利妥昔单抗聚集体和片段的高分离度 SEC 分离与定量分析

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 AdvanceBio SEC 300Å, 2.7 µm 色谱柱

应用简报

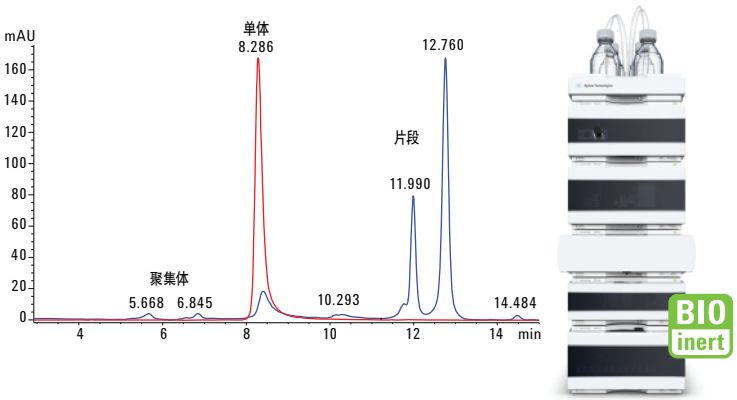
生物制剂与生物仿制药

作者

M.Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技公司
Bangalore, India

摘要

单克隆抗体聚集可通过产品和环境因素等多种机制产生。体积排阻色谱 (SEC) 是单克隆抗体型治疗药物聚集体和片段含量测定和定量分析的标准方法。本应用简报重点展示强制应激研究中获得的利妥昔单抗生物仿制药和创新药物的完整态、聚集体及片段的高分离度分离与定量分析。其中采用 Agilent 1260 Infinity 四元生物惰性液相色谱和 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行分离与定量分析，并使用分子量标准品校准色谱柱。AdvanceBio SEC 色谱柱的高灵敏度、高分离度分离适用于监测聚集体/降解物，也是亟需高分离度与高灵敏度的应用的理想选择。



Agilent Technologies

前言

体积排阻色谱 (SEC) 是分离治疗性 mAb 中单体、低分子量 (LMW) 和高分子量 (HMW) 异构体的一种常用方法。原始条件下的 SEC 根据不同分子大小在填料孔隙中的差异化扩散来实现单体及其异构体的分离。mAb 型药物的成功开发还需要评估强制降解研究中产生的聚集体和片段，这类研究中通常采用物理和化学降解途径。由于聚集体与免疫原性息息相关，且会对安全性与药效产生影响，因此分子大小在生物治疗药物的开发中扮演着重要角色。而确定能够分离与监测这些异构体的 SEC 方法是一项艰巨的挑战。本文展示了使用 SEC 分析中突破性技术 — Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的此类方法的优势。这款色谱柱采用独特的 2.7 µm 硅胶填料与键合技术实现 mAb 及其质量异构体的高分离度分离。该方法具有出色的保留时间和峰面积精度，证明了色谱柱与所用生物惰性液相色谱系统之间具有适用性。

材料与方法

仪器

本研究使用完全生物兼容且最高耐压 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列柱温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC)（G1316C，选项 19）
- Agilent 1260 Infinity DAD VL（G1315D，配备生物惰性标准流通池，10 mm）

软件

Agilent ChemStation 修订版 B.04.03（或更高版本）。

条件

色谱柱：	Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm（部件号 PL1180-5301）
流动相：	磷酸盐缓冲液 (PBS)，50 mM 含 150 mM 氯化钠的磷酸钠，pH 7.4
TCC 温度：	室温
进样量：	10 µL
流速：	0.8 mL/min
检测器：	UV，220 和 280 nm

试剂、样品与材料

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药、西妥昔单抗、曲妥单抗和 ADC 购自当地药店，并根据制造商的使用说明进行储存。PBS、盐酸和氢氧化钠购自 Sigma-Aldrich 公司。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 水纯化系统（Millipore Elix 10，美国）

AdvanceBio SEC 色谱柱校准

通过测定几种标准品（蛋白质聚集体、甲状腺球蛋白 (670 KDa)、γ-球蛋白 (158 KDa)、卵清蛋白 (44 KDa)、肌红蛋白 (17 KDa) 和维生素 B12 (1.35 KDa)）的洗脱体积来校准 AdvanceBio SEC 色谱柱。绘制标准品分子量 log 值与洗脱体积的关系图，以确定样品的等同分子量。

