

# 利用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C3 色谱柱对完整的和还原态单克隆抗体的超快速反相分析进行优化

## 应用简报

### 生物制药

### 作者

James Martosella, Phu Duong  
Agilent Technologies, Inc.  
2850 Centreville Rd  
Wilmington, DE  
19808

### 摘要

利用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C3 色谱柱对完整的和还原态单克隆抗体 (mAbs) 的快速反相分离进行了优化。使用 StableBond C3 固定相和成熟的亚 2  $\mu\text{m}$  RRHD 色谱柱技术实现了单克隆抗体组分的高分离度分离，表明其适用于高通量 mAb 表征。本文对不同细胞系表达的单克隆抗体的快速高分离度分离过程进行了评估和优化。对连续运行序列过程中 ZORBAX 300SB-C3 色谱柱的寿命稳定性和重现性进行了评估，结果表明该色谱柱对高温和高压具有极高的耐受性，表现出稳定的分离性能。



**Agilent Technologies**

## 引言

制药领域的生物治疗药物开发正处于快速发展中。其中，可靠的抗体药物表征是该类药物开发过程中的关键挑战。抗体的分离可通过多种色谱技术实现，并需要通过多种分离模式对其进行检测和定量。反相（RP）色谱法是表征抗体的一种方法，该方法可以实现优异的液质联用检测。然而，采用反相色谱法分离类似单克隆抗体（mAbs）这样的大分子物质时，通常会面临峰展宽、峰扩散和峰分离度差等问题，这些问题会限制该方法在分析中的应用。如今，随着UHPLC和更小颗粒填料色谱柱的出现，可以在提高分离度的同时更快速地完成这些分离。随着新型功能团固定相的出现，使用反相分离蛋白质可获得更好的选择性和更高的灵敏度。当前，mAbs反相分析的改善在促进生物制药分析方面展现出良好的应用前景。

本文利用ZORBAX超高压快速高分离度（RRHD）300SB-C3色谱柱在极短的时间内实现了完整的、还原态单克隆抗体的超高分离度分离。具体而言，我们在75 °C条件下系统优化了梯度洗脱条件，实现了完整的和还原态轻链和重链mAbs的超快速高效分离。我们还考察了ZORBAX 300SB-C3色谱柱在高温、高压和低pH操作条件下的使用寿命和重现性，以监测色谱柱的保留行为、峰形和柱效的变化。本文的研究工作表明，所建立方法适用于mAb的快速分析，能够实现可重现的高分离度分离。

## 实验部分

### 材料

本研究中使用了两种人源化单克隆抗体。一种抗体由CHD媒介（安捷伦，部件号010774）表达，另一种单克隆抗体由中国仓鼠卵巢（CHO）细胞表达，购自宾夕法尼亚Creative Biolab公司。三氟乙酸购自Sigma-Aldrich公司（圣路易斯，密苏里州），异丙醇、正丙醇和乙腈由Honeywell-Burdick & Jackson公司（马斯基根，密歇根州）提供。1-丙醇购自VWR公司（部件号BJ322-4）。MWCO（截留分子量）为3500的透析盒购自Thermo Scientific公司（部件号66330）。

## 降解和烷基化反应

在盐酸胍（GuHCl）变性条件下使单克隆抗体发生降解并烷基化，获得游离的轻链和重链抗体。用水对0.5 mL（1.5 mg/mL）抗体溶液进行透析，以除去防腐剂。透析完毕后，立即用100 mM TRIS-HCl和4 M GuHCl（Mallinckrodt公司，菲利普斯堡，新泽西州，美国）稀释0.5 mL的透析液，使其最终浓度为0.75 mg/mL。将pH值调至8.0，加入10 μL 0.5 M的二巯苏糖醇（DTT，Sigma公司）贮备液，使其最终浓度为5 mM。将混合液置于37 °C水浴中孵育30 min。将抗体快速冷却到室温，加入26 μL 0.5 M的碘乙酰胺（IAM，Sigma公司）贮备液，使其最终浓度为13 mM。将烷基化抗体的溶液在室温下避光放置45 min。取出后立即加入20 μL 0.5 M的DTT，使其最终浓度为10 mM，以终止反应。然后取1.0 mL降解和烷基化的抗体溶液放入一个4 mL的3.5 K MWCO的浓缩器（部件号5185-5991）中，在3800 RPM的转速下用水（0.1% TFA）脱盐30 min。该浓缩过程重复两次，使其最终体积为0.5 mL（1.5 mg/mL）。

