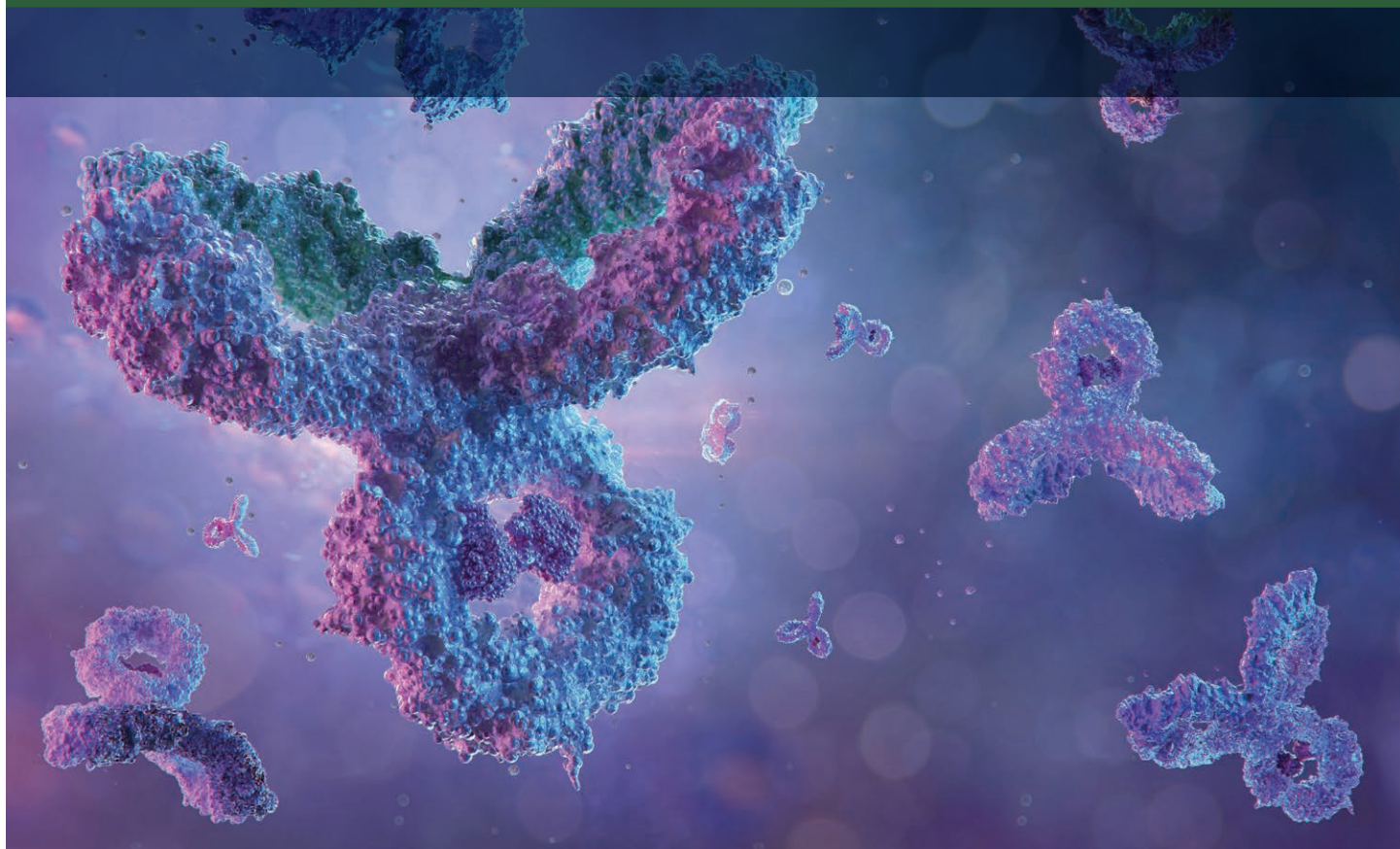


安捷伦生物色谱柱

聚集体/片段分析

应用文集



目录

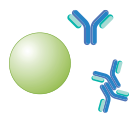
背景	2
入门指南	3
用于生物分子分析的体积排阻色谱操作指南 — 5991-3651CHCN	4
精选应用简报	22
提升 mAb 聚集体分析性能 — 5994-2709ZHCHN	22
单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析 — 5994-0828ZHCHN	29
使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析 — 5994-1739EN	33
使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体 — 5994-1869ZHCHN	42
小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析 — 5994-1829ZHCHN	51
共价高分子量胰岛素分析 — 5994-1566EN	59
校准 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 — 5991-7799EN	65
胰岛素生物仿制药与创新药物的体积排阻色谱分析 — 5991-6872CHCN	72
优化和执行蛋白质聚集体研究的完整工作流程 — 5991-7476CHCN	79
体积排阻色谱在存在阴离子表面活性剂的情况下的应用 — 5991-7989EN	85
更多应用简报	92
更多信息	92

聚集体/片段分析

背景

蛋白质经常容易由于环境条件刺激而发生聚集，形成二聚体和大分子量低聚物或高阶结构。这在生物治疗蛋白质的生产中尤其成问题，因为目标蛋白质需要承受的多种环境条件都可能诱导聚集。这些条件包括发酵过程中温度和浓度的变化，以及下游处理过程中 pH 和浓度的变化。甚至剪切力（来自叶轮叶片、搅拌器和其他工程设备）也可能导致应激相关聚集。聚集体，特别是分子量非常大的多聚体以至显微镜下可见颗粒的存在，可能会对健康有害。因此，必须量化和确定聚集水平，并予以限制。

体积排阻色谱是特别适合从高阶聚集体中分离单体峰的技术之一。使用合适的浓度检测器，例如 UV 或 DAD，可以相对直观地进行定量。抗体药物偶联物或 ADC 等更为复杂的分子可能更具挑战性，因为疏水性细胞毒性药物的存在可能导致许多体积排阻色谱柱无法发挥理想性能。为解决这一问题，安捷伦开发了一种新的固定相，可显著降低次级相互作用的风险。因此，新型 AdvanceBio SEC 色谱柱非常适合聚合物的快速分离和定量。



聚集体/片段分析

体积排阻色谱

各种生物分子分离的准确定量分析

AdvanceBio SEC 1.9 和 2.7 μm

功能全面，可应对常规和挑战性应用

属性	优势
亲水性聚合物涂层	避免次级相互作用
提高分析速度	按时交付结果
提高重现性	减少重复工作
提高灵敏度	即使是低浓度聚集体也能实现定量分析
1.9 μm 颗粒填料	极高分离度
带 PEEK 内衬的不锈钢硬件选项	适用于金属敏感型样品和检测的无金属流路

Bio SEC-3 和 Bio SEC-5

超大孔径和放大选项

属性	优势
与大多数水相缓冲液兼容	方法灵活
孔径选择范围广，包括 1000 \AA 和 2000 \AA	从肽到 VLP，选项丰富
分析和半制备规格	便于放大或缩小

入门指南

由于外部因素可能导致蛋白质聚集，因此样品前处理是聚集体分析中最重要的步骤之一。需要确保蛋白质完全溶解在流动相中，同时不会受到可能改变聚集水平的因素影响，例如超声处理、温度、pH 和过度浓缩。体积排阻色谱是一种依赖于等度洗脱的技术，相对比较简单直接。流动相条件应能确保蛋白质与色谱柱固定相之间不会发生次级相互作用。通常使用水相缓冲液，例如在中性 pH 下的 150 mmol/L 磷酸钠或 PBS（磷酸盐缓冲液）。这种流动相溶液同时也为细菌生长提供了理想条件。因此，必须定期制备新鲜缓冲液，并在使用前用 0.2 μm 过滤器过滤。在任何情况下，都不能将未使用的缓冲液长时间留在仪器上。

若能避免在流动相中添加叠氮化钠等防腐剂，就可以使用低波长 (210–220 nm)，从而大大提高该技术的灵敏度。储存色谱柱时建议使用防腐剂，例如 20% 乙醇。但必须小心谨慎，因为含有机改性剂的流动相粘度通常会大幅增加，可能导致色谱柱损坏。

生物分子分析体积排阻色谱：操作指南

SEC 成功分析指南

利用生物分子在溶液中的体积而进行色谱分离的方法即为体积排阻色谱 (SEC)。与其他色谱模式不同，SEC 的分离不依靠分析物和色谱柱固定相之间的任何化学作用。这是从多种干扰物（包括聚集物、赋形剂、细胞碎片及其他降解产生的杂质）中分离和分析完整蛋白质的理想解决方案。因此，SEC 广泛应用于开发和生产过程中的生物治疗性分子表征。

在本指南中，我们将讨论 SEC 分离、溶质大小和分子量的影响、色谱柱选择、流动相重要注意事项，以及 SEC 的使用规则等内容。



分离方法简单直接

利用 SEC，分子可按其在溶液中的尺寸从大到小依次分离。非常大的分子不会进入填充柱床，会在死体积内最先洗脱。大小适中的分子依据其体积的不同可以不同程度地渗透进微孔中（图 1），而最小的分子在微孔结构中扩散最深，从而最后洗脱。

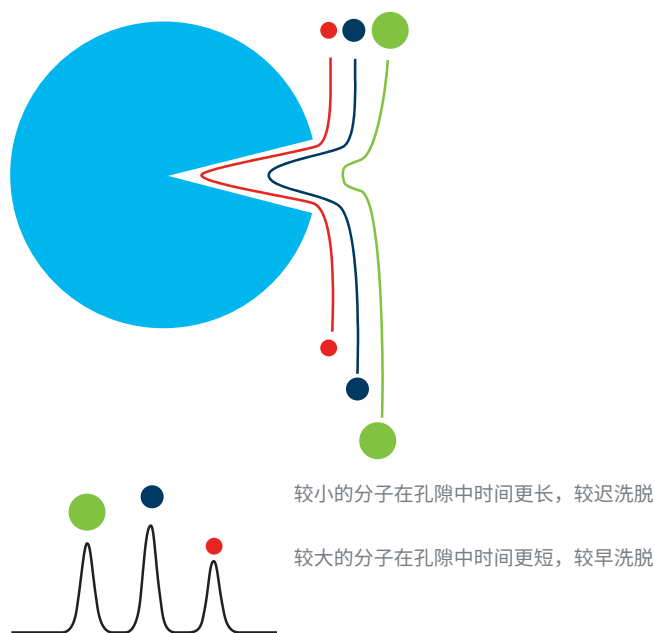


图 1. 不同体积的分子以不同程度渗入固定相孔隙内

体积排阻色谱法适用于分离和定量蛋白质混合物，因此是重组蛋白生产过程中的一种重要质控手段。包括测定聚集体（二聚体、三聚体、四聚体等）以及从较大分子量的蛋白质中分离低分子量的赋形剂和杂质（图 2）。

了解并控制治疗性蛋白中的聚集体十分必要，因为其会影响药物有效性、保质期甚至会导致潜在的严重免疫反应。ICH(Q6B) 等法规明确指出必须分离并定量目标产品中的聚集体。

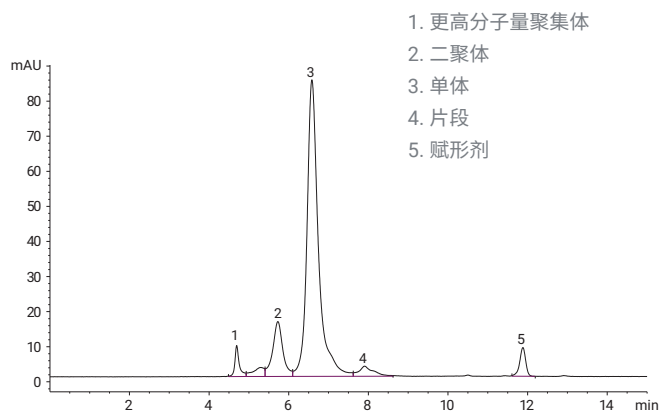


图 2. IgG 聚集体和赋形剂的分离

完整 IgG 单体和二聚体的分离条件

参数	值
样品:	多克隆 IgG
样品浓度:	150 mmol/L 磷酸钠缓冲液
色谱柱:	Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å 7.8 × 300 mm
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流速:	1.0 mL/min
温度:	室温
检测器:	UV, 220 nm
进样量:	5 µL

洗脱顺序通常由分子量大小决定，分子量最大的分子最先被洗脱，但 SEC 真正的分离机制是基于分子在溶液中的体积。大多数蛋白是致密的球形结构，但一些蛋白分子是圆柱形，因此可能会比预期洗脱更早，这是由于它们在溶液中有着更大的流体动力学半径（图 3）。此外，不同的流动相也会影响洗脱顺序，因为溶液中分子体积会改变（流体动力学半径或回转半径）。

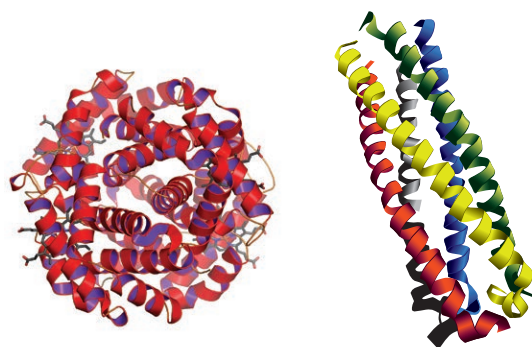
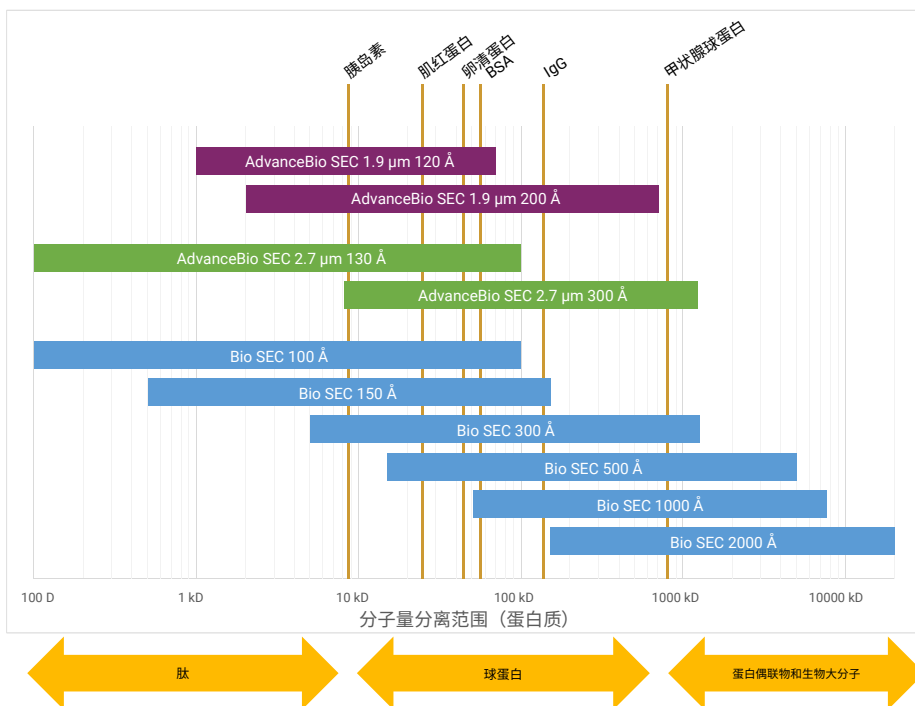


图 3. 致密型球状蛋白与圆柱形蛋白的对比

SEC-UV/DAD 方法开发指南

针对生物分子、聚集体分析（肽、多肽和蛋白质）的基于体积的分离选择初始色谱柱和条件。



推荐的初始分离条件

色谱柱: AdvanceBio SEC 或 Agilent Bio SEC-5
流动相: 150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0*
梯度: 10–30 min 等度洗脱
温度: 推荐: 10–30 °C, 最高: 80 °C

流速: 7.8 mm 内径色谱柱: 0.1–1.25 mL/min
4.6 mm 内径色谱柱: 0.1–0.4 mL/min
2.1 mm 内径柱: 0.05–0.1 mL/min
样品量: ≤ 总柱体积的 5%
*可以使用高盐和低盐的其他水相缓冲液

如需了解其他信息, 请参见应用简报: *蛋白质高效体积分离的最佳参数优化* (出版号 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

得到初始色谱图后, 可能需要进行某些改变以改善分离度、保持蛋白质溶解性, 或降低样品与色谱填料之间的相互作用。可以上下调整流动相的离子强度, 以便获得更出色的分离。通常, pH 值也可以调节 ± 0.2 个单位。如果还需要进一步优化, 上下调整的范围则应相应扩大。还可以改变温度或添加有机溶剂。

对于需要加盐的方案, 以下为常用缓冲液:
100–150 mmol/L 氯化钠溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
100–150 mmol/L 硫酸钠溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
50–100 mmol/L 尿素溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0。也可以用其他类似的盐 (如 KCl) 和盐酸胍。

pH 范围: 2.0–8.5

可添加的有机溶剂包括:

5%–10% 乙醇 (或其他类似溶剂, 如甲醇或乙腈) 溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0; 5% DMSO 溶于 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0。请注意: 使用高粘度流动相时, 应当降低流速以保持压力不超过最高运行压力。

温度:

SEC 分离通常在 10–30 °C 下进行。蛋白质和多肽的分离需要较高温度, 以改善蛋白质和疏水性多肽的分离度和回收率。为尽可能保持温度敏感型蛋白质的最大生物活性, 可在低温环境中运行 SEC。Agilent Bio SEC 色谱柱的最高运行温度为 80 °C。注意高温会使蛋白质变性。

SEC 的仪器注意事项

SEC 的分离原理意味着洗脱体积或保留时间对分析结果至关重要。只有高性能的仪器才能确保高精度和重现性。最好用等度泵或梯度泵运行等度模式，同时可采用示差折光 (RI) 检测器以及更为常规的 UV 或 DAD 检测器。为确保基线稳定，特别是当使用 RI 检测器时，强烈建议对流动相进行在线脱气并使用柱温箱。高温下运行可以增加扩散系数，从而提高分离度、重现性并降低柱压。因此对于高性能系统而言，柱温箱必不可少。

即使复杂溶剂条件也能确保稳定可靠运行

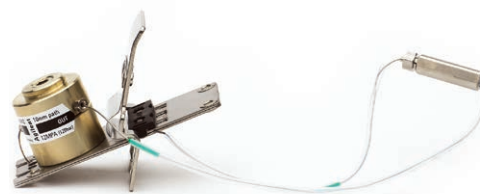
分析生物分子时通常使用 2 mol/L NaCl 或 8 mol/L 尿素等高盐浓度的缓冲液且使用 1-13 的极端 pH 值给液相色谱仪带来了严峻的挑战。1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱采用的特殊设计可轻易应对这些严苛的溶剂条件。溶剂运送系统使用耐腐蚀的钛材质，样品流路采用非金属材料，由此建立了极为稳定的仪器，不仅可以保护您的样品，同时还能保护您的仪器投资。此外，检测器专为生物分子分离而设计，不会影响蛋白质分析、峰形和回收率。

分析过程中确保蛋白质稳定

加热会使蛋白质变性，所以样品在整个液相流路中保持恒定的温度非常重要。使用附加的控温器可有效冷却配有惰性样品定量环和陶瓷进样针的安捷伦生物惰性自动进样器。柱温箱中的生物惰性热交换器可保持温度恒定。



Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统



配有 RFID 标签的生物惰性流通池，10 mm，13 μ L（部件号 G5615-60022）

安捷伦提供了多种适用于蛋白质的生物惰性流通池，可确保在不同条件下进行可靠的蛋白质分析。对于 DAD，新型最大光强卡套式流通池 LSS 将降低光强度，确保样品完整性。如需了解关于流通池选件的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/bioflowcells

软件解决方案提供全新见解

使用体积排阻色谱时，有多种可选软件为您提供支持：

- HPLC 软件：Agilent OpenLAB CDS ChemStation 软件有助于获取、查看和组织色谱数据，并执行定量分析
- GPC/SEC 软件：可作为安捷伦 GPC/SEC 系统的配置部件，提供基于分子量的更多信息
- 缓冲液顾问软件：快速简单地创建盐梯度和 pH 梯度，免除繁琐且易于出错的方法开发步骤，如缓冲液前处理、缓冲液混合及 pH 测定



体积排阻表征步骤

样品前处理

体积排阻色谱的样品前处理方法与 HPLC 蛋白质分析的样品前处理方法类似。最重要的一点是样品必须能够溶于洗脱液，且自身可在流动相条件下实现良好分离。由于 SEC 分离与 HPLC 的其他形式相比具有更大的色谱柱尺寸与更小的线速度从而具有相对较低的流速（见下文的“色谱柱尺寸”部分），因此样品浓度和进样量需要大于常规量。为避免损害色谱柱，建议在使用前进行样品过滤或离心以除去颗粒物。然而过滤无法解决样品溶解度低的问题，此时需要更换洗脱液。

为进行有效的样品前处理，确保溶解样品的方法不会改变样品本身的性质也很重要。某些蛋白质可能会在压力条件下发生聚集（形成二聚体或更大分子量的多聚体）或解离（形成更低分子量的亚基）。这些条件包括反复冻融、极端温度、超声甚至浓缩。请参见第 5 页的方法开发指南了解详细信息。

Captiva 低蛋白质结合过滤器

无论您使用何种样品前处理方法，采用一种低蛋白结合过滤器对样品进行过滤都是一个不错的选择。

安捷伦的 PES 过滤器在蛋白质相关的过滤中提供优越和一致的低蛋白质结合力。在大多数液相色谱分析中，PES 滤膜相对 PVDF 滤膜而言是一种更好的选择。对于常见的液相色谱溶剂，安捷伦的 PES 具有与 PVDF 过滤器相似的兼容性，而在蛋白质结合力和清洁度方面比 PVDF 更胜一筹。更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/filtration

Captiva PES 过滤器

直径 (mm)	孔径 (µm)	认证	外壳	部件号
4	0.45	LC	聚丙烯	5190-5095
4	0.2	LC	聚丙烯	5190-5094
15	0.2	LC	聚丙烯	5190-5096
15	0.45	LC	聚丙烯	5190-5097
25	0.2	LC	聚丙烯	5190-5098
25	0.45	LC	聚丙烯	5190-5099



色谱柱选择

色谱柱尺寸

SEC 色谱柱尺寸通常大于其他色谱所用的色谱柱尺寸，而流速及线速度却相对较小。SEC 标准色谱柱尺寸为 7.8×300 mm，流速 1.0 mL/min，而反相色谱柱常为 2.1×150 mm 或 4.6×150 mm，线速度为 SEC 的 2-3 倍。这不是色谱柱尺寸决定的，而是 SEC 分离原理所致。

进行 SEC 分离时，样品浓度不会增加，而样品浓度增加这一现象在其他色谱技术中较为常见，原因是分析物会被固定相吸附或是发生相互作用。因此，SEC 的进样量要大得多 (5-20 μ L)，且浓度通常较高 (1-4 mg/mL)。每根色谱柱的分析时间通常为 10-12 分钟 (假定常规 7.8×300 mm 色谱柱流速为 1.0 mL/min)，色谱峰通常很宽，因此无需较高的数据采集速率。蛋白质聚集体的对比或定量要用到 HPLC 软件。获得多分散聚合物的分子量分布信息需要使用特定的 SEC 软件。

最为重要的是要通过定期校准来了解所选色谱柱的性质。使用足够大的、无法渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的排阻极限。同样地，使用非常小的、可渗入任何孔隙的分子，便可测定色谱柱的总渗透极限。然后，您需要确保所进行的分离处于这两个极限值之间。如果样品的色谱图中存在排阻物质或在总渗透点处洗脱的物质，这表明需要选用其他孔径的色谱柱进行分析。



较短的色谱柱可提高分析速度

通常需要使用 300 mm 长的色谱柱以获得所需的分离度。不过为了提高分离速度，可以考虑使用更短的色谱柱。使用 150 mm 柱长的色谱柱可使分离时间缩短一半，但分离度会降低。如果需要通过实现高通量，通常可在不超过反压限值的前提下采用更短的色谱柱和更高的流速，从而可进一步缩短分析时间。见图 5。

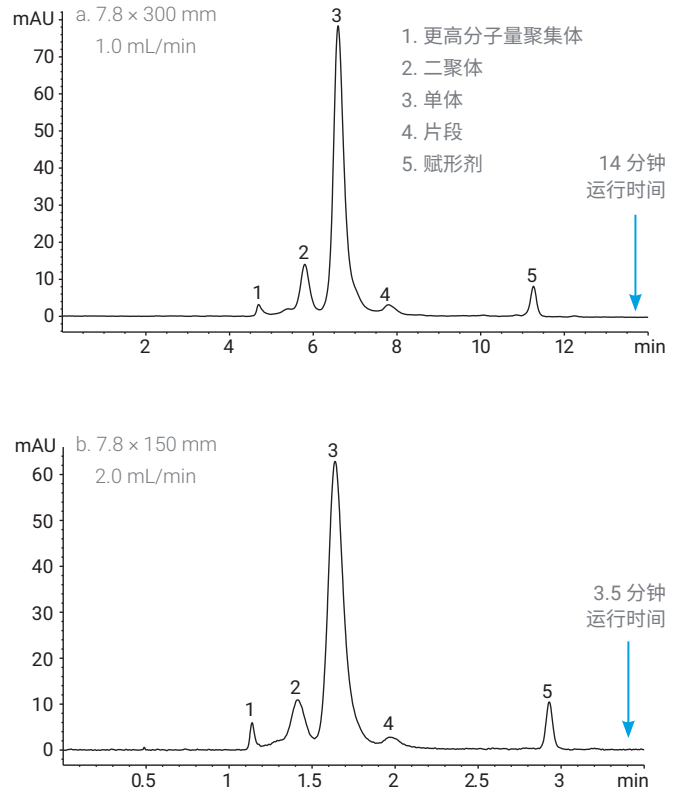


图 5. 比较 300 mm 与 150 mm Advantech SEC 色谱柱的多克隆 IgG 分析结果，以表明可以节省的时间

色谱柱填料选择

测定样品溶解性以及确定分离流动相（水、缓冲液或有机溶剂）后，根据分子的类型和尺寸选择合适的体积排阻色谱柱。对于分子量分布范围较宽的聚合物分子，如肝素、淀粉或纤维素，常使用装填聚合物吸附剂的色谱柱。硅胶基固定相最适于分析蛋白质和分子量不均一的分子（表 1）。

Agilent Bio SEC 色谱柱用于分离包括蛋白聚集体在内的生物分子，而安捷伦 GPC 色谱柱用于包括多糖分子量测定在内的天然聚合物分析。需要记住，蛋白质中含有众多氨基酸带有不同侧链基团，如酸性、碱性、疏水性、中性/亲水性。为了防止它们与硅胶色谱柱的固定相相互作用，需要在流动相中加入缓冲液。

安捷伦会针对色谱柱给出适合的分子量范围，理想情况下您所选用的色谱柱应该处于该操作范围的中间区间。



Agilent Bio SEC 色谱柱用于分离包括蛋白聚集体在内的生物分子，而安捷伦 GPC 色谱柱用于包括多糖分子量测定在内的天然聚合物分析。

体积排阻色谱 (SEC)

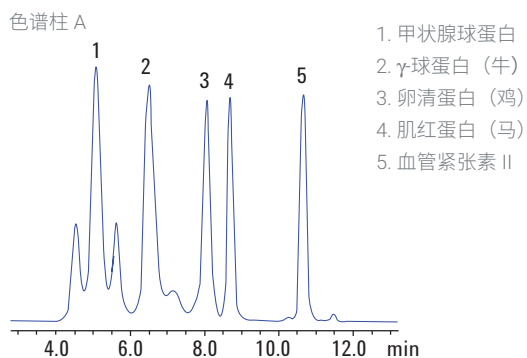
表 1. 安捷伦提供各种 SEC 色谱柱，可满足您的所有体积排阻分析需求

应用	安捷伦色谱柱	说明
蛋白质		
mAb、蛋白质和多肽的 SEC-UV/DAD、非变性 SEC/MS 或 LS 分析	Agilent AdvanceBio SEC	一种创新技术，能够提供高分离度，避免样品重复分析，并能缩短分析时间，从而提高实验室分析效率。可选用于非变性 SEC-MS 的带 PEEK 内衬的色谱柱。
生物大分子及含有多种分子量组成的样品	Agilent Bio SEC-5	多种孔径可供选择（100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å 和 2000 Å），能够覆盖更宽的分析物范围。
球蛋白，抗体	ProSEC 300S	高盐浓度下进行蛋白质分析的理想色谱柱。
蛋白质，球蛋白	ZORBAX GF-250/450	在方案仍要求使用 USP 指定产品 L35 时应采用的老式产品。

孔径

相对于其他生物聚合物而言，蛋白质的体积相对较小且致密，所以 300 Å 孔径是进行初始色谱柱选择的一个不错选择。图 6 对比了使用不同孔径的色谱柱分离含 5 种蛋白质混合物的参比标样和多克隆 IgG 样品，结果清楚表明了孔径对分离度的影响。

Agilent AdvanceBio SEC 蛋白质标准品



条件

参数	值
色谱柱 A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5301)
色谱柱 B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5350)
样品:	Agilent AdvanceBio SEC 蛋白质标准品 (300 Å, 部件号 5190-9417 和 130 Å, 部件号 5190-9416)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm

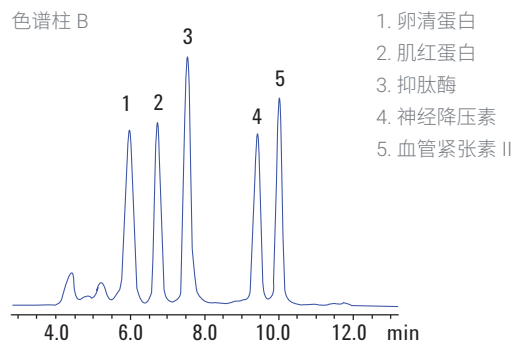
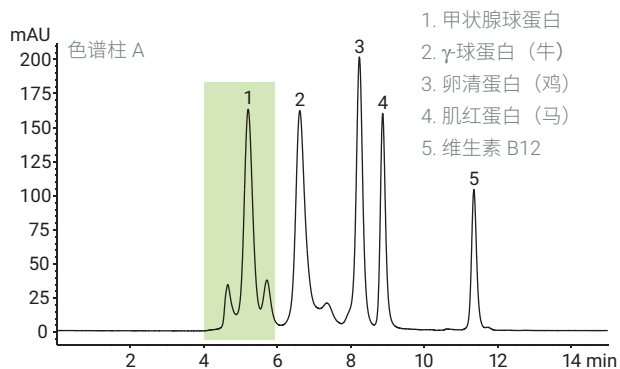


