

第五十六期 电子期刊

新型高载，耐碱型

rProtein A HC-650F 亲和层析填料

2013年10月

HIGH
QUALITY
EXPERIENCE

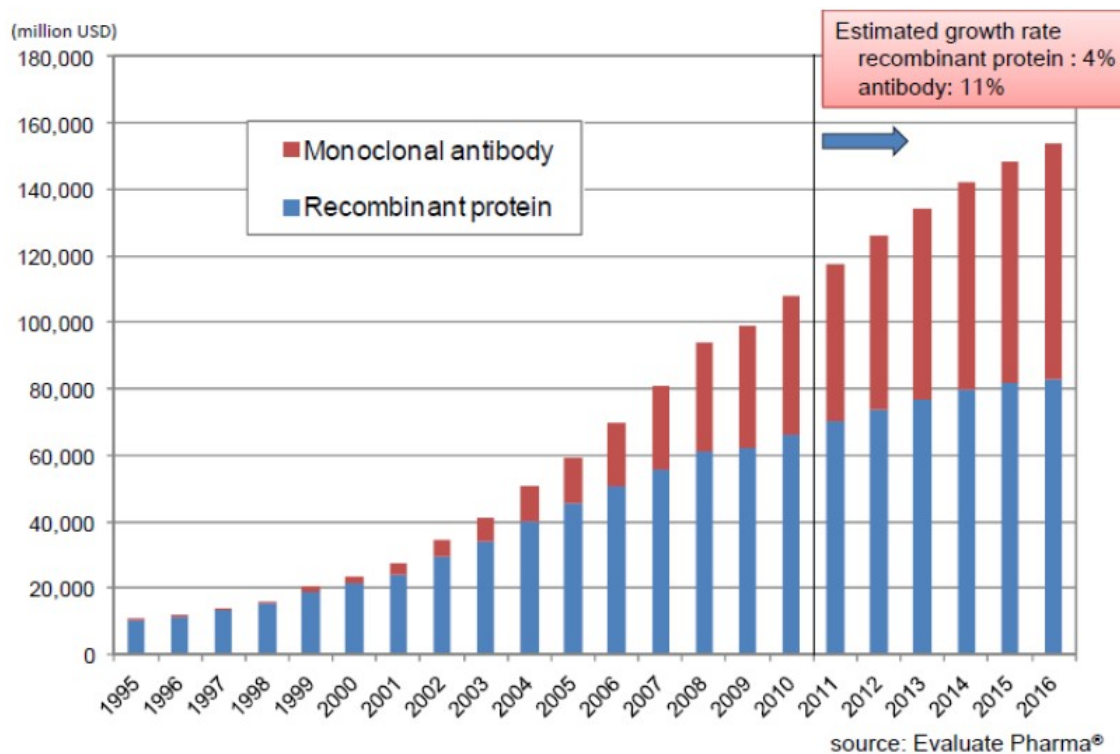


新型高载量，耐碱型 AF-rProtein A HC-650F 亲和层析填料

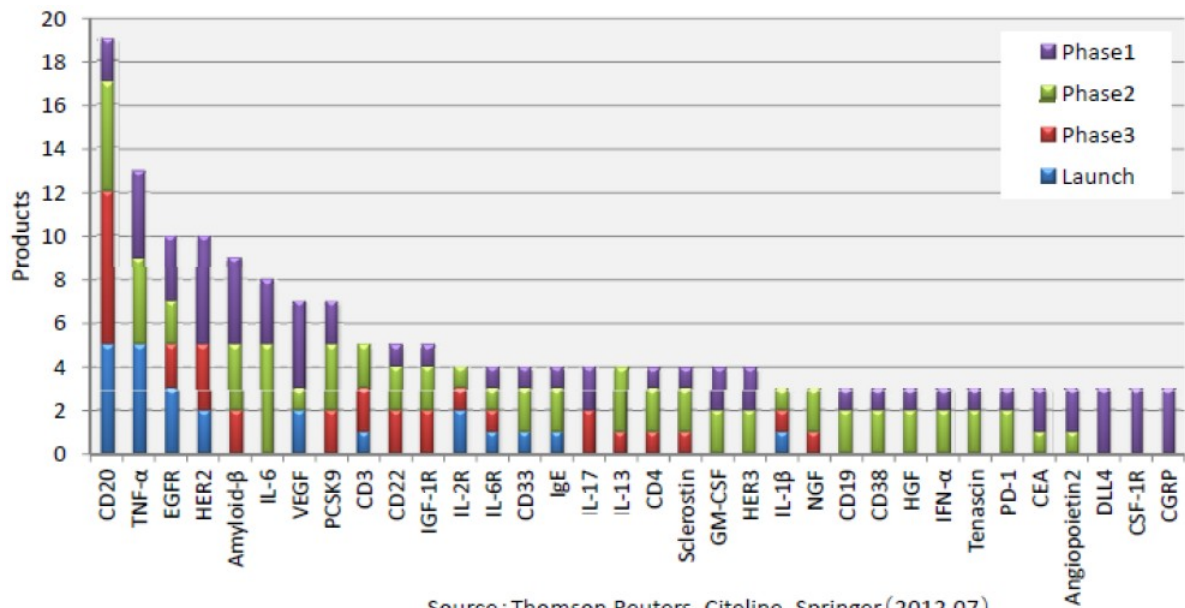
抗体药物主要针对癌症、免疫性疾病，作用机制明确、副作用相对较少，同时也是医药行业中高技术含量、高附加值、高门槛的产品类群。抗体药物具有靶向性，直接与目标特异结合，这一特点在其他药物很难实现；同时药物副作用小，在临床上具有广阔的应用前景，目前主要用于肿瘤、自身免疫等疾病的治疗。

