

Cellufine™ MAX IB

Cellufine™ SPA-HC 树脂是用于快速筛查 rProtein A 抗体亲和力的易用预装微型柱。

混合型色谱树脂与传统的 IEX 或 HIC 树脂相比，具有独特的选择性差异。JNC Corporation 开发了一种新式混合型树脂——Cellufine™ MAX IB，用于初始 rProtein A 捕获后单克隆抗体纯化。该类树脂用丁基进行一定程度修饰，具有耐盐性的聚乙烯胺表面改性。所得到的配体结构表现出一种混合模式的功能，具有混合伯胺+丁基表面化学。除了单克隆抗体精制应用之外，该类树脂还可用于其他下游工艺，如等离子体分馏就利用了这种混合模式配体的独特选择性。这种混合模式的树脂是以交联 Cellufine 纤维素基珠体为基础，非常稳定，耐碱性 CIP，并可以在高流速模式、及最小背压下运行。

树脂性能见下表 1 概述。

表 1. Cellufine MAX IB 的性能特征

性能	特征
配体	部分用丁基修饰的聚丙烯胺 (Polyallyl amine)
基质	高交联纤维素珠体
粒径	平均 90 微米 (40-130 微米)
镜检	<5
流速	≥500 cm/h (0.3 MPa) 内径 10 cm- 长 13 cm, 24°C 纯净水
牛血清白蛋白结合载量 (毫克/毫升)	64 (低盐) 59 (高盐)
建议在位清洗溶液	0.5 M NaOH
建议清洗条件	乙醇(70%)、异丙醇(30%)、盐酸胍(6M)、尿素(6M)
存储 (长期)	20%乙醇, 2-8°C

1. 在显微镜下观察破碎颗粒的百分比
2. 50mM Tris-HCL, pH 8.5,
3. 50mM Tris-HCL, pH 8.5+0.2 M NaCl

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；体积 50%所需悬浮液=(目标柱体积[CV] × 2) × (压缩因子 Cf)

压缩因子 Cf=【重力沉降/流填装】Cellufine MAX IB 床高= 1.35-1.40，水流动相
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：
- $$\begin{aligned}\text{最终目标床高} &= \text{柱体积 (mL)} / \text{色谱柱柱截面面积(cm)} \\ &= 100 / \pi \times \text{半径平方} \\ &= 100 / 4.91 \\ &= 20.4 \text{ 厘米}\end{aligned}$$
- 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。Skcnwkcnsn
*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(A_s)来检查和评估装柱状态。

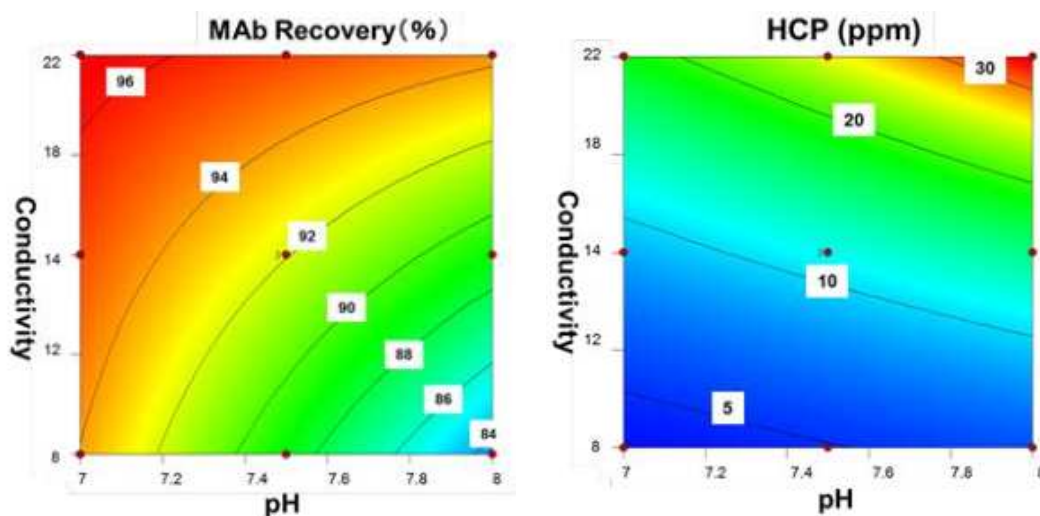
操作指南

Cellufine MAX IB 基于伯氨基阴离子交换模式与配体上的丁基 HIC 改性，具有混合模式的性质。由于这些性质，树脂的吸附/解吸性能受 pH 和电导率(离子强度)的影响较大。应对操作条件进行仔细优化。下方图 1 中等值线图概述了实验设计(DOE)研究的一个例子。在 A 组中，显示针对 pH 和电导率变量筛选的目标单克隆抗体的回收率。在 B 组中，针对同样的两个变量筛选 CHO-HCP 的去除情况。