## UHPLC 条件

仪器	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，配备有自动进样器（ALS）、二元泵、柱温箱（TLC）和二极阵列检测器（DAD）
色谱柱	安捷伦 ZORBAX RRHD 300 SB-C3, 1.8 μm 2.1 × 100 mm（部件号 858750-909） 2.1 × 50 mm（部件号 857750-909）
流动相 (完整 mAb)	A. 98/2 水/正丙醇（0.1% TFA） B. 70/20/10 异丙醇/乙腈/水（0.1% TFA）
流动相 (还原态 mAb)	A. 水+ 0.1% TFA (v/v) B. 80/10/10 正丙醇/乙腈/水（0.1% TFA）
进样量	2 μL
流速	0.5 mL/min 1.0 mL/min（完整） 1.25 mL/min（寿命测试）
梯度程序	多梯段
柱温	75 °C
检测	UV, 280 nm

在连续的色谱分析中，增加 2 min 的后运行时间以重新平衡色谱柱。

## 结果

### 梯度优化以实现超快速分析降解的和烷基化的单克隆抗体

图 1 中的色谱图展示了由 CHO 细胞衍生的还原态和烷基化的 mAb 的快速分离谱图。采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3  $2.1 \times 100$  mm 色谱柱，在 75 °C 和最佳的梯度洗脱程序下，于 4.5 min 内实现了轻链和两种重链变体的高效分离。两个重链 1 和 2 获得了窄带分离色谱峰，并且具有优异的分度。在 0.6 min 出现的轻链色谱峰与周围 0.5 min 和 0.7 min 的轻链碎片峰实现了出色的分离。该分离的最优梯度洗脱条件见表 1。

#### 利用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 ( $2.1 \times 100$ mm, $1.8 \mu\text{m}$ ) 色谱柱快速分离还原态单克隆抗体

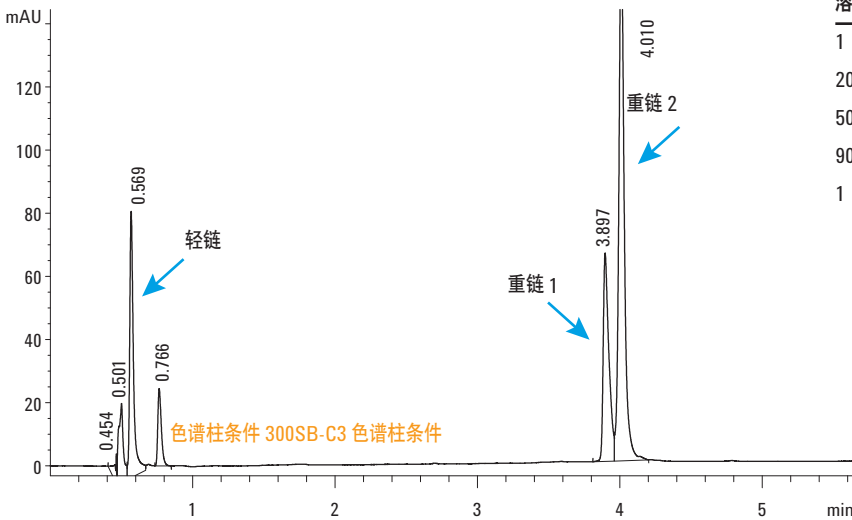


表 1. 安捷伦 ZORBAX RRHD 300 SB-C3 梯度洗脱条件

溶剂 B%	时间 (min)
1	0
20	2
50	5
90	6
1	6.1

色谱柱	安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3, $2.1 \times 100$ mm, $1.8 \mu\text{m}$	柱温	74 °C
样品	还原态 mAb (IgG1) (1.0 mg/mL) BioCreative 公司 IgG1	流速	0.5 mL/min
进样量	2 $\mu\text{L}$	检测	UV 280
流动相 A	0.1% TFA 溶液		
流动相 B	80% 正丙醇, 10% 乙腈, 9.9% 水和 0.1% TFA		

