

# Columna Protein G Bio-Monolith: más opciones para la determinación de la titulación de anticuerpos monoclonales (mAb)

## Nota de aplicación

Productos biológicos y biosimilares

### Autor

Phu T. Duong  
Agilent Technologies, Inc.

### Introducción

Durante los últimos años, los anticuerpos monoclonales (mAb) se han convertido en uno de los principales productos biofarmacéuticos en respuesta a la necesidad de tratamiento de varias enfermedades. Estos anticuerpos se han diseñado con una estructura genética específica para aumentar su afinidad por los agentes patógenos. Durante el desarrollo de estos anticuerpos, las columnas analíticas de afinidad Protein A y Protein G se usan para determinar su titulación o concentración a partir de varios sobrenadantes de cultivos celulares para seleccionar el clon más productivo. Se usa un monolito polimérico inerte como soporte tanto para las columnas Protein A como para las columnas Protein G. Ambas columnas tienen una gran afinidad por los anticuerpos y de este modo solo se unen a anticuerpos de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Sin embargo, tienen diferente selectividad, según se indica en la tabla 1

Esta nota de aplicación presenta la columna Agilent Protein G Bio-Monolith. La columna está diseñada para una alta velocidad y una gran capacidad de carga. Se presentan unos datos que demuestran la linealidad con una alta especificidad. Los análisis de linealidad revelan la capacidad de la columna para análisis de cuantificación precisa de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de cultivos celulares. Además, los análisis de datos de vida útil indican que la columna puede ser muy reproducible, y que tiene una vida útil muy larga con una retropresión estable y baja. La columna Protein G Bio-Monolith es complementaria a la columna Protein A Bio-Monolith para proporcionar más opciones para la determinación de la titulación de anticuerpos monoclonales.



**Agilent Technologies**

Tabla 1. Afinidad ligante de las columnas Agilent Protein A y Protein G Bio-Monolith para diferentes subclases de IgG [1,2].

| Anticuerpo                      | Protein A | Protein G |
|---------------------------------|-----------|-----------|
| <b>Humano</b>                   |           |           |
| IgG1 humana                     | ++++      | ++++      |
| IgG2 humana                     | ++++      | ++++      |
| IgG3 humana                     | –         | ++++      |
| IgG4 humana                     | ++++      | ++++      |
| IgA humana                      | ++        | –         |
| IgD humana                      | ++        | –         |
| IgE humana                      | ++        | –         |
| IgM humana                      | ++        | –         |
| <b>Ratón</b>                    |           |           |
| IgG1 de ratón                   | +         | ++        |
| IgG2a de ratón                  | ++++      | ++++      |
| IgG2b de ratón                  | ++++      | +++       |
| IgG3 de ratón                   | +         | +++       |
| IgM de ratón                    | +/-       | –         |
| <b>Fragmentos de anticuerpo</b> |           |           |
| Fab humana                      | +         | +         |
| F(ab') <sub>2</sub> humana      | +         | +         |
| scFv humana                     | +         | +         |
| Fc humana                       | +         | +         |
| K humana                        | +         | +         |
| I humana                        | +         | +         |

++++ = afinidad intensa  
 +++ = afinidad moderada  
 ++ = afinidad débil  
 + = afinidad leve  
 – = afinidad nula

## Materiales y métodos

- Fosfato sódico monobásico monohidrato (Sigma-Aldrich, Corp., ref. S3522) (PM 137,99)
- Fosfato sódico dibásico dihidrato (Sigma, ref. 71643) (PM 177,99)
- Ácido cítrico monohidrato (Sigma, ref. C7129) (PM 210,14)
- Cloruro sódico (Sigma, ref. S5886) (PM 58,44)
- Ácido fosfórico, 85 % peso en H<sub>2</sub>O, 99,99 % con trazas de metal (Aldrich, ref. 345245)
- Solución de hidróxido sódico, 50 a 52 % en agua, eluyente para IC (FLUKA 72064) (PM 40)
- Glicina para electroforesis, ≥99 % (Sigma, ref. G8898) (PM 75,07)
- Ácido acético glacial (Sigma, ref. A9967) (PM 60,05)
- Ácido clorhídrico, 36,5 a 38,0 %, biorreactivo para biología molecular (Sigma, ref. H1758)
- Kit de lisis celular de *Escherichia coli* (Sigma ref. CB0500).

- Sobrenadante y lisado de células CHO (ovario de hámster chino), sobrenadante de células de insecto, anticuerpo monoclonal derivado de células CHO humanizado (IgG2 e IgG3) de CreativeBio Labs.

## Método

La fase móvil A es el tampón ligante y de lavado, con tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7,4. Las dos soluciones madre (0,2 M) se hacen a partir de 27,6 g de fosfato sódico monobásico monohidrato en 1 l de agua desionizada, y 35,6 g de fosfato sódico dibásico dihidrato también en 1 l de agua desionizada.

Para hacer 2 l de fosfato sódico con tampón fosfato sódico 50 mM y cloruro de sodio 50 mM, pH 7,0:

1. Mezclar 195 ml de la solución madre de fosfato sódico monobásico monohidrato y 305 ml de solución madre de fosfato sódico dibásico dihidrato. Agitar usando un agitador magnético.
2. Añadir 5,8 g de cloruro de sodio y seguir agitando.
3. Añadir 1 l de agua desionizada.
4. Medir el pH de la solución, y ajustar hasta pH 7,0 con NaOH o ácido fosfórico 3 M.
5. Verter la solución en un matraz volumétrico de 2 l y añadir agua hasta la marca.

