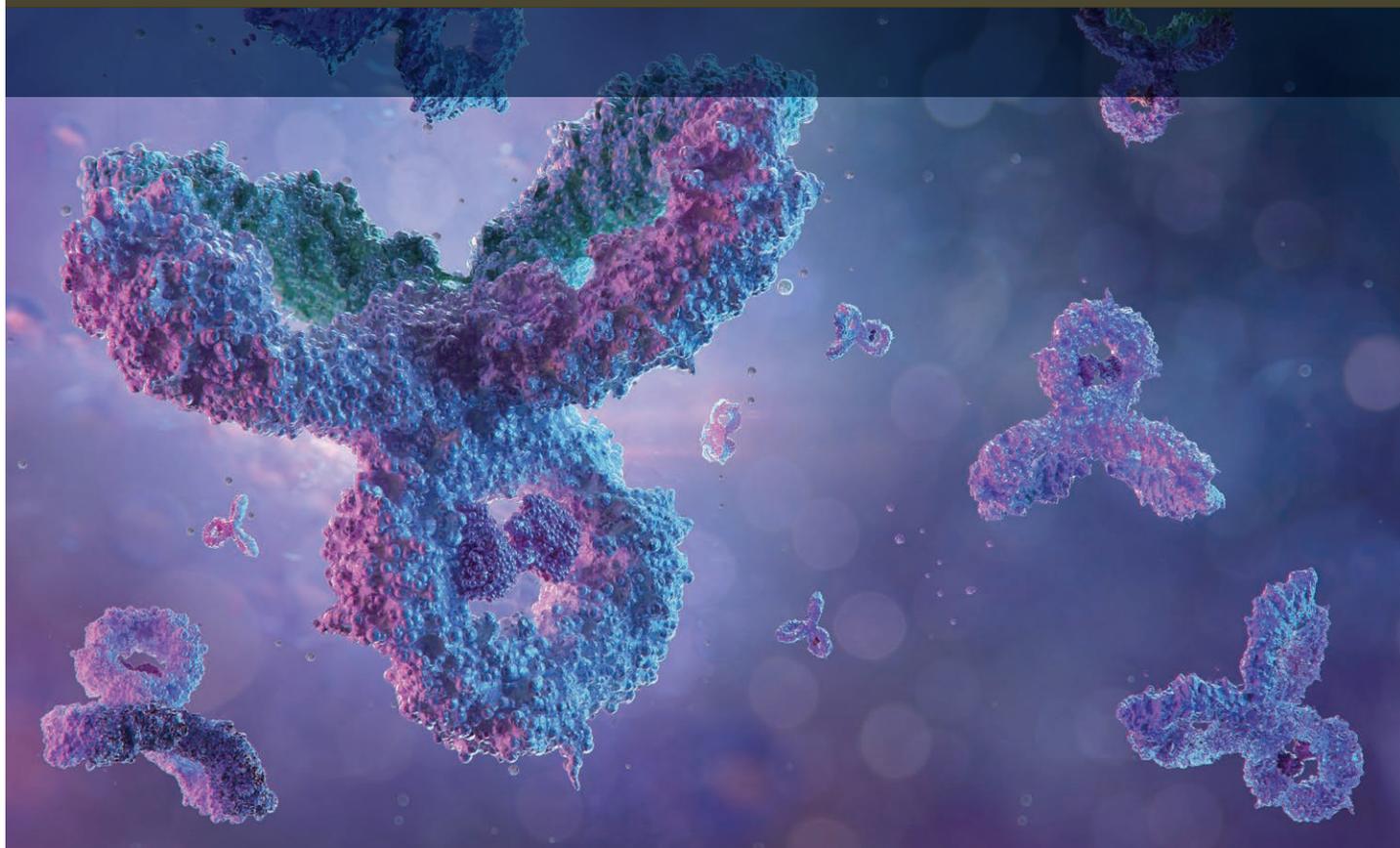


安捷伦生物色谱柱

滴度测定

应用文集



目录

背景	2
入门指南	3
用于滴度测定的亲和色谱操作指南	4
精选应用简报	17
稳定可靠的重组 Protein A Monolith 色谱柱，用于抗体滴度测定 — 5994-3088ZHCN	17
使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞 克隆选择 — 5991-5124EN	24
使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 mAb 滴度分析 — 5991-5135EN	32
更多应用简报	39
更多信息	39

滴度测定

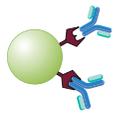
背景

在生物治疗药物的生产过程中，滴度测定用于测量发酵液中目标蛋白质的浓度。在以下两种重要的情况下，需要进行准确的滴度测定。第一种情况是在克隆选择过程中，仅选择那些提供足量目标蛋白质的转染克隆，因为并非所有克隆都同等有效。第二种情况是在发酵工艺的放大过程中监测目标蛋白质的浓度。细胞培养基条件的优化和最佳收获时间的确定依靠准确的滴度测定。

对于单克隆抗体，最有效的滴度测定方法之一是亲和色谱法。通过将 IgG 分子吸附到 Protein A 或 Protein G 亲和色谱柱上，可以去除来自发酵液的其他杂质和副产物。将经纯化的单克隆抗体洗脱，通过峰面积与校准曲线的对比进行定量分析，从而实现蛋白质浓度的快速测量。

采用整体式色谱柱有助于消除细胞培养基碎片堵塞的风险，并快速（短于 1 分钟）提供结果。

这些色谱柱也可用于纯化足量的材料，用于后续使用其他互补技术进行 CQA 分析（例如聚集体分析或电荷异构体分析），并且易于合并为 2D 工作流程。



滴度测定

亲和色谱

工艺开发过程中 mAb 滴度测定的理想选择

BioMonolith Protein A 和 BioMonolith Protein G

天然 Protein A 或 Protein G

属性	优势
快速分离	缩短方法开发时间
高结合容量	应用更灵活
大大减少堵塞	缩短系统停机时间

入门指南

在选择用于滴度测定的亲和色谱柱时，首先要考虑的是待纯化或分析的目标蛋白质。不同来源（人、小鼠等）的不同免疫球蛋白（IgG 1、2 等）对 Protein A 与 Protein G 具有不同的亲和力。例如，人 IgG3 与 Protein G 紧密结合，但是与 Protein A 完全不结合。有关选择 Protein A 或 Protein G 色谱柱的指南以及建议的流动相和样品方法，可参见以下操作指南。流动相 B（亲和色谱实验中的洗脱缓冲液）是一个可以优化的方法参数。

用于滴度测定的亲和色谱：操作指南

前言

亲和色谱是一种利用特定蛋白之间（如抗原/抗体）高度特异性分子间相互作用的强大分离技术。安捷伦提供了几种专门的亲和产品，包括用于对单克隆抗体 (mAb) 进行分离和定量的整体 Protein A 和 Protein G 色谱柱。

近年来，mAb 已成为可满足多种疾病治疗需求的主要生物制药产品。这些经特别设计的抗体具有特定的基因构成，能够更好地以病原为靶标。在这些抗体的开发过程中，Protein A 和 Protein G 分析型亲和色谱柱可用于测定各种细胞培养上清液中的抗体滴度或浓度，以选出高产量的克隆。

色谱柱选择

Protein A 和 G 色谱柱对抗体均具有高亲和性，因此它们仅结合细胞培养上清液中的抗体。然而，它们的选择性各有不同。例如，Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱对人亚类 IgG1、IgG2 和 IgG4 具有高亲和力，对 IgG3 没有亲和性，而 Agilent Bio-Monolith Protein G 色谱柱对人亚类 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 都具有高亲和力。IgG1 凭借其稳定性（半衰期较长）、在血清中的丰度以及较少出现聚集，成为最常用的生物治疗药物。通常不使用 IgG3，因为它容易聚集且不太稳定。相反，Protein G 色谱柱对人亚类单克隆抗体（例如 IgA 和 IgD）没有亲和性，但是 Protein A 色谱柱能够与这些抗体结合（表 1）。这些色谱柱相互补充，Protein G 对不与 Protein A 结合的 mAb 具有亲和性，反之亦然（图 1）。因此，它们能够实现目前作为生物治疗药物进行开发的各种 mAb 亚类和片段的滴度测定。

表 1. Protein A 和 G 与不同的人 IgG 亚类和小鼠 IgG 亚类的结合亲和性 [(1), (2)]

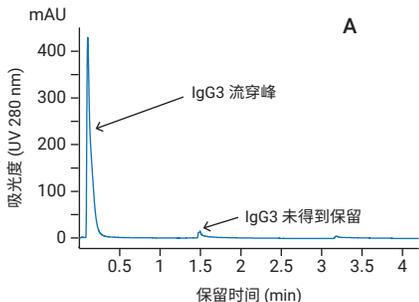
抗体	抗体	Protein A	Protein G
人	人 IgG1	++++	++++
	人 IgG2	++++	++++
	人 IgG3	-	++++
	人 IgG4	++++	++++
	人 IgA	++	-
	人 IgD	++	-
	人 IgE	++	-
	人 IgM	++	-
小鼠	小鼠 IgG1	+	++
	小鼠 IgG2a	++++	++++
	小鼠 IgG2b	+++	+++
	小鼠 IgG3	++	+++
	小鼠 IgM	+/-	-

抗体片段	Protein A	Protein G
人 Fab	+	+
人 F(ab') ₂	+	+
人 scFv	+	-
人 Fc	++	++
人 K	-	-
人 λ	-	-

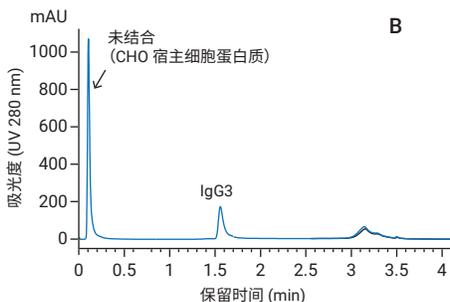
Protein A 和 G 对不同抗体的相对亲和性表示法：

- ++++ = 强亲和性
- +++ = 中等亲和性
- ++ = 弱亲和性
- + = 微弱亲和性
- = 无亲和性

Bio-Monolith Protein A 对 IgG3 无选择性



Bio-Monolith Protein G 对 IgG3 具有选择性



Bio-Monolith Protein A 柱对 IgG3 无亲和性，而 Bio-Monolith Protein G 柱则有亲和性。

图 1. 摘自 5991-6087CHCN 或应用简报 5991-6094CHCN

HPLC 系统注意事项 — 分析过程中确保蛋白质稳定

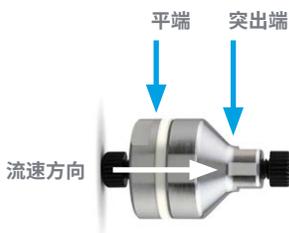
这些整体柱与 HPLC 和 UHPLC 系统兼容，但是此类分析的理想之选是 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统。它可以轻松处理具有挑战性的溶剂条件，例如 pH 1 至 pH 13 的极端 pH 值以及高盐浓度的缓冲液。溶剂输送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，由此建立了极为稳定的仪器。

样品前处理

亲和色谱的样品前处理方法与 HPLC 蛋白质分析的样品前处理方法类似。进样前需要极少的样品前处理，以优化色谱柱性能并延长色谱柱寿命。

- 对样品进行离心或过滤，去除上清液或裂解液中的宿主细胞碎片和颗粒，以防止堵塞色谱柱
- 对于血清/血浆样品，最好去除样品中的脂类。脂类将与色谱柱发生强结合，导致色谱柱和仪器污染

Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱带有白色条带，而 Bio-Monolith Protein G 亲和色谱柱则带有黄色条带。



条件

样品进样

对于包含 1–5 mg/mL mAb 的样品，推荐进样量为 1–5 μ L。样品可溶于 H₂O 或流动相 A 中。每次最多进样 50 μ L 或 400–500 mg mAb 至色谱柱上。

流速

色谱柱可在 1.0–3.0 mL/min 的流速下运行，以实现高速分离。

温度

为实现成功分离，典型温度为 25 °C。色谱柱使用温度范围为 4–40 °C。

检测

推荐在 280 nm 下进行 UV 检测，在该波长下的吸收由具有芳香基或更多偶联侧链的氨基酸引起。

流动相

流动相 A 结合和清洗缓冲液

流动相 A 为结合缓冲液：50 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.4。

结合/清洗缓冲液应新鲜配制。此外，建议使用 0.22 或 0.45 μ m 膜过滤缓冲液，以减少缓冲液杂质积聚在色谱柱内部筛板上。此过滤步骤有助于防止色谱柱堵塞。

流动相 B 洗脱缓冲液

Bio-Monolith Protein A 和 G 色谱柱与用于 mAb 洗脱的许多低 pH 缓冲液兼容，详见表 2。通常使用柠檬酸、甘氨酸、HCl 和乙酸。如果所用样品浓度低，并需要考虑基线噪音和伪峰，那么可选择 HCl 作为洗脱液，因为它的折射率较低。

