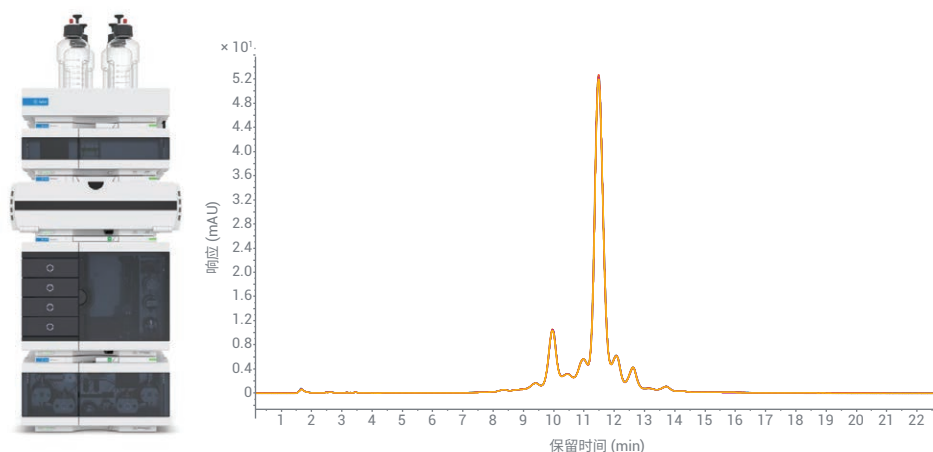


您的分析可以采用多平缓的梯度？

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进
mAbs 电荷异构体分析



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

电荷异构体分析是一项对所用液相色谱系统有较高要求的应用，因为它需要使用腐蚀性的高浓度盐缓冲液和非常平缓的梯度来实现最佳分离。使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对不同的盐梯度进行评估，并分析分离度和重现性。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的流路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。即使对于极具挑战性的平缓梯度也表现出出色的重现性，证实了 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有高可信度。

前言

单克隆抗体 (mAbs) 是一种高度异质性大分子, 大小约为 150 kDa, 通常通过重组法生产。它们的生产要经历复杂的生物合成过程, 这一过程中可发生大量修饰, 从而产生数百种不同的异构体。脱酰胺化、氧化、二硫键、N-糖基化、N-末端和 C-末端加工是最常见的翻译后修饰 (PTMs)。所有这些修饰均可在合成过程中发生, 但生产和储存过程也会增加这些大分子的复杂性。PTMs 会形成复杂的异构体分布, 需要进行全面的分析和监测, 因为最终药品中的修饰可能与生物活性丧失、半衰期改变或免疫原性增加相关^[1]。某些 PTMs 会导致分子形成电荷异构体, 通常使用离子交换色谱 (IEX) 对这些异构体进行分析^[2]。电荷异构体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一, 因此需要严格的验收标准和质量控制。确认产品正确生产并鉴别和定量任何杂质至关重要。

平缓梯度洗脱在蛋白质的 IEX 中非常常见。用于洗脱蛋白质的离子强度模式中的典型盐梯度约为 1–3 mmol/min, pH 值的允许误差为 ± 0.02 个 pH 单位^[3]。

1290 Infinity II 生物液相色谱系统配备高性能高速泵。与低压混合泵 (如四元泵) 相比, 二元泵的主要优势在于, 它能够更准确、更精密地混合小比例溶剂组分。这种精确混合能力可以在溶剂梯度开始和结束时提供高精度的溶剂组成^[4]。这是生成可重现且准确的平缓梯度 (每个通道低于 1%/min) 的基础。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。整个流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N (一种镍钴合金) 制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了对曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样的电荷异构体的分析。研究中测试了不同的盐梯度斜率, 以便达到最佳分离。然后评估了最佳梯度斜率的重现性。

实验部分

设备

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B), 配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B), 配备生物兼容性微量流通池, 3 mm, 2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版

