



Системные решения проблемы агрегатов

Успех любого биологического препарата, например моноклональных антител (mAb), рекомбинантных белков или биоаналогов, в значительной степени зависит от последующей очистки. Среди проблем, с которыми часто сталкиваются ученые в ходе данного процесса, - образование и/или удаление агрегатов мономеров. Хотя агрегаты физически и химически подобны мономерам, их присутствие в конечном очищенном продукте, особенно в терапевтическом mAb, нежелательно по многим причинам. Во-первых, агрегаты часто содержат примеси, такие как белки клеток-хозяев (НСП) и ДНК, что приводит к образованию сложных загрязняющих веществ. Это может увеличить риск анафилаксии или иммуногенного ответа у пациентов. Во-вторых, агрегаты терапевтических mAb часто демонстрируют иные профили биоактивности/потенции, стабильность при хранении и фармакодинамические/фармакокинетические свойства, чем их мономерные аналоги (Lang et al. 2011). По этим причинам удаление агрегатов стало важным направлением последующей обработки.

Образование агрегатов может быть обусловлено несколькими процессами: (1) интенсивная ферментация может привести к неправильному разрушению дисульфидных связей во время биосинтеза и разворачиванию или денатурации молекул лекарственных средств при температурах роста клеток ($\geq 25^\circ\text{C}$) (Rathore et al. 2013); (2) Аффинная хроматография белка А, которая используется для очистки объемных примесей, присутствующих в исходном сырье, требует сильных кислотных условий элюирования, что может вызвать структурные изменения и способствовать олигомеризации чувствительных к рН молекул; (3) в качестве меры вирусной деактивации элюат белка А часто поддерживается при низком значении рН в течение 30-60 минут, что может ускорить образование агрегатов; и (4) агрегаты также могут образовываться во время и после очистки, если условия/методы последующей обработки не идеальны.

Компания Bio-Rad уже более 50 лет обеспечивает постоянно совершенствующийся спектр хроматографических смол для очистки биопрепаратов в промышленных количествах. По мере роста биофармацевтической промышленности присутствие агрегатов стало предметом интенсивного и все более пристального изучения. В данном руководстве мы приводим краткий обзор различных смол, которые могут быть использованы для удаления/минимизации агрегатов в промышленных процессах очистки.

Ионообменные (IEX) хроматографические смолы

Ввиду того, что агрегатные молекулы химически кратны мономеру, они имеют пропорционально больший поверхностный заряд. Это делает ионообменные смолы идеальными для их очистки.

Bio-Rad предлагает новые мелкодисперсные хроматографические смолы, оптимизированные для высокого разрешения и емкости. Такие смолы могут быть особенно продуктивны в сложных ситуациях и на заключительных стадиях полировки (He et al. 2010).

Смола Nuvia™ S

Это высокоемкая, прочная катионообменная смола (СЕХ) с отличными динамическими характеристиками связывания и низким обратным давлением при высоких скоростях потока.

Потенциал Nuvia S для обработки агрегатов был исследован при использовании моноклонального антитела mAb G, которое склонно агрегироваться при кислотном элюировании из колонки аффинной хроматографии белка А (Рисунок 1). Nuvia S успешно снизила содержание агрегата с 13,8% в загруженном материале до <1% в очищенном элюате при сохранении 93% восстановления mAb (бюллетень 5984). Высокие скорости потока, на которых способна использоваться данная смола, обеспечивают дополнительное преимущество в виде минимизации взаимодействия антител с протеазами и нуклеазами, присутствующими в исходном потоке клеточной культуры, тем самым сводя к минимуму деградацию антител.