注：通常，用于亲和色谱柱的洗脱缓冲液与结合/清洗缓冲液的折射率 (RI) 差异较大；因此，当洗脱液开始流动时，可能会出现基线噪音和伪峰。该峰可能干扰低浓度样品的定量分析。为了尽可能减小这种影响，建议使用高品质化学品，并且应运行空白以确定伪峰。如果需要，空白运行可用于基线扣除。

表 2. 兼容的洗脱缓冲液

色谱柱	洗脱缓冲液	浓度	pH
Bio-Monolith Protein A 和 rProtein A	柠檬酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	甘氨酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	乙酸	5%–20%	
Bio-Monolith Protein G	柠檬酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	甘氨酸	0.1 mol/L	2.5–3.0
	乙酸	5%–20%	

快速分离方案

Agilent Bio-Monolith rProtein A (重组蛋白 A) 分析柱是 Bio-Monolith 和亲和色谱家族的新成员。该色谱柱可用于高速分析单克隆抗体 (mAb) 滴度和小规模纯化, 并可轻松集成到二维液相色谱等其他分析工作流程中。本研究以最大流速测试了重组蛋白 A 色谱柱, 并对天然 Protein A 色谱柱进行了桥接研究。证明了一种色谱结合/洗脱法可用于测定 mAb 滴度, 该方法具有非常短的运行时间 (1 分钟), 适用于克隆筛选、工艺开发及优化等高通量应用。

高通量 mAb 滴度分析

实验部分

化学品与试剂

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别, 且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括:

- 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A), 配备样品冷却装置 (选件 100)
- 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A), 配备生物惰性热交换器 (选件 019)
- 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

HPLC 方法条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)								
结合缓冲液 (洗脱液 A):	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4								
结合缓冲液 (洗脱液 B):	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6								
梯度曲线:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0-0.2</td><td>0 (结合)</td></tr><tr><td>0.3-0.65</td><td>100 (洗脱)</td></tr><tr><td>0.66-0.90</td><td>0 (再平衡)</td></tr></tbody></table> <p>(0.1 min 后运行)</p>	时间 (min)	%B	0.0-0.2	0 (结合)	0.3-0.65	100 (洗脱)	0.66-0.90	0 (再平衡)
时间 (min)	%B								
0.0-0.2	0 (结合)								
0.3-0.65	100 (洗脱)								
0.66-0.90	0 (再平衡)								
流速:	3 mL/min								
柱温:	25 °C								
检测:	UV, 280 nm								
进样量:	4 µL (上样 10 µg)								

结果与讨论

高通量 mAb 滴度分析

证明使用高通量方法，在 1 分钟的色谱运行时间内即可实现 mAb 的高速滴度分析（图 1）。纯化的（结合/洗脱）mAb 的保留时间约为 0.61 分钟，与 CHO 细胞培养上清液中包含的宿主细胞蛋白的杂质峰（保留时间约为 0.05 分钟）分离良好。在图 1 中，重复进样添加了 mAb 的粗制上清液，在 125 bar 的反压水平下，通量为 60 个样品/小时，显示出了一致且可靠的性能。

在整个研究过程中，峰形、保留时间和反压没有明显变化。图 2 显示了不同上样量生成的色谱图。然后通过绘制峰面积与进样量之间的关系来生成校准曲线（图 3）。结果表明，如校准曲线所示，该方法的线性响应出色 ($R^2 = 0.9993$)，并能准确测量两组不同样品中 mAb 的含量。

这些数据证明了使用这种快速分析方法准确测定 mAb 滴度的可行性。

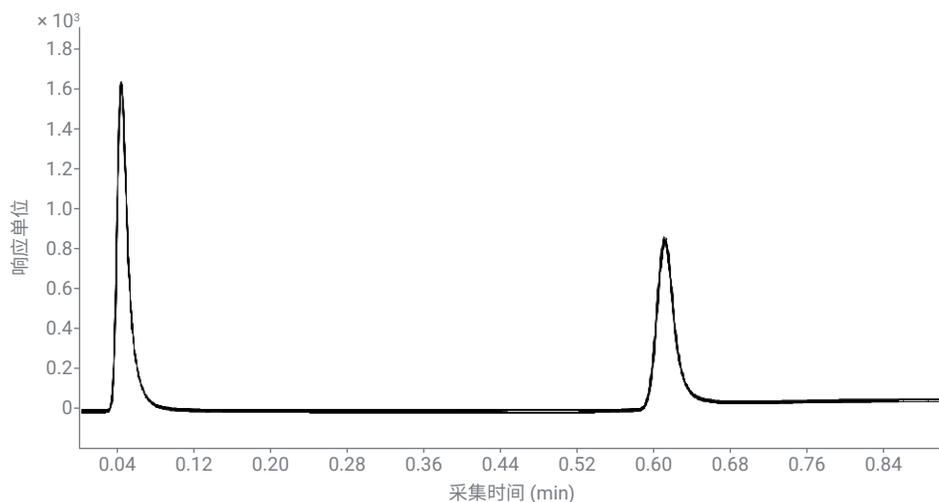


图 1. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：60 次连续进样的叠加色谱图。第一个峰为细胞培养上清液中宿主细胞蛋白杂质；第二个峰为纯化的 mAb

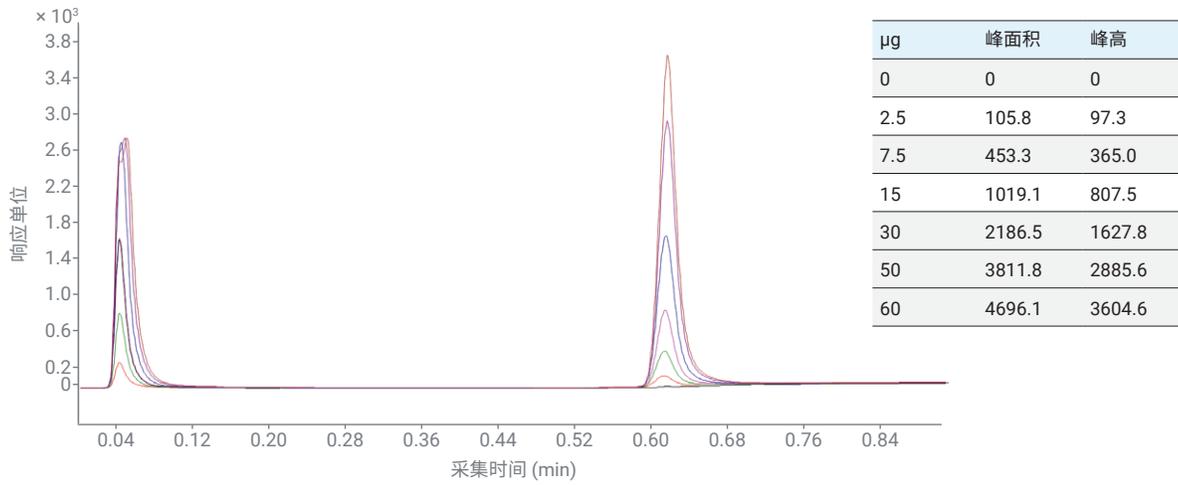


图 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：校准曲线。上样量递增的样品的叠加色谱图，用于生成校准曲线

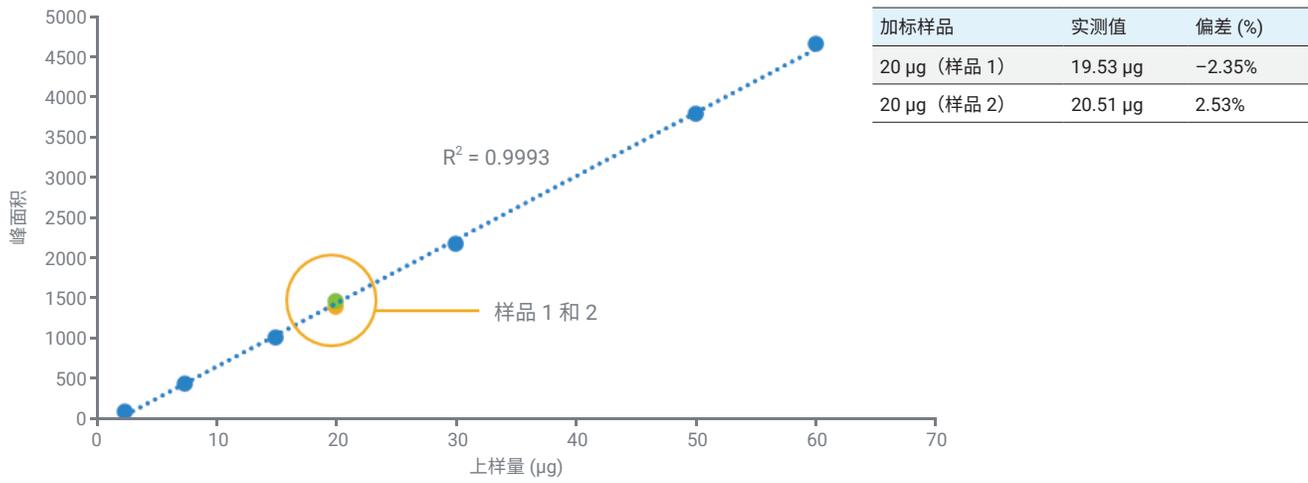


图 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱：标准曲线线性响应和偏差 (%)

桥接研究

在桥接研究中，对于天然和重组色谱柱，保留时间、标准曲线的线性和偏差、样品交叉污染和回收率等性能特征没有可检出的差异。这项工作为那些正准备从天然 Protein A 色谱柱转换到 rProtein A 色谱柱的研究者提供了信心。

实验部分

化学品与试剂

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1.5 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体和相同浓度的纯化重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统由以下组件组成：

- 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)
- 配备生物热交换器的 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- 各自配备生物流通池的 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B) 和可变波长检测器

HPLC 方法条件

参数	值	
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)	
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5069-3639)	
结合缓冲液 (洗脱液 A)：	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4	
结合缓冲液 (洗脱液 B)：	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6	
梯度曲线：	时间 (min)	%B
	0.0–0.5	0 (结合)
	0.6–2.6	100 (洗脱)
2.7–4.0	0 (再平衡)	
流速：	1.5 mL/min	
柱温：	25 °C	
检测：	UV, 280 nm	
进样量：	5–50 µL (上样 25 µg)	

结果与讨论

桥接研究

在相同条件下测试了两种 Bio-Monolith Protein A 色谱柱的性能。天然 Protein A 和 rProtein A 色谱柱之间的所有特性存在较小差异或没有差异，包括纯化的 mAb 的保留时间和峰形（图 4）、标准曲线的线性响应和加标样品回收率（图 5 和图 6），以及样品交叉污染（图 7）。

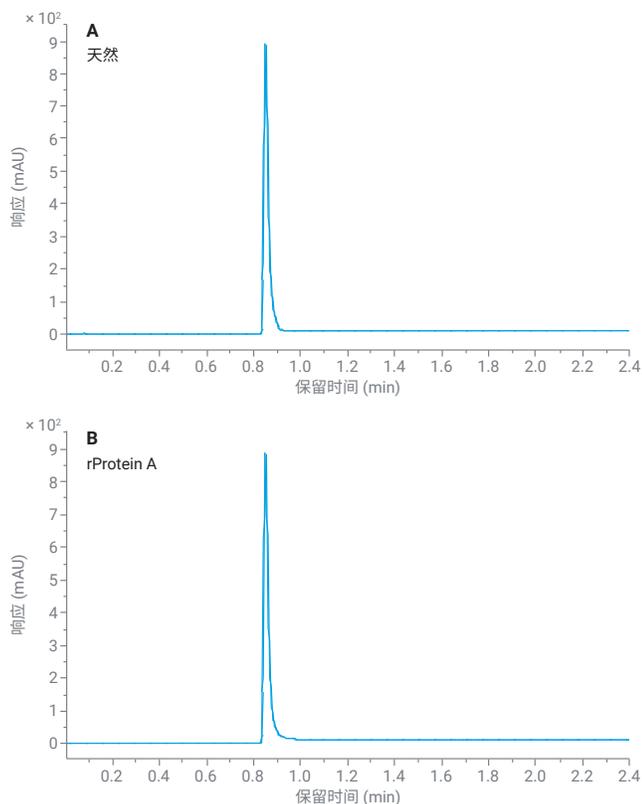
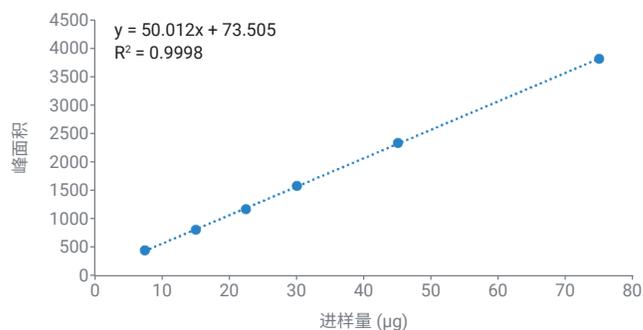
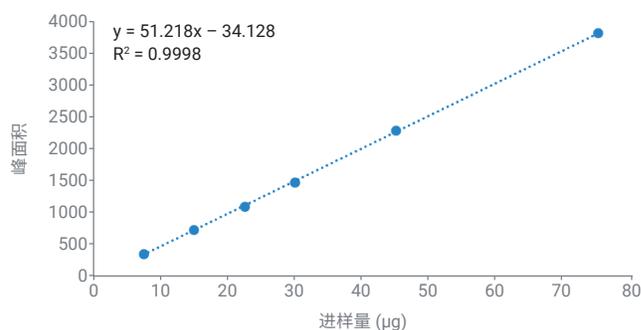


