

## 引言

阴离子交换层析法是一种广泛应用于蛋白质捕获或去除杂质的方法。通常，使用具有季胺或 DEAE（二乙基氨基乙基）配体的阴离子交换填料。然而，经 protein A 初始纯化后的单克隆抗体（mAb）或未稀释生物原料中都含有较高的盐浓度，此时这些较常规填料会显示出蛋白质载量降低的缺点。要在这些工艺阶段使用 DEAE 或季胺填料，必须稀释柱填充材料以将其电导率调节至约 5 mS/cm。

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 是一种应用于生产规模（例如去除多聚体和清除病毒）的独特耐盐性阴离子交换填料。该填料基于伯胺基为功能团的 TOYOPEARL HW-75F 尺寸排阻填料制成。这允许当在吸附-洗脱模式中使用 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 填料时在电导率高达 15 mS/cm 的情况下保持吸附载量。

当在流穿工艺步骤中使用时，TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 可以在更高盐浓度情况下用于去除多聚体，在往层析柱上样前来自捕获步骤的洗脱后所得样品只需进行最小调节。表 1 列出了 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 填料的特性。

表 1. TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 的特性

	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F
粒径 (µm)	30-60
孔径 (nm)	>100
离子交换容量 (eq/L 填料)	0.07-0.13
SBC (g/L 填料)	≥70

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 是纯化 mAbs 中间体（经 protein A 初始纯化）的理想填料，用该填料可将多聚体和其它杂质从目标产物里去除，无需在上样前稀释或缓冲液交换产物。

本文提供的数据证明了在流穿装置中使用 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 填料，可以从经 protein A 初始纯化的 IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体的单体里去除二聚体和更高阶多聚体的能力。

## 实验条件/结果

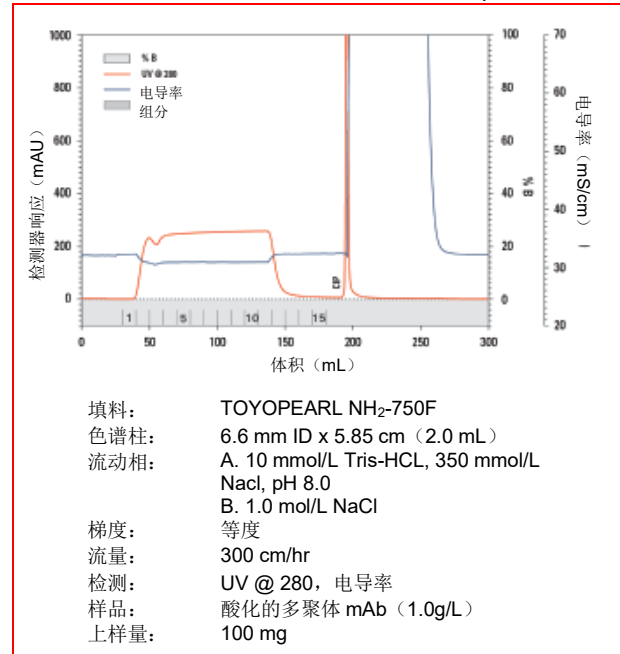
在二聚体/多聚体的去除实验中，用 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 填料填充至 6.6 mm ID × 5.85 cm 规格的层析柱。

在 10mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.0 和 8.0 的流动相中用不同浓度的 NaCl 进行多聚体的去除实验。将 100mL 酸化的多聚体 mAb 样品（1.0g/L）上样到层析柱，并在流穿模式中收集未吸附的 mAb。然后，用 1.0 mol/L NaCl 冲洗层析柱去除吸附的 mAb 多聚体。

在流穿过程中的产物峰里得到多个组分，然后使用 TSKgel® G3000SW<sub>XL</sub> 尺寸排阻色谱柱对其分析以验证从 mAb 单体里分离二聚体和多聚体的情况。

