

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

ИЗДВАЈАЊЕ ТЕРАПИЈСКИХ ПРОТЕИНА ИЗ ЋЕЛИЈСКИХ КУЛТУРА (*DOWNSTREAM* ПРОЦЕСИ)

3. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

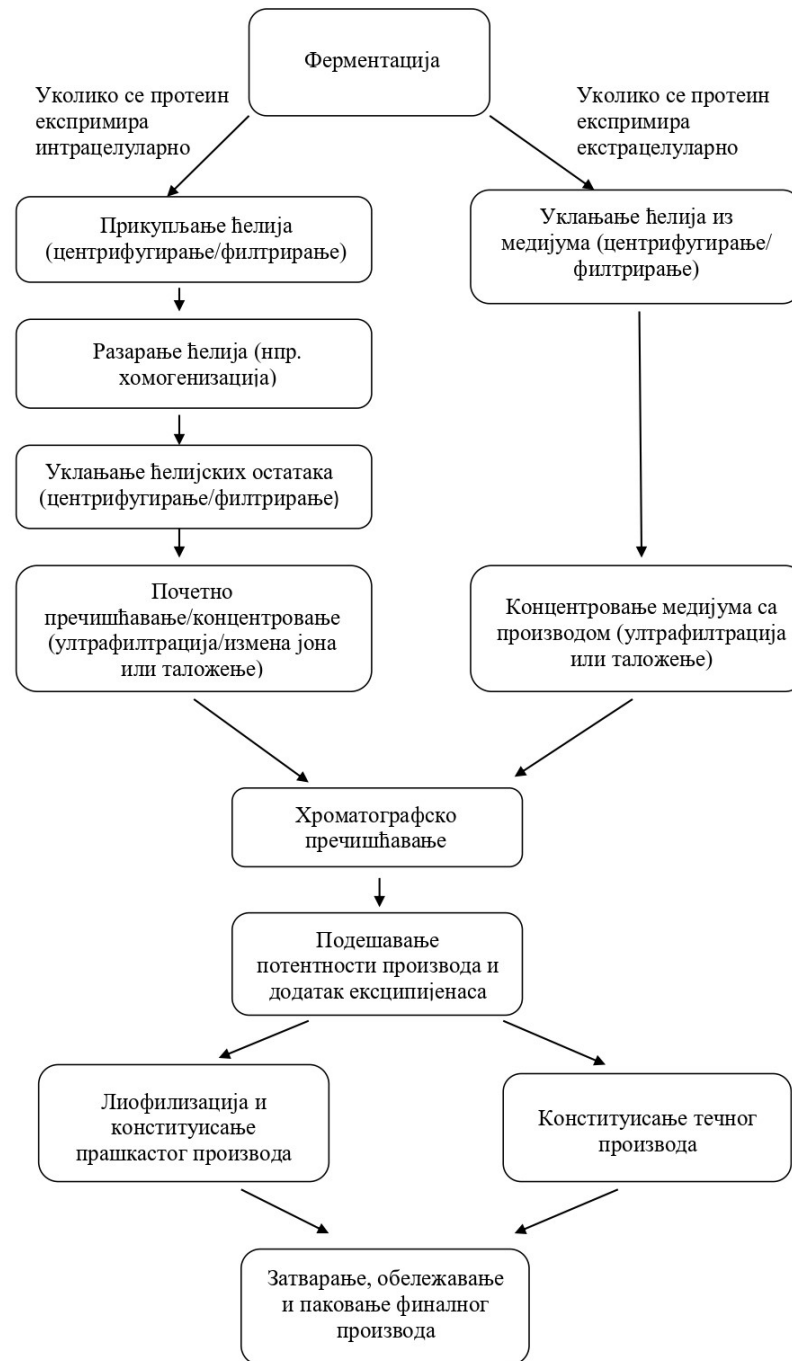
Крагујевац

Downstream процеси

- Током *upstream* процеса културе ћелија се размножавају, акумулира се биомаса и синтетише протеин од интереса, а потом следи изоловање, пречишћавање, концентровање и формулација добијеног производа у финални производ, тј. *downstream* процеси.
- *Downstream* процес се може грубо поделити у 6 фаза:
 - „жетва“ ћелија и изоловање сировог протеина,
 - концентровање и грубо пречишћавање добијеног протеина,
 - фино хроматографско пречишћавање протеина,
 - формулација финалног производа,
 - пуњење бочица производом, сушење смрзавањем (уколико је потребно) и затварање производа,
 - означавање (сигнирање) и паковање производа.

Downstream процеси

- Иако је принцип процеса производње увек исти, кораци у *downstream* процесу се разликују у зависности од биофармацеутика који се производи, а за сваки од њих произвођач задржава право поверљивости и због тога су они ретко доступни.
- *Downstream* процеси се спроводе у условима „чисте собе“ са циљем да се производ заштити од потенцијалне контаминације. Из истог разлога се у свим фазама производње биофармацеутика користи искључиво вода за инјекције (као растварач и у изради пуфера). Такође, контрола рН вредности током *downstream* процеса је неопходна, јер протеини задржавају структурни интегритет и биолошку активност само у одговарајућем опсегу рН вредности. Уколико је рН вредност изван препорученог опсега долази до денатурације протеина, при чему они губе своју карактеристичну тродимензионалну структуру, а самим тим и биолошку активност. Већина биофармацеутика је стабилна само на неутралној рН вредности (рН 5-8).



Жетва ћелија и изоловање протеина

- На крају процеса ферментације започиње прикупљање односно жетва добијеног производа, чиме започиње друга фаза у производњи биофармацеутика - *downstream* процеси. Главни циљ жетве је одвајање протеина од интереса из медијума. Изоловање подразумева брзо одвајање протеинског производа од интереса од ћелијских остатака у медијуму биореактора.
- Циљеви ове фазе су уклањање свих микрочестица, већег дела воде, додатних супстанци за раст из медијума и заштита протеинског производа од протеолитичких ензима или других деградационих компоненти. У зависности од специфичности примењене методе за изоловање (филтрација, афинитетна хроматографија), производ је након ове фазе 95% пречишћен.

Жетва ћелија и изоловање протеина

- За сваку ћелијску линију постоје одређени услови који морају бити испуњени да би се процес ферментације завршио и започела жетва протеина. Одлука о томе када су ови услови испуњени заснива се на праћењу културе, тако што се узорци узимају у одређеним интервалима да би се пратио напредак културе. У тренутку када добијени производ испуни унапред одређене параметре очекиваног квалитета (дефинисане за сваки производ понаособ) и квантитета (принос), приступа се процесу жетве. Највећи принос квалитетног производа се достиже када број ћелија у култури почне да опада, тј. ћелије почну да умиру. Међутим, у том тренутку је цела серија у опасности, јер се ослобођају ензими из лизираних ћелија који би могли да деградирају производ.