步骤

将流动相 (10 µL) 作为空白进样，随后将完整和应激 mAb 重复进样 6 次，以计算峰面积和保留时间 (RT) 偏差。

利妥昔单抗聚集体前处理

mAb 聚集体前处理方法为，用流动相将单克隆抗体稀释至最终浓度为 2 mg/mL。pH 应激测试方法与前述方法基本相同，仅有略微改动 [1]。简而言之，将 1 M HCl 溶液缓慢滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 M NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 M HCl 溶液将 pH 值调回至 6.0。pH 值变化间大约有 1 min 的等待时间，此时以 500 rpm 速度持续搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 min。

结果与讨论

分离和检测

校准 AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱时使用了一系列分子量已知的标准蛋白质（图 1）。采用于 5.748 min 时在色谱柱中洗脱出的蛋白质标准品中的标准蛋白质聚集体（空白峰）计算死体积，对应的 V_0 = 4.59 (mL)。色谱柱中分离的蛋白质的校准曲线具有线性关系，并定义了所分析蛋白质范围 (1.3 - 670 KDa) 的排阻限 (670 KDa)（图 2）。然后可以使用此曲线图根据未知蛋白质的洗脱体积确定其分子量。

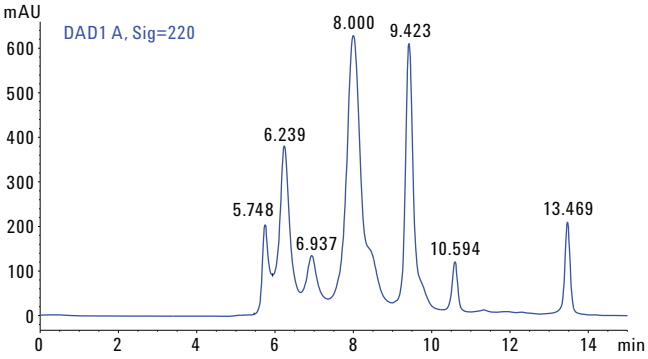


图 1. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上的蛋白质标准品分离结果

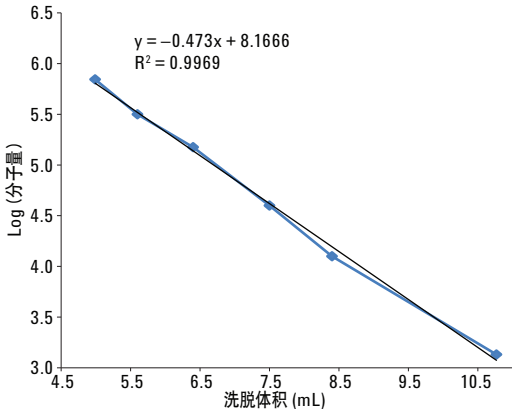


图 2. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上的蛋白质标准品校准曲线

图 3 表明使用 AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱可在 8 分钟内对完整 mAb 实现完美分离。图中不存在早洗脱或晚洗脱峰，说明市售 mAb 制剂呈均质且没有发生聚集或降解的迹象。

