



使用 TSKgel® UP-SW2000 尺寸排阻色谱柱配接 LenS₃™ MALS 检测器表征重组蛋白生物治疗药物

简介

生物治疗药物通常为较大的分子，例如肽、蛋白质和单克隆抗体，其单体分子量在 3,000~150,000 Da 之间。其片段、二聚体及其他高阶聚集体可能会引起严重的免疫原性反应，因此药物中必须确保无此类杂质。如果药物为热敏感型生物治疗性蛋白，这一点尤其重要。目前为止，尺寸排阻是分离和表征此类应用的首选色谱模式。本应用展示了使用 2 μm 尺寸排阻色谱柱直接连接到 LenS₃ 多角度光散射 (MALS) 检测仪，在线检测两个重组蛋白样品绝对分子量的检测报告。

材料和方法:

样品: BSA (校准标准)
 样品 1—溶于流动相的 1.72 mg/mL 的重组蛋白 (~90 kDa)
 样品 2—溶于流动相的 3.64 mg/mL 的重组蛋白 (~90 kDa)

样品在 -20 °C 下保存，分析前解冻至 8 °C。用流动相 (8 °C 下预冷) 稀释样品来调节浓度。

色谱条件:

仪器: ThermoFisher Ultimate® 3000 UHPLC 和 Chromeleon® 软件
色谱柱: TSKgel UP-SW2000 (2 μm, 4.6 mm ID × 30 cm)
流动相: BupH 修饰的 Dulbecco 磷酸盐缓冲溶液，是使用光散射级水制备，并经 0.1 μm 的 PES 膜过滤而来 (该缓冲溶液是按照以下说明从生理盐水制备所得: Thermo Scientific-目录# 28374, 批次 TL275790)
流速: 0.20 mL/min
检测器: UltiMate 3000 VWD 可变波长检测器 @280 nm 波长和 Tosoh LenS₃ MALS 检测器 (串联排列: 色谱柱→UV→MALS)
柱温箱温度: 25 °C
自动进样器温度: 8 °C
进样量: 样品 1: 25 μL
 样品 2: 10 μL

结果和讨论

使用新鲜制备的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液校准多检测器设置。图 1 显示了 UV 和 MALS 检测器的叠加曲线。SECview™ 软件中的一步校准程序调整了检测器之间的死体积，并对串联检测器时引起的带宽扩展效应进行了校正，同时确定了检测器的校准常数和偏移量。

图 1. 使用 BSA 蛋白标准品校准检测器

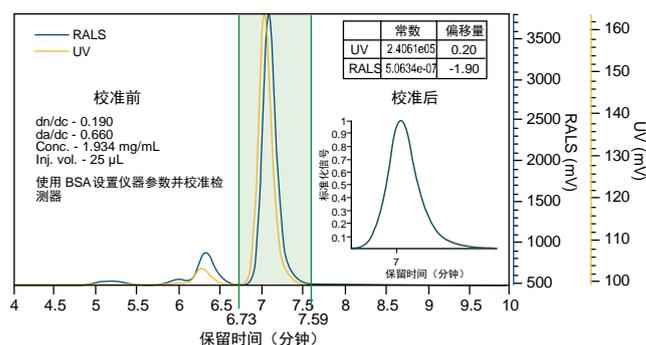


图 2 和图 3 分别显示了两次连续注入样品 1 和样品 2 的 UV 检测器重叠图。放大图 (主谱图内) 显示了在 TSKgel UP-SW2000 色谱柱上单体和聚集体之间优异的分离度。

