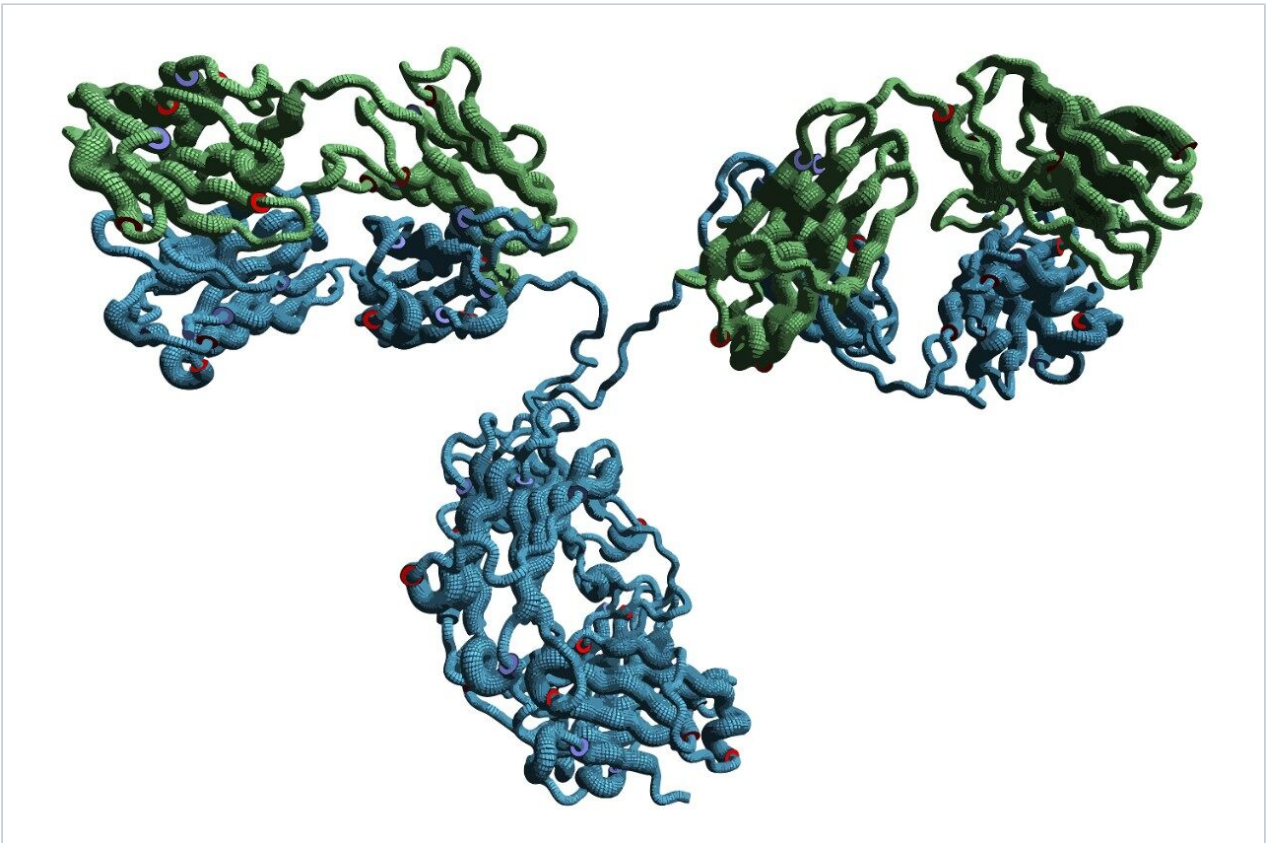


应用纪要

BioResolve SEC mAb保护柱在样品生产工艺和制剂开发中的应用

Stephan M. Koza, Weibin Chen

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

蛋白类生物治疗药物的开发通常使用体积排阻色谱(SEC)来评估蛋白质的自缔合和裂解情况。但是，样品在加工过程中纯化和制剂开发通常会导致目标蛋白质进入溶液形成沉淀，大幅降低SEC色谱柱的使用寿命。本文介绍BioResolve SEC mAb, 200 Å, 2.5 μm保护柱在有效保护BioResolve SEC, 2.5 μm, 7.8 x 300 mm分析柱方面的运用，并且对分离度的影响非常小。此外，本文证明，2.5 μm粒径色谱柱与1.7 μm粒径色谱柱相比，对带有悬浮蛋白质沉淀物的样品的预测容差有所提高。

