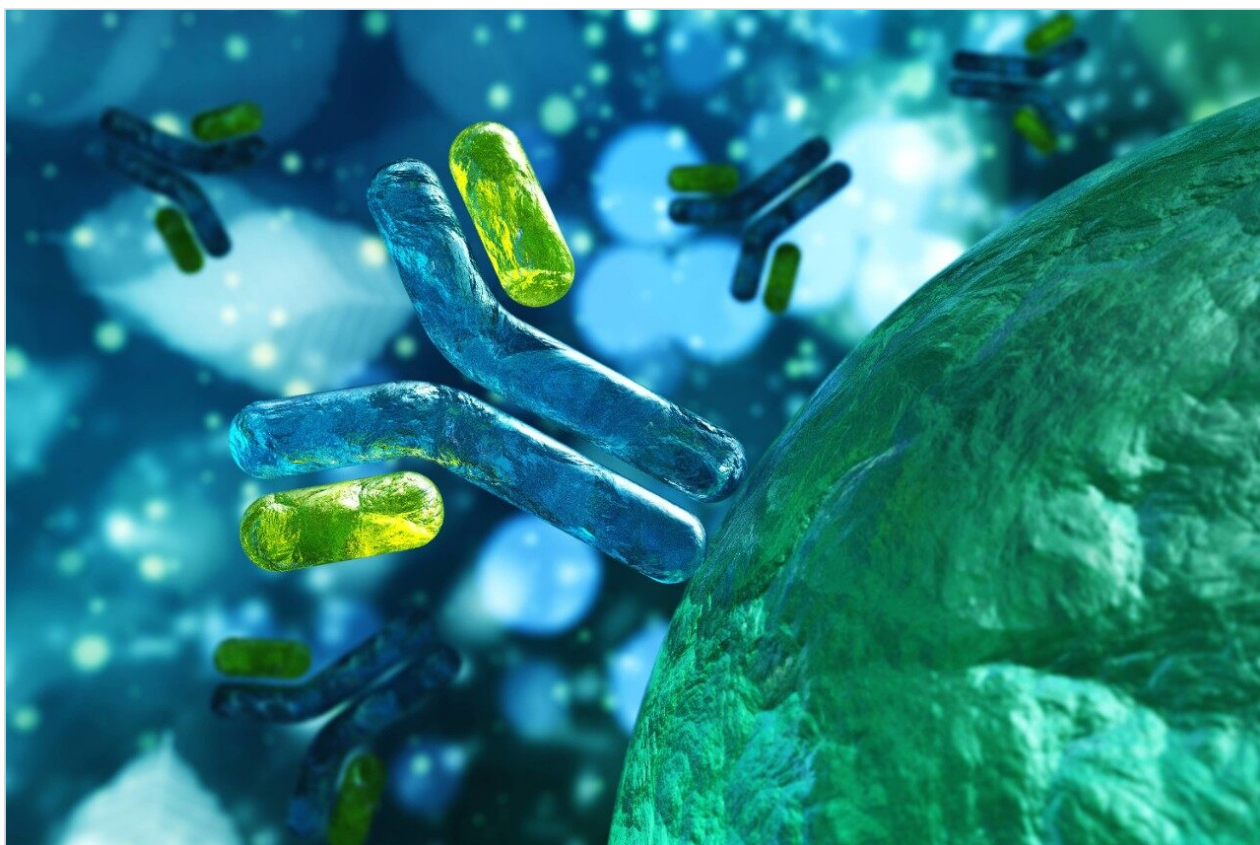


应用纪要

将体积排阻色谱法从标准HPLC系统转移到 Arc HPLC系统

Zhimin Li, Paula Hong, Patricia R. McConville

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报介绍将用于单克隆抗体(mAb)分析的体积排阻色谱(SEC)法从符合行业标准的HPLC系统转移到Waters Arc HPLC系统。使用两套系统获得的保留时间、单体峰面积百分比、高分子量物质、低分子降解物和重现性相当。

优势

- 在标准HPLC系统与Arc HPLC系统之间实现SEC方法的无缝转移
- Arc HPLC系统在对不同大小的单克隆抗体(mAb)进行SEC分析时可获得很小的RSD

简介

体积排阻色谱法是生物制药行业在评估生物治疗药物时常用的一种LC方法。由于SEC法通常使用高浓度盐溶液，因此可能需要首选生物惰性或生物相容性LC系统，但这些系统不一定适用于所有仪器。在进行适当保养的条件下，例如完成分析后冲洗系统，不锈钢LC系统可成功用于SEC分离。

本研究介绍将用于单克隆抗体(mAb)生物治疗药物曲妥珠单抗的SEC方法，从符合行业标准的HPLC系统转移到Arc HPLC系统。已有研究表明，蛋白质聚集体（包括高分子量(HMW)物质）与药物的不良免疫作用和疗效降低有关¹。因此，无论采用何种仪器，SEC方法都应该对HMW物质和其它降解物进行可重现的定量分析。本例将介绍SEC方法在标准HPLC与Arc HPLC系统之间的可转移性。