色谱柱

Bio MAb, NP5, 2.1 $\times$ 250 mm, PEEK (部件号 5190-2411)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、盐酸、氢氧化钠、三羟甲基甲胺、咪唑和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

- Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744)
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗（商品名为赫赛汀）购自 Roche (Basel, Switzerland)
- 曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8

缓冲液配制

配制 2 L 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)：称取 4.45 g 磷酸二氢钠一水合物和 7.44 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中，用超纯水定容至 2 L (→ 缓冲液 A)。将 29.22 g 氯化钠（总浓度 500 mmol/L）加入 1 L 棕色空瓶中，用配制好的磷酸盐缓冲液 A 定容至 1 L (→ 缓冲液 B)。测量两种配制缓冲液的 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 6.8（加入大量盐会改变 pH 值）。配制的缓冲液均使用 0.2 µm 滤膜过滤。

方法

见表 1。

注：使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于含 500 mmol/L 氯化钠的溶剂 B，在泵方法的溶剂选择字段使用“氯化钠 0.5 mol/L”而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到最佳性能。

结果与讨论

方法开发

为获得所需分离度并实现最佳分离，电荷异构体分析需要进行全面的方法开发。有两个参数是成功的关键：最佳 pH 值和最佳梯度斜率。这两个因素都会对分离产生重大影响。首先，建议进行 pH 筛选，以找到用于实现分离的最佳 pH。在之前的实验中，使用 pH 6.4–7.4 的缓冲液进行分析，发现两种样品（曲妥珠单抗和 NISTmAb 参比标样）在 pH 6.8 时均获得最佳结果（数据未展示）。下一步是确定理想的梯度斜率，以实现有效的分离。

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 6.8, B: 30 mmol/L 磷酸盐，pH = 6.8, 500 mmol/L 氯化钠
梯度	30 min 内 0 或 25 mmol/L–150 mmol/L NaCl — 方法开发时使用不同的平缓梯度 30 min 内 0 mmol/L（曲妥珠单抗）和 25 mmol/L (NIST)–100 mmol/L NaCl，用于重现性研究 30 min 内 25–50 mmol/L NaCl，用于重现性研究（非常平缓的梯度） 31 min — 500 mmol/L NaCl 清洗 停止时间：35 min 后运行时间：15 min
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量：3 µL（曲妥珠单抗）和 2 µL (NIST) 样品温度：10 °C 进样针清洗：用水清洗 3 秒

图 1 显示了不同梯度斜率下曲妥珠单抗电荷异构体分析的叠加色谱图，梯度斜率范围为 1% B/min (5 mmol/L/min) 至 0.33% B/min (1.66 mmol/L/min)。梯度越平缓，对泵性能的要求就越高。为在梯度洗脱过程中始终提供高精度的溶剂组成，需要泵能够准确、精密地混合小比例溶剂组分。但必须考虑到，非常平缓的梯度对盐梯度而言并不总能获得更高分离度，但总会增加峰宽（如图 1 中的 0.33% B/min）。因此，重现性研究选择的梯度斜率处于各测试梯度的中间，为 0.66% B/min 和 3.3 mmol/L/min，此处梯度仍较为平缓。

我们对 NISTmAb 参比标样的电荷异构体进行了类似的分离方法开发（见图 2）。与等电点 (pI) 约为 9 的曲妥珠单抗相比，由于 NIST 抗体的 pI 较高（约为 9.2），故 NIST 的起始条件含盐量略高。为了更有效地分离 NISTmAb 参比标样的电荷异构体，所用梯度较曲妥珠单抗略为平缓，最平缓的梯度为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)，这对泵来说是一项挑战性任务。对于进一步的重现性研究，我们选择了 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 的梯度斜率。

