



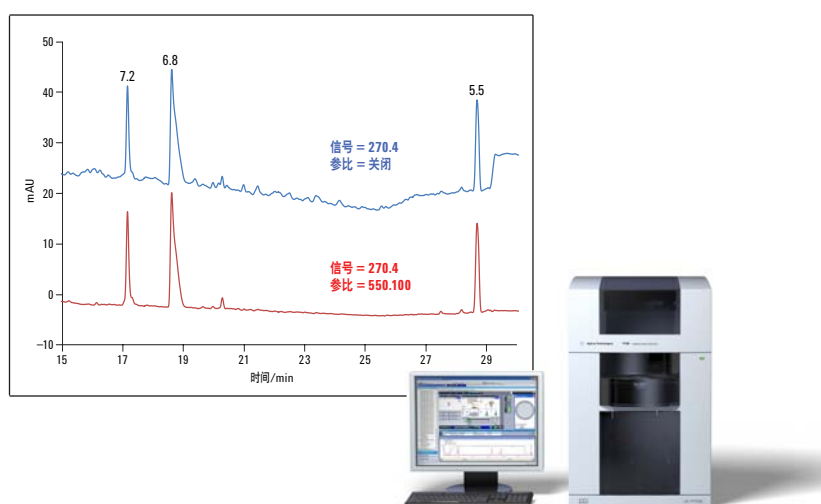
通过 Agilent 7100 毛细管电泳系统的毛细管等电聚焦进行单克隆抗体电荷异质性分析

应用简报

生物制药

作者

Christian Wenz
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany



摘要

单克隆抗体 (mAb) 作为治疗药物具有重要意义，因此人们对能够表征这种复杂分子的高分离度分析方法的需求正不断增长。mAb 的一个重要特性是它的电荷状态可能会在生产过程期间和之后发生变化。而毛细管等电聚焦 (cIEF) 正是一种非常有效的测量 mAb 电荷异质性的方法。本应用简报中展示了如何利用 Agilent 7100 CE 系统的 cIEF 对 mAb 电荷异构体进行高分离度的分析。



Agilent Technologies

前言

毛细管电泳 (CE) 法已成为生物制药产品开发和质量控制中一种不可或缺的工具¹。一些基于 CE 的方法也已经运用到治疗性蛋白特别是 mAb 的鉴定和纯度测定中, 例如毛细管凝胶电泳 (CGE) 和毛细管区带电泳 (CZE) 或毛细管等电聚焦 (cIEF), 前者根据流体半径实现分离, 后者根据电荷异质性实现分离。

在很多生物技术实验室中, 毛细管 IEF 技术已经取代了平板凝胶 IEF 技术, 这是由于相比平板凝胶 IEF 技术, 毛细管 IEF 技术具有更多的优势, 例如自动化程度高、重现性和定量分析能力强。一些修饰会影响 mAb 的电荷状态, 包括酰胺化/去酰胺化、C 端赖氨酸缺失、N 端焦谷氨酸盐的形成或多糖唾液酸化等。由于这些修饰会严重影响治疗药物的免疫原性和整体生物活性, 因此监管机构要求对这些电荷异构体进行监测。

本研究简报利用 Agilent 7100 毛细管电泳系统, 描述并评价了一种常见的分析 mAb 电荷异构体的高分离度 cIEF 方法^{2,3}。并采用四台不同的 CE 仪器测定中间精密度的。

实验部分

材料

来源于小鼠骨髓瘤细胞系 MOPC 21 的 IgG1 Kappa (mIgG1-k), IEF 标志物, 尿素, L-精氨酸, 亚氨基二乙酸和三 (羟甲基) 氨基甲烷购自西格玛奥德里奇公司 (美国圣路易斯), Pharmalyte 5-8 购自通用电气医疗集团生命科学 AB 公司 (瑞典乌普萨拉), 盐酸和冰醋酸购自默克公司 (德国达姆斯塔特), 磷酸购自杰帝贝柯公司

(美国奥斯汀)。0.05 × 670 mm 中性涂层毛细管 (贝克曼库尔特部件号 477441) 和 cIEF 凝胶 (贝克曼库尔特部件号 477497) 购自贝克曼库尔特公司 (美国富勒顿)。其它所有材料和仪器均来自安捷伦科技公司 (德国瓦尔特布隆)。

