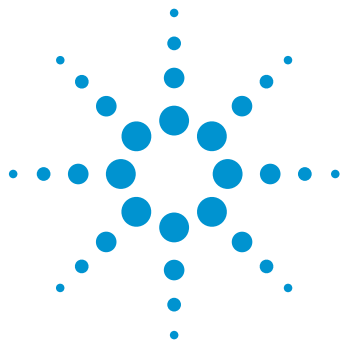




# 从 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪到 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪的无缝方法转移

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的电荷异构体分析

## 应用简报

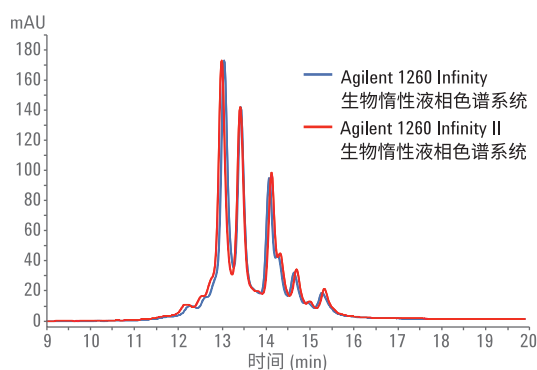
生物制药与生物仿制药

### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技公司  
Waldbronn, Germany

### 摘要

监测生物药物的电荷异质性对于生产安全有效的药物至关重要，因为电荷分布的改变可能会引起不良免疫反应。本应用简报展示了对利妥昔单抗创新药物及其生物仿制药的电荷异构体的分析。电荷异构体在峰型模式方面表现出相似性，但是创新药物与生物仿制药的单峰的强度则存在明显差异。从 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪转换为 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪，所获得的分析结果相当。结果还表明保留时间具有优异的一致性，最大偏差小于 0.5%。两种系统在保留时间和峰面积方面获得了高精度的结果。



**Agilent Technologies**

## 前言

仪器间的方法转移对不同行业的实验室而言都是一项重要课题<sup>1</sup>。对于制药及生物制药行业中经验证的方法，由于实验室现代化发展等因素，必须实现从一台仪器到另一台仪器的等效方法转换。

随着生物制药行业的发展，出现了许多昂贵的新兴单克隆抗体 (mAb) 药物，这导致了低价生物仿制药的不断开发。对创新药物与生物仿制药的比较研究对于评估生物仿制药 mAb 的安全性和有效性至关重要。这些广泛的研究包括重要的质量属性，例如滴度分析、聚集研究、电荷异构体和糖基化分析、肽谱分析等。两种最重要的质量属性是聚集研究以及电荷异构体分布的分析<sup>2</sup>。本应用简报中使用的 mAb 为利妥昔单抗的创新药物及生物仿制药，此类药物与多药化疗法一起用于治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤<sup>3</sup>。

本应用简报使用弱阳离子交换色谱法 (WCX) 分析了利妥昔单抗创新药物及生物仿制药的电荷异构体分布情况。对两种不同的生物惰性系统 (Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪) 进行比较以证明所测试的两种系统的等效性。

## 实验部分

### 仪器

本实验在 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统和 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统上完成。该系统包括以下模块：

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高性能生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1330B)，用于样品冷却
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，配备生物惰性溶剂热交换器
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315C)，配备 10 mm 生物惰性标准流通池

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元液相色谱系统

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置 (选件 #100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量恒温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器 (选件 #019)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池 (选件 #028)

### 色谱柱

Agilent Bio mAb，非多孔，2.1 × 250 mm，5 μm HPLC 色谱柱，PEEK (部件号 5190-2411)

### 软件

- Agilent OpenLAB CDS 2.1 版
- 安捷伦缓冲液顾问软件 A.01.01 [009]

使用 Agilent OpenLAB CDS 2.1 版软件进行液相色谱仪控制和液相色谱数据分析。OpenLAB CDS 2.1 版软件提供了用于液相色谱、气相色谱和单四极杆质谱的单个软件系统。它具有直观的用户界面，以及可采用拖放式模板创建的定制化交互式报告功能。