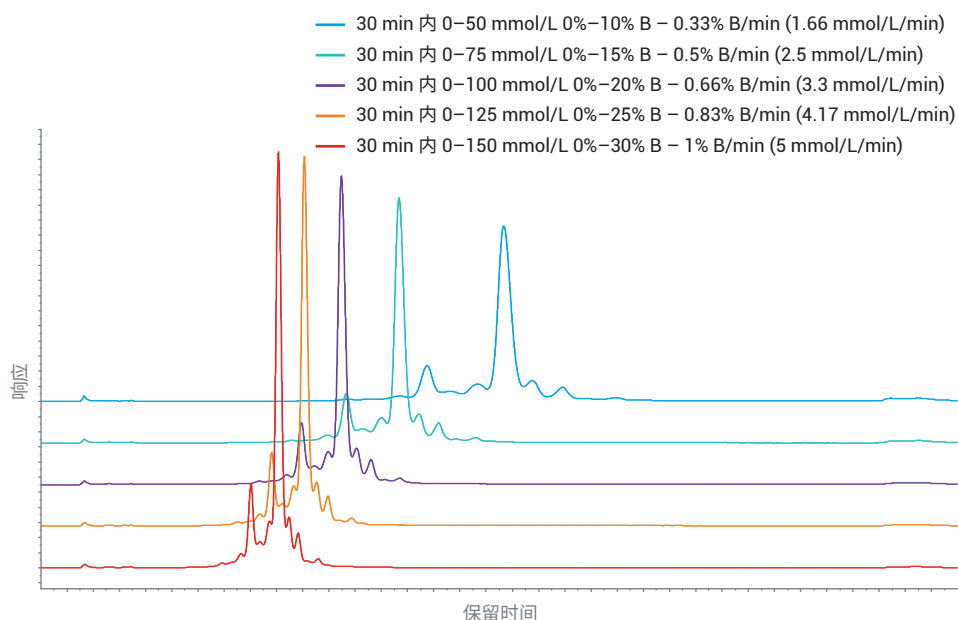


图 1. 不同盐梯度斜率下曲妥珠单抗分离的方法开发

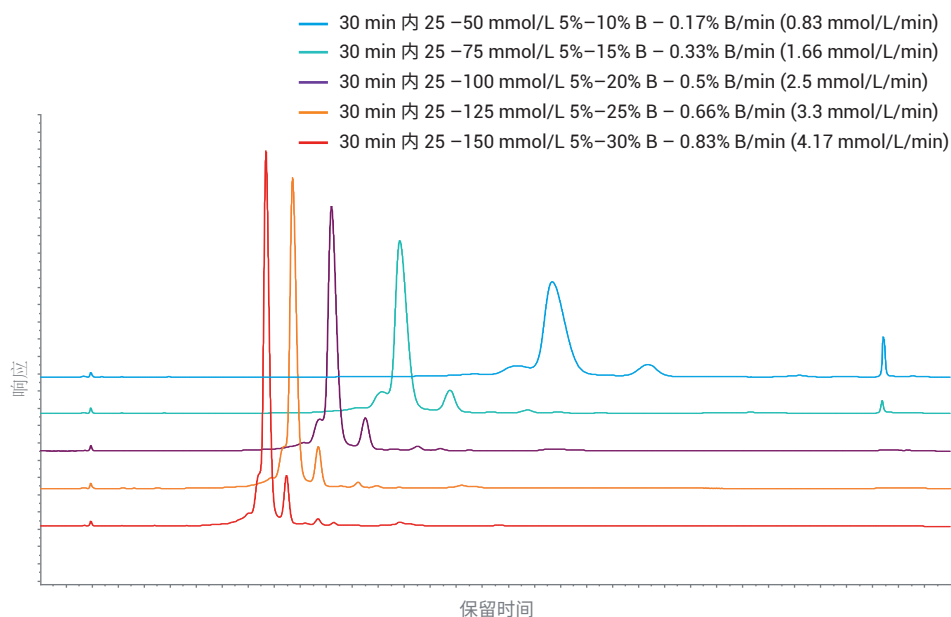


图 2. 不同盐梯度斜率下 NISTmAb 参比标样分离的方法开发

曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性

图 3 显示了曲妥珠单抗电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。图 3B 显示了放大视图，以便更清晰地显示分离的异构体。标为 A 的异构体表示主峰前洗脱的酸性异构体，标为 B 的异构体表示主峰后洗脱的碱性异构体。主峰前有 5 种酸性异构体被洗脱，主峰后有 4 种碱性异构体被洗脱。对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.052%，除两个非常小的异构体峰 A1 和 B3 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.82%。

