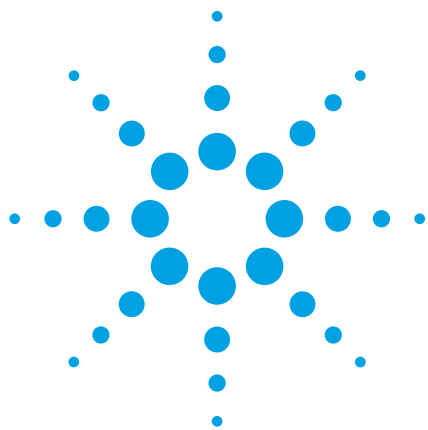




采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统通过肽谱分析、SEC 和 IEX 对治疗性蛋白质进行理化表征

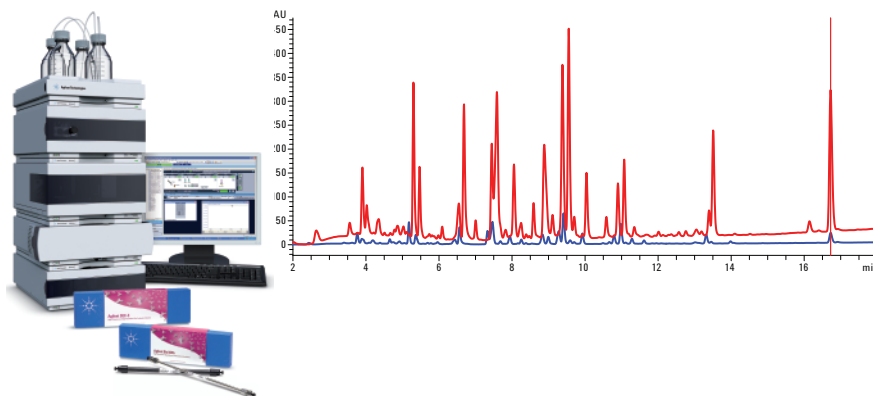
应用简报

生物制药

作者

Srividya Kailasam、Jochen Strassner、
Faizy Ahmed 和 Martin Vollmer
安捷伦科技有限公司
印度班加罗尔和
德国瓦尔德布隆

P.M. Sundaram, Bharathi Sriram
Gangagen 生物技术有限公司，
印度班加罗尔



摘要

本文利用新型 Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱系统开发了用于表征治疗性蛋白质 P128 的高灵敏快速液相色谱方法。其中采用亚 2 μm 色谱柱技术得到最优肽图，缩短了这种蛋白的分析时间。利用新型安捷伦生物惰性高效液相色谱柱进行体积排阻色谱 (SEC) 及离子交换色谱 (IEX) 分析，以检测蛋白制剂中可能存在的杂质或异型体。具有生物惰性和耐腐蚀性的仪器与简单且重现性良好的方法相结合，使得该解决方案适用于 QA/QC 实验室的常规应用。



Agilent Technologies

前言

在药物开发的每个阶段均需深入分析治疗性蛋白的理化性质，以确保药物的安全性及有效性。通常采用一些基于液相色谱的试验对蛋白药物进行鉴定并确定其完整性，例如肽图分析，SEC 及 IEX。P128 是一种抗葡萄球菌蛋白，名义分子量为 28 kDa。它在大肠杆菌中重组表达。本应用简报证实了 Agilent 1260 生物惰性四元液相系统通过反相色谱法适用于分析胰酶消化 P128 所得的肽段，并且可结合新型生物液相色谱柱及 IEX 和 SEC 法用于鉴定结构异构体。

实验部分

完全生物惰性且生物兼容、最高耐压达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 系列柱温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性加热元件的 Agilent 1260 柱温箱 (G1316C 选项 19)
- 配有 60 mm 最大光强高灵敏度流通池的 Agilent 1260 DAD (G4212B 选项 33)
- 软件：ChemStation B.04.02

在整个样品流路中没有任何金属组件，因此样品不会接触到金属表面。溶剂输送管路中没有任何不锈钢或铁质组件。

化学品与试剂

P128 由 Gangagen 生物技术有限公司提供，三羟甲基氨基甲烷、尿素、二硫苏糖醇 (DTT) 及碘乙酰胺均购自 Sigma Aldrich 公司，三氟乙酸、磷酸氢二钠、磷酸氢钠和氯化钠均购自 Fluka 公司。乙腈 (LiChrosolv) 及 Millipore 水用于配制流动相。

