



Life Sciences

## 产品说明

USD 2629

# MEP HyperCel™ 混合模式 层析填料

疏水电荷诱导层析/HCIC

产品描述与应用概要



## 前言

颇尔公司的MEP HyperCel混合模式填料是一种灵活的层析填料设计，用于捕获和纯化从实验室到生产规模的抗体和各种重组蛋白质。它提供了：

- 蛋白质分离的独特机制和选择性
- 一种替代疏水层析（HIC）的无盐/低盐的方法
- 单克隆和多克隆抗体的捕获和中度纯化（多聚体，DNA和HCP的去除）
- 提高工艺的经济性

MEP HyperCel填料引入一种特殊的混合或多模式分离机制，不同于常规的离子交换或亲和原理，能非常有效地替换传统HIC。

MEP HyperCel填料在大规模使用时具有显著优势，特别是与传统的HIC做比较，它因为不需要添加大量的盐促进蛋白质的结合，从而可以使操作流程简化，省去了一些操作步骤（例如洗滤，超滤），并且能提高经济效益。基于它的配基结构，MEP HyperCel填料可选择性地捕获免疫球蛋白。组合其他传统的方法如离子交换，HIC，甚至用在Protein A之后从不同的料液中直接捕获或者中度纯化抗体，以增强对DNA的清除、HCP（宿主细胞蛋白）和多聚体的去除。

对于“非抗体”蛋白质（例如重组蛋白、酶等），MEP HyperCel填料同样可以在纯化过程中用于捕获或者作为中度纯化步骤。当用于捕获步骤时，原料通常可直接上样，不需调整pH或离子强度。

MEP HyperCel填料有助于建立一个简化的工艺流程，节省操作步骤，诸如洗滤或超滤，降低废液处置量等；预计有更长的使用寿命，因为MEP HyperCel填料可以耐受苛刻的在位清洗方法（0.5–1M NaOH，30–60mins接触时间）——所有因素都有利于降低纯化成本。

注：有关最近发表的相关文章，请见封底参考文献。

## 特点和优势

**独特的分离机制和与众不同的选择性**

混合模式机制可以纯化传统层析技术（如离子交换或传统HIC等）不能轻易分离的抗体或其它蛋白质，比如利用疏水性的差异来分离等电点非常接近的蛋白质等。

## 直接从不同物料中捕获免疫球蛋白

基于它独特的配基结构，MEP HyperCel填料对免疫球蛋白有选择性。抗体结合发生在中性pH条件下，很大程度上不依赖于物料的离子强度。

稀浓度的样品在吸附时无需浓缩（例如，物料稀释至50–100µg IgG/ml的情况下也可以达到有效的捕获）。从不含蛋白和含蛋白添加成份的细胞培养液上清、转基因牛奶中以及腹水和血清中纯化抗体的应用也有报道。相对于Protein A亲和填料，MEP HyperCel对IgG的结合力与亚型及种属无关。对“弱结合”的抗体变种（如小鼠IgG1或大鼠IgG）也能很好结合。MEP HyperCel填料有助于HCP的去除和病毒的清除，并能有效地从细胞上清液中一步去除DNA。请注意，不建议在物料或缓冲液中添加Tween和Triton，因为这些表面活性剂可能会干扰蛋白质与MEP HyperCel填料的结合。

颇尔公司的产品信息USD2518插页中有对抗体捕获基本方法的描述。

## 在温和条件下洗脱抗体和分离杂质

抗体的典型洗脱条件在pH 5.5–4.0范围内，取决于蛋白等电点和杂质的特点。与Protein A亲和层析相比，这个洗脱条件相对温和，可有助于降低多聚体的形成，更好地保护抗体的生物活性。此外，MEP HyperCel填料的pH依赖型洗脱机制，利用疏水性的不同，能把IgG与HCPs、DNA、抗体多聚体及错误折叠的单体有效分离。在某些情况下，在MEP HyperCel洗脱缓冲液中加精氨酸（0.1–1.0M），除了降低抗体聚集的风险，也减少了许多抗体在遇到酸性pH值后溶解度损失的现象，并允许用更加温和甚至中性的pH洗脱（pH7.0左右）（请参考文献目录第14条）。