结果与讨论

蛋白质聚集体（或HMW物质）可能会影响生物治疗药物的安全性和疗效¹。在mAb和其它蛋白质类药物的产品生命周期中，SEC是一种常用的分离方法，通常用于监测是否存在HMW和低分子量(LMW)降解物。LMW降解物通常是由非酶肽键水解所致²。

曲妥珠单抗是一种抗HER2 IgG1 mAb，可治疗乳腺癌³。利用两套HPLC系统，即符合行业标准的HPLC系统和Arc HPLC系统，以SEC方法分析曲妥珠单抗（过期后）。在两套系统中观察到相当的色谱图，具有相似的保留时间和分离度（图1）。在两张色谱图中，单个HMW和LMW峰（标记为“LMW2”）与单体主峰实现了基线

分离。在单体峰附近观察到部分分离的肩峰（标记为“LMW1”）。为进行方法转移，对单体峰进行积分，使其包含此肩峰。

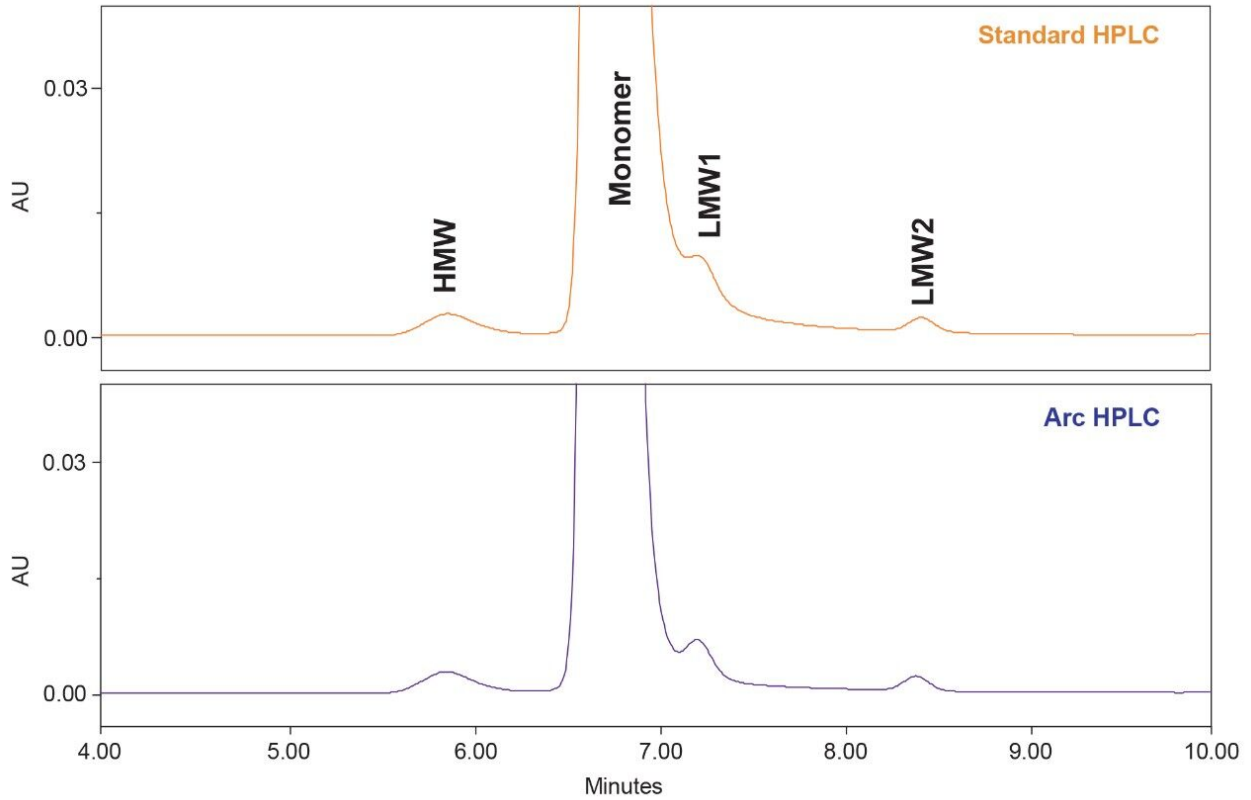


图1.利用标准HPLC系统（上图）和Arc HPLC系统（下图）获得曲妥珠单抗的SEC分离色谱图。（方法：*XBridge BEH SEC 200 Å, 2.5 μm, 7.8 mm × 300 mm*蛋白分析专用柱；20 mM磷酸盐缓冲液/350 mM氯化钠，pH 6.8；10 mg/mL曲妥珠单抗，进样量10 μL；流速1.0 mL/min）

表1和表2分别展示了五次重复进样的平均保留时间(RT)和峰面积百分比，以及相应的标准偏差和RSD百分比。使用这两套系统进行五次进样得到的三个峰中，每个峰的平均RT和RSD百分比相当。所有峰的保留时间漂移约0.02 min，RT重现性在0.1%RSD内。