La fase móvil B es el tampón de elución que contiene ácido cítrico 0,1 M, pH 2,0, obtenido disolviendo 21 g de ácido cítrico monohidrato en unos 600 ml de agua agitando suavemente. Ajustar a pH 2,0 con HCl 1 M y después diluir la solución con agua hasta 1 l en un matraz volumétrico.

El sobrenadante de células CHO, el lisado, el lisado de células de insecto (se dio un pulso en centrífuga a todas las muestras) y las inmunoglobulinas monoclonales humanizadas IgG1, IgG2, e IgG3 se compraron a Creative BioLabs, New York. *El lisado de Escherichia coli* se preparó siguiendo las recomendaciones del protocolo de Sigma-Aldrich, Corp [3]. El kit contiene un reactivo de lisis bacteriana CellLytic B, (500 ml), solución de lisozima (10 × 1 ml), benzonasa (25.000 unidades), y un cóctel inhibidor de proteasas (5 ml). El lisado se prepara añadiendo 1,0 g de pasta celular a 10 ml de reactivo CellLytic B, 0,2 ml de lisozima, 0,1 ml de inhibidores de proteasas y 500 unidades de benzonasa. La mezcla se prepara haciendo un vórtex brevemente y se mezcla durante 10 minutos (a mano o con el agitador) para garantizar una mayor extracción de las proteínas solubles. La mezcla se centrifuga a 5.000 g durante 10 minutos para sedimentar los materiales insolubles. La fracción de proteína soluble (sobrenadante) se separa con cuidado de los restos celulares (sedimento en el fondo del tubo). La concentración de proteína del sobrenadante puede estimarse usando el ensayo de Bradford para medir proteínas, en este caso fueron 40 mg/ml.

A parte del sobrenadante se le adicionó IgG1, IgG2 o IgG3 tal y como se describe. Los sobrenadantes se diluyeron con tampón ligante (o tampón A) hasta una concentración final de 10 mg/ml, y se añadieron 2 mg/ml de un anticuerpo monoclonal único humanizado como IgG1, IgG2 o IgG3.

## Condiciones

Columna: Columna Agilent Protein G Bio-Monolith, 5,2 de diámetro, 4,95 mm de longitud (ref. 5190-6900).

Tampón ligante: A, 50 mM de fosfato de sodio, pH 7.

Tampón de elución: B, Ácido cítrico 0,1 M a pH 2,0

Muestra: consultar los cromatogramas

Vol. iny.: consultar los cromatogramas

Velocidad de flujo: 1,0 ml/min (o consultar los cromatogramas)

| Gradiente: | Tiempo (min) | % A |
|------------|--------------|-----|
|            | 0            | 100 |
|            | 0,4          | 100 |
|            | 0,5          | 0   |
|            | 2,0          | 0   |
|            | 2,1          | 100 |
|            | 4,2          | 100 |

Temperatura: 25 °C

Detector: UV, 280 nm

Sistema: LC cuaternario bioinerte Agilent 1260 Infinity

## Resultados y debate

### Especificidad y selectividad

Como se indica en la tabla 1, la columna Protein G tiene una mayor afinidad de unión para las diferentes subclases de anticuerpos monoclonales humanizados que la columna Protein A, y solo la columna Protein G tiene afinidad por la subclase IgG3. Los datos de la figura 1A demuestran la especificidad de la columna Protein G Bio-Monolith y su capacidad para monitorizar la titulación, es decir, la presencia y concentración de anticuerpos en el sobrenadante. Se inyectó en la columna la muestra con el anticuerpo monoclonal humanizado recombinante purificado, IgG3, que se adicionó en el sobrenadante de las células CHO. Este anticuerpo monoclonal se expresó en la línea celular CHO. Los datos muestran que la IgG3 fue la única proteína capturada y eluida de la columna, aproximadamente a los 1,6 minutos a 1,0 ml/min, mientras que la columna no capturó ninguna proteína de la célula hospedadora, y eluyó en el pico no retenido.

Para demostrar la diferente selectividad entre las columnas Protein A y Protein G se inyectaron en ambas, por separado, anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2 e IgG3. Las dos columnas capturaron tanto a IgG1 como a IgG2 (datos no mostrados) pero la columna Protein A Bio-Monolith no capturó la IgG3. La IgG3 eluyó como un pico no retenido, y la IgG3 solo fue capturada y eluida por la columna Protein G Bio-Monolith (comparar las figuras 1A y 1B).

