

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

Stephan M. Koza, Hua Yang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

治疗性蛋白中的自缔合体、聚集体以及片段大小异构体杂质对免疫反应或活动具有潜在的不良影响，因此它们在整个临床前和临床研究阶段以及获批药品中通常被视为关键质量属性(CQA)。体积排阻色谱(SEC)是监测这些杂质的常用方法。由于许多生物制药开发公司的研发流程中往往有多个类似的候选药物（例如单克隆抗体），因此，尽可能采用有效的平台分析方法，可以在方法使用、文档、员工培训和实验室储备方面获得优势^{1,2}。仅使用一种流动相和色谱柱的平台SEC方法应始终提供高分离度和可靠的分离。因此，如果SEC色谱柱可以在更广泛的流动相条件下使用，该平台方法能够分析的化合物数量应该也有所增加。此外，当需要为特定蛋白质重新优化平台方法的流动相组成时，通用性更强的SEC色谱柱可以简化该方法的开发。

本研究评价了20 mM磷酸钠缓冲液(NaPi) (pH范围5.8~7.6) 和氯化钠（浓度范围50 mM~400 mM）对现有生物类似药单克隆抗体的SEC分离效果。我们使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和上一代Waters BioResolve SEC mAb色谱柱(200 Å, 2.5 μm)评估了这些高度变化的SEC洗脱液的性能。

优势

- 使用具有宽范围pH(5.8~7.6)和离子强度（约70 mM~约450 mM）缓冲液的SEC，提高SEC评估治疗性蛋白大小异构体的能力和稳定性

- 在与高效液相色谱(HPLC)兼容的SEC色谱柱上以高分离度分离mAb聚集体和片段大小异构体
- 使用具有Auto · Blend Plus功能的Empower促进QbD方法开发以及稳定性测试
- 提升平台分析SEC方法的通用性

简介

最近使用MaxPeak Premier高性能表面(HPS)硬件和羟基封端聚环氧乙烷(PEO)键合BEH (亚乙基桥杂化有机硅胶) (BEH-PEO)颗粒开发的Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)能够大幅减少与多种分析物蛋白质的非特异性相互作用。这些更改在目前尚未改良不锈钢硬件的沃特世二醇基键合BEH SEC色谱柱上进行,目的是开发出一种具有更高通用性的高效SEC色谱柱,能够使用更广泛的流动相条件(弱碱性pH缓冲液)分析更多种类的分析物。我们在最近的研究中发现,使用Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)作为SEC流动相时,在弱碱性生理pH(约7.4)和离子强度(约150 mM)下,XBridge和ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(2.5 μm和1.7 μm粒径)与采用非金属色谱柱硬件填充交联葡聚糖-琼脂糖颗粒的SEC色谱柱具有相似的惰性³。在同一项研究中,我们还观察到Premier SEC色谱柱与采用不锈钢硬件填充BEH-二醇基颗粒的SEC色谱柱相比,方法稳定性略有提高。

本研究比较了XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱与目前的沃特世二醇基键合BEH SEC色谱柱(Waters BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 μm)的平台能力和通用性。沃特世二醇基键合BEH SEC色谱柱技术还提供了一种表现出平台能力的SEC色谱柱⁴。使用20 mM磷酸钠缓冲液(NaPi)(pH范围5.8~7.6)和氯化钠(粗略浓度范围50 mM~400 mM),通过全因子质量源于设计(QbD)方法,评价了目前在美国上市的四种现有生物类似药单克隆抗体药品(贝伐单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗和曲妥珠单抗)。在pH值和等渗性方面,这些高度变化的SEC洗脱液涵盖了多种mAb和其他重组蛋白药品制剂的缓冲液。

实验

样品描述

生物类似药mAb为贝伐单抗(Mvasi, 25 mg/mL)、英夫利昔单抗(Avsola, 10 mg/mL)、利妥昔单抗(Ruxience, 10 mg/mL),曲妥珠单抗(赫赛汀, 21 mg/mL)是它们的原研生物制剂。所有样品均在经过一次或多次冻融循环后进行了原样分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	带CH-30A APH柱温箱的ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测:	ACQUITY UPLC TUV检测器, 配备5 mm钛合金流通池, 波长: 280 nm和214 nm
样品瓶:	聚丙烯材质12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 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 mm, 配套mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005070) BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300 mm (部件号: 176004595)
柱温:	25 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	2-4 μL
流速:	0.75 mL/min
流动相A:	100 mM一水合磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O), Sigma-Aldrich BioXtra (71507) (经0.1 μm无菌过

滤)

流动相B:	100 mM二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich BioUltra (71643) (经0.1 μm 无菌过滤)
流动相C:	1.00 M氯化钠(NaCl), BioUltra (71376) (经0.1 μm 无菌过滤)
流动相D:	Milli-Q 18 M Ω 水 (经0.1 μm 无菌过滤)

数据管理

色谱软件	具有Auto · Blend Plus功能的Empower 3 (FR 4)
------	----------------------------------------

结果与讨论

缓冲液的pH和NaCl浓度对XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱和BioResolve SEC mAb色谱柱性能的影响