色谱条件

色谱柱

色谱柱 1:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱, 3.0 mm x 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-302)
色谱柱 2:	AdvanceBio 肽图分析色谱柱, 3.0 x 150 mm, 2.7 μm (部件号 653950-302)

液相色谱分析方法

进样量:	2 μL			
流动相 A:	含 0.1% TFA 和 2% ACN 的水溶液			
流动相 B:	含 0.08% TFA 的 100% ACN			
流速:	0.2 mL/min		0.4 mL/min	
	分钟	%B	分钟	%B
	0	2	0	2
	9	15	4.5	15
	60	45	30	45
	63 – 64.5	80	31.5 – 32.25	80
	66 – 81	2	33 – 40.5	2
	0.6 mL/min		0.8 mL/min	
	分钟	%B	分钟	%B
	0	2	0	2
	3	15	2.25	15
	20	45	15	45
	21 – 21.5	80	15.75 – 16.12	80
	22 – 27	2	16.5 – 20.25	2
紫外检测器:	230 nm/4 nm, 参比: 400/60 nm (也在 214 nm、240 nm、260 nm 和 280 nm 波长下采集数据)			

肽图分析

样品前处理

蛋白在含有尿素的条件下用 DTT 进行还原，然后采用碘乙酰胺进行烷基化。样品稀释并超滤后，在 tris 缓冲液 (pH 7.6) 中消化过夜。酶解时，酶与底物的比例保持为 1:20。通过加入 1 μL 的 10% 甲酸溶液淬灭酶活性。样品用真空浓缩干燥，然后采用 100 μL 的 0.25 M tris 缓冲液 (pH 7.6) 进行复溶。

体积排阻色谱

色谱柱

色谱柱 1:	Agilent Bio-SEC-3 色谱柱, 3 μm , 300 Å, 7.8 mm $\times$ 300 mm (部件号 5190-2511)
色谱柱 2:	Agilent Bio-SEC-5 色谱柱, 5 μm , 300 Å, 7.8 mm $\times$ 300 mm (部件号 5190-2526)
色谱柱 3:	品牌 A SEC-5 色谱柱, 5 μm , 300 Å, 7.8 mm $\times$ 300 mm

液相色谱方法

进样量:	1 μL
流动相 A:	含有 150 mM 氯化钠的 150 mM 磷酸钠 (pH = 7.0)
流速:	1 mL/min
UV 检测器:	220 nm/4 nm 参比: 关闭 (同时也采集 230 nm 和 280 nm 波长下的数据)

离子交换色谱

样品经超滤脱盐, 萃取至 20 mM 磷酸钠 (pH = 6) 中。

色谱柱

色谱柱 1:	Agilent Bio MAb NP 5 色谱柱, PK, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm (部件号 5190-2407)
色谱柱 2:	Agilent Bio MAb NP 10 色谱柱, PK, 4.6 $\times$ 250 mm, 10 μm (部件号 5190-2415)
色谱柱 3:	品牌 B WCX-10 色谱柱, 4.0 mm $\times$ 250 mm, 10 μm

液相色谱方法

进样量:	2 μL										
流动相 A:	20 mM 磷酸钠 (pH = 6.0)										
流动相 B:	含 1.0 M 氯化钠的 20 mM 磷酸钠 (pH = 6.0)										
流速:	0.5 mL/min										
	<table><tr><th>分钟</th><th>%B</th></tr><tr><td>0</td><td>10</td></tr><tr><td>35</td><td>35</td></tr><tr><td>36</td><td>10</td></tr><tr><td>45</td><td>10</td></tr></table>	分钟	%B	0	10	35	35	36	10	45	10
分钟	%B										
0	10										
35	35										
36	10										
45	10										
UV 检测器:	220 nm/4 nm, 参比: 关闭 (同时也采集 220 nm、230 nm、240 nm 和 280 nm 波长下的数据)										

