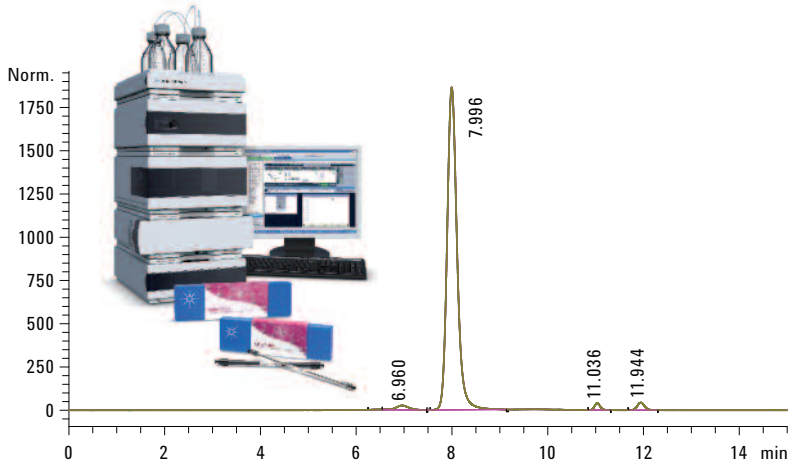
使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱和 Agilent BioSEC 色谱柱，通过体积排阻色谱法对单克隆抗体进行表征

应用简报

生物制药

作者

Srividya Kailasam，Jochen Strassner，
Faizy Ahmed 和 Martin Vollmer
安捷伦科技
印度班加罗尔和
德国瓦尔德布隆



摘要

使用 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent BioSEC 色谱柱来考察两种单克隆抗体 (mAb) 的纯度和稳定性：Anti-FLAG 和 BL05。利用高灵敏度的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器在低浓度条件下表征这些抗体。生物惰性液相色谱系统结合 BioSEC 色谱柱，适合针对治疗性 mAb 和蛋白质开发可靠、耐用的常规体积排阻色谱方法。与竞争色谱柱相比，这两种 mAb 的变体与抗体主峰可以实现更好分离。

前言

对于在重组蛋白质和 mAb 的制剂、贮存和临床使用过程中监测其纯度，高灵敏度的分析技术是必需的。这些样品中由于不当的生产、制剂、贮存或操作条件产生的聚集体，可基于其与药物主成分分子体积的不同而得到分离和检测。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 和 UV 检测来分析聚集体和构象异构体，以监测所研究样品的完整性。本文论证了采用 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent BioSEC 色谱柱，通过 SEC 分离 mAb 并监测其完整性的方法适用性。该型仪器与使用较小粒径填料的色谱柱相结合，成为从天然构象抗体中分离异构体的有效工具，同时使抗体与仪器和色谱柱填料表面的次级相互作用降至最低。

实验部分

系统

完全生物兼容、最高耐压达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高效自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱，包含生物惰性加热元件(G1316C #19)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，带生物惰性 60 mm 最大光强高灵敏度流通池 (G4212A #33)
- ChemStation B.04.02 版软件

该系统的创新型毛细管技术使样品流路完全不含任何金属组件，确保样品不会接触到金属表面。溶剂输送流路未采用任何不锈钢组件，防止因腐蚀而释放出铁。

化学品与试剂

单克隆抗体：1. Anti-FLAG，3.8 mg/mL（西格玛奥德里奇公司，美国密苏里州圣路易斯）和 2. BL05，0.76 mg/mL（Stratagene 公司，美国加利福尼亚州圣地亚哥）

SEC 标准混合物：（甲状腺球蛋白、免疫球蛋白（IgA 和 IgG）、卵清蛋白、核糖核酸酶、胞苷）、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠和氯化钠均购自西格玛奥德里奇公司（美国密苏里州圣路易斯）。

体积排阻色谱

色谱柱

色谱柱 1：Agilent BioSEC 3，3 µm，300 Å，7.8 mm × 300 mm（部件号 5190-2511）

色谱柱 2：Agilent BioSEC 5，5 µm，300 Å，7.8 mm × 300 mm（部件号 5190-2526）

色谱柱 3：品牌 A，5 µm，250 Å，7.8 mm × 300 mm

液相色谱方法

进样量：1 µL

流动相 A：150 mM 磷酸钠 (pH = 7.0) 及

流动相 B：含有 150 mM 氯化钠的 150 mM 磷酸钠 (pH = 7.0)