图 6. 比较孔径对 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 标准品分离度的影响。绿色区域突出显示了两种孔径下的不同分离度。分析较大蛋白质时需使用较大的孔径

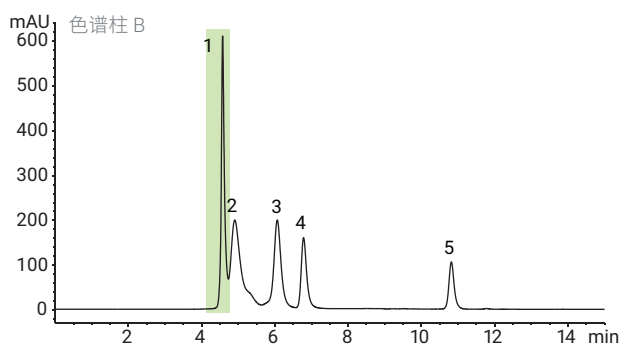
使用 300 Å 孔径的色谱柱时，最大体积的蛋白质甲状腺球蛋白和 IgG 二聚体可实现分离，但随着孔径的减小，最大的蛋白质均被排出色谱柱，因此无法进行有效分离。

BioRad 凝胶过滤混标



条件

参数	值
色谱柱 A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5301)
色谱柱 B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1580-5350)
样品:	BioRad 凝胶过滤混标
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm



评价 SEC 的渗透范围

对于蛋白质分离，必须了解，SEC 的分离机制是依据溶质在溶液中的体积而非它们的分子量。比较蛋白质/多肽与支链淀粉/多糖及 PEG/PEO 的校准曲线时，这一点尤为明显，如图 7 所示。支链淀粉/多糖与 PEG/PEO 的校准曲线非常类似，而蛋白质/多肽的曲线就发生了偏移且形状不同。蛋白质由形成三维结构的复杂多肽链组成。而这些结构会受到它们所暴露环境的影响，如 pH 值或离子强度。氨基酸链会形成最适宜的形状，导致蛋白质的结构和体积发生变化。

为了证实洗脱时间取决于体积而非分子量，查看分子量约 50000 左右的校准物的保留时间，可发现其中存在显著差异（图 8）。PEG 在 7 分钟左右时洗脱，多糖在 7.5 分钟左右时洗脱，而蛋白质的洗脱时间则约为 9.5 分钟。

这清楚地表明 SEC 的分离机制是基于分子的实际体积而非分子量。因此，当使用校准曲线时需要说明所使用的校准物。例如，可说明目标样品相当于分子量 50000 的支链淀粉/多糖。第 16 页中的先进检测器就不存在这种相对性。

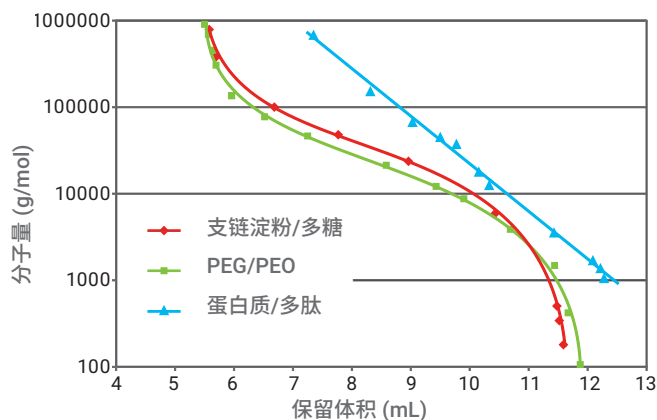


图 7. 三种类型的校准物所得的校准曲线对比

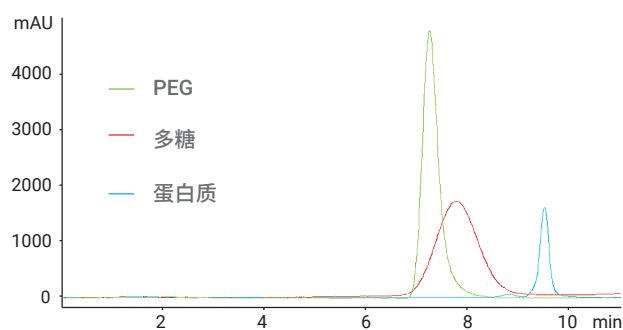


图 8. 分子量相似的校准物的叠加色谱图



130 Å AdvanceBio SEC 校准标样 (部件号 5190-9416, 130 Å AdvanceBio SEC 校准标样, 2 mL/瓶)

含 5 种精选蛋白质（卵清蛋白、肌红蛋白、抑肽酶、神经降压素、血管紧张素 II，分子量范围为 43–1.1 kDa）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 130 Å AdvanceBio SEC 色谱柱。该标准品可用于常规色谱柱校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

300 Å AdvanceBio SEC 校准标样 (部件号 5190-9417, 300 Å AdvanceBio SEC 校准标样, 2 mL/瓶)

含 5 种精选蛋白质（甲状腺球蛋白、 γ -球蛋白、卵清蛋白、肌红蛋白、血管紧张素 II）的蛋白质混合物，适用于校准 Agilent 300 Å AdvanceBio SEC 色谱柱。该标准品可用于 200 Å 和 300 Å AdvanceBio SEC 色谱柱的常规校准，以确保涉及蛋白质纯化与分析的多种应用可在理想的系统性能下进行。

粒径

选择色谱柱时，粒径也是一个重要考虑因素。较小的粒径可提供更有效的分离，从而实现更高的分离度，但是存在较大蛋白质降解（剪切/变形）的风险。图 9 比较了 Agilent Bio SEC 色谱柱 3 μm 和 5 μm 填料颗粒。如果样品前处理和洗脱液前处理过程中不够仔细，会造成色谱柱反压升高、色谱柱堵塞的风险。推荐采用过滤器去除不溶物质和碎片。使用保护柱或在线过滤器还可延长色谱柱使用寿命。

3 μm 和 5 μm SEC 填料颗粒的比较

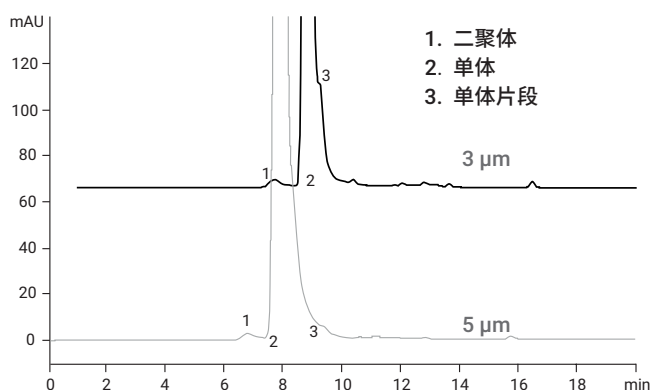


图 9. Agilent Bio SEC-3 和 Agilent Bio SEC-5 填料颗粒的对比。3 μm 柱具有更出色的分离效果

色谱柱内径

根据样品量选择色谱柱内径也十分重要。如果待分析物质的量很少，采用 4.6 mm 内径色谱柱（流速 0.35 mL/min）即可。但使用更小内径的色谱柱时，尽可能减小系统体积非常重要，可以避免过度扩散和分离度降低。当使用水相洗脱液时，SEC 被认为是一种非变性技术，极为适用于分离复杂样品或样品成分，以便进一步分析。Agilent SEC-3 和 SEC-5 产品系列的 21.2 mm 色谱柱等大内径色谱柱可用于通过分析型 HPLC 系统进行实验室制备型分离。

单克隆抗体分析条件

参数	值
色谱柱 A:	Bio SEC-3, 300 \AA 7.8 \times 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2511)
色谱柱 B:	Bio SEC-5, 300 \AA 7.8 \times 300 mm, 5 μm (部件号 5190-2526)
样品:	人源化单克隆抗体
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7
流速:	1 mL/min
检测器:	UV, 220 nm



Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 7.8 \times 300 mm 和 4.6 \times 300 mm

方法参数

流速

对有些应用而言，分析速度十分关键。采用短色谱柱（如采用 150 mm 替代常规 300 mm）和/或提高流速均可缩短分析时间。但这两种方法同时也会降低分离度，这是因为 SEC 依靠分子不断扩散进入和排出色谱柱的孔隙中而形成不同的路径长度，从而实现分离。尽管如此，如图 10 所示，使用 150 mm 长色谱柱在 2 mL/min 流速下分析 IgG 二聚体和单体时，仍可在 4 分钟内获得定量分析所需的足够分离度。

条件

参数	值
色谱柱:	AdvanceBio SEC 300 Å 7.8 × 150 mm, 2.7 μm (部件号 PL1180-3301)
样品:	IgG (2 mg/mL)
洗脱液:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.5、1.0、1.5 mL/min (52、102、152 bar)
检测器:	UV, 220 nm
进样量:	5 μL

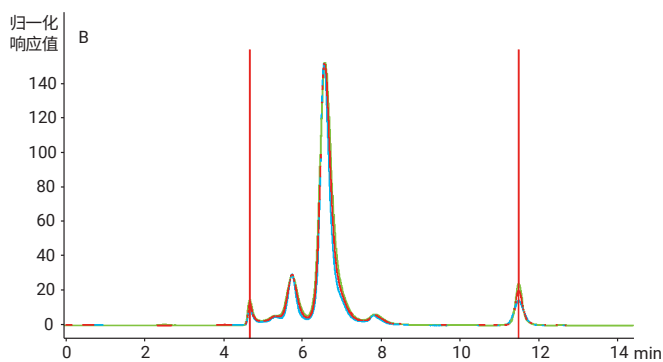
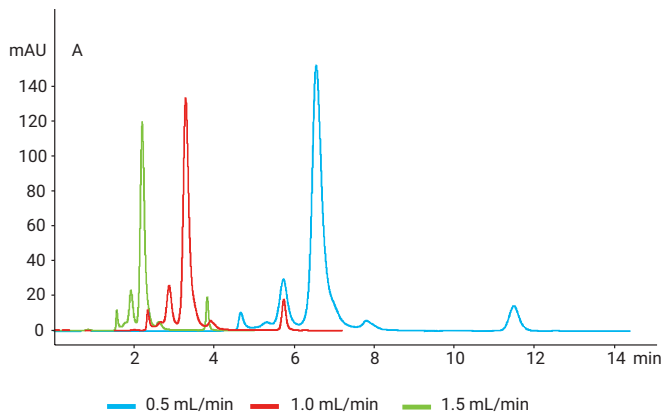


图 10. 提高流速可将分析时间从 12 min 缩短至 4 min (A)。将保留时间进行归一化处理后叠加时 (B)，可明显发现保留时间是一致的，且几乎没有损失分离度

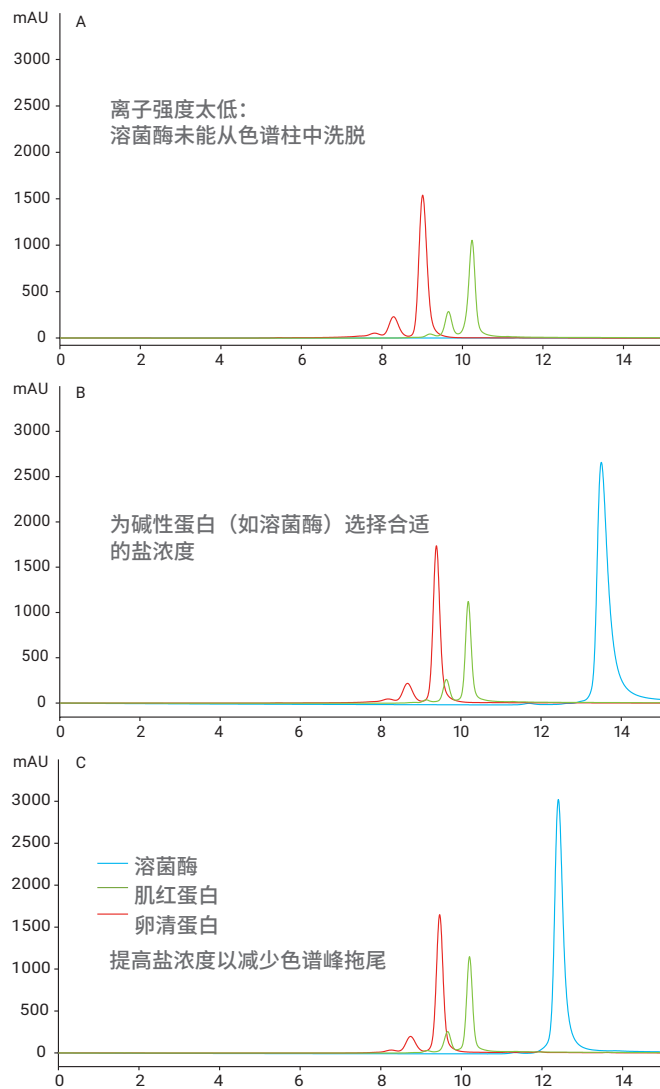
SEC 方法的故障排除

问题	来源	解决方案
回收率低于预期，或峰形过宽	疏水性分析物	在流动相内加入少量 (10%–20%) 有机改性剂 (乙腈或甲醇)
色谱峰出现在不应出现的地方 (根据分子量判断)，或色谱峰拖尾	离子相互作用或碱性蛋白	增加离子强度，使盐浓度达到 50–100 mmol/L 之间；加入磷酸盐缓冲液
峰形差	非特异性吸附	增加盐浓度或试用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
分析物保留/分离度差	孔径小于分子体积	检查色谱柱孔径；详见第 6 页和第 12 页

流动相选择

次级相互作用会导致分离不佳

可以通过进行方法优化,来防止次级相互作用的发生。这样的相互作用可能会导致迟于预期的分析物洗脱, 出现分子量较低的假象。稍微调整流动相组成: pH 值、离子强度或有机改性剂, 就有利于解决类似问题 (图 11)。还可能需改善孔径选择、串联色谱柱、降低分析流速或改变柱温来获得期望的分离效果。



条件

参数	值
色谱柱:	Agilent Bio SEC-3, 300 Å 4.6 × 300 mm, 3 μm (部件号 5190-2513)
样品:	蛋白质 (1 mg/mL 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7)
仪器:	150 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0
流速:	0.35 mL/min
检测器:	UV, 220 nm
A: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 50 mmol/L NaCl B: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 100 mmol/L NaCl C: 洗脱液 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 + 400 mmol/L NaCl	
进样量:	5 μL

50 mmol/L NaCl 溶于
20 mmol/L 缓冲液

400 mmol/L NaCl 溶于
20 mmol/L 缓冲液

图 11. 离子强度过高或过低对所需分离度的影响

校准

选择了色谱柱后，需要使用已知分子量的标样进行校准。每次更改色谱柱或流动相后，都需要再次校准。保留时间对分子量作图便得到校准曲线（图 12）。根据目标分子选择合适的标样极其重要。对蛋白质分离而言，需采用蛋白质分子量标样。对多糖分离而言，需采用支链淀粉分子量标样。

蛋白质	MW	保留体积				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
甲状腺球蛋白	670000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-球蛋白	158000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
卵清蛋白	45000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
肌红蛋白	17000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
核糖核酸酶 A	12700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
维生素 B12	1350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
尿嘧啶	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

理想情况下，标样应溶解于流动相，且需确保样品完全溶于流动相。如果溶液浑浊，则需要进一步处理。进样前应采用离心或过滤以除去不溶物。而物理方法可能会改变分子量组成，因此有必要通过改变流动相条件以提高样品溶解度。

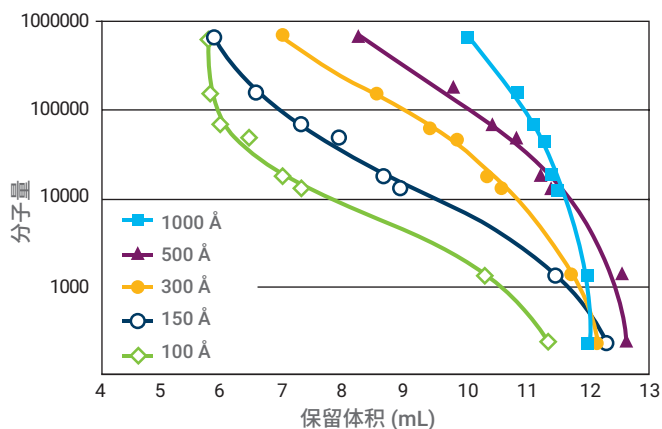


图 12. 将保留时间对分子量作图得到的校准曲线

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent Bio SEC-5 7.8 × 300 mm, 5 μm (部件号 5190-2521)
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速:	1.0 mL/min
检测器:	UV



先进的检测技术

需要进一步考虑的因素包括检测器的选择。UV 或二极管阵列 (DAD) 检测器常用于蛋白质分离。多肽和蛋白质通常可在 220 nm 下获得最佳结果 (最高灵敏度)。一些缓冲液或有机改性剂可能在低波长处背景吸收过高, 这时有必要选择 254 nm 或 280 nm。UV 检测的一个缺点是有些分子不具有发色团, 而由于分析物为等度洗脱, 则可改用 RI 检测器。高级光散射检测器的加入可显著提高 SEC 的性能。静态光散射检测可准确测定摩尔质量, 无需色谱柱校准, 还可避免不良的相互作用。联用动态光散射检测还可用于分子体积大小研究。光散射检测大大提高了灵敏度, 可用于发现含量极低的聚集体 (图 13)。选择死体积较低的检测器非常重要, 可确保获取额外信息且丝毫不损色谱性能。

在特殊情况下, 质谱 (MS) 可以在非变性模式 (标准水性缓冲液流动相) 或变性 (流动相中包含有机溶剂) 条件下与 SEC 一起使用。在使用质谱的情况下, 窄径色谱柱因流速较低而更常用于非变性模式质谱分析。在某些情况下, 带 PEEK 内衬的色谱柱有助于消除不利的样品-金属相互作用。针对这些情况, AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱可提供 2.1 mm 内径和带 PEEK 内衬的规格。

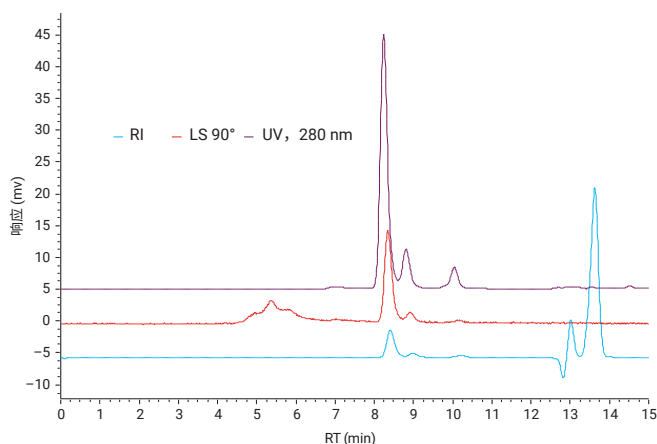


图 13. 使用不同检测器对蛋白质分离的检测结果

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 300 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm
样品:	降解的单克隆抗体
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统联用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 GPC/SEC 系统
流动相:	150 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0
流速:	0.8 mL/min
温度:	30 °C
检测器:	UV, 280 nm + RI + LS 90°
进样量:	5 μL

蛋白质偶联物

治疗性蛋白质容易在开发过程的表达、再折叠、下游处理、制剂、灭菌和储存等所有阶段发生聚集和降解。尽管聚集体/降解产物的含量极低，但它们仍可对生物药物产生严重影响，如导致活性丧失、降低溶解度以及增加免疫原性。体积排阻色谱是表征蛋白质聚集体的标准方法，法规文件申报和审批中也明确要求使用体积排阻色谱。

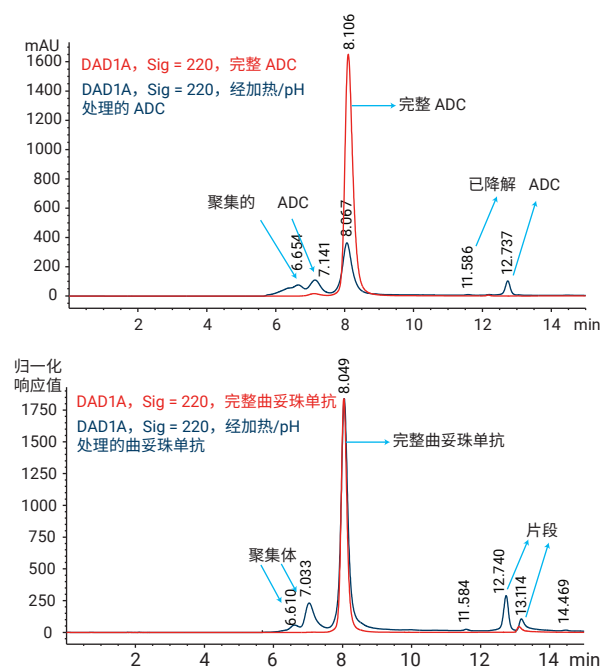


图 14. mAb 和疏水性较强的 ADC 均使用同一种水性流动相

为改善给药方式并提高半衰期与效价，可将包括单克隆抗体在内的蛋白质进行偶联。将水溶性聚合物（如聚乙二醇）与蛋白质偶联可提高药物活性、延长药物在血液中的半衰期并降低免疫原性。最近，抗体药物偶联物 ADC 越来越受到关注，期间研究人员将单克隆抗体与细胞毒素剂偶联以进行靶向给药并增强治疗效果。偶联后同样需要进行聚集体研究，因为样品特性的改变将为 SEC 分离带来更大挑战。需使用具有低非特异性结合的色谱柱（如 AdvanceBio SEC）分析抗体和 ADC，流动相可使用水性流动相。见图 14。

条件

参数	值
色谱柱:	AdvanceBio SEC 300 Å 7.8 × 300 mm, 2.7 μm
仪器:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统
流动相:	PBS, 50 mmol/L 磷酸钠 + 150 mmol/L 氯化钠, pH 7.4
TCC 温度:	室温
进样量:	10 μL
流速:	0.8 mL/min
检测器:	UV, 220 nm

为您的成功之路指引方向

www.agilent.com/chem/navigator

安捷伦液相色谱和样品前处理在线选择工具中包括品种丰富的生物色谱柱和小分子色谱柱系列产品，帮助您针对应用选择合适的色谱柱。

在线选择工具为您提供四种简单的搜索选项：

- 按部件号搜索，液相色谱柱和样品前处理产品交叉引用信息将帮助您寻找合适的安捷伦替换部件



- 按化合物搜索，使用下拉列表
- 按 USP 方法搜索
- 按色谱柱搜索，根据所用的色谱柱方法提供建议

样品前处理

- 理想情况下，样品应溶解于流动相
- 如果样品浑浊，可能需要改变流动相条件
- 过滤或离心可使样品澄清，但这些方法会改变样品的分子量组成
- 为溶解样品，可通过略微加热、漩涡振荡，或有时使用超声，但需要小心使用，因为这会改变分子量组成
- 小心仔细，确保样品不会在储存中发生变化
- 样品需新鲜制备并尽快用于分析
- 细菌会在缓冲液中快速生长
- 高浓度样品可能会逐渐发生变化，导致聚集甚至沉淀



色谱柱选择

- 为确保样品完整性，需使用长柱以较低的流速进行 SEC 分离
- 色谱柱长度通常为 150 或 300 mm
- 7.5 或 7.8 mm 内径的色谱柱常规流速为 1.0 mL/min，4.6 mm 内径的色谱柱常规流速为 0.35 mL/min，2.1 mm 内径的色谱柱常规流速为 0.1 mL/min
- 通常采用串联色谱柱以提高生物聚合物应用的分离度
- 使用较小填料粒径可提高蛋白质应用中的分离度
- 采用较小填料粒径的 150 mm 色谱柱可缩短分析时间

色谱柱填料选择

- 分析物不得与色谱柱填料发生非特异性相互作用
- 硅胶基质吸附剂可用于分析多肽和蛋白
- 聚合物基质吸附剂可用于分析生物聚合物

色谱柱参数

- **孔径** — 取决于样品的分子量范围，避免排阻出样品成分，尽可能增加所需分离区域的体积
- **粒径** — 填料粒径越小分离度越高（但反压更高）
- **色谱柱长度** — 平衡好分离度及分析时间
- **色谱柱内径** — 使用较小内径的色谱柱可减少溶剂损耗和进样量



流动相

- 流动相应包括缓冲液/盐以克服离子相互作用，但盐度太高会导致疏水作用
- 请勿改变分析物，以避免蛋白质降解/聚集等现象的发生
- 新鲜配制流动相并迅速使用，室温下存储的稀缓冲液非常利于细菌生长
- 缓冲液的保存期不得超过 7 天，除非冷藏保存
- 使用前应过滤水（可能性小）或缓冲盐（可能性大）中的颗粒物
- 当使用硅胶色谱柱时，高 pH 磷酸盐缓冲液（尤其是高温条件下）会显著缩短色谱柱寿命

如需了解用于 SEC 的安捷伦生物色谱柱的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/advancebio

提升 mAb 聚集体分析性能

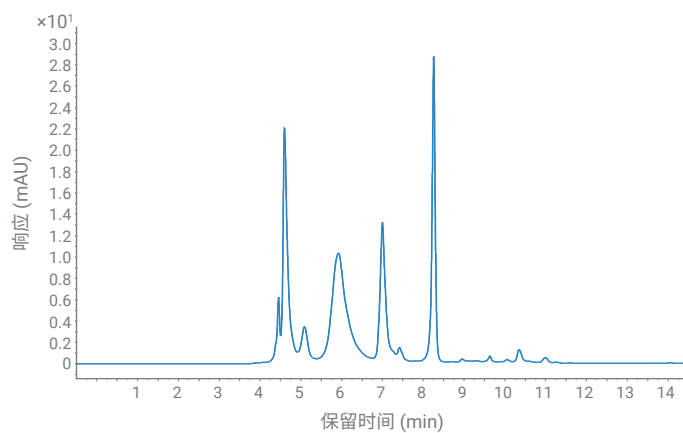
使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统进行高分离度 SEC 分析

作者

Edgar Nägele
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了配备 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和超低扩散毛细管的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过体积排阻色谱 (SEC) 分离蛋白质的出色分离度。生物兼容性 UHPLC 系统能够使用腐蚀性盐缓冲液进行分析, 因此节省了维护费用。比较了不同内径毛细管 (0.17、0.12 和 0.07 mm) 在 SEC 分析中的分离度。对一种蛋白质混标和单克隆抗体 (mAbs) (包括聚集体) 进行了分离, 并比较了分离度。此外, 由单一软件解决方案中的 Agilent OpenLab GPC/SEC 附加软件确定了分子量, 实现了一步式工作流程。



前言

mAbs 等现代生物药物是高度异质性的化合物。聚集体是最重要的关键质量属性 (CQAs) 之一，通常采用 SEC 进行监测。这项技术可根据标准品计算待测物分子量，从而对化合物进行鉴定。此外，该技术还可通过显示更高分子量的聚集体成分（如二聚体和更高程度聚集体）来确认纯度。为获得足够的分离度，推荐使用亚 2 μm 颗粒填充的现代 SEC 色谱柱。为实现出色性能，首选亚 2 μm 色谱柱和死体积尽可能小的 UHPLC 仪器。死体积过大会因扩散效应而损失这些色谱柱获得的分离度。此外，完全生物兼容的 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以充分应对 SEC 缓冲液中常用的高浓度盐，以超低的维护成本提供可靠结果。

本应用简报介绍了现代亚 2 μm SEC 色谱柱在 1290 Infinity II 生物液相色谱系统上的应用，展示了使用死体积极小的仪器带来的优势。为证明死体积对蛋白质和聚集体分离的影响，使用了不同内径的毛细管。将特征明确的 NISTmAb 通过 pH 诱导和热诱导产生更多聚集体，随后分离这些聚集体。

实验部分

仪器

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备集成式样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)，配备生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μL

其他部件

Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包 (G7132A#006)

软件

Agilent OpenLab 2.5 版和 GPC/SEC 附加软件 1.2 版

液相色谱方法

参数	阀
溶剂	磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.4
流速	0.35 mL/min
等度分离	
柱温	30 °C
样品温度	4 °C
进样针清洗	用水清洗 3 秒
进样量	5 μL
检测 (VWD)	280 nm, 采集速率 20 Hz

色谱柱

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 μm (部件号 PL1580-5201)

样品

- 校准用蛋白质混标 (部件号 5190-9417)：甲状腺球蛋白 (670000 Da)、 γ -球蛋白 (150000 Da)、卵清蛋白 (45000 Da)、肌红蛋白 (17000 Da)、血管紧张素 II (1000 Da)
- 人源化单克隆抗体 (mAb) 曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8
- Agilent NISTmAb，人源化 IgG1 κ mAb (部件号 5191-5745) (Steinheim, Germany)

pH 诱导/温度诱导 NISTmAb 方案

使用流动相将 mAb 稀释至 2 mg/mL 的最终浓度。pH 诱导方法与其他文献所述基本相同，仅有略微改动^[1]：将 1 mol/L HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 mol/L HCl 溶液将 pH 值调回 6.0。pH 值变化间大约有 1 分钟的等待时间，期间持续缓慢搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 min。

溶剂和化学品

- **PBS**：在 25 °C 下将 1 片 PBS 片溶于 200 mL 去离子水，得到 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.0027 mol/L 氯化钾、0.137 mol/L 氯化钠，pH 7.4
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

结果与讨论

用于蛋白质 SEC 分离的现代色谱柱中填充亚 2 μm 颗粒，可实现出色分离。而这需要仪器具有优化的低死体积，因为高死体积特别是内径较大的毛细管会损失获得的分离度。1290 Infinity II 生物液相色谱系统对 5 种蛋白质混标（包括 3 种二聚体）的分离结果如图 1A 所示。为了尽可能降低死体积和扩散效应，我们使用了内径 0.07 mm 的毛细管进行分离。早洗脱的甲状腺球蛋白二聚体 (4.947 min) 实现了部分分离。如需设置用于分子量测定的校准，使用该混合物中的所有蛋白质生成校准曲线（图 1B）。获得了四阶理想曲线拟合。

