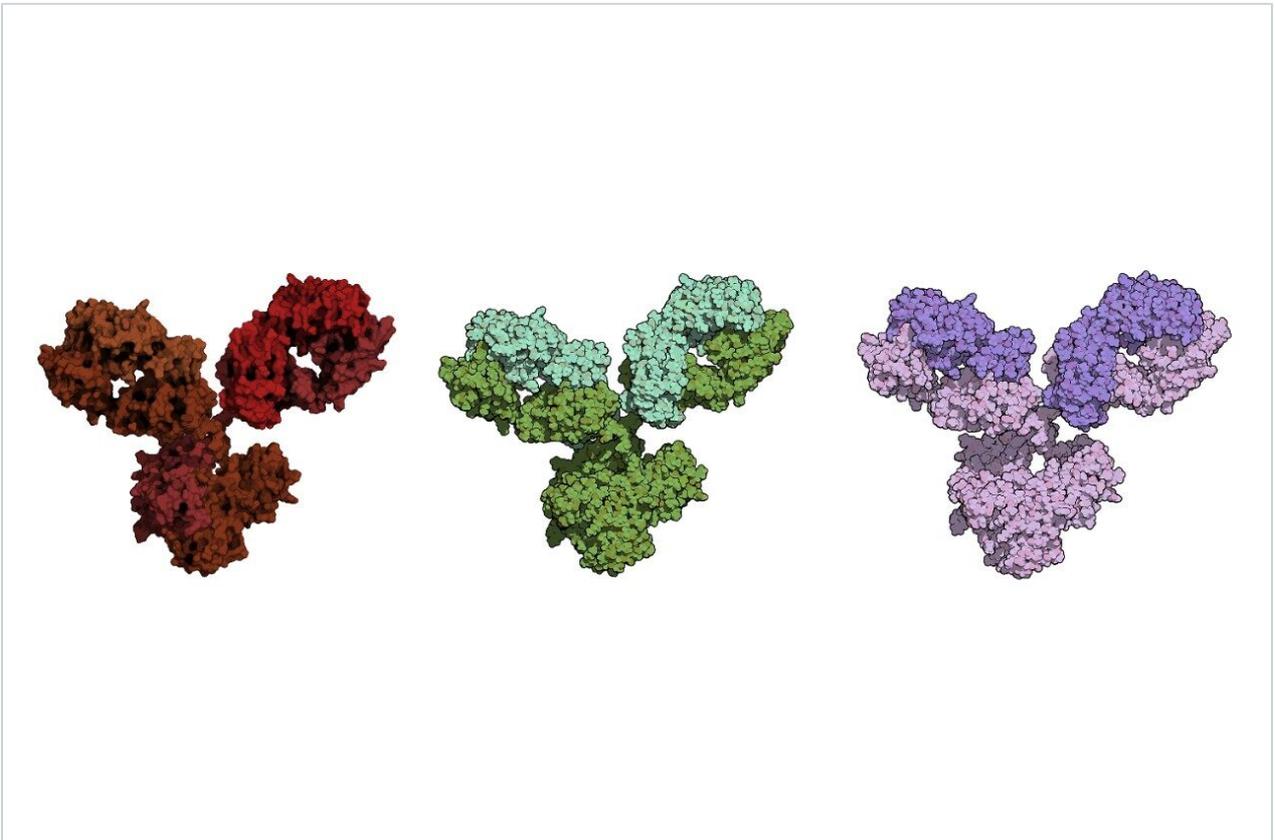


应用纪要

比较亚3 μm HP-SEC色谱柱在IgG抗体聚集体(HMWS)和片段(LMWS)分析中的性能

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

比较Waters BioResolve SEC mAb分析色谱柱(200 Å, 2.5 µm, 7.8×300 mm)色谱柱与三种市售SEC色谱柱(亚3 µm, 7.8×300 mm)在mAb药物西妥昔单抗聚集体(HMWS)、单体和片段(LMWS)分离中的性能。各色谱柱制造商先前已使用流动相进行比较, 报告了相同SEC色谱柱或假定填料颗粒表面相似但粒径或尺寸不同的色谱柱分离西妥昔单抗的性能结果。在测试的色谱柱中, BioResolve SEC mAb色谱柱表现出优异的柱效(USP塔板数), 且USP拖尾值居于较低水平。观察到各被测色谱柱对单体与二聚体HMWS之间的分离度相当, 而两种具有较大孔径的色谱柱使多聚体与二聚体HMWS之间的分离度略有提高。最后, BioResolve SEC mAb色谱柱使mAb单体(150 kDa)与LMWS(50 kDa和100 kDa)之间获得了优异的分​​离度。

优势

- 使用Waters BioResolve SEC mAb色谱柱进行mAb(西妥昔单抗)片段分析可提高性能, 同时提供与几种市售SEC色谱柱相当的聚集体分析结果。
- 之前已经证明, 色谱柱尺寸(7.8×300 mm)和粒径(2.5 µm)与HPLC、UHPLC和UPLC LC系统兼容。
- 与市售SEC(亚3 µm, 7.8×300 mm)色谱柱相比, 该色谱柱具有更高的柱效和峰拖尾性能, 可改善mAb及其他尺寸相当的治疗性蛋白质的分离效果。

简介

体积排阻色谱法(SEC)是用于蛋白质聚集体(高分子量物质, HMWS)常规分析的理想方法, 也适用于蛋白质碎片(低分子量物质, LMWS)的非变性分析¹。许多mAb生物治疗药物的LMWS是IgG铰链区发生蛋白酶裂解产生的, 包括Fab-Fc LMWS(LMWS1, 约100 kDa)以及Fab和Fc结构域(LMWS2, 约50 kDa)²。