流速：1 mL/min

紫外检测：220 nm/4 nm 参比：关闭

结果与讨论

在不同的缓冲液条件下对标准蛋白进行分析

采用 SEC 对 mAb 进行分析时，为使固定相次级相互作用最小化并获得最大分离度，对缓冲液进行优化是必不可少的工作。在使用许多市售 SEC 色谱柱时，通常会用大量的腐蚀性盐来防止非特异性结合、峰展宽或峰拖尾。

本文采用了两种缓冲体系：A) 150 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 和 B) 含有 150 mM 氯化钠的 150 mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)，用于这两种 mAb 的 SEC 分离。

为了在进样分析 mAb 前评估色谱柱和系统的性能，我们分别采用这两种缓冲条件分析了分子量已知的蛋白质标准混合物：无 NaCl（图 1）和含 150 mM NaCl（图 2）。当使用另一厂商的品牌 A 色谱柱及缓冲液 A（图 1）分离标准蛋白时，色谱峰存在明显的展宽和拖尾现象。使用同样的缓冲液 A，与 Agilent BioSEC 5 色谱柱相比，Agilent BioSEC 3 色谱柱展现出更高的分离效率和分离度。该结果表明，与使用较大粒径填料的色谱柱相比，较小粒径填料色谱柱可以改善蛋白质分离中的传质效应（图 1）。Agilent BioSEC 色谱柱的性能并未因缺少盐类添加剂而受到影响，表明高浓度的盐在防止次级相互作用中并不是必需的。

