

Практическое руководство: Выбор наиболее подходящих смол для промышленной очистки нативных и рекомбинантных белков

Доктор Пайал Хандельвал
Bio-Rad Laboratories, Inc., 6000 Джеймс Уотсон Драйв, Геркулес, Калифорния 94547



Растворы для очистки

Бюллетень 6810

Ускорьте свой рабочий процесс очистки белков с помощью нашего широкого спектра технологических смол

Нативные и рекомбинантные белки используются в самых разных областях применения - от разработки лекарств до целевой валидации и высокопроизводительного скрининга. В связи с этим крупномасштабное производство и очистка белка стали основными потребностями в промышленных условиях. С момента утверждения рекомбинантного инсулина в качестве терапевтического средства в начале 1980-х годов число биотерапевтических препаратов на основе белка постоянно увеличивается. В настоящее время более 200 белков были одобрены для терапевтического и диагностического использования человеком, а более 350 находятся на поздней стадии клинических испытаний (Walsh 2010). Кроме того, стратегии крупномасштабного производства позволяют получать титры клеточных культур, содержащих десятки граммов целевого белка на литр. Таким образом, успешно удовлетворяются растущие требования к более высоким титрам белка. Однако процессы последующей очистки должны гарантировать удаление примесей. Ввиду того, что расходы на эти процессы, включая очистку, составляют 45-92% от общей стоимости производства чистой партии рекомбинантного белка (Straathof 2011), разработка эффективных и экономичных стратегий очистки является абсолютным приоритетом.

Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствующийся спектр хроматографических смол для очистки биопрепаратов в промышленных количествах. В данном бюллетене рассмотрены различные смолы, которые могут быть использованы для промышленной очистки белков, и специфические свойства, на основе которых эти смолы включены в данный список.

Аффинная хроматография

Иммобилизованная металаффинная хроматография (IMAC) обычно используется для очистки рекомбинантных белков, меченных гистицином. Несколько терапевтических белков-кандидатов, очищенных с помощью IMAC, в настоящее время проходят клинические испытания. IMAC использует матрицу, имеющую металло-хелатную группу, подходящую для связывания металла. Иммобилизованный металл содержит координационные центры, способные связываться с остатками гистицина, прикрепленными к рекомбинантному белку, что позволяет очистить его путем элюирования металло-хелатом, таким как имидазол.

Смолы Profinity IMAC

Смолы Profinity IMAC основаны на нашей запатентованной технологии микрочастиц UNOsphere™. Они обладают превосходными свойствами противотока при максимально высоком рабочем давлении и высоких скоростях потока, что обеспечивает быструю очистку, очистку колонки и повторное выравнивание. Они отличаются превосходной механической прочностью и совместимы с денатурирующими агентами, моющими средствами и восстановителями. Их выработка и чистота результатов превосходят смолы IMAC от других производителей (Рисунок 1) (бюллетень 5456).

Кроме того, они доступны в двух формах — незаряженные и заряженные Ni²⁺. Незаряженная форма может быть заряжена любым ионом металла для еще большей гибкости очистки.

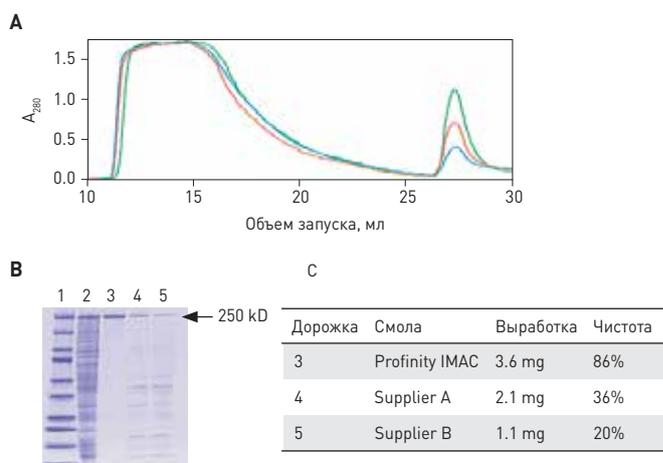


Рисунок 1. Сравнение смолы IMAC компании Bio-Rad со смолами IMAC двух других производителей. А - сопоставленные хроматограммы. В - анализ помеченных гистицином белков методом ДМС-ПААГ-электрофореза, С - расчетная выработка и чистота элюированных помеченных гистицином белков. Смола Profinity IMAC (—); производитель А, (---); производитель В (-).