### 样品

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药样品购自印度当地的药店。

### 化学品

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA)。

## 色谱条件

| 参数                                                        | 值                               |      |                   |                                             |                                             |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------|------|-------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 盐梯度 0-200 mM NaCl, 30 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.8 (由缓冲液顾问软件计算得到的梯度) | 时间 (min)                        | A) 水 | B) NaCl (1000 mM) | C) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (55 mM) | D) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM) |
|                                                           | 0.00                            | 43.1 | 0.0               | 31.0                                        | 25.9                                        |
|                                                           | 30.00                           | 22.3 | 20.0              | 22.7                                        | 35.0                                        |
|                                                           | 35.00                           | 22.3 | 20.0              | 22.7                                        | 35.0                                        |
| 停止时间                                                      | 35 min                          |      |                   |                                             |                                             |
| 后运行时间                                                     | 30 min                          |      |                   |                                             |                                             |
| 流速                                                        | 0.25 mL/min                     |      |                   |                                             |                                             |
| 进样量                                                       | 2 µL                            |      |                   |                                             |                                             |
| 进样器温度                                                     | 10 °C                           |      |                   |                                             |                                             |
| 色谱柱温度                                                     | 25 °C                           |      |                   |                                             |                                             |
| DAD                                                       | 280 nm/4 nm, 参比: 关闭             |      |                   |                                             |                                             |
| 峰宽                                                        | > 0.025 min (0.5 秒响应时间) (10 Hz) |      |                   |                                             |                                             |

## 结果与讨论

离子交换色谱的方法开发通常从 pH 筛选开始, 通过 pH 筛选找到分离电荷异构体的最佳色谱条件。在分离利妥昔单抗电荷异构体的过程中, 选择磷酸盐缓冲梯度, 使用氯化钠实现离子强度的线性提升。能够使磷酸盐缓冲液实现最佳缓冲容量的 pH 范围处于 6 至 7.5 pH 之间。因此, pH 筛选从 pH 6.2 开始, 并以 0.2 的增量逐渐提高至 pH 7.2。图 1 显示了使用利妥昔单抗生物仿制药得到的 pH 筛选色谱图。根据所调节的 pH 不同, 观察到保留时间以及分离度方面存在明显差异。利用安捷伦缓冲液顾问软件计算四元梯度, 对所有调节的 pH 值采用相同的四种储备液。结合由缓冲液

顾问软件计算得到的动态混合四元梯度, 可缩短并简化 pH 筛选工作流程<sup>4</sup>。特别是, 与人工配制用于预混合的双组分梯度的缓冲液相比, 使用缓冲液顾问软件计算得到的动态混合梯度能

够显著减少缓冲液配制时间。此外, 它可以避免中断分析序列以引入并冲洗新的缓冲液组分, 选择 pH 6.8 以实现最高的分离度, 并用于所有后续的分析。

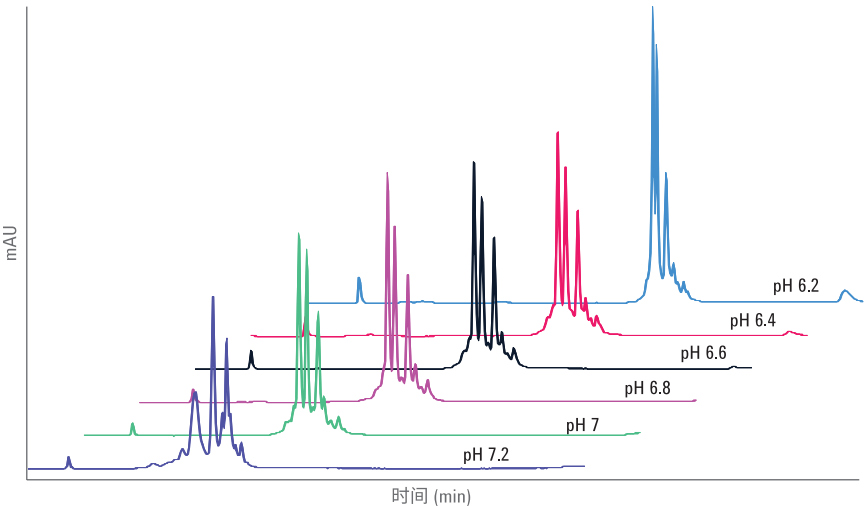


图 1. 在 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪上使用利妥昔单抗生物仿制药在 pH 6.2 至 7.2 的范围内进行 pH 筛选

图 2 显示了利妥昔单抗创新药物与生物仿制药在 pH 6.8 下的电荷异构体比较。可以看到单峰的强度之间存在明显差异。两张色谱图的叠加图表明峰质量看起来相似，但是峰数量（尤其是碱性异构体）有很大程度的不同（图 3）。具有最高强度的生物仿制药的两种碱性异构体在之前发布的应用简报中被鉴定为 C-末端赖氨酸变体<sup>5</sup>。

