

生物兼容液相色谱仪与多角度光散射检测器联用测定双抗分子量

LC-305

摘要： 本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器测定双抗分子量，为推断双抗连接情况提供依据。本实验采用体积排阻色谱对双抗样品进行分离，多角度光散射检测器检测分子量。通过谱图得知，此双抗样品（单抗 Fc 端融合型）含 3 个主要成分，多角度光散射检测器测得重均分子量分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，推测双抗样品组成为双抗（Fc 端融合 scFv），单抗（未融合 scFv）和单链抗体 scFv。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可为双抗连接情况的确定提供依据。

关键词： 多角度光散射检测器 双抗 重均分子量

双特异性抗体（以下简称双抗）是同时能够结合两个不同表位或者抗原的抗体，从而阻断或激活双靶点信号通路，介导免疫细胞对肿瘤细胞更好的杀伤，因此可能会获得比单一抗体更好的临床结果，双抗研发也备受关注。

双抗种类繁多，有基于片段化设计的分子，直接将多个抗原结合单元结合在一个没有 Fc 区域的分子上，设计简单，但缺乏 Fc 端，血浆半衰期相对较短，可能存在稳定性和聚集性问题；也有基于保留 Fc 区域设计的对称性分子设计和非对称性分子设计模式，保留 Fc

区域的双抗药物，血浆半衰期较长，可发挥类似于 IgG 的抗体特点。

在双抗产品研发生产过程中，需要对其大小异质性进行分析，反映双抗连接情况，保障产品质量。本文采用体积排阻色谱（SEC）联合多角度光散射检测器（MALS）对单抗 Fc 端融合型对称分子双抗样品大小异质性进行分析，SEC 根据分子量大小分离双抗样品，MALS 检测器测定双抗样品分子量，从而推断双抗样品连接情况。此方法简单高效、准确度高，可用于测定双抗样品分子量。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津生物兼容液相色谱系统（Nexera Bio）。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A	脱气机：DGU-20A _{5R}
输液泵：LC-20AD _{XR}	自动进样器：SIL-20A _{XR}
柱温箱：CTO-20AC	检测器 1：SPD-M20A
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98	检测器 2：MALS*

MALS*：多角度光散射检测器

1.2 分析条件

色谱柱：SHIMSEN Ankylo SEC-300（300 mm × 7.8 mm I.D., 3.0 μm）

岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-01215-10

流动相：A 相：50 mM 磷酸盐缓冲液 + 300 mM NaCl（pH=6.8）

B 相：乙腈

流速：0.7 mL/min 柱温：30°C

进样体积：10 μL 检测波长：260 nm

洗脱方式：等度洗脱，B 相浓度为 10%。

■ 标准溶液和样品配制方法

牛血清蛋白 (BSA) 标准溶液：称取牛血清蛋白 2.000 mg，用超纯水定容至 1 mL，浓度为 2.000 mg/mL。

双抗溶液：双抗样品用超纯水溶解，浓度为 5.000 mg/mL。

■ 结果与讨论

3.1 MALS 测定分子质量原理

当分子被激光照射时，散射光的强度与其分子量有直接相关，这种关系可以用光散射 Rayleigh 方程来进行描述。当从 10° 角（小角度）来测量低浓度样品光散射强度时，Rayleigh 方程可以简化为： $R_{LALS}=k_{opt} \times c \times Mw$ 。其中， R_{LALS} 为小角度散射光强，可由 MALS 检测器检测得到； k_{opt} 为光散射常数； c 为浓度，单位为 mg/mL； Mw 为重均分子量。

如需得到分子量分布，还需浓度型检测器计算不同分子量的占比，所以本文将紫外检测器与 MALS 连用，得到不同分子量占比，计算数均分子量 Mn 、Z 均分子量 Mz 及分子量分布指数。

MALS 测定分子量还需计算仪器响应常数，一般采用已知分子量的同类型标准溶液计算得到，本实验标准溶液为牛血清蛋白溶液。

3.2 牛血清蛋白标准溶液谱图

分析牛血清蛋白标准溶液，已知分子量为 66500，得到谱图如图 1 所示。从图可知，紫外谱图有 3 个峰，保留时间 12.950 min 的主峰为 BSA 主成分，10-12 min 两峰为聚集体。通过 SECview 软件计算得到主成分含量为 86.29%，主成分浓度为 1.726 mg/mL，MALS 仪器响应强度为 2.9626×10^{-7} ，紫外仪器响应强度为 8.8552×10^5 。