优势

- 对有可能沉淀的蛋白样品进行高通量SE-HPLC分析
- 与UP-SEC相比，SE-HPLC色谱柱对蛋白沉淀进样导致的分离度损失的容差有所提高

简介

蛋白质的自缔合形式或高分子量物质(HMWS)通常用作评估蛋白类生物治疗药物的关键质量属性(CQA)，因为它们会影响治疗的安全性和有效性¹。考虑到SEC具有出色的可靠性和样品通量，因此仍将该方法用作评估蛋白质自缔合的主要方法之一²。不过一定要结合补充方法（例如分析超速离心(AUC)）以确认SEC测定方法的准确性³。SEC方法在蛋白质碎片水平或低分子量物质(LMWS)测定方面的使用也有所增加，尤其是用于单克隆抗体治疗药物⁴。由于研究人员对提高样品通量的需求日益增加，因此柱效更高、粒径更小（亚2 μm）的超高性能SEC (ultra-performance SEC, UP-SEC)色谱柱成为必备工具。UP-SEC色谱柱（内径4.6 mm）使用的填料也更小，相比使用较大粒径填料的高性能SEC (high-performance SEC columns, SE-HPLC)色谱柱(7.8 mm)，前者对LC系统低扩散的要求更高⁵。

除了对LC系统扩散的容差更低之外，为了保持优异的分度，UP-SEC色谱柱对保护柱的性能要求也更高。因此，UP-SEC需要高效保护柱。在此前发布的一篇文章中，介绍了2.5 μm粒径、7.8 mm内径的SE-HPLC色谱柱对单克隆抗体的分度，与UP-SEC色谱柱相当，分析时间略有增加⁶。出于相同的原因，7.8 mm内径的SE-HPLC色谱柱可以在具有更高扩散的LC系统上有效使用，对SE-HPLC保护柱的效率要求更低。此外，由于HP-SEC色谱柱的粒径较大，与1.7 μm粒径的色谱柱相比，我们观察到对带有悬浮蛋白质沉淀物的样品的预测容差有所提高。当待测蛋白质样品的颗粒物含量水平不确定时，应考虑上述属性。

结果与讨论

评估了执行悬浮蛋白质沉淀物进样时，BioResolve SEC mA, 200 Å, 2.5 μm保护柱（部件号：[186009443](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009443) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009443>>）保护7.8 x 300 mm BioResolve SEC mAb色谱柱（部件号：[186009441](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009441) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009441>>）的有效性。此外，还比较了BioResolve SEC mAb, 2.5 μm保护柱和ACQUITY BEH UPLC SEC, 200 Å, 1.7 μm蛋白分析专用保护柱（部件号：[186005793](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005793) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005793>>）对沉淀蛋白进样的敏感性。在80 °C下，对BEH200 SEC蛋白质混标（部件号：[186006518](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186006518) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186006518>>，复溶于500 μL水中）以800 RPM的速度在定轨摇床上降解处理30分钟，产生沉淀蛋白。使用过期的Erbix（西妥昔单抗）样品制成浓度为2 mg/mL的液体制剂以评估分离性能。

评估BioResolve SEC mAb保护柱对西妥昔单抗分离的影响（图1）。实验详情见图1说明。我们观察到保留时间的预期增加以及分离质量的微小变化。安装保护柱后，HMWS1的分离度(USP)不变，LMWS1的峰谷比(P/V)略有下降。鉴于LMWS1的含量水平为0.5%，P/V值稍微下降很可能是由于扩散效应导致低水平拖尾程度增加的结果¹。

