

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

Stephan M. Koza, Hua Yang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

在治疗药物中，蛋白质衍生的自缔合杂质、聚合物杂质和片段杂质的状态作为关键质量属性(CQA)，可通过非变性体积排阻色谱法(SEC)进行广泛监测。在现代高样品通量SEC色谱柱上对这些杂质进行准确定量时，通常需要使用偏离制剂缓冲液pH值且具有更高离子强度的流动相，这可能会导致聚集的蛋白在SEC分析过程中解离¹。因此，作为替代方案，我们评价了生理pH值(~7.4)和离子强度(~150 mM)的Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS)作为当前在售的单克隆抗体生物类似药的SEC分析洗脱液，在三根HPLC系统兼容的SEC色谱柱上的使用情况，使用的三根色谱柱分别为Waters XBridge Premier色谱柱（粒径2.5 μm，孔径250 Å）、上一代Waters BioResolve SEC mAb（200 Å，2.5 μm）色谱柱和Cytiva SuperDex 200 Increase色谱柱。此外，我们还与Premier SEC 1.7 μm 粒径UPLC版本的色谱柱进行了比较

优势

- 将等于或接近生理pH值(~7.4)和离子强度(~150 mM)的缓冲液用于SEC，能够更好且更稳定地评价蛋白治疗药物的大小异构体
 - 使用预制的Dulbecco PBS缓冲液作为SEC洗脱液，可加速方法开发，简化常规部署
 - 与填充葡聚糖颗粒的色谱柱相比，使用具有生理兼容性的PBS缓冲液可显著提高SEC分离的样品通量
 - 改进SEC平台分析方法的通用性
-

简介

Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 μm)均为技术升级产品。首先, 色谱柱柱体、末端接头和滤头的金属表面均采用专有化学技术 (MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术) 进行了改良, 旨在大大减少离子间的相互作用以及分析物蛋白质和金属表面的金属络合物形成, 同时保持与金属色谱柱硬件相当的高柱效和可重现的颗粒填充能力。此外, 使用羟基封端的聚环氧乙烷(PEO)取代BEH SEC颗粒的二醇基键合, 进一步使离子和疏水次级相互作用尽可能减少。这些改进为SEC色谱柱带来了许多蛋白质惰性优势, 这些优势可通过使用填充在非金属色谱柱硬件 (如30多年前首次推出的SuperDx 200) 中的交联葡聚糖-琼脂糖来实现¹。而这些现代色谱柱由于BEH颗粒强度更高且粒径更小, 还可以显著提高样品通量。与纯硅胶基质SEC颗粒相比, 亚乙基桥杂化(BEH)颗粒还能够提供更好的长期碱性pH稳定性 (pH范围为2.5~8.0), 但该色谱柱的pH上限小于当前的Cytiva SuperDex 200 Increase色谱柱 (pH范围为3~12)。

为了充分应用这些新色谱柱技术的惰性特性, 我们评估了Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS)在生理pH值(~7.4)和离子强度(~150 mM)条件下, 以及在离子强度120 mM(0.8× DPBS)至300 mM(2× DPBS)的条件下作为SEC流动相的使用情况。pH和等渗性显著偏离制剂缓冲液的SEC流动相可能会改变所评估蛋白质样品的自缔合状态¹。虽然理想情况下应使用与治疗性蛋白制剂缓冲液成分尽可能接近的SEC流动相, 但这通常不容易实现。或者, 可以使用具有生理pH和渗透压代表性的缓冲液, 可能更有望实现有效的SEC分离, 且可能对蛋白质自缔合进行相关性更高的评估。就这一点而言, 使用DPBS作为流动相可提供与血清、间质液和淋巴液一致的pH(7.4)和张力, 静脉给药或皮下给药的肠外治疗蛋白主要暴露在这些体液中。

