

扩张柱床吸附层析回收纯化 灌流培养生产的单克隆抗体

余晓玲 米力* 姚西英 陈志南*

(第四军医大学细胞工程研究中心, 国家 863 计划西安细胞工程基地, 陕西 西安 710032)

摘 要 用扩张柱床吸附层析技术,一步回收纯化连续灌流培养的单克隆抗体。用 Streamline SP 阳离子交换介质在固定床柱 XK16/20 上进行条件摸索,扩张床柱 Streamline-25 和 50 分别用于小规模条件优化和中试规模放大。培养液中的低浓度单抗经此步处理,浓缩 10 倍以上,纯度提高 5~7 倍,回收率 >90%,制备周期比固定柱床层析缩短一半以上。根据培养液中单抗浓度的不同,一次处理量为 18~50L,纯化规模由实验室水平(400mg)扩大至中试水平(2g),生产成本和工艺复杂性大为降低。应用扩张柱床吸附层析技术,建立单克隆抗体回收纯化工艺,具有经济、简便、高效实用和良好的可放大性。

关键词 扩张柱床吸附 纯化工艺 灌流培养 单克隆抗体

中图分类号 R392.33 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0227-06

工程抗体产业化是通过现代生物工程技术实现的。用批式、流加式或连续灌流式大规模培养杂交瘤细胞或工程抗体表达细胞生产抗体,回收液需经适当的纯化以满足应用时的纯度要求。吸附技术广泛应用于蛋白的纯化,其传统的操作模式是固定柱床吸附,但这种方法不适用于非澄清的原料。因此,大多数的下游纯化方案都包括至少一个澄清样品的操作单元,最常用的就是离心和微滤的方法,而这两种方法都存在着各自的问题,无论单独或联合使用都会导致产率的下降,甚至产品活性的损失,时间和资金的耗费也相当可观^[1-2]。因此,发展新下游纯化方法以简化传统的纯化方案是个亟待解决的问题。

扩张柱床吸附层析正是适应大规模下游纯化的需求而开发的新的层析技术。它可将大规模培养的回收液直接上柱,介质沉积形成的柱床随着由下向上的液流而扩张。纯化介质在床体中均匀的悬浮,并按照不同的颗粒尺寸和密度形成的梯度而有续排列,形成一个均衡、稳定的吸附环境,从而起到有效的吸附分离作用。在扩张柱床中,由于向上的液流使介质颗粒彼此分开,介质间的空隙加大,细胞和细胞碎片不受阻碍地随流动相通过,而目标蛋白吸附

在介质颗粒上,最后洗脱回收吸附的靶蛋白。

近年来扩张柱床吸附技术被生物制药工业领域广泛接受,因为它使人们看到了减少纯化工艺步骤、节省资金投入和增加产品收率的可能性。Noda 等将毕赤酵母中表达的重组人血清白蛋白经过热处理后,全细胞培养液直接在直径 1 m 的 Streamline SP 柱上获得成功分离^[3],Barnfield 等人用 STREAMLINE DEAE 纯化 *E. coli* 胞内表达蛋白——抗凝血酶 Annexin V^[4],Johansson 等回收 *E. coli* 围膜表达重组绿脓杆菌外毒素 A ExotoxinA PE553D^[5]等。扩张柱床吸附技术的另一个重要应用领域就是直接从杂交瘤或 CHO 细胞培养液中捕获单抗:用 STREAMLINE rProtein A 回收纯化批式培养中的单抗 IgG1、IgG2a^[6-8];阳离子交换介质 STREAMLINE SP 用于纯化杂交瘤细胞培养液中的 IgG2a^[9]和 CHO 细胞培养液中的重组单抗,处理能力达 12000L,呈现较好的线性放大性^[10,11]。STREAMLINE rProtein A 的优点是一步纯化可以达到较高纯度,比较适于以获取抗体为最终目的纯化,但该介质价格昂贵,介质寿命也较短,加之我们的终产品是片段抗体,回收全抗体的高纯度对制备片段抗体并非必须。基于产品特点和工艺成本的考虑,本研究选用 STRE-