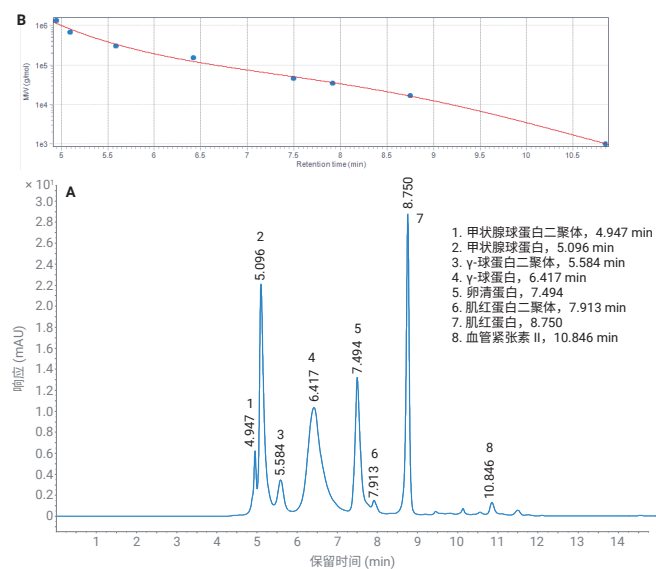


图 1. (A) Agilent AdvanceBio SEC, 200 \AA , 4.6 \times 300 mm, 1.9 μm 与 Agilent 1290 Infinity II 生物超低扩散工具包（包括 0.07 mm 毛细管）相结合，分离包括 3 种二聚体在内的 5 种蛋白质混标。(B) 使用含有几种二聚体的蛋白质混标测定分子量的 SEC 校准曲线

使用校准曲线测定曲妥珠单抗和其中包含的二聚体的分子量（图 2）。抗体在 6.489 分钟洗脱，相应二聚体在 5.673 分钟洗脱（图 2A）。曲妥珠单抗和二聚体最大峰值处测得的分子量分别为 Mp 141566 Da 和 Mp 321609 Da。分子量分布如图 2B 所示，分子量计算值如图中表 (2C) 所示。

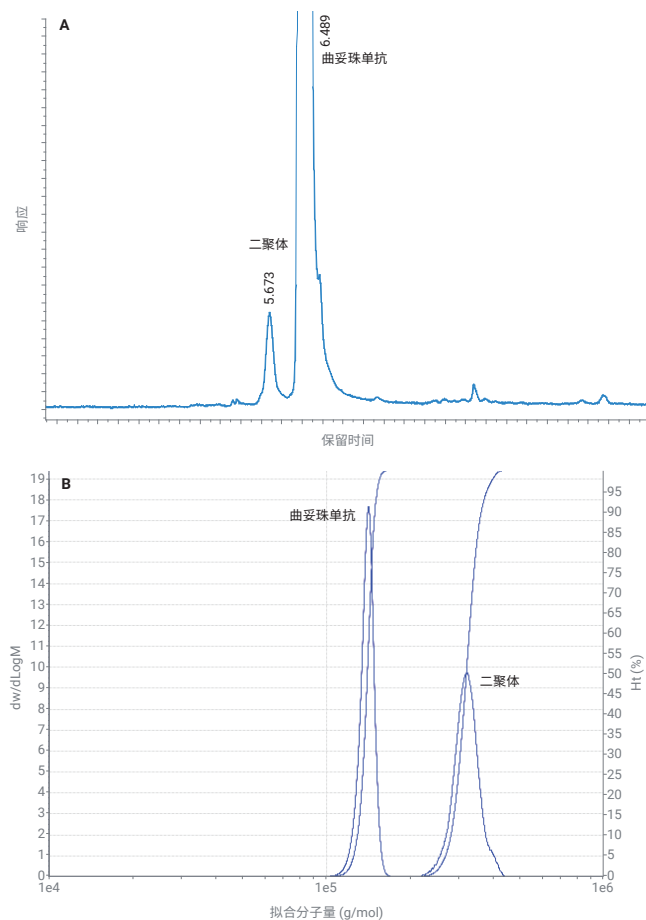


表 2C: 曲妥珠单抗及其聚集体的分子量

化合物	RT (min)	Mp (g/mol)
曲妥珠单抗聚集体	5.673	321609
曲妥珠单抗	6.489	141566
D4	0.072	0.071
D6	0.065	0.262
D8	0.066	0.281

图 2. 曲妥珠单抗和二聚体，分子量测定。(A) 曲妥珠单抗单体和二聚体的 SEC 分离。(B) 曲妥珠单抗和二聚体的分子量。(C) 表列出了曲妥珠单抗及其聚集体的分子量。Mp: 最大峰分子量

比较内径 0.07 (ULD)、0.12 和 0.17 mm 的毛细管，可以看出所用毛细管内径的影响。为了证明这种影响，我们测定了蛋白质混标（如图 1 所示）第二个峰和第三个峰的分离度（图 3）。采用内径 0.07 mm 的毛细管，可以获得峰 2 和峰 3 的理想分离度值（图 3 中的表）。使用蛋白质混标的峰 2 测定半峰宽。从测量值可以看出，毛细管内径越大，峰宽越大。

毛细管对曲妥珠单抗及其聚集体的分离影响如图 4 所示。此处可以看到一个额外的低分子量化合物隐藏在主峰下，在使用 0.17 mm 毛细管分离时只出现一个微弱的肩峰，在使用 0.07 mm 毛细管分离时肩峰更加清晰可见。

毛细管 (μm)	分离度		峰宽 (min)
	峰 2	峰 3	峰 2
0.07	0.94	1.98	0.110
0.12	0.86	1.88	0.120
0.17	0.71	1.73	0.142

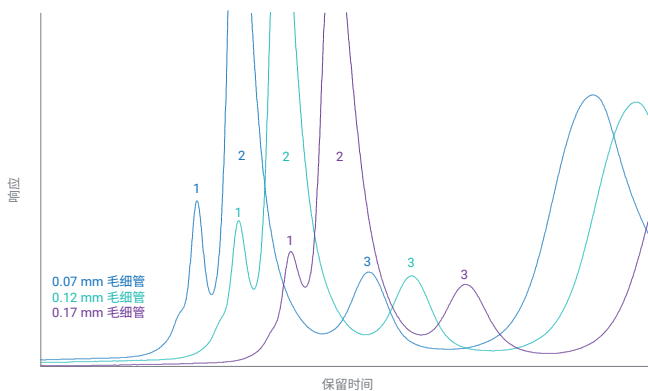


图 3. 比较毛细管内径增加对分离度和峰宽的影响

毛细管 (μm)	分离度	峰宽 (min)	
		赫赛汀	聚集体
0.07	3.34	0.096	0.189
0.12	3.05	0.107	0.205
0.17	2.83	0.121	0.216

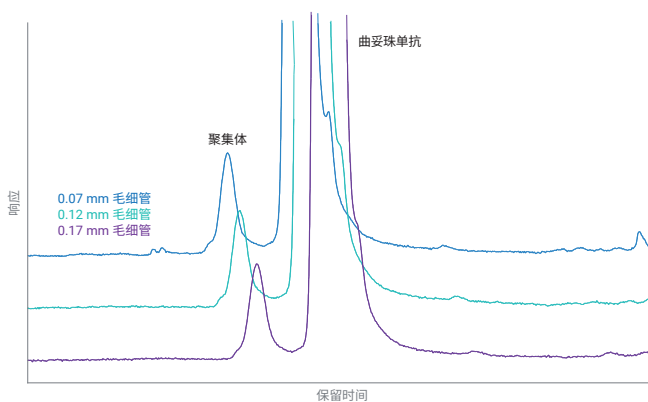


图 4. 所用毛细管内径对曲妥珠单抗与其二聚体的分离度和峰宽的影响

所有毛细管的保留时间和峰面积都具有出色的 RSD 值（表 1）。

另一个例子是，将特征明确的 NISTmAb（人源化 IgG1k mAb）与聚集体分离，并测定分子量（图 5）。

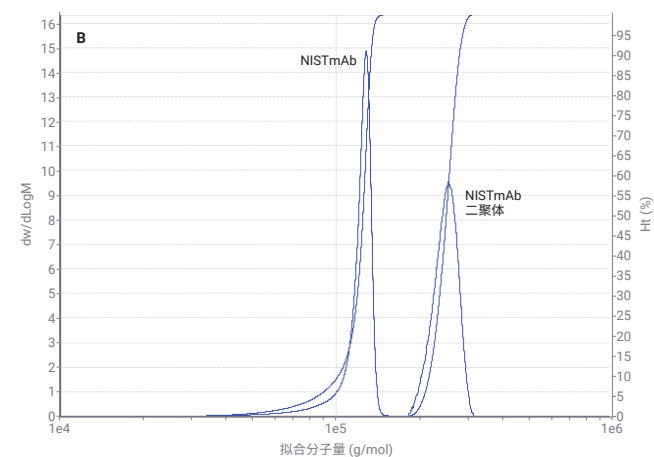
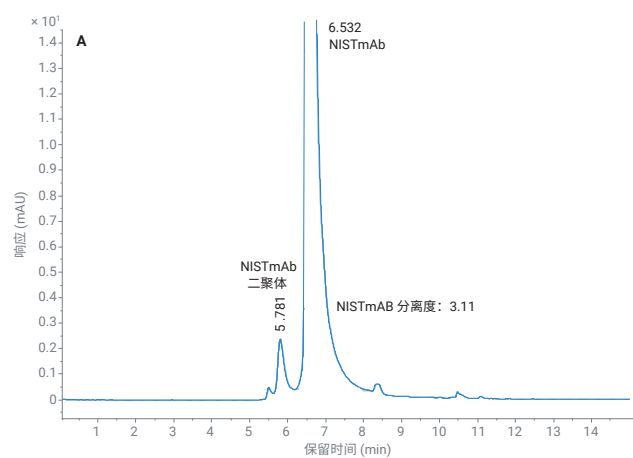


表 1. 所用毛细管分离曲妥珠单抗的保留时间和峰面积的 RSDs。随着毛细管体积的增加，保留时间相应增加

	0.07 mm 毛细管		0.12 mm 毛细管		0.17 mm 毛细管	
	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
平均值	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD (%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25

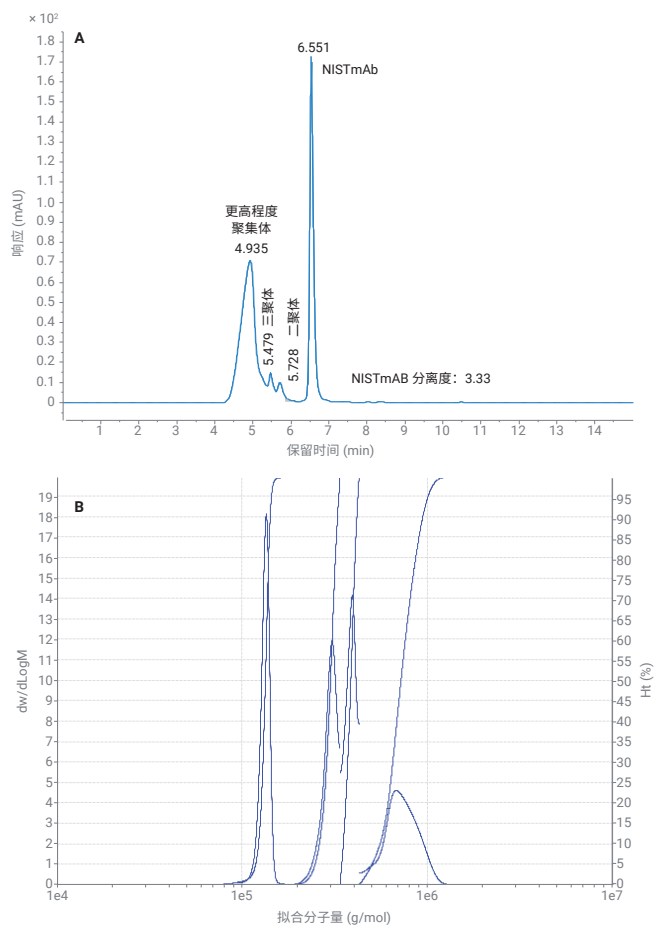
C

RT (min)	峰面积	峰高	分离度USP	峰拖尾	半峰宽
5.781	23.80	2.08	7.59	1.940	1.940
6.532	3006.00	409.40	3.11	1.569	0.100

D

RT (min)	Mp (g/mol)
5.781	305626
6.532	144767

图 5. (A) NISTmAb 与其主要二聚体的分离，分离度为 3.11。(B) NISTmAb 及其聚集体的分子量。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量



在 pH 诱导和温度诱导条件下（见“实验部分”），该 mAb 能够形成较高度度的聚集体（图 6）。使用超低扩散毛细管可分离出更高度度的聚集体（图 6A）。图 6B 和相应表格概述了它们的分子量分布和峰表征值。

C

RT (min)	峰面积	峰高	分离度USP	峰拖尾	半峰宽
4.913	1926.46	70.80	7.59	0.781	0.398
5.479	129.63	14.58	0.85	1.277	0.168
5.728	106.16	9.5	0.91	1.985	0.185
6.551	1208.07	172.21	3.33	1.116	0.110

D

RT (min)	Mp (g/mol)
4.913	706827
5.479	411615
5.728	321609
6.551	141918

图 6. (A) pH 诱导产生的 NISTmAb 聚集体的分离。(B) 诱导条件下 NISTmAb 产生的聚集体的分子量分布。(C) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的主峰表征值。(D) 表列出 NISTmAb 及其聚集体的分子量

结论

本应用简报介绍了 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 AdvanceBio SEC 色谱柱结合，因极小的系统死体积和毛细管的超低扩散性能，能够以超高分离度分离蛋白质及其聚集体。1290 Infinity II 生物液相色谱系统是一台完全生物兼容的系统，能够使用高浓度盐缓冲液，从而提供了超低的维护成本和理想的分离度性能。

参考文献

1. 利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析
安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6303CHCN，**2016**

单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析

采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱

作者

Veronica Qin

安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了采用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱进行单克隆抗体 (mAb) 的高分离度和高通量体积排阻色谱 (SEC) 分析。经优化的亚 2 µm 填料颗粒可实现更快的分离速度和高分离度，从而实现准确的定量分析。

前言

聚集体和片段是生物治疗蛋白的关键质量属性，需要对它们进行充分表征。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 分析不同体积的上述物质。有些情况下需要高通量 SEC 分析。例如，在药物开发早期阶段的克隆选择或工艺开发期间，每天需要分析大量样品。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有独特且耐用的亚 2 μm 填料颗粒，可实现高分离度快速分析。这些特性可显著提高样品通量，同时提供稳定、准确的结果。

实验部分

材料

SILu Lite SigmaMAb 通用抗体标准品购自 MilliporeSigma，并用水复溶至 1 mg/mL。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠均购自 MilliporeSigma。所有化学品纯度均 ≥ 99.5 %。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。每天配制新鲜溶液，使用前通过 0.22 μm 滤膜过滤。

仪器

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪包括如下配置：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性四元泵 (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 可变波长检测器 (G7114A)

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5201)
- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 1.9 μm, 4.6 × 150 mm (部件号 PL1580-3201) 生物惰性流通池 (选件 #028)

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

结果与讨论

材料

图 1 显示了含有聚集体和片段的 mAb 的 SEC 色谱图，使用 300 mm 色谱柱在 0.35、0.4 和 0.5 mL/min 流速下进行分析。即使在 0.5 mL/min 的流速下也获得了二聚体/单体以及单体/片段 1 的出色分离 (表 1)。与 0.35 mL/min 流速相比，节省了 28% 的运行时间，并且分离度不受影响。

仪器条件

参数	HPLC 条件
柱温	25 °C
流动相	50 mmol/L 磷酸钠, 200 mmol/L NaCl, pH 7.0
流速	0.3–0.7 mL/min
进样量	1 μL
检测	UV 220 nm

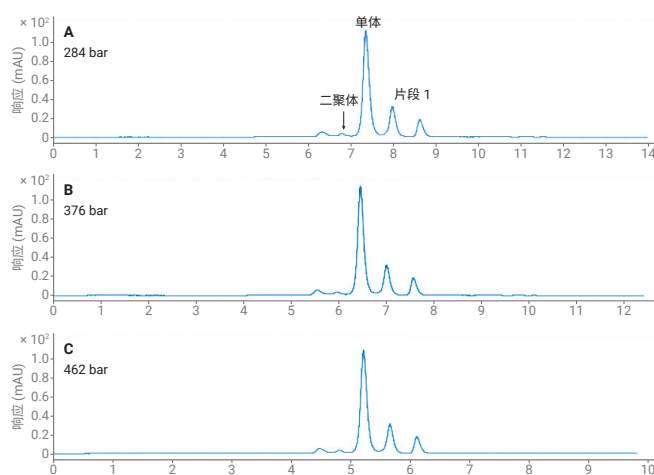


图 1. SigmaMAb (与其 F(ab')₂ 和 Fc 片段的混合物) 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 300 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl, pH 7.0，流速为 A) 0.35 mL/min; B) 0.4 mL/min; C) 0.5 mL/min

聚集体和片段是生物治疗蛋白的关键质量属性，需要对它们进行充分表征。通常使用体积排阻色谱 (SEC) 分析不同体积的上述物质。有些情况下需要高通量 SEC 分析。例如，在药物开发早期阶段的克隆选择或工艺开发期间，每天需要分析大量样品。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm 色谱柱具有独特且耐用的亚 2 μm 填料颗粒，可实现高分离度快速分析。这些特性可显著提高样品通量，同时提供稳定、准确的结果。

表 1. 不同流速下的峰拖尾因子和分离度

流速 (mL/min)	拖尾因子 (单体)	分离度 (二聚体/单体)	分离度 (单体/片段 1)
0.35	1.18	1.98	2.37
0.4	1.16	1.96	2.36
0.5	1.14	1.91	2.29

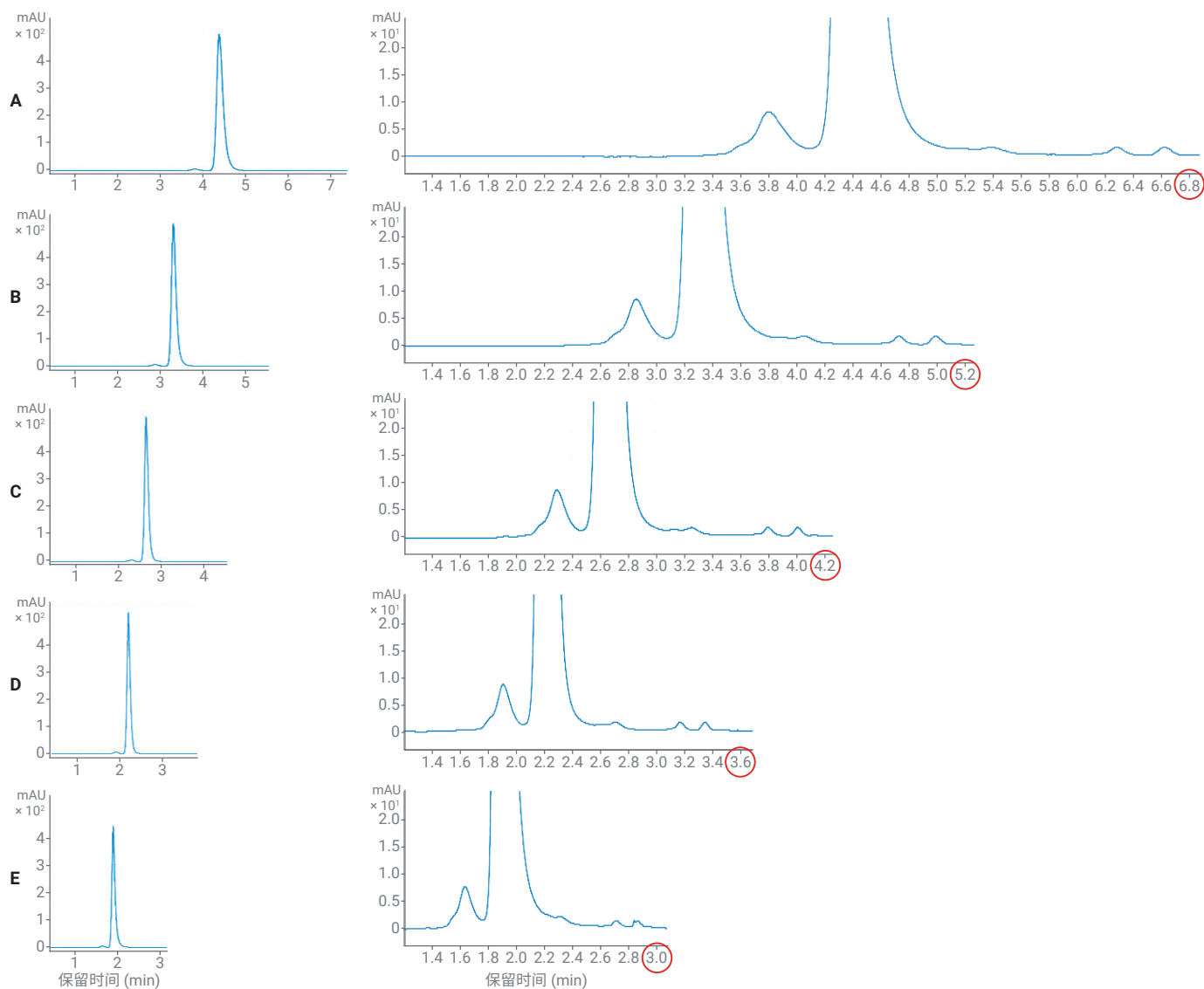


图 1. SigmaMAb 的体积排阻色谱图，采用 4.6 × 150 mm SEC 色谱柱，流动相为 50 mmol/L 磷酸钠，200 mmol/L NaCl，pH 7.0，流速为 A) 0.3 mL/min；B) 0.4 mL/min；C) 0.5 mL/min；D) 0.6 mL/min；E) 0.7 mL/min

该色谱柱所用的独特填料颗粒可在更高流速下实现出色的稳定性，并且二聚体/单体具有出色的分离度，可准确定量二聚体峰面积（表 2）。

表 2 计算了流速对样品通量的影响。当流速从 0.3 mL/min 增加到 0.7 mL/min 时，每天可以分析 480 个样品，通量提高了 2.3 倍。与以 0.3 mL/min 运行的 300 mm 色谱柱（每天只能分析 105 个样品）相比，通量提高了 4.6 倍。

结论

本研究表明，AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱能够实现 mAb 聚集体的快速分析。耐用的填料颗粒能够以更高流速运行，并且保持高分离度。通过将色谱柱柱长从 300 mm 缩短至 150 mm，将流速从 0.3 mL/min 提高到 0.7 mL/min，样品通量将提高 4.6 倍。

表 2. 流速对分离度、单体峰面积百分比和样品通量的影响

RT	运行时间 (min)	反压 (bar)	分离度	二聚体峰面积 (%)	每小时可处理的样品数	每天处理的样品数 (24 小时)
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8-9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11-12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16-17	400
0.73	3.0	380	1.58	2.30	20	480

使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析

作者

David L. Wong

安捷伦科技有限公司

摘要

非变性质谱法可用于各种蛋白质相关应用，例如蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-配体结合、蛋白质复合物结构、蛋白质折叠和抗体药物偶联物。大多数非变性质谱分析使用纳流电喷雾方法，而这面临着巨大的挑战。

本应用简报介绍了一种稳定且灵敏的 LC/MS 方法，使用标准液相色谱流速进行天然蛋白质分析。该工作流程包括 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、AdvanceBio SEC 色谱柱、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 MassHunter BioConfirm 软件。

前言

非变性质谱 (MS) 技术已广泛用于表征完整蛋白质和非共价蛋白质复合物。尽管存在巨大的分析挑战, 但该技术成功地分析和研究了从几 kDa 到 1 MDa 以上的各种大小的蛋白质复合物结构 (蛋白质-配体结合或蛋白质-蛋白质相互作用)^[1-4]。在不使用有机溶剂和酸增强样品去溶剂化和离子化作用的情况下, 在中性 pH 条件下对蛋白质样品进行非变性质谱分析时, 每个分子的电荷往往较少, 并且在较高 m/z 范围内 MS 信号丰度低得多。在过去十年间, 纳流电喷雾电离 (nESI) 方法已成为天然蛋白质分析的关键方法。nESI 形成细小的带电液滴, 可显著提高样品的去溶剂化和离子化效率, 同时保留非共价蛋白质-蛋白质复合物。然而, 中性水性蛋白质样品在不稳定的纳流流速条件下通常容易聚集, 并导致纳流喷雾针堵塞。此外, 需要训练有素或经验丰富的研究人员使用 nESI 技术生成高质量的 MS 数据。

在本研究中, 我们展示了一种用于分析天然蛋白质和蛋白质复合物的高灵敏度分析流 LC/MS 方法。该工作流程使用 AdvanceBio 体积排阻色谱 (SEC) 柱进行在线样品分离。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 具有大分子 SWARM 自动调谐功能和 30000 m/z 扩展质量范围, 用于实现快速且可重现的天然蛋白质分析 (图 1)。

实验部分

材料与amp;方法

单克隆抗体标准品 RM 8671 购自美国国家标准技术研究院 (NIST), 该标准品通常被称为 NIST-mAb。赫赛汀 (曲妥珠单抗) 制剂购自基因泰克 (South San Francisco, California, USA)。曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物制剂 (TDM1, ADC) 同样购自基因泰克。其余全部蛋白质样品和化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

样品前处理

为了进行非变性质谱分析, 将蛋白质样品保存在中性 pH 和挥发性水溶液 (例如乙酸铵或甲酸铵) 中至关重要。因此, 在质谱分析之前, 通常需要进行样品脱盐和缓冲液交换。简而言之, 就是使用 Bio-Rad Bio-Spin P-6 (限值 6000 MW) 或 P-30 (限值 40000 MW) 小柱将蛋白质储备液 (1-10 mg/mL) 脱盐并使用 100 mmol/L 乙酸铵进行溶剂交换。首先用 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液使小柱完全平衡。然后将蛋白质样品转移至色谱柱顶部并以 1000 × g 离心 5 分钟。然后使用 100 mmol/L 乙酸铵进行蛋白质缓冲液交换, 随后即可进行质谱分析。这种脱盐方案导致的样品损失极小, 蛋白质分子的结构改变也非常少。



图 1. 天然蛋白质分析工作流程的分析组件

仪器

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

LC/MS 分析

在 1290 Infinity II 液相色谱仪与配备安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统上进行 LC/MS 分析。使用具有大分子 SWARM 自动调谐功能的 Agilent MassHunter 采集 (B.09.00) 工作站软件。

使用 Agilent AdvanceBio SEC 保护柱 (4.6 × 30 mm, 200 Å, 1.9 μm) 进行液相色谱分离。

表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。

数据处理

使用 Agilent MassHunter 定性分析 10.0 和 BioConfirm 10.0 软件处理天然完整 mAbs 或蛋白质复合物的所有质谱数据。

结果与讨论

天然蛋白质和蛋白质复合物分析的方法优化

为了克服天然蛋白质分析的挑战，进行了一些关键的方法开发和优化：

- 在质谱分析之前使用离线脱盐小柱 (Bio-Rad Bio-Spin P-30) 进行样品前处理 (脱盐和缓冲液交换)，并使用在线 SEC 色谱柱进一步分离目标蛋白质和背景盐，提高了质谱分析灵敏度和质谱数据质量
- 使用常规流速 (0.2 mL/min) 下的 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液不仅消除了样品聚集，而且提高了保存完好的天然蛋白质样品的 LC/MS 分析重现性
- 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统具有用于优化大分子离子传输效率的大分子 SWARM 自动调谐功能，以及高达 m/z 30000 的扩展质量数范围，可实现高灵敏度的天然蛋白质复合物分析

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
色谱柱	AdvanceBio SEC (200 Å, 4.6 × 30 mm, 1.9 μm) (部件号: PL1580-1201)
恒温箱	4 °C
溶剂 (A)	100 mmol/L 乙酸铵 (pH 7)
等度洗脱	0–5 min, 100% A
柱温	室温
流速	0.2 mL/min
进样量	1–5 μL

表 2. 非变性质谱数据采集参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
样品类型	肌红蛋白	完整 mAbs	完整大分子蛋白质复合物
离子源	安捷伦喷射流	安捷伦喷射流	安捷伦喷射流
干燥气温度	150 °C	365 °C	150 °C
干燥气流速	10 L/min	12 L/min	10 L/min
雾化器	30 psig	35 psig	30 psig
鞘气温度	150 °C	300 °C	150 °C
鞘气流速	10 L/min	12 L/min	10 L/min
毛细管电压	5000 V	5500 V	5000 V
喷嘴电压	2000 V	2000 V	2000 V
碎裂电压	250 V	300 V	250 V
锥孔电压	100 V	220 V	100 V
四极杆 AMU	m/z 500	m/z 1000	m/z 3000
质量范围	m/z 300–7000n	m/z 3000–10000n	m/z 5000–25000n
采集速率	1.0 幅谱图/s	1.0 幅谱图/s	1.0 幅谱图/s
采集模式	正离子， 扩展 (m/z 10000) 质量数范围	正离子， 扩展 (m/z 10000) 质量数范围	正离子， 扩展 (m/z 25000) 质量数范围

完整肌红蛋白（含血红素）的非变性质谱分析

肌红蛋白非共价相互作用的非变性质谱分析已得到充分研究^[4]。在肌红蛋白中，血红素通过氢键和疏水相互作用与珠蛋白非共价结合。当血红素与珠蛋白结合时，该蛋白质称为全肌红蛋白（天然构象）。监测 ESI-MS 质谱图中肌红蛋白离子的电荷态分布已用于蛋白质折叠/去折叠研究^[4]。电荷较高的脱辅基肌红蛋白（不含血红素）表明天然血红素-蛋白质相互作用被破坏，导致蛋白质出现较大程度的去折叠。如图 2A 所示，肌红蛋白在有机和酸性溶剂中以及严苛的质谱离子源条件下变性。

变性肌红蛋白的电荷分布包迹为 m/z 1000 (17+)–3500 (5+)，强度最高的带电离子为 12+。大多数天然全肌红蛋白变性为脱辅基肌红蛋白和血红素（图 2A 的插图）。我们经过优化的肌红蛋白非变性质谱分析清楚地表明，肌红蛋白的天然构象得到保留（图 2B）。仅可检测到痕量的脱辅基肌红蛋白和血红素。全肌红蛋白的电荷分布包迹为 9+ 至 5+，电荷态 8+ 的离子丰度最高。非变性质谱离子的整体质谱信号强度约为变性质谱图的 1/10。