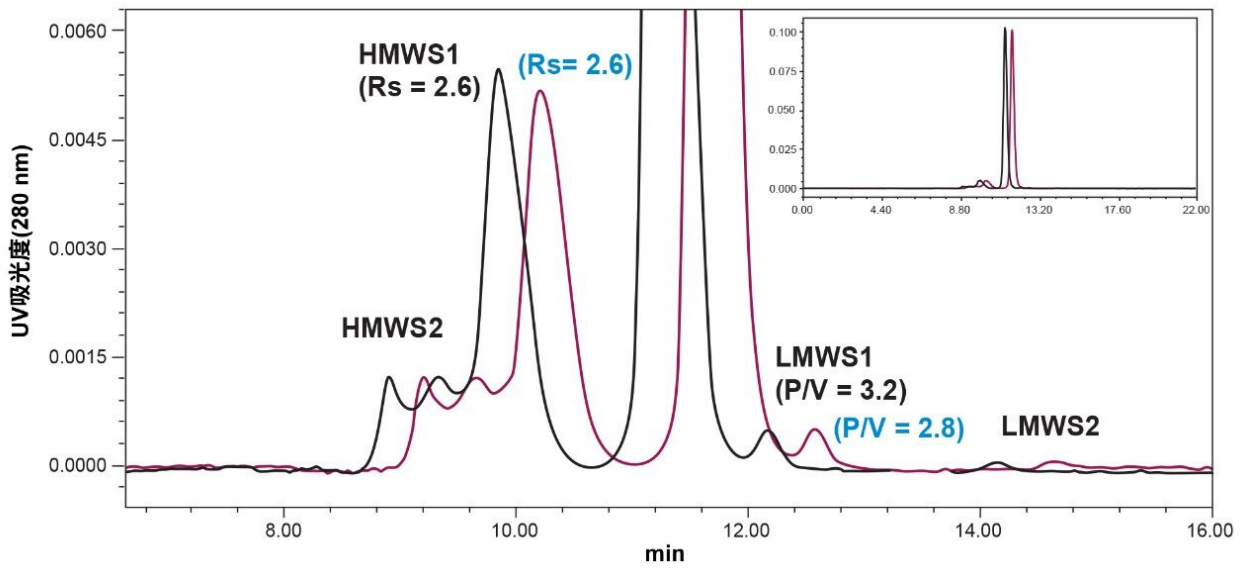


图1. 安装BioResolve SEC mAB保护柱（蓝色）和没有安装保护柱（黑色）的情况下，使用 $2.5\ \mu\text{m}$ 粒径的 $7.8 \times 300\ \text{mm}$ BEH SEC色谱柱分离 $2\ \text{mg/mL}$ 西妥昔单抗样品（进样体积为 $14\ \mu\text{L}$ ）的SEC重叠色谱图。图中显示了HMWS1分离度(R_s)和LMWS1的 P/V ，以及峰面积百分比。流速为 $0.575\ \text{mL/min}$ ，流动相为 $50\ \text{mM}$ 磷酸钠和 $200\ \text{mM}$ 氯化钾， $\text{pH}\ 7.0$ 。使用Empower 3控制的H-Class Bio UPLC系统执行分析。

接下来，在已安装保护柱的情况下，向色谱柱进样一系列 $14\ \mu\text{L}$ 降解蛋白质标准品，每进样20次后评估西妥昔单抗的分离情况（图2）。在40次降解蛋白质标准品的进样过程中，我们观察到HMWS1的分离度稳定下降。此外，HMWS1和HMWS2的色谱图也发生了一些变化。需要注意的是，在这些研究中，HMWS2和HMWS1的峰面积百分比一直在变化，主要是由于这些自缔合形态的高含量和不稳定性所致。HMWS2和HMWS1的高含量是冻融循环造成的，在临床应用时不建议本产品使用此循环。因此不报告这些值。

