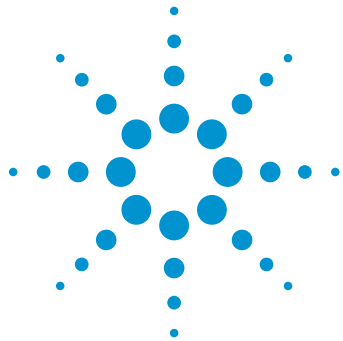




在 AdvanceBio SEC 聚集体分析之后 进行 Protein A 亲和 IgG 捕获

采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案

应用简报

生物治疗药物与生物制药

作者

Patrick Cronan、Timothy Rice 和
Michael Kruger
安捷伦科技公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案对生物治疗样品中聚集体的定量分析。Protein A 亲和捕获在第一维中进行，而体积排阻色谱在第二维中进行。多中心切割用于将样品从第一维转移到第二维。这项技术能够在一次分析中完成整个表征，无需进行馏分收集和多次进样。



Agilent Technologies

前言

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了一个分析难题。在对这些分子进行开发和使用期间，需要对它们进行深入表征¹。

Protein A 是在金黄色葡萄球菌细胞壁中发现的免疫球蛋白-Fc (IgG) 受体。这种蛋白质对多克隆和单克隆 IgG (如人 IgG 1、IgG 2 和 IgG 4 以及来自兔和小鼠等其他物种的 IgG) 具有较强的亲和性。固定化的 Protein A 常用于 IgG 的制备和生产级纯化。Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 分析型色谱柱可用于对复杂混合物或纯样品中的 IgG 进行快速定量分析和小规模纯化^{2,3}。

体积排阻色谱 (SEC) 则是生物治疗样品中聚集体定量分析的首选方法。使用 SEC 聚集体分析之后进行 Protein A IgG 捕获，可生成更准确的表征结果，因为所分析的样品更加纯净。采用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案可使这种分析在一次进样中完成。IgG 的 Protein A 捕获在第一维中进行。然后，在多中心切割定量环中采集洗脱的 IgG，并在第二维中将其洗脱到 Agilent AdvanceBio SEC 体积排阻色谱上，以进行准确的聚集体分析。

实验部分

仪器

本研究使用的二维液相色谱解决方案将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱作为第一维系统。将 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统与安捷伦二维液相色谱 Quick-Change 快速更换阀头、多中心切割阀（带有 12 个出厂已安装的 40 μ L 样品定量环）和 Agilent 1290 Infinity 高速泵联用，用于第二维色谱。第二维中采用了二极管阵列检测器 (DAD)。图 1 示出了所用的仪器模块。

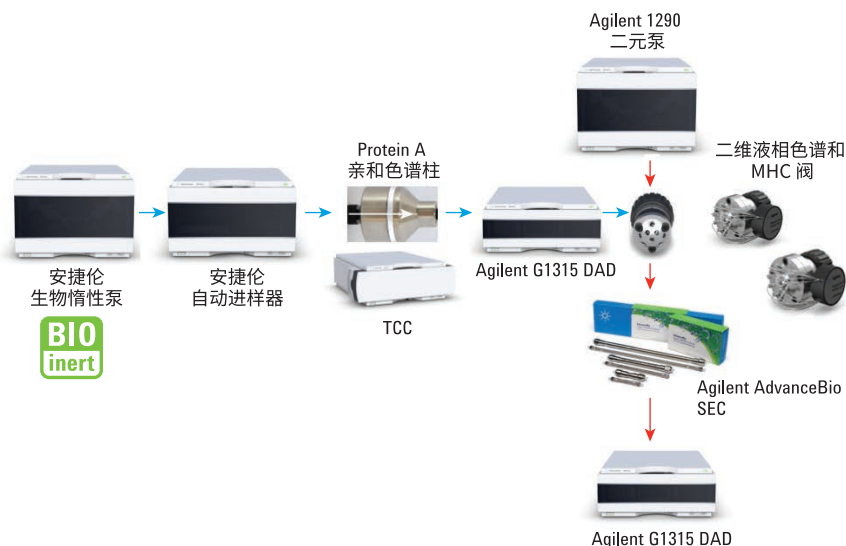


图 1. 第一维中配有 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱和第二维中配有 Agilent AdvanceBio SEC 的二维液相色谱解决方案配置

