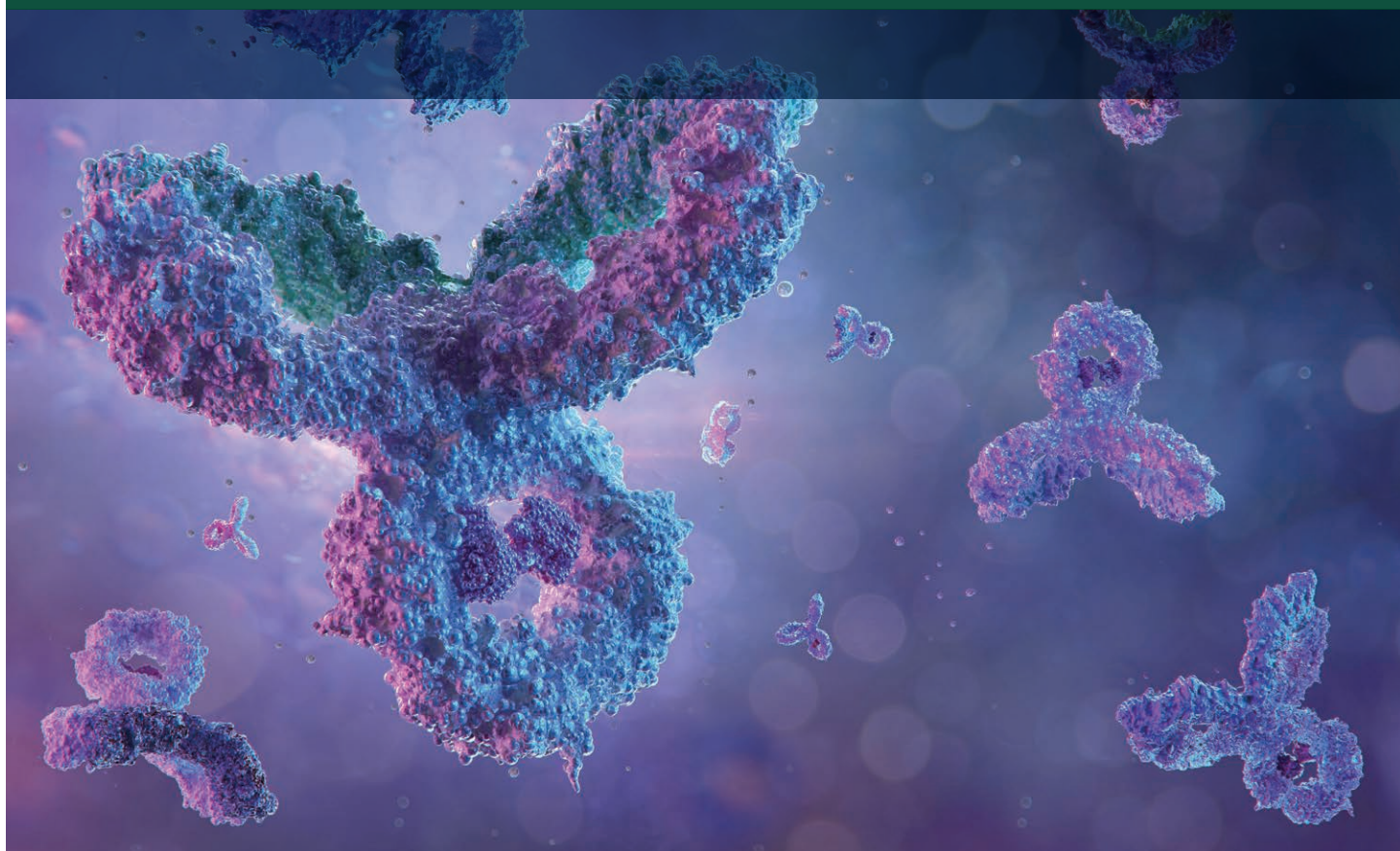


安捷伦生物色谱柱

完整蛋白质和亚基纯度

应用文集



目录

背景	2
入门指南	3
精选应用简报	5
监测产品相关的 mAb 片段 — 5994-3021ZHCN	5
测定半胱氨酸连接的 ADC 中的药物/抗体分布 — 5991-7192EN	11
对完整和还原态治疗性单克隆抗体 (mAb) 进行快速的高分离度分析 — 5991-6274EN	15
利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 二苯基亚 2 µm 色谱柱分析 IgG1 中的二硫键 — 5991-1694CHCN	20
便捷、可靠地分析抗体药物偶联物 — 5994-3522EN	25
高盐 — 高重现性 — 5994-2691ZHCN	29
AdvanceBio HIC：用于单克隆抗体 (mAb) 异构体分析的疏水性 HPLC 色谱柱 — 5994-0199ZHCN	34
更多应用简报	40

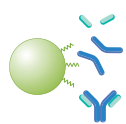
完整蛋白质和亚基纯度

背景

反相色谱仍然是色谱工作者“武器库”中最有价值的工具之一。这是一种广为人知的技术，依赖于分析物和固定相之间的疏水相互作用。对于完整蛋白质，该技术使用有机溶剂梯度作为流动相，通常使用离子对试剂。在这些条件下，分子很可能发生变性。这是一种灵敏的分析技术，因为样品保留在色谱柱上得到浓缩，且适用于质谱分析。因此，该技术适用于测定完整蛋白质的精确质量。

对于大分子蛋白质（例如单克隆抗体），甚至对于较小的片段（例如重链和轻链或 IgG 分子的 Fab 和 Fc 区域），推荐使用大孔径色谱柱。安捷伦提供多种配置的 300 Å 和 450 Å 产品，包括全多孔、采用表面多孔颗粒的 Poroshell 技术以及一系列烷基键合相。键合相通常具有较短的碳链长度（C8 或 C4/C3）或具有更多独特的配体，例如可提供不同选择性的二苯基。

由于反相色谱分析准确度高，因此可以使用完整蛋白质和片段分析来比较生物治疗药物的生物仿制药与原研药。然而，始终需要执行额外的测试以鉴定可能检出的不同异构体的具体位置。



完整蛋白质和 亚基纯度

大分子色谱 (> 150 Å)

广泛的选择性满足每一次分离要求

AdvanceBio RP-mAb

单克隆抗体的理想选择

属性	优势
孔径 450 Å, 表面多孔颗粒	适用于高分离度 mAb 分离的出色设计
更长的色谱柱寿命	更低的运行成本

ZORBAX RRHD 300 Å 1.8 µm

UHPLC 分离

属性	优势
最大压力 1200 bar	可兼容 UHPLC
1.8 µm 颗粒	超高分离度

PLRP-S*

适用于质谱检测的理想的甲酸性能

属性	优势
无硅醇基相互作用的 聚合物填料	更出色的峰形、更优异的 回收率和更低的残留
耐用的弹性填料	在更长的寿命期获得可重 现的结果

* 提供带 PEEK 内衬的不锈钢硬件

入门指南

选择用于完整蛋白质分析的反相色谱柱时需要考虑多个相互关联的因素：样品分子量和最适合的填料孔径，色谱柱固定相，所用的仪器（特别是检测器的类型），流动相条件，以及速度或通量要求等。

分析物分子越大，则需要越大的孔径。除一些例外情况，用于完整蛋白质分析的孔径通常为 300–500 Å。根据经验，孔径至少应为蛋白质流体动力学半径的三倍。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱具有 450 Å 的孔径，ZORBAX RRHD 300 Å、ZORBAX 300SB 和 Poroshell 300 均具有 300 Å 的孔径，而 PLRP-S 提供多种孔径。虽然 1000 Å 的 5 µm PLRP-S 色谱柱孔径明显大于常用于完整蛋白质分析的色谱柱，但是该色谱柱可为完整蛋白质和蛋白质片段分析提供优异的结果。

对于反相色谱柱，选择色谱柱固定相的通用指南是，分子量越大，使用的烷基链应越短。因此，C18 色谱柱常用于多肽分析，而 C8、C4 和 C3 色谱柱常用于完整蛋白质分离。除线性烷基链以外，AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX RRHD 300 和 ZORBAX 300SB 色谱柱可提供二苯基固定相。有时，二苯基固定相的不同选择性可提供所需的分离。PLRP-S 是一种聚合物填料而不是硅胶基填料。它提供典型的反相分离以及略有不同的选择性和宽 pH 耐受性。

可用的仪器决定了能够达到的最大压力。当然可以在支持 1200 bar 的 UHPLC 上使用最大耐压为 600 bar 的色谱柱。但是应注意不要使色谱柱超压，否则会导致色谱柱过早发生故障。在安捷伦反相产品组合中，ZORBAX RRHD 色谱柱的最大反压为 1200 bar，因此可用于高速、高压分离。

在考虑仪器和反压能力时，需要考虑是否要将正在开发的方法转移至具有不同的最大反压的另一套液相色谱系统。如果需要这样做，则开发能够在所有平台上运行的方法将更经济、省时。

检测器选择通常与流动相条件有关。对于蛋白质分离，通常需要决定使用紫外检测还是质谱 (MS)。传统上，紫外检测使用三氟乙酸 (TFA) 作为离子对试剂进行分离，而质谱检测优选甲酸。TFA 通常用于紫外检测是因为它在硅胶基色谱柱上可获得出色的峰形，但是它会导致质谱分析发生离子抑制。甲酸可保留 MS 灵敏度，但在硅胶基色谱柱上无法获得理想的峰形，因此，对于甲酸流动相，推荐使用聚合物型 PLRP-S 色谱柱。通过对各方面因素的权衡，也可以在硅胶基色谱柱上使用甲酸流动相，或在质谱分析中使用 TFA。采用紫外检测时，使用甲酸或 PLRP-S 也没有任何问题。

水/乙腈梯度常用于完整蛋白质和单克隆抗体片段的反相分离，并且通常适用于安捷伦反相色谱柱。在某些分离情况下，不同的有机溶剂（例如甲醇或异丙醇）可能会为选择性带来有利改变。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱使用含有异丙醇、乙腈和水的有机流动相时可提供出色结果。应用简报 5991-6274EN 提供了有关此色谱柱和流动相配对的更多详细信息。

AdvanceBio 脱盐反相产品为在线脱盐提供了小柱形式的基于 PLRP-S 的方法。该小柱通常在质谱分析之前使用，但也可与紫外检测配合使用以及用于在进行后续分析之前对脱盐样品进行馏分收集。

监测产品相关的 mAb 片段

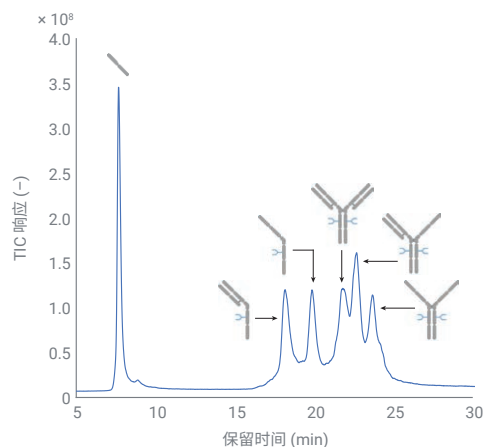
使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行完整蛋白质分析如何实现低分子量物质的 UV 和 MS 检测

作者

André Feith
安捷伦科技有限公司

摘要

普遍认为低分子量 (LMW) 或高分子量 (HMW) 物质等产品相关杂质是治疗性单克隆抗体 (mAb) 产品的关键质量属性 (CQAs)，需要在整个药物生产过程中进行监测。本应用简报基于 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统结合带 PEEK 内衬的 Agilent PLRP-S 色谱柱的卓越性能，开发了一种 RPLC 方法。通过分析 NISTmAb 的还原重链和轻链，即使梯度斜率非常平缓的情况下，也可观察到出色的相对保留时间和面积偏差。方法开发后，两条重链 (H2) 或两条重链一条轻链 (H2L) 等所有相关 LMW 片段均可得到分离与检测。得益于与 UV 和 MS 检测器的依次联用，该方法可用于生物药物生产链的多个领域。该方法也可作为 SDS-PAGE/CE-SDS 的替代方法，在一次运行中分析两种 CQAs — LMW 物质以及翻译后修饰 (PTMs)。



