

MaxPeak Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱在生理pH条件下分析含聚山梨醇酯(Tween)的单克隆抗体生物类似药时的使用寿命

Stephan M. Koza, Hua Yang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

治疗药物中自缔合或聚集的蛋白质杂质可能会引起免疫反应，因此令人担忧。鉴于此，相应的制剂药通常含有聚山梨醇酯（Tween 20或Tween 80），用于防止蛋白质自缔合和表面吸附。由于体积排阻色谱(SEC)是一种监测此类蛋白质相关杂质的常用方法，因此还需要重点关注SEC色谱柱与蛋白质及其制剂药缓冲液成分的相容性。

此前的文章证明，使用Waters Premier SEC蛋白分析专用柱可以在等于或接近生理pH值(7.4)和离子强度条件下实现有效分离。鉴于该中等碱性条件(pH 7.4)可能会对硅胶基质填料颗粒的稳定性产生不利影响，因此，本研究在该条件下，通过分析市场上含有Tween 20或Tween 80的四种单克隆抗体生物类似药，评估了近期推出的这些色谱柱的使用寿命。由于先前有文章提到，这种制剂药的表面活性剂可能会导致上一代Waters BEH SEC蛋白分析专用柱的使用寿命缩短，因此本研究对这款色谱柱的使用寿命进行了重新评估，以确定能否通过使用Waters SEC蛋白分析专用柱延长色谱柱使用寿命。在本研究中，分别使用Waters XBridge Premier（粒径2.5 μm，孔径250 Å）色谱柱以及ACQUITY Premier SEC (250 Å, 1.7 μm)和ACQUITY SEC (200 Å, 1.7 μm)蛋白分析专用柱执行500多次分析，以此评估它们的性能。本研究通过分离自缔合及片段化mAb大小异构体评估色谱柱的分离性能。

优势

- 将等于或接近生理pH值(~7.4)和离子强度(~150 mM)的缓冲液用于SEC，从而稳定地评价蛋白质治疗药物的大小异构体
- 色谱柱对含有聚山梨醇酯（Tween 20或Tween 80）的治疗性mAb样品执行500多次分析后仍能正常使用
- 在使用寿命研究期间，可重复测定HMWS和LMWS杂质含量

简介

注射用蛋白质治疗药物中的自缔合或聚集蛋白质杂质通常称为高分子量物质(HMWS)，可能会在一些患者体内引起免疫反应¹。因此，相关制剂药通常含有聚山梨醇酯（Tween 20或Tween 80）等非离子表面活性剂，以防止蛋白质自缔合²。对此，行业通常使用体积排阻色谱(SEC)监测HMWS，有时用来监测治疗性蛋白质相关片段（低分子量物质/LMWS）。因此，在开发SEC方法时，不仅需要考虑SEC色谱柱与所用流动相的相容性，还需要考虑色谱柱与蛋白质及其制剂药缓冲液成分的相容性。

Waters XBridge Premier SEC 250 Å, 2.5 μm和ACQUITY Premier SEC 250 Å, 1.7 μm蛋白分析专用柱的色谱柱硬件和填料颗粒化学成分均进行了优化，以减少蛋白质与表面的相互作用³。具体来说，在使用SEC色谱柱分析含有聚山梨醇酯的蛋白质治疗药物时，将亚乙基桥杂化(BEH) SEC颗粒与羟基封端聚环氧乙烷(PEO)而不是二醇基进行键合，可以进一步尽量减少色谱柱与蛋白质的次级疏水性相互作用，预计也能降低表面活性剂对色谱柱污染的可能性⁴。

在本研究中，分别使用Waters XBridge Premier（粒径2.5 μm，孔径250 Å）、ACQUITY Premier SEC (250 Å, 1.7 μm)和ACQUITY SEC (200 Å, 1.7 μm)蛋白分析专用柱对目前在美国作为生物类似药销售的四种不同的单克隆抗体药物执行了500多次分析，以此评估了它们的性能。贝伐单抗、英夫利昔单抗和利妥昔单抗样品是生物类似药，而曲妥珠单抗样品则是原研药物。贝伐单抗和曲妥珠单抗药物含有Tween 20，而英夫利昔单抗和利妥昔单抗药物则含有Tween 80。

在早期研究中，我们证实了Waters Premier SEC色谱柱使用弱碱性（生理pH值（约为7.4）和离子强度（约为150 mM））Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS)作为流动相时能够有效地进行分离³。由于碱性条件会降低硅胶基质填料颗粒的稳定性，因此评估Waters Premier色谱柱的使用寿命时使用的流动相是DPBS，而ACQUITY SEC蛋白分析专用柱则需要使用1.5X DPBS（pH值为7.4，离子强度约为225 mM）缓冲液才能有效分离所有四种单克隆抗体。

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:	ACQUITY UPLC H-Class Bio™系统, 配备CH-30A APH柱温箱
检测:	配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器™, 波长: 280 nm和214 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 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005070) ACQUITY Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm, 4.6 × 300 mm, 配有mAb大小异构体标准品 (部件号: 176005072) ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm, 配有BEH200 SEC蛋白质混标 (部件号: 176003905)