Жетва ћелија и изоловање протеина

- Основни циљ *downstream* процеса је изоловање протеина из биолошког извора, чија комплексност пре свега зависи од тога да ли се протеин експримира интрацелуларно или екстрацелуларно. Код употребе анималних ћелијских култура биофармацеутици се секретују у медијум (екстрацелуларно), док се код прокариотских ћелија протеини углавном акумулирају интрацелуларно.
- Када се жељени протеин секретује онда се ћелије прикупљају и инактивирају (нпр. аутоклавирањем), а потом одбацују, док се екстрацелуларна течност, где се налази протеин од интереса, даље процесуира. Иницијални корак у процесу пречишћавања у овом случају је уклањање ћелијских остатака и преосталих интактних ћелија центрифугирањем или микрофилтрацијом.

Жетва ћелија и изоловање протеина

- Са друге стране, уколико се жељени протеин експримира интрацелуларно, ћелије се прикупљају а потом разарају како би се ослободио интрацелуларни садржај у којем се налази протеин од интереса.
- Разарање ћелија је праћено вишеструким корацима пречишћавања како финални производ не би садржао бактеријске патогене или производе разградње (нпр. ендотоксин), који могу бити узрочници нежељених ефеката.

Разарање ћелија

- Разарање микробиолошких ћелија је отежано због присуства ћелијског зида, па су због тога развијени бројни ефикасни системи који могу разорити велике количине микробиолошких ћелија. За разарање микробиолошких ћелија користе се хемијске, физичке и ензимске методе.
- Хемијске методе подразумевају употребу:
 - детерџената;
 - антибиотика;
 - растварача (нпр. толуен, ацетон);
 - хаотропних средстава (нпр. уреа, гванидин);
 - базних супстанци.

Разарање ћелија

- Физичке методе подразумевају:
 - сонификацију;
 - хомогенизацију;
 - мешање у присуству абразива (најчешће стаклене куглице, тј. перле).
- Ензимска метода подразумева:
 - третман лизозим ензимима
- Технике разарања као што су сонификација или третман лизозим ензимима користе се само у лабораторијским условима, због ограничења опреме и економских аспеката.

Разарање ћелија хемијским методама

- Процедуре за екстракцију протеина које подразумевају употребу детерџената су ефикасне, али имају и велики број недостатака. Један од главних недостатака је што могу довести до денатурације и таложења протеина, што ограничава њихову употребу.
- Иако у неким случајевима детерџенти немају директан негативан утицај на протеин, њихово присуство у неком од следећих корака пречишћавања може бити проблематично (нпр. спречавају везивање протеина за колону и онемогућавају хидрофобне интеракције).
- Такође, присуство детерџената у финалној формулацији, чак и у траговима је неприхватљиво из медицинских разлога.

Разарање ћелија физичким методама

- Разарање микробиолошких ћелија (и неких врста анималних или биљних ткива) се најчешће спроводи механичким методама, као што су хомогенизација или снажно мешање у присуству абразива.

Хомогенизација

- Током процеса хомогенизације, суспензија ћелија пролази кроз поре малог пречника под високим притиском, што резултује настанком снажних сила раздвајања. Када суспензија микроорганизама пролази кроз излазни део, долази до тренутног пада притиска на вредности нормалног атмосферског притиска.

Разарање ћелија физичким методама

Хомогенизација

- Снажне силе раздвајања и тренутни пад притиска су веома ефикасне силе које доводе до разарања ћелија. Најчешће је један пролазак ћелија кроз хомогенизатор довољан за адекватно разарање ћелија, али је некада потребно поступак поновити 2 - 3 пута.
- Данас су доступни хомогенизатори који обрађују велике количине суспензија (неколико хиљада литара суспензије током сат времена). Постојање ефикасног система за расхлађивање смањује могућност за денатурацију протеина (у супротном, денатурација би се десила услед пораста температуре током процеса хомогенизације).

Разарање ћелија физичким методама

Мешање ћелија у присуству стаклених перли

- Мешање ћелија у присуству стаклених перли се користи као додатни метод за разарање микробиолошких ћелија у лабораторијама и у индустрији. Микроорганизми се смештају у комору са стакленим перлама пречника 0,2 - 0,3 mm. Ова смеша се потом снажно мућка, па услед јаких судара између микробиолошких ћелија и стаклених перли долази до разарања ћелија. Ове силе обезбеђују ефикасно разарање већине микробиолошких ћелија. Како би се постигло оптимално разарање одређених ћелија подешавају се различити параметри (однос броја ћелија и перли, као и брзина и трајање мућкања).

Разарање ћелија физичким методама

Мешање ћелија у присуству стаклених перли

- Системи који се користе у лабораторијама могу хомогенизовати неколико грама микробиолошких ћелија у минути, док индустријски куглични млинови могу обрађивати 1000 L ћелијске суспензије током сат времена.
- Системи за хлађење своде на минимум инаktivацију протеина која би могла да настане услед ослобађања топлоте током разарања ћелија.

Уклањање нуклеинских киселина

- Након завршеног процеса разарања ћелија започиње процес пречишћавања. Како би се ефикасно сакупили остаци ћелија из оваквих раствора неопходно је повећање центрифугалне силе и дуже центрифугирање.
- Пре пречишћавања ослобођеног интрацелуларног протеина неопходно је уклањање нуклеинских киселина јер значајно повећавају вискозитет ћелијског хомогената, што отежава даље процесуирање хомогената, нарочито у индустрији.
- Ефикасно уклањање нуклеинских киселина је нарочито битно у пречишћавању протеина који су намењени за терапијску употребу. У регулативама се наводи да укупни садржај нуклеинских киселина у финалном производу не сме бити већи од неколико μg /доза.
- Ефикасно уклањање нуклеинских киселина током процеса пречишћавања протеина може се постићи преципитацијом или употребом нуклеаза.

Уклањање нуклеинских киселина

Преципитација нуклеинских киселина

- Велики број катјона може ефикасно да преципитира ДНК и РНК јер стварају комплексе са негативно наелектрисаним нуклеинским киселинама. Најчешће се као преципитант користи полиетиленимин (катјонски полимер дугог ланца). Након таложења, преципитат се заједно са остацима ћелија уклања центрифугирањем или филтрацијом.
- Примена полиетиленимина у процесу пречишћавања протеина намењених за терапијску употребу се не препоручује јер мале количине неизреагованог мономера, које су канцерогене, могу остати у препарату. Уколико се ипак полиетиленимин користи, онда се мора обезбедити комплетно уклањање полимера и његових мономера кроз наредне кораке пречишћавања.

Уклањање нуклеинских киселина

Употреба нуклеаза за уклањање нуклеинских киселина

- Нуклеинске киселине се најчешће уклањају из ћелијског хомогената помоћу нуклеаза које катализују ензимску деградацију нуклеинских киселина. Предности употребе нуклеаза су:
 - ефикасност;
 - економска исплативост;
 - безбедност (за разлику од многих раније коришћених хемијских преципитаната, нуклеазе су безбедне и не угрожавају финални производ).

