混合抗体的亲和色谱分离策略

周月芳^{1,2}, 张 焱^{2*}, 罗 坚², 康丽梅^{2,3},
陈 毅², 石 红², 孟庆雄^{1*}, 苏志国^{2*}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院过程工程研究所
生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 3. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要:乳腺生物反应器可以高效表达重组人单克隆抗体,但是目标产品与乳液原料中的牛抗体性质、结构非常类似,分离难度很大。本文对牛抗体和重组人抗体的种属差异进行了分析,并在此基础上制定了新型分离策略,采取 Protein A 亲和色谱和免疫亲和色谱来解决混合抗体的分离问题,并讨论了色谱洗脱模式对分离效果的影响。结果表明,Protein A 亲和色谱结合梯度洗脱可以有效地纯化得到混合抗体,但是难以彻底分离重组人抗体和牛抗体;相比之下,使用 Protein A 亲和色谱结合置换色谱模式可以更加高效地分离混合抗体,最终可以得到纯度高达 95% 以上的重组人抗体,回收率可达 95% 以上。免疫亲和色谱同样可以有效地分离纯化重组单克隆抗体,且其通用性更强,可以应用于任何动物乳腺表达重组人抗体的分离纯化中。

关键词:Protein A 亲和色谱;免疫亲和色谱;重组人抗体;牛抗体;乳腺生物反应器

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2013)10-0974-06

Separation strategy of affinity chromatography
for mixed antibodies

ZHOU Yuefang^{1,2}, ZHANG Yan^{2*}, LUO Jian², KANG Limei^{2,3},
CHEN Yi², SHI Hong², MENG Qingxiong^{1*}, SU Zhiguo^{2*}

(1. Institute of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; 2. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;
3. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: A mammary gland bioreactor can efficiently express human recombinant monoclonal antibody. However, the target products are similar to the bovine antibody in the raw emulsion material in properties and structures. Thus it is difficult to achieve effective separation of the target products. In this work, the species differences between bovine antibody and recombinant human antibody were analyzed and a new separation strategy was raised based on it. We employed two kinds of affinity chromatography to separate these two antibodies from each other and studied the effect of elution mode upon separation. The results demonstrated that Protein A affinity chromatography could get hybrid antibodies using gradient elution mode, but hardly separate the recombinant human antibody and bovine antibody from each other. In contrast, the combination of Protein A affinity chromatography and displacement chromatography could separate the hybrid antibodies effectively and finally give recombinant human IgG (rHGG) product with the purity of 95% and the yield of more than 95%. Immuno-affinity chromatography could also effectively purify recombinant monoclonal antibodies and owned better generality, which could be used in purification of recombinant antibody expressed by any animal mammary gland.

* 通讯联系人. E-mail: yzhang@home.ipe.ac.cn(张焱); qxmeng@sina.com(孟庆雄); zgso@home.ipe.ac.cn(苏志国).
基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2013CB733600, 2013CB733604); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA021202); 国家自然科学基金项目(21306207, 21275134, 3100960); 中国计量科学研究院基础科学研究项目(21-JB1127).
收稿日期: 2013-03-13

Key words: Protein A affinity chromatography; immuno-affinity chromatography; recombinant human antibody; bovine antibody; mammary gland bioreactor

单克隆抗体类药物具有高度均一、特异性强、效价高、无交叉反应性等诸多优势,已经发展成为生物药品领域中一大类重要的诊断和治疗剂^[1,2]。目前国内国外制药厂家多使用动物细胞反应器生产重组单克隆抗体,所得产品结构准确、活性高,已经得到了医疗行业的认可^[3]。然而,该方法成本非常高昂,从而在一定程度上限制了单克隆抗体在医药领域的广泛应用。新兴的乳腺生物反应器技术同样可以生产高活性的单克隆抗体产品^[4],而且具有表达量高、成本低廉、产品开发周期短等优势,已经迅速成为单克隆抗体药物开发、生产的重要组成部分^[5-7]。我国研究者已经成功地利用牛乳腺生物反应器表达了人 CD20 单克隆抗体^[8],有望在不远的将来占据一定的市场份额。然而,下游的分离纯化步骤依然是限制该类产品的规模化应用的瓶颈步骤。

