

直接快速分析细胞培养物中的单克隆抗体滴度和聚集体的SEC方法

Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

重点介绍一种使用内在蛋白荧光检测(SEC-FLR)的快速2.4分钟体积排阻色谱(SEC)方法，可直接分析澄清细胞培养物样品中的单克隆抗体(mAb)滴度和聚集体（高分子量物质，HMWS）。前述方法采用之前所述的200 mM乙酸铵(AMA)流动相，可以更高效地部署在专用于LC-MS分析的LC系统上，并且已证实其可以在分析细胞培养物样品时延长色谱柱使用寿命。与使用280 nm处的UV吸光度(A280)相比，使用FLR检测能够将细胞培养物样品的进样体积减少至十分之一以下。因此，可以通过50 ng或更高的上样量（0.1 μ L样品，浓度为0.5 μ g/ μ L）轻松追踪细胞培养物中的mAb滴度和聚集体。如果使用A280，虽然可以在同样低的上样量条件下测定滴度，但无法测定HMWS水平。

这种高通量(HT)、低上样量的SEC方法使用XBridge™ Premier SEC蛋白分析专用柱 (250 Å, 2.5 μ m, 4.6 x 150 mm)，流速为1.0 mL/min。已使用ACQUITY™ Premier UPLC系统评估方法性能和稳定性。

优势

- 快速（2.4分钟）分析mAb滴度和HMWS的SEC-FLR法
- 直接进样细胞培养样品，无需蛋白A纯化

- 假设每次分析使用不超过0.1 μL的细胞培养物，用于分析mAb CHO细胞培养物样品时色谱柱使用寿命预计可延长至1000次分析

简介

本研究开发出一种直接通过SEC技术分析澄清细胞培养物中mAb滴度和HMWS的方法。通常情况下，在通过SEC评估细胞培养物样品中的mAb HMWS水平之前，需要先经过蛋白A亲和纯化。已有文献报道了该方法的另一个版本，该版本使用2D-LC蛋白A和SEC方法来测定滴度和聚集体水平¹。就本应用而言，蛋白A纯化的挑战之一是，蛋白A的洗脱条件可能会改变HMWS水平。对细胞培养物样品中的mAb进行直接SEC分析是一种潜在的规避方法²。由于mAb及其聚集体与单个宿主细胞蛋白相比具有极高的丰度和大小，因此这种分析模式通常是可行的，但是，细胞培养物样品会污染色谱柱。

本研究的起源是早期的一份报告，其中使用与LC-MS仪器兼容的AMA流动相，证明Waters ACQUITY Premier SEC 250 Å, 1.7 μm蛋白分析专用柱能够对经蛋白A纯化的mAb样品进行HT SEC分析³。在之前的研究中，SEC色谱柱在处理各种部分纯化的细胞培养物样品时的长期性能值得注意。据推测，200 mM AMA的抗微生物特性可能具有一定的优势。

基于这一观察结果，考虑对细胞培养物中的mAb进行直接SEC分析。虽然这些样品在获取时理论上不会受到微生物污染，但由于其营养成分丰富，在处理和储存过程中非常容易受到污染。另一个需要考虑的因素是，经过澄清和过滤的细胞培养物样品中可能引入了颗粒物和其他组分，这些颗粒物会污染SEC色谱柱。因此，此处使用内在蛋白FLR作为检测方法，以及次级相互作用非常小并且填充颗粒更大的SEC色谱柱，从而尽可能减小色谱柱的进样体积。故使用了XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm)。

该色谱柱采用亲水性MaxPeak™ HPS硬件（色谱柱柱体、末端接头和筛板），其中填充高覆盖率的羟基封端聚环氧乙烷(BEH-PEO)键合亚乙基桥杂化颗粒。因此，SEC色谱柱与要分离的蛋白质大小异构体之间的结合水平较低，可进一步用于使用各种流动相组成进行低蛋白质载样量的分析。使用ACQUITY Premier UPLC系统进行方法开发、性能和稳定性研究，以进一步减少潜在的蛋白质-金属相互作用。

