

使用乙酸铵流动相对单克隆抗体进行快速的SEC-UV分析

Stephan M. Koza, Albert H. W. Jiang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

介绍一种使用乙酸铵流动相在4分钟内分析单克隆抗体(mAb)样品中聚集体的高分离度体积排阻和紫外吸光度检测(SEC-UV)方法。快速非变性的SEC-UV方法对于生物治疗性细胞培养、纯化和制剂开发很有用。此外，与使用非挥发性盐和缓冲液流动相（NaCl、磷酸盐等）的传统体积排阻色谱(SEC)相比，使用乙酸铵(AMA)流动相的快速SEC-UV方法也可以更有效地部署在LC-MS分析专用的LC系统上。值得注意的是，虽然ESI-MS检测也可用于此SEC方法，但高AMA浓度和流速会导致MS数据质量不佳。

在本应用中，我们使用SEC高效地监测蛋白A纯化单克隆抗体样品中的mAb自缔合或聚集体杂质，这些杂质会影响产品的安全性和有效性。基于蛋白A的自动化mAb纯化使用Andrew+™移液机器人进行。高通量SEC-UV方法使用ACQUITY™ Premier SEC (250 Å, 1.7 μm, 4.6 x 150 mm)蛋

白分析专用柱，流动相为200 mM乙酸铵，流速为0.50 mL/min，进行UV吸光度检测(280 nm)。除了评估BioAccord™ LC-MS (ESI-Tof)系统的性能外，还单独在ACQUITY Premier UPLC™系统上评估了方法性能和稳定性。

优势

- 使用SEC-UV方法快速分析经蛋白A纯化的细胞培养样品、上游纯化样品和配方稳定性样品中的mAb HMW和LMW大小异构体，整个过程只需4分钟
- 采用SEC-UV方法高效分析浓度为0.5 mg/mL或更高的mAb样品，并与UPLC-MS系统兼容
- 历时3个月，执行超过700多次分析，证明色谱柱的实际使用寿命

简介

SEC常用于监测单克隆抗体的自缔合或聚集体杂质，这些杂质会影响治疗性蛋白质的产品安全性和有效性¹。之前的研究已经证明，Waters ACQUITY Premier SEC 250 Å, 1.7 μm 蛋白分析专用柱能够进行快速、高通量(HT)的体积排阻色谱(SEC)分析，在低离子强度下提供稳定的分离并具有高分离度^{2,3}。本研究将这些功能应用于开发蛋白A纯化单克隆抗体样品的HT SEC-UV分析，使用了与LC-MS仪器兼容的乙酸铵(AMA)流动相。

AMA普遍用于非变性SEC-MS分析，我们之所以在SEC-UV分析中选择它作为流动相盐，是因为它与LC-MS仪器的兼容性相比传统的SEC缓冲液成分（如磷酸钠和氯化钠）要好很多。此外，AMA据称在高浓度下具有抑菌特性⁴。虽然并未专门评估AMA的这一特性，但与磷酸盐和其他更容易受到微生物

物污染的生物缓冲体系相比，这可能是一个潜在的优势。

此外，我们还展示了在平行研究中生成的色谱柱使用寿命数据，该研究历时3个月以上，重点考察一种自动化蛋白A纯化方法进行的700多次分析，并展示了柱间重现性结果。

实验

样品描述

购买不同厂商的单克隆抗体，用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至指定浓度。购买的单克隆抗体包括英夫利昔单抗、利妥昔单抗、那他珠单抗、西妥昔单抗、托珠单抗和NISTmAb RM-8671，以及曲妥珠单抗的两个样品：曲妥珠单抗(Herceptin™)和曲妥珠单抗-anns (Kanjinti™)。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier UPLC，配备二元或四元 溶剂管理器（BSM或 QSM）和CH-A柱温箱 ，或BioAccord™ LC- MS (ESI-ToF)系统
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12 × 32 mm螺 口瓶，带瓶盖和预切割

