

使用 TSKgel® Protein A-5PW 色谱柱快速检测单克隆抗体滴度

引言

近年来抗体类治疗药市场正持续快速增长，其主要的应用领域是在与癌症、免疫（炎症）相关疾病的治疗领域。目前全球销售前 10 的药品中就有 6 种是单克隆抗体药物。预计该市场今后几年仍将继续增长，将有更多单克隆抗体（mAb）开发成新药用于治疗各种疾病。

在单抗药物的初期研发阶段，产生许多含有细胞培养物所分泌 mAb 的细胞上清液样品。这些样品需要筛选以测定 mAb 的滴度，这通常需要使用亲和 Protein A 色谱柱来完成。Protein A 色谱柱还被用来测定从细胞培养物上清液中收集 mAb 的最佳时间以及筛选表达最大数量 mAb 的最佳细胞克隆物。此外，还可以先使用亲和 Protein A 色谱柱部分纯化 mAb，以确定正确细胞系和部分表征新生成的 mAb。由于要将许多样品筛选用于各种用途，所以需要一种可靠的、高通量的色谱柱。

在本文实验中，采用了 TSKgel Protein A-5PW、20 μ m 分析色谱柱用于快速捕获各种浓度的 mAb 并准确检测其滴度。这款规格为 4.6mm I.D. \times 3.5 cm 的 PEEK 色谱柱填充有键合重组 Protein A 配基（C 区域的编码修饰六聚体）的聚甲基丙烯酸聚合物填料，可以在高流速下实现高通量分析，同时可保持色谱柱柱效、峰宽和分辨率。另外，TSKgel Protein A-5PW 色谱柱可在进样 2000 多次后仍不会出现性能下降的情况。

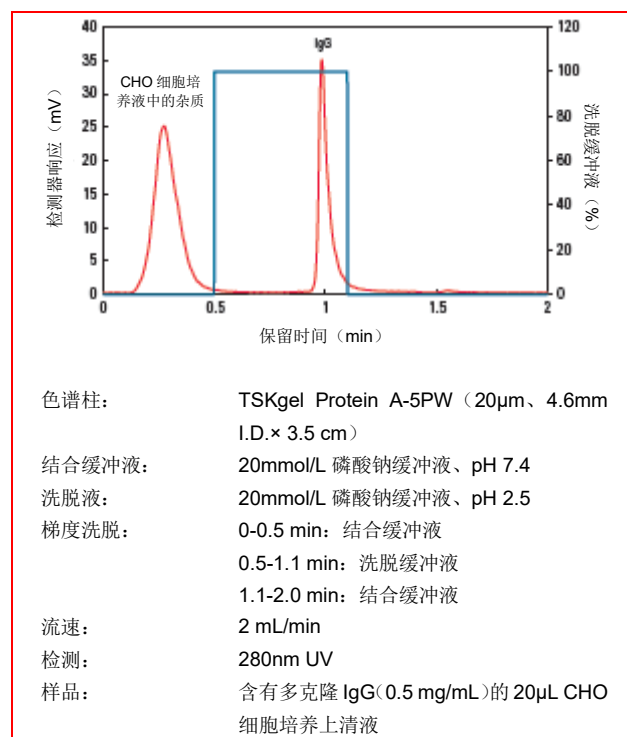
1. 实验条件

色谱柱:	TSKgel Protein A-5PW (20 μ m、4.6 mm I.D. \times 3.5 cm (PEEK)) 其他品牌的 Protein A 色谱柱 (20 μ m、4.6 mm I.D. \times 3.5 cm (PEEK))
结合缓冲液:	20mmol/L 磷酸钠缓冲液、pH 7.4
洗脱液:	20mmol/L 磷酸钠缓冲液、pH 2.5 (备注: 还可以使用 12 mmol/L 的 HCl、20-100mmol/L 的柠檬酸、pH 2.5-3.5 的 20-100mmol/L 甘氨酸、pH 2.5-3.5 的 5-10% 醋酸洗脱 IgG)
梯度洗脱:	0-0.5 min: 结合缓冲液 0.5-1.1 min: 洗脱缓冲液 1.1-2.0 min: 结合缓冲液
流速:	2 mL/min
检测:	280nm UV
样品:	如色谱图所示的 CHO 上清液和 IgG

2. 结果与讨论

收集 CHO 细胞培养上清液后，将其短暂旋转去除细胞碎片并浓缩样品。然后使用 Protein A 色谱柱进行滴度分析。图 1 为 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱快速捕获 mAb (人 IgG) 的色谱图。在 2 分钟内完成分析，包括结合、洗涤、洗脱和再平衡步骤。色谱柱不吸附上清液中的宿主细胞蛋白，因此被洗脱为流穿峰。仅 IgG 被捕获，然后以约 1 分钟的洗脱时间从色谱柱中洗脱出。之后，使用 TSKgel UP-SW3000 尺寸排阻法色谱柱对 IgG 峰组分进行处理，对多聚体和单体进行分析。分析结果表明：收集的 IgG 中 98% 以上都为单体（数据未显示）。

图 1. 使用 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱快速捕获 CHO 细胞培养上清液中的 IgG



测定所收集细胞培养上清液中的 mAb 浓度需要色谱柱在较宽的动态范围内都具有良好线性，从而准确检测 mAb 浓度。图 2 为具有良好线性 ($R^2 > 0.999$) 的校准曲线，表明 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱对多克隆 IgG (0.1-10 g/L) 具有较宽的动态范围。该色谱柱检测 2~200 μ g 不同浓度样品获得的色谱图相似，其峰型和保留时间都无任何变化（见图 3）。

