

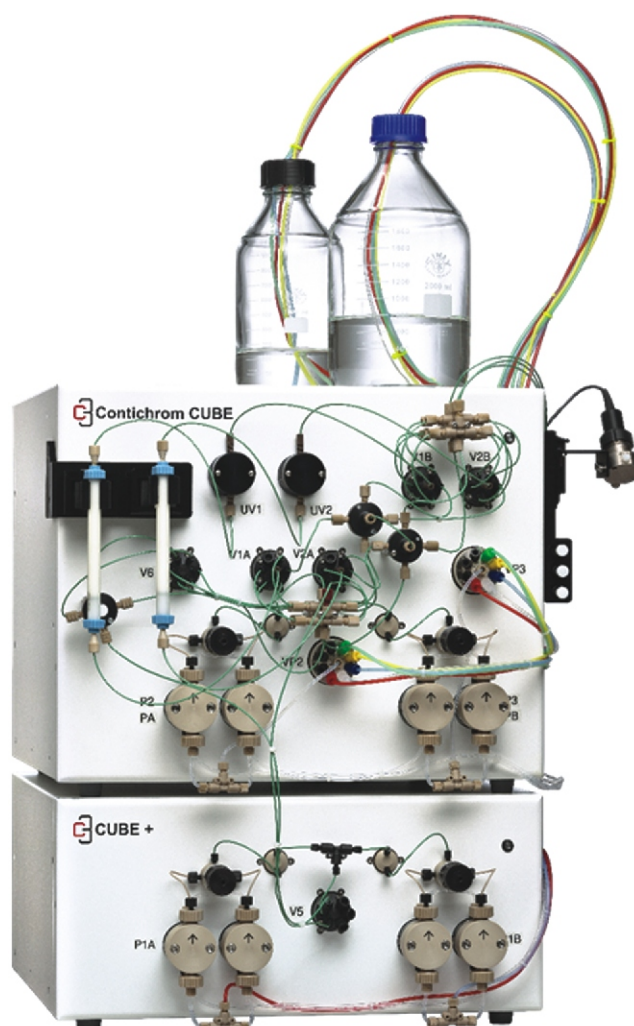
# 慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

## 第九十五期

### Contichrom连续流层析

#### ——CaptureSMB动态过程控制



2017-06

## 2C-PCC动态过程控制 逆流捕获过程 (CaptureSMB<sup>®</sup>)

Contichrom<sup>®</sup> CUBE层析系统可采用批处理和连续周期逆流 (PCC) 进行目标蛋白亲和层析纯化。PCC可使捕获环节层析填料的利用率显著提高, 其与传统批处理相比, 可普遍提高40% - 60%。此外, 还可使产量提高2倍。该系统具有更快的处理速度, 可缩短目标蛋白在上样过程中与蛋白酶和糖苷酶的接触时间, 从而保护蛋白完整性。简化的双柱位配置, 最大限度地降低了硬件故障风险。

2C-PCC (CaptureSMB<sup>®</sup>)是最简化和最有效的PCC设计。

本应用手册介绍了Contichrom<sup>®</sup> CUBE FPLC系统CaptureSMB<sup>®</sup>动态过程控制——AutomAb<sup>®</sup>如何在层析填料结合载量发生变化的情况下进行调整。层析填料结合载量的变化, 是由于填料在使用过程中的损耗或上样蛋白浓度不同、成分改变等造成的。该动态控制是与FDA所提倡的通过过程分析技术 (PAT) 提高产品质量相一致的。

### 介绍

连续流层析可获得更高的产量, 且成本更低, 这是通过降低Protein A 填料用量和缓冲液消耗量实现的。由于操作稳定, 其可更好地保证产品质量的一致性。为保证连续工艺处于最佳设定点, 需要进行动态过程控制。PCC工艺的高产量可使投入降低, 设备占地面积更小, 却可提供与更大规模的普通设备相同的产出。

### 2C-PCC (CaptureSMB<sup>®</sup>)基础理论

2C-PCC 仅用2根层析柱即可实现循环化捕获纯化过程 (图1), 这是最简化和最稳定的多柱捕获过程, 并已被科学证实, 这比其它多柱配置更为有效。2C-PCC采用优化的子过程进行上样、淋洗、在位清洗和再生, 2根层析柱恰当连接或独立运行。亲和填料价格昂贵, 通过优化上样工艺, 可使亲和填料达到完全满载, 利用率达到最高。