样品前处理

在 CE 分析前, 使用 Microcon YM-30 离心过滤装置 (密理博公司, 美国贝德福德) 及 20 mM 的 Tris/HCl, pH 值为 8 的缓冲液对 mAb 样品进行脱盐处理。利用 Qubit 分析 (生命技术公司, 英国佩斯利) 法测定蛋白浓度, 可得脱盐后蛋白浓度为 2–3 mg/mL。在 0.5 mL 离心管中加入下列试剂, 得到供 cIEF 分析的样品溶液:

- 100 μ L cIEF 凝胶 (含有 3 M 的尿素)
- 3.0 μ L Pharmalyte 5-8
- 4.5 μ L 500 mM L-精氨酸 (阴极稳定剂)
- 5.0 μ L 200 mM 亚氨基二乙酸 (阳极稳定剂)
- 约 3 μ L IEF 混合标志物
- 10 μ L 脱盐后的 mAb

各试剂在样品溶液中的终浓度为: 80% cIEF 凝胶, 2.4 M 尿素, 2.4% Pharmalyte 5-8, 18 mM L-精氨酸, 8 mM 亚氨基二乙酸以及 0.16–0.24 mg/mL mAb。IEF 标志物 5.5/6.2/6.6/6.8/7.2 的体积分别为 0.5/1.0/0.2/2.0/0.2 μ L, 所得的终浓度分别为 12/8/1.6/16/1.6 ng/mL。混合物涡旋 10 s, 短暂离心并转移至 100 μ L CE 样品瓶中。样品溶液存放在 CE 仪器自动进样器的样品盘中, 控温 10 °C, 并在 24h 内完成分析。

CE 条件

在所有 CE 分析中, Agilent 7100 CE 系统配有外部水浴, 温度设置为 6 °C, 并配有检测器滤光片 (部件号 G7100-62700), 以及 4 bar 的外压。将中性涂层毛细管的两端剪短, 使其两端到检测器窗口的距离分别为 8.5 cm 和 24.5 cm, 安上绿色的准直接口 (部件号 G7100-60210), 并放入安捷伦毛细管卡套中。每天对毛细管进行一次高压冲洗, 条件为: 3.5 bar, 350 mM 乙酸冲洗 5 分钟, 纯水冲洗 2 分钟, cIEF 凝胶冲洗 5 分钟。每次进样前对毛细管进行高压冲洗, 条件为: 3.5 bar, 4.3 M 尿素溶液冲洗 3 分钟, 纯水冲洗 2 分钟。采用 2 bar 高压进样 100s, 然后将进出口电极浸入水中。聚焦的条件为: 25 kV, 5 分钟, 阳极电解液为 200 mM 磷酸, 阴极电解液为 300 mM NaOH。化学淌度的条件为: 出口瓶溶液更换为 350 mM 乙酸, 30 kV 保持 30 分钟。每次分析后对毛细管进行高压冲洗, 条件为: 3.5 bar, 纯水冲洗 2 分钟。所有的冲洗均为正向模式, 即压力均施加于进口瓶。毛细管温度保持在 20 °C。如无另作说明, 检测器波长为 270 nm, 带宽为 4 nm (无参比波长)。检测器响应时间为 2 秒。所有的试剂均放置于 2 mL 玻璃瓶中。废液瓶留空, 其余填充体积为 1.6 mL。每 3 次分析后, 更换所有的试剂瓶。

结果与讨论

Agilent 7100 CE 仪器方法的适用性

本应用简报中使用商业化的小鼠 mAb 作为模型蛋白，并应用载体两性电解质（pH 值范围为 5-8），展示了 Agilent 7100 CE 系统运行高分离度 cIEF 方法^{2,3}的适用性。其中为了抑制电渗流，采用了中性涂层毛细管进行分离，填充凝胶为乙二醇和聚环氧乙烷的水溶液混合物，并添加尿素以增加蛋白溶解性。此外，在样品溶液中添加阳极稳定剂亚氨基二乙酸和阴极稳定剂 L-精氨酸，以避免聚焦过程中载体两性电解质和样品成分的丢失（见实验部分）。

图 1 表示的是其中一台仪器测得的结果。就峰高、分析时间和分离度而言，这些结果与使用相同样品的已发表数据极为相似²。为使 7100 CE 系统更好地适应高分离度的 cIEF 技术，我们对方法做了两个改动。第一，略微延长毛细管，最终总长度为 33 cm，有效长度为 24.5 cm。这是使毛细管与 7100 CE 系统毛细管卡套匹配所必需的。为了弥补由于毛细管长度增加导致的分析时间延长，将样品溶液中阳极稳定剂亚氨基二乙酸的浓度从 4 mM 提高到 8 mM。第二，吸收波长设置为 270 nm。选择此检测波长的原因是由于检测器滤光片的使用会限制 280 nm 处的光强度⁴。这种滤光片只能传输 260 nm 左右及 450 nm 以上的光。使用这种滤光片的目的是为了避免样品化合物在高能 UV 光下变性。低波长检测的一个缺点是由于两性电解质吸光度增加，从而导致背景噪音

