



Life Sciences

应用指南

USD2409

采用 **MEP HyperCel™** 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

本研究说明了什么

本项有关 MEP HyperCel 填料的 HCIC 研究表明，高纯度抗体可通过一步吸附法直接进行高产量回收，甚至可从含有高浓度污染蛋白的原料中进行回收，如白蛋白。根据样品中蛋白的相对疏水性和阶段性洗脱的 pH 值，HCIC 双模式机制可对洗脱条件进行精确调整。这种机制可对污染物中的目标抗体进行高效、选择性地吸附。使用常规低成本缓冲液优化后，可获得 97% 纯度和 97% 产量的抗体，与利用 A 蛋白树脂的亲和力从非浓缩原料中直接吸附获得的产物相似。

最后，MEP HyperCel 是一种可工业化放大的填料，可用 1 M 氢氧化钠清洗，是一种可用于大规模 IgG 吸附的经济有效的方法。

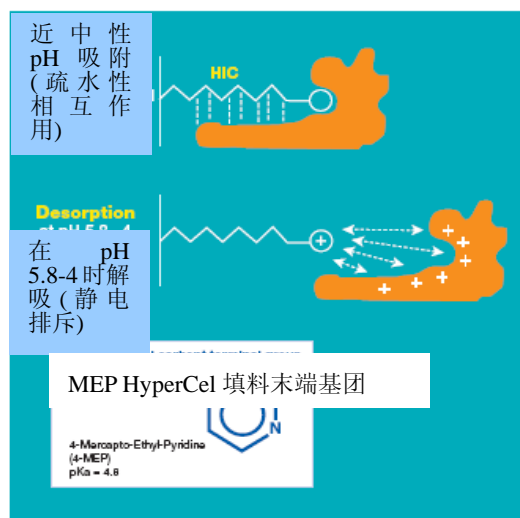
1. 介绍

BioSeptra MEP HyperCel 的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 是一种专门为从各种原料中纯化和回收抗体而研发的层析方法。这种方法可以在生理 pH 下直接吸附抗体，并在弱酸性 pH 下进行洗脱。经过短期优化研究后可以达到高产量和高纯化，因此 MEP HyperCel 被定位为一种经济有效、功能强大的亲和树脂替代产品。

本研究表明，MEP HyperCel 填料可在一步操作中方便地应用于对小鼠 IgG₁ 的有效吸附及纯化。

2. 目的

对疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 进行优化，使其成为对治疗和诊断用单克隆抗体直接吸附的亲和层析法 (A 蛋白) 的潜在替代方案。最终目的是设计一种功能强大、具有可变大小、可从含有白蛋白的原料中吸附小鼠 IgG₁ 的方法，该方法采用 MEP HyperCel 填料，仅需进行一步吸附，其纯度和产量可至少达到 90%。



MEP HyperCel 填料吸附/洗脱机制。

3. 材料和方法

- **样品：**对两种不同的细胞培养物上清液 (CCS) 进行优化，包括细胞培养基中含有的白蛋白和转铁蛋白：浓缩 30 倍的 CCS (小鼠 IgG₁: 1.5 mg/mL) 和非浓缩型 CCS [IgG₁: 0.043 mg/mL]。
- **层析法：**采用使用 MEP HyperCel 填料 (Pall) 的 HCIC 层析法，PBS 平衡，pH 7.4。CCS 直接上样到层析柱；过柱结束后，MEP HyperCel 填料采用大约相当于 5 倍柱体积的 1 M NaOH 进行复原。小规模分析运行可以在 ÄKTA* Explorer 100 (GE Healthcare) 上进行，大规模分析运行可以在 PKL6 层析系统 (Pall) 上进行。
- **分析：**应用 SDS-PAGE (12% 丙烯酰胺凝胶) 和蛋白芯片系统 (CIPHERGEN Biosystems, Inc.) 的 SELDI 对组分进行分析。IgG 纯度通过带 TSKgel* G4000SWXL 层析柱 (Tosoh Bioscience) 的 SEC HPLC 进行评估。蛋白质浓度采用 BCA 标准检测法进行测定 (Interchim)。

