

Аффинный хроматографический сорбент:

RUselect-P

(протеин А –полиакрилат)

Оглавление

1.	Область применения продукта	4
2.	Технические параметры продукта.....	4
3.	Зависимость динамической связывающей ёмкости сорбента RuSelect-P (DBC10) от времени удерживания.....	5
4.	Зависимость пропускной способности сорбента RuSelect-P от давления в хроматографической системе.	5
5.	Изменение динамической ёмкости сорбента RuSelect-P после санации.....	6
6.	Порядок действий при работе с афинным сорбентом RUselect-P.....	6
6.1	Упаковка колонны.	6
6.2	Уравновешивание.	6
6.3	Нанесение образца.....	6
6.4	Промывка.	7
6.5	Элюция.	7
6.6	Санация. СІР («очистка-на месте»).....	7
7.	Хранение.....	8

1. Область применения продукта

Аффинный сорбент **RUselect-P** представляет собой полиакрилатную матрицу с иммобилизованным рекомбинантным мутантным белком А, способным специфически связывать Fc-фрагмент иммуноглобулинов класса G человека 1, 2 и 4 подтипов (IgG1, IgG2, IgG4). **RUselect-P** предназначен для хроматографического выделения и очистки антител (моноклональных и поликлональных) из различных источников, например, асцита, сыворотки или культуральной жидкости. Сорбент устойчив в щелочной среде, выдерживает многократный контакт с 0.1 М раствором NaOH.

2. Технические параметры продукта

Название сорбента	RUselect-P
Тип сорбента	Аффинный сорбент для очистки антител
Лиганд	Устойчивый к щелочам рекомбинантный Белок А
Плотность лиганда	~ 4.5 мг/мл
Внешний вид	Твердые монодисперсные микросферы
Размер частиц ¹	~ 70 мкм
Матрица	Полиакрилат, сферический
Максимальная скорость потока	До 400 см/ч
рН стабильность операционная ²	3~12 (долгосрочная),
рН стабильность СІР ³	2~13.7 (краткосрочная, СІР)
Применение	Подходит для разделения и очистки антител (моноклональных и поликлональных)
Химическая стабильность	Стабилен в следующих растворах: 8 М мочевины; 6 М гидрохлорида гуанидина; 2% бензилового спирта; 20% этанола
Динамическая емкость сорбента (DVC10) при 10 минутах удерживания, мг/мл ⁴	~50 мг/мл сорбента

¹ медианный размер частиц при совокупном распределении объема.

² диапазон рН при котором сорбент может эксплуатироваться без значительного изменения функциональности.

³ диапазон рН при котором сорбент может быть подвергнут очистке-на-месте без значительного изменения функциональности.

⁴ величина полученная при работе с модельным рекомбинантным гиперхимерным моноклональным антителом (АТ1756).

3. Зависимость динамической связывающей ёмкости сорбента RuSelect-P (DBC10) от времени удерживания