本研究选择的色谱柱是Waters BioResolve SEC mAb色谱柱 (二醇基键合BEH, 200 Å, 粒径2.5 μm, 不锈钢硬件)、Waters XBridge Premier SEC 250 Å, 2.5 μm蛋白分析专用柱 (PEO键合BEH、MaxPeak HPS硬件) 以及Cytiva SuperDex 200 Increase色谱柱 (玻璃和聚合物硬件中填充有8.6 μm交联葡聚糖-琼脂糖颗粒)。此外, 我们还与Premier 1.7 μm粒径UPLC ACQUITY版本的色谱柱进行了比较。对目前美国市售的四种单克隆抗体(mAb)生物类似药的SEC分离进行了评估。

实验

样品描述

本实验采用的mAb生物类似药为贝伐单抗 (Mvasi, 25 mg/mL)、英夫利昔单抗 (Avsola, 10 mg/mL)、利妥

昔单抗（Ruxience, 10 mg/mL），及其生物原研药曲妥珠单抗（赫赛汀, 21 mg/mL）。所有样品均在一个或多个冻融循环后进行直接分析，未经稀释。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统, 配备CH-30A APH柱温箱
检测条件:	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 mm, 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 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005072) BioResolve SEC mAb色谱柱, 200 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300 mm (部件号: 176004595) Cytiva Superdex 200 Increase 10/300 GL色谱柱, 10 × 300 mm (部件号: 28990944)
柱温:	室温

样品温度:	6 °C
进样体积:	2-10 mL
流速:	0.25 - 0.5 mL/min
流动相A:	磷酸盐缓冲液(DPBS, 10×), Dulbecco配方 10× (Alfa Aesar, J61917) (0.1 μm无菌过滤)
流动相B:	Milli-Q 18 MΩ水 (0.1 μm无菌过滤)

数据管理

色谱软件: Empower 3 (FR 4)

结果与讨论

A. DPBS浓度对XBridge Premier SEC和BioResolve SEC mAb色谱柱性能的影响

在不同浓度的DPBS下, 使用BioResolve SEC mAb和XBridge Premier SEC色谱柱评估了四种mAb生物类似药样品。评估的两种色谱柱尺寸均为7.8 × 300 mm, 流速为0.5 mL/min。与280 nm处的UV吸光度相比, 214 nm处的UV吸光度用于提高低丰度大小异构体的灵敏度。然而, 由于单体峰在检测器的线性范围以上, 因此对于使用的上样量的定量无效。BioResolve SEC mAb色谱柱的结果如图1所示, XBridge Premier SEC色谱柱的结果如图2所示。对于这些样品, 推测HMWS2和HMWS1以mAb的多聚体形式和mAb的二聚体自缔合形式为主。在这些样品中也观察到抗体碎裂为LMWS1和LMWS2。假设LMWS1主要是mAb铰链区中单次裂解产生的约100 kDa片段, 该片段由共价Fc结构域和单个Fab结构域组成, 而LMWS2主要由单个Fab和Fc结构域组成。

