

# 使用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱 分析聚乙二醇化蛋白质

## 应用简报

生物制药

## 作者

M.Sundaram Palaniswamy  
安捷伦科技有限公司  
印度

## 摘要

通过聚乙二醇化能够改变治疗性蛋白质的物理化学和生物性质（如提高溶解度、降低免疫原性、延长半衰期以及防止蛋白酶破坏），从而显著提高其价值。体积排阻色谱法 (SEC) 是检测分子量大于聚乙二醇化蛋白质杂质的首选方法。由于聚乙二醇介导的与硅胶固定相的相互作用会导致回收率降低、峰形变差以及过度拖尾，因此聚乙二醇化蛋白质的 SEC 分析面临着很大挑战。本应用简报描述了一种用于检测聚乙二醇粒细胞集落刺激因子 (PEG GCSF) 的简单而灵敏的 SEC 方法。采用 AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱在水相流动相下进行 PEG GCSF 的分离和定量分析。线性曲线在 12.5-2000 μg/mL 的范围内具有优异的相关系数，表明该方法适用于定量分析。该方法具有出色的保留时间和峰面积精度，证明了该方法的适用性。此外，AdvanceBio SEC 还可对强制应激研究中得到的聚集体进行分离与定量分析。



Agilent Technologies

## 前言

聚乙二醇化是聚乙二醇 (PEG) 聚合物链与另一个分子发生共价结合的过程, 另一个分子通常是药物或治疗性蛋白质。将 PEG 的活性衍生物与目标大分子共同温育通常可实现聚乙二醇化。PEG 基团具备的多项优势有助于提高蛋白质稳定性并延长体内的循环半衰期。美国食品药品监督管理局 (FDA) 已批准 PEG 为公认安全物质 [1]。目前已有集中聚乙二醇化产品通过了 FDA 的审批。聚乙二醇粒细胞集落刺激因子 (PEG GCSF) 是一种长效的重组 GCSF, 其中含有 GCSF 以及 20 KDa 与甲硫氨酸残基 N 端共价结合的聚乙二醇分子。GCSF 是一个含有 175 个氨基酸的蛋白质, 分子量为 18800 道尔顿。PEG GCSF 的总分子量为 39 KDa。各论草案方法推荐使用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 测定 PEG GCSF 和更高分子量聚集体的纯度 [2]。多数针对 PEG GCSF 的已发布方法采用含有 100 mM NaCl、85% 磷酸以及最多 10% 乙醇的水相流动相以减少非特异性相互作用并改善峰形和分离性能 [3]。聚集体有时会比自然形态更易于与固定相结合, 因此治疗性蛋白质的不理想吸附是 SEC 分析过程中的一个主要问题。由于这一优先结合趋势, 聚集体的 SEC 分析往往并不准确, 甚至存在无法检出的风险。使用含有机溶剂或极端 pH 的流动相可解决这一问题, 结果表明这种流动相能够提高分离度和回收率。然而, 除可能会使可逆聚集体解离外, 这种流动相还可能会使配方缓冲液中不可逆的聚集体发生解离 [4]。

本文展示了用于 SEC 分析的突破性技术 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱的优势。这款色谱柱采用创新型硅胶填料和特有的亲水键合技术, 可使各种样品均获得出色的分离度和体积分离, 且无需向流动相中添加有机改性剂。

## 材料与方法

### 仪器

采用完全生物兼容且最大系统耐压为 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统, 由以下几个模块组成:

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (部件号 G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (部件号 G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (部件号 G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (部件号 G1316C, 选项 19)
- Agilent 1260 Infinity DAD VL (部件号 G1315D, 配备生物惰性标准流通池, 10 mm)
- 填充 2.7 μm 填料的 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm (部件号 PL1180-5350)

### 软件

Agilent ChemStation B.04.03 (或更高版本)

### SEC 参数

表 1 列出了使用 Agilent 1260 生物惰性液相色谱系统进行 SEC 分析的色谱参数。

表 1. SEC HPLC 的色谱参数

参数	条件
流动相:	150 mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.8
TCC 温度:	室温
等度运行:	流动相 A
进样量:	10 μL
流速:	0.8 mL/min
紫外检测:	214 和 280 nm