Концентровање производа

- Након изолације протеина добија се веома разблажен производ протеина, концентрације свега 10 до 200 mg/L. Концентровање подразумева повећање концентрације сировог протеинског производа, чиме се добијају мање запремине, које су погодније за даљи рад и које убрзавају даљи поступак обраде.
- Концентровање производа може се постићи преципитацијом, и то употребом соли (амонијум сулфат) или растварача (етанол). Настали преципитат се потом прикупља центрифугирањем/филтрацијом и раствара у малој количини пуфера. Филтрација се користи и за концентровање протеина пре даљег пречишћавања. Грубо пречишћавање подразумева уклањање крупних контаминаната, укључујући хомологе протеине ћелије домаћина и случајних вируса (нпр. пореклом од особља), као и свих потенцијално контаминирајућих материја насталих у току процеса производње.

Концентровање производа

- За концентровање раствора са протеинима може се користити и јоноизмењивачка хроматографија.
- Међутим, обе методе обезбеђују само делимичну пречишћеност протеина, јер се неће сви типови протеина присутни у сировом препарату преципитирати или везати за јонски измењивач заједно са циљним протеином.

Концентровање производа

Ультрафилтрација

- За почетно концентровање производа најчешће се користи ултрафилтрација помоћу мембрана величине пора 1 - 20 nm. Ове поре су довољно мале да задрже и протеине мале молекулске масе (од 1 до 300 kDa). Важно је да материјал од којих се израђује мембрана има малу способност адсорпције протеина.
- Мембране ултрафилтера се најчешће израђују од целулоза-ацетата или целулоза-нитрата, али се могу користити и поливинил-хлорид и поликарбонат. Ови „пластични“ типови мембрана имају већу хемијску и физичку стабилност у поређењу са мембранама на бази целулозе.
- У лабораторијским условима се најчешће користи равна мембрана која се поставља на потпорну мрежу на дну ћелијске коморе. Како би се спречило смањење брзине протока кроз мембрану користи се механизам за мешање који спречава концентрисање молекула који не могу да прођу кроз мембрану.

Концентровање производа

- Ультрафилтрацијом се постиже:
 - делимично пречишћавање протеина;
 - уклањање пирогена из раствора;
 - уклањање молекула мале молекулске масе из протеинског раствора (дијафилтрација).
- Ультрафилтрација је метода избора за концентровање протеина због бројних предности:
 - не смањује биоактивност протеинских молекула;
 - обезбеђује висок принос чистог производа >99%;
 - већа брзина концентровања;
 - не захтева много додатне опреме.

Концентровање производа

- Недостатак ове методе је могућност брзог запушења мембране (нпр. вискозни раствори брзо смањују проток и продужавају трајање процеса).
- Ультрафилтрација се такође користи између два корака хроматографије да би се производ концентровао и уклонио пуфер из раствора како би се припремили услови за следећи корак хроматографије.
- Најзад, стерилизација филтрацијом директног протока која подразумева употребу кетрица са нанофилтрима, омогућава уклањање микробиолошких организама, нерастворних протеина, нежељених и ендогених вируса, као и стерилизацију производа у припреми за коначну формулацију.

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Након што се протеин изолује и концентрује неопходно је пречишћавање до постизања хомогености, тј. морају се одстранити сви непотребни протеини, као и потенцијално контаминирајући агенси. Пречишћавање се најчешће спроводи употребом комбинације хроматографских техника.
- Фино пречишћавање подразумева елиминацију контаминаната присутних у траговима и нечистоћа, као што су неактивне или нежељене изоформе терапијских протеина или уобичајених нечистоћа укључујући фрагменте протеина или њихове хемијске модификације.
- Пример за то су делимично савијени протеини, погрешно комбиновани пептидни ланци или пептидни ланац са модификованим бочним ланцима аминокиселина, као што су оксидоване или деаминоване форме.
- Фазе грубог и финог пречишћавања омогућавају уклањање ненамерно унетих ендогених вируса из производа, као и преосталих трагова ДНК, ендотоксина и протеина ћелије домаћина.

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Принцип хроматографије се заснива на томе да се молекули из смеше нанети на стационарну фазу одвајају једни од других током кретања кроз колону „ношени“ мобилном фазом.
- Стационарна фаза је чврста фаза фиксирана унутар колоне за коју су везане одговарајуће поларне или неполарне функционалне групе које дају карактер колони (нпр. колоне C-18).
- Мобилна фаза је течна фаза која пролази кроз колону преко стационарне фазе која такође може бити поларног или неполарног карактера. А раздвајање молекула из смеше (нпр. раздвајање протеина од интереса од нечистоћа), заснива се на њиховој природи (поларности, наелектрисању, величини, облику и др.), све у зависности од основа раздвајања хроматографске технике.

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Адсорбенти који се користе за израду стационарне фазе могу бити неорганске природе, као што су силикагел, стаклене перле, хидроксиапатит, разни оксиди метала (алуминијум оксид), и органски полимери (умрежени декстрини, целулоза, агароза), све у зависности од типа хроматографске технике.
- Након што се кроз хроматографску колону пропусти мобилна фаза која садржи и узорак (протеин) који се пречишћава, раздвајање се дешава интеракцијом компоненти узорка са стационарном фазом, односно са поларним или неполарним групама везаним за стационарну фазу. На интеракције са стационарном фазом утичу функционалне групе протеина које јонизују (нпр. амино- и карбоксилна група), карбонилне функционалне групе и групе које су доноси и акцептори водоничне везе. Уколико протеин оставрује интеракције са стационарном фазом смањује се брзина елуирања.

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Идеална стационарна фаза за одвајање протеина треба да поседује високу механичку чврстоћу, велику порозност, висок капацитет, биокомпатибилност и високу стабилност матрикса у разним растварачима. Такође је пожељно да стационарна фаза не ступа у неспецифичне интеракције са протеинима.
- Различитим хроматографским техникама могу се раздвојити протеини на основу њихових карактеристика. Протеини се разликују према: величини, облику, наелектрисању, присуству хидрофобних група на површини и способности за везивање различитих лиганата. Због ових разлика, неке компоненте смеше остају дуже у стационарној фази и полако се крећу кроз хроматографски систем, док друге брзо прелазе у мобилну фазу и брже напуштају систем. Иако протеински молекули могу бити међусобно слични, сваки тип протеина поседује одређену комбинацију карактеристика, тј. протеински хроматографски „отисак прста“.

