

使用 TOYOPEARL® Sulfate-650F 强阳离子交换填料捕获和去除 mAb 多聚体, 提高单克隆抗体纯度

TOYOPEARL
应用指南

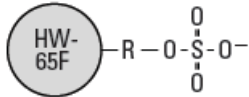
引言

在单克隆抗体 (mAb) 纯化工艺中, 离子交换层析常用作中间体纯化步骤, 以去除蛋白多聚体、宿主细胞蛋白 (HCP) 和脱落的 Protein A 配基。目前生物制药行业专注于开发连续的下游纯化工艺。通常, 生物制药企业的科学家们在使用 Protein A 层析捕获 mAb 后, 通常使用阳离子交换 (CEX) 和阴离子交换 (AEX) 层析步骤继续提高 mAb 的纯度。在这项研究中, 我们专注于开发 CEX 步骤, 以去除多聚体、宿主细胞蛋白和脱落的 protein A 配基, 从而在单次纯化步骤中提高 Protein A 填料初步纯化后的 mAb 纯度。

在这项研究中, 我们使用了一种新型的强阳离子交换填料 TOYOPEARL Sulfate-650F。该填料具有以下特点: 极强的 mAb 多聚体捕获能力、高耐盐性、适用 pH 值范围宽以及高动态吸附载量。在 Protein A 层析步骤后使用该填料的纯化方案, 几乎无需调整 mAb 料液的 pH 值即可直接进行纯化。

材料和方法

在这项研究中, 使用的是 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料 (结构如下图所示), 45 μm (粒径), 100 nm (孔径) 和 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, 45 μm (粒径), 100 nm (孔径) 填料, 两种填料的牌均为东曹生命科学。实验中, 将两种填料分别装填入两根 Omnifit®Benchmark 层析柱, 规格分别为 25 mm ID × 25 cm 和 6.6 mm ID × 10 cm。在将含有 IgG₁ 的 CHO 上清液通过 TOYOPEARL Sulfate-650F 层析柱纯化后收集到的 IgG₁ 组分则使用 TSKgel®G3000SW_{XL}, 5 μm, 25 mm, 7.8 mm ID × 30 cm 规格的 SEC 色谱柱进行分析。



使用 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料纯化 IgG₁

如下步骤所示, 将含有 IgG₁ 的 CHO 细胞上清液 (CCS) 通过装填 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 的 25 mm ID × 15cm 层析柱进行纯化。在 100mAU 开始和结束收集洗脱峰。

1	平衡 (6 CV, 225 cm/hr) : 20 mmol/L Tris-醋酸盐, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4
2	上样 (48 mg/mL, 225 cm/hr) : TBL-mAb-01 CCS
3	淋洗 (10 CV, 225 cm/hr) : 20 mmol/L Tris-醋酸盐, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4
4	洗脱 (5 CV, 225 cm/hr) : 50 mmol/L 醋酸, pH 3.0
5	清洗 (4 CV, 225 cm/hr) : 0.1 mol/L NaOH
6	再生 (4 CV, 225 cm/hr) : 20 mmol/L Tris-醋酸盐, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4

将经过 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 纯化后的 IgG₁ 料液用 1 mol/L Tris base 调节 pH 值为 5.0, 并通过 280nm UV 吸光度进行定量。将一份 protein A 洗脱液通过超滤 (7×) 溶解于到去离子水中。

静态吸附载量筛选

为了获得 TOYOPEARL Sulfate-650F 上 mAb 的静态吸附载量 (SBC), 将纯化后的 IgG₁ 洗脱液收集并调节到不同 pH 值和氯化钠条件以及最终 IgG₁ 浓度为 10 mg/mL。如下所述, 将 IgG₁ 吸附到 Resin Seeker 板 (20 μL/孔) 中的 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料。在室温下将调节的 protein A IgG₁ 洗脱液通过平衡吸附法结合到填料 1 小时。孵育之后, 通过真空过滤从每个孔里去除填料, 然后读取每个孔中 75μL 样品的 UV 吸光度以确定未吸附的蛋白浓度。测定静态吸附载量用 SAS JMP 12 软件分析 SBC 数据。