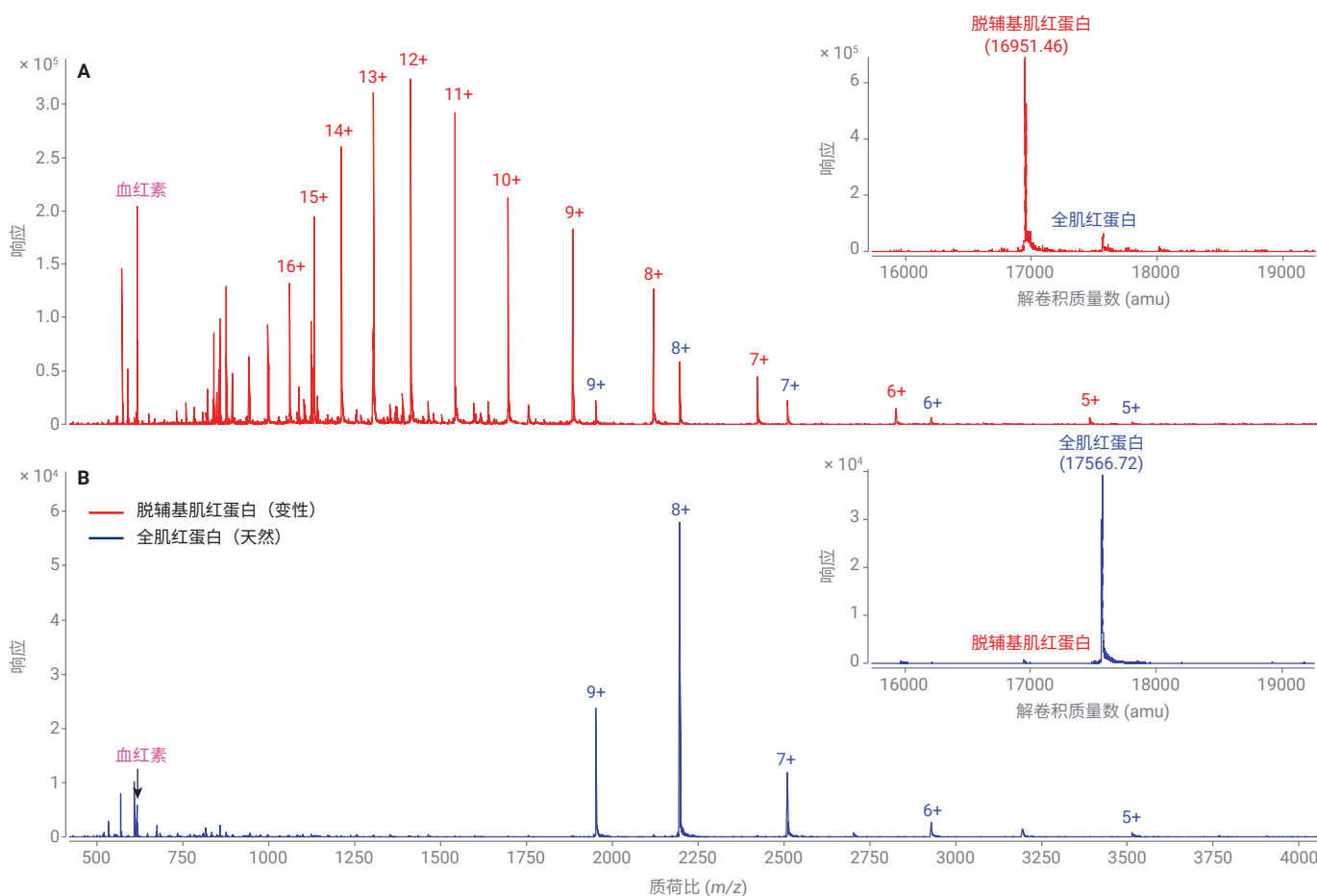


图 2. 完整肌红蛋白样品的 LC/MS 分析。

A) 在变性 LC/MS 条件下分析肌红蛋白样品（之前的研究）。

血红素基团从蛋白质复合物中解离出来，大部分蛋白质为脱辅基肌红蛋白（插图）。

B) 肌红蛋白的非变性质谱分析。全肌红蛋白（含血红素）结构得以保留，仅检测到痕量的血红素

非变性质谱分析结果证实，SEC 色谱柱流动相的离子强度在维持蛋白质天然构象方面也发挥着重要作用^[2]。图 3 展示了两种流动相条件下乙醇脱氢酶（ADH，四聚体）的非变性质谱分析。尽管两种流动相均为中性 pH，但在流动相中用甲酸铵代替乙酸铵时，观察到蛋白质解离产物（二聚体）（图 3A 和 3B）。此外，与 100 mmol/L 乙酸铵相比，50 mmol/L 甲酸铵中完整天然 ADH 的电荷态分布包迹转移到较低的 m/z 范围（图 3C）。

结果表明，在流动相中使用甲酸铵会增加多电荷离子的数量和强度（最大为 26+，而使用乙酸铵时为 23+，图 3），尽管仍将 ADH 视为完整的蛋白质四聚体复合物。因此，我们认为 100 mmol/L 乙酸铵溶液在非变性质谱分析过程中为蛋白质复合物提供了更好的结构保护作用。

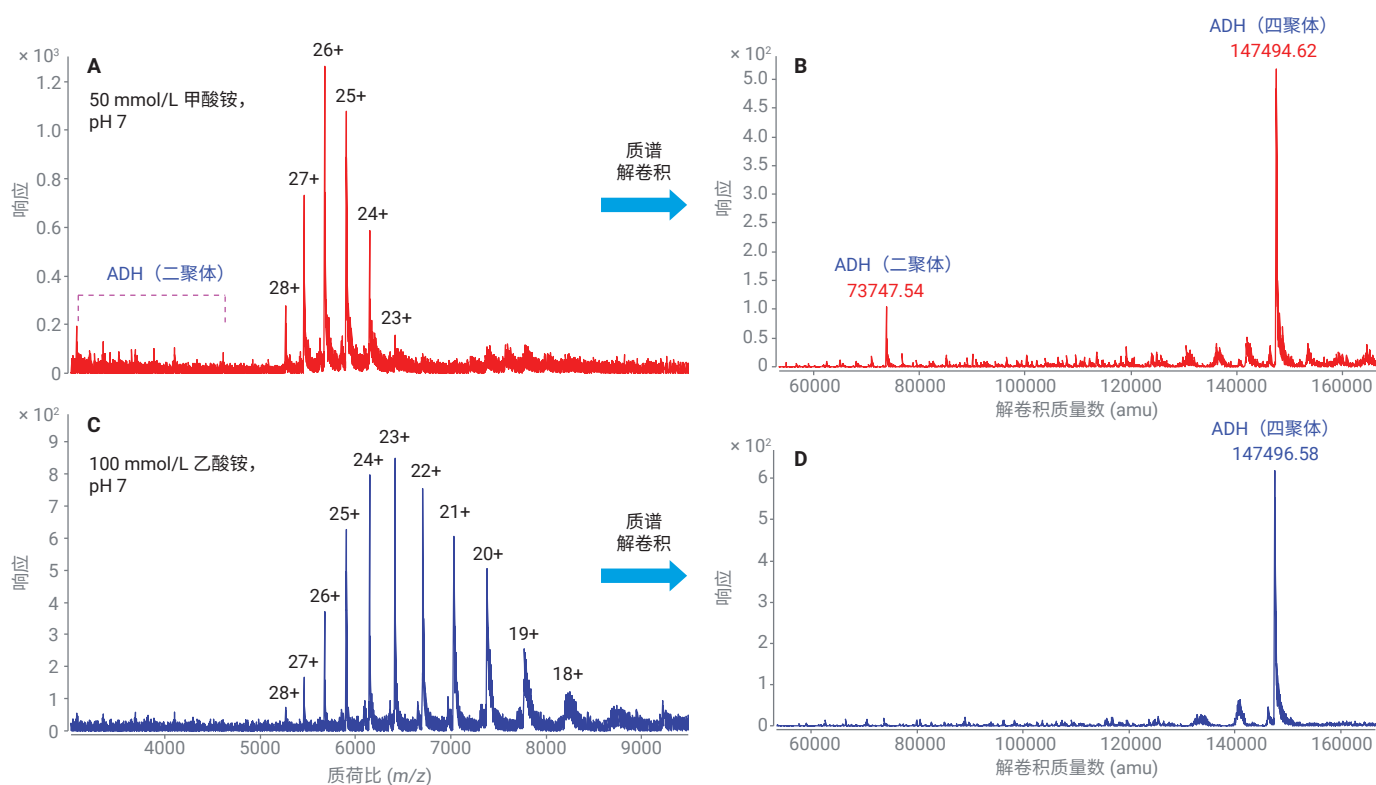


图 3. 不同溶剂条件下的天然乙醇脱氢酶（ADH，四聚体）分析。

A) 天然 ADH 在 50 mmol/L 甲酸铵溶液 (pH 7) 下的分析结果。C) 天然 ADH 在 100 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH 7) 下的分析结果。B) 和 D) 两个样品的解卷积质谱图

完整 mAbs 的非变性质谱分析

单克隆抗体 (mAbs) 及其衍生物迅速成为一类重要的生物药物分子，广泛应用于各种治疗应用。mAbs 的非变性质谱分析可以提供有价值的信息，例如：蛋白质折叠、mAb 聚集体 (mAb 二聚体或三聚体)、抗体药物偶联物 (ADCs) 和双特异性 mAbs 等。

在本研究中，我们采用在线 SEC 方法进行快速、可靠的 mAbs 非变性质谱分析。使用 100 mmol/L 乙酸铵溶剂，以 0.2 mL/min 的流速进行 5 分钟等度洗脱，将约 0.5–1.0 μg mAb 进样至 AdvanceBio SEC 保护柱。Q-TOF 离子源条件经过优化，可在 m/z 5000–10000 的质量范围内获得优质的非变性质谱图。

图 4 展示了变性质谱条件 (图 4A 和 4B) 以及非变性质谱条件 (图 4C 和 4D) 下完整 NIST mAb 标准品的 LC/MS 分析。在这两种条件下，NIST mAb 的所有主要糖型均实现了良好分离 (图 4A 和 4C, 插图)。变性 NIST mAb 的电荷态分布范围为 m/z 2000–5000 (30+ 至 75+)，而天然 NIST mAb 的电荷分布包迹为 m/z 5000–10000 (15+ 至 30+)。如解卷积质谱图 (图 4B 和 4D) 所示，所有主要糖型的质量误差均低至几个 ppm。在两种质谱条件下，我们还获得了完整 NIST mAb 分析数据的出色一致性。

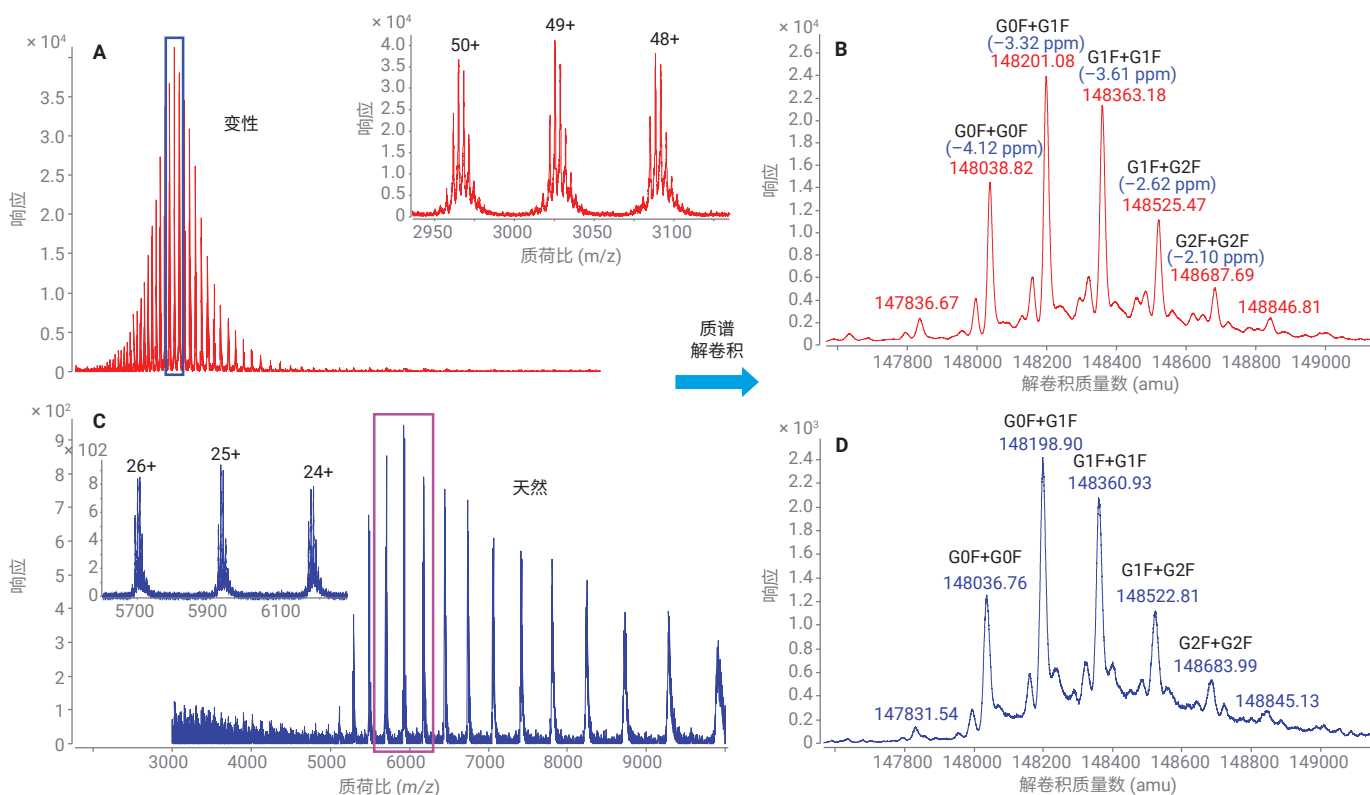


图 4. NISTmAb 的 LC/MS 分析，其分析条件为：A) 变性质谱条件 (乙腈和 0.1% 甲酸) (之前的研究，参考文献 5)，以及 C) 非变性质谱条件 (100 mmol/L 乙酸铵, pH 7)。图 B) 和 D) 分别显示了两个样品的解卷积质谱图

同样，对生物治疗药物（曲妥珠单抗，商品名：赫赛汀）及其 ADC（曲妥珠单抗-美坦新衍生物偶联物，T-DM1）进行了非变性质谱分析和比较。图 5A 所示为完整赫赛汀的非变性质谱图，电荷分布包迹良好 (m/z 5000–10000)，电荷态范围为 15+ 至 28+。响应最强的电荷态为 24+，表明完整赫赛汀处于其天然/折叠构象。如插图解卷积谱图所示，主要糖型实现了较高的质量数准确度。

非变性质谱分析可以在保留蛋白质分子天然结构构象的情况下对其进行检测。由于该方法大大降低了流动相中有机溶剂和酸的干扰，因此是非共价蛋白质复合物或酸不稳定蛋白质偶联物（例如某些 ADCs）的理想分析工具。图 5 显示了 T-DM1 的非变性原始质谱图和解卷积质谱图（插图）。使用 BioConfirm DAR 计算器计算得到的平均 DAR 值为 3.5（图 5B，插图），这与基因泰克（制造商）报告的完整 ADC 的 DAR 值一致。

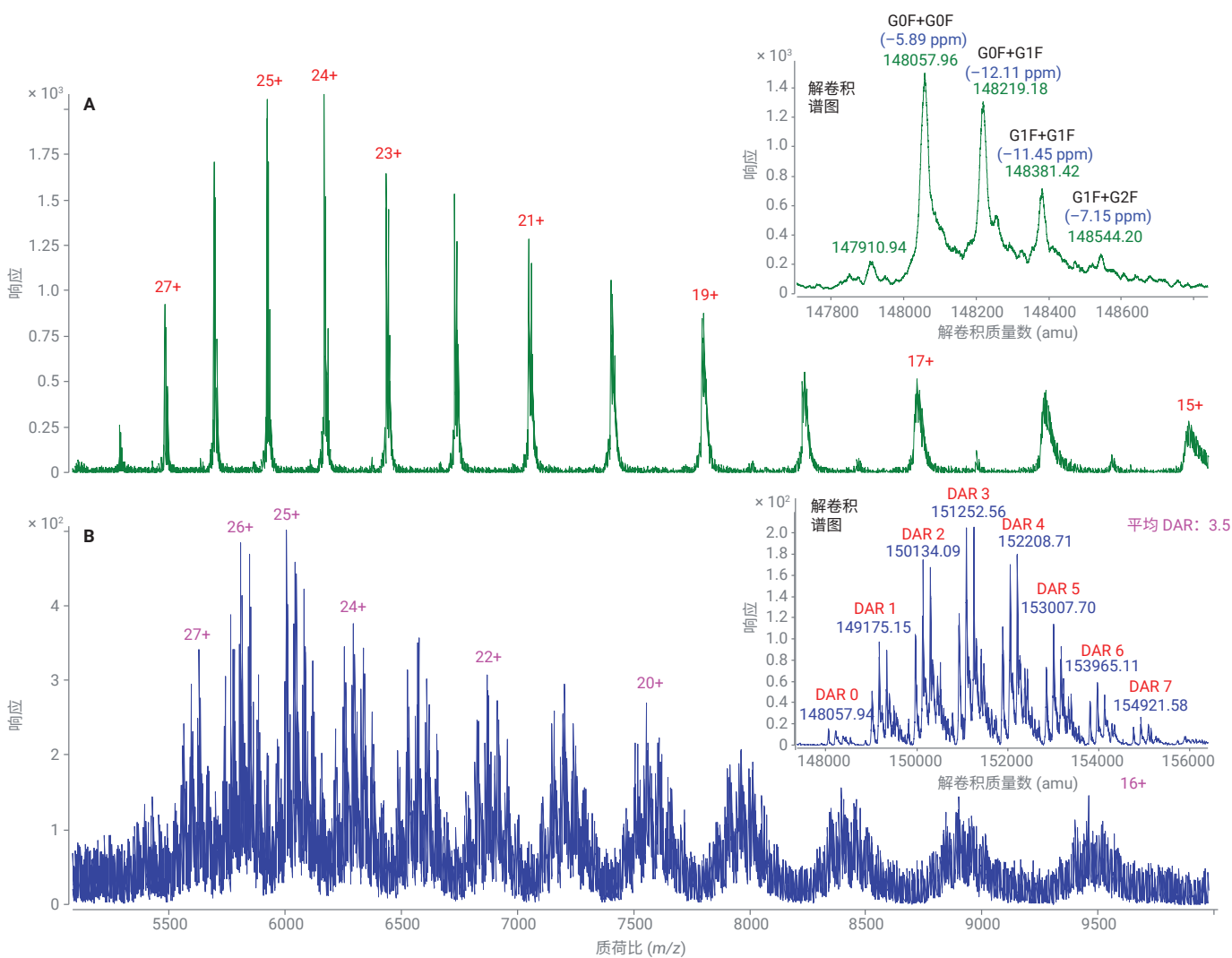


图 5. mAb 及其抗体药物偶联物 (ADC) 的非变性 LC/MS 分析: A) 赫赛汀和 B) T-DM1。插图显示了两个样品的解卷积质谱图

完整蛋白质复合物的非变性质谱分析

使用 3 种蛋白质复合物样品对优化的非变性质谱分析方法进行了评估。样品包括：四聚体丙酮酸激酶 (PK, 232 kDa)、六聚体谷氨酸脱氢酶 (GDH, 335 kDa) 和四聚体 β -半乳糖苷酶 (466 kDa)。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统提供大分子 SWARM 自动调谐功能, 可在高达 m/z 30000 的扩展质量数范围内优化大分子离子传输效率。它是用于天然蛋白质复合物分析的理想 LC/MS 系统。图 6A 显示了四聚体丙酮酸激酶的非变性质谱图。检测到范围为 m/z 6000–10000 的两个电荷分布包迹, 电荷态为 24+ 至 37+。

解卷积谱图显示, 样品中存在 PK 四聚体的两种多蛋白质形式复合物: 全长丙酮酸激酶和截短的 PK 四聚体 (三个完整亚基加上一个具有 N 端裂解的 PK 蛋白质形式)^[3]。

在较高的 m/z (> m/z 10000) 下, 6545XT 系统对蛋白质复合物也表现出了出色的检测灵敏度。图 6B 和 6C 显示了 GDH 和 β -半乳糖苷酶的非变性质谱图。GDH 和 β -半乳糖苷酶的蛋白质电荷包迹均大于 m/z 8000, 而其丰度最高的离子分别位于 m/z 9566 (35+) 和 m/z 10832 (43+)。在进样量为 1–10 μg 的情况下, 测得完整六聚体 GDH 和四聚体 β -半乳糖苷酶的分子量分别为 334754 Da 和 465788 Da。

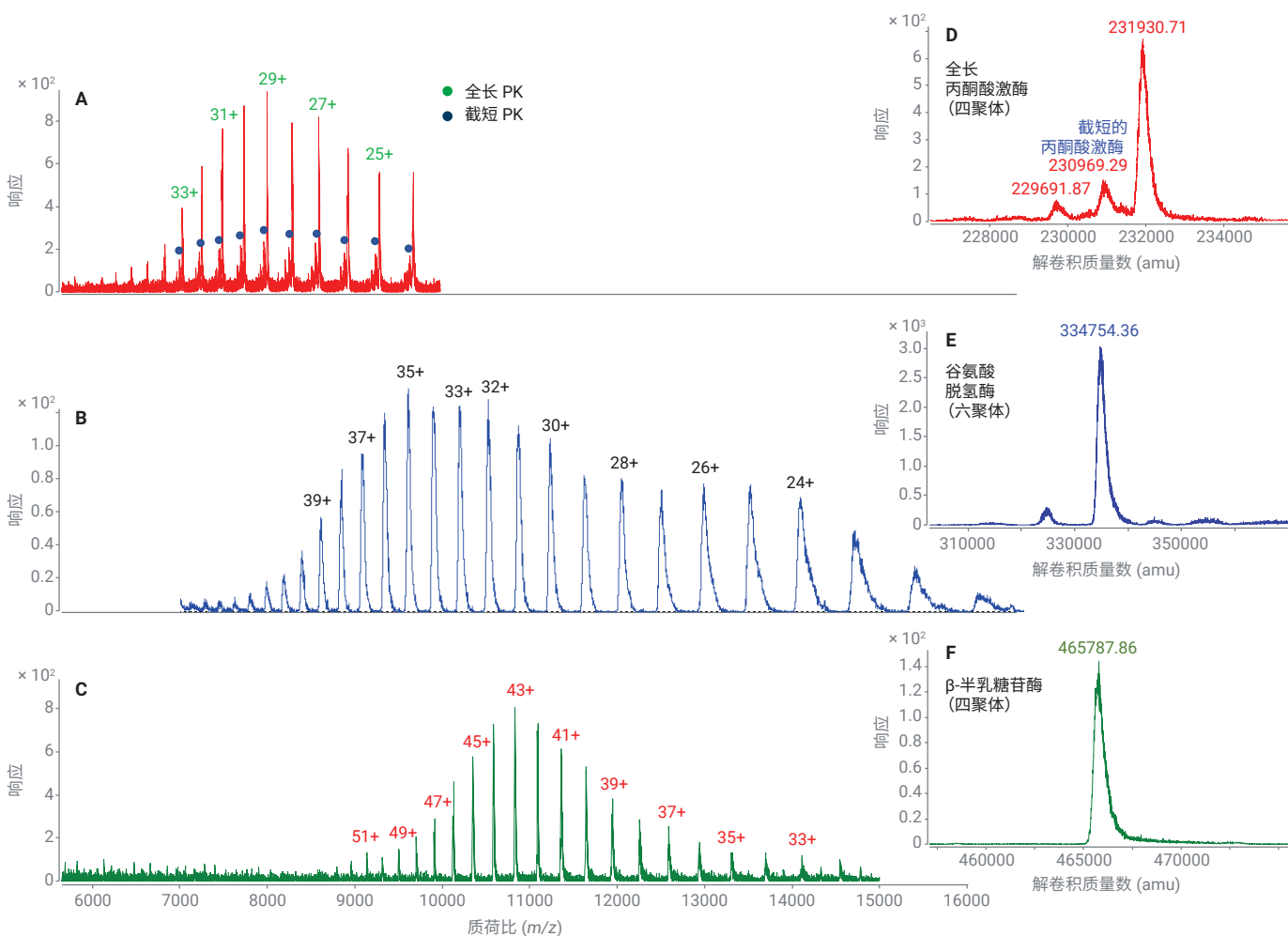


图 6. 不同完整蛋白质复合物的非变性质谱分析。A) 丙酮酸激酶 (PK, 四聚体, 232 kDa), B) 谷氨酸脱氢酶 (GDH, 六聚体, 335 kDa) 以及 C) β -半乳糖苷酶 (四聚体, 466 kDa)。解卷积谱图分别显示于图 D) 至图 F) 中。使用 mMass 开源质谱软件工具对图 6B 中的原始质谱图进行了平滑处理

结论

针对天然蛋白质分析，我们开发了一种高灵敏度且稳定的 LC/MS 工作流程方法。这种优化的工作流程使用配备 AdvanceBio SEC 色谱柱的 1290 Infinity II 液相色谱系统、质量数范围扩展至 m/z 30000 的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 以及 MassHunter BioConfirm 软件。研究表明，这种非变性质谱分析方法具有以下优势：

- 在典型的分析型液相色谱流速下，使用在线 SEC 色谱柱消除了与 nanoESI 分析相关的挑战性问题（蛋白质聚集和不稳定的喷雾流）
- 经过优化的非变性质谱条件为 ADC 表征提供了高可信度，并能准确测定 DAR 值
- 结合大分子 SWARM 自动调谐功能和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的扩展质量数范围，可实现对天然完整大分子蛋白质复合物的灵敏检测和表征

参考文献

1. Heck, A. J. Native Mass Spectrometry: A Bridge Between Interactomics and Structural Biology. *Nat. Methods* **2008**, 5, 927–933
2. Freeke, J.; Robinson, C. V.; Ruotolo, B. T. Residual Counter Ions can Stabilise a Large Protein Complex in the Gas Phase. *Intl. J. Mass Spec.* **2010**, 298, 91–98
3. Schachner, L. F.; Kelleher, N. L. Standard Proteoforms and Their Complexes for Native Mass Spectrometry. *JASMS* **2019**, 30, 1190–1198
4. Konermann, L., Rosell, F. L., Mauk, A. G.; Douglas, D. J. Acid-Induced Denaturation of Myoglobin Studied by Time-Resolved Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Biochemistry* **1997**, 36(21), 6448–6454
5. Wong, D. L., 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 准确表征完整单克隆抗体，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-7813CHCN, **2017**

使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱和 AdvanceBio HIC 色谱柱分析驼源单域抗体

作者

Te-Wei Chu 和 Greg Staples
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用体积排阻色谱 (SEC) 和疏水相互作用色谱 (HIC) 对驼源单域抗体 (纳米抗体) 的分析。纳米抗体是一类日益增长的用于治疗目的的单域抗体片段。与其他 SEC 色谱柱相比, Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱在纳米抗体聚集体和片段的高分离度分离方面具有独特的优势。Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱能够分析纳米抗体的翻译后修饰 (PTMs), 例如谷氨酰胺/焦谷氨酸转化。另外, 本文还展示了一种基于 SEC 的非变性 LC/MS 方法, 该方法有助于更好地了解 PTM 和杂质表征。

前言

尽管单克隆抗体 (mAb) 等生物治疗药物取得了成功, 但这类药物仍然存在许多明显的缺陷。例如, 应用最广泛的生物药物 IgG mAbs 具有复杂的结构和相当大的分子量 (150 kDa)。大分子量使它们无法在体内有效地递送到病变细胞 (例如肿瘤中的细胞)。而单域抗体 (也称为纳米抗体) 在达到其预期靶点方面则提供了巨大的机会^[1]。

纳米抗体是来源于骆驼重链抗体的小分子量 (约 15 kDa) 天然单域蛋白质 (图 1)。它们是重组产生的抗原结合 V_{HH} 片段, 具有与常规 IgG mAbs 相当的结合亲和性。由于分子量较小, 纳米抗体可以与常规 mAbs 通常无法接近的抗原基序结合, 从而到达目前“无成药性”的靶点。此外, 相对简单的蛋白质构象为药物开发人员提供了许多优势, 例如便于生产和不同的给药途径^[1]。这些颇具前景的特征使纳米抗体和 V_{HH} 片段衍生的生物制剂成为生物药物研发管线中的新星^[2]。

本应用简报介绍了使用 SEC 和 HIC, 结合紫外检测对两种 V_{HH} 片段 (抗-PD1 和抗-PDL1 单域抗体) 进行的全面表征。此外, 我们还展示了两种样品基于 SEC 的非变性 LC/MS 分析。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm 色谱柱设计用于分子量范围为 1–80 kDa 的蛋白质等生物小分子的水相 SEC 分离。该色谱柱非常适用于纳米抗体分析。与来自其他供应商的 SEC 色谱柱相比, 独特的亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料技术可实现更高分离度的聚集体和片段分离。HIC 分析可在非变性条件下对蛋白质异构体进行反相式分离。Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱在纳米抗体 PTM 表征方面具有出色的疏水性和选择性。使用通用 HIC 方法 (不使用有机溶剂改性剂), 观察到一种常见的 PTM, 即谷氨酰胺/焦谷氨酸转化。这些方法的结合为深入分析纳米抗体纯度和评估关键质量属性提供了完整的解决方案。

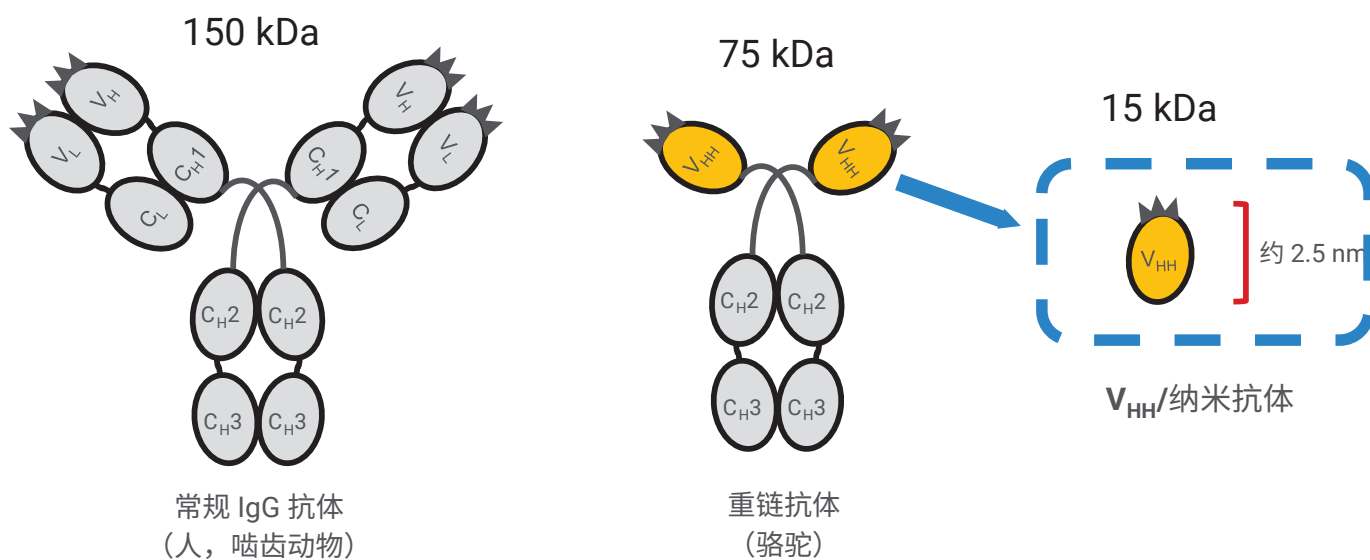


图 6. V_{HH} 单域抗体 (纳米抗体) 和常规 mAb 的对比示意图

实验部分

样品和化学品

- 美洲驼抗-PD1 单域抗体 [F12A8]; 购自 ProSci Inc (Poway, CA)
- 美洲驼抗-PDL1 单域抗体 [F2G2]; 购自 ProSci Inc (Poway, CA)
- 谷氨酰胺酰肽环转移酶; 购自 R&D Systems (Minneapolis, MN)
- 人抗-IL8 IgG 单克隆抗体; 由内部 CHO 细胞产生

