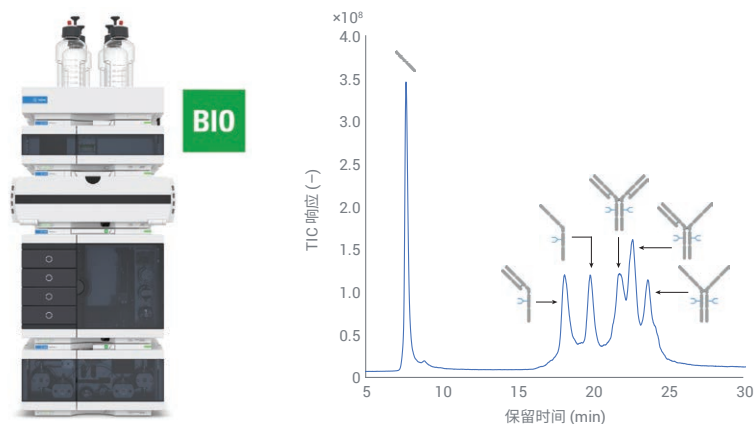


## 检测产品相关的 mAb 片段

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<sup>[1]</sup>。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 LMW 物质（见图 1）或 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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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 色谱柱的卓越性能，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。

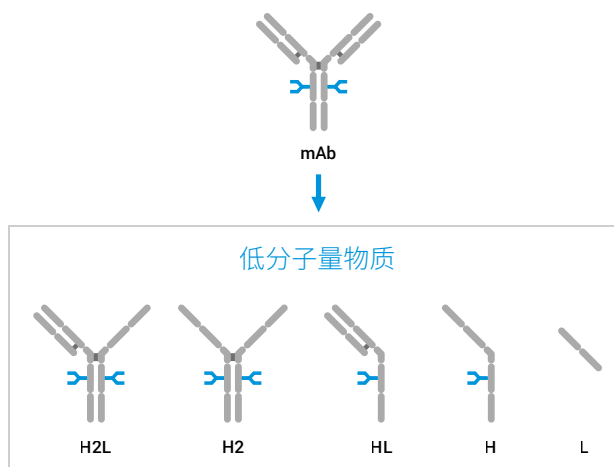


图 1. 单克隆抗体 (mAb) 的还原诱导 LMW 物质的概览图。缩写：H2L (两条重链和一条轻链)、H2 (两条重链)、HL (一条重链和一条轻链)、H (重链) 和 L (轻链)

## 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 大容量柱温箱 (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  $\mu$ 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  $\mu$ m 1000  $\text{\AA}$ , 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  $\mu$ 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。

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 1000 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
UV 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 冲洗: 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极佳性能。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极佳，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。

