



JSR Life Sciences

Очистка фрагментов антител и однодоменных антител с использованием смолы белка А – Amsphere A3

Помимо использования для антител и конструкций содержащих Fc фрагмент, смола белка А Amsphere™ A3 может использоваться для очистки фрагментов антител различного формата: VHH однодоменные антитела (sdAbs), конструкции содержащие VH3 домен, такие как антиген-связывающий фрагмент (Fabs) и различные гибридные белки такие как одноцепочечный переменный фрагмент (scFvs).

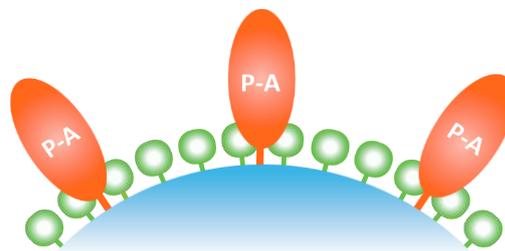
Данное указание по применению содержит основную информацию которая касается использования Amsphere A3 для аффинной очистки VHH sdAbs и фрагментов антител которые содержат VH домен, но не содержат Fc фрагмент. Представлены рекомендации по проведению экспериментов. Руководство по эксплуатации Amsphere A3 содержит более подробную информацию по использованию смолы.

Справочная информация

Из-за отсутствия Fc участка фрагменты антител не могут аффинно связываться с большинством лигандом белка А, стабильных в щелочной среде. Однако лиганд белка А Amsphere A3 проявляет высокую аффинность к VHH однодоменным антителам и Fabs. Была определена кристаллическая структура комплекса VHH-PrA и определены аминокислоты, участвующие в связывании VHH. Все эти участки также в VHH домене Fab классического антитела. Это дает веские основания полагать аналогичный механизм связывания для VHH и VH доменов.

Чтобы получить более подробную информацию обратитесь к нашему докладу «Purification of antibody fragments and single domain antibodies with Amsphere A3 Protein A resin» на сайте JSR Life Sciences (www.jsrlifesciences.com).

Amsphere A3



Amsphere A3 – это новая смола на основе белка А, разработанная с использованием поверхностно-модифицированной основы и модифицированного, стабильного в щелочной среде лиганда.

Лиганд белка А

высокая динамическая обменная емкость (DBC) благодаря контролируемой конформации (постоянной) и ориентации
Высокая щелочная стабильность благодаря белковой инженерии

Поверхностная модификация

Низкий уровень загрязнения (НСП) благодаря гидрофилизации поверхности

Состав основы

Высокий уровень DBC при высокой скорости потока
Постоянная скорость потока и устойчивость к колебаниям давления благодаря жесткому сшиванию

Рекомендации по правилам очистки

Стандартные правила для аффинной хроматографии с белком А, используемые для mAbs, могут также использоваться для фрагментов антител. Некоторые важные моменты для очистки фрагментов антител описаны в этой главе.

Уравновешивание колонки и загрузка исходного

Для уравновешивания можно использовать обычный буфер с нейтральным рН, например, натрия фосфат или трис-НСl. При использовании колонки после длительного хранения рекомендуется до начала использования выполнить холостой пуск с последующей очисткой.

Для ряда VH и VHH sdAbs были протестированы различные условия связывания. Не было обнаружено значительных отличий в DBC в диапазоне рН (6.8 – 7.6), проводимости (5 – 45 мСм/см), времени удерживания (2 – 6 минут) и титров (0.1 – 4.2 г/л). Использование восстановителя (100 мМ тиоглицерол) при HCCF также не влияет на DBC.

Было установлено, что связывание фрагмента Fab, полученного расщеплением Трастузумаба папаином, является зависимым от соли. Поэтому рекомендуется использовать условия с низкой проводимостью (< 5.0 мСм/см) для начального изучения связывания мишеней связанных с VH доменом, и в последствии исследовать условия с более высокой проводимостью.

