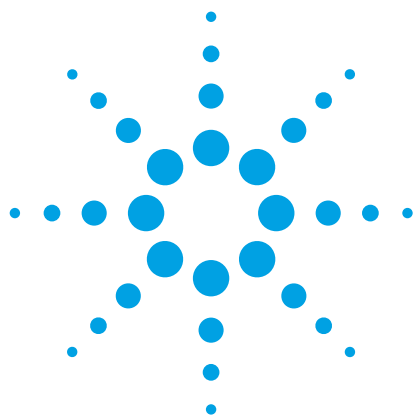




Bio-Monolith Protein G-Säule - Mehr Optionen für die mAb- Titerbestimmung

Application Note

Biologika und Biosimilars

Autor

Phu T. Duong
Agilent Technologies, Inc.

Einführung

Monoklonale Antikörper (mAb) haben sich in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Biopharma-Produkte zur Behandlung verschiedener Krankheiten entwickelt. Ihre spezielle genetische Konstruktion ist auf bessere Spezifität für Krankheitsfaktoren ausgerichtet. Bei der Entwicklung dieser Antikörper werden Protein A- und Protein G-Analyseaffinitätsäulen verwendet, um ihren Titer bzw. ihre Konzentration in verschiedenen Zellkulturüberständen zu bestimmen und dadurch den Klon mit der höchsten Ausbeute auszuwählen. Als Träger für die Protein A- und Protein G-Säulen dient ein inerter polymerer Monolith. Beide Säulen zeichnen sich durch hohe Antikörperaffinität aus, deshalb binden sie nur an Antikörper in Zellkulturüberständen, jedoch mit unterschiedlicher Selektivität (siehe Tabelle 1).

Diese Application Note stellt die Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule vor. Die Säule ist auf schnelle Analyse und hohe Kapazität ausgelegt. Die gezeigten Daten belegen die Linearität mit hoher Spezifität. Die Linearitätsanalyse zeigt die Möglichkeit einer genauen Quantifizierungsanalyse von mAb in Zellkulturüberständen mithilfe der Säule. Darüber hinaus geht aus Analysendaten der Lebensdauer hervor, dass die Säule in hohem Maß reproduzierbar ist und eine lange Lebensdauer mit stabilem und niedrigem Rückdruck aufweist. Die Bio-Monolith Protein G-Säule stellt eine Ergänzung der Bio-Monolith Protein A-Säule dar und bietet damit mehr Optionen zur Bestimmung des Titers monoklonaler Antikörper.



Agilent Technologies

Tabelle 1. Bindungsaffinität von Agilent Bio-Monolith Protein A und G für verschiedene IgG-Subklassen [1,2].

Antikörper	Protein A	Protein G
Human		
Humaner IgG1	++++	++++
Humaner IgG2	++++	++++
Humaner IgG3	–	++++
Humaner IgG4	++++	++++
Humaner IgA	++	–
Humaner IgD	++	–
Humaner IgE	++	–
Humaner IgM	++	–
Maus		
Maus-IgG1	+	++
Maus-IgG2a	++++	++++
Maus-IgG2b	++++	+++
Maus-IgG3	+	+++
Maus-IgM	+/-	–
Antikörperfragmente		
Humanes Fab	+	+
Humanes F(ab') ₂	+	+
Humanes scFv	+	+
Humanes Fc	+	+
Humanes K	+	+
Humanes λ	+	+

+++++ = Starke Affinität
 +++ = Moderate Affinität
 ++ = Schwache Affinität
 + = Leichte Affinität
 – = Keine Affinität

Material und Methoden

- Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (Sigma-Aldrich, Corp., Best.-Nr. S3522) (MW 137,99)
- Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (Sigma, Best.-Nr. 71643) (MW 177,99)
- Zitronensäure Monohydrat (Sigma, Best.-Nr. C7129) (MW 210,14)
- Natriumchlorid (Sigma, Best.-Nr. S5886) (MW 58,44)
- Phosphorsäure, 85 Gew.-% in H₂O, 99,99 % trace metal basis (Aldrich, Best.-Nr. 345245)
- Natriumhydroxidlösung, 50 bis 52 % in Wasser, Lösemittel für IC (FLUKA 72064) (MW 40)
- Glycin für die Elektrophorese, ≥99 % (Sigma, Best.-Nr. G8898) (MW 75,07)
- Eisessig (Sigma, Best.-Nr. A9967) (MW 60,05)
- Salzsäure, 36,5 bis 38,0 %, BioReagent, für die Molekularbiologie (Sigma, Best.-Nr. H1758)
- Escherichia coli* Zellysekit (Sigma, Best.-Nr. CB0500).

- Überstand und Lysat von CHO-Zellen (Zellen aus dem Eierstock des Chinesischen Hamsters), Insektenzellüberstand, humanisierter monoklonaler Antikörper aus CHO-Zellen (IgG2 und IgG3) von CreativeBio Labs.

Methode

Die mobile Phase A ist der Bindungs- und Waschpuffer mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4. Aus 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat in 1 l deionisiertem Wasser und 35,6 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, ebenfalls in 1 l deionisiertem Wasser werden zwei Stammlösungen (0,2 M) hergestellt.

Zur Herstellung von 2 l Natriumphosphat mit 50 mM Natriumphosphatpuffer und 50 mM Natriumchlorid, pH 7,0:

- 195 ml Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat-Stammlösung mit 305 ml Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat-Stammlösung mischen und mit einem Magnetrührer rühren.
- 5,8 g Natriumchlorid hinzufügen und weiterrühren.
- 1 l deionisiertes Wasser hinzufügen.
- Den pH-Wert der Lösung messen und mit NaOH oder 3 M Phosphorsäure auf pH 7,0 einstellen.
- Die Lösung in einen volumetrischen 2-l-Kolben gießen und bis zur Markierung mit Wasser auffüllen.

