

使用快速高分离度体积排阻色谱柱分析 生物治疗药物中的聚集体

应用简报

生物制剂与生物仿制药

作者

Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

前言

由于聚集体会对药物安全性产生显著影响并且可能引发抗原反应，因此蛋白质聚集是生物治疗药物蛋白质的关键质量属性 [1]。聚集体还可能会降低生物治疗药物的药效并大幅降低生产工艺的经济效益。蛋白质通常在暴露于压力条件下时发生聚集，例如 pH、温度或浓度的变化，因此不同生产阶段均有可能发生聚集。目前人们已经确定选择体积排阻色谱 (SEC) 方法进行聚集体的定量分析。

在生物治疗药物开发过程中（例如在克隆选择过程中或在通过严格的“实验设计”法优化发酵条件时）监视聚集体的形成情况，这些过程可能产生大量需要进行体积排阻分析的样品。

SEC 常用条件的分析时间往往需要 20 min 甚至更长，这极大限制了对大量样品的分析能力。Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱具有高度优化的粒径和孔径设计，可实现更快速的分离，从而显著减少分析瓶颈问题。本应用简报介绍的技术可提高样品通量而不影响分析的准确性。



Agilent Technologies

材料与方法

试剂、样品与材料

免疫球蛋白 G (IgG) 购自 Sigma-Aldrich 公司。蛋白质混标购自 Bio-Rad Laboratories, Inc.。蛋白质混标的组分为甲状腺球蛋白 (670 KDa)、 γ -球蛋白 (158 KDa)、卵清蛋白 (44 KDa)、肌红蛋白 (17 KDa) 和维生素 B12 (1.35 KDa)。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 水纯化系统。

仪器

采用完全生物兼容的 Agilent 1260 Infinity 四元生物惰性液相色谱系统，该系统由以下模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- 配备生物惰性流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315D)

软件为 Agilent ChemStation B.04.03。

条件

色谱柱： Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱，7.8 × 150 mm，2.7 μ m (部件号 1180-3301)，
Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱，7.8 × 300 mm，2.7 μ m (部件号 1180-5301)，
其他供应商的二醇色谱柱，7.8 × 300 mm，5 μ m

流动相： 150 mM 磷酸钠，pH 7.0

TCC 温度： 30 °C

进样量： 5 μ L

流速： 0.5 – 1.4 mL/min (参见图例)

检测条件： UV 220 nm

结果与讨论

AdvanceBio SEC 色谱柱的 2.7 μ m 颗粒专为实现最高柱效而设计，可避免样品出现剪切降解的风险，并且颗粒间不会出现堵塞。独特的制造方法控制了孔径和结构以及孔隙体积。使用亲水聚合物层可确保蛋白质峰尖锐且分离度良好。图 1 展示了使用 AdvanceBio SEC 色谱柱与其他供应商的相同规格 (7.8 × 300 mm) 色谱柱对蛋白质标准品进行 SEC 分离所得的色谱图对比结果。与其他色谱柱相比，AdvanceBio SEC 色谱柱对蛋白质标准品具有较高的分离效率。并且 AdvanceBio SEC 色谱柱对于 IgG 单体 (峰 4) 表现出理想的色谱峰形。与其他供应商的色谱柱相比，AdvanceBio SEC 色谱柱能够更好地分离卵清蛋白二聚体 (峰 5)。上述结果表明 AdvanceBio SEC 色谱柱具有出色的性能。

