基于 Tecan Fluent 平台的 IMCStip 比较 Protein A 纯化：树脂类型与洗脱 pH 对抗体聚集的影响

Todd Mullis[1] • **Patrick Kates**[1] • **Gracie Anderson**[1,2] • **L. Andrew Lee**[1]

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

Contact: inquiries@imcstips.com

引言

• 蛋白质纯化工艺的优化对获得高回收率、高纯度及高单体占比至关重要。该优化过程通常耗时且需人工操作，需综合考虑以下变量：

- 树脂类型
- 树脂结合载量
- Wash / Elution 条件

- 本研究采用 IMCStips 移液吸头对两种抗体样本进行纯化。在纯化优化过程中使用了两种商用树脂:
  - MabSelect™ PrismA: 具有行业标准的高载量和高特异性
  - Praesto™ JettedA50 HipH: 以实现更高 pH 值洗脱而著称
- 在 Tecan Fluent 平台上实现全自动抗体纯化与缓冲液更换的 IMCStip 技术应用
- 主要发现:
  - pH 值影响：在 pH 3.6 时回收率相当；pH 3.9~4.5 条件下 Praesto™ Jetted A50 HipH 较 MabSelect™ PrismA 具有更高回收率
  - 单体占比：存在树脂特异性及 pH 特异性的差异化影响

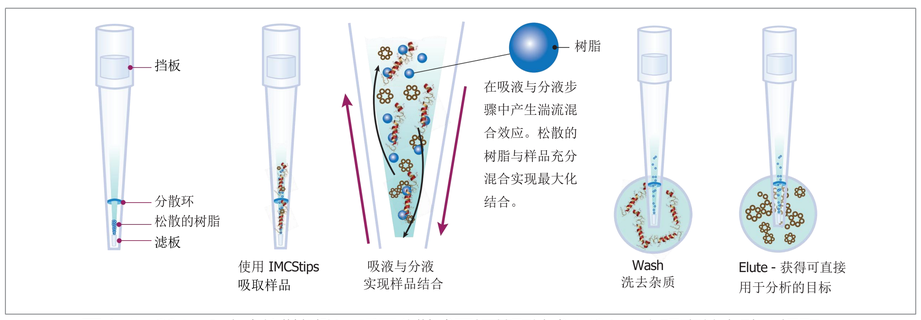


图 1: IMCStips® 内含松散树脂，采用分散式固相萃取技术（dSPE）实现高效自动化提取

METHODS

- 在 Tecan Fluent 系统上实现全自动 Protein A 纯化与缓冲液置换
  - 1 mL Protein A Tecan IMCStip
    - 25 µL MabSelect™ PrismA
    - 25 µL Praesto™ JettedA50 HipH
  - 1 mL SizeX$_{150}$ Tecan IMCStip
- 通过 MabSelect™ PrismA 与 Praesto™ JettedA50 HipH 从澄清细胞培养上清液中捕获单克隆抗体
- 洗脱 pH 梯度： 2.9 ~ 4.9
- 采用以下方法分析纯化后抗体的回收率与单体占比:
  - 280 nm 紫外吸收检测
  - SDS-PAGE 电泳
  - 尺寸排阻色谱（SEC）

