

1 – Научно-производственная биотехнологическая платформа «ЭкспертБИОТЕХ», 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – R&D and Pilot Plant Biotechnological Platform «ExpertBIOTECH», 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

* адресат для переписки:
E-mail:
dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

ДАУНСТРИМ-ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Д.А. Гусаров^{1*}

Резюме. Развитие биофармацевтической отрасли начинается с разработки эффективных продуцентов. Однако чем сложнее белок и его продуцент, тем большее количество примесей, среди которых эндотоксины, белки хозяина, вирусы, родственные примеси, агрегаты и высокомолекулярные контаминанты, синтезируется или накапливается в ходе процесса получения. Статья описывает подходы к выделению и очистке биофармацевтических белков (даунстрим-процесс). Обсуждаются основные хроматографические и нехроматографические методы.

Ключевые слова: даунстрим-процесс, выделение и очистка, примеси.

DOWNSTREAM PROCESS OF BIOPHARMACEUTICALS

D.A. Gusarov^{1*}

Abstract. The development of the biopharmaceuticals begins with the development of effective producers. But the more complex protein and its producer, the greater the amount of impurities is synthesized or accumulated during the upstream process. Among them are as follows: bacterial endotoxins, viruses, host cell proteins, related impurities, aggregates and high molecular weight admixtures etc. This article describes approaches to the downstream process purification of biopharmaceutical proteins. We discuss the main chromatography and non-chromatographical methods.

Keywords: downstream process, purification, impurities.

ВВЕДЕНИЕ

Полученные в ходе биопроцесса лекарственные средства (зачастую лишённые биологической активности) необходимо очищать от примесей до терапевтических степеней чистоты. Весь цикл подобного даунстрим-процесса можно разделить на совокупность операций по выделению белка в той или иной форме из культуральной жидкости / клеток и очистки его от примесей. Для того чтобы определиться с операциями даунстрим-процесса, нужно точно знать [1]:

- (1) физико-химические свойства белка (аминокислотную последовательность, которая определяет заряд, массу, гидрофобность и т.д.; третичную последовательность – в основном знание о цистеиновых связях и свободных цистеинах; наличие или отсутствие посттрансляционных модификаций и т.д.);
- (2) способ биопроцессинга белка (платформа биосинтеза, способ производства – интрацеллюлярно или экстрацеллюлярно, физическое состояние в клетке – в растворе или в тельцах включения);

- (3) спектр возможных примесей, включая возможности деградации продукта во время производственных процессов и хранения.

В широком плане можно представить себе даунстрим-процесс в виде схемы, представленной на рисунке 1.

К интрацеллюлярным белкам можно относить в основном некоторые прокариотические белки (реже – дрожжевые белки). Стадии разрушения и отделения дебрисов являются в технологическом плане лимитирующими выделение – это основной недостаток интрацеллюлярных платформ биосинтеза. Экстрацеллюлярные платформы, к которым относятся все эукариотические системы биосинтеза, лишены этого недостатка, что должно облегчать последующую очистку.

Однако сам факт проведения дополнительных операций – а это не только описанные процедуры выделения белка из клеток, но еще и стадии отмывки тел включения, их растворения в денатурирующих буферах – зачастую способствует тому, что белок, приходящий на очистку, гораздо более «чистый» по сравнению с подобным же экстрацеллюлярным белком.

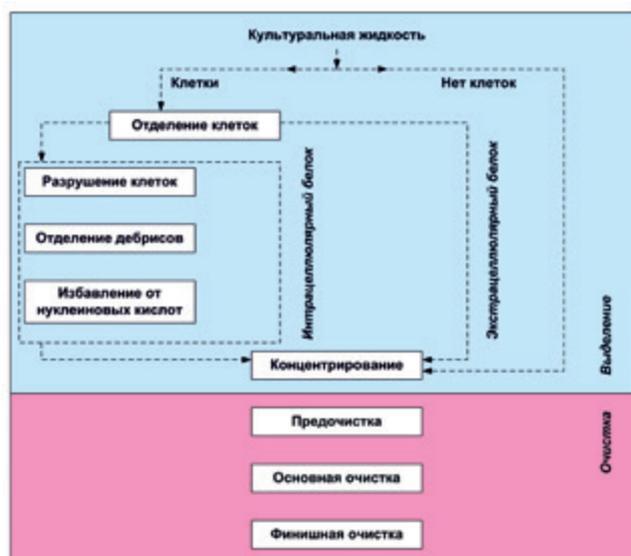


Рисунок 1. Схема даунстрим-процесса получения генно-инженерных белков

ком. Кроме того, концентрации выделяемых интрацеллюлярных белков также существенно выше, что облегчает и очистку, и внутрипроизводственный контроль всех этапов.

Следующие примеси должны быть минимизированы в ходе даунстрим-процесса:

- (1) процессуальные, а именно:
 - (1.1) производные клеточного субстрата: остаточные нецелевые белки продуцента, балластные молекулы ДНК или ее фрагменты, компоненты клеточных стенок;
 - (1.2) производные клеточных культур: индукторы, антибиотики, плазма, компоненты питательных сред;
 - (1.3) производные даунстрим-процесса: ферменты, химические и биохимические реагенты, неорганические соли, растворители, носители, смытые с хроматографических колонн лиганды;
- (2) родственные, а именно:
 - (2.1) продукты ферментативной или химической деградации;
 - (2.2) модифицированные формы целевой молекулы: дезамидированные, изомеризованные, окисленные формы, формы с некорректно замкнутыми дисульфидными связями, формы с некорректными конъюгированными остатками (гликозилирование, фосфорилирование);
 - (2.3) агрегаты целевого белка.

Очевидно, что максимальное избавление от примесей возможно только с помощью многостадийной

очистки. В целом многостадийность можно описать тремя составляющими:

- предочистка, или грубая очистка от механических включений и примесей типов (1.1), (1.2), (2.3);
- основная очистка, или избавление от родственных примесей типов (2.1), (2.2) и остатков (2.3);
- финишная очистка, или доочистка от примесей типа (1.3) и иногда следовых количеств остальных примесей.

К наиболее опасным для человека примесям, очистка от которых должна быть максимально эффективна, относятся остатки нуклеиновых кислот продуцента, вирусы и эндотоксины клеточной стенки бактерий.

ОЧИСТКА БЕЛКОВ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

Липополисахариды (ЛПС), или бактериальные эндотоксины (БЭ), – это фрагменты внешней клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий, высоко токсичные для человека и способные приводить к развитию ряда тяжелых заболеваний, даже таких, как сепсис, рак и диабет [2–4]. Показано, что эндотоксины даже в очень низких концентрациях существенно воздействуют на организм животных и человека. Это воздействие главным образом определяется проведением токсического сигнала эндотоксина при участии TLR4, который является обязательным условием сигнализации эндотоксина, активация которого инициирует комплексную систему взаимодействия сигнальных молекул, что приводит к проявлению пирогенности и токсичности [5]. Например, ингаляционное введение мышам 1 мкг ЛПС *Escherichia coli* O111:B4 приводило к значительному возрастанию антител в крови животных (более 3000 нг/мл IgE, более 2000 мкг/мл IgG) [6].