前言

mAbs 是生物药物中一类主要的产品，已成功用于各类疾病的治疗^[1]。这些生物分子具有保守的异四聚体结构，由两条重链和两条轻链通过二硫键连接组成。在生产过程中或储存不当时，可能会形成某些产品相关杂质，如低分子量 LMW 物质（见图 1）或高分子量 HMW 物质（如抗体二聚体）。即使经过大量纯化步骤，这些杂质也可能仍会存在，因此有必要将它们作为药品的 CQA 进行监测。抗体二聚体、三聚体或多聚体等 HMW 物质可通过体积排阻色谱 (SEC) 和 UV 检测进行常规分析和分离^[2]。SEC 与 MS 检测联用，可用于进一步表征杂质的相关分子量和 PTMs^[3]。重链 (H)、轻链 (L) 或 H2L 片段等 LMW 物质可通过毛细管电泳-十二烷基硫酸钠 (CE-SDS) 进行分析^[4]。遗憾的是，由于 SDS 引起的高离子抑制，CE-SDS 无法与 MS 检测联用，因此 LMW 物质的推测鉴定通常根据经验知识进行。本应用简报基于 1290 Infinity II 生物液相色谱系统和带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的出色性能，展示了 mAbs 的 LMW 物质的另一种分析方法。由于采用了反相液相色谱 (RPLC) 模式，NISTmAb 的所有相关还原诱导 LMW 片段均可通过 UV 和 MS 进行检测，以根据需要用于常规或深入分析。

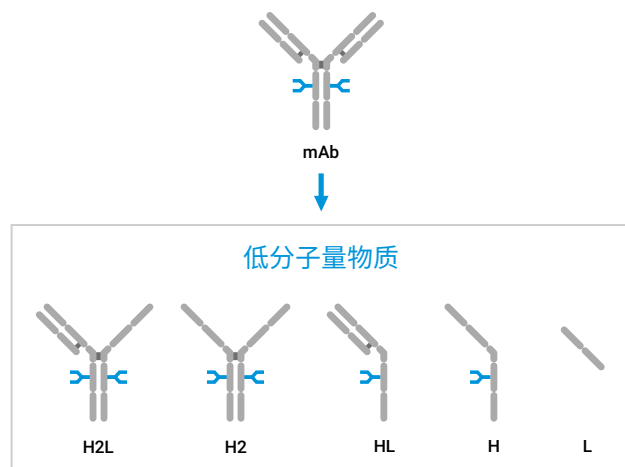


图 1. 单克隆抗体 (mAb) 的还原诱导 LMW 物质产生的示意图。缩写：H2L（两条重链和一条轻链）、H2（两条重链）、HL（一条重链和一条轻链）、H（重链）和 L（轻链）

实验部分

设备

与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的 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)，配备一个标准流速
- Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD)(G7114B)，配备生物微量流通池（用于 VWD，3 mm，2 μ L，RFID）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00 或更高版本)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (10.0 或更高版本)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 或更高版本)

色谱柱

Agilent PLRP-S 5 μ m 1000 Å, 2.1 $\times$ 100 mm，带 PEEK 内衬
(部件号 PL1912-2502PK)

化学品

使用 Agilent InfinityLab 超纯 LC/MS 乙腈（部件号 5191-4496）和 Agilent-NISTmAb（部件号 5191-5744）。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)。DL-二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。

样品前处理

将 40 µg NISTmAb 与 1 mmol/L DTT 在棕色玻璃样品瓶中孵育，4 °C 下直接置于 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中，可实现 NISTmAb 的部分还原。将 40 µg NISTmAb 与 10 mmol/L DTT 在 60 °C 下孵育 30 分钟，可实现重链 (H) 和轻链 (L) 的完全还原。进样浓度为 1 mg/mL NISTmAb 或还原 NISTmAb。

方法

表 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的液相色谱方法

参数	值
色谱柱	Agilent PLRP-S 5 µm 1,000 Å, 2.1 × 100 mm, 带 PEEK 内衬
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min – 25% B 9.00 min – 30% B 34.00 min – 38% B 34.01 min – 100% B 36.00 min – 100% B 36.01 min – 25% B 40.00 min – 25% B
流速	0.400 mL/min
温度	60 °C, 装有热平衡装置
紫外检测	VWD: 280 nm, 10 Hz/MS: 见表 2
进样	进样量: 0.3 µL 样品温度: 4 °C 清洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 分析完整 NISTmAb 和相应 LMW 物质的离子源和质谱参数

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
气体温度	350 °C
干燥气流速	12 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	180 V
锥孔电压	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
采集模式	正离子, 扩展 (m/z 10000) 质量数范围
质量数范围	m/z 100–10000
采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	m/z 922.0098

结果与讨论

从制造到质量控制的整个生产过程中，对生物药物的分析都需要液相色谱系统尽可能提供出色性能。为评估 1290 Infinity II 生物液相色谱系统在 mAb 片段分析方面的性能，利用 DTT 将 NISTmAb 完全还原成 H 和 L 片段。图 2 展示了七次连续进样获得的相对保留时间和峰面积标准偏差 (RSD)。结果表明，1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的保留时间和峰面积精度出色，非常适合以平缓梯度分析 mAb 抗体片段。尽管液相色谱方法由两个线性梯度步骤组成（斜率分别为 0.32% 和 0.55% B/min），但保留时间和峰面积精度的 RSD 值仍较低，前者为 0.190% (L) 和 0.056% (H)，后者为 0.530% (L) 和 0.744% (H)。

采用 RPLC 分析 LMW 物质时的一大挑战是由于它们的疏水性与实际 mAb 相似，因此对 H2 或 H2L 等抗体片段的分离能力有所欠缺。这些片段可以在发酵过程中产生，也可以由最终产品发生部分还原得到。而这些片段也可通过少量 DTT 或降温的方式经过一定时间的部分还原而人工生成。利用这项技术，开发了一种基于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的 RPLC 方法。

图 3 的色谱图显示了 NISTmAb 在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中的动态还原情况。由于添加了 DTT，图 1 所示的所有相关 mAb 片段均实现很好的分离和随时间的变化。尤其是 H2、H2L 片段和 NISTmAb 在 RPLC 中实现了非常出色的分离，因此带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的结合是分析 LMW 的理想方法。得益于 RPLC 模式，1290 Infinity II 生物液相色谱系统可轻松与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用，MS 数据可在 Agilent MassHunter BioConfirm 软件中进行分析。解卷积后，各片段的主要糖型如图 3 所示。NISTmAb 的特征性糖基化表明，该方法可轻松分析不同片段的 PTMs。此外，图 4B 所示为 mAb 峰周围聚集片段的代表性离子的提取离子色谱图 (EIC)。得益于带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱的出色分离能力，这些 EICs 也具有好的峰形。

由于仪器设置依次包括 1290 Infinity II 可变波长检测器和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，因此可在一次运行中同时进行 UV 和 MS 检测，几乎无谱带展宽，并可轻松完成过程开发到质量控制的方法转移（图 4A）。

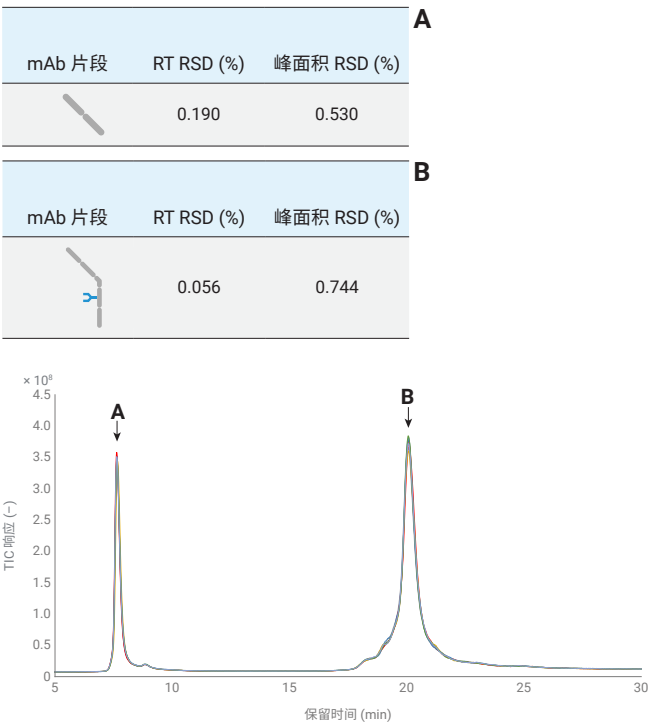


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析 NISTmAb 还原生成的重链和轻链片段的相对保留时间和峰面积精度值 (RSD, n = 7)

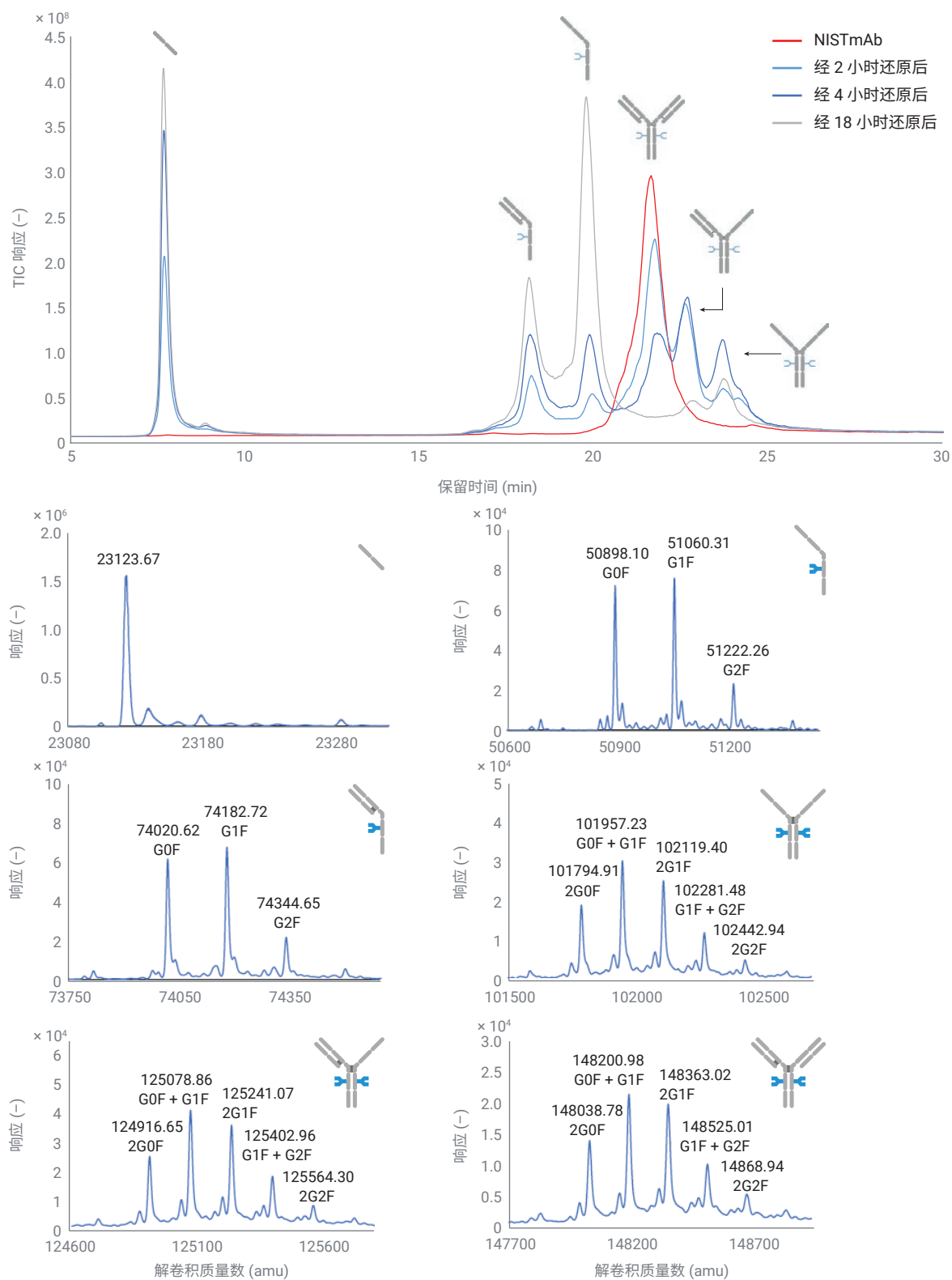


图 3. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测的 NISTmAb 部分动态还原的色谱图。各片段的相应提取质谱图显示出 NISTmAb 的特征性糖基化

