



# 第十届中国药学会 生物技术药物质量分析研讨会

## 资料汇编

主办：中国药学会 

承办：中国药学会生物药品与质量研究专业委员会

协办：沃特世科技（上海）有限公司 

安捷伦科技（中国）有限公司 

普洛麦格（北京）生物技术有限公司 

赛默飞世尔科技（中国）有限公司 

上海爱博才思分析仪器贸易有限公司 

2022年8月11日至12日 | 线上会议

# 目 次

一、会议日程.....	1
二、大会报告.....	4
1. iPSC质量控制研究进展.....纳 涛	5
2. QbD 分析方法开发和质量控制策略简介.....谢红伟	6
3. mRNA 疫苗质量控制法规解读与实际应用.....马 洁	7
4. 阿达木单抗国抽质量状况与质控方法标准化.....郭 莎	8
5. PEG 化人生长激素安全性相关的质量研究.....王英武	10
6. AAV 基因治疗产品的纯度分析策略与技术.....李 响	11
7. CD19-CART 体外效力方法验证研究分享.....李国亚	12
8. AAV 基因治疗产品质控策略和检测方法.....周泽鑫	13
9. 多维液相色谱技术——质谱联用在抗体和 ADC 分析表征与 质量控制上的应用进展.....陈 熙	14
10. 创新型 T 细胞免疫治疗产品 STAR-T 的开发及临床转化.....赵学强	16
11. 高通量测序用于基因编辑进行质控的挑战和机遇.....许伟宏	18
12. 人生长激素体外活性质量分析方法研究.....张孝明	19
13. 通用型 CAR-T 细胞 IND 申请 CMC 要点分析.....任江涛	20
14. SCIEX 全新高分辨质谱 ZenoTOF 7600 在生物药深度表征中的 应用.....罗 继	21
15. 《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》介绍.....邱 晓	22
16. Waters 高端质谱仪及其在蛋白药物高级结构解析中的应用.....聂爱英	23

17. HPV 疫苗体外效力检验方法验证.....	林知捷	24
18. 基于 MOA 检测的生物发光法生物活性检测技术平台在细胞 基因治疗和传染病研究中的应用.....	王 隽	25
19. 治疗性核酸药物递送关键技术进展.....	朱 晰	27
20. 赛默飞最新应用方案-直面生物治疗性产品分析中的痛点与难点.....	张晓夕	28
<b>三、 论文交流.....</b>		<b>29</b>
1. ADC 酶解产物中药物偶联肽段的高分离度分析.....	Suresh Babu C.V 等	30
2. mAb SEC USP 专论方法在 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱 上的稳定性.....	Hua Yang 等	35
3. 反义寡核苷酸的高灵敏度 LC-MS/MS 生物分析定量 .....	Suma Veeramachineni 等	42
4. 一种新型的反相色谱柱用于合成寡核苷酸的快速高效分离.....	夏敏等	49
5. 全自动在线衍生法进行氨基酸分析检测.....	陆予菲等	59
6. 使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处理 与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程.....	John Yan 等	66
7. 用于 mAb（单克隆抗体）和 ADCs（抗体偶联药物） LC/MS 分离的 PLRP-S 聚合物型反相色谱柱.....	Suresh Babu C.V.等	75
8. 用于 ADCs（抗体偶联药物）药物抗体偶联比（DAR 值）分析的 AdvanceBio HIC 色谱柱.....	夏敏等	82
9. 在 Xevo™ G3 QToF 平台上应用肽图分析和多属性方法（MAM） 工作流程执行 mAb 药品的生物类似药比较.....	Kellen DeLaney 等	88
10. 关于生物治疗药物聚集体和片段分析用的 SEC 色谱柱选择的 思考.....	李艺婷	99



# 会议日程



## 第十届中国药学会生物技术药物质量分析研讨会日程

开幕式				
时 间：2022年8月11日 08:30~08:40				
主持人：中国食品药品检定研究院生物制品检定所所长 徐苗				
致 辞：中国药学会领导				
会议报告				
时 间：2022年8月11日 08:40~11:40				
时 间	报告人	报告题目	单 位	主持人
08:40-09:10	纳 涛	iPSC质量控制研究进展	中国食品药品检定研究院细胞资源保藏研究中心	徐 苗
09:10-09:40	谢红伟	QbD分析方法开发和质量控制策略简介	信达生物制药集团	
09:40-10:10	马 洁	mRNA疫苗质量控制法规解读与实际应用	斯微（上海）生物科技股份有限公司	
10:10-10:40	郭 莎	阿达木单抗国抽质量状况与质控方法标准化	中国食品药品检定研究院单抗室	孟淑芳
10:40-11:10	王英武	PEG化人生长激素安全性相关的质量研究	长春金赛药业有限责任公司	
11:10-11:40	李 响	AAV基因治疗产品的纯度分析策略与技术	中国食品药品检定研究院重组药物室	
午 休				
时 间：2022年8月11日 13:00~17:00				
时 间	报告人	报告题目	单 位	主持人
13:00-13:30	李国亚	CD19-CART体外效力方法验证研究分享	中国食品药品检定研究院细胞室	周 勇
13:30-14:00	周泽鑫	AAV基因治疗产品质控策略和检测方法	广州派真生物技术公司	
14:00-14:30	陈 熙	多维液相色谱技术——质谱联用在抗体和ADC分析表征与质量控制上的应用进展	安捷伦科技（中国）有限公司	
14:30-15:00	赵学强	创新型T细胞免疫治疗产品STAR-T的开发及临床转化	华夏英泰（北京）生物技术有限公司	黄维金
15:00-15:30	许伟宏	高通量测序用于基因编辑进行质控的挑战和机遇	广州辑因医疗科技有限公司	
15:30-16:00	张孝明	人生长激素体外活性质量分析方法研究	中国食品药品检定研究院激素室	
16:00-16:30	任江涛	通用型 CAR-T 细胞 IND 申请 CMC 要点分析	南京北恒生物科技有限公司	
16:30-17:00	罗 继	SCIEX全新高分辨质谱ZenoTOF 7600在生物药深度表征中的应用	SCIEX中国	



## 会议报告

时 间：2022 年 8 月 12 日 08:40~12:00

时 间	报告人	报告题目	单 位	主持人
08:40-09:10	邱 晓	《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》介绍	国家药品监督管理局药品审评中心生物制品药学部	梁成罡
09:10-09:40	聂爱英	Waters 高端质谱仪及其在蛋白药物高级结构解析中的应用	沃特世科技（上海）有限公司	
09:40-10:10	林知捷	HPV 疫苗体外效力检验方法验证	厦门万泰沧海生物技术有限公司	
10:10-10:40	王 隽	基于 MOA 检测的生物发光法生物活性检测技术平台在细胞基因治疗和传染病研究中的应用	普洛麦格（北京）生物技术有限公司	王 兰
10:40-11:10	朱 晰	治疗性核酸药物递送关键技术进展	上海天泽云泰生物医药有限公司	
11:10-11:40	张晓夕	赛默飞最新应用方案-直面生物治疗性产品分析中的痛点与难点	赛默飞世尔科技（中国）有限公司	
11:40-12:00	会议讨论和总结			



# 大会报告



## 纳 涛

中国食品药品检定研究院细胞资源保藏研究中心

### 个人简介：

纳涛：博士 / 副研究员，中国食品药品检定研究院，细胞资源保藏研究中心，主要从事间充质干细胞、人多能性干细胞及其诱导分化细胞和多种组织来源的组织工程细胞的质量控制研究及质量评价工作。共发表论文 30 余篇（SCI 文章 20 篇），参编专著 2 部。做为重要骨干参与了十三五、十四五国家重点研发计划项目和中科院干细胞先导专项等国家级细胞质量控制研究项目的研究工作。2020 年获第二十二届中国科协求是杰出青年成果转化奖。

### 报告题目：iPSC 质量控制研究进展

### 报告摘要：

人诱导多能性干细胞（induced pluripotent stem cells, iPSCs）是通过导入特定的转录因子将各类体细胞重编程的多能性干细胞，它具有自我更新和三胚层细胞分化的潜能。在限定代次范围内并保持未分化状态的 iPSCs 可作为种子细胞，在体外经特定刺激诱导分化为不同类型的前体细胞或终末功能细胞等用于治疗常规药物难以治愈的疾病或补充 / 替代人体病损细胞或组织。为确保 iPSCs 及其诱导分化的各类功能细胞在临床应用的安全性及有效性，iPSCs 作为种子细胞除了需具备明确的细胞鉴别特征、多能性、分化潜能和无各种内外源病毒因子污染外，还需考察其工艺相关的杂质残留和遗传稳定性等质量属性。而 iPSCs 诱导分化的细胞在具备与相应原代体细胞类型相似的生物学功能外，必须对种子细胞或诱导分化不完全的细胞残留、功能细胞的异质性和稳定性等安全性等进行考察。我们对 iPSCs 及其诱导分化细胞的质量要求及相应的评价策略进行了长期研究，初步建立了相关质量属性的评价技术、评价策略和原则，可为在建立 iPSCs 及其诱导分化细胞的质量控制标准提供参考。



## 谢红伟

信达生物制药集团

### 个人简介：

谢红伟，现为信达生物制药产品开发部副总裁。都柏林大学博士，生物药物分析表征和抗体产品开发专家，在美国和中国从事药物分析和蛋白药开发表征 20 多年。对 QbD 生物药研发和单抗、双抗、ADC 产品关键质量属性 CQA 分析和质量控制有一定造诣。参加过多个单抗产品的上市（NDA/BLA/MAA）申报和 30 多个抗体产品的临床（IND/IMPd）申报，在 mAbs 和 Analytical Chemistry 等国内外专业杂志发表学术论文 50 多篇，应邀在国内外行业会议口头报告 50 多次。

报告题目：QbD 分析方法开发和质量控制策略简介

### 报告摘要：

通过分析监控关键质量属性 CQA，产品开发、工艺开发和生产依赖于分析支持和质量控制 QC。质量源于设计 QbD 越来越广泛用于生物医药的开发和质量研究。为更好地基于风险可控、实现科学和高效的分析方法开发和变更控制，提高企业和监管机构的沟通效率，ICH 颁发了基于 QbD 的分析方法开发（AQbD）新法规 Q14（征求意见稿）。本报告将介绍 QbD 分析方法开发和控制策略，结合 QbD 抗体药物开发和质量研究经验，对 ICH Q14 AQbD 的初步理解做一简要分享。



## 马 洁

斯微（上海）生物科技股份有限公司

### 个人简介：

马洁博士，斯微生物方法开发部以及分析部负责人。2014年毕业于英国贝尔法斯特女王大学药学院，2020年加入斯微生物，主要负责 mRNA 疫苗分析方法的开发、生产各环节的质量研究及分析检测工作。

报告题目：mRNA 疫苗质量控制法规解读与实际应用

### 报告摘要：

- 1) 基于 USP 及相关法规，解读 mRNA 疫苗质量控制；
- 2) mRNA 疫苗质量研究（实际应用）



## 郭 莎

中国食品药品检定研究院单抗室

### 个人简介：

郭莎，女，医学博士，副研究员，毕业于北京协和医学院&清华大学医学部，免疫学专业。自2015年8月起在中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室工作至今，主要从事单克隆抗体的质量控制研究工作，侧重于单抗的质控方法开发和稳定性研究。主持国家药典标准提高课题1项，参与国家自然科学基金课题2项，重大新药创制课题3项，于国内外期刊发表第一作者论文12篇（SCI收录2篇），获发明专利2项。

**报告题目：**阿达木单抗国抽质量状况与质控方法标准化

### 报告摘要：

在全球单抗产业蓬勃发展的大趋势下，阿达木单抗一直占据着历年销售榜首的位置，被称为“药王”。单抗作为新型的生物技术药物，价格也一直居高不下。经过2019年医保谈判，2020年正式纳入国家医保，降价幅度达83%，极大降低了患者的用药成本，提升了公众的用药可及性。那么纳入集采之后的阿达木单抗能否达到较高的质量要求并符合相应的质量标准，是药监机构、医疗系统和广大民众切实关心的问题。

在这样的背景下，阿达木单抗于2021年成为首个纳入国家药品评价性抽检的单抗品种。按照国抽计划，共抽检了11个批次阿达木单抗，涉及5个批准文号，涵盖了包括原研药和全部生物类似药在内的5家企业，包括了生产环节和经营环节。由于目前阿达木单抗品种未收录到《中国药典》各论，因此，国抽检验采用各企业已批准的质量标准进行，对抽样批次进行了分子排阻色谱、阳离子交换色谱、还原电泳、非还原电泳、结合活性、生物学活性、蛋白含量共7个关键质控项目的检测，检测结果为全部符合规定。但对比各家企业的检验标准，不管是从方法上，还是从质量标准上，都存在差异，即使是同一检验方法，操作参数也



不同，导致各产品间的质量评价缺少统一的平台和尺度，因此，还对阿达木单抗关键质控方法进行了标准化和联合验证，拟定了相应质量标准。通过此次国抽，判定阿达木单抗总体质量状况为“好”；对阿达木单抗关键质控方法进行了标准化，为国家药品抽检提供了统一的评价系统，为《中国药典》阿达木各论收录提供了技术支撑，也为后续企业提供了质控参考。



## 王英武

长春金赛药业有限责任公司

### 个人简介：

王英武，2003年毕业于吉林大学，获生物化学博士学位，并留校任教。2004年破格为副教授，2006年赴美国麻省理工学院（MIT）攻读博士后，2009年晋升教授，2012年晋升博士生导师。现任长春金赛药业生物药开发院副院长。主要研究方向为蛋白类药物筛选设计与质量控制。从事药物质量研究相关工作近20年，拥有专利4项，出版实验教程一部，在国内外重要期刊上发表SCI收录论文近50篇，参加20余项新药研发项目。

**报告题目：**PEG化人生长激素安全性相关的质量研究

### 报告摘要：

聚乙二醇修饰是指在蛋白质，多肽或其他非肽类分子表面连接一个或多个聚乙二醇（PEG）分子。高分子量PEG本身无毒，无抗原性，高度溶于水。PEG修饰可以显著延长蛋白类药物生物半衰期，增加药物在体内的稳定性，并能有效降低蛋白类药物的免疫原性。截止到目前，已有多款PEG修饰蛋白类药物获得FDA批准。尽管PEG修饰蛋白类药物通常被认为是安全的，但是长期暴露于此类药物，有可能会存在一定的安全性隐患，如组织空泡化，过敏，免疫源性等，特别是在儿童中。

聚乙二醇重组人生长激素注射液，商品名金赛增，是一款PEG修饰蛋白药物，于2014年在中国获批上市，主要用于治疗内源性生长激素缺乏所引起的儿童生长缓慢。本报告针对金赛增与安全相关的质量属性进行了研究，包括但不限于修饰位点、产品相关杂质、宿主蛋白、残余DNA、相关蛋白、免疫源性等。通过对这些质量属性的深入理解，并采取相应措施加以控制，以期最大可能的减小药物安全风险，保证患者的用药安全。



## 李响

中国食品药品检定研究院

### 个人简介：

主任技师。2002 年进入中国食品药品检定研究院工作至今。研究方向为重组 DNA 制品的质量控制研究。核酸和多肽药物、基因治疗药物质量分析技术应用研究，重组药物标准物质的建立及质控方法标准化。创新药物研究开发技术平台建设等。

报告题目：AAV 基因治疗产品的纯度分析策略与技术

### 报告摘要：

AAV 基因产品的特点及纯度分析策略，从病毒颗粒层面，蛋白层面，核酸层面开展 AAV 纯度分析，运用多种分析手段检测病毒颗粒的聚集体，空心 / 实心及部分实心 AAV 颗粒的比例，介绍 AUC，SEC-MALS 及 AEX 技术在病毒颗粒层面上的纯度分析及应用。在蛋白层面上主要介绍 CE 技术在 AAV 衣壳蛋白纯度分析的研究应用，并介绍 CE 技术在核酸层面上对 AAV 基因完整性分析的应用。AAV 纯度分析方法在方法学验证上需要注意的问题。



## 李国亚

中国食品药品检定研究院细胞室

### 个人简介：

李国亚，病原生物学硕士，中国食品药品检定研究院细胞室研究实习员，研究方向为细胞及细胞治疗产品质量控制研究，硕士期间的研究课题为“CD19-CART 细胞体内外有效性的相关性研究”。目前主要工作为免疫细胞治疗产品的质量控制研究。

报告题目：CD19-CART 体外效力方法验证研究分享

### 报告摘要：

由于 CAR-T 细胞是一种个体化产品，质量属性非常特殊，且制备方法多样、工艺复杂，为产品的质量控制带来了极大的挑战。其中的生物学效力便是主要关注点之一，生物学效力检测包括体外法和体内法，尚未建立明确的标准。体外杀伤效力检测方法较多，其中 BATDA 法在 CD19 CAR-T 细胞体外杀伤效力检测实验中已经得到了方法学验证，在方法的通用性方面还需要进行扩展。本实验室前期在 NK 细胞体外杀伤效力检测方法上的研究已经证明，BATDA 法与经典的  $^{51}\text{Cr}$  释放法相关性较好；且目前已上市的 CAR-T 细胞产品及国内的研究均以 CD19 靶点为主，所以 BATDA 法在 CD19 CAR-T 细胞上的应用，包括对方法进行优化、方法学验证及应用，为今后的 CAR-T 细胞研究及产业化生产的质量控制奠定了基础。



## 周泽鑫

广州派真生物技术公司

### 个人简介：

周泽鑫，派真生物质量研究与控制总监，负责 CMDO 事业部质粒、AAV 载体的表征研究、分析开发、质量控制。在派真生物期间成功开发建立了 60 多套载体表征和质控的分析方法。有 10 年的病毒载体类制品的药物研发和分析质控经验，过往主导过多个细胞与基因治疗产品的分析质控板块，相关项目已成功完成 IND 申报。

**报告题目：** AAV 基因治疗产品质控策略和检测方法

### 报告摘要：

目前以 AAV 为递送载体的基因治疗已经在多个遗传疾病上取得成功，相关产品已经上市。但 AAV 基因治疗作为新兴行业其发展仍然处于早期阶段，AAV 的质量研究存在不少的挑战 -- 不同血清型、基因组类型、基因组长度的 AAV 产品有不同的产品特性，在不同的工艺类型下还会产生不同的产品杂质。无论是 AAV 定量和效价的评估还是杂质分析，异质性和多态性的产生导致难以采用单一方法实现对 AAV 质量属性的检测。对 AAV 的工艺支持和质量放行需要建立多个正交分析的表征方法和放行方法来构建质控策略，在同一质量属性的不同检测方法间建立关联性和延续性，并做方法学确认或者验证。AAV 基因治疗产品的质控未形成行业内共识本报告主要针对如何设置 AAV 基因治疗产品的表征分析和质量控制方法矩阵进行探讨，对关键的质控方法进展进行讨论。



## 陈熙

安捷伦科技（中国）有限公司上海第一分公司

### 个人简介：

毕业于北京大学应用化学专业，2009 年在美国获得 Clark University 生物化学博士学位之后，陈熙博士加入了仪器分析行业，开始从事基于 LC 和 LC/MS 的生物制药理化分析的工作，与生物制药企业密切合作，参与开发过多个单克隆抗体、抗体偶联物、多肽药物、核酸药物、PEG 化蛋白等药物相关的分析方法。使用离子淌度和氢氘交换等技术手段进行蛋白高级结构表征和表位分析，在此领域也发表过多篇文章。2021 年加入安捷伦创新中心，致力于与客户深入合作，探索和拓展安捷伦平台在生物制药分析领域的应用开发。

**报告题目：**多维液相色谱技术—质谱联用在抗体和 ADC 分析表征与质量控制上的应用进展

### 报告摘要：

近年来，随着生物制药行业在中国的蓬勃发展，先进的理化分析手段，比如液质联用等分析平台，逐渐被广泛的应用到各类生物药品的研发和质控当中去，从传统的重组蛋白类药物，比如单克隆抗体、ADC 等，到现在的核酸药物、mRNA 疫苗等新型分子，强大的分析平台都是药物研发过程中的重要基石。

除了传统的一维液相质谱联用技术，二维与多维液相质谱联用得到了越来越多的关注。在线的二维液相有非常多的用途，例如对于无法在单一色谱柱上分离的复杂样品进行进一步分离，去除基质或干扰化合物净化样品，目标化合物在线富集，一维质谱不兼容方法的在线样品处理（脱盐，酶切）等，极大的提高的一次分析能够得到的样品信息，被测物的线性动态范围，避免离线方法造成的样品变化。

安捷伦公司的二维系统在重组蛋白药物研发中有着广泛的应用，灵活的泵和阀的选择以及软件控制，极大程度上简化了二维体系的样品开发难度。本次演讲会通过应用实例来展



示多维液相质谱联用技术在抗体和 ADC 药物研发中的独特优势。从相对简单的 HIC/SEC 的 ADC 不同 DAR 值组分，到多维液相的电荷异质性杂质在线酶切和肽图数据分析等，这些解决方案能够对于现有的表征数据提供更进一步的信息和补充。



## 赵学强

华夏英泰（北京）生物技术有限公司

### 个人简介：

赵学强在中科院取得免疫学博士学位，在美国安德森癌症中心从事博士后研究工作和清华大学任副研究员，是北京市海外高层次人才计划专家。已从事肿瘤免疫学研究近 20 年，在《Nature Medicine》、《Nature Immunology》等国际高水平期刊上发表论文 31 篇；申请 30 余项细胞治疗相关专利；主持和参与国家自然科学基金、科技部重点研发项目、北京市科技重大专项等 10 余个项目，总金额超过 5 千万。曾获北京市科委科技进步奖、教育部科学研究优秀成果自然科学一等奖等荣誉。2018 年 3 月与国际知名免疫学家林欣教授将研发成果转化并联合创立了华夏英泰，全面负责公司的运营和管理，为公司搭建了近百人的产品开发团队，吸引了多位具有资深产业背景和丰富药物开发经验的专业人才加入，完成 6 轮近 5 亿元股权融资。公司目前在昌平生命园租赁近 5000 平米研发办公场地，已建立近千平 GMP 级别细胞制备中心，拥有全球首创的 STAR-T 技术平台、enTCR-T 技术平台以及成熟的工艺开发及分析质控产业化平台，产品管线涉及血液瘤、实体瘤及病毒感染相关等疾病治疗。公司 2022 年 6 月递交了第一个双靶点 STAR-T 产品的 IND 申报，并已启动或完成数个研究者发起的临床研究试验，有望在 5 年内推动至少 2 款细胞治疗药物上市。

**报告题目：**创新型 T 细胞免疫治疗产品 STAR-T 的开发及临床转化

### 报告摘要：

合成性 T 细胞受体抗原受体 (Synthetic TCR and Antigen Receptor, STAR)-T 细胞治疗技术是华夏英泰与清华大学联合开发的具有自主知识产权的一种全新型、疗效卓然的细胞治疗技术平台。与当前主流的 CAR-T 技术相比，STAR-T 更具有天然 T 细胞的特性，天然双靶点，毒性低，耗竭慢，浸润性强，对双靶点血液瘤及实体瘤治疗有强大的突破优势。



血液瘤方向，单靶点 CD19 STAR-T 临床数据已在 2020 年美国血液学年会（ASH）会议上做专题报告，并被美国血液学会官方媒体《Hematology News》头版重点报道；2022 年 5 月在国际知名血液学杂志《American Journal of Hematology》发表了经长期随访确证的临床数据。双靶点 CD19/CD20 STAR-T 临床数据在 2021 年欧洲血液学会（EHA）发布，并于 2022 年 6 月完成 IND 申报，正加速推进临床进程。

STAR-T 针对实体肿瘤的临床前数据发表在 2021 年《Science》子刊，受到业内广泛的关注和认可。STAR-T 有望在 CAR-T 难以攻克的实体瘤领域取得突破性进展，现已启动数项针对肝癌、胃癌、胰腺癌等适应症的探索性临床研究。



## 许伟宏

广州辑因医疗科技有限公司

### 个人简介：

许伟宏博士，广州辑因医疗科技有限公司，生物信息学资深总监。

南加州大学计算生物学博士，曾任哈佛医学院讲师、斯坦福基因组技术中心和麻省总医院研究员。研究方向为生物信息学、基因组技术和转化医学。基因组技术与转化医学研发经验 >15 年，发表研究论文 30 余篇。开发基因组平台技术 4 项，其中转化为产品 2 项。通过深度参与斯坦福基因组技术中心 4 家初创公司 (Ion Torrent, Cellular Research, Guardant Health & Sirona Genomics) 的早期孵化，以及回国后参加多家初创公司的早期研发工作，对基因组技术的开发、应用、监管及市场趋势均有深入的理解。

**报告题目：**高通量测序用于基因编辑进行质控的挑战和机遇

### 报告摘要：

基因编辑技术的出现使得基于生物学中心法则治疗疾病成为可能，这也对基因编辑产品的质量控制系统、方法和监管提出了新的挑战。高通量测序具有极高的灵敏度、特异性和通量，自然而然地被选为基因编辑产品的质量分析方法，从技术和科学两个层面为生物技术药物质量分析领域带来新的发展机会。这包括在靶脱靶检测方案的合理设计、不同类型低频变异的灵敏检测、检测限的临床设置、基因编辑标准品的等效建立、性能验证方案的系统覆盖及脱靶变异的临床解读和干预等问题。这些问题的解决需要学术界、产业界和监管机构等利益相关者的共同努力，建立一个由监管机构领导的基因组编辑产品质控联盟，共同研究探讨该领域快速发展带来的这些挑战，共同为该领域制定一些合理的监管规则和建议。



## 张孝明

中国食品药品检定研究院激素室

### 个人简介：

张孝明，博士。2012年毕业于北京大学生命科学学院细胞生物学系；2013-2019年在新加坡国立大学医学院生物化学系接受博士后训练；2020年加入中检院激素室，主要从事重组激素类及重组酶类药物的检验检定工作。以第一作者身份在 Cell reports, iScience 等杂志发表 SCI 论文和核心期刊文章多篇。

### 报告题目：人生长激素体外活性质量分析方法研究

### 报告摘要：

人生长激素（hGH）生物学活性与其结构功能密切相关，生物学活性检测是评价其质量的有效和必要手段。国际公认的 hGH 生物学活性检测标准方法为动物体内实验法，该方法依据 hGH 对去垂体幼龄大鼠的增重作用来反映 hGH 的生物学活性，存在周期长、个体差异性大、操作熟练度要求高等不足。在全球生物技术药物行业大力发展替代方法研究的形势下，基于细胞的体外生物活性分析方法是否可以用于补充甚至替代体内动物实验法，已成为热点问题。《美国药典》自 2014 版收录 Nb2-11 细胞增殖法作为考察 hGH 原液和注射用 hGH 体外活性的方法，并积极探索该方法替代体内动物实验的可行性。《中国药典》也已收录 rhGH 原液和注射用 rhGH，但活性测定方法仍仅收录体内法。考虑到“补短板”需求，我们研究建立了 Nb2-11 细胞增殖法，并进行了全面的方法学验证。实验结果表明此方法准确度好，精密度高，稳定可靠，与体内动物法检测结果一致性强，该方法可用于 rhGH 产品的生物学活性检测和质量控制。



## 任江涛

南京北恒生物科技有限公司

### 个人简介：

任江涛，中科院博士，宾夕法尼亚大学博士后。师从美国科学院院士，CAR-T之父 Carl June 教授。现任南京北恒生物科技有限公司合伙人兼首席科学家，江苏省淋巴瘤专业委员会委员，湖南大学研究生校外导师。入选江苏省“双创人才”，南京市企业专家工作室等。相关研究成果发表于 Cell Stem Cell, Clinical Cancer Research, Cell Research 等国际期刊，曾先后任职于诺华制药、TCR2 Therapeutics 等。获得国内首个通用型 CAR-T 临床批件，针对 T 细胞恶性肿瘤的通用型 CAR-T 与针对胃癌的四代 CAR-T 获得美国 FDA 孤儿药资格认定。

报告题目：通用型 CAR-T 细胞 IND 申请 CMC 要点分析

### 报告摘要：

1. 通用型 CAR-T 细胞产品开发难点
2. 通用型 CAR-T 细胞 CMC 难点与要点分析



罗 继

SCIEX 中国

**个人简介：**

罗继，硕士，具有 12 年 LCMS 使用经验，于 2011 年加入 SCIEX 公司，主要负责公司生物药及蛋白质组学研究领域的技术支持工作，工作期间接触大量生物制药领域表征分析实际案例，在该领域具备丰富的经验。

**报告题目：**SCIEX 全新高分辨质谱 ZenoTOF 7600 在生物药深度表征中的应用

**报告摘要：**

- 1.SCIEX 全新高分辨质谱 ZenoTOF 7600 硬件特点介绍
2. 深度表征案例分享：研发早期产品中三硫键表征分析
- 3.ZenoTOF 7600 用于单抗样本 Denove 从头测序分析



## 邱 晓

国家药品监督管理局药品审评中心生物制品药学部

### 个人简介：

2016年清华大学博士毕业后进入药审中心生物制品药学部，目前主要从事抗肿瘤生物制品的药学审评工作。作为主要执笔人之一完成了《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》，并参与了多个生物制品变更相关的指导原则的制修订工作。

报告题目：《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》介绍

### 报告摘要：

上市后变更管理是生物制品全生命周期管理中不可或缺的重要环节，需要相关技术指导原则提供必要的指导，以确保上市后变更不会对生物制品安全、有效和质量可控产生负面影响。本次报告内容为概要介绍2021年6月发布的《已上市生物制品药学变更研究技术指导原则（试行）》的起草背景、一般考量、变更分类及技术要求等主要内容，重点通过结合常见生物制品变更举例，对基于风险的变更分级及变更可比性研究方面进行说明，阐释目前技术审评中的考量，同时也对试行一年多来出现的一些比较集中的代表性问题进行说明，以反映当前我们对生物制品上市后药学变更涉及技术问题的认知、观点和建议。



## 聂爱英

沃特世科技（上海）有限公司

### 个人简介：

聂爱英，毕业于复旦大学生物化学专业获博士学位，现就职于 Waters 科技（上海）有限公司，担任全国生物大分子应用经理一职，负责全国生物制药和蛋白质组学的应用开发与技术支持工作。在抗体、ADCs、重组蛋白、疫苗、多肽、寡聚核苷酸等生物技术药物结构分析和质量控制方面有丰富的经验。尤其擅长生物大分子药物的高分辨质谱质量研究，同国内多家知名企业、监管机构开展相关应用与标准方法合作开发，共同建立先进的色谱质谱解决方案。

**报告题目：** Waters 高端质谱仪及其在蛋白药物高级结构解析中的应用

### 报告摘要：

近年来，液质联用技术（LC-MS）成功应用于生物药物开发的不同阶段（研究、开发、QC），已经成为生物药表征不可或缺的技术手段。随着分析要求的逐步深入，蛋白药物高级结构的解析也逐渐走入了大众视野，越来越多的科学家开始致力于研究蛋白的高级结构。

Waters 公司的氢氘交换质谱（HDX-MS）以及环形淌度质谱（Cyclic IMS）以其优异的质谱性能，在蛋白药物高级结构解析的进程中起到了极大的促进作用。本次报告将结合这两种质谱技术，讲述 Waters 高端质谱仪在蛋白药物高级结构解析中的应用。

1. 氢氘交换质谱（HDX-MS）技术的研究进展
2. 环形淌度质谱（Cyclic IMS）技术的研究进展
3. 氢氘交换质谱（HDX-MS）及环形淌度质谱（Cyclic IMS）在蛋白药物高级结构解析中的应用



## 林知捷

厦门万泰沧海生物技术有限公司

### 个人简介：

林知捷先生，现任厦门万泰沧海生物技术有限公司质量控制部门负责人，负责疫苗分析方法开发、验证与转移，产品质量标准的制定，生产工艺变更（如放大与转移）的质量可比性研究工作；负责 QC 实验室的管理。具有 10 多年疫苗分析研发 / 质量控制领域的工作经验。曾负责完成二价宫颈癌疫苗分析研发及相关的注册申报工作。曾获厦门大学药学学士学位及生物学双学位。

**报告题目：**HPV 疫苗体外效力检验方法验证

### 报告摘要：

近几年随着国产 HPV 疫苗陆续上市，体外效力方法在产品放行中也得到了广泛应用。本次报告首先回顾了 HPV 疫苗体外效力方法的开发过程，包括关键抗体的筛选要求、企业效力参考品的研制考虑、关键实验条件的确定及计算模型的选择。在此基础上根据国内外生物制品效价测定方法验证指导原则，完成了专属性、准确度、精密度、线性、范围等指标的验证。

当前体外效力替代体内效力的研究与验证工作发展迅速，替代方法的应用不仅可以减少实验动物的使用量，降低各项检验成本，提高产品放行检验与批签发效率，而且能够保证检验结果更加准确可靠。结合未来分析方法的发展趋势及 3R 原则的贯彻实施，企业积极开展体外效力替代体内效力的验证工作，通过对一系列不同效价样品体内及体外效力的研究，证明二者具有良好的相关性，为替代工作的顺利完成奠定了基础。



## 王隽

普洛麦格（北京）生物技术有限公司

### 个人简介：

Jun Wang is a senior research scientist in Research and Development department at Promega Corporation focusing on Bioassay development. She has 15+ years of biotech experiences for cell engineering and assay development in supporting drug discovery for both small molecule and biological products. During her 8 years tenure at Promega, Jun has developed numerous immune checkpoint bioassays (4-1BB, OX40, GITR, BTLA/HVEM, BCMA et al) and PBMC based ADCC Killing assays serving for cancer immunotherapy and anti-viral drug development such as SARS-CoV-2 and Ebola virus. Prior to joining Promega, Jun held an R&D scientist position in Thermo Fisher Scientific Inc. focusing on developing cell-based reporter assays and biochemical kinase binding assays for HTS small molecular screening. Jun received her M.S in Microbiology from Xiamen University and a second M.S in Entomology from University of Wisconsin-Madison.

**报告题目：**基于 MOA 检测的生物发光法生物活性检测技术平台在细胞基因治疗和传染病研究中的应用

### 报告摘要：

Cell and Gene Therapies (CGT) hold considerable potentials for the treatment of hereditary genetic disorders. the complexity of measuring potency is still an unmet need as the most pressing cause of regulatory delay for cell therapeutics. Meanwhile, viral pathogens are also arising globally at unprecedented rates, with few to no effective interventions available for most emerging viral diseases (EVDs). Vaccines and neutralizing monoclonal antibodies (mAbs) have proven effective in combating EVDs, including COVID-19. However, efforts to develop new vaccines and mAbs are hindered by the lack of safe, rapid, and biologically relevant assays to measure virus neutralization.



To meet these urgent needs, here we developed a quantitative bioassay platform utilizing the HiBiT/LgBiT split luciferase system that can be used to rapidly measure both CAR-T induced target cell killing (TCK) as well as viral entry and neutralization. By a simple add-mix-read format in just a few hours, this HiBiT assay provides killing signal specifically from target cells for CAR therapy. Rapid measurement of viral entry and inhibition by neutralization antibody is also hereby demonstrated using COVID as well as other important EVDs such as Ebola virus (EBOV).



## 朱 晰

上海天泽云泰生物医药有限公司

### 个人简介：

朱晰，博士，副研究员。四川大学华西药学院药剂学博士，哈佛大学医学院联合培养博士研究生。现任上海天泽云泰生物医药有限公司非临床及转化研究、非病毒载体开发高级总监。曾就职于波士顿布里根妇女医院、上海益诺思生物（国家上海新药安评中心）。

工作方向为创新生物制品的非临床向临床转化，及非病毒载体递送系统开发。发表 SCI 论文 40 余篇，包括 PNAS 等行业顶尖杂志。负责或参与创新生物制品非临床研究 20 余项，参与创新药 phase 1 临床研究 10 余项。授权 2 项核酸递送纳米载体美国及国际 PCT 专利。

获美国纳米医学学会起步研究者奖、教育部科研优秀成果自然科学一等奖、上海市青年科技英才扬帆计划等。任四川大学校外硕士生导师。

### 报告题目：治疗性核酸药物递送关键技术进展

### 报告摘要：

随着技术的成熟、资本的推动，核酸药物有望成为继小分子化药和抗体药物后的第三大类型药物，是未来生物制药最具临床潜力的前沿领域之一。但与此同时，传统核酸药物仍存在“难以成药”“不可成药”与“效力不足”等问题。其不稳定性、免疫原性、细胞摄取效率低、内吞体逃逸难等缺陷曾限制了核酸药物的发展。递送技术核酸类药物成药的关键性技术之一，在保护 RNA 结构、增强靶向能力、降低给药剂量和降低毒副作用等方面起重要作用。在众多不同技术原理的递送寄送技术中，LNP 和 GalNAc 是最先成熟并获得临床成功的技术平台。于此同时，在未来的更多的疾病应用场景下，包括遗传性疾病、传染性疾病、肿瘤等方面，更多的新的递送技术可能会崭露头角。该报告将对近年来具有较大转化潜力的新的核酸类药物递送技术进行浅析。



## 张晓夕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

### 个人简介：

张晓夕，2012年毕业于复旦大学，同年加入赛默飞世尔公司，现负责赛默飞色谱与质谱全球制药/生物制药垂直市场团队在上海建立的应用实验室日常管理及方法开发工作。

**报告题目：**赛默飞最新应用方案 - 直面生物治疗性产品分析中的痛点与难点

### 报告摘要：

随着生物制药行业在全球范围内的蓬勃发展，和近三年来的新冠肺炎全球大流行国内外药企均加大了对于产品的研发投入，随之对理化分析所需的各种平台和技术带来了更高的要求。

作为全球科学服务领域的领导者，赛默飞一直致力于帮助客户解决在工作中所遇到的各种挑战。

本次报告将介绍以下两个应用方向的最新方案；

iCIEF 制备和 MS 联用：从 iCIEF 与高分辨质谱在线直联测定完整分子量，到离线收集馏分进行深入肽图分析，直面单抗、ADC 和融合蛋白等样品的电荷变异体分析中的痛点与难点；

mRNA 疫苗：将会介绍 2022 年美国质谱年会上发布的高分辨质谱及 BioPharmaFinder 软件用于 mRNA 疫苗表征的最新方案。



# 论文交流



## ADC 酶解产物中药物偶联肽段的高分离度分析

Suresh Babu C.V, 马玲\*, 安捷伦科技有限公司, 上海, 200080

**【摘要】目的:** 抗体药物偶联物 (ADC) 是用于生物治疗用途的主要蛋白质药物。当细胞毒性药物与单克隆抗体 (mAb) 偶联时, 偶联位点有多种选择。通过高分离度肽谱分析可以实现对 ADC 偶联位点的鉴定。**方法:** 酶将 mAb 裂解成肽段的特异性导致了不同的裂解模式, 并由此生成包含偶联位点的不同肽段。高分离度肽谱分析可用于鉴定由细胞毒性药物的偶联所产生的肽。本文证实了 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱和 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统在 ADC 肽谱分析中的应用。在使用 UV 进行分析时, 实现高分离度对鉴定单个肽非常重要, 因此, 在方法开发时对流速和梯度时间进行了优化以提高峰容量。**结果:** 曲妥珠单抗及其细胞毒性药物偶联物 ADC 的肽谱比较表明了对应于药物偶联多肽的肽谱差异。这些疏水性多肽在 AdvanceBio 肽谱分析柱上得到分离。**结论:** AdvanceBio 肽谱分析色谱柱可为各种类型的肽提供高分离度。在分析疏水性更强的偶联肽时获得了良好的峰形和重现性, 能够实现鉴定和定量分析。

**【关键词】** 抗体药物偶联物、肽谱分析、酶解、肽段、峰容量, 高分离度

## High-Resolution Mapping of Drug Conjugated Peptides in an ADC Digest

Suresh Babu C.V, Ling Ma\*, Agilent Technologies, Inc., Shanghai, 200080

**【ABSTRACT】OBJECTIVE:** Antibody drug conjugates (ADCs) are prime protein drugs for biotherapeutic use. When a cytotoxic drug is conjugated to a biotherapeutic monoclonal antibody (mAb), there are several options for the conjugation site. High separation peptide mapping analysis can be used to identify ADC conjugation sites. **METHODS:** The specificity of the enzyme to cleave the mAb into peptide fragments results in different cleavage patterns, and, hence, peptide fragments, around the conjugation site. High-resolution peptide mapping can be used to identify peptides that are produced as a result of conjugation of the cytotoxic drug. This document demonstrates the use of the Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Column and an Agilent 1290 Infinity LC system for ADC peptide mapping analysis. For analysis using UV, it is important to have high resolution to identify the individual peptides, therefore, the method was developed with an optimized flow rate and gradient time for increased peak capacity. **RESULTS:** Comparison of a peptide map of Trastuzumab biotherapeutic mAb and its cytotoxic drug conjugate, ADC, revealed the peptide map differences corresponded to drug-conjugated peptides. These hydrophobic peptides were resolved on the AdvanceBio

作者: Suresh Babu C.V, 安捷伦科技有限公司耗材与消耗品部应用科学家。主要研究领域: 大分子生物药的表征与分析。  
通讯作者: 马玲, 女, 博士, 安捷伦科技有限公司耗材与消耗品部应用工程师。主要负责生物大分子分析领域色谱柱和耗材的产品推广和应用研究。Email: [ling.ma@agilent.com](mailto:ling.ma@agilent.com), Tel: 15902194841.



