



生物大分子层析工艺中高载量离子交换填料 TOYOPEARL GigaCap™ 系列产品的介绍



主要内容

- TOYOPEARL填料的基本性质
- 生物分离中的三步层析工艺法简介
- 离子交换填料中离子交换官能基团的修饰
- TOYOPEARL离子交换填料的产品链
- TOYOPEARL GigaCap 系列产品
- TOYOPEARL GigaCap Q-650M
- TOYOPEARL GigaCap S-650M
- TOYOSCREEN层析工艺研发及筛选用预装柱
- 用户评价反馈信息
- 单克隆抗体纯化中TOYOPEARL填料的产品链



TOYOPEARL 填料的基本性质

- **良好的刚性(填料硬度)**
 - 可应用于大型制备层析柱(2000L),并可获得更高的流速.
- **填料粒径分布范围窄**
 - 峰型尖锐,分离效果更好
 - 低压降(特别适合于填料的装填和大型层析柱的操作使用)
- **良好的化学,物理稳定性**
 - 收缩,溶胀小
 - 耐高盐,有机溶剂,碱洗,酸洗及高压灭菌
- **无特异性吸附**
 - 对生物分子有更好的分离效果和回收率
- **可靠的填料**
 - 生物负载(Bioburden):内毒素水平低,细菌计数
- **产品系列齐全**
 - 分子尺寸排阻层析填料(SEC),离子交换层析填料(IEC), 疏水反应层析填料(HIC), 亲和层析填料(AFC)
- **填料产能有保证(50,000L/Y)**
 - 产品保证/高品质
 - 可提供GMP 审查(工厂按ISO-9000运行)



工业规模生产中 TOYOPEARL及TSK-GEL填料的实际应用举例

■ 生物医药

- B牛乳糖(Beta-Galactosidase)
- 红细胞生成素(EPO)
- 八因子(Factor VIII)
- 表皮生长因子 (EGF)
- 生长激素 (r-hGH)
- 胰岛素(Insulin)
- β 干扰素(Interferon beta)
- 白介素II(Interleukin-2)
- 单克隆抗体(Monoclonal Antibodies)
- 多肽(Peptides)
- 组织血浆酶原活化剂(Tissue Plasminogen Activator)
- 乙肝疫苗和其他疫苗(Hepatitis B Vaccine and other vaccines)
- 合成低聚核苷酸(Synthetic oligonucleotide)
- 其他

工业酶,食品添加剂等

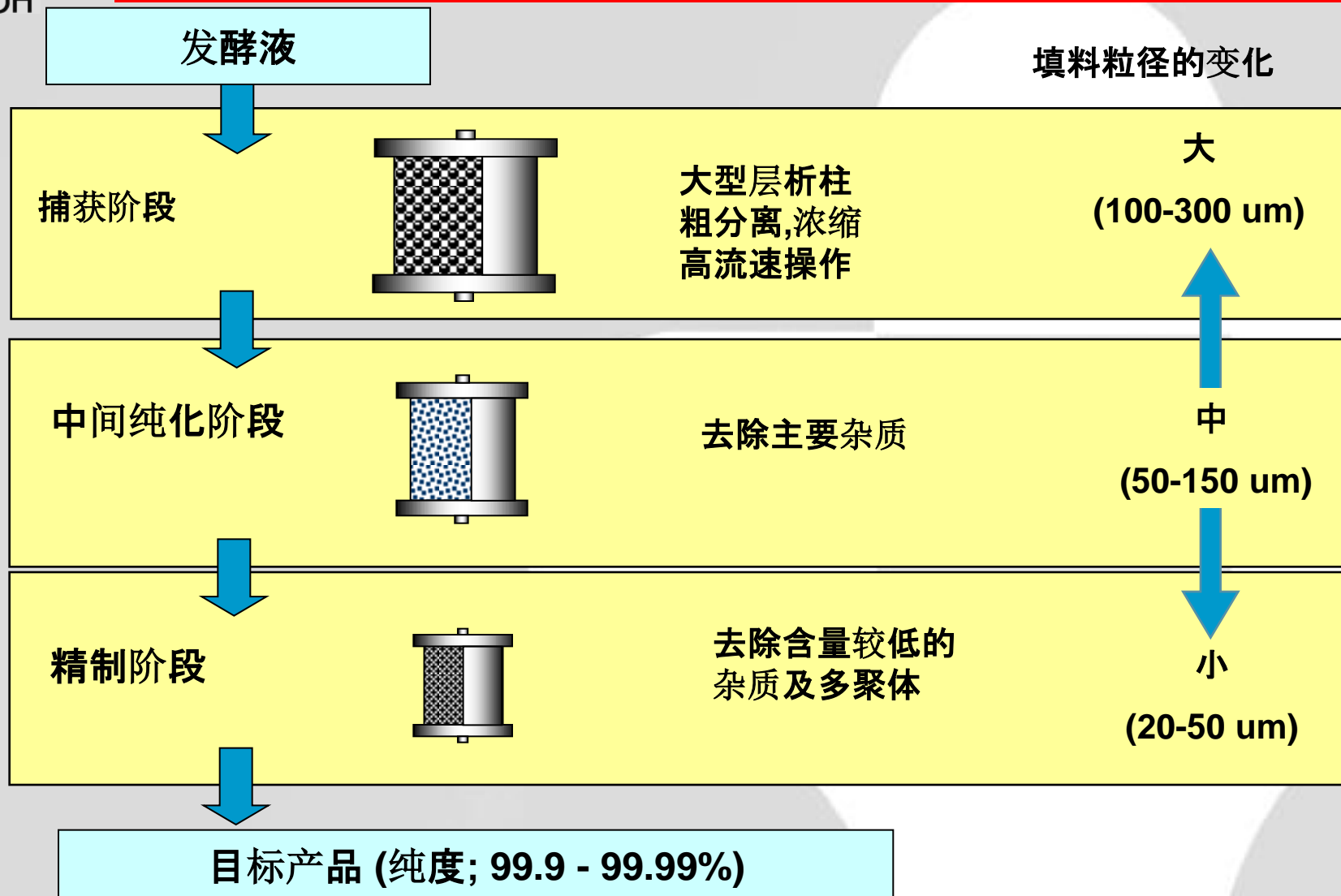
- 氨基肽酶K(Aminopeptidase K)
- 胰肽酶阻断剂(Elastase Inhibitor)
- 低聚糖(Oligosaccharide)
- 多酚(Polyphenol)
- 蛋白酶K(Proteinase K)
- 尿素酶(Urease)
- 其他

生产规模:10 L--- 2,000 L /层析柱



TOSOH

生物分离中的三步层析工艺法简介



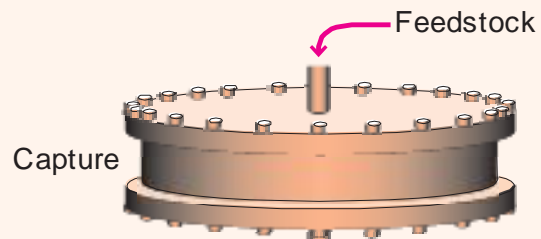


三步层析工艺法对应的TOYOPEARL 离子交换填料

Process step

Bead size

Process media



200 μ m

Anion

Cation

Toyopearl MegaCap SP-550EC

100 μ m

Toyopearl GigaCap Q-650M

Toyopearl GigaCap S-650M

Toyopearl SuperQ-650C

Toyopearl SP-650C

Toyopearl DEAE-650C

Toyopearl SP-550C

Toyopearl QAE-550C

Toyopearl CM-650C

Intermediate Purification

65 μ m

Toyopearl GigaCap Q-650M

Toyopearl GigaCap S-650M

Toyopearl SuperQ-650M

Toyopearl SP-650M

Toyopearl DEAE-650M

Toyopearl CM-650M

35 μ m

Toyopearl SuperQ-650S

Toyopearl SP-650S

Toyopearl DEAE-650S

Toyopearl CM-650S

Polishing

30 μ m

TSKgel SuperQ-5PW (30)

TSKgel SP-5PW (30)

TSKgel DEAE-5PW (30)

20 μ m

TSKgel SuperQ-5PW (20)

TSKgel SP-5PW (20)

TSKgel DEAE-5PW (20)