增加。但如果使用一种可见光作为参比波长（见图 2）。并且使用参比波长的另一个优点是可以提高基线稳定性。

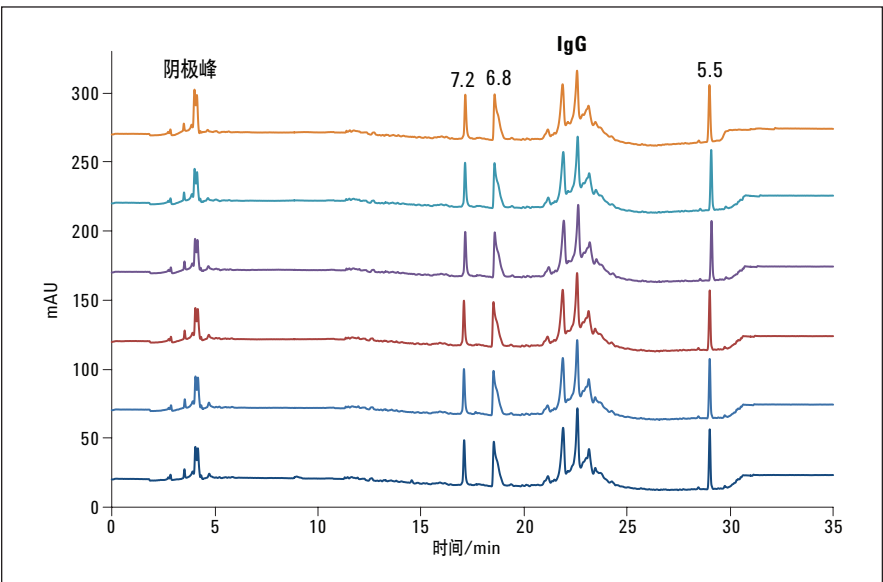


图 1
利用 Agilent 7100 CE 系统进行 mAb 异构体分析。采用高分离度 cIEF 分析包含有 mIgG1- κ 和 IEF 标志物 5.5, 6.8 和 7.2 的样品。图中显示的是 6 次连续进样的电泳图

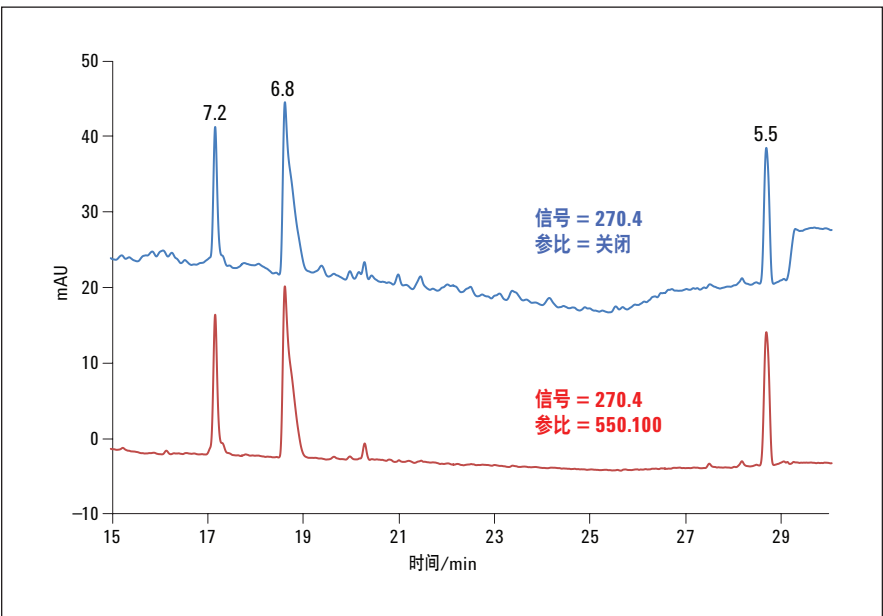


图 2
使用和未使用参比波长时的数据。采用 cIEF 分析只含有 IEF 标志物的样品。图中显示的是相同分析中未使用参比波长（蓝色）和使用参比波长（红色）时的电泳图。未使用参比波长时，21 至 25 分钟间的 ASTM 噪音为 0.12 mAU，而使用参比波长时，该噪音为 0.039 mAU。IEF 标志物的峰高在两种情况下类似