Die mobile Phase B ist ein Elutionspuffer aus 0,1 M Zitronensäure, pH 2,0. Dieser wird hergestellt, indem 21 g Zitronensäure Monohydrat unter behutsamem Rühren in etwa 600 ml Wasser aufgelöst werden. Mit 1 M HCl auf pH 2,0 einstellen und die Lösung anschließend in einem volumetrischen Kolben mit Wasser auf 1 l verdünnen.

CHO-Zellüberstand und -lysat, Insektenzelllysat (alle Proben wurden zentrifugiert) und humanisierter monoklonaler IgG1, IgG2 und IgG3 wurden von Creative BioLabs, New York, erworben. *Escherichia coli*-Lysat wurde nach dem von Sigma-Aldrich, Corp. empfohlenen Protokoll hergestellt [3]. Das Kit enthält CellLytic B, ein bakterielles Lysereagenz (500 ml), Lysozymlösung (10 × 1 ml), Benzonase (25 000 Einheiten) und Proteaseinhibitor-Cocktail (5 ml). Zur Herstellung des Lysats wird 1,0 g Zellpaste zu 10 ml CellLytic B-Reagenz, 0,2 ml Lysozym, 0,1 ml Proteaseinhibitoren und 500 Einheiten Benzonase gegeben. Das Gemisch wird kurz auf dem Vortexer und dann 10 Minuten von Hand oder auf dem Schüttler gemischt, um eine weitere Extraktion der löslichen Proteine durchzuführen. Dann wird das Gemisch 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert, um etwaiges unlösliches Material in das Pellet zu überführen. Die lösliche Proteinfraction (Überstand) wird sorgfältig von den Zelltrümmern (Pellet am Boden des Röhrchens) abgenommen. Die Proteinkonzentration im Überstand kann mithilfe des Bradford-Proteinassays geschätzt werden und beträgt in diesem Fall 40 mg/ml.

Ein Teil des Überstands wurde dann der Beschreibung entsprechend mit IgG1, IgG2 oder IgG3 versetzt. Die Überstände wurden mit Bindungspuffer (oder Puffer A) bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml verdünnt und mit 2 mg/ml eines einzelnen gereinigten humanisierten monoklonalen Antikörpers, wie etwa IgG1, IgG2 oder IgG3, versetzt.

Bedingungen

Säule:	Agilent Bio-Monolith Protein G, 5,2 mm Durchmesser, 4,95 mm Länge (Best.-Nr. 5190-6900)														
Bindungspuffer:	A, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,4														
Elutionspuffer:	B, 0,1 M Zitronensäure, pH 2,0														
Probe:	siehe Chromatogramme														
Inj.-Vol.:	siehe Chromatogramme														
Flussrate:	1,0 ml/min (oder siehe Chromatogramme)														
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (Min.)</th> <th>% A</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>0,4</td><td>100</td></tr> <tr><td>0,5</td><td>0</td></tr> <tr><td>2,0</td><td>0</td></tr> <tr><td>2,1</td><td>100</td></tr> <tr><td>4,2</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	Zeit (Min.)	% A	0	100	0,4	100	0,5	0	2,0	0	2,1	100	4,2	100
Zeit (Min.)	% A														
0	100														
0,4	100														
0,5	0														
2,0	0														
2,1	100														
4,2	100														
Temp.:	25 °C														
Detektor:	UV, 280 nm														
System:	Agilent 1260 Infinity bioinertes quaternäres LC-System														

Ergebnisse und Diskussion

Spezifität und Selektivität

Wie in Tabelle 1 angegeben ist, weist die Protein G-Säule für verschiedene Subklassen humanisierter monoklonaler Antikörper höhere Bindungsaffinität als die Protein A-Säule auf, wobei jedoch nur Protein G Affinität für die Subklasse IgG3 hat. Die Daten in Abbildung 1A belegen die Spezifität der Bio-Monolith Protein G-Säule und ihre Eignung zur Überprüfung des Titors, d. h. des Vorhandenseins und der Konzentration von Antikörpern im Überstand. Bei der auf die Säule injizierten Probe handelte es sich um CHO-Zellüberstand, der mit gereinigtem rekombinantem humanisiertem IgG3-mAb versetzt war. Dieser mAb wurde in der CHO-Zelllinie exprimiert. Den Daten zufolge war IgG3 das einzige Protein, das an die Säule gebunden und nach etwa 1,6 Minuten bei 1,0 ml/min eluiert wurde, während keines der Wirtszellproteine an die Säule gebunden, sondern im Durchfluss-Peak eluiert wurde.

Um die unterschiedliche Selektivität zwischen Protein A- und Protein G-Säulen aufzuzeigen, wurden beide separat mit monoklonalen IgG1-, IgG2- und IgG3-Antikörpern injiziert. Beide Säulen banden sowohl IgG1 als auch IgG2 (Daten nicht gezeigt), während IgG3 von der Bio-Monolith Protein A-Säule nicht gebunden wurde. IgG3 wurde als Durchfluss-Peak eluiert und nur von der Bio-Monolith Protein G-Säule gebunden und davon eluiert (vgl. Abbildung 1A und 1B).

