

## 采用完全生物兼容性流路对 mAbs 进行非变性 SEC/MS 分析

在 mAbs 分析中使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 带 PEEK 内衬的色谱柱

### 作者

Liesa Verscheure,  
Gerd Vanhoenacker,  
Pat Sandra, Koen Sandra  
RIC group  
President Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

Sonja Schneider 和 Udo Huber  
安捷伦科技公司  
Hewlett-Packard-Strasse 8  
D-76337 Waldbronn  
Germany

### 摘要

重组蛋白质治疗药物（例如单克隆抗体 (mAbs)）的体积排阻色谱法 (SEC) 是检测是否存在可能对安全性和有效性产生不利影响的体积异构体的重要分析工具。SEC 通常使用非挥发性磷酸盐缓冲液，这使得分离过程与质谱 (MS) 不兼容。因此，峰鉴定需要脱盐步骤（在线或离线）。

实验已证明，由于非特异性相互作用，当应用于经典的不锈钢仪器/色谱柱配置时，与 MS 兼容的挥发性缓冲液（如乙酸铵）的效率明显低于磷酸盐缓冲液。这些非特异性相互作用可通过使用生物惰性或生物兼容性流路来抵消。本应用简报展示了带聚醚醚酮 (PEEK) 内衬的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱与 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统组合用于 mAbs 的非变性 SEC/MS 分析的潜力。

## 前言

SEC 广泛应用于研究与 mAbs 相关的聚集和片段化，其中蛋白质根据流体动力学半径（体积）洗脱<sup>[1-4]</sup>。SEC 能够在非变性水溶液条件下分离体积异构体，通常使用具有中性 pH 和高离子强度的磷酸盐缓冲液。它是唯一不依赖与固定相相互作用的色谱技术，因此无需应用流动相梯度。相反，分子穿过色谱柱的速度取决于填料颗粒孔隙的可及性。非常大的分子首先被阻挡并洗脱，而较小的分子则依据其体积的不同，不同程度地渗透进微孔中。遗憾的是，这些分子可能与固定相发生不必要的次级相互作用，从而导致拖尾峰、回收率低和洗脱时间偏移，严重影响分离。这些相互作用通常是静电相互作用或疏水相互作用，可通过调整流动相组成（添加盐、有机溶剂等）来抑制<sup>[5]</sup>。然而，最近推出了惰性更高的创新 SEC 材料，能够在使用常见的流动相组成时限制或避免次级相互作用。一个有力的例子是 AdvanceBio SEC 色谱柱，它使用涂覆有亲水聚合物的硅胶颗粒填料，能够分析最具挑战性/最棘手的蛋白质生物药物。通过这种方式，屏蔽固定相上的潜在活性位点<sup>[6,7]</sup>。

由于使用非挥发性缓冲液和盐，SEC 与 MS 不兼容。因此，峰鉴定需要收集馏分并脱盐，以保证成功完成电喷雾电离 (ESI)。如今，这些过程通常使用二维液相色谱/质谱 (2D-LC/MS) 以自动化方式进行：在安装于多中心切割阀上的定量环中收集第一维 SEC 峰，然后在第二维使用反相液相色谱 (RPLC) 或 SEC 以在线方式脱盐<sup>[8,9]</sup>。然而，在过去几年中，使用乙酸铵等挥发性流动相直接将 SEC 与 MS 结合起来是一个趋势<sup>[10]</sup>。有趣的是，这一趋势揭示了另一种非特异性相互作用：mAbs 与不锈钢表面的相互作用，这种相互作用在液相色谱系统、毛细管和色谱柱硬件中无处不在<sup>[11,12]</sup>。当使用高离子强度的磷酸盐缓冲液时，通常能够掩盖这种效应。

因此，成功进行 mAb 的非变性 SEC/MS 测量需要完全生物兼容性流路，而 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和带 PEEK 内衬的 AdvanceBio SEC 色谱柱能够提供此类流路。1290 Infinity II 生物液相色谱系统是一种生物兼容性仪器，具有不含铁的流路，可大幅降低不必要的相互作用的风险<sup>[13]</sup>。为了能够在极高的压力下进行色谱分析，整个系统使用金属合金 MP35N 代替不锈钢。带 PEEK 内衬的 AdvanceBio SEC 色谱柱的不锈钢表面被 PEEK 掩盖。该系统与色谱柱的组合提供了优异的生物兼容性、耐化学腐蚀性以及机械和热稳定性。

本应用简报比较了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和带 PEEK 内衬的 AdvanceBio SEC 色谱柱与其对应的不锈钢色谱柱在 mAbs 非变性 SEC/MS 分析中的性能。