结果和讨论

肽图分析

通常采用肽图分析确证蛋白种类。首先通过蛋白酶消化治疗性蛋白质，然后采用高分离度反相 HPLC 进行分析，从而获得肽图。分析的目标是色谱分离并检测所有蛋白片段，以实现完整序列覆盖。由于被分析样品很复杂，其中含有数百种不同的化合物，因此肽图分析需要很长的分析时间。在药物开发的早期，选用质谱作为鉴定所有肽段碎片的检测技术。而在后期和 QA/QC 过程中，确证肽段谱图最常使用 UV 检测。生物惰性仪器对疏水性的肽段及蛋白尤其具有优势，由于这些成分常常粘附在金属表面。

在本研究中，我们展示了一个 26 kDa 的重组表达新型生物制剂 (NBE) 的数据，这是 Gangagen 生物技术公司正在开发的一种用于治疗人类疾病的抗菌素蛋白 P128。结合 Agilent Bio HPLC 色谱柱以及开发用于生物大分子分析的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪器，可对这种蛋白进行肽图分析、SEC 及离子交换色谱分析。

基于 UV 的肽图分析常用于 QA/QC NBE 环境以检测重组蛋白药物在生产或加工过程中发生的所有序列异常。

图 1 展示了采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统获得的肽图，其中应用了两种反相色谱柱：

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱， 3.0×100 mm， $1.8 \mu\text{m}$
- AdvanceBio 肽图分析色谱柱， 3.0×150 mm， $2.7 \mu\text{m}$

在该示例中，Agilent Eclipse Plus 色谱柱所得的分离度略好。因此，采用该色谱柱作进一步研究。

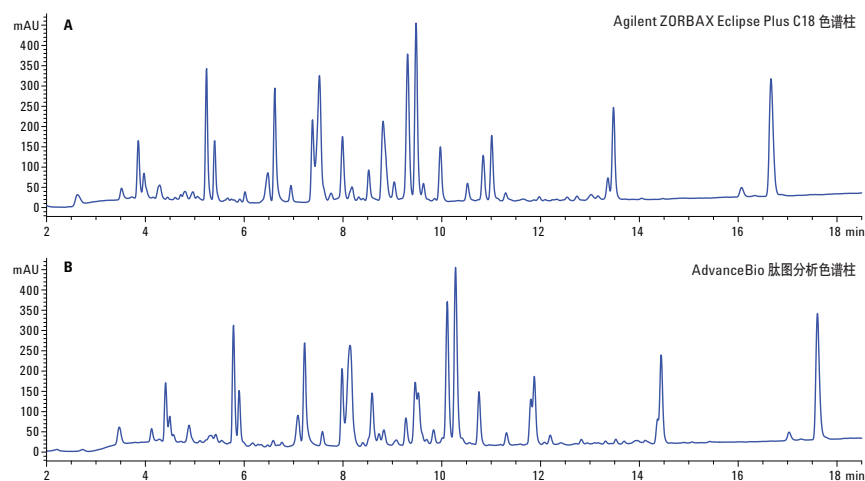


图 1. 利用两种色谱柱在 0.6 mL/min 流速下分别以相应梯度进行 P128 酶解物的分析，
A) Agilent ORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱， $3.0 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ， $1.8 \mu\text{m}$ ，
B) AdvanceBio 肽图分析色谱柱， $3.0 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ ， $2.7 \mu\text{m}$

分析非常复杂的混合物时需要尽可能高的分离度，因此通常导致分析时间过长，例如肽图分析。亚 2 μm (STM) 填料技术与 UHPLC 仪器相结合，可显著缩短分析时间，同时保持高分离度（图 2a - 2d）。