Стадия промывки

После того, как связывание было подтверждено, как описано в предыдущей главе, может быть оптимизирована стадия промывки для улучшения удаления НСР (и в некоторых случаях ДНК). Для VHH sdAbs можно использовать стадию промывки с высоким содержанием соли, без потери продукта.

Элюирование

Целевой продукт, связанный со смолой, может быть элюирован кислым буфером (рН 2.7-4.0). Нами были получены выходы больше 95% при объеме элюирования $\leq 3 CV$ для глицин-НСl (100 мМ; рН 2.7), цитрата натрия (50 мМ; рН 3.2) и ацетата натрия (50 мМ; рН 3.0). Для определения оптимального рН для элюирования, необходимо изучить линейный градиент рН для небольшого объема.

Кислотное вытеснение, очистка и дезинфекция

После элюирования колонку можно дополнительно промыть кислотными буферами для удаления остаточных белков или примесей. Для этого можно использовать уксусную кислоту, соляную кислоту, фосфорную кислоту (рН 1.5 – 3.0; 20 – 200 мМ).

Для очистки Amsphere A3 можно использовать щелочной раствор, например, 0.1 - 0.5 М NaOH. Также можно использовать другие буферы, содержащие широко распространённые химические реагенты, такие как ПАВ, органические растворители, органические и неорганические соли. Несмотря на то, что Amsphere A3 обладает высокой щелочной стабильностью продолжительное время контакта с щелочными буферами приводит к уменьшению DBC. Следовательно, необходимо незамедлительно уравновесить колонку после очистки.

В таблице 1 представлен обзор результатов по химической стабильности при различных концентрациях относительно времени воздействия. В зависимости от желаемого режима очистки и дезинфекции, продолжительность службы смолы (в количестве циклов) может быть рассчитана на основе данных в таблице. Для определения конечной точки для срока службы смолы используется степень сохранения DBC на уровне 80% от первоначальной.

ТАБЛИЦА 1: ДАННЫЕ ЩЕЛОЧНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ для Amsphere A3. ВРЕМЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ для РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НАТРИЯ ГИДРОКСИДА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОТОРЫХ DBC для ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ Ig ПРИ ВРЕМЕНИ УДЕРЖИВАНИЯ 4 МИН СОХРАНЯЕТСЯ 90 И 80 % ОТ НАЧАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ.

NaOH КОНЦЕНТРАЦИЯ (моль/л)	ВРЕМЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ 22 °C (HRS)	
	СОХРАНЕНИЕ 90% DBC	СОХРАНЕНИЕ 80% DBC
0.1	106	162
0.2	37	68
0.5	18	27

Хранение

Amsphere A3 поставляется в 50 мМ буфере натрия фосфата с 16% (об) этанола. Должен храниться при температуре от 2 – 8 °C и не замораживаться. Для хранения колонки заполненной Amsphere A3, промыть колонку буфером с нейтральным pH и содержанием 16 – 20 % (об) этанола и хранить при 2 – 8 °C. Также вместо этанола можно использовать 2 % раствор бензилового спирта.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ – ПРИМЕРЫ

Для VHH sdAbs было проверено более 100 молекул, 99% из которых показали связывание с Amsphere A3.

Что касается связывания VH, экспериментальные и литературные данные показывают, что значительное связывание белка A с VH ограничено молекулами подсемейства VH3 человека, без каких-либо примеров из других семейств генов.

DBC

В таблице 2 показаны примеры значений DBC полученных для фрагментов антител с различной степенью сложности с точки зрения количества связанных доменов. Так как такие молекулы имеют меньший гидродинамический радиус чем mAbs, они диффундируют быстрее в и из пор частиц. Поэтому, для маленьких молекул, DBC не возрастает с увеличением времени удерживания более 2 мин.

ТАБЛИЦА 2: ОЖИДАЕМЫЙ ДИАПАЗОН ЗНАЧЕНИЙ DBC для Amsphere A3 для ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ и sdAbs с РАЗЛИЧНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МАССАМИ.