图 1. Cellufine MAX IB 单克隆抗体回收和 CHO-HCP 去除的筛选

A 组, 单克隆抗体恢复百分比

B 组, HCP 去除

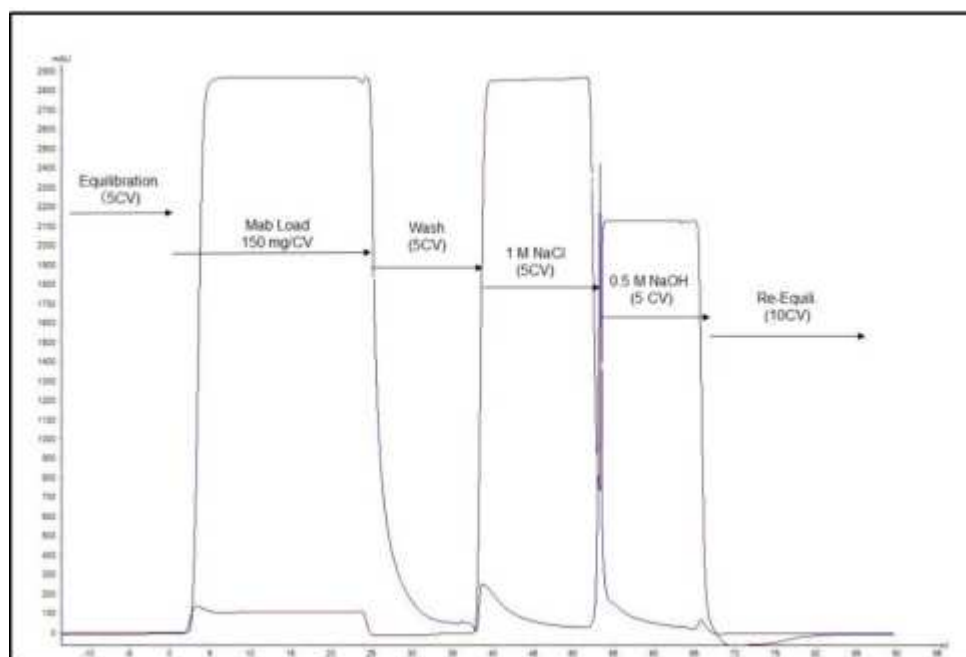


上述等值线图可用于确定最佳加载 pH 值和离子强度条件, 以实现使用该混合型树脂对目标单克隆抗体的最大回收率, 以及去除 CHO-HCP 杂物。

rProtein A 捕捉后单克隆抗体的流穿精制

Cellufine MAX IB 可作为负(流穿)模式用于单克隆抗体的精制应用。在下方图 2 中, 一个典型的色谱图说明了从 CHO 细胞培养中捕获初始 rProtein a 后, 用 Cellufine MAX IB 对单克隆抗体进行流穿精制。

图 2. 用 Cellufine MAX IB 在 rProtein A 捕捉后对单克隆抗体进行流穿精制



将 Cellufine MAX IB 填充到一个 5mm 内径×13.5 cm 长(2.65 mL)色谱柱中, 以 1.325 mL/min (407 cm/h) 的流速, 在 pH 7.0 的 20 mM Tris-HCL 缓冲液中平衡。用 rProtein A 色谱

柱初始捕获后，得到的洗脱馏分在 pH 3.5 的 60mM 醋酸中保持 60 分钟，在 pH 3.4 下使病毒失活。完成此步骤之后，使用 Tris 碱基将样品(18.0 mg/mL Mab)调整为 pH 7.0，使用 NaCl 或上样缓冲液稀释电导率为 5 mS/cm。然后将样品过滤(0.22 μ M)，将澄清后的样品以 150 mg Mab / mL 的树脂泵入 MAX IB 柱中，收集平衡缓冲液中流穿+洗涤馏分。冲洗至基线后，用 5 柱体积 1.0 M NaCl 和 5 柱体积 0.5M NaOH 再生色谱柱。然后用 10 柱体积的平衡缓冲液对柱进行再平衡。

上方的色谱图清楚地显示，在 rProtein A 洗脱和病毒灭活后，只需要很小的调整，在流穿馏分中的 Mab 具有很高的回收率。

下面的表 2 概述了 Cellufine MAX IB、MAX Q-h 和聚合物改性琼脂糖 Q 竞争介质以流穿精制方式对 CHO-HCP、dsDNA (HCD)、浸出 rProtein A 和聚合材料的去除情况。

表 2. 用 Cellufine MAX IB 和两种不同的聚合物改性 Q IEX 树脂对单克隆抗体 (Mab) 进行两步纯化

	蛋白 A 洗脱缓冲液	HCP (ng/mg mAb)	浸出蛋白 A (ng/mg_mAb)	聚合物(%)	HCD (pg/mg mAb)	回复率(%)
上样液	60 mM 醋	72	3.0	1.7	10	100
Cellufine MAX Q-h	酸盐缓冲液	22	2.1	1.9	<10	97
聚合物改性琼脂糖 Q	(pH 3.5)	27	2.1	1.8		96
Cellufine MAX IB		3	0.0	1.0		95

