



# Ca<sup>++</sup>Pure-HA:

纯化生物大分子的层析介质





# Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析介质

- ☆ 它是什么?
- ☆ 它是如何工作的?
- ☆ 主要应用
- ☆ 性能特点





# Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析介质

☆ Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析介质是一种对生物大分子有着独特分离选择性的羟基磷灰石树脂填料。

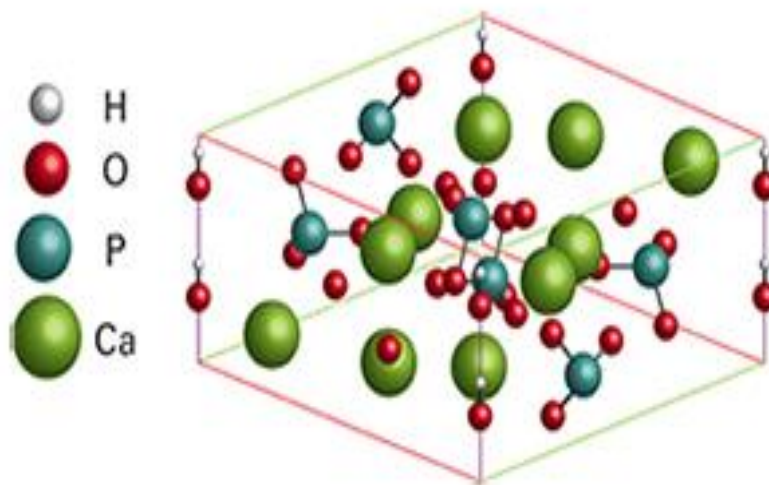
☆ 这种混合模式的树脂填料适用于：

- ② 生物样品的纯化，如抗体和DNA
- ② 从天然抗体中去除杂质（完整的抗体/单体）
- ② 分离双链和单链DNA



# 颗粒构造

- ☆ 颗粒由 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  构成
- ☆ 球形、大孔形式的六方晶体结构
- ☆ 在高温下烧结以提高机械强度和化学稳定性



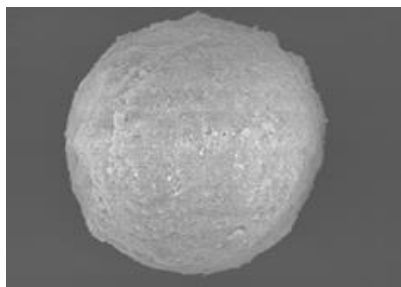


## 基本参数

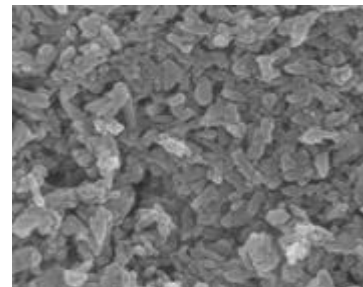
骨架	羟基磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
平均粒径	39 $\mu\text{m}$
动态吸附载量	>30 g/L 人源化 IgG (2 min 柱留时间) >25 g/L 溶菌酶 (2 min 柱留时间)
压力范围	10 MPa (max)
珠密度	$\geq 0.5$ g/mL
耐碱性	>65 CIP cycles in 1.0 mol/L NaOH
储存条件	干粉保存或者 0.1 - 0.5 mol/L NaOH保存



## 颗粒形状（显微镜观察）

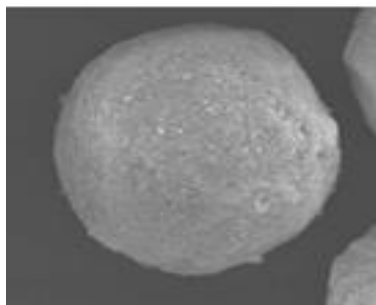


Ca<sup>++</sup>Pure-HA SEM 放大 2,000X

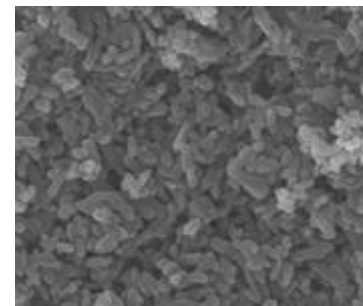


Ca<sup>++</sup>Pure-HA SEM 放大 50,000X

VS



CHT Type I SEM 放大 2,000X



CHT Type I SEM 放大 50,000X

通过显微镜观察可以看出两种介质没有本质上的区别。



# Ca<sup>++</sup>Pure HA: 工作原理

## 与钙基团的相互作用

- ☆ 位于表面的钙基团带正电荷。
- ☆ Ca<sup>++</sup>Pure HA 钙基团的工作原理类似于阴离子交换。

## 与磷酸基团的相互作用

- ☆ Ca<sup>++</sup>Pure HA的磷酸基团带负电荷。
- ☆ 与磺酸基和羧基等阳离子交换介质一样，Ca<sup>++</sup>Pure HA的磷酸基团通过与带正电荷的氨基残基通过静电相互作用结合强碱性物质。



