

优化和执行蛋白质聚集体研究的完整工作流程

将体积排阻色谱与方法开发和光散射相结合

应用简报

生物治疗药物和生物仿制药

作者

Andy Coffey 和 Matthew Rain
安捷伦科技公司

摘要

本应用简报介绍了一套完整的聚集体分析工作流程，它能够：

- 优化单克隆抗体高性能体积排阻色谱 (SEC) 的流动相条件
- 表征包括单体、二聚体和高阶聚集体等物质的聚集特征

我们使用安捷伦缓冲液顾问软件自动进行复杂的 SEC 优化实验，实验中充分利用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统的功能，在一系列快速液相色谱运行中对各种缓冲液组分进行自动实时混合。Agilent 1260 Infinity Bio-MDS 多检测器套装提供了动态光散射检测功能，能够检测高阶蛋白质聚集体、测定绝对分子量并扩大紫外检测系统的测量范围。



Agilent Technologies

前言

一些单克隆抗体 (mAb) 和蛋白质在溶液中容易自发聚集^{1,2}。在许多生物制药应用中, 必须在各种条件下精确地表征和定量此类聚集的程度。体积排阻色谱 (SEC) 是一种表征和定量蛋白质聚集体的强大技术, 但是准确测量需要在适合天然蛋白质确证的条件下具有优异的色谱性能。为通过改善特定蛋白质的色谱峰形提高其分离度, 通常需要评估各种不同的流动相条件。

采用 SEC 技术时有时会忽略对缓冲液条件的优化。过去, 通过优化缓冲液条件克服与固定相材料之间不必要的非特异性相互作用, 但对色谱柱缺陷的优化有可能造成本用于测定聚集体的技术对待测聚集体造成破坏的风险。然而, Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的惰性表面涂层有助于减少各种缓冲液条件下的次级相互作用, 并提供更高的灵活性以优化用于蛋白质构象分析和色谱分离的缓冲液化学组成。参数筛选实验的复杂性是日常优化聚集体分析 SEC 缓冲液条件的另一障碍。优化实验需要设计复杂的备选流动相表格, 并繁琐地手动配制许多不同的溶液以通过实验评估盐分基质、缓冲液和 pH 变化。然而, 现代工具已大幅简化了优化 SEC 条件、表征和定量聚集体以及在日常使用中配置最佳技术的工作流程。

本应用简报展示了一套用于聚集体研究的完整工作流程解决方案, 其能够:

- 从四种简单的储备液中自动混合指定列表中的液相色谱缓冲液, 并使用安捷伦缓冲液顾问软件和高分离度生物惰性四元液相色谱泵实时调节 pH 和缓冲液浓度
- 利用动态光散射检测技术测量高阶蛋白质聚集体, 补充紫外检测以将高灵敏度扩展至宽质量范围
- 利用光散射检测表征聚集蛋白质和单体蛋白质的绝对分子量和流体动力学半径

在该分析中, 我们使用 Agilent AdvanceBio SEC 15 cm 色谱柱为快速筛查提供快速分离。值得注意的是, AdvanceBio SEC 色谱柱提供更长 (和更短) 的类型, 因此在可能需要更高分离度的情况下, 该方法可轻松适用于 30 cm 色谱柱或甚至更多色谱柱。本研究中的单克隆抗体样品包括市售利妥昔单抗和市售利妥昔单抗生物仿制药。

材料与amp;方法

试剂、样品与材料

磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 VWR。使用的所有化学品和试剂纯度均 $\geq 99.7\%$ 。所用的 $> 18 \text{ M}\Omega$ 纯水来自 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore, 美国)。每天使用前配制新鲜溶液并通过 $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤器进行过滤。

仪器

用于聚集体分析的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统包括:

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (G5654A)
- 配备样品冷却器和多重清洗功能的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)
- 配备生物惰性热交换器的 Agilent 1260 Infinity II 多柱恒温箱 (G7116A)
- 配备生物惰性标准流通池的 Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 多检测器系统 (G7805AA)
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å, $7.8 \times 150 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱 (部件号 PL1180-3301) 或
- Agilent AdvanceBio SEC, $2.7 \mu\text{m}$ 300Å $7.8 \times 300 \text{ mm}$ 色谱柱 (部件号 PL1180-5301)

仪器条件

参数	值
流动相	见表 1
流速	0.8 mL/min
温度	25 °C
进样量	1-25 μL (取决于样品浓度)
检测条件	220 nm, 280 nm, LS 90°, 以及 DLS
样品	利妥昔单抗创新药物、利妥昔单抗生物仿制药和 BSA

结果与讨论

为确定每种分析物混合物的最佳流动相组成，我们评估了四种不同 pH 条件下的三种不同流动相，这些流动相代表组成了 12 种实验条件。缓冲液组成为：

- 150 mM 磷酸钠
- 10 mM 磷酸钠 + 140 mM NaCl
(模拟不同 pH 值的 PBS)
- 100 mM 磷酸钠 + 150 mM NaCl

每种流动相在 pH 6.2、6.6、7.0 和 7.4 下进行测试。

执行每次实验时，我们在安捷伦缓冲液顾问软件中指定了每次处理的缓冲液组成和 pH。软件自动计算储备液 A-D 的适当混合比例，以在液相色谱参数筛选运行中实时获得所需的流动相组成。表 1 汇总了 12 种实验条件。

使用这些条件分析市售利妥昔单抗样品、利妥昔单抗生物仿制药样品和市售 BSA 蛋白质混标（10 mg/mL 溶液，用于仪器校准）。

使用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 150 × 7.8 mm 色谱柱，每个样品能够在 10 分钟内完成筛选实验。

表 1. 实验条件及相应流动相组成

实验	用户指定的参数				软件计算的参数			
	pH	缓冲液 (mM)	NaCl (mM)	总浓度 (mM)	%A	%B	%C	%D
1	6.2	150	0	150	25.0	0.0	57.0	18.0
2	6.6	150	0	150	25.0	0.0	42.3	32.7
3	7.0	150	0	150	25.0	0.0	26.3	48.7
4	7.4	150	0	150	25.0	0.0	13.8	61.2
5	7.4	10	140	150	67.0	28.0	0.9	4.1
6	7.0	10	140	150	67.0	28.0	1.8	3.2
7	6.6	10	140	150	67.0	28.0	2.9	2.1
8	6.2	10	140	150	67.0	28.0	3.9	1.1
9	6.2	100	150	250	20.0	30.0	36.3	13.7
10	6.6	100	150	250	20.0	30.0	26.1	23.9
11	7.0	100	150	250	20.0	30.0	15.6	34.4
12	7.4	100	150	250	20.0	30.0	7.8	42.2

A = 水

B = 500 mM NaCl

C = 200 mM NaH₂PO₄

D = 200 mM Na₂HPO₄

对色谱数据的初步审查表明，流动相条件影响实验过程中利妥昔单抗创新药物和利妥昔单抗生物仿制药的峰形，如图 1 和图 2 所示。两种分子具有相似结构，采用 10 mM 磷酸钠和 140 mM NaCl 的流动相组成也表现出了相同的异常行为。该流动相组成所获得的峰拖尾显著增加，峰高明显降低。其他蛋白质也可观察到这种行为，说明需要认真评估流动相组成对两种方法开发和稳定性影响。