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: 对于7.8 x 300 mm色谱柱进样10 µL, 对于4.6 x 300 mm色谱柱进样4 µL 贝伐单抗和曲妥珠单抗: 对于7.8 x 300 mm色谱柱进样5 µL, 对于4.6 x 300 mm色谱柱进样2 µL
流速:	0.2-0.5 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 (FR 4)
-------	-------------------

结果与讨论

XBridge Premier、ACQUITY Premier和ACQUITY BEH色谱柱使用寿命评估

分别使用XBridge Premier蛋白分析专用柱(7.8 x 300 mm)、ACQUITY Premier蛋白分析专用柱(4.6 x 300 mm)和ACQUITY BEH SEC蛋白分析专用柱(4.6 x 300 mm)对四种不同的单克隆抗体样品执行了500多次分析(对每种单克隆抗体样品约执行125次分析), 评估它们对HMWS和LMWS杂质的分离效果。所有四种单克隆抗体样品中的表

面活性剂含量均大于临界胶束浓度(CMC)。贝伐单抗(MVASI)和曲妥珠单抗(赫赛汀)分别含有0.04%和0.009%的Tween 20 (CMC为0.006%)⁵。利妥昔单抗(Ruxience)和英夫利昔单抗(AVSOLA)分别含有0.02%和0.005%的Tween 80 (CMC为0.001%)⁵。Premier SEC蛋白分析专用柱使用的SEC流动相是弱碱性生理pH值(约为7.4)和离子强度(约为150 mM)的Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS),而ACQUITY SEC蛋白分析专用柱使用的则是1.5倍浓度(离子强度约为225 mM)的DPBS³。在本研究中,通过LC将10X DPBS浓缩液稀释到目标浓度。此外,在使用前对10X DPBS浓缩液和Milli-Q 18 MΩ水进行了0.1 μm无菌过滤。

XBridge Premier色谱柱各分析时间点的流速为0.5 mL/min(运行时间为25分钟)。中间时间点的流速是0.80 mL/min,交错进样单克隆抗体(运行时间为10分钟)。在ACQUITY Premier色谱柱上,中间时间点以及英夫利昔单抗和曲妥珠单抗分析时间点的流速是0.35 mL/min。将贝伐单抗和利妥昔单抗分析时间点的流速降到了0.20 mL/min,以改善在0.35 mL/min流速下分析这些样品中的LMWS1片段时分离度较差的情况。单克隆抗体LMWS1峰紧接着在主(单体)峰之后洗脱,因此,通常更容易受到分离度降低的影响,这是因为在5σ系统扩散大于10 μL的LC上,丰度约为0.5%或更低时会出现柱外扩散⁶。在ACQUITY Premier色谱柱使用寿命研究中,使用的是配有CH-30A柱温箱和主动预加热器(APH)的ACQUITY UPLC H-Class系统,该系统的5σ系统扩散为17 μL。在具有同等配置的ACQUITY UPLC H-Class系统上,对于所有分析,ACQUITY BEH SEC色谱柱的流速均为0.35 mL/min,并且在中间时间点交错进样单克隆抗体。所有时间点均重复分析两次。

图1显示的是分别在XBridge Premier色谱柱、ACQUITY Premier色谱柱以及ACQUITY BEH蛋白分析专用柱上分离单克隆抗体得到的全尺寸色谱图。所有三种色谱柱生成的总色谱图差不多,其中都包含HMWS和LMWS杂质的痕量分析结果。图2至图4显示了从三种色谱柱的使用寿命研究中获得的典型色谱图的放大视图。通过目视检查,我们观察到所有总色谱图在HMWS和LMWS大小异构体(包括其部分分离的肩峰)保留时间和分离效果方面似乎一致。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。在这些样品中也观察到抗体碎裂为LMWS1和LMWS2。假设LMWS1主要是mAb铰链区中单次裂解产生的约100 KDa片段,该片段由共价Fc结构域和单个Fab结构域组成,而LMWS2主要由单个Fab和Fc结构域组成。