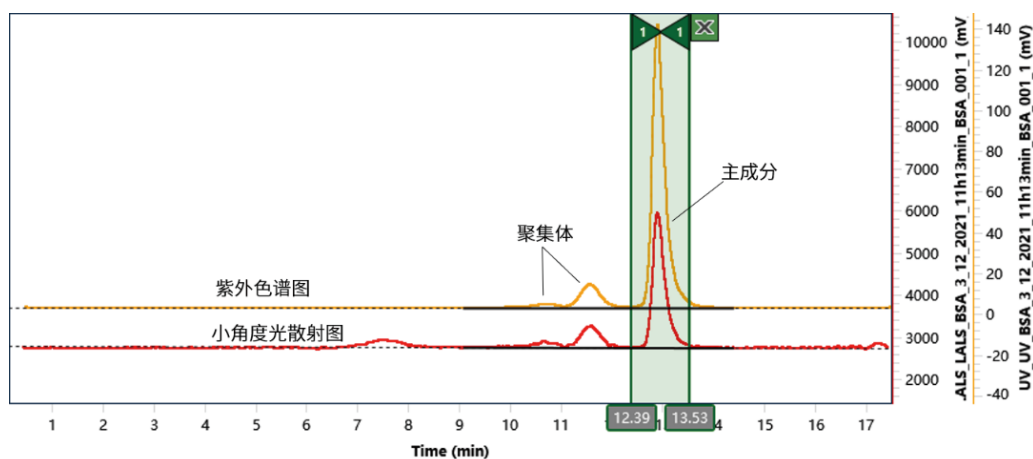


图 1 BSA 溶液谱图

3.3 双抗样品分子量结果

按照 1.2 中仪器方法分析双抗样品，该样品为单抗 Fc 端融合型双抗，得到谱图如图 2 所示。从图中可见：双抗样品共出现 3 个主要色谱峰，通过 SECview 软件计算得到峰 1、峰 2、峰 3 重均分子量 Mw 分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，三峰重均分子量与数均分子量的比值 (Mw/Mn) 均为 1.00，具体分子量分布见图 3。

峰 2 与峰 3 分子量之和为 201522 Da，与峰 1 分子量偏差为 1.92%，故推测峰 1 为双抗（单抗 Fc 端融合 scFv），峰 2 为单抗（未融合 scFv），峰 3 为单链抗体 scFv。

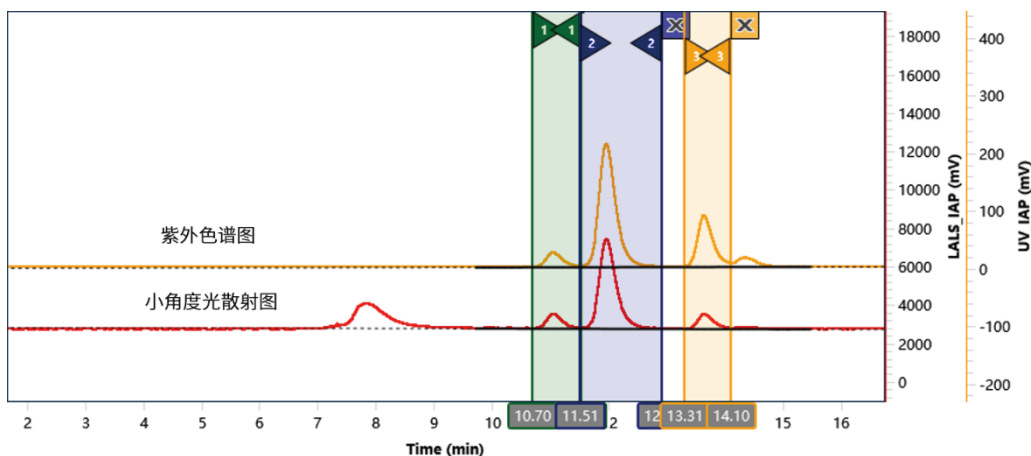


图 2 双抗样品谱图

Peak Number	Left Limit [Min]	Right Limit [Min]	Retention time [Min]	MW by LS [Da]	Mn by LS [Da]	Mw by LS [Da]	Mz by LS [Da]	Mp by LS [Da]
Peak_1	10.699	11.538	11.046	194,882	197,453	197,708	197,951	173,569
Peak_2	11.514	12.912	11.962	145,151	144,757	145,121	145,464	133,651
Peak_3	13.308	14.101	13.641	55,999	56,193	56,401	56,599	48,083

图 3 双抗样品分子量分布

■ 结论

本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio 联合多角度光散射检测器测定双抗分子量，为推断双抗连接情况提供依据。本实验采用体积排阻色谱对双抗样品进行分离，多角度光散射检测器检测分子量。通过谱图得知，此双抗样品（单抗 Fc 端融合型）含 3 个主要成分，多角度光散射检测器测得重均分子量分别为 197708 Da、145121 Da、56401 Da，推测双抗样品组成为双抗（Fc 端融合 scFv），单抗（未融合 scFv）和单链抗体 scFv。此分子量测定方法操作简便，快速，成本低，可为双抗连接情况的确定提供依据。

岛津应用云