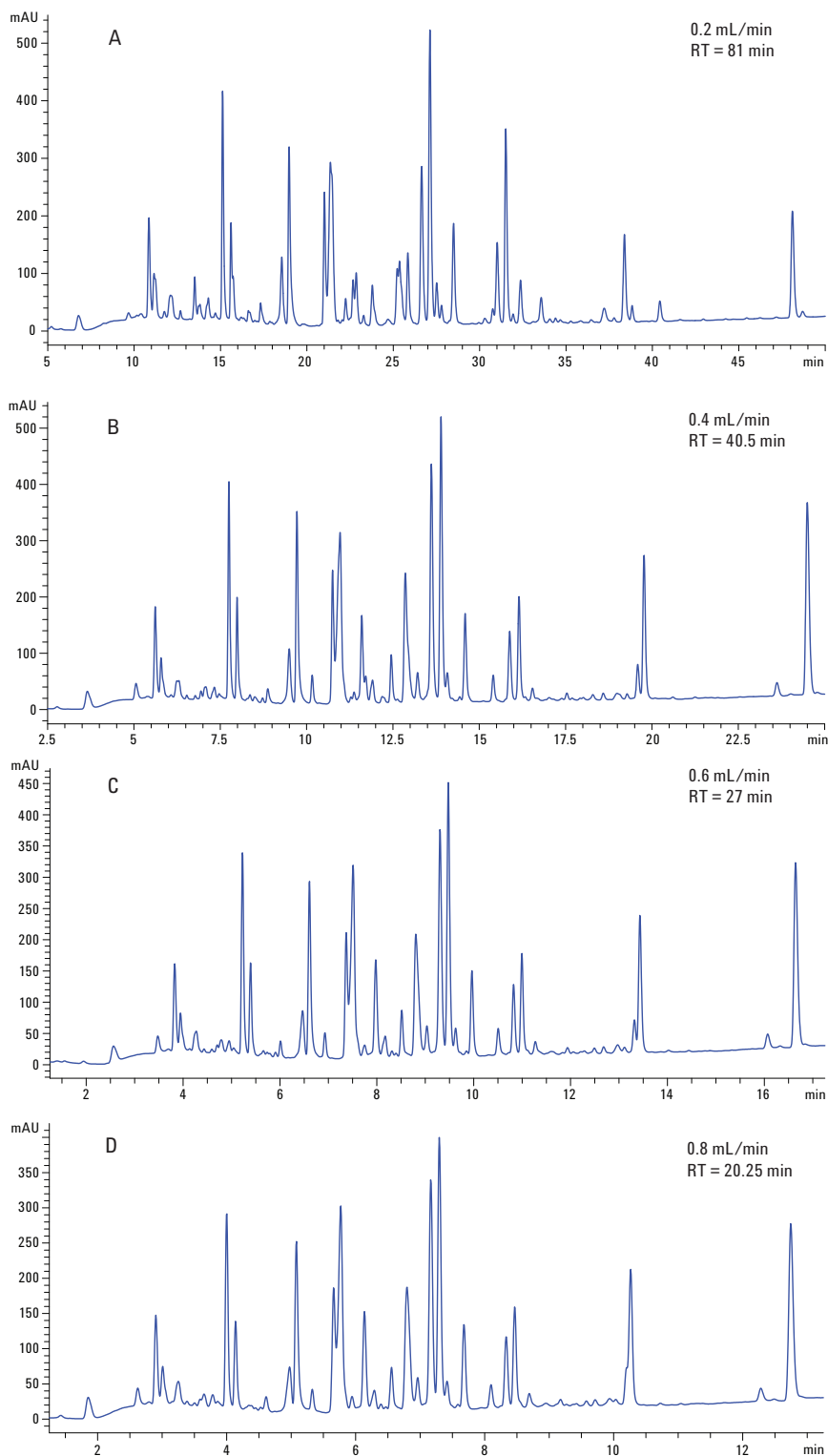


图 2a-2d. 利用 Agilent ORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (3.0 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm)，在不同梯度和流速下进行 P128 酶解物的分析

分析的稳定性和重现性是表征治疗药物以验证所选 NBE 的特性和完整性的最重要因素，同时也是满足监管部门需求的最重要因素。我们利用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪在 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (3.0×100 mm, $1.8 \mu\text{m}$) 上进行了五次重复进样分析。(图 3 显示了五次分析后保留时间和峰面积的重现性极好)。

检测微量杂质时需要高灵敏度的分析。采用最大光强流通池技术的 Agilent 1260 Infinity DAD 的灵敏度比采用旧版流通池设计的 Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus 高出十倍 (图 4)。该技术可检测修饰, 例如克隆表达发生变异所产生的修饰。它还可降低珍贵样品的消耗。据观察发现, 配备 60 mm 最大光强流通池的 Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B) 的灵敏度是 Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus 检测器 (G1315C) 的十倍。