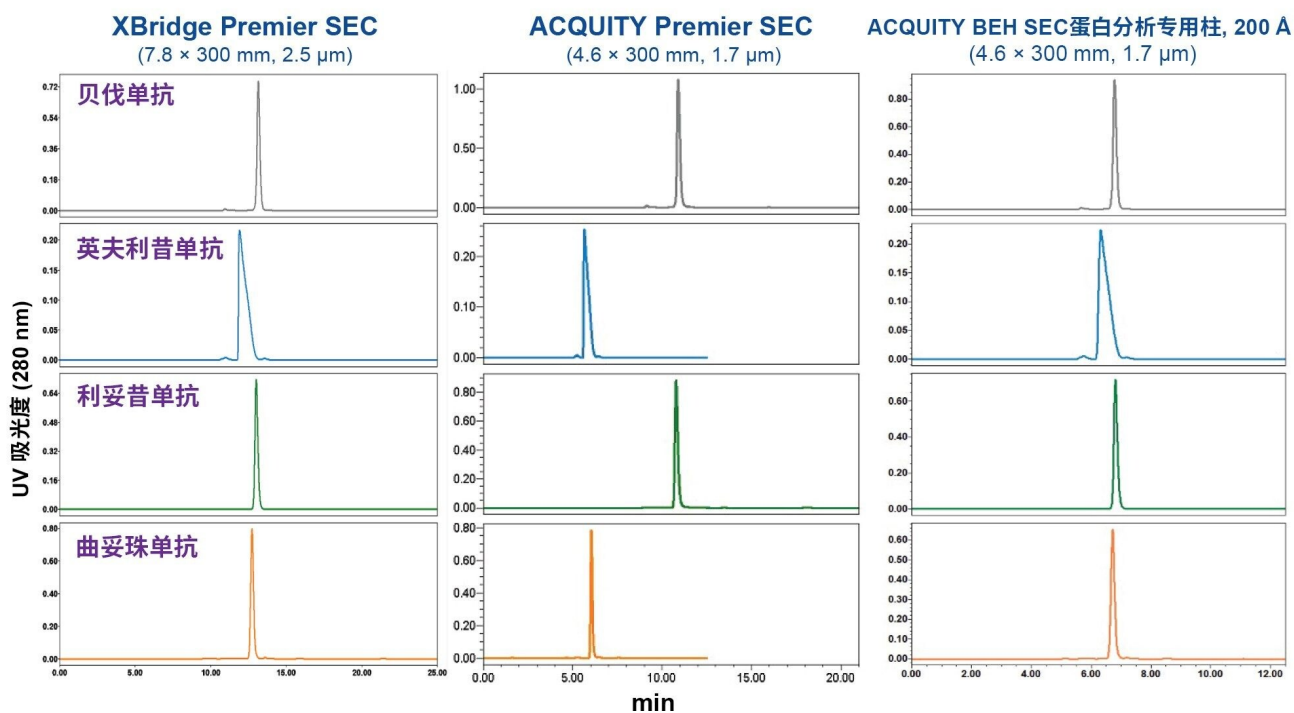


图1.使用Waters Premier SEC色谱柱和BEH SEC蛋白分析专用柱以SEC法分离生物类似药单克隆抗体样品得到的全尺寸色谱图。Waters Premier SEC色谱柱使用的流动相是DPBS，BEH SEC蛋白分析专用柱使用的是1.5倍指定浓度的DPBS。对于ACQUITY Premier SEC色谱柱，分析贝伐单抗和利妥昔单抗时的流速为0.20 mL/min，而分析英夫利昔单抗和曲妥珠单抗时的流速则为0.35 mL/min。ACQUITY BEH SEC蛋白分析专用柱的流速为0.35 mL/min，XBridge Premier SEC色谱柱的流速为0.50 mL/min。其他实验条件见正文。

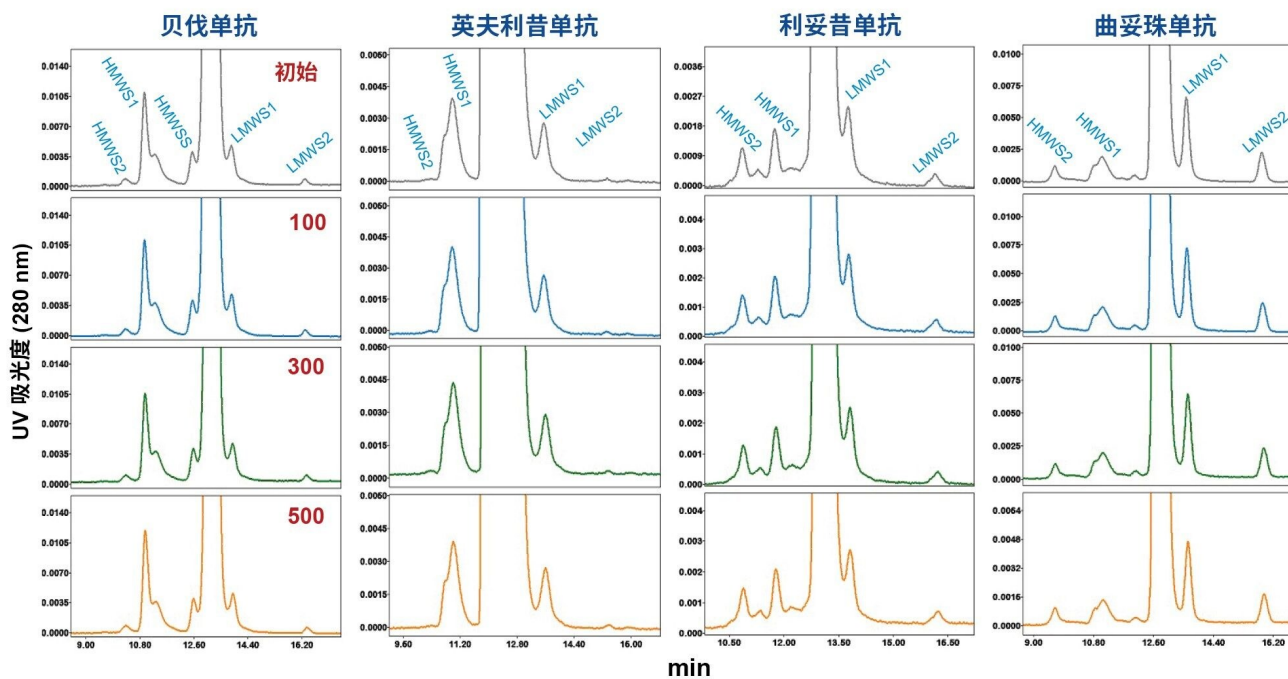


图2.XBridge Premier 250 Å SEC色谱柱在使用寿命研究中以SEC法分离生物类似药单克隆抗体样品生成的放大色谱图。图中显示的是大致初始进样以及第100、300和500次的色谱图。使用DPBS作为流动相，流速为0.50 mL/min。其他实验条件和峰描述见正文。