中间精密度

利用上述 cIEF 方法，采用四台不同的仪器进行 mAb 异构体等电点 (pI) 的定量分析和相对丰度测定。我们使用 ChemStation 软件对所有峰进行自动积分，并将 mAb 峰划分为不同的异构体，如图 3。利用标志物 pI 与迁移时间得出的线性回归方程计算各异构体的表观 pI。如表 1 中所示，各个异构体表观 pI 的中间精密度的中间精密度为 0.105 RSD% 或更小。这与已发表的实验室内中间精密度值 (0.1 RSD%) 相符³。相对峰面积超过 20% 的主要异构体 B、C 和 D 的相对峰面积中间精密度良好。但是次要异构体 A 和 E 的中间精密度均超过 10 RSD% (表 1)。这可能是由于这些次要异构体的峰边界较难界定 (图 3)，并且可能与两性电解质吸光度增加引起的背景增强有关。这两种效应相结合对积分算法提出了挑战。但是图 1，3-4 和表 1 中的数据均是在未使用参比波长的情况下获得的。而参比波长的使用很可能会对结果有所改善 (图 2)。

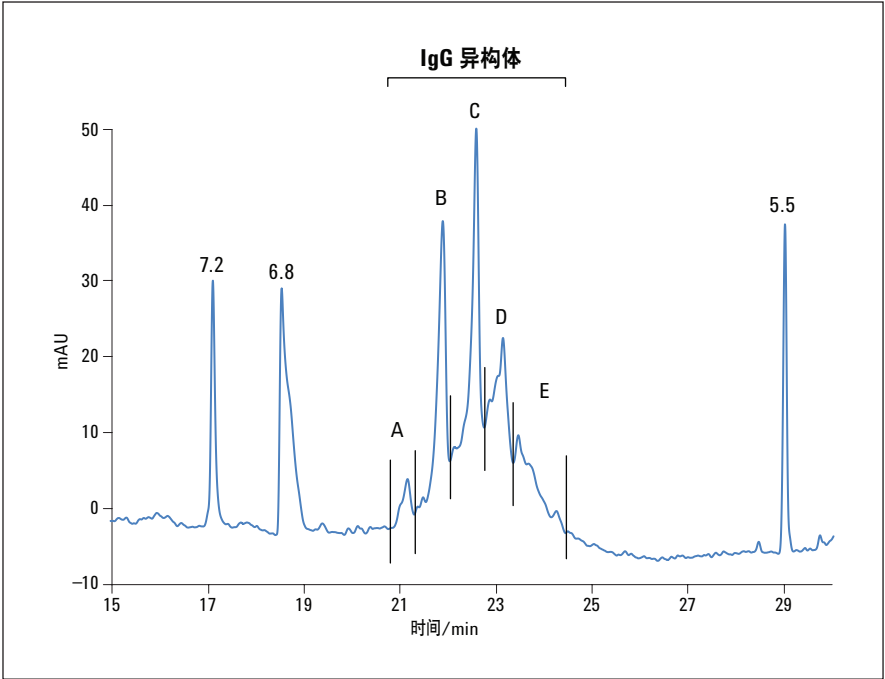


图 3
mAb 异构体的定量分析。部分放大图 1 中的一张电泳图，将 mIgG1 峰划分为 5 个异构体，分别表示为 A-E，如图中所示

异构体	表观等电点			峰面积 (%)		
	平均值	SD	RSD%	平均值	SD	RSD%
A	6.546	0.007	0.105	4.29	0.47	10.93
B	6.457	0.004	0.056	23.22	0.58	2.50
C	6.365	0.003	0.042	32.94	0.69	2.08
D	6.290	0.002	0.036	25.66	1.48	5.77
E	6.232	0.002	0.029	13.89	1.76	12.67

表 1
运用高分离度 cIEF 的 Agilent 7100 CE 系统的中间精密度。数据来源于四台 CE 仪器，其中每台仪器分别在四天内进行了六次分析 (n=24)。异构体 A-E 峰的划分如图 3 所示