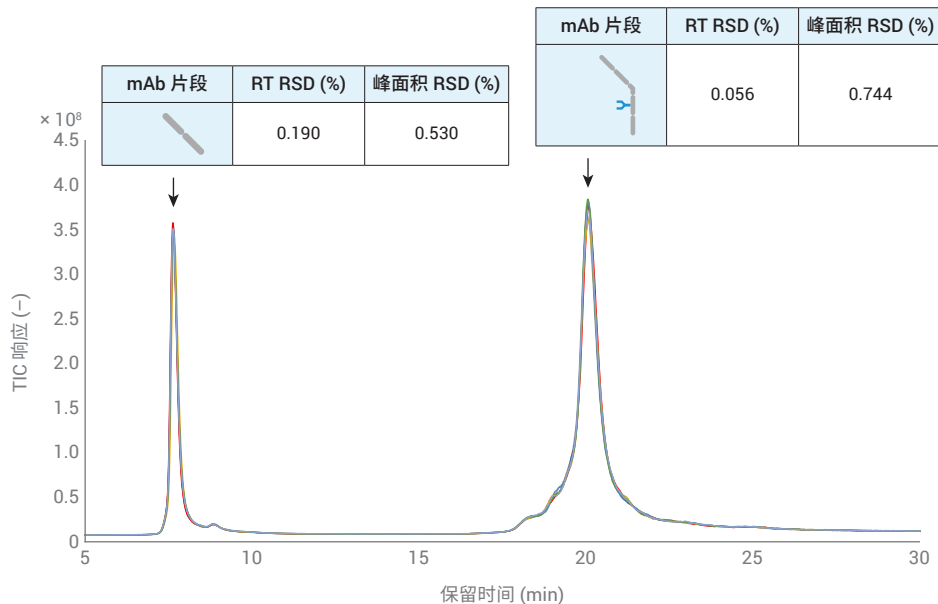


图 2. Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析 NISTmAb 还原生成的重链和轻链片段的相对保留时间和峰面积精度值 (RSD, n = 7)

图 3 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 的首选方法。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 色谱柱的优秀分离能力，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)。

