



采用 Agilent Bio MAb NP5 色谱柱分析完整和羧基末端消解的 IgG1

应用简报

生物制药

作者

Xiaomi Xu 和 Phu T Duong
安捷伦科技有限公司

摘要

几乎所有蛋白质在 mRNA 翻译完成后都要经历修饰过程，而此类修饰很可能表现为重链羧基末端赖氨酸的存在或缺失。因此，监测单克隆抗体，特别是 IgG1 产品的一致性有着重要意义。安捷伦 Bio Mab 色谱柱专门设计用于单克隆抗体的电荷异质性（包含羧基末端赖氨酸变异）分析。Agilent Bio MAb NP5（非多孔型，5 μm ）4.6 \times 250 mm PEEK 色谱柱能够实现更高的分离度，同时能够改善峰形、提高定量准确度。将该型色谱柱安装于两种不同的高效液相色谱（Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱和 Agilent 1100 系列液相色谱）系统中，对两种不同来源的 IgG1 进行分析。



Agilent Technologies

前言

过去的十年中，单克隆抗体/IgG1 (mAb) 作为一种重要的生物治疗药物逐渐被大家所认知。然而由于其结构较为复杂，IgG1 常常表现为高度的异质性，这种异质性包含了各种各样的翻译后修饰。其中，比较常见的是治疗性抗体重链上羧基末端不同水平的赖氨酸修饰。虽然尚未完全掌握此类修饰对 IgG1 生物活性的影响，但是羧基末端赖氨酸变体异质性的程度能够反映产品的一致性，因此有必要对其进行评估。阳离子交换色谱法是表征 IgG1 电荷异质性的有效手段，Agilent Bio MAb NP5 具有良好的选择性，可以获得极高的分离度，特别适合 IgG1 分析。

实验部分

样品采用了两种不同来源的、皆为人源化的中国仓鼠卵巢细胞提取的单克隆抗体 IgG1。羧肽酶 B, NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 均购自西格玛奥德里奇 (美国密苏里州圣路易斯)。

羧基末端酶切步骤

IgG1, 1 mg/mL 溶于 10 mM pH 7.5 磷酸钠盐缓冲液，以 12.5 个单位羧肽酶 B 于 37 °C 条件下孵育 2h。

色谱条件

色谱柱: Agilent Bio MAb NP5, 4.6 x 250 mm PEEK (部件号 5190-2407)
流动相: A. 10 mM pH 5.5 磷酸钠缓冲液
B. A + 0.5 M NaCl
流速: 0.85 mL/min
梯度程序: 0-25min, 10-35% B (除非另有说明)
检测: UV 225 nm
样品: 5 μL 1 mg/mL 完整或羧基末端消解的 IgG1
仪器: Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱或 Agilent 1100 系列液相色谱

结果与讨论

羧肽酶 B 是一种可以水解蛋白质羧基末端碱性氨基酸 (如赖氨酸和精氨酸) 的酶。通过比较完整和羧基末端酶解 IgG1 的色谱图，可以鉴定 IgG1 链上羧基末端赖氨酸的连接情况。图 1 中所示为采用 Agilent Bio MAb NP5 色谱柱得到的完整和羧基末端酶解后 IgG1 (来源 A) 的叠加色谱图，上图是完整的色谱图，下图是上图椭圆形区域的放大图。大约在 2min 时最先流出羧肽酶 B。从色谱图中可以看出，来源 A 的 IgG1 含有四个碱性变体，其中有两个峰为赖氨酸变体 (lys-1, lys-2)。

