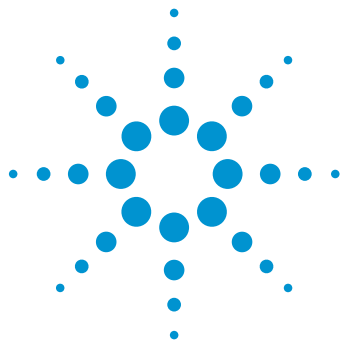




使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案分析单克隆抗体酶解物

应用简报

生物治疗药物与生物仿制药

作者

Gerd Vanhoenacker, Koen Sandra,
Isabel Vandenheede, Frank David,
Pat Sandra

Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

Metablys
Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

Udo Huber, Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

摘要

当前，单克隆抗体和重组蛋白等蛋白质类生物药物广泛应用于治疗各种严重威胁人类生命的疾病，包括癌症和自身免疫性疾病。蛋白质治疗远远比小分子药物的治疗复杂，因此，阐明这种复杂性成为一个分析难题。

本文使用配备 DAD 检测器的 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案，论证了采用全二维液相色谱 (LCxLC) 分析单克隆抗体胰蛋白酶酶解物的应用潜力。



Agilent Technologies

前言

在各种疾病的治疗中，由重组 DNA 技术制造的治疗性大分子正变得越来越重要。据估计，目前全球的蛋白质治疗市场（单克隆抗体 (mAb) 及其它重组蛋白质）占据大约全部医药市场的 20 %。未来十年内，批准的新药中超过 50 % 都将是生物药物¹。

在这些大分子的开发和使用期间，需要对它们进行深入表征。本文描述了一种用于单克

隆抗体曲妥单抗的同一性和纯度评价的肽谱分析方法。曲妥单抗，商品名赫赛汀，是一个分子量为 150 kDa 的大分子，用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。胰蛋白酶酶解后，预计会生成超过 100 种具有宽动态浓度范围的不同理化性质的肽（图 1）。这是一个复杂的分析难题，需要极高的分离性能。全二维 LCxLC 可以大幅提高色谱分离度，只要两维分离是正交的，那么在组分转移到第二维时也会保持其在第一维中获得的分离度^{2,3}。

本文报道了强阳离子交换 (SCX) 色谱联用反相液相色谱 (RPLC)，对于肽的分析，该组合提供了良好的正交性³。采用一个双定量环接口将馏分从第一维转移到第二维中，并保持原有（第一维中获得的）分离度。分析中使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案。我们强调了一些关键结果，并论证了系统的性能。