1	平衡 (3 x200 pL/孔) : 50 mmol/L Tris-醋酸盐*, 各种 NaCl 浓度和 pH 值
2	吸附 (200 pL/孔, 1 小时, 室温) : TBL-mAb-01, 10 g/L, 各种 NaCl 浓度和 pH 值

*注意: 用 Tris base 滴定 50 mmol/L 醋酸盐调节 pH 值至 4.0 - 5.6。用醋酸盐滴定 50 mmol/L Tris base 调节 pH 值至 7.2 - 8.4。

动态吸附载量优化

测定 TOYOPEARL Sulfate-650F 在 10% 穿透下的动态吸附载量 (DBC)。将透析后的 protein A 洗脱液调节到不同的 pH 值和盐浓度, IgG₁ 浓度为 5 mg/mL。如下表所示的条件进行 DBC 测定。首先测定蛋白在 100% 穿透下的 UV 吸光度 (280 nm)。然后将蛋白过柱, 测定 10% 穿透下的 UV 吸光度, 然后基于上样的蛋白溶液体积确定 DBC。用 SAS JMP 12 统计学软件分析 DBC 数据。

1	平衡 (10 CV, 180 cm/hr) : 50 mmol/L 醋酸盐-Tris, 各种 NaCl 浓度和 pH 值
2	上样 (45 cm/ hr) : TBL-mAb-01, 5 g/L 到大约 136 mAU
3	淋洗 (5 CV, 45 cm/ hr) : 平衡缓冲液
4	洗脱 (5 CV, 45 cm/ hr) : 平衡缓冲液 + 1 mol/L NaCl
5	清洗 (5 CV, 60 cm/hr) : 0.5 mol/L NaOH
6	再生 (5 CV, 60 cm/ hr) : 水

洗脱优化

用 1 mol/L 醋酸和/或 1 mol/L Tris base 将收集的 IgG₁ 洗脱液调节 PH 值至 5.2, 用 4 mol/L NaCl 或水调节电导率至 12.1 mS/cm。将样品上样到如下所示 TOYOPEARL Sulfate-650F 的 6.6 mm × 3.0 cm 层析柱上。测定洗脱峰处的电导率。

1	平衡 (10 CV, 180 cm/hr) : 50 mmol/L 醋酸盐-Tris, 100 mmol/L NaCl, pH 5.2
2	上样 (45 cm/ hr) : TBL-mAb-01, 大约 10 g/L
3	淋洗 (5 CV, 45 cm/ hr) : 平衡缓冲液
4	洗脱 (20 CV, 45 cm/hr) : 50 mmol/L 醋酸盐-Tris, 100 - 500 mmol/L NaCl, pH 5.2
5	清洗 (5 CV, 60 cm/hr) : 0.5 mol/L NaOH
6	再生 (5 CV, 60 cm/ hr) : 水

用 98mg/mL 上样浓度在 260, 290 以及 320 mmol/L 的 NaCl 浓度下进行 10CV 的梯度洗脱, 重复分离过程。在整个梯度洗脱中, 收集 1-CV 组分并分析蛋白浓度、多聚体含量(使用 TSKgel G3000SW_{XL} SEC 色谱柱)、CHO-HCP (ELISA) 和 protein A 配基含量 (ELISA)。

1	平衡 (10 CV, 180 cm/hr): 50 mmol/L 醋酸盐-Tris, 100 mmol/L NaCl, pH 5.2
2	上样 (45 cm/hr): TBL-mAb-01, 大约 10 g/L
3	淋洗 (5 CV, 45 cm/hr): 平衡缓冲液
4	洗脱 (10 CV, 45 cm/hr): 平衡缓冲液 + 260 - 320 mmol/L NaCl
5	冲洗 (5 CV, 45 cm/hr): 50 mmol/L 醋酸盐-Tris, 1.0 mol/L NaCl, pH 5.2
6	清洗 (5 CV, 60 cm/hr): 0.5 mol/L NaOH
7	再生: 水 (5 CV, 60 cm/hr)

