

# mAbs 聚集体研究

结合使用体积排阻色谱与多角度光散射

## 作者

Jasmin Preis\* 和 Miriam Lossa

\* 安捷伦科技有限公司

## 摘要

配备 UV、RI 和静态光散射检测的体积排阻色谱 (SEC) 是一种强大的分析工具组合，用于测定单克隆抗体 (mAb) 聚集体和片段的含量和分子量。具有优化的分离范围的现代高分离度 SEC 色谱柱充分发挥了该方法的潜力。

## 前言

生物治疗药物（例如 mAbs）因其在诊断和治疗各种慢性自身免疫性或肿瘤性疾病方面的有效性和潜力而受到越来越多的关注<sup>[1]</sup>。

控制 mAbs 的关键质量属性 (CQAs) 对于避免药物有效性降低和预防免疫原性反应至关重要。其中需要监测的一个基本参数是聚集体（二聚体、三聚体和高阶聚集体）的含量。聚集可能在生产过程或运输过程中发生，也可能是长期储存的结果。除了聚集，还应监测由于完整抗体降解而产生的抗体片段。

GPC/SEC 是监测聚集和片段化的首选方法。需要使用 GPC/SEC 方法通过 UV 和光散射检测等高分离度和高灵敏度检测技术同时分析天然抗体及其聚集体和片段。

## 实验部分

见表 1。

## 结果与讨论

GPC/SEC 与多种检测技术（包括 UV、RI 和 LS）的组合是用于同时测定抗体聚集体和片段的强大分析工具。这些不同类型的检测进行组合的一个巨大优势在于其互补性。UV 和 RI 均为浓度检测器，通常用于测定样品的纯度。假定折射率增量 (dn/dc) 和消光系数 ( $\epsilon$ ) 相同，这些检测器还可用于定量分析聚集体和片段。

表 1. 仪器参数

	条件
泵	等度泵 流速: 1.00 mL/min 流动相: 34 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.4, 0.3 mol/L NaCl
进样系统	自动进样器 灵活的进样量
色谱柱	Agilent MAB 3 $\mu$ m 预柱, 8 $\times$ 50 mm (货号 MAA080503) Agilent MAB 3 $\mu$ m, 8 $\times$ 300 mm (货号 MAA083003MC)
检测器	多波长 UV-Vis 检测器 (MWD), $\lambda = 280$ nm 和/或 $\lambda = 214$ nm 示差折光 (RI) 检测器 多角度光散射检测器 (MALLS), $\lambda = 660$ nm
软件	Agilent WinGPC UniChrom

然而，摩尔质量只能在使用已知校准标样进行校准后才能测定，而光散射检测器是灵敏的摩尔质量检测器，因此，与光散射检测器联用对 mAb 及其聚集体的分析进行了补充。这种组合有两大优势：光散射是测定大分子摩尔质量的绝对方法，对高摩尔质量具有高灵敏度。因此，由于分子量依赖性，MALLS 检测器对少量的 mAb 缔合物和高阶聚集体也具有较高的灵敏度。除了检测之外，为了获得高度分离且符合要求的数据，成功的 GPC/SEC 实验需要具有适用于目标分析物的分离范围的色谱柱或色谱柱组合。MAB 色谱柱经过精心设计，适用于蛋白质和 mAb 应用。MAB 色谱柱覆盖 mAb 单体、缔合物、聚合体和片段监测所需的完整分离范围，还为 mAbs 的 CQAs 测定提供了长期的高分离度性能。

图 1 所示为天然抗体（即兔血清 IgG）和抗体聚集体的曲线叠加图，图 2 所示为天然 mAb 和抗体片段的曲线叠加图。两个数据集均来自使用一根 MAB 3  $\mu$ m 色谱柱的应用。

分析单克隆抗体时三种检测器信号如图 3 所示。光散射信号表明对高摩尔质量聚集体具有更高的灵敏度。这并不意味着使用光散射进行定量，而是简化了 CQA 的监测和 mAb 聚集过程的研究。

从多检测配置得到的数据中可获得以下信息：

- 单体、二聚体和三聚体的绝对摩尔质量和回转半径 (Rg) (MALLS 检测器)
- 相对法测得的片段摩尔质量（校准，RI/UV 检测器）
- 纯度：高阶聚集体、缔合物、单体和片段的数量 (RI/UV 检测器)