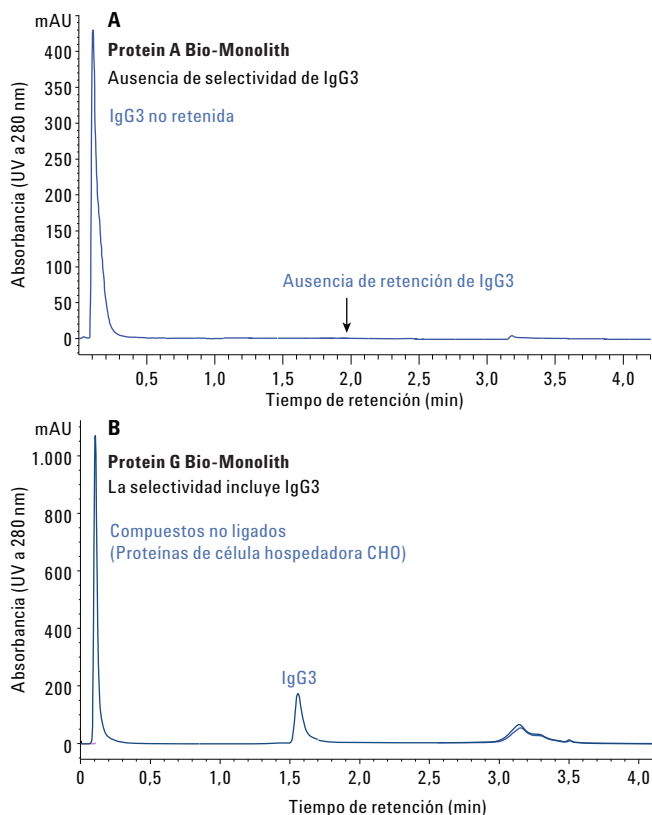


Figura 1. A) Ausencia de unión de IgG3 en la columna Protein A Bio-Monolith. La IgG3 eluyó como un pico no retenido. 2 mg/ml de IgG3 humanizada mezclada con tampón ligante (se inyectaron 3 µl en la columna). B) La columna Agilent Protein G Bio-Monolith capturó rápidamente solo la IgG3 de un cultivo celular adicionado con IgG3 (se inyectaron 5 µl de 2,0 mg/ml de IgG3 mezclada con 10 mg/ml de sobrenadante de células CHO en la columna).

Se realizó una prueba más robusta para confirmar que la especificidad de la columna Protein G Bio-Monolith era tal que no tenía afinidad de unión por las proteínas de la célula hospedadora. Se usaron muestras de las proteínas de la célula hospedadora del lisado celular de *E. coli*, del lisado de células CHO, del sobrenadante y del lisado de células de insecto. Estos lisados contienen proteínas de la célula hospedadora que se extrajeron utilizando tampones de lisis que contenían dodecil sulfato sódico, un reactivo químico que afecta mucho a las uniones no específicas a la columna. Estas muestras no contenían anticuerpos, solo proteínas de la célula hospedadora. Esta prueba se realizó porque las muestras complicadas dan resultados no específicos si la columna no está bien diseñada. La figura 2 no muestra evidencias de que ninguna proteína del sobrenadante de la célula hospedadora se adhiera a la columna. Todas las proteínas de la célula hospedadora eluyeron en picos no retenidos. Los datos sugieren que la columna Protein G Bio-Monolith no tuvo afinidad por las proteínas de la célula hospedadora.

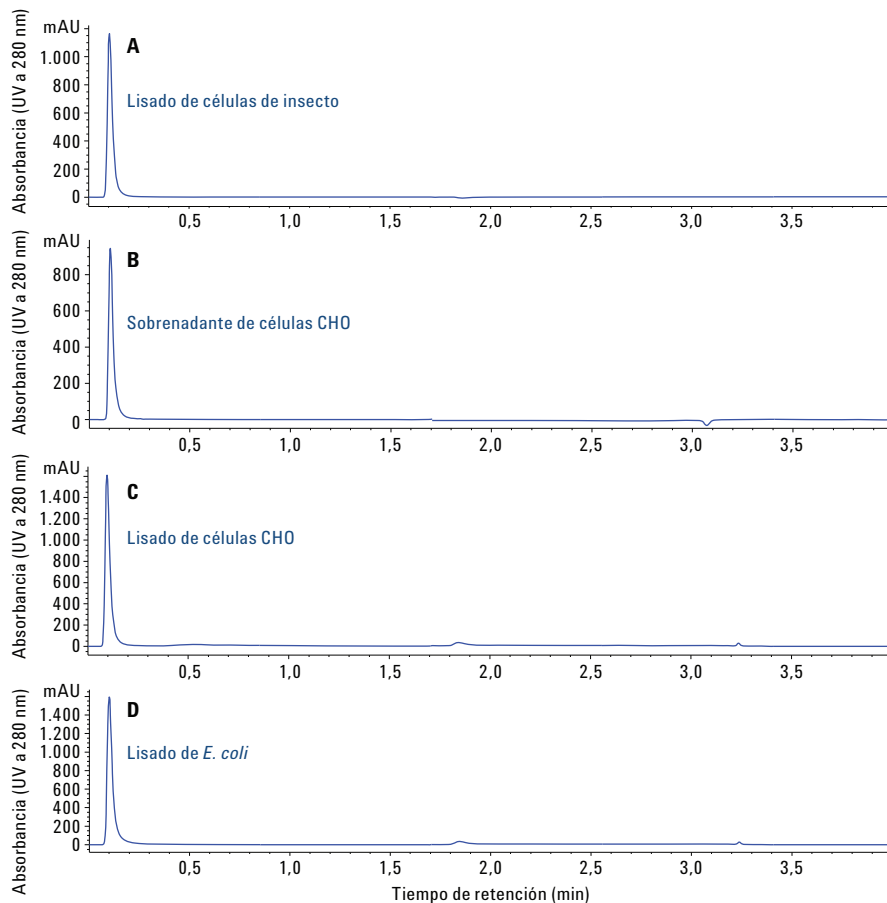


Figura 2. Análisis de especificidad usando la columna Agilent Protein G Bio-Monolith con 10 mg/ml de proteínas de la célula hospedadora diluidas con el tampón ligante. El volumen de inyección fue de 5 µl para todas las muestras. A) lisado de células de insecto, B) sobrenadante de células CHO, C) lisado de células CHO, D) lisado de *E. coli*.