Ионообменная (IEX) хроматография

IEX является одним из наиболее часто реализуемых начальных этапов очистки белка при условии, что целевой белок не помечен. Белки, являясь амфотерными молекулами, способны связываться со смолой IEX в зависимости от уровня pH раствора. pH связывающего или элюирующего буфера не влияет на заряд сильных ионообменных смол, сохраняющих его неизменным в широком диапазоне pH, ввиду чего они считаются предпочтительными смолами при промышленной организации биопроцессов. Элюирование белков может осуществляться путем изменения pH или ионной силы раствора, однако при изменении pH становится труднее контролировать воспроизводимость. Поэтому для крупномасштабных исследований предпочтителен солевой градиент. Теоретически для элюирования может быть использована любая соль, так как все они вступают в электростатические взаимодействия и, таким образом, пригодны к связыванию и элюированию. Однако высаливание зачастую приводит к более сильному связыванию белков со смолами, поэтому предпочтительно выбирать соли со слабым высаливающим эффектом, такие как хлорид натрия, а не соли с высоким высаливанием, такими как сульфат аммония.

Компания Bio-Rad предлагает множество смол IEX, которые, как было доказано, очень эффективны при промышленной очистке белка.

Ионообменные смолы Nuvia™

Смолы Nuvia IEX обладают высокой связывающей способностью, исключительным разрешением и высокой производительностью. Чтобы подчеркнуть их возможности по очистке белка, был проведен эксперимент по быстрой одноступенчатой очистке белка из молочной сыворотки. Основные сывороточные белки, включающие α-лактальбумин (ALA), β-лактоглобулин (BLG), бычий сывороточный альбумин (BSA) и бычий иммуноглобулины, были очищены в ходе рабочего процесса смолами Nuvia™ S и Nuvia™ Q (Рисунок 2) (бюллетень 6128).

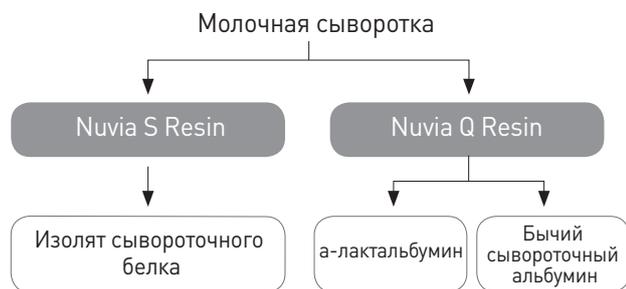


Рисунок 2. Процесс очистки белка из молочной сыворотки при помощи смол Nuvia S и Nuvia Q IEX. WPI - изолят сывороточного белка.

Анионнообменные смолы (AEX) Nuvia Q

Данная смола сверхвысокой емкости с высокой связывающей способностью в широком диапазоне pH и скоростей потока была использована для эффективного удаления ALA и BLG из сыворотки, показав денситометрическую чистоту в 85%. Было доказано, что она качественно очищает такие белки, как транстиретин (TTR) (бюллетень 6711). Рекombинантная очистка TTR затруднена из-за агрегационных свойств белка, исключающих

возможность использования кислотных буферов или денатурационных агентов. Поскольку TTR имеет изоэлектрическую точку 5,7, смола Nuvia Q может быть использована для его очистки в нейтральных буферных условиях. Полученные фракции имеют показатели чистоты >95% (Рисунок 3).

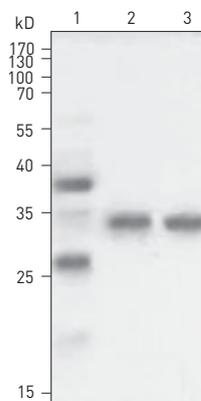


Рисунок 3. Анализ транстиретина методом ДНС-ПААГ-электрофореза. Дорожка 1 - белковое загрязнение; дорожка 2 - элюированный транстиретин; дорожка 3 - стандарт транстиретина.

Катионообменные смолы (CEX) Nuvia S

Данные смолы для промышленной очистки отличаются сверхвысокой емкостью, повышенной способностью к захвату и исключительными свойствами текучести. Была доказана их эффективность при удалении изолята сывороточного протеина (WPI) из молочной сыворотки. Ввиду того, что большинство сывороточных белков имеют изоэлектрическую точку 4,7, загрузка сыворотки в смолу Nuvia S при pH 4,0 привела к захвату WPI вместе со всеми другими белками в потоке. Изолят сывороточного протеина был элюирован с помощью буфера элюирования при pH 8,0.