实验

样品描述

对过期的mAb曲妥珠单抗(Herceptin™)和曲妥珠单抗-anns (Kanjinti™)进行分析。用磷酸盐缓冲液(PBS)或未转染的CHO细胞培养基(NTM)将样品稀释至指定浓度。NTM由Syd Labs, Inc.在转瓶中使用未转染的CHO-K1细胞制备，于第2天到第15天收集瓶中的消耗型培养基（平均细胞活力约90%），合并，用0.2 μm滤膜过滤。

质谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier UPLC，配备四元溶剂管理器(QSM)和CH-A柱温箱
检测:	ACQUITY UPLC TUV检测器，配备5 mm钛合金流通池， 波长：280 nm；使用ACQUITY UPLC FLR检测器（激发波长：280 nm，发射波长：350 nm）。设置为在0.6 min处自动复零。1.0 mL/min流速方法
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:	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm，配套mAb大小异构体标准品(P/N: 176004779)
柱温:	25 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	0.1 μL或1.0 μL
流速:	1.0 mL/min（运行时间=2.4 min），或按照说明，
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

数据管理

色谱软件: Empower™ 3 (FR 4)

结果与讨论

方法开发

本研究的主要目的是开发一种可靠的HT非变性SEC方法，用于分析澄清CHO细胞培养基样品中的mAb滴度和HMWS，样品仅需稀释处理。使用XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱(2.5 μm, 4.6 x 150 mm)和200 mM AMA流动相，在1.0 mL/min的流速下实现了有效分离，分析时间为2.4分钟，并且通过内在蛋白FLR进行峰检测，成功实现研究目的。此外，为了在先前的分析完全完成之前开始下一次分析，在0.6 min处添加了检测器自动复零事件。结果显示，结合以上操作，进样体积为0.1 μL时，该方法能够有效监测细胞培养样品中1%或更高浓度的二聚体HMWS(HMWS1)以及滴度为0.5 mg/mL的mAb。

使用A280方法时，mAb单体是以相应的SEC保留时间检测的细胞培养物样品中的主要组分。比较纯化后的mAb（浓度为1.0 mg/mL，用PBS稀释）和未转染培养基(NTM)样品的色谱图可以清楚地证明这一点（图1）。我们比较了这两个样品的A280（主要来自色氨酸和酪氨酸残基的蛋白质吸光度谱带）与260 nm处的UV吸光度(A260)（DNA和RNA的峰吸光度谱带）。正如预期的那样，纯化的mAb单体和HMWS1的A280约为A260的两倍。但是，对于NTM样品，A280 nm和A260 nm相当（图1）。这一结果与A260一致，部分原因是NTM样品中存在低水平的DNA或RNA。

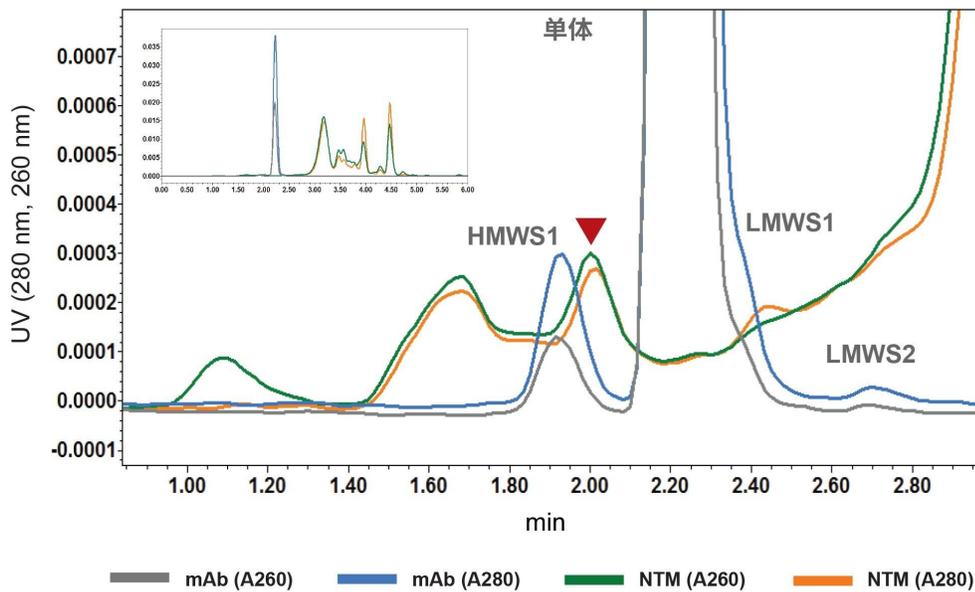


图1.用PBS稀释至1 mg/mL的纯化mAb（曲妥珠单抗-anns）样品(mAb)以及未转染的细胞培养物样品(NTM)的SEC-UV 280 nm和260 nm色谱图。使用XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱(2.5 μm, 4.6 x 150 mm)和200 mM AMA流动相，流速为0.5 mL/min。进样体积为1 μL。其他条件见正文。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。

