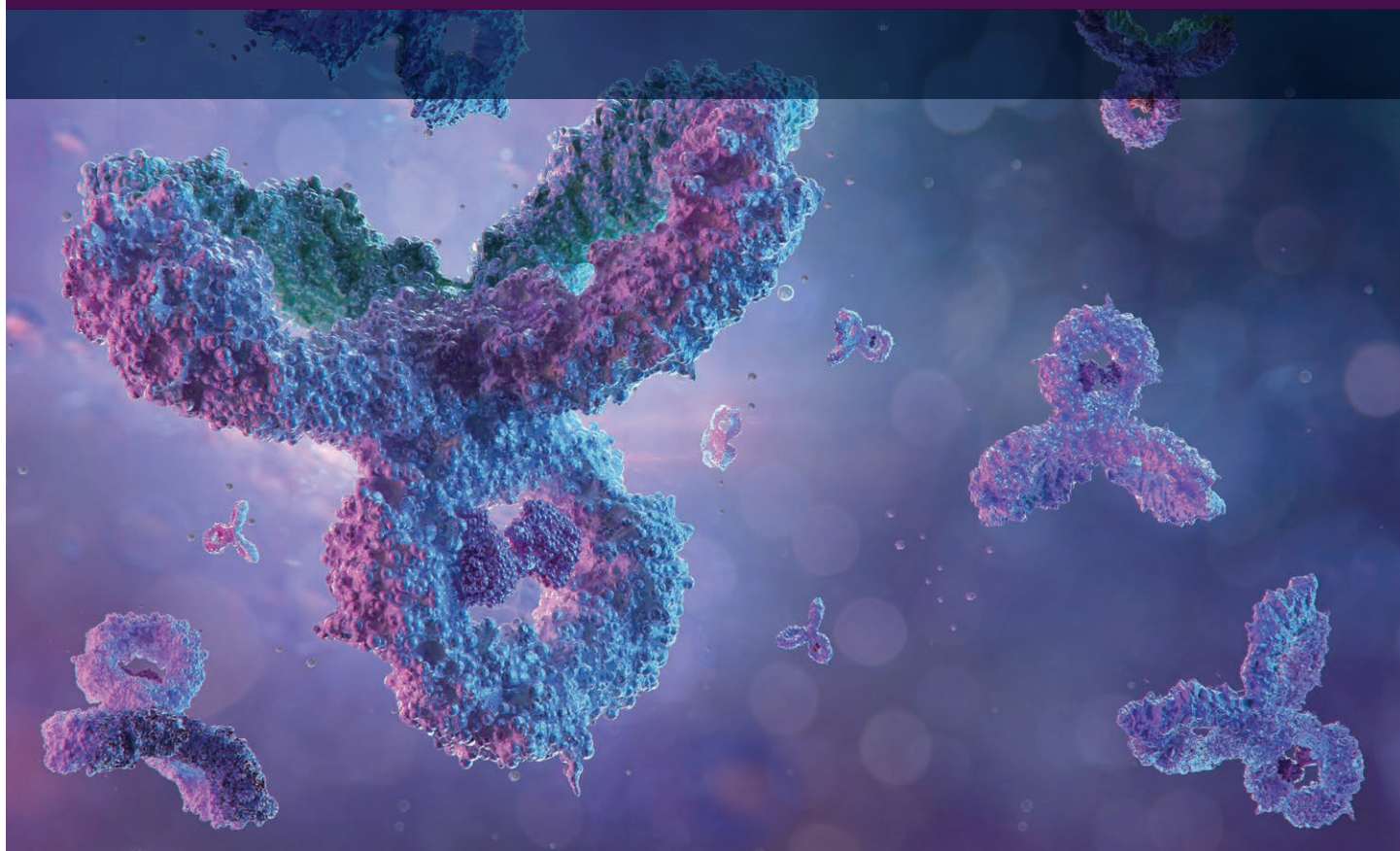


安捷伦生物色谱柱

电荷异构体分析

应用文集



目录

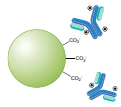
| | |
|---|--------------------|
| 背景 | 2 |
| 入门指南 | 3 |
| 用于生物分子分析的离子交换色谱操作指南 — 5991-3775EN | 4 |
| 精选应用简报 | 22 |
| 便捷定制阳离子交换分析 — 5994-3257EN | 22 |
| 您的分析可以采用多平缓的梯度？ Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAb 电荷异构体分析 — 5994-2692ZHCN | 29 |
| 利妥昔单抗创新药物与生物仿制药 mAb 的电荷异质性分析 — 5991-5557EN | 37 |
| 采用安捷伦弱阳离子交换柱进行快速分离 — 5990-9931EN | 42 |
| 使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法的蛋白质分离 — 5991-0565CHCN | 46 |
| 使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征 — 5994-2020EN | 52 |
| 更多应用简报 | 64 |

电荷异构体分析

背景

由于存在带正电荷和带负电荷的氨基酸以及带负电荷的多聚糖（唾液酸），意味着大分子蛋白质作为多电荷物质存在，并且有几种副反应可导致净电荷变化。了解涉及到的氨基酸或多聚糖及其在大分子生物治疗蛋白质中的特定位置至关重要。抗体抗原结合区内的异构体对功能的影响可能更为重大。

离子交换色谱可以分离一些电荷异构体，特别是那些位于蛋白质表面（而不是隐藏在结构内）的电荷异构体。尽管如此，分离可能具有 +50 净电荷的分子和 +49 或 +51 的电荷异构体仍然相当困难。通过使用非多孔颗粒避免孔结构，从而避免孔扩散，在某种程度上可以改善峰形并提高分离度。通常需要重新使用弱阳离子交换柱并进行广泛的方法优化，以确定特定分子最合适的条件。



电荷异构体分析

离子交换色谱

提高生物分子表征的准确度与速度

Bio MAb

单克隆抗体分离的理想选择

| 属性 | 优势 |
|-------------|------------------|
| 刚性非多孔颗粒 | 高效分离 |
| 亲水聚合物层 | 避免非特异性吸附 |
| 高密度 WCX 固定相 | 高离子交换容量，非常适合 MAb |

Bio IEX

蛋白质和多肽分离的理想选择

| 属性 | 优势 |
|---------------|-----------------|
| 具有亲水性涂层的刚性颗粒 | 避免非特异性吸附 |
| 强/弱阳离子、阴离子固定相 | 只需一个色谱柱即可应对所有分离 |

入门指南

由于大多数蛋白质所含的碱性氨基酸多于酸性氨基酸，因此大多数电荷异构体分离需要采用阳离子交换。然而，每种蛋白质都不相同，找到能够实现所需最佳分辨率的条件可能需要相当多的优化工作。强阳离子交换柱通常更易于使用，但对于单克隆抗体，弱阳离子交换柱可能是实现所需分离度的唯一途径。

在开始方法开发之前，确定目标蛋白质的等电点 (pI) 至关重要。如果初始流动相条件的 pH 值过分接近蛋白质的 pI，蛋白质就不会保留在色谱柱上。pH 与主要物质的等电点之间的差距应为至少 0.5 至 2 个 pH 单位，具体取决于电荷异构体 pI 的差异。蛋白质可以通过盐梯度（用高离子强度破坏蛋白质在色谱柱上的吸附）或 pH 梯度（蛋白质在 pH 等于 pI 时洗脱）洗脱。

值得考虑采用一种能够在方法开发过程中筛选几种不同色谱柱的仪器。即使是离子强度和 pH 等方法条件的微小变化，也很难预测会产生怎样的结果；这两个因素都会影响蛋白质上的净电荷，如果是弱离子交换色谱柱，还会影响色谱柱上的净电荷。建议采用严格的“质量源于设计”方针。建议使用开发矩阵或系统化设计实验的软件。缓冲液顾问软件可以利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱的四元 HPLC 泵功能，从而为方法开发节约大量时间。本节列出的一些应用简报，包括“操作指南”和相关应用简报，说明了如何使用缓冲液顾问软件来测试一系列流动相条件。如果最佳分离条件要求缓冲液在缓冲范围极限的 pH 水平下具有非常低的离子强度，也可以采用 PEEK 色谱柱。

与体积排阻色谱一样，离子交换通常采用非变性条件，对完整的天然蛋白质进行分离。这意味着这种方法不兼容 MS，除非将其作为二维液相色谱中的第一维。不过，可以通过 UV 检测实现定量。

用于生物分子分析的离子交换色谱： 操作指南

前言

蛋白质由含有许多氨基酸的链组成，其中几种氨基酸具有酸性或碱性侧链基团。因此，蛋白质表面上的总电荷可以通过调节周围溶液的 pH 来控制。等电点 pI 是蛋白质的净电荷为中性时的 pH（正电荷数量等于负电荷数量）。如果 pH 低于 pI ，则蛋白质总电荷为正，可以保留在带负电荷的阳离子交换吸附剂上；如果 pH 高于 pI ，则蛋白质总电荷为负，可以保留在阴离子交换吸附剂上。

在本“操作指南”中，我们将讨论离子交换 (IEX) 色谱、色谱柱选择，流动相的重要注意事项、使用 IEX 的一般经验规则、仪器注意事项等。

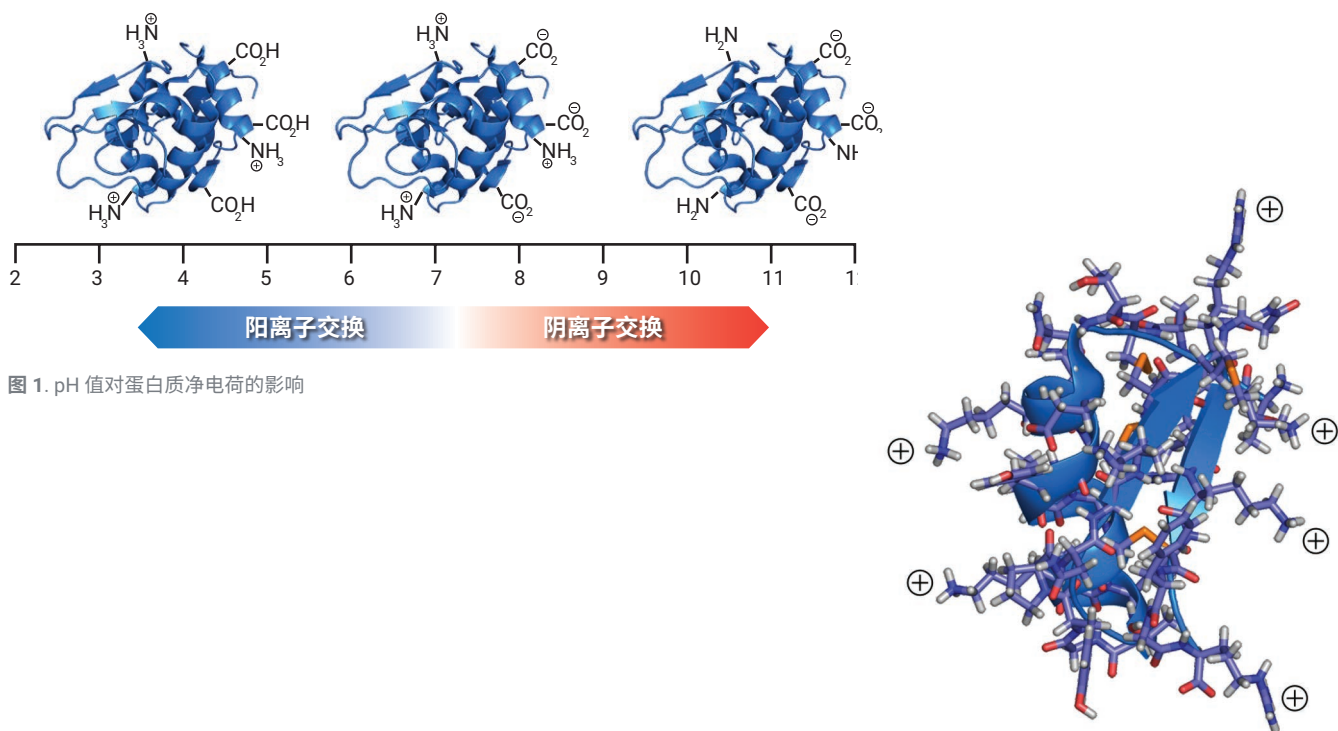


图 1. pH 值对蛋白质净电荷的影响

基于离子电荷的分离通常在非变性条件下进行

离子交换是一种广泛使用的方法，根据离子电荷的差异分离生物分子。它是一种温和的非变性技术，不需要有机溶剂，因此经常用于表征天然或活性形式的蛋白质，也用于纯化。

蛋白质含有多种基团，这些基团可能带来电荷差异。酸性基团包括 C 端羧酸、天冬氨酸和谷氨酸的酸性侧链以及糖基化蛋白质中唾液酸产生的酸性基团；碱性基团包括 N 端胺以及精氨酸、赖氨酸和组氨酸的碱性侧链。因此，分子的总电荷取决于周围溶液的 pH，继而又会影响可以使用的离子交换方法。必须在整个分离过程中控制流动相的 pH，因此使用水相缓冲液作为洗脱液。

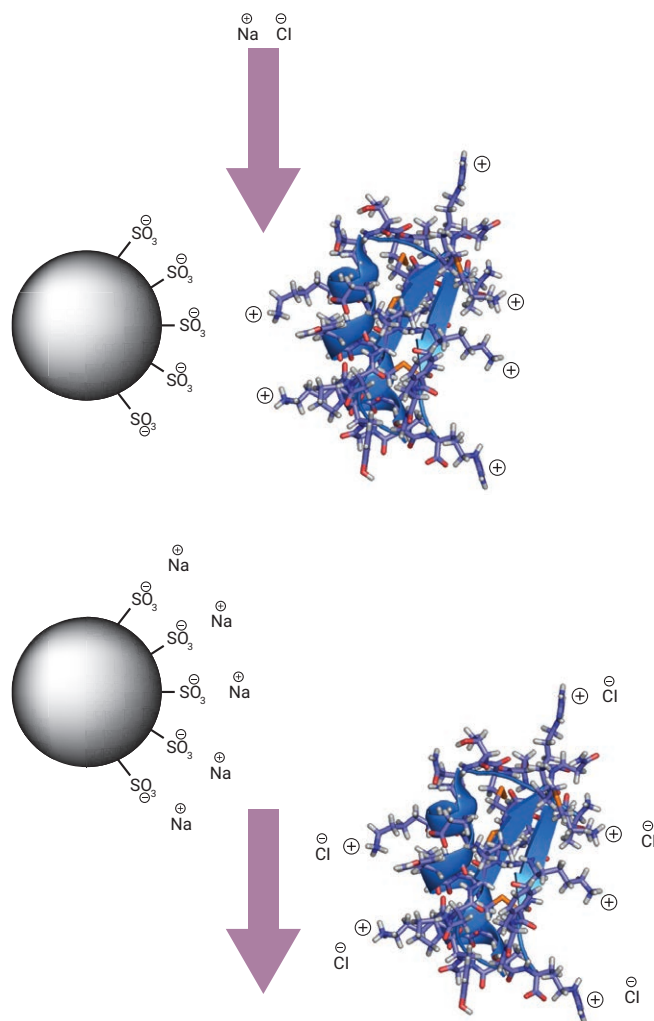


图 2. 离子交换的分离机制

因此，离子交换技术适用于分离具有不同等电点的蛋白质，但它在分离单个蛋白质的带电异构体方面同样很有价值。在越来越重要的生物制药领域，蛋白质通过生物工程生产并从发酵反应中分离出来，带电异构体表示着蛋白质的一级结构存在差异，因此带电异构体的鉴定非常重要。一级结构的差异可能说明糖基化或降解途径有所变化，例如 C 端残基缺失或酰胺化/脱酰胺化作用。它们还可能导致稳定性或活性发生改变，并可能引起不良免疫反应。离子交换用于在开发过程中分离和量化电荷异构体，也用于生物治疗药物生产过程中的质量控制和质量保证。对于单克隆抗体 (mAb) 等大分子，还需要考虑分子的大小和结构 (mAb 通常为 150 kD)，特别是当色谱相互作用只会发生在表面电荷上时。

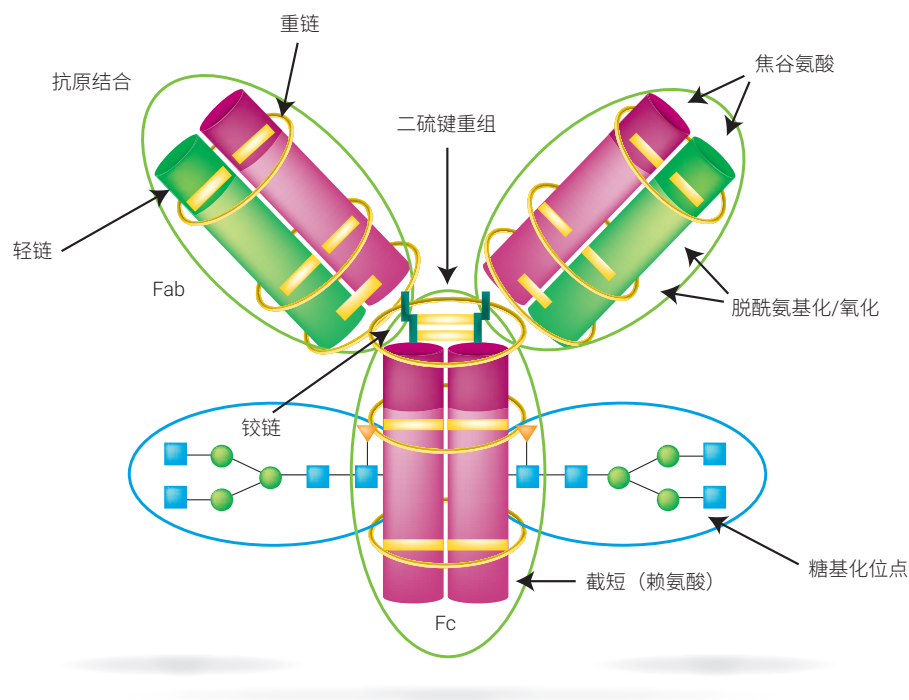
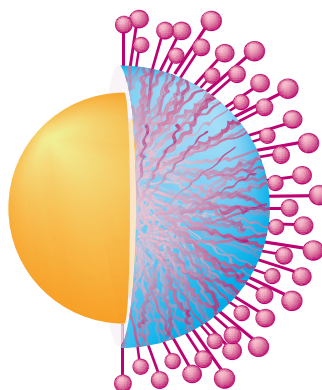


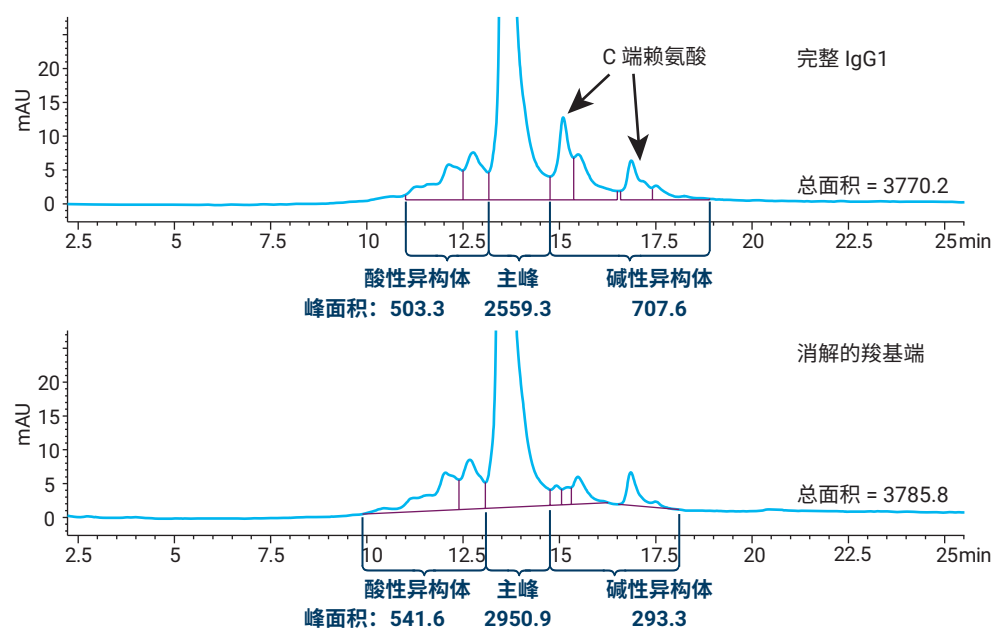
图 3. 通过不同程度的氨基酸糖基化、脱酰胺化和氧化作用，以及重链的赖氨酸截短生成的单克隆抗体的电荷异构体

Agilent Bio MAb HPLC 色谱柱： 从内到外的优越性能

- 填料、涂层和键合能够耐高压，有助于实现更高的分离度和更快速的分离
- 亲水聚合物层消除了大多数非特异性键合
- 高度均一、致密填装的弱阳离子交换 (WCX) 功能团化学键合到亲水聚合物层上



使用 Bio MAb 色谱柱鉴定重链的羧基端截短



条件

| 参数 | 值 |
|------|--|
| 色谱柱: | Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm |
| 样品: | 5 μL 1 mg/mL 完整或羧基端消解的 IgG1 |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 5.5 B: A + 0.5 mol/L NaCl |
| 流速: | 0.85 mL/min |
| 梯度: | 0 到 25 分钟 B 从 10% 增加到 35% |
| 检测器: | UV, 225 nm |
| 进样量: | 5 μL |

图 4. 在 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统上使用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱分析羧基端消解的 IgG1 的计算数据。色谱柱展现出高分离度，可以进一步改善色谱峰鉴定和准确定量

了解成功离子交换分离的要求

第 1 步：

样品前处理

离子交换色谱的样品前处理方法与其他蛋白质分析并没有什么不同。最重要的一点是样品必须能够溶于洗脱液，且自身可在流动相条件下实现良好分离。为了避免损害色谱柱，建议在使用前进行样品过滤以除去颗粒物。但是，不能用过滤来补偿样品的低溶解度问题，需要更换洗脱液。

Captiva 低蛋白质结合过滤器

Agilent Captiva 优级 PES 针头过滤器可在蛋白质相关的过滤中提供出色而一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，聚醚砜 (PES) 滤膜相对聚偏二氟乙烯 (PVDF) 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦的 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/filtration

