

## 使用与UPLC™和HPLC兼容的MaxPeak™ Premier SEC蛋白分析专用柱快速分析单克隆抗体的大小异构体

---

Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

高通量、快速的体积排阻色谱(SEC)方法对于生物治疗药物的工艺和配方开发非常有帮助。此外，快速SEC方法可用于更高效地进行实时纯度分析以支持生产过程。在这些应用中，SEC可用于监测可能影响产品安全性或有效性的自缔合或聚集形成的蛋白质杂质或蛋白质碎裂。

在之前的应用纪要中，已经证明使用Waters™ MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用柱在具有生理pH (7.4)和离子强度的流动相条件下可以实现有效的分离和色谱柱使用寿命延长。因此，本研究评估了这些最近推出的UPLC和HPLC分析色谱柱版本的性能和使用寿命，在接近指定的最大压力下运行，使分析时间只需2.1~3.0 min。

本研究利用500次分析成功评估了一根Waters ACQUITY™ Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm)和两根尺寸分别为4.6 × 150 mm和7.8 × 150 mm的XBridge™ Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)。以四种市售的单克隆抗体生物类似药为对象，评价了色谱柱针对自缔合和选定的碎裂大小异构体的分离性能。

### 优势

- 快速SEC分析(2.1~3.0 min)，在UPLC和HPLC系统上对mAb大小异构体进行SEC分析

- 在接近最大指定柱压的条件下，色谱柱使用寿命大于500次分析
- 在整个生命周期研究中可重现地测定HMWS和LMWS杂质水平

---

## 简介

高通量、快速的SEC方法对于监测蛋白质聚集体杂质或蛋白质碎裂非常有帮助，可确保产品安全性和有效性不受影响，此外，此方法还可以缩短分析时间，有望加快生产工艺和配方开发<sup>1,2</sup>。此外，快速SEC方法可用于更高效地进行实时纯度分析，有望为注册的生产过程提供支持<sup>3</sup>。在之前的研究中，柱长为300 mm的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)已被证明可在生理pH (7.4)和离子强度下提供高分离度分离和长期稳定性，这在很大程度上是由于使用的亚乙基桥杂化(BEH) SEC颗粒与亲水性羟基封端的聚环氧乙烷(PEO)键合，在不同pH下均稳定，经PEO改性的色谱柱硬件减少了蛋白质-表面相互作用<sup>4</sup>。因此，本研究评估了与UPLC和HPLC兼容的MaxPeak Premier SEC色谱柱（柱长为150 mm）快速、高通量地进行SEC分析的能力以及色谱柱使用寿命，分析期间色谱柱在接近各自指定的最大操作压力下运行，将分析时间控制在2.1~3.0 min。

本研究以目前在美国作为生物类似药销售的四种市售单克隆抗体(mAb)药品为对象进行了500次分析进样，分别使用一根ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱（孔径250 Å，粒径1.7 μm，4.6 × 150 mm）和两根内径分别为4.6 mm和7.8 mm的XBridge Premier（250 Å，2.5 μm，柱长150 mm）色谱柱进行分析。其中，贝伐单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗样品为生物类似药产品，曲妥珠单抗样品为原研药产品。对自缔合和选定的碎裂mAb大小异构体的分离性能均进行了评估。

---

## 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-A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
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 μ L, 100个/包 (部件号: 186002639)
色谱柱:	ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176004783) XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176004781) XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 7.8 × 150 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176004779)
柱温:	室温
样品温度:	6 °C
进样体积:	英夫利昔单抗和利妥昔单抗: 5 mL (针对7.8 × 150 mm色谱柱) 和2 mL (针对4.6 × 150 mm色谱柱) 贝伐单抗和曲妥珠单抗: 2.5 mL (针对7.8 × 300 mm色谱柱) 和1 mL (针对4.6 ×

	150 mm色谱柱)
流速:	0.75~2.0 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色谱数据系统

---

## 结果与讨论

通过在ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(4.6 × 150 mm)、XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(4.6 × 150 mm)和XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(7.8 × 150 mm)上进行500次运行, 评估了高通量SEC分离四种不同mAb样品中可定量的高分子量物质(HMWS)和低分子量物质(LMWS)杂质的性能。先前已经深入研究了这四种治疗性mAb样品对ACQUITY和XBridge Premier SEC色谱柱寿命的影响<sup>4</sup>。因此, 本研究仅在报告的时间点(0或初始时间点以及100、200、300、400、500次进样)对mAb样品进行评估, 同时用5 μL空白(水)进行中间进样。此外, 利用LC将10X DPBS浓缩液与水混合, 制得1X PBS流动相。另外, 10X DPBS浓缩液和Milli-Q 18 MΩ水在使用前经0.1 μm无菌过滤。对于4.6 × 150 mm色谱柱和7.8 × 150 mm色谱柱, 贝伐单抗和曲妥珠单抗的进样体积分别为1.0 μL和3.0 μL, 而英夫利昔单抗和利妥昔单抗的进样体积分别为2.0 μL和6.0 μL。

