

ZKONCENTROVÁNÍ A DIAFILTRACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

BROŽ P.

Karolina Express-Sartorius, filtry@sartorius.cz

Cílový rekombinantní protein se rozpustil v močovině o koncentraci 8 M. Cílem zkušebního filtračního testu bylo zkoncentrovat protein a odstranit močovinu za účelem přípravy produktu k dalšímu zpracování.

1. Stručná charakteristika procesu

Geneticky upravený protein byl rozpuštěn v močovině o koncentraci 8 M a s tím zároveň se upravilo pH na 3,8 Tris HCl pufrem. Celkový objem takto připraveného vzorku byl 3400 ml. Protože roztok byl prostý viditelných částic, nebylo nutné provést předfiltraci. Geneticky upravený protein byl o molekulové váze 20 kDa, a proto se k filtračnímu testu vybrala membrána o NMWCO 5 kDa. Materiálem ultrafiltrační membrány byla stabilizovaná celulóza, kterou firma SARTORIUS dodává pod obchodní značkou Hydrosart®. Tato membrána má extrémně nízké nespecifické sorpční vlastnosti, čímž se zvyšuje účinnost separace a také se zlepšuje účinnost následného čistícího procesu.

Hlavním cílem filtračního testu bylo zjistit množství proniklého proteinu do toku permeátu.

2. Popis procedury

- Proplach kazety DEMI vodou za účelem odstranění konzervačního prostředku. Po ukončení proplachu se změnilo pH DEMI vody, které bylo na hodnotě 7.
- Stanovení průtoku čisté vody přes kazetu. Později je tato hodnota nápomocná k posouzení kvality a účinnosti vyčištění kazety. Pokud průtok čisté vody přes kazetu klesne pod 70% původní hodnoty, musí se zlepšit čistící procedura.
- Proplach membrány roztokem močoviny o koncentraci 8M v Tris HCl pufri s hodnotou pH 3,8. Proplach se prováděl po dobu 10 minut.
- Zkoncentrování roztoku o původním objemu 3400 ml na 600 ml pomocí membrány Hydrosart® s NMWCO 5 kDa.
- Diafiltrace s výměnou cca 14-ti násobného množství pufri Tris HCl pH=3,8.
- Průnik proteinu se měřil reakcí s modrým barvivem Comassie Blue G 250 a specifickou zkouškou (chemická reakce s následným měřením absorbance při 280 nm). Měření se provádělo v průběhu diafiltrace postupně.

Obr. 1 – Sartoflow Alfa



- Po ukončení diafiltrace se cílový produkt nacházel v retentátu.
- Promytí membrány pufrem. Promývací roztok se přidal k retentátu a potom se měřila účinnost separace pro rekombinantní protein.
- Vyčištění kazety a porovnání průtoku čisté vody po čištění a před čištěním k ověření účinnosti čistícího procesu.

3. Materiály a metody

Systém cross-flow se skládá z UF držáku Sartocoon2+, peristaltického čerpadla, chlazené nádoby vstupního roztoku, kde se udržovala teplota pod 10 °C. Teplota se pečlivě monitorovala během celého procesu. Dále se systém skládal z nezbytného příslušenství – hadice, manometry, ventily.

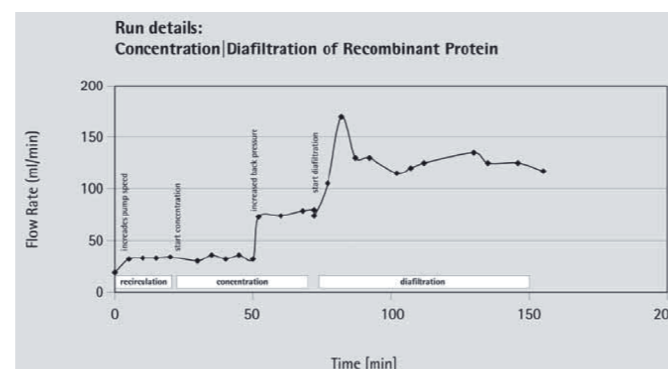
Membrána materiál Hydrosart®, cut off 5 kDa, filtrační povrch 0,6 m², obj.č. 3021442906E-SG.

