



TOYOPEARL Super A在单克隆抗体高效捕获中的性能评估

简介

Protein A层析是基于抗体与层析填料上的Protein A配体之间的特异性结合作用。Protein A是一种来自金黄色葡萄球菌的42 kDa表面蛋白，由5个免疫球蛋白结合结构域组成。每个结合域都能与多种哺乳动物物种的蛋白质结合，尤其是通过Fc区内的重链与免疫球蛋白G (IgG) 相结合。虽然天然形式的Protein A曾被用作第一代Protein A填料的配体，但目前最常用的是大肠杆菌表达的重组形式 (rProtein A)。通过对配体蛋白结构的修饰、单结构域多聚体配体的开发以及多点结合技术的应用，现今使用的Protein A填料已具备耐强碱、高载量和超高稳定性等特点。

除了动态吸附载量 (DBC)、耐碱性和压力-流速特性等决定操作灵活性的操作参数之外，还应特别关注填料的关键性能参数，例如回收率、杂质去除率、目标蛋白的质量以及对后续下游步骤的影响。这些关键性能要素对于生产更安全、更高纯度且符合日益严格的行业监管标准的产品至关重要，并且对整体工艺的经济性和效率有着重大影响。

本应用笔记介绍了新型TOYOPEARL® Super A填料的单克隆抗体 (mAb) 捕获工艺。

实验条件

填料: TOYOPEARL Super A
层析柱尺寸: SkillPak™ 5 TOYOPEARL Super A
 8.0 mm ID × 10 cm (5 mL)
流动相: 见表1
方法概述: 见表2
流速: 2.5 mL/min
检测: UV @ 280 nm; 电导率; pH
温度: 室温
样品: 三种不同浓度的人源化mAb (IgG1) 收获液: 分别为高滴度 (8.31 g/L)、中滴度 (4.24 g/L)、低滴度 (2.09 g/L)。
进样量: 所有不同浓度的样品, 均进样DBC₁₀ (动态吸附载量, 定义为穿透液UV值达到收获液100% UV值的10%时的吸附载量)的80% (样品浓度降低时, 进样体积增加)。

表1 单克隆抗体捕获工艺的流动相组成

| 缓冲液名称 | 原料 | pH值 | 电导率 (mS/cm) |
|--------|--|-----|-------------|
| 缓冲液A | 20 mmol/L HEPES游离酸; 20 mmol/L MES一水合物; 20 mmol/L 乙酸; 20 mmol/L 氯化钠; 2 mol/L HCl (用于调节) | 2.7 | 4.2 |
| 缓冲液B | 20 mmol/L HEPES游离酸; 20 mmol/L MES一水合物; 20 mmol/L 乙酸; 20 mmol/L 氯化钠; 55 mmol/L 氢氧化钠; 2 mol/L NaOH (用于调节) | 8.5 | 5.9 |
| 磷酸盐缓冲液 | 50 mmol/L 磷酸二氢钠二水合物; 1 mol/L 氯化钠; 2 mol/L 尿素; 5 mmol/L EDTA; 2 mol/L NaOH (用于调节) | 7.0 | 78.0 |
| NaOH | 0.5 mol/L NaOH | 不适用 | 99 |
| 醋酸盐缓冲液 | 200 mmol/L 乙酸; 20% 乙醇 (v/v); 5 mol/L NaOH (用于调节) | 4.7 | 3.2 |

表2 纯化方法概述

| 步骤 | pH值 | 缓冲液/梯度 | CV |
|-----|-----|---------|-------------------|
| 平衡 | 7.1 | 80% B | 5 |
| 载量 | 不适用 | 过滤后的收获液 | 不适用 |
| 清洗1 | 7.1 | 80% B | 3 |
| 清洗2 | 7.0 | 磷酸盐缓冲液 | 5 |
| 清洗3 | 5.9 | 41% B | 3 |
| 洗脱 | 3.4 | 14.4% B | 5 ^{#1} |
| CIP | 不适用 | NaOH | 2+1 ^{#2} |
| 保存 | 不适用 | 醋酸盐 | 3 |

#1: 洗脱峰在50~100 mAU范围内。
 #2: 接触时间为30分钟 (包括在过柱2倍柱体积 (CV) 后的暂停时间)