ТИП ЦЕЛЕВОЙ МОЛЕКУЛЫ	МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА (kDa)	МАКСИМАЛЬНЫЙ DBC (г/л)	ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ (мин)
Моновалентный VH/VHH	12 - 20	30	2
Бивалентный, тривалентный, тетравалентный VH/VHH	30 - 60	35	2
Более высокая сложность сшитых Ab доменов	60 - 100	50	4

В сравнении с полноразмерными mAbs, значение емкости масса на объем смолы (г/л) для моновалентных и бивалентных VNHs более чем в 2 – 3 раза ниже. Тем не менее, в молярном соотношении можно ожидать, что в 3 – 4 раза больше моновалентных VNHs присоединится к белку А.

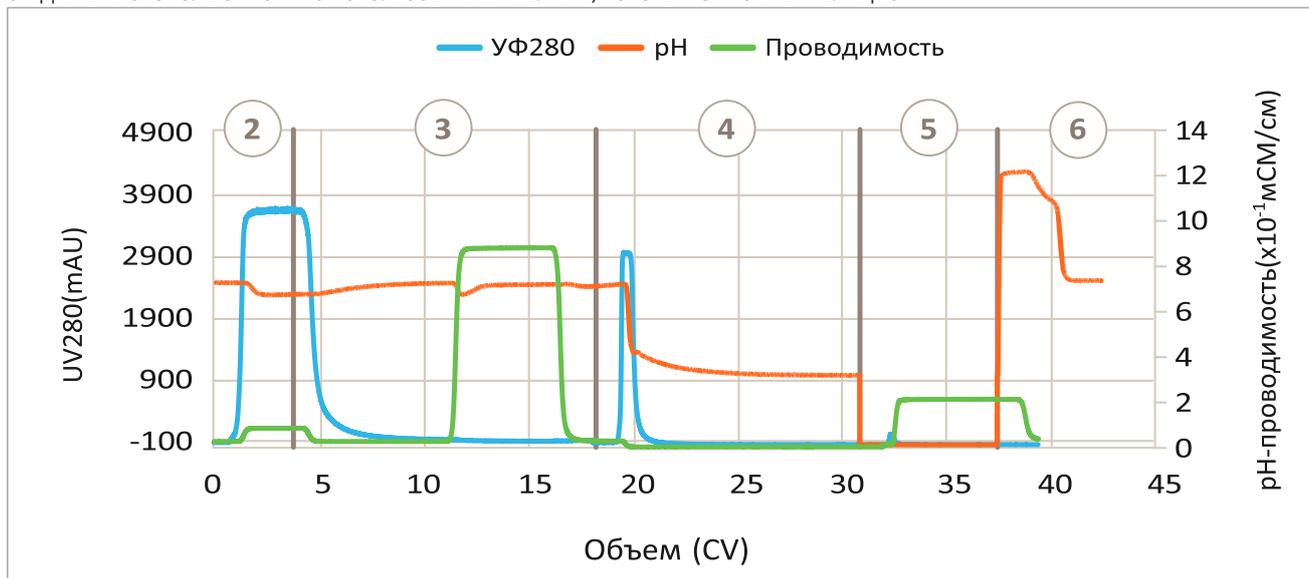
Очистка от примесей

Рисунок 2 и таблица 4 демонстрируют пример хроматографической производительности при очистке серии VNH с использованием Amsphere A3. Условия используемые при очистке сведены в таблицу 3.

ТАБЛИЦА 3: ПРОТОКОЛ ИСПОЛЪЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ VNH С ИСПОЛЪЗОВАНИЕМ Amsphere A3. (*): НССФ = ОСВЕТЛЕННЫЙ ИСХОДНЫЙ РАСТВОР VNH sdAb (*PICHA PASTORIS* СУПЕРНАТАНТ) С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 4.1 г/л – рН 6.9 И 8.8 мСМ/см. (**): рН МЕТР ОТКЛЮЧЕН.