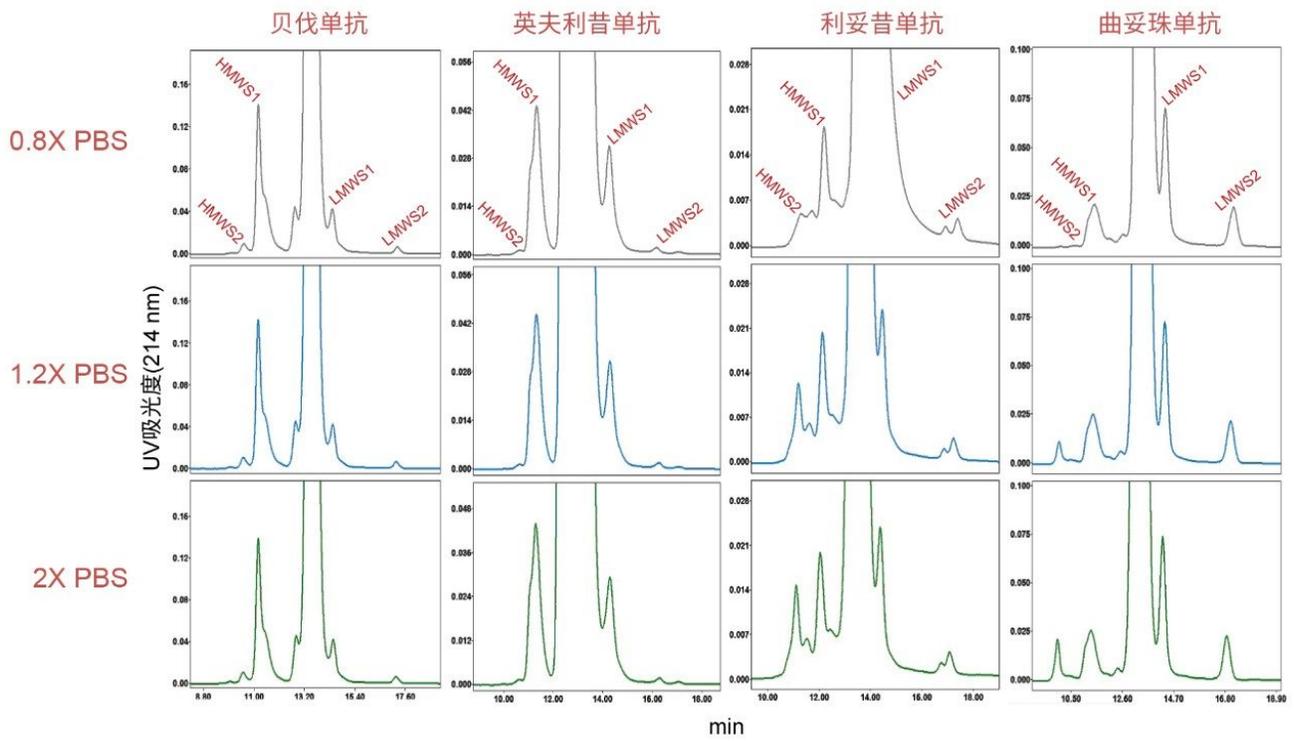


图1.图中展示了使用BioResolve SEC mAB, 200 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300 mm色谱柱在不同浓度的Dulbecco磷酸盐缓冲液中分离mAb生物类似药样品的堆叠图。实验条件见正文。

