

层析填料中顽固色素去除的新方法研究

翁志兵^{1,2}, 王鹏红², 赵力², 夏松², 金坚¹, 朱祯平², 李华钟¹

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 三生国健药业(上海)股份有限公司, 上海 201210)

摘要: 对纯化工艺中因铁离子污染形成黄褐色的阴离子填料进行了研究。该色素在碱性条件下产生并加重, 利用常规方法高盐、表面活性剂均无法清除。作者使用磷酸、醋酸、柠檬酸、盐酸进行测试, 发现浓磷酸去除填料色素的能力高于柠檬酸, 而浓醋酸和浓盐酸不能明显去除填料色素。基于上述结论, 进一步研究磷酸在不同浓度和不同处理时间下对填料中色素的影响。结果发现, 随着磷酸浓度的增加, 铁离子质量浓度和载量相应增加; 然而, 随着孵育时间的延长, 填料载量虽然相应增加, 但是铁离子质量浓度却逐渐降低。由此推断, 在磷酸处理填料色素的过程中, 随着孵育时间的增加, 铁离子可能与填料内腔的多孔结构发生二次吸附, 使得溶液中的铁离子逐渐减少。通过数据分析结合颜色比较确定, 0.5 mol/L 磷酸孵育阴离子填料 8.75~11.35 min 可以显著去除铁离子带来的顽固色素问题, 使得填料载量恢复如初, 同时也避免相关杂质污染最终蛋白质产品。本研究去除层析填料杂质的新方法可为相关生物制品在下游工业化领域中降本增效提供参考。

关键词: 阴离子填料; 色素; 抗体; 技术方法; 铁离子

中图分类号: TS 201 文章编号: 1673-1689(2022)02-0106-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.013

A New Method of Removing Stubborn Pigments from Chromatographic Resin

WENG Zhibing^{1,2}, WANG Penghong², ZHAO Li², XIA Song²,
JIAN Jin¹, ZHU Zhenping², LI Huazhong¹

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Sunshine GuoJian Pharmaceutical (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 201210, China)

Abstract: This study investigated the yellow-brown anion exchange resin formed by ferric ion pollution in the purification process. The pigment is produced and aggravated under alkaline conditions, and cannot be removed by conventional methods such as high salt and surfactants. Phosphoric acid, acetic acid, citric acid and hydrochloric acid were used for testing in this study. It was found that concentrated phosphoric acid could remove resin pigments more effectively than citric acid, while concentrated acetic acid and hydrochloric acid could not. Based on the above conclusions, the effect of phosphoric acid on the pigment in the resin under different concentrations and treatment times was further studied. The results showed that the ferric ion concentration and

收稿日期: 2021-01-13

作者简介: 翁志兵(1980—), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事生物制药方面的研究。E-mail: wengzhib@3s-guojian.com

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事工业微生物和生物制药方面的研究。E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

resin capacity increased with the increase of phosphoric acid concentration, however, prolonging incubation time led to the increase of resin capacity, but gradually decreased ferric ion concentration. Hence, it was inferred that during the treatment of resin pigment with phosphoric acid, there was secondary adsorption of iron ions to the porous structure of resin lumen with the increase of incubation time, resulting in the gradual decrease of ferric ions in the solution. Through data analysis in combination with color contrast, it was determined that incubating anion exchange resins with 0.5 mol/L phosphoric acid for 8.75~11.35 minutes could significantly remove the stubborn pigment problems caused by ferric ions, and restored the resin capacity recover, while avoiding related impurities to pollute the final protein product. The new method for removing impurities in chromatography resin studied in this paper could provide a theoretical reference for the cost reduction and efficiency enhancement of related biological products in the downstream industrialization.

