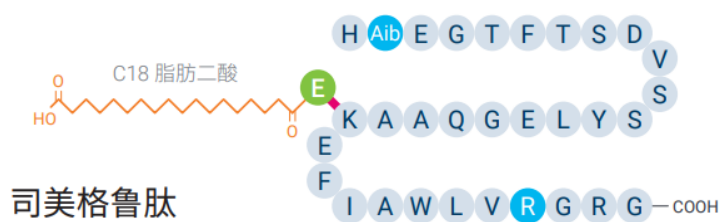


使用 SEC-MALS 联用技术鉴定 司美格鲁肽寡聚物

作者

刘鹏，刘彬，孟颖
安捷伦科技（中国）有限公司



摘要

司美格鲁肽是一种新型长效胰高血糖素样肽-1 受体激动剂 (GLP-1a)，市场增速很快。截至 2025 年第一季度，诺和诺德王牌单品司美格鲁肽的总销量跃升至全球首位，登上“药王”宝座。对于肽类药物而言，其物理稳定性是制药行业关注的焦点。在此类药物的研发、配制和生产过程中，面临的一个主要挑战是其形成的低聚物、多聚体和淀粉样蛋白原纤维等复杂结构，这些结构可能是细胞毒性和免疫源性的潜在来源。为了确保 GLP-1a 用药的安全性和有效性，需要对这些复杂的结构进行表征，以避免不良高级结构的存在。本文使用体积排阻色谱联用多角度激光光散射检测器 (SEC-MALS)，分别在天然和变性条件下对市售司美格鲁肽产品以及原料药中的单体、寡聚体和高聚体进行了鉴定和表征。



前言

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是一种肠促胰岛素激素, 已知能够通过刺激胰岛素分泌来降低血糖水平, 且具有减缓胃排空和增加进食后饱腹感的作用。21 世纪初, 研究人员开发出模拟内源性 GLP-1 功能的 GLP-1 受体激动剂或类似物 (GLP-1a), 用于治疗 2 型糖尿病。在诺和诺德™ 的重磅药物 Ozempic™ (司美格鲁肽) 取得成功之后, GLP-1a 作为减肥药物, 再次引起市场的巨大关注。

目前, GLP-1 固有的物理不稳定性仍然是药物加工和制剂领域的一大挑战。在特定条件下, 这种肽类激素也是少数容易聚集的肽/蛋白类型之一, 表现出异常的纤维化动力学特性。为了确保 GLP-1a 制剂的安全性和给药的有效性, 表征制剂中存在的寡聚状态并了解其聚集途径至关重要。例如, 诺和诺德的利拉鲁肽药物会自组装成七聚体, 并且在注射液中主要以这种形式存在^[1]。另外, 由于多肽的低聚体结构对缓冲溶液十分敏感, 因此必须掌握缓冲溶液配方对低聚化的影响^[2]。

在生物制药领域, 体积排阻色谱 (SEC) 是一种常用的聚集体分析技术。常规 SEC 基于目标物在色谱柱上的洗脱行为以及用于建立柱校正曲线的标准品相似的假设, 根据分析物的保留时间计算出分子量。然而, 在常规 SEC 分析中, 由于目标物与标准品之间往往存在化学结构差异, 导致分子量计算不可避免地产生偏差, 因此采用该方法获得的分子量结果一般被称为相对分子量。相对分子量无法准确表达样品真实的聚集状态和构象关系。例如, GLP-1a 多肽样品在 SEC 模式下可能以多种聚集形式存在, 或者在色谱柱上发生解聚, 将导致难以通过柱校正基于样品保留时间来准确计算寡聚状态的分子量。而体积排阻色谱-多角度激光光散射检测器 (SEC-MALS) 联用技术能够直接测量绝对分子量, 而不依赖于色谱柱校正, 由此克服了常规 SEC 方法带来的分子量计算结果的不确定性。

在本文中, 我们分别在天然 SEC 条件和变性 SEC 条件下, 使用 SEC-MALS 联用技术对经典 GLP-1a 药物司美格鲁肽进行了研究。重点介绍了使用 SEC-MALS 表征司美格鲁肽或其他 GLP-1a 的寡聚态以及制剂配方对聚集体的影响, 为 GLP-1a 用药安全性以及有效性研究提供了科学的实验数据参考。