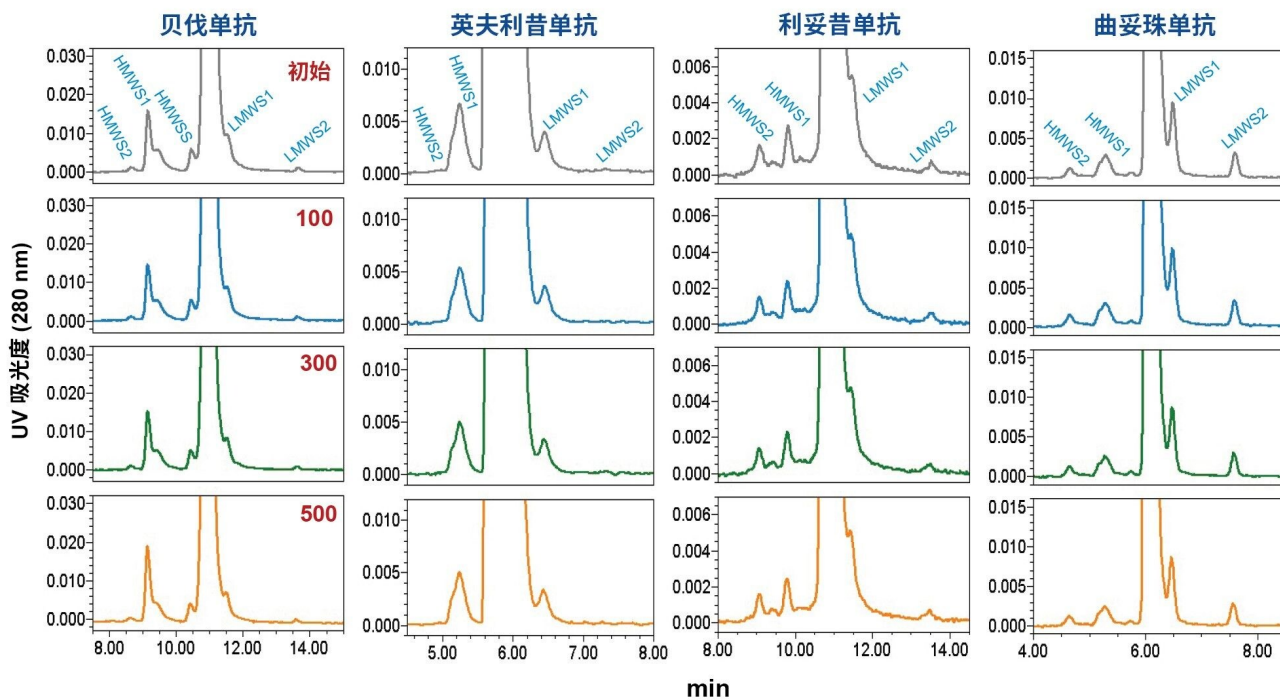


图3.ACQUITY Premier 250 Å SEC色谱柱在使用寿命研究中以SEC法分离生物类似药单克隆抗体样品生成的放大色谱图。图中显示的是大致初始进样以及第100、300和500次的色谱图。使用DPBS作为流动相。分析贝伐单抗和利妥昔单抗时的流速为0.20 mL/min，而分析英夫利昔单抗和曲妥珠单抗时的流速则为0.35 mL/min。其他实验条件和峰描述见正文。

