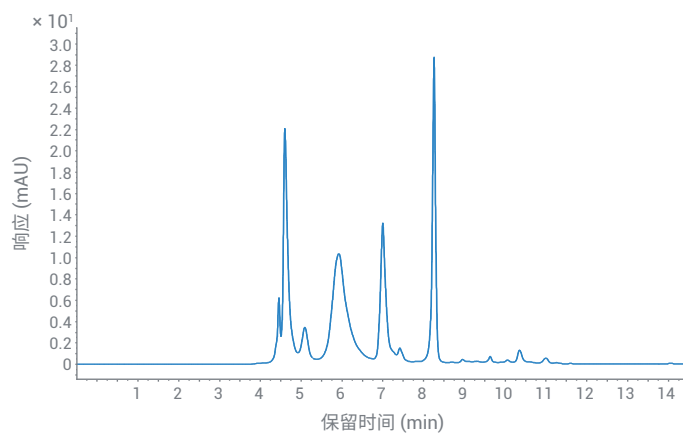


## 提升 mAb 聚集体分析性能

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析



### 作者

Edgar Nägele  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

本应用简报介绍了配备 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和超低扩散毛细管的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过体积排阻色谱 (SEC) 分离蛋白质的出色分离度。生物兼容性 UHPLC 系统能够使用腐蚀性盐缓冲液进行分析，因此节省了维护费用。比较了不同内径毛细管 (0.17、0.12 和 0.07 mm) 在 SEC 分析中的分离度。对一种蛋白质混标和单克隆抗体 (mAbs) (包括聚集体) 进行了分离，并比较了分离度。此外，由单一软件解决方案中的 Agilent OpenLab GPC/SEC 附加软件确定了分子量，实现了一步式工作流程。

## 前言

mAbs 等现代生物药物是高度异质性的化合物。聚集体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一，通常采用 SEC 进行监测。这项技术可根据标准品计算待测物分子量，从而对化合物进行鉴定。此外，该技术还可通过显示更高分子量的聚集体成分（如二聚体和更高程度聚集体）来确认纯度。为获得足够的分离度，推荐使用亚 2  $\mu\text{m}$  颗粒填充的现代 SEC 色谱柱。为实现最佳性能，首选亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱和死体积尽可能小的 UHPLC 仪器。死体积过大因扩散效应而损失这些色谱柱获得的分离度。此外，完全生物兼容的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以完美应对 SEC 缓冲液中常用的高浓度盐，以最低的维护成本提供可靠结果。

本应用简报介绍了现代亚 2  $\mu\text{m}$  SEC 色谱柱在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统上的应用，展示了使用死体积极小的仪器带来的优势。为证明死体积对蛋白质和聚集体分离的影响，使用了不同内径的毛细管。将特征明确的 NISTmAb 通过 pH 诱导和热诱导产生更多聚集体，随后分离这些聚集体。

## 实验部分

### 仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备集成式样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备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池，3 mm，2  $\mu\text{L}$

### 其他部件

Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (G7132A#006)

### 软件

Agilent OpenLab 2.5 版和 GPC/SEC 附加软件 1.2 版

### 液相色谱方法

参数	值
溶剂	磷酸盐缓冲液 (PBS)，pH 7.4
流速	0.35 mL/min
等度分离	
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
样品温度	4 $^{\circ}\text{C}$
进样针清洗	用水清洗 3 秒
进样量	5 $\mu\text{L}$
检测 (VWD)	280 nm，采集速率 20 Hz

### 色谱柱

Agilent AdvanceBio SEC 200  $\text{\AA}$ ，  
4.6  $\times$  300 mm，1.9  $\mu\text{m}$   
(部件号 PL1580-5201)

### 样品

- 校准用蛋白质混标（部件号 5190-9417）：甲状腺球蛋白 (670000 Da)、 $\gamma$ -球蛋白 (150000 Da)、卵清蛋白 (45000 Da)、肌红蛋白 (17000 Da)、血管紧张素 II (1000 Da)
- 人源化单克隆抗体 (mAb) 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
- Agilent NISTmAb，人源化 IgG1k mAb（部件号 5191-5745）

