



治疗性抗体的 SEC-MALS 分析 — 稳健可靠的深度样品表征法

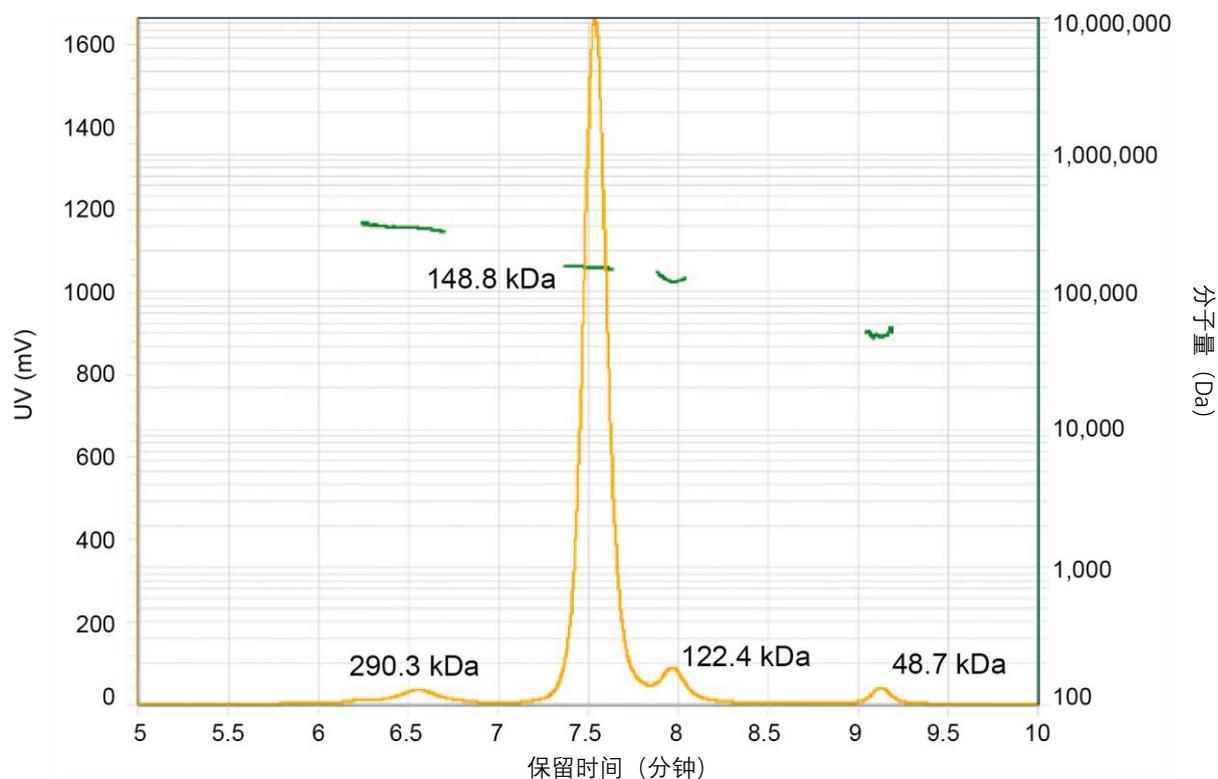
单克隆抗体 (mAb) 能够有效治疗癌症、自身免疫疾病、病毒感染及其他疾病。抗体治疗药物的最新发展旨在增加更多的特异性结合域 (双特异性和多特异性), 提高其有效性, 和 (或) 将分子缩小为特异性结合域 (如 scFv 或 Fab 片段), 实现更好的组织渗透性。随着分子变得愈加复杂, 潜在的高 / 低分子量 (H/LMW) 杂质也变得愈加复杂。因此, 为了准确分析各种分子, 需要比 UV 更加先进的检测方法来自表征 mAb 样品。

多角度光散射法 (MALS) 适用于测定样品组分的分子量, 更好地了解分子的聚集体和片段。MALS 检测的是分子被激光束击中时的散射光。散射光的强度取决于分子的浓度和分子量。本文中, 我们使用了 TSKgel® UP-SW3000-LS 色谱柱和 LenS₃ MALS 检测器针对 mAb 标准品进行分析。据此, 我们展示了增加 MALS 检测器可以获取哪些数据、方法的稳健性如何、以及便于集成 MALS 检测进入 mAb 分析流程中的设备。

实验条件

为了展示 MALS 检测与尺寸排阻色谱法联用分析单克隆抗体的优势, 我们采用了如下所述的 mAb 对照品和一种通用的分离方法。因为光散射对盐晶体、微生物或色谱柱脱落物等颗粒比 UV 检测更加敏感, 为了获得最优质量的 MALS 数据, 采取了以下匹配措施: 流动相两次过滤; 使用光散射专用 UHPLC 色谱柱 (TSKgel UP-SW3000-LS), 该柱曾与其他两种色谱柱进行比较, 其噪音水平最低; 选择 LenS₃ MALS 检测器, 其具有较高的灵敏度可以表征低丰度的杂质。

