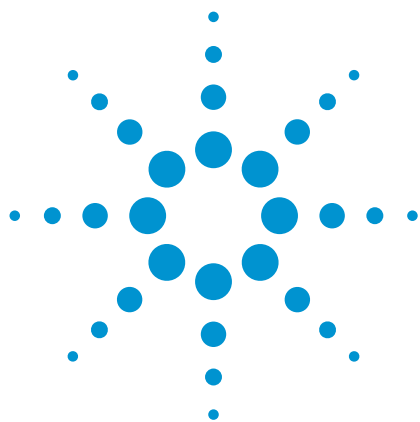




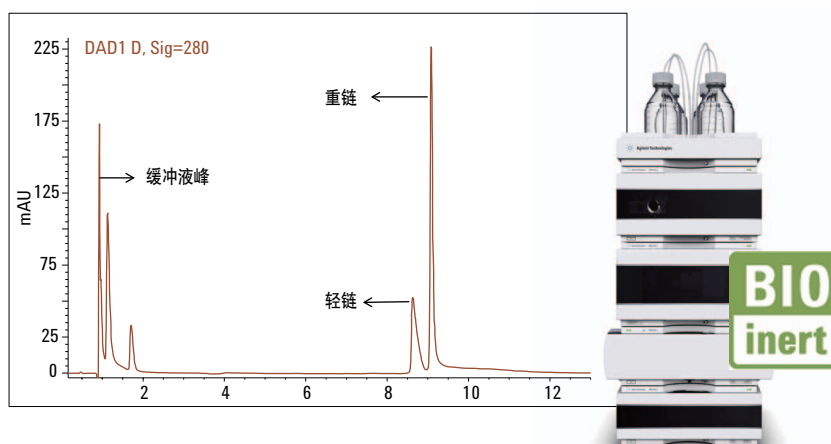
利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 二苯基亚 2 μm 色谱柱分析 IgG1 中的二硫键

应用简报

生物制药

作者

M. Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技公司
班加罗尔, 印度



摘要

本应用简报报导了一种简易的反相 HPLC 方法，用于分析单克隆抗体 (mAb) 中的二硫键。其中通过 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基亚 2 μm 粒径色谱柱实现分离。在完整蛋白质及肽段消化物的反相分离中，二苯基 1.8 μm 色谱柱能够提供 UHPLC 级别的性能。当与 UHPLC 仪器联用时，这种通用型色谱柱可在更短的分析时间内获得更全面的表征结果。1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的耐压能力高达 600 bar，能够承受采用更低粒径（低至 1.7 μm ）的新型色谱柱技术所要求的更高压力。



Agilent Technologies

前言

虽然近年来重组 mAb 疗法取得了很大的发展，但是关于它们的二硫键模式，人们所掌握的信息很少。研究 IgG1 抗体中完整的二硫键分布极具挑战性，这是由于它们的分子量很大，并且二硫键的数目很多。对于治疗性单克隆抗体 (mAb)，二硫键是保持免疫球蛋白 (IgG) 三级和四级结构的关键因素。在 mAb 生产过程中，链间和链内的二硫键均在表达宿主细胞内形成，然后进行分泌和纯化。之前的报道指出，对于 IgG2 及二硫化介导的 IgG4 臂交换，二硫键会发生重排，反映出这些 IgG 类型的一种固有行为^{1,2}。但是，已有报道观察到 IgG1 中的二硫键数目呈现出不规则的显著降低³，这对于治疗性 mAb 的生产而言是一个很重要的问题。本应用简报证实了 1260 生物惰性四元泵液相色谱系统适用于 IgG1 中二硫键的分离和分析，该系统采用反相 HPLC 方法和 ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 × 100 mm，1.8 μm 粒径色谱柱。采用亚 2 μm 粒径色谱柱的超高效液相色谱 (UHPLC) 分离，可改善每次分析的分离度和灵敏度，缩短分析时间，并且可用于分析 IgG1、还原态 IgG1，以及 IgG1 消化产生的肽段。

