

使用生产级的蛋白A亲和色谱树脂进行自动化高通量分析级单克隆抗体纯化

Stephan M. Koza, Caitlin M. Hanna, Albert H. W. Jiang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本文介绍了一种基于自动化分析级蛋白A亲和技术从中国仓鼠卵巢(CHO)细胞条件培养基中纯化单克隆抗体(mAb)的方法。使用分析人员选择的工艺级蛋白A树脂、96孔0.2 μm过滤板和轨道板振荡器，实验证明这种经济有效的方法可纯化120 μg~240 μg的mAb。此纯化方法的多个移液步骤（每个样品12步）虽然可以手动执行，但采用Andrew+机器人平台可以大幅减少分析人员的时间，简化繁琐的纯化操作并降低出错可能性，大约1个小时即可完成48个样品的纯化。Andrew+机器人配有直观的OneLab可视化程序界面，可部署经过开发和审查的纯化方案，并促进本方案和类似样品板型纯化方案的优化和评估。

最终的方案可获得经纯化和中和的mAb样品，上样量为120 μg时，mAb样品的浓度为1.02 μg/μL或更高（100 μL的回收率≥85%），上样量为240 μg时，此浓度为2.27 μg/μL（100 μL的回收率≥94%）。本文还介绍了将该方案用作大小异构体分析（体积排阻色谱，SEC）样品预处理和使用LC-MS进行游离N-糖分析的评估信息。

优势

- 可从细胞培养物中以高通量自动化分析级(120 μg~240 μg)蛋白A亲和技术批次纯化mAb，样品回收率高(≥85%)
- 使用分析人员选择的工艺级蛋白A树脂或其他亲和色谱树脂（蛋白L或G）

- 48个样品的制备用时约1小时
- 可在SEC和游离N-糖分析中有效去除宿主细胞蛋白及其他干扰物

简介

从细胞培养物样品中以高通量分析级技术纯化治疗性重组单克隆抗体(mAb)对于支持细胞培养工艺的开发至关重要¹。可靠且可重现的纯化有助于分析方法的顺利实施，例如体积排阻色谱(SEC)、游离N-糖分析、肽图分析以及其他样品前处理或分析可能会受条件培养基组分、宿主细胞蛋白和核酸干扰的分析方法。

在过去的几十年中，研究人员使用蛋白A亲和捕获技术开发了许多可用于分析级纯化mAb的方法和设计。本蛋白A纯化研究的主要目标是开发一种自动化方法，尽可能降低mAb质量数要求，同时提高回收率和最终mAb浓度，分析过程中采用分析人员选择的工艺级蛋白A树脂。

实验

从各种来源制备mAb（曲妥珠单抗）后，使用磷酸盐缓冲液(PBS)或未转染的条件（14天）CHO细胞培养基(NTM)稀释至指定浓度。NTM的制备由Syd Labs, Inc.协助，使用未转染的CHO-K1细胞于转瓶中制备而得。在第2-15天收集转瓶中的消耗培养基（平均细胞活力约为90%），混合后进行0.2 μm过滤。

蛋白A

机器人系统：	配备Extraction+模块的Andrew+移液机器人
过滤板：	Pall™ AcroPrep™ Advance 96孔过滤器 样品板 - 350 μL，0.2 μm Supor™膜（产品ID：8019）
收集板：	Waters QuanRecovery™ 700 μL 96孔板

(部件号: 186009184)

蛋白A树脂:	Cytiva MabSelect™ (部件号: 17519901) , 浆液含量约为25% (1:1, PBS:50%) 。针对 50% 树脂, 1000 g离心 3 min, 并用体积等于树脂体积的400 mM NaCl、20%乙醇替换上清液。
PBS:	磷酸盐缓冲液: 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na ₂ HPO ₄ 和2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
NB:	中和缓冲液: 1 M Tris, pH 7.5
EB:	洗脱缓冲液: 100 mM甘氨酸, pH 3.0
轨道振荡器:	Eppendorf ThermoMixer® C (8 °C)
软件:	OneLab (Andew Alliance/Waters)

