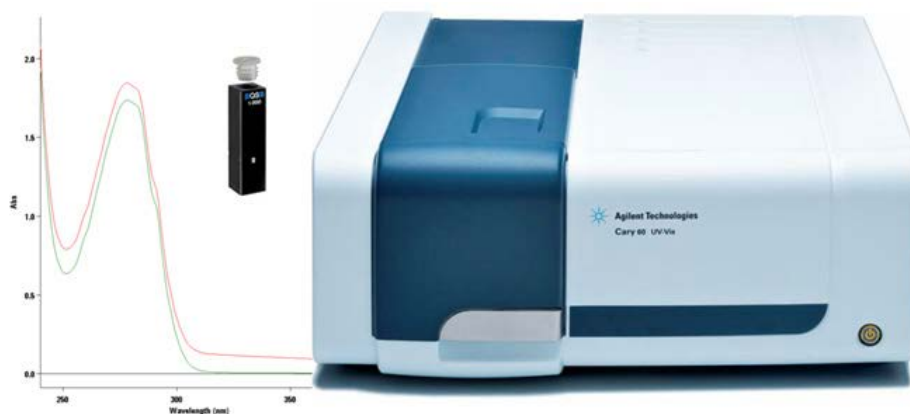


## mAb 聚集体表征

HPLC 方法与使用 Cary 60 紫外-可见分光光度计开发的快速方法的比较



### 作者

Arunkumar Padmanaban,  
Sreelakshmy Menon  
安捷伦科技有限公司

### 前言

单克隆抗体 (mAbs) 是制药公司广泛生产的重要生物制品。随着 mAbs 在生物过程中的应用不断增加, 对其进行详细表征的技术引起制药公司的极大关注。由于蛋白质聚集体影响生物活性, 因此是监管机构、学术界和制造商之间激烈讨论的话题之一<sup>[1]</sup>。亚可见蛋白质聚集体可能暴露出当蛋白质处于稳定形式时可能不存在的表位。可靠地鉴定聚集体的存在对于 mAbs 表征至关重要。

聚集体的形成在生产、纯化、制剂和存储过程中受到众多因素的影响。因此, 采用快速 QC 方法鉴定蛋白质聚集体的存在极具优势。该方法可用于抗体生产生命周期中的许多阶段 (例如克隆筛选), 以及在存储过程中对产品进行持续监测。作为检测蛋白质聚集体的分析方法之一, 紫外光谱的优势在于它是一种无损方法。此外, 该方法所需样品量少, 并且仅需极少的样品前处理, 样品分析更加简单。

本研究开发了一种快速 QC 方法来指示聚集体的存在。该方法使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计鉴定在不同诱导条件下 mAb 溶液中产生的聚集体。通过体积排阻色谱 (SEC) 分析 (表征蛋白质聚集体的标准方法) 进行聚集体的确认。

## 实验部分

### 试剂与样品

市售 mAb 购自当地药房并根据制造商的使用说明进行储存。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均购自 Sigma-Aldrich。新鲜配制缓冲液, 使用前用 0.22 μm 膜过滤。

### 样品前处理

采用两种不同的诱导方法处理 mAb 样品以诱导聚集: 热诱导以及加速冻融诱导 (见下文)。将未处理 (未诱导) 的样品作为分析测量的对照样品。

### 热诱导

用水将 mAb 样品稀释至 1 mg/mL。将 100 μL 稀释后的 mAb 等分试样置于 0.5 mL Eppendorf 管中。然后使用 ThermoMixer 恒温混匀仪 (Eppendorf) 在 65 °C 下分别孵育 5 分钟和 10 分钟, 进行热诱导处理。样品冷却至室温后开始分析。

### 加速冻融诱导:

将 100 μL 的 1 mg/mL mAb 等分试样置于 0.5 mL Eppendorf 管中。将这些样品管浸入乙醇-干冰浴中, 直至溶液冻结。然后将冷冻样品立即放入恒温混匀仪中, 在 30 °C 下恒温 4 分钟。待样品完全解冻后, 再次进行急冻。重复该冻融循环 15 次, 然后进行分析表征。