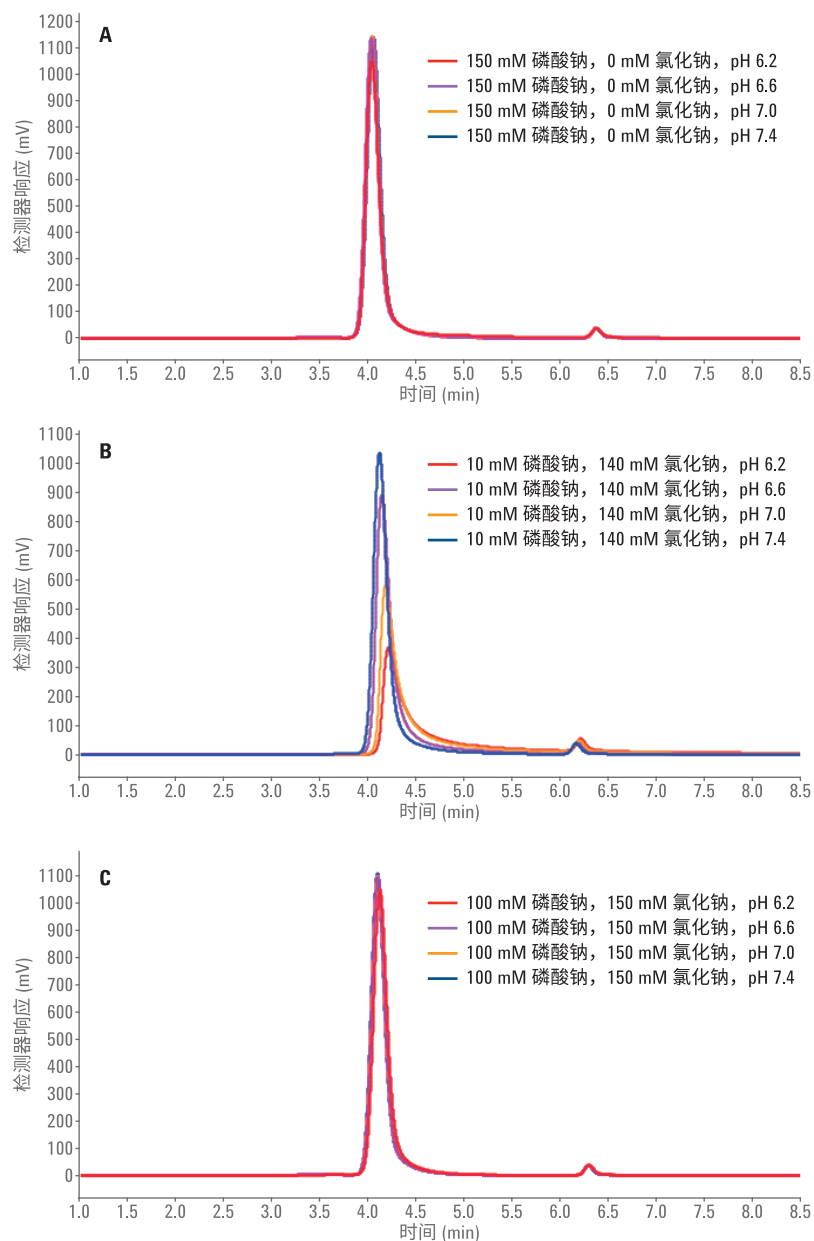


图 1. 利妥昔单抗创新药物（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

为定量分析聚集体含量，需要使用紫外检测器。单体峰和聚集体峰（如能检出）的积分能够确定峰面积聚集体百分比。图 3A 和图 3B 分别给出了利妥昔单抗创新药物和利妥昔单抗生物仿制药的结果。在 pH 7.0 下使用 150 mM 磷酸钠或 100 mM 磷酸钠配合 150 mM NaCl（实验 3 和 11）获得了一致性最好的结果。