SEC

液相色谱系统:	ACQUITY Premier UPLC, 配备二元管理器 (BSM或QSM) 、CH-A柱温箱或 BioAccord™ LC-MS (ESI-ToF)系统
检测:	ACQUITY UPLC TUV检测器, 配备5 mm钛合金流通池, 波长: 280 nm
样品瓶:	聚丙烯12 × 32 mm螺口瓶, 带瓶盖和预切割 PTFE/硅胶隔垫, 容积300 µL, 100个/包(P/N: 186002639)

色谱柱:	ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 4.6 x 150 mm, 配有mAb大小异构体标准品(P/N: 176004783)
柱温:	25 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.5 mL/min
流动相:	乙酸铵, LC-MS级 (Supelco LiChropur™, LC-MS的洗脱液添加剂, 73594), 0.1 μm无菌过滤, 200 mM, 或按规定
色谱软件:	Empower™ 3 (FR 4)

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
样品收集:	Waters QuanRecovery™ 700 μL 96孔板, P/N: 186009184
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH™ Amide游离寡糖分析专用柱, 部件号186004742, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm, 130 Å
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C

进样体积： 15 μ L

流动相A： 50 mM甲酸铵，pH 4.4（LC-MS级，部件号：186007081）

流动相B： 乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	1.0	25	75	初始
3.50	1.0	42	58	6
3.55	1.0	60	40	6
3.75	1.0	60	40	6
3.80	1.0	25	75	6
5.00	1.0	25	75	6

ACQUITY RDa检测器设置

质量范围： 400-7000 m/z

模式： ESI+

采样速率： 10 Hz

锥孔电压： 45

脱溶剂气温度： 300

毛细管电压： 1.50 kV

信息学软件：

使用糖基数据库进行精确质量筛查

数据管理

色谱软件：

waters_connect

结果与讨论

方法开发

我们根据之前描述的蛋白A亲和过滤板式和其他色谱仪式方法，成功调整开发出一种自动化mAb纯化方法¹⁻³。实验所用的基础方案纲要见图1，根据图中所示相对简单的程序，每个样品需要12个移液步骤和4个培养步骤。简而言之，除洗脱缓冲液pH外，本文介绍的自动化mAb蛋白A纯化的优化还包括结合和洗脱机制、体积和时间的评估。