## 在无盐或者低盐条件下蛋白的结合

很多“非抗体”重组细胞蛋白家族使用MEP HyperCel填料纯化。和传统的HIC相比（如丁基或苯基配基），蛋白与填料的结合不需要加大量的盐，如硫酸铵或者其它易溶性盐离子。这使工艺成本变得更低，并简化了废液处理程序。产品可以回收在低浓度的缓冲液中，减少了洗滤或超滤步骤，这样有助于更好地优化工艺流程和增加经济效益。



## 产品描述

MEP HyperCel填料由一个独特的连接4-巯基乙基吡啶（4-MEP）的刚性纤维素基架组成。纤维素基架赋予高孔隙率，化学稳定性和低非特异性吸附。平均直径80–100 $\mu$ m，在低反压下有优良的流速特性，适合用于大规模生产。MEP HyperCel填料可用于从实验室到几百升的生产规模的层析柱。该填料有不同规格的包装以及使用方便的PRC预装柱，（1–5mL），用于填料的筛选、快速的方法优化和放大。MEP HyperCel填料供货时储存在含20%乙醇的1M NaCl溶液中，如有需要还可按客户需求定制包装。

表 1

MEP HyperCel填料的主要性能

平均粒径	80 - 100 $\mu$ m
人IgG的动态结合载量 (10%流穿)	$\geq 20$ mg/mL
配基	4-巯基-乙烷-吡啶
配基密度	80 - 125 $\mu$ mol/mL
工作pH (长期)	2 - 12
清洗pH (少于6小时)	2 - 14
耐压	< 3 barg (44 psig)
典型工作压力	< 1 barg (14 psig)

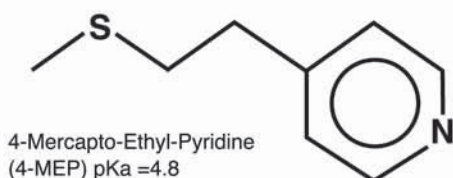
\* 在PBS中加入5 mg/mL人IgG，停留6分钟（流速 70 cm/h）。

## 分离机制

MEP HyperCel填料对物质的分离基于混合模式或者多模式机制，也称之为疏水电荷诱导层析（HCIC）。HCIC是双模式配基，能形成pH依赖的可离子化行为。4-MEP配基的结构如图1所示。

图 1

4-MEP 配基结构示意图



## 蛋白结合: 中性 pH, 无需调整物料上样条件

蛋白在相对温和的疏水作用和接近中性的pH条件下，配基上的吡啶基团不带电荷，蛋白会通过温和的疏水作用发生结合。

4-MEP配基的等电点为4.8，包含尾部的疏水基团和头部的可离子化基团。在生理pH值，芳香吡啶环不带电荷，同时具有疏水性。4-MEP具有对免疫球蛋白的选择性；与抗体结合归功于脂肪间隔臂以及与硫醚基团的互动。在无盐或低盐浓度条件下，配基结构和密度的设计使蛋白结合更加有效。

## 蛋白洗脱: 降低pH值，产生静电排斥

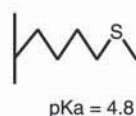
蛋白质的解吸附由静电排斥作用推动进行。通过降低流动相pH值，使配基和蛋白质带上相似的电荷。当流动相的pH值降低时，取决于目标蛋白的pI和配基pKa。图2说明IgG的结合机制；配基的pKa是4.8，当pH为4.8的时候配基带50%的正电荷，或者在pH值为5.8的时候带10%的正电荷。如果蛋白带足够数量的净正电荷，那么即使配基只带10%正电荷，就会发生解吸附。这种静电排斥机制不只是抗体特异的，也可以被用来纯化“非抗体”的多种蛋白质或从一个复杂的料液中特异去除杂质。

图 2

MEP HyperCel填料上的抗体结合及洗脱

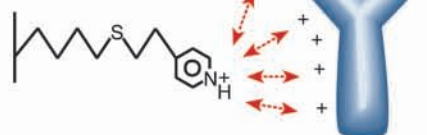
生理条件下，在中性pH值附近发生吸附

疏水作用



pH4.0–5.8发生解吸附

静电排斥



IgG的结合通过疏水和分子识别联合作用实现，解吸附是通过降低流动相的pH值而产生的静电排斥作用进行。

## 载量

与其他层析填料类似，MEP HyperCel填料的载量取决于诸多因素，包括目标蛋白的性质，其等电点以及物料的组成等。通常情况下，“非抗体”重组蛋白的基本载量范围为10–100mg/mL，抗体的载量范围为20–30mg/mL。

