

Biozen dSEC-2分析单抗及聚集体的体积排阻色谱条件开发

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

尺寸排阻色谱法 (SEC) 是根据药物大分子的流体动力体积和尺寸进行分离的技术, 对于大分子的聚集体分析尤为适用。bioZen dSEC-2 色谱柱采用的填料为低孔隙率的硅胶, 并采用了独有的亲水性二醇类键合表面化学修饰来防止硅胶表面与蛋白质样品相互作用, 提高聚集体的响应和回收率。同时低孔隙率的硅胶提高了柱子的耐压和批间一致性。另外, bioZen系列使用的BioTi.钛金属硬件设计可以减少金属属于生物大分子之间的次级相互作用、残留以及进样到检测之间回收率低的问题。

当我们在开发一个SEC方法用于分析单抗的时候, 需要通过方法优化来抑制非特异性吸附, 不同抗体理化性质的差异, 对流动相中盐的最佳浓度有所不同。理想情况下缓冲液和盐的浓度根据抗体和实验要求进行优化, 但是当运行一个平台方法的时候, 往往需要连续分析多个不同的抗体, 所以我们需要一个通用的方法或者一个方法优化的起始条件。

在本应用中, 通过对比两种单克隆抗体的色谱表现来探讨bioZen dSEC-2 色谱柱的通用性色谱条件, 以帮助节约方法开发的工作量和提高方法通用性。

关键词

SEC尺寸排阻色谱柱; 抗体聚集体分析; bioZen dSEC; BioTi钛合金

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

Thermo U3000 高效液相色谱;

3.1.2试剂材料

实验用水为屈臣氏蒸馏水, 磷酸二氢钠、磷酸

氢二钠、氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾均为色谱纯;

3.1.3样品

英夫利昔单抗购自欧洲药典标准品, Anti-HEL-Human IgG1购自于当地生物制药公司, 并根据制造商的使用说明进行储存;

3.2仪器检测条件

3.2.2色谱条件

色谱柱: Biozen dSEC-2 (7.8×300mm, 3 μ m, 200Å); P/N: 00H-4788-K0;

流动相: 见表1;

流速: 1 mL/min;

柱温: 30 °C;

进样量: 10 μ L;

波长: 214 nm

样品浓度: 英夫利昔单抗 5mg/mL

Anti-HEL-Human IgG1: 0.5mg/mL

梯度: 等度

表 1. 实验条件及相应流动相组成

实验	pH	磷酸钠缓冲液 (mM)	NaCl (mM)
1	6.8	100	50
2	6.8	100	100
3	6.8	100	250
4	6.8	100	400
5	6.8	100	500
6	6.8	50	100
7	6.8	50	250
8	6.8	50	400
9	6.8	200	100
10	6.8	200	250
11	6.8	200	400
12	5.8	100	250
13	6.2	100	250
14	7.4	100	250
15	6.2	200 (磷酸钾)	250 (氯化钾)

3.3 结果与讨论

3.3.1 磷酸钠缓冲液和氯化钠的浓度

在100mM磷酸钠缓冲液pH 6.8条件下考察不同氯化钠浓度对两种单抗峰形和聚集体含量的影响，结果表明，随着氯化钠浓度的提高，主峰拖尾得到抑制，峰形变窄；当氯化钠浓度提到250mM以上时，进一步增加浓度对峰形拖尾和聚集体含量只有很轻微的改善，甚至没有改善的作用。参见图1-4。