近年来，抗体药物在生物制药领域占有愈来愈重要的地位，全球市场销售总额超过 500 亿美元，年均增长率超过 20%。抗体药物正呈现朝气蓬勃的发展态势。而随着生命科学技术的迅速发展，抗体药物必将成为未来 10 年国际生物医药领域开发的热点。专家预计，抗体药物产业正高速发展，到 2014 年全球抗体药物年销售额将突破 1000 亿美元。近年来，中国的单抗技术也受到世界越来越多的关注和重视，抗体药物在中国市场保持了 50% 的年均增长率，单抗药物研发也已被列入国家重点攻关项目。

抗体药物在生物医药品市场中的增长



共 400 种目标产物，针对 174 种单抗和 34 种抗原



一、单抗药物在生产中的问题及解决

1986年，美国FDA批准了第一个单克隆抗体药物上市，距今已经20多年了。在经历了20年的发展历程，目前已取得了巨大成功，但仍存着许多难以克服的问题。

1. 抗体靶抗原的不确定性，以及抗体自身的抗原性是主要问题之一。由于人们对很多存在于靶细胞和组织上的靶抗原的确切分布和功能并不完全了解，从而出现临床应用的很多不确定性，由此产生安全问题。这一点在免疫疾病的抗体治疗中表现的尤为突出。
2. 抗体药物开发的第二个障碍是生产成本过高，以至成为“富贵药”。成本是抗体药物生产的一个瓶颈问题，同时也成为决定抗体药物未来发展的一个关键问题。

针对以上问题，可以通过改善制造工艺和优化抗体分子两方面来降低成本。

1. 改善制造工艺

- 细胞培养过程中滴度的提升，大量培养技术
- 原料的改进：原核生物，动物细胞，转基因动植物
- 色谱法的制造工艺：高吸附、高选择性、高速处理、一次性使用
- 非色谱法技术：选择沉淀法

2. 优化抗体分子

- Recycling抗体（回收利用抗体），Sweeping抗体（筛选抗体），双特异性抗体，POTELLIGENT抗体（用于增强部分KaloBios治疗性抗体的ADDC[抗体依赖细胞的细胞