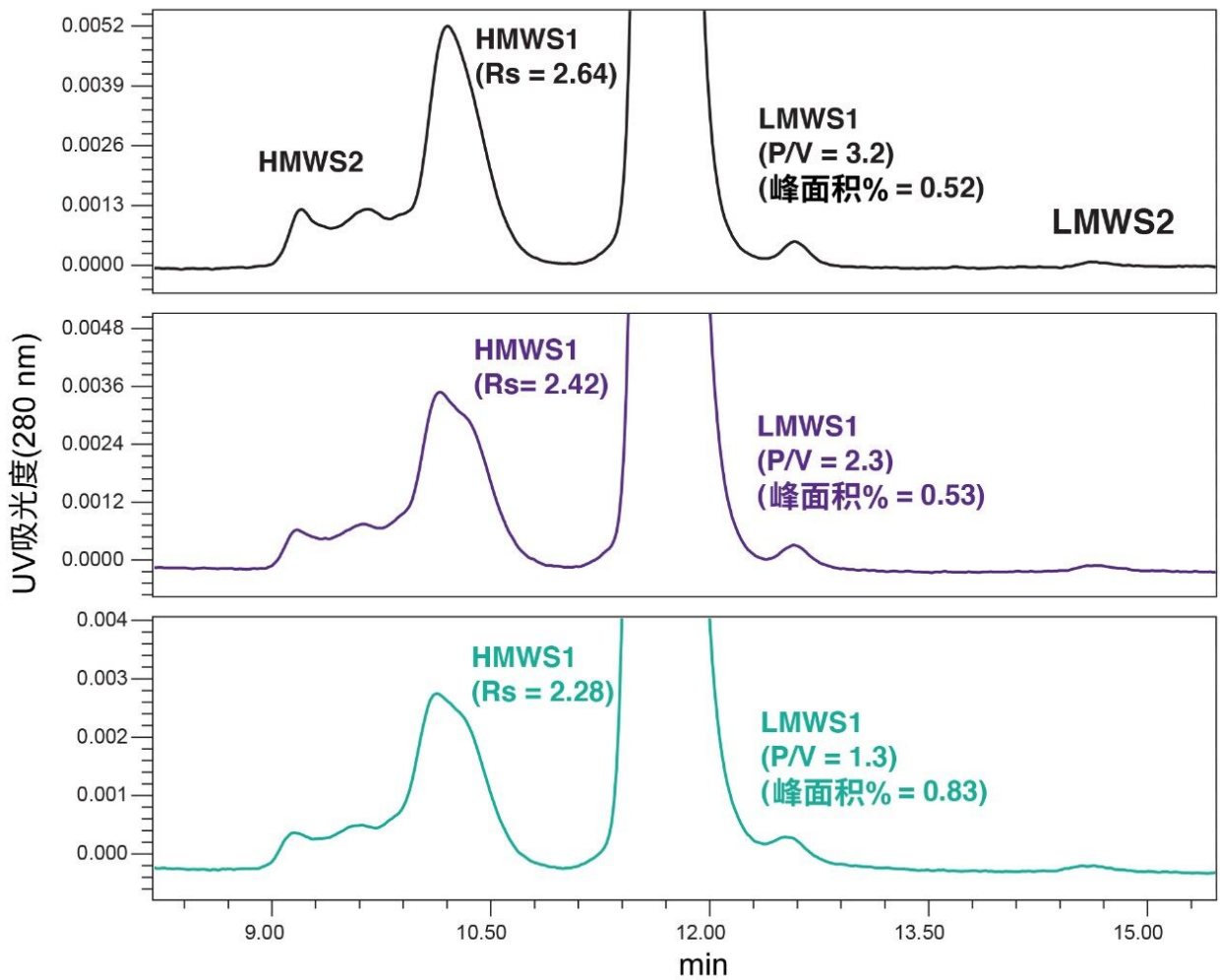


图2.最初使用SEC分析柱和BioResolve保护柱进行西妥昔单抗SEC分离的结果（黑色），以及随后进样20次（蓝色）和40次（绿色）14 μ L降解SEC蛋白质标准品的SEC分离结果。其他实验条件见图1说明。

同样观察到LMWS1的P/V降低，更值得注意的是，测得LMWS1的峰面积百分比增加60%。这很可能是单体峰的低水平拖尾程度增加的结果。请注意，对于mAb治疗药物，LMWS1的含量可能被视为一项CQA。

更换结垢的保护柱，然后重新评估西妥昔单抗的分离结果（图3）。如图所示，色谱性能大幅提高。虽然HMWS1的分离度和LMWS1的P/V没有完全恢复到初始水平，但之前的大多数性能都已恢复，而且LMWS1峰面积百分比的大幅增加被逆转。这些数据表明，在分析含有沉淀蛋白的样品时，BioResolve SEC mAb保护柱可有效延长分析柱的使用寿命。

