

8小时快速完成完整蛋白多模式表征

史俊霞，金琦芸

赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词

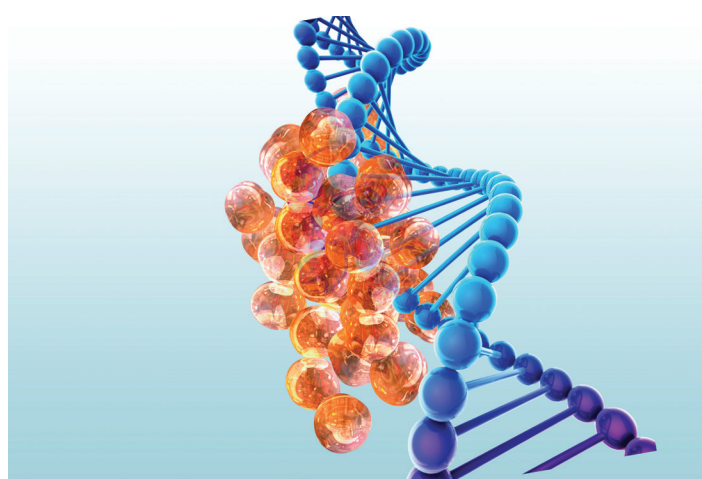
曲妥珠单抗类似药，CX-1 pH 梯度缓冲液，MAbPac SEC-1，ProPac Elite WCX，MAbPac HIC-Butyl，Vanquish Flex UHPLC

摘要

蛋白药物的生物活性，稳定性，聚集体产生，脱酰胺等翻译后修饰跟蛋白制剂组成，外界储存条件，蛋白的天然折叠状态以及构象高度相关^[1]。因此离子交换色谱法^[2]，疏水相互作用色谱法^[3]和尺寸排阻色谱法^[4]成为蛋白质表征，稳定性研究和质控的常用方法。而这三种分离模式中，缓冲液的选择，pH值，盐浓度都会对样品的分离结果产生比较大的影响，尤其是离子交换模式，既需要考察流动相的最佳缓冲范围，又要考察流动相对固定相的缓冲作用^[6]。因此，寻找快速，高通量的完整蛋白表征方法成为大多数科研工作者的追求。本文使用线性CX-1 pH梯度缓冲液，在Vanquish Flex低压四元系统上实现了配置一次流动相，完成完整蛋白的四种分离模式方法优化，方法简便高效。

1. 引言

蛋白质药物高活性，高特异性，低毒性，临床疗效确切，适应症涉及肿瘤、免疫系统，神经系统，眼科，罕见病等领域的特色。蛋白药物分子量相对较大，结构复杂，高度不均一性的特点。在抗体生产过程中如：细胞系开发，上游细胞培养，回收过程，下游纯化，储存和运输中，蛋白可能会发生脱酰胺，氧化，聚集等翻译后修饰或者折叠状态的变化，影响蛋白的活性，因此多模式，多角度进行蛋白完成表征成为生物制药领域中必不可少的分析方法。IEC，SEC，HIC作为常规的分析方法，单独方法开发和条件优化时比较花时间和精力。本文使用线性CX-1 pH梯度缓冲液，氯化钠，水为流动相，在Vanquish Flex UHPLC系统上，实现8个小时完成曲妥珠单抗电荷异构体盐梯度，电荷异构体pH梯度，聚体片段尺寸排阻色谱法和疏水相互作用色谱法的方法开发，满足科研人员快速高效表征的需求。



2. 实验部分

2.1 仪器，色谱柱与试剂

1.1.1 Vanquish Flex UHPLC

1.1.2 MAbPac SEC-1 5 μ m 7.8 mm X300 mm

(Thermo Fisher公司，P/N 088460)

1.1.3 ProPac Elite WCX 5 μ m 4.0 mm X150 mm

(Thermo Fisher公司，P/N 302972)

1.1.4 MAbPac HIC-Butyl 5 μ m 4.6 mm X100 mm

(Thermo Fisher公司，P/N 088558)

1.1.5 CX-1 Buffer Kit 250 mL

(Thermo Fisher公司, P/N 085349)

1.1.6 氯化钠 (分析纯, Thermo Fisher公司)

1.1.7 纯水 (18兆欧, Thermo Fisher公司纯水机)

