

用于 2D-LC/MS mAb 分析中在线脱盐的 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱

应用简报

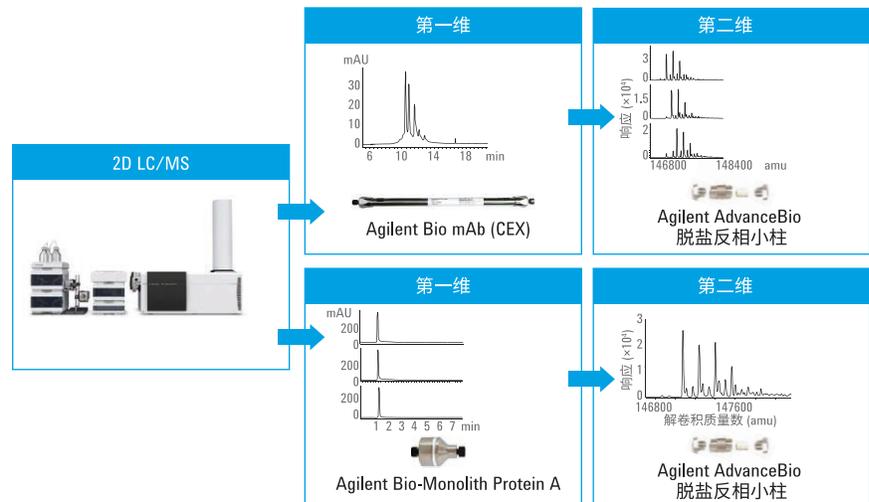
生物治疗药物与生物制药

作者

Suresh Babu C.V. 和 Ravindra Gudihal
安捷伦科技公司

摘要

本应用简报介绍了在第二维中使用脱盐小柱并利用 2D-LC/MS 配置进行单克隆抗体 (mAb) 的脱盐 and 表征。第一维分离中使用了离子交换 (IEX) 和亲和色谱 (主要是基于盐的洗脱条件)。在第二维中, 在进行质谱分析之前使用 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱对馏分脱盐。结果表明脱盐小柱具有出色的性能, 可提供高质量的质谱数据。



用于单克隆抗体表征的 2D-LC/MS 工作流程示例



Agilent Technologies

前言

单克隆抗体 (mAb) 治疗性药物是制药行业中一个不断发展的领域。这些分子的性质十分复杂，且在开发过程和整个生命周期中经历了各种酶或化学修饰。这些修饰会造成异质性，包括裂解、翻译后修饰 (PTM)、降解、聚集和序列变异。因此，必须通过全面的理化表征确保产品的安全性、质量和药效。多维液相色谱 (2D-LC) 与质谱 (MS) 的联用技术是表征不同 mAb 异构体的最佳分析技术。亲和、离子交换 (IEX) 和体积排阻色谱 (SEC) 等技术常用于第一维分离。这些液相色谱技术中采用的典型流动相为水相，并含有与质谱检测不兼容的非挥发性盐分。为了鉴定这些通过质谱实现分离的色谱峰，在第二维中采用了在线脱盐方法。

本应用简报介绍了使用 AdvanceBio 脱盐反相小柱作为在线脱盐柱在第二维中对 mAb 进行分析。第一维液相色谱使用 IEX 表征电荷异构体，此外，使用 Protein A 色谱柱的亲和捕获功能对不同 mAb 样品（包括创新药物和生物仿制药）进行分析。结果表明 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱具有出色的性能，可提供高质量的质谱数据。

实验部分

样品

治疗性单克隆抗体 mAb1 (创新药物)、mAb2 (生物仿制药) 和 mAb3 (创新药物) 购自当地药店，并根据制造商的说明进行储存。所有试剂均为液相色谱级。

仪器

使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案，包括以下模块：

- Agilent 1260 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A) 及 1290 Infinity 柱温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (2X G1316C)

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A) 和 2 位/4 通双向阀 (二维液相色谱阀头, G4236A)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (2X G1170A) 和配备 40 μ L 定量环的多中心切割阀 (2x G4242-64000)
- 配备 10 mm 流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (2x G1315C)
- Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS (G6530A)

