

使用Premier SEC蛋白分析专用柱评估SEC-MALS数据质量

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

体积排阻色谱(SEC)结合多角度光散射(MALS)和UV/RI检测已越来越多地用于表征大分子的生物物理特性，包括分子量、聚集、大小和构象。数据质量对于准确表征这些特性至关重要。研究表明，XBridge™ Premier SEC 250 Å, 2.5 µm蛋白分析专用柱和ACQUITY™ Premier SEC 250 Å, 1.7 µm蛋白分析专用柱的SEC-MALS噪音水平较低。使用Premier 250 Å蛋白分析专用柱以及其他市售的Waters SEC色谱柱获得的SEC-UV-MALS数据确定了曲妥珠单抗分子量。

优势

- XBridge Premier SEC 250 Å, 2.5 µm蛋白分析专用柱和ACQUITY Premier SEC 250 Å, 1.7 µm蛋白分析专用柱的MALS噪音水平较低
 - 使用Premier SEC蛋白分析专用柱测定蛋白质的分子量，然后进行UV和MALS检测
-

简介

SEC已广泛用于表征大分子的大小异构体，该技术可以分离单体与高分子量聚集体以及低分子量物质和其他杂质。

通过结合多角度光散射(MALS)和UV检测器，大大提高了SEC的效用，可用于表征蛋白质生物治疗药物的许多生物物理特性，例如分子量、聚集、大小和构象^{1,2}。SEC-MALS实验的数据质量对于准确表征至关重要。

Waters MaxPeak™ Premier SEC蛋白分析专用柱填充有与羟基封端聚环氧乙烷键合的BEH™颗粒，而色谱柱硬件采用了经过MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术处理的不锈钢。在本应用纪要中，我们将从Premier SEC蛋白分析专用柱获得的SEC-MALS噪音水平与两种色谱柱—Waters二醇基键合亚乙基桥杂化(BEH)有机硅胶基质SEC色谱柱以及二醇基键合硅胶基质SEC色谱柱进行了比较。还测定了曲妥珠单抗及其大小异构体的分子量。

实验

样品描述

将曲妥珠单抗(21 mg/mL)直接进样至LC系统。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 (平均系统扩散: $4\sigma < 22\ \mu\text{L}$)
检测条件:	ACQUITY UPLC TUV检测器, 配备5 mm钛合金流通池, 波长: 280 nm MALS检测器: Wyatt μ DAWN
样品瓶:	聚丙烯12 × 32 mm螺纹颈口样品瓶, 带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫, 容积300 μL , 100个/包 (部件号: 186002639)
色谱柱:	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm , 7.8 × 300, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005070)

ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 1.7 µm, 4.6 × 300, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005072)

ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 Å, 1.7 µm, 4.6 mm × 300 mm (部件号: 186005226)

BioResolve SEC mAb分析专用柱, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176004595)

二醇基键合硅胶基质SEC色谱柱, 250 Å, 5 µm, 7.8 x 300 mm

柱温:	室温
样品温度:	10 °C
进样体积:	10 µL (7.8 mm内径的色谱柱) 3.5 µL (4.6 mm内径的色谱柱)
流速:	0.75 mL/min — 7.8 mm内径色谱柱 0.38 mL/min — 4.6 mm内径色谱柱
流动相:	2 x DPBS (磷酸盐缓冲液, Dulbecco配方)
数据管理	
色谱软件:	Empower™ 3 (FR 4)

结果与讨论

平衡40~50分钟后，将空白样品进样至全新的SEC色谱柱，以使用2X DPBS（磷酸盐缓冲液，Dulbecco配方）流动相评估SEC-MALS噪音。这种噪音可能会受到进样过程中的压力脉冲以及从色谱柱中脱落的颗粒的影响。图1显示了从五根SEC色谱柱获得的MALS数据。两根4.6 x 300 mm色谱柱的数据采集速率为5 Hz，三根7.8 x 300 mm色谱柱的数据采集速率为2 Hz。除图1a中的二醇基键合硅胶基质SEC色谱柱以外，已设置y轴以使y值范围（最大值和最小值之差）相同。此举有助于直观地比较色谱柱之间的噪音水平。图1a显示了整个运行的数据，而图1b显示了其中两分钟的数据，根据这两分钟的数据估算噪音水平。整体而言，Premier SEC蛋白分析专用柱的噪音水平是相应的ACQUITY BEH 200 SEC 1.7 μm 色谱柱和BioResolve SEC 2.5 μm 色谱柱的1.5–2倍。二醇基键合硅胶基质SEC, 250 Å, 5 μm 色谱柱的MALS噪音分别是ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱和BioResolve SEC色谱柱的2.5倍和4倍。此外，二醇基键合硅胶基质SEC, 250 Å, 5 μm , 7.8 x 300 mm色谱柱在大约2分钟和6分钟产生两个早洗脱峰，这可能是进样压力脉冲导致色谱柱上的颗粒或粉末脱落所致。在测试的色谱柱上没有观察到向上的尖峰，表明从色谱柱上脱落的颗粒量极少。这些结果与先前的发现一致³。

