

ÄKTAcrossflow™ : 全新全自动超滤 / 微滤切向流过滤工艺开发系统

Alisa Liten, József Vasi, Ulf Segerbo

Amersham Biosciences AB, GE Healthcare SE-751 84 Uppsala Sweden

简介

出于经济考虑，切向流过滤(CFF)工艺的开发和问题的解决通常通过小规模系统进行，理想的小规模系统应该具有全自动化的工艺过程控制来一致模拟大规模生产实际状态的特征，并能提供所获数据，用于结果的全面分析。在此，我们展示了一个CHO来源的抗体浓缩/洗滤工艺的优化结果，它是使用一个全新、全自动的小规模CFF系统：ÄKTAcrossflow。

试验和结果评估

试验目的：使用ÄKTAcrossflow系统和50 cm²膜包，来确定一种抗体10倍浓缩和6倍洗滤的最优工艺条件。

寻找最优工艺条件

使用TMP漂移法来确定工艺的最优切向流(CF)和TMP。编写单一方法来自动进行TMP漂移，并检测总共36个参数，列在表1中。

表 1. TMP 漂移参数的设定

抗体浓度(mg/ml)		Set1	Set2	Set3
5	CF(ml/min)	24	16	8
	TMP 设定(bar)	1.0-1.6-2.2-2.8-3.4-4.0		
50	CF(ml/min)	24	16	8
	TMP 设定(bar)	1.0-1.6-2.2-2.8-3.4-4.0		

具有UNICORN软件的数据分析和曲线绘制特点的过滤特定评估模型被用于运行TMP漂移的评估(图1)。

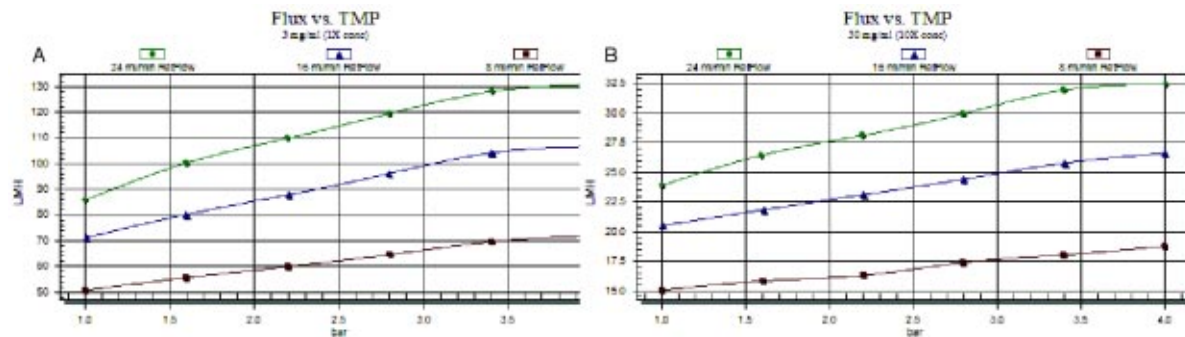


图 1. TMP 漂移的评估

A: 5 ma/ml; B: 50ma/ml 抗体样品

基于 Flux vs TMP 的曲线分析, 24 ml/min CF 和 2.5 bar TMP 被选作最优操作条件。这些设定确保工艺中最小凝胶层的形成并保持高透过速度。

寻找洗滤的最优浓度

洗滤的优化要考虑缓冲液的消耗和操作时间。以洗滤因子执行洗滤过程中，在洗滤时间优化因子的最大值时，将获得完成洗滤的最短时间，洗滤时间优化因子(DF T.O.F)的计算如下：

