

Практическое руководство: Выбор наиболее подходящих смол для промышленной обработки и очистки вирусов млекопитающих

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



Растворы для очистки

Бюллетень 6790

Выбор всех смол для очистки вирусов млекопитающих в одном месте

В последние 35 лет биологические препараты, такие как моноклональные антитела (mAb) и рекомбинантные белки, а чуть позднее биоаналоги и улучшенные биотехнологические препараты превратились в мощные терапевтические средства и доказали свою эффективность в лечении различных заболеваний человека. Однако, ввиду наличия у каждого биологического продукта неотъемлемого риска переноса и/или размножения внешнего вирусного материала, успешное применение таких продуктов в организме человека зависит от возможности эффективно удалять любые вирусные загрязнители. С одной стороны, так как вирусы могут непосредственно заражать клетки млекопитающих и вызывать такие заболевания, как СПИД, инфекционный паротит, корь, герпес, гепатит, менингит и опоясывающий лишай, очистка биопрепаратов от вирусной составляющей имеет решающее значение для эффективности лекарственных средств на их основе. С другой стороны, очистка и изучение безвредных вирусов способны помочь в разработке профилактической и лечебной терапии. Одним из наиболее распространенных технологических этапов, включенных в схемы последующей очистки и обработки вирусов, является использование хроматографических смол. Смолы, в отличие от других традиционных методов, наряду с качеством и количеством очищенного вируса, сохраняют вирусную инфекционность и, следовательно, являются более предпочтительными средствами очистки.

Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствующийся спектр хроматографических смол для очистки биопрепаратов в промышленных количествах. В данном бюллетене приводится краткий обзор различных сред на основе апатита, которые могут быть эффективно использованы для очистки малых и средних вирусов. Эти простые в использовании смолы легко масштабировать и получать в результате работы концентрированный высокоактивный вирус. Смолы для очистки таких крупных и крайне сложных вирусов, как аденовирусы, описаны в бюллетене 6807 – Выбор наиболее подходящих смол для очистки аденовирусов.

Среда керамического гидроксипатита СНТ™ может использоваться с различными типами вирусов

Керамический гидроксипатит СНТ может быть использован для хроматографического отделения оболочечных и неразвитых вирусов различных размеров из разных источников и семейств, таких как денге, японский энцефалит, грипп, гепатит после мышинной лихорадки, аденовирус, полиовирус и кошачий калицивирус (Таблица 1).

Таблица 1. Разнообразные вирусы, очистка которых эффективна при помощи СНТ.

Вирус	Семейство	Род	Геном	Оболочка	Размер, нм
Денге	Flaviviridae	Flavivirus	Однонитевая РНК	+	50
Японский энцефалит	Flaviviridae	Flavivirus	Однонитевая РНК	+	50
Грипп	Orthomyxoviridae	Influenzavirus	Однонитевая РНК	+	80–120
Гепатит после мышинной лихорадки	Coronaviridae	Coronavirus	Однонитевая РНК	+	100–150
Аденовирус	Adenoviridae	Mastadenovirus	Однонитевая РНК	–	90
Полиовирус	Picornaviridae	Enterovirus	Однонитевая РНК	–	30
Кошачий калицивирус	Caliciviridae	Vesivirus	Однонитевая РНК	–	30–38

Стандартная процедура очистки вирусов при помощи СНТ

Типичный рабочий процесс промышленной очистки вируса при помощи СНТ состоит из 6 этапов (смотрите ниже), на каждом из которых предъявляются особые требования к буферам (Таблица 2). Хроматография выполнена в системе компании Bio-Rad BioLogic DuoFlow™. Колонки (4.6 x 35 мм, Sugiyama Shoji Co., Ltd., Япония) с 10 мкм фильтром-сепаратором были заполнены 40 мкм среды СНТ. В колонках был произведен запуск первичного экстракта.

Промывка

Выравнивание

Загрузка образца

Промывка

Элюирование

Промывка

Таблица 2. Стандартная процедура промышленной очистки вирусов.

Этап	Мобильная фаза	pH	Объем, мл
Промывка	600 мМоль фосфата натрия	7.2	5
Выравнивание	10 мМоль фосфата натрия	7.2	10
Загрузка образца	10 мМоль фосфата натрия	7.2	10
Промывка	10 мМоль фосфата натрия	7.2	10
Элюирование	Элюат градиента из 10–600 мМоль фосфата натрия	7.2	15
Промывка	600 мМоль фосфата натрия	7.2	5

Сохранение вирусной активности при использовании СНТ для хроматографической очистки

Вирусы, очищенные СНТ, были протестированы несколькими методами (Таблица 3) на сохранение вирусной активности. Результаты показывают, что СНТ способен очищать высокоактивный вирус. Анализ чистоты белковых загрязнений был выполнен с помощью УФ-поглощения при 280 нм и ДНС-ПААГ анализа, а загрязнение ДНК клеток-хозяев оценивалось с помощью комплекта реактивов для работы с одноклеточными ДНК Quant-iT PicoGreen.