图 4. 天然 Protein A 色谱柱和 rProtein A 色谱柱的色谱图和 mAb 峰结果比较



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 μg (经纯化)	25.25 μg	0.99%
25 μg (上清液中)	26.09 μg	4.35%

图 5. rProtein A 色谱柱：线性响应



加标样品	实测值	偏差 (%)
25 μg (经纯化)	24.94 μg	-0.23%
25 μg (上清液中)	25.78 μg	3.12%

图 6. 天然 Protein A 色谱柱：线性响应

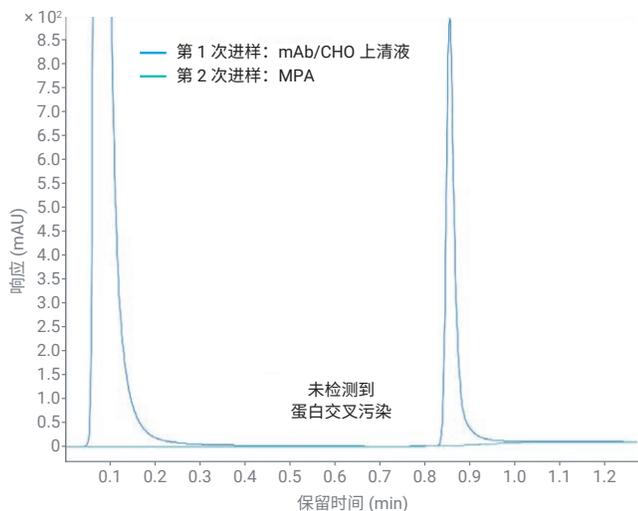


图 7. rProtein A 色谱柱：交叉污染分析。随后进样的结合缓冲液 (MPA) 没有检测到蛋白交叉污染

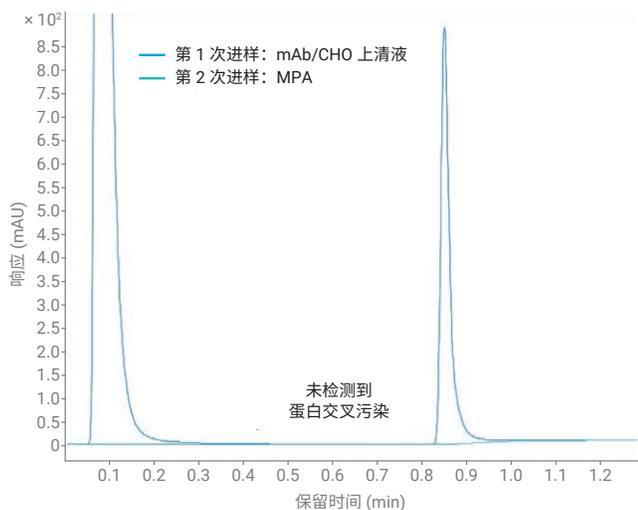


图 8. 天然 Protein A 色谱柱：交叉污染分析。随后进样的结合缓冲液 (MPA) 没有检测到蛋白交叉污染

回收率分析

除了比较天然 Protein A 和 rProtein A 色谱柱的回收率外，本研究还比较了两种非安捷伦的 rProtein A 色谱柱。流速调整为 2 mL/min，以适应非安捷伦色谱柱的运行流速。其他 mAb 样品包括：

- Agilent NISTmAb (部件号 5191-5744)
- Sigma SiLu mAb, 购自 Sigma-Aldrich (SiLu Lite, 部件号 MSQC4)

不使用色谱柱 (使用两通接头)，通过进样纯化的 mAb 样品获得 mAb 峰的基线曲线下面积 (AUC)，纯化的 mAb 样品用流动相 B 稀释。使用色谱柱，获得洗脱的 mAb 的 AUC。mAb 样品量与测定基线 AUC 时的用量相同。

$$\text{回收率 (\%)} = (\text{洗脱的 mAb 的 AUC} / \text{基线 AUC}) \times 100$$

HPLC 方法条件

参数	值								
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)								
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5069-3639)								
结合缓冲液 (洗脱液 A)：	50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4								
结合缓冲液 (洗脱液 B)：	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6								
梯度曲线：	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0–0.4</td> <td>0 (结合)</td> </tr> <tr> <td>0.5–1.3</td> <td>100 (洗脱)</td> </tr> <tr> <td>1.31–4.0</td> <td>0 (再平衡)</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0.0–0.4	0 (结合)	0.5–1.3	100 (洗脱)	1.31–4.0	0 (再平衡)
时间 (min)	%B								
0.0–0.4	0 (结合)								
0.5–1.3	100 (洗脱)								
1.31–4.0	0 (再平衡)								
流速：	2 mL/min								
柱温：	25 °C								
检测：	UV, 280 nm								
进样量：	4 μL (上样 10 μg)								

结果分析

rProtein A 色谱柱的平均回收率比天然 Protein A 色谱柱低 1%，但仍优于两种非安捷伦色谱柱。虽然天然 Protein A 色谱柱的回收率略占优势，但在 3 个 mAb 样品中，rProtein A 色谱柱的回收率最稳定。

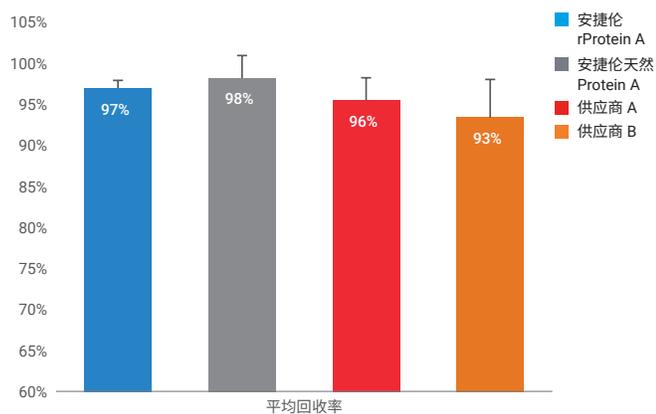


图 9. mAb 回收率结果比较

结论

天然 Protein A 色谱柱和 rProtein A 色谱柱之间的桥接研究表明，rProtein A 色谱柱具有与天然 Protein A 色谱柱相似或等效的性能。

大幅延长色谱柱寿命

色谱柱再生

使用一体式膜盘的主要优点在于，其具有的通道而非孔可以降低细胞培养样品进样时色谱柱堵塞的可能性。这样提高了稳定性并减少了清洗工作。通过在每 30–50 个样品后运行空白梯度进样，可减小色谱柱污染。

如果观察到色谱柱劣化（拖尾峰或宽峰），建议采用以下清洗程序。第一步是色谱柱再生。如果性能仍然无法达到理想状态，可使用原位清洗程序，这样将减少可用的 Protein A 的量。

色谱柱再生

- 用 2 mL（色谱柱体积 (CV) 的 20 倍）的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 1 mol/L NaCl (pH 7–8) 在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
- 用 2 mL（20 倍 CV）的低 pH 溶液（例如洗脱缓冲液）进行清洗
- 用结合缓冲液重新平衡色谱柱

原位清洗

- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的 0.1 mol/L NaOH 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行清洗（反向冲洗）
- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的去离子水在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
- 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）浓缩缓冲液 (0.1–0.5 mol/L) 清洗以恢复正常 pH (7.0–7.4)
- 用 5 mL（50 倍 CV）结合缓冲液重新平衡色谱柱

如果杂质高度疏水或为脂类，并且不易从色谱柱中去除，则可以使用 2-丙醇（最多 30%）或盐酸胍（最多 3 mol/L）来去除这些杂质。使用这些替代清洗溶液后，请按照步骤 1 至 4 进行操作。

警告：使用这些清洗溶液清洗色谱柱时，务必降低色谱柱的流速，以免产生的高压超过色谱柱允许的最高压力。

短期储存

当需要过夜储存或储存几天时，可使用结合缓冲液冲洗色谱柱，然后将其与仪器断开连接，加盖并储存于 4–8 °C 下。在短期储存后首次进样前，应对色谱柱进行平衡。

长期储存

如果不使用色谱柱的时间超过两天，应使用至少 1 mL (10 倍 CV) 去离子水进行冲洗，然后用至少 2 mL (20 倍 CV) 包含 20 mmol/L Tris 缓冲液的 20% 乙醇 (pH 7.4) 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行冲洗。然后使用色谱柱末端塞将其密封，并储存于 4–8 °C (39–46 °F) 下。

参考文献

1. Richman, D. D., Cleveland, P. H., Oxman, M. N., and Johnson, K. M. 1982. "The binding of 1. *Staphylococci* protein A by the sera of different animal species." *J. Immunol.* 128: 2300–2305
2. Frank, M. B. 1997. "Antibody Binding to Protein A and Protein G beads". 5. In: Frank, M. B., ed. *Molecular Biology Protocols*. Oklahoma City

订购信息

部件号	描述
5190-6903	Bio-Monolith 重组 Protein A, 4.95 × 5.2 mm
5069-3639	Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm
5190-6900	Bio-Monolith Protein G 亲和色谱柱, 4.95 × 5.2 mm

更快速、更一致的生物分子表征 — Agilent AdvanceBio 色谱柱

Agilent AdvanceBio 色谱柱能够提供始终如一、出色的多肽及蛋白质分离和表征性能。这些先进的色谱柱能够提高分析准确度和分析效率，并消除可能妨碍分析的干扰。它们经过严格测试，并享有安捷伦 60 天完全满意质量保证。

如需了解更多信息，请访问
www.agilent.com/chem/AdvanceBio

与您携手合作，共获理想结果

不断出现的挑战需要更优异的解决方案。我们的解决方案将帮助生物制药科学家在疾病研究领域实现开拓创新、加速药物发现，且在整个产品开发和生产阶段更具信心。

如需了解更多有关安捷伦生物制药解决方案的信息，请访问 agilent.com/en/solutions/biopharma-pharma

稳定可靠的重组 Protein A Monolith 色谱柱，用于抗体滴度测定

作者

Te-Wei Chu 和
Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

在生物治疗抗体的制造过程中，在最佳时间点进行收集的必要条件是能够快速分离细胞培养上清液原液。使用重组 Protein A 亲和配体制成的 Bio-Monolith 色谱柱有几大优势。首先，Bio-Monolith 色谱柱具有超大孔结构，能大大降低阻塞风险。其次，相对与天然 Protein A 结合的 IgG，重组 Protein A 不但具有选择性，而且配体纯度更高、结构更稳定。最后，Bio-Monolith 色谱柱也可用于小规模纯化，以配合其他分析技术的使用，尤其是在测定关键质量属性 (CQAs) 时。

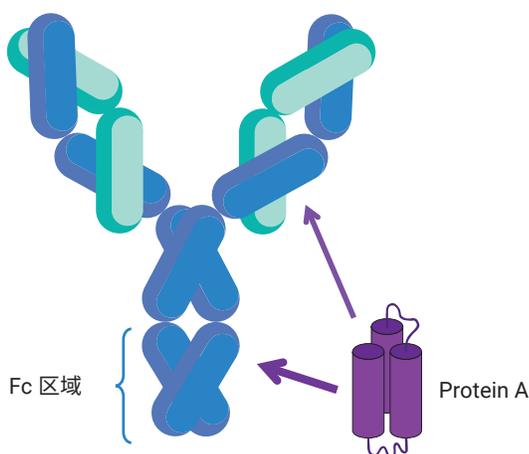


图 1. Protein A 与免疫球蛋白 G (IgG) 的相互作用

前言

天然 Protein A 是从金黄色葡萄球菌中分离出的表面蛋白，对不同物种的各种免疫球蛋白的 Fc 区域都具有强结合亲和性。天然 Protein A 亲和色谱已经成为从细胞培养上清液原液提取纯化单克隆抗体的一种选择方式。重组 Protein A 还可提供更多优势：重组 Protein A 自身的生产纯度更高；此外，还可经改造确保其固定在固定相上，为蛋白结合提供理想方向。

使用重组蛋白 A 还有助于延长色谱柱寿命。通常，色谱柱寿命会因细胞培养上清液天然特性而缩短。重组 Protein A 色谱柱寿命延长的原因在于其比天然 Protein A 色谱柱更能抵御色谱柱清洗所需的严苛条件。