图 1. 在 75 °C、0.5 mL/min 流速和 UV 280 nm 检测条件下利用安捷伦 ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C3 ( $2.1 \times 100$  mm,  $1.8 \mu\text{m}$ ) 色谱柱实现了对还原态单克隆抗体的快速分离。梯度洗脱条件见表 1

## 优化条件以实现来自不同细胞系的完整 mAbs 的高分离度快速分析

采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱分离并优化来自不同细胞系的单克隆抗体, 考察 C3 色谱柱对不同 mAb 表达的选择性。通过系统的梯度程序方法优化, 确定了每种 mAb 实现最优分离度快速分离的梯度程序。图 2 中上图所示的分离谱图, 是采用表 2A 所列的梯度洗脱条件对 CDH 媒介表达的安捷伦标准抗体进行优化分析的结果。该分离在 4 min 内完成, 完整单克隆抗体的色谱峰极窄, 获得了优异的分离度。相应地, 图 2 中下图展示的是采用表 2B 所列的梯度洗脱条件对 CHO 细胞系表达的人源化 mAb 的优化分离结果。在该分离中, 采用了可以分辨出主峰前面一个肩峰的较平缓的梯度程序。图 2 中两种分离方法的建立可以促进高通量 mAb 的高效表征。每次分离结束时均使用 90% 异丙醇进行一次快速冲洗和快速再平衡, 以实现连续进样分析。

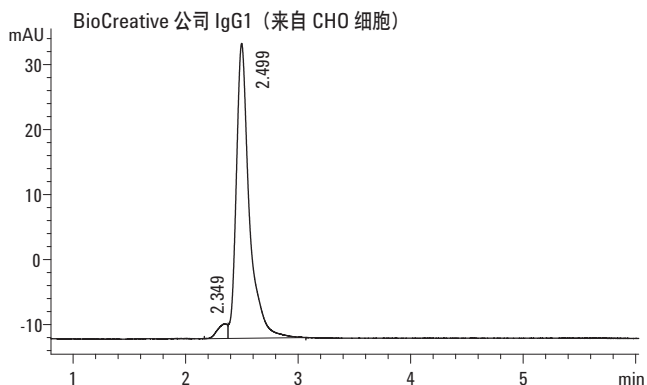
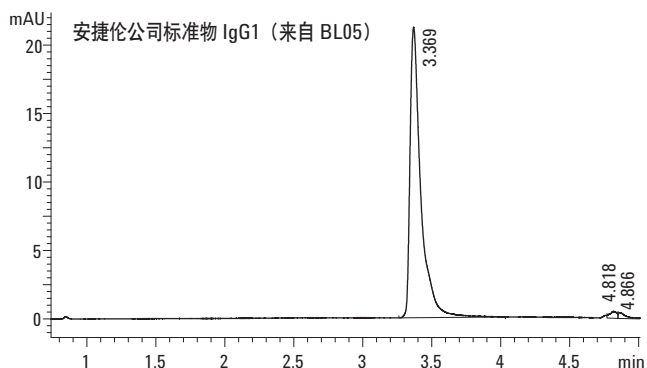
表 2A 分析安捷伦公司标准物 IgG1 的梯度程序

溶剂 B%	时间 (min)
10	0
25	2.5
35	4.5
90	4.56
90	5.0
10	6

表 2B 分析 BioCreative 公司 IgG1 的梯度程序

溶剂 B%	时间 (min)
5	0
25	5
25	7
90	8
5	9

## 利用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱实现完整 IgG1 及其降解产物的快速分离



色谱柱 安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3,  
2.1 × 100 mm, 1.8 μm