本研究采用全响应面实验设计评价了使用BioResolve SEC mAb色谱柱或XBridge Premier SEC色谱柱时, 缓冲液的pH和NaCl浓度对四种生物类似药mAb样品(贝伐单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗和曲妥珠单抗) SEC分离性能的影响。两种色谱柱的尺寸均为7.8 x 300 mm, 在0.75 mL/min流速下完成评价。使用具有Auto · Blend Plus功能的Empower软件以及浓缩磷酸钠(100 mM NaH_2PO_4 和100 mM Na_2HPO_4)和氯化钠(1.00 mM NaCl), 制备了一系列16个20 mM磷酸钠缓冲液, pH值为5.8、6.4、7.0、和7.6, NaCl浓度为50 mM、100 mM、200 mM和400 mM。表1列出了这些缓冲液的预测离子强度。

mM NaCl	pH			
	5.8	6.4	7.0	7.6
400	420	428	441	452
200	220	228	241	252
100	120	128	141	152
50	70	78	91	102

表1.具有不同浓度氯化钠(*mM NaCl*)的20 *mM*磷酸钠缓冲液的预测离子强度

贝伐单抗(Mvasi, 25 mg/mL)和曲妥珠单抗(赫赛汀, 21 mg/mL)进样2.0 μ L, 英夫利昔单抗(Avsola, 10 mg/mL)和利妥昔单抗(Ruxience, 10 mg/mL)进样4.0 μ L。以5.8、7.6、6.4和7.0的顺序运行pH条件,并在每个pH条件下以200 mM、100 mM、400 mM和50 mM的顺序运行各NaCl浓度条件。每个条件仅分析一次,在每个条件下评价分子量标准品,确认色谱柱性能在整个分析过程中的一致性。BioResolve SEC mAb色谱柱的结果见图1、3、6、7, XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱的结果见图2、4、6和8。对于这些样品,假定HMW2和HMW1主要代表mAb的多聚体形式和mAb的二聚体自缔合形式。在这些样品中还观察到抗体片段LMW1和LMW2。据推测,LMW1主要是mAb铰链区单次裂解的结果,产生约100 KDa的片段,该片段由共价Fc结构域和单个Fab结构域组成,而LMW2主要由单个Fab和Fc结构域组成。

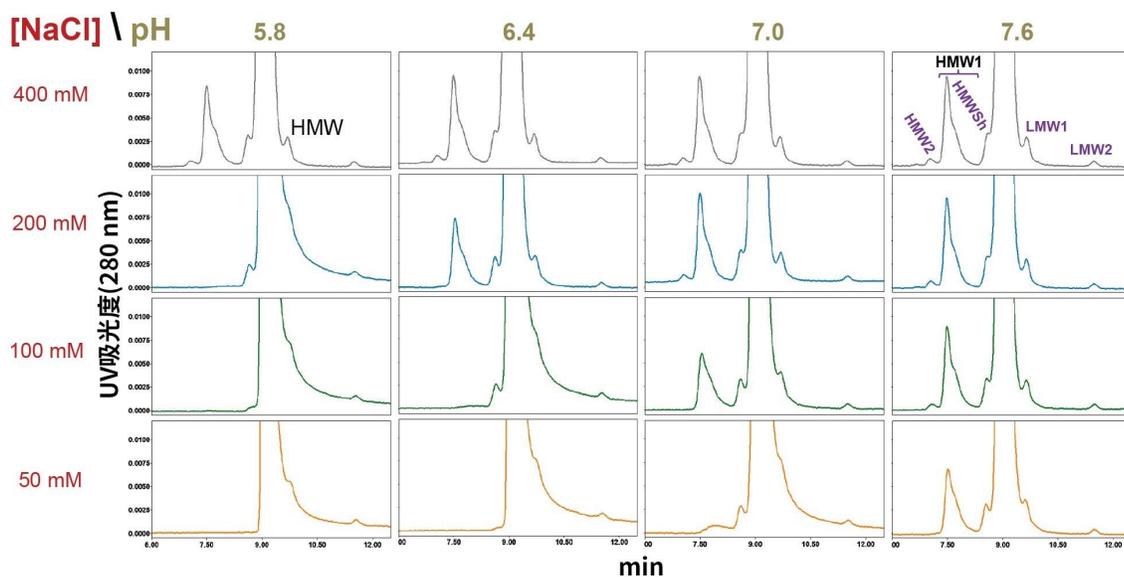


图1. BioResolve SEC mAb 色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的贝伐单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