本应用简报测试了一款全新的安捷伦重组 Protein A Bio-Monolith 色谱柱的寿命。

实验部分

试剂与化学品

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

样品

样品是从含有 1 mg/mL 重组 IgG 单克隆抗体的生物反应器中收集的粗制中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件 #019）
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

HPLC 条件

参数	值
色谱柱：	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (部件号 5190-6903)
结合缓冲液 洗脱液 A)	50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4
洗脱缓冲液 洗脱液 B)	100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.6
清洗缓冲液	1) 含 1 mol/L NaCl 的 100 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4 2) 含 20% 异丙醇的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.4
梯度：	时间 (min) %B
	0-0.5 0 (结合)
	0.6-1.8 100 (洗脱)
	1.9-4.0 0 (再平衡)
流速：	1 mL/min
进样量：	根据需要 (1-20 µL)
柱温：	24 °C
检测：	UV 280 nm

结果与讨论

使用与文献^[1]所述细胞培养上清液相比含有更高浓度宿主细胞蛋白质的细胞培养上清液原液，研究了 Bio-Monolith 重组 Protein A (rProtein A) 色谱柱的稳定性。

按照结合、洗脱和色谱柱再平衡的步骤顺序重复序列进行，每进样 250 次后的结果显示于图 2、图 3 和图 4。第 1500 次进样后，引入采用清洗缓冲液的色谱柱再生步骤（参见“方法条件”），此后每 500 次进样执行一次。正如预期，如此高挑战性的原液样品基体果然让色谱柱压力不断累积上升（图 5）。

而经过定期清洗，在 3000 次进样中，色谱柱持续提供了一致可靠的峰面积和滴度分析（图 6 和图 7）。

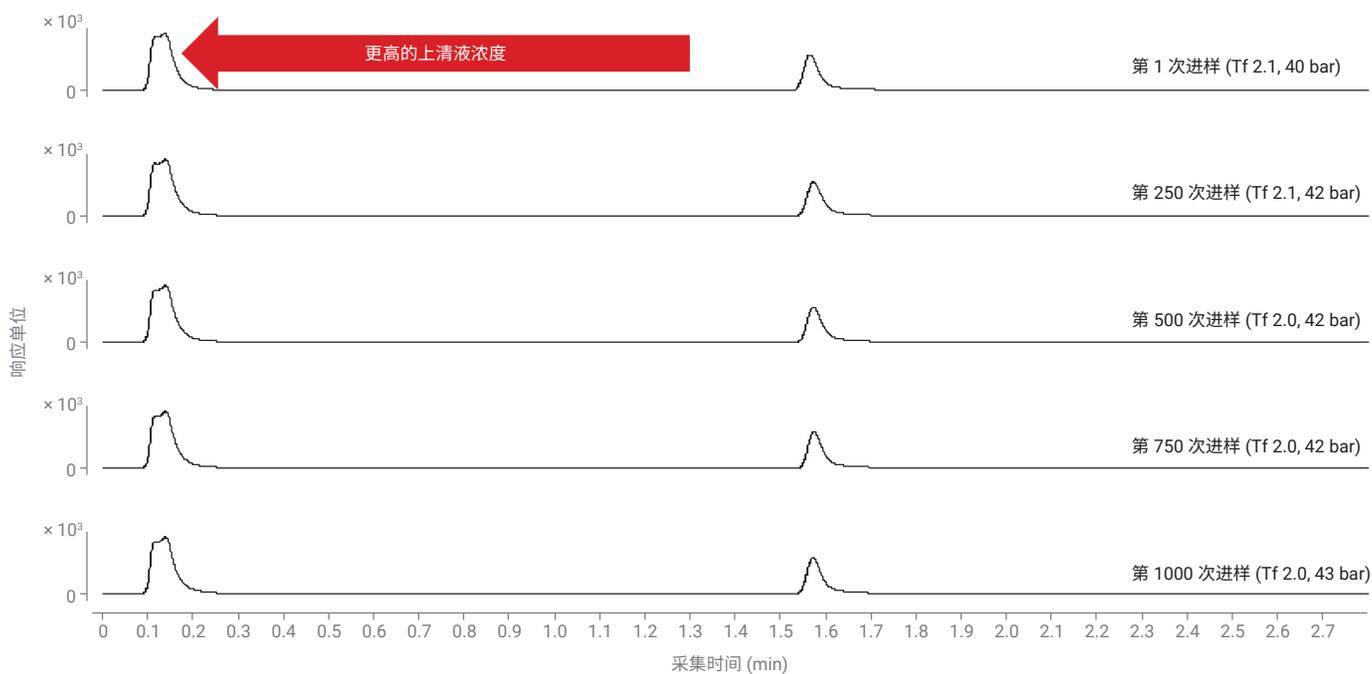


图 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 1 次进样至第 1000 次进样

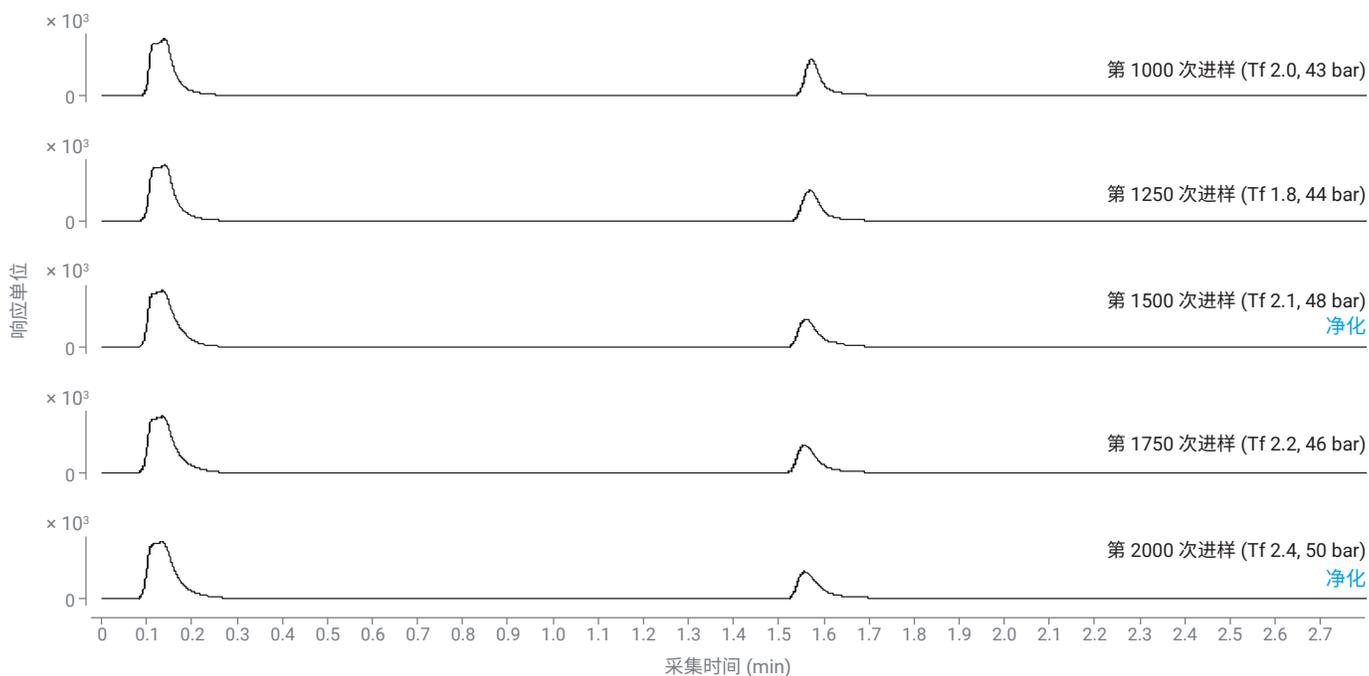


图 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 1000 次进样至第 2000 次进样

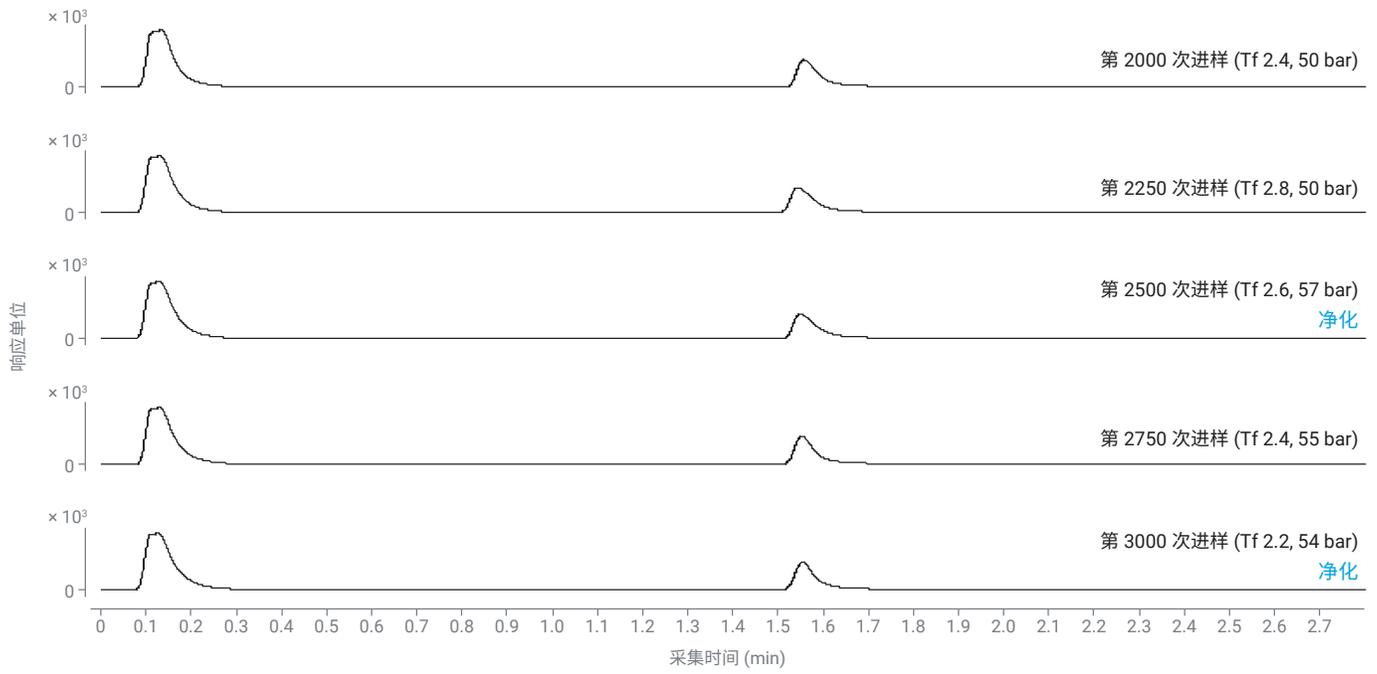


图 4. Agilent Bio-Monolith rProtein A 色谱柱寿命：第 2000 次进样至第 3000 次进样

表 1. 寿命范围内色谱柱压力与进样次数关系

N-糖	创新药物	生物仿制药
1	38.0	40.0
250	41.0	41.5
500	43.0	42.0
750	48.0	42.0
1000	-	43.0
1250	-	44.0
1500	-	48.0