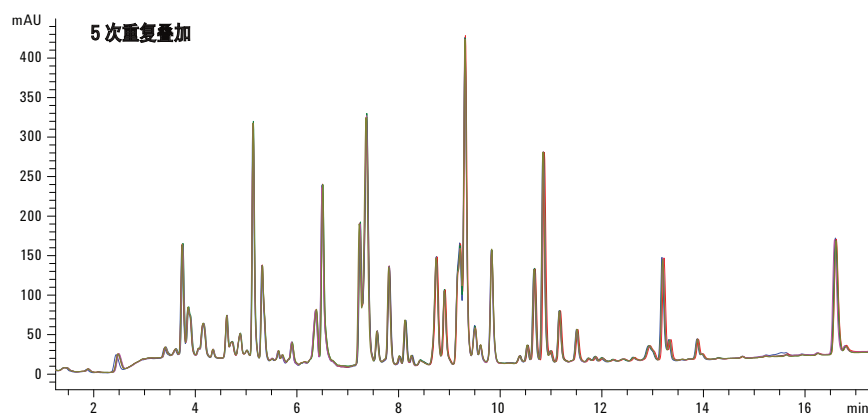


图 3. 采用 Agilent ORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 ($3.0 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$) 在 0.6 mL/min 流速下以相应梯度进行五次 P128 酶解物分析的叠加图

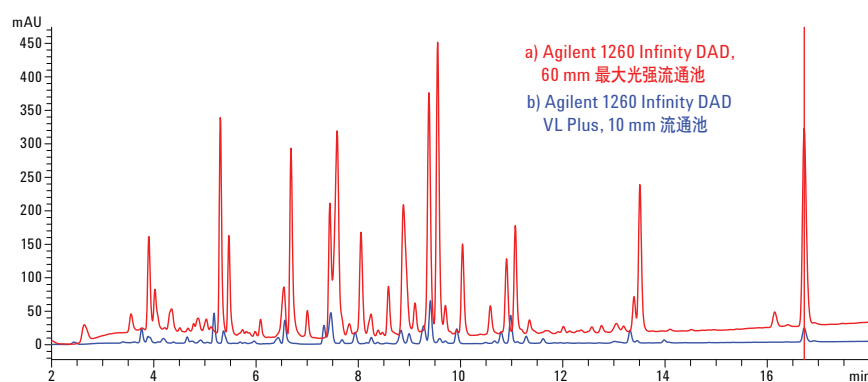


图 4. 应用配备 A) Agilent 1260 Infinity DAD, 60 mm 最大光强流通池或 B) Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus (G1315C) 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性高效液相色谱系统, 采用 Agilent ORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱, $3.0 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$ 在 0.6 mL/min 流速下以相应梯度分别进行 P128 酶解物分析的色谱图叠加

体积排阻色谱

为了证实蛋白的完整性或证明天然构象中未形成二聚体或多聚体，体积排阻色谱 (SEC) 结合 UV 检测是一种常用的分析技术。体积排阻的缺点是分离度较低。采用小粒径 SEC 色谱柱可得到出众的分离度并可最大限度地减少次级相互作用，因此是检测杂质或多聚体形成的有力工具。采用肽图分析中的相同蛋白进行 SEC 实验。其中比较了两种 5- μm 粒径色谱柱和一种 3- μm 粒径色谱柱的结果。混合物中的第二种化合物只在使用 Agilent Bio-SEC 3- μm 色谱柱的条件下才可被检测（图 5）。

