

Аксиома – отечественное оборудование для хроматографии белков

С. М. Староверов¹

УДК 577.112:543.544

Статья посвящена отечественной линии хроматографов для белков «Аксиома». Представлены примеры применения промышленных хроматографов и характеристики новых лабораторных хроматографов «АксиомаДебют» и «АксиомаСтандарт» с применением отечественных критических компонентов. Оборудование обеспечивает работу в градиентном режиме с использованием ультрафиолетового и кондуктометрического детекторов. Управление осуществляется отечественным программным комплексом «Мультихром Аксиома», позволяющим расширять функциональные характеристики оборудования. Хроматограф «АксиомаСтандарт» обеспечивает работу с давлением до 100 бар, что дает возможность использовать высокоэффективные колонки для белков с частицами малого размера и реализовать все основные методы разделения белков.

Ключевые слова: хроматографы среднего и низкого давления «Аксиома», хроматография белков, программное обеспечение, колонки для хроматографии белков

Хроматография – ключевая стадия в выделении и очистке природных и рекомбинантных белков, при производстве современных высокоочищенных фармацевтических препаратов для таргетной терапии, производства диагностикумов, чистых белков для аналитического и технического применения.

Все больше лекарственных средств, полученных биотехнологическими методами, используется в клинической практике, включая моноклональные антитела, гормоны, интерфероны, эритропоэтины, колониобразующие факторы, вакцины, антибиотики, бактериофаги, коагулянты, в том числе факторы свертывания крови, ингибиторы протеинкиназ.

При проведении биосинтеза в чужеродной клетке-хозяине присутствует значительное количество различных по природе примесей, в том числе фрагменты ДНК клетки-хозяина, ее белки, полисахариды и эндотоксины. Наличие примесей снижает эффективность применения препарата или вызывает серьезные осложнения. Применение белковых препаратов

с примесями в составе диагностических или аналитических систем может исказить результаты анализа.

Зачастую для достижения требований Фармакопеи требуется проведение нескольких последовательных стадий очистки рекомбинантных белков, причем именно хроматографическая очистка, обеспечивает быстрое и наиболее эффективное удаление нежелательных примесей с получением белкового препарата заданной чистоты.

Непростая задача – и выделение белков из сложных природных источников, например, из плазмы крови. Для получения свободного от вирусов высокоочищенного иммуноглобулина G необходимо три стадии хроматографической очистки.

В течение десятилетий в стране отсутствовало отечественное оборудование для выделения и очистки белков, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах. Компания «БиоХимМак СТ» более двадцати лет назад начала собственные разработки в этой области. Как ни странно, все начиналось с пилотно-промышленных систем, а не с лабораторного оборудования. Мы разрабатывали технологии очистки по заказам отечественных фармацевтических

¹ АО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия.



Рис. 1. Оборудование АО «БиоХимМак СТ» для хроматографической очистки белков

компаний, для чего необходимо было адаптированное оборудование. Стандартное оборудование не всегда способствовало оптимальной реализации метода, а делиться технологическими тонкостями с зарубежными компаниями наши фармпредприятия не готовы. Также разработанное и произведенное нами оборудование заметно ниже по стоимости. К промышленному оборудованию не предъявляются высокие требования по дизайну, что облегчало состоятельность в этом секторе бизнеса. Ключевые компоненты были легко доступны на открытом мировом рынке, что обеспечивало высокое качество критических составляющих и продукта в целом. Отдельные хроматографы эксплуатируются в производстве уже более 12 лет. На рис. 1 представлены примеры технологического оборудования для хроматографической очистки белков, разработанного и изготовленного АО «БиоХимМак СТ».

Перечень разработанных технологий и реально внедренных в производство, широк и разнообразен. Это технологии производства синтетических и генно-инженерных пептидов

(бусерелин, октреотид, инсулин), антибиотиков (эремомидин), макролидов (такролимус), природных и рекомбинантных белков и ферментов (иммуноглобулин G и церулоплазмин из плазмы крови), рекомбинантных стафилокиназы и аспарагиназы, проферментов из эндокринного сырья, природных антиоксидантов растительного происхождения (дигидрокверцетин из сибирской лиственницы, антоцианы из черники). Наши комплексы работают на многих ведущих предприятиях отечественной фармацевтической промышленности.

Отметим технологию получения свободного от вирусов высокоочищенного иммуноглобулина G, разработанную для предприятия Микроген в 2012 году и поставленную вместе с нашим оборудованием в Пермский филиал. На рис. 2 представлена фотография флакона с готовой продукцией.

