

# Практическое руководство: Выбор наиболее подходящих смол для промышленной очистки моноклональных антител

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



## Растворы для очистки

Бюллетень 6875

Выстройте свою оптимальную стратегию очистки mAb при помощи наших разнообразных смол. Развитие технологии моноклональных антител (mAb) за последние 25 лет коренным образом изменило задачи, стоящие перед нами, и привело ко многим инновационным открытиям. Эти высокоспецифичные биологические продукты оказали значительное влияние на направление и прогресс как научных исследований, так и практической терапии. В научно-исследовательских целях mAb преимущественно производятся для выделения, идентификации и описания определенных белков. На терапевтическом фронте они показали свой потенциал при лечении таких заболеваний, как рак, хронические воспаления и инфекции. Столь широкое применение mAb превратило их очистку в одну из самых крупных и быстрорастущих сфер фармацевтической промышленности. Очистка mAb в значительной степени взаимосвязана с колоночной хроматографией. Однако каждая хроматографическая смола обладают определенными свойствами и работает в заданном диапазоне технических параметров, поэтому очистка mAb состоит из нескольких последовательных этапов с использованием двух или более смол. Часто эти стадии очистки называют захватом, промежуточным этапом и полировкой. Идеальная стратегия очистки для каждого mAb обычно выстраивается на основе нескольких критериев, включая его конечное ожидаемое использование и различные сложности, возникающие в ходе очистки, такие, к примеру, как затраты, жесткие условия элюирования, образование агрегатов, необходимость максимального восстановления мономера и желаемая чистота.

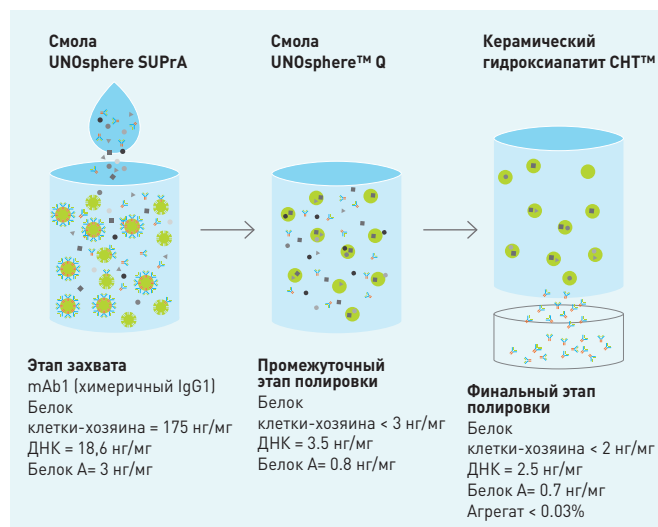
Компания Bio-Rad уже более 50 лет реализует постоянно совершенствуемый спектр хроматографических смол для очистки биопрепаратов в промышленных количествах. В данном руководстве рассмотрены различные смолы, которые могут быть использованы для промышленной очистки mAb, и специфические свойства, на основе которых эти смолы включены в данный список.

### Этап очистки захват

#### Смола UNOsphere SUPrA™

Первым шагом в очистке моноклональных антител является их захват из надосадочной жидкости клеточных гибридом. Аффинная хроматография на основе белка А на сегодняшний день является наиболее распространенным методом такого захвата. Смола UNOsphere SUPrA разработана для выполнения этого этапа очистки в промышленных количествах (Рисунок 1) на основе технологии микрокапсул UNOsphere™ в сочетании с лигандом рекомбинантного белка А, продуцируемым в *E. coli* при помощи реагентов, не содержащих компонентов животного происхождения. Она может выпускаться с большой высотой слоя для увеличения времени воздействия (а следовательно, улучшенного связывания mAb) на клеточный экстракт без чрезмерных скачков давления. Она может быть использована для элюирования узких профилей, требующих низких объемов буфера. Кроме того, элюирование можно проводить при относительно высоком уровне pH ( $\leq 11$ ), сводя к минимуму возможность образования агрегатов/осадка. Данная смола обычно обеспечивает восстановление целевого mAb >95%, а также показывает довольно качественную очистку белков клеток-хозяев (НСР) и ДНК. Эти возможности, наряду с другими ее техническими свойствами (бюллетень 5729), позволяли бы считать UNOsphere SUPrA идеально подходящей к использованию для очистки на этапе захвата (бюллетень 5728).

Однако одним из ограничивающих факторов ее использования в качестве единственной смолы для очистки является, в дополнение к относительно высокой стоимости белка А, отмеченное выщелачивание белка А из микрокапсул, что способно загрязнить образец.