使用的所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高等级。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich。使用配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipore) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统对水进行纯化。

色谱柱

- Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (部件号 PL1580-5250)
- Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 150 mm (部件号 PL1580-3250)
- Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 \times 100 mm (部件号 685975-908)

仪器

对于 HPLC 实验, 使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统, 其中包括:

- 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 可变波长检测器 (G7114A)

对于 LC/MS 实验, 使用 Agilent 6224 精确质量飞行时间 (TOF) 液质联用系统和 1290 Infinity II 液相色谱仪, 其中包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- 双 ESI 离子源 Agilent 6224 精确质量飞行时间 (TOF) 液质联用系统

结果与讨论

SEC 是表征生物制剂聚集体的金标准技术。它的色谱分离机制比较独特，分析物不会在固定相中保留；相反，它们根据对填料颗粒孔隙的可及性进行分离。因此，根据溶液中蛋白质分析物的大小（流体动力学半径）仔细选择色谱柱孔径非常重要。纳米抗体是分子量约为 15 kDa 的小分子蛋白质，即流体动力学半径约为 25 Å。填充小孔径 (120–130 Å) 填料颗粒的 SEC 色谱柱可在适合此类应用的范围内提供线性分离^[3,4]。图 2 显示了采用标准方法并使用 pH 7 的磷酸钠作为流动相（以保持蛋白质的天然状态）对抗-PD1 单抗 (sdAb) 进行的 SEC 分离。从图中可以看出，使用 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱可以实现 sdAb 单体与杂质（即高分子量 (HMW) 和低分子量 (LMW) 物质）的出色分离。

与填充大颗粒 (2.7 μm) 填料的色谱柱相比，HMW 和 LMW 物质的分离度以及单体峰的峰宽和拖尾因子均明显改善。与其他供应商的 2 μm SEC 技术相比，AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 色谱柱表现出更优异的性能。这归功于颗粒表面精心设计的键合相覆盖，可以消除不利的次级相互作用^[3,4]。

方法条件

参数	HPLC 条件 (SEC 分析)
色谱柱	Agilent 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	0.35 mL/min
柱温	25 °C
进样量	5 μL, 1 mg/mL
总运行时间	15 min
检测	UV 214 nm

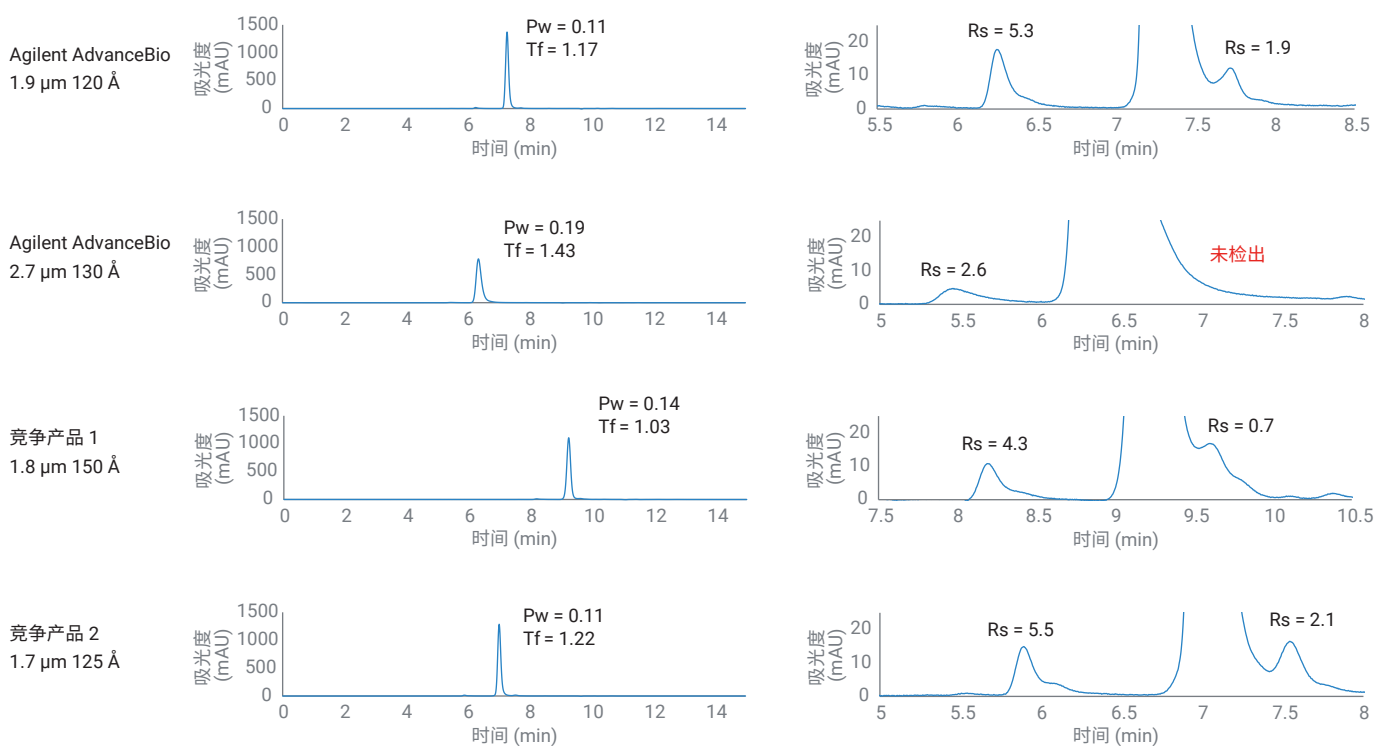


图 2. 抗-PD1 单抗的 SEC 分离。右图对左图中的运行进行了基线放大。显示了 HMW 聚集峰（较早洗脱）或 LMW 片段峰（较晚洗脱）与单体峰的分

SEC 是一种相对简单的色谱方法，色谱柱以等度模式运行。方法开发和优化涉及流动相参数（pH、盐浓度等）的选择，以尽可能减少潜在的次级相互作用，例如离子或疏水相互作用。图 3 显示了用于优化抗-PD1 和抗-PDL1 sdAb 分析方法的 SEC 盐浓度实验。该实验选择长度为 15 cm 的短色谱柱，以实现更高的通量并加快方法优化速度。结果表明，在所使用的流动相 NaCl 浓度范围内，抗-PD1 sdAb 与色谱柱的次级相互作用极少或没有。从各流动相条件下相似的色谱峰形和保留时间可以看出这一点。相反，在较高盐浓度的流动相条件下，抗-PDL1 sdAb 的峰形质量略有下降，并且保留时间延迟，表明分析物与色谱柱之间存在潜在的疏水相互作用。有趣的是，在 250 mmol/L NaCl 及更高浓度下，次级（肩峰）峰变得明显。

方法条件

参数	HPLC 条件 (SEC 盐浓度实验)
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 150 mm (部件号 PL1580-3250)
流动相	20 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0, 氯化钠浓度如图 3 所示
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	2 μL , 1 mg/mL
总运行时间	7 min
检测	UV 214 nm

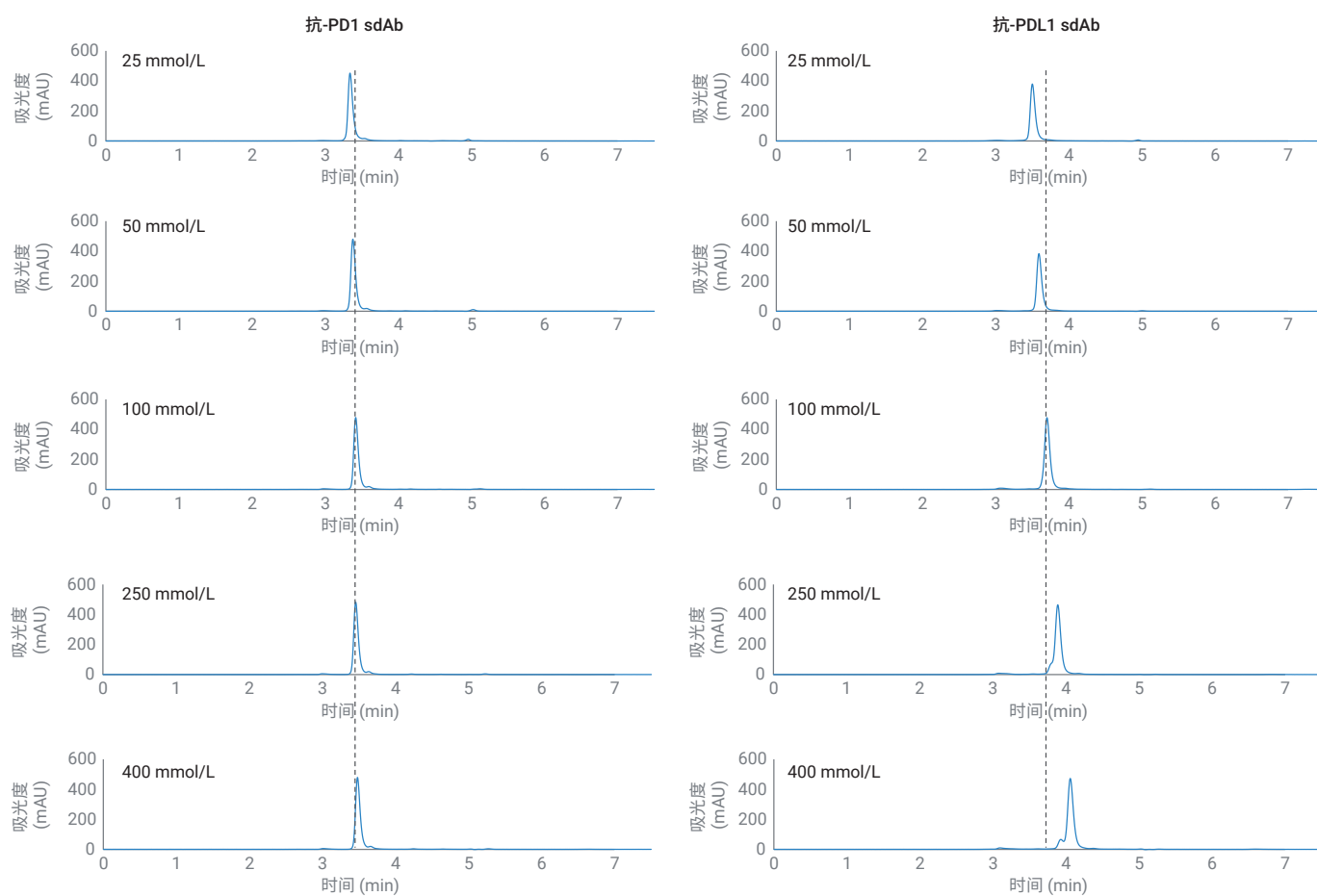


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 色谱柱对抗-PD1 (左) 和抗-PDL1 (右) 单域抗体进行的盐浓度实验

这种现象常见于含有高度疏水性模体或具有极端等电点的挑战性蛋白质。由于纳米抗体仅包含抗体的可变结构域，因此不同纳米抗体之间的氨基酸序列相差极大，这可能会导致蛋白质的理化特性存在巨大差异。本文介绍的方法可用于快速筛选 SEC 流动相条件，以确定分析不同样品的最佳条件。数据显示，对于抗-PDL1 sdAb，应使用具有较低盐浓度（50 mmol/L 或更低）的流动相。

为了进一步表征这两种纳米抗体，我们进行了非变性 SEC-LC/MS 实验（图 4）。结果表明，AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 色谱柱适用于使用低浓度挥发性水性缓冲液（即 50 mmol/L 乙酸铵）的 SEC-MS。可以看出，两个 sdAb 样品均获得了出色的离子色谱图和高分辨率质谱图。解卷积质谱结果显示了两个样品的精确分子量测定值：抗-PD1 sdAb (16528 Da) 和抗-PDL1 sdAb (16895 Da)。

方法条件

参数	非变性 SEC-LC/MS 条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	50 mmol/L 乙酸铵, pH 7.0
流速	0.35 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$
进样量	20 μL , 1 mg/mL
总运行时间	15 min
质谱检测	最小范围: 300 m/z 最大范围: 7000 m/z 离子极性: 正
质谱离子源参数	气体温度: 325 $^{\circ}\text{C}$ 气体流速: 5 L/min 雾化器压力: 30 psi 毛细管电压: 5500 V 碎裂电压: 250 V 锥孔电压: 65 V 八极杆 RF 峰: 750 V

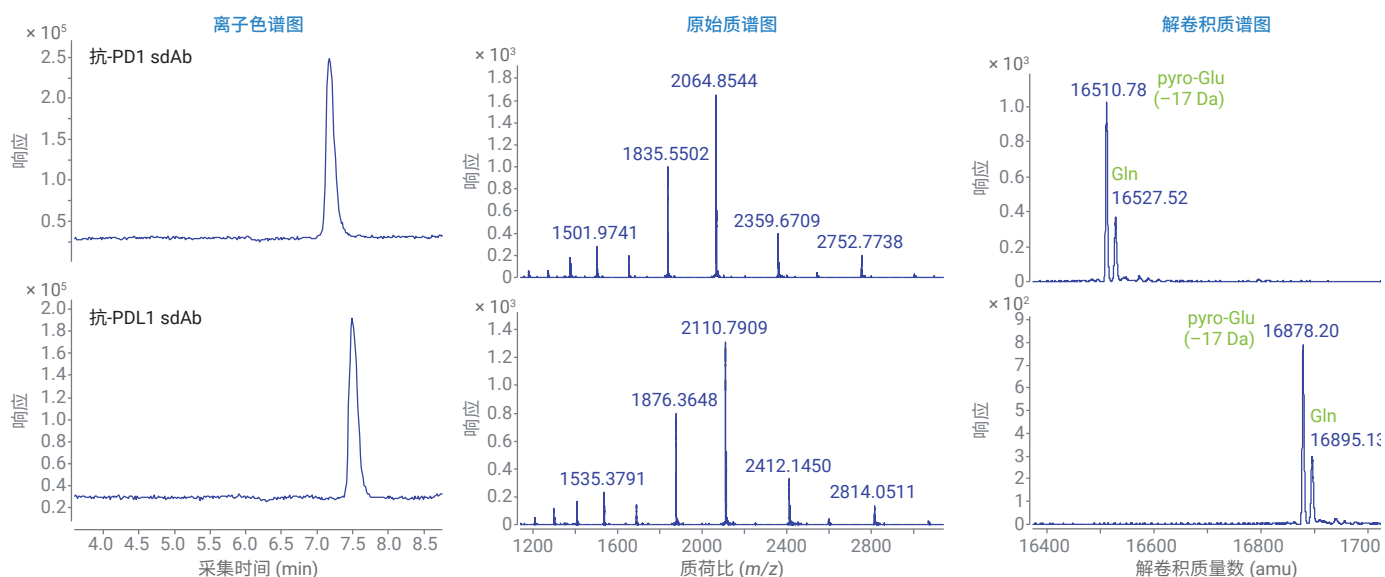


图 4. 抗-PD1（上图）和抗-PDL1（下图）单域抗体的非变性 SEC-LC/MS 分析

有趣的是，质谱结果显示两个样品都存在大量的 -17 Da 修饰。这是与 N-端谷氨酰胺 (Gln) 环化形成焦谷氨酸 (pyro-Glu) 相关的典型质量转移^[5]。Gln/pyro-Glu 转化通常发生在抗体的重链可变结构域；因此，在纳米抗体 (V_{HH} 片段) 中观察到这种 PTM 也就不足为奇了。本研究分析的两种 sdAb 样品均在细菌 (大肠杆菌) 中产生。研究表明，在原核系统中进行生产时，可能导致蛋白质作为包涵体被回收，从而导致非常规的 PTMs^[5]。由于 V_{HH} 的 N 端 Gln 残基靠近互补性决定区域 (CDR)，pyro-Glu 的形成可能会对靶标结合产生显著影响^[1]。因此，通常需要对这种 PTM 进行仔细的特征和记录^[5]。

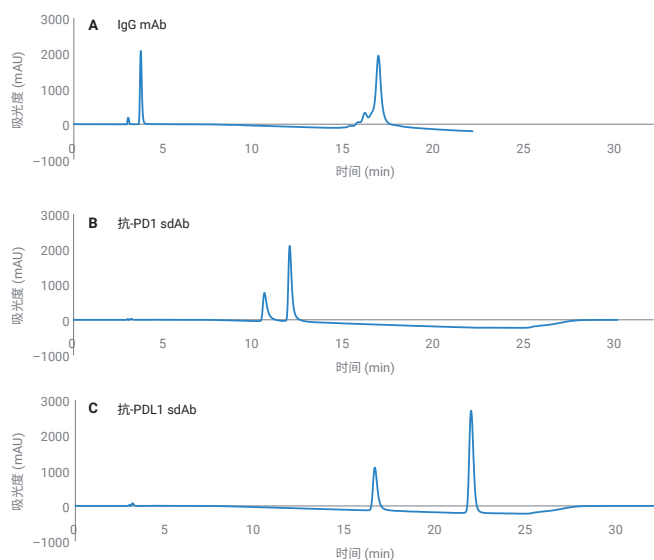


图 5. (A) IgG mAb、(B) 抗-PD1 单域抗体和 (C) 抗-PDL1 单域抗体的疏水相互作用色谱图

方法条件

参数	HPLC 条件 (HIC 分析)
色谱柱	Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908)
流动相	A) 含 2 mol/L 硫酸铵的 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 B) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7
梯度	0 min: 50% B 2 min: 50% B 17 min: 100% B 20 min: 100% B 22 min: 50% B 32 min: 50% B
流速	0.4 mL/min
柱温	30 °C
进样量	5 μL, 0.8 mg/mL (mAb) 5 μL, 1.0 mg/mL (sdAb)
检测	UV 214 nm

为了表征蛋白质的 Gln/pyro-Glu 转化，可以使用离子交换色谱和 HIC 等色谱方法。本研究选择的是 HIC，因为除了 PTM 分析之外，它还可以评估两种 sdAb 样品的疏水性。HIC 利用盐析机制，在接近生理条件下基于疏水性分离完整的天然蛋白质。图 5 显示了使用通用硫酸铵梯度法对抗-PD1 和抗-PDL1 sdAb 以及 IgG mAb 进行的 HIC 分离。两种纳米抗体的两个色谱峰均实现良好分离，表明两份样品都含有两种不同疏水性的物质。该结果与显示 Gln/pyro-Glu 转化的 LC/MS 数据一致。此外，HIC 数据表明抗-PDL1 sdAb 的疏水性非常强。抗-PDL1 sdAb 的保留时间比抗-PD1 sdAb 和 IgG mAb（分子量大 10 倍）长得多。这些结果有助于解释 SEC 盐浓度实验中观察到的现象（图 3），表明了两种单域抗体之间的主要理化特性差异。

为了进一步确认 HIC 分离的两个峰是否确实为含有 Gln 或 pyro-Glu 的 sdAb 物质，本研究使用谷氨酰胺酰胺环转移酶 (QPCT) 开发了一种生化方法（图 6）。已知该酶能催化蛋白质 N-端谷氨酰胺残基转化为焦谷氨酰胺基团^[6]。事实上，用 QPCT 处理两种 sdAb 样品后，色谱图仅包含 pyro-Glu 峰。本研究中使用 AdvanceBio HIC 色谱柱进行的实验表明，该色谱柱可以为纳米抗体 PTM 分析提供出色的选择性。

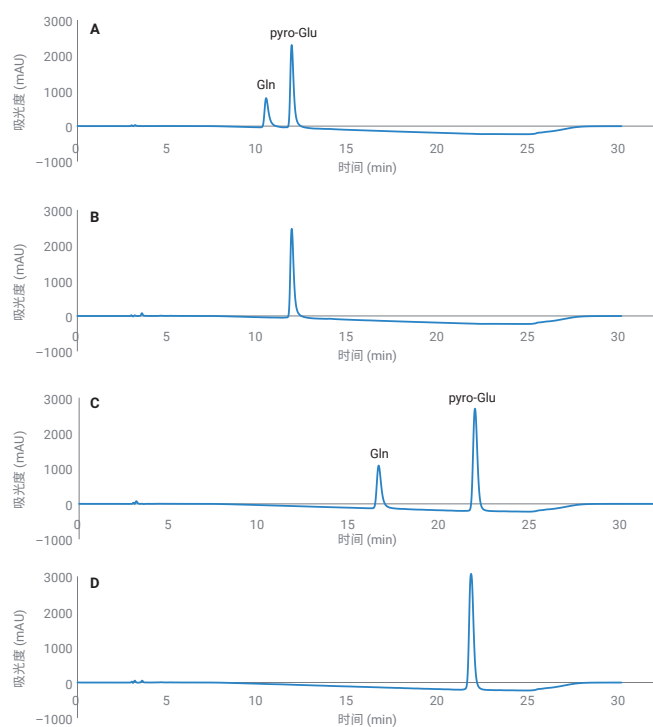


图 6. (A) 抗-PD1 sdAb、(B) 抗-PD1 sdAb + QPCT、(C) 抗-PDL1 sdAb 和 (D) 抗-PDL1 sdAb + QPCT 的 HIC 分析。对于酶处理，将 20 μ L sdAb (1 mg/mL) 与 4 μ L QPCT 在 37 $^{\circ}$ C 下共孵育 16–18 小时

结论

这种纳米抗体是一类革命性的新型生物药物形式，与传统的 mAb 疗法相比具有许多优势。针对这一类新型生物产品的研发，表征和记录在生产 and 储存过程中可能形成或改变的质量属性至关重要。研究表明，这些属性会影响药物效价、药代动力学、免疫原性和安全性。需要使用可靠且稳定的分析工具和方法。本应用简报介绍了可成功应用于纳米抗体表征的 SEC、HIC 和 SEC-LC/MS 技术。可以使用 SEC 对重要的关键质量属性 (CQA)，例如 HMW 聚集体和 LMW 片段 GluGln，进行高分辨率和高通量表征。使用 HIC 和 SEC-MS 方法可以检测分子的细微变化，例如翻译后 Gln/pyro-Glu 转化。本文介绍的方法为在天然、非变性模式下详细分析纳米抗体提供了指导。

参考文献

1. Bannas, P.; Hambach, J.; Koch-Nolte, F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies as Antitumor Therapeutics. *Front Immunol.* **2017**, *8*, 1603
2. Morrison, C. Nanobody Approval Gives Domain Antibodies A Boost. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 485–487
3. Kondaveeti, S. Analysis of Covalent High Molecular Weight Insulin (共价高分子量胰岛素分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1566EN，**2020**
4. Kondaveeti, S.; Chu, T-W.; Coffey, A., 小分子治疗性蛋白的高分离度体积排阻色谱分析，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1829ZHCN，**2020**
5. Jefferis, R. Posttranslational Modifications and the Immunogenicity of Biotherapeutics. *J. Immunol. Res.* **2016**, *2016*, 5358272
6. Busby, W. Jr. *et al.* An Enzyme(s) That Converts Glutaminy-Peptides into Pyroglutamyl-Peptides. Presence in Pituitary, Brain, Adrenal Medulla, and Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8532–6

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。这些填料颗粒采用独特技术制造，同时具备适用于分离小分子蛋白和多肽等分子的理想孔径和孔隙体积。

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

参数	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
总运行时间	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

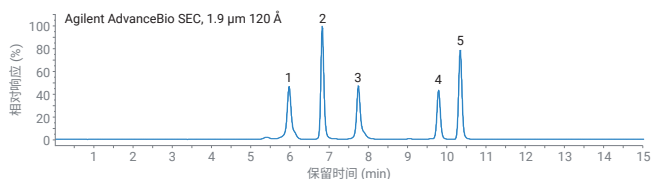


图 1. 低分子量蛋白质和多肽混合物在 0.35 mL/min 下的体积排阻色谱图

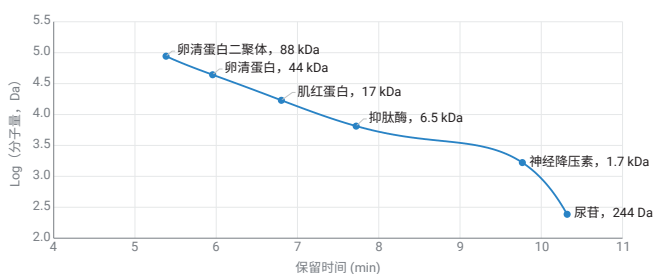


图 2. 低分子量蛋白质和多肽标准品的 AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 校准曲线

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 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）。

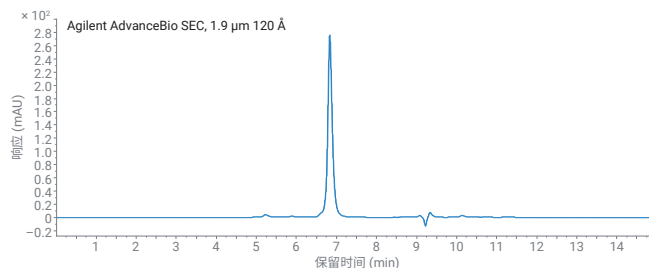


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 4.6 × 300 mm 色谱柱，在 0.35 mL/min 下获得的 hG-CSF 的体积排阻色谱图

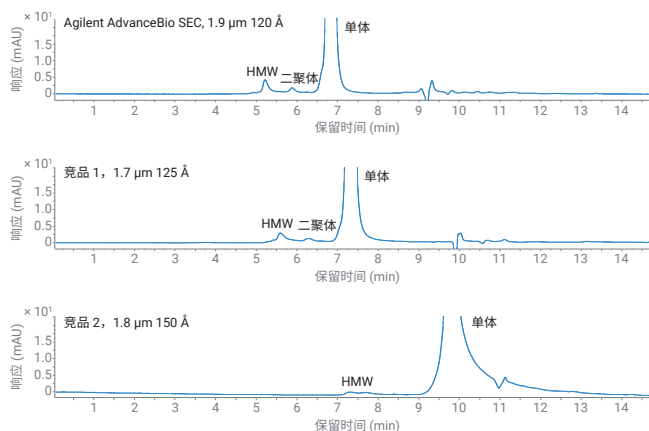


图 4. hG-CSF 体积排阻色谱图的放大图，流速 0.35 mL/min

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 \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理想峰形和分离度。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理想 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 \AA				竞品 1, 1.7 μm 125 \AA				竞品 2, 1.8 μm 150 \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	N.D.			
单体	6.82	96.37	3.77	1.13	7.31	96.68	3.04	1.11	9.74	97.99		2.13

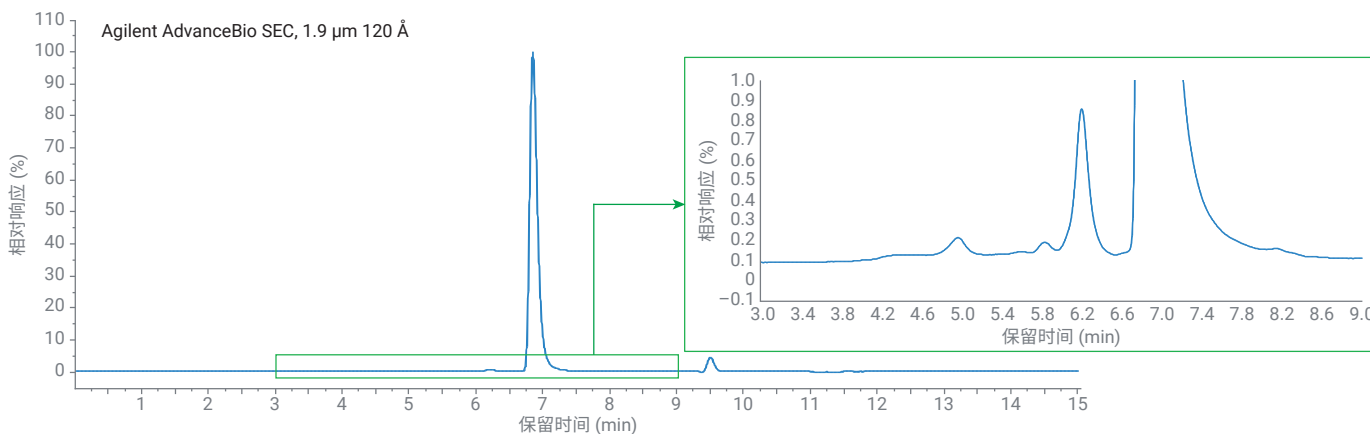


图 5. 生长激素 (rhGH) 的体积排阻色谱图

表 2. IFN α -2b 方法优化期间的峰形数据

NaCl (mmol/L)	峰宽 (min)	峰拖尾	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。

方法条件

参数	INF α -2b 的 HPLC 优化条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 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