虽然可以使用多根串联的HPLC SEC(HP-SEC)色谱柱或较低的线性速度来提供可靠地分离LMWS1与mAb单体所需的柱效, 但这种分离通常需要使用粒径为2 µm或更小的UPLC-SEC(UP-SEC)色谱柱提供更高的柱效才能实现合理的分析通量³。虽然填充亚2 µm颗粒的SEC色谱柱可以在HMWS分析中提供出色的样品通量, 但这些色谱柱的内径(I.D.)通常为4.6 mm, 因此, 当其用于分析LMWS1时, 必须使用扩散体积非常低且受到严格控制的UPLC系统, 才能获得一致的分​​离效果和可重现的相对LMWS1峰面积^{3,4}。

因此, 我们开发出更大规格的7.8 mm内径HP-SEC色谱柱, 填料使用孔径为200 Å, 粒径为2.5 µm的BEH颗粒(XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 Å, 2.5 µm, 部件号: [186009164](#) <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009164>>)，以有效填补UPLC-SEC色谱柱之间的性能差距。该色谱柱提供了更稳定且更易于转移的分析，对所用LC系统柱外扩散的依赖性较低，同时使分析时间延长了50%或更少⁵。此后，该通用色谱柱在色谱柱填料方面经过重新优化以专门改善IgG mAb单体与LMWS1的分离效果，优化后的色谱柱为BioResolve SEC mAb分析色谱柱（200 Å, 2.5 μm, 7.8×300 mm，部件号：[186009441](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009441) <
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009441>>)。

本研究的目的是展示BioResolve SEC mAb (7.8×300 mm)色谱柱与三种市售SEC色谱柱（亚3 μm, 7.8×300 mm）的性能比较。比较了柱效和峰形的性能基础以及mAb的HMWS与LMWS的分离效果。SEC供应商在色谱柱比较中使用的流动相几乎总是与他们在色谱柱优化过程中使用的流动相相同，以便评估其他制造商的色谱柱。为避免这种方法可能造成的偏差，我们确定了一种mAb药物（西妥昔单抗），多家色谱柱供应商已发表了使用本研究中测试的相同色谱柱或看起来具有相同SEC颗粒填料但粒径或色谱柱硬件不同的色谱柱分离该mAb的方法详请（即，流动相组成）。