QC

Pure Product

10 μ m

TSKgel SuperQ-5PW ϕ 7.5mmIDx7.5cm

TSKgel SP-5PW ϕ 7.5mmIDx7.5cm

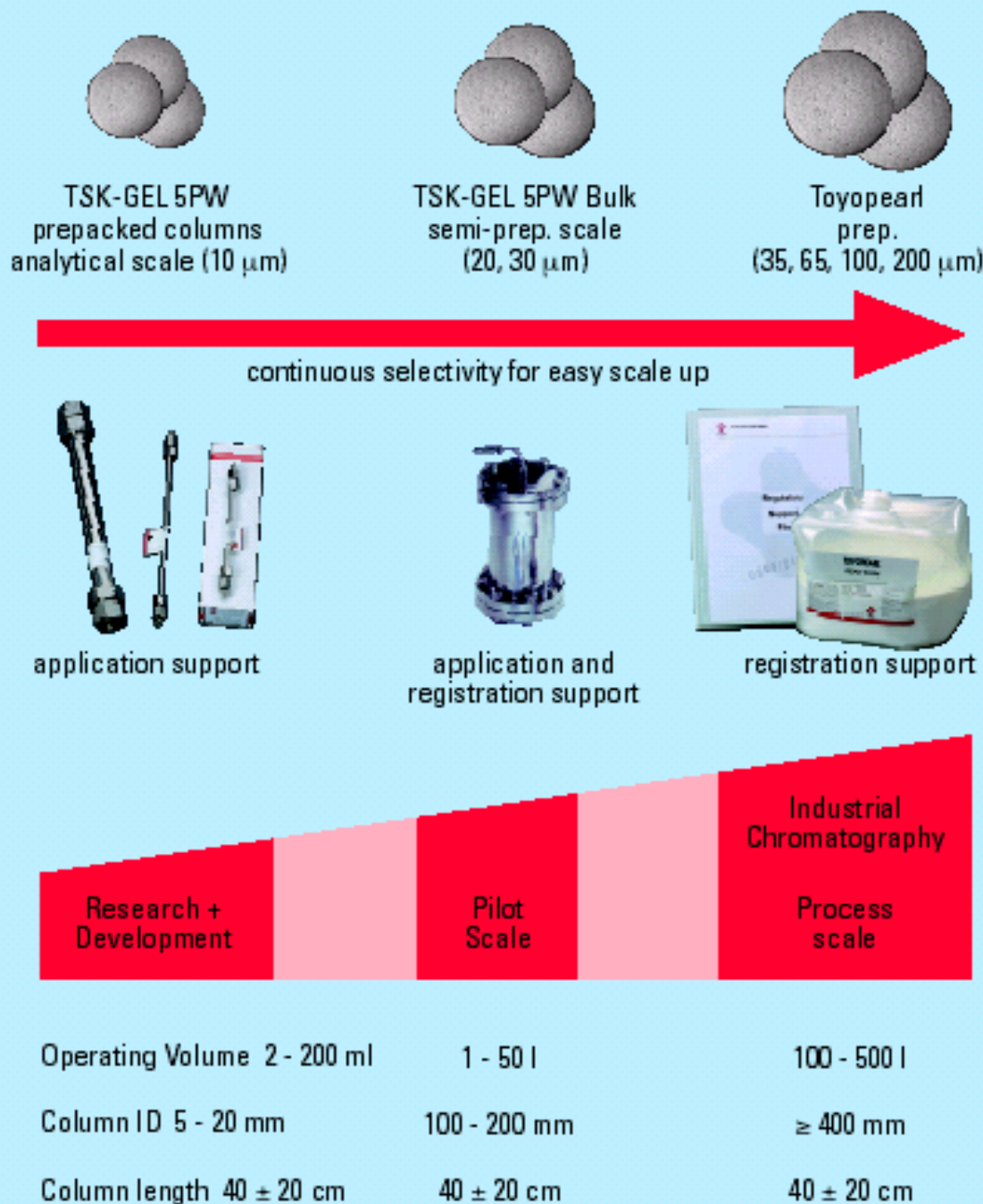
TSKgel DEAE-5PW ϕ 7.5mmIDx7.5cm

TSKgel CM-5PW ϕ 7.5mmIDx7.5cm

Same selectivity HPLC columns are available for most process media



产品的连续性 (10 μm -200 μm)



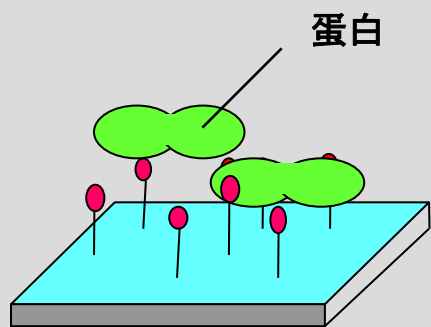


生物分离中的离子交换层析工艺

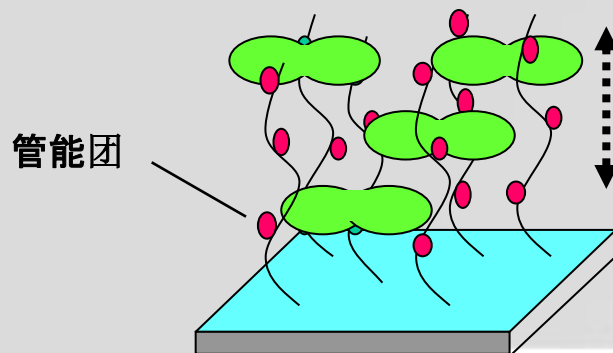
■ 离子交换填料的应用

- 60% 的层析工艺会使用到离子交换填料
- 在捕获这一步可以大量处理进料(样品)
- 价格(投资成本)远比疏水和亲和填料便宜
- 工艺中在位清洗(GIP)方便
- 某些时候分离效果比疏水和亲和填料差一些
- 三步层析工艺:AIEC-HIC-SEC,AIEC-CIEC-HIC,AIEC-AFC-HIC
- 层析工艺中阴离子交换填料(AIEC)更受欢迎
- 可以直接从捕获步骤进入最后的精制步骤(即可以省去中间一步的纯化步骤)
- 阴离子交换填料(AIEC)可以有效去除核酸和内毒素
- 阳离子交换填料(CIEC)可以有效去除细胞培养液中的宿主细胞蛋白(HCP)来源的杂质

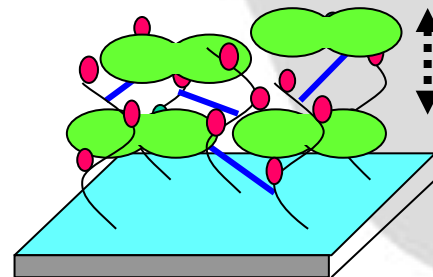
填料中离子交换官能团的多种修饰方式及特征



单层修饰



嫁接式修饰



网络式修饰

官能团:	单层修饰	嫁接式修饰	网络式修饰
载量:	较低	高	高
填料收缩性:	不明显	明显	明显
柱压:	低	较高	低



TOYOPEARL 离子交换填料的产品链

■ **GigaCap Q-650M**



- 最高载量, BSA (> 162 mg/mL)
- 适用于各种分子量的蛋白
- 捕获阶段
- 高分离效果(高分辨率)

■ **SuperQ-650S,M,C**

- 高载量 (-155mg/ml)
- OligoDNA, siRNA
- 适用于低分子量和中等分子量的蛋白
- 高分离效果

■ **QAE-550C**

- 高载量 (-78 mg/ml)
- 适用于低分子量和中等分子量的蛋白
- 强吸附能力

■ **DEAE-650S,M,C**

- 载量;-35mg/ml
- 高分离效果
- 适用于中等分子量和高分子量的蛋白

■ **GigaCap S-650M**



- 高载量, IgG (>136mg/ml)
- 适用于IgG 和各种分子量大小的蛋白
- 捕获阶段
- 高分离效果(高分辨率)