2.2 样品信息

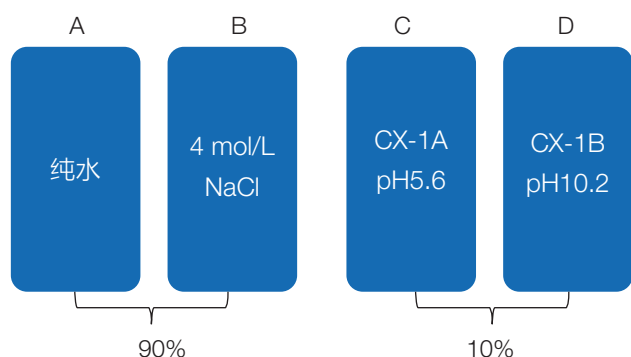
2.2.1 曲妥珠单抗类似药

利妥昔单抗类似药

2.2.2 样品制备方法: 原液水稀释到3.0 mg/mL

2.3 色谱和检测器条件

四个分析方案中各通道的流动相组成



仪器: Vanquish Flex UHPLC

进样体积: 20 μ L

检测波长: UV 280nm

柱温: 30 $^{\circ}$ C

流速: 0.8 mL/min

2.3.1 弱阳离子交换pH梯度与盐梯度方法开发

色谱柱: ProPac Elite WCX 5 μ m 4.0 mm X150 mm

样品浓度: 曲妥珠单抗类似药 3.0 mg/mL

pH梯度方法设置

实验次数	0.00 min	2.00 min	12.00 min	12.01 min	15.00 min	15.01 min	20.00 min
A%	90	90	90	75	75	90	90
B%	0	0	0	25	25	0	0
C ₁ %	10	10	0	0	0	7	7
D ₁ %	0	0	10	0	0	3	3
C ₂ %	7	7	2	0	0	6	6
D ₂ %	3	3	8	0	0	4	4
C ₃ %	6	6	2	0	0	6	6
D ₃ %	4	4	8	0	0	4	4

*C₁%D₁%; C₂%,D₂%; C₃%,D₃%分别为3个方法中的C相与D相的百分比。

盐梯度方法设置

实验次数	0.00 min	2.00 min	12.00 min	12.01 min	15.00 min	15.01 min	20.00 min
A%	89.5	89.5	85	85	65	89.5	89.5
B%	0.5	0.5	5	5	25	0.5	0.5
C ₁ %	10	10	10	10	10	9	9
D ₁ %	0	0	0	0	0	1	1
C ₂ %	9	9	9	9	9	8	8
D ₂ %	1	1	1	1	1	2	2
C ₃ %	8	8	8	8	8	7	7
D ₃ %	2	2	2	2	2	3	3
C ₄ %	7	7	7	7	7	6	6
D ₄ %	3	3	3	3	3	4	4
C ₅ %	6	6	6	6	6	5	5
D ₅ %	4	4	4	4	4	5	5
C ₆ %	5	5	5	5	5	5	5
D ₆ %	5	5	5	5	5	5	5

* C₁%D₁%;C₂%,D₂%;C₃%,D₃%;C₄%,D₄%;C₅%,D₅%;C₆%,D₆%分别为6个方法中的C相与D相的百分比。

2.3.2 尺寸排阻方法开发

色谱柱: MAbPac SEC-1 5 μ m 7.8 mm X300 mm

样品浓度: 曲妥珠单抗类似药 3.0 mg/mL

尺寸排阻模式下不同pH值方法设置

实验次数	0.00 min	2.00 min	12.00 min	12.01 min	15.00 min	15.01 min	20.00 min
A%	82	82	82	82	82	82	82
B%	8	8	8	8	8	8	8
C ₁ %	10	10	10	10	10	9	9
D ₁ %	0	0	0	0	0	1	1
C ₂ %	8	8	8	8	8	7	7
D ₂ %	2	2	2	2	2	3	3
C ₃ %	7	7	7	7	7	6	6
D ₃ %	3	3	3	3	3	4	4
C ₄ %	6	6	6	6	6	6	6
D ₄ %	4	4	4	4	4	4	4