Эту технологию в 2021–2023 годах использовали для получения «Ковид Глобулина» из плазмы больных, перенесших Ковид-19. Объем переработки достигал 53 тонны плазмы в год. Оборудование до сих пор работает в производстве высокоочищенного иммуноглобулина.

Для компании Супраген разработана технология очистки рекомбинантной стафилокиназы – действующего вещества препарата «Фортелизин» – эффективного фибринолитика, вышедшего на первое место в России среди аналогичных препаратов зарубежного производства (рис. 3).

Полученные знания и опыт мы использовали при разработке лабораторных хроматографов. Это было бы невозможно при отсутствии критических отечественных технологий – основных компонентов

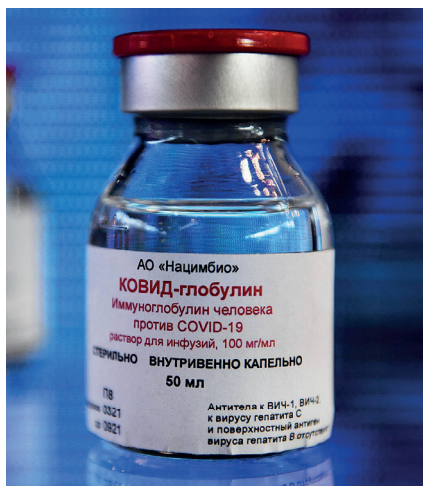


Рис. 2. Флакон с препаратом «Ковид-глобулин»



Рис. 3. Препарат «Фортелизин»

лабораторных приборов, прежде всего плунжерных насосов из инертных компонентов и переключающих кранов, производство которых освоила компания «Севко». Хроматограф среднего давления «АксиомаСтандарт» состоит из трех насосов и четырех кранов и выпускается в двух исполнениях: с потоками до 25 мл/мин и давлением до 100 бар и с потоками до 150 мл/мин и давлением до 50 бар.

Детектирование осуществляется УФ-монитором при 280 нм, на основе светодиода, контроль проводимости регистрируется кондуктометром. Это также российское производство компаний «Люмэкс» и «Эконикс Эксперт». Компоновка прибора позволяет расширить возможности детектирования за счет установки дополнительного проточного рН-метра и/или УФ-детектора с переменной длиной волны в диапазоне 190–600 нм.

На рис. 4 представлен общий вид хроматографа «АксиомаСтандарт 25» и его гидравлическая схема. Из гидравлической схемы видно, что градиент создается двумя насосами, а третий насос обеспечивает подачу образца и буферных растворов для реализации методов, включающих несколько стадий. Ввод образца можно осуществить инжектором, а дополнительный кран позволяет изменить направление потока для эффективной регенерации колонки. Наличие встроенного коллектора фракций и программное обеспечение дает возможность реализовать

циклическую схему наработки целевого продукта с промежуточной регенерацией колонки в автоматическом режиме, что значительно повышает выход продукции без затрат на дорогостоящие сорбенты и колонки большого объема.

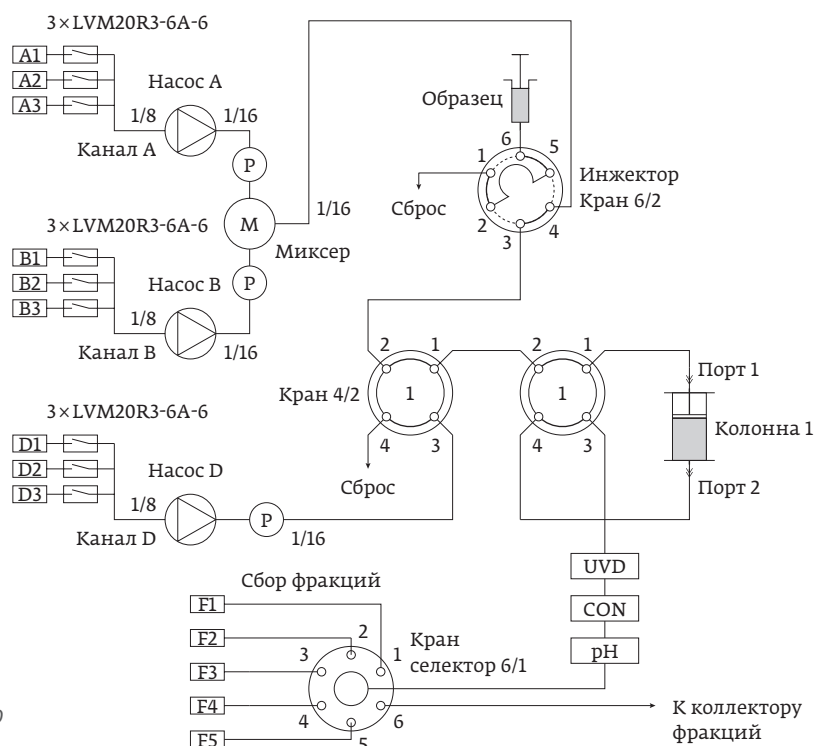
Еще одним критическим компонентом наших хроматографов является программное обеспечение (ПО) «Мультихром Аксиома». Оно основано на известной российской программе для хроматографии «МультиХром» версии 4 (компания «Амперсенд») и работает как в операционной среде Windows, так и на компьютерах под управлением ОС Астра Линукс. Гидравлическая схема хроматографа отображается на экране и визуализирует потоки элюента, положение кранов и клапанов, параметры хроматографической системы, показания детекторов, систем ввода образца и сбора фракций (рис. 5).

