

# Практическое руководство: Выбор наиболее подходящих смол для промышленной очистки иммуноглобулина G IgG

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



## Растворы для очистки

Бюллетень 6793

### Комплексные решения для очистки иммуноглобулина G

Иммуноглобулины (Ig), или антитела (Ab), являются тяжелыми глобулярными белками плазмы, образующимися в ответ на инородные тела или антигены. Они существуют в пяти изоформах: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Иммуноглобулин IgG обеспечивает большую часть иммунитета на основе антител. Способность иммунной системы животных продуцировать антитела против введенного антигена может быть легко использована для получения специфических антител как для фундаментальных исследований, так и для диагностических целей. Кроме того, распространение рекомбинантных ДНК и белковых технологий приоткрыло ранее неизведанные горизонты в конструировании антител. Значительные усовершенствования в экспрессии и производстве антител в первоначальном потоке привели к необходимости улучшить процессы очистки в последующем потоке для удаления загрязняющих веществ, таких как альбумин, трансферрин и  $\alpha$ 2-макроглобулин из нативной сыворотки и белков клеток-хозяев (HCPS) из рекомбинантного источника.

На выбор хроматографической смолы для очистки целевого антитела влияет целый ряд факторов, включая требуемую чистоту для конечного применения и необходимые физико-химические характеристики очищенного образца. Ввиду того, что каждая смола обладает уникальными свойствами, стратегии очистки часто разбиваются на этапы, такие как захват, промежуточный этап и полировка, чтобы обеспечить максимальную чистоту антител. Смолы, используемые на каждой стадии, должны выбираться на основе того, соответствуют ли они желаемым затратам на организацию процесса, временным рамкам эксперимента и чистоте результатов, среди прочих факторов.

Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствуемый спектр хроматографических смол для очистки антител в промышленных количествах. В данном руководстве рассмотрены различные смолы, которые могут быть использованы для промышленной очистки поликлональных иммуноглобулинов IgG, а также их специфические свойства, на основе которых эти смолы включены в данный список. Подробная информация о смолах, подходящих непосредственно для очистки моноклональных антител (mAb), находится в Бюллетене 6875 - Выбор наиболее подходящих смол для промышленной очистки моноклональных антител.

### Аффинная очистка

#### Смола UNOsphere SUPrA™

Аффинная хроматография белка А широко используется для очистки иммуноглобулинов IgG, так как смолы на основе белка А отличаются высокой аффинностью к Fc-регионам большинства иммуноглобулинов, включая IgG. Смола UNOsphere SUPrA была разработана на основе рекомбинантного белка А (включает только центр связывания IgG для обеспечения специфического извлечения IgG из сыворотки), соединяемым с микрочастицами UNOsphere™ для надежной и масштабируемой очистки IgG. Данная смола обладает множеством преимуществ по сравнению с другими смолами белка А, включая прогнозируемую производительность при широком диапазоне концентраций антител, а также стабильность при высоком уровне pH (<11). При работе с IgG она обладает связывающей способностью в 25-30 мг/мл (бюллетень 5729) и как правило обеспечивает

>95% восстановление целевых антител при чистоте ~90% (Рисунок 1 и Таблица 1) (бюллетень 6053). Таким образом, смола UNOsphere Supra может считаться отличным выбором для очистки IgG в промышленных количествах.

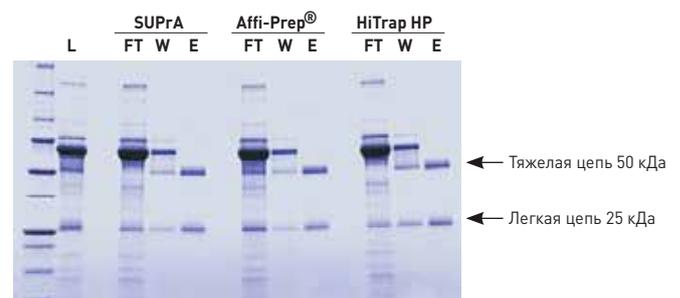


Рисунок 1. Очистка IgG, полученных при помощи смолы UNOsphere SUPrA, в сравнении с двумя другими смолами белка А. L - загрузка; FT - процесс потока; W - промывка; E - элюат.