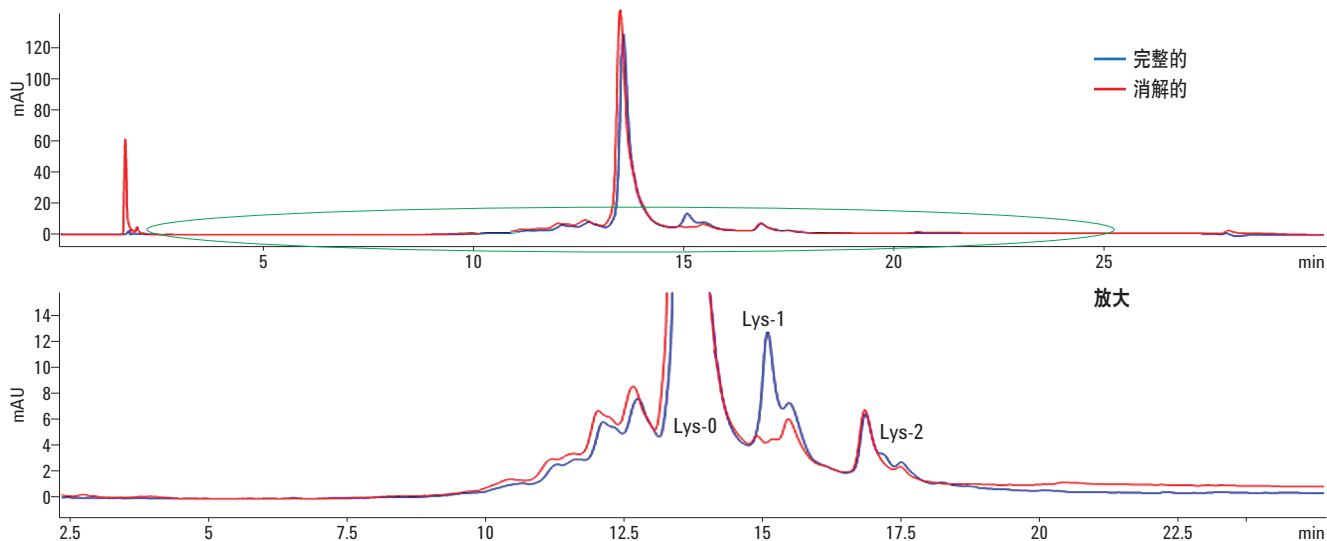


图 1. 采用 Agilent Bio MAb NP5 色谱柱分离完整和羧基末端消解的 IgG1 (来源 A)，梯度: 0-25min, 10-35% B

图 2 是来源 B 的 IgG1 完整和酶解后色谱图，从图中可以看出，IgG1 含有两个碱性变体，而这两个碱性变体都来源于赖氨酸 (lys-1, lys-2)。通过比较消解后的 IgG1 色谱峰，很容易观察到这两个宽峰含有赖氨酸变体的信息。

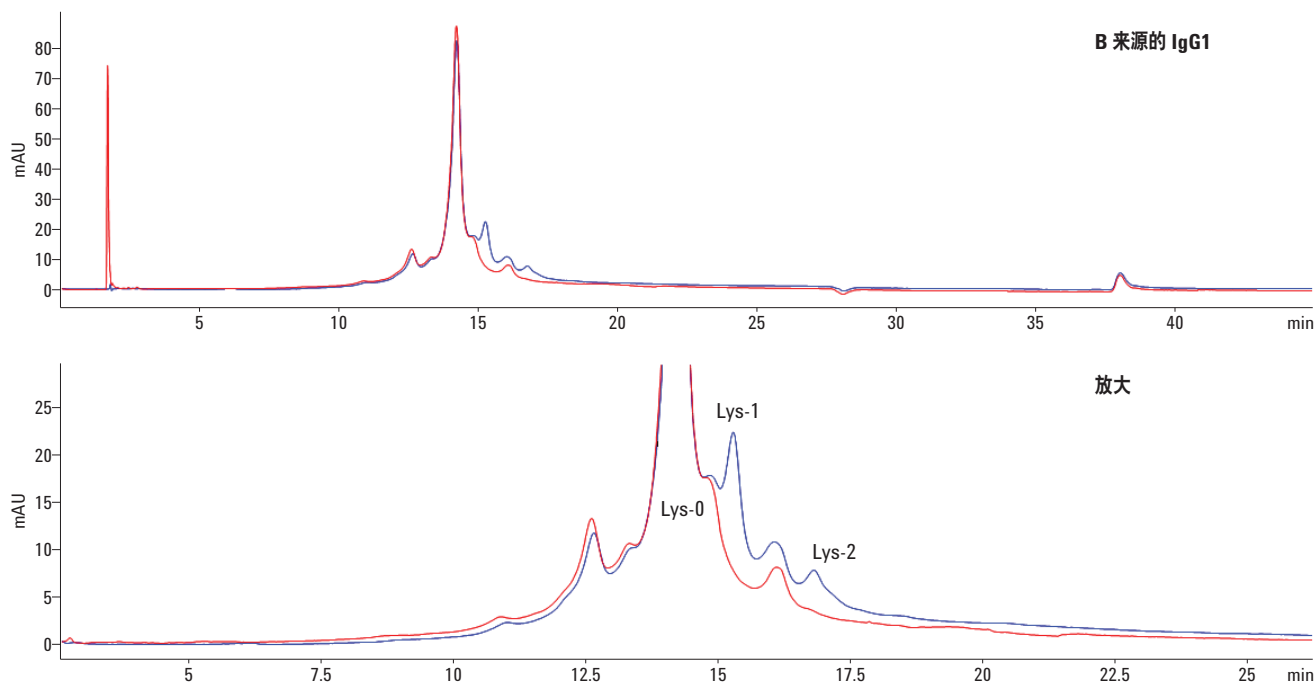


图 2. 采用 Agilent Bio MAb NP5 色谱柱分离完整和羧基末端消解的 IgG1 (来源 B)