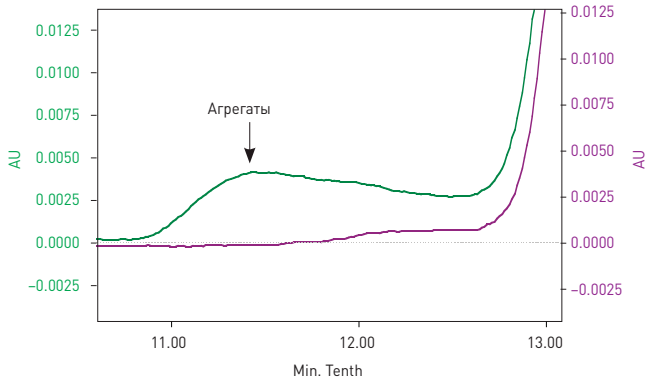


Рисунок 1. Анализ удаления агрегата из mAb G с использованием смолы Nuvia S методом гель-проникающей жидкостной хроматографии высокого давления. Загрузка (—); Фракции 3–8 (—).

Смола Nuvia™ HR-S

Данная смола СЕХ с высоким разрешением. Она отличается гидрофильной полимерной матрицей с открытой структурой пор, предназначенной для быстрого и эффективного переноса массы, и обладает превосходной текучестью при высоких скоростях потока. Ее можно использовать в крупномасштабных работах по последующей очистке. Она отлично подходит для разделения высокомолекулярных примесей, например, агрегатов mAb и близкородственных биомолекул (бюллетень 6439). Кроме того, она показала свою эффективность при снижении содержания агрегата с 10% в нагрузке до 0,46–0,85% в элюате с восстановлением мономера 66–81% (Рисунок 2)

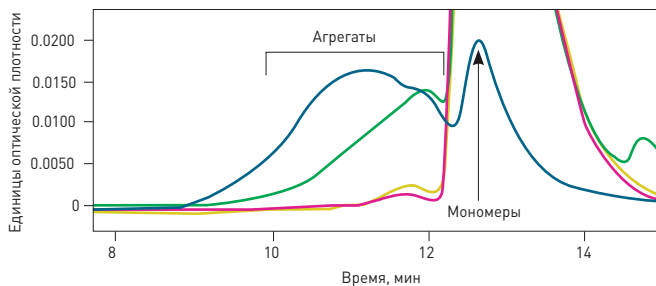


Рисунок 2. Профили загрузки при гель-проникающей хроматографии (—), выбранные кластеры (Фракции 17–20) (—) и (Фракции 17–19) (—), и агрегированный кластер (Фракции 21–22) (—).

Nuvia HR-S также превосходит другие смолы СЕХ с мелкими частицами по показателю минимизации наличия агрегатов с высокой степенью восстановления. В прямом сравнении Nuvia HR-S дала <0,3% остаточного агрегатного содержания с >80% восстановлением против ~70% восстановления, полученного Смолой 1 (Рисунок 3).

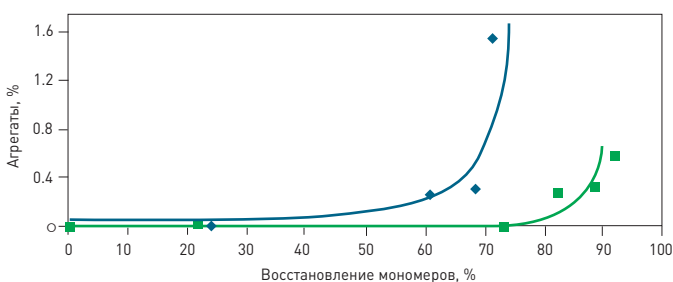


Рисунок 3. Производительность смолы Nuvia HR-S ■ по сравнению со Смолой 1 ◆.

Смолы (НІС) для взаимодействия при гидрофобной хроматографии

Ввиду того, что некоторые агрегаты проявляют повышенную поверхностную гидрофобность по сравнению с мономерами, смолы НІС также могут быть использованы для удаления агрегатов. Изменения уровня pH могут повлечь за собой изменения гидрофобности белков и способствовать их связыванию/высвобождению из смол НІС. Точно так же изменения концентрации солей могут изменять силу взаимодействия белков со смолами, тем самым влияя на их очистку. Высокие концентрации солей часто помогают белкам связываться со смолами НІС. Следовательно, при обратном градиенте солей агрегаты остаются связанными со смолой, в то время как мономеры элюируются. Компания Bio-Rad предлагает два типа НІС-смол: Macro-Prep® t-Butyl, являющейся умеренно гидрофобной, для использования при очистке белков со слабыми гидрофобными областями или небольшим их количеством, и слабо гидрофобную Macro-Prep® Methyl, которую можно использовать для очистки белков с сильными гидрофобными областями.