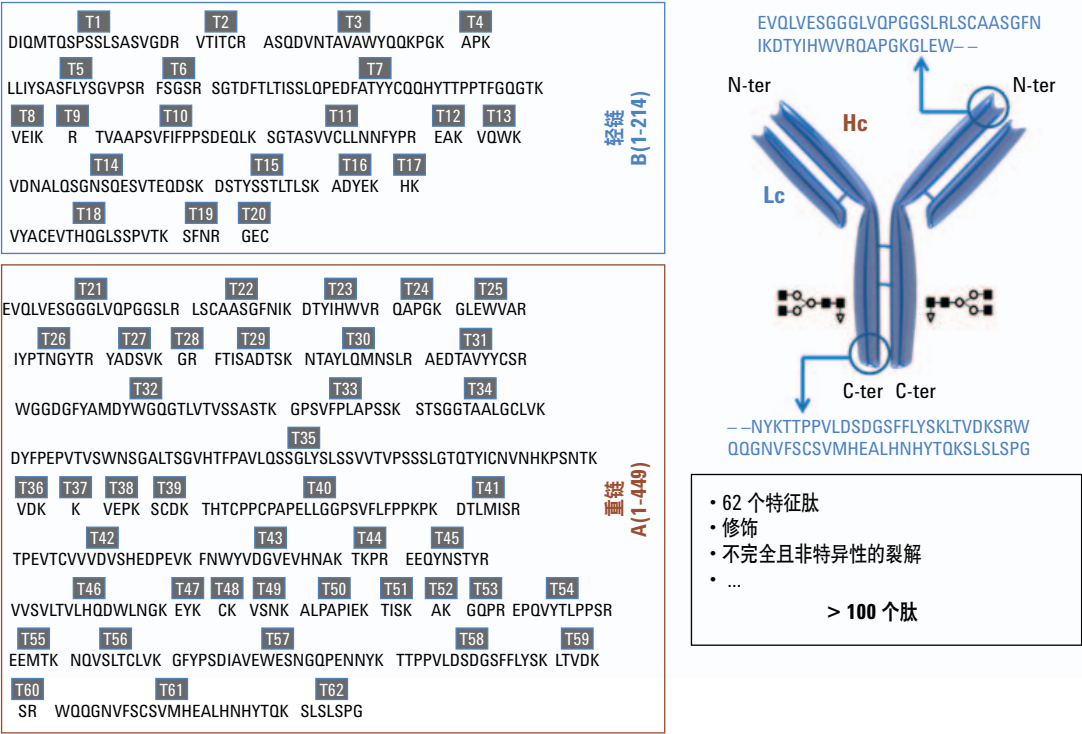


图 1. 蛋白质的结构及其氨基酸序列。特征肽标记为 T1-T62

实验部分

溶液与样品

所有溶剂来自 Biosolve B.V. 公司（范肯斯沃德，荷兰），均为 HPLC 级。磷酸和氯化钠购自 Sigma-Aldrich 公司（博尔讷姆，比利时）。

样品前处理

使用如下的样品前处理过程。

取样	相当于 100 µg 蛋白质的量
加入表面活性剂	100 mM Tris 中含 0.1 % 的 Rapigest, pH 7.5
稀释	1 mM CaCl ₂ 溶液
还原	5 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 溶液
烷基化	10 mM 碘乙酰胺 (IAA) 溶液
消解	胰蛋白酶 (1:25, w/w), 37 °C 酶解 16 h
分析准备	降低 pH (TFA), 静置, 离心

样品还采用下述强降解条件进行处理。

氧化处理	叔丁基过氧化氢 (TBHP), 30 °C 氧化 23 h
pH 处理	Tris, pH 9, 37 °C 保持 3 天

仪器

使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案。配置如下所示。

G4220A	带有密封垫冲洗可选件的 Agilent 1290 Infinity 二元泵（第一维）
G4220A	Agilent 1290 Infinity 二元泵（第二维）
G4226A	Agilent 1290 Infinity 自动进样器
G1330A	Agilent 1290 Infinity 自动进样器恒温器
G1316C	Agilent 1290 Infinity 柱温箱
G4212A	带标准流通池的 Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器
G1170A	Agilent 1290 Infinity 阀驱动
G4236A	用于 2D-LC 的 2 位/4 通阀

软件

- 带有 2D-LC 扩展软件的 Agilent OpenLAB CDS Chemstation 修正版 C.01.04
- 用于 2D-LC 数据分析的 GC Image LCxLC 版软件（GC Image 有限责任公司，林肯市，内布拉斯加州，美国）

方法

第一维	
色谱柱	MIC-15-Polysulfoethyl-Asp, 150 × 1.0 mm, 5 μm (PolyLC 有限公司)
溶剂 A	5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5 % 乙腈溶液中
溶剂 B	5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5 % 乙腈 + 400 mM NaCl 溶液中
流速	60 μL/min
梯度程序	0 - 30 min: 3 - 25 % B 30 - 50 min: 25 - 45 % B 50 - 55 min: 45 - 100 % B 55 - 58 min: 100 % B 后运行时间: 13 min, 3 % B
温度	25 °C
第二维	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 50 mm, 3.5 μm (部件号 959943-902)
溶剂 A	0.1 % 磷酸水溶液
溶剂 B	乙腈
流速	3.5 mL/min
空闲流速	0.5 mL/min
初始梯度	0 - 0.43 min: 2 - 35 % B 0.43 min: 2 % B
梯度调制	0.43 min 时 35 % B, 50 min 时升到 65 % B, 51 min 时升到 100 % B (图 2)
温度	55 °C
调制	
调制开启	1 - 53 min
定量环	两个 40 μL 定量环, 并联配置
调制时间	0.50 min
进样	
体积	20 μL
温度	4 °C
注射针清洗	冲洗端口 6 s (5 mM 磷酸盐, pH 3, 在 5 % 乙腈溶液中)
检测	
波长	信号 214/4 nm, 参比 360/100 nm
数据采集速率	80 Hz