### pH 诱导/温度诱导 NISTmAb 方案

使用流动相将 mAb 稀释至 2 mg/mL 的最终浓度。pH 诱导方法与其他文献所述基本相同，仅有略微改动<sup>[1]</sup>：将 1 mol/L HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调回 6.0。pH 值变化间大约有 1 分钟的等待时间，期间持续缓慢搅拌溶液。将所得溶液在 60  $^{\circ}\text{C}$  下温育 60 分钟。

### 溶剂和化学品

- PBS**：在 25  $^{\circ}\text{C}$  下将 1 片 PBS 片溶于 200 mL 去离子水，得到 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.0027 mol/L 氯化钾、0.137 mol/L 氯化钠，pH 7.4
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

## 结果与讨论

用于蛋白质 SEC 分离的现代色谱柱中填充亚 2  $\mu\text{m}$  颗粒, 可实现最佳分离。而这需要仪器具有优化的低死体积, 因为高死体积特别是内径较大的毛细管会损失获得的分离度。1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5 种蛋白质混标 (包括 3 种二聚体) 的分离结果如图 1A 所示。为了最大程度降低死体积和扩散效应, 我们使用了内径 0.07 mm 的毛细管进行分离。早洗脱的甲状腺球蛋白二聚体 (4.947 min) 实现了部分分离。如需设置用于分子量测定的校准, 使用该混合物中的所有蛋白质生成校准曲线 (图 1B)。获得了四阶最佳曲线拟合。

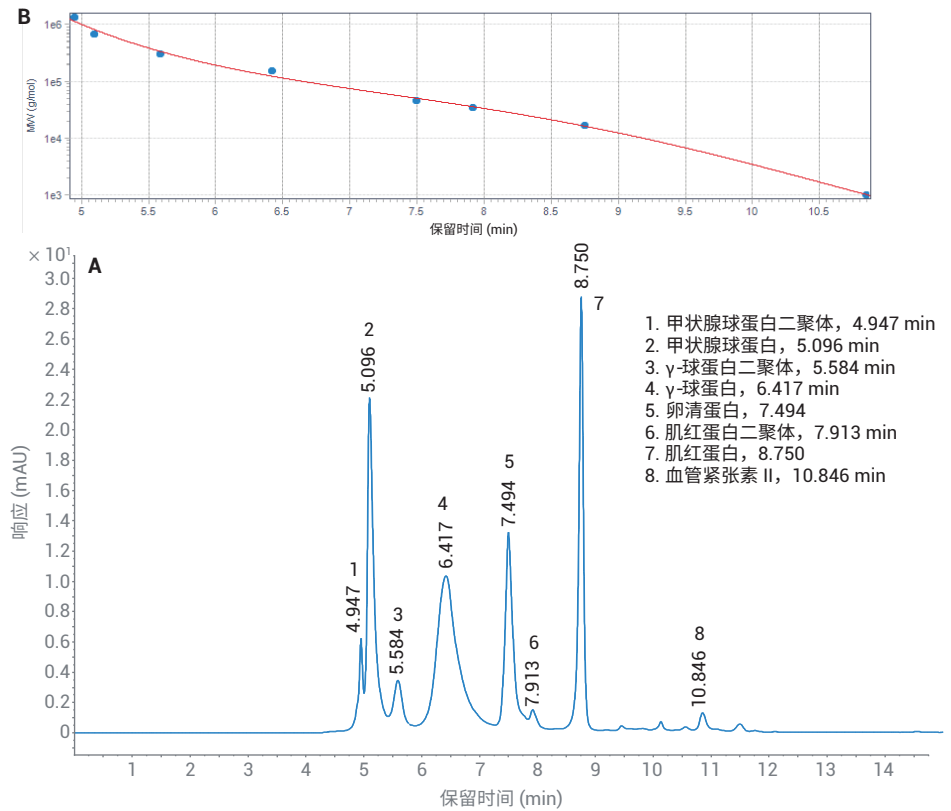


图 1. (A) Agilent AdvanceBio SEC, 200  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  300 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  与 Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (包括 0.07 mm 毛细管) 相结合, 分离包括 3 种二聚体在内的 5 种蛋白质混标。(B) 使用含有几种二聚体的蛋白质混标测定分子量的 SEC 校准曲线