Техника	Стационарна фаза (чврста)	Основ раздвајања
Јоноизмењивачка хроматографија	катјонска или анјонска	Разлике у површинском наелектрисању протеина при датој рН вредности
Гел-филтрација	микропорозне куглице силицијум диоксида	Разлике у маси/облику различитих протеина
Афинитетна хроматографија	агароза или порозне стаклене перле на којима су имобилисани молекули попут ензима и антитела	Биоспецифична интеракција протеина и одговарајућег лиганда
Хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама	умрежени агарозни гелови који садрже октил- и фенил- хидрофобне групе	Разлике у површинској хидрофобности протеина
Хроматофокусирање	катјонска или анјонска	Разлике у изоелектричним тачкама

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Осим гел-филтрације, све остале врсте хроматографија које се користе у пречишћавању протеина су адсорптивне природе. У адсорпционој хроматографији стационарна фаза је поларнија од мобилне фазе.
- Протеин од интереса се селективно везује за матрикс при одређеним условима и ослобађа се када се ти услови промене. Узорак се додаје у колону под условима који фаворизују селективно задржавање циљног протеина. У идеалном случају, циљни протеин се једини задржава на колони, али је у пракси то веома ретко. Колона се затим „испира“ мобилном фазом у циљу отклањања невезаног материјала. Након тога се састав мобилне фазе мења, како би се омогућила десорпција везаног протеина (одлепљивање са колоне).

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Фракције елуата се прикупљају и анализира се количина укупног протеина и протеина од интереса. Фракције које садрже циљни протеин се „пулују“ (спајају) и подвргавају следећем кораку пречишћавања. Коришћењем неке од ових метода значајно се повећава чистоћа протеина од интереса, док се применом комбинације метода добијају високо пречишћени протеински препарати.
- У процесима добијања протеина од интереса у фармацеутској биотехнологији користи се комбинација 2 - 4 различите хроматографске методе које су високо аутоматизоване и софтверски контролисане.

Хроматографске методе за пречишћавање протеинских производа

- Најчешће коришћене хроматографске методе су гел-филтрација и јоноизмењивачка хроматографија. Такође, афинитетна хроматографија се користи када год је то могуће, јер њена висока биоспецифичност олакшава постизање високог степена пречишћавања. Хроматографске колоне средње величине (капацитета 5 - 15 L) су израђене од каљеног стакла или пластике, док су веће процесне колоне израђене од нерђајућег челика.
- Процес хроматографске сепарације се углавном одвија под ниским притиском. Међутим, може се користити и хроматографија под високим притиском (енгл. *High pressure liquid chromatography* - HPLC), када то не утиче негативно на протеински производ, нпр. у случају производње инсулина.

Гел-филтрација

- Гел-филтрација, односно ексклузиона хроматографија, омогућава раздвајање протеина на основу разлике у њиховој молекулској маси и облику. Сходно томе да већина протеина произведених у ћелијским културама има сличан облик, раздвајање се заснива на разликама у молекулској маси.
- Приликом процеса гел-филтрације треба узети у обзир различите параметре:
 - избор гел матрикса,
 - запремину и концентрацију узорка,
 - параметре колоне,
 - избор елуента,
 - брзина протока кроз колону,
 - чишћење и складиштење колоне.
- Такође, на гел-филтрацију утичу и стабилност матрикса на примењене органске раствараче, промене рН вредности и температуре, као и компатибилност матрикса са молекулима који се одвајају.

Гел-филтрација

- Раздвајање протеина гел-филтрацијом постиже се пропуштањем раствора који садржи протеин од интереса кроз колону у којој се налази гел матрикс.
- Током гел-филтрације, протеини мале молекулске масе се задржавају у гел матриксу, док протеини велике молекулске масе немају ту способност, па јако брзо пролазе кроз колону, тј. елуирају се.
- Унутрашња структура гел матрикса подсећа на лавиринт кроз који мали протеини могу пролазити и задржати се у гелу. У овом лавиринту постоје путеви различите дужине тако да у зависности од величине протеина зависи и брзина којом ће он путовати кроз гел матрикс. Што је протеин мање молекулске масе, доступнији му је већи број путева и дуже се задржава у гел матриксу, тако да се прво елуирају протеини веће молекулске масе, а потом све мањи протеини.

Гел-филтрација

- Гел матрикс се најчешће припрема умрежавањем полимерних молекула као што су: декстран, агароза, полиакриламид, винил полимери (поливинилетил-карбитол, поливинил пиролитон), целулоза, материјали на бази силицијум диоксида или мешавине попут декстран-полиакриламида или декстран-агарозе.
- Најчешће се користе гел матрикси који се састоје од порозних перли састављених од умреженог полиакриламида, агарозе, декстрана или њихове комбинације.
- Ови гел матрикси се формулишу у суспендованом облику или у прашкастом облику.

Гел-филтрација

- Величина пора у гел матриксу зависи од интензитета њиховог умрежавања, тако да што се више полимери повезују, стварају се мање поре и структура гела постаје ригиднија.
- Поре код високо умрежених гел матрикса су мале величине и спречавају улазак протеина у гел матрикс.
- Овакви матрикс гелови се могу користити за раздвајање протеина од осталих молекула и често се користе за уклањање пуферских компоненти мале молекулске масе и соли из протеинских раствора.

Гел-филтрација

- Гел-филтрација се ретко користи током иницијалних фаза пречишћавања протеина, јер се колоне лако запрљају различитим нечистоћама из узорка.
- Најчешће се користи при крају процеса пречишћавања, када је протеин од интереса релативно чист и присутан у малој концентрованој запремини.
- Гел-филтрација се углавном користи за одвајање протеина од соли (нпр. после корака таложења амонијум сулфатом).
- Како би раздвајање било ефикасно, у колону се уносе мале количине раствора (2 - 5% од укупне запремине колоне).

Гел-филтрација

- Раствор у ком се налази протеин од интереса се пропушта кроз колону и протеинске компоненте се постепено елуирају из раствора употребом одговарајућег пуфера. У многим случајевима елуат из колоне пролази кроз детектор, што олакшава моменталну детекцију протеинских фрагмената. Елуат се сакупља као низ фракција, а свака од фракција може бити запремине неколико литара.
- Иако је гел-филтрација ефикасна техника за пречишћавање протеина, она има одређене недостатке:
 - добијање значајно разблаженог раствора протеина;
 - проток кроз колону је спорији него код других хроматографских техника (време обраде узорка је дуго, што је за индустрију неповољно јер повећава трошкове).