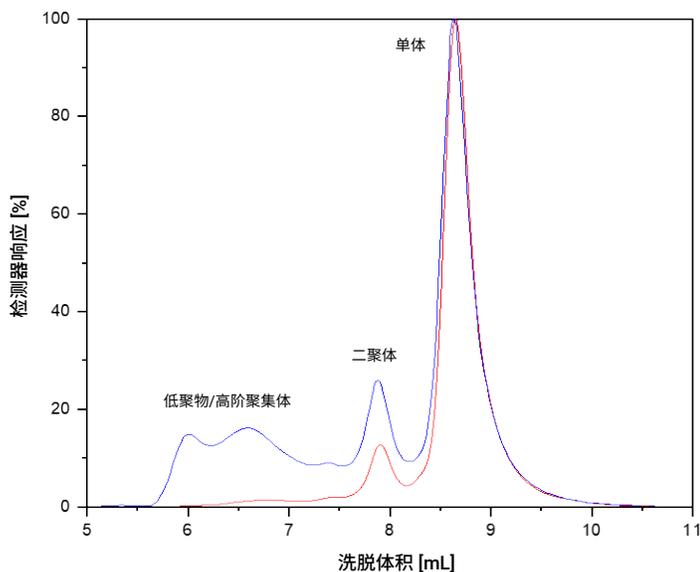


图 1. Agilent MAB 3  $\mu\text{m}$  色谱柱的分离范围。红色曲线为天然抗体及其缔合物的 UV 信号与洗脱体积的关系图。蓝色曲线为聚集的抗体样品的曲线

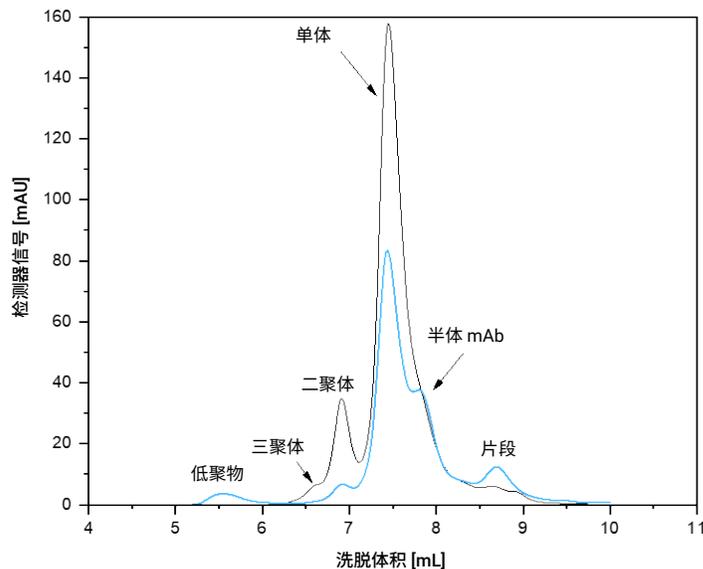


图 2. Agilent MAB 3  $\mu\text{m}$  色谱柱的分离范围。黑色曲线为天然抗体及其缔合物的 UV 信号与洗脱体积的关系图。蓝色曲线为通过还原得到的片段化抗体样品的曲线

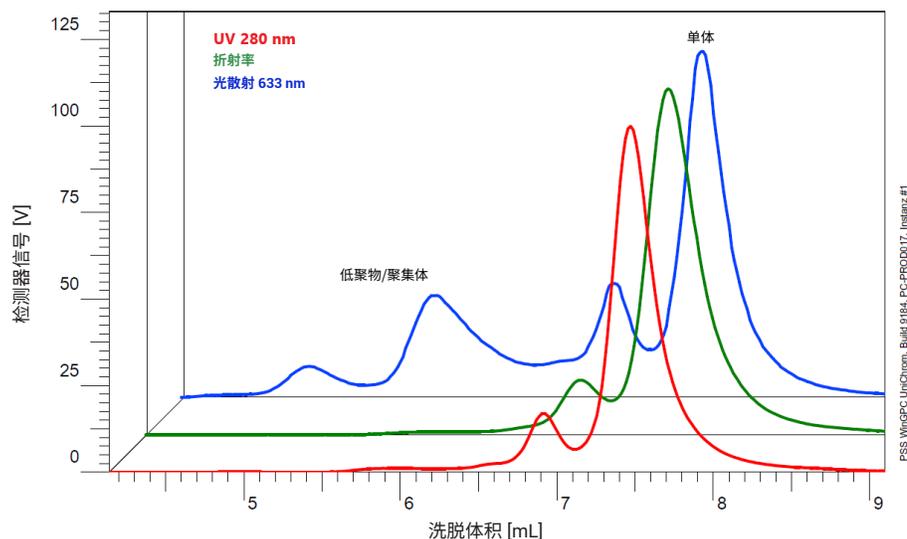


图 3. 抗体聚集体的高灵敏度分析。由于摩尔质量依赖性，抗体缔合物和高阶聚集体的光散射信号比单体信号更强，为高阶聚集体的检测提供了更高的灵敏度

## 结论

GPC/SEC 与 MALLS 检测的组合是一种强大的 mAbs 聚集分析工具，而聚集分析是 CQAs 的一个方面。除此之外，还可以通过上述测量设置获得绝对摩尔质量和尺寸信息（例如回转半径 (Rg)）。此外，Agilent MAB 色谱柱经过预平衡，可与光散射检测器联用。还提供生物惰性版本的 GPC/SEC 系统、MALLS 检测器和 MAB 色谱柱，避免在分析过程中与不锈钢接触。

## 参考文献

1. Klein, C. Monoclonal Antibodies, MDPI books, 2018

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

RA44973.5708564815

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2020, 2023  
2023 年 3 月 2 日, 中国出版  
5994-5721ZHCN

 **Agilent**  
Trusted Answers