Waters™

应用纪要

mAb SEC USP专论方法在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上的稳定性

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

体积排阻色谱(SEC)已广泛用于基于分子大小的杂质分析。在本应用纪要中，我们展示了基于SEC的mAb分析USP专论方法在使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)时可保持稳定。该色谱柱结合了Waters MaxPeak Premier高性能表面(HPS)和BEH颗粒技术的SEC性能优势，可测定单克隆抗体的HMWS、单体和LMWS。使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱的USP方法可以作为一个有效起点，开发基于分子大小测量其他单克隆抗体中杂质的方法。

XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)与7.8 × 300 mm色谱柱（填充5 µm颗粒，孔径250 Å的L59 SEC色谱柱，使用USP方法中指定的流动相）相比，获得的结果一致。此外，XBridge色谱柱对于SEC流动相pH和离子强度的变化，以及色谱柱之间的变化均能表现出良好的稳定性。

优势

- 用于mAb大小异构体分析的USP SEC方法在使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)时可保持稳定
- Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)是USP列出的L59色谱柱，其定量结果与USP专论中指定用于mAb分析的L59色谱柱结果相当。此外，XBridge色谱柱还大大提高了HMWS和LMWS杂质的分离度

- USP mAb SEC分析在色谱柱之间的重现性得到证明

简介

美国药典(USP)通则<129>（重组治疗性单克隆抗体的分析程序）中提供了通过体积排阻色谱(SEC)法测定重组治疗性单克隆抗体(mAb)中杂质的步骤[1]。该方法使用7.8 × 300 mm SEC色谱柱，其中填充5 µm颗粒，孔径250 Å，用于监测高分子量物质(HMWS)、mAb单体以及低分子量物质(LMWS)。假设有三分之一的mAb（Fab或Fc结构域）为LMWS[2]。

沃特世的MaxPeak Premier高性能表面(HPS)技术优势，与全新基于BEH的颗粒键合技术相结合，大幅减少了意外的次级离子相互作用和疏水相互作用，有助于实现可靠的mAb大小异构体SEC分析。

在本应用纪要中，我们展示了分析USP单克隆IgG标准品的USP方法在使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 7.8 × 300 mm)时可保持稳定。此外，使用XBridge色谱柱与USP方法规定的7.8 × 300 mm SEC色谱柱（填充5 µm颗粒）测定目前美国市售的四种单克隆抗体(mAb)生物类似药的HMWS和LMWS，获得了一致的结果。

实验

样品描述

单克隆IgG系统适应性标准品购自USP。分析的mAb生物类似药为贝伐单抗(Mvasi)、英夫利昔单抗(Avsola)、利妥昔单抗(Ruxience)，及其原研药曲妥珠单抗（赫赛汀）。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测条件：	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12 × 32 mm螺纹颈口样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积300 µL，100个/包（部件号：186002639）
色谱柱：	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱，250 Å，2.5 µm，7.8 × 300，配有mAb大小异构体标准品（部件号：176005070） BioSuite Diol (OH)色谱柱，250 Å，5 µm，7.8 × 300 mm（部件号：186002165）
柱温：	室温
样品温度：	10 °C
进样体积：	5–20 µL
流速：	0.5-1 mL/min
流动相A：	400 mM磷酸二氢钾
流动相B：	400 mM磷酸氢二钾
流动相C：	1 M氯化钾

流动相D： 水

缓冲剂传输浓度： 200 mM

梯度表（Auto·Blend 方法，使用经验表）

时间(min)	流速(mL/min)	pH	盐(mM)	盐曲线
0.0	0.5	6.2	250	
35.0	0.05	6.2	250	11

通用四元液相色谱系统的等效梯度表如下。

时间(min)	%A	%B	%C	%D
0.0	36.7	13.3	25.0	25.0
35.0	36.7	13.3	25.0	25.0

结果与讨论

A. 使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱的USP方法稳定性

如图1所示，使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300 mm)分析了USP单克隆IgG。USP方法中使用的流动相是200 mM磷酸钾和250 mM氯化钾，pH 6.2。此外，还通过改变pH（6.0和6.4）和离子强度（200 mM和300 mM氯化钾）运行了其他四种流动相条件，研究方法稳定性。

在不同的流动相条件下获得了相似的分离效果（图1B），表明在使用同一XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm, 7.8 × 300)的情况下，USP方法在测试的pH和离子强度范围内可保持稳定。USP通则<129>中设置的定量标准为，HMWS的峰面积百分比必须在