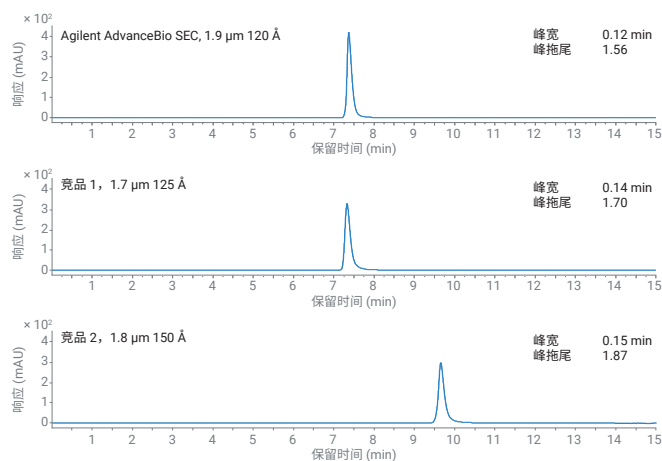


图 6. 干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

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。

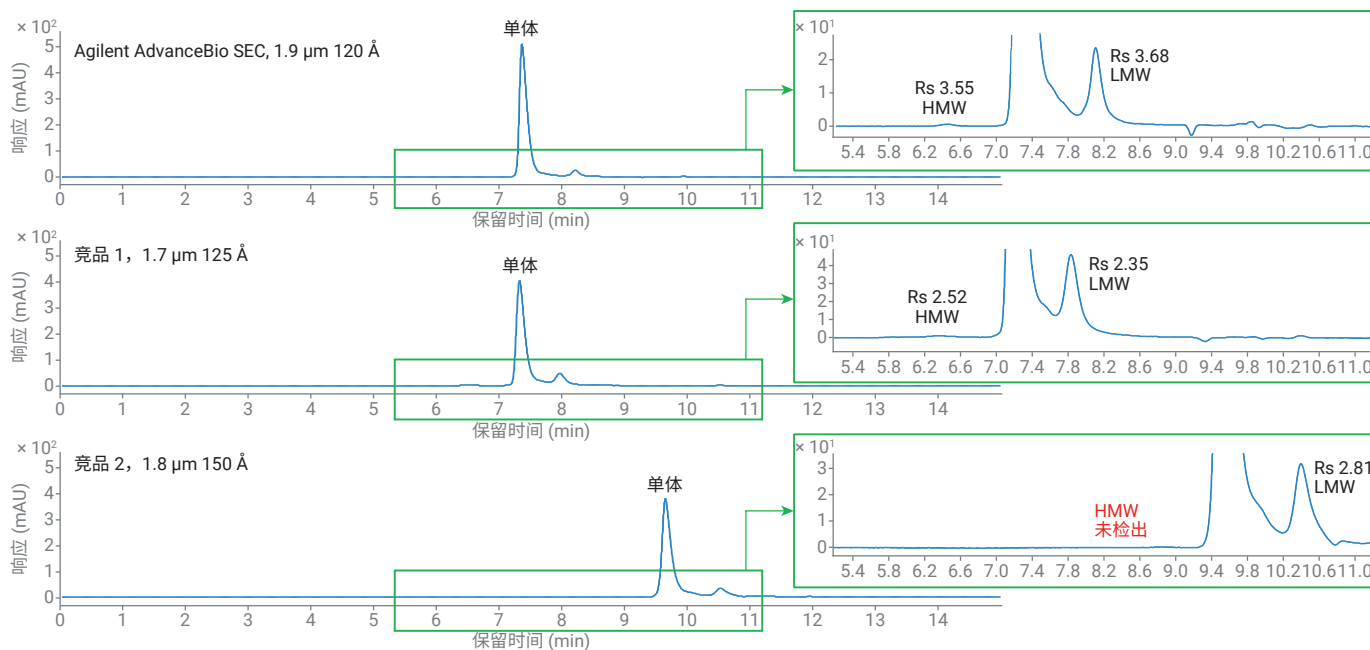


图 7. 干扰素 α -2b 的体积排阻色谱图

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

共价高分子量胰岛素分析

使用高性能体积排阻色谱提高速度和分离度

作者

Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

使用 HPLC 体积排阻色谱 (SEC) 法对胰岛素进行了分析，采用的色谱柱为 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 孔径、亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料色谱柱。将分析结果与传统方法和竞争厂商色谱柱进行了性能和效率的比较。使用 AdvanceBio 色谱柱时，胰岛素和高分子量 (HMW) 蛋白质的分离度显著高于传统方法，并且色谱分析时间更短，使高通量胰岛素样品分析成为现实。

前言

胰岛素是一种用于控制血糖稳态的小分子多肽激素，广泛应用于糖尿病治疗。基因工程技术使生物制药公司开发出了各种长效胰岛素类似物。早有研究表明，在酸性和高温条件下，胰岛素单体会形成淀粉样纤维^[1]。由于胰岛素类似物比天然胰岛素更易聚集，对于胰岛素类似物制造商来说，这是一个非常棘手的问题^[2]。可注射胰岛素的关键质量控制属性之一是控制胰岛素纤维化，通常称为高分子量 (HMW) 蛋白质。在当前的美国药典 (USP) 和欧洲药典 (EP) 专论方法中，对 HMW 聚集体的测定基于 HPLC 体积排阻色谱 (SEC)^[3,4]。根据 EP 方法，规定使用“孔径为 12–12.5 nm 的色谱 R 亲水性硅胶 (5–10 μm)，适用于从共价二聚体和聚合物中分离胰岛素单体”，长度为 30 cm，最小内径为 7.5 mm 的色谱柱。然而，该方法的运行时间长达 35 分钟，这对于任何进行高通量样品分析的实验室来说都会产生高昂成本。本文介绍了一种使用 Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 孔径、亚 2 μm 亲水聚合物涂层硅胶填料色谱柱开发的 SEC 方法。与传统药典方法相比，本方法具有运行速度更快、胰岛素和共价胰岛素 HMW 分离度更高的优点。

方法条件

参数	HPLC 条件
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 4.6 × 300 mm (部件号 PL1580-5250)
流动相	精氨酸 (1.0 g/L)/乙酸/乙腈 (65/15/20 v/v/v)
流速	0.30 mL/min
柱温	25 °C
进样量	2 μL
样品	人胰岛素对照品， 热处理胰岛素 (60 °C, 6 个小时)
总运行时间	15 min

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。

样品前处理

为了进行非变性质谱分析，将蛋白质样品保存在中性 pH 和挥发性水溶液（例如乙酸铵或甲酸铵）中至关重要。因此，在质谱分析之前，通常需要进行样品脱盐和缓冲液交换。简而言之，就是使用 Bio-Rad Bio-Spin P-6（限值 6000 MW）或 P-30（限值 40000 MW）小柱将蛋白质储备液（1–10 mg/mL）脱盐并使用 100 mmol/L 乙酸铵进行溶剂交换。首先用 100 mmol/L 乙酸铵缓冲液使小柱完全平衡。然后将蛋白质样品转移至色谱柱顶部并以 1000 × g 离心 5 分钟。然后使用 100 mmol/L 乙酸铵进行蛋白质缓冲液交换，随后即可进行质谱分析。这种脱盐方案导致的样品损失极小，蛋白质分子的结构改变也非常少。

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 可变波长检测器 (G7114A)

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS。

样品前处理

人胰岛素对照品 (Sigma, I2643) 和热处理胰岛素样品按照欧洲药典进行处理。

复溶样品，在 0.01 mol/L 盐酸溶液中稀释至 4.0 mg/mL，然后进一步稀释至终浓度 2 mg/mL。

结果与讨论

本应用重点展示了在 USP 和 EP 专论方法提供的条件下，对 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm 色谱柱分析胰岛素样品中 HMW 蛋白质的性能评估。这两种药典方法规定的酸性流动相由 0.65 g/L L-精氨酸、15% 乙酸和 20% (v/v) 乙腈组成。此流动相能够评估这些制剂中共价 HMW 的含量，同时破坏非共价胰岛素的自缔合以及与色谱柱间的相互作用。这款特色 AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱采用亲水性聚合物涂层设计，大大减少了分析物与填料颗粒表面之间不必要的次级效应。该色谱柱可实现出色的分离度和准确的 HMW 蛋白质定量。

图 1 显示了使用欧洲药典胰岛素对照品获得的系统适用性色谱图。1.9 μm 色谱柱的单体和 HWM 蛋白质分离度为 4.03，远远超过专论方法中系统适用性要求 ≥ 2.0 的分离度。胰岛素对照样品中 HMW 蛋白质的峰面积（表 1）满足 $< 1\%$ 的适用性要求。值得注意的是，此分析方法使用 AdvanceBio SEC 120 Å, 1.9 μm, 4.6 × 300 mm 色谱柱，总分析时间约为 15 分钟，而使用更大粒径的传统亲水性硅胶色谱柱的欧洲药典专论方法则需要 35 分钟。

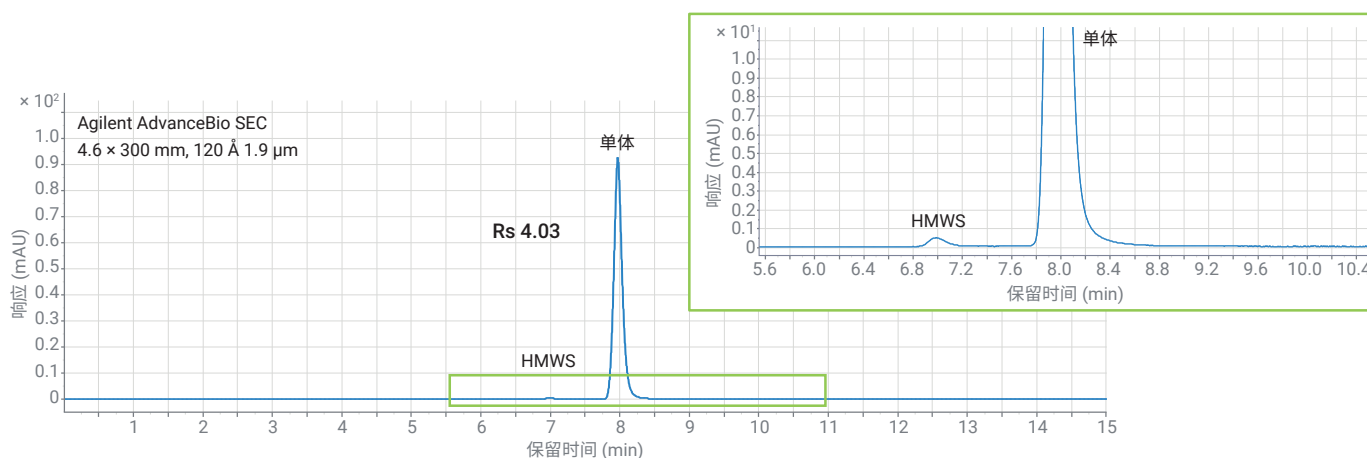


图 1. 具有单体和 HMW 蛋白质的人胰岛素对照品的体积排阻色谱图

表 1. 人胰岛素对照品 SEC 分析的结果汇总

峰归属	RT (min)	峰面积百分比	分离度 USP	峰拖尾	半峰宽
胰岛素 HMW	6.99	0.67		1.48	0.15
胰岛素单体	7.96	99.33	4.03	1.04	0.15

欧洲药典专论中胰岛素 SEC HMW 测定方法规定 SEC 粒径为 5–10 μm ，而美国药典专论中没有规定粒径范围。作为本研究的一部分，对 AdvanceBio SEC 120 \AA , 1.9 μm 色谱柱和其他 SEC 色谱柱供应商的产品进行了比较，这些色谱柱均采用亚 2 μm 颗粒，长度相当于 300 mm，内径 4.6 mm（图 2）。与竞争厂商的色谱柱相比，安捷伦 1.9 μm 色谱柱的分离度显著提高 (> 50%)。胰岛素单体峰尾的分离度也得到明显改善，与供应商 2 SEC 色谱柱相比，低分子量片段峰在安捷伦 SEC 色谱柱上实现了更出色的分离。在供应商 2 SEC 色谱柱中观察到明显的峰拖尾，这可能是次级相互作用造成。需要重点注意的是，胰岛素峰的不同洗脱时间是由于这些色谱柱之间的孔径差异造成的。

热处理胰岛素样品中 HMW 蛋白质的峰面积百分比在所有色谱柱中均超过 1%，表明该样品不符合适用性测试限值。然而，与其他供应商的色谱柱相比，使用安捷伦 SEC 120 \AA , 1.9 μm 色谱柱分离出更高百分比的聚集体。

汇总数据如表 2 所示。在 AdvanceBio SEC 120 \AA , 1.9 μm , 4.6 \times 300 mm 色谱柱方法中，单体和共价二聚体峰的分析效率有所提高，再次证明更新后的方法可提高分离度，并缩短运行时间。根据 USP (USP37-NF32S1) 和 EP 指南，等度方法的最大调整范围为粒径减小 50%，色谱柱内径改变 25%。基于这些要求，使用粒径为亚 2 μm 、内径为 4.6 mm 的色谱柱来分析胰岛素的 SEC 方法仍需要进一步的方法验证和优化，以便将现代颗粒填料技术融入已建立的方法中。

表 2. 使用竞争产品对热处理胰岛素样品进行 SEC 分析的结果汇总

峰归属	AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA			供应商 1 SEC 125 \AA 1.7 μm			供应商 2 SEC 150 \AA 1.8 μm		
	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽	峰面积 (%)	峰拖尾	半峰宽
HMWS	1.93			1.57			1.10	2.01	
胰岛素单体	97.66	1.00	0.13	97.85	1.10	0.13	98.80	1.37	0.14
LMWS	0.41			0.58			0.20	97.99	

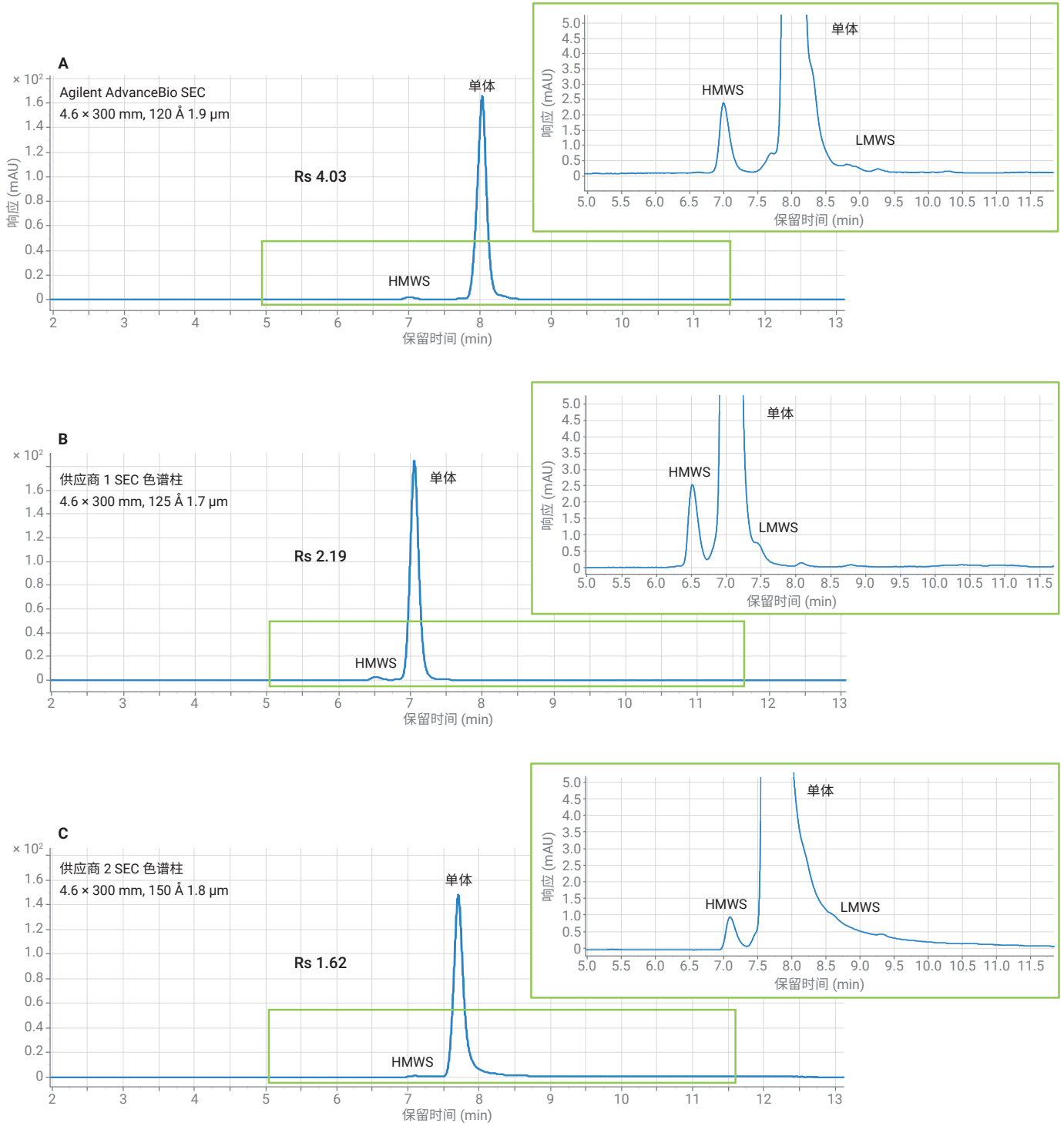


图 2. 使用竞争产品对具有聚集体和低分子量片段的热处理胰岛素进行 SEC 分析

结论

体积排阻色谱是美国药典和欧洲药典规定的分析治疗制剂中共价 HMW 胰岛素的标准方法。本文给出了色谱图，展示了使用不同竞争厂商的 SEC 色谱柱时该方法的性能。结果表明，与传统的 SEC-HPLC 方法相比，使用 Agilent BioAdvance SEC 120 Å 孔径、AdvanceBio SEC 1.9 μm 色谱柱和 Agilent Infinity II 生物惰性液相色谱仪能够显著提高分离度，同时减少分析时间和流动相使用。

参考文献

1. Yang, Y., et al. An Achilles' Heel in an Amyloidogenic Protein and Its Repair: Insulin Fibrillation and Therapeutic Design." *J. Biol. Chem.* **2010**, 10806–10821
2. Librizzi; Fabio; Rischel. The Kinetic Behavior of Insulin Fibrillation is Determined by Heterogeneous Nucleation Pathways. *Protein Science* **2005**, 12, 3129–3134
3. Insulin Monograph, *USP Pharmacopeial Forum*, 31(5), 1375
4. European Pharmacopeia 5.0, *Human Insulin Monograph* **2005**, 838, 1800–1802

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱校准

技术概述

作者

Andy Coffey
安捷伦科技有限公司

前言

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱专为生物分子的水相体积排阻色谱 (SEC) 而设计。这些填料颗粒采用独特技术制造，同时具备适用于分离蛋白质、多糖或水溶性聚合物等分子的理想孔径和孔体积。

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。对于多糖分析，应使用支链淀粉多糖分子量标准品，而对于合成聚乙二醇或聚环氧乙烷，PEG/PEO 标准品较为适宜。

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。由此就提出了成功使用 SEC 需要的两个关键环节：

- 分析物与固定相之间不应存在次级相互作用
- 选择的孔径应匹配所分析分子的大小

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。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^[1]。这对于单克隆抗体等分子而言是一个特殊问题，如果存在蛋白质聚集，在用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。相比之下，多糖和聚环氧乙烷等合成聚合物不具有多种基团，但通常是由一系列密切相关的低聚物组成。在这种情况下，SEC 可以提供分子量、分子量分布和支化信息的分析^[2]。

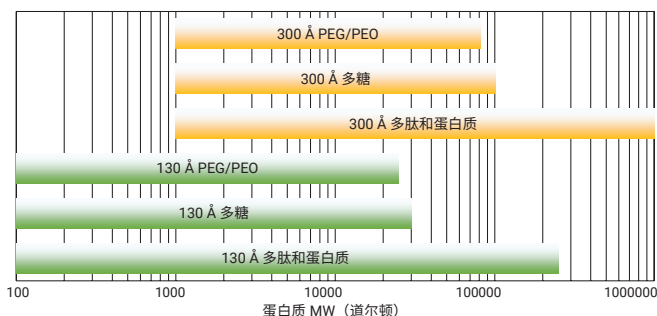


图 1. Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的分离范围

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱校准

选择分析中使用的洗脱液。样品需要能够溶于流动相，并且不应存在会导致分子提前或延后洗脱的次级相互作用。对于蛋白质，我们建议使用 150 mmol/L 磷酸钠，pH 7.0，因为这样可以消除 HPLC 系统中可能导致腐蚀的氯化钠。不过仍然可以使用其他流动相，包括磷酸盐缓冲液 (PBS) 或 0.1 mol/L 磷酸钠/0.1 mol/L 硫酸钠等高强度流动相（请参见第 10–11 页）。

将标准品溶解于流动相中。确保溶液澄清，没有不溶物质存在。如有必要，可过滤样品。为确保样品完全溶解，可考虑更换流动相。

记录每种标准品的色谱图，并绘制保留时间 (x 轴) 与分子量 (y 轴) 的关系图，以创建校准曲线。请注意，y 轴是以对数刻度绘制。

条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5350) Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5301)
样品:	安捷伦聚乙二醇校准试剂盒, PEG-10, 10 × 0.2 g (部件号 PL2070-0100) 安捷伦环氧乙烷校准试剂盒, PEO-10, 10 × 0.2 g (部件号 PL2080-0101) AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品, 冻干, 1.5 mL (部件号 5190-9416) AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品, 冻干, 1.5 mL (部件号 5190-9417) 蛋白质标准品 (Sigma-Aldrich) 使用流动相将样品配制为 0.5–1.0 mg/mL
洗脱液 A:	150 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸盐, 140 mmol/L NaCl) 或 100 mmol/L 磷酸钠 + 100 mmol/L 硫酸钠, pH 7.0
流速:	1.0 mL/min
检测器:	多糖和 PEG/PEO 标准品使用 RI 检测器 多肽和蛋白质使用 UV 检测器, 220 nm
系统:	Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱 (附带示差折光检测器)

多肽和蛋白质校准

蛋白质和多肽通常是结构非常紧凑的分子，包含多个氢键、静电相互作用或二硫桥等共价键。最好选择能够涵盖色谱柱操作范围的一系列标准品来校准。还可以使用制备好的标准混合物，因为容易对峰进行清晰界定和良好分离（图 3A 和 3B）。

如果存在来自不同氨基酸的各种侧链官能团，就意味着可能发生不利的次级相互作用，因此可能需要测试不同的流动相组成。

图中的峰大多非常尖锐清晰，因为它们代表的是单一分子种类。蛋白质含有聚集体是很常见的，通常也得到了良好分离——明显是早洗脱峰或一系列峰。

蛋白质/多肽	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
甲状腺球蛋白	670000	4.60	5.14
γ-球蛋白	150000	4.90	6.53
BSA	66000	5.53	7.57
卵清蛋白	44300	6.04	8.13
肌红蛋白	17600	6.77	8.79
细胞色素 C	12327	6.95	8.92
抑肽酶	6511	7.56	9.38
神经降压素	1672	9.42	10.54
血管紧张素 II	1040	9.94	10.82

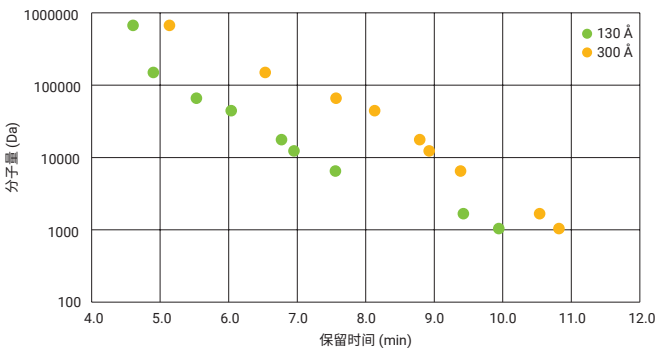


图 2. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行蛋白质和多肽校准

蛋白质和多肽标准品的代表性色谱图

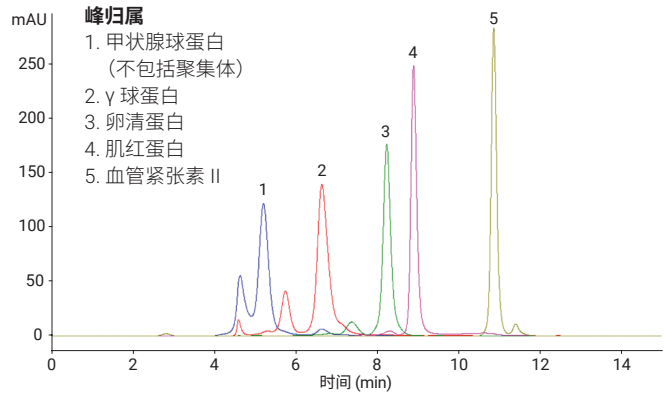


图 3A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分析 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 蛋白质标准品（部件号 5190-9417）中包含的每种多肽和蛋白质

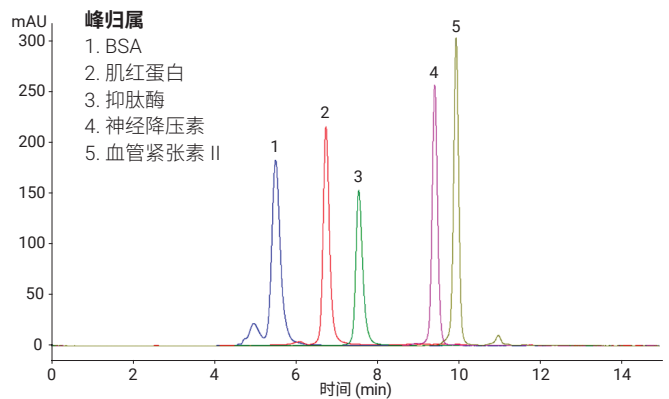


图 3B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分析 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 蛋白质标准品（部件号 5190-9416）中包含的每种多肽和蛋白质

多糖校准

如果分析物也是多糖，应使用淀粉或纤维素等多糖标准品进行校准。多糖有许多类型，包括直链、支链或硫酸化分子。与多肽或蛋白质不同，它们包含多种链长，体积可能非常大。因此，您需要确保使用的色谱柱能够分离要研究的多糖的分子量范围。

每多一个己糖，质量数差异为 162，这意味着很难分离各种低聚物，除非样品足够小（图 5C），使用两个串联色谱柱以提高分离度。

串联运行两个色谱柱可以提高分离度，使单个低聚物在 5800 Da 多糖样品中可见。

该样品含有约 30–40 个单元的低聚物，质量数差异为 162 Da。

多糖	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
788K	788000	4.48	4.74
380K	380000	4.58	4.84
100K	100000	4.73	5.33
48K	48000	4.89	6.19
23.7K	23700	5.39	7.42
5.8K	5800	7.16	9.22
麦芽三糖	504	9.46	10.72
麦芽糖	342	9.73	10.82
葡萄糖	180	10.01	11.09

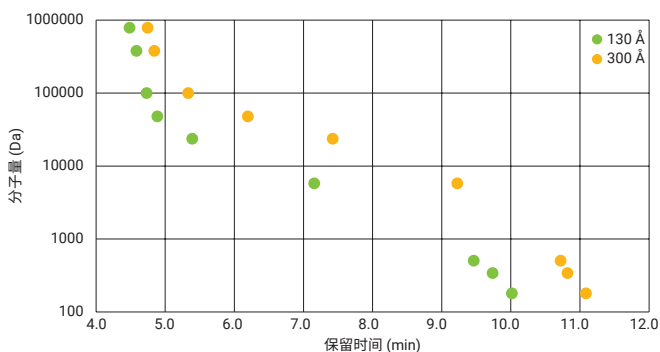


图 4. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行多糖校准

多糖标准品的代表性色谱图

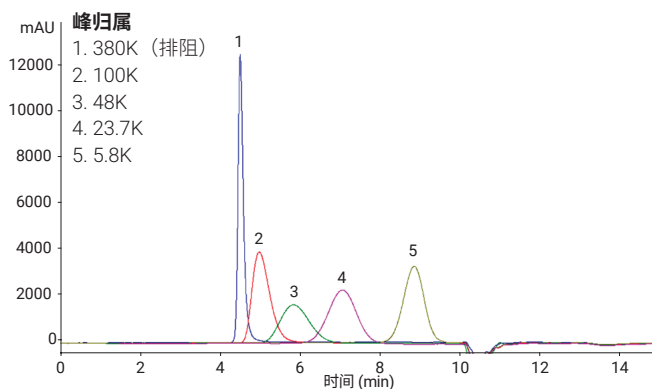


图 5A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分离多糖标准品

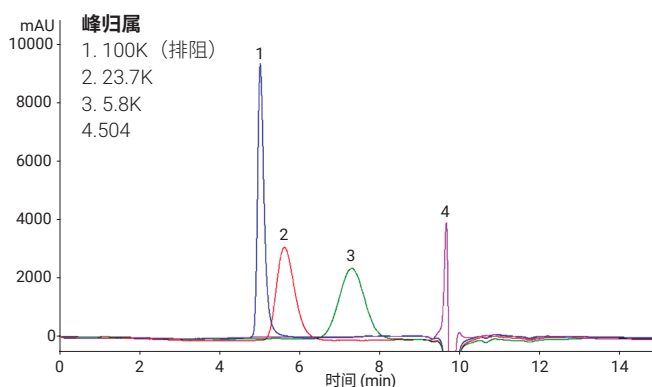


图 5B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分离多糖标准品

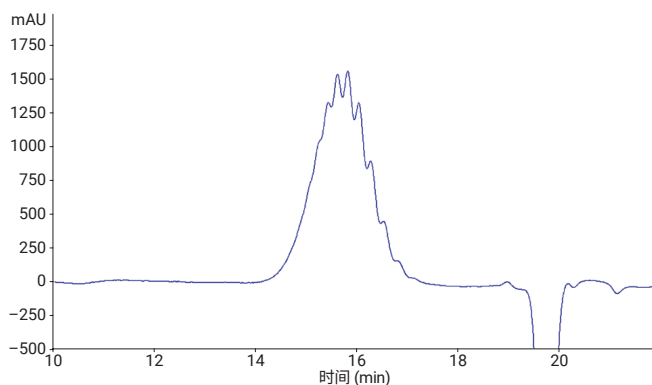


图 5C. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å + 130 Å 色谱柱串联运行多糖 5.8K 分离

PEG/PEO 校准

聚乙二醇 (PEG) 和聚环氧乙烷 (PEO) 类化合物为合成聚合物，有多种规格可供选择，覆盖的分子量范围较为宽广。与多糖类似，它们包含多种链长，但质量数差异只有 44 Da。

PEG/PEO	MW	保留时间 (min)	
		130 Å	300 Å
905K	905000	4.41	4.73
692K	692000	4.41	4.73
498.6K	498600	4.58	4.83
305.5K	305500	4.55	4.85
135.8K	135800	4.65	4.93
77.35K	77350	4.71	5.20
46.47K	46470	4.77	5.67
21.3K	21300	5.11	6.81
12.14K	12140	5.65	7.74
8.73K	8730	6.10	8.28
3.87K	3870	7.26	9.32
1.48K	1480	8.59	10.26
420	420	9.79	11.03
106	106	10.64	11.44