AMLINE SP 为纯化介质,验证了扩张床柱吸附层析在生物反应器连续灌流培养生产单抗时,作为回收纯化的初始步骤的简便、可靠和良好的可放大性,使抗体生产能力大幅提高。

1 材料和方法

1.1 扩张柱床吸附层析介质、柱床和系统

扩张柱床吸附介质 Streamline SP、扩张柱床 Streamline25(2.5cm 内径)、Streamline50(5.0cm 内径)、固定床柱 XK16/20(1.6cm 内径)均购自 Amersham Biosciences(瑞典)。Waters 650 快速蛋白液相色谱仪(美国 Waters 公司);扩张床柱配备 2 台 BT00-100M 型蠕动泵(河北保定兰格恒流泵有限公司),一台 HD-21-88 型核酸蛋白检测仪(上海琪特分析仪器有限公司)和一台 YOKOGAWA 3057 便携式记录仪(四川仪表四厂)。

1.2 目的蛋白和培养液

杂交瘤细胞在 5L CelliGen PLUS 生物反应器(美国 NBS 公司)上用无血清培养基 CCM1(美国 Hyclone 公司)加 1% 小牛血清进行连续灌流培养^[13]。收获的培养液中总蛋白为 2.1g/L,游离细胞数为 1.03×10^6 /mL,主要蛋白成分有牛血清白蛋白、转铁蛋白和胰岛素,抗人肝癌单抗 HAb18IgG1 的浓度为 110 ~ 289mg/L。

1.3 固定床上的吸附条件摸索

固定床柱 XK16/20 在 Waters 650 快速蛋白液相色谱仪上运行。Streamline SP 阳离子交换介质在 XK16/20 柱上的装填高度为 10cm。介质颗粒为球形,直径 100 ~ 300 μ m,平均颗粒直径为 200 μ m,介质是微孔的,交联 6% 的琼脂糖,并含有一个晶型石英的核心,平均颗粒密度为 1.2g/mL。取少量培养液以离心法澄清后上柱,流速为 300cm/h。尝试不同的缓冲液系统、不同的 pH、洗脱液的盐浓度、洗脱模式及样品预处理的方法。

1.4 小试规模扩张床柱的方法优化

用未经澄清的样品在小试规模的扩张床柱 Streamline25 上进行方法优化,以验证在方法摸索阶段所选择的条件。StreamlineSP 介质在 Streamline25 柱上的装填高度为 15cm,约 74mL 介质。扩张柱床吸附的基本工作原理为:介质沉积的柱床(简称沉积床)用吸附缓冲液(A 液)以向上的液流进行平衡和扩张,待扩张的柱床稳定后,以相同的流速和流向上样。上样结束后,再用 A 液以相同流速和流向冲洗,直至紫外检测信号回基线。这时,关掉蠕动泵,

使介质重新沉积,调节活塞至刚好在沉积床的表面,然后以向下的液流和沉积床的状态进行洗脱。在此阶段,需确定最佳的线性流速、柱床扩张程度及平衡、冲洗、洗脱体积和洗脱模式等。此外,还必须确定一个有效的介质在位清洗方案。

1.5 中试规模扩张床柱上的放大

在 Streamline 50 柱上进行条件放大。StreamlineSP 介质约 300mL,沉积床高度约 15cm,系统设置状态与小试时相同。从 25mm 柱放大到 50mm 柱时,除了介质体积、上样量和体积流速(mL/min)随规模放大而增大外,样品预处理方式、沉积床高度、介质载量和线性流速(cm/h)等其他参数基本一致。