Поэтому активные фармацевтические субстанции (АФС), особенно служащие для создания инъекционных лекарственных форм, должны быть максимально избавлены от подобных примесей. Фармакопеи всего мира рекомендуют лимитировать содержание БЭ в лекарственных формах внутривенного назначения до 5 единиц (EU, или endotoxin unit) на 1 кг веса тела за час [7]. Одна единица приблизительно равна 100 пкг эндотоксина.

Ниже (рисунок 2) приводится схематический вид химической структуры бактериального ЛПС [8]. Полисахаридный фрагмент содержит O-специфическую цепь, включающую повторяющуюся последовательность олигосахаридных единиц на основе гликозильных остатков (до 50), а также ядро [9]. O-специфическая цепь уникальна для каждого прокариотического штамма; она вносит существ-

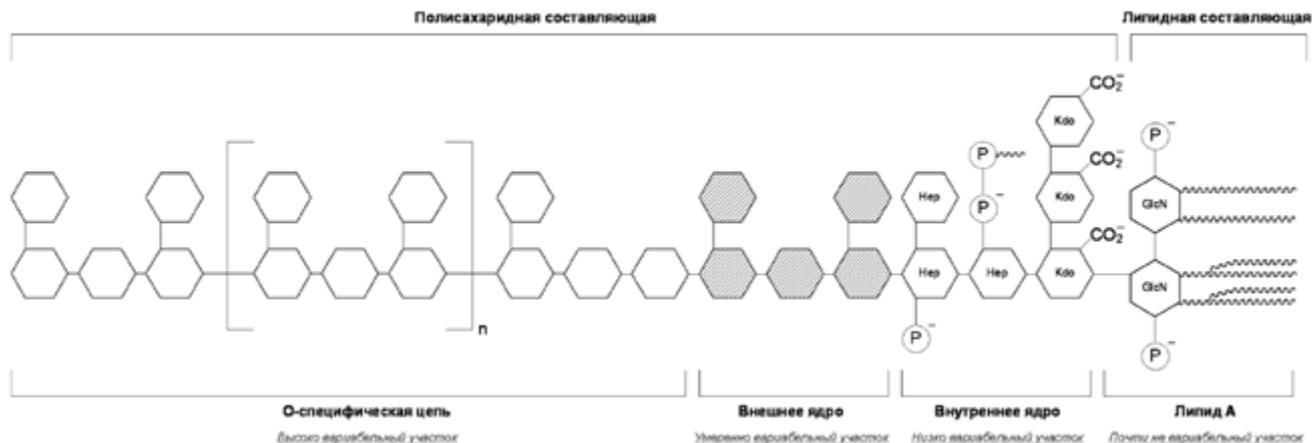


Рисунок 2. Схематическая химическая структура бактериального липополисахарида. Сокращения: Hep – гептоза; Kdo – 2-кето-3-деоксиоктоновая кислота; GlcN – N-ацетилглюкозамин; P – фосфат

венный вклад в серологическую специфичность, вызывая иммунный ответ в организмах человека и животных. Основными составляющими ядра являются остатки гептозы (гексапиранозы во внешней части ядра и L-глицеро-D-манногептозы во внутренней части), а также группы 2-кето-3-деоксиоктоновой кислоты.

Липидный фрагмент эндотоксинов, или липид А, является наименее варибельной и наиболее консервативной частью. Липид А отвечает за эндотоксическую активность [10]. Она проявляется в стимулировании производства и высвобождения гранулоцитами и макрофагами эндогенных медиаторов, таких как биоактивные липиды, NO, цитокины (например, интерлейкин-1) [11–13]. Большие концентрации таких медиаторов в организме могут привести к множеству различных патофизиологических реакций, как-то: повышению температуры тела, лейкопении, тахикардии, гипотонии, рассеянной внутрисосудистой коагуляции и т.д. [14, 15].

Важно отметить, что липид А и внутреннее ядро полисахаридной составляющей эндотоксинов частично фосфорилированы. Это приводит к тому, что в растворах с нейтральным или основным pH эндоток-

сины будут иметь выраженный отрицательный заряд (pKa 1,3) [16].

Молекулярная масса мономеров различных ЛПС может варьировать в достаточно широких диапазонах, что объясняется варибельностью O-специфической цепи. Известны эндотоксины с молекулярными массами от 2,5 кДа (с укороченной O-специфической цепью) до 70 кДа (с очень длинной O-специфической цепью) [17]. Большая же часть ЛПС имеет молекулярную массу от 10 до 20 кДа.

Однако необходимо отметить, что мономерные ЛПС могут образовывать супрамолекулярные структуры за счет неполярных взаимодействий между липидными «хвостами», а также за счет образования «сшивок» фосфатных групп бивалентными катионами [18–20]. Таким образом, в водных растворах эндотоксины могут агрегировать в ламелярные, кубические или инвертированные гексагональные структуры, такие как мицеллы или везикулы (рисунок 3). Диаметр подобных структур достигает 0,1 мкм, а молекулярная масса – 1000 кДа. Бивалентные катионы, такие как Ca²⁺ и Mg²⁺, способствуют образованию супрамолекулярных структур, а детергенты, ЭДТА и бел-

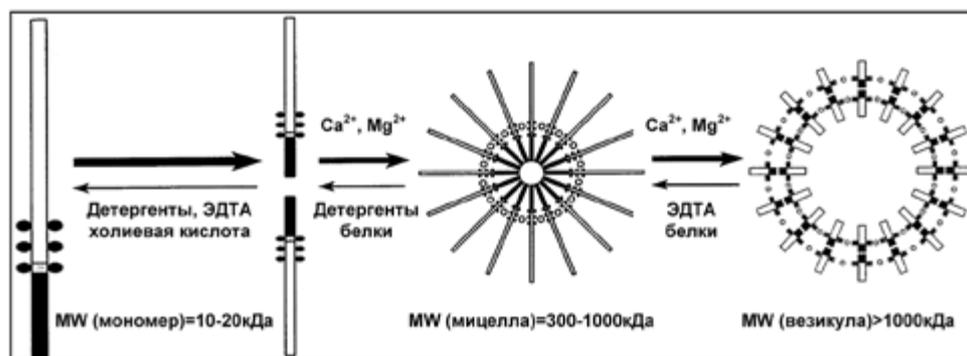


Рисунок 3. Схема полиморфизма липополисахаридов в водных растворах

ки, наоборот, смещают равновесие в сторону образования мономерных форм [21, 22].

