

Большой потенциал препаратов на основе белков

Контроль качества рекомбинантных белков посредством N-терминального секвенирования по Эдману



Компания «Шимадзу» имеет более чем 20-летний опыт в области секвенирования по Эдману и недавно выпустила последний продукт PPSQ 31/33A для Европейского рынка

Будущее фармацевтики за особой категорией терапевтических и диагностических препаратов, именуемых белковыми препаратами. До настоящего времени современная медицина при лечении и профилактике заболеваний и патологических состояний во многом опиралась на синтетические или химические препараты.

Тем не менее, разработки в области молекулярной биологии способствовали накоплению знаний о биологических системах и взаимодействиях между ними. Например, ученые теперь знают больше о причинах многих заболеваний и о том, как организм человека борется с ними. Сейчас они обращают особое внимание на применение собственных механизмов организма при разработке лекарственных препаратов, которые имитируют действие защитных средств организма. Сегодня прогресс в биотехнологии привел к повышенному использованию живых организмов и биологических веществ при производстве белковых препаратов для применения в здравоохранении. В частности, применение технологии рекомбинантных ДНК (рДНК) позволило получать большие количества белковых препаратов.

В настоящее время различают несколько типов белковых препаратов, например:

1) Цитокины

Данные препараты регулируют работу иммунной системы. Они представляют собой

белки, которые активируют клетки иммунной системы для выполнения различных иммунных функций.

2) Гормоны

Белковые препараты, которые регулируют функции в организме. В качестве препаратов данные белки могут применяться для повышения уровня специфических гормонов, таких как эстроген во время менопаузы или при недостаточном росте. Также их можно использовать для лечения определенных заболеваний, таких как диабет, или патологий, таких как бесплодие.

3) Факторы свертывания крови

Белки, регулирующие свертывание крови. Данные препараты применяются для лечения нарушений свертываемости крови, таких как гемофилия.

4) Вакцины

Белки, которые стимулируют иммунную систему для того, чтобы она вырабатывала специфические антитела, которые используются для профилактики или лечения заболеваний.

5) Моноклональные антитела

Белки, которые отмечают специфический чужеродный материал (такой как раковые клетки, бактерии или вирусы – возбудители заболеваний), чтобы удалить или разрушить его другими компонентами иммунной системы. Они также применяются в качестве эффективных диагностических средств при многих специфических генетических заболеваниях и других состояниях, таких как беременность.

Первым веществом такого типа, которое было одобрено для терапевтического применения, был биосинтетический «человеческий» инсулин, полученный при помощи технологии рекомбинантных ДНК.

Расщепление по Эдману для секвенирования аминокислот

Для получения белка и оптимизации процесса

необходимо обеспечить надлежащий контроль качества, чтобы не допустить условий, при которых образуются «укороченные» варианты белков или возникает повышенный уровень примесей в пробе. Предпочтительным методом пока остается N-терминальное секвенирование по Эдману.

Расщепление по Эдману, разработанное Пером Эдманом, представляет собой метод секвенирования аминокислот в пептиде или белке. Согласно данному методу аминотерминальный остаток метится и отщепляется от пептида без разрушения других пептидных связей между другими аминокислотными остатками. Фенил изотиоцианат реагирует с незаряженной минотерминальной аминокислотной группой в слабощелочной среде, образуя фенилтиокарбамильное производное. Данное производное конечной аминокислоты затем расщепляется в кислой среде как производное тиазолинона. Аминокислота тиазолинон затем выборочно экстрагируется

в органический растворитель и обрабатывается кислотой для образования более стабильного производного аминокислоты-фенилтиогидантоина (ФТГ), которое можно идентифицировать посредством хроматографии и сравнения со стандартами. Данную процедуру можно повторить, чтобы определить следующую аминокислоту.