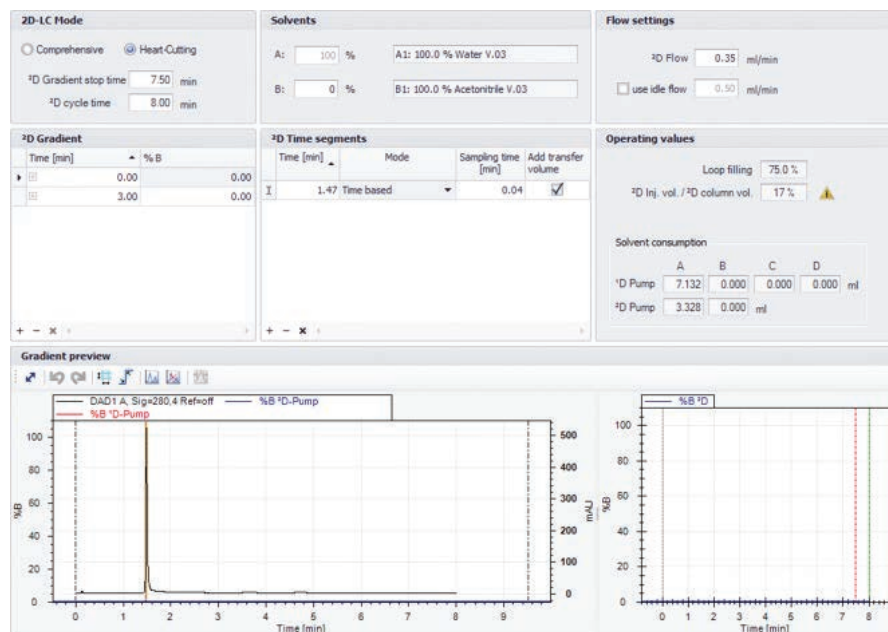
软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件以及 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱软件用于配置系统、设置二维液相色谱方法以及控制二维液相色谱的数据采集 (图 2)。

样品

样品是购自 Sigma 的 IgG 标准品 (部件号 I9640)。

A



B

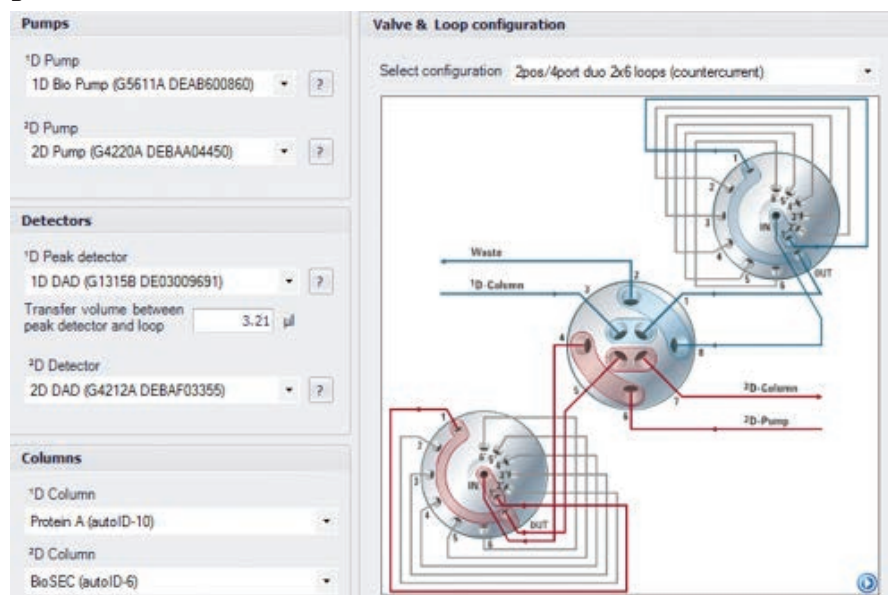


图 2. 在二维液相色谱系统中配置 Agilent OpenLab CDS ChemStation 二维液相色谱软件，并为第二梯度和多次切割设置第一参比色谱以及叠加的第一维梯度。该方法设置对话框可以轻松设置多个次数和定时事件