结果与讨论

使用Waters 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>>)比较BioResolve SEC mAb色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8×300 mm)与三种市售SEC色谱柱（亚3 μm, 7.8×300 mm）的性能。相应色谱图的直观比较以及各色谱柱使用的分离条件如图1所示。基于甲状腺球蛋白多聚体(T3)和尿嘧啶(U)的洗脱体积之间的差异，观察到所有四种色谱柱的孔体积相当（处于10%以内，数据未显示）。但是，需要注意的是，各种蛋白质标准品的相对洗脱体积有所不同。观察到BioResolve色谱柱与色谱柱Y之间的相似度最高，而色谱柱X与色谱柱Z的分离度则相对接近。这些差异主要与填料颗粒的平均孔径相关，可以从甲状腺球蛋白单体(T1)与甲状腺球蛋白的HMWS（T2和T3）之间的分离结果中明显看出，它们在具有更大孔径的色谱柱X和色谱柱Z上表现出更高的分离度。相反，IgG (I)与BSA (B)在孔径较小的BioResolve色谱柱和色谱柱Y上表现出更好的分离效果。稍后将介绍这些孔径差异如何在mAb分离中体现。

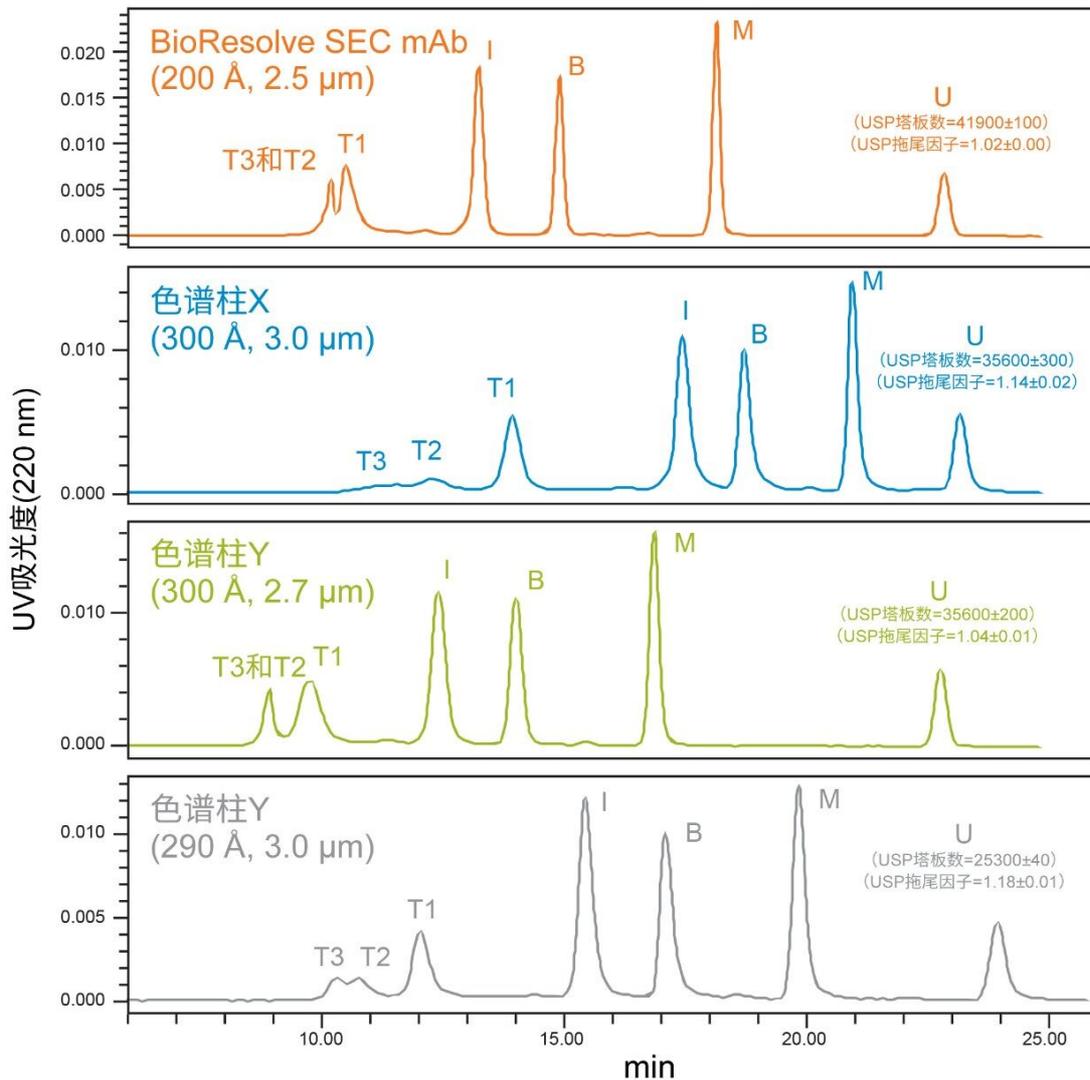


图1. Waters BEH200 SEC蛋白质混标（进样体积3 μL）在BioResolve SEC mAb色谱柱(200 Å, 2.5 μm, 7.8×300 mm)以及三种同样尺寸的市售SEC色谱柱（包含亚3 μm颗粒）上的分离结果。峰鉴定结果为：甲状腺球蛋白多聚体(T3, ≥1.98 MDa)、甲状腺球蛋白二聚体(T2, 1.32 MDa)、甲状腺球蛋白单体(T1, 660 KDa)、IgG (I, 150 KDa)、BSA (B, 66 KDa)、肌红蛋白(M, 17 KDa)和尿嘧啶(U, 112 Da)。