Captiva 优级 PES 针头过滤器

| 直径 (mm) | 孔径 (μm) | 认证 | 外壳 | 部件号 |
|---------|---------|-------|-----|-----------|
| 4 | 0.2 | LC/MS | 聚丙烯 | 5190-5094 |
| 4 | 0.45 | LC | 聚丙烯 | 5190-5095 |
| 15 | 0.2 | LC/MS | 聚丙烯 | 5190-5096 |
| 15 | 0.45 | LC | 聚丙烯 | 5190-5097 |
| 25 | 0.2 | LC/MS | 聚丙烯 | 5190-5098 |
| 25 | 0.45 | LC | 聚丙烯 | 5190-5099 |



AssayMAP 自动化蛋白质和多肽样品前处理

AssayMAP 样品前处理是一种用于蛋白质纯化、消化、肽段纯化和肽段分馏的自动化解决方案，可以大大缩短实际操作时间，同时大幅提高工作流程的重现性和效率。标准化的用户界面简化了工作流程，同时可以灵活控制关键分析参数。AssayMAP 技术具有高水平的数据质量和增强的功能，可从发现到验证和生产过程中提供无可比拟的工作能力。

- 可重现的结果
- 缩短手动操作时间
- 简单的用户定制方案
- 高通量，每天可处理 8 到 384 个样品
- 轻松进行方法转换

了解更多有关 AssayMAP 技术的信息：

www.agilent.com/lifesciences/assaymap

对于完整蛋白质的分析工作流程（例如本指南中提供的工作流程），可以使用 Protein A 或 Protein G 微量色谱柱在 AssayMAP 平台上定量纯化目标蛋白质，然后进样至 HPLC 色谱柱以便分离和检测完整的蛋白质电荷异构体。

为进行有效的样品前处理，还需要确保溶解样品的方法不会改变样品本身的性质。



第 2 步：

色谱柱选择 - 离子交换

| 应用 | 安捷伦色谱柱 | 说明 |
|--|--|--|
| 单克隆抗体 | Bio MAb | 单克隆抗体的全面表征，包括酸性和碱性亚型的鉴别和监测。Agilent Bio MAb HPLC 色谱柱填充了专为单克隆抗体基于带电量的高分离度分离而设计的特殊树脂颗粒。 |
| 肽和蛋白质 | Bio IEX | Agilent Bio IEX 色谱柱填充的是聚合物型非多孔离子交换填料。Bio IEX 色谱柱专为实现高分离度、高回收率和高分离效率而设计。 |
| 蛋白质、多肽和脱保护寡核苷酸 | PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å | 强阴离子交换官能团共价连接到化学稳定的全多孔聚合物表面，拓展了操作的 pH 范围。此外，阴离子交换能力与 pH 值无关。对于合成寡核苷酸，可以使用高温、有机溶剂和高 pH 等变性条件进行分离。5 µm 填料能够提供比中等压力液相色谱中使用的 30 µm 填料更高的分离度。 |
| 球蛋白和肽 非常大的生物分子/高速 | PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å | |
| 小肽到大蛋白 | PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å | PL-SCX 是一种具有强亲水性涂层和强阳离子交换官能团的大孔 PS/DVB 填料。其生产工艺受到严格控制，能够提供理想的强阳离子交换官能团密度，适用于分析、分离和纯化广泛的生物分子。5 µm 填料能够提供比中等压力液相色谱中使用的 30 µm 填料更高的分离度。 |
| 球蛋白 非常大的生物分子/高速 | PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å | |
| 抗体 (IgG、IgM)、 质粒 DNA、病毒、 噬菌体和其他生物大分子 | Bio-Monolith QA Bio-Monolith DEAE Bio-Monolith SO ₃ | 强阳离子交换相、强阴离子交换相和弱阴离子交换相。 Bio-Monolith HPLC 色谱柱与 HPLC 和制备型 LC 系统兼容，包括 Agilent 1100 和 1200 Infinity 系列。 |
| 病毒、DNA、大分子蛋白 质粒 DNA、噬菌体 蛋白质、抗体 | Bio-Monolith QA Bio-Monolith DEAE Bio-Monolith SO ₃ | |

色谱柱填料选择

与大多数色谱技术一样，有一系列色谱柱可供选择。对于离子交换，首先要考虑的是“阴离子交换还是阳离子交换”。还可以在强离子交换或弱离子交换之间选择。大多数情况下，最好从强离子交换色谱柱开始。如果需要，可以使用弱离子交换剂来提供选择性差异。

强阳离子交换色谱柱中的基团是磺酸，因此固定相在所有流动相中（酸性最强的流动相除外）均带负电。相反，强阴离子交换色谱柱中的基团是季胺基团，其所有流动相中（碱性最强的流动相除外）带正电。因此，强阳离子交换色谱柱的操作范围最宽。弱离子交换吸附剂（弱阳离子交换剂中的羧酸和弱阴离子交换剂中的胺）受流动相条件的影响更大。这些基团与蛋白质本身的带电基团并无不同，并且带电程度可能受到离子强度以及流动相 pH 的影响。

这可能导致分离度发生变化，但可以通过精心选择操作条件来巧妙地控制和优化。因此，弱离子交换剂是一种附加工具，有时可以提供强离子交换色谱柱无法提供的选择性。

孔径

如果分离度的重要性高于容量，则 Agilent Bio IEX 产品系列提供的刚性球形非多孔颗粒填料（具有适当的表面官能团）可能是有益的。在分析特别大的生物分子，或者需要达到更高速度时，Agilent Bio-Monolith 色谱柱可以提供出色结果。一些固定相，如 PL-SCX 或 PL-SAX 吸附剂，是具有 1000 或 4000 Å 孔的全多孔颗粒。必须确保孔足够大，以便蛋白质不受阻碍地完全渗透到结构中。这样可以提高的表面积，从而提高载样量，更加适合于制备级分离。

出色的分离能力

填料具有亲水聚合物层和紧密装填的离子交换官能团，对各种等电点 (pI) 的蛋白质混合样品能够提供非常尖锐的峰形和极高的分离度。

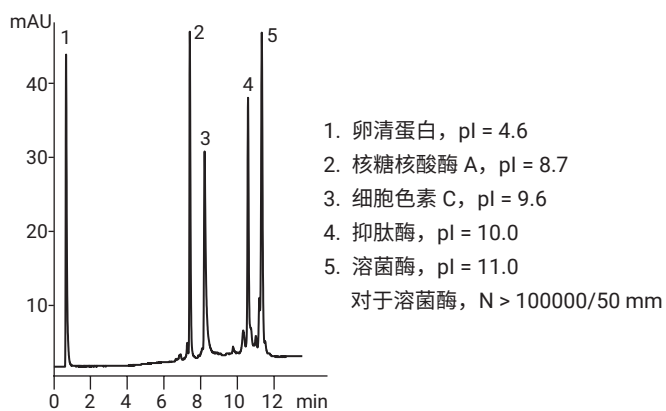


图 5. Agilent Bio SCX 出色的分离能力

条件

| 参数 | 值 |
|---------|--|
| 色谱柱: | Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 × 50 mm, 3 μm |
| 缓冲液: A: | 10 mmol/L 磷酸盐, pH 6.0 |
| 流速: | 0.5 mL/min |
| 梯度: | 0–1.0 mol/L NaCl, 15 min |
| 检测器: | 280 nm |

粒径

选择色谱柱时，粒径是一个重要考虑因素。较小的粒径可提高分离效率，但代价是操作压力较高。因为生物分子相对较大并且扩散速率较慢，所以减小粒径提高的分离度不一定能达到与小分子相同的水平。此外，含有水相缓冲液的洗脱液相对粘稠，必须注意避免反压过高。

使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μm 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品

条件

| 参数 | 值 |
|--------|--|
| 色谱柱 A: | Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 \times 50 mm, 3 μm |
| 色谱柱 B: | Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 \times 50 mm, 3 μm |
| 色谱柱 C: | Bio MAb, 不锈钢 5190-2403 4.6 \times 50 mm, 3 μm |
| 样品: | 核糖核酸酶 A、细胞色素 c、溶菌酶和蛋白质混合物 |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 5.7 B: A + 1 mol/L NaCl |
| 流速: | 0.5 mL/min |
| 梯度: | 0 min - 100% A: 0% B 25 min - 0% A: 100% B |
| 温度: | 室温 |
| 检测器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱, 带二极管阵列检测器, 波长 220 nm |

柱卡套

选择色谱柱时，粒径是一个重要考虑因素。较小的粒径可提高分离效率，但代价是操作压力较高。因为生物分子相对较大并且扩散速率较慢，所以减小粒径提高的分离度不一定能达到与小分子相同的水平。此外，含有水相缓冲液的洗脱液相对粘稠，必须注意避免反压过高。

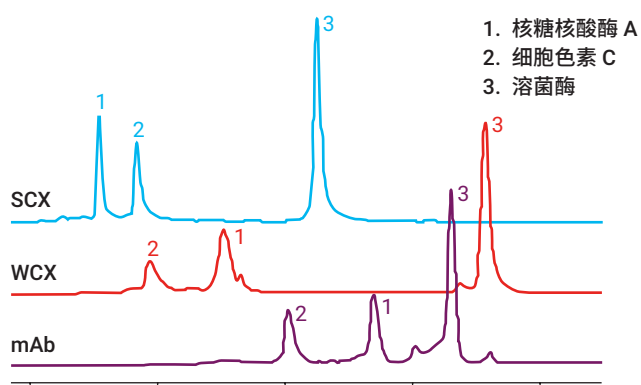


图 6. 使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μm 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品

利用更小粒径的填料和更短的色谱柱实现更快分析 — 分离速度提高 30%

可使用不锈钢色谱柱，但盐梯度可能具有腐蚀性，如果任其与色谱柱接触，会导致腐蚀。PEEK 色谱柱就没有这个问题，可能适合于金属敏感分子，但它们工作的反压较低。如需非金属样品流路，应使用 PEEK 色谱柱和生物惰性色谱仪，如 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱。

条件

| 参数 | 值 |
|--------|--|
| 色谱柱 A: | Bio WCX, 不锈钢 5190-2445 4.6 × 250 mm, 5 μm |
| 色谱柱 B: | Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 × 50 mm, 3 μm |
| 样品: | 0.5 mg/mL |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 20 mmol/L 磷酸钠, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl 梯度: 0 min - 100% A: 0% B |
| 梯度: | 0%–50% B |
| 温度: | 室温 |
| 进样量: | 10 μL |
| 检测器: | UV, 220 nm |

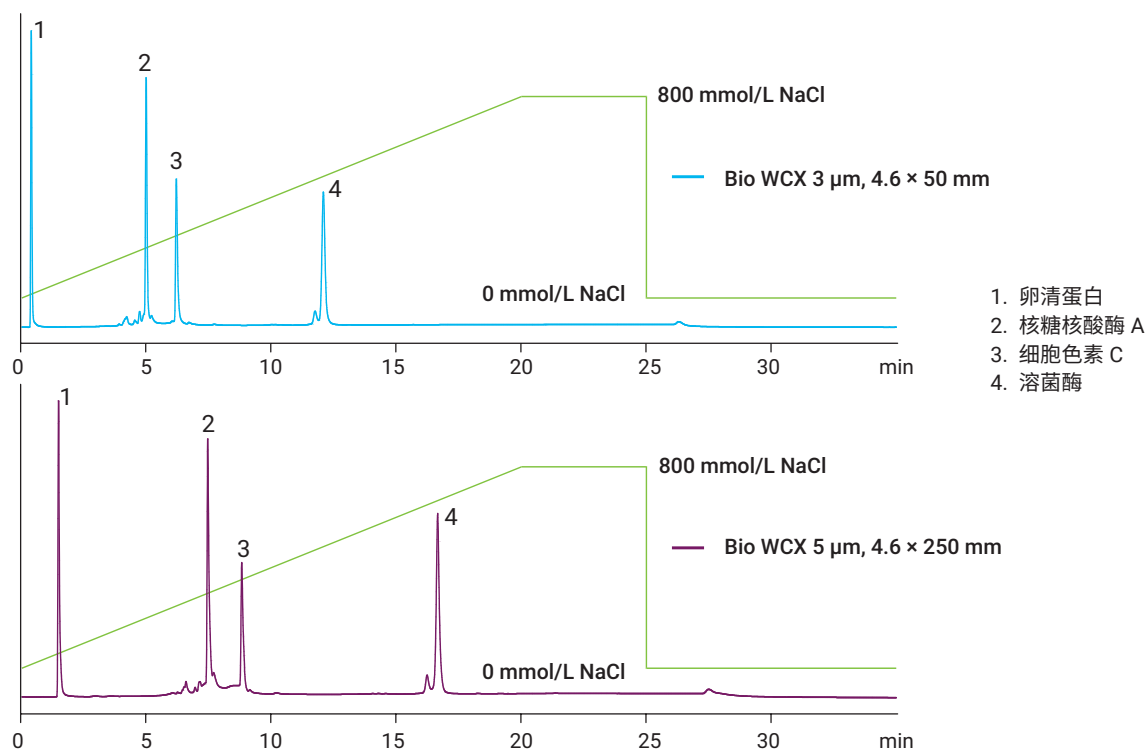


图 7. 使用 Agilent Bio WCX 色谱柱 (4.6 × 50 mm, 3 μm 和 4.6 × 250 mm, 5 μm) 在 1 mL/min 的流速下进行蛋白质分离。较小的填料粒径和较短的色谱柱分析速度较快 — 样品在较长色谱柱中洗脱需要 17 min，而在较短色谱柱洗脱仅需 12 min

色谱柱内径

根据待分析的样品量选择色谱柱内径也十分重要。如果待分析物质的量很少，采用 2.1 mm 内径色谱柱 (流速 0.35 mL/min) 即可。但使用更小内径的色谱柱时，需要尽可能减小色谱柱和检测器之间的系统体积，这样可以避免过度扩散和分离度降低。

第 3 步：

HPLC 系统的注意事项

这类分析的理想选择是 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱。它可以轻松处理具有挑战性的溶剂条件，例如 pH 1 至 pH 13 的极端 pH 值以及高盐浓度的缓冲液。

溶剂运送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，因而仪器极为稳定。

检测

对于生物分子，例如由通过酰胺键连接的多个氨基酸组成的蛋白质，UV 检测波长为 210 nm 或 220 nm 时信号强度和灵敏度更好。然而，离子交换常用的一些洗脱剂在低波长处背景吸收过高，因此可能需要换成 254 nm 或 280 nm。这些波长仅对具有芳香侧链或更高共轭程度侧链的氨基酸敏感，这会大大降低灵敏度。

优化无相互作用色谱

安捷伦生物惰性液相色谱备件可提供稳定且无相互作用的结果，从而确保提高系统效率，同时凭借更尖锐的峰形与更高的分析重现性提高色谱分析的可靠性。

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/biosupplies



Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱是离子交换色谱理想的 HPLC 仪器。



第 4 步：

流速

4.6 mm 内径色谱柱使用的典型流速为 0.5–1.0 mL/min。对有些应用而言，分析速度十分关键。使用较短色谱柱（如采用 50 mm 替代常规的 150 mm 或 250 mm）或提高流速，或者同时采用两种方案，均可缩短分析时间（注意不要超过色谱柱压力限制）。

较小粒径填料显著提高分离度

条件

| 参数 | 值 |
|--------|---|
| 色谱柱 A: | Bio WCX, 不锈钢 5190-2441 4.6 × 50 mm, 1.7 μm |
| 色谱柱 B: | |
| 样品: | 0.5 mg/mL |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 20 mmol/L 磷酸钠, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl |
| 梯度: | 0%–50% B |
| 温度: | 室温 |
| 进样量: | 10 μL |
| 检测器: | UV, 220 nm |

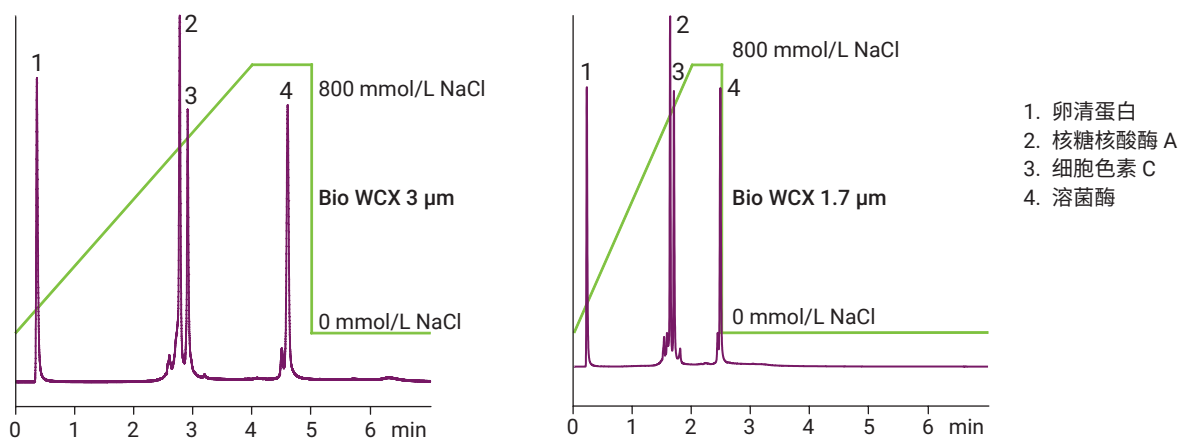


图 8. 通过提高流速缩短分析时间（峰形和分离度不受影响）

流动相选择

第 5 步：

初始流动相选择将由蛋白质的 pI 和分析方法（阳离子交换或阴离子交换）决定。图 10 所示为常用的缓冲液范围。

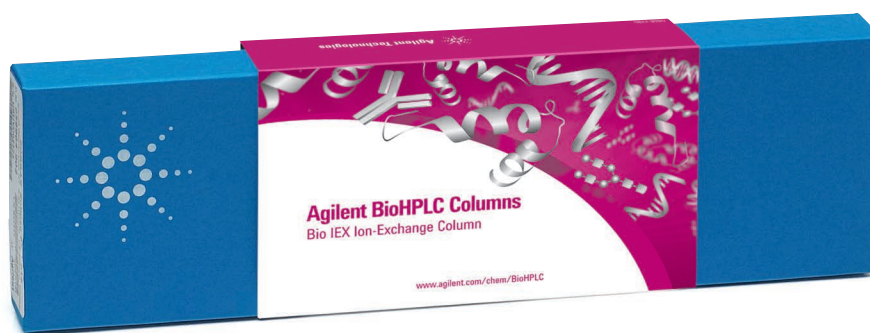
缓冲剂的作用是控制分离过程中 pH 的变化，从而在保持所分析化合物上的电荷一致。需要记住，缓冲液只有在与其解离常数 pKa 相差不到一个 pH 单位时才能良好发挥作用。磷酸或磷酸盐具有三种解离常数：



因此，pH 在 6–7 范围内的磷酸盐缓冲液适用于阳离子交换色谱，其浓度通常为 20–30 mmol/L，并且具有在波长为 210 nm 时背景吸收较低的优点。必须系统且精确地制备缓冲液，因为即使离子强度或 pH 值的微小差异也会在不同程度上影响蛋白质的保留时间，并且可能导致色谱分析的分选度和变异性不佳。

需要意识到，与在正常操作条件下完全电离的强离子交换柱不同，弱离子交换柱的离子化程度会受到缓冲液 pH 和离子强度的影响。这是可用于改变选择性以实现所需分离的工具之一。

但是，为了让生物分子从色谱柱洗脱，必须引入竞争离子。这通常会通过线性氯化钠梯度实现。洗脱液 A 含有调节至适当 pH 的缓冲液。洗脱液 B 含有相同浓度的缓冲液和更高浓度的氯化钠（可能为 0.5 mol/L），然后将 pH 调节至同样的值。



条件

| 参数 | 值 |
|--------|--|
| 色谱柱 A: | Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm |
| 样品: | 三种蛋白质的混合物, 溶于 PBS (磷酸盐缓冲液), pH 7.4 核糖核酸酶 A: 13700 Da, pI 9.6 细胞色素 C: 12384 Da, pI 10-10.5 溶菌酶: 14307 Da, pI 11.35 |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统 |
| 流动相: | A: 水 B: 1.5 mol/L NaCl C: 40 mmol/L NaH ₂ PO ₄ D: 40 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 按照由缓冲液顾问软件预先确定的比例混合 C 和 D, 得到具有所需 pH 范围和强度的缓冲液。 |
| 流速: | 1 mL/min |