由于分离度较高，可以计算来源 A 中变体 lys-1 和 lys-2 的峰面积（图 3），其面积分别为 272 和 148，各占总面积的约 8.64% 和 1.34%。通过重复 10 次 IgG1（来源 A）进样测试该分析方法

的重现性。测试结果表明保留时间、峰形、峰面积具有高度的一致性。同时，也对来源 B 羧基末端峰的计算数据进行了分析（数据未示出）。

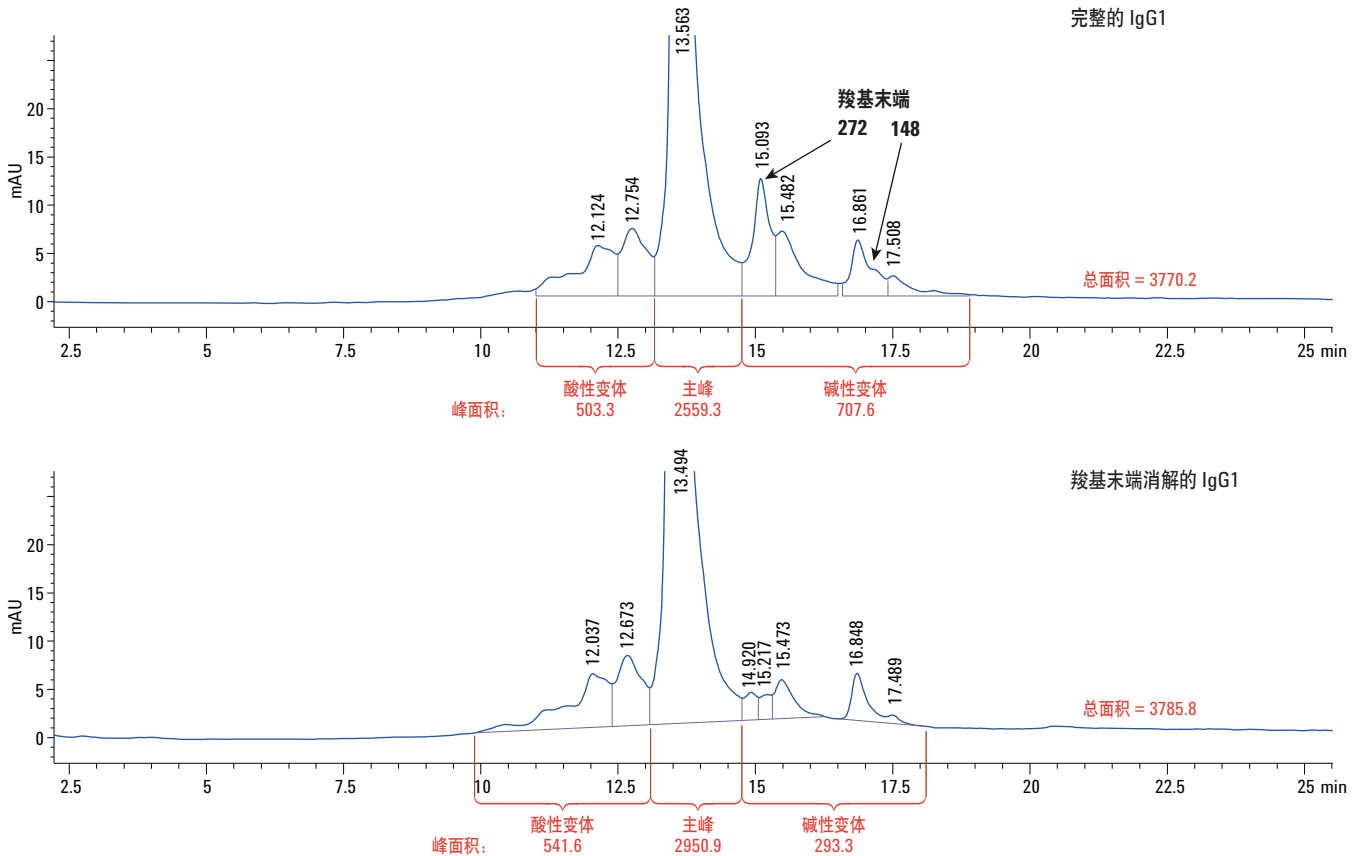


图 3. 在 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上使用 Agilent Bio MAb NP5 色谱柱分析羧基末端消解的 IgG1（来源 A）的计算数据

