Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用BioResolve RP色谱柱对完整抗体进行高效分离

Ximo Zhang、Robert Birdsall和Ying Qing Yu
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

应用优势

- 使用BioResolve RP色谱柱提高完整抗体反相分离的分离度
- 减少完整抗体分离的柱上残留并改善色谱重现性
- 稳定、高专属性的LC平台方法，适用于分析多种抗体

沃特世解决方案

Waters® ACQUITY® UPLC® H-Class Bio系统

ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器

BioResolve™ RP色谱柱

Empower® 3软件

关键词

完整抗体，生物治疗药物，RPLC分离，BioResolve RP

简介

自1986年第一款治疗性抗体(Orthoclone OKT3)上市以来，该市场的规模已经大幅扩张[1]。截至2017年，总共已有81款抗体相关药物产品获得了FDA/EMA批准[2,3]。这类药物之所以发展迅速，一部分原因是由于治疗性抗体具有专属性，相较于传统治疗药物，它们不仅是有效的疾病治疗药物，不良副作用的风险也在可控水平[4]。不过，由于生物大分子、抗体通常具有较高的结构异质性，因此在产品的整个生命周期内都需要进行全面的表征和分析，才能确保药物的安全性、疗效和重现性[5,6]。

在表征生物分子的多种分离技术中，反相液相色谱(RPLC)在抗体研发中应用最为广泛，该技术被用于药物成分与药物产品的完整质量数分析、杂质分析以及稳定性评价[7,8]。然而，在大多数情况下，分析人员在进行这类分析时都会遇到分离不充分和色谱性能差的问题，这是因为固定相性质(如形态、孔径和表面化学性质)与分析物理化性质(如大小)的匹配情况不理想。鉴于此，人们迫切需要为单克隆抗体(mAb)等生物大分子专门开发，且能够克服传统RPLC色谱柱相关性能缺陷的色谱柱技术，以便使用这些色谱柱开发LC方法来支持快速发展的治疗性抗体市场。

Waters® BioResolve RP色谱柱的填料颗粒形态和键合方式经过专门设计，是为解决这些难题量身定制的。BioResolve RP色谱柱的表面多孔颗粒和大孔径(450 Å，压汞法测定)可改善其分离生物大分子(如mAb)的动力学特性和分离性能，而创新的多苯键合相则赋予该色谱柱有利分析的解吸行为和独特的选择性，同时使其保留性与传统RPLC色谱柱相当。此外，2.7 µm硅基实心核颗粒产生的柱压较低，因此灵活性更强，在产品的整个生命周期内可用于各种LC平台，而不会对性能产生不良影响[9,10]。

本应用纪要将展示BioResolve RP色谱柱分离完整抗体的出色性能。本研究以6种抗体为代表，考察该色谱柱的适用范围。我们将开发用于分离完整抗体的平台方法，并使用该方法比较BioResolve RP色谱柱的性能与市场上专为这类应用设计的其它业内领先色谱柱产品的性能。

实验

化学品和试剂

使用NIST mAb (RM 8671)和沃特世完整单抗质量数检查标准品(部件号：186006552)作为参比物质，测试样品为一组治疗性mAb，包括利妥昔单抗、托珠单抗、贝伐单抗和西妥昔单抗。用水稀释或溶解所有样品，得到浓度为5 µg/µL的溶液。HPLC级水、乙腈和TFA购自Fisher Scientific，开封即用，无需其它处理。

LC条件

开发的方法

系统：ACQUITY UPLC H-Class Bio

检测器：ACQUITY UPLC TUV
5 mm流通池，λ = 280 nm

色谱柱：1：BioResolve RP, 450 Å, 2.7 µm (*平均孔径采用压汞法测量)，2.1 × 50 mm (部件号：176004156)，包括色谱柱和参比标准品)
2：C4, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 50 mm
3：聚合物色谱柱, 1500 Å, 4.0 µm, 2.1 × 50 mm

柱温：80 °C

样品瓶：12 × 32 mm 玻璃总回收样品瓶 (部件号：600000750cv)