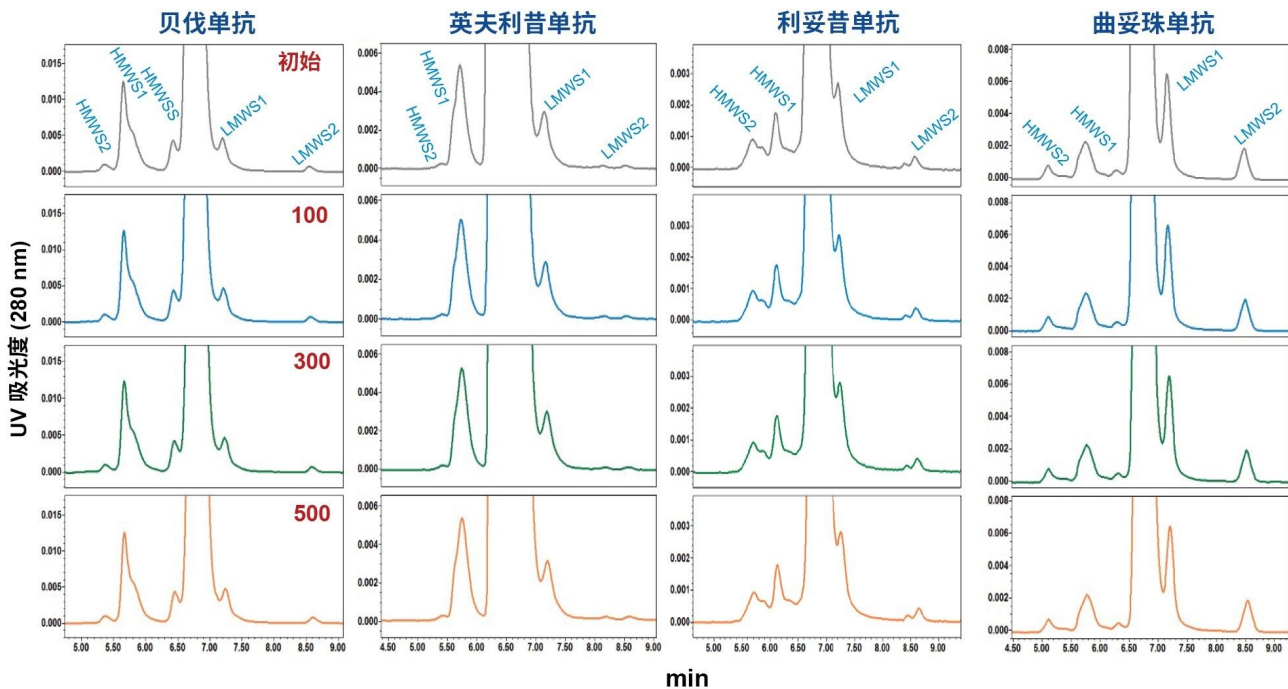


图4.ACQUITY BEH 200 Å SEC蛋白分析专用柱在色谱柱使用寿命研究中以SEC法分离生物类似药单克隆抗体样品生成的放大色谱图。图中显示的是大致初始进样以及第100、300和500次的色谱图。使用DPBS作为流动相，流速为0.35 mL/min。其他实验条件和峰描述见正文。

图5至图7显示了色谱图中已确定的可测定HMWS和LMWS大小异构体的相对峰面积变化。还对观察到的贝伐单抗的HMWS肩峰(HMWS2)的相对峰面积进行了监测，未报告英夫利昔单抗中LMWS2的分析结果，这是因为其丰度一直较低(≤0.02%)。此外，对于所有样品，根据峰谷比(P/V;《美国药典》第621章)评估了LMWS1分析中的部分分离度。由于LMWS1的丰度较低且其洗脱位置在主要单体峰尾部，因此，其P/V可以起到衡量柱效能降低情况的作用。