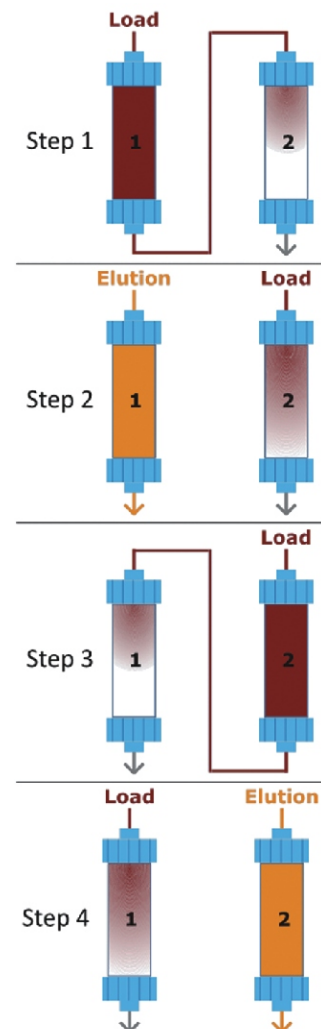


图1. 2C-PCC (CaptureSMB<sup>®</sup>)原理

步骤1: 在连续上样阶段, 柱1和柱2保持串联。柱1满载样品 (红色), 其流穿被柱2捕获。

步骤2: 柱1进行淋洗、洗脱、清洗和再平衡, 同时柱2进行连续上样。

步骤3: 柱1再生完毕后, 将层析柱进行串联, 柱2满载后, 其流穿被柱1捕获。

步骤4: 柱2进行淋洗、洗脱、清洗和再平衡, 同时柱2进行连续上样。该连续处理方法循环进行。

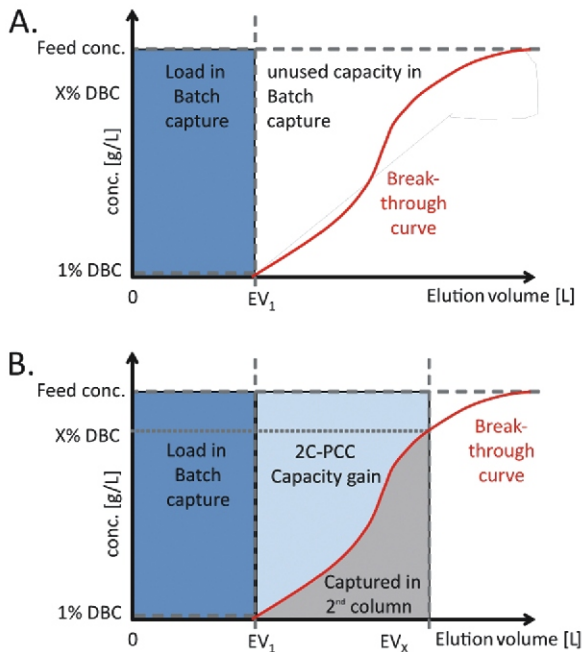


图2.普通层析和PCC载量利用率对比图。图A为批处理上样。在批处理的捕获过程中，当样品出现流穿时，上样必须结束，从而避免样品损失。图B：在2C-PCC连续上样阶段，第1根层析柱进行上样，直至出现流穿（例如70%流穿），流穿样品被第2根层析柱捕获。因此，第1根层析柱的载量利用率得到显著提高。

## Contichrom® CUBE系统进行2C-PCC

Contichrom® CUBE系统可进行目标分子的连续纯化。其建立双柱位Contichrom®平台旨在简化系统配置和操作处理。其捕获过程动态控制功能AutomAb®是Contichrom® CUBE的关键功能。双柱位设计不仅更可靠，而且比普通批处理和其它多柱位设计效率更高（图3）。

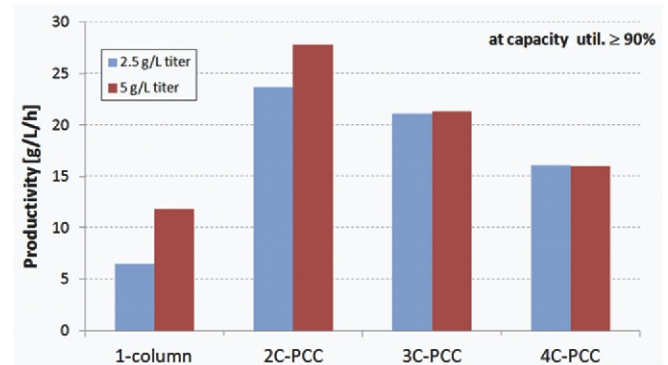


图3.载量利用率> 90%的多柱位系统产量对比图。其显示了典型上样浓度2.5 g/L和5 g/L的影响结果。2C-PCC比普通批处理和更复杂的3柱位、4柱位设计更具优势。