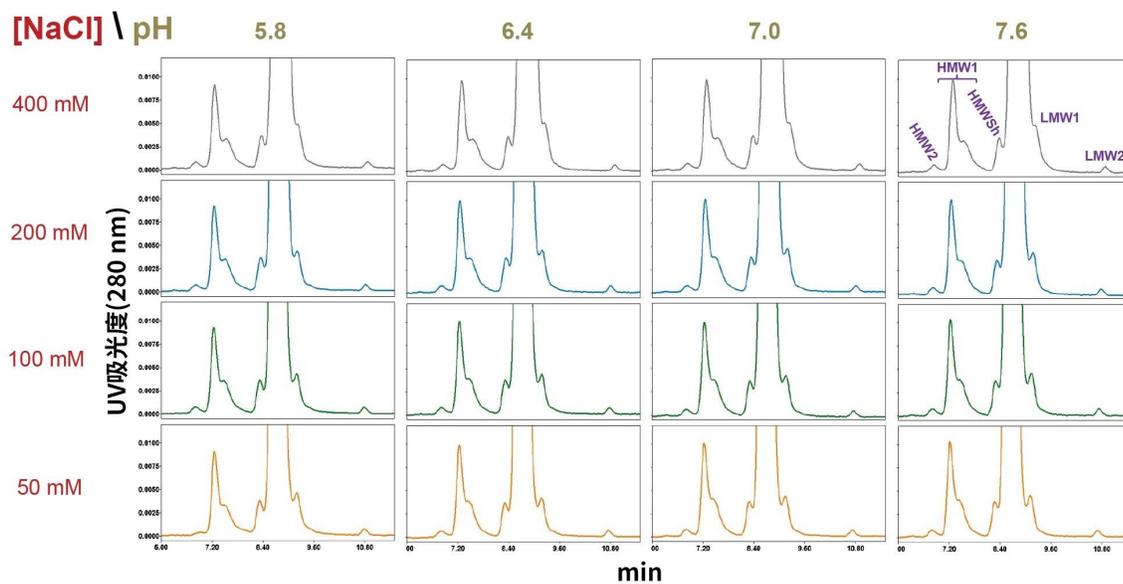


图2.XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的贝伐单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

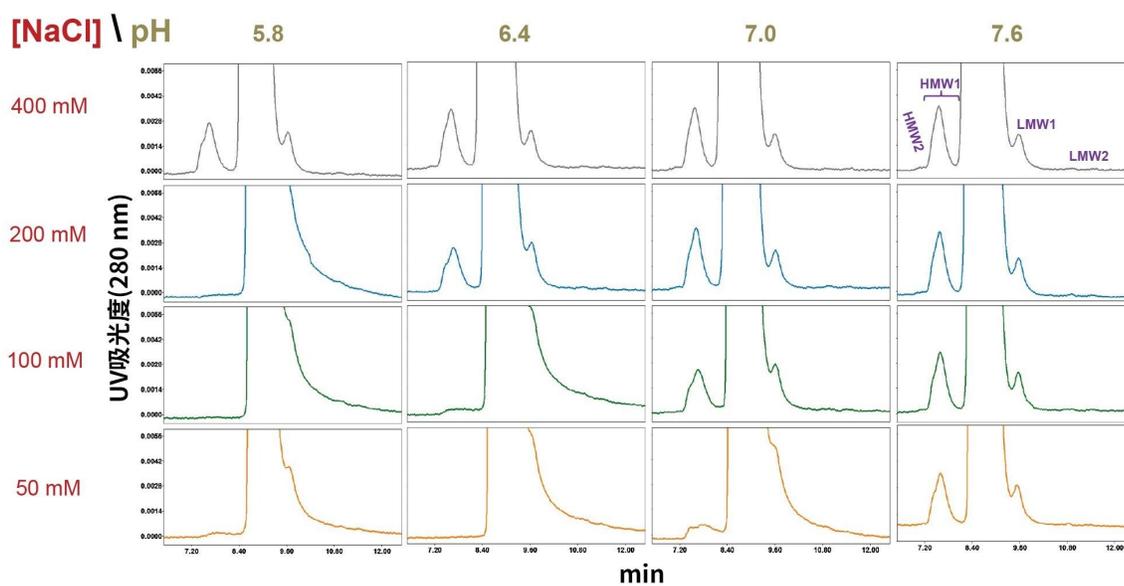


图3. BioResolve SEC mAb 色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的英夫利昔单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