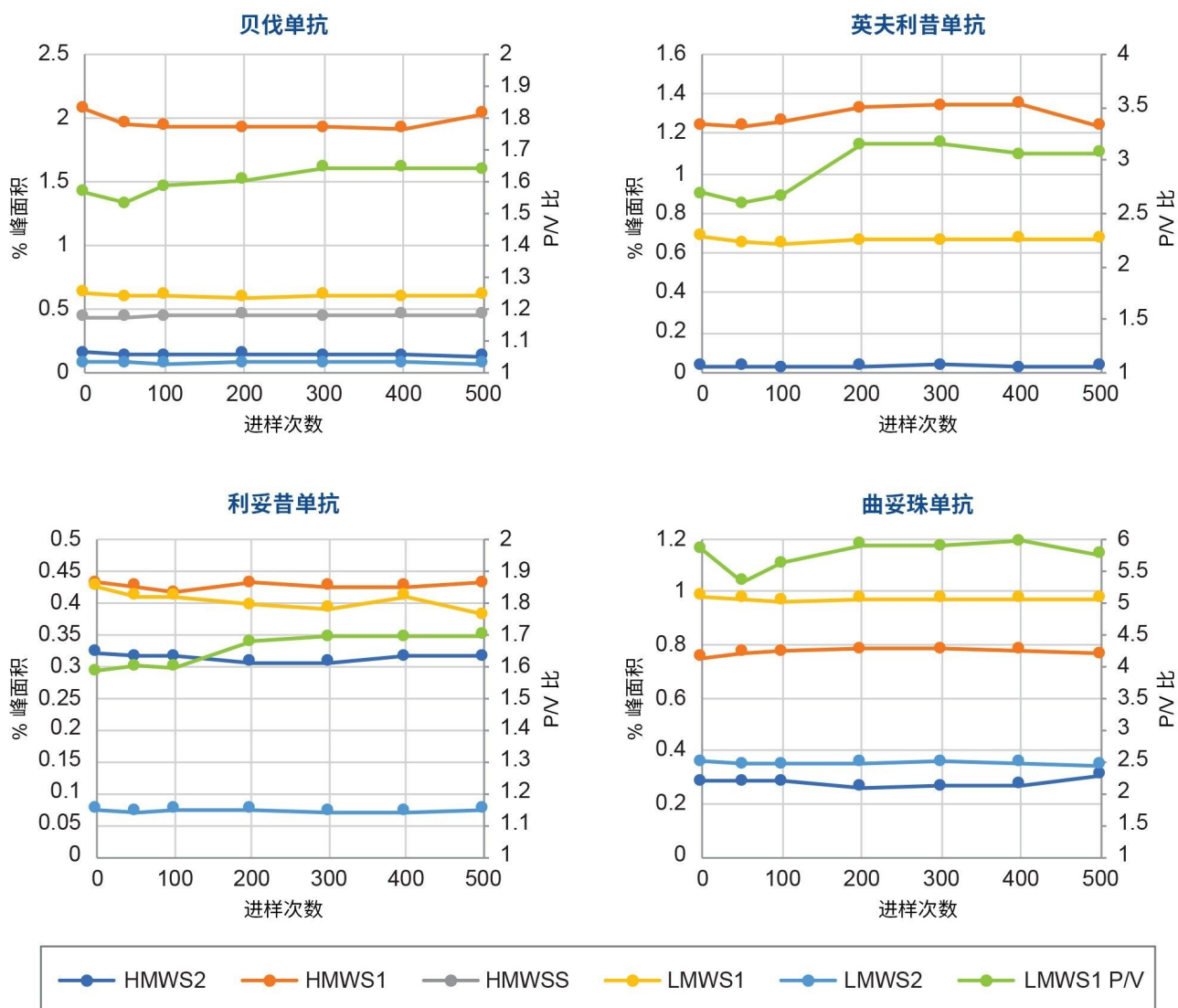


图5.使用寿命研究中XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱的定量结果（图2）。图中显示了所评估生物类似药单克隆抗体样品中HMWS和LMWS的相对丰度（左轴）及LMWS1的P/V值（右轴）。所有时间点均重复分析两次。图中显示的是大致初始进样以及第50、100、200、300、400和500次进样的色谱图。其他实验条件和峰描述见正文。