## 试剂、样品与材料

商品化 PEG GCSF 购自当地药房并遵照制造商的使用说明进行储存。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和盐酸均购自 Sigma-Aldrich。使用的所有化学品和试剂均为 HPLC 级。高纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型, 美国)。

## 步骤

进样 10  $\mu$ L 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分析物浓度作图, 得出单体校准曲线。

## 线性和范围

校准曲线由浓度范围为 7.8-2000  $\mu$ g/mL 的 9 个 PEG GCSF 的标准浓度点构建。

## LOQ 和 LOD

将信噪比 (S/N) > 3 时的最低 PEG GCSF 浓度定义为 LOD, 而将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。

## PEG GCSF 聚集体制备

根据各论草案制备 PEG GCSF 聚集体。简言之, 将约 2 mg/mL 的药品置于聚丙烯管中并分别在 55  $^{\circ}$ C 下温育 60、120 和 180 分钟。随后将样品冷却至室温并立即进行分析。

## 系统适用性

根据各论草案的规定, 聚集体的比例不得超过 5%。此外, 3 次重复进样之间聚集体峰面积比的 RSD% 不得高于 10%。3 次重复进样中 PEG GCSF 单体峰的 RT 差异不得超过 0.2 分钟。

## 结果与讨论

### 分离和检测

图 1 表明在该色谱条件下完整 PEG GCSF 可实现良好分离, 表现为 5.989 分钟的单个对称峰。图中可明显看到共轭物包括二聚体和更高分子量的聚集体, 如放大视图所示。然而, 由图中不存在晚洗脱峰可以看出样品中不含游离 GCSF。

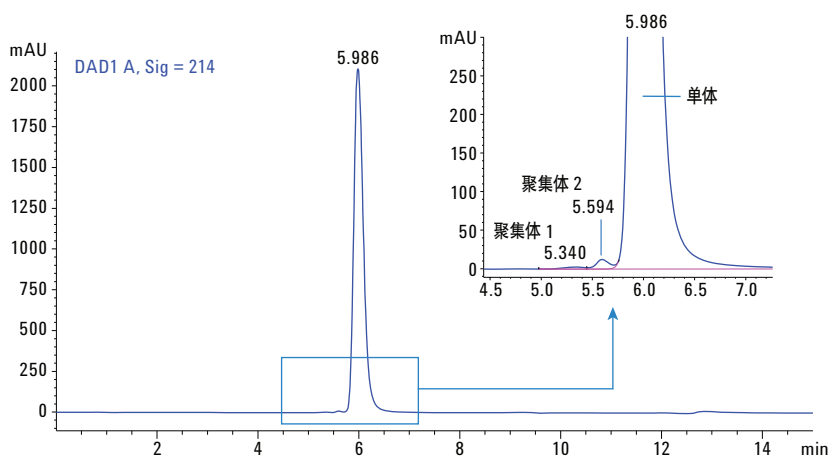


图 1. 完整治疗性 PEG GCSF 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130 $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  300 mm, 2.7  $\mu$ m 色谱柱上得到的 SEC 色谱图

## 保留时间和峰面积的精密度

该流程的精密度以一系列测定结果间的接近一致程度来表示。可通过在前述条件下对均匀样品进行多次分析得到这些测定结果，常用相对标准偏差 (RSD) 表示。图 2 展示了六次重复进样的叠加色谱图，表明结果具有绝佳的分离重现性。表 2 列出了六次重复进样中 PEG GCSF 单体和聚集体的平均 RT 和峰面积 RSD。主峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.023% 和 0.081%，表明分析方法重现性和系统精密度均十分出色。

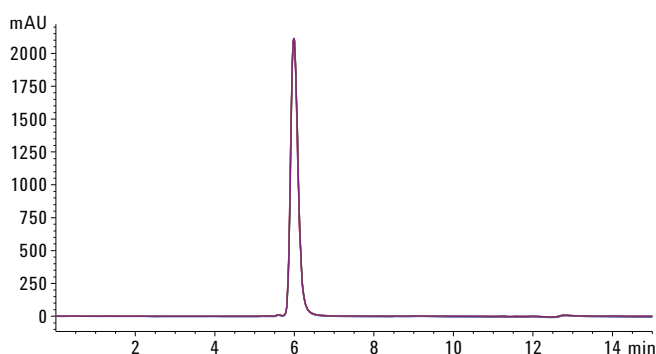


图 2. 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱上分离得到的 PEG GCSF 的 6 次重复叠加色谱图

