

# Cellufine™ SPA-HC

Cellufine SPA-HC 是一种亲和层析树脂，用于分离免疫球蛋白，包括来自复杂基质（如细胞培养上层清液和血清/血浆）的单克隆抗体(mAb)。该类树脂基于高度交联的球形纤维素基珠体，以碱性稳定的 rProtein A 亲和配体功能化。Cellufine SPA-HC 具有良好的流动特性，配体渗滤液水位低，动态载量高，并在经过多次在位清洗与重复使用后保持良好的粘结性。所开发的高交联纤维素基珠体，适应更高的流量要求，满足未来高效率净化工作流程的要求。这种新型的高性能亲和树脂可以为治疗性单克隆抗体的下游纯化需求提供高效的纯化工艺。

树脂性能见下表 1 概述。

表 1. Cellufine rPA-CP 的性能特征

性能	特征
配体	在大肠杆菌中产生的碱性稳定的 rProtein A
基质	高交联纤维素珠体
粒径	平均 70 微米
配体偶联方法	通过甲酸基偶联
流速	≥600 cm/h (0.3 MPa) 内径 30 cm- 长 20 cm, 24°C 纯净水
动态结合载量 (DBC)	≥70 mg /ml (C <sub>10</sub> 带有多克隆免疫球蛋白 G) <sup>1</sup>
建议在位清洗溶液	0.1 M NaOH
工作温度	4°C-40°C
存储 (长期)	20% 乙醇, 2-8°C

<sup>1</sup>用人多克隆两种球蛋白（注入人类免疫球蛋白），在 10% 穿透点，6 分钟停留时间，测定 C<sub>10</sub> DBC

## 使用流量适配器装柱

- 1) 当柱体积 < 1 升时；将目标柱体积(CV)所需的足够悬浮液倒入过滤器漏斗(玻璃制)中，用至少 5 个柱体积的水洗涤 3 次，以除去存储液。如有必要，如果装柱缓冲液与水不同，则重复上述步骤。
- 2) 当柱体积 > 1 升时；将存储缓冲液从容器中沉淀的树脂上方倒出，用水替换。然后重新悬浮树脂，让其再次沉淀，冲洗掉存储缓冲液。重复 2-3 次或考虑在存储缓冲液中装柱并即时清洗色谱柱。
- 3) 最后清洗完后，加入足够的装柱缓冲液，将树脂悬浮在 50-60% (v/v) 的悬浮液中。
- 4) 将部分悬浮液倒入 50 毫升的量筒中，静置过夜或至少 4 小时。
- 5) 测量重力沉降床的床高(体积)，据此计算悬浮液率；% = (重力沉降床体积/总悬浮液体积) × %
- 6) 用装柱缓冲液或水调整到 50% (v/v) 树脂悬浮液浓度
- 7) 用下式计算填装色谱柱所需悬浮液的体积；50% 悬浮液体积 = (目标柱体积 [CV] × 2) × (压缩因子 Cf)

压缩因子 Cf = 【重力沉降/流填装】床高

例如，若需要 100 毫升柱体积，需要 (100×2) × 1.35 = 270 毫升 50 悬浮液，树脂压缩系数为 1.35，最终可得柱体积为 100 mL

**注意：**树脂压缩因子 Cf 会影响色谱柱的填装效率（详细信息详见附件），并且可能需要通过调整色谱柱上的轴压来调整。

- 8) 计算为获得所需床体积而预计的最终床高。

例如，对于直径为 2.5 cm 的色谱柱中 100 ml 的目标床体积 CV，目标床高度计算公式如下：

$$\begin{aligned} \text{最终目标床高} &= \text{柱体积 (mL)} / \text{色谱柱柱截面面积(cm}^2\text{)} \\ &= 100 / \pi \times \text{半径平方} \\ &= 100 / 4.91 \\ &= 20.4 \text{ 厘米} \end{aligned}$$