Peptide Mapping Column. **CONCLUSION:** the AdvanceBio Peptide Mapping Column provided resolution across the range of peptide types. Good peak shapes and reproducibility were obtained for the analysis of the more hydrophobic conjugated peptides, enabling identification and quantitation.

**【KEY WORDS】** Antibody drug conjugates, peptide mapping analysis, enzymatic hydrolysis, peptide, peak capacity, high resolution

单克隆抗体 (mAb) 已成为治疗癌症和自身免疫性疾病的重要治疗药物<sup>[1,2]</sup>。mAb 的成功推动了各种新一代形式的单克隆抗体的开发, 包括抗体药物偶联物 (ADC), 其通过稳定的连接结合了特异性 mAb 和细胞毒性药物<sup>[1,2]</sup>。ADC 的应用前景在于可以将高毒性药物选择性地运送至肿瘤细胞, 从而显著减少典型化疗通常会带来的副作用。肽谱分析是分析和表征这些分子的重要方法。在 mAb 和 ADC 胰蛋白酶酶解产物中存在数百种具有不同理化特性的肽, 并且这些肽的浓度范围较宽, 因此对分离能力提出了极高的要求。本文介绍了配备 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱如何成功应对这些极具挑战性的分离。

## 1 仪器与材料

治疗性蛋白质 ADC 和曲妥珠单抗购自当地药店。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级。mAb 的胰蛋白酶酶解步骤同其他地方的描述<sup>[3]</sup>一致。在用胰蛋白酶酶解前, 在变性条件下对二硫键进行还原与烷基化。

采用配备下列配置的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统开展研究:

- 带一体式真空脱气机的 Agilent 1290 Infinity 二元泵(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器(DAD) (G4212A), 配备 10 mm 最大光强流通池 (G4212-60008)
- AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (部件号 651750-902)

## 2 色谱分析条件

色谱柱为Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm (部件号 651750-902)。流动相为A相0.1%三氟乙酸水溶液, B相含0.08%三氟乙酸的90%乙腈溶液。梯度洗脱 (0-60min, 3%-50%B; 60-65min, 50%-90%B; 65-66min, 90%B; 66-70min, 90%-3% B), 后运行10min。进样量 10μL(10μg/μL), 流速0.5mL/min, 柱温60 °C, 数据采集210 nm/4 nm, 252 nm/4 nm。

## 3 结果与讨论

峰容量通常用作评估标准以衡量给定色谱条件下色谱柱的性能。mAb 酶解将产生许多待分析的

肽段。因此，有必要开发一种能够提高峰容量的方法。另外，峰容量在肽谱分析研究中至关重要，以解决较小的杂质峰或样品异质性。由于发生糖基化和细胞毒性药物偶联的ADC的异质性，相比于未偶联的mAb，ADC在胰蛋白酶酶解后将产生更多复杂的肽段。为监测胰蛋白酶酶解后的ADC肽段混合物，梯度时间和流速的优化对于实现更高的峰容量至关重要。

通过用梯度时间除以基线处五个肽段峰的平均峰宽 ( $5\sigma$ )，计算得出峰容量值。图1展示了梯度时间和流速对峰容量的影响。结果表明， $2.1 \times 250 \text{ mm}$ ,  $2.7 \mu\text{m}$  色谱柱在  $0.5 \text{ mL/min}$  流速和60分钟的梯度时间下具有最高峰容量。因此，这些条件是以高分离度鉴定具有细胞毒性药物偶联的肽段的最佳条件。

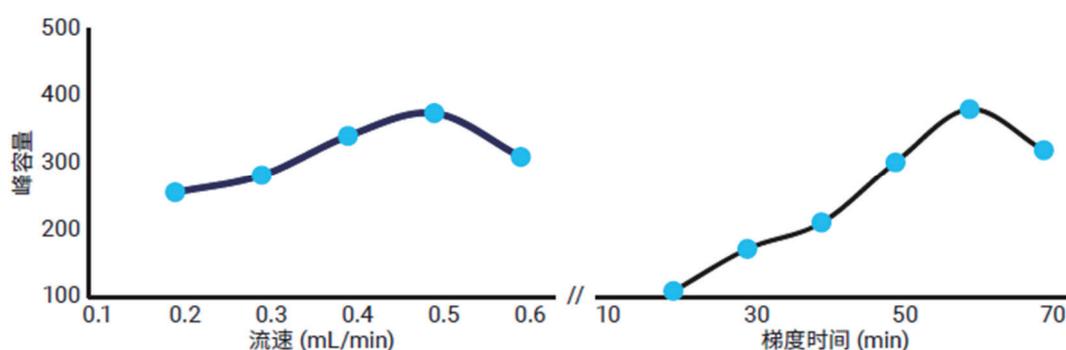


图1 流速和梯度时间对峰容量的影响

图2展示了胰蛋白酶酶解的ADC的肽谱。肽谱表现出优异的性能，在整个梯度曲线上实现了基线分离和良好的分离度。根据过往有关ADC的肽谱分析的文献报道<sup>[4]</sup>，与150 mm色谱柱（220 分钟）相比，250 mm 色谱柱（60 分钟）的分离时间得到显著改善。获得的峰容量值为 354，并且RSD值证明保留时间和峰面积具有优异的重现性，从而也表明了系统优异的精密度（表1）。

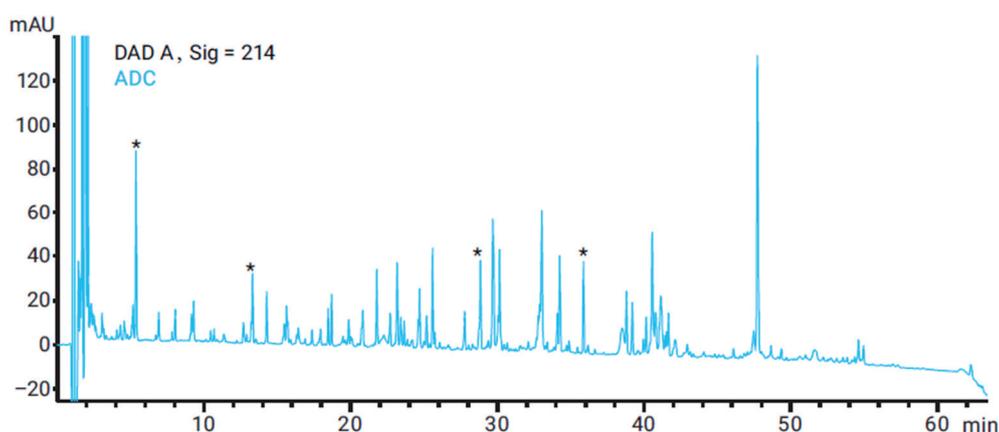


图2 胰蛋白酶酶解的ADC在Agilent AdvancedBio肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱

(选择标有\*的峰计算RSD)

表1 图2所示的峰的保留时间和峰面积 RSD (n = 5)

	平均 RT	RT RSD(%)	平均峰面积 (mAU/min)	峰面积 RSD(%)
峰1	5.37	0.13	369.2	0.76
峰2	14.27	0.06	106.1	1.66
峰3	28.84	0.02	202.61	0.09
峰4	35.86	0.02	193.83	0.58

为鉴定连接有细胞毒性药物的肽段，通过监测 252 nm 处的UV迹线来分析mAb及其偶联物ADC酶解后的肽段（图 3）。ADC的肽谱不同于曲妥珠单抗的肽谱。很明显，ADC中疏水性更强的药物连接的肽更晚洗脱（约40至60分钟）。两个肽谱的比较表明，ADC酶解产物中鉴定出的一组较晚洗脱的肽在mAb酶解产物中并未出现。这些疏水性多肽是具有细胞毒性药物偶联的肽段。

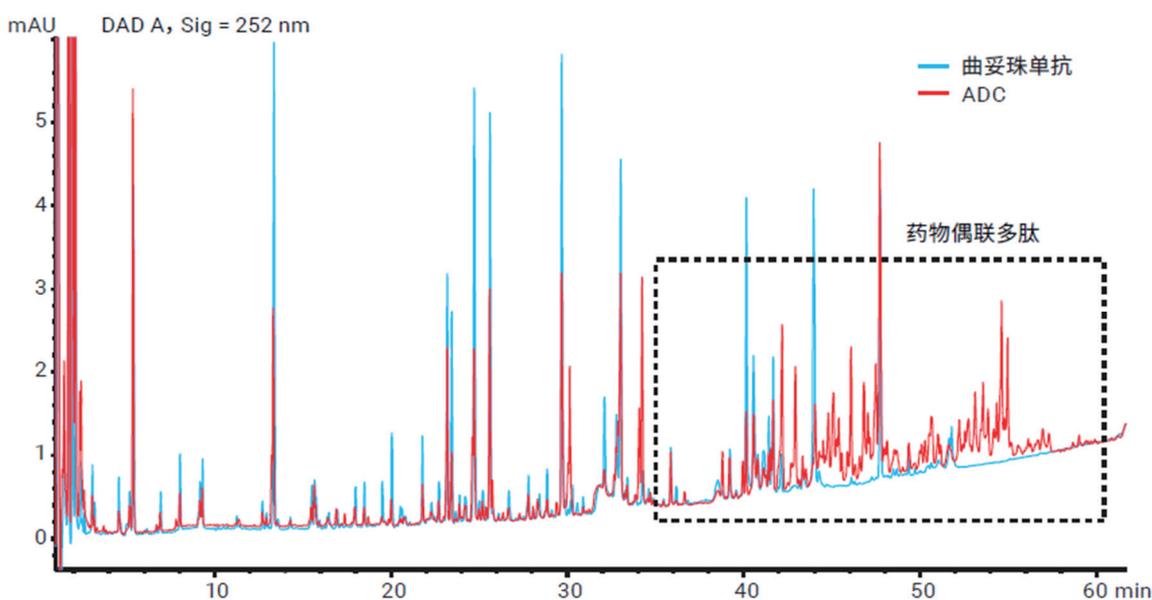


图3 胰蛋白酶酶解的ADC和曲妥珠单抗在Agilent AdvancedBio肽谱分析色谱柱上分离后所得的肽谱的叠加图

#### 4 结论

将250mm Agilent AdvanceBio肽谱分析色谱柱与Agilent 1290Infinity 液相色谱系统配合使用时，获得了高分离度肽谱。通过比较mAb及其偶联物ADC的肽谱，能够鉴定出ADC酶解产物中与细胞毒性药物偶联的肽。另外，我们证明了AdvanceBio肽谱分析色谱柱可为各种类型的肽提供高分离度。在分析疏水性更强的偶联肽时获得了良好的峰形和重现性，能够实现鉴定和定量分析。

#### 参考文献

[1] Sandra, K.; Vandenheede, I.; Sandra, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein



biopharmaceutical characterization [J]. *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 [J]. *Anal. Chem*, 2016, 88, 480–507.

[3] Gudihal, R.; Waddell, K. Identification of Oxidation Sites on a Monoclonal Antibody Using an Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/ MS System Coupled to an Accurate-Mass 6520 Q-TOF LC/MS (使用 Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS 系统与精确质量6520 Q-TOF LC/MS 联用技术进行单克隆抗体氧化位点的鉴定), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-8768EN, 2011.

[4] Kim, M. T.; et al. Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate [J]. *Bioconjugate Chem*, 2014, 25, pp 1223–1232.



# mAb SEC USP 专论方法在 XBridge Premier SEC 蛋白分析

## 专用柱上的稳定性

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu, Jiaying Hong

沃特世公司

**【摘要】**体积排阻色谱(SEC)已广泛用于基于分子大小的杂质分析。在本应用纪要中,我们展示了基于 SEC 的 mAb 分析 USP 专论方法在使用 Waters XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)时可保持稳定。该色谱柱结合了 Waters MaxPeak Premier 高性能表面(HPS)和 BEH 颗粒技术的 SEC 性能优势,可测定单克隆抗体的 HMWS、单体和 LMWS。使用 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱的 USP 方法可以作为一个有效起点,开发基于分子大小测量其他单克隆抗体中杂质的方法。XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)与 7.8 × 300 mm 色谱柱(填充 5 μm 颗粒,孔径 250 Å 的 L59 SEC 色谱柱,使用 USP 方法中指定的流动相)相比,获得的结果一致。此外,XBridge 色谱柱对于 SEC 流动相 pH 和离子强度的变化,以及色谱柱之间的变化均能表现出良好的稳定性。

**【关键词】**XBridge Premier SEC; 体积排阻色谱; mAb; 高性能表面技术

美国药典(USP)通则<129>(重组治疗性单克隆抗体的分析程序)中提供了通过体积排阻色谱(SEC)法测定重组治疗性单克隆抗体(mAb)中杂质的步骤 1。该方法使用 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱,其中填充 5 μm 颗粒,孔径 250 Å,用于监测高分子量物质(HMWS)、mAb 单体以及低分子量物质(LMWS)。假设有三分之一的 mAb (Fab 或 Fc 结构域)为 LMWS2。

沃特世的 MaxPeak Premier 高性能表面(HPS)技术优势,与全新基于 BEH 的颗粒键合技术相结合,大幅减少了意外的次级离子相互作用和疏水相互作用,有助于实现可靠的 mAb 大小异构体 SEC 分析。

在本应用纪要中,我们展示了分析 USP 单克隆 IgG 标准品的 USP 方法在使用 Waters XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 7.8 × 300 mm)时可保持稳定。此外,使用 XBridge 色谱柱与 USP 方法规定的 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱(填充 5 μm 颗粒)测定目前美国市售的四种单克隆抗体(mAb)生物类似药的 HMWS 和 LMWS,获得了一致的结果。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

液相色谱系统: ACQUITY UPLC H-Class Bio (美国沃特世公司)。

作者简介: 洪佳莹, 硕士, 沃特世科技(上海)有限公司, E-mail: JiaYing\_Hong@waters.com



## 1.2 样品

单克隆 IgG 系统适应性标准品购自 USP。分析的 mAb 生物类似药为贝伐单抗(Mvasi)、英夫利昔单抗(Avsola)、利妥昔单抗(Ruxience)，及其原研药曲妥珠单抗（赫赛汀）。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱：XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱（250Å，2.5 μm，7.8×300，部件号：176005070）/ BioSuite Diol (OH) 色谱柱，250 Å，5 μm，7.8×300 mm（部件号：186002165）；柱温：室温；进样量：5–20 μL；流速：0.5-1 mL/min；流动相 A：400 mM 磷酸二氢钾；流动相 B：400 mM 磷酸氢二钾；流动相 C：1 M 氯化钾；流动相 D：水；缓冲剂传输浓度：200 mM，流动相梯度见表 1。样品瓶：聚丙烯 12×32 mm 螺纹颈口样品瓶；样品温度：10 °C。

梯度表（Auto-Blend 方法，使用经验表）

时间(min)	流速(mL/min)	pH	盐(mM)	盐曲线
0.0	0.5	6.2	250	
35.0	0.05	6.2	250	11

通用四元液相色谱系统的等效梯度表如下

时间(min)	%A	%B	%C	%D
0.0	36.7	13.3	25.0	25.0
35.0	36.7	13.3	25.0	25.0

## 3 结果与讨论

### A. 使用 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱的 USP 方法稳定性

如图 1 所示，使用 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8×300 mm)分析了 USP 单克隆 IgG。USP 方法中使用的流动相是 200 mM 磷酸钾和 250 mM 氯化钾，pH 6.2。此外，还通过改变 pH（6.0 和 6.4）和离子强度（200 mM 和 300 mM 氯化钾）运行了其他四种流动相条件，研究方法稳定性。

在不同的流动相条件下获得了相似的分离效果（图 1B），表明在使用同一 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8×300)的情况下，USP 方法在测试的 pH 和离子强度范围内可保持稳

定。USP 通则<129>中设置的定量标准为，HMWS 的峰面积百分比必须在 0.4%–0.67%之间，且 LMWS 的峰面积百分比不得超过(NMT) 0.2%。如图 1B 中所示，HMWS 在 10.7-12.3 分钟之间洗脱，LMWS 在 15.5-16.3 分钟之间洗脱。HMWS 和 LMWS 的平均峰面积百分比在所有流动相条件下均符合定量标准，如色谱图中所示(n=2)。

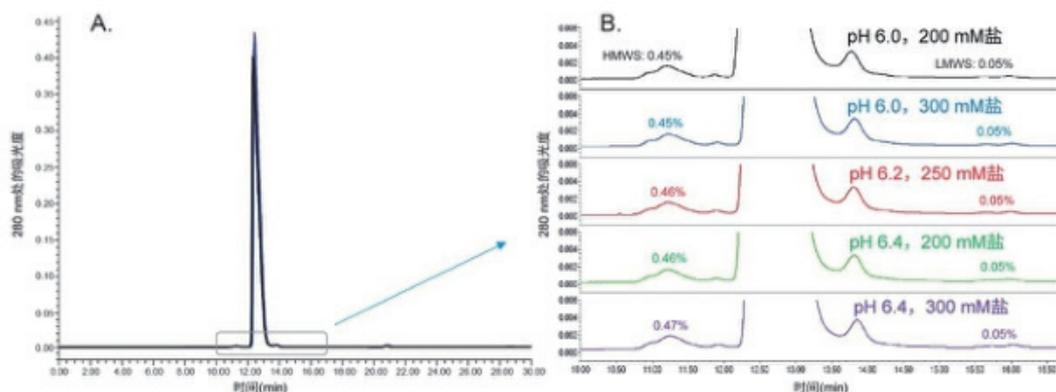


图 1.使用 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)在五种流动相条件下分析用于单克隆 IgG 大小异构体测定的 USP 专论方法。A. 全尺寸叠加色谱图。B. HMWS 和 LMWS 的放大视图，每张色谱图上显示了平均峰面积百分比(n=2)。

图 2 显示了填充 5 μm 颗粒的 L59 SEC 色谱柱（即用于单克隆 IgG 大小异构体测定的 USP 方法色谱柱）在 USP 指定的流动相下的分析结果。色谱图中显示了 HMWS 和 LMWS 的平均峰面积百分比，均符合定量标准(n=2)。

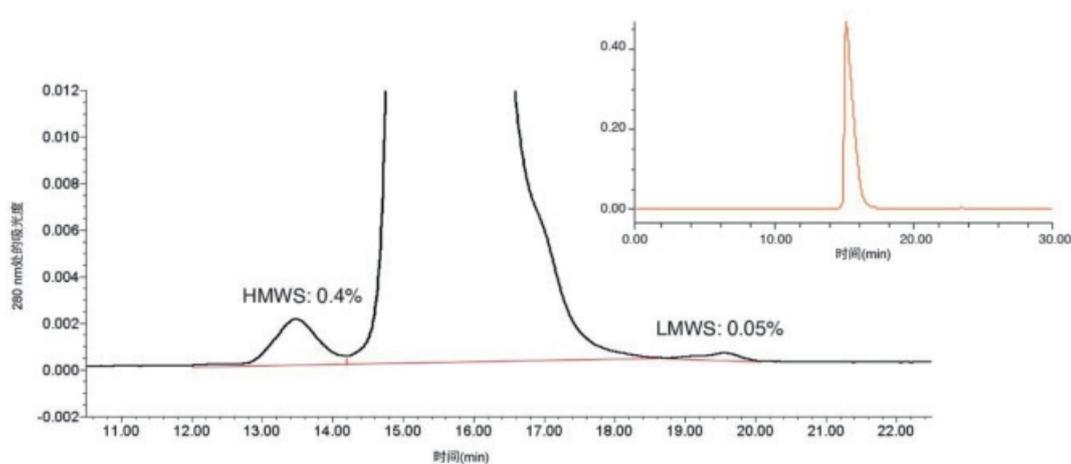


图 2.使用填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱在通则<129>中规定的流动相条件（200 mM 磷酸钾和 250 mM 氯化钾，pH 6.2）下分析用于单克隆 IgG 大小异构体测定的 USP 专论方法。色谱图中显示了 HMWS 和 LMWS 的平均峰面积百分比(n=2)。插图显示了色谱图的全尺寸视图。

### B. 使用 USP 方法对 mAb 生物类似药进行杂质分析

使用 USP 方法在来自不同批次的三根 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 SEC 色谱柱上分析 USP 单克隆 IgG 和四种美国市售的 mAb 样品(曲妥珠单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗)(图 3-图 7)。在分析 mAb 生物类似药和原研药时,除 Premier 色谱柱#3 外,所有色谱柱的流速均为 0.5 mL/min, Premier 色谱柱#3 的流速为 1 mL/min。在大多数色谱柱上均进行了重复进样(n=2)。误差条指示结果的范围。

使用来自三个批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm 颗粒)以及上文详述的 USP 方法推荐色谱柱测定所有五种 mAb 的 HMWS 和 LMWS,均获得了一致的结果。对于 LMWS1, Premier 色谱柱#3 的结果百分比偏低,原因可能是在较高流速下,单体峰和 LMWS1 之间的分离度有所降低。然而,在大多数情况下,无论流速高低,所有三根 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)测得的 HMWS 和 LMWS 峰面积百分比均非常相似,这表明 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)可用于更高的样品通量。对于测定的所有 mAb, LMWS1 在 USP 方法色谱柱上均未充分分离,无法进行可靠的定量。因此,图中不包含它的任何数据。在某些情况下,使用 USP 方法色谱柱测得的 HMWS1 峰面积百分比低于 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm),这可能是因为在填充 5 μm 颗粒的 USP 方法色谱柱上, HMWS1 与单体峰之间的分离度较低。

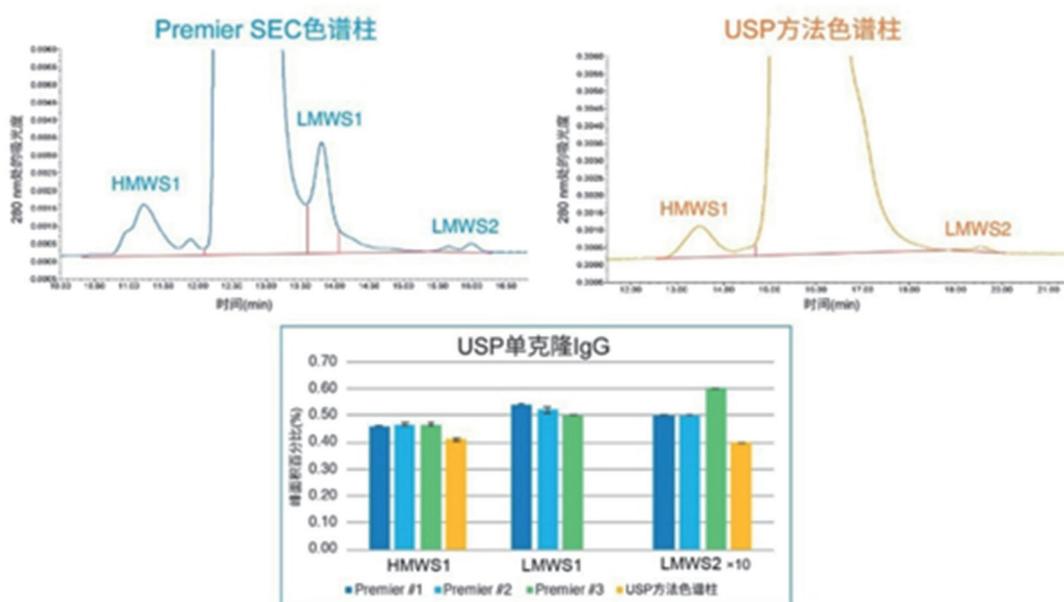


图 3.使用来自三个不同批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱,在通则<129>中规定的流动相条件下分析 USP 单克隆 IgG 大小异构体的结果比较。为了更好地观察结果,图中将 LMWS2 的峰面积百分比提升至实际值的 10 倍。

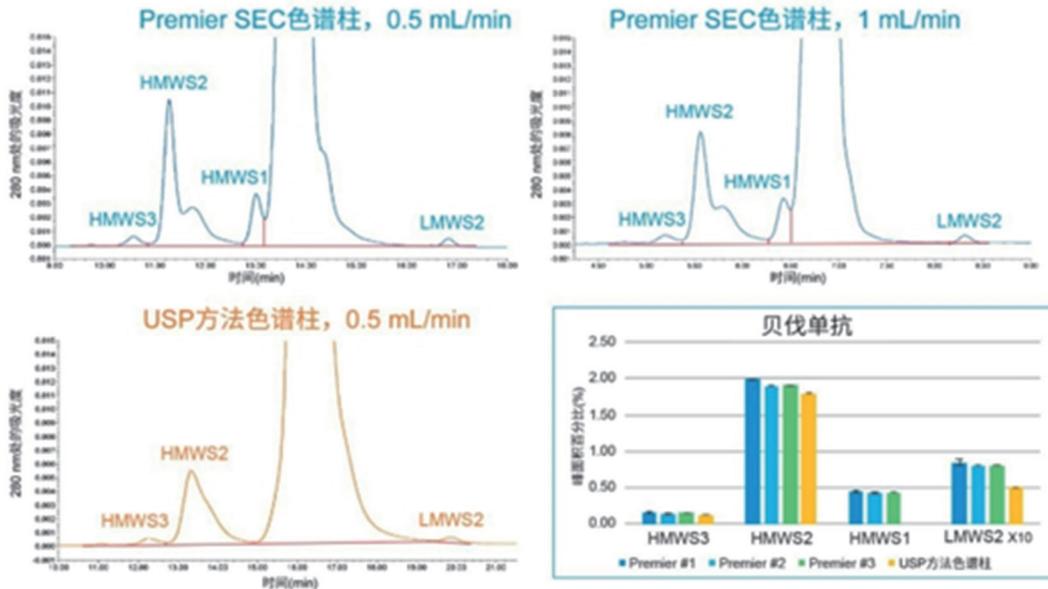


图4.使用来自三个不同批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱, 在通则<129>中规定的流动相条件下分析贝伐单抗生物类似药的结果比较。除 Premier 色谱柱#3 外, 所有色谱柱的流速均为 0.5 mL/min, Premier 色谱柱#3 的流速为 1 mL/min。为了更好地观察结果, 图中将 LMWS2 的峰面积百分比提升至实际值的 10 倍。

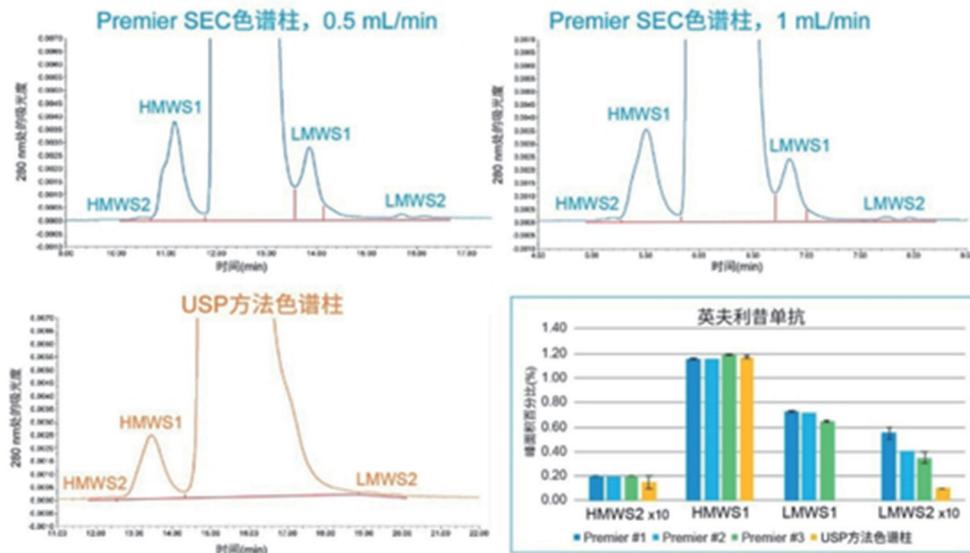


图5.使用来自三个不同批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱, 在通则<129>中规定的流动相条件下分析英夫利昔单抗生物类似药的结果比较。除 Premier 色谱柱#3 外, 所有色谱柱的流速均为 0.5 mL/min, Premier 色谱柱#3 的流速为 1 mL/min。为了更好地观察结果, 图中将 HMWS2 和 LMWS2 的峰面积百分比提升至实际值的 10 倍。

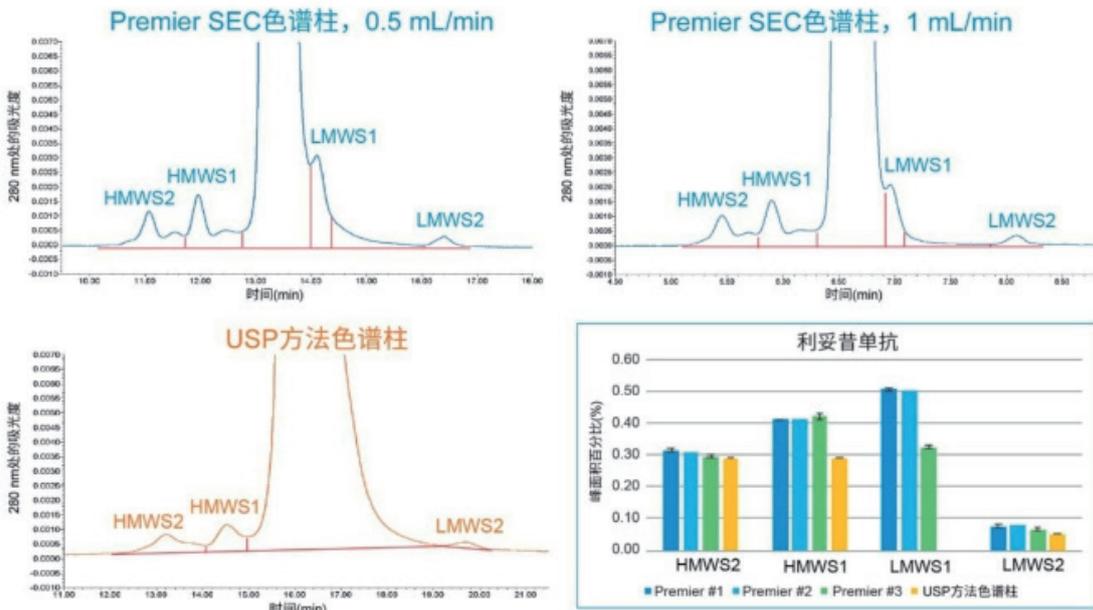


图 6.使用来自三个不同批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱, 在通则<129>中规定的流动相条件下分析利妥昔单抗生物类似药的结果比较。除 Premier 色谱柱#3 外, 所有色谱柱的流速均为 0.5 mL/min, Premier 色谱柱#3 的流速为 1 mL/min。

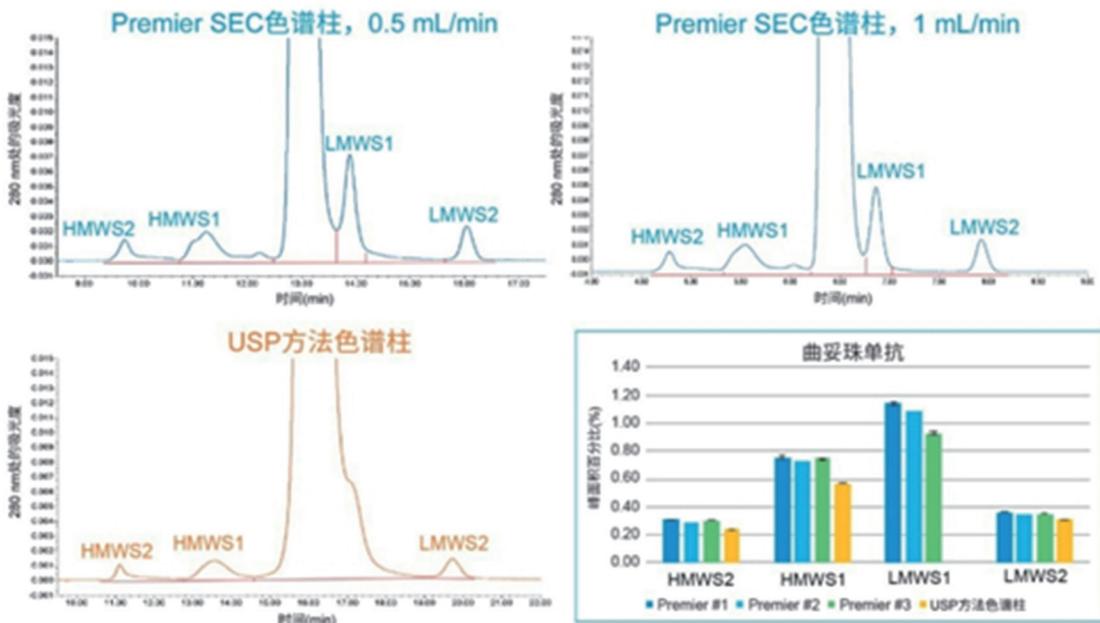


图 7.使用来自三个不同批次的 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和一根填充 5 μm 颗粒的 USP SEC 方法色谱柱, 在通则<129>中规定的流动相条件下分析曲妥珠单抗的结果比较。除 Premier 色谱柱#3 外, 所有色谱柱的流速均为 0.5 mL/min, Premier 色谱柱#3 的流速为 1 mL/min。



#### 4 结论

用于单克隆抗体 HMWS 和 LMWS 测定的 USP 方法在使用 Waters XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)时可保持稳定。使用 XBridge Premier SEC 蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)可获得一致的结果, 并且与使用填充 5 μm 颗粒的 USP 方法色谱柱获得的结果相当。

因此, 使用 XBridge 色谱柱的 mAb SEC USP 专论方法可以作为起点, 开发基于分子大小测定单克隆抗体中杂质的方法。此外, 与 USP 方法指定的填充 5 μm 颗粒的 SEC 色谱柱相比, XBridge 色谱柱的样品通量可以达到它的 2 倍。

#### 参考文献

1. Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies. USP General Chapter <129>. 2017.
2. Hong P.; Koza S. M.; Fountain K. J. Analysis of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled With Mass Spectrometry Under Non-denaturing Conditions. Waters Application Note. 720004254EN. 2012.



