



针对基于蛋白A纯化工艺的树脂筛选、洗涤参数及洗脱参数的自动化优化

Patrick A. Kates¹ • Gracie K. Anderson^{1,2} • Penny Hamlyn³ • Mark Hicks³ • L. Andrew Lee¹

¹Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC • ²University of South Carolina, Columbia, SC • ³Ecolab Bioprocessing, Ecolab, Llantrisant, South Wales

INTRODUCTION

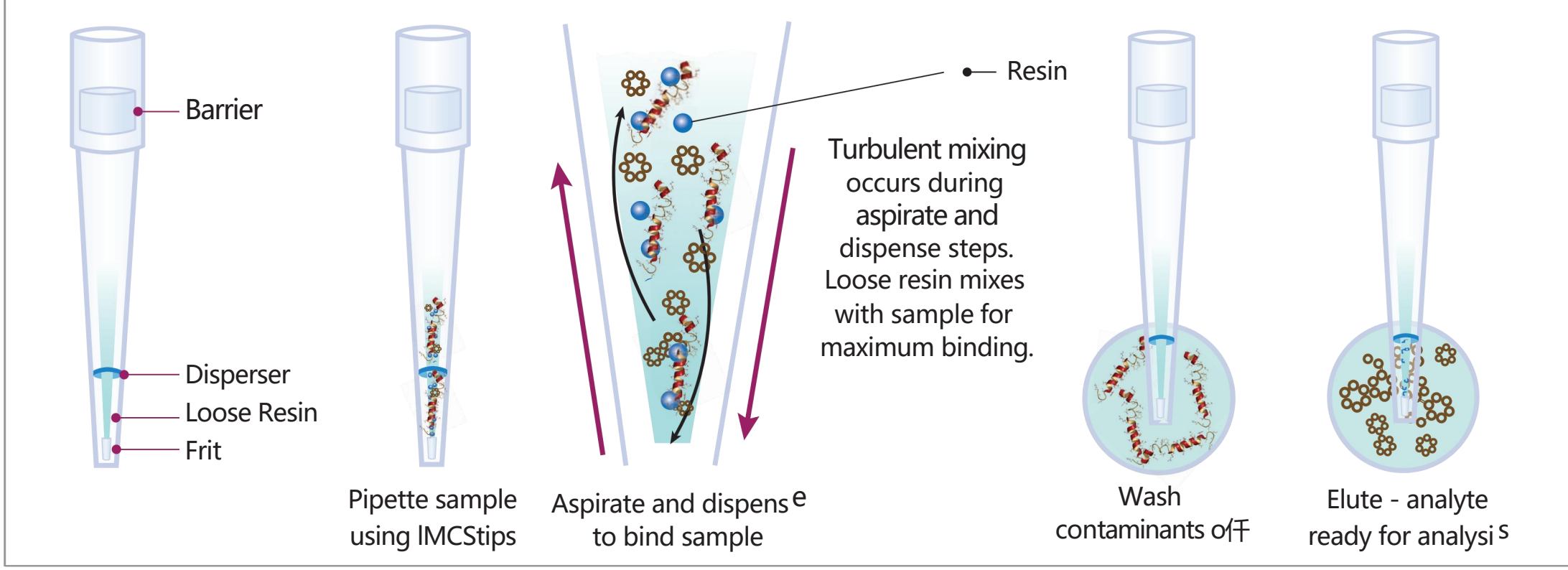


图 1: 装有松散树脂的 IMCStips® 采用分散固相萃取技术进行高效的自动化提取。

- 优化蛋白纯化过程对于获得高回收率、高纯度和高单体百分比至关重要。
- 优化过程是一个非常耗时的过程。
- 需要考虑多个变量，包括：
 - ◇ 树脂类型
 - ◇ 树脂结合能力
 - ◇ 洗涤/洗脱条件
- 在本研究中，使用 IMCSip 纯化四种抗体样品。为优化蛋白纯化，使用了四种商业树脂：
 - ◇ MabSelect Prisma™ (Prisma)
 - ◇ Praesto™ Jetted A50 HipH (HipH)
 - ◇ MabSelect SuRe™ LX (MSSLX)
 - ◇ Purolite™ DurA™ Cycle A50 (DurA)
- 在 Hamilton Microlab STAR 平台上，使用 Hamilton 移液吸头进行全自动抗体纯化。

