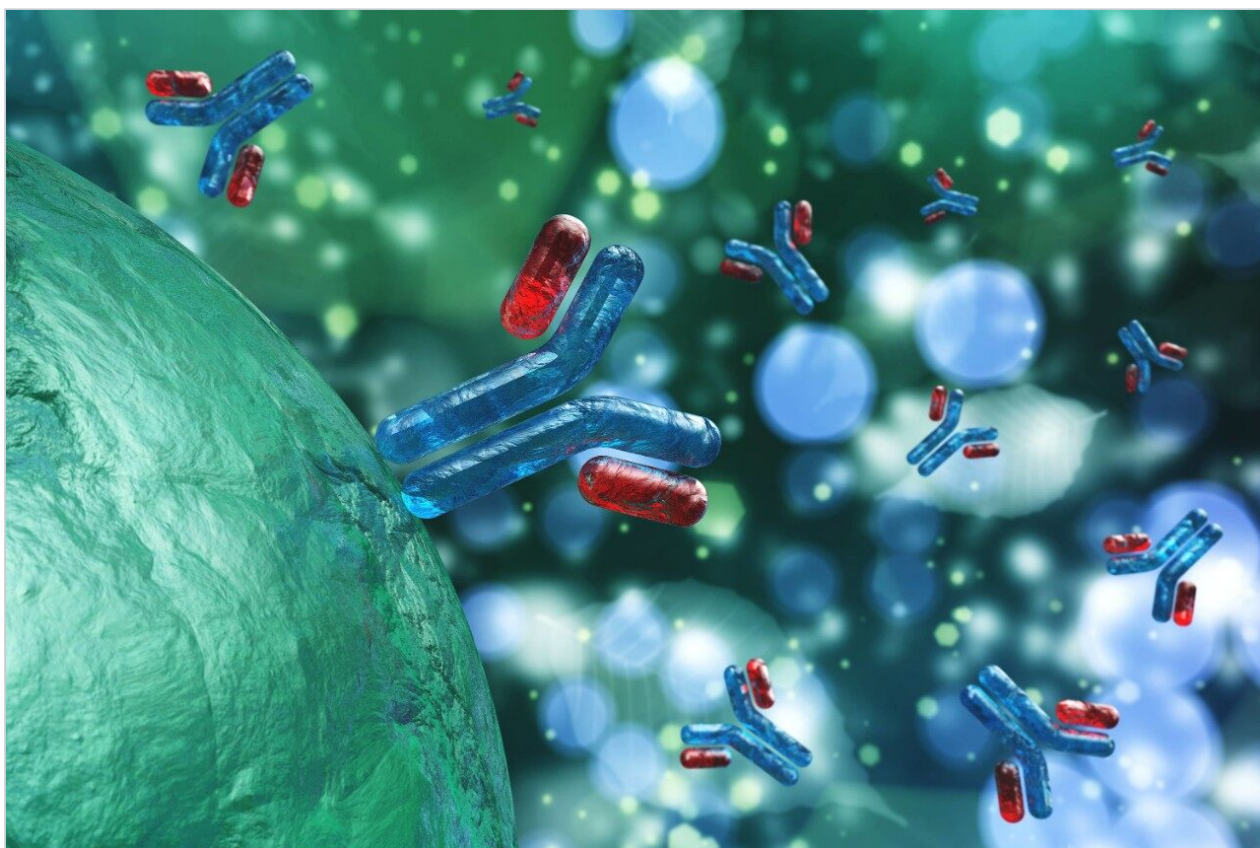


体积排阻色谱法分析单克隆抗体在不同UHPLC系统之间的转移

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分析的体积排阻色谱法从Agilent 1260 Infinity生物惰性液相色谱系统转移至配备ACQUITY 30 cm单区色谱柱管理器(CM-30S)的ACQUITY Arc Bio系统。根据液相色谱系统扩散选择合适的SEC色谱柱，在方法转移后获得的保留时间、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

- 用于mAb分析的SEC方法在ACQUITY Arc Bio系统与Agilent 1260 Infinity生物惰性系统之间无缝转移
- ACQUITY CM-30S支持使用长度大于25 cm的色谱柱运行传统液相色谱方法和方法开发

简介

使用水性流动相的体积排阻色谱法(SEC)在蛋白质聚集体（高分子量物质，HMWS）的相对定量分析中占有重要地位¹。已有研究表明，蛋白质聚集体与药物的不良免疫作用和疗效降低有关²。因此，在不同的超高效液相色谱(UHPLC)系统之间进行方法转移时，务必要确保SEC方法能够可重现地定量分析HMWS及其他降解物的含量。