## 动态过程控制原理

Contichrom® CUBE层析系统采用独特的过程控制程序——AutomAb®自动纠正过程中的偏差，从而使其保持在设定点。AutomAb®可以监测并控制层析柱的饱和水平，且可以自动进行调整。如果工艺参数发生变化，比如样品成分的变化（包括目标蛋白质质量或浓度的变化）或层析填料载量的变化，上样时间也会进行相应调整。层析填料的载量会由于亲和配基的脱落而发生变化，例如用于mAb纯化的Protein A。

该系统也可运行固化的过程控制，即运行预先设定的固定层析过程控制。无论该过程引入任何变化，都会被排斥掉，这将导致获得的目标产品的浓度和质量发生改变。因此，当进行连续工艺生产时，动态过程控制必不可少。

参考文献: Baur D., Angarita M., Müller-Späh T., Steinebach F., Morbidelli M. 2016. Comparison of batch and continuous multi-column protein A capture processes by optimal design. *Biotechnology Journal*. 11: 1860-7314.

## AutomAb<sup>®</sup> 控制的定义

AutomAb<sup>®</sup> 是一种保证捕获过程处于最优的控制工具，即使在过程参数发生变化时也不例外。当2根层析柱串联后上样，第2根层析柱可以接收第1根层析柱的流穿(预上样)。AutomAb<sup>®</sup> 可以通过控制相关联的上样时间来保证预上样面积恒定，从而保证在连续上样过程中，上样至下一根层析柱的样品量保持相同。预上样面积可由使用者自行确定，也可由AutomAb<sup>®</sup> 在第1次循环中计算得到。

其它的动态过程控制系统是通过测定柱前、柱后的UV 信号相对值来进行判断的，这需要1套额外的检测器。然而AutomAb<sup>®</sup> 仅需要1套UV检测器位于2根层析柱之间即可(图4)。因此，AutomAb<sup>®</sup> 消除了由于UV检测器校准偏差所造成的错误风险。

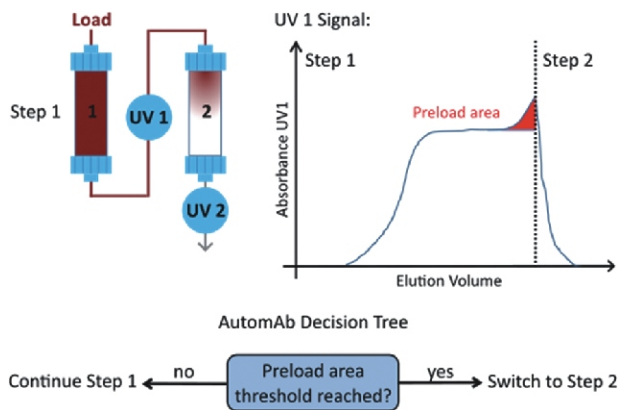


图4. 2C-PCC系统的每根层析柱都有其专属的UV检测器位于柱后。层析柱连接后，第1根层析柱的流出端UV信号，也同样是第2根层析柱的流入端UV信号(见上图UV1)。AutomAb<sup>®</sup> 监测第1根层析柱的流出端UV信号并保证mAb持续上至第2根层析柱。

## AutomAb<sup>®</sup> 控制操作

2C-PCC进行多次循环操作后，层析柱载量会跟单柱位捕获一样降低，例如填料的protein A配基密度降低导致。该影响通常可在重复清洗/淋洗以及碱处理后观察到。其结果是，导致预上样面积值缩小。同样，蛋白浓度会随时间增长或降低(例如灌流细胞培养)，从而导致预上样到达时间提前或延迟。无论预上样与之前的循环相比提前还是延迟，AutomAb<sup>®</sup> 可以通过自动调整上样时间来保证预上样面积恒定。因此，填料利用率和抗体回收率仍然保持在最优水平。该控制系统还可以消除柱效差异所导致的不同流穿曲线形状影响(图5)。