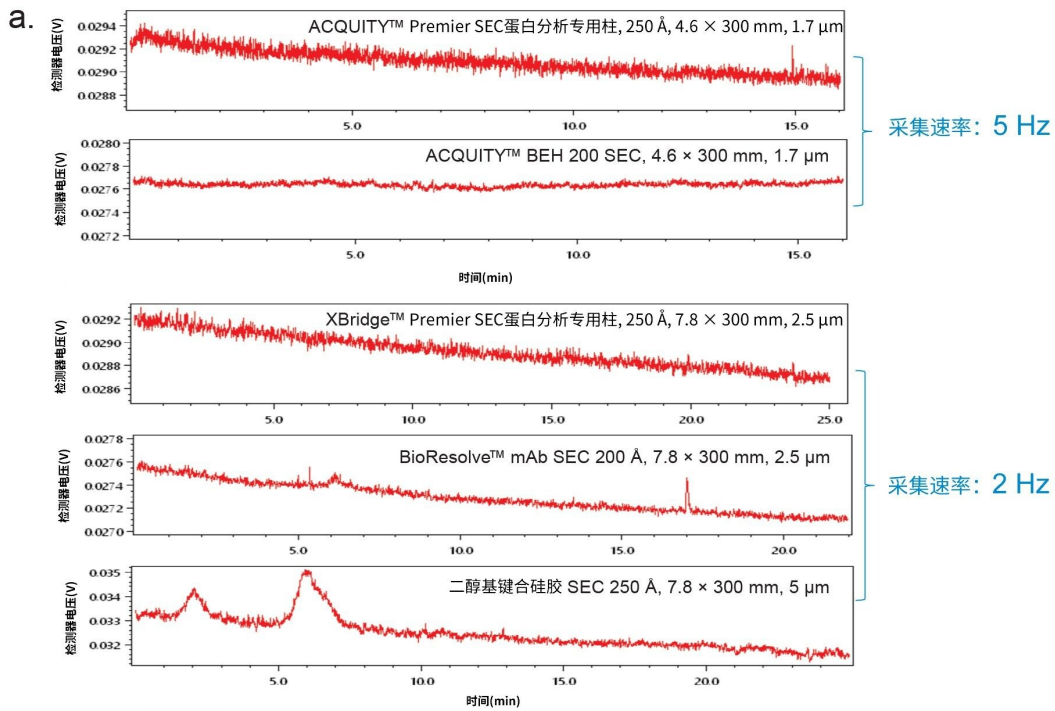
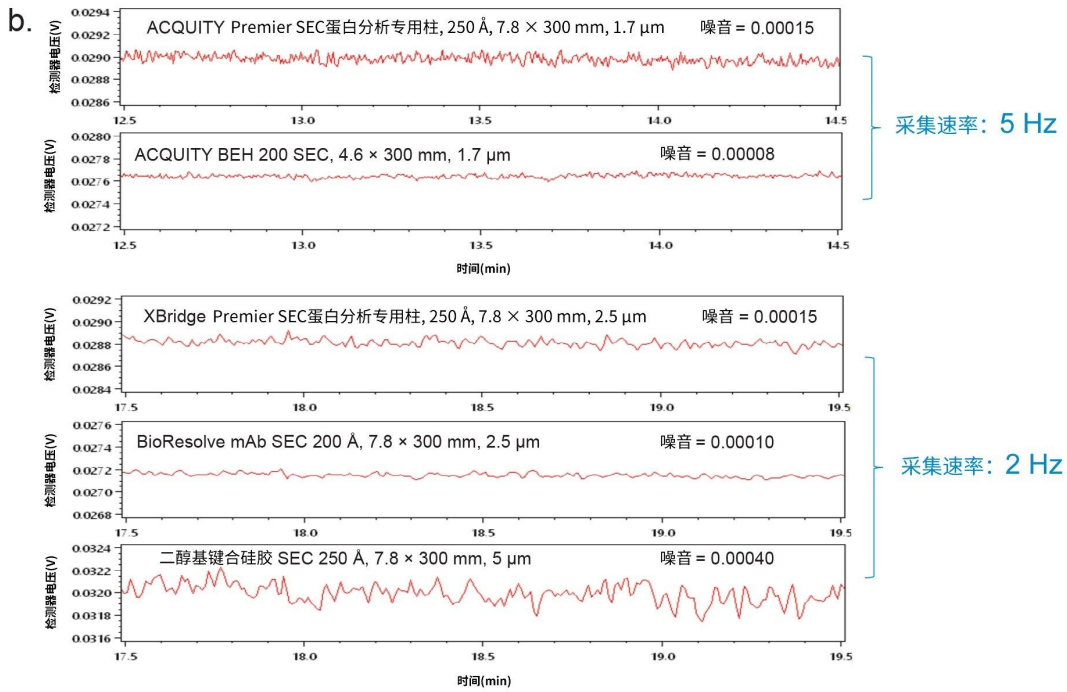