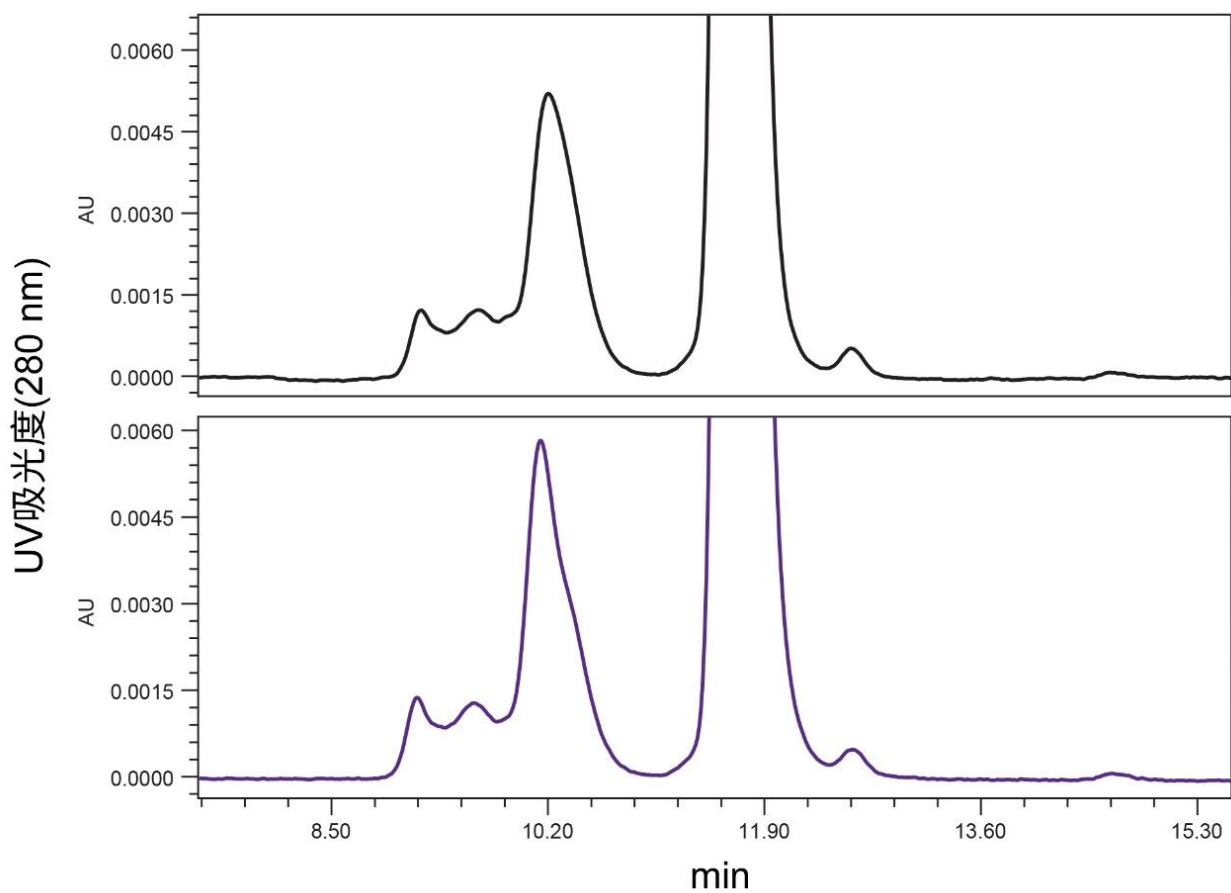


图3.最初使用SEC分析柱和BioResolve保护柱进行西妥昔单抗SEC分离的结果（黑色），以及进样40次降解SEC蛋白质标准品后更换保护柱得到的SEC分离结果（蓝色）。其他实验条件见图1说明。

在最终研究中，我们使用相同的 $2.5\ \mu\text{m}$ 粒径， $7.8 \times 300\ \text{mm}$ 分析柱，比较BioResolve SEC mAb, $2.5\ \mu\text{m}$, $4.6 \times 30\ \text{mm}$ 保护柱与同尺寸ACQUITY UPLC BEH SEC, $1.7\ \mu\text{m}$ 蛋白分析保护柱的结垢率。在本研究中，由于 $1.7\ \mu\text{m}$ 粒径保护柱是为 $4.6\ \text{mm}$ 内径分析柱设计，因此进样少量($5\ \mu\text{L}$)降解蛋白标准品，并在每10次进样后评估西妥昔单抗的分离结果（图4）。我们观察到，HMWS1的分离度和LMWS1的P/V的初始性能损失率相当，在初始20次沉淀蛋白进样中似乎更大。考虑到这两种保护柱的内径和长度一致，且 $2.5\ \mu\text{m}$ 粒径保护柱的进样体积几乎是 $1.7\ \mu\text{m}$ 粒径保护柱的3倍，因此，上述结果清楚地表明，与填充 $1.7\ \mu\text{m}$ 粒径颗粒的SEC色谱柱相比， $2.5\ \mu\text{m}$ 粒径的SEC色谱柱更不易因沉淀蛋白而结垢。此结果在预料之中，因为粒径越大，对沉淀颗粒的过滤程度就会降低。还可以预测到的是，结垢的保护柱对 $4.6\ \text{mm}$ 内径分析柱分离效果的影响会大于对 $7.8\ \text{mm}$ 内径分析柱的影响，因为后者产生的峰体积更大。

