

利用 Agilent ZORBAX RRHD 亚 2 μm 300 二苯基 UHPLC 色谱柱对还原态和完整的单克隆抗体进行超快速高分离度分离

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

通过优化色谱条件，利用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度（RRHD）300 二苯基反相色谱柱实现对完整的和还原态单克隆抗体（mAbs）的快速分离。独有的二苯基固定相和耐用的超高压快速高分离度色谱柱技术与梯度洗脱条件优化相结合，在高通量 mAb 表征中实现了超快速分离，获得了优异的峰形。在短时间内高分离度、高效分离了分别由中国仓鼠卵巢细胞和 CDH 媒介细胞株表达的两种单克隆抗体，并对结果进行了评价和比较。在重现性和柱寿命的连续考察过程中，在较高的操作压力和温度下对 ZORBAX RRHD 300 二苯基色谱柱进行了评价，结果表明其具有较高的操作耐受性。



Agilent Technologies

引言

制药领域中生物治疗药物的开发正处于快速发展，而可靠的抗体药物表征是该类药物开发过程中的关键挑战。虽然抗体可以通过多种分离技术来表征，但由于近期诸如亚 2 μm 色谱柱填料和新型固定相等更加高效和出色的色谱材料的使用，采用反相色谱技术分离抗体获得了快速发展。

本文中，我们实现了短时间内对完整和还原态单克隆抗体 (mAbs) 的超高分离度分离，并且表现出传统 C18、C8 和 C3 色谱柱表征难以企及的选择性。具体而言，我们在高温下系统优化了梯度洗脱条件，实现了完整 mAb 与还原态轻链和重链 mAb 亚型的快速分离。这些研究的目标侧重于通过运行之间方法的优化，实现快速高效的分析，缩短过长的柱平衡时间或者后运行冲洗时间。我们还对 ZORBAX RRHD 300 二苯基色谱柱的使用寿命和重现性进行了评价。为了评价色谱柱的使用寿命，在较高的操作压力 (> 900 bar) 和温度 (75 °C) 以及低 pH 和高流速条件下重复进样 1000 次蛋白质混标对其进行测试。通过对 mAb 标样进样分析 200 次来考察色谱柱在运行过程中的重现性和保留行为。

实验部分

材料

本研究中使用了两种人源化单克隆抗体。一种抗体在安捷伦公司由 CDH 媒介 (部件号 010774) 表达，另一种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)。

还原和烷基化

在盐酸胍 (GuHCl) 变性条件下使单克隆抗体还原并发生烷基化，以获得游离的轻链和重链亚型。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 溶液稀释 0.5 mL 的透析液，使其最终浓度为 0.75 mg/mL (马林克罗特, 菲利普斯堡, 新泽西, 美国)。将 pH 值调到至 8.0, 加入 10 μL 0.5 M 的二巯苏糖醇 (DTT, Sigma) 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。然后将抗体快速冷却到室温, 加入 26 μL 0.5 M 的碘乙酰胺 (IAM, Sigma) 贮备液, 使其最终浓度为 13 mM。将烷基化的抗体溶液室温下避光放置 45 min。取出后立即加入 20 μL 0.5 M DTT, 使其最终浓度为 10 mM, 终止反应。然后取 1.0 mL 还原态和烷基化的抗体溶液放入一个 4 mL 3.5 K MWCO 的浓缩器 (部件号 5185-5991) 中, 在 3800 RPM 下水 (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)。

HPLC 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	Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300-diphenyl, 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm (部件号 858750-944); 2.1 \times 50 mm (部件号 857750-944)
流动相	(完整的 mAb) A. 98/2 水/异丙醇 (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	1–3 μL
流速	0.5 mL/min (还原态抗体) 1.0 mL/min (完整的抗体) 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

超快速分析还原态单克隆抗体时的梯度优化

图 1 中的对比色谱图展示了还原态和烷基化的单克隆抗体在两种优化条件下的分离情况。采用 ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1×100 mm 色谱柱, 在优化条件下可以实现还原态 mAb 的轻链和两个重链亚型的高效分离。图 1 中的上方色谱图具体展示了采用表 1A 中的梯度洗脱条件对重链的窄带、高分离度分离。

作为比较, 图 1 中的下方色谱图展示了经过优化后, 两个重链的分离度有所提高, 但此时峰宽略有增加。在本次分离中, 两个重链接近基线分离。本次分离的优化条件见表 1B。比较这两次分离可以看出, 采用二苯基固定相只需对梯度程序稍做改进就可以提高两个重链的分离效果。此外, 采用相同粒径填料的 C3 和 C8 色谱柱, 却很少看到在相同条件下有明显改善其分离度的效果, 表明与传统的短碳链固定相相比, 二苯基固定相相对于该特定抗体的分离具有独特的选择性优势。