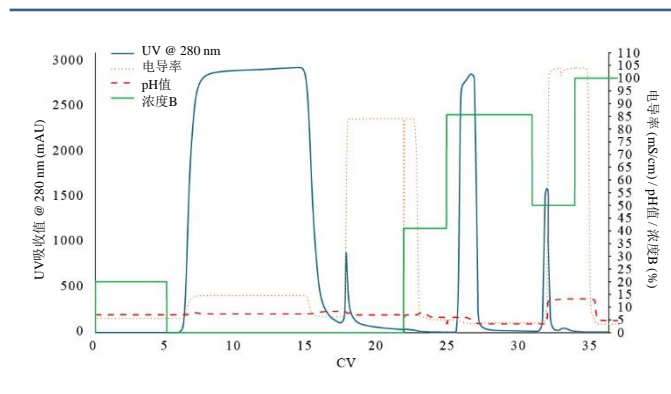
结果和讨论

纯化工艺

在对人源化mAb进行纯化时, 使用了实验条件中提到的缓冲液。也可选用其他缓冲液 (例如, 平衡/进样使用0.1 mol/L、pH值为7.0的磷酸钠缓冲液; 洗脱使用0.1 mol/L、pH值为3.0的醋酸钠缓冲液)。在样品进样过程中, 所有实验的保留时间 (RT) 均为2分钟。下述数据均基于本文前面提到的实验条件。鉴于抗体特性可能存在差异, 所以可能需要对缓冲液和实验条件进行调整, 以获得类似的结果。

将不同浓度的人源化mAb细胞培养收获液进样到5 mL TOYOPEARL Super A填料的层析柱中。具体方法详见表2。图1展示了浓度为4.24 g/L的mAb收获液在TOYOPEARL Super A填料中的完整纯化工艺的谱图。

图1 TOYOPEARL Super A填料（5 mL 层析柱）对中滴度人源化mAb收获液（4.24 g/L）的纯化谱图



首先，用5倍柱体积的20%缓冲液A和80%缓冲液B平衡层析柱，为mAb收获液进样并结合到柱上确保最佳条件。在进样过程中（4.24 g/L浓度mAb收获液使用10倍柱体积），收获液中所有不与TOYOPEARL Super A填料上的Protein A配体相互作用的成分都会穿过层析柱，并可在280 nm波长处被检测到较高的紫外信号。进样步骤之后，进行3倍柱体积的第1次清洗（使用与平衡时相同的缓冲液）。第1次清洗的目的是洗掉那些与Protein A填料几乎没有或完全没有相互作用的残留收获液成分。

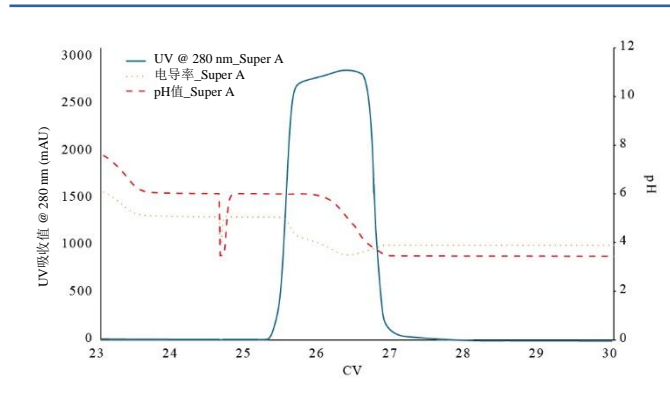
第1次清洗之后是进行5倍柱体积的第2次清洗，第2次清洗液由pH值为7的磷酸盐缓冲液组成。第2次清洗时的电导率高于平衡时的条件，且含有高浓度盐和尿素。这些添加剂会促进竞争性结合，从而将未结合的宿主细胞蛋白（HCP）和DNA从柱上洗脱下来。这表现为在18倍柱体积处出现一个小的UV峰，同时伴随电导率的小幅上升。

第3次清洗使用由41%的缓冲液B和59%的缓冲液A组成的溶液，清洗体积为3倍柱体积。这次清洗将电导率降至平衡时的水平，并将pH值降至5.9，为接下来的酸性洗脱步骤做好准备。此时的pH值尚未低至引发洗脱的程度。随后用5倍柱体积的pH值为3.4的14%缓冲液B来洗脱产物。图2显示产物在1.7倍柱体积内被洗脱出来。使用TOYOPEARL Super A填料时，mAb的洗脱pH值是4.9~5.0。

