

# 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

Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μm 色谱柱

## 应用简报

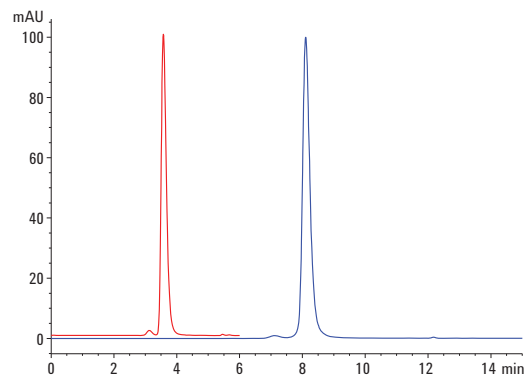
生物制药

## 作者

M. Sundaram Palaniswamy  
安捷伦科技公司

## 摘要

单克隆抗体 (mAb) 可能会因细胞培养、收获、纯化、存储和填充期间的多种机制发生聚集。体积排阻色谱 (SEC) 是对 mAb 进行体积分离的标准方法。该方法被认为是用于定性和定量评估聚集体的强大参考技术。多种中间样品的 SEC 分析不仅需要数小时才能完成, 而且在样品处于不利环境中时, 还会极大地影响聚集状态。本研究证明了使用短柱长小孔径的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱对 mAb 和抗体药物偶联物 (ADC) 实现快速、高分离度、灵敏且可重现的分离和定量分析。分离和定量分析可在 4 min 内完成, 更重要的是, 该方法能够对应激条件下形成的聚集体进行监控与检测。



Agilent Technologies

## 前言

蛋白质通常在暴露于应激条件下时发生聚集，例如 pH、温度或浓度的变化。不同生产阶段均有可能发生聚集，包括上游、下游或仅存储过程。体积排阻色谱 (SEC) 是一种用于监测和表征单克隆抗体 (mAb) 和抗体药物偶联物 (ADC) 聚集体的方法。然而，SEC 分离通常在相对较低的流速下采用较长色谱柱进行，分析时间通常较长。最近采用配备亚 2  $\mu\text{m}$  的超高性能液相色谱 (UHPLC) 来克服这些难题，结果表明分析时间大大缩短。然而，当应用非常细小的填料和较高流速时，热力和剪切力可能对于温度或压力敏感的蛋白质至关重要 [1]。此外，使用水性流动相对 ADC 进行 SEC 分析时得到了较差峰形，且聚集体和单体之间的分离度不合格。这些问题可能是疏水性细胞毒性药物和固定相之间的非特异性相互作用引起的。为解决这个问题并改善峰形，我们向 SEC 流动相中添加了多种有机改性剂。然而，这些有机改性剂可能会破坏蛋白质并缩短色谱柱的使用寿命。

安捷伦对 SEC 进行了多次改进，以提高所得信息的质量。其中，所开发的短柱长 (150 mm) 小孔径 (4.6 mm) 色谱柱与独特的亲水性聚合物涂层相结合，具有最佳孔隙体积和孔径。这些开发成果可确保色谱峰获得良好分离且峰形尖锐，而无需向水性流动相添加任何有机改性剂。本应用简报展示了应用短柱长小孔径的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱对 mAb 和 ADC 实现了快速的高通量 SEC 分析。本研究还展示了这款色谱柱在这些分子定量分析方面的应用。

## 材料与amp;方法

### 仪器、色谱柱和标准品

采用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 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C 选项 19)
- 配备 60 mm 最大光程高灵敏度流通池的 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B, 选项 33)
- 填充 2.7  $\mu\text{m}$  填料的 Agilent AdvanceBio SEC, 300  $\text{\AA}$ , 7.8  $\times$  150 mm 色谱柱 (部件号 PL1180-3301)
- 填充 2.7  $\mu\text{m}$  填料的 Agilent AdvanceBio SEC, 300  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  150 mm 色谱柱 (部件号 PL1580-3301)
- AdvanceBio SEC 300  $\text{\AA}$  冻干蛋白质标准品。1.5 mL (部件号 5190-9417)

### 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, pH 7.0 (流动相 A)
TCC 温度	室温
等度运行	流动相 A
进样量	5 $\mu\text{L}$ (7.8 $\times$ 150 mm 柱) 和 2 $\mu\text{L}$ (4.6 $\times$ 150 mm 柱)
流速	1 mL/min (7.8 $\times$ 150 mm 柱) 0.35 mL/min (4.6 $\times$ 150 mm 柱)
紫外检测	220 和 280 nm

## 试剂、样品与材料

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药、赫塞汀和 ADC 购自当地药店，并根据制造商的使用说明进行储存。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、盐酸 (HCl) 和氢氧化钠 (NaOH) 均购自 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。

## Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱校准

通过测定 Agilent 300 Å 蛋白质标准品 (甲状腺球蛋白 (670 KDa)、 $\gamma$ -球蛋白 (158 KDa)、卵清蛋白 (44 KDa)、肌红蛋白 (17 KDa) 和血管紧张素 II (1000 KDa)) 的洗脱体积来校准 AdvanceBio SEC 色谱柱。绘制 AdvanceBio SEC 蛋白质标准品分子量  $\log(\log MW)$  值与洗脱体积的关系图, 以确定排阻限。

