



高纯度单克隆抗体回收的 工艺优化

客户面临的挑战

- ▶ 在使用Protein A填料进行高载量mAb捕获后，出现HCP残留量偏高、目标产物回收率偏低的问题。
- ▶ 现有的标准Protein A纯化方案未能达到预期效果。

东曹的解决方案

TOYOPEARL® Super A填料

- ▶ 适应多种工艺条件的灵活性

我们做了什么？

- ▶ 优化淋洗与洗脱步骤，提升mAb回收率并降低杂质含量。

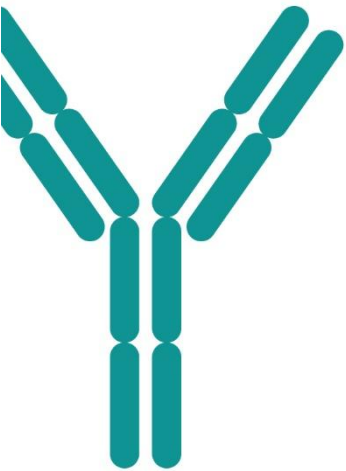
结果如何？

- ▶ 工艺调整后，回收率最高可达99%，宿主细胞蛋白残留量降低量最高达2000倍。

TOYOPEARL Super A可实现高回收率、低HCP残留以及极低的Protein A脱落，为高效纯化单克隆抗体提供稳定且灵活的工艺平台。

客户获益

工艺优化显著提升mAb纯度和回收率，有效增强工艺经济性和生产效率。



TOSOH BIOSCIENCE

**SEPARATION
& PURIFICATION**

CONNECTING MINDS.
TOUCHING LIVES.



TOYOPEARL® Super A动态吸附载量及上样-淋洗-洗脱条件优化

TOYOPEARL Super A是东曹生命科学推出的新一代重组Protein A亲和层析填料。该产品具备多项卓越特性，包括更高的载量、更强的碱稳定性（可耐受浓度高达1 mol/L的NaOH原位清洗(CIP)）、更温和的洗脱pH条件以及更小的洗脱体积。此外，该产品还表现出高动态吸附载量(DBC)、高效的宿主细胞蛋白(HCP)去除能力和较低的Protein A配体脱落量。产品形态灵活，既提供使用便捷的SkillPak™预装柱（包括专为多柱层析系统设计的多种规格），也提供散装填料。TOYOPEARL Super A可全面满足从工艺开发、工艺优化到商业化生产等各阶段的生物制药需求。不含动物源成分，且已验证内毒素含量低（≤10 EU/mL）。

由于每种单克隆抗体（mAb）的特性不尽相同，所以建议通过针对性的工艺开发来充分发挥TOYOPEARL Super A填料的最佳性能。单抗自身的多项特性差异，例如序列、表达水平、稳定性（如pH耐受性、聚集倾向等），都可能影响纯化结果。而针对特定分子定制专属纯化方法，可确保实现最大限度的回收率和纯度。TOYOPEARL Super A能够适应多种工艺条件，这为在不同阶段进行方法优化提供了多种可能性。

本报告详细介绍了在TOYOPEARL Super A预装柱上纯化模型单克隆抗体曲妥珠单抗（trastuzumab）的工艺优化流程实例。并测定了DBC随上样浓度和停留时间（RT）的变化关系。

动态吸附载量

填料特性

填料	TOYOPEARL Super A
平均粒径	45 μm (F级)
平均孔径	100 nm
基质材料	羟甲基甲基丙烯酸聚合物
配体	经修饰及优化的C结构域六聚体配体，采用多点结合
耐碱性	可耐受浓度高达1 mol/L的NaOH

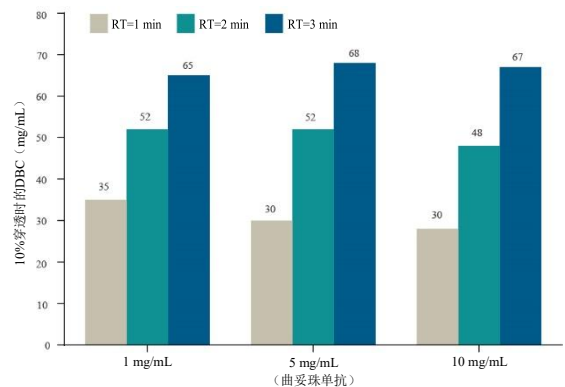
方法

预装柱: SkillPak 5 TOYOPEARL Super A
预装柱尺寸: 0.8 cm ID×10 cm BH=5.0 mL
流动相: 20 mmol/L磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl
样品: 曲妥珠单抗, 浓度为1、5、10 mg/mL
(流动相配制)
停留时间: 1、2、5分钟