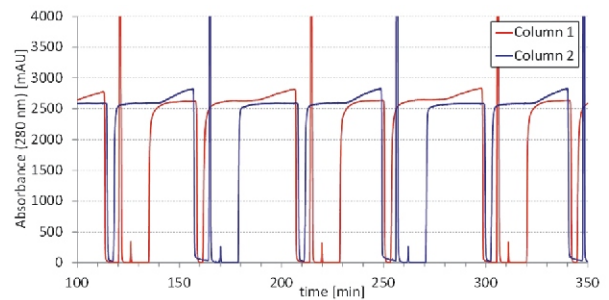
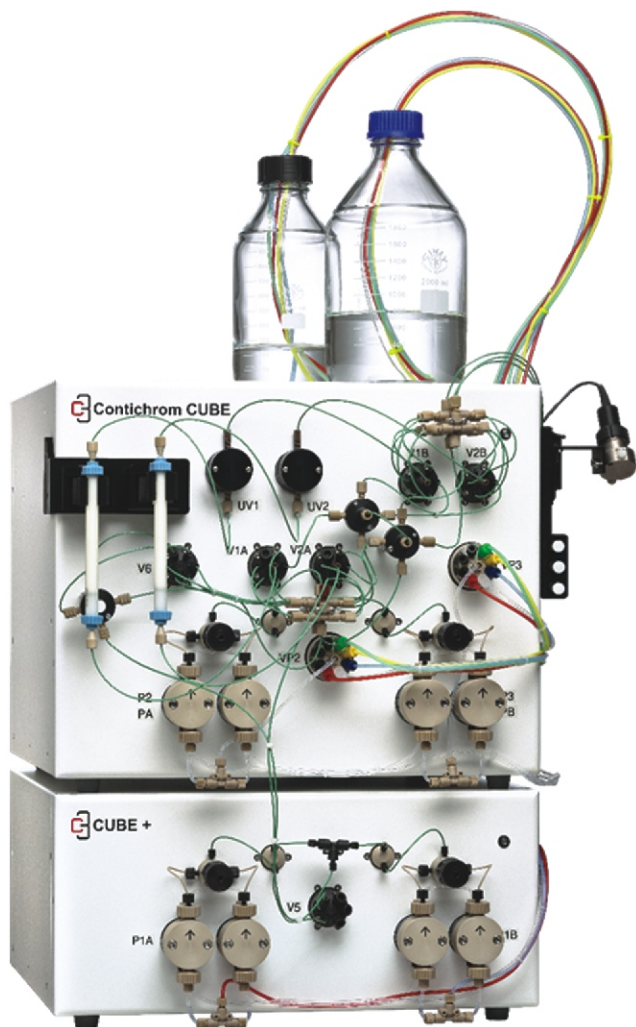


图5. AutomAb<sup>®</sup> 控制的2C-PCC 图谱。柱效差异所导致的流穿曲线形状(红线:柱1;蓝线:柱2)并不影响预上样。

## 增加控制的灵活性

与其它多柱位PCC相比，其连续上样与回收、再生的执行是完全独立的，这避免了限速步骤(如长时间CIP)与连续上样并行进行。因此，AutomAb<sup>®</sup> 可彻底控制连续上样时间。这保证连续上样步骤在不同上样浓度和载量降低的情况下，仍可在最大流速下进行。



## 2C-PCC设计与AutomAb®

使用CaptureSMB® 向导，可以通过单次流穿曲线数据得到2C-PCC 运行方法（见图6）。该方法可显示最优的2C-PCC操作要点，该向导可显示预期的运行状态，例如产量、载量利用率、缓冲液和样品消耗量、产品浓度以及运行时间。可在向导中选择AutomAb® 控制，当运行启动时该选择即被激发，此后，AutomAb® 即可保持最优控制点。

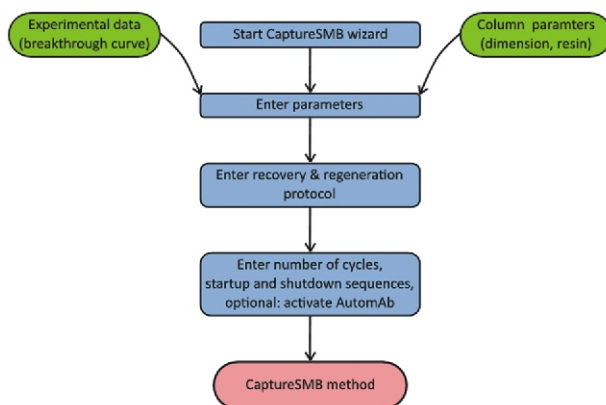


图6. CaptureSMB 向导生成方法流程图。AutomAb® 控制为可选项。

## 结论

毫无疑问，连续流层析可显著提高下游纯化的产量。然而，若没有动态过程控制，则需要设定额外的安全范围来避免洗脱产物发生变化，这将导致工艺缺乏可靠性或造成产品损失。

AutomAb® 动态控制功能可保证2C-PCC实现最优操作。在各种情况下，如样品浓度或层析填料载量的变化，都是可以得到补偿的。AutomAb® 确保连续流层析可用于处理存在上样成分变化的灌流细胞培养。



中国地区代理：北京慧德易科技有限责任公司

地址：北京市昌平区回龙观西大街118号龙冠置业大厦609室

网址：www.prep-hplc.com

电话：010-59812370/1/2/3

传真：010-59812400

邮箱：sales@prep-hplc.com