

小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析

作者

Sandeep Kondaveeti,
Te-Wei Chu 和 Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

涉及聚集的蛋白质变性过程是阻碍稳定蛋白质药物制剂开发的因素之一。使用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 测定这些蛋白质的纯度和聚集体是一种相对简单的技术。定期校准 SEC 方法可确保更好的重现性，从而提高准确性，还可及早发现样品及批次中的潜在问题。本简报将 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱与其他供应商的亚 2 µm 填料色谱柱进行了比较。对重组人生长激素 (hGH)、人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF) 以及干扰素 α-2b (INF α-2b) 蛋白的分析结果表明，AdvanceBio 色谱柱在小分子蛋白质治疗药物应用方面具有卓越性能。

前言

近年来，生物衍生的治疗药物（称为生物制剂）的开发显著增长，广泛应用于治疗各种疾病。一些生物药物包括生长因子和细胞因子等小分子蛋白质治疗药物，它们在调节血液、肌肉和骨细胞的产生、成熟和活性方面发挥着关键作用。例如，人生长激素 (hGH) 用于刺激由于缺乏激素而生长缓慢或生长不正常的儿童和成人的生长^[1]。人粒细胞集落刺激因子 (hG-CSF) 用于治疗化疗中的癌症患者，以提高被细胞毒性治疗药物降低的白细胞水平^[2]。干扰素是一类具有多种治疗用途的糖蛋白，但会形成部分去折叠的形式以及聚集体，尤其当暴露于 pH 或热降解条件下时^[3]。

涉及聚集的蛋白质变性过程是阻碍稳定蛋白质药物制剂开发的主要因素之一。美国药典专论方法推荐使用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 测定这类蛋白质的纯度和聚集体。SEC 是一种相对简单的技术。它依靠的是向固定相孔结构进行的简单扩散：较大的分子无法渗透到颗粒孔隙中，会首先洗脱，而较小的分子比较容易扩散到孔隙中，会较晚洗脱。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱专为生物分子的水相体积排阻色谱 (SEC) 分析而设计。这些填料颗粒采用专有技术制造，同时具备适用于分离小分子蛋白和多肽等分子的最佳孔径和孔隙体积。

实验部分

设备与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich（现属于 Merck）或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置（选件 #100）
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器（选件 #019）
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池（选件 #028）

软件

OpenLab 2.2 CDS

方法条件

HPLC 条件	
色谱柱	AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速	0.30 或 0.35 mL/min (如文中所示)
柱温	25 °C
进样量	2 µL, 1 mg/mL
样品	低分子量蛋白质混标 人生长激素, rhGH 人粒细胞集落刺激因子, rG-CSH
总运行时间	15 或 20 分钟 (取决于流速)

结果与讨论

蛋白质是含有酸性、碱性、中性和疏水性等多种侧链基团的复杂分子。寻求避免次级相互作用的最佳条件可能较为困难，但 AdvanceBio SEC 产品系列的硅胶颗粒具有聚合物表面涂层，可以解决很多这方面的问题。分离机理是基于溶液中分子的大小（流体动力学半径）。自然界中的蛋白质通常是致密的球状结构，通常会在极端温度、pH 或盐组成等应激条件下聚集，形成二聚体和更大的单元。这对于蛋白质分子而言是一个特殊问题，如果存在蛋白质聚集，在作为治疗药物分子给药时可能引发不良反应。SEC 为蛋白质聚集的量化和监测提供了理想工具。图 1 展示了低分子量蛋白质和多肽标准品的 SEC 分离。这些标准品基于保留时间的校准曲线如图 2 所示。由此估计该色谱柱的最佳分子量范围为 1–80 kDa。