Смолы IEX UNOsphere

Данные смолы универсальны как по емкости, так и по разрешающей способности смолы, представляют из себя экономически эффективное решение для очистки белка. Они разработаны для высокоэффективного захвата биомолекул из исходного потока материала. Смолы UNOsphere™ Q AEX отличаются большей площадью поверхности для достижения максимальной скорости захвата, емкости макромолекул, восстановления и производительности. При обработке бычьего сывороточного альбумина они проявляют связывающую способность до 125-180 мг/мл при линейном диапазоне скоростей 150-1200 см/ч (бюллетень 2724). Смолы UNOsphere™ S CEX обладают высокой воспроизводимостью вне зависимости от партии и демонстрируют уникальную способность самостоятельно генерировать градиент pH при определенных схемах элюирования (бюллетень 2669).

Смолы IEX Macro-Prep®

Данные смолы обладают уникальными эксплуатационными возможностями для очистки крупных биомолекул, таких как белки плазмы и вирусоподобные частицы, благодаря крупнопористой структуре и сочетанию слегка гидрофобной полимерной основы с гидрофильными лигандами. Это семейство представлено четырьмя различными типами смол IEX для промышленной очистки. Смолы Macro-Prep® High S - это сильнодействующие смолы CEX, идеально подходящие для очистки щелочных и нейтральных белков и пептидов, а также

для решения задачи быстрой очистки (бюллетень 5643). Смолы Macro-Prep® CM – это слабые смолы СЕХ, обеспечивающие стабильные и воспроизводимые результаты (бюллетень LIT271). Смолы Macro-Prep® High Q-это сильнодействующие смолы АЕХ, идеально подходящие для очистки кислотных и нейтральных белков и пептидов (бюллетень 2204). Смолы Macro-Prep® DEAE-это слабые смолы АЕХ, отличающиеся высокой химической, механической и термической стабильностью и подходящие для применения в промышленных масштабах, в аналитических целях и полупрепаративной хроматографии (бюллетень 1942).

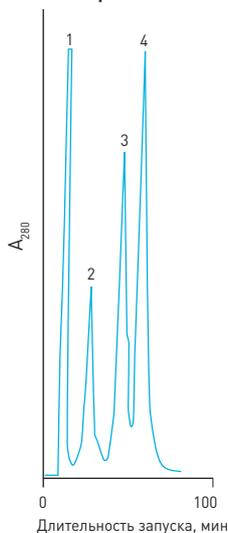
Смолы для хроматографии гидрофобного взаимодействия (НИС)

Гидрофобность белка определяется его аминокислотным составом. Высокие концентрации солей обнажают поверхностные гидрофобные пятна, позволяя белкам связываться с алкильной группой смол НИС, после чего белки можно элюировать, уменьшая градиент соли. Смолы НИС часто используются в сочетании со смолами IEX в процессах очистки белков. Поскольку смолы IEX участвуют в элюировании при наличии высокого процента соли, а смолы НИС в таких условиях осуществляют связывание белков, смолу НИС можно использовать после этапа IEX без необходимости буферного обмена.

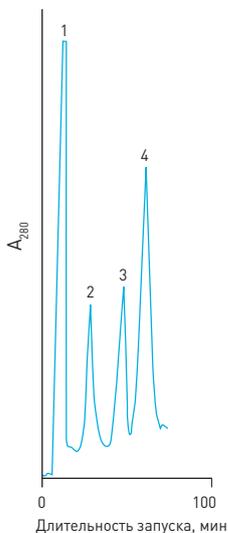
Смолы НИС Macro-Prep®

Мы предлагаем микрочастицы НИС Macro-Prep на основе метакрилата для очистки белков с использованием гидрофобных взаимодействий. Как метиловые, так и т-бутиловые смолы пригодны для очистки белков, имеющих слабые или сильные гидрофобные области. Удержание, селективность и биологическая активность белков зависят от уровня рН, типа используемой соли и ее концентрации. Два различных лиганда обеспечивают альтернативную селективность для более успешного выполнения разделения (Рисунок 4) (бюллетень 1841).

Метиловая смола НИС Macro-Prep



Т-бутиловая смола НИС Macro-Prep



Peak	Белки	Время удержания, мин	
		Methyl	t-Butyl
1	Цитохром с	7.30	10.41
2	Яичный альбумин	32.25	40.22
3	α-амилаза	62.81	71.50
4	Ферритин	81.49	90.90

Рисунок 4. Сравнение отделения белков и времени их удержания.