尿嘧啶的USP塔板数基于切线法计算，在5%峰高(n=2)下测量USP拖尾因子。流动相为：对于BioResolve色谱柱，50 mM磷酸钠(pH 7.0)、200 mM氯化钾；对于色谱柱X，200 mM磷酸钠(pH 6.7) (NaOH)；对于色谱柱Y，50 mM磷酸钠、150 mM氯化钠(pH 7.4) (NaOH)；对于色谱柱Z，50 mM磷酸钾、250 mM氯化钾(pH 6.8) (KOH)。流速为0.50 mL/min，柱温为25°C。在由Empower 3控制的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上重复分析两次，5σ扩散体积为14 μL。值不确定度表示范围。

作为相对SEC色谱柱性能的衡量指标之一，使用尿嘧啶(U)的切向USP塔板数(N)方法比较分离效率，其中尿嘧啶是完整包含的SEC标志物。与预期一致，BioResolve色谱柱的实测塔板数更高，因为该色谱柱的粒径在测试的SEC色谱柱中最小。如果将塔板高度 ($H=L/N$ ，其中L为柱长) 根据粒径归一化 (折合塔板高度， $h=H/dp$ ，其中 dp 为粒径)，可以看到色谱柱X ($h=2.81$)和色谱柱Y ($h=3.04$)与BioResolve色谱柱($h=2.87$)更接近，表明色谱柱X和色谱柱Y也得到了高效填充。

然后考察USP拖尾因子作为衡量色谱柱填料质量的指标。当USP拖尾因子接近1.0时，峰更加对称。USP拖尾因子是5%峰高处的峰对称性衡量指标。从图中可以看出，采用BioResolve色谱柱和色谱柱Y得到的峰相对对称，而采用色谱柱X和色谱柱Z得到的峰拖尾稍大。对于蛋白质的SEC分离，填充为稍显拖尾的色谱柱将改善HMWS和单体的分离度，同时降低LMWS的分离度，而得到更对称峰形的色谱柱将使HMWS和LMWS的分离更一致。