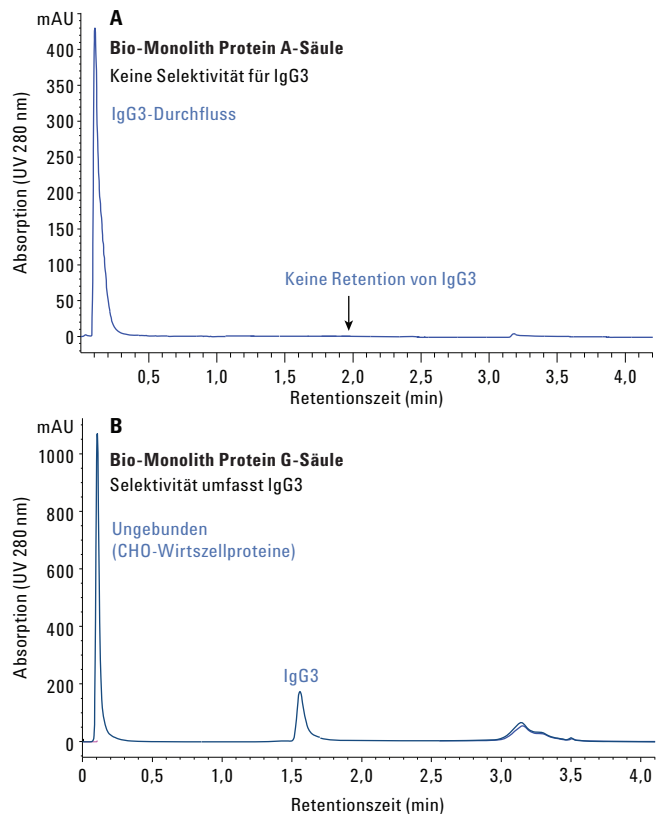


Abbildung 1. A) Keine Bindung von IgG3 an die Bio-Monolith Protein A-Säule. IgG3 wurde als Durchfluss-Peak eluiert. 2 mg/ml humanisiertes IgG3, mit Bindungspuffer gemischt (auf die Säule injiziertes Volumen: 3 µl). B) Die Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule war in der Lage, aus einer mit IgG3 versetzten Zellkultur (auf die Säule wurden 5 µl von 2,0 mg/ml IgG3, gemischt mit 10 mg/ml CHO-Zellüberstand, injiziert) schnell nur IgG3 zu binden.

Um zu bestätigen, dass die Spezifität der Bio-Monolith Protein G-Säule eine Bindungsaffinität für Wirtszellproteine ausschloss, wurde ein robusterer Test durchgeführt, bei dem Wirtszellproteinproben von *E. coli*-Zelllysate, CHO-Zelllysate und -überstand sowie Insektenzelllysate verwendet wurden. Diese Lysate enthielten Wirtszellproteine, die mit Lysepuffern auf der Basis von Natriumdodecylsulfat extrahiert worden waren. Diese chemische Substanz hat erheblichen Einfluss auf die unspezifische Bindung an die Säule. Diese Proben enthielten keine Antikörper, sondern nur Wirtszellproteine. Der Test wurde durchgeführt, weil robuste Proben bei entsprechenden Defiziten der Säule unspezifische Ergebnisse liefern. Abbildung 2 zeigt keinerlei Hinweis darauf, dass die Säule ein Protein aus den Wirtszellüberständen absorbierte. Alle Wirtszellproteine wurden als Durchfluss-Peaks eluiert. Die Daten lassen den Schluss zu, dass die Bio-Monolith Protein G-Säule keine Affinität für Wirtszellproteine aufweist.

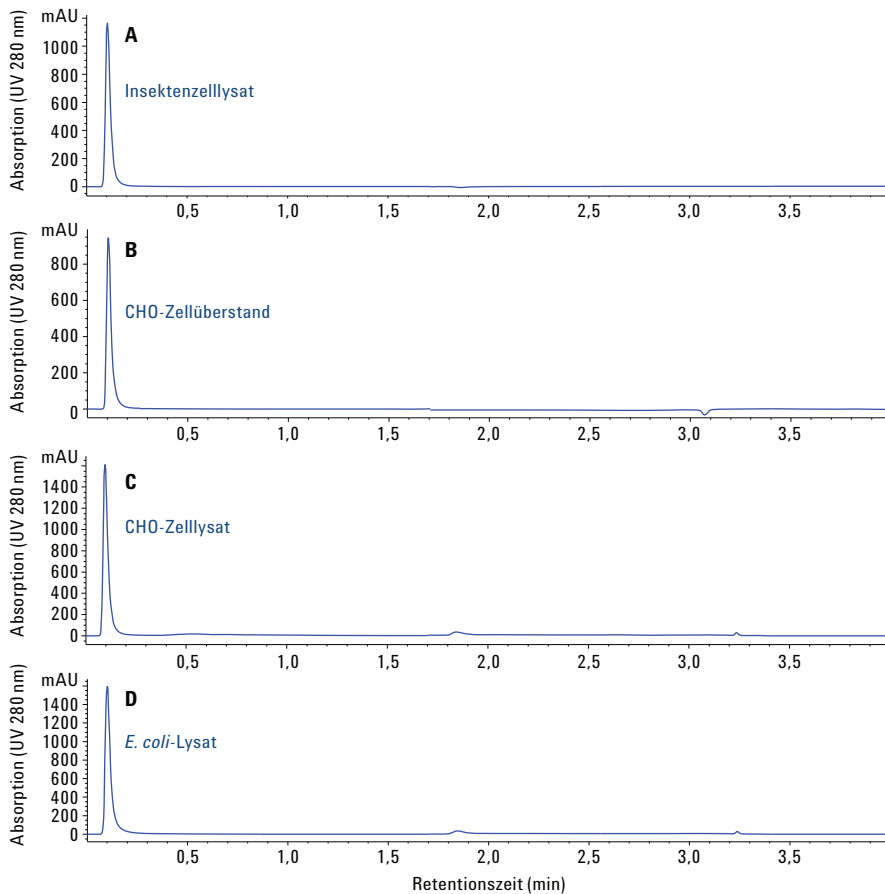


Abbildung 2. Analyse der Spezifität der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule mit 10 mg/ml Wirtszellproteinen, verdünnt mit Bindungspuffer. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Proben 5 µl. A) Insektenzelllysat, B) CHO-Zellüberstand, C) CHO-Zelllysat, D) *E. coli*-Lysat.