接下来的原位清洗（CIP）步骤使用0.5 mol/L的NaOH，分为三个阶段：2倍柱体积清洗、保持24分钟、再进行1倍柱体积的原位清洗，总接触时间为30分钟。在这一步骤中，会有一些残留的产物或杂质被洗脱出来（在原位清洗步骤开始时会出现UV信号）。之后，层析柱即可重新使用。

TOYOPEARL Super A填料对mAb的洗脱体积相对较小，其洗脱峰详情如图2所示。

图2 TOYOPEARL Super A填料纯化人源化mAb的洗脱峰



使用TOYOPEARL Super A填料时，4.24 g/L滴度样品的纯化产物在1.7个柱体积内完成洗脱，洗脱体积为8.4 mL。虽然实验数据基于4.24 g/L的抗体滴度为例，但测试发现不同mAb滴度下的洗脱体积基本一致。纯化抗体的回收率高达95.6%。

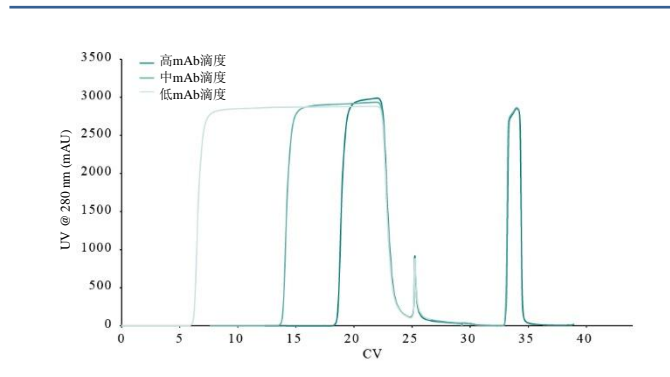
对于放大实验而言，较小的洗脱体积对后续纯化步骤（例如，在必要时进行的阳离子交换层析）非常有利，同时也有助于缩短洗脱的工艺时间，减少所需的缓冲液用量。较小的洗脱体积通常伴随着较高的样品浓度，这同样也会缩短工艺时间并减少缓冲液消耗。

在下一个步骤中，将不同滴度的样品进样至5 mL层析柱中。

对于不同上样滴度，层析图谱（除上样阶段外）具有高度相似性。各浓度上样时均保持相同的抗体上样量。清洗、洗脱和原位清洗步骤看起来高度一致，表明收获液的浓度不会影响纯化效果。

图3展示了TOYOPEARL Super A填料处理不同滴度样品的三张谱图。为清晰起见，仅显示280 nm波长处的UV信号。

图3 TOYOPEARL Super A填料纯化三种不同mAb滴度样品的层析叠加图



纯化工艺的分析数据

表3展示了不同mAb滴度和载量的概述，以及下述不同样品的命名方式。

表3 人源化mAb收获液的不同滴度概述

| 人源化mAb浓度 (g/L) | 载量 (g/L) | 产品描述 |
|----------------|----------|--------|
| 8.31 | 32.6 | 高mAb滴度 |
| 4.24 | 36.7 | 中mAb滴度 |
| 2.09 | 34.3 | 低mAb滴度 |

收集并分析了三种mAb滴度样品的洗脱液。使用TSKgel® G3000SW_{XL}分析型尺寸排阻色谱柱测定了总回收率、单体含量以及聚集体含量。结果见表4和表5。

表4 不同mAb滴度的洗脱液数据（洗脱液合并后，测定其浓度、pH值和电导率）

| mAb滴度 | 洗脱液体积 (mL) | 洗脱液体积 (CV) | 浓度 (g/L) | pH值 | 电导率 (mS/cm) | 回收率 (%) |
|-------|------------|------------|----------|-----|-------------|---------|
| 高 | 8.3 | 1.7 | 19.8 | 4.9 | 3.8 | 100.6 |
| 中 | 8.4 | 1.7 | 21 | 5.0 | 3.3 | 95.6 |
| 低 | 8.3 | 1.7 | 20.5 | 5.0 | 3.7 | 98.9 |