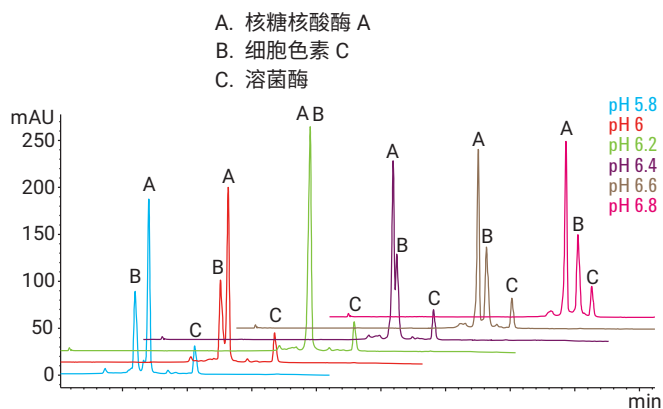


图 9. 利用动态混合四元梯度进行三种蛋白质混合物分离的 pH 筛选

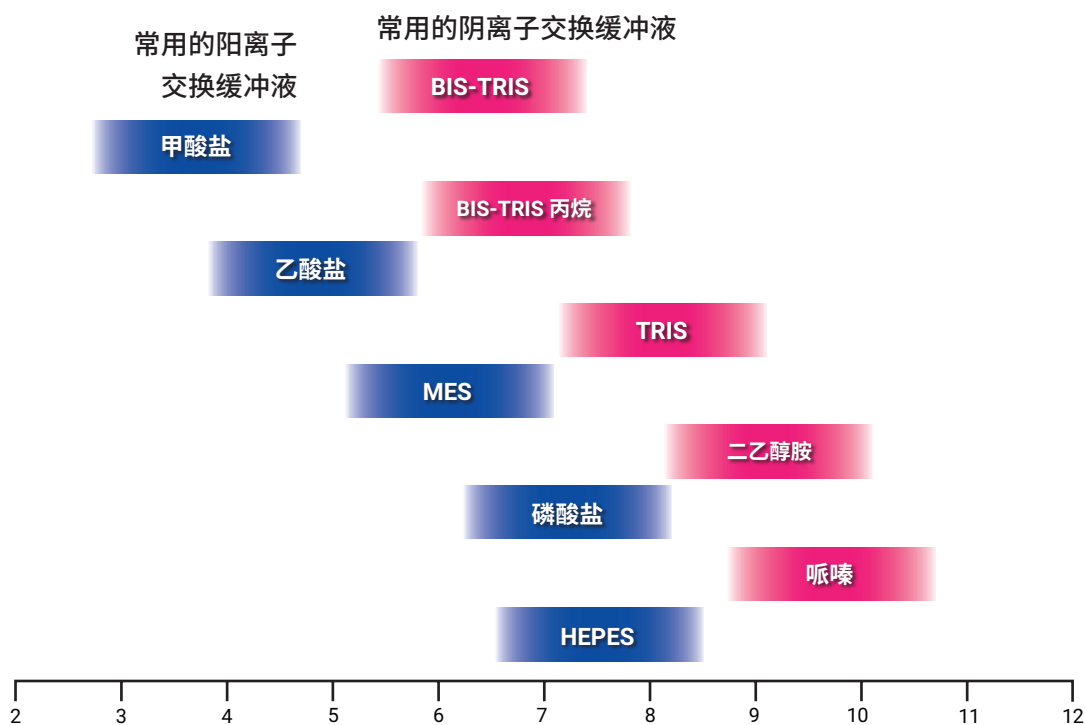


图 10. 离子交换常用缓冲液

开发一种有效的离子交换方法

必须记住，单克隆抗体等生物分子的复杂程度超乎想象。一个典型的 mAb 包含超过 1300 个单个氨基酸。其中，可能 130 个具有酸性侧链，180 个具有碱性残基。单克隆抗体可能在中性 pH 下净电荷为正，因此应使用阳离子交换色谱柱分离。但是，很难预测这种分子的实际等电点 pI，因此可能需要一些方法开发或优化工作。

样品前处理

- 理想情况下，样品应溶解于流动相（洗脱液 A）
- 如果样品浑浊，可能需要改变流动相条件
- 过滤或离心可使样品澄清，但这些方法会改变样品的组成
- 样品需新鲜制备并尽快用于分析。冷藏可以延长样品的“保质期”
- 细菌会在缓冲液中快速生长

色谱柱填料选择

- 阴离子交换和阳离子交换之间的选择取决于目标蛋白质的等电点
- 强离子交换剂是很好的首选，如果需要，可以使用弱离子交换剂来提供选择性差异

色谱柱选择

- 孔径：目标蛋白质必须能够自由渗透到颗粒孔隙中。对于不太在意色谱柱载样量的分析级分离，非多孔球形颗粒填料可以提供更高分离度
- 粒径：填料粒径越小，分离度越高（但反压更高）
- 色谱柱柱长：较短的 50 mm 色谱柱可提供更快的分离速度，特别是颗粒较小时，而较长的 250 mm 色谱柱则可提供更高的分离度
- 色谱柱内径：使用较小内径的色谱柱可减少溶剂损耗和进样量（适合样品有限的情况）



流动相

- 流动相中应含有维持所需操作 pH 的缓冲液，浓度通常为 20 mmol/L。缓冲液的 pH 和离子强度会影响弱离子交换产物的分离度，因此应通过实验找到最佳条件
- 向流动相中加入氯化钠会改变 pH 值。应根据需要重新调整
- 新鲜配制流动相并迅速使用，因为室温下存储的稀缓冲液非常利于细菌生长
- 缓冲液的保存期不得超过 7 天，除非冷藏保存
- 使用前过滤。水（可能性小）或缓冲盐（可能性大）中可能存在颗粒物

色谱柱活化及平衡

为了实现可重现的离子交换分离，必须对色谱柱进行平衡，并在梯度中设置净化阶段。蛋白质洗脱是通过增加离子强度或改变洗脱液 pH 或同时采取两种措施来实现的，因此在每次分析结束时，必须让色谱柱平衡恢复到起始条件、离子强度和 pH。如果没有这样做，下一次色谱柱运行的谱图将会有所不同，因为蛋白质与色谱柱的相互作用方式不同。

软件

安捷伦缓冲液顾问软件是另一个可以简化工作流程的工具。通过提供快速简单的途径来建立盐梯度（图 11）和 pH 梯度（图 12），安捷伦缓冲液顾问软件消除了繁琐并易于出错的方法开发步骤，如缓冲液前处理、缓冲液混合和 pH 初筛。缓冲液顾问软件可利用 1260 Infinity 生物惰性四元泵的混合机制，对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合，简化生物分析工作流程，大幅缩短缓冲液前处理所需时间。此外，缓冲液的制备也更加准确，由此可以将方法更稳定地转移到其他实验室。

为了建立盐梯度，要将来自通道 D 的不断增加的盐溶液与分别来自通道 A 和 B 的酸性和碱性缓冲液混合，并使用来自通道 C 的水进行稀释。



利用安捷伦缓冲液顾问软件进行快速缓冲液初筛。
观看视频：agilent.com/chem/bufferadvisor-video

只用了四种流动相洗脱液便完成了 20 个实验的初筛，而此前需要 40 种洗脱液。软件可自动混合各种缓冲液，得到需要的 pH 和缓冲液强度。然后就可以在四元泵中程控运行梯度时间表，如图 13 所示。

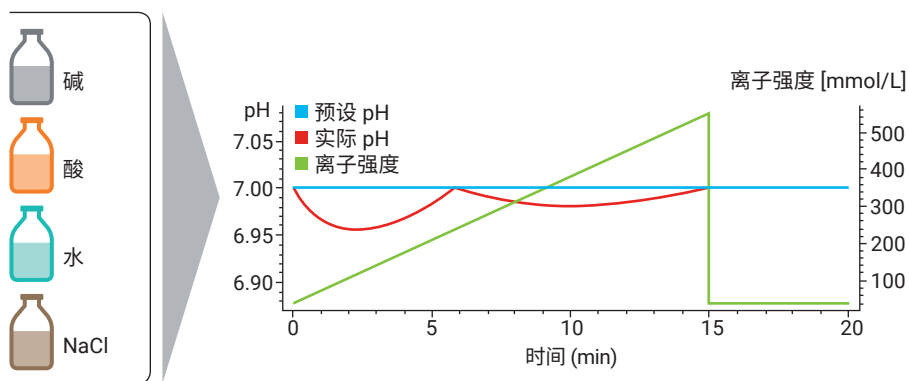


图 11. 使用安捷伦缓冲液顾问软件从储备溶液轻松建立盐梯度

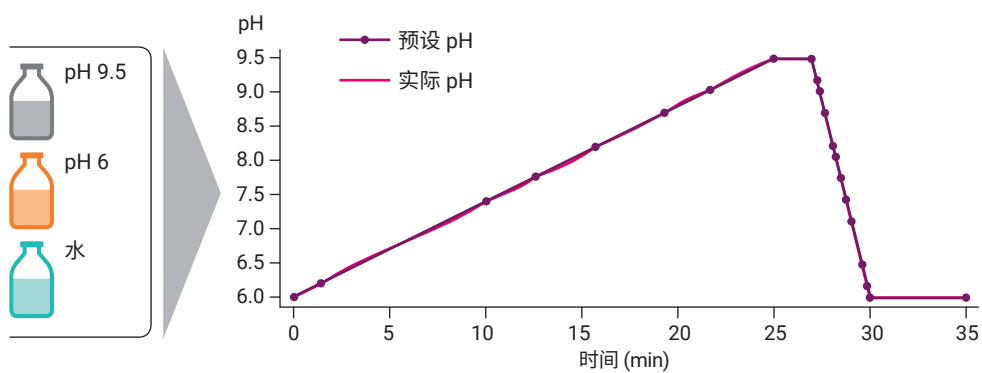


图 12. 单克隆抗体分离的缓冲液强度优化 — 从储备溶液轻松建立 pH 梯度

条件

| 参数 | 值 |
|--------|--|
| 色谱柱 A: | Bio WCX, 不锈钢 5190-2443 4.6 × 50 mm, 3 μm |
| 色谱柱 B: | Bio SCX, 不锈钢 5190-2423 4.6 × 50 mm, 3 μm |
| 样品: | IgG 单克隆抗体 |
| 样品浓度: | 2 mg/mL (溶于 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0) |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 水 B: 1.5 mol/L NaCl C: 40 mmol/L NaH ₂ PO ₄ D: 40 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 按照由缓冲液顾问软件预先确定的比例混合 C 和 D, 得到具有所需 pH 范围和强度的缓冲液。 |
| 流速: | 1.0 mL/min |
| 梯度: | 色谱图采集条件: pH 5.0 到 7.0, 缓冲液强度 10 到 25 mmol/L 0 到 15 min 内 0 到 500 mmol/L NaCl, 15 到 20 min 内 500 mmol/L NaCl DOE 实验 pH 5.0 到 7.0 0 到 200 mmol/L, 0 到 250 mmol/L, 以及 0 到 300 mmol/L |
| 温度: | 室温 |
| 进样量: | 5 μL |
| 检测器: | UV, 220 nm |

条件

| 参数 | 值 | | | | | | | | | | |
|----------|---|----------|----------|---|---|----|-----|----|-----|----|---|
| 色谱柱 A: | Bio MAb, PEEK 5190-2407 4.6 × 250 mm, 5 μm | | | | | | | | | | |
| 样品: | IgG 单克隆抗体 | | | | | | | | | | |
| 恒温箱 | | | | | | | | | | | |
| 流动相: | A: 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.0 B: 10 mmol/L 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.5 | | | | | | | | | | |
| 流速: | 1.0 mL/min | | | | | | | | | | |
| 梯度: | <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>流动相 (%B)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>27</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> | 时间 (min) | 流动相 (%B) | 0 | 0 | 25 | 100 | 27 | 100 | 30 | 0 |
| 时间 (min) | 流动相 (%B) | | | | | | | | | | |
| 0 | 0 | | | | | | | | | | |
| 25 | 100 | | | | | | | | | | |
| 27 | 100 | | | | | | | | | | |
| 30 | 0 | | | | | | | | | | |
| 后运行时间: | 5 min | | | | | | | | | | |
| 温度: | 30 °C | | | | | | | | | | |
| 数据采集: | 214 和 280 nm | | | | | | | | | | |
| 采集速率: | 20 Hz | | | | | | | | | | |
| 流通池: | 60 mm 光程 | | | | | | | | | | |
| 进样量: | 10 μL (洗针进样, 冲洗进样口 7 s) | | | | | | | | | | |
| 检测器: | | | | | | | | | | | |

优化电荷异构体分离的自动化方法开发

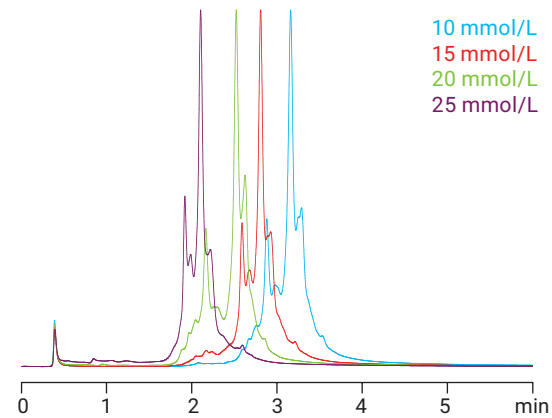


图 13. 从单克隆 IgG 分离的筛选色谱图中, 在 pH 6.5 条件下优化缓冲液强度

使用 Bio MAb 色谱柱获得准确定量的可靠方法

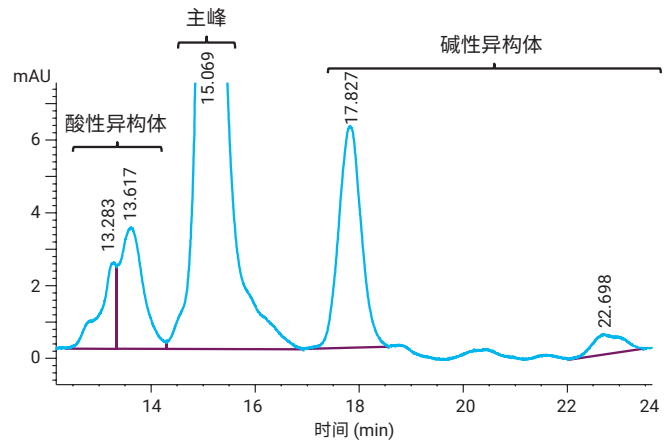


图 14. 使用 Agilent Bio MAb PEEK, 4.6 × 250mm, 5 μm 色谱柱进行基于 pH 梯度的阳离子交换 IgG1 分离色谱图

便捷定制阳离子交换分析

结合使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统、安捷伦缓冲液顾问软件和用于高分离度电荷异构体分析的 pH 梯度

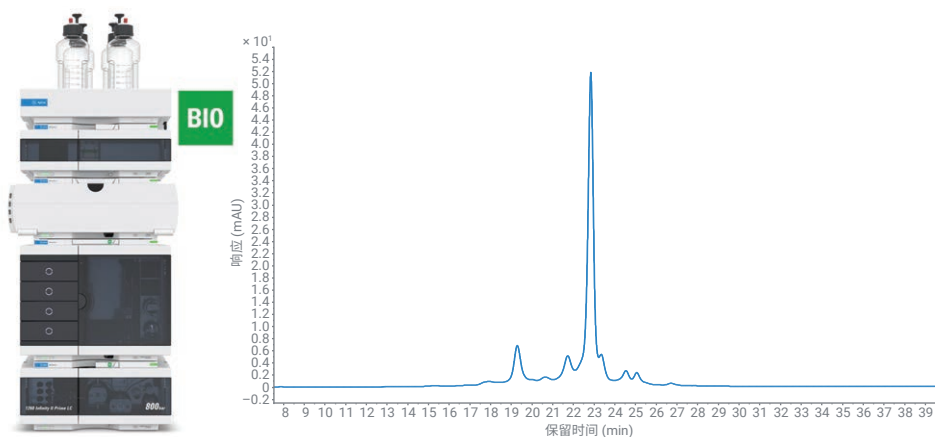
作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

单克隆抗体的电荷异构体分离对于色谱工作者而言是一项充满挑战性的工作。由于所分析的单克隆抗体的微异质性，需要进行大量的方法开发才能找到所需的理想分离度。pH 梯度的分离能力优于许多传统的盐梯度，能够以非常有效的方式分离电荷异构体。本应用简报展示了使用不同类型的 pH 梯度对两种单克隆抗体（曲妥珠单抗和 NIST mAb）进行高分离度和可重现的电荷异构体分析。

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统配备完全不含铁的流路和 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵，能够使用安捷伦缓冲液顾问软件对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合。



前言

治疗性单克隆抗体 (mAb) 是高度异质的分子，由大量异构体组成。它们天然存在于这种生物药物中，不一定被视为杂质。溶液中的蛋白质在与水性介质的界面处主要具有极性和带电荷的氨基酸，而疏水性残基则因疏水相互作用而倾向于自缔合。位于蛋白质“外部”并与周围液体接触的氨基酸更容易被修饰^[1]。

变异（也称为蛋白质微异质性）可能源自抗体生产过程中的翻译后修饰。此外，纯化过程、配制和/或存储之后的修饰也可形成^[2]。然而，如果这些变异存在于药物蛋白中，它们的生物活性可能会有所不同，免疫原性可能会增强^[2]。因此，需要对 mAb 的微异质性进行广泛的分析表征，确保生物药物的安全性和有效性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是单克隆抗体电荷异构体分析的金标准^[3]。经典盐梯度方法经全面优化后具有较高的分离度。然而，开发用于蛋白质分离的高分离度离子交换方法的工作量非常大。需要优化包括盐浓度、流动相 pH 值和添加剂在内的许多参数。此外，每个分子（尤其是生物分子）可能表现出不同的行为，并且开发的方法不允许实验参数发生较大的变化，尤其是 pH 值的变化^[1,4]。

基于 pH 梯度的 CEX（也被称为色谱聚焦）为分离 mAb 电荷异构体提供了高分离度且稳定的方法^[1,4,5]。在典型的离子交换色谱 (IEX) 中，分子通过增加缓冲液的离子强度（主要是盐类，例如 NaCl）从色谱柱中洗脱出来。相比之下，在使用 pH 梯度时，结合分子会随着缓冲液 pH 值的变化而洗脱。这会改变它们的表面净电荷，使结合分子在其等电点 (pI) 洗脱，此时的分子呈电中性。

宽 pH 梯度方法更通用，可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外，与基于离子强度的传统 IEX 相比，基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

宽 pH 梯度方法更通用，可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外，与基于离子强度的传统 IEX 相比，基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统，专为生物色谱条件而设计：样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁；贯穿 Multisampler、大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）。

将 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用缓冲液顾问软件帮助动态混合来自四种储备溶液的溶剂，简化生物分析工作流程，并显著缩短缓冲液制备所需的时间。使用缓冲液顾问软件，可以通过计算 IEX 的泵时间表快速、简单地生成四元盐梯度和 pH 梯度。

本应用简报介绍了使用两种不同的 pH 梯度对曲妥珠单抗和 NIST mAb 参比标样的电荷异构体的分析。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (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 版或更新版本

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、tris（三羟甲基甲胺）、咪唑、盐酸和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- 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

根据缓冲液顾问软件的储备溶液配方配制缓冲液（见图 1）。

由缓冲液顾问软件计算得到的四元磷酸盐缓冲液系统

- A: 水
- B: 1700 mmol/L 氯化钠
- C: 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠
- D: 55 mmol/L 磷酸氢二钠

注：此设置可用于盐梯度和 pH 梯度洗脱，实现直接比较，并增加方法开发的可能性。

由缓冲液顾问软件计算得到的二元宽 pH 梯度缓冲液系统

使用缓冲液顾问软件，还可以创建宽范围的 pH 梯度（也称为复合缓冲液）。在这些情况下，仅使用 C 和 D 通道来创建梯度。本实验使用 Farnan 和 Moreno 描述的 pH 梯度^[1]，并将缓冲液组分以用户混合物的形式插入缓冲液顾问软件的储备溶液组成中（2.4 mmol/L tris、1.5 mmol/L 咪唑、11.6 mmol/L 哌嗪，以及用于将 pH 调节至 pH 6 & C 和 10.5 & D 的 HCl）。利用此选项，用户可以构建自制的缓冲液组成，获得所需的 pH 范围。缓冲液顾问软件计算两种缓冲混合物的离子强度 (IS) 和缓冲容量 (BC)。

A: 水

B: n/a

C: pH = 6; IS = 22.5 mmol/L; BC = 6.19 mmol/L

D: pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L; BC = 2.31 mmol/L

注：使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于磷酸盐缓冲梯度中含 1700 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 1.5 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理想性能。

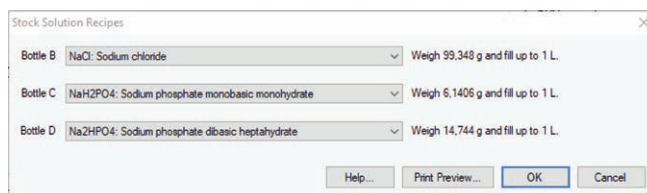


图 1. 安捷伦缓冲液顾问软件储备溶液配方 — 四元磷酸盐缓冲液系统

方法

表 1. 四元磷酸盐缓冲液系统 — 盐梯度色谱条件

| 参数 | 值 |
|------|---|
| 溶剂 | A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠 |
| 梯度 | 梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 NaCl 的浓度从 10 mmol/L 升至 110 mmol/L; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 分钟 后运行时间: 15 分钟 |
| 流速 | 0.200 mL/min |
| 温度 | 30 °C |
| 紫外检测 | 280 nm 10 Hz |
| 进样 | 进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒 |

表 2. 四元磷酸盐缓冲液系统 — pH 梯度色谱条件

| 参数 | 值 |
|------|--|
| 溶剂 | A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠 |
| 梯度 | 梯度 0–30 分钟: 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 从 7 升至 8.4; 30–31 分钟: 500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间: 31 分钟 后运行时间: 15 分钟 |
| 流速 | 0.200 mL/min |
| 温度 | 30 °C |
| 紫外检测 | 280 nm 10 Hz |
| 进样 | 进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒 |

表 3. 二元宽 pH 梯度缓冲液系统/Farnan pH 梯度

| 参数 | 值 |
|------|--|
| 溶剂 | A) n/a B) n/a C) pH = 6; IS = 22.4 mmol/L; BC = 6.14 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1]) D) pH = 10.5; IS = 0.717 mmol/L; BC = 2.31 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1]) |
| 梯度 | 曲妥珠单抗梯度: 梯度 0–50 分钟: pH 从 8.3 升至 10; 然后在 51–55 分钟, 在 pH 10.5 下进行“清洗”步骤 停止时间: 55 分钟 后运行时间: 20 分钟 NISTmAb 梯度: 梯度 0–45 分钟: pH 从 8.9 升至 10.5 停止时间: 50 分钟 后运行时间: 20 分钟 |
| 流速 | 0.200 mL/min |
| 温度 | 30 °C |
| 紫外检测 | 280 nm 10 Hz |
| 进样 | 进样量: 4 µL 样品温度: 8 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒 |

结果与讨论

使用缓冲液顾问软件，可以计算盐梯度和 pH 梯度。使用本应用简报实验部分描述的四元磷酸盐缓冲液，可以计算用于分离曲妥珠单抗电荷异构体的两种梯度。

图 2 显示了在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离曲妥珠单抗电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图。通过盐梯度和 pH 梯度实现的分离性能相当，使用 pH 梯度时的分离度略有提高。

缓冲液顾问软件的一个功能是通过在给定梯度内添加额外的梯度阶梯来改进线性梯度（盐梯度和 pH 梯度）的计算，从而实现出色的线性，而不会与所需/预设 pH 产生重大偏差。要启用此功能，需要选中缓冲液顾问软件用户界面 (UI) 中的 4. 创建 % 时间表部分的优化梯度选项框（见图 3A 和 3B 中的红色圆圈）。

