

在ACQUITY™ Premier UPLC™系统上部署 Auto · Blend Plus技术

Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本研究展示了Auto · Blend Plus技术在生物制药产品的开发和制造中所能提供的价值和实用性。Auto · Blend Plus技术是ACQUITY™ Premier UPLC系统的标准功能，降低了与电荷异构体分析方法开发过程相关的负担和成本。这是通过利用ACQUITY Premier QSM模块的四元溶剂混合功能来实现的，此功能可以使用纯溶剂或浓缩储备液的溶剂瓶来管理流动相组成。借助该功能，用户可减少工作台工作时间，为数据分析留出更多时间。为了证明这一优势，我们开发了一种用于mAb药品的非变性离子交换色谱(IEX)方法，使用一组流动相组分在多种条件下进行探索。结果表明，ACQUITY Premier系统与Auto · Blend Plus技术的结合为方法的探索和优化提供了有效的解决方案。此外，用户可访问的组分表使优化方法完全透明，用户可以使用一组已定义的流动相组分同时简化方法验证和最终面向受监管环境的方法迁移。这些功能已完全集成在Waters CDS/信息学解决方案中，使ACQUITY Premier系统成为支持生物制药产品开发和制造的理想平台。

优势

- Auto · Blend Plus技术的优势：
 - 灵活的溶剂管理，实现高效的方法探索
 - 可以利用一组简单的流动相减少成本和时间
-

- 与沃特世符合法规要求的Empower™软件完全集成
- 能够使用集成的组分表验证和迁移方法

简介

与药物相关的方法开发过程有时是一项艰巨的任务，包括以迭代的方式评估多个分离方法参数。这种优化过程不仅会大幅增加在实验室内的工作台操作时间，而且成本十分高昂，因为通常需要对所研究的每个条件集重新制备样品和流动相。这对于生物制药行业尤其如此，该行业通常通过非变性技术（如IEX）分析蛋白质样品，在分析时需要优化pH和离子强度等相关条件，才能充分分离与药品相关的电荷异构体^{1,2}。从这个角度来说，部署可以减少方法开发周期相关负担的技术对于制药公司来说十分有利，有助于推动产品更快地进入市场。

最近，沃特世公司推出了采用MaxPeak™ HPS技术的ACQUITY Premier UPLC系统（图1），该系统进一步改善了Waters LC™生物分离产品组合的色谱性能。作为本产品的一部分，ACQUITY Premier系统可以配置二元或四元溶剂管理器。配置四元溶剂管理器的客户可以使用Waters Auto·Blend Plus技术简化方法开发过程。这可以通过利用四元溶剂混合功能来实现，用户可以利用浓缩储备液的溶剂瓶来实时管理流动相组成，从而减少操作时间并留出更多时间来分析数据。本研究的目的是应用Auto·Blend Plus技术来优化英夫利昔单抗电荷异构体的分离，并证明该技术可有效地加速药物开发过程以及降低开发成本^{3,4}。



图1.重新定义性能。ACQUITY Premier系统是ACQUITY UPLC平台的新一代升级版本，提供了兼具可靠性、稳定性、高质量和配置灵活性的ACQUITY UPLC PLUS系列，满足您的所有期望。

实验

磷酸钠（一元/二元酸）购自Sigma Aldrich，氯化钠购自Fisher Chemical。使用MS级水制备100 mM NaH₂PO₄、100 mM Na₂HPO₄和1000 mM NaCl储备液。英夫利昔单抗药品Remicade购自Amerisource Bergen，按照生产商说明的剂量浓度(10 mg/mL)制备，然后直接进样。

液相色谱条件（Auto·Blend Plus技术）

液相色谱系统：	ACQUITY Premier系统（带QSM模块）
检测条件：	ACQUITY TUV, FC=Ti 5 mm, λ=214 nm
样品瓶：	QuanRecovery MaxPeak样品瓶（部件号：186009186）

色谱柱:	Protein-Pak™ Hi Res CM (7 μm, 4.6 × 100 mm, 部件号: 186004929)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.750 mL/min
流动相A:	100 mM NaH ₂ PO ₄
流动相B:	100 mM Na ₂ HPO ₄
流动相C:	1000 mM NaCl
流动相D:	H ₂ O

液相色谱条件 (传统方法)

液相色谱系统:	ACQUITY Premier系统 (带QSM模块)
检测条件:	ACQUITY TUV, FC=Ti 5mm, λ=214 nm
样品瓶:	QuanRecovery MaxPeak™ 样品瓶
色谱柱:	Protein-Pak HiRes CM (7 μm, 4.6×100 mm)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C