图 2 和 3 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱在宽范围载量下与峰面积呈良好线性关系

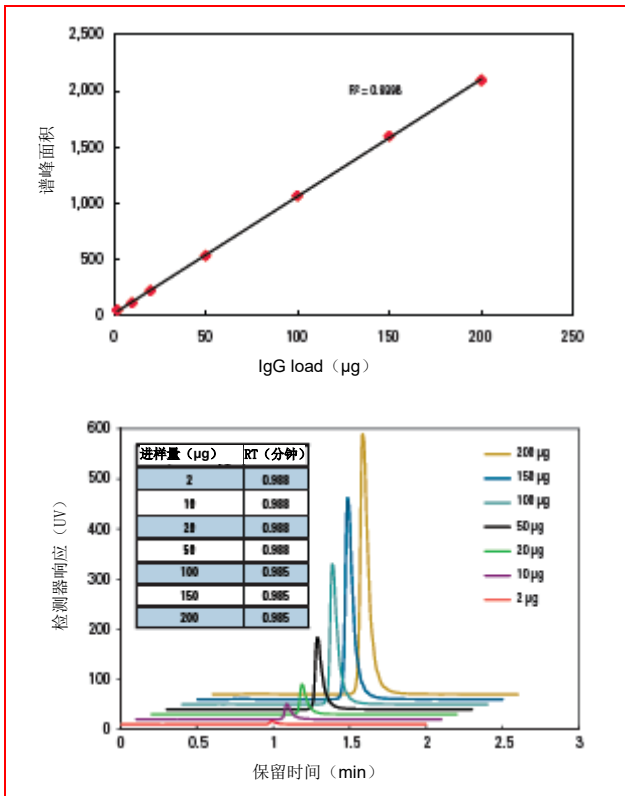
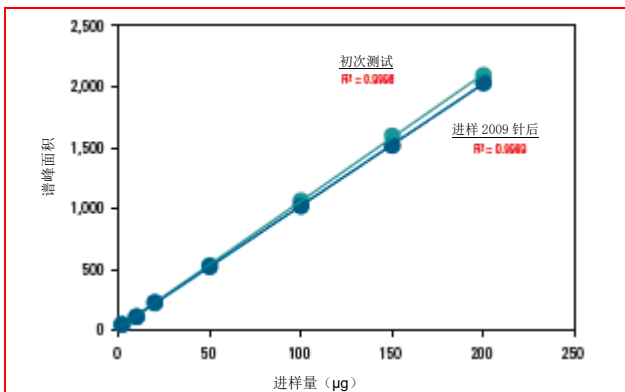


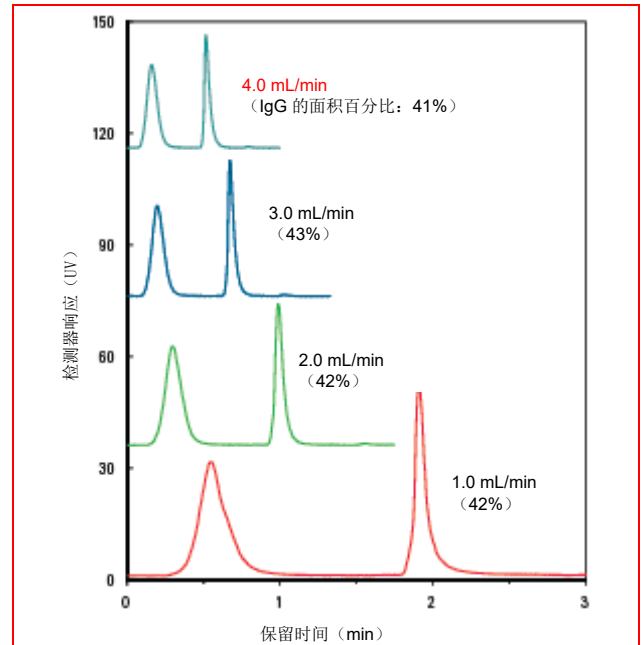
图 4 中对 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱进行了线性分析测试, 表明了该色谱柱的耐用性和其较宽的动态载量范围。取用含 IgG 单克隆抗体的 CHO 细胞培养上清液作为样品, 连续 2009 次进样而不清洗色谱柱。最后, 采用市售 IgG 单克隆抗体制作校准曲线时, 测试前后 IgG 校准曲线未发现有明显变化。色谱柱仍然保持其高载能力及优异的线性关系 ($R^2=0.9999$)。

图 4. TSKgel Protein A-5PW 色谱柱的耐用性和动态范围



通过四种不同流速 (1、2、3 和 4 mL/min) 证明 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱对分离效果的影响。图 5 表明: 流速对色谱柱结合与吸收 IgG 的影响极小。不同流速时的未结合 (流穿) 蛋白峰与结合 IgG 的相对峰面积百分比保持不变。

图 5. 不同流速下 TSKgel Protein A-5PW 色谱柱分离 IgG 的色谱图



梯度条件

流速 (mL/min)	结合缓冲液 (min)	洗脱缓冲液 (min)	结合缓冲液 (min)
4.0	0-0.25	0.25-0.55	0.55-1.00
3.0	0-0.33	0.33-0.73	0.73-1.33
2.0	0-0.50	0.50-1.10	1.10-2.00
1.0	0-1.00	1.00-2.20	2.20-4.00

含有多克隆抗体 (0.5 mg/mL) 的 20 µL CHO 细胞培养上清液

3. 结论

TSKgel Protein A-5PW 亲和色谱柱可在 2 分钟内捕获和准确定量所收集细胞培养基中的单克隆抗体。此款色谱柱因其耐受高流速和耐用性的特点, 可以实现高通量分析。并且具有较宽的动态范围, 适用于检测不同工艺阶段的 mAb 滴度。