图 1. mAb 中高 / 低分子量杂质的分子量测定



色谱柱: TSKgel UP-SW3000-LS, 2 μm ,
4.6 mm ID \times 30 cm L (P/N 23546)
流动相: 100 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 6.7,
100 mmol/L, Na_2SO_4 (使用 0.1 μm 孔径 PES 真空
过滤器过滤两次)
流速: 0.35 mL/min
检测: UV@280 nm, LenS₃ 多角度光散射 (使用 RALS 计算 MW)
进样量: 10 μL
样品: SILu™ Lite SigmaMAb (1 mg/mL)、IgG1 mAb 标准品 (Sigma #MSQC4)
仪器: Thermo Scientific™ Vanquish™ UHPLC

结果

mAb 中高 / 低分子量杂质的分子量测定

为了分析抗体样品的分子量 (MW) 分布, 首先采用了 BSA 对系统进行了校准。根据上述方法分析 1 mg/mL 的溶液, 选择单体峰进行系统校准。校准修正了检测器间死体积导致的信号位差和谱带展宽, 确定了 UV 和 MALS 的响应因子, 及 MALS 检测器的归一化因子。

使用 UV 检测 (280 nm) 和 MALS 对 mAb 样品进行了分析。UV 曲线 (图 1, 黄色) 显示, 单体峰在 7.6 min 完成洗脱, 高分子杂质在 6.6 min 左右完成洗脱, 其他两个低分子杂质, 一个在 7.9 min 完成洗脱, 另一个在 9.2 min 完成洗脱。

已识别分子的 MW (绿色) 是通过使用 UV 信号 (消光系数 = 1.5 mL/mg) 计算的浓度结果及直角光散射信号 (RALS) 并由 SECview® 软件计算得到。测定的单体 MW 为 148.8 kDa, 这与未修饰抗体 (146 kDa) 加上糖基化修饰后的分子量结果一致。6.6 min 洗脱的 HMW 分子的 MW 计算结果为 290.3 kDa, 表明其为 mAb 二聚体。其中一个分子量为 122.4 kDa 的 LMW 杂质, 可能是无轻链的 mAb, 而最小峰分子量计算为 48.7 kDa, 这相当于 Fab 片段的分子量或两条轻链聚集体的分子量。

表 1. 使用 SEC-MALS 测定三次 mAb MW 时的稳健性和灵敏度

	总蛋白浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	重量占比	注入的蛋白质 (ng)	RALS 的平均 MW (Da)	标准差 (Da)	% CV
单体(149 kDa)	1000	85.9 %	8590	150,360	64	0.04
	200		1718	149,711	39	0.03
	40		344	149,681	280	0.2
	8		69	153,420	1,124	0.7
	1.6		14	142,839	4,562	3.2
二聚体(298 kDa)	1000	2.9%	288	295,265	3,067	1.0
	200		58	302,324	2,399	0.8
	40		12	316,672	20,025	6.3
片段(48 kDa)	1000	1.7 %	166	47,158	243	0.5
	200		33	48,348	175	4.5
	40		7	60,079	11,311	18.8

SEC-MALS 分析 mAbs 时的灵敏度和稳健性

接下来, 通过进样一式三份的 1:5 稀释的系列 mAb 样品来测定 SEC-MALS 分析 mAb 时的稳定性和灵敏度。表 1 所示为注入不同浓度的单体、二聚体和片段时的 MW 测定结果。由于这些分子在样品中的比重不同, 给定总蛋白质浓度下每种分子的进样量也进行了计算和说明。

对于单体, 我们发现低至 14 ng 的 MW 测定值也在统计平均值 $\pm 5\%$ 范围内。然而, 随着进样量的减少, 精确度随之降低, 标准偏差随之增大。针对于二聚体 MW 的测定, 情况比较类似。最低进样量到 12 ng 时, 计算出的 MW 为 317 kDa (+6 %) 和变异系数高达 6.3 %。相反, 在较高浓度下, 二聚体 MW 的测定比较准确 (与统计平均值偏差 $< 2\%$), 变异系数也很低 (% CV $< 1.1\%$)。同样, 针对于小 Fab 片段 (48 kDa), 显示可靠的 MW 测定最低样品量低至 33 ng。而低到 7 ng 的最低进样量时, 则会导致 MW 测定不准、三次测量间的变异系数高。其原因不仅是分析物含量低, 而且是由于分子越小, 散射光量也会越低。

结论

使用 SEC-MALS 分析单克隆抗体样品时, 可以直接测定样品组分的 MW, 便于峰的杂质结构归属。高灵敏度的 LenS₃ MALS 检测器对抗体二聚体的灵敏度低至 50 ng 以下, 测定单体和杂质的 MW 的浓度可低至 15 ng。但此时准确度稍低、偏差较大。