图 2. 样品 1 的 UV 检测器重叠图-连续两次进样

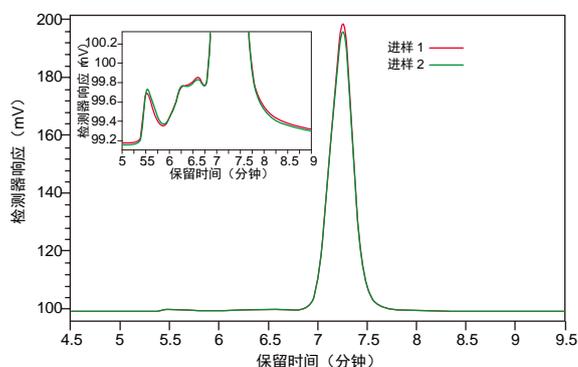


图 3. 样品 2 的 UV 检测器重叠图-连续两次进样

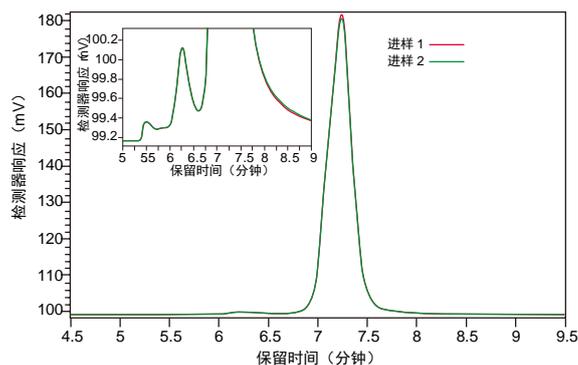


图4和5分别显示了样品1和样品2的分子量（绿色）曲线。两种样品中聚集体含量的浓度不同。

图4.样品1的分子量分布图

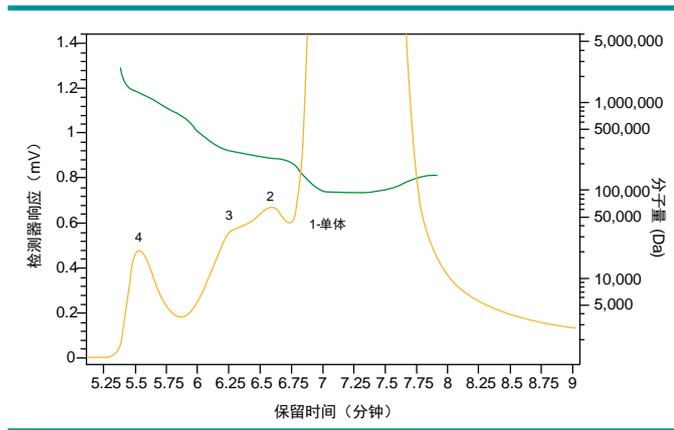
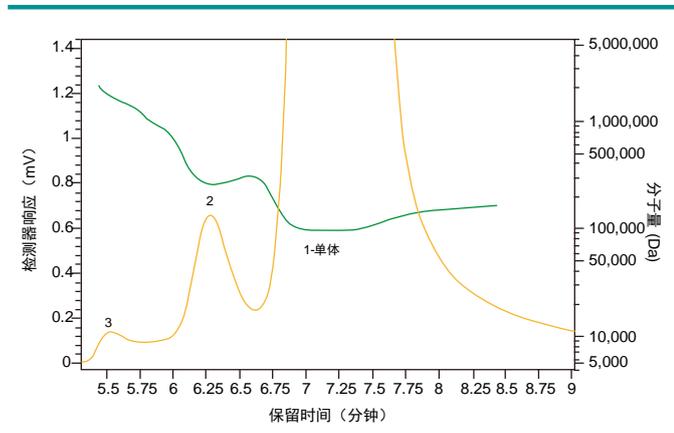


图5.样品2的分子量分布图



仔细观察 UV 曲线，可以发现两个样品中单体峰在较高的保留区域上似乎都显示出了轻微的肩峰，表明是一个双峰形状。通过 MALS 检测器使用分子量曲线进一步分析，可以发现两个独立的分子量群。图6和图7放大了单体峰，并展示了两个样品中两个分子量的平稳点 1a 和 1b。考虑到这些重组蛋白对环境条件的敏感性，肩峰 (1b) 表明温度诱导聚集的开始，这在两个样品中的程度不同。

