Cellufine ™ SPA-HC

这种亲和层析树脂，用于分离免疫球蛋白，包括源自复杂基质（如细胞培养上层清液和血清/血浆）的单克隆抗体（mAb）

Cellufine SPA-HC 树脂，基于高交联的球形纤维素珠体，经碱性稳定的 rProtein A 亲和配体功能化而成。该树脂具有良好的流动性能，配体渗滤液水位低，动态结合载量高，以及经过多次在位清洗（CIP）与重复使用后依然具有良好的结合保持性能。JNC 所开发的高交联纤维素基珠体，适应更高的流量要求，可满足未来高效率纯化工作流程的要求。这种新型高效亲和树脂，促进了治疗性单克隆抗体下游纯化的高效纯化工艺的发展。树脂性能概述见下表 1。

表 1. Cellufine SPA-HC 的性能特征

性质	特征
配体	大肠杆菌中产生的碱性稳定的 rProtein A 亲和配体
基质	高交联纤维素体
粒径	平均直径 70 微米
配基偶联方式	通过树脂上的甲酸基耦联
流速	10cm 内径×20cm 长色谱柱，≥650 cm/h （0.3 MPa）
动态结合载量（DBC）	70 mg /ml （采用单克隆抗体免疫球蛋白的 DBC C_{10}）
建议在位清洗溶液	0.1 M NaOH
稳定温度	在 4 - 50℃下，存储 1 周后无明显性能变化。
存储	2 - 8℃在 20% （v/v）乙醇中，暂存 2.5 年。
化学稳定	存储在 30% （v / v）异丙醇、20-70% （v / v）乙醇、8 M 尿素、6 M - 盐酸胍-HCl、或 0.1M 乙酸，1 周后性能没有显著改变
pH 工作范围	3-12

[1] 用人多克隆丙种球蛋白（注入人类免疫球蛋白），在 10%穿透点，6 分钟停留时间，测定 C_{10} DBC

与其他介质相比，具有较高的动态结合载量

将人多克隆抗体动态结合载量（DBC）与商用 rProtein A 树脂进行比较，结果表明，Cellufine SPA-HC 是具有高的吸附能力当，可以在生物生产中支持免疫球蛋白 G 捕获。图 1 概括了比较 SPA-HC 与 85 微米交联琼脂糖珠在数个停留时间内的比较数据。表 2 显示了 4 分钟和 6 分钟停留时间的树脂比较。

图 1. 与商用蛋白 A 树脂比较多克隆抗体动态结合载量

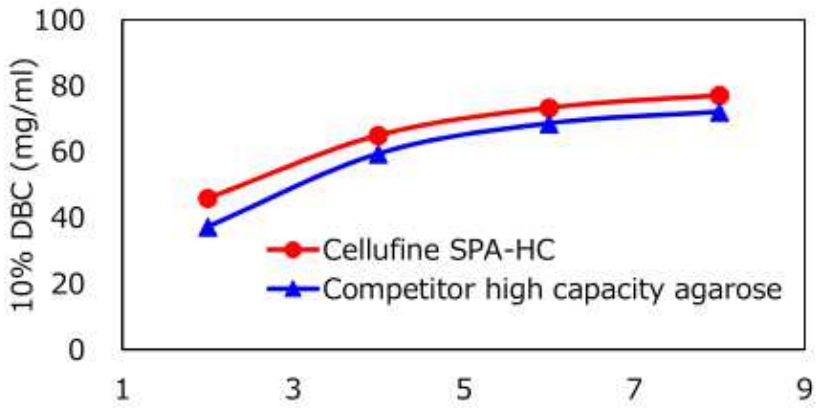


表 1. 在 4 和 6 分钟停留时间，一系列的商用树脂的动态结合载量

树脂基聚合物	机械性能		多克隆抗体 10% DBC（mg/mL）	
	珠体规格*（微米）	流速**（cm/h,0.2MPa）	4 分钟	6 分钟
Cellufine SPA-HC	70	200	67	72
交联琼脂糖	85	220	57	68
	60	130	75	79
聚乙烯醚聚合物	50	-	52	55
聚甲基丙烯酸酯	45	120	68	75
甲基丙酸烯聚合物	50	100	67	71
交联纤维素	75	260	60	69