图1.使用五根全新的SEC色谱柱在空白进样时收集的SEC-MALS基线噪音。流动相为2 x DPBS。

1a.基线和完整色谱图。



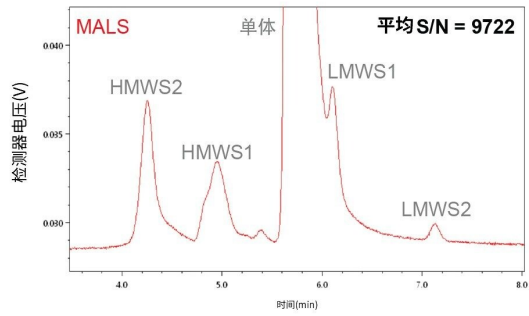
1b. 色谱图的其中2分钟，已经确定该区段的噪音并在右上角注明。

使用2 x DPBS流动相在所有五根SEC色谱柱上分离曲妥珠单抗以测定分子量(MW)。图2a和2b显示了通过MALS (上图, 红色) 和UV 280 nm (下图, 蓝色) 检测进行分离的结果。与之前的结果一致³⁻⁷, 高分子量物质 (HMWS2, HMWS1) 和低分子量物质(LMWS2)与单体峰实现了良好分离。除了在二羟基键合硅胶基质色谱柱上观察到LMWS1嵌入单体峰下方外, 在其余色谱柱上都观察到LMWS1的部分分离。关于LMWS1和单体之间的分离度, ACQUITY BEH 200 SEC, 4.6 x 300 mm 1.7 μm色谱柱略优于ACQUITY Premier SEC 250 Å, 4.6 x 300 mm 1.7 μm色谱柱 (图2a), 这可能是Premier SEC色谱柱峰体积小, 因此Premier SEC色谱柱的性能受到系统分散的负面影响更大。二羟基键合硅胶基质色谱柱上大约6到7分钟出现额外的峰 (用虚线圈出), 这也可能是进样过程中压力脉冲的影响所致。

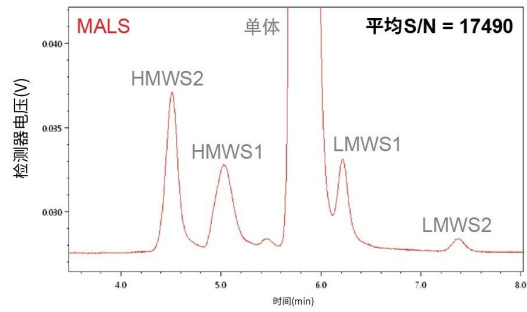
MALS检测的平均信噪比如图2右上角所示。通过将曲妥珠单抗单体峰高除以基线相对稳定的噪音水平获得该值 (n = 4或5)。ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱的信噪比是相应的ACQUITY BEH 200 SEC 1.7 μm色谱柱和BioResolve SEC 2.5 μm色谱柱的二分之一至三分之二, 这主要是由于噪音水平略高。由于信号较低而噪音较高, 二羟基键合硅胶基质色谱柱的信噪比相比其他四根色谱柱低约一个数量级。

a.