	PTFE/硅胶隔垫，容积 300 μ L，100个/包(P/N: 186002639)
色谱柱：	ACQUITY Premier SEC 蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μ m, 4.6 x 150 mm，配有mAb大小异 构体标准品(P/N: 176004783)
柱温：	25 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	5 μ L，或按规定
流速：	0.5 mL/min
流动相：	乙酸铵，LC-MS级（ Supelco LiChropur™，LC-MS的 洗脱液添加剂 , 73594），0.1 μ m无 菌过滤，200 mM，或按 规定

数据管理

色谱软件：	Empower™ 3 (FR 4)和 UNIFI™版本2.1.2.14
-------	--

结果与讨论

方法开发

本研究的目的是开发一种HT非变性SEC-UV方法用于分析mAb聚集体，该方法可以更容易地部署在LC-MS分析专用的UPLC系统上。我们使用200 mM AMA流动相实现了这一目标，测试的7种mAb全都实现有效分离。还选择了0.5 mL/min的流速，使分析时间低至4分钟。

AMA的升华点为120 °C，并且在LC-MS应用中具有高纯度，是一种挥发性、兼容MS的盐。乙酸盐(pKa 4.75)和铵盐(pKa 9.25)分别在pH低于6.0或高于8.0时具有最大缓冲能力，AMA未滴定时的pH约为7.0，此时的缓冲能力可忽略不计，尽管乙酸盐和铵盐的缓冲能力预计将达到最大缓冲能力的至少5%。我们对一系列mAb评估了100 mM~300 mM的AMA浓度范围（图1）。这些mAb样品根据其原标签浓度用PBS稀释至1.0 mg/mL。为保持各mAb的HMWS载样量相当，对HMWS相对丰度约1%或更少的mAb样品使用5 μ L的进样体积，对HMW含量较高的mAb样品则使用更少的进样体积。

在AMA浓度为150 mM和更高时，在所评估的所有mAb中观察到相当的谱图和HMWS峰面积。但是，使用100 mM AMA流动相时，两种曲妥珠单抗样品均观察到HMWS的峰面积减少，曲妥珠单抗中HMWS2损失最明显，托珠单抗和NISTmAb中的HMWS峰面积也有较小程度的减少。基于这些结果选择200 mM AMA作为理想的流动相条件，因为此条件下所有被测的mAb都实现了稳定的分离。还观察到低分子量mAb片段（LMWS1和LMWS2）。虽然大多数mAb样品中的LMWS均为痕量水平并且难以分离（LMWS1<0.7%，LMWS2<0.1%），但150 mM和250 mM AMA之间的分离结果是一致的。

选择的流速为0.5 mL/min，分析时间低至4分钟。在此流速下实现了有效分离，此外，当部署在LC-MS系统上时，避免了因连接到MS切换阀而对UV流通池造成的过大压力。

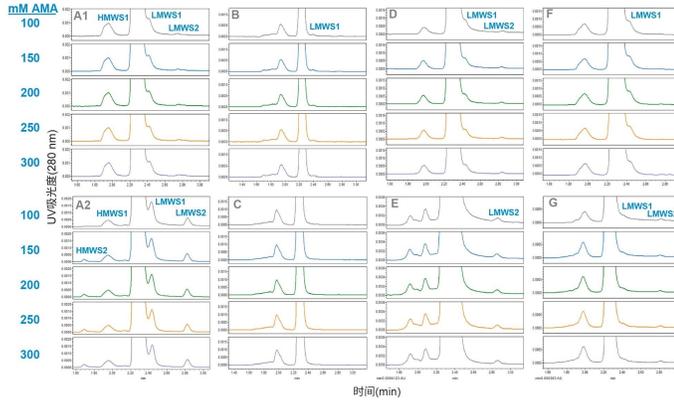


图1.几个mAb样品的SEC-UV色谱图，AMA流动相的浓度范围为100 mM~300 mM。除非另有说明，否则进样体积为5 μ L。样品标识为：(A1)曲妥珠单抗-anns、(A2)曲妥珠单抗、(B)西妥昔单抗(0.5 μ L)、(C)那他珠单抗(1 μ L)、(D)托珠单抗、(E)利妥昔单抗、(F)英夫利昔单抗和(G) NISTmAb RM-8671 (1.5 μ L)。所有制剂都在过期后进行分析。这些数据是在 ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。