■ **MegaCap SP-550EC**

- 高载量(-120mg/ml)
- 高流速
- 适用于多肽(胰岛素)及小分子量的蛋白
- 捕获阶段

■ **SP-550C**

- 高载量(-120mg/ml)
- 多肽,小分子量的蛋白
- 强吸附能力

■ **SP-650, CM-650S, M, C**

- 载量; -60mg/ml
- 高分离效果
- 适用于中等分子量和高分子量的蛋白

我们还可以提供粒径更小 (20, 30 μ m) ,可适用于高分离效果的中高压制备型 TSK-GEL PW系列的散装填料



TOYOPEARL GigaCap系列填料的应用

- 血清,血浆蛋白生产厂家
 - 白蛋白,γ球蛋白,凝血因子等
- 生物制药企业
 - 单克隆抗体,基因重组蛋白,胰岛素等
- 诊断试剂公司
 - 单克隆抗体,基因重组蛋白,酶,多肽等
- 食品工业
 - 基因重组蛋白,酶,多肽等
- 合同企业
- 经济型层析工艺
 - 高性价比工艺



TOYOPEARL GigaCap Q-650M

- 基本物性
- 主要特点及其他公司同类产品的比较



Toyopearl GigaCap Q-650M的基本物性

- **蛋白载量; 牛血清白蛋白 (BSA)**
 - 静态吸附载量(SBC); >162 g/L (in 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5))
 - GigaCap Q-650M填料的静态吸附载量高于SuperQ-650M填料
 - 动态吸附载量(DBC); >150 g/L
- **离子交换容量**
 - 0.1 – 0.2 mequiv./mL
- **填料粒径分布**
 - 50 – 100 μ m (>80%)
- **生物负载(Bioburden)**
 - 细菌记数; <100 CFU/mL
 - 内毒数; <10 EU/mL
- **不溶性物质**
 - 提取物; < 0.2 %
- **杂质**
 - < 6 颗粒/100 mL
- **产品规格与其他类型的 Toyopearl 填料相似.**
- **碱性稳定性与其他阴离子交换填料相似**
 - 至少可以在 0.5 N NaOH 中保存两周而无变化



主要特点及其他公司同类产品的比较

- **GigaCap Q-650M 填料具有更好的机械稳定性,更高的蛋白载量和更好的选择性,洗脱峰型尖锐.**
 - 静态吸附载量(SBC); BSA > 162 g/L (实测结果; 191 g/L)
 - 动态吸附载量(DBC); BSA > 150 g/L (实测结果; 175 g/L)
- Q Sepharose XL (GE)
 - 多交联琼脂糖类填料
 - 相似的载量和选择性
 - 缺点:由于填料基质较软,不适用于使用大型层析制备柱,同样也不适于在高流速下使用.
- Capto Q (GE)
 - 高多交联琼脂糖类填料:较 Q Sepharose XL的刚性好,硬度与 Toyopearl 填料相似
 - 载量与 GigaCap Q-650M 填料相似
 - 缺点:由于填料粒径分布范围较宽,填料的分离效果稍差.由于质量迁移较低,洗脱峰形展宽.这可能与填料上官能团的空间结构有关.



对牛血清白蛋白 (BSA)的动态吸附载量(DBC)

离子交换填料	粒径分布	离子交换容量	DBC (BSA)	回收率
	(μm)	(meq/mL)	(mg/mL-gel)	(%)
Toyopearl GigaCap Q-650M	50-100	0.16	175	98
Toyopearl SuperQ-650M	50-150	0.12	149	98
Toyopearl QAE-550C	50-150	0.33	70	98
Q Sepharose XL	50-150	NA	220	96
Capto Q	90	NA	166	98
Fractogel TMAE HiCap	40-90	NA	138	95

Eluent; 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)

Flow rate; 212 cm/hr, DBC calculated by capacity at 10% Breakthrough curve.



动态吸附载量(DBC)与流速的依存关系

	对牛血清白蛋白(BSA) 的动态吸附载量(DBC) (g/L-gel)			
	线性流速 212 cm/hr	500 cm/hr	800 cm/hr	1060 cm/hr
GigaCap Q-650M	175	168	164	NA
Capto Q	171	161	155	NA
Fractogel TMAE Hicap(M)	138	NA	120*	106

*：测定Fractogel TMAE Hicap(M)填料对牛血清白蛋白的动态吸附载量时,使用了636 cm/hr 的线性流速(代替 500 cm/hr的线性速度)。

数据表明:

GigaCap Q-650M 填料在高流速下具有高的动态吸附载量。

Fractogel TMAE Hicap (M) 填料在高流速下使用时动态吸附载量相对较低。



对多种蛋白静态吸附载量 (SBC)的比较

	静态吸附载量 (g/L-gel)			
	大豆胰蛋白酶 抑制剂 (Mw: 22KDa) (pI 4.5)	牛血清白蛋白 (Mw: 66KDa) (pI 4.9)	伽玛球蛋白 (Mw: 160KDa) (pI 5.8-7.3)	甲状腺球蛋白 (Mw: 660KDa) (pI 4.5)
GigaCap Q-650M	202	210	138	95
Capto Q	NA	236	139	89
Q-Sepharose XL	NA	NA	127	71

吸附条件(Binding conditions);

大豆胰蛋白酶抑制剂(STI); 15 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)

牛血清白蛋白(BSA); 15 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0) + 15 mmol/L NaCl

伽玛球蛋白(IgG); 15 mmol/L Tris-HCl (pH 8.7)

甲状腺球蛋白(Thy); 15 mmol/L Tris-HCl (pH 8.7) + 100 mmol/L NaCl

※对蛋白的静态吸附载量是会随着蛋白分子量大小,淋洗液的pH值及离子强度(如盐浓度)变化而变化的。



蛋白吸附载量与蛋白分子量大小的相关关系

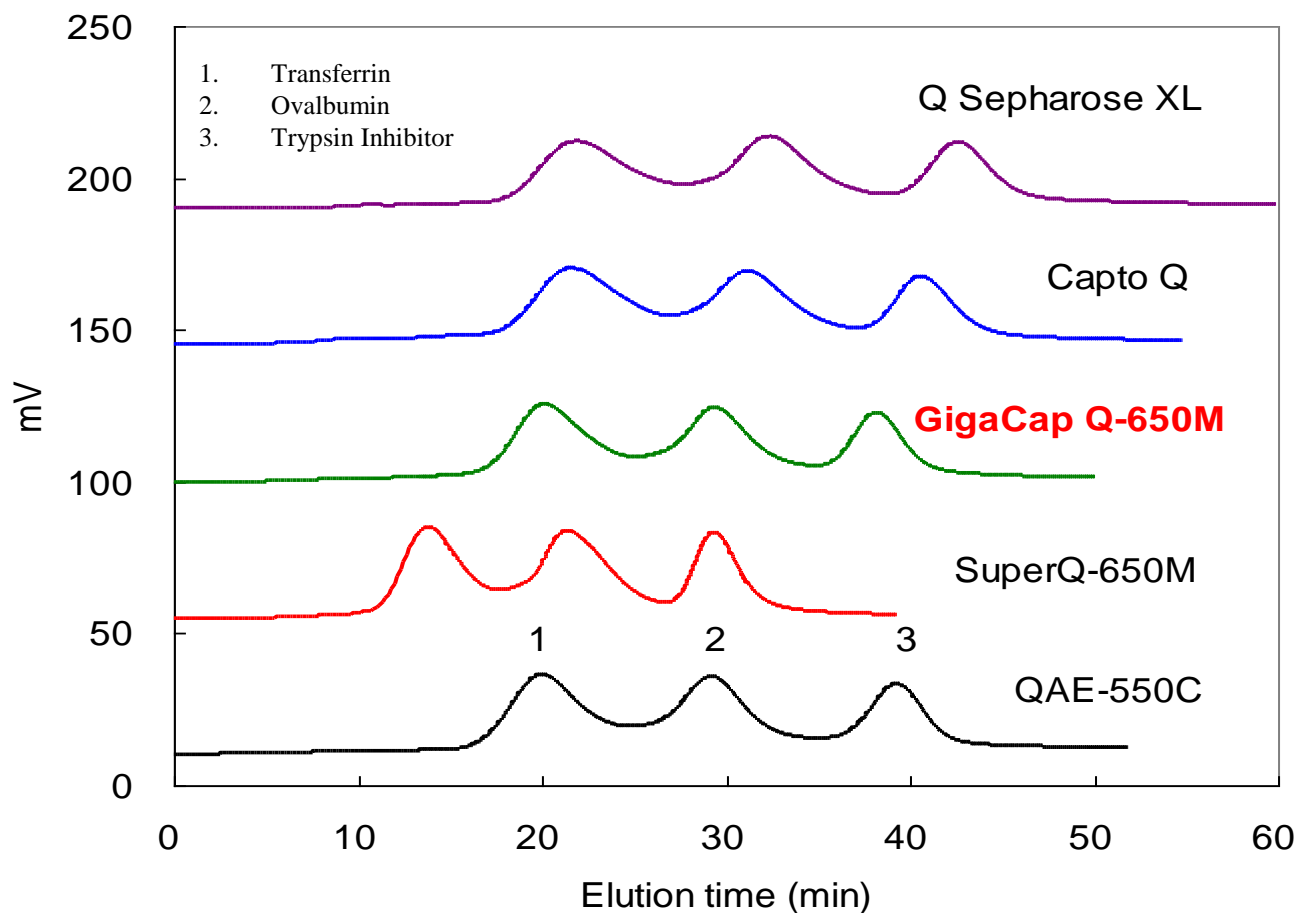
		BSA (MW: 66,000)	IgG (MW: 160,000)	Thyroglobulin (MW: 660,000)
GigaCap Q-650M	SBC	191 g/L	138 g/L	95 g/L
	DBC	175 g/L	108 g/L	49 g/L
Capto Q	SBC	179 g/L	139 g/L	89 g/L
	DBC	166 g/L	95 g/L	7 g/L