图 1 显示了 2D-LC/MS 配置的设置。

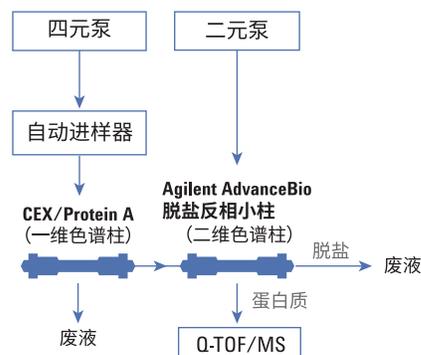


图 1. 2D-LC/MS 配置的示意图

色谱条件

多中心切割 2D-LC/MS 分析 (IEX \rightarrow 脱盐-RP; 亲和 \rightarrow 脱盐-RP)	
第一维泵 (IEX)	
溶剂 A	水
溶剂 B	NaCl (850.0 mM)
溶剂 C	NaH ₂ PO ₄ (41.0 mM)
溶剂 D	NaH ₂ PO ₄ (55.0 mM)
流速	0.75 mL/min
梯度	使用安捷伦缓冲液顾问软件计算出的盐梯度 (缓冲液: 30 mM, pH: 6.3, NaCl: 0-161.5 mM) 0 min: 30.3% A, 0.0% B, 59.6% C, 10.1% D 2 min: 26.0% A, 5.0% B, 56.9% C, 12.1% D 8 min: 21.5% A, 10.0% B, 54.9% C, 13.6% D 20 min: 13.3% A, 19.0% B, 51.9% C, 15.8% D 35 min: 30.3% A, 0.0% B, 59.6% C, 10.1% D
后运行时间	10 min

色谱条件 (续)

第一维泵 (Protein A, 亲和)	
溶剂 A	20 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4
溶剂 B	0.5 M 乙酸
流速	1 mL/min
梯度	0-0.5 min: 0% B (结合) 0.6-1.7 min: 100% B (洗脱) 1.8-3.5 min: 0% B (再生)
第二维泵 (脱盐-RP)	
溶剂 A	0.1% 甲酸
溶剂 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.4 mL/min
梯度	0 min: 5% B 0.5 min: 5% B 3.0 min: 80% B 4.0 min: 80% B 4.1 min: 5% B 6.0 min: 5% B
二维梯度停止时间	6.0
二维分析周期	6.1
自动进样器	
进样量	5 μ L
样品温度	5 $^{\circ}$ C
色谱柱 (IEX \rightarrow 脱盐-RP) (亲和 \rightarrow 脱盐-RP)	
第一维色谱柱	Agilent Bio mAb NP5, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m PEEK (部件号 5190-2407) Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 \times 5.2 mm, 5 μ m (部件号 5069-3639)
第二维色谱柱	Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱, 2.1 \times 12.5 mm, 10 μ m, 1000 \AA (部件号 PL1612-1102)
柱温箱	
第一维色谱柱	室温
第二维色谱柱	室温
多中心切割	
运行模式	根据第一维的保留时间设置的中心切割 (二维时间段) 进行基于时间的多中心切割。 在取样时间为 0.04 min (定量环充填 > 200%) 的条件下对杂质进行中心切割。
检测	
第一维	波长 280 nm/4 nm
DAD 参数	参比波长 360 nm/100 nm
第二维	气体温度 350 $^{\circ}$ C
质谱参数	鞘气温度 400 $^{\circ}$ C 气体流速 8 L/min 鞘气流速 11 L/min 雾化气压力 35 psi 毛细管电压 5000 V 喷嘴电压 1000 V 碎裂电压 200 V
液相色谱流计时	配备质谱阀切换 (废液/质谱) 的时间段

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件, 版本 C.01.07 [27] 以及 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱采集软件, 版本 A.01.02 [24]
- Agilent MassHunter Workstation 软件, 版本 B.05.01, Build 4.0.479.0
- 安捷伦缓冲溶液顾问软件 A.01.01 [009]

结果与讨论

由于 mAb 的异质性, 配备质谱检测的二维液相色谱是生物治疗药物表征的首选工具。IEX、SEC 和亲和色谱等色谱技术用于分析关键质量属性。在本研究中, 第一维分离同时采用了亲和纯化和 IEX。在第二维的反相脱盐步骤之后分析 mAb 样品, 无需对馏分进行手动脱盐。