**Таблица 1.** Количественная оценка остаточных белков клеток-хозяев (НСР) и ДНК после очистки mAb при помощи смол UNOsphere SUPrA и MabSelect.

Смола НСР, нг/мг	НСР, ng/mg	ДНК, нг/мг	Рекомбинантный белок А, ppm
MabSelect	39.2	26.0	6.4
SUPrA	33.2	21.6	20.5

Таким образом, смола UNOsphere SUPrA идеально подходит в качестве автономного средства для антител, которые не должны быть исключительно чистыми. Кроме того, она может быть использована на этапе захвата очистки, что может помочь в удалении выщелоченного белка А на последующих стадиях.

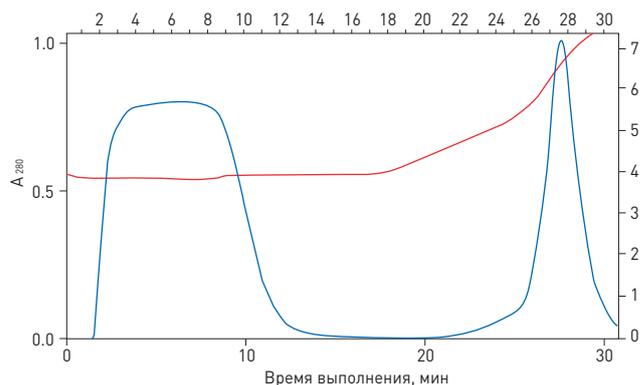
## Ионообменная хроматография

### Смола UNOsphere™ S

UNOsphere S является катионообменной смолой (СЕХ), обеспечивающей высокую производительность благодаря высокой связывающей способности и низкому противодавлению. Было доказано, что она связывает в среднем 40-60 мг IgG/мл в диапазоне линейных скоростей 150-600 см/ч (бюллетень 2669). Более конкретно, она была успешно использована на этапе захвата при очистке рекомбинантного антитела из семян кукурузы с 97% восстановлением и 80% чистотой (бюллетень 2774) (Таблица 2) и высокоэффективным захвате мышиного IgG1 с подтвержденным 97% восстановлением (Рисунок 2). Она обладает уникальной способностью самостоятельно генерировать градиент pH при определенных схемах элюирования, что обуславливает ее разрешающую способность, недостижимую для других смол СЕХ. Кроме того, даже жесткие циклы очистки на месте и дезинфекции не влияют на ее долгосрочную стабильность, ввиду чего она демонстрирует повышенную способность к регенерации и является пригодной к повторному использованию. Также было доказано, что данная смола успешно очищает белок А от загрязнений (бюллетень 2849).

**Таблица 2.** Сводная по очистке трансгенных IgG с помощью керамического гидроксипатита UNOsphere S и СНТ™

Шаг очистки	Итого Иммуноглобулина G (IgG),	Итого Протеина мг	%	Чистота, %
Сырой кукурузный экстракт + IgG	1.0	6.1	100	22
UNOsphere S	1.07	1.47	97	80
СНТ	0.88	0.91	82	95