将 Cellufine MAX IB 填装到一个 5mm 内径×13.5 cm 长(0.29mL)色谱柱中，在 pH 7.0 的 20 mM Tris-HCL 缓冲液中平衡。用 60mm 乙酸 pH 3.5 从 rProtein A 中洗脱单克隆抗体，病毒在 pH 3.4 失活后，用 Tris 碱基调整至 pH 7.0，用 NaCl 或上样缓冲液稀释电导率为 6ms/cm。然后将样品过滤(0.22 μ M)以去除任何不溶性物质，然后以 190-200 mg Mab /mL 的树脂以 0.075 mL/min (4 分钟停留时间)的流速装填到 Cellufine MAX IB 色谱柱。收集流穿馏分，并检测上述蛋白 A 洗脱馏分中的杂质。

上表结果证明，Cellufine MAX IB 混合型树脂以一种非常有效的流穿精制方式，对 CHO-HCP、浸出 rProtein A、dsDNA 和蛋白质聚合物具有良好的清除能力。

样品制备与上样

用 0.22 μ m 低蛋白结合过滤器以离心或微滤法澄清样品，去除聚集的颗粒物质。样品在平衡缓冲液或离子强度和 pH 的类似条件下 (以达到所需的环境，最大限度地提高非保留流穿馏分中单克隆抗体的数量)，应调整至 1 ~ 20 mg/mL 的浓度。如有必要，用透析交换样品缓冲液，用超滤膜(离心、中空纤维或 TFF 装置形式)进行透滤，或用 SEC 色谱交换缓冲液。

建议缓冲液

平衡缓冲液: 10 - 50mM 磷酸钠, 0 - 0.15 M NaCl, pH 6.0-9.0
10 - 50mM Tris-HCl, 0 - 0.15 M NaCl, pH 7.5 - 9.0

洗脱缓冲液: 在上述平衡缓冲液中加入 0.1 - 2.0 M NaCl

再生与平衡

分离后，用超过 5 柱体积的高离子强度洗脱缓冲液(1 - 2 M NaCl)洗涤 Cellufine MAX IB 填充柱，接着用 0.5 M NaOH 使树脂再生。这一步完成后，用 10 柱体积的平衡缓冲液重新平衡，直到色谱柱洗脱液达到与缓冲液相匹配的稳定 pH 和电导率值。

除热

用 5 柱体积的 0.2 M 氢氧化钠溶液洗涤色谱柱，停止流通，静置 16 小时，然后用 5-10 柱体积的无内毒素水冲洗，然后用上述方法平衡缓冲液。0.2 M NaOH - 20% (v/v) 乙醇对内毒素的去除也有一定效果。对于更快速的除热，0.2 M 氢氧化钠在 90% (v/v) 乙醇中与树脂接触 2 小时将产生同等的内毒素去除效果。

在位清洗建议

3 柱体积 0.5 M 氢氧化钠清洗 15 分钟或于 0.1 M 氢氧化钠中静置过夜。

流速建议

Cellufine Max IB 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 1000cm /h。
- 色谱柱直径 30 厘米，床高 20 厘米，<0.3 MPa，为 >500 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，吸附量不变化。

长期存储，2-8℃，20% 乙醇。切勿冷冻。

JNC CORPORATION 公司

化学品事业部 生命化学部

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

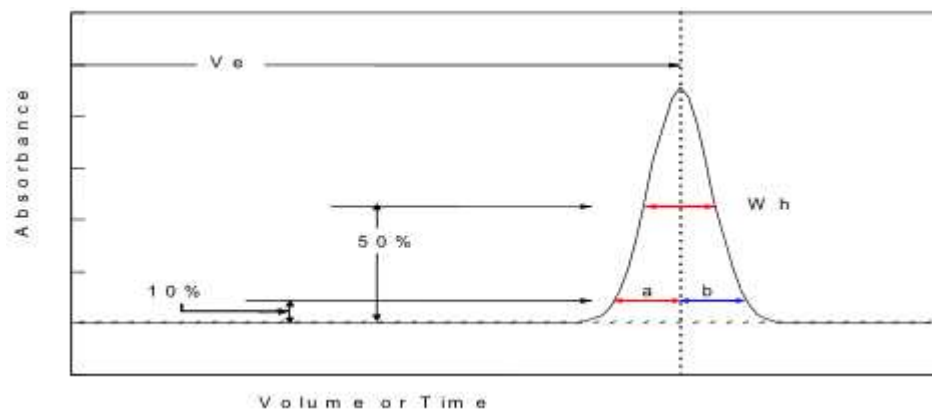
电子邮件：cellufine@jnc-corp.co.jp

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

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。