1.6 检测方法

1.6.1 抗体定量分析:采用酶联免疫吸附试验(ELISA 夹心法),具体步骤参见文献[12]。

1.6.2 抗体纯度检测:采用 SDS-PAGE 法。将回收单抗的浓度调整为 1g/L,在非还原条件下行 SDS-PAGE,分离胶浓度为 10%,每孔上样 20 μ L。胶片用薄层色谱扫描仪扫描,测定纯度百分比。

2 结果

2.1 在固定床柱上摸索的条件

从生物反应器上收获的培养液,其电导为 12 ~ 14ms/cm, pH7.3 ~ 7.5,要使其吸附到离子交换介质上,必须对样品进行适当的处理。我们对样品稀释比(1:1 ~ 1:4)、不同 pH 的缓冲体系(pH5.0 ~ 6.0 的醋酸钠、柠檬酸和磷酸缓冲液)、不同的样品预处理方式(用平衡缓冲液、超纯水、等渗葡萄糖以及不同浓度的 HCL 等进行样品的稀释和 pH 调节)、不同的洗脱盐浓度等条件进行了研究。经过方法摸索,在固定床柱上获得最好纯化结果的条件为: pH5.4, 20mmol/L 的柠檬酸缓冲液为平衡和冲洗液; pH5.4, 20mmol/L 的柠檬酸缓冲液含 1mol/L NaCl 为洗脱液,流速为 300cm/h,经线性梯度洗脱模式确定的洗脱盐浓度为 0.15 ~ 0.2mol/L。上柱前,培养液经离心澄清后,以超纯水稀释 2.5 ~ 3.0 倍并调节 pH 至 5.4,电导为 2 ~ 5ms/cm。实验证明:确定一个使目标蛋白尽可能多的吸附,在上样和冲洗过程中的损失尽可能少,且在此前提下使杂蛋白的吸附也尽可能少的样品稀释比,对取得好的吸附效果非常重要(图 1、2)。从 SDS-PAGE(图 2)可看出,上样期间的穿过峰和 A 液冲洗峰中主要是牛血清白蛋白,无可见 IgG 条带,在 1mol/L NaCl 的再生峰中也仅见转铁蛋白和牛血清白蛋白条带, IgG 仅在 0.2 mol/L NaCl 的

洗脱峰中出现。

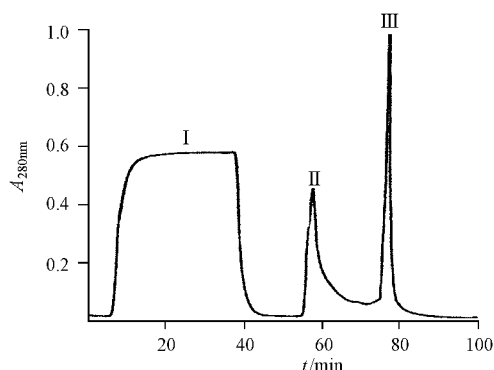


图1 HAB18 杂交瘤细胞培养液在 XK16/20 固定床柱上用 Streamline Sp 介质纯化的色谱图

Fig.1 The chromatogram of clarified HAB18 hybridoma cell culture broth purified on XK16/20 with streamline SP absorbent

Peak I :Sample application and washing ;
Peak II :Elution with 0.2mol/L NaCl ;
Peak III :Elution with 1mol/L NaCl

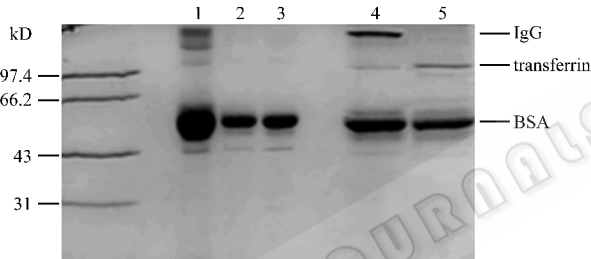


图2 HAB18 杂交瘤细胞培养液在 XK16/20 固定床柱上用 Streamline SP 介质纯化的 10% SDS-PAGE 分析

Fig.2 10% SDS-PAGE analysis of clarified HAB18 hybridoma cell culture broth purified on XK16/20 with streamline SP absorbent

