

Magnetic fishing: Et attraktivt prospekt for bioprocesser

Vi har alle spillet det »magnetiske fiskespil« i Tivoli, hvor en fiskestang med magnetisk madding bruges til at fange fisk. De samme principper kan også anvendes i bioprocesser, hvor magnetisk følsomme adsorbenter kan bruges til selektivt at »fiske« et produkt ud af en kompleks opløsning. Denne proces kaldes high-gradient magnetic fishing (HGMF)

Af Tim Hobley, Anders Heebøll-Nielsen og Owen R.T. Thomas, Center for Bioteknologisk Procesforskning, BioCentrum-DTU

Behovet for at adskille et biologisk stof fra et andet er et centralt tema, som har indflydelse på alle aspekter af moderne bioteknologi. Fremskridt i nye separations- og detektionsmetoder har været hjørnesten i de voksende områder proteomics og genomics. De vil komme til at spille en central rolle i erhvervelse af viden og føre til udvikling af nye produkter. For at kunne udnytte disse opdagelser industrielt og levere et produkt, der kan sælges til den rette pris, kræves det, at der fokuseres på nye gærings- og molekylærbiologiske teknikker og på nye metoder til produktoprensning.

Behovet for nye skalerbare separationsmåder

Omkostningerne ved oprensningsprocesserne er signifikante, og de kan beløbe sig til 75% af produktionsomkostningerne [1]. Årsagerne til disse omkostninger er indlysende, idet selv insulin med en lang produktionshistorie i rekombinant gær stadig kræver over 20 trin, før den nødvendige renhed opnås. For en 20-trins proces er det endelige udbytte kun ~36%, selv hvis udbyttet for hvert trin var 95%. På trods af disse grimme kendsgerninger har implementeringen af nye typer skalerbare separationsprocesser i industrien været langsom, og man er fortsat afhængig af konventionelle enhedsoperationer, såsom centrifugering, filtrering, chromatografi og krystallisation, anbragt sammen i standardiserede sekvenser. En reduktion af det overordnede antal trin vha. implementering af en ny generisk enhedsoperation i begyndelsen af sammensætningen af oprensningsprocesser er ønskelig. En sådan teknik skal hurtigt kunne behandle meget store volumener (f.eks. >100 m³ for industrielle enzymer), der indeholder partikulært materiale, såsom celler, cellerester og kolloider, og samtidig levere en klaret, koncentreret og delvist oprenset strøm til efterfølgende trin.

For at få et gennembrud i oprensningsprocesser er et nyt separationsprincip nødvendigt. En gennemgang af andre industrier, som omkostningseffektivt og hurtigt må behandle store volumener ubehandlede væsker, såsom spildevand eller mineralprocesser, viser, at magnetisk separation er særlig interessant.

Magnetiske separationer er mærkværdigvis blevet fuldstændig overset til brug i industriel bioseparation, og princippet har

kun været brugt i laboratorieprocedurer, som f.eks. cellesortering [2] og isolering af DNA til molekylær biologi.

High-gradient magnetic fishing-processen

Anvendelsen af magnetfelter i skalerbare bioseparationer omhandler to hoveddele:

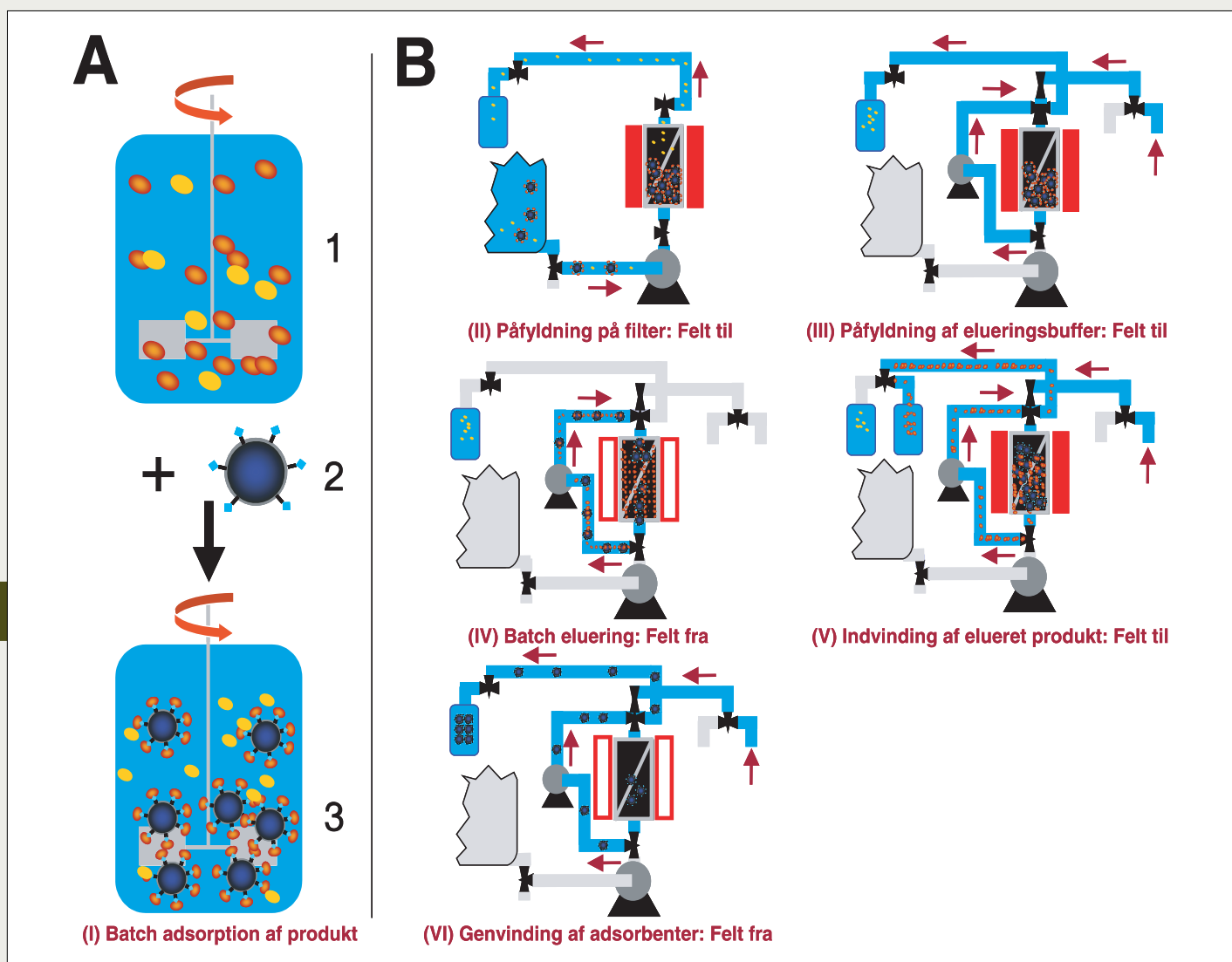
(A) adsorption af produktet til magnetiske adsorbentpartikler efterfulgt af:

(B) adskillelse af de produktfyldte adsorbenter i et magnetisk filter og desorption af produktet.

Et generelt processkema er skitseret i figur 1 [3,4,5,6]. Indledningsvis bindes produktet til de magnetiske bærere, f.eks. i en batch-adsorptionsreaktor (figur 1A). Den ekstremt hurtige adsorptionskinetik for de små (~1 µm), essentielt ikke-porøse adsorbenter tillader også brug af en rørreaktor med kort opholdstid (f.eks. ~10 s). Dernæst indfanges de produktfyldte bærere i det magnetiske filter (figur 1B), og alle ikke-adsorberede substanser eller partikulære materialer passerer igennem pga. den meget høje åbenhed (typisk 90%) og opsamles. I det simpleste tilfælde medieres udskiftning af råmateriale i filtret med elueringsbuffer i det tredje trin vha. en recirkulationsløkke, der omfatter en pumpe (figur 1B). I det fjerde trin isoleres løkken og filtret, det magnetiske felt slås fra, og der pumpes ved høj hastighed, hvorved batchvis desorption af produktet opnås. Feltet slås til i det femte trin, hvilket resulterer i indfangning af de desorberede, magnetiske bærere og tillader, at filtret og løkken skylles igennem for at indvinde det eluerede produkt. Dernæst frigives bærerne fra filtret og løkken og opsamles ved, at yderligere buffer påfyldes, og det magnetiske felt slås fra (figur 1B). Afhængig af råmaterialets grovhed kan en eller flere vaskecykler, analoge til elueringsprocessen, anvendes efter påfyldning på filtret. Gentagne elueringscykler øger udbyttet, men fører til fortynding af de kombinerede fraktioner.