重组牛乳中的蛋白质杂质种类较多,包括牛自身表达的多克隆抗体。牛抗体(bovine IgG, BGG)会导致部分人群的过敏甚至免疫混乱,因此需要严格限制其在纯化所得重组人抗体(recombinant human IgG, rHGG)蛋白质产品中的含量。然而,牛抗体与重组人抗体的结构以及物理、化学性质均非常相似,分离难度很大,从而对重组抗体的分离纯化提出了严峻的挑战。Grunfeld 等^[9]采用混合模式的色谱技术分离混合抗体,取得了一定的分离效果。但实验结果表明,这种利用抗体疏水性进行分离的方法通用性有限,无法解决所有混合抗体分离的问题。此外,Pollock 等^[10]提出了可通过亲和色谱分离纯化乳腺生物反应器表达的重组抗体分子,但并未报道其产品中动物抗体的残留量。

在本文中,首先对重组人抗体和牛抗体之间的种属差异进行了分析,并在此基础上设计了通用性更强的分离方案。针对抗体分子重链上存在种属特征序列的特点,构建了两套分离方案,分别使用商品化的 Protein A 亲和介质和自制免疫亲和介质用于同源抗体的分离,并讨论了两种分离模式对 Protein A 色谱分离同源抗体效果的影响。最终建立可以彻底分离混合抗体的分离策略。该方法操作简单,易于放大,可以为乳腺生物反应器表达重组抗体的规模化生产提供有效的支持和参考。

1 实验部分

1.1 仪器

ÄKTA 液相色谱系统和 Ultraspec 2000 紫外-可见分光光度计、XK 16/20 色谱柱(GE Healthcare 公司); Model 450 酶联免疫检测仪、Mini-PROTEAN Tetra System 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); TGL-16M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); Milli Q Plus 超纯水机(美国 Millipore 公司);色谱柱: 150 mm × 10 mm(上海锦华色谱设备厂)。

1.2 试剂

重组人 CD20 抗体奶粉(中国农业大学); Bovine IgG 试剂盒和 Human IgG 试剂盒(上海研辉技术有限公司); Protein A 亲和介质(中国科学院过程工程研究所工程中心);化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 重组人 CD20 抗体

将重组人 CD20 抗体奶粉放在 4 ℃ 下保存。重组人 CD20 抗体奶粉预处理:按 1:15 的质量比将其溶于纯水中;于 10 000 r/min、4 ℃ 下离心 30 min,弃去上层油脂得到脱脂乳;调节脱脂乳 pH = 4.6,静置 2 h 后再次于 10 000 r/min、4 ℃ 下离心 30 min,弃去下层酪蛋白沉淀,得到含有重组人 CD20 抗体的乳清。

1.4 免疫亲和色谱分析

羊抗人单抗亲和色谱介质的制备:取 5 mL 左右的琼脂糖白球介质,用去离子水抽洗干净,将抽干的白球介质放入锥形瓶中,按 1:3:1 的质量比加入 1,4-丁二醇二缩水甘油醚和 1.5 mol/L 氢氧化钠溶液(含介质体积 0.33% 的硼氢化钠),在水浴摇床中进行环氧活化反应。取出活化后的介质抽洗至 pH 中性,介质抽干后重新放入清洗过的锥形瓶中,按 1:6 的质量比加入羊抗人免疫球蛋白进行偶联配基反应(条件:37 ℃、120 r/min、24 h)。偶联后介质用去离子水清洗并抽干,使用 1 mol/L 乙醇胺溶液(pH 11.0)封闭(条件:37 ℃、140 r/min、4 h)。抽洗干净封闭后介质中的乙醇胺(水洗-酸洗-水洗-碱洗-水洗),将抽干后的羊抗人单抗亲和色谱介质保存在 20% 乙醇中待用。