峰	蛋白质/多肽	分子量 (Da)
1	卵清蛋白	44000
2	肌红蛋白	17000
3	抑肽酶	6700
4	神经降压素	1700
5	尿苷	244

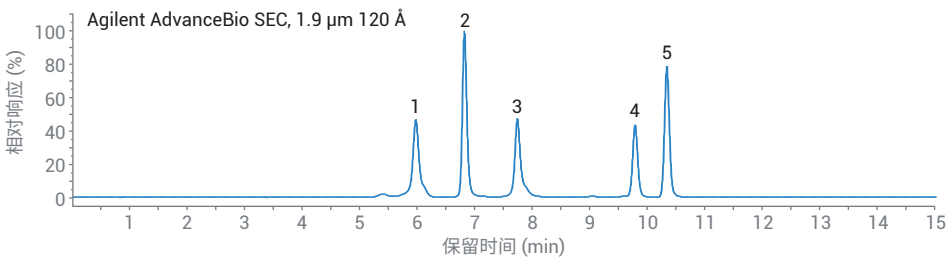


图 1. 低分子量蛋白质和多肽混合物在 0.35 mL/min 下的体积排阻色谱图

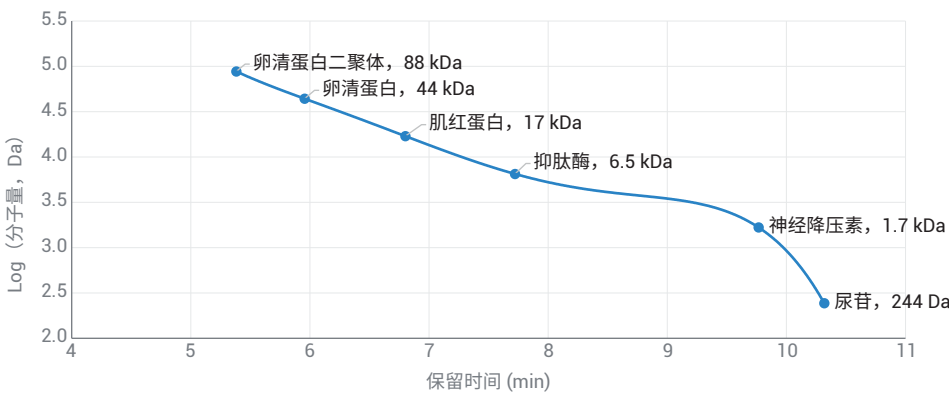


图 2. 低分子量蛋白质和多肽标准品的 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 校准曲线

即使使用 AdvanceBio SEC 色谱柱是为了定量单体和二聚体含量，使用适当的分子量标准品定期进行校准仍然是个很好的做法。定期校准可确保更好的重现性，从而提高准确性，还可及早发现潜在问题，减少系统停机时间和故障排除工作。对于蛋白质分离，应使用的标准品是一系列充分表征的蛋白质，涵盖色谱柱的整个操作范围。选择正确的标准品可确保成功应用 SEC 的两个关键环节：分析物与固定相之间的次级相互作用应尽可能小。选择的孔径应匹配所分析分子的大小。

本应用简报展示了使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱对重组 hGH 和 hG-CSF 治疗性蛋白质进行体积排阻色谱 (SEC) 分析，与当前的竞品亚 2 µm 填料技术相比，其可实现高分离度分离。通过进一步优化流动相条件，还比较了未降解和热降解干扰素 α-2b (IFN α-2b) 的 SEC 分离。

将目标分析物的保留时间与校准曲线进行比较，可以确定是否存在次级相互作用。峰洗脱时间早于或晚于预期或是峰形不佳，则表明流动相条件可能未得到充分优化。图 3 展示了使用 AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å 色谱柱获得的 hG-CSF 体积排阻色谱图，其保留时间与 20 kDa 左右的蛋白质的保留时间非常接近。

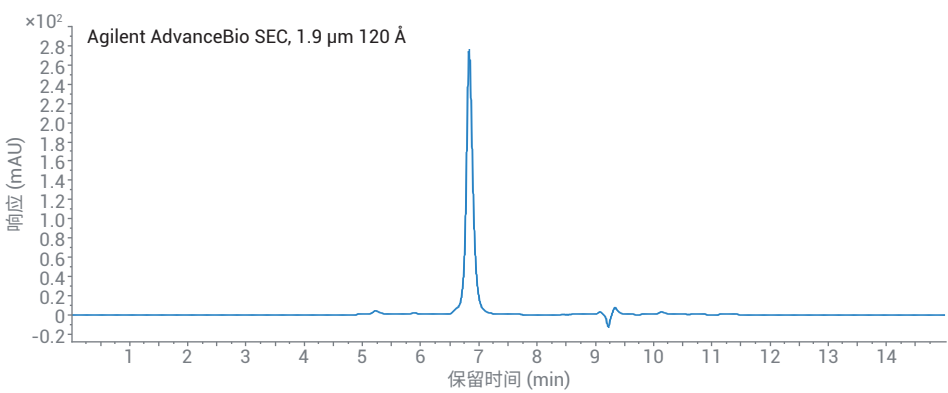


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å 4.6 × 300 mm 色谱柱，在 0.35 mL/min 下获得的 hG-CSF 的体积排阻色谱图

图 4 展示了在 AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å 色谱柱和其他供应商的亚 2 µm 色谱柱上获得的 hG-CSF 谱图的基线放大