西妥昔单抗的全尺寸色谱图和放大视图分别如图2和图3所示。在全尺寸色谱图中，观察到在所有四种色谱柱上，蛋白质标准品的保留时间总体趋势相同，并且mAb单体具有尖锐且相对对称的峰形。在放大视图中 (图3)，观察到色谱图特征良好：对于BioResolve色谱柱和色谱柱Y，基线在LMWS2洗脱之前回到原始位置；对于色谱柱X和色谱柱Z，基线在LMWS2洗脱后立即回到原始位置。这表明用于各种色谱柱的流动相相当适合。

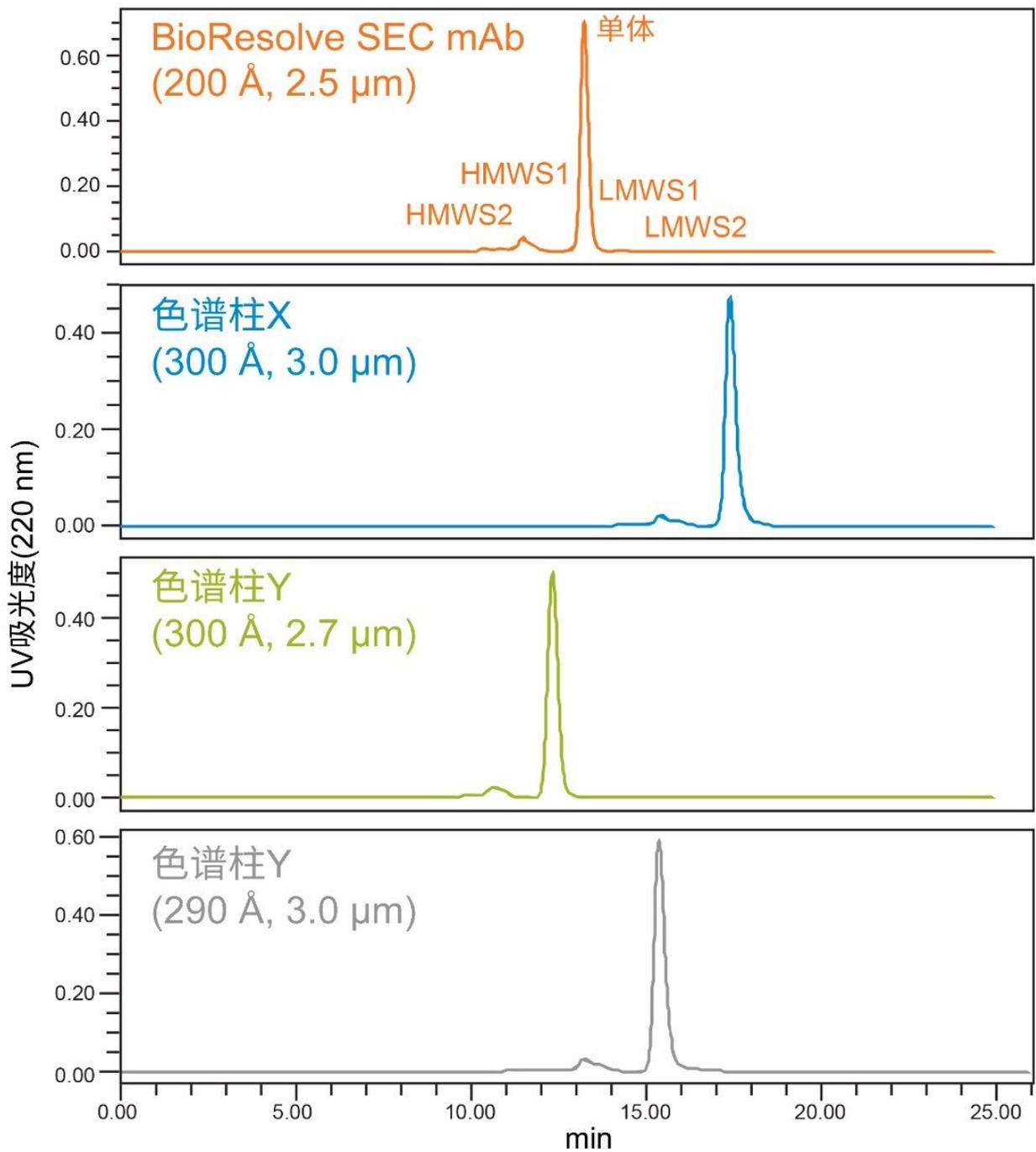
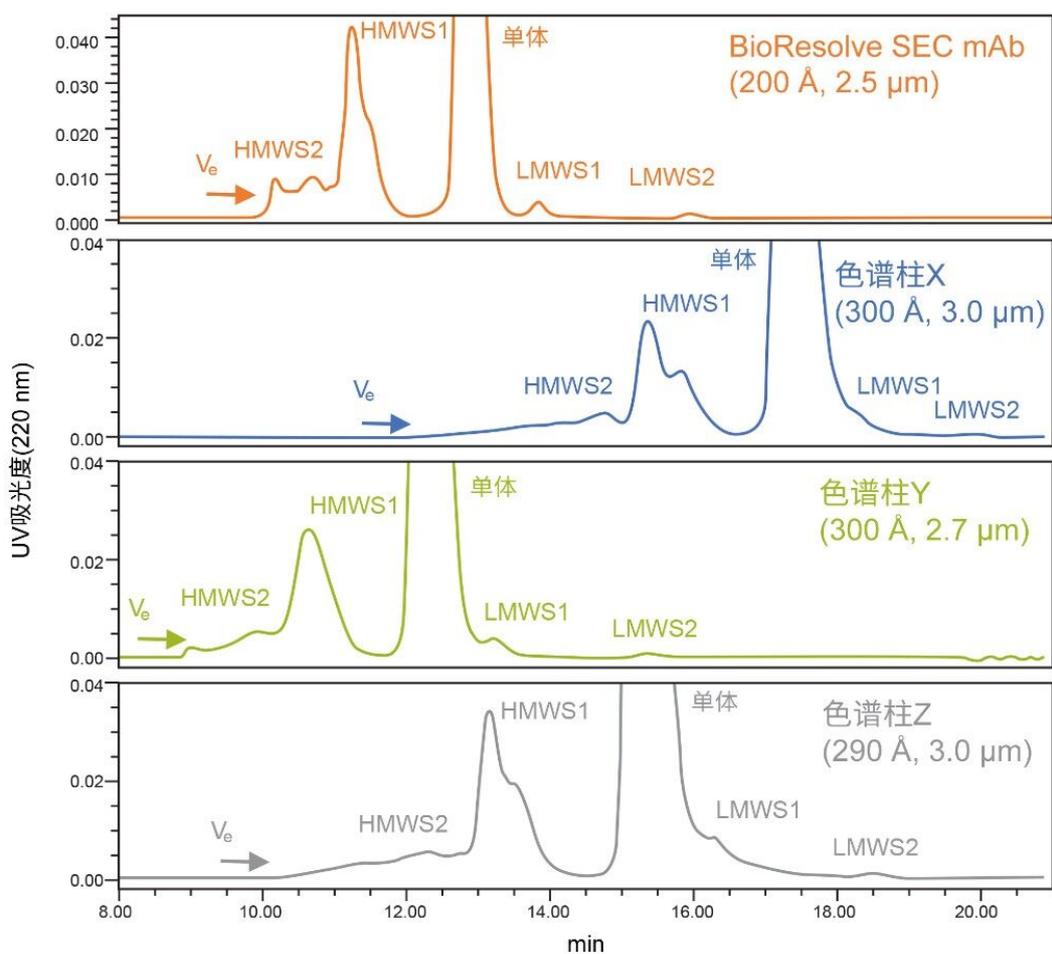


