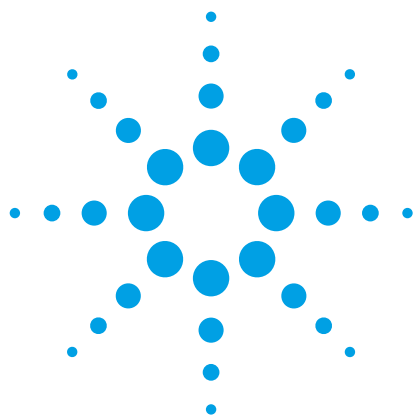




采用 Agilent Bio SEC-3 色谱柱分离重组人促红细胞生成素

应用报告

生物制药

作者

Phu T Duong and James Martosella
安捷伦科技有限公司
2850 Centerville Rd,
Wilmington, DE 19808
美国

Linda L Lloyd
安捷伦科技有限公司
Essex Rd, Church Stretton
Shropshire,
英国

摘要

在重组蛋白的制备、纯化、储存和临床研究应用过程中，需要采用高灵敏度的分析技术对其纯度进行监测。此外，生物技术和制药公司对分析重现性的要求也非常高。Agilent Bio SEC 色谱柱专为应对这些挑战而设计。该色谱柱填料表面覆盖有亲水性的聚合物涂层，能有效地减少它与组分间的次级相互作用，实现极高的柱效和柱稳定性。它可使用有机改性剂，并针对低盐浓度条件进行了优化。这些条件对于提高 QC 中蛋白质一级结构分析的效率非常关键。本文数据着重展现不同大小重组人促红细胞生成素的分离。与其它许多生物分子一样，重组 EPO 蛋白的异质性（聚集体、二聚体、单体）是由于其在生产过程中的修饰造成的。本文在中性磷酸钠缓冲液条件下，通过对流速、梯度程序和重现性等方面进行考察，优化了色谱分析方法。



Agilent Technologies

引言

重组人 EPO 蛋白是世界上许多生物制药公司广泛生产的治疗药物之一。促红细胞生成素蛋白 (EPO) 是血浆里的一种糖蛋白激素。它是作用于骨髓中红细胞 (红血球) 前体的细胞因子。EPO 控制着红血球的生成, 并且还具有神经保护作用, 可防止多种潜在的脑损伤和一些组织中的细胞凋亡。重组人 EPO 蛋白 (rEPO) 是应用重组 DNA 技术由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的。rEPO 单多肽链含有 165 个氨基酸, 预计分子量为 24000 道尔顿, 表面糖基化后分子量为 30400 道尔顿。通过采用多种类型的色谱柱, 包括体积排阻色谱柱可实现 EPO 蛋白与其杂质的 HPLC 分离。本文数据着重展现了采用分析型体积排阻色谱法对 CHO 细胞产生的多种不同大小的 EPO 蛋白进行分离。方法采用配备 Agilent Bio SEC-3, 3 μm , 100 Å 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统。

材料与方法

HPLC 系统

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统是用于生物大分子分析的专用解决方案。新型的无金属样品流路组件设计, 以及无钢铁的溶剂输送系统, 确保了生物分子的完整性, 并最大限度地减小了不必要的表面相互作用, 同时延长了色谱柱的寿命。它能在苛刻的溶剂组成或 pH 条件下完美运行。从极低压力的传统生物纯化色谱柱到高压的 STM 分析型生物色谱柱, 系统均适用。使用 SEC 和 IEX 系列全新的 Bio-HPLC 色谱柱, 能够在蛋白质和 NBE 分析中实现最高的单位时间分辨率。

HPLC 色谱柱

Agilent Bio SEC-3 (部件号 5190-250) HPLC 色谱柱是体积排阻色谱 (SEC) 领域的一项突破性技术。它填充了表面覆盖专利亲水涂层、窄粒径分布的 3 μm 球形硅胶填料。这层很薄的聚合物层是在控制条件下化学键合到高机械稳定性的高纯硅胶表面的, 以确保得到高效的体积排阻填料颗粒。Agilent Bio SEC-3 HPLC 色谱柱有 100Å、150Å 和 300Å 几种不同孔径规格, 能够满足大多数多肽和蛋白质体积排阻分离的需要。

化学品与试剂

CHO 细胞产生的人 EPO 蛋白购自 Creative BioLabs 公司 (Shirley, NY, 美国)。磷酸二氢钠和磷酸氢二钠均购自 Sigma-Adrich 公司 (St. Louis, MO, 美国)。

LC 方法

表 1 列出了本实验采用的色谱条件。其它变动已在相关色谱图中标出。

表 1. 基本色谱条件

参数	项目
色谱柱	Agilent Bio SEC-3, 100Å, 4.6 × 300 mm, 3 μm
样品	重组人 EPO 蛋白 (rEPO)
样品浓度	1.0 mg/mL
进样体积	5 μL
流速	0.35 mL/min
流动相	150 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.0
检测器	UV, 225 nm
系统	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