*C₁%D₁%; C₂%,D₂%; C₃%,D₃%; C₄%,D₄%分别为4个方法中的C相与D相的百分比。

2.3.4 疏水方法开发

色谱柱: MAbPac HIC-Butyl 5 μm 4.6 X100 mm

样品浓度: 曲妥珠单抗类似药 3.0 mg/mL

利妥昔单抗类似药 3.0 mg/mL

疏水模式下不同pH值方法设置

实验次数	0.00 min	20.00 min	20.01 min	25.00 min	25.01 min	30.00 min
A%	90	0	0	0	90	90
B%	0	90	90	90	0	0
C ₁ %	10	10	10	10	8	8
D ₁ %	0	0	0	0	2	2
C ₅ %	8	8	8	8	6	6
D ₅ %	2	2	2	2	4	4
C ₂ %	6	6	6	6	4	4
D ₂ %	4	4	4	4	6	6
C ₆ %	4	4	4	4	2	2
D ₆ %	6	6	6	6	8	8
C ₃ %	2	2	2	2	0	0
D ₃ %	8	8	8	8	10	10
C ₄ %	0	0	0	0	0	0
D ₄ %	10	10	10	10	10	10

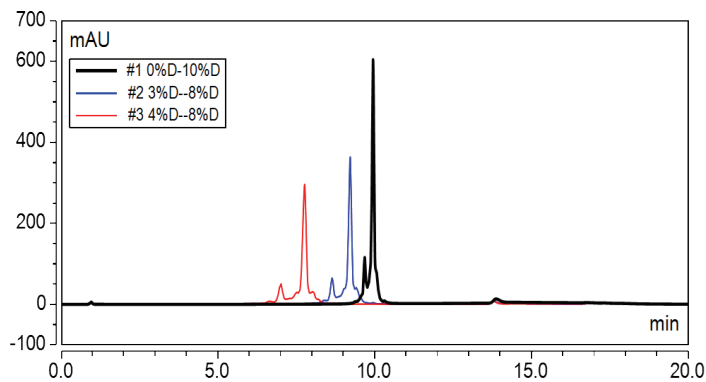
*C1%D1%;C2%,D2%;C3%,D3%;C4%,D4%为曲妥珠单抗类似药的疏水方法开发C相与D相的百分比。

C1%D1%;C2%,D2%;C3%,D3%;C4%,D4%;C5%,D5%;C6%,D6%为利妥昔单抗类似药的疏水方法开发C相与D相的百分比;

3. 实验结果与讨论

3.1.1 曲妥珠单抗类似药快速pH梯度结果

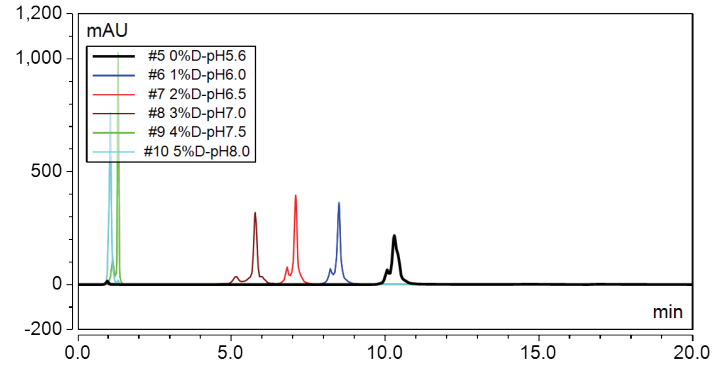
如图一使用ProPac Elite WCX 5 μm 4X150mm色谱柱, 1小时内完成曲妥珠单抗类似药的pH梯度方法开发。4%-8%D梯度条件下, 样品的酸碱峰与主峰的分离结果最好。