# 主要应用

## 可用于纯化:

### ☆ 完整/天然 IgGs

☺ 在精纯步骤，抗体Fc段的羧基与HA的钙离子发生强烈的亲和吸附，能有效地去除Protein A纯化后的抗体中的片段和多聚体

### ☆ IgG Fab 片段

☺ 带正电荷的Fab片段主要与磷酸基团发生离子交换作用

### ☆ IgA 和 IgM

☺ 与完整的IgG相类似的吸附作用

### ☆ DNA 和 RNA

☺ 与钙基团有较强的吸附作用

### ☆ 融合蛋白和磷酸化蛋白

☺ 与钙基团有较强的吸附作用





# 主要应用和特点 – 针对单克隆抗体纯化

## ☆ 独特的分离选择性

☺ 对mAb的单体峰和杂质峰有着极高的分辨率

## ☆ 高纯度以及高产率

☺ mAb单体的回收率 > 80% , 杂质的去除率 ≥ 1.1%

## ☆ 兼容多个缓冲盐区域

☺ 提供多种纯化mAb的优化参数

## ☆ 增加了使用寿命

☺ 改善了对pH的稳定性

## ☆ 高动态吸附载量

☺ 适合在各种不同的流速下捕获mAb, 例: 5分钟柱留时间: 55 mg mAb/mL-resin

## ☆ 良好的流速/压力曲线

☺ 可在高流速下进行工艺开发或生产, 最高耐压10MPa

## ☆ 良好的批次重现性

☺ 不同批次对溶菌酶的载量波动 < 5%



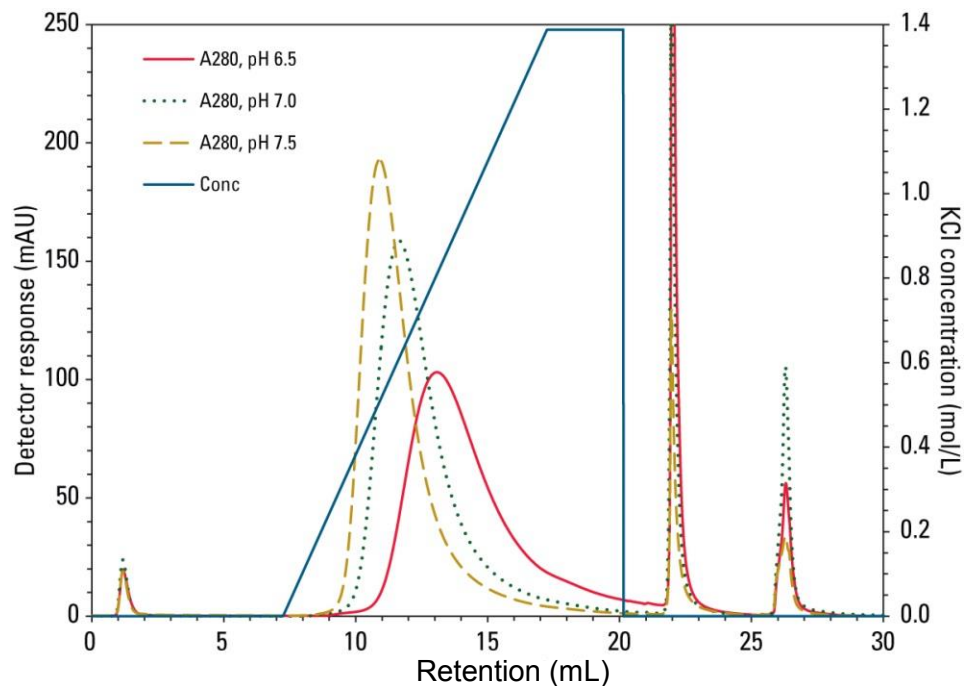
# IgG纯化案例

层析填料:	Ca <sup>++</sup> Pure-HA
层析柱尺寸:	5 mm ID x 5 cm (1.0 mL)
平衡缓冲液:	50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L <b>KPO</b> <sub>4</sub> , pH as indicated
淋洗缓冲液:	50 mmol/L <b>KPO</b> <sub>4</sub> , pH as indicated
洗脱缓冲液:	平衡缓冲液 + 2.0 mol/L <b>KCl</b> as indicated, pH as indicated
再生缓冲液:	500 mmol/L <b>KPO</b> <sub>4</sub> , pH as indicated
清洗缓冲液:	1.0 mol/L <b>KOH</b>
梯度:	69.4% B (chloride), 10 CV gradient delay, 5 CV
流速:	300 cm/hr (1 min residence time)
检测:	UV @ 280 nm (mAU), Conductivity (mS/cm), pH
温度:	室温
样品:	2.0 mg/mL-media partially-purified mAb-01 (0.2 mL injection)
设备:	ÄKTA avant 25
方法:	Pre-equilibrate, strip buffer, 3 CV Equilibrate, equilibration buffer, 10 CV Load Wash, equilibration buffer, 5 CV Elution, gradient as indicated, 25 CV Strip, strip buffer, 5 CV Sanitize, sanitization buffer, 5 CV