结果

将纯化后的曲妥珠单抗上样至SkillPak 5 TOYOPEARL Super A预装柱，直至观察到10%穿透。实验共测试了三种样品浓度和三种停留时间，结果如图1所示。

图1 曲妥珠单抗在三种停留时间和三种样品浓度条件下，在10%穿透（BT）时的DBC（单位：mg/mL）。



停留时间对吸附载量的影响最为显著，停留时间越长，吸附载量越高。在停留时间为5分钟条件下，TOYOPEARL Super A对三种样品浓度的平均DBC为67 mg/mL。进样液中的单克隆抗体滴度对载量未产生显著影响。

工艺优化

沿用常规亲和层析工艺的标准流程，实验采用了经典的吸附-淋洗-洗脱三步法作为工艺优化基础。为了确保pH控制和蛋白活性，洗脱组分需立即用1 mol/L Tris碱液进行中和，该碱液已按洗脱组分体积的1/20比例预先加注于收集板中。

材料与amp;方法

预装柱: SkillPak 5 TOYOPEARL Super A
预装柱尺寸: 0.8 cm ID × 10 cm BH = 5.0 mL
流速: 1.25 mL/min (RT为4分钟),
(平衡阶段: 2.5 mL/min (RT为2分钟))
样品: 含曲妥珠单抗的CHO培养上清液, 6.9 mg/mL
进样体积: 39.53 mL
进样量: 55 mg/mL 填料 (≈90% 载量)

工艺条件

阶段	流动相	长度
平衡	20 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV
进样	曲妥珠单抗CHO原液	
淋洗1	20 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV
淋洗2	25 mmol/L 柠檬酸钠, pH 5.2 + 测试用添加剂	5 CV
洗脱	25 mmol/L 柠檬酸钠, pH 3.2 + 测试用添加剂	5 CV
CIP	0.5 mol/L NaOH	4 CV
再平衡	20 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV

分析: mAb 滴度

mAb滴度采用TSKgel® Protein A-5PW分析柱进行定量测定。该分析柱可在2分钟的短时间内，高效对复杂基质（如CHO原液）中的未纯化单克隆抗体进行定量，适用于回收率分析。同时采用紫外分光光度法对洗脱样品中的抗体滴度进行验证，其结果与该分析方法所得数据高度一致。

分析方法

色谱柱: TSKgel Protein A-5PW
(4.6 mm ID × 3.5 cm L, 粒径20 μm)
流动相: A: 20 mmol/L 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠, pH 7.4
B: 12 mmol/L HCl
梯度: 0 - 0.5分钟, 0% B
0.51 - 2.0分钟, 100% B (分步洗脱)
流速: 2.0 mL/min
进样量: 2.5 - 5.0 μL

分析: HCP及Protein A的ELISA测定

使用Cygnus Technologies公司的第三代CHO HCP ELISA Kit,3G, 测定HCP浓度。使用Cygnus Technologies公司的Tosoh R50、R40及R28 Protein A Mix-N-Go™ ELISA试剂盒测定洗脱液中的Protein A含量。

工艺优化: 淋洗步骤

为了模拟生物制药工艺条件，在淋洗步骤优化阶段将曲妥珠单抗的上样量控制在填料载量的约90% (55 mg/mL)。这种高载量条件与实际生产环境一致，而在生产中，填料利用率的最大化对提高生产通量至关重要。在该类条件下，HCP的含量会相应升高，从而增加了纯化工艺的难度。本研究旨在评估TOYOPEARL Super A填料在真实载量条件下的性能表现，并找出可有效降低HCP含量的淋洗缓冲液优化方案。