进样体积： 5 μ L

流速： 0.750 mL/min

流动相A： 20 mM磷酸盐缓冲液，pH 6.55

流动相B： 20 mM磷酸盐缓冲液，含有200 mM NaCl，pH 6.45

流动相C： H₂O

流动相D： H₂O

梯度表（传统方法）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
初始	0.750	95.0	5.0	0.0	0.0	初始
9.00	0.750	72.5	27.5	0.0	0.0	6
10.00	0.750	72.5	27.5	0.0	0.0	6
11.00	0.750	0.0	100.0	0.0	0.0	6
13.00	0.750	0.0	100.0	0.0	0.0	6
14.00	0.750	95.0	5.0	0.0	0.0	6
27.00	0.750	95.0	5.0	0.0	0.0	6

数据管理

色谱软件： Empower 3, FR4

结果与讨论

作为ACQUITY Premier系统标准功能的一部分，Auto·Blend Plus方法可以通过最新发布的Empower、MassLynx™和waters_connect™软件的仪器方法面板进行部署。如图2A所示，在本研究中使用Empower 3，通过在仪器方法窗口中选择相关图标（虚线框）启用Auto·Blend Plus技术。选择后，将打开Auto·Blend Plus界面，如图2B所示。在这个界面中，用户可以从预填充的下拉列表中选择水性缓冲液或有机溶剂，或使用自定义的溶剂瓶系统。如图所示，当使用自定义溶剂瓶系统时，用户可以使用pKa或经验数据校正pH值。值得注意的是经验数据方法，这是因为可以通过该方法使用Auto·Blend Plus算法修正溶液中的盐引入的同离子效应，从而提高溶液在一定离子强度范围内保持准确pH值的能力。为了充分利用经验数据方法，我们使用仪器方法表中显示的储备液，通过实验测量了九种不同流动相组成的pH值。磷酸盐缓冲体系的示例如图2B所示。一旦启用并校准，Auto·Blend Plus技术将以直观的方式显示与pH值和离子强度（盐）相关的梯度信息，如图3所示。这为用户研究pH和/或盐的影响提供了灵活性，用户可以使用这个单一的缓冲体系进行高效的方法探索。

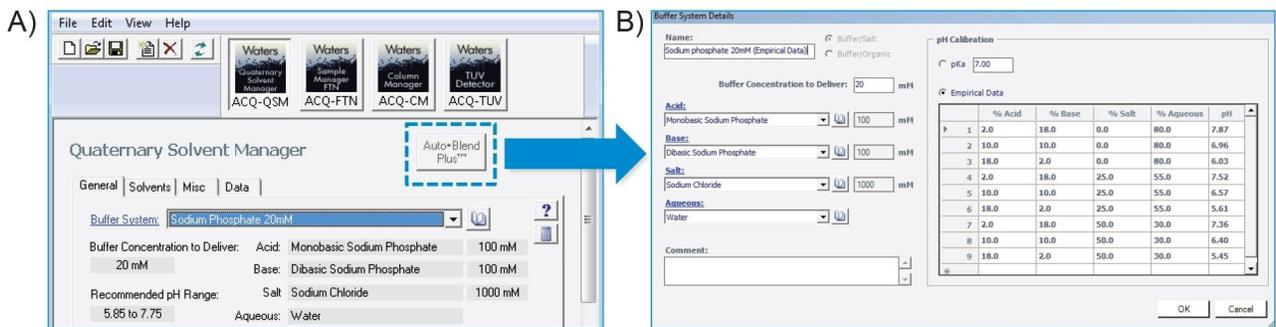


图2.集成技术。A)Auto·Blend Plus技术是沃特世软件支持的标准功能，用户可以在仪器方法窗口中选中对应图标（虚线框）轻松访问。B)选中后，即可访问Auto·Blend Plus面板，用户可以从溶剂/缓冲体列表中选择或自定义溶剂瓶系统。