在方法转移过程中，应考虑的一项重要系统特性是柱外扩散，通常也称为谱带展宽。较大的柱外扩散始终对分离度有不利影响，尤其是SEC分离度，因为该分离是由扩散驱动，与固定相的相互作用非常小，甚至没有³。针对液相色谱系统选择合适的SEC色谱柱尺寸，可大幅降低柱外扩散的影响⁴。我们将以SEC方法从Agilent 1260 Infinity生物惰性系统转移到配备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统为例进行详细说明。CM-30S是用于ACQUITY Arc系统的新款色谱柱管理器⁵。其保留了支持长色谱柱的能力以便运行传统方法，同时将色谱柱容量扩展为至多15根色谱柱（使用两个CM-30S），允许采用更大尺寸的色谱柱进行方法开发。

结果与讨论

在液相色谱中，色谱峰谱带展宽约为柱外扩散体积与柱上扩散体积的总和⁶。柱外扩散可通过实验确定，用 $5\sigma_{ec}$ 表示，为4.4%峰高处的峰宽与流速的乘积^{6,7}。Agilent 1260 Infinity生物惰性系统的实测 $5\sigma_{ec}$ 为31 μ L，配

备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统为50 μL 。方法转移的关键目标是获得HMWS峰面积百分比的等效定量。按照基于液相色谱系统扩散选择合适SEC色谱柱的指南⁴，选择固定相粒径为3.5 μm 的7.8 mm（内径） $\times$ 300 mm SEC色谱柱。

在Agilent 1260 Infinity生物惰性系统(Agilent 1260 Bio)和配备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统上运行曲妥单抗（过期后）（一种用于治疗乳腺癌的抗HER2 IgG1 mAb）⁸的SEC分析。图1显示，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。在两张色谱图中，单个HMW峰和低分子量(LMW)峰均与单体主峰实现了基线分离。在单体峰附近观察到未分离的肩峰（标记为“*”）。为进行方法转移，对单体峰进行积分，使其包含此肩峰。

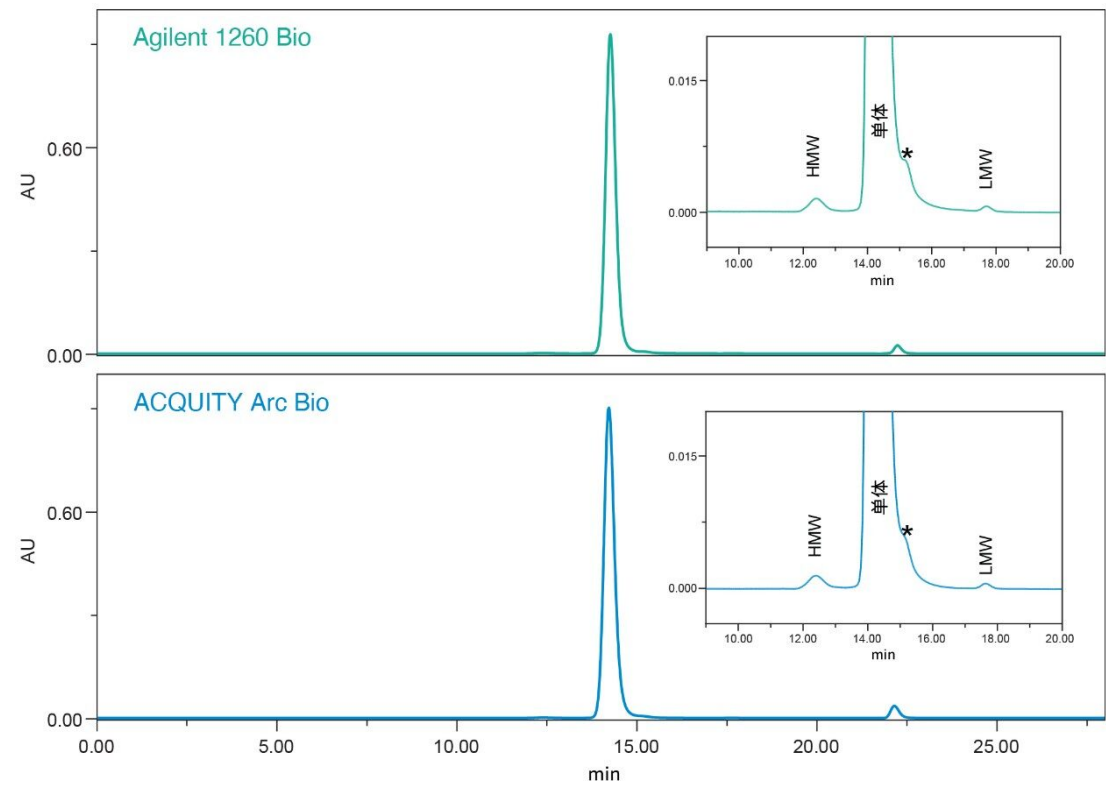


图1.在Agilent 1260 Infinity生物惰性系统（标记为“Agilent 1260 Bio”）和配备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统上采集的曲妥单抗的SEC色谱图。（方法：XBridge BEH SEC 200 $\text{\AA}$, 3.5 μm , 7.8 mm $\times$ 300 mm蛋白分析专用柱；20 mM磷酸盐缓冲液/350 mM氯化钠，pH 6.8；10 mg/mL曲妥单抗，进样体积10 μL ；流速0.5 mL/min）

