基于 protein A 纯化的树脂筛选、清洗参数与洗脱参数自动化优化

Patrick A. Kates[1] ● **Gracie K. Anderson**[1,2] ● **Penny Hamlyn**[3] ● **Mark Hicks**[3] ● **L. Andrew Lee**[1]

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

引言

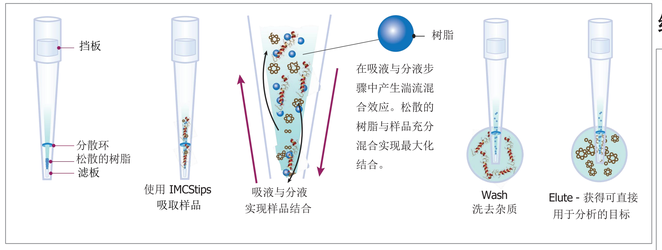


图 1：含有松散树脂的 IMCStips® 采用分散式固相萃取（dSPE）技术实现高效自动化提取

- 优化蛋白质纯化流程对获得高回收率、高纯度和高单体占比至关重要
- 优化过程耗时较长
- 需综合考虑以下变量：
  - 树脂类型
  - 树脂结合载量
  - 洗脱/清洗条件
- 本研究使用 IMCStips 对四种抗体样本进行纯化，并采用四种商用树脂进行优化：
  - MabSelect PrismA™ (PrismA)
  - Praesto™ JettedA50 HipH (HipH)
  - MabSelect SuRe™ LX (MSSLX)
  - Purolite™ DurA™ Cycle A50 (DurA)
- 在 Hamilton Microlab STAR 平台上使用 Hamilton 吸头实现全自动抗体纯化

方法

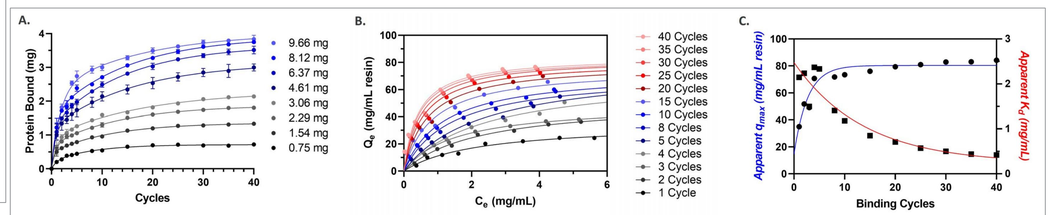
- 在 Hamilton STAR 系统上实现自动化 Protein A 纯化
  - 使用装载 50 µL Protein A 树脂的1 mL IMCStip（树脂类型：PrismA、MSSLX、HipH或DurA）
  - 采用 8 种不同清洗条件
  - 设置 2.9~4.9 的梯度洗脱 pH 范围
- 通过多克隆 Human IgG 结合载量实验验证树脂在吸头格式中的预期性能
- 纯化三种不同来源的单抗与一种双特异性抗体
- 依次进行清洗优化、洗脱优化及参数组合优化以获得理想纯化条件

图 2：Hamilton STAR 平台使用 IMCStips 进行自动化蛋白纯化的台面布局

- 通过以下方法分析纯化后抗体的回收率、单体占比和宿主细胞蛋白（HCP）含量：
  - HCP ELISA 检测试剂盒（Cygnus Technologies）
  - NanoDrop 或 Molecular Devices 酶标仪 $Abs_{280\ nm}$ 检测
  - SDS-PAGE 电泳
  - 尺寸排阻色谱（SEC）

结果

结合曲线



Resin	Manufacturer's DBC (mg/mL)	Tip-based q_{max} (mg/mL)	Tip-based K_d (mg/mL)
PrismA	80	80.3	0.23
HipH	60	52.4	0.40
MSSLX	60	72.4	0.51
DurA	80	71.8	0.58

图 3：PrismA 树脂（50 µL）与多克隆 Human IgG 的结合数据
A.通过不同初始蛋白量结合循环后的差值计算确定结合动力学
B. 将结合数据转换为 Langmuir 等温线，展示树脂载量（Q_e）与溶液中游离蛋白（C_e）的函数关系
C. 绘制每个结合循环的 Q 值与 K_d 值，获得无限循环下的理论结合载量

清洗条件的优化与 HCP 去除率 (双特异性抗体 bsAb)

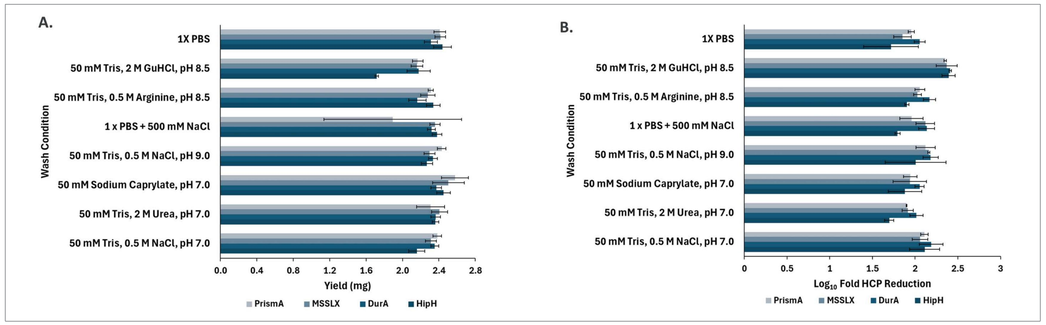


图 4：双特异性抗体（滴度3.4 mg/mL）纯化中清洗条件优化示例 （使用 pH 2.9 的100 mM 醋酸缓冲液进行洗脱）
A. 不同清洗条件下的得率对比　　B. 采用不同清洗条件对宿主细胞蛋白（HCP）的去除效果