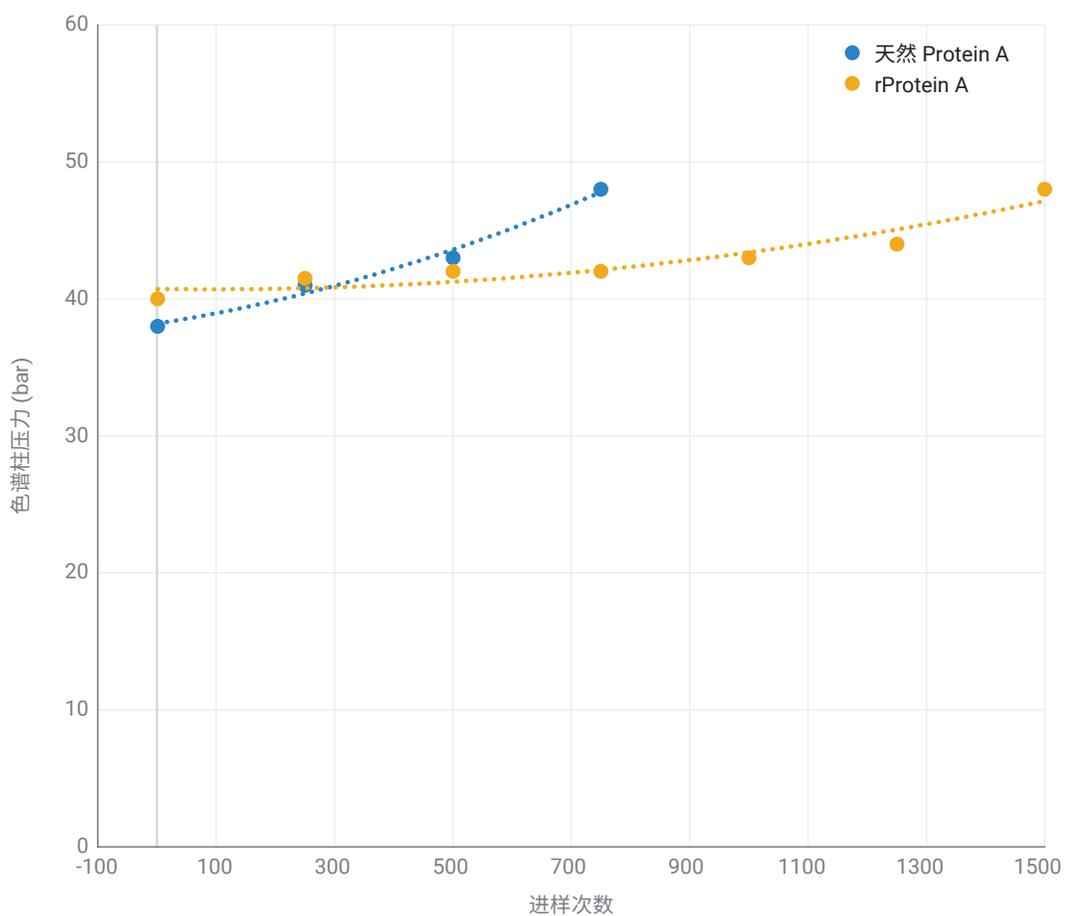


图 5. 寿命范围内色谱柱压力与进样次数关系

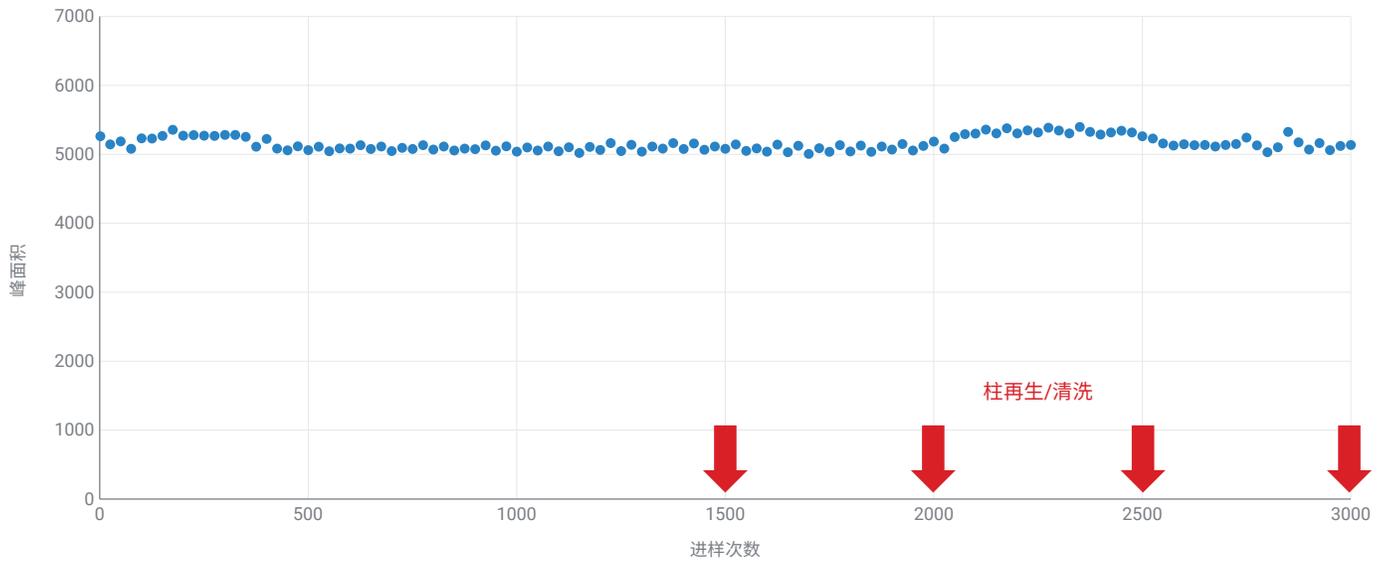


图 6. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样次数关系

表 2. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样量 (µg) 关系

数量 (µg)	初始	第 2000 次进样之后	第 3000 次进样之后
1	654	633	688
2	1363	1323	1308
5	2766	2984	2979
10	5526	5699	5666
15	7706	7653	7699
20	10541	10268	10347

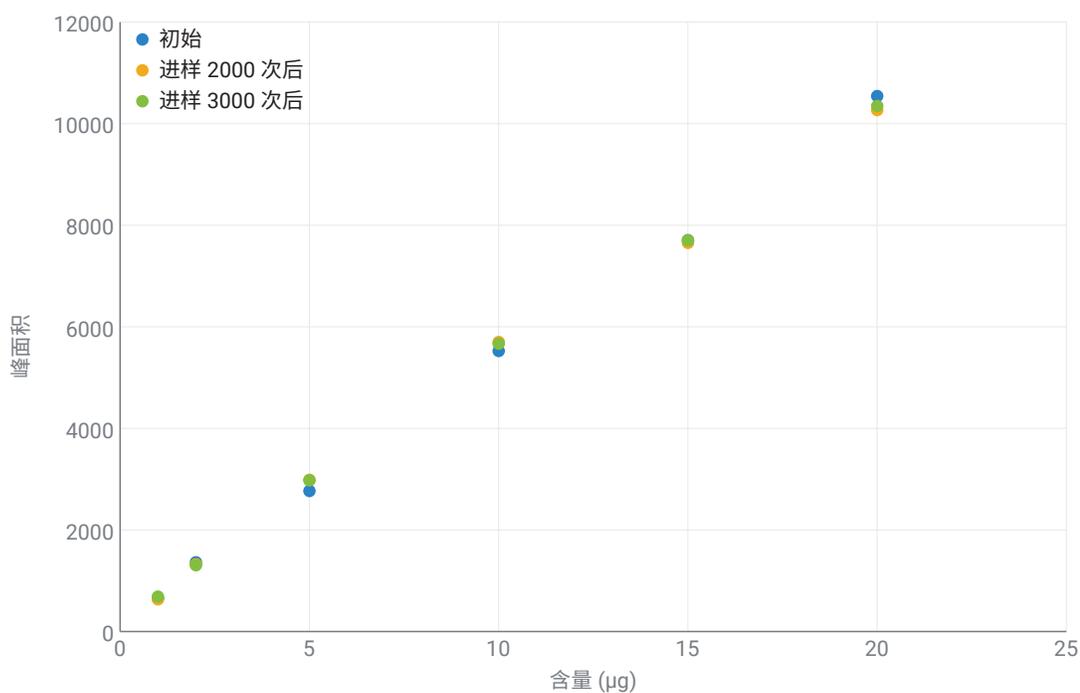


图 7. 色谱柱寿命范围内峰面积与进样次数关系

结论

本应用简报显示，Bio-Monolith rProtein A 色谱柱在滴度分析中的性能稳定可靠，超出了我们观察到的同等天然 Protein A 色谱柱的性能。

参考文献

1. Coffey, A.; Kondaveeti. 延长 Bio-Monolith Protein A 色谱柱在滴度测定中的使用寿命，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-2168ZHCN，2020

使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行细胞克隆选择

作者

Emmie Dumont,
Isabel Vandenheede,
Pat Sandra, Koen Sandra
色谱研究所 (RIC)

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

James Martosella,
Phu Duong, Maureen Joseph
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了如何使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱测定中国仓鼠卵巢细胞培养上清液中的重组单克隆抗体滴度，以及如何使用该色谱柱富集 μg 级抗体，以便通过质谱进一步进行结构表征。该工作流程可为生物药物和生物仿制药开发中的克隆选择过程提供指导。

前言

当前，单克隆抗体 (mAb) 广泛应用于治疗危及生命的疾病，包括癌症和自身免疫性疾病。已经上市单克隆抗体药物超过 30 种，其中 9 种成为了 2010 年的重磅炸弹级药物，2009 年的 10 种最畅销生物药物中有 5 种是单克隆抗体^[1]。目前，mAb 被认为是增长最快的一类治疗药物。由于未来几年这些畅销的 mAb 即将迎来市场开放（专利到期），导致相关生物仿制药的研发生产将呈现爆炸式增长。最早的 2013 年两种单克隆抗体生物仿制药首次获批，均含有相同的活性物质英夫利昔单抗^[2]。

无论是开发 mAb 创新药物还是生物仿制药，在开发过程的早期进行细致周密的克隆选择都至关重要。本应用简报介绍了 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱如何指导此过程。这种 HPLC 色谱柱由表面包覆金黄色葡萄球菌 Protein A 的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-共聚-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 高孔隙率整体载体组成。它结合了整体柱的优点（即快速高效的分离和极少的交叉污染）和 Protein A 受体对免疫球蛋白 G (IgG) Fc 区域的高选择性。因此，它是以高通量方式直接测定细胞培养上清液中 mAb 滴度和产量以及纯化足量 mAb 以供进一步分析测量（例如，通过质谱 (MS)、离子交换色谱 (IEX)、体积排阻色谱 (SEC) 或疏水相互作用色谱 (HIC) 进行测量）的理想工具。

我们展示了使用 Bio-Monolith Protein A 色谱柱基于滴度和结构特性选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞克隆的过程。曲妥珠单抗于 1998 年上市，商品名为赫赛汀，目前仍广泛应用于 HER2 阳性乳腺癌的治疗^[3]。这种主要的生物治疗药物分别于 2014 年和 2018 年在欧洲和美国对市场开放。为了基于生物仿制药 mAb 滴度对克隆进行选择，我们利用赫赛汀原研药生成的校准曲线测定了绝对浓度。为评估结构特性并与原研药分子进行比较，我们使用 Protein A 色谱柱富集了足够分析量的 mAb，然后进行质谱分析。

实验部分

材料

乙腈、水和异丙醇购自 Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)。柠檬酸、甲酸、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 和三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗（商品名为赫赛汀）购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗生物仿制药 CHO 细胞培养上清液来自当地一家生物技术公司。

样品前处理

用流动相 A 稀释 21 mg/mL 的赫赛汀储备液以建立校准曲线。在 50 mmol/L Na_2HPO_4 中按 1:1 的比例稀释细胞上清液。进样之前，在 5000 g 下将上清液离心 5 分钟。加入 10 mmol/L TCEP，将收集的馏分在室温下还原 1 小时。

仪器

在下列仪器系统上使用 Bio-Monolith Protein A 进行测量：

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315A)
- Agilent 1200 Infinity 系列分析型馏分收集器 (G1364C)

在下列仪器系统上进行 LC/MS 测量：

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，配备：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220B)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量 Q-TOF，配备安捷伦喷射流 LC/MS (G6540A)

软件

- 安捷伦科技公司 OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C01.05 (35)
- 安捷伦科技公司 MassHunter 仪器控制软件 (B05.01)
- 安捷伦科技公司 MassHunter 数据分析软件 (B06.00)
- 安捷伦科技公司用于 MassHunter 的 BioConfirm 软件 (B06.00)

Bio-Monolith 色谱柱条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith Protein A (部件号 5069-3639)								
流动相:	A) 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4 B) 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8								
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0-0.5</td><td>0 (结合)</td></tr><tr><td>0.6-1.7</td><td>100 (洗脱)</td></tr><tr><td>1.8-3.5</td><td>0 (再生)</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0-0.5	0 (结合)	0.6-1.7	100 (洗脱)	1.8-3.5	0 (再生)
时间 (min)	%B								
0-0.5	0 (结合)								
0.6-1.7	100 (洗脱)								
1.8-3.5	0 (再生)								
流速:	1 mL/min								
进样量:	50 μ L								
检测:	UV 280 nm								
馏分收集:	基于时间								

LC/MS 条件

参数	值														
小柱:	在线脱盐小柱, 2.1 \times 10 mm														
流动相:	A) 0.1% 甲酸水溶液 (v:v) B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (v:v)														
流速:	400 μ L/min														
进样量:	可变 (对应于 1 μ g 的蛋白质质量)														
针头清洗溶剂:	60% 乙腈, 35% 水, 5% 异丙醇														
自动进样器温度:	7 $^{\circ}$ C														
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>5</td></tr><tr><td>2</td><td>80.0</td></tr><tr><td>3</td><td>80.0</td></tr><tr><td>3.10</td><td>5</td></tr><tr><td>5</td><td>5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	5	0.5	5	2	80.0	3	80.0	3.10	5	5	5
时间 (min)	%B														
0	5														
0.5	5														
2	80.0														
3	80.0														
3.10	5														
5	5														
Q-TOF 离子源:	安捷伦喷射流离子源, 正离子模式														
干燥气温度:	300 $^{\circ}$ C														
干燥气流速:	8 L/min														
干燥气流速:	35 psig														
雾化器压力:	350 $^{\circ}$ C														
鞘气温度:	11 L/min														
喷嘴电压:	1000 V														
毛细管电压:	3500 V														
碎裂电压:	200 V														
Q-TOF 检测:	质量数范围 3200 amu														
数据采集范围:	500-3200 m/z														
高分辨率模式	(4 GHz)														
数据采集速率: 模式	每秒 1 幅谱图														
曲线采集:															
分流阀:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>流向</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>废液</td></tr><tr><td>1</td><td>MS</td></tr><tr><td>3.5</td><td>废液</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	流向	0	废液	1	MS	3.5	废液						
时间 (min)	流向														
0	废液														
1	MS														
3.5	废液														

