

东曹生命科学的 TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650F 是一款单克隆抗体 (mAbs) 纯化用的高载量 Protein A 填料。该填料, 在保留时间为 5 分钟时的动态吸附载量 (DBC) 达到 70 g/L, 是目前生物制药工业中最新的高载量亲和填料之一。

## 引言

Protein A 层析法是纯化单克隆抗体产物中的关键步骤。它是一种非常常用的纯化工艺, 由于其特异性吸附, 常作为捕获步骤用于去除杂质, 例如宿主细胞蛋白。在开发稳健的制造工艺中, 必须选择能够在广泛的操作参数范围内充分去除这些工艺杂质的 protein A 填料。

在 protein A 层析中, 将粗原料在促进吸附的条件下通过层析柱。完成上样后, 将层析柱在不影响目标产物和配基之间特异性相互作用的条件下进行淋洗, 但这样会破坏工艺杂质 (宿主细胞蛋白等) 和固定相之间的所有非特异性相互作用。

然后, 用破坏目标产物/配基相互作用的流动相条件洗脱吸附的蛋白。通常, 从 protein A 填料中洗脱目标分子的方法是通过降低流动相的 pH 值, 使结合位点的分子结构产生变化从而抑制吸附。

以下实验比较了 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F、TOYOPEARL AF-rProtein A-650F 和另一种市售高载量 protein A 填料的宿主细胞蛋白 (HCP) 去除能力。表格 1 列出了该实验所用填料的特性和动态吸附载量。

表格 1. Protein A 填料的特性

产品名称	生产商	直径	吸附载量 (g/L)	
			DBC (2 min)	DBC (5 min)
TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	Tosoh Bioscience	45 µm	50	70
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	Tosoh Bioscience	45 µm	30	40
售高载量 protein A 填料		85 µm	30	58

## 实验条件/结果

将 TOYOPEARL AF-rProtein A-650F、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 和售高载量 protein A 填料装填在多功能 MediaScout®RoboColumn®10.0 mm ID × 5 mm 层析柱中, 其柱床体积为 200µL。

采用一项 4 因素组合实验设计方案来比较这些填料在宿主细胞蛋白去除方面的性能。实验设计因素包括洗脱 pH 值、填料上样量原料浓度和初始 HCP 浓度。图 1 显示了用 protein A 填料进行实验的设计空间参数。

图 1. 设计空间参数

4因素中心组合试验设计方案						
因素	变量	最小值	最大值	-1实际值	+1实际值	平均值
A	洗脱pH值	2.25	4.25	2.75	3.75	3.26
B	填料上样量 (g/L)	10.0	50.0	20.0	40.0	30.0
C	原料浓度 (g/L)	0.25	9.25	2.50	7.00	4.75
D	HCP尖峰 %	5.0	25.0	10.0	20.0	15.0
	HCP浓度 (µg/mL)	100	500	200	400	300

变量: 原料浓度  
填料上样量  
HCP 尖峰  
pH

中心点值

变量: 洗脱缓冲液 (柠檬酸或醋酸)

根据 Design-Expert® DOE 软件生成的实验设计方案, 使用 Tecan Freedom EVO®自动化液体处理仪器进行纯化。用柠檬酸和醋酸作为洗脱缓冲液进行实验, 每种填料总共进行 60 次实验。

使用 Cygnus Technologies 第三代 CHO HCP ELISA 试剂盒分析原料和被洗脱 mAb 中的宿主细胞蛋白含量。图 2 以原料中 HCP 数量级减少的形式显示每个实验的宿主细胞蛋白质去除情况, 图 3 显示上样浓度对 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料去除 HCP 能力的影响。

图 2 显示这些实验中所有受评估填料的 HCP 呈现出数量级减少。对于 protein A 纯化而言, 允许的数量级减少值通常大于 2.5。用柠檬酸和醋酸洗脱缓冲液, 所有受评估填料 HCP 减少值为 2.4 和 3.6 数量级之间。