*除了 Cellufine SPA-HC 外，其他颗粒规格信息均源自供应商资料。

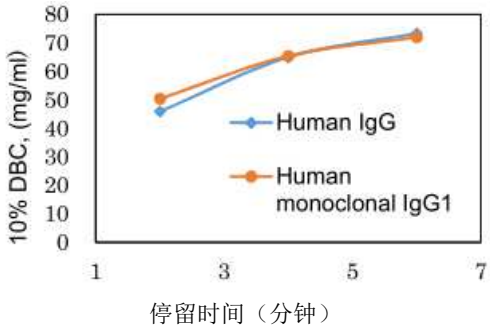
**流速数据源自已发表的报告（参考 J. Chro.A 1554 （2018） 45-60）。在床高为 10 cm 长时使用 11 mm 内径色谱柱。Cellufine SPA-HC 的数据是根据上述实验数据按色谱柱的尺寸推算得到的。

将 1mL 的预装柱（6.7mm 内径×3cm 长）在 pH 7.5 下，20 mM 磷酸钠缓冲液+ 0.15M NaCl 中平衡。用平衡缓冲液将人多克隆抗体（pAb）原液（注入 50 mg/mL 人免疫球蛋白 G）调至 5 mg/mL 浓度免疫球蛋白 G，用 0.22 微米孔径的定量过滤器过滤，去除微粒。在 10%流穿点位测量动态结合载量。

从中国地鼠卵巢细胞培养样品中纯化单克隆抗体

Cellufine SPA-HC 还显示出与人类单克隆抗体亚型 1（见图 2）的高动态结合载量，说明这种新型树脂可用于高效的单克隆抗体纯化工艺流程。

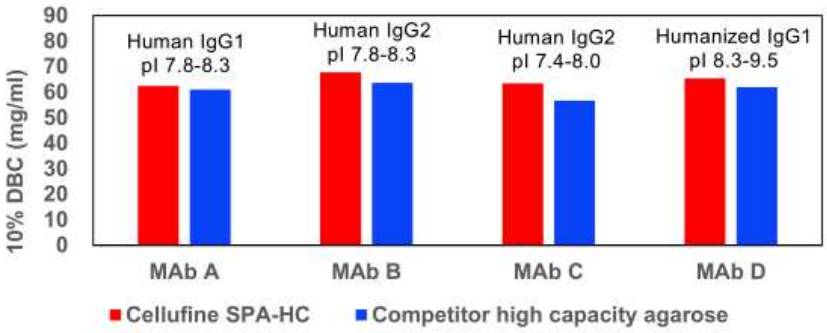
图 2.单克隆与多克隆抗体动态结合载量比较



购买的商用人多克隆抗体（注入免疫球蛋白 G）。从中国地鼠卵巢细胞培养中纯化人单克隆抗体免疫球蛋白 G1。

采用等电点（pl）范围内的单分子束（mAb）及其子类型，研究了分子电荷状态对树脂动态结合能力的影响。结果表明，与 85 pM 大容量琼脂糖竞争树脂相比，Cellufine SPA-HC 对单链单胞菌具有较强的吸附能力，且具有较强的 DBC 吸附能力。图 3 为相关概要。