方法评估

在mAb样品浓度为0.5 μ g/ μ L~2.0 μ g/ μ L时，观察到HMWS和LMWS大小异构体的相对峰面积一致。为了评估样品浓度的影响，我们使用浓度为0.5、1.0和2.0 μ g/ μ L的曲妥珠单抗进行了评估。结果见图2。三种HMWS大小异构体（HMWS2、HMWS1和HMWS）和两种LMWS大小异构体（LMWS1和LMWS2）观察到一致的色谱图相对峰面积。HMWS1和HMWS2主要是mAb的自缔合二聚体和多聚体。未明确鉴定标为HMWS的峰，但怀疑它是LMWS mAb片段的自缔合产物。LMWS1主要是缺少一个Fab结构域的mAb (~100

KDa), LMWS2主要是Fab和Fc的混合物(~50 KDa)。

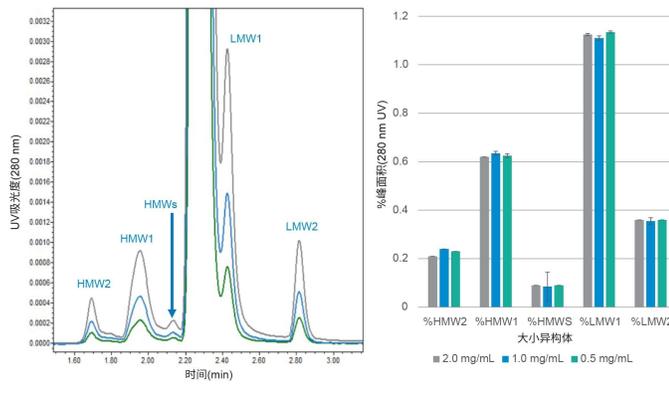


图2.曲妥珠单抗的SEC-UV色谱图和定量结果, 评估的浓度为0.5、1.0和2.0 mg/mL。误差条柱表示所得值的范围($n=3$)。进样体积为5 μ L, 所有制剂均在过期后进行分析。这些数据是在ACQUITY Premier QSM UPLC上收集的。

本研究的进样体积为5 μ L。可以通过增加进样体积、使用更灵敏波长(例如214 nm)的UV吸光度或使用内在蛋白荧光检测来获得更低的检测限, 但本应用未作进一步研究。

我们还使用两种曲妥珠单抗样品的混合物证实了该方法用于大小异构体相对量度的有效性(图3)。对于此评估, 图1中所示的两种曲妥珠单抗制剂(曲妥珠单抗-anns和曲妥珠单抗)单独和以1:1 (v:v)的混合物进行分析。使用的曲妥珠单抗样品主要在80 $^{\circ}$ C下储存了大约十年, 根据纯样品的SEC分析, 其总mAb浓度高于曲妥珠单抗-anns样品。因此测得1:1 (v:v)的混合物包含56.1%的曲妥珠单抗和43.9%的曲妥珠单抗-anns(重量比)。获得了HMWS2、HMWS1、LMWS1和LMWS2大小异构体在低于或接近1%的相对含量下的函数响应曲线。

本研究对部分分离的峰使用了垂直基线积分法(图3)。虽然垂直基线法通常会高估某些峰的百分比, 例如LMW1, 它

与在其之前洗脱的丰度更高（100倍）的主（单体）峰部分分离，但这种方法往往能够更好地促进可靠的自动积分算法。然而，这种情况仅限于在两个峰之间可以检测到峰谷时。是否存在峰谷将取决于色谱分离的质量和微量成分的相对丰度。流动相效率、色谱柱分离度、LC系统扩散等变量都会影响色谱分离的质量⁵。在这些研究中，UPLC系统的5 σ 扩散低于12 μ L。例如，在此方法中，LMW1异构体的定量预计不会扩展到曲妥珠单抗-anns样品中观察到的水平(0.6%)以下