图6.样品1的单体峰的分子量分布图

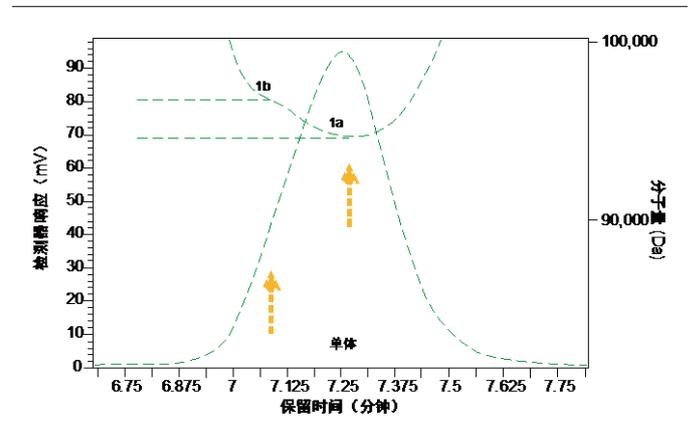


图7.样品2的单体峰的分子量分布图

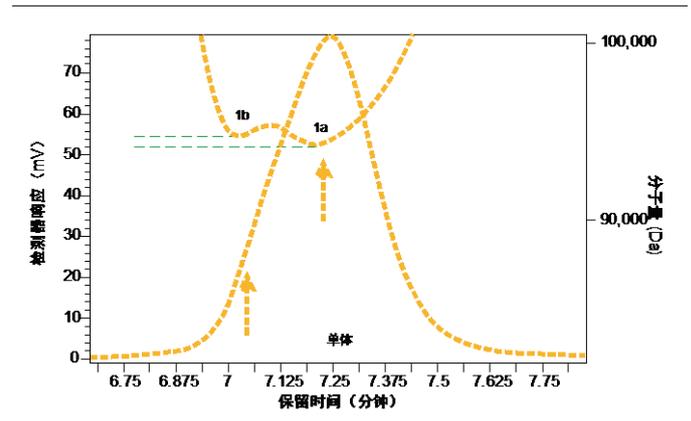


表 1 和表 2 列出了识别出的聚集峰的色谱分析结果，包括分子量和百分比含量。

表 1. 样品 1 的结果表

峰	保留时间*	峰 MW	% UV 面积
1a	7.220	93,564 Da	98.06%
1b	-	95,811 Da	
2	6.593	229,024 Da	0.69%
3	6.355	276,217 Da	0.73%
4	5.533	1,285,996 Da	0.51%

表 2. 样品 2 的结果表

峰	保留时间*	峰 MW	% UV 面积
1a	7.242	93,106 Da	98.73%
1b	-	93,602 Da	
2	6.282	251,078 Da	1.04%
3	5.540	1,631,227 Da	0.23%

*保留时间按分钟统计

结论

该研究表明，使用 SEC-MALS 配置可以测定和量化重组蛋白治疗剂中的分子量种类，包括单体和多种不同级别的聚集体。TSKgel UP-SW2000 不仅能够出色地分离出样品 1 和样品 2 中的高阶聚集体与单体，而且还能够分离出分子量稍高的、几乎与单体同时洗脱的温度诱导聚集体。该色谱柱的检测结果具有高重复性，确保导出更高准确度和精确度色谱图，用于 LenS₃ MALS 检测器分析。LenS₃ 和 SECview 软件结合使用，使得即使在极低浓度 / 存在聚集体的情况下，也能对所有峰的分子量测定及面积计算获得可重复的准确结果。

TSKgel 和 Tosoh Bioscience 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

LenS 是 Tosoh Bioscience LLC 的商标。

SECview 是 Tosoh Bioscience LLC 在美国和欧盟及东曹公司在日本的注册商标。

UltiMate 和 Chromleon 是 Dionex Corporation 的注册商标。