图 3. 与一些列 pl 及亚型单克隆抗体有关的动态结合载量



从澄清的上层清液中捕获在中国地鼠卵巢细胞培养中表达的单克隆抗体，用 1 M Tris 碱基和 1 M NaCL 调整至 pH 7.5 以及 15ms /cm 电导率。此外，在 4 分钟的停留时间内，还调整了抗体滴度（1.25 g/Lt.）的样品体积，使其达到 10% 动态结合载量测量值的 80%。上样后，用 10 柱体积平衡缓冲液将 1mL 色谱柱冲洗至基准。保存的单克隆抗体以 10 柱体积的 60 mM 醋酸钠 pH 3.0 洗脱。收集到的馏分用 1 M Tris 碱中和，并进行测定：a）单克隆抗体回收率（按 A280 估算）；b）ELISA 法测定 CHO-HCP（百万分率）；c）经 SEC 分析，回收的单克隆抗体馏分中聚合物的百分比。回收率和杂物水平的完整摘要见下表 2。

表 2. 单克隆抗体纯化摘要

样品	加入单克隆抗体（mg/mL）	洗脱柱体积	产出率%	CHO-HCP（百万分率）	滤出的 rProtein A（百万分率）	聚合物比重%（经 SEC 分析）
上样	-	-	-	8.68 x 105	-	-
SPA-HC	53	3.0	89	1800	4	1.4
交联琼脂糖	51	3.9	89	1820	8	1.9

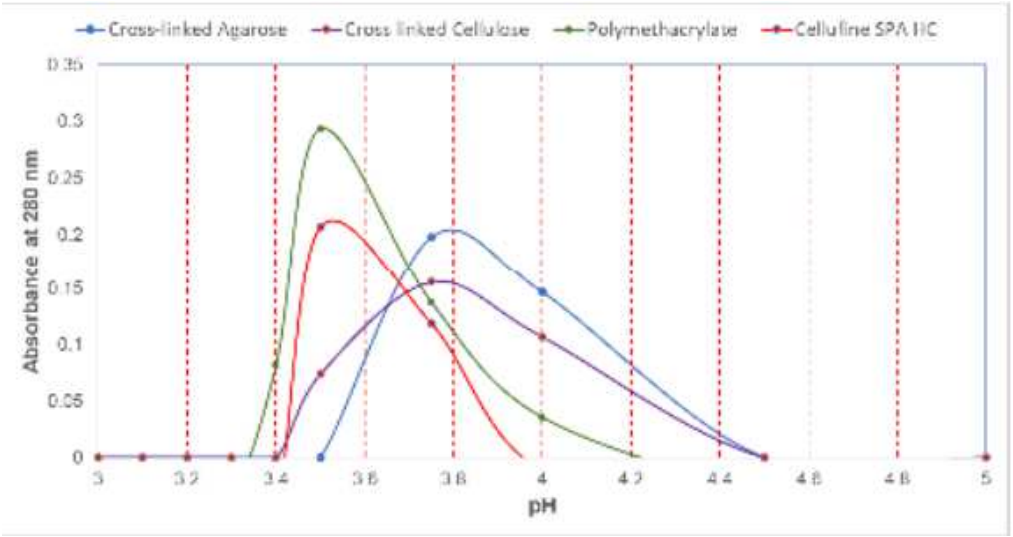
本研究表明，Cellufine SPA-HC 可有效地捕获 CHO 培养上清液中的单抗，从而在净化流程的第一个捕获步骤中实现高水平的杂质去除。

洗脱液 pH 的高通量筛选

利用离心旋转装置（Ultrafree MC 带 0.45 微米孔径过滤器, EMD Millipore 公司）对洗脱液 pH 进行了高通量筛选，如下：1）将 0.02 mL 的 50% （v/v）树脂悬浮液到入上述装置中准备试验；2）用 0.4 mL 上样缓冲液（20mM 磷酸钠缓冲液+ 0.15 M NaCl, pH 7.5）冲洗 2 次；3） 在上样缓冲液中加入 0.4 ml 的 5 mg/ ml 纯化的丙种球蛋白免疫球蛋白 G；4）用 0.4 mL 上样缓冲液洗涤 2 次；5）用 0.1M 甘氨酸在 pH 5.0、4.5、4.0、3.75、3.5、3.4、3.3、3.2、3.1 和 3.0 下连续洗脱；6）在多孔塔板（低紫外线丙烯酸，Corning）中收集每个洗脱步骤的滤液，再用紫外酶标仪在 280 nm 光区处测定洗脱蛋白（分子动力学法）。