图。色谱图的底端部分表明了与次级相互作用相关的问题（晚于预期洗脱时间和拖尾峰）。

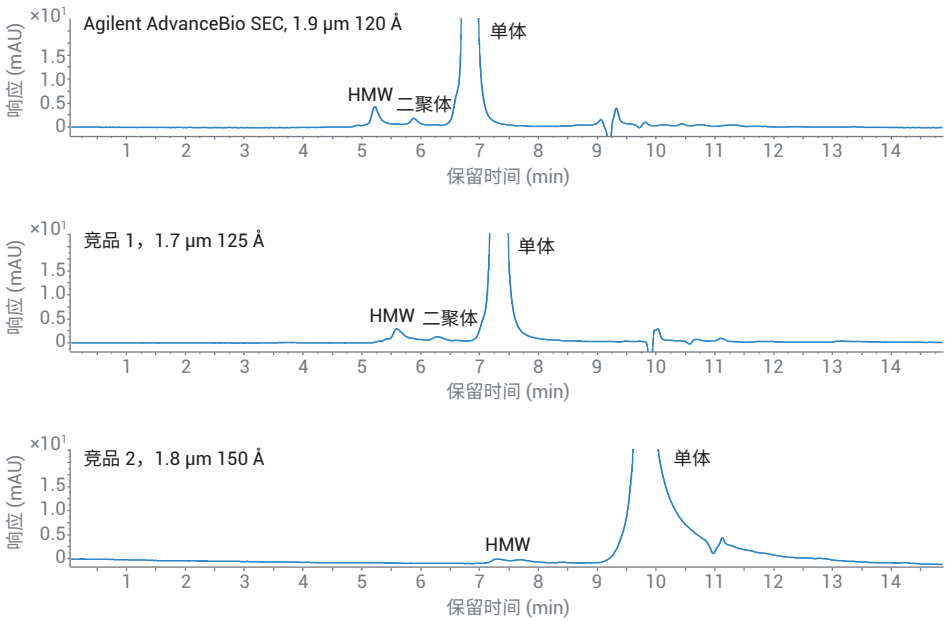


图 4. hG-CSF 体积排阻色谱图的放大图，流速 0.35 mL/min

许多其他生物治疗性蛋白质具有相似的分子量，因此也适合在同一 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 $\text{\AA}$ 色谱柱上进行分析。重组形式的 hGH 及生长激素可能由于翻译后修饰或下游加工而含有一些杂质。图 5

展示了在上述相同条件下获得的生长激素的体积排阻色谱图。插图显示了放大后的基线区域，可以明显观察到二聚体和高分子量聚集体。

其他蛋白质可能需要进一步开发方法以获得最佳峰形和分离度。如表 2 所示，通过在不同流动相条件下进行一系列实验来确定获得最佳 IFN α -2b 峰形和蛋白质回收率的流动相组成。

表 1. hG-CSF 高分子量 (HMW)、二聚体和单体峰的峰面积数据

	AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 $\text{\AA}$				竞品 1, 1.7 μm 125 $\text{\AA}$				竞品 2, 1.8 μm 150 $\text{\AA}$			
	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾	RT (min)	峰面积 (%)	Rs USP	峰拖尾
HMW	5.22	2.61		1.16	5.59	2.49		1.28	7.40	2.01		1.37
二聚体	5.88	1.02	2.41	1.11	6.27	0.83	1.68	1.26	未检出			
单体	6.82	96.37	3.77	1.13	7.31	96.68	3.04	1.11	9.74	97.99		2.13