结果与讨论

完整 rEPO 蛋白分离条件的优化

从 0 到 30 min 时间内, 优化的等度洗脱流速为 0.35 mL/min。采用该色谱柱可以快速分离测试混合物, 30 min 内即可使 rEPO 蛋白与其杂质分离。当采用小孔径和小粒径填料色谱柱分离小分子蛋白时, 峰型的完美和峰间的高分离度是其主要优势 (图 1)。100 Å 孔径填料色谱柱适用于高效分离小分子蛋白。本文数据表明, 在 pH 7.0、不加盐 (氯化钠) 的 150 mM 磷酸钠缓冲液流动相条件下, Agilent Bio SEC 色谱柱可获得极高的分离效率。其蛋白聚集体、二聚体和单体实现了良好分离。

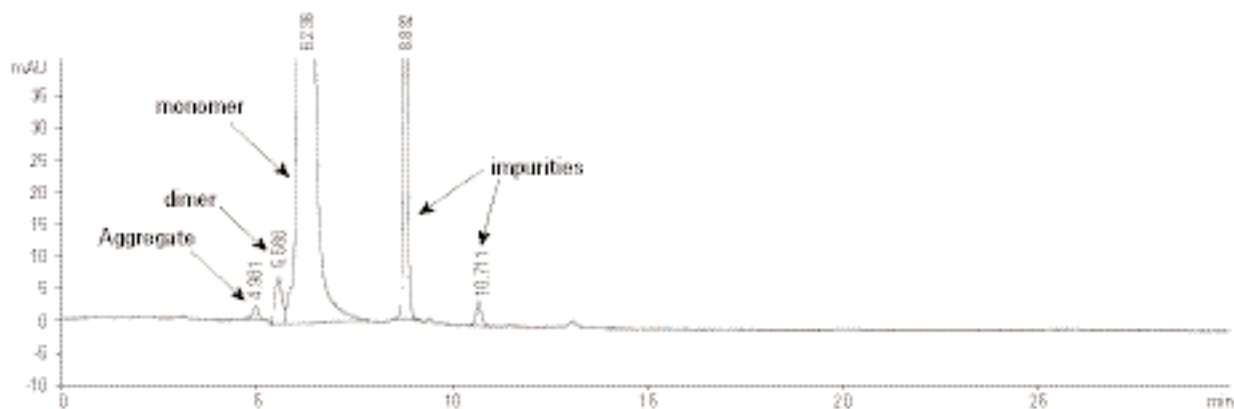


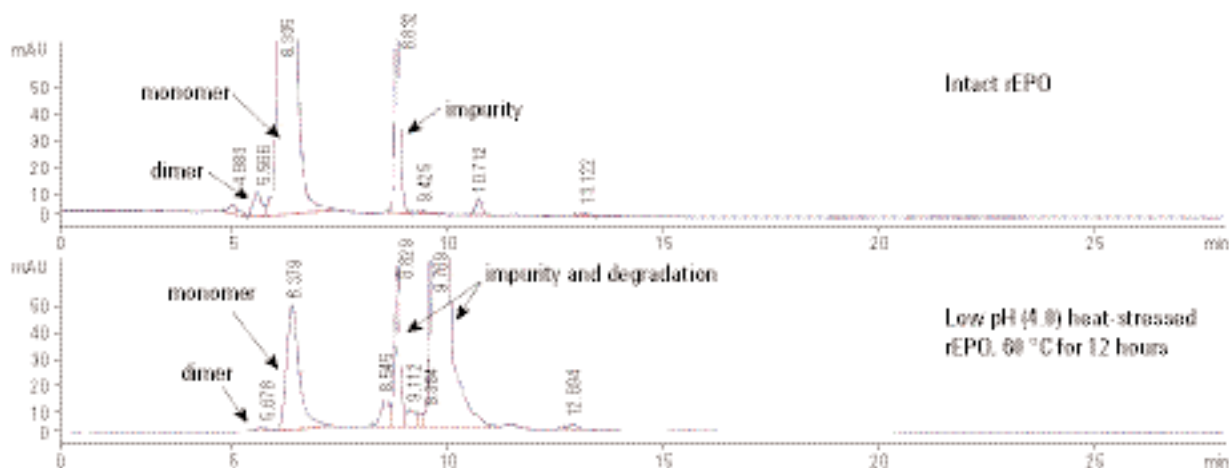
图 1. 采用 Agilent Bio SEC-3, 100Å, 4.6 × 300 mm, 3 μm 色谱柱分离完整 rEPO 蛋白

低 pH 值条件下热处理 rEPO 的分离及其与完整 rEPO 分离的比较

在药物的生产和制备过程中，治疗性蛋白的降解非常重要，因此需要对其进行严密监测，以防药效降低或带来不良的免疫原性。为了验证小孔径填料的分离性能，我们采用 Bio SEC-3, 100 Å 色谱柱分离了在 pH 4.0 醋酸溶液中，60 °C 恒温 12 h

热处理的 rEPO。分离条件与分离完整 rEPO 的条件完全相同（图 1）。图 2 下图显示分离热降解后的 rEPO 得到了很好的分离度，并且与完整 rEPO 的色谱图存在很大差异。聚集体、二聚体和单体的显著减少表明 rEPO 在高温、低 pH 值缓冲液条件下发生了有效降解 [1]，并且通过采用 Bio SEC-3, 100 Å 色谱柱实现了有效分离。二者色谱峰对比见表 2。