## 实验部分

### 材料

磷酸钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和乙酸铵购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)，磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)。I 级水由 Sartorius (Göttingen, Germany) Arium pro 超纯实验室水纯化系统使用自来水生成。凝胶过滤标准品购自 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)，其中含有分子量标准品甲状腺球蛋白 (670000 Da)、丙种球蛋白 (158000 Da)、卵清蛋白 (44000 Da)、肌红蛋白 (17000 Da) 和维生素 B12 (1350 Da)。曲妥珠单抗和抗体药物偶联物 (ADC) 维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin) 分别由 Roche (Basel, Switzerland) 和 Seattle Genetics (Bothell, WA, USA) 提供。NISTmAb 标准品 (RM8671) 由安捷伦科技公司 (Santa Clara, CA, USA) 提供。

### 样品和流动相前处理

将 mAbs 用 PBS 稀释至 1 mg/mL。两种 mAbs 均经过轻微处理（在 50 °C 下处理 1 周）以增加高分子量 (HMW) 和低分子量 (LMW) 物质。根据制造商的说明，将凝胶过滤标准品用水稀释。流动相现用现配，且使用前经 0.2  $\mu\text{m}$  瓶口分液器过滤。

仪器

使用两种 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统：1290 Infinity II 液相色谱系统（不锈钢 [SST] LC）和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统（生物兼容性）。两种系统均配备内径 75 µm 的超低扩散（ULD，也称为 SST 或生物兼容性）工具包，以减小峰展宽。

配置细节

|         | 安捷伦不锈钢液相色谱系统                                               | 安捷伦生物液相色谱系统                                                    |
|---------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 泵       | 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)                              | 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)                                |
| 自动进样器   | 配备集成式样品恒温器的 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)         | 配备集成式样品恒温器的 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A)         |
| 柱温箱     | 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备 ULD 热交换器 (G7116-60021) | 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备 Bio ULD 热交换器 (G7116-60091) |
| 检测器     | 1290 Infinity II DAD (G7117B)                              | 1290 Infinity II DAD (G7117B)                                  |
| 流通池     | 标准 InfinityLab 最大光强卡套式流通池，10 mm (G4212-60008)              | 最大光强卡套式流通池 LSS，10 mm (G7117-60020)                             |
| 超低扩散工具包 | 适用于 1290 Infinity II 液相色谱系统的低扩散工具包 (5067-5963)             | 适用于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的低扩散工具包 (5004-0007)               |
| 质谱系统    | 采用安捷伦喷射流技术的 6545 LC/Q-TOF                                  |                                                                |

方法

评估了两种 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱：不锈钢 (SST) 色谱柱和带 PEEK 内衬的色谱柱。在 Agilent OpenLab CDS 2.6 版中采集并处理 SEC/UV 数据。利用 Agilent MassHunter 数据采集系统 (B.09.00) 获得非变性 SEC/MS 数据，并使用带有 BioConfirm 插件的 Agilent MassHunter 定性分析系统 (B.07.00) 进行分析。

SEC 条件

|            | 不锈钢色谱柱                                                               | 带 PEEK 内衬的色谱柱                                                                     |
|------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 色谱柱        | Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 150 mm, 1.9 µm (部件号 PL1580-3201) | Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 带 PEEK 内衬, 2.1 × 150 mm, 1.9 µm (部件号 PL1980-3201PK) |
| 流速         | 360 µL/min                                                           | 75 µL/min                                                                         |
| 进样量/上样量 UV | 19 µL/19 µg                                                          | 4 µL/4 µg                                                                         |
| 进样量/上样量 MS |                                                                      | 10 µL/50 µg                                                                       |
| 流动相        | 150 mM 磷酸钠, pH 7<br>100 mM 乙酸铵<br>50 mM 乙酸铵                          |                                                                                   |
| 柱温         | 25 °C                                                                |                                                                                   |
| 自动进样器温度    | 6 °C                                                                 |                                                                                   |
| 检测 UV      | 280/4 nm, 参考关闭, 峰宽 > 0.1 min                                         |                                                                                   |

非变性 MS 参数

| 参数     | 值        |                      |
|--------|----------|----------------------|
| 离子化    | 电喷雾正离子模式 |                      |
| MS 分流阀 | 绕过       |                      |
| 离子源参数  | 干燥气温度    | 300 °C               |
|        | 干燥气流速    | 8 L/min              |
|        | 雾化器压力    | 35 psi               |
|        | 鞘气温度     | 300 °C               |
|        | 鞘气流速     | 8 L/min              |
|        | 毛细管电压    | 3500 V               |
|        | 喷嘴电压     | 1000 V               |
|        | 碎裂电压     | 350 V                |
| 采集参数   | 锥孔电压     | 220 V                |
|        | 质量数范围    | 扩展的质量数范围 (2 GHz)     |
|        |          | 500–10000 <i>m/z</i> |
|        | 采集速率     | 1 幅质谱图/秒             |
|        | 模式       | 高分辨率模式               |
|        |          | 曲线采集                 |