下方图 4 总结了 Cellufine SPA-HC、交联琼脂糖（85 微米粒径）、聚甲基丙烯酸酯（45 微米粒径）以及交联纤维素的数据（75 微米粒径）。

图 4. 洗脱液 pH 的高通量筛选



以上结果表明，Cellufine SPA-HC 和聚甲基丙烯酸酯基树脂均在 pH 3.5 时达到洗脱峰，其余两种树脂在 pH 3.8 时达到洗脱峰。这种洗脱 pH 的差异可能反映了不同的 rProtein A 亲和配体在这些商业树脂上的结构。该方法是一种快速筛选洗脱液 pH 值的方法，而且使用的材料很少。

碱稳定性及在位清洗——相邻周期 CHO-HCP（交换）

在重复使用 rProtein 亲和树脂的循环过程中经常使用碱进行在位清洗。采用 0.1M 碱性清洗，重复使用高达 150 次，估算 Cellufine SPA-HC。下图 4 对该结果进行了概述。

图 4. 0.1M NaOH 在位清洗研究，接触 15 分钟，重复使用 150 次

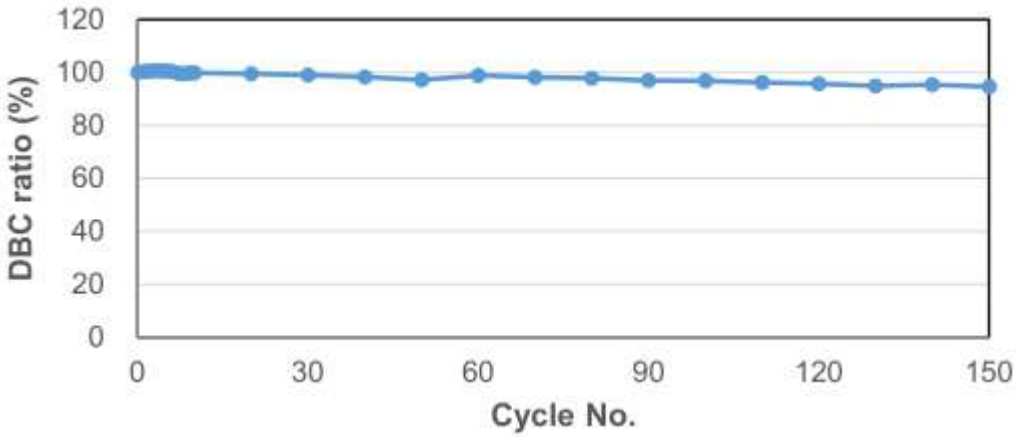


图 4 显示在用 0.1M NaOH 在位清洗，重复 150 次后依然保持动态结合载量的高保持率（>95%）。循环 0 次时载量为 75 mg/mL，研究结束时变为 72 mg/mL。

通过细胞培养和 pAb 捕获的交替，研究了 CHO-HCP 在重复使用周期中的“遗留”情况，并通过 ELISA 法测定了 pAb 组分中 CHO-HCP 的水平。

结果见下表 3。

表 3.重复使用周期之间的 CHO-HCP“遗留”概括

样品	CHO-HCP（百万分率）	用 SPA-HC 的 HCP 清除率%	“遗留”到下一个次的比重
上样	777,000		
单克隆抗体洗脱循环 1	306	> 99	28.2
多克隆抗体洗脱-无在位清洗	86	-	
单克隆抗体洗脱循环 2	238	> 99	5.5
多克隆抗体洗脱-0.1M 在位清洗	13	-	
单克隆抗体洗脱循环 3	260	> 99	3.2
多克隆抗体洗脱-0.5M 在位清洗	8	-	