结果和讨论

使用 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料纯化 IgG₁

将含有 IgG₁ 的粗样品流过 protein A 层析柱, 并收集 IgG₁ 的组分用于后续实验。图 1 显示了通过 protein A 层析纯化后的 IgG₁。收集洗脱峰, 进一步采用尺寸排阻层析法用 TSKgel G3000SW_{XL} SEC 色谱柱分析单体和多聚体含量、宿主细胞蛋白 (HCP) 含量和脱落的 protein A 配基 (见表格 1)。

图 1. 使用 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料从 CHO 上清液粗样品里纯化 IgG₁

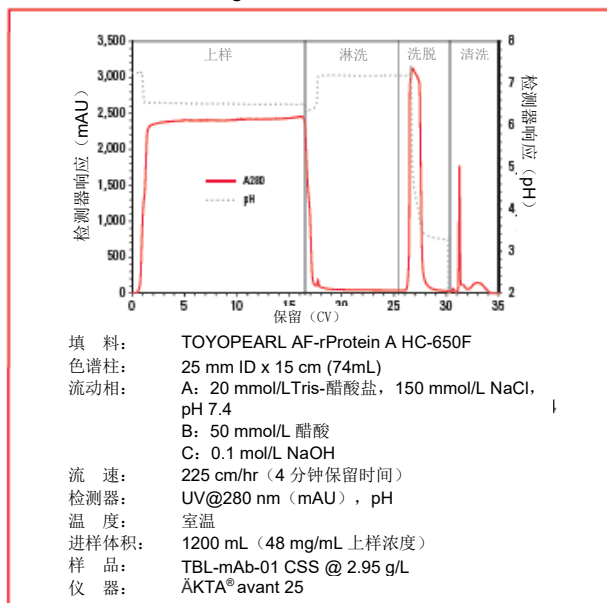


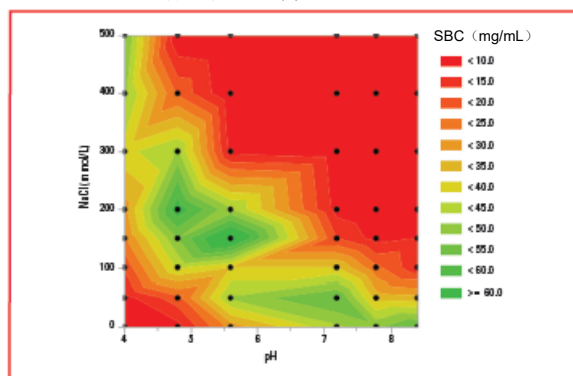
表 1. 收集的 IgG₁ 洗脱峰的分析数据

Protein A 洗脱液分析	
产率 (总 IgG)	99%
多聚体	4.4% (0.5% HMW, 3.9% 二聚体)
HCP	1260 ppm
Protein A	1.2 ppm

TOYOPEARL Sulfate-650F 填料的静态吸附载量 (SBC) 筛选

为了优化 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料的吸附载量, 通过开展 SBC 筛选实验以确定在给定溶剂和蛋白浓度条件下吸附至层析介质的蛋白的最大量。图 2 显示在 pH 值为 4.0-5.6 或 7.2-8.4 和 0-500 mmol/L 的 NaCl 浓度条件下 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料产生的吸附图谱。在 pH 值介于 4.8 和 5.6 之间, NaCl 浓度大约 100 mmol/L-200 mmol/L 时观察到蛋白吸附最大。在 pH 值较低处, NaCl 是蛋白吸附所必需的。在 pH 值较高处, 几乎没有 NaCl 时观察到吸附显著。