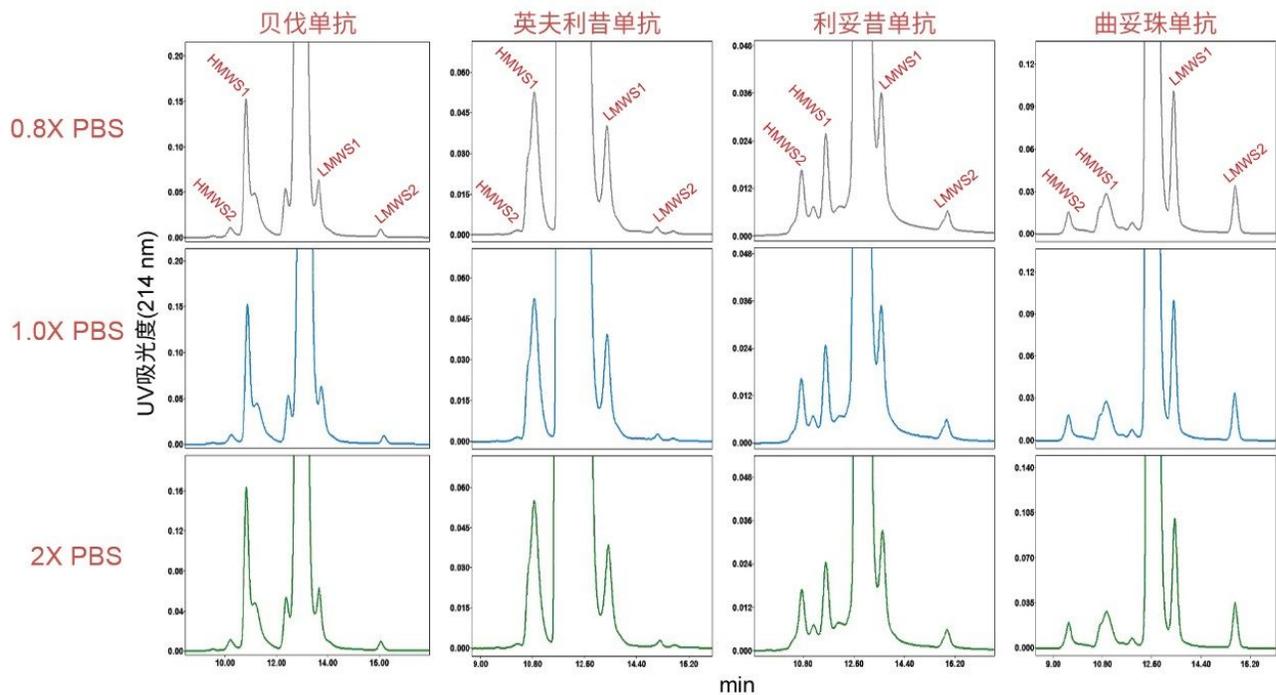


图2.图中展示了使用XBridge Premier SEC 250 Å, 2.5 μm, 7.8 × 300 mm蛋白分析专用柱在不同浓度的Dulbecco磷酸盐缓冲液中分离mAb生物类似药样品的堆叠图。实验条件见正文。

对于贝伐单抗和英夫利昔单抗，在0.8× DPBS~2× DPBS的范围内，观察到两种色谱柱在HMWS回收率和LMWS1片段分离度方面均表现出一致的结果。然而，对于利妥昔单抗和曲妥珠单抗，BioResolve色谱柱的分析结果显示，在0.8× DPBS的条件下，多聚体HMWS(HMWS2)的回收率有明显损失，LMWS1片段的分离度有所降低。对于利妥昔单抗，对BioResolve色谱柱的不利影响在1.2× DPBS浓度下已基本解决，而对于曲妥珠单抗，尽管观察到的趋势表明HMWS2可能在1.5× DPBS的浓度下实现完全回收，但在2× DPBS的条件下可达到最大回收率。然而，随着浓度从0.8× DPBS增加到2× DPBS，XBridge Premier色谱柱上的利妥昔单抗和曲妥珠单抗结果均未发生改变。这些结果表明，与使用不锈钢硬件的上一代二醇基键合BEH SEC色谱柱相比，XBridge Premier色谱柱硬件的表面填料和颗粒减少了与四种mAb生物类似药之间的非特异性相互作用。更具体地说，该结果可能与这些mAb的等电点(pI)相关。报告的曲妥珠单抗(pI=9.1)和利妥昔单抗(pI=9.4)的pI测定值明显比贝伐单抗(pI=8.3)和英夫利昔单抗(pI=7.6)的碱性更高，这可能导致它们与低丰度负电荷（如填充颗粒上的硅醇）发生更强的阳离子相互作用²。这些结果表明，与上一代二醇基键合BEH SEC色谱柱相比，Premier SEC色谱柱为有效分离提供了更广泛的条件，因此，应该更适用于SEC平台分析方法。

B. 使用SuperDx 200 Increase、XBridge Premier和ACQUITY Premier色谱柱，在DPBS条件下分离mAb生物类似药

除了XBridge Premier色谱柱以外，我们还分别使用了Cytiva SuperDx 200 Increase 10/300 GL(8.6 mm, 10 × 300 mm)色谱柱和ACQUITY Premier SEC(1.7 mm, 4.6 × 300 mm)色谱柱，在DPBS(1×)流动相条件下对四种mAb生物类似药进行了分析（图3）。SuperDx色谱柱技术采用葡聚糖-琼脂糖交联颗粒和生物兼容性色谱柱硬件，30多年以来已广泛应用于在生理条件下或接近生理条件下蛋白质和肽的纯化和分析。此外，由于SuperDx色谱柱填充颗粒的可压缩性较强，它与5 mm及更小粒径的硅胶基色谱柱相比，粒径更大，流速限制更低，因此该色谱柱的分析时间更长，它们与蛋白质和肽的非特异性相互作用水平非常低。此外，由于压力效应，较大尺寸的填充颗粒不太可能滤除较大的蛋白质多聚体形式或改变蛋白质自缔合的状态。