上图



下图

图 2. 采用 Agilent Bio SEC-3, 100Å, 4.6 × 300 mm, 3 μm 色谱柱分离 pH 4.0 (醋酸) 条件下热处理后的 rEPO

表 2. 完整 rEPO 和热处理 rEPO（低 pH、高温下处理）分离组分间峰面积百分比的差异

rEPO 条件	聚集体%	二聚体%	单体%	杂质%
完整	0.6	1.6	85.6	10.3
低 pH 下进行热处理	未检出	0.2	6.1	92.2

中性 pH 值条件下热处理 rEPO 的分离

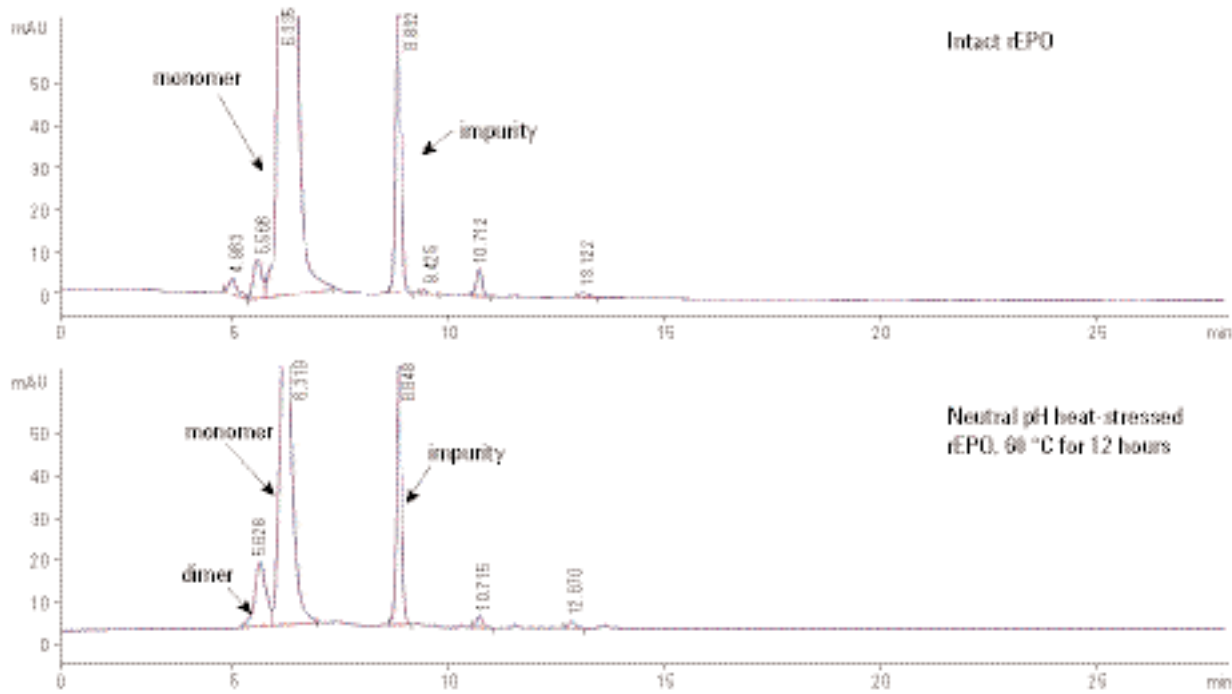
重组人 EPO 在中性 pH 值 (pH 7.0) 条件下, 60 °C 恒温热处理 12 h。在中性 pH 值条件下, 分离数据表明了分离结果的变化。这一变化没有在低 pH 值条件下热降解时显著（比较表 2 和表 3、图 2 和图 3，下图）。二聚体增加到 11%，同时单体

减少到 62.5%。虽然降解没有低 pH 下热降解的 rEPO 明显，但是数据结果也能清楚地表明，Bio SEC-3 色谱柱分离不同分子量的 rEPO 杂质和降解产物具有良好的分离度。

表 3. 完整 rEPO 和热处理 rEPO（中性 pH、高温下处理）分离组分间峰百分比的差异

rEPO 条件	聚集体%	二聚体%	单体%	杂质%
完整	0.6	1.6	85.6	10.3
低 pH 下进行热处理	未检出	11.7	62.5	24

上图



下图

图 3. 采用 Agilent Bio SEC-3, 100 Å, 4.6 × 300 mm, 3 μm 色谱柱良好地分离了中性条件下热处理的 rEPO 蛋白质

结论

采用配备 Agilent Bio-SEC 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统进行 rEPO 聚集体分析展现了良好的分析性能。本解决方案对于治疗性重组蛋白纯度分析与稳定性考察的方法开发和监测不失为一个极佳的工具。

参考文献

1. Yoshiyuki Endo *et al.*, *J. Biochem.* (1992) 112 (5): 700-706.

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 1 日 中国印刷

5990-9544CHCN



Agilent Technologies