1 :HAB18 hybridoma cell culture broth ;
2 :fraction of break-through during sample application ;
3 :fraction of washing ; 4 :elution pool of 0.2mol/LNaCl ;
5 :elution pool of 1mol/L NaCl

2.2 小试规模扩张床柱上的方法优化

在这个阶段,使用未经澄清的培养液在实验室规模的扩张床柱 Streamline25 上,按照上述在固定柱床上摸索的条件进行。以 250cm/h 的流速平衡、上样、冲洗(液流向上)柱床扩张程度为沉积床高度的 2.9 倍。采用步进洗脱模式,洗脱液为平衡缓冲液含 0.2mol/L NaCl,在沉积床状态下以 100cm/h 的流速一步洗脱吸附的抗体(液流向下)。纯化结果与在固定床柱上获得的非常相似,培养液中存在的细胞和/或细胞碎片并未影响介质对 IgG 的吸附。平衡及扩张体积为 4 个沉积床体积,冲洗体积为 20 个沉

积床体积,洗脱体积为 2 个沉积床体积。IgG 回收率为 87.6%,较纯化前浓缩 9.4 倍(由 0.155 mg/mL 至 1.456mg/mL)纯度提高 5.7 倍。在 Streamline 25 扩张床柱上的纯化结果见图 3、4。

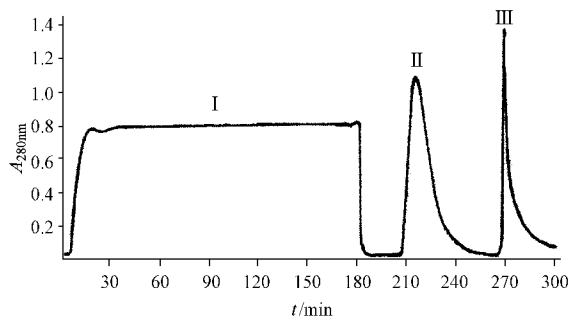


图3 HAB18 杂交瘤细胞培养液在 Streamline 25 扩张床柱上用 Streamline SP 介质纯化的色谱图

Fig.3 The chromatogram of unclarified HAB18 hybridoma cell culture broth purified on Streamline 25 with streamline SP absorbent.

Peak I :Sample application and washing ;
Peak II :Elution with 0.2mol/L NaCl ;
Peak III :Elution with 1mol/L NaCl

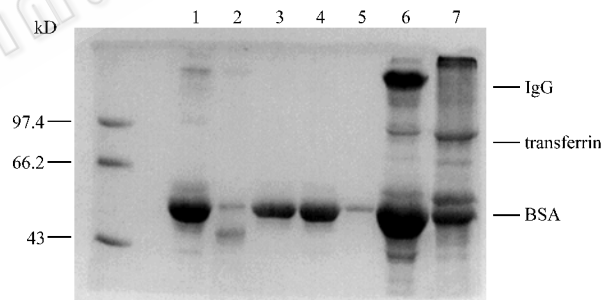


图4 HAB18 杂交瘤细胞培养液在 Streamline 25 扩张床柱上用 Streamline SP 介质纯化的 10% SDS-PAGE 分析

Fig.4 10% SDS-PAGE analysis of unclarified HAB18 hybridoma cell culture broth purified on Streamline 25 with streamline SP absorbent

1 : HAB18 hybridoma cell culture broth ; 2~4 :fraction of break-through during sample application ; 5 :fraction of washing ; 6 : elution pool of 0.2mol/L NaCl ;
7 :elution pool of 1mol/L NaCl