方法

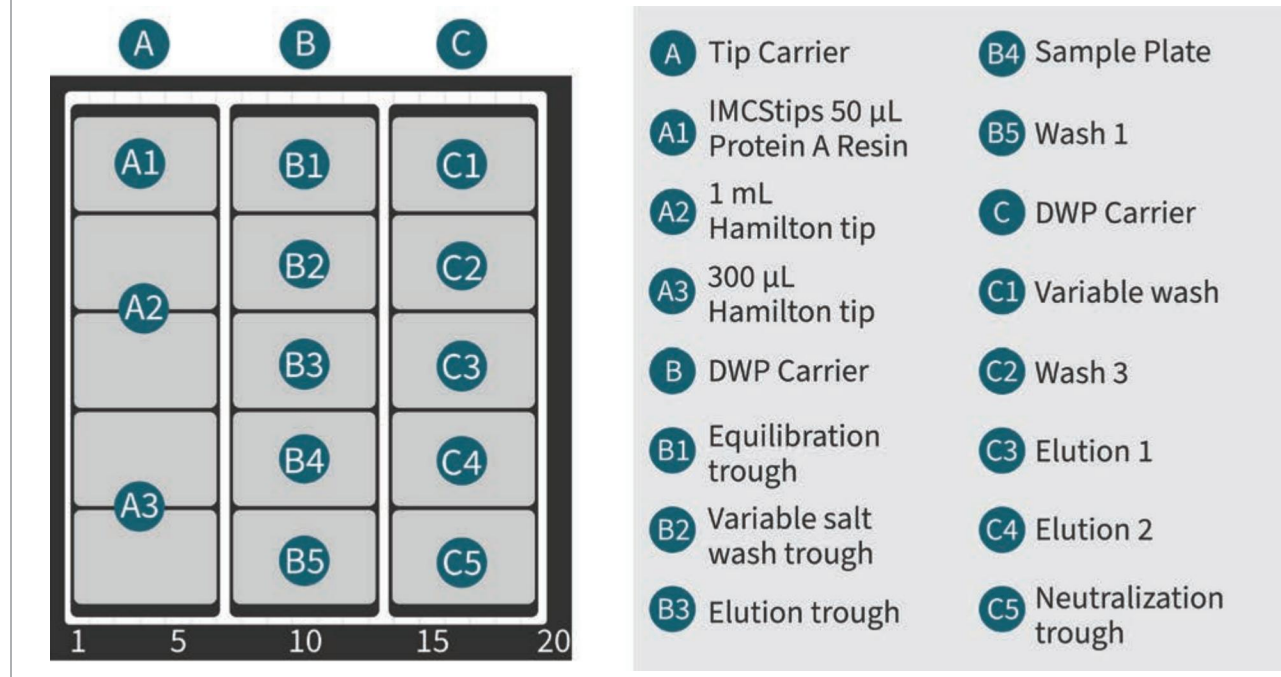