结果与讨论

图 1 显示了在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和 AdvanceBio SEC 200 Å 带 PEEK 内衬的色谱柱上获得的几种 mAbs 的 SEC UV 280 nm 色谱图，其中使用 150 mM 磷酸钠（即 SEC 中的金标准流动相）和 100 mM 乙酸铵（作为 MS 兼容性替代品）。后一种流动相的成功使用为将 SEC 与 MS 直接结合提供

了契机，无需脱盐步骤。观察到所有 mAbs（包括 ADC）均获得了令人满意的分离性能，AdvanceBio SEC 颗粒填料的亲水聚合物涂层有利于这一性能。由于 ADCs 与固定相发生了次级相互作用，其疏水特性为早期 SEC 颗粒填料上的 ADC 分析带来了挑战。

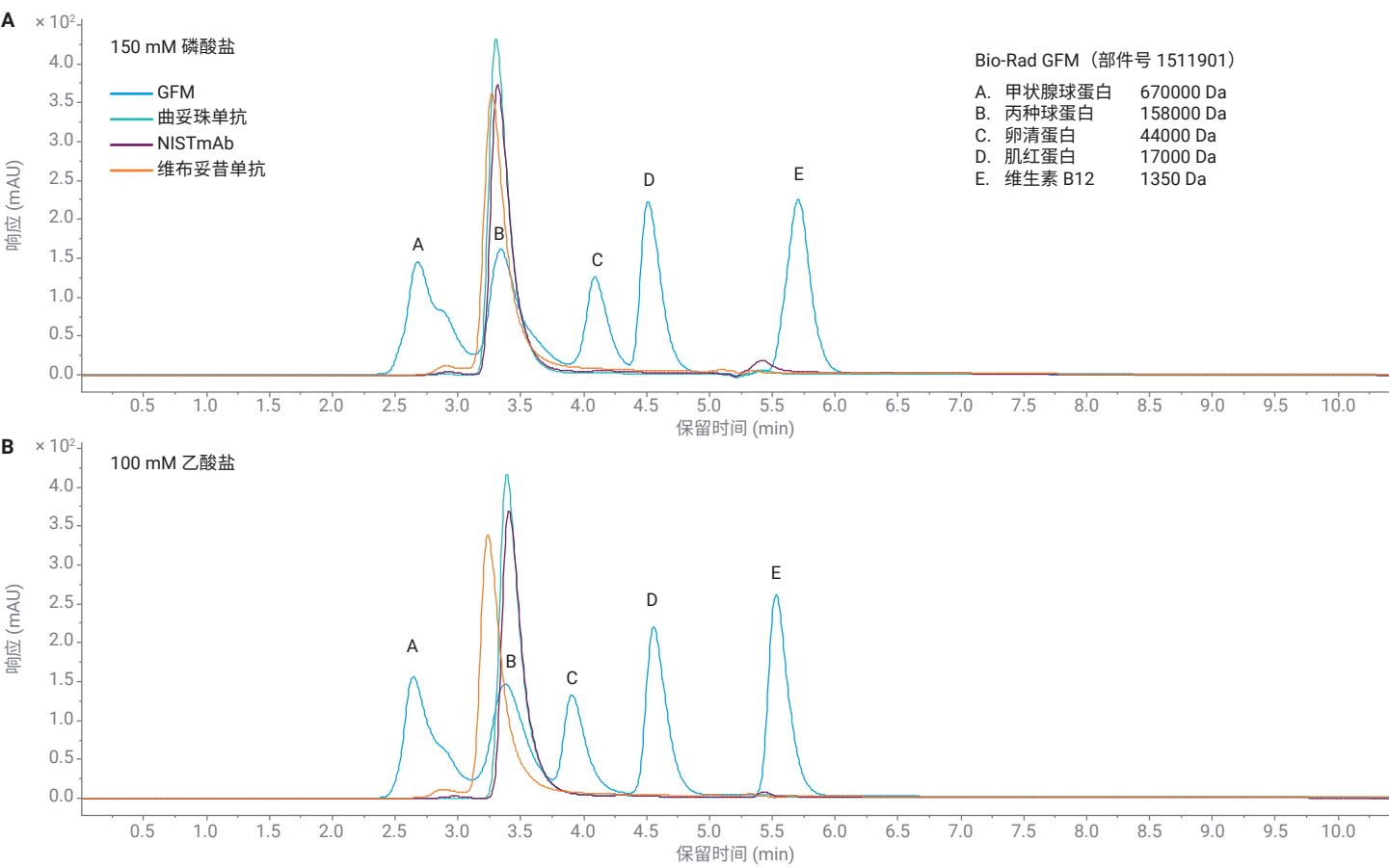


图 1. 在 Agilent 1290 Infinity II 生物惰性液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 带 PEEK 内衬的色谱柱上，使用 (A) 150 mM 磷酸钠和 (B) 100 mM 乙酸铵作为流动相，获得的曲妥珠单抗、NISTmAb 和维布妥昔单抗与凝胶过滤标准品叠加的 UV 280 nm SEC 色谱图