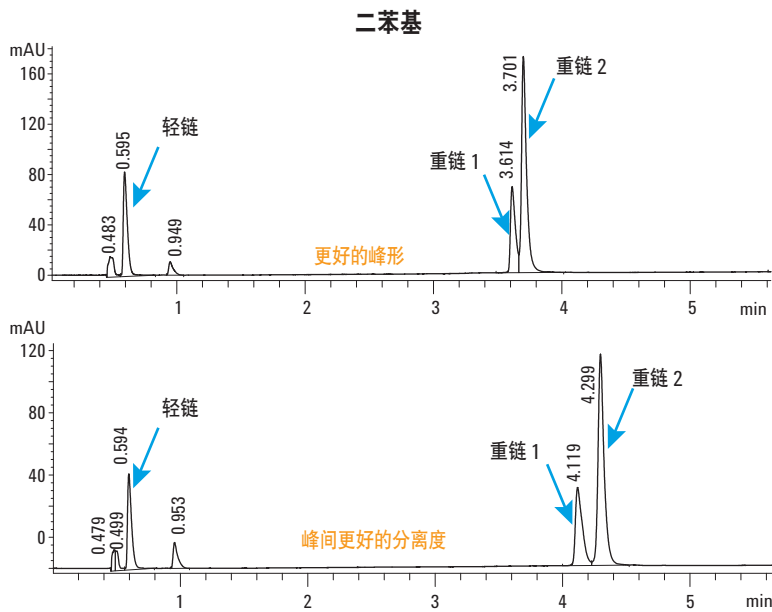


表 1A 梯度 A

溶剂 B%	时间 (min)
1	0
20	2
70	5
90	5.1
1	7

表 1B 梯度 B

溶剂 B%	时间 (min)
1	0
20	2
50	5
90	5.1
1	7

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1×100 mm, $1.8 \mu\text{m}$
样品	还原态单克隆抗体 (IgG1) (1.0 mg/ml) ——BioCreative 公司 IgG1
进样量	2 μL
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
梯度程序	条件 1: 0 min–1% B, 2 min–20% B, 5 min–70% B 条件 2: 0 min–1% B, 2 min–20% B, 5 min–50% B
流速	0.5 mL/min
柱温	74 °C
检测	UV, 280 nm

图 1. 在不同的梯度洗脱条件下, 采用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分度 300-diphenyl (2.1×100 mm) 色谱柱对两种还原态单克隆抗体超快速分离结果的比较。上图的分离具有较窄的峰宽和较短的保留时间。下图的分离显示两个重链峰具有更高的分离度, 但是柱效较低

超高分离度快速分析完整的 mAbs 的条件优化

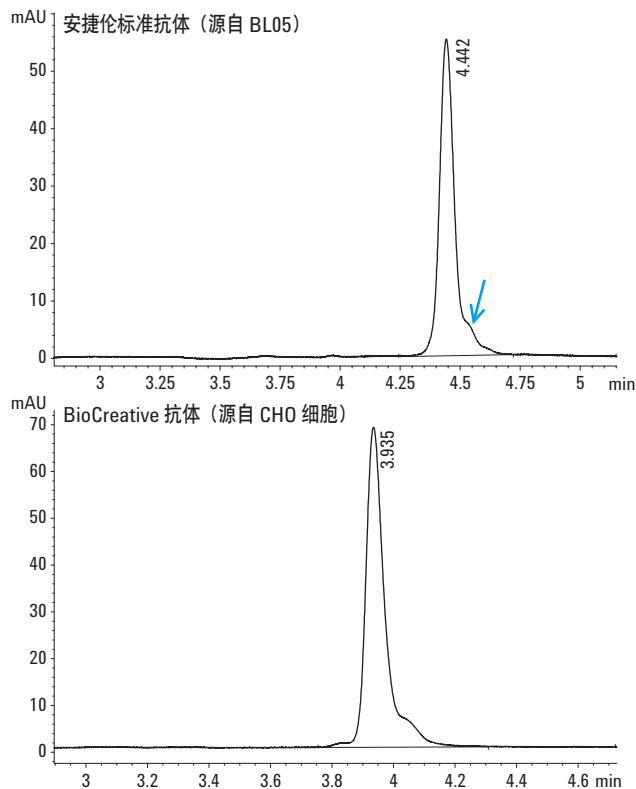
为了评价完整的单克隆抗体在 ZORBAX 300 二苯基 (2.1 × 50 mm) 色谱柱上的分离性能, 我们选择了两种 mAbs 分别进行分析速度和分离度的优化。通过系统的梯度考察, 我们找到了充分发挥二苯基固定相分离性能快速分离各 mAbs 的最佳梯度。图 2 中的上方色谱图展示了采用表 2A 中所列的梯度洗脱条件, 对 CDH 媒介表达的安捷伦标准抗体的优化分离。分离在 5 min 内完成, 表现出对完整抗体和 4.5 min 肩峰 (箭头所指) 具有优异的分度。作为比较, 图 2 中的下方色谱图展示了采用表 2B 中所列的梯度洗脱条件, 对 CHO 细胞株表达的 mAb 的优化分离。在该分离中, 对梯度稍加调整, 以提高前后完整的 mAb 峰的分度。除了可以获得高分离度和快速分离外, 两次分离的优化还有助于提高 mAb 在不同分析过程中的重现性。为满足重复高通量进样序列的要求, 每次分离结束时均使用 90% 异丙醇对色谱柱进行快速冲洗, 使其快速重新平衡。