图 3A 和 3B 展示了在未选中 (A) 和 (B) 选项框的情况下，预设 pH 值和实际 pH 值之间的差异。在不进一步优化缓冲液顾问软件的情况下，实际 pH 值可能与预设 pH 值偏离 0.4 个单位，这使得用户难以信任运行梯度线性。通过选中优化梯度选项框（图 3B），将额外的阶梯插入原始梯度中，确保 pH 梯度的线性。左下角的最终泵梯度时间表显示了额外插入的阶梯，它们使实际梯度尽可能接近预设梯度。然后，可以将此梯度时间表导出到 OpenLab 的方法中，实现轻松传输，而无需额外输入。

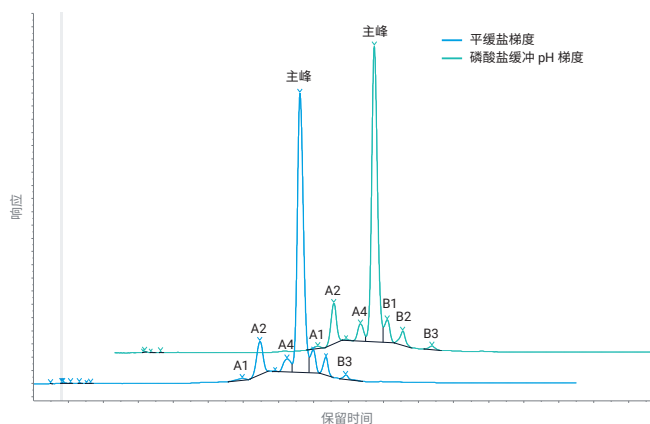


图 2. 在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7-8.4）（绿色）下分离电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图

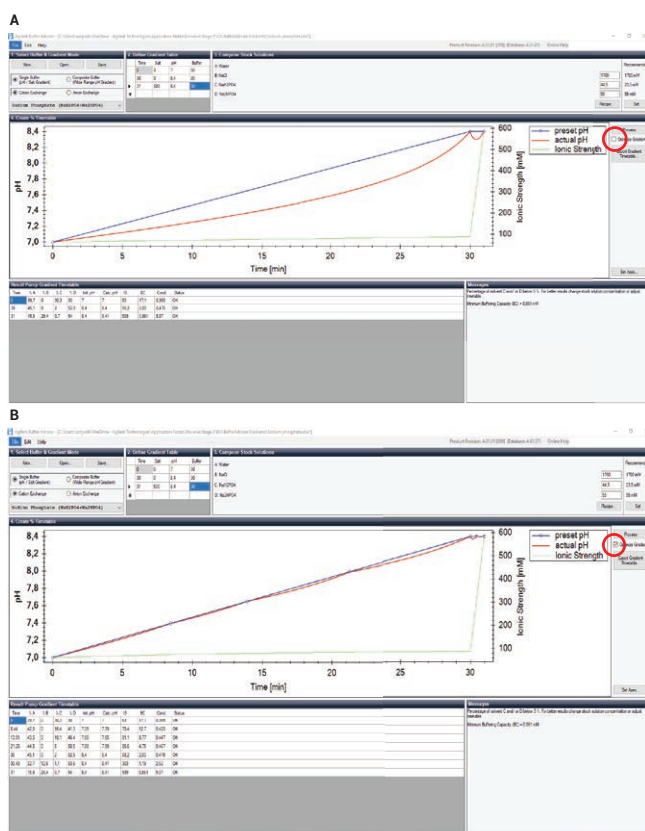


图 3. 优化安捷伦缓冲液顾问软件中的梯度功能，实现高度线性的 pH 梯度。A 显示优化前的梯度，B 显示优化后的梯度

图 4 显示了在磷酸盐缓冲 pH 梯度 (pH 7–8.4) 下 7 次后续曲妥珠单抗电荷异构体分析运行的叠加色谱图。除前两个峰外, 其余峰的保留时间 (RT) 均具有出色的重现性 (相对标准偏差 (RSD) 小于 0.085%)。由于异构体 A3 和 B3 的峰面积和高度都很小, 因此峰面积重现性高于 1%。

在磷酸盐缓冲系统中, 方法开发受到限制, 尤其是在目标分子的 pI 不在 pH 6–8 缓冲范围内的情况下。如果分子的 pI 太高, 则无法使用该缓冲液系统完成洗脱。例如, pI 为 9.186 的 NIST mAb 需要使用不同的缓冲液系统才能从 CEX 色谱柱中洗脱。

更通用的一种方法是使用由多个缓冲液系统组成的宽范围 pH 梯度。该设置也以复合缓冲液 (宽范围 pH 梯度) 的名称包含在缓冲液顾问软件中。Farnan 和 Moreno (2009) 提出的 pH 6.0–10.5 的 pH 梯度^[1]是一种适用于分析单克隆抗体电荷异构体的缓冲液系统。

进一步应用该系统, 并针对曲妥珠单抗和 NIST mAb 对方法进行了优化。

图 5 显示了使用宽范围 pH 梯度对曲妥珠单抗电荷异构体的分离, 将 pH 从 8.3 逐步调整到 10 以实现理想分离度。与磷酸盐缓冲 pH 梯度相比 (见图 2), 可以多分离出两种酸性异构体 (A1–A6, 在主峰之前洗脱) 和一种碱性异构体 (在主峰之后洗脱)。图 5B 中的放大图突出显示了主峰周围不同电荷异构体的出色分离度, 与图 2 中所示的平缓盐梯度和 pH 梯度相比, 具有更尖锐的峰形和更高的分离度。

对所有分离异构体的 RT 和峰面积精度进行了评估 (见图 5 中的峰表)。即使是极小的峰, RT 精度也非常出色, 其 RSD 均低于 0.06% (第一个异构体 A1 除外)。除极小的峰外, 大多数峰的面积精度都十分出色。

研究还证明, Farnan 和 Moreno 使用的 pH 梯度^[1]是 NISTmAb 分析的理想选择 (见图 6)。针对 NISTmAb, 由于其 pI 不同, pH 梯度被修改为不同的 pH 范围。利用这种 pH 8.9–10.5 的平缓梯度, 可以分离出三种酸性异构体和两种碱性异构体。

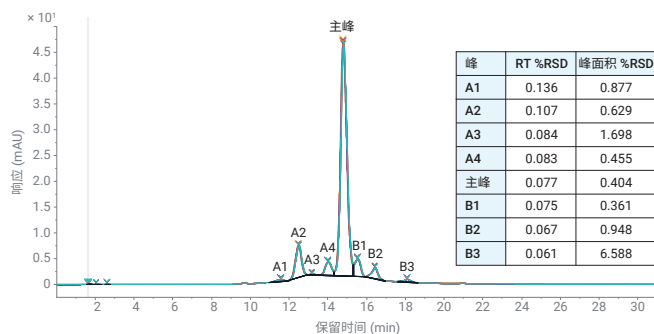


图 4. 采用 pH 7–8.4 的磷酸盐缓冲 pH 梯度分析曲妥珠单抗的七次连续运行的叠加色谱图, 包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表

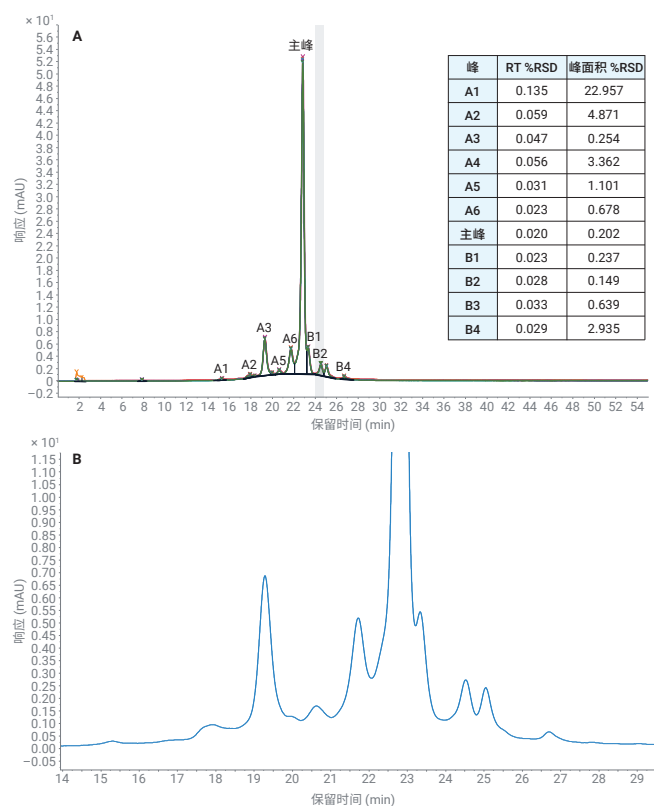


图 5. 采用 pH 8.3–10 的宽 pH 梯度七次连续运行曲妥珠单抗的叠加色谱图, 包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表 (A), 以及单次进样的放大图 (B)

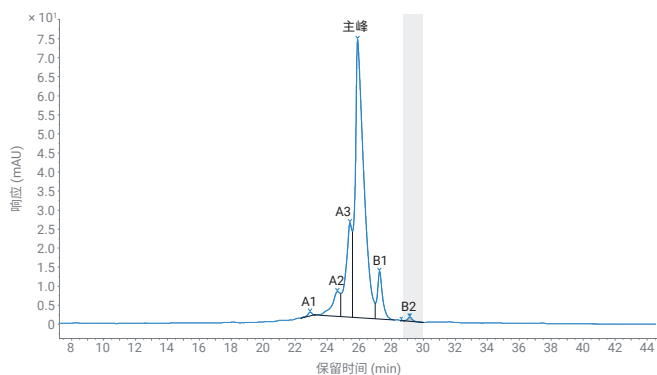


图 6. 使用根据 Farnan 和 Moreno^[1] 修改的 pH 梯度在 pH 8.9–10.5 下分离 NISTmAb

结论

研究表明，在分析单克隆抗体时，pH 梯度比盐梯度更具优势。即使是与平缓盐梯度相比，pH 梯度的表现也十分突出，一方面简化了方法开发，另一方面可生成高分离度色谱结果。盐梯度方法开发的潜力十分有限，梯度斜率的变化只会增加峰宽，而不会进一步改变分离度^[7]，而 pH 梯度则可提供进一步提高分离度并保持尖锐峰形的可能性。曲妥珠单抗和 NIST mAb 的分析证明了这一点，尤其是在使用基于 Farnan 和 Moreno 的宽范围 pH 梯度^[1]时。缓冲液顾问软件促进磷酸盐缓冲系统四种储备液的动态混合，消除了实验中耗时的手动缓冲液配制。此外，缓冲液顾问软件可以轻松计算宽范围 pH 梯度。因此，使用缓冲液顾问软件开发，并在配备全能泵和完全不含铁样品流路的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上运行的所有方法均提供了高度可靠且可重现的结果。

参考文献

1. 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
2. Liu, H. *et al.* Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2426–2447
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 468–481
4. Rea, J. *et al.* Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 317–323
5. Lingg, N. *et al.*, Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1373*, 124–130
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*(8), 2079–2093
7. Schneider, S., 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 mAb 电荷异构体分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2692ZHCN，**2020**

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

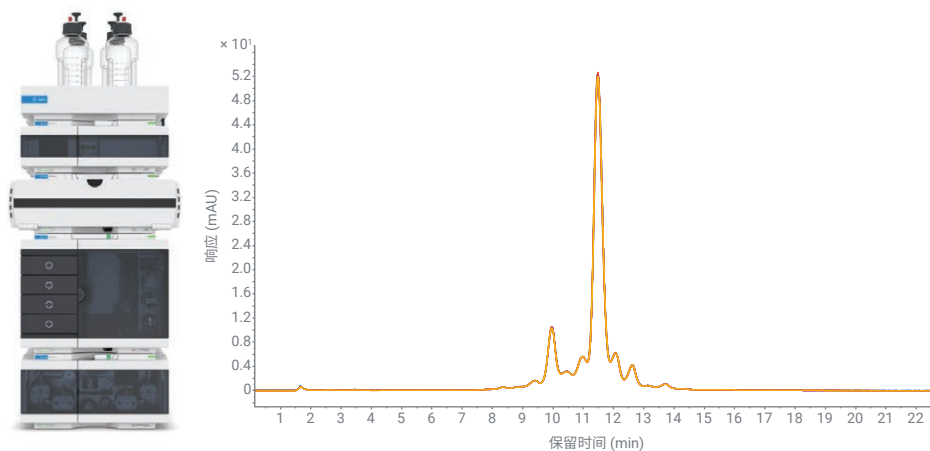
作者

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出色分离。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。这种准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, 以便达到出色分离。然后评估了理想梯度斜率的重现性。

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

Agilent 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

注: 由于 Adcetris 含有多种佐剂, 此处提及的浓度不只是蛋白质浓度, 而是药物所有组分的总浓度。

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 μ m 滤膜过滤。

方法

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 分钟 后运行时间: 15 分钟 |
| 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 |

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理想性能。

结果与讨论

方法开发

为获得所需分离度并实现出色分离, 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: 理想 pH 值和理想梯度斜率。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理想 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 时均获得出色结果 (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。

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。

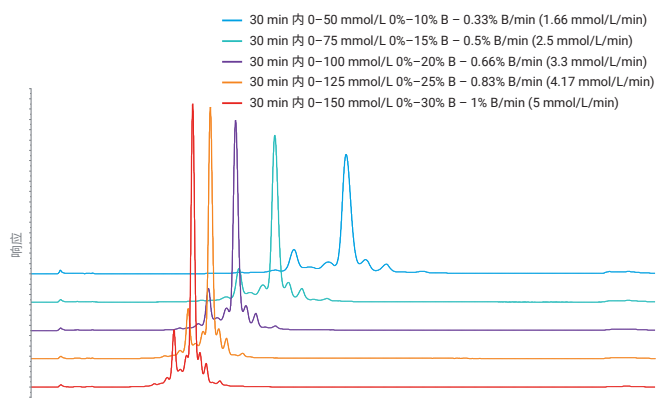


图 1. 不同盐梯度斜率下曲妥珠单抗分离的方法开发

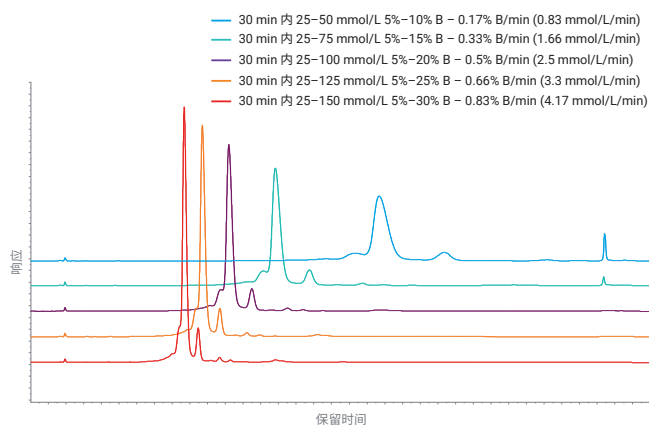
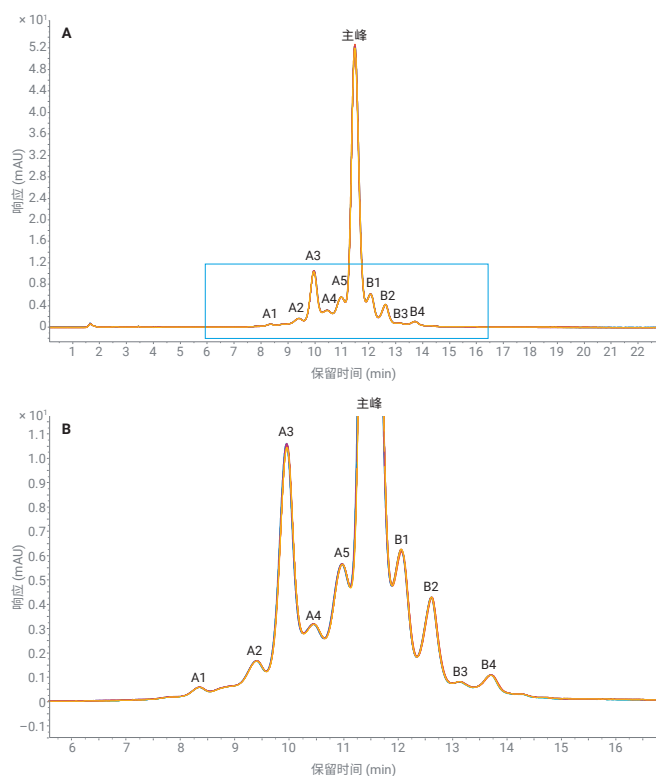


图 2. 不同盐梯度斜率下 NISTmAb 参比标样分离的方法开发

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%。



| RSD 精度 | RT (%) | 峰面积 (%) |
|--------|--------|---------|
| A1 | 0.033 | 1.793 |
| A2 | 0.016 | 0.701 |
| A3 | 0.026 | 0.403 |
| A4 | 0.023 | 0.813 |
| A5 | 0.032 | 0.327 |
| 主峰 | 0.033 | 0.313 |
| B1 | 0.038 | 0.329 |
| B2 | 0.048 | 0.254 |
| B3 | 0.046 | 3.549 |
| B4 | 0.051 | 0.812 |

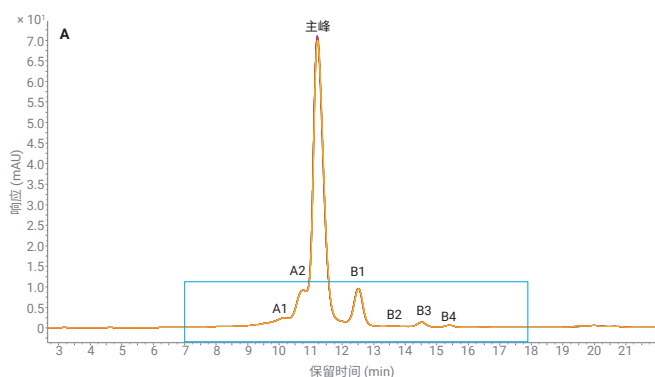
图 3. 曲妥珠单抗电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.66% B/min (3.3 mmol/L/min)。(B) 放大图

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。



| RSD 精度 | RT (%) | 峰面积 (%) |
|--------|--------|---------|
| A1 | 0.058 | 0.540 |
| A2 | 0.039 | 0.374 |
| 主峰 | 0.045 | 0.126 |
| B1 | 0.042 | 0.141 |
| B2 | 0.049 | 1.469 |
| B3 | 0.033 | 0.354 |
| B4 | 0.033 | 0.485 |

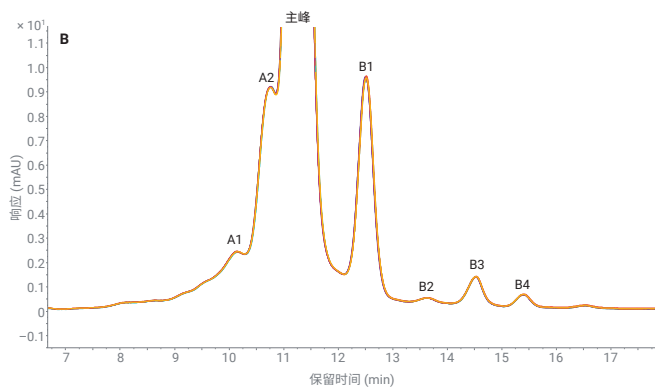
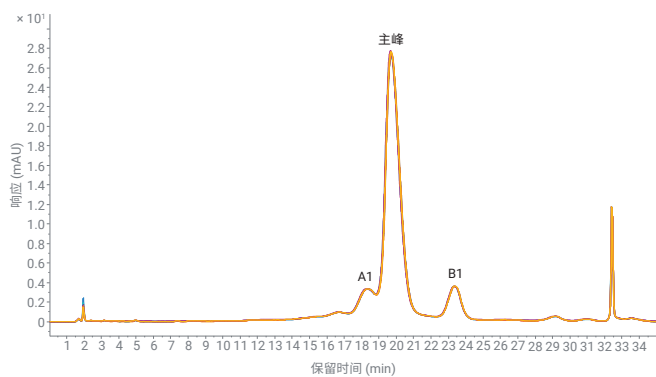


图 4. NISTmAb 参比标样电荷异构体分离 7 次后续运行的重现性研究 (A)，梯度斜率为 0.5% B/min (2.5 mmol/L/min)。 (B) 放大图

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。



| RSD 精度 | RT (%) | 峰面积 (%) |
|--------|--------|---------|
| A1 | 0.238 | 6.608 |
| 主峰 | 0.102 | 1.95 |
| B1 | 0.08 | 8.157 |

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)

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出色的分离度,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理想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。

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. 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 5990-7595CHCN, **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

利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异质性分析

作者

Suresh Babu C.V.