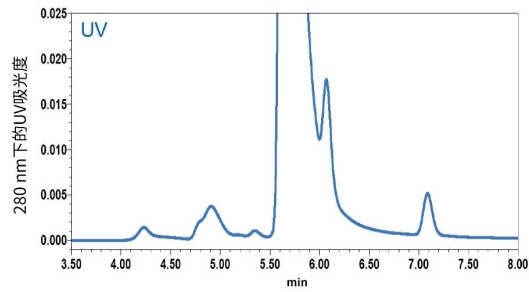
ACQUITY Premier SEC 250 Å, 4.6 × 300 mm, 1.7 μm



ACQUITY BEH 200 SEC, 4.6 × 300 mm, 1.7 μm



ACQUITY Premier SEC 250 Å, 4.6 × 300 mm, 1.7 μm



ACQUITY BEH 200 SEC, 4.6 × 300 mm, 1.7 μm

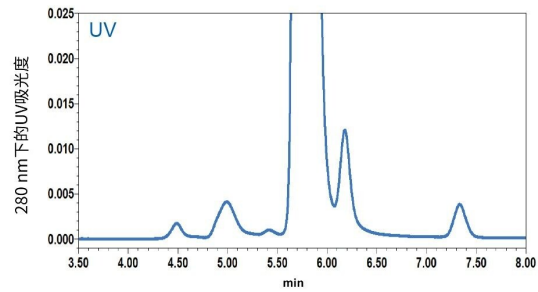
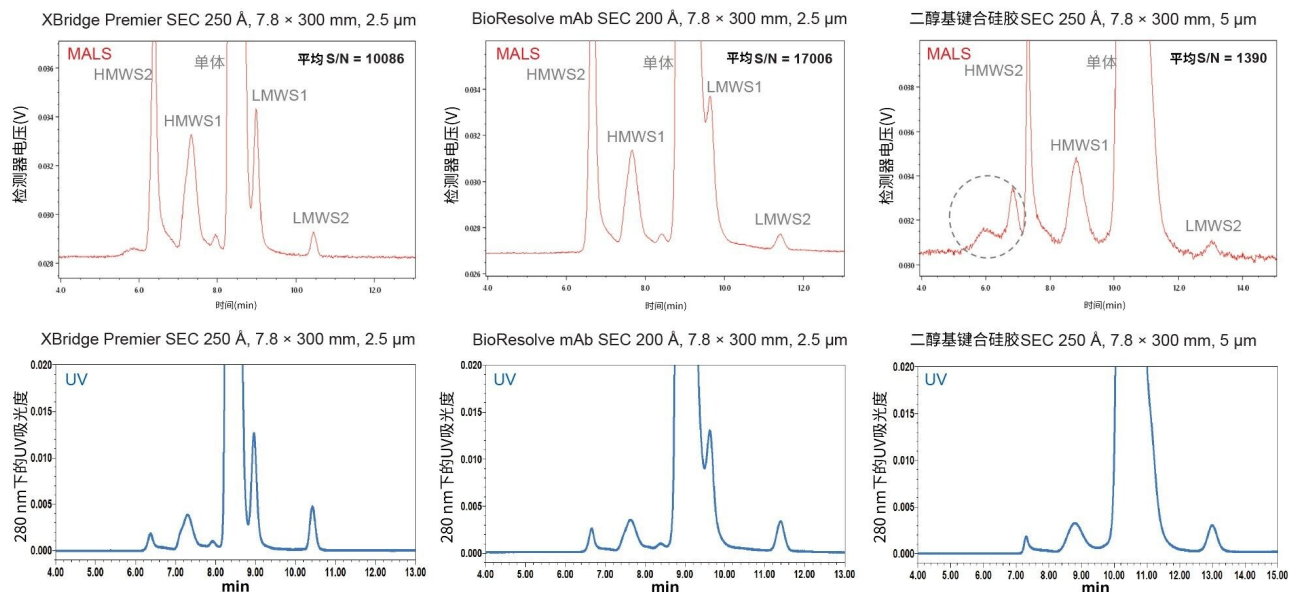


图2. 在使用2 x DPBS作为流动相进行测试的五根SEC色谱柱上分离曲妥珠单抗及其大小异构体。红色迹线（上图）是MALS信号，蓝色迹线（下图）是UV 280 nm信号。

2a. 从两根4.6 x 300 mm, 1.7 μm色谱柱获得的色谱图。

b.