Detaily procesu jsou v uvedeny v Tab. 1 a na Obr. 2.

Tab. 1 – Koncentrace močoviny v průběhu procesu

Objem permeátu [ml]	Koncentrace močoviny [M]	Objem retentátu [ml]
Startovací roztok	8	3400
2490	2,3 x 10 ⁻¹	680
4000	2,7 x 10 ⁻²	720
9200	1,6 x 10 ⁻⁵	845

Obr. 2 – Průtok permeátu během procesu UF a diafiltrace



3.1. Funkce membrány Hydrosart®

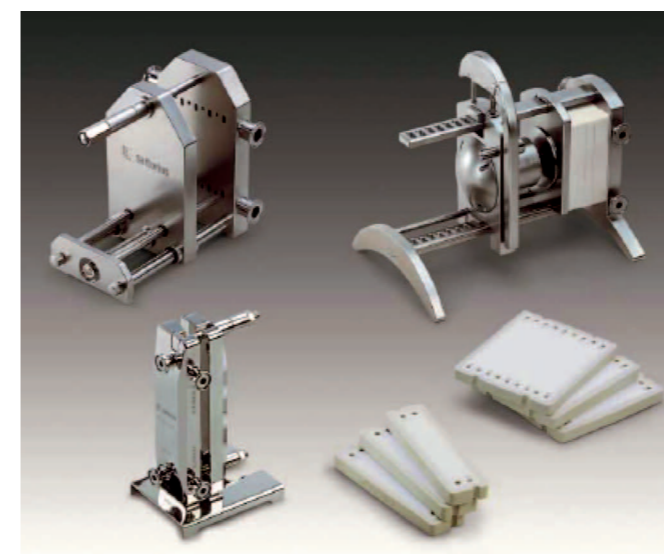
Během prvních 20-ti minut testu se permeát vracel zpět do nádoby vstupního roztoku. Během procesu zůstávala teplota roztoku na vstupu konstantní, tzn. pod 10 °C. Pokud by průtok permeátu poklesl během počáteční fáze filtrace, znamenalo by to, že protein na vstupu se naadsorboval, nebo navázal na membránu. Tento proces se zpravidla ukončí za prvních 20-ti minut filtrace.

Získané výsledky ukazují, že průtok se během této doby nezměnil a to znamená, že složky roztoku nebyly adsorbovány membránou. To také potvrzuje minimální adsorpční vlastnosti membrány Hydrosart®.

3.1.1 Zkoncentrování roztoku rekombinantního proteinu

Průtok permeátu byl prvních 50-ti minutách ultrafiltrace neměn-

Obr. 2 – Ultrafiltrační držáky a kazety Sartorius



ny. Potom se zvedl na více jak dvojnásobek a to přiškrcením toku retentátu a snížením rychlosti čerpadla. To mělo také za následek zvýšení Trans Membránového Tlaku (TMP).

Snížení toku retentátu nemělo další vliv na funkci ultrafiltrační kazety – tzn. na snížení výkonu, nebo zablokování filtrační membrány.

Zkoncentrování roztoku bylo 6-násobné. Při tomto koncentračním faktoru se neměnil průtok permeátu a nebyl ovlivněn koncentrací močoviny v produktu.

Celkové zkoncentrování trvalo 78 minut. Objem permeátu byl 2490 ml, při toku permeátu 32 ml/min (3,2 litru/hod.m²). Tok permeátu je méně jak v polovině výkonnosti kazety.

3.1.2. Diafiltrace

Diafiltrace se provedla udržováním konstantního objemu roztoku na vstupu, který byl doplňován promývacím pufrem stejnou rychlostí jakou odtékal permeát (promývání konstantním objemem). Provozní parametry (rychlost peristaltického čerpadla a TMP) zůstávaly během diafiltrace konstantní. Přesto na počátku vystoupil průtok permeátu až na 170 ml/min, ale potom poklesl a stabilizoval se na hodnotě cca 130 ml/min.