Јоноизмењивачка хроматографија

- Јоноизмењивачка хроматографија може да се користи у позитивном или негативном режиму, па тако нпр. у негативном режиму производ тече кроз колону под условима који фаворизују адсорпцију контаминаната на матрикс, док се протеин од интереса не везује. Стога се сходно карактеристикама протеина који се пречишћавају (нпр. изоелектрична тачка) одређује врста потребне колоне.
- У јоноизмењивачкој хроматографији чврсту стационарну фазу чини измењивач јона, најчешће неки нерастворни материјал, попут полимерне смоле (нпр. полистиренска смола умрежена помоћу дивинил-бензена). Измењивачи јона садрже везане јоне који могу бити замењени јонима присутним у узорку.
- Могу бити анјонски и катјонски: анјонски измењивачи везују негативно наелектрисане молекуле, док катјонски измењивачи везују позитивно наелектрисане молекуле.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Концентрација соли у пуферу за елуирање се повећава континуирано или постепено. Што је чвршће везан протеин за јонски измењивач, то ће се касније појавити у пуферу за елуирање. Слично је код хроматографије са рН градијентом - рН вредност се мења континуирано или постепено, а протеин се везује при једној рН, а ослобађа при другој рН вредности. Сходно томе, као резултат хетерогености у гликозилацији, гликозиловани протеини се могу елуирати у релативно широком рН опсегу (до 2 рН јединице).
- Одређене есенцијалне аминокиселине које улазе у састав протеинских ланаца имају наелектрисане бочне ланце. На рН вредности 7 аспарагинска и глутаминска киселина имају негативно наелектрисане бочне киселе групе, док лизин, аргинин и хистидин имају позитивно наелектрисане базне групе.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Протеини поседују позитивно и негативно наелектрисање које зависи од удела ових аминокиселина (N-терминалне аминок групе и C-терминалне карбоксилне групе такође доприносе укупном наелектрисању протеина). Укупно наелектрисање присутно у неком протеину зависи од релативне заступљености ових аминокиселина у протеину и рН вредности протеинског раствора.
- Вредност рН на којој протеински молекул поседује наелектрисање 0 назива се изоелектрична тачка (pI). На рН вредностима изнад изоелектричне тачке протеин ће бити негативно наелектрисан, док ће на рН вредностима нижим од изоелектричне тачке протеин бити позитивно наелектрисан.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Јоноизмењивачка хроматографија се заснива на принципима реверзибилне електростатичке привлачности наелектрисаног молекула (протеина од интереса) и стационарне фазе која садржи ковалентно везане функционалне групе супротног наелектрисања. Протеини се из колоне елуирају додатком пуфера који утиче на промену рН вредности или повећањем концентрације соли у пуферу за испирање.
- Јоноизмењивачка колона која поседује ковалентно везане позитивне групе назива се анјонски измењивач и адсорбује анјонске протеине (тј. негативно наелектрисане протеине). Позитивно наелектрисане функционалне групе у анјонском измењивачу су најчешће аминокиселинске и диетиламинокиселинске групе. Елуирање се постиже употребом пуфера за испирање, при чему анјони замењују протеине у јоноизмењивачком матриксу. На физиолошкој рН вредности већина протеина је негативно наелектрисана, тако да се анјонско измењивачка хроматографија чешће користи.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Јоноизмењивачка колона која поседује ковалентно везане негативне групе назива се катјонски измењивач и адсорбује катјонске протеине (тј. позитивно наелектрисане протеине). Негативно наелектрисане функционалне групе у катјонском измењивачу су најчешће сулфо и карбоксиметил групе.
- Током процеса измене катјона, позитивно наелектрисани протеини се везују за негативно наелектрисан јоноизмењивачки матрикс изменом јона (често H^+) и формирањем електростатичких интеракција. Елуирање се постиже употребом пуфера за испирање, при чему катјони (најчешће Na^+ из NaCl) замењују протеине у јоноизмењивачком матриксу.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Код већине процеса пречишћавања протеина користи се бар један корак пречишћавања на јоноизмењивачкој колони. Ова техника се често примењује због:
 - могућности високог степена пречишћавања;
 - једноставности повећања запремине раствора која ће се пречишћавати (погодно за индустрију);
 - једноставног руковања;
 - једноставне регенерације колоне;
 - могућности концентровања протеина од интереса;
 - тога што је једна од најјефтинијих доступних хроматографских техника.

Јоноизмењивачка хроматографија

- Да би се поједноставило пречишћавање, протеину се може додати специфични маркер (тако што се у ген који кодира синтезу протеина од интереса инсертује секвенца која ће кодирати синтезу полиаминокиселинског ланца).
- На пример, маркер који се састоји од остатака аргинина омогућава протеину да се веже за катјонски измењивач под условима у којима се скоро ниједан други ћелијски протеин не везује. Међутим, ограничење ове технике је што се може користити само у лабораторијским условима али не и у индустрији, због проблема везаних за уклањање аргинина или других специфичних маркера протеина.

Хроматофокусирање

- Хроматофокусирање се заснива на раздвајању протеина на основу разлике у њиховим изоелектричним тачкама. У овој техници се користи јоноизмењивачка колоне у којој се налази пуфер који омогућава стварање рН градијента дуж колоне (рН вредност дуж колоне расте). У циљу максималног раздвајања протеина рН градијент мора бити линеаран. Постигнут опсег рН градијента зависи од рН вредности пуфера за елуирање и рН вредности на које је јонски измењивач еквилибрисан.
- Узорак се меша са пуфером чија је рН вредност нижа у односу на рН вредност на почетку колоне. Након примене узорка, колоне се константно испира пуфером који мења рН вредност у колони и омогућава кретање протеина кроз колону.

Хроматофокусирање

- Негативно наелектрисани протеини се одмах адсорбују на анјонски измењивач, а позитивно наелектрисани протеини путују даље кроз колону. Због повећања рН вредности дуж колоне позитивно наелектрисани протеини долазе до тачке где је рН вредност колоне једнака њиховој pI , а даљим кретањем низ колону ти протеини постају негативно наелектрисани јер рН вредност расте изнад њихове pI , и то условљава њихово везивање за колону.
- Након прве примене пуфера за елуирање сви протеини се крећу низ колону док не дођу до рН вредности у колони која је изнад вредности њихове pI . У овој фази они се везују за анјонски измењивач. На тај начин се фракционишу протеини, који имају различите изоелектричне тачке.

Хроматофокусирање

- Формирани рН градијент није статичан. Константном применом пуфера за елуирање рН вредност дуж колоне се мења. Према томе, сви протеини везани за колону ће се одвојити услед примене пуфера за елуирање када околна рН вредност буде испод њихове pI и они постану позитивно наелектрисани.
- Тако одвојени протеини путују низ колону док не дође до следеће тачке рН вредности која ће бити изнад његове pI где ће се поново везати за колону.
- Овај процес се понавља све док протеин не напусти колону на својој pI .

Хроматофокусирање

- Како би се постигли најбољи резултати, идеално је да колона буде подешена тако да протеин од интереса своју pI достигне на средини pH градијента.
- Ова техника је ефикасна када се користи заједно са другим хроматографским методама током пречишћавања протеина.
- Чешће се користи у лабораторијским условима, јер је за употребу у индустрији неисплатива због великог утрошка пуфера за елуирање.

Хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама

- Од 20 аминокиселина које се најчешће налазе у структури протеина, њих осам се, због неполарне природе бочних ланаца, класификују као хидрофобне. У хидрофобне аминокиселине се сврставају: аланин, валин, леуцин, изолеуцин, пролин, триптофан, метионин и фенилаланин.
- Хидрофобне групе у протеину су међусобно повезане хидрофобним интеракцијама и окренуте ка унутрашњости протеина, а само мали број хидрофобних група остаје на површини протеина изложен воденој средини. Протеински молекули се разликују по броју и типу хидрофобних аминокиселина на својој површини, а самим тим и по степену хидрофобности. Хидрофобне аминокиселине имају тенденцију да се групишу у виду гроздова или трака на површини протеина.

Хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама

- Хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама раздваја протеине на основу разлике у степену хидрофобности, тј. заснива се на нековалентним хидрофобним интеракцијама између протеина и стационарне фазе. Након додавања узорка у колону настају хидрофобне интеракције између хидрофобних делова на површини протеина и хидрофобних група које су ковалентно везане за матрикс (стационарна фаза).
- Најчешће коришћени матрикси за ову врсту хроматографије су умрежени агарозни гелови (октил- и фенил-сефарозе који садрже октил- и фенил- хидрофобне групе). Одвајање протеина употребом хроматографије засноване на хидрофобним интеракцијама зависи од интеракција између протеина, гел матрикса и воденог растварача у окружењу.

Хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама

- Пожељно је да се протеински узорци додају у колону за хидрофобне интеракције у условима јаке јонске снаге. Услед хидратације соли у раствору долази до формирања „штита“ сачињеног од молекула воде око сваког јона. На овај начин, молекули воде се удаљавају од протеинских молекула, чиме се омогућава откривање хидрофобних делова на површини протеина.
- Док се протеини пропуштају кроз колону, одређени део ће хидрофобним интеракцијама бити задржан на колони. Што је протеин хидрофобнији, то ће и везивање за колону бити снажније.
- Након корака испирања, везани протеин може се елуирати променом услова који ће смањити хидрофобне интеракције. То се може постићи применом:
 - пуфера за испирање који има мању јонску снагу;
 - одговарајућег детерџента;
 - етанола или етилен гликола за смањење поларности пуфера.

Афинитетна хроматографија

- Афинитетна хроматографија је најсензитивнија метода за пречишћавање протеина. Ова техника се заснива на способности протеина да се специфично и реверзибилно везују за друга једињења, лиганде.
- Велики број различитих лиганада се може ковалентно везати за инертни матрикс сачињен од агарозних перли или силикатних честица и “спаковати” у хроматографску колону. У таквом систему, само протеински молекули који се селективно везују за имобилисани лиганд се задржавају на колони.
- Испирањем колоне одговарајућим пуфером, испраће се сви невезани молекули. Елуирање везаних протеина из колоне постиже се променом састава елуционог пуфера, тако да је афинитет протеина за имобилисани лиганд знатно смањен.

Афинитетна хроматографија

- Бројне нековалентне интеракције доприносе протеин-лиганд интеракцијама, због чега је понекад за елуацију протеина од интереса довољно:
 - променити рН вредност пуфера;
 - променити јонску снагу раствора;
 - додати детерџенте;
 - додати супстанце које смањују поларност раствора (нпр. етиленгликол).
- Међутим, некада је неопходна примена компетитивног лиганда (слободни супстрат, аналог или кофактор) који ће помоћи одвајање. Употреба компетитивних лиганда резултује селективнијим одвајањем протеина у односу на одвајање уз промену рН вредности или јонске снаге раствора. Оптимални услови за одвајање протеина са површине колоне утврђују се емпиријски, а некада се користи и комбинација различитих начина за елуацију.

Афинитетна хроматографија

- Афинитетна хроматографија има бројне предности у односу на конвенционалне хроматографске технике:
 - веома висока селективност и специфичност - повећава се чистоћа преко 1000 пута, са приносом $\approx 100\%$, у лабораторијским условима;
 - увођењем афинитетне хроматографије у процес пречишћавања протеина драстично се смањује број потребних корака за постизање одговарајуће чистоће протеина.

Међутим, постоје и одређени недостаци ове методе:

- биоспецифични лиганди могу бити скупи и недовољно стабилни;
- технике спајања лиганада са матриксом могу бити хемијски комплексне, дуготрајне и скупе;
- испирање везаног лиганда из матрикса може да:
 - смањи капацитет система;
 - изазове цурење хемијских агенаса у протеински производ.

Афинитетна хроматографија

- Овај тип хроматографије се не користи на самом почетку пречишћавања протеинског производа, јер различити ензими присутни у сировом препарату могу променити или деградирати скупе афинитетне гелове. Међутим, требало би да се користи што је раније могуће у процесу пречишћавања, како би се искористио пун потенцијал ове методе у погледу високе специфичности.
- У афинитетне хроматографије се убрајају:
 - Имуноафинитетна хроматографија
 - Протеин А хроматографија
 - Лецитин афинитетна хроматографија
 - Хроматографија заснована на афинитету према бојама
 - Метал-афинитетна хроматографија

Имуноафинитетна хроматографија

- Имуноафинитетна хроматографија је најспецифичнија од свих биоспецифичних хроматографија која може врло брзо и ефикасно пречистити антигене (протеине) до високог степена чистоће. У овој методи користи се стационарна фаза (агароза или порозне стаклене перле) која је импрегнирана специфичним антителима.
- Одвајање насталог комплекса са површине колоне може захтевати услове који могу довести до делимичне денатурације везаног протеина (нпр. промена рН вредности пуфера или употреба хаотропних супстанци као што су уреа или гванидин).
- Најчешће се за елуирање користи глицин-НСI пуфер који подешава рН вредност у опсегу 2,2 - 2,8, а некада се за елуирање користе алкални пуфери.

Имуноафинитетна хроматографија

- Антитела се могу користити за пречишћавање нативних протеина и рекомбинантних протеина у комбинацији са другим методама. Међутим, постоји неколико главних фактора који ограничавају употребу антитела код имуноафинитетне хроматографије:
 - велики трошкови и време потребно за производњу моноклонских антитела у жељеном обиму;
 - висока специфичност антиген-антитело интеракција захтева изолацију специфичних антитела за изолацију антигена из одређеног извора;
 - имобилизација антитела на колону често доводи до смањења или потпуног губитка њихових капацитета за везивање за антиген;
 - антитело-антиген комплекси високог афинитета се тешко одвајају, што често доводи до инактивације протеинског производа током елуирања из имобилисаног антитела.

Имуноафинитетна хроматографија

- Из тог разлога, за пречишћавање протеина са антителима треба изабрати антитела ниског афинитета како би се избегла денатурација пречишћених протеина. Са аспекта трошкова и безбедности, најпогоднији су нови синтетички лиганди (синтетички лиганди који мимикују протеин А и L) који су јефтинији и смањују ризик од контаминације који је повезан са применом природних лиганда хуманог или анималног порекла за изоловање антитела.
- Пример употребе имуноафинитетне хроматографије у индустрији је пречишћавање рекомбинантног фактора коагулације VIII.