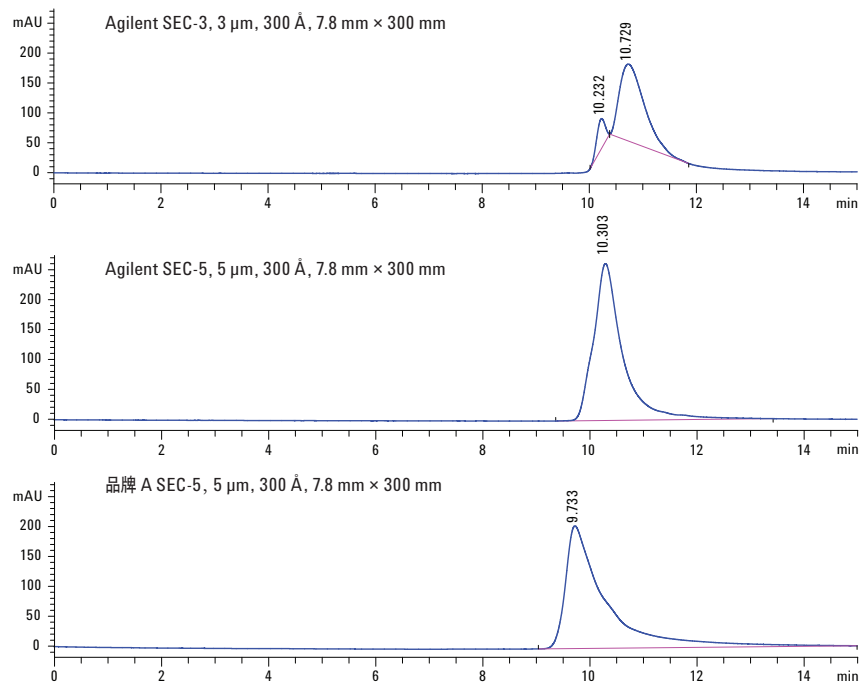


图 5. 应用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统以及不同的 SEC 色谱柱进行 P128 治疗性蛋白样品的体积排阻分析

离子交换色谱

离子交换色谱可用于分离生产或加工过程中末端赖氨酸残基发生氧化、脱酰胺化或截断所产生的 NBE 电荷异构体。为了从主峰中分离碱性或酸性异构体，分离度必须高且次级表面相互作用需要尽可能小。采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性防腐的四元液相系统并使用 Agilent Bio Mab 5 及 Bio Mab 10 色谱柱及一种尺寸相似的商用色谱柱（品牌 B）对 P128 蛋白脱盐样品进行分离。应用 Agilent Bio Mab 5 色谱柱可获得最佳峰形及最高效率（图 6）。

结论

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相系统及 Agilent Bio 高效液相色谱柱系列为表征治疗性蛋白药物 P128 的理化性质提供了一个强大的多功能工具。用于分析治疗性蛋白的安捷伦解决方案可实现生物惰性、卓越的分离度、抗腐蚀性、高灵敏度及快速的分离。

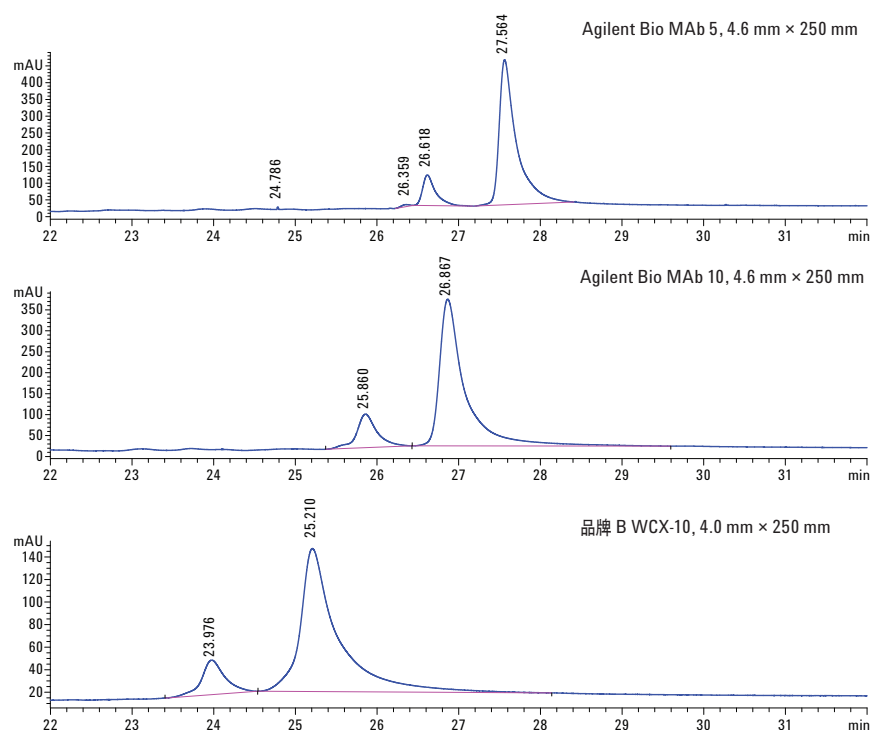


图 6. 应用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统以及不同的阳离子交换色谱柱进行 P128 治疗性蛋白样品分析所得的弱阳离子交换色谱图

www.agilent.com/chem/bio-inert

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 12 月 1 日
出版号 5990-6192CHCN



Agilent Technologies