### 紫外光谱扫描

使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计对对照样品和经诱导的 mAb 样品进行光谱扫描。将 50 μL 等分试样加入安捷伦亚微量矩形石英样品池中 (10 mm 光程)。记录 240–380 nm 范围内样品相对于空白校正基线的吸光度。使用图 1 中所示的公式<sup>[2]</sup> 计算聚集指数 (A.I.)。使用 Agilent Cary WinUV 扫描应用软件进行数据采集和分析。

$$AI = \left( \frac{OD350}{OD280 - OD350} \right) * 100$$

图 1. 聚集指数计算公式

其中 OD 350 表示 350 nm 处的吸光度 (%Abs), OD280–OD350 表示 280 nm 和 350 nm 处的吸光度差值。

### 体积排阻色谱 (SEC)

使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统对样品进行 SEC 分析, 该系统包括:

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱, 配备生物惰性热交换器
- 安捷伦柱温箱
- Agilent 1260 Infinity VL Plus 型二极管阵列检测器
- Agilent AdvanceBio SEC 液相色谱柱, 300 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm

液相色谱参数如表 1 所示。这些参数来自另一项研究<sup>[3]</sup>, 并用于本研究的分离过程。计算单体和聚集体的峰面积, 并与对照样品进行比较。采用 OpenLAB CDS ChemStation 进行数据采集和分析。

表 1. 液相色谱仪器条件

参数	设置
流动相 A	150 mmol/L 磷酸钠 pH 7.0
色谱柱	AdvanceBio SEC 2.7 $\mu\text{m}$ 300 $\text{\AA}$ 7.8 $\times$ 300 mm 色谱柱
TCC 温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	25 $^{\circ}\text{C}$
等度运行	流动相 A
运行时间	15 分钟
进样量	5 $\mu\text{L}$
流速	0.8 mL/min
DAD	220 nm 和 280 nm

## 结果与讨论

### 紫外光谱法

紫外吸收光谱法提供了定量测量蛋白质溶液的最简单的无损方法。

利用该方法定量分析蛋白质，无需进行化学衍生或复杂的染料偶联反应。

使用 Cary 60 紫外-可见分光光度计测量在不同条件下诱导形成聚集体的 mAb 样品。Cary 60 适用于测量生物样品，因为闪烁式氙灯不会导致光敏样品发生光降解。安捷伦提供各种石英样品池，样品容量在 5  $\mu\text{L}$  至 1 mL 范围内。本研究使用样品容量为 50  $\mu\text{L}$ 、光程为 10 mm 的亚微量石英样品池。使用该样品池可确保将样品损失降至最低，并且仅需少量样品即可进行测量。

任何高于 320 nm 的吸收信号均归因于聚集体颗粒对光的散射。不含聚集体的蛋白质溶液在 320 nm 以上无吸收<sup>[4]</sup>。图 2 展示了未经诱导和经诱导的 mAb 样品的光谱扫描结果。图 A 为热诱导样品的吸收光谱。可以观察到 350 nm 处的光密度略有增加。该光谱与图 B 中冻融诱导样品的光谱相比，后者在 350 nm 处的光密度显著增加。