图 2. 所有受评估填料的 HCP 去除情况

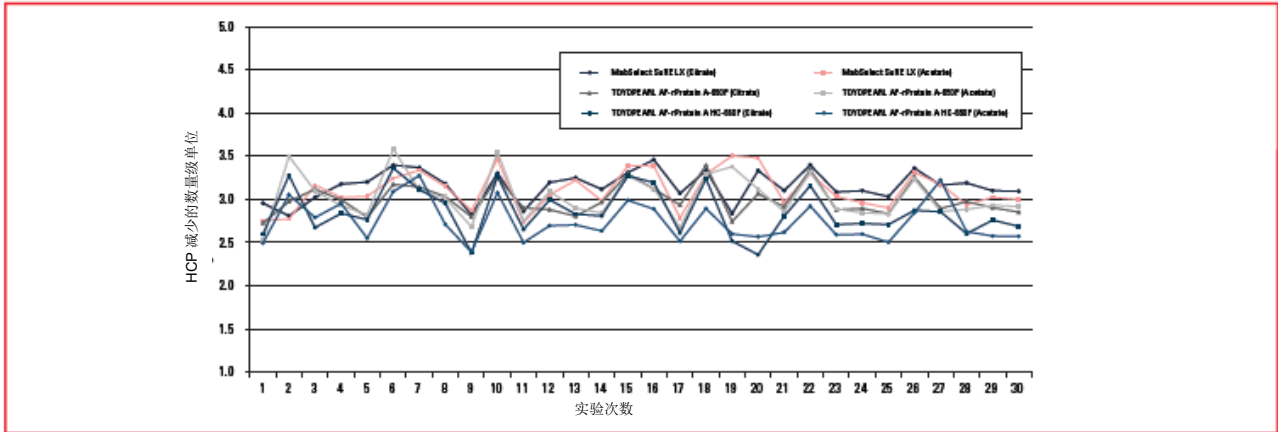


图 3. 原料浓度对层析柱洗脱中 HCP 浓度的影响

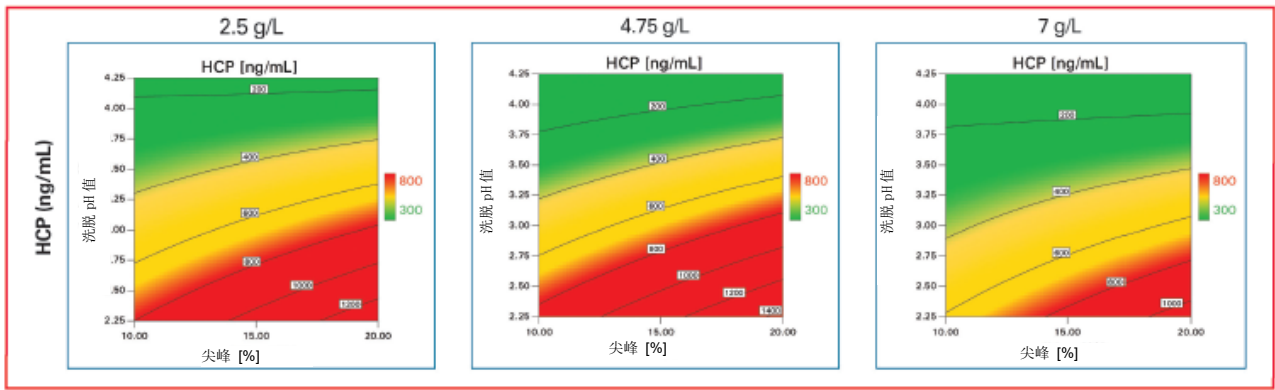


图 3 中显示了关于 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 粗原料中的 mAb 浓度对被洗脱 mAb 产物中 HCP 浓度的影响。当粗原料中的 mAb 浓度提高时，洗脱产物中的 HCP 浓度降低。这表明，即使是高原料浓度，TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料也能满足生物制药工业中去除宿主细胞蛋白所需的性能。

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 和 MabSelect SuRe LX 填料都显示出令人满意的 HCP 去除能力。特别是对于 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F，当粗原料中的 mAb 浓度提高时，洗脱产物中的 HCP 浓度降低。这证明 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 可成功用于去除宿主细胞蛋白。

## 结论

Protein A 层析法是纯化单克隆抗体产物中的关键步骤。鉴于其可以在单个步骤中去除高达 95% 以上的细胞培养相关杂质的能力，选择 Protein A 填料可以减轻后续下游步骤去除如宿主细胞蛋白等这些工艺杂质的负担。在开发稳健的制造工艺中，必须能够在广泛的操作参数范围内充分地去除这些工艺杂质的 Protein A 填料。

Tosoh Bioscience 和 TOYOPEARL 是东曹株式会社的注册商标。MediaScout 和 RoboColumn 是 Atoll 有限责任公司的注册商标。Freedom EVO 是帝肯的注册商标。Design-Expert 是 Stat-Ease 公司的注册商标。