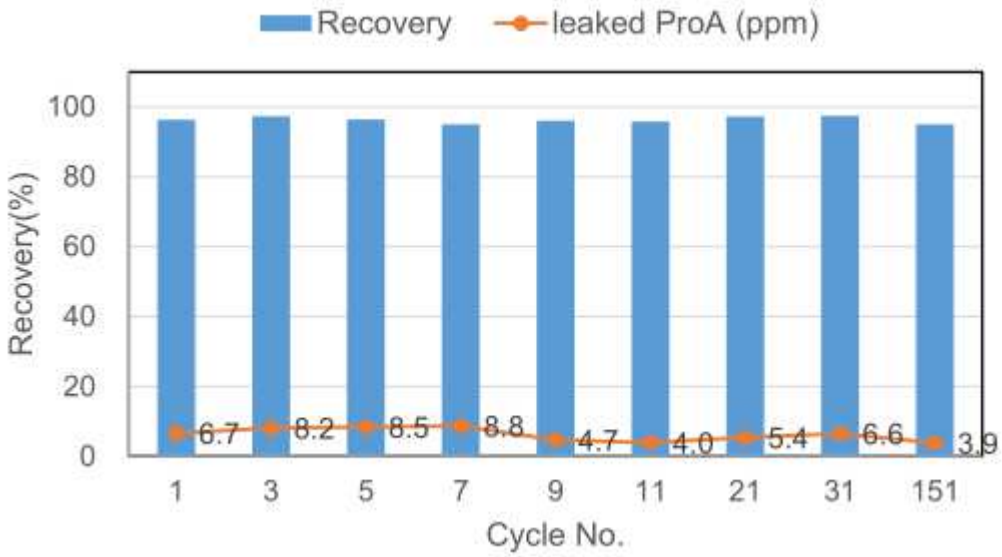
该研究表明，在三个重复使用周期内，CHO HCP 清除率较高。在非常低水平的重复使用周期之间存在一些“遗留”，在每个重复使用周期之间的基本 CIP 进一步减少了这种遗留。

碱稳定性及在位清洗——150 次 0.1M NaOH 在位清洗后的 rProtein A 渗滤液

用 0.02M Tris-HCl 缓冲液，0.15M NaCl 在 pH 7.5 下平衡 1mL 的 Cellufine SPA-HC 微型柱，然后用 60 mg/mL 的多克隆抗体（80%的 75 mg/mL 浓度 10%穿透液 DBC，停留时间 6 分钟）以 0.125 mL/min 的流速上样。用 60mM 醋酸钠在 pH 3.0 洗脱保留馏分。用 100 mM 醋酸冲洗后，用 0.1M 氢氧化钠接触色谱柱，在位清洗 15 min。

在所有用 0.1 M NaOH 进行的 150 次 CIP 循环中，DBC 的回收率(> 95%)也保持不变，并且显示出极低的蛋白 A 可滤出水平（<百万分之 9）。下面的图 5 显示了该研究结果的概要。