流动相：水和乙腈

MP添加剂：0.1% TFA

载样量：2.5 µg

进样体积：0.5 µL

梯度表：

时间 (min)	流速 (min)	%A	%B
初始	0.500	75.0	25.0
10.00	0.500	55.0	45.0
11.00	0.500	20.0	80.0
11.50	0.500	20.0	80.0
11.51	0.500	75.0	25.0
15.00	0.500	75.0	25.0

结果与讨论

由于各种翻译后修饰以及工艺/产品相关杂质的存在，抗体产品往往具有较高的异质性[5]。此外，mAb分子较大(通常为150 kDa)，而传统RPLC固定相的孔径较小，因此分子扩散受到限制，进而增加了mAb表征的难度。为了表征这种异质性，本研究开发了一种使用Bio Resolve RP色谱柱分离完整抗体的RPLC方法，并且在可接受的分析时间内优化了峰之间的分离度。为探讨该方法的适用性，本研究选择了多种抗体作为分析对象，包括利妥昔单抗、托珠单抗、贝伐单抗和西妥昔单抗，以及沃特世完整单克隆抗体质量数检查标准品(部件号：186006552)和NIST mAb RM 8671。如图1所示，采用乙腈在10 min内从25%增加到45%(添加0.1% TFA)的梯度进行分离，大部分mAb样品都分离出了多种杂质，具体表现为mAb主峰上出现肩峰(插图)。这是极有价值的产品相关杂质信息，可能表明产品发生了氧化，而非其它化学或物理修饰。此外，明显可以看出每个样品的峰都非常对称而且很窄，这表明2.7 µm颗粒经过优化的对称形态和BioResolve RP固定相450 Å的孔径的确能够实现更有效的传质。