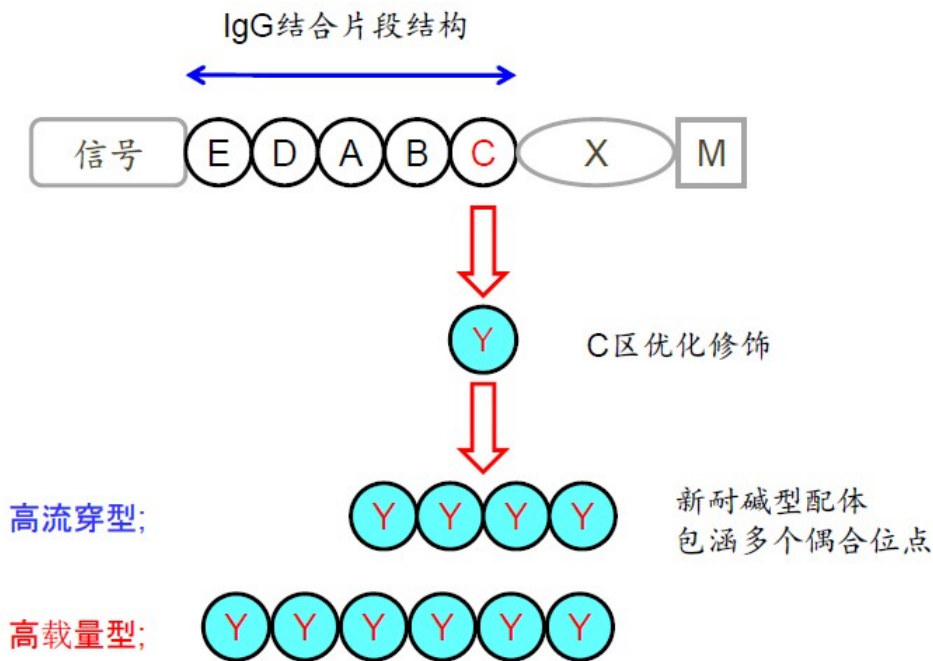
毒性]

- 单体，抗体片段，抗体·抗原复合体(ADC)
- DDS技术（数字化技术），PEG化（聚乙二醇修饰）

二、Protein A

Protein A 是一种金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白质，能特异性地与人和哺乳动物抗体（主要是 IgG）的 Fc 区结合。因而，将 Protein A 与层析介质以一定的方式结合，可制备用于抗体纯化的亲和填料。

早期的 Protein A 柱结合的都是天然 Protein A。天然 Protein A 由 5 个 IgG 结合域和其它未知功能的非 Fc 结合域组成，分子量约 42KDa，结构如下图所示。这种柱子对 IgG 的亲和能力很强，可以吸附大量的 IgG。但同时，天然 Protein A 的其他非结合域会和非目标蛋白结合，这样被洗脱下来的蛋白质纯度不够，会影响到后续的试验。



三、新一代 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料

1. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料特点

新一代 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料是单抗纯化用的高载量的 Protein A 填料，比其他高载量 Protein A 填料更高的动态吸附载量。其特点如下：

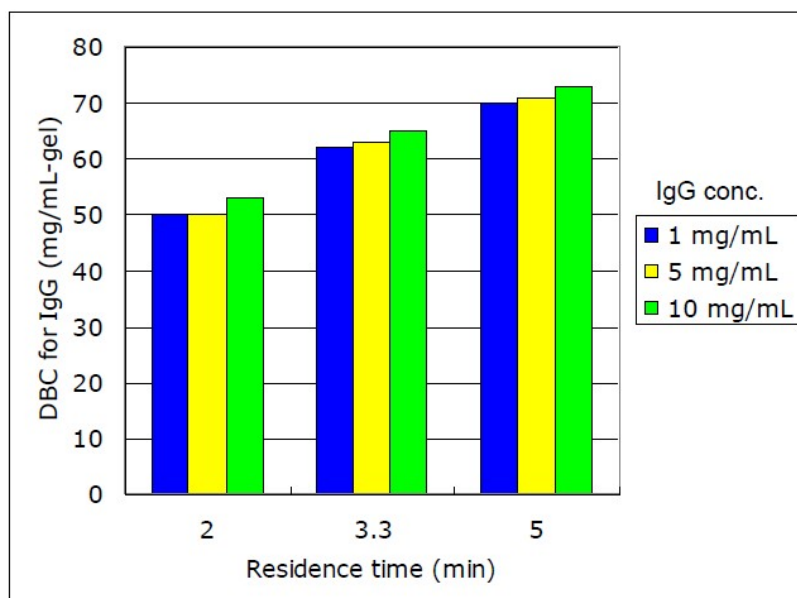
1) 高吸附载量

- 在保留时间为5分钟时，对IgG的动态吸附载量达到70g/L
- 在保留时间为2分钟时，对IgG的动态吸附载量为50g/L
- 适用于10g/L的高滴度IgG

2) 耐碱性/高化学稳定性

- 可以使用0.1 mol/L NaOH在位清洗 (CIP) 200次以上
- 可以使用0.1 mol/L, 0.5 mol/L NaOH、乙醇、尿素等进行简单清洗
- 能够在生产现场和室温下保存
- 能在大型色谱柱中使用
- TOYOPEARL系列填料可以适用于上百升柱体积的层析柱中
- 填料成本降低
- 在初步筛选和大规模工艺中实现更低的价格