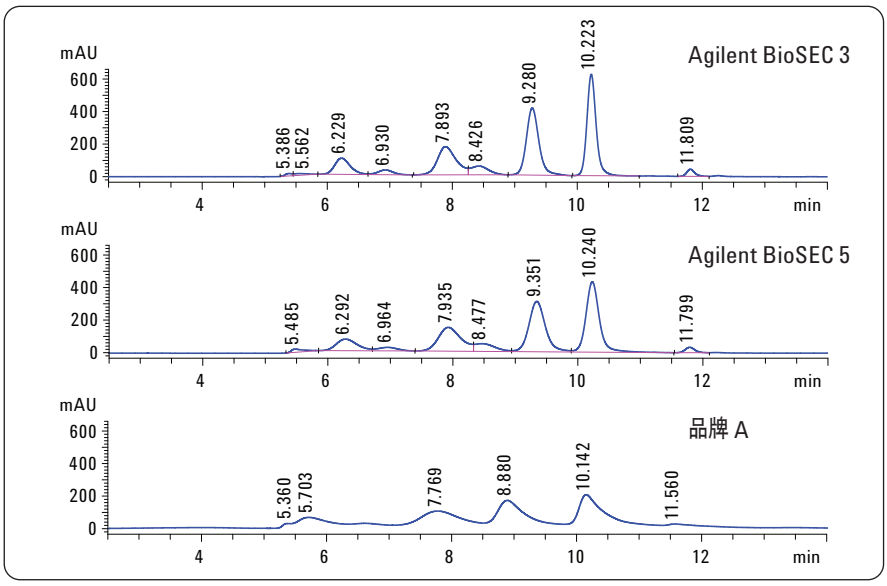


图 1

使用流动相 A，分别采用三根色谱柱对 1 µL 标准混合物进行 SEC 分析

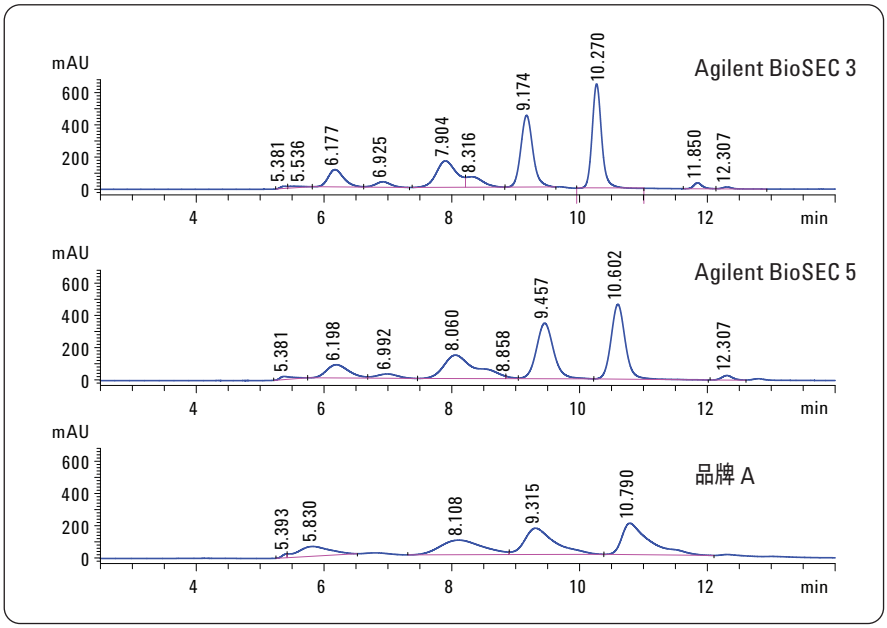


图 2

使用流动相 B，分别采用三根色谱柱对 1 µL 标准混合物进行 SEC 分析

单克隆抗体的分离

通过对 mAb 的分离（Anti-FLAG 柱上量 0.76 µg）进一步评估了安捷伦生物惰性解决方案的性能。将 Agilent BioSEC 3 和 Agilent BioSEC 5 与粒径 5 µm，孔径 250Å 的相同规格市售色谱柱（品牌 A）进行比较。结果明确肯定了蛋白标准混合物的实验结论。采用品牌 A 色谱柱进行分析时（无盐添加剂实验），抗体峰出现明显拖尾，而采用 Agilent BioSEC 色谱柱进行分析时可获得对称峰形、更高的分离度和灵敏度（图 3），无需使用高浓度腐蚀性盐。

分析结果的重复程度通常反映了方法的稳定性，这对于 QA/QC 尤其重要。图 4 中所示为采用 BioSEC 3 µm 色谱柱重复 5 次分析未稀释的 Anti-FLAG mAb 得到的重叠色谱图。色谱图完美重叠，清楚地表明了方法优异的重复性，以及稳定的仪器和色谱柱性能。