实验部分

试剂和样品

氯化钠固体 (纯度 99.0%) 购于 Sigma-Aldrich; 磷酸氢二钠十二水合物 (纯度 98.0%) 购于 Sigma-Aldrich; 磷酸为色谱级, 购于迪马公司; 所用实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水; 牛血清白蛋白 (BSA) 粉末购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; ReadyVLS-Kit Dextran/Pullulan 试剂盒购于安捷伦科技 (中国) 有限公司 (部件号 VLSPD202C, 葡聚糖/普鲁兰多糖光散射系统校正标准品); 司美格鲁肽注射剂 (成药, Drug Product, 简称 DP) 为某品牌市售商品; 司美格鲁肽冻干粉 (原料药, Drug Substance, 简称 DS) 来源于某品牌原料药。

仪器和设备

采用 Agilent 1260 Infinity III 液相色谱系统, 配备如下安捷伦模块: 四元泵 (部件号 G7111B)、自动进样器 (部件号 G7129A)、柱温箱 (部件号 G7116A)、紫外可变波长检测器 (部件号 G7114A)、示差折光检测器 (部件号 G7162A) 和 1260 多角度激光光散射检测器 (部件号 G7885A)。

色谱柱选用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å (2.7 µm, 7.8 × 300 mm; 部件号 PL1180-5301)。

标准品制备

普鲁兰多糖系统校正溶液: 准确移取 1.0 mL 稀释溶液 (含有 10 mM Na₂HPO₄ 和 150 mM NaCl, pH 7.5) 至一瓶黑色普鲁兰多糖系统校正标准品中; 在室温下静置 4 小时后, 轻微振摇, 配制得到浓度为 1.41 mg/mL 的系统校正溶液, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

BSA 溶液: 精确称取 BSA 粉末 61.0 mg 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 准确移取适量稀释溶液 (含有 10 mM Na₂HPO₄ 和 150 mM NaCl, pH 7.5) 定容至刻度线; 在室温下静置 2 小时后, 轻微振摇, 配制得到浓度为 6.1 mg/mL 的 BSA 溶液, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

样品前处理

司美格鲁肽注射剂 (DP): 浓度为 1.34 mg/mL, 保存于 4 °C 冰箱中备用。由于制剂中司美格鲁肽浓度较低, 因此采用直接进样模式。

司美格鲁肽冻干粉 (DS): 精确称取司美格鲁肽冻干粉 46.0 mg 置于 10 mL 棕色容量瓶中; 准确移取适量稀释溶液 (含有 10 mM Na_2HPO_4 和 150 mM NaCl, pH 7.5) 定容至刻度线; 在室温下静置 4 小时后, 轻微振摇, 配制得到浓度为 4.6 mg/mL 的司美格鲁肽 (DS) 溶液, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

体积排阻色谱条件

色谱柱: 1 根 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å (2.7 μm , 7.8 × 300 mm)
流速: 0.8 mL/min
柱温: 30 °C
检测器: 紫外可变波长检测器 (VWD)
示差折光检测器 (RID)
静态多角激光光散射检测器 (MALS)
系统校正标准品: ReadyVLS-Kit Dextran/Pullulan 试剂盒
软件: WinGPC (G7890AA 和 G7891AA)

天然体积排阻条件 (Native SEC-MALS)

流动相: 10 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.5

在天然体积排阻条件下, 样品的示差折光指数增量值 (dn/dc 值) 为 0.185 mL/g; 在 280 nm 下的理论紫外消光系数为 $6990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。由于司美格鲁肽的分子量为 4113.58 g/mol, 因此其对应的紫外消光系数为 $1.70 (\text{mg}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

变性体积排阻条件 (Denaturing SEC-MALS)

流动相: 150 mM Na_2HPO_4 /乙腈/0.1% 精氨酸 (体积比为 9/25/65), pH 8.0

在变性体积排阻条件下, 有机溶液中样品的 dn/dc 值为 0.175 mL/g。司美格鲁肽在 280 nm 下的紫外消光系数为 $0.85 (\text{mg}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

值得注意的是, 接近生理 pH 值的磷酸盐缓冲溶剂极易引起细菌和藻类生长, 至少应每隔几天更换一次。并且在更换不同的缓冲溶液之前, 应首先用水或者有机试剂水溶液冲洗系统, 以预防系统污染。为了避免缓冲盐在系统内结晶, 分析结束后应将流速设置为低流速, 而不是停止流速。

