



Комплексное решение для очистки белка и количественного определения агрегации с помощью центрифугирования

Юлия П. Лучано-Чади (Julia P. Luciano-Chadee)¹

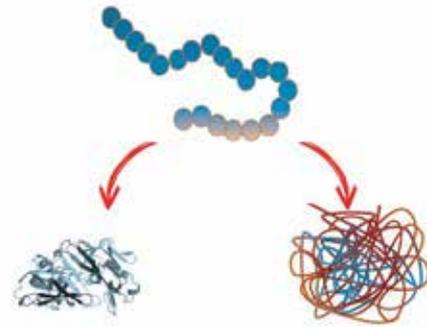
¹Beckman Coulter, Inc., Индианаполис, штат Индиана, 46268

Введение

Агрегация белка – это биологический процесс, вызванный атипичным взаимодействием дестабилизированных белков.¹ Характеризация поведения белковых молекул в растворе имеет решающее значение, так как дестабилизированные белки подвержены химическим и физическим изменениям, приводящим к потере их функциональности. Самое главное, что при разработке лекарственных препаратов на основе белковых молекул даже минимальные количества агрегатов могут вызывать вредные эффекты из-за потенциального изменения эффективности биофармацевтических препаратов и формирования нежелательного иммунного ответа у пациентов.² Кроме того, растущее число биосимиляров требует строгих регуляторных процедур, которые должны надлежащим образом рассматривать анализ качества продукции, проводимый биофармацевтическими компаниями.³

Многие факторы могут влиять на поведение и агрегацию белков, включая температуру, окисление, концентрацию, pH, ионную силу, добавки, детергенты, криопротекторы, циклы замораживания-оттаивания, а также условия хранения и обработки.

Центрифугирование представляет собой универсальный метод для выделения белков и характеристики готовых белковых препаратов.⁴ Линейка центрифуг производства компании Beckman Coulter Life Sciences позволяет проводить качественное разделение и анализ белка на современном уровне, предлагая пользователям комплексные решения, с помощью которых можно выполнять процесс от начала до конца. Организация рабочего процесса на основе центрифугирования может быть очень эффективной, поскольку она позволяет систематически удалять агрегаты путем использования методик выделения в градиентах плотности при варьирования плотности градиентов и ускорений.



Несвернутая полипептидная цепь распадается с образованием правильно свернутой трехмерной структуры белка. И наоборот, если ключевые взаимодействия не сформированы, нестабильный белок может агрегировать и образовывать скопления

Грубая очистка клеточных лизатов и отделение белковых преципитатов с помощью центрифугирования

Перед изучением белковых агрегатов выполняется очистка белковых препаратов⁵. Как правило, белки сверхэкспрессируются в организме, например, в бактериях, дрожжах или культуре клеток млекопитающих. Характеристики, уникальные для каждого белка, такие как аминокислотный состав, размер, форма, изоэлектрическая точка и растворимость, используются для разработки уникальных стратегий выделения целевого белка. Цель состоит в том, чтобы выделить наибольшее количество исследуемого функционального белка с наименьшим количеством других контаминирующих веществ. Центрифугирование является важным и зачастую первым шагом в любом протоколе очистки белка. Серия высокоскоростных центрифуг Avanti JXN имеет ряд роторов, которые могут облегчить проведение любой стадии очистки белка. Широкий выбор роторов с различными комбинациями объема и ускорения, а также возможность смены буферных растворов для обеспечения стабильности белков делает центрифугу Avanti JXN универсальным прибором, который способен удовлетворить потребности широкого спектра протеомных исследований. Очистка белка с помощью центрифугирования является надежным, воспроизводимым, зарекомендовавшим себя методом..