淋洗缓冲液添加剂

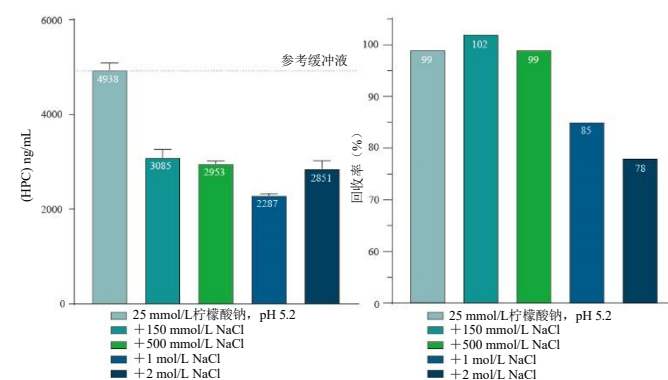
实验选取了NaCl和L-精氨酸盐酸盐作为淋洗缓冲液添加剂，研究其对淋洗步骤的优化效果。NaCl可抑制基于电荷作用的非特异性结合，而L-精氨酸盐酸盐则属于温和的离液剂，既能减少蛋白聚集，还可破坏HCP与层析柱之间的吸附作用。

实验针对淋洗2步骤，测试了不同浓度的上述添加剂，以空白淋洗缓冲液为参照，测定了洗脱液中的目标物回收率和HCP去除率。

淋洗缓冲液添加剂: 实验结果

实验方法参照前文所述，差异之处为在淋洗2缓冲液 (25 mmol/L 柠檬酸钠, pH 5.2) 中添加了不同浓度的NaCl。我们在150、500、1000和2000 mmol/L的四种NaCl浓度下进行了测定，结果如图2所示。

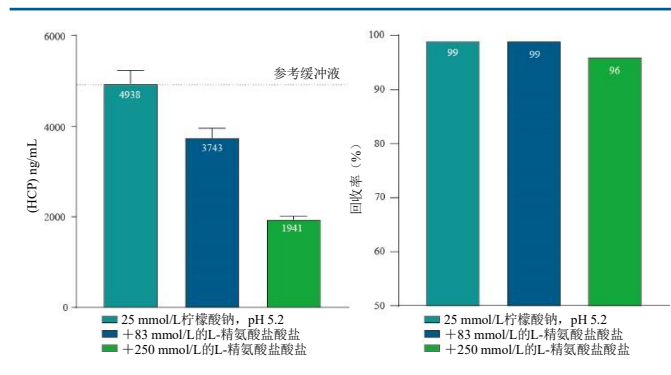
图2 左图: 在淋洗2步骤中添加不同浓度NaCl时的洗脱液中HCP的浓度。数据为4次ELISA重复实验的平均值 (其中150 mmol/L条件为2次重复)，误差线表示标准偏差。右图: 在淋洗2步骤中添加不同浓度NaCl后，洗脱液中mAb的回收率。回收率的计算方法是: 用TSKgel Protein A色谱柱分别测定原液和洗脱液中的mAb浓度，再以洗脱液中的mAb质量除以进样mAb质量获得。



在淋洗缓冲液中添加150 mmol/L NaCl, 可在回收率与HCP去除率之间取得最佳平衡。500 mmol/L浓度组的表现也可接受，且与最优组效果相近，但我们更倾向于选用能达到既定纯度和回收目标的最低添加剂浓度。

与仅使用柠檬酸钠相比，在淋洗缓冲液中添加浓度为83 mmol/L和250 mmol/L的L-精氨酸盐酸盐，同样能有效降低HCP的含量（图3）。为了简化后续工艺开发流程，我们最终选定了NaCl。

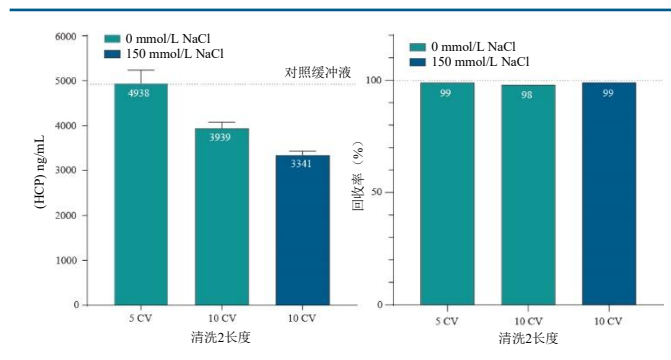
图3 左图：在淋洗2步骤中添加两种浓度L-精氨酸盐酸盐时的洗脱液中HCP的浓度。数据为4次ELISA重复实验的平均值，误差线表示标准偏差。右图：在淋洗2步骤中添加两种浓度L-精氨酸盐酸盐后，洗脱液中mAb的回收率。