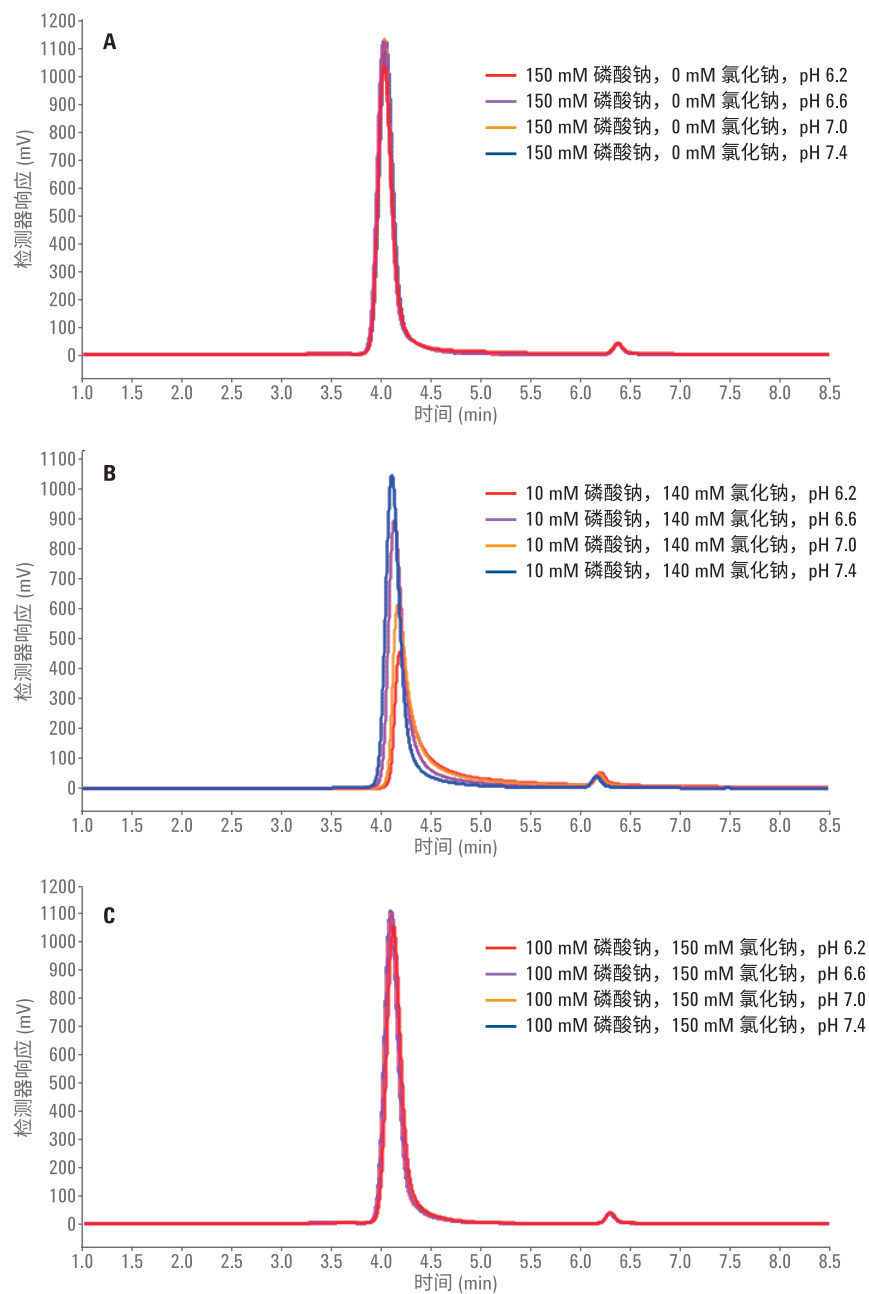


图 2. 利妥昔单抗生物仿制药（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

图 4 示出了在 pH 7.0 的三种不同缓冲液组成下获得的色谱图，结果清楚地表明，当使用 10 mM 磷酸钠和 140 mM NaCl 作为流动相分析该分子时未检出聚集体（用箭头突出显示）。

可另外选择在聚集体分析工作流程中增加光散射检测器，它可以揭示蛋白质聚集体相关的更有用信息。在单次进样特征明确的分子（在本例中为 BSA）以完成简单的仪器校准后，即可快速测定检测器间延迟和仪器常数。Agilent Bio-SEC 软件可用于根据同一色谱柱和流速条件下获得的其他色谱图的单个峰报告分子量信息。