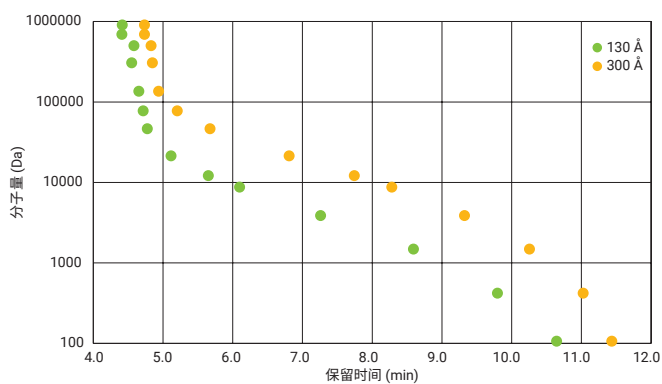


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱进行 PEG/PEO 校准

PEG/PEO 标准品的代表性色谱图

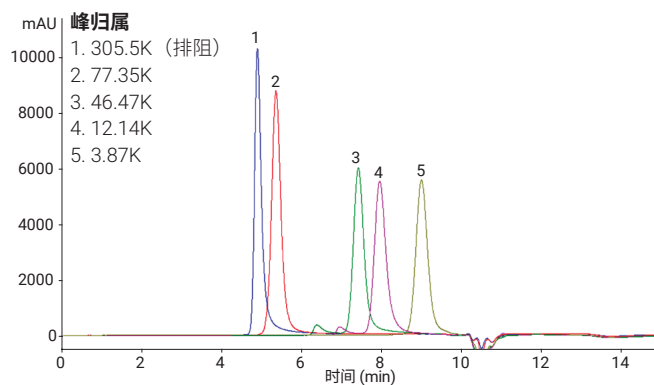


图 7A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱分离 PEG/PEO 标准品

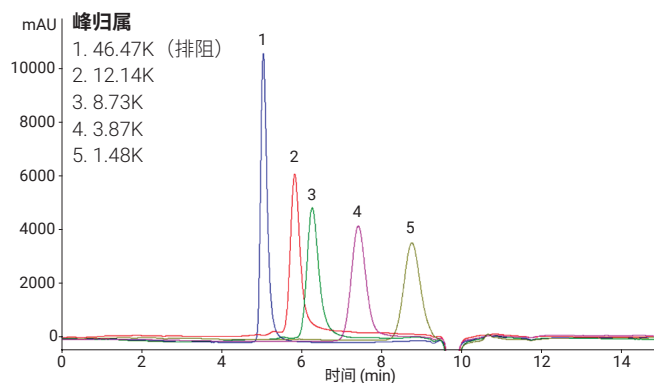


图 7B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱分离 PEG/PEO 标准品

流动相组成的影响

需要考虑流动相对溶液中分子大小的影响或者对防止次级相互作用的影响，因为会影响保留时间，改变校准曲线的形状。在以下三种不同流动相的比较中，可以清晰地看到这一点：150 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0；PBS，pH 7.4（约 10 mmol/L 磷酸盐，140 mmol/L NaCl）；0.1 mol/L 磷酸钠 + 0.1 mol/L 硫酸钠，pH 7.0（图 8）。

对于多糖等不存在次级相互作用的分子，流动相组成的影响最小（图 9）。

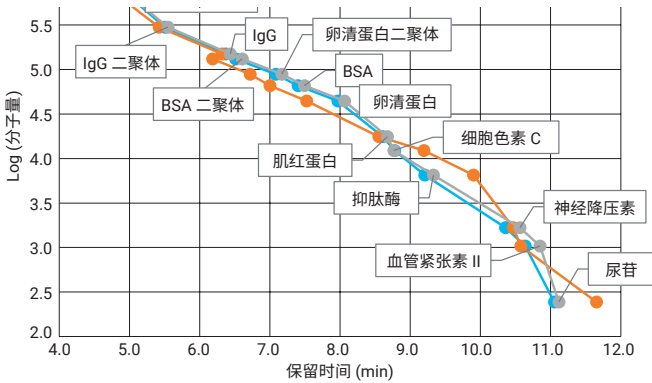


图 8. 流动相组成对使用蛋白质标准品进行色谱柱校准的影响

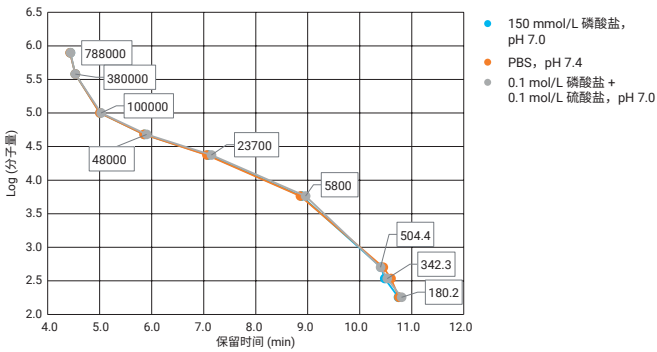


图 9. 流动相组成对使用多糖标准品进行色谱柱校准的影响

为多肽或蛋白质 SEC 分析选择流动相时，需要确定 pH 或离子强度的差异可能对目标样品造成的影响。图 10A、10B 和 10C 显示不同流动相条件下 BSA 的保留时间存在明显变化。二聚体和单体峰之间的分离度因子可能也会受到影响，因此应对方法优化和方法稳定性进行充分探讨。

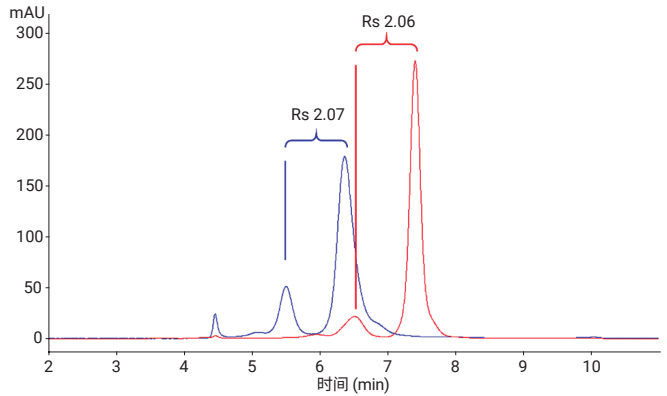


图 10A. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 150 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.0) 分离 γ 球蛋白和 BSA

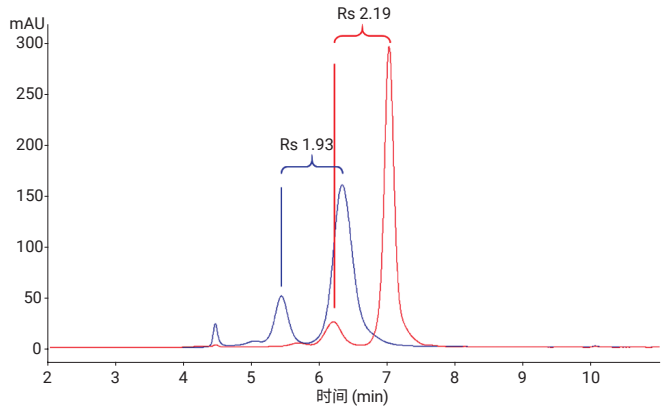


图 10B. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 PBS (pH 7.4) 分离 γ 球蛋白和 BSA

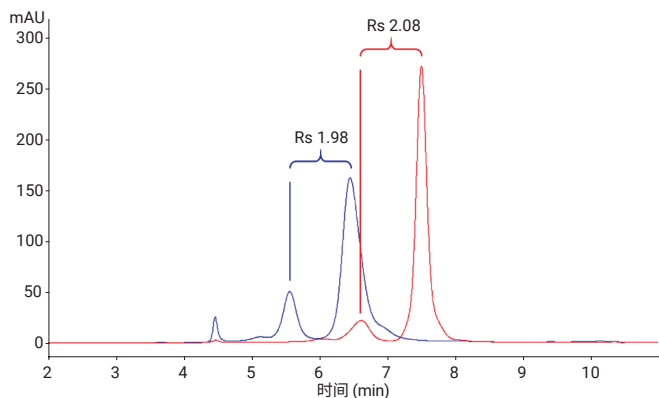


图 10C. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱和 100 mmol/L 磷酸钠 + 100 mmol/L 硫酸钠 (pH 7.0) 分离 γ 球蛋白和 BSA

结论

使用适当的标准品校准 Agilent AdvanceBio SEC 体积排阻色谱柱，可以确保您了解正确的工作范围，并且可以使用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，可以用于监测一段时间内的色谱柱性能，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。

安捷伦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。结合品种齐全的安捷伦液相色谱仪器、耗材和技术支持，我们可以根据您的需求提供完整工作流程解决方案。

订购信息

部件号	描述
PL1180-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm 保护柱
PL1580-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm 保护柱
5190-9417	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
PL1180-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm 保护柱
PL1580-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm 保护柱
5190-9416	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL

另请参见

1. 生物分子分析体积排阻色谱：使用指南；5991-3651CHCN
2. GPC/SEC 标准品：产品指南；5990-7996CHCN
3. GPC 色谱柱校准：最佳实践指南；5991-2720CHCN

参考文献

1. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **1993**, *10(4)*, 307-377

www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Conventional_GPC_-_Polymers_ans_Molecular_Weight.pdf

胰岛素生物仿制药与创新药的体积排阻色谱分析

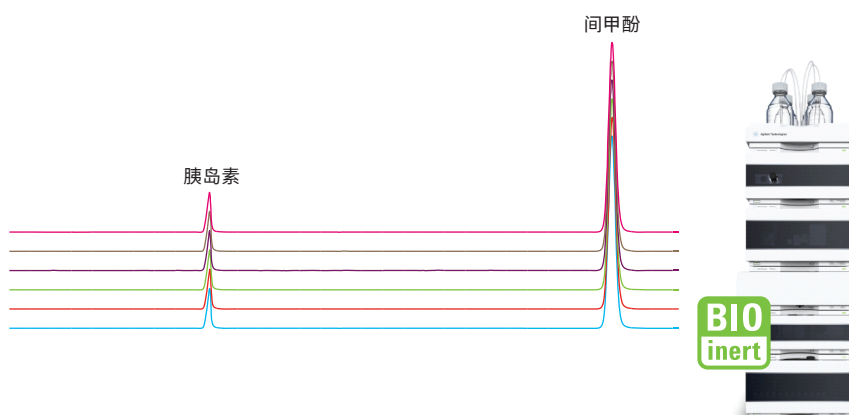
使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱

作者

M. Sundaram Palaniswamy 与
Andrew Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

胰岛素是一种用于控制血糖稳态的小分子多肽激素。基因工程技术使生物制药公司开发出了各种长效胰岛素类似物。目前仍未出现用于胰岛素类似物分析的药典方法。本文根据 EP 方法草案，采用 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱开发出了一种用于鉴定胰岛素类似物创新药和生物仿制药的 SEC 方法。采用系统适用性测试以及由胰岛素创新药作为标准物质的保留时间 (RT) 和峰面积精度研究证实了该方法在常规分析中的有效性。本应用简报还介绍了这款色谱柱在定量研究中检测分子量大于胰岛素的杂质方面的应用。



前言

新型胰岛素类似物是人胰岛素产品的一种替代物。临床试验已经证明，与人胰岛素相比，这些类似物具有相同或更好的疗效。胰岛素类似物目前是市面上的长效型人胰岛素。美国食品药品监督管理局 (USFDA) 在 2000 年 4 月批准了胰岛素类似物的使用。与小分子不同，生物治疗药物来自于生物过程。每个制造商各自都有一套用于生产原料药和药品的内部开发过程。这些生产方法可能使原料药中产生聚集体和降解产物等杂质。由于对降糖药需求的不断增加，因此生产不含杂质的药物以及提供无副作用的安全药物是一项十分重要却充满挑战的任务。在生物制药行业中，配备紫外检测器的液相色谱仪是批签发和表征研究的一种通用工具^[1]。体积排阻色谱 (SEC) 则是纯度分析的首选方法，可用于检测药品中的聚集体。本应用简报描述了一种用于测定胰岛素生物仿制药及其创新药参比之间的分子相似性，并进行了系统适用性与方法精密度分析的 SEC-UV 方法^[2]。这些测试可确保方法所得到的结果具有合格的准确度和精密度。所选标准基于关键色谱参数及其在可接受限值范围内的变异，方法评价实验中对该限值进行了定义。胰岛素的线性曲线在 10.6–3400 µg/mL 的范围内具有出色的相关系数，表明此方法适用于定量分析。文中还描述了采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱监测并分离强制应激研究中测得的分子量大于药品的杂质。

表 1. SEC HPLC 的色谱参数

参数	条件
流动相	200 mL 无水乙酸、300 mL 乙腈和 400 mL 水，用浓氨水将 pH 调节至 3.0，并用水稀释至 1000.0 mL
TCC 温度	室温
等度运行	流动相 A
进样量	10 µL
流速	0.5 mL/min
紫外检测	276 nm

材料与方法

仪器

- 采用完全生物兼容、最高压力达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，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 系列恒温箱 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C, 选项 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (G1315D, 配备生物惰性标准 10 mm 流通池)
- Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm (部件号 PL1180-5350)
- 软件
- Agilent ChemStation B.04.03 (或更高版本)
- 体积排阻色谱参数
- 表 1 展示了使用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性液相色谱系统进行体积排阻分析时的色谱参数

试剂、样品与材料

商品化胰岛素创新药与生物仿制药购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。乙酸和氨水购自 Sigma-Aldrich。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水采用 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国) 进行处理。

步骤

进样 10 µL 流动相 A 作为空白，随后对各线性浓度分别重复进样三次。用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD%) 值。以较低线性浓度样品的进样分析确定检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。将各线性浓度下的平均峰面积对胰岛素浓度作图，得出单体校准曲线。

线性和范围

校准曲线由浓度范围为 10.6–3400 µg/mL 的 9 个胰岛素创新药的标准浓度点构建。

LOQ 和 LOD

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低胰岛素浓度定义为 LOD，而将 S/N > 10 时的最低浓度定义为 LOQ。

胰岛素聚集体制备

通过温度处理制备胰岛素聚集体。简言之，将约 3.4 mg/mL 的药品置于聚丙烯管中并在 60 °C 下温育 6 小时。将样品冷却至室温并立即进行分析。

系统适用性

根据各论草案得出以下系统适用性要求：

- 对称因子：胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
- 峰谷比：最小值为 2
- 保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和：不高于色谱峰总面积的 0.3%，不考虑 RT 大于胰岛素峰的所有峰

结果与讨论

分离和检测

采用胰岛素创新药为参比标样，与胰岛素生物仿制药进行对比。通过优化 SEC HPLC 分离条件，完整胰岛素生物仿制药与创新药 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上实现了出色分离。55 分钟的总分析时间表明样品十分均匀，并未发生聚集。色谱柱中还可观察到防腐剂间甲酚的峰，洗脱时间约为 49 分钟（图 1）。

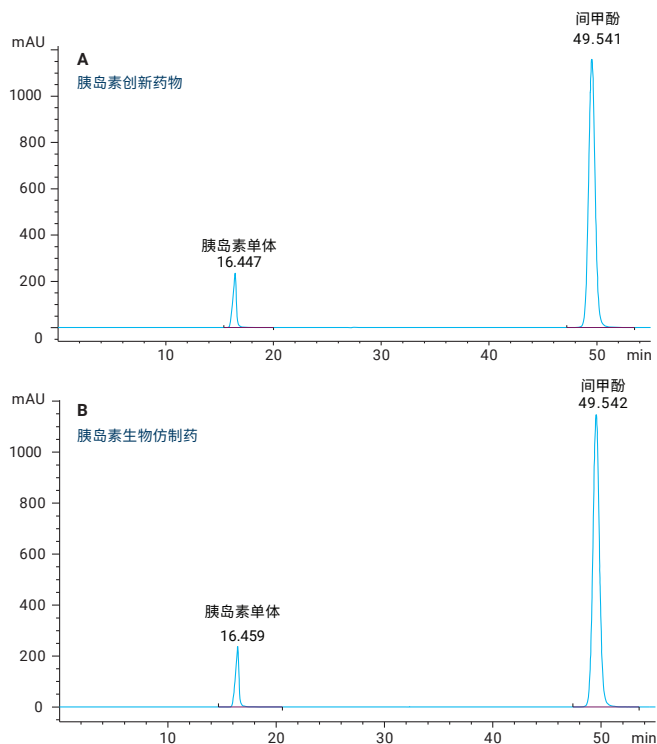


图 1. 胰岛素创新药和生物仿制药在 Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上得到的 SEC HPLC 色谱图

保留时间和峰面积的精密度

图 2 展示了胰岛素创新药与生物仿制药六次重复进样的叠加色谱图，表明结果具有出色的分离重现性。表 2 列出了六次重复进样中胰岛素单体的平均 RT 与峰面积 RSD。胰岛素单体的 RT 和峰面积 RSD 分别在可接受限值 $\pm 3\%$ 和 $\pm 5\%$ 的范围内，表明该方法具有优异的重现性和精密度。

系统适用性

表 3 列出了胰岛素类似物此次系统适用性研究的可接受标准，表 4 则展示了系统适用性的汇总结果。

胰岛素创新药与生物仿制药的系统适用性测试结果表明，使用安捷伦生物惰性液相色谱仪以及 AdvanceBio SEC 色谱柱的方法符合胰岛素 QA/QC 分析的严格性能要求。

表 2. RT 和峰面积精度 (n = 6)

样品	RT		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
胰岛素创新药物	16.450	0.057	5544.91	0.285
胰岛素生物仿制药	16.460	0.044	5459.55	0.662

表 3. 可接受标准

参数	限值
对称因子	胰岛素类似物色谱峰的最大值为 2.0
峰谷比	最小值为 2
保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	不高于色谱峰总面积的 0.3%

表 4. 系统适用性测试结果汇总

样品	Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱分析结果			
	对称因子	峰谷比	保留时间小于胰岛素类似物保留时间的所有杂质总和	通过 (是/否)
胰岛素创新药物	1.71	-	0.167	是
胰岛素生物仿制药	1.72	-	0	是

表 5. 胰岛素创新药的 LOD、LOQ 和 S/N 结果 (n = 3)

浓度 (μg/mL)	信噪比	平均峰面积
10.6 (LOD)	11.9	12.8
31.8 (LOQ)	34.7	37.4

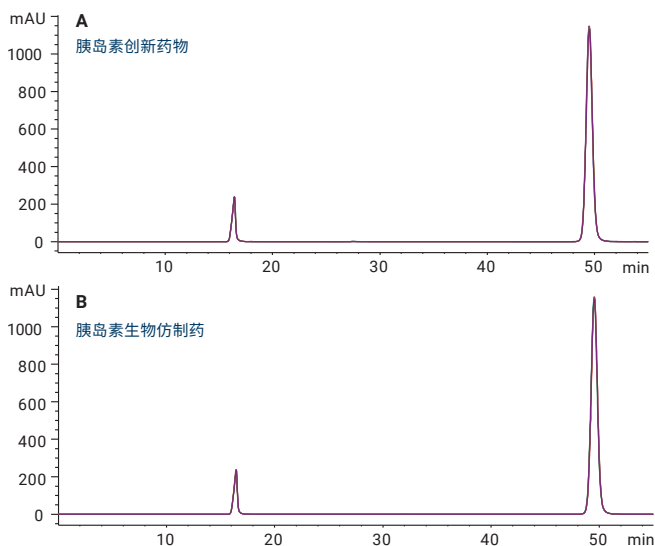


图 2. 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱上分离得到的胰岛素创新药和生物仿制药的 6 次重复叠加色谱图

LOD 和 LOQ

胰岛素创新药的 LOD 和 LOQ 分别为 11.3 µg/mL 和 28 µg/mL，表明该方法的灵敏度很高。表 5 展示了胰岛素创新药的 LOD 和 LOQ 测定值。

线性

使用面积响应与胰岛素浓度从 LOD 到本研究声明的最高浓度水平 (3.4 mg/mL) 构建了胰岛素创新药的线性曲线。图 3 显示了浓度范围为 10.6–3400 µg 的胰岛素线性曲线。R² 测定值大于 0.99，表明峰面积与胰岛素浓度之间存在良好的剂量依赖相关性。

聚集/降解分析与定量

生物治疗药物中的杂质分布对药品安全的重要性日益凸显。尽管聚集浓度极低，但仍会对产品质量产生极大影响。AdvanceBio SEC 色谱柱设计用于尽可能减少与生物分子的相互作用，从而实现胰岛素聚集体的完全基线分离。这些胰岛素聚集体在 AdvanceBio SEC 色谱柱上的洗脱时间分别为 11.181 和 13.884 分钟，如图 4 所示。

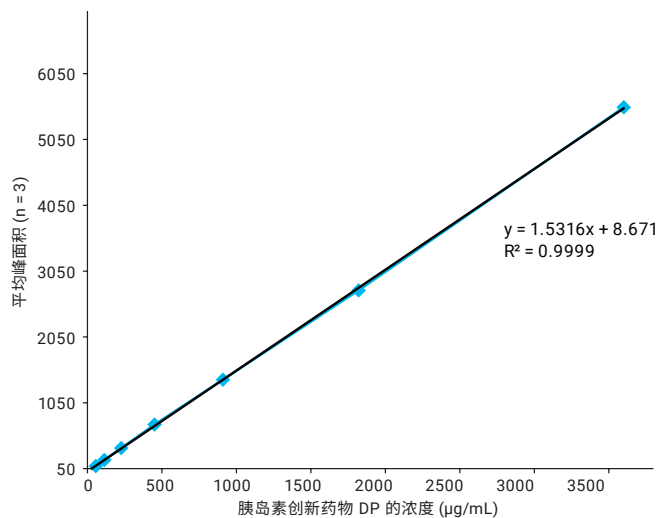


图 3. 10.6–3400 µg/mL 胰岛素标准浓度的线性曲线，显示出出色的线性相关系数数值

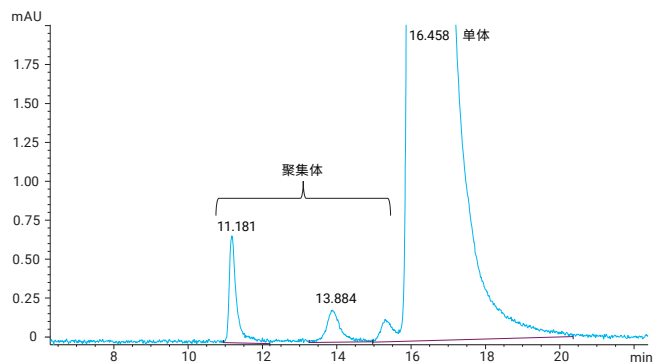


图 4. 经加热处理胰岛素的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱图表明胰岛素聚集体实现了基线分离

经济价值和使用寿命研究

成本是实验室主管或团队负责人可能会重点关注的一个方面，特别是相比其他色谱柱类型的 AdvanceBio SEC 色谱柱成本。在 SEC 分离中，除操作人员和仪器成本外，最昂贵的开销就是色谱柱本身的成本。如果色谱柱寿命不够长或柱间重现性出现问题，那么就可能需要筛选多个色谱柱。通过控制整个生产过程来确保批间重现性是必不可少的。图 5 展示了 AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130 Å 填料中的分离，确保对整个生产过程实现了完全控制。

我们的一个目标是确保色谱柱在整个用户开发过程中具有更长的使用寿命。延长色谱柱使用寿命具有额外优势，例如可大大缩短停机时间。图 6 显示 3 mg/mL 胰岛素原料药共进样 250 次，每隔 50 次选择一张色谱柱得到的 6 张叠加色谱图。表 6 列出了所选进样的 RT、峰面积、拖尾因子与理论塔板数。

结果清晰表明，RT、峰面积和拖尾因子在 250 进样中几乎未发生改变。理论塔板数和柱效指标也未产生明显差异。

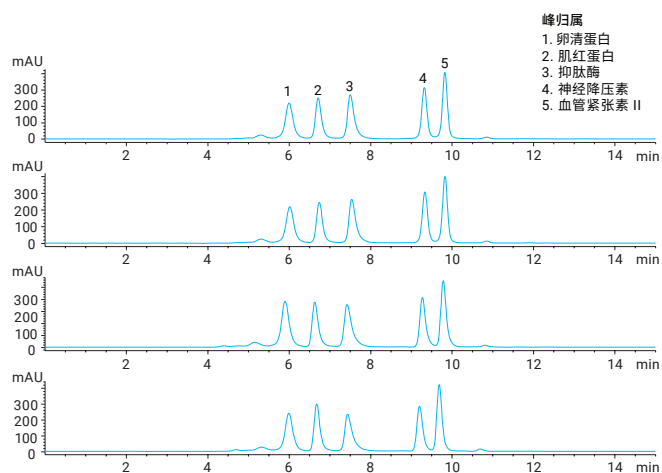


图 5. AdvanceBio 130 Å 蛋白质标准品在 4 个不同批次 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 填料中的分离

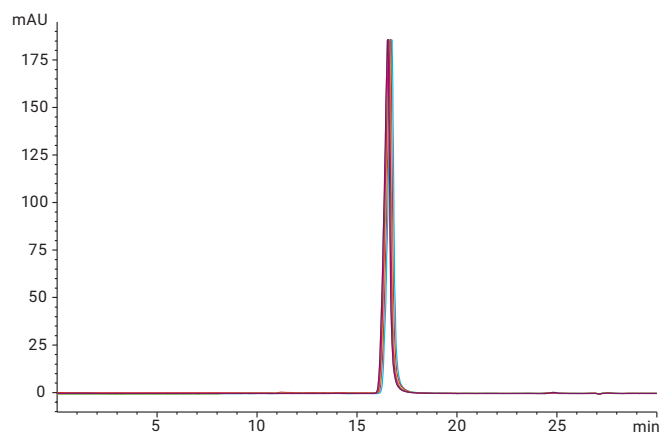


图 6. 250 次进样中每隔 50 次选择一张色谱图得到的 6 次重复进样叠加色谱图

结论

体积排阻色谱法是检测与监控生物药物聚集体和单体的常用方法。本应用简报证明了 Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 色谱柱是进行胰岛素类似物研究的理想选择。我们采用药典方法草案开发了一个用于定义胰岛素生物仿制药品和创新药品之间生物相似性的紫外型简单方法，方法采用了 AdvanceBio SEC 130 Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱。该方法具有优异的 RT 和峰面积精度，并能满足系统适用性要求。峰面积与胰岛素药品的 8 个标准浓度之间呈线性关系，并具有出色的线性相关系数。LOD 和 LOQ 测定值分别为 10.6 µg/mL 和 31.8 µg/mL，表明方法的灵敏度极高。AdvanceBio SEC 色谱柱可用于分离和监测强制应激研究中分析的聚集体。我们还展示了使用 AdvanceBio SEC 色谱柱所具备的更大经济效益，其中包括减少批间生产差异，以及利用重现而稳定的结果延长色谱柱使用寿命。将这一简单的重现方法与生物惰性和耐腐蚀仪器相结合，可作为整个开发过程中胰岛素常规质量检查的可靠适用方法。

表 6. 胰岛素原料药 250 进样的 RT、峰面积、拖尾因子和理论塔板数

进样次数	RT (min)	峰面积	拖尾因子	理论塔板数
1	16.657	3944	0.899	16001
50	16.671	3966	0.890	15849
100	16.681	3968	0.898	15982
150	16.622	3942	0.893	15942
200	16.634	3953	0.895	15919
250	16.634	3963	0.890	15944

参考文献

1. Kannan V; Narayanaswamy P; Gadamssetty D; Hazra P; Khedkar A; Iyer, H. A tandem mass spectrometric approach to the identification of O-glycosylated glargine glycoforms in active pharmaceutical ingredient expressed in *Pichia pastoris*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23(7), 1035-42
2. Pharmeuropa, Vol. 23, No. 2, April **2011**

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检测相结合

作者

Andy Coffey 和 Matthew Rain
安捷伦科技有限公司

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。

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, 必须在各种条件下准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合适技术的工作流程。

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 150 mm 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 300 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, 300 \AA , $7.8 \times 150 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱 (部件号 PL1180-3301) 或
- Agilent AdvanceBio SEC, $2.7 \mu\text{m}$ 300 \AA $7.8 \times 300 \text{ mm}$ 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	220 nm, 280 nm, LS 90°, 以及 DLS
样品	利妥昔单抗创新药、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理想流动相组成，我们评估了四种不同 pH 条件下的三种不同流动相，代表了 12 种实验条件。缓冲液组成为：

- 150 mmol/L 磷酸钠
- 10 mmol/L 磷酸钠 + 140 mmol/L NaCl (模拟不同 pH 值的 PBS)
- 100 mmol/L 磷酸钠 + 150 mmol/L 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 300 Å 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 (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	总浓度 (mmol/L)	%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 mmol/L NaCl

C = 200 mmol/L NaH₂PO₄

D = 200 mmol/L 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 mmol/L 磷酸钠和 140 mmol/L 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。

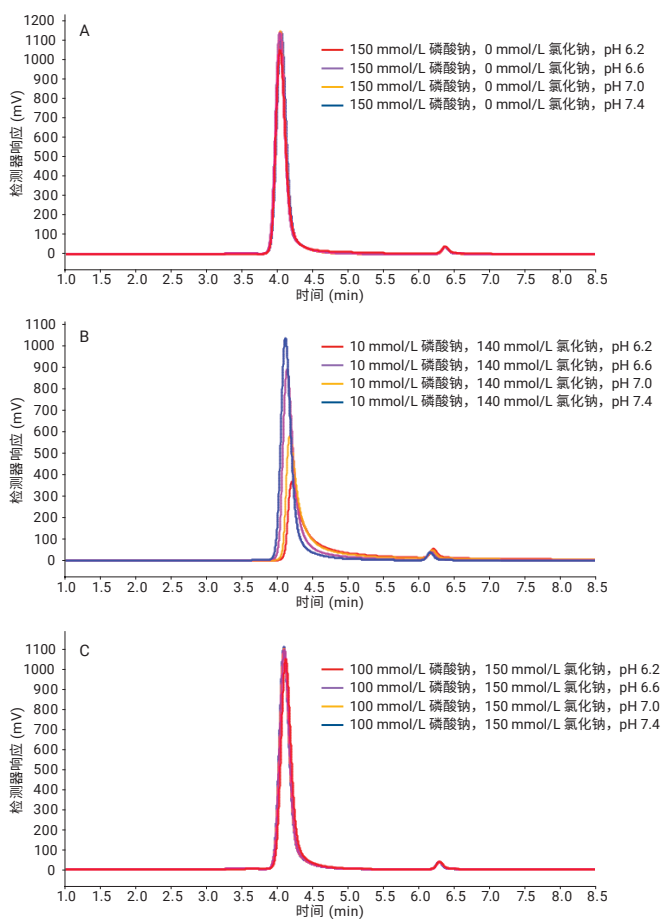


图 1. 利妥昔单抗创新药（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

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和利妥昔单抗生物仿制药的结果。在 pH 7.0 下使用 150 mmol/L 磷酸钠或 100 mmol/L 磷酸钠配合 150 mmol/L NaCl（实验 3 和 11）获得了一致性最好的结果。