**Рисунок 1.** Пример полного цикла очистки моноклонального антитела. Смола UNOsphere SUPrA применяется на этапе захвата, смола UNOsphere Q - на промежуточном этапе полировки, а СHT Ceramic Hydroxyapatite служила средой для финального этапа полировки.

### Смола Nuvia™ S

Эта высокоемкая сильная катионообменная смола обеспечивает устойчивость, требуемую для первоначального неаффинного захвата mAb (Ng and Snyder 2012; Рисунок 2), и разрешение, требуемое на промежуточном этапе полировки. Будучи хроматографической смолой на основе формулы смол Nuvia с четвертичными сульфогруппами, прикрепленными к полимерным поверхностным расширителям, она обладает превосходными динамическими характеристиками связывания в широком диапазоне уровней pH и проводимости, низким противодавлением при высоких скоростях потока, присущих современным последующим процессам обработки образцов. Высокие скорости потока дают дополнительное преимущество, снижая к минимуму воздействие антител на протеазы и нуклеазы, присутствующие в исходном потоке клеточной культуры. В некоторых случаях сульфогруппы обеспечивают лучшую адсорбцию mAb, чем смола UNOsphere™, которая имеет такую же основу, хотя и не имеет привитых к поверхности заряженных полимеров (Perez - Almodovar et al. 2012).

Благодаря своей высокой проводимости она обеспечивает последовательный захват mAb, несмотря на необходимость наличия значительного количества хлорида натрия в экспрессионных культурах млекопитающих, а также позволяет работать без предварительного кондиционирования или разбавления образцов непосредственно перед загрузкой колонки, что приводит к уменьшению размеров колонки и снижению капитальных затрат. Кроме того, это отличный инструмент для удаления фрагментов mAb и их агрегатов (бюллетень 5984).

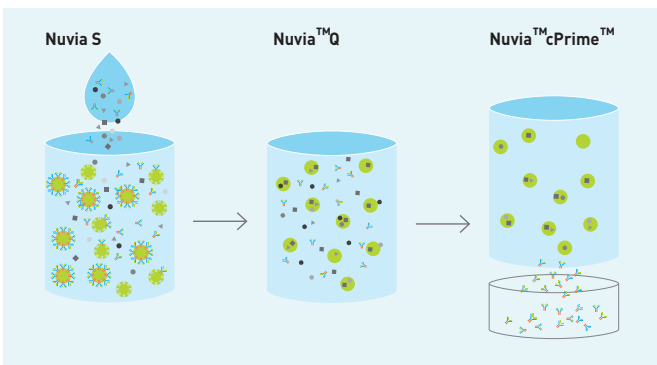


Рисунок 2. Первоначальный неаффинный захват mAb. Цикл очистки mAb: смола Nuvia S применялась на этапе захвата, Nuvia Q - на промежуточном этапе полировки, а Nuvia cPrime - на финальном этапе полировки.

### Промежуточный этап очистки

#### Смола UNOsphere QR

Ионообменная хроматография является обязательным этапом очистки mAb после этапа аффинного захвата белка А. Смола UNOsphere Q, будучи высокоемкой анионообменной смолой (АЕХ) с высокой пропускной способностью, прекрасно подходит для промежуточной очистки (Рисунок 1). Эта микрочастица отличается порами большого диаметра и высокой площадью поверхности для обеспечения максимальной скорости захвата примесей (НСР и ДНК) из элюата захвата или исходного сырья, что позволяет достичь высокого уровня целевого восстановления и производительности. Она обеспечивает связывающую способность 125-180 мг белка/мл смолы в линейном диапазоне скоростей 150-1200 см/час.

В зависимости от конечной цели очистки, допускается ее использование совместно со смолой СЕХ (Бюллетень 5735) для получения более качественных результатов (Tugcu et al. 2008).

#### Смола Nuvia Q

Данная смола АЕХ ультравысокой емкости предназначена для использования на промежуточном этапе и на этапе полировки при очистке моноклональных антител (Рисунки 2 и 3), как в аффинных, так и в неаффинных процессах. Ее четвертичные аминогруппы, прикрепленные к запатентованному полимерным поверхностным удлинителям на базовой матрице Nuvia, обеспечивают лучшую в своем классе динамическую связывающую способность в широком диапазоне уровней pH и скоростей потока. Большинство моноклональных антител обладают щелочной изоэлектрической точкой, поэтому не связываются смолами АЕХ. Таким образом, смола АЕХ идеально подходит для связывания с такими загрязнителями (бюллетень 6745), как отрицательно заряженные НСР и ДНК клеток-хозяев, а в процессе потока может быть получена более чистая фракция несвязанного mAb.