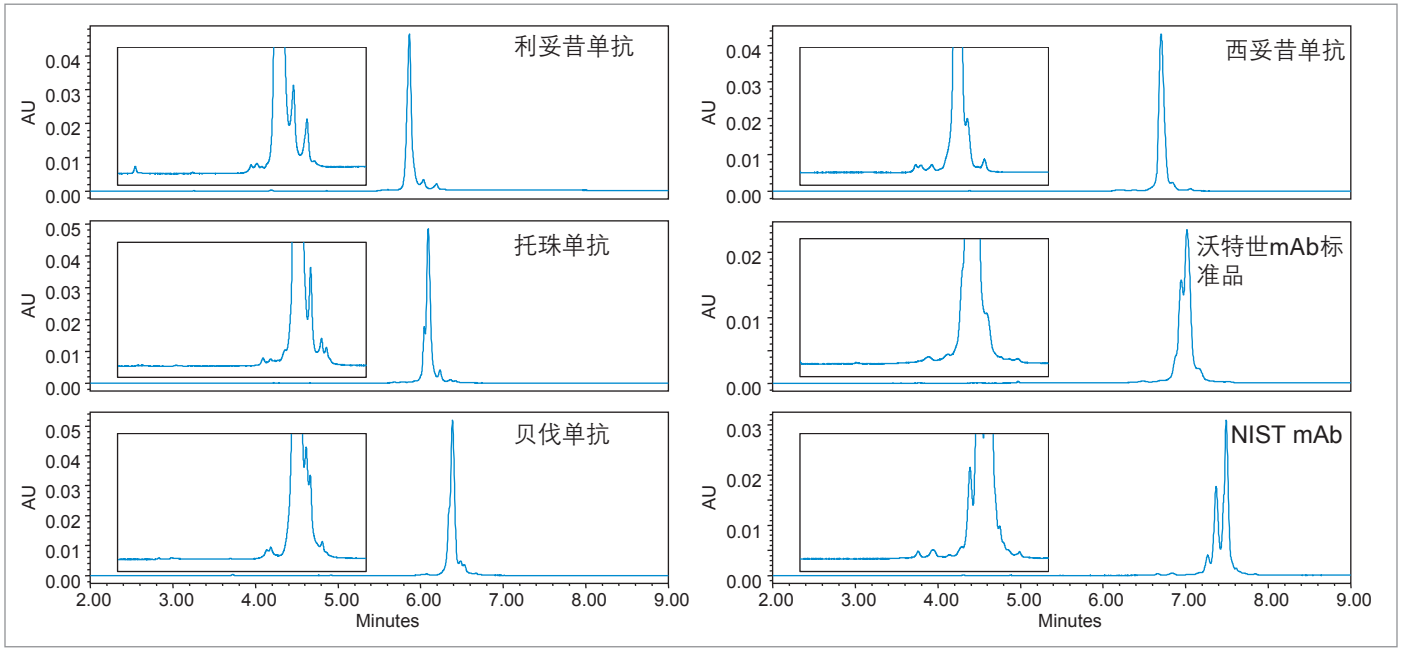

图1.使用BioResolve RP 色谱柱分离完整抗体。色谱图的局部放大图证明样品异质性实现了高分离度的分离。梯度：乙腈在10 min内从25%增加到45%(添加0.1% TFA)。流速：0.5 mL/min。

为比较BioResolve RP色谱柱与其它RPLC固定相的性能，我们采用这种经过优化的方法比较了BioResolve RP色谱柱与市场上其它两款业内领先的色谱柱(一种是C_4键合的全多孔颗粒色谱柱，另一种是二乙烯基苯聚合物颗粒色谱柱)。此处以利妥昔单抗为例进行详细介绍，我们将三款色谱柱得到的色谱图叠加起来进行对比(图2A)。BioResolve RP色谱柱分离得到的主峰的半峰全宽($W_{50\%}$)为3.40 s，聚合物色谱柱为4.84 s，C_4色谱柱为4.00 s。此外，如图2B所示，BioResolve RP色谱柱提高了肩峰的分离度，分离出了低丰度杂质。为了验证此结果并非特定于利妥昔单抗这一种分析物，我们使用更多的mAb样品评估了色谱柱。如图3所示，托珠单抗、贝伐单抗和沃特世完整单克隆抗体质量数检查标准品的色谱图中也分离出了肩峰，清楚地证明了BioResolve RP 色谱柱在分离度和峰形方面的出色性能。

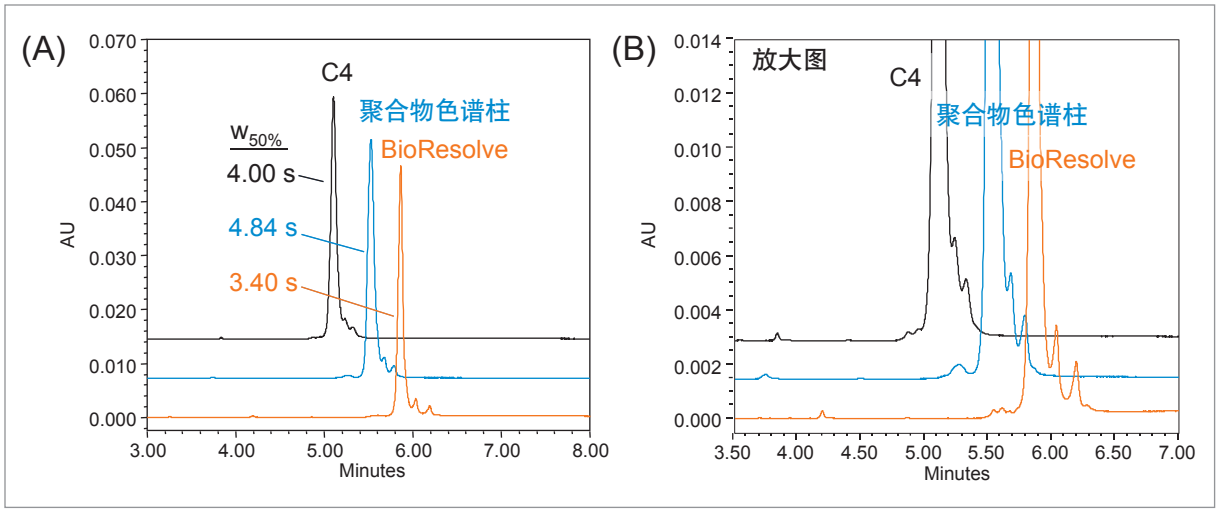

图2. 三款色谱柱得到的利妥昔单抗色谱图对比。A)标示出了每个峰的半高峰宽($w_{50\%}$)。B)为色谱图的放大图。与市场上业内领先的C_4色谱柱和聚合物色谱柱相比，BioResolve RP色谱柱的分离度最高且峰宽最窄。梯度：乙腈在10 min内从25%增加到45%(添加0.1% TFA)。流速：0.5 mL/min。