2b. 从三根 $7.8 \times 300 \text{ mm}$, 2.5 或 $5 \mu\text{m}$ 色谱柱获得的色谱图。HMWS: 高分子量物质; LMWS: 低分子量物质。

使用Wyatt的Astra软件处理SEC-UV-MALS实验的数据 (图3和表1)。对于单体和HMWS1 (可能是二聚体) 的分子量, 在所有色谱柱中获得了一致的结果。在测试的色谱柱中观察到LMWS1 MW的变化, 这可能是由于峰大部分在单体峰的尾部下方洗脱。色谱柱之间的LMWS2 MW变化可能是由于峰丰度低。二醇基键合硅胶基质色谱柱上的LMWS2峰上出现较大的MW变化 (图3e), 这可能是信号偏低和噪音偏高双重因素所致。

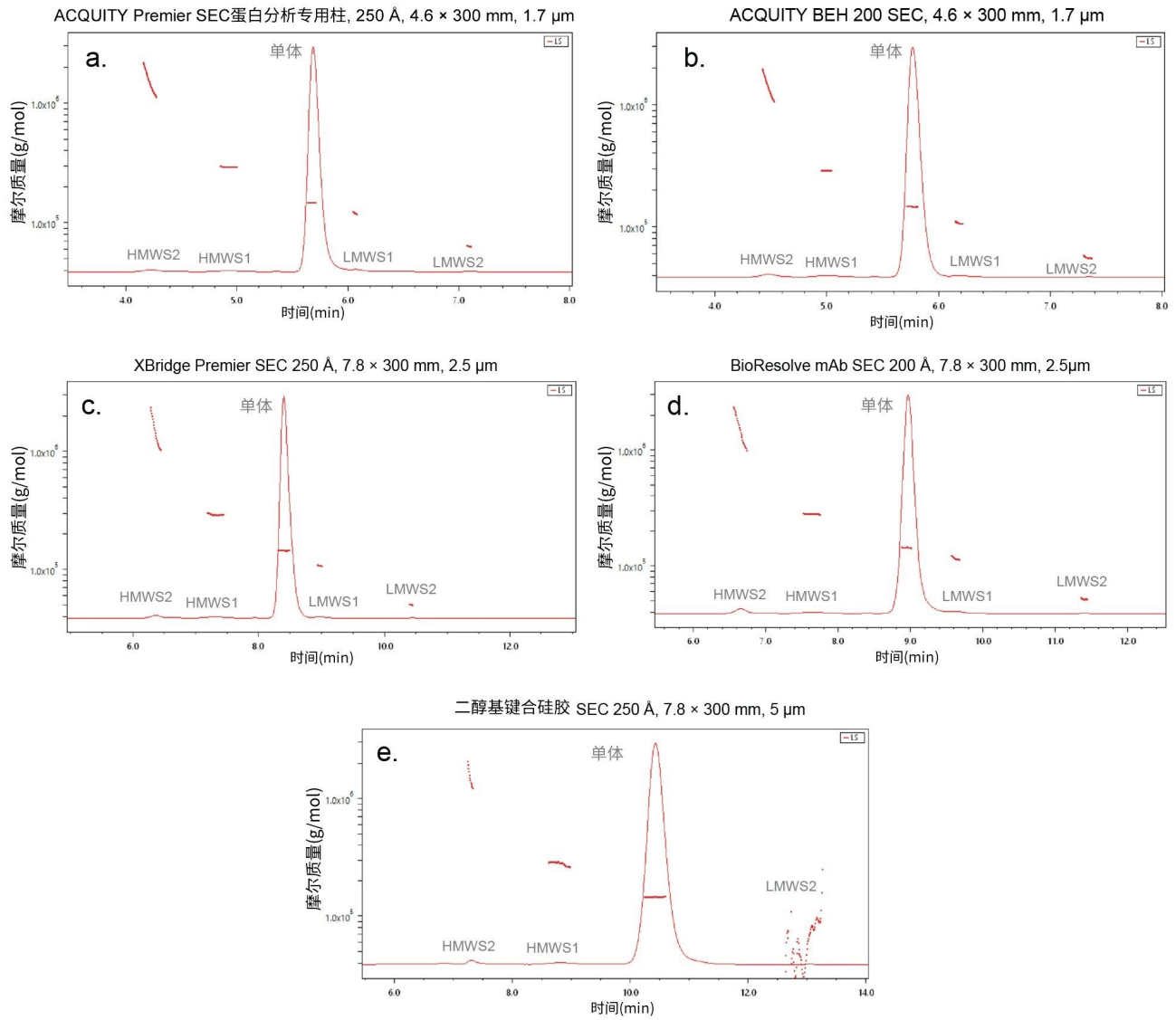


图3.使用以2 x DPBS作为流动相进行测试的五根SEC色谱柱所得的数据，确定曲妥珠单抗及其大小异构体的分子量。使用Wyatt Technology的Astra软件处理数据。结果如表1所示。