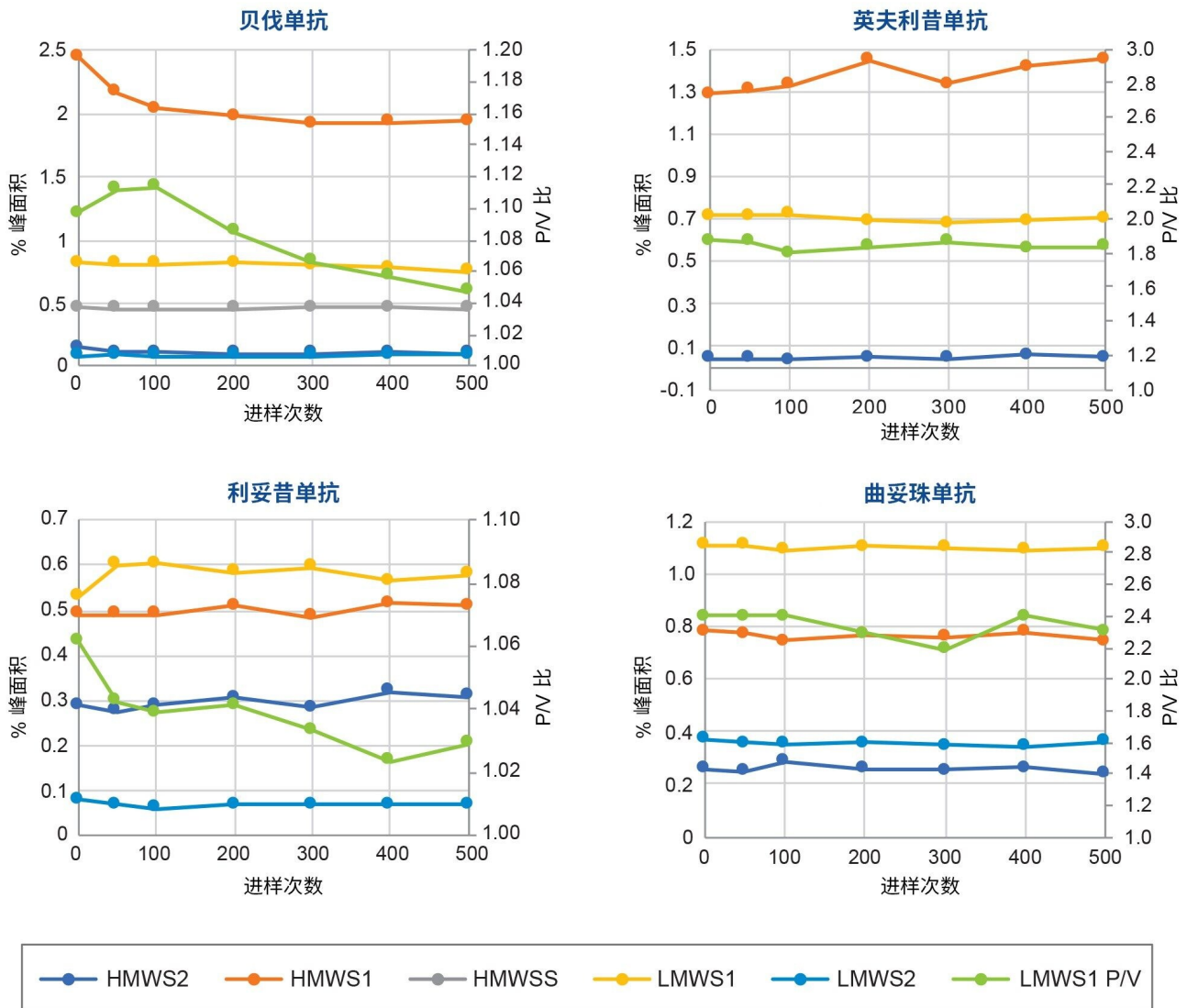


图6.使用寿命研究中ACQUITY Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱的定量结果（图3）。图中显示了所评估生物类似药单克隆抗体样品中HMWS和LMWS的相对丰度（左轴）及LMWS1的P/V值（右轴）。所有时间点均重复分析两次。图中显示的是大致初始进样以及第50、100、200、300、400和500次进样的色谱图。其他实验条件和峰描述见正文。

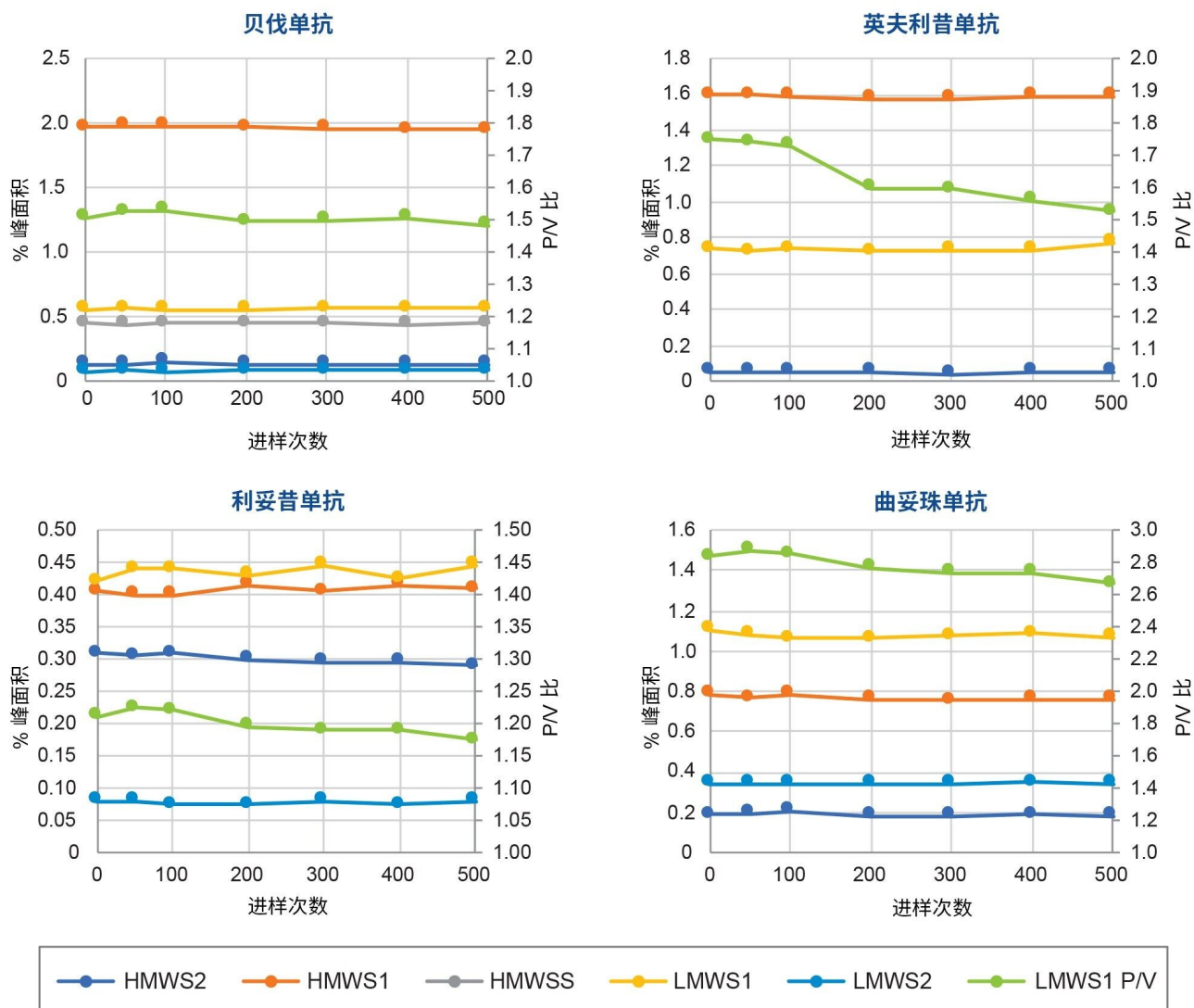


图7.使用寿命研究中ACQUITY BEH 200 Å SEC蛋白分析专用柱的定量结果（图4）。图中显示了所评估生物类似药单克隆抗体样品中HMWS和LMWS的相对丰度（左轴）及LMWS1的P/V值（右轴）。所有时间点均重复分析两次。图中显示的是大致初始进样以及第50、100、200、300、400和500次进样的色谱图。其他实验条件和峰描述见正文。