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

4. 采用 MEP HyperCel 填料的 HCIC 层析优化方法

4.1. pH 梯度洗脱和特异性洗涤程序

MEP HyperCel 填料可通过疏水性电荷诱导机制从粗制原料流中直接吸附抗体。可在生理 pH 下实现对 IgG 的吸附,通过阶段洗脱降低和调节 pH 来推动洗脱的进行 (在 pH 范围为 6 到 3 内较典型)。从细胞培养中所得到的污染物,如白蛋白、转铁蛋白或其他疏水性物质,可以结合到 MEP 配体上。这些污染物中的一部分可以通过特殊洗涤步骤予以去除,主要采用水和辛酸钠洗涤剂 (见图 1),但是调整流动相 pH 及其组成对获得最佳纯度是必要的 (见 5.2 节)。

4.2. 流速和停留时间的优化

停留时间也会影响分离质量 (产量) 和持续时间。初期实验可允许停留时间为 5 分钟。为了减少放大阶段的循环时间,我们对产量和纯度与停留时间之间的关系进行了研究 (见 5.3 节)。

4.3. 放大

一旦确定了相关条件 (pH 洗脱和停留时间),可在恒定柱床高度下通过增加层析柱直径进行放大。MEP HyperCel 填料具工艺放大性,可用于几毫升到 100 L 的层析柱尺寸范围。

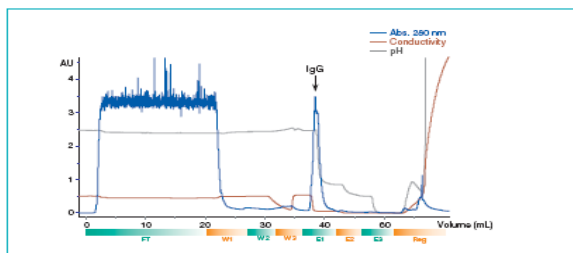


图 1.对在 pH 4.5 下从浓缩原料中直接洗脱所得小鼠 IgG₁ 的纯化。

层析柱: 0.46 cm 内径× 5 cm 高, 体积: 0.83 mL;
样品: 浓缩型 IgG₁ 原料; 上样: 20 mL; 平衡缓冲液:
PBS, pH 7.4; 洗涤缓冲液: PBS, pH 7.4 (W1), 去
离子水 (W2), 溶于 PBS 中的 25 mM 辛酸钠 (W3);
洗脱缓冲液: 50 mM 乙酸钠, pH 4.5 (E1), pH 4.0
(E2), pH 3.0 (E3); 再生: 1 N NaOH; 流速: 60 cm/h
(停留时间 5 min)。

5. 从浓缩型细胞培养物上清液中直接吸附 IgG₁: 优化

5.1. 初始 IgG₁ 吸附和洗脱参数的测定

如图 1 所示,浓缩型 CCS (小鼠 IgG₁: 1.5 mg/mL) 上样到采用 PBS 平衡后 pH 为 7.4 的 MEP HyperCel 层析柱上。注入后,采用三步洗涤顺序 (PBS、H₂O、辛酸钠, W1、W2、W3),并分别在 pH 4.5 (E1)、4.0 (E2)和 3.0 (E3)下进行阶段洗脱。

SDS-PAGE 分析表明 (图 2),如细胞培养条件所预测,上样馏份受到了白蛋白的严重污染。采用去离子水洗涤和辛酸钠的洗涤步骤仅解吸了一小部分白蛋白 (W2 和 W3)。目标 IgG₁ 主要在 pH 4.5 下洗脱后被回收,估计纯度为 70-80% (SDS-PAGE)。由于层析柱过载,某些 IgG 也可在洗涤时被解吸。

结论: 在未优化的初始程序中,最终的 IgG 馏份仍然受到了白蛋白和转铁蛋白的污染,因此需作进一步的优化 (见 5.2 节)。

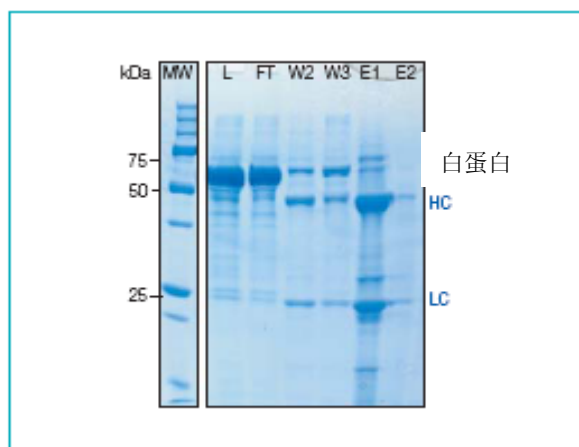


图 2.还原条件下的 SDS-PAGE 分析。

L: 上样样品
FT: 流动池
W2: 洗涤液 2 (去离子水)
W3: 洗涤液 3 (辛酸钠)
E1: 洗脱池 1 (pH 4.5)
E2: 洗脱池 2 (pH 4.0)