本研究所用的流速和相应的压力如表1所示。流速的选择旨在测试在推荐的最大柱压下或附近的色谱柱使用寿命。推荐的柱压代表仅由色谱柱产生的压力, 该压力通过从使用安装的色谱柱观察到的系统压力减去使用零死体积两通接头(部件号: 289000439 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts-kits/289000439-union-zero-dead-volume.html>>)代替色谱柱时观察到的LC系统压力来确定。三种色谱柱的流速均超过推荐的最大值。在这样的流速条件下, 4.6 × 150 mm ACQUITY Premier和XBridge Premier色谱柱

的柱压接近推荐的最大值。7.8 × 150 mm XBridge Premier色谱柱在UPLC系统的最大流速(2.00 mL/min)下运行，这是该色谱柱推荐流速的两倍，达到的柱压远低于推荐的最大值。对于4.6 × 150 mm色谱柱，在色谱柱与TUV检测器之间使用0.0025英寸(64 μm) PEEK接头（部件号：[700009971 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009971-assy-tube-inlet-0025-id-peek-nut-85.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009971-assy-tube-inlet-0025-id-peek-nut-85.html)）；而对于7.8 × 150 mm色谱柱，则使用0.004英寸(100 μm) PEEK接头（部件号：[700009972 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009972-tubing-assembly-detector-inlet-peek-0004-id-with-peek-nut-85-lon.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009972-tubing-assembly-detector-inlet-peek-0004-id-with-peek-nut-85-lon.html)）。

色谱柱	指定最大值		测试条件		
	流速 (mL/min)	柱压 (PSI, [bar])	流速 (mL/min)	总压力 (PSI, [bar])	柱压 (PSI, [bar])
ACQUITY Premier SEC (4.6 × 150 mm)	0.50	7000, [483]	0.75	8720, [601]	6700, [462]
XBridge Premier SEC (4.6 × 150 mm)	0.50	4500, [310]	1.00	7010, [483]	4270, [294]
XBridge Premier SEC (7.8 × 150 mm)	1.00	4500, [310]	2.00	6900, [476]	3540, [244]

表1. 流速和相应的压力。

在ACQUITY Premier和两种XBridge Premier色谱柱上分离mAb所得到的放大色谱图如图1所示。关于痕量水平的HMWS和LMWS杂质，三种色谱柱均产生了相似的整体色谱图。与其他两种色谱柱相比，4.6 × 150 mm XBridge色谱柱的分离度较低，部分原因在于所用的线速度较高，这一结果符合预期。另外，4.6 × 150 mm XBridge色谱柱(2.5 μm)的粒径也比4.6 × 150 mm ACQUITY色谱柱(1.7 μm)大50%左右，且更大内径的7.8 × 150 mm XBridge色谱柱受LC系统扩散的影响较小<sup>5</sup>。根据测定结果，本研究使用的LC系统的5-sigma (5σ)系统扩散体积为7.9 μL<sup>6</sup>。在比较ACQUITY色谱柱与7.8 × 150 mm XBridge色谱柱时，我们通常观察到ACQUITY色谱柱为HMWS异构体提供了更高的分离度，这是因为其粒径较小；而由于LC系统扩散效应，LMWS2在7.8 × 150 mm XBridge色谱柱上与单体拖尾峰的分离度往往更高。