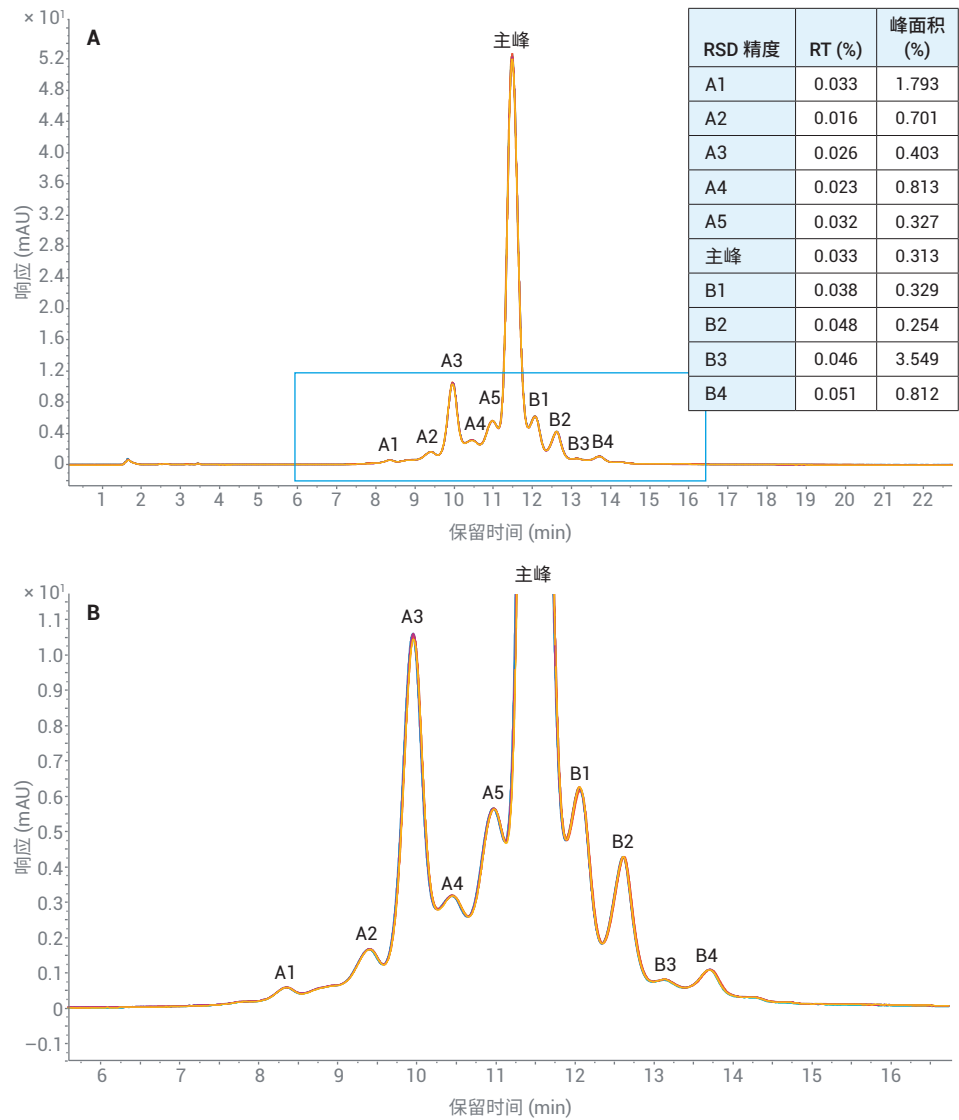


图 3. 曲妥珠单抗电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。(B) 放大图

NISTmAb 电荷异构体分离的重现性

图 4 显示了 NISTmAb 参比标样电荷异构体分离的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。