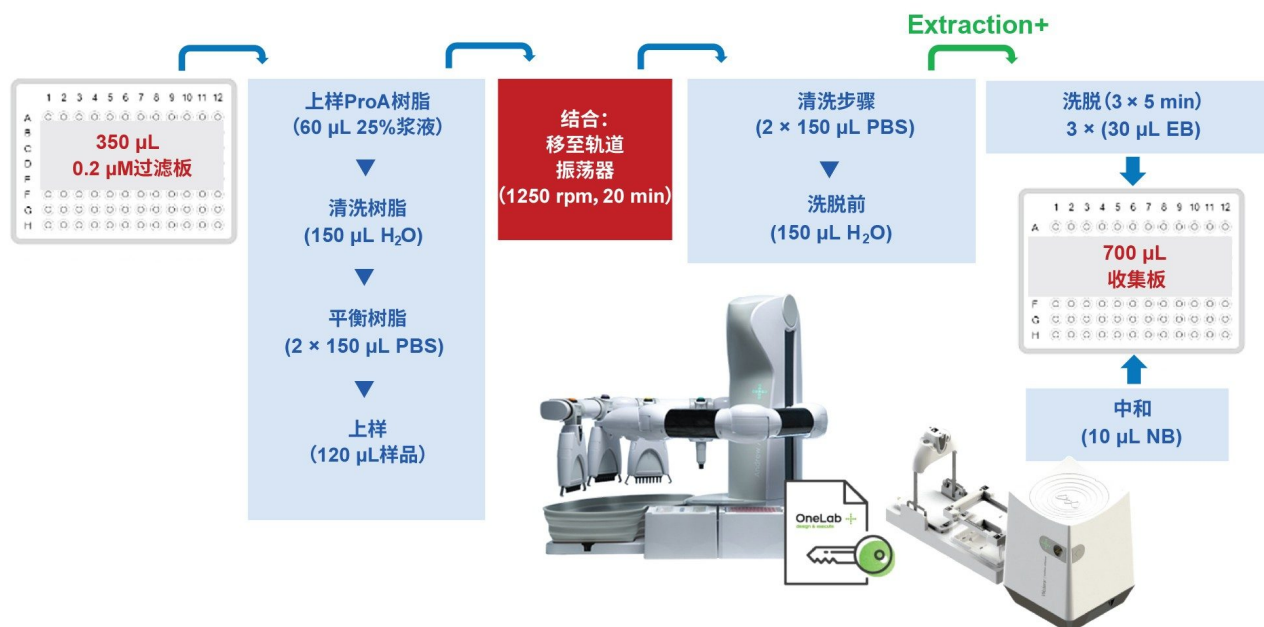


图1.使用Andrew+机器人平台、Extraction+设备和OneLab可视化程序界面，从CHO细胞条件培养基完成单克隆抗体的自动化分析级蛋白A亲和纯化示意图。洗脱缓冲液(EB)和中和缓冲液(NB)的定义见实验部分。

在上样步骤中，使蛋白A树脂保持悬浮状态对于有效结合至关重要。为此，使用轨道板混合器（8 °C下以1250 RPM混合20 min）获得的mAb回收率高于使用移液管进行重复抽吸和分配（每个上样步骤耗时最长2 min）。改用新型Andrew+机器人平台后，分析人员只需在20分钟的结合步骤中从轨道振荡器中取放过滤板。

洗脱缓冲液（甘氨酸）的pH值也是影响从蛋白A树脂中回收mAb的关键因素。本研究观察到，虽然pH值低于3.0时，mAb的回收率增加，但人为多聚体（高分子物质，HMWS）也随之增多。因此，在最终方法中，以1:9的比例加入洗脱样品中的1.0 M TRIS (pH 7.5) 可以有效中和用于洗脱步骤的100 mM甘氨酸(pH 3.0)。平衡、清洗和洗脱步骤的缓冲液体积也经过了优化。用户可以在OneLab图形化界面中为移液步骤轻松设置多个体积，很大程度上改进了这一流程的操作。

方法评估

在目标样品滴度为1.0 µg/µL且上样体积为120 µL的条件下，实现了此纯化程序的目标，即日间重复分析得到100 µL浓度为1.0 µg/µL或更高的纯化mAb样品（实验B和C，图2）。这些样品的回收率为87%。在0.5 µg/µL的较低滴度和120 µL上样量条件下，观察到回收率仅为70%，但对0.5 µg/µL样品执行两次单独的120 µL上样（每次20 min）时，回收率增加到85%，纯化后mAb样品的最终浓度为1.02 µg/µL（实验A和D，图2）。较低上样量条件

下的mAb损失百分比较高，表明可能发生了由过滤板或蛋白A树脂引起的非特异性损失。如图所示，这些实验中使用的相比（体积_{样品}/体积_{树脂}）为8或4，并使用之前提及的高通量SEC方法监测蛋白A树脂纯化结果⁴。

研究还显示，使用15 μL的蛋白A树脂通过拟定的方法能够纯化240 μg的mAb（实验E，图2）。研究中进行了两个实验。第一个实验是执行两次120 μL上样，浓度为1.0 μg/μL（每次20 min，相比=8），第二个实验是将蛋白A树脂的量和mAb浓度加倍（实验E和F，图2）。后一个实验中，相比减少了两倍，降低到4。对于将上样体积增加一倍的实验，无法将350 μL过滤板置于轨道振荡器上进行操作。这两个实验的回收率均为95%或更高，但是，将240 μg mAb上样至15 μL蛋白A树脂时，纯化样品的浓度大约高两倍。这进一步证明，在细胞培养物的mAb滴度显著低于纯化样品所需浓度的情况下，多个结合步骤更加实用。虽然在本研究中未实施，但以上数据表明使用更高的样品浓度或更多的结合步骤以及每孔30 μL的树脂时，可以纯化最多480 μg的mAb。