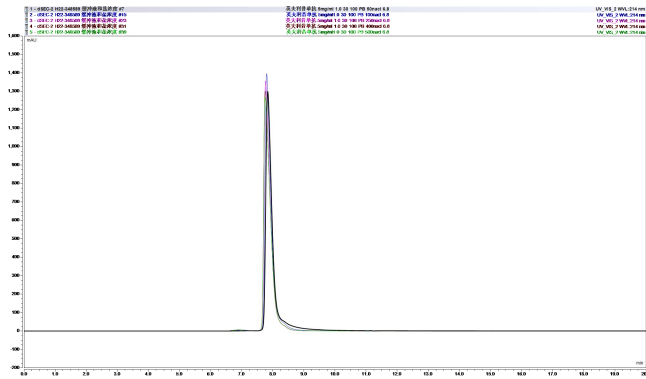


图1 英夫利昔单抗 100mM磷酸钠缓冲液中添加不同浓度氯化钠叠图

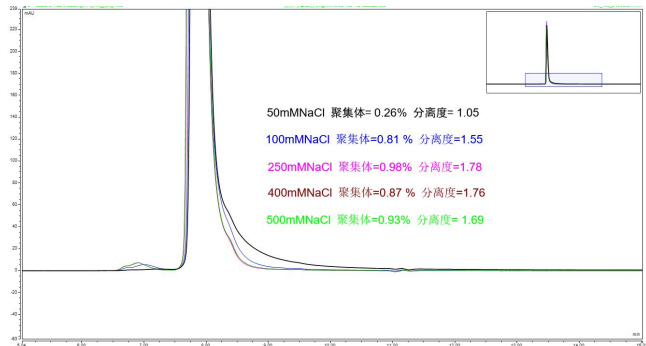


图2 上图局部放大

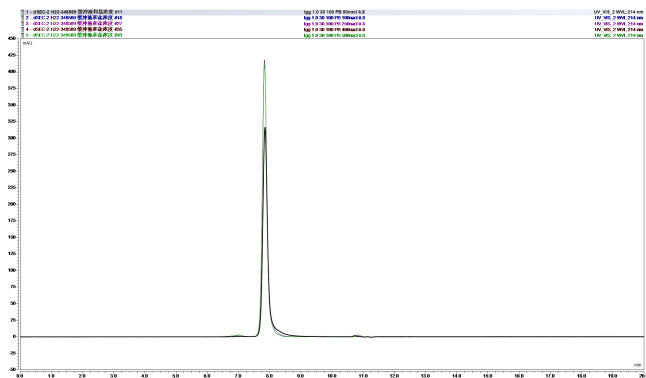


图3 Anti-HEL-IgG1 100mM磷酸钠缓冲液中添加不同浓度氯化钠叠图

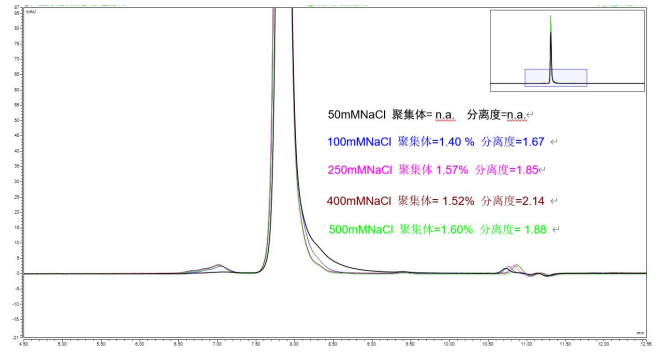


图4 上图局部放大

在50mM磷酸钠缓冲液pH 6.8条件下考察不同氯化钠浓度，可以观察到氯化钠浓度从250mM提高到400mM后，峰型拖尾和聚集体含量仍然得到很小幅度的改善。参见图5-8。