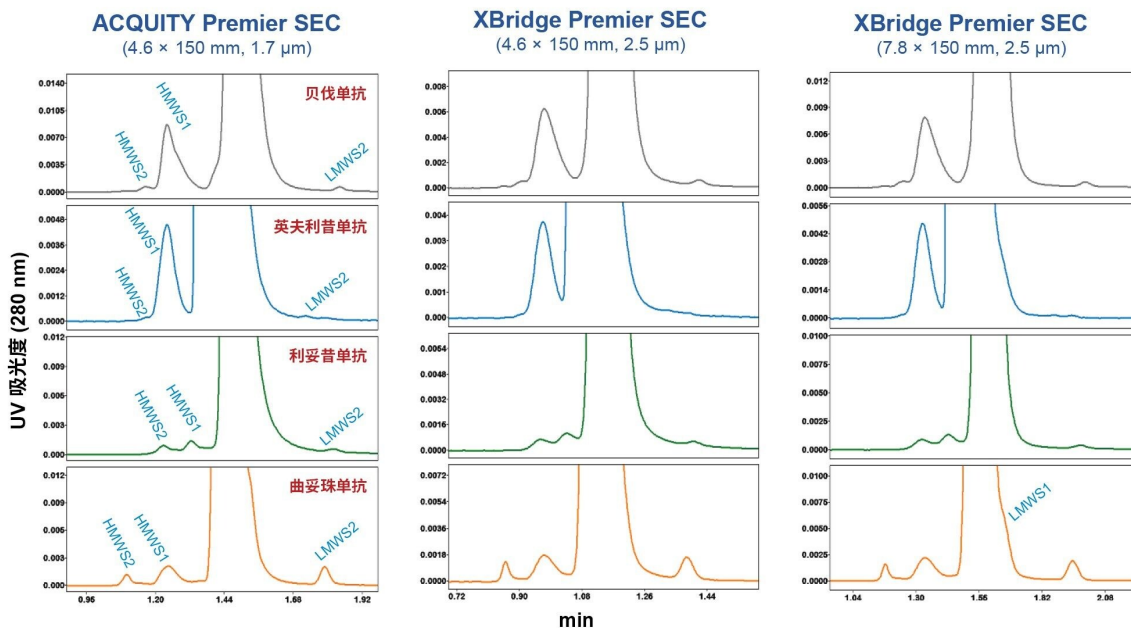


图1.使用柱长为150 mm的MaxPeak Premier SEC色谱柱进行高通量生物类似药mAb样品SEC分离的结果对比。对于4.6 × 150 mm ACQUITY Premier SEC色谱柱、4.6 × 150 mm XBridge Premier SEC色谱柱和7.8 × 150 mm XBridge Premier SEC色谱柱，所用的流速分别为0.75 mL/min、1.0 mL/min和2.0 mL/min，相应的分析时间分别为2.8 min、2.1 min和3.0 min。其他实验条件和峰说明见正文。

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。在这些样品中也可以观察到抗体碎裂为LMWS1和LMWS2。在这些条件下，假设LMWS1主要是mAb铰链区中单次裂解产生的一个约100 KDa片段，该片段由共价Fc结构域和单个Fab结构域组成，在7.8 × 150 mm色谱柱上只能观察到LMWS1表现为曲妥珠单抗主（单体）峰的轻微拖尾肩峰，因此无法进行定量。LMWS2主要由铰链区的两条重链裂解得到的单个Fab和Fc结构域组成，在所有抗体样品中均得到定量，但英夫利昔单抗除外，该抗体因丰度始终偏低(≤0.02%)没有结果报告。由于LMWS2和LMWS1通常通过相同的降解途径产生，因此仅通过定量分析LMWS2来监测所选样品的降解途径可能是合理的做法。

图2至图4为三种色谱柱的使用寿命研究所得到的代表性色谱图的放大图。如图所示，在HMWS和LMWS2大小异构体的保留时间和分离方面（包括部分分离的肩峰），三种色谱柱的整体色谱图基本一致。