注：对抗体而言，与Protein A亲和填料相比，MEP对不同亚类和种属的抗体的载量没有明显差异（比如：小鼠IgG2a和IgG1，后者与Protein A的结合较弱）。

表 2

MEP HyperCel填料对IgG的载量

	结合载量
人多克隆IgG	32 mg/mL
鼠单克隆IgG1 (来自腹水)	37 mg/mL
鼠单克隆IgG2a (来自细胞培养)	34 mg/mL

诸如许多其他的层析填料，影响MEP HyperCel填料结合载量的关键因素有：

## 停留时间

停留时间 (RT) 影响产率/纯度, 需要针对不同的实例进行优化 (请参考颇尔应用文献USD 2409)。

通常, 需要调整层析柱的线速度, 使停留时间保持在平均 5–8min。根据纯度/产率的结果, 可减少停留时间, 来缩短纯化周期。

## 结合 pH

MEP HyperCel填料的相对疏水性可以通过改变pH值的进行调控。对于弱疏水性蛋白质的分离, 需要用中性pH, 而对强疏水性蛋白质分离可使用较低的pH, 低pH时MEP的相对疏水性和结合能力更弱。

如图3A所示, 当pH值从7变到9时, 人多克隆抗体的结合载量从25变到33mg/mL。在pH值6.5, 结合载量大约是20mg/mL。当pH值进一步降低并接近配基的pKa时, 由于配基和蛋白质表面正电荷的增加而使载量下降。

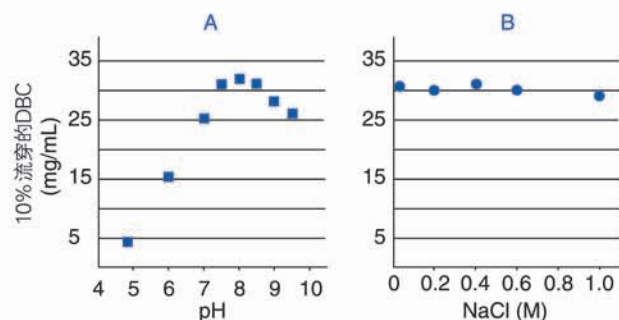
## 离子强度

图3B所示, IgG的动态结合载量很大程度上并不依赖于缓冲液的离子强度 (如NaCl浓度从50mM变到1M范围的浓度)。通常含IgG的物料可以不需要调节离子强度即可直接上样。

对于“非抗体”类蛋白质, 在某些情况下可能会通过添加盐 (如 0.5–1M浓度的NaCl), 来加强疏水基团的作用和蛋白结合效果。与传统的HIC填料相等, 这样的处理可以在低盐浓度下实现更好的动态结合载量和回收率。

图 3

pH值和离子强度对MEP HyperCel填料的IgG结合载量的影响



IgG载量在MEP HyperCel填料发生10%流穿时获得vs. 结合缓冲液的pH值 (A) 和离子强度 (B)。

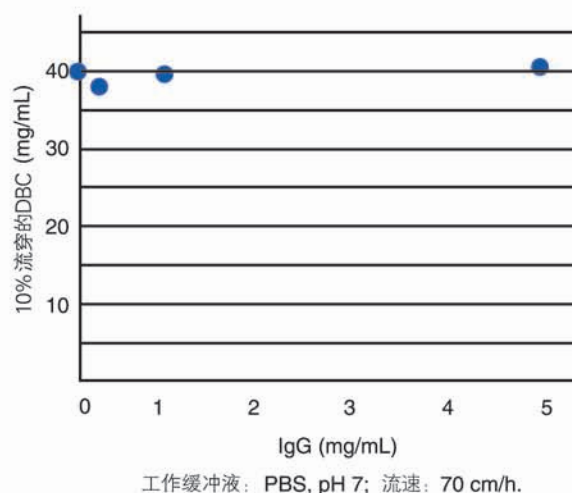
实验条件: 层析柱1.1cm ID×9cm; 样品: IgG (2mg/mL); 流速: 90cm/h

## 浓度

如图4中, IgG在50ug/mL至5mg/mL的浓度范围内, MEP对其载量没有明显变化。因此, MEP HyperCel填料可从未经浓度的高度稀释的物料中有效捕获抗体。