结果与讨论

这种二维分离有助于加快单克隆抗体 (mAb) 聚集体的分析速度。在聚集体表征中将两个步骤相结合后，可以在一次进样中执行整个分析，从而省略了馏分收集步骤。图 3 示出了典型的 Protein A 亲和捕获分离结果。用磷酸盐缓冲液捕获样品，并用 500 mM 乙酸（水溶液）进行洗脱。

图 4 表明，当 SEC 步骤在二维分析中用作第一维时，可在样品从 Protein A 亲和色谱柱中释放后立即执行该步骤。

方法

第一维分离 — 使用 UV 检测进行 Protein A 亲和捕获	
色谱柱	Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱（部件号 5069-3639），室温
流速	0.75 mL/min
流动相 A	100 mM PBS
流动相 B	500 mM 乙酸
梯度	0 min 时 B 为 0% 0.5 min 时 B 为 0% 0.51 min 时 B 为 100% 2.5 min 时 B 为 100% 2.6 min 时 B 为 0%
第二维分离 — SEC	
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm（部件号 PL1580-3301），25 °C
流速	0.35 mL/min
流动相	10 mM PBS pH 7.4，等度
二维液相色谱模式	多中心切割

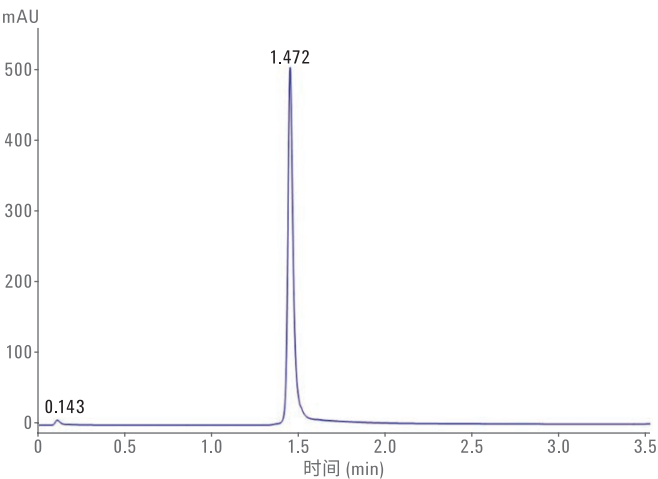


图 3. 使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱对 IgG 的 Protein A 亲和捕获分离

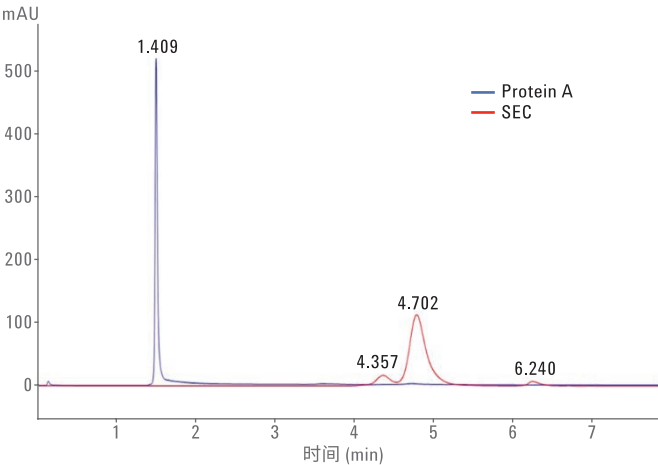


图 4. 使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱的 Protein A 亲和捕获以及使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的 IgG 体积排阻色谱分离