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

5.2. 基于 HCIC 机制的纯度优化原理：缓冲液盐浓度和洗脱 pH

HCIC 是以双模式合成配体 (4-巯基乙基吡啶) 的 pH 依赖性为基础。在 MEP HyperCel 填料上, 经过生理吸附后, 可通过静电排斥触发 IgG 解吸: 这是通过降低缓冲液 pH 使配体和抗体上形成相反的电荷 (正电荷) 实现的。当缓冲液 pH 降低时, 相反电荷的大小取决于抗体的等电位点、原料的杂质和配体的 pKa。

因此, 根据 pH 洗脱和络合物原料流中共存的不同物质的相对疏水性, 可对分离的 HCIC 机制进行精细调整。实际上, 可通过调整两种操作参数来实现: 盐浓度和缓冲液 pH (在阶段洗脱期间)。

所有测试条件汇总见图 3。在本研究中, 标准上样和 PBS 平衡后, 在 pH 为 5.5 的洗脱缓冲液中添加 0.5 M NaCl 可达到优化目的 (从而提高了 IgG 洗脱的选择性)。然后, 在 pH 5 无盐存在的情况下, 进行一步 pH 洗脱 (E2) (在 pH 为 4 和 3 时所测试的两个步骤并未造成额外的 IgG 解吸, 并在最后的顺序中降低)。

因此采用的最终洗脱顺序为:

1. 白蛋白解吸: pH 5.5, 并添加 0.5 M NaCl 进行第一步洗脱 (E1)。

2. IgG 洗脱: pH 5 进行第二步洗脱 (E2): 在该步, IgG 被完全洗脱—产量达到 93%, 通过 SEC HPLC 估计的纯度为 97%——见图 4)。

结论: 如图 5 和图 6 以及表 1 所示, 与 5.1 节描述的初始条件相比, 洗脱参数的优化使 IgG₁ 产量和纯度得到显著提高。

条件	结果	结论
标准条件		
<ul style="list-style-type: none"> 结合: PBS, pH 7.4 洗涤: PBS、水、辛酸钠 洗脱: pH 4.5, 4.0, 3.0 	70-80%的纯度 (白蛋白污染)	<ul style="list-style-type: none"> 洗脱 pH 微调 通过在洗脱缓冲液中添加 NaCl 增加选择性
洗脱优化		
<ul style="list-style-type: none"> 结合: PBS, pH 7.4 洗涤: PBS 洗脱: pH 阶段洗脱 (pH 从 5.5 到 3.0)—在洗脱缓冲液中添加或不添加 NaCl 	通过 IgG-白蛋白的差异性洗脱提高选择性	<ul style="list-style-type: none"> 当缓冲液含有 NaCl 时, 白蛋白可在比 IgG 更高的 pH 下被洗脱 当 NaCl 浓度降低时, IgG 可被完全洗脱
优化的条件		
<ul style="list-style-type: none"> 结合: PBS, pH 7.4 洗涤: PBS, pH 7.4 洗脱: 第一个洗脱步骤: pH 5.5 + 0.5 M NaCl 第二个洗脱步骤: pH 5.0, 无盐 	纯度 > 90% 产量 > 90%	<ul style="list-style-type: none"> 第一步洗脱: 白蛋白解吸 第二步洗脱: IgG 洗脱