结果与讨论

系统适应性考察

为了验证 SEC-MALS 检测器常数校正和延迟体积校正的适应性, 使用 BSA 溶液进行测试。图 1 为 BSA 的 SEC-MALS 色谱图, 其中显示了 BSA 单体、二聚体和三聚体的分子量表征结果, 与 BSA 的理论分子量相比, 计算结果符合预期。另外, 与紫外信号相比, 通过 MALS 信号可以清晰地看出 BSA 中高聚体的存在 (图 1 中 LS 信号上最早洗脱的部分)。这是由于待测分子越大, 在 MALS 检测器上产生的响应越灵敏^[3]。MALS 是一种摩尔质量敏感型检测器, 信号强度不仅取决于样品的浓度, 而且取决于样品的摩尔质量。样品的摩尔质量越高, 检测器信号响应也越高。相比之下, 紫外检测器和示差折光检测器都属于浓度型检测器, 信号响应只取决于样品浓度以及样品本身的常数 (例如, dn/dc 值或紫外检测波长下的消光系数)。

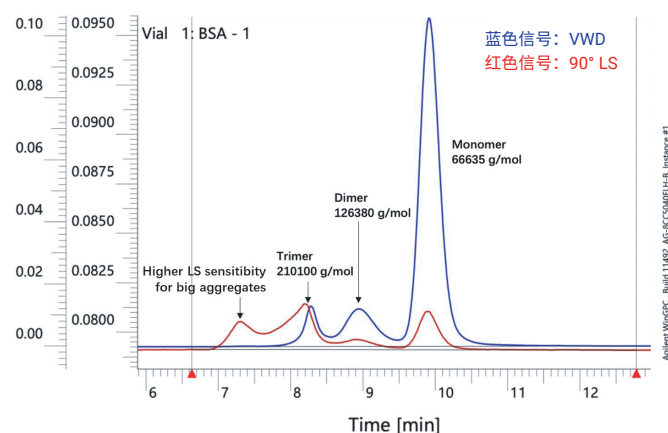


图 1. BSA 的 SEC-MALS 分析结果, 其中显示了 BSA 单体和聚集体的分子量表征结果

天然 SEC 条件下的司美格鲁肽 MALS 分析结果

在天然 SEC 条件下, 司美格鲁肽 (DS 和 DP) 主要以一个主峰的形式被洗脱出来, 不存在明显的不可逆聚集体。司美格鲁肽 DP 在上样量为 107.2 μg 的条件下, 实测重均分子量 (weight-average molar mass, M_w) 为 12.202 kDa (表 1)。结合司美格鲁肽的理论分子量, 可以推测出此时的寡聚态多以三聚体的形式存在。与此同时, SEC-MALS 还可以表征司美格鲁肽在色谱柱上发生的可逆寡聚化结合。

图 2 显示了在不同上样量下得到的司美格鲁肽 (DS) 的色谱图对比结果。从图中可以看出, 司美格鲁肽具有非常明显的上样量依赖性, 具体表现为可逆的寡聚化结合 (表 1)。随着司美格鲁肽 (DS) 上样量从 368 μg 降低至 36.8 μg , 所得重均分子量 (M_w) 从 14.437 kDa 降至 8.832 kDa, 表明其寡聚态随着上样量的变化, 从三聚体与四聚体的混合物转变为三聚体和二聚体。

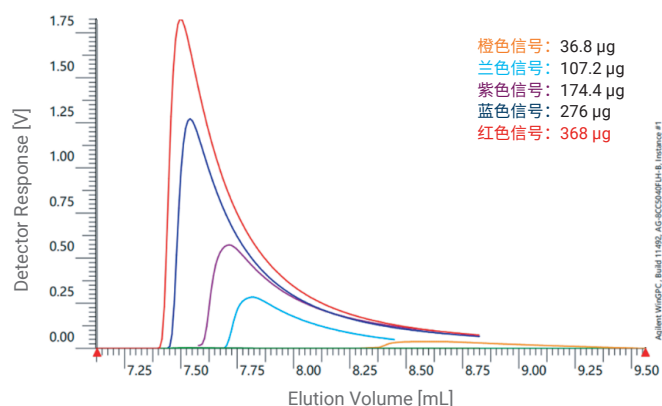


图 2. 上样量对司美格鲁肽寡聚态的影响

表 1. 在不同上样量下得到的司美格鲁肽（DP 和 DS）重均分子量 (weight-average molar mass, Mw) 和峰尖分子量 (apex molar mass, Mp) 结果

上样量 (µg)	司美格鲁肽注射液 (DP)		司美格鲁肽冻干粉 (DS)	
-	Mw (kDa)	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mp (kDa)
36.8	-	-	8.832	9.601
107.2	12.202	13.423	-	-
174.4	-	-	13.433	14.462
276	-	-	13.902	14.848
368	-	-	14.437	15.793