Итак, ЛПС по своей природе гидрофобны (из-за включения липидных хвостов) и отрицательно заряжены (из-за наличия остатков фосфорной кислоты). Несмотря на то, что мономеры ЛПС относительно малы (10–20 кДа), они могут образовывать высокомолекулярные (выше 1000 кДа) структуры, достаточно устойчивые в водных растворах. Все эти свойства позволяют предложить ряд решений для очистки белков, составляющих АФС, от примесных бактериальных эндотоксинов.

Ультрафильтрация и гель-фильтрация

Очевидно, что супрамолекулярные формы эндотоксинов (мицеллы и везикулы) могут быть достаточно легко отделены от белка с меньшей молекулярной массой. Логично предположить, что такие методы, как ультрафильтрация или гель-фильтрация, могут быть использованы для очистки АФС.

Показано, что использование ультрафильтрационных мембран с порами 300 кДа позволяет достаточно эффективно (до концентрации 0,06 ЕУ/мл) удалять ЛПС из водных растворов, не содержащих белки [23]. Однако большинство белков дестабилизируют супрамолекулярные структуры ЛПС, дезагрегируя их до мономерных форм. Поэтому для эффективного разделения необходимо дополнительно стимулировать полиморфизм эндотоксинов. Для этой цели предложено вводить в раствор ионы бивалентных металлов, а именно Ca^{2+} или Mg^{2+} [24]. Эти ионы резко смещают равновесие в сторону образования везикул, размер которых более 1000 кДа, и даже после удаления катионов из раствора (при отсутствии дестабилизирующих факторов) везикулы могут превращаться в мицеллы размером 300–1000 кДа, не распадаясь до мономеров. Например, введение 45 мМ Ca^{2+} в раствор, содержащий 85 мкг/мл гемоглобина, загрязненного эндотоксинами в концентрации 5 мкг/мл, способствовало образованию крупных везикул ЛПС, которые были отделены с помощью ультрафильтрации (финальное содержание эндотоксинов в растворе гемоглобина составило 6 пг/мл) [25].

Это же свойство, очевидно, можно использовать для удаления эндотоксинов методом гель-фильтрации. Стабилизированные бивалентными катионами везикулы должны элюироваться раньше, чем белки. Однако положительно заряженные белки могут электростатически связываться с ЛПС, что обычно резко уменьшает эффективность очистки [26].

Двухфазная экстракция

Этот метод основан на использовании детергентов в концентрациях, превышающих их критические концентрации мицеллообразования. Неполярные взаимодействия между детергентом и липид-

ной частью эндотоксинов приводят к образованию мицеллярных структур. Агрегированные мицеллы при температурах выше точки мицеллообразования содержат незначительное количество воды и представляют собой отдельную фазу, в которую вовлечена большая часть эндотоксинов от общего содержания. Такие мицеллы могут быть отделены с помощью центрифугирования. Экстракцию при необходимости повторяют до тех пор, пока содержание эндотоксинов в растворе белка не окажется ниже требуемой величины [27, 28].

Для двухфазной экстракции чаще всего используются неионогенные детергенты ряда «Тритон». Например, точка мицеллообразования Тритона X-114 составляет +22 °С, поэтому смешение раствора белка, обогащенного эндотоксинами, и детергента проводят при пониженных температурах (+5 °С), а при нагревании смеси до температур выше +22 °С образуются две фазы, далее разделяемые центрифугированием.

Двухфазная экстракция позволяет снизить содержание ЛПС на несколько порядков, при этом не вызывая денатурации белка и не снижая его активность. Недостатком метода является то, что водная, обогащенная белком фаза содержит некоторое количество детергента, которое сложно контролировать методами анализа. Более того, сообщалось, что остаточный детергент в растворе белка значительно затрудняет проведение SDS-PAGE и LAL-тестов [29]. Таким образом, необходимо дополнительно вводить в процесс стадию гель-фильтрации для избавления белка от следов детергента. Необходимо также отметить, что разделение образующихся фаз методом центрифугирования проходит довольно плохо. Так, например, 4000–5000 г оказывается недостаточно для эффективного разделения: нижняя, осаждаемая гелеподобная фаза при неосторожном движении сразу же смешивается с верхней фазой. Очевидно, что такая методика не может быть использована в промышленных условиях.

Ионообменная хроматография

Рекомбинантные белки, выделяемые из культуральной жидкости штаммов-продуцентов чаще всего в форме тел включения, содержат значительное количество эндотоксинов клеточной стенки. Для очистки таких белков используются методы ионообменной хроматографии. Важно помнить, что pH подвижной фазы должен быть ниже изоэлектрической точки очищаемого белка, но выше pKa эндотоксинов. Слабо отрицательно или нейтрально заряженные белки чаще всего очищают с помощью анионообменной хроматографии [30]. При pH 8 большая часть таких белков будет десорбироваться при концентрации вытесняющего агента (например, хлорида натрия) 0,1–0,3 М. Эндотоксины, будучи сильно связанными с матрицей сорбентов, десорбируются только при концентрации 0,5 М или выше. Однако такие отрицательно заряжен-

ные белки, как бычий сывороточный альбумин, не будут эффективно очищаться от ЛПС [31].

В случае основных, положительно заряженных белков используют катионообменную хроматографию. Теоретически такие белки при pH 2-4 сорбируются матрицей, в то время как ЛПС элюируются без сорбции.

Однако на практике ионообменная хроматография не всегда позволяет избавиться многие белки от эндотоксинов до необходимых степеней чистоты, так как отрицательно заряженные ЛПС могут образовывать комплексы с белками. Например, как сообщалось Sang-Hyun Pyo и соавторами, при очистке рекомбинантного гистона H 1,5, сильно основного белка (pI 10,91), на катионите СП-сефарозе (GE Healthcare, Швеция) содержание эндотоксинов было снижено с 7,89 EU/мг до 7,48 EU/мг, а на анионите ДЭАЭ-сефарозе (GE Healthcare, Швеция) – до 7,33 EU/мг [32].

Однако результаты ионообменной хроматографической очистки могут быть значительно улучшены, если использовать Тритон X-114. Раствор белка предварительно смешивают с 1% детергентом при пониженной температуре, а затем наносят на колонну, упакованную ионообменным сорбентом, предварительно уравновешенную подвижной фазой, также включающей 1% детергента. С повышением концентрации вытесняющей соли белок элюируется, практически лишенный эндотоксинных примесей (менее 0,05 EU/мг). Однако проблема контроля чистоты очищенного продукта остается, как и в случае использования двухфазной экстракции. Также серьезным недостатком такого метода является использование очень больших объемов подвижных фаз для промывки колонны [33, 34].

Адсорбционная хроматография

Было предложено использование хроматографии на активированном угле для удаления эндотоксинов [35, 36]. Однако такой метод можно применять для очистки подвижных фаз и растворов реагентов, используемых в биофармацевтических производствах, но не для очистки белковых растворов из-за необратимой сорбции неселективными адсорбентами.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Было неоднократно показано, что ОФ ВЭЖХ является отличным средством для избавления от эндотоксинов. Гидрофобные липидные группы обеспечивают эффективное связывание с неподвижной фазой ВЭЖХ-сорбентов, поэтому время удержания эндотоксинов значительно выше времени удержания большинства белков; более того, десорбция эндотоксинов наступает только при существенных концентрациях органи-

ческого модификатора в подвижной фазе (до 70–90% ацетонитрила) [37, 38].