# 独特的分离选择性

## 使用KCl洗脱去除IgG中的多聚体



☆  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 适合在不同的pH条件下，使用磷酸钾缓冲液进行上样，并且用KCl进行洗脱。

☆ 在三种不同的pH条件下，对mAb多聚体的去除效果相近。

☆ 从结果上看，单体峰和聚体峰的分选度很高。

☆ 增加 pH = 更早出峰。



## 高纯度&高产率

Salt	pH	Peak Molarity (mmol/L)	Recovery (% native)	Aggregate (%)	Fragment (%)
<b>Load</b>				<b>6.6</b>	<b>0.6</b>
<b>KCl</b>	6.5	814	72.9	1.3	0.5
	7.0	615	80.0	1.8	0.3
	7.5	509	81.0	2.2	0.3

- ☆ 在pH7.0的条件下，mAb单体的回收率> 80%。
- ☆ 用KCl 作为洗脱缓冲液，可以在各种pH条件下有效去除多聚体。
- ☆ 使用KCl缓冲液可以在较低的pH条件下更有效地去除多聚体。



# 高纯度

## 使用KCl洗脱去除宿主细胞蛋白（HCP）

Salt	pH	Pool Volume (CV)	CHO-HCP (ppm)
Load			2,200
KCl	6.5	5.3	500
	7.0	3.9	590
	7.5	3.9	910

Ca<sup>++</sup>Pure-HA pH 6.5-7的条件下可以有效去除HCP。



# 纯化IgG

## 样品中含有高百分比的mAb聚体、多聚体

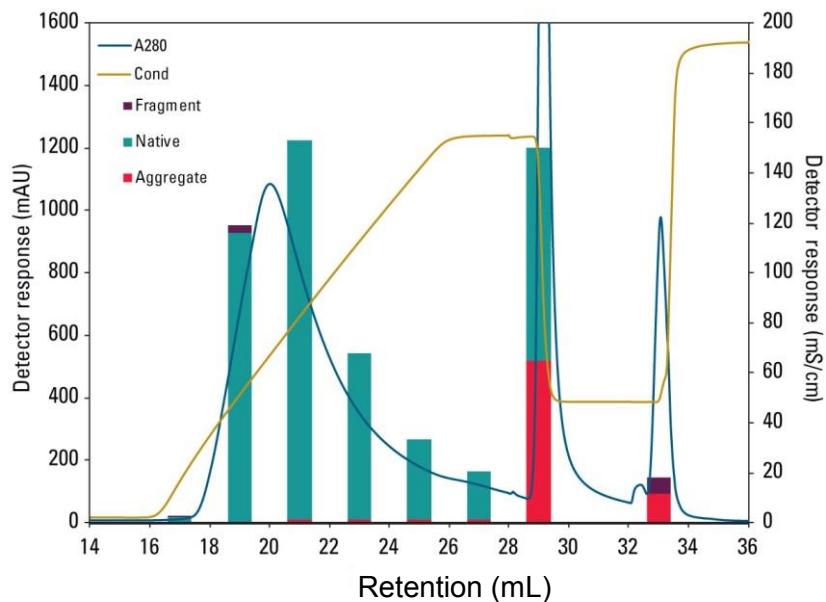
层析介质:	Ca <sup>++</sup> Pure-HA, lot CPBL122716A
层析柱尺寸:	5 mm × 5 cm (1.0 mL)
平衡缓冲液:	20 mmol/L <b>MES</b> , <b>5 mmol/L KPO<sub>4</sub></b> , pH 6.5
淋洗缓冲液:	50 mmol/L <b>KPO<sub>4</sub></b> , pH 6.5
洗脱缓冲液:	equilibration buffer + 2.0 mol/L salt as indicated
再生缓冲液:	500 mmol/L <b>KPO<sub>4</sub></b> , pH 6.5
清洗:	1.0 mol/L <b>KOH</b>
梯度:	0 - 1.4 mol/L <b>KCl (potassium chloride)</b> , 10 CV
流速:	75 cm/hr (4 min residence time)
检测:	UV @ 280 nm (mAU), Conductivity (mS/cm), pH
温度:	室温
样品:	TBL-mAB-01A @ 11.7 g/L- <i>contains <b>18.8% aggregate</b> (sample was forced aggregation)</i>
上样体积:	2.00 mL (23.4 g/L load ratio)
设备:	ÄKTA avant 25
方法:	Pre-equilibration: strip buffer, 3 CV Equilibration: equilibration buffer, 10 CV Load Wash 1: equilibration buffer, 4 CV; Wash 2: wash buffer, 4 CV; Wash 3: equilibration buffer, 4 CV Gradient elution: 14 CV Strip: strip buffer, 4 CV Sanitization: sanitization buffer, 4 CV <i>2 CV fractions collected throughout</i>