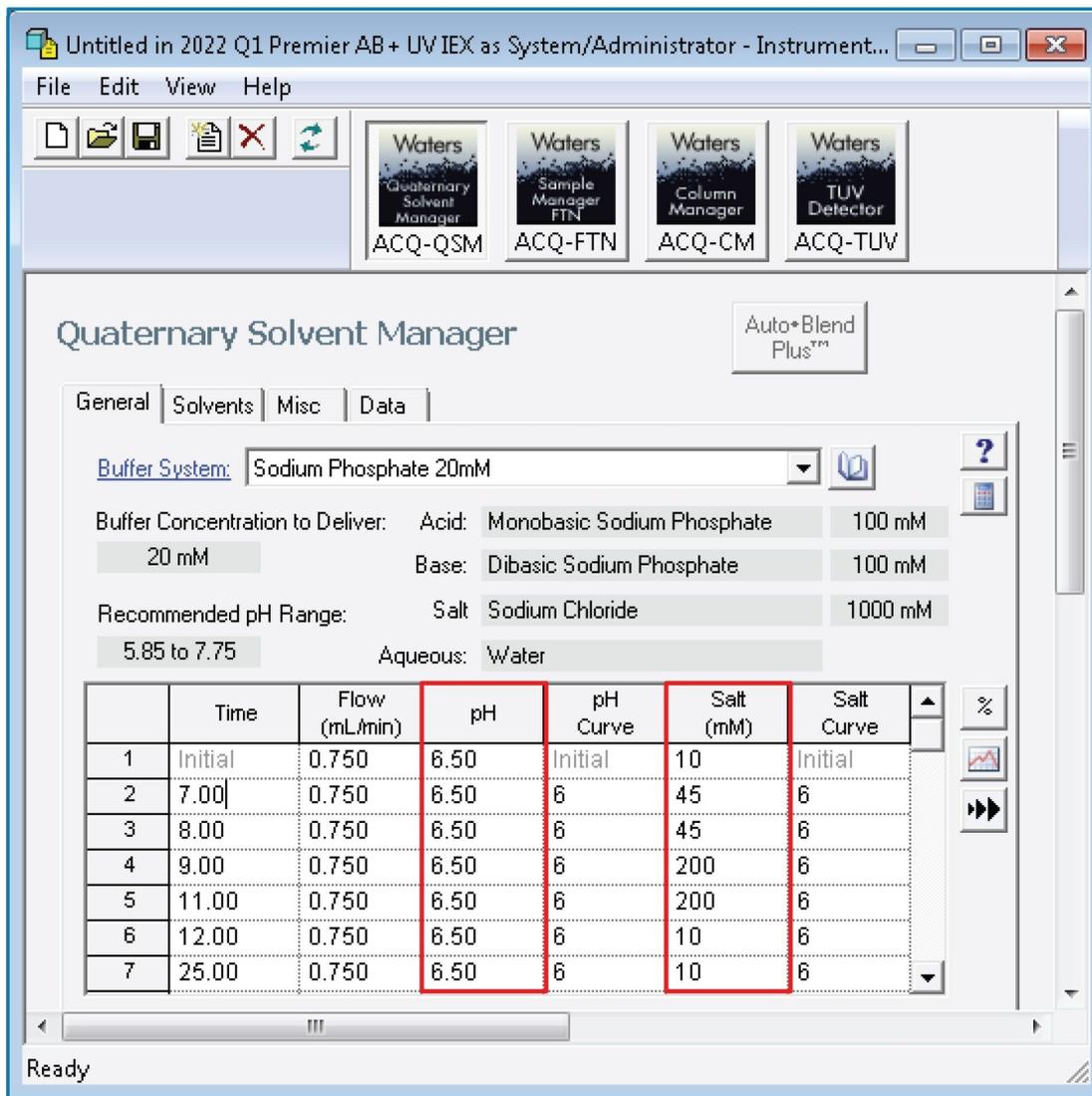


图3.直观的图形用户界面。Auto-Blend Plus技术允许用户使用pH和/或盐（红框）梯度定义梯度条件，从而增加灵活性。

为了在实际环境中证明这一原理，使用10–100 mM NaCl的快速筛选梯度，评估了英夫利昔单抗在不同pH值下的电荷异构体曲线。如图4A所示，Auto-Blend Plus方法能够使用单一溶剂瓶缓冲液设备以递增的方式研究pH值。用户可以使用这种方法快速测定pH=6.5以上的流动相，从而提高色谱空间使用效率，并能够实现可接受的电荷异构体分离度。

在相同的缓冲体系中使用类似的方法，然后评估较缓的盐梯度，同时保持流动相的pH恒为6.8。如图4B所示，缓梯度提升了主要赖氨酸电荷异构体(+0K, +1K, +2K)之间的分离度。酸性物质和+0K赖氨酸异构体之间的分离度变化可以忽略不计，这表明先洗脱组分没有与固定相发生强烈的吸附，并且极少受到较缓的盐梯度的影响，这表明较低的流动相pH值可能更适合优化此类电荷异构体分析。值得注意的是，在传统方法开发实践中，因为时间限制和仪器可用性等因素可能会限制可评估条件的数量，这种观察结果/相关性很可能会被忽略。