表 2A 梯度

溶剂 B%	时间 (min)
15	0
25	2.5
35	4.5
35	4.9
90	5.0
90	5.5
15	6.0

表 2B 梯度

溶剂 B%	时间 (min)
10	0
25	2.5
35	4.5
90	4.56
90	5.0
10	6.0

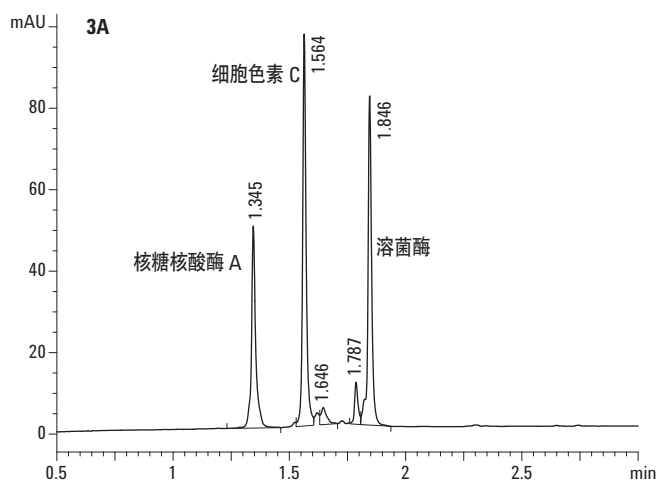


色谱柱 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm
 样品 单克隆抗体 (1.0 mg/mL) — BioCreative 公司 IgG1 和安捷伦公司标准 IgG1
 进样量 2 μL
 流动相 A 98/2 水/异丙醇 (0.1% TFA)
 流动相 B 70/20/10 异丙醇/乙腈/水 (0.1% TFA)
 流速 1.0 mL/min
 柱温 74 °C
 检测 UV, 280 nm

图 2. 在 2.1 × 50 mm Agilent ZORBAX RRHD 300SB 二苯基色谱柱上使用 UHPLC 优化分离两种不同来源的单克隆抗体。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 70/20/10 的异丙醇/乙腈/水 (0.1% TFA)。图 2 中的上方色谱图展示的是对 CDH 媒介表达的 mAb 的优化分离, 下方色谱图展示的是对 CHO 细胞株表达的人源化 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

在重复分析 mAb 的过程中，保持柱床的稳定性和入口滤芯的性能对于色谱柱能在高温和高压下连续操作至关重要。按照表 3 所列的条件，在 900 bar 的压力和低 pH 值条件下，通过重复进样对 ZORBAX RRHD 300 二苯基色谱柱的寿命进行评价。在 2.1×50 mm 色谱柱上，以核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶



样品	二苯基保留时间 (min)	二苯基“塔板数”
核糖核酸酶 A	1.35	50816
细胞色素 C	1.56	63533
溶菌酶	1.85	92272

图 3A. 采用 2.1×50 mm ZORBAX RRHD 300-diphenyl 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。分离条件如表 3 所列

表 3

色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基柱, 2.1×50 mm, $1.8 \mu\text{m}$	
样品	核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶 (3 mg/mL)	
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 μL (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