图 4B 显示了 2 个酸性异构体和 4 个碱性异构体的放大视图。再次对所有异构体和主峰的保留时间 (RT) 和峰面积的精度进行了评估。RT 和峰面积的精度均非常出色，RT 的 RSD 低于 0.06%，除一个非常小的异构体峰 B2 外，峰面积的 RSD 值均低于 0.55%。

如图 2 所示，与 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min) 梯度（仍较为平缓 — 用于重现性研究）相比，最平缓的梯度 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min) 并没有提供更好的分离度。

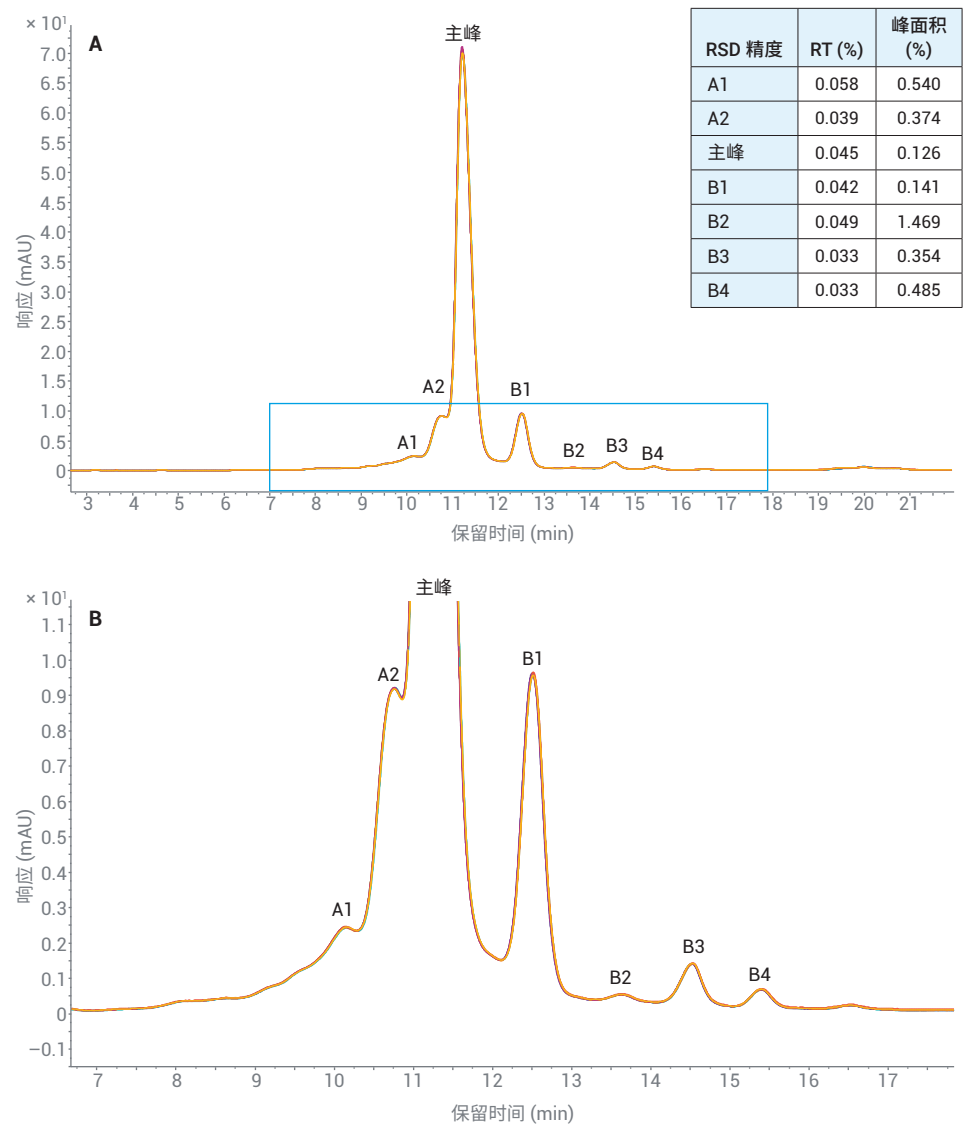


图 4. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。 (B) 放大图

然而，1290 Infinity II 生物高速泵可应对具有挑战性的梯度斜率，如图 5 所示。在 7 次后续运行中，尽管峰宽在该梯度下有所增加，RT 的精度仍非常出色（RSD 低于 0.25%）。随着峰宽的增加，峰高减小，会对峰面积精度产生不利影响。

结论

使用 1290 Infinity II 生物液相色谱系统评估了不同盐梯度斜率下分析曲妥珠单抗和 NISTmAb 电荷异构体的分离度和重现性。乍看之下，更平缓的梯度似乎能提高分离度。而对两种 mAbs 而言，评估的最平缓梯度并没有提供最好的分离度，随着斜率的减小，峰开始变宽，分离度并没有进一步提高。进一步评估了高分离度和尖锐峰形最优组合梯度的方法重现性。对于 3.3 mmol/L/min（曲妥珠单抗）和 2.5 mmol/L/min（NISTmAb）的梯度斜率，RT 和峰面积的重现性均非常出色。评估的所有峰的 RT RSD 均低于 0.06%。对使用最平缓梯度的 NISTmAb 分析进行了重现性评估，即使对于斜率为 0.83 mmol/L/min 的超平缓梯度，RT 的精度仍非常出色（RSD 小于 0.25%）。这些数据表明，1290 Infinity II 生物液相色谱系统及其完全不含铁的流路非常适合在生物色谱条件下使用，可获得高度重现的结果。