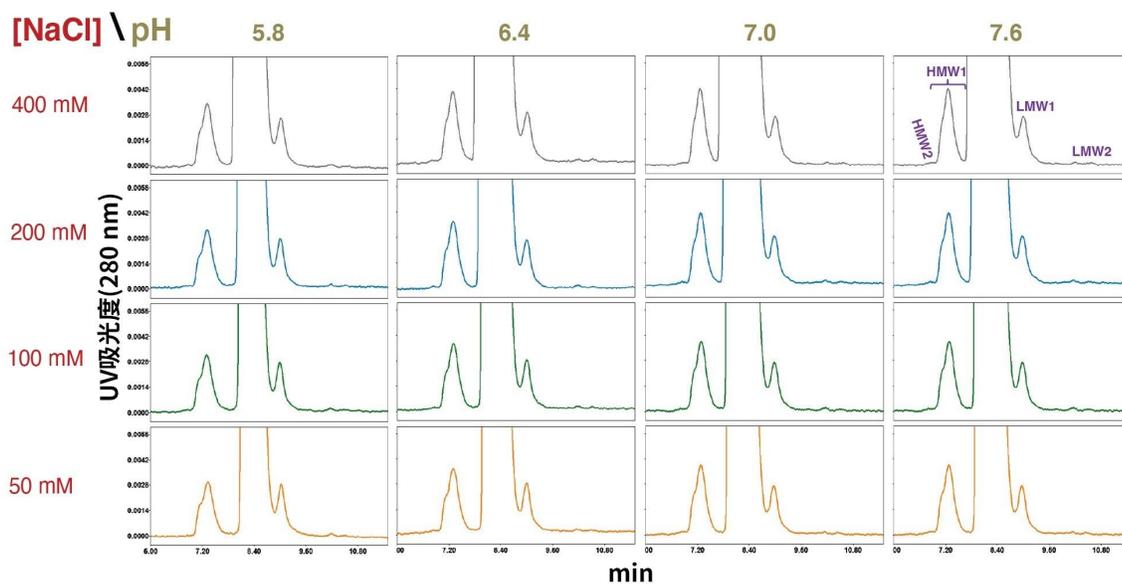


图4.XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的英夫利昔单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。已标记出pH 7.6, 400 mM NaCl色谱图中的峰。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

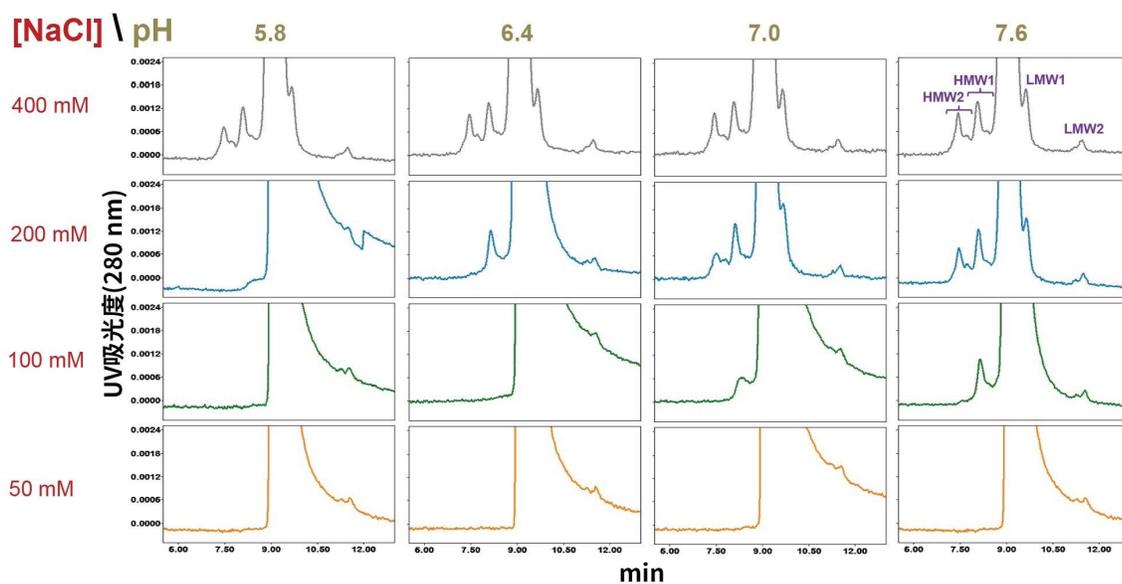


图5. BioResolve SEC mAb 色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的利妥昔单抗药品SEC分离色谱图, pH 值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。已标记出pH 7.6, 400 mM NaCl 色谱图中的峰。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus 功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

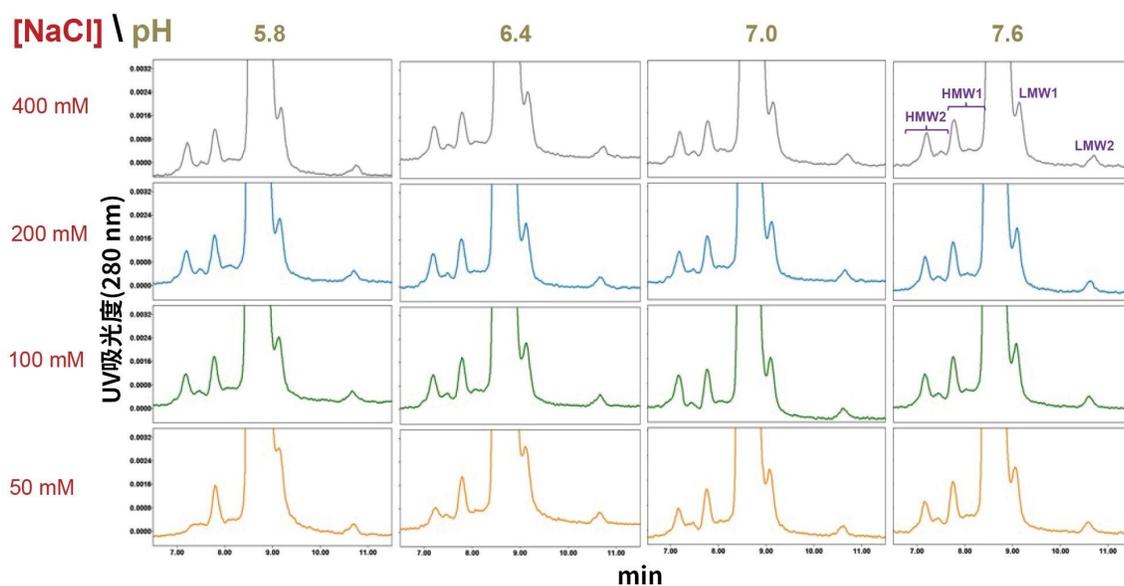


图6.XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的利妥昔单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。已标记出pH 7.6, 400 mM NaCl色谱图中的峰。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用有Auto-Blend Plus功能的Empower的经验数据生成pH和NaCl浓度。