表 2. 保留时间和峰面积精度 (n = 6)

样品	保留时间		峰面积	
	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
PEG GCSF	5.987	0.023	99.39	0.081
PEG GCSF 聚集体 1	5.594	0.01	0.413	4.91
PEG GCSF 聚集体 2	5.340	0	0.155	5.1

这一精密度还符合了系统适用性要求：

- 聚集体比例不得超过 5%
- 3 次重复进样间聚集体峰面积比的 RSD% 不得超过 10%
- 3 次重复进样中 PEG GCSF 单体峰的保留时间不得超过 0.2 分钟

因此，PEG 偶合物中高分子量聚集体的含量不得超过 0.6%。此外，由 SEC HPLC 测得的 PEG GCSF 纯度应大于 99%。

## LOD 和 LOQ

LOD 和 LOQ 分别为 3.125 μg/mL 和 12.5 μg/mL，表明该方法具有较高灵敏度。表 3 中列出了 PEG GCSF 的 LOD 和 LOQ 测定值。图 3 展示了偶合物与空白的 LOD 和 LOQ 叠加色谱图。

表 3. LOD、LOQ 和 S/N 的结果 (n = 3)

浓度 (μg/mL)	信噪比	平均峰面积
3.125 (LOD)	4.6	13.69
12.5 (LOQ)	17.7	27.16

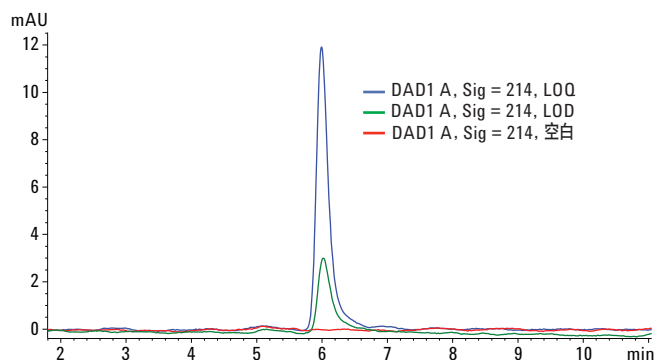


图 3. 在 Agilent AdvanceBio SEC, 130Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱上分离得到的 PEG GCSF 的 LOD 和 LOQ 与空白的叠加色谱图

## 线性

使用面积响应与 PEG GCSF 浓度构建了从 LOQ 浓度到本研究最高浓度的 PEG GCSF 线性曲线。图 4 显示了浓度范围为 12.5 - 2000  $\mu\text{g}$  的 PEG GCSF 线性曲线。

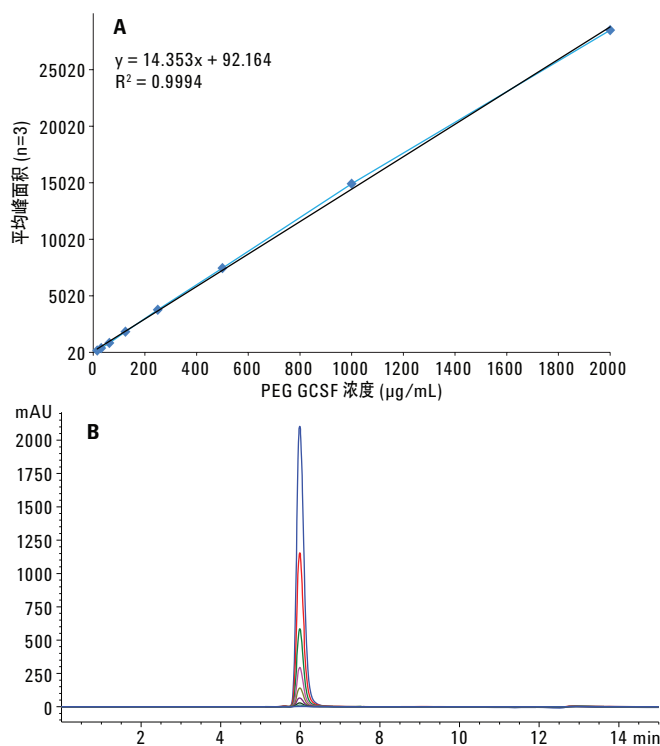


图 4. 12.5-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PEG GCSF 8 个标准浓度的线性曲线 (A)，显示出极佳的线性相关系数。图中还显示了线性范围的叠加色谱图 (B)

