使用 Cellufine 亲和载体及混合模式载体的单克隆抗体纯化的两步法纯化

Cellufine是一种在球形的多孔纤维素粒子的表面修饰各种各样的试剂（功能基团）的色谱填料。被用于制造抗体药物、疫苗、蛋白质制剂等生物制药品。

由于抗体医药拥有卓越的药效和较小的副作用等优势，因此逐渐形成代替低分子药物的巨大市场。但是，由于成为抗体药物核心的单克隆抗体是蛋白质，因此必须采用高度的纯化技术。成为纯化工序核心的Protein A色谱极其昂贵，并成为压迫制造成本的主要因素，因此选择具有卓越性价比的填料是很重要的。JNC公司长期销售可以兼顾载体成本与性能的世界最高水平的Protein A色谱填料“Cellufine SPA-HC”。但是，由于Protein A色谱以蛋白质为试剂，因此在下游工序中所占的成本增高。作为另一种解决措施，省略纯化工序这个步骤本身对于降低成本是有效的。

本报告中报告了通过Protein A色谱实施的捕获工序与通过Cellufine MAX IB实施精制（polishing）工序的两步法纯化，实现单克隆抗体的高纯度纯化的方法。通过实现两步法纯化，能够减少下游工序的纯化设备投资，并实现降低运营成本。

1．纯化的概要

由于CHO细胞培养产生的杂质中存在源于宿主细胞的杂质（Host Cell Protein = HCP 宿主细胞蛋白）和源于宿主细胞的 DNA 碎片、以及在 Protein A 色谱工序时发生流出的 Protein A 碎片等。我们尝试了用 2 个色谱工序（两步法纯化）纯化蛋白，并将其作为清除这些复杂的杂质的步骤。

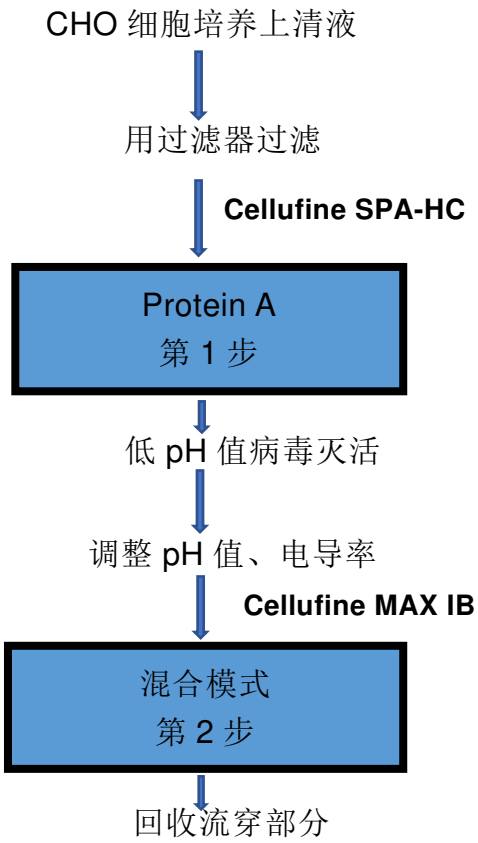
1）Protein A 色谱

是纯化源于 CHO 细胞的复杂的杂质的第 1 步工序。这是通过能够固定与抗体有亲和活性的源于 Staphylococcus aureus 的 Protein A 的色谱预装柱，清除超过 99%的杂质的重要步骤。Cellufine 正在销售能够固定具有较高耐碱性的重组 Protein A 试剂的 **Cellufine SPA-HC**。并采用专有的粒径控制技术，实现将吸附量与耐压性的均衡性提高至极限的设计。因此，是一款凭借高流速、高吸附能力而实现较高性价比的色谱填料。