※动态吸附载量(DBC)测定所使用的线性流速为212 cm/hr.

随着蛋白分子量的增大,不同填料的吸附载量(SBC&DBC)的差别趋于明显.
对于大分子量的甲状腺球蛋白,CaptoQ填料的静态吸附载量(SBC) 虽然较高,但动态吸附载量(DBC)很低.



不同填料的分离选择性及分离效果的比较

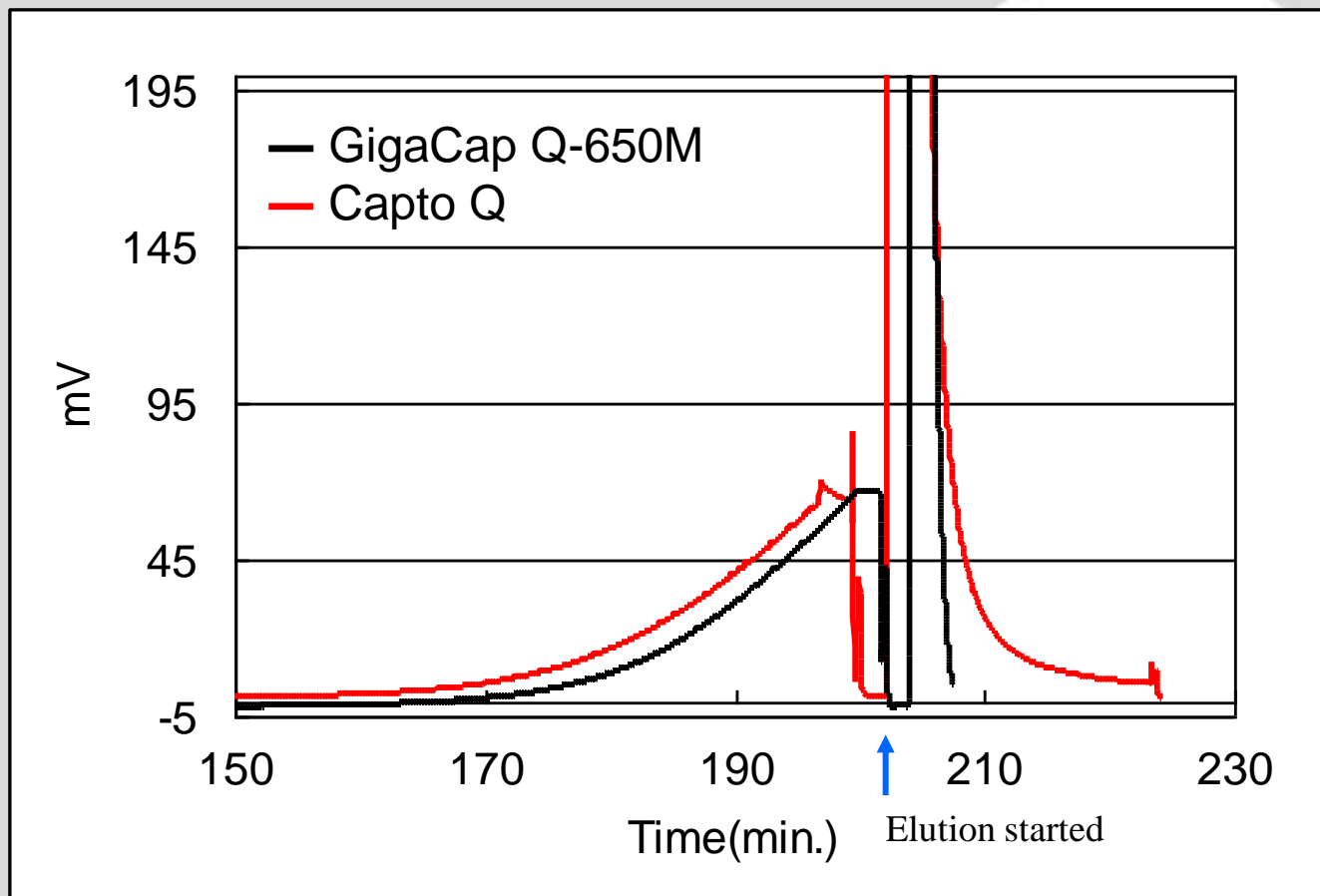


	Rs	
	TF/OV	OV/TI
GigaCap Q-650M	1.18	1.34
SuperQ-650M	1.11	1.31
QAE-550C	1.16	1.45
Capto Q	0.99	1.19
Q Sepharose XL	1.12	1.34

GigaCap Q-650M 填料同时具有较高的载量和较高的分离效果.



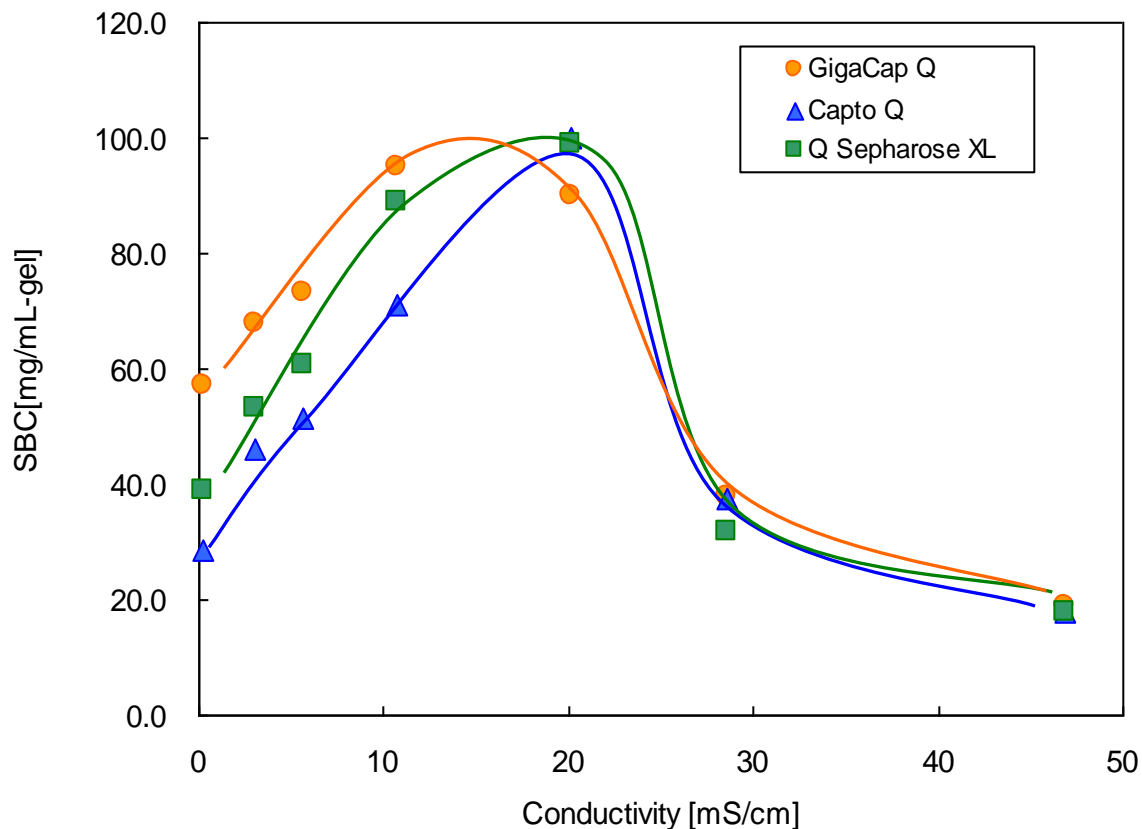
牛血清白蛋白(BSA)阶段性洗脱的峰宽比较



GigaCap Q-650M 填料的洗脱峰峰形较 Capto Q填料的洗脱峰峰形尖锐(>2倍),这表明在工业层析工艺中使用GigaCap Q-650M填料时可以获得更高的生产效率.