内在蛋白FLR检测主要监测高量子产率的色氨酸残基，可消除DNA和RNA的干扰，并且使mAb HMWS检测的信噪比(S/N)相比A280提高10倍以上（图2）。S/N越高，样品体积下限就越低，如图2所示，FLR检测的进样体积为0.1 μL，而A280的进样体积为1.0 μL。此外，在本例中，NTM中使用A280检测时干扰二聚体HMWS1测量的组分在使用FLR检测时并不明显。

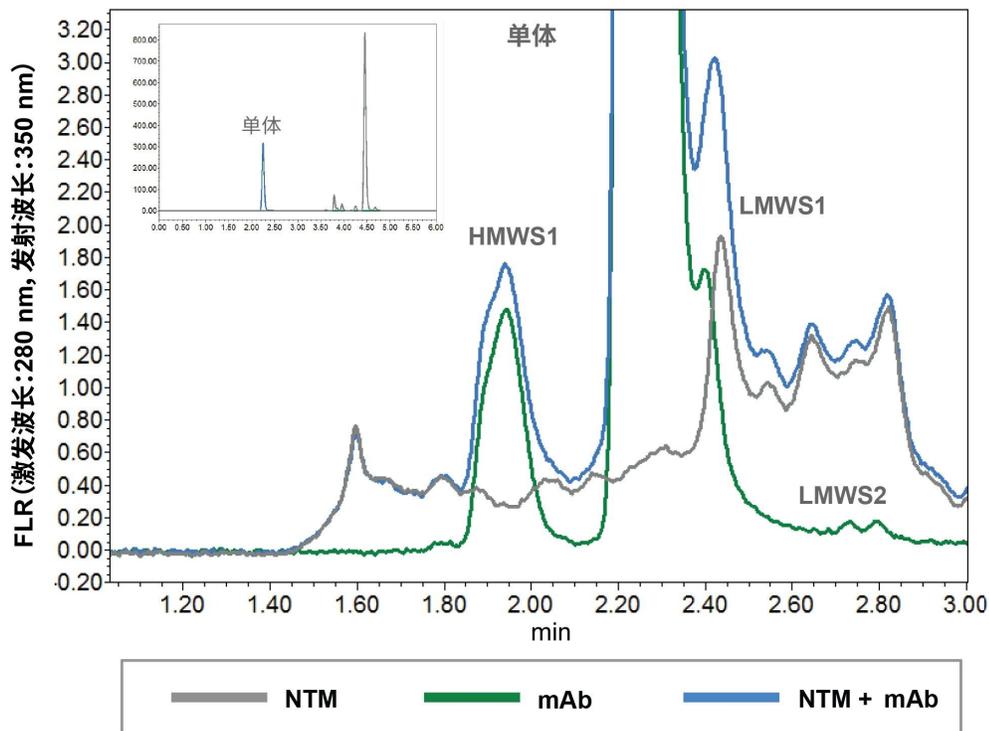


图2.使用PBS (mAb)和NTM (NTM + mAb)稀释至1 mg/mL的纯化mAb（曲妥珠单抗-anns）样品以及未加标NTM样品(NTM)的SEC-FLR色谱图。其他条件见正文和图1。进样体积为0.1 μ L。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。