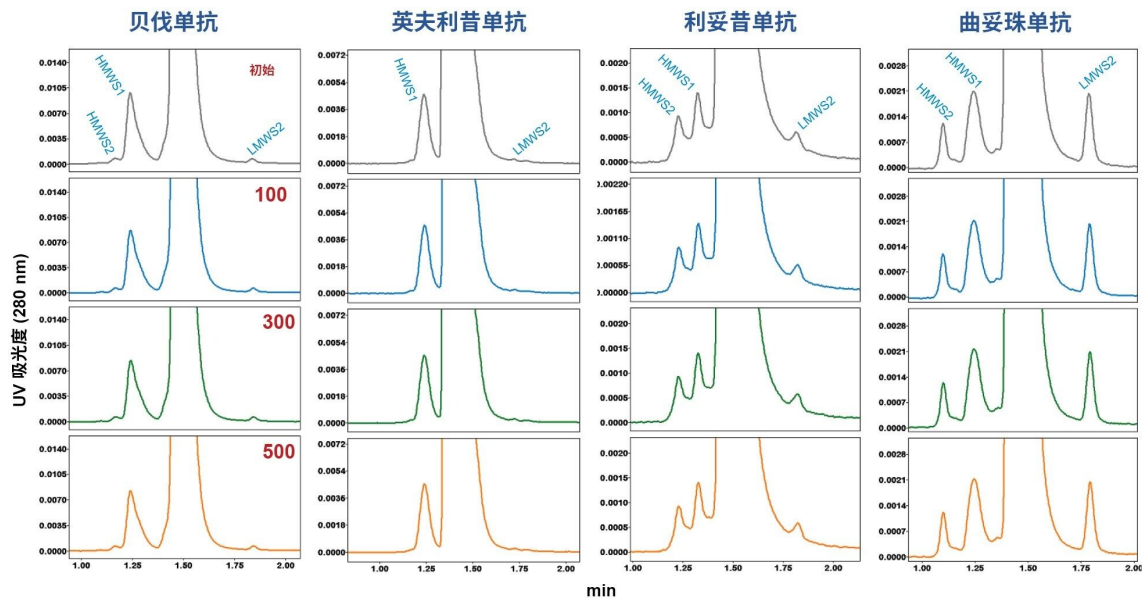


图2.在高通量色谱柱使用寿命研究中得到的生物类似药mAb样品的ACQUITY Premier SEC (4.6 × 150 mm)放大色谱图。图中显示了近似初始进样以及进样编号100、300和500的结果。利用DPBS作为流动相，流速为0.75 mL/min，分析时间为2.8 min。其他实验条件和峰说明见正文。

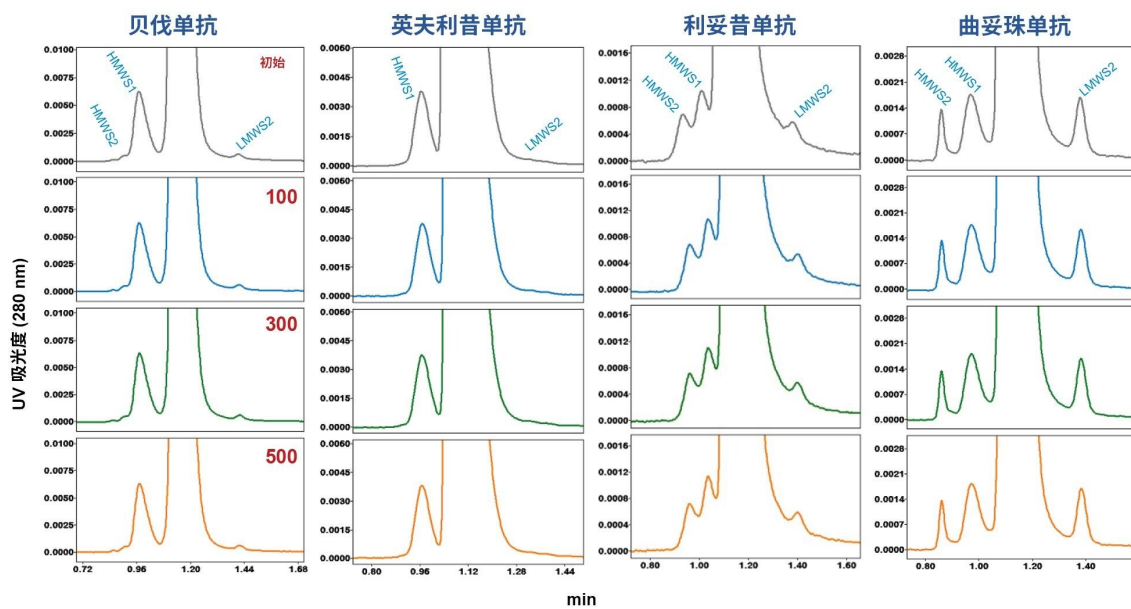


图3.在高通量色谱柱使用寿命研究中得到的生物类似药mAb样品的XBridge Premier SEC (4.6 × 150 mm)放大色谱图。图中显示了近似初始进样以及进样编号100、300和500的结果。利用DPBS作为流动相，流速为1.00 mL/min，分析时间为2.1 min。其他实验条件和峰说明见正文。



