



JSR Life Sciences

# Щелочная стабильность Amsphere A3: Циклическое изучение с использованием 0.5 М NaOH

## Введение

Гидроксид натрия наиболее часто используется для очистки смолы с белком А поэтому щелочная стабильность является ценным качеством. В течение всего жизненного цикла производительность смолы должна соответствовать установленной спецификации. С точки зрения экономической выгоды, жизненный цикл смолы в количестве циклов должен быть настолько большим насколько это возможно, и будет зависеть от условий эксплуатации, например, концентрации гидроксида натрия и времени контакта. Мы исследовали стабильность Amsphere A3 при времени контакта 15 минут с 0.5 М NaOH на стадии очистки.

## Материалы и методы

Все эксперименты были выполнены на 1 мл колонке MediaScout® MiniChrom (0.5 см внутреннего диаметра, 5 см высота слоя), предварительно упакованной компанией Repligen. Лиофилизованное гуманизованное поликлональное антитело производства Equitech-bio использовалось для определения DBC. Для проведения эксперимента использовался хроматограф AKTA avant 25 производства GE Healthcare.

Концентрацию исходного раствора поликлонального антитела измеряли при длине волны 280 нм с использованием спектрометра Eppendorf Bio-Spectrometer. Концентрация исходного раствора составляла от 5.1 до 5.4 г/л.

В начале испытаний определили значение при 10 % проскоке. Затем проводилась циклическая обработка буферами и каждый 15 пуск измерялась DBC. Последовательность запусков для измерения DBC и запусков с буферами представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1: Последовательность запусков с буферами

ШАГ	РАСТВОР – БУФЕР	СКОРОСТЬ (см/ч)	ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ (мин)	CV
Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат pH 7.5	150	2.0	5.0
Элюирование	150 мМ ацетат натрия pH 3.0	150	2.0	5.0
Очистка	0.5 М NaOH (15 мин время контакта )	100	3.0	5.0

## Amsphere™ A3

Amsphere A3 – это новая смола на основе белка А, разработанная с использованием поверхностно-модифицированной основы и модифицированного, стабильного в щелочной среде лиганда.

### Лиганд белка А

- высокая динамическая обменная емкость (DBC) благодаря контролируемой конформации (постоянной) и ориентации
- Высокая щелочная стабильность благодаря белковой инженерии

### Поверхностная модификация

- Низкий уровень загрязнения (НСП) благодаря гидрофилизации поверхности

### Состав основы

- Высокий уровень DBC при высокой скорости потока
- Постоянная скорость потока и устойчивость к колебаниям давления благодаря жесткому сшиванию

Для подтверждения производительности смолы после множества циклов очистки было выполнено сравнение способности очистки для Тоцилизумаба (загрузка 40 г/л) на колонке после 101 цикла и на новой колонке. Содержание белков клеток хозяина (НСП) and ДНК измерялись в исходном растворе и в элюате. Для измерения НСП использовался комплект Cygnus Technologies, каталожный по F550. Комплект Quant-iT™ Picogreen® dsDNA kit (P11496, Life Technologies) использовался для измерения ДНК.

Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	150	2.0	5.0
-----------------	----------------------------	-----	-----	-----

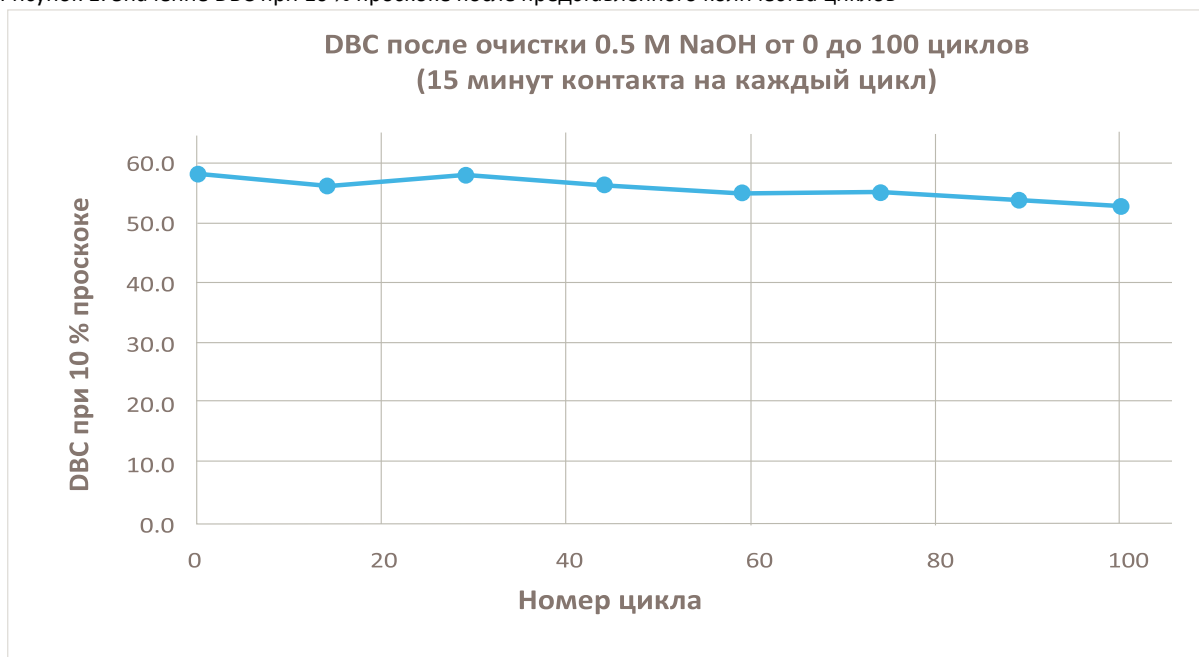
Таблица 2: Последовательность запусков для определения DBC Amsphere A3