图 4

IgG浓度对MEP HyperCel填料结合载量的影响



## 温度

此类机制的疏水结合程度由熵驱动, 并随温度上升结合作用增强。在研究工艺稳定性和结合载量时, 应特别注意保持缓冲液和操作室温保持一致。

## 用MEP HyperCel层析填料回收纯度的抗体

MEP HyperCel填料对免疫球蛋白具有选择性, 但在物料中的其他分子 (细胞培养基补充, 白蛋白, 铁载体, 表面活性剂) 可能会与4-MEP的配基相互作用。然而数据显示, 即使物料中“富含蛋白质”, 用MEP进行一步纯化后, 其纯度依然可以达到95–98% (请参考应用文献部分的应用3)。不过, 要使抗体与细胞培养物及杂质或添加剂, 如HCP (白蛋白, 转铁蛋白) 进行适当的分离, 需要对洗脱pH和特异的洗脱顺序进行仔细优化 (请参考颇尔应用文献USD 2409, USTR 2565和产品信息插页USD 2518)。

## 获得最佳IgG纯度的优化指南

对MEP HyperCel填料的初步评价应包括确定洗脱pH值的实验, 在该pH值下对目标抗体的洗脱有最高的选择性和最佳分辨率。洗脱的最佳pH值的摸索是在逐步降低pH的情况下, 用系列缓冲液在分步洗脱模式下获得的。分步洗脱的步骤数取决于物料的性质及抗体的等电点等特性, 典型的分步洗脱模式最终是三步不同pH的洗脱。第一步洗脱碱性/亲水性杂质 (如果有的话), 第二步使目标抗体洗脱, 第三步使酸性或疏水杂质洗脱。这种方法成功地用于区别抗体, HCP, 抗体多聚体, 错误折叠体或其他杂质。根据酸性和疏水性杂质的特点, 最后一步洗脱可在pH3.0时进行。在pH3.0进行最终冲洗可以使NaOH最后一步清洗之前有效去除所有残留的杂质。



## 化学稳定性及清洗

在常规条件下，MEP HyperCel填料典型的工作pH范围为2–12。但当接触时间较短以及在位清洗时，MEP HyperCel填料在pH 2–14内都具有稳定化学性质。因此，一般上推荐0.5–1.0M的NaOH作为清洗剂。用1M NaOH进行连续的200循环的在线清洗（1小时接触/循环）后，填料依然能保持其初始的良好性能。其他吸附的杂质可以用6 M胍（2–3CVs），8M尿素或40%异丙醇冲洗后去除（请参考颇尔产品信息插页USD2518）。

## 方案筛选以及放大

MEP HyperCel填料的物理和化学性质都决定了其非常适用于实验室研发、中试以及大规模生产。MEP HyperCel填料与常规的用于低压或中压工艺的层析系统相兼容。对于复杂的蛋白质和非纯物质的分离，建议选择MEP HyperCel填料和带有脂肪族和芳香族人工合成链的PaLL HEA HyperCel以及PPA HyperCel混合型填料联合使用，它们可以提供更多的层析图谱选择性（请参考颇尔手册USD2443）。

## 实验室规模或者应用于工艺方法的开发

使用96孔过滤板或Pall PRC预装柱可达到有效的分离。1mL 和5mL PRC预装柱具有较高的装填效率（>2500塔板/米），可以直接连接到常用的实验室层析系统，具有最佳的稳定性（请参考颇尔手册USD 2492）。进一步的放大可以通过在Pall LRC实验室层析柱里装填填料（最高达 900 mL的填料体积）来实现（请参考颇尔手册USD 2480）。

## 中试或工艺规模的应用

MEP HyperCel填料的设计是为了满足蛋白纯化领域从中试到生产规模的需求，目前在从几升到几百升体积的层析柱内都有使用（请见图5）。颇尔公司提供专门针对大规模空柱的特殊装填方案和技术支持，也可以提供一个全面的验证包和法规支持文件（RSF），以协助用户顺利完成验证程序。

图 5

筛选及放大原则



填料性能可以先通过Pall AcroWell™或AcroPrep™96微滤板进行初步筛选，然后上Pall PRC1mL或5mL预装柱，再转移到Pall LRC的空玻璃柱。针对生产规模，颇尔公司提供了直径从28cm到2m的型号齐全的Resolute层析空柱。