图 3. 优化原理

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

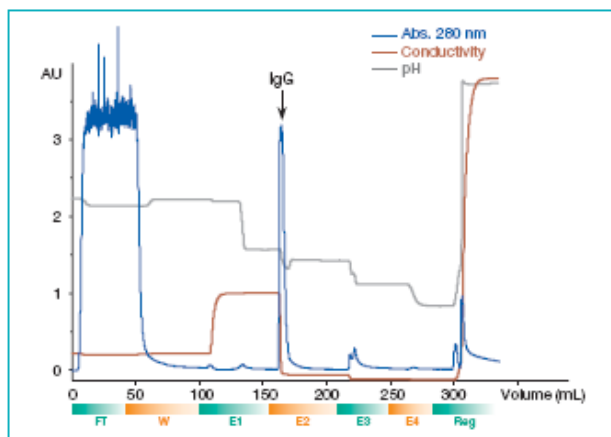


图 4. 对基于 MEP HyperCel 填料从浓缩型原料中所得的小鼠 IgG₁ 的纯化 (优化程序)。

层析柱: 1 cm 内径 × 9.7 cm 高, 体积: 7.6 mL;
 样品: 浓缩型 IgG₁ 原料; 上样: 45 mL; 平衡缓冲液: PBS, pH 7.4; 洗涤缓冲液: PBS, pH 7.4; 洗脱缓冲液: 100 mM 乙酸钠, pH 5.5 + 0.5 M NaCl (E1), 50 mM 乙酸钠, pH 5.0 (E2), 50 mM 乙酸钠, pH 4.0/3.0 (E3/E4); 流速: 80 cm/h (停留时间 7.5 min)。

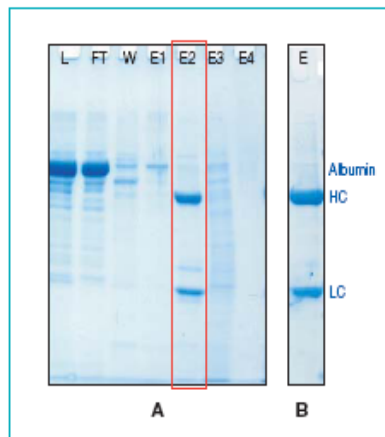


图 5. 还原条件下的 SDS-PAGE 分析。馏份来自浓缩型原料中小鼠 IgG 的纯化。

A: 基于 MEP HyperCel 填料的优化。
 B: 基于 Protein A Ceramic HyperD® F 填料的纯化。

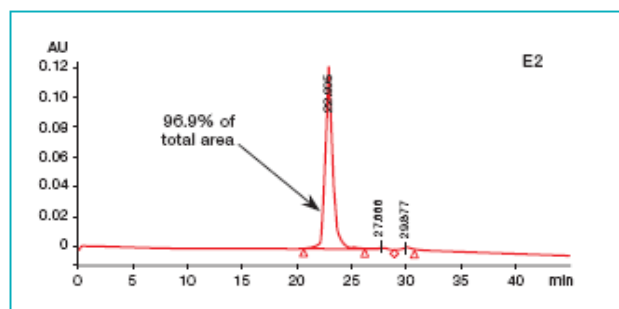


图 6. 在 TSKgel* G4000SWXL 凝胶层析柱上对基于 MEP HyperCel 填料的浓缩型小鼠 IgG₁ 原料纯化所得的洗脱池 E2 的分析 (优化程序)。

表 1. 优化程序后, 浓缩型 CCS 在 MEP HyperCel 填料上纯化的产量和纯化因子。

Step	[IgG ₁] (mg/mL)	Purity (%)	Purification factor	Yield (%)
Conc. CCS	1.5	4	1	100
Elution pool E2	2.6	97	24	93

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

5.3 规模放大操作参数的优化 (循环周期)

为了实现规模放大，本文通过研究不同停留时间的影响，来优化循环周期和产量之间的最佳平衡点。通常，在 MEP HyperCel™ 填料上，用户应达到最短 5-8 分钟的停留时间，以得到最佳结果（生产能力、产量）。在这种情况下，图 7 中的汇总结果表明，获得 90% IgG 产量的最小停留时间预计大约为 7 分钟。在最终的工艺中，总循环周期可通过减少洗脱时间进行进一步优化。由于样品含有高浓度蛋白，停留时间会比正常时间更长。