# 反义寡核苷酸的高灵敏度 LC-MS/MS 生物分析定量

Suma Veeramachineni, Mark Wrona, Jiaying Hong

沃特世公司

**【摘要】**本应用纪要介绍了 Waters™ Xevo™ TQ Absolute 串联四极杆质谱仪(MS/MS)的定量和定性能力，并说明这款仪器适用于人血浆中寡核苷酸的生物分析。

**【关键词】**Waters Xevo TQ Absolute; 寡核苷酸; 生物分析

寡核苷酸成为一种难以测量的底物是由多种因素导致的，包括但不限于：需要离子对或非反相色谱；需要精细的处理和样品制备；经常与耗材发生非特异性结合并且经常与色谱系统中存在的金属表面相互作用。本文要展示了高性能 Xevo TQ Absolute 串联四极杆质谱仪与 Waters ACQUITY Premier 联用系统分析生物基质中寡核苷酸的性能。本研究定量分析了寡聚脱氧胸苷标准品（Waters MassPREP™ 寡核苷酸分离技术(OST)标准品）和全硫代反义寡核苷酸 GEM91 [d(P-Thio)(C-T-C-T-C-G-C-A-C-C-C-A-T-C-T-C-T-C-T-C-C-T-T-C-T)-DNA]。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

- Waters ACQUITY Premier 系统(BSM)
- Waters™ Xevo™ TQ Absolute 串联四极杆质谱仪

### 1.2 样品

使用内部配制的 TE 缓冲液（10 mM Tris + 1mM EDTA，用氢氧化铵将 pH 调节至 8）制备 Waters MassPREP 寡核苷酸分离技术 (OST) 标准品（部件号：186004135 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186004135-massprep-oligonucleotide-standard.html>>）和寡聚脱氧核苷酸硫代磷酸酯 GEM91（由 Integrated DNA Technologies, Inc. 定制合成）的储备液，浓度分别为 10 μM 和 1 mg/mL。血浆样品通过连续稀释人血浆储备液（购自 BioIVT）制备。血浆样品用苯酚:氯仿:异戊醇 25:24:1 通过液-液萃取法萃取，然后用+99%的氯仿进行二次萃取。最后，蒸干水提液，并复溶于 100 μM EDTA 溶液中。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱：Waters ACQUITY Premier C18 寡核苷酸分析专用柱（1.7 μm, 2.1 x 50 mm）；柱温：50℃ ；

作者简介：洪佳莹，硕士，沃特世科技（上海）有限公司，E-mail: JiaYing\_Hong@waters.com

进样量：20  $\mu\text{L}$ ；流速：0.5 mL/min；流动相 A：含有 100 mM 六氟异丙醇(HFIP) + 15 mM N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的水溶液；流动相 B：含有 100 mM 六氟异丙醇(HFIP) + 15 mM N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)的 80%乙腈溶液；流动相梯度见表 1。样品板：搭载 MaxPeak™的 QuanRecovery™样品板，容积 700  $\mu\text{L}$ （部件号：186009185）；样品瓶：带圆形塞预开口硅胶盖垫（部件号：186006332）。样品温度：8  $^{\circ}\text{C}$

表 1 液相梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.5	95.0	5.0	初始
3.50	0.5	78.0	22.0	6
4.00	0.5	20.0	80.0	6
4.50	0.5	95.0	5.0	6
5.00	0.5	95.0	5.0	6

## 2.2 质谱条件

ACQUITY RDa:

电离模式：ESI+；全扫描检测模式；质量范围：50-2000 m/z；毛细管电压：1.2 kV；锥孔电压：20V；扫描速率：2Hz；脱溶剂气温度：350 $^{\circ}\text{C}$ ；智能数据采集：开。

## 2.3 数据管理

## 2.4 质谱条件

电离模式：ESI-，采集类型：MRM，毛细管电压：2.5 kV，锥孔电压：30 V，电离源补偿：30，离子源温度：150  $^{\circ}\text{C}$ ，脱溶剂气温度：600  $^{\circ}\text{C}$ ，脱溶剂气流速：1000 L/h；锥孔气流速：150 L/h，碰撞气体流速：0.15 mL/min

表 2.寡核苷酸分析所用的 MRM 通道和条件

名称	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
15T	561.8	125.1	30	35
20T	601.1	125.1	30	35
25T	627.3	303.1	30	20
30T	646.5	303.1	30	20
GEM91	597.2	319.1	30	20
GEM132(内标)	732.7	319.0	30	40

## 2.5 数据管理

使用 MassLynx™ v4.2 采集数据，使用 TargetLynx™处理数据。

## 3 结果与讨论

在配备 ACQUITY Premier C18寡核苷酸分析专用柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm( 部件号: 186009484 < <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009484-acquity-premier-oligonucleotide-c18-column-130a-17--m-21-x-50-mm.html>>) 的 ACQUITY Premier 系统上进行色谱分离, 使用 5 分钟梯度 (流动相 B 由 5%升高至 80%), 流速为 0.5 mL/min。ACQUITY Premier 色谱柱在硬件上采用了 MaxPeak™高性能表面(HPS)技术, 这对于尽可能减少非特异性结合来说至关重要, 并因此提高了寡核苷酸回收率和分析检测限。HPS 技术专为尽量减少金属与分析物 (例如寡核苷酸和其他对金属表面表现出很强亲和力的分析物) 之间的相互作用而开发<sup>[1,2]</sup>。

GEM91 的典型谱图见图 1, 图中显示了电荷态峰簇的大体分布 (MS 扫描), MS/MS 谱图显示了被选作 GEM91 的 MRM 通道母离子的电荷态产生的碎片。在方法开发过程中可能会监测多个离子。如果首选离子受到干扰, 可以轻松选择不同峰簇和合适的碎片离子。

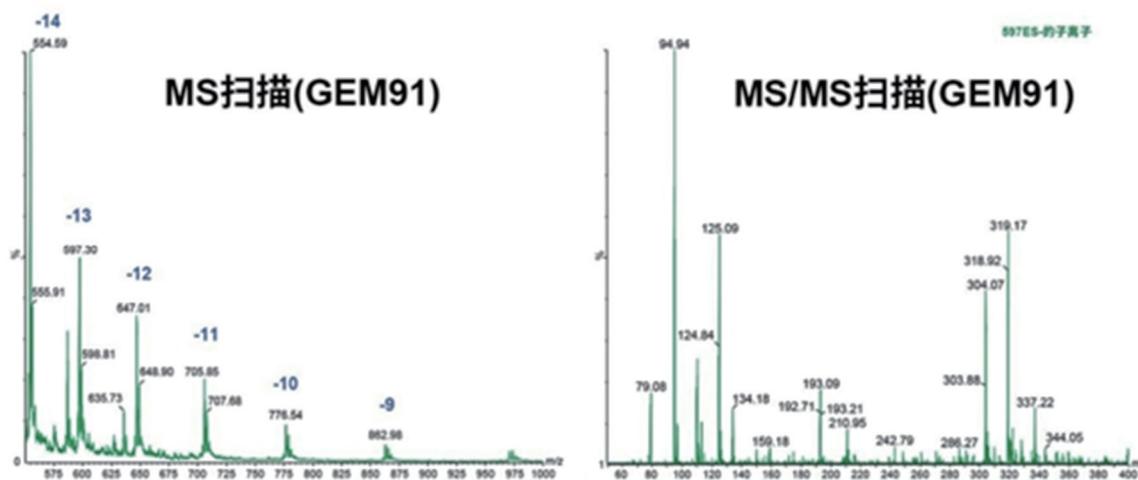


图 1.GEM91 的代表性谱图 (左) 和 MS/MS 谱图 (右)

图 2A 显示了 GEM91 ( $m/z$  597.2 > 319.1) LLOQ 相对于基质背景的代表性迹线。图 2B 显示了 0.1~500 ng/mL QC 样品的代表性迹线

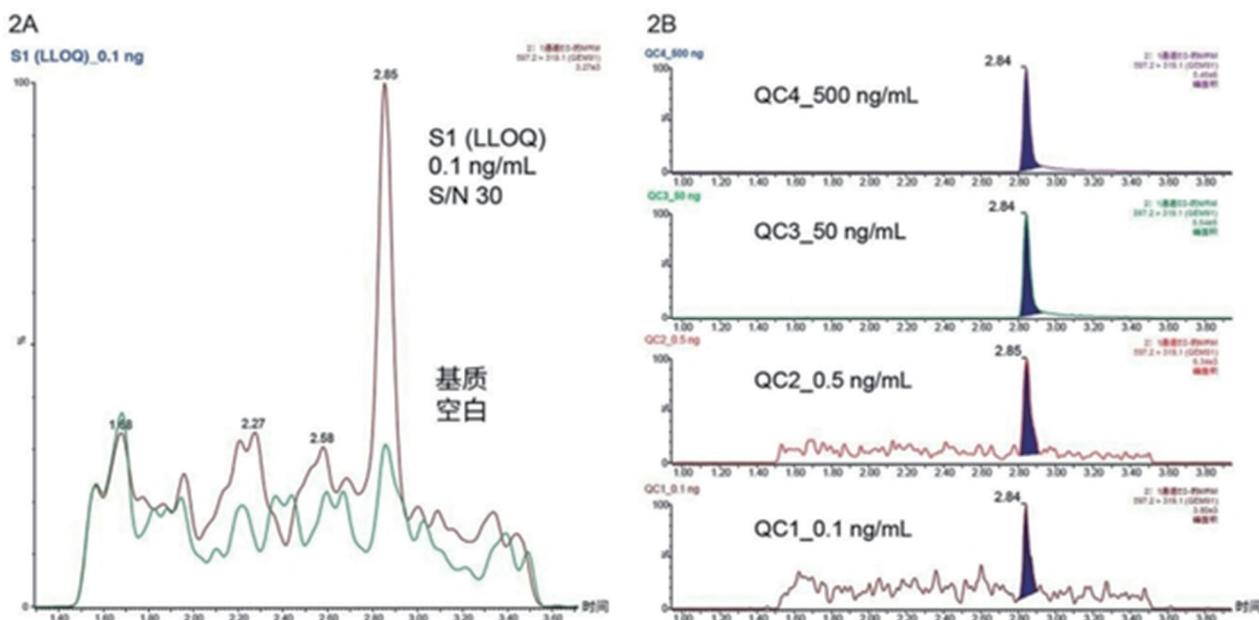


图 2A.GEM 91 (597.2>319.1) 0.1 ng/mL 标准品(LLOQ)与空白基质 (绿色痕迹) 的叠加图图 2B.GEM91 QC 样品 (0.1–500 ng/mL)的代表性迹线

OST 标准品和 GEM 91 在 Xevo 串联四极杆质谱仪上的标准曲线和质量控制(QC)性能总结见表 2。OST 储备液的制备单位为  $\mu\text{M}$ ，报告单位为 nM，对应的 LLOQ (ng/mL)见表格右半部分，GEM91 的报告单位为 nM 和 ng/mL。

表 3.本实验使用的校准标准品

名称	标准品浓度 (nM)	OST (准确度 (%))				GEM91			LLOQ (ng/mL)
		15T	20T	25T	30T	标准品浓度 (ng/mL)	标准品浓度 (nM)	准确度 (%)	
标准品1	0.01	94.5	103.7	105.4	-	0.10	0.08	110.2	15T 0.045
标准品2	0.02	107.3	94.8	92.9	101.6	0.20	0.16	82.1	20T 0.06
标准品3	0.05	111.2	93.9	87.3	90.6	0.50	0.39	92.8	25T 0.075
标准品4	0.10	96.0	95.6	111.9	111.6	1.00	0.78	98.4	30T 0.090
标准品5	0.20	99.5	111.1	88.8	98.4	2.00	1.60	97.0	
标准品6	1.00	101.1	104.8	104.8	100.9	10.0	7.80	97.8	
标准品7	10	96.6	104.1	103.8	102.1	100	78.0	106.2	
标准品8	100	99.3	99.8	105.2	111.1	1000	780	108.9	
标准品9	500	98.6	100.5	101.2	93.9	5000	3890	107.4	
标准品10	1000	95.9	91.9	98.6	89.9	10000	7780	99.1	

定量下限(LLOQ)为 0.1 ng/mL，动态范围为 0.1–10000 ng/mL。校准曲线呈线性， $r^2$  值>0.99 (1/x<sup>2</sup> 加权)，所有接受的校准点的平均准确度在 87–112%之间。表 3 报告了寡核苷酸 OST 和 GEM 91 的 QC 性能，所有寡核苷酸的平均准确度在 90–114%之间，CV (未显示) 在 1.1–10.5%之间。OST 标准品的结果表明，与较长链的寡核苷酸相比，较短链的寡核苷酸可能具有更高的灵敏度。GEM91 与长

度相似的 25T 标准品表现出相似的结果，而 15T 标准品在 LLOQ 为 0.05 ng/mL 时的灵敏度是 GEM91 的两倍。

表 4. 本实验使用的 QC 样品

名称	标准品浓度 (nM)	OST (准确度 (%))				GEM91		
		15T	20T	25T	30T	QC浓度 (ng/mL)	QC浓度 (nM)	准确度 (%)
QC1	0.01	114.3	100.3	93.7	N/A	0.10	0.08	99.2
QC2	0.05	100.3	105.2	104.0	108.7	0.50	0.39	91.0
QC3	5.0	95.1	99.9	93.2	100.1	50	39.0	106.8
QC4	50	90.1	99.8	95.6	100.9	500	390	110.7
QC5	400	96.6	99.6	97.7	97.2	4000	3110	108.3
QC6	800	92.3	92.1	93.0	91.6	8000	6220	98.3

在 Xevo TQ Absolute 上测试的几个通道都能够检出生物基质中亚 ng/ml 水平的 GEM91 寡核苷酸。图 3 显示了 GEM91 LLOQ 为 0.1 ng/mL 水平的三个通道。

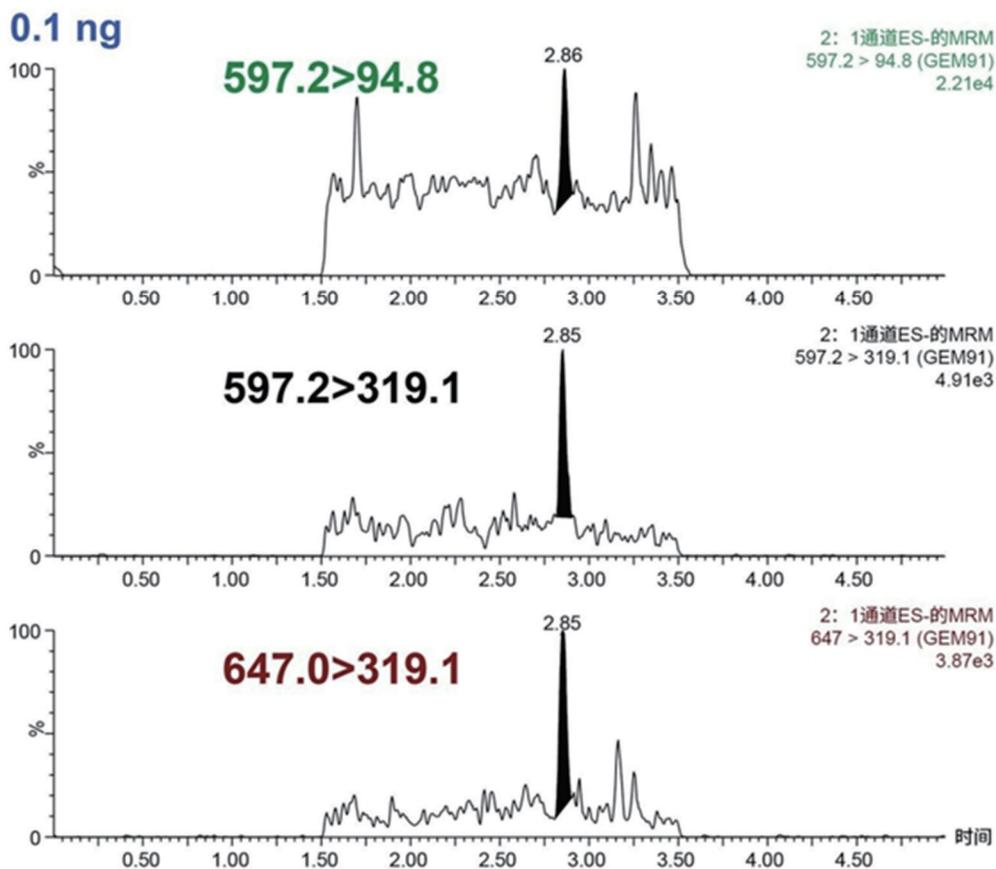


图 3. 不同通道检测 0.1 ng/mL 样品的能力

与基本结构部分相对应的低质量通道（例如，通过 597.2 > 94.8 通道测量的硫代磷酸酯碎片离子）通常是强度最高的碎片离子和有吸引力的定量目标，但在复杂的血浆基质背景中可能具有挑战性或选

择性较低。本研究在 LLOQ 水平的低分子量和高分子量碎片质量通道中均观察到较高的离子计数和可接受的信噪比。319.1 碎片离子的-14 (597 Da)和-13 (647 Da)电荷态迹线说明了 597.2 > 94.8 MRM 峰形和性能与本研究中分子量更大的离子之间的差异。最终, 这种灵活性有助于用户在临床前(和人体)研究的物种/基质变化中选择具有最佳灵敏度和选择性表现的通道。本应用纪要展示了使用 m/z 319.1 离子的-13 电荷态(m/z 597.2)的 QC、线性和生物分析价值图, 然而, Xevo TQ Absolute 在 0.1 ng/mL 的 LLOQ 水平下检出了 GEM91 (与空白响应相比, 响应值>5 倍), 且血浆样品的所有通道(如图 3 所示)都表现出类似的生物分析性能。

图 4 显示了 MS 系统上获得的 0.1~10,000 ng/mL 范围内 GEM91 (597.2>319.1)的线性动态范围, 并显示了 10 ng/mL 以下低水平校准标准品的放大图。观察到线性动态范围达到五个数量级。

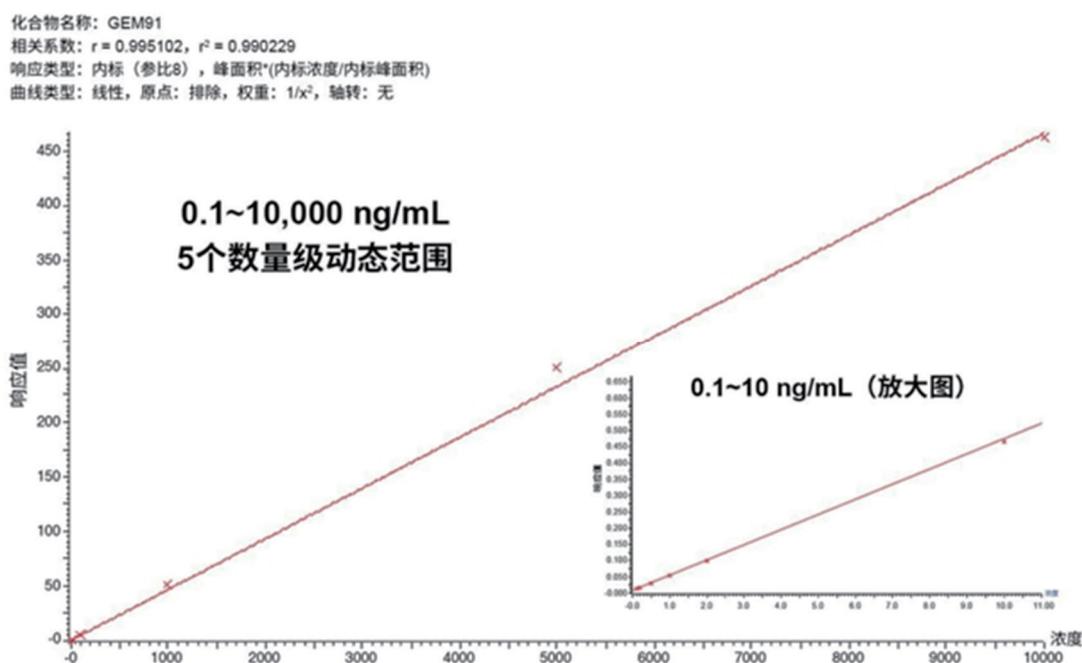


图 4.在 Xevo TQ Absolute 上分析 GEM 91 获得的标准曲线, 显示 5x 线性动态范围, 插图所示为 0.1-10 ng/mL 标准品的放大图。

#### 4 结论

- Xevo TQ Absolute 对棘手的负电离化合物具有超高的灵敏度, 能够为基于液相色谱/质谱联用法(LC-MS/MS)定量生物基质中寡核苷酸的常规应用生成高质量数据。
- 这款仪器在分析人血浆中的反义寡核苷酸和寡核苷酸性能标准品时, 均观察到低至 ng/ml 水平的灵敏度和良好的动态范围性能。



- 如果分离系统和分析柱均使用搭载 MaxPeak 高性能表面(HPS)技术的 ACQUITY Premier, 将有助于缓解金属吸附, 确保在定量生物分析中获得稳定、高灵敏度的定量性能。

#### 参考文献

1. Guilherme J. Guimaraes, J. Michael Sutton, Martin Gilar, Michael Donegan, Michael G. Bartlett, 'Impact of Nonspecific Adsorption to Metal Surfaces in Ion Pair-RP LC-MS Impurity Analysis of Oligonucleotides', Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 208, 20 January 2022, 114439.
2. Jennifer M Nguyen , Martin Gilar, Brooke Koshel, Michael Donegan, Jason MacLean, Zhimin Li & Matthew A Lauber, 'Assessing the Impact of Nonspecific Binding on Oligonucleotide Bioanalysis', Future Science, BIOANALYSIS VOL.13, NO.16.
3. Kathryn Brennan, Mary Trudeau, Paul D. Rainville, 利用 ACQUITY Premier 系统和色谱柱改善寡核苷酸生物分析的色谱性能, 沃特世应用纪要, 720007119ZH, 2021 年 1 月.



## 一种新型的反相色谱柱用于合成寡核苷酸的快速高效分离

夏敏<sup>1\*</sup>, Phu Duong<sup>2</sup>, Brian A. Bidlingmeyer<sup>2</sup>, Alex Zhu<sup>2</sup>, Stephen Luke<sup>2</sup>

(1. 安捷伦科技(中国)有限公司, 上海200080; 2. 安捷伦科技有限公司, 维明顿, 19808)

**【摘要】目的:** 评估一款新型的表面填料反相色谱柱在高pH条件下用于寡核苷酸LC/UV和LC/MS分析的性能。**方法:** 使用两种常见流动相梯度, 搭配 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱对多种去保护(去除二甲氧基三苯甲基(DMT)) DNA 和 RNA 寡核苷酸进行分离和鉴定。65°C下, 对25mer DNA 寡核苷酸连续进样约400次考察色谱柱稳定性。将结果与全多孔杂化颗粒填料色谱柱的分离结果进行了对比。**结果:** RNA和DNA 寡核苷酸接近基线分离。LC/MS 数据也显示出良好的质量准确性, 并提供了部分寡核苷酸的序列信息。AdvanceBio寡核苷酸专用色谱柱所得的峰宽比 1.7 $\mu$ m 全多孔杂化填料C18色谱柱所得峰宽更窄。与1.7 $\mu$ m的全多孔杂化填料 C18色谱柱相比, 2.7 $\mu$ m粒径的 AdvanceBio寡核苷酸专用色谱柱可以在更低的反压条件下运行保留时间重现性佳。**结论:** 2.7 $\mu$ m AdvanceBio寡核苷酸专用色谱柱, 具有在高pH条件下稳定的表面多孔填料, 用于快速、高分离度分离不同大小的脱保护RNA和DNA寡核苷酸, 数据结果表明具有出色的分离度和柱寿命。2.7 $\mu$ m的色谱柱粒径可兼容600bar HPLC和1200 bar UHPLC系统。

**【关键词】** 寡核苷酸; LC/UV; LC/MS

## Fast and High-Resolution Reversed-Phase Separation of Synthetic Oligonucleotides

Min Xia<sup>1</sup>, Phu Duong<sup>2</sup>, Brian A. Bidlingmeyer<sup>2</sup>, Alex Zhu<sup>2</sup>, Stephen Luke<sup>2</sup> (1. Agilent Technologies, Shanghai, 200080; 2. Agilent Technologies, Inc., Wilmington, 19808)

**【ABSTRACT】OBJECTIVE:** To evaluate a superficially porous particle columns for oligonucleotides LC/UV and LC/MS analysis in high-pH condition. **METHODS:** We demonstrate separation and identification of a number of de-protected (removal of the dimethoxytrityl group (DMT)) DNA and RNA oligonucleotides, using Agilent AdvanceBio Oligonucleotide columns and two popular mobile phase gradients. Data were collected from ~400 consecutive injections of 25-mer DNA oligo at 65 °C to evaluate column stability. Results are compared to the separation on a totally porous, hybrid particle column. **RESULTS:** All the RNA and DNA oligonucleotides peaks were separated with baseline resolution. The LC/MS data also demonstrate excellent mass accuracy and provide sequence information of some oligonucleotides. The peak

\* 通讯作者: 夏敏, 女, 硕士, 研究方向: 生物药关键质量属性 [min.xia@agilent.com](mailto:min.xia@agilent.com) Tel: (021)36127723



width on the AdvanceBio Oligonucleotide column was narrower than that generated by the 1.7  $\mu\text{m}$  totally hybrid porous particle C18 column. AdvanceBio Oligonucleotide column permitted operation at a lower backpressure compared to the 1.7  $\mu\text{m}$  totally hybrid particle C18 column. AdvanceBio Oligonucleotide column generated stable, nearly unchanged, and highly reproducible peak retention times. **CONCLUSION:** The AdvanceBio Oligonucleotide column, 2.7  $\mu\text{m}$ , with highly stable pH superficially-porous particles is designed for separating deprotected RNA and DNA oligonucleotides of different sizes with speed and high resolution. The AdvanceBio Oligonucleotide column was also shown to have the chemistry that delivers exceptional sample resolution and superior column lifetime. With 2.7  $\mu\text{m}$  particles, the columns are compatible with 600 bar HPLC, and 1,200 bar UHPLC systems

**【KEY WORDS】** Oligonucleotides; LC/UV; LC/MS

基于 DNA 和 RNA 的合成寡核苷酸是一种成功的生物治疗药物，可以治疗多种疾病。其合成过程有多个步骤。尽管偶联效率很高，但随着循环次数的增加，寡核苷酸的总体收率会降低，主要杂质为单 (N-1) 和双 (N-2) 缺失的偶联失败。为确保药物效价，减少药物相互作用的可能性，需要得到高纯度的产品，因此，分析产品纯度尤为重要。寡核苷酸的分析方法有很多，其中最常见的是阴离子交换色谱法。这种方法分离度高，但通常需要很长时间进行分离。此外，鉴于其溶剂体系使用高浓度盐溶液洗脱寡核苷酸，无法兼容质谱。所以通过阴离子交换色谱法分析鉴定寡核苷酸及其杂质非常繁琐。

本应用简报中，我们展示了使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱对多种去保护（去除二甲氧基三苯甲基 (DMT)）DNA 和 RNA 寡核苷酸进行快速、高分离度的分离和鉴定。该色谱柱为填充有表面多孔 Poroshell 填料的反相色谱柱，在高 pH 条件下依然性能稳定。这些填料有多孔外层和实心内核，限制了扩散距离，结合窄粒径分布，提高了分离速度，改善了色谱分析性能。色谱柱粒径为 2.7  $\mu\text{m}$ ，额定压力为 600 bar，可在 HPLC 和 UHPLC 仪器上轻松使用。

Poroshell 填料使用专有技术进行了化学改性，使其对高达 pH 11.0 的高 pH 流动相仍具有很强的耐受性。封端的 C18 键合相和 100Å 孔径为寡核苷酸提供了出色的选择性。本应用简报中的数据包括使用两种常见流动相梯度分离和鉴定 DNA 和 RNA 寡核苷酸。洗脱液易挥发，与 MS 兼容。一种含有醋酸三乙胺 (TEAA)，常用于 LC/UV 分离，另一种含有六氟异丙醇和三乙胺 (HFIP:TEA)，常用于寡核苷酸的 LC/MS 分析。LC/MS 数据也显示出良好的质量准确性，并提供了部分寡核苷酸的序列信息。将结果与全多孔杂化颗粒填料色谱柱的分离结果进行了比较。

## 1. 材料与方法

色谱柱为 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱，2.1 × 50 mm（部件号 659750-702）。乙腈、甲醇、



TEAA、HFIP 和 TEA 均购自 Sigma-Aldrich 公司。DNA 样品为 DNA 寡核苷酸（安捷伦寡核苷酸分子量标准品，部件号 5190-9029）（表 1）。色谱柱对比分析使用 23 mer RNA，MS 数据分析使用 25 mer DNA，均来自 NASD, Boulder。RNA 样品为 RNA 寡核苷酸（安捷伦寡核苷酸分离度标准品，部件号 5190-9028）（表 2）。

表 1 DNA 寡核苷酸特征

Tab.1 DNA-oligonucleotide characteristics

序列	序列	保证纯度	含量 (nmol)
15 mer	TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
20 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
25 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
30 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
35 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2
40 mer	TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	> 85%	2

表 2 RNA 寡核苷酸特征

Tab.2 RNA-oligonucleotide characteristics

序列	序列	保证纯度	含量 (nmol)
14 mer	rCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
17 mer	rUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
20 mer	rUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2
21 mer	rGrUrCrArUrCrArCrArCrUrGrArArUrArCrCrArArU	> 85%	2

### 1.1 仪器

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱
- Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS

LC/UV 条件	
流动相	A) 100 mmol/L TEAA 的水溶液 B) 100 mmol/L TEAA 的乙腈溶液
流速	0.6 mL/min (或其他流速)
梯度	见色谱图
停止时间	见色谱图
后运行	5 min
柱温	65 °C
样品	见色谱图
进样	见色谱图
检测	UV 260 nm

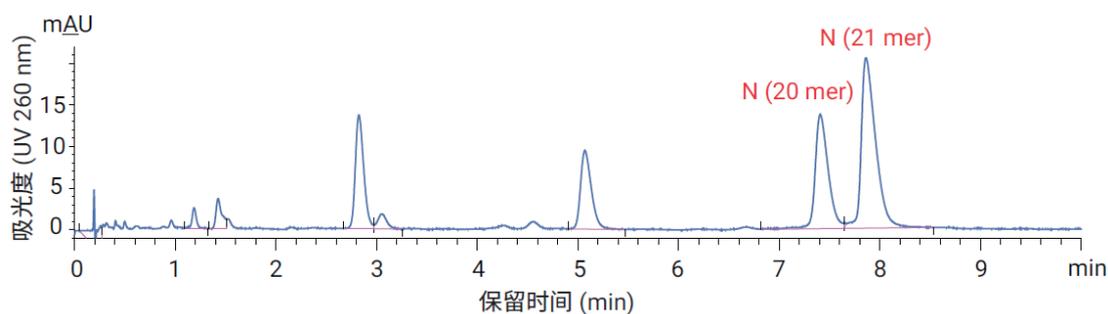
适用于 LC/MS 的条件	
流动相	A) HFIP:TEA (400 mmol/L:15 mmol/L) 的水溶液 B) 甲醇:流动相 A (50:50)
流速	0.4 mL/min
梯度	在 0.5 min 内 B 由 30% 升至 40%，然后在 5 min 内由 40% 升至 70%
样品	25mer DNA
停止时间	见色谱图
柱温	65 °C
检测	MS, 或 260 nm UV
最小范围	400 m/z
最大范围	1700 m/z
扫描速率	3.00 幅谱图/秒
离子极性	-ve
毛细管电压	3500
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	200

## 2. 结果与讨论

### 2.1 分离 N 和 N-1 寡核苷酸

#### 2.1.1 分离 RNA 寡核苷酸

包含 4 种 RNA 寡核苷酸的寡核苷酸分离度标准品（范围为 14 至 21 mer），设计用于验证仪器和色谱柱分析合成寡核苷酸的性能（批间）。图 1 展示了 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱对该标准品的分离能力。所有的峰均在 9 分钟内分离，峰形尖锐、分离良好。N 和 N-1 RNA 寡核苷酸（21 和 20 mer）接近基线分离。数据表明，该色谱柱能够良好地将寡核苷酸主成分从其杂质中分离出来。



梯度： 10 min 内 B 由 10% 升至 14%

停止时间： 11 min

样品： 安捷伦寡核苷酸分离度标准品

14 mer、17 mer、20 mer、21 mer RNA (部件号 5190 - 9028)

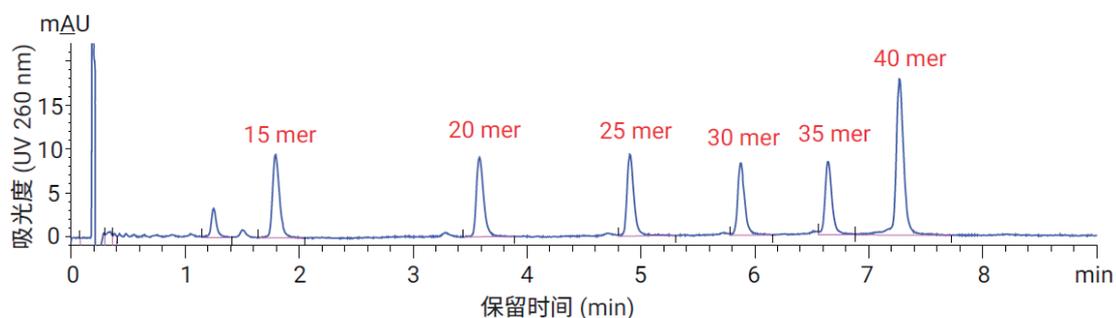
进样量： 10  $\mu$ L

图 1 使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱分离安捷伦寡核苷酸分离度标准品

Fig.1 Separation of Agilent Oligonucleotide Resolution Standard using an Agilent AdvanceBio Oligonucleotide column.

### 2.1.2 分离 RNA 寡核苷酸

通过分离含 6 种 DNA 寡核苷酸的寡核苷酸分子量标准品（范围 15 至 40 mer），证明了 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱对复杂样品的分离能力。图 2 表明所有 6 种寡核苷酸在 8 分钟内完成分离。所有峰均为基线分离度分离。15 mer DNA 寡核苷酸仅在短短 2 分钟内便开始洗脱，20 和 25 mer 寡核苷酸分别在 4 分钟和 5 分钟时洗脱。这些数据表明 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱适用于寡核苷酸的高通量分离。



梯度： 12 min 内 B 由 6% 升至 8%

停止时间： 13 min

样品： 安捷伦寡核苷酸分子量标准品

15 mer、20 mer、25 mer、30 mer、35 mer、40 mer DNA（部件号 5190-9029）

进样量： 0.5  $\mu$ L

图 2 使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱分离安捷伦寡核苷酸分子量标准品

Fig.2 Separation of Agilent Oligonucleotide Ladder using an Agilent AdvanceBio Oligonucleotide column

### 2.2 质谱兼容性

为鉴定新生产和复制生产批次的寡核苷酸，确认其纯度，需要进行质谱分析。图 3 显示了 25 mer 单个 DNA 寡核苷酸的质谱结果。AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱在仅约 3 分钟内对 25 mer DNA 寡核苷酸峰及其杂质实现了高色谱分离度。研究记录和报告了 UV 和 TIC 迹线，以及基线的放大图。主峰和 N-峰基线分离的放大图表明两条迹线非常相似，几乎平行。两种检测方法间的兼容性表明，MS 数据完全建立后，UV 迹线的灵敏度足以进行梯度运行，确定主峰和杂质（N-峰），无需再次使用 MS。图 4 显示了 TIC 迹线的解卷积数据以及完整标记的峰，表 3 显示了分析 25 mer DNA 寡核苷酸主峰及其杂质的精确质量数和各结构的百分比。表中的总和值表示色谱柱实现了 100% 的回收率。

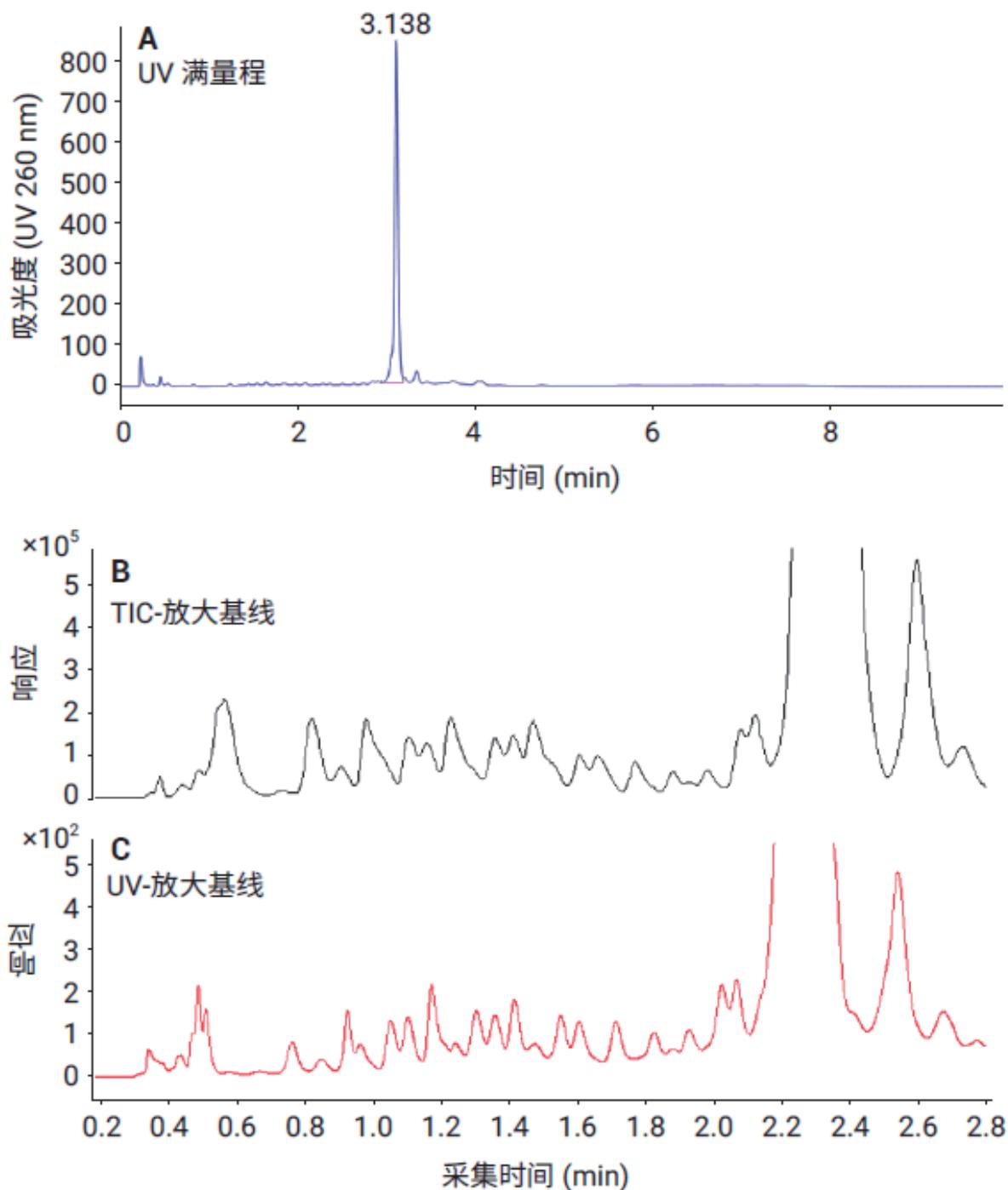


图3 使用兼容 MS 的溶剂分离 25 mer DNA 寡核苷酸

Fig.3 Separation of 25-mer DNA oligonucleotide using MS-compatible solvent

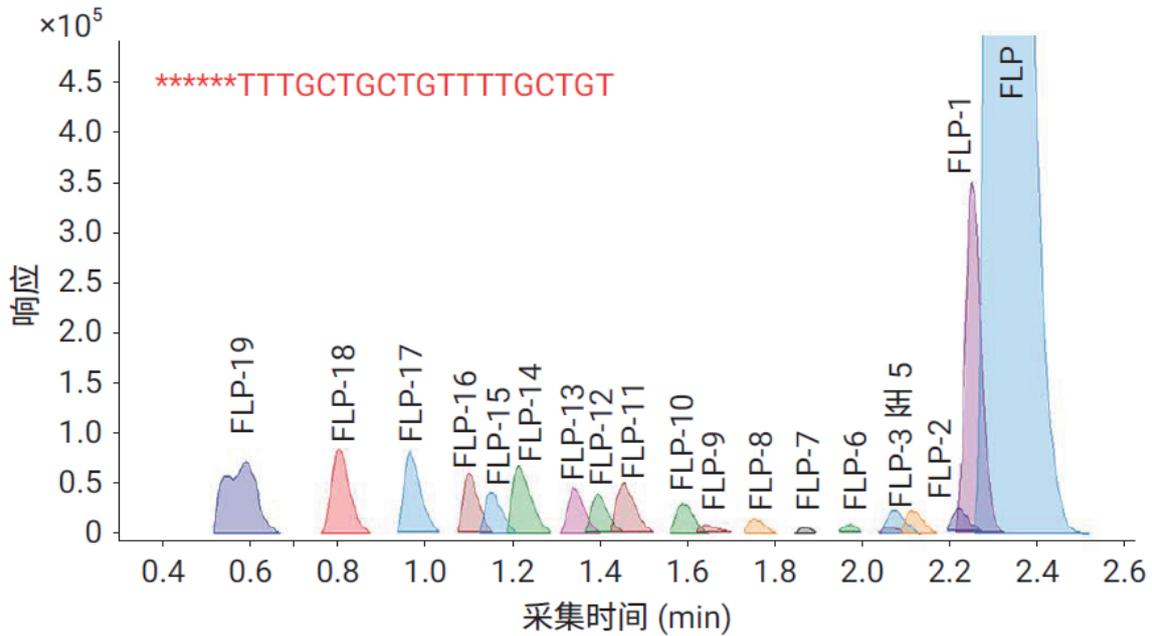


图 4 由 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱分离的 25-mer DNA 寡核苷酸的 TIC 解卷积数据  
 Fig.4 Deconvoluted data from TIC of a 25-mer DNA oligonucleotide separated by the Agilent AdvanceBio Oligonucleotide column