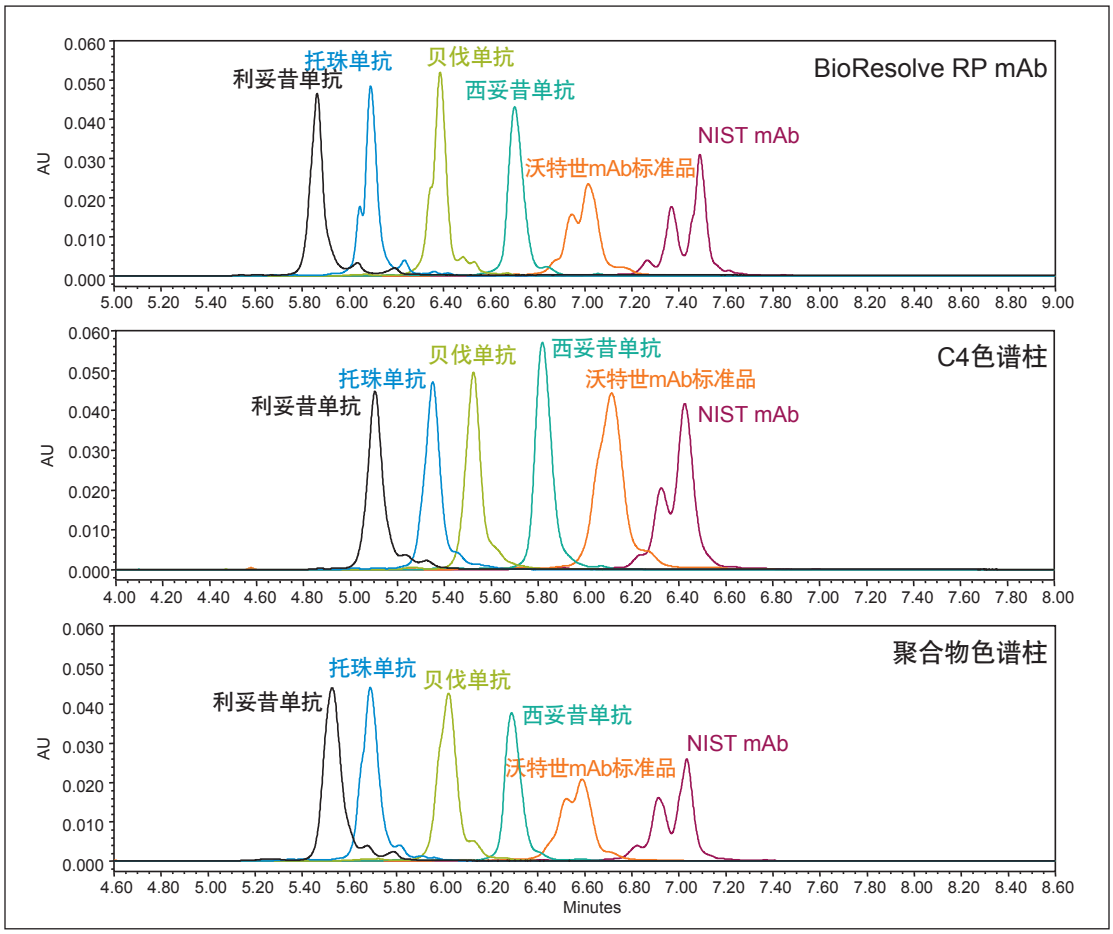

图3. 三款色谱柱分离六种抗体所得的色谱图的叠加图。BioResolve RP 色谱柱分离六个样品的分离度都高于市场上业内领先的C_4色谱柱和聚合物色谱柱。梯度：乙腈在10 min内从25%增加到45%(添加0.1% TFA)。流速：0.5 mL/min。

