

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОЙ МОЧЕВИНЫ В ПОЛУПРОДУКТАХ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

Колбацкая С.А., Шевырин В.А., Глазырина Ю.А.

Уральский федеральный университет
620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

При развитии производства рекомбинантных белков разрабатываются новые технологические стадии для повышения качества очистки и выделения целевого продукта. Одним из таких подходов является применение мочевины для солюбизации белков из телец включений. Контроль уровня примесей, в том числе остаточной мочевины, в полупродуктах производства является важной задачей при обеспечении качества конечного препарата. Хроматографические методы, широко применяющиеся при контроле качества фармацевтических субстанций, отвечают поставленной задаче.

Несмотря на развитие биотехнологической отрасли, в литературе не получили большого внимания методы контроля примесей в белковых препаратах в соответствии с внедрениями новых технологических решений. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) может применяться как для контроля содержания целевого белка, так и для определения количеств примесных веществ. Разнообразие аппаратурной базы, способов детекции и возможность подбора условий определения, как одиночных соединений, так и группы веществ, дает возможность специфично и точно контролировать состав продукта.

Целью настоящего исследования является разработка методики определения содержания мочевины в растворах белков и других полупродуктах производства рекомбинантных белков на основе ВЭЖХ.

При определении содержания мочевины методом ВЭЖХ широко используется HILIC-режим хроматографии гидрофильных взаимодействий. Данный подход подразумевает использование водно-ацетонитрильных смесей в качестве подвижных фаз в изократическом режиме и хорошо сочетается с УФ-детекцией. В рамках разработки методики для контроля содержания мочевины на модельных растворах были подобраны рабочие параметры: соотношение ацетонитрила к воде 95 : 5, скорость потока 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 2 мкл, детекция проводилась при длине волны 194 нм, ширина спектральной щели 8 нм. Данные были получены при использовании цвиттер-ионной колонки InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 3,0 · 150 mm, 2,7 μm на хроматографе Agilent Technologies серии 1260 Infinity II. Также выявлена зависимость величины отклика детектора от состава растворителя вводимой пробы, что является важным фактором в рамках этапа избавления от белковой матрицы избытком органического растворителя. При выбранных параметрах установлен предел количественного обнаружения 2,0 мкг/мл.

Проект выполнен по заказу СПбНИИВС ФМБА России.