方法评估

使用FLR或A280检测均可轻松测定细胞培养物样品中0.25 mg/mL至4.0 mg/mL的mAb滴度。使用PBS和NTM制备mAb的连续稀释液，使用进样体积0.1 μ L进行A280和FLR检测。此外，使用A280对进样体积为1.0 μ L的PBS样品进行了评估。进样体积为0.1 μ L的NTM样品和PBS稀释样品得到的色谱图如图3所示。下降基线积分用于对用PBS稀释的mAb样品进行分析，而切向切割积分则用于对用NTM稀释的mAb样品进行分析。然后使用PBS校准曲线计算NTM样品中的mAb滴度，然后将其与目标值相关联（图4）。无论是基于相关系数图斜率的偏倚，还是与预期值的总体偏差($\leq 3.2\%$)，加标NTM样品中的两次滴度测定值均表现出非常小的结果。该结果表明，可以使用A280或FLR检测方法直接测定细胞培养物中的mAb滴度，并且进样体积低至0.1 μ L。

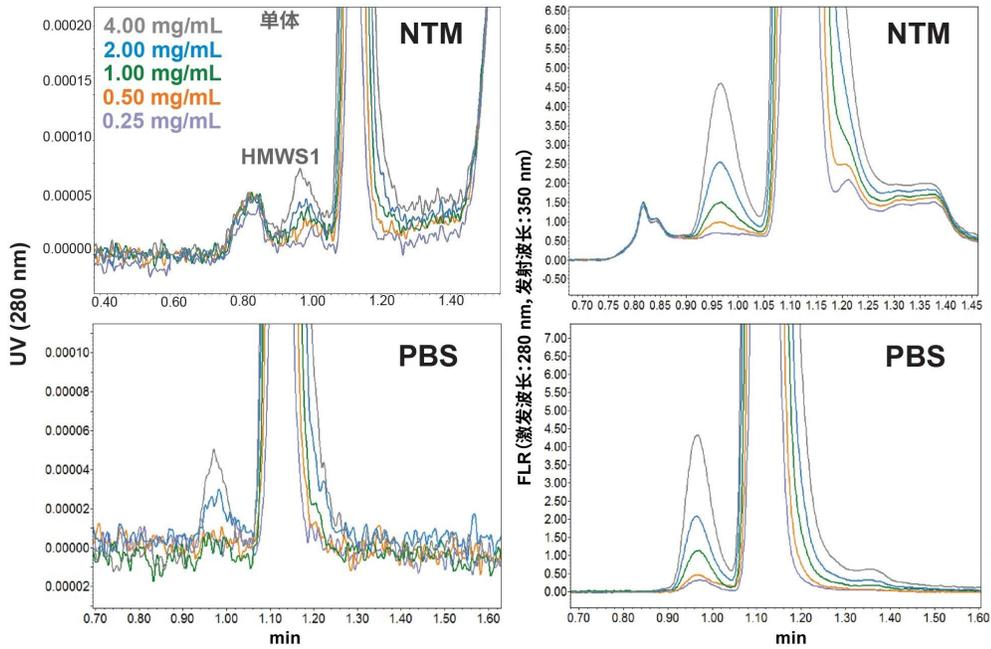


图3.用PBS和NTM连续稀释至4.0、2.0、1.0、0.5和0.25 mg/mL的纯化mAb（曲妥珠单抗-anns）样品的SEC-UV和SEC-FLR叠加色谱图。流速为1.0 mL/min（分析时间2.4分钟），进样体积为0.1 μ L。其他条件见正文和图1。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。

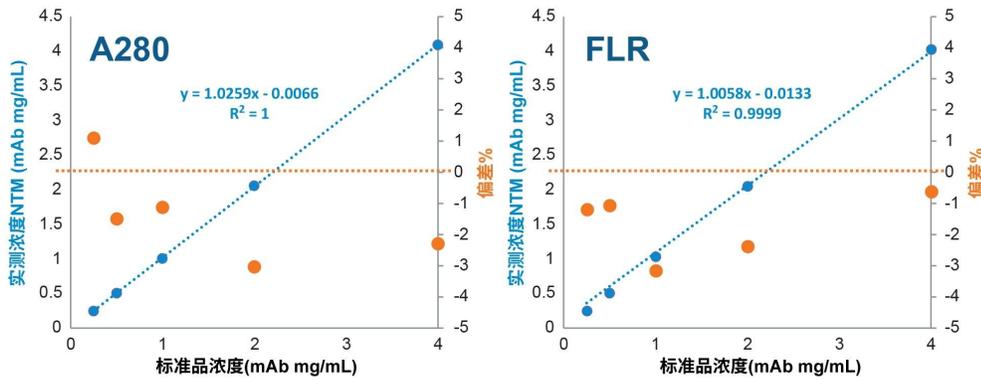


图4.细胞培养物样品的SEC-UV和SEC-FLR滴度定量能力（左侧y轴）与预测值相关。预测值基于使用PBS稀释的mAb药品生成的校准曲线。SEC-UV和SEC-FLR色谱图见图3。第二条（右侧）Y轴上显示的是与预测值的相对偏差百分比，其中橙色虚线表示无偏差。更多讨论和信息请参阅正文。