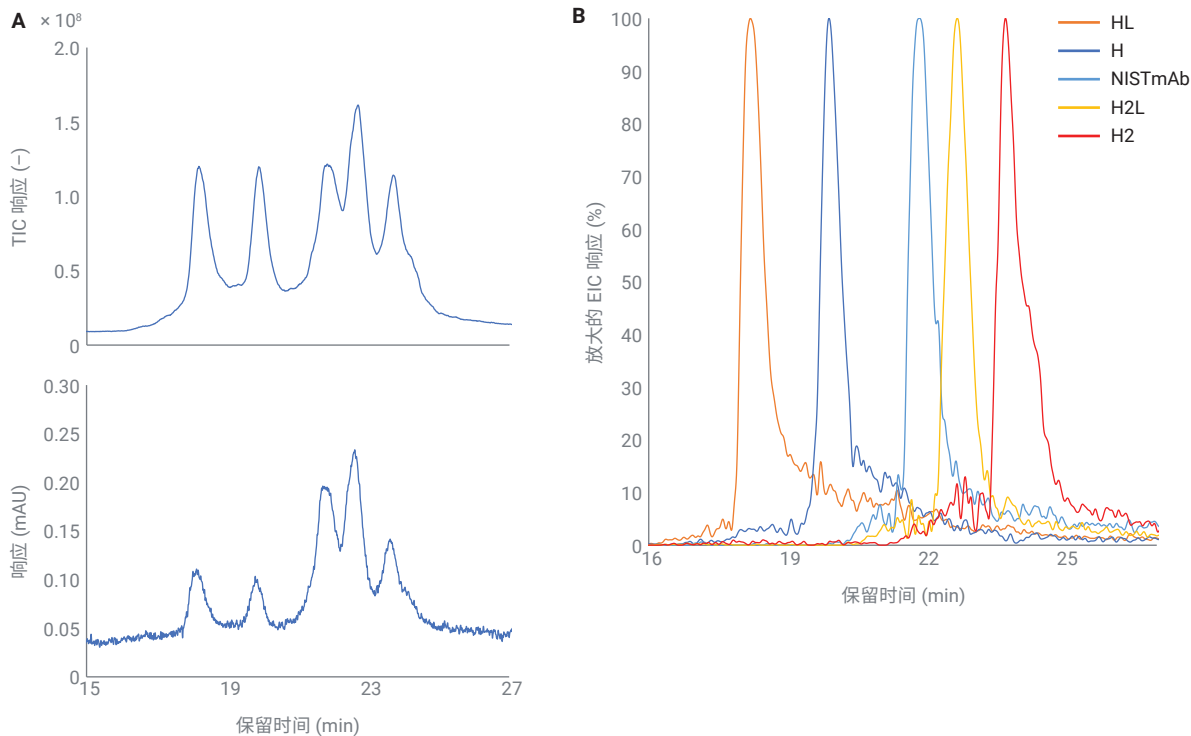


图 4. 一次运行中获得的 NISTmAb 周围聚集片段的 MS 和 UV 谱图 (A)。NISTmAb 片段的提取离子色谱图，展现出出色的峰形 (B)

结论

传统 SDS-PAGE 和现代等效的 CE-SDS 均广泛应用于 LMW 和 HMW 物质等产品相关杂质的分析。然而，利用这些方法鉴定 LMW 物质结构一直面临着挑战，且主要基于经验知识。本应用简报介绍了一种 RPLC 方法，该方法能够分离 NISTmAb 所有相关还原诱导 LMW 物质。基于重链和轻链片段分析结果，1290 Infinity II 生物液相色谱系统展现出出色的保留时间和峰面积精度值。在 1290 Infinity II 生物 Multisampler 中对 NISTmAb 进行动态还原，随后用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行检测，这一系列操作展现了该方法分析翻译后修饰的潜力。与片段分析相结合时，这种能力可加速生物药物的发展。这就是在生产工艺到最终质量控制的生物药物分析过程中，带 PEEK 内衬的 PLRP-S 色谱柱和 1290 Infinity II 生物液相色谱系统能够适应未来需求的原因。

参考文献

1. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000
2. Nägele, E. 提升 mAb 聚集体分析性能：使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2709ZHCN，**2020**
3. Vandenheede, I. et al. SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs (SEC 与高分辨率质谱联用系统用于 mAbs 和 ADCs 的详细表征)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-0303EN，**2018**
4. Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620

测定半胱氨酸连接的 ADC 中的药物/抗体分布

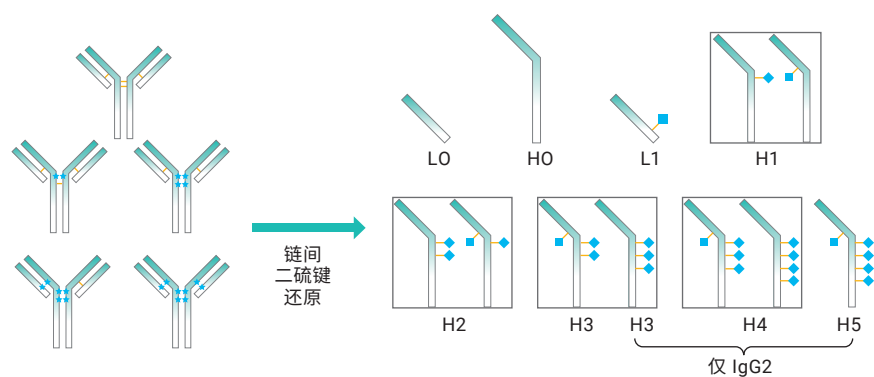
分析 IgG1 和 IgG2 亚类的 ADC

作者

Lily Liu
Agensys, Inc.
Santa Monica, CA, US
Andy Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报展示了在药物/抗体比率测定过程中使用亚 2 μm 反相色谱柱获得了更出色的分离度和准确度。在本研究中，测定了来源于 IgG1 和 IgG2 亚类的抗体中间体的抗体药物偶联物的药物/抗体比率。



前言

抗体药物偶联物 (ADC) 代表了一类快速增长的抗癌治疗药物，此类药物使用共价键与化学稳定键将抗体的特异性与化学治疗剂的效价相结合。ADC 领域不断扩展，人们正在开发越来越多的偶联技术。一类主要的 ADC 包括与半胱氨酸残基的偶联，该半胱氨酸残基通过马来酰亚胺键形成链间二硫键。与效价直接相关的 ADC 的主要关键质量属性之一是药物/抗体比率 (DAR)。每个抗体可以偶联最多 8 或 12 个药物连接物，这取决于 IgG 抗体亚类^[1]。

疏水相互作用色谱 (HIC) 是测定偶联物分布并计算由 IgG1 mAb 生产的 ADC 的 DAR 的常用方法。然而，由于位置异构体和可变偶联物之间的不完全分离，通过 HIC 监测由 IgG2 mAb 生产的 ADC 的偶联物分布和 DAR 极具挑战性。反相 (RP) 色谱可用作一种替代或正交技术，用于在还原链间二硫键后测定 ADC 的 DAR。使用这种技术，可以通过实验由未偶联和偶联的轻链和重链的分布计算 DAR。对于由 IgG2 抗体生产的 ADC，RP 是一种更合适的方法。这是因为未偶联和可变偶联的轻链和重链之间的洗脱由偶联的药物连接物的数量决定，而与偶联位点无关。

在这些应用中，适用的 HIC 和 RP 色谱柱有限。本应用简报介绍了使用 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱表征未偶联和可变偶联的轻链和重链的分布，并用于测定平均 DAR。本文介绍了适用于由 IgG1 和 IgG2 抗体生产的 ADC 的 RP UHPLC 方法。与使用常见 HPLC 色谱柱的方法相比，ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱改善了峰分离度，并得到了未偶联和偶联的轻链和重链的相似分布以及相似 DAR。

材料与方法

试剂、样品与材料

由完整的人 IgG1 和 IgG2 抗体中间体生产的 ADC 为专有产品。DL-二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Thermo Scientific (Pierce NoWeigh DTT)。所有溶剂均为 HPLC 级并且购自 VWR 或 Fisher Scientific。

样品在其各自的制剂缓冲液 (pH 5–6) 中稀释至 5 mg/mL，并用 1 mol/L tris (pH 9) 将 pH 调节至约 8。通过在 37 °C 下在 40 mmol/L DTT 中孵育 15 分钟来实现链间二硫键的部分还原。冷却至室温后，用含 2% 甲酸的 50% 乙腈按照 1:1 的比例稀释还原后的样品以淬灭还原反应。

UHPLC 方法

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8, 50 mm × 2.1, 1.8 µm
其他色谱柱	Vydac 214MS, C4, 2.1 × 50 mm, 5 µm, 300 Å Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 µm, 1,000 Å
流动相	A) 0.1% TFA 水溶液 B) 含 0.08% TFA 的 90% ACN
柱温	80 °C (IgG1) 70 °C (IgG2)
柱后冷却器	35 °C
进样量	2 µL (IgG1) 3 µL (IgG2)
流速	1 mL/min (IgG1) 0.8 mL/min (IgG2)
检测	UV, 214 和 280 nm
自动进样器温度	10 °C
IgG1 梯度	时间 (min) %B 0 34.5 3 38.0 5.5 38.5 25 55.0 25.1 75.0 26 75.0 26.1 34.5 后运行时间: 4 min
IgG2 梯度	时间 (min) %B 0 30.0 3 30.0 21 45.0 21.1 75.0 22 75.0 22.1 30.0 后运行时间: 2 min

仪器

配备 DAD 检测系统的 UHPLC 购自外部供应商。

用于 UHPLC 分析的同等级仪器为 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，该仪器系统预期可提供相当或更出色的性能

峰归属

通过将 UHPLC 与在线质谱联用来确认峰归属（数据未示出）。主峰对应于未偶联和可变偶联的轻链和重链。作为拖尾肩峰从主峰洗脱的峰被鉴定为具有一个或多个还原的链内二硫键。观察到对应于偶联的重链的多个峰具有相同的质量数，并且被鉴定为位置异构体，其中药物连接物偶联于不同的半胱氨酸残基。

DAR 计算

使用公式 1 根据 UV 色谱图的分析结果计算 DAR 值。

$$\text{DAR} = 2 \left(\sum_{n=0}^1 \frac{\text{LC 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}} + \sum_{n=0}^1 \frac{\text{HC 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 HC 峰面积}} \right)$$

公式 1

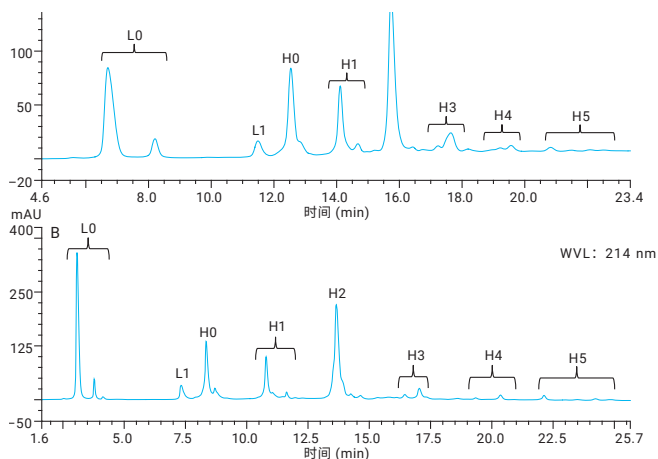


图 1. 在半胱氨酸偶联的 IgG2 ADC 分析中，使用 C4 HPLC 色谱柱 (A) 和 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 (B) 获得的还原 RP 曲线的比较

结果与讨论

图 1 比较了使用传统 C4 HPLC 色谱柱和 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱获得的由 IgG2 mAb 中间体生产的 ADC 的反相色谱图。通过使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱的 UHPLC 方法获得的色谱图中，观察到的色谱峰更尖锐，并且相比于 C4 HPLC 色谱柱表现出更出色的分离度。使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱实现的峰分离能够提高色谱峰积分的准确度，因此计算得出的 DAR 值高出 0.1。

图 2 展示了使用 Agilent PLRP-S 色谱柱和 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱分析得到的由 IgG1 mAb 生产的还原态 ADC 的 RP 色谱图。与 PLRP-S HPLC 色谱柱相比，在 ZORBAX RRHD 300SB-C8 色谱柱上实现的未偶联和偶联的轻链和重链的分离产生了更尖锐的峰，并改善了微量物质的分离度。根据使用 ZORBAX RRHD 色谱柱得到的结果计算的 DAR 值比 PLRP-S 色谱柱得到的结果高 0.1。该差异可归因于更准确的峰积分。