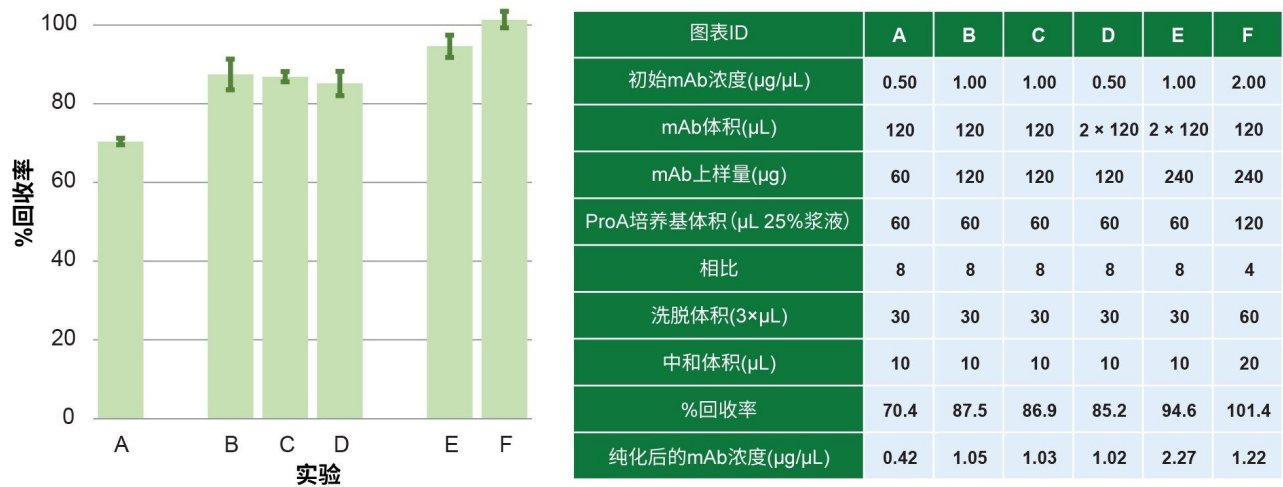


图2.上样研究实验和回收率。上样量为120 μg或更高时，可达到85%或更高的回收率。详细信息见正文。误差条柱表示所得值的范围(n=2)。以上数据采用ACQUITY Premier BSM UPLC收集获得。

在一项扩展的重现性研究中，目标mAb纯化（120 μL，1.0 μg/μL）实现了90%或更高的回收率。在本次评估中，先用PBS将mAb样品稀释至1.0 μg/μL，然后将mAb加标至NTM中以制备相同浓度的第二份样品。根据总SEC峰面积（280 nm条件下检测）评估两种样品重复测定8次的结果。两种样品的回收率相当（均较高），其中PBS样品的回收率为94.4 ± 5.8%，NTM样品的回收率为90.8 ± 5.4% (95% CI)，两种样品得到的纯化mAb浓度均大于1.09 μg/μL。

除可靠的回收率以外，蛋白A方法还提供了一种相对有效的纯化方式，可用于进一步分析mAb样品中的天然大小异构体和游离N-糖。由于平均细胞活力较低(90%)，NTM的组分（宿主细胞蛋白质、DNA等）含量显著增加，可能