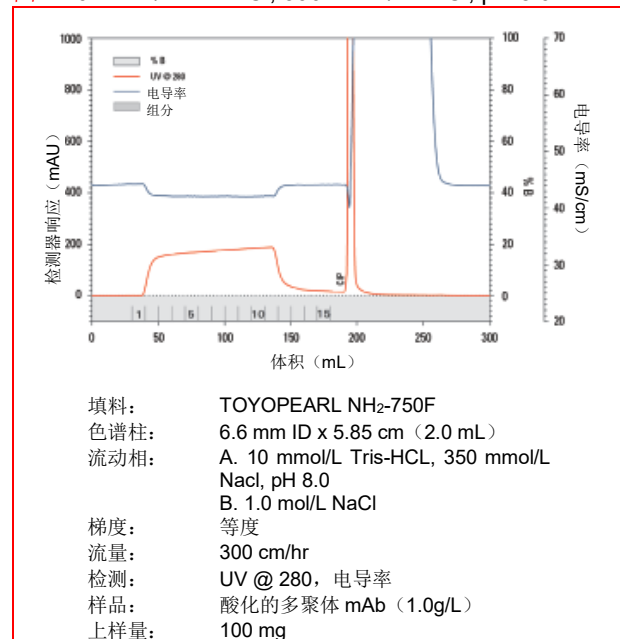
在 10 mmol/L Tris-HCl, NaCl 浓度 350 mmol/L, pH 8.0 的条件下进行流穿实验。（图 1）具有 13% 的初始多聚体含量。在流穿模式中收集的 mAb 单体具有 2% 的最终多聚体含量以及 90% 的总产物产率。

图 1. 10 mmol/L Tris-HCl, 350 mmol/L NaCl, pH 8.0



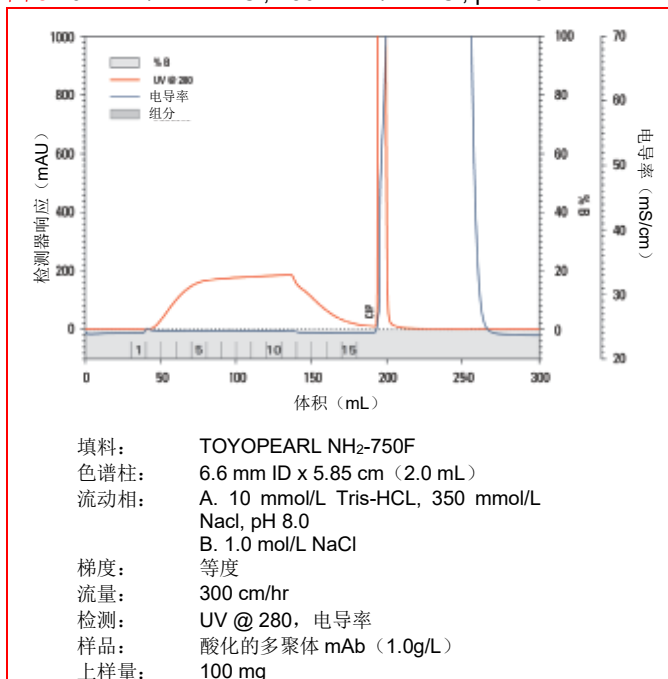
在 10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0 的条件下进行实验。（图 2）具有 17% 的初始多聚体含量。在流穿模式中收集的 mAb 单体具有 3% 的最终多聚体含量以及 93% 的总产物产率。