一组不同 mAb 的分析

我们利用生物科技公司提供的三种等电点在 5.5 至 6.8 之间的不同 mAb，检验所用 cIEF 方法的适用性（图 4）。每种 mAb 的电荷异构体均实现了良好的分离。其中 mAb2 的电泳图信息量特别丰富，6 种电荷异构体均得到了清晰的分离。

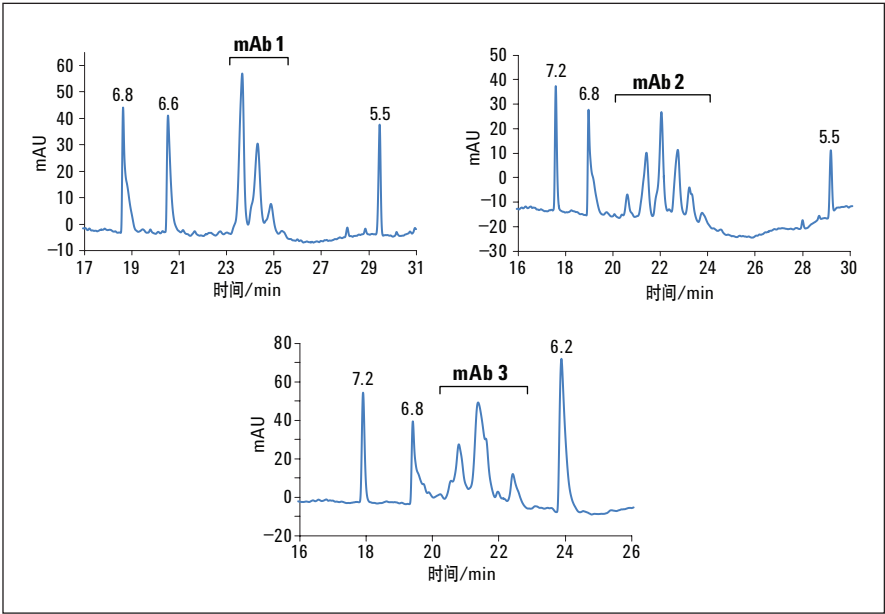


图 4
一组不同 mAb 的分析。采用与 mIgG1- κ 相同的方法分析来自生物科技公司的三种 mAb。在 mAb1 和 mAb3 的分析中使用了不同的 IEF 标志物

结论

本研究简报证实了 Agilent 7100 CE 系统可实现对 mAb 电荷异构体的可靠及高精度分析。在此系统中对已建立的高分离度 cIEF 方法略作修改，并将结果与已发表的数据进行比较。可知主要 mAb 电荷异构体的等电点和相对丰度的中间精密度良好。并且，我们采用一组不同的 mAb 测试了方法的适用性。7100 CE 系统的灵活性设计使其可以方便地对现有 cIEF 方法进行修改。这种易于使用的设计既可以对现有商业 cIEF 或 CGE 试剂盒方法进行微调⁵，也可以进行单独的 CZE 方法开发。此外，空气冷却卡套可供快速更换任意标准熔融石英毛细管，且 7100 CE 系统的二极管阵列检测器支持在广泛应用中进行方法最优化以提高灵敏度。

参考文献

1.
Guo, A., Camblin, G., Han, M., Meert, C. and Park S., "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis; Vol. 9 of separation sciences and technology series", Ahuja, S. and Jimilar M. I. (Eds.), Academic Press, Chapter 14, **2008**.
2.
Mack, S., Cruzado-Park, I., Chapman, J., Ratnayake, C. and Vigh, G., "A systematic study in CIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness", Electrophoresis 30, 4049-4058, **2009**.
3.
Salas-Solano, O. et al., "Intercompany Study to Evaluate the Robustness of Capillary Isoelectric Focusing Technology for the Analysis of Monoclonal Antibodies", Chromatographia 73, 1137-1144, **2011**.
4.
安捷伦科技技术文件, "7100 Capillary Electrophoresis System: Installing the detector filter assembly" (7100 毛细管电泳系统: 安装检测器滤光片), 部件号 G7100-90111
5.
Wenz, C., "Performance of commercially available gels for protein characterization by capillary gel electrophoresis with UV detection on the Agilent 7100 CE system" (采用 Agilent 7100 CE 系统通过毛细管凝胶电泳和 UV 检测进行蛋白质表征以测定商品化凝胶的性能), 安捷伦科技应用简报, 出版号 5990-7976CHCN

www.agilent.com/chem/ce

© 安捷伦科技公司, 2012
2012 年 9 月 1 日 中国出版
出版号 5991-1142CHCN



Agilent Technologies