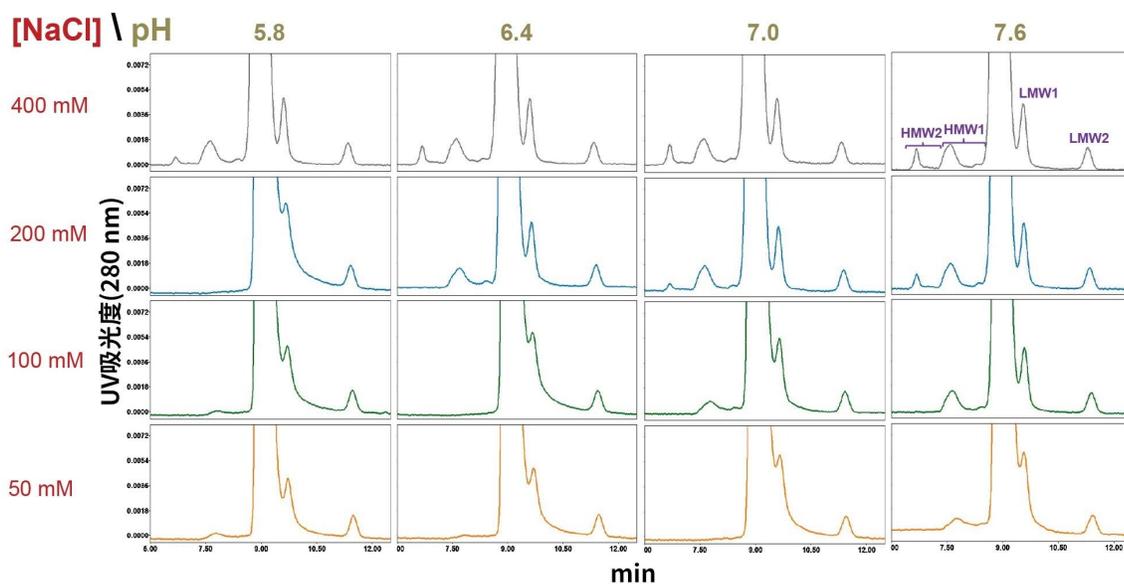


图7. BioResolve SEC mAb 色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的曲妥珠单抗药品SEC分离色谱图, pH 值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。已标记出pH 7.6, 400 mM NaCl 色谱图中的峰。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用Empower AutoBlend+的经验数据生成pH和NaCl浓度。

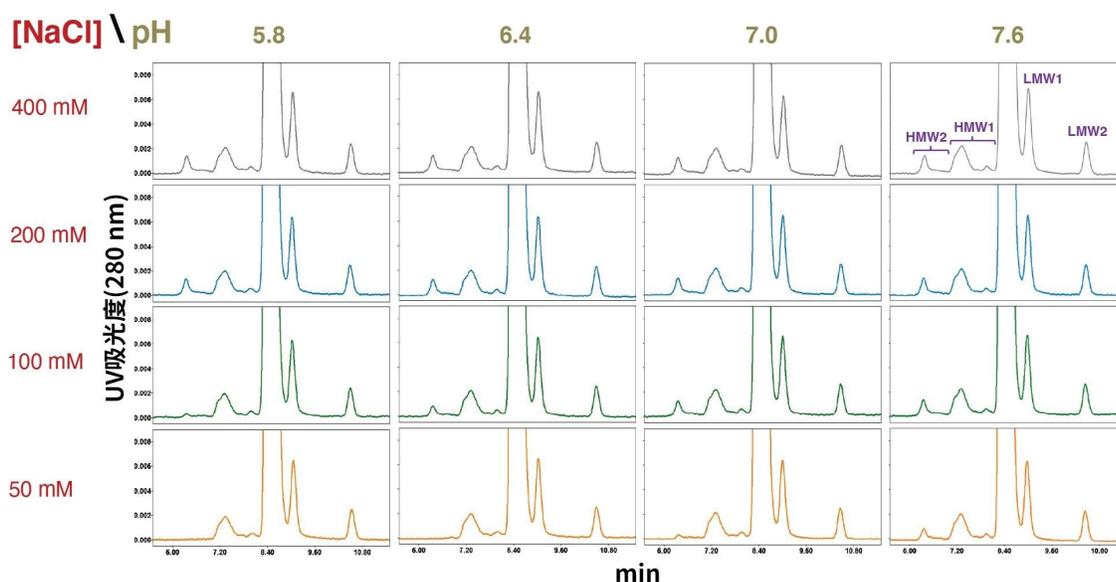


图8.XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm)的曲妥珠单抗药品SEC分离色谱图, pH值范围为5.8~7.6 (20 mM磷酸钠), 氯化钠(NaCl)浓度范围为50 mM~400 mM。已标记出pH 7.6, 400 mM NaCl色谱图中的峰。流速为0.75 mL/min (分析时间15分钟), 使用Empower AutoBlend+的经验数据生成pH和NaCl浓度。