会干扰这两种分析，如图3所示的SEC色谱图结果。

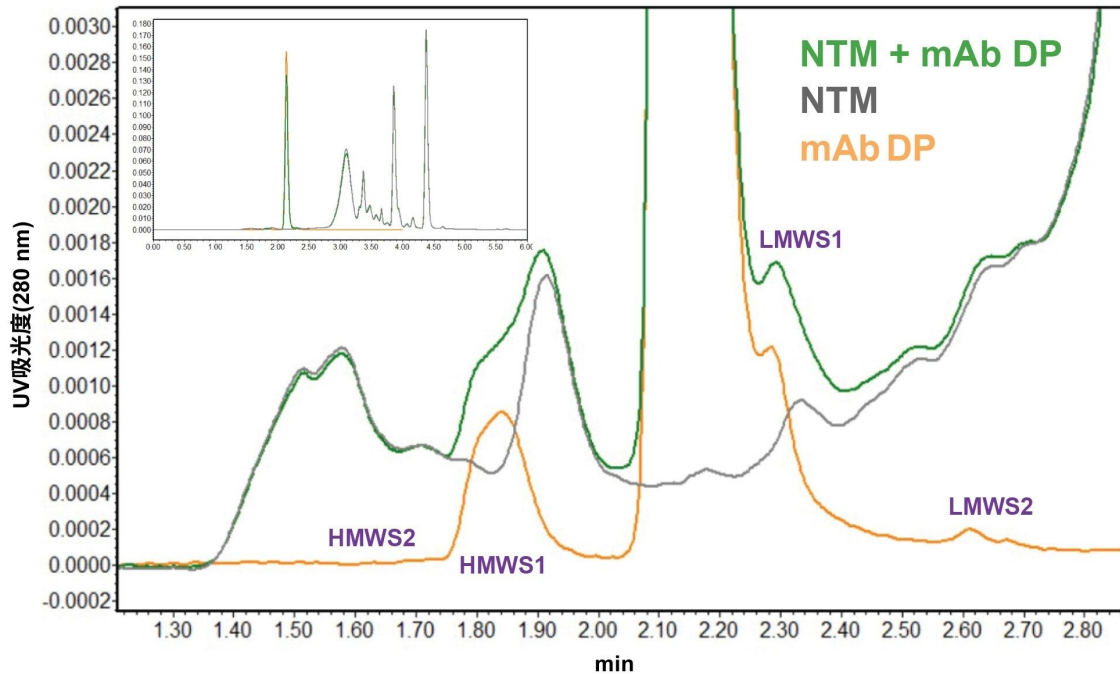


图3.未转染CHO细胞培养基的全尺寸和放大SEC色谱图，包括纯培养基（NTM，灰色）和加标mAb药品（NTM+DP，绿色）后的色谱图。图中还展示了用PBS稀释的1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 药品（DP，橙色）。其他详细信息见正文。以上数据采用ACQUITY Premier BSM UPLC收集获得。

利用SEC方法评估蛋白A纯化样品的HMWS和低分子量大小异构体(LMWS)的相对丰度，将其作为对照与原始样品相对比（图4）。与图3所示的色谱图相比，实现了干扰组分的大幅去除。但是，需要注意的是，蛋白A纯化程序会改变mAb HMWS水平。痕量(<0.05%)的多聚HMWS2是人为生成的，而二聚HMWS1实现部分回收。NTM加标样品中HMWS1大小异构体的绝对回收率估计为68%，PBS加标样品为59%（假设蛋白A纯化过程也没有产生额外的HMWS1形式）。之前曾有研究报告，即使部署了更精确的LC方法，使用蛋白A亲和色谱纯化时，HMWS mAb异构体的定量回收也存在挑战⁶。尽管存在这种偏差，本文介绍的蛋白A方法仍能够提供有关条件培养基样品中HMWS含量的重要信息。虽然超出本研究的范围，但进一步优化纯化方法也可以提高大小异构体评估的准确度。