在此阶段,还确定了介质的在位清洗(CIP)方案:将柱活塞调节至 2 倍沉积床的高度,以扩张床的状态(液流向上)进行冲洗,步骤为:第一步,0.5mmol/L NaOH + 1mmol/L NaCl, 30cm/h,保持至少 4 h;第二步,3 个沉积床体积的超纯水,100cm/h;第三步,3 个沉积床体积的 25% 的醋酸,100cm/h;第四步,10 个沉积床体积的超纯水或平衡缓冲液。CIP 程序应在每次纯化后立即进行,介质经在位清洗后

即可再次使用。

2.3 中试规模扩张柱床上的放大

从上面的小试条件放大到中试规模时,介质体积、上样量相应增大。平衡、上样、冲洗流速为 275cm/h(液流向上)柱床扩张程度为沉积床高度的 3 倍。洗脱是在沉积床的状态下以 100cm/h 的流速进行(液流向下),平衡和洗脱液组成与在 Streamline 25 扩张床柱上的相同。所得结果除 IgG 洗脱体积稍大于小试而为 2.2 个沉积床体积外,其余结果与小试一致。IgG 回收率 91.5% 较纯化前浓缩 9.6 倍(由 0.182g/mL 至 1.753mg/mL),纯度提高 5.4 倍。在 Streamline 50 扩张床柱上的纯化结果见图 5。

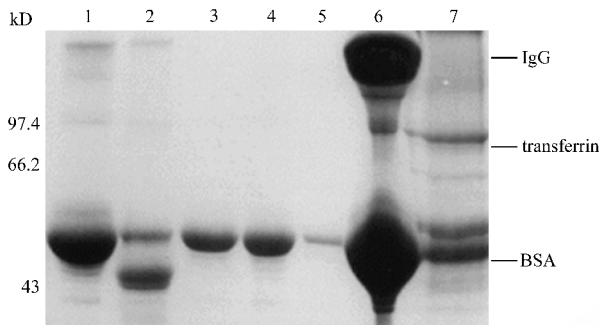


图 5 HAB18 杂交瘤细胞培养液在 Streamline 25 扩张床柱上用 Streamline Sp 介质纯化时所获各峰的 10% SDS-PAGE 分析

Fig.5 10% SDS-PAGE analysis of unclarified HAB18 hybridoma cell culture broth purified on Streamline 50 with streamline SP adsorbent.

1: HAB18 hybridoma cell culture broth; 2~4: fraction of break-through during sample application; 5: fraction of washing; 6: elution pool of 0.2mol/L NaCl; 7: elution pool of 1mol/L NaCl

2.4 三种规模的纯化研究结果

表 1 表明,从固定柱床到实验室规模的扩张柱床再到中试规模的扩张柱床的逐级放大过程中,工艺参数具有良好的放大性,为进一步过渡到大规模生产提供了依据。

2.5 扩张柱床层析与在实验室水平的纯化中使用的固定柱床层析比较

表 2 就主要纯化指标和操作参数进行了比较,通过比较不难看出,扩张柱床吸附层析的优势所在:实验室规模的固定柱床层析处理 50mL 的小鼠腹水需 28h 以上,中试规模的扩张柱床层析处理 50L 的培养液仅需不到 8h,制备周期缩短了 50% 以上,抗体的生产能力大幅提高。

表 1 纯化规模放大中主要参数的比较

Table 1 The comparison of process parameter in scale up

	XK16/20	Streamline25	Streamline50
Adsorben(mL)	30	74	300
Cell culture broth(mL)	50	1000	18000
Sample dilution	1:2.8	1:2.5	1:2.9
Expanded degree(H/H ₀)	/	2.9	3.0
Concentration of MAb(mg/mL)			
Start material	0.156	0.155	0.182
Elution pool	1.097	1.456	1.753
Purity factor*	6.8	5.7	5.4
Recovery yield(%)	89.2	87.6	91.5

* Purity factor = $\frac{\text{mg MAb in elution pool}/\text{mg total prote in elution pool}}{\text{mg MAb in feed stock}/\text{mg total prote in feed stock}}$