安捷伦科技印度私人有限公司，

班加罗尔，印度

摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱、生物色谱柱和 Agilent OpenLAB ChemStation 软件工具进行利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异构体高分离度分离。Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK 离子交换色谱柱填充的是专为单克隆抗体 (mAb) 基于电荷的分离而设计的特殊树脂颗粒。优化的盐梯度显示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药之间酸性和碱性电荷异构体谱图之间的差异。电荷异构体保留时间、峰高和峰面积的精度均在可接受的范围内。通过羧肽酶 B (CPB) 进行 C 端消化，显示出利妥昔单抗生物仿制药中的主要赖氨酸变体峰。

前言

最近，生物仿制药产品在生物制药中日益普及。mAb 可经历各种翻译后修饰 (PTM)，包括赖氨酸截短、脱酰胺基化、氧化、糖基化等，从而使其生物化学和生物物理学性质异质化。由于这些修饰，电荷异构体可影响 mAb 作为生物治疗药物的治疗效果、活性和稳定性。因此，在药物开发中对电荷异质性进行表征非常重要，这会成为生物制药行业中的质量控制 (QC) 步骤。此外，必须使用精确的生物分析方法才能证明生物仿制药与创新药之间的相似性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是电荷敏感抗体分析的金标准。在 CEX 中，通常需要针对每种蛋白质优化方法参数，因为离子交换取决于带电荷的蛋白质分子对固定离子交换基团的可逆吸附。本应用简报介绍了采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱和 Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK 色谱柱分离利妥昔单抗创新药和生物仿制药电荷异构体的盐梯度方法。该方法比较了利妥昔单抗创新药和生物仿制药的 CEX 谱图，确定了酸性、碱性和主要形式的保留时间、高度、面积和量化的精度。进行羧肽酶 B (CPB) 消化以研究 C 端赖氨酸变体的贡献。

实验部分

仪器

实验采用最高操作压力达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪。在整个样品流路中没有任何金属组件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送管路中没有任何不锈钢或铁质组件。

系统

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器(G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC) (G1316C 选项 19)
- 配备 10 mm 生物惰性标准流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315D)
- Agilent Bio mAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK (部件号 5190-2407)

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.062
安捷伦缓冲液顾问软件，修订版 A.01.01

表 1. IEX 色谱使用的色谱参数

| 参数 | 条件 | | | | |
|-------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 流动相 A | 水 | | | | |
| 流动相 B | NaCl (850.0 mmol/L) | | | | |
| 流动相 C | NaH ₂ PO ₄ (41.0 mmol/L) | | | | |
| 流动相 D | Na ₂ HPO ₄ (55.0 mmol/L) | | | | |
| 梯度 | 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) | 流动相 C (%) | 流动相 D (%) |
| | 0 | 30.3 | 0 | 59.6 | 10.1 |
| | 2 | 26.0 | 5.0 | 56.9 | 12.1 |
| | 8 | 21.5 | 10.0 | 54.9 | 13.6 |
| | 20 | 13.3 | 19.0 | 51.9 | 15.8 |
| | 21 | 30.3 | 0 | 59.6 | 10.1 |
| 进样量 | 5 µL | | | | |
| 流速 | 0.75 mL/min | | | | |
| 数据采集 | 280 nm/4 nm, 参比: 360 nm/100 nm | | | | |
| 采集速率 | 5 Hz | | | | |
| TCC | 室温 | | | | |
| 样品恒温箱 | 5 °C | | | | |
| 后运行时间 | 10 分钟 | | | | |

试剂、样品与步骤

利妥昔单抗创新药与生物仿制药购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、盐酸 (HCl) 和氢氧化钠均购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水使用 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国) 制备。羧肽酶 B (C9584) 购自 Sigma-Aldrich。

离子交换色谱参数

表 1 展示了使用 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱进行离子交换色谱分析时采用的色谱参数。将利妥昔单抗 (创新药和生物仿制药) 在水中稀释至 1 mg/mL, 使用 280 nm 波长监测洗脱。利用保留时间 (RT)、峰面积和峰面积百分比计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。利用相对峰面积百分比对 mAb 的电荷异构体进行定量。

羧肽酶 B 消化

将利妥昔单抗生物仿制药和创新药用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 稀释至 1 mg/mL, 向其中加入 0.25 单位的 CPB 并在 37 °C 下孵育。分析前, 在不同时间点将反应混合物等分并用乙酸淬灭。

结果与讨论

安捷伦缓冲液顾问软件是为蛋白质电荷异构体分离生成 pH 或离子强度梯度的理想工具。它可以缩短方法开发所需的时间。为实现理想的 mAb 电荷异构体分离, 本研究使用缓冲液顾问软件进行了一系列方法开发筛选运行。图 1 所示为使用 Bio MAb PEEK 色谱柱分析利妥昔单抗创新药和生物仿制药的电荷异构体图谱, 显示在 20 分钟内实现了电荷异构体的高分离度分离, 其中生物仿制药有三个不同的峰 (缓冲液: 30 mmol/L, pH: 6.3, NaCl: 0-161.5 mmol/L)。Agilent Bio MAb 色谱柱含有致密填充的弱阳离子交换树脂。早洗脱和晚洗脱峰分别称为酸性异构体和碱性异构体。11.4 分钟处的峰记为主峰。利妥昔单抗创新药与生物仿制药五次重复进样的叠加色谱图表明结果具有出色的分离重现性 (图 2)。主峰的平均 RT 和面积 RSD 如图所示。RSD 在可接受的范围内, 证明系统精度较高。

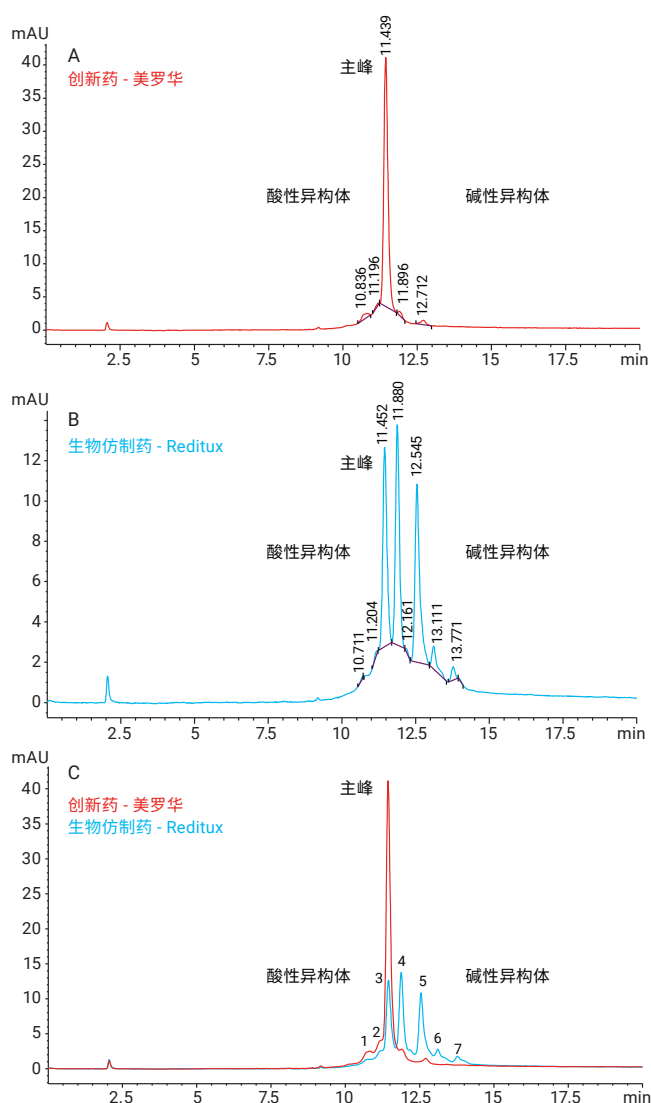


图 1. 使用 Agilent Bio MAb 5 μ m 色谱柱获得的利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B) 的电荷异构体谱图。C) 利妥昔单抗创新药与生物仿制药的叠加谱图。峰 1 和 2: 酸性异构体; 3: 主要形式; 4、5、6、7: 碱性异构体。

mAb 的高分离度分离有助于使用峰面积对电荷异构体进行定量。表 2 所列为五次连续分析中电荷异构体的面积百分比。两种 mAb 的电荷异构体面积百分比存在显著差异。在利妥昔单抗生物仿制药中，利妥昔单抗的主要形式为 93.21% 和 29.78%。与创新药 (3.22%) 相比，利妥昔单抗生物仿制药的主要电荷异构体为 69.46% 碱性异构体。

表 2. 根据峰面积百分比对电荷异构体进行定量分析, n = 5

| 创新药 - 美罗华 | | RT (min) | 峰面积 % |
|-------------|--|---------------------------------------|-------|
| 酸性异构体 | | 10.84、11.21 | 3.56 |
| 主峰 | | 11.44 | 93.21 |
| 碱性异构体 | | 11.9、12.7 | 3.22 |
| 生物仿制药 - 美罗华 | | RT (min) | 峰面积 % |
| 酸性异构体 | | 10.73、11.22 | 0.76 |
| 主峰 | | 11.45 | 29.78 |
| 碱性异构体 | | 11.87、12.15、 12.59、13.1 和 13.77 | 69.46 |

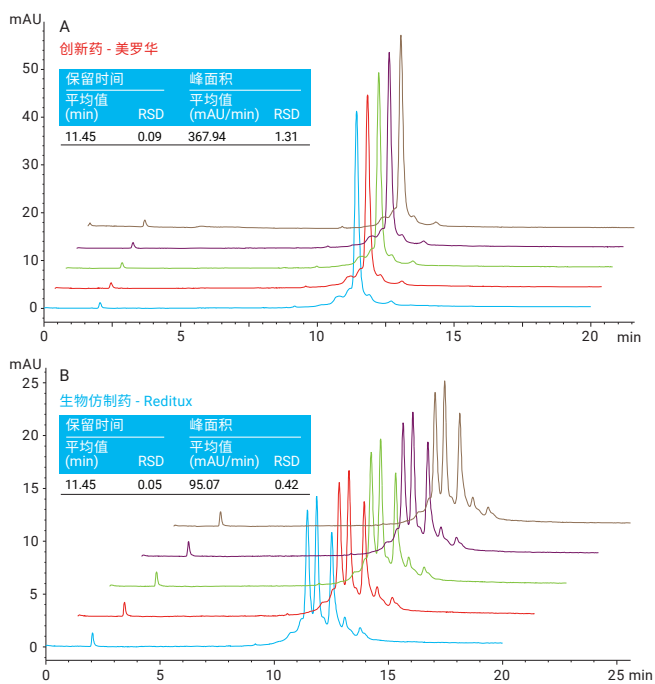


图 2. 采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK 色谱柱五次重复进样分离利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B) 的重叠谱图。插入表所示为保留时间和峰面积的精度, n = 5

为了进一步表征碱性异构体 mAU 峰, 使用羧肽酶 B 消化两种 mAb。图 3A 和 3B 分别显示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药 C 端裂解之前和之后的 IEX 叠加谱图 50。经羧肽酶 B 处理后碱性异构体峰消失, 证实这些峰对应于赖氨酸 20 变体。图 4 所示为经 CPB 处理的利妥昔单抗生物仿制药与未经 CPB 处理的利妥昔单抗创新药的 IEX 叠加谱图, 0 表示两种 mAb 的电荷异构体存在相似性。

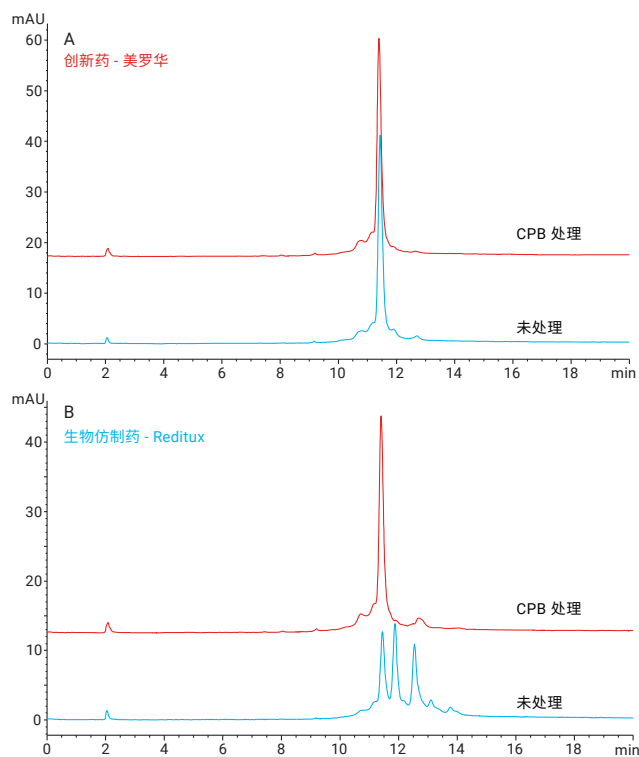


图 3. 碱性电荷变异体表征。采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK 色谱柱分离经 CPB 处理 (过夜) 和未经处理的利妥昔单抗创新药 (A) 和生物仿制药 (B)

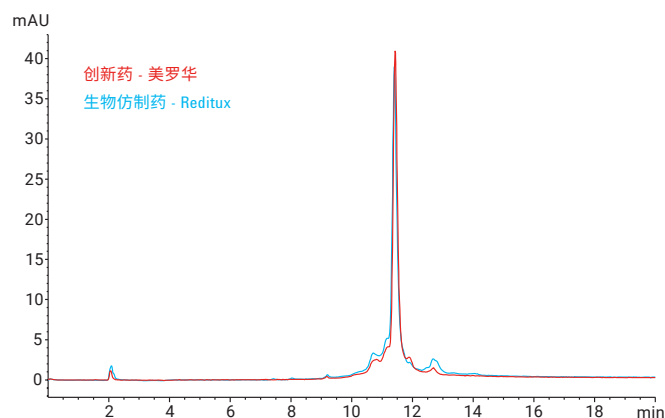


图 4. 未经 CPB 处理 (红色) 的利妥昔单抗创新药和经 CPB 处理的利妥昔单抗生物仿制药 (蓝色) 的叠加谱图

结论

本应用简报介绍的盐梯度方法展示了使用 Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK 色谱柱对 mAb 电荷异构体谱图进行高分离度分离。利妥昔单抗创新药和生物仿制药具有不同的分离谱, 酸性和碱性异构体的含量不同。羧肽酶 B 消化证实, 生物仿制药中的主要碱性异构体对应于赖氨酸变体。该解决方案将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱、Bio MAb PEEK 色谱柱与重现性良好的方法结合, 特别适用于生物制药行业中 mAb 的 QA/QC 分析。

参考文献

Yan, He; et al. J. Sep. Sci. **2011**, 34, 548–555

安捷伦出版号 5991-0895CHCN

安捷伦出版号 5990-6844CHCN

安捷伦出版号 5991-0565CHCN

采用安捷伦弱阳离子交换柱进行更快 分离

作者

Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

离子交换色谱是分离复杂蛋白质混合物的常用方法。传统上，使用增加盐浓度的平缓梯度和可提供必要分离度的长柱长进行这种分离。通常使用大直径颗粒填充色谱柱，以尽可能减小反压。本应用简报展示了如何通过利用小粒径非多孔离子交换吸附剂的优势，在不影响分析性能的前提下显著缩短分析时间并提高通量。

前言

蛋白质、多肽和寡核苷酸是表面上带有多个电荷的复杂分子，因此通常采用离子交换色谱法分析这些物质。该技术非常适合用于分离带电的生物分子，因为它使用非变性条件，并且具有良好的性能和分离度。

传统上，这意味着使用高度多孔的颗粒填料，以便这类大分子能够穿透。此外，通常使用填充有 5 μm 或 10 μm 颗粒填料，长度为 15 cm 或 25 cm 的色谱柱。

安捷伦的 Bio IEX 系列等非多孔吸附剂由刚性聚合物核颗粒及其结合的包含离子交换官能团的亲水层组成，它们的出现提高了分离度。这是因为消除了由于分子渗透进入大颗粒核心导致的扩散限制谱带展宽。继而，这意味着可以使用更小的颗粒和更短的色谱柱长度来显著提高通量，从而大大缩短分析时间。馏分分析等任务效率提升的好处非常明显。

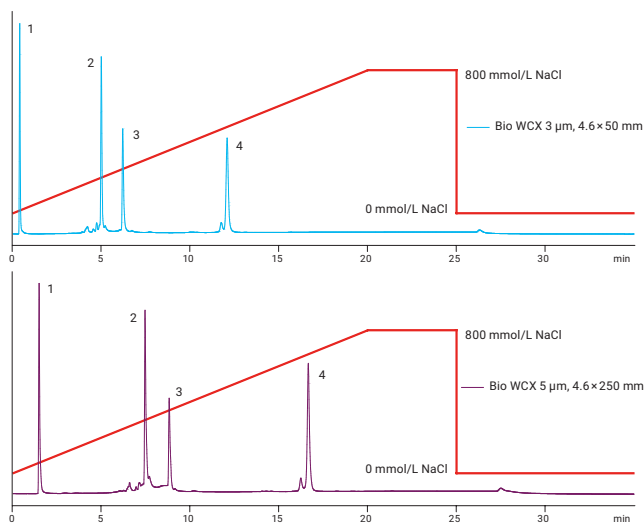


图 1. 使用 Agilent Bio WCX 5 μm 4.6 \times 250 mm 色谱柱和 Agilent Bio WCX 3 μm 4.6 \times 50 mm 色谱柱分离蛋白质的色谱图对比 (流速 1.0 mL/min)

材料与方法

Agilent Bio IEX 色谱柱填充的刚性聚合物非多孔颗粒结合有带官能团的亲水聚合物层。由此得到的 1.7、3 和 5 μm 刚性颗粒能够减少由全多孔颗粒的扩散限制引起的谱带展宽效应，从而提供高分离度和高分离效率。化学键合的亲水涂层可以显著降低非特异性结合的影响，提高回收率。

Bio-Monolith 色谱柱条件

| 参数 | 值 |
|------|--|
| 色谱柱: | Agilent Bio WCX 5 μm , 4.6 \times 250 mm SS (部件号 5190-2445) Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm SS (部件号 5190-2443) Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm SS (部件号 5190-2441) |
| 样品: | 卵清蛋白 (1), 核糖核酸酶 A (2), 细胞色素 c (3), 溶菌酶 (4) |
| 仪器: | Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱 |
| 流动相: | A: 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.5 B: A + 1.6 mol/L NaCl |
| 梯度: | 0%–50% B |
| 温度: | 室温 |
| 进样量: | 10 μL |
| 浓度: | 0.5 mg/mL |
| 检测: | UV, 220 nm |

结果与讨论

由塔板数衡量的色谱柱性能取决于粒径和柱长。由此可以推断，与填充较大颗粒的较长色谱柱相比，填充较小颗粒的较短色谱柱可实现相同的性能水平（图 1）。这在实践中很常见。然而，对于梯度洗脱，该方法还需要进一步改进，才能提供缩短运行时间和提高分析效率的更多优势。

计算较短梯度程序时，将梯度时间转换为色谱柱体积是一种有用的方法，可以在提高分离速度方面达到理想效果（表 1）。然而，较小的粒径可能需要较高的流速才能大幅提高性能。这可以通过图 2 所示的 van Deemter 曲线来说明。

为了尽可能提高使用 Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱的分离效率，以 1.0 mL/min、1.5 mL/min、2.0 mL/min、2.5 mL/min 的流速进行 4 分钟梯度分离（图 3）。与预期结果相同，较高流速带来的较高线速度改善了峰形。

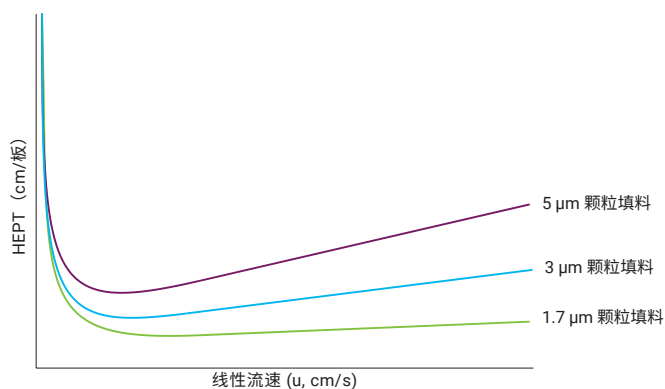


图 2. 典型的 van Deemter 曲线

表 1. 梯度时间到色谱柱体积的转换

| 时间 (分钟) | mmol/L NaCl | #CV |
|---------|-------------|-----|
| 0 | 0 | 0.0 |
| 20 | 800 | 4.8 |
| 25 | 800 | 6.0 |
| 25.01 | 0 | 6.0 |
| 35 | 0 | 8.4 |

#CV = 1.0 mL/min 下得色谱柱体积数 (4.6 Å~ 250 mm 色谱柱)

| 时间 (分钟) | mmol/L NaCl | #CV |
|---------|-------------|-----|
| 0 | 0 | 0.0 |
| 4 | 800 | 4.8 |
| 5 | 800 | 6.0 |
| 5.01 | 0 | 6.0 |
| 7 | 0 | 8.4 |

#CV = 1.0 mL/min 下得色谱柱体积数 (4.6 Å~ 50 mm 色谱柱)

相比之下，Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱在相同条件下的峰形更为尖锐（图 4）。

提高流速应当意味着可以进一步缩短梯度时间。使用 Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱对此进行研究。0 到 800 mmol/L NaCl 梯度运行时间由 4 分钟缩短至 2 分钟。

结果发现，在 1.7 mL/min 的流速下，反压仍然低于 400 bar，峰形和分离度也依旧出色（图 5）。

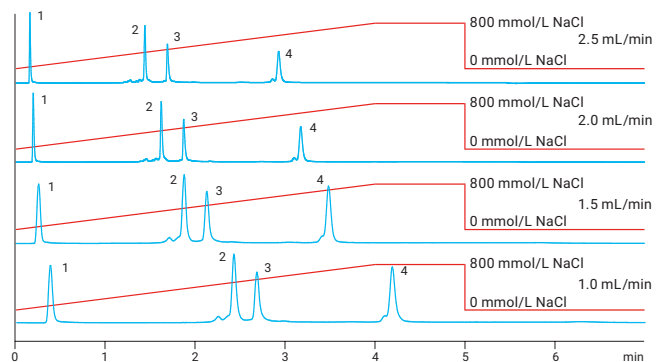


图 3. 流速对色谱性能的影响 (Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm)

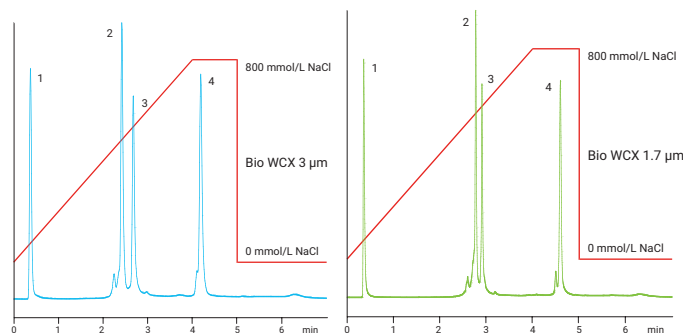


图 4. Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm 和 Agilent Bio WCX 1.7 μm 色谱柱的对比

