

Cellufine™ MAX IB

一种用于 rProtein A 亲和捕获后精制单克隆抗体的混合型层析树脂

混合型层析树脂与传统的 IEX 或 HIC 树脂不同，有着独特的选择性。JNC Corporation 公司研发了一种新型混合型树脂 Cellufine™ MAX IB，用于初始蛋白 A 捕获后的单克隆抗体(Mab)纯化。该树脂具有耐盐聚氨基表面改性(见图 1)，部分由丁基衍生而来。Cellufine MAX IB 的基本色谱性质和化学稳定性如表 1 所示。

用混合聚氨基+可控疏水表面化学得到的配体结构表现出一种混合模式的功能。除了单克隆抗体精制应用，该树脂还可用于其他下游工艺，如等利用这种混合模式配体的独特选择性进行离子体分馏。这种混合模式的树脂是基于高度交联的 Cellufine 纤维素基珠体，非常稳定，耐碱性在位清洗，并可以以最小的背压在高流速模式下操作。90 微米(平均)的高交联纤维素颗粒非常适合大规模的生物制药生产过程。

图 1. 混合型树脂配体结构

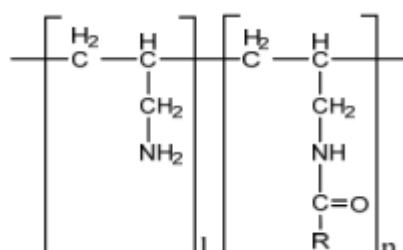


表 1. Cellufine MAX IB 特性

特性	参数
基质	高交联纤维素
粒径	平均 90 微米 (40-130 微米)
显微镜检验 (%) *	<5
配体	用丁基衍生的聚伯氨基
离子交换容量	>80 μ equiv/ml
在位清洗	0.5M NaOH
消毒	在 121°C 高温高压灭菌 20 分钟
清洗建议**	乙醇 (70%) 异丙醇 (30%) 盐酸胍 (6M) 和尿素 (6M)

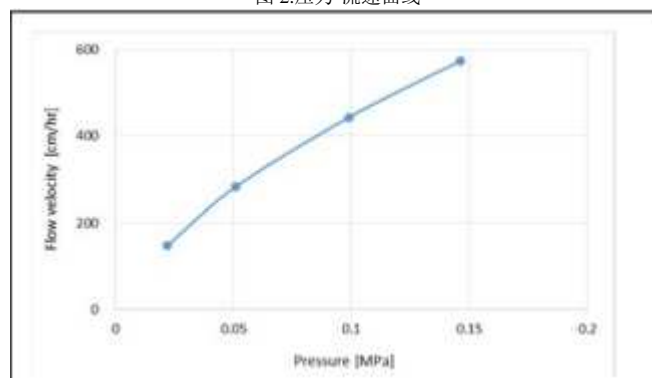
*在显微镜下观察破碎颗粒的百分比

**如果色谱柱背压过高或在操作时发生“结转”，可以使用列出的清洗条件。建议以逆流或上行流的方式进行清洗循环，以去除可能阻碍入口筛板或柱内树脂顶层的物料。

Cellufine MAX IB 压力-流速曲线

Cellufine MAX IB 是高交联纤维素球体，在图 2 概览中 (10cm 内径×13cm 长色谱柱，流动相：纯水，24±1°C) 展示出优秀的流速特性。在<0.3MPa 的背压下，流速可高达 500cm/h.

图 2. 压力-流速曲线



Cellufine MAX IB 耐盐性

Cellufine MAX IB 的耐盐性来自于聚伯氨基配体，在 2M 盐 BSA 结合能力仅降低 8% (见上文表 2)。Cellufine MAX IB 配体中丁基的密度可以很容易地控制，以优化除单克隆抗体

外的其他靶分子。这种配体设计理念将使 Cellufine MAX IB 可灵活地应用于生物制药纯化的广泛领域。

表 2. “耐盐” BSA 结合能力

特性	参考值
BSA 吸附能力 (饱和结合)	64 mg/mL (低盐分) ***
	59 mg/mL (高盐分) ****
流穿模式下免疫球蛋白 G 的回复率	> 95%

***50 mM Tris-HCl (pH 8.5)
 ****50 mM Tris-HCl (pH 8.5) + 0.2 M NaCl

在位清洗建议

可用 0.5M NaOH 溶液对 Cellufine 介质进行在位清洗。使用过的介质应使用表 1 中所列的推荐试剂清洗后，在 25°C 下，用 20%乙醇保存。

rProtein A 捕获后，对单克隆抗体进行 Cellufine IB 精制

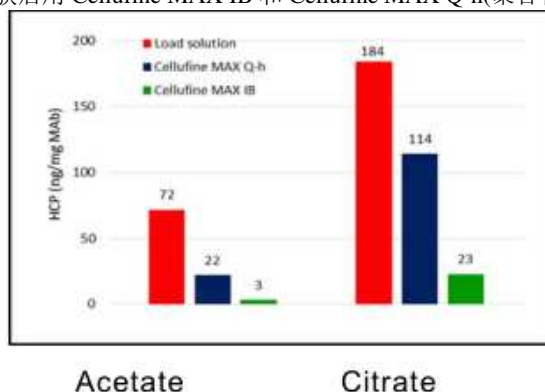
采用流穿模式的 Cellufine MAX IB，在用 rProtein A 树脂两步捕获单抗后，从 CHO 培养液的上层清液中去掉 HCP。(参见下方图 2)