在图 2 中，每张图均在插图中展示了相同数据的双对数曲线图。它们显示了散射对总体吸光度的贡献。

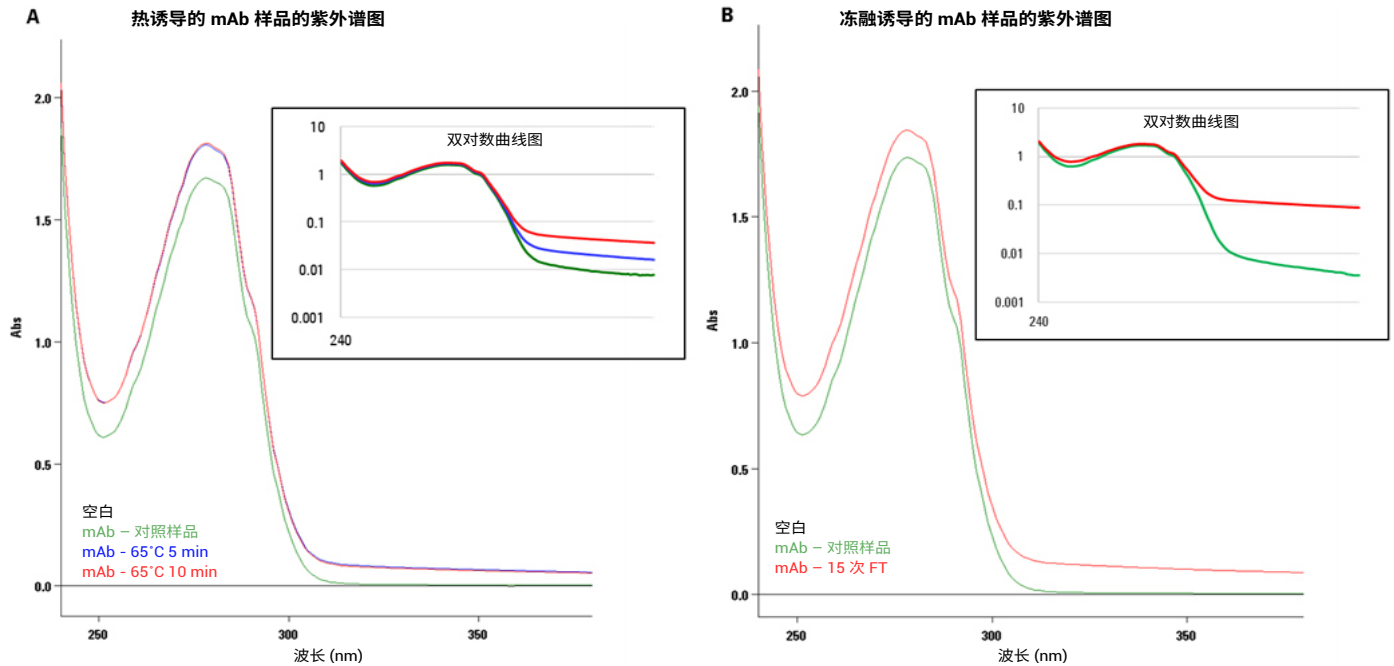


图 2. 未经诱导的 mAb 和经诱导的 mAb 样品的紫外吸收光谱。图 A: 热诱导的样品，图 B: 冻融诱导的样品。插图展示了双对数曲线图

紫外迹线的偏移增加，可以清楚地看出溶液的光密度变化。

使用图 1 中的公式，根据这些数据计算聚集指数 (AI)，表 2 中列出了聚集指数的变化。反复冻融循环的样品表现出比对照样品和热诱导样品更高的聚集指数。从这些数据可以看出，冻融诱导比热诱导更易形成聚集体。这可能是冰-液界面处发生部分去折叠、pH 值随缓冲盐结晶发生变化以及冰晶生长过程中的溶质浓度等因素所致。

### SEC 分析

使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱（粒径为 2.7  $\mu\text{m}$ ）分析所有样品。AdvanceBio SEC 色谱柱可有效分离制剂中的单体峰、聚集体峰以及小分子防腐剂。在很短的分析时间内即可实现单体峰与聚集体峰的高分离度分离。

表 2. 未经诱导的样品和经不同诱导条件诱导的样品的聚集指数变化

样品	OD 280 nm	OD 350 nm	聚集指数
未经诱导的 IgG	1.57	0.01	0.5
65 °C – 5 min	1.69	0.02	1.1
65 °C – 10 min	1.72	0.04	2.5
15 次冻融 (FT)	1.82	0.10	5.8