羊抗人单抗亲和色谱:柱体积(CV)5 mL,使用 A 液(20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0)平衡色谱柱后,进样流速 0.25 mL/min,继续用 A 液淋洗至基线平稳;使用 B 液(20 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH 2.7)进行洗脱,流速 1 mL/min,测定收集的重组人 CD20 抗体的含量和牛抗体的含量。

1.5 亲和色谱分析

Protein A 亲和色谱柱, CV 5 mL, 使用 A 液平衡色谱柱后, 分别进样 1/5 倍柱体积 (1 mL)、2/5 倍柱体积 (2 mL)、1 倍柱体积 (5 mL)、2 倍柱体积 (10 mL) 和 4 倍柱体积 (20 mL) 的重组人 CD20 抗体乳清, 流速 0.5 mL/min; 进样后继续用 A 液淋洗至基线平稳, 洗去未结合的杂质; 使用 B 液进行洗脱, 流速 1 mL/min, 收集洗脱峰并进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析以测定蛋白纯度, 采用试剂盒双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定重组人抗体的含量和牛抗体的含量。

1.6 Bovine IgG ELISA 分析

采用底物显色法检测收集的各峰中 BGG 含量, 每次试验都需建立 BGG 标准曲线。每个样品孔中预先包被牛免疫球蛋白 G 抗体, 作为探针, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体, 用底物四甲基联苯胺 (TMB) 显色, 底物在 HRP 催化下显色, 通过酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值 (OD 值), 计算样品浓度, 从而测定 BGG 的含量。

1.7 Human IgG ELISA 分析

采用底物显色法检测收集的各峰中 rHGG 含量, 每次试验都需建立 rHGG 标准曲线。每个样品孔中预先包被重组人免疫球蛋白 G 抗体 (作为探针), 加入 HRP 标记的检测抗体, 用底物 TMB 显色, 底物在 HRP 催化下显色, 通过酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值, 计算样品的浓度, 从而测定 rHGG 的含量。

1.8 蛋白质含量的测定

参考马斯亮蓝法, 根据牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的标准曲线计算得出原料及色谱峰中蛋白质的含量。

1.9 纯度检测

采用 SDS-PAGE 分析: 样品中加入 2% 巯基乙醇, 于 100 ℃ 下煮沸 3 ~ 5 min, 在 15% 的分离胶中电泳, 蛋白质进样量 2 μg, 染色方法采用银染。

2 结果与讨论

前期采用文献^[9]报道的疏水色谱方法分离乳清原料中的重组人 CD20 抗体和牛抗体, 但是分离效果不佳。这是由于针对不同抗原的重组人抗体的疏水性存在差异, 文献报道的疏水方法无法适用于所有重组人抗体的纯化, 其通用性有限。只有从抗体分子的结构入手, 才能开发出通用性更强的混合抗体分离技术。抗体分子可分为恒定区和可变区, 同一物种来源抗体分子的恒定区非常保守, 氨基酸

序列完全一致; 不同物种来源的抗体分子恒定区存在显著差异, 可以根据该差异区域对重组人抗体和牛抗体进行分离。基于这一研究思路, 设计了两条分离工艺路线, 分别使用 Protein A 亲和色谱和自制的免疫亲和色谱进行了分离实验。