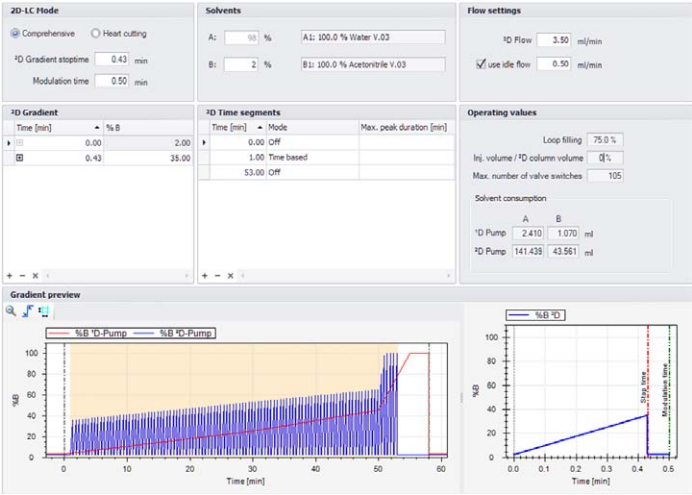


图 2. 2D-LC 方法屏幕截图 (OpenLAB CDS Chemstation)

结果与讨论

图 3 展示了采用 GC 成像软件对上述方法所制备的酶解物生成的等值线图。我们得到了曲妥单抗序列的一个完整覆盖范围。使用可与质谱联用的适当方法对斑点进行鉴定（使用 G6530B QTOF 系统）。斑点在整个表面随机分散，表明两维间具有良好的正交性。