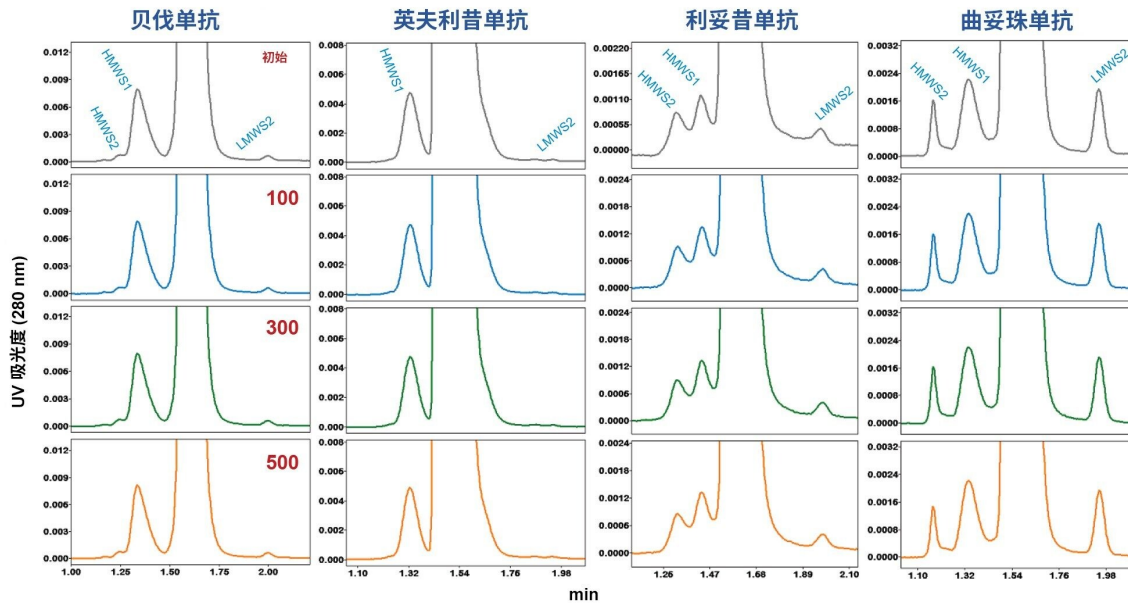


图4. 在高通量色谱柱使用寿命研究中得到的生物类似药mAb样品的XBridge Premier SEC (7.8 × 150 mm)放大色谱图。图中显示了近似初始进样以及进样编号100、300和500的结果。利用DPBS作为流动相，流速为2.00 mL/min，分析时间为3.0 min。其他实验条件和峰说明见正文。

在色谱图中鉴定出的可测量的HMWS和LMWS大小异构体的相对峰面积变化如图5至图7所示。另外，对于所有样品，将HMWS1的分离度视为功能性柱效变化的指标进行评价。在超过500次进样过程中，HMWS和LMWS杂质的相对定量测量结果以及HMWS1的分离度对于所有三种色谱柱均保持相对不变，表明这些色谱柱在高于推荐流速的条件下运行时能够保持稳定的性能。然而，与指定的参考流速相比，预计色谱柱在这些较高流速下使用时使用寿命将会缩短。