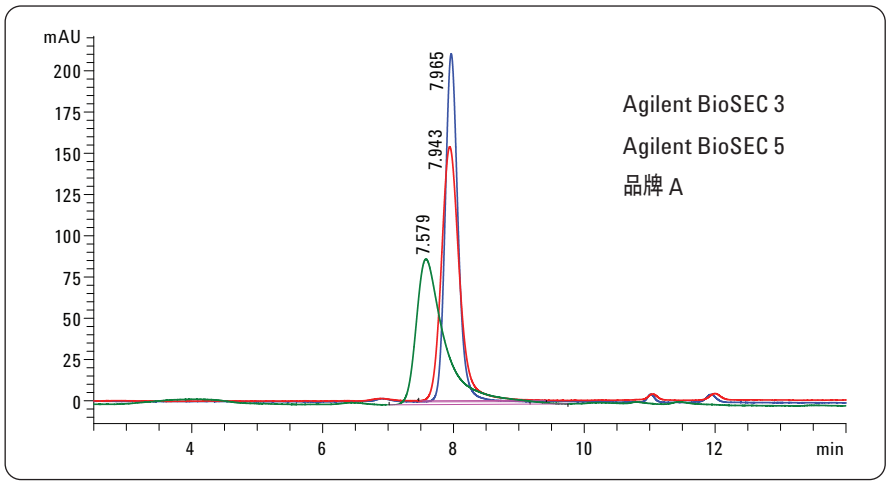


图 3

使用流动相 A，分别采用三根色谱柱对 1 µL Anti-FLAG mAb（5 倍稀释）进行 SEC 分析

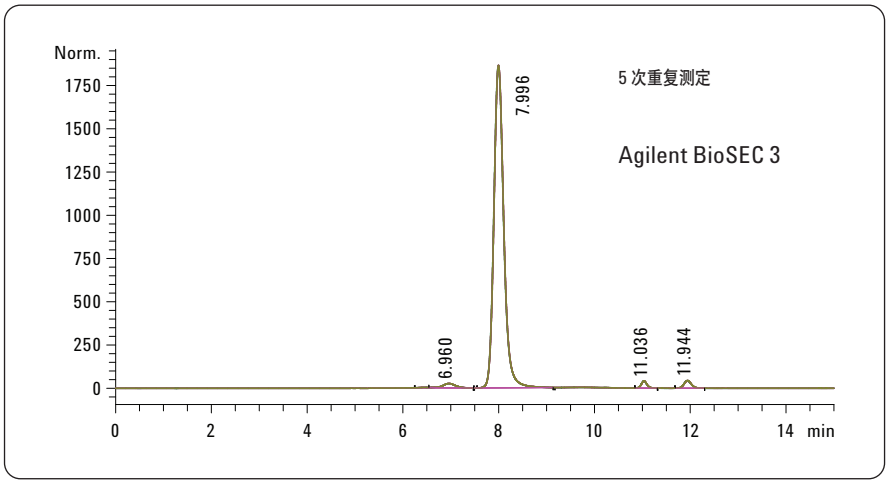


图 4

采用 Agilent SEC 3 色谱柱分析未稀释的 Anti-FLAG mAb (1 µL)；流动相 A

热诱导的 mAb 理化性能变化

药品生产和制剂过程中，需要密切关注治疗性蛋白质的聚集现象，以防止药效下降或出现不良免疫反应。通常使用 SEC 来监测聚集体，因为它可以根据抗体分子的体积大小进行分离，并且其使用专门设计的不与生物分子相互作用的填料。

为了加速抗体理化性质（聚集和变性）的变化过程，取抗体 BL05 的等分试样在 60 °C 下分别加热 5、10、30 和 60 min。BL05 mAb 构象的变化过程可以通过分析不同加热时间的样品很清楚地观察到。在保留时间 8 min 的单体峰高度随时间下降的同时，保留时间 5.5 min 的色谱峰高度明显上升（图 5）。在将 Agilent BioSEC 色谱柱与品牌 A 色谱柱进行比较时，其色谱性能的差异是显而易见的。图 5c（品牌 A）的色谱图显示出较低分离效率并且存在峰拖尾现象，难以进行定量分析，而采用 Agilent BioSEC 色谱柱（图 5a 和 5b）则显示出优异的分离度。采用 Agilent BioSEC 3（图 5b）时分离效率可进一步提高。