Функции ПО поддерживаются платой управления хроматографа, в составе которой имеется три аналого-цифровых преобразователя, семь вариантов цифровых выходов с частотной и широтно-импульсной модуляцией. Такая конфигурация прибора дает широкие возможности для наращивания функционала, позволяет, в дальнейшем, проводить модернизацию и подключать дополнительные модули в зависимости от возникающих задач.

При работе ПО записываются протоколы действия пользователя, измеряемые сигналы и команды



Рис. 4. Хроматограф «АксиомаСтандарт 25» и его гидравлическая схема



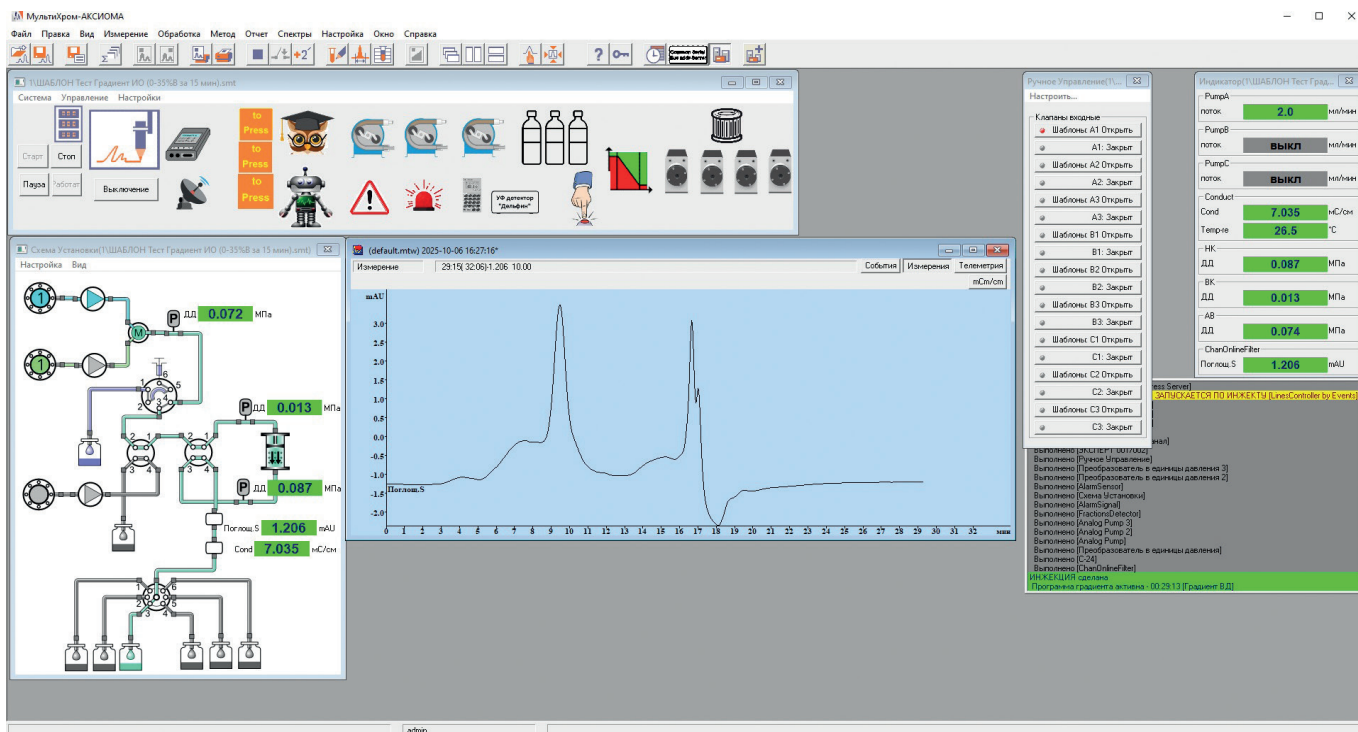


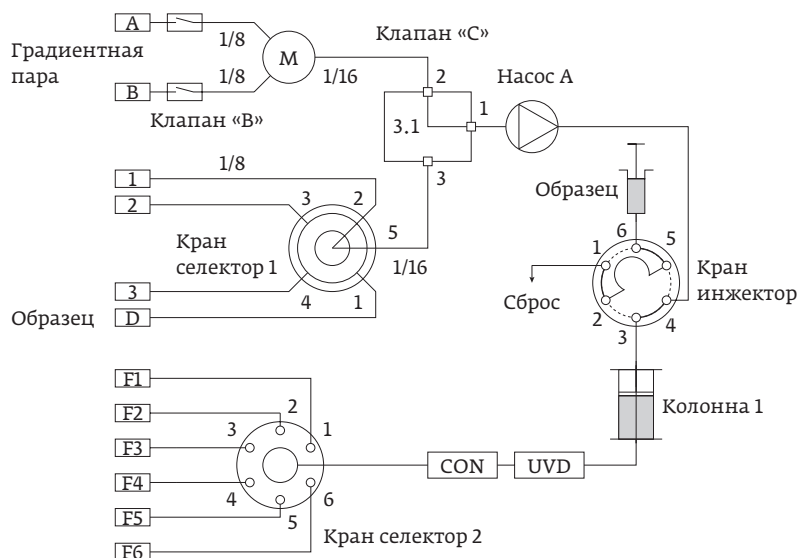
Рис. 5. Интерфейс программного обеспечения

управления (след аудирования) для соответствия стандартам GLP. ПО «МультиХром Аксиома» обеспечивает целостность данных, надежную идентификацию оператора, возможность смены оператора во время проведения процесса разделения белковой смеси или анализа. Есть поддержка валидационных процедур, включая валидацию системы (IQ/OQ/PQ), методик и самого ПО.