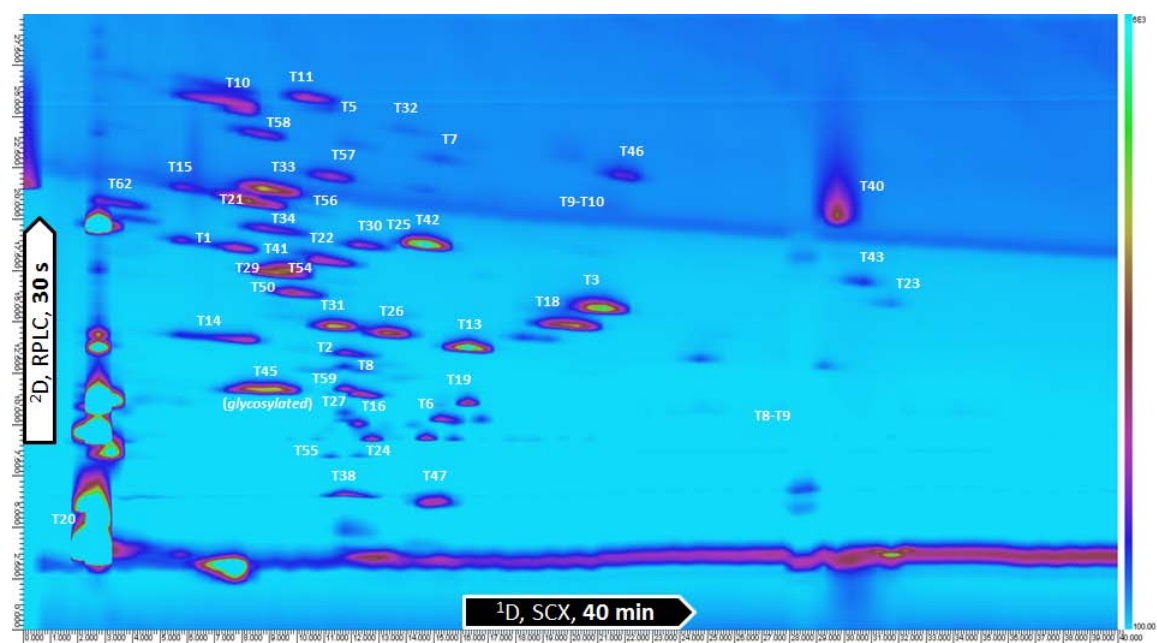


图 3. 曲妥单抗胰蛋白酶酶解物分析的 LCxLC 等值线图

重复进行 5 次分析，计算方法的精密度。表 1 总结了四个肽的分析结果。体积和保留时间的精密度非常好，表明该方法可以用于比较不同批次的产品，以及原研药和生物仿制药。

表 1. 对所选斑点计算得到的精密度数据，n = 5

%RSD	T3	T11	T43	T50
体积	2.04	1.94	4.56	2.59
高度	0.85	1.78	2.15	0.54
RT 2D	0.09	0.05	0.25	0.15

该方法还可用来检测杂质和修饰。为了证实这一点，我们对曲妥单抗样品进行了一次强降解研究。产品分别在氧化和高 pH 值条件下进行处理，我们可得到其氧化物和脱酰胺产物。图 4 展示了一个原研药样品和一个

氧化处理样品的分析详情。降解样品明显包含了更多的斑点。我们特别挑选了一个斑点采用 LC/MS/MS 进行鉴定。该斑点可以追溯到肽 T41。它是该肽段中蛋氨酸被氧化的结果。

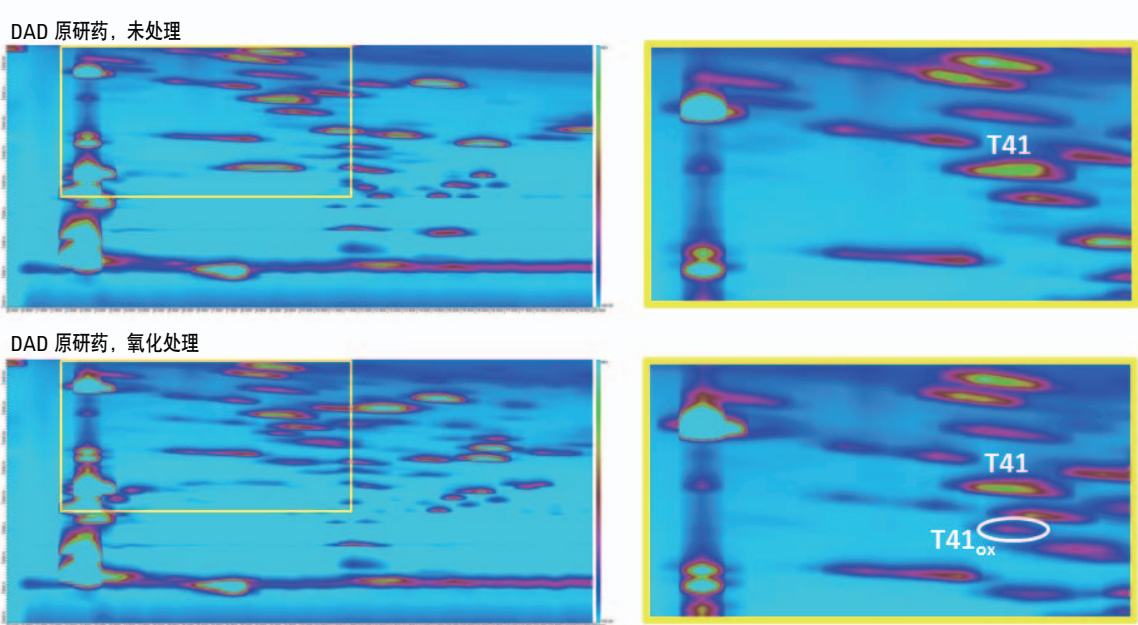


图 4. 分析未处理和氧化处理的曲妥单抗蛋白酶解物所得的 LCxLC 等值线图。注意，氧化作用已经处在未处理样品中的临界水平，说明了研究方法的强度

图 5 展示了一个类似的实例，它是一个高 pH 处理样品的结果。肽 46 很容易脱酰胺基，因为它包含天冬酰胺。在高 pH 处理期间，天冬酰胺转变为天冬氨酸。在第二维相同的保留时间处，等值线图中明显多出了一个斑点。这表明在所采用的条件下，仅使用反相液相色谱很难将特征肽与其脱酰胺降解产物分离。采用适当的方法，通过 LC/MS/MS 确证修饰产物的同一性。