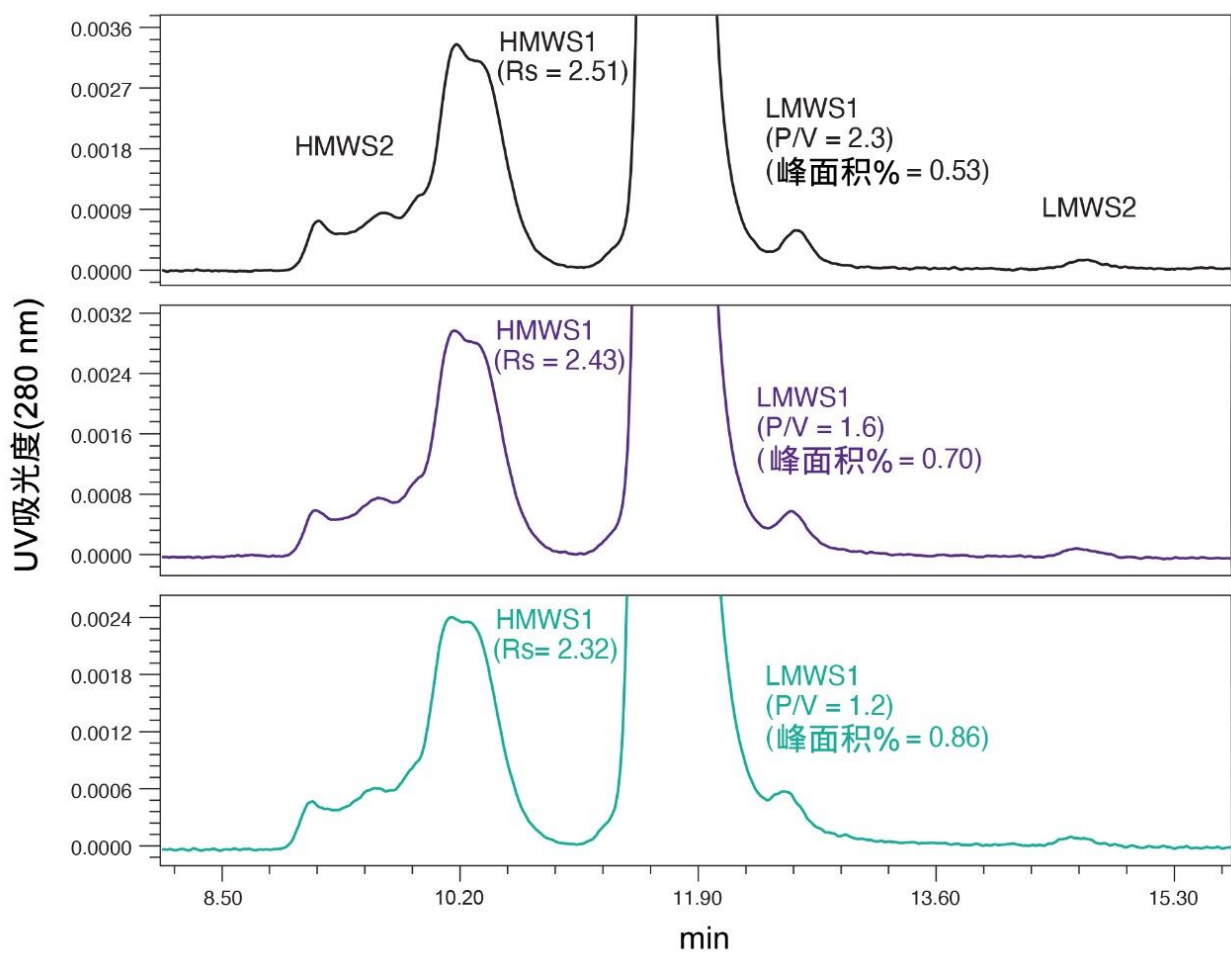


图4.最初使用SEC分析柱和ACQUITY SEC 200 Å保护柱进行西妥昔单抗SEC分离的结果（黑色），以及随后进样10次（蓝色）和20次（绿色）5 μ L降解SEC蛋白质标准品的SEC分离结果。其他实验条件见图1说明。