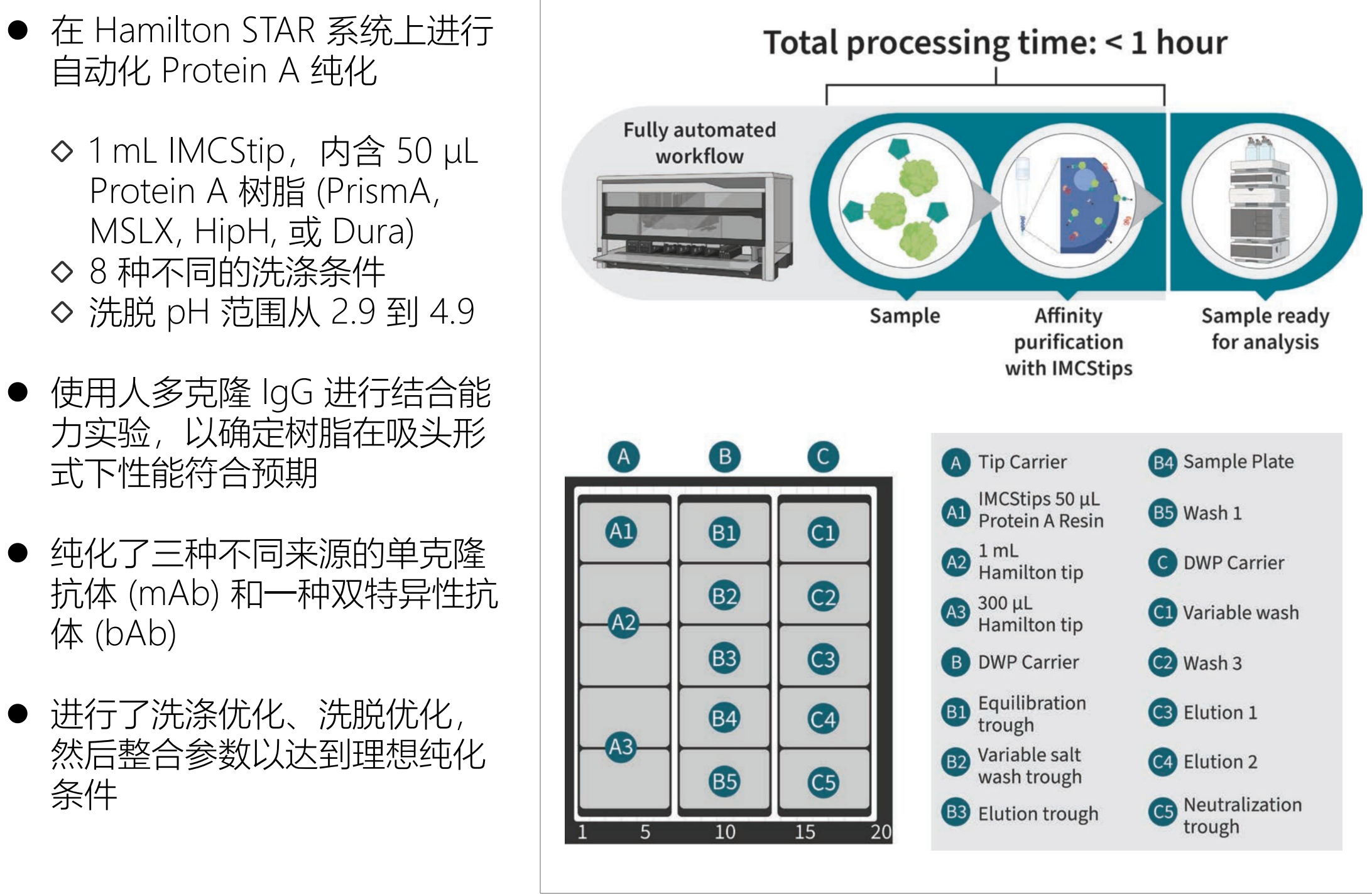