Протеин А хроматографија

- Већина врста *Staphylococcus aureus* ствара протеин познат као протеин А. Протеин А се специфично и са великим афинитетом везује за Fc фрагмент имуноглобулина G, како хуманог, тако и пореклом из организама других сисара.
- Иммобилизацијом протеина А (стационарна фаза) на хроматографску колону сачињену од природних (агароза, целулоза) или синтетичких (полистирен-дивинил бензен, полиметакрилат) материјала, ствара се афинитетни систем који се користи за пречишћавање IgG. Међутим, постоје значајне варијације у афинитету везивања протеина А за различите подкласе IgG добијене од различитих сисара.

Протеин А хроматографија

- У неким случајевима се уместо протеина А користи протеин М. Већина имуноглобулина који се везују за протеин А то чине у алкалним условима, а потом се елуирају у киселој средини.
- На пример, препарат фактора IX се пречишћава имуноафинитетном хроматографијом, у којој је стационарна фаза импрегнирана анти-IX мишјим моноклонским антителом које омогућава везивање фактора IX у присуству пуфера који садржи Ca^{2+} јоне.
- Елуирање фактора IX са колоне се постиже додатком хелатног средства (нпр. EDTA) у пуфер за елуацију.

Лецитин афинитетна хроматографија

- Лецитин афинитетна хроматографија се користи за пречишћавање великог броја гликопротеина. Лецитини везују одређене моносахариде (α -D-маноза, α -D-глукоза, D-N-ацетил галактозамин), а многи везују и неке полисахариде. Најпознатији и најчешће коришћени су конканавалин А (Con A), лецитин из соје (SBL) и аглутинин из пшеничних клица (WGA). Гликопротеини се везују за лецитин на колони при неутралној рН вредности.
- За елуирање гликопротеина са колоне користи се пуфер другачије рН вредности или пуфер са компетитивним лигандом (угљени хидрати за које лецитин има висок афинитет као што су α -метилманозид, α -метилглукозид, лактоза, L-фукоза, D-маноза, галактоза).

Лецитин афинитетна хроматографија

- Иако се лецитин афинитетна хроматографија може користити за пречишћавање великог броја гликопротеина, није толико заступљена због бројних недостатака:
 - већина лецитина је скупа;
 - сирови протеински узорци садрже више од једног гликопротеина - у већини таквих случајева ће се употребом лецитин афинитетне хроматографије добити смеша гликопротеина;
 - недовољно искуства у индустријској примени.

Хроматографија заснована на афинитету према бојама

- Запажање да се одређени протеини другачије елуирају са колоне за гел-филтрацију у присуству декстран-плавог довело је до развоја хроматографије засноване на афинитету према бојама.
- Декстран-плаво састоји се од триазин боје која је ковалентно везана за декстран, молекул велике молекулске масе. Откриће да неки протеини везују триазинску боју убрзо је довело до његове употребе као афинитетног адсорбента имобилисаног на агарозном матриксу.
- Данас се бројне триазинске боје користе као афинитетни адсорбенци, јер имају способност да вежу поједине протеине.

Хроматографија заснована на афинитету према бојама

Предности ове методе:

- доступност и приступачност боја;
- хемијско везивање боја за матрикс је прилично једноставно, најчешће не захтева ништа више од инкубације у базним условима при повишеној температури (избегава се употреба штетних хемијских агенаса за везивање, попут цијаноген-бромида);
- веза између матрикса и боје је резистентна на хемијску, физичку и ензимску деградацију - на овај начин, цурење лиганда из колоне је минимално и уколико се деси, лако се препознаје због боје;

Хроматографија заснована на афинитету према бојама

Предности ове методе:

- капацитет везивања протеина је висок и превазилази капацитете природних биоспецифичних лиганата;
- релативно лако се постиже елуирање везаног протеина применом хаотропних агенаса, као што су уреа и гванидин.

Највећи недостатак је то што се не може предвидети да ли ће се жељени протеин задржати на колони, као ни услови који ће омогућити оптимално везивање и елуирање, већ се те информације добијају из праксе.

Метал-афинитетна хроматографија

- Метал-афинитетна хроматографија развијена је 70-их година прошлог века и представља псеудоафинитетну методу за пречишћавање протеина. Адсорпција се заснива на формирању слабих координационих веза између слободних група на површинама протеина са металним јонима, који су имобилисани на хроматографским колонама (стационарна фаза).
- Хелирајући агенси попут иминодиацетата везују велики број металних јона (Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Al). Афинитетни гел не садржи металне јоне, тако да се у зависности од потреба може „напунити“ металом по избору (тако што се раствор соли одговарајућег метала пропушта кроз колону, нпр. у случају бакра користи се со CuSO_4).

Метал-афинитетна хроматографија

- У метал-афинитетној хроматографији су развијени различити носачи који имају одређене предности и недостатке. Традиционални носачи су засновани на меком гел матриксу као што је агароза. Полисахариди, као што је целулоза, имају предност због биокомпатибилности, али имају и недостатке у виду ниске механичке чврстоће па се стога не могу користити код система високог притиска. За разлику од њих, неоргански носачи, као што је силицијум диоксид, имају одлична механичка својства, али мана им је недостатак иреверзибилне неспецифичне адсорпције протеина.
- Тетрадентатни хелирајући лиганди показују веће афинитете за јоне метала у односу на тридентатне, али показују нижу способност везивања протеина због губитка једног координационог места. Ово је упадљивије код пентадентатних хелатних лиганда.

Метал-афинитетна хроматографија

- Избор металног јона зависи од протеина који се пречишћава. Тривалентни јони, као што су Al^{3+} , Ga^{3+} и Fe^{3+} , погодни су за пречишћавање фосфопротеина, док се двовалентни јони као што су Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Co^{2+} користе за пречишћавање протеина који садрже хистидин. Остаци хистидина из протеина најчешће интерагују са металним јонима, градећи слабе координационе везе.
- Елуирање везаних протеина спроводи се снижавањем рН вредности пуфера (хистидин се протонује и не може хелирати метални јон). Такође, у пуфер за елуирање може се додати снажан компетитор који ће створити комплекс (нпр. EDTA). Ова хроматографска техника се најчешће примењује за пречишћавање рекомбинантних протеина који садрже хистидин.
- Не користи се за пречишћавање металопротеина, већ за пречишћавање неметалопротеина (протеина који у својој структури немају метал).

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- Већина хроматографских техника које су до сада описане спроводе се при релативно ниском притиску, где се проток кроз колону регулише пумпама које стварају низак притисак.
- Фракционисање узорка на таквим хроматографским колонама траје и до неколико сати. Значајно је да проток кроз колону буде спор, јер протеини интерагују са површином хроматографске колоне док пролазе кроз њу, а те интеракције зависе од брзине протока.