淋洗步骤延长优化

我们选定150 mmol/L NaCl 条件进行后续开发，原因是该浓度既能保持目标抗体的回收率，又能有效降低HCP含量。为了探究能否通过单纯延长淋洗时间进一步降低HCP含量，我们将淋洗2步骤的体积从5 CV延长至10 CV。同时，我们还将该条件（10 CV、150 mmol/L NaCl）分别与标准体积（5 CV）、对照缓冲液延长清洗（10 CV、0 mmol/L NaCl）进行对比，其结果如图4所示。

图4 左图：在淋洗2步骤中添加0 mmol/L NaCl 或150 mmol/L NaCl（蓝色条）时，洗脱液中HCP的浓度。数据为4次ELISA重复实验的平均值，误差线表示标准偏差。淋洗时长标在X轴上。右图：各组实验的洗脱液中mAb的回收率。



将淋洗步骤的体积从5 CV延长至10 CV后，HCP的含量进一步降低，且回收率未受影响。后续的洗脱和上样量优化实验，均采用此淋洗缓冲液配方及淋洗体积参数。

工艺优化：洗脱缓冲液添加剂

在淋洗工艺优化的实验中发现，TOYOPEARL Super A在上样量达到DBC的约90%时，可获得约99%的高回收率。考虑到低载量条件下回收率通常会下降，我们尝试寻找一种能够提升回收率的洗脱条件。因此，实验将mAb上样量设置为吸附载量的约10%，在该条件下，未添加任何试剂的对照组回收率仅为78%，我们还测试了L-精氨酸盐酸盐、甘油和乙醇作为洗脱缓冲液添加剂的效果。

我们选用精氨酸是因为其可破坏蛋白间的相互作用。此前实验还观察到，当淋洗步骤中精氨酸的浓度达到250 mmol/L或更高时，会导致mAb发生渗漏。由此我们推测，若将其用于洗脱步骤，则可能因为该作用机制而提升回收率。为此，我们在洗脱缓冲液中分别添加了100、500和1000 mmol/L三种浓度的L-精氨酸盐酸盐进行测试。

我们选用了甘油和乙醇作为添加剂，是因为这二者可改变溶剂极性，从而可能破坏mAb和Protein A配体之间的疏水相互作用。相较于丙二醇或异丙醇等毒性较强的试剂，甘油与乙醇属于安全性较高的工艺用试剂，但这两者在生物制药工艺中并不受青睐，并且去除程序繁琐。我们在实验中，在使用NaOH进行柱消毒之前，先用5 CV的超滤水冲洗去除甘油和乙醇这两种添加剂。这一操作的目的是避免NaOH与添加剂接触，防止生成乙氧基离子等不必要的亲核反应物质。实验设置了5%、10%、20%（v/v）三种浓度梯度，分别测试了甘油和乙醇作为洗脱缓冲液添加剂的效果。

洗脱缓冲液添加剂：实验结果

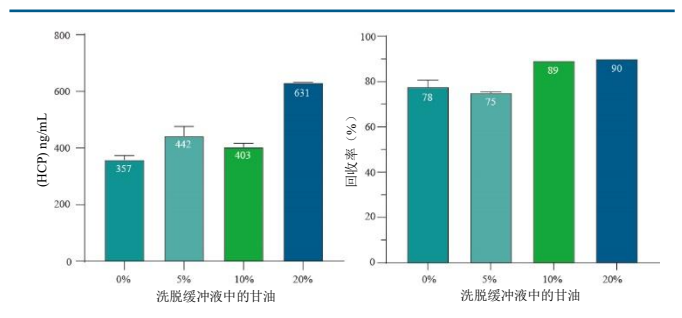
精氨酸和乙醇

L-精氨酸盐酸盐的洗脱增强效果较差，不仅未对回收率产生正向作用，还导致洗脱液中的HCP含量有所升高。乙醇虽能小幅提升回收率（添加10%乙醇时最高提升13%），但会使HCP的去除效果大幅下降（其含量增加近3倍）。

甘油

甘油作为洗脱缓冲液添加剂，表现出优异的性能。实验结果显示，添加10%甘油时，回收率提升了14%，且HCP含量未出现显著增加（图5）。

图5 左图：在洗脱缓冲液中添加不同浓度甘油时，洗脱液中HCP的浓度。数据为2次ELISA重复实验的平均值（其中0%甘油条件为4次重复），误差线表示标准偏差。各组实验的洗脱液中mAb的回收率：除0%甘油组重复实验3次、5%甘油组重复实验2次外，其余浓度组均为单次实验，误差线表示标准偏差。