Genaue Quantifizierung

In den frühen Phasen der Entwicklung bei der Auswahl der Zelllinie wie auch bei der Herstellung, wenn die mAb-Menge im Zellkulturüberstand den optimalen Gewinnungszeitpunkt bestimmt, ist eine genaue Quantifizierung des mAb-Titers unerlässlich. Um die Leistung der Bio-Monolith Protein G-Säule bei der genauen Quantifizierung von mAbs aufzuzeigen, wurden verschiedene Mengen (µg) gereinigter IgG-Antikörper auf die Säule injiziert. Zur Bestimmung der Analysegenauigkeit wurden anhand des Verhältnisses von Peakflächen zu IgG-Mengen Linearitätskurven erstellt. Die in Abbildung 3 dargestellte Linearität von Peakflächen aus der Protein G-Säule zeigt, dass die Säule zur Quantifizierung von mAb in gewonnenen Zellkulturmedien in einem breiten Konzentrationsbereich geeignet ist. Es wurden auch geringe Mengen von lediglich 2 µg IgG auf die Säule injiziert; in diesem Fall war das Signal/Rauschen-Verhältnis nicht höher als 1:1 (Daten nicht gezeigt). Die maximale Beladungskapazität dieser Säule beträgt ungefähr 400 bis 500 µg IgG (Daten nicht gezeigt), was die bei der Zelllinienauswahl und Herstellung übliche Konzentrationsspanne abdeckt.

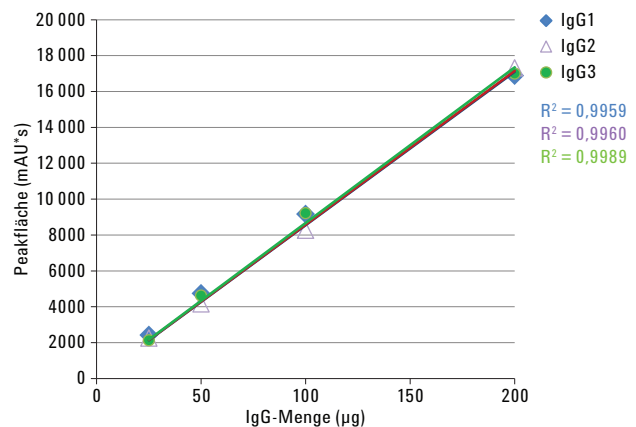


Abbildung 3. Die Bio-Monolith Protein G-Säule von Agilent ist für die Quantifizierung monoklonaler Antikörper geeignet. Die Linearitätskurven beinhalten Peakflächen von 25 bis 200 µg IgG.

Größere Beladungsmengenspanne als die Protein G-Säule eines Drittanbieters

In Abbildung 4A ist ein Vergleich zwischen der Bio-Monolith Protein G-Säule und der Protein G-Säule eines Drittanbieters (2,1× 30 mm, 4000 Å) in Bezug auf die Linearität der IgG3-Beladungsmenge über einen weiten Bereich dargestellt. Die Agilent Säule erzeugte bei Beladungsmengen zwischen 25 und 200 µg IgG3 lineare Daten, die andere Säule, den Empfehlungen

in den Unterlagen des Drittanbieters entsprechend, nur bei 25 bis 100 µg IgG3, da sie bei höheren Beladungsmengen nicht das gesamte Material binden konnte. Tatsächlich erzeugte die Protein G-Säule des Drittanbieters bei Beladung mit 200 µg einen Durchbruch-Peak des mAb (d. h. ein Teil des IgG3 wurde nicht auf der Säule gebunden und eluierte als Durchfluss-Peak), wie in Abbildung 4B gezeigt ist.