为评估 SEC 流路中是否存在不锈钢组件的影响,采用几种系统或色谱柱组合对 mAb 样品进行分析。图 2 和图 3 分别显示了在经典不锈钢系统和色谱柱 (左)、不锈钢系统和带 PEEK 内衬的色谱柱 (中) 以及生物兼容性液相色谱系统和带 PEEK 内衬的色谱柱 (右) 上对曲妥珠单抗和 NISTmAb 的分析。所有组合均采用 150 mM 磷酸盐流动相以及 50 和 100 mM 乙酸铵相 (作为 MS 兼容性替代品) 进行评估。磷酸钠在所有测试组合中均提供了令人满意的分离性能, HMW 物质的回收率良好。当用乙酸铵代替磷酸钠并降低流动相离子强度时,在流路中存在不锈钢组件的情况下,分离质量会受到不利影响。色谱柱硬件的影响使得不锈钢色谱柱与作为流动相的乙酸铵配合使

用时,几乎无法检出 HMW 物质 (如有)。当安装带 PEEK 内衬的色谱柱并使用 100 mM 乙酸铵运行时, HMW 物质重新出现。使用 50 mM 乙酸铵流动相 (在 MS 灵敏度方面最有利) 时,只有生物兼容性液相色谱系统与带 PEEK 内衬的色谱柱的组合 (右下色谱图) 能够检出 HMW 杂质,提供有用的结果。

图 4 进一步示出仪器对峰宽和拖尾的影响。当应用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统时,峰宽始终较小。将磷酸盐流动相替换为与 MS 兼容的乙酸盐后,峰拖尾也不会增加。另一方面,当不锈钢液相色谱系统上的流动相改变时,峰宽和拖尾都会受到严重影响。降低流动相的离子强度会放大这种效应。