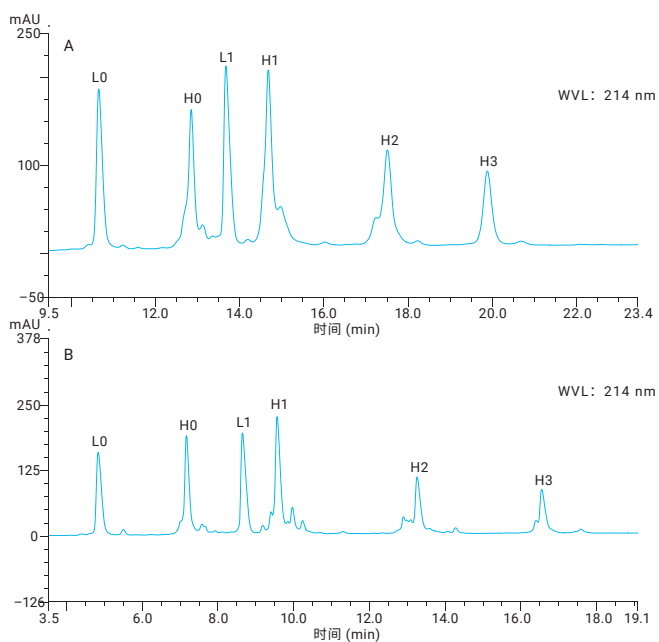


图 2. PLRP-S HPLC (A) 与 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 的比较。半胱氨酸偶联的 IgG2 ADC 的 1.8 μm (底部) 曲线

分布与 DAR 值

表 2 展示了 ZORBAX RRHD 色谱柱和两种不同的 HPLC 色谱柱得到的未偶联和偶联的轻链和重链的分布以及计算得出的平均 DAR。使用由 ZORBAX RRHD 色谱柱获得的结果计算得出的相对峰面积及相应的 DAR 值与使用 HPLC 色谱柱测得的值相似。使用亚 2 μm 色谱柱的主要优势在于峰分离度得到改善。这一改善的分离度有利于在使用 HPLC 色谱柱时获得与主峰共洗脱的微量物质的更出色的分离。本应用简报中使用的梯度还可用于通过 LC/MS 检测样品稳定性的微小变化，并对较小的峰进行表征。另外，ZORBAX RRHD 色谱柱更高的峰分离度和压力兼容性支持开发较短的梯度以实现高通量检测。

结论

反相方法可测定未偶联和偶联的轻链和重链的分布，并用于计算 ADC 的 DAR。结果表明，Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱适用于这些应用，可支持对来源于 IgG1 和 IgG2 抗体中间体的 ADC 进行表征。观察到从 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱洗脱的峰更尖锐，并且相比于纳入比较的 HPLC 色谱柱获得了更出色的分离。这一改善能够实现更准确的峰积分和相应的 DAR 值。由 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱实现的峰分离度的改善还可检测偶联位点位置异构体。结果表明，使用 ZORBAX RRHD SB300-C8 色谱柱的 RP 方法适用于表征部分还原的 ADC 的偶联物分布以代替疏水相互作用色谱或与疏水相互作用色谱正交使用。

参考文献

1. Wiggins, B.; *et al.* Characterization of Cysteine-Linked Conjugation Profiles of Immunoglobulin G1 and Immunoglobulin G2 Antibody-Drug Conjugates. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(4), 1362–1372

表 2. 使用 Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 与 HPLC 色谱柱得到的各种形态的相对峰面积和平均 DAR 值的比较

峰归属	IgG2 ADC		IgG1 ADC	
	% 利用 HPLC (C4)	% 利用 UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)	% 利用 HPLC (PLRP-S)	% 利用 UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)
L0	22.6	23.7	14.3	13.3
L1	2.3	3.4	15.6	17.7
H0	17.3	15.6	16.8	15.4
H1	12.5	13.1	26.2	27.8
H2	32.4	30.9	16.8	15.8
H3	7.4	8.1	10.5	10.0
H4	2.1	3.2	–	–
H5	3.3	2.2	–	–
DAR	3.5	3.6	3.6	3.7

对完整和还原态治疗性单克隆抗体 (mAb) 进行快速的高分离度分析

安捷伦生物惰性液相色谱系统和 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱

作者

M. Sundaram Palaniswamy

安捷伦科技有限公司

班加罗尔，印度

摘要

治疗性单克隆抗体 (mAb) 已成为针对许多疾病进行开发的治疗药物中增长最快的一类药物。新型 mAb 以每年 40 种的速度进入临床试验。此外，还迫切需要一种能够用于高通量分析大量样品以支持生物制药开发的分析方法。本应用简报介绍了一种快速、高分离度方法用于通过反相 HPLC 分析完整和还原态治疗性 mAb 创新药物和生物仿制药。使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统与 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4 和 Diphenyl 色谱柱实现分离。RP-mAb 色谱柱具有表面多孔 3.5 μm 颗粒以及 450 Å 的大孔径，与相同尺寸的全多孔颗粒填料相比，可提高分析准确度并缩短分析时间。该系统的生物惰性与高分离度、较短分析时间和高重现性的方法相结合，使其非常适合用于生物制药 QA/QC 分析。

前言

在生物仿制药开发过程中，评估生物仿制药与参比分子或创新药物分子之间的分子相似性至关重要。监管机构需要采用许多物理化学方法，其中涉及各种相似性评估项目。监管机构希望看到与之前的公司或创新药物公司提交的在各仪器平台上的相似性数据，主要包括高效液相色谱 (HPLC)、TOF、Q-TOF 质谱和毛细管电泳。HPLC 是一种通过体积排阻或离子交换测定完整蛋白质的成熟技术。然而，反相 (RP) 色谱固定相 (300 Å 的大孔径或具有短烷基链的熔融核颗粒填料) 领域的技术发展使其成为一种分析完整蛋白质的极具应用前景的工具^[1]。

过去，使用大孔径、全多孔颗粒 RP HPLC 分析 mAb 及其片段收效甚微。由于它们的大尺寸和有限的多样性，分析时间通常过于漫长，并且洗脱的 mAb 峰较宽，从而影响分离度。相比之下，高效表面多孔色谱柱可在几分钟内轻松高效地分离 mAb 及其片段。

在本研究中，我们证明了 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio RP-mAb 色谱柱适用于对完整的和片段化的治疗性创新药物和利妥昔单抗生物仿制药进行高分离度的快速分离。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱的独特设计可提供独特的选择性，因为其采用具有大孔径 (450 Å) 的表面多孔颗粒填料 (3.5 µm)。该色谱柱在分离速度和分离度方面具有明显优势，同时可与所有仪器兼容。

实验部分

设备

采用完全生物兼容且最大系统耐压为 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- 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 (G1316C, 选项 19)
- 配备 60 mm 最大光程高灵敏度流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B, 选项 33)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (部件号 799775-944)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (部件号 799775-904)

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。

软件

Agilent ChemStation B.04.03 (或更高版本)

反相 HPLC 参数

使用 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱进行完整和还原态 mAb 分析的色谱参数如表 1 所示。

表 1. 用于完整和还原态 mAb 分析的色谱参数

参数	HPLC (完整和还原态 mAb)	
流动相	A) 水 + 0.1% TFA	
	B) IPA:ACN:水 (70:20:10) + 0.09% TFA	
色谱柱	Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm	
	Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm	
梯度	时间 (min)	%B
	0	15
	0.5	25
	1.5	35
	1.51	35
	3.0	60
	4.0	60
后运行时间	2 min	
进样量	1 µL	
流速	1.0 mL/min	
TCC	80 °C	
紫外检测	220 和 280 nm	

试剂、样品与材料

利妥昔单抗创新药物和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。PBS 和三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP) 购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。乙腈和 2-丙醇购自 Lab-Scan 公司 (曼谷, 泰国)。对于完整和还原态 mAb 分析, 使用 PBS 将利妥昔单抗样品稀释至 2 mg/mL。

样品前处理

mAb 还原

为分离轻链和重链, 将一份 0.5 M TCEP 储备液加入 mAb 样品中, 使最终浓度达为 10 mmol/L。将混合物在 60 °C 下保持 30 分钟。

结果与讨论

具有表面多孔颗粒填料和大孔径的 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱可实现更高的分离度与更短的运行时间, 为生物药物发现、开发和 QA/QC 应用提供准确、可重现的单克隆抗体分析结果。与最高压力 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统相结合, 可用于 mAb 分离。流动相为异丙醇 (IPA)、乙腈 (ACN)、水和三氟乙酸 (TFA) 的混合物。图 1 和图 2 分别展示了完整利妥昔单抗创新药物和生物仿制药在 AdvanceBio RP-mAb Diphenyl (2.1 × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱和 AdvanceBio RP-mAb C4 (2.1 × 50 mm, 3.5 μm) 色谱柱上经优化的 RP HPLC 洗脱曲线, 证明能够在 4 分钟内实现快速分离并获得优异的峰形。图 1 和图 2 的对比结果表明, 在相同的色谱条件下使用不同的键合相可获得不同的选择性, 其中二苯基键合相可实现更细致的分离。

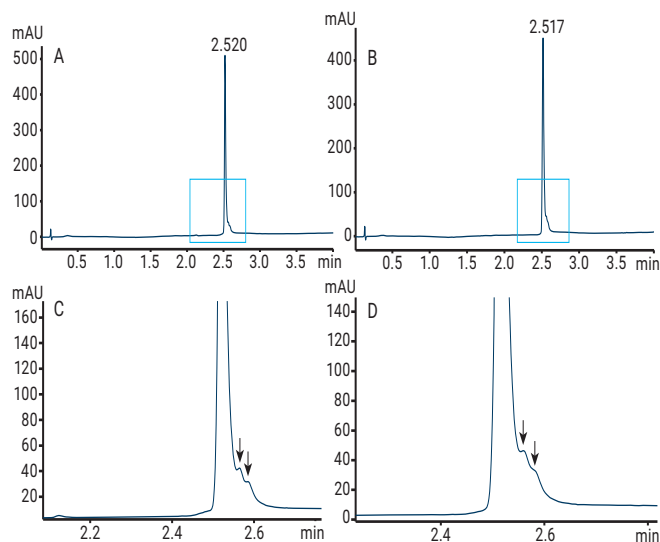


图 1. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上的 RP-HPLC 分析结果。C 和 D 为放大图

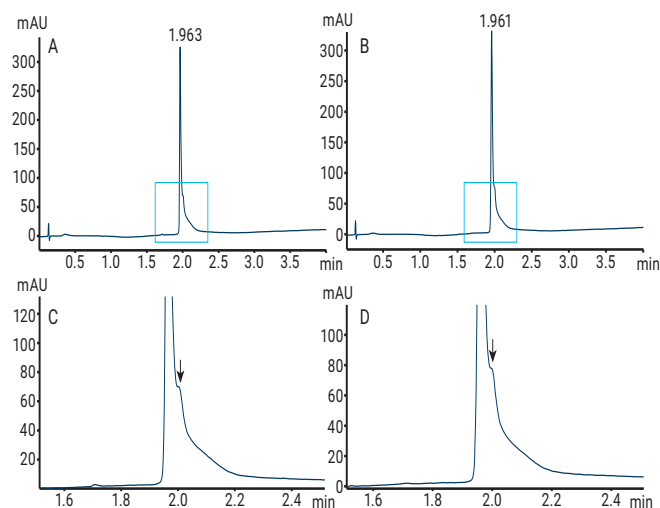


图 2. 完整利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。C 和 D 为放大图

还原态 mAb 分析

利用 TCEP 还原得到游离的抗体轻链和重链。AdvanceBio RP-mAb 色谱柱在抗体片段的快速、高分离度分离方面非常有效。图 3 和图 4 中的曲线分别展示了使用 C4 和二苯基键合相针对抗体片段分离进行优化的快速反相分析结果（约 4 分钟）。