0.4%–0.67%之间，且LMWS的峰面积百分比不得超过(NMT) 0.2%。如图1B中所示，HMWS在10.7-12.3分钟之间洗脱，LMWS在15.5-16.3分钟之间洗脱。HMWS和LMWS的平均峰面积百分比在所有流动相条件下均符合定量标准，如色谱图中所示(n=2)。

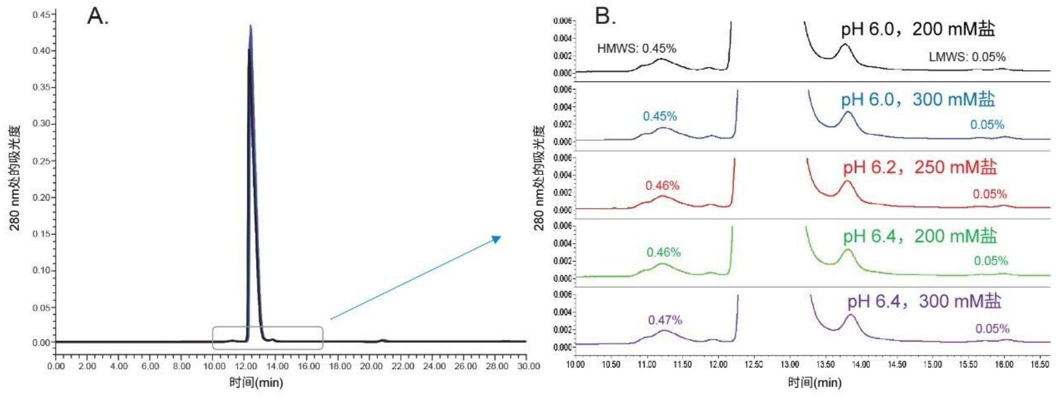

图1.使用*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱*(250 Å, 2.5 µm)*在五种流动相条件下分析用于单克隆*IgG*大小异构体测定的*USP*专论方法。*A.* 全尺寸叠加色谱图。*B. HMWS*和*LMWS*的放大视图，每张色谱图上显示了平均峰面积百分比*(n=2)*。

图2显示了填充5 µm颗粒的L59 SEC色谱柱（即用于单克隆IgG大小异构体测定的USP方法色谱柱）在USP指定的流动相下的分析结果。色谱图中显示了HMWS和LMWS的平均峰面积百分比，均符合定量标准(n=2)。

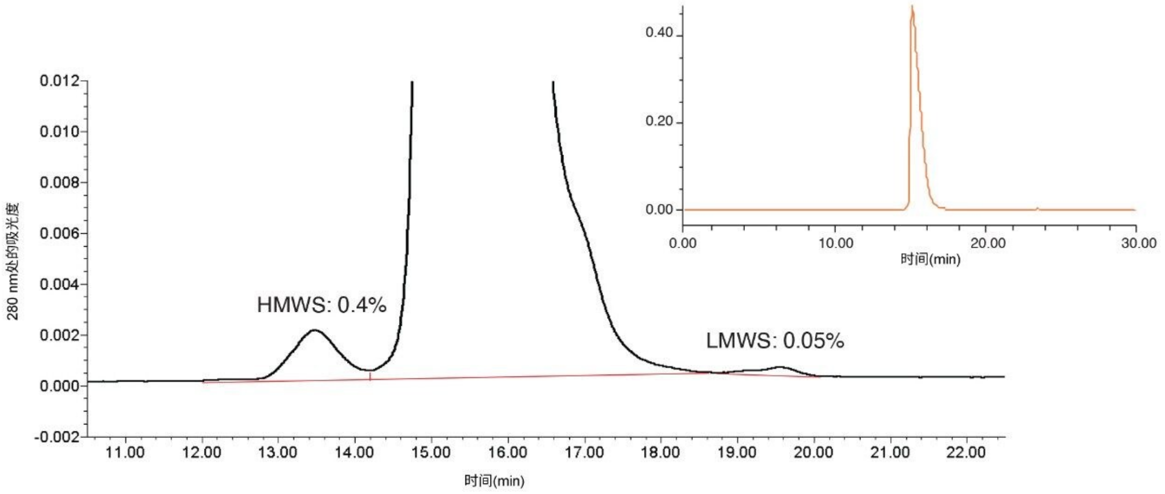

图2.使用填充5 µ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱在通则<129>中规定的流动相条件（200 *mM*磷酸钾和250 *mM*氯化钾，*pH 6.2*）下分析用于单克隆*IgG*大小异构体测定的*USP*专论方法。色谱图中显示了*HMWS*和*LMWS*的平均峰面积百分比(*n=2*)。插图显示了色谱图的全尺寸视图。

