

## 使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)改善单克隆抗体和抗体偶联药物的分离性能

---

Kenneth D. Berthelette, Jennifer M. Nguyen, Lavelay Kizekai, William J. Warren, Steve Shiner

Waters Corporation

---

### 摘要

单克隆抗体(mAb)和抗体偶联药物(ADC)作为生物制药产品已有二十多年的历史。在2020年销量排名前50的药品中,有11种是mAb,其中包括销量位居前两名的产品Humira和Keytruda<sup>1</sup>。体积排阻色谱(SEC)是在蛋白质大小异构体的表征过程中执行分离的一种主要技术。但是,蛋白质与液相色谱(LC)柱硬件和/或填料之间不良的次级相互作用可能会影响所得数据的质量。Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)专为减轻这些次级相互作用而设计。使用Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 μm)和硅胶基质SEC (dSEC-2)色谱柱分离三种不同的蛋白质标准品,凸显Waters MaxPeak Premier SEC技术为这些特定应用领域带来的改进。

### 优势

- 提高了两种mAb标准品中低分子量物质(LMWS)的USP分离度和检测性能
  - 与硅胶柱相比,该技术改善了三种不同的标准品中HMWS相对于单体的相对峰面积(百分比)
  - 提高了三种不同的标准品中主要mAb单体峰的5σ效率
  - 使用磷酸盐缓冲盐水(PBS),简化了SEC洗脱液方法开发
-

---

## 简介

得益于治疗性生物分子在合成、表征、生产和疗效方面的进步，这类药物目前正在快速发展。在2021年美国食品药品监督管理局(FDA)批准的50种药物中，有16种是生物制剂<sup>2</sup>。为正确表征目标化合物，确保追踪到聚集体和片段，分析人员可以采用体积排阻色谱(SEC)法。SEC技术是在20世纪50年代由Wheaton和Bauman首次推出的，能够根据化合物的流体动力学半径实施分离<sup>3</sup>。自那时起，固定相设计和生产工艺的改进，包括颗粒孔径一致、新孔径出现以及可重现的颗粒生产工艺和测试，使SEC更加可靠和准确，同时有利于新型化合物的方法开发和验证工作。

现有SEC方法特别容易受到分析物与分离平台（包括色谱柱硬件和SEC填充颗粒）之间相互作用的影响。这些相互作用可能是离子相互作用和/或疏水相互作用，具体取决于分析条件、目标分析物和系统配置。生物分析物的复杂性可能导致多种次级相互作用，产生峰形较差且较宽的峰，并可能降低聚集体或片段的回收率。分析物的酸性部分可能与液相色谱(LC)系统的金属表面相互作用，导致峰面积减小<sup>4-6</sup>。沃特世于2020年推出了MaxPeak Premier高性能表面(HPS)硬件，旨在减轻小分子分析物与金属柱和系统硬件之间的离子相互作用。蛋白质极易发生离子相互作用，因此需要额外的特殊考虑，还必须采取措施以减轻蛋白质与填料上活性位点之间的离子和疏水相互作用。为此，我们将包含高覆盖率羟基封端聚环氧乙烷(BEH-PEO)键合的新型亚乙基桥杂化颗粒与新型亲水性MaxPeak HPS硬件配合使用，为不良次级相互作用问题提供了解决方案<sup>7</sup>。本文所述研究比较了Waters XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱(250 Å, 2.5 µm)与硅胶柱(dSEC-2, 200 Å, 2.5 µm)在Agilent 1260 Infinity Bio系统上的性能。

---

## 实验

### 样品描述

将沃特世mAb大小异构体标准品（部件号：[186009429 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009429-mab-size-variant-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009429-mab-size-variant-standard.html)）复溶于70 µL水中(2.28 mg/mL)，涡旋混合数秒，然后进样。用组氨酸制剂缓冲液（12.5 mM组氨酸/12.5 mM盐酸组氨酸）制备NISTmAb参比物质8671工作溶液(2 mg/mL)。用Milli-Q水制备抗体偶联药物(ADC)曲妥珠单抗-美坦新偶联物(KADCYLA)工作溶液(5 mg/mL)。

### 液相色谱条件

---

液相色谱系统:	Agilent 1260 Infinity生物惰性四元液相色谱系统、HiP ALS（高性能自动进样器）和配备生物惰性流通池(10 mm, 13 $\mu$ L)的DAD。测得5-sigma (5 $\sigma$ )系统扩散为37 $\mu$ L。
检测:	UV @ 280 nm, 5 Hz
色谱柱:	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 $\text{\AA}$ , 7.8 $\times$ 300 mm, 2.5 $\mu$ m  对比柱: dSEC-2 200 $\text{\AA}$ , 7.8 $\times$ 300 mm, 3 $\mu$ m
柱温:	室温
样品温度:	8 $^{\circ}$ C
进样体积:	10.0 $\mu$ L (mAb标准品) , 7.2 $\mu$ L (KADCYLA)
流速:	0.58 mL/min
等度流动相:	2x磷酸盐缓冲盐水 (20 mM磷酸盐、276 mM NaCl、5.4 mM KCl, pH 7.4)
样品管理器清洗液:	18.2 M $\Omega$ 水
样品管理器灌注液:	18.2 M $\Omega$ 水

## 数据管理

色谱软件:	Empower 3 Feature Release 4
-------	-----------------------------

## 结果与讨论

Agilent 1260 Infinity生物惰性系统配置了二极管阵列检测器(DAD)和生物惰性流通池(10 mm, 13  $\mu$ L)。开始检测之前,先使用尿嘧啶进样来评估系统谱带展宽,根据4.4% ( $5\sigma$ )处峰宽测得系统扩散为37  $\mu$ L。每种被测色谱柱在样品进样前均平衡40 min,以达到分析条件。

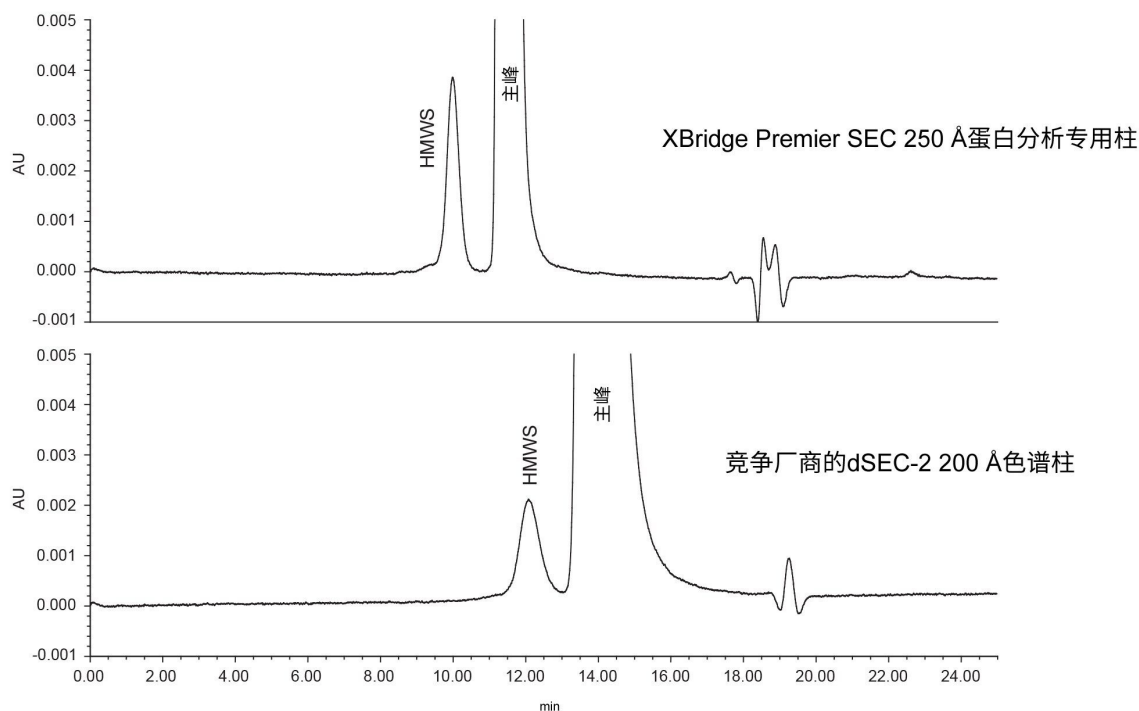


图1.两种色谱柱上的ADC分析结果。使用2x PBS水溶液进行等度分离,流速为0.57 mL/min,UV检测波长为280 nm。

ADC曲妥珠单抗-美坦新偶联物(KADCYLA)的分离结果如图1所示。在两种色谱柱中,高分子量物质(HMWS)与主峰均实现了良好分离。与XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱相比,竞争厂商的dSEC-2色谱柱产生的峰稍宽,保留时间也 longer。保留时间增加可能是由于两种固定相的孔径不同。分离的关键属性(包括HMWS的峰面积百分比)如表1所示。XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱与竞争厂商的dSEC-2色谱柱相比,前者的HMWS峰面积百分比略高,二者分别为1.72%和1.51%。这些值均处于该物质的商定范围内,竞争厂商色谱柱的值只是刚好处于该范围内。沃特世色谱柱提供的主峰半高处分离度也比竞争厂商色谱柱高,分别为2.68和1.71。从开发和疗效测试再到生产过程中的质量控制测试,在整个产品生命周期内,可靠地测量HMWS对于确保产品的安全性和疗效至关重要。

要。

在沃特世mAb大小异构体标准品的分析中，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱表现出类似的改善，如图2所示。沃特世mAb大小异构体标准品不仅含有HMWS，还含有LMWS或片段。由参比物质NISTmAb (8671)可知，沃特世mAb大小异构体标准品富含IdeS酶解片段，分子量约100 kDa的物质大约占总mAb的1%。因此，本实验将100 kDa片段称为LMWS1&2，因为它同时含有水解和IdeS酶解物质，这些物质的洗脱时间非常接近，未实现完全分离<sup>8</sup>。

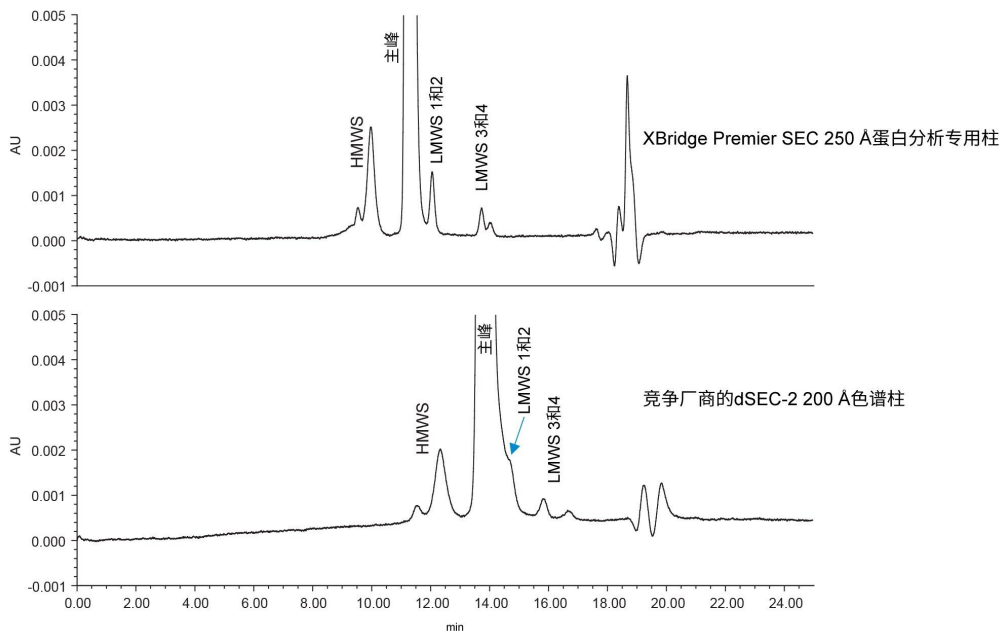


图2.沃特世mAb大小异构体标准品在XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱和竞争厂商dSEC-2硅胶柱上的分析结果。使用2x PBS水溶液作为流动相进行等度分离，流速为0.57 mL/min，UV检测波长为280 nm。

XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱使主峰与LMWS1&2峰获得有效分离，而竞争厂商色谱柱仅使主峰的尾部产生一个肩峰。由于单体的分子量（约150 kDa）与第一个片段的分子量（约100 kDa）相差不到两倍，并且在单体峰尾部洗脱的LMWS的丰度低得多，因此这两者非常难以分离。从主峰中分离出LMWS1&2，以及HMWS更高的回收率，同时仍然处于标准品的指导范围内，提供了更彻底的样品表征。XBridge Premier HMWS蛋白分析专用柱与竞争厂商的dSEC-2色谱柱相比，前者的HMWS峰面积百分比略高，二者分别为2.47%和2.28%，此外还有其他方面的改善，如表1所示。总体而言，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱的分离效率优于竞争厂商色谱柱，尤

其是在HMWS和LMWS1&2的分离中。

最后要分析的标准品是NISTmAb参比物质(RM) 8671。该标准品在两种色谱柱上得到的色谱图如图3所示。该标准品包含HMWS以及LMWS1和LMWS4的小峰，但不含LMWS2片段。基于色谱图的峰鉴定方法详见Waters mAb size variant standard care and use manual (《沃特世mAb大小异构体标准品维护和使用手册》)<sup>7</sup>。

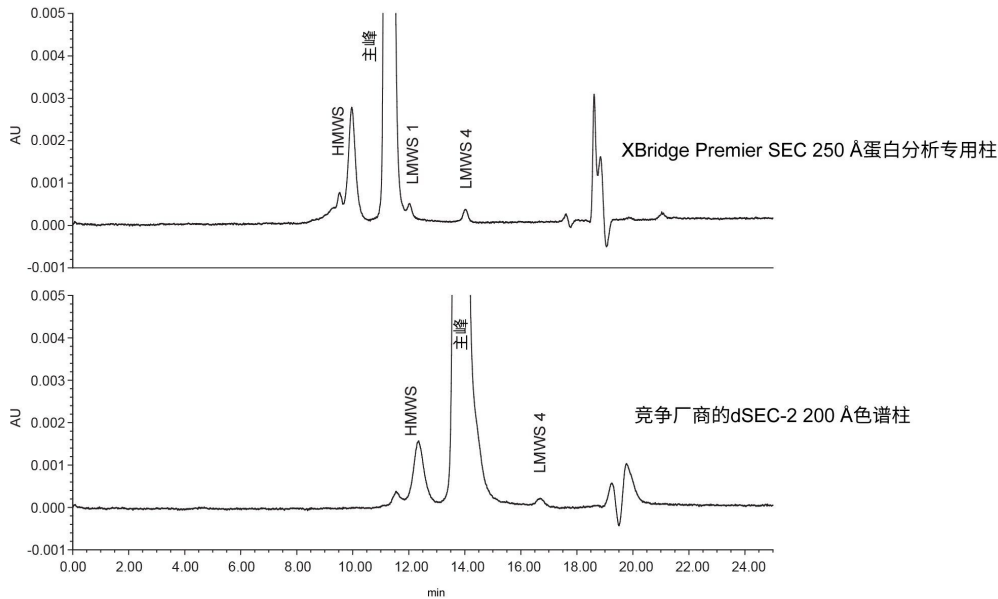


图3.NISTmAb参比物质8671在XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱和竞争厂商dSEC-2硅胶柱上的分析结果。使用2x PBS水溶液作为流动相进行等度分离，流速为0.57 mL/min，UV检测波长为280 nm。

LMWS1在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上表现出部分分离，相对丰度较低(0.26%)，因此无法计算该峰的半高处USP分离度。而dSEC-2色谱柱未表现出LMWS1峰，只是在主峰中出现一个较小的肩峰，与沃特世mAb标准品的结果类似。此外，在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上，LMWS4的S/N有所改善，可能还有助于改善定量结果。NISTmAb RM 6871分离的全部详细信息见表1。

峰	属性	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 µm			竞争厂商的dSEC-2色谱柱, 200 Å, 2.5 µm		
		赫赛莱标准品	沃特世mAb标准品	NIST RM6871	赫赛莱标准品	沃特世mAb标准品	NIST RM6871
主峰	峰面积%	98.28	96.34	96.84	98.49	97.12	97.62
	USP分离度(HH)	2.68	3.47	3.44	1.71	2.53	2.59
	5-Sigma	7934	19995	19998	2229	12273	12363
	USP拖尾因子	1.45	1.13	1.13	1.70	-	1.10
HMWS	峰面积%	1.72	2.47	2.73	1.51	2.28	2.20
LMWS1和2 (仅LMWS1 - NIST)	初始P/V比	-	4.15	1.46	-	-	-
	USP分离度(HH)	-	2.63	-	-	-	-
	峰面积%	-	0.74	0.26	-	-	-
LMWS 3和4	峰面积%	-	0.45	0.17	-	0.61	0.18

表1.所有三种标准品在XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱和竞争厂商dSEC-2硅胶柱上的分离结果的表格数据。除初始p/v比以外，其余所有值均通过Empower CDS计算得出。初始p/v比的计算方法是取顶点处的峰高除以LMWS 1峰与主峰之间的谷高。5-Sigma是在4.4%峰高处测得的塔板数。

对于大多数相关参数，XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱均在所有三个样品的预期范围内获得了更出色、更准确的结果。竞争厂商色谱柱对ADC样品的HMWS结果超出了预期的峰面积百分比，对NIST mAb和沃特世大小异构体标准品则刚好处于预期范围内。在XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱上，各标准品中HMWS的峰面积百分比均较高，最高达分离的总峰面积的0.53%。可靠定量并回收HMWS对于生物制药mAb的生产和质量控制至关重要。尽管HMWS的峰面积百分比处于标准品的参数范围内，但该值较低仍然表明最终产品中的物质表示不准确。LMWS1&2与主峰的分​​离是关键。XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱能够更有效地分离LMWS1&2与主峰，进而有可能更可靠地表征样品。如果LMWS1&2峰未得到良好分离，则片段峰的峰面积百分比将低于应有值，导致表征不准确和总体结果不佳。

## 结论

生物药物化合物的SEC分析是一种非常有用的技术，能够对生物治疗性蛋白质进行准确表征和工艺监测，但这种分析很容易受到不良次级相互作用的影响，对结果造成干扰。Waters XBridge和ACQUITY Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱有两种粒径可供选择，采用了沃特世创新的色谱柱填料以及针对蛋白质分离优化过的亲水性MaxPeak Premier HPS硬件，是专为减轻次级相互作用而设计的。在三种不同标准品的分析中，这种创新设计与竞争厂商色谱柱相比，可以更好地分离HMWS和LMWS。XBridge和ACQUITY Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱能够对生

物药物化合物进行一致的表征，在关键分析中提供重要信息并提高结果可信度。

---

## 参考资料

1. 50 of 2020' s Best-selling Pharmaceuticals. *Drug Discovery and Development*. Accessed 3-Jan-2021. <https://www.drugdiscoverytrends.com/50-of-2020s-best-selling-pharmaceuticals/> <  
<https://www.drugdiscoverytrends.com/50-of-2020s-best-selling-pharmaceuticals/>>
2. Novel Drug Approvals for 2021. FDA website. Accessed 4-Jan-2021. <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021> <<https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021>>
3. Wheaton RM, Bauman WC. Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1953. 159-176.
4. Kellett J, Birdsall RE, Yu YQ. Increasing Recovery of Phosphorylated Peptides Using ACQUITY Premier Technology Featuring MaxPeak High Performance Surfaces. Waters Application Note [720007198EN](#), 2021.
5. DeLano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen J, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Analytical Chemistry* 2021 5773–5781.
6. Jung M, Lauber M. MaxPeak高性能表面(HPS)技术在改善灵敏度和动态范围方面的表现：关于核苷酸检测的案例研究. 沃特世应用纪要. [720007053ZH](#), 2021.
7. Kizekai L, Lauber M. Waters ACQUITY and XBridge Premier Protein SEC 250 Å Columns: A New Benchmark in Inert SEC Column Design. Waters Application Note. [720007493EN](#), 2022.
8. Waters mAb Size Variant Standard Care and Use Manual, [720006811EN](#) <  
<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135068415&lid=135068414&type=USRM>> , 2022.

## 致谢



感谢Pamela Irenata开发了检测参数。

感谢Mark Trahan和Andrew Steere允许我们访问并帮助我们设置仪器。

---

## 特色产品

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007528ZH, 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