

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第八十二期

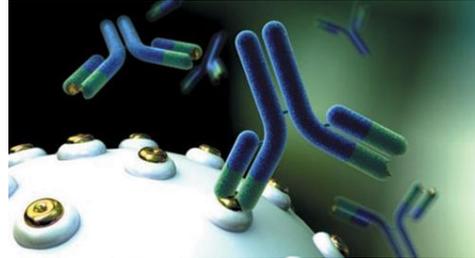
抗体药物的层析纯化工艺



2016-05

第八十二期 抗体药物的层析纯化工艺

随着生物制药以及诊断试剂领域对单克隆抗体（mAbs）的需求日益旺盛，需要更大量、更高纯度的抗体产品。因此，通过层析法实现抗体的下游纯化变得日趋重要。



各种模式中，蛋白 A 亲和层析法可获得高纯度的单抗，因此普遍用于初始纯化步骤（即初期捕获）中。离子交换层析法（IEC）的高载量特点也使之在抗体的制备纯化中被广泛采用。疏水相互作用层析法（HIC）具有去除抗体多聚体以及脱落的蛋白 A 配体等杂质的性能。混合模式层析法（MXC，含羟基磷灰石类分离介质）也被运用到了抗体的层析纯化工艺之中。

抗体药物的层析纯化工艺

采用蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺

采用蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺是指第一步捕获使用蛋白 A 亲和层析，其后步骤使用其他层析模式去除诸如宿主细胞蛋白、核酸、抗体多聚体和脱落的蛋白 A 配体等杂质的方法。工艺中如果选用阴离子交换层析法（包括阴离子交换膜层析法），则是通过目标抗体流穿或吸附并去除杂质而达到纯化抗体的目的。



图 1. 采用了蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺示例

抗体药物的层析纯化工艺

不采用蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺

不采用蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺可降低工艺成本。可通过结合使用阳离子交换层析法 (CEX)、阴离子交换层析法 (AEX)、疏水相互作用层析法 (HIC) 以及混合模式层析法 (MXC) 实现对单抗的高纯度纯化制备。