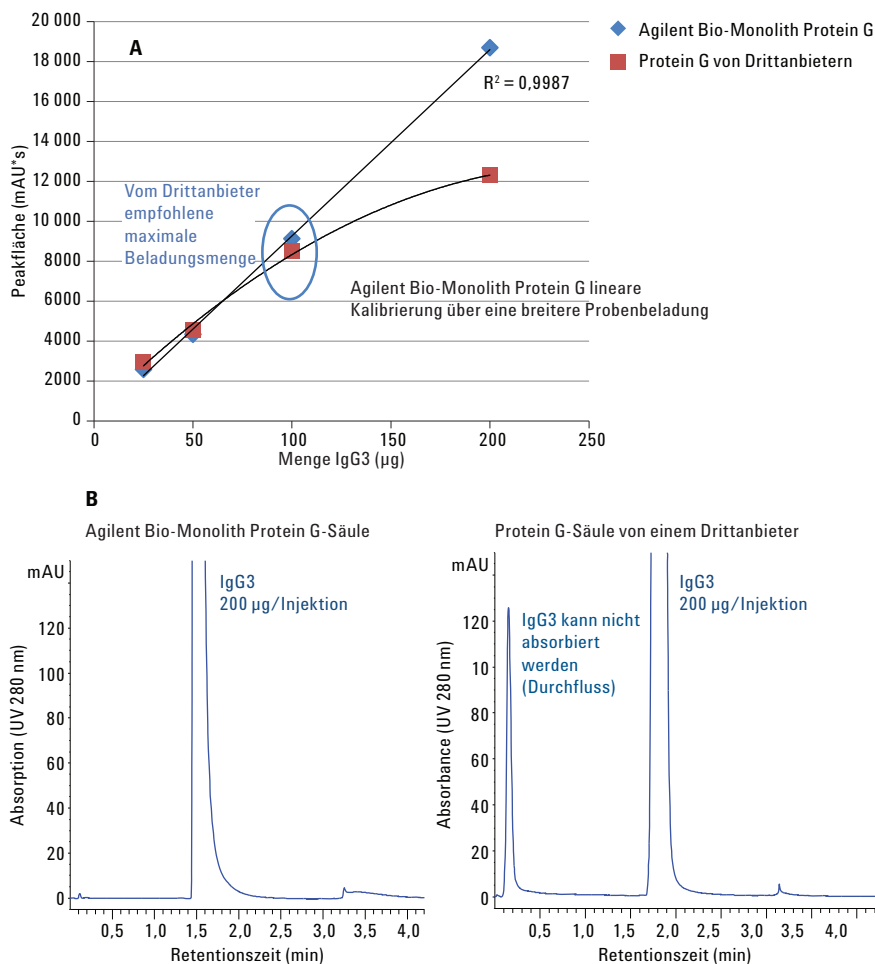


Abbildung 4. A) Vergleich der Linearität der Beladungsmengenspanne zwischen der Bio-Monolith Protein G-Säule von Agilent und der Protein G-Säule eines Drittanbieters. B) Bei Beladung mit 200 µl zeigt die Säule des Drittanbieters einen Durchfluss, der bei der Bio-Monolith Protein G-Säule nicht zu beobachten ist. Die Bio-Monolith Protein G-Säule hat demnach eine höhere Beladungskapazität.

Schnelle Trennungen

Die Bio-Monolith Protein G-Säule ist für schnelle Trennungen ausgelegt. Ihre Fähigkeit zur schnellen Bindung und Elution von mAb bei verschiedenen Flussraten ist in Abbildung 5 mit IgG3 bei Flussraten von 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 ml/min gezeigt (die Säule ist für bis zu 3,0 ml/min geeignet, Daten nicht gezeigt). Tabelle 2

zeigt die Flussraten und Säulengradienten. Bei Erhöhung der Flussrate verkürzte sich die Retention des IgG3-Peaks, jedoch waren die relativen Peakflächen bei allen Flussraten ähnlich. Daraus geht hervor, dass die Säule bei allen Flussraten eine ähnliche Wiederfindung ermöglichte (Tabelle 3).

Tabelle 2. Flussraten und Anwendungsgradienten bei der Beurteilung der Retentionskapazität der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule.

Zeit (Min.)	%A	%B
1,0 ml/min		
0	100	0
0,4	100	0
0,5	0	100
1,7	0	100
1,8	100	0
4,2	100	0
1,5 ml/min		
0	100	0
0,3	100	0
0,4	0	100
1,3	0	100
1,4	100	0
3,0	100	0
2,0 ml/min		
0	100	0
0,2	100	0
0,3	0	110
0,9	0	100
1,0	100	0
2,1	100	0
2,5 ml/min		
0	100	0
0,1	100	0
0,3	0	100
0,7	0	100
0,8	100	0
1,7	100	0

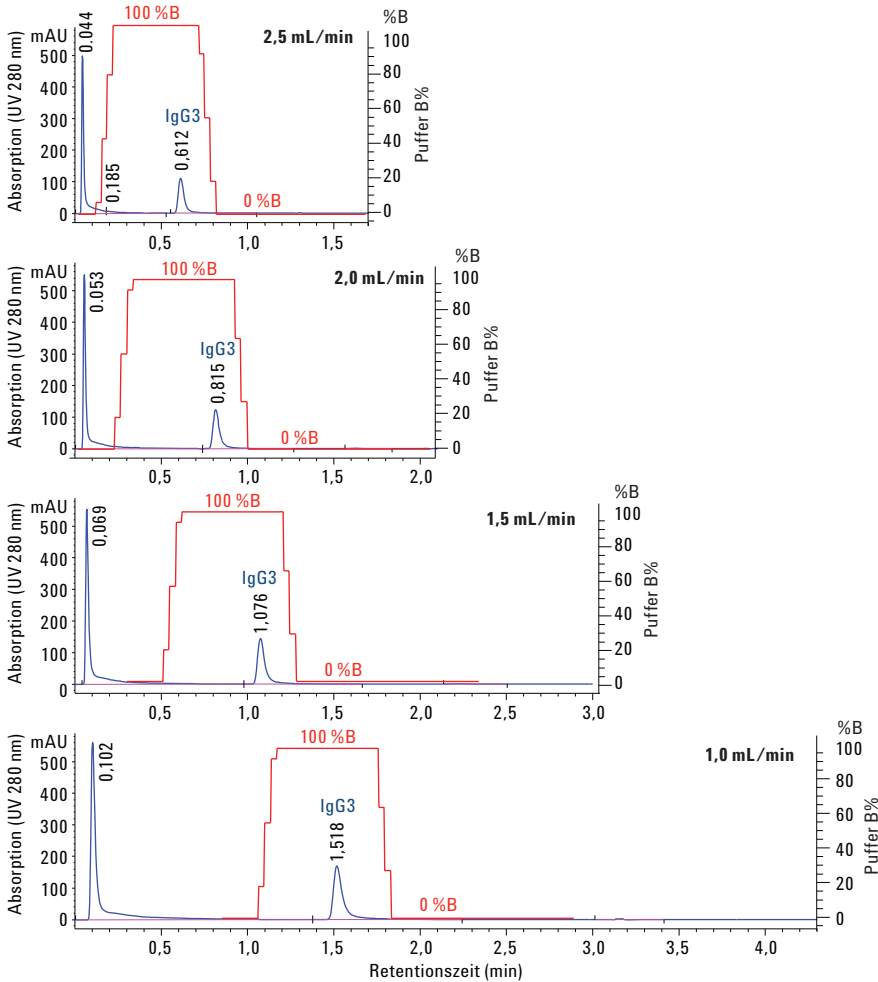


Abbildung 5. Bindung von IgG3 auf der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule bei unterschiedlichen Flussraten. Injektionsmenge: 5 µl (2,0 mg/ml IgG3, gemischt mit 5 mg/ml CHO-Wirtszellproteinen).