结果与讨论

通过测定曲妥珠单抗滴度进行克隆选择

图 1 展示了特定的产生曲妥珠单抗的克隆的上清液与赫赛汀原研药的 Protein A 色谱图叠加。未结合的物质在流通中被洗脱，而 mAb 仅在降低 pH 后才释放出来。就原研药而言，未观察到任何物质的流穿峰，这一结果并不意外，因为它属于上市产品。就上清液而言，可以看到由未结合的物质产生的显著信号。

图 2 展示了在生物仿制药开发计划框架中得到的 12 种产生曲妥珠单抗的克隆的 Protein A 色谱图叠加。从这些色谱图中，已经能够区分低产量克隆和高产量克隆。可以通过峰面积和由稀释的赫赛汀原研药建立的外部校准曲线计算绝对 mAb 浓度。

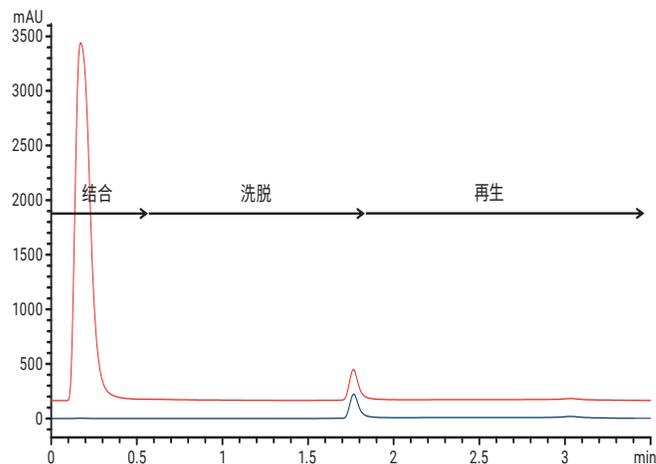


图 1. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆（克隆 9，红色）以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的赫赛汀原研药（蓝色）的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱图。请注意，用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释。

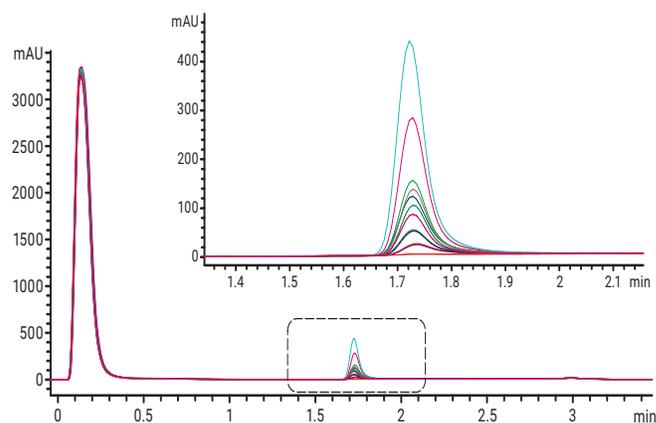


图 2. 12 种产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 叠加色谱图

赫赛汀的校准曲线及校准点对应的色谱图分别如图 3 和图 4 所示。在 0.02–2 mg/mL 范围内获得了良好的线性，该浓度范围是 CHO 细胞中的典型 mAb 滴度范围。获得的 mAb 滴度如表 1 所示并以图形方式展示于图 5 中。根据这些结果，可以为进一步的生物仿制药开发制定明确的决策，即，可轻松选择高产量克隆 9 和 10 并对其进行亚克隆。通过峰面积和由稀释的赫赛汀原研药建立的外部校准曲线，表 1 还展示了在两种不同的细胞培养基中培养 CHO 克隆时获得的滴度，并清晰展示出两种培养基相互之间的优劣。

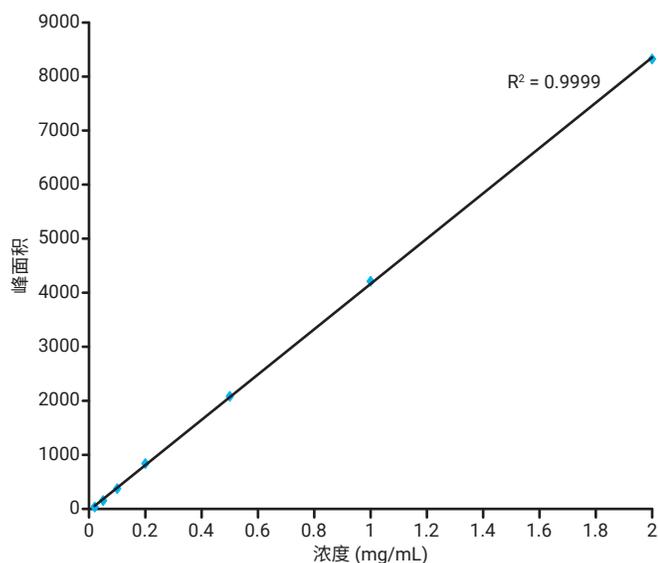


图 3. 赫赛汀 Agilent Bio-Monolith Protein A 校准曲线，校准浓度范围 0.02–2 mg/mL

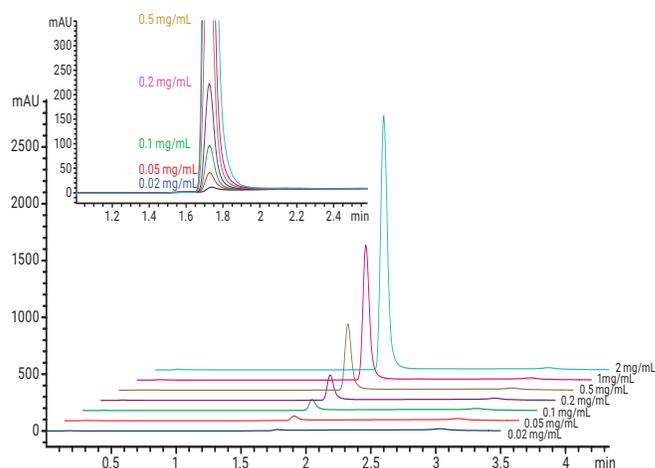


图 4. 赫赛汀校准点的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 叠加色谱图

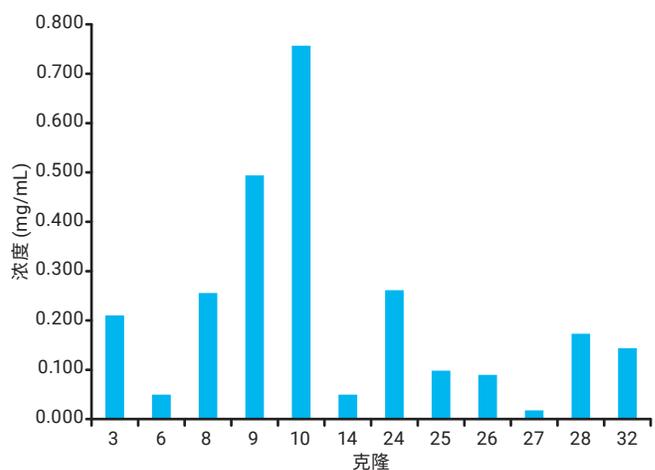


图 5. 以图形方式展示不同曲妥珠单抗 CHO 克隆中的生物仿制药 mAb 滴度，以 mg/mL 表示

表 1. 在两种不同培养基中培养的不同 CHO 克隆中测得的曲妥珠单抗生物仿制药绝对浓度

CHO 克隆 培养基 A	浓度 (mg/mL)	CHO 克隆 培养基 B	浓度 (mg/mL)
3	0.156	3	0.210
6	0.048	6	0.050
8	0.155	8	0.256
9	0.215	9	0.494
10	0.311	10	0.757
14	0.038	14	0.050
24	0.082	24	0.262
25	0.049	25	0.098
26	0.037	26	0.090
27	-	27	0.018
28	0.117	28	0.173
32	0.156	32	0.144

通过评估结构特性进行克隆选择

在 mAb 滴度评估之后，克隆选择的第二项重要标准基于结构方面。对于生物仿制药开发来说，仿制药的结构应当与原研药产品高度相似，并且保持在原研药批次间差异的范围内。因此，我们收集 Protein A 馏分后将二硫键还原得到轻链和重链，再通过高分辨率质谱进行分析。这一方法可用于验证氨基酸序列并揭示糖基化模式。

为了能够在包含酸性缓冲液的收集瓶中直接还原 mAb，选择 TCEP 替代更常用的还原剂二硫苏糖醇 (DTT)。前者能够在宽 pH 范围（包括低 pH 值）内进行还原，而后的还原能力仅限于高于 7 的 pH 值。在线脱盐后，将还原后的馏分输送至质谱系统。图 6 和图 7 展示了赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗生物仿制药的高产量克隆的解卷积轻链和重链质谱图。

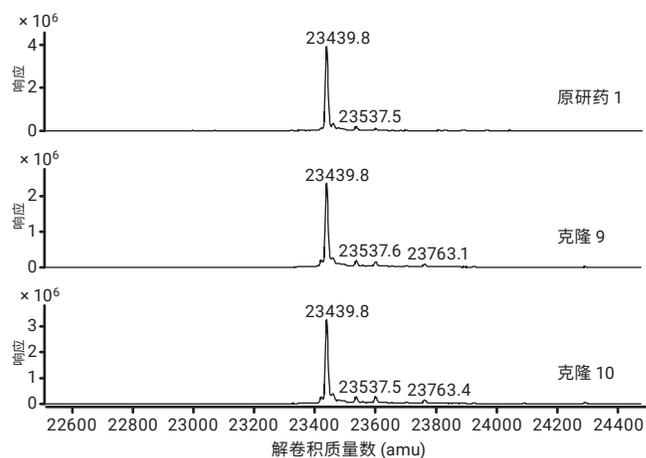


图 6. 赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗的克隆的解卷积轻链质谱图

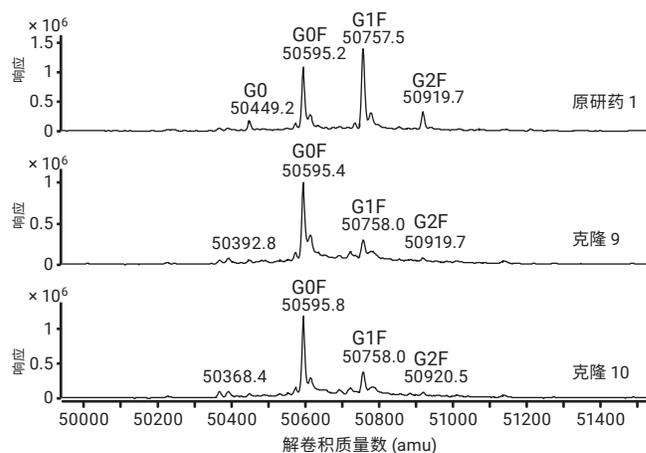


图 7. 赫赛汀原研药和两种产生曲妥珠单抗的克隆的解卷积重链质谱图。缩写 G0、G0F、G1 和 G2F 是指与 mAb 骨架连接的 N-糖

表 2 和表 3 展示了在四个原研药生产批次和 12 种曲妥珠单抗克隆中测得的 MW 值和主要糖型的相对强度。由此可以得出结论，赫赛汀原研药和克隆产生的曲妥珠单抗显示出相同的轻链和重链分子量。

此外，在原研药和克隆产生的 mAb 的重链上观察到相同的复合型 N-糖。

根据美国 and 欧洲监管机构的要求（一级结构应当相同，并且应保留糖基化），这些特点被视为生物相似性的最重要属性。虽然从定性角度来看，具有相似的糖基化，但从定量角度来看仍具有差异。一份单独的应用简报介绍了如何使用 Protein A Bio-Monolith 色谱柱分析通过调节生长培养基以使糖基化符合原研药指标要求^[4]。

表 2. 在原研药和曲妥珠单抗克隆中测得的轻链和重链 MW 值

MW (Da)	原研药 1	原研药 2	原研药 3	原研药 4	克隆 3	克隆 6
轻链	23439.8	23439.8	23439.8	23439.8	23439.8	23440.2
重链 *	49149.9	49150.2	49150.1	49150.1	49150.5	49151.0