操作压力与甘油的注意事项：甘油会增加洗脱缓冲液的黏度，进而导致柱前压力小幅上升；不过该压力仍低于最大操作压力限值。在某些偶然情况下，CIP结束后，在泵与层析柱清洗完毕后重新进行系统平衡之前，会出现高压现象。此时，在重新平衡之前，增加高流速的系统清洗（不经过层析柱），可恢复基线压力。这种现象可能是系统管路中残留的甘油在低流速条件下未能充分分散所引起的。在实验中，添加10%甘油时，未出现柱内压差升高的情况。

工艺优化：最终确定条件

优化后工艺：与对照工艺的差异项标为红色

相	缓冲液	洗脱体积
平衡	20 mmol/L磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV
上样	CHO原液, 6.9 mg/mL的曲妥珠单抗	
上样体积	4.94 mL	39.5 mL
上样量	6.8 mg/mL填料 (≈10%)	55 mg/mL填料 (≈90%)
淋洗1	20 mmol/L磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV
淋洗2	25 mmol/L柠檬酸钠, pH 5.2, 150 mmol/L NaCl	10 CV
洗脱	25 mmol/L柠檬酸钠, pH 3.2, 10%甘油	5 CV
CIP	水 (downflow)	5 CV
	0.5 mol/L NaOH	4 CV
	水 (上流)	2 CV
重新平衡	20 mmol/L磷酸钠, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl	5 CV

为了确定该优化工艺在大规模条件下的性能表现，我们分别在约10%和约90%的DBC条件下进行了工艺验证（表1）。由于此前的洗脱工艺优化仅在低上样量条件下完成，因此我们进一步研究了最终确定工艺在更贴近生产实际的高上样量条件下的性能表现，并对相关数据进行了量化分析。

表1 优化后的TOYOPEARL Super A在高低mAb载量条件下的性能对比

进样量 (约占最大载量的百分比)	10%	90%
回收率	89%	97%
[Protein A], ng/mL	19.56	29.11
[Protein A], ppm	2.62	1.04
[HCP], ng/mL	402	7709
[HCP], ppm	54	276
HCP对数去除率	3.34	2.06

两种载量条件下的工艺均表现出极低的Protein A配体脱落，证明了TOYOPEARL Super A配体的稳定性。HCP的去除效果同样显著，在10%低载量条件下表现出超过2000倍的下降。制备色谱需要权衡纯度与回收率这两项指标，低载量条件虽能获得更高纯度，但会牺牲部分回收率。TOYOPEARL Super A卓越的捕获能力和杂质去除能力，可有效降低亲和层析后的繁琐精纯步骤的工艺负担，从而优化整体的工艺经济性。

结论

TOYOPEARL Super A填料可适配多种工艺条件，拓展了潜在实验空间，助力高效的下游工艺开发。

我们确定了L-精氨酸盐酸盐和NaCl是效果显著的淋洗缓冲液添加剂，并优化了淋洗步骤——不仅将回收率提升至99%，还实现了高达2000倍的HCP去除效果。

同时，我们还验证了甘油是理想的洗脱增强型添加剂，尤其适用于低上样量下仍需保障高回收率的情况。实验数据表明，添加10%甘油可使回收率提高14%。

本研究展示了最终优化工艺在高、低两种上样量条件下的性能数据；结果表明，该工艺不仅实现了极低的Protein A配体脱落，还展现出优异的HCP杂质去除能力。

TOYOPEARL Super A是一款灵活且稳定的单克隆抗体制备纯化解决方案。这款填料在多种工艺条件下均能保持优异的稳定性与整体可靠性，是各类mAb纯化的优选方案。

产品信息

货号	产品名称	规格
0023580	TOYOPEARL Super A	10 mL
0023581	TOYOPEARL Super A	25 mL
0023582	TOYOPEARL Super A	100 mL
0023583	TOYOPEARL Super A	1 L
0023584	TOYOPEARL Super A	5 L

货号	产品名称	规格	柱尺寸
0045398	SkillPak 1 TOYOPEARL Super A	1 mL (每支)	7 mm ID × 2.5 cm
0045399	SkillPak 1 TOYOPEARL Super A (数量5)	1 mL (每支)	7 mm ID × 2.5 cm
0045400	SkillPak 5 TOYOPEARL Super A	5 mL (每支)	8 mm ID × 10 cm
0023483	TSKgel Protein A-5PW		4.6 mm ID × 3.5 cm