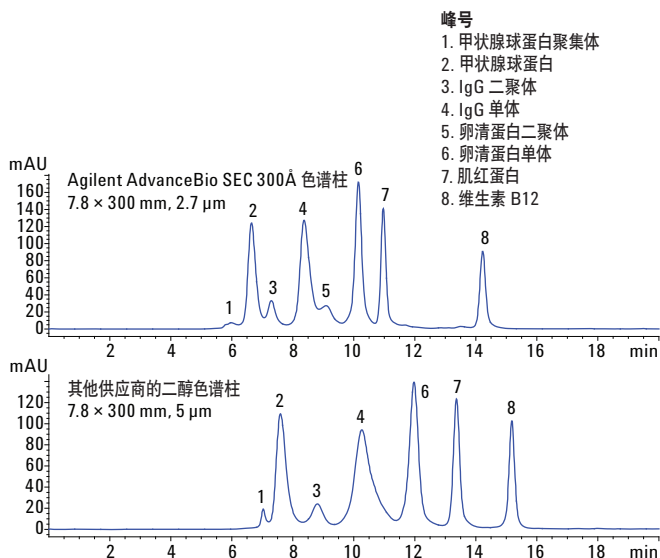


图 1. 在高分离度运行条件下 (流速 0.8 mL/min, 运行时间 20 min) 得到的蛋白质标准品的体积排阻色谱分析结果, 表明 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱具有出色的性能

在“标准”高分离度条件下采用 300 mm 的色谱柱和 0.8 mL/min 的流速，运行时间为 20 min。因此每小时的最大样品通量为 3 份，处理 96 份样品需要 1.3 天的时间。为了提高分析效率，较短的 150 mm 色谱柱可相应缩短运行时间。图 2 显示了在 0.8 mL/min 流速下运行 300 mm 和 150 mm AdvanceBio SEC 色谱柱所得的免疫球蛋白 G 的分离结果。使用 150 mm 色谱柱时保留时间缩短了一半，单体峰与二聚体峰之间的分离度因子为 1.73，定量性能不受影响。因此 AdvanceBio SEC 色谱柱越短，则 mAb 的分析时间越短且分离度越高。

生物治疗药物蛋白质聚集体与增强免疫原性、影响疗效和毒性相关。SEC 分析法对聚集体的准确定量主要取决于单体峰与聚集峰之间的分离度。因此，分离度与定量性能是 SEC 的两个关键参数，其中线速度会影响分离度。为评价上述两个参数，采用 150 mm 色谱柱对不同流速进行了测试。AdvanceBio SEC 色谱柱颗粒具有出色的稳定性，因此能在极高的流速条件下运行并且不会导致性能过度下降。虽然在更高流速条件下分离度因子会降低。然而，单体峰面积的定量结果基本未发生变化（图 3），使您能够筛查更多的样品以确定其聚集体含量。

样品通量最大化所带来的竞争优势和更加可靠的分析结果将为用户带来良好的经济效益。降低色谱柱长度并提高流速是实现快速 SEC 运行最直接的策略。表 1 显示了流速与每天样品分析数量之间的关系的理论计算结果。流速为 1.5 mL/min 时，运行时间为 4.8 min，每天可分析 300 份样品，表明样品通量最高可达 4.2 倍。

图 4 显示了不同流速下使用 300 mm 和 150 mm 色谱柱得到的 SEC 叠加色谱图。该图明显表明快速 SEC 分析条件下仍能够准确定量单体的含量，并且只需四分之一的的时间。

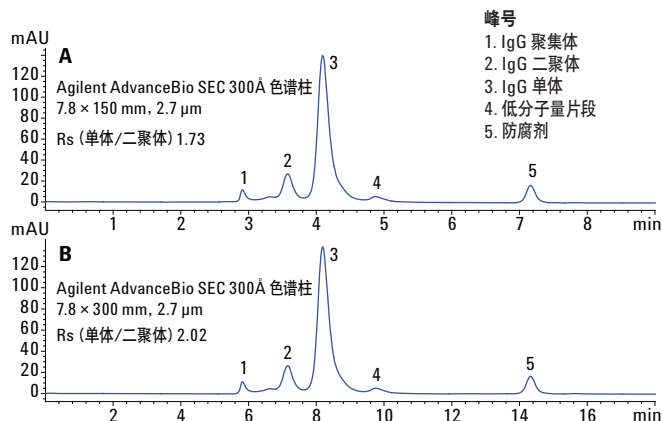


图 2. 在流速为 0.8 mL/min 的高分离度条件下得到的免疫球蛋白 G 的体积排阻色谱分析结果。其中，150 mm 色谱柱，运行时间 9 min (A)；300 mm 色谱柱，运行时间 18.5 min (B)