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- Када је проток низак протеини могу процесом дифузије пролазити кроз поре на гелу у колони. Уколико је проток кроз колону већи од стопе дифузије онда је раздвајање протеина неефикасно, јер сви протеини који нису успели да прођу кроз поре гела брже напуштају колону него идентични молекули који су дифундовали кроз поре.
- Висок проток кроз колону смањује и адсорпциони капацитет, јер многи молекули немају могућност дифундовања у гел, већ само пролазе кроз колону.
- Међутим, постоји приступ који омогућава примену повишеног протока кроз колону без смањеног раздвајања протеина. То захтева употребу микрочестица као стационарне фазе чиме се смањује време потребно за дифузију протеинских молекула.

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- Свако смањење дијаметра микрочестица захтева драстично повећање притиска како би се одржала одређена брзина протока. Овакав брз проток се може омогућити применом течних хроматографских система под високим притиском. Употребом оваквих система раздвајање узорка се скраћује са неколико сати на неколико минута.
- Многи мали протеини, нарочито они које се секретују екстрацелуларно (нпр. инсулин, цитокини, хормон раста) су јако стабилни и могу се фракционисати употребом HPLC колоне без денатурације или губитка биоактивности. Насупрот томе, многи велики протеини (нпр. фактор коагулације VIII) су релативно нестабилни и губе активност услед денатурације када се примени високи притисак током раздвајања.

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- Меки гелови који се користе код метода које примењују ниски притисак су неупотребљиви у системима који захтевају примену високог притиска, због њихове компресибилности.
- Стационарна фаза се састоји од централног језгра (обично силикатне честице или полимери, као што су полисахариди или полистирени) на чијој површини су везане жељене функционалне групе, тако да су бројне хроматографске технике применљиве на HPLC: јоноизмењивачка, гел-филтрација, афинитетна и хидрофобне интеракције.
- Силикатне честице у колони су веома малих димензија, што омогућава велику контактну површину и као последицу тога високу моћ раздвајања протеина.

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

- HPLC се може користити у аналитичке и препаративне сврхе. У оба случаја (аналитичком и препаративном), HPLC има значајне предности у односу на хроматографске технике које функционишу при ниском притиску:
 - боље раздвајање протеина, јер је смањена величина пора, што резултује читавањем оштријих пикова него код примене система са нижим притиском;
 - повећана брзина фракционисања (неколико минута);
 - висок степен аутоматизације.
- Највећи недостаци HPLC су трошкови и у мањој мери капацитет. Стога се због техничких и економских разлога HPLC користи у препаративне сврхе код *downstream* процеса протеина мале молекулске масе и екстремно скупих протеина (терапијских).

Брза протеинска течна хроматографија (FPLC)

- Поред HPLC постоји и алтернативна метода, брза протеинска течна хроматографија (енгл. *Fast Protein Liquid Chromatography* - FPLC), која користи ниже притиске који дозвољавају употребу матрикса заснованих на полимерима, као што је агароза. Висока резолуција се постиже употребом колоне малог пречника.
- FPLC колоне су израђене од стакла или инертне пластике, а HPLC колоне од високо квалитетног нерђајућег челика. У многим случајевима, FPLC системи су исплативији у односу на HPLC. Упркос томе што раде на нижим притисцима, они и даље комбинују добро раздвајање протеина, убрзање процеса у односу на традиционалне системе под ниским притиском као и висок ниво аутоматизације.

Брза протеинска течна хроматографија (FPLC)

- FPLC се комбинује са осталим врстама хроматографије (јоноизмењивачка, афинитетна хроматографија, гел-филтрација), а најчешћа је комбинација са анјонском јоноизмењивачком хроматографијом која служи за пречишћавање многих протеина.
- Поред протеина, метода је применљива и на друге врсте биолошких узорака, укључујући липопротеине, полинуклеотиде, синтетске олигонуклеотиде, плазмидску ДНК и молекул РНК.

Уградња маркера за пречишћавање

- Пречишћавање рекомбинантних протеина у односу на протеине из природних извора може бити једноставније, јер је експресија циљног протеина велика и однос циљног протеина и пратећих „нечистоћа“ је бољи. Такође, код рекомбинантних протеина могуће је уградити специфичне маркере који ће олакшати пречишћавање.
- Технике генетског инжењеринга омогућавају инкорпорацију специфичних пептидних или протеинских маркера у протеин од интереса. Маркер омогућава стварање хибридног протеина са одговарајућим физичко-хемијским особинама које ће олакшати пречишћавање циљног протеина. Такав молекул настаје фузионисањем ДНК секвенце за маркер и ДНК секвенце која кодира настанак протеина од интереса.

Уградња маркера за пречишћавање

- Развијени су маркери за брзо и једноставно пречишћавање хибридних протеина коришћењем различитих техника (јоноизмењивачка, афинитетна и хроматографија заснована на хидрофобним интеракцијама):
 - Додатком полиаргинина (или полилизина) на С-терминус протеина уводи се снажно позитивно наелектрисање, захваљујући чему се протеин лакше пречишћава катјон-измењивачком хроматографијом. Овај приступ се користи у пречишћавању различитих интерферона и урогастроно у лабораторијским условима.

Уградња маркера за пречишћавање

- Додатком великог броја хидрофобних аминокиселина настаје молекул са снажним хидрофобним карактером који ће се као такав ефикасно пречистити хроматографијом заснованом на хидрофобним интеракцијама.
- Додатком полихистидина добија се молекул који се може пречистити употребом метал-афинитетне хроматографије.
- Постоје маркери који олакшавају пречишћавање протеина афинитетном хроматографијом. Гени који кодирају настанак протеина А могу се фузионисати са генима или кДНК који кодирају настанак протеина од интереса. Настали хибридни молекул се може пречистити употребом колоне која садржи имобилисани IgG.

Уградња маркера за пречишћавање

- Након пречишћавања хибридних протеина потребно је да се уклони маркер, јер он сам по себи може бити имуноген. Маркери се дизајнирају тако да садрже тачку раздвајања на коју делује специфична протеаза или да омогуће раскидање хемијских веза на месту фузије протеина и маркера. Уклањање маркера се спроводи *ензимима* или *хемијским средствима*.
- Од ензима се најчешће користе ендопептидазе: трипсин, фактор Ха и ентерокиназе, али се користе и егзопептидазе, као што је карбоксипептидаза А (секвенционално уклања аминокиселине са С-терминуса протеина док не наиђе на остатке лизина, аргинина или пролина). Ендопептидазе које раскидају пептидне везе у протеину се користе за уклањање дугих, док се егзопептидазе користе за уклањање кратких маркера. Протеин од интереса не сме садржати пептидне везе које могу да буду разграђене неким од примењених метода за уклањање маркера.

Уградња маркера за пречишћавање

- Употреба хемијских средстава подразумева употребу цијаноген-бромида или хидроксиламина. Битно је да након уклањања маркера, протеин од интереса остане интактан. Некада се хемијске методе морају изводити под неповољним условима који захтевају високе температуре и екстремне рН вредности, а такви услови неповољно утичу на сам протеин.
- Селективно раскидање везе између маркера и протеина мора бити праћено његовим адекватним раздвајањем од истог, што може захтевати додатно хроматографско пречишћавање.