对评价的每种mAb进行了数据分析, 包括确定HMW2、HMW1、LMW2和LMW1的相对峰面积, 以及根据峰谷比(P/V)确定LMW1的分离度。此外还额外评估了贝伐单抗的HMW肩峰(HMWSh), 未评估英夫利昔单抗的HMW2或LMW2, 因为这些大小异构体的丰度(<0.02%)和信噪比(<2)较低。为了评估每种mAb和色谱柱组合的有效操作范围, 在视觉上相似的色谱图中对观察到的HMW和LMW异构体的分离度和相对峰面积进行了积分, 并确定了HMW和LMW形式相对丰度的中值。如果峰面积百分比在中值的10%以内, 则认为pH和NaCl浓度缓冲液成分对HMW1和LMW1有效, 此外, LMW1的峰谷比(P/V)分离度要求大于1.05, 以实现一致的基线下积分。由于HMW2和LMW2的丰度较低, 峰面积百分比必须在中位数的20%以内, 才能认为它们的分离有效。为了直观了解两种色谱柱的通用性, 我们汇编了mAb结果。在第一个汇编中(图9), 我们汇总了在每个NaCl浓度和pH条件下HMW2(适用时)、HMW1和LMW2(适用时)均实现有效定量的mAb数量, 并以热图的形式呈现。在第二个汇编中, 除HMW2、HMW1和LMW2之外, 还要求对LMW1进行有效分析(图10)。

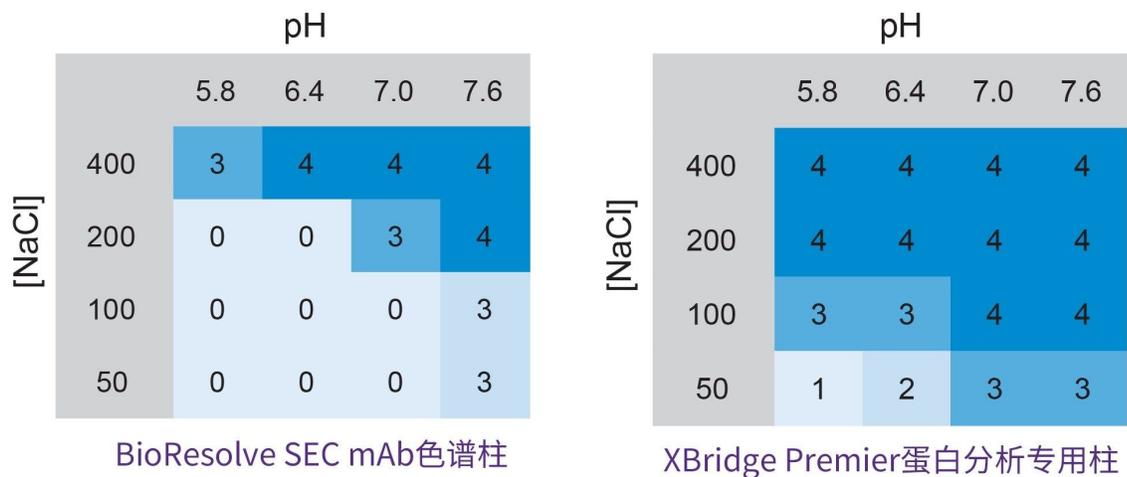


图9. BioResolve SEC mAb和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱对四种生物类似药mAb药品的HMW1、HMW2和LMW2大小异构体（图1至8）进行SEC分析的有效性热图汇编。定量和分离度方面的有效分离评分为1或0，最高得分为4。其他色谱和数据分析的详细信息参见正文。