$$DF\ T.O.F = \text{样品 flux} \times \text{浓缩因子}$$

使用 24 ml/min 的回流速度和 2.5 bar TMP，10 倍浓缩抗体来产生用于洗滤时间优化分析的数据。

DF T.O.F. vs 浓缩因子绘图评估表明工艺的最大浓度, 50 mg/ml, 是执行洗滤的最优浓度(图 2)。这也提供了最小的缓冲液消耗。

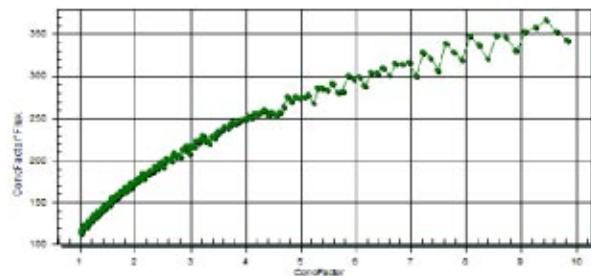


图 2. 洗滤时间优化

工艺验证

一个自动全浓缩 / 洗滤工艺用来优化参数(图 3)以确定漂移的结果。

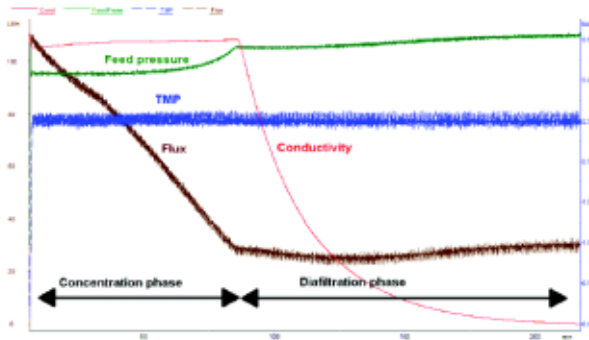


图 3. 选定的全工艺参数

分析结果

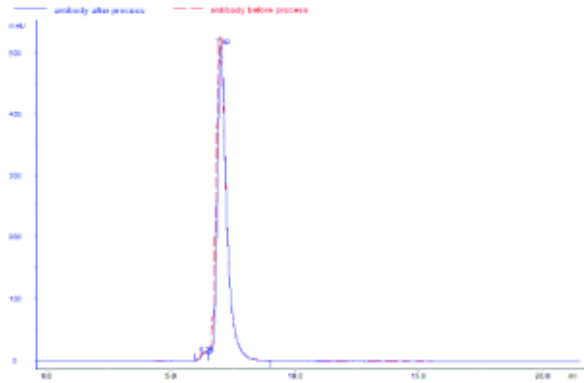
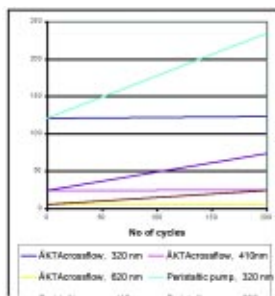


图 4. 抗体样品的层析分析

抗体样品在全工艺前后都做了分析。25 μ g 样品在 5 μ m SEC 凝胶柱上层析，并在 214nm 分析蛋白质量 (图 4)。结果确证系统对于蛋白质量仅有轻微影响。

系统对于蛋白质量的影响

抗体以 100 ml/min 的速度在整个系统里循环 200 次以产生由系统引起的聚合，没有滤器连接。作为对照，抗体也通过蠕动泵循环。用 320, 410 和 620nm 光吸收检测是否产生聚合物。ÄKTAcrossflow 对蛋白聚合仅有轻微影响。



结论

- 执行了大量参数联合自动筛选并完成了所有工艺参数的记录和运行
- 使用 ÄKTAcrossflow 软件进行全面数据分析评估后，确定了最优参数
- 最优参数在自动全工艺运行中得到了验证
- 样品分析确证系统对目标蛋白仅有微小影响

ÄKTAcrossflow, 在 UNICORN 软件基础上提供了一个理想的平台用于执行全自动 CFF 试验。

致谢：感谢 Dr. Ganesh Vedanthan 和 Eva Gefroh AMGEN, Seattle, USA. 提供抗体样品。

(上接第 22 页尾)

讨论

- 在亲和洗脱之前增加一步额外的清洗能去掉结合力弱的分子量在 66x10³D 的蛋白和低分子量的污染物 (比较图 4 与图 5 中色谱图的第一个峰, 同样的比较图 4 中 SDS-PAGE 中 4 – 6 泳道和图 5 中 SDS-PAGE 2 – 4 泳道)。
- 用平缓的盐梯度洗脱的蛋白分离度比系统默认的洗脱条件洗脱下的蛋白分离度有增加 (见 6)。
- 在第四步增加凝胶过滤的层析步骤, 蛋白质被置换到最终的缓冲液中, 并按分子量的大小进行分离。但在这个研究中, 三步纯化和四步纯化所达到的蛋白质纯度是相差不多的。(结果没有出示)
- 另一个增加蛋白质纯度的方法是在亲和层析柱上加载过量的样品。通过这个方法, 组氨酸融合蛋白结合力更强, 在上样时能和结合力弱的杂质竞争结合位点 (结果没有出示)。

结论

高级功能能进一步优化 ÄKTExpress 纯化工艺。对于三步纯化工艺 (亲和 – 脱盐 – 离子交换),

- 纯化结果的默认值来源于纯度测定蛋白
- 在亲和洗脱前增加咪唑浓度的清洗, 能促进融合蛋白的纯化
- 在离子交换层析时用平缓的梯度洗脱能产生更好的结果