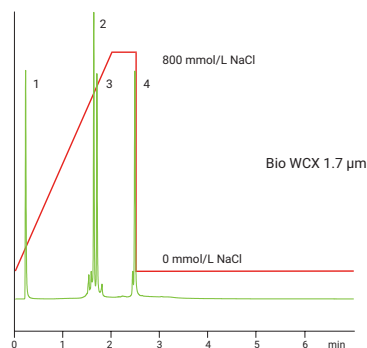


图 5. 使用 Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm 色谱柱在 3 分钟内分离蛋白质（流速 1.7 mL/min）

结论

我们已经证明，通过使用填充较小粒径（3 μm 和 1.7 μm ）的较短的 5 cm 色谱柱，Agilent Bio WCX 产品能够将运行时间从 20 分钟或 30 分钟大幅缩短至不到 3 分钟，同时仍然保持出色的峰分离度。在注重时间的应用中，这可以实现更高的通量。

反压为 400 bar，说明将整个梯度的分析时间从 30 分钟以上大幅缩短至 4 分钟以内时，像 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪这样的 600 bar 系统仍然适用。

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法中的蛋白质分离

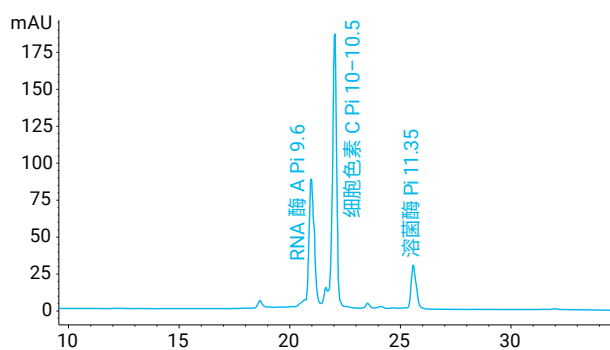
采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统进行蛋白质分离

作者

Sonja Schneider
Jochen Strassner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报表明，将安捷伦缓冲液顾问软件与 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用，是利用离子强度梯度进行自动化蛋白质分离的理想解决方案。通常，利用预先混合的二元梯度进行 pH 筛选既浪费时间又增加了工作强度。而使用由缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度时，可以缩短并简化 pH 筛选过程。此外，使用缓冲液顾问软件计算得到的梯度还可获得卓越的保留时间精度和 pH 一致性。



前言

蛋白质由多种不同的氨基酸组成，其中含有弱酸性（羧基）和碱性（氨基）基团。因此，蛋白质是种两性分子，在特定 pH 值范围内大多以两性离子形式存在。在某一 pH 值下，蛋白质所带静电荷为零，且不与任何带电介质相互作用，此时的 pH 值即为等电点 (pI)。在离子交换色谱 (IEX) 中，可利用蛋白质表面净电荷和 pH 值间的独特关系实现更出色的蛋白质分离。在分析过程中，pH 值将确定蛋白质所带的电荷数，并有助于缓冲液中的蛋白质保持其自然结构。

为了确保目标蛋白质与 IEX 色谱柱更好的结合及洗脱特性，所用缓冲液的 pH 值和离子强度是非常重要的因素。即使这两个参数出现很小的变化也会影响分离效果。因此，当使用离子强度梯度时，pH 筛选是一种寻找最优分离条件的重要方法。与 pH 梯度相反的是，离子强度梯度的 pH 值将保持恒定。通过增加流动相的离子强度（盐浓度），弱结合能力的蛋白质先于强结合能力的蛋白质被洗脱出来。

一般来说，用于分析的预混合二元梯度包括弱离子强度的起始缓冲液和强离子强度的洗脱缓冲液。这包括下列准备步骤：

- 溶解适量缓冲液化合物至指定的浓度
- 利用酸/碱滴定调节流动相的 pH 值
- 分装缓冲液，并向其中一份缓冲液中加入盐（洗脱缓冲液）
- 必要时利用酸/碱滴定调节洗脱缓冲液的 pH 值

要利用预先混合的二元梯度进行 pH 筛选，应准备多瓶缓冲液。例如，为了测试 6 种不同的 pH 值，需要准备 12 瓶预先混合的缓冲液。相反，如果使用动态混合的四元梯度，只需准备 4 瓶缓冲液即可获得多种 pH 值。此外动态混合缓冲液可免除人工滴定缓冲液溶液的步骤，该步骤通常很耗时且容易引入误差。应用动态混合的四元梯度可简化方法开发过程，并且由于只需提供四瓶储备溶液，可大大缩短缓冲液前处理时间：

- 管路 A：水
- 管路 B：盐溶液
- 管路 C：酸性缓冲组分
- 管路 D：碱性缓冲组分

通过使用这四种储备溶液，可前处理不同 pH 值和盐浓度的不同缓冲液。缓冲液顾问软件可帮助您计算储备溶液的百分比，以获得所需的 pH 值、缓冲液浓度和离子强度（图 1）。

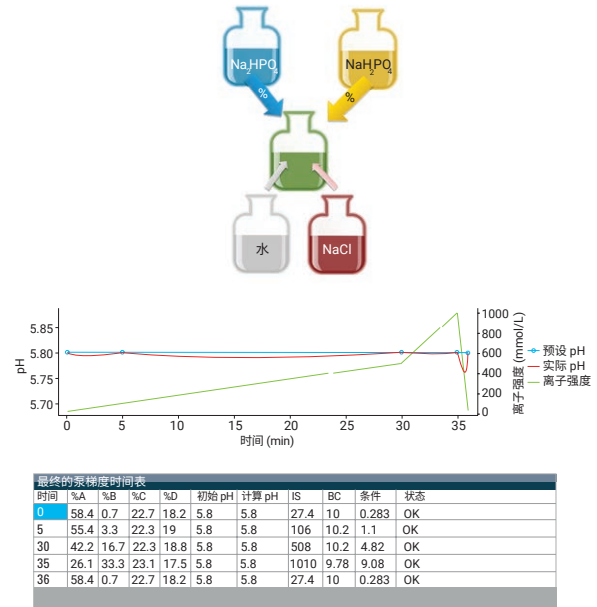


图 1. 四元混合以产生具有恒定 pH 值的盐梯度

缓冲液顾问软件将生成一个时间表，可通过 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件中的导入溶剂混合文件功能导入到 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵方法中（图 2）。

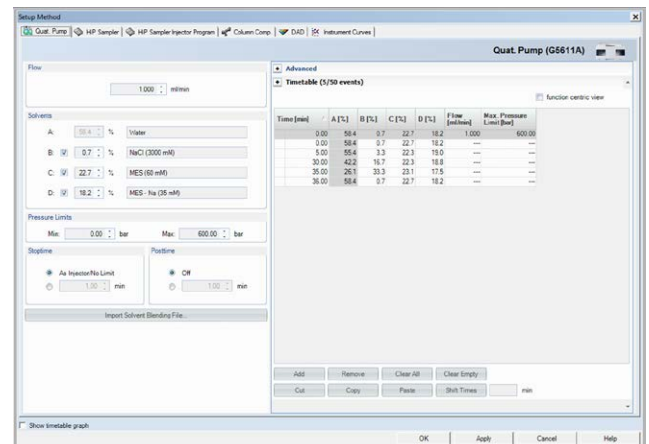


图 2. 生成的时间表可由 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件导入 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的方法中

缓冲液顾问软件可应用于阴离子或阳离子交换色谱法中的离子强度或 pH 梯度控制。该软件可为单缓冲液（离子强度梯度）或复合缓冲液（pH 梯度）应用提供多种可供选择的缓冲液。用户可根据目标蛋白质和所使用的色谱柱为阴离子或阳离子交换选择缓冲液（图 3）。为了确保更出色的缓冲容量，列出了缓冲液应使用的推荐 pH 范围和浓度。

在使用离子强度梯度的离子交换色谱法中，一个常见的问题是加入中性盐（例如 NaCl）会导致 pH 值降低^[1,2]。缓冲液顾问软件将考虑酸性和碱性缓冲液的浓度以维持所需的恒定 pH 值，之后重新计算整体流动相成分以解决这个问题。此外，如果 pH 偏移过大，缓冲液顾问软件会在泵时间表中自动插入额外的时间点。

| Time | Salt | pH | Buffer |
|------|------|-----|--------|
| 0 | 20 | 5.8 | 20 |
| 5 | 100 | 5.8 | 20 |
| 30 | 500 | 5.8 | 20 |
| 35 | 1000 | 5.8 | 20 |
| 36 | 20 | 5.8 | 20 |

图 3. 用于阳离子交换色谱的缓冲液列表，根据推荐的 pH 值范围排序

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高效生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，配备生物惰性溶剂热交换器
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 VL (G1315D，配置生物惰性标准流通池，10 mm)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性分析型馏分收集器 (G5664A)

色谱柱

- Agilent Bio MAb 色谱柱，PEEK，4.6 × 250 mm，5 μm

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.03 [32]
- 安捷伦缓冲液顾问软件，修订版 A.01.01

溶剂

缓冲液 A: H₂O

缓冲液 B: NaCl 3 mol/L

缓冲液 C: MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物) 60 mmol/L

缓冲液 D: MES-Na (2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐) 35 mmol/L

样品

三种蛋白质混合物，溶于 PBS (磷酸盐缓冲液)，pH 7.4

核糖核酸酶 A: 13700 Da pI 9.6

细胞色素 C: 12384 Da pI 10–10.5

溶菌酶: 14307 Da pI 11.35

所有溶剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。MES (2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物) 及 MES-Na (2-(N-吗啉)乙磺酸钠盐) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。NaCl 购自 VWR (Radnor, PA, USA)。

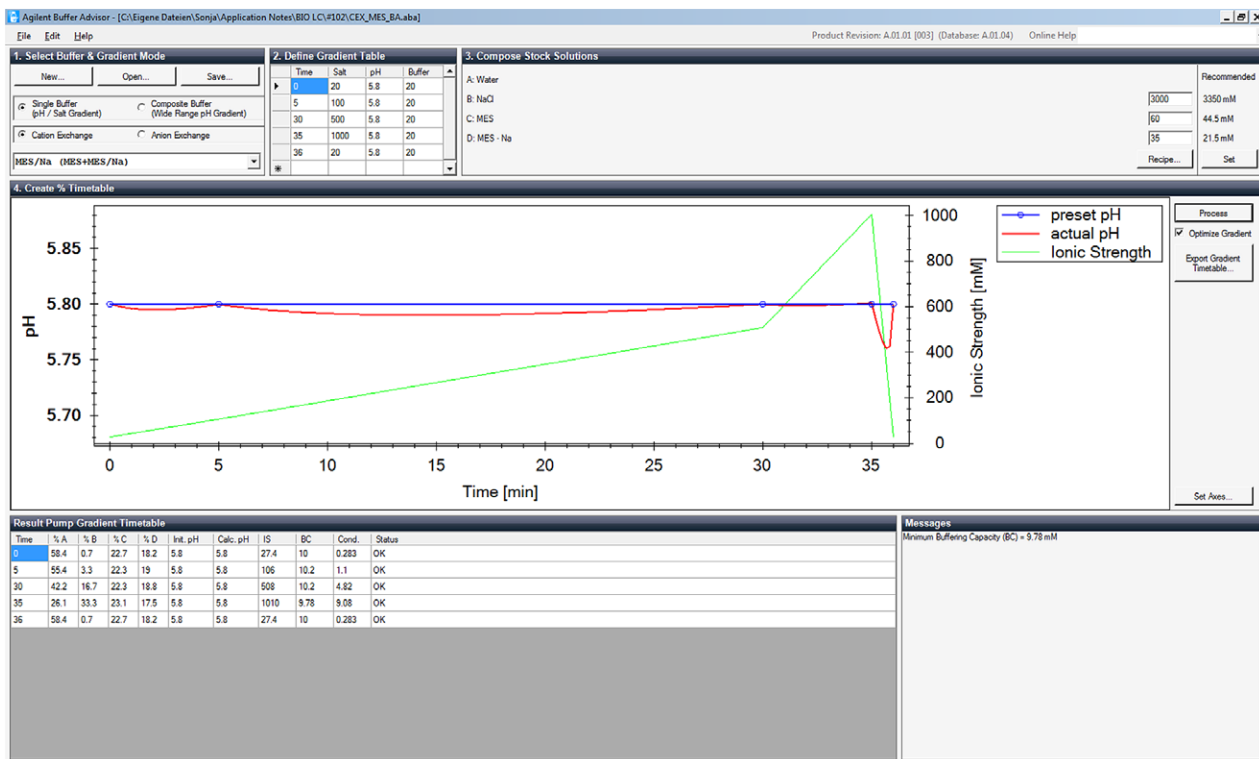


图 4. 安捷伦缓冲液顾问软件，显示了“结果与讨论”中所描述的步骤

条件

| 参数 | 值 |
|---------|--|
| 流速: | 1 mL/min |
| 梯度: | 0 min – 20 mmol/L NaCl 5 min – 20 mmol/L NaCl 30 min – 500 mmol/L NaCl 35 min – 1000 mmol/L NaCl 36 min – 20 mmol/L NaCl |
| 进样量: | 10 µL |
| 恒温箱: | 4 °C |
| TCC 温度: | 25 °C |
| DAD: | 280 nm/4 nm |
| 参比: | 关闭 |
| 峰宽: | > 0.05 min (1.0 s 响应时间) (5 Hz) |

| | | |
|----------|---------------------------|-------------------------------------|
| Bottle B | NaCl: Sodium chloride | Weight 175.32 g and fill up to 1 L. |
| Bottle C | MES: MES | Weight 11.714 g and fill up to 1 L. |
| Bottle D | MES - Na: MES sodium salt | Weight 7.6027 g and fill up to 1 L. |

图 5. 储备溶液配方

结果与讨论

使用安捷伦缓冲液顾问软件对 pH 值 5.8 至 6.8 之间的计算结果进行 pH 筛选。在四元盐梯度的 6 种不同 pH 值下进行三种蛋白质混合物（核糖核酸酶 A、细胞色素 C 及溶菌酶）的分离。动态混合的四元梯度由软件的计算结果生成。缓冲液顾问软件通过计算指定时间点下流动相中每种储备溶液的百分比，可简化不同四元梯度的生成过程（图 4）。

1. 在确定梯度参数后，例如时间，最大盐浓度，pH 值，以及缓冲液浓度
2. 缓冲液顾问软件将计算所需的储备溶液浓度。按下 Recipe 按钮后，软件将显示前处理储备溶液所需化学品的精确质量（图 5）。用户可调整这些建议的储备溶液浓度
3. 选择 Process 选项卡
4. 缓冲液顾问软件将计算每个通道所需的量以便在整个色谱方法运行过程中维持正确的 pH 值。此外，它还将计算所输入的 pH 值，盐浓度和缓冲液浓度是否适合所选的缓冲液体系。时间表中还列有其他数据，例如流动相的缓冲容量

对核糖核酸酶A (A)、细胞色素 C (B) 和溶菌酶 (C) 这三种蛋白质混合物的 pH 筛选结果证实了安捷伦缓冲液顾问软件的优势 (图 6)。从此图中我们可以看出, 即使 pH 值发生很小的变化 (例如 0.2), 也会显著影响蛋白质在弱阳离子交换 (WCX) 色谱柱上的保留性。当 pH 值从 5.8 变为 6.8 时, 洗脱顺序发生明显变化。

人工前处理预先混合二元梯度的相应缓冲液包括的一些步骤。对每种 pH 值及每个准备好的试剂瓶 (一个为低离子强度, 另一个为高离子强度), 都需要对缓冲液进行人工滴定。为了获得最佳分离度, 对 6 种不同 pH 值进行 pH 筛选时需准备 12 个溶剂瓶 (包括化学品称量, pH 值调节)。这是一个非常耗时的过程, 而且非常容易出现误差和差异。

相反, 安捷伦缓冲液顾问软件可以自动地、可重现地利用四种储备溶液混合得到所有六种分离条件, 无需任何人工干预。在 pH 5.8 下可实现更出色的分离效果 (图 6)。

根据该研究结果, 用户对如何进行操作可有多种选择:

1. 微调所得的 pH 值和梯度
2. 通过 OpenLAB CDS ChemStation 软件将动态混合四元梯度转移至其他仪器
3. 使用预先混合的缓冲液, 在二元梯度中实施 pH 值结果筛选

但是在最后一种情况下, 由于缓冲液顾问软件中具有 pH 值优化程序, 预计会在正确 pH 值处发生偏移。

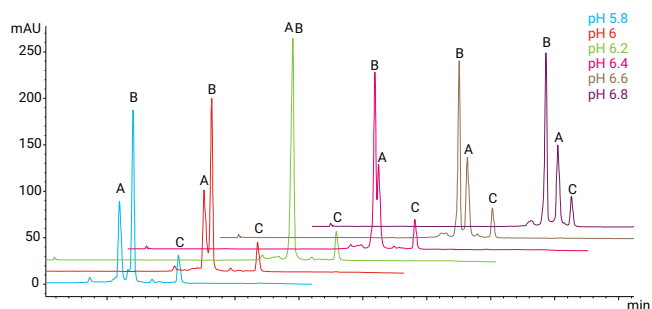


图 6. 利用动态混合四元梯度进行三种蛋白质混合物分离的 pH 筛选

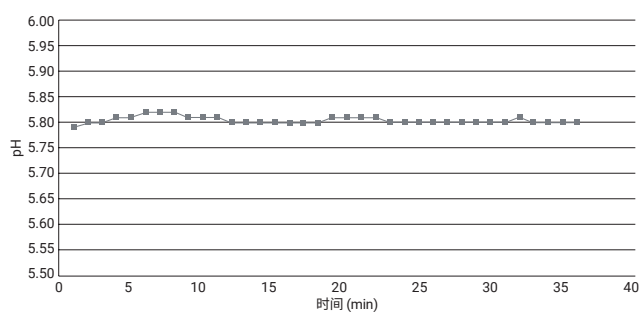


图 7. 离线 pH 测量

结论

使用由缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度时，可以缩短并简化 pH 筛选过程。利用缓冲液顾问软件计算得到的动态混合四元梯度，可显著减少缓冲液准备时间，尤其是与人工前处理的预先混合二元梯度缓冲液相比。缓冲液顾问软件为阴离子和阳离子交换色谱提供了众多的预先验证、用户可选的缓冲系统，并提供了前处理最适合储备溶液所需的配方。软件会对 pH 值加以优化，令得出的 pH 值比通过人工前处理的缓冲液所形成预混合梯度的 pH 值更为准确和精确。缓冲液顾问软件将考虑酸性和碱性缓冲液的浓度以维持所需的恒定 pH 值，之后重新计算四元梯度以解决这个问题。

将缓冲液顾问软件与 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用，是生成四元梯度的一种非常好的方法。借助缓冲液顾问软件的计算结果可实现准确、可重现性的分析，是自动化 pH 筛选和准确离子交换色谱领域中的出色工具软件。因此，缓冲液顾问软件是离子交换色谱中分析方法自动化开发的理想工具，可无缝转移至相关的 QA/QC 部门。

参考文献

1. R. J. C. Brown & M. J. T. Milton. Observation of a combined dilution and salting effect in buffers under conditions of high dilution and high ionic strength, *Accred Qual Assur* 8(11): 505–510, **2003**
2. A. E. Voinescu et al. Similarity of Salt Influences on the pH of Buffers, Polyelectrolytes, and Proteins, *J. Phys. Chem. B* 110: 8870–8876, **2006**

使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征

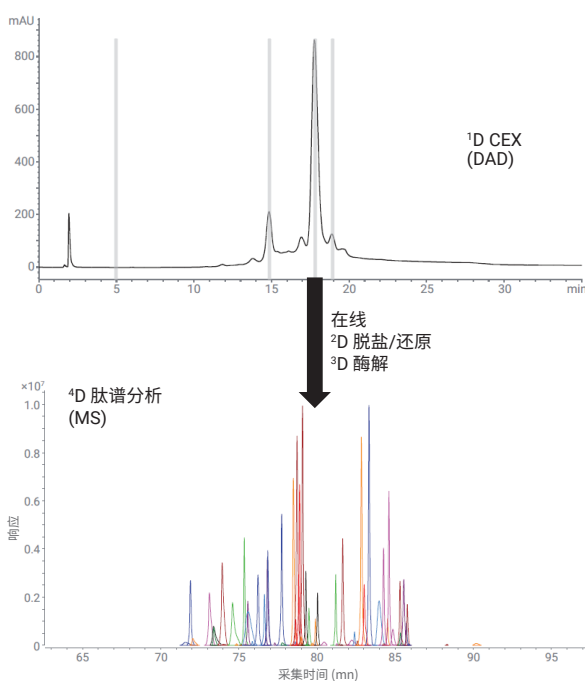
作者

Liesa Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra, Koen Sandra
RIC Biologics, Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider,
Udo Huber
安捷伦科技有限公司
德国

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 Agilent 6545 LC/Q-TOF 系统的四维液相色谱/质谱 (4D-LC/MS) 对单克隆抗体 (mAb) 电荷异构体进行的全自动化深入表征。通过阳离子交换色谱 (CEX) 分离的电荷异构体被收集在安装于多中心切割阀上的定量环中，在对其进行基于 LC/MS 的肽谱分析之前，依次进行在线脱盐、变性、还原和胰蛋白酶酶解。



前言

蛋白质生物药物已成为治疗各种疾病的重要药物，包括癌症、心血管疾病、糖尿病、感染、炎症和自身免疫性疾病^[1-3]。蛋白质生物药物有多种形式，包括单克隆抗体 (mAb)、抗体药物偶联物 (ADC)、融合蛋白、激素、生长因子、细胞因子、治疗性酶、血液因子、疫苗和抗凝血剂。这些分子在安全性和有效性方面具有明显的优势，极大地改变了制药市场，迄今为止，已有超过 350 种产品获得美国和欧盟的批准可用于人类^[1-3]。这大约占了整个制药市场的四分之一，其中 mAb 是发展最快的一类药物。

伴随着巨大的治疗潜力，这些分子的结构非常复杂，对分析的要求极为苛刻^[1,2]。与小分子药物相比，生物药物具有较大的质量数 (mAb 的 MW 约为 150 kDa) 和异质性。生物药物是一个或多个基因的产物。然而，可能同时存在数百种在翻译后修饰 (PTM)、氨基酸序列、高阶结构等方面有所不同的异构体，这些因素共同构成了产品的特征、安全性和有效性^[1-3]。因此，它们的深入结构表征涉及大量的分析工具，而色谱 (LC) 和质谱 (MS) 是其中的前沿技术。