接下来，我们根据上述实验数据评估了NTM和PBS中二聚体HMWS1的测定方法（图3和图5）。所用mAb样品中不存在明显水平的多聚HMWS（HMWS2），并且在0.1 μL的进样体积下使用A280检测无法定量HMWS1。通过对比PBS样品中HMWS1的定量结果，使用A280（进样体积为1.0 μL，色谱图未显示）测量时，HMWS1的平均相对丰度为0.93%，使用FLR测量的平均相对丰度为0.92%（不包括0.25 mg/mL样品）。0.25 mg/mL样品的HMWS1测定结果与该平均值存在显著的正偏差，这在一定程度上可能是积分干扰，反映了该方法的定量限(LOQ)。

mAb浓度为0.5 mg/mL或更高时，通过FLR检测得到的NTM样品中HMWS1的相对丰度保持一致，但也低于在PBS样品中观察到的相对丰度。这与对NTM样品使用切向切削积分和对PBS样品使用下降基线积分进行比较的结果一致。尽管结果存在偏差，但这些数据表明FLR检测可以检测到CHO细胞培养物样品中HMWS1含量的实际变化。

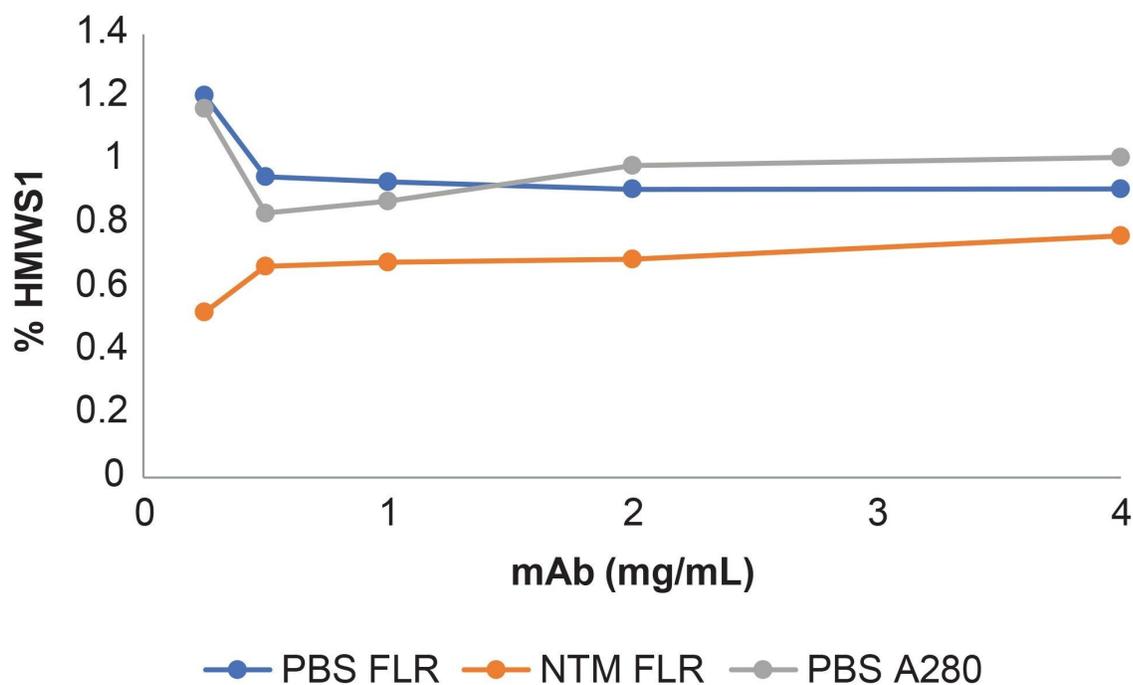


图5.使用SEC-FLR法定量测定细胞培养物样品(NTM FLR)中的HMWS1。图中还显示了使用SEC-UV (进样体积1.0 μ L) 和SEC-FLR进行检测时,用PBS稀释的mAb对照样品的观察值。NTM FLR样品的HMWS1丰度值始终较低。更多讨论和信息请参阅正文。