图 2. 使用收集的 IgG₁ 洗脱液进行 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料的 SBC 筛选



动态吸附载量 (DBC) 优化

通过用三阶段的全因子 DoE (实验设计) 在 pH 值在 4.8 - 5.6 和 100 - 200 mmol/L NaCl 浓度条件下优化 DBC (结果如图 3 所示连同表 2 中的数据点)。在 pH 值 4.8, 150 mmol/L NaCl 浓度和 pH 值 5.2, 100 mmol/L NaCl 浓度之间观察到一个最大的 DBC (>120 mg/mL)。将 pH 值 5.2, 12.1 mS/cm 的条件用于最大吸附的洗脱优化实验。

图 3. 使用收集的 IgG₁ 洗脱液进行 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料的动态吸附载量优化

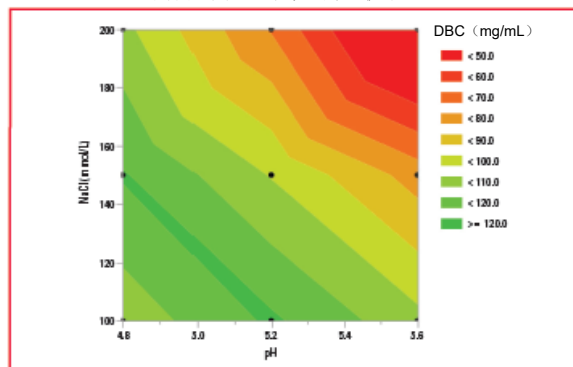


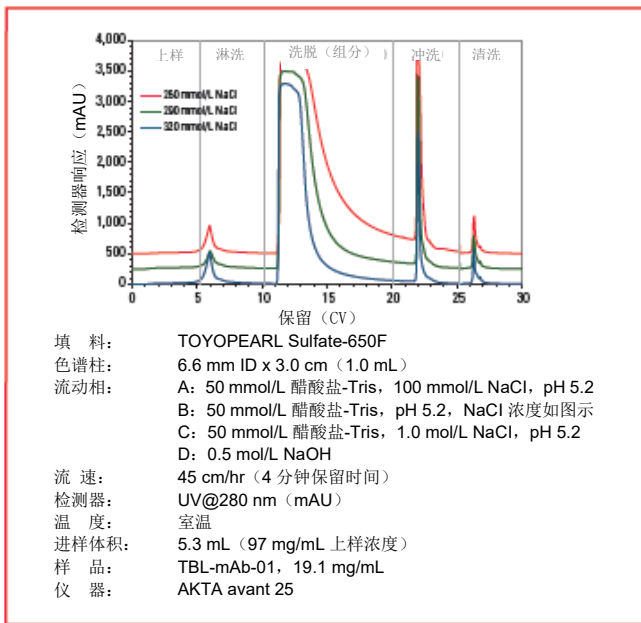
表 2. 各种条件下的动态吸附载量数据 (随机的运行条件)

实验 (次序)	运行 (次数)	pH 值	NaCl (mmol/L) 浓度	DBC (mg/mL)
1	5	4.8	100	104
2	1	5.6	100	103
3	2	4.8	200	103
4	4	5.6	200	23
5	8	4.8	150	121
6	9	5.6	150	76
7	7	5.2	100	122
8	6	5.2	200	69
9	3	5.2	150	99
10	10	5.2	150	102

单体和多聚体峰分离和洗脱条件的优化

为了优化洗脱条件, 在 pH 值为 5.2 下进行梯度洗脱。观察到 30.1 mS/cm 的峰电导率 (约 288 mmol/L NaCl)。NaCl 浓度在 260、290 或 320 mmol/L 条件下, 以分步梯度重复实验 (见图 4)。由于洗脱时峰拖尾, 在洗脱过程中收集 1-CV 组分。分析各组分的 IgG₁ 浓度、多聚体、HCP 和 protein A 含量, 然后分析这些结果以确定最佳 NaCl 浓度和峰体积。