Таблица 3. Методы проверки вирусной активности после хроматографии СНТ.

Методы проверки	Вирус
Реакция гемагглютинации (НА)	Денге, грипп, аденовирус
Метод бляшкообразования	Японский энцефалит
50% инфицирующая доза тканевой культуры калицивируса, (TCID ₅₀)	Полиовирус, кошачий калицивирус, гепатит после мышинной лихорадки

Компания Bio-Rad предлагает два вида сред СНТ, Тип I и Тип II, в различных размерах. Тип I обладает более высокой способностью связывать белки и кислотные белки, тогда как тип II связывает белки слабее, однако обеспечивает лучшее разрешение нуклеиновых кислот и некоторых белков. Мы также предлагаем Керамический гидроксифторapatит МРС™ и Керамический фторapatит СFT™, которые имеют несколько иные свойства по сравнению с СНТ. Каждая из этих смол ведет себя по-разному с разными вирусами в разных условиях. Следовательно, необходимо оптимизировать выбираемую смолу и сопутствующие условия для каждого очищаемого вируса.

Например, была произведена очистка вируса денге 2-го типа с использованием всех четырех апатитов. Выработка при помощи МРС составила всего 50% против ~80% выработки при использовании трех других апатитов. Кроме того, лучшее отделение вируса от примесей наблюдалось в среде СНТ типа II из-за большего размера ее пор (Рисунок 1). Важность выбора подходящей среды для конкретного вируса была также отмечена при использовании сред СНТ типа II и СFT типа II при очистке полиовируса. СНТ смогла восстановить 88% образцов, тогда как СFT- 102% вируса (Рисунок 2). Подробности данных экспериментов находятся в бюллетене 6549.

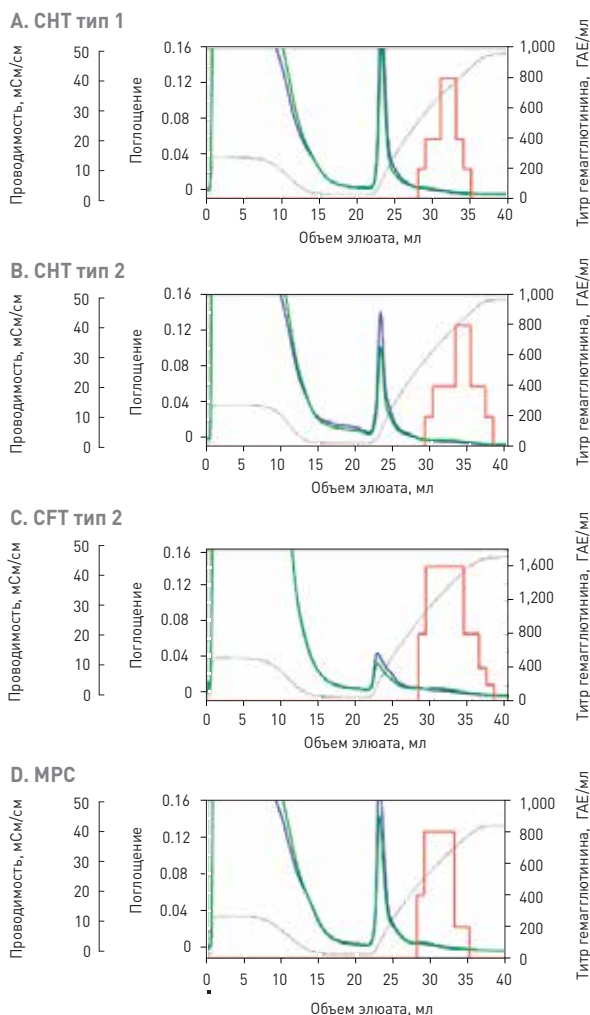


Рисунок 1. Сравнение четырех смол на основе апатита при очистке вируса денге второго типа 2. Поглощение ультрафиолета на 260 нм (—); поглощение на 280 нм (—); проводимость (—); вирусная активность в ходе реакции гемагглютинации (—).