图2.降解Erbix (西妥昔单抗) 药品样品 (浓度为2 mg/mL, 进样体积10 μL) 在BioResolve SEC mAb色谱柱 (200 Å, 2.5 μm, 7.8×300 mm) 以及三种同样尺寸的市售SEC色谱柱 (包含亚3 μm颗粒) 上的全尺寸分离谱图。峰鉴定结果见正文, 其他实验条件见图1。



色谱柱	HMWS2 峰面积%	HMWS1 峰面积%	HMWS1 Rs	LMWS1 峰面积%	LMWS1 P/V	LMWS2 峰面积%
BioResolve	3.04 ± 0.02	8.97 ± 0.02	3.36 ± 0.02	0.48 ± 0.01	4.98 ± 0.11	0.11 ± 0.00
色谱柱X	2.92 ± 0.13	7.96 ± 0.04	2.27 ± 0.01	ND	1.00 ± 0.00	0.15 ± 0.01
色谱柱Y	2.04 ± 0.00	8.45 ± 0.01	2.26 ± 0.00	0.81 ± 0.01	1.24 ± 0.01	0.11 ± 0.00
色谱柱Z	3.18 ± 0.04	8.22 ± 0.02	2.27 ± 0.00	ND	1.00 ± 0.00	0.17 ± 0.02

图3.图2展示了降解Erbitux（西妥昔单抗）药品样品的放大分离谱图，以及相关的列表面积百分比和分离质量结果。峰鉴定结果见正文。 V_e 表示色谱柱的排除体积。分离度(R_s)基于USP半峰高方法确定。峰谷比(P/V)基于LMWS1峰高除以单体LMWS1谷高来计算。HMWS1分离度根据单体确定。ND表示值无法确定。样品重复分析两次，且列出的不确定度表示数值的范围。

观察到HMWS1和单体在四种色谱柱上的分离结果相当。虽然BioResolve色谱柱使HMWS1的USP半峰高分离度提高了26–50%，但该数值受到采用较大孔径的色谱柱导致第二种HMWS1大小异构体的分离度增加的干扰

。还观察到多聚体HMWS2形式在色谱柱X和色谱柱Z上的分离度增加，与SEC蛋白质标准品中甲状腺球蛋白的观察结果一致。研究发现，HMWS1和HMWS2的相对含量可变，这可能是由于样品在经过多次冻融循环后不稳定，因此不建议使该液体制剂药品经过多次冻融循环。尽管提供了HMWS1和HMWS2的相对含量（图3），但是这些结果在该比较中并不重要。

在50 kDa LMWS2片段的分离中，观察到所有四种色谱柱都表现出良好的分离效果。该片段的峰面积百分比非常低（约0.1%），因此，在220 nm处监测UV吸光度以改善信噪比。BioResolve色谱柱和色谱柱Y均使LMWS2达到基线分离，且峰面积百分比相同(0.11%)。色谱柱X和色谱柱Y产生的单体峰拖尾较小，使其达到部分分离，最终通过人为积分提高了HMWS2的峰面积百分比。

对于单体和LMWS1的分离，仅在BioResolve色谱柱和色谱柱Y上观察到可辨识的峰谷。按LMWS1的峰谷比(P/V)衡量该分离的程度，BioResolve SEC mAb色谱柱的P/V为4.98，明显大于色谱柱Y（P/V为1.24）。这可能是因为BioResolve色谱柱具有更出色的孔径、更高的塔板数和更小的峰拖尾程度。与BioResolve色谱柱(0.48%)相比，在色谱柱Y上观察到的边际分离度还导致LMWS1峰面积百分比人为增加(0.81%)。随着LMWS1丰度降低，由于色谱柱或LC系统可能引起主要单体峰发生低水平拖尾，因此与单体分离并实现可靠的定量变得更具挑战性。尽管未在本研究中进行评估，但测试的所有四种SEC色谱柱似乎都使LMWS1与单体部分分离。因此，如果样品中LMSW1的相对丰度较高，则可能获得可靠的定量结果。否则，将需要通过增加柱长或降低这些色谱柱的流速来提高分离效率。