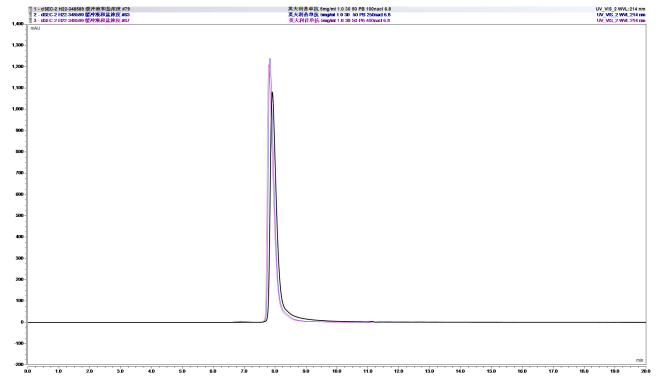


图5 英夫利昔单抗 50mM磷酸钠缓冲液中添加不同浓度氯化钠叠图

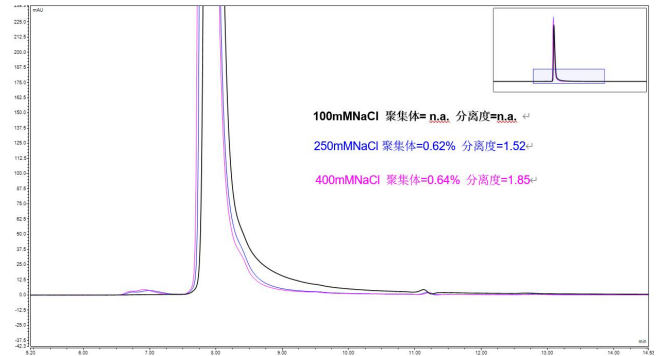


图6 上图局部放大

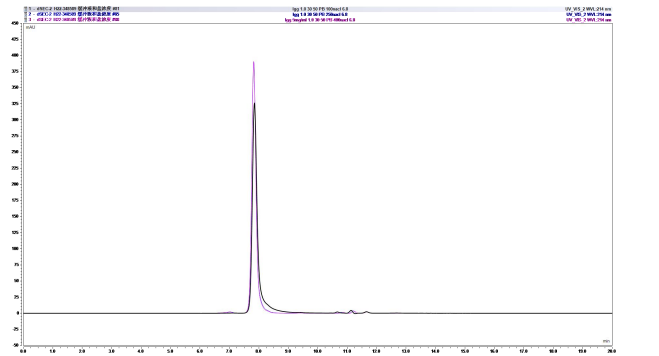


图7 Anti-HEL-IgG1 50mM磷酸钠缓冲液中添加不同浓度氯化钠叠图

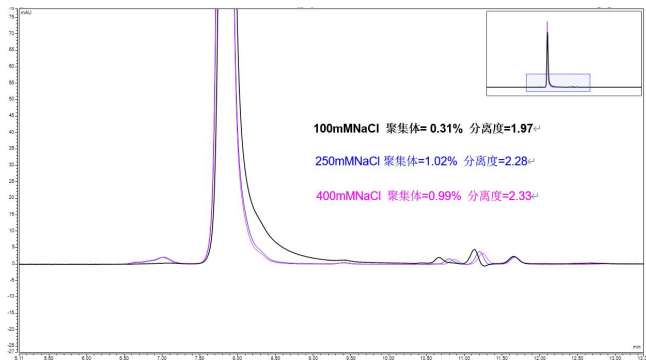


图8 上图局部放大

实验结果标明，在Biozen dSEC-2色谱柱对单抗类型的样品聚集体进行分析，使用50或者100mM的磷酸钠缓冲液中加入250mM氯化钠，也就是总体的离子强度在300-350mM时已经基本对次级作用进行抑制，改善主峰的拖尾和聚集体的分离度以及回收率。当然如果采用更高的离子强度也可以，但是为了延长色谱柱的使用寿命，我们还是建议采用尽可能低的缓冲液和盐的浓度。

3.3.2 pH值的影响

通过对比100mM磷酸钠+250mM氯化钠，pH值分别为5.8，6.2，6.8，7.4流动相条件。可以发现英夫利昔单抗在pH5.8条件下没有检查到聚集体；随着pH值增加，峰型拖尾逐步改善，聚集体含量也有所增加，在pH6.8的条件下达到最优，随后在pH7.4峰型有略微改善，但是聚集体含量有所降低。参见图9-10。