结论：总循环周期可明显缩短，并可在 7.6 mL MEP HyperCel 层析柱上从 45 mL 原料中纯化得到 67 mg97%纯度的 IgG₁。

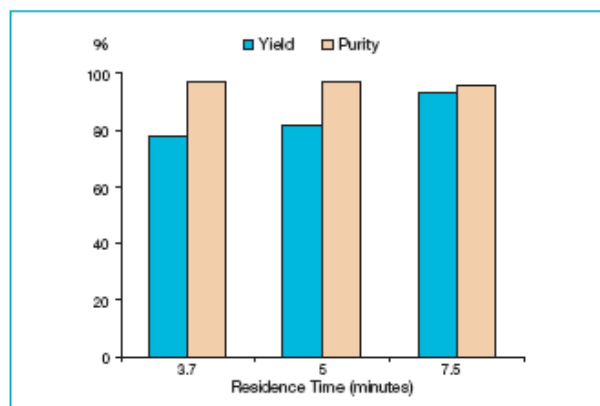


图 7. 在 MEP HyperCel 填料上通过优化程序对浓缩 30 倍的原料进行纯化，以评估产量和纯度与停留时间的关系。

采用 MEP HyperCel™ 填料的疏水性电荷诱导层析法 (HCIC) 对抗体纯化条件进行优化和放大研究：应用于单克隆小鼠 IgG₁

6. 从非浓缩的细胞培养物上清液中直接吸附 IgG₁：优化和放大

前面的优化程序已成功应用于从未浓缩原料中吸附 IgG₁ [IgG₁ : 0.043 mg/mL]。条件汇总见图8，结果汇总见图9和表 II。

低蛋白浓度可以增加吸附效率，从而在不损失 IgG 产量的情况下，将停留时间明显减少到3-5分钟。

结论：增加层析柱直径可实现60倍的放大。采用 MEP HyperCel 填料可在更短的停留时间中实现从非浓缩 CCS 中高效地吸附 IgG (产量97%，纯度97%)，表明它可被用作一种吸附装置，并除去了初始浓缩步骤。

表 II. 基于 MEP HyperCel 填料、非浓缩型 CCS 纯化放大的产量和纯化因子。

Step	[IgG ₁] (mg/mL)	Purity (%)	Purification factor	Yield (%)
CCS	0.043	2	1	100
Elution pool E2 Scale up	0.77	97	45	97

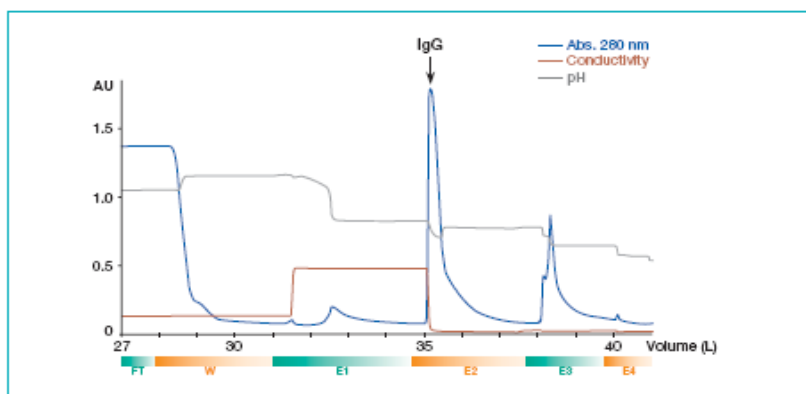


表8. 采用 MEP HyperCel 填料从 28 mL 非浓缩型细胞培养上清液中对小鼠 IgG₁ 进行纯化。

层析柱：5 cm 内径 × 17.5 cm 高，体积：343 mL；样品：非浓缩型细胞培养物上清液；上样：28 L；平衡+洗涤：PBS，pH 7.4；洗脱：100 mM 乙酸钠，pH 5.5 + 0.5 M NaCl (E1)，50 mM 乙酸钠，pH 5.0 (E2)，50 mM 乙酸钠，pH 4.0/3.0 (E3/E4)；流速：上样：230 cm/h (停留时间4.6 min)，洗涤/洗脱：300 cm/h (停留时间3.5 min)。

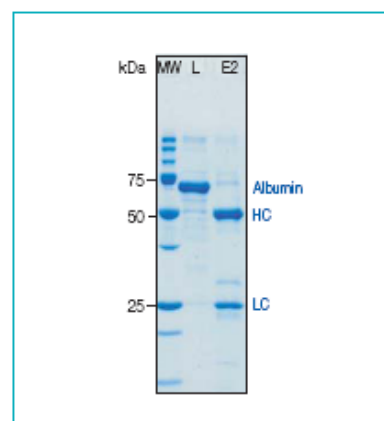


图 9. 简化条件下的 SDS-PAGE 分析。