热诱导样品的 SEC 色谱图如图 3 中的图 A 所示，冻融样品如图 B 所示。所有样品均显示出主要单体峰，约占总峰面积的 99%。在对照样品中，7 分钟处出现少量的聚集体峰。热诱导样品的色谱图显示，在保留时间 6 分钟处出现另一个峰。而对照样品中不存在该峰。另外，经诱导样品的基线在 11 分钟左右有所升高，表明存在降解的 mAb。色谱图显示，在热诱导时某些固有聚集体转变为高阶聚集体。尽管聚集体的总峰面积相同，但采用 SEC 分析可以分离出不同形式的聚集体。对照样品和经过 15 次冻融循环的样品的叠加色谱图如图 B 所示。

该图表明，在经过诱导的样品中，7 分钟处聚集体的峰面积有所增加。

表 3 所示的单体峰和聚集体峰的峰面积百分比表明，与热降解相比，在反复冻融循环中发生高度聚集。紫外谱图显示出类似的结果。

表 3. 不同条件下 SEC 色谱图中聚集体和单体峰的峰面积百分比

mAb 样品	峰面积 %	
	聚集体	单体
未经诱导的 mAb	0.73	99.13
65 °C – 5 min	0.68	99.23
65 °C – 10 min	0.67	99.20
15 次冻融 (FT)	1.18	98.65

紫外吸收数据和 SEC 数据在评估存在的聚集体方面具有良好的相关性。尽管紫外吸收法无法分离聚集体，但是可以将其作为 SEC 表征前的快速分析工具。紫外吸收法的优点在于所需样品量少、样品可重复使用、仪器设置简单且分析快速（耗时不到 1 分钟）。

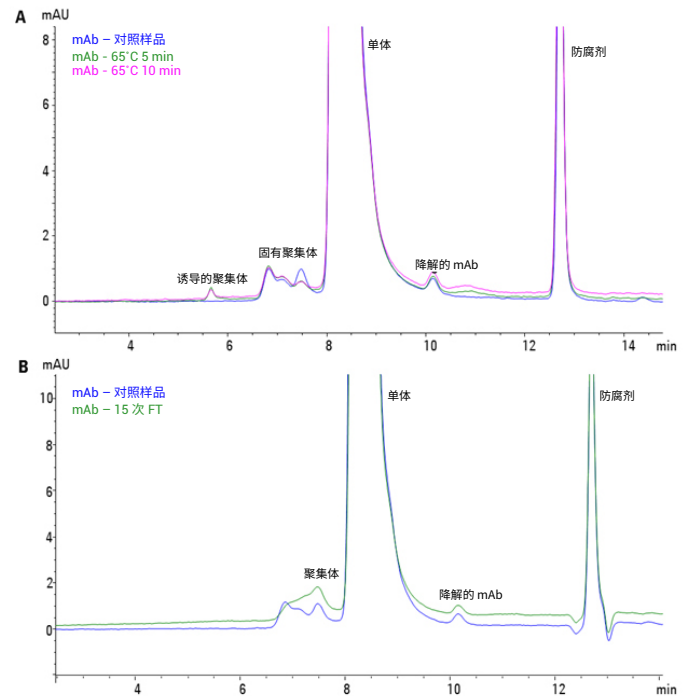


图 3. 未经诱导的 mAb 和经诱导的 mAb 样品的 SEC 叠加色谱图。图 A: 经热诱导的样品，出现了聚集体峰。图 B: 经冻融诱导的样品，聚集体峰增加

## 结论

本研究的结果表明，使用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计可以监测单克隆抗体溶液中聚集体的存在。尽管该方法无法分离不同形式的聚集体，但是在采用 SEC 分离这些聚集体之前，可以将该方法作为一种快速筛选方法来鉴定是否存在聚集体。结果还表明，Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱与 Agilent 1260 生物惰性液相色谱系统结合使用，能够在较短的运行时间内实现 mAb 聚集体的高分离度分析。

## 参考文献

1. Vázquez-Rey, et al. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108
2. Hawe, A, et al. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci.* **2009**, 38
3. Coffey, A. 等，优化和执行蛋白质聚集体研究的完整工作流程。安捷伦科技公司，出版号 5991-7476CHCN，2017
4. Raynal, B. et al. Quality Assessment and Optimization of Purified Protein Samples: Why and How? *Microb Cell Fact.* **2014**, 13

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)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。