Magnetiske adsorbenter

En af nøglerne til HGMF-processen er den magnetiske bærer. Denne bør være: (i) superparamagnetisk, og (ii) have høj bindingskapacitet. Partikler, der er superparamagnetiske, har



Figur 1. Principperne for high-gradient magnetic fishing.

A. Ubehandlet råmateriale (1) og magnetiske adsorbenter (2) blandes, hvilket lader målproteinet binde sig til liganderne på partiklerne (3).

B. Behandling af produktfyldte adsorbenter i det magnetiske filter (se teksten for detaljer).

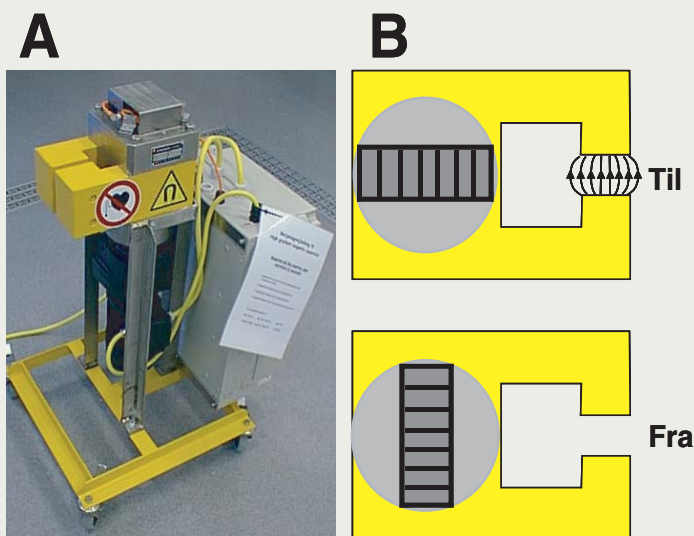
høj magnetisk susceptibilitet, men forbliver ikke magnetiserede, når de fjernes fra feltet; dette er essentielt for god resuspendering under vaske- og elueringstrin. Adsorbenterne, der fabrikeres i vores laboratorier, er ikke-porøse partikler, der er $\sim 0,5\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ i diameter [3,4,5,6]. Større partikler ville give højere magnetiske hastigheder (ligning 1), hvilket tillader indfangning i det magnetiske filter ved højere flowhastigheder, men overfladearealet (pr. volumen) ville blive reduceret drastisk, hvilket begrænser mængden af protein der »indfanges« i det magnetiske filter. Overfladebehandling af partiklerne med en tyk, porøs polymer (for at give et højt overfladeareal) ville påvirke bindingskinetikken. Det har desuden den ulempe, at procentdelen af magnetisk materiale i den overordnede partikel reduceres, og dermed mindskes den magnetiske hastighed (ligning 1). Ligander, der benyttes til at binde protein, kobles til bærerne ved at anvende standardfremstillingsreaktioner for chromatografimatricer. Således kan magnetiske bærere derivatiseres med ligander såsom ionbyttere, affinitets-, pseudoaffinitets-, »hydrophobic charge induction«-ligander og farver osv. [3,4,5,6].

$$v_r = \frac{v_m}{v_o} = \frac{2\mu_o(\chi_s - \chi_f)M_w H_o b^2}{9\eta a v_o} \quad (1)$$

Ligning 1 beskriver forholdet (v_r) mellem den magnetiske hastighed (v_m) af en partikel med radius b og magnetisk susceptibilitet χ_s , og hastigheden (v_o) af en væske med magnetisk susceptibilitet χ_f og viskositet η , som bærer partiklen forbi en enkelt tråd med radius a og magnetisering M_w i et magnetisk felt af styrken H_o . Heri repræsenterer μ_o den magnetiske permeabilitet for vakuum. For ethvert system af partikel, tråd, væske og felt eksisterer en kritisk afstand fra tråden, hvor alle partikler indfanges på tråden [7].