Действительно, многие рекомбинантные белки, очищенные с помощью ОФ ВЭЖХ, практически не содержат бактериальных эндотоксинов [39]. Среди таких продуктов – инсулин человека [40, 41], гормон роста [42], гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [43], β -интерферон [44] и другие.

Однако со временем эндотоксины могут накапливаться на сорбенте, что приводит к их элюции вместе с продуктом, возможно, из-за вытеснения последним ЛПС с занятых ими активных центров сорбента [45]. То есть сорбент необходимо периодически депирогенизировать, промывая подвижной фазой, включающей, помимо органического модификатора, 1 М гидроксид натрия или 1–2 М уксусную кислоту. Подвижная фаза с крайними значениями pH может негативно отразиться на работоспособности и сроке эксплуатации сорбента. Это, конечно, ограничивает использование ВЭЖХ для очистки белков от эндотоксинов.

Хроматография гидрофобных взаимодействий

Хроматография гидрофобных взаимодействий, или HIC (hydrophobic interaction chromatography), является достаточно популярным методом очистки белков и пептидов, так как замечательно вписывается в линейку даунстрим-процесса: после ионообменной хроматографии элюируемый продукт содержит значительное количество соли, что позволяет наносить его сразу на HIC-колонну. Как и в случае ВЭЖХ, эндотоксины клеточной стенки удерживаются сорбентами HIC сильнее, чем белки. Однако HIC существенно уступает ВЭЖХ как в эффективности, так и в производительности. Основным преимуществом перед ВЭЖХ является возможность проводить депирогенизацию сорбента растворами щелочей.

Примеры использования такого метода хроматографической очистки от ЛПС: очистка на сорбенте фенил-тойоперл 650M (Tosoh, Япония) рекомбинантного 42 кДа фрагмента белка MSP1, компонента противомаллярийных вакцин [46]; очистка антигена вируса гепатита Б от пирогенов [47].

Описана интересная оптимизация метода очистки белков от эндотоксинов с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий [30]. В раствор образца белка, предназначенного для нанесения на колонну, упакованную фенил-сефарозой (GE Healthcare, Швеция), вводили сульфат аммония и гуанидина гидрохлорид в таких концентрациях, в которых не наблюдалось осаждения (высаливания) продукта (однако их концентрации должны быть близки к точке осаждения). В таких условиях продукт элюировался без сорбции, в то время как эндотоксины связывались с лигандами сорбента. Таким способом удалось, выделяя

целевой белок из телец включения, одновременно снизить содержание эндотоксинов с 1 100 000 EU/мг до 200 EU/мг.

Аффинная хроматография

На данный момент аффинная хроматография (АХ) является наиболее признанным методом избавления от эндотоксинов. Однако ЛПС, биосинтезируемые различными штаммами, сильно отличаются друг от друга главным образом из-за различных О-специфических цепей. Поэтому аффинный сорбент, предназначенный для связывания ЛПС, должен специфически взаимодействовать с наиболее консервативной частью эндотоксинов, а именно с липидом А. Такая специфичность может достигаться за счет модификации матрицы сорбента следующими лигандами: полимиксином Б, гистамином/гистидином, остатком деоксихолевой кислоты, полиэтиленимином, поли-ε-лизином и т.д.

Наибольшее распространение среди аффинных лигандов получил полимиксин Б (рисунок 4). Он представляет собой поверхностно-активный, положительно заряженный циклический пептид, который способен дезагрегировать комплексы с эндотоксинами и связываться с липидом А [48]. Например, использование полимиксин-Б-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) позволяет получать моноклональные антитела, содержащие менее 0,625 EU/мл (исходно 20–100 EU/мл) [49].

Однако АХ на полимиксиновых сорбентах может быть сопряжена с потерей очищаемого белка вследствие ионных взаимодействий между аминными группами лиганда и отрицательно заряженными областями белка в растворах с низкой ионной силой. Например, при очистке бычьей каталазы десорбирует-

ся только 74–76% белка, а при очистке бычьего сывороточного альбумина – только 80% [50, 51].

Еще одним серьезным недостатком полимиксиновых колонок является возможность загрязнения продукта вымываемым с сорбента лигандом, который обладает нейротоксичностью и способностью при попадании в организм человека стимулировать высвобождение интерлейкина-1 моноцитами [52, 53].

Сорбенты с привитыми лигандами типа гистамина или гистидина обеспечивают сравнимую с полимиксином специфичность связывания. Гистамин обладает более высокой аффинностью к эндотоксинам, зато гистидин безопаснее для использования в хроматографической очистке биофармацевтических белков, так как не обладает такой биологической активностью, как гистамин [54, 55].

Стоит отметить, что и полимиксиновые, и гистаминовые/гистидиновые сорбенты достаточно дорогостоящие.

Однако такой поликатионный лиганд, как поли-ε-лизин, существенно дешевле и более устойчив к вымыванию с сорбента в процессе элюции. Сорбент, например сефароза, ковалентно иммобилизованный поли-ε-лизином, объединяет в себе как сильные катионные, так и гидрофобные свойства. Таким образом, можно элюировать растворы образца с существенной ионной силой (то есть содержащие большое количество соли, например до 3 М хлорида натрия); целевой белок не будет связываться с сорбентом, тогда как эндотоксины задержатся. Показано, что поли-ε-лизин позволяет снизить содержание ЛПС ниже 0,1 EU/мл даже в случае белков, обладающих кислотными свойствами, например сывороточного альбумина [56, 57].