表 4. 根据峰面积得到的单体与聚集体的相对含量

经处理的 PEG GCSF (60 min)		经处理的 PEG GCSF (120 min)		经处理的 PEG GCSF (180 min)	
时间	峰面积%	时间	峰面积%	时间	峰面积%
5.59	2.85	5.24	16.01	5.12	91.89
5.99 (单体)	96	5.59	12.74	5.57	1.14
		5.99 (单体)	70.29	5.98 (单体)	6.44

## 聚集/降解分析与定量

图 5 显示的经加热处理 PEG GCSF 的 SEC 图谱表明 AdvanceBio SEC 色谱柱可用于分离和检测聚集体。如色谱图所示，完整 PEG GCSF 与更高分子量的聚集体彼此实现了良好分离。表 4 根据峰面积比总结了 PEG GCSF 单体和聚集体的相对含量。

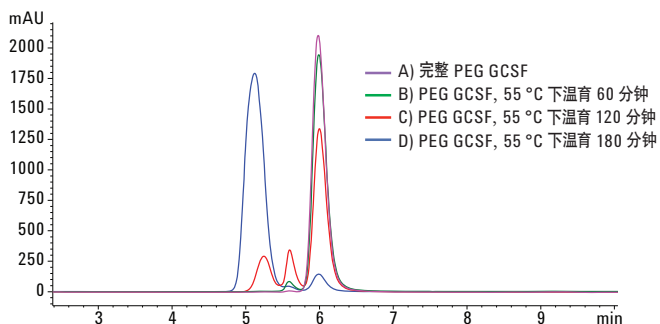


图 5. 采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱通过 SEC HPLC 测定出的 PEG GCSF 聚集趋势。(A) 完整 PEG GCSF 对照，(B) 55 °C 下温育 60 分钟，(C) 55 °C 下温育 120 分钟，(D) 55 °C 下温育 180 分钟

数据清晰表明，聚集体在 55 °C 下处理后浓度有所升高，单体形式的含量则相对有所降低，由 96% 分别降低至 70% 和 6.44%。

## 结论

本应用简报证明了采用 PEG GCSF 作为模型蛋白质进行聚乙二醇化蛋白质分析的几个出色的解决方案。文中开发出了一种采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱，无需在流动相中添加有机改性剂即可监测 PEG GCSF 纯度的简单 SEC HPLC 方法。该方法具有优异的 RT 和峰面积 RSD，并能满足 PEG GCSF 系统适用性要求。PEG GCSF 的 LOD 和 LOQ 分别为 3.125 µg/mL 和 12.5 µg/mL，表明该分析方法具有较高灵敏度。12.5-2000 µg/mL 的 8 个标准偶合物浓度的线性曲线具有极佳的线性相关系数值，表明该方法可实现准确定量分析。此外，治疗性 PEG 蛋白质的应激研究还表明 AdvanceBio SEC 色谱柱可对聚集体进行分离和检测，并能根据峰面积比进行定量分析。将这一简单的重现方法与仪器的生物惰性和耐腐蚀相结合，可使这类解决方案成为生物制药研究中聚乙二醇化蛋白质 QC 分析的可靠适用方法。

## 参考文献

1. Gaberc-Porekar, V.; Zore, I.; Podobnik, B.; Menart, V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2008**, *11*, 242–250.
2. [ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/Pefilgrastim-2961377726.pdf](http://ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/Pefilgrastim-2961377726.pdf)
3. Ratto, J. J.; O'Conner, S. R.; Distler, A. R.; Wu, G. M.; Hummel, D.; Treuheit M. J.; Herman, A. C.; Davis, J. M. Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins. *J. of Chromatog. A* **1997**, *763*, 337–344.
4. Tsutomu Arakawa; *et al.* The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J. of Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1674–1692.

## 更多信息

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

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2016  
2016年3月23日，中国出版  
5991-6791CHCN



**Agilent Technologies**