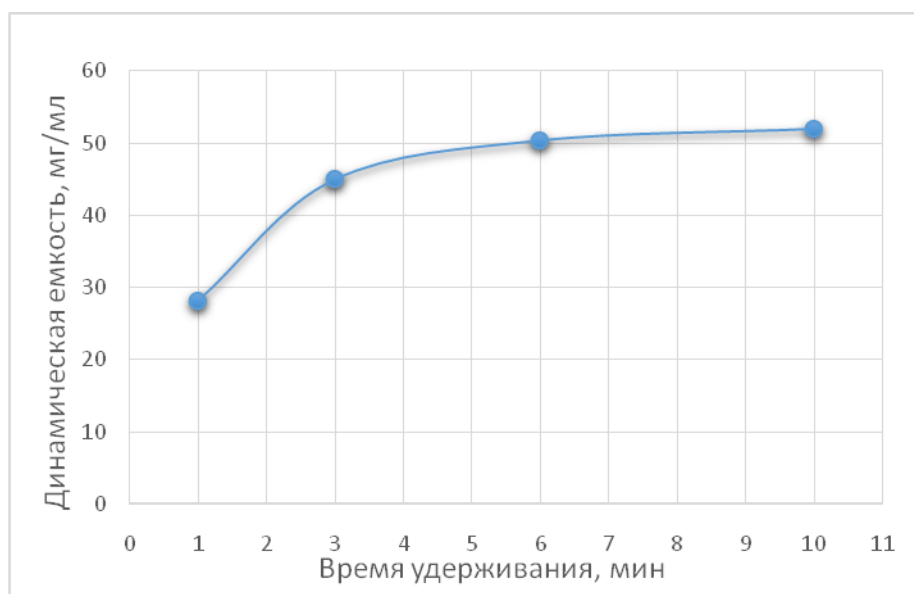


Рис. 1 Хроматографическая система GE АКТА PURE, колонка Tricorn 10/100, линейный поток 25.6 см/ч, высота сорбента 2.5 см, время контакта раствора АТ с сорбентом 1, 3, 6 и 10 минут, фосфатно-солевой буфер рН 7.4. Расчет DBC10 (10% проскока) производился программным обеспечением Dynamic Binding capacity calculations UNICORN Extension.

4. Зависимость пропускной способности сорбента RuSelect-P от давления в хроматографической системе

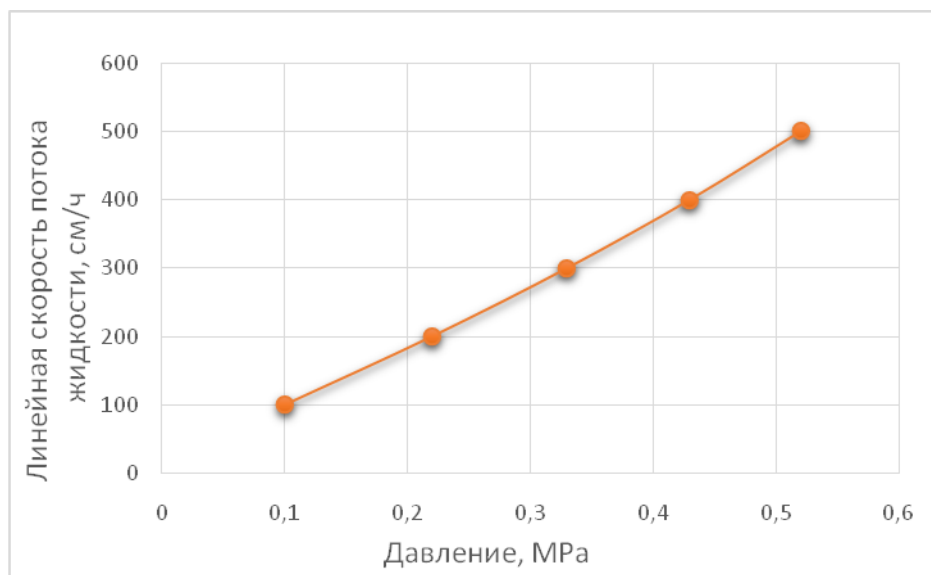


Рис. 2 Хроматографическая система GE АКТА PURE, колонка ХК 16/40, высота сорбента 15 см, фосфатно-солевой буфер рН 7.4.

5. Изменение динамической ёмкости сорбента RuSelect-P после санации

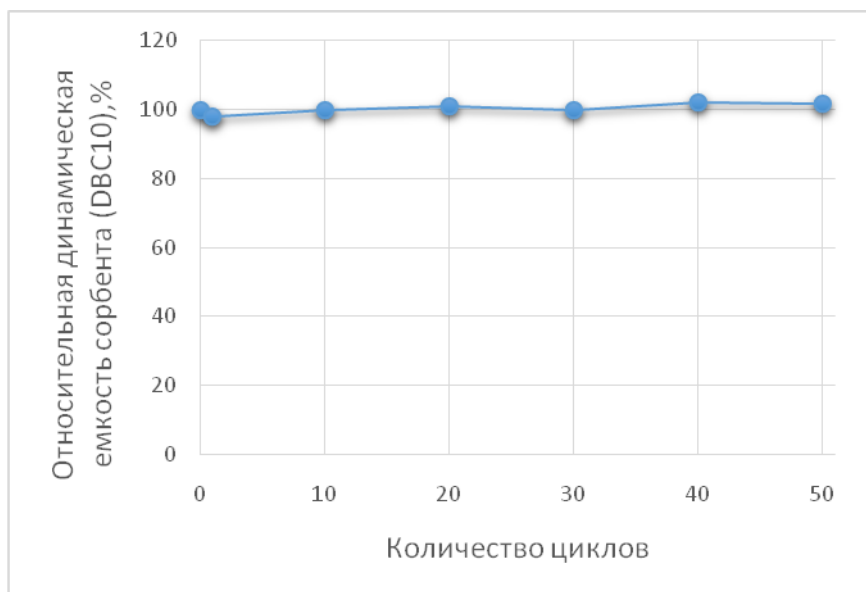


Рис. 3 Изменение DBC10 при времени удерживания 3 минуты после 50 циклов санации 0.1 М NaOH.