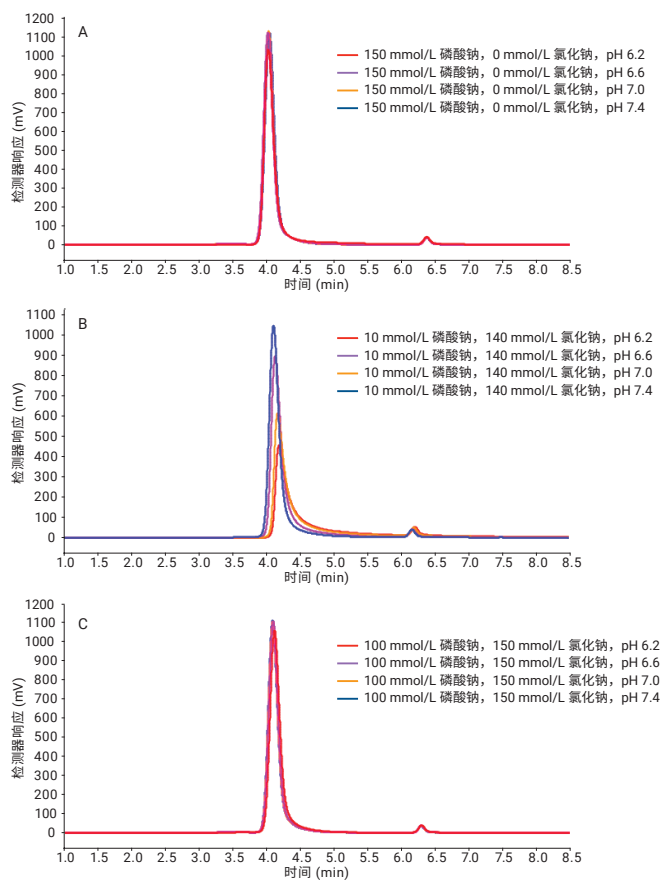


图 2. 利妥昔单抗生物仿制药（进样量 1 μ L）在 12 种不同流动相条件下的连续运行结果（实验 1-12：见表 1）

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 mmol/L 磷酸钠和 140 mmol/L 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任何其他色谱图的单个峰报告分子量信息。

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。

较大聚集体和在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，并在图 6 所示的某些流动相条件下揭示了利妥昔单抗创新药和生物仿制药发生了差异化的更广泛的聚集。

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）。

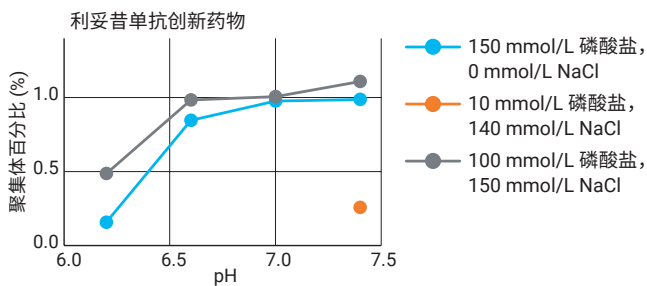


图 3A. 利妥昔单抗创新药中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

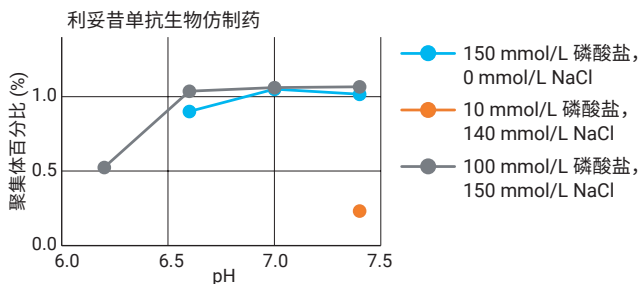


图 3B. 利妥昔单抗生物仿制药中聚集体含量的峰面积百分比（实验 1-12：见表 1）。图中显示了检出聚集体的实验数据点

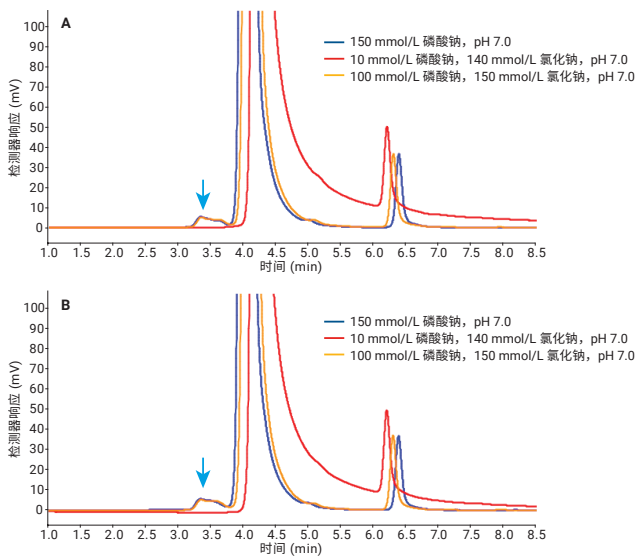


图 4. 在 pH 7.0 最佳条件的不同缓冲盐浓度下（表 1 中的实验 3、6 和 11）运行得到的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) 的 UV 220 nm 信号的基线放大图

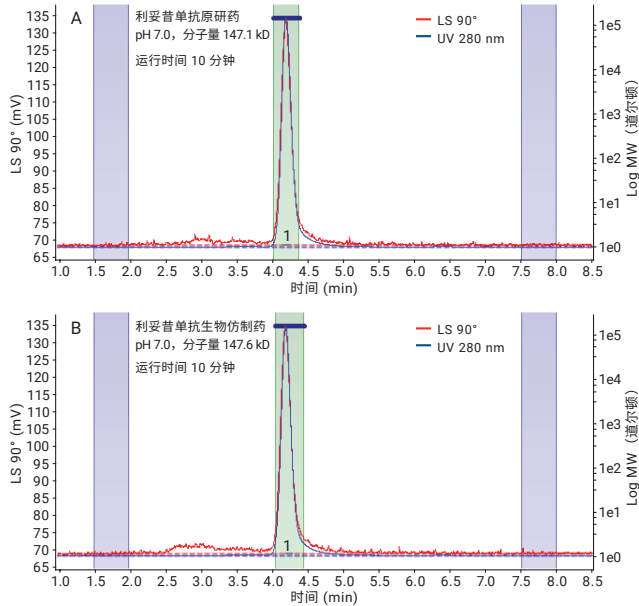


图 5. 在 100 mmol/L 磷酸钠、150 mmol/L NaCl 和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 11) 运行的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

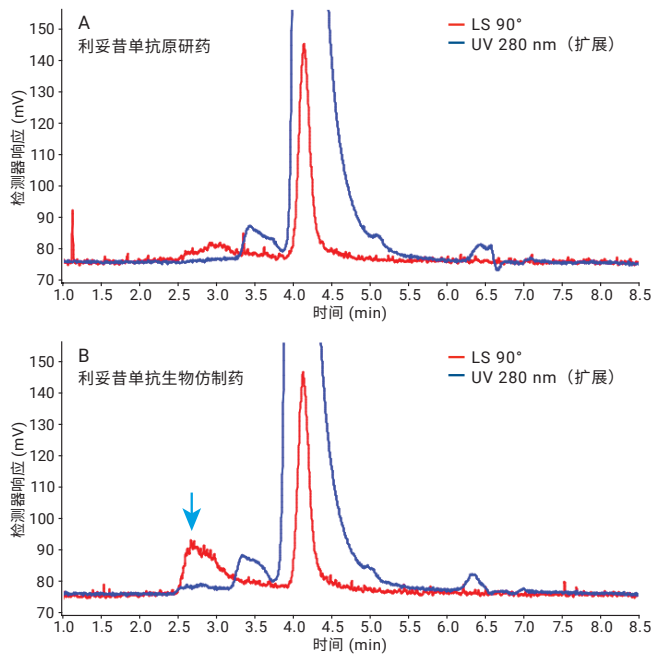


图 6. 在 150 mmol/L 磷酸钠和 pH 7.0 条件下 (表 1 中的实验 3) 运行的利妥昔单抗创新药 (A) 和利妥昔单抗生物仿制药 (B) LS 分析结果的比较

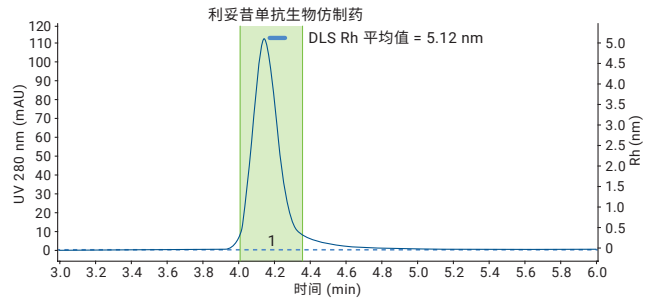


图 7. 利妥昔单抗生物仿制药的 DLS 分析显示了 LS 检测器得到的流体动力学半径结果

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 300 Å 150 mm 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 300 cm 色谱柱。AdvanceBio SEC 色谱柱表现出更多优势, 例如非特异性结合。BioMDS 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。

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**

存在阴离子表面活性剂的情况下使用 体积排阻色谱

完整蛋白质分析

作者

Andy Coffey
安捷伦科技有限公司

摘要

十二烷基硫酸钠 (SDS 或 SLS) 是人们熟知的阴离子表面活性剂，常用于使蛋白质变性。它常用于聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，通过与广泛蛋白质极其一致的结合水平提供可靠的质荷比。这样，就能够根据相对离子淌度对应的相对分子大小来分离变性蛋白质。相反，基于分子大小的蛋白质分离使用的体积排阻色谱 (SEC) 通常在非变性条件下进行，主要使用水相缓冲液作为流动相。

本应用简报将 SEC 和光散射检测结合使用，以研究不同 SDS 浓度对蛋白质分子的影响。通过研究 RT、表观分子量和流体动力学半径的变化来研究这一影响。

前言

为使蛋白质变性，在其临界胶束浓度 (CMC) 以上使用十二烷基硫酸钠 (SDS)。SDS 在纯水中的 CMC 为 8.2 mmol/L (约 0.2% w/v)。但是，缓冲盐的存在或 pH 和温度的变化可显著降低 CMC。例如，在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中观察到的 CMC 值约为 1.0 mmol/L (约 0.04% w/v)。当大约 62 个 SDS 分子聚结成球形，其中疏水核被阴离子表面包围时，会形成胶束，如图 1 所示。通常，SDS-PAGE 样品前处理使用的 SDS 浓度远高于 2% w/v，同时还会使用还原剂裂解蛋白质分子内的二硫键。得到的饱和 SDS-蛋白质复合物中，平均每克蛋白质含有 1.4 g SDS^[1]。研究者认为这种变性蛋白质是刚性圆柱形状，因此凝胶电泳中观察到的离子淌度与分子量成正比。省略二硫键还原后，观察到 SDS 与蛋白质的比例显著降低，达到平衡的时间可能加倍^[2]。

相反，研究者发现添加 SDS (约 10:1 摩尔比) 可阻止 BSA 溶液发生热变性，否则热变性会产生高分子量低聚物^[3]，或降低非共价聚集水平。过去建议在流动相中使用 0.1% w/v SDS 以减少保留时间 (RT)，并改善蛋白质体积排阻色谱 (SEC) 的峰形^[4]。

SDS 使蛋白质变性的机制尚不完全清楚。由于表面活性剂分子和蛋白质都具有互补的离子和疏水区域，因此显然可能涉及到多种机制的组合。热力学研究表明，并非只有离子相互作用。SDS 可能首先通过与蛋白质表面上带正电荷的氨基酸侧链 (Lys 和 Arg) 之间的离子相互作用开始结合。增加 SDS 浓度会导致更高的掺入水平，推测柔性蛋白质链最终由 SDS 胶束修饰，而不是最初提出的刚性圆柱模型^[5]。

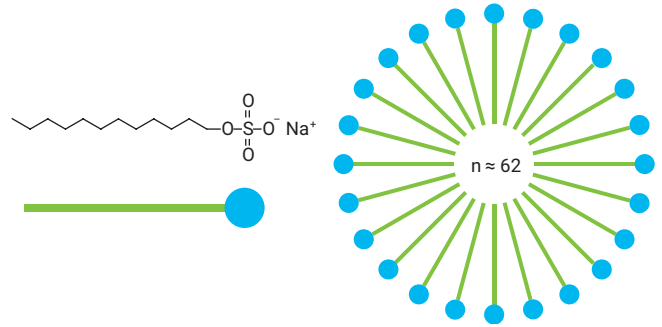


图 1. 浓度高于 CMC 时形成 SDS 胶束的动画 (聚集数约为 62)

牛血清白蛋白 (BSA) 是一种蛋白质，由于能够作为组织和细胞之间小分子的载体而得到充分研究。研究者已使用多种分析技术测定了 BSA 单体的结构和体积 (流体动力学半径)。其一级结构为 583 个氨基酸，分子量为 66,463 道尔顿，如图 2 所示。商业样品通常含有不同量的二聚体和高阶聚集体，不同的分离技术可能导致这些低聚物的含量不同。由于 BSA 含有 35 个半胱氨酸残基，因此存在 17 个二硫键和一个游离巯基。研究者认为 BSA 低聚物主要通过这个多余巯基参与的二硫键共价连接。因此，在不存在还原剂的情况下，用 SDS 变性不会导致这种共价连接的二聚体和高阶聚集体恢复为单体形式。

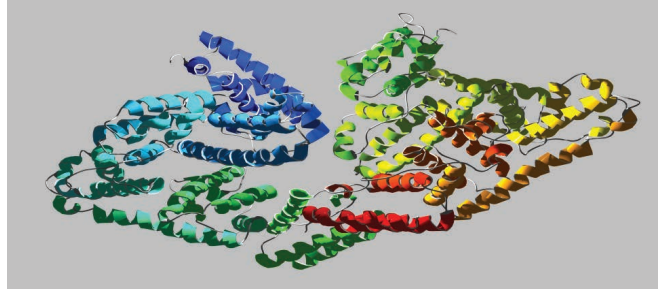


图 2. 牛血清白蛋白的天然心形构象

为研究 SDS 变性对 BSA 特征的影响，进行了一系列实验。使用未还原 BSA 蛋白的 SEC，可以确定二聚体和高阶聚集体的含量。另外使用具有动态光散射 (DLS) 功能的光散射检测器，可以测量分子量和流体动力学半径 (Rh)。该系列实验选用的洗脱液是磷酸盐缓冲液 (PBS)，其中含有 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液和 140 mmol/L NaCl, pH 7.4 (洗脱液 A)。用相同方式制备第二流动相，但添加 2% w/v SDS (洗脱液 B)。然后通过改变洗脱液 A 和洗脱液 B 的比例增加流动相中 SDS 的浓度，运行 HPLC 仪器。

在整个实验过程中使用同样的 BSA 样品，只在 PBS 中以 10 mg/mL 的浓度制备。

该实验旨在确定：

- SDS 是否能使 BSA 低聚物变性
- 对于使用在线光散射检测测定的分子量，会观察到什么影响
- 对于流体动力学半径，会观察到什么变化

条件

参数	值
色谱柱：	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5301)
样品：	BSA (Sigma-Aldrich) 用洗脱液 A 配制浓度为 10 mg/mL 的样品
洗脱液 A：	PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸盐, 140 mmol/L NaCl)
洗脱液 B：	PBS, pH 7.4 (10 mmol/L 磷酸钠, 140 mmol/L 氯化钠) + 2.0% w/v SDS
梯度：	在 0% B; 10% B; 20% B; 30% B; 40% B; 50% B; 60% B; 70% B 时等度洗脱
流速：	0.8 mL/min
检测器：	UV; 280 nm; LS 15°, LS 90°
仪器：	Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱联用 Agilent 1260 Infinity Bio-SEC 多检测器系统

结果与讨论

进行两次空白进样以使色谱柱在流动相中活化，然后重复进样 10 mg/mL 的 BSA。

图 3 显示了不同流动相组成下的四次单独实验的叠加色谱图 (UV 280 nm 信号)。表 1 列出了整个实验系列的相关 RT 信息。

从表 1 可以看出，不同运行的总峰面积几乎没有变化。这说明增加 SDS 浓度不会导致蛋白质吸附，或由于诱导聚集而导致蛋白质损失。RT 有所缩短，但从 0.6% 到 1.4% SDS (w/v) 保持稳定，如图 4 所示。RT 缩短也导致峰间分离度降低，因此难以准确确定二聚体和高阶聚集体变性的程度。显然这些多聚体峰的丰度仍然很高，因此应当主要是共价连接。

表 1. RT 和总峰面积

流动相中的 SDS 浓度	RT (min)			总峰面积
	高阶聚集体	二聚体	单体	
0.0%	6.00	6.46	7.29	3632
0.2%	5.22	5.59	6.45	3633
0.4%	4.96	5.23	5.96	3668
0.6%	4.89	5.15	5.83	3588
0.8%	4.89	5.13	5.80	3571
1.0%	4.89	5.11	5.77	3572
1.2%	4.88	5.11	5.76	3536
1.4%	4.90	5.10	5.75	3566

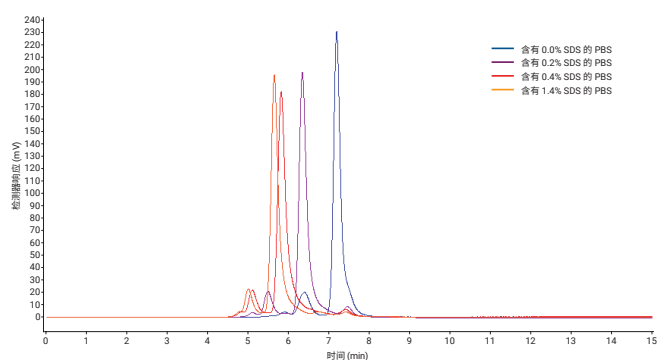


图 3. 流动相中 SDS 浓度增加的 BSA 色谱图

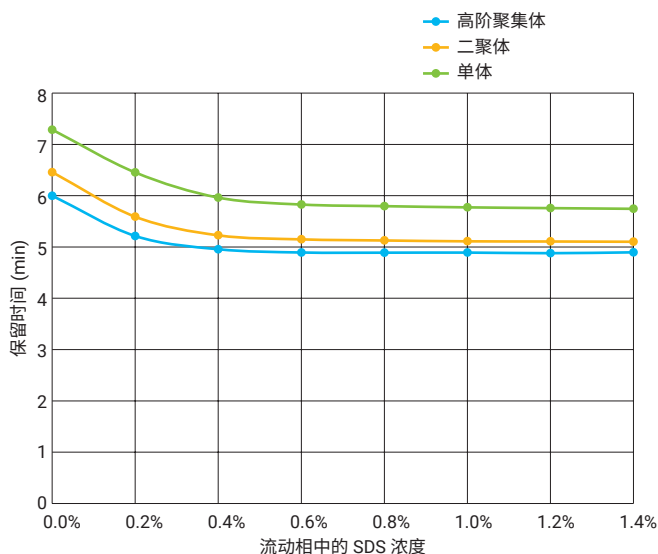


图 4. 流动相中 SDS 浓度对 RT 的影响

在 SEC 中，RT 较短表示溶液中分子体积较大，但不一定表示分子量较大。为确定色谱图中三个主峰的分子量，使用 BioSEC 软件按照下式^[6]描述的关系计算分子量：

位置：

(LS) = 光散射检测器信号

K_{LS} = LS 检测器常数

dn/dc = 比折射率增量*

(UV) = UV 检测器信号 (280 nm)

ϵ = 消光系数

* 对于非糖基化蛋白，使用近似值 $dn/dc \approx 0.186 \text{ mL/g}$

图 5 显示了选择进行光散射分子量测定的每个峰的区域，如此选择是为了尽可能减少预期的峰叠加引起的干扰。表 2 显示了分子量测量的结果。表中包括已计算单体相对数量的列。需要认识到，高阶聚集体峰的分子量几乎都比单体峰的分子量大三倍，说明它是三聚体。二聚体峰的分子量比单体峰的分子量大两倍，符合预期。此外，每个峰的分子量都随着 SDS 浓度的增加而增加，直到在 0.6% w/v SDS 达到平台期，这与此时 RT 的稳定化一致。

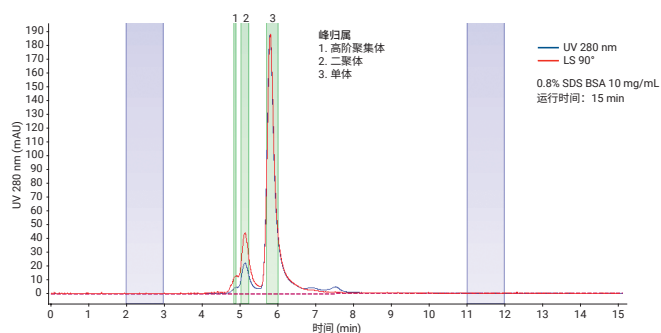


图 5. BSA (1) 高阶聚集体、(2) 二聚体和 (3) 单体峰的分子量计算区域

表 2. 光散射检测的分子量分析

SDS w/v%	质量数增加			SDS:BSA (g/g)		
	高阶聚集体	二聚体	单体	高阶聚集体	二聚体	单体
0.0	202197	136383	67838	3.0	2.0	1.0
0.2	242541	194876	107905	2.2	1.8	1.0
0.4	560154	359239	203737	2.7	1.8	1.0
0.6	667318	423418	212596	3.1	2.0	1.0
0.8	615726	404898	207028	3.0	2.0	1.0
1.0	624648	404634	205868	3.0	2.0	1.0
1.2	617385	405618	206376	3.0	2.0	1.0
1.4	612031	406699	206614	3.0	2.0	1.0

表 3. 随着表面活性剂浓度增加，BSA 的质量数增加，在浓度 > 0.6% 时达到稳定状态

SDS w/v%	质量数增加			SDS:BSA (g/g)		
	高阶聚集体	二聚体	单体	高阶聚集体	二聚体	单体
0.0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.2	40344	58493	40067	0.2	0.4	0.6
0.4	357957	222856	135899	1.8	1.6	2.0
0.6	465121	287035	144758	2.3	2.1	2.1
0.8	413529	268515	139190	2.0	2.0	2.1
1.0	422451	268251	138030	2.1	2.0	2.0
1.2	415188	269235	138538	2.1	2.0	2.0
1.4	409834	270316	138776	2.0	2.0	2.0

由于观察到的分子量随流动相中存在的 SDS 浓度增加而增加，可以推断每种分子的质量数实际上会通过相连 SDS 的积聚而增加。然而，观察到的质量数增加相当大，高于预期，特别是因为该 BSA 样品并未经过还原（表 3）。在分析条件下的稳定状态质量数增加是每 1 g 蛋白质 2 g SDS，说明 SDS 胶束沿着蛋白质分子的积聚不受其包含低聚物数量的影响。

仔细检查 0.0% SDS 和 1.4% SDS 下色谱图浓度依赖的 UV 迹线，可发现更进一步的差异。分子量较高的物质分离度明显降低，但在流动相组成为 1.4% SDS 时，单体峰之后洗脱的一些较小的峰显露出来（图 6）。这些分子量较小的物质无法鉴定。

图 7A 显示了 BSA 在 0.0% SDS 和 1.4% SDS 浓度下的 LS 90° 检测器信号。由于光散射检测器是质量敏感型而非浓度依赖型，因此在较高表面活性剂浓度条件下获得的信号远大于天然条件下的信号也就不足为奇。

除了图 7A 所示最高 SDS 浓度下的响应增加之外，还存在垂直偏移。在分析 DLS 数据以确定 Rh 时发现了这一现象的原因。我们不仅发现单体峰的 Rh 增加（大约 3.8–5.7 nm，接近文献中的数值）^[7,8,9]，还检测到大小为 2.4–2.8 nm 的颗粒连续背景信号，几乎可以肯定这是由于溶液中存在 SDS 胶束而产生。

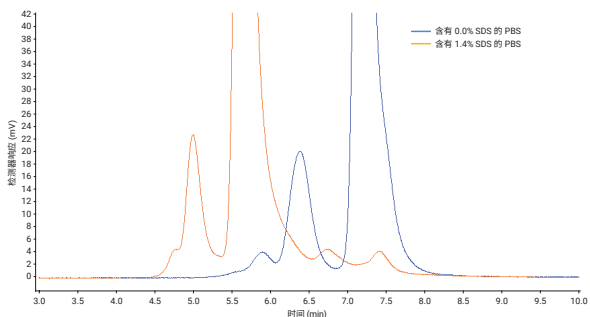


图 6. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 UV 280 nm 信号放大图

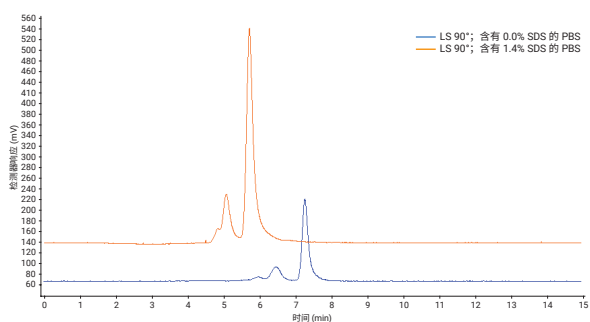


图 7A. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 LS 90° 信号概览

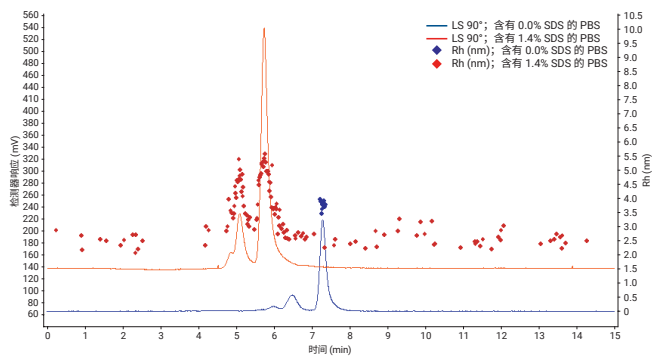


图 7B. 含有 0.0% SDS 和 1.4% SDS 的 PBS 流动相中 BSA 的 LS 90° 信号概览，增加了流体动力学半径 (Rh) 数据

结论

本实验起初旨在使用具有光散射检测的 SEC 确定 SDS 是否可以使 BSA 低聚物变性。我们发现，无法通过分离度损失精确定量低聚物含量，因为对应于单体、二聚体和高阶聚集体的各个峰密集洗脱。但是很明显，三种物质均保持完整并被 SDS 饱和至相同程度。

即使蛋白质变性，会使分子展开，预计会在溶液中产生更大的结构，导致 SEC 的 RT 更短。然而，随着 SDS 浓度从 0.0 增加到 0.4% w/v，单体、二聚体和高阶聚集体的分子量均按比例增加。在较高的 SDS 浓度 (0.6%–1.4% w/v) 下，随着各种分子被 SDS 饱和，光散射测定的 RT（溶液中的体积也随之稳定）和分子量趋于稳定。

使用 DLS 功能确定流体动力学半径时发现，体积的增加与文献中经过还原 BSA 样品的数值相当。体积增加没有反映出非还原条件下运行的 BSA 样品的构象变化，但是重复了随着分子与 SDS 胶束复合并被其饱和时观察到的分子量增加。

显然，尽管从良好的峰形和可重现的回收率可以看出，Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 色谱柱能够耐受流动相中的 SDS，但如果所分析蛋白质类型的体积和分子量大幅增加，SEC 分离会受到很大影响。应尽可能避免在 SEC 的流动相中使用表面活性剂。

参考文献

1. Reynolds, J. A.; Tanford, C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*(19), 5161–5165
2. Pitt-Rivers, R.; Impiombato, F. S. A. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *The Biochemical Journal* **1968**, *109*, 825–830
3. Aoki, K.; Hiramatsu, K.; Kimura, K.; Kaneshina, S.; Nakamura, Y.; Sato, K. Heat Denaturation of Bovine Serum Albumin. I: Analysis by Acrylamide-gel Electrophoresis. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University* **1969**, *47*(4), 274–282
4. Hagarová, D.; Horváthová, M.; Žúbor, V.; Breier, A. Optimization of conditions for size-exclusion chromatography of proteins. *Chemical Papers* **1991**, *45*(3), 341–348
5. Shirahama, K.; Tsujii, K.; Takagi, T. Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* **1974**, *75*, 309–319
6. Wen, J.; Arakawa, T.; Philo, J. S. Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 155–166
7. Lorber, B.; Fischer, F.; Bailly, M.; Roy, H.; Kern, D. Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. *Biochem. and Mol. Biol. Ed.* **2012**, *40*(6), 372–382
8. Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W. The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering. *Langmuir* **2000**, *16*(3), 922–927
9. Tanner, R. E.; Herpigny, B.; Chen, S.-H.; Rha, C. K. Conformational change of protein sodium dodecylsulfate complexes in solution: A study of dynamic light scattering. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*(8), 3866–3872

更多应用简报

AdvanceBio SEC

部件号	标题
5994-0876EN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm 色谱柱开发 NIST mAb 的体积排阻色谱分析方法
5991-6791CHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱分析聚乙二醇化蛋白质
5991-7165CHCN	使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱对生物制剂进行灵敏的高通量体积排阻色谱 (SEC) 分析
5991-6458ZHCN	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
5991-6304CHCN	利妥昔单抗聚集体和片段的高分离度 SEC 分离与定量分析
5991-6303CHCN	利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析
5991-6302CHCN	用于聚集体分析的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱：仪器兼容性
5991-6474CHCN	Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱在生物治疗药物分析方面的优势

Bio SEC-3

部件号	标题
5991-2463EN	为 Agilent Bio SEC-3 色谱柱选择适合的校准
5991-3955EN	利用 Agilent 1260 Infinity 多检测器 Bio-SEC 解决方案的先进的光散射检测功能确定蛋白质分子量和分子大小
5990-9894CHCN	Agilent Bio SEC 柱用于生物分子表征的孔径优化

其他信息

许多标准品可用于协助方法开发、分子量估算和系统 QC 测试。

部件号	名称
5190-9416	AdvanceBio SEC 130 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
5190-9417	AdvanceBio SEC 300 Å 冻干蛋白质标准品, 1.5 mL
PL2070-0100	聚乙二醇校准试剂盒, PEG-10, 10 × 0.5 g
PL2080-0101	聚环氧乙烷校准试剂盒, PEO-10, 10 × 0.2 g
PL2090-0101	普鲁兰多糖校准试剂盒
5191-5744	Agilent-NISTmAb 标准品, 1/包
5191-5745	Agilent-NISTmAb 标准品, 4/包

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

安捷伦客户服务中心：

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

RA44312.6528009259

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

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，2021
2021年4月1日，中国出版
5994-0032ZHCN