2.1 Protein A 亲和色谱

2.1.1 梯度洗脱模式

Protein A 亲和介质可以利用配基与抗体恒定区之间的亲和力进行分离纯化。人抗体与牛抗体恒定区的种属差异导致它们与 Protein A 配基之间的亲和力强弱存在一定的差异^[11], 可以实现上述的研究思路。文献^[12]也证实, 使用 Protein A 亲和色谱可以有效地分离混合抗体。因此本文首先使用 Protein A 亲和色谱结合常规线性梯度洗脱 (10 倍柱体积洗脱液中 A 液从 0% 到 100%) 的方式对样品进行分离, 结果如图 1 所示。电泳结果 (图 2) 表明, Protein A 色谱可以有效地纯化抗体, 洗脱峰电泳纯度大于 95%。但是, ELISA 检测结果 (表 1) 表明洗脱峰中同时存在重组人 CD20 抗体和牛抗体, 且牛抗体的含量较高 (17.1%), 没有达到预期的分离混合抗体的效果。

2.1.2 置换色谱模式

实验中优化了 Protein A 色谱分离工艺, 使用置换色谱模式分离混合抗体。置换色谱是一种常用的色谱方式, 它利用混合蛋白质竞争性地结合在固定相上来分离纯化蛋白质, 可以在离子交换、亲和色谱以及疏水色谱等多种色谱柱中使用^[13]。根据文献报道, 置换色谱模式适合分离物理、化学性质非常接近的蛋白质混合物, 研究者已经将该分离模式应用于自上而下的蛋白质组学的分离纯化, 并取得了不错的效果^[14]。

图 1 Protein A 亲和色谱介质在线性梯度洗脱条件下制备 rHGG 的色谱图

Fig. 1 Chromatogram for the preparation of rHGG by Protein A affinity chromatographic media with linear gradient elution (0% A - 100% A in the eluent of 10 times of column volume)

图 2 Protein A 亲和色谱介质各洗脱峰的还原性电泳图
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of chromatographic fractions obtained from Protein A affinity chromatographic media under reducing conditions

M. protein markers; 1. whey; 2. penetration peak; 3. elution peak.

表 1 Protein A 亲和色谱介质的纯化效率
Table 1 Purification efficiency of Protein A affinity chromatographic media

Sample	rHGG yield * / %	rHGG purification fold	BGG residual rate ** /%
Recombinant bovine milk	100.0	1.0	2.5
Whey	80.0	4.1	12.5
Elution peak	99.4	1.7	17.1
Total	79.5	7.0	

* rHGG yield = Ma/Mb. Ma is rHGG content in the harvest sample and Mb is rHGG content in the sample injection. Both of Ma and Mb were calculated by human IgG ELISA detection.

** BGG residual rate = Mc/Md. Mc is BGG content in a sample detected by bovine IgG ELISA. Md is total protein content in the sample detected by Bradford method.

考察了进样量对置换色谱分离效果的影响。分别进样 1、2、5、10、20 mL 乳清,收集各批次的洗脱峰,使用 SDS-PAGE 检测纯度并使用 ELISA 分析洗脱峰中牛抗体的残留量。如图 3 所示,进样量不会影响色谱产品的纯度,实验所得洗脱峰的纯度达到了电泳纯。ELISA 及蛋白质含量分析结果如表 2 所

表 2 不同进样体积下 Protein A 亲和色谱介质的纯化效率
Table 2 Purification efficiency of Protein A affinity chromatographic media at different injection volumes

Injection volume/ mL	rHGG yield * / %	rHGG purification fold	BGG residual rate * /%
1	96.6	1.9	10.2
2	98.5	2.01	5.2
5	97.3	2.02	4.5
10	94.8	2.05	1.5
20	95.1	2.01	0.8

* rHGG yield and BGG residual rate are the same as in Table 1.