下图是TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F在不同保留时间下对IgG的动态吸附载量。



层析柱：TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D.×5 cm)

IgG 溶液：1,5,10 g/L in 0.02 mol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.15 mol/L NaCl

保留时间：2、3.5、5 min

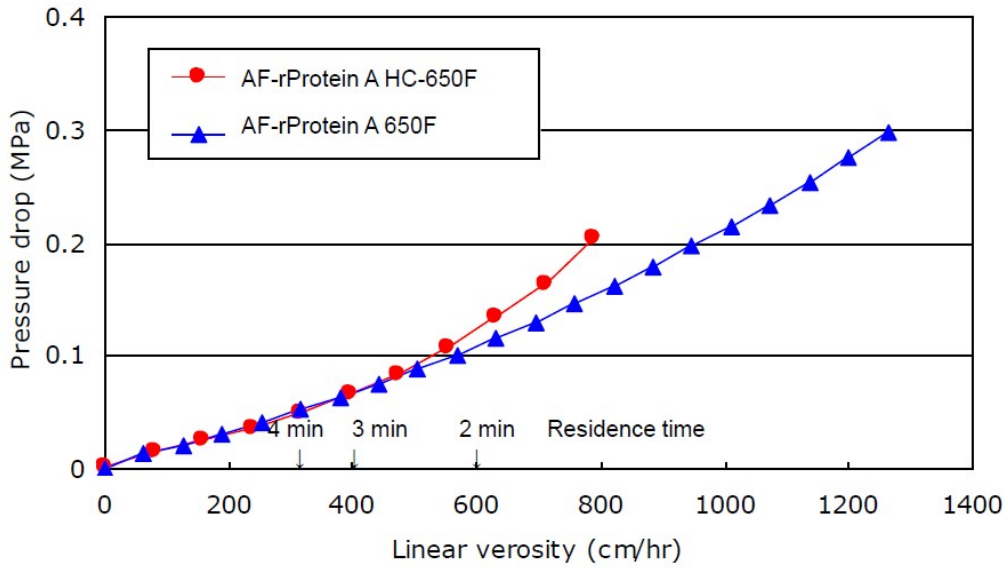
检测器：UV (280 nm)

DBC 通过 10%的穿透曲线计算而得

地址：北京市昌平区回龙观西大街118号龙冠置业大厦609室 电话：010-59812370/1/2/3

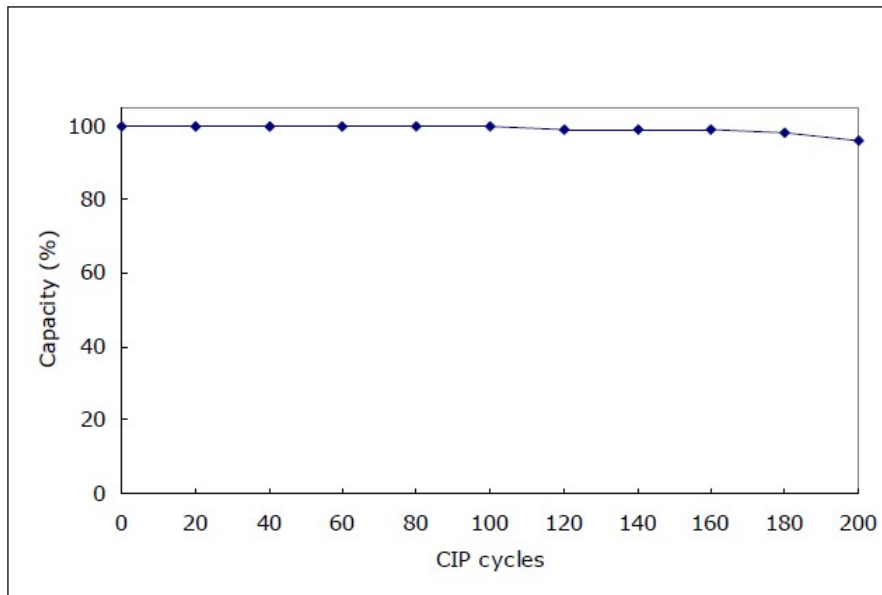
网址：www.prep-hplc.com 全国统一免费热线：4008-111-326