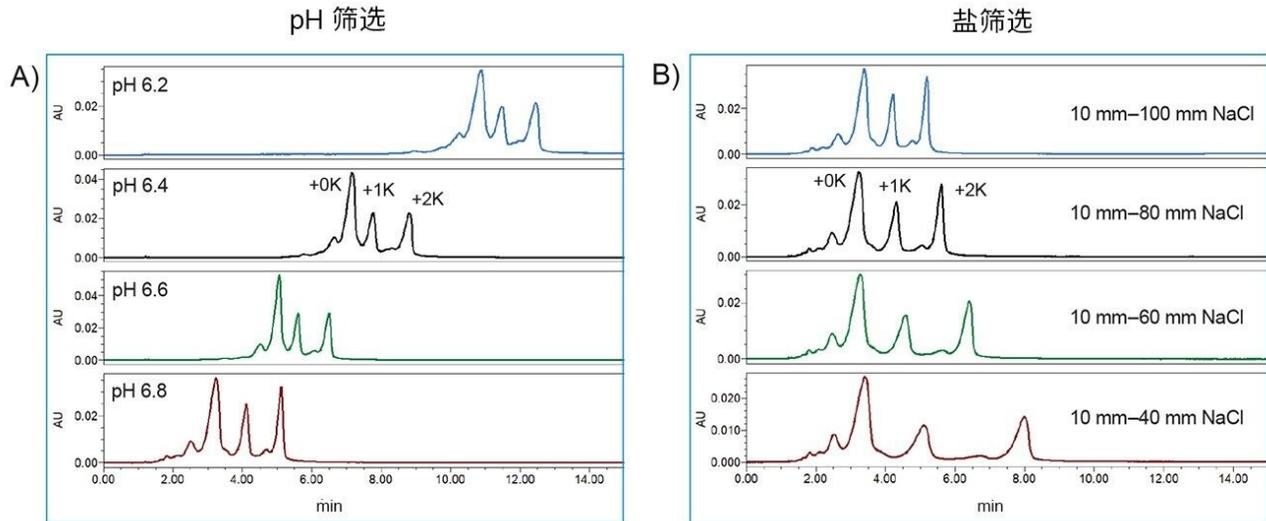


图4. 高效方法探索。Auto-Blend Plus技术使用浓缩储备液作为流动相，可以管理流动相组成，并研究与A) pH值和/或B)离子强度相关的多种条件，从而实现高效的方法探索。

利用从最初的方法探索中获得的知识，使用相同的缓冲体系进行进一步优化，发现当流动相pH=6.5，温度升高至40 °C时，有助于使用0.750 mL/min的高流速，并且在使用10-45 mM NaCl梯度时，可以很好地利用色谱空间，实现不同电荷异构体之间可接受的分离度（图5A）。从相关数据（表1）可以明显看出，重复进样峰面积的% RSD较低，表明ACQUITY Premier系统能够提供一致且可重现的结果。

最后，还通过研究梯度斜率验证了在更高的通量下能否获得一致的结果，以及能否适应制造和更高通量的开发环境下的效率需求。使用相同的缓冲体系，评估从1% NaCl/min到5% NaCl/min的梯度斜率（每次递增1%），每次运行的梯度时间按比例减少。如图5B及其对应的数据（表2）所示，ACQUITY Premier系统能够将峰面积偏差保持在1%以内，且具有高度的重现性(%RSD ≤ 3%)，同时将总分析运行时间从51分钟缩短到23分钟，展示了支持高通量环境的潜力。

一些受监管的环境（如制造业），要求方法经过确认、验证和方法/技术转移，一些使用其他LC平台的组织可能无法使用Auto·Blend Plus甚至基于四元的液相色谱系统等软件功能。考虑到这一点，Auto·Blend Plus技术允许用户访问其算法生成的组分表，便于方法迁移。图6A显示了可从仪器方法窗口访问的组分表示例。

为了证明此技术广泛的适用性，将使用Auto·Blend Plus开发的当前方法转换为与二元混合流动相体系兼容的方法。为此，新鲜制备了四种储备液，如图6B所示。使用组分表溶剂瓶体积百分比，用140 mL NaH_2PO_4 （储备液A）、60 mL Na_2HPO_4 （储备液B）、0 mL（储备液C）和800 mL（储备液D）制备1 L流动相A，从而在不添加NaCl的情况下制备20 mM磷酸盐缓冲液。通过实验测定pH值为6.55，在预期pH值的0.05范围内。类似地，使用组分表中的第四行制备流动相B，图6B中列出了使用的储备液体积。实验确定流动相B的pH值为pH=6.45。使用组分表配置的每个流动相的预期pH值和实验pH值之间的一致性表明Auto·Blend Plus能够提供准确的流动相组分，同时在组分参数方面保持透明。