SEC-FLR方法检测多聚HMWS2变化的能力也得到印证。在本研究中,浓缩的mAb样品在45 $^{\circ}$ C下过夜搅拌进行降解。然后将该样品用PBS和NTM稀释至1.0 mg/mL,随后用未降解样品稀释这两种降解样品(1:3) (图6)。根据这些结果,我们观察到PBS和NTM稀释后样品中的HMWS2响应均呈合理的线性。但是,由于NTM中存在共洗脱组分,因此NTM曲线的y轴截距为0.5%。HMWS1的结果显示,NTM和PBS样品的响应曲线相当,与之前描述的结果一致。

综上所述,这些结果表明,本文所提出的SEC方法能够直接可靠地测定澄清细胞培养物样品中的mAb滴度。此外,还可以轻松观察到大量二聚HMWS1 ($\geq 1\%$)和多聚HMWS2 ($\geq 1.5\%$)。检测限取决于细胞培养条件、mAb滴度和聚集体水平。在评价方法准确性方面,以上结果基于mAb样品加标至存活率较低(约90%)的NTM中得到的结果,此外也可以通过其他方法进行评价,即去除细胞培养物样品中的mAb和聚集体mAb(例如,蛋白A捕获),然后在去除了mAb的样品中加入纯化的mAb样品。

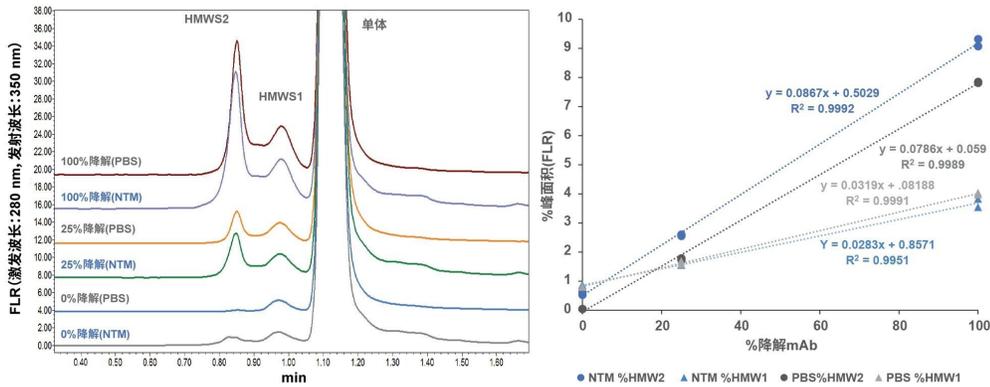


图6.经降解诱导聚集的mAb（曲妥珠单抗-anns）纯化样品的SEC-FLR叠加色谱图。随后用未降解样品按1:3的比例稀释降解样品（25%降解样品）。样品浓度为1.0 mg/mL，并叠加用PBS和NTM进行稀释的稀释系列。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。图中展示了NTM和PBS稀释样品的HMWS1和HMWS2定量测定结果。更多讨论和信息请参阅正文。

方法可靠性

通过对加标1.0 mg/mL mAb的NTM进行超过500次连续分析，评估色谱柱性能。分析前24 h内将样品以 $10^3 \times g$ 离心3 min，并置于自动进样器中保持在6–8 °C。进样体积为0.1 μ L，流速为1.0 mL/min。进样细胞培养物样品的主要问题是可能会引入颗粒物，破坏通过填充床的流动模式，导致分离度降低和色谱柱化学污染。本研究未使用保护柱，以更好地评估对分析柱性能的影响。间歇性地进样用PBS稀释过的纯mAb以评估色谱柱性能（图7）。在研究过程中，我们观察到HMWS1与单体之间的分离度(USP HH)呈现缓慢而稳定的下降。预计在超过1000次进样后将无法实现基线分离度($R_s < 1.5$)。