图一 ProPac Elite WCX 色谱柱快速筛选最佳pH梯度条件

3.1.2 曲妥珠单抗类似药快速盐梯度结果

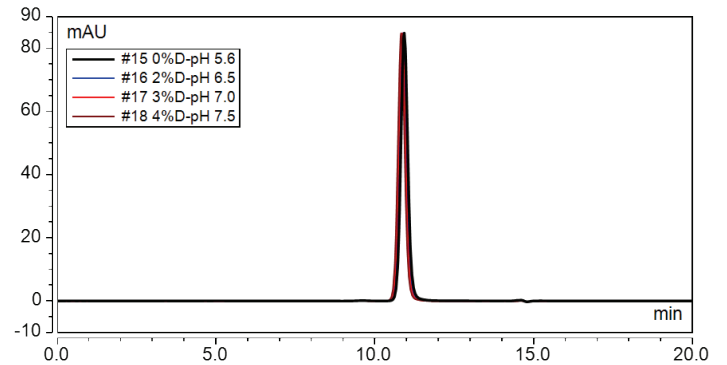
如图二所示, 使用ProPac Elite WCX 5 μm 4X150mm色谱柱, 1.5小时内完成曲妥珠单抗类似药的盐梯度方法开发。3%D-7%D的比例下, 样品的酸碱峰与主峰的分离结果最好。



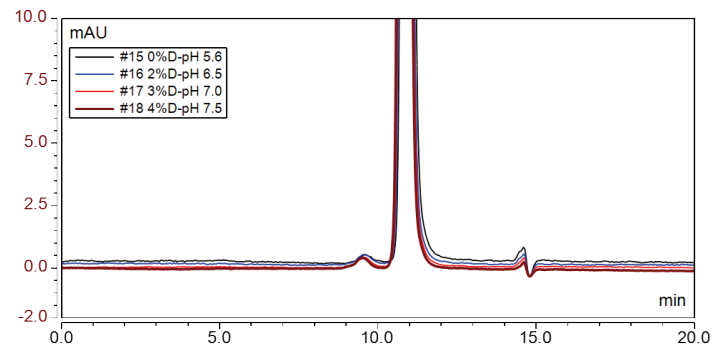
图二 ProPac Elite WCX 色谱柱快速筛选盐梯度下最佳pH值

3.1.3 曲妥珠单抗类似药快速尺寸排阻模式结果

如图三, 图四所示, 缓冲液pH值变化对曲妥珠单抗类似药的聚体和单体分离没有影响, 在不同的pH值条件下, 聚体和单体的保留时间和峰形都没有变化。



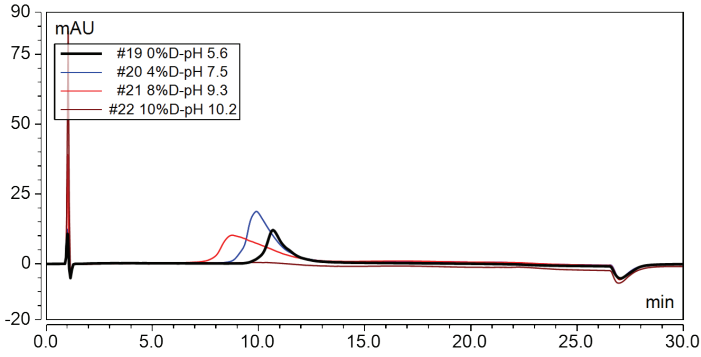
图三 MAbPac SEC-1色谱柱快速筛选SEC模式下pH值



图四 MAbPac SEC-1色谱柱在不同pH值下分离曲妥珠单抗类似药放大图

3.1.4 曲妥珠单抗类似药快速疏水模式结果

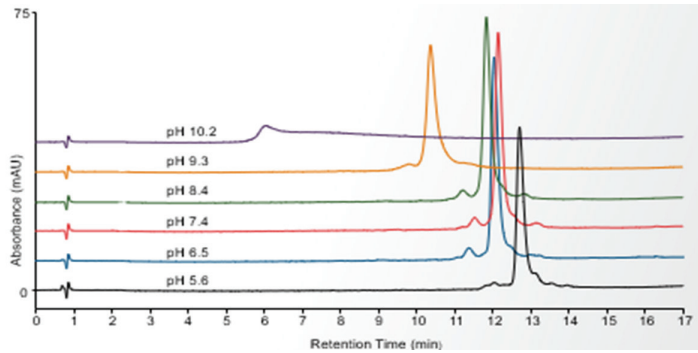
如图五所示，MAbPac HIC-Butyl 5 μm 4.6X100mm色谱柱上，1.5小时内完成曲妥珠单抗类似药在不同pH条件下的结果。疏水组分在不同pH值下差异不大。但是在pH值为10.2时，样品流穿了。