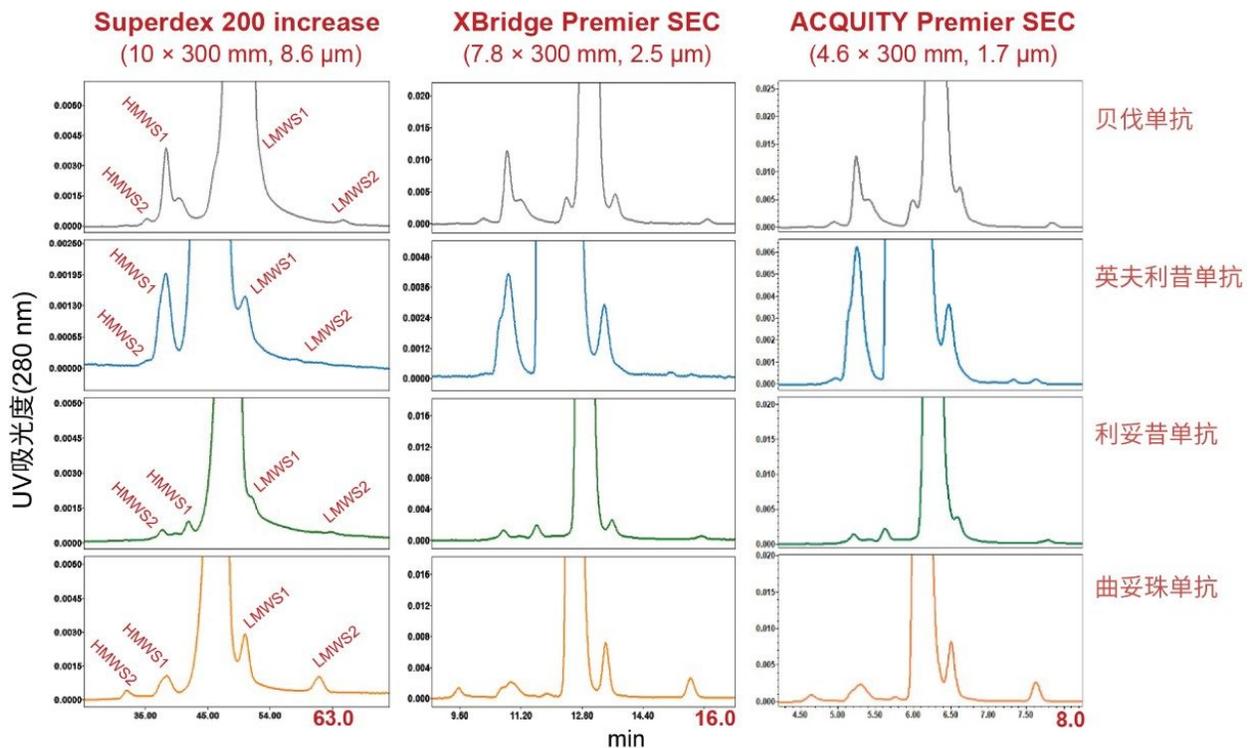


图3.图中展示了使用1× Dulbecco磷酸盐缓冲液作为流动相时，使用选定色谱柱进行mAb生物类似药样品的SEC分离获得的堆叠图。实验条件见正文。

在本研究中，SuperDx色谱柱以0.25 mL/min的流速运行，以尽可能地提高分离度。有研究表明，尽管使用SuperDx和类似的SEC色谱柱的蛋白质-色谱柱相互作用较低，但仍然存在非特异性离子相互作用，导致某些蛋白