- 9) 将底部流量适配器组装到色谱柱上。准备好底部筛板组件，用装柱缓冲液从大直径色谱柱的注射器或泵中去除空气。在色谱柱底部留大约 1 厘米。

- 10) 如有必要，在色谱柱的顶部添加一个床高的适配器，以适应全部体积的悬浮液。

**注意：**将全部悬浮液一次倒进色谱柱内，保证床装填均匀。

- 11) 关闭色谱柱的底部出口。

- 12) 将悬浮液一次倒入色谱柱内，避免空气滞留在树脂悬浮浆内。

- 13) 打开底部出口，让床开始沉降，直到树脂床上方出现 2-3 厘米的透明液体。

- 14) 停止出口流液，小心地用装柱缓冲液填满色谱柱，直到顶部，不要干扰沉降树脂床。

- 15) 启动上面步骤 6 中所述的流量适配器。

- 16) 将顶部流量适配器组装到色谱柱上，尽量减少色谱柱顶部的滞留气泡。

- 17) 用装柱缓冲液以 200cm/h 开始流通 5 分钟，并检查是否有泄漏。然后将流速逐步提高到 600cm/h，或直至达到最大 0.3MPa 压力，对树脂床进行流动充填 30min。

**注意：**在这种流速下（为保证稳定填床，而高于色谱柱正常运行的流速），色谱柱背压力\*应该在 0.25 到 0.30 MPa 之间。Skcnwkcsm

\*此为在色谱柱中填充树脂时的压降。当同一尺寸的空缓冲填充柱处于同一直线位置时，应该设定系统的背压限额。最好在色谱柱的进口端用仪表测量背压。

- 18) 床高稳定，关闭出口，从塔顶开始流通（不要去掉流量适配器），然后慢慢地将顶部流量适配器向下移动，将装柱缓冲液从色谱柱的顶部换出。将顶部的适配器取下，以便与沉积的树脂床接触。

- 19) 重新开始，流速为 600cm/h。如果床沉积下来，并远离顶部适配器，就向下调整顶部适配器，以适应新的床高。

- 20) 在目标床高，根据上面第 7 步计算中使用的压缩因子，柱体积应该与预期的目标体积相同。如果床高高于预期，则可通过降低顶部适配器施加轴压。如果床高度低于预期，则由于树脂的压缩因子可能高于预期，因此悬浮液的原始体积可能更低，或者树脂在流通时装得更多。在这种情况下，必须重新装柱或继续使用较小的柱体积。如果是后者，则根据减少的柱体积重新计算操作流速。

- 21) 通过测量如附录 1 所示的 HETP 和峰对称因子(As)来检查和评估装柱状态。

## 操作指南

Cellufine SPA-HC 与免疫球蛋白结合具有与野生型蛋白 A 配体相同的特异性。纤维素基柱体对宿主细胞蛋白的非特异性结合非常低，残留的免疫球蛋白 G 容易在 pH 3-4 之间洗脱。通过树脂表面的甲酰基还原胺化固定配体是非常稳定的，渗滤液的含量较低，需要多次循环再用。Cellufine SPA-HC 是一种重组的野生型蛋白 A 配体，具有更好的耐碱性和更高的结合能力。因此，能使用 0.1M NaOH 进行多达 160 次在位清洗，证明能够保持完全的结合

活性。如有必要，0.5 M 氢氧化钠已被证明可以保留 80% 的结合活性，最多可重复 50 次在位清洗。

### 建议缓冲液

平衡缓冲液：50mM 磷酸钠，0.15 M NaCl, pH 7.4

洗脱缓冲液：60mM 醋酸盐缓冲液，pH3.0

在位清洗：0.1M NaOH

水

### 用丙种球蛋白测量动态结合载量 DBC

每种单克隆抗体的动态结合载量可能各不相同。理想情况下，在 10% 流穿点应测量单克隆抗体的纯化样品 DBC。如果这不可能，可以如本例所述，替代丙种球蛋白样品或纯化的多克隆抗体，以建立树脂性能基准。