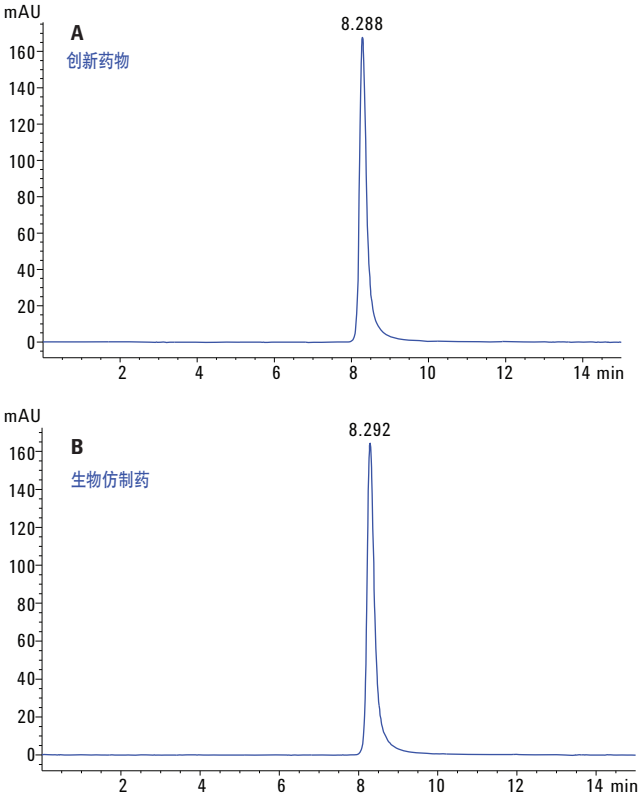


图 3. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上的完整治疗性 mAb SEC 谱图：
A：利妥昔单抗创新药物；B：利妥昔单抗生物仿制药

图 4 所示为利妥昔单抗生物仿制药和创新药物的叠加图，图中显示出对称的尖锐峰形，且不发生非特异性键合。表 1 显示完整 mAb 6 次重复进样得到的平均保留时间和峰面积 RSD 值。保留时间和峰面积的 RSD 分别小于 0.04% 和 1%，这表明方法重现性和系统精密度均十分出色。生物仿制药和创新药物的保留时间近似。此外，创新药物和生物仿制药的峰面积百分比纯度均大于 99%，表明它们极其相似。

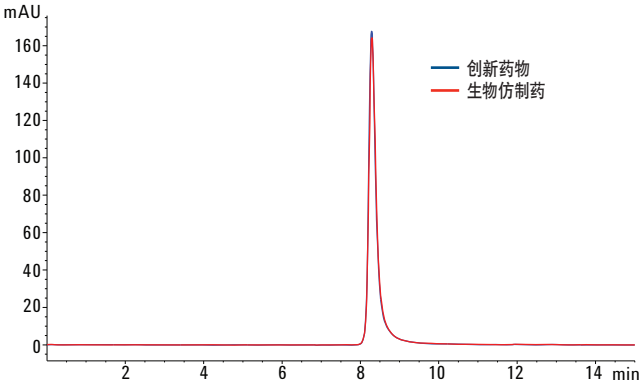


图 4. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上分离的利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的叠加色谱图

表 1 利妥昔单抗的保留时间和峰面积精密度 (n = 6)

	保留时间		峰面积	
样品	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
利妥昔单抗创新药物	8.28	0.04	99.33	1.21
利妥昔单抗生物仿制药	8.29	0	100	0

聚集/降解分析与定量

我们利用 SEC 对比完整态和应激 mAb 生物仿制药与创新药物，从而对聚集体和降解物进行监测。在色谱运行中，在单体形式之前洗脱的所有峰被认为是聚集体峰，而之后洗脱的所有峰则为降解物峰 [2]。

图 5 为 pH/热应激利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的 SEC 谱图。该谱图表明在使用同一个完整分析方法时，AdvanceBio SEC 色谱柱可分离并检测到聚集和降解 mAb。创新药物和生物仿制药中聚集体和片段的相对定量结果以峰面积百分比形式总结于表 2 中。