2）混合模式色谱

在第 2 步中使用了混合模式色谱。能够将 Protein A 中清除不充分的抗体聚集体、Protein A 流出蛋白质、源于宿主的杂质纯化至低于标准值的水平。本次验证的工艺流程中，在流穿（flow through）模式下使用了该步骤。这也是一种让属于标的物的抗体流穿预装柱，并让杂质吸附在预装柱上的方法。Cellufine 正在销售的 **Cellufine MAX IB** 就属于实现两步法纯化的混合模式色谱。

图 1　单克隆抗体纯化流程



3）纯化流程的总结

本次纯化工序的流程如图 1 所示。用 2 个色谱工序纯化了细胞培养后的抗体试样。

2. Protein A 色谱

将 Cellufine SPA-HC 填充入 JNC（株）销售的 Empty 预装柱“Empty 5 mL Mini Column (ID.14.6mm x H 30mm，产品目录 No.: EMC5SK)”。

清除培养细胞后，准备了用 0.22um 的过滤器清除不溶物后的 CHO 细胞培养上清液。

通过 Protein A 色谱工序的纯化结果如图 2 所示。

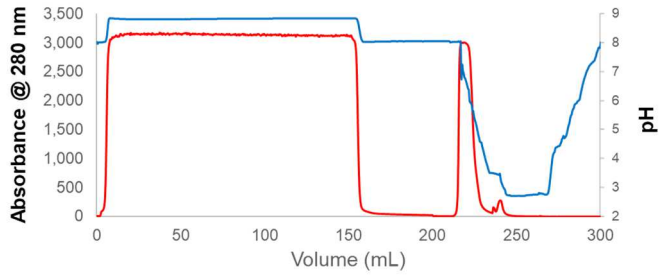


图 2．Cellufine SPA-HC 工序

预装柱条件

预装柱: 5mL 迷你预装柱（1.46 cm ID x H3.0 cm）

上样试样:10% DBC（4 分钟）的 80%的量 = 200mg

抗体浓度: 5mg/mL

流速: 1.25 mL/min = 滞留时间 4min

溶出: 10 CV、60 mM 醋酸 pH 值 3.5

获得了良好的结果，抗体的回收率达到 93%。用 HPLC 预装柱来分析回收的单克隆抗体与 CHO 细胞培养上清液的单克隆抗体后，我们发现有效地清除了 2 倍体以上的聚集体（图 3、表 1）。

试样	培养上清液 %	SPA-HC 溶出部分 %
高分子聚集体	21.3	3.9
IgG 二倍体	10.1	6.0
IgG 单体	68.6	90.2

表 1　通过 Cellufine SPA-HC 清除聚集体

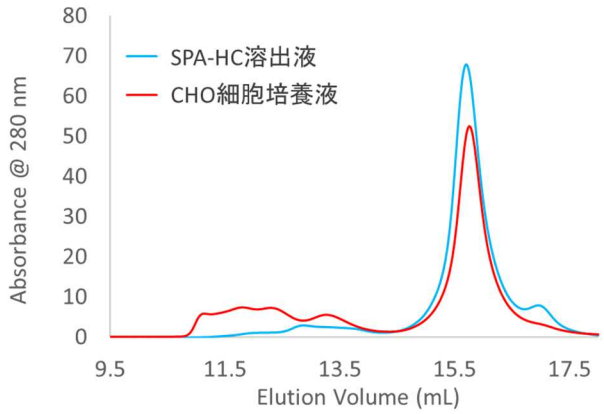


图 3 通过 Cellufine SPA-HC 清除聚集体

HPLC 预装柱：TSK gel Super SW mAb HR

流动相：200 mM 磷酸纳 pH 值 6.7 + 0.1M 硫酸纳

检测器：PDA280 nm

令人吃惊的是经过 Protein A 色谱工序后，单克隆抗体的聚集体减少了。这个现象表明了在下一个精制（polishing）工序中，能够减少色谱的负担。这也许是由于使用了修饰 C 结构域（C domain ），而非 Z 结构域（Z domain ）的 Protein A 试剂，通常在 Cellufine SPA-HC 的 Protein A 试剂中使用 Z 结构域。