这一流程证明了通过 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案在一次分析中同时使用 Protein A 和 SEC 技术的可行性。在证明之余，还测试了采用二维方法对不同聚集体浓度的 SEC 检测。在 65 °C 下的热水浴中将 IgG 标准品加热处理 24 小时。加热后得到了更大浓度的聚集体，如图 5 和图 6 所示。图 6 表明聚集体与单体和二聚体得到了明显分离。

结论

Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案为在一个方法中测定 mAb 滴度和聚集体提供了一种通用而高效的方法，无需进行馏分收集和多重进样。Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱作为二维液相色谱工作流程的第一维，有助于在滴度测定中实现 mAb 的分析级纯化，并可在聚集体分析前作为初始纯化步骤。Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱对聚集体与单体的分离表现出优异的分度度，可在二维液相色谱工作流程中作为第二维实现准确的评估。

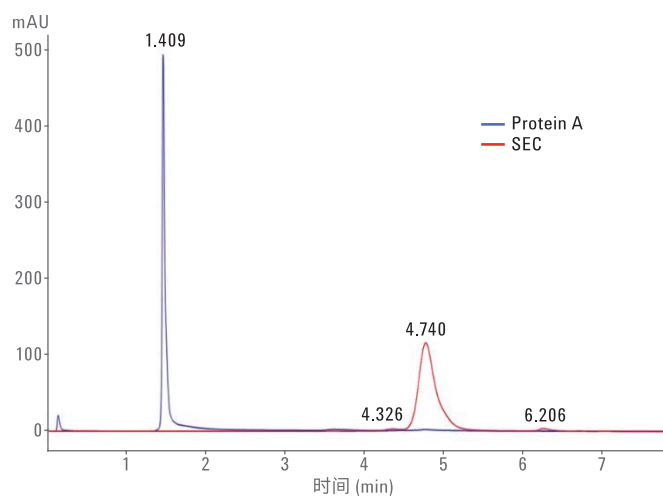


图 5. 使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱的 Protein A 亲和和捕获以及使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的热处理 IgG 体积排阻色谱分离

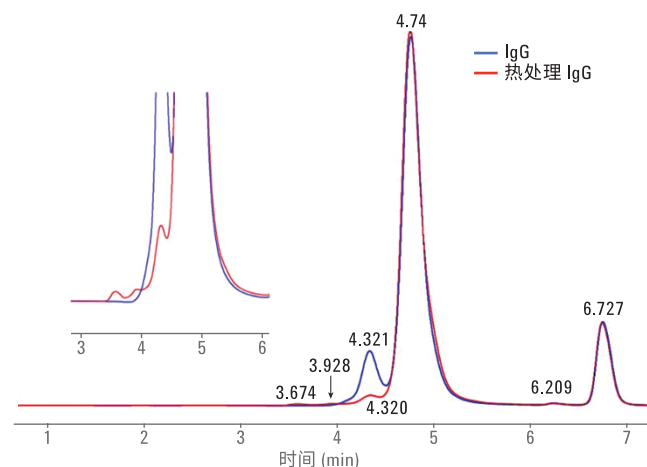


图 6. IgG 和热处理 IgG 的 Agilent AdvanceBio SEC 二维体积排阻色谱分离的叠加图

参考文献

1. Vanhoenacker, G. 等, 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, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-2880CHCN, **2013**
2. Lohaus, C. 等, 用 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和 HPLC 色谱柱快速测定人多克隆 IgG, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5989-9733CHCN, **2008**
3. Duong, P. T. 采用 Agilent Bio-Monolith Protein A 亲和色谱柱监测细胞培养液中的单克隆抗体滴度, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-2990CHCN, **2014**

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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, 2016

2016 年 9 月 1 日, 中国出版

5991-7223CHCN



Agilent Technologies