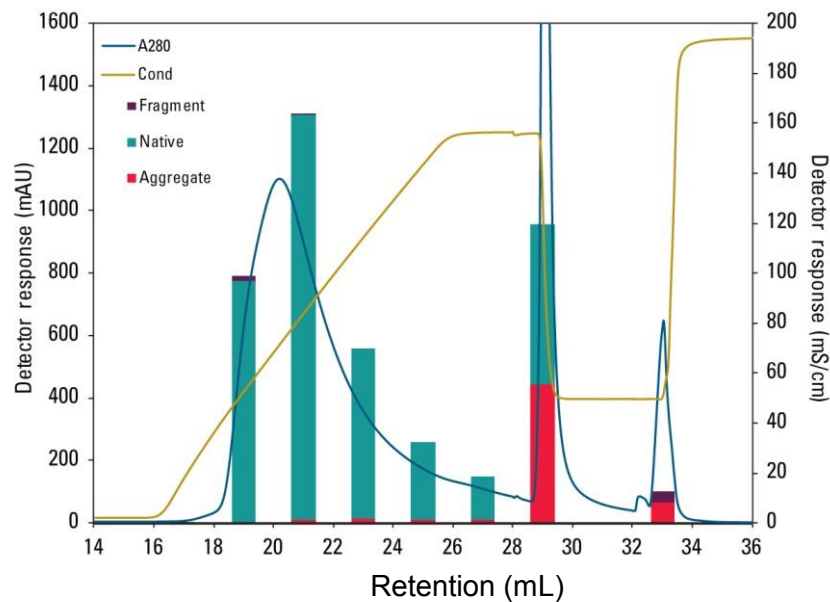
# 独特的分离选择性

使用KCl洗脱去除IgG样品中的多聚体

Ca<sup>++</sup>Pure-HA



CHT Type I



☆ 两种介质显示了相近的mAb多聚体去除率。

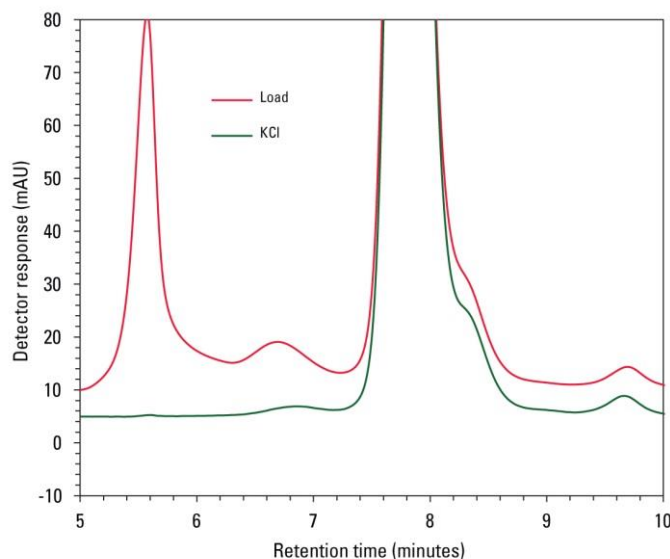
☆ 分离曲线显示了单体峰和聚体峰之间的高分离度。



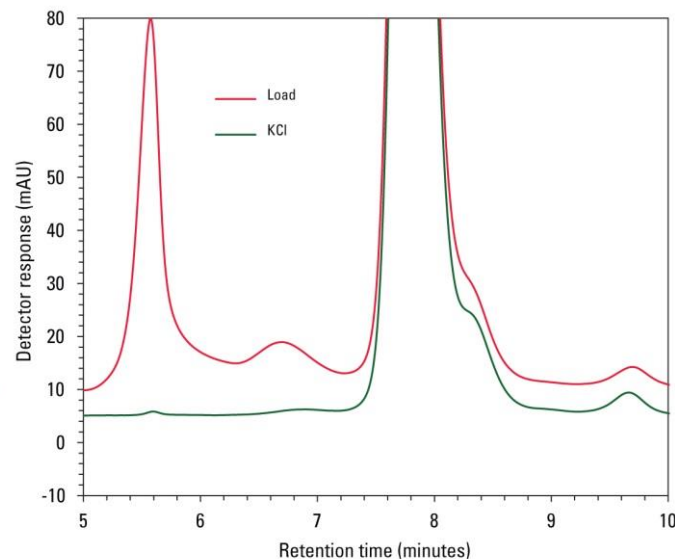
# 高纯度

使用SEC-HPLC分析洗脱峰的纯度

Ca<sup>++</sup>Pure-HA



CHT Type I



Condition	Media	Fraction (mL)	Aggregate (%)	Fragment (%)
Initial Sample Load			18.8	1.3
KCl Elution	Ca <sup>++</sup> Pure-HA	8.9	1.1	1.0
	CHT Type I	8.0	1.2	1.1