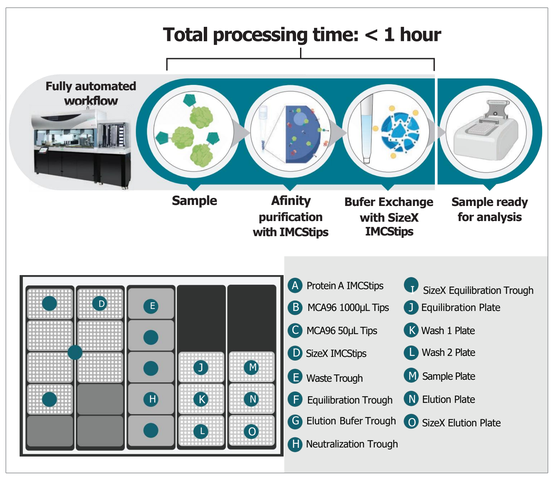


图 2：Tecan Fluent 工作站样品盘布局示意图（展示使用 IMCStip 实现 96 个样本全自动蛋白纯化及后续缓冲液更换的标准化操作流程）

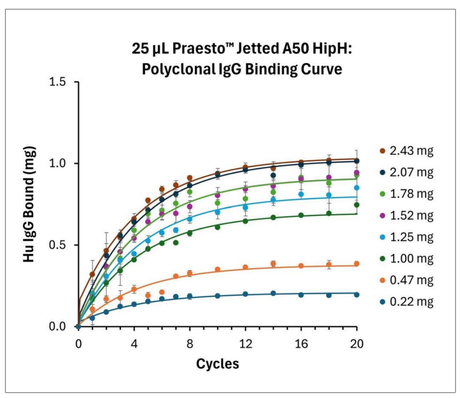


图 3: 25 µL HipH (1 mL Tecan IMCStips) 结合动力学曲线

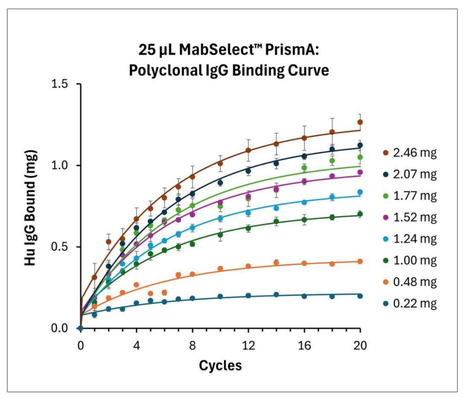


图 4: 25 µL PrismA (1 mL Tecan IMCStips) 结合动力学曲线

MabSelect™ PrismA 与 Praesto™ JettedA50 HipH: 回收率比较

MabSelect™ PrismA v Praesto™ Jetted A50 HipH: mAb			
Resin Type	Elution pH	Total Protein, µg	Monomer Percentage, %
MabSelect™ PrismA	2.9	181.2	97%
MabSelect™ PrismA	3.2	176.4	98%
MabSelect™ PrismA	3.4	176.3	98%
MabSelect™ PrismA	3.6	167.7	99%
MabSelect™ PrismA	3.9	53.3	100%
MabSelect™ PrismA	4.2	2.3	100%
MabSelect™ PrismA	4.4	4.6	N/A
MabSelect™ PrismA	4.7	0.0	N/A
MabSelect™ PrismA	4.9	0.0	N/A
Praesto™ Jetted A50 HipH	2.9	164.0	98%
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.2	169.8	98%
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.4	167.6	98%
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.6	170.0	99%
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.9	159.5	100%
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.2	143.7	100%
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.4	109.6	100%
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.7	77.9	100%
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.9	22.4	100%

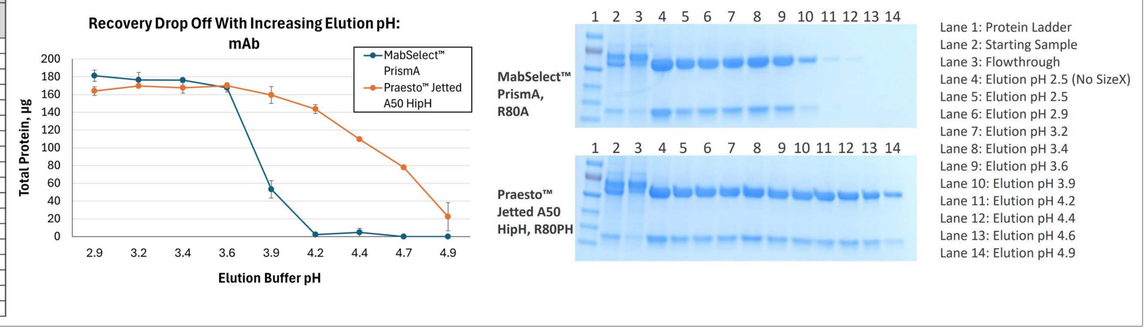


图 5: 不同 pH 值的洗脱缓冲液下 MabSelect™ PrismA 与 Praesto™ JettedA50 HipH 回收率对比（使用细胞培养上清液表达的**单克隆抗体**进行纯化实验）