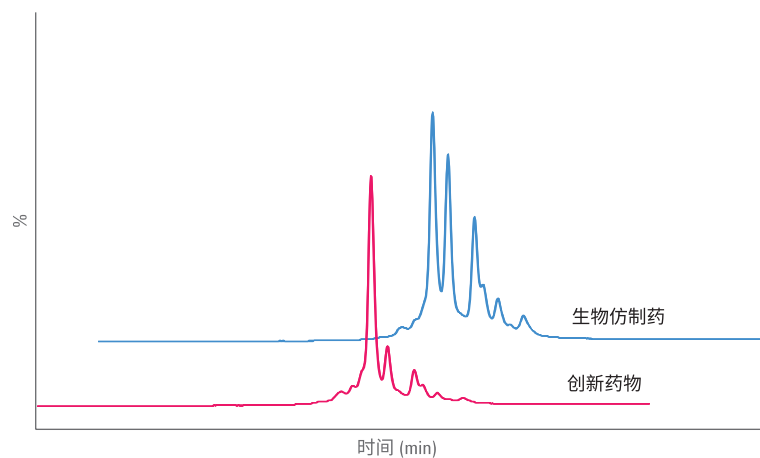


图 2. 采用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪在 pH 6.8 下获得的利妥昔单抗创新药物与生物仿制药的电荷异构体图谱的比较

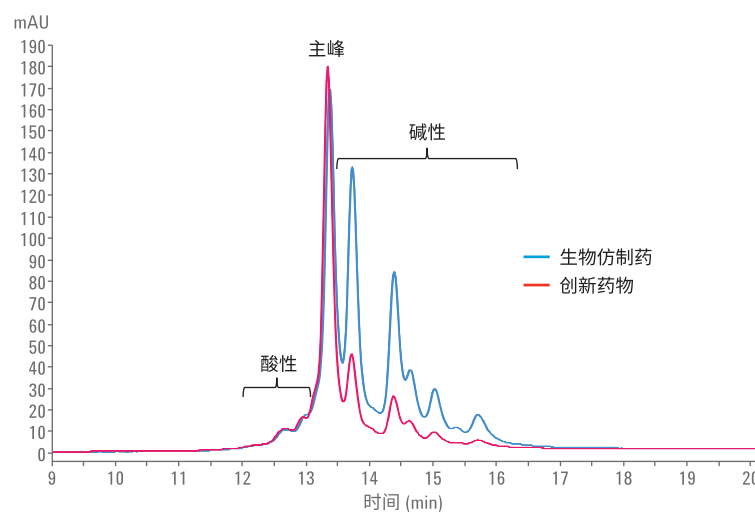


图 3. 在 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪上得到的利妥昔单抗创新药物与生物仿制药的电荷异构体图谱的直接叠加图

为了证明等效性，将用于电荷异构体分析的方法不经任何改变应用于 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪。图 4 显示了在两种系统上获得的 WCX 色谱图的叠加图：1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪（蓝色迹线）和 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪（红色迹线）。表 2 显示了所比较的保留时间。在两套生物惰性系统上观察到优异的保留时间一致性，最大偏差小于 0.5%。

在 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪上连续进样利妥昔单抗生物仿制药五次，评估保留时间和峰面积的精度。1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪所得的分离、对应的保留时间和峰面积精度分别如图 5 和图 6 所示。两种系统在保留时间和峰面积方面表现出高精度色谱结果。

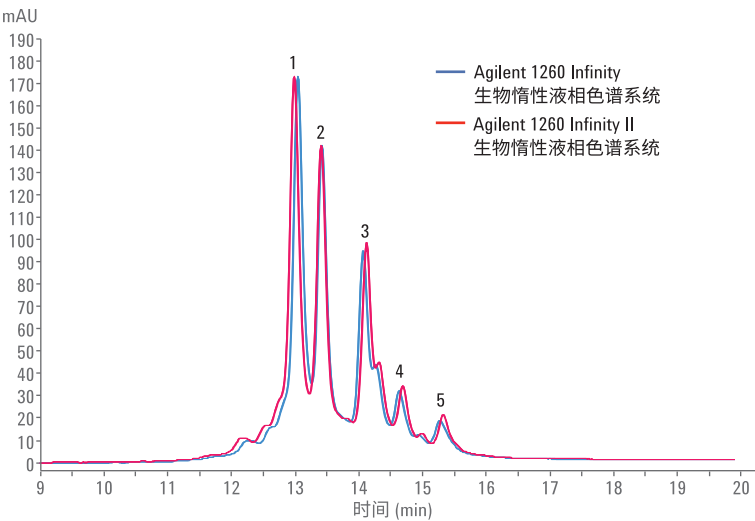


图 4. Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪（蓝色迹线）和 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪（红色迹线）在 pH 6.8 下进行生物仿制药 WCX 分离的叠加图

表 2. Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪在 pH 6.8 下进行生物仿制药 WCX 分离得到的保留时间的比较

|     | Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统 (min) | Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统 (min) | 偏差 (%) |
|-----|----------------------------------------|-------------------------------------------|--------|
| 峰 1 | 13.37                                  | 13.31                                     | 0.47   |
| 峰 2 | 13.75                                  | 13.73                                     | 0.17   |
| 峰 3 | 14.40                                  | 14.44                                     | -0.28  |
| 峰 4 | 14.95                                  | 15.01                                     | -0.39  |
| 峰 5 | 15.59                                  | 15.65                                     | -0.41  |