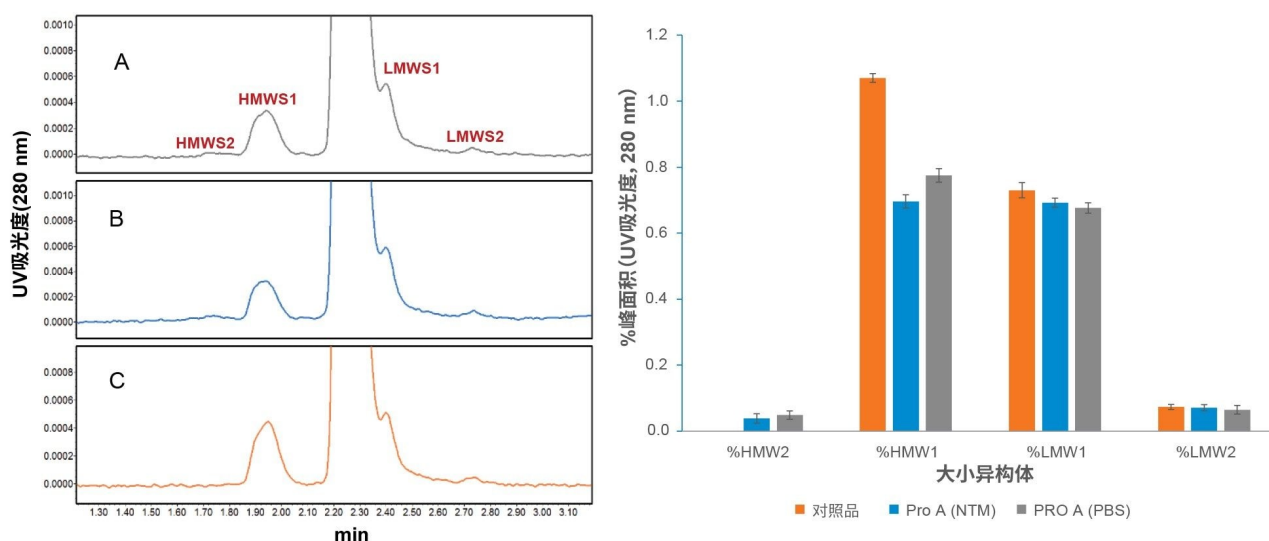


图4.所示为以下分析物的SEC-UV定性分析结果的评估：将经蛋白A纯化的mAb加标入A（PBS，n=8，灰色）和B（未转染的CHO细胞条件培养基，NTM，n=8，蓝色）中，然后与C（加标对照品，n=3，橙色）进行对比。色谱条件见正文。误差条柱表示所得值的不确定度(95% CI)。以上数据采用ACQUITY Premier BSM UPLC收集获得。

蛋白A纯化的有效性在用于游离N-糖分析时也同样很有效。CHO细胞蛋白质组中鉴定出的蛋白质和糖蛋白已超过6000种，其中许多蛋白质和糖蛋白即使在mAb的蛋白A纯化过程中也没有完全去除⁷。为了说明拟定的mAb纯化方案在N-糖分析中的适用性，本研究比较了采用蛋白A从NTM和PBS中纯化获得的mAb样品（图5）。这些结果均使用之前报道的高通量LC-MS方法（配备ESI-ToF检测）获得⁷。比较结果显示，与SEC观察到的总体纯化程度一致，两种样品的主要mAb糖型结果相当。此外，有三种痕量糖型在mAb产品开发中会引起研究人员的关注，因为它们会影响产品安全性(FA2BG1)或疗效（FA2G2S1和M5）。其中，唯一观察到的显著变化是，对于从NTM纯化的mAb，高甘露糖游离寡糖(M5)的相对丰度显著增加（从0.38%增加到0.58%）。此增加可能是由于共纯化HCP的丰度较低，尽管本文中并没有进一步研究，但对蛋白A清洗步骤（图1）中使用的体积和溶液进行修改可能会进一步提升HCP的去除率。