图 2: 在 Hamilton STAR 平台上使用 IMCStips 进行自动化蛋白纯化的样品板布局示意图

- 使用以下方法分析纯化后的抗体样品的回收率、单体百分比和 HCP 含量：
 - ◇ HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies)
 - ◇ 使用 NanoDrop 或 Molecular Devices 酶标仪测量 A280
 - ◇ SDS-PAGE
 - ◇ 尺寸排阻色谱法 (SEC)

结果

结合曲线

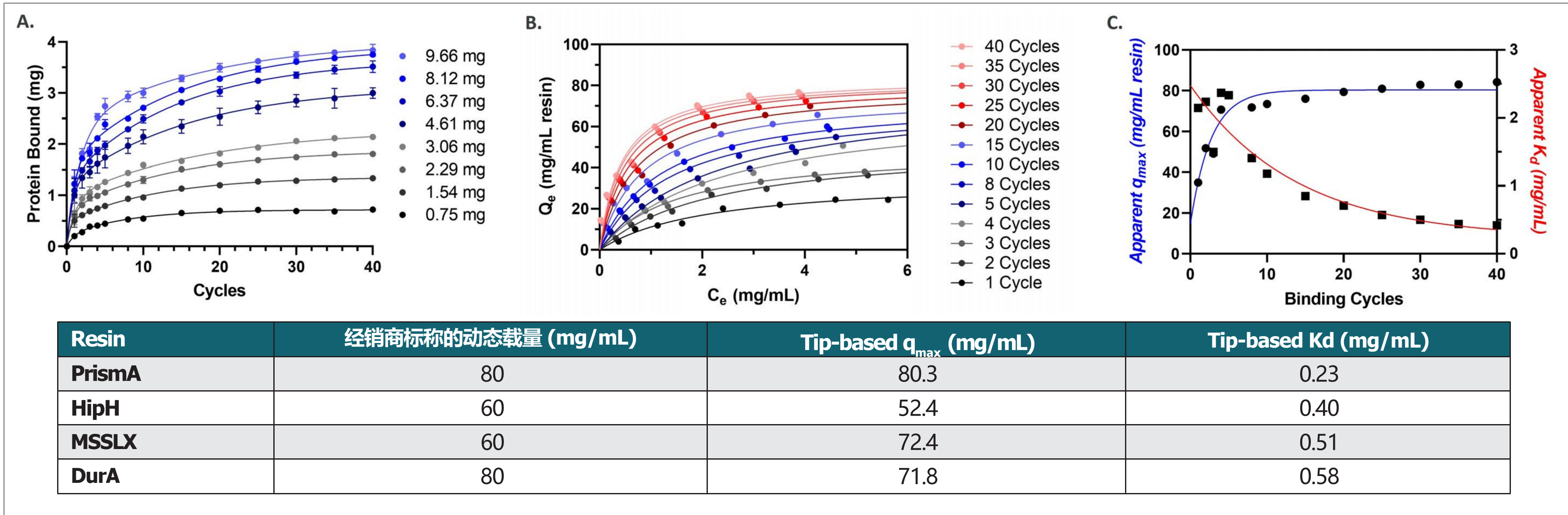


图 3: Prisma (50 µL) 与人多克隆 IgG 的结合数据。A. 通过计算一系列初始蛋白量下每个结合循环后的差值来确定结合动力学。B. 将结合数据转换为朗缪尔吸附等温线，以展示作为溶液中游离蛋白 (C₀) 函数的树脂结合能力 (q₀)。C. 绘制每个结合循环的 Q 值和 K_d 值，以获得无限结合循环下的理论结合能力。

洗涤条件优化中的宿主蛋白去除(bsAb,双特异性抗体)

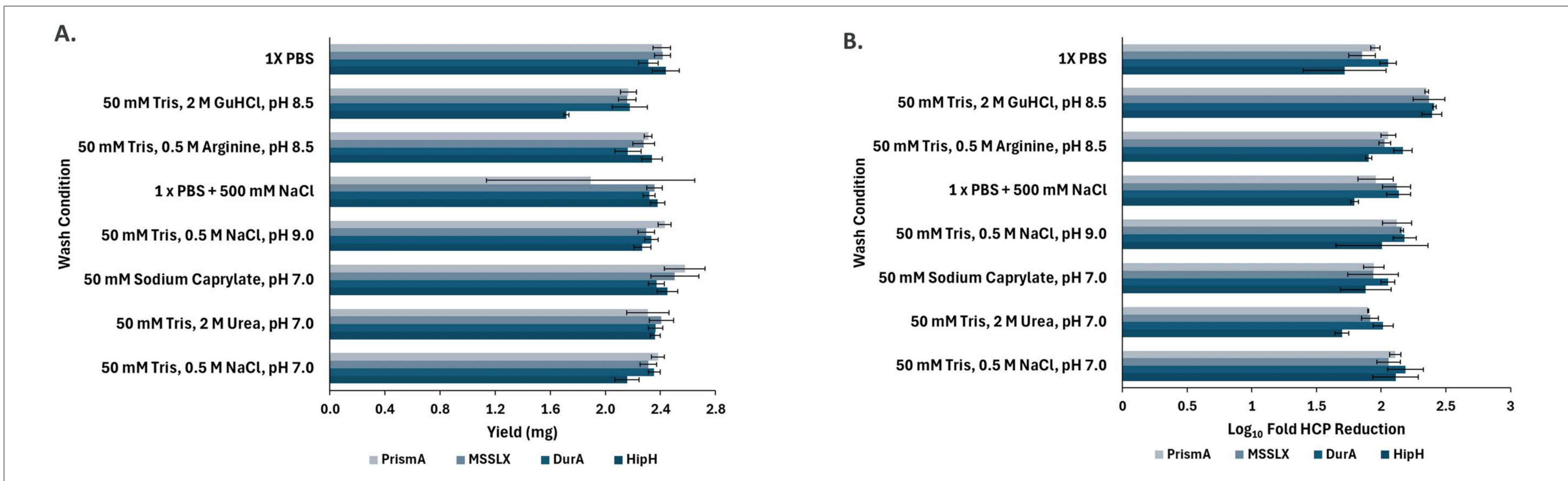


图 4: 纯化双特异性抗体 (滴度 3.4 mg/mL) 的洗涤优化示例。A. 不同洗涤条件下的产量对比。B. 使用不同洗涤条件对宿主细胞蛋白 (HCP) 去除效果的影响。使用 pH 2.9 的 100 mM 醋酸盐缓冲液从吸头中洗脱样品。