Keywords: anion exchange resin, pigment, antibody, technical method, Fe³⁺

随着抗体药物的快速上市,相似品种间的竞争日趋激烈。药监局医保政策与时俱进,集采步伐日益临近,抗体药物的价格呈现断崖式下跌趋势,促使抗体药物为主体的新型疗法成为惠及普通病患的治疗方法之一^[1-4]。但是单克隆抗体的产业链发展并不完善,核心技术和关键材料大都被欧美企业垄断,直接导致抗体药的生产成本居高不下,高昂的生产成本与低廉的销售价格之间的矛盾凸显。药企在降低抗体的生产成本和优化抗体质量的两方面的需求已成为企业发展的核心^[5-11]。基于目前市场及其技术发展的预期,抗体药物的成本将会从目前每克 2 000 美元降至每克 200 美元以下^[12]才能惠及更多的患者。

在生物医药的各个生产阶段,纯化成本占整体生产成本的比例高达 50%~80%^[13]。其中层析介质的成本又在整个纯化工段中有着举足轻重的地位。延长层析介质的使用寿命可以显著降低生产成本,而在纯化生产过程中,层析介质可以有效去除上清液中多种杂质,如宿主蛋白质、内毒素、亲和填料脱落的 Pro-A、色素等^[14-15]。目前蛋白质中间体及原液中的宿主蛋白质、内毒素和残留的 Pro-A 蛋白质都有特定的方法精确检测,吸附在填料中的杂质也可以通过氢氧化钠、高盐再生等方式最大限度去除,以免污染最终产品^[16]。但是不管是填料还是蛋白质中间体中的色素去除依然是一个重大技术难题。据文献报道,色素广泛存在于蛋白质中间体和最终原液

中,具体表现为蛋白质中间体和原液呈现不同的颜色,尤其在高浓度蛋白质溶液中尤为显著^[17],如:铁离子形成的黄色、黄褐色^[18],维生素 B12 形成的粉色^[19]以及镍离子形成的蓝色,其中以黄褐色最为普遍^[20-21]。这些元素主要来自培养基和中间体所接触到的铁质工艺设备^[22],如不锈钢容器及管道;色素污染层析介质的具体表现是含有色素的中间体在层析系统上样过程中,色素会首先与层析柱上层填料结合,导致层析填料由乳白色变成色素相应的颜色,随着上样量和填料循环数的增加,色素会逐步扩散到中下层填料,严重时色素等杂质带来的污染能让层析柱内的填料塌陷。通常情况下,这些填料吸附的色素会被后续再生工序中的再生液去除,从而恢复填料性能,也避免吸附在填料上的杂质污染下一个工艺循环,将蛋白质原液的杂质残留降至最低,从而减淡蛋白质中间体的颜色,实现更好的原液质量。但在某些特殊情况下,我们发现用常规的方法无法去除填料中的色素,积累的色素将导致填料的使用寿命降低,具体表现是填料载量明显下降,填料外观颜色变深。

作者研究了 Capto adhere ImpRes 中顽固色素去除的案例,Capto adhere ImpRes 是一款将配体 N-苯甲基 N-甲基乙醇胺耦合到活化的粒径约 40 μm 的琼脂糖微球的阴离子交换填料,化学结构示意图见图 1。

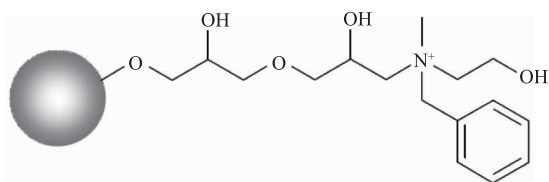


图1 Capto adhere ImpRes 化学结构示意图

Fig. 1 Diagram of chemical structure of Capto adhere ImpRes

抗体蛋白中间体使用 Capto adhere ImpRes 上样、平衡、洗脱,蛋白质样品和 Capto adhere ImpRes 填料均没有出现显著的颜色变化,但纯化结束后,用 1 mol/L NaOH 对该填料进行消毒再生时,发现上层填料的颜色由乳白色变成黄色,且随着循环次数的增加逐渐加深,最终呈现黄褐色,常规方法处理后填料无法恢复原本的乳白色。基于该类情况,如何开发一种有效去除层析填料色素来延长层析介质的寿命的方法尤为必要。本研究对这类极难去除的色素进行初步的研究,并达到良好的去除效果。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氯化钠,磷酸,氢氧化钠:国药控股化学试剂有限公司产品;醋酸,盐酸,磷酸氢二钠,磷酸二氢钠:广州化学试剂厂产品;Tris:美国 Promega 公司产品;填料 Capto adhere Impres: 美国 Cytiva 公司产品;水:实验室超纯水;所有流动相均经过 0.45 μm 滤膜过滤。