3. 混合模式色谱

作为精制（polishing）工序，实施了使用混合模式色谱的流穿纯化。即：让杂质吸附在预装柱上，并让单克隆抗体流穿预装柱的方法。

在精制（polishing）工序中使用了属于 Cellufine 专有的混合模式色谱填料的 Cellufine MAX IB。首先用 1.0 M 三羟甲基氨基甲烷（TRIS buffer）缓冲液将通过 Cellufine SPA-HC 纯化获得的溶出部分调配成 pH 值 7.0、电导率 6 mS/cm 的溶液。然后，作为在预装柱上使用的前处理操作，用 0.22 μm 的 PES 过滤器来过滤该调配溶液。（图 4 ）显示了使用 Cellufine MAX IB 的色谱纯化结果。

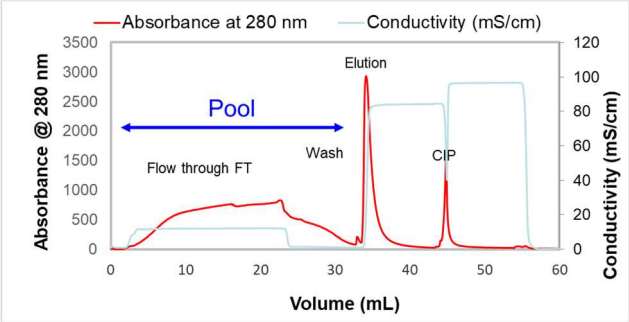


图 4 . Cellufine MAX IB 的精制（polishing）工序

预装柱条件

预装柱: 1mL 迷你预装柱

平衡缓冲液：10 CV of 60 mM 醋酸钠 pH 值 7

上样试样:20 mL(抗体量为 120mg)

抗体浓度:6 mg/mL

流速: 0.25 mL/min = 滞留时间 4min

溶出: 1M NaCl

定置洗脱：0.5M NaOH

用 10 CV（预装柱体积）的平衡缓冲液（60 mM 醋酸钠缓冲液,pH 值 7.0）对被填充在 1mL 迷你预装柱上的 Cellufine MAX IB 实施了离子平衡。让抗体浓度被调配至 6mg/mL，并承载 20 mL（抗体量为 120mg）的试样流穿了预装柱。将流穿的部分作为抗体试样加以回收。然后，用 5CV 的离子平衡缓冲液洗脱预装柱的同时，将洗脱液加入流穿部分一并回收。为了回收吸附在预装柱上的分子，透过 5CV 的量并溶出了 1M NaCl。在定置洗脱中使用了 0.5M NaOH。