仪器设备

仪器

具有完全生物兼容性的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，最高耐压为 600 bar，由以下模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高效自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列自动进样器恒温器 (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱，配置生物惰性嵌入式加热元件 (G1316C，选项 19)

- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器，配置 60 mm 最大光强高灵敏度流通池 (G4212B 选项 33)
- Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 × 100 mm，1.8 μm 粒径色谱柱 (部件号 858750-944)。

整个样品流路中不含任何金属部件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送系统中不含任何不锈钢或铁质部件。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation，LC 和 LC MS 系统版，修订版 C.01.04

HPLC 分析

参数	条件	
流动相 A	水 + 0.1% TFA	
流动相 B	乙腈 + 0.09% TFA	
梯度程序	时间 (min)	流动相 B (%)
	0	25
	3	35
	4	40
	5	40
	15	90
	16	25
	后运行时间	5 min
进样体积	3 μL (洗针进样，针冲洗口启动 7 秒)	
流速	0.3 mL/min	
数据采集	214 和 280 nm	
采集速率	20 Hz	
流通池	60 mm 光程	
柱温箱	50 °C	
样品恒温箱	5 °C	

表 1
RP HPLC 的色谱参数

试剂、样品与材料

人单克隆抗体 IgG1 是一种专利性药物分子。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、三羟甲基氨基甲烷碱以及蛋白内切酶 Lys C 均购自美国西格玛奥德里奇公司。所有的化学品和试剂均为 HPLC 级，高纯水由 Milli Q 纯水系统（Millipore Elix 10 型，美国）制备。乙腈为梯度极，购自 Lab-Scan 公司（泰国曼谷）。

完整 IgG1 的还原和烷基化

用 100 mM Tris HCl 和 4 M Gu HCl，pH 8.0 将 IgG1 稀释至 2 mg/mL。加入 10 μ L 0.5 M DTT 储备液，使其终浓度为 5 mM。混合物在 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟。然后待反应混合物短暂冷却至室温。加入 26 μ L 0.5 M 碘乙酰胺储备液，使其终浓度为 13 mM。反应 45 分钟。移去后加入 20 μ L DTT 以淬灭反应，并使终浓度为 10 mM。

Lys C 消化 IgG1 和还原

用 100 mM Tris HCl，pH 8.0 将 IgG1 稀释至 1 mg/mL。加入蛋白内切酶 Lys C 的 100 mM Tris HCl 溶液，pH 8.0，其中酶和蛋白质的比例为 1:100 (w/w)。混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。然后加入 10% TFA 将 pH 值降至 6.0 以停止反应。然后，使用本应用简报上文中介绍的方法还原 Lys C 消化后的 IgG1。

结果与讨论

分离和检测

ZORBAX RRHD 300 二苯基 1.8 μ m 粒径色谱柱具有可耐受低 pH 和温度稳定性好的优势，与耐压 600 bar 以及能在更高压力下运行的 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用时，可用于分离蛋白质。

图 1 A 展示了优化后完整 IgG1 的 RP HPLC 洗脱图谱，其中采用了 ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 $\times$ 100 mm，1.8 μ m 粒径色谱柱，证实了 IgG1 在 15 分钟内具有优异的保留性。进行 6 次重复实验以检测分析的重现性。图 1 B 为 6 次重复实验的叠加图。

