

AdvanceBio HIC：用于单克隆抗体 (mAb) 异构体分析的疏水性 HPLC 色谱柱

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪

作者

Andrew Coffey 和
Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱从单克隆抗体 (mAb) 天然形式中分离其氧化异构体。暴露的氨基酸侧链残基（如甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸）的氧化是单克隆抗体的一种常见降解途径，也是生物技术中面临的一项主要分析挑战。通常，与天然形式相比，氧化的 mAb 效价会降低¹。因此，为确保 mAb 产品的疗效，对这些降解的分析至关重要。mAb 氨基酸残基的氧化会改变 mAb 的疏水性，这是由于氧化形式具有更高的极性，或其构象发生变化²。基于疏水性差异分离生物分子的 HPLC 法包括反相色谱和疏水相互作用色谱 (HIC)。HIC 可用于表征来自翻译后修饰 (PTM) 的 mAb 异构体。AdvanceBio HIC 色谱柱可为 mAb 氧化异构体与未修饰形式的分离提供出色的分离度，并可在不将 mAb 分解为亚基或不采用其他样品前处理方法的前提下分离被氧化的物质。

前言

mAb 及相关产品（如抗体药物偶联物 (ADC)、双特异性抗体 (bsAb)）是发展最快的一类生物治疗药物。重组 mAb 在加工、运输和储存过程中会进行大量 PTM。在这些修饰中，暴露的氨基酸侧链（如甲硫氨酸 (Met)、色氨酸 (Trp)）的氧化是一种常见现象。许多研究已报道，mAb 氧化会对产品保质期和生物活性造成负面影响^{1,2}。因此，用于检测 mAb 氧化异构体的分析方法的开发受到广泛关注。甲硫氨酸氧化的 mAb 产品的亚磺和磺侧链比其天然形式更大且极性更高，这可能将改变蛋白质的结构、稳定性和生物功能。反相液相色谱 (RPLC) 和 HIC 等疏水性 HPLC 法常用于表征 mAb 异构体。最近，已有多项研究表明 HIC 用于监测重组 mAb 的氧化具有较好的选择性和易用性，可作为一种出色的 RPLC 替代方法³。

与 RPLC 类似，HIC 同样基于与固定相的疏水相互作用来分离分析物。HIC 的洗脱顺序使蛋白质按其相对疏水性依次排列。与 RPLC 不同的是，HIC 使用非变性条件，无需有机溶剂或高温，可在生理 pH 下实现分离，从而使蛋白质结构得到保留。因此，可使用 HIC 分析蛋白质天然形式的构象变化⁴。

AdvanceBio HIC 是一种硅胶基 HPLC 色谱柱，专为分离 mAb 及其相关产品而设计。其独特的专利化学键合相可为 mAb 和 mAb 异构体分析提供高分离度和所需选择性。本应用简报介绍了使用 AdvanceBio HIC 色谱柱分离 NIST mAb 氧化异构体。

实验部分

仪器与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。人源化 IgG1k mAb 样品（产品项目编号 8671）购自 NIST SRM Standards。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件编号 100）
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件编号 019）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池（选件编号 028）

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS

t-BHP 氧化 mAb

将 1 mL NIST mAb (1 mg/mL)（溶于制剂缓冲溶液中）溶液与 0.2% (v/v) 的 70% 叔丁基过氧化氢 (t-BHP) 溶液在室温下共孵育 24 小时。用截留分子量为 10 kDa 的 Amicon Ultra-10 离心管去除残留氧化剂。然后用 50% 流动相 B 替换样品缓冲溶液。

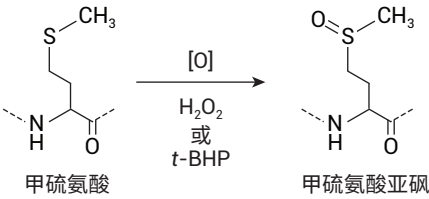
获得图 6 所示数据所用的反应条件为：将 2% (v/v) 的 70% t-BHP 溶液加入 1 mL NIST mAb 样品 (1 mg/mL)，然后将反应混合物进样至色谱柱。进样瓶温度保持在 7 °C，同一样品瓶进行多次进样。

H₂O₂ 氧化 mAb

将 1 mL NIST mAb (1 mg/mL)（溶于制剂缓冲溶液中）溶液与 0.2% (v/v) 的 50% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液在室温下共孵育 24 小时。用截留分子量为 10 kDa 的 Amicon Ultra-10 离心管去除残留氧化剂。然后用 50% 流动相 B 替换样品缓冲溶液。