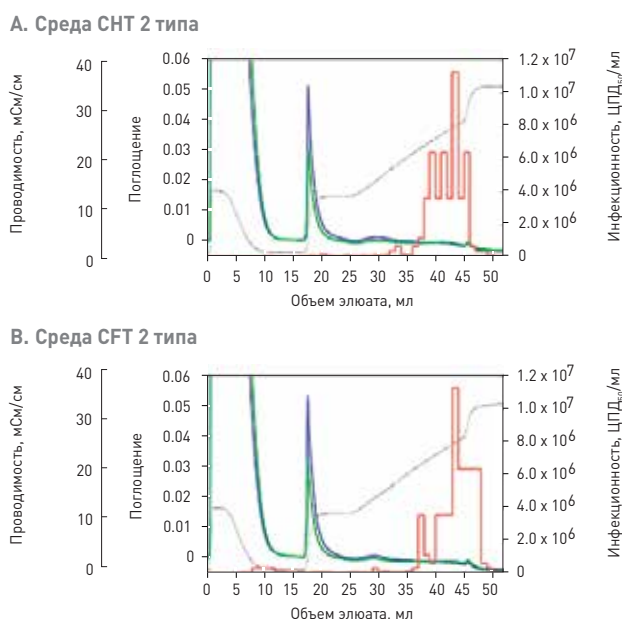
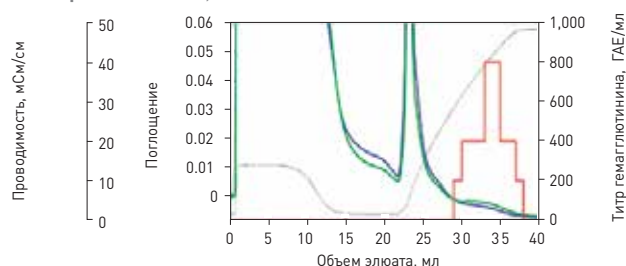


Рисунок 2. Сравнение четырех смол на основе апатита при очистке полиовируса. Поглощение ультрафиолета на 260 нм (—); поглощение на 280 нм (—); проводимость (—); вирусная активность в ЦПД₅₀ (—).

Выбор наилучших условий для проведения очистки вирусов при помощи сред на основе апатитов

Эффективность вирусной очистки с точки зрения времени и количества зависит от множества факторов, включая скорость потока и наклон солевого градиента. Доказано, что уменьшение скорости потока в десять раз (от 1,0 мл/мин до 0,1 мл/мин) улучшает резкость пиков элюции и, следовательно, выделение вируса денге 2-го типа. (Рисунок 3). Более подробная информация об очистке вирусов гриппа, гепатитита после мышинной лихорадки и японского энцефалита аналогичным способом на различных апатитовых средах, находится в бюллетене 6549.

А. Скорость потока 1,0 мл/мин



В. Скорость потока 0,1 мл/мин

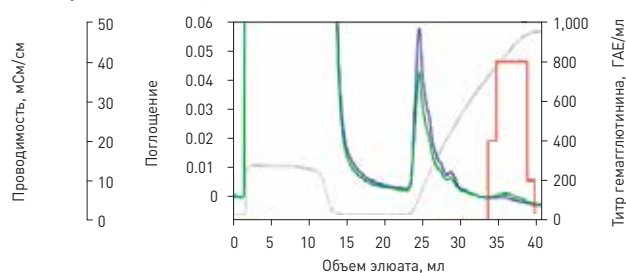


Рисунок 3. Отделение вируса денге второго типа при различных скоростях потока. Поглощение ультрафиолета на 260 нм (—); поглощение на 280 нм (—); проводимость (---); вирусная активность в ходе реакции гемагглютинации (—).

Гидроксиапатитовые среды также обеспечивают обработку вирусов в 0,6–3,5 порядка концентрации ДНК (Dove et al. 1990, Grun et al. 1992). Было доказано, что при обработке вирусов они иногда способны превзойти гель-хроматографию в 15 раз, ионообменную хроматографию в 75 раз и выпадение осадка в 150 раз (Dove et al. 1990). В частности, было доказано, что СНТ очищает до 4 порядка концентрации ДНК ксенотропного вируса мышинного лейкоза (x-MuLV) и 1-2 порядка концентрации ДНК мелкого вируса мышей (MVM) от образца антител (Snyder et al. 2009). Поэтому их можно расценивать как эффективные среды для обработки и очистки мелких и средних вирусов млекопитающих. Как упоминалось ранее, аденовирусы требуют использования других ионообменных смол и смол смешанного типа, таких как Nuvia™ cPrime™, Nuvia™ S (катионообменная смола, CEX), Nuvia™ Q (анионообменная смола, AEX), UNOsphere™ S (CEX) и UNOsphere™ Q (AEX). Использование данных смол для очистки аденовирусов подробно описано в бюллетене 6807.

Надеемся, что информация, представленная в данном бюллетене, поможет вам в работе над вашей стратегией промышленной очистки требуемых вирусов. 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

Dove GB et al. (1990). Альтернативы очистки моноклональных антител IgM (человека). Серия Симпозиум ACS 427, M.R. Ladisch et al., eds. (Вашингтон, Американское химическое общество), стр. 194–209.
Grun JB et al. (1992). Удаление/инактивация вирусов путем очистки биофармацевтических препаратов. *Biopharm* 5, 22–30.
Snyder MA et al. (2009). Усиление очистки вирусов на керамическом гидроксипатите с помощью полиэтиленгликоля. *J Sep Sci* 32, 4048–4051

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

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