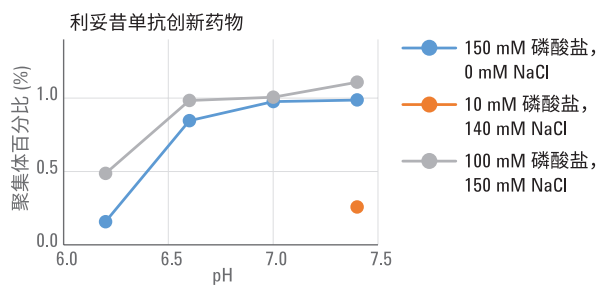


图 3A. 利妥昔单抗创新药物中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

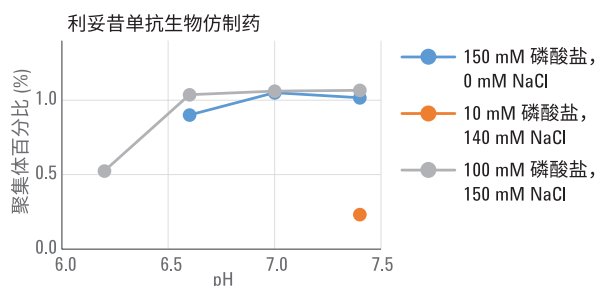


图 3B. 利妥昔单抗生物仿制药中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

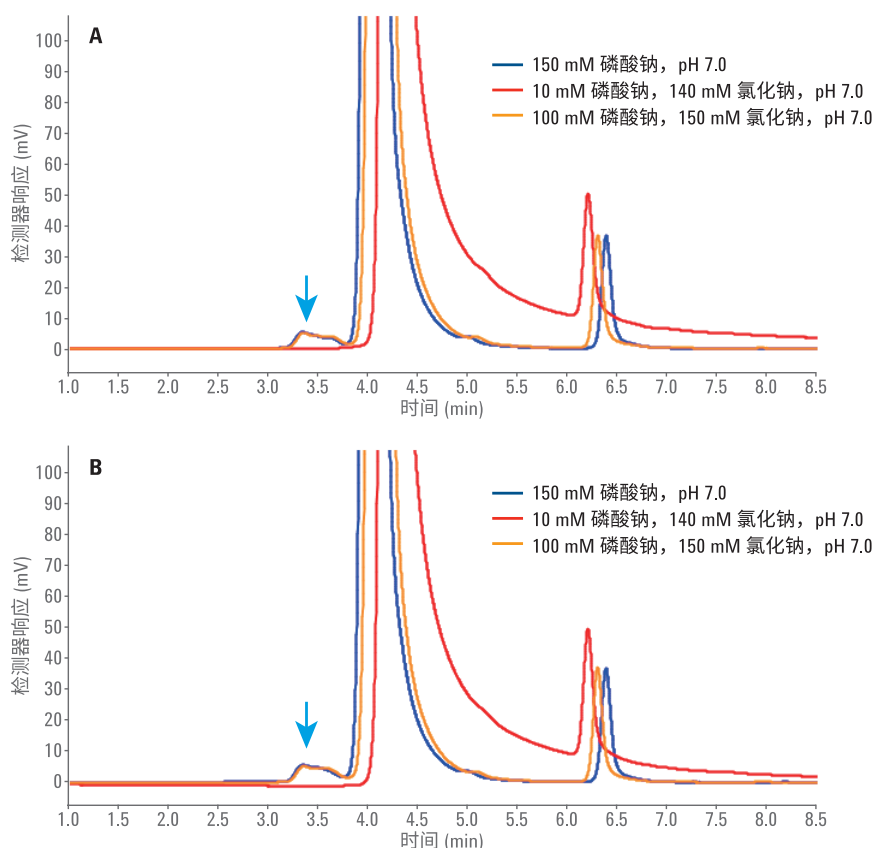


图 4. 在 pH 7.0 最佳条件的不同缓冲盐浓度下（表 1 中的实验 3、6 和 11）运行得到的利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 的 UV 220 nm 信号的基线放大图