表 3 质谱分析和回收率

Tab.3 MS analysis and recovery

峰	响应	%
FLP	5089897	44.33
FLP-1	1656225	14.42
FLP-2	304129	2.65
FLP-3	303848	2.65
FLP-4	218243	1.90
FLP-5	113062	0.98
FLP-6	104555	0.91
FLP-7	110327	0.96
FLP-8	134341	1.17
FLP-9	134080	1.17
FLP-10	186947	1.63
FLP-11	358833	3.12
FLP-12	251690	2.19
FLP-13	272844	2.38
FLP-14	416306	3.63
FLP-15	238205	2.07
FLP-16	304333	2.65

FLP-17	403038	3.51
FLP-18	459344	4.00
FLP-19	422518	3.68
总和	11482765	100

### 2.3 色谱柱对比

表面多孔填料的结构为实心核加纤薄多孔表面，物质扩散进出多孔结构的距离更短，因此传质更快。图 5 比较了含 2.7  $\mu\text{m}$  填料的 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱和含 1.7  $\mu\text{m}$  全多孔杂化填料的 2.1  $\times$  50 mm 全多孔杂化色谱柱对 23 mer RNA 寡核苷酸的分离效果。数据表明，AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱分析所得 23 mer RNA 寡核苷酸峰宽比 1.7  $\mu\text{m}$  全多孔杂化填料 C18 色谱柱所得峰宽更窄。这表明在表面多孔固定相的扩散进出距离更短使得物质传输更快，产生的峰分离度更高。与 1.7  $\mu\text{m}$  的全多孔杂化填料 C18 色谱柱相比，2.7  $\mu\text{m}$  粒径的 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱可以在更低的反压条件下运行，0.4 mL/min 时后者为 108 bar，前者为 292 bar。因此，AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱可兼容 600 bar HPLC 系统以及 1200 bar HPLC 系统，实现快速分离。

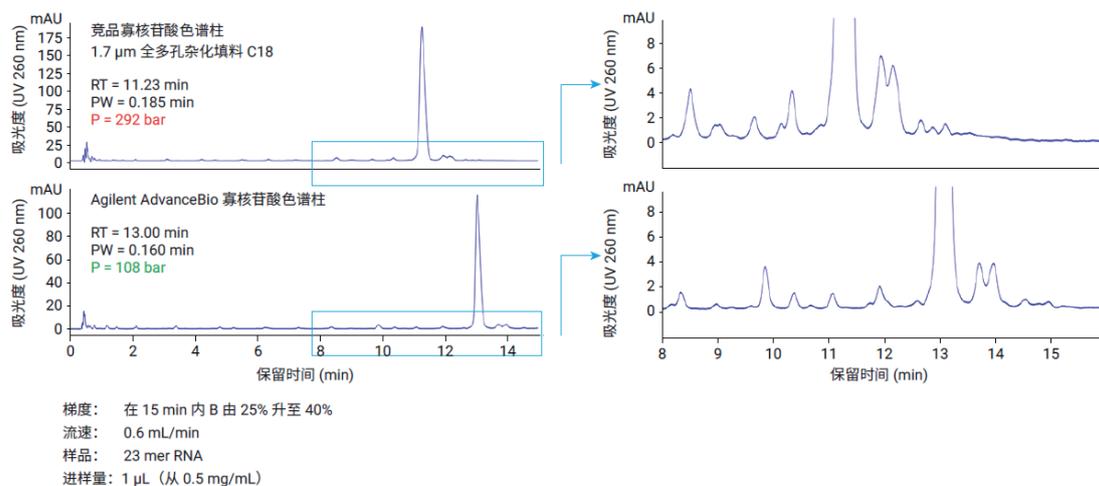


图 5 比较使用 AdvanceBio 寡核苷酸 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱和 1.7  $\mu\text{m}$  全多孔杂化填料 C18 色谱柱（采用 HFIP:TEA 流动相）分离 25 mer DNA 寡核苷酸的结果

Fig.5 Comparing the 25-mer DNA oligonucleotide separation on an AdvanceBio Oligonucleotide 2.7  $\mu\text{m}$  column versus a 1.7  $\mu\text{m}$  totally hybrid porous particle C18 column using HFIP:TEA in the mobile phases

### 2.4 色谱柱稳定性

图 6 显示了 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱和 2.5  $\mu\text{m}$  全多孔杂化填料 C18 色谱柱的稳定性和对比数据，两根色谱柱尺寸均为 2.1  $\times$  50 mm。数据为在 65  $^{\circ}\text{C}$  下，对 25 mer DNA 寡核苷酸连续进样约 400 次的结果。记录峰保留时间，结果显示 AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱的峰保留时间稳定、

几乎不变、重现性佳，略优于竞品寡核苷酸色谱柱，即 2.5  $\mu\text{m}$  全多孔杂化填料 C18 色谱柱。这些稳定性数据表明，AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱的寿命较长，与 2.5  $\mu\text{m}$  全多孔杂化色谱柱相当。

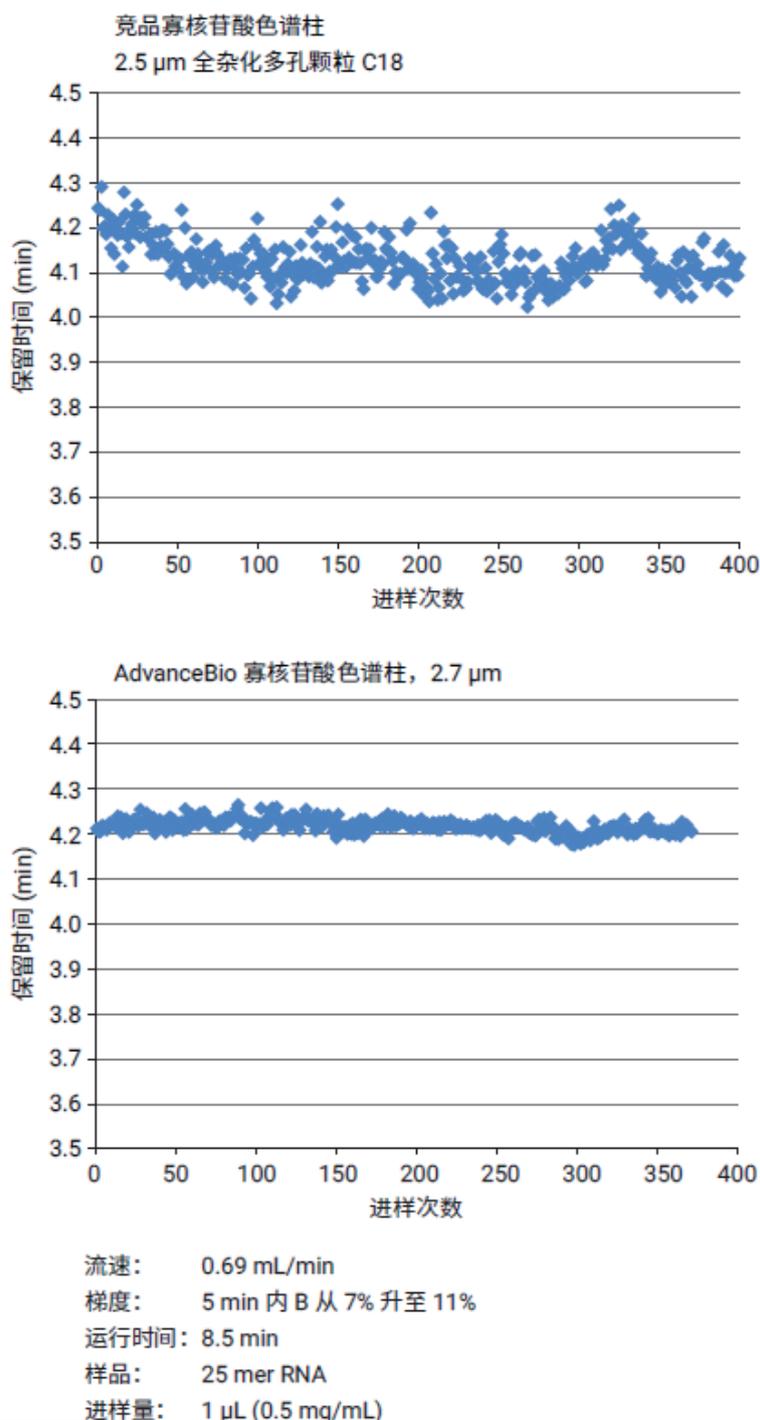


图 6 色谱柱稳定性研究

Fig.6 Column stability study



### 3. 结论

2.7  $\mu\text{m}$  AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱，具有在高 pH 条件下稳定的表面多孔填料，用于快速、高分离度分离不同大小的脱保护 RNA 和 DNA 寡核苷酸。色谱柱可使用含有高 pH（分析寡核苷酸的理想 pH）离子对试剂的 LC/UV 和 LC/MS 流动相，如 TEAA 和 HFIP:TEA (>pH 8.0)。AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱的填料也被证明具有出色的样品分离度和色谱柱使用寿命。2.7  $\mu\text{m}$  的色谱柱粒径可兼容 600 bar HPLC 和 1200 bar UHPLC 系统。AdvanceBio 寡核苷酸专用色谱柱有多种尺寸选项，可以满足各种基于 DNA 和 RNA 的寡核苷酸分离和分析需求。



## 全自动在线衍生法进行氨基酸分析检测

陆予菲<sup>1</sup>, 李艺婷<sup>1</sup> (1.安捷伦科技公司)

**【摘要】目的:** 本文旨在开发出一种能够对氨基酸进行快速和高分析灵敏度定量分析的液相色谱(LC)方法。**方法:** 本方法采用安捷伦自动进样器进行自动化在线柱前氨基酸衍生, 然后利用填充表面多孔颗粒填料的 Agilent AdvanceBio 氨基酸专用色谱柱对各种不同氨基酸进行色谱分离后进入检测器检测。**结果:** 使用本方法成功应用于在三种不同样品基质中对 23 种氨基酸进行液相色谱分离与精确测定。**结论:** 利用本方法的自动化和高分析灵敏度定性定量不同种类的氨基酸, 可应用在食品、制药和生物行业。

**【关键词】** 氨基酸; 自动衍生; 液相

### Analysis of Amino Acids Derived Online Using an Agilent AdvanceBio AAA Column

Yufei Lu<sup>1</sup>, Yiting Li<sup>1</sup> (1. Agilent Technologies, Inc.)

**【ABSTRACT】 Objective:** A liquid chromatographic (LC) method capable of quick, high analytical sensitivity quantitative analysis of amino acids has been developed. **Methods:** This method uses automated online precolumn amino acid derivatization performed using an Agilent autosampler combined with an Agilent AdvanceBio AAA column packed with superficially porous particles. **Results :** This method was successfully applied in LC separation and precise determination of 23 amino acids in three different sample matrices. **Conclusion** The automation and high analytical sensitivity of this method can be applied to the qualitative and quantitative of different kinds of amino acids in the food, pharmaceutical, and biological industries.

**【KEYWORDS】** Amino acids; Automatic online derivatization; Liquid chromatography

氨基酸分析历来都是色谱分析中的难点, 在食品、制药和生物等行业中有广泛应用。如何高效地分析不同种类的氨基酸, 是许多分析化学工作者面临的问题。许多市场上的方法均存在缺陷, 如色谱柱在高 pH 下寿命短、分析效率低、稀有试剂不易获取等。本文开发出的液相色谱方法, 可实现氨基酸的高分析速度和高分析灵敏度定量分析。此方法采用可靠的在线柱前氨基酸衍生, 结合填充表面多孔颗粒填料的 Agilent AdvanceBio 氨基酸专用的 C18 色谱柱进行色谱分离。使用安捷伦自动进

通讯作者: 李艺婷, 女, 研究方向: 生物制药 [yi-ting.li@agilent.com](mailto:yi-ting.li@agilent.com) (021)6127541



样器可轻松实现自动化在线衍生，其中一级氨基酸用邻苯二甲醛 (OPA) 进行衍生，二级氨基酸用 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC) 进行衍生。本次实验所需的所有试剂和氨基酸标准品均来自安捷伦 AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒。

## 一、材料与实验

### 1.1 仪器与试剂

仪器型号为 Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪，所配备的模块分别为 G1312B 二元泵、G1367D 液体自动进样器、G1316A 柱温箱、G4212B 二极管阵列检测器。本实验选用的色谱柱为 Agilent AdvanceBio AAA C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm。甲醇和乙腈为色谱纯，购自迪马科技公司。盐酸、磷酸氢二钠和硼酸钠为分析纯，购自百灵威科技公司。实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统制得的超纯去离子水。23 种氨基酸参比标样、OPA 试剂、FMOC 试剂和硼酸盐缓冲液来自安捷伦科技公司的 AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒。

### 1.2 样品信息

样品包括复方氨基酸注射液、复方氨基酸片和山羊乳，均购自当地的药店和超市。

### 1.3 氨基酸标准溶液的配制

将 1 mL 安瓿瓶装的 250 pmol/μL 氨基酸标准品平均分装成 10 份，每份 100 μL。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶，在 4 °C 下储存。从氨基酸补充剂试剂盒中准确称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.0 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺和 91.95 mg 色氨酸。然后将这些氨基酸加入 25 mL 容量瓶中，再加入 12.5 mL 0.1 M 盐酸溶液，超声直至氨基酸溶解。然后用水稀释至刻度，摇匀，并作为氨基酸补充剂储备液 1 在 4 °C 下储存。从氨基酸补充剂试剂盒中准确称取 58.58 mg 正缬氨酸和 44.54 mg 肌氨酸，将其加入 50 mL 容量瓶中。然后向容量瓶中加入 25 mL 0.1 M 盐酸溶液，超声至氨基酸溶解。然后用水稀释至刻度，摇匀，并作为氨基酸补充剂储备液 2 在 4 °C 下储存。此溶液可作为内标溶液使用。取适量氨基酸补充剂储备液 1 和 2，加入分装的各氨基酸标准品中，并用涡旋振荡仪将其混匀；贴氨基酸标准溶液标签，待用。

### 1.4 衍生化试剂的配制

**FMOC 试剂：**将 1 mL 安瓿瓶装的 FMOC 平均分装成 10 份，每份 100 μL。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶，在 4 °C 下储存。在该储存条件下，分装的溶液可在 7-10 天保持稳定。

**OPA 试剂：**将 1 mL 安瓿瓶装的 OPA 平均分装成 10 份，每份 100 μL。将每份样品置于样品瓶的内插管中。盖好样品瓶，在 4 °C 下储存。在该储存条件下，分装的溶液可在 7-10 天保持稳定。

**稀释剂：**100 mL 流动相 A（含 1.2 mL 磷酸），4 °C 下储存。

### 1.5 样品前处理



复方氨基酸注射液：取 1 mL 样品溶液，置于 50 mL 容量瓶中。然后，加入 25 mL 0.1 M 盐酸溶液，摇匀，加水稀释至刻度，并再次摇匀。使混合物通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜，保存续滤液，待用。

复方氨基酸片：取 5 片样品，研匀，然后准确称取相当于 1 片量的细粉。将粉末置于 15 mL 离心管中，加入 0.1 M 盐酸溶液，超声至粉末溶解。然后，使溶液通过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜。取续滤液 1 mL，加入 50 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，待用。山羊乳：参考乳制品国家标准 GB / T 5009.124-2003 配制。简言之，用 HCl 使山羊乳中的蛋白质变性，在高温下水解为氨基酸，经过滤和干燥后，重悬于柠檬酸钠缓冲液中。

### 1.6 自动进样程序的编写

- 吸取 2.5  $\mu\text{L}$  硼酸盐缓冲液
- 吸取 1.0  $\mu\text{L}$  样品
- 在清洗口将 3.5  $\mu\text{L}$  混合液混合 5 次
- 等待 0.2 分钟，然后吸取 0.5  $\mu\text{L}$  OPA
- 在清洗口将 4  $\mu\text{L}$  混合液混合 10 次
- 吸取 0.4  $\mu\text{L}$  FMOC
- 在清洗口将 4.4  $\mu\text{L}$  混合液混合 10 次
- 吸取 32  $\mu\text{L}$  稀释剂
- 在清洗口将 20  $\mu\text{L}$  混合液混合 8 次
- 进样
- 等待 0.1 分钟
- 阀切换至旁路

### 1.7 液相色谱条件

液相色谱条件具体见表 1

表 1. 液相色谱条件

参数	值
色谱柱	AdvanceBio AAA C18, 4.6 $\times$ 100 mm, 2.7 $\mu\text{m}$
流速	1.5 mL/min
柱温	40 $^{\circ}\text{C}$
流动相	A 相: 10 mmol/L 磷酸氢二钠和 10 mM 硼酸钠溶液, 用盐酸将 pH 调节为 8.2 B 相: 甲醇: 乙腈: 水, 45:45:10 (v: v: v)
梯度	时间 (min) %B 0.0 2 0.35 2 13.4 57

	13.5 100 15.7 100 15.8 2 18.0 2
检测器	338 nm, 带宽 10 nm; 参比 390 nm, 带宽 20 nm (一级氨基酸) 262 nm, 带宽 16 nm; 参比 324 nm, 带宽 8 nm (二级氨基酸) 在赖氨酸出峰后切换波长实验设置: 在 10.0 分钟时, 从 338 nm 切换为 262 nm

## 二、结果与讨论

按照本报告所述的自动进样程序进行氨基酸样品的在线衍生进样。利用配备 AdvanceBio AAA 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统在 18 分钟内对 23 种氨基酸实现了基线分离, 图 1 和表 2 示出氨基酸标准溶液的色谱图以及图中涉及的 23 种氨基酸列表。本报告所述分析方法为在原有方法<sup>[1,2]</sup>的基础上, 采用 Poroshell HPH-C18 色谱柱开发的方法。由于未改变色谱柱选择性, 氨基酸的出峰顺序也不变。赖氨酸与羟脯氨酸之间有 0.1 分钟的间隔, 因此波长切换对化合物的分析没有影响。

采用本报告所述的方法对实际样品中的氨基酸进行测定, 结果如图 2-4 所示。实际样品中的氨基酸均实现了完全的基线分离。该方法可成功测定复方氨基酸注射液中的 18 种氨基酸、复方氨基酸片中的 17 种氨基酸以及乳制品中的 16 种氨基酸。

表 2. 23 种氨基酸标准品列表

峰号	氨基酸
1	天冬氨酸
2	谷氨酸
3	天冬酰胺
4	丝氨酸
5	谷氨酰胺
6	组氨酸
7	甘氨酸
8	苏氨酸
9	精氨酸
10	丙氨酸
11	酪氨酸
12	胱氨酸
13	缬氨酸
14	甲硫氨酸
15	正缬氨酸
16	色氨酸
17	苯丙氨酸
18	异亮氨酸

19	亮氨酸
20	赖氨酸
21	羟脯氨酸
22	肌氨酸
23	脯氨酸

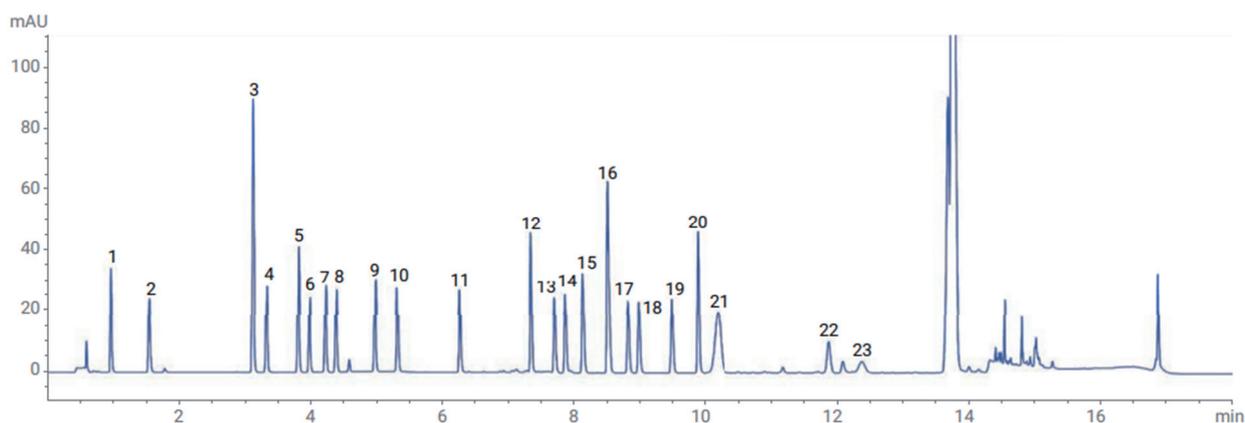


图1. 23种氨基酸标准品的分离结果

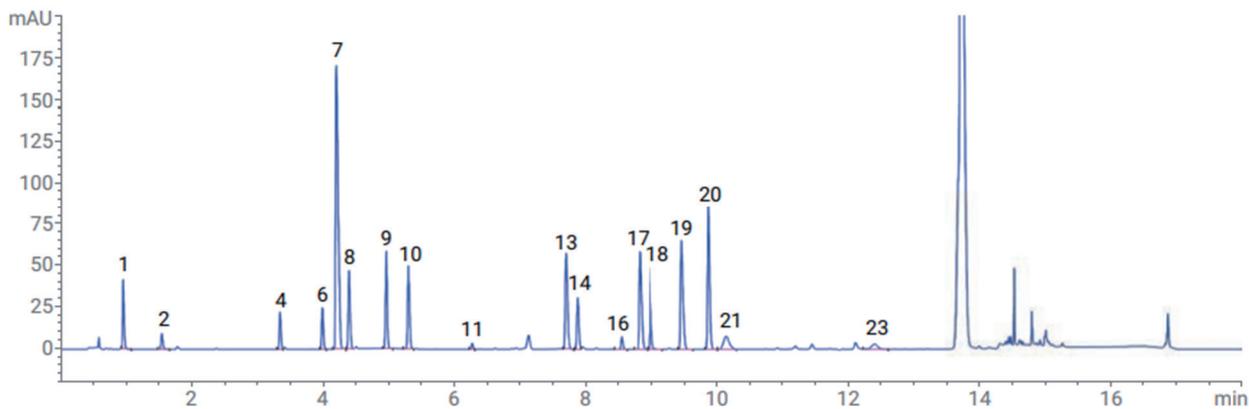


图2. 复方氨基酸注射液的分离结果

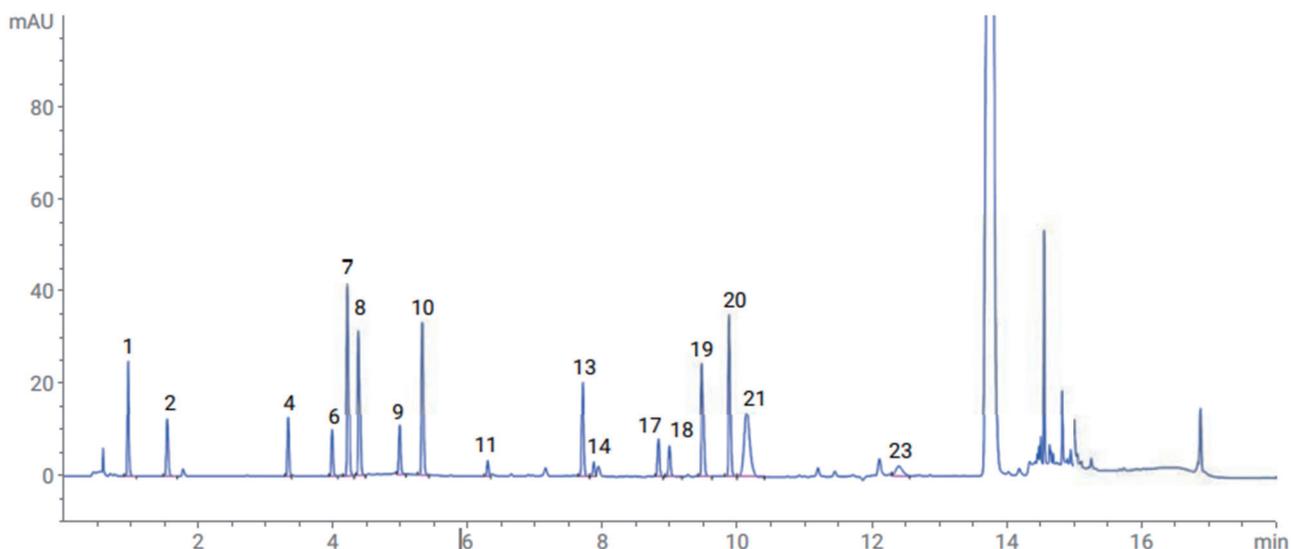


图3. 复方氨基酸片样品的分离结果

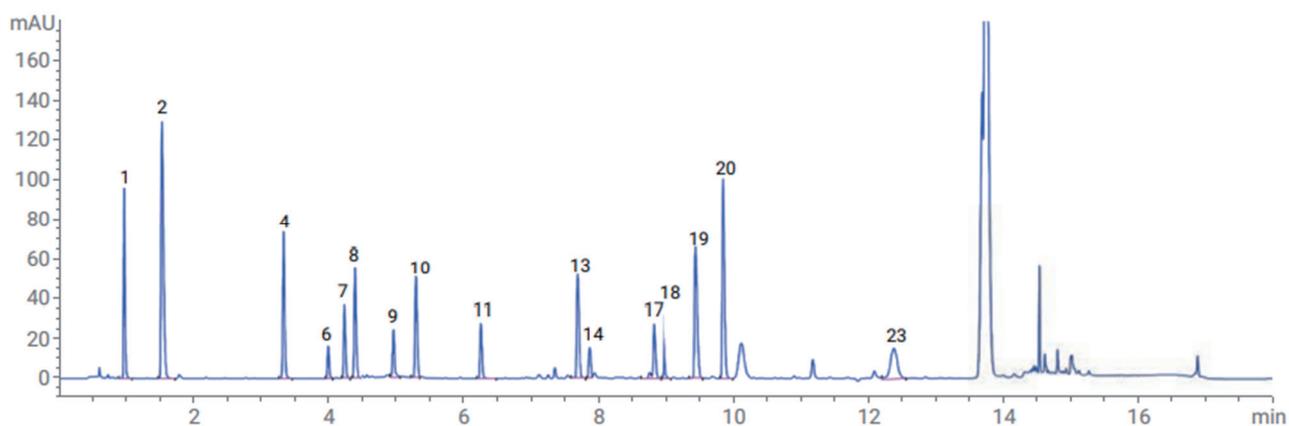


图4. 乳制品（山羊乳）中氨基酸的分离结果

### 三、结论

本实验使用 Agilent AdvanceBio AAA C18 色谱柱，在原有氨基酸分析方法的基础上，建立了准确、快速、重现性好的氨基酸分析方法，实现了对 23 种氨基酸的定性和定量分析。本实验对三种不同的化学药物和食品基质中的氨基酸进行了分析，均获得了良好的分离度，实现了准确的定量分析。在线衍生为分析过程节省了大量样品前处理时间。因此，该方法非常适合制药、食品及其他行业中大量样品的氨基酸分析。AdvanceBio AAA C18 色谱柱填充表面多孔颗粒填料，能够获得与亚 2  $\mu\text{m}$  填料相当的柱效，柱压仅有亚 2  $\mu\text{m}$  填料的 50% 左右。本实验中的最高梯度压力为 220 bar，完全兼容常规液相色谱系统。此氨基酸分析方法中所用的流动相体系呈碱性，因此硅胶基质色谱柱的耐受能力非常重要。pH 耐受性测试



证明, AdvanceBio AAA C18 色谱柱在碱性条件下具有良好的稳定性, 可有效保证氨基酸分析获得可靠的重现性<sup>[3,4]</sup>。在实际样品的分析中, 建议使用 AdvanceBio AAA C18 保护柱。

#### 参考文献

- [1] Henderson, J. W. 等人, 快速、准确、灵敏、重现性好的 HPLC 氨基酸分析方法。安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5980-1193CHCN, 2000
- [2] Henderson Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals (采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的改进氨基酸分析方法, 适合多种安捷伦液相色谱仪和分离目的)。安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-4547EN, 2010
- [3] Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries (使用高 pH 稳定的 Poroshell HPH 键合固定相延长色谱柱在药物分析中的使用寿命)。安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991- 5022EN, 2014
- [4] Long, W. Automated Amino Acid Analysis Using an Agilent Poroshell HPH-C18 Column (使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析)。安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5571EN, 2015



## 使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程

John Yan, Aled Jones, 陆予菲\*, 安捷伦科技有限公司, 北京, 100102

**【摘要】目的：**使用 Agilent AdvanceBio Gly-X 样品前处理试剂盒建立生物治疗药物的快速 N 糖分析工作流程；**方法：**使用 Agilent AdvanceBio Gly-X 配合 InstantPC 和 2-AB Express 试剂盒（原 ProZyme），通过 PNGase F 释放 N 糖，然后分别使用 InstantPC 进行及时糖胺标记或使用 2-AB 进行还原胺化标记。使用亲水相互作用液相色谱（HILIC）分离标记的 N 糖，并用荧光和质谱（MS）进行检测；**结果：**使用 InstantPC 和 2-AB 标记的 N 糖进行 HILIC 分离，重要的糖型均可得到良好分离。两种标记物所获得的糖型相对面积百分比相当。同时，InstantPC 显示荧光和 MS 信号高于 2-AB；**结论：**Gly-X 样品前处理可提供高重现性和通量，InstantPC 的前处理时间为 1 小时，2-AB Express 的前处理时间为 2 小时。此外，InstantPC 标记可改进荧光响应和 MS 电离效率。

**【关键词】**单克隆抗体、融合蛋白、N 糖前处理、亲水相互作用色谱

## Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics Using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with LC/FLD/MS

John Yan, Aled Jones, Yufei Lu, Agilent Technologies, Inc., Beijing, 100102

**【ABSTRACT】 OBJECTIVE:** Developing a rapid N-Glycan analysis workflow for biotherapeutics using the Agilent AdvanceBio Gly-X kit; **METHOD:** Using the Agilent AdvanceBio Gly-X with InstantPC and Gly-X 2-AB Express kits (formerly ProZyme) for the release of N-glycans using PNGase F followed by instant glycosylamine labeling with InstantPC or reductive amination labeling with 2-AB Express, respectively. Labeled N-glycans were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), with detection using both fluorescence and mass spectrometry (MS); **RESULTS:** HILIC separation of labeled N-glycans from Rituxan and Enbrel labeled with InstantPC or 2-AB results in well resolved peaks for major glycan species. Analysis with fluorescence detection of InstantPC and 2-AB labeled N-glycans from biotherapeutics

作者: John Yan, 安捷伦科技有限公司应用科学家。主要研究方向: 大分子生物药的表征与分析

\*通讯作者: 陆予菲, 女, 安捷伦科技有限公司消耗品部门生物色谱分离应用科学家。主要研究方向: 生物药关键质量属性  
[yu-fei\\_lu@agilent.com](mailto:yu-fei_lu@agilent.com) Tel: (010) 64397911



Rituxan and Enbrel results in comparable relative percent areas for major glycoforms. InstantPC displays higher fluorescence and MS signal compared to 2-AB; **CONCLUSION:** Gly-X sample preparation offers a high level of reproducibility and throughput, with a one hour preparation time for InstantPC and two hours for 2-AB Express. In addition, the InstantPC label offers improved fluorescence response and MS ionization efficiency.