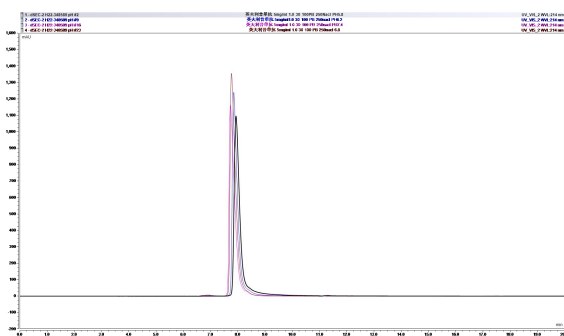


图9 英夫利昔单抗 100mM磷酸钠+250mM氯化钠，不同pH条件下叠图

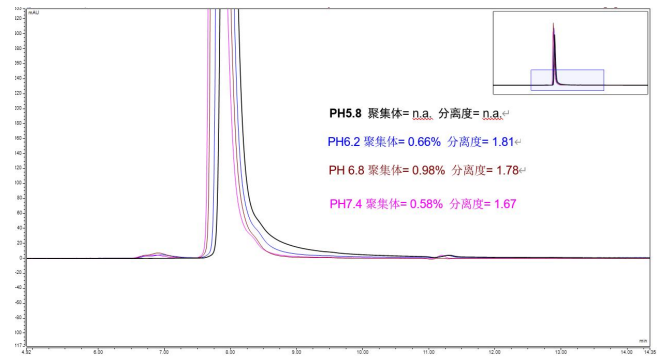


图10 上图局部放大

对于Anti-HEL-IgG1的情况有相似之处但不完全雷同，随着流动相pH的增加，峰型也得到改善；聚集体含量有所增加，在pH 6.8的条件下最优，随后在pH7.4的时候，聚集体含量迅速下降。参见图11-12。

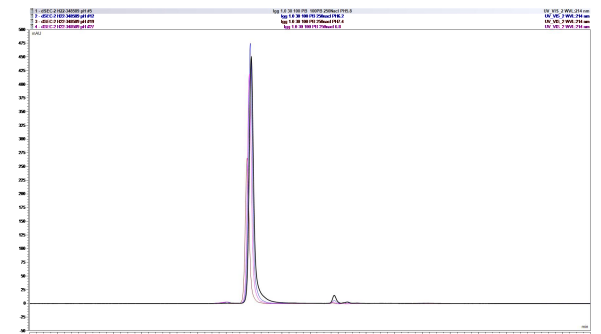


图11 Anti-HEL-IgG1在100mM磷酸钠+250mM氯化钠，不同pH条件下叠图

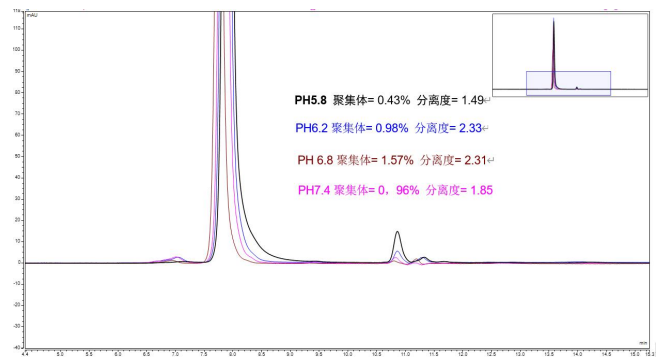


图12 上图局部放大

pH值的变化可能对蛋白质结构和次级作用均有影响，所以需要对生物分子的分离和定量分析造成的影响进行评估。根据目前两个单抗样本的对比发现pH6.8可能比较适合作为方法开发的起始点。

3.4.3 和USP通则方法的结果对比

美国药典(USP)通则<129>（重组治疗性单克隆抗体的分析程序）中规定了体积排阻色谱(SEC)法测定单抗的色谱条件谱柱，其色谱条件为 200 mM磷酸钾和250 mM氯化钾，pH 6.2。通过对比可以看到在dSEC-2色谱柱上，采用更低离子强度的流动相

(100mM磷酸钠缓冲液 pH6.8+250mM氯化钠, 图中标为“平台条件”) 可以看到英夫利昔单抗在平台条件下可以获得更好的分离度和聚集体含量。对于 Anti-HEL-IgG1, 平台方法的聚集体含量似乎更低, 实际上是因为在该条件下, 单体的主峰面积更大导致的。参见图13-16。