如图 4 的色谱图所示，上样试样后很快就检测到属于标的物的单克隆抗体的 UV 峰值。为了回收单克隆抗体，回收了已流穿的试样以及 5CV 的量的洗脱液。

确认了回收的单克隆抗体部分的杂质残留量（表 2）。经过纯化的抗体部分的回收率达到 81%，部分抗体被吸附在 Cellufine MAX IB 上。

试样	回收率 %	HCP ppm	流出 Protein A
上样试样	-	9.5	3.9
抗体部分	81	3.9	0.5
溶出	9.1	11.5	3.4

表 2 MAX IB 后的杂质

为了确认被吸附在 Cellufine MAX IB 上的抗体的性质，使用 HPLC 预装柱实施了抗体的分析。

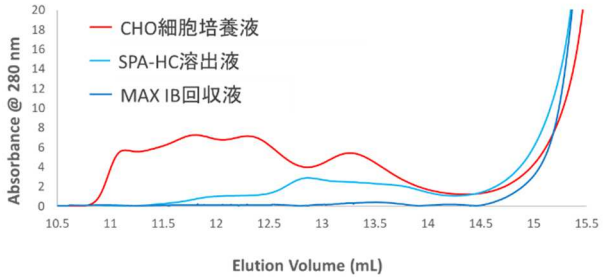


图 5 通过 HPLC 实施的聚集体分析

HPLC 预装柱：TSK gel Super SW mAb HR

流动相：200 mM 磷酸钠 pH 6.7 + 0.1M 硫酸钠

检测器：PDA280 nm

根据流穿 Cellufine MAX IB 的单克隆抗体部分，判明了抗体的聚集体已被有效地清除（图 5，表 3）。

本次使用了非常多的CHO细胞培养液的聚集体试样，其中二倍体占 10.1%、高分子聚集体占 21.3%。通常情况下，能够通过在培养工序中的控制减少聚集体。本次研讨中为了评价 Cellufine MAX IB 的性能，使用了这种含有较多聚集体的试样。

	培养液 %	SPA-HC 溶出液 %	MAX IB 回收率 %
聚集体	21.3	3.9	0.6
二倍体	10.1	6.0	1.9
单体	68.6	90.2	97.6

表 3 各步骤内的聚集体的演变

成功地将单克隆抗体的聚集体占 CHO 细胞培养上清液的比例从 21.3%显著减少至 0.6%。
并成功地将二倍体占 CHO 细胞培养上清液的比例从 10.1%减少至 1.9%。

总结

本文介绍了使用 Cellufine 并通过 2 个色谱工序，把用 CHO 细胞培养的单克隆抗体纯化至高纯度的方法。本次介绍的使用 Cellufine SPA-HC 与 Cellufine MAX IB 的两步法纯化能够将源于宿主的蛋白质（HCP）、流出 Protein A、抗体的聚集体纯化至有效的、合理的水平，因此可以将其称为划时代的先进方法。随着细胞培养技术的进步，单克隆抗体的发酵单位效价逐渐提高。但是同时形成大量抗体聚集体等的副作用也成为问题。通过采用本次介绍的 2 个色谱工序，成功地清除包括抗体聚集体的杂质，将抗体蛋白纯化至极高纯度。因此可以将两步法纯化称为能够削减制造单克隆抗体的下游工序的成本，有助于缩短制造周期的卓越方法。

最后将通过本次验证获得的一系列杂质的属性在表 4 中列示如下。

工序	CHO-HCP	蛋白质 A 流出量	抗体聚集体	回收率
	[ppm]	[ppm]	[%]	[%]
CHO 培养上清液	56342	-	31.4	-
Cellufine SPA-HC	17.9	4.3	9.9	92.8
Cellufine MAX IB	4	0.5	2.5	75

表 4 两步法色谱的杂质属性

关于产品信息的说明

有关产品的详细信息请浏览相应的网页。

Cellufine SPA-HC
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/grade/grade-9.html
Cellufine MAXIB
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/grade/grade-8.html#maxib
使用说明书及技术资料可在以下网页中下载 pdf。
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/guide/index.html

订购说明

日语名称	填料尺寸	目录编号
Cellufine SPA-HC	1ml x 1 (Mini-Column)	21900-11
	1ml x 5 (Mini-Column)	21900-51
	5ml x 1 (Mini-Column)	21900-15
	10ml	21900
	50ml	21901
	500ml	21902
	5 lt	21903
	10 lt	21904
Cellufine MAXIB	1ml x 5 (Mini-Column)	21600-51
	5ml x 5 (Mini-Column)	21600-15
	10ml	21600
	50ml	21601
	100ml	21602
	500ml	21603
	5 lt	21604
	10 lt	21605

关于各种咨询和技术的说明

（北美&欧洲）
JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY 10580

Tel: 914-921-5400
Fax: 914-921-8822
Email: cellufine@jncamericany.com

（日本、亚洲、其他）
JNC 株式会社
生命化学事业部
邮编：100-8105
东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町大楼 9 楼
Tel: 03 3243 6150
Fax: 03 3243 6219
Email: cellufine@jnc-corp.co.jp