o

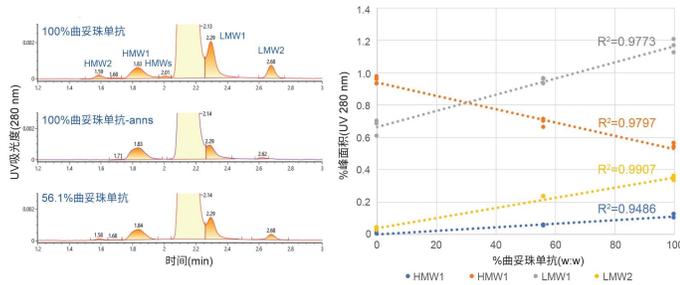


图3.曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-anns以及两者混合物的SEC-UV色谱图和定量结果。进样体积为5 μ L，所有制剂均在过期后进行分析。这些UV数据是在BioAccord LC-MS (ESI-ToF)系统上收集的。色谱条件见正文。

本研究还证明了这种HT方法的主要用途之一：测试经蛋白A亲和纯化的mAb样品。对于此评估，使用PBS制备浓度为1 μ g/ μ L的曲妥珠单抗-anns样品，并添加1 μ g/ μ L到澄清的未转染的CHO细胞培养基(NTM)中。NTM由Syd Labs, Inc.在转瓶中使用未转染的CHO-K1细胞制备，于第2天到第15天收集瓶中的消耗型培养基（平均细胞活力约90%），合并，用0.2 μ m滤膜过滤。然后使用Andrew+移液机器人(Andrew Alliance™)对两个加标样品进行蛋白A纯化。简单来讲，就是使用Cytiva MabSelect™树脂（约15 μ L）捕获样品（每种样品120 μ L），分配到96孔Pall AcroPrep™ 0.2 μ m

Supor™板中。使样品在定轨板摇床上结合20分钟(1200 rpm)，用PBS洗涤，并用30 μ L pH 3的100 mM甘氨酸洗脱三次（静态保持5分钟），然后立即用10 μ L pH 7.5的1.0 M TRIS中和。NTM加标样品的回收率为94.4%（6.1% RSD，n=8），PBS加标样品的回收率为90.8%（6.9% RSD，n=8）。

SEC方法的有效性通过测定曲妥珠单抗-anns对照品和蛋白A纯化样品的大小异构体的相对丰度得到证明（图4）。对于该SEC方法，对照品中HMWS1 (0.9% RSD)、LMWS1 (2.4% RSD)和痕量LMWS2 (7.9% RSD)的%RSD值(n=3)表明，大小异构体的相对丰度测定可重现。两组蛋白A纯化样品的结果显示，HMWS1 (3.5% RSD)、LMWS1 (2.8% RSD)和LMWS2 (24.7% RSD)的最大方差更大(n=8)。这些较高的方差可能是由于蛋白A纯化和SEC方法引入的合并方差所致。

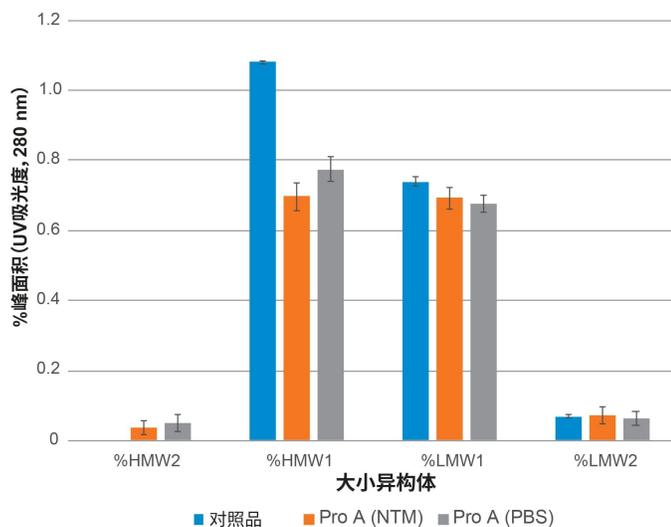


图4. 经蛋白A纯化的曲妥珠单抗-*anns*的SEC-UV定量结果评估。将加入PBS ($n=8$)和未转染的CHO细胞培养基(NTM, $n=8$)的曲妥珠单抗-*anns*与加标对照品($n=3$)进行比较。色谱条件见正文。误差条柱表示所得值的范围。这些数据是在ACQUITY Premier BSM UPLC上收集的。

尽管进一步的研究不在本研究的范围内，但值得注意的是，基于蛋白A的mAb纯化程序使曲妥珠单抗-*anns*的HMWS结果略有偏差。痕量($<0.05\%$) HMW2是人为生成的，而HMW1仅部分回收。NTM加标样品中HMW1大小异构体的绝对回收率估计为68%，PBS加标样品为59%，假设蛋白A纯化过程也没有产生额外的HMW1形式。之前曾有研究报告，即使部署了更精确的LC方法，使用蛋白A亲和纯化时，HMW mAb异构体的定量回收也存在挑战⁶。

总体而言，这些结果表明，无论是在典型的蛋白质制剂缓冲液中，还是在中和的蛋白A洗脱缓冲液中，所开发的SEC-UV方法都可以有效地测定低样品浓度范围(≥ 0.5 mg/mL)的mAb大小异构体。最终方法的分析时间仅4分钟，即能够回收和分离被测mAb的HMW形式，并且还可以分离所评估的

几种mAb的低分子量(LMW)大小异构体。值得注意的是，虽然ESI-MS检测可用于此分离，但高AMA浓度和流速会导致MS数据质量不佳。

方法可靠性

方法可靠性的两个主要组成部分是色谱柱的长期性能和柱间重现性。我们使用AMA流动相历时3个多月运行了700多个样品，来额外评估色谱柱使用寿命（图5）。在此期间，色谱柱多次停止和启动，长时间不使用，并暴露于各种神经蛋白A纯化、部分纯化的样品，甚至直接暴露于粗制的细胞培养基样品中。在比较色谱柱的早期和后期性能时，虽然初始分离度大部分得以保留，但仍观察到总体保留性能有轻微变化。还可以看出多聚体HMW2的丰度较低。这主要归因于样品稳定性，该色谱柱与新色谱柱几乎同时使用相同的曲妥珠单抗样品，二者性能相当（图6）。此外，用于比较的新色谱柱也填充了后来生产的颗粒。总之，这些结果表明这些色谱柱具有持续的性能并且可以提供可靠的柱间性能。

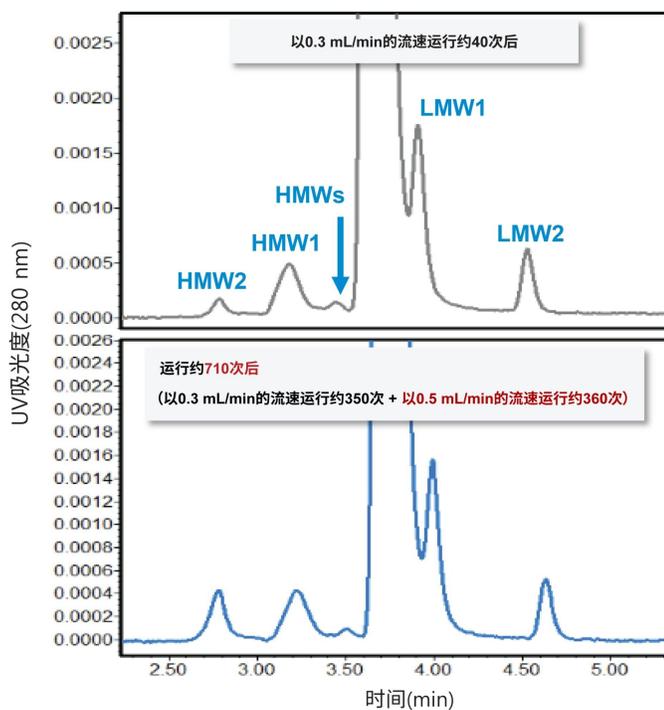


图5.在0.3到0.5 mL/min的流速下使用200 mM乙酸铵流动相时的实际SEC色谱柱使用寿命。曲妥珠单抗（PBS中浓度1 mg/mL）历时3个月进行700多次分析的色谱图比较。色谱条件和进一步讨论见正文。这些数据是在ACQUITY Premier BSM UPLC上以0.3 mL/min的流速收集的。