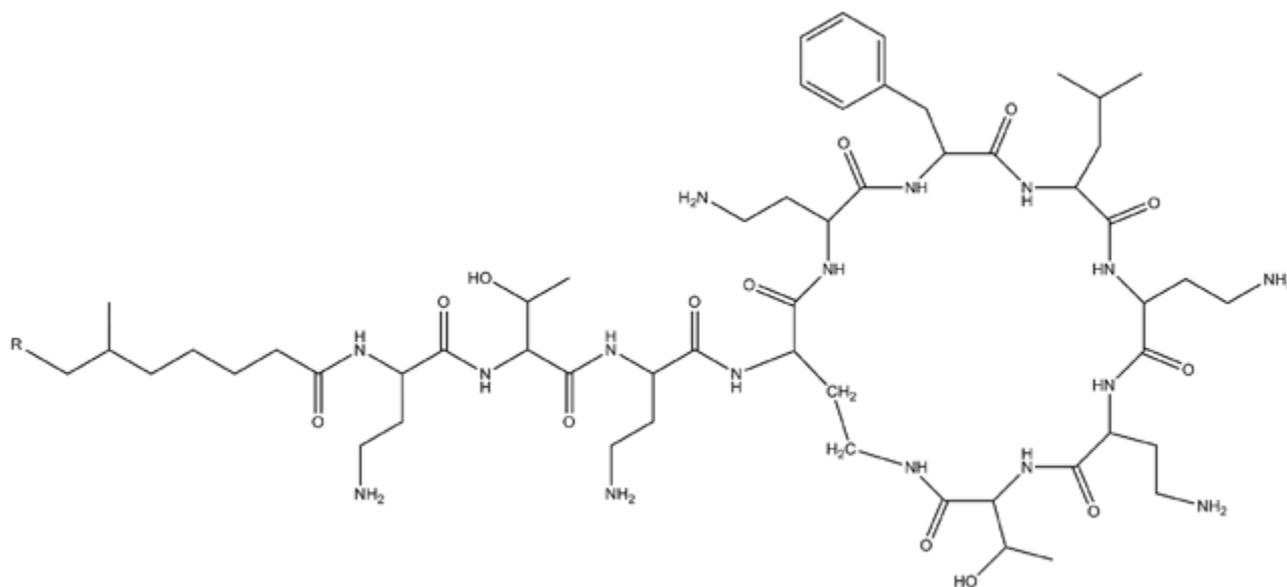


Рисунок 4. Структура лиганда полимиксина Б

Свойства аффинных сорбентов, применяемых для очистки от эндотоксинов клеточной стенки, одинаковы и основаны главным образом на сродстве к липидной части ЛПС. При использовании таких сорбентов крайне важно помнить, что эффективность избавления растворов белка от ЛПС зависит от времени контакта матрицы сорбента с элюируемым образцом. Необходимо так организовывать скорость потока, чтобы время контакта было не менее 16 ч.

Иммобилизованные мембранные фильтры и картриджи

Хроматографические методы избавления от эндотоксинов сегодня могут быть заменены на методы, основанные на фильтрации растворов через особые мембраны или картриджи. Эти мембраны или картриджи могут быть иммобилизованы любым из описанных в данном обзоре лигандом; чаще всего используются иммобилизации с помощью ДЭАЭ, полимиксина и поли-ε-лизина. Такие коммерчески доступные системы существенно дешевле сорбентов, они стерильны и апирогенны в отличие от сорбентов, и не нужно тратить время на упаковку колонны и ее депирогенизацию.

Однако, как уже отмечалось выше, время контакта депирогенизуемого раствора с лигандами мембраны/картриджа является наиболее критическим параметром процесса, что в конечном итоге ограничивает использование подобных систем.

Итак, технология рекомбинантных ДНК позволила получать множество белков, предназначенных для терапевтических целей. При этом чаще всего для биосинтеза целевых продуктов используются штаммы-продуценты *Escherichia coli*, так как культивировать прокариотические микроорганизмы дешевле по сравнению с эукариотическими клетками, бактерии способны быстро синтезировать белки в больших количествах, и, наконец, накоплен значительный опыт работы именно с *E. coli*. Однако процесс ферментации продуцента сопряжен с тем, что продукт загрязнен эндотоксинами клеточной стенки. Столь пирогенные и токсичные примеси необходимо удалять из растворов белка до предельно допустимых значений. Но эндотоксины – это очень стабильные соединения. Например, для того чтобы их разрушить, необходимы высокие температуры (180–250 °С) и крайние значения pH (0,5–1,0 М NaOH или 1–2 М уксусная кислота). Также их отрицательный заряд и наличие гидрофобных участков могут способствовать образованию комплексов с белками. Следовательно, очистка белков от эндотоксинов является очень сложной задачей, вынуждающей иногда вводить дополнительные стадии в даунстрим-процесс.

Обширный ассортимент способов, предложенных для избавления от ЛПС, в очередной раз подтверждает, насколько бывает сложно достичь необходимых

степеней чистоты в том или ином производственном процессе получения биофармацевтических белков. Среди таких способов можно выделить хроматографические и нехроматографические.

К первым относятся ионообменная, обращенно-фазовая, аффинная, гель-проникающая хроматография и хроматография гидрофобных взаимодействий.

Нехроматографические способы включают ультрафильтрацию и двухфазную экстракцию. Оба метода отлично справляются с задачей очистки от эндотоксинов растворов, не содержащих белки. Однако для очистки целевых белков описанные методы малоэффективны. Особое место занимают фильтрационные мембраны и картриджи, которые являются своего рода упрощенным вариантом ионообменной и/или аффинной хроматографии.

ОЧИСТКА ОТ ФРАГМЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Остаточные нуклеиновые кислоты и их фрагменты, как правило, не представляют большой проблемы при очистке генно-инженерных белков. Это связано с тем, что их свойства уж слишком ярко выражены: большой отрицательный заряд и существенная гидрофобность. Очевидно, что практически все известные хроматографические методы, из которых наиболее предпочтительными кажутся ионообменная хроматография, ОФ ВЭЖХ и хроматография гидрофобных взаимодействий, являются достаточно эффективными.

К нехроматографическим методам избавления от фрагментов нуклеиновых кислот можно отнести кислотную экстракцию и белковое солевое осаждение.

Для кислотной экстракции на этапах выделения белка из клеток в раствор гомогената добавляю 1–3% хлорную кислоту при интенсивном перемешивании [58]. В результате в течение короткого срока (от нескольких минут до пары часов) большая часть молекул нуклеиновых кислот преципитирует. Осадок удаляют с помощью декантации, сепарации, центрифугирования или тангенциальной фильтрации.

Возможен и другой подход – осаждение целевого белка. Для этого используют различные соли (хлорид натрия, сульфат аммония и т.д.), наиболее удобные в соответствии с рядом Гоффмайстера [59]. Фрагменты нуклеиновых кислот не преципитируют и остаются в надосадочной жидкости.

ОЧИСТКА ОТ ВИРУСОВ

Вирусная, а также прионная контаминация является наиболее опасной для человека. Естественно, в первую очередь это относится к культурам клеток млекопитающих. Для оценки эффективности очистки

от вирусов введена единая система расчета логов избавления от вирусов (log-viral reduction, LVR). LVR рассчитывается по разности десятичных логарифмов количества вирусных частиц в титре до очистки и в титре после очистки. Очевидно, что чем выше значение LVR для той или иной стадии даунстрим-процесса, тем она более эффективна [60].

Наиболее известными и проверенными методами очистки от вирусов являются ионообменная, аффинная хроматографии, хроматография гидрофобных взаимодействий, ОФ ВЭЖХ, инактивация пониженными значениями pH (таблица 1) [61].

Таблица 1.

Типичные приемы очистки от вирусов

Метод очистки	LVR
Аффинная хроматография	4,23
Катионообменная хроматография	2,13
Анионообменная хроматография	4,98
Хроматография гидрофобных взаимодействий	4,19
Инактивация при низком pH	> 4,4

Интересно, что инактивация вирусов в низких значениях pH является одним из наиболее эффективных способов избавления от этих примесей. Для этого в растворе целевого белка понижают pH до 3,0 и ниже (если это возможно и не способствует преципитации, деградации белка или потере его активности) на 1 ч и более. После чего раствор подвергают ультрафильтрации на мембранах 20–80 нм.