MW (Da)	原研药 8	原研药 9	原研药 10	原研药 14	克隆 24	克隆 25
轻链	23439.8	23439.8	23439.8	23439.9	23439.8	23439.9
重链 *	49150.6	49150.1	49150.5	49150.2	49150.6	49151.1

MW (Da)	原研药 26	原研药 27	原研药 28	原研药 32
轻链	23440.0	23441.4	23439.8	23439.9
重链 *	49150.9	49151.9	49150.7	49150.9

* 去糖基化后的理论 MW 值

表 3. 四个原研药生产批次和曲妥珠单抗克隆中的主要糖型的相对强度

糖型	原研药 1	原研药 2	原研药 3	原研药 4	克隆 3	克隆 6
% Man 5	1.6	1.6	1.3	1.1	2.7	1.6
% G0F-GlcNAc	1.5	2.7	3.3	2.4	3.2	3.2
% G0	5.7	5.9	5.0	4.9	2.8	3.3
% G0F	35.2	44.8	50.5	48.2	66.1	56.2
% G1F	45.2	38.4	34.0	36.8	20.6	27.7
% G2F	10.7	6.6	5.9	6.7	4.7	8.1

糖型	克隆 8	克隆 9	克隆 10	克隆 14	克隆 24	克隆 25
% Man 5	2.6	3.3	5.0	1.2	1.9	5.1
% G0F-GlcNAc	3.8	4.8	4.6	2.1	3.6	4.2
% G0	1.7	2.9	2.9	3.9	2.2	2.3
% G0F	69.9	66.1	64.1	64.6	68.6	60.7
% G1F	18.4	18.5	19.5	22.9	19.4	20.9
% G2F	3.6	4.3	3.8	5.3	4.3	6.7

糖型	克隆 26	克隆 27	克隆 28	克隆 32
% Man 5	5.4	0.0	1.5	3.1
% G0F-GlcNAc	5.8	0.0	2.9	4.3
% G0	1.8	0.0	1.2	2.7
% G0F	61.6	67.2	61.6	64.3
% G1F	19.5	32.8	26.3	20.3
% G2F	5.8	0.0	6.5	5.3

结论

Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱成功应用于基于滴度以及与原研药的结构相似性来选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的克隆。在 mAb 创新药物与生物仿制药开发的早期，这一克隆选择过程至关重要。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra. *J. Chromatogr. A.*, **1335**, 81 (2014)
2. www.ema.europa.eu
3. www.gene.com
4. E. Dumont, et al., Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS (使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5124EN (2014)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱进行 mAb 滴度分析

作者

Emmie Dumont, Isabel Vandeneede, Pat Sandra 和 Koen Sandra

色谱研究所 (RIC)

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

James Martosella, Phu Duong 和 Maureen Joseph
安捷伦科技有限公司

摘要

单克隆抗体 (mAb) 在多种疾病的治疗中变得越来越重要。在重组 mAb 的开发过程中，必须对各种细胞培养上清液中的蛋白质滴度和产量进行监测。本应用简报介绍了如何成功应用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱来测定 mAb 浓度。

前言

来自金黄色葡萄球菌的 Protein A 对免疫球蛋白 (IgG) 的 Fc 结构域具有极强的亲和性，能够从复杂基质（例如细胞培养上清液）中对其进行捕获。使用 Protein A 的亲亲和色谱是治疗性单克隆抗体 (mAb) 纯化的金标准，通常代表下游处理中的第一个色谱步骤。Protein A 色谱在这一大规模纯化之外也可用于其他应用。在分析型应用中，它在 mAb 的开发早期用于以高通量方式直接测定细胞培养上清液中的 mAb 滴度和产量，以及纯化 μg 级材料以供进一步测量，例如，通过质谱 (MS)、离子交换色谱 (IEX)、体积排阻色谱 (SEC) 或疏水相互作用色谱 (HIC) 进行测量。

本应用简报介绍了 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱在 mAb 滴度分析中的应用。该 HPLC 色谱柱 (图 1) 的内径为 5.2 mm, 柱长为 4.95 mm, 由高度交联的聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-共聚-乙二醇二甲基丙烯酸酯) 一体式膜盘组成, 该多孔膜盘表面覆盖有来自金黄色葡萄球菌的天然 Protein A。其整体性特征表现在具有 1200–1500 nm 的均匀通道, 而不是孔和空洞, 从而可提供快速高效的分离, 基本不存在交叉污染并具有优异稳定性。这些功能使其非常适合用于 mAb 滴度分析, 能够成功指导克隆选择和细胞培养基优化。我们展示了使用该色谱柱测定中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞培养上清液中 mAb 绝对浓度的最佳实践。利用曲妥珠单抗生物仿制药项目的数据进行说明。曲妥珠单抗于 1998 年上市, 商品名为赫赛汀, 用于治疗 HER2 阳性乳腺癌, 其在欧洲的专利期于 2014 年到期, 在美国的专利期于 2018 年到期。

实验部分

材料

水来自 Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands)。柠檬酸、乙酸、 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗生物仿制药 CHO 细胞培养上清液来自当地一家生物技术公司。

样品前处理

进样之前, 用流动相 A 稀释 21 mg/mL 的赫赛汀储备液。在 50 mmol/L Na_2HPO_4 中按 1:1 的比例稀释细胞上清液。进样之前, 在 5000 g 下将上清液离心 5 分钟。

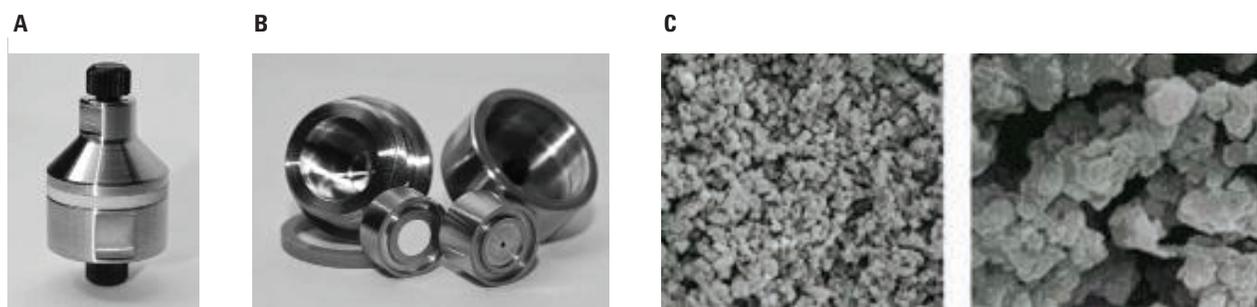


图 1. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆 (克隆 9, 红色) 以及用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.2 mg/mL 的赫赛汀原研药 (蓝色) 的 UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱图。请注意, 用磷酸盐缓冲液按 1:1 的比例对上清液进行稀释

仪器

在下列仪器系统上使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 进行测量:

- Agilent 1100 系列四元泵 (G1311A)
- Agilent 1100 系列自动进样器 (G1313A)
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器 (G1315A)

软件

- 安捷伦科技公司 OpenLAB CDS ChemStation 修订版 C01.05 (35)

Bio-Monolith 色谱柱条件

参数	值								
色谱柱:	Agilent Bio-Monolith Protein A (部件号 5069-3639)								
流动相:	A) 50 mmol/L 磷酸盐, pH 7.4 B) 100 mmol/L 柠檬酸, pH 2.8, 500 mmol/L 乙酸, pH 2.6								
梯度:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0–0.5</td> <td>0 (结合)</td> </tr> <tr> <td>0.6–1.7</td> <td>100 (洗脱)</td> </tr> <tr> <td>1.8–3.5</td> <td>0 (再生)</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0–0.5	0 (结合)	0.6–1.7	100 (洗脱)	1.8–3.5	0 (再生)
时间 (min)	%B								
0–0.5	0 (结合)								
0.6–1.7	100 (洗脱)								
1.8–3.5	0 (再生)								
流速:	1 mL/min								
进样量:	可变 (50 μL , 针对 CHO 细胞培养上清液进行优化)								
检测:	UV 280 nm								

结果与讨论

缓冲液选择

图 2 展示了由 Protein A 色谱柱得到的典型色谱图。示例色谱图由特定的产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的上清液进样一次得到。未结合的物质在流通中被洗脱，而 mAb 在中性 pH 条件下得到保留（结合），并且仅在应用阶梯梯度降低 pH 后才释放出来。在这种情况下，利用 pH 为 7.4 的 50 mmol/L 磷酸钠进行结合/上样，并利用 pH 为 2.8 的 100 mmol/L 柠檬酸进行洗脱。这是适合任何应用的良好起始条件。

在针对 Protein A 色谱柱开发新方法时，应对结合缓冲液和洗脱缓冲液进行优化。对于结合缓冲液，pH 为 7.4 的 50 mmol/L 磷酸钠是一个不错的选择，且 pH 可优化至介于 7 和 8 之间。对于洗脱缓冲液，此处所用的 100 mmol/L 柠檬酸是一个不错的选择。其他可能使用的洗脱缓冲液是 pH 为 2.6 的 500 mmol/L 乙酸、pH 为 2.8 的 100 mmol/L 甘氨酸盐酸盐和 pH 为 1.9 的 12 mmol/L HCl。

图 3 比较了乙酸和柠檬酸对赫赛汀原研药的洗脱效果。尽管使用柠檬酸获得了稍微更尖锐的峰，但是二者观察到的峰形和峰面积非常相似。就这种赫赛汀原研药而言，未观察到任何物质的流穿峰，这一结果并不意外，因为它属于上市产品，不含宿主细胞蛋白质。在所示的色谱图中，流速设置为 1 mL/min。整体性载体的特征在于依靠对流传质而非扩散传质，并且几乎不受流速影响，因而可实现高通量分离。这非常适用于 mAb 滴度测定，因为 mAb 滴度测定中通常需要处理大量样品。可应用于色谱柱的最大流速为 2 mL/min，这一流速可实现 2 分钟内的快速分离。

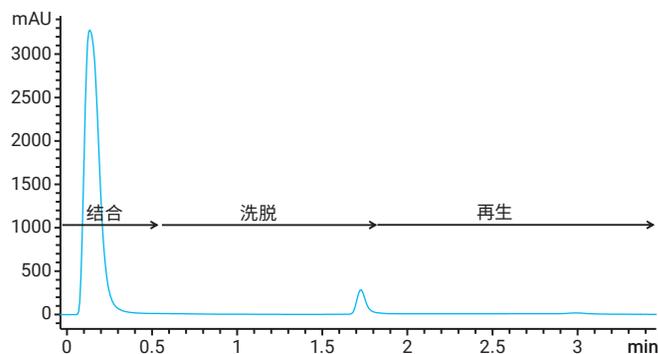


图 2. 产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的上清液的 UV 280 nm Protein A 色谱图。进样量为 50 μ L。未结合物质的半峰宽为 0.10 分钟，保留的 mAb 的半峰宽为 0.06 分钟

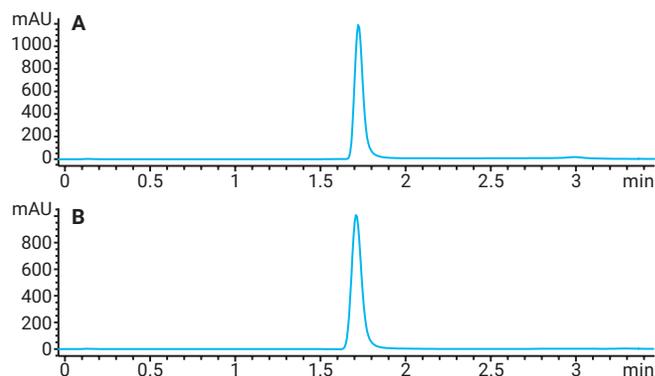


图 3. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的 UV 280 nm Protein A 色谱图 (进样量 50 μ L, 上样量 25 μ g)。使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 进行洗脱。采用柠檬酸和乙酸洗脱时，半峰宽分别为 0.057 分钟和 0.067 分钟

精密度、线性、残留和进样量

精密度对于 mAb 滴度测定至关重要。表 1 展示了赫赛汀原研药进样 10 次通常可得到的峰面积和保留时间重现性。色谱图如图 4 所示。采用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液时，均获得了优异的相对标准偏差 (RSD) 值。通过在 mAb 进样序列后进样缓冲液空白来同时评估残留 (图 5)。在 10 倍色谱柱上样量 (5 μg) 下，几乎观察不到残留，这可以再次归因于整体载体的使用。当色谱柱上的单次 mAb 载样量达到 500 μg 时，可明显观察到 1% 的残留。这代表色谱柱的最大上样量，在实际实验中通常不会遇到。值得注意的是，在第二次进样缓冲液空白后该残留得到消除。

表 1. 对浓度为 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药重复分析 10 次 (进样量 5 μL)，获得的保留时间和峰面积 RSD 值