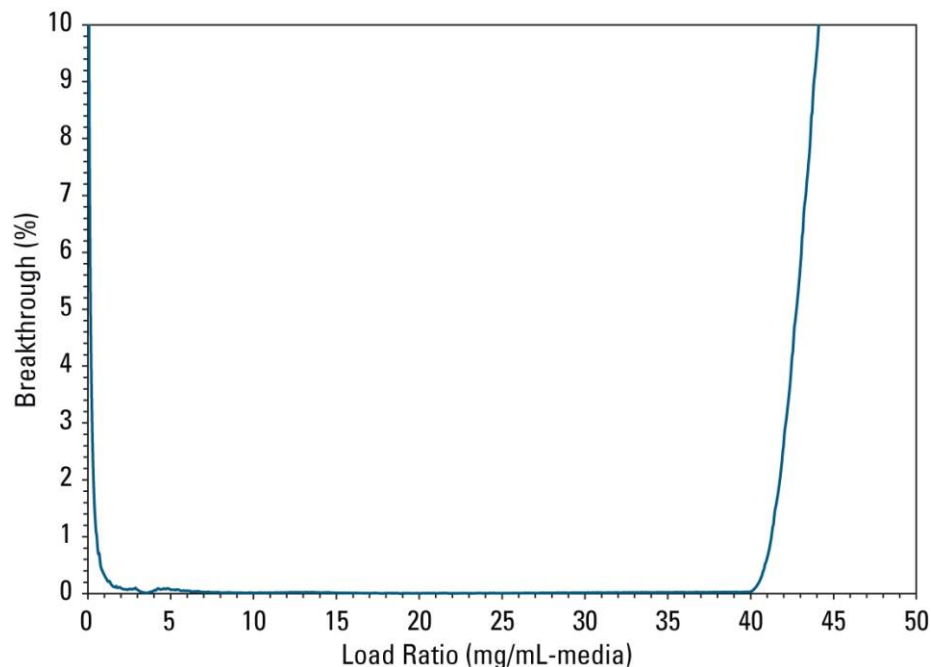
☆ 使用SEC-HPLC分析洗脱峰各收集组分纯度。

☆ 两种介质均适合使用KCl洗脱体系，并且都能有效去除抗体片段和多聚体。





# 高动态吸附载量



层析介质: Ca<sup>++</sup>Pure-HA, lot CPBL122716A  
层析柱尺寸: 5 mm × 5 cm (1.0 mL)  
平衡缓冲液: 20 mmol/L MES, 5 mmol/L KPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
淋洗/洗脱: 500 mmol/L KPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
再生: 1.0 mol/L KOH  
流速: 75 cm/hr (4 min residence time)  
检测: UV @ 280 nm (mAU), Conductivity (mS/cm)  
温度: ambient  
样品: IgG @ 2.00 g/L  
设备: ÄKTA avant 25

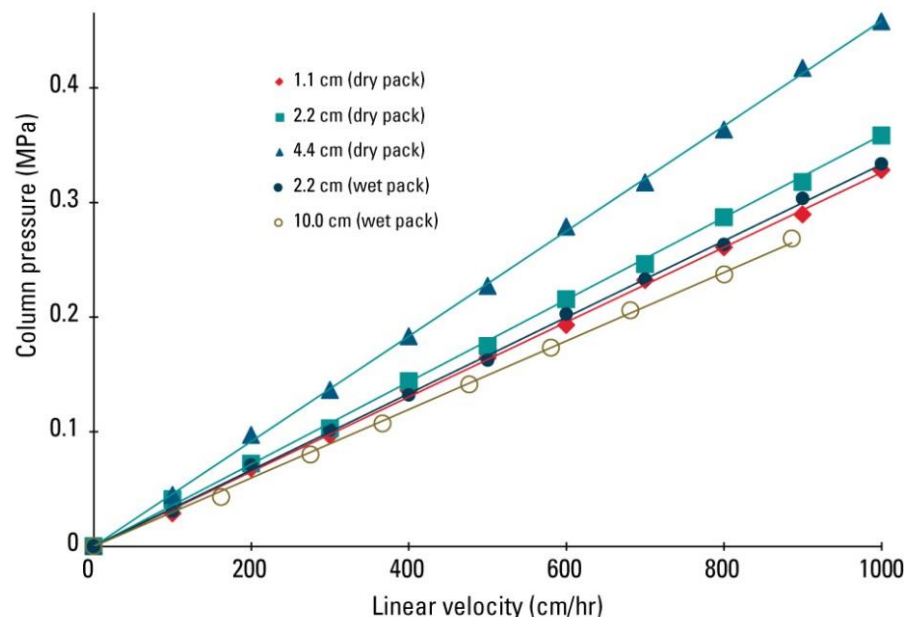
Ca<sup>++</sup>Pure-HA 显示了高动态吸附载量性能 (5%穿透)

😊 4 分钟柱留时间, 42.8 mg/mL-resin

😊 5 分钟柱留时间, 55 mg/mL-resin (没有显示在该图表上)



# 良好的压力流速曲线



层析填料:

Ca<sup>++</sup>Pure-HA

层析柱尺寸:

1 mm ID × 19.3 cm (dry pack)

2.2 mm ID × 20.3 cm (dry pack)

4.4 mm ID × 19.3 cm (dry pack)

2.2 mm ID × 20.6 cm (wet pack)

10.0 mm ID × 21.3 cm (wet pack)

流动相:

5 mmol/L sodium phosphate, pH 7.2

线性流速:

as noted

检测:

pressure (MPa)

☆ Ca<sup>++</sup>Pure-HA 最大耐压10Mpa。

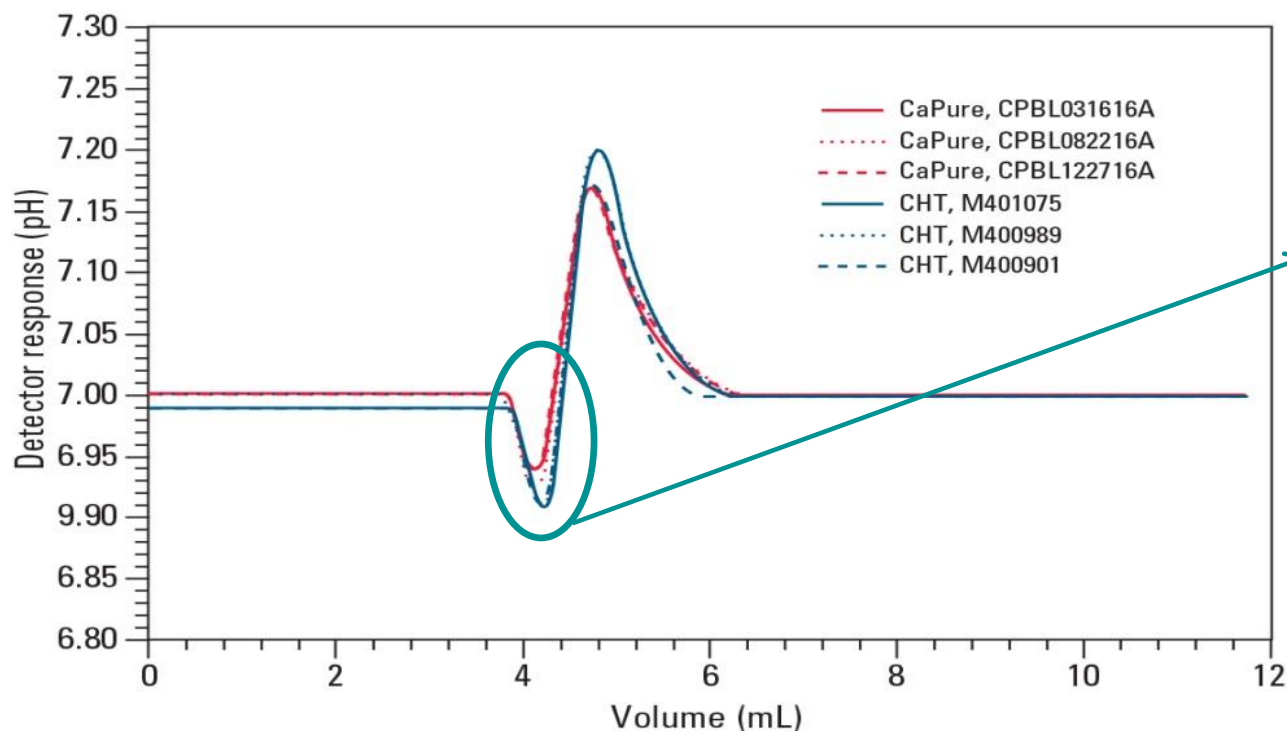
☆ 良好的耐压性能使Ca<sup>++</sup>Pure-HA在高流速下使用时，仍然保持压力和流速的良好线性关系。

☆ 图表中的线性关系在大规模层析中仍然可以保持。

☆ Ca<sup>++</sup>Pure-HA 可以在干粉状态或者溶胀状态下进行装填。



# 填料耐久性增强



## 关于pH漂移的注意事项

☆ 在阳离子交换层析中用盐洗脱时，盐带的正电荷将置换吸附在填料上的水合氢离子。

☆ 作为离子交换的结果，由于洗脱液中水合氢离子浓度的增加，溶液的pH将降低。

☆ 对于羟基磷灰石层析介质，洗脱期间的这种瞬时pH下降可能会对填料产生影响，因为羟基磷灰石在低pH下易于溶解。

☆ 两种介质都会出现pH值波动，但是由图可见Ca<sup>++</sup>Pure-HA产生波动的范围更小。

☆ 这种特性有利于增加填料的耐久性。



## 良好的批次稳定性

Lot	Bed Height (cm)	HETP (cm)	Asymmetry	DBC Lysozyme (mg/mL-media)
CPBL123015A	3.21	0.036	2.0	19.7
CPBL012716A	3.29	0.031	1.9	17.9
CPBL071316A	3.24	0.034	1.7	19.3
CPBL082216A	3.13	0.037	1.7	19.9
CPBL122716A	3.27	0.031	1.5	19.0
Average				19.2
Std. Dev.				0.8
% RSD				4.1