对于IgG或更高分子量的蛋白,GigaCap Q-650M填料可以获得更为尖锐的洗脱峰.

淋洗液中盐浓度与填料对高分子量蛋白(甲状腺球蛋白)的静态吸附载量之关系



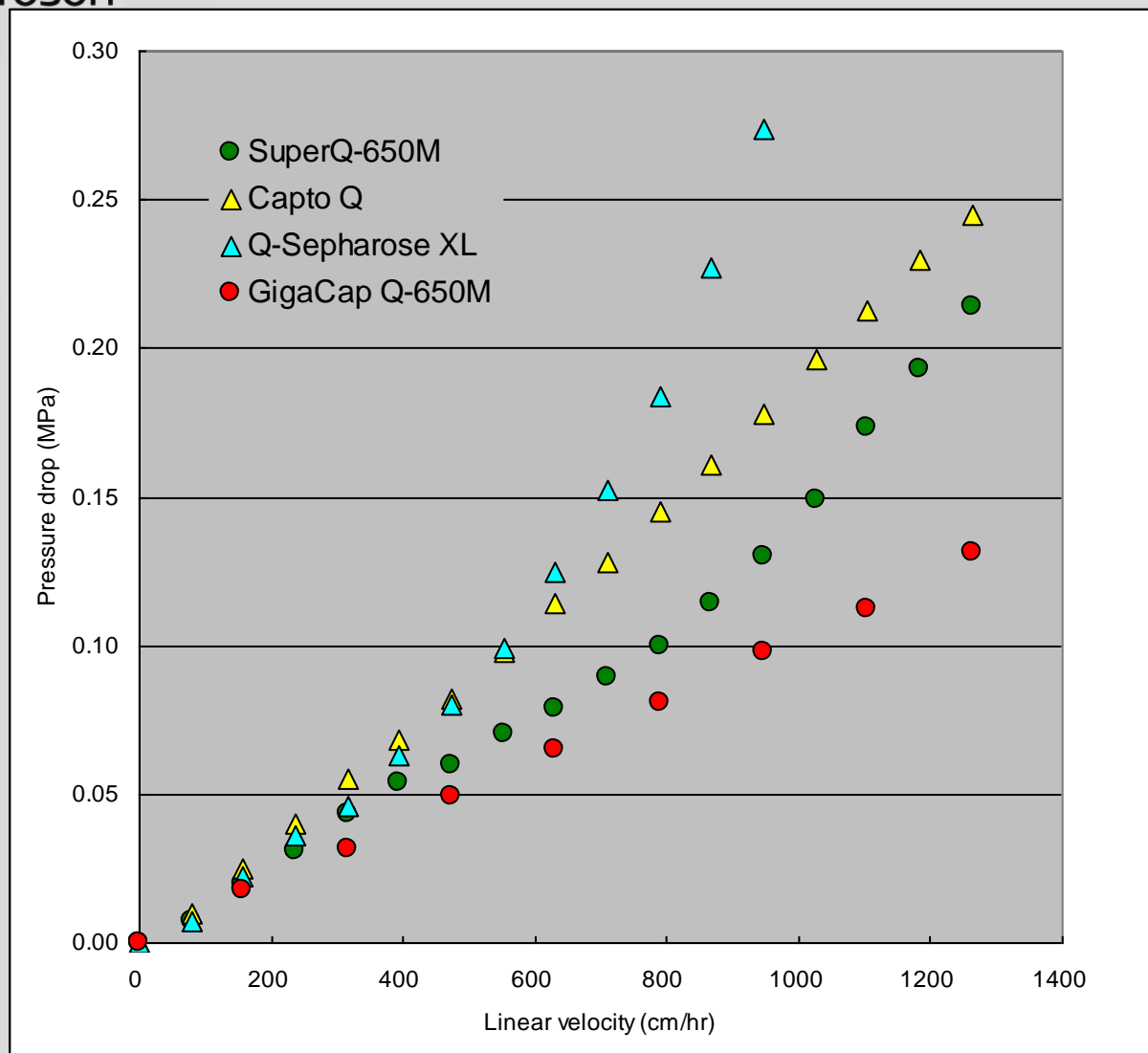
Comparison of SBC (protein : Thyroglobulin)

比起不含盐的淋洗液,GigaCap Q-650M填料在下列条件下[0.1-0.15 mol/L in 15 mmol/L Tris-HCl (pH 8.7)],对蛋白的静态吸附载量更高.

对大分子量的蛋白,当缓冲液中含有 0.1 mol/L的盐时,有利于加强蛋白与 GigaCap Q-650M和其他离子交换填料间的吸附力.



不同离子交换填料压降与流速的关系(填料刚性比较)

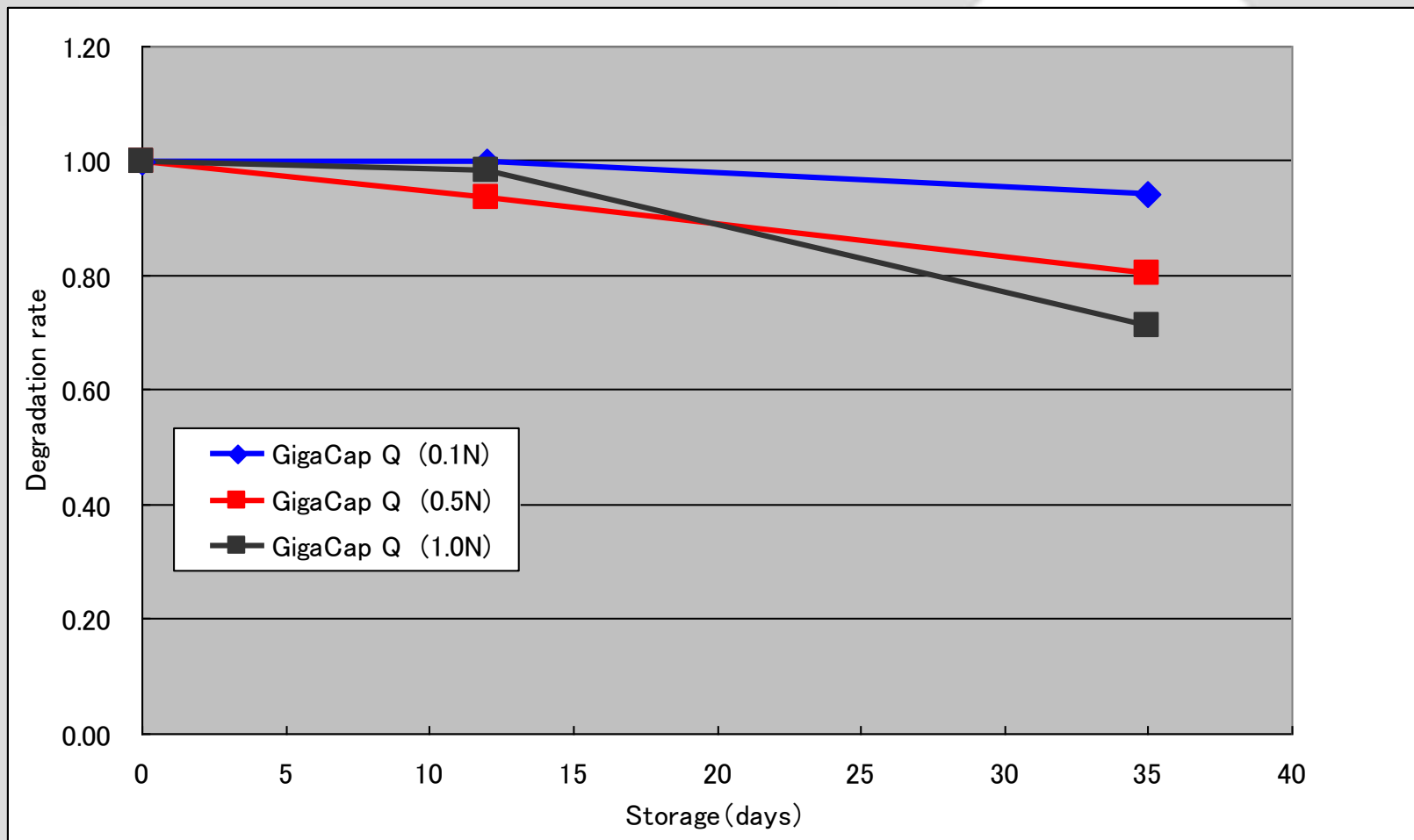


GigaCap S-650M 填料有更低的压降,可以使用于大型层析柱并获得高流速.