B. 使用USP方法对mAb生物类似药进行杂质分析

使用USP方法在来自不同批次的三根XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)和一根填充5 µm颗粒的SEC色谱柱上分析USP单克隆IgG和四种美国市售的mAb样品（曲妥珠单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗）（图3-图7）。在分析mAb生物类似药和原研药时，除Premier色谱柱#3外，所有色谱柱的流速均为0.5 mL/min，Premier色谱柱#3的流速为1 mL/min。在大多数色谱柱上均进行了重复进样(n=2)。误差条指示结果的范围。

使用来自三个批次的XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱（250 Å，2.5 µm颗粒）以及上文详述的USP方法推荐色谱柱测定所有五种mAb的HMWS和LMWS，均获得了一致的结果。对于LMWS1，Premier色谱柱#3的结果百分比偏低，原因可能是在较高流速下，单体峰和LMWS1之间的分离度有所降低。然而，在大多数情况下，无论流速高低，所有三根XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)测得的HMWS和LMWS峰面积百分比均非常相似，这表明XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)可用于更高的样品通量。对于测定的所有mAb，LMWS1在USP方法色谱柱上均未充分分离，无法进行可靠的定量。因此，图中不包含它的任何数据。在某些情况下，使用USP方法色谱柱测得的HMWS1峰面积百分比低于XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)，这可能是因为在填充5 µm颗

粒的USP方法色谱柱上，HMWS1与单体峰之间的分离度较低。

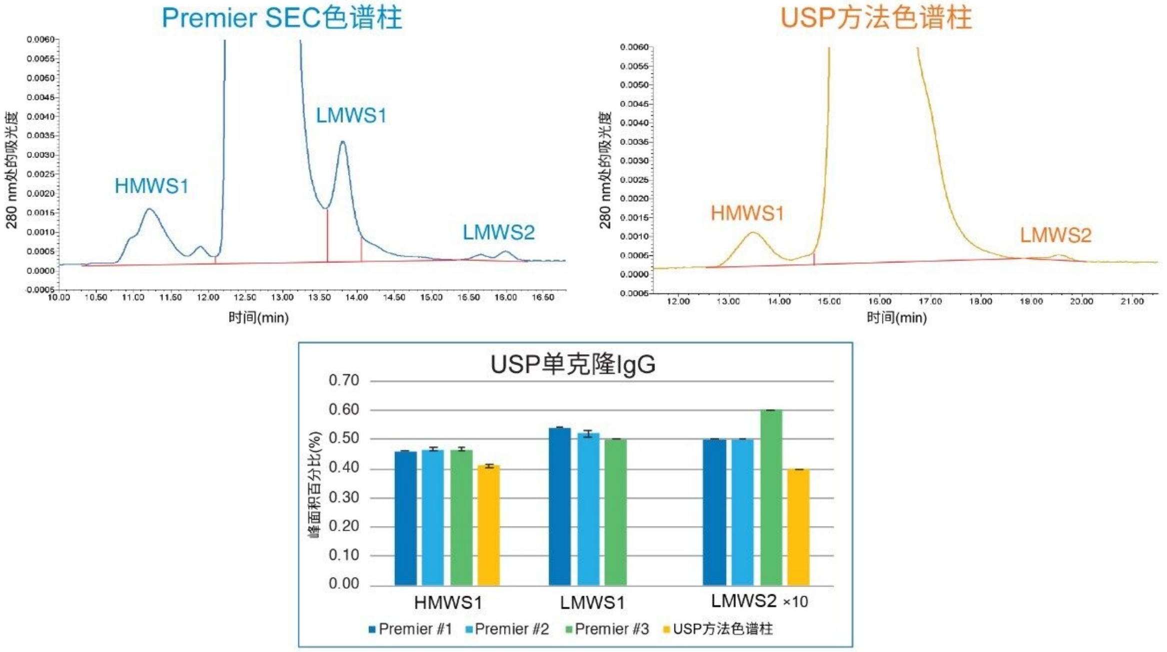

图3.使用来自三个不同批次的*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱(250 *Å, 2.5 μm)*和一根填充5 μ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱，在通则<129>中规定的流动相条件下分析*USP*单克隆*IgG*大小异构体的结果比较。为了更好地观察结果，图中将*LMWS2*的峰面积百分比提升至实际值的10倍。