样品 单克隆抗体 (IgG1) 1.0 mg/mL  
安捷伦公司标准物 IgG1 (上图)  
BioCreative 公司 IgG1 (下图)

进样量 2 μL

流动相 A 0.1% TFA 溶液

流动相 B 70% 异丙醇, 20% 乙腈, 10% 水和 0.1% TFA

柱温 75 °C

流速 0.5 mL/min

检测 UV, 280 nm

图 2. 在安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 × 50 mm 色谱柱上, 优化两种单克隆抗体的 UHPLC 分离。分离采用 1.0 mL/min 的流速和 75 °C 的柱温, 流动相 B 的组成为异丙醇/乙腈/水。图 2 中上方色谱图展示的是由 CDH 媒介表达的 mAb 的优化分离, 下方色谱图展示的是由 CHO 细胞系表达的人源化 mAb 的优化分离。每次分离结束时均执行一个 2 min 的快速后运行柱平衡程序

## 柱寿命

在 900 bar 的压力和低 pH 值下，通过重复进样对安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 色谱柱的寿命进行评价。在重复分析 mAb 的过程中，色谱柱填充柱床的稳定、固定相的稳定和入口滤芯的性能对于色谱柱在较高的温度和压力下正常连续运行至关重要。为了评估这一性能，在  $2.1 \times 50$  mm 的色谱柱上，以 1.25 mL/min 的流速对核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶混合样品重复分析了 1000 次。其分离色谱图请见图 3。在每次寿命运行中，记录蛋白质梯度洗脱峰的宽度，同时密切监测背压的变

### 利用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 ( $2.1 \times 50$ mm, $1.8 \mu\text{m}$ ) 色谱柱实现标准蛋白质及其降解产物的快速分离

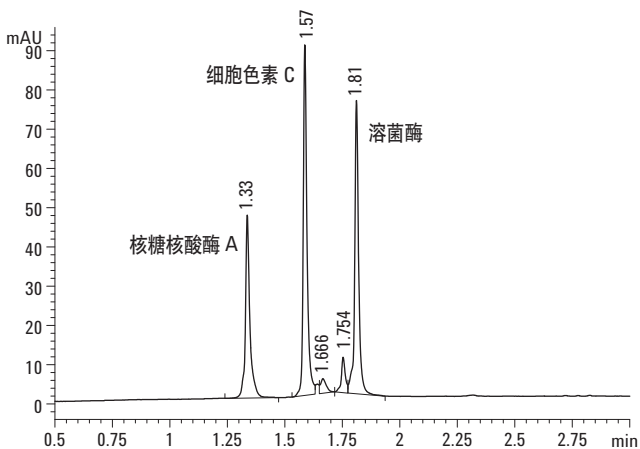


图 3. 利用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3  $2.1 \times 50$  mm 色谱柱快速分离核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶样品，以考察柱寿命稳定性。色谱条件见表 2

色谱柱	安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 $2.1 \times 50$ mm, $1.8 \mu\text{m}$ (部件号 857750-909)	
样品	核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶 (3 mg/mL)	
进样量	1 $\mu\text{L}$	
HPLC 仪	安捷伦 1290 Infinity 系列	
检测	UV, 280 nm	
流动相 A	水 + 0.1% TFA (v/v)	
流动相 B	乙腈 + 0.1% TFA (v/v)	
流速	1.25 mL/min	
进样量	1 $\mu\text{L}$ (1 mg/mL)	
柱温	室温	
梯度程序	溶剂 B%	时间 (min)
	10	0
	70	2.5
	90	2.6
	90	3.0
	10	5.0

化情况。如图 4A 所示，每间隔 100 次进样对 10 次峰宽的变化情况进行绘图。可以看到，在 1000 次连续进样中，峰宽保持稳定，同时柱背压 (图 4B) 也稳定在 900 bar 不变。结果表现出高重现性的峰宽和柱效，同时柱背压的升高也并不显著，这表明该色谱柱具有优异的填充柱床，对高流速、低 pH 值和反复高压操作具有优异的耐受性。此外，在柱寿命分析过程中可维持优异的流速变化，表明入口滤芯对蛋白质或系统颗粒堵塞具有较高的耐受性。