结果与讨论

在配方开发期间，常需监测稳定性研究或应力样品（例如样品暴露于过氧化氢（H₂O₂）、紫外线或金属离子）中的蛋白质氧化情况。本研究中，使用 *t*-BHP 和 H₂O₂ 作为化学氧化剂促进 NIST mAb 样品的氧化。过往研究表明，这两种试剂均能特异性氧化 mAb 的 Met 侧链残基。H₂O₂ 更易氧化不易接近的掩蔽残基，而 *t*-BHP 则氧化表面暴露更多的 Met 残基⁷。图 1 展示了化学氧化剂诱导的 Met 氧化反应示意图。



AdvanceBio HIC 色谱柱在低盐浓度起始条件下可区分 mAb 氧化异构体与未处理的 mAb 样品。在所报告的实验条件下，经 t-BHP 氧化的 NIST mAb 将产生多个保留时间更短的峰，这可能是由于构象发生变化。HIC 色谱图（图 4）中标注为 1–6 的较早流出的峰表明 mAb 的 Met 残基被氧化。保留时间约为 12.6 分钟的峰 7 对应未氧化的 mAb。H₂O₂ 处理的 mAb 样品被完全氧化，洗脱的三个峰具有更短的保留时间，表明 Met 残基被氧化的程度更高。IgG1k mAb 样品与两种不同氧化剂共孵育后所得的色谱图差异表明，反应受 Met 残基溶剂可及性以及氧化剂空间限制的影响，这与之前的报道一致⁶。

为进一步提高分离度，使用更慢的流速以及更平缓的梯度条件。设置流速为 0.3 mL/min，起始硫酸铵浓度为 1.2 mol/L 且梯度速率为 25 mmol/L/min，在相对更短的分析时间内实现了更好的分离（图 5）。在这幅色谱图中，可从未经处理的 mAb 样品中清晰观察到多种 mAb 氧化物。