Separatorer med permanente magneter og filtre

Den anden nøgle til HGMF er evnen til hurtigt at indfange de produktfyldte, magnetiske adsorbenter og dernæst frigive dem i vaske- og elueringscykler. Til dette benyttes *deep bed*-magnetiske filterkassetter, der består af trådnæt af rustfrit stål (400-serien). Disse kassetter placeres i et homogent magnetfelt, og hver tråd i filtret bliver til en minimagnet, hvilket skaber store feltgradienter, der indfanger indkommende, produktfyldte adsorbenter. Når feltet slås fra, frigives partiklerne. Nærlæsning af ligning 1 viser, at partiklernes magnetiske hastighed er en funktion af et antal variable og ikke bare den magnetiske feltstyrke. Således er det kun nødvendigt at bruge moderate felter (f.eks. $> \sim 0,4\text{ T}$), hvis passende ss400-tråddiameter (f.eks. $100\text{ }\mu\text{m}$), bærertyper ($0,5\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ ikke-porøse) og lineære flow-



Figur 2. Kontrollerbar separator med permanent magnet.
A. Lille-skala-separator: Felstyrke 0,56-0,45 T (til), 0,03 T (fra); polgab 1,5-2,5 cm; vægt ~70 kg; højde ~70 cm.
B. Skema til betjening af separatoren. Øvre panel: Permanente magneter i en cylindrisk samling orienteres ved at bruge en elektromotor, der tillader feltlinjerne at cirkulere igennem jernåget og hen over polgabet. Nedre panel: Permanente magneter roteres 90°, hvilket leder til, at feltlinjerne cirkuleres alene i venstre side af åget.

hastigheder (f.eks. op til 72 m h⁻¹) benyttes [3,4,5,8]. De nødvendige felter kan let genereres med kraftige permanente magneter (~ 1 T). Elektro- eller superledende magnetseparatorer er ikke påkrævet. Nye separatortyper (figur 2A), hvor en cylinder, der indeholder en samling permanente magneter, roteres inde i et jernåget, hvilket tillader, at feltet ved polerne, hvor filtret er anbragt, kan slås til og fra som ønsket (figur 2B) [8]. Filterkassetten er isoleret fra separatoren, og der er ingen »bevægelige dele« i kontakt med fødestrømmen. Det forenkler rensning og *sterilisation-in-place*-procedurer. Ydermere er sådanne design yderst skalerbare [8,9].

At komme i gang med HGMP-processen

Som for alle adsorptive separationsteknikker er identifikation af den bedst egnede matrix det første trin. Screening af adsorption kan udføres batchvis i lille skala ved at bruge magnetiske bærere og et magnetisk stativ, svarende til batchvis screening af chromatografimedier. Ligandtyper (og arbejdsbetingelser, såsom pH, konduktivitet og buffere) fundet under screening af konventionelle chromatografiske adsorbenter kan også benyttes til at identificere passende magnetiske partikler. Tilsyneladende dissociationskonstanter (dvs. mellem bæreren og produktet) i mikromolar størrelsesorden er generelt passende [4]. Den faktiske bærerkoncentration, der er nødvendig for at fjerne produktet fra råmaterialet, kan bestemmes i lille skala, og adsorbentkoncentrationer op til 40 g L⁻¹ er typisk mest egnet [4,6]. Vi har vist, at resultater opnået i lille skala ved batchvis screeningsforsøg kan bruges direkte i HGMP-processen.

