

单克隆抗体和抗体药物偶联物的体积排阻色谱分析

采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱

作者

Veronica Qin
安捷伦科技有限公司

摘要

体积排阻色谱 (SEC) 是表征生物治疗蛋白质体积异构体的一种常用技术。本应用简报比较了不同供应商的 2 μm 和亚 2 μm SEC 色谱柱对单克隆抗体 (mAb) 和抗体药物偶联物 (ADC) 的 SEC 分析。Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱对实现 mAb 和 ADC 的高分离度分离具有独特的优势。

前言

生物治疗蛋白质的高分子量 (HMW) 聚集体和低分子量 (LMW) 片段可能在药物开发、储存、运输或释放过程中由各种应激条件诱导形成。这些体积异构体属于关键质量属性 (CQA)，需要进行充分表征。药品中存在上述物质可能导致出现免疫原性反应和药代动力学或效价差异^[1,2]。SEC 是分析 mAb 和 ADC 中体积异构体的标准技术。但是，由于可能存在疏水性有效载荷，ADC 的 SEC 分析面临挑战。这些特征可能导致分析物与色谱柱固定相之间发生不利的次级相互作用。本应用简报展示了 AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱和其他供应商的两种主要 SEC 色谱柱竞品（两种色谱柱均为 2 µm 或亚 2 µm 颗粒填料色谱柱）对 mAb 和 ADC 的 SEC 分析。与其他供应商的色谱柱相比，AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱独特的键合相对 mAb 和 ADC 的分析具有更卓越的性能。该色谱柱可实现出色的峰形和分离度，并减少了次级相互作用。

实验部分

试剂、样品与材料

SILu Lite SigmaMAb 通用抗体标准品和 SigmaMAb ADC 模拟物购自 MilliporeSigma，并用水复溶至 1 mg/mL。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 MilliporeSigma。所有化学品纯度均 ≥ 99.5%。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。每天使用前配制新鲜溶液并通过 0.22 µm 膜过滤器进行过滤。

仪器

液相色谱系统

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪包括如下配置：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件 #019）
- Agilent 1260 Infinity II 可变波长检测器 (G7114A)

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm (4.6 × 300 mm, 1.9 µm, 200 Å)
- 供应商 A (4.6 × 300 mm, 1.7 µm, 200 Å)
- 供应商 B (4.6 × 300 mm, 2.0 µm, 250 Å)

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

参数	1260 Infinity II LC
柱温	25 °C
流动相	50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L 氯化钠，pH 7.0
流速	0.35 mL/min
进样量	1–2 µL
检测器	UV 220 nm

结果与讨论

图 1 为对 IgG1 mAb (SigmaMAb) 样品 (与其 F(ab')₂ 和 Fc 片段的混合物) 进行分离得到的 SEC 色谱图的对比。如表 1 所示, 与色谱柱 A 和色谱柱 B 相比, 使用 AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱得到的单体和低分子量物质的峰形更尖锐。与其他两款色谱柱相比, 二聚体/单体以及单体/LMW1 在 AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱上获得了更出色的分离。在三款色谱柱中, AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱为从 mAb 单体中分离 HMW 和 LMW 物质提供了最佳性能。利用该色谱柱获得了最窄的峰和最佳分离度, 并且反压低于色谱柱 A。尽管色谱柱 B 由于其填料粒径稍大而具有最低反压, 但其性能有所降低。

图 2 比较了使用不同供应商的三款相同尺寸的 SEC 色谱柱 (4.6 × 300 mm) 分析 ADC 模拟物 (SigmaMAb ADC) 得到的 SEC 色谱图。色谱柱 A 的峰形较宽, 且分裂成至少两个或更多个峰, 表明疏水性有效载荷与色谱柱固定相发生了次级相互作用。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱得到的峰形比色谱柱 B 更尖锐。此外, AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱能很好地分离 LMW 片段峰 (用红色圈出, $R_s = 2.55$)。相比之下, 色谱柱 A 完全无法分离该峰, 色谱柱 B 也只能实现部分分离。上述结果表明, AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱对 ADC 分析具有更出色的性能。