在单克隆抗体及其他蛋白质药物的产品生命周期中，蛋白质聚集是一个主要问题，它会导致药物发生不良免疫反应和疗效降低。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。表1显示了两套UHPLC系统得到的HMW与单体之间的平均分离度(R_s)、HMW峰的50%峰高处峰宽以及4.4%峰高处峰宽。在这两套系

统之间，HMW与单体之间的分离度以及HMW的峰宽差异可忽略不计。

HMW峰	分离度	50%峰高处的峰宽 (min)	4.4%峰高处的峰宽 (min)
Agilent 1260 Bio	2.6	0.510	1.166
ACQUITY Arc Bio	2.5	0.524	1.195
差异	0.1	-0.01	-0.03

表1.两套系统间HMW峰与单体峰之间的平均($n=6$)分离度(R_s)、HMW峰的50%峰高处峰宽以及4.4%峰高处峰宽比较

表2汇总了HMW、单体峰和LMW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的峰面积百分比无差异，所有分析物的RSD百分比差异至多有两个0位(0.00%)。

峰面积%	HMW			单体			LMW		
	平均值	SD	%RSD	平均值	SD	%RSD	平均值	SD	%RSD
Agilent 1260 Bio	0.26	0.00	0.00	99.68	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
ACQUITY Arc Bio	0.26	0.00	0.00	99.68	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
差异	0.00			0.00			0.00		

表2.两套系统间曲妥珠单抗SEC分离的峰面积百分比（峰面积%）重现性($n=6$)比较

配备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统虽然柱外扩散体积大于Agilent 1260 Infinity生物惰性系统，但通过选择合适的SEC色谱柱，可大幅降低对SEC分离的影响。柱外扩散相对于柱上扩散足够小；因此，在这两套UHPLC系统之间获得了等效的分离结果。

结论

本研究成功将用于mAb分析的SEC方法从Agilent 1260 Infinity生物惰性UHPLC系统转移至配备ACQUITY 30 cm单区色谱柱管理器(CM-30S)的ACQUITY Arc Bio系统。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0.00%以内。所有物质的峰面积百分比重现性在0.00% RSD以内。

配备CM-30S的ACQUITY Arc Bio系统可轻松适应传统SEC分析中通常采用的7.8 mm（内径）× 300 mm（长）色谱柱。本应用简报证明，ACQUITY Arc Bio系统可重现聚集体、单体和片段的高分离度分离，并实现准确定量。此外，通过在ACQUITY Arc Bio系统中配备两个CM-30S，色谱柱容量可扩展为至多15根色谱柱，有利于在现代化UHPLC系统上采用更大尺寸的色谱柱进行方法开发。

参考资料

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2012, 35, 2923–2950.
2. Rosenberg, AS. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. *The AAPS Journal*, 2006, 8:501–7.
3. Iraneta, P.; Koza, S. 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, 2020, 720006956ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/high-resolution-size-exclusion-chromatography-separations-of-mab-aggregates,-monomers,-and-fragments-using-bioresolve-sec-mab-columns-on-uplc,-uhplc,-and-hplc-chromatography-systems.html>>
4. Koza, S.; Reed, C.; Chen, W. 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, 2019, 720006336ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-system-dispersion-size-exclusion-chromatography-analysis-monoclonal-igg-antibody-aggregates-fragments-selecting-optimal-column-configuration.html>>
5. Instrument Specifications, ACQUITY Arc System, Waters Spec Sheet, 720005400EN. <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134849388>>
6. Koza, S.; Reed, C.; Chen, W. 评估LC系统扩散对体积排阻色谱分析蛋白的影响. 沃特世应用纪要, 2019, 720006337ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-system-dispersion-size-exclusion-chromatography-analysis-proteins.html>> .
7. Hong, P.; McConville, P. 延迟体积与柱外体积的定义及其如何影响方法转换. 沃特世白皮书, 2016, 720005723ZH <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134895769>> .

8. Koza, S.; Hong, P.; Fountain, KJ. 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/nextgen/us/en/library/application-notes/2012/size-exclusion-ultra-performance-liquid-chromatography-method-development-degradation-products-trastuzumab-antibody.html>>

特色产品

ACQUITY Arc Bio系统 <<https://www.waters.com/134966135>>

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

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

720007075ZH, 2020年10月