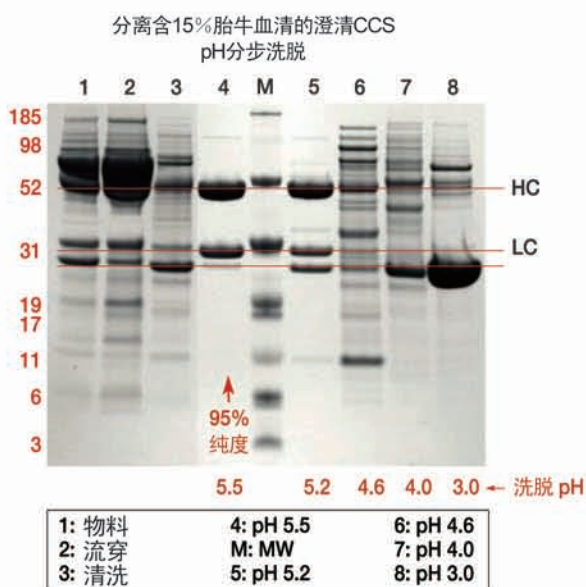
## 应用实例

### 应用 1. 从“富含蛋白质”的原料中纯化大鼠IgG: 采用降低pH进行分步洗脱优化的原则

d选择一种富含蛋白质的原料（大鼠IgG在含15%胎牛血清的物料中），来说明洗脱pH值对IgG纯化的影响（见图6）。在初期的一系列实验中，IgG的片段在pH 4.0进行洗脱；然而，大量不纯的杂质也会在pH4.0时洗脱出来，包括一些降解的自由轻链(TFLC)，从而使目标IgG（约75%）需要进一步纯化。然后，pH阶段洗脱在pH 5.5, 5.2, 4.6, 4.0和3.0时分别进行。用pH5.5洗脱时，IgG的洗脱纯度提高到95%（成分中还包括4%TFLC，其他杂质则显著减少[4]）。当pH值降至5.2时，促进了解吸附的TFLC浓度的增加(5)。当pH值降到4.6，再降到4.0时（第6和7条泳道），杂质成分被洗脱。最后，TFLC在pH3.0被洗脱(8)。通过这些数据，我们可以看到目标IgG的最佳回收阶段应在pH 5.5进行。

表 6

从“富含蛋白质”的原料中纯化大鼠IgG



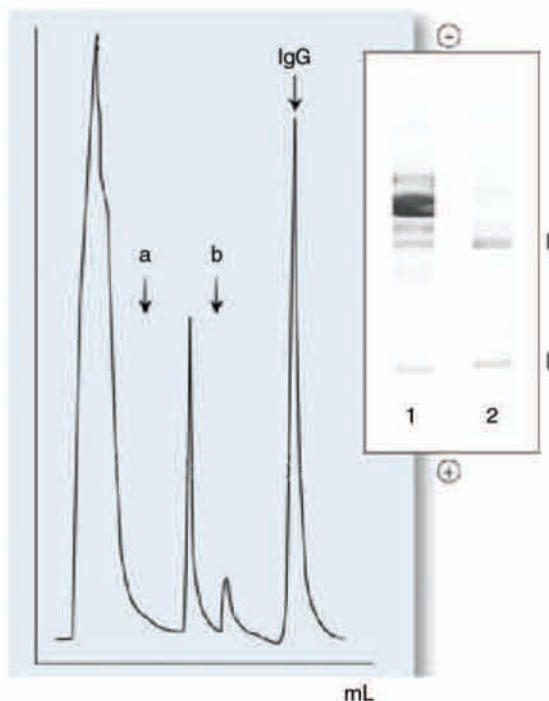
Data Courtesy of J. Ford and D. Conrad, Virginia Commonwealth University

## 应用 2. 实验室规模从腹水中分离纯化单克隆抗体

MEP HyperCel填料用于从腹水中纯化抗体。为了降低粘度，在上样前先将样品用等体积的平衡缓冲液稀释。图7中显示了抗体纯度为83%，得率为79%。IgG组分的纯度可以通过使用DEAE Ceramic HyperD® F 阴离子交换层析填料进一步增加。

图 7

从腹水中捕获免疫球蛋白



(a), (b) = 2步清洗步骤后的杂质洗脱峰值

平衡: 50 mM Tris-HCl, pH 8;

洗脱: 50 mM 醋酸钠, pH 4.0;

流速: 70 cm/hr. 先用水, 再用25mM 辛酸钠进行冲洗;