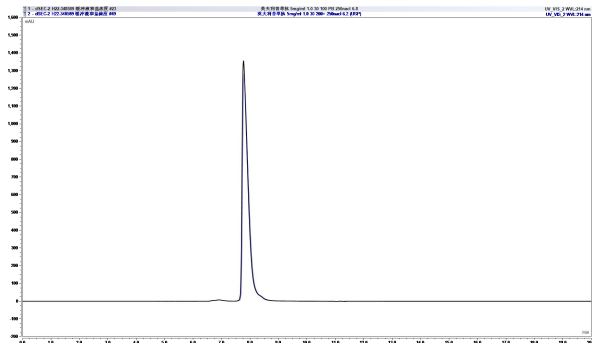


图13 英夫利昔单抗 平台条件和USP条件的对比

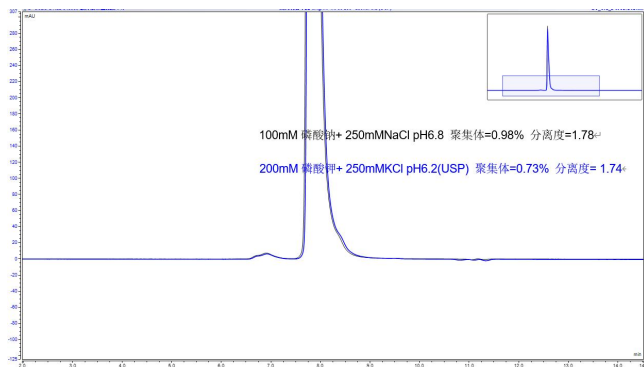


图14 上图局部放大

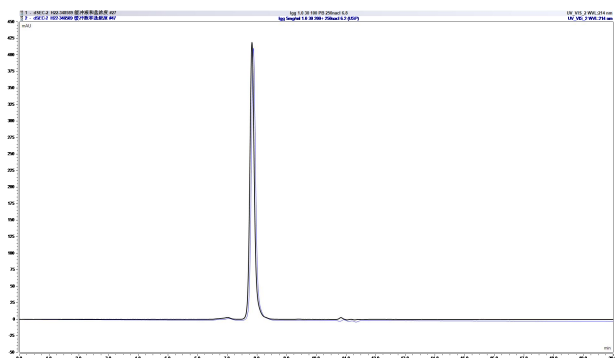


图15 Anti-HEL-IgG1 平台条件和USP条件的对比

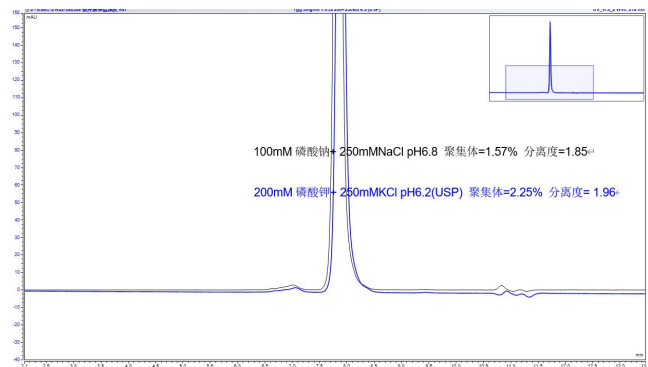


图16 上图局部放大

结论

本文目的是对Biozen dSEC-2在对单抗及其聚集体分析的SEC方法进行色谱条件摸索, 希望找到一个适合的方法开发起始点, 具有好的耐用性和重现性, 作为平台方法同时分析多个单抗类大分子药物。

通过上述实验对比可以发现, 缓冲液离子强度对聚集体量有很大的影响, 当氯化钠浓度从50升至250 mM时, 可以观察到更高的聚集体含量和更尖锐对称的峰形, 并且保留时间也趋于稳定。这说明流动性中添加氯化钠可以使分析物和填料的次级作用得到抑制。我们还观察到在相同离子强度和不同pH值下, 聚集体的回收率有所不同。根据本文中两个抗体的数据, 在pH6.8的情况下, 可以获得最高的聚集体含量和良好的峰型。

综上所述, 可以将100mM磷酸钠+250mM氯化钠 pH 6.8 作为Biozen dSEC-2色谱柱的初始条件, 作为平台方法用于同时对多个单抗样品进行分析, 以达到高通量筛选抗体的目的。

参考资料:

1. Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies. USP General Chapter <129>. 2022





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息, 请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential — Company Proprietary