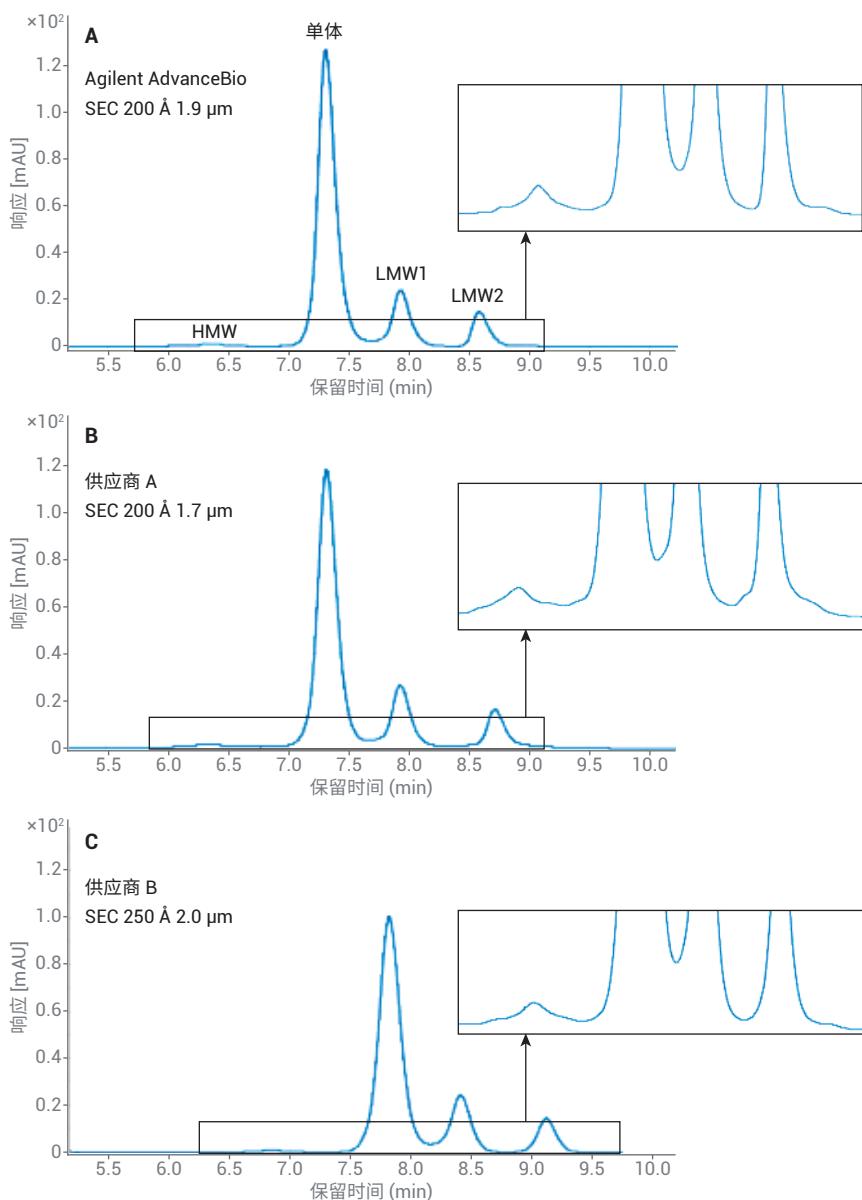


图 1. SigmaMAb (与其 F(ab')₂ 和 Fc 片段的混合物) 的体积排阻色谱图, 采用 4.6 × 300 mm SEC 色谱柱, 流动相为 50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L NaCl, pH 7.0, 流速为 0.35 mL/min

表 1. 三款 SEC 色谱柱的峰宽、分离度和反压比较

色谱柱	半峰宽			分离度		反压 (bar)
	单体	LMW1	LMW2	二聚体/单体	单体/LMW1	
Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm	0.159	0.154	0.148	2.79	2.28	340
供应商 A SEC 200 Å 1.7 μm	0.172	0.166	0.160	2.46	2.09	354
供应商 B SEC 250 Å 2.0 μm	0.194	0.182	0.169	2.49	1.83	260