结论

目前，有多种市售SEC色谱柱（包含 $3\ \mu\text{m}$ 颗粒和 $7.8\times 300\ \text{mm}$ 的色谱柱尺寸）可有效地用于分析mAb样品中与HMWS和LMWS产品相关的杂质。这些现代 $3\ \mu\text{m}$ SEC色谱柱比上一代包含 $5\text{-}8\ \mu\text{m}$ 颗粒的SEC色谱柱具有更高的分离效率。另外，包含 $2\ \mu\text{m}$ 颗粒的 $4.6\ \text{mm}$ 内径SEC色谱柱可有效提高HMWS和LMWS分离的样品通量，但LMWS1的可重现分析只能在低扩散的UHPLC和UPLC系统上实现。相比之下，经过优化的 $7.8\ \text{mm}$ 内径现代 $3\ \mu\text{m}$ SEC色谱柱可有效地用于各种HPLC系统平台，而样品通量仅降低33%或更少。

与经过适当评估的市售SEC色谱柱相比，Waters BioResolve SEC mAb分析色谱柱($200\ \text{\AA}$, $2.5\ \mu\text{m}$, $7.8\times 300\ \text{mm}$)分离mAb HMWS1（二聚体）与单体的效果相当。在评估的所有SEC色谱柱中，平均孔径较小的BioResolve SEC mAb色谱柱和SEC色谱柱Y使mAb HMWS1和HMWS2（多聚体）获得了充分且可靠的分离，而采用色谱柱X和色谱柱Z（具有较大的平均孔径）得到的分离度较低。

对于片段分析，平均孔径较小的BioResolve色谱柱和色谱柱Y使LMWS2 (50 kDa)获得相似的基线分离，并使LMWS1 (100 kDa)和mAb单体之间获得可辨识的峰谷。BioResolve色谱柱使LMWS1获得了更出色的分离效果

，平均P/V为4.98，而色谱柱Y的P/V则为1.24。LMWS1在色谱柱Y上较低的分选度以及LMWS2在色谱柱X和色谱柱Z上较低的分选度导致积分得到这些杂质的相对峰面积相比于在BioResolve色谱柱上观察到的值人为提高。

BioResolve SEC mAb色谱柱(200 Å, 2.5 µm, 7.8×300 mm)可提供高效且对称的峰形，使mAb药物和相似大小蛋白质的HMWS和LMWS在HPLC、UHPLC和UPLC平台上实现高分离度分离。

参考文献

1. 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, 2923-50.
2. Cordoba, A.J.; Shyong, B-J.; Breen, D.; Harris, R. J. Non-Enzymatic Hinge Region Fragmentation of Antibodies in Solution. *J. Chromatogr., B.* 2005, 818, 115-21.
3. 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.
4. Fekete, S.; Guilleme, D. Influence of Connection Tubing in Modern Size Exclusion Chromatography and its Impact on the Characterization of mAbs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 149, 22-32.
5. Koza, S. M.; Chen, W. High Resolution and High Throughput Size-Exclusion Chromatography Separations of IgG Antibody Aggregates and Fragments on UHPLC and HPLC Systems with 2.5 µm BEH Particles. Waters Application Note, [720006522EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135016169>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135016169) , 2019.

致谢

我们非常感谢Pamela Iraneta、Steve Shiner和William Warren对本研究所做的贡献。

特色产品

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

720006985ZH, 2020年8月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.