Отделение белковых молекул от агрегатов методом препаративного ультрацентрифугирования

Хорошо известно, что центрифугирование представляет собой универсальный и общепринятый метод для разделения неочищенной смеси клеточных компонентов.^{4,5} Кроме того, ультрацентрифугирование в градиентах плотности является основным методом разделения и анализа исследуемых белков на основе размера и массы⁶. При центробежном вращении под действием определенной гравитационной силы молекулы перемещаются сверху вниз по раствору в пробирке. Это движение уравнивается плотностью и вязкостью жидкости или выталкивающей силой. В состоянии равновесия суммарный эффект гравитационных и выталкивающих сил приводит к накоплению специфических белков в определенной точке пробирки, при этом происходит отделение белков от агрегатов с различными коэффициентами осаждения⁶. Более плотные агрегированные белки движутся быстрее, чем более легкие отдельные белковые молекулы.

Градиенты для зонально-скоростного центрифугирования формируются путем последовательного наслаивания полос различной плотности. При использовании наиболее распространенного метода аликвоту менее плотного раствора сначала дозируют с помощью пипетки в центрифужную пробирку и последовательно вводят более плотные растворы в нижнюю часть пробирки, используя длинный шприц, чтобы не нарушать предыдущие слои, оставляя резкую границу раздела между слоями различной плотности. При альтернативном подходе слои с более низкой плотностью осторожно размещают поверх более плотных растворов. Непрерывный градиент также может быть получен из прерывистого градиента путем инкубации или центрифугирования раствора в течение предварительно установленного периода времени или с использованием коммерческого устройства для создания градиента. Третий метод, изопикнического ультрацентрифугирования, включает длительное центрифугирование смеси градиента и целевых молекул до достижения равновесия, что приводит к точному разделению молекул. При использовании всех этих методов раствор диффундирует таким образом, что происходит постепенное увеличение плотности от нижней до верхней части пробирки.

После образования градиента небольшой объем раствора, содержащего белковую смесь, помещают поверх градиента плотности. Во время вращения ротора белки проходят через градиент и разделяются в соответствии с их коэффициентами осаждения, причем белковые агрегаты осаждаются быстрее, чем отдельные исследуемые белковые молекулы. Время и скорость центрифугирования определяются эмпирическим путем.

После центрифугирования отделенные белки обычно собирают посредством прокола нижней части пробирки и сбора фракций по каплям, или вручную, извлекая фракции пипеткой из мениска. Для оценки содержания белка в каждой фракции могут быть выполнены биохимические или функциональные методы определения.

Кроме отделения агрегатов типичной задачей при исследовании и разработке терапевтических белков является очистка белок-лигандных комплексов. Серия ультрацентрифуг Optima XPN включает препаративные центрифуги, совместимые с множеством роторов и расходных материалов, подходящих для различных протоколов очистки и выделения белков. Общепринятым методом разделения белков является гель-фильтрационная хроматография (SEC).⁴ По сравнению с центрифугированием SEC требует большого коэффициента разбавления, отсутствие взаимодействия между молекулами белка и носителем (эффектов матрицы), а также обладает более низким разрешением. Центрифугирование в градиенте плотности является предпочтительным методом, поскольку оно позволяет пользователям настраивать параметры для эффективного разделения, регулируемого законами термодинамики. Параметры можно изменять для всех белков после выбора оптимальных настроек времени центрифугирования, скорости и условий градиента.⁷

Окисление белков на границе раздела воздуха и жидкости также может привести к увеличению агрегации.^{1,4,5} Для сепарации методом SEC необходимо использовать большие количества восстановителя в буферных растворах, что может увеличить затраты на эксперимент. Кроме того, типичный буферный раствор хранится во флаконах с большим объемом среды при увеличении площади поверхности раздела воздуха и жидкости. Герметичность пробирок Opti-Seal и Quick-Seal, совместимых с ультрацентрифугами Beckman Coulter, минимизирует границу раздела воздуха и жидкости, что приводит к большей стабильности белкового препарата и уменьшению агрегации. Более того, центрифугирование позволяет обойтись без использования меток слияния, которые могут существенно повлиять на растворимость белка, что является распространенным недостатком методов очистки белков на основе хроматографии.⁸