洗脱条件优化

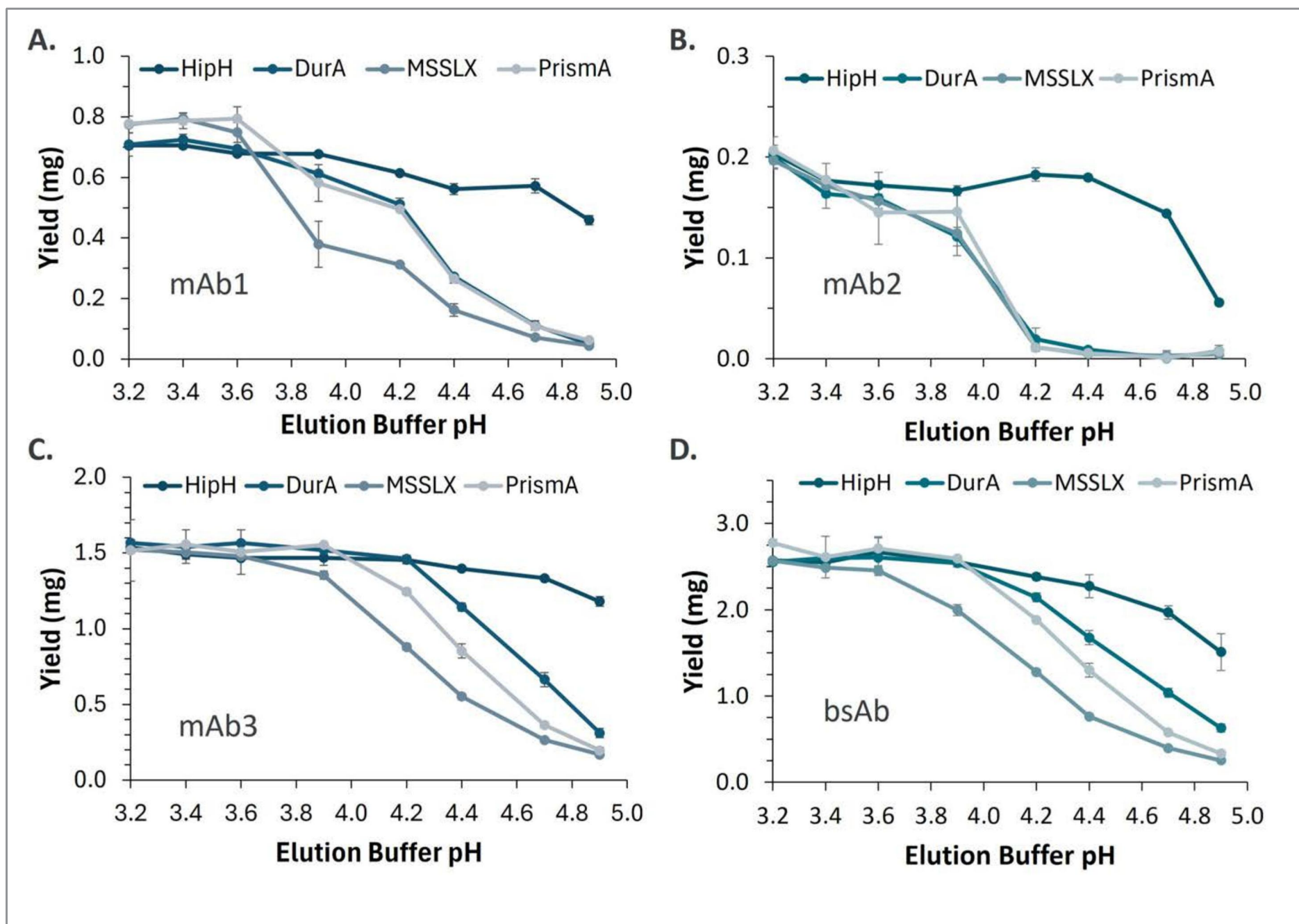


图 5: 四种树脂在 pH 范围内对四种不同抗体的洗脱优化。A. mAb2, C. mAb3, 和 D. bAb。

洗脱优化中的聚集体分析

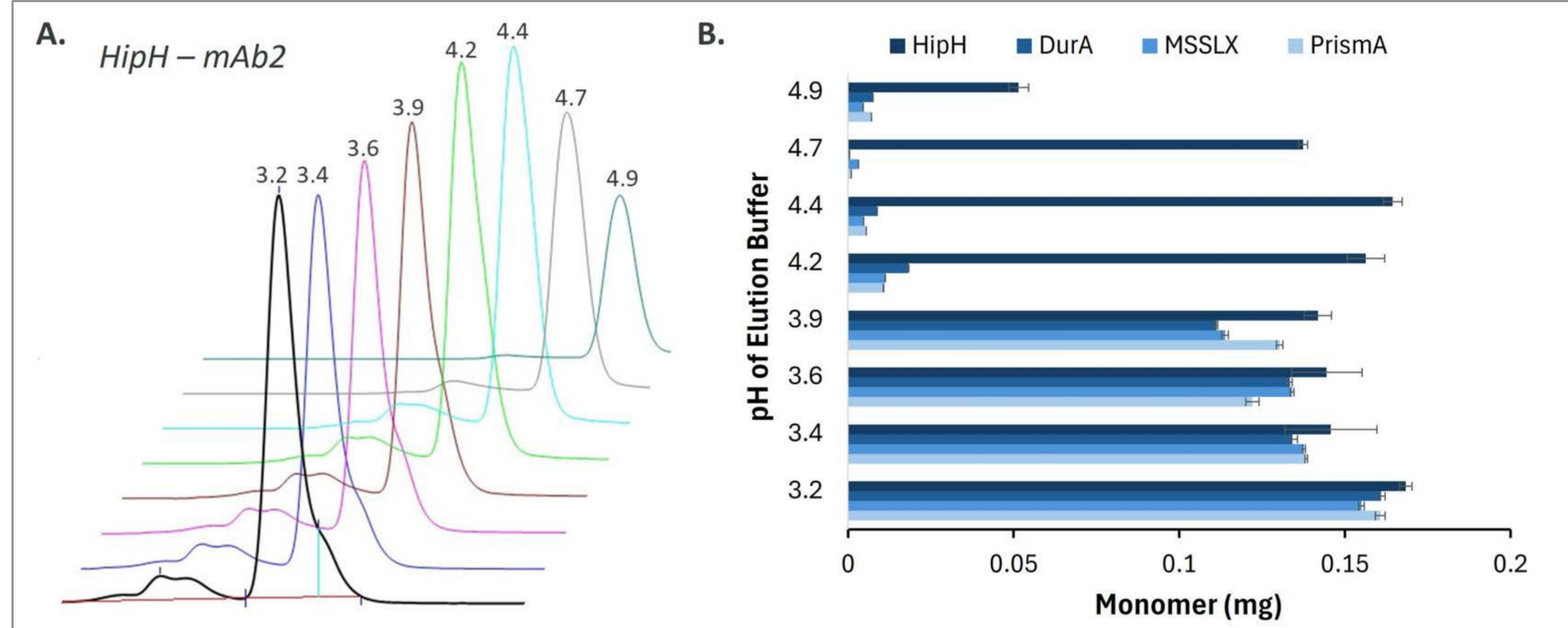


图 7: 不同 pH 值洗脱缓冲液下双特异性抗体的聚集体分析。A. 使用 HipH 树脂纯化双特异性抗体时，不同 pH 值 (3.2-4.9) 下的 SEC 层析图谱。B. 针对四种被测树脂，在不同 pH 值下纯化得到的单体量。

HipH	3.2	3.4	3.6	3.9	4.2	4.4	4.7	4.9
Monomer %	83 ± 0.3	83 ± 0.4	84 ± 0.3	85 ± 1.1	86 ± 0.5	92 ± 0.2	95 ± 0.2	92 ± 2.5
HMW %	10 ± 0.3	10 ± 0.2	9.9 ± 0.1	9.9 ± 0.1	9.2 ± 0.1	8.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2