### Cuantificación precisa

La cuantificación precisa de la titulación de anticuerpos monoclonales es esencial durante las etapas iniciales de desarrollo, cuando se selecciona la línea celular, y también durante la fabricación cuando la cantidad de anticuerpo monoclonal en el sobrenadante del cultivo celular determina el tiempo de recogida óptimo. Para demostrar la capacidad de la columna Protein G Bio-Monolith de cuantificar con precisión los anticuerpos monoclonales, se inyectaron en la columna cantidades diferentes (µg) de IgG purificadas. Se usaron los datos de las áreas de pico en comparación con las cantidades de IgG generadas para construir las líneas de linealidad, para determinar la precisión del análisis. La figura 3 muestra la linealidad de las áreas de pico de la columna Protein G, y muestran que la columna puede utilizarse para cuantificar anticuerpos monoclonales en los medios de cultivo celular recogidos con diferentes intervalos de concentración. En las columnas se inyectaron tan solo 2 µg de IgG. La relación señal-ruido no fue mayor que 1:1 a 2 µg (datos no mostrados). La capacidad de carga máxima para esta columna es de aproximadamente 400 a 500 µg de IgG (datos no mostrados), lo que cubre el intervalo de concentraciones logradas durante la selección y producción de la línea celular.

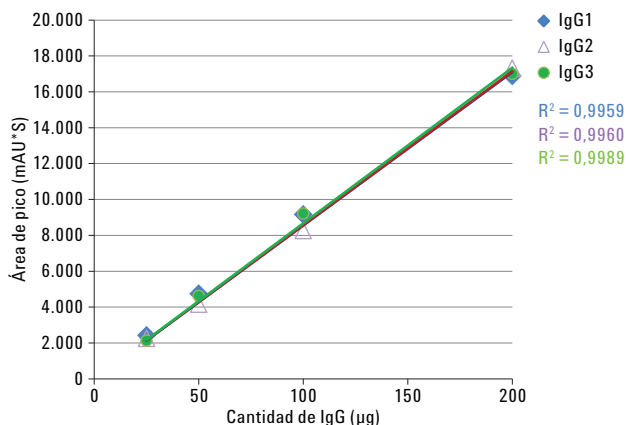


Figura 3. La columna Agilent Protein G Bio-Monolith cuantifica anticuerpos monoclonales. Las rectas de linealidad incluyen datos de las áreas de pico de 25 a 200 µg de IgG.

## Un mayor rango de carga que las columnas de proteína G de otros proveedores

La figura 4A muestra la comparación de linealidad para un amplio rango de carga de IgG3 entre la columna Protein G Bio-Monolith y una columna de proteína G de 2,1× 30 mm, 4,000Å de otro proveedor. La columna de Agilent generó un rango de carga lineal de 25 a 200 µg de IgG3, mientras que la otra columna solo pudo generar datos lineales entre 25 y 100 µg de IgG3, según lo

recomendado por la literatura del otro proveedor. El motivo para no tener una línea lineal en un mayor rango de carga era porque la columna no era capaz de retener todo el material en el rango de carga más alto. De hecho, en un rango de carga de 200 µg, la columna de proteína G del otro proveedor tuvo un pico de rendimiento para el anticuerpo monoclonal (algunas IgG3 no quedaron retenidas en la columna y se eluyeron como un pico no retenido), según se muestra en la figura 4B.

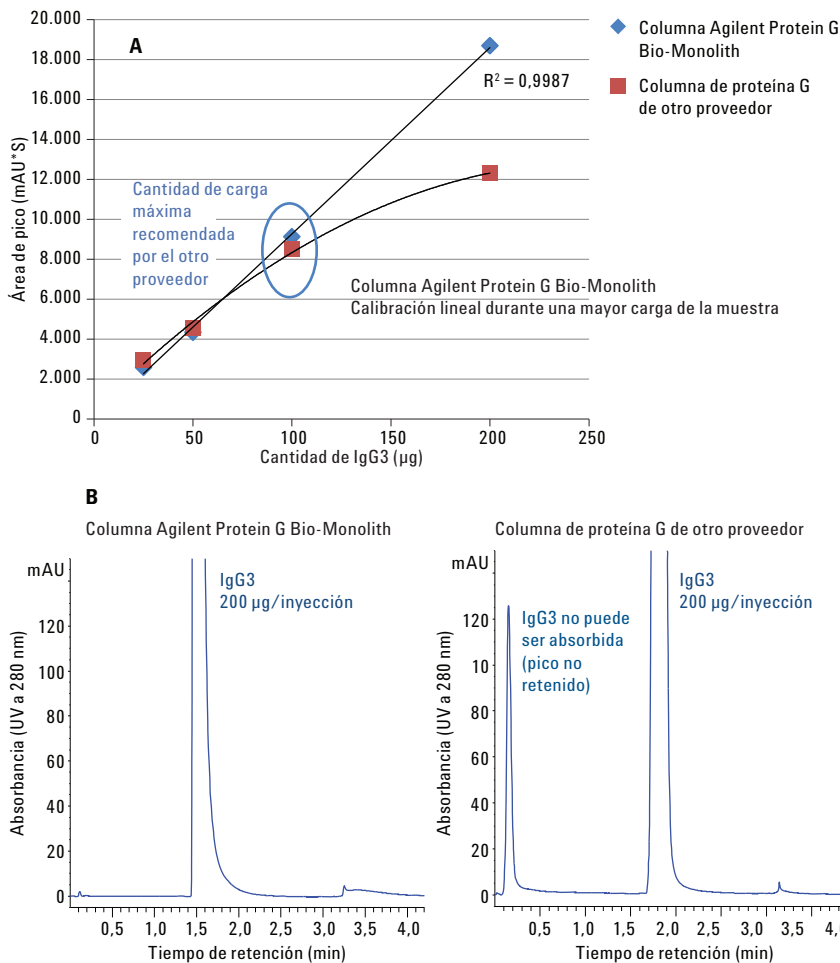


Figura 4. A) Comparación del rango de carga lineal entre la columna Agilent Protein G Bio-Monolith y la columna de proteína G de otro proveedor. B) En una carga de 200 µl, la columna del otro proveedor muestra un pico no retenido que no se observa con la columna Protein G Bio-Monolith. De este modo, la columna Protein G Bio-Monolith tiene una mayor capacidad de carga.

