

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-52

ПРИМЕНЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА DOE ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УСЛОВИЙ РАЗРУШЕНИЯ АГРЕГАТОВ FC-СЛИТОГО БЕЛКА

DOE APPROACH TO STUDY THE CONDITIONS OF DESTRUCTION OF FC-FUSION PROTEIN AGGREGATES

П. С. Астрелина, Ю. В. Петрова, А. В. Казакова

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

P. S. Astrelina, Y. V. Petrova, A. V. Kazakova

Pharm Holding CJSC, Saint Petersburg

✉ Polina.Astrelina@geropharm.com

Аннотация

Проведено исследование разрушения агрегатов Fc-слитого белка (64 кДа) с использованием подхода DoE. Изучено влияние ПАВ, восстановителей, хаотропных агентов, спиртов и pH. Результаты раскрывают механизмы белковой агрегации.

Abstract

Screening study of Fc-fusion protein (64 kDa) aggregate disruption using DoE approach. Analyzed surfactants, reductants, chaotropes, alcohols, and pH. Key aggregation mechanisms are described. DoE proved effective for multi-factor analysis.

Агрегация белков представляет собой одну из ключевых проблем, возникающих при их очистке, хранении и использовании, поскольку может существенно влиять на стабильность, растворимость и функциональные свойства молекул. Особое внимание привлекают белки, содержащие Fc-фрагмент, поскольку их структура располагает к образованию агрегатов различной природы. Изучение факторов, способствующих или препятствующих агрегации, позволяет глубже понять механизмы межмолекулярных взаимодействий и может найти применение в широком спектре научных и технологических задач. Статистический подход дизайна эксперимента (DoE, Design of experiments) позволяет эффективно изучить влияние сразу нескольких параметров и их взаимосвязей на этот процесс.

Целью настоящей работы было скрининговое исследование условий, способствующих разрушению агрегатов Fc-слитого белка, с применением статистического подхода DoE. Был проведен анализ нескольких факторов, влияющих на устойчивость и поведение белка в растворе.

В качестве объекта исследования использовали Fc-слитый белок молекулярной массой 64 кДа. Агрегаты получали методом эксклюзионной хроматографии с использованием сорбента Sephacryl S-200 (Cytiva). На основании литературных данных были выбраны пять групп факторов: поверхностно-активные вещества (Tween-80, Tween-20, Triton X-100, Brij®, CHAPs), восстановители (дитиотреитол, цистеин), хаотропные агенты (гуанидина гидрохлорид, мочевины), спирты (изопропанол, глицерин, полиэтиленгликоль), а также значение pH (в диапазоне 7–10). С помощью программного обеспечения MODDE® был составлен дизайн эксперимента, включающий 49 опытов. Эффективность разрушения агрегатов оценивалась по показателям выхода растворимого белка и его чистоте, определяемым методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты показали, что наибольшее положительное влияние на выход белка оказало добавление 1 % Triton X-100 и 1 % Tween-80. Чистота при этом также увеличивалась при добавлении 1 % Triton X-100, 0,1 % Brij® и 0,5 % CHAPs. Среди восстановителей наилучший эффект показал дитиотреитол в концентрации 1 мМ, способствуя улучшению обоих показателей. Из хаотропных агентов положительное влияние на выход оказывал 2 М гуанидин гидрохлорид, при этом его влияние на чистоту было незначительным. Добавление спиртов не оказывало статистически значимого эффекта. Повышение pH среды до 10 стабильно способствовало увеличению как выхода, так и хроматографической чистоты белка.

Результаты показали, что щелочная среда способствует разрушению агрегатов, вероятно, за счет усиления электростатического отталкивания между молекулами. Дитиотреитол эффективно разрушает нецелевые дисульфидные связи, особенно при высоком pH. Положительный эффект гуанидина подтверждает участие электростатических взаимодействий в формировании агрегатов. Поверхностно-активные вещества, такие как Triton X-100,

вероятно, действуют за счет взаимодействия с гидрофобными участками белков и стабилизации растворимой формы.

Таким образом, оптимальные условия для разрушения агрегатов Fc-слитого белка включают pH среды 10, а также добавление Triton X-100, гуанидина гидрохлорида и дитиотреитола. Полученные данные позволяют лучше понять физико-химические основы агрегации белков и могут быть полезны при разработке подходов к стабилизации белковых растворов в исследовательской и прикладной областях. Применение подхода DoE продемонстрировало высокую эффективность для комплексного анализа влияния нескольких факторов на поведение белков в растворе и их устойчивость к агрегации.