**【KEY WORDS】** Monoclonal antibody, Fusion protein, N-glycan sample preparation, HILIC

N-糖表征是生物治疗药物开发过程的重要环节，因为 N-糖的结构会影响糖基化生物治疗药物的功能，这常常使糖基化成为 关键质量属性 (CQA)<sup>[1]</sup>。N-糖分析通常涉及用标签标记游离多聚糖，以便进行荧光 (FLD) 检测，并增强质谱 (MS) 的电离，及后续的 N-糖分离、检测和相对定量。与最近推出的染料（如 InstantPC）相比，许多常用的荧光标签（如 2-AB<sup>[2]</sup>）在 MS 灵敏度方面受到限制，且早些的 N-聚糖样品前处理工作流程可能非常耗时<sup>[3]</sup>。然而，2-AB 的使用已超过 20 年，因此在文献和许多实验室中得到了很好的认可。

## 1. 仪器与材料

LC/MS 级乙腈和水购自 Honeywell Research Chemicals。mAb1、mAb2 和 ADC（赖氨酸偶联）购自当地药店并根据制造商的说明进行储存

使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析专用色谱柱在安捷伦 LC/MS 上分离标记的 N 糖样品，仪器配制包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵（G7120A）
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler（G7167B）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱（G7116B）
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器（G1321B）
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

### 1.1 样品前处理

使用配备 InstantPC（部件号 GX96-IPC）和 Gly-X 2-AB Express（部件号 GX96-2AB）的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒，用于单克隆抗体利妥昔单抗（Rituxan，批号 M190170）和 Fc 融合蛋白依那西普（恩利，批号 1092537）中的 N-糖标记前处理，每次前处理 40 μg 蛋白。

使用标准手动方案进行 InstantPC 和 2-AB 标记样品的前处理。Gly-X 溶液内去糖基化实验方案在 90 °C 下变性 3 分钟，打开糖蛋白目标位点，使 PNGase F 可以在 50 °C 下，5 min 完成去糖基化。溶液内去糖基化后，对游离 N-糖进行 1 分钟的糖胺标记，制备 InstantPC 标记样品，然后在真空条件下

使用 HILIC 固相萃取 (SPE) 净化游离染料。(图 1A)

使用标准 Gly-X 2-AB Express 方案和还原胺化化学反应制备 2-AB 标记的 N-糖 样品。在使用 PNGase F 进行 Gly-X 的 5 分钟去糖基化后, 游离 N-糖从糖胺形式 (-NH<sub>2</sub>) 转化为游离还原末端 (-OH), 使 2-AB 能够进行还原胺化标记。然后通过真空过滤将 N-糖去溶剂化到固态基质上, 然后在基质上进行 2-AB 标记步骤。(图 1B)

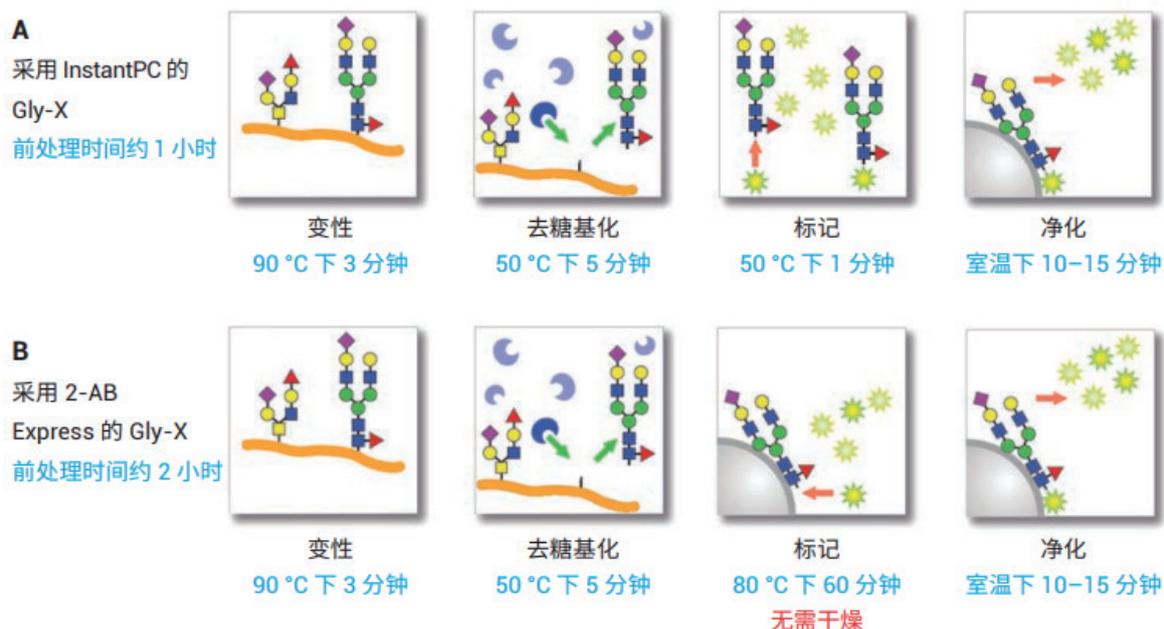


图1. Gly-X N-糖样品前处理。A) InstantPC工作流程, 包括溶液内去糖基化和标记, 后续基质上净化; B) 2-AB 工作流程, 在溶液内进行去糖基化, 然后进行基质上标记和净化

## 1.2 仪器方法条件

色谱柱	Agilent AdvanceBio 糖谱分析专用色谱柱, 2.1×150mm, 1.8μm (部件号 859700-913)																										
流动相	洗脱液 A) 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 洗脱液 B) 乙腈																										
流速	0.5 mL/min																										
柱温	40 °C																										
进样量	1 μL																										
梯度曲线	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>48</td> <td>38</td> <td>62</td> </tr> <tr> <td>49</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>51.5</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>			时间	%A	%B	0	20	80	2	25	75	48	38	62	49	60	40	51.5	60	40	52	20	80	60	20	80
时间	%A	%B																									
0	20	80																									
2	25	75																									
48	38	62																									
49	60	40																									
51.5	60	40																									
52	20	80																									
60	20	80																									

荧光检测	InstantPC: 285nm (激发波长); 345nm (发射波长) 2AB: 260nm (激发波长); 430nm (发射波长)
离子模式	双 AJS ESI
干燥气温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
雾化器压力	35 psi
毛细管电压	3000 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
质量数范围	m/z 600-3000

### 1.3 软件

- 数据采集: Agilent MassHunter 采集软件
- 数据分析: Agilent MassHunter 定性分析软件

## 2. 结果与讨论

### 2.1 使用 HILIC 分离 InstantPC 和 2-AB N-糖

使用 60 分钟的方法对 Rituxan 和恩利中 InstantPC 或 2-AB 标记的 N-糖进行 HILIC 分离 (图 2 和图 3), 重要的糖型的峰分离良好。Rituxan (图 2A 为 InstantPC; 图 3A 为 2-AB) 是一种免疫球蛋白 G (IgG), 具有单克隆抗体的典型 N-糖谱图, 这类中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达的单克隆抗体 Fc 区域有一个 N-糖基化位点, 主要为中性复合二天线型 N-糖与核心岩藻糖、部分 Man5 和比例相对较低的唾液酸化多聚糖。恩利为 Fc 融合蛋白, 除 Fc 区域中的单个 N-糖位点外, 由于融合标签 TNF- $\alpha$  受体 (TNFR) 胞外区有两个额外的 N-糖基化位点, 因此其 N-糖谱图 (图 2B 为 InstantPC; 图 3B 为 2-AB) 含有更高水平的唾液酸化多聚糖<sup>[5]</sup>。

尽管 N-糖种类的洗脱顺序相当, 2-AB N-糖的 HILIC 保留时间比 InstantPC N-糖的 HILIC 保留时间短。对于 G0F/Man5 和 Man5/G1 等经常在生物治疗药物开发过程中监测的关键物质对, 使用 InstantPC 和 2-AB 标记均可得到良好分离, 进而可靠地确定组成的相对百分比。G1F 异构体 G1F[6] 和 G1F[3] 也可得到分离。表 1 至表 4 中列出了相对百分比面积、标准偏差和相对标准偏差, 表明 4 次样品处理重复进样之间的差异程度较低。差异程度会随多聚糖丰度降低而增加。与 2-AB (图 3B) 相比, InstantPC 的额外优势在于使用前文所述的色谱条件时, 可从恩利中分离异构体 G2S1[6]/[3] 和 G2FS1[6] (图 2B)。使用荧光检测对生物治疗药物 Rituxan 和恩利中 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖进行分析, 得出的主要糖型 G0F、G1F[6]/[3]、G2F、G2S2 和 G2FS2 的相对百分比面积相当。

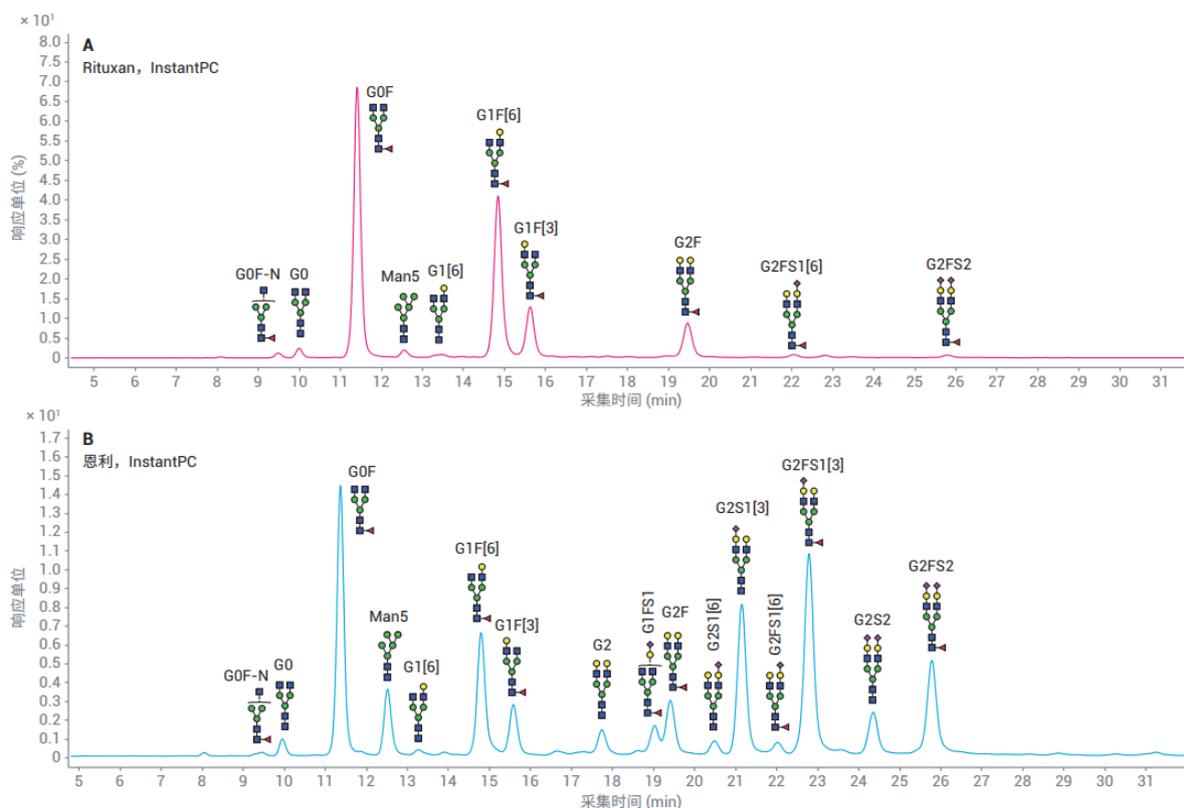


图2. 用InstantPC标记的A) Rituxan和B) 恩利N-糖HILIC-UHPLC荧光谱图。

表1. 图2A用InstantPC标记的利妥昔单抗N-糖的相对峰面积百分比 (n=4)

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

表2. 图2B用InstantPC标记的恩利N-糖的相对峰面积百分比 (n=4)

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0	1.10	0.02	2.09
G0F	19.36	0.16	0.84
Man5	5.08	0.03	0.52
G1[6]	0.48	0.00	0.00
G1F[6]	10.48	0.04	0.39
G1F[3]	3.97	0.01	0.25
G2	2.08	0.01	0.55
G1FS1	1.84	0.05	2.49
G2F	4.26	0.09	1.99
G2S1[6]	1.18	0.01	0.49
G2S1[3]	13.91	0.04	0.31
G2FS1[6]	0.89	0.00	0.00
G2FS1[3]	20.54	0.08	0.37
G2S2	4.26	0.01	0.14
G2FS2	10.54	0.08	0.78

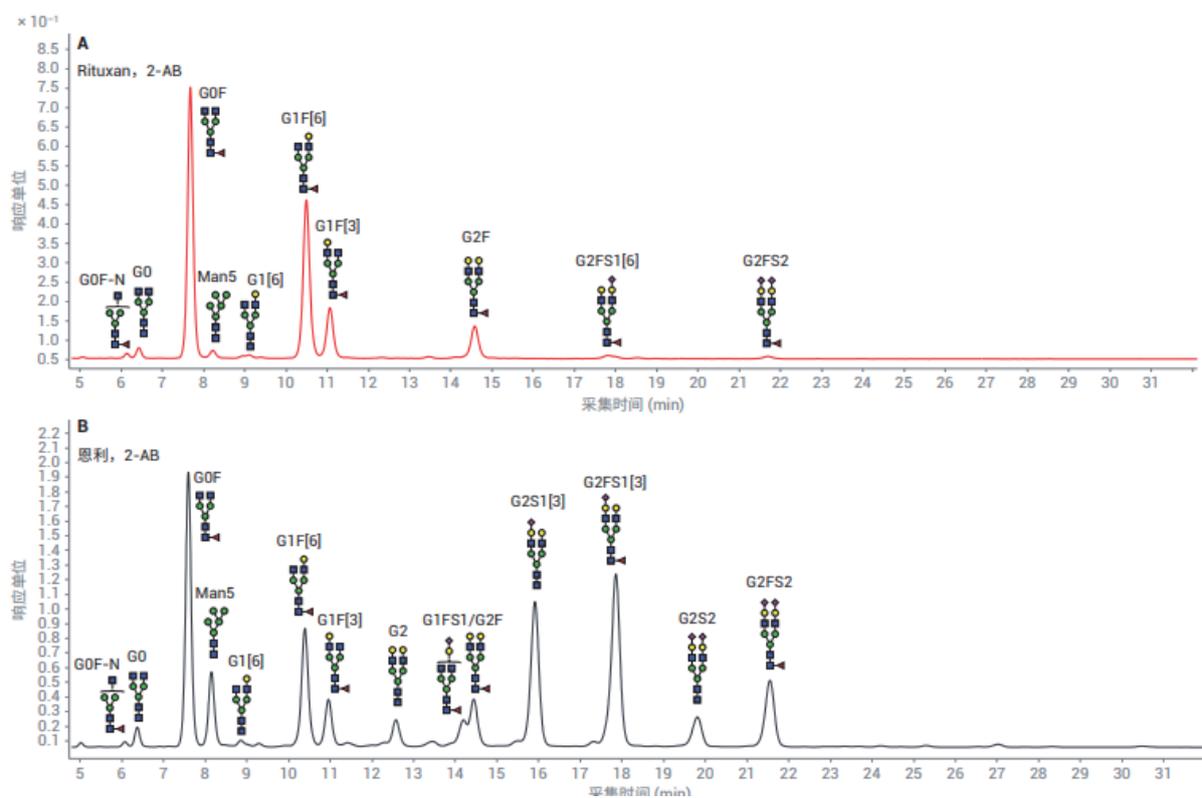


图3. 用2-AB标记的A) Rituxan和B) 恩利N-糖HILIC-UHPLC荧光谱图。

表3. 图3A用2-AB标记的利妥昔单抗N-糖的相对峰面积百分比 (n=4)

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.78	0.09	11.94
G0	1.64	0.05	3.12
G0F	44.89	0.39	0.87
Man5	1.54	0.14	8.83
G1F[6]	31.39	0.09	0.27
G1F[3]	10.40	0.14	1.34
G2F	7.52	0.16	2.10
G2FS1	1.17	0.03	2.13
G2FS2	0.67	0.02	3.58

表4. 图3B用2-ABC标记的恩利N-糖的相对峰面积百分比 (n=4)

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.32	0.02	7.44
G0	1.27	0.07	5.34
G0F	20.18	0.45	2.22
Man5	5.50	0.34	6.17
G1[6]	0.45	0.02	3.89
G1F[6]	10.35	0.33	3.18
G1F[3]	3.92	0.17	4.39
G2	2.21	0.15	6.78
G2F/G1FS1	7.00	0.25	3.63
G2S1	15.19	0.17	1.09
G2FS1	20.10	0.32	1.59
G2S2	4.19	0.25	5.95
G2SF2	9.35	0.74	7.93

## 2.2 使用 FLD 和 MS 检测 InstantPC 和 2-AB N-糖

当使用相同量的糖蛋白起始材料 (40  $\mu\text{g}$ ), 且 HILIC 分离的相对进样体积 (100  $\mu\text{L}$  试剂盒洗脱液中的 1  $\mu\text{L}$ ) 相同时, InstantPC 显示的荧光和 MS 信号高于 2-AB (图 4)。InstantPC 和 2-AB 标记的 Man5 单个谱图表明 InstantPC 的 MS 信号更高 (图 5)。

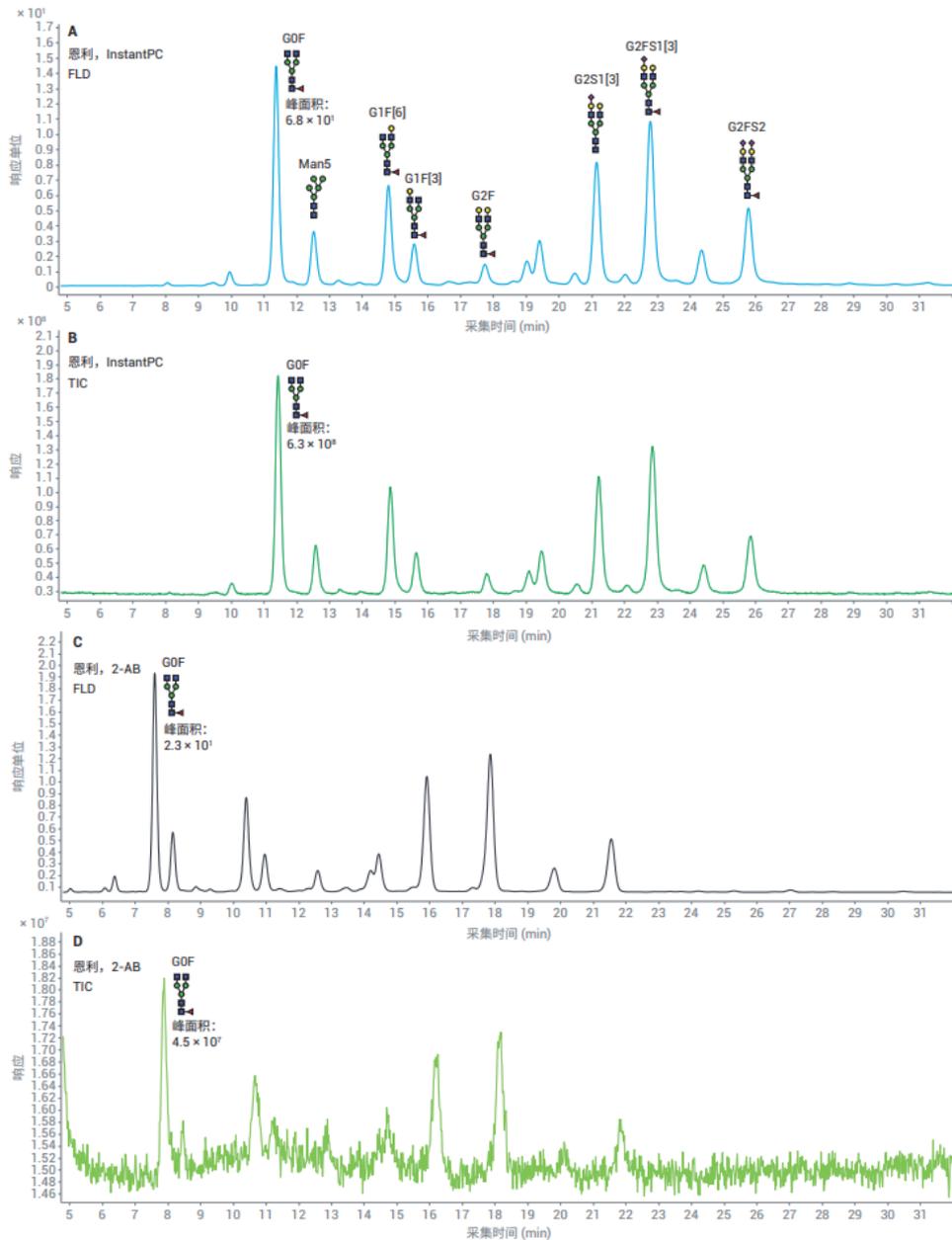


图 4. 用 InstantPC 和 2-AB 标记的恩利 N-糖的 FLD 和 MS 结果。A) InstantPC FLD; B) InstantPC 总离子流图 (TIC); C) 2-AB FLD; D) 2-AB TIC

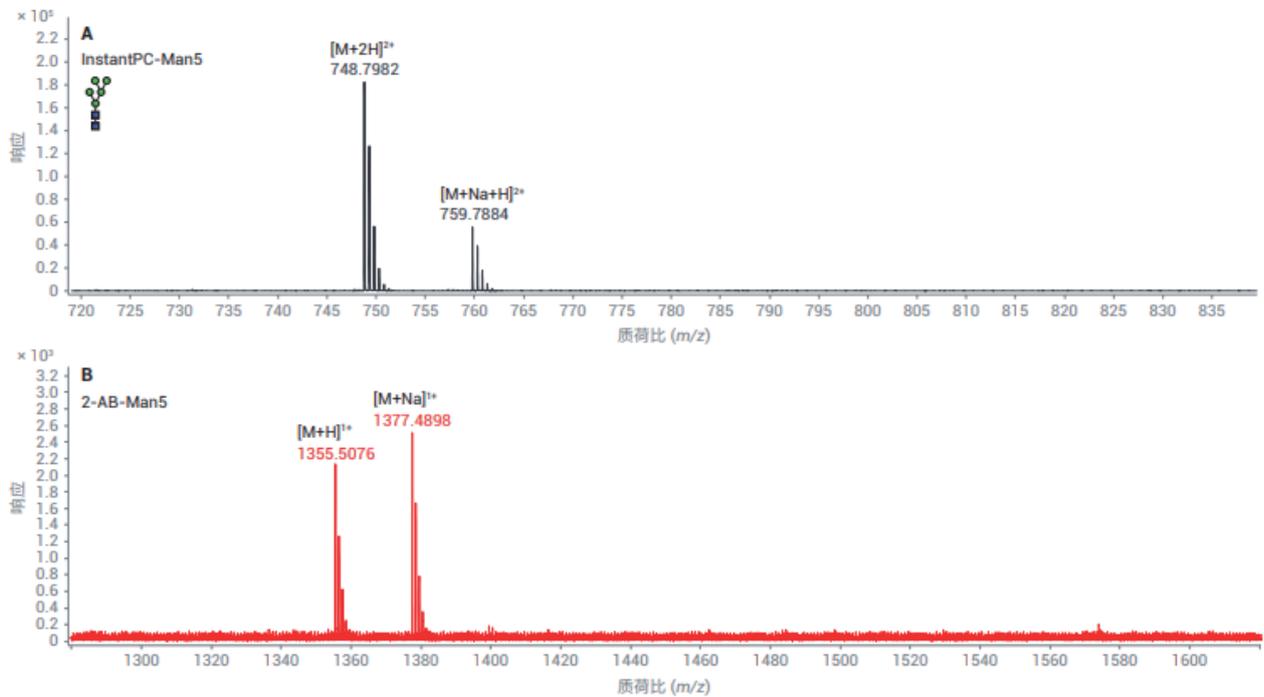


图5. 用 A) InstantPC 和 B) 2-AB 标记的恩利 Man5 的质谱比较

### 3. 结论

糖基化为许多生物治疗蛋白的特征之一，常作为必须监测的 CQA。N-糖分析在治疗性蛋白质的开发和生产中十分重要。Gly-X N-糖样品前处理工作流程可在 5 分钟内释放 N-糖，同时适合使用 InstantPC 进行糖胺标记和使用 2-AB 进行还原胺化化学标记。该工作流程可使用 InstantPC 进行即时糖胺标记，或者在无需干燥的情况下使用 2-AB 进行基质还原胺化标记。根据相对荧光峰面积百分比对多聚糖种类进行谱图分析，并使用高分辨率质谱确认峰归属。与 2-AB 相比，InstantPC 标记的多聚糖在正离子模式下显示出更高的 FLD 信号和更高的 MS 电离效率，从而能够可靠地检测低丰度的多聚糖种类。尽管 InstantPC 的性能优势明显，但 2-AB 是已使用多年的 N-糖标记。因此，快速的 2-AB 工作流程可保证与 2-AB N-糖历史数据集的连续性。

### 参考文献

- [1] Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* 2015, 104(6), 1866–1884
- [2] Anumula, K. R. Advances in Fluorescence Derivatization Methods for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Glycoprotein Carbohydrates. *Anal. Biochem.* 2006, 350, 1–23



- [3] Kimzey, M. et al. Development of a 5-Minute Deglycosylation Method for High Throughput N-Glycan Analysis by Mass Spectrometry. ProZyme Technical Note, Bulletin 4001, Rev E.
- [4] Yan, J. et al. Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 由单克隆抗体进行用于液相色谱-荧光分析的释放 N 糖样品前处理, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0682ZHCN, 2019
- [5] Houel, S.; et al. N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. Anal. Chem. 2014, 86, 576–584



## 用于 mAb (单克隆抗体) 和 ADCs (抗体偶联药物) LC/MS 分离的 PLRP-S 聚合物型反相色谱柱

Suresh Babu C.V., 陆予菲\*, 安捷伦科技有限公司, 北京, 100102

**【摘要】目的:** 建立一个可以兼容质谱的反相色谱方法, 结合质谱方法进行完整蛋白和片段分析;  
**方法:** 使用聚合物基质填料色谱柱, 采用质谱兼容流动相体系 (含有甲酸的流动相), 对完整蛋白进行分析。同时, 对样品进行化学反应和酶反应, 对单克隆抗体 (mAb) 和抗体偶联药物 (ADCs) 进行片段分析;  
**结果:** 使用 Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 1000Å 色谱柱对 mAb 和 ADC 进行完整蛋白和片段的 LC/MS 分析, 甲酸体系下, 这些主要片段峰之间可达到良好的分离。同时由于未使用三氟乙酸 (TFA), 该方法可获得良好的质谱灵敏度;  
**结论:** 本研究使用聚合物型反相色谱柱 (Agilent PLRP-S) 展示了 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分析, 在甲酸体系下可获得良好的峰形和分离, 实现完整和片段化 mAb 与 ADC 的精确质量数测定。

**【关键词】** 单克隆抗体、抗体药物偶联物、反相色谱法、液质联用、精确质量数

### PLRP-S Polymeric Reversed-Phase Column for LC/MS Separation of mAbs and ADC

Suresh Babu C.V., Yufei Lu, Agilent Technologies, Inc., Beijing, 100102

**【 ABSTRACT 】 OBJECTIVE :** Developing a reversed-phase LC method, compatible with mass spectrometry, for the analysis of intact proteins and fragments; **METHOD:** Using a polymer-based column with the LC/MS-compatible mobile phase (mobile phase containing formic acid) to analyze intact proteins. To analyze the generated fragments, the samples were subjected to chemical and enzymatic reactions; **RESULTS:** LC/MS analysis of intact proteins and fragments of mAbs and ADCs was performed on an Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 1000Å column, with good separation of these major fragment peaks in formic acid. At the same time, since trifluoroacetic acid (TFA) is not used, this method can obtain good mass spectrometry sensitivity; **CONCLUSION:** This study demonstrates LC/MS analysis of mAbs and ADCs using a polymer-based reversed-phase column (Agilent PLRP-S) with good peak shape and separation in the formic acid system, enabling accurate analysis of intact and fragmented mAbs and ADCs Mass determination.

**【 KEY WORDS 】** Monoclonal antibody, Antibody drug conjugates, Reverse phase chromatography, LC/MS, Accurate-Mass

作者: Suresh Babu C.V., 安捷伦科技有限公司应用科学家。主要研究方向: 大分子生物药的表征与分析

\*通讯作者: 陆予菲, 女, 安捷伦科技有限公司消耗品部门生物色谱分离应用工程师。主要研究方向: 生物药关键质量属性  
[yu-fei\\_lu@agilent.com](mailto:yu-fei_lu@agilent.com) Tel: (010) 64397911



单克隆抗体 (mAb) 和抗体偶联药物 (ADC) 是具有异质性的治疗分子<sup>[1]</sup>。药物开发过程中可对这些分子进行各种修饰, 因此需要全面的表征来确保安全性和药效。反相液相色谱与质谱检测结合最常用于 mAb 和 ADC 的初步表征。选择正确的液相色谱柱和方法对于获得可重现的高分离度分离和高质量质谱数据至关重要。通常, 在传统硅胶反相色谱柱的流动相中使用甲酸 (FA, 一种可用于质谱的离子对试剂) 会导致总离子流图 (TIC) 峰形变差, 从而影响 LC/MS 结果 (分离度、灵敏度、质谱信号、准确分子量信息等等)。因此, 液相色谱柱必须与甲酸条件兼容, 以便改进生物大分子的 LC/MS 分析。

## 1. 仪器与材料

### 1.1 样品

治疗性 mAb1、mAb2 和 ADC (赖氨酸偶联) 购自当地药店并根据制造商的说明进行储存

### 1.2 样品前处理方法

- 完整蛋白: 使用 0.1% 甲酸的 3% 乙腈 (ACN) 溶液将 mAb1、mAb2 和 ADC 稀释到 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的浓度
- 片段还原: 将 20  $\mu\text{L}$  mAb (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 样品与 5  $\mu\text{L}$  二硫苏糖醇 (DTT) (1 M) 混合, 然后在 37  $^{\circ}\text{C}$  下温育 1 小时
- 木瓜蛋白酶消化: 将 10  $\mu\text{L}$  mAb (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 样品与 5  $\mu\text{L}$  水解缓冲液 (含半胱氨酸) 和 5  $\mu\text{L}$  活化木瓜蛋白酶 (Sigma) 混合。将混合物在 37  $^{\circ}\text{C}$  下温育 3 小时
- IdeS 蛋白酶消化: 将 20  $\mu\text{L}$  mAb (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 样品与 0.5  $\mu\text{L}$  FabRICATOR (30 个单位) (Sigma) 混合, 将混合物在 37  $^{\circ}\text{C}$  下温育 1 小时

### 1.3 仪器

- Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
- 配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6530 精确质量数四极杆飞行时间 (Q-TOF) 质谱仪

### 1.4 仪器方法条件

色谱柱	Agilent PLRP-S 2.1 $\times$ 50 mm, 5 $\mu\text{m}$ , 1000 $\text{\AA}$ (部件号 PL1912-1502)
流动相	洗脱液 A) 0.1% 甲酸的水溶液 洗脱液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.6 mL/min
柱温	80 $^{\circ}\text{C}$
进样量	1 $\mu\text{L}$
停止时间	11.1 分钟
后运行时间	4 分钟

梯度曲线	完整:		
	时间	%A	%B
	0	80	20
	4	80	20
	5	60	40
	10	30	70
	11	10	90
	11.1	80	20
	片段:		
	时间	%A	%B
	0	80	20
	10	50	50
	10.1	15	85
	11	15	85
11.1	80	20	
离子模式	正离子模式, 双 AJS ESI (profile)		
干燥气温度	350 °C		
干燥气流速	8 L/min		
鞘气温度	400 °C		
鞘气流速	11 L/min		
雾化器压力	35 psi		
毛细管电压	5500 V		
碎裂电压	380 V		
锥孔电压	65 V		
Oct RF Vpp	750 V		
采集参数 MS 模式	数据在 1 GHz 下采集, 仅 MS 模式, 质量数范围为 600-4000m/z (片段), 2000-6000m/z (完整)		

### 1.5 软件

- 数据采集: Agilent MassHunter 定性分析软件
- 数据分析: Agilent MassHunter BioConfirm 软件

## 2. 结果与讨论

为获得更好的色谱性能, 通常将三氟乙酸 (TFA) 添加到流动相中作为离子对试剂, 以获得更尖锐的色谱峰。然而, TFA 因其信号抑制效应而不适用于质谱分析<sup>[2]</sup>。甲酸是用于生物分子应用的质谱最适用的离子对试剂, 但使用传统硅胶色谱柱时可能会形成较差的峰形。在用于 mAb 等高分子量蛋白质时, 需要在获得良好色谱峰形和高信噪比 (S/N) m/z 质谱之间进行权衡<sup>[3]</sup>。选择合适的液相色谱柱对于获得质谱兼容性和提高 mAb 和 ADC 分离度十分重要。在本研究中, 使用聚合物型 PLRP-S

色谱柱分析完整和片段级 mAb 和 ADC。PLRP-S 经久耐用且具有机械稳定性，可提供各种适用于生物大分子应用的孔径和填料尺寸。

## 2.1 完整分析

图 1 展示了使用 PLRP-S,  $2.1 \times 50$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ,  $1000\text{\AA}$  色谱柱对完整 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分析。应用这款色谱柱，获得了出色的 TIC 峰形，mAb 的半峰宽 (FWHM)  $\leq 0.1$  min，ADC 的半峰宽 (FWHM) 为 0.25 min。使用标准反相流动相体系（乙腈 + 甲酸）获得了较窄的 TIC 峰宽。两种 mAb 表现出的峰宽类似，表明该方法适用于各种 mAb 样品。具有高度异质性的 ADC 样品也表现出较窄的峰宽。

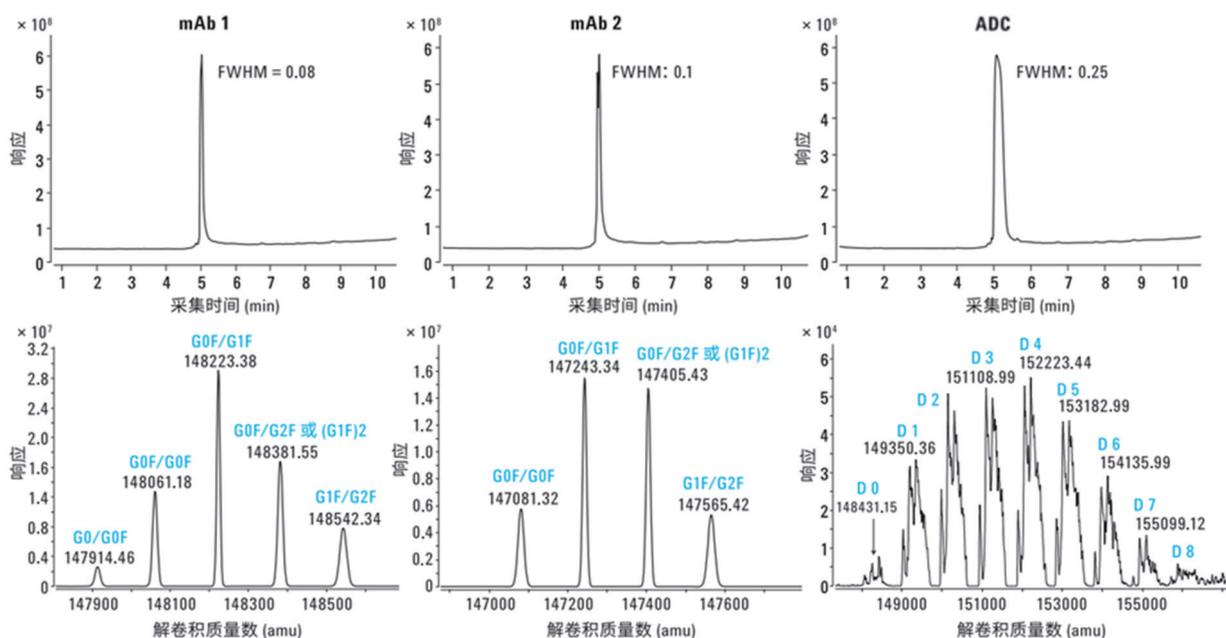


图 1. 采用 Agilent PLRP-S  $2.1 \times 50$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ,  $1000\text{\AA}$  色谱柱对完整 mAb/ADC 的 LC/MS 分析结果。上图：总离子流色谱图 (TIC)；下图：解卷积质谱图。FWHM：半峰宽

使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件将原始质谱转换为零电荷质谱。图 1 显示了解卷积谱图。mAb1 解卷积谱图中显示了五种主要糖型，而 mAb2 谱图中则显示了四种主要糖型。ADC 的解卷积质谱显示，一种药物在加载八个主要药物偶联物 (D0 至 D8) 的步骤中有效载荷有增大趋势。

## 2.2 片段分析

为对生成的片段进行分析，对样品进行了化学反应和酶反应。图 2 展示了使用 PLRP-S,  $2.1 \times 50$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ,  $1000\text{\AA}$  色谱柱对还原态 IdeS 和木瓜蛋白酶消化的 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分离。利用标准流动相体系（乙腈 + 甲酸）可使片段峰 (LC、HC、ScFc、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、2 \* Fab<sub>2</sub> 和带有不同类型药

物偶联物的 ADC) 在 PLRP-S 柱上得到充分的分离。与预期结果相同, 两种 mAb 样品经消化后形成了两种主要片段。

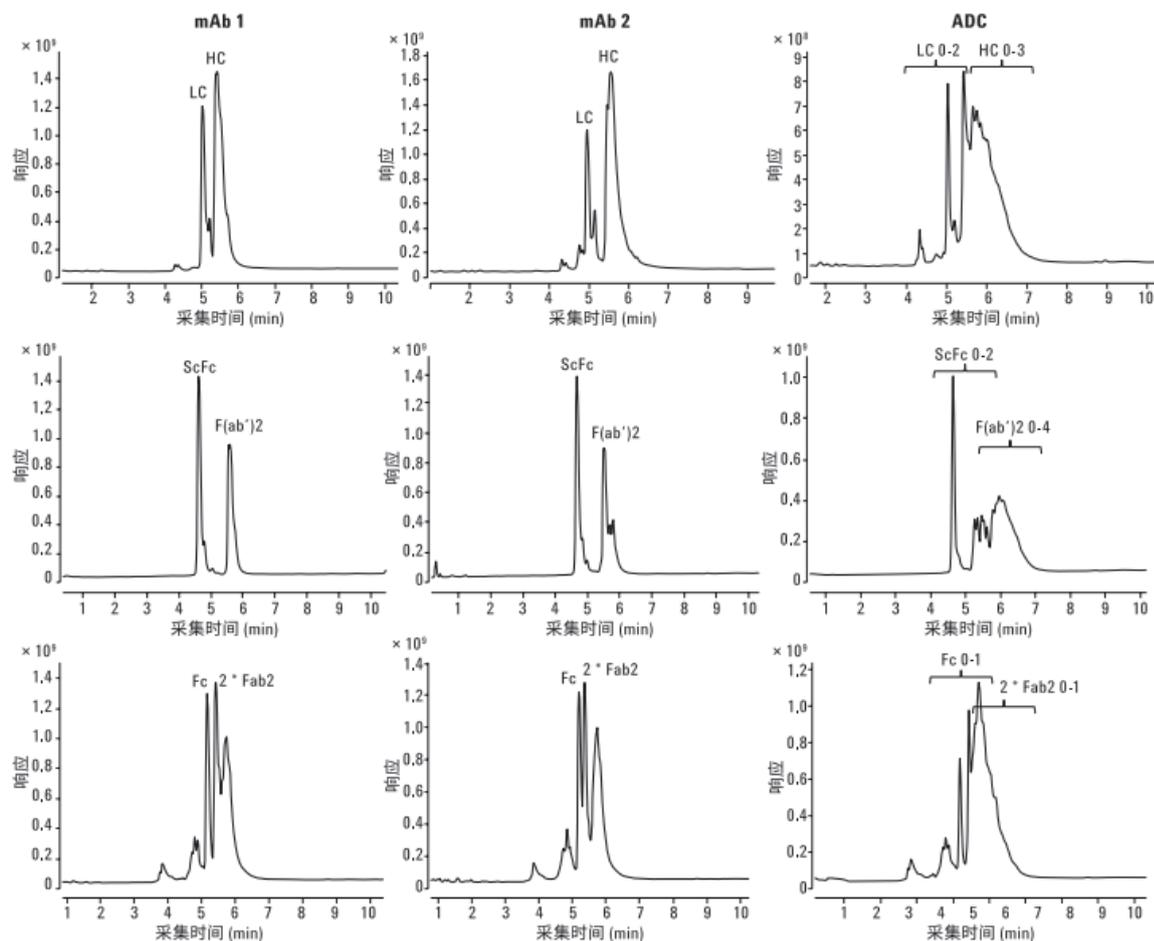


图 2. 采用 Agilent PLRP-S  $2.1 \times 50\text{mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ,  $1000\text{\AA}$  色谱柱对 mAb 片段的 LC/MS 分析结果。上图: 还原; 中图: IdeS 消化; 下图: 木瓜蛋白酶消化

这些主要片段峰之间的分离足以获得更好的质谱灵敏度, 实现准确的分子量测定 (图 3)。ADC 样品中各类片段的分离具有挑战性, 因为在不同的可用赖氨酸残基处的偶联会引发高度异质性。图 2 显示了 PLRP-S 色谱柱对糖基化 ADC 片段的分离结果。显然, 不同药物偶联物在上述 LC/MS 条件下得到了良好的分离, 从而证明了 PLRP-S 色谱柱的分离性能。图 3 显示了 mAb1 和 ADC 片段的代表性解卷积谱图。