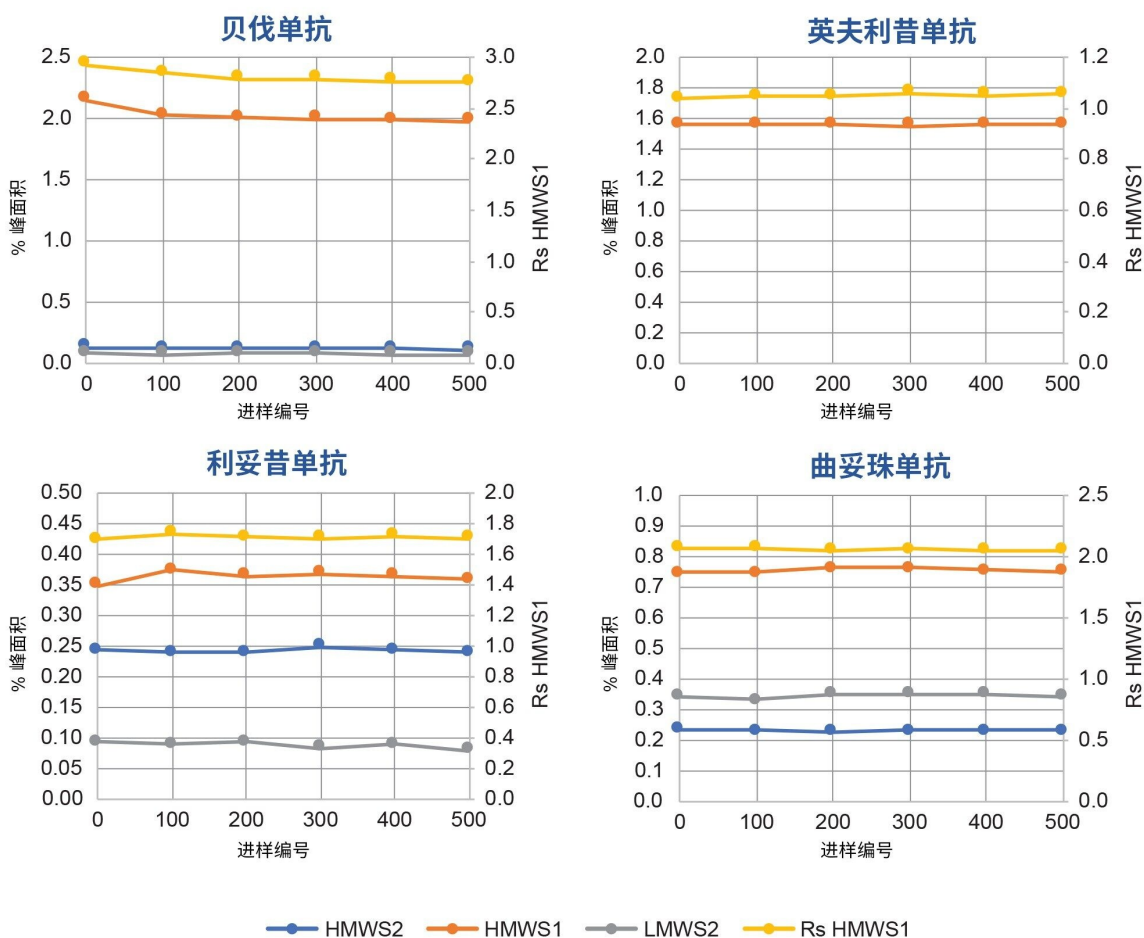


图5.在高通量使用寿命研究中使用ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱(4.6 × 150 mm) (图2) 分析生物类似药mAb样品的定量结果。图中展示了HMWS和LMWS2的相对丰度(左轴)以及HMWS1的分离度(Rs, 即USP半峰高)值(右轴)。在各时间点重复分析两次。图中显示了近似初始进样以及进样编号50、100、200、300、400和500的结果。其他实验条件和峰说明见正文。