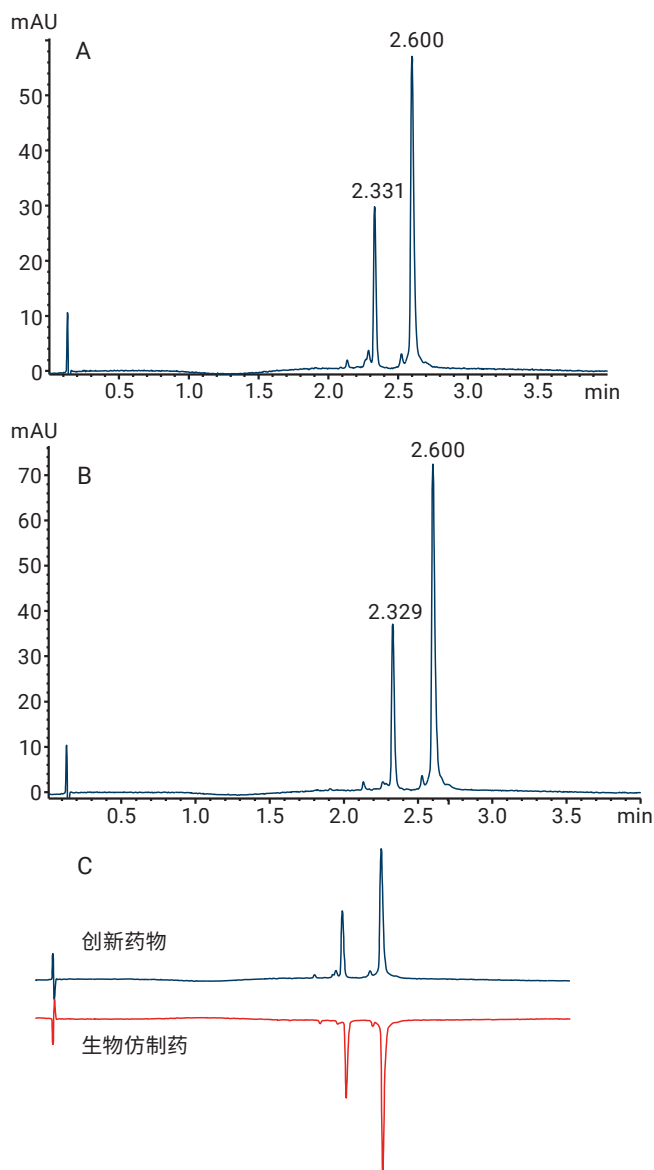


图 3. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。镜像图叠放 (C)

在这两种情况下，由于二硫键被还原，mAb 分离为单独的轻链 (LC) 和重链 (HC) 并被洗脱。用于完整 mAb 分析的梯度也同样能够分离还原态样品的 LC 和 HC。与在完整 mAb 分析中看到的一样，LC 和 HC 对 Diphenyl 和 C4 色谱柱表现出不同的选择性。使用 AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 色谱柱和 C4 色谱柱对完整和还原态创新药物和生物仿制药的 RP HPLC 分析结果表明，这一对 mAb 高度相似。

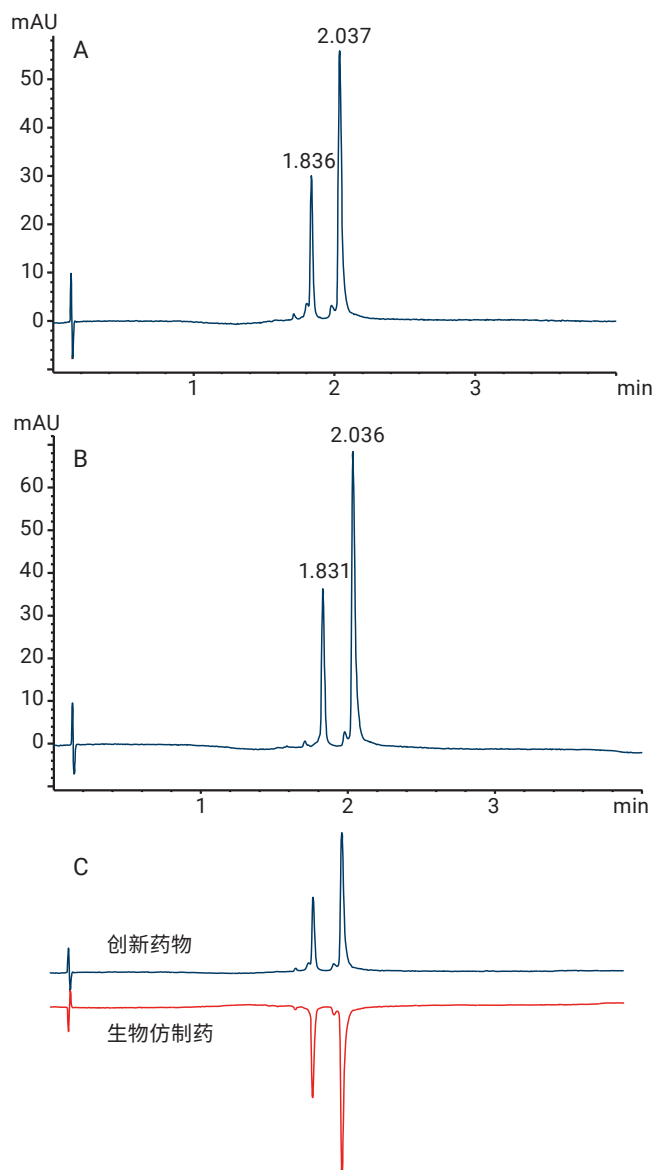


图 4. 利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 在 Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm 色谱柱上得到的 RP-HPLC 曲线。镜像图叠放 (C)

保留时间和峰面积的精密度

表 2 和表 3 展示了在二苯基和 C4 键合相色谱柱上六次重复测定完整和经 TCEP 还原的利妥昔单抗创新药物以及生物仿制药得到的平均保留时间和峰面积 RSD。结果表明，两种色谱柱的 RT 和峰面积精密度分别处于 $\pm 3\%$ 和 $\pm 5\%$ 的可接受限值内。

结论

在本应用简报中，我们展示了通过一种简单的基于 LC-UV 的方法来确定生物仿制药与其参比创新药物之间的分子相似性。我们首先使用 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统与 Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 色谱柱和 C4 色谱柱开发用于完整 mAb 的高分离度、快速分离方法。使用相同的方法，我们还能在 TCEP 还原之后对轻链和重链进行分离。使用 AdvanceBio RP-mAb 色谱柱对完整和还原态 mAb 进行分析得到了优异的峰面积和 RT 精密度，并证明了方法的可靠性。这种用于完整和还原态 mAb 分析的快速、简单、可重现的方法与系统的生物惰性相结合，使该解决方案适用于生物制药行业中的 mAb 相似性分析。

参考文献

1. Navas, N; *et al.*, Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, pp 9351-9363

表 2. 完整 mAb 分析的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

样品	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物	1.96	0	71.61	1.98
利妥昔单抗生物仿制药	1.95	0.26	77.3	0.47
Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物	2.51	0.20	66.7	0.458
利妥昔单抗生物仿制药	2.51	0	73.3	1.86

表 3. 还原态 mAb 分析的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

样品	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物 LC	2.32	0.60	19.71	4.24
利妥昔单抗创新药物 HC	2.58	1.52	57.33	1.57
利妥昔单抗生物仿制药 LC	2.32	0.07	23.56	3.25
利妥昔单抗生物仿制药 HC	2.60	0.05	58.40	5.61
Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
利妥昔单抗创新药物 LC	1.83	0	21.5	1.4
利妥昔单抗创新药物 HC	2.03	0.04	51.2	2.25
利妥昔单抗生物仿制药 LC	1.83	0.03	24.47	3.84
利妥昔单抗生物仿制药 HC	2.03	0.06	52.66	0.84

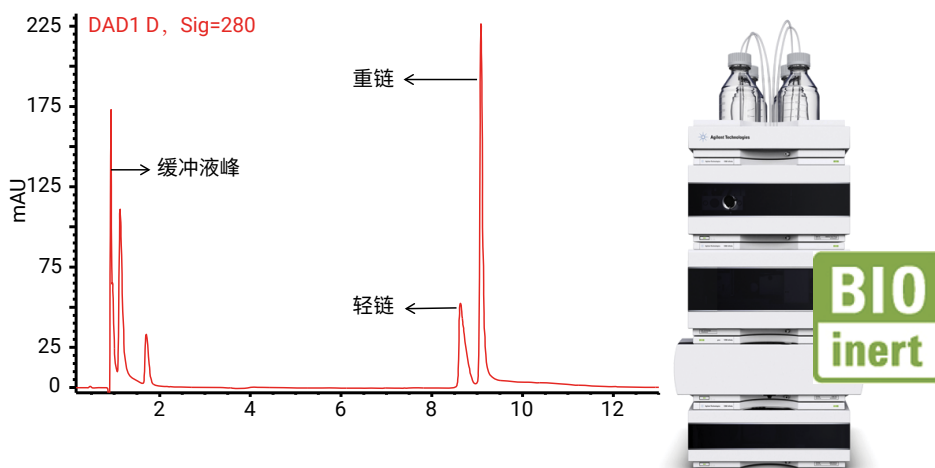
利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 二苯基亚 2 μm 色谱柱分析 IgG1 中的二硫键

作者

M. Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技有限公司
班加罗尔，印度

摘要

本应用简报介绍了一种简单的反相 HPLC 方法，用于分析单克隆抗体 (mAb) 中的二硫键。其中通过 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统及 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基亚 2 μm 颗粒填料色谱柱实现分离。在完整蛋白质及多肽酶解物的反相分离中，二苯基 1.8 μm 色谱柱能够提供 UHPLC 级别的性能。当与 UHPLC 仪器联用时，这种通用型色谱柱可在更短的分析时间内获得更全面的表征结果。1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统的压力范围高达 600 bar，能够提供更低粒径（低至 1.7 μm ）的新型色谱柱技术所要求的更高压力。



前言

虽然近年来重组 mAb 治疗药物取得了很大的进展，但是关于它们的二硫键模式，人们掌握的信息很少。研究 IgG1 抗体中完整的二硫键分布极具挑战性，这是由于它们的分子量很大，并且二硫键的数目很多。对于治疗性单克隆抗体 (mAb)，二硫键是保持免疫球蛋白 (IgG) 三级和四级结构的关键因素。在 mAb 生产过程中，链间和链内的二硫键均在表达宿主细胞内形成，然后进行分泌和纯化。之前的报道指出，对于 IgG2 及二硫化介导的 IgG4 臂交换，二硫键会发生重排，反映出这些 IgG 类型的一种固有行为^[1,2]。但是，已有报道观察到 IgG1 中的二硫键数目呈现出不规则的显著降低^[3]，这对于治疗性 mAb 的生产而言是一个很重要的问题。本应用简报证实了 1260 生物惰性四元液相色谱系统适用于 IgG1 中二硫键的分离和分析，该系统采用反相 HPLC 方法和 ZORBAX RRHD 300 二苯基，2.1 × 100 mm，1.8 µm 粒径色谱柱。采用亚 2 µm 粒径色谱柱的超高效液相色谱 (UHPLC) 分离，可改善每次分析的分离度和灵敏度，缩短分析时间，并且可用于分析 IgG1、还原态 IgG1，以及 IgG1 酶解产生的肽段。

设备

仪器

采用完全生物兼容且最大系统耐压为 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- 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 (G1316C，选项 19)
- 配备 60 mm 最大光程高灵敏度流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B，选项 33)
- Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 × 100 mm，1.8 µm 色谱柱 (部件号 858750-944)

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。

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.04

HPLC 分析

表 1 RP HPLC 的色谱参数

参数	条件	
流动相 A	水 + 0.1% TFA	
流动相 B	乙腈 + 0.09% TFA	
梯度	时间 (min)	流动相 B (%)
	0 分钟	25
	3 分钟	35
	4 分钟	40
	5 分钟	40
	15 分钟	90
	16 分钟	25
	后运行时间	5 分钟
进样量	3 µL (洗针进样， 针冲洗口启动 7 秒)	
流速	0.3 mL/min	
数据采集	214 和 280 nm	
采集速率	20 Hz	
流通池	60 mm 光程	
柱温箱	50 °C	
样品恒温箱	5 °C	

试剂、样品与材料

人单克隆抗体 IgG1 是一种专利药物分子。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺、三羟甲基氨基甲烷以及蛋白内切酶 Lys C 均购自 Sigma Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。乙腈为梯度极, 购自 Lab-Scan 公司 (曼谷, 泰国)。

完整 IgG1 的还原和烷基化

用 100 mmol/L Tris HCl 和 4 mol/L Gu HCl (pH 8.0) 将 IgG1 稀释至 2 mg/mL。加入 10 µL 0.5 mol/L DTT 储备液, 使其最终浓度为 5 mmol/L。将混合物在 37 °C 下保持 30 分钟。反应混合物短暂冷却至室温。加入 26 µL 0.5 mol/L 碘乙酰胺储备液, 使其最终浓度为 13 mmol/L。静置 45 分钟。然后加入 20 µL DTT 以淬灭反应, 并使最终浓度为 10 mmol/L。

IgG1 的 Lys C 酶解和还原

使用 100 mmol/L Tris HCl (pH 8.0) 将 IgG1 稀释至 1 mg/mL。加入蛋白内切酶 Lys C 的 100 mmol/L Tris HCl 溶液 (pH 8.0), 其中酶与蛋白质的比例为 1:100 (w/w)。混合物在 37 °C 下孵育过夜。然后加入 10% TFA 将 pH 值降至 6.0 以停止反应。随后, 使用本应用简报上文中介绍的方法还原 Lys C 酶解后的 IgG1。