Retention time (min)	Standard HPLC		Arc HPLC		Difference
	RT	%RSD	RT	%RSD	
HMW	5.89	0.07	5.87	0.06	0.02
Monomer	6.75	0.06	6.72	0.03	0.03
LMW 2	8.43	0.05	8.41	0.03	0.02
Average					0.02

表1.两套系统间曲妥单抗SEC分离的保留时间(RT)重现性(n=5)比较

% Area	HMW			Monomer			LMW2		
	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD	Mean	SD	%RSD
Standard HPLC	0.52	0.01	1.71	99.29	0.01	0.01	0.18	0.00	0.00
Arc HPLC	0.53	0.01	1.04	99.28	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00
Difference	0.01			0.01			-0.01		

表2.两套系统间曲妥单抗SEC分离的峰面积百分比（峰面积%）重现性(n=5)比较

SEC分离的主要目标之一是测量聚集体（即HMW物质）的百分含量。聚集是蛋白质药物开发过程中存在的主要问题，会导致药物产生不良免疫反应和疗效降低。表2总结了单体峰以及HMW和LMW2物质的峰面积百分比和重现性。比较结果显示，两套系统间HMW、单体和LMW2的峰面积百分比差异在0.01%以内，所有分析物的RSD百分比差异在2%以内。

从图1可以看出，与标准HPLC系统相比，Arc HPLC系统上可观察到单体主峰和肩峰LMW1之间的峰谷略深。比较半峰宽（ σ 处峰宽）和4.4%峰高处峰宽（ 5σ 处峰宽）可以看出，Arc HPLC系统得到的峰宽比标准HPLC系统得到的峰宽略窄（表3）。Arc HPLC系统上单体峰的拖尾因子也稍低。总体而言，Arc HPLC系统上单体与LMW1峰之间的峰谷比(p/v)为1.32，而标准HPLC系统上的峰谷比为1.02。Empower色谱数据系统(CDS)可以对这些峰进行积分，方法是在单体峰和LMW1峰之间的峰谷处放置一条垂线，从而指定LMW1的面积百分比。利用标准HPLC系统得到LMW1的峰面积百分比为1.58%，利用Arc HPLC系统时为1.00%，而单体和LMW1的总和保持不变（图2）。本案例研究表明，虽然系统间的色谱性能可能不同，与标准HPLC系统相比，SEC分析在Arc HPLC系统上也可以实现相同甚至更好的性能。

LC systems	Monomer peak			p/v
	width @ σ	width @ 5σ	Tailing	
Standard HPLC	0.40	0.17	1.32	1.02
Arc HPLC	0.37	0.16	1.25	1.32

表3.两套HPLC系统上的单体峰宽（ σ 处峰宽和 5σ 处峰宽）、拖尾以及单体峰和LMW1峰之间的p/v比较

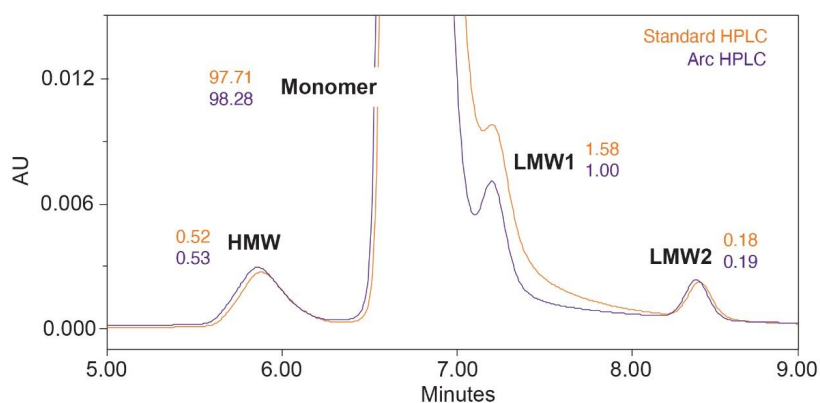


图2.两套HPLC系统上曲妥珠单抗分析中所有物质的峰面积百分比（五次进样的平均值）比较

结论

曲妥珠单抗的SEC方法可成功从符合行业标准的HPLC系统转移到Arc HPLC系统。系统间的保留时间差异在0.02 min以内。两套系统间的关键质量属性，即HMW物质的峰面积百分比差异，在0.01%以内。所有物质的峰面积百分比重现性在2% RSD以内。此外，Arc HPLC系统产生的峰比标准HPLC系统产生的峰略窄，因此单体主峰和肩峰LMW1之间的p/v比更高。

参考文献

1. Rosenberg, A.S. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. *The AAPS Journal*, 2006 ; 8:501–7.
2. Xiang, T.; Lundell, E.; Sun, Z.; and Liu, H. Structural Effect of a Recombinant Monoclonal Antibody on Hinge Region Peptide Bond Hydrolysis. *Journal of Chromatography B*, 2007; 858: 254–62.
3. Koza, S.; Hong, P.; and Fountain, K.J. Size-Exclusion UltraPerformance Liquid Chromatography Method Development for the Analysis of the Degradation Products of the Trastuzumab Antibody. Waters Application Note, 2012, [720004416EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134693747>> .

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

Empower 3 色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720006962ZH, 2020年7月