质大小异构体无法完全回收³。因此，我们在 $0.8 \times \sim 2 \times$ DPBS的浓度范围下，使用该色谱柱评价了mAb生物类似药，并证实了回收率的可重现性（数据未显示）。因此，在没有分析超速离心(AUC)等其他确证数据的情况下，将使用SuperDx色谱柱观察到的HMWS含量来评估XBridge Premier SEC和ACQUITY Premier SEC色谱柱的柱效。如前所述，XBridge Premier SEC色谱柱的流速为0.5 mL/min。ACQUITY Premier SEC的流速接近于最大值，为0.35 mL/min，是XBridge色谱柱线性速度的两倍。因此，SuperDx 200、XBridge Premier和ACQUITY Premier色谱柱的分析时间分别为100分钟、25分钟和12.5分钟。

使用SuperDx、XBridge Premier和ACQUITY Premier色谱柱得到的mAb生物类似药的色谱图一致（图3），HMWS1和HMWS2的定量结果相当（图4），分离度的主要差异来自于柱效或LC系统扩散。将SuperDx色谱柱上的流速降低到XBridge Premier色谱柱线性速度的30%，可观察到HMWS异构体的有效分离，且LMWS1片段有部分分离，但运行时间增加至大约4倍。为了达到XBridge Premier色谱柱的分离效率，预计需要以降低3倍的线性速度串联运行三根SuperDx色谱柱，这将导致分析时间延长至大约9倍（未进行实验）。

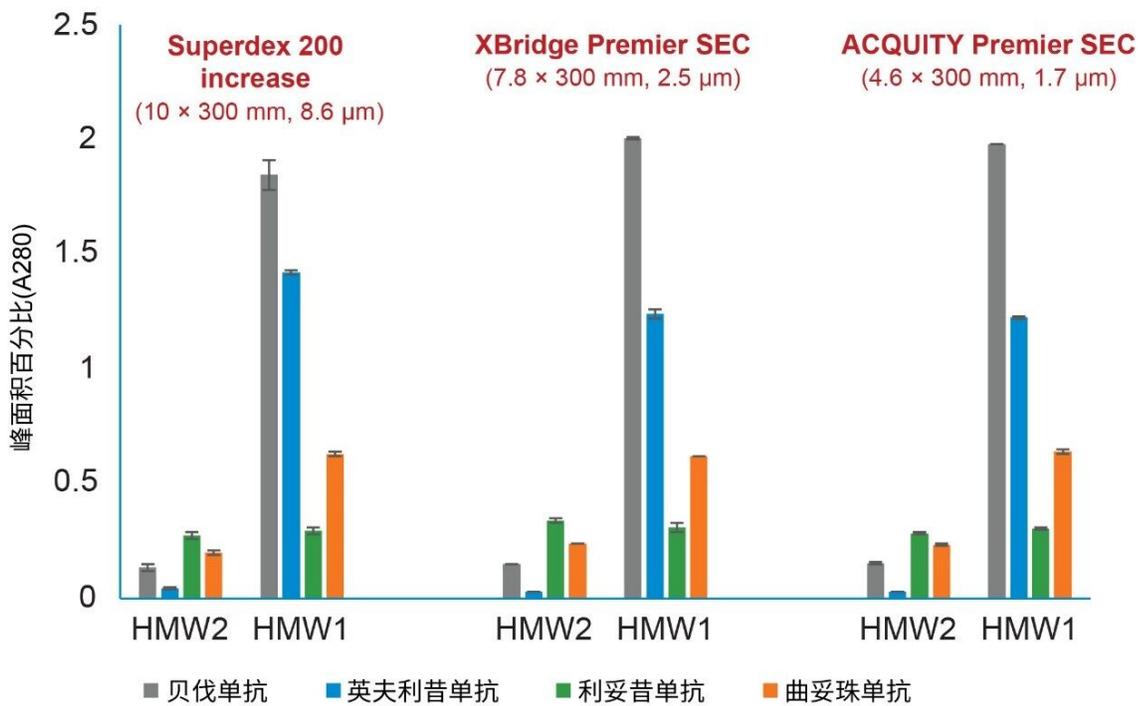


图4.使用1 × Dulbecco磷酸盐缓冲液作为流动相，比较在SuperDx 200、XBridge Premier 250 Å和ACQUITY Premier 250 Å SEC色谱柱上测定的mAb生物类似药HMW1和HMW2大小异构体的相对丰度。色谱图请参见图3。误差条表示重复测量的范围。实验条件见正文。