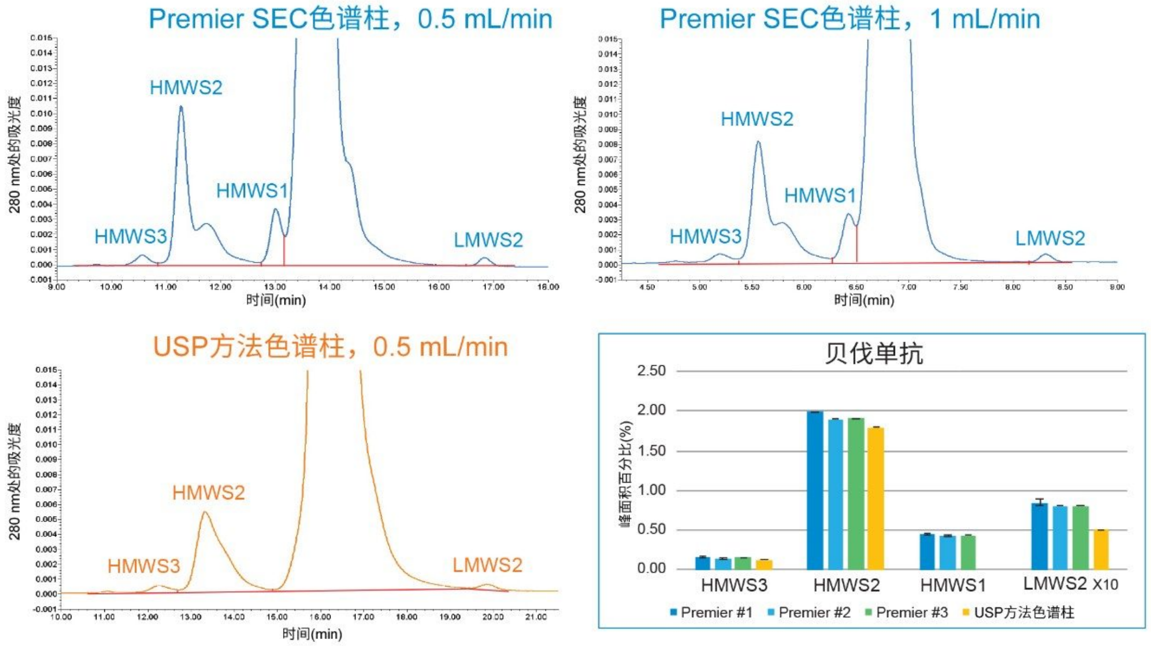

图4.使用来自三个不同批次的*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱(250 *Å, 2.5 μm)*和一根填充5 μ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱，在通则<129>中规定的流动相条件下分析贝伐单抗生物类似药的结果比较。除*Premier*色谱柱#3外，所有色谱柱的流速均为0.5 *mL/min*，Premier色谱柱#3的流速为1 *mL/min*。为了更好地观察结果，图中将*LMWS2*的峰面积百分比提升至实际值的10倍。