Для расширения сферы применения разработан бюджетный вариант хроматографа низкого давления (до 2 бар) с использованием перистальтического насоса «АксиомаДебют» (рис. 6). (Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ по развитию ответственного научного приборостроения, шифр темы: «Хроматограф».)



Рис. 6. Хроматограф «АксиомаДебют» и его гидравлическая схема



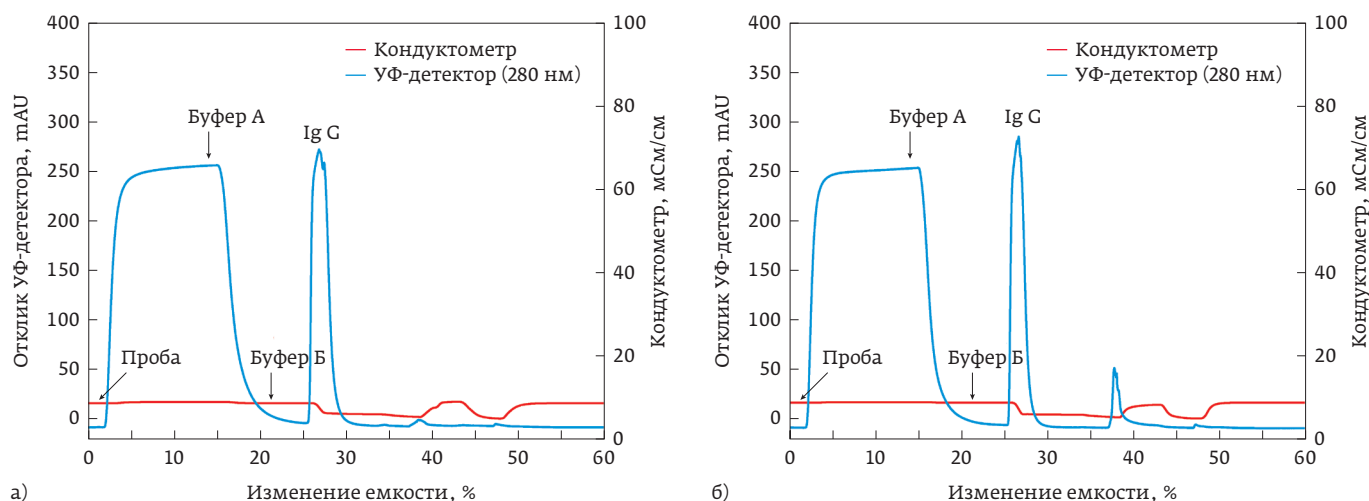


Рис. 7. Хроматограммы выделения IgG на колонке Protein A 6FF объемом 1 мл. Слева 1-й цикл, справа – 20-й цикл

Градиент создается клапанами со стороны низкого давления. Образец может наноситься как насосом по отдельной линии, так и с помощью инъекционного крана. Наличие крана выбора буферных растворов позволяет, как и в хроматографе «Аксиома Стандарт», реализовать циклическую программу наработки целевого белка.