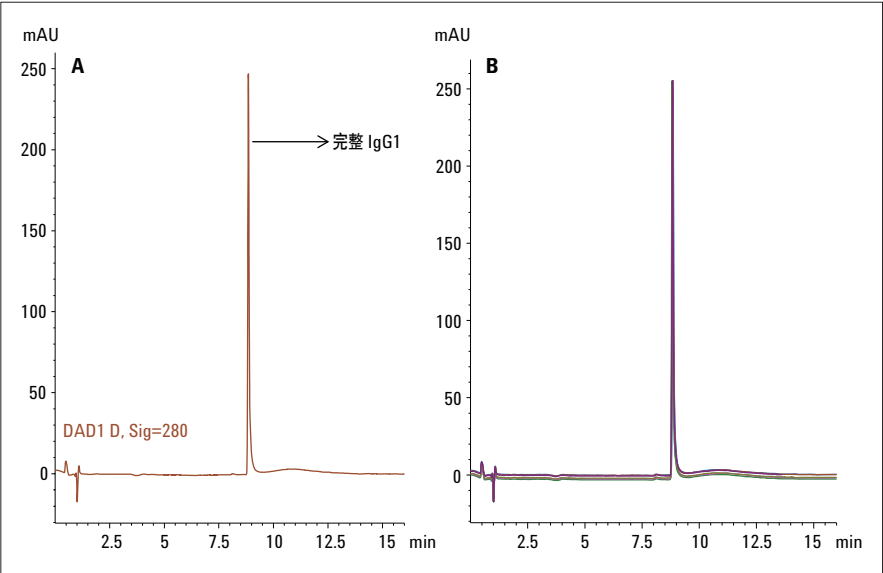


图 1 利用 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 $\times$ 100 mm，1.8 μ m 粒径色谱柱所得的完整 IgG1 的 RP HPLC 谱图 (A)，以及六次重复的叠加图 (B)

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: $\pm$ 3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: $\pm$ 5.0%)
8.838	0.086	1,170	0.461

表 2 保留时间和峰面积 RSD (%), 完整 IgG1, n = 6

还检测了对完整 IgG1 中二硫键进行还原和烷基化的效果。图 2 **A** 展示了经过还原和烷基化后的 IgG1 反相色谱图，**B** 为与还原/烷基化缓冲液空白的叠加图，**C** 为 6 次重复实验的叠加图以展示分离的重现