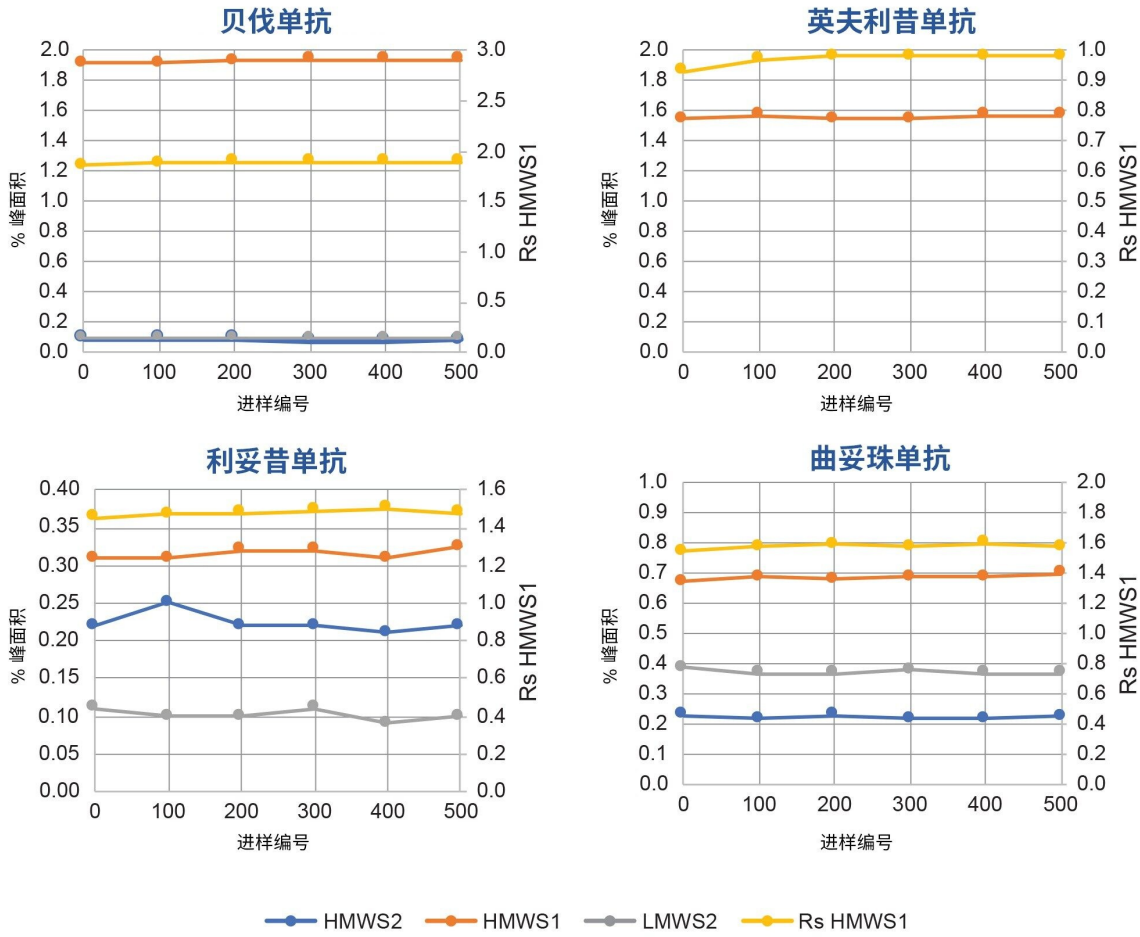


图6.在高通量使用寿命研究中使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(4.6 × 150 mm) (图3) 分析生物类似药mAb样品的定量结果。图中展示了HMWS和LMWS2的相对丰度 (左轴) 以及HMWS1的分离度 (Rs, 即USP半峰高) 值 (右轴)。仅在初始时间点和最终时间点重复分析两次。图中显示了近似初始进样以及进样编号50、100、200、300、400和500的结果。其他实验条件和峰说明见正文。

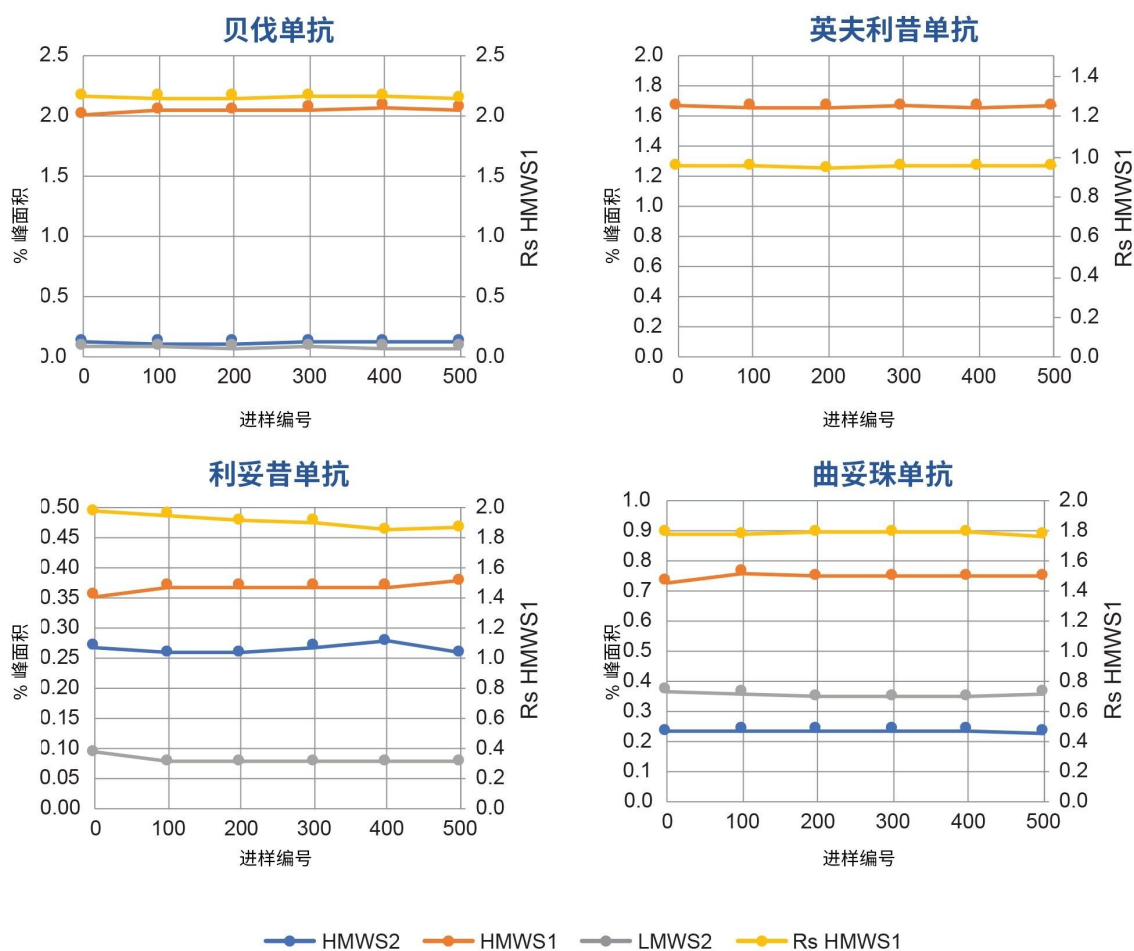


图7.在高通量使用寿命研究中使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(7.8 × 150 mm) (图2) 分析生物类似药mAb样品的定量结果。图中展示了HMWS和LMWS2的相对丰度(左轴)以及HMWS1的分离度( $R_s$ , 即USP半峰高)值(右轴)。仅在初始时间点和最终时间点重复分析两次。图中显示了近似初始进样以及进样编号50、100、200、300、400和500的结果。其他实验条件和峰说明见正文。