Хроматографические смолы смешанного типа

Методы работы, при которых используются смолы ІЕХ и НІС, способны спровоцировать образование дополнительных агрегатов или мультимеров из-за повышения концентрации белка или соли, а также соблюдения требований к уровню pH для элюирования. Хроматографические смолы смешанного типа служат для решения данных задач.

Смешанные хроматографические режимы позволяют проводить разделение как по заряду, так и по гидрофобности или сродству металлов на одном этапе. Смолы смешанного типа компании Bio-Rad обладают уникальными разделительными свойствами, непревзойденной селективностью и выдающимся разрешением и могут быть использованы для эффективного удаления агрегатов.

Среды керамического гидроксипатита СНТ™

Будучи смешанной средой, СНТ обладает преимуществом двойной очистки СЕХ и метало-аффинной очистки. Она отличается формированием электростатических, отталкивающих и координирующих ковалентных связей при взаимодействии с белковыми видами. Ее разнообразная селективность обеспечивает превосходную обработку агрегатов и удаление различных видов примесей за один этап (бюллетень RP0033), в том числе агрегатов и фрагментов моноклональных антител, ДНК, НСПs, вирусов, эндотоксинов, и белка А. По сравнению с другими смолами смешанного типа СНТ обеспечивает лучшее восстановление мономера с минимальными уровнями агрегата при очистке некоторых mAb, таких как mAb S (Рисунок 4) (бюллетень 6749). Она может эффективно удалять агрегаты различных исходных образцов. В простом и эффективном, состоящем из одного этапа эксперименте было показано, что СНТ удаляет практически все продукты агрегации и деградации, обнаруженные в образце IgG4 человека (бюллетень 2940).

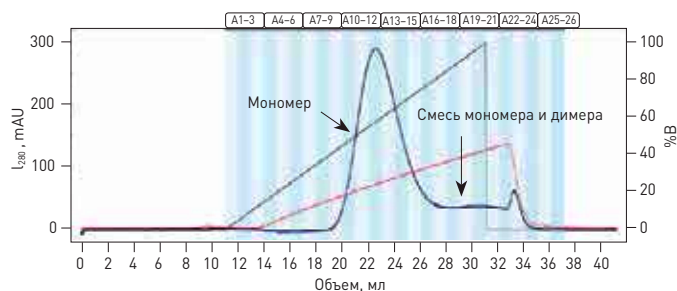


Рисунок 4. Удаление агрегатов mAb с СНТ. ОП 280 (—); проводимость (—), %В (—). Синие вертикальные линии показывают, где были собраны образцы.

Смола Nuvia™ cPrime™

Данная смола сочетает в себе гидрофобные и СЕХ взаимодействия, обеспечивая надежное восстановление при высоких скоростях потока в коммерческих производственных условиях. Размер ее частиц оптимизирован для обеспечения исключительных свойств потока, быстрого переноса массы и крайней стабильности. Будучи солеустойчивой смолой, она может быть эффективно использована для очистки mAb, чувствительной к соли и рН, с минимальным изменением исходных образцов. Были зафиксированы ее хорошие результаты очистки агрегатов препарата mAb из клеток CHO при работе с двумя другими смолами IEX, Nuvia S и Nuvia™ Q (бюллетень 6241).

Bio-Rad предлагает огромный выбор хроматографических смол для удаления агрегатов, которые поддерживают эффективность и безопасность продукта. Надеемся, что информация, представленная здесь, поможет вам в работе над вашей стратегией удаления агрегатов. 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).

СНТ удаляет практически все продукты агрегации и деградации, обнаруженные в образце IgG4 человека (бюллетень 2940).

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