结果与讨论

分离和检测

ZORBAX RRHD 300 二苯基 1.8 µm 粒径色谱柱具有可耐受低 pH 和温度稳定性好的优势, 与能在更高压力下 (600 bar) 运行的 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用时, 可用于分离蛋白质。图 1 A 展示了优化后完整 IgG1 的 RP HPLC 洗脱曲线, 其中采用了 ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm 色谱柱, 证实了 IgG1 在 15 分钟内具有优异的保留性。进行 6 次重复分析以测定分析的重现性。图 1 B 为 6 次重复分析的叠加谱图。

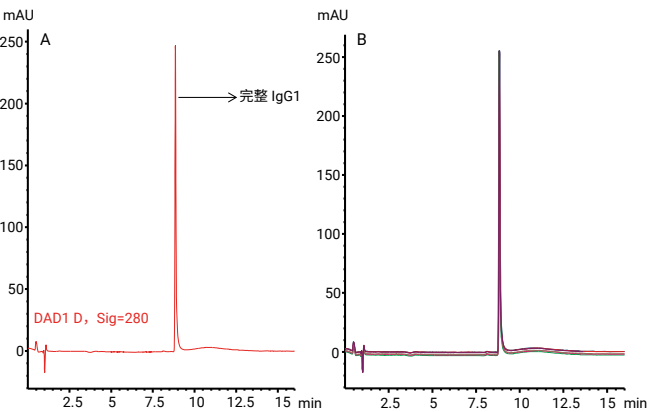


图 1. 利用 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm 色谱柱所得的完整 IgG1 的 RP HPLC 谱图 (A), 以及六次重复分析的叠加谱图 (B)

表 2 完整 IgG1 的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
8.838	0.086	1170	0.461

还检测了对完整 IgG1 中二硫键进行还原和烷基化的效果。图 2 A 展示了经过还原和烷基化后的 IgG1 反相色谱图，B 为与还原/烷基化缓冲液空白的叠加图，C 为 6 次重复分析的叠加图以展示分离的重现性。由于二硫键被还原，IgG1 分离为轻链和重链。IgG1 洗脱后，存在明显的轻链 (LC) 和重链 (HC)，如图 2 中所示；但是，未采用质谱分析证实这一点。

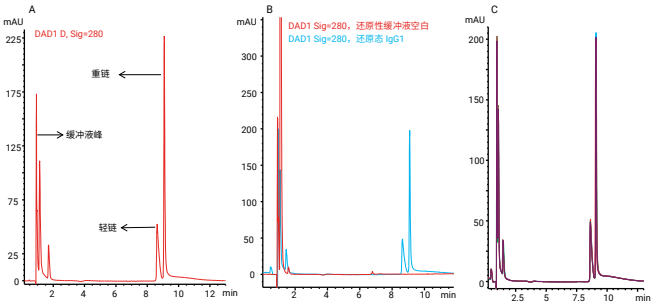


图 2. (A) 还原和烷基化 IgG1 的 RP HPLC 谱图，(B) 与缓冲液空白的叠加图，(C) 六次重复分析的叠加图

表 3. 轻链的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
8.638	0.091	504.33	2.780

表 4. 重链的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

保留时间		峰面积	
平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
9.084	0.152	1520	0.390

在未还原状态下，完整 IgG1 的 Lys C 酶解产物所得的肽谱图会形成复杂程度较低的 RP HPLC 谱图。IgG1 酶解产物的代表性色谱图 (图 3 A) 中显示了两个用于峰面积和保留时间精度评估的峰 (基线分离)。叠加图中展示了尖锐的色谱峰，且具有良好的分离度和优越的分离重现性 (图 3 B)。

此外，我们想要比较未还原和还原状态下 IgG1 的反相色谱图，以测定二硫键所连接的肽段。图 4 中展示了未还原 (红线) 和还原 (蓝线) IgG1 的 Lys C 肽谱图的叠加图。还原后，IgG1 的 Lys C 酶解产物中出现了额外的色谱峰 (以 * 号表示)，证实了它们由二硫键连接。

保留时间和峰面积的精密度

完整 IgG1、还原态 IgG1 和未还原状态下蛋白内切酶 Lys C 酶解后的 IgG1 的保留时间和峰面积精密度分别如表 2、3 和 4 中所示。结果显示 ZORBAX 二苯基亚 2 μm 色谱柱的保留时间和峰面积精密度分别在 3% 和 5% 内。

用 Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 分析 IgG1 的二硫键

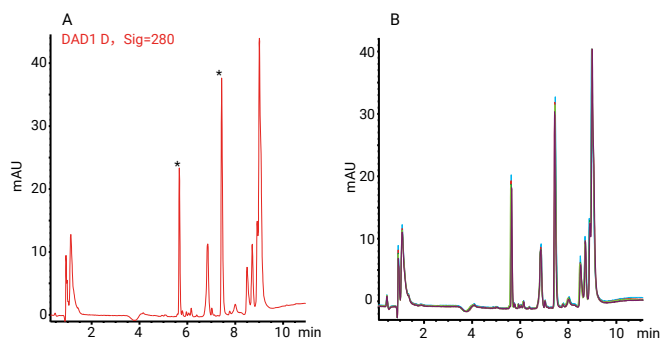


图 3. (A) Lys C 酶解后 IgG1 的 RP HPLC 谱图以及 (B) 六次重复分析的叠加图。用于保留时间和峰面积 RSD 评估的峰以 * 号标示

表 5 Lys C 酶解后 IgG1 的保留时间和峰面积 RSD (%), n = 6

	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD (限值: ±3.0%)	平均值 (mAU/min)	RSD (限值: ±5.0%)
峰 1	5.525	0.307	60	0.544
峰 2	7.444	0.140	132.45	1.113

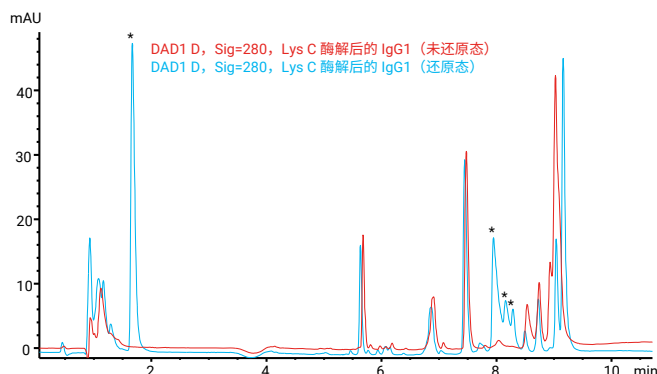


图 4. 比较未还原（红线）和还原（蓝线）状态下 Lys C 酶解后 IgG1 的肽谱图。二硫键连接的肽段以 * 号标示

结论

在生物制药工艺开发和监测过程中，二硫键分析对于研究蛋白质的一些翻译后修饰非常重要。我们展示了将 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统与 Agilent ZORBAX RRHD 300 二苯基, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm 色谱柱联用，能够实现单克隆抗体中二硫键的可重现、高分离度分析，适用于生物制药工艺开发和监测。优越的峰面积和保留时间精度证实该方法具有可靠性。此外，1260 Infinity 生物惰性液相色谱的压力范围高达 600 bar，能够采用耐压更高的新型小粒径（低至 1.7 μm）色谱柱技术。仪器的生物惰性和抗腐蚀性加上简单且可重现的方法，使得这种解决方案特别适合用于生物制药行业中单克隆抗体的 QA/QC 分析。

参考文献

1. R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng, Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 2503–2510
2. T.-Y. Yen, H. Yan, B.A. Macher, Characterizing closely spaced, complex disulfide bond patterns in peptides and proteins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 37 (2002) 15–30
3. Mullan et al. *BMC Proceedings* 2011, 5 (Suppl 8):P110

便捷、可靠地分析抗体药物偶联物

在 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上使用三元梯度进行药物-抗体比率测定

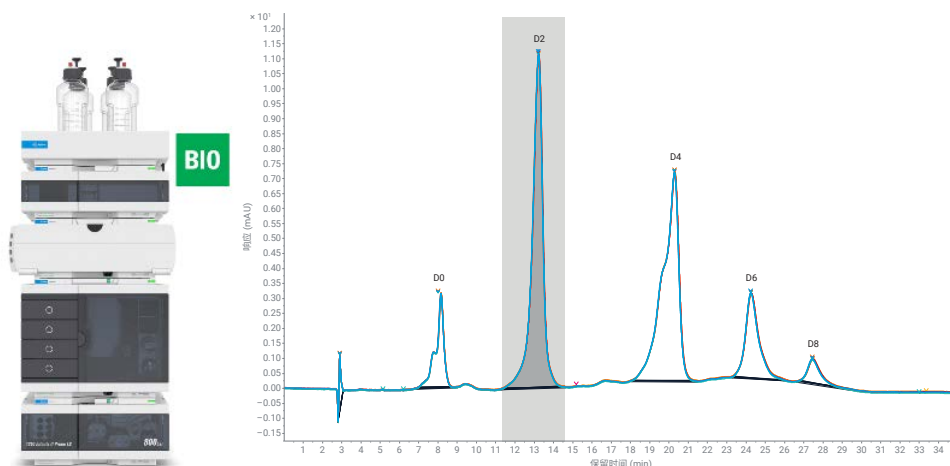
作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

在疏水相互作用色谱 (HIC) 中加入异丙醇等有机改性剂是降低疏水性抗体药物偶联物 (ADC) 的保留能力以及调整选择性的重要参数。

本应用简报展示了使用三元梯度并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行的药物-抗体比率 (DAR) 测定。结果表明，Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统对于这种具有挑战性的高浓度盐缓冲液和有机溶剂组合具有出色的重现性，使之成为新一代安捷伦高端液相色谱系统，可生成高度可靠的数据。



前言

ADC 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAb)^[1]。与单独的抗体相比，其结构更为复杂，且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADC（例如本妥昔单抗 ADC）在链间二硫键还原后生成，从而形成可与特定马来酰亚胺连接物偶联的游离巯基。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量，结果形成每个抗体包含 0 (D0)、2 (D2)、4 (D4)、6 (D6)、8 (D8) 个药物分子的混合物。

特别是由于高 DAR 物质的疏水性，加入有机改性剂（例如异丙醇）有助于从 HIC 柱中完全洗脱。通常，在二元梯度中，将改性剂添加到用于洗脱的流动相（通常是含有少量盐或不含盐的缓冲液）中。Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用第三通道添加有机改性剂。由于两种溶剂在泵中混合时可能形成盐晶体，因此高浓度盐缓冲液与有机流动相的结合至关重要。

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、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。因此，1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统非常适合用于生物色谱条件，凭借通常用于 HIC 的高浓度腐蚀性盐，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

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 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 版或更新版本

色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱，3.5 μ m，4.6 $\times$ 100 mm（部件号 685975-908）

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。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和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

本妥昔单抗 ADC（商品名 Adcetris，来自 Takeda, Tokyo, Japan）溶于 50% 水: 50% 溶剂 A（见下文），浓度为 100 mg/mL。

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

A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

C) 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)：取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 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。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7（缓冲液 B）。将 198.21 g 硫酸铵（总浓度 1.5 mol/L）加入 1 L 棕色空瓶中，用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L（& 缓冲液 A）。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7（加入大量盐可改变 pH 值）。配制的缓冲液均使用 0.2 μ m 滤膜过滤。

方法

参数	值
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 C) 异丙醇
梯度	梯度: 0 min 55% A, 40% B, 5% C 25 min 0% A, 75% B, 25% C 停止时间: 35 min 后运行时间: 10 min
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 µL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注：在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统，而 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外，密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而，避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

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 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A，在泵方法的溶剂选择字段使用硫酸铵 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。

结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果，5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体，附着的药物分子数量不断增加（D0–D8 对应 0–8 个结合分子）。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图，确定了这些峰^[2]。

我们评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度。通过 7 次后续运行，经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.055%，表明 RT 具有良好的精度。这证明了四元泵在运行三元梯度方面的出色性能，即使在使用高浓度盐缓冲液（例如本研究使用的 1.5 mol/L 硫酸铵缓冲液）和异丙醇这样极具挑战性的组合作为有机改性剂的情况下也是如此。峰面积的精度也十分出色，RSD < 0.46%（最后一个峰除外）（见图 1 的表）。

HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR。通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分，能够计算总体 DAR（公式 1）。

公式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.3（见表 1）。

表 1. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积 %	DAR 计算值
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
DAR				3.3

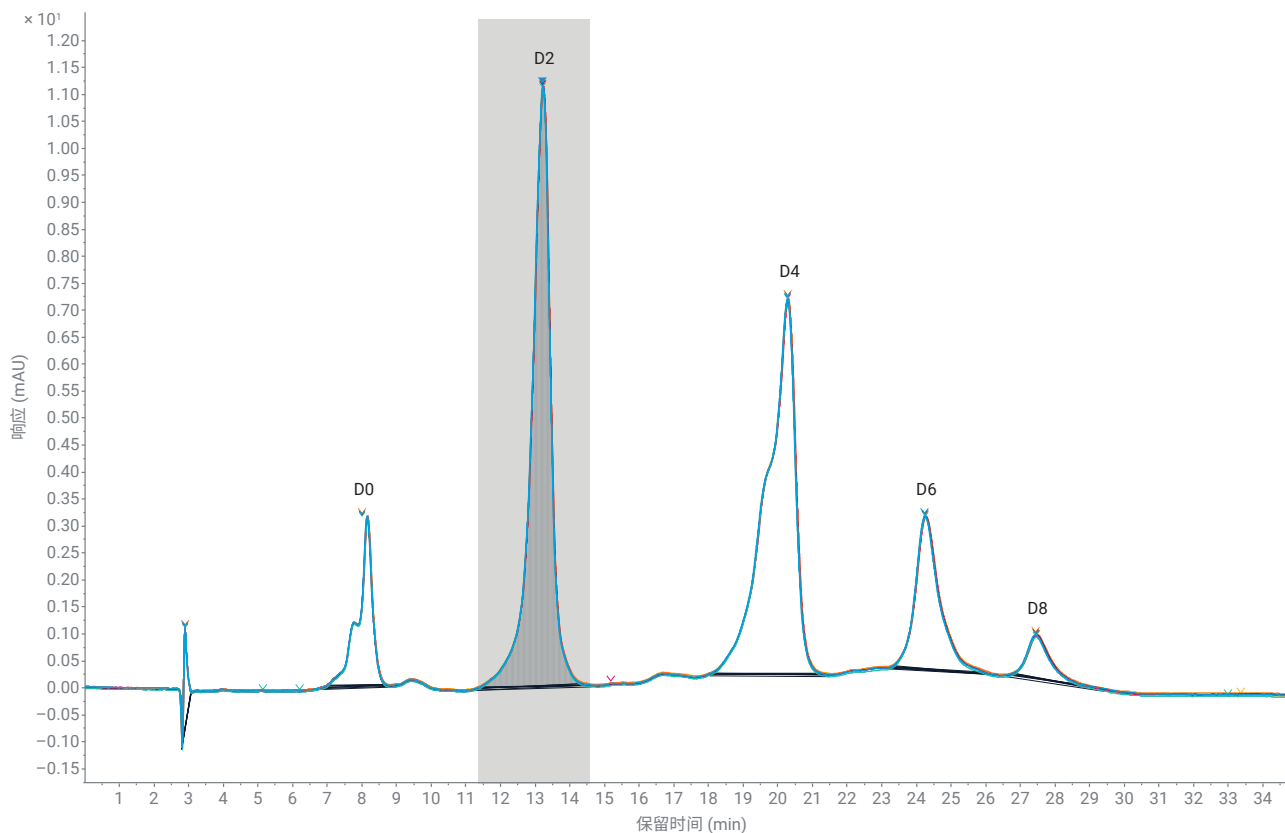


图 1. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC。D0–D8 表示不同的 DAR 异构体。所示为 7 次后续运行的叠加色谱图。通过空白扣除功能，使用在同一序列中运行的空白进样过滤缓冲液 A 中硫酸铵盐引起的基线漂移

结论

本研究使用三元梯度下的 HIC，并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行了分析。5 种预期 ADC 均得到很好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.3 个药物分子。配备 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统出色地完成了挑战性溶剂组合的分析。保留时间重现性十分优异，相对标准偏差低于 0.055%，可实现类似二元泵的性能，生成高度可靠的数据。

参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51
2. Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393–403

高盐 — 高重现性

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过疏水相互作用色谱分析抗体药物偶联物

作者

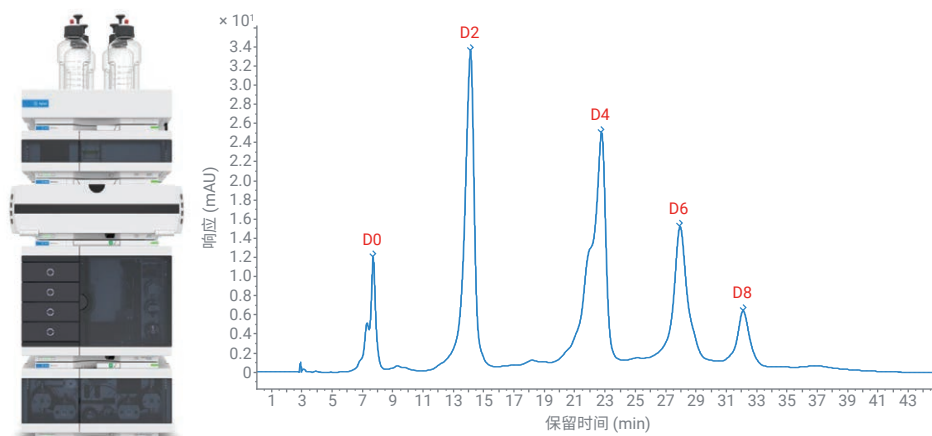
Sonja Schneider

安捷伦科技有限公司

摘要

通常使用疏水相互作用色谱 (HIC) 测定药物/抗体比率 (DAR)。这种温和的非变性分析方法的洗脱液含有高浓度腐蚀性盐，对液相色谱 (LC) 系统提出了挑战。

Agilent 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。本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR。经计算，DAR 为每个抗体 3.7 个药物分子。所得结果具有良好的重现性，证明 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，生成的数据具有超高可信度。“空白扣除”是 Agilent OpenLab CDS 的一项软件功能，可以消除由于硫酸铵纯度较低造成的基线漂移，从而实现平滑积分。



前言

抗体药物偶联物 (ADCs) 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAbs)^[1]。与单独的抗体相比, 其结构更为复杂, 且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADCs^[2] (如本妥昔单抗 ADC, 商品名为 Adcetris, 由 Takeda 原研) 将小分子连接到部分还原 mAb 的游离巯基上^[3,4]。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量, 结果形成每个抗体包含 0、2、4、6、8 个药物分子的混合物。与 mAb 偶联的平均药物分子数量是 ADC 最重要的质量属性之一, 因为它直接影响 ADC 的安全性和有效性。DAR 决定了可以递送到所需组织的有效载荷量^[5]。

HIC 是分离每个抗载体药量不同的半胱氨酸连接的 ADC 分子的参考技术^[6]。相对疏水性随 ADC 载药量的增加而增加, 因为与 mAb 连接的小分子通常相对具有疏水性。因此, HIC 非常适用于监测 DAR。

HIC 是一种可以保持天然蛋白结构的非变性分析技术。它通常在中性 pH 条件下进行, 可以使用从高到低的盐梯度分离蛋白质。分离原理与蛋白质盐析实验相同^[6]。在流动相 A 中使用高浓度盐缓冲液, 蛋白质失去水化层, 保留在固定相的疏水表面。流动相 B 通常为相同的缓冲液 (主要是磷酸盐), 不添加盐。随着流动相 B 在梯度中的占比增加, 蛋白质重新形成水化层并从色谱柱中洗脱。加入少量有机溶剂 (如异丙醇) 也有助于从色谱柱中洗脱蛋白质。

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^[7]、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。样品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)。

本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR, 评价了保留时间和峰面积的精度。此外, 还展示了 OpenLab 2 数据处理方法中的“空白扣除”功能过滤漂移基线的优势。

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 AdvanceBio HIC 色谱柱, 3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100 mm (部件号 685975-908)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。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和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

本妥昔单抗 ADC (商品名 Adcetris, 来自 Takeda, Tokyo, Japan) 溶于一半水、一半溶剂 A (见下文), 浓度为 100 mg/mL。

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

A: 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7

B: 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7): 取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 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。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调至 7。然后, 将 198.21 g 硫酸铵 (总浓度 1.5 mol/L) 加入 1 L 棕色空瓶中, 用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L (& 缓冲液 A)。测量 pH 值, 如有需要, 将 pH 值调回 7 (加入大量盐可改变 pH 值)。将 200 mL 异丙醇和 800 mL 配制好的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 混合并加入 1 L 棕色空瓶中 (& 缓冲液 B)。配制的缓冲液均使用 0.2 µm 滤膜过滤。

注: 与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致整体疏水性相应增加。因此, 有必要在流动相中加入一些有机改性剂 (此处加入 20% 异丙醇)。

方法

表 1. 盐梯度色谱条件

参数	HPLC (完整和还原态 mAb)
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 20% 异丙醇
梯度	0 min 时 30% B, 30 min 时 100% B 停止时间: 45 分钟 后运行时间: 10 分钟
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 µL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注: 在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统, 而 1290 Infinity II 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外, 密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而, 避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

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 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A, 在泵方法的溶剂选择字段使用“硫酸铵 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。

结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果, 5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布, 也可以测定 DAR。

虽然链间二硫键被偶联的药物破坏和占据, 但抗体链间的共价键和非共价键力相结合足以使 mAb 在分析过程中保持完整形态。这是由于 HIC 在温和的非变性条件下进行, 使其成为分析半胱氨酸连接 ADCs 的理想选择。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体, 附着的药物分子数量不断增加 (D0-D8 对应 0-8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图, 确定了这些峰^[6]。

通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分, 能够计算总体 DAR (公式 1)。

公式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

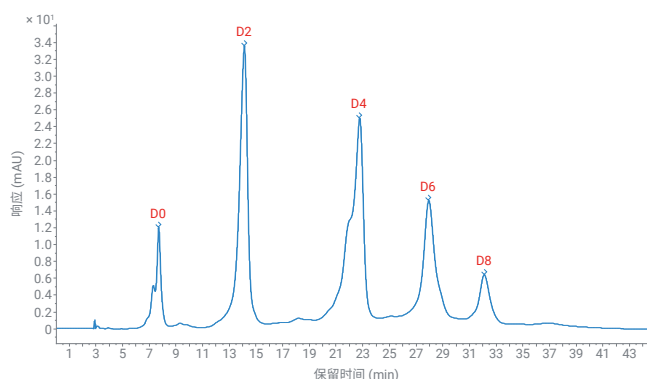


图 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析本妥昔单抗 ADC。D0-D8 表示不同的 DAR 异构体

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.7（见表 2）。这一数值与文献一致^[9]。

我们还评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度（图 2）。经过 7 次后续运行，经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.081%，表明 RT 具有良好的精度。峰面积的精度也十分出色，RSD < 0.282%（见图 2 的表）。

硫酸铵是 HIC 分析中一种极其常用的离液盐。通常使用的盐浓度范围为 1–2 mol/L，这个浓度相当大。如果在分析中使用较低纯度的盐（有时从盐晶体的颜色即可看出），色谱图的基线会发生明显漂移，造成潜在的积分误差。为了解决这个问题，可使用一种称为“空白扣除”的软件功能利用空白进样过滤基线漂移。此功能可在 OpenLab 2 的数据处理方法中找到（参见图 3）。图 4 显示了应用该功能之前和之后具有不同基线行为的色谱图。

表 2. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			DAR	3.733

峰归属

RSD 精度	RT (%)	峰面积 (%)
D0	0.074	0.064
D2	0.080	0.043
D4	0.072	0.071
D6	0.065	0.262
D8	0.066	0.281