6. Порядок действий при работе с афинным сорбентом RUselect-P

6.1 Упаковка колонны

Упаковка хроматографической колонны афинным сорбентом производится в соответствии со стандартными рабочими процедурами. Необходимо убедиться, что сорбент имеет температуру окружающей среды, равномерно перемешан и не содержит пузырьков воздуха.

Примечание. При упаковке хроматографической колонны рекомендуется использовать геометрию рабочего слоя колонки в диапазоне соотношения длины к диаметру 5:3 ~ 2:1.

6.2 Уравновешивание

Перед работой следует уравновесить упакованную сорбентом колонну рабочим буфером до постоянных значений pH и проводимости (3 - 5 объемов колонны). Рекомендуется использовать буфер нейтрального pH и ионной силы. Пример рабочего буфера: натрий-фосфатный буфер (PBS) pH 7.4.

6.3 Нанесение образца

Перед нанесением рекомендуется отфильтровать исходный раствор для удаления механических примесей, например, с помощью фильтра с пределом отсека 0.45 мкм.

Объем нанесения выбирается в соответствии с характером исходного раствора, содержанием в исходном растворе антител и объемом сорбента. Оптимальный объем исходного раствора также может быть установлен с помощью экспериментов.

Если концентрация антител в исходном растворе высокая, рекомендуется разбавить раствор до концентрации антител 1~2 мг/мл рабочим буфером, чтобы избежать высокой концентрационной нагрузки влияющей на эффективность сорбента.

6.4 Промывка

После нанесения образца следует промыть колонну буферным раствором 100 мМ ацетата натрия pH 6.0-6.5 до постоянных значений pH и проводимости (3 - 5 объемов колонны).

6.5 Элюция

Рекомендуется осуществлять элюцию антител с применением элюирующего буферного раствора с низким значением pH < 4.

Примечание

Объем пика при элюции зависит не только от pH, но и от типа буферного раствора. Чтобы получить раствор элюированных IgG в меньшем объеме, рекомендуем использовать 100 мМ ацетат натрия pH 3.5.

После элюции целевых антител следует немедленно перевести сорбент в колонне в буфер с нейтральным значением pH. Это позволит продлить срок службы сорбента.

Долговременное пребывание иммуноглобулинов при низком pH может привести к их денатурации и потере их биологической активности. Полученный раствор очищенных антител следует нейтрализовать до значения pH 7.0 - 7.4. Пример буферного раствора для нейтрализации: 1М Трис-HCl, pH 8.5. Высокая концентрация антител в элюате может привести к их агрегации.

6.6 Санация СІР («очистка-на месте»)

Сорбент можно повторно использовать без регенерации, но осаждение некоторых денатурированных веществ и агрегации белков на носитель могут влиять на скорость потока и снижать связывающую способность. При уменьшении производительности колонны рекомендуется проводить процедуру санации.

Процедура СІР

Промойте сорбент 3 колоночными объемами рабочего буфера; затем промойте сорбент 2-5 колоночными объемами 0,1 М раствора гидроксида натрия (NaOH). Рекомендуется не превышать время контакта сорбента с гидроксидом натрия свыше 30 минут. По завершении промывки сорбента гидроксидом натрия, промойте сорбент 0,25 -0,5 объемами 100 мМ

ацетата натрия рН 3.5 для нейтрализации гидроксида натрия и затем 5 объемами рабочим буферным раствором до постоянного рН (- 5 объемов колонны).

Примечание

Ввиду увеличения вязкости раствора при промывке 0.1 М NaOH, в том числе за счет десорбции неспецифически связавшихся примесей, возможно увеличение давления в хроматографической системе. Рекомендуется не задавать высокую скорость потока элюентов при санации или использовать промывку обратным током.

7. Хранение

Хранить в прохладном месте при температуре +4~8°C. Беречь от солнечных лучей. В процессе хранения категорически нельзя допускать заморозки сорбента. Держать крышку контейнера плотно закрытой. В качестве консервирующего раствора (в том числе и в упакованных колоннах) рекомендуется использовать 20% раствор этилового спирта.