1. 根据附录 1，准备一个如上所述的填充柱。从这些数据中，能够测量色谱柱和附加硬件的空隙体积  $V_0$ 。
2. 如果该色谱柱存在 20% (v/v) 乙醇中，则用至少 5 柱体积的上述平衡缓冲液洗涤。
3. 在平衡缓冲液中制备 1mg/ml 人球蛋白溶液。用紫外分光光度计，在 1cm 光程长的试管中读取 1ml 的 280nm 处吸光度，来检查浓度。使用 14.4 的 E1% 消光系数估计蛋白质浓度。如有必要，调整到 1mg /mL 目标浓度的 5% 柱体积以内。
4. 开始流通色谱柱，设置停留时间为 6 分钟。此条件下的流速计算如下：  
流速（毫升/分钟）= 柱体积（毫升）/停留时间(分钟)
5. 用上述缓冲液（包括 1mg /mL 丙种球蛋白溶液）准备好色谱仪上的所有线。
6. 用色谱柱、离线、通过紫外流动细胞清除蛋白溶液，并记录在 280 nm 处吸光度痕迹的平稳值。这称为 10% 突破点位的估值  $A_{max}$ 。
7. 将蛋白溶液从系统中洗出，并平衡 5 柱体积。
8. 以上文 4 中计算流速装填 1mg /mL 丙种球蛋白溶液，停留时间达到 6 分钟。继续上样，直到开始看到蛋白质上样流穿，表明已经超过 DBC。
9. 在流穿时，当吸光度超过  $A_{max}$  的 50% 时，停止蛋白上样，换用平衡缓冲液，用 5 柱体积洗掉所有未结合的蛋白质载量。
10. 当达到基准吸光度时，用 5 柱体积的醋酸盐缓冲液在 pH 3.0 下开始洗脱。
11. 收集洗脱峰，估计抗体回收量。
12. 洗脱后用 10 柱体积的水冲洗掉柱内残留的低 pH 缓冲液。
13. 然后用 3 柱体积 0.1 M NaOH 柱装，停止流动 15min 进行在位清洗。
14. 用 5 柱体积平衡缓冲液在位清洗，直到达到目标电导率和 pH 值。
15. 用 20% (v/v) 乙醇交换平衡缓冲液，封上色谱柱的进出口，在 2-8°C 下存储色谱柱。

## 纯化方案

用离心法准备样品，随后用 0.22 微米过滤器澄清，去除不溶性物质，然后装柱。使用报告的或测量的 DBC10% 穿透点位和单克隆抗体滴定度的样品，估算可以装填多少培养上清液。为了避免树脂在流过程中超过载量而丢失产品，装填 DBC10% 穿透点位的 80%。例如，用 1 g/L 的抗体滴定度，100 mL 的 Cellufine SPA-HC 色谱柱和 65 mg/mL 的 C<sub>10</sub>，停留时间为 4 分钟，要装柱的培养液的体积计算如下；

$$\begin{aligned} \text{要装的培养液的体积 (mL)} &= \{[C_{10} \times 0.80] \times \text{柱体积}\} / \text{单克隆抗体滴定度} \\ &= \{[70 \times 0.80] \times 100\} / 1 \\ &= 5600 \text{ mL} \end{aligned}$$

达到 6 分钟停留时间流速 = 柱体积 / 停留时间

$$= 100 / 4 = 25.0 \text{ mL/min}$$

填装上述蛋白柱的时间 = 上样体积 (mL) / 流速 (mL/min)

$$= 5600 / 25.0 = 224 \text{ min}$$

按照上述工作流程测量 DBC 的流动差异；

· 检查样品的 pH 和电导率，然后再上样，如有必要，调整到平衡缓冲液的范围。大多数细胞培养样品缓冲 pH 接近 7.4，不具备高盐分。

· 当单克隆抗体滴定度低时，减少上样体积，考虑用超滤膜截留分子量 30-50 kDa，用 TFF 浓缩样品。

· 作为培养样品洗脱液中未保留的组分，在约 1-2 色谱柱孔隙体积 (V<sub>0</sub>) 处可以看到吸光度的早期穿透。

· 收集样品的最后 50 mL，上样并确认在流经馏分的流体中没有发现单克隆抗体。

· 上样后，用平衡缓冲液将洗涤液增加至 15 柱体积，以从装填样品中去除任何非特异性保留的宿主细胞蛋白 (HCP) 和双股脱氧核糖核酸 (dsDNA)。

· 洗脱后，用 1M Tris 碱将 pH 值提高到 3.5，静置 30 分钟，以使病毒失活。

· 病毒失活后提高 pH > 4.0，稳定单克隆抗体，或平衡好 pH 和电导条件，进行下一步精制。

### 在 rProtein A 捕获后的建议精制步骤

在蛋白质 A 捕获后，需要在随后的“精制”步骤中去除以下杂物：a) 宿主细胞蛋白 (HCP)，b) 浸出的蛋白质 A 配体，c) 残留的双股脱氧核糖核酸 (dsDNA) 以及 d) > 300 kDa 分子量的单克隆抗体聚合物。某些情况下，还需要去除单克隆抗体二聚体。Cellufine 树脂可以去除这些杂物，详见下文所列。与此类树脂更多相关信息可登录以下网页查阅