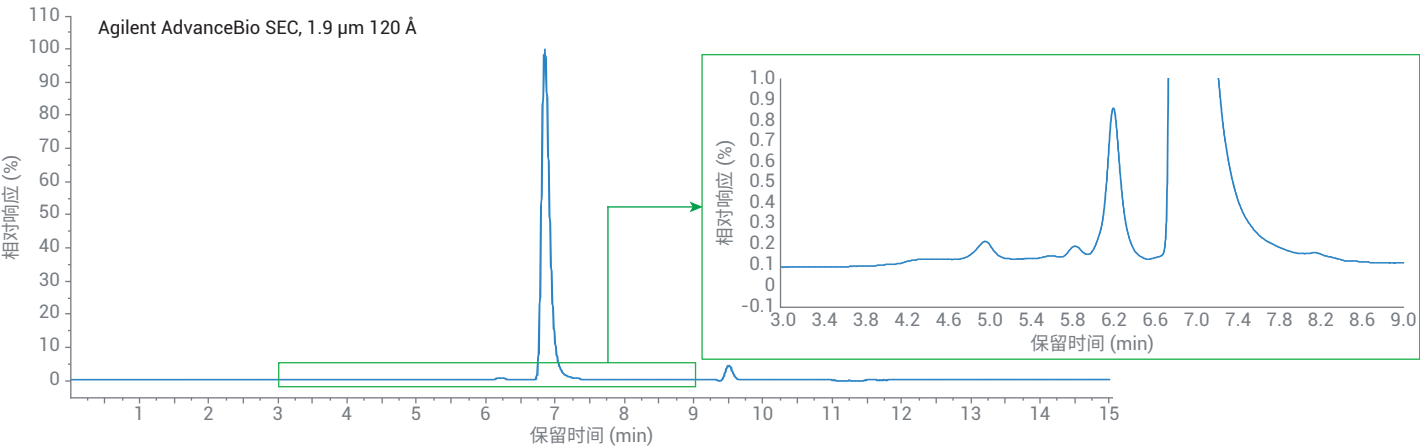


图 5. 生长激素 (rhGH) 的体积排阻色谱图

表 2. IFN α -2b 方法优化期间的峰形数据

NaCl (mmol/L)	峰宽 (min)	拖尾	分离度 HMW-单体	分离度 单体-LMW
100	0.20	2.88	1.94	1.98
150	0.18	2.65	2.25	2.31
200	0.16	2.52	2.26	2.66
250	0.15	2.39	2.84	2.86
400	0.14	2.08	3.32	3.59

图 6 展示了在三种不同的亚 2 μm SEC 色谱柱上获得的干扰素 α -2b 标准物质的体积排阻色谱图以及保留时间和色谱峰拖尾数据。利用 SEC 分离 IFN α -2b 杂质时，色谱柱性能的差异可能会导致分离度的不同，因此使用降解样品重复进行该实验。

对于干扰素 α -2b，有研究认为聚集体的形成涉及分子的部分去折叠，但部分去折叠的分子在一定程度上是稳定的^[3]。此外，O-糖基化也会降低这些分子的热稳定性^[4]。由于大肠杆菌细胞系不会引入糖基化变体，因此用于生产重组蛋白的细胞系的选择是一个关键参数。

INF α -2b 的最佳 HPLC 条件	
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 4.6 $\times$ 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	200 mmol/L 磷酸钠 + 250 mmol/L 氯化钠, pH 6.5
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	2 μL , 1 mg/mL
样品	干扰素 α -2b (INF α -2b) 热处理干扰素 α -2b (INF α -2b): 60 $^{\circ}\text{C}$ (保持 30 min)
总运行时间	15 min

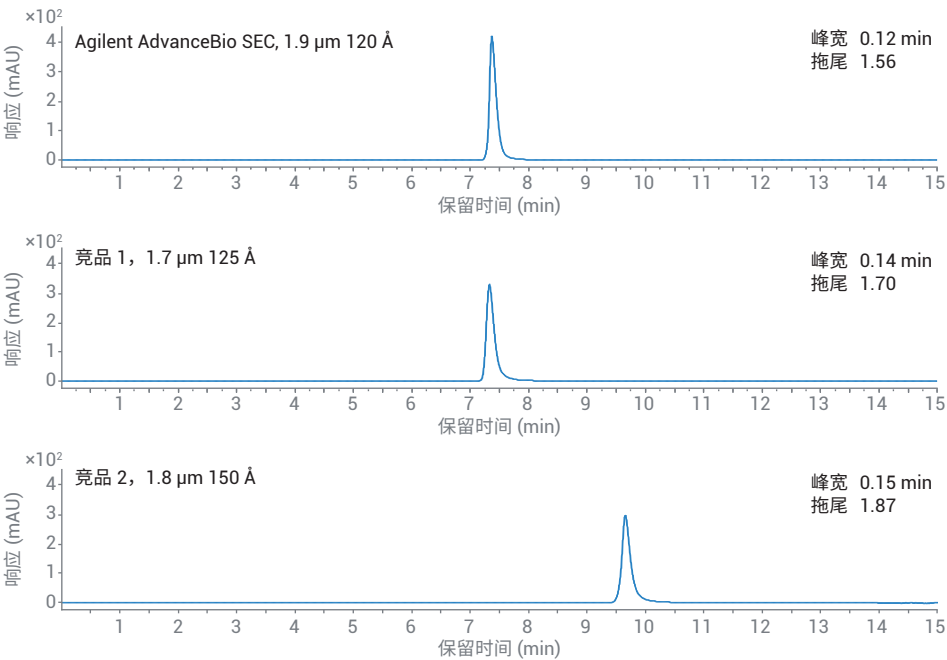


图 6. 干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

将干扰素 α -2b 样品进行热降解（加热到 60 °C，保持 30 分钟）可能会引入多种杂质，包括较早洗脱的高分子量物质（HMW）以及较晚洗脱的低分子量物质（LMW），如图 7 所示。与预期一致，无论