表 2: 使用 HipH 树脂纯化双特异性抗体时，不同 pH 洗脱条件下单体与高分子量片段的分布。

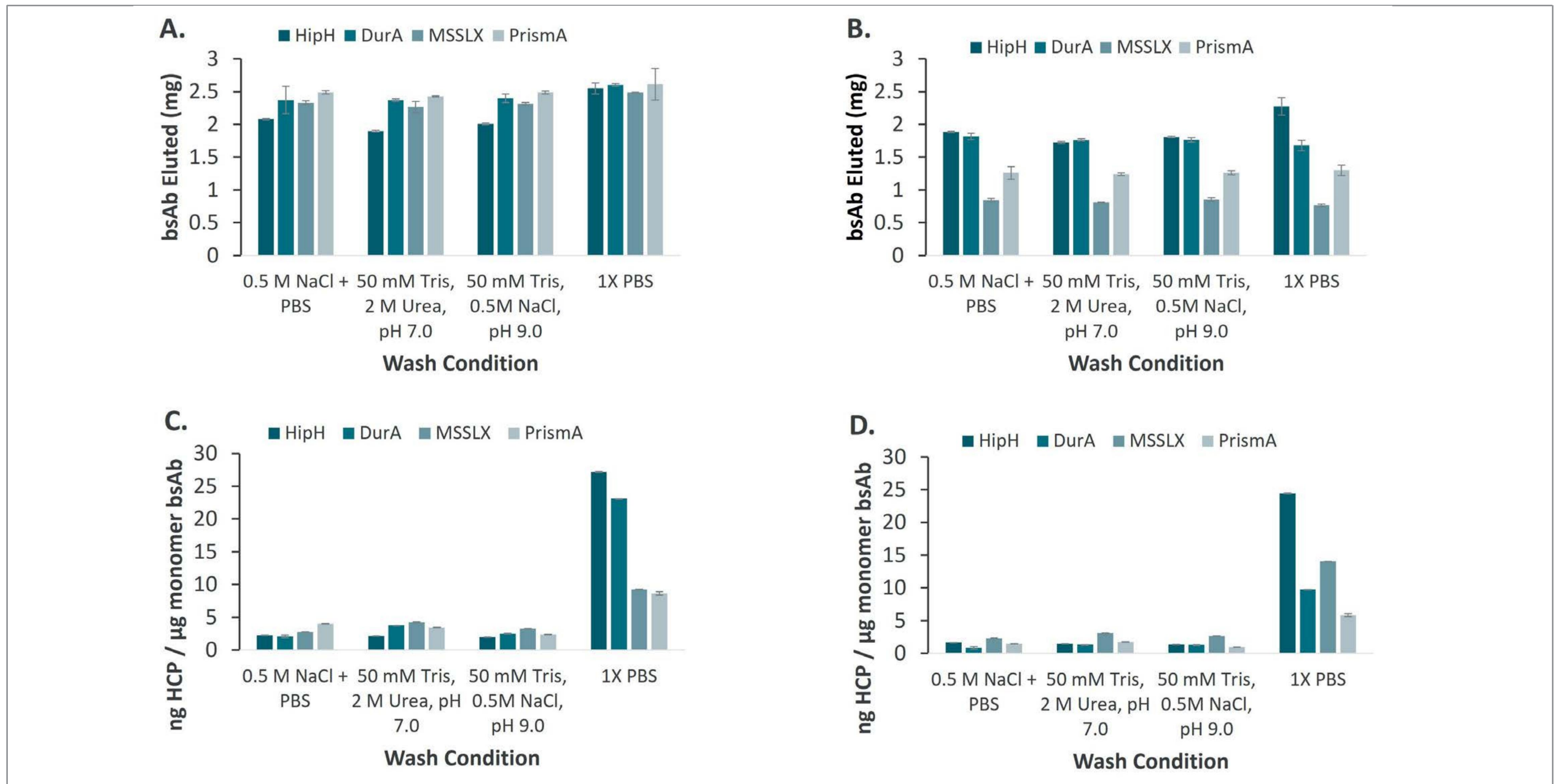


图 8: 方法参数的优化带来了相较于初始条件的性能提升。A. 在 pH 3.4 的洗脱条件下，使用四种不同洗涤条件，所有树脂对双特异性抗体的总产量比较。B. 在 pH 4.4 的洗脱条件下，使用四种不同洗涤条件，所有树脂对双特异性抗体的总产量比较。C. 在 pH 3.4 洗脱条件下，每微克双特异性抗体单体中所含宿主细胞蛋白量的比较。D. 在 pH 4.4 洗脱条件下，每微克双特异性抗体单体中所含宿主细胞蛋白量的比较。

结论

- 在 Hamilton STAR 平台上建立的自动化方法，使用 IMCStips 可在 60 分钟内完成 96 个样品的纯化。
- 该纯化方法可作为筛选工具，用于确定目标抗体的最佳树脂、洗涤和洗脱条件。
- MabSelect™ Prisma 和 Purolite™ Dura™ 具有最高的结合载量。
- 使用四种含有单克隆抗体的不同细胞上清液样品：
 - 在低滴度条件下，所有树脂在低 pH 洗脱中表现相似。
 - 在高滴度条件下，Prisma 和 DuraA 在低 pH 洗脱中表现出更有效的结合能力。
 - HipH 在高 pH 洗脱中被证明是最有效的树脂。