图 5 示出在实验 11 的高浓度盐条件下运行得到的利妥昔单抗创新药物和利妥昔单抗生物仿制药的光散射分析结果。光散射分析仅关注单体峰，报告的分子量接近之前的应用简报¹中发现的精确质量数值。预期生物仿制药分子具有略高的质量数，因为其中存在 C 末端赖氨酸变体，该变体在原研药分子中并不明显。

较大聚集体和显微镜下才能看到的颗粒的形成在生物制药应用中受到特别关注。光散射检测对高度聚集样品的灵敏度对紫外检测获得的浓度数据形成补充。

尽管紫外检测得出的单体和二聚体结果非常相似，但光散射检测器对高阶聚集体具有更高的响应，并揭示了利妥昔单抗创新药物和生物仿制药在图 6 所示的某些流动相条件下发生更广泛的聚集。

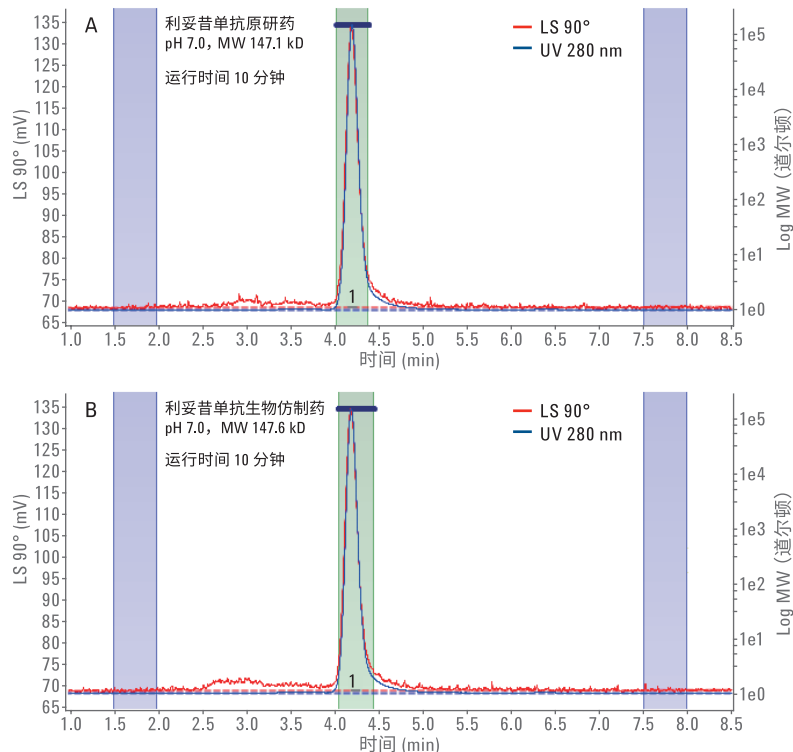


图 5. 在 100 mM 磷酸钠、150 mM NaCl 和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 11) 运行的利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

