

Cellufine™ MAX DexS-HbP

这是一种新型色谱树脂，含有右旋糖酐硫酸盐聚合物配体，作为仿肝素物，用以分离、纯化血浆蛋白。

右旋糖酐硫酸酯是天然多糖右旋糖酐的合成衍生物，具有与肝素相似的生物活性。例如，右旋糖酐硫酸酯选择性地抑制 HIV-1 在活体内的复制或快速结合肝素辅因子 II。右旋糖酐硫酸酯还用于制备阳离子交换色谱树脂。JNC 公司开发了一种新型色谱树脂——Cellufine MAX DexS-HbP，该树脂采用硫酸右旋糖酐作为仿亲和肝素模拟配体。这种新型树脂是基于晶体状高度交联稳定的纤维素基珠体，非常适合大规模的生物制药生产。这种新型珠体结构具有耐碱性在线清洗的特点，能够在高流量模式下以最小的背压操作。表 1 概况了这种新型肝素模拟亲和树脂的性能。

表 1. Cellufine MAX DexS-HbP 的性质

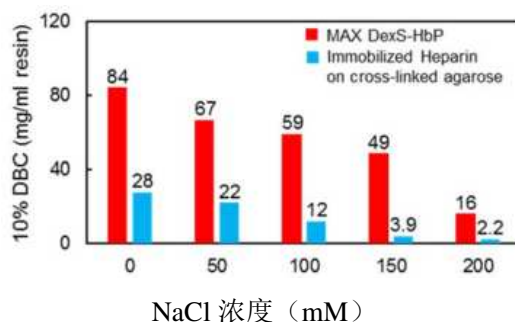
性质	
珠体基质	高交联纤维素体
粒径	平均 90 微米 (40-130 微米)
配体	右旋糖酐硫酸酯
在位清洗	0.5 M NaOH
溶菌酶吸附容量	> 50 mg/ml
操作压力	< 0.3 MPa
操作流速	高达 1200cm/h

吸附在 Cellufine MAX DexS-HbP 树脂上的模型蛋白

JNC 研究了一系列与肝素模拟树脂结合的模型蛋白，并与琼脂糖珠体上的肝素进行了比较。

我们利用溶菌酶结合技术对 Cellufine 肝素模拟树脂进行了表征，并与琼脂糖珠体上的肝素进行了比较。

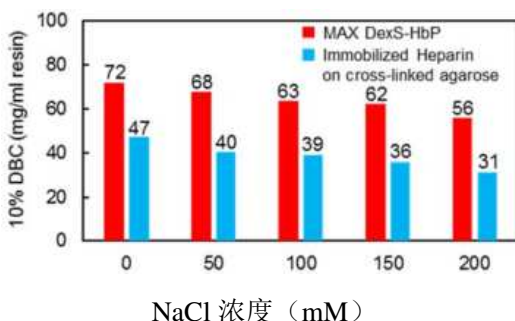
图 1. Cellufine MAX DexS-HbP 与肝素偶联琼脂糖的溶菌酶动态载量



在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速，停留时间为 4 分钟，测量动态载量。在 50mM Tris HCl 缓冲液,pH 9.5 + 0、50mM、100mM、150mM 和 200mM NaCl 中，以 2mg /ml 的速度加样溶菌酶。

乳铁蛋白结合也同样被用来表征 Cellufine 肝素模拟树脂，并与琼脂糖珠体上的肝素进行了比较。图 2 概括了盐浓度范围内的动态载量(DBC)数据。

图 2. Cellufine MAX DexS-HbP 与肝素偶联琼脂糖的乳铁蛋白动态载量



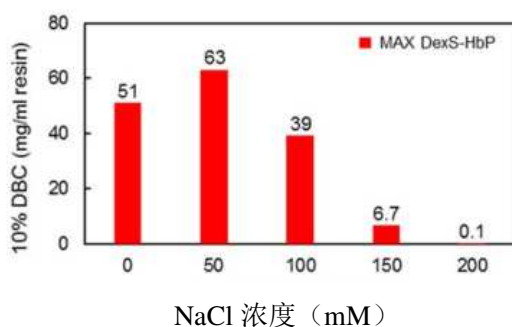
在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速，停留时间为 4 分钟，测量动态载量。在 50mM Tris

HCl 缓冲液, pH 7.5 + 0、50mM、100mM、150mM 和 200mM NaCl 中, 以 2mg/ml 的速度加样乳铁蛋白。

我们在 pH 为 5.0 的醋酸盐缓冲液中, 在一定的盐浓度范围内, 对多克隆免疫球蛋白 (IgG) 的结合进行了研究。

下面的图 3 概括动态载量数据。

图 3. 多克隆免疫球蛋白 G 结合 Cellufine MAX DexS-HbP 的动态载量



在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速, 停留时间为 4 分钟, 测量动态载量。在 10mM Tris HCl 缓冲液, pH 5.0 + 0、50mM、100mM、150mM 和 200mM NaCl 中, 以 2mg/ml 的速度加样多克隆免疫球蛋白 G。下方的表 2 概括对盐和 pH 变量的进一步研究。