Хроматографические смолы смешанного типа

Смолы/среды смешанного типа отличаются уникальной селективностью. Эти смолы сочетают в себе свойства смол СЕХ и металлическую аффинность смол НИС, зачастую позволяя разделять биомолекулы, которые кажутся однородными при обработке с помощью других хроматографических методов, что повышает их популярность в схемах очистки белков. Нами разработано два вида смол/сред смешанного типа — керамический гидроксипатит СНТ™ и Nuvia™ сPrime™.

Среда керамического гидроксипатита СНТ

СНТ обладают рядом надежных свойств, повышающих эффективность их выработки и финансовую ценность. Доступны два типа керамического гидроксипатита СНТ: Тип I и тип II. Тип I обладает более высокой способностью связывать белки и кислотные белки.

Тип II имеет более низкую способность связывать белки, но обеспечивает лучшее разрешение нуклеиновых кислот и некоторых белков. При работе с ними существует возможность управлять связыванием и удержанием различных белков, изменяя рН буфера и тип используемого СНТ, что было доказано экспериментом с участием 16 различных белков (Рисунок 5) (бюллетень 1986).

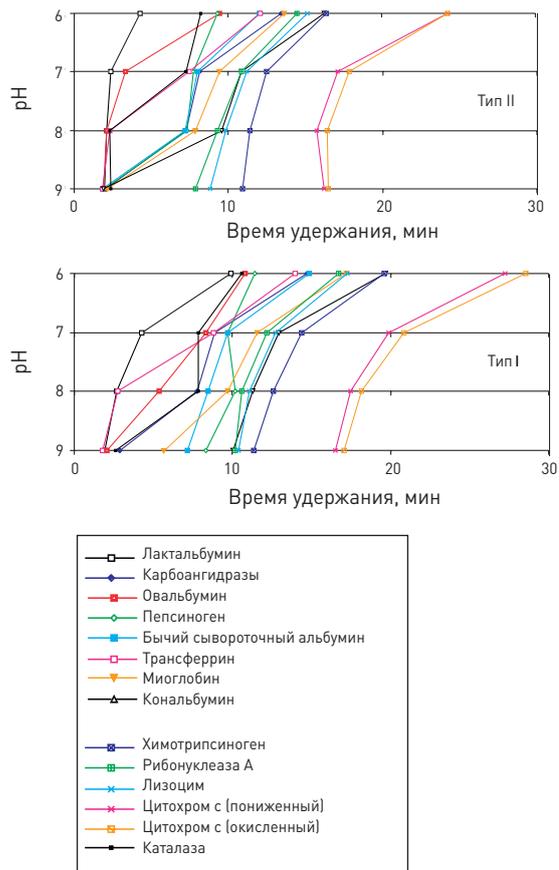


Рисунок 5. Изменения во времени удержания белка в средах СНТ Типа I и Типа II при увеличении уровня рН. Очищаемые белки были загружены и элюированы с использованием линейного градиента фосфата натрия при уровне рН 6, 7, 8, и 9.

СНТ очень эффективно дополняет другие формы хроматографии, чем формирует полный рабочий процесс очистки белка. Например, было доказано, что очистка при помощи СНТ после этапа ИМАС генерирует высокоочищенные образцы альфа-1-антитрипсина (бюллетень 2535). Кроме того, она также может быть использована для очистки в один этап непомятых нативных белков, которые невозможно очистить с помощью ИМАС. Мы также использовали СНТ при очистке в один этап для выделения связывающего кальций белка фреквенина (бюллетень 2575). Было доказано, что многие другие белки, такие как калретинин, кальбиндин и кальцийзависимый адгезин из адгезии Rhizobiaceae, также эффективно очищаются при помощи СНТ в один этап (Cheung et al. 1993, Smit et al. 1989).

Смолы Nuvia cPrime

Данные смолы были специально разработаны для очистки широкого спектра терапевтических белков и многочисленных новых конструкций, многие из которых не могут быть обработаны аффинным методом. Они способствуют достижению эффективной очистки при использовании гидрофобного и СЕХ режимов. Состав этих смол подразумевает наличие большого пространства для связывания и элюирования, что позволяет разрабатывать высоконадежные методы для коммерческого применения. Чувствительные к соли и рН белки с высокой склонностью к агрегации и/или деградации могут быть эффективно очищены с помощью Nuvia cPrime. Было доказано, что этими смолами при различных условиях эффективно очищается широкий спектр белков с различными изоэлектрическими точками (pI) (Таблица 1) (бюллетень 6418).

Таблица 1. Наилучшие условия связывания и элюирования различных белков при помощи Nuvia cPrime.