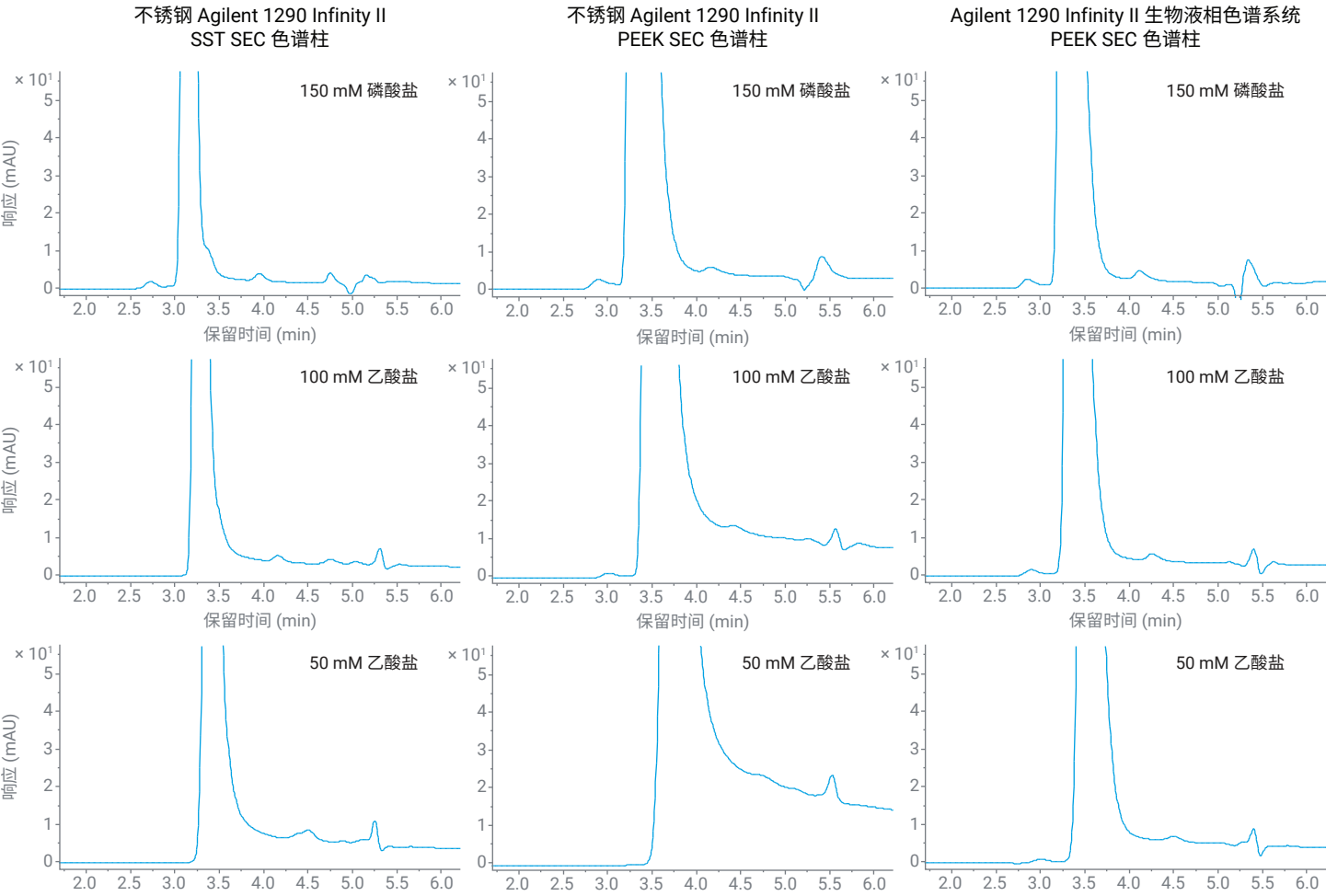


图 2. 使用不同流动相组成和不同惰性程度的硬件得到的曲妥珠单抗的 UV 280 nm SEC 色谱图

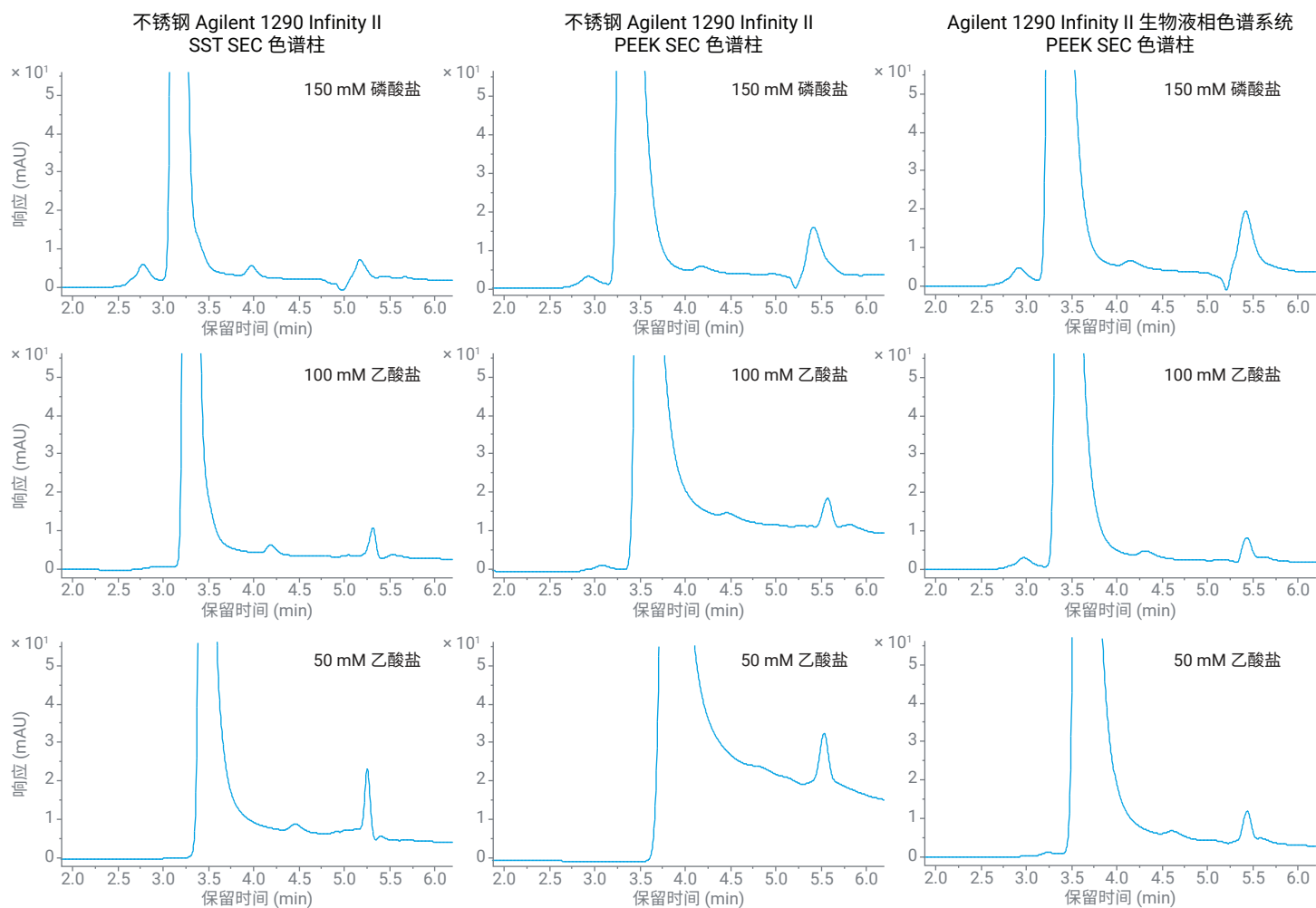


图 3. 使用不同流动相组成和不同惰性程度的硬件得到的 NISTmAb 的 UV 280 nm SEC 色谱图

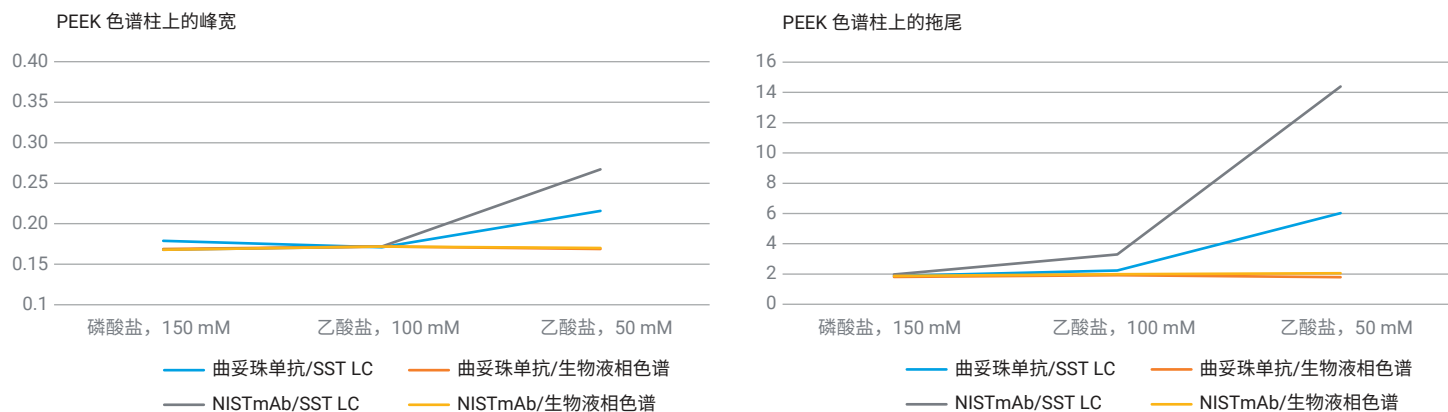


图 4. 在使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统 (SST LC) 和 Agilent 1290 Infinity II 生物惰性液相色谱系统以及不同的流动相组成获得的曲妥珠单抗和 NISTmAb 的 UV 280 nm SEC 色谱图中观察到的峰宽和拖尾

1290 Infinity II 生物液相色谱系统与带 PEEK 内衬的 AdvanceBio SEC 色谱柱（使用乙酸铵）相结合的出色性能为将 SEC 直接连接至非变性 MS 以支持 mAb 表征提供了机会。作为概念验证，使用该硬件和 Agilent 6545 LC/Q-TOF 分析 mAbs。选择 100 mM 乙酸铵流动相以平衡色谱性能与 MS 灵敏度。

图 5 显示了 NISTmAb 的 SEC/UV/MS 分析。UV 280 nm 色谱图显示，可基于解卷积质谱图将 HMW 和 LMW 变体分别鉴定为 mAb 二聚体和 Fab 片段。与主峰相关的谱图突出显示了几种由以双天线型复合 N-糖 G0、G0F、G1F 和 G2F 修饰的糖型。该谱图还揭示了携带 C 端赖氨酸的 mAb 变体的存在。