性。由于二硫键的还原，IgG1 被分为轻链和重链。IgG1 洗脱后，存在明显的轻链 (LC) 和重链 (HC)，如图 2 中所示；但是，质谱分析未能证实这一点。

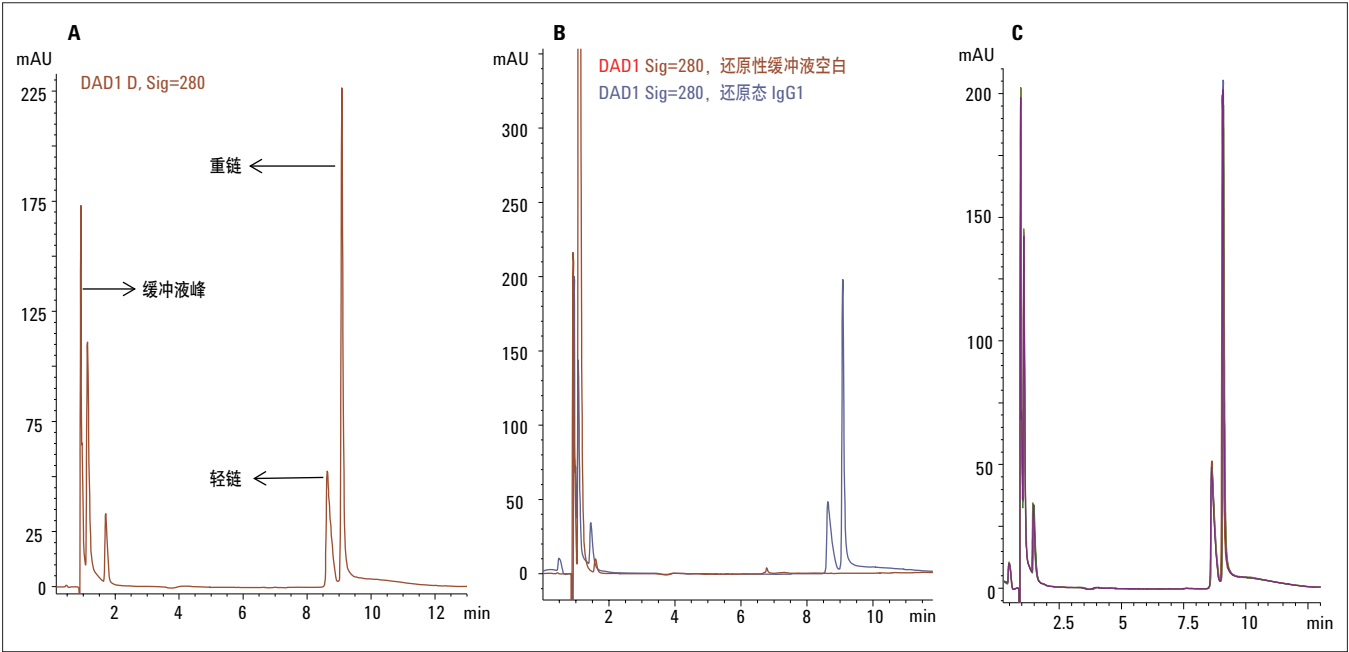


图 2
(A) 还原和烷基化 IgG1 的 RP HPLC 谱图，(B) 与缓冲液空白的叠加图，(C) 六次重复的叠加图

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: $\pm 3.0\%$)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: $\pm 5.0\%$)
8.638	0.091	504.33	2.780

表 3
保留时间和峰面积 RSD (%), 轻链, n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: $\pm 3.0\%$)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: $\pm 5.0\%$)
9.084	0.152	1,520	0.390

表 4
保留时间和峰面积 RSD (%), 重链, n = 6

在未还原状态下，完整 IgG1 的 Lys C 消化物所得的肽图会形成复杂程度较低的 RP HPLC 谱图。IgG1 消化物的代表性色谱图（图 3 A）中显示了两个用于峰面积和保留时间精密度评估的峰（基线分离）。叠加图中展示了尖锐的色谱峰，且具有良好的分离度和优越的分离重现性（图 3 B）。

此外，我们想要比较未还原和还原状态下 IgG1 的反相色谱图，以测定二硫键所连接的肽段。图 4 中展示了未还原（红线）和还原（蓝线）IgG1 的 Lys C 肽图的叠加图。还原后，IgG1 的 Lys C 消化物中出现了额外的色谱峰（以 * 号表示），证实了它们由二硫键连接。

保留时间和峰面积的精密度

完整 IgG1、还原态 IgG1 和未还原状态下蛋白内切酶 Lys C 消化后的 IgG1 的保留时间和峰面积精密度分别如表 2、3 和 4 中所示。结果显示 ZORBAX 二苯基亚 2 μm 色谱柱的保留时间和峰面积的精密度分别在 3% 和 5% 以内。

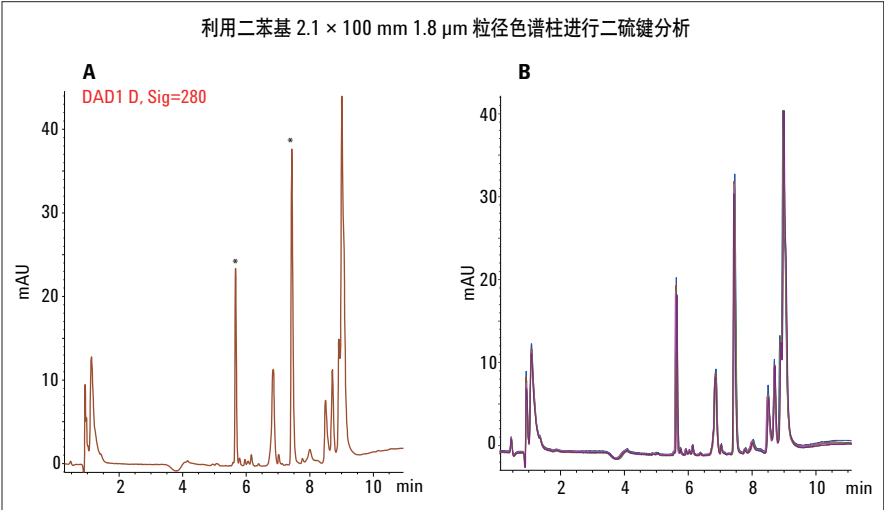


图 3
(A) Lys C 消化后 IgG1 的 RP HPLC 谱图以及 (B) 六次重复的叠加图。用于保留时间和峰面积 RSD 检测的峰以 * 号标示

	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD (限值: ± 3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ± 5.0%)
色谱峰 1	5.525	0.307	60	0.544
色谱峰 2	7.444	0.140	132.45	1.113