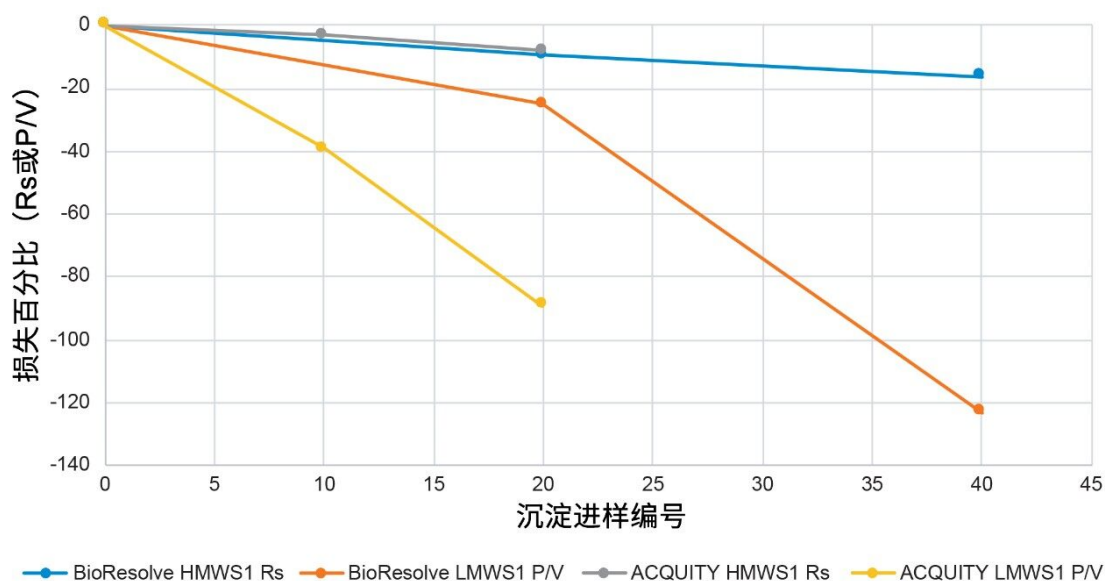


图5.使用SEC分析柱进行西妥昔单抗SEC分离时，安装BioResolve保护柱或ACQUITY SEC 200 Å保护柱时HMWS1分离度和LMWS P/V的趋势比较。数据来自图2和图4中的色谱图。

结论

上述结果表明，在分析可能含有不同水平沉淀蛋白的工艺开发样品中的HMWS和LMWS时，使用BioResolve SEC mAb保护柱（部件号：[186009443](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009443) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009443>>）保护BioResolve SEC mAb色谱柱可能非常有利。

此外，进样含有沉淀蛋白的样品时，与装有1.7 μm粒径颗粒的UP-SEC色谱柱相比，装有2.5 μm粒径颗粒的HP-SEC色谱柱性能损失要小得多。

最后，虽然使用保护柱可能会有所帮助，但在可能的情况下，都应考虑在样品制备时进行过滤或最好是离心以除去颗粒，尽可能减少形成潜在的沉淀。

参考文献

1. Roberts, C. J. Therapeutic Protein Aggregation: Mechanisms, Design, and Control. *Trends in Biotechnology* 2014, 32 (7), 372-380.
2. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2012, 35 (20), 2923-2950.
3. Philo, J. S. Is Any Measurement Method Optimal for All Aggregate Sizes and Types? *The AAPS Journal* 2006, 8 (3), E564-E571.
4. Mou, X.; Yang, X.; Li, H.; Pollard, D. J. A High Throughput Ultra Performance Size Exclusion Chromatography Assay for the Analysis of Aggregates and Fragments of Monoclonal Antibodies. *Pharmaceutical Bioprocessing* 2014, 2 (2), 141-156.
5. Koza, S. M.; Reed, C.; Chen, W. Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal Column Configuration for Your Method. Waters Application Note, [720006336EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417) , 2018.
6. Koza, S. M.; Reed, C., Chen W., Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal Column for Your Method. Waters Application Note, [720006336EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417) , 2019.
7. Koza, S. M.; Reed, C.; Chen, W. Evaluating the Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Proteins. Waters Application Note, [720006337EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996381>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996381) , 2019.

致谢

感谢Lavelay Kizekai和Steve Shiner为本研究提供流动相和色谱柱，感谢Bill Warren和Pam Iraneta审阅本文稿。

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

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

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

720006955ZH, 2020年8月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.