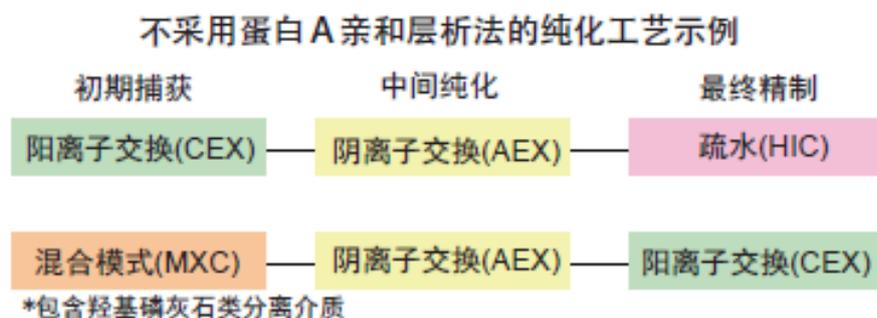


图 2. 不采用蛋白 A 亲和层析法的纯化工艺示例

表 1. 用于单抗纯化的 Toyopearl 产品举例

| 分离模式 | 推荐产品 | 载量 | 获得纯度 | 主要特点 |
|------|---------------------------------|---------------|------|---|
| AFC | TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F | ≥ 68 g/L | 非常高 | 耐碱、高载量型 |
| | TOYOPEARL AF-rProtein A-650F | ≥ 45 g/L | 非常高 | 耐碱、高流速型 |
| IEC | TOYOPEARL GigaCap S-650M/650S | 100 - 175 g/L | 高 | 通过对吸附、洗脱条件的优化, 可获得与蛋白A亲和填料匹敌的抗体纯化效果。 |
| | TOYOPEARL GigaCap CM-650M | 90 - 110 g/L | 高 | CM型弱阳离子交换填料, 载量高。即使对含较高盐浓度的抗体样品仍具有高吸附载量。 |
| | TOYOPEARL GigaCap Q-650M/650S | 流穿法 | 中等 | 有效去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体。 |
| | TOYOPEARL Q-600C AR | 流穿法 | 中等 | 有效去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体; 可吸附并分离含较高盐浓度的样品; 超高耐碱性能。 |
| | TOYOPEARL NH2-750F | 流穿法 | 中等 | 有效有效去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体、耐盐型填料。 |
| MXC | TOYOPEARL MX-Trp-650M | ≥ 75 g/L | 高 | 混合模式填料, 可分离Fab段, 耐盐型填料。 |
| | TOYOPEARL Phenyl-650M | 30 - 50 g/L | 高 | 去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体的效果优异。 |
| HIC | TOYOPEARL PPG-600M | 20 - 40 g/L | 高 | 去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体的效果优异; 可适用于疏水性较强的抗体纯化。 |
| | TOYOPEARL Hexyl-650C | 流穿法 | 中等 | 有效去除多聚体、宿主细胞蛋白、脱落的蛋白A配体。 |

抗体药物的层析纯化工艺

蛋白 A 亲和层析填料 (耐碱、高载量 / 高流速型)



蛋白 A 填料在单抗纯化工艺中具有载量高, 处理速度快等众多优势, 非常适合用于单抗纯化的捕获阶段。

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 是东曹推出的新型的耐碱型、高载量蛋白 A 填料, 即使是高滴度、高浓度 (10 g/L) 的单抗样品, 在常用流速下也具有非常高的动态载量。

TOYOPEARL AF-rProtein A-650F 作为老一代的蛋白 A 产品, 可以在高流速 (柱留时间 1 min) 下进行样品的处理。东曹的填料机械强度高, 在柱高为 20-30 cm 的情况下, 仍然可以使用高流速的条件进行分离 (线性流速 500-1000 cm/h), 同时保持较高的动态载量, 从而提高抗体纯化工艺的生产效率。

TOYOPEARL AF-rProtein A 650F 和 AF-rProtein A HC-650F 是将新的耐碱型蛋白 A 配体多位点结合到填料基体上, 对鼠 IgG1、IgM 以及 Fab 具有很强的亲和力。并且在碱性条件下多次 CIP 循环后, 吸附载量也不会降低。

抗体药物的层析纯化工艺

离子交换层析填料 (高载量、强耐碱型)

随着官能团键合技术的进步, 目前主流的离子交换填料对于抗体的吸附载量一般都能打到 100-170 g/L。抗体的等电点一般为中性或者弱碱性, 所以阳离子交换填料在抗体的纯化工艺中一般适用于吸附 - 洗脱模式。



TOYOPEARL GigaCap S-650M 对抗体的动态载量非常高,通过优化洗脱液,在 1000 cm/h 的线性流速下,动态载量约为 90 g/L,并且可以得到与蛋白 A 填料相媲美的纯度。

阴离子交换填料在抗体的纯化工艺中一般通过流穿模式来去除样品中的宿主细胞蛋白、核酸、内毒素、多聚体等杂质。TOYOPEARL GigaCap Q-650M、TOYOPEARL Q-600C AR、TOYOPEARL NH2 -750F 等,均是高载量型的优异层析填料。

TOYOPEARL GigaCap S-650M 对抗体的动态载量 非常高,通过优化洗脱液,在 1000 cm/h 的线性流速下,动态载量约为 90 g/L 并且可以得到与蛋白 A 填料相媲美的纯度。

阴离子交换填料在抗体的纯化工艺中一般通过流穿模式来去除样品中的宿主细胞蛋白、核酸、内毒素、多聚体等杂质。TOYOPEARL GigaCap Q-650M、TOYOPEARL Q-600C AR、TOYOPEARL NH2 -750F 等,均是高载量型的优异层析填料。

TOYOPEARL 离子交换填料不仅对抗体有着较高的载量,在洗脱时,抗体的洗脱峰型尖锐、不拖尾的特点也减少了工艺中样品的处理时间,提高生产效率。培养的上清液中如果含有盐 (0.1-0.15 mol/L), 可以使用 TOYOPEARL GigaCap CM-650M 、 TOYOPEARL Q-600C AR、TOYOPEARL NH2-750F 具有盐耐性的填料 进行直接上样分离。