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析介质显示了良好的批次重现性。



## 小贴士

### 使用磷酸盐处理和未使用磷酸盐处理:

☆ 对于非mAb分子，使用磷酸盐进行冲洗处理后，可以改善Ca<sup>++</sup>Pure-HA填料的使用效果。

☆ 对于其他分子，不会有影响。



# 使用磷酸盐处理以提高对非mAb分子的DBC

层析介质: Ca<sup>++</sup>Pure-HA, lot CPBL123015A  
层析柱: 6.6 mm ID x 3 cm (1.0 mL)  
流动相: A: 10 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
流动相: B: 500 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
流动相: C: 1.0 mol/L NaOH  
流速: 200 cm/hr (0.9 min residence time)  
检测: UV @ 280 nm (mAU)  
温度: 室温  
样品: 2.00 mg/mL mAb, diluted in mobile phase A  
设备: ÄKTA avant 25

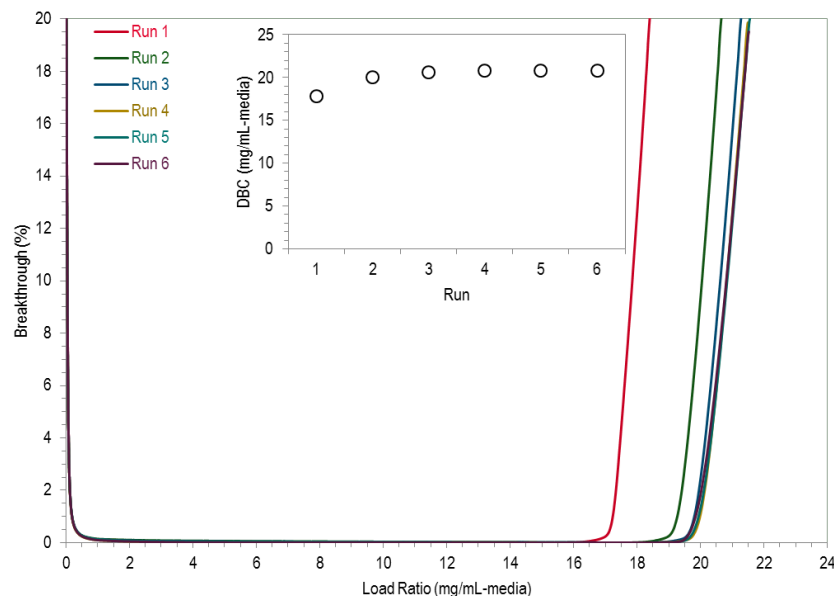
方法: Sanitize, mobile phase C, 5 CV  
Rinse, water, 0.5 CV  
**Conditioning wash, mobile phase B, 30 CV**  
Equilibrate, mobile phase A, 10 CV  
Load, to >10 % breakthrough  
Wash, mobile phase A, 10 CV  
Elution, mobile phase B, 10 CV



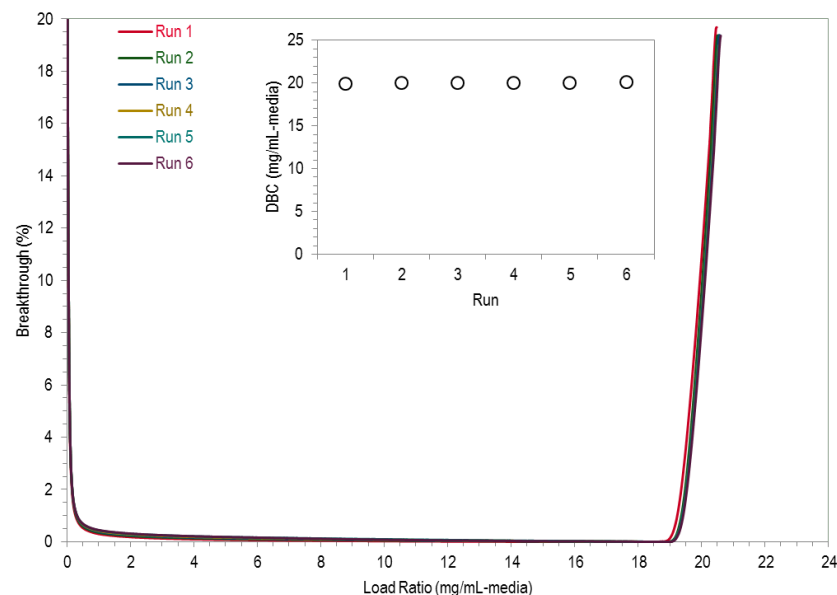
# 使用磷酸盐处理以提高对非mAb分子的DBC

提高了每次上样的稳定性

未使用磷酸盐处理



使用磷酸盐冲洗30个CV



- ☺ 在同样的Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析柱上重复上样。
- ☺ 使用磷酸盐冲洗后可以使DBC更加稳定。
- ☺ 注意: DBC的差异在预期范围内。