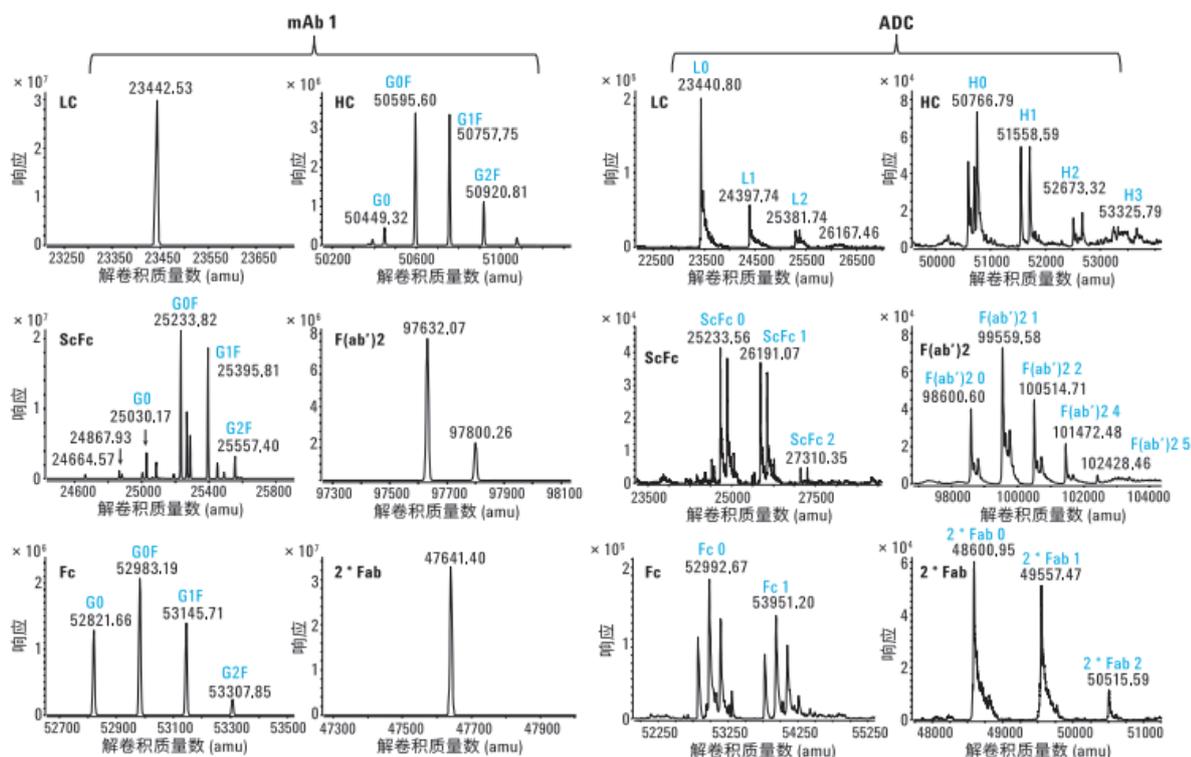


图 3. 代表性解卷积质谱图。上图：还原；中图：IdeS；下图：木瓜蛋白酶消化

### 3. 结论

本研究使用聚合物型反相色谱柱 (Agilent PLRP-S) 展示了 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分析。Agilent PLRP-S 色谱柱对完整和片段级 mAb 和 ADC 的分析表现出卓越的分離性能。PLRP-S 柱含有硬質、大孔的球形聚苯乙烯和二乙烯基苯填料。这些填料在整个 pH 范围内具有物理和化学稳定性。Agilent PLRP-S 采用含有甲酸的流动相，可提供更高的色谱性能和高质量质谱响应。这些填料本质上是疏水的，因此既没有键合相也没有烷基配体需要进行反相分离，从而确保了这种高重现性材料不含硅醇基与重金属离子，使得即使是在甲酸体系下仍可获得良好的峰形和分离。本文使用 PLRP-S 色谱柱结合 Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS，对 ADC 等多种治疗性 mAb 进行了分析。该方法可获得更好的 LC/MS 结果，可实现完整和片段化 mAb 与 ADC 的精确质量数测定。

### 参考文献

- [1] Beck, A.; Reichert, J. M. *Antibody-drug conjugates.mAbs* 2014, 6:1, 15-17
- [2] McCalley, D. V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2004, 1038, 77–84



- [3] Gudihal, R.; Suresh Babu C. V.; Tang, N. Analysis of Monoclonal Antibody(mAb) Using Agilent 1290 InfinityLC System Coupled to Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) (将 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6530 精确质量四极杆 飞行时间系统联用以分析单克隆抗体 (mAb))；应用 简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-4266EN，2014
- [4] Suresh Babu, C. V. LC/MS of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio RP-mAb (使用 Agilent AdvanceBio RP-mAb 对完整治疗性单克隆抗体 进行 LC/MS 分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-6296EN，2015
- [5] Gudihal, R.; Suresh Babu, C. V.; Tang, N.; Madhavi H. N.; Uma, M. Intact Protein Analysis using an Agilent 6550 Q-TOF Mass Spectrometer (使用 Agilent 6550 Q-TOF 质谱仪进行完整蛋白质分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-2116EN，2013
- [6] Martosella, J; Duong, P; Moyer, S, 采用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 色谱柱对还原态单克隆抗体进行快速 UHPLC 分析，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-9631CHCN，2012



## 用于 ADCs ( 抗体偶联药物 ) 药物抗体偶联比 ( DAR 值 ) 分析的

### AdvanceBio HIC 色谱柱

夏敏<sup>1\*</sup>, Andrew Coffey<sup>2</sup>, Sandeep Kondaveeti<sup>2</sup> (1. 安捷伦科技 ( 中国 ) 有限公司, 上海 200080; 2. 安捷伦科技有限公司, 维明顿, 19808)

**【摘要】目的:** 确认 AdvanceBio HIC 色谱柱的特性及其在抗体偶联药物 (ADCs) 分析中的应用。**方法:** 用温和的条件洗脱, 确保生物分子保持在未变性状态, 对半胱氨酸连接的 ADCs 进行分析。**结果:** 通过使用适当的流速和柱长, 并在梯度中使用所需量的有机改性剂, 较短的 3 cm 色谱柱的分离速度比在较长的 10 cm 色谱柱上采用较慢梯度时的分离速度快得多, 且得到的药物抗体偶联比 (DAR) 值几乎完全相同。在异丙醇浓度不足的情况下, 疏水性较强的 DAR 6 和 DAR 8 异构体被保留。**结论:** 通过控制流动相组成并选择合适的流速和色谱柱尺寸, 能够使用 AdvanceBio HIC 色谱柱快速准确地分析 ADCs 的 DAR 值。

**【关键词】** 疏水相互作用色谱; 抗体偶联药物; 药物抗体偶联比

## An AdvanceBio HIC Column for Drug-to-Antibody Ratio (DAR) Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs)

Min Xia<sup>1</sup>, Andrew Coffey<sup>2</sup> and Sandeep Kondaveeti<sup>2</sup> (1. Agilent Technologies, Shanghai, 200080; 2. Agilent Technologies, Inc., Wilmington, 19808)

**【ABSTRACT】OBJECTIVE:** Characterize the AdvanceBio HIC column and use it in the analysis of antibody drug conjugates (ADCs). **METHODS:** Analyze cysteine-linked ADCs with the mild conditions used for elution, which ensures that the biomolecule remains in an undenatured state. **RESULTS:** With the appropriate use of flow rate and column length, together with the required amount of organic modifier in the gradient, it is possible to perform much faster separations on shorter 3 cm columns compared to slower gradients on longer 10 cm columns. The drug-to-antibody ratio (DAR) values determined from these chromatograms are almost identical. More hydrophobic DAR 6 and DAR 8 variants are retained with insufficient propan-2-ol concentration. **CONCLUSION:** By controlling the mobile phase composition, together with the choice of flow rate and column dimensions, it is possible to use the AdvanceBio HIC column for analysis of the DAR value of ADCs with both speed and accuracy.

\* 通讯作者: 夏敏, 女, 硕士, 研究方向: 生物药关键质量属性 [min.xia@agilent.com](mailto:min.xia@agilent.com) Tel: (021)36127723

**【KEY WORDS】** Hydrophobic interaction chromatography; antibody drug conjugates; drug-to-antibody ratio

疏水相互作用色谱（HIC）使用含盐流动相以减小生物分子溶解度，有利于这些分子吸附到 HIC 固定相上。通过梯度洗脱减小盐浓度，能够使分子按照疏水性逐渐增加的顺序洗脱。分离过程类似于反相色谱，但是无需使用通常会导致蛋白质变性的离子对试剂和高浓度有机溶剂组分。这对分析通过半胱氨酸连接的 ADCs 来说非常重要。用作有效载荷的小分子连接到部分还原的单克隆抗体（mAb）的自由巯基上，但这会导致多分散分布（图 1）。测量这种分布（称为 DAR）对于确定所获得的 ADCs 的效价至关重要。

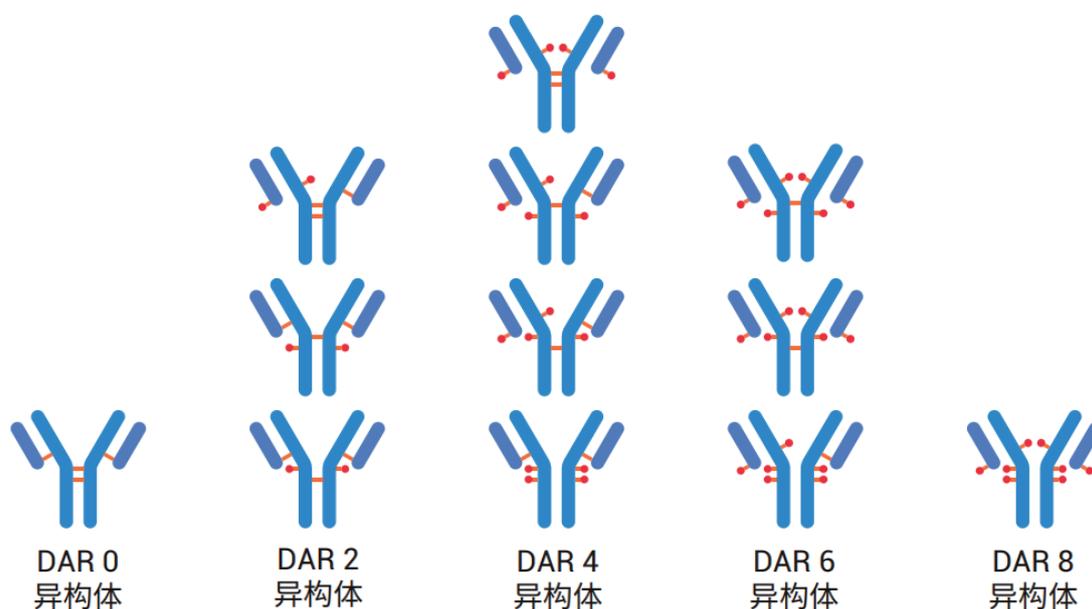


图 1 具有不同数量和位置的有效载荷组分的半胱氨酸连接的 ADCs 的多分散分布

Fig.1 Polydisperse distribution of cysteine-linked ADCs with different quantities and positions of payload components.

## 1. 仪器与材料

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。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。

### 1.1 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 大容量柱温箱 (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)

## 1.2 软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS

## 1.3 方法条件

色谱柱	AdvanceBio HIC 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908) AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm (部件号 681975-908)			
流动相	洗脱液 A) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 洗脱液 B) 2 mol/L 硫酸铵 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠中), pH 7.0 洗脱液 C) 异丙醇 洗脱液 D) HPLC 级水			
流速	0.5 mL/min			
柱温	25 °C			
进样量	5 µL			
总运行时间	31 分钟			
梯度曲线	时间	%A	%B	%C
	0	50	45	5
	15	75	0	25
	20	75	0	25
	21	50	45	5
	31	50	45	5

## 2. 结果与讨论

HIC 中使用的高浓度盐意味着采用全生物惰性液相色谱是非常有利的。如果附带密封垫清洗和进样针清洗等避免盐析问题的附加功能, 那么将更加有利。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。因此, 采用四元液相色谱系统使其他通道能够用于有机改性剂和水或其他冲洗溶剂。与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致 mAb 分子的总体疏水性发生显著改变。因此, 需要在流动相中添加一些有机改性剂 (参见方法条件和梯度曲线部分)。使用 HIC 能够分析处于完整状态的半胱氨酸连接的 ADCs (图 2)。如果采用反相技术, 将会分离未通过半胱氨酸键连接的重链和轻链。反相色谱可用于分析半胱氨酸连接的 ADCs, 但是仅在这些分子完全还原的情况下才能实现<sup>[1]</sup>。通过对不同 DAR 异构体的峰面积积分, 能够计算总体 DAR (公式 1)。

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

公式 1

Equation 1

表 1 显示了计算得到的该样品的值。DAR 4.04 与预期值以及之前观察到的值一致<sup>[2]</sup>。

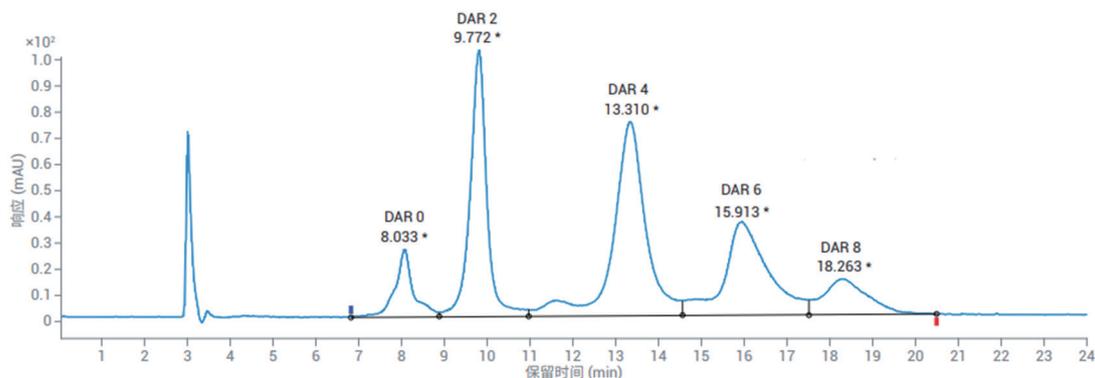


图 2 本妥昔单抗 (Adcetris) 的 HIC 分离

Fig.2 HIC separation of brentuximab vedotin (Adcetris)

表 1 峰面积与 DAR 结果

Tab.1 Peak area to DAR results.

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	8.03	763	6.9	0	0.00
2	9.77	2759	25.1	2	0.50
3	13.31	3936	35.8	4	1.43
4	15.91	2565	23.3	6	1.40
5	18.26	978	8.9	8	0.71
				DAR	4.04

在样品前处理过程中应小心操作，以确保样品完全溶解且不存在 DAR 异构体歧视；DAR 0 的亲水性高于 DAR 8，并且能够选择性地溶解于流动相中。如果所有样品未完全溶解，则会导致误差。在流动相条件中包括异丙醇梯度非常重要，否则 DAR 6 和 DAR 8 异构体将可能吸附到色谱柱上。图 3A、3B 和 3C 表明，在异丙醇浓度不足的情况下，疏水性较强的 DAR 6 和 DAR 8 异构体被保留。

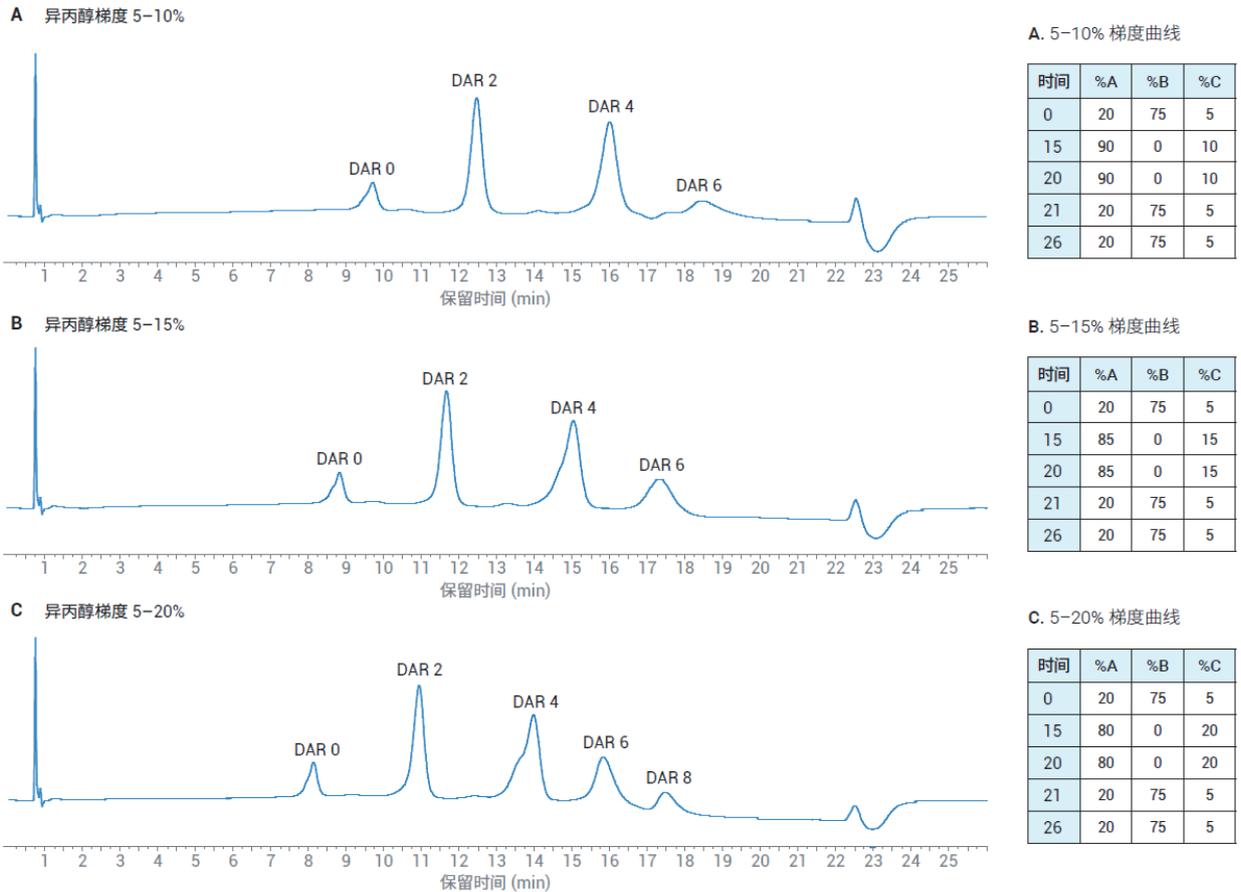


图 3 异丙醇梯度对 ADC DAR 异构体分离的影响

Fig.3 Effect of propan-2-ol gradient in separation of ADC DAR variants

通过使用适当的流速和柱长，并在梯度中使用所需量的有机改性剂，较短的 3 cm 色谱柱（图 4）的分离速度比在较长的 10 cm 色谱柱（图 5）上采用较慢梯度时的分离速度快得多。表 2 和 3 中的结果表明，从这些色谱图中得到的 DAR 值几乎完全相同。

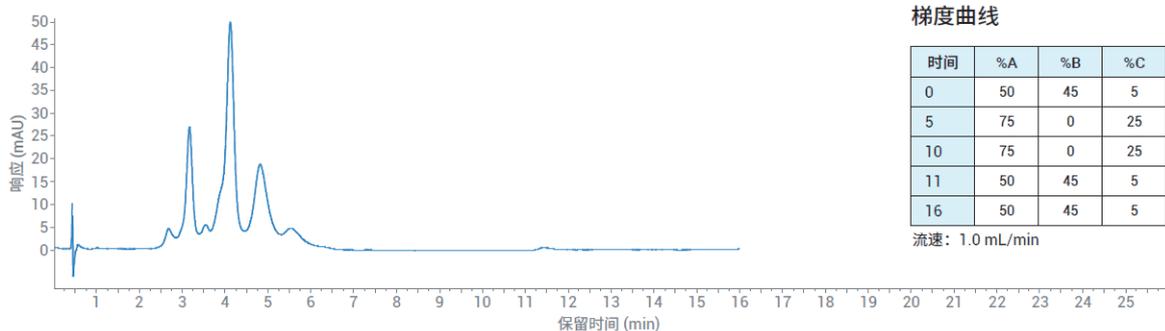


图 4 ADC 模拟物在 AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm 色谱柱上的快速 (8 min) 分离

Fig.4 Fast (8 minute) separation of an ADC mimic on AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm column

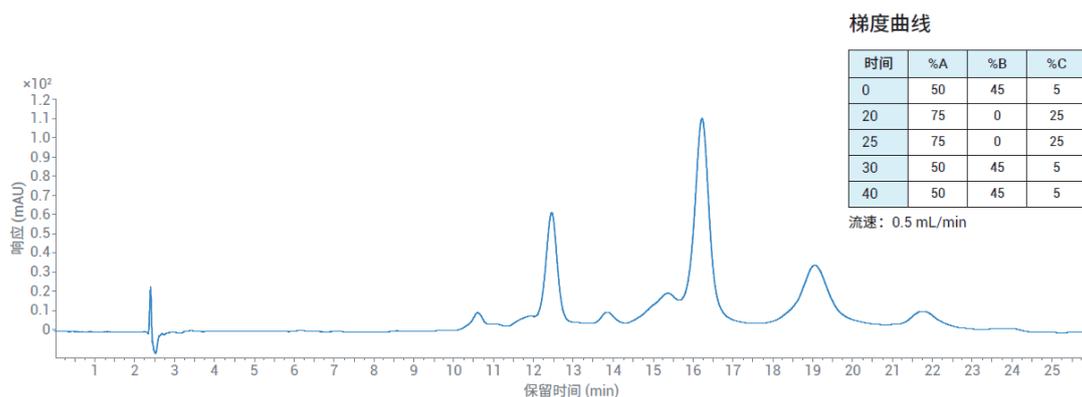

 图 5 ADC 模拟物在 AdvanceBio HIC  $4.6 \times 100$  mm 色谱柱上的缓慢 (24 min) 分离

 Fig.5 Slow (24 minute) separation of an ADC mimic on AdvanceBio HIC  $4.6 \times 100$  mm column

表 2 由 8 min 分离 (图 4) 得到的 DAR 值

Tab. 2 DAR value from 8-minute separation (Fig.4).

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	2.66	61.5	3.2	0	0.0
2	3.14	321.4	16.9	2	0.3
3	4.10	894.1	46.9	4	1.9
4	4.80	471.1	24.7	6	1.5
5	5.52	158.0	8.3	8	0.7
				DAR	4.4

表 3 由 24 min 分离 (图 5) 得到的 DAR 值

Tab.3 DAR value from 24-minute separation (Fig.5)

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	10.61	304.3	3.0	0	0.0
2	12.46	1768.9	17.2	2	0.3
3	16.22	4905.3	47.7	4	1.9
4	19.04	2420.5	23.5	6	1.4
5	21.76	879.1	8.6	8	0.7
				DAR	4.4

### 3. 结论

我们已经证明, 通过控制流动相组成并选择合适的流速和色谱柱尺寸, 能够使用 AdvanceBio HIC 色谱柱快速准确地分析 ADCs 的 DAR 值。

### REFERENCE

- [1] S. Zuo, 使用 UHPLC/Q-TOF 联用系统 测定抗体偶联药物 (ADCs) 的药物/ 抗体比率 (DAR), 安捷伦科技公司 应用简报, 出版号 5991-6559CHCN, 2016
- [2] S. Schneider, 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



## 在 Xevo™ G3 QTof 平台上应用肽图分析和多属性方法(MAM)工作流程执行 mAb 药品的生物类似药比较

Kellen DeLaney, Samantha Ippoliti, Lisa Reid, Owen Cornwell, Ying Qing Yu, Emma Harry, Mark Towers,

Jiaying Hong

沃特世公司

**【摘要】**随着越来越多的单抗(mAb)生物类似药不断涌现, 业界非常需要采用简化的流程来表征这些产品。要在快节奏、不断增长的市场中占有一席之地, 拥有能够提供数据以可靠地鉴定和定量肽属性的仪器, 以及能够在保持合规性的同时加快并自动完成分析的数据分析流程, 至关重要。全新的 Xevo G3 QTof 平台与 ACQUITY™ Premier UPLC™系统相结合, 能够对生物治疗性蛋白质进行稳定可靠的分析。基于应用程序的合规信息学平台 waters\_connect™能够简化从采集到分析的数据管理流程。这些集成式工具能够开发出高效的生物制药工作流程, 包括用于表征和属性监测的工作流程。本研究展示了 waters\_connect 如何与 Xevo G3 QTof 配合用于单抗生物类似药的表征和监测。我们分析了四种英夫利昔单抗样品(原研药和三种生物类似药)的肽图, 旨在研究这些样品的脱酰胺、氧化、赖氨酸剪切和糖基化等产品属性。使用合规软件 waters\_connect 内的 Peptide MAM 应用程序定量分析各单抗之间的相对丰度差异。还对原研药和一种生物类似药进行了目标属性的降解研究, 以根据每种单抗的热降解鉴定关键质量属性(CQA)。结果展示了搭载集成式 waters\_connect 数据采集和处理工具的 Xevo G3 QTof 平台如何成为比较肽图分析工作流程以确定 mAb 生物相似性的合适平台。

**【关键词】**肽段多属性方法(MAM); 肽图分析; Xevo™ G3 QTof

随着单克隆抗体(mAb)专利到期, 越来越多的生物类似药正在获得监管机构批准。在竞争日益激烈的生物类似药市场上, 需要采用简化的流程来表征和比较生物类似药与原研药。表征生物类似药需要一种可靠的工作流程来鉴定和定量对安全性、有效性和稳定性至关重要的各种产品属性。生物类似药产品与原研药产品的活性成分高度相似, 但它们的特性可能会因生产方法的不同而有所差别, 只要这些差别不会产生具有临床意义的影响即可。表征和比较生物类似药的主要途径之一是使用肽图来分析翻译后修饰。酶解 mAb 并使用液相色谱(LC)-质谱(MS)联用法分析肽片段, 能够确认一级序列并找到产品变异位点。多属性方法(MAM)在定量多个样品的目标属性方面越来越受欢迎, 这种方法的通量高于传统的数据分析表征方法。与针对单个属性使用多种正交分析技术不同, MAM 能够使用 LC-MS 直接监测样品的大量属性<sup>[1]</sup>。

作者简介: 洪佳莹, 硕士, 沃特世科技(上海)有限公司, E-mail: JiaYing\_Hong@waters.com

在 waters\_connect 信息学平台控制下运行的 Xevo G3 QTof 质谱仪（图 1）为执行生物制药工作流程提供了一种简化的解决方案。Xevo G3 QTof 更新了离子光学元件，旨在优化肽传输效率并提供全面的定量能力，适用于生物治疗药物属性的表征和监测。合规的 waters\_connect 平台能够处理从样品提交到数据分析和审查的整个工作流程，其中集成的 UNIFI™ 应用程序（肽图分析）、科学数据库（属性数据库）和 Peptide MAM 应用程序（目标属性监测和新峰检测）能够实现表征与监测工作流程的无缝协调。本研究展示了该组合式工作流程用于英夫利昔单抗和三种生物类似药产品（Inflectra®、Avsola® 和 Renflexis®）的肽图表征和监测的有效性。我们比较了四种 mAb 的肽图，通过降解研究鉴定并可重现地监测了原研药和其中一种生物类似药的关键质量属性(CQA)。

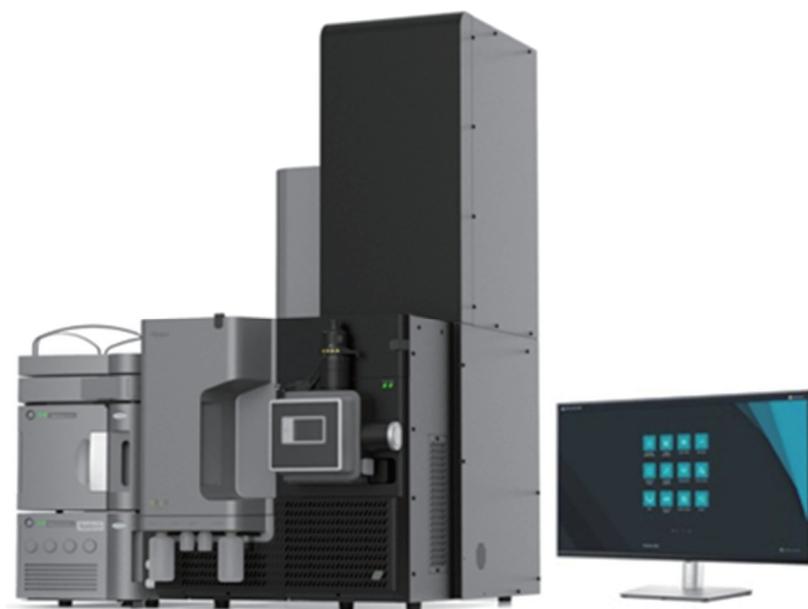


图 1. 搭载集成式 waters\_connect 信息学软件的 Xevo G3 QTof 平台，能够进行合规、基于应用程序的数据采集、处理、审查和报告。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

- ACQUITY Premier UPLC 系统 – BSM 配置
- Xevo™ G3 QTof

### 1.2 样品

将包括原研药(Remicade®)和生物类似药(Inflectra)在内的英夫利昔单抗样品在 37 °C 下温育 0 周（无降解）、1 周或 2 周。包括另外两种生物类似药（Avsola 和 Renflexis）在内的所有样品都经过还原、烷基化、脱盐、胰蛋白酶酶解和 0.1%甲酸酸化。测得的最终浓度为 0.16 μg/μL。



## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY Premier CSH™ (130 Å C18 1.7 μm, 2.1 × 100 mm); 柱温: 60℃ ; 进样量: 2μL; 流速: 0.200 mL/min; 流动相 A : 0.1%甲酸的水溶液; 流动相 B: 0.1%甲酸的乙腈溶液; 流动相梯度: 流动相 B 在 50 min 内从 1%增加至 35% (总运行时间为 80 min)。样品瓶: 采用 MaxPeak™ HPS 的 QuanRecovery™样品瓶(P/N: 186009186); 样品温度: 8 °C。

### 2.2 质谱条件

电离模式: ESI+; 全扫描检测模式; 质量范围: 100-2000 m/z; 毛细管电压:2.2 kV; 碰撞能量: 低能量: 6V, 高能量梯度: 20-50V; 锥孔电压: 20V; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 350°C; 锥孔气流速: 35 L/h; 脱溶剂气流速: 600 L/h; 智能数据捕获(IDC): 低(5)。

### 2.3 数据管理

使用搭载 UNIFI 应用程序 (1.9.12.7 版) 和 Peptide MAM 应用程序 (1.0.0.3 版) 的 waters\_connect 信息学平台 (2.1.1.13 版) 采集并处理数据。

## 3 结果与讨论

全面表征生物类似药对于确保产品与原研药产品的可比性至关重要。本研究证明, 在集成式 waters\_connect 平台中运行的 Xevo G3 QTof 适用于对英夫利昔单抗和获批的生物类似药进行严格的对比分析。虽然每种生物类似药的氨基酸序列都与原研药相同, 但产品变体谱图的差异会影响药物的安全性、稳定性和有效性。

为深入了解生物类似药之间的差异, 我们比较了各种英夫利昔单抗产品的肽图。将 ACQUITY Premier UPLC 与 Xevo G3 QTof 联用以分析胰蛋白酶酶解样品, 使用 MSE 数据非依赖型碎裂来鉴定肽并定位修饰位点。在 waters\_connect 内的 UNIFI 应用程序肽图分析工作流程中, 四种英夫利昔单抗产品的序列覆盖率均超过 95%, 质量数误差小于 5 ppm。此外, 结果展现出优异的进样间重现性, 峰强度的相对标准偏差低于 5%。这一显著的重现性可从图 2A 看出, 该图中 Remicade 三次重复进样的叠加色谱图几乎完全重叠。

虽然各 mAb 样品的色谱图看起来非常相似 (如图 2B 所示), 但在产品变体的相对丰度方面观察到显著差异。在四种产品中, 定位到 47 处修饰, 包括 6 处氧化、12 处脱酰胺、28 处 N-糖基化和 1 处 C-端赖氨酸剪切。图 3 显示了天然和氧化形式的肽的高能量 MSE 谱图示例。由于分配的碎片离子获得了高覆盖率, 因此能够可靠地鉴定肽并定位蛋氨酸修饰, 如 y 离子系列所示。使用 waters\_connect 中的 Peptide MAM 应用程序定量不同修饰的相对丰度差异。该软件能够就在 waters\_connect 系统内对通过 UNIFI 应用程序肽图分析工作流程在各个样品中鉴定出的产品质量属性列表进行靶向定量。

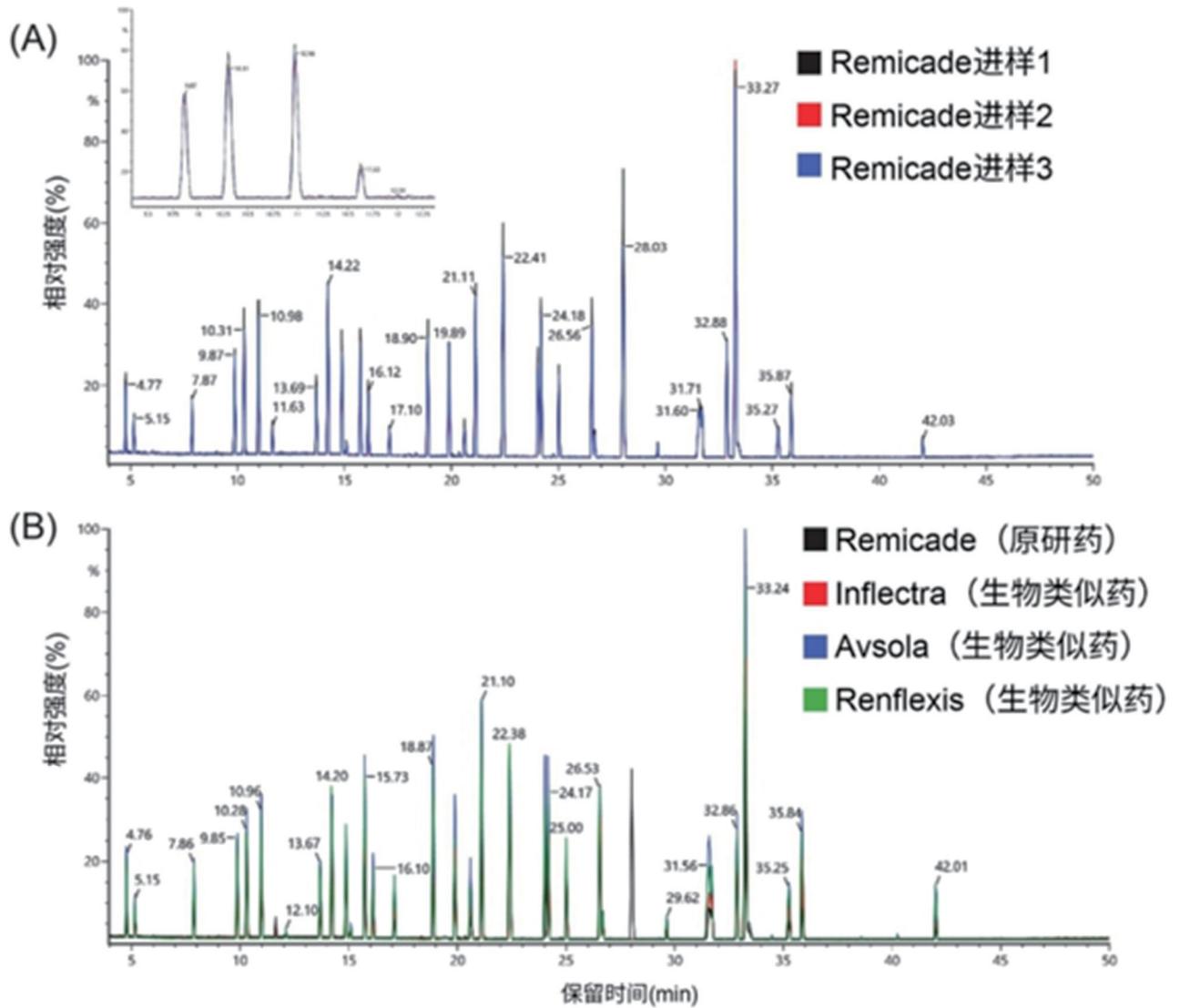


图 2.mAb 酶解物的基峰离子(BPI)叠加色谱图: (A)原研药(Remicade)样品的重复进样结果, 显示峰几乎完全重叠; (B)原研药和三种生物类似药的进样结果, 显示出相似的肽图谱。

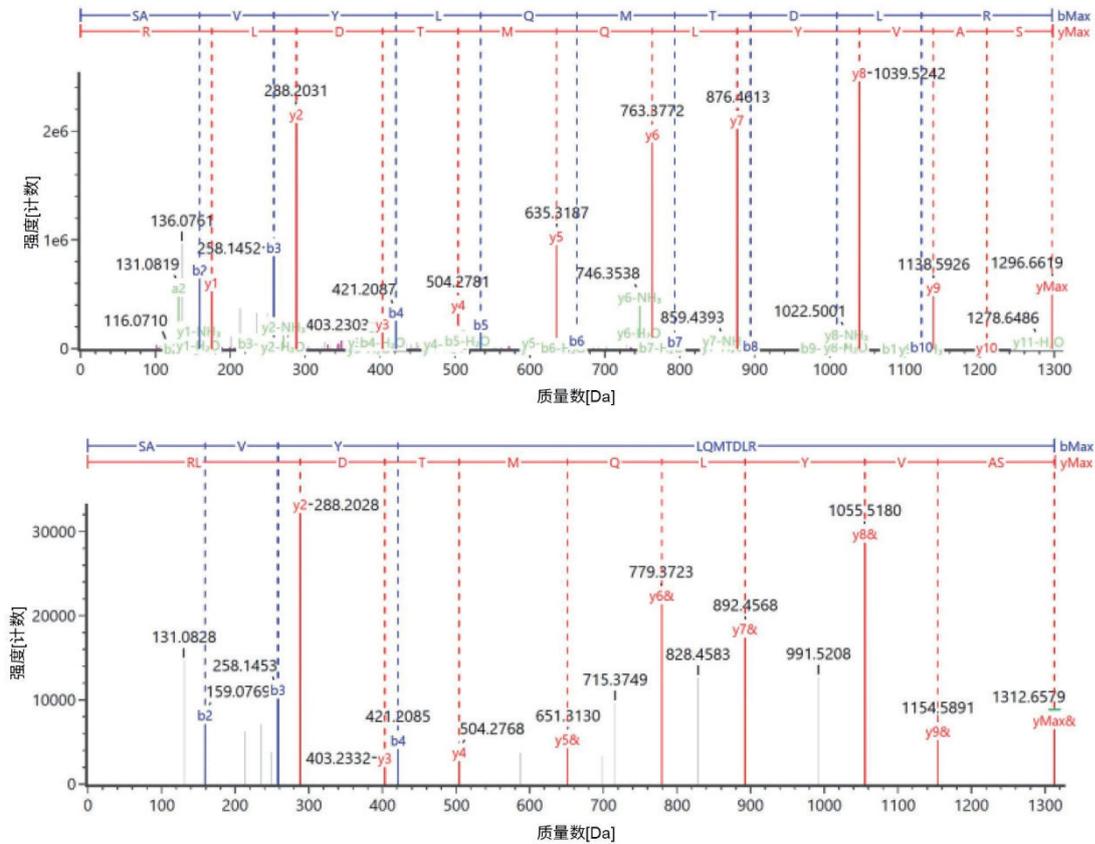


图 3.未修饰形式（上图）和氧化形式（下图）的 HT11 肽的高能量 MSE 谱图

在查看定量结果之前，我们执行了系统适用性分析作为 Peptide MAM 工作流程的一部分。评估已知肽样品的间歇进样结果，此步骤检查旨在确保系统为分离和质谱检测仪器以及自动化数据处理程序产生可接受和预期的结果。该过程是增强结果可信度的关键，因为属性监测需要高度的分析严谨性。利用 MassPREP™ 肽混标 (P/N: 186002337 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards-reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>> ) 进行系统适用性进样。图 4B 显示了如何在进样中跟踪肽数据的两个示例，包括质量数误差和峰宽。重复测定值的可视化使用户能够轻松识别随时间推移的异常或系统漂移。图 4C 显示了每种肽的全部四种系统适用性参数，反映出该平台在整个样品序列持续期间表现出较高的质量精度 ( $\pm 1.5$  ppm 以内) 和优异的重现性。使用 Xevo G3 QToF 所实现的重现性让我们更容易区分样品之间的细微趋势，同时减少了获得有意义的痕量产品变体结果所需的重复样品数量，可节省时间和费用。