Препаративная ультрацентрифуга серии Optima XPN

Исследование белковых агрегатов с помощью аналитического ультрацентрифугирования

Как обсуждалось выше, применение метода SEC в качестве инструмента сепарации имеет серьезные недостатки, в том числе значительное разбавление и влияние матрицы. Поэтому данный метод не является оптимальным для критической оценки размера частиц и агрегации белковых продуктов. Кроме того, он требует использование стандартов для определения молекулярной массы, что вводит дополнительную переменную, увеличивающую допустимую погрешность и потенциальную ненадежность метода SEC.⁹

Анализ белковых препаратов с помощью аналитического ультрацентрифугирования (AUC) предоставляет пользователям больше данных, чем любой сопоставимый метод. AUC является самым точным и высокоэффективным инструментом¹⁰ для количественной оценки агрегации белка. Это абсолютный метод, который опирается на основную принципиальную физическую модель для определения молекулярной формы, массы и комплексообразования с высоким разрешением в широком диапазоне молекулярных масс образцов и концентрации буферных растворов.

Возможность варьировать буферный раствор в широком диапазоне крайне важно - его состав (pH, ионная сила, добавки и т. д.) имеет наибольшее значение, так как он напрямую влияет на стабильность белка.^{7,8,9,10} Метод AUC используется при скрининге потенциальных молекул-кандидатов, разработке и характеристике биотерапевтических препаратов и оценки их стабильности.¹¹ Использование AUC в отделах контроля качества биофармацевтических предприятий может способствовать эффективному выявлению возможного нежелательного иммунного ответа на препараты на основе белков или на биоаналоги. Новая центрифуга Optima AUC расширяет возможности метода аналитического ультрацентрифугирования, и предоставляет точные параметры седиментации макромолекул и характеристики их агрегирования.

Список литературы

1. Philo JS, Arakawa T. Mechanisms of protein aggregation. *Current Pharma Biotech* 2009;10:348-51.
2. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS Journ* 2006;8(3):E501-07.
3. Niazi SK. *Biosimilars and Interchangeable Biologics: Tactical Elements*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2016.
4. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. Section 3.5, Purifying, Detecting, and Characterizing Proteins. 4th ed. New York (NY): W.H. Freeman; 2000.
5. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. Section 4.1, The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. 5th ed. New York (NY): W.H. Freeman; 2002.
6. Graham JM. *Biological Centrifugation*. 1st ed. Oxford (UK): Bios Scientific Publishers Ltd; 2001.
7. Berkowitz, SA. Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals. *AAPS Journ* 2006;8(3):E590-E605.
8. Louis JM, McDonald RA, Nashed NT, et al. Autoprocessing of the HIV-1 protease using purified wild-type and mutated fusion proteins expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1991;199:361-69.
9. Gabrielson JP, Arthur KK, Stoner MR, et al. Precision of protein aggregation measurements by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation in biopharmaceutical applications. *Anal Biochem* 2009;396:231-41.
10. Arthur KK, Kendrick BS, Gabrielson JP. Chapter Twenty - Guidance to achieve accurate aggregate quantitation in biopharmaceuticals by SV-AUC. *Methods Enzym* 2015;562:477-500.
11. Pekar A, Sukumar M. Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: practical considerations that affect precision and accuracy. *Analyt Biochem* 2007;367(2):225-37.



Не для применения в медицинских целях.

© 2020 Beckman Coulter, Inc. Все права защищены. Название Beckman Coulter, стилизованный логотип, а также знаки продукции и услуг Beckman Coulter, упомянутые в настоящем документе, являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками компании Beckman Coulter, Inc. в США и других странах. Все остальные торговые знаки являются собственностью соответствующих владельцев. Продукты, перечисленные в данном документе не предназначены и не валидированы для медицинского применения.

ООО "Бекмен Культер", представительство Beckman Coulter Life Sciences
ул. Станиславского, д. 21, стр. 3, Москва, Россия, 109004.
тел. +7 (495) 228 67 00, эл. почта: ls-russia@beckman.com, mybeckman.ru

CENT-2269WP01.17