作为本研究的延伸，我们还评估了色谱柱的重复性、残留以及批次间重现性。图4为利妥昔单抗三次连续进样的叠加谱图，表明BioResolve RP色谱柱、C_4色谱柱和聚合物色谱柱的重现性不相上下。

相比之下，残留测定结果表明三款色谱柱的性能存在差异。残留测试方法为三次连续进样利妥昔单抗之后，进样空白样品并计算残留样品的峰面积。

计算结果显示，与C_4色谱柱(0.20%)和聚合物色谱柱(0.24%)相比，BioResolve RP色谱柱的残留最低(0.11%)。

为评估批次间的重现性，从不同产品批次中挑选三根BioResolve RP色谱柱用于分离利妥昔单抗。如图5所示，三根色谱柱的平均保留时间%RSD为0.11，这表明BioResolve RP色谱柱具有良好的批次间重现性。

综上所述，本研究证明BioResolve RP色谱柱可用于开发高效、稳定的完整抗体异质性评估方法，以协助提升药物产品安全性和疗效评估的可信度。

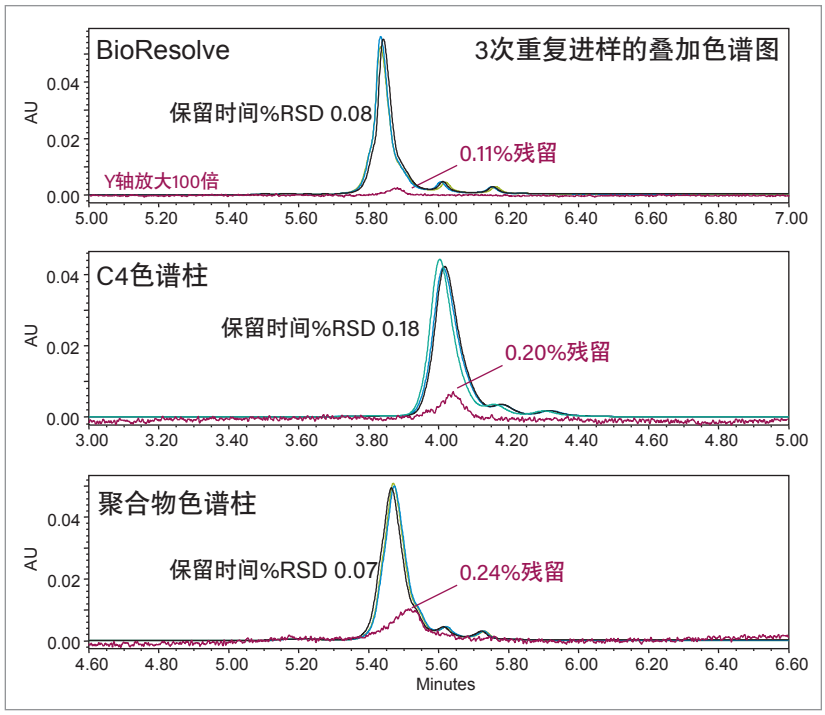

图4.利妥昔单抗分离的残留和进样间重现性(n = 3)比较。红色为抗体进样之后空白进样的色谱图，其y轴放大了100倍。BioResolve RP 色谱柱的残留最低，重现性与其它色谱柱不相上下。