示。随着进样量的增加,洗脱峰中的牛抗体残留率逐渐减少,当进样量增加到 20 mL 时,牛抗体残留率降至 0.82%;结合电泳分析结果可知,此时洗脱峰中的重组人 CD20 抗体纯度可以达到 95% 以上。

图 3 不同进样体积下 Protein A 亲和色谱介质各洗脱峰的还原性电泳图
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of chromatographic fractions obtained by Protein A affinity chromatographic media under reducing conditions at different injection volumes

M. protein makers; W. whey. Injection volumes: 1. 1 mL; 2. 2 mL; 3. 5 mL; 4. 10 mL; 5. 20 mL.

2.2 免疫亲和色谱分离

上述 Protein A 置换色谱可以有效地分离重组人抗体和牛抗体,但是其通用性仍然受到一定的限制。举例来说,兔源 IgG 同 Protein A 之间的亲和力与人源 IgG 非常相似,因此兔乳腺生物反应器表达的重组人抗体无法使用上述方案进行分离。为此,设计合成了通用性更强的免疫亲和色谱介质用于解决混合抗体的分离。免疫亲和配基为针对目标抗体种属特征区域的单克隆抗体,仅能结合该物种来源的抗体,而不能结合其他物种来源的抗体,从而实现混合抗体的分离。

在本文中,以羊抗人单抗为亲和配基合成了免疫亲和介质用于重组人 CD20 抗体和牛抗体的分离,结果见图 4。使用 ELISA 检测了洗脱峰组分,并计算了色谱纯化倍数,结果如表 3 所示,洗脱峰中牛

表 3 免疫亲和色谱的纯化效率
Table 3 Purification efficiency by immuno-affinity chromatography

Sample	rHGG yield * / %	rHGG purification fold	BGG residual rate * /%
Recombinant bovine milk	100.0	1.0	2.5
Whey	80.0	4.1	12.5
Elution peak	29.0	2.1	0.6
Total	23.2	8.4	

* rHGG yield and BGG residual rate are the same as in Table 1.

抗体含量很低(0.2%);结合 SDS-PAGE 纯度检测结果(见图 5)可知,重组抗体产品的纯度大于 95%。

图 4 免疫亲和色谱制备 rHGG 的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the preparation of rHGG by immuno-affinity chromatography

图 5 免疫亲和色谱各洗脱峰的还原性电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of chromatographic fractions obtained by immuno-affinity chromatography under reducing conditions

M. protein markers; 1. whey; 2. elution peak.

2.3 讨论

Grunfeld 等^[9]首先报道了利用重组人抗体和牛抗体的疏水性差异进行分离的案例,但是本研究的前期实验结果表明,该方法通用性不强,无法适用于所有的重组人抗体。为了适应乳腺生物反应器产业化的需求,有效地纯化重组动物乳液中的人抗体产品,需要找到通用性更强的分离纯化方法。本文针对抗体分子恒定区的结构特点,设计了两套分离方案并对此进行了探索。

2.3.1 Protein A 置换色谱

Pollock 等^[10]曾经使用亲和色谱分离乳腺生物反应器表达的重组抗体,但并没有对其产品中的动物抗体残留进行报道,也没有深入地研究重组抗体在亲和色谱过程中的分离机理。在本文中,通过实验考察了重组抗体和动物抗体在亲和色谱中的分离

机理,并对此方法的色谱条件、分离抗体的纯度和回收率等进行了深入的研究。Protein A 亲和色谱是一种常用的纯化抗体的手段,可以高效地分离纯化抗体。本文进一步开发了该色谱技术的潜力,利用不同种属抗体分子与 Protein A 之间亲和力的差异来分离混合抗体。当进样量较小时,Protein A 介质的有效吸附位点比较充足,重组人抗体和牛抗体都吸附到介质上,此时只能以梯度洗脱的方法进行分离。由于人抗体和牛抗体之间的性质差异不大,相应的最佳洗脱梯度间隔较小,在实际的梯度洗脱过程中往往由于柱效的原因,难以实现有效的分离。

随着色谱进样量的增加,抗体分子数量逐渐多于介质的有效吸附位点,此时人抗体和牛抗体在亲和柱上发生竞争性吸附。由于人抗体与 Protein A 配基之间的亲和力更强,因此在竞争过程中占据优势地位,逐渐置换弱吸附的牛抗体而结合在色谱柱上,被置换下来的牛抗体流穿,然后将吸附到柱上的人抗体洗脱下来,即可实现混合抗体的分离。