图 2. 10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0



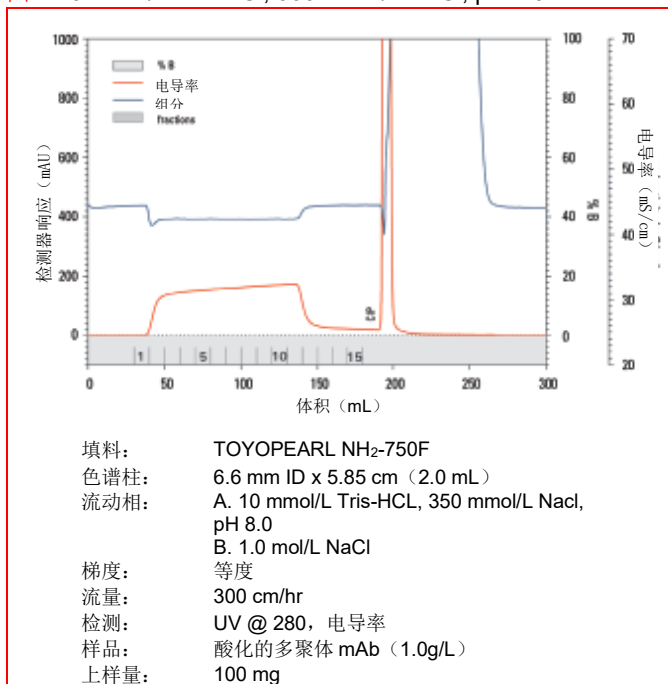
在 10 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, pH 7.0 条件下进行流穿实验。(图 3) 具有较高的初始多聚体含量为 28%。在流穿模式中收集的 mAb 单体具有 0% 的最终多聚体含量以及 75% 的总产物产率。

图 3. 10 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, pH 7.0



在 10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.0 条件下进行最后一组实验(图 4)。具有最高的初始多聚体含量, 为 32%。在流穿模式中收集到的 mAb 单体中最终的多聚体含量为 2%, 总产物产率为 75%。

图 4. 10 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.0



Tosoh Bioscience、TOYOPEARL 和 TSKgel 是东曹株式会社的注册商标

图 5 显示了用于最佳条件测试的组分分析图和原料, 证明了图 3 中的实验能将多聚体从 mAb 单体里完全去除。根据图 2 中的实验, 图 6 中显示了具有最多残留多聚体的组分分析图和原料。

图 5. 图 3 中多聚体 mAb 和组分峰的 SEC 分析

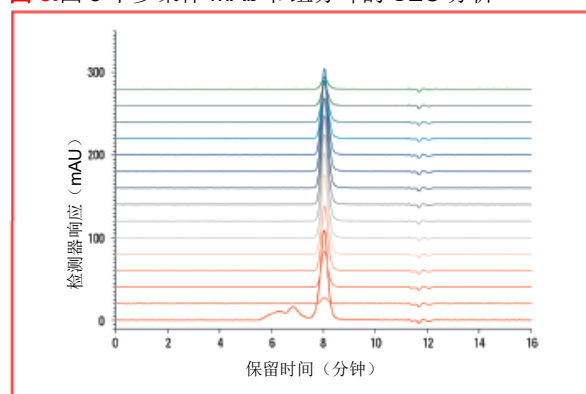
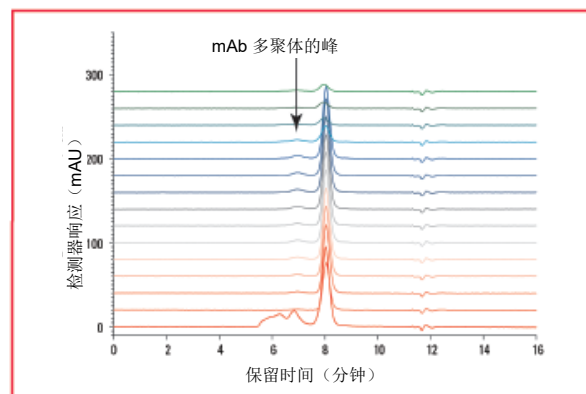


图 6. 图 2 中多聚体 mAb 和组分峰的 SEC 分析



## 结论

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 是一种有效的阴离子交换填料, 用于在流穿装置中从经 protein A 初始纯化的 mAb 单体里去除二聚体和更高阶的多聚体。

该填料独特的高耐盐性允许在盐浓度高达 0.5mol/L 时保留 mAb 多聚体。在这些条件下, 可以从 mAb 单体里去去除多聚体, 无需在上样前稀释或缓冲液交换经 protein A 捕获后的样品。

虽然在少数几个实验中一些多聚体与单体峰一起共洗脱, 但可通过进一步完善方法以进一步减少携带量并提高单体峰中的产物产率。