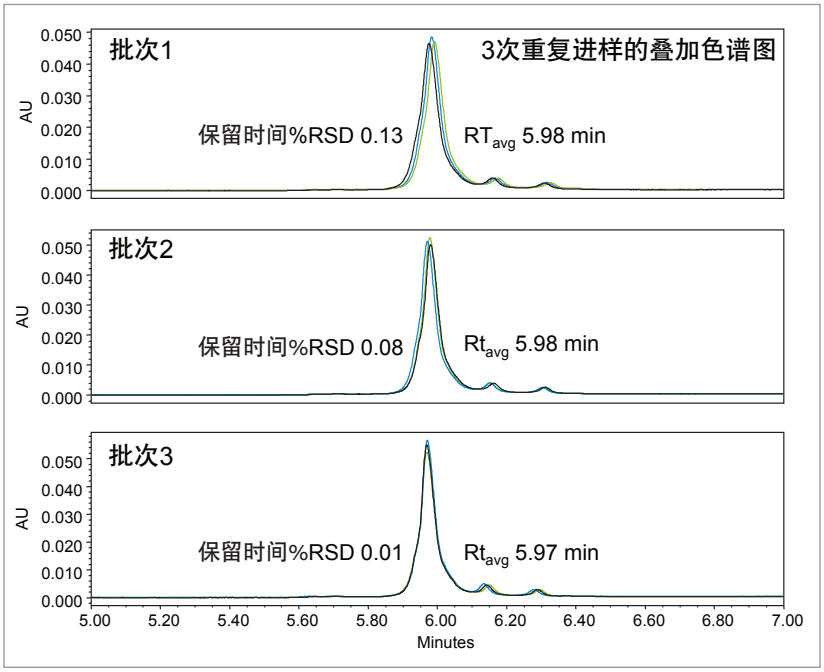

图5.通过分离利妥昔单抗评估BioResolve RP的批次间重现性。使用三个不同批次的BioResolve RP色谱柱进行比较，每个批次的色谱柱都展现了出色的进样间重现性。三根色谱柱的平均保留时间%RSD为0.11，这表明BioResolve RP色谱柱具有良好的批次间重现性。

结论

本研究开发了一种能够高效分离完整抗体的反相分离方法，该方法充分利用了BioResolve RP色谱柱专为这类应用而设计的各项特性。BioResolve RP色谱柱中填充有经过优化的硅基实心核颗粒，这些颗粒被具有450 Å孔径的创新多苯键合相多孔涂层包裹，有效提高了完整抗体分离的效率和选择性。与目前业内领先的多孔和非多孔色谱柱相比，这种色谱柱在分离度、峰宽、峰形和残留方面的性能均有所提升。文中所示的数据表明，与传统的RP色谱柱相比，BioResolve RP色谱柱所得的峰宽窄20%，残留降低50%，对完整抗体的分离能力大幅提升，是抗体表征和分析的理想工具。

参考文献

1. Liu, J.K.H. The History of Monoclonal Antibody Development-Progress, Remaining Challenges and Future Innovations. *Annals of Medicine and Surgery*. 2014, 3, 113–116.
2. Monoclonal Antibodies Approved by the EMA and FDA for Therapeutic Use. Animal Cell Technology Industrial Platform.
3. FDA Press Announcements. Food and Drug Administration.
4. Baty, D., et al. Therapeutic Antibodies: Success, Limitations and Hope for the Future. *British Journal of Pharmacology*. 2009, 157(2), 220–233.
5. ICH Q8. Pharmaceutical Development. 2009.
6. Defining Critical Quality Attributes for Monoclonal Antibody Therapeutic Products. *BioPharm International*. 2014, 27, 7.
7. Dong, M., et al. HPLC for Characterization and Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *LCGC North America*. 32, 10, 796–808
8. Zhang, Y. T., et al. Development of a Rapid RP-UHPLC-MS Method for Analysis of Modifications in Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Journal of Chromatography B*. 2016, 1032, 172–181.
9. Nguyen, J., et al. Designing a New Particle Technology for Reversed Phase Protein Separations Through the Optimization of Diffusion Properties, Waters Application Note, 720006168EN, Jan 2018.
10. Nguyen, J., et al. A Novel Phenyl Bonded Phase for Improved Protein Reversed Phase Separation, Waters Application Note, 720006169EN, Jan 2018.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY、UPLC和Empower是沃特世公司的注册商标。BioResolve和The Science of What's Possible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。

©2018年 沃特世公司。中国印刷。2018年1月 720006203ZH AG-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 6555
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

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