## Separaciones rápidas

La columna Protein G Bio-Monolith está diseñada para separaciones rápidas. Su capacidad para capturar y eluir rápidamente anticuerpos monoclonales a diferentes velocidades de flujo se demuestra con IgG3 en la figura 5, con velocidades de flujo de 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 ml/min (la columna puede manejarse

hasta 3,0 ml/min, datos no mostrados). La tabla 2 muestra las velocidades de flujo y los gradientes de funcionamiento. La retención del pico de IgG3 se acortó cuando se aumentó la velocidad de flujo. Sin embargo, las áreas de pico relativas entre todas las velocidades de flujo fueron similares. Esto indica que la columna generó una recuperación similar en todas las velocidades de flujo (tabla 3).

Tabla 2. Velocidades de flujo y gradientes de funcionamiento usados para evaluar la capacidad de retención de la columna Agilent Protein G Bio-Monolith.

| Tiempo (min)      | %A  | %B  |
|-------------------|-----|-----|
| <b>1,0 ml/min</b> |     |     |
| 0                 | 100 | 0   |
| 0,4               | 100 | 0   |
| 0,5               | 0   | 100 |
| 1,7               | 0   | 100 |
| 1,8               | 100 | 0   |
| 4,2               | 100 | 0   |
| <b>1,5 ml/min</b> |     |     |
| 0                 | 100 | 0   |
| 0,3               | 100 | 0   |
| 0,4               | 0   | 100 |
| 1,3               | 0   | 100 |
| 1,4               | 100 | 0   |
| 3,0               | 100 | 0   |
| <b>2,0 ml/min</b> |     |     |
| 0                 | 100 | 0   |
| 0,2               | 100 | 0   |
| 0,3               | 0   | 110 |
| 0,9               | 0   | 100 |
| 1,0               | 100 | 0   |
| 2,1               | 100 | 0   |
| <b>2,5 ml/min</b> |     |     |
| 0                 | 100 | 0   |
| 0,1               | 100 | 0   |
| 0,3               | 0   | 100 |
| 0,7               | 0   | 100 |
| 0,8               | 100 | 0   |
| 1,7               | 100 | 0   |

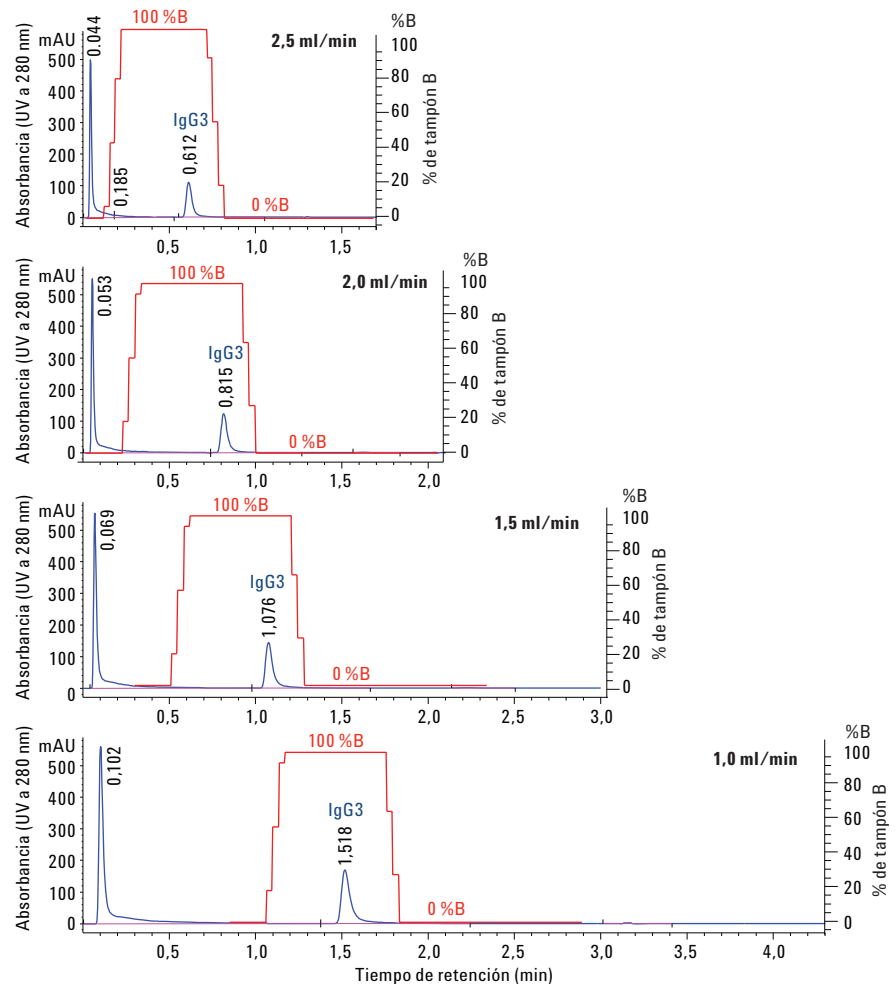


Figura 5. Unión de IgG3 en la columna Agilent Protein G Bio-Monolith evaluada a varias velocidades de flujo. Inyección de 5  $\mu$ l (2,0 mg/ml de IgG3 mezclada con 5 mg/ml de proteínas de la células hospedadoras CHO-).