Recovery With Increasing Elution pH: Bispecific mAb			
Resin Type	Elution pH	Total Protein, µg	Monomer Percentage, %
MabSelect™ PrismA	2.9	828.0	90.2
MabSelect™ PrismA	3.2	846.9	89.8
MabSelect™ PrismA	3.4	764.7	90.3
MabSelect™ PrismA	3.6	809.9	90.3
MabSelect™ PrismA	3.9	760.7	92.5
MabSelect™ PrismA	4.2	503.9	95.8
MabSelect™ PrismA	4.4	343.2	97.9
MabSelect™ PrismA	4.7	172.8	98.8
MabSelect™ PrismA	4.9	92.6	98.9
Praesto™ Jetted A50 HipH	2.9	701.8	87.9
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.2	673.5	87.6
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.4	616.7	87.6
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.6	624.2	88.5
Praesto™ Jetted A50 HipH	3.9	645.5	89.0
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.2	589.0	89.9
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.4	543.2	91.9
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.7	537.7	92.8
Praesto™ Jetted A50 HipH	4.9	394.2	94.2

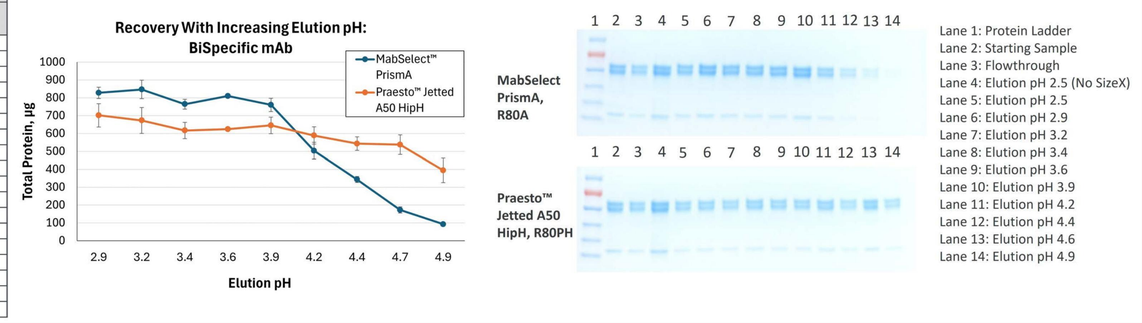


图 6: 不同 pH 值的洗脱缓冲液下 MabSelect™ PrismA 与 Praesto™ JettedA50 HipH 回收率对比（使用细胞培养上清液表达的**双特异性单克隆抗体**进行纯化实验）