### 安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 ( $2.1 \times 50$ mm, $1.8 \mu\text{m}$ ) 色谱柱的寿命测试

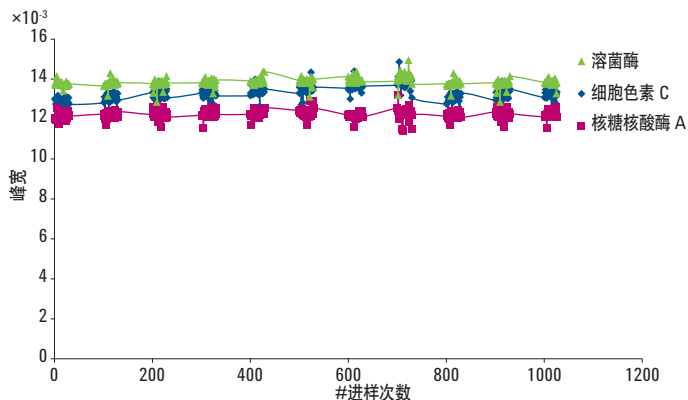


图 4A. 在 900 bar 背压和高流速 (1.25 mL/min) 下对安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3  $2.1 \times 50$  mm 色谱柱的寿命测试结果。该图展示了在 1000 次分析中，每间隔 100 次进样对核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶蛋白质组分峰宽连续图示

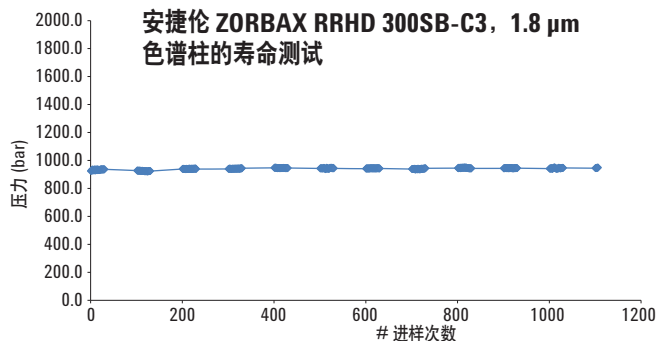
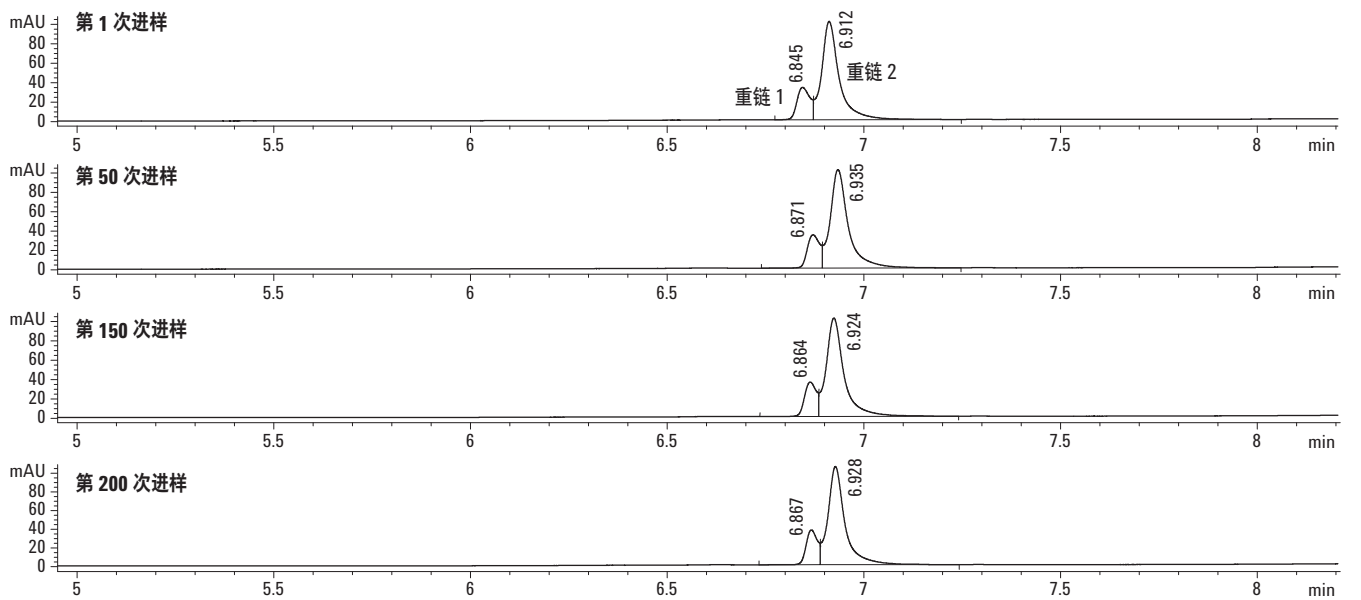