ACQUITY Premier SEC色谱柱以XBridge Premier SEC色谱柱线性速度的两倍运行，以尽可能地提高样品通量，同样实现了HMWS杂质的有效分离和定量。然而，由于ACQUITY UPLC H-Class Bio系统（配备CH-30柱温箱）线性速度降低更多且存在 5σ 系统扩散(18 μL)，观察到LMWS1片段的分离度显著低于XBridge Premier，原因是后者的内径更大，因此峰体积也更大⁴。

这些结果表明，与葡聚糖-琼脂糖颗粒色谱柱相比，在 $1\times$ DPBS生理缓冲液（pH 7.4，离子强度150 mM）的流动相条件下，使用XBridge和ACQUITY Premier SEC色谱柱可对评价的mAb生物类似药进行有效、稳定的SEC分离，且SEC样品通量显著提高。虽然预计 $1\times$ DPBS缓冲液无法成为所有蛋白质SEC分析的有效流动相，但使用不同浓度的DPBS有可能简化mAb和其他潜在蛋白质的方法开发和转移，并提高易用性。在这些研究中，DPBS浓缩液需经过0.1 μm 无菌过滤，才能用于1.7 μm 粒径的色谱柱，但对于2.5 μm 或更大粒径的色谱柱，通常也可以使用0.2 μm 过滤缓冲液。最后，该数据还表明，在SEC色谱柱开发中应用MaxPeak Premier HPS和BEH-PEO技术可成功减少色谱柱的非特异性蛋白质-色谱柱相互作用，这也可能在开发和部署使用其他缓冲系统的方法时提供一些优势。

结论

与上一代二醇基键合BEH SEC色谱柱相比，XBridge和ACQUITY Premier 250 Å, SEC色谱柱在色谱柱硬件和填充颗粒填料方面取得了显著的技术进步，减少了非特异性蛋白质-色谱柱相互作用。这一改进的性能，可以帮助用户使用SEC在处于或接近生理pH值(~7.4)和离子强度(~150 mM)的缓冲液条件下评估蛋白治疗药物的HMWS和LMWS，如本文中测定的mAb生物类似药所示。在这些研究中，就非特异性相互作用而言，XBridge和ACQUITY Premier SEC色谱柱的性能与填充葡聚糖-琼脂糖交联颗粒的SuperDx 200 SEC色谱柱相当，同时还显著提高了样品通量。XBridge和ACQUITY Premier SEC色谱柱使用预制的Dulbecco PBS或其他缓冲液体系分析单克隆抗体和其他治疗性蛋白大小异构体 (~10 KDa至650 KDa)，可改善SEC平台分析方法的通用性，加速方法开发，简化常规部署。

参考资料

1. Tsutomu Arakawa, Daisuke Ejima, Tiansheng Li, John S. Philo. The Critical Role Of Mobile Phase Composition In Size Exclusion Chromatography Of Protein Pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 99, Issue 4, 2010, Pages 1674–1692.

2. Alexandre Goyon, Melissa Excoffier, Marie-Claire Janin-Bussat, Balazs Bobaly, Szabolcs Fekete, Davy Guillaume, Alain Beck. Determination Of Isoelectric Points And Relative Charge Variants Of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Journal of Chromatography B*, Volumes 1065–1066, 2017, Pages 119–128.
3. Jie Wen, Tsutomu Arakawa, John S. Philo. Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions, *Analytical Biochemistry*, Volume 240, Issue 2, 1996, Pages 155–166.
4. 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：基于方法选择理想色谱柱规格，沃特世应用纪要，720006336ZH，2019.

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>>

720007484ZH，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