磷酸溶液:分别取 0.1、0.3、0.5 mol 的浓磷酸于烧杯中,加入超纯水搅拌均匀定容至 1 L,配制成 0.1、0.3、0.5 mol/L 磷酸溶液。

平衡液:取 1.21 g Tris 和 8.77 g NaCl 置于烧杯中,加入超纯水搅拌均匀定容至 1 L,经 0.45 μm 滤膜过滤,制成 10 mmol/L Tris +150 mmol/L NaCl,常温保存。

洗脱液:取 0.050 mol 醋酸置于烧杯中,加入超纯水搅拌均匀,定容至 1 L,经 0.45 μm 滤膜过滤,制成 50 mmol/L 醋酸,常温保存。

再生液:取 26.08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 14.28 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 置于烧杯中,加入超纯水搅拌均匀,定容至 1 L,经 0.45 μm 滤膜过滤,制成 200 mmol/L PB,常温保存。

消毒液:取 20 g NaOH 置于烧杯中,加入超纯

水搅拌均匀定容至 1 L,经 0.45 μm 滤膜过滤,制成 0.50 mol/L NaOH,常温保存。

保存液:取 0.4 g NaOH 置于烧杯中,加入超纯水搅拌均匀定容至 1 L,经 0.45 μm 滤膜过滤,制成 0.01 mol/L NaOH 常温保存。

1.2 仪器与设备

AKTA pure m150: 美国 Cytiva 公司产品;pH 计、电导仪:瑞士梅特勒-托利多公司产品;NanoDROP 2000 型分光光度计:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;电感耦合等离子体质谱 ICP-MS 7900:美国 Agilent 公司产品;电子天平:德国 Sartorius 公司产品;纯水仪:德国 Merck 公司产品;Centrifuge 5910R 冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 填料孵育方法 将不同浓度磷酸溶液分别加入到含有色素的 Capto adhere Impres, 室温振荡处理并分别离心 5、10、15 min。处理后的填料经振荡混匀,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至中性。

1.3.2 Capto adhere ImpRes 的动态载量测试方法 将上述处理后的 Capto adhere ImpRes 按照如下步骤进行处理:首先对柱子进行前处理,依次加入超纯水 3 cv (cv 代表柱体积,3 cv 即 3 个柱体积),消毒液 3 cv,超纯水 3 cv,再生液 3 cv,超纯水 3 cv,平衡液 3 cv;然后进行上样;最后对柱子进行后处理,依次加入平衡液 6 cv,洗脱液 5 cv,消毒液 3 cv,超纯水 3 cv,保存液 3 cv。各溶液配方见表 1。

表 1 不同溶液的配方

Table 1 Formulations of different solutions

溶液	配方	pH
平衡液	10 mmol/L Tris +150 mmol/L NaCl	8.50
洗脱液	50 mmol/L 醋酸	2.96
再生液	200 mmol/L PB	6.60
消毒液	0.50 mol/L NaOH	-
保存液	0.01 mol/L NaOH	-

载量实验计算方法:填料载量(mg/mL)=

$$\frac{(\text{上样体积}(\text{mL})-\text{柱体积}(\text{mL})) \times \text{上样质量浓度}(\text{mg/mL})}{\text{柱体积}(\text{mL})}$$

1.3.3 铁离子测量方法 利用电感耦合等离子体质谱法(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)分析检测蛋白质样品中的 Fe 离子的浓度,将 0.2 mL 样品溶液准确地转移到 15 mL 离心管

中,用 2 g/dL 硝酸溶液稀释至 2 mL,充分混合并于 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行检测。ICP-MS 法检测的仪器参数设定为:RF 射频功率 1 550 W,蠕动泵转速 0.1 r/s,采样速度 0.3 r/s,样品采样时间为 60 s,稳定时间 40 s,采样深度 8 mm,辅助气体(高纯氩气)流量 1.0 L/min,载气(高纯氩气)流量为 1.14 L/min。