图 4B. 安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3,  $2.1 \times 50$  mm 色谱柱压力变化图每间隔 100 次进样连续记录柱背压并对其绘图

## 柱重现性

对还原态 mAb 样品重复进样分析 200 次，以考察安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 色谱柱的重现性。采用一根 2.1 × 50 mm 色谱柱对两个还原态重链变体 mAb 进行分离，同时考察其保留时间和分离度的变化。如图 5 所示，分离结果表明在 75 °C 和低 pH 条件下，在连续进样分析过程中，色谱柱从一次运行到下一次运行表现出优异的重现性。mAb 重链 1 和 2 在第 1 次、第 50 次、第 150 次和第 200 次进样分析时的色谱峰保持一致的保留时间与峰形，没有发生任何峰形变差或柱效损失，表现出一致的分离效果。

**柱重现性——利用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱对还原态单克隆抗体进行连续 200 次进样分析**



色谱柱	安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	梯度程序	0 min–1% B, 2 min–20% B, 5 min–50% B, 7 min–50% B, 8.0 min–90% B, 8.3 min–1% B, 保持 2 min
样品	降解的单克隆抗体 (IgG1) (1.0 mg/mL) 安捷伦公司 BL05 IgG1	柱温	75 °C
进样量	2 μL	流速	0.4 mL/min
流动相 A	0.1% TFA 溶液	检测	UV, 280 nm
流动相 B	80% 正丙醇, 10% 乙腈, 9.9% 水和 0.1% TFA		

图 5. 采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 × 50 mm 色谱柱于 75 °C 柱温下对还原的和烷基化的 mAb 重复进样分析 200 次。

展示了第 1 次、第 50 次、第 150 次和第 200 次进样的运行情况。流动相：A：水 (0.1% TFA)，B：80/10/10 正丙醇/乙腈/水 (0.1% TFA)。

梯度程序：0 min–1% B, 2 min–20% B, 5 min–50% B, 7 min–50% B, 8.0 min–90% B, 8.3 min–1% B, 保持 2 min

## 结论

采用安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C3, 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱可以实现对单克隆抗体的超快速高效分离。色谱条件的优化与 ZORBAX RRHD 300 色谱柱技术相结合, 可实现对来自不同来源的完整 mAb 和还原态 mAb 的快速高分离度分离。对梯度洗脱条件和流动相组成进行了系统优化, 可以在短时间内完成对还原态单克隆抗体的分离、柱冲洗和再平衡, 表明该方法适用于高通量 mAb 表征。

另外还通过重复进样分析考察了 ZORBAX RRHD 300SB-C3 色谱柱的稳定性 (柱寿命) 和重现性。在 900 bar 和低 pH 条件下连续进样 1000 次, 色谱柱柱效保持稳定, 并且展现出对柱床不稳定或筛板堵塞导致的背压上升具有优异的耐受性。此外, 在连续 200 次进样分析两个重链 mAb 变体的过程中, 获得了一致的峰形和分离度, 同时其保留时间不变。

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

安捷伦公司对本资料中可能出现的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、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，2012  
2012年2月13日，中国印刷  
5990-9667CHCN



**Agilent Technologies**