#### Смола Nuvia™ HR-S

Смола СЕХ с высоким разрешением может быть использована как на промежуточных, так и на конечных этапах полировки при очистке в различных рабочих процессах (Рисунок 3). Она также основана на технологии микрочастиц Nuvia и превосходно подходит для масштабирования при крупномасштабном последующем производстве. С ее помощью можно достичь отличного разделения близкородственных биомолекул и высокомолекулярных примесей, таких как агрегаты mAb, тем самым увеличив степень восстановления мономеров (бюллетень 6439).

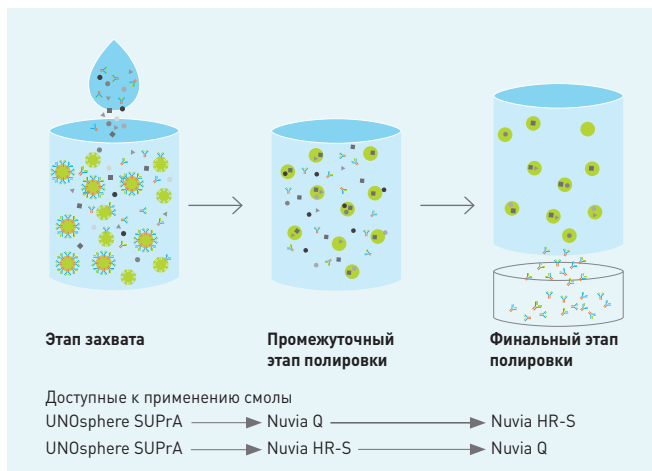


Рисунок 3. Доступность различных смол при очистке mAb.

### Этап очистки полировка

#### Среды керамического гидроксипатита СНТ

Керамический гидроксипатит СНТ идеально подходит для использования как на промежуточном, так и на финальном этапе полировки при очистке mAb (Рисунок 1). Она обладает уникальной селективностью, позволяющей обрабатывать смеси, которые кажутся однородными для других сред. Будучи средой смешанного типа, СНТ обладает двойным преимуществом СЕХ и металл-аффинной очистки. Она сочетает в себе положительно заряженные центры кальция для аффинного связывания и отрицательно заряженные фосфатные группы для взаимодействия СЕХ. Ее улучшенная селективность позволяет выполнять самую качественную обработку агрегатов среди

сред смешанного типа, а также очищать присутствующие в образцах многочисленные примеси, такие как фрагменты mAb, ДНК, НСПС, вирусные частицы, эндотоксины и белок А, всего за один этап (бюллетень RP0033). По сравнению с другими смешанными смолами СНТ обеспечивает лучшее восстановление мономера (бюллетень 6749) при меньшем объеме элюата (Таблица 1).

**Таблица 1.** СНТ показывает наилучший уровень восстановления мономера mAb по сравнению с двумя сходными смолами.

Среда	Содержание мономера mAb S, %	Восстановление мономера mAb S, %	Объем элюата, (Объем колонки)
СНТ	99.5	82.7	5
Capto adhere	99.5	48.8	14
Capto adhere ImpRes	99.5	61.7	14

### 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 pH, с минимальным изменением исходных образцов. Nuvia cPrime обладает более высоким сродством с полноразмерными mAb, относящимися к технологическим примесям и побочным продуктам и поэтому идеально подходит для этапа полировки при очистке mAb (Рисунок 2). Она может быть использована при очистке mAb, которые не могут быть обработаны аффинным методом. В таких неаффинных процессах она наилучшим образом очищает белки НСП и двухнитевые ДНК клетки-хозяина, а также снижает к минимуму содержание агрегатов (бюллетень 6241).

**Таблица 2.** Nuvia cPrime обеспечивает устойчивое восстановление mAb при высоких скоростях потока.

Скорость потока, м/час	DBC, 10% VT, mAb X, мг/мл	% восстановления
150	40	88%
200	33	85%
250	30	80%

DBC, динамическая связывающая способность; VT, всплеск.

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

### Список источников

- Ng PK and Snyder MA (2012). pH-катионообменная хроматография при захвате и элюировании моноклональных антител. *J Sep Sci* 35, 29–35.
- Perez-Almodovar EX et al. (2012). Многокомпонентная адсорбция моноклональных антител на макропористых и полимерных привитых катионообменных смолах. *J Chromatogr A* 1264, 48–56.
- Tugcu N et al. (2008). Максимизация производительности на различных этапах хроматографии при очистке моноклональных антител. *Biotechnol Bioeng* 99, 599–613.

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