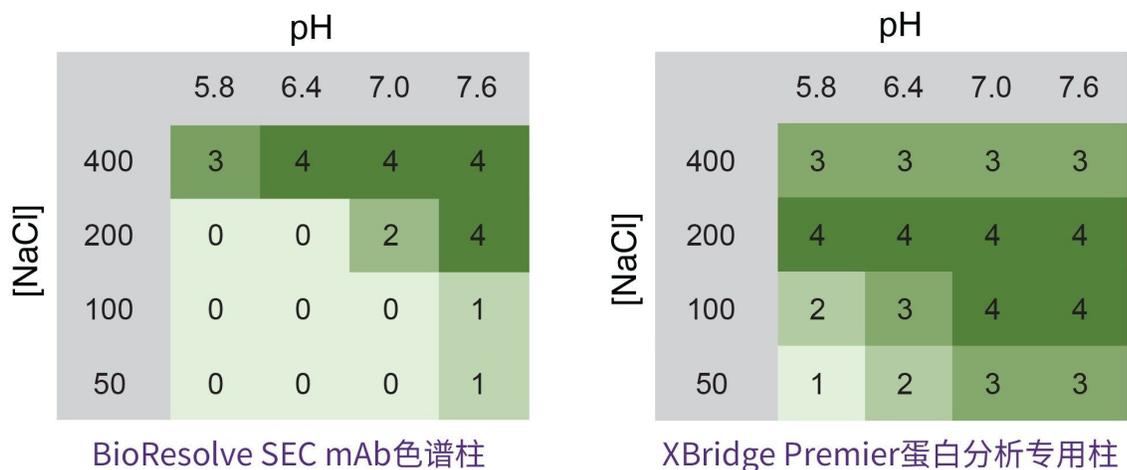


图10. BioResolve SEC mAb和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱对四种生物类似药mAb药品的HMW1、HMW2、LMW2和LMW1大小异构体（图1至8）进行SEC分析的有效性热图汇编。定量和分离度方面的有效分离评分为1或0，最高得分为4。其他色谱和数据分析的详细信息参见正文。

在比较BioResolve SEC mAb色谱柱和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱生成的热图时，突出了XBridge Premier色谱柱在分析总HMW（HMW2和HMW1）和LMW2大小异构体（图8）操作范围方面的显著性能提升。由于在LMW2分析失败的相同条件下HMW分析也同样失败了，图8中的热图也适用于仅分析HMW的SEC方法。

当增加额外的测定要求时，两种色谱柱上LMW1分析的成功次数均有所减少（图9）。最值得注意的是，使用400 mM NaCl时，XBridge Premier SEC色谱柱（图2）在任意pH水平下对贝伐单抗的LMW1分析均失败，虽然LMW1的定量满足要求，但P/V比低于要求(1.05)。由于曲妥珠单抗单体和LMW1在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上从200 mM NaCl到400 mM NaCl条件下的洗脱曲线或保留时间没有变化，因此排除了失败因素为颗粒或键合相收缩或膨胀导致的颗粒孔径等色谱柱特性变化。因此，失败的P/V值很可能主要是由于XBridge Premier SEC色谱柱上贝伐单抗的最大P/V (1.33)是本研究中观察到的最低值，再加上400 mM NaCl下非特异性相互作用的轻微增加、蛋白质构象的变化，或两者兼而有之。

一般来说，当使用较高离子强度（较高NaCl浓度）和较高pH值的流动相时，两种SEC色谱柱的性能相似。当使用生理pH（约7.4）和离子强度（约150 mM）的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)作为SEC洗脱液分析相同的生物类似药单克隆抗体时，这些性能特征也与这些色谱柱的先前结果一致³。此外，在有效条件下进行分析时，两种色谱柱均生成了相当且可重现的HMW和LMW大小异构体定量结果（图11）。不过，与BioResolve SEC色谱柱相比，XBridge Premier SEC色谱柱在使用较低pH值和较低离子强度的流动相时，色谱柱实用性明显更高，表明色谱柱中的不良离子相互作用水平较低。XBridge Premier SEC色谱柱的宽pH范围能力和低离子相互作用水平可能有助于在弱碱性生理pH或弱酸性pH流动相条件下开发通用型平台SEC方法，许多治疗性mAb和其他蛋白类药品能够在更能代表生理条件或制剂缓冲液的离子强度下配制以及操作。