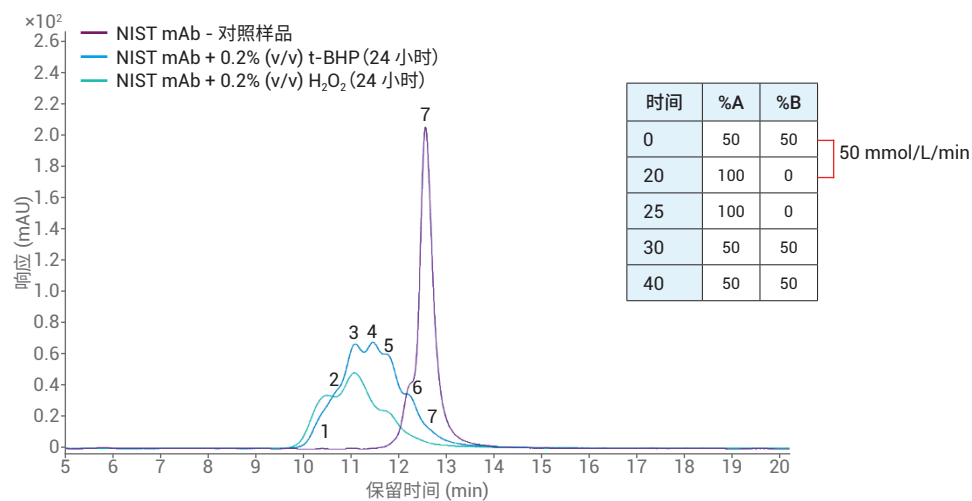


图 4. 使用更低的起始盐浓度分离 NIST mAb 氧化异构体

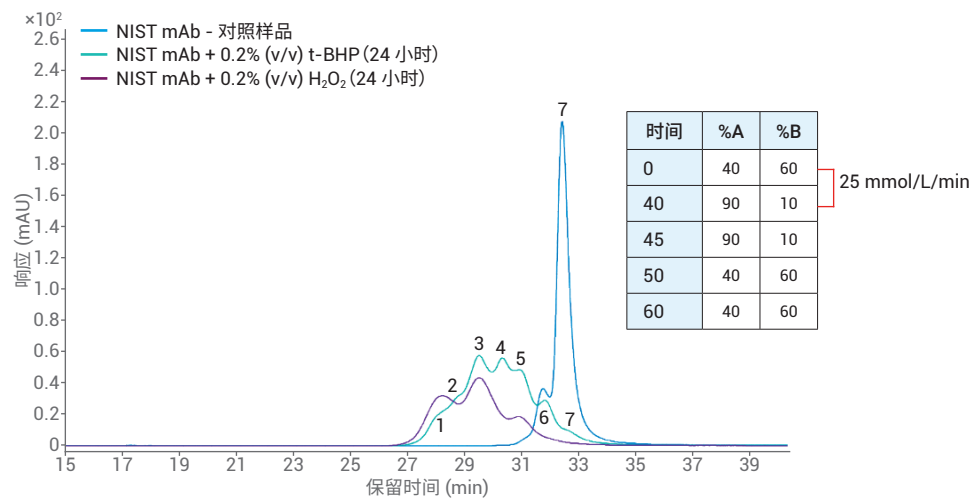


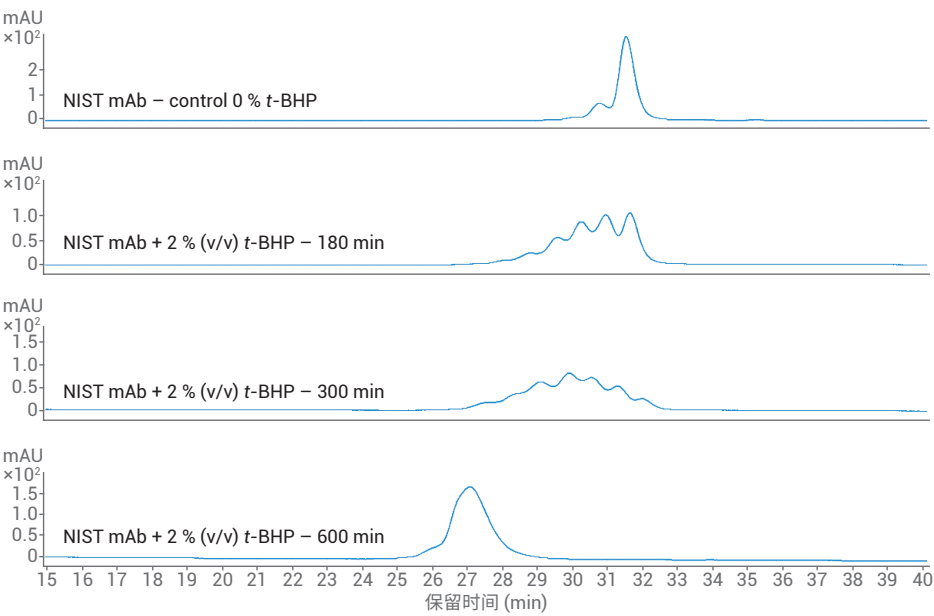
图 5. 使用平缓梯度分离 NIST mAb 氧化异构体

在图 6 中，NIST mAb 样品与 2% (v/v) *t*-BHP 共孵育，使用更平缓的梯度条件在不同时间点监测氧化反应。从叠放的色谱图可以看出，mAb 氧化程度随 *t*-BHP 孵育时间的增加而增加。几个小时氧化反应后可观察到多种 mAb 氧化物。这表明 mAb 样品两条重链上的表面可及的 Met 残基可能被随机氧化，如之前的研究所报

道⁵。反应 10 小时后，mAb 样品被进一步氧化并产生一个较宽的峰，表明发生了强制氧化。之前的研究推测，掩蔽较深的 Met 残基的氧化会引起更显著的结构变化，这可能导致 mAb 部分展开⁷。部分展开的 mAb 可能具有更多构象变异，导致产生更宽的峰以及更大的保留时间偏移。

结论

AdvanceBio HIC 色谱柱可实现 mAb 氧化异构体与其天然形式的分离。使用 AdvanceBio HIC 色谱柱，在更慢的流速以及更平缓的梯度条件下可实现 mAb 氧化异构体的最佳分离，同时还可保持相对较短的分析时间。



时间	%A	%B
0	40	60
40	90	10
45	90	10
50	40	60
60	40	60

25 mmol/L/min

图 6. 监测 *t*-BHP 氧化 mAb 的反应

参考文献

1. Zhang, Y.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography of soluble Interleukin I receptor type II to reveal chemical degradations resulting in loss of potency, *Anal. Chem.* **2008**, 80(18), 7022-8
2. Gaza-Bulseco, G.; *et al.* Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, 870(1), 56-62
3. Boyd, D.; Kaschak, T.; Yan, B. HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *J. Chromatogr. B.* **2011**, 879 (13–14), 955-60
4. Fekete, S.; *et al.* Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 130, 3-18
5. Chumsae, C.; *et al.* Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 850 (1–2), 285–294
6. Shen, F. J.; *et al.* The application of tert-butylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody. In *Techniques in Protein Chemistry*; Marshak, D. R., Ed.; Academic Press, Inc.: San Diego, CA, **1996**; 7, 275–284
7. Liu, D.; *et al.* Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* **2008**, 47(18), 5088–5100

www.agilent.com/chem

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，2018
2018 年 8 月 20 日，中国出版
5994-0199ZHCN

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