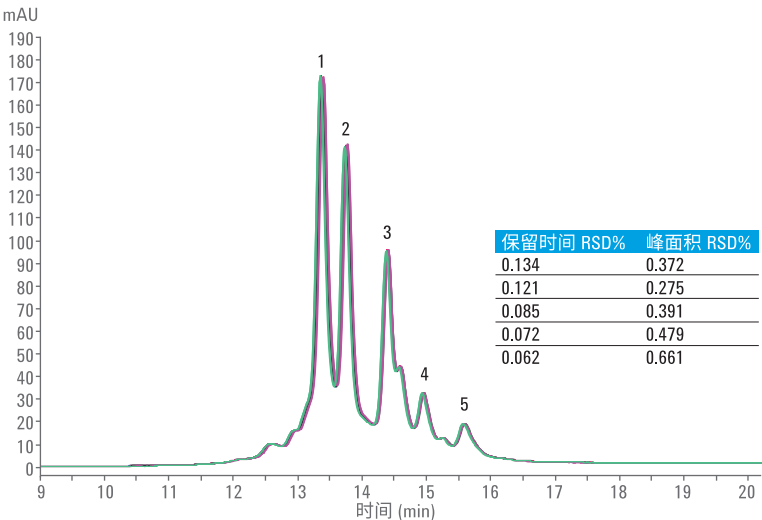


图 5. 在 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪上进行五次连续进样得到的利妥昔单抗生物仿制药的电荷异构体的叠加图

## 结论

利用弱阳离子交换色谱对利妥昔单抗创新药物和生物仿制药进行电荷异构体分析。利用安捷伦缓冲液顾问软件计算得到 pH 6.2 至 7.2 的梯度进行方法开发/pH 筛选后，选择 pH 6.8 在磷酸盐缓冲体系中使这些样品获得最佳分离度。对创新药物与生物仿制药的电荷异构体分布进行比较后，发现峰型形状相似，但是单峰的强度存在明显差异。采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱仪和 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪在 pH 6.8 环境下进行分离。观察到保留时间具有优异的一致性，最大偏差小于 0.5%，证明了两套生物惰性系统的等效性。此外，两种系统在保留时间和峰面积方面获得了高精度结果。

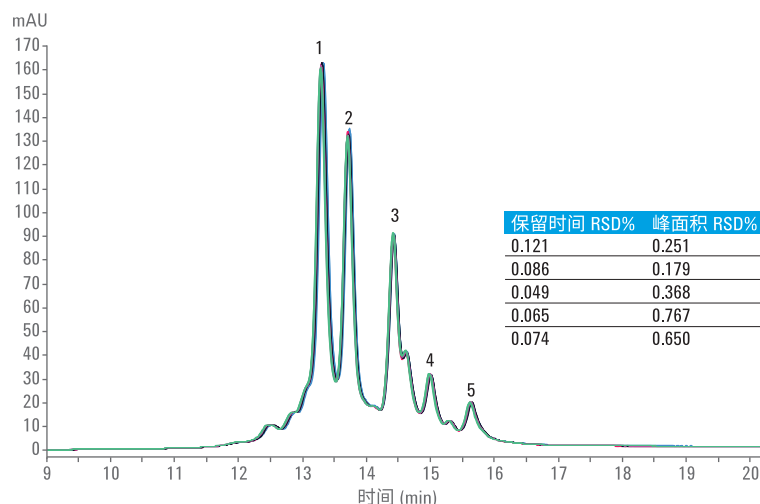


图 6. 在 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪上进行五次连续进样得到的利妥昔单抗生物仿制药的电荷异构体的叠加图

## 参考文献

1. Agilent 1290 Infinity with ISET (采用 ISET 的 Agilent 1290 Infinity)，安捷伦科技公司用户使用手册，部件号 G4220-90314，**2015**
2. ICH, ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
3. Roy, P. S.; *et al.* Comparison of the efficacy and safety of Rituximab (Mabthera) and its biosimilar (Reditux) in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemo-immunotherapy: A retrospective analysis. *Indian J. Med. Paediatr Oncol.* **2013**, 34(4), 292–298
4. Schneider, S.; Strassner, J. 使用安捷伦缓冲液顾问软件优化阳离子交换色谱法的蛋白质分离，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0565CHCN，**2012**
5. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN，**2016**

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016  
2016 年 11 月 1 日，中国出版  
5991-7442CHCN



**Agilent Technologies**