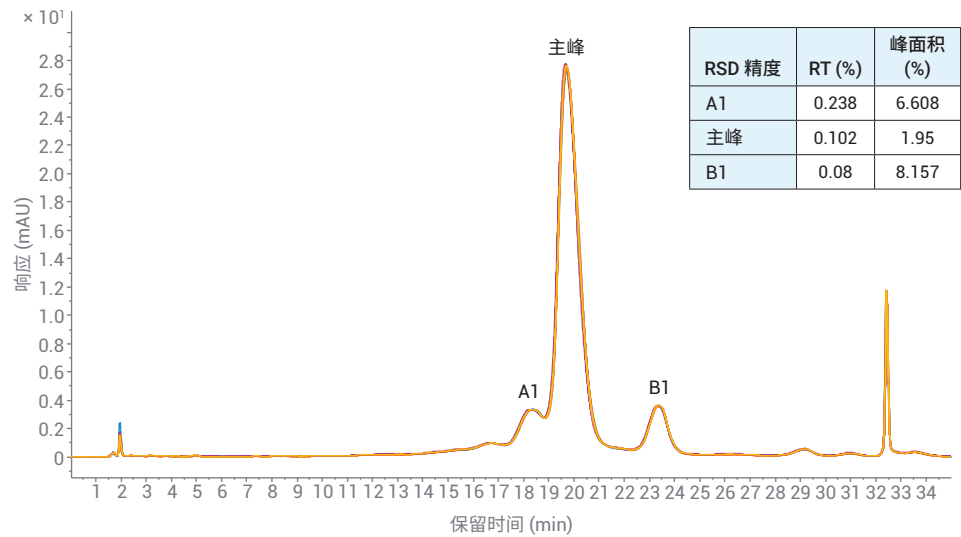


图 5. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究，梯度斜率为 0.17% B/min (0.83 mmol/L/min)

参考文献

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841-3849
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56-64
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846-8857
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development (液相色谱手册: 液相色谱柱与方法开发指南), 安捷伦科技公司, 出版号 5990-7595EN, **2016**
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065-1066, 119-128
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363-379

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

DE.964027778

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, 2020
2020年10月12日, 中国出版
5994-2692ZHCN