- 关于 pH 洗脱条件：
 - 随着洗脱 pH 的升高，四种被测抗体的单体百分比呈增加趋势。
 - 将较高的洗脱 pH 条件与有利的洗涤条件相结合，可使洗脱产物中单位单体的宿主细胞蛋白含量最大程度地降低。

- 本实验中测试的所有抗体表现均不相同，这表明筛选更优的洗涤、洗脱条件以及所用树脂是有价值的。

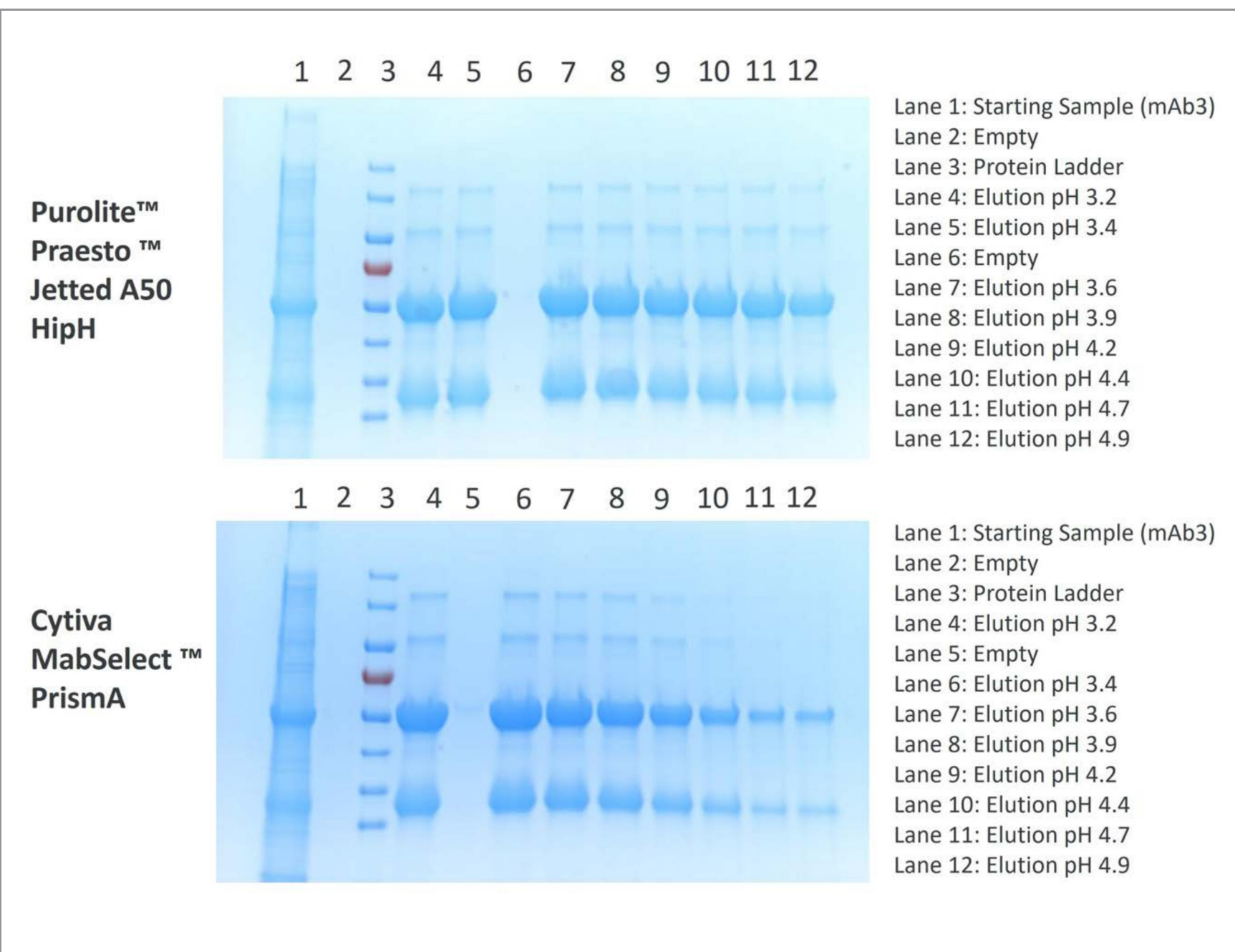


图 6: 通过 SDS-PAGE 比较 HipH 和 Prisma 对 mAb3 的回收率和纯度。