当线性流速达到 600 cm/hr 时,Q-Sepharose XL填料将可能会发生柱床塌陷的现象.这限制了此种填料使用于大型层析柱的可能性.



GigaCap Q-650M填料碱性条件下的保存稳定性



当GigaCap Q填料保存在 0.1 N, 0.5 N, 1.0 N 的 NaOH 中35天后,填料的载量分别会下降 5 %, 20 %, 和 29 %.



TOYOPEARL GigaCap S-650M

- 基本物性
- 主要特点及与其他公司同类产品的比较



TOYOPEARL GigaCap S-650M的基本物性

- 对IgG的吸附载量
 - 静态吸附载量(SBC): 136 g/L – 176 g/L
 - 动态吸附载量(DBC): 122 g/L– 165 g/L
- 离子交换容量
 - 0.1 – 0.2 mequiv./MI
- 填料粒径分布
 - 50 – 100 um ($\geq 80\%$)
- 生物负载(Bioburden)
 - 细菌计数: ≤ 100 CFU/mL
 - 内毒素: ≤ 10 EU/mL
- 不溶性物质
 - 提取物: $\leq 0.2\%$
- 杂质
 - ≤ 6 颗粒/100 mL
- 产品规格与其他类型的 Toyopearl 填料相似(除了对蛋白有更高的吸附载量)



主要特点及与其他公司同类产品的比较

- **TOYOPEARL GigaCap S-650M**填料具有良好的选择性和刚性,对 IgG 具有更高的载量.
 - 动态吸附载量(DBC) : IgG(140 g/L); lysozyme(190 g/L): insulin(130 g/L)
- **SP Sepharose XL (GE)**
 - 多交联琼脂糖类填料
 - 相似的载量和选择性
 - 缺点:由于刚性较弱,不可以在大型层析制备柱或柱床较高的层析柱条件下进行高流速的操作.
- **Capto S (GE)**
 - 高多交联琼脂糖类填料,克服了 SP Sepharose XL 填料刚性差的弱点
 - 相似的选择性和刚性
 - 缺点:由于填料粒径分布范围宽,致使峰型展宽;对CHOP表达的单克隆抗体选择性较差.
- **Fractogel SE HiCap (Merck)**
 - 相似的填料基质和刚性
 - 缺点:载量仅为 GigaCap S-650M 填料的一半;选择性较差
 - 使用含盐的淋洗液时填料易发生收缩,限制了其在大型层析制备柱或柱床较高的层析柱条件下的使用.



单克隆抗体的层析工艺简介

■ Protein A 亲和层析工艺

- 常用工艺(70%单克隆抗体层析工艺采用ProteinA亲和层析)
- 优点; 在捕获阶段便可获得高纯度的单克隆抗体产品.
- 缺点:填料昂贵;亲和填料不是很稳定
 - Protein A 亲和填料的价格:;\$5,000 – 12,000/L
- 层析工艺举例: AFC-CIEC-AIEC, AFC-HIC-CIEC

■ 非 Protein A亲和层析工艺

- 优点:填料投资成本低;填料碱洗稳定
 - IEC/HIC 填料的价格: \$500 – 2,000/L
- 缺点:需要多步才能获得高纯度的单克隆抗体产品
- 层析工艺举例: CIEC-AIEC-HIC, CIEC-HIC-AIEC-SEC, CIEC-HAC-HIC, HCIC-CIEC-HIC-HAC

■ 备注

- CHO宿主蛋白 (CHOP)和单克隆抗体的多聚体需要使用IEC和HIC层析填料去除
- 其他还有 HCIC类(混合模式; Pall), 羟基磷灰石 (Bio-Rad)等填料可以应用在单克隆抗体的纯化工艺中



对Y球蛋白(Y IgG)的动态吸附载量(DBC)

离子交换填料	粒径分布	离子交换容量	动态吸附载量 (IgG)	回收率
	(μm)	(meq/mL)	(mg/mL-gel)	(%)
TOYOPEARL GigaCap S-650M	50-100	0.16	145	98
TOYOPEARL SP650C	50-150	0.12	12	98
TOYOPEARL SP550C	50-150	0.13	14	98
SP Sepharose XL	50-150	0.17	140	98
Capto S	(90)	0.13	138	NA
Fractogel SE HiCap	40-90	0.08	68	97

Flow rate; 212 cm/hr, DBC was calculated by 10 % height of Breakthrough curve.