图 2. 两步纯化流程

澄清细胞培养基
蛋白 A 捕获 (结合与洗脱)
用醋酸盐或柠檬酸盐缓冲液在 pH3.5 下洗脱
病毒在 pH 3.5+过滤时失活
用 Tris 碱调整到 pH 7.0, 并调整电导率为 6 mS/cm
Cellufine MAX IB 流穿精制

本报告评估了上样缓冲液的导电性和洗脱缓冲液的种类(柠檬酸盐和乙酸盐)。以 Cellufine MAX Q-h 和聚合物改性琼脂糖-Q 等右旋糖酐改性阴离子 IEX 树脂为参照。对这些树脂的样品进行 pH 调整，使其与推荐的流穿条件相匹配。详见下方图 3 概要。

图 3. 蛋白质 A 捕获后用 Cellufine MAX IB 和 Cellufine MAX Q-h(聚合物改性 Q) 去除 HCP



结果表明，与阴离子 IEX 标准树脂季铵盐相比，Cellufine MAX IB 对 rProtein A 洗脱馏分中 HCP 的去除效果更好。单价乙酸盐缓冲液对 CHO HCP 的去除率最高。本研究随后扩展到滤过的蛋白 A 的清除、残留的 dsDNA (HCD)和最终流穿馏分中单克隆抗体聚集物的还原。这些结果汇总在下面的表 3 中。

表 3. 用 Cellufine MAX IB 和两种不同的聚合物改性 Q IEX 树脂对 Mab 进行两步纯化

	ProA 洗脱缓冲液	HCP (ng/mg mAb)	渗漏 ProA (ng/mg_mAb)	聚合物 (%)	HCD (pg/mg mAb)	回收率 (%)
上样溶液		72	3.0	1.7	10	100
Cellufine MAX Q-h	60 mM 醋酸盐缓冲液 (pH 3.5)	22	2.1	1.9	<10	97
聚合物改性琼脂糖 Q		27	2.1	1.8		96
Cellufine MAX IB		3	0.0	1.0		95

在 5mm 内径×3cm 长色谱柱中装填 Cellufine MAX IB，并以三羟甲基氨基甲烷醋酸缓冲液 (pH7) 中平衡。用 60 mM 醋酸 pH 3.5 从蛋白 A 中洗脱单克隆抗体。在病毒失活后，用 Tris 碱基将 pH 调整到 7.0，用 NaCl 或用上样缓冲液稀释电导率为 6 mS/cm。然后将样品过滤(0.22 微米)以去除所有不溶性物质，然后以 190-200 mg Mab /mL 的树脂以 0.75 mL/min (停留时间 4 分钟)的流速装填到 Cellufine MAX IB 色谱柱上。收集通过该组分的流量，并检测蛋白 A 洗脱组分中的上述污染物。

总结

有报道称(见参考 1)，由于柠檬酸钠等多价缓冲液降低了伯氨基或季氨基 IEX 表面的 Zeta 电位，从而导致蛋白质吸附减少。Cellufine MAX IB 不受柠檬酸缓冲液的影响，通过精制的方式，用一价醋酸盐缓冲液对 CHO HCP、浸出蛋白 A、残留 HCD 进行去除，并减少单克隆抗体聚合物(见表 3)。此外,Cellufine MAX IB 在高盐条件下 (见图 2) 表现出良好的 HCP 去除效果，如 14 mS/cm (~ 120mm NaCl)，这意味着病毒失活后的 rProtein A 洗脱样品可以在 pH 调整到 7.0 后直接装填到混合模树脂上。完成 rProtein A 捕获的两步纯化流程(见图 2)，随后进行 Cellufine MAX IB 流穿精制是细胞培养后单克隆抗体分离的一种高效纯化策略。

参考文献

1) Douglas B. Burns, Andrew L. Zydney. Buffer effects on the zeta potential of ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science Volume 172, Issues 1-2, 1 July 2000, Pages 39-48

订购信息

说明	数量	产品编号
Cellufine MAX IB	5 x 1 ml 盒	21-600-51
	1 x 5 mL 盒	21-600-15
	10 mL	21600
	50 mL	21601
	100 mL	21602
	500 mL	21603
	5 L	21604
	10 L	21605

采购/技术支持

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/>