表 2. 在 pH 5-8, 一定 NaCl 浓度范围内, 多克隆免疫球蛋白 G 的动态载量

10%多克隆免疫球蛋白 G 的动态载量 (mg/ml)			
NaCl 浓度 (mM)	150	200	250
pH 5.0 ^a	6.7	0.1	< 0.1
pH 7.0 ^b	< 1	0	0
pH 8.0 ^c	0	0	0

按照图 3 所示, 在以下缓冲液中用克隆免疫球蛋白 G (2 mg/ml) 测量动态载量;

a) 10mM 乙酸盐, pH 5.0; b) 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; c) 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0。

论述

溶菌酶和乳铁蛋白在琼脂糖珠上的结合明显高于肝素。在高达 150mM NaCl 的条件

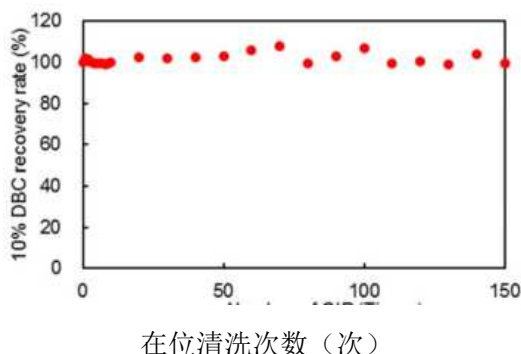
下, 两种蛋白结合容量 > 45 mg/ml。肝素亲和剂已被用作重组治疗性人乳铁蛋白生产的最后一个精制步骤(见参考文献 1)。相比之下, 在 pH 7 至 pH 8, 当 > 150mM NaCl 浓度下, 多克隆免疫球蛋白 G 没有吸附到 Cellufine MAX Dx - Hbp 上。

参考文献 1: Choi et al Glycoconjugate J. 2008 August; 25(6): 581-593

在位清洗, 多次重复使用

在用 0.5 M NaOH 进行 150 次碱性在线清洗后, 新型的 Cellufine DexS-HbP 树脂表现出稳定的 10% 动态载量溶菌酶结合性能。下方图 4 概括了蛋白质结合性能的恢复情况。

图 4. 使用 0.5M NaOH (10 柱体积) 在位清洗



多次碱性在位清洗后, 在 5 mm 内径×2.5 cm 长(体积 0.49 ml)的流填充柱中以 0.125 ml/min 的流速, 停留时间为 4 分钟, 测量蛋白质回收率。

在缓冲液 A 中以 2mg/ml 速度加样溶菌酶; 50mM Tris-HCl, pH 9.5+150mM NaCl。用缓冲液 B 洗脱回收残留蛋白;

50mM Tris-HCl, pH 9.5+1.0M NaCl。

接着对该色谱柱进行在位清洗循环。详情如下表 3 概述。

论述

Cellufine MAX DexS-HbP 在 0.5 M NaOH 中模拟了 150 次在位清洗循环，结果表明溶菌酶结合活性保持良好。

表 3.碱性在位清洗工作流程

工序	流速(ml/min)	柱体积
用缓冲液 A 平衡 (50mM Tris-HCl, pH9.5+150mM NaCl)	0.5	10
在缓冲液 A 中以 2mg/ml 上样溶菌酶	0.125	70
用缓冲液 A 洗涤	0.5	10
用缓冲液 B 洗脱 (缓冲液 A+1M NaCl)	0.5	30
用缓冲液 A 洗涤	0.5	10
碱性(0.5M NaOH)在位清洗	0.5	10
用缓冲液 A 再平衡	0.5	10

用 Cellufine MAX DexS-HbP 纯化抗凝血酶 III (AT III)