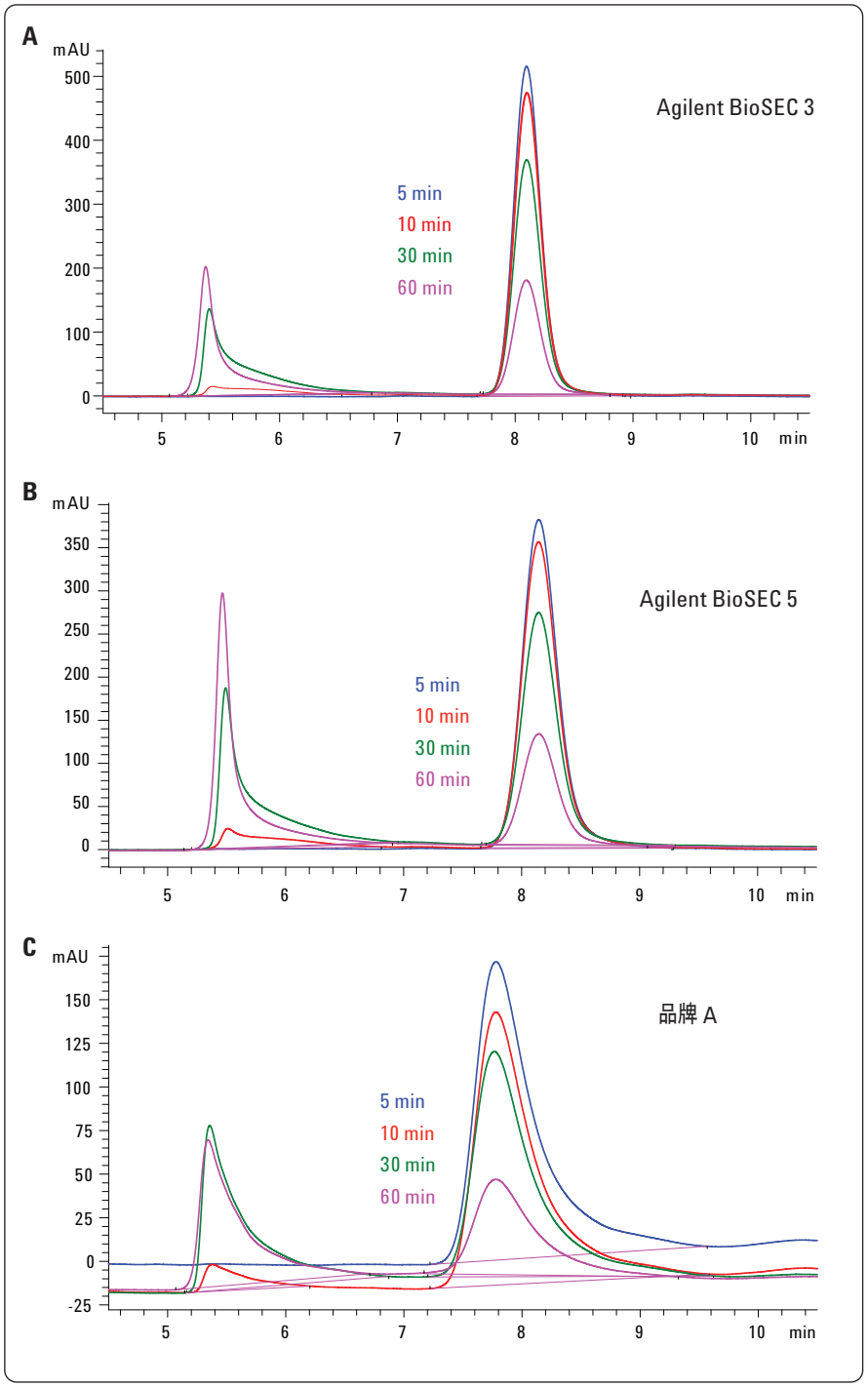


图 5a、5b 和 5c
BL05 的热诱导聚集 (60 °C)；流动相 A

通过对第二种不同的样品进行分析，该结果得到确证。在本实验中，将 Anti-Flag mAb 在 60 °C 下加热 30 min 后再进行分析（图 6）。两根 Agilent BioSEC 色谱柱皆具有更高的分离效率和峰对称性，而品牌 A 色谱柱分离的灵敏度和分离度则较低。

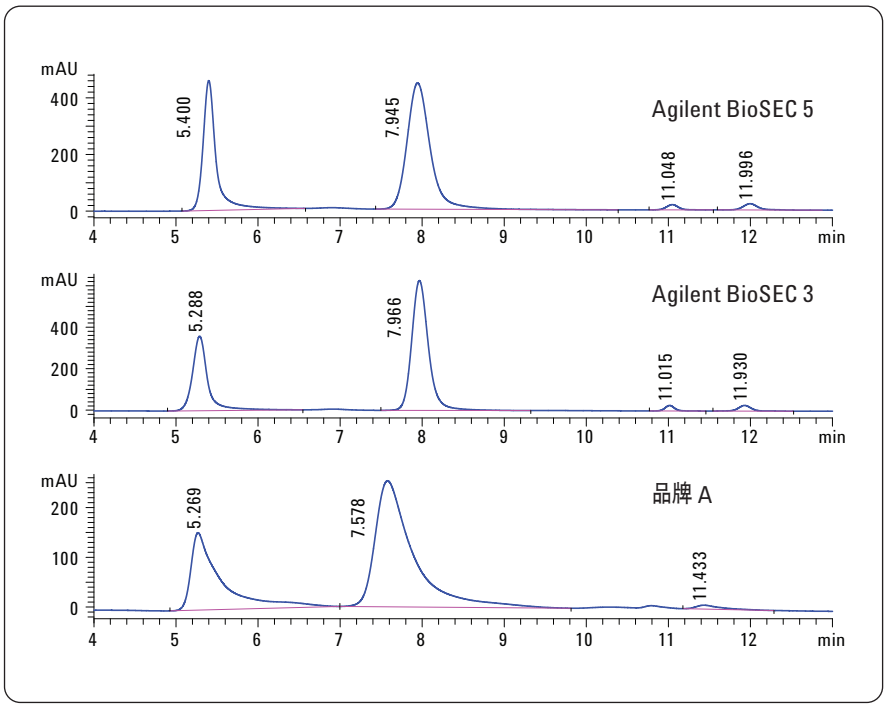


图 6

未稀释的 Anti-FLAG（1 µL，柱上量 3.8 µg）的热诱导聚集 (60 °C，30 min)；流动相 A

结论

本研究论证了在 mAb 理化性质分析领域，将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性高效液相色谱系统与 Agilent BioSEC 色谱柱联用，可实现优异的性能。使用更小粒径填料色谱柱可以获得更高的分离效率。该解决方案为监测治疗性单克隆抗体的纯度和稳定性，以及相应方法开发提供了一款优秀的工具。

www.agilent.com/chem/bio-inert

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 2 月 1 日
出版号 5990-6414CHCN



Agilent Technologies