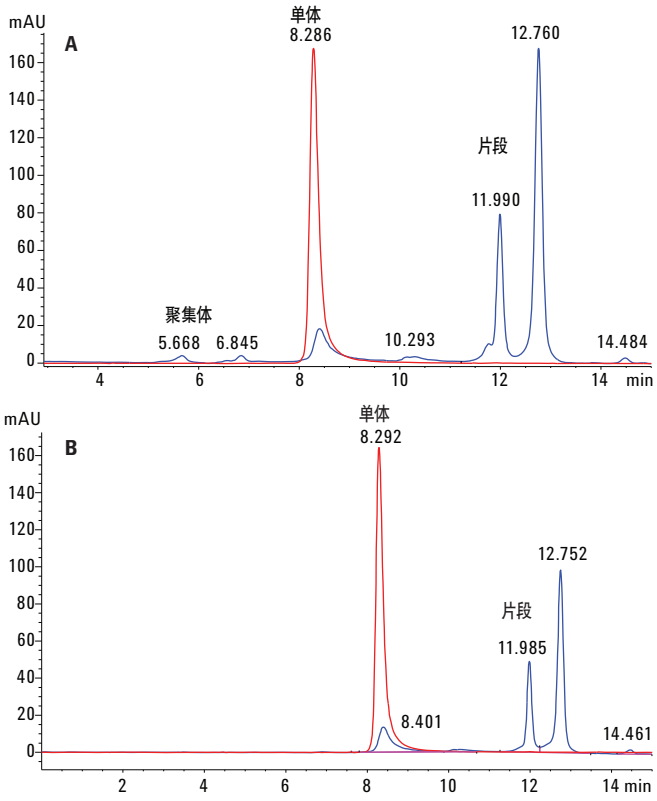


图 5. (A) 完整利妥昔单抗创新药物（红色）与 pH/热应激样品（蓝色）以及 (B) 完整利妥昔单抗生物仿制药（红色）与应激样品（蓝色）的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱叠加图

表 2. 完整与应激利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的相对峰面积百分比

完整创新药物		应激创新药物	
时间	峰面积%	时间	峰面积%
8.288（单体）	100	1.289	4.24
		5.668	2.26
		6.845	2
		8.40（单体）	13.6
		10.29	2.81
		11.99	23.22
		12.76	51.01
		14.48	1.11
完整生物仿制药		**应激生物仿制药**	
时间	峰面积%	时间	峰面积%
8.292（单体）	100	8.40（单体）	16.832
		11.985	24.24
		12.75	57.36
		14.46	1.5

此处值得注意的是，与生物仿制药相比，mAb 创新药物聚集体的相对峰面积由于应激条件而有所增加。然而，两种 mAb 的片段图谱和片段峰面积却高度一致。经应激处理后创新药物和生物仿制药的单体形式分别为 13% 和 16%，而两种 mAb 的主要形式为洗脱时间约为 12.75 min 的片段，占比大于 50%。

最后，为确定 AdvanceBio SEC 色谱柱对分子量略微不同的市售单克隆体和 ADC 的分离能力而进行了样品的单进样分析。图 6 为叠加色谱图。AdvanceBio SEC 色谱柱根据治疗性 mAb 和 ADC 的分子量实现了分离，因为图中清晰显示了它们的保留时间差异，因此证明这款色谱柱适用于这些分子的分析。

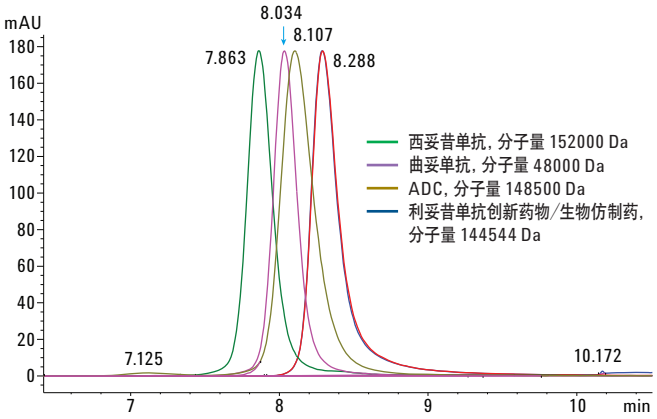


图 6. Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上分离的利妥昔单抗创新药物/生物仿制药、曲妥单抗与西妥昔单抗的叠加色谱图

结论

基于 mAb 的产品的开发过程极其复杂，其中涉及大量用于测定纯度、聚集体和其他与产品相关异构体的物理化学表征。体积排阻色谱广泛应用于原始条件下单体、HMW 和 LMW 类型的监测与定量分析。本研究采用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å，7.8 × 300 mm，2.7 µm 色谱柱开发出了一种原始条件下分离完整和应激利妥昔单抗样品的简单方法。优化的方法将单体分离为一个纯度为 100% 的单一对称峰，且未出现聚集体或片段迹象。此外，该方法还可对应激研究产生的聚集体和碎片进行分离与定量分析。仅有类似 AdvanceBio SEC 这样能够实现 mAb 及其质量异构体高分离度与高灵敏度分离的色谱柱才能实现上述分析。此外，Agilent 1260 Inifinity 生物惰性四元液相色谱为生物惰性和耐腐蚀性提供了保证。

参考文献

1. Ba ak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, **2005**.

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 10 月 16 日，中国出版
5991-6304CHCN

Agilent Technologies