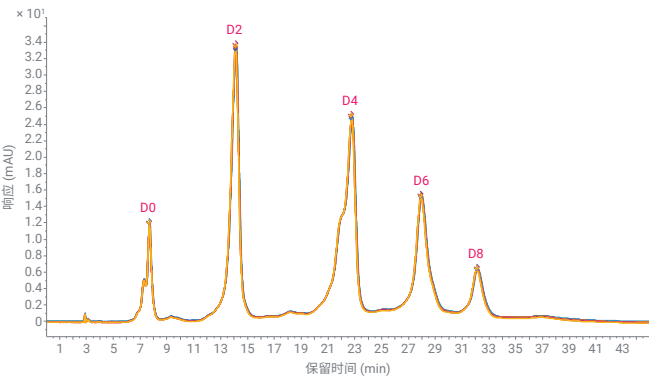


图 2. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC（7 次后续运行的叠加色谱图）

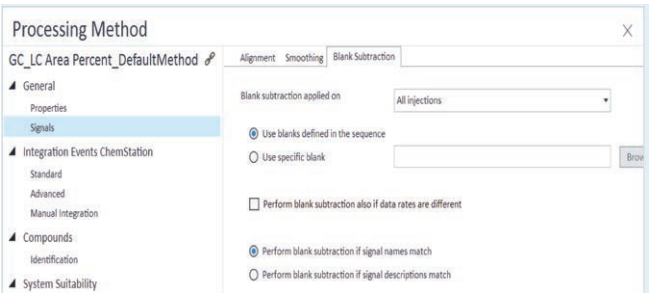


图 3. Agilent OpenLab CDS 2 的数据处理方法中“空白扣除”功能的屏幕截图

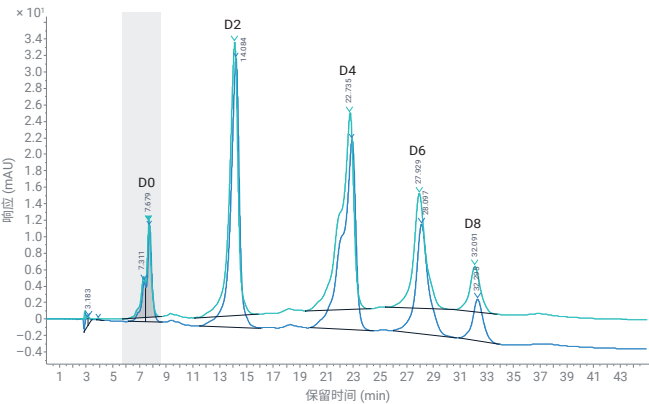


图 4. 空白扣除前（蓝色）和扣除后（绿色）的 HIC 色谱图比较

结论

在 Infinity II 1290 生物液相色谱系统上使用 HIC 法分析了本妥昔单抗 ADC。5 种预期 DAR 均得到良好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.7 个药物分子。7 次后续运行的精度分析显示了 RT 和峰面积的出色重现性。HIC 中使用的洗脱液含有高浓度的腐蚀性盐，对液相色谱系统带来了挑战。由于具有完全不含铁的样品流路，1290 Infinity II 生物液相色谱系统非常适合在生物色谱条件下使用，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

OpenLab 2 软件的空白扣除功能使用户可在分析中使用纯度更低的硫酸铵，而不会对结果产生负面影响。只需扣除空白运行即可校正基线，以实现平滑的积分计算。

1290 Infinity II 生物液相色谱仪的生物兼容性硬件与 OpenLab 2 的新软件功能相结合，产生的数据具有超高可信度。

参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51
2. Marcoux, J. et al. Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, 24, 1210–1223
3. Younes, A. et al. Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, 363(19), 1812–1821
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates (半胱氨酸连接的抗体药物偶联物的分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8493EN，**2017**
5. Wakankar, A. et al. Analytical Methods for Physiochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, 3(2), 161–172
6. Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393–403
7. 卓越性能，可靠结果，不负重托：Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统，安捷伦科技公司产品样本，出版号 5994-2376ZHCN，**2020**
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, 4(4), 458–465

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发展受到广泛关注。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

设备与材料

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(H_2O_2)、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 H_2O_2 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。 H_2O_2 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。

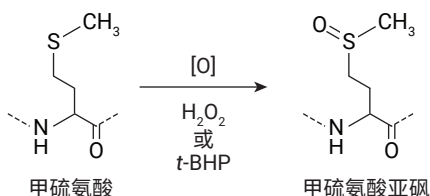


图 1. 化学氧化剂诱导的甲硫氨酸氧化

图 2 中的 NIST mAb (人源化 IgG1k) 氨基酸序列表明, mAb 两条重链均含有六个可能的表面可及 Met 残基。之前对大多数人源化 IgG1 亚类抗体的研究表明, 位于抗原结合 (或 Fc) 区域 CH₂ 和 CH₃ 结构域的 Met 残基更易发生氧化^[5]。在 NIST mAb 中, Met 255 和 Met 431 的氨基酸容易发生氧化。示意图如图 3 所示。

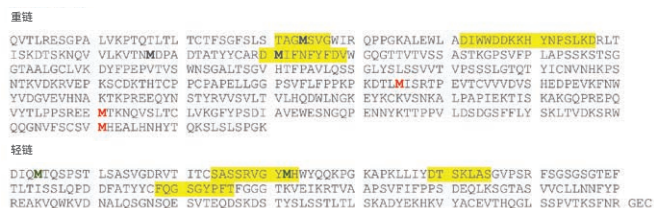


图 2. NIST mAb 氨基酸序列

方法条件

参数	HPLC 条件		
色谱柱	AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908)		
流动相	洗脱液 A) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 洗脱液 B) 含 2 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0		
流速	0.3~0.5 mL/min		
柱温	25 °C		
进样量	5 µL		
最终样品浓度	1 mg/mL		
检测	UV, 220 nm		
梯度曲线	流速: 0.5 mL/min		
	时间	%A	%B
	0	50	50
	20	100	0
	25	100	0
	30	50	50
	40	50	20
平缓梯度	流速: 0.3 mL/min		
	时间	%A	%B
	0	40	60
	40	90	10
	45	90	10
	50	40	60
	60	40	60

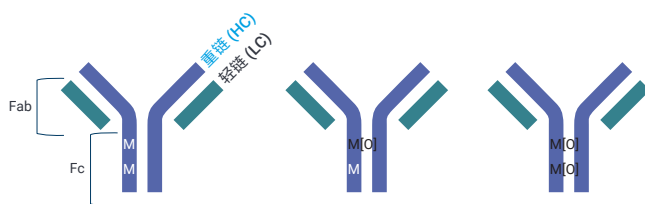


图 3. 人源化 IgG1 mAb 中, 位于 Fc 区域的甲硫氨酸残基最易被氧化

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。

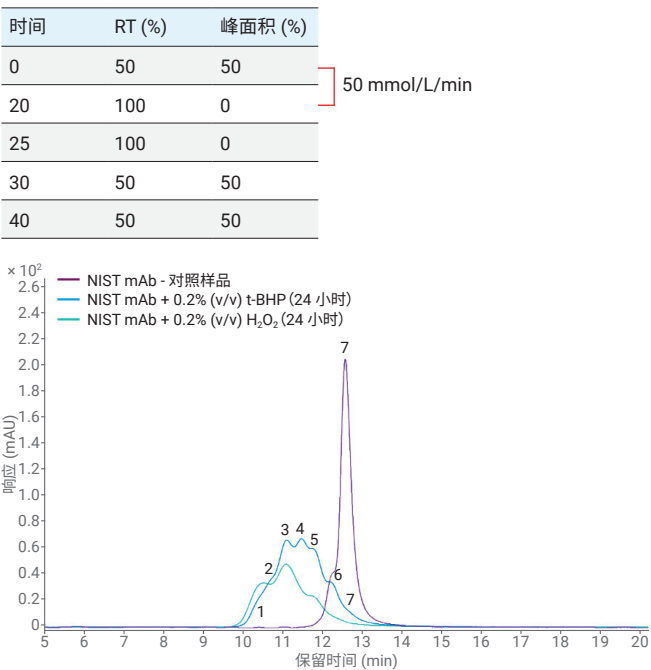


图 4. 使用更低的起始盐浓度分离 NIST mAb 氧化异构体

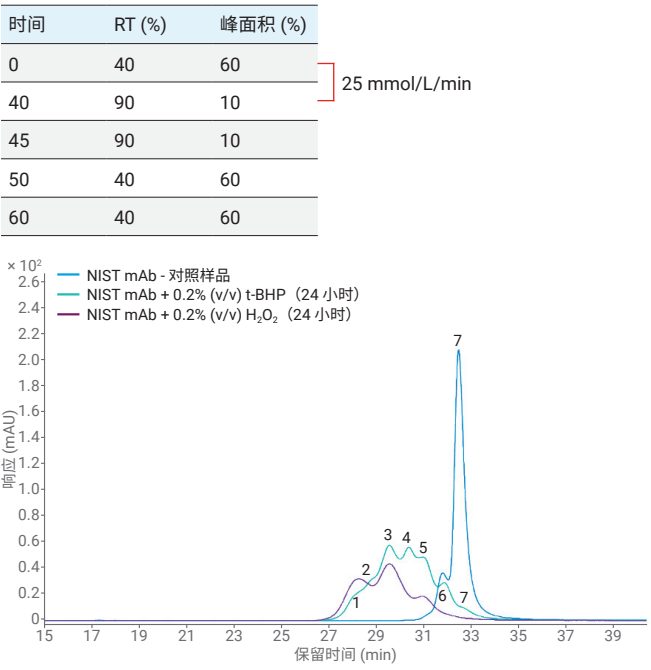


图 5. 使用平缓梯度分离 NIST mAb 氧化异构体

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。

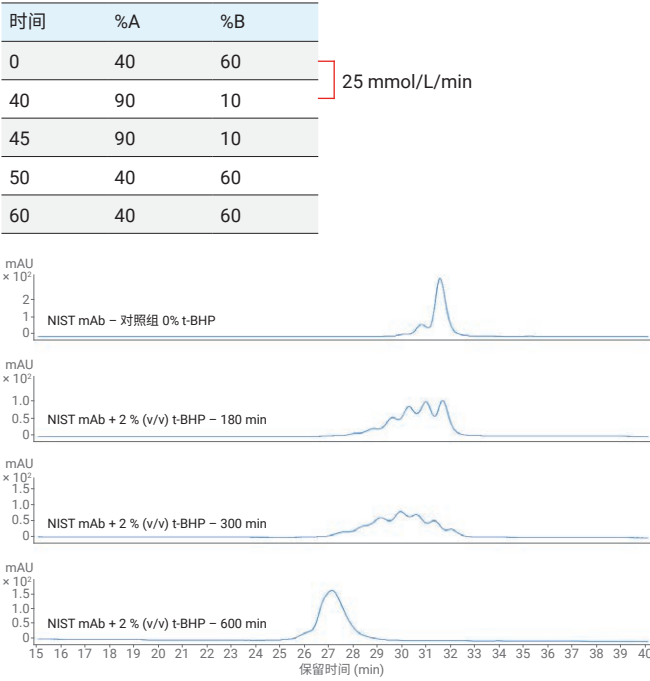


图 6. 监测 t-BHP 氧化 mAb 的反应

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 氧化异构体的出色分离，同时还可保持相对较短的分析时间。

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

更多应用简报

AdvanceBio RP mAb

出版号	标题
5991-6296EN	使用 AdvanceBio RP-mAb 对完整治疗性单克隆抗体进行 LC/MS 分析
5991-4723EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC 色谱柱缩短定量分析人 IgG 的分析周期
5991-5125EN	使用 Agilent Bio-Monolith Protein A 色谱柱和 LC/MS 进行的细胞培养优化
5991-6094ZHCN	Bio-Monolith Protein G 色谱柱 — 更多 mAb 滴度测定选择

PLRP-S

出版号	标题
5991-6263CHCN	使用自动化样品前处理和新型 DAR 计算器软件计算抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR)
5991-6559CHCN	使用 UHPLC/Q-TOF 测定抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR)

AdvanceBio HIC

出版号	标题
5994-0149ZHCN	用于抗体药物偶联物 (ADC) 药物/抗体比率 (DAR) 分析的 AdvanceBio HIC 色谱柱
5994-1869ZHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体

ZORBAX RRHD 300SB

出版号	标题
5990-9668CHCN	利用 Agilent ZORBAX RRHD 亚 2 µm 300 二苯基 UHPLC 柱对还原态和完整单克隆抗体进行超快速高分离度分离
5990-7988EN	利用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 反相柱分析氧化胰岛素链
5990-7989EN	用于蛋白质分离的 Agilent ZORBAX 300SB-C18 1.8 µm 快速高分离度色谱柱
5990-9248CHCN	使用 Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 (1.8 µm) 反相色谱柱进行重组人促红细胞生成素的快速分离
5990-9631CHCN	利用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 柱对还原态单克隆抗体进行快速 UHPLC 分析
5990-9016CHCN	使用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C8 1.8 µm 色谱柱进行完整单克隆抗体的反相分离
5990-9667CHCN	利用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 300SB-C3 柱对完整和还原态单克隆抗体的超快速反相分析进行优化

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

DE44368.380162037

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
5994-0036ZHCN