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/>

**Cellufine™ MAX IB**，一种新型的混合型伯胺基疏水改性树脂，可用于以流穿方式，去除 HCP、浸出的蛋白 A 和单克隆抗体聚合物。

· 可用 Tris 碱将 pH 调至 7.0

- 具有较宽的电导率范围，最高可达 0.2 M NaCl  
Cellufine™ MAX GS, 一种覆有右旋糖酐的阳离子交换树脂，具有高结合载量，可用于结合和洗脱，去除二聚体和聚集的单克隆抗体。
- 可用 Tris 碱将 pH 调至 4.5，低电导率 < 5mS /cm  
Cellufine™ MAX Q-h, 一种大容量阴离子交换树脂，可用于以流穿方式，去除 HCP、浸出的蛋白 A 和残留的双股脱氧核糖核酸 (dsDNA)。
- 可用 Tris 碱将 pH 调至 8.5，电导率 ~ 12mS /cm

### 在位清洗建议

在使用 0.1 M 氢氧化钠 (15 柱体积持续 15 分钟) 进行 160 个在位清洗循环操作后，Cellufine SPA-HC 仍然保持着超过 >85% 的动态载量。使用 0.5 M 氢氧化钠 (3 柱体积持续 15 分钟) 进行 50 次循环操作，可以保持 >80% 的活性。

### 流速建议

Cellufine SPA-HC 是基于高交联纤维素树脂，在高流速下表现稳定。例如：

- 色谱柱直径 2.2 cm，床高 20 cm，< 0.3 MPa，为 2800cm /h。
- 色谱柱直径 30 厘米，床高 20 厘米，< 0.3 MPa，为 >600 cm /h。

### 存储建议

开封容器，2-8℃ 存储。切勿冷冻。

短期存储，溶液主体和色谱柱可以在常温下存储长达 4 周。在 40℃ 高温下存储一个月，相应的在室温下 (25℃) 存放 6 个月，在 10℃ 下存放 2.5 年，吸附量不变化。

长期存储，2-8℃，20% 乙醇。切勿冷冻。

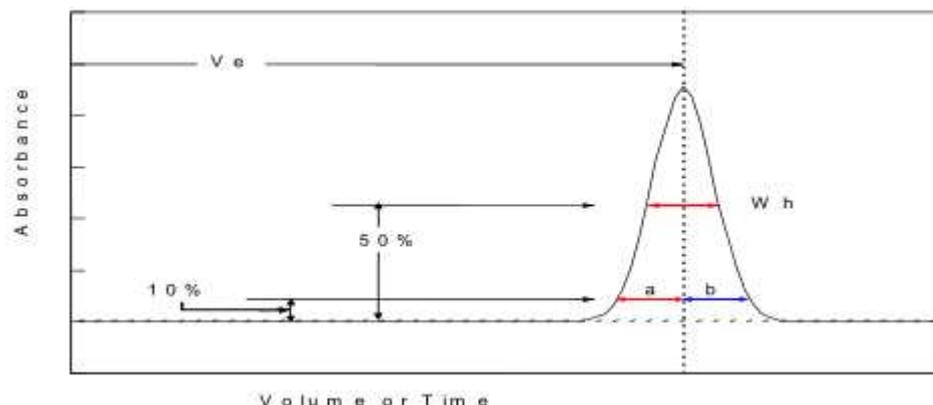
### 订购信息

说明	数量	产品编号
Cellufine SPA-HC	1×1 毫升 (微型柱)	21900-11
	5×1 毫升 (微型柱)	21900-51
	1×5 毫升 (微型柱)	21900-15
	10 毫升	21900
	50 毫升	21901
	500 毫升	21902
	5 升	21903
	10 升	21904

## 附件 1: Cellufine 树脂装柱评估

色谱柱的装柱状态评估方法可采用一些指标进行, 例如(理论)塔板的数目(N)、与等板高度(HETP)和对称因子(As)。所选的评估指标受各测量条件影响。例如, 随着色谱柱的直径/高度、管道的不同、溶剂样品体积、流速、温度等的不同而变化。因此, 有必要每次采用相同的测量条件。

参数	条件
样品体积	1-2.5%柱体积
样品浓度	1-2% (v/v) 1M NaCl
流速	30cm/h
检测	电导率



计算公式 $HETP=L/N$ $N=5.54 \times (V_e / W_h)^2$ $As= b/a$	L	柱高【cm 或 m】
	$V_e$	洗脱时间或体积
	$W_h$	半峰宽
	a,b	峰宽为 10%的峰高(a) 前, (b)后
	注意	$V_e$ , $W_h$ , a,b 单位相同

一般来说, N 值越大越好。(同样, HETP 值越小越好)。不对称因子(As)应接近 1。通常, 可接受的对称值范围为 0.8-1.6。

## 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

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