图五 MAbPac HIC-Butyl不同pH值下分析曲妥珠单抗类似药

3.1.5 利妥昔单抗类似药快速疏水模式结果

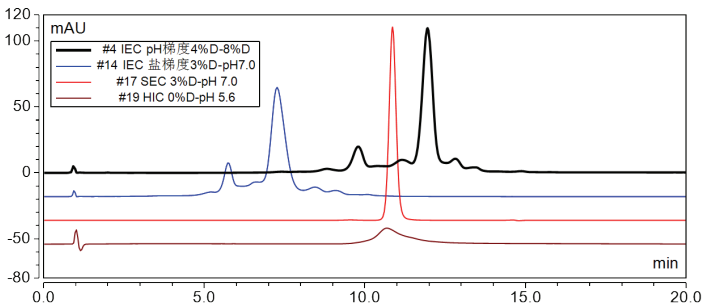
如图六所示，MAbPac HIC-Butyl 5 μm 4.6X100mm色谱柱上，1.5小时内完成利妥昔单抗类似药在不同pH条件下的结果。疏水组分在pH值5.6下利妥昔单抗类似药疏水组分信息最多。



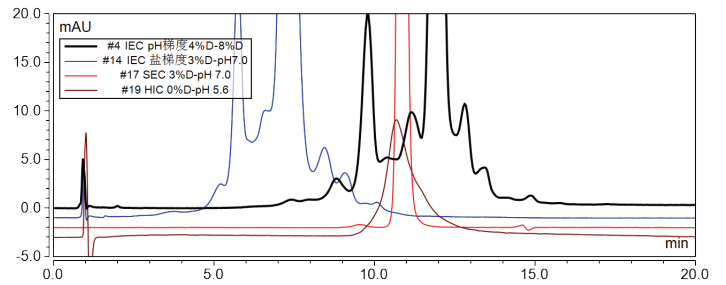
图六 MAbPac HIC-Butyl不同pH值下分析利妥昔单抗

3.1.6 曲妥珠单抗类似药四种分离模式下最优条件对比结果

如图七,图八所示，经过8个小时的条件优化和筛选后，将盐梯度和pH梯度时间延长为30分钟，得出了曲妥珠单抗类似药的电荷异构体信息。其中pH梯度方案下，曲妥珠单抗类似药的分离效果药优于盐梯度方案。



图七 曲妥珠单抗类似药四种分离模式下最优条件对比谱图



图八 曲妥珠单抗类似药四种分离模式下最优条件放大对比谱图

4. 实验结论

蛋白药物分子量大，结构复杂，工艺监控要求比较高。我们以曲妥珠单抗类似药和利妥昔单抗类似药为例，开发了高通量的完整蛋白表征的离子交换pH梯度方法，盐梯度方法，尺寸排阻方法和疏水相互作用方法。同时延长盐梯度和pH梯度时间，可以很大程度地提高曲妥珠单抗类似药的电荷异构体，且pH梯度分离结果更优于盐梯度的结果。SEC模式分离曲妥珠单抗类似药时，pH值的变化对于聚体和单体的分离，峰形影响都非常小。HIC模式中，pH值变化对于曲妥珠单抗类似药的疏水组分分离影响不大，但是对于利妥昔单抗的疏水组分分离影响比较大的，在pH5.6时，利妥昔单抗的疏水组分分离更好。该整体平台方法简便可靠，可以用于研发中方法快速开发和高效的质控放行。

参考文献

- ^[1] Baubek Spanov, Analytical tools for the characterization of deamidation in monoclonal, *Journal of Chromatography Open*(2)(2022)100025
- ^[2] DiMarco, Simultaneous monitoring of monoclonal antibody variants by strong cation-exchange chromatography
- ^[3] Mingyan Cao, Characterization and quantification of succinimide using peptide mapping under low-pH conditions and hydrophobic interaction chromatography
- ^[4] Patricia Estep, An alternative assay to hydrophobic interaction chromatography for high-throughput characterization of monoclonal antibodies, *mAbs*
- ^[5] Shanhua.Li, Analysis of Monoclonal Antibodies and Their Fragments by Size-Exclusion Chromatography Coupled with an Orbitrap Mass Spectrometer *Application Note* 20940
- ^[6] Julia Baek, New Insights into the Chromatography Mechanisms of IonExchange Charge Variant Analysis: Dispelling Myths and Providing Guidance for Robust Method Optimization



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC