Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

单克隆抗体及其高聚体的体积排阻色谱分析方法开发

Paula Hong和Kenneth J. Fountain
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市枫树街34号)

应用优势

- 稳定分析mAb单体和聚集体
- 高通量SEC分离
- 一致的纯度曲线
- 高级聚集体的可重现定量分析
- 简单的SEC方法开发

沃特世解决方案

- ACQUITY UPLC® H-Class Bio系统
- ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7 µm色谱柱
- Auto•Blend Plus™ 技术
- Empower® 2软件

关键词

体积排阻色谱，UPLC，单克隆抗体，方法开发，聚集体

简介

自生物类似药问世以来，其中存在的蛋白质聚集体就一直是影响其安全性和疗效的一大阻碍[1]。因此，在生物治疗药物的整个生产过程中，我们通常都会对蛋白质聚集体进行监测。尽管现在已有多种分析技术可用于分析可溶性聚集体，但一直以来占主导地位的都是体积排阻色谱(SEC)[2]。

SEC采用的是二醇基涂层的硅胶色谱柱和HPLC仪器，引入UPLC® 或结合亚2 µm颗粒的低扩散系统后，其等度分离效果已经得到了进一步的改善，能够实现更高的分离度、分析通量以及分析的灵敏度[3]。但是，就像所有SEC方法一样，我们还可通过调整该方法所涉及的多个参数来改善分离效果和提高方法稳定性。以下应用，我们将研究其中几个参数对SEC分离的影响，包括流动相组成、流速以及色谱柱长度。该应用中对分离效果的评估基于色谱柱校准、分离度以及聚集体定量等多个标准。

实验

样品描述

本实验所用的蛋白质标准品(BioRad,溶解于去离子水中)含牛甲状腺球蛋白(5 mg/mL)、牛γ-球蛋白(5 mg/mL)、鸡卵清蛋白(5 mg/mL)、马肌红蛋白(2.5 mg/mL)以及维生素B12(0.5 mg/mL)。所分析的小鼠单克隆抗体经蛋白A亲和层析法纯化，样品浓度为10 mg/mL，溶于0.1 M碳酸氢钠和0.5 M氯化钠溶液中，pH = 8.3。实验中未进行样品的实验间条件控制。

方法条件

LC条件:

系统:	配备TUV和钛合金流通池的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
波长:	214和280 nm
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7 µm, 4.6 x 150 mm, 部件号186005225
柱温:	30 °C
样品温度:	4 °C
进样体积:	2 µL(除非另有说明)
流速:	0.4 mL/min(除非另有说明)
流动相:	采用Auto•Blend Plus技术制备
最终组成:	25 mM磷酸钠, pH 6.8, 200 mM氯化钠 (除非另有说明)