洗脱条件优化

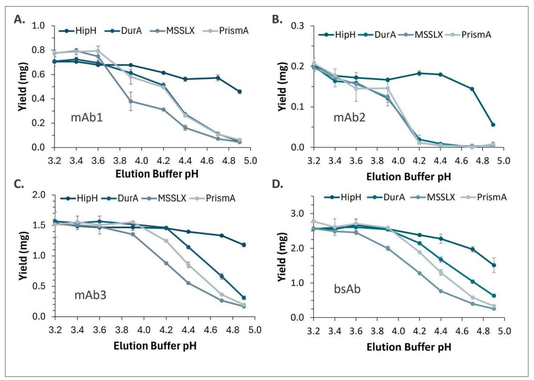


图 5：四种树脂在不同pH条件下对四种抗体的洗脱优化
A. mAb1　　B. mAb2　　C. mAb3　　D. bsAb

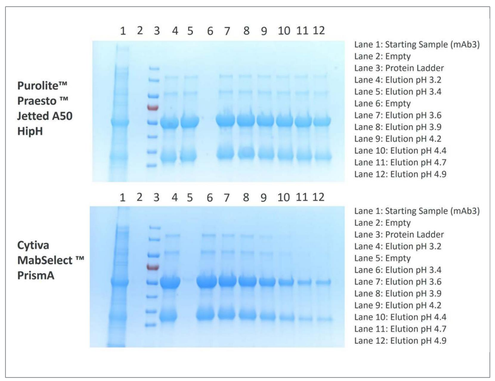


图 6：通过 SDS-PAGE 比较 HipH 和 PrismA 纯化 mAb3 的回收率与纯度

洗脱条件优化及聚集体分析

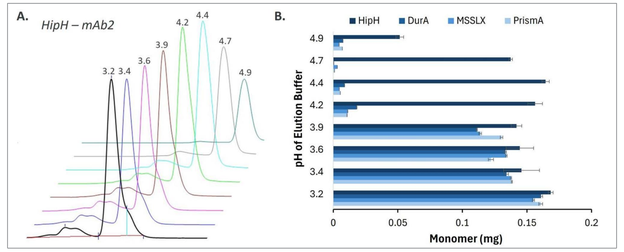


图 7：不同 pH 洗脱缓冲液中 bsAb 的聚集体分析
A. 使用 HipH 树脂纯化 bsAb 时不同 pH 值（3.2~4.9）的 SEC 谱图
B. 四种树脂在不同 pH 条件下纯化所得单体的含量

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 bsAb 时不同 pH 洗脱条件下的单体与高分子量片段（HMW）分布

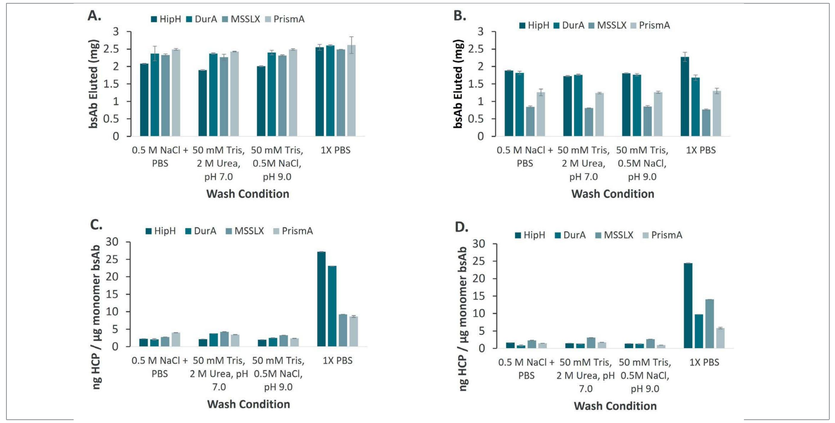


图 8：方法参数优化显著提升了纯化性能
A. 所有树脂在 pH3.4 洗脱时采用四种清洗条件对 bsAb 总得率的比较
B. 所有树脂在 pH4.4 洗脱时采用四种清洗条件对 bsAb 总得率的比较
C. 各树脂在 pH3.4 洗脱时每 µg bsAb 单体的 HCP 含量对比
D. 各树脂在 pH4.4 洗脱时每 µg bsAb 单体的 HCP 含量对比

结论

- 基于 Hamilton STAR 建立的自动化方法结合 IMCStips 可在60分钟内完成 96 个样本的纯化
- 该纯化方案可作为筛选工具，确定目标抗体最佳树脂类型、清洗与洗脱条件
- MabSelect™ PrismA 和 Purolite™ DurA™ 具有最高结合载量
- 使用四种含单抗的细胞上清样本发现：
  - 低滴度时，所有树脂在低 pH 洗脱条件下表现相近
  - 高滴度时，PrismA 和 DurA 在低 pH 洗脱中展现更优结合效能
  - HipH 在高 pH 洗脱条件下效果最佳
- 不同 pH 的洗脱液的影响：
  - 四种测试抗体的单体百分比随洗脱 pH 升高而增加
  - 高 pH 洗脱结合优化清洗条件可最大程度降低每单体物质的 HCP 含量
- 本实验所有抗体均呈现独特行为特征，表明筛选优化清洗/洗脱条件及树脂类型的必要性

imcs
integrated micro-chromatography systems