结论

本研究比较了三款色谱柱的性能，包括 AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱和其他供应商的 2 μm 和亚 2 μm 色谱柱，考察了它们在分析 mAb 和 ADC 时获得的峰形以及对 HMW 和 LMW 体积异构体的分离效果。与其他供应商的色谱柱相比，AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱在分析 mAb 时获得的 HWM 和 LMW 物质的峰形和分离度更出色。对于疏水性更强的样品（如 ADC），AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有明显优势：大大减少了不利的次级相互作用，获得的峰更尖锐、对称，并且能很好地分离 LMW 片段峰。相比之下，另外两个供应商的色谱柱表现出明显的非特异性结合，得到分裂峰或峰变宽，无法分离 LMW 峰。

参考文献

1. Rosenberg, A. S. Effects of Protein Aggregates: an Immunologic Perspective. *AAPS J* **2006**, 8(3), E501-507
2. De Groot, A. S.; Scott, D. W. Immunogenicity of Protein Therapeutics. *Trends Immunol.* **2007**, 28(11), 482–490

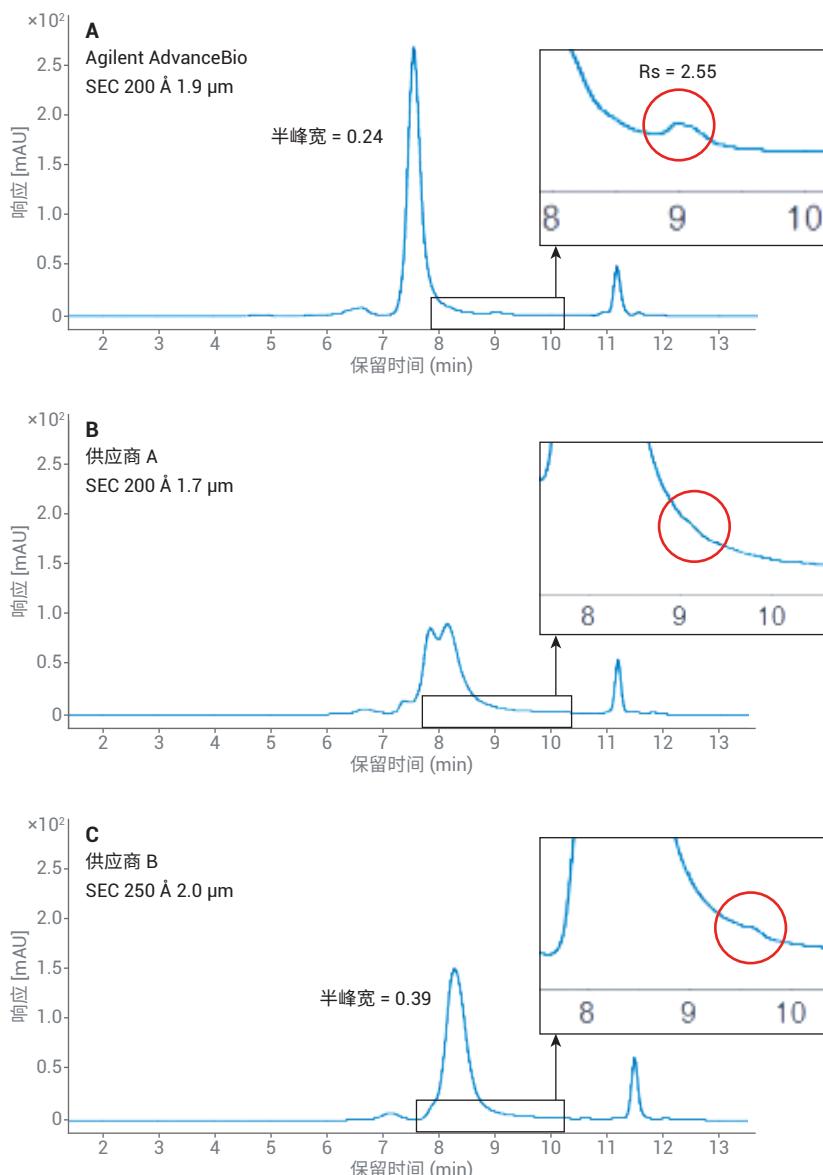


图 2. SigmaMAb ADC 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 300 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl, pH 7.0, 流速为 0.35 mL/min

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, 2019
2019 年 4 月 8 日, 中国出版
5994-0827ZHCN

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