表 5
保留时间和峰面积 RSD (%), Lys C 消化后 IgG1, n = 6

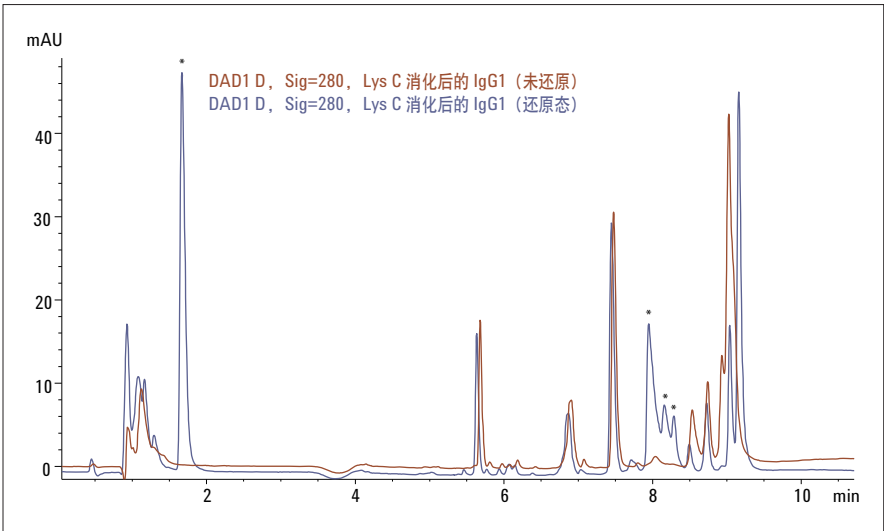


图 4
比较未还原（红线）和还原（蓝线）状态下 Lys C 消化后 IgG1 的肽图。二硫键连接的肽段以 * 号标示

结论

在生物制药工艺开发和监测过程中，二硫键分析对于研究蛋白的一些翻译后修饰非常重要。我们展示了将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性系统液相色谱系统与 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基， 2.1×100 mm， $1.8 \mu\text{m}$ 粒径色谱柱联用，能够实现单克隆抗体中二硫键的可重复高分离度分析，适用于生物制药工艺开发和监测。优越的峰面积和保留时间精密度证实该方法具有可靠性。此外，1260 Infinity 生物惰性液相色谱的耐压高达 600 bar，能够采用压力要求更高的新型小粒径（低至 $1.7 \mu\text{m}$ ）色谱柱技术。仪器的生物惰性和抗腐蚀性加上简单和可重复的方法，使得这种解决方案特别适合用于生物制药行业中单克隆抗体的 QA/QC 分析。

参考文献

1.
R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng,
Strategies for locating disulfide bonds
in a monoclonal antibody via mass
spectrometry spectrometry, *Rapid
Commun. Mass Spectrom.* 13 (**1999**)
2503–2510.
2.
T.-Y. Yen, H. Yan, B.A. Macher,
Characterizing closely spaced, complex
disulfide bond patterns in peptides and
proteins by liquid chromatography/
electrospray ionization tandem mass
spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 37
(**2002**) 15–30.
3.
Mullan *et al.* *BMC Proceedings* **2011**,
5(Suppl 8): P110

**[www.agilent.com/chem/
bio-inert](http://www.agilent.com/chem/bio-inert)**

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 2 月 1 日，中国出版
5991-1694CHCN



Agilent Technologies