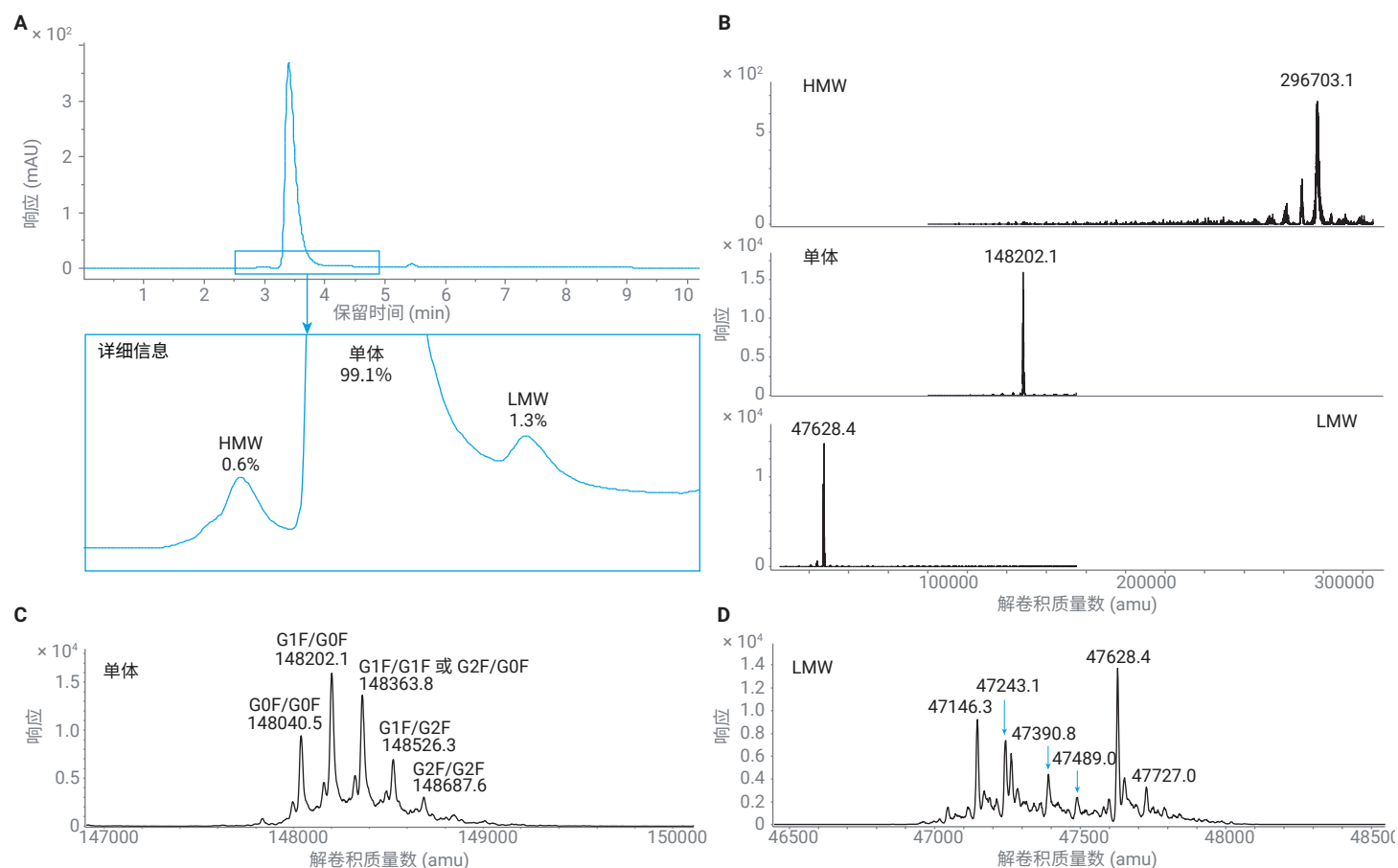


图 5. 在 50 °C 下处理 1 周的 NISTmAb 的 SEC/UV/MS。 (A) UV 280 nm 色谱图， (B) 与标注为 HMW、单体和 LMW 的峰相关的解卷积非变性质谱图，以及单体 (C) 和 LMW (D) 的解卷积非变性质谱图的缩放图

图 6 显示了维布妥昔单抗（一种链间半胱氨酸偶联的 ADC）的 SEC/UV/MS 分析结果。由于轻链和重链仅由非共价相互作用维持，因此该 ADC 的测量显然受益于非变性 SEC 和 MS 条件。该状态是由链间二硫键还原和随后的游离巯基的偶联引起的。与

主峰相关的解卷积谱图突出显示了药物分布和药物/抗体比率 (DAR) (ADCs 的一种关键质量属性 (CQA))。此外，还揭示了糖基化模式以及携带连接子但不携带细胞毒性药物的 DAR 物质亚群。