HPLC 仪器 Agilent 1290 Infinity 系列

检测 UV, 280 nm

组成的蛋白质混合标样作为样品，在 1.25 mL/min 的流速下重复进样 1000 次。分离得到的色谱图如图 3A 所示，充分说明了 2 min 以下的快速运行周期有利于延长柱寿命。在每次运行中，记录蛋白质梯度洗脱峰的宽度，同时密切监测背压的变化情况。如图 3B 所示，每隔 60 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，柱压也稳定在 900 bar 不变。稳定的峰宽和平稳的压力曲线表明色谱柱具有优异的填充柱床，其对于高流速（相对于 2.1 mm 内径色谱柱而言）、低 pH 值和高压下的连续操作具有优异的耐受性。此外，对大量蛋白质样品进行分析后，ZORBAX RRHD 300-diphenyl 色谱柱还可保持极佳的滤速，这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。

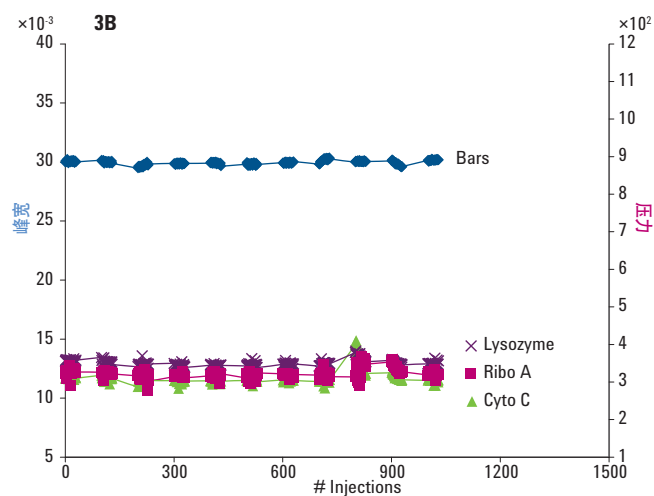
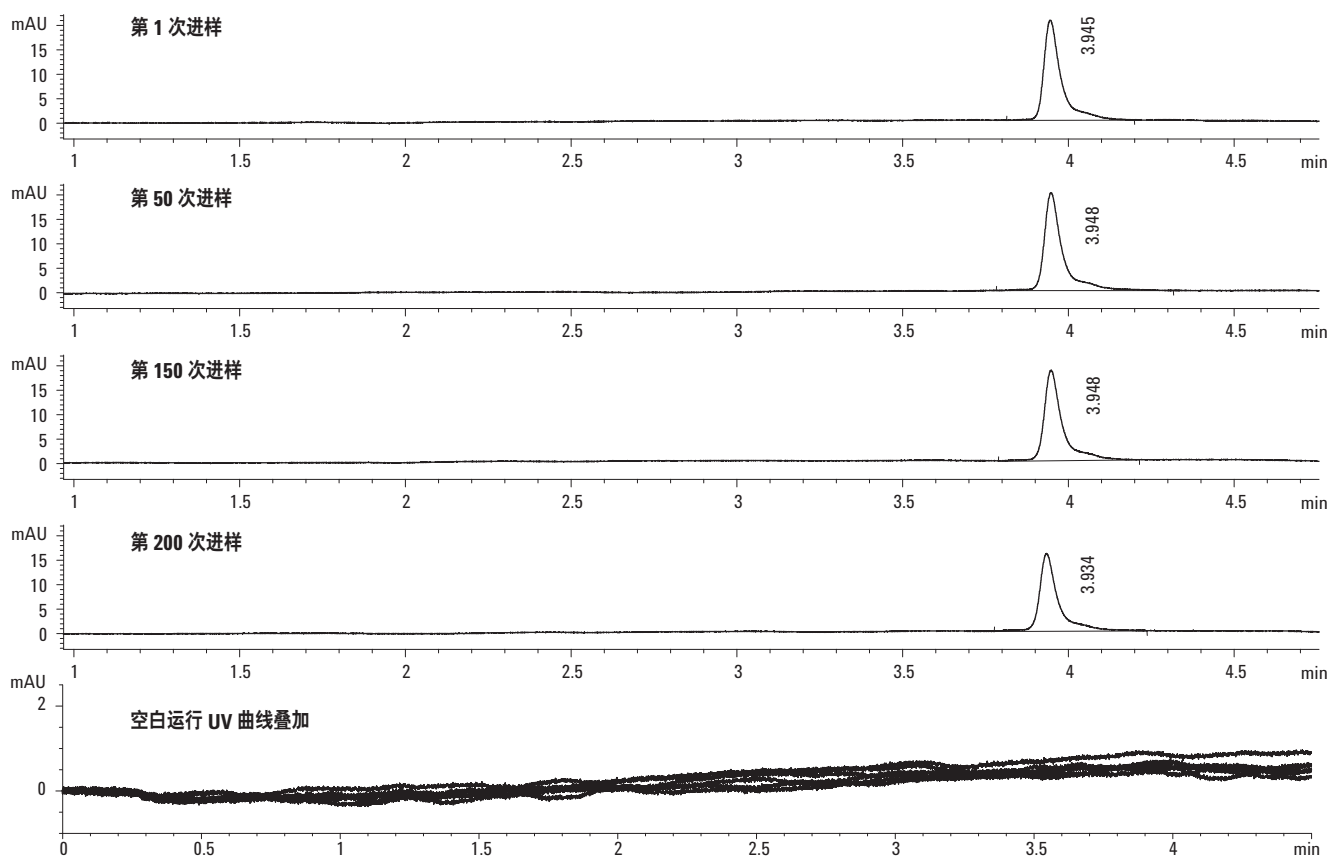