ОЧИСТКА ОТ РОДСТВЕННЫХ БЕЛКОВ

В широком смысле слова родственными белками, с одной стороны, могут быть продукты агрегации белков, а с другой – продукты деградации.

Агрегаты – примеси более высокого порядка, чем целевой генно-инженерный белок. Поэтому одним из наиболее популярных методов очистки от агрегатов является гель-фильтрация.

Особого внимания заслуживает сорбент, который используется при гель-фильтрации. Чаще всего для этих целей применяют сефадексы, впервые введенные в практику Поратом и Флодином [62]. В настоящее время основным производителем сефадексов является корпорация GE Healthcare (ранее Amersham Biosciences, Pharmacia, Швеция). Однако в нашей стране подобный гидрофильный гель также был разработан и запатентован [63]. Показано, что осмотическая

стабильность отечественного сорбента для гель-фильтрации даже выше стабильности зарубежных аналогов.

Пожалуй, самым изученным примером агрегаций является процесс фибриллообразования инсулина. Фибрилляция молекул инсулина в волокнообразные агрегаты протекает практически постоянно, но особенно заметной становится при высоких концентрациях гормона (выше 5 мг/мл) [64–66]. Катализируют агрегативное фибриллообразование низкий pH растворов инсулина, высокая температура (выше комнатной), высокая ионная сила, различные органические растворители, например этиловый спирт. В растворах кислот молекула инсулина существует главным образом в мономерной форме [67–69]. В нейтральной области pH инсулин стабилизирован в равновесии между мономерной и димерной формами. Фибриллообразование начинается с разворачивания молекулы до мономера с последующим волокнообразным скручиванием ее в нити, нерастворимые в физиологических условиях [70]. По-видимому, в условиях низких значений pH вокруг молекулы инсулина создается заряженное окружение водно-белковых молекул, в котором усиливается притяжение между гидрофобными и заряженными участками инсулиновой молекулы – создается эффект торнадо, когда все увеличивающееся притяжение заставляет молекулы соединяться друг с другом в вихреобразные нитевидные структуры, обладающие гораздо большим радиусом Стокса, чем исходная мономерная молекула гормона. Это позволяет проводить их гель-фильтрационное разделение [71, 72]. Удаление волокнообразных фибрилл необходимо, так как их наличие в растворе инсулина служит главным инициатором агрегации; при их отсутствии дальнейшее фибриллообразование сильно заторможено, особенно при низких температурах [73].

Для каждого конкретного генно-инженерного белка спектр родственных примесей, возникающий вследствие деградаций, уникален. Это может быть окисление, протеолитическая деструкция, дезамидирование по остаткам аспарагина или глутамина и др. Самые проблематичные для даунстрим-процесса примеси – дезамидированные формы целевого белка.

Методы избавления от дезамидированных примесей лучше всего также рассматривать на примере инсулина. В производстве инсулина проблема дезамидирования стоит настолько остро, что нормативной документацией особенно подчеркивается, что в конечных препаратах количество A21-дезамидоинсулина не должно превышать 2%. Эта родственная примесь образуется в ходе дезамидирования остатка аспарагина в 21 положении A-цепи. Дезамидирование протекает в кислых условиях гораздо быстрее, чем в щелочных; в нейтральных заметно не протекает [74, 75]. Однако сложность как раз и в том, что все производственные условия получения инсулина проводятся при низких

значениях pH, в которых инсулин лучше растворим и не осаждаётся. А хранятся препараты инсулина, в том числе готовые лекарственные формы, в условиях слабощелочных. В нейтральных же условиях инсулиновые растворы содержат проблематично из-за близости к pI белка.

Показано, что эффективного избавления от A21-дезамидоинсулина можно достичь только с помощью ОФ ВЭЖХ в очень селективных условиях [40, 41].

ИНСТРУМЕНТЫ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА

После разработки подхода и оптимизации выделения и очистки генно-инженерных белков процесс необходимо валидировать, а именно: выполнением ряда проверок должно быть подтверждено, что все процессы, составляющие технологию получения белка, воспроизводимо и предсказуемо отвечают назначенным целям [76].

Валидация процесса позволяет в первую очередь оценить его способность воспроизводимо и предсказуемо достигать результатов, как-то: заданной производительности и необходимого качества продукта. Для этого первоначально определяются критические параметры, которые вносят определяющий вклад в процесс выделения и очистки. Эти критические параметры могут быть заданы по условию осуществления процесса (параметры «на входе») или получены в качестве результата осуществления процесса (параметры «на выходе»). Для валидации процесса параметры «на входе» следует менять в допустимых пределах и оценивать изменение параметров «на выходе» (таблица 2). Параметры «на выходе» оцениваются в соответствии с заданными критериями приемлемости: если параметры не выходят за диапазон критерия приемлемости, то можно считать процесс валидным; а если параметры в той или иной мере превышают пределы критериев приемлемости, то условия проведения такого процесса должны быть пересмотрены, то есть должны быть иначе заданы параметры «на входе».

Таблица 2.

Примеры параметров процесса хроматографии «на входе» и «на выходе»

	Параметры
«на входе»	pH, температура, ионная сила, нагрузка, скорость потока, время удержания
«на выходе»	Чистота, концентрация, стабильность, выход, содержание ДНК, содержание эндотоксинов, содержание вирусов, давление в системе

Алгоритмов нахождения оптимальных параметров «на входе» для получения максимально эффективных параметров «на выходе» не так много, как мог-

ло бы показаться с учетом достаточно длительного в историческом плане развития биотехнологии и методов выделения и очистки.

1. Эмпирический подход. Он включает установление полного перечня параметров процесса, проведение процесса при различных их значениях и математический анализ полученной матрицы эксперимента. Очевидно, что параметров много; значений, в пределах которых эти параметры варьируются, еще больше – следовательно, такая работа займет очень много времени, сил, реактивов и в конечном счете финансовых средств. Поэтому оптимизация/квалификация процесса с помощью такого алгоритма, как правило, проводится в наихудших условиях [58]. Метод основан на проведении серии процессов при параметрах, которые на практике приводят к наиболее безобразным результатам (старый сорбент, не до конца проведенная регенерация и т.д.), и оценке приемлемости получаемых результатов заданным критериям (чистота, время цикла, выход). Метод назван FMEA (Failure Mode Effect Analysis), или анализ влияния граничных условий валидности. Такой подход позволяет однозначно определить диапазон валидности процесса, а также оптимизировать некоторые его параметры с помощью математических процессоров [59].
2. Модельно-эмпирический подход. По своему принципу это то же самое, что и подход, описанный пунктом выше. Разница – в материальном обеспечении и масштабе [60, 61]. Вполне очевидно, что эксперименты по подбору оптимальных (или даже только граничных) условий проведения биотехнологических процессов всегда дорогостоящие. Рекомендации FDA, ICH, ВОЗ гласят [62], что любая квалификация процесса должна протекать минимум на пяти последовательных сериях/циклах получения продукта. А уж оптимизация займет гораздо больше пяти циклов. В этом подходе проводится обратное масштабирование процесса со всеми его параметрами до лабораторного уровня. После чего начинается эмпирически-аналитическая работа по оптимизации или квалификации в наихудших условиях функционирования. Вместо промышленного биореактора – маленький лабораторный прибор. Вместо препаративной хроматографической колонны – аналитический картридж, заполненный таким же сорбентом. С учетом коэффициентов масштабирования подбираются значения параметров, а результаты экспериментов оцениваются теми же методами, FMEA.