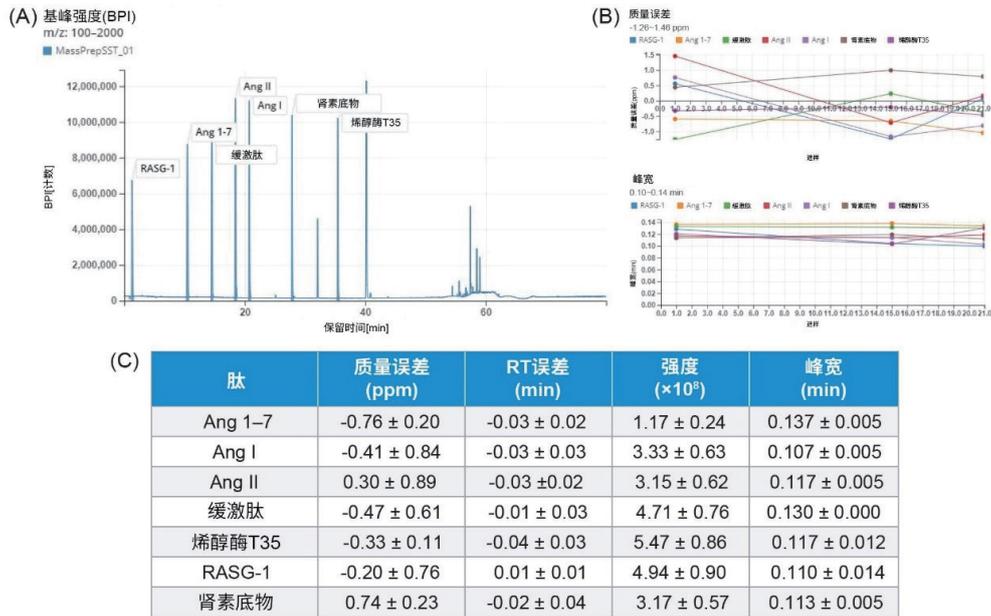


图 4.使用 Peptide MAM 应用程序处理的 MassPREP 肽混标数据的系统适用性结果: (A)示例色谱图, (B)值、质量数误差和峰宽示例, 通过在进样中跟踪各个峰得到, 以及(C)每个监测峰的所有适用性参数。

使用 Peptide MAM 应用程序测得的目标肽属性的相对定量结果显示, 所监测属性的相对标准偏差平均小于 2.0%。图 5 以示例显示了这些结果在应用程序中的呈现方式, 简化的条形图有助于快速评估每个目标属性的数据。

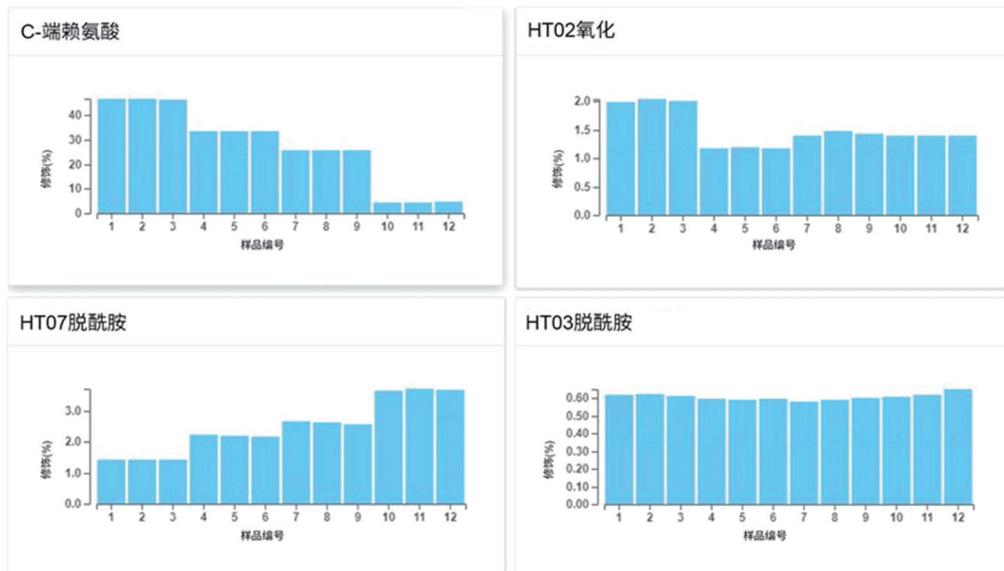


图 5.Peptide MAM 应用程序中四个所监测属性 (C-端赖氨酸、HT02 氧化、HT07 氧化和 HT03 脱酰胺) 结果的条形图。进样标记为: 1-3 为 Remicade、4-6 为 Inflectra、7-9 为 Avsola、10-12 为 Renflexis。

氧化和脱酰胺肽以及 C-端赖氨酸偶联的定量结果如图 6 所示。监测的所有六个氧化位点均显示各英夫利昔单抗产品之间存在明显差异。例如，重链胰蛋白酶酶解肽(HT) 02、HT11 以及 HT03 上的一个位点在原研药中表现出更高的氧化百分比，而 HT22 在两种生物类似药 (Avsola 和 Renflexis) 中表现出更高的氧化百分比。

脱酰胺的差异不太突出。在监测的 12 个脱酰胺位点中，只有两个位点在生物类似药之间存在显著差异，例如 HT07，它在三种生物类似药中具有更高的脱酰胺百分比；另一个位点是 HT38，它在 Inflectra 和 Avsola 中的脱酰胺百分比相比于 Remicade 和 Renflexis 较小。

我们还定量分析了 C-端赖氨酸剪切程度，因为这种修饰在生物生产过程中很常见，并且可能对受体结合产生影响<sup>4</sup>。如图 6 所示，不同生物类似药之间的赖氨酸剪切程度差异显著，其中 Renflexis 在肽上保留的百分比最小。

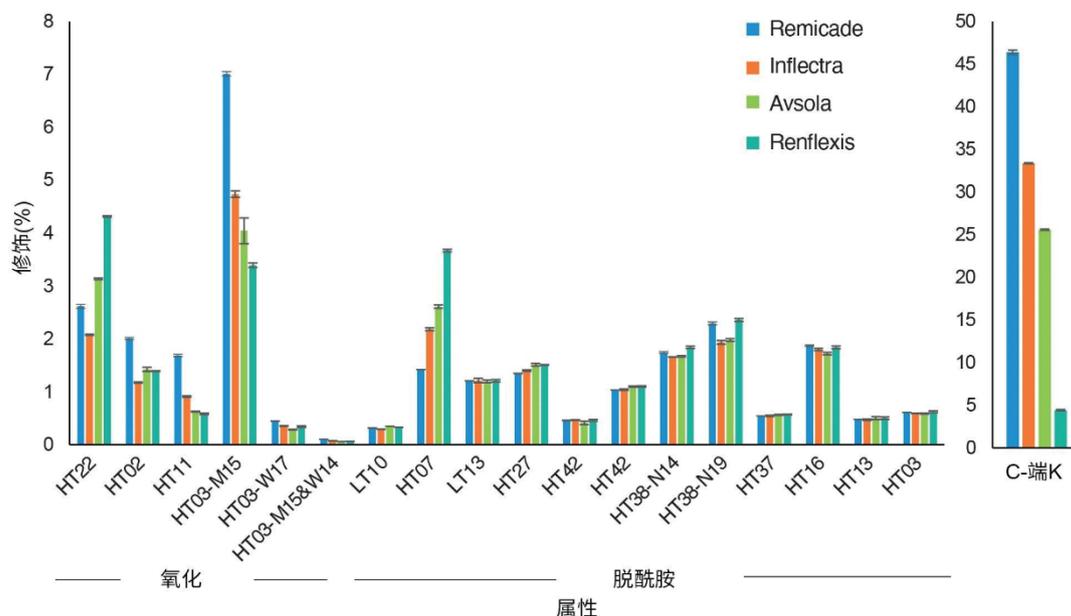


图 6.原研药与三种生物类似药之间肽属性（氧化、脱酰胺和 C-端赖氨酸偶联）的相对丰度。误差条柱表示基于三次重复进样的标准偏差。对于具有多个修饰位点的肽，标明经修饰的氨基酸。H，重链；L，轻链；T，胰蛋白酶酶解肽。

不同英夫利昔单抗产品之间各种 N-糖变体的百分比表现出差异，可能是因为生产过程和细胞系差异导致的<sup>5</sup>。图 7 显示了 HT26 肽的 28 种 N-糖型的相对丰度，分为三组：高丰度（相对丰度高于约 2%）、低丰度（相对丰度低于约 2%）和免疫原性（含有 N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc)或半乳糖- $\alpha$ -1,3-半乳糖( $\alpha$ -gal)的聚糖)。

FA2 和 FA2G1 在所有四种 mAb 中都是主要糖型，分别占有所有形式肽的总丰度约 50%和 30%。不

过，它们在每种 mAb 中确切的相对含量各不相同，例如在 Avsola 中，FA2 丰度最高，FA2G1 丰度最低。而在 Inflectra 中，FA2 丰度在 Xevo™ G3 QToF 平台上应用肽图分析和多属性方法(MAM)工作流程执行 mAb 药品的生物类似药比较最低，FA2G2 丰度最高。

正如预期一样，与 Avsola 和 Renflexis 相比，Remicade 和 Inflectra 中的免疫原性糖型丰度更高，这是由于细胞系的差异，Remicade 和 Inflectra 来自鼠细胞系，Avsola 和 Renflexis 则来自中国仓鼠卵巢细胞系。

低丰度糖型在四种 mAb 之间显示出截然不同的相对丰度。例如，A1、M5A1G1、FM5A1 和 A1G1 在 Remicade 中的相对丰度最高，而 A2G1 和 M6 在 Renflexis 中的相对丰度最高，A2G1 在 Inflectra 中最高。糖基化差异非常值得关注，因为它们可能会影响药物引发良性或不良免疫反应的能力。

除比较肽图以外，我们还对原研药和一种生物类似药 (Inflectra) 进行了降解研究。降解试验在生物治疗药物开发中非常重要，可获得与开发分析方法、确定剂型、鉴定杂质、计算保质期和比较生物类似药产品降解途径相关的信息<sup>6,7</sup>。无论采用热降解、化学降解还是机械降解，目的都是加速蛋白质降解并提高杂质水平，提供有关蛋白质的有效性和免疫原性如何受到影响的见解。这些研究能够鉴定 CQA，即对产品效价、有效性和安全性至关重要的肽属性。

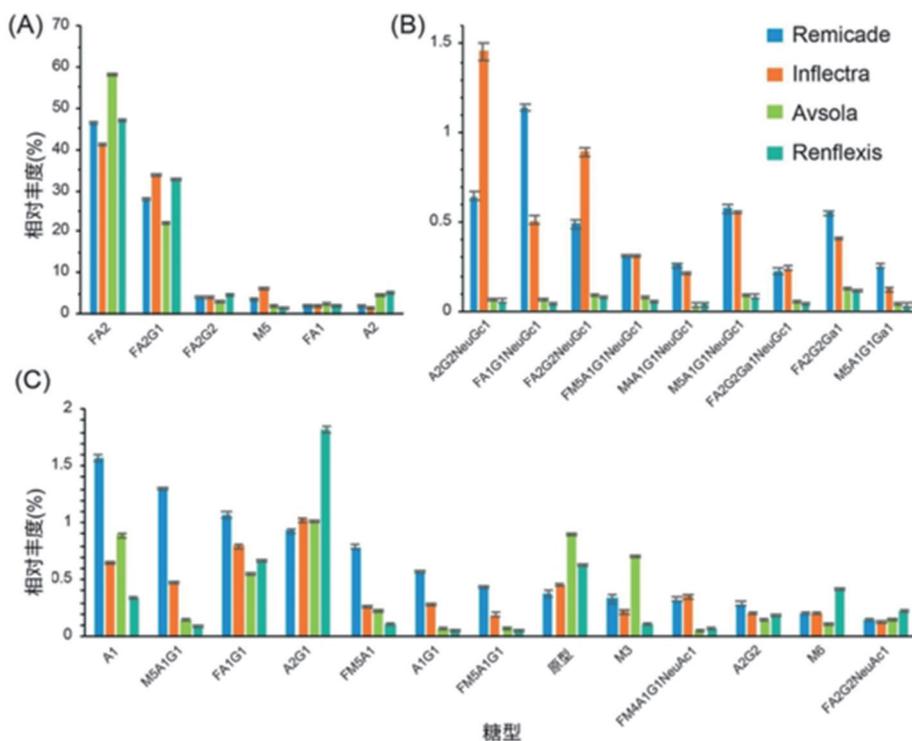


图 7.原研药和三种生物类似药中糖基化重链肽 HT26 的相对丰度，按照(A)高丰度糖型、(B)免疫原性糖型和(C)低丰度糖型分类。糖型基于 Oxford 命名法进行标记。误差条柱表示基于三次重复进样的标准偏差。

本研究采用降解实验，通过 Peptide MAM 应用程序来监测 Remicade 和 Inflectra 中 CQA 的变化。样品在分析前接受一到两周的温度降解处理，并与未降解样品进行比较。图 8 显示了对比 Inflectra 与 Remicade 的未降解（对照）和两周降解样品的镜像图。虽然镜像图中的色谱图看起来相似，主峰无明显差异，但使用 MAM 应用程序鉴定出若干 CQA 的细微变化，如图 9 所示。许多 CQA 在降解样品中表现出升高的反应，但并非所有 CQA 在原研药与生物类似药之间都表现出一致的增加。例如，HT22 和 HT02 的氧化在 Remicade 的两周样品中有所减少，但在 Inflectra 的两周样品中有所增加。其他 CQA 在两者之间表现出一致的结果，例如 HT07 和 HT38 的脱酰胺，在两种 mAb 的一周和两周样品中均逐渐增加。在降解样品中，糖型的相对丰度或赖氨酸剪切的相对含量未观察到显著差异（数据未显示）。预计生物类似药的产品变异模式并不相同，需要对所有差异进行风险评估，以确定这些差异对分子的功能和安全性特征的潜在影响。

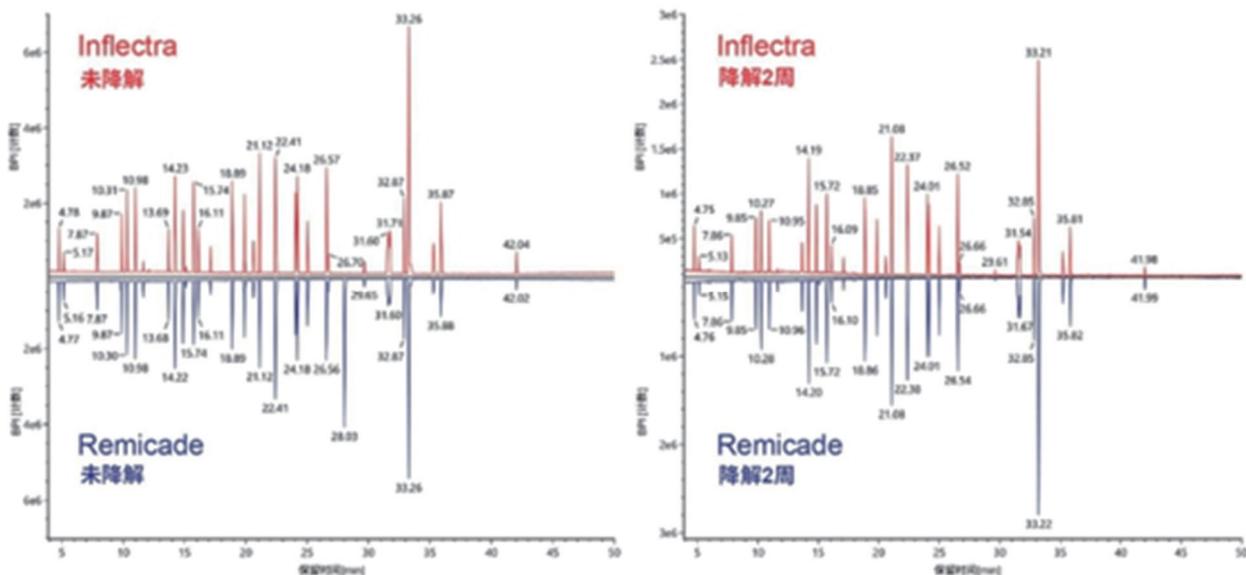


图 8.比较 Inflectra 与 Remicade 未降解样品（左）和两周高温降解样品（右）的镜像图

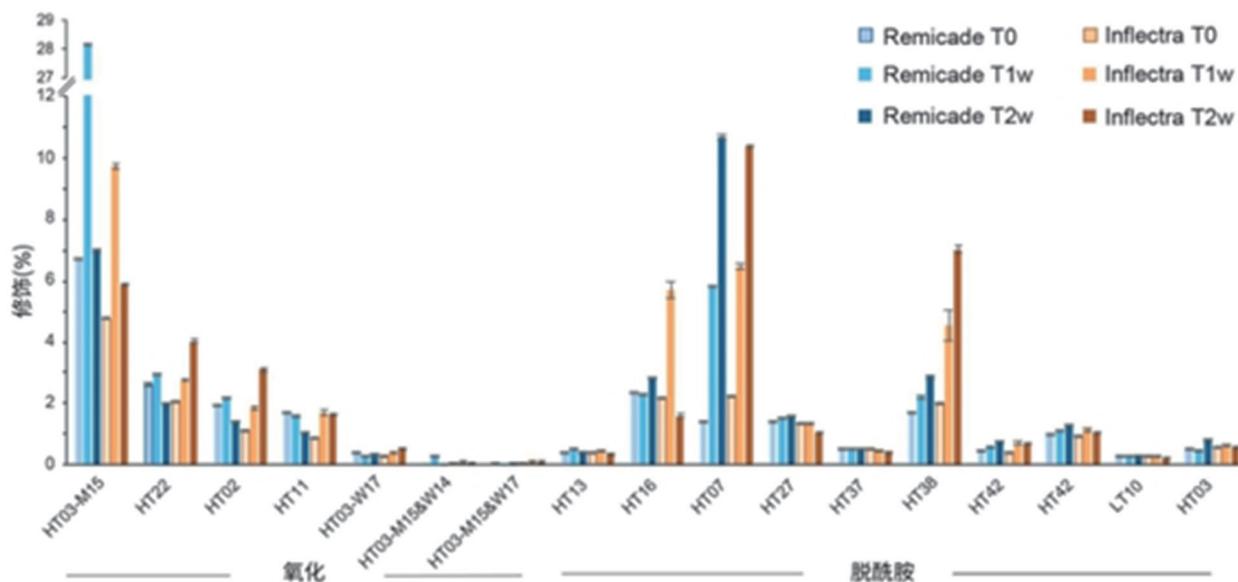


图 9. Remicade 和 Inflectra 中氧化和脱酰胺肽在各种降解条件下的相对丰度，包括未降解(T0)、一周降解(T1w)和两周降解(T2w)。误差条柱表示基于三次重复进样的标准偏差。对于具有多个修饰位点的肽，标明经修饰的氨基酸。H，重链；L，轻链；T，胰蛋白酶酶解肽。

#### 4 结论

全面表征生物类似药 mAb 对于确保产品的安全性和有效性以及依靠原研药的经验来减轻后续产品的临床负担至关重要。搭载合规信息学工具 waters\_connect 的 Xevo G3 QToF 平台能够通过简化的肽图分析和 Peptide MAM 工作流程对产品属性进行稳定高效的分析。本研究使用该平台表征一级结构，使英夫利昔单抗原研药和三种生物类似药样品都实现了较高的序列覆盖率。借助集成的 UNIFI 应用程序和 Peptide MAM 应用程序，对四种 mAb 产品的肽属性进行了鉴定、相对定量和比较。此外，还通过降解研究对潜在的 CQA 进行了鉴定和定量。这些结果表明，Xevo G3 QToF 能够与 waters\_connect 数据采集和处理工具无缝集成用于生物类似药肽图表征和属性监测工作流程。

#### 参考文献

1. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-Attribute Method for Characterization, Quality Control Testing, and Disposition of Biologics.mAbs. Taylor and Francis, 2015 Aug, 7(5), 881-890.
2. Ranbaduge N, Yu YQ. 以精简、合规的工作流程执行肽段多属性方法(MAM). 沃特世应用纪要: 720007094ZH, 2020 年 12 月.



- 3.Ranbaduge N, Yu YQ. 智能数据捕获(IDC)为多属性方法(MAM)研究提供出色的 Xevo G2-XS 数据采集和处理性能. 沃特世应用纪要: 720007441ZH, 2021 年 12 月.
- 4.Faid V, Leblanc Y, Berger M, Seifert A, Bihoreau N, Chevreux G. C-terminal Lysine Clipping of IgG1: Impact on Binding to Human FcγRIIIa and Neonatal Fc Receptors.Eur J Pharm Sci.2021 Jan, 159, 105730.
- 5.Duivelshof BL, Jiskoot W, Beck A, Veuthey J, Guillarme D, D'Atri V. Glycosylation of Biosimilars: Recent Advances in Analytical Characterization and Clinical Implications.Analytica Chimica Acta.2019 Dec, 1089, 1-18.
- 6.Haw A, Wiggenhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler H, Jiskoot W. Forced Degradation of Therapeutic Proteins.J Pharm Sci.2012 March, 101(3), 895-913.



## 关于生物治疗药物聚集体和片段分析用的 SEC 色谱柱选择的思考

李艺婷<sup>1</sup> (1.安捷伦科技公司)

**【摘要】目的：**体积排阻色谱 (SEC) 是生物技术药物表征分析和质量控制中最常用的方法，能够对聚集体和片段等杂质进行分析，也可用于测定目标峰的平均摩尔质量。SEC 的分离效率仅由固定相决定，不受流动相的影响。因此，成功应用 SEC 的关键在于根据给定生物分子选择合适色谱柱。不同类型市售 SEC 色谱柱的尺寸、孔径以及粒径各不相同。本文旨在对不同供应商的 SEC 色谱柱进行了比较，旨在确定能够影响所得数据质量的色谱柱性能差异。**方法：**采用常用流动相在相同的液相色谱条件、不同厂家市售色谱柱的条件下去尝试分离蛋白质标准品、单抗和抗体-药物偶联 (ADC) 物，得出结果图谱和数据进行对比分析。**结果：**通过对结果图谱和数据各方面比较，由安捷伦设计和制造的色谱柱可控制孔径、结构与体积并涂覆亲水聚合物层，获得最高的柱效，从而确保蛋白质峰形尖锐并得到充分分离。**结论：**本研究对于市售不同厂家和不同规格的 SEC 色谱柱选择提供方式和基础资料。

**【关键词】**生物治疗药物；单抗；抗体-药物偶联物；体积排阻；固定相

## Selection and Discussion of Size Exclusion Chromatographic Column for Analysis of Biotherapeutic

Yiting Li<sup>1</sup> (1. Agilent Technologies, Inc.)

**【ABSTRACT】Objective:** Size exclusion chromatography (SEC) is widely used to characterization and QC the aggregates and fragment of biotherapeutics, and it can be used to measure the average molar weight of the peaks. The separation efficiency of SEC is determined only by the stationary phase and not affected by the mobile phase. Therefore, the key to the successful application of SEC lies in the selection of an appropriate column for a given biomolecule. Different types of commercially available SEC columns vary in size, aperture, and particle size. The purpose of this paper is to compare SEC columns from different vendors in order to identify the column performance differences that can affect the quality of the obtained data. **Methods:** The standard protein, monoclonal antibody, and antibody-drug conjugation (ADC) were isolated under the same liquid chromatographic conditions and commercial chromatographic conditions of different manufacturers using a common mobile phase. **Results:** By comparing the results and data, the column designed and

通讯作者：李艺婷，女，研究方向：生物制药 [yi-ting.li@agilent.com](mailto:yi-ting.li@agilent.com) (021)6127541

manufactured by Agilent controlled the pore size, structure, and volume and was coated with a hydrophilic polymer layer to achieve the highest column efficiency, thus ensuring the protein peak shape was sharp and adequate separation. **Conclusion:** The method of this study can provide the method and basic data for the selection of SEC columns from different manufacturers and different specifications.

**【KEYWORDS】** Biotherapeutics; Antibody; Antibody-drug conjugation; Size exclusion; Stationary phase

## 一、材料与方法

### 1.1 材料与试剂

样品分别为蛋白质分子量标准品（甲状腺球蛋白聚集体、甲状腺球蛋白、IgG、牛血清白蛋白、肌红蛋白）、尿嘧啶总渗透标准品、治疗性单克隆抗体利妥昔单抗、治疗性单克隆抗体曲妥单抗和市售治疗性抗体-药物偶联物。配制磷酸盐缓冲液的固体试剂均来自 Sigma。

### 1.2 色谱柱与仪器

7.8 × 300 mm 规格的有 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱 2.7 μm、其他供应商产品 A 200Å, 3.5 μm、其他供应商产品 B 450Å, 3.5 μm、其他供应商产品 C 250Å, 5 μm、其他供应商产品 D 250Å, 4 μm、其他供应商产品 E 300Å, 3 μm。

4.6 × 300 mm 规格的有 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱, 2.7 μm、其他供应商产品 F 450Å, 2.5 μm、其他供应商产品 G 200Å, 1.7 μm。

### 1.3 色谱条件

色谱条件见表 1。

表 1. 色谱条件

参数	7.8 × 300 mm SEC 色谱柱	4.6 × 300 mm SEC 色谱柱
流速	0.8 mL/min	0.4 mL/min
流动相	150 mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0	150 mM 磷酸盐缓冲液, pH7.0
仪器	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统	配置 G1315D DAD 和生物惰性流通池的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统 (1200bar)
进样量	5 μL	5 μL
柱温	室温	室温
检测器	UV 220nm	UV 220nm

## 二、结果与讨论 2.1 对比 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱以确定可靠的 SEC-DAD 方法 2.1.1 蛋白质标准品分离

图 1 对比了使用不同孔径的色谱柱分离含 6 种蛋白质的参比标样, 结果清楚表明孔径对分离度的影响。体积最大的甲状腺球蛋白及其单体在 450Å 和 300Å 孔径下具有良好的分离度。但随着孔径

的减小，体积最大的蛋白质均被排出色谱柱，因此分离度较差。虽然最大蛋白质在孔径 450Å 的色谱柱 B 和孔径 300Å 的色谱柱 E 中得到较好分离，但这两款色谱柱更宽的色谱峰宽也使低浓度聚集体定量分析更加困难、准确度更低。AdvanceBio SEC 色谱柱可同时提高高、中、低分子量生物分子的分离度，这在分离多种生物分子时非常重要（图 1）。AdvanceBio SEC 色谱柱也可实现更高灵敏度、更窄峰宽以及更小洗脱体积。

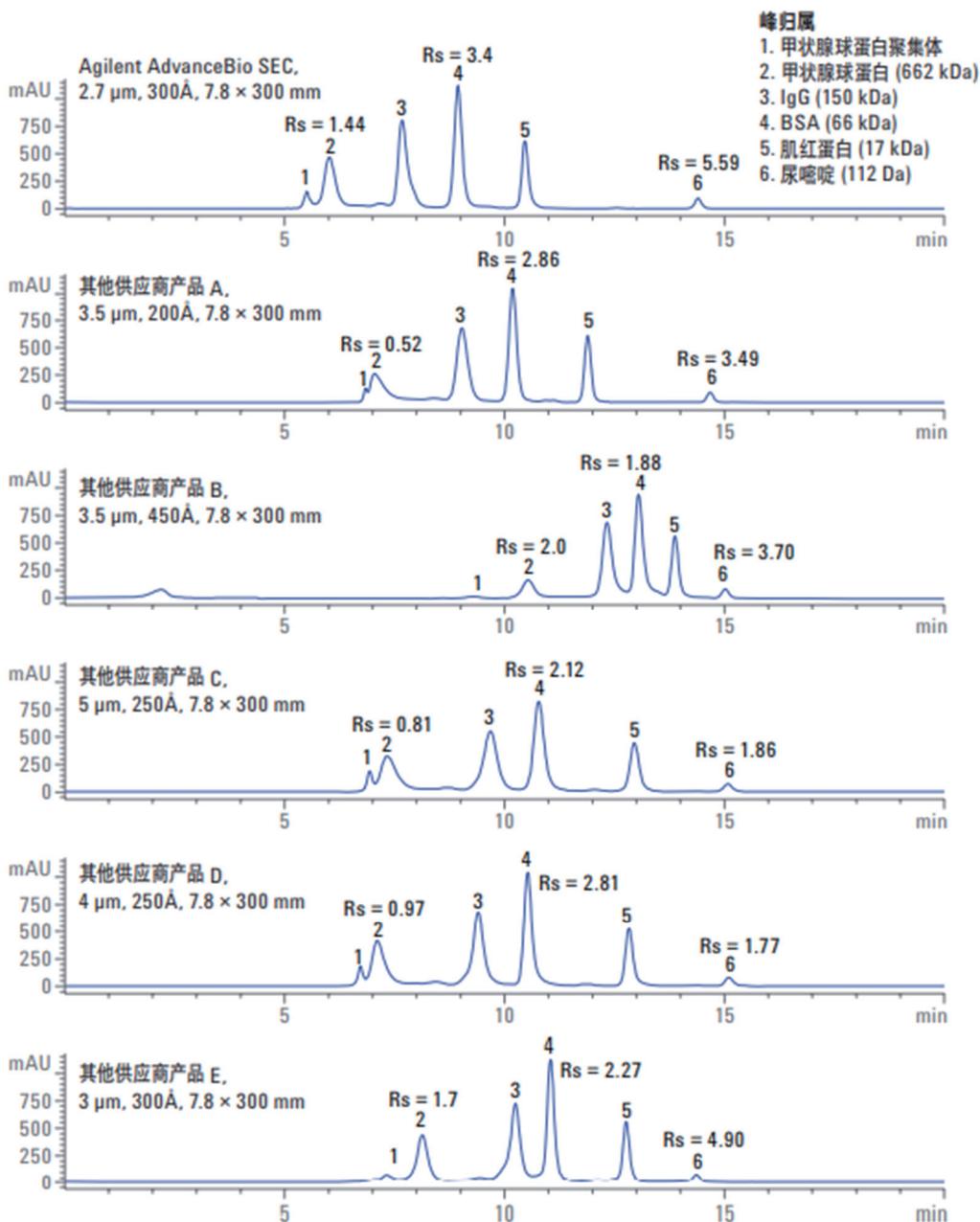


图 1. 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱中的蛋白质标准品 SEC 谱图对比。图中显示了峰 1/2、3/4 以及 5/6 之间的分离度计算值

为评价孔径对各种蛋白质标准品分离度的影响，本研究绘制出了各色谱柱的校准曲线（图 2）。体积大于孔径的分子将被排阻而体积小于孔径的分子将渗透进入微孔中，以此可确定色谱柱的排阻限和渗透范围。理想的 SEC 色谱柱应在校准曲线线性程度最高的部分对生物分子实现分离。当针对同一蛋白质范围评估色谱柱分离性能时，AdvanceBio SEC 色谱柱的大部分分离曲线均呈线性且具有较小斜率。这一性能可提高 662 kDa - 112 Da 分子量范围（多数蛋白质类生物治疗药物的分子量范围）内的蛋白质标准品分离度。

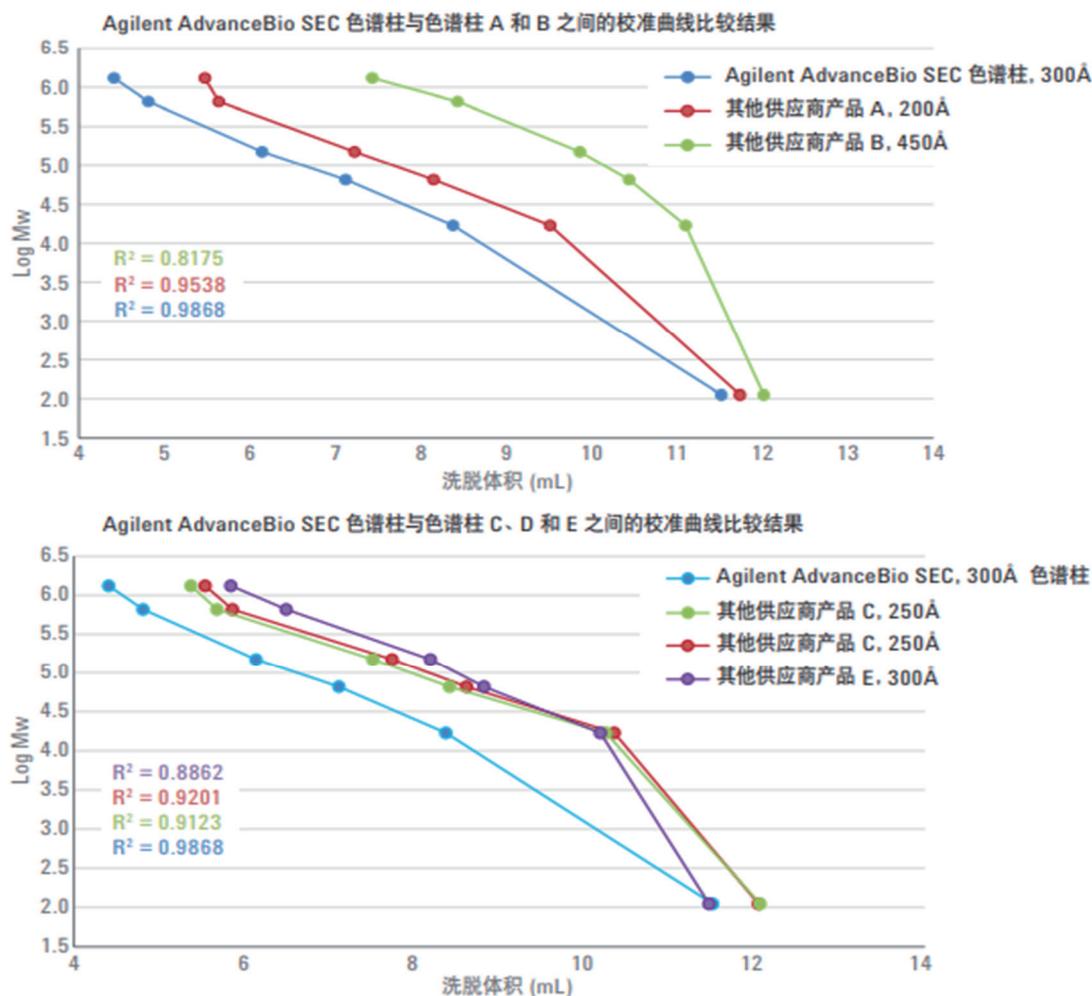


图 2. 多种 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱中的蛋白质标准品校准曲线

### 2.1.2 比较孔隙体积

SEC 的峰容量和分离度主要由孔隙体积确定。更大的孔隙体积可在更宽的分子量范围内实现更好的分离。表 2 列出了根据色谱柱总渗透点（尿嘧啶）和排阻限（甲状腺球蛋白聚集体）算出的孔隙体积。与其他色谱柱相比 AdvanceBio SEC 色谱柱具有更大的孔隙体积 (7.11 mL)，因此具有更高的分离度与峰容量。

表 2. 色谱柱总孔隙体积对比

色谱柱	孔隙体积 (mL)
<b>7.8 × 300 mm</b>	
Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱, 2.7 μm	7.11
其他供应商产品 A 200Å, 3.5 μm	6.25
其他供应商产品 B 450Å, 3.5 μm	4.57
其他供应商产品 C 250Å, 5 μm	6.51
其他供应商产品 D 250Å, 4 μm	6.70
其他供应商产品 E 300Å, 3 μm	5.62
<b>4.6 × 300 mm</b>	
Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱, 2.7 μm	2.36
其他供应商产品 F 450Å, 2.5 μm	2.06
其他供应商产品 G 200Å, 1.7 μm	2.20

### 2.1.3 治疗性单克隆抗体的分离

图 3 显示 AdvanceBio SEC 2.7 μm 色谱柱对治疗性曲妥单抗分离的数据质量改善结果。色谱图显示出多种色谱柱进行单体与聚集体分离的分离度值。AdvanceBio SEC 色谱柱和色谱柱 D 在分离曲妥单抗单体及其聚集体时具有最高的分离度因子, 分别为 2.37 和 2.41。而声称可分离较大体积蛋白质、抗体二聚体或更大聚集体的色谱柱 E 却未能成功分离聚集体, 从而无法对单体和聚集体进行峰积分并确定其分离度。