图 4. 在各种条件下通过 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料进行分离后收集的 IgG₁ 洗脱峰的图表分析



分析峰的回收率、多聚体、HCP 和 protein A 含量 (见图 5)。数据分析表明在 260 mmol/L NaCl 浓度的洗脱缓冲液和最大 (9 CV) 洗脱体积下, 多聚体和 HCP 的去除效果最佳。在这些条件下的 Protein A 配基含量 (40 ppb) 显著低于在上样中的浓度 (1200 ppb)。数据表 3 所示。

图 5. 从 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料里收集的洗脱峰的分析数据

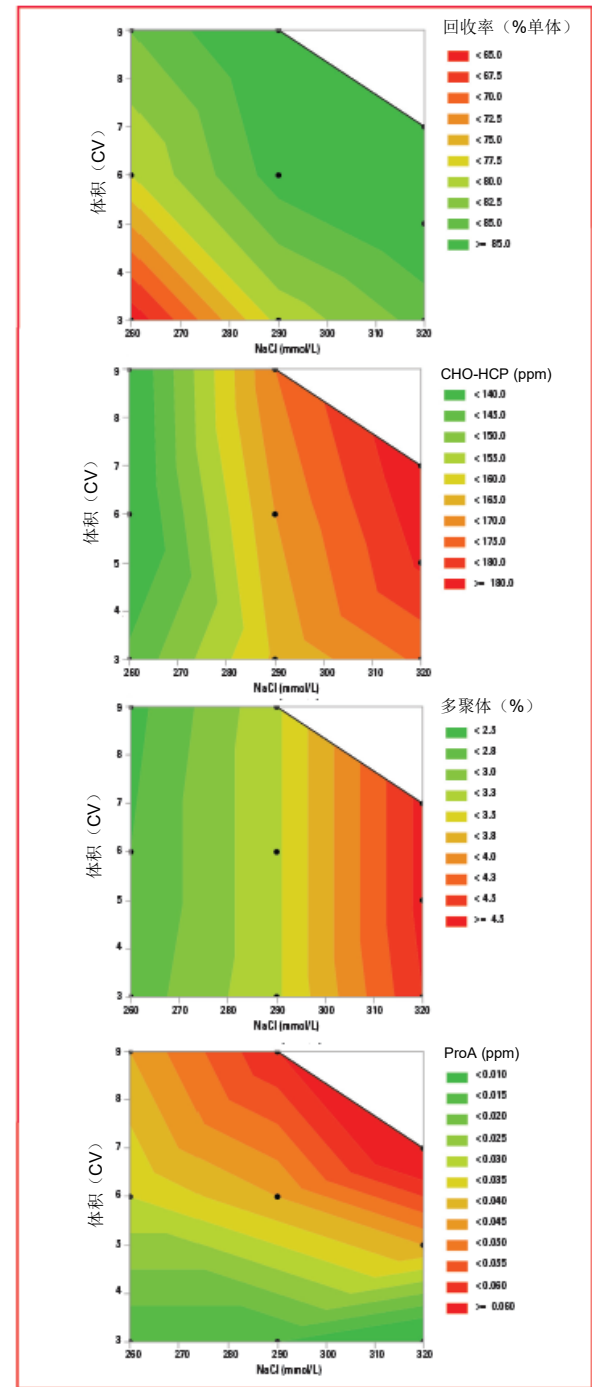
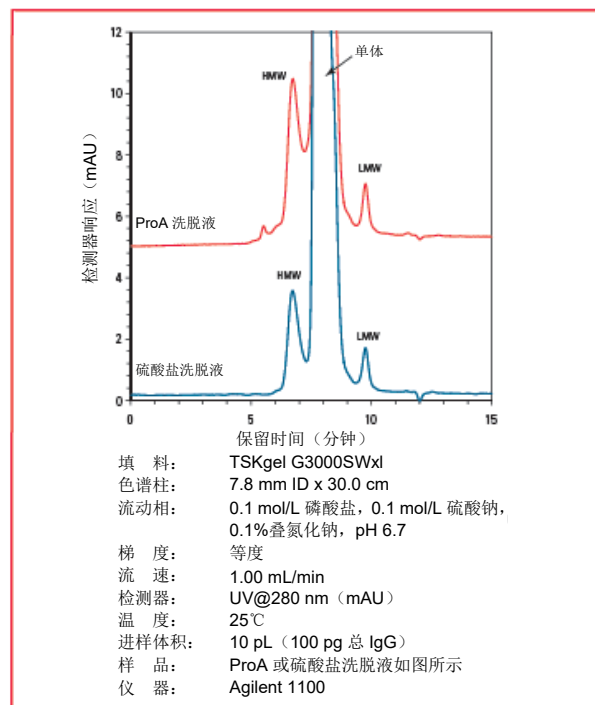