Несмотря на то, что данный метод был создан более 40 лет назад, он все еще применяется на различных этапах разработки новых препаратов или для демонстрации сопоставимости и однородности партий для выпуска во время производства. В Европе требуется соблюдать разные нормативы Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) при описании свойств белковых препаратов, например

- Руководство по разработке, производству, описанию свойств и спецификациям моноклональных антител

РТН-аминокислота	Время элюирования		
	День 1	День 7	День 15
Асп	2,45 мин	2,44 мин	2,44 мин
Глу	3,14	3,15	3,15
Асн	3,84	3,83	3,83
Глн	4,06	4,05	4,05
Сер	4,25	4,25	4,25
Тре	4,61	4,60	4,60
Гис	4,90	4,89	4,90
Гли	5,26	5,26	5,26
Ала	6,65	6,65	6,66
Тир	7,04	7,04	7,05
Арг	7,66	7,65	7,65
Мет	11,44	11,45	11,47
Вал	11,79	11,79	11,82
Про	12,22	12,22	12,25
Трп	14,43	14,44	14,49
Лиз	16,49	16,50	16,55
Фен	17,03	17,04	17,11
Иле	17,58	17,59	17,64
Лей	18,99	19,01	19,06

Таблица 1: Воспроизводимость времени удержания разных аминокислот при сравнении дня 1 / 7 / 15