表 2 扩张柱床层析与固定柱床层析纯化单抗主要纯化指标和操作参数比较

Table 2 Comparison of mAb purified by expanded bed adsorption with Streamline SP media and a packed bed adsorption with Phenyl-sepharose HP media

	Packed-bed chromatography	Expanded-bed chromatography
Purity(%)	≥95	60.1
Immunoactivity	1 8000	1 8000
recovery yield(%)	90.2	91.5
pretreatment(h)	24	1.5
purification cycle(h)	4	6
process step(s)	3	1
scale-up	difficult	easy

3 讨论

近年来,扩张柱床吸附技术已广泛应用于 *E. coli* 包涵体、胞内、围膜、胞外分泌以及酵母菌、哺乳动物、杂交瘤、昆虫细胞甚至转基因动物乳汁^[13] 中表达的重组生物产品的纯化,特别是用于诊断或治疗用单抗的大规模纯化。大量应用研究表明,这种吸附技术较之传统的固定柱床吸附技术的显著优势在于(1)可直接从含有细胞、细胞碎片的非澄清原料中回收目标产品,减少了目标产品在复杂的预处理过程中因细胞破裂释放的胞内酶对产品的降解(2)对培养液中的活细胞、死细胞的出色清除能力及显著降低宿主 DNA 的能力,使其适于生产治疗用蛋白或单抗^[14](3)简化了下游工艺,减少了设备开支,减少了产品损失,提高了产率(4)良好的可放大性,保证了规模放大时工艺的稳定性和产品的均一性。

在实验中,我们发现有些因素对纯化结果有着直接或重要影响:第一,由于杂交瘤细胞对外界环境非常敏感(特别是剪切力),应避免采用剧烈的 pH 调节和搅拌方式;第二,要取得理想的吸附效果,除了 pH 的选择外,还必须使杂交瘤细胞培养液的电导降至合适的程度,样品的稀释度是影响吸附效果的重要因素;第三,通过固定床柱的条件摸索确定了洗脱盐浓度后,在扩张床柱上最好采用步级洗脱模式,因为这样可以不需梯度混合系统而一步洗脱目标蛋白,减少洗脱体积和洗脱液用量,并使样品的浓缩效果更好;第四,由于扩张柱床吸附技术是为下游纯化的初始阶段而设计的,使用的是未经处理的粗原料,介质直接与原料中存在的杂质,如细胞、细胞碎片、膜上的特殊物质、脂类及细胞溶解释放的核酸等接触,这些杂质或污染物会影响扩张床的流体力学性质^[15]。因此,一个行之有效的介质在位清洗方案是完整工艺的重要组成部分,将有效延长介质的使用寿命,确保一个重复性很好的纯化结果。第五,目标蛋白的吸附模式有两种:一是固定体积流速,二是固定柱床扩张程度,两种模式各有利弊^[16],在工艺设计过程中,应根据目标产品的性质加以选择。

实验结果也显示了扩张柱床吸附层析技术存在的一些问题。如与常规固定柱床层析相比,这种层析技术提高靶分子纯度的效果不很明显。这不仅是因为它的优势主要在于迅速高效地捕获靶分子,使其澄清、浓缩并处于相对稳定的状态,减少复杂的预处理造成的产物降解或活性损失,并为在固定柱床上的进一步纯化提供便利,而且因为它特殊设计的介质,有着比固定柱床层析介质大的多的颗粒尺寸,使它的分辨率受到限制。然而,扩张柱床层析在大规模纯化中的应用却并未因此而受阻^[17]。

在工程抗体产业化的工艺研究中,目标蛋白的回收和纯化是保证产品质量、降低生产成本、提高工艺效率的重要一环。我们通过针对具体目标蛋白的扩张柱床中试纯化工艺设计研究,验证了扩张柱床吸附技术的高效性、实用性和良好的放大性,建立了针对本产品的回收纯化工艺条件,为连续灌流培养生产单抗提供了生产工艺基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Chase HA. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *TIBTECH*, 1994, **12**: 296 - 303