2 填料刚性。填料的压力/流速曲线如下图。



层析柱尺寸: 22 mm I.D. x 20 cm

3. 使用 0.1 N NaOH 对 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 在位清洗 (CIP)



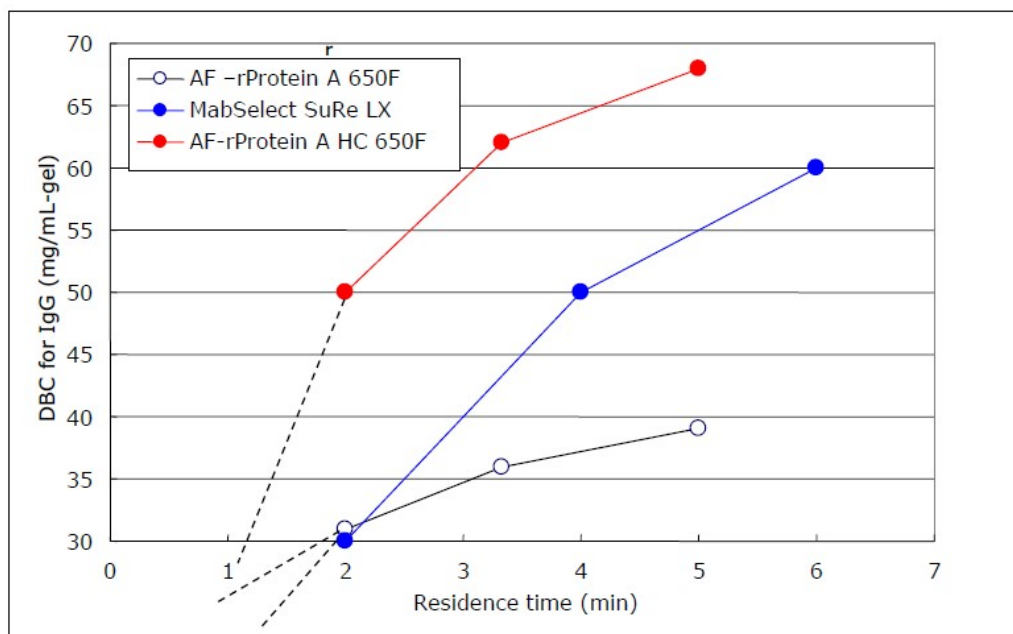
层析柱: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D. x 5 cm)

CIP 循环: 10 CV with binding buffer, 5 CV with elution buffer, 7 CV with binding buffer

3 CV with 0.1 N NaOH (contact time; 15 min), 5 CV with binding buffer

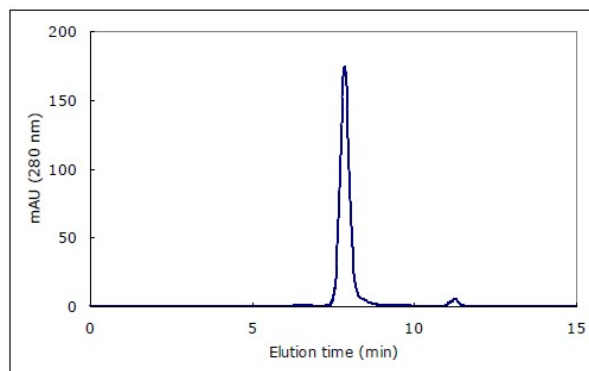
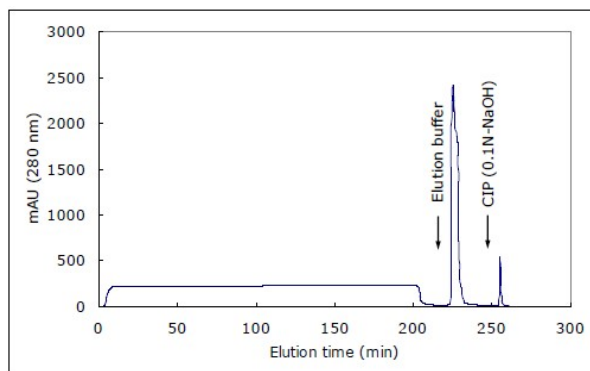
每清洗 20 次, 测定一次 DBC (10%的穿透曲线下测得)。