Na změnu průtoku měla vliv snížená koncentrace močoviny a změna rozpustnosti složek roztoku na vstupu, kterou způsobila nižší koncentrace močoviny.

Objem proplachovacího pufri byl při diafiltraci cca 14-ti násobný (cca 9,3 litru). Koncová koncentrace močoviny po diafiltraci byla 1,6 x 10⁻⁵ M.

Proces diafiltrace trval 88 minut a celkové množství permeátu bylo 9200 ml. Průměrný průtok permeátu byl 105 ml/min (10,5 litru/hod.m²).

3.3. Výťažnost produktu

V průběhu diafiltrace, asi po 22-ti minutách procesu, bylo zjištěno detekcí na barvivo Comassie Blue 250, že něco proniká do toku permeátu. Pravděpodobnou příčinou bylo snížení koncentrace močoviny, při které se zvýšila rozpustnost vstupních složek, nebo disociovaly z většího proteinu. Proto se následně změnila koncentrace proteinu v retentátu a nebyl zjištěn žádný pokles koncentrace. Při dalším pokračování diafiltrace se změnila koncentrace proteinu v retentátu po každých 4 litrech přidaného pufri. Žádná ztráta proteinu směrem do toku permeátu se nezjistila.

3.4. Zpětné vyčištění membrány Hydrosart®

Po ultrafiltraci a diafiltraci se membrána proplachovala roztokem pufri po dobu 60 minut. Potom byla stanovena hodnota průtoku čisté vody. Průtoky jsou uvedeny v Tab. 2. Výsledky ukazují, že po čištění se průtok vody vrátil na původní hodnoty nové kazety s membránou Hydrosart®. Výsledek ukazuje perfektní čistitelnost této kazety.

Tab. 2 – Průtok čisté vody – účinnost čistícího procesu

	Tlak (bary)			Průtok (ml/min)	
	Vstup	Výstup	TMP	Retentát	Permeát
Nová kazeta	1,3	0,6	0,95	7620	130
Kazeta po čištění	1,3	0,5	0,9	7800	130

3.5. Zvýšení výkonu na základě získaných výsledků filtračního testu

Průtok permeátu během UF: 7,5 l/hod.m².

Průtok permeátu během diafiltrace: 10,5 l/hod.m².

Počáteční objem: 300 l.

Objem získaného permeátu: 250 l.

Promývací objem pufri: 14 x 50 = 700 l.

Filtrační plocha: 18 m² (30 kazet)

Celkový čas procesu bez čištění: 6 hodin, z toho 1,9 hod pro UF a 3,7 hod pro diafiltraci.

4. Závěr

Test povrdil perfektní účinnost membrány Hydrosart® v UF kazetě a to v následujícím:

- výborný výtěžek produktu (cca 100%),
- výbornou čistitelnost UF kazety,
- nedochází v průběhu filtrace ke vzniku usazenin na povrchu membrány.

Zpracováno na základě firemních podkladů Sartorius.

Serge Kratochvíl **Karolina Express**

www.sartorius-stedim.com

LABORATORNÍ A PRŮMYSLOVÁ FILTRACE • VÁŽICÍ TECHNIKA

- předfiltrace
- sterilní filtrace
- ultrafiltrace
- crossflow filtrace
- měření integrity filtrů
- Biostat-laboratorní fermentory
- air samplery
- mikrobiologické sady
- membránové adsorbéry
- STEDIM Bags pro manipulaci s roztoky ve farmaceutickém průmyslu

- laboratorní váhy
- průmyslové váhy
- váhy pro stanovení sušiny
- váhy do prostředí Ex
- komparátory
- převodníky, indikátory
- vážicí plošiny
- procesní kontroléry
- indikátory kovů
- příslušenství vah

• odstředivky, třepačky, pH metry, inkubátory

Vaničkova 31
400 01 Ústí nad Labem

Tel.: 475 211 348
Tel./fax: 475 200 870

E-mail: info@sartorius.cz
http://www.karolinaexpress.cz