2 结果与分析

2.1 不同种类浓度酸溶液处理结果

分别使用 17.5 mol/L 醋酸、14.63 mol/L 磷酸、1 mol/L 柠檬酸和 12 mol/L 盐酸加入到含有色素的 Capto adhere Impress 中,室温振荡处理 5 min,观察填料颜色变化。由图 2 可知,浓磷酸去除填料色素的能力高于柠檬酸,上清液呈黄色;浓醋酸和浓盐酸不能明显去除填料色素,因此后续实验选用磷酸去除填料色素。

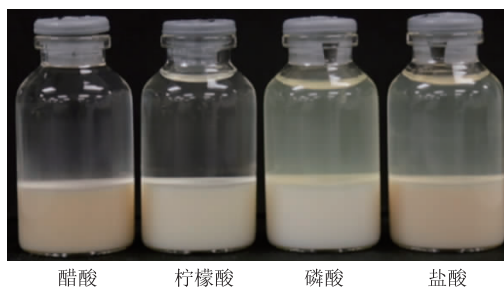


图 2 不同浓度酸处理后的 Capto adhere Impress

Fig. 2 Capto adhere Impress after treatment with different concentrated acids

2.2 不同浓度磷酸溶液孵育结果

使用不同浓度的磷酸溶液加入含有色素的 Capto adhere Impress 里,室温振荡 5、10、15 min,取上清液离心,测铁离子质量浓度,孵育后的填料用 1 mol/L NaOH 调 pH 至中性,沉降分层。由表 2 可知,0.5 mol/L 磷酸处理填料 5 min 时,上清液中铁离子浓度最高,去除色素能力最强。色素去除后对各组填料载量性能进行测试,0.5 mol/L 磷酸处理时间为 10~15 min 后的载量恢复到填料初始状态(载量约 76 mg/mL)。

由表 2 和图 3 可知,相同磷酸浓度下,孵育最初 10 min,载量随时间增长快速增加,10 min 后增长变缓,而铁离子质量浓度却逐渐降低,推断在磷酸处理填料过程中,铁离子可能与填料基架的多孔

表 2 不同浓度磷酸处理不同时间的 Capto adhere Impress
Table 2 Capto adhere Impress treated with different concentrations of phosphoric acid for different time

磷酸浓度/(mol/L)	孵育时间/min	铁离子质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	载量/(mg/mL)
0.1	5	6.45	62.71
	10	4.91	63.22
	15	4.37	63.46
0.3	5	16.91	65.27
	10	16.16	74.21
	15	14.21	73.45
0.5	5	25.67	71.76
	10	20.89	75.36
	15	16.90	76.92
空白对照	-	-	75.86

源	LogWorth	P值
磷酸浓度(mol/L)	3.537	0.000 29
时间(min)	1.941	0.011 46
磷酸浓度(mol/L)*磷酸浓度(mol/L)	1.448	0.035 66
磷酸浓度(mol/L)*时间(min)	1.360	0.043 61
时间(min)*时间(min)	0.487	0.325 48

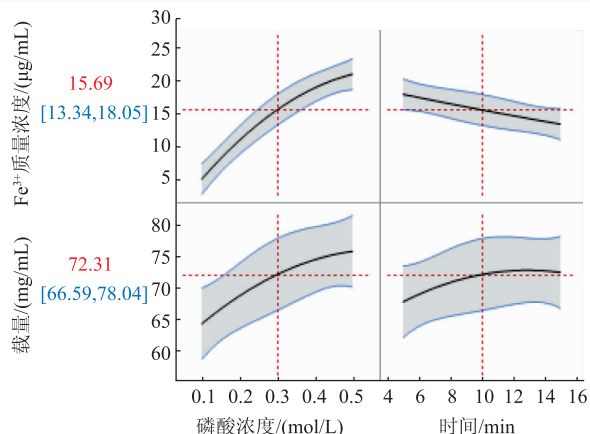


图 3 不同浓度磷酸处理不同时间的 Capto adhere Impress
Fig. 3 Capto adhere Impress treated with different concentrations of phosphoric acid for different time