## 结论

之前已经证明, ACQUITY和XBridge Premier 250 Å SEC色谱柱在色谱柱硬件和填料颗粒化学性质方面的技术进步能够在生理pH流动相的条件下延长色谱柱使用寿命<sup>4</sup>。然而, 之前的色谱柱使用寿命研究侧重于在低于推荐

最大值的流速下使用柱长为300 mm的色谱柱进行高分离度分离，本研究则使用150 mm色谱柱评价了色谱柱在快速、高通量分离条件下的使用情况。除了色谱柱柱长更短以外，本研究使用的流速超过推荐的最大值，相应的分析时间在2.1~3.0 min之间。

在本研究中，我们在低扩散UPLC（ $5\sigma$ 系统扩散体积为7.9  $\mu\text{L}$ ）系统上评价了与UPLC兼容的4.6  $\times$  150 mm ACQUITY Premier SEC和XBridge Premier SEC色谱柱以及与HPLC兼容的7.8  $\times$  150 XBridge Premier SEC色谱柱。虽然HPLC系统的压力限值（例如Waters Arc™ HPLC系统，压力限值为9500 PSI/655 bar）足以按照所述流速运行4.6  $\times$  150 mm色谱柱，但HPLC系统的系统扩散体积更大，这可能导致分离性能降低。因此，建议在HPLC系统中使用更大内径的7.8  $\times$  150 XBridge Premier SEC色谱柱。在超过500次进样过程中，三款色谱柱在HMWS2、HMWS1和LMWS2定量以及HMWS1（主要是二聚体）大小异构体与主峰（单体）之间的分离度方面表现出一致的性能。本研究评估了色谱柱对目前市售的共四种生物类似药抗体药品系列的性能。

在本研究中，流动相经0.1  $\mu\text{m}$ 无菌过滤，所分析的样品是预计不包含明显含量的镜下可见或更大颗粒( $\geq 0.1 \mu\text{m}$ )的妥善配制药剂。这两个因素大大降低了色谱柱污染的可能性。但是，如果分析物是可能含有大量镜下可见或较大颗粒的开发阶段样品，建议使用保护柱（MaxPeak Premier SEC蛋白分析专用保护柱，部件号：[186009969 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009969-maxpeak-premier-protein-sec-guard-250a-25--m-46-x-30-mm-1-pk.html >](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009969-maxpeak-premier-protein-sec-guard-250a-25--m-46-x-30-mm-1-pk.html)）或采取离心等样品前处理手段<sup>6</sup>。

---

## 参考资料

1. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Nari LO, Topp EM. "Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates" *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):417-430.
2. Eon - Duval, Alex, Hervé Broly, and Ralf Gleixner. "Quality Attributes of Recombinant Therapeutic Proteins: An Assessment of Impact on Safety and Efficacy as Part of a Quality by Design Development Approach." *Biotechnology progress* 28, no.3 (2012): 608-622.
3. Mou, Xiaodun, Xiaoyu Yang, Hong Li, Alexandre Ambrogelly, and David J. Pollard. "A High Throughput Ultra-Performance Size Exclusion Chromatography Assay for the Analysis of Aggregates and Fragments of Monoclonal Antibodies." *Pharmaceutical Bioprocessing* 2, no.2 (2014): 141-156.
4. Stephan M. Koza, Hua Yang, and Ying Qing Yu, "MaxPeak Premier Protein SEC 250 Å Column Lifetimes at Physiological pH for Polysorbate (Tween) Formulated Biosimilar Monoclonal

Antibodies” , 2022, Waters Application Note, [720007523](#).

5. Stephan M. Koza, Corey Reed, and Weibin Chen, LC系统扩散对单抗聚集体和片段SEC分析的影响：基于方法选择最佳色谱柱规格, 2019, 沃特世应用纪要, [720006336ZH](#).

6. mAb聚集体、单体和片段的体积排阻色谱(SEC)指南, 沃特世产品手册, [720006067ZH](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=134957469>> .

---

## 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>>

720007584ZH, 2022年3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