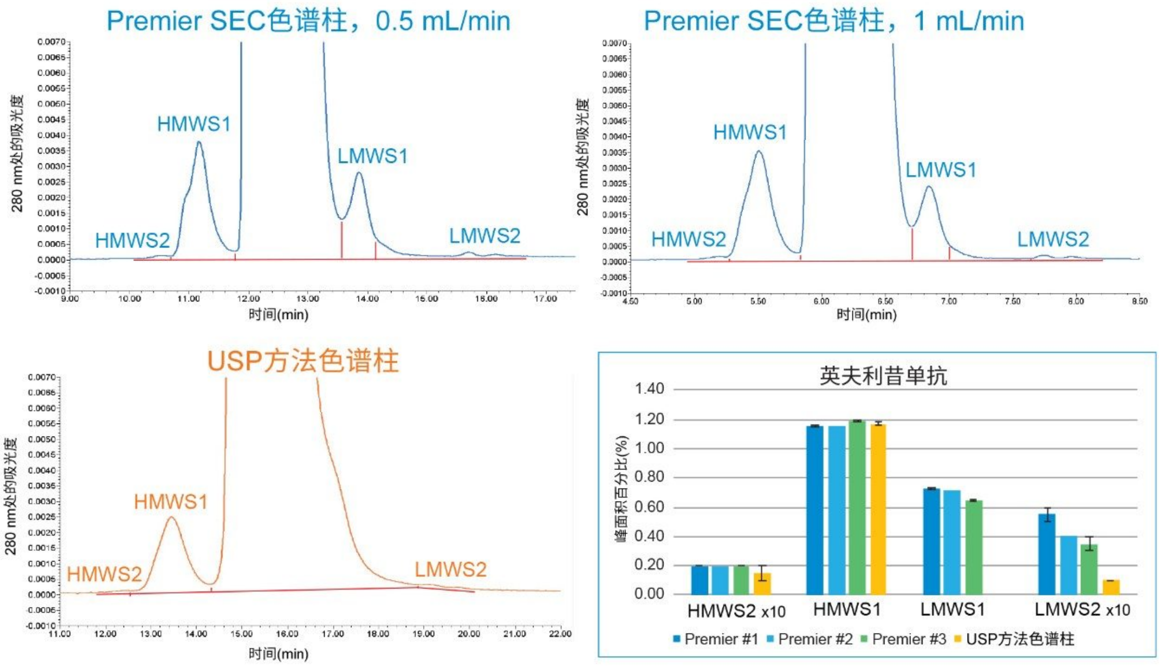

图5.使用来自三个不同批次的*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱(250 *Å, 2.5 μm)*和一根填充5 μ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱，在通则<129>中规定的流动相条件下分析英夫利昔单抗生物类似药的结果比较。除*Premier*色谱柱#3外，所有色谱柱的流速均为0.5 *mL/min*，Premier色谱柱#3的流速为1 *mL/min*。为了更好地观察结果，图中将*HMWS2*和*LMWS2*的峰面积百分比提升至实际值的10倍。

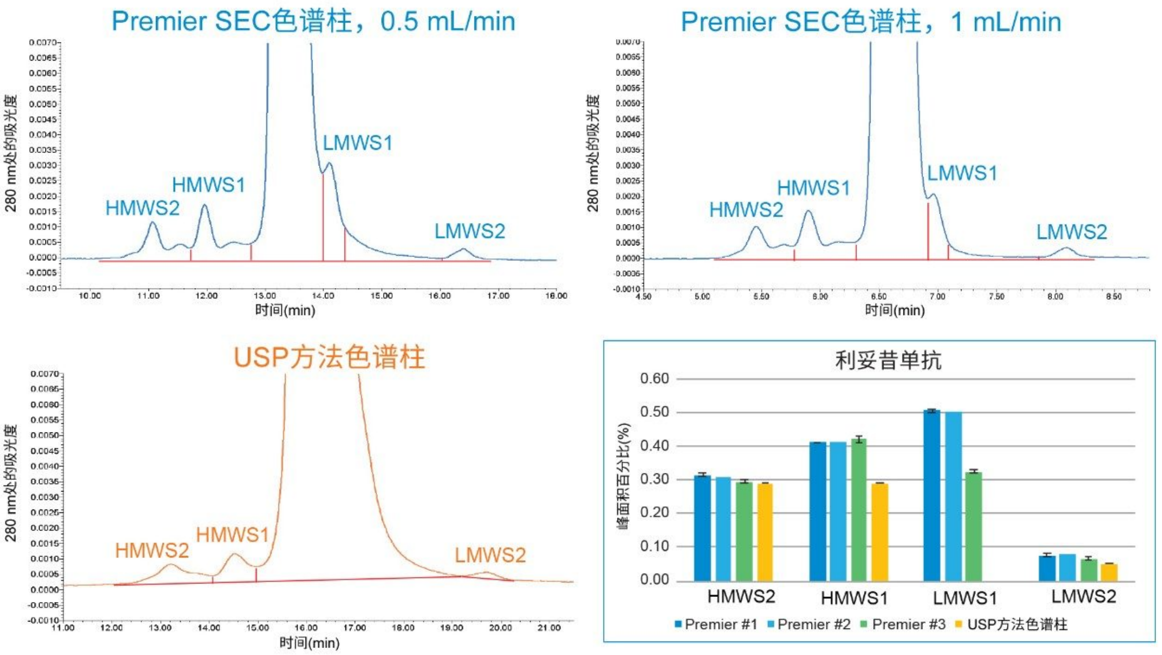

图6.使用来自三个不同批次的*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱(250 *Å, 2.5 μm)*和一根填充5 μ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱，在通则<129>中规定的流动相条件下分析利妥昔单抗生物类似药的结果比较。除*Premier*色谱柱#3外，所有色谱柱的流速均为0.5 *mL/min*，Premier色谱柱#3的流速为1 *mL/min*。