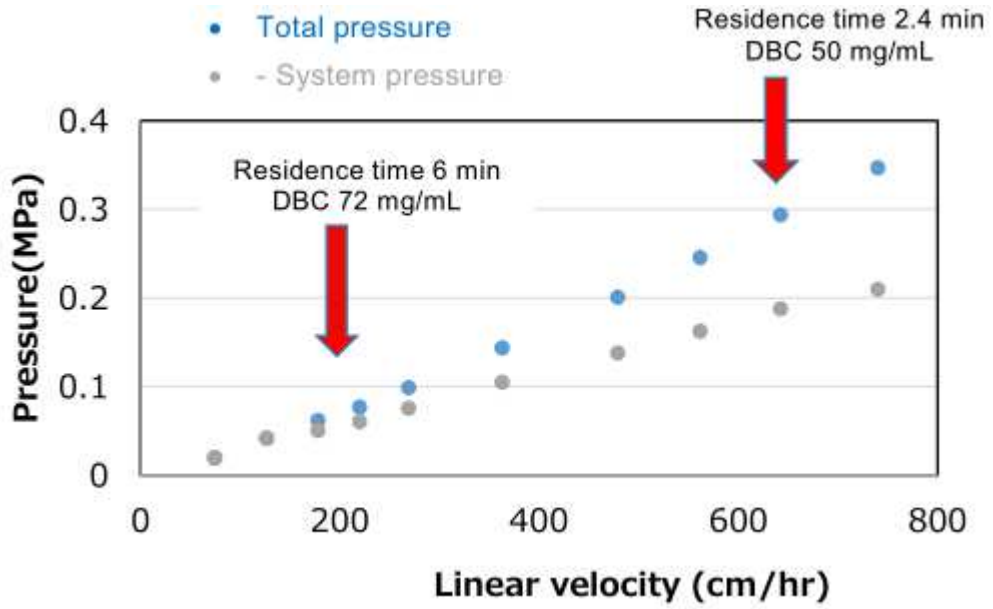
图 5. 总结洗脱单克隆抗体的研究和测量 rProtein 渗滤液在 150 周期的在位清洗和重用。



试制色谱柱(1-2L)的压力/流量特性

由于 Cellufine SPA-HC 是建立在高度交联的纤维素球体结构基础上，因此非常适合用于大型色谱柱的传统制造。压力流速研究表明，在 10cm 内径×20 cm 长床高(1.57 L)的色谱柱中，Cellufine SPA-HC 在 650 cm/h 时的背压小于 0.3MPa。下图 6 总结了在 750 cm/h 流量范围内测量的背压/流量曲线。

图 6. SPA-HC 填料中试色谱柱的压力/流量曲线



在 10 cm 内径×20 cm 长色谱柱（通用电气医疗，Axichrom 10/300, 1.57L 柱体积），20-25℃，水流动相下进行压力/流量试验。

上述数据表明，在中试色谱柱中填充 Cellufine SPA HC 树脂可以在停留时间 2.4min、流速为 650 cm/h、< 0.3MPa 的情况下进行操作，并从澄清的中国仓鼠卵巢细胞样品中获得 50 mg/mL 的单克隆抗体。

rProtein A 捕获后的推荐精制步骤

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）中国仓鼠卵巢细胞宿主细胞蛋白（HCP），b）滤过的蛋白质 A 配体，c）残余的双股脱氧核糖核酸（dsDNA），d）单克隆抗体聚合物> 300 kDa 分子量。在某些情况下，还需要去除单抗二聚体。可用 Cellufine 树脂来去除这些杂物，如下所示。

Cellufine MAX IB，一种新型的混合型伯胺基疏水改性树脂，通过流穿去除 CHO-HCP、浸出蛋白 A 和 mAb 的聚合体。

·用 Tris 碱调整 pH 到 7.0

·具有较宽的电导率范围，高达 0.2M NaCl

Cellufine MAX GS，一种包覆有右旋糖酐的阳离子交换树脂，具有高结合载量，可用于二聚体和聚合单克隆抗体的结合和脱出。

• 用 Tris 碱调整 pH 到 4.5，低电导率< 5 mS/cm.

Cellufine MAX Qh, 一种高载量阴离子交换树脂，可用于去除 HCP、浸出蛋白 A 和残留的 dsDNA。

• 用 Tris 碱调整 pH 到 8.5，低电导率<12 mS/cm

有关该类树脂的详情，请浏览网址:https://www.inc-corp.co.jp/fine/en/cellufine/

存储

开封存储，2-8℃。切勿冷冻。

吸附容量不随 40℃高温贮藏 1 个月而变化，常温贮藏 6 个月(25℃)，10℃贮藏 2.5 年。

长期存储，20% (v/v)乙醇，2 - 8℃。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

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/