На наш взгляд, огромным недостатком обоих подходов является собственно скрининг всех параметров. И в первом, и во втором случае, хоть и в другом формате, необходимо проводить матрицу эксперимента для всех известных параметров процесса. Да, страте-

гия наихудшего случая функционирования помогает сократить число экспериментов. Но процессы биофармацевтики настолько многогранны и многофакторны, что общее число экспериментов все равно довольно высоко.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Scott. Biopharmaceutical Manufacturing // Presentation on Lab Basics for the Biotech Industry, MIP480. 2009.
2. L. Anderson, F. Unger. Synthetic studies on structural elements of the hydrophobic region present in bacterial endotoxins. In Bacterial Lipopolysaccharides // American Chemical Society. ACS Symposium Series. 1983. № 231. P. 1.
3. K.C. Hou, R. Zaniewski. Scaling-up of affinity chromatography by radial-flow cartridges // Biotechnol. Appl. Biochem. 1990. V. 12. P. 315–321.
4. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, 3rd Edition / Ed. by K.L. Williams, M. Dekker // Drugs and Pharmaceutical sciences. 2007. V. 167. 440 p.
5. X. Du, A. Poltorak, Y. Wei. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution // Eur Cytokine Netw Eur Cytokine Netw. 2000. V. 11. P. 362–371.
6. K. Gerhold, K. Bluemchen, A. Franke, Ph. Stock, E. Hamelmann. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112 (2). P. 389–396.
7. R.A. Nash, A.H. Wachter. Pharmaceutical Process Validation, an international third edition, revised and expanded // Drugs and Pharmaceutical sciences. 2003. V. 129. 536 p.
8. E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zaehring, U. Seydel, F. Di Padova, M. Schreier, H. Brade. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // FASEB J. 1994. V. 8. P. 217–225.
9. J. Schletter, H. Heine, A.J. Ulmer, E.T. Rietschel. Molecular mechanisms of endotoxin activity // Arch. Microbiol. 1995. V. 164. P. 383–389.
10. L. Li. Protein and endotoxin interactions and endotoxin removal from protein solutions: Diss. ... Doctor of Philosophy. – New Jersey Institute of Technology. 1999.
11. C. Galanos, O. Luederitz, E. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities // Eur. J. Biochem. 1985. V. 148. P. 1–5.
12. M. Helander, B. Lindner, H. Brade, H. Altmann, A. Lindberg, E. Rietschel, U. Zaehring. Chemical structure of the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae strain I-69 Rd–/b+. Description of a novel deep-rough chemotype / Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. P. 483–492.
13. U. Zaehring, B. Lindner, E. Rietschel. Molecular structures that influence the immunomodulatory properties of the lipid A and inner core region oligosaccharides of bacterial lipopolysaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1994. V. 50. P. 211–276.
14. S.N. Vogel, M.M. Hogan. Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses // Immunophysiology: the role of cells and cytokines in immunity and inflammation / Ed. by J.J. Oppenheim, E.M. Shevach. – Oxford: Oxford University Press, 1990. P. 238–252.
15. D. Nogue. Septic shock // Am. J. Med. Sci. 1991. V. 302. P. 50–65.
16. K. Hou, R. Zaniewski. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge // J. Parenter. Sci. Technol. 1990. V. 44. P. 204–209.
17. F.B. Anspach. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. V. 49. P. 665–681.
18. J. Shands, J. Graham, K. Nath. The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide // J. Mol. Biol. 1967. V. 25. P. 15–16.
19. E. Hannekart-Pokorni, D. Dekagel, F. Depuydt. Macromolecular structure of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria // Eur. J. Biochem. 1973. V. 38. P. 6–13.
20. U. Seydel, H. Labischinski, M. Kastowsky. Conformations of endotoxin and their relationship to biological activity // Immunobiology. 1993. V. 187. P. 191–197.
21. M. Kastowski, T. Gutberlet, H. Bradaczek. Molecular modeling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 4798–4806.
22. D. Petsch, F. Anspach. Endotoxin removal from protein solutions // J. Biotechnol. 2000. V. 76. P. 97–119.
23. L. Li, R. Luo. Protein concentration effect on protein-lipopolysaccharide (LPS) binding and endotoxin removal // Biotechnol. Lett. 1997. V. 19 (2). P. 135–138.