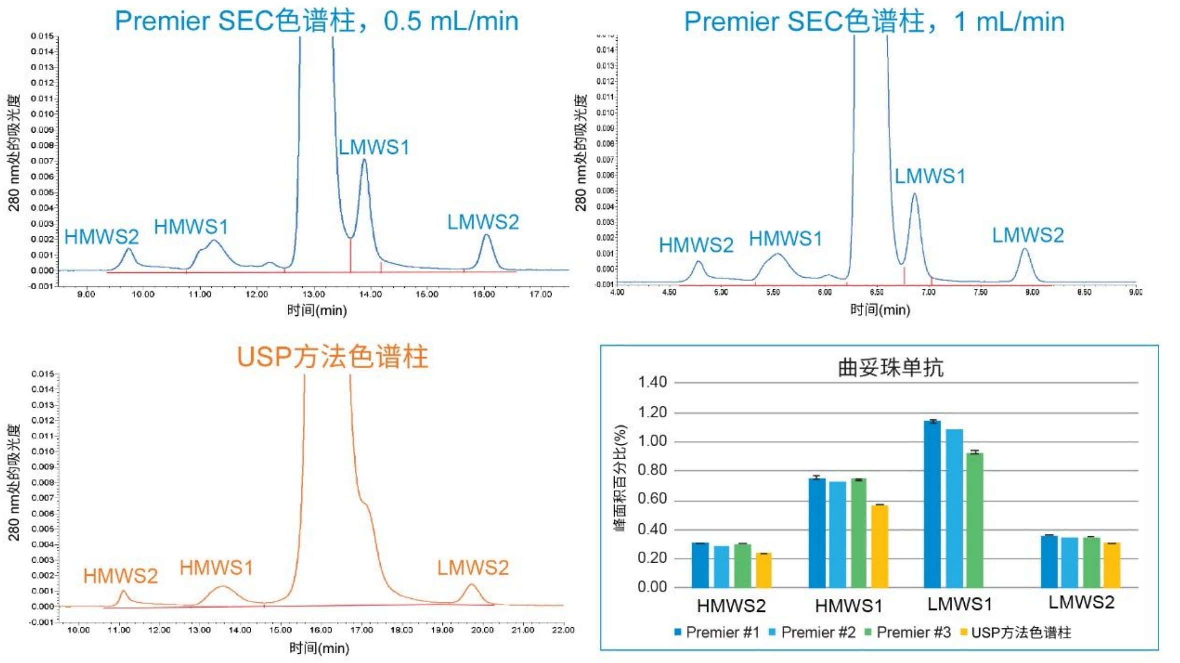

图7.使用来自三个不同批次的*XBridge Premier SEC*蛋白分析专用柱(250 *Å, 2.5 μm)*和一根填充5 μ*m*颗粒的*USP SEC*方法色谱柱，在通则<129>中规定的流动相条件下分析曲妥珠单抗的结果比较。除*Premier*色谱柱#3外，所有色谱柱的流速均为0.5 *mL/min*，Premier色谱柱#3的流速为1 *mL/min*。

结论

用于单克隆抗体HMWS和LMWS测定的USP方法在使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)时可保持稳定。使用XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)可获得一致的结果，并且与使用填充5 μm颗粒的USP 方法色谱柱获得的结果相当。

因此，使用XBridge色谱柱的mAb SEC USP专论方法可以作为起点，开发基于分子大小测定单克隆抗体中杂质的方法。此外，与USP方法指定的填充5 μm颗粒的SEC色谱柱相比，XBridge色谱柱的样品通量可以达到它的2倍。

参考资料

1. Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies. USP General Chapter <129>. 2017.
2. Hong P.; Koza S. M.; Fountain K. J. Analysis of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled With Mass Spectrometry Under Non-denaturing Conditions. Waters Application Note. 720004254EN. 2012.

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>

XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/columns/sec-columns.html>

720007481ZH，2021年12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