图 3B. 在较高的压力和流速 (1.25 mL/min) 下，绘制的 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基 2.1×50 mm 色谱柱寿命稳定性曲线。在 1000 次分析中，每隔 60 次进样对核糖核酸酶 A、细胞色素 C 和溶菌酶蛋白质组分的连续十次峰宽进行绘图。记录相同进样间隔的柱压，并以其相对于进样次数进行绘图

柱重现性

对完整人源化 mAb 样品进行 200 次进样分析，考察这一过程中色谱柱的重现性。按照表 2A 所列的梯度洗脱条件，对一根新的 2.1 × 50 mm ZORBAX RRHD 300-diphenyl 色谱柱进行重现性考察。为了评价色谱柱的重现性以及后运行对色谱柱的恢复能力，

连续进样 200 次，并且每 20 次运行后即进行一次空白运行，监测多次蛋白质进样的残留效应。设定分离条件，使色谱柱在高柱压 (>700 bar)、75 °C 的操作温度以及低 pH 条件下连续运行。如图 4 所示，对完整 mAb 的重复分离表明，保留时间和峰形表现出较高的重现性。此外，后运行空白结果表明，运行过程中 mAb 不存在残留污染 (见图 4 中最下方的图)。



色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm
样品	单克隆抗体 (IgG1) (1.0 mg/mL) ——BioCreative 公司 IgG1 和安捷伦公司标准 IgG1
进样量	1 μL
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
流速	1.0 mL/min
柱温	74 °C
检测	UV, 280 nm

图 4. 采用 Agilent ZORBAX RRHD 2.1 × 50 mm 300 二苯基色谱柱于 75 °C 柱温下对完整 mAb 样品重复进样分析 200 次。所示色谱图为第 1、50、150 和 200 次对完整的 mAb 样品的分离结果。底部图谱展示的是色谱柱评价过程中 5 次空白运行 UV 曲线的叠加，每分析 20 次样品后运行一次空白分析 (注：重叠曲线的满刻度量程为 2 mAu)。分离采用的梯度洗脱条件如表 2B 所列

结论

Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 1.8 μm 色谱柱可以实现对完整的和还原态单克隆抗体 (mAb) 的超快速高效分离, 适用于 mAb 的高通量筛选。针对特定抗体的要求, 通过系统的梯度洗脱条件优化, 可在 5 min 内实现对完整的与还原态 mAb 亚型的高分离度分离。独有的二苯基固定相和 RRHD 色谱柱技术可以实现稳定的可重复分离, 同时获得优异的峰形。与采用传统 C3 和 C8 固定相相比, 该色谱柱在梯度洗脱分离中表现出独有的选择性优势。

ZORBAX RRHD 300 二苯基色谱柱的稳定性 (寿命) 和重现性也通过重复进样分析得到了验证。在 900 bar 和低 pH 条件下连续进样 1000 次, 色谱柱的柱效保持稳定, 且对于柱床不稳定或筛板堵塞导致的背压上升表现出较高的耐受性。此外, 通过在 700 bar 条件下连续进行 200 次进样分析, 结果表明抗体的峰形、分离度和保留时间始终不变, 且空白运行中也没有发现色谱峰残留污染或在 UV 曲线上出现鬼峰。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、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7日，中国印刷
5990-9668CHCN



Agilent Technologies