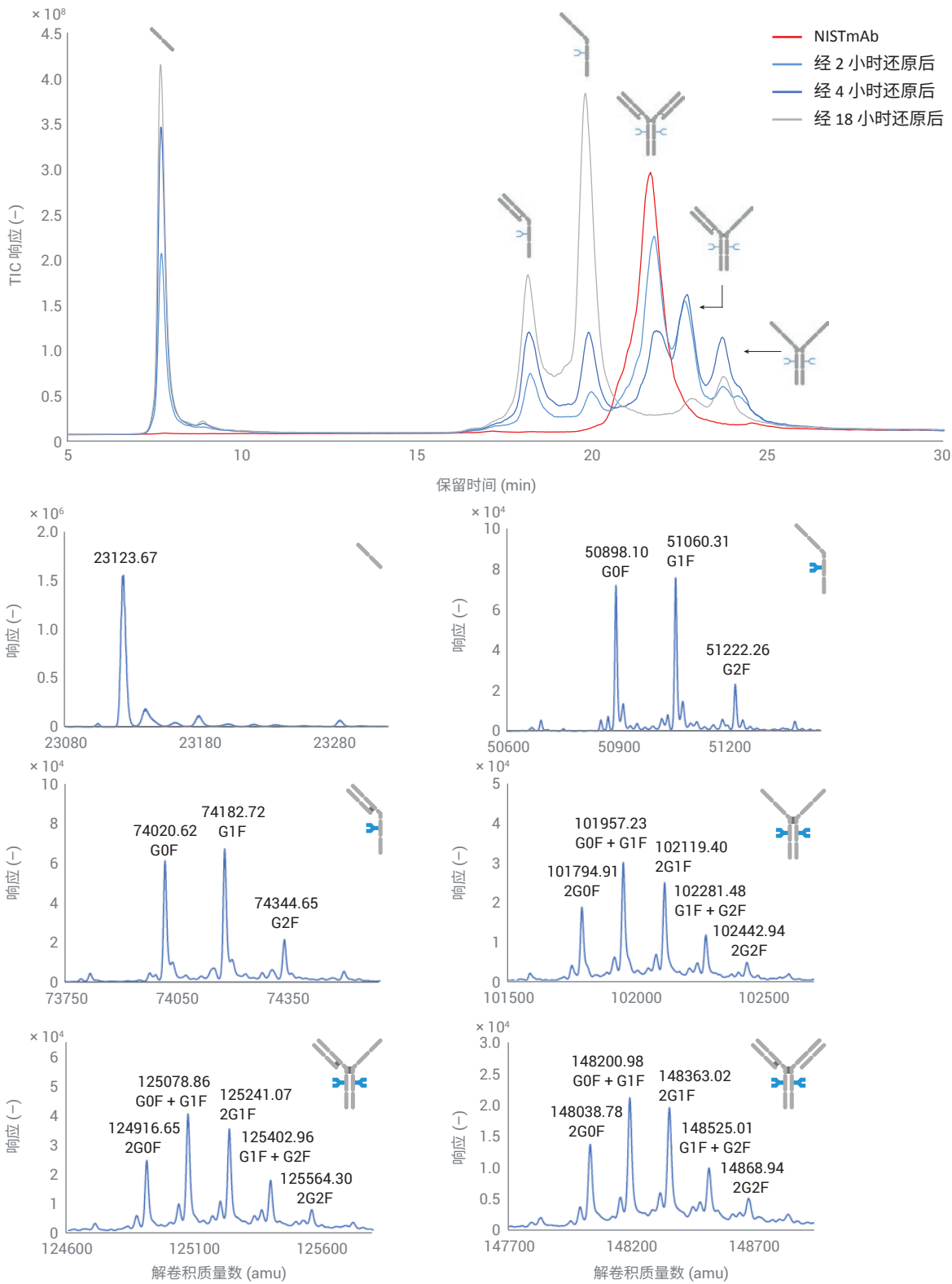


图 3. 由 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 检测的 NISTmAb 部分动态还原的色谱图。各片段的相应提取质谱图显示出 NISTmAb 的特征性糖基化

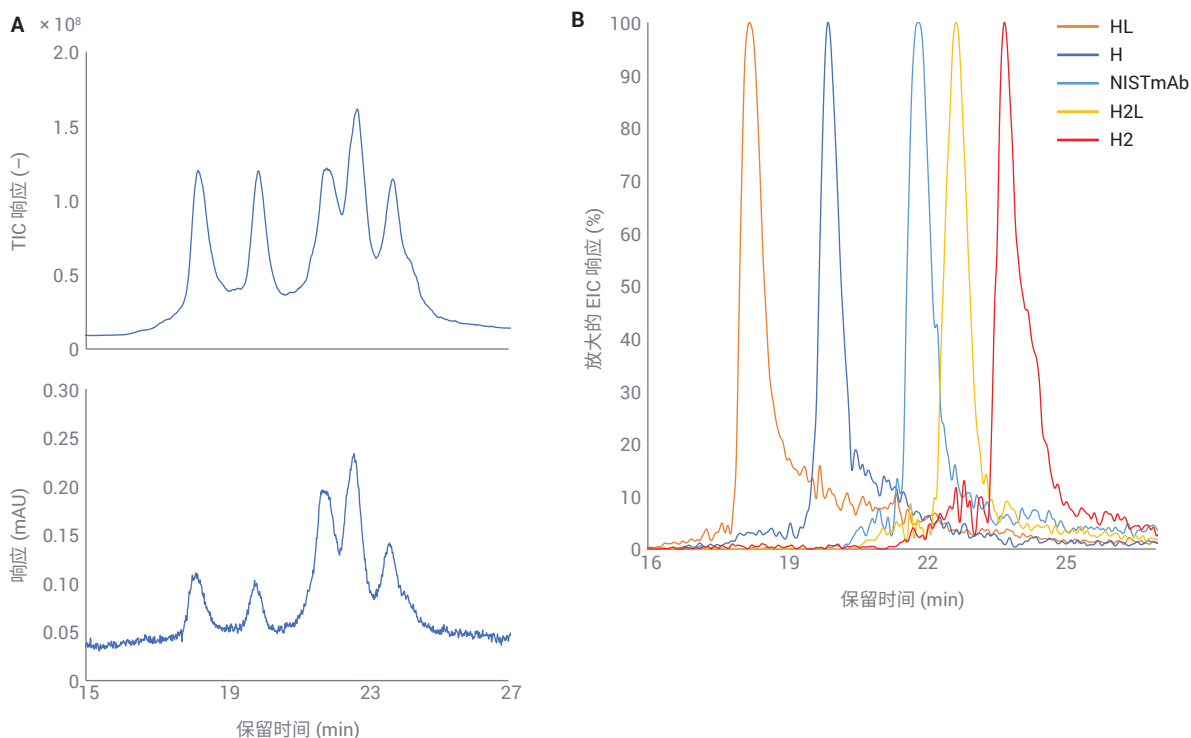


图 4. 一次运行中获得的 NISTmAb 周围聚集片段的 MS 和 UV 谱图 (A)。NISTmAb 片段的提取离子色谱图，展现出出色的峰形 (B)

## 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优秀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

- 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**
- Vandenhede, 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**
- 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

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)

DE44181.2356018519

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 1 月 29 日, 中国出版  
5994-3021ZHCN

 **Agilent**  
Trusted Answers