表 3. 在各种条件下从 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料里收集的洗脱峰的合并数据（随机的运行条件）

实验 (次序)	运行 (次数)	洗脱 NaCl (mmol/L) 浓度	池体积 (CV)	回收率 (%单体)	多聚体 (%Dimer/HMW)	HCP (ppm)	Protein A (ppm)
上样							
1	2	260	3	63.1	3.9/0.54	1260	1.2
		260	6	77.5	2.6/0.09	141	0.009
		260	9	82.6	2.4/0.07	134	0.040
2	1	290	3	78.3	3.0/0.13	161	0.007
		290	9	86.3	3.0/0.12	165	0.042
		290	9	88.7	3.1/0.12	170	0.060
3	3	320	3	83.4	4.3/0.20	171	0.003
		320	9	87.7	4.4/0.19	181	0.039
		320	9	90.2	4.5/0.19	185	0.067

图 6 显示了 NaCl 浓度 260 mmol/L，9 CV 体积下洗脱液池的 SEC 分析的数据。数据显示，相对于从 protein A 填料里收集的 IgG₁ 洗脱物峰物质种多聚体含量（特别是 HMW 杂质）有所降低。

图 6. SEC 色谱柱分析收集到的单体峰



对 SEC 色谱柱收集到的组分峰的高分子量、HCP 和 protein A 配基含量进行分析。表格 4 显示，通过 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料纯化后，收集的 IgG₁ 峰显著降低 HMW、HCP 和 protein A 配基的含量。这表明 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料可以有效地去除和降低 IgG₁ 的杂质。

表 4. 从 SEC 色谱柱里收集到的峰的分析数据

杂质	ProA 洗脱液	硫酸盐洗脱液
二聚体 (%)	3.9	2.4
HMW (%)	0.54	0.07
HCP (ppm)	1260	134
ProA (ppm)	1.2	0.040

结论

TOYOPEARL Sulfate-650F 填料具有高动态吸附载量 (> 120 mg/mL)，在 pH 值 4.8，150 mmol/L NaCl 浓度和 pH 值 5.2，100 mmol/L NaCl 浓度下具有 DBC 最大值。在 pH 值 5.2 下进行洗脱，回收率和杂质去除（多聚体、HCP、脱落的 protein A）效果最佳。事实上，从 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料层析柱里收集的 IgG₁ 单体峰的分析数据显示，其纯度显著改善（令人满意的 HMW 蛋白和 HCP 含量），同时在收集的 IgG₁ 峰中几乎没有检测到 protein A 配基。将选择这个强大的阳离子交换填料作为在 mAb 经 protein A 初步纯化后的步骤，仅需要微调样品的 pH 值或盐浓度即可。

TOYOPEARL、TSKgel 和 Tosoh Bioscience 是东曹株式会社的注册商标。Omnifit 是百柯流体有限公司的注册商标。ÅKTA 是通用电气医疗集团的注册商标。