数据管理

软件: Empower 2

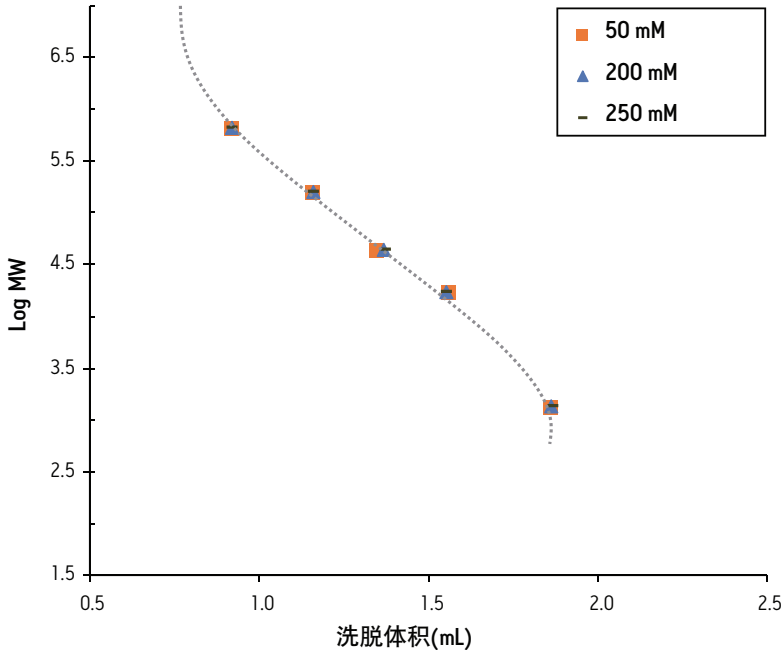
结果与讨论

进行SEC方法开发时需对多个因素进行评估。理想情况下，SEC分离基于溶液中蛋白质的尺寸大小。鉴于此，我们对水相条件下原始状态的生物分子进行了体积排阻色谱分析。然而，混合模式的相互作用会对蛋白质尺寸的测定产生影响[4]。具体而言，填充材料上带电荷的位点会与蛋白质相互作用，从而发生“离子交换”效应。为了确认这些效应对测定的影响程度，我们需要对流动相条件进行评估。但是另一方面，色谱分离的条件又会改变蛋白质的结构和状态。盐的浓度、组成以及pH都会影响蛋白质的三维结构以及蛋白质间的相互作用。因此，在评估SEC方法时还需要结合生物分子的生物活性信息。

在下面的讨论中，我们将概述SEC方法开发的思路和参数。虽然我们以UP-SEC为例阐述SEC方法开发步骤，同样的原则也适用于所有HP-SEC分离的方法开发。我们将基于峰形、分离度、校准准确度以及定量结果对方法进行评估。利用四元洗脱液管理系统，并结合能充分利用该四元洗脱液混合系统优势的软件，可轻松完成对流动相离子强度和pH的优化[5]。这一方法将贯穿于我们的整个研究。

流动相离子强度

为了最大限度降低填料与蛋白质之间的次级相互作用，必须调整流动相的离子强度。我们分析了溶于50-250 mM氯化钠的一组蛋白标准品，以确定流动相浓度对校准曲线的影响。选择氯化钠是因为它是SEC分离中最常用的盐。缓冲液浓度(磷酸钠)和pH分别保持25 mM和6.8。在所有的测试浓度下，每种蛋白质的保留时间差异均小于0.07 min，其中卵清蛋白的保留时间变化最大(图1)。这些结果表明校准曲线对盐浓度不敏感。



蛋白质	分子量
甲状腺球蛋白	670000
γ-球蛋白	158000
卵清蛋白	44000
肌红蛋白	17000
维生素B12	1350

图1.氯化钠对SEC校准曲线的影响。
注：由于蛋白质在溶液中的形状不同，校准点并非呈一条直线。

除了蛋白质标准品外，我们还评估了溶于50-250 mM氯化钠中的小鼠单克隆抗体(mAb)的SEC分离情况(图2)。正如通常会在凝胶过滤填料上观察到的一样[2]，较大的离子强度可减少mAb单体的峰拖尾现象并使峰形更窄。当氯化钠浓度从50升至200 mM时，mAb的峰高从0.189升至0.289。USP拖尾因子也从1.64降至1.22。而当流动相离子强度从200升至250 mM氯化钠时，上述变化不再明显(USP拖尾因子 = 1.20)。

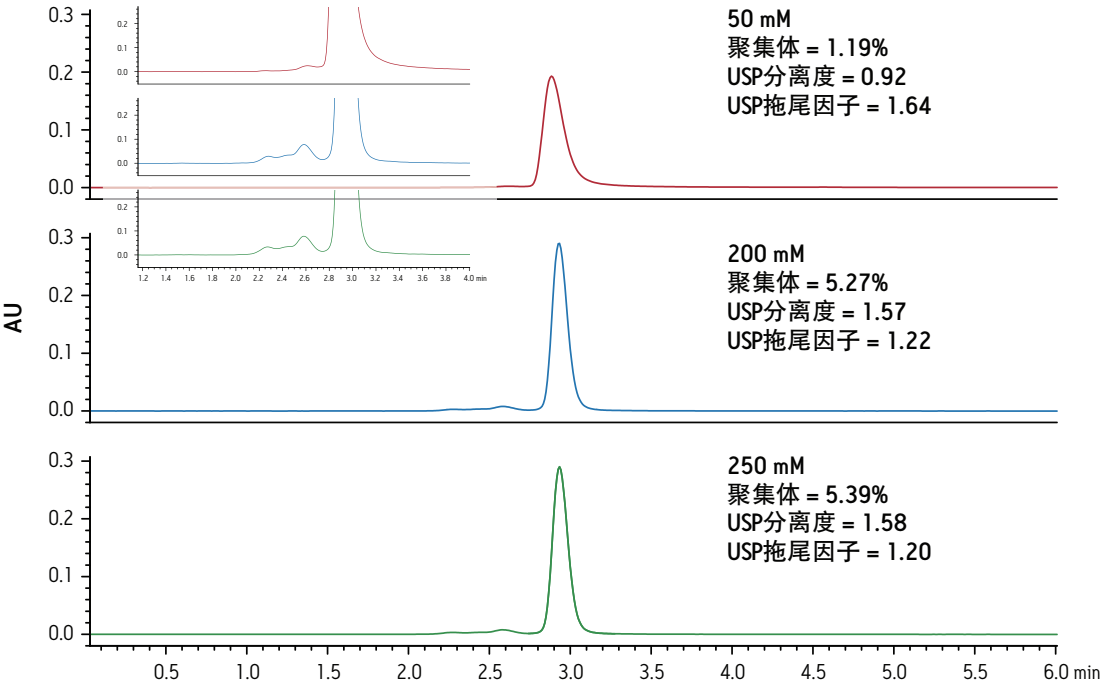


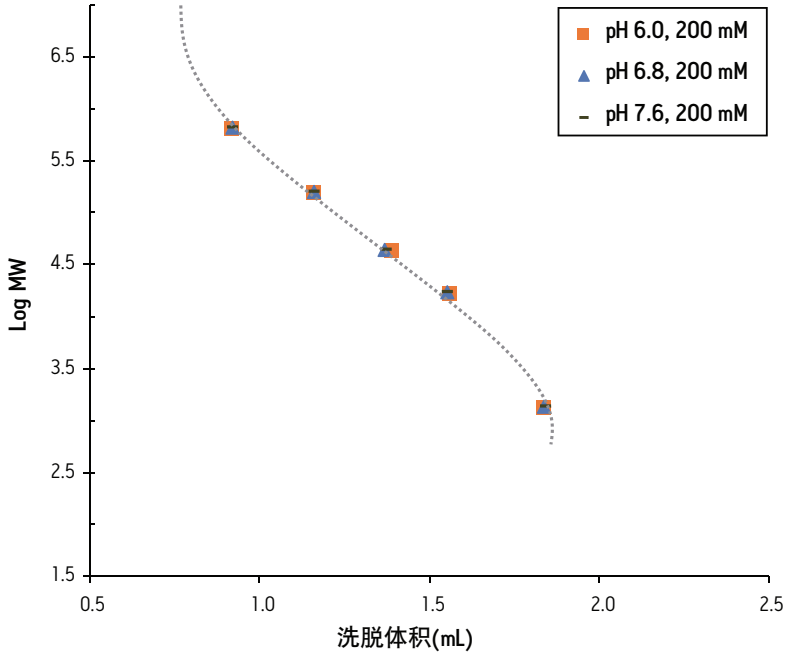
图2. 氯化钠对小鼠mAb的SEC分离的影响。

我们还分析了缓冲液离子强度对观察到的聚集体量的影响。在上述实验中，当氯化钠浓度从50升至200 mM时，我们得到了更高的聚集体回收率(如插图所示)。聚集体的峰面积百分比从1.18%增加至5.27%。但是，当氯化钠浓度超过200 mM时，聚集体量的变化不再显著。这说明高于该浓度时基本没有发生次级相互作用。

正如已经在制备SEC填料上所观察到的那样,保留时间的差异以及峰形的改变表明蛋白质与色谱柱填料间发生了次级相互作用。这些相互作用会延长保留时间并导致不规则的峰形，而通过增强缓冲液的离子强度即可轻松将这些相互作用降至最小。

流动相pH

考虑到pH对次级相互作用以及蛋白质结构均有影响，我们在进行SEC方法开发时还应对pH及其可能对生物分子的分离和定量分析造成的影响进行评估。我们使用pH 6.0 - 7.6的蛋白标准品混合物对BEH200色谱柱进行了评估。这一分析的目的是评估pH对色谱柱校准的影响。pH范围的选择基于磷酸钠缓冲液的缓冲能力范围。氯化钠的浓度保持200 mM。实验结果表明蛋白质的保留时间没有出现明显变化。所有保留时间的差异均在0.02min之内(图3)，这说明在测试条件下，pH对校准没有显著影响。



蛋白质	分子量
甲状腺球蛋白	670000
γ-球蛋白	158000
卵清蛋白	44000
肌红蛋白	17000
维生素B12	1350

图3.流动相pH对SEC校准曲线的影响
注：由于蛋白质在溶液中的形状不同，校准点并非呈一条直线。

为了测试pH对典型生物治疗药物的影响，我们在相同的条件下(pH6.0 - 7.6，200 mM氯化钠)对mAb进行了分析(图4)。随着pH从6.0升至7.6，mAb单体的峰高降低，且保留时间提前(图4)。但是，聚集体量在pH 6.0 - 7.6 范围内的变化小于0.4%(5.7 - 5.3%)，这说明流动相pH对测定部分没有影响。

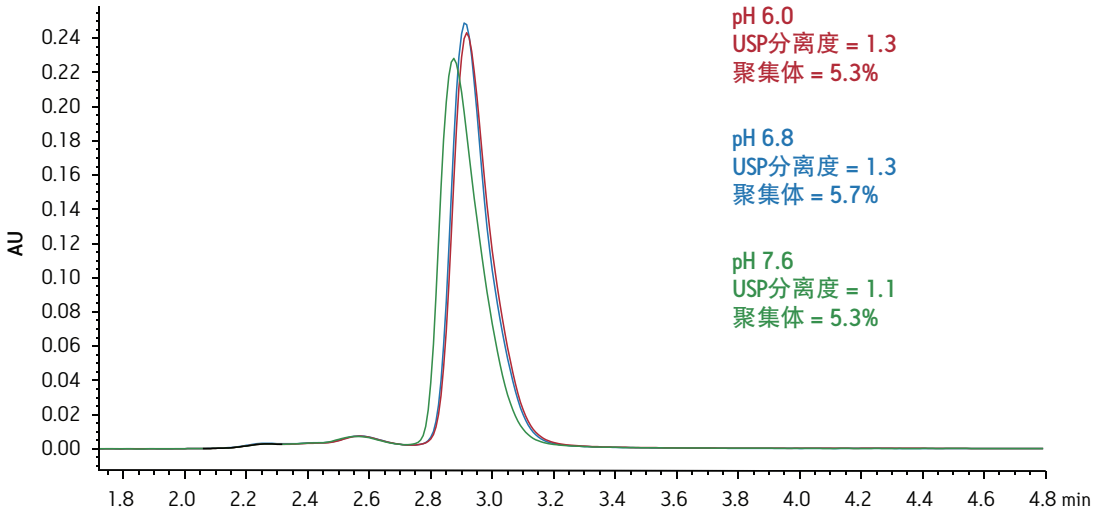


图4.流动相pH对小鼠mAb的SEC分离的影响。流动相：25 mM磷酸钠，200 mM氯化钠，pH 6.0-7.6。

缓冲液pH会影响次级相互作用。在本实验中，我们发现单体的洗脱曲线发生了改变，而二聚体的洗脱曲线则没有变化。这说明发生变化的是流体动力学半径而非次级相互作用。

流速

线性速度会影响基于蛋白质尺寸分离的分离度。尽管采用低流速时运行时间会更长，但这样可提高分离度，从而获得更可靠的聚集体定量结果。

此外，本应用采用了亚2 µm颗粒填料，因此我们可以使用更短的色谱柱，从而使得UPLC-SEC的通量仍高于传统的HP-SEC[3]。

为了测试方法的可靠性和稳定性，我们分析了流速对mAb的SEC分离的影响，分别在0.2和0.4 mL/min的流速下对mAb进行三次重复进样分析(图5)。对分离结果进行的分析表明，聚集体的定量并未随流速发生显著改变。但是，流速降低却使单体/二聚体的分离度提高了15%。较低的流速可提高分离度，而较高的流速则能够提高通量和缩短分析时间。

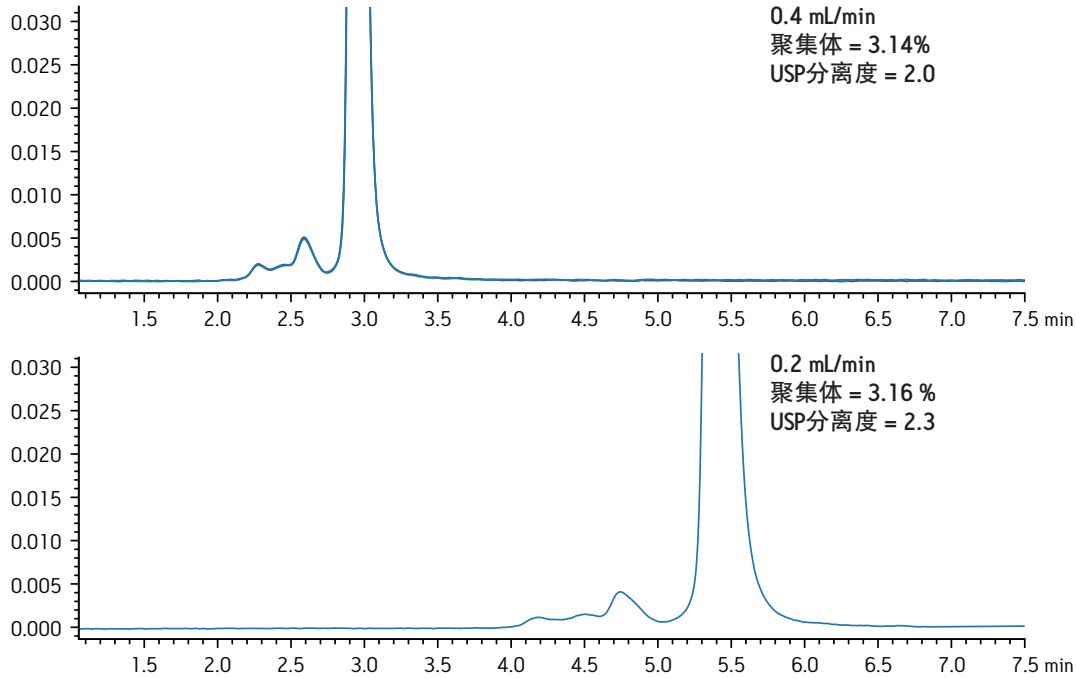
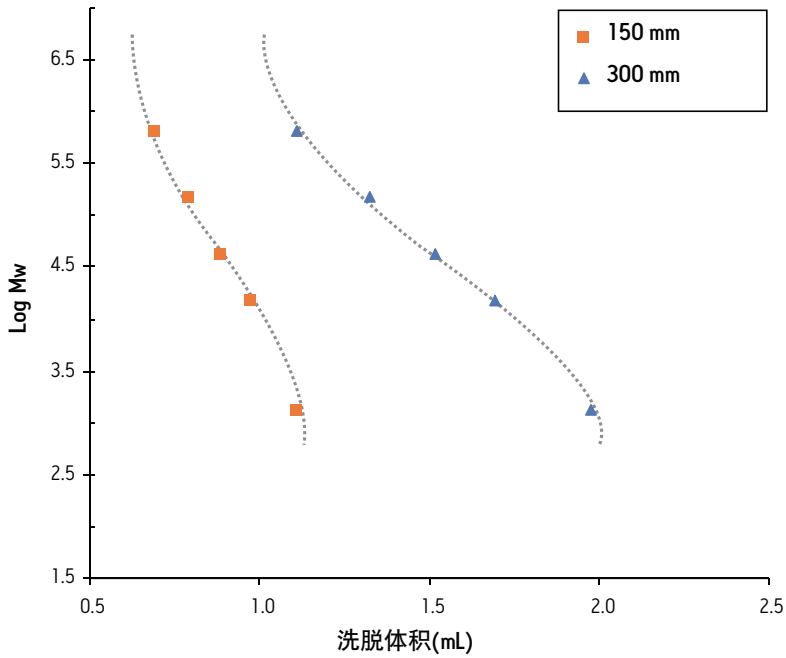


图5.流速对小鼠mAb的SEC分离的影响。

色谱柱长度

通过增加色谱柱长度也可改善SEC分离度。SEC分离基于物质通过色谱柱填料孔隙的进出扩散。较大的蛋白质无法进入孔隙，因此会更早洗脱出来。蛋白质越小，其在孔隙中的驻留时间越长，保留时间也就越长。根据上述原理，色谱柱越长，分离度越高。

为了展示这些影响，我们在4.6 x 150 mm以及4.6 x 300 mm的色谱柱上运行了一组蛋白标准品。校准曲线的对比结果显示，与150 mm色谱柱相比，300 mm色谱柱的校准曲线斜率更加平缓，说明增加色谱柱长度可增强其分离能力(图6)。



蛋白质	分子量
甲状腺球蛋白	670000
γ-球蛋白	158000
卵清蛋白	44000
肌红蛋白	17000
维生素B12	1350

图6. 色谱柱长度对SEC校准曲线的影响。
注：由于蛋白质在溶液中的形状不同，校准点并非呈一条直线。

另外，我们还在4.6 x 150 mm以及4.6 x 300 mm色谱柱上使用小鼠mAb测试了色谱柱长度对SEC分离的影响。在相同的条件下，单体/二聚体在较长的色谱柱上能够实现更高的分离度(2.07 - 2.80)(图7)，且聚集体量相当。分离度的改善还明显地体现在单体的峰拖尾上，300 mm色谱柱分离所得的峰拖尾上部分分离出了一个低分子量的小峰，而150 mm色谱柱分离所得的峰拖尾上则没有出现该峰。然而，伴随分离度改善的是保留时间的延长(从3.0 min延长至6.0 min)。

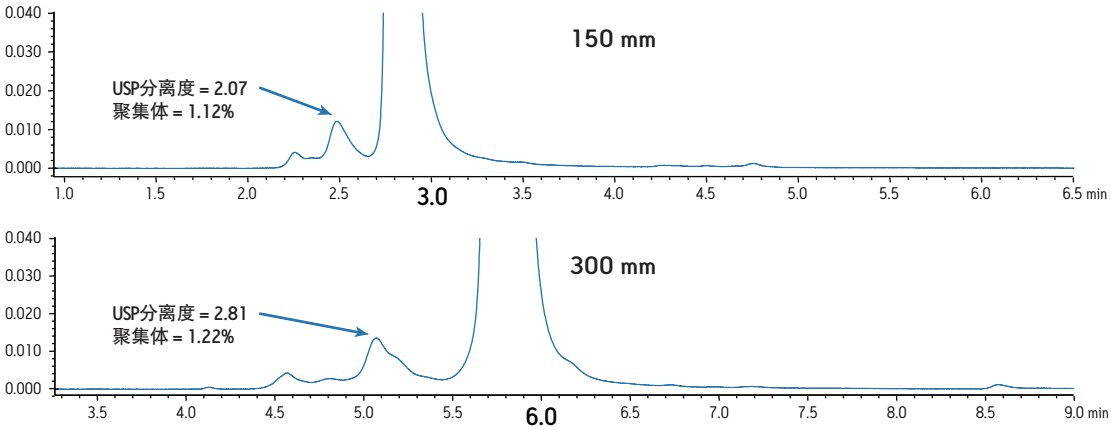


图7. 色谱柱长度对小鼠mAb的SEC分离的影响。

这些结果表明改变色谱柱长度是进行方法开发的一个有效途径。根据方法的不同需求，可以通过选择色谱柱长度达到更高的分离度或实现更高的通量。例如，在生产环境下，增加色谱柱长度可达到更高的分离度。而在研发过程中，较短的色谱柱则能够缩短分析时间并提高分析通量。

结论

体积排阻色谱一直以来都是分析单克隆抗体及其聚集体的标准技术。但是，任何SEC方法都必须进行充分评估以开发出最佳方法。

与耗时的HP-SEC相比，使用UP-SEC能够在更短的时间内更加高效和可靠地预测方法优化结果。此外，Auto•Blend Plus技术的使用也让我们能够更加轻松地系统性研究流动相对蛋白质结构以及次级相互作用的影响。

如前所述，要优化方法，我们必须对多个条件进行评估，包括流动相(pH和离子强度)、流速以及色谱柱长度。此外，虽然文中没有详细介绍，进样体积、载样量以及温度也是影响SEC分离的因素。因此，我们推荐在进行方法开发时，应评估涉及下列影响因子的实验组：

1. 离子强度
2. pH
3. 色谱柱长度
4. 流速
5. 其它变量(载样量、进样体积、温度等)

这些实验还应结合蛋白质的生物活性信息。如果已知的影响蛋白生物活性的因素有限，我们推荐使用PBS作为初始流动相。

参考文献

1. Rosenberg, A.S., *"Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective,"* AAPS Journal **8**(3): article 59 [2006].
2. Philo, J.S., *"Is Any Measurement Method Optimal for All Aggregate Sizes and Types?"* AAPS Journal, **8**(3), article 65 [2006].
3. Fountain, K.J., Hong, P., Serpe, S., Bouvier, G.S.P., Morrison, D., "*Analysis of Biomolecules by Size-Exclusion UltraPerformance Liquid Chromatography*," Waters Application Note [2010]; Part Number WA64266.
4. Golovchenko, N. P., Kataeva, I.A., Akimenko, V. K., *"Analysis of pH- Dependent Protein Interactions with Gel Filtration Medium,"* J. of Chromatogr. **591**: 121 [1992].
5. Hong, P., Fountain, K.J., Wheat, T.E., Morrison, D., *"IEX Method Development of a Monoclonal Antibody and Its Charge Variants,"* Waters Application Note, [2011]; Part Number 720003836EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY UPLC和UPLC是沃特世公司的注册商标。Auto•Blend Plus和Empower是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。所有其它商标均为其各自所有者的资产。

©2011年 沃特世公司 印制于中国 2011 年 10 月 720004076ZH LS-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com