表5 不同mAb进样量下的单体和聚集体含的洗脱液数据（单体和聚集体的含量是使用分析型SEC色谱柱测定的）

| mAb滴度 | 单体 (%) | 聚集体 (%) |
|-------|--------|---------|
| 高 | 96.4 | 2.2 |
| 中 | 96.4 | 2.3 |
| 低 | 96.3 | 2.3 |

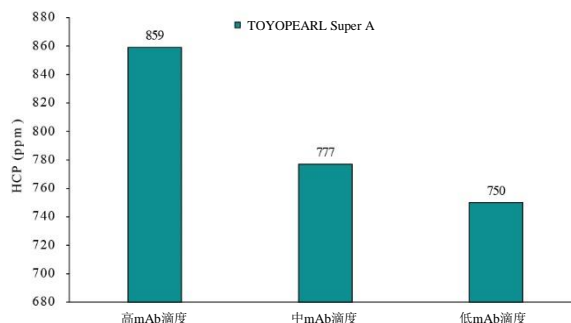
为了更好地评估mAb在TOYOPEARL Super A填料对抗体的纯化效果，使用HCP ELISA试剂盒测定了纯化前后收获液的HCP含量，并据此计算HCP的去除率。针对不同滴度的三个纯化工艺均进行了HCP去除率测定，结果如表6所示。

表6 不同mAb滴度下的HCP浓度

| mAb滴度 | HCP进样量 (ng/mL) | HCP进样量 (ppm) | HCP洗脱液 (ng/mL) | HCP洗脱液 (ppm) | 洗脱液中HCP的去除率 (X-fold) |
|-------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------------|
| 高 | 265557 | 31976 | 17023 | 859 | 37.2 |
| 中 | 246553 | 58136 | 16293 | 777 | 74.9 |
| 低 | 232813 | 111181 | 15338 | 750 | 148.3 |

图4展示了TOYOPEARL Super A填料对不同mAb滴度的HCP的去除情况。

图4 不同mAb滴度下的人源化mAb收获液中HCP的去除情况



另外还使用了特异性Protein A ELISA试剂盒来测定Protein A配基的脱落情况。结果如表7所示。

表7 使用TOYOPEARL Super A填料时，不同mAb滴度下的Protein A配基的脱落情况

| mAb进样量 | Protein A [ng/mL] | Protein A [ppm] |
|--------|-------------------|-----------------|
| 高 | 18 | 1 |
| 中 | 98 | 5 |
| 低 | 141 | 8 |

结论

在关键性能表现方面，TOYOPEARL Super A填料在不同的mAb滴度下都显示出了高效且稳定的结果。

TOYOPEARL Super A填料展现出显著优势：可在温和的pH条件下洗脱、洗脱体积小、对HCP的清除效果极佳、单体回收率高且聚集体形成极少。这些特性确保了工艺的稳健性和重现性，能够满足严格的质控与监管要求，同时提升经济效益。

总而言之，TOYOPEARL Super A填料兼具行业领先的关键性能属性以及符合行业标准的操作参数，是大规模生物工艺的理想选择。这些特性提高了工艺经济性，并简化了高质量mAb的制备流程。

订购信息

| 货号 | 产品名称 | 填料体积 | 孔径 | 粒径 |
|---------|-------------------|--------|--------|-------|
| 0023580 | TOYOPEARL Super A | 10 mL | 100 nm | 45 μm |
| 0023581 | TOYOPEARL Super A | 25 mL | 100 nm | 45 μm |
| 0023582 | TOYOPEARL Super A | 100 mL | 100 nm | 45 μm |
| 0023583 | TOYOPEARL Super A | 1 L | 100 nm | 45 μm |
| 0023584 | TOYOPEARL Super A | 5 L | 100 nm | 45 μm |

| 货号 | 产品名称 | 填料体积 | 柱尺寸 |
|---------|------------------------------------|----------|------------------|
| 0045398 | SkillPak 1 TOYOPEARL Super A | 1 mL (支) | 7 mm ID × 2.5 cm |
| 0045399 | SkillPak 1 TOYOPEARL Super A (数量5) | 1 mL (支) | 7 mm ID × 2.5 cm |
| 0045400 | SkillPak 5 TOYOPEARL Super A | 5 mL (支) | 8 mm ID × 10 cm |