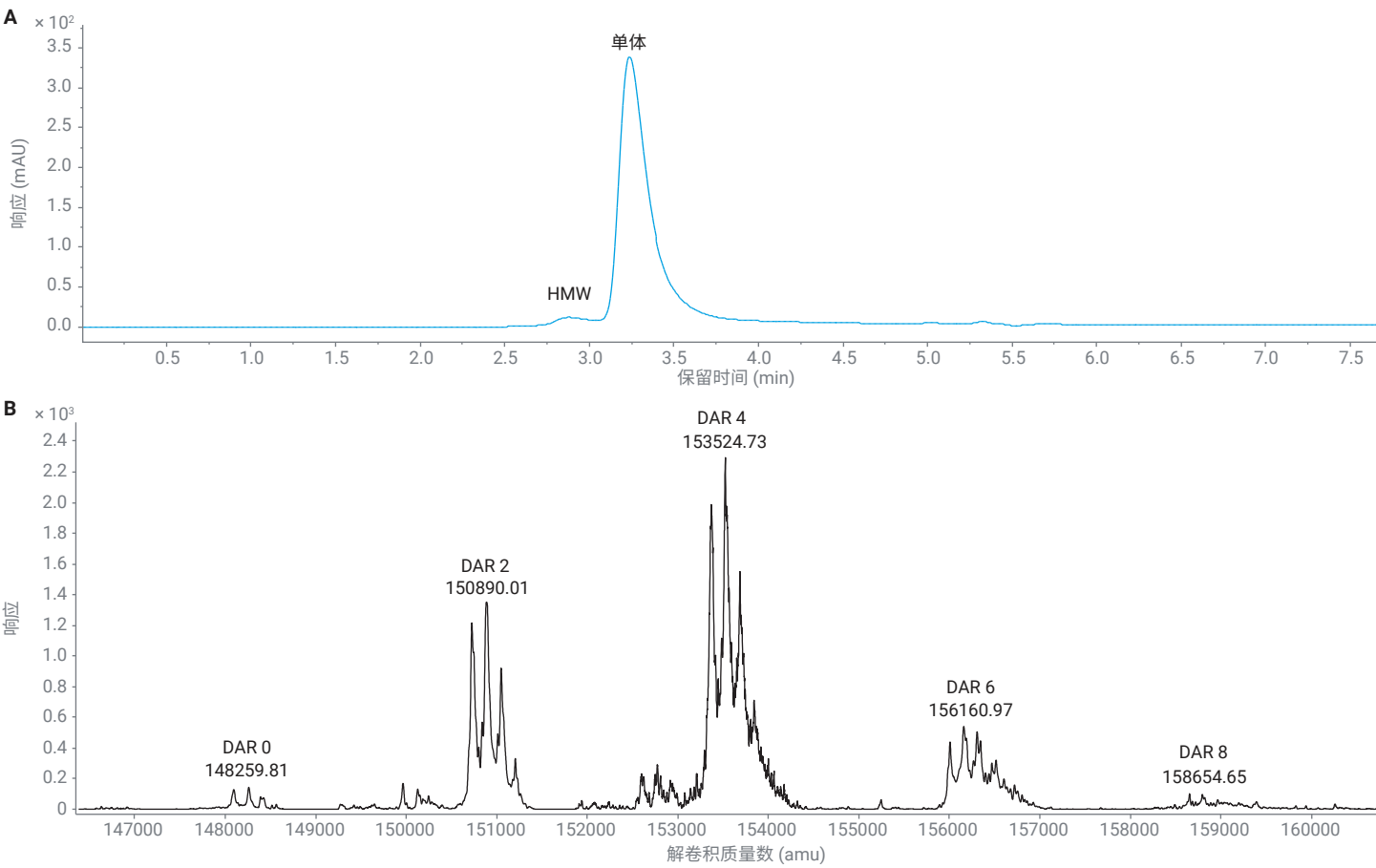


图 6. ADC 维布妥昔单抗的 SEC/UV/MS。 (A) UV 280 nm 色谱图，以及 (B) 与单体峰相关的解卷积非变性质谱图，显示药物分布为 0 到 8 且 DAR 为 4



## 结论

当使用非变性 SEC/MS 分析 mAbs 时，不能低估液相色谱仪器和色谱柱惰性的重要性。减少与流路中不锈钢组件的非特异性相互作用，对于确保获得足够的色谱性能和 HMW 物质的回收率至关重要。在这方面，配备带 PEEK 内衬的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的 Agilent Infinity II 生物液相色谱系统非常有吸引力。本应用简报表明，可以使用与 MS 兼容的乙酸铵成功置换传统的磷酸盐流动相，且对分离性能的影响非常小，从而能够实现出色的非变性 MS 检测。

## 参考文献

1. Sandra, K.; Vandenheede, I.; Sandra, P. Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103
2. Fekete, S. et al. Theory and Practice of Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Aggregates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 101, 161–173
3. Fekete, S. et al. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507
4. Goyon, A. et al. Unravelling the Mysteries of Modern Size Exclusion Chromatography – the Way to Achieve Confident Characterization of Therapeutic Proteins. *J. Chromatogr. B* **2018**, 1092, 368–378
5. Arakawa, T. et al. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 1674–1692
6. Goyon, A. et al. Evaluation of Size Exclusion Chromatography Columns Packed with Sub-3  $\mu\text{m}$  Particles for the Analysis of Biopharmaceutical Proteins. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1498, 80–89
7. Schneider, S.; Jegle, U.; Dickhut, C. Size Exclusion Chromatography Analysis of Antibody Drug Conjugates (抗体药物偶联物的体积排阻色谱分析)，安捷伦科技公司应用简报，5991-8244EN，**2017**
8. Sandra, K. et al. Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157
9. Vanhoenacker, G.; Sandra, P.; Sandra, K. Minimizing the Risk of Missing Critical Sample Information by Using 2D-LC. *LCGC Europe* **2022**, 35, 348–353
10. Vandenheede, I.; Sandra, P.; Sandra, K. Denaturing and Native Size-Exclusion Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates. *LCGC Europe* **2019**, 32, 304–311
11. Goyon, A. et al. Characterization of 30 Therapeutic Antibodies and Related Products by Size Exclusion Chromatography: Feasibility Assessment for Future Mass Spectrometry Hyphenation. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1065–1066, 35–43
12. Murisier, M. et al. The Importance of Being Metal-Free: The Critical Choice of Column Hardware for Size Exclusion Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1183, 338987
13. Nägele, E. 提升 mAb 聚集体分析性能，安捷伦科技公司应用简报，5994-2709ZHCN，**2020**

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE22982808

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，2023-2024  
2024 年 10 月 15 日，中国出版  
5994-5674ZHCN