Optimering af produktiviteten af bærerindfangningstrinnet kræver, at sammenhængen mellem flowhastighed og filterkapacitet bestemmes ved at udføre gennembrudsforsøg med adsorbenter. Den koncentrerende styrke afhænger af forholdet mellem det kombinerede volumen af filter og recirkulationsløkke og mængden af råmateriale behandlet pr. komplet HGMP-cyklus (figur 1). Renhed og udbytte bestemmes primært af antallet af vaske- og elueringscykler og de valgte bærertyper og buffere.

Anvendelser for magnetisk fiskeri

High-gradient magnetic fishing har et bredt spektrum af potentielle anvendelser i biotekindustrien. Teknikken synes særlig egnet til oprensningsprocesser af proteiner til terapeutisk, diagnostisk eller industriel brug. Vi har anvendt HGMP til at fjerne trypsin, antistofprocesser, indfangning af proteiner og enzymer fra valle og gæringsvæsker såvel som behandling af *inclusion bodies* og semikontinuert genfoldning af proteiner [3,4,5,6]. Ud over disse anvendelser kunne man forstille sig en række andre:
- Et eksempel er hurtig fjernelse af forurenende substanser.

F.eks. proteaser, der ellers kan destabilisere produktet, i lave koncentrationer fra store volumener af råmaterialer.

- Et andet eksempel er *in situ*-indfangning af produkt, forureninger eller inhibitorer direkte i løbet af gæringer. Det kunne gøres ved at tilsætte steriliserede adsorbenter til gæringstanken eller til en recirkulationsløkke i bioreaktoren.

- Ydermere er formindsnkning af HGMP-processen også muligt ved *high-throughput screening*.

Den flaskehals, der begrænser udbredt introduktion af HGMP, er leverancer af magnetiske adsorbenter. Selvom der er mange producenter af egnede, magnetiske partikler, er kun få villige til at levere bærerne i store mængder til passende priser. Heldigvis er denne udfordring taget op af nogle af de mere fremsynede bærerproducenter, og storskala-HGMP vil uden tvivl være almindeligt forekommende i bioprocessindustrien inden for de næste 5-10 år.

Evnen til at fremstille vores egne magnetiske adsorbenter kombineret med den transportable lille-skala-separator med permanente magneter (figur 2A) tillader os at udføre forsøg, der kan bevise principperne ved at bruge rigtige råmaterialer fra biotekindustrien.

E-mail-adresse:
Timothy Hobley: th@biocentrum.dtu.dk

Referencer:

1. Fish, N.M and Lilly, M.D. (1984). The interactions between fermentation and protein recovery. *Bio/Technology*, 2: 623-628.
2. Manz, R., Assenmacher, M., Pflüger, E., Miltenyi, S. and Radbruch, A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecule relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1921-1925.
3. Hubbuch, J.J., Matthiesen, D.B., Hobley, T.J. and Thomas, O.R.T. (2001). High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: A first principle comparison. *Bioseparation*, 10: 99-112.
4. Hubbuch, J.J. and Thomas, O.R.T. (2002). High-gradient magnetic affinity separation of trypsin from porcine pancreatin. *Biotechnol. Bioeng.*, 79: 301-313.
5. Heebøll-Nielsen, A. (2002). High gradient magnetic fishing: Support functionalisation and application for protein recovery from unclarified bioprocess liquors. Ph.D.-Afhandling, Center for Bioteknologisk Procesforskning, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet, Danmark.
6. Heebøll-Nielsen, A., Choe, W.S., Middelberg, A.P.J. and Thomas, O.R.T. (2003). Efficient inclusion body processing using chemical extraction and high gradient magnetic fishing. *Biotechnol. Progr.*, 19: 887- 898.
7. Watson, J.H.P. (1973). Magnetic filtration. *J. Appl. Phys.*, 44: 4209-4213.
8. Hoffmann, C., Franzreb, M. and Höll, W.H. (2002). A novel high-gradient magnetic separator design (HGMS) for biotech applications. *IEEE Trans. Appl. Superconduct.*, 12: 963- 966.
9. <http://www.steinert.de/steng/trennen/hochgradienten/hochgradienten.html> (Steinert Elektromagnete Bau GmbH, Tyskland, besøgt 08. oktober 2003).