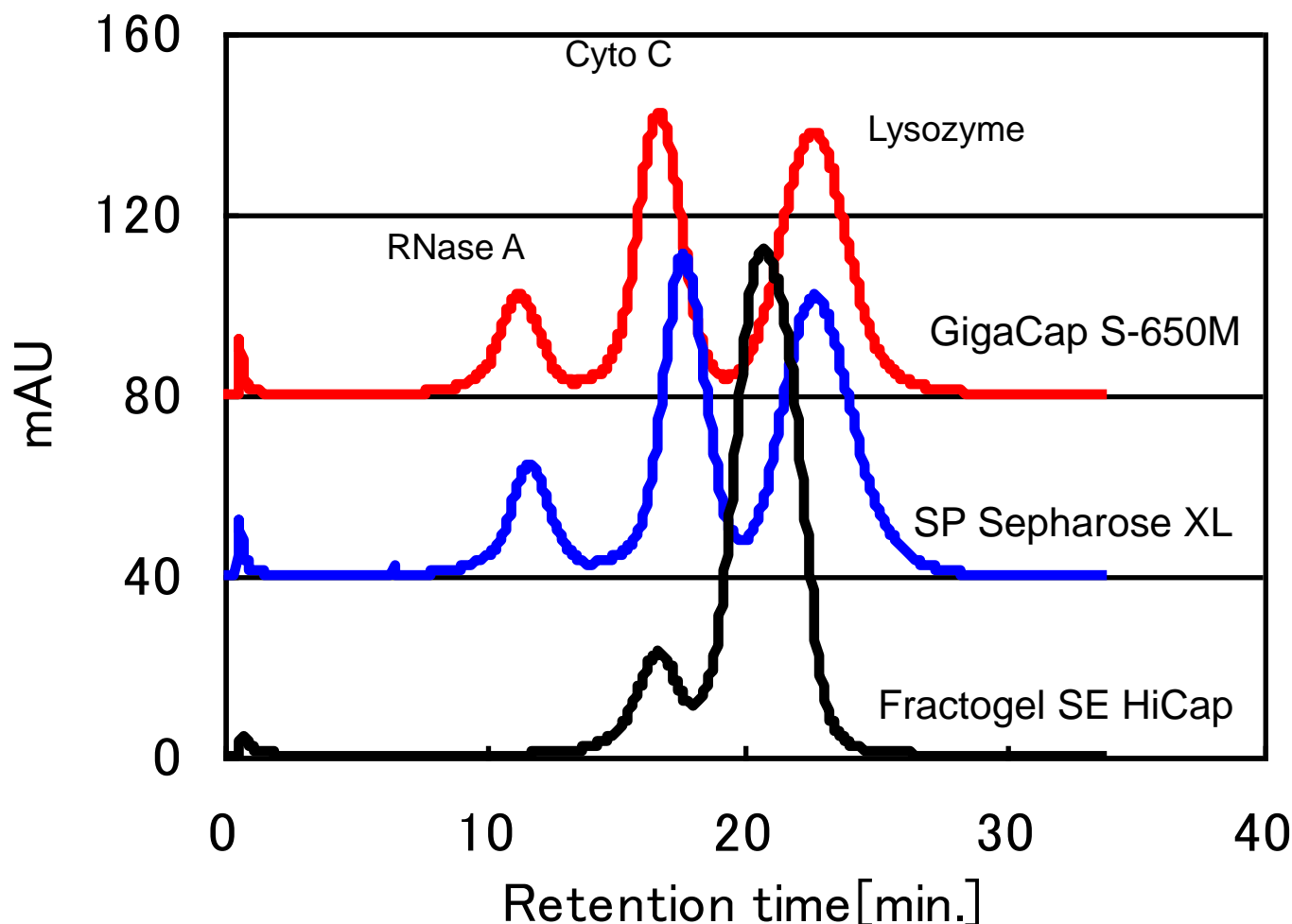


动态吸附载量(DBC)与流速的依存关系

	动态吸附载量(DBC) (human IgG, g/L)			
	线性流速 212 cm/hr	424 cm/hr	636 cm/hr	1060 cm/hr
GigaCap S-650M	145	114	99	75
SP Sepharose XL	138	NA	108	85
SP Sepharose FF	21	NA	8	5
Fractogel SE Hicap(M)	69	NA	39	27

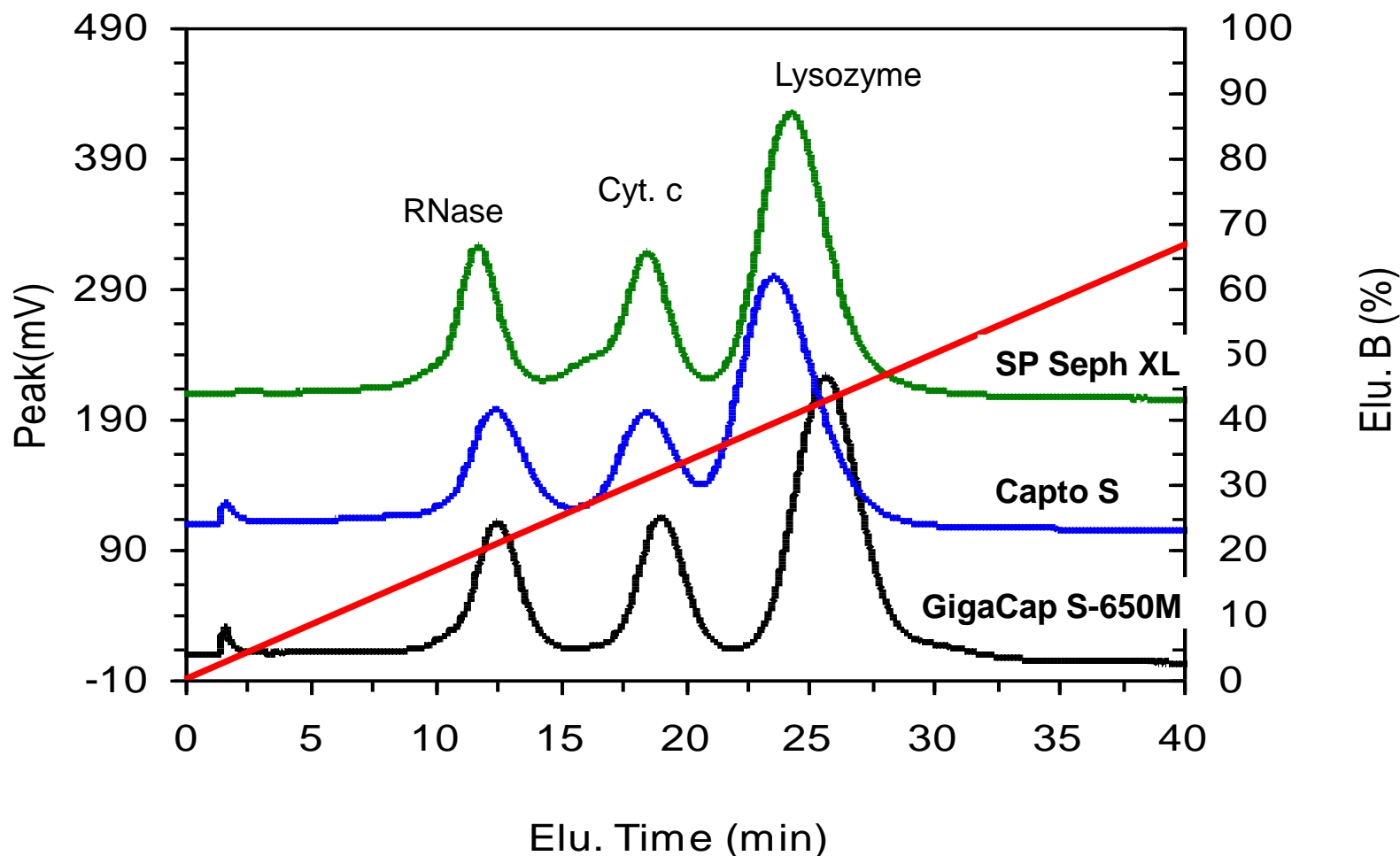
GigaCap S-650M 和 SP Sepharose XL填料在高于 600 cm/hr的线性流速下仍然可以获得很高的载量,然而对于 SP Sepharose XL填料来讲在大型的层析柱下是很难获得如此高的线性流速的,其他填料在高线性流速下对 IgG的动态吸附载量是很低的.

分离选择性和分离效果比较 (1)



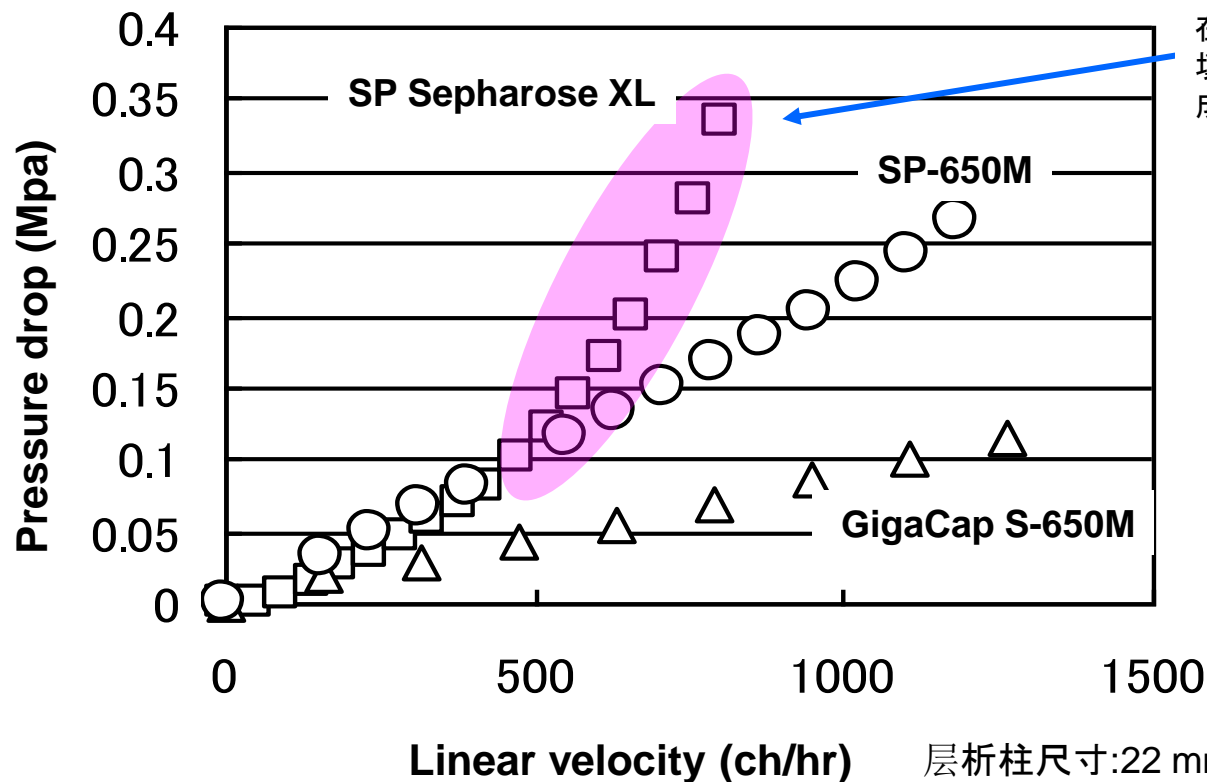
GigaCap S-650M 填料的分离选择性与SP Sepharose XL填料相似.