图7所示的是Auto·Blend Plus方法与从组分表中导出的手动二元混合方法的对比。如图所示，这两种方法都得到了电荷异构体曲线。绝对保留时间的微小差异可能是由于pH值的微小差异造成的，这是因为二元流动相体系无法纠正同离子效应。然而，这对结果的影响可以忽略不计，因为两种方法报告的平均峰面积百分比均在0.25%以内。这些结果表明，Auto·Blend Plus方法可以轻松转换为传统方法，以最小的成本促进确认、验证和技术转移。总体而言，本研究证明了Auto·Blend Plus技术在生产优化方法方面的价值和实用性，以及在减少生物治疗药物产品开发和制造相关时间和成本方面的作用。

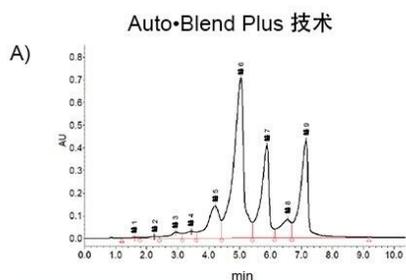


表3. 峰面积 (Auto•Blend Plus 技术)

进样	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
1	0.11	0.43	1.68	1.74	9.68	41.97	19.01	5.18	20.21
2	0.12	0.42	1.75	1.67	9.72	41.94	19.07	5.14	20.18
3	0.10	0.42	1.75	1.67	9.76	41.97	19.02	5.16	20.14
平均值	0.10	0.42	1.73	1.69	9.72	41.96	19.03	5.16	20.17
标准偏差	0.005	0.006	0.041	0.04	0.04	0.015	0.03	0.018	0.036
% RSD	5.01	1.99	2.36	2.37	0.41	0.04	0.16	0.35	0.18

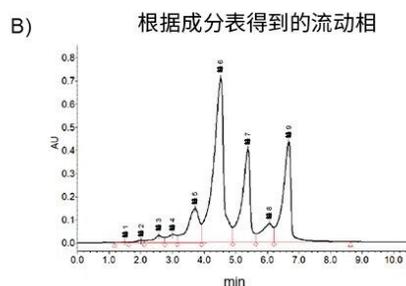


表4. 峰面积 (成分表方法)

进样	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
1	0.12	0.43	1.75	1.77	9.72	41.69	18.99	5.17	20.37
2	0.10	0.48	1.72	1.73	9.74	41.89	19.04	5.16	20.14
3	0.12	0.44	1.76	1.71	9.71	41.68	18.99	5.20	20.39
平均值	0.11	0.45	1.74	1.74	9.72	41.75	19.01	5.18	20.30
标准偏差	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.12	0.03	0.02	0.14
% RSD	8.67	5.35	1.26	1.72	0.17	0.29	0.17	0.36	0.70

图7. 方法迁移。将A) Auto•blend Plus方法转化为B)使用根据组分表制备的二元流动相体系的传统方法。结果在不同的方法之间具有高度的可比性，表明Auto•blend Plus方法可以成功迁移进行验证。

结论

Auto • Blend Plus是ACQUITY Premier UPLC系统的标准功能，用户可以借助该技术通过一组简单组分测试多个缓冲组分，从而减少与方法开发过程相关的负担和成本。借助可访问的组分表，用户能够以尽可能小的工作量对满足监管指导原则的方法进行迁移和验证。这些功能已完全集成在Waters CDS/信息学解决方案中，使ACQUITY Premier系统成为轻松支持生物制药产品开发和制造的灵活平台。

参考资料

1. Fekete *et al.* Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2015; 113:43–55.

2. Du *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs*. 2012 Sep–Oct; 4(5):578–85.
3. Eyer B *et al.* How Similar Is Biosimilar? A Comparison of Infliximab Therapeutics in Regard to Charge Variant Profile and Antigen Binding Affinity. *Biotechnol J*. 2019 Apr; 14(4).
4. Jung *et al.* Physicochemical characterization of Remsima. *mAbs*. 2014; 6(5):1163–77.

特色产品

[ACQUITY Premier系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

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

[Auto · blend Plus <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134623262>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134623262)

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

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007603ZH, 2022年4月

© 2022 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