IEX → 脱盐-RP

采用盐梯度的弱阳离子交换色谱 (WCX) 常用于 mAb 电荷异质性的分离。为了进一步表征这些电荷异构体色谱峰,需要在质谱分析之前进行脱盐步骤。图 2 和图 3 显示了创新药物和生物仿制药 mAb 的 2D-LC/MS 电荷异构体结果。在第一维中,使用 Agilent Bio mAb PEEK 色谱柱分离不同电荷形态。然后在第二维中,使用 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱进行脱盐。创新药物 mAb 显示出一个主要峰(被指定为主峰),此外还显示出低浓度碱性和酸性异构体。早洗脱和晚洗脱峰分别称为酸性异构体和碱性异构体。生物仿制药 mAb 的色谱图显示了不同的分离谱,代表与创新药物 mAb 相比碱性和酸性异构体的含量不同。使用多中心切割方法将创新药物与生物仿制药 mAb 的所选峰转移到第二维脱盐小柱中进行质谱分析。参考文献 1 和 2 提供了有关多中心切割二维液相色谱方法的更多信息。图 3 显示了这些电荷异构体峰的解卷积质谱结果。在 WCX 中,创新药物与生物仿制药 mAb 的主峰在相同保留时间处洗脱,各自的解卷积质量数测量结果确认了这些峰具有相同归属。生物仿制药 mAb 峰 2 和峰 3 的质谱分析结果表明峰 1、2 和 3 之间存在 128 Da 的偏移。这一偏移对应于 C 端赖氨酸截短(利用羧肽酶 B 消解得到确认,数据未示出)。该组数据展示了 AdvanceBio 脱盐反相小柱用于 mAb 电荷异构体鉴定的高效在线脱盐方法。为实现高分离度 mAb 分离,可以在第二维中使用 Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱³。

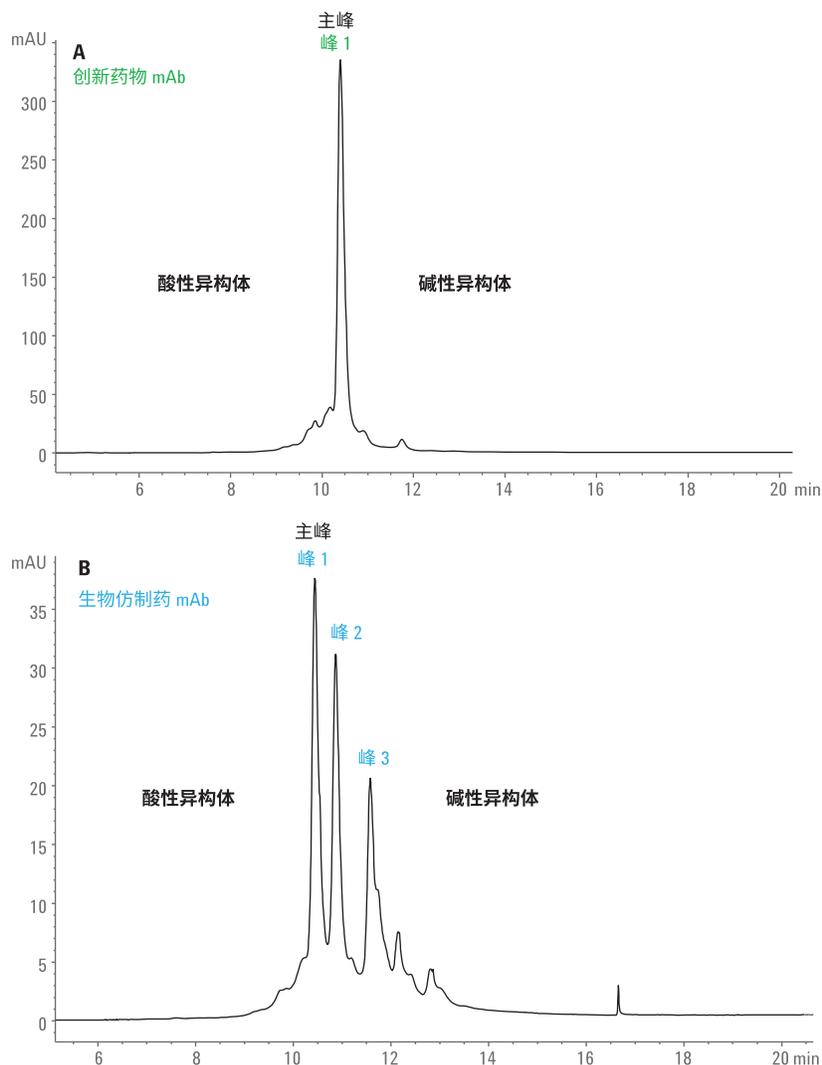


图 2. 使用 Agilent Bio mAb 5 μm 色谱柱获得的创新药物和生物仿制药 mAb 的第一维电荷异构体谱图。将分配的峰 1、2 和 3 转移到第二维 (Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱) 中进行质谱分析