在 Agilent 1100 系列液相色谱仪上重复相同的试验，图 4 是采用 Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm 色谱柱分析完整（上图）和羧基末端消解（下图）的 IgG1（来源 A）所得到的色谱图。很显然，正如之前的报道 [1]，Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统（B 栏，右侧）可以实现更好的峰形和更高的灵敏度。

结论

Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm 色谱柱用于 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统时，可以实现对 IgG1 单克隆抗体的高分离度分析。两种不同来源 IgG1 的分离结果和赖氨酸变体百分比也各不相同。虽然两种 IgG1 都来源于中国仓鼠卵巢细胞系，但不同的生产工艺导致两种 IgG1 中的赖氨酸含量不同。

参考文献

1. P. T. Duong, F. Ahmed, T. Clary. “HPLC 分离单克隆抗体的电荷变异体：使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统对比 Agilent Bio Mab NP10 和竞争产品 10 μm 粒径 WCX 色谱柱”。应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-6844CHCN (2010)。

更多信息

这些数据代表了典型的分析结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

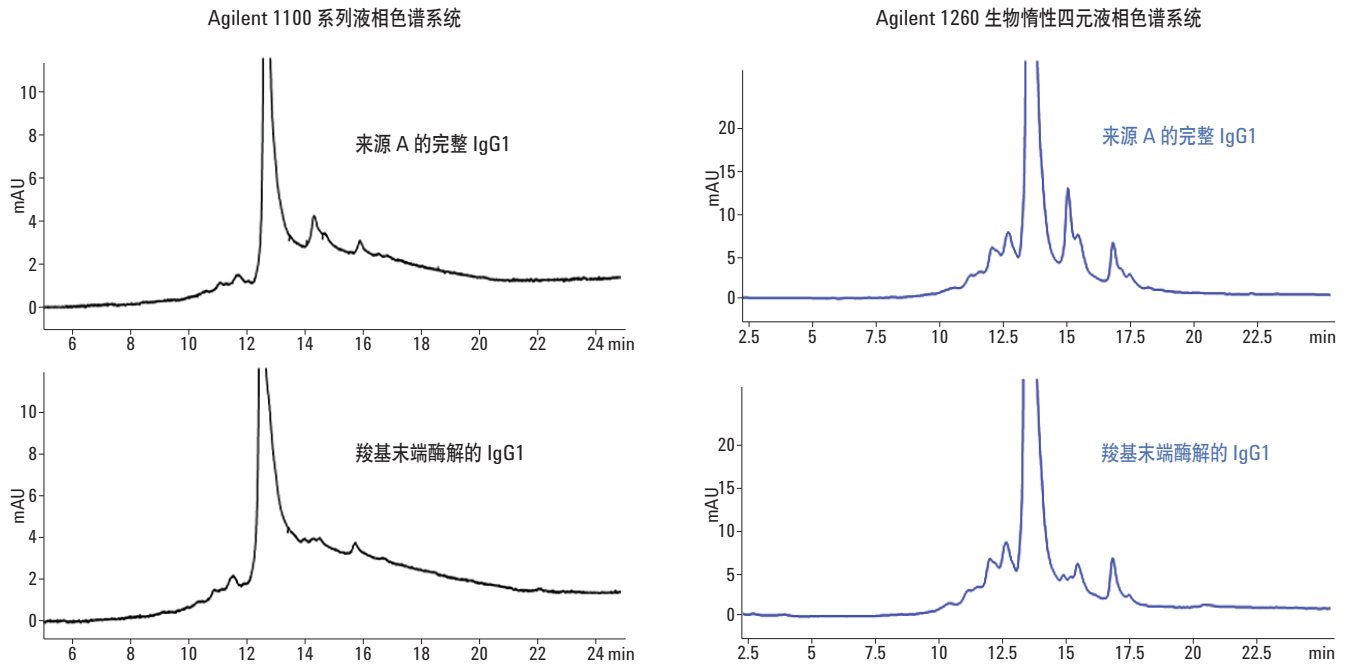


图 4. 分别在 Agilent 1100 系列液相色谱和 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上，使用 Agilent Bio Mab NP5 PEEK 色谱柱，对来源 A 的完整和羧基末端酶解 IgG1 进行分离的结果对比

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2012
2012年8月6日，中国印刷
5991-0895CHCN



Agilent Technologies