Tabla 3. La columna Agilent Protein G Bio-Monolith muestra porcentajes relativos similares de picos no retenidos y picos de IgG3 en todas las velocidades de flujo.

| Velocidad de flujo (ml/min) | Área total (mAU*S) | Área de pico no retenido (mAU*S) | Área relativa de pico no retenido (%) | Área de pico de IgG3 (mAU*S) | Área relativa de pico de IgG3 (%) |
|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 2,5                         | 798                | 521                              | 65,3                                  | 277                          | 34,7                              |
| 2,0                         | 1.056              | 709                              | 67,1                                  | 347                          | 32,9                              |
| 1,5                         | 1.390              | 932                              | 67,1                                  | 458                          | 32,9                              |
| 1,0                         | 2.069              | 1392                             | 67,3                                  | 677                          | 32,7                              |

La figura 6 muestra la recta de linealidad de la retropresión de la columna. Cuando se probó la columna en un rango de carga de 0,5 ml/min, aumentando de 1 a 2,5 ml/min, la retropresión aumentó linealmente. La columna admite una retropresión máxima de 150 bar. Una velocidad de flujo de separación típica de la columna Protein G Bio-Monolith es de 1,0 ml/min. Con la velocidad de flujo del instrumento ajustada a 1,0 ml/min, la retropresión de la columna fue de unos 24 bar. Cuando la velocidad de flujo aumentó hasta 2,5 ml/min, la retropresión de la columna aumentó hasta unos 60 bar. Hubo un efecto mínimo sobre la unión de IgG en la columna en la retropresión máxima, como se indica anteriormente.

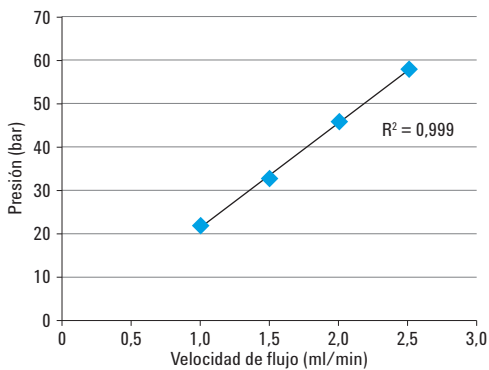


Figura 6. Velocidad de flujo en función de la retropresión La retropresión de la columna Agilent Protein G Bio-Monolith aumentó linealmente cuando la velocidad de flujo también aumentó linealmente.

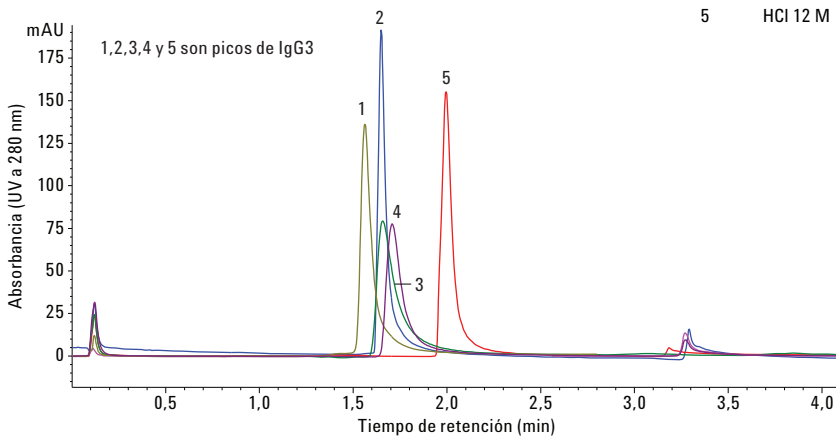


Figura 7. Pico de IgG3 humanizada eluida de una columna Agilent Protein G Bio-Monolith mediante diferentes eluyentes ácidos.

### Compatibilidad de diferentes tampones de elución

La figura 7 muestra la compatibilidad con diferentes tampones de elución para la columna Protein G Bio-Monolith. El pico de IgG3 puede eluirse mediante muchos eluyentes ácidos diferentes. La tabla 4 muestra las fuerzas y el pH de los eluyentes ácidos. Estos eluyentes son capaces de eluir IgG3 de la columna con tiempos de retención similares (también se observaron datos similares para otras IgG), salvo con HCl 12 mM. La retención del pico de IgG3 fue mayor, en comparación con el tiempo de retención del pico de IgG3 eluido por otros tampones de elución. Este tampón de elución, cuando se aumentó su concentración a 0,1 M, obtuvo la fuerza suficiente para eluir IgG3 con una retención similar al de otros tampones de elución.

También cabe destacar que cada eluyente ácido generó un pico de IgG3 con una anchura de pico y un factor de cola ligeramente diferentes. Se sugiere que dependiendo de la IgG, los eluyentes ácidos y sus fuerzas influirán de manera diferente en el tiempo de retención así como en la anchura de pico y el factor de cola. Por lo tanto, dependiendo de la IgG y las expectativas de los datos, los eluyentes ácidos y sus concentraciones deben determinarse experimentalmente.