分离选择性和分离效果比较 (2)



GigaCap S-650M填料的洗脱峰型较为尖锐.

不同离子交换填料压降与流速的关系(填料刚性比较)



在这一部分,琼脂糖凝胶基质的填料有很大的背压,这最终会造成层析柱柱床塌陷

GigaCap S-650M 填料有最低的压降,可使用于大型层析制备柱,并可以获得更大的操作流速.



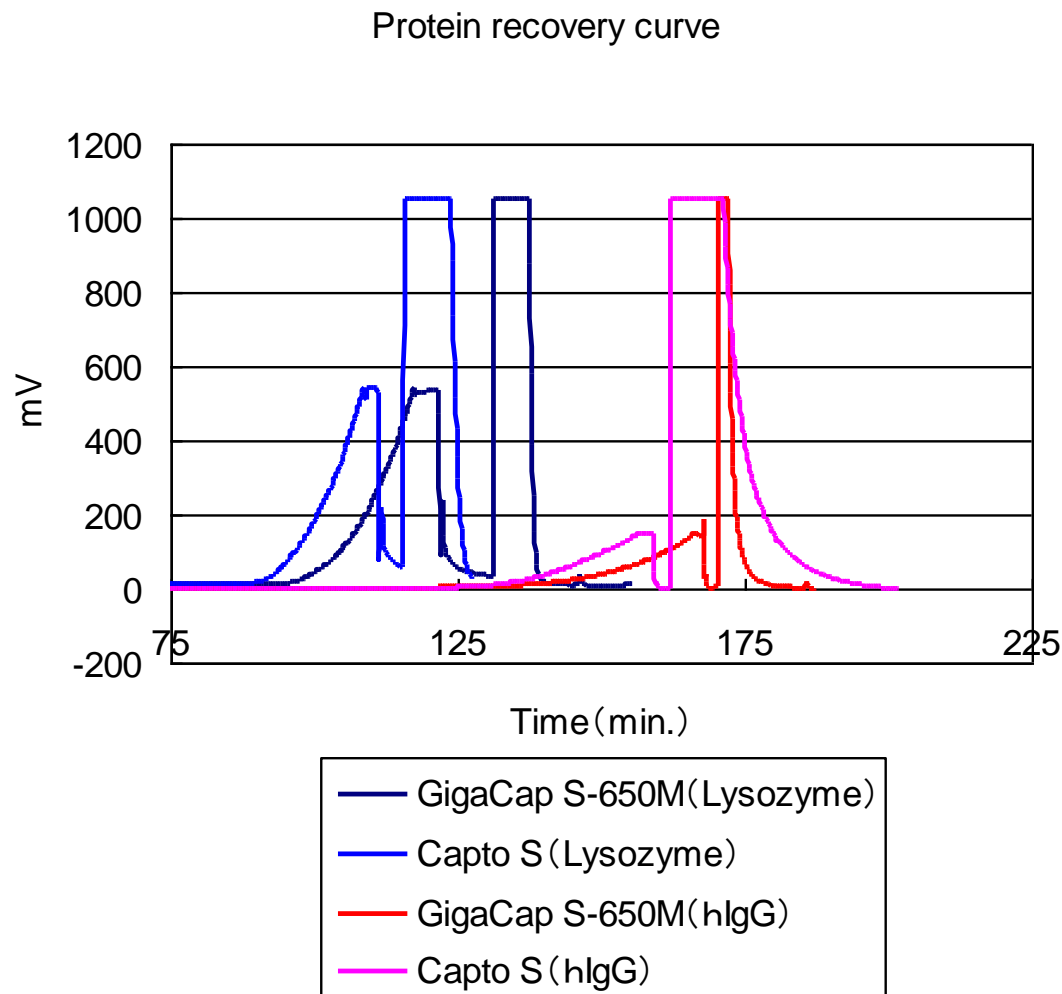
GigaCap S-650M填料碱性条件下的保存稳定性

使用 1.0 N NaOH保存	周	0	1周	3周	5周
离子交换容量	meq/mL	0.159	0.157	0.158	0.156
动态吸附载量(DBC) (IgG, 10%breakthrough)	mg/mL-gel	143	144	140	135
IgG的回收率	%	99	101	100	99

GigaCap S-650M 可以保存于 1.0 N的 NaOH中一个月而保持稳定,对蛋白的离子交换容量和载量均可保持不变.



对溶菌酶及Y球蛋白阶段式洗脱时的峰宽比较



GigaCap S-650M 填料对Y球蛋白阶段式洗脱时峰形更尖锐,峰宽较窄.



ToyoScreen™ 层析工艺研发及筛选用预装柱



- 方便选择最有效的层析工艺填料(填料筛选)
- 方便进行选择性的纯度,回收率,载量的确认和洗脱条件的优化(条件优化)
- 有阴离子交换,阳离子交换,疏水和亲和填料的套装及各种填料的单一包装
- 可提供1 ml和 5 ml两种包装规格
- 可以与 HPLC和/或 Bio-LC系统相连(如:AKTA Prime系统)





用户评价反馈信息

- “即使从细胞培养液中直接进行单克隆抗体的纯化, GigaCap S-650M 填料也会具有更高的载量,对 CHOP 杂质具有很好的选择性,峰形尖锐(美国客户)
- “即使在很高的流速下,GigaCap S-650M填料对单克隆抗体具有更高的载量,可以替代 Protein-A亲和填料.”(美国客户)
- “在市场上可以获得的 7种离子交换填料中 (如: SP Sepharose XL, Capto S, Fractogels等), GigaCap S-650M 填料具有更高的吸附载量.”(欧洲客户)
- “对于小分子物质如胰岛素,GigaCap S-650M填料同样具有很高的载量.”(欧洲客户)
- 胰岛素层析工艺中的注意点
 - GigaCap S-650M 具有较小的填料粒径(50-100 微米), 即使与专门为胰岛素纯化工序中用于捕获阶段而设计的TOYOPEARL MegaCap SP-II 550EC 离子交换填料相比也具有更高的吸附载量.
 - 由于MegaCap SP-II 550 EC填料粒子径更大(100-300微米),其更容易操作,更可以使用在大型层析制备工艺中的捕获阶段,可获得更高的线性流速.
 - 如果需要获得更高的分离 效果,也可以使用粒径更小(20, 30 微米),分辨率更高的TSK-GEL PW类型的散装离子交换填料.



Attention to TOYOPEARL GigaCap Series

- Different type of functional group from SuperQ type
 - Different spacer/extender from SuperQ-650M
- Capture resin but with smaller particle size
 - Capture resin has 100-300 micron (i.e. EC grade), but GigaCap Q-650M has relatively smaller 50-100 micron particles.
 - Described as 650M grade, but the actual particle size on GigaCap Q-650M has slightly larger than regular M grade (40-90 μ m), which enables to operate at higher flow rate with lower pressure drop.
- Packed-bed use only
 - GigaCap Q-650M is not applicable to fluidized bed nor suspended resin chromatography, due to smaller particles and light density of the resin.
 - Explain to customers that this resin performs high chromatographic properties on packed column conditions.
 - The product label and Handling Manual describe as PACKED BED USE ONLY, and/or applied to packed column use.



单克隆抗体纯化中TOYOPEARL填料的产品链

■ 离子交换填料

– GigaCap S-650M

- 在 TOYOPEARL 系列填料中对1gG有最高的载量..

■ 疏水反应填料

– 疏水填料对单克隆抗体及其多聚体有很好的分离效果.

– PPG-600M

- 对单克隆抗体有中等强度的吸附能力和较高的回收率,这可以大大提高生产效率(纯化工艺经济性).

– Butyl-600M

- 对单克隆抗体有更高的吸附载量,适用于低疏水性单克隆抗体的纯化制备.

– Phenyl-600M

- 对单克隆抗体有更高的吸附载量和更高的回收率.