

Практическое руководство: Выбор наиболее подходящих смол для удаления эндотоксинов в ходе очистки

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



Растворы для очистки

Бюллетень 6813

Эффективно устраняйте эндотоксины с помощью наших универсальных технологических смол. Эндотоксины являются одной из наиболее распространенных пирогенных (вызывающих лихорадку) примесей, присутствующих в терапевтических белковых препаратах. Они представляют собой отрицательно заряженные сложные агрегаты липополисахаридов (LPS), имеющиеся в клеточных стенках грамотрицательных бактерий. Эндотоксины высвобождаются при разрушении жизнеспособных клеточных стенок или мертвых бактерий. Присутствие даже незначительного количества таких пирогенов в очищенных белках может вызвать серьезные нарушения в процессе последующей очистки. В терапевтических белках такие загрязнители могут привести к септическому шоку, повреждению тканей и даже смерти в некоторых случаях. В исследовательских образцах эндотоксины могут препятствовать точному отображению данных и иммунологических показаний. Поэтому очень важно, чтобы эндотоксины были удалены из всех очищенных белков, особенно из предназначенных для терапевтического применения, такого как лекарства, инъекционные препараты и другие фармацевтические продукты. Эндотоксины чрезвычайно термически стабильны и нечувствительны к изменениям уровней pH, что делает эффективное и экономичное удаление эндотоксинов очень сложной задачей. На самом деле удаление эндотоксинов является одной из самых сложных задач в последующей обработке белка. Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствуемый спектр хроматографических смол для очистки белков в промышленных количествах. В данном руководстве рассмотрены смолы, зарекомендовавшие себя с наилучшей стороны для удаления эндотоксинов.

Анионообменные (АЕХ) хроматографические смолы

Ввиду негативного заряда эндотоксинов хроматография при помощи смол АЕХ зачастую является наилучшим решением для их удаления.

Смола Macro-Prep® High Q

Эта сильная смола АЕХ, идеально подходящая для связывания кислых биомолекул, является отличным выбором для быстрой и экономичной очистки. Она обеспечивает разделение с высоким разрешением при высоких скоростях потока. Ее гидрофобная основа вступает в активное взаимодействие с липополисахаридами эндотоксинов, повышая таким образом эффективность их удаления. Превосходная механическая и химическая стабильность Macro-Prep High Q делает ее предпочтительным выбором по сравнению с другими представленными на рынке анионными смолами (Q) для быстрой обработки больших объемов исходных потоков. Данная смола успешно используется для удаления эндотоксинов из различных белковых продуктов.

Очищенный от дрожжей белок X (молярная масса 15,4 кД, изоэлектрическая точка 6,5) генерировал положительный сигнал при тестировании лизата амебоцитов *Limulus* (LAL), что указывало на наличие эндотоксинов.

Однако хроматографические смолы, ранее успешно удалявшие эндотоксины из белков, оказались неспособны выполнить очистку этого образца, после чего была протестирована выборка из 20 различных смол, чтобы определить лучшую из них для элиминации эндотоксинов (бюллетень 2204). Шесть смол, показавших хорошую эффективность удаления, отмечены на Рисунке 1. При этом очистка с использованием Macro-Prep High Q показала самое низкое соотношение эндотоксина и белка X по сравнению с пятью другими представленными на рынке смолами.

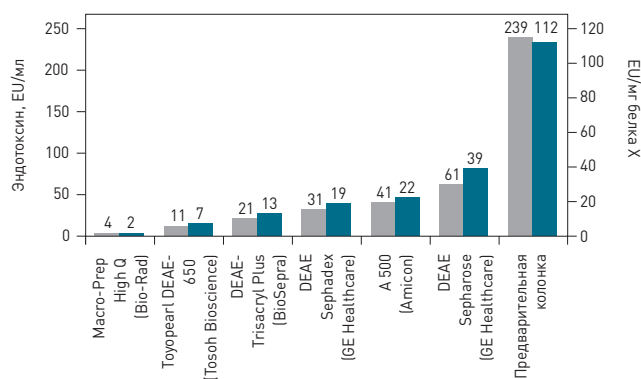


Рисунок 1. Оценка эффективности шести смол АЕХ при удалении эндотоксинов, EU/мл (■); EU/мг белка X (■).

Белок Z (MW 28,3 кД, pI ~6)- это липофильный белок, проявляющий высокое сродство к эндотоксинам, что затрудняет его очистку. Традиционные методы экстракции органическими растворителями снижали уровень эндотоксина всего на 97%. Очистка при помощи смолы Macro-Prep High Q помогла расщепить белок Z на уровне связей эндотоксина. Молекулы белка Z, содержащие низкие уровни эндотоксинов, элюировали при низких концентрациях соли, тогда как молекулы с высокими уровнями эндотоксинов элюировали позже в градиенте. В итоге 77% общего белка Z было восстановлено при снижении содержания эндотоксина на 99,99% (Таблица 1) (бюллетень 2204).

Таблица 1. Результаты снижения уровня эндотоксина в белке Z при помощи смолы Macro-Prep High Q в условиях денатурации.