ШАГ	РАСТВОР – БУФЕР	СКОРОСТЬ (см/ч)	ВРЕМЯ УДЕРЖИВАНИЯ (мин)	CV
Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	150	2.0	5.0
Загрузка	Гуманизированный поликлональный IgG растворенный в уравновешивающем буфере	75	4.0	До проскока >10%
Промывка 1	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	75	4.0	5.0
Промывка 2	20 мМ натрия фосфат; 0.5 М NaCl; рН 7.5	75	4.0	5.0
Промывка 3	20 мМ натрия фосфат рН 7.5			3.0
Элюирование	150 мМ ацетат натрия рН 3.0			5.0
Очистка	0.5 М NaOH (15 мин время контакта )	100	3.0	5.0
Уравновешивание	20 мМ натрия фосфат рН 7.5	150	2.0	5.0

## Результаты

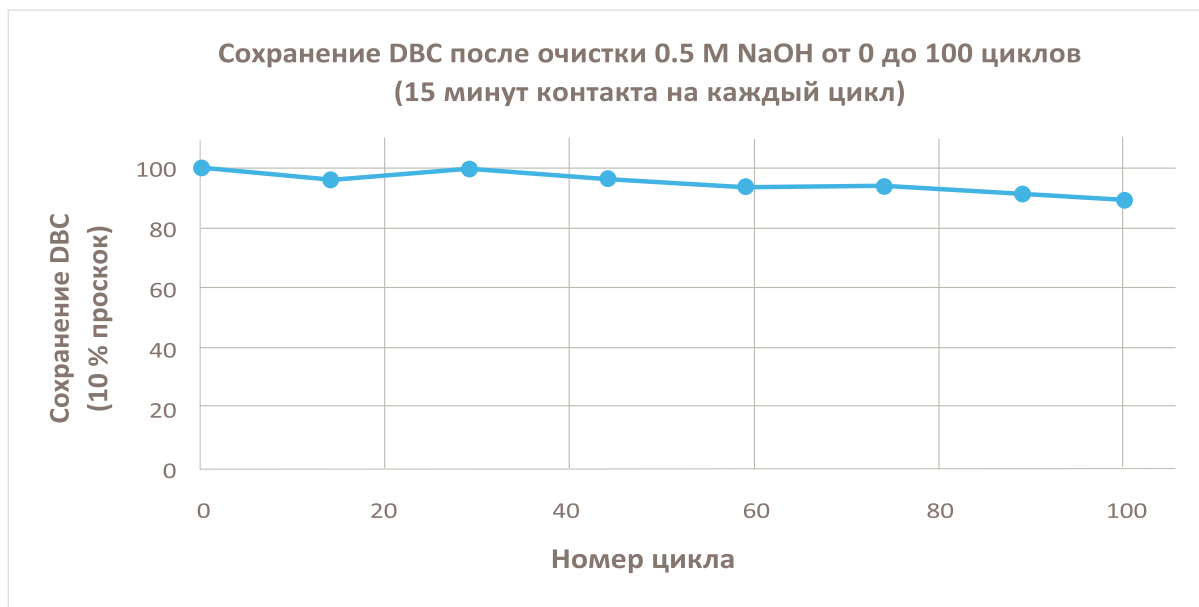
В начале изучения DBC для поликлонального IgG составляла 58 г/л. После 100 циклов DBC составляла 53 г/л.

Рисунок 1: Значение DBC при 10 % проскоке после представленного количества циклов



Amsphere A3 демонстрирует способность хорошо сохранять динамическую обменную емкость. После 100 циклов DBC все еще составляет 91 % от начального значения.

Рисунок 2: Сохранение DBC после представленного количества циклов



Производительность по очистке сохраняется после 100 циклов. Очистку от HCP and DNA можно считать одинаковой после 100 циклов с использованием 0.5 М NaOH.

Таблица 3: Сравнение способности очистки HCP и DNA новой колонки и после проведения 101 цикла

	КОНЦЕНТРАЦИЯ HCP (ppm)			КОНЦЕНТРАЦИЯ DNA (ppm)		
	Исходная	После	LRV	Исходная	После	LRV
ПУСК 1	735644	1269	2.8	9432	6	3.2
ПУСК 102		1260	2.8		8	3.1

## Выводы

Amsphere A3 обладает высокой щелочной стабильностью. DBC постепенно уменьшается при использовании 0.5 М NaOH в качестве промывочного раствора, но данные показывают, что смола может использоваться на протяжении 100 циклов с временем контакта 15 минут, без влияния на эффективность очистки. Колонки обычно загружаются на 80 % от значения при 10 % проскоке. После 100 циклов не возникает проблем с очисткой IgG.



JSR Life Sciences

Amsphere™ является глобальной торговой маркой JSR Corporation

©2017 JSR Corporation – Все права защищены .

Больше информации на [www.jsrlifesciences.com](http://www.jsrlifesciences.com)

#### ЕВРОПА

JSR Life Sciences JSR Micro NV  
Technologielaan 8  
3001 Leuven  
Belgium  
+32-16-668-721 [bioprocess.eu@jsrlifesciences.com](mailto:bioprocess.eu@jsrlifesciences.com)

#### СТРАНЫ ЕАЭС

ООО «АКА-Лоджик»  
143405, Московская область, г. Красногорск, Ильинское  
шоссе, 1А, этаж 6, пом. 14.2  
Тел.: +7 (969) 077-72-72  
E-mail: [info@aka-logic.ru](mailto:info@aka-logic.ru)