变性 SEC 条件下的司美格鲁肽 MALS 分析结果

在美国药典和欧洲药典中通过 SEC 表征胰岛素聚集体含量的色谱条件中，采用含有乙腈、精氨酸和乙酸的流动相体系。本文采用类似的变性 SEC 条件，对司美格鲁肽（DP 和 DS）的聚集体进行了表征。图 3 显示了司美格鲁肽（DP 和 DS）的紫外色谱图，其中 DS 只有一个主峰被洗脱出来，而 DP 中存在多个峰。经过 SEC-MALS 分子量确认，DP 和 DS 中的主峰为司美格鲁肽单体。在 DP 中，比主峰更早洗脱出来的峰是相对质量含量为 2% 的二聚体（见表 2）。

综上，对于司美格鲁肽在天然 SEC 条件下或天然配方制剂中形成的低聚体，可通过向流动相中加入有机试剂，使其解离成单体。

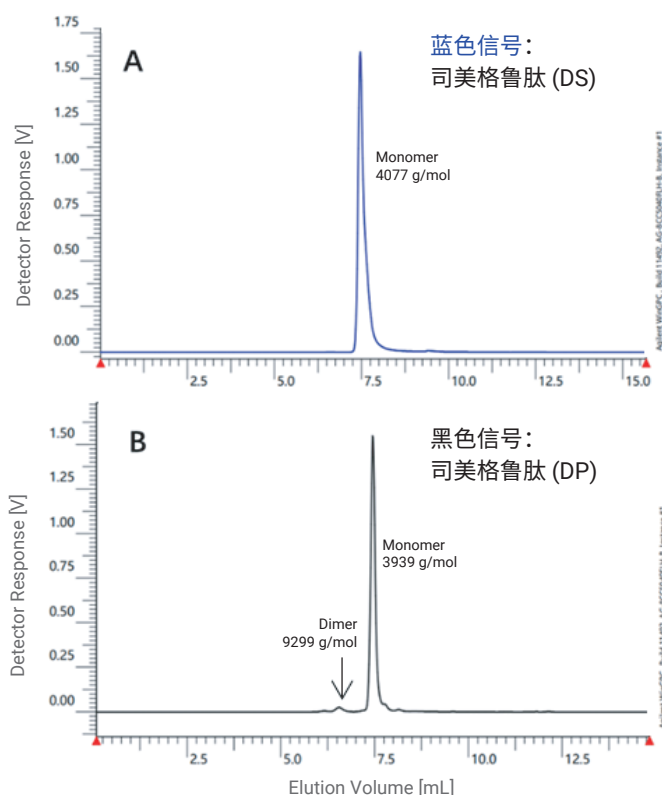


图 3. 司美格鲁肽（DP 和 DS）的紫外色谱图：A 为 DS 的色谱图；B 为 DP 的色谱图

表 2. 在变性 SEC-MALS 条件下得到的司美格鲁肽（DP 和 DS）中的单体和聚集体表征结果

GLP-1a	DP (kDa)	DS (kDa)	形态	质量百分比 (%)
司美格鲁肽	3.939	4.077	单体	100% (DS) 98% (DP)
	8.298	-	二聚体	2% (DP)

结论

GLP-1 受体激动剂类似物 (GLP-1a) 的寡聚态、聚集体和淀粉样蛋白原纤维的鉴定/表征对于确保这些肽类药物临床疗法的质量、安全性和有效性至关重要。SEC-MALS 联用技术可在天然和变性条件下对司美格鲁肽单体、天然低聚物和高分子聚集体进行有效表征和定量，还可帮助药物研发专家深入分析其更复杂的动力学行为，例如溶液中的可逆化聚体结合。与常规 SEC 方法相比，SEC-MALS 可提供准确的样品分子量，反馈样品在 SEC 模式下的真实聚集形态。另外，与传统 RPLC 或 LC-MS 技术相比，体积排阻色谱联用多角度光散射检测技术 (SEC-MALS) 非常适合对各种 GLP-1a 中的聚集体状态进行高通量评估，为 GLP-1a 制剂工艺开发以及用药安全性/有效性研究提供科学的实验依据。

参考文献

1. Steenagaard, D. B. et al. The molecular basis for the delayed absorption of the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. Presented at the 68th Scientific Sessions of the American Diabetes Association. San Francisco, CA, 6–10 Jun 2008
2. Dauer, K. et al. High-Throughput Screening for Colloidal Stability of Peptide Formulations Using Dynamic and Static Light Scattering. *Mol. Pharm.*, 2021, 18 (5): 1939–1955
3. Van Bruijnsvoort, M. et al. Retention Behaviour of Amylopectins in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Studied by Multi Angle Light Scattering Detection. *J. Chromatogr. A*, 2001, 925 (1–2): 171–182

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



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

DE-008777

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、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025
2025 年 8 月 7 日，中国出版
5994-8558ZHCN