



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

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



Растворы для очистки

Бюллетень 6881

Эффективное устранение мусорных ДНК с помощью наших универсальных технологических смол

Производство клеточной культуры рекомбинантных белков неизменно приводит к получению образца белка, загрязненного ДНК клетки-хозяина. Наличие такой загрязняющей ДНК приводит к увеличению вязкости исходного потока и способно негативно повлиять на последующие этапы очистки, такие как анионообменная хроматография. Более того, загрязнение клеточной ДНК создает терапевтический риск. Регулирующие органы требуют, чтобы уровень ДНК во всех образцах терапевтических белков и антител был снижен до 10-100 пг/доза. Процессы осветления клеточной культуры, такие как центрифугирование или тангенциальная поточная фильтрация (TFF), могут привести к небольшому удалению ДНК, однако одновременно создают условия для высокого сдвига, способные увеличить разрушение клеток и, как следствие, загрязнение. Кроме того, использование бензоназы или других нуклеаз может привести к загрязнению фрагментами ДНК вместо полноразмерной ДНК и потребовать последующего удаления нуклеазы. Более того, эти методы не поддерживают ДНК-связывающую активность некоторых белков, что может быть заявлено в качестве требования к процессу очистки. Хроматография же, в отличие от этого метода, позволяет избежать подобных проблем, что приводит к более качественному удалению ДНК из технологических потоков.

Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствуемый спектр хроматографических смол для очистки белков в промышленных количествах. В данном руководстве рассмотрены смолы, предназначенные для удаления загрязнения ДНК в ходе очистки белков (бюллетень 6810), очистки моноклональных антител (бюллетень 6875) и очистки иммуноглобулинов G (бюллетень 6793).

Смола для аффинной хроматографии

Смола UNOsphere SUPrA™ n

Данная смола предназначена для очистки моноклональных и поликлональных антител в технологических масштабах. Более высокая высота ее слоя может быть использована для увеличения времени удержания без чрезмерного увеличения давления, обеспечивая большую операционную свободу. Очистка с помощью аффинной смолы на основе белка А зачастую является первым шагом при очистке исходного потока, поскольку она может привести к >90% удалению ДНК и других загрязнений, таких как белки клеток-хозяев (HCP), при минимальной оптимизации буфера. Было отмечено, что смола UNOsphere SUPrA значительно снижает уровень загрязнения ДНК при очистке антител (Таблица 1) (бюллетень 5728).

Таблица 1. Обработка ДНК из клеточного экстракта при помощи различных смол.

| Этап очистки | Смола | DNA Content, ng/mg mAb ¹ | DNA Content, ng/mg mAb ² |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Надосадочная жидкость клеточной культуры | – | >5 x 10 ³ | >1.6 x 10 ⁵ |
| Захват | UNOsphere SUPrA | 18.6 | 19 |
| Промежуточный | UNOsphere™ Q | 3.5 | 1.9 |
| Полировка | СНТ™ Керамический гидроксипатит | 2.5 | 3 |

Ионообменные (IEX) хроматографические смолы

Ввиду того, что ДНК, как правило, отрицательно заряжена, смолы IEX могут быть использованы для ее отделения от целевых биомолекул с аналогичным или противоположным зарядом, используя соответствующие буферные условия.

Катионообменные смолы (CEX)

Смола Nuvia™ S

Nuvia Смола Nuvia S представляет собой смолу CEX следующего поколения со сверхвысокой емкостью, построенной на доказавшей свою эффективность технологии базового матрикса UNOsphere. Она обеспечивает очень высокий уровень захвата и исключительные проточные свойства, предназначенные для удовлетворения как текущих, так и будущих технологических потребностей. В ней присутствуют легкодоступные отрицательно заряженные группы для связывания биомолекул. ДНК клетки-хозяина не адсорбируется на этой матрице в нормальных условиях, так как оба отрицательных заряда отталкиваются друг от друга. Таким образом, ДНК выводится в процессе потока, а начальная колонка промывается, в то время как целевой белок связывается со смолой. Следовательно, режим связывания/элюирования может удалить из образца более трех порядков концентрации ДНК, как показано в таблице 2 (бюллетень 6241).

Анионообменные смолы (АЕХ)

Отрицательно заряженная ДНК связывается с положительными зарядами на данных лигандах и удерживается на колонке, в то время как целевая биомолекула оказывается в потоке. Смолы АЕХ обычно используются на промежуточных стадиях очистки после прохождения исходным потоком начального цикла очистки - захвата. Данные смолы не следует использовать на стадиях захвата из-за риска их насыщения связанной ДНК, что может привести к снижению ионной связывающей способности для других загрязняющих веществ.

Смола Nuvia Q

Смола Nuvia Q является смолой АЕХ ультра высокой емкости следующего поколения. Она обеспечивает высокую связывающую способность в широком диапазоне значений pH и скоростей потока, а также способна эффективно очищать загрязнение ДНК из сбора клеточной культуры углеводов на промежуточной стадии очистки mAb (Таблица 2).

Таблица 2. Обработка ДНК из клеточного экстракта углеводов при помощи различных смол.

| Этап очистки | Смола | DNA Content, ng/mg |
|--|----------------|-----------------------|
| Надосадочная жидкость клеточной культуры | – | 9.3 x 10 ⁴ |
| Захват | Nuvia S | 17 |
| Промежуточный | Nuvia Q | 4.1 |
| Полировка | Nuvia™ cPrime™ | <0.008 |

Смола UNOsphere Q

Смола UNOsphere Q является смолой АЕХ высокой емкости с высокой пропускной способностью на основе акриламида и виниловых мономеров, предназначенной для технологической хроматографии. Смола была разработана с порами большого диаметра и большой площадью поверхности, чтобы максимизировать скорость захвата, емкость макромолекул, восстановление и производительность. Она работает по тому же принципу удаления двухнитевой ДНК клетки-хозяина, что и Nuvia Q, и способна снизить уровень ДНК на несколько порядков концентрации во время очистки mAb при использовании на промежуточном этапе очистки (Таблица 1) (бюллетень 5728).

Среды/смолы смешанного типа

Смолы/среды смешанного типа сочетают в себе функциональность двух или более одномодалных смол. В результате своей многофункциональности смолы могут взаимодействовать с биомолекулами в нескольких режимах, что позволяет достичь большей чистоты при одновременном уменьшении количества этапов очистки. Эти смолы используют ортогональный подход к очистке с помощью IEX или хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) для трудноочищаемых биомолекул.

Смола Nuvia cPrime

Смола Nuvia cPrime разработана с использованием смешанного лиганда, который обеспечивает уникальный баланс между гидрофобными и заряженными характеристиками. Она эффективна для очистки существующих терапевтических белков, а также большого числа разнообразных конструкций, находящихся в стадии разработки, многие из которых не могут быть обработаны аффинным методом. Было доказано, что она крайне эффективна при очистке ДНК загрязнений из сбора клеточной культуры углеводов для очистки mAb на заключительном этапе полировки (Таблица 2) (бюллетень 6241).

Надеемся, что информация, представленная здесь, поможет вам в работе над вашей стратегией удаления загрязнения ДНК. 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 изучения.

Бензолаз является товарным знаком компании Мерк KGaA.

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 Таиланд 66 662 651 8311 ОАЭ 971 4 8187300 Великобритания 44 020 8328 2000

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