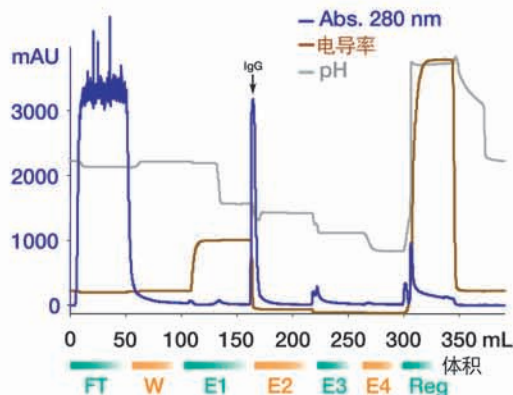
SDS-PAGE (还原条件)分析: (1) = 天然样品; (2) = 纯化抗体.

## 应用 3. 从“富含蛋白质”（含白蛋白）的CHO（中国仓鼠卵巢细胞）细胞的培养上清液（CCS）中用一步法捕获单克隆小鼠 IgG1

图8的实例证明了MEP HyperCel填料可以实现用一步法纯化IgG，并达到和Protein A填料类似水平的纯度和得率，甚至当CCS含有大量白蛋白等主要杂质时也能达到同样的效果。

图 8

从富含白蛋白的CHO细胞培养上清液中用一步法纯化IgG1



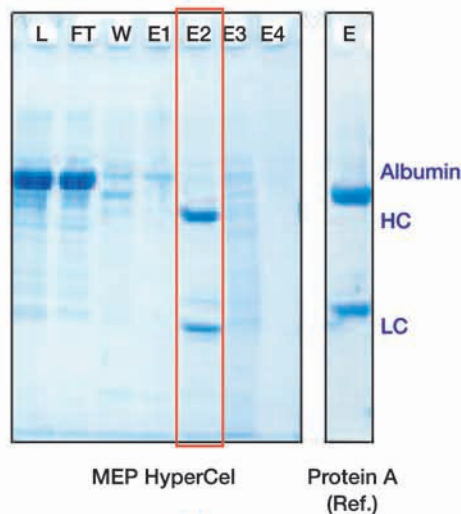
平衡/清洗: PBS, pH 7.4

洗脱: E1: 100 mM Na Ac, pH 5.5, 0.5 M NaCl

E2: 50 mM Na Ac, pH 5.0

E3、E4: 50 mM Na Ac, pH 4.0、3.0

流速: 80 cm/h (停留时间 = 7.5 min.)



MEP HyperCel

Protein A  
(Ref.)

结论

一步捕获:

- 97% 纯度
- 93% 抗体得率

应用 4. 在MAb捕获阶段，在MEP HyperCel填料上从CHO细胞培养物中去除杂质（HCP 和 DNA）

MEP HyperCel填料用于从不含蛋白的CHO细胞培养上清液中捕获MAb。结果（表3）显示这是一种非常行之有效的DNA去除法（>4.7Log），并且HCP降低了100倍。下一步的层析采用Pall CM Ceramic HyperD F弱阳离子交换层析，从而进一步降低HCP含量（数据未显示）。

应用 5. 作为HIC的替代品，MEP HyperCel填料在E.coli重组蛋白纯化中的评估：工艺优点综述

MEP HyperCel填料用作大肠杆菌重组蛋白纯化顺序中Butyl疏水填料的替代品。列于表4的结果表明，无论将MEP HyperCel填料用在工艺中的步骤2或是步骤3，都可以降低蛋白结合的盐需求量，从而实现更高的载量和纯度，省去了第一代工艺中最后用分子筛的耗时步骤。

表 3  
去除CHO细胞培养中的杂质

组分	IgG 回收率(%)	IgG (ng/mL)	HCP (ppm)	HCP (降低Log10)	HCP (ng/mL)	DNA (ppm)	DNA (降低Log10)
起始物料	100	92000	102000	-	705	781	-
MEP HyperCel 填料	93	8600	1200	1.9	<0.1	<0.014	>4.7

DNA的检测采用Quant-IT, PicoGreen, 双链DNA检测试剂盒（Invitrogen公司）；HCP的检测采用ELISA试剂盒（Cygnus技术）。