在将单克隆抗体药物进样500多次期间，所有三种色谱柱的色谱图、HMWS和LMWS杂质的相对定量结果以及LMWS1的P/V几乎没有差异。观察发现ACQUITY Premier色谱柱的HMWS分析结果差异最大，其中，开始几个时间点的贝伐单抗中HMWS1含量分析结果偏高。由于观察发现HMWS1相关亚型的分离结果差异不大，因此上述差

异被认为是因样品处理和等分所致。此外，观察发现使用ACQUITY Premier色谱柱和ACQUITY BEH蛋白分析专用柱分析部分单克隆抗体样品中的LMWS1时，分离度略有下降，而P/V值与XBridge Premier色谱柱一致。这可能是因为两种ACQUITY色谱柱的初始P/V值较小，因此受整体柱效下降的影响更大，以及使用小颗粒填料的色谱柱更容易受到样品或流动相中颗粒物质的影响。需要注意的一点是，在所有三种色谱柱使用寿命研究中，LMWS1的定量结果基本没有差异。

如前所述，将亚乙基桥杂化(BEH) SEC颗粒与羟基封端聚环氧乙烷(PEO)而不是二醇基进行键合，预计能够降低表面活性剂对色谱柱污染的可能性。然而，与先前研究相比，在本研究中，ACQUITY BEH二醇基键合蛋白分析专用柱在对含有Tween 20或Tween 80的单克隆抗体样品执行500多次分析后，性能仍然良好⁴。由于在初始研究中使用的磷酸盐-氯化钠流动相的离子强度和pH值（离子强度约为200 mM，pH值为6.8）与1.5X DPBS相似（离子强度约为225 mM，pH值为7.4），因此在早期研究中观察到的ACQUITY BEH蛋白分析专用柱性能下降可能是因样品或流动相中的颗粒物质所致。

结论

先前已经证明，通过技术推进改善XBridge和ACQUITY Premier 250 Å SEC色谱柱的色谱柱硬件和填料颗粒化学成分，可以控制非特异性蛋白质与色谱柱之间的相互作用，从而可以使用弱碱性（即等于或接近生理pH值（约为7.4）和离子强度（约为150 mM））DPBS缓冲液分析治疗性蛋白质中的HMWS和LMWS。我们使用DPBS缓冲液评估了上述色谱柱以及上一代ACQUITY BEH蛋白分析专用柱(200 Å)的使用寿命，结果表明，所有色谱柱在pH值8.0（上限）条件下均可长期使用。在该使用寿命研究中使用的治疗性单克隆抗体药物样品含有Tween 20或Tween 80，并且在样品未经稀释的情况下进样。

所有三种色谱柱在分别对治疗性单克隆抗体样品执行500多次分析后，在HMWS和LMWS分离和定量方面仍具有良好性能。这些结果表明，在XBridge Premier SEC色谱柱、ACQUITY Premier SEC色谱柱和ACQUITY BEH蛋白分析专用柱上，分析含有聚山梨醇酯表面活性剂的蛋白质样品时，使用生理pH值流动相可以延长色谱柱使用寿命。如果要延长这种使用1.7 μm或2.5 μm颗粒填料的色谱柱的使用寿命，还需要考虑对流动相进行0.1 μm无菌过滤，以及确保样品未含有大量亚可见颗粒物质或大颗粒物质(≥0.1 μm)。如果所开发样品可能含有大量亚可见颗粒物质或大颗粒物质，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)）或进行样品预处理（如离心）⁷。

参考资料

1. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, Topp EM. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci*. 2016 Feb;105(2):417–430.
2. Liu, Haiyan, Yutong Jin, Rashmi Menon, Erin Laskowich, Lisa Bareford, Phil de Vilmorin, Dave Kolwyck, Bernice Yeung, Linda Yi. Characterization of Polysorbate 80 by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Understand Its Susceptibility to Degradation and Its Oxidative Degradation Pathway. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2021).
3. Stephan M. Koza, Hua Yang, and Ying Qing Yu. 在生理pH值和离子强度下通过现代体积排阻色谱法分离生物类似药抗体. 沃特世应用纪要 [720007484ZH](#), 2022.
4. 使用短保护柱延长UPLC体积排阻色谱柱的使用寿命. 沃特世技术简报 [720004034ZH](#), 2011.
5. Singh, S.M., Bandi, S., Jones, D.N. and Mallela, K.M., 2017. Effect of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and FC Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(12), pp.3486–3498.
6. Stephan M. Koza, Corey Reed, Weibin Chen, LC系统扩散对抗聚集体和片段SEC分析的影响：基于方法选择最佳色谱柱规格, 沃特世应用纪要 [720006336ZH](#), 2019.
7. 沃特世公司, 《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/webassets/cms/library/docs/720006067en.pdf>> .2020.

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>>

720007523ZH, 2022年2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](#)