使用校准曲线测定曲妥珠单抗和其中包含的二聚体的分子量 (图 2)。抗体在 6.489 分钟洗脱, 相应二聚体在 5.673 分钟洗脱 (图 2A)。曲妥珠单抗和二聚体最大峰值处测得的分子量分别为 Mp 141566 Da 和 Mp 321609 Da。分子量分布如图 2B 所示, 分子量计算值如图中表 (2C) 所示。

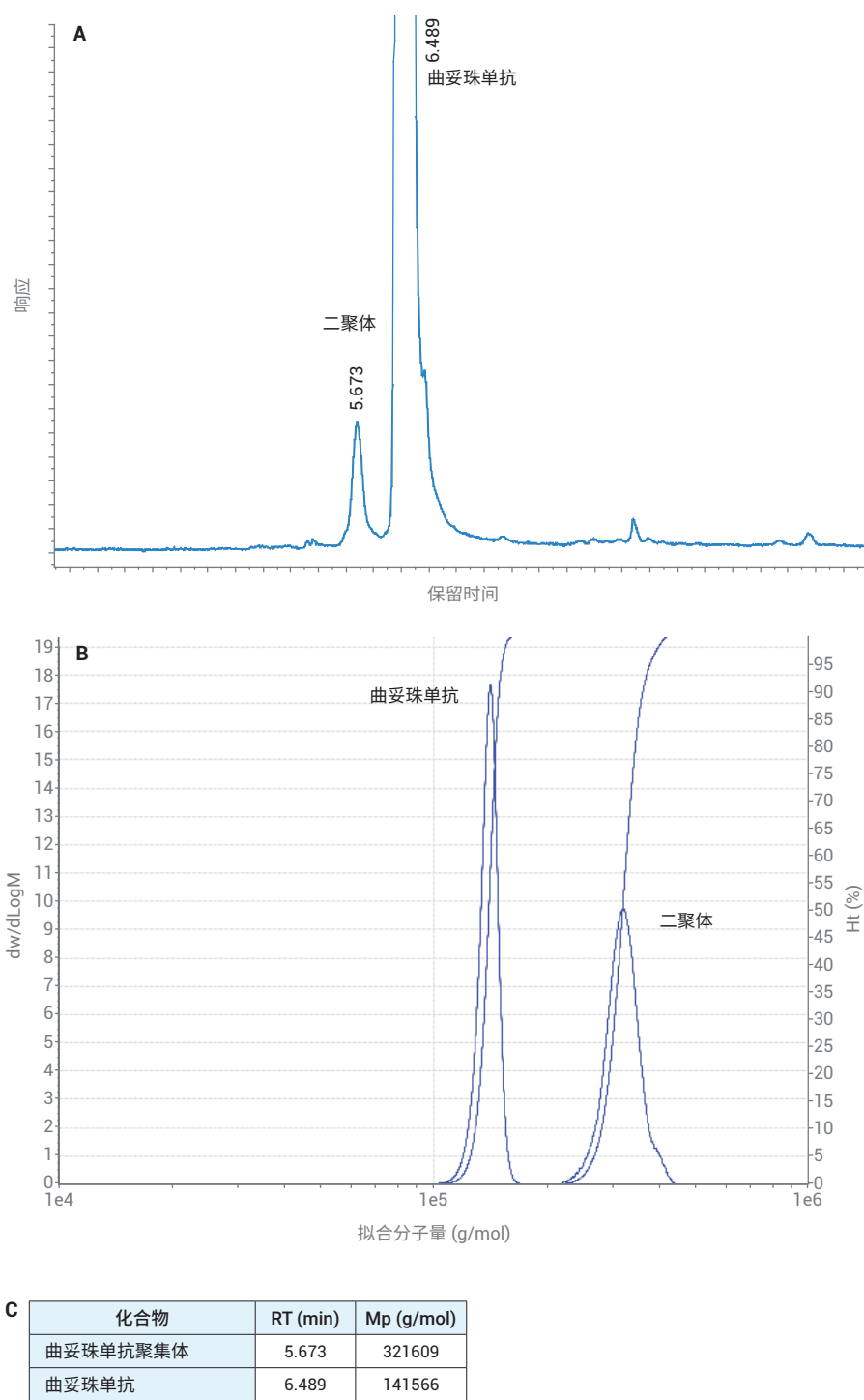


图 2. 曲妥珠单抗和二聚体, 分子量测定。(A) 曲妥珠单抗单体和二聚体的 SEC 分离。(B) 曲妥珠单抗和二聚体的分子量。(C) 表列出了曲妥珠单抗及其聚集体的分子量。Mp: 最大峰分子量

比较内径 0.07 (ULD)、0.12 和 0.17 mm 的毛细管，可以看出所用毛细管内径的影响。为了证明这种影响，我们测定了蛋白质混标（如图 1 所示）第二个峰和第三个峰的分离度（图 3）。采用内径 0.07 mm 的毛细管，可以获得峰 2 和峰 3 的最佳分离度值（图 3 中的表）。使用蛋白质混标的峰 2 测定半峰宽。从测量值可以看出，毛细管内径越大，峰宽越大。

毛细管对曲妥珠单抗及其聚集体的分离影响如图 4 所示。此处可以看到一个额外的低分子量化合物隐藏在主峰下，在使用 0.17 mm 毛细管分离时只出现一个微弱的肩峰，在使用 0.07 mm 毛细管分离时肩峰更加清晰可见。