分子量 X1000 (g/mol)	Premier SEC 4.6 × 300 mm, 1.7 μm	BEH200 SEC 4.6 × 300 mm, 1.7 μm	Premier SEC 7.8 × 300 mm, 2.5 μm	BioResolve SEC 7.8 × 300 mm, 2.5 μm	二醇基键合硅胶 SEC 7.8 × 300 mm, 5 μm
HMWS2	1444.3	1355.7	1392.1	1425.9	1452.7
HMWS1	289.7	285.8	289.1	277.1	277.0
单体	145.9	145.0	143.1	142.5	144.6
LMWS1	118.9	106.1	106.4	115.4	未检出
LMWS2	62.9	55.4	49.8	51.3	62.0

表1.基于SEC-UV-MALS实验，通过Wyatt的Astra软件确定曲妥珠单抗及其大小异构体的分子量。

结论

SEC-MALS的数据质量对于准确且可重现地测定大分子的分子量和其他生物物理特性至关重要。在本应用纪要中，我们评估了多根色谱柱上的SEC-MALS噪音水平，包括MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用柱（ACQUITY Premier SEC 250 Å, 1.7 μm蛋白分析专用柱和XBridge Premier SEC 250 Å, 2.5 μm蛋白分析专用柱）、ACQUITY UPLC BEH SEC 200 Å, 1.7 μm蛋白分析专用柱、BioResolve SEC mAb 200 Å, 2.5 μm色谱柱和一根二醇基键合硅胶基质色谱柱。数据显示ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱上的SEC-MALS噪音水平略高于ACQUITY BEH 200 SEC蛋白分析专用柱。与二醇基键合硅胶基质250 Å, 5 μm色谱柱相比，ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱的SEC-MALS噪音水平有大幅改善。在曲妥珠单抗大小异构体方面，所有色谱柱上的单体和HMWS1分子量均获得了一致结果。LMWS1和LMWS2 MW在不同色谱柱之间存在差异，分别可能是部分分离和低丰度所致。在二醇基键合硅胶基质色谱柱上，LMWS2峰出现较大的MW变化，这可能是信号偏低和噪音偏高双重因素所致。

参考资料

1. Some D., Amartely H., Tsadok A., Lebendiker M. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *Journal of Visualized Experiments*. 2019; (148), e59615, doi:10.3791/59615.

2. Huang R. Y.-C., Wang F., Wheeler M., Wang Y., Langish R., Chau B., Dong J., Morishige W., Bezman N., Strop P., Rajpal A., Gudmundsson O., and Chen G. Integrated Approach for Characterizing Bispecific Antibody/Antigens Complexes and Mapping Binding Epitopes with SEC/MALS, Native Mass Spectrometry, and Protein Footprinting. *Anal.Chem.*2020; 92, 10709–10716.
3. Koza S. M., Chen W. Improving SEC-MALS Data Quality with Ethylene Bridged Hybrid HPLC Size-Exclusion Columns. Waters Application Note. 2018, [720006289](#).
4. Koza S. M., Yang H., Yu Y. Q. 使用Waters XBridge Premier SEC蛋白质分析专用柱扩展体积排阻色谱平台方法用于单克隆抗体分析的通用性. 沃特世应用纪要. 2022年, [720007500ZH](#).
5. Koza S. M., Yang H., Yu Y. Q. 在生理pH值和离子强度下通过现代体积排阻色谱法分离生物类似药抗体. 沃特世应用纪要. 2022年, [720007484ZH](#).
6. Koza S. M., Yang H., Yu Y. Q. MaxPeak Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱在生理pH条件下分析含聚山梨醇酯(Tween)的单克隆抗体生物类似药时的使用寿命. 沃特世应用纪要. 2022年, [720007523ZH](#).
7. Yang H., Koza S. M., Yu Y. Q. mAb SEC USP专论方法在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上的稳定性. 沃特世应用纪要. 2021年, [720007481ZH](#).

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007670ZH, 2022年7月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)