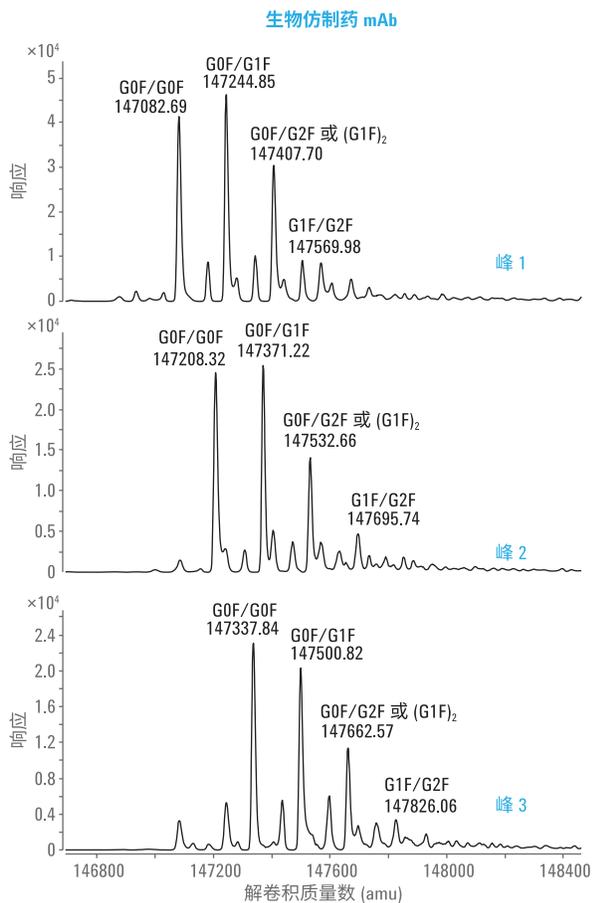
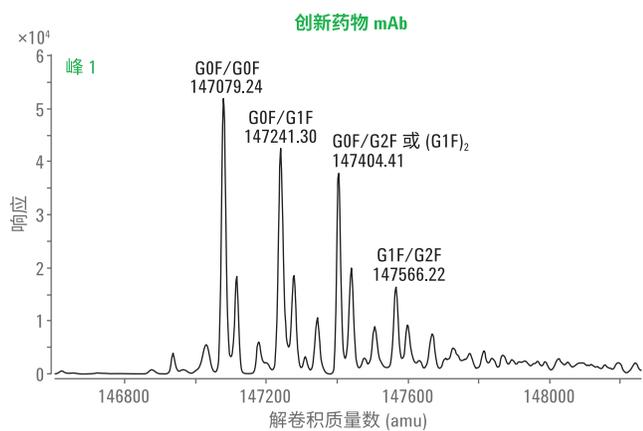


图 3. 图 2 中指定的峰 1、2 和 3 的解卷积质谱图

亲和 → 脱盐-RP

在 mAb 的生产和纯化过程中，确保选择正确的克隆十分重要，该步骤可生成具有高表达的正确候选产物。通常，使用 Protein A 和 Protein G 的亲和色谱用于纯化和测定细胞培养物中的 mAb 浓度。此外，还可以使用质谱分析确认产物峰的归属。在本研究中，

使用 2D-LC/MS 中心切割方法对三种药物 mAb 进行了分析。第一维中使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱捕获和富集 mAb。在第二维中，在质谱分析之前使用 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱进行脱盐。使用中心切割方法将 Protein A 色谱柱中获得的亲和纯化峰（图 4）转移到第二维脱盐

小柱中进行质谱分析。图 4 显示了三种 mAb 样品各自的解卷积质谱图。质量数测量的分析结果表明 mAb 具有正确的质量。该组数据展示了使用 AdvanceBio 脱盐反相小柱的快速在线脱盐方法。