CEX 是研究可能因 PTM [例如天冬酰胺脱酰胺、C 端赖氨酸截短、N 端环化 (焦谷氨酸构造) 和唾液酸化等] 产生的电荷异构体的关键技术。在 CEX 技术中，固定相的阴离子基团和蛋白质表面的阳离子基团之间的静电相互作用为分离奠定了基础。在流动相 pH 低于其等电点 (pI) 时，将蛋白质加载到色谱柱上，并使用盐梯度或 pH 梯度实现洗脱。CEX 缓冲液通常由非挥发性成分组成，使得这些方法与质谱不兼容。峰鉴定是一项繁琐的任务，涉及在质谱分析之前进行峰采集和脱盐^[4]。随着稳定的商用二维液相色谱仪器的最新推出，这一系列任务现在通常以在线、自动化的方式进行^[5-9]。从 CEX 色谱柱洗脱的物质存储在定量环中，并在质谱测量之前使用反相液相色谱 (RPLC) 或体积排阻色谱 (SEC) 进行在线脱盐。全二维液相色谱 (LC × LC) 和 (多) 中心切割二维液相色谱 (LC-LC) 均得到使用^[5-9]。

然而，为了明确鉴定 CEX 峰，需要进行肽谱分析。虽然蛋白质测定可表明身份，并突出显示质量数差异超出质谱仪质量数准确度的主要修饰，但它通常不提供实际的氨基酸序列，也不允许我们定位修饰。针对后者，受之前研究工作的启发^[10-12]，本应用简报介绍了一种完全自动化的在线 ⁴D-LC/MS 设置，通过整合第一维 (¹D) CEX、峰采集、²D 脱盐、变性、还原、³D 胰蛋白酶酶解以及基于 ⁴D RPLC/MS 的肽谱分析，对 mAb 电荷异构体进行深入表征。

实验部分

材料

乙腈 (HPLC-S)、水 (ULC/MS) 和甲酸 (ULC/MS) 来自 Biosolve (valkenward, The Netherlands)。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、NaCl、NH₄HCO₃、三羟甲基氨基甲烷和二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。超纯 Tris-HCl (pH 7.5) 购自 ThermoFisher 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。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)。

样品前处理

用一维 CEX 流动相 A (MPA: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65) 将曲妥珠单抗稀释至 7 mg/mL。在高 pH (100 mmol/L Tris, pH 9.0) 和 37 °C 条件下将曲妥珠单抗孵育 3 天，然后用一维 CEX 流动相 A 通过缓冲液交换至 7 mg/mL，从而诱导脱酰胺基化。

仪器

使用配备多中心切割选件的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统、额外的 Agilent 1260 Infinity II 四元泵和 Agilent 1260 Infinity II 等度泵，以及两个额外的 2 位/6 通阀和零死体积 T 形管。使用内径为 0.12 mm 的不锈钢管。配置的示意图如图 1 所示，并在本应用简报中进行了汇总。使用二极管阵列检测 (DAD) 进行第一维 (CEX) 和第四维 (RPLC) 检测。此外，使用配备喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 进行第四维和最后维度的检测。

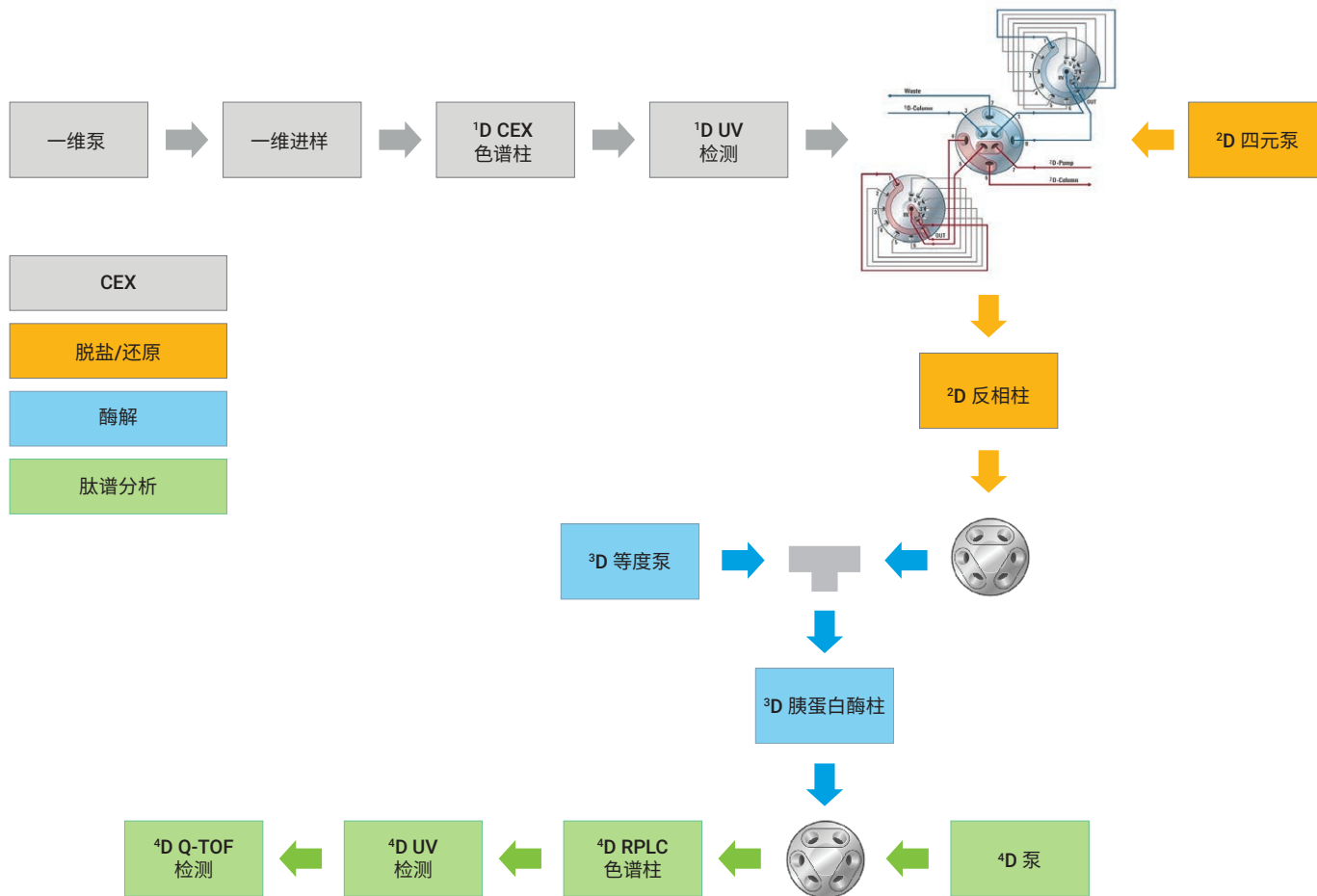


图 1. 4D-LC/MS 配置，包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析

配置

第一维：阳离子交换色谱：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7167B Agilent 1290 Infinity II Multisampler，配备样品恒温箱（选件 101）
- G7116B Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT)，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器，配备 3.7 mm HDR InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G4212-60032)

注：安装了短型 3.7 mm 检测器流通池，以降低信号强度并防止 UV 信号饱和

具有多中心切割功能的二维液相色谱

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备二维液相色谱阀 (G4236A)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40 μL 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原：

G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第三维：胰蛋白酶酶解

- G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD，配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池（G4212-60008）
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF，配备喷射流电喷雾离子源

注：Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱位于同一个柱温箱的不同区域，分别保持在 40 °C 和 60 °C。

| 第一维：阳离子交换色谱 | | | |
|-------------|---|-------|--------|
| 色谱柱 | Agilent Bio MAb, 无孔 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部件号 5190-2411) | | |
| 温度 | 30 °C | | |
| 流动相 A | 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65 | | |
| 流动相 B | 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65 + 100 mmol/L NaCl | | |
| 流速 | 0.2 mL/min | | |
| 梯度 | 时间 (min) | B (%) | CEX 分析 |
| | 0 | 5 | |
| | 36 | 70 | |
| | 36.5 | 100 | |
| | 46 | 100 | |
| | 46.5 | 5 | |
| 60 | 5 | | |
| 进样量 | 100 μg | | |
| 检测 | 220 和 280 nm | | |
| 峰宽 | > 0.025 min (10 Hz) | | |

| 第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原（手动输入重复事件） | | | | | | |
|--------------------------------|--|-------|-------|-------|-------------|-------|
| 色谱柱 | 聚合物基脱盐小柱，2.1 × 10 mm | | | | | |
| 温度 | 23 °C | | | | | |
| 流动相 A | 0.1% (v/v) 甲酸水溶液 | | | | | |
| 流动相 B | 0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液 | | | | | |
| 流动相 C | 20 mmol/L DTT 的 100 mmol/L Tris-HCl 溶液，pH 7.5 | | | | | |
| 梯度 | 时间 (min) | A (%) | B (%) | C (%) | 流速 (mL/min) | |
| | 10 | 99 | 1 | 0 | 0.5 | 脱盐和聚焦 |
| | 10.01 | 0 | 0 | 100 | 0.2 | 还原 |
| | 20 | 0 | 0 | 100 | 0.2 | |
| | 20.01 | 99 | 1 | 0 | 0.5 | |
| | 25 | 99 | 1 | 0 | — | 脱盐和洗脱 |
| | 25.01 | 40 | 60 | 0 | — | |
| | 27 | 40 | 60 | 0 | 0.5 | |
| | 27.01 | 40 | 60 | 0 | 0.015 | 洗脱和酶解 |
| | 68 | 40 | 60 | 0 | 0.015 | |
| | 68.01 | 0 | 100 | 0 | 0.5 | |
| | 85 | 0 | 100 | 0 | — | |
| | 95 | 99 | 1 | 0 | — | |
| | 120 | 99 | 1 | 0 | — | |
| 阀 | 27 min: 位置 1 & 位置 2 (开始胰蛋白酶酶解) 67 min: 位置 2 & 位置 1 (开始肽谱分析) | | | | | |

软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 修正版 C.01.07 SR4 [505]
- 二维液相色谱附加软件修正版 A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter 仪器控制软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm 数据分析软件 (B.07.00)

方法

在二维液相色谱软件中对第一维和第四维进行配置，在常规方法设置中对第二维和第三维进行控制，并将其设定为重复事件。这些事件的循环时间为 110 分钟，与二维液相色谱软件中设定的第四维的循环时间相同。MassHunter 采集软件由二维液相色谱系统的远程启动触发。

在整个 CEX 分析过程中进行了四次中心切割。4.8 分钟时进行的第一次中心切割为空白切割，它使我们可以在分析实际的目标 CEX 中心切割之前对所有维度进行预处理。

| 多中心切割第一维 > 第二维 | |
|----------------|----------|
| 曲妥珠单抗采样时间表 | |
| 切割 | 时间 (min) |
| 1 - 空白 | 4.80 |
| 2 - 前峰 | 14.93 |
| 3 - 主峰 | 17.55 |
| 4 - 后峰 | 18.99 |

| 第三维：胰蛋白酶酶解（手动输入的重复事件） | | |
|-----------------------|---|-------------|
| 色谱柱 | Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶 PEEK (2.1 × 150 mm) | |
| 温度 | 40 °C | |
| 流动相 | 50 mmol/L NH ₄ HCO ₃ , pH 8 | |
| | 时间 (min) | 流速 (mL/min) |
| | 25 | 0.06 |
| 梯度 | 25.01 | 0.135 |
| | 67 | 0.135 |
| | 67.01 | 0.06 |
| | 135 | 0.06 |
| | 酶解 | |
| 阀 | 27 min: 位置 1 -> 位置 2 (开始胰蛋白酶酶解) | |
| | 67 min: 位置 2 -> 位置 1 (开始肽谱分析) | |

数据处理

使用集成于 MassHunter 软件中的 BioConfirm 算法，将测量得到的信号与曲妥珠单抗轻链和重链序列进行匹配。将实验数据与序列匹配的质量容差设置为 8 ppm。在 20 ppm 质量数准确度下获得的提取离子色谱图 (EIC) 用于监测 PTM（例如脱酰胺基化）。

结果与讨论

完全自动化的在线 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括 CEX、峰采集、脱盐、变性、还原、胰蛋白酶酶解以及肽谱分析）的分析流程图如图 1 所示。将 CEX 分离的物质收集在安装于多中心切割阀上的 40 µL 定量环中，并逐一转移到聚合物 RP 小柱中进行脱盐、变性和还原。随后，通过升高乙腈浓度使捕集于小柱上的还原 mAb 洗脱到胰蛋白酶柱中。使用 T 形管将胰蛋白酶酶解缓冲液与反相流动相混合，以获得理想酶解条件并降低乙腈浓度。

| 第四维：使用反相色谱进行肽谱分析（由二维液相色谱软件控制的重复事件） | | |
|------------------------------------|---|-------|
| 色谱柱 | Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱 (2.1 × 150 mm × 2.7 µm) (部件号 651750-902) | |
| 温度 | 60 °C | |
| 流动相 A | 0.1% (v/v) 甲酸水溶液 | |
| 流动相 B | 0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液 | |
| 流速 | 0.4 mL/min | |
| | 时间 (min) | B (%) |
| | 0 | 1 |
| | 8.5 | 1 |
| | 9 | 100 |
| | 15 | 100 |
| | 16 | 1 |
| 梯度 | 20 | 1 |
| | 64 | 1 |
| | 64 | 1 |
| | 97 | 45 |
| | 98 | 100 |
| | 103 | 100 |
| | 104 | 1 |
| | 110 | 1 |
| DAD 检测 | 214 和 280 nm | |
| 峰宽 | > 0.025 min (10 Hz) | |

质谱检测

| 参数 | 离子源 |
|-------|---------|
| 正离子模式 | |
| 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 | 350 °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 | 175 V |

| 参数 | 采集 |
|------------------|----------------|
| 模式 | 扩展动态范围 (2 GHz) |
| 数据采集范围 | m/z 100–3200 |
| | 1 幅谱图/s |
| | 重点采集模式 |
| 67 分钟后将分流阀切换至 MS | |

在酶解过程中，胰蛋白酶柱与肽谱分析柱对齐，生成的肽段集中在 RPLC 柱头。20 分钟后，阀切换使酶解产物开始洗脱到质谱中。

mAb 曲妥珠单抗的 CEX 色谱图如图 2 所示。曲妥珠单抗，商品名赫赛汀，是一种结合 HER2 受体的人源 IgG1，因此可用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。mAb 的 pI 为 8.45，在 CEX 流动相 pH 下带正电荷，以此控制与带负电荷的色谱树脂之间的相互作用。使用 NaCl 盐梯度洗脱 mAb 后，出现了多种电荷异构体，随后对其进行在线肽谱分析。图 3A 示意图展示了涉及三个 CEX 峰（前峰、主峰和后峰）和一个 CEX 空白（如图 2 所示）的分析的 4D-LC/MS 实验。图 3B 为一个循环中压力和 DAD 谱图的放大图，并显示了 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析。可实现超过 90% 的序列覆盖率。鉴定出的肽段如表 1 所示，LC/MS 化合物色谱图的叠加图如图 4 所示。未覆盖的肽段通常较小且/或具有亲水性，且在酶解过程中不会集中于肽谱分析柱的柱头。出于此原因，它们被转移到废液瓶中。

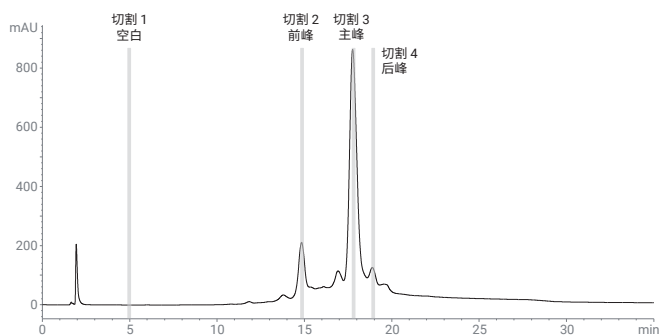


图 2. 单克隆抗体曲妥珠单抗的 CEX 色谱图。根据参考文献 13 设定条件。灰色表示进行的中心切割

除序列信息之外，肽谱分析还可揭示修饰和修饰位点信息。图 5 显示了 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析，并重点展示了两个肽段（即在 30 位处包含潜在脱酰胺化位点的轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)，以及在 102 位处包含潜在异构化位点的重链肽段 WGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTK (HC 99-124)）的 EIC。从数据可以推断出，前峰对应于脱酰胺化异构体，在其中一条轻链的 30 位处，天冬酰胺转变为天冬氨酸。还可以证明后峰在其中一条重链的 102 位处携带异天冬氨酸。对应于修饰和未修饰异构体的双组分峰清楚、直观地说明了这一点。这些结果与 Harris 等人报告的结果一致，他们对赫赛汀的酸性和碱性异构体进行了离线馏分收集和肽谱分析^[4]。

我们对高 pH 处理后的赫赛汀样品进行了相同的实验（图 6）。此类条件会诱导脱酰胺化，从而使 mAb 具有更强的酸性。图 6 中呈现的 CEX 谱图显示了一种酸性位移，CEX 峰 1 和峰 2 的肽谱数据表示双脱酰胺化异构体，其两条轻链均在 30 位处发生了脱酰胺化。CEX 峰 3 和峰 4 对应于单次脱酰胺化事件，一条轻链在 30 位处发生了脱酰胺化。峰 1 和峰 2 以及峰 3 和峰 4 之间的差异源自另一次脱酰胺化，这次发生在重链的 387 位。该脱酰胺化位点出现在两个肽段（一个完全裂解，一个未裂解）中，当发生脱酰胺化时，它们的酶解方式明显不同。

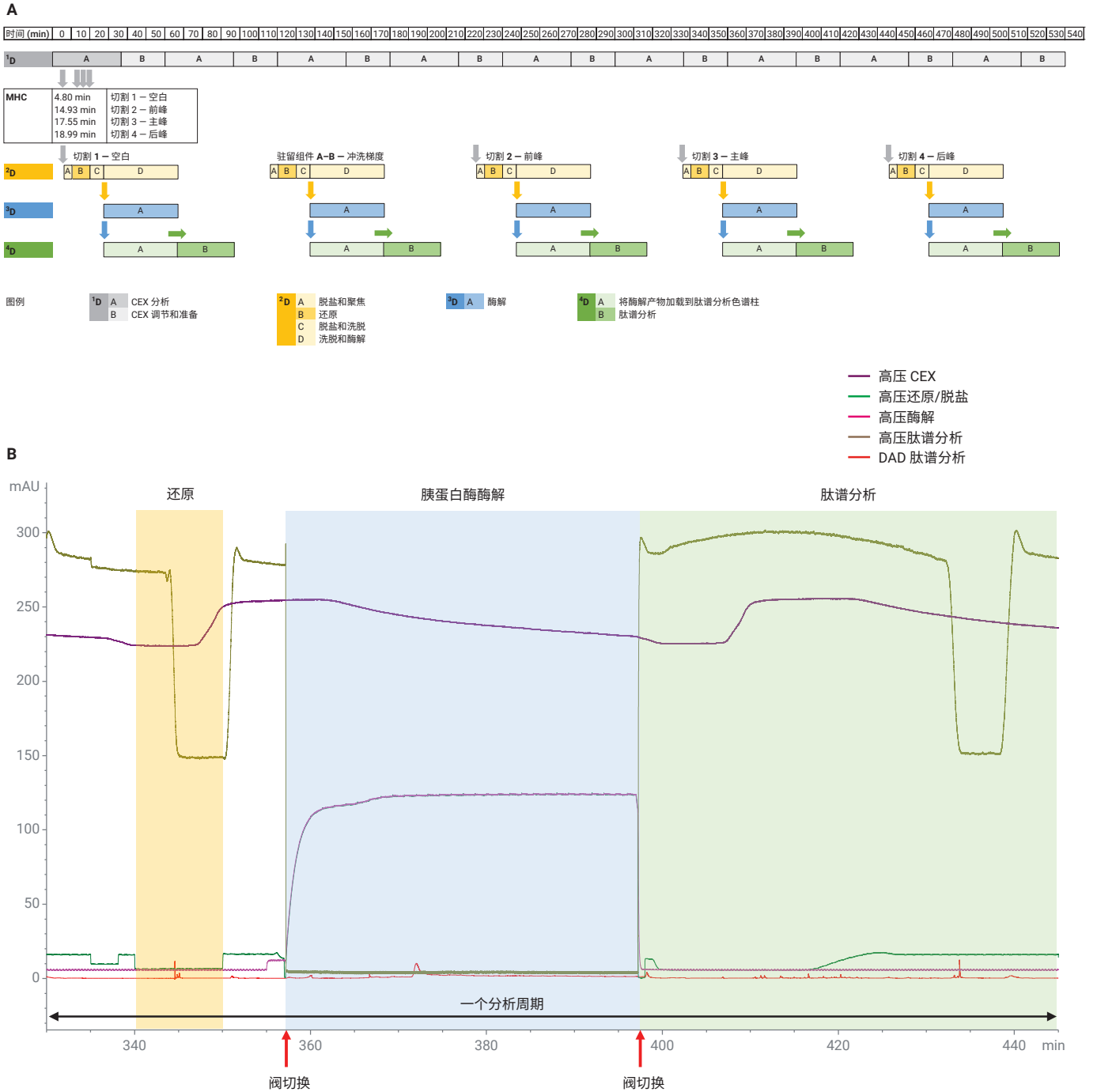


图 3. (A) 4D-LC/MS 实验不同阶段的示意图，重点显示前峰、主峰和后峰以及 CEX 空白（如图 2 所示）区域。(B) 重点显示 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析