Образец	Protein Z, mg	EU/ml x 10 ³	EU/mg Protein Z
Загрузка	857	35,100	40,960
Несвязанный кластер	758	29	38.3
Кластер градиента	~20	<1	-
Десорбция 2 Молей NaCl	<5	6,680	>1.3 x 10 ⁶
Конечный лиофилизированный препарат	662	3.5	5.3

Также Bio-Rad рекомендует две другие смолы AEX, пригодные для удаления эндотоксинов в ходе очистки.

Смола Nuvia™ Q

Данная смола AEX следующего поколения ультра высокой производительности отличается высокой связующей способностью в широком диапазоне значений pH и скоростей потока, что позволяет использовать ее в различных экспериментальных проектах. Ее уникальная конструкция придает ей лучшую в своем классе динамическую связующую способность (бюллетень 6129).

Смола UNOsphere™ Q

Является сильной анионообменной смолой. Ее высокомакропористый характер обеспечивает хорошую связующую способность в диапазоне линейных скоростей 150-1200 см/ч (бюллетень 2724).

Катионообменные (СЕХ) хроматографические смолы Смола Nuvia™cPrime™ наряду с другими смолами СЕХ является эффективным средством удаления эндотоксинов, так как ею связываются целевые белки, а отрицательно заряженные эндотоксины удаляются в процессе потока.

Хроматография смешанного типа

Хроматографические смолы смешанного типа отличаются уникальными отделяющими свойствами, такими как невероятная избирательность и разрешение, при работе с разнообразными молекулами.

Среды керамического гидроксипатита СНТ™

СНТ – это смешанная хроматографическая среда с долгой историей применения в очистке антител. Она способна удерживать растворенные АЕХ вещества с помощью положительно заряженного кальция (сродства металлов с кальцием), СЕХ с фосфатными группами и/или водородной связи с кристаллическими гидроксильными группами. Эндотоксины обладают высокой кислотностью из-за высокого содержания фосфорильных и карбоксильных остатков, обладающих сильным сродством к ионам кальция в СНТ.

В ходе исследований градиента было установлено, что высокая концентрация фосфатов в буфере приводит к совместному элюированию эндотоксинов и целевого химерного mAb.

Эта проблема была преодолена использованием буферов с низкой концентрацией фосфатов, а также градиента хлорида натрия, что позволило удерживать эндотоксины на колонке СНТ и элюировать mAb в ранних фракциях (Рисунок 2). Таким образом, СНТ может быть использована для оптимизации состава буфера с целью достижения баланса между элюированием чистого продукта и устранением загрязнений. В Таблице 2 показано резкое снижение уровня эндотоксина после градиентной очистки хлорида натрия (бюллетень RP0033).

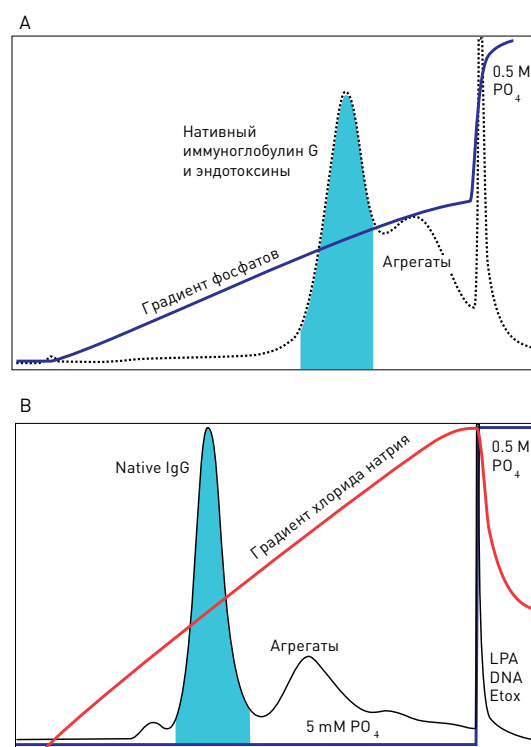


Рис. 2. Характеристики элюирования IgG в различных буферах. А, распределение нативного IgG и примесей в фосфатном градиенте от 5 до 300 мМ, распределение нативного IgG и основных классов загрязняющих веществ в градиенте хлорида натрия при 5 мМ фосфате. LPA - лизофосфатидная кислота; Etox - эндотоксины.

Таблица 2. Сравнение очистки эндотоксинов при помощи градиентов фосфатов и хлорида натрия.

	Эндотоксин, EU/мл
Исходный материал	>500
Кластер фосфатов	16.6
Кластер NaCl	<0.05

Керамическая Гидроксифторапатитовая среда MPC™

Данная среда представляет собой композит гидроксиапатита и фторапатита, сохранивший уникальные разделительные свойства СНТ. Она также отличается высокой стабильностью уровня pH, что обеспечивает дополнительные преимущества для финансового аспекта процесса (бюллетень 6432).

Керамическая фторапатитовая среда CFT™

Это композит фторапатита и гидроксиапатита, полученный химическим превращением нанокристаллов гидроксиапатита во фторапатит при участии фторсодержащего реагента. CFT может использоваться при сложных условиях хроматографии для разделения кислотных белков, требующих буферизации при уровне pH, не превышающем 5,6 (бюллетень 3111).

Надеемся, что информация, представленная здесь, поможет вам в работе над вашей стратегией удаления эндотоксинов рекомбинантных белков или очистки антител. 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).

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