# 未使用磷酸盐处理以提高对IgG的DBC

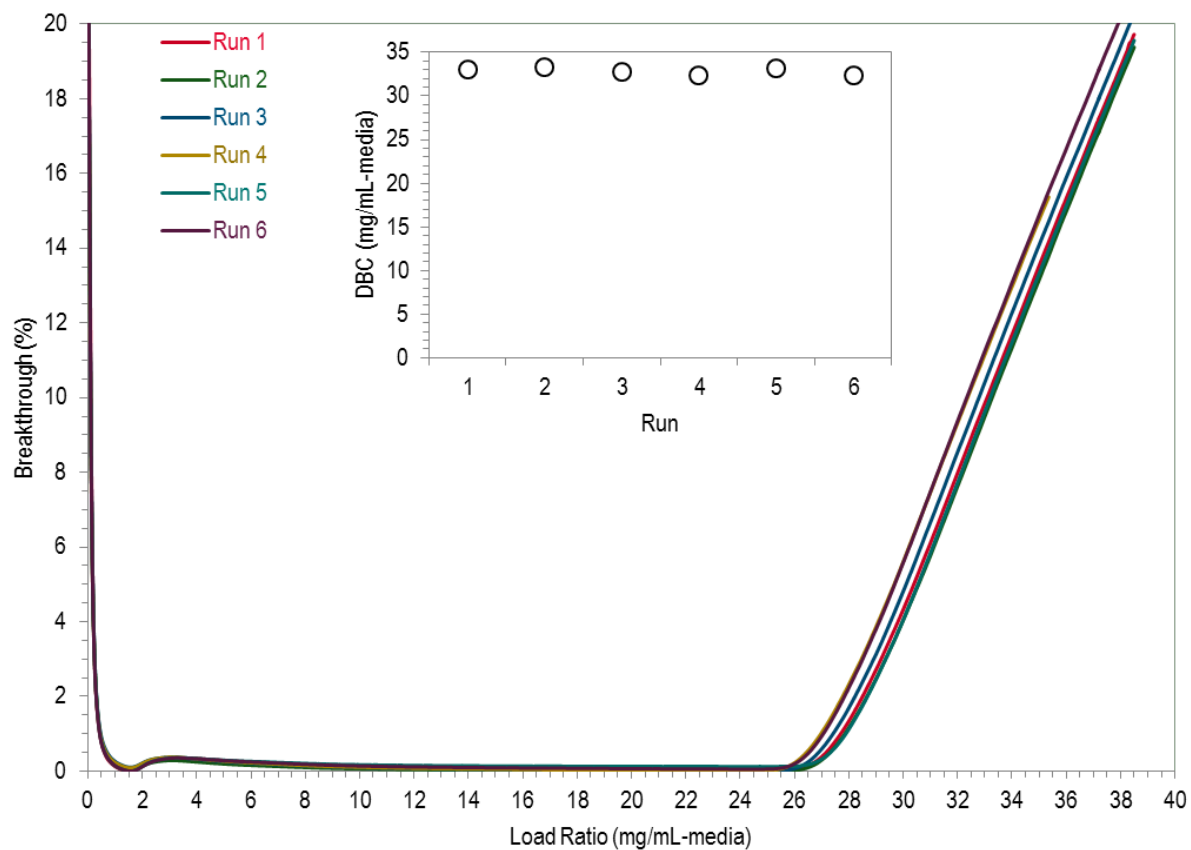
层析介质: Ca<sup>++</sup>Pure-HA, lot CPBL123015A  
层析柱: 6.6 mm ID x 3 cm (1.0 mL)  
流动相: A: 10 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
流动相: B: 500 mmol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 6.5  
流动相: C: 1.0 mol/L NaOH  
流速: 200 cm/hr (0.9 min residence time)  
检测: UV @ 280 nm (mAU)  
温度: 室温  
样品: 2.00 mg/mL mAb, diluted in mobile phase A  
设备: ÄKTA avant 25

方法: Sanitize, mobile phase C, 5 CV  
Rinse, water, 0.5 CV  
Pre-equilibrate, mobile phase B, 3 CV  
Equilibrate, mobile phase A, 10 CV  
Load, to >10 % breakthrough  
Wash, mobile phase A, 10 CV  
Elution, mobile phase B, 10 CV





## 未使用磷酸盐处理以提高对IgG的DBC



☹️ 使用磷酸盐冲洗处理对mAb的载量提高上没有效果。



## 其他应用

《Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析介质用户使用指南》涵盖了大多数使用方法以帮助用户正确地使用这款介质，其中包括：

1. 洗脱方法
2. 清洗、再生和储存
3. 应用和方法开发
4. 层析柱装填
5. 实际问题处理
6. 参考文献
7. 技术支持



***Thanks !***