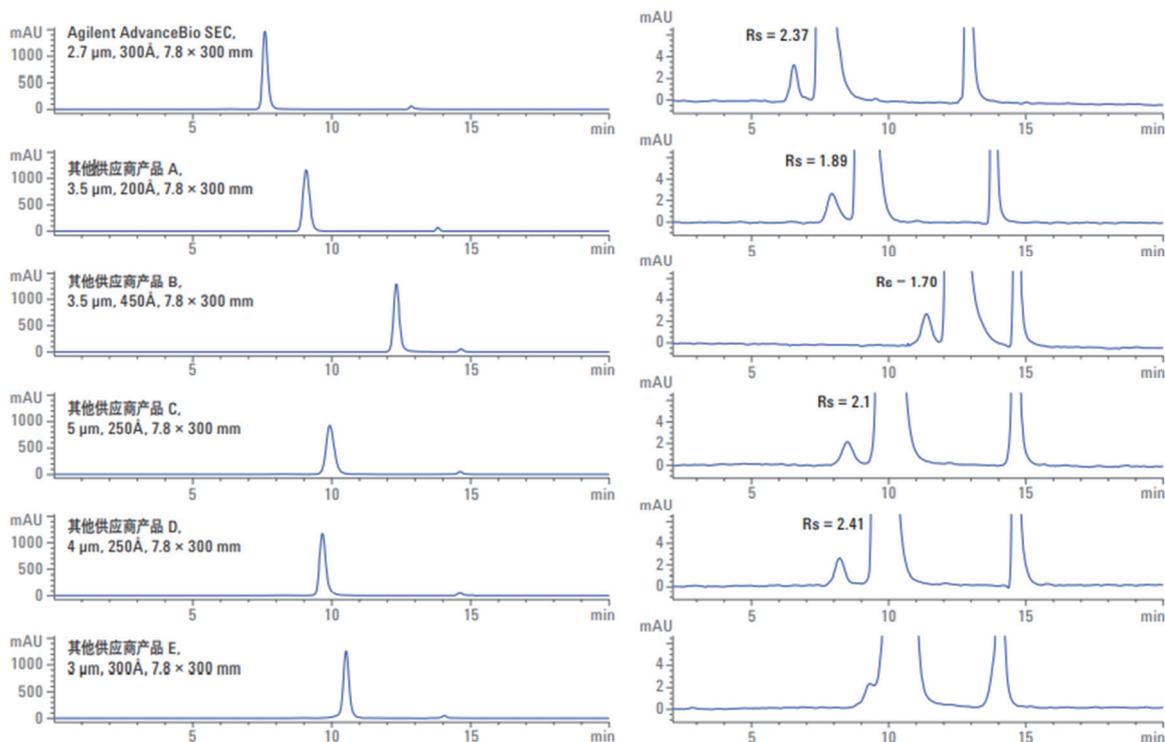


图 3. 多种 7.8 × 300 mm SEC 色谱柱对曲妥单抗单体及聚集体的分析结果

研究中还对比了市售治疗性单克隆抗体利妥昔单抗在不同色谱柱分离结果进行了比较，以说明色谱柱在实际应用条件下的分析性能。图 4 中的突出显示区域显示了 AdvanceBio SEC 色谱柱与色谱柱 A-E 聚集体与片段分离性能的对比结果。AdvanceBio SEC 的最佳孔径与孔隙体积使其拥有分离治疗性单抗及其聚集体和降解产物所必需的高分离度。

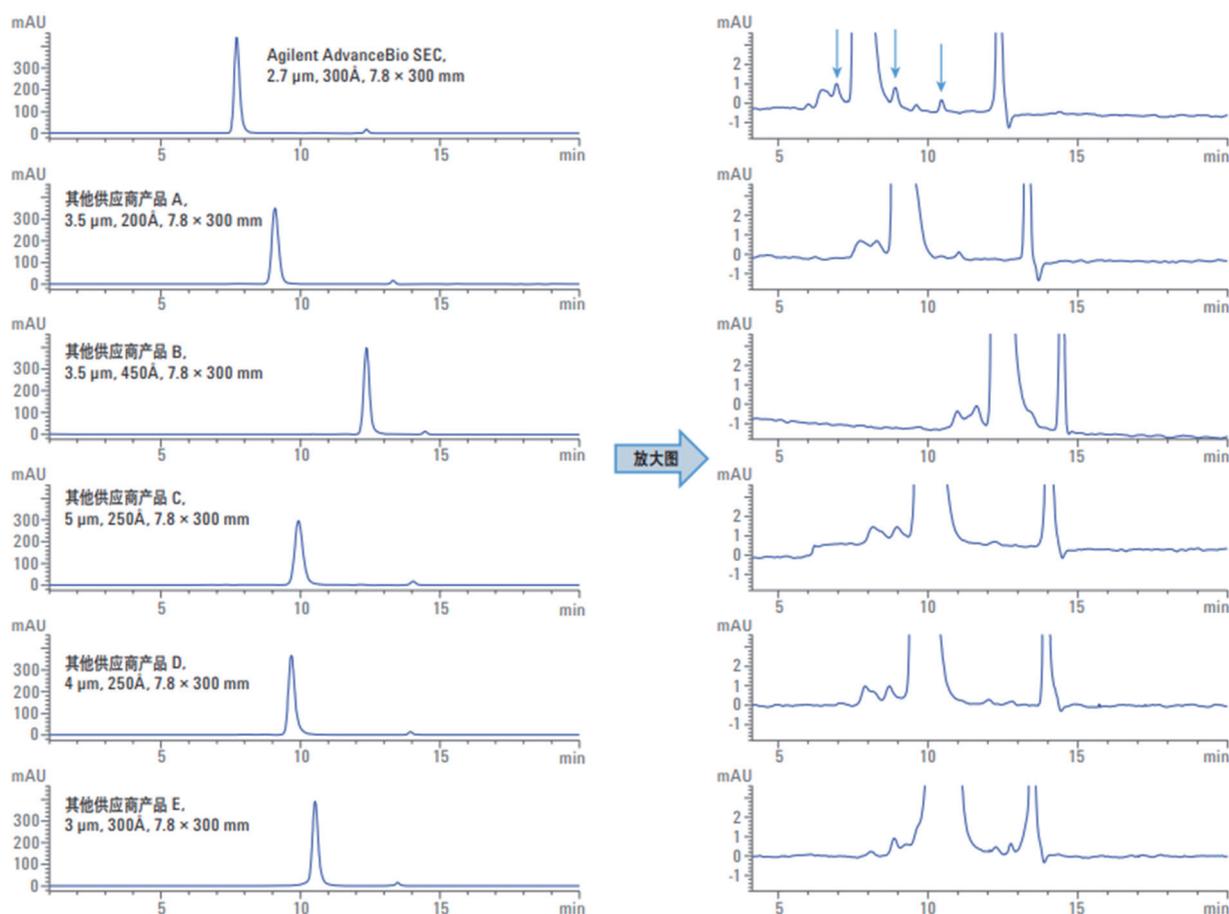


图 4. 多种  $7.8 \times 300$  mm SEC 色谱柱中的利妥昔单抗谱图对比

#### 2.1.4 抗体-药物偶联物的分离

抗体-药物偶联物 (ADC) 的 SEC 分析需要固定相与疏水性有效载荷之间次级相互作用较小的色谱柱。多数利用水相进行 ADC SEC 分析的已公布方法会导致较差峰形以及对单分子偶联物聚集体的不完整分离。疏水性有效载荷与固定相之间的非特异性相互作用会导致这一现象。虽然事实证明添加有机改性剂能够克服这一现象，但更大的流动相粘度会使压力升高，从而损失流速或色谱柱寿命。此外由于有机物会影响样品聚集，因此样品完整性也会有所损失。由于疏水性有效载荷与固定相之间存在非特异性相互作用，因此在色谱柱 A-E 上使用水性流动相进行 ADC 分析将导致峰形较差，如图 5 所示。而在 AdvanceBio SEC 色谱柱上使用水性流动相 (150 mM 磷酸缓冲液) 分析 ADC 却

可得到对称峰形。该方法同时使单体和聚集体获得了最高分离度 ( $R_s = 1.75$ )，表明疏水性药物与 AdvanceBio SEC 色谱柱固定相之间不存在非特异性相互作用 (图 5)。此外，AdvanceBio SEC 对 ADC 聚集体的分离度高于其他所有色谱柱，表明其适用于分析 ADC 及其聚集体。其他供应商的色谱柱得到的宽色谱峰不仅会影响灵敏度并使低浓度聚集体检测受限，也不利于峰积分。

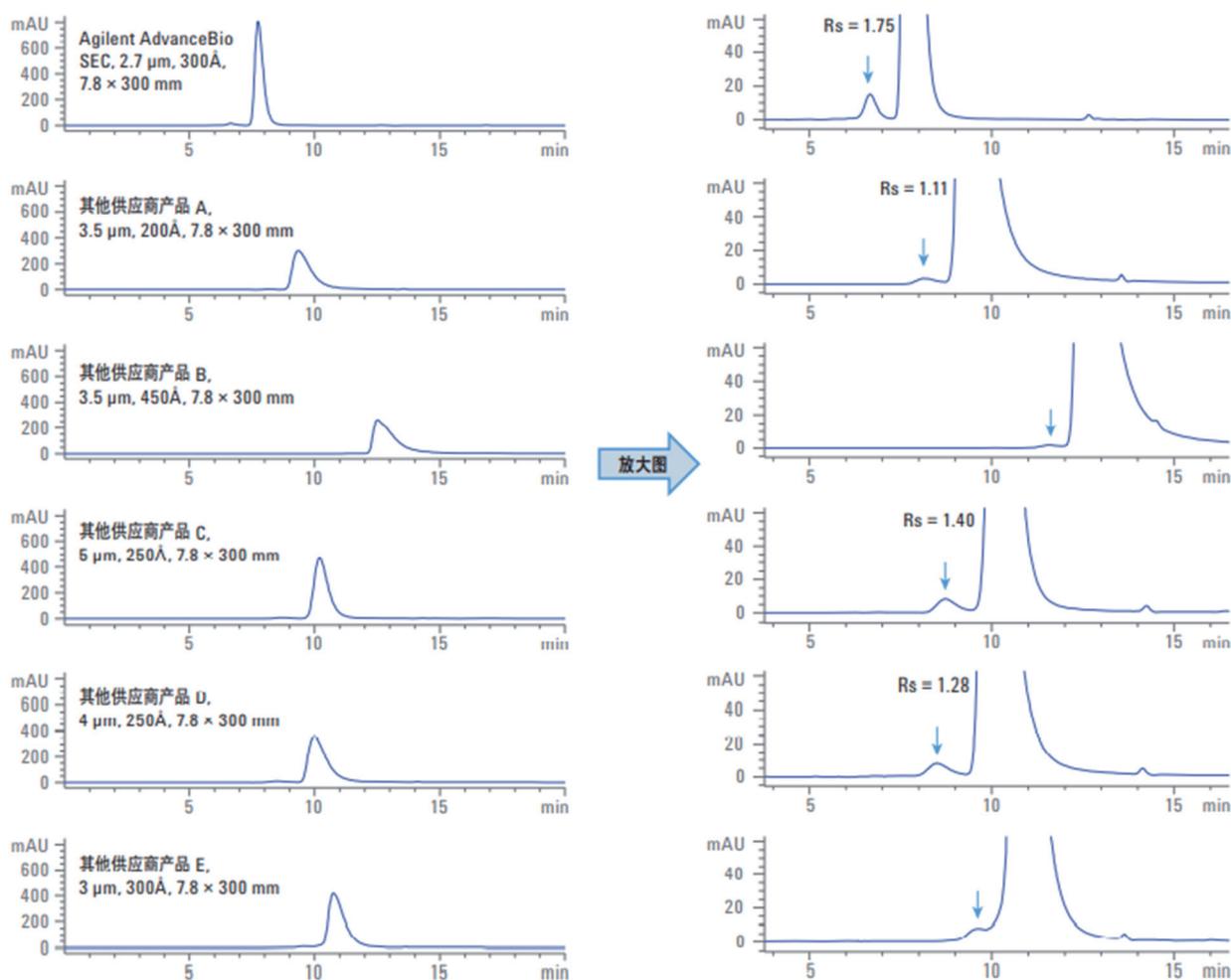


图 5. 多种  $7.8 \times 300$  mm SEC 色谱柱中的治疗性 ADC 谱图对比

## 2.2 对比 $4.6 \times 300$ mm SEC 色谱柱以确定高灵敏度方法

### 2.2.1 蛋白质标准品分离

图 6 对 AdvanceBio SEC  $300\text{\AA}$ ,  $4.6 \times 300$  mm,  $2.7 \mu\text{m}$  色谱柱与色谱柱 F 和色谱柱 G 中含 5 种蛋白质参比标样的分离度进行了对比。安捷伦色谱柱对体积最大的甲状腺球蛋白聚集体 (峰 1) 实现了良好分离, 与其他色谱柱相比具有更高的灵敏度和更窄的色谱峰。总体而言, AdvanceBio SEC 色谱柱对高、中、低分子量标准品的分离度均优于色谱柱 F, 而与  $1.7 \mu\text{m}$  色谱柱 G 相当。

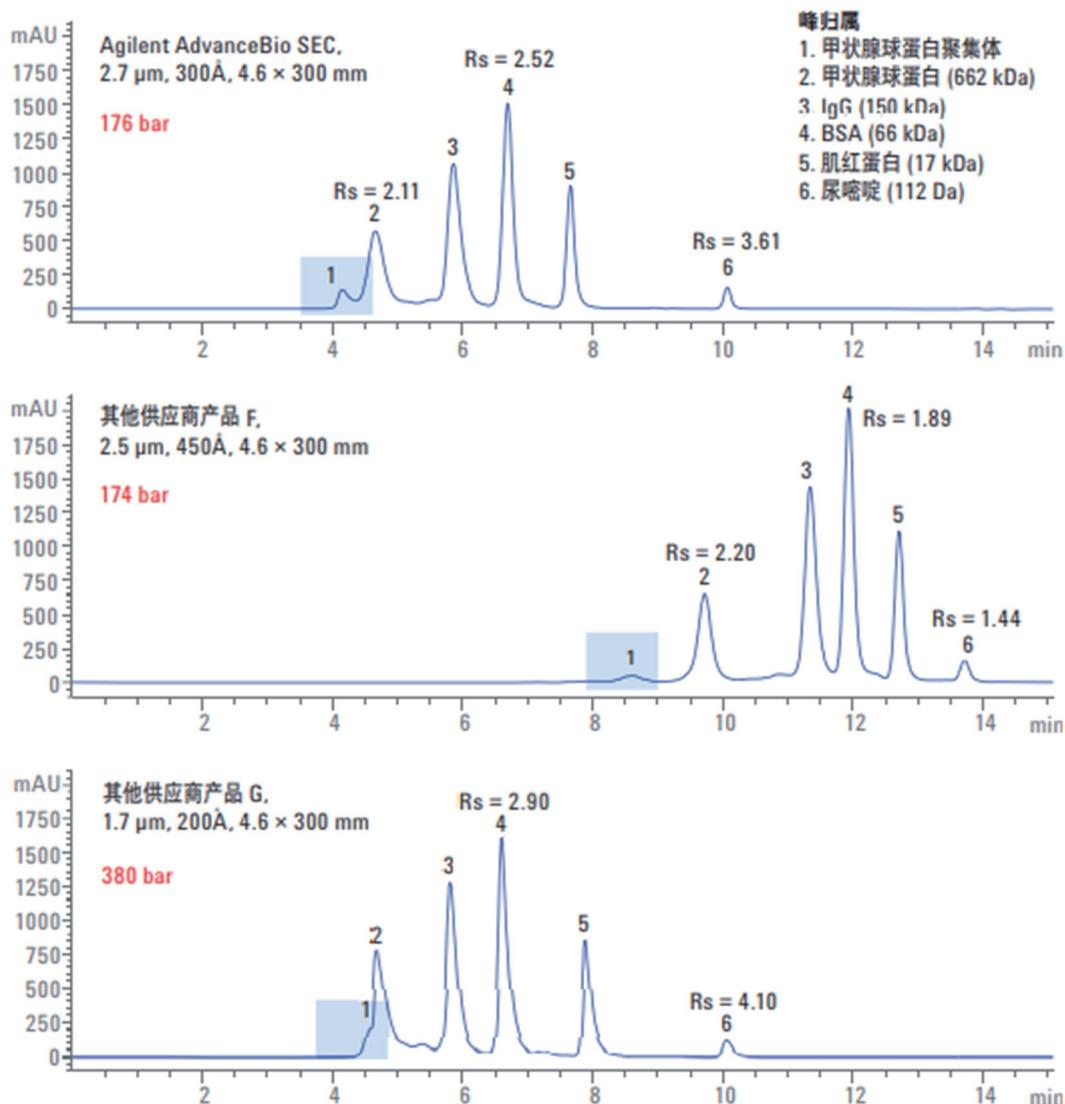
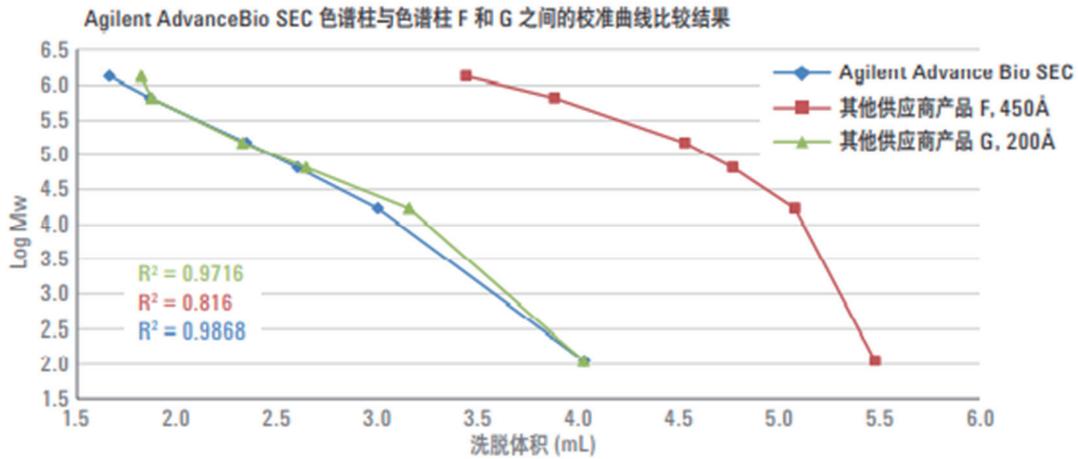


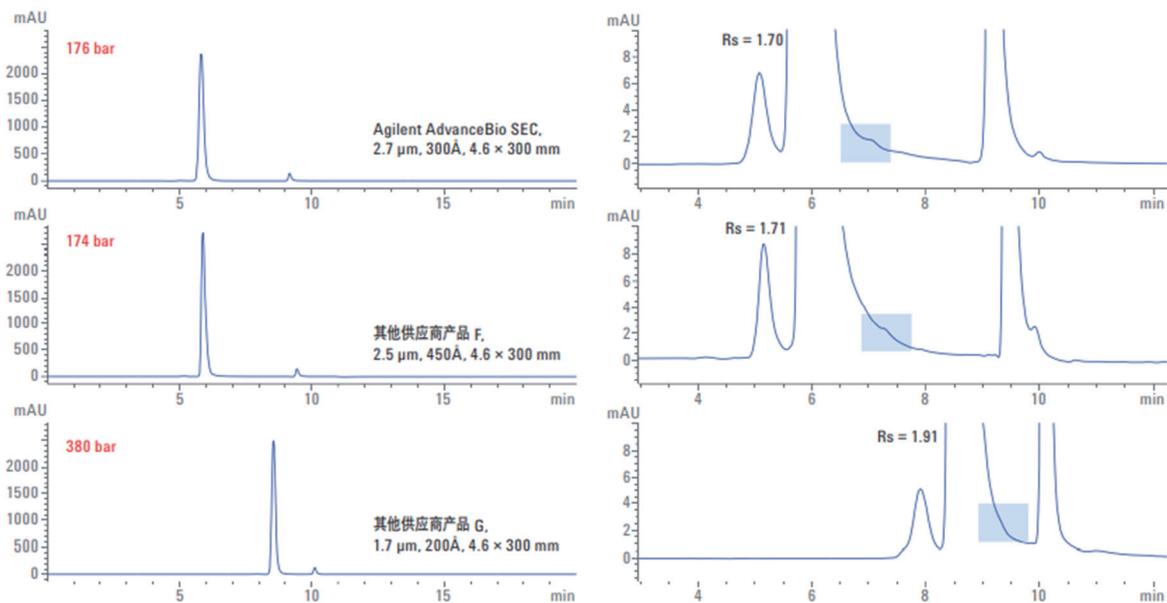
图 6. 多种  $4.6 \times 300$  mm SEC 色谱柱中的蛋白质标准品谱图对比。图中显示了峰 1/2、3/4 以及 5/6 之间的分离度计算值

AdvanceBio SEC 校准曲线具有较小的斜率与出色的线性相关系数，因此能够得出更准确的分子量结果（图 7）。与色谱柱 F (2.06 mL) 和色谱柱 G (2.20 mL) 相比，AdvanceBio SEC 色谱柱的孔隙体积 (2.36 mL) 更大，因此分离度更好、峰容量更高。此外，色谱柱 F 分离相同范围标准品所需的运行时间更长。这款色谱柱的渗透范围 (5.48 mL) 还超出了色谱柱体积 (4.9 mL)，表明洗脱时可能发生了非特异性相互作用。


 图 7. 多种  $4.6 \times 300$  mm SEC 色谱柱中的蛋白质标准品校准曲线

### 2.2.2 治疗性单克隆抗体的分离

图 8 显示了  $4.6 \times 300$  mm 色谱柱对 mAb 曲妥单抗的分离结果。色谱图显示出单体与聚集体分离所得的分离度值。AdvanceBio SEC 色谱柱的单体峰分离度与  $2.5 \mu\text{m}$ ,  $450\text{\AA}$  色谱柱 F 以及  $1.7 \mu\text{m}$ ,  $200\text{\AA}$  色谱柱 G 相当。另外, AdvanceBio SEC 与色谱柱 F 能够鉴定出降解曲妥单抗(以蓝色突出显示), 而色谱柱 G 则无法分离该降解产物。


 图 8. 不同制造商的  $4.6 \times 300$  mm SEC 色谱柱对曲妥单抗单体及聚集体的分析结果

### 2.2.3 抗体-药物偶联物的分离

图 9 表示多种  $4.6 \times 300$  mm 色谱柱的 ADC SEC 分离结果。与色谱柱 F 和色谱柱 G 相比, AdvanceBio SEC 色谱柱明显具有最高的 ADC 单体及其聚集体分离度因子 ( $R_s = 1.47$ )。由于疏水性有

效载荷与色谱柱固定相之间存在次级相互作用，因此色谱柱 F 和色谱柱 G 得到的峰形较差。AdvanceBio SEC 色谱柱同样表现出针对 ADC 单体的更好峰形与针对聚集体的更高分离度。除蛋白质标准品、mAb/ADC 及其聚集体实现更充分分离之外，AdvanceBio SEC 色谱柱还可在大约 176 bar 的压力下运行，相比之下亚 2  $\mu\text{m}$  色谱柱 G 的最大压力为 380 bar。后者需要采用能够承受高反压的液相色谱系统。

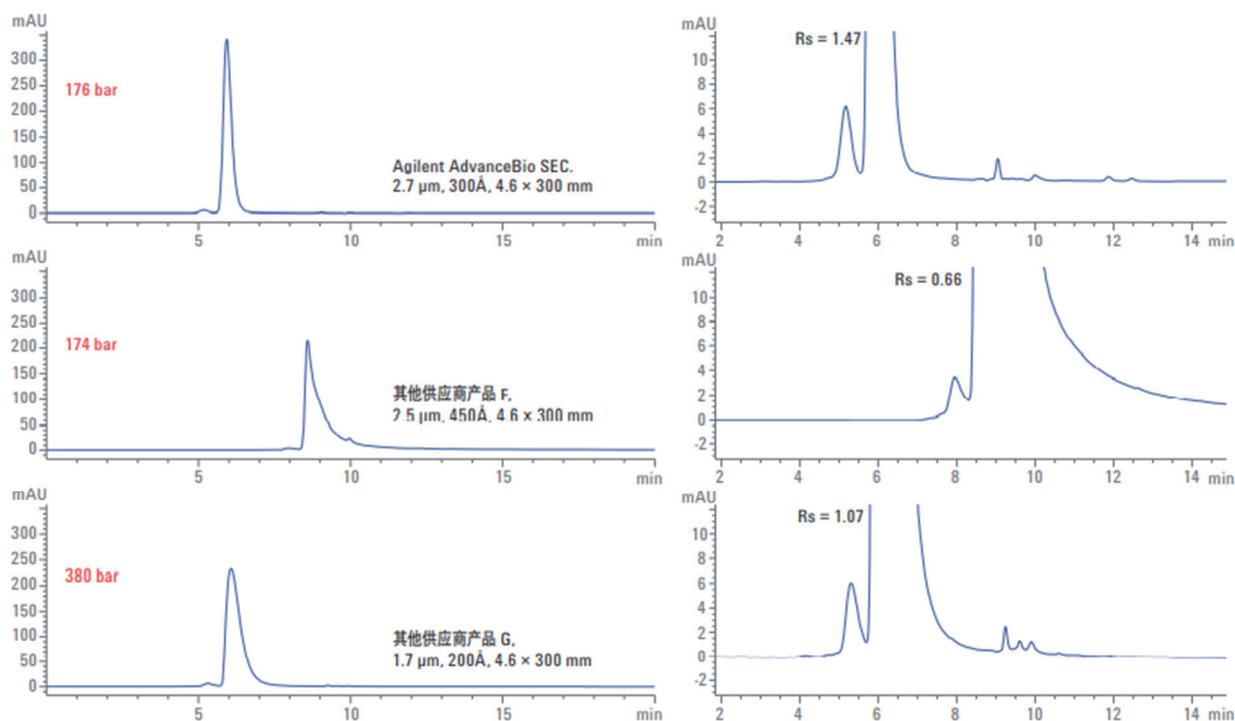


图 9. 多种  $4.6 \times 300 \text{ mm}$  SEC 色谱柱的 ADC 分离结果对比

### 三、 结论

体积排阻色谱分析在生物分子表征领域具有巨大潜力。本文通过各类市售供应商的 SEC 色谱柱进行比较，表明 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱在生物治疗药物分析领域的多项优势。首先使用  $7.8 \times 300 \text{ mm}$  色谱柱对多种蛋白质、mAb 单体、聚集体以及片段进行了分离。AdvanceBio SEC 色谱柱的最佳孔径和孔隙体积在单体、聚集体和片段分离中表现出突出的分离度和峰容量，有助于实现可靠稳定的分离。为提高灵敏度，将相应的方法转移至  $4.6 \times 300 \text{ mm}$  色谱柱中并与  $2.5 \mu\text{m}$ ,  $450\text{\AA}$  以及  $1.7 \mu\text{m}$ ,  $200\text{\AA}$  色谱柱分离度进行比较，结果表明转移后的方法仍具有出色的分离度。此外，将两根色谱柱串联使用可显著提高分离度和峰容量。但该方法仅适用于可在低压下运行的 SEC 色谱柱。最终，使用水性流动相分离 ADC 单体及其聚集体时，AdvanceBio SEC 色谱柱也表现出更好的峰形与可信度，同时不会损失色谱柱寿命与样品完整性。



# 统一您的生物制药(LC/MS)工作流程

Xevo G3 QToF系统是能够详细表征生物分子和生物工艺的分析利器。您可以选用Xevo G3 QToF或配备ACQUITY Premier的BioAccord系统从表征分析顺利过渡到专门的属性监测分析。



## 统一工作流程，全面覆盖研发、制造和QC环节

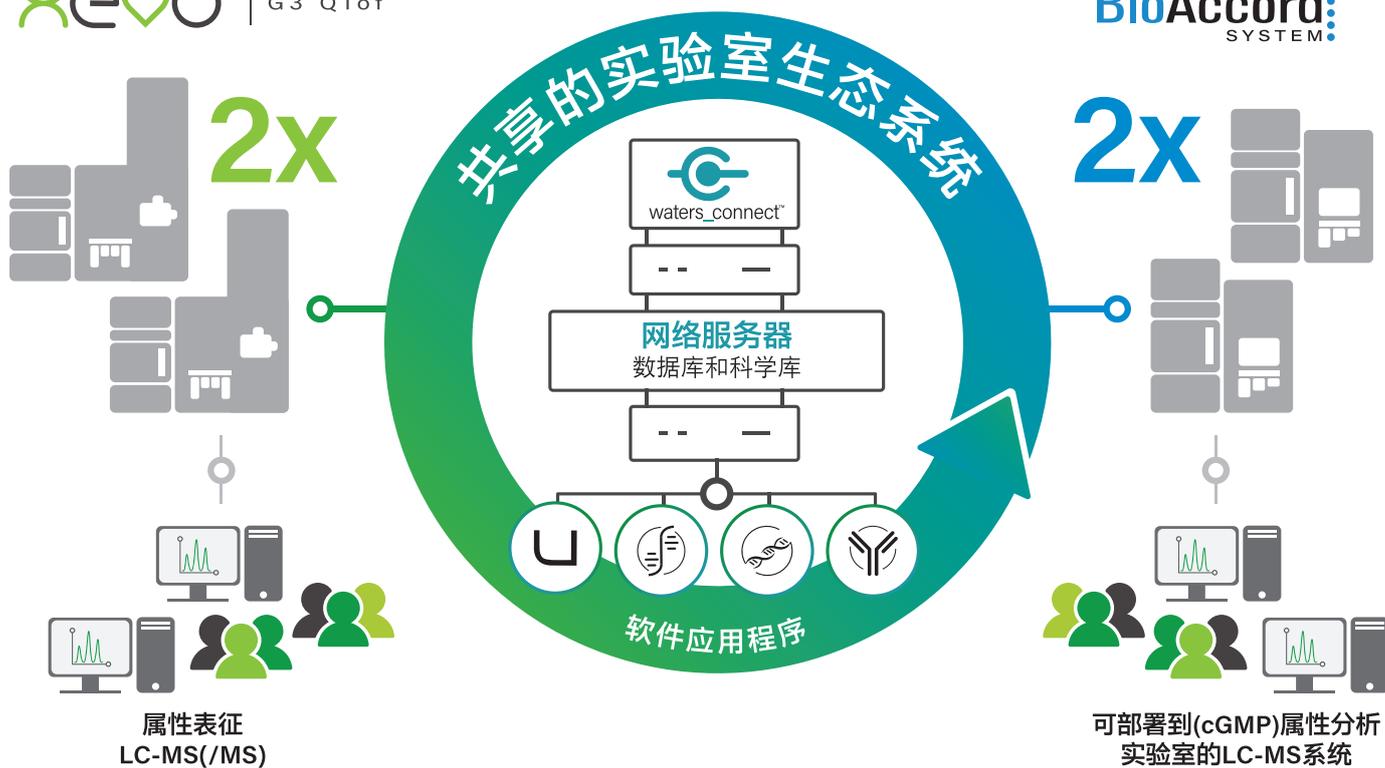
表征

属性监测

常规分析/QC放行

XeVO™ | G3 QToF

BioAccord™  
SYSTEM



✓ 集成化且符合法规要求



数据采集



数据处理



报告



数据可追溯性



数据可传输性

✓ 现代化的联网生态系统



## 提升检测效率，降低检测成本

无论是对原辅料进行 100% 鉴定测试还是仅进行批次抽检，Agilent Vaya 拉曼光谱原辅料鉴定系统均可为您提供快速、灵活的工作流程。Vaya 采用传统手持式拉曼和穿透包装 SORS 技术，无需打开透明或不透明容器，可以节省时间和成本，并减少与有害物质的接触。随着法规的变化以及测试要求的提高，使用 Vaya 可以在更短的时间内完成更多检测。

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





Promega

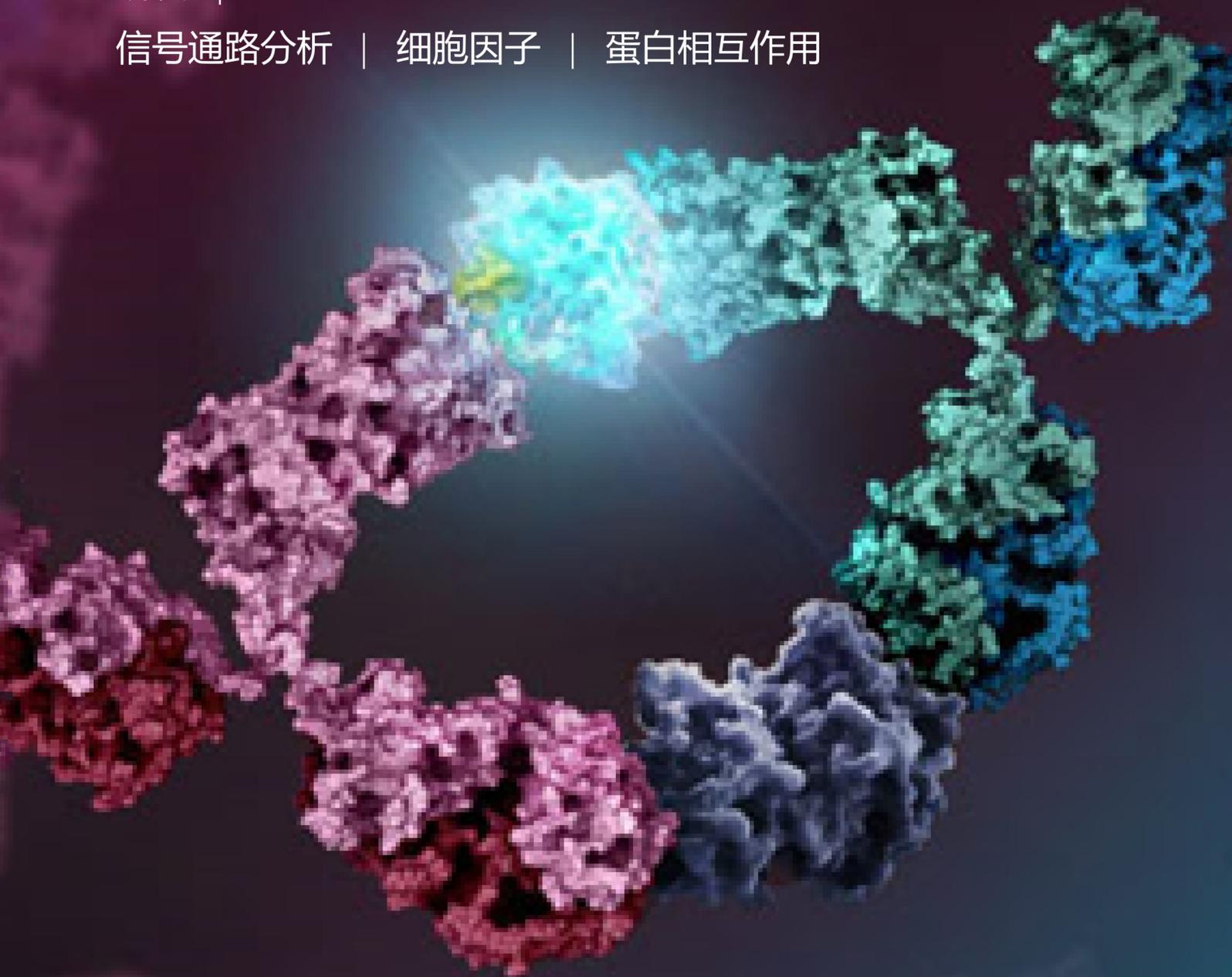
一种**简单**、**快速**的分析物检测方法

# Lumit™ Immunoassays

代谢调控 | 免疫原性细胞死亡 | 生物治疗药物

研发 |

信号通路分析 | 细胞因子 | 蛋白相互作用



# Lumit™ FcγR Binding immunoassays

Promega开发了基于检测生物发光信号的均质型免疫检测平台(Lumit™)研究FcγR与抗体的相互作用。该方法用来检测和比较Fcγ受体对IgG Fc结构域的亲合力，是易于使用的，可靠的，高通量的筛选方法，其将在抗体开发、生产和加工过程中发挥重要的作用。

**Lumit™ FcγR Binding immunoassays**，当与生物发光法的Fc Effector Reporter Bioassays联合使用时，将有助于阐明和表征抗体MOA，从而发现更好的治疗方法。

## 可检测受体包括：

- Lumit™ **FcγRI** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIA(H131)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIA(R131)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIIA(V158)** Binding Immunoassay
- Lumit™ **FcγRIIIA(F158)** Binding Immunoassay

## Lumit™技术优势：

- 该检测方法无需固定和洗涤流程；
- 均质型检测，简单快速(30-60min)；
- 检测只需要简单的化学发光检测仪；
- 该检测兼容384-孔板模式；
- 生物发光检测提供了广泛的检测窗口。

Promega目前有超过 **100** 种生物活性检测 ( Bioassay ) 试剂盒，如您需要咨询产品，请与我们联系。

邮箱：[marketing@promega.com.cn](mailto:marketing@promega.com.cn)

电话：010-58256268转市场部



Promega生命科学

*Time is  
precious*

# 公司简介

---

## 赛默飞世尔科技简介

赛默飞世尔科技是科学服务领域的世界领导者。公司年销售额约 400 亿美元。

我们的使命是帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。我们帮助客户加速生命科学领域的研究、解决在分析领域所遇到的复杂问题与挑战、提高实验室生产力、通过提供诊断以及研发制造各类突破性的治疗方法，从而改善患者的健康。

我们全球的员工将借助于一系列行业领先的品牌——Thermo Scientific、Applied Biosystems、Invitrogen、Fisher Scientific、Unity Lab Services、Patheon 和 PPD，为客户提供领先的创新技术、便捷采购方案和全方位的制药服务。欲了解更多信息，请浏览公司网站：[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

## 赛默飞世尔科技中国简介

赛默飞世尔科技进入中国发展已近 40 年，在中国的总部设于上海，并在北京、广州、香港、成都、沈阳、西安、南京、武汉、济南等地设立了分公司，员工人数约为 5000 名。我们的产品主要包括分析仪器、实验室设备、试剂、耗材和软件等，提供实验室综合解决方案，为各行各业的客户服务。

为了满足中国市场的需求，现有 9 家工厂分别在上海、北京、苏州和广州等地运营。我们在全中国还设立了 5 个应用开发中心以及示范实验室，将世界级的前沿技术和产品带给中国客户，并提供应用开发与培训等多项服务；位于上海和苏州的 3 个中国创新研发中心，拥有 110 多位专业研究人员和工程师及 100 多项专利。创新中心专注于垂直市场的产品研究和开发，结合中国市场的需求和国内外先进技术，研发适合中国用户的技术和产品；我们拥有遍布全国的维修服务网点和特别成立的中国技术培训团队，在全国有超过 2800 名专业人员直接为客户提供服务。

我们致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。欲了解更多信息，请登录网站：[www.thermofisher.cn](http://www.thermofisher.cn)

# 关于 SCIEX

SCIEX 致力于提供精准检测和化合物定量的解决方案，帮助我们的客户保护和改善人类的健康和安全。我们在质谱技术领域拥有50年的创新经验。从1981年成功推出第一台SCIEX的商业化三重四极杆质谱系统开始，我们一直致力于开发突破性的技术和解决方案，从而影响和推进可以改善人们生活的科学研究和成果。

今天，SCIEX作为全球生命科学和技术创新者的丹纳赫集团一员，我们将继续在质谱和毛细管电泳技术领域开发稳健的解决方案。 我们可以帮助客户监测环境危害因子并做出迅速响应；更好的理解疾病和疾病标志物，改善疾病的临床治疗，助力相关药物研发上市；保证食物更健康和更安全。

这就是世界各地的科学家们愿意选择SCIEX产品的原因，我们帮助您获得可靠的结果，以便您做出更好的关键决策，从而改善人们的生活。

获取更多信息, 请访问 [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn) .

联系我们: [WeChat](#), [LinkedIn](#).

全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897.

人类健康的改善依赖于精确科学的力量。