4. 在不同保留时间下，新一代 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 动态吸附载量和旧款 TOYOPEARL AF-rProtein A 650F 以及 GE 公司 HITRAP MABSELECT SURE 亲和填料的比较。



* MabSelect SuRe LX:(官方数据)

5. 使用 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 纯化从 CHO 细胞培养的单抗



层析柱：TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D.×5 cm)

吸附液：0.02 mol/L sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.15 mol/L NaCl

洗脱液：0.1 mol/L citrate (pH 3.0)

流速：0.2 mL/min 检测器：UV (280 nm)

样品：40 mL feedstock from cell culture (humanized IgG1: 1 g/L)

纯度检测：TSKgel G3000SWXL (right figure)

6. 各厂家 Protein A 填料的比较

下图是各厂家Protein A填料在吸附载量、价格、刚性以及保留时间方面的对比。

Product name	Supplier	Base matrix	Particle size (micron)	Binding capacity (g/L)*			Chemical stability	List price (\$/L)**	Comment
				SBC	DBC (2 min)	DBC (5 min)			
TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650M	Tosoh	Polymer	45	>68	50	70	NaOH durable	NA	rProtein A; C-domains, Multipoint attachment
TOYOPEARL AF-rProtein A 650M	Tosoh	Polymer	45	>45	30	40	NaOH durable	12,000	rProtein A; 4 C-domains, Multipoint attachment, high flow type
MabSelect SuRe LX	GE	Agarose	85	ND	30	58	NaOH durable	16,000	rProtein A; 4 B-domains, Single point attachment
MabSelect SuRe	GE	Agarose	85	ND	30	40	NaOH durable	15,000	rProtein A; 4 B-domains, Single point attachment
AbSolute	NovaSep	Silica glass	44	70	40	45	pH 1.5 - 9.0	18,000	High flow type, Bed height max 40 cm, 1 % benzyl alcohol/acetate buffer, < 10 CFU/mL
ProSep UltraPlus	Merck	Porous Glass	60	> 67	45	50	pH 1.5 - 8.5	15,000	rProtein A; natural type, Multipoint attachment, High flow type, Bed height max 30 cm, Shipped with 1 % benzyl alcohol/acetate buffer
KanCapPro A	Kaneka	Cellulose	75	ND	30	50	NaOH durable	?	rProtein A; 5 C-domains, announced to expand production scale in 2013
Amsphere Protein A JWT203	JSR	Polymer	50	ND	33	43	NaOH durable	?	Hydrophobic properties?

* Catalogue data
** Estimated price

TOSOH CORPORATION, BIOSIENCE DIVISION

- GE MabSelect SuRe LX
- Novasep AbSolute
- Merk ProSep UltraPlus
- Thermo/Life Technologies, POROS Protein A
- Kaneka KanCap Pro A

7. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料吸附、洗脱包括 NaOH 清洗步骤

- 1) 使用中性的缓冲液上样
- 2) 使用中性的缓冲液冲洗
- 3) 使用pH为3.5~3.0的酸性的缓冲液洗脱单抗
- 4) 使用中性的缓冲液冲洗
- 5) 使用0.1 N NaOH清洗

* 使用酸性缓冲液洗脱后，一些聚合性和疏水性的杂质仍然吸附在填料上。这些杂质需要用碱来清洗。但是，当酸性洗脱后突然改变为碱性溶液的情况下，这些杂质可能会在清洗过程中沉淀。因此，为了避免杂质沉淀，推荐先用中性缓冲液冲洗。

8. TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 产品列表

P/N	Product name	Volume size
0023425	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	10 mL
0023426	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	25 mL
0023427	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	100 mL
0023428	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	1 L
0023429	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	5 L
0023434	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	50 L
0023430	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F	1 mL x 5
0023431	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F	5 mL x 1
0023432	ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F	5 mL x 5
0021400	ToyoScreen Holder	
0020028	T-F Union (M 6 10-32)	Connector for FPLC system
0023433	ELISA for Protein A-R40	ELISA kit for TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F

* ELISA Kit is different from that for TOYOPEARL AF-rProtein A 650F.

为了让大家有机会亲自体验 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 填料在纯化上的应用，慧德易公司可提供免费样品供大家试用，数量有限，预试从速！请从以下链接下载试用表格：

http://www.prep-hplc.com/download_detail/&downloadsId=931422d0-3e26-460a-8c33-3288166d6847&comp_stats=comp-FrontDownloads_list01-001.html