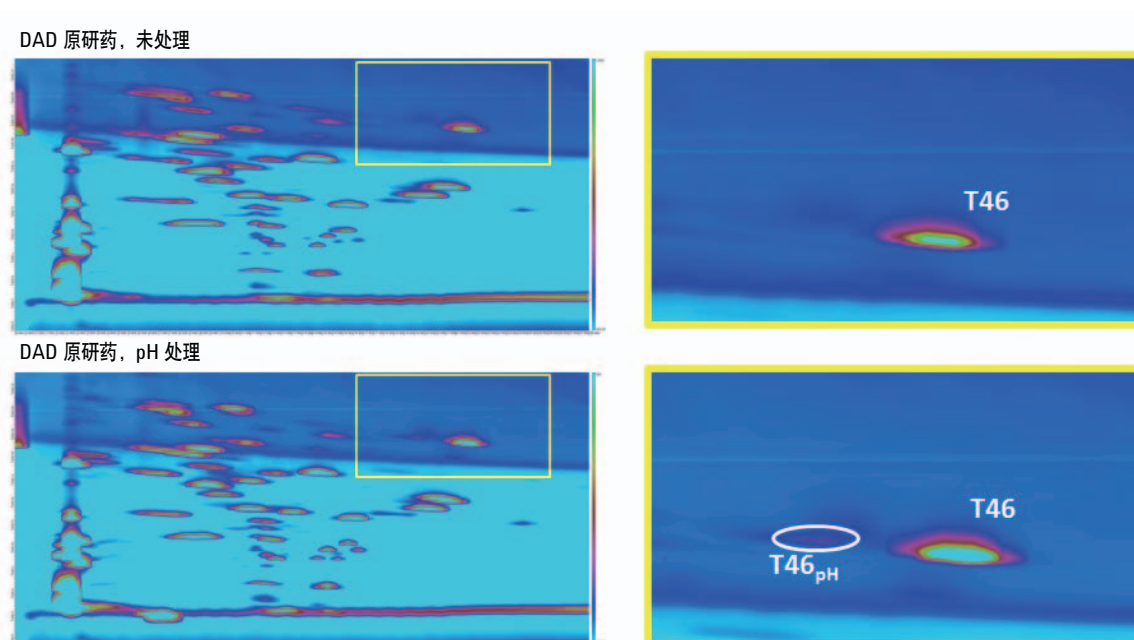


图 5. 分析未处理和 pH 处理的曲妥单抗胰蛋白酶酶解物所得的 LCxLC 等值线图

结论

对于蛋白质类生物药物等复杂样品的分析，Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案是一个理想的解决方案。该方法在纯度和同一性评价中具有极大潜力。该组合具有优异的精确性，我们可使用该方法对不同批次的产品，以及原研药和生物仿制药进行质量控制和比较研究。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, "The power of liquid chromatography-mass spectrometry in the characterization of protein biopharmaceuticals," *LCGC Europe Supplement*, May **2013**
2. I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, "Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations – a review," *Anal. Chim. Acta.* 64 14-31 (**2009**)
3. K. Sandra, M. Moshir, F. D'hondt, R. Tuytten, K.n Verleysen, K. Kas, I. Francois, P. Sandra, "Highly efficient peptide separations in proteomics. Part 2: bi- and multidimensional liquid-based separation techniques," *J. Chromatogr., B* 877, 1019-1039 (**2009**)

www.agilent.com/chem/cn

本文中的信息、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，2013
2013 年 9 月 1 日，中国印刷
5991-2880CHCN



Agilent Technologies