[2] Hjorth R. Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments. *TIBTECH*, 1997, **15**: 230 - 235

[3] Noda M, Sumi A, Ohmura T *et al.* European patent Application, EP0699687A2

[4] Barnfield frej A-K, Hjorth R, Hammarstrom A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **44**: 922 - 929

[5] Johansson HJ, Jagersten C, Shiloach J. Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from *E. coli* using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media. *J Biotechnology*, 1996, **48**: 9 - 14

[6] Lütkemeyer D, Ameskamp N, Tebbe H. Estimation of cell damage in bench-and pilot-scale affinity expanded-bed chromatography for the purification of Monoclonal Antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **65**(1): 114 - 119

[7] Robert LF, Gregory SB, Cerardo AZ. Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method. *J Biotechnology*, 1999, **75**: 372 - 280

[8] Thommes J, Bader A, Halfar M *et al.* Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. *J Chromatogr A*, 1996, **752**: 111 - 122

[9] Thommes J, Halfar M, Lenz S *et al.* Purification of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth by fluidized bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **45**: 205 - 211

[10] Bodey B, Kaisa HE, Goldfarb RH. Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation*, 1995, **5**: 41 - 52

[11] Recovery of a recombinant monoclonal antibody from CHO cell culture broth by expanded bed cation exchange adsorption at large scale. *Expanded Bed Adsorption principle and method* p117, Amersham Pharmacia Biotech.

[12] Mi I(米力), Li I(李玲), Feng Q(冯强) *et al.* Continuous perfusion culture hybridoma cells for production of monoclonal antibody. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(30): 360 - 364

[13] Degener A, Belew M, Velender WH. Zn²⁺-selective purification of recombinant proteins from the milk of transgenic animals. *J Chromatogr A*, 1998, **799**: 125 - 137

[14] Lütkemeyer D, Ameskamp N, Tebbe H. Estimation of cell damage in bench-and pilot-scale affinity expanded-bed chromatography for the purification of Monoclonal Antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **65**(1): 114 - 119

[15] Asplund M, Ramberg M. The value of efficient cleaning. *Downstream* 28, Amersham Pharmacia Biotech

[16] Chang YK, Chase HA. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of expanded degree of bed expansion on adsorption performance. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996, **49**: 512 - 526

[17] Anspach FB, Curbelo D, Hartmann F *et al.* Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *J Chromatogr A*, 1999, **865**: 129 - 144

Recovery and Purification of Monoclonal Antibody Produced by Continuous Perfusion Culture Using Expanded Bed Adsorption

YU Xiao-Ling MI Li* YAO Xi-Ying CHEN Zhi-Nan*

(The Fourth military medical university, National Engineering Research Center, Xi'an 710032, China)

Abstract Monoclonal antibody produced by continuous perfusion culture was recovered and purified by expanded bed adsorption chromatography. A packed bed column XK16/20 was used for method scouting with Streamline SP adsorbent. Two expanded bed columns Streamline-25 and -50 were used for method optimization and pilot scale experiment, respectively. The recovery yield of monoclonal antibody was above 90% in a 5~7 fold enhanced purity and 10 fold increased concentration. According to the different concentration of monoclonal antibody in cell culture broth, about 18~50L fluid can be treated in a single cycle. MAb purification from lab scale (400mg per cycle) to a small pilot scale (2g per cycle) has been achieved. Compared with packed bed adsorption, the preparation cycle was half shortened, and the cost of production and the complexity of process were decreased markedly. It has been proven that a purification process based on expanded bed adsorption technique is simple, efficient and economical.

Key words expanded bed adsorption, purification process, continuous perfusion culture, monoclonal antibody

Received: 07-08-2003

This work was supported by Grant from National "863" Program (No. 2002AA217011).

* Corresponding author. Tel 86-29-3374547, Fax 86-29-3293906, E-mail: imi@vip.sina.com, zhicore2@mmu.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>