	СТАДИЯ	РАСТВОР – БУФЕР	СКОРОСТЬ ПОТОКА (см/ч)	ВРЕМЯ ПРЕБЫВАНИЯ (мин)	ОБЪЕМ (CV)
1	Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	300	1.0	5.0
2	Загрузка	VNH НССФ (*)	100	3.0	3.2
3	Промывка 1	20 мМ натрия фосфат рН 7.5			7.0
	Промывка 2	20 мМ натрия фосфат; 1.0 М NaCl; рН 7.5			5.0
	Промывка 3	20 мМ натрия фосфат рН 7.5			3.0
4	Элюирование	50 мМ натрия ацетат рН 3.0			
5 (**)	СIP Часть 1	0.1 М NaOH (замещение элюирующего буфера)	150	2.0	3.0
	СIP Часть 2	0.1 М NaOH (15 мин. время контакта)	55	5.5	3.0
6	Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	300	1.0	5.0

РИСУНОК 1: ОЧИСТКА VHh sdAb С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ Amsphere A3. ГОЛУБАЯ: УФ 280. ОРАНЖЕВАЯ: pH. ЗЕЛЕНЬ: ПРОВОДИМОСТЬ (мСМ/см). ЭКСПЕРИМЕНТ БЫЛ ПРОВЕДЕН НА АКТА™ AVANT 25 ОТ GE HEALTHCARE НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПОДГОТОВЛЕННОЙ КОЛОНКЕ ОТ REPLIGEN С 1 мл Amsphere A3 (0.5 см ДИАМЕТР; 5.0 см ВЫСОТА СЛОЯ). НОМЕРА В ВЕРХНЕЙ ЧАСТИ ГРАФИКА СООТНОСЯТСЯ С НОМЕРАМИ СТАДИЙ В ПРОТОКОЛЕ ОЧИСТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКА А, КОТОРЫЙ ОПИСАН В ТАБЛИЦЕ 3.



Результаты представленные в таблице 4 демонстрируют низкий объем элюирования при хорошем извлечении белка и хорошей очистке примесей. Удаление НСР и ДНК аналогично ранее описанным значениям при аффинном захвате Ig (2 – 3 LRVs).

ТАБЛИЦА 4: РЕЗУЛЬТАТЫ ОЧИСТКИ ДЛЯ УСЛОВИЙ ОПИСАННЫХ В ТАБЛИЦЕ 3, ХРОМАТОГРАММА КОТОРОГО ПРЕДСТАВЛЕНА НА РИСУНКЕ 1. ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ БЫЛ ИСПОЛЬЗОВАН НАБОР *PICHA PASTORIS* 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ НСР ELISA KIT (CYGNUS TECHNOLOGIES, KAT. № F640).

ПАРАМЕТР	ЗНАЧЕНИЕ	ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ
Загрузка колонки	13	г/л
Объем элюирования	1.6	CV
Извлечение	98	%
НСР LRV	2.7	Log

Список сокращений

Ab: антитело	kDa: килодальтон
CIP: Очистка	LRV: логарифмическое уменьшение значения
CV: Объем колонки	mAb: моноклональное антитело
DBC: Динамическая обменная емкость	MW: Молекулярная масса
Fab: Антиген-связывающий фрагмент	scFv: одноцепочечный вариабельный фрагмент
Fc: Кристаллизующийся фрагмент	sdAb: однодоменное антитело
НССФ: Собранная культуральная жидкость	VH: вариабельный фрагмент тяжелой цепи
НСР: Белки клетки хозяина	VH3: вариабельный домен тяжелой цепи семейства генов 3
IgG: Иммуноглобулин G	VHh: Вариабельный домен тяжелой цепи антитела



JSR Life Sciences

Amsphere™ является глобальной торговой маркой JSR Corporation

©2017 JSR Corporation – Все права защищены .

Больше информации на www.jsrlifesciences.com

ЕВРОПА

JSR Life Sciences JSR Micro NV
Technologielaan 8
3001 Leuven
Belgium
+32-16-668-721 bioprocess.eu@jsrlifesciences.com

СТРАНЫ ЕАЭС

ООО «АКА-Лоджик»
143405, Московская область, г. Красногорск, Ильинское
шоссе, 1А, этаж 6, пом. 14.2
Тел.: +7 (969) 077-72-72
E-mail: info@aka-logic.ru