在置换色谱模式中,进样量对分离效果的影响非常关键。如果进样量过小,置换过程不彻底,那么所得洗脱峰中牛抗体杂质含量可能超标,无法得到合格的重组抗体产品;如果进样量过大,则重组抗体可能大量流穿,造成分离纯化过程中目标产品收率过低。因此在使用置换色谱分离混合抗体时,重点需要对进样量进行优化。

值得指出的是,不同动物来源的抗体与 Protein A 介质之间的亲和力存在显著差异,Protein A 色谱方法虽然可以有效地分离重组人抗体和牛抗体,但并非适用于所有动物乳腺生物反应器产品的纯化。例如,兔抗体与 Protein A 之间的亲和力非常强^[11],与人抗体相当,如果使用兔乳腺表达重组人抗体,则无法采用该策略进行混合抗体的分离。

2.3.2 免疫亲和色谱

本文开发的免疫亲和色谱是一种通用性更强的混合抗体分离策略。该技术采用针对人抗体种属特征区域的单克隆抗体为配基合成免疫亲和介质,分离混合抗体。由于亲和配基仅能结合人抗体,因此该技术可以广泛应用于所有动物乳腺生物反应器表达重组人抗体的分离纯化,通用性极强。目前,该色谱技术尚存在目标产品回收率较低等缺陷,这主要是由于重组人抗体和亲和配基之间的亲和作用力过强,常规方法难以顺利地将其洗脱所致。拟在将来进一步研究洗脱方法,以提高重组产品回收率,完善该色谱分离策略。

3 结论

针对重组动物乳液中混合抗体分离问题,本文开发了两种亲和色谱分离策略并比较了其分离效果和通用性。结果表明,使用 Protein A 色谱结合梯度洗脱可以有效地纯化得到混合抗体,但是无法分离重组人 CD20 抗体和牛抗体;Protein A 色谱结合置换模式的分离度更高,在合适的进样量条件下可以有效地分离重组人 CD20 抗体和牛抗体,从而得到高纯度的重组目标产品。该方法具有一定的通用性。免疫亲和色谱同样可以完成分离动物抗体-重组人抗体混合物的任务,且其通用性更强,可以应用于任何动物乳腺表达重组人抗体的分离纯化中。

参考文献:

[1] van Dijk M A, van de Winkel J G. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5(4): 368

[2] Walsh G. BioPharm Int, 2004, 17(12): 18

[3] Newcombe C, Newcombe A R. J Chromatogr B, 2007, 848: 2

[4] Houdebine L M. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13(6): 625

[5] Zhang R, Rao M, Li C, et al. Transgenic Res, 2009, 18(3): 445

[6] Zhang Y Q. Chinese Journal of Biologicals (张颖琦. 中国生物制品学杂志), 2009(3): 309

[7] Zhu X F, Qu J F, Wu X J, et al. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine (朱小甫, 渠敬峰, 吴旭锦, 等. 畜牧兽医杂志), 2007, 26(3): 50

[8] Li N, Tang B. China Poultry (李宁, 汤波. 中国家禽), 2011, 33(15): 1

[9] Grunfeld H, Moore P. J Immunol Methods, 1997, 201(2): 233

[10] Pollock D P, Kutzko J P, Birck-Wilson E, et al. J Immunol Methods, 1999, 231: 147

[11] Amersham Pharmacia Biotech. Handbook: Protein Purification. [S. l.]: Amersham Pharmacia Biotech, 1999

[12] Duhamel R C, Schur P H, Brendel K, et al. J Immunol Methods, 1979, 31(3/4): 211

[13] Gajdosik M S, Clifton J, Josic D. J Chromatogr A, 2012, 1239: 1

[14] Ahrend R, Lichtner B, Buck F, et al. J Chromatogr B, 2012, 901: 34