**Рис. 2.** Очистка мышиного IgG1 на колонке UNOsphere S. A<sub>280</sub> (—); буфер pH (—).

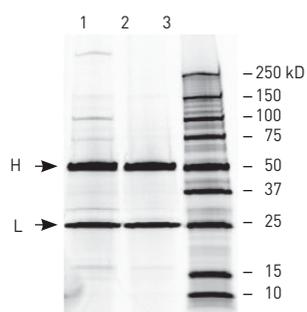
### Смола Macro-Prep® DEAE

Macro-Prep DEAE является слабой анионообменной смолой (АЕХ) с отличными текучими свойствами и способностью поддерживать свою разрешающую способность при скорости потока  $\geq 1000$  см/час. Большинство иммуноглобулинов IgG обладают щелочной изоэлектрической точкой, поэтому не связываются смолами АЕХ. Таким образом, данная смола АЕХ отлично подходит для связывания таких загрязняющих веществ, как отрицательно заряженные белки НСР и ДНК клетки-хозяина, обеспечивая получение более чистой фракции несвязанного щелочного IgG в ходе проточного процесса. Смола Macro-Prep DEAE устойчива в широком спектре органических растворителей, что позволяет тщательно дезинфицировать и регенерировать материал. Она показывает хорошие результаты при низком и среднем давлении, а также демонстрирует минимальные изменения объема при изменении уровня pH или ионной силы. Ее использовали в качестве смолы для очистки захвата лошадиного IgGТ (бюллетень 2524).

## Хроматография смешанного типа

### Среды керамического гидроксипатита СНТ

СНТ обладает уникальной селективностью, позволяющей обрабатывать смеси, которые кажутся однородными для других сред. Это отличный выбор для промежуточной или окончательной полировки. Благодаря своим отменным свойствам и повышенной емкости при работе с насыщенным материалом она предоставляет улучшенное качество очистки IgG, эффективность выработки и финансовую выгоду при использовании. Среда СНТ доступна в двух форматах: Тип I и Тип II. В дополнение к повышенным показателям чистоты было доказано, что СНТ уменьшает количество агрегатов IgG4 в биофармацевтическом продукте (Рисунок 3) (бюллетень 2940), а также может быть использована для удаления загрязнений белка А (бюллетень 2849), что является ее преимуществом ввиду широкого спектра иммуномодулирующих эффектов, связанных с белком А и его фрагментами. Она обеспечивает легкое промышленное отделение белка А от нефракционированных кондиционированных сред без необходимости в дополнительных стадиях или агентах. СНТ также может быть использована для удаления эндотоксинов из исходного материала с использованием фосфатного градиента 0-1 М (бюллетень RP0033).



**Рисунок 3.** Анализ уменьшения образцов методом ДНС-ПААГ-электрофореза после очистки колонки СНТ. Дорожка 1 - IgG4 исходный материал; дорожка 2 - СНТ-очищенный образец; дорожка 3 - стандарты молекулярной массы; H - Тяжелая цепь IgG4; L- Легкая цепь IgG4.

### Керамическая фторапатитовая среда CFT™

CFT – это среда на основе апатита, представляющая собой композит фторапатита и гидроксиапатита. Одним из ее уникальных свойств является возможность использования при очистке образцов с низким уровнем pH (~5,0). Ее прочность на растяжение, химическая стойкость и плотность обеспечивают превосходную пропускную способность и стабильную производительность при отделении IgG.

Она может быть использована на этапе полировки очистки IgG после того, как целевые молекулы были захвачены и элюированы из колонки белка А (бюллетень 5853).

Для очистки моноклональных антител IgG также допускается использование других смол, таких как Nuvia™ Q, Nuvia™ S, Nuvia™ HR-S, и Nuvia™ cPrime™. В бюллетене 6875 находятся подробные сведения об очистке моноклональных антител IgG при помощи данных смол. Надеемся, что информация, представленная здесь, поможет вам в работе над вашей стратегией промышленной очистки поликлональных иммуноглобулинов. 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](mailto:process@bio-rad.com) или в нашу службу поддержки клиентов по телефону 1-800-4-BIORAD (1-800-424-6723).

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

### Список источников

He X et al. (2010). Среда Nuvia S. Bioprocess International 8, 59-61.

Lang DA et al. (2011). Агрегаты в производстве моноклональных антител. Biotechnol Bioeng 108, 1,494-1,508.

Rathore AS et al. (2013). Агрегация продуктов моноклональных антител: образование и удаление. Biopharm International 26, 40-45.

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