mAb: MabSelect™ PrismA

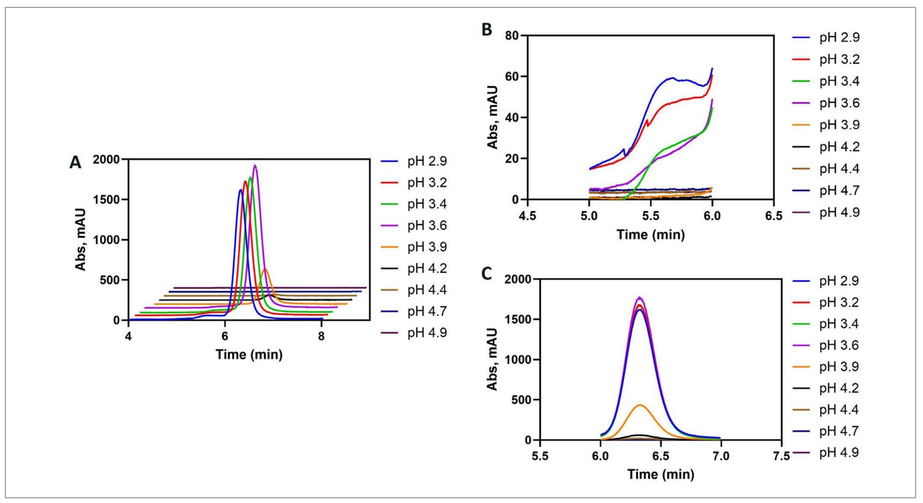


图 7: 不同 pH 条件下 MabSelect™ PrismA 纯化的单克隆抗体的色谱对比
A) 全色谱图 B) 聚合体峰 C) 单体峰

mAb: Praesto™ JettedA50 HipH

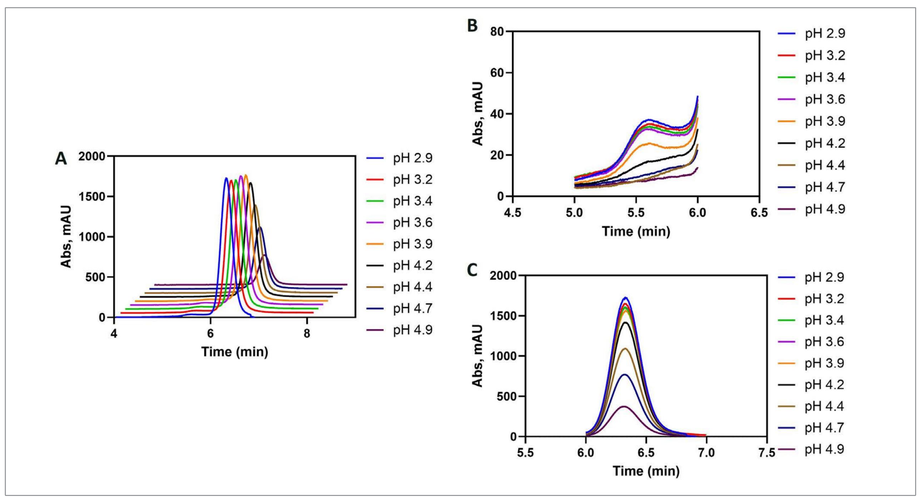


图 8: 不同 pH 条件下 Praesto™ JettedA50 HipH 纯化的单克隆抗体的色谱对比
A) 全色谱图 B) 聚合体峰 C) 单体峰

结果

- 在 Tecan Fluent 平台建立的自动化方法可在 60 分钟内完成 96 个样本的纯化与缓冲液更换
- MabSelect™ PrismA 比 Praesto™ JettedA50 HipH 具有更高的结合载量
- 使用两种含单克隆抗体的细胞上清样本进行测试:
  - 两种树脂在低 pH 值范围内均能实现相近的回收率
  - 在 pH3.6 以下时得率相当
- 低 pH 洗脱条件下:
  - 即使在同一洗脱 pH 下，两种测试抗体的单体百分比仍显著受树脂类型影响
  - 随着 pH 值升高，单体百分比相应增加
- 高 pH 洗脱条件（3.9及以上）:
  - Praesto™ Jetted A50 HipH 树脂可显著提高回收率

结论

- IMCStip 技术可实现高效的蛋白纯化工艺优化，简化树脂类型、结合载量和洗脱条件的测试流程
  - 传统方法（如 FPLC）需要更长的人工操作时间
- 实验数据表明回收率与单体含量受以下因素影响:
  - 纯化所用树脂的特异性
  - 洗脱 pH 值
- 本研究为抗体纯化筛选策略的自动化与优化奠定基础，有望同步提升得率与单体含量

imcs integrated micro-chromatography systems