24. L. Li, R. Luo. Protein and endotoxin interactions and endotoxin removal from protein solutions // *Separation Sciences and Technology*. 1999. V. 34(9). P. 1729–1741.
25. L. Li, Luo RG. Use of Calcium to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultra filtration // *Biotechnol. Tech*. 1998. V. 12(2). P. 119–122.
26. D. Morrison, L. Leive. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures // *J. Biol. Chem*. 1975. V. 250. P. 2911–2919.
27. T.E. Karplus, R.J. Ulevitch, C.B. Wilson. A new method for reduction of endotoxin contaminations from protein solutions // *J. Immunol. Methods*. 1987. V. 105. P. 211–220.
28. Y. Aida, M. Pabst. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114 // *J. Immunol. Methods*. 1990. V. 132. P. 191–195.
29. M.J. Wilson, C.L. Haggart, S.P. Gallagher, D. Walsh. Removal of tightly bound endotoxin from biological products // *J. Biotechnol*. 2001. V. 88. P. 67–75.
30. R. Bischoff, D. Speck, P. Lepage, L. Delatre, K. Leoux, S. Brown. Roitsch C: Purification and biochemical characterization of recombinant 1-antitrypsin variants expressed in *Escherichia coli* // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 3464–3472.
31. D. Petsch, E. Rantze, F. Anspach. Selective adsorption of endotoxin inside a polycationic network of flat-sheet microfiltration membranes // *J. Mol. Recognit*. 1998. V. 11. P. 222–231.
32. S.-H. Pyo, H.-B. Park, S.-S. Hong, J.-H. Kim. A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* // *Biotechnol. Lett*. 2001. V. 23. P. 737–740.
33. P. Reichelt, C. Schwartz, M. Donzeau. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents // *Prot. Exp. Purif*. 2006. V. 46. P. 483–488.
34. R.H. Chen, C.-J. Huang, B.S. Newton, G. Ritter, L.J. Old, C.A. Batt. Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography // *Prot. Exp. Purif*. 2009. V. 64. P. 76–81.
35. J.P. Nolan, J.J. McDevitt, G.S. Goldmann. Physicochemical properties of quartz controlling biological activity. Silica, Silicosis and Cancer – Surface Properties // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1975. V. 149. P. 766–771.
36. M. Nagaki, R. Hughes, J. Lau, R. Williams. Removal of endotoxin and cytokines by adsorbents and the effect of plasma protein binding // *Int. J. Artif. Organs*. 1991. V. 14. P. 43–50.
37. Y. Yasaka, M. Tanaka. The distribution of the blood flow during exercise in chronic heart failure – compensatory mechanism to the decreased cardiac output // *J. Chromatogr. B*. 1994. V. 659. P. 139–143.
38. Y. Li, R. Lander, W. Manger, A. Lee. Determination of lipid profile in meningococcal polysaccharide using reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr. B*. 2004. V. 804. P. 353–358.
39. K.M. Gooding, F.E. Regnier. HPLC of Biological Macromolecules. Methods and Applications. – N.Y. 1990. 796 p.
40. E.P. Kroeff, R.A. Owens, E.L. Campbell, R.D. Johnson, H.I. Marks. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr*. 1989. V. 461. P. 45–61.
41. Д.А. Гусаров, В.В. Востриков, Е.А. Ручко, В.А. Ласман, А.В. Михалев, Д.И. Баирамашвили. Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки / Биотехнология. 2006. № 2. С. 44–49.
42. G. Karlsson, P. Gellerfors, A. Persson, B. Noren, P. Edlund, C. Sandberg, S. Birnbaum. Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 855. P. 147–155.
43. S. Sainathan, L. Tu, K. Bishnupuri, M. Han, A. Li, R. Newberry, K. McDonald, D. Crimmins, C. Houchen, S. Anant, B. Dieckgraefe. PEGylated murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: production, purification, and characterization // *Prot. Exp. Purif*. 2005. V. 44. P. 94–103.
44. S. Hershenson, Z. Shaked. Purification of recombinant beta-interferon incorporating RP-HPLC, United States Patent. 1990. № 4, 894, 330.
45. Endotoxin Removal from Proteins. URL: <http://www.proteinchemist.com/tutorial/endotoxin.html> (дата обращения 28.07.2016).
46. R. Shimp, jr., L. Martin, Y. Zhang, B. Henderson, P. Duggan, N. MacDonald, J. Lebowitz, A. Saul, D. Narum. Identification and Characterization of the *Plasmodium yoelii* PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of *Toxoplasma gondii* RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection // *Prot. Exp. Purif*. 2006. V. 50. P. 58–67.

47. Merck-USA. Removal of pyrogens and yeast proteins from hepatitis B virus surface antigen, United States Patent. 1989. № 4,707,542.
48. J. Lopes, W. Inniss. Electron Microscopy of Effect of Polymyxin on Escherichia coli Lipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1969. V. 100. P. 1128–1130.
49. A. Horenstein, F. Crivellin, A. Funaro, M. Said, F. Malavasi. Human CD38: a glycoprotein in search of a function // J. Immunol. Methods. 2003. V. 275. P. 99–112.
50. K. Hou, R. Zaniewski. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 12. P. 315–324.
51. F. Anspach, O. Kilbeck. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Chromatogr. A. 1995. V. 711. P. 81–87.
52. B.A. Newton. The properties and mode of action of the polymyxins // Bac. Rev. 1956. V. 20. P. 14–27.
53. C. Damais, C. Jupin, M. Parant, L. Chedid. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B // J. Immunol. Methods. 1987. V. 101. P. 51–56.
54. S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata. Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption // J. Chromatogr. 1983. V. 262. P. 193–197.
55. S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa. Characteristics and applications of adsorbents for pyrogen removal // Biotechnol. Appl. Biochem. 1988. V. 10. P. 143–148.
56. H. Choi, R. Yang, M. Kunioka. Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 58. P. 807–811.
57. M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama. Removal of endotoxin from protein solution using poly(ε-lysine)-immobilized cellulose beads // Am. Biotechnol. Lab. 2002. V. 20. P. 36–41.
58. G. Carta, A. Jungbauer. Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. – Weinheim. 2010.
59. D. Voet, J. Voet. Biochemistry. – New York: John Wiley and Sons, 1990.
60. G. Subramanian. Bioseparation and bioprocessing. A handbook // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. – Weinheim. 2007.
61. Y. Li, O. Galperina. PDA Viral Safety Workshop. – Germany. 2005.
62. J. Poreth, P. Flodin. Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation // Nature. 1983. V. 2. P. 1657–1659.
63. Патент РФ № 2187363. Способ получения гидрофильного геля / А.В. Смирнов, Е.А. Гукасова, Д.И. Баирамашвили, А.И. Мирошников. 2002.
64. Endotoxin Removal from Proteins. URL: <http://www.proteinchemist.com/tutorial/endotoxin.html> (дата обращения 28.07.2016).
65. R. Shimp-jr., L. Martin, Y. Zhang, B. Henderson, P. Duggan, N. MacDonald, J. Lebowitz, A. Saul, D. Narum. Identification and Characterization of the Plasmodium yoelii PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of Toxoplasma gondii RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection // Prot. Exp. Purif. 2006. V. 50. P. 58–67.
66. Merck-USA. Removal of pyrogens and yeast proteins from hepatitis B virus surface antigen, United States Patent. 1989. № 4,707,542.
67. J. Lopes, W. Inniss. Electron Microscopy of Effect of Polymyxin on Escherichia coli Lipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1969. V. 100. P. 1128–1130.
68. A. Horenstein, F. Crivellin, A. Funaro, M. Said, F. Malavasi. Human CD38: a glycoprotein in search of a function // J. Immunol. Methods. 2003. V. 275. P. 99–112.
69. K. Hou, R. Zaniewski. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 12. P. 315–324.
70. F. Anspach, O. Kilbeck. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Chromatogr. A. 1995. V. 711. P. 81–87.
71. B.A. Newton. The properties and mode of action of the polymyxins // Bac. Rev. 1956. V. 20. P. 14–27.
72. C. Damais, C. Jupin, M. Parant, L. Chedid. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B // J. Immunol. Methods. 1987. V. 101. P. 51–56.
73. S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata. Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption // J. Chromatogr. 1983. V. 262. P. 193–197.
74. S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa. Characteristics and applications of adsorbents for pyrogen removal // Biotechnol. Appl. Biochem. 1988. V. 10. P. 143–148.
75. H. Choi, R. Yang, M. Kunioka. Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 58. P. 807–811.
76. M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama. Removal of endotoxin from protein solution using poly(ε-lysine)-immobilized cellulose beads // Am. Biotechnol. Lab. 2002. V. 20. P. 36–41.