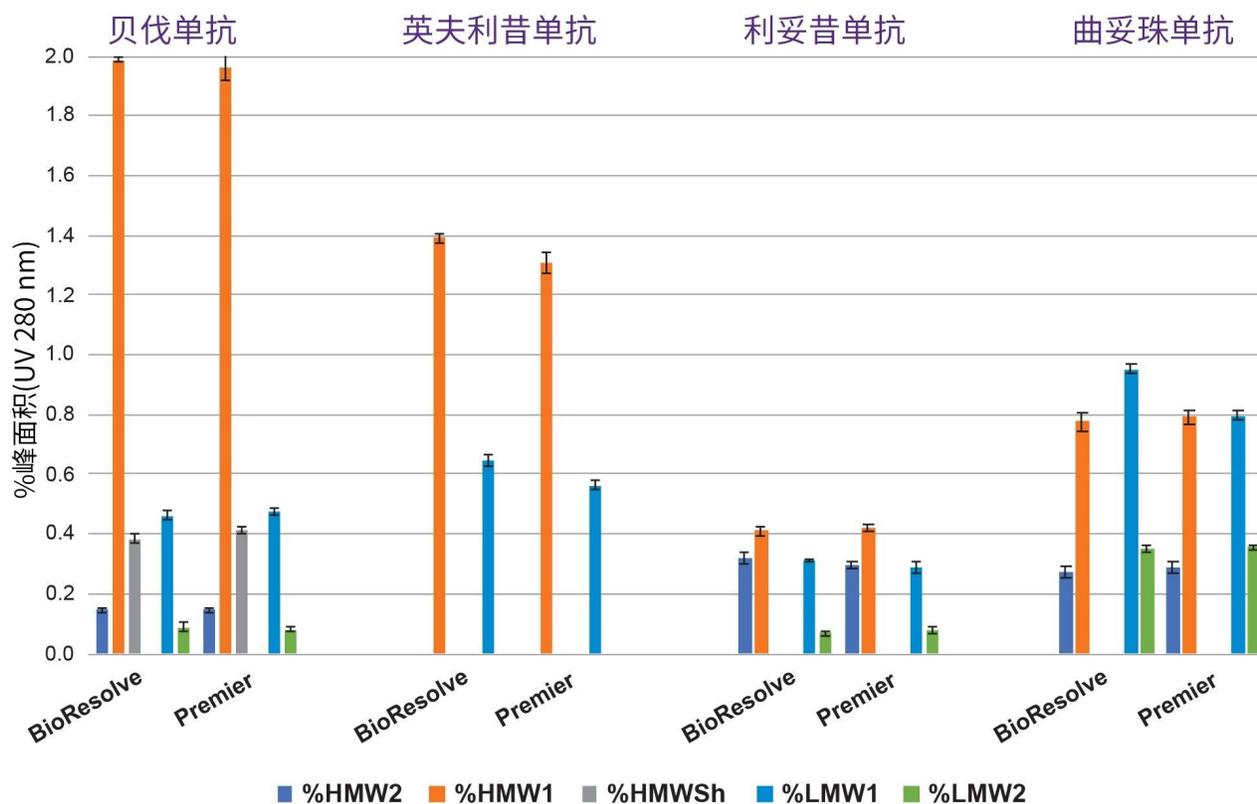


图11. BioResolve SEC mAb与XBridge Premier SEC色谱柱对四种生物类似药mAb药品中HMW1、HMW2、LMW2和LMW1大小异构体（图1至8）的平均相对定量结果对比图。仅对能够有效分离所有四种mAb的流动相条件的结果进行了平均。为HMW2、HMW1和LMW2平均值和标准偏差误差条选择的流动相条件基于图9中所示的热图（BioResolve n=4, XBridge Premier n=10）。LMW1分析基于图10中所示的热图（BioResolve n=4, XBridge Premier n=6）。详细信息见正文。

结论

我们评价了XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm, 7.8 mm x 300 mm)的mAb SEC平台方法能力。与上一代二醇基键合BEH SEC色谱柱相比，该色谱柱在硬件和填料颗粒方面的技术进步已成功用于生产这样一种色谱柱：提供高通量分析的同时还能减少非特异性蛋白质-色谱柱相互作用，且先前已证明可以用作mAb SEC平台方法。BEH-PEO颗粒在碱性pH水平下的性能和稳定性（推荐pH值范围：2.5–8.0）得到了改善，也可以使用

SEC和缓冲液（pH值等于或接近生理pH值（约7.4）或许多蛋白质药物制剂的弱酸性pH值（约6），离子强度为生理离子强度(150-200 mM)及更低，具体数据取决于蛋白质）评估mAb和潜在的其他蛋白质药物HMW和LMW杂质。

XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm, 7.8 mm x 300 mm)填料具有平台分析SEC方法的通用性，也能够加速定制方法开发，同时7.8 mm内径色谱柱还能与HPLC、UHPLC和UPLC色谱系统兼容，额外提供简化的常规方法部署和传输能力^{5,6}。此外，ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 µm, 4.6 mm x 300 mm)具有与XBridge Premier SEC色谱柱相当的惰性，可产生相似结果，且当部署在低扩散UPLC色谱系统上时，预估样品通量增加约30%。

参考资料

1. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and Functional Analysis of Monoclonal Antibodies in Support of Biologics Development. *Protein Cell*. 2018;9(1):74–85.
2. Moore, Rowan. Leveraging Platform Analytical Methods for Biopharma QbD. *Pharma Manufacturing*. <https://www.pharmamanufacturing.com/articles/2017/leveraging-platform-analytical-methods-for-biopharma-qbd/> <<https://www.pharmamanufacturing.com/articles/2017/leveraging-platform-analytical-methods-for-biopharma-qbd/>>
3. Stephan M. Koza, Hua Yang, Ying Qing Yu. Modern Size-Exclusion Chromatography Separations of Biosimilar Antibodies at Physiological PH and Ionic Strength, Waters Application Note, [720007484EN](#), 2022.
4. Renee Yang, Yun Tang, Bing Zhang, Xuemei Lu, Alice Liu, Yonghua Taylor Zhang. High Resolution Separation of Recombinant Monoclonal Antibodies by Size-Exclusion Ultra-High Performance Liquid Chromatography (SE-UHPLC), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 109, 2015, Pages 52–61.
5. Stephan M. Koza, Corey Reed, Weibin Chen. LC系统扩散对抗聚集体和片段SEC分析的影响：基于方法选择最佳色谱柱规格，沃特世应用纪要 [720006336ZH](#), 2019.
6. Pamela C. Iraneta, Stephan M. Koza. 在UPLC、UHPLC和HPLC色谱系统上使用BioResolve SEC mAb色谱柱对mAb聚集体、单体和碎片进行高分离度体积排阻色谱分离，沃特世应用纪要 [720006956ZH](#), 2020.

特色产品

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

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

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

720007500ZH, 2022年1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