是 HMW 与单体之间还是单体与 LMW 之间，在 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱上均获得了最大分离度。在先前未降解样品的分离中，该色谱柱获得的峰最窄，峰拖尾最小。

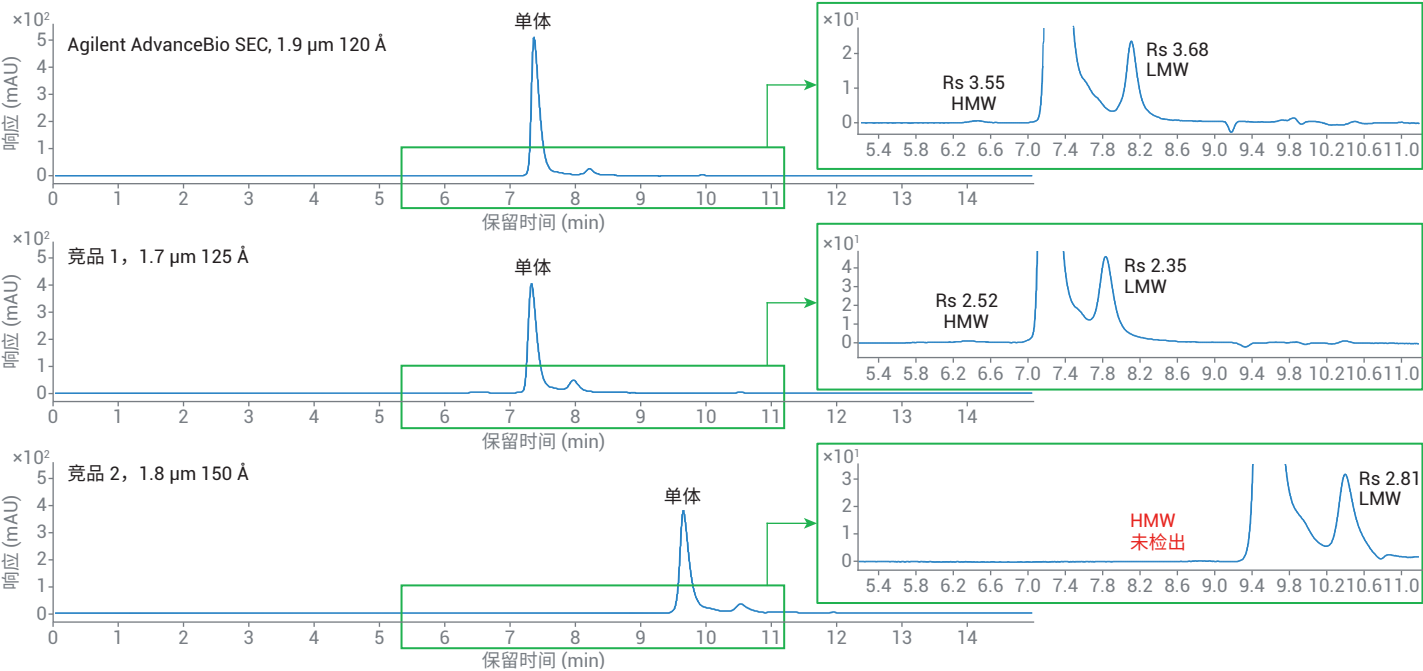


图 7. 热处理干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

结论

Agilent AdvanceBio SEC 提供一系列色谱柱尺寸和不同孔径，适用于不同大小的分子。与其他供应商类似填料粒径和孔径特征的色谱柱相比，独具特色的 AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱可实现对小分子治疗性蛋白质的高分离度 SEC 分析，展现出了优异的性能。

使用适当的标准品校准 AdvanceBio SEC 体积排阻色谱柱，可以确保您充分了解正确的工作范围，并且可以通过校准曲线估算未知分子的分子大小。但是，使用一系列标准品进行定期校准非常有益，可以用于监测色谱柱性能随时间的变化，从而及早发现潜在的问题。继而，可以采取纠正措施，最终缩短系统停机时间并提高分析效率。

参考文献

1. Bayol, A. et al. *Pharmeuropa Bio.* **2004**, 2004(1), 35–45
2. Advani, S. H. et al. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2010** (Jul–Sep), 31(3), 79–82
3. Sharma, V. K.; Kalonia, D. S. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 1721–1729
4. Johnston, M. J. W. et al. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28, 1661–1667

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.1110648148

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，2020
2020 年 3 月 30 日，中国出版
5994-1829ZHCN