	乙酸		柠檬酸	
	峰面积	RT (min)	峰面积	RT (min)
1	361	1.669	383	1.666
2	362	1.668	372	1.666
3	373	1.668	365	1.665
4	365	1.669	389	1.667
5	370	1.669	383	1.666
6	373	1.669	378	1.666
7	367	1.671	379	1.678
8	365	1.668	377	1.666
9	366	1.670	376	1.667
10	360	1.670	377	1.667
平均值	366	1.669	378	1.667
S	4.64	0.001	6.52	0.001
% RSD	1.27	0.06	1.73	0.06

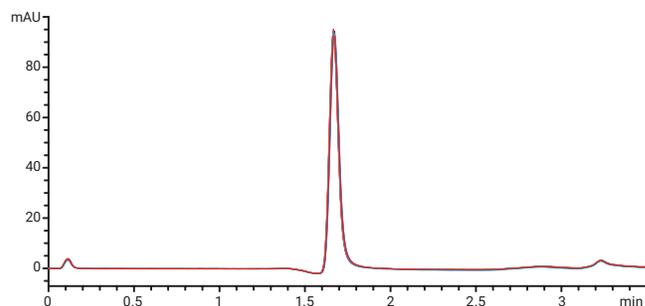


图 4. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的重复测定 (n = 10) UV 280 nm Protein A 色谱图 (进样量 5 μL)。使用乙酸实现洗脱

检测限 (LOD) 接近色谱柱上样量 0.5 μg 。这对进样量提出了一些要求。如果样品具有较低的 mAb 浓度，则需要采用较高的进样量。图 6 展示了将 1 mg/mL 赫赛汀原研药的进样量从 5 μL 提高至 50 μL 所获得的线性。可以看出 50 μL 的进样量完全可行并且可检出的最低柱上量为 0.5 μg ，mAb 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品即可满足该要求。

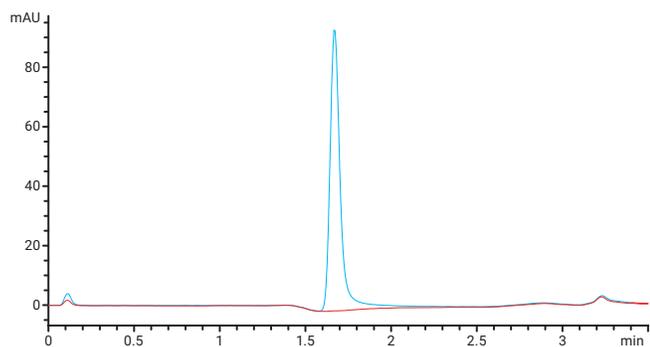


图 5. 用 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4) 稀释至 0.5 mg/mL 的赫赛汀原研药的 UV 280 nm Protein A 色谱图，以及在赫赛汀进样 10 次后分析的空白缓冲液。使用乙酸实现洗脱，且进样量为 5 μL

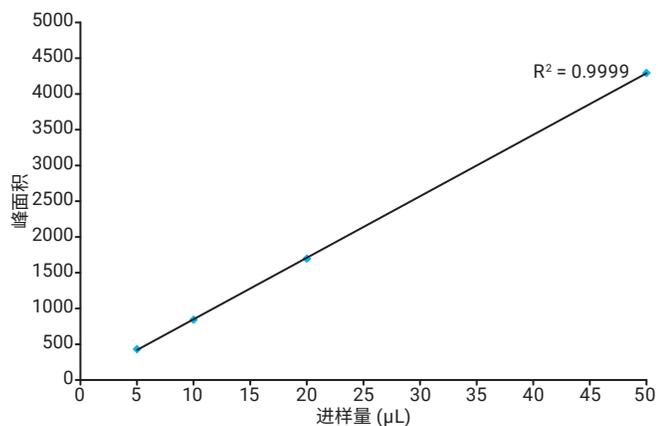


图 6. 将赫赛汀原研药 (0.5 mg/mL) 的进样量从 5 μL 提高至 50 μL 所获得的线性

在 mAb 滴度测定中，评估 mAb 绝对浓度至关重要。可通过细胞培养上清液中测得的峰面积和利用稀释的 mAb 标准品建立的外部校准曲线来计算 mAb 绝对浓度。对于赫赛汀生物仿制药项目来说，原研药产品中已采用了这一标准，原研药产品准确配制成 21 mg/mL。使用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液时，赫赛汀原研药一系列稀释溶液的校准曲线如图 7 所示。对应的色谱图如图 8 所示。在两种情况下，在 0.02 mg/mL 至 2 mg/mL 范围内均获得了优异的线性，该浓度范围为 CHO 细胞中常见的 mAb 滴度范围。

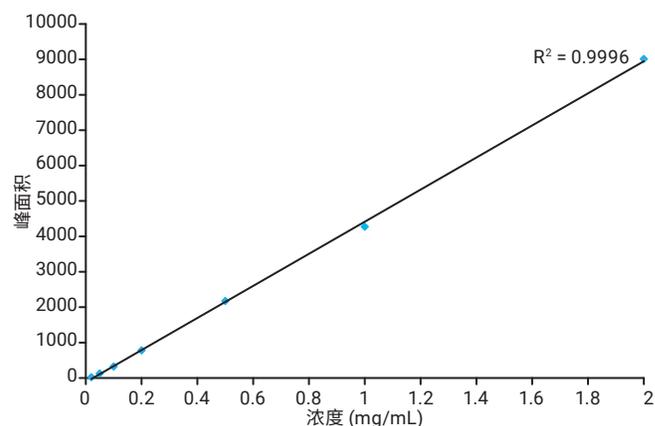
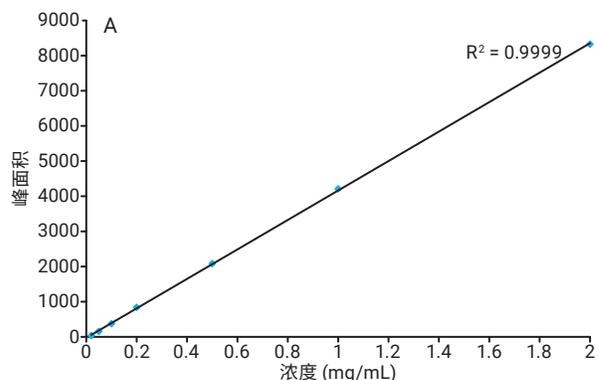


图 7. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的赫赛汀 Protein A 校准曲线 (0.02–2 mg/mL)

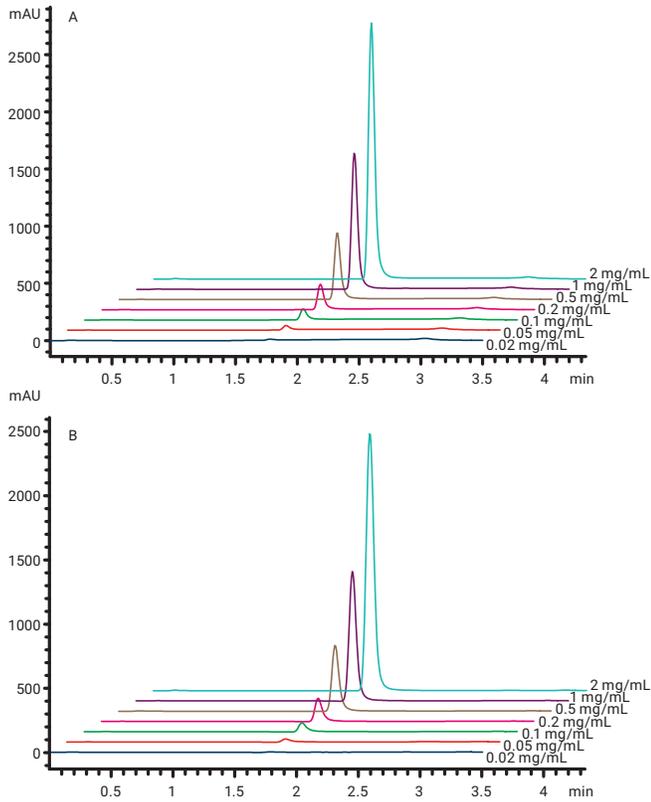


图 8. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的赫赛汀校准点的 UV 280 nm Protein A 叠加色谱图

在 mAb 滴度测定中的应用

该方法具有测定细胞培养上清液中 mAb 滴度所需的所有特性。它在预期的 mAb 浓度范围内可实现快速测定，结果准确且线性好，并且不受残留的影响。为说明这一点，使用 Bio-Monolith Protein A 色谱柱分析赫赛汀生物仿制药开发计划框架中所获得的 9 种产生曲妥珠单抗的克隆，以测定 mAb 绝对浓度。色谱图如图 9 所示，并且表 2 列出了使用柠檬酸和乙酸作为洗脱缓冲液所获得的 mAb 滴度。使用两种洗脱缓冲液获得了非常一致的数据。这些结果支持在 mAb 的开发过程中及早制定明确的决策。可轻松选择出高产量克隆并进行进一步开发。

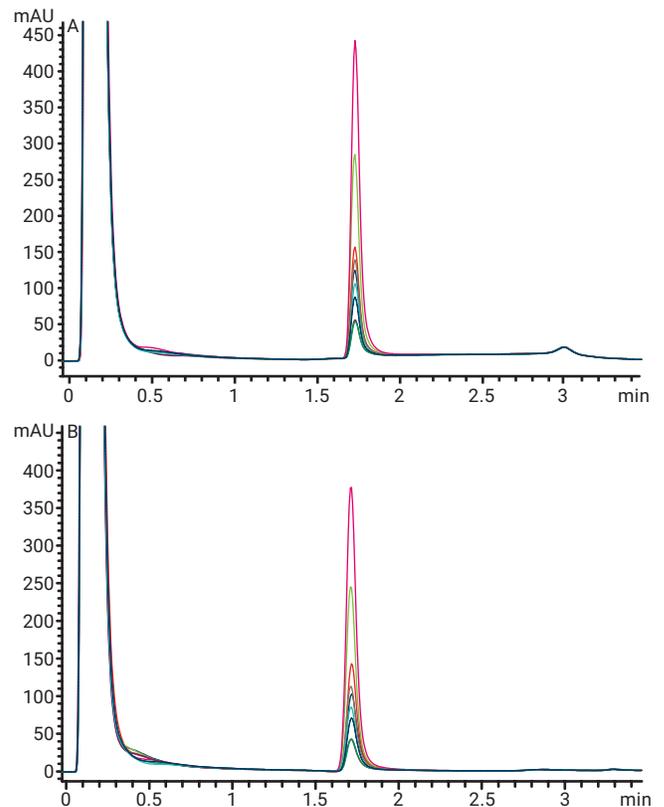


图 9. 使用柠檬酸 (A) 和乙酸 (B) 作为洗脱缓冲液得到的九种产生曲妥珠单抗的 CHO 克隆的 UV 280 nm Protein A 叠加色谱图

大幅延长色谱柱寿命

色谱柱再生

使用一体式膜盘的主要优点在于，其具有的通道而非孔可以降低细胞培养样品进样时色谱柱堵塞的可能性。这样提高了稳定性并减少了清洗工作。通过在每 30–50 个样品后运行空白梯度进样，可减小色谱柱污染。如果观察到色谱柱劣化（拖尾峰或宽峰），建议采用以下清洗程序。第一步是色谱柱再生。如果性能仍然无法达到理想状态，可使用原位清洗程序，这样将减少可用的 Protein A 的量。

色谱柱再生

1. 用 2 mL（色谱柱体积 (CV) 的 20 倍）的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 1 mol/L NaCl (pH 7–8) 在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
2. 用 2 mL（20 倍 CV）的低 pH 溶液（例如洗脱缓冲液）进行清洗
3. 用结合缓冲液重新平衡色谱柱

原位清洗

1. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的 0.1 mol/L NaOH 在 0.2–0.5 mL/min 的流速下进行清洗（反向冲洗）
2. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）的去离子水在 0.5–1.0 mL/min 的流速下进行清洗
3. 用 1–2 mL（10–20 倍 CV）浓缩缓冲液 (0.1–0.5 mol/L) 清洗以恢复正常 pH (7.0–7.4)
4. 用 5 mL (50 CV) 结合缓冲液重新平衡色谱柱

结论

Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱成功应用于基于滴度以及与原研药的结构相似性来选择产生曲妥珠单抗生物仿制药的克隆。在 mAb 创新药物与生物仿制药开发的早期，这一克隆选择过程至关重要

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

更多应用简报

出版号	标题
5991-2990CHCN	采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱监测细胞培养液中的单克隆抗体滴度
5991-4723EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 色谱柱缩短定量分析人 IgG 的分析周期
5991-5125EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化
5991-6094ZHCN	Bio-Monolith Protein G 色谱柱 — 更多 mAb 滴度测定选择

其他信息

Agilent Bio-Monolith 色谱柱还提供离子交换形式。

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE44468.5563194444

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021年9月30日，中国出版
5994-0038ZHCN