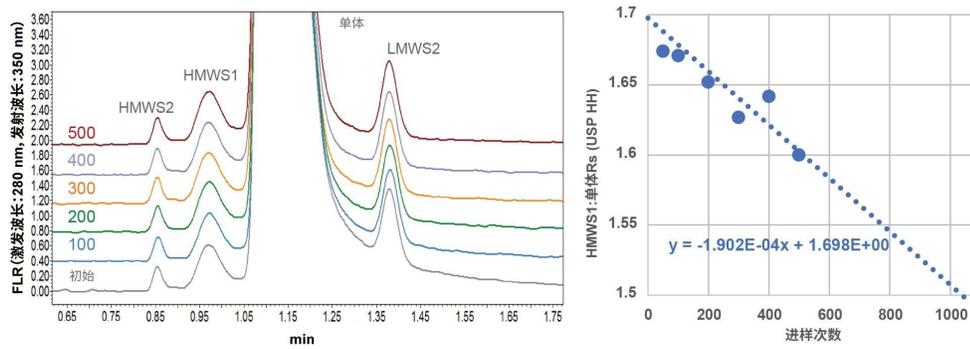


图7.使用纯化的*mAb*（曲妥珠单抗）样品在不同时间点评估SEC-FLR色谱柱使用寿命。所分析的样品已过期，结果显示出HMWS和LMWS大小异构体的含量均较为显著（约1%）。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。图中显示了各时间点HMWS1与单体之间的USP分离度(HH) (R_s)。更多讨论和信息请参阅正文。

减少培养基样品的进样体积是延长色谱柱使用寿命的有效途径之一。由于0.1 μL 是所用LC系统指定的最小进样体积，因此将含有1.0 mg/mL *mAb*的NTM样品用PBS连续稀释(1:1)，然后仅使用FLR检测器进行分析（图8）。数据评估的执行方式与之前介绍的方法类似（见图4）。在低至4倍稀释水平下，经PBS稀释的加标NTM样品的滴度和HMWS1丰度测定结果始终一致。但是，对于*mAb*滴度为1.0 mg/mL且HMWS1浓度为1%的细胞培养物样品，建议使用1:1的稀释比例进行保守分析，这是为了得到高于LOQ的HMWS1峰($S/N=14$)。这种稀释使每次分析的细胞培养物进样量减少为二分之一，从而显著降低了由细胞培养物组分引起的色谱柱性能下降。当然，对于具有较高滴度或HMWS水平的样品，可以增加细胞培养物样品的稀释倍数。此外，虽然未在本研究中进行评估，但结合使用保护柱也有助于减少色谱柱污染。