抗体药物的层析纯化工艺

混合模式层析填料 (高载量型)

此类填料的官能团即具有离子性,又具有疏水性。混合模式填料对于含有一定盐浓度 (0.15 mol/L NaCl) 的单抗样品可以进行直接上样,进行吸附和洗脱分离。

TOYOPEARL MX-Trp-650M 的官能团为色氨酸,对抗体具有非常高的动态载量 (70 g/L 以上)。相比于蛋白 L 填料,对抗体片段 (Fab) 和单体 (scFv) 都有着更高的动态载量。

抗体药物的层析纯化工艺

疏水层析填料（高载量型）

疏水相互作用层析法不仅可以分离诸如宿主细胞蛋白、核酸、脱落的蛋白 A 配体等杂质，还可以分离抗体的多聚体和异构体。

TOYOPEARL 600 系列产品被称为第二代疏水层析填料，通过优化填料的孔径从而大大提高了对单抗的吸附载量。抗体的动态吸附载量一般为 20-45 g/L，但是我们需要通过抗体的疏水性、回收率、分辨率等条件来选择最优的疏水填料。

一般而言，苯基和丁基(TOYOPEARL Phenyl-650M 、 Phenyl-600M 、 Butyl-650M、 Butyl-600M) 适用于单抗的分离，但是对于疏水性比较强的抗体则需要选择疏水性比较弱的 TOYOPEARL PPG-600M 疏水填料。最新的研究中，有使用混合盐溶液(Dual salts) 来提高吸附载量的案例，TOYOPEARL Hexyl-650C 在流穿模式的运用，TOYOPEARL Phenyl-650、 Butyl-650、 PPG-600、 Ether-650M 等也被运用在 ADC 药物的分离纯化中。

抗体药物的层析纯化工艺

工艺开发、筛选用预装柱（ToyoScreen 产品）

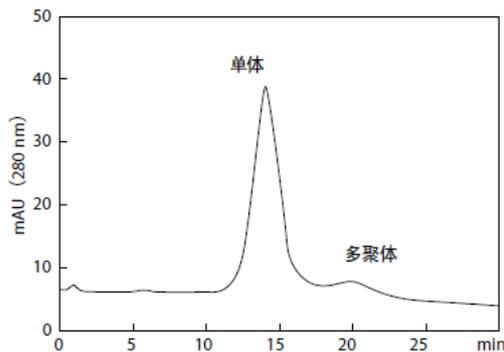


ToyoScreen 筛选用预装柱（1 ml 装及 5 ml 装）包括各种层析模式，可用于层析填料的筛选、精制纯度和回收率的研究以及层析条件的优化工作等方面。与 HPLC 或 MPLC 系统连用可简单地对抗体的分离效果进行评估。

抗体药物的层析纯化工艺

高速分离、高分辨率、小粒径填料（离子交换填料、疏水填料）

使用离子交换或疏水填料分离异构体的时候，对分辨率要求特别高的情况下，可以使用粒径为 20-30 μm 的小粒径填料例如 TSKgel PW 系列，或者 TOYOPEARL GigaCap Q-650S 和 GigaCap S-650S 来进行纯化分离。



层析柱：TOYOPEARL NH₂-750F (5 mm I.D. × 5 cm)
 缓冲液 A：20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0)
 缓冲液 B：20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 + 1.0 mol/L NaCl (pH8.0)
 梯度：缓冲液 A→B (60 分钟线性梯度)
 流速：1.0 mL/min
 检测：UV (280 nm)
 样品：单克隆抗体 (IgG1, 0.5 mg)

TOYOPEARL NH₂-750F 能有效去除多聚体。

图 3. 单克隆抗体多聚体的分离



图 4. 抗体纯化的工艺平台示例：AFC-CIEC-HIC

更多资讯，请致电慧德易：4008-111-326