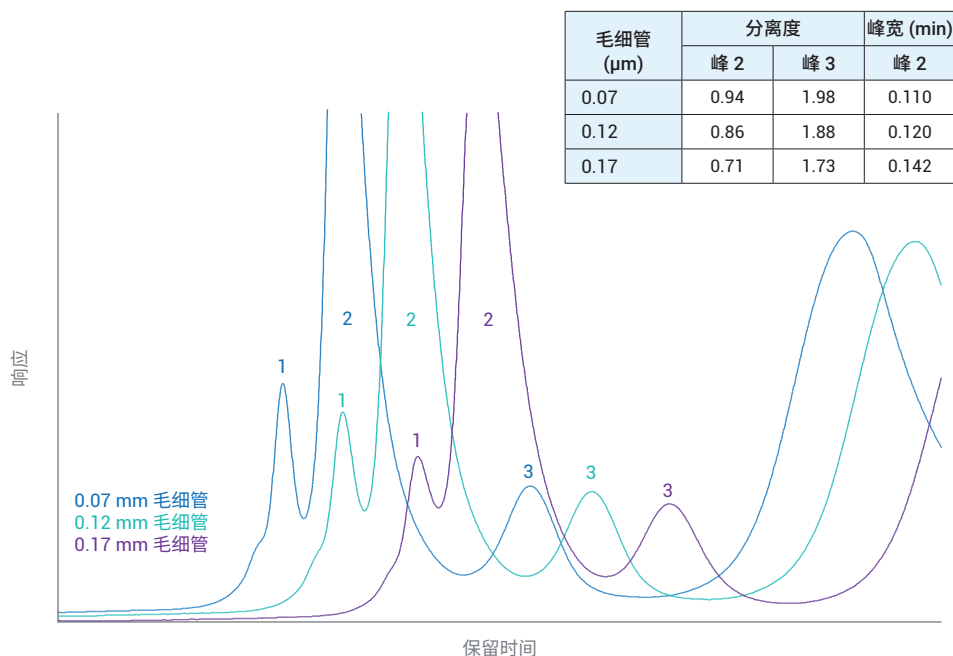


图 3. 比较毛细管内径增加对分离度和峰宽的影响

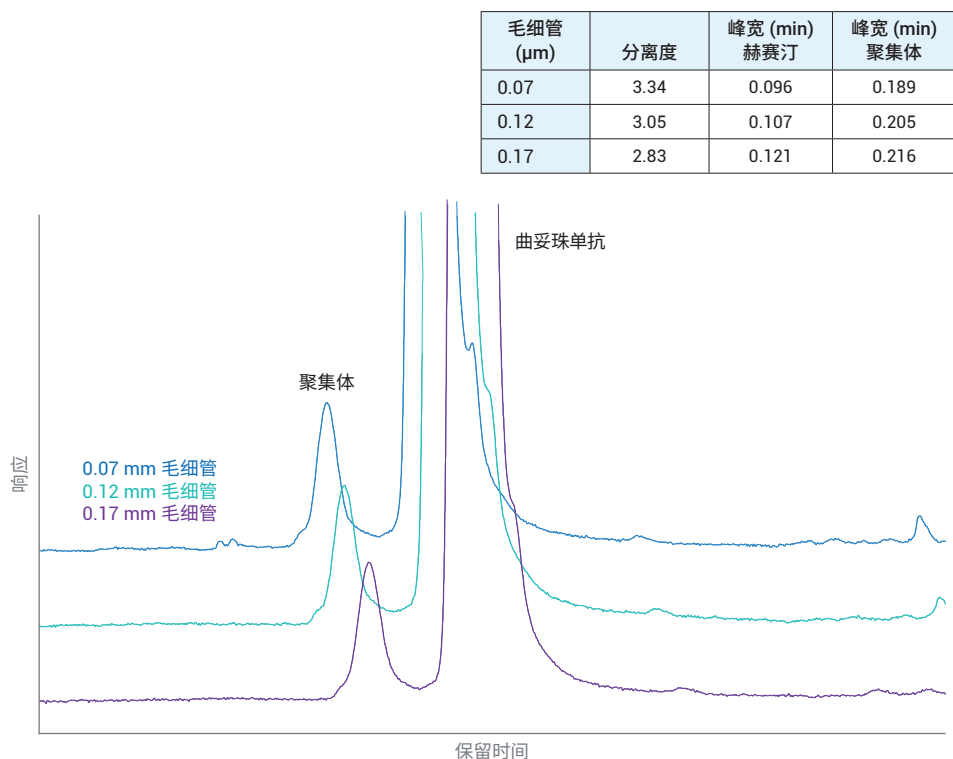


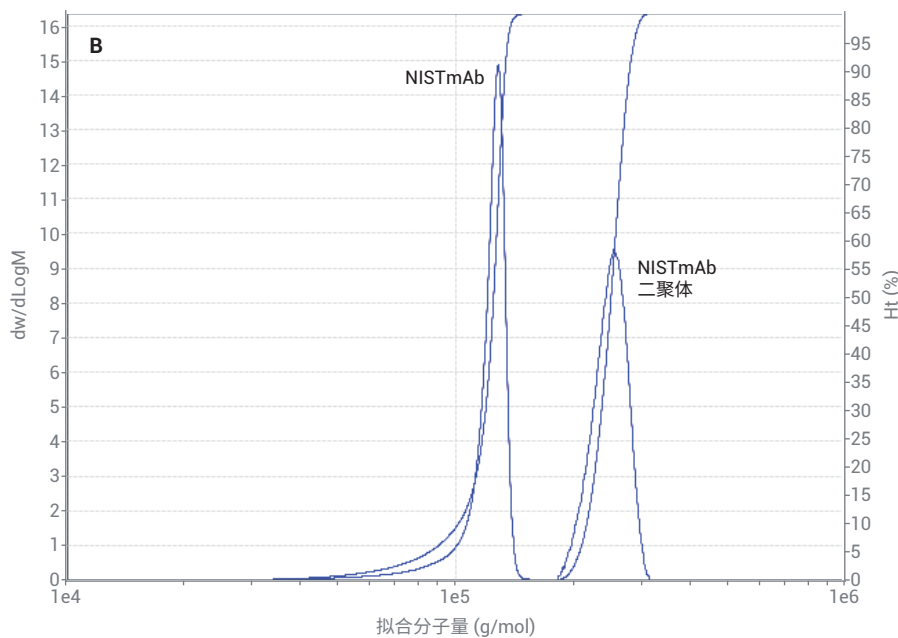
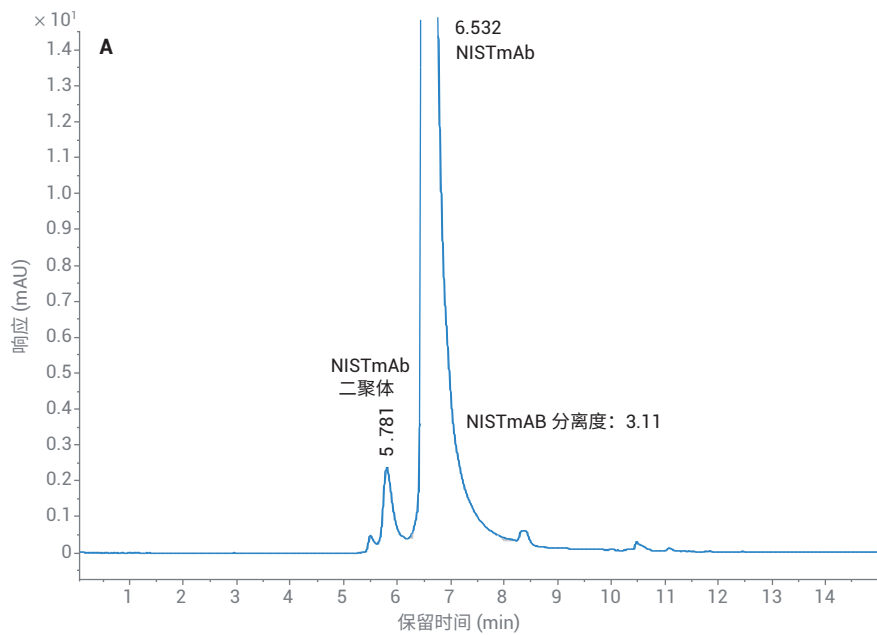
图 4. 所用毛细管内径对曲妥珠单抗与其二聚体的分离度和峰宽的影响

所有毛细管的保留时间和峰面积都具有出色的RSD值(表1)。

另一个例子是,将特征明确的NISTmAb(人源化IgG1κ mAb)与聚集体分离,并测定分子量(图5)。

表 1. 所用毛细管分离曲妥珠单抗的保留时间和峰面积的 RSDs。随着毛细管体积的增加,保留时间相应增加

	0.07 mm 毛细管		0.12 mm 毛细管		0.17 mm 毛细管	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
平均值	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD (%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25