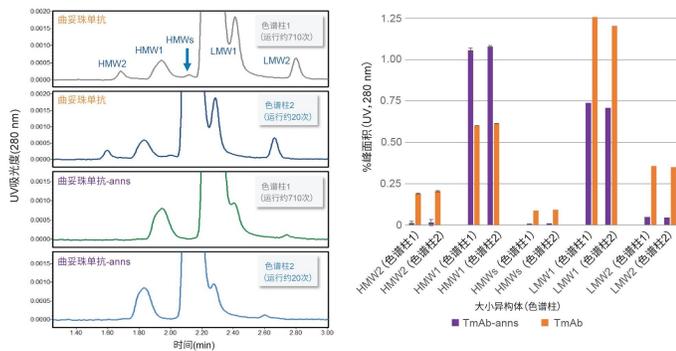


图6.两根填充不同批次（相隔几个月生产）SEC颗粒的色谱柱的柱间重现性。评估的样品为曲妥珠单抗-anns和曲妥珠单抗，浓度1 mg/mL (PBS)。流动相为200 mM乙酸铵，流速为0.5 mL/min。色谱柱1历时3个月进行了700多次分析，色谱柱2的数据是在运行20次以后生成的。色谱条件和进一步讨论见正文。误差条柱表示所得值的范围(n=2)。这些数据是在ACQUITY Premier BSM UPLC上收集的。

结论

快速非变性的体积排阻色谱(SEC)法对于生物治疗性细胞培养和纯化工艺以及原料药和药物制剂的开发很有用。此外，与使用非挥发性盐和缓冲液流动相（NaCl、磷酸盐等）的传统SEC相比，使用乙酸铵流动相的快速SEC-UV方法也可以更有效地部署在LC-MS分析专用的LC系统或色谱柱上。

具体而言，对于本应用，我们成功优化了单克隆抗体大小异构体（聚集体和片段）分析的高通量（运行时间4分钟）SEC-UV方法：使用ACQUITY Premier SEC(250 Å, 1.7 μm, 4.6 x 150 mm)蛋白分析专用柱，流动相为200 mM乙酸铵，流速为0.50 mL/min，进行UV吸光度检测(280 nm)。除了评估BioAccord LC-MS (ESI-ToF)系统的性能外，还单独

在ACQUITY Premier UPLC系统上评估了可靠的方法性能，所有系统的扩散体积都很低。

此外，还展示了色谱柱历时3个月进行700多次分析的使用寿命性能以及柱间重现性。对于此评估，流动相经0.1 μm无菌过滤，样品经0.2 μm单独过滤或在蛋白A纯化程序中过滤，这样可以大幅降低色谱柱污染的可能性。但是，如果分析物是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，250 Å，P/N: 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>>）或采取离心等样品前处理手段。

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. Stephan M. Koza, Hua Yang和Ying Qing Yu, “使用 Waters XBridge Premier SEC蛋白质分析专用柱扩展体积排阻色谱平台方法用于单克隆抗体分析的通用性”，沃特世应用纪要, [720007500ZH](#), 2022年1月.
3. Stephan M. Koza和Ying Qing Yu, “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”，沃特世应用纪要, [720007584ZH](#), 2022年3月.
4. Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J. and De Jong, H., 2019.Acetate metabolism and the inhibition of

bacterial growth by acetate. *Journal of bacteriology*,
201(13), pp.e00147–19.

5. Stephan M. Koza, Corey Reed和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年6月.

6. Dunn ZD, Desai J, Leme GM, Stoll DR, Richardson DD. Rapid two-dimensional Protein-A size exclusion chromatography of monoclonal antibodies for titer and aggregation measurements from harvested cell culture fluid samples. *MAbs*. 2020;12(1):1702263.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <](#)

<https://www.waters.com/134613317>>

[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>>

[Andrew+移液机器人 <](#)

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>

>

[Empower色谱数据系统 <](#)

<https://www.waters.com/10190669>>

[720007852ZH](#), 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