Tabla 4. Compatibilidad y efecto de diferentes eluyentes ácidos sobre IgG

| Pico n.º | Ácido                        | Ancho de pico (PW) | Factor de cola (TF) del 5 % a 1 ml/min | Presión (bar) |
|----------|------------------------------|--------------------|--|---------------|
| 1        | Ácido cítrico 0,1 M a pH 2,0 | 0,058              | 1,68                                   | 24            |
| 2        | HCl 0,1 M                    | 0,053              | 1,58                                   | 24            |
| 3        | 5 % de ácido acético         | 0,071              | 1,85                                   | 24            |
| 4        | Glicina 0,1 M                | 0,075              | 1,82                                   | 24            |
| 5        | HCl 12 M                     | 0,068              | 1,69                                   | 24            |

## Recuperación del rendimiento de la columna después de una limpieza in situ.

La figura 8 muestra cómo la columna Protein G Bio-Monolith puede recuperar todo su rendimiento después de una limpieza in situ (CIP). Se inyectó IgG3 en la columna y después se inyectaron más de 1000 inyecciones con IgG3 adicionada en el sobrenadante y el lisado de células CHO. Los datos muestran que cuando la columna estaba sucia la anchura de pico de IgG3 era mayor y que la altura de pico era menor (compare las figuras 8A y 8B, antes y después de la limpieza in situ). Los datos también muestran que

algunas IgG3 no fueron capturadas por la columna y que se eluyeron como un pico no retenido (figura 8, panel A). Después de limpiar la columna, esta volvió a recuperar su rendimiento total e IgG3 fue capturada por completo (consultar figura 8B). La figura 9 muestra los datos de comparación de linealidad de un amplio rango dinámico de carga antes y después de haber limpiado adecuadamente la columna. Las áreas de pico de IgG3 de antes y después de la limpieza in situ fueron muy comparables y altamente lineales. Los datos indicaron que la columna se limpió eficazmente y de manera compatible con el protocolo de limpieza descrito en la tabla 5.

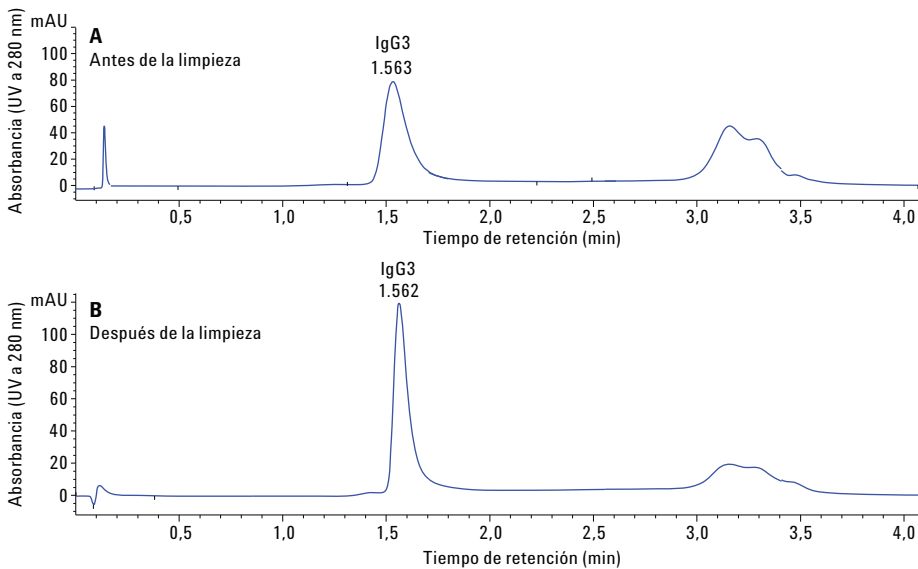


Figura 8. A Inyección de IgG3 en una columna Agilent Protein G Bio-Monolith después de más de 1000 inyecciones. La columna estaba sucia b) Se limpió la columna y recuperó todo su rendimiento

Tabla 5. Protocolo de limpieza in situ de una columna Agilent Protein G Bio-Monolith para evitar que entren contaminantes al resto de la columna, se debe invertir el sentido del flujo durante el primer paso del protocolo de 0,2 a 0,5 ml/min.

| Paso | Solución                                   | Volumen de lavado de la columna (CV) |
|------|--|--------------------------------------|
| 1    | NaOH 0,1 M                                 | 10 a 20                              |
| 2    | Agua desionizada                           | 10 a 20                              |
| 3    | Tampón fosfato sódico 0,5 M a pH 7,4       | 10 a 20                              |
| 4    | Reequilibrar la columna con tampón ligante | 50                                   |

En algunos casos, la simple regeneración de la columna monolítica no es suficiente. Las moléculas de la muestra podrían no eluir completamente de la columna o podrían precipitar en ella. Esta acumulación de contaminantes en la columna puede provocar una pérdida de resolución y de la capacidad ligante, un aumento de la retropresión o un bloqueo completo. Debe establecerse un protocolo de limpieza in situ específico según el tipo de contaminantes presentes en la muestra. Dispone de más sugerencias de regeneración en la guía del usuario.