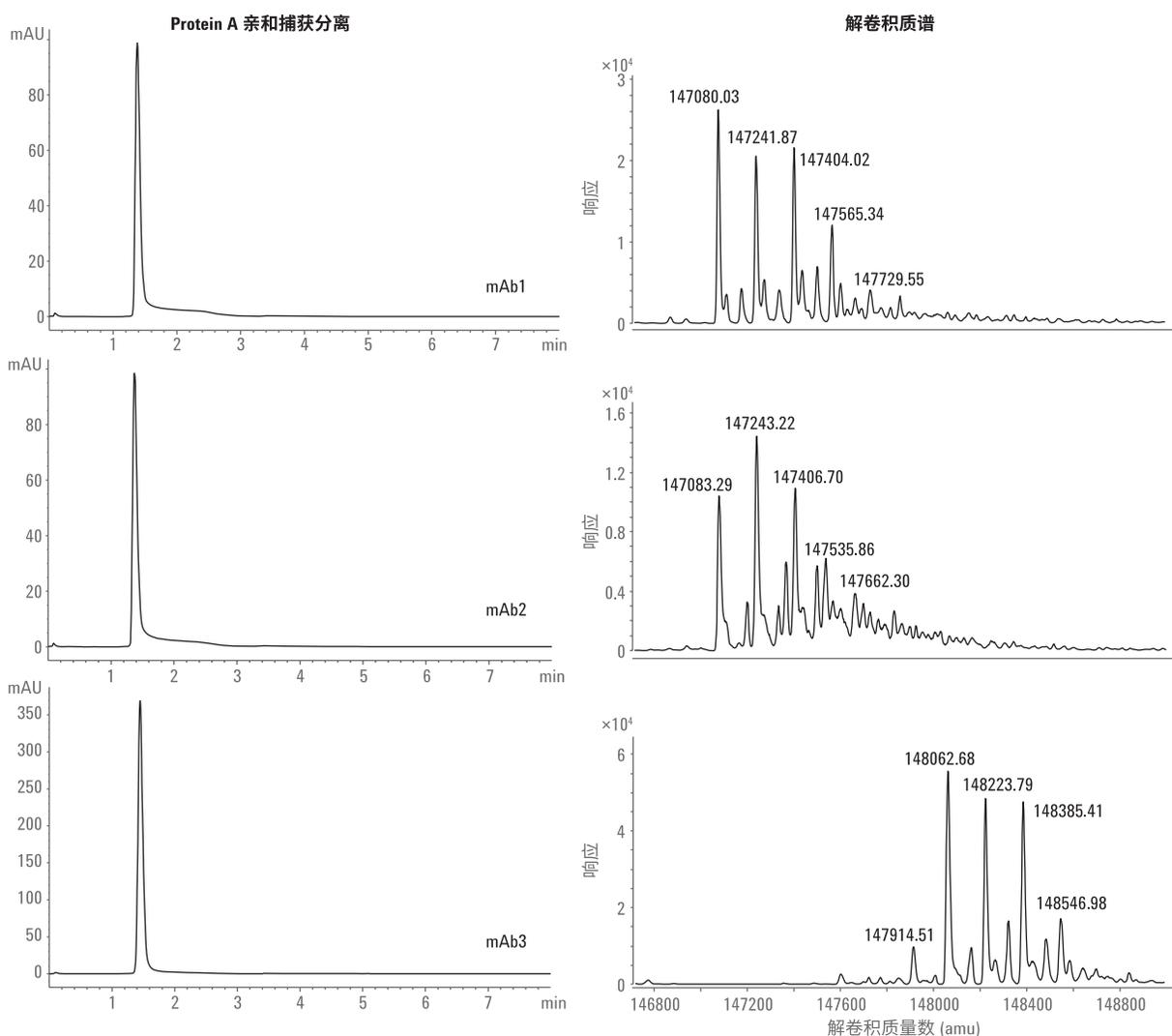


图 4. 使用 Protein A 作为第一维色谱柱，脱盐小柱作为第二维色谱柱获得的 mAb 的 2D-LC/MS 谱图。将第一维色谱图中的选定主峰捕获并转移到 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱中，该反相柱能够高效去除盐分并提供高质量质谱结果

结论

本研究展示了安捷伦二维液相色谱系统与安捷伦生物色谱柱联用进行 mAb 表征的工作流程解决方案。这一目的可通过在第一维中应用电荷异构体或蛋白质亲和捕获，然后在第二维中的质谱分析之前使用 Agilent AdvanceBio 脱盐反相小柱实现。结果表明，使用 AdvanceBio 脱盐反相小柱可实现高效的在线脱盐。

参考文献

1. Buckenmaier, S. Agilent 1290 Infinity 多中心切割二维液相色谱解决方案, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5615CHCN, **2015**
2. Krieger, S. Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in Method Development for Impurity Analysis – The Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution (多中心切割二维液相色谱在杂质分析方法开发中的应用 – Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5643EN, **2015**
3. Sandra, K.; Vanhoenacker, G.; Vandenheede, I.; Steenbeke, M.; Joseph, M.; Sandra, P. Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine. *Journal of Chromatography B* **2016**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.040>

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016年9月1日，中国出版

5991-7066CHCN



Agilent Technologies