

内毒素是细菌细胞壁的残留物，其可以污染药物产品并且引起免疫原性反应。由于它们的发热诱发作用，而将它们通常称为“热原质”。由于在细菌表达系统中用于产生药物产品的宿主细胞受到污染，或由于非微生物产品中的意外细菌污染，可能会在药物产品中发现内毒素。因此，清除内毒素是生物制剂的后期加工的要求，特别是那些源于含有内源宿主细胞内毒素的微生物表达系统的产品。在该研究中，我们评估了 TOYOPEARL NH2-750F 通过阴离子交换层析法去除内毒素的能力。

引言

TOYOPEARL NH2-750F 是针对工艺规模应用的耐盐阴离子交换填料，基于用伯胺基官能化的 TOYOPEARL HW-75F 尺寸排阻填料。表格 1 列出了 TOYOPEARL NH2-750F 填料的性能。

表格 1. TOYOPEARL NH2-750F 的性质

	TOYOPEARL NH2-750F
粒径 (µm)	30-60
孔径 (nm)	> 100
离子交换量 (eq/L 填料)	0.07-0.13
SBC (g/L 填料)	≥ 70

TOYOPEARL NH2-750F 填料是纯化 mAb 和其它蛋白质中间体的理想选择，在此将多聚体和其它带负电荷的杂质（如 DNA 和内毒素）从目标产物里去除，而不必在上样前稀释或缓冲液交换产物。

本文提供的数据说明了 TOYOPEARL NH2-750F 在流穿装置中去除内毒素的能力。

实验条件

用 75mL 的 0.1mol/L 磷酸冲洗 ÄKTA 系统，然后用 75mL 的 E-pure 水冲洗。然后用 0.5mol/L 氢氧化钠冲洗系统，并且在环境温度下孵育至少 1 小时。孵育后，用 75mL 的 E-pure 水，然后用 20mmol/L 的 Tris base (pH 7.4) 冲洗该系统，直到记录到稳定的电导率和 pH 基线。通过鲎试验 (LAL) 证实足够的系统清洁。

用 5CV 的 0.5 mol/L 氢氧化钠就地清洗 TOYOPEARL NH2-750F MiniChrom 柱 (8mm 内径×10cm)，接触时间为 15 分钟。用 2CV 的 20 mmol/L Tris base, 1 mol/L NaCl, pH 7.4 再生层析柱，然后用 20 mmol/L Tris base, pH 7.4 进行平衡，直到获得稳定的电导率和 pH 基线 (约 3CV)。

在该实验中所使用的所有溶液都通过 LAL 试验测试背景内毒素水平，并且确定是无内毒素的，尽管再生液在 LAL 试验中确实显示出一些痕量的内毒素。因此，在测试前，用无内毒素的水稀释再生样品。

将 5mg 等分的脂多糖 (LPS) 悬浮在 1.0mL 无内毒素的水中，剧烈混合 5 分钟。通过 LAL 试验测试 LPS 溶液的稀释液的内毒素活性。将内毒素储备液避光冷藏直至使用。

用 20mmol / L Tris base (pH 7.4) 平衡层析柱，直到获得稳定的电导率和 pH 基线。将 50 mL 平衡缓冲液样品 (20 mmol / L Tris base, pH 7.4) 用标准化的 LPS 溶液加标，以得到终浓度约为 100,000 EU / mL。然后用加标的平衡缓冲液上样到层析柱，并且收集 2CV (10mL) 流通组分。上样后，用 3CV 的平衡缓冲液清洗层析柱，并且用 3CV 的高盐缓冲液 (20mmol / L Tris base, 1mol / L NaCl, pH 7.4) 再生。收集清洗和再生步骤的组分。如先前所述，在随后的测试或储存于 20% 乙醇之前就地清洗层析柱。

通过 LAL 试验测试所有填充材料、流通、清洗和再生组分的内毒素。

结果

针对内毒素清除情况，在水中制备了大肠杆菌脂多糖的溶液。当以 1:1×10⁸ 稀释度进行测试时，5mg / mL LPS 溶液产生 5.6×10⁷ EU / mL 的内毒素活性。在柱平衡缓冲液中将柱填充材料制备为具有约 100,000 EU / mL 的内毒素含量。直接测定该溶液的起始浓度为 89,000 EU / mL，其总上样为 4,450,000 EU (89,000 EU / mL × 50mL)。

使用以下方法来计算内毒素清除情况：

样品内毒素浓度 (C_i) 如上所述确定为 89,000 EU / mL。根据样品内毒素浓度和上样体积 (V_i) 来确定上样样品的对数内毒素含量 (L_i)：

$$L_i = \log_{10} C_i + \log_{10} V_i$$

对于上样样品：

$$L_{Load} = \log_{10} C_{Load} + \log_{10} V_{Load} = \log_{10} 89,000 \text{ EU/mL} + \log_{10} 50.0 \text{ mL} = 6.65$$

通过减法来确定给定组分 (A_i) 的内毒素清除情况。

$$A_i = L_{Load} - L_i$$

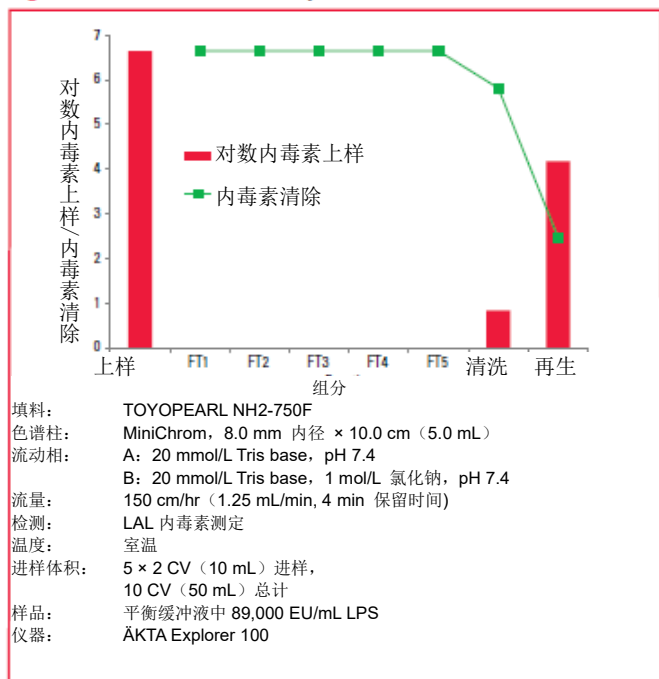
对于清洗样品：

$$A_{Wash} = L_{Load} - L_{Wash} = 6.65 - 0.83 = 5.82$$

从图 1 中可以看出，清洗阶段中内毒素有一些小的穿透，该组分的对数减少值为 5.82。请注意，这代表原始填充材料中内毒素小于 0.0002% 的穿透。

流通组分的内毒素浓度小于测定的检测限 (0.1 EU / mL); 因此, 每个流通组分的最小对数减少值为 6.7。图 1 显示了该过程中每个步骤的对数内毒素清除的图示。

图 1. 内毒素清除总结



结论

TOYOPEARL NH2-750F 在流通色谱模式中是一种可有效去除内毒素的阴离子交换填料。该实验显示, TOYOPEARL NH2-750F 能够将样品中的内毒素降低至低于 LAL 测定检测限的水平, 在这种情况下对数值大于 6.7。

Tosoh Bioscience 和 TOYOPEARL 是东曹株式会社的注册商标。
AKTA 是 GE 医疗生命科学的注册商标。

东曹生命科学电子邮箱:
info.tbs@tosoh.com
www.tosohbioscience.com

AN94

0416