**C**

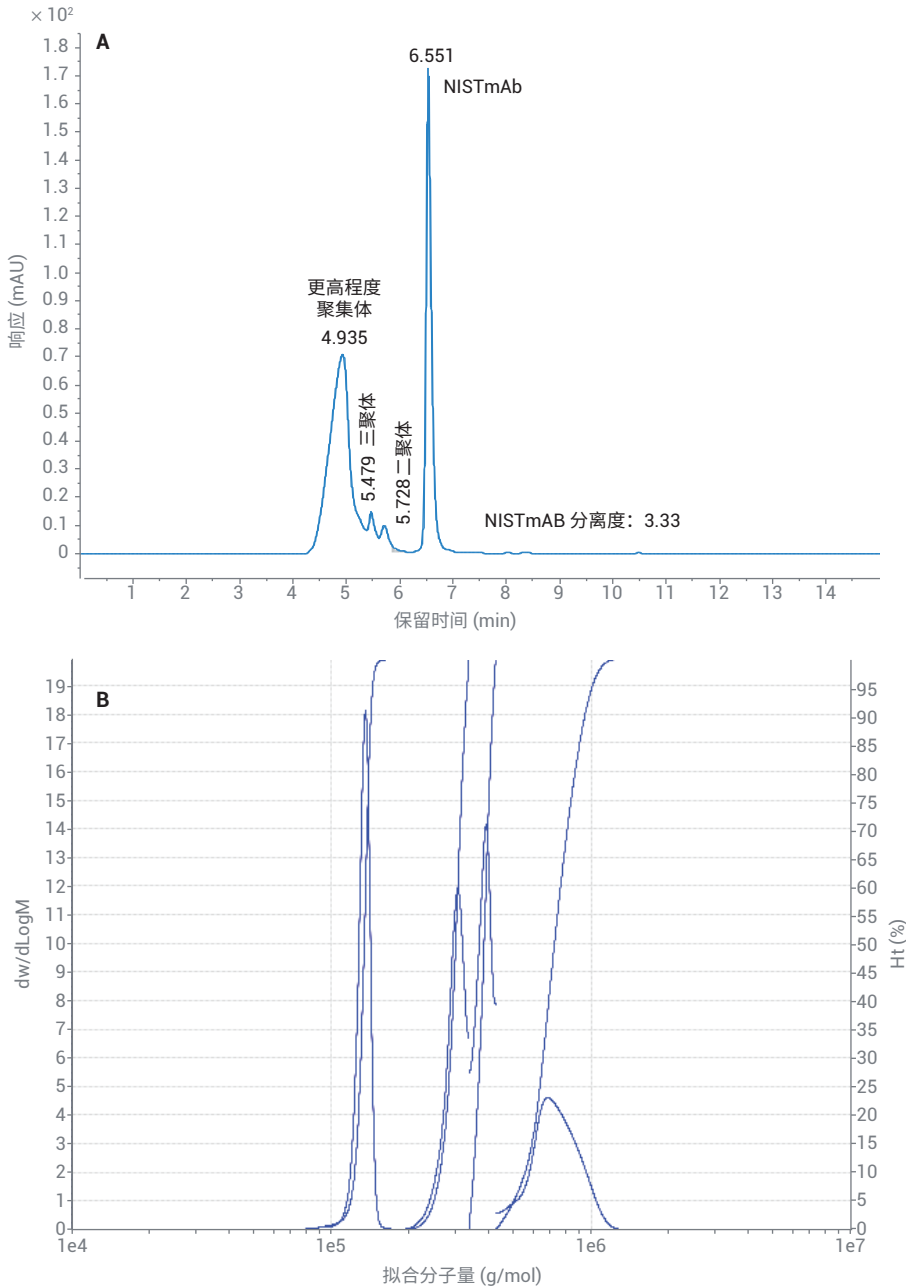
RT (min)	峰面积	峰高	USP 分离度	峰拖尾	半峰宽
5.781	23.80	2.08		1.940	0.175
6.532	3006.00	409.40	3.11	1.569	0.100

**D**

RT (min)	Mp (g/mol)
5.781	305626
6.532	144767

图 5. (A) NISTmAb 与其主要二聚体的分离, 分离度为 3.11。(B) NISTmAb 及其聚集体的分子量。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

在 pH 诱导和温度诱导条件下（见“实验部分”），该 mAb 能够形成较高程度的聚集体（图 6）。使用超低扩散毛细管可分离出更高程度的聚集体（图 6A）。图 6B 和相应表格概述了它们的分子量分布和峰表征值。



**C**

RT (min)	峰面积	峰高	USP 分离度	峰拖尾	半峰宽
4.913	1926.46	70.80		0.781	0.398
5.479	129.63	14.58	0.85	1.277	0.168
5.728	106.16	9.5	0.91	1.985	0.185
6.551	1208.07	172.21	3.33	1.116	0.110

**D**

RT (min)	Mp (g/mol)
4.913	706827
5.479	411615
5.728	321609
6.551	141918

图 6. (A) pH 诱导产生的 NISTmAb 聚集体的分离。(B) 诱导条件下 NISTmAb 产生的聚集体的分子量分布。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

## 结论

本应用简报介绍了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 AdvanceBio SEC 色谱柱结合，因极小的系统死体积和毛细管的超低扩散性能，能够以最高分离度分离蛋白质及其聚集体。1290 Infinity II 生物液相色谱系统是一台完全生物兼容的系统，能够使用高浓度盐缓冲液，从而提供了最低的维护成本和最佳的分离度性能。

## 参考文献

1. 利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6303CHCN，2016

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)

DE.1846180556

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  
2020年10月22日, 中国出版  
5994-2709ZHCN