结构发生二次吸附,因而铁离子质量浓度随时间呈下降趋势。二次吸附的铁离子预计在下次 NaOH 消毒处理填料时再次产生色素,因此需要控制孵育时间;在相同孵育时间的条件下,随着磷酸浓度的增加,铁离子质量浓度和载量同时增加。综上所述,磷酸浓度和孵育时间对去除填料色素及恢复载量有重要影响。

使用不同浓度磷酸和不同的孵育时间对 Capto adhere Impress 进行响应面分析,将表 2 数据导入到 JMP 软件中,以磷酸浓度和孵育时间为输入值,铁

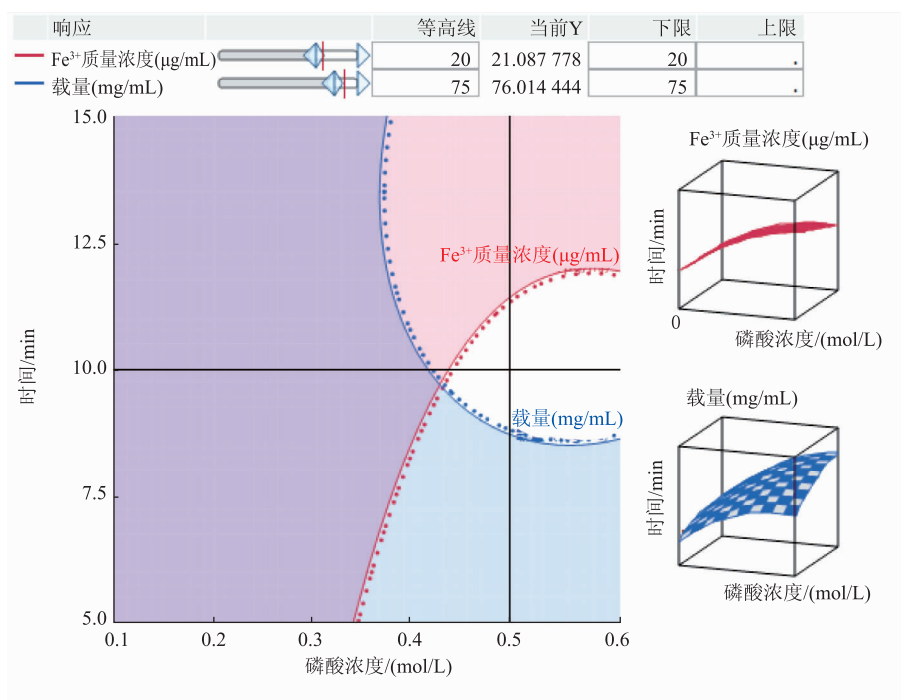


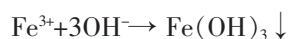
图 4 响应面分析法

Fig. 4 Response Surface Methodology

离子质量浓度和载量为响应输出,进而得到图4。由图4可知,蓝色线为75 mg/mL载量等高线,红色线为20 μg/mL铁离子质量浓度等高线,白色区为推荐工艺操作面。填料对照组载量为75.86 mg/mL,以76 mg/mL载量为实验目标,选择0.5 mol/L磷酸孵育填料8.75~11.35 min就可以实现以上目的。

3 结语

在本研究的阴离子填料案例中,在蛋白质上样、平衡、洗脱阶段,中间体样品和填料均没有出现显著的颜色变化,但在NaOH对填料进行消毒再生时,填料由乳白色逐渐变黄色,且随填料的循环次数增加,颜色逐渐加深,最终呈黄褐色,推测填料中吸附的铁离子与氢氧化钠发生反应,产生黄色沉淀颗粒,并沉积滞留于填料多孔腔内部,反应如下:



参考文献:

- [1] 朱迅. 医药生物技术及生物技术药物(三)——工程化抗体药物的现状及发展趋势[J]. 中国医药技术经济与管理, 2009, 3(12): 65-72.
- [2] 张敏, 李佳, 俞德超. 单克隆抗体药物在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2015, 30(6): 495-500.
- [3] 张怀民, 傅秀慧, 刘晓志. 单克隆抗体药物耐药机制的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2017, 20(1): 107-12.
- [4] TANG J, PEARCE L, O'DONNELL-TORMEY J, et al. Trends in the global immuno-oncology landscape[J]. *Nature Reviews*

- Drug Discovery**, 2018, 17(11):783-784.
- [5] MOHAMMADIAN O, RAJABIBAZL M, POURMALEKI E H, et al. Development of an improved lentiviral based vector system for the stable expression of monoclonal antibody in CHO cells[J]. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2019, 49(8): 822-829.
- [6] 崔乐乐, 卜桐, 刘兆基, 等. 单克隆抗体及其抗感染作用的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2020, 40(2): 87-92.
- [7] 苏昂. 抗 HSA 单克隆抗体基因的筛选及重组表达[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [8] MAERTEN P, SHEN C, DE HERTOOGH G, et al. Agonistic anti-4-1bb (cd 137) monoclonal antibody (mab) aggravates experimental colitis, but do not abrogate tolerance in the T cell transfer model of colitis[J]. **Environmental Microbiology**, 2005, 16(1): 60-71.
- [9] WANG Z, ZHU J, LU H. Antibody glycosylation: impact on antibody drug characteristics and quality control[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020, 104(5): 1905-1914.
- [10] TAWFIQ Z, CAIAZZA N C, KAMBOURAKIS S, et al. Synthesis and biological evaluation of antibody drug conjugates based on an antibody expression system: conamax[J]. **ACS Omega**, 2020, 5(13): 7193-7200.
- [11] KAWISH S M, BEG S, RAHMAN M, ALAM K, ILYAS R, AHMAD F J. Nanoformulation Strategies for Cancer Treatment: Micro and Nano Technologies[M]. Netherlands: Elsevier, 2021: 227-253.
- [12] 季宇. 单克隆抗体一次性生产平台成本分析[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(1): 56-63.
- [13] 翟东改, 陈凌, 钱平. 抗体药物纯化方法研究进展[J]. 生物化工, 2018, 4(3): 145-149.
- [14] 陈泉, 卓燕玲, 许爱娜, 等. 蛋白 A 亲和层析法纯化单克隆抗体工艺的优化[J]. 生物工程学报, 2016, 32(6): 807-818.
- [15] 魏建玲, 张波, 刘颖, 等. 人源化抗人 TNF α 单克隆抗体纯化工艺的优化[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(1): 79-83.
- [16] 尚玉珍, 宋怡兰. 氢氧化钠纯度对阴树脂再生效果及水处理的影响[J]. 华北电力技术, 2001(10): 22-24.
- [17] VIJAYASANKARAN N, VARMA S, YANG Y, et al. Effect of cell culture medium components on color of formulated monoclonal antibody drug substance[J]. **Biotechnology Progress**, 2013, 29(5): 1270-1277.
- [18] BUTKO M, PALLAT H, CORDOBA A, et al. Recombinant antibody color resulting from advanced glycation end product modifications[J]. **Analytical Chemistry**, 2014, 86(19): 9816-9823.
- [19] PRENTICE K M, GILLESPIE R, LEWIS N, et al. Hydroxocobalamin association during cell culture results in pink therapeutic proteins[J]. **mAbs**, 2013, 5(6): 974-981.
- [20] XU J, JIN M, SONG H, et al. Brown drug substance color investigation in cell culture manufacturing using chemically defined media: a case study[J]. **Process Biochemistry**, 2014, 49(1): 130-139.
- [21] SONG H, XU J, JIN M, et al. Investigation of color in a fusion protein using advanced analytical techniques: delineating contributions from oxidation products and process related impurities[J]. **Pharmaceutical Research**, 2016, 33(4): 932-941.
- [22] XU J, REHMANN M S, XU X, et al. Improving titer while maintaining quality of final formulated drug substance via optimization of CHO cell culture conditions in low-iron chemically defined media[J]. **mAbs**, 2018, 10(3): 488-499.