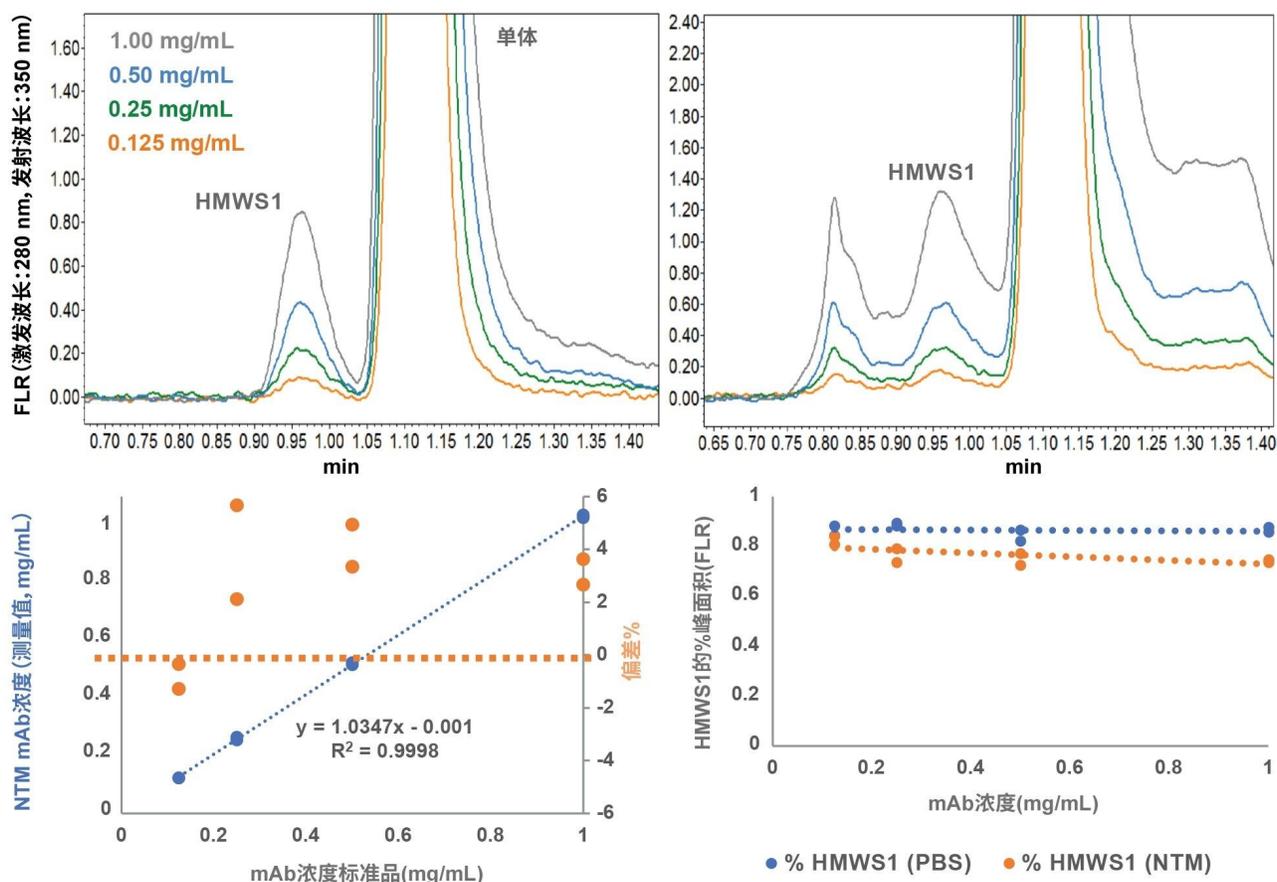


图8.纯化mAb（曲妥珠单抗-anns）样品最初用PBS和NTM稀释至1.0 mg/mL，然后用PBS连续稀释至0.5、0.25和0.125 mg/mL的SEC-FLR叠加色谱图。液相色谱条件和数据分析如图3至图5以及正文所述。

结论

本文介绍了一种高通量（2.4 min，运行时间2.4 min）SEC方法，使用XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱(2.5 μm, 4.6 x 150 mm)和200 mM AMA流动相，在1.0 mL/min的流速下，通过内在蛋白FLR检测对澄清细胞培养物中的单克隆抗体同时进行滴度和聚集体(HMWS)分析，无需事先进行蛋白纯化。开发本方法的目的是为细胞系和细胞培养物优化实验提供潜在支持。此外，本方法也可以用于支持纯化工艺开发，例如用于初始产物捕获步骤，此时某些样品中仍然存在培养基组分。

总体而言，本方法的灵敏度和分离度来源于内在蛋白FLR检测以及LC系统和SEC色谱柱，因此蛋白质-表面相互作用水平可忽略不计。由此获得的方法能够有效监测mAb滴度和显著增加的HMWS（≥1%至1.5%的水平）。此外，通过将4.6 mm内径色谱柱上的细胞培养样品进样体积大幅减少至0.05 μL至0.10 μL，并使用具有抗微生物特性的流动相，可以将色谱柱的使用寿命延长至1000次分析以上，如果使用保护柱的时间可能更长。需要注意的是，在本次评估中，流动相经过0.1 μm的无菌过滤，样品也经过0.2 μm的过滤，并在分析前进行了离心。

致谢

由衷感谢Abert W. Jiang、Alireza Agkhaye和Xiao Dong为最终完成这个项目所付出的努力和思考。

参考资料

1. 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.
2. Paul, A.J., Schwab, K. and Hesse, F., 2014. Direct analysis of mAb aggregates in mammalian cell culture supernatant. *BMC biotechnology*, 14(1), pp.1–11.
3. 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，2023年。

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

ACQUITY UPLC FLR检测器 <<https://www.waters.com/514222>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007915ZH，2023年5月



© 2024 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](#)