表 4  
用MEP HyperCel填料（替换烷丁基配体）作为抗HIC（疏水层析）的替代品来纯化大肠杆菌重组蛋白

	含HIC步骤的传统工艺	用MEP HyperCel填料替代HIC工艺
工艺中层析步骤数	4 (包含最终的分子筛)	3 (省略最终的分子筛)
蛋白结合需要的盐浓度	3.5M NaCl	2M NaCl
结合载量	低	高（比HIC传统树脂高10倍）
强度	不适用	极好（11个发酵批次）
纯度（C4 HPLC）	HIC步骤后需要最终SEC	高

HIC: 疏水层析  
SEC: 分子筛层析



## 订购信息

产品型号	描述	规格
12035-069	MEP HyperCel	5 mL
12035-010	MEP HyperCel	25 mL
12035-028	MEP HyperCel	100 mL
12035-036	MEP HyperCel	1 L
12035-040	MEP HyperCel	5 L
12035-044	MEP HyperCel	10 L
可按要求定制	MEP HyperCel	> 10 L
PRC05X050MEPHCEL01	PRC Column 05X050 MEP HyperCel	1mL预装填料
PRC08X100MEPHCEL01	PRC Column 8x100 MEP HyperCel	5mL预装填料

## 参考文献

1. Boschetti, E., Jungbauer, A., *Sep. Sci. & Tech.* 2 No. 15, Acad. Press (2000) 535.
2. Manzke, O., et al., *J. Immunol Methods* 208 (1997) 65.
3. Burton, S.C., and Hardling, D.R.K., *J. Chromatogr.* 814 (1998) 71.
4. Scholz, G.H., et al., *J. Chromatogr.* 709 (1998) 189.
5. Scholz, G.H., et al., *J. Immunol. Meth.* 219 (1998) 109.
6. Schwartz, W., et al., *J. Chromatogr. A* 908 (2001) 251.
7. Guerrier, L., et al., *Bioseparation* 9 (2000) 211
8. Guerrier, L., et al., *J. Chromatogr. B* 755 (2000) 37
9. Boschetti, E., *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 361.
10. Ferreira, G.M., et al., *BioPharm International*, May 1, (2007)
11. Chen J., et al., *J. Chromatography A*, 1177 (2008) 272-281.
12. Francis R., *BioProcessing International Conference*, April 2008, Vienna.
13. Lees et al., *BioProcess International* vol 7, n°2 (2009) 42-48.
14. Arakawa T. et al., *Protein Expr. Purif.* 63 (2009), 158-163.
15. Bak H. and Thomas O.R.T., *J. Chromatogr. B*, 848 (2007) 116-130.
16. Coulon D. et al., *J. Chromatogr. B*. 808 (2004) 111-115.
17. Ghose S., et al. *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 498-508.



Life Sciences

颇尔过滤器(北京)有限公司  
地址: 北京市经济技术开发区宏达  
南路12号 (100176)  
电话: (010) 8722 5588  
传真: (010) 6780 2238

上海分公司  
地址: 上海市张江高科技园区哈雷  
路917弄3号楼 (201203)  
电话: (021) 6169 5656  
传真: (021) 6169 5678

广州分公司  
地址: 广州市滨江中路308号海运  
大厦16层K座 (510220)  
电话: (020) 8410 2211  
传真: (020) 8410 2033

长春办事处  
地址: 长春市亚太大街6789号万  
晟商务花园2号楼1207 (130021)  
电话: (0431) 8860 2233  
传真: (0431) 8860 2233

香港办事处  
电话: (852) 2583 9610  
传真: (852) 2511 5773



成都办事处  
电话: (028) 8620 3737  
传真: (028) 8620 3717

石家庄联络处  
电话: (0311) 8399 5931  
传真: (0311) 8399 5931

请浏览我们的网站: [www.pall.com/biopharm](http://www.pall.com/biopharm)

请发邮至我们的邮箱: [Biopharm\\_China@ap.pall.com](mailto:Biopharm_China@ap.pall.com)

The information provided in this literature was reviewed for accuracy at the time of publication. Product data may be subject to change without notice. For current information consult your local Pall distributor or contact Pall directly.

© 2009, Pall Corporation. Pall, , AcroPrep, AcroSep, HyperCel, HyperD, and Resolute are trademarks of Pall Corporation. ® indicates a trademark registered in the USA. Filtration, Separation, Solution,  is a service mark of Pall Corporation. \*Quant-IT and PicoGreen are trademarks of Invitrogen. Tween is a trademark of ICI Americas. Triton is a trademark of Union Carbide Corp.