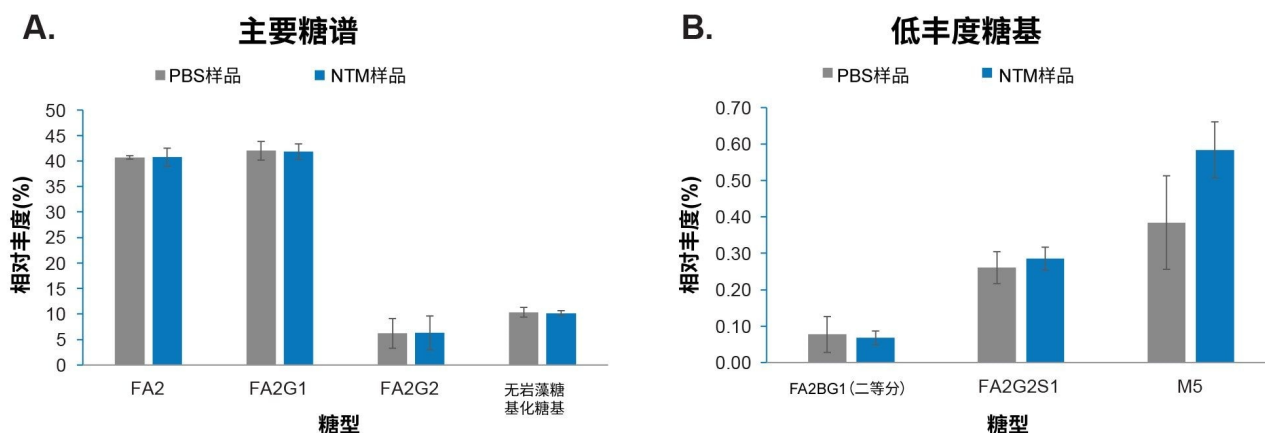


图5.比较使用PBS（灰色）和NTM（蓝色）制备的mAb纯化样品的UPLC-MS N-糖谱。误差条柱显示95%置信区间($n=4$)。该方法可以比较多种样品类型之间的高丰度和低丰度糖基的N-糖谱。

结论

综上所述，所得数据表明，Andrew+机器人平台可以有效地从澄清的细胞培养物样品中执行基于过滤板的蛋白A亲和纯化，以高回收率(>90%)纯化120 μg 至240 μg 的mAb。含量低至60 μg 的mAb也可以实现纯化，回收率较低(70%)。使用MabSelect树脂时，此方法的预测纯化上限至少为480 μg ，但该值可能会根据所选的生产级蛋白A树脂的结合能力而有所不同。此方法可获得0.2 μm 的过滤样品，根据上样量的不同，样品的浓度最高可达2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

自动化程序将对每个样品执行12个单独的移液步骤，在20分钟的结合步骤中，用户只需在轨道振荡器中取放过滤板。该方法制备48个样品的制备时间约为1 h，其中的35 min包含20 min的结合步骤和3次mAb洗脱期间的保持时间（各5 min）。最后，经实验证明，该方法能够有效去除宿主细胞蛋白和其他SEC、游离N-糖分析干扰物，并且尽可能减少了人为聚集体的产生。

参考资料

1. Hopp J, Pritchett R, Darlucio M, Ma J, Chou JH., “Development of a High Throughput Protein a Well-Plate Purification Method for Monoclonal Antibodies” .*Biotechnol Prog.*2009 Sep-Oct; 25(5):1427–32.
2. Coffman, Jonathan L., Jack F. Kramarczyk, and Brian D. Kelley., "High - Throughput Screening of Chromatographic Separations: I. Method Development and Column Modeling." *Biotechnology and bioengineering* 100.4 (2008): 605–618.
3. Bergander, T., Nilsson - Välimaa, K., Öberg, K. and Lacki, K.M., “High - Throughput Process Development: Determination of Dynamic Binding Capacity Using Microtiter Filter Plates Filled With Chromatography Resin” .*Biotechnology progress*, 24(3), pp.632–639.2008.
4. Stephan M. Koza, Albert H, W. Jiang, 和Ying Qing Yu, “使用乙酸铵流动相对单克隆抗体进行快速的SEC-UV分析” , 沃特世应用纪要, [720007852ZH](#), 2022年2月。
5. Dunn ZD, Desai J, Leme GM, Stoll DR, Richardson DD. “Rapid two-dimensional Protein-A Size Exclusion Chromatography of Monoclonal Antibodies for Titer and Aggregation Measurements from Harvested Cell Culture Fluid Samples.*MAbs.*2020;12(1):1702263.
6. Jones, M., Palackal, N., Wang, F., Gaza - Bulseco, G., Hurkmans, K., Zhao, Y., Chitikila, C., Clavier, S., Liu, S., Menesale, E. and Schonenbach, N.S., 2021. “ “High - Risk” Host Cell Proteins (HCPS): A Multi - Company Collaborative View” .*Biotechnology and Bioengineering*, 118(8), pp.2870–2885.
7. Caitlin M. Hanna, Stephan M. Koza, 和Ying Qing Yu, “蛋白A纯化单克隆抗体的自动化高通量N-糖标记和LC-MS分析” 。沃特世应用纪要, [720007854ZH](#), 2023年2月。

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/waters/10195515>](https://www.waters.com/waters/10195515)

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007861ZH, 2023年2月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)