В качестве примера на рис. 7 представлены результаты выделения иммуноглобулина G (IgG) из смеси с альбумином для демонстрации стабильности процесса в циклическом методе и возможностей хроматографа «АксиомаДебют» для наработки целевого продукта.

Хроматографию смеси IgG (1 мг/мл) и альбумина (5 мг/мл) проводили на колонке объемом 1 мл (7,3×25 мм), заполненной сорбентом Protein A 6FF (фирма Galak, Китай). Образец объемом 13 мл наносили насосом со скоростью 1 мл/мин. С такой же скоростью проводили последующие хроматографические стадии и промывки. Использовали четыре буферных раствора: элюент А: 20 мМ Na₂HPO₄; 0,15М NaCl pH 7,4 – стартовый буфер; элюент В: 0,1М глицин-HCl pH 2,5 – элюирование IgG; элюент С: 0,1М NaOH – промывка от прочих сильно связавшихся примесей; элюент D: вода – отмывка и подготовка к регенерации. Процесс осуществляли по следующей программе: 0–13 мин нанесение образца, 13–23 мин – Буфер А; 23–31 мин – Буфер В; 31–35 мин – Буфер D; 35–40 мин – Буфер С; 40–45 мин – Буфер D; 45–55 мин – Буфер А. Нанесение, очистку и сбор образца осуществляли в автоматизированном циклическом режиме, количество циклов 20.

Результат разделения практически не изменяется в течение двадцати циклов процесса. При

циклическом режиме за 20 часов удается наработать 260 мг IgG на колонке объемом 1 мл. Технические характеристики хроматографической системы позволяют применять колонки объемом 100 мл и более (колонки диаметром 24 мм), при этом за 20 часов в описанном режиме можно наработать около 25 грамм иммуноглобулинов, а при использовании полной емкости сорбента (30 мг/мл) вдвое больше.

Таким образом, хроматографы «АксиомаДебют» и «АксиомаСтандарт 25/150» обеспечивают возможность работы в лабораторном и пилотном промышленном масштабе.

Все хроматографические системы используют идентичную программу «Мультихром Аксиома», это облегчает переход от разработки до промышленной реализации технологии очистки. Большинство критических компонентов хроматографов в настоящее время уже производятся в нашей стране (насосы, переключающие краны, УФ-детекторы, проточный кондуктометр и pH-метр), что в полной мере отвечает требованиям отечественного продукта. В течение года мы планируем получить сертификат отечественного происхождения оборудования.

Для реализации лабораторных и промышленных методов очистки необходимы колонки различного размера и сорбенты с необходимыми характеристиками. Наша компания производит готовые к применению пластиковые колонки 1 и 5 мл и стеклянные колонки диаметром 10, 16 мм и от 24 до 300 мм, заполненные сорбентами различных производителей (рис. 8).

Эффективность разделения в значительной степени зависит от выбранного сорбента. Мы



Рис. 8.
Колонки для
хроматографии
белков

предлагаем наборы однотипных по химической природе сорбентов, упакованных в колонки объемом 1 мл для предварительной оценки селективности и дальнейшего правильного выбора сорбента.

Обладая большим опытом в разработке методик и технологий разделения, мы всегда готовы оказать методическую помощь в процессах выделения и очистки белков как на лабораторном, так и производственном уровне.

Авторы / Authors

Староверов Сергей Михайлович, д. х. н.,
президент АО «БиоХимМак СТ», Ленинские горы д. 1/11, Москва,

119234, РФ. Область научных интересов: химия поверхности, сорбенты на основе кремнезема, жидкостная хроматография.
Staroverov Sergei Mikhailovich,
JSC BioChemMack S&T President, Leninskie Gory b.1/11, Moscow,
119234, Russian Federation. Research interests: surface chemistry,
silica-based sorbents, liquid chromatography.
staroverov@bcmst.ru
ORCID 0000-0002-7648-2320

Конфликт интересов / Conflict of Interest

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 20.10.2025
Принята к публикации 31.10.2025