肝素对琼脂糖的亲和力已被用于直接从牛全血浆（参考 2）中纯化高纯度的抗凝血酶 III。

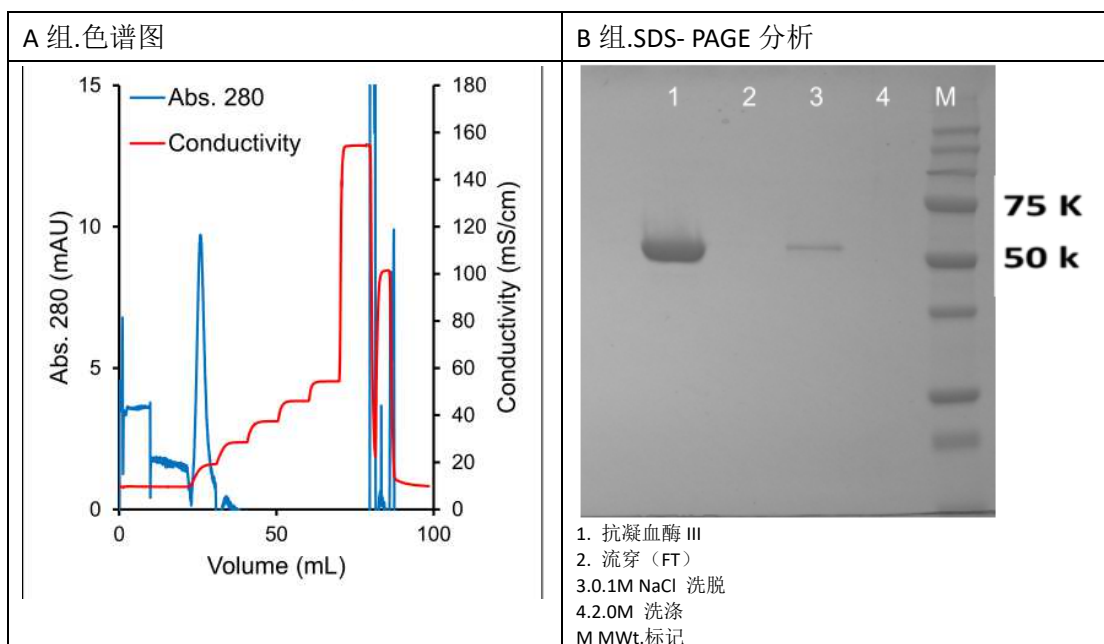
参考 2, Data file 18-1134-77 AE HiTrap

Heparin HP Figure 5. GE Healthcare

Biosciences AB

抗凝血酶 III 吸附、洗脱、纯化流程如下图 5 所示。本研究采用 5 mm 内径×2.5 cm 长 (0.49 ml 体积)层析柱，用 100 mM Tris HCl, 10 mM 柠檬酸三钠缓冲液 pH 7.4, 以 2.0 mg/ml 的速度上样 0.15 ml 抗凝血酶 III (Neuart)。用 Cellufine MAX DexS-HbP 存留的物质，在上样缓冲液中以 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 2M NaCl 分阶梯度洗脱。在还原条件下，用 SDS- PAGE 分析洗脱馏分。

图 5. 抗凝血酶 III 在 Cellufine MAX DexS-HbP 上的色谱分析。



论述

乳铁蛋白显示，在最高 200mm NaCl，最大 pH 7.5 时上样，与 MAX DexS-HbP 结合的 10%动态载量 > 56 mg/ml。在相同条件下，固定化肝素的载量仅为 31 mg/ml。在这两种情况下，它们的载量都随着 NaCl 的增加而下降。多克隆免疫球蛋白 G 与固定化肝素的结合

很少或没有。相比之下，MAX DexS-HbP 在 50 mM NaCl 时表现出 > 63 mg/ml 的载量，但在 200 mM NaCl 时迅速下降。

综上所述，右旋糖酐硫酸酯改性的 Cellufine MAX DexS-HbP 对乳铁蛋白和溶菌酶的结合能力显著提高，且在生理离子强度下多克隆抗体的保留率最低。这种树脂对血浆蛋白的分离非常有用，如抗凝血酶 III。

用于血浆蛋白纯化的其他纤维素产品

Cellufine ET clean (多聚赖氨酸) 能在生理 pH、离子强度为 $p = 0.02 - 1.0$ 和 $0 - 25^{\circ}\text{C}$ 时从细胞产物溶液中去除了毒素。

ET Clean S (2000 MWt.截留孔径)

ET Clean L ($> 2 \times 10^6$ MWt.截留孔径)

CellufineGH-25 脱盐介质——基于多孔、球形、高度交联的纤维素颗粒。明显的 3kDa 排阻限允许蛋白质在孔隙体积中通过色谱柱，同时阻止内部孔隙中分子量较小的溶质。

说明	数量	产品编号
Cellufine MAX DexS-HbP	5x1 毫升微型柱	21700-51
	1x5 毫升微型柱	21700-15
	10 毫升	21700
	50 毫升	21701
	500 毫升	21702
	5 升	21703
	10 升	21704

JNC CORPORATION 公司

生命化学事业部

日本东京都千代田区大手町 2 丁目 2-1，邮政编码 100-8105

电话+ 81-3-3243-6150，传真+ 81-3-3234-6219

电子邮件: cellufine@jnc-corp.co.jp

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/>