表 1. 通过基于 RPLC/MS 的在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中鉴定出的肽段

| RT | 质量数 | 进样量 | 进样量% | 序列 | 测序位置 | 靶向序列 质量数 | 误差 (ppm) | 漏切位点 |
|------|-----------|----------|------|---|-------------|-------------|-------------|------|
| 79.1 | 1880.9972 | 66635668 | 6.61 | EVQLVESGGGLVQPGGSLR | HC(001-019) | 1880.9956 | 0.8 | 0 |
| 76.8 | 1109.5539 | 25727274 | 2.55 | LSCAASGFNIK | HC(020-030) | 1109.5539 | 0.0 | 0 |
| 81.2 | 2180.0864 | 16055279 | 1.59 | LSCAASGFNIKDTYIHWVR | HC(020-038) | 2180.0837 | 1.2 | 1 |
| 76.6 | 1088.5410 | 13618352 | 1.35 | DTYIHWVR | HC(031-038) | 1088.5403 | 0.6 | 0 |
| 76.2 | 829.4442 | 24354704 | 2.42 | GLEWVAR | HC(044-050) | 829.4446 | -0.5 | 0 |
| 71.9 | 1083.5360 | 19879112 | 1.97 | IYPTNGYTR | HC(051-059) | 1083.5349 | 1.0 | 0 |
| 72.1 | 1181.6059 | 3708836 | 0.37 | GRFTISADTSK | HC(066-076) | 1181.6041 | 1.6 | 1 |
| 73.1 | 968.4819 | 26423682 | 2.62 | FTISADTSK | HC(068-076) | 968.4815 | 0.4 | 0 |
| 79.3 | 2260.1184 | 317550 | 0.03 | FTISADTSKNTAYLQMNSLR | HC(068-087) | 2260.1158 | 1.1 | 1 |
| 81.3 | 3518.6474 | 320893 | 0.03 | FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR | HC(068-098) | 3518.6446 | 0.8 | 2 |
| 76.8 | 1309.6451 | 24858112 | 2.47 | NTAYLQMNSLR | HC(077-087) | 1309.6449 | 0.1 | 0 |
| 79.9 | 2568.1769 | 5903991 | 0.59 | NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR | HC(077-098) | 2568.1737 | 1.2 | 1 |
| 71.6 | 1276.5392 | 2994056 | 0.30 | AEDTAVYYCSR | HC(088-098) | 1276.5394 | -0.1 | 0 |
| 85.3 | 2783.2545 | 16863744 | 1.67 | WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK | HC(099-124) | 2783.2537 | 0.3 | 0 |
| 78.7 | 1185.6398 | 68405792 | 6.79 | GPSVFPLAPSSK | HC(125-136) | 1185.6394 | 0.4 | 0 |
| 77.7 | 1263.6494 | 36588096 | 3.63 | STSGGTAALGCLVK | HC(137-150) | 1263.6493 | 0.1 | 0 |
| 88.3 | 6655.2898 | 221285 | 0.02 | DYFPEPVTYSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK | HC(151-213) | 6655.2857 | 0.6 | 0 |
| 79.8 | 1374.7171 | 214690 | 0.02 | VDKKVEPKSCDK | HC(214-225) | 1374.7177 | -0.4 | 3 |
| 84.9 | 2729.4093 | 7103687 | 0.71 | THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK | HC(226-251) | 2729.4073 | 0.7 | 0 |
| 73.4 | 834.4277 | 13166738 | 1.31 | DTLMISR | HC(252-258) | 834.4269 | 1.0 | 0 |
| 82.0 | 2897.4175 | 220680 | 0.02 | DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK | HC(252-277) | 2897.4151 | 0.9 | 1 |
| 84.3 | 4556.2041 | 547132 | 0.05 | DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK | HC(252-291) | 4556.1992 | 1.1 | 2 |
| 79.3 | 2081.0013 | 17858876 | 1.77 | TPEVTCVVVDVSHEDPEVK | HC(259-277) | 2080.9987 | 1.2 | 0 |
| 83.0 | 3739.7881 | 18901388 | 1.88 | TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK | HC(259-291) | 3739.7828 | 1.4 | 1 |
| 78.6 | 1676.7966 | 5991668 | 0.59 | FNWYVDGVEVHNAK | HC(278-291) | 1676.7947 | 1.1 | 0 |
| 84.6 | 1807.0008 | 38113724 | 3.78 | VVSVLTVLHQDWLNGK | HC(305-320) | 1806.9992 | 0.9 | 0 |
| 83.3 | 2227.2022 | 63210428 | 6.27 | VVSVLTVLHQDWLNGKEYK | HC(305-323) | 2227.2001 | 0.9 | 1 |
| 82.4 | 2458.3080 | 2959244 | 0.29 | VVSVLTVLHQDWLNGKEYCK | HC(305-325) | 2458.3043 | 1.5 | 2 |
| 81.6 | 2886.5495 | 183447 | 0.02 | VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK | HC(305-329) | 2886.5426 | 2.4 | 3 |
| 73.9 | 837.4964 | 38694668 | 3.84 | ALPAPIEK | HC(330-337) | 837.4960 | 0.5 | 0 |
| 75.4 | 1285.6662 | 875645 | 0.09 | EPQVYTLPPSR | HC(348-358) | 1285.6667 | -0.4 | 0 |
| 75.6 | 1903.9366 | 36378636 | 3.61 | EPQVYTLPPSREEMTK | HC(348-363) | 1903.9350 | 0.8 | 1 |
| 80.5 | 2989.5263 | 1849832 | 0.18 | EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK | HC(348-373) | 2989.5253 | 0.3 | 2 |
| 78.4 | 1721.8701 | 179925 | 0.02 | EEMTKNQVSLTCLVK | HC(359-373) | 1721.8692 | 0.6 | 1 |
| 78.9 | 1103.6013 | 45037560 | 4.47 | NQVSLTCLVK | HC(364-373) | 1103.6009 | 0.4 | 0 |
| 81.6 | 2543.1245 | 29221288 | 2.90 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK | HC(374-395) | 2543.1241 | 0.2 | 0 |
| 85.7 | 4398.0307 | 5032842 | 0.50 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK | HC(374-412) | 4398.0281 | 0.6 | 1 |
| 85.9 | 4954.3531 | 225838 | 0.02 | GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK | HC(374-417) | 4954.3502 | 0.6 | 2 |
| 82.8 | 1872.9144 | 57538216 | 5.71 | TTTPVLDSDGSFFLYSK | HC(396-412) | 1872.9146 | -0.1 | 0 |
| 82.6 | 2429.2370 | 970108 | 0.10 | TTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK | HC(396-417) | 2429.2366 | 0.2 | 1 |
| 77.8 | 2986.3744 | 1042270 | 0.10 | SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK | HC(418-442) | 2986.3715 | 1.0 | 1 |
| 78.5 | 2743.2427 | 46302832 | 4.60 | WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK | HC(420-442) | 2743.2384 | 1.6 | 0 |
| 74.6 | 659.3487 | 26985572 | 2.68 | SLSLSPG | HC(443-449) | 659.3490 | -0.5 | 0 |
| 76.7 | 1877.8787 | 2655889 | 0.26 | DIQMTQSPSSLSASVGDR | LC(001-018) | 1877.8789 | -0.1 | 0 |
| 79.5 | 2551.2398 | 9011163 | 0.89 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCR | LC(001-024) | 2551.2371 | 1.1 | 1 |

表 1. 续

| RT | 质量数 | 进样量 | 进样量% | 序列 | 测序位置 | 靶向序列质量数 | 误差 (ppm) | 漏切位点 |
|------|-----------|----------|------|--|-------------|-----------|----------|------|
| 75.6 | 1989.9932 | 10501849 | 1.04 | ASQDVNTAVAWYQQKPGK | LC(025-042) | 1989.9908 | 1.2 | 0 |
| 74.8 | 2286.1771 | 370620 | 0.04 | ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK | LC(025-045) | 2286.1757 | 0.6 | 1 |
| 84.3 | 1771.9519 | 27274394 | 2.71 | LLIYSASFLYSGVPSR | LC(046-061) | 1771.9509 | 0.6 | 0 |
| 85.8 | 4129.8936 | 10160642 | 1.01 | SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK | LC(067-103) | 4129.8892 | 1.1 | 0 |
| 85.3 | 4599.1803 | 2980494 | 0.30 | SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK | LC(067-107) | 4599.1792 | 0.2 | 1 |
| 84.5 | 4755.2888 | 6157193 | 0.61 | SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIKR | LC(067-108) | 4755.2803 | 1.8 | 2 |
| 82.2 | 2101.1217 | 3894068 | 0.39 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLK | LC(108-126) | 2101.1208 | 0.4 | 1 |
| 84.0 | 1945.0220 | 32666390 | 3.24 | TVAAPSVFIFPPSDEQLK | LC(109-126) | 1945.0197 | 1.2 | 0 |
| 90.2 | 3666.8789 | 1457746 | 0.14 | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR | LC(109-142) | 3666.8756 | 0.9 | 1 |
| 85.5 | 1739.8676 | 23403588 | 2.32 | SGTASVCLLNNFYPR | LC(127-142) | 1739.8665 | 0.6 | 0 |
| 75.9 | 2676.2628 | 852142 | 0.08 | VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK | LC(146-169) | 2676.2627 | 0.0 | 1 |
| 80.0 | 4160.0087 | 11663837 | 1.16 | VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK | LC(146-183) | 4160.0033 | 1.3 | 2 |
| 79.7 | 4766.2746 | 403170 | 0.04 | VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYK | LC(146-188) | 4766.2683 | 1.3 | 3 |
| 78.8 | 3618.7073 | 16391463 | 1.63 | VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK | LC(150-183) | 3618.7021 | 1.5 | 1 |
| 78.6 | 4224.9705 | 725845 | 0.07 | VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYK | LC(150-188) | 4224.9670 | 0.8 | 2 |
| 77.3 | 4490.1265 | 478190 | 0.05 | VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHK | LC(150-190) | 4490.1209 | 1.3 | 3 |
| 78.9 | 6290.0188 | 328711 | 0.03 | VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK | LC(150-207) | 6290.0085 | 1.6 | 4 |
| 79.0 | 1501.7515 | 2071466 | 0.21 | DSTYLSSTLTLTK | LC(170-183) | 1501.7512 | 0.2 | 0 |
| 74.0 | 2689.3218 | 547667 | 0.05 | ADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK | LC(184-207) | 2689.3170 | 1.8 | 2 |
| 73.4 | 2083.0562 | 6116953 | 0.61 | HKVYACEVTHQGLSSPVTK | LC(189-207) | 2083.0521 | 2.0 | 1 |
| 75.3 | 1817.8988 | 25691042 | 2.55 | VYACEVTHQGLSSPVTK | LC(191-207) | 1817.8982 | 0.3 | 0 |

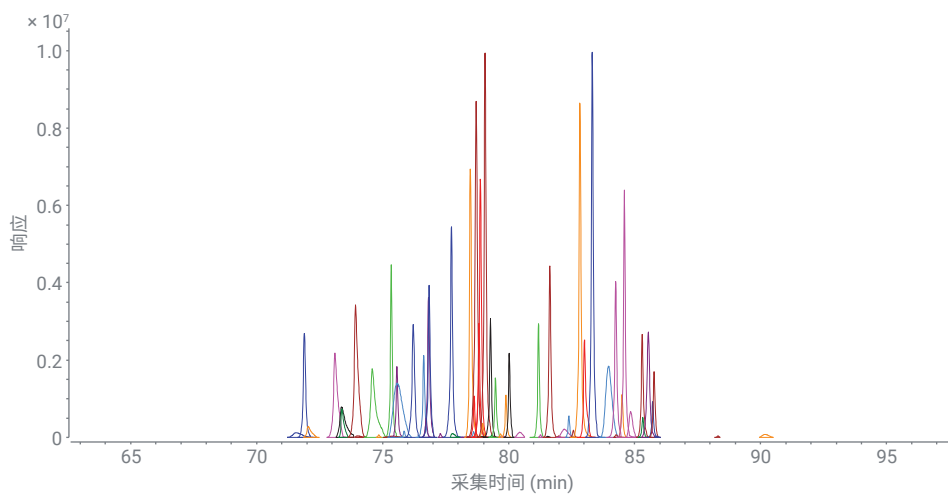


图 4. 通过在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中 MS 鉴定肽段的 RPLC/MS 化合物色谱图的叠加图

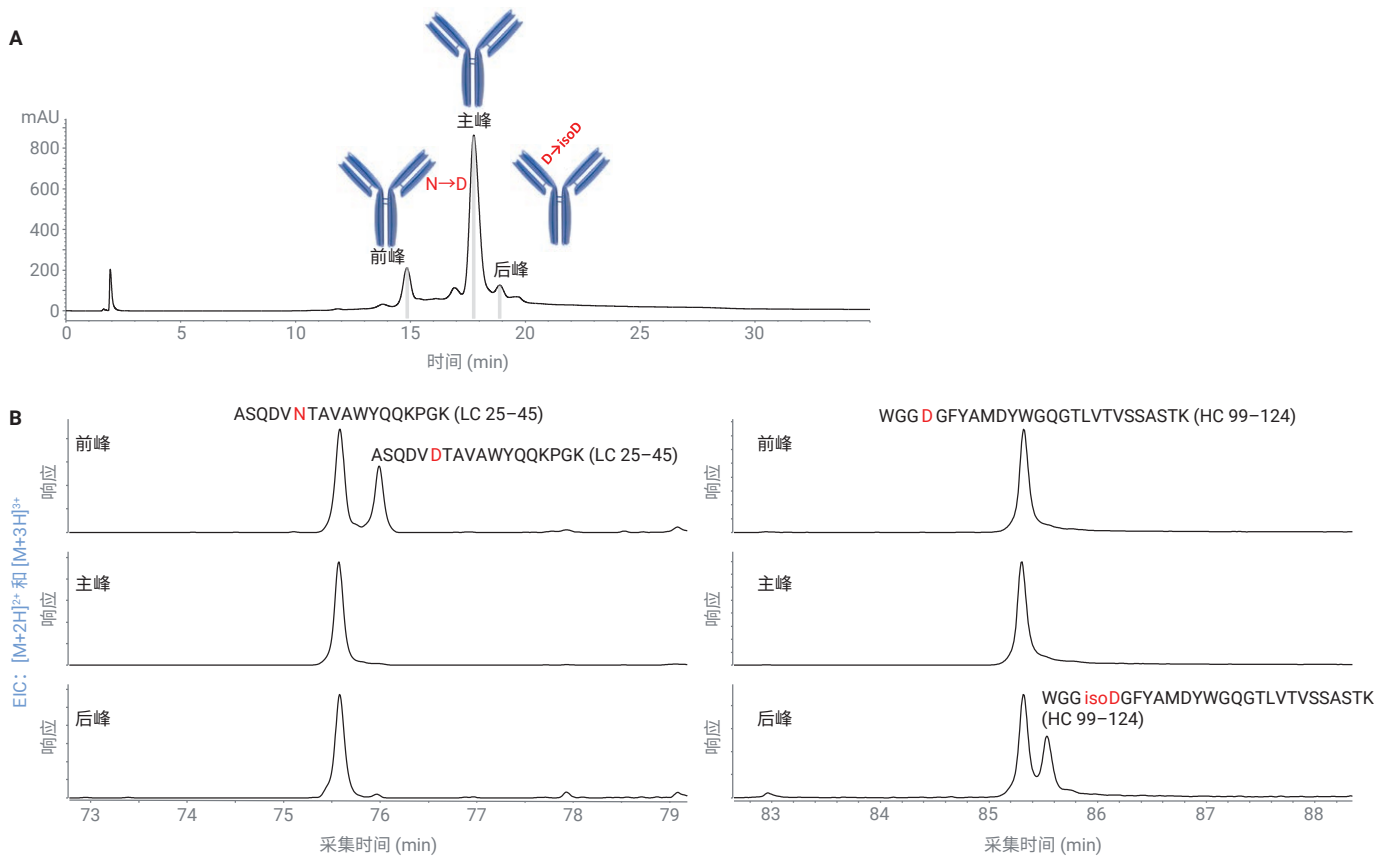


图 5. 曲妥珠单抗 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析。轻链肽段 ASQDV^NTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDV^DTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 WGG^DGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 和异构化重链肽段 WGG^{isoD}GFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 的 (A) CEX 色谱图和 (B) 提取离子色谱图

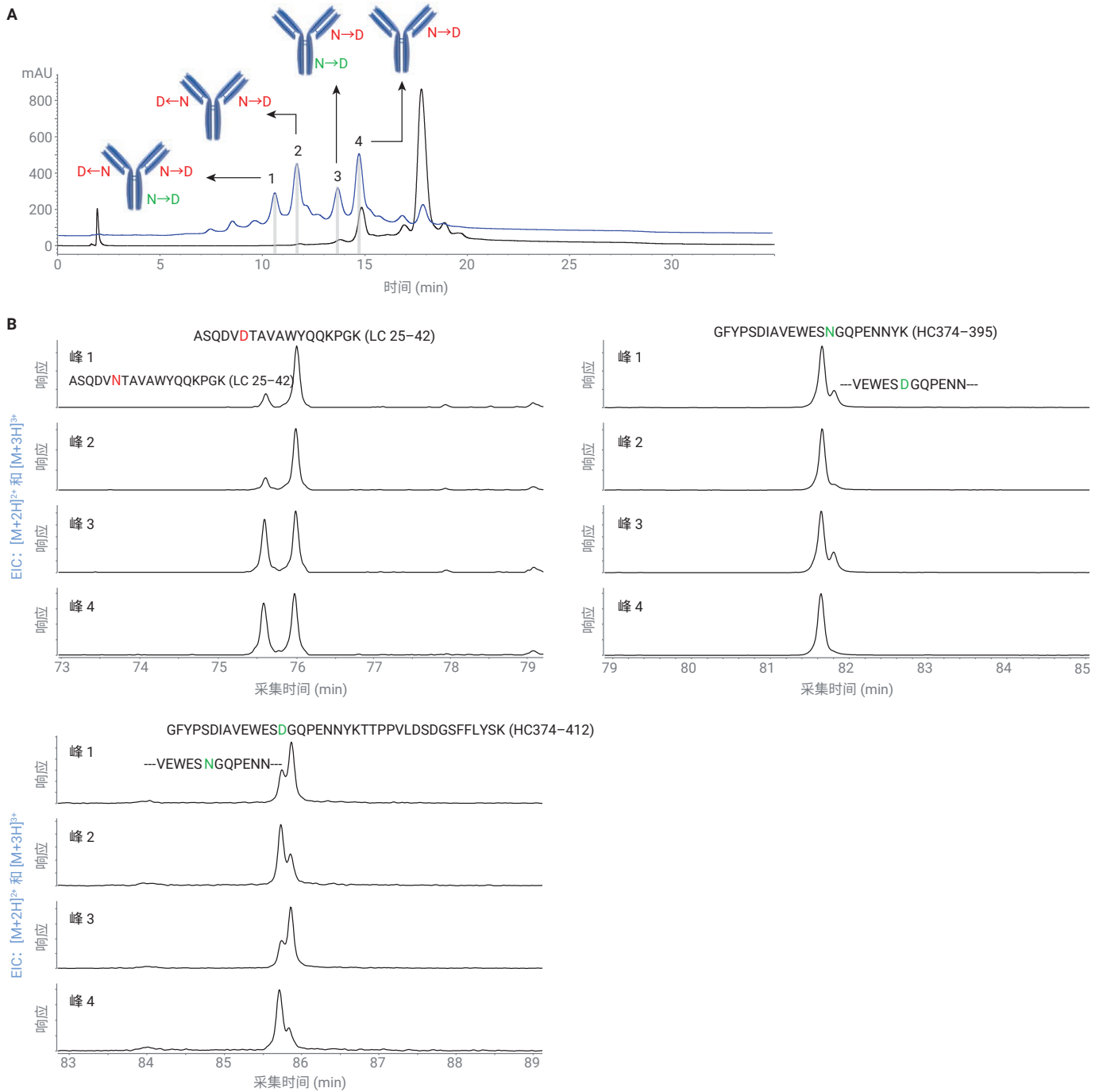


图 6. 高 pH 处理曲妥珠单抗 CEX 峰 1、2、3 和 4 的在线肽谱分析。(A) 未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 色谱图的叠加图, (B) 轻链肽段 ASQD**V****N**TAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQD**V****D**TAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 GFYPSDIAVEWES**N**GQPENNYK (HC 374-395)、脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYK (HC 374-395)、重链肽段 GFYPSDIAVEWES**N**GQPENNYK**T**TPPLDSDGSFFLYSK (HC374-412) 和脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYK**T**TPPLDSDGSFFLYSK (HC 374-412) 的提取离子色谱图

结论

我们介绍并成功应用完全自动化的 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析）对在未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 谱图中观察到的酸性和碱性异构体进行了表征。该多维系统基于 InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 6545 LC/Q-TOF 系统。通过在第一维中用 Protein A 亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱等代替 CEX，可以轻松配置这种 4D-LC/MS 设计的不同形式。

参考文献

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992–1000
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233–245
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51–60
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307–8315
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 119–130
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN，**2016**
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119–2125
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896–14903
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma. 2019.460740
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography (通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5273EN，**2014**

更多应用简报

| 出版号 | 标题 |
|---------------|--|
| 5991-7442CHCN | 从 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪到 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪的无缝方法转移 |
| 5991-5273EN | 通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体 |
| 5991-5274EN | 通过阳离子交换色谱表征 Fab 和 Fc 片段 |
| 5991-0895CHCN | 应用 Agilent Bio MAb 5 μm 色谱柱对完整的和 C 端消化的 IgG1 进行分析 |
| 5990-9629CHCN | pH 梯度洗脱用于改善单克隆抗体电荷异构体的分离 |
| 5991-1407EN | 使用 pH 梯度阳离子交换色谱对单克隆抗体中的电荷异质性进行高分离度分析 |
| 5991-1408EN | 使用经安捷伦缓冲液顾问软件计算的复合缓冲系统的 pH 梯度进行蛋白质分离 |
| 5991-4722EN | 缩短单克隆抗体电荷异构体分析的周期时间 |
| 5991-3365EN | 使用缓冲液顾问软件生成的 pH 梯度以及在线 pH 和电导率监测功能简化 mAb 电荷异构体分析方法的优化 |
| 5990-9270EN | 使用阳离子交换色谱通过安捷伦 3 μm 离子交换色谱柱分离蛋白质标准品 |
| 5990-9614CHCN | 通过阴离子交换色谱法进行蛋白质分析 |
| 5991-5221EN | 2AB 标记 N-糖的电荷分析 |

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

安捷伦客户服务中心：

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

DE44368.386099537

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

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，2021
2021年4月23日，中国出版
5994-0034ZHCN