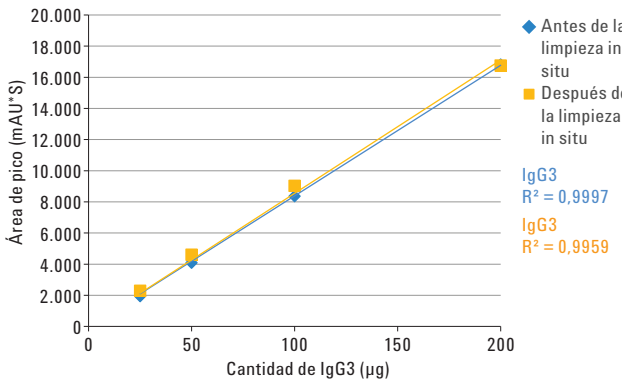


Figura 9. Comparación de la linealidad lograda por la columna Agilent Protein G Bio-Monolith a lo largo de un rango dinámico de carga

### Vida útil y reproducibilidad

Las figuras 10 y 11 muestran los resultados de 1000 inyecciones consecutivas de IgG3 y sobrenadantes de células CHO más lisados en la columna Protein G Bio-Monolith. La columna recibió 40 inyecciones con sobrenadante de células CHO más lisado, y después 10 inyecciones de IgG3. Esta secuencia se repitió durante 1000 inyecciones de manera continuada sin realizar limpiezas. La integridad del pico de tiempo de retención y del área de pico (figura 9) así como el factor de cola del pico y la anchura de pico de IgG3 (figura 10) permaneció casi sin cambios, sin comprometer al rendimiento de la columna en términos de unión, separación y capacidad de elución.

La figura 11 muestra que la anchura de pico y el factor de cola tuvieron un impacto mínimo durante este estudio con 1000 inyecciones.

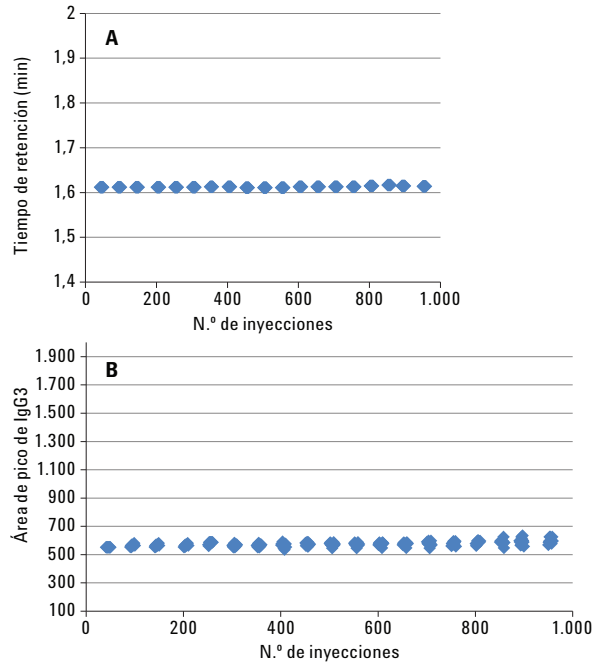


Figura 10. Reproducibilidad de la columna Agilent Protein G Bio-Monolith durante 1000 inyecciones sin limpieza in situ A) Tiempo de retención. B) Área de pico de IgG3. Se registraron diez inyecciones después de 40 inyecciones, y se realizó durante 1000 inyecciones. El tiempo de retención y la anchura de pico de IgG3 no variaron (desviación estándar = 2,5, n = 100).

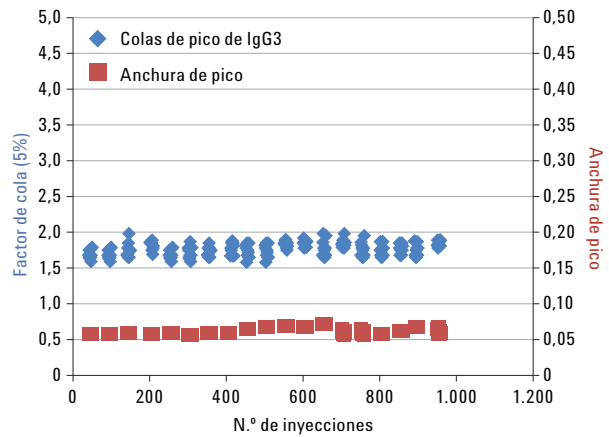


Figura 11. Uniformidad de la anchura de pico y del factor de cola del pico de IgG3 durante 1000 inyecciones en una columna Agilent Protein G Bio-Monolith

## Conclusiones

La columna Agilent Protein G Bio-Monolith tiene una gran afinidad por las subclases de anticuerpos monoclonales. Es evidente que la columna puede capturar y cuantificar con precisión a lo largo de un amplio rango linealidad de carga los anticuerpos monoclonales procedentes de sobrenadantes. Las columnas pueden usarse eficazmente para cuantificar la cantidad de anticuerpos monoclonales con varias velocidades de flujo sin sacrificar los datos. La retropresión de funcionamiento fue significativamente baja, lo que ilustra que la columna Protein G Bio-Monolith puede utilizarse con instrumentos HPLC de <600 bar. La flexibilidad de la columna con diferentes eluyentes ácidos permite crear diseños experimentales fáciles y sencillos. Las columnas Agilent Protein A y Protein G Bio-Monolith son de este modo complementarias, así, la columna Protein G tiene afinidad por anticuerpos monoclonales que no se unen a la columna Protein A y *viceversa*. Estas columnas proporcionan más opciones para una determinación de la titulación rápida para una mayor gama de variantes de anticuerpos monoclonales.

## Referencias

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. Referencias CB0500 y CB0050. Folleto técnico. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

## Más información

Estos datos representan unos resultados típicos Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015, 2017, 2018  
Impreso en EE. UU.  
el 6 de julio de 2018  
5991-6094ES



**Agilent Technologies**