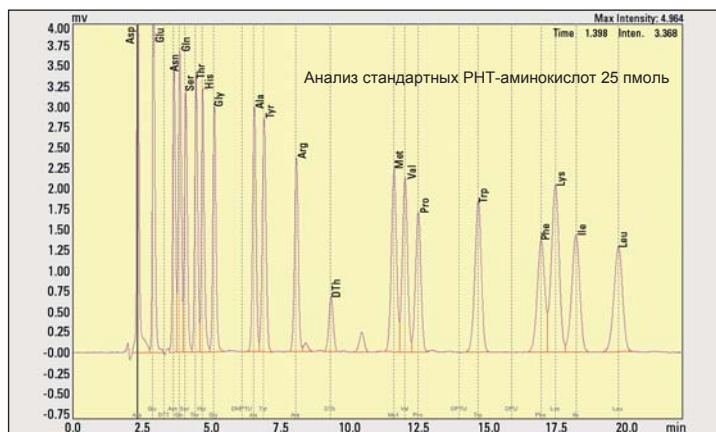


Рисунок 1: Хроматограмма стандартных аминокислот

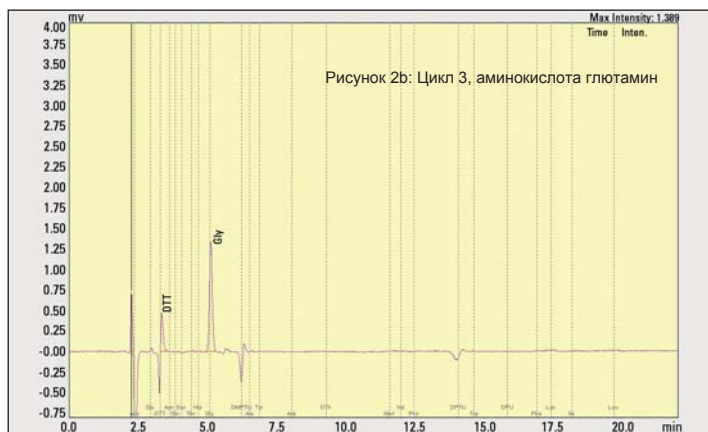


Рисунок 2b: Цикл 3, аминокислота глутамин

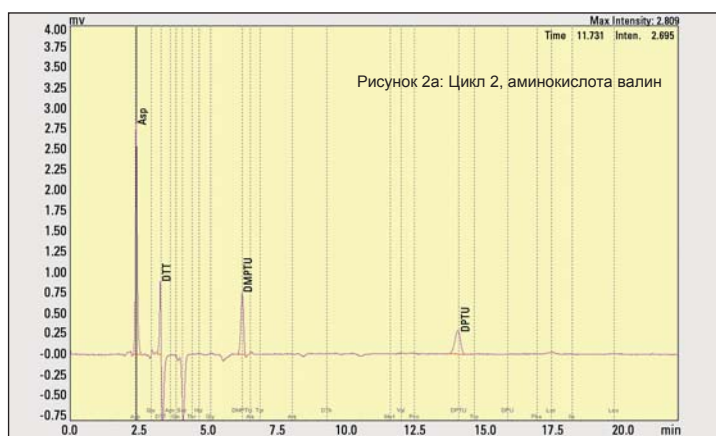


Рисунок 2a: Цикл 2, аминокислота валин

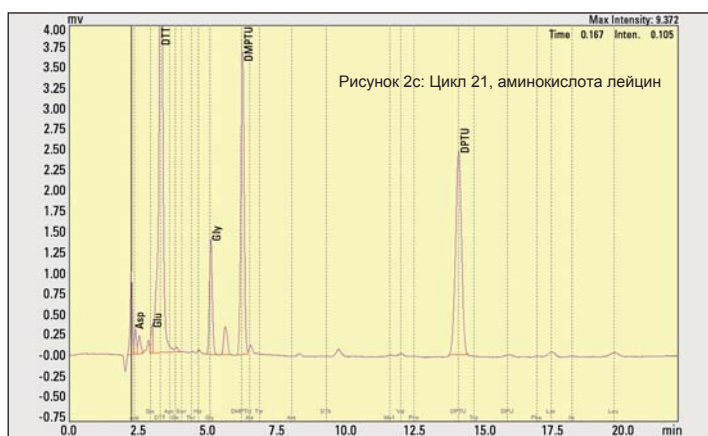


Рисунок 2c: Цикл 21, аминокислота лейцин

Рисунок 2a, 2b, 2c: Результаты элюирования аминокислот в разных циклах расщепления. Отрицательные пики получены из-за автоматической функции вычитания, помогающей идентифицировать возрастающие сигналы в следующих циклах.

и сходных препаратов (ЕМЕА/СНМР/ВWР/157653/2007).

- Руководство по сходным биологическим лекарственным препаратам (ЕМЕА/СНМР/437/04)
- Руководство по сходным биологическим лекарственным препаратам, содержащим белки, полученные биотехнологическим путем, в качестве активных веществ: Проблемы качества (ЕМЕА/СНМР/ВWР/49348/2005)
- Руководство по сходным биологическим лекарственным препаратам, содержащим белки, полученные биотехнологическим путем, в качестве активных веществ: доклинические и клинические вопросы (ЕМЕА/СНМР/ВWР/42832/2005).

Эффективность анализа при помощи секвенаторов с одним или тремя реакторами

Надежность метода секвенирования по Эдману в нормальных условиях, таких как контроль качества, возможность

правильно определять изобарные аминокислоты (лейцин/изолейцин) и получать количественную информацию на основании препарата, а также возможных примесей, по-прежнему делает данный метод предпочтительным. Даже там, где расщепление по Эдману в области идентификации белков вытеснила масс-спектрометрия, она не может достоверно ответить на все вопросы, а ее результаты труднее интерпретировать. Следовательно, расщепление по Эдману также применяется для поиска последовательностей новых белков и пептидов.

PPSQ 31A/33A был выпущен в Европе в 2009 году на основе общепризнанных модулей ВЭЖХ линейки Prominence. PPSQ 31 A – это прибор с одним реактором, а PPSQ 33A – прибор с тремя реакторами, позволяющий проводить автоматический последовательный анализ трех проб для повышения эффективности анализа.

Белковые секвенаторы серии PPSQ достигают исходной

стабильности и позволяют проводить высокочувствительный анализ РН-аминокислот путем их изократического разделения. Изократическое секвенирование обеспечивает высокую стабильность моментов удержания (Таблица 1). Пики, обнаруженные в предыдущих циклах, могут затем отменяться при помощи предварительной обработки хроматограмм, благодаря чему пользователю легче идентифицировать последовательности. Проведение анализа РН-аминокислот в изократическом режиме дает возможность лабораториям сократить объем сбросных вод и эксплуатационные издержки. Реагенты и колонки для разделения продаются фирмой «Вако» и могут еще больше сократить издержки производства (www.wako-chemicals.de).

Новая программа значительно улучшает анализ данных

Кроме того, вновь разработанная программа для секвенаторов

обеспечивает важную повторную обработку хроматограмм для определения аминокислотных последовательностей. Данная программа обрабатывает множественные хроматограммы, объединенные по пробам, что значительно повышает функциональность анализа данных. Также благодаря внедрению самой последней системы ВЭЖХ анализа уровни шума снижены, что обеспечивает высокочувствительное обнаружение РН-аминокислот. Возможности PPSQ были ярко продемонстрированы при анализе пробы неизвестного белка, который был правильно секвенирован до 58 циклов, начиная приблизительно с пробы 200 пмоль, и до 40 циклов для материала пробы приблизительно 40 пмоль.