Tabelle 3. Der relative prozentuale Durchfluss und die IgG3-Peaks der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule sind bei allen Flussraten ähnlich.

Flussrate (ml/min)	Gesamtfläche (mAU*s)	Durchfluss-Peakfläche (mAU*s)	Relative Durchfluss-Peakfläche (%)	IgG3-Peakfläche (mAU*s)	Relative IgG3-Peakfläche (%)
2,5	798	521	65,3	277	34,7
2,0	1056	709	67,1	347	32,9
1,5	1390	932	67,1	458	32,9
1,0	2069	1392	67,3	677	32,7

Abbildung 6 zeigt die Linearitätskurve des Rückdrucks der Säule. Bei Erhöhung der Flussrate in der Säule in Intervallen von 0,5 ml/min über einen Bereich von 1 bis 2,5 ml/min stieg der Rückdruck linear an. Der maximale Rückdruck der Säule betrug 150 bar. Bei Trennungen mit der Bio-Monolith Protein G-Säule wird typischerweise eine Flussrate von 1,0 ml/min verwendet. Bei eingestellter Geräteflussrate von 1,0 ml/min betrug der Säulenrückdruck ~24 bar. Wurde die Flussrate auf 2,5 ml/min erhöht, stieg der Säulenrückdruck auf ~60 bar. Wie bereits erläutert, war selbst bei maximalem Rückdruck lediglich ein minimaler Einfluss auf die IgG-Bindung auf der Säule festzustellen.

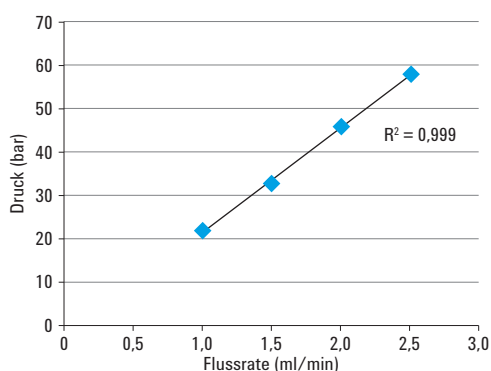


Abbildung 6. Flussrate vs. Rückdruck. Der Rückdruck der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule nahm linear zu, wenn sich auch die Flussrate linear erhöhte.

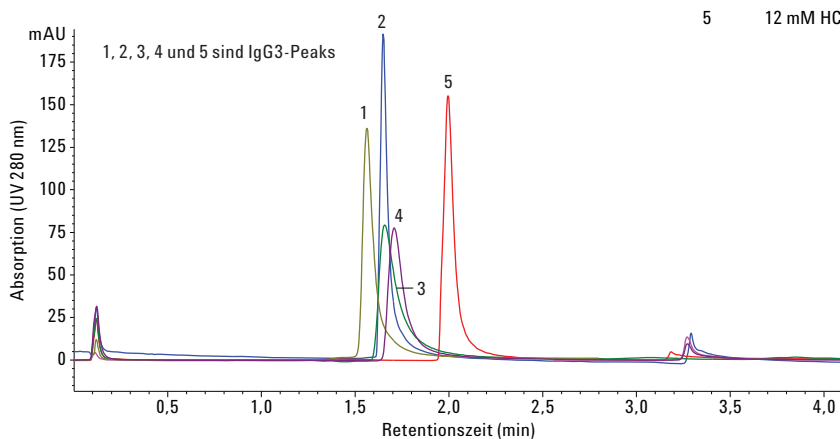


Abbildung 7. Der Peak von humanisierten IgG3 eluierte mit verschiedenen säurehaltigen Lösemitteln aus der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule.

Kompatibilität verschiedener Elutionspuffer

Abbildung 7 zeigt die Kompatibilität der Bio-Monolith Protein G-Säule mit verschiedenen Elutionspuffern. Der IgG3-Peak kann mit zahlreichen säurehaltigen Lösemitteln eluiert werden. Tabelle 4 zeigt die Konzentrationsstärken und pH-Werte der verschiedenen säurehaltigen Lösemittel. Mit diesen Lösemitteln wurde IgG3 (sowie auch andere IgG) mit ähnlichen Retentionszeiten aus der Säule eluiert. Mit 12 mM HCl war die Retention des IgG3-Peaks jedoch im Vergleich zu der Retentionszeit des mit anderen Elutionspuffern eluierten IgG3-Peaks verlängert. Nachdem die Konzentration dieses Elutionspuffers auf 0,1 M erhöht wurde, konnte IgG3 mit einer ähnlichen Retention wie mit anderen Elutionspuffern eluiert werden.

Jedes säurehaltige Lösemittel erzeugte darüber hinaus einen IgG3-Peak mit geringfügig variabler Peakbreite und unterschiedlichem Tailing-Faktor. Daraus ist zu folgern, dass säurehaltige Lösemittel und ihre Konzentration je nach IgG unterschiedlichen Einfluss auf die Retentionszeit sowie auf die Peakbreite und den Tailing-Faktor haben. Daher sind säurehaltige Lösemittel und ihre Konzentrationen in Abhängigkeit vom IgG-Subtyp und den erwarteten Daten experimentell zu bestimmen.

Tabelle 4. Kompatibilität und Auswirkung verschiedener säurehaltiger Lösemittel auf IgG.

Peak-Nr.	Säure	PW	5 % TF	Druck (bar) bei 1 ml/min
1	0,1 M Zitronensäure, pH 2,0	0,058	1,68	24
2	0,1 M HCl	0,053	1,58	24
3	5 % Essigsäure	0,071	1,85	24
4	0,1 M Glycin	0,075	1,82	24
5	12 mM HCl	0,068	1,69	24

Wiederfindung der Säulenleistung nach Reinigung (Clean-in-Place)

Abbildung 8 zeigt, dass die Leistung der Bio-Monolith Protein G-Säule nach einer Reinigung bzw. Clean-in-Place (CIP) vollständig wiederherstellbar ist. Nach über 1000 Injektionen von mit IgG3 versetztem Überstand und Lysat von CHO-Zellen wurde erneut IgG3 auf die Säule injiziert. Daten zeigen, dass die Peakbreite von IgG3 bei Verschmutzung der Säule größer und die Peakhöhe reduziert war (vgl. Abbildung 8A und 8B vor und nach CIP). Außerdem wurde ein Teil des IgG3 nicht von der Säule gebunden

und als Durchfluss-Peak eluiert (Abbildung 8, Panel A).

Nach der Reinigung der Säule wurde deren Leistung zu 100 % wiederhergestellt und IgG3 wieder vollständig gebunden (siehe Abbildung 8B). Abbildung 9 zeigt Vergleichsdaten der Linearität über einen breiten dynamischen Beladungsbereich vor und nach fachgerechter Reinigung der Säule. Die IgG3-Peakflächen vor und nach dem CIP-Verfahren waren weitestgehend vergleichbar und in hohem Maß linear. Aus den Daten geht hervor, dass die Säule mit dem in Tabelle 5 beschriebenen Reinigungsprotokoll effizient gereinigt wurde.

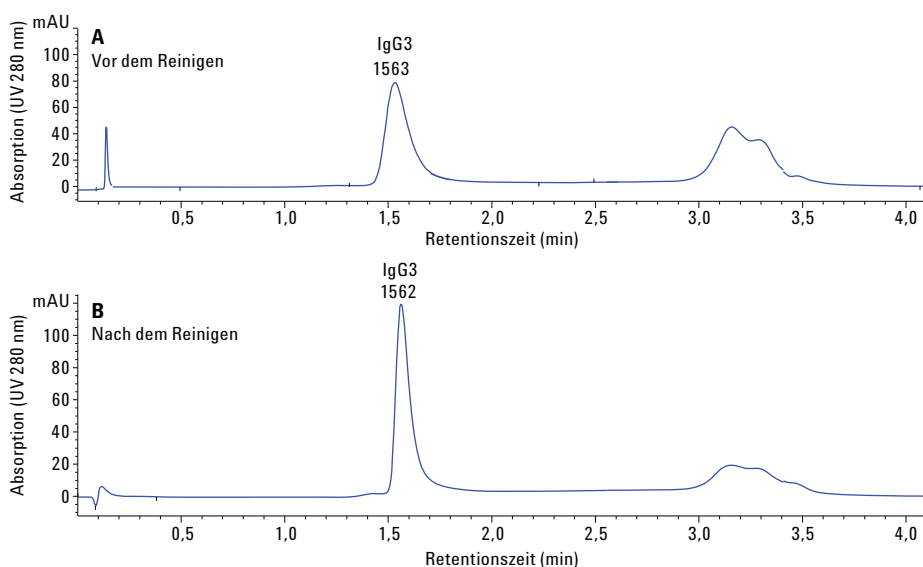


Abbildung 8. A) Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule nach mehr als 1000 Injektionen bei Injektion von IgG3. Die Säule war verschmutzt. B) Die Säule wurde gereinigt und erlangte ihre Leistung zu 100 % wieder.

Tabelle 5. Protokoll zum Reinigen (Clean-in-place, CIP) der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule. Um zu verhindern, dass Verunreinigungen in die anderen Säulenteile gelangen, sollte im ersten Schritt des Protokolls ein Umkehrfluss mit 0,2 bis 0,5 ml/min verwendet werden.

Schritt	Lösung	Waschen, Säulenvolumen (CV)
1	0,1 M NaOH	10 bis 20
2	Entionisiertes Wasser	10 bis 20
3	0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4	10 bis 20
4	Säule erneut mit Bindungspuffer äquilibrieren	50

Mitunter ist die einfache Regeneration der monolithischen Säule nicht ausreichend. Es kommt vor, dass Probenmoleküle nicht vollständig von der Säule eluiert bzw. darin ausgefällt werden. Diese Ansammlung von Verunreinigungen in der Säule kann zu Einbußen in puncto Auflösung und Bindungskapazität, erhöhtem Rückdruck oder kompletter Blockade führen. Je nach Art der in der Probe vorhandenen Verunreinigungen sollte ein spezielles CIP-Protokoll erarbeitet werden. Weitere Vorschläge zur Säulenregeneration sind der Benutzerinformation zu entnehmen.

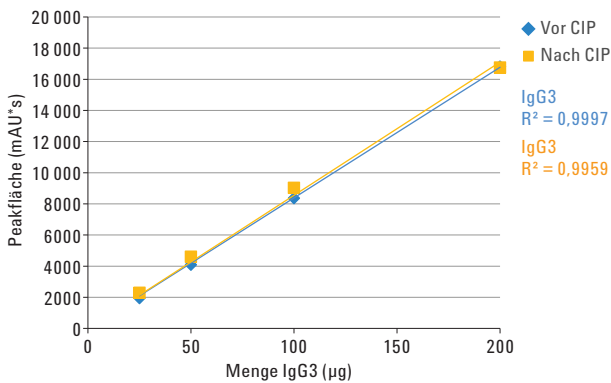


Abbildung 9. Vergleich der Linearität der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule über einen breiten dynamischen Beladungsbereich vor und nach dem CIP-Verfahren.

Lebensdauer und Reproduzierbarkeit

Abbildung 10 und 11 zeigen die Ergebnisse von 1000 aufeinander folgenden Injektionen von IgG3 und CHO-Zellüberständen plus Lysat auf die Bio-Monolith Protein G-Säule. Es wurden 40 Injektionen mit CHO-Zellüberstand plus Lysat und anschließend 10 Injektionen mit IgG3 durchgeführt. Diese Reihenfolge wurde 1000 Injektionen lang beibehalten, ohne die Säule zwischendurch zu reinigen. Die Integrität der Peak-Retentionszeit und der Peakfläche (Abbildung 9) sowie der Tailing-Faktor und die Breite des IgG3-Peaks (Abbildung 10) blieben nahezu unverändert gleich, ohne dass sich in Bezug auf die Leistung der Säule Einbußen in puncto Bindung, Trennung und Elutionskapazität ergaben.

Abbildung 11 zeigt, dass die Peakbreite und der Tailing-Faktor im Verlauf der Studie mit 1000 Injektionen minimale Auswirkungen hatten.

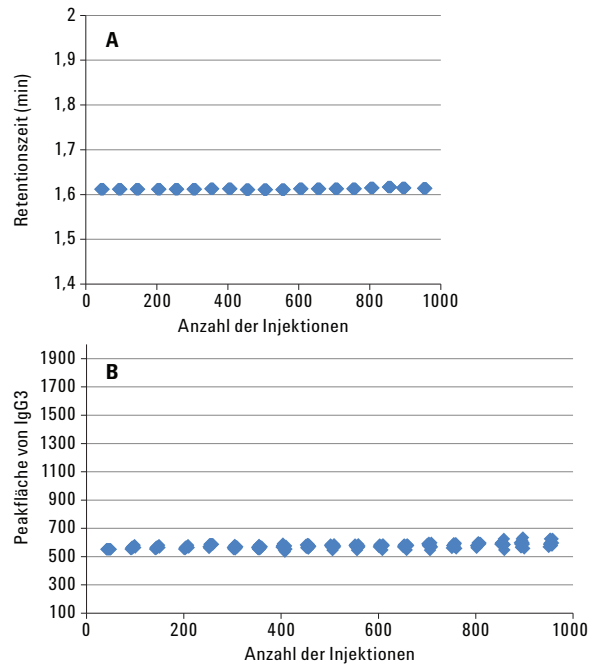


Abbildung 10. Reproduzierbarkeit der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule über 1000 Injektionen ohne Reinigen (Clean-in-Place, CIP). A) Retentionszeit. B) Peakfläche von IgG3. Nach 40 Injektionen wurden zehn Injektionen aufgezeichnet, und es wurden über 1000 Injektionen durchgeführt. Retentionszeit und Peakbreite von IgG3 blieben unverändert (Standardabweichung = 2,5, n = 100).

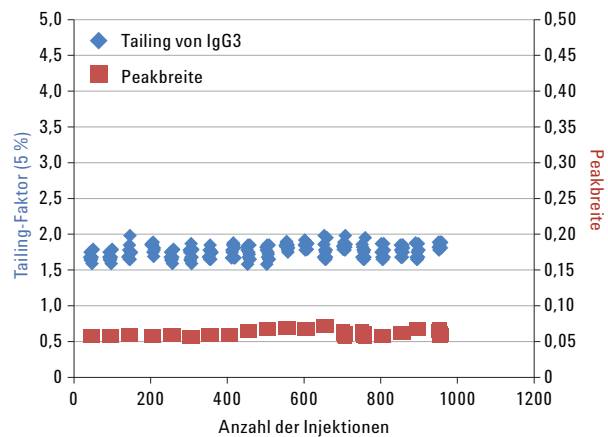


Abbildung 11. Einheitlichkeit der Peakbreite und des Tailing-Faktors des IgG3-Peaks über 1000 Injektionen auf der Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule.

Fazit

Die Agilent Bio-Monolith Protein G-Säule weist hohe Affinität für monoklonale Antikörper verschiedener Subklassen auf. Es können damit mAbs aus Überständen gebunden und genau quantifiziert werden, wobei die Säule eine ausgedehnte lineare Beladungsspanne aufweist. Die Säulen können effektiv verwendet werden, um die Menge eines monoklonalen Antikörpers bei verschiedenen Flussraten zu quantifizieren, ohne dass es zu Dateneinbußen kommt. Der Rückdruck während des Betriebs der Säule war bemerkenswert niedrig, was zeigt, dass die Bio-Monolith Protein G-Säule zusammen mit HPLC-Geräten bei <600 bar betrieben werden kann. Die Flexibilität der Säule in Bezug auf verschiedene säurehaltige Lösemittel macht einen einfachen und direkten Versuchsaufbau möglich. Bio-Monolith Protein A- und G-Säulen von Agilent ergänzen sich daher gegenseitig, da Protein G Affinität für mAbs hat, die nicht an Protein A binden, und *umgekehrt*. Diese Säulen bieten mehr Optionen für die rasche Titerbestimmung einer größeren Bandbreite an mAb-Varianten.

Literatur

1. Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1. Staphylococci protein A by the sera of different animal species. *J. Immunol.* **1982**, *128*, 2300-2305.
2. Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5. In *Molecular Biology Protocols*; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.
3. Anon. CellLytic B Plus Kit. Katalognummer CB0500 und CB0050. Technical Bulletin. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

Weitere Informationen

Diese Daten geben typische Ergebnisse wieder. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015, 2017, 2018
Gedruckt in den USA,
6. Juli 2018
5991-6094DEE



Agilent Technologies