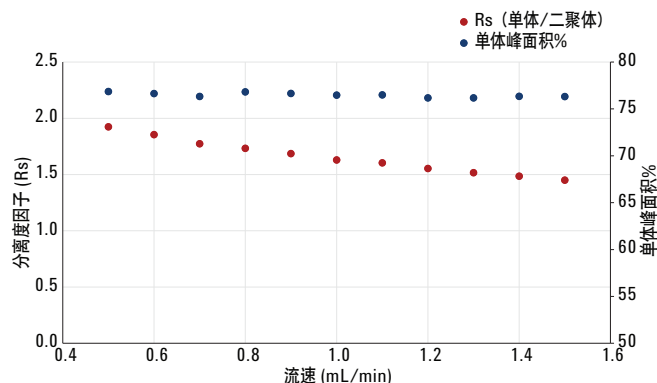


图 3. 流速对分离度因子和单体峰面积百分比测定结果的影响

表 1. 提高流速可实现的样品通量增量

色谱柱长度 (mm)	流速 (mL/min)	分析时间 (min)	每小时可处理的样品数	每天可处理的样品数
300	0.8	20	3	72
150	0.5	15	4	96
150	0.6	12	4-5	120
150	0.7	10	5-6	144
150	0.8	9	6-7	160
150	0.9	8	6-7	180
150	1.0	7	7-8	205
150	1.1	6.5	8-9	220
150	1.2	6	8-9	240
150	1.3	5.5	11	260
150	1.4	5	12	288
150	1.5	4.8	12-13	300

结论

本研究证明了使用更短的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和更高的流速具有诸多优势，能够提高生物治疗药物蛋白质聚集体的分析通量。本文通过将色谱柱长度从 300 mm 缩短至 150 mm，并将流速从 0.8 mL/min 提高至 1.5 mL/min，能够使样品通量和分析效率提高 4 倍，从而使分析 96 份样品的时间从 1.3 天缩短至 8 小时。

参考文献

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* **2014**, 11(2), 99–109.

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

高通量

Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱
7.8 × 150 mm, 2.7 μm
1.5 mL/min
单体峰面积% = 76.3%

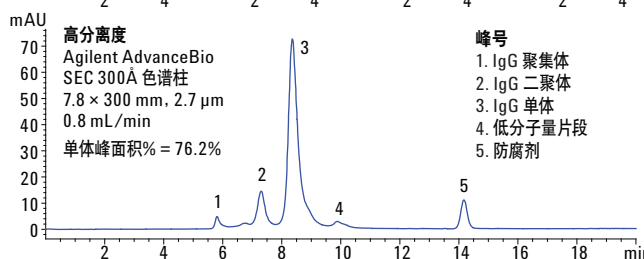
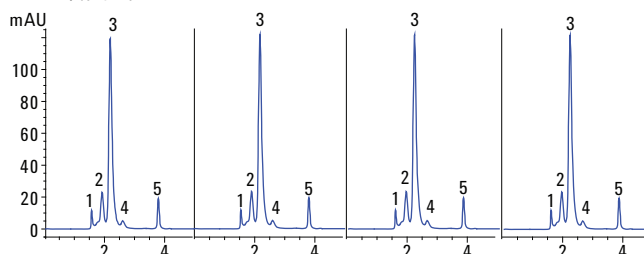


图 4. 免疫球蛋白 G 在高通量和高分离度条件下所得的色谱图对比

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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。

本文中的信息、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，2017
2017 年 11 月 2 日，中国出版
5991-6458ZH-CN



Agilent Technologies