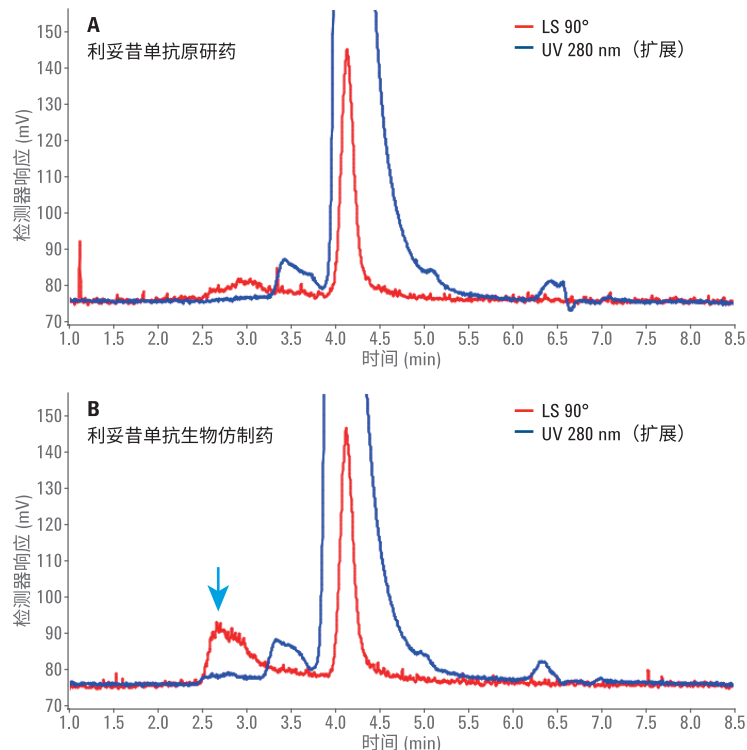


图 6. 在 150 mM 磷酸钠和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 3) 运行的利妥昔单抗创新药物 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

DLS 功能的补充进一步扩充了可获得的信息量,使流体动力学半径测量成为可能(图7)。

结论

包含全生物惰性流路的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统与安捷伦缓冲液顾问软件相结合,提供了对用于蛋白质聚集体定量分析的体积排阻色谱进行方法优化的简单方法。在较短的 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 15 cm 色谱柱下能够实现更快速的分离,大大提高了通量并缩短了筛选各种分析条件所需的时间。为获得更高的分离度和准确度,可使用更长的 30 cm 色谱柱。AdvanceBio SEC 色谱柱表现出更多优势,例如非特异性结合。Bio-MDS 多检测器套装与 Bio-SEC 软件可用于揭示通过任何其他方法难以检测的低浓度高分子量聚集体。最后, Bio-MDS 可用于测定蛋白质分子量或与 DLS 检测结合测定流体动力学半径信息。该技术组合包括完整的工作流程解决方案,可快速优化 SEC 条件,准确定量整个分子量范围内的聚集体,并表征单克隆抗体在相关缓冲液条件下的聚集动力学。

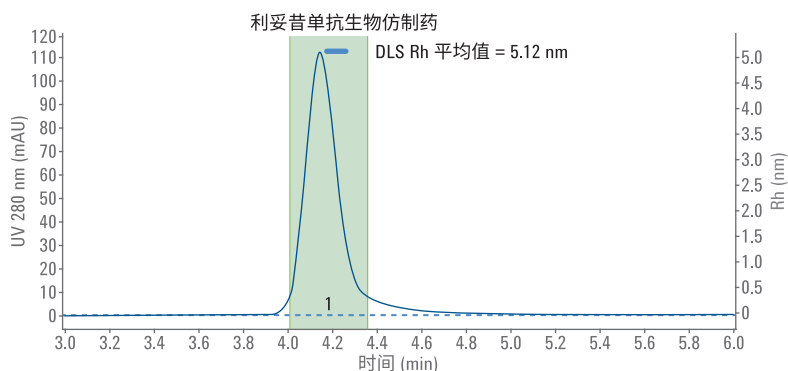


图7. 利妥昔单抗生物仿制药的 DLS 分析显示了 LS 检测器得到的流体动力学半径结果

参考文献

1. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), **2014**
2. Mahler, H-C.; *et al.* Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis, *J. Pharm. Sci.* **2008**, *98*(9)
3. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征), *安捷伦科技公司应用简报* 出版号 5991-6673EN **2016**

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

www.agilent.com/chem/bioseparations

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, 2017
2017年1月5日, 中国出版
5991-7476CHCN



Agilent Technologies