Тестируемый белок	pI	Наилучшие ожидаемые условия, согласно плану эксперимента
Бычий сывороточный альбумин	4.7	Связывание: 10 mM NaCl, pH 4.0 Элюирование: 1,000 mM NaCl, pH 8.0
Бычья карбоангидраза	5.9	Связывание: 10 mM NaCl, pH 4.6 Элюирование: 1,000 mM NaCl, pH 8.0
Кональбумин	6.9	Связывание: 10 mM NaCl, pH 4.0 Элюирование: 505 mM NaCl, pH 6.0
Лактоферрин	9.2	Связывание: 205 mM NaCl, pH 4.0 Элюирование: 1,000 mM NaCl, pH 8.0
Моноклональные антитела X	9.5	Связывание: 300 mM NaCl, pH 4.6 Элюирование: 800 mM NaCl, pH 8.0

Надеемся, что информация, представленная в данном бюллетене, поможет вам в работе над вашей стратегией промышленной очистки рекомбинантных белков. Для получения технической поддержки/информации о продуктах или для запроса ценового предложения обратитесь к своему региональному представителю компании Bio-Rad по адресу: process@bio-rad.com или в нашу службу поддержки клиентов по телефону 1-800-4-BIORAD (1-800-424-6723).

Список источников

- Cheung W-T et al. (1993). Связывание кальция куриным кальретинином и крысиным кальбиндином D28k, синтезированными в бактериях. *Eur J Biochem* 215, 401-410.
- Smit G et al. (1989). Очистка и частичная исследование биотипа *Rhizobium leguminosarum viciae* Ca²⁺-зависимого адгезина, обуславливающего первый этап прикрепления клеток семейства Rhizobiaceae к кончикам корневых волос растений. *J Bacteriol* 171, 4054-4062.
- Straathof AJJ (2011). Доля затрат в последующих процессах ферментативного производства. *Комплексные биотехнологии*, второе издание, M-Y Murray, ed. (Burlington, MA: Academic Press), стр. 811-814.
- Walsh G (2010). Биофармацевтические критерии 2010. *Nat Biotechnol* 28, 917-924.

Изучите наш огромный ассортимент промышленных хроматографических смол, их эксплуатационные характеристики и применение (бюллетень 6713), а также запросите образец продукции для исследования.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Веб сайт bio-rad.com США 1 800 424 6723 Австралия 61 2 9914 2800 Австрия 43 1 877 89 01 177 Бельгия 32 (0)3 710 53 00 Бразилия 55 11 3065 7550 Канада 1 905 364 3435 Китай 86 21 6169 8500 Чехия 420 241 430 532 Дания 45 44 52 10 00 Финляндия 358 09 804 22 00 Франция 33 01 47 95 69 65 Германия 49 89 31 884 0 Гонг Конг 852 2789 3300 Венгрия 36 1 459 6100 Индия 91 124 4029300 Израиль 972 03 963 6050 Италия 39 02 216091 Япония 81 3 6361 7000 Корея 82 2 3473 4460 Мексика 52 555 488 7670 Нидерланды 31 (0)318 540 666 Новая Зеландия 64 9 415 2280 Норвегия 47 23 38 41 30 Польша 48 22 331 99 99 Португалия 351 21 472 7700 Россия 7 495 721 14 04 Сингапур 65 6415 3188 ЮАР 27 (0) 861 246 723 Испания 34 91 590 5200 Швеция 46 08 555 12700 Швейцария 41 026 674 55 05 Тайвань 886 2 2578 7189 Тайланд 66 662 651 8311 ОАЭ 971 4 8187300 Великобритания 44 020 8328 2000

helicon

121374, г. Москва,
Кутузовский пр., д. 88
Тел.: +7 (499) 705-50-50
info@helicon.ru



8 800 770 71 21
helicon.ru

ФИЛИАЛЫ:

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ:

630090 г. Новосибирск,
ул. Инженерная, д. 28
Тел.: +7 (383) 207-84-85
novosibirsk@helicon.ru

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ:

195220 г. Санкт-Петербург,
ул. Гжатская, д. 22, корп. 1
Тел.: +7 (812) 244-85-52
spb@helicon.ru

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В ПРИВОЛЖСКОМ РЕГИОНЕ:

420021 г. Казань,
ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел.: +7 (843) 202-33-37
volga@helicon.ru

ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ:

344116 г. Ростов-на-Дону,
ул. 2-ая Володарская, д. 76/23а
Тел.: +7 (863) 209-88-89
rostov@helicon.ru