## 定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)

例如, 使用赫塞汀和 ADC 对 LOD 和 LOQ 进行测量。将信噪比 (S/N) > 3 时的最低蛋白质浓度定义为 LOD, 而将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。

## 步骤

为了计算峰面积和保留时间 (RT) 偏差, 将 5  $\mu$ L 和 2  $\mu$ L 流动相作为空白进样, 随后将完整和应激 mAb 重复进样 6 次。

## 利妥昔单抗聚集体前处理

将利妥昔单抗创新药物和 ADC 用作 mAb 和 ADC 的代表性示例进行聚集体分析。聚集体的诱导方法与前述方法基本相同, 仅有略微改动 [2]。

1. 将 1 M HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液 (2 mg/mL) 中, 使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0
2. 滴加 1 M NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0
3. 再次滴加 1 M HCl 溶液将 pH 值调回至 6.0

pH 值变化间大约有 1 min 的等待时间, 在此期间以 500 rpm 的速度持续搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 min。

## 结果与讨论

### 分离和检测

使用一系列分子量已知的安捷伦 300Å 蛋白质标准品来校准 AdvanceBio SEC 色谱柱。使用蛋白质标准品中的甲状腺球蛋白聚集体 (空白峰) 计算死体积。这些聚集体在 AdvanceBio SEC, 7.8  $\times$  150 mm 色谱柱上的洗脱时间为 2.56 min, 死体积为 ( $V_0$ ) = 2.56 mL, 在 4.6  $\times$  150 mm 色谱柱上的洗脱时间为 2.35 min, 对应的死体积为  $V_0$  = 0.805 mL。AdvanceBio SEC 色谱柱中所分离蛋白质的校准曲线呈线性关系, 该曲线还定义了所分析蛋白质范围的排阻限 (670 KDa) 和总渗透极限 (1000 Da)。然后可以使用此曲线图根据未知蛋白质的洗脱体积确定其分子量 (图 1)。

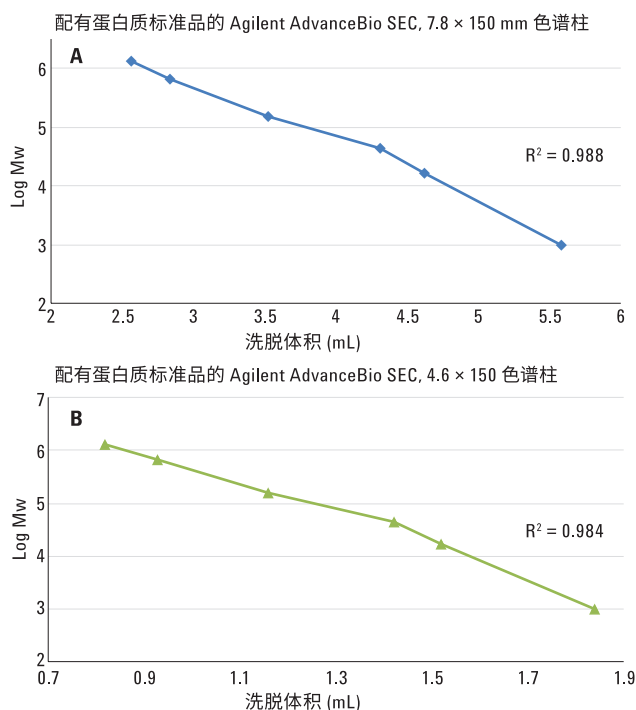


图 1. 蛋白质标准品在 7.8  $\times$  300 mm (A) 和 4.6  $\times$  150 mm (B) 的 Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱上的校准曲线

此举的目的是通过缩短运行时间来提高分析通量。流速决定了给定色谱柱尺寸的 SEC 运行时间，然而，在较高流速下，分离度可能会受到影响。为获得更短的运行时间，需要降低色谱柱死体积与流速的比例。缩短柱长和提高流速是获得更快速 SEC 的一种直接方法 [2,3]。图 2 为利妥昔单抗生物仿制药和创新药物、赫赛汀以及 ADC 在 AdvanceBio SEC, 7.8 × 150 mm 色谱柱上得到的 SEC 色谱图。这些色谱图表明在色谱条件下，单体可在 4 min 内实现出色的分离。

为获得更出色的灵敏度，采用 AdvanceBio SEC, 4.6 × 150 mm 色谱柱进行分离。图 3 表明此举可获得卓越的分选性能。在上述两种情况下均不存在早洗脱或晚洗脱峰，说明市售 mAb 制剂呈均质，且没有发生聚集或降解的迹象。利用上述两种色谱柱与水性流动相对疏水性 ADC 进行分析可获得对称峰，表明疏水性有效载荷与固定相担体之间不存在次级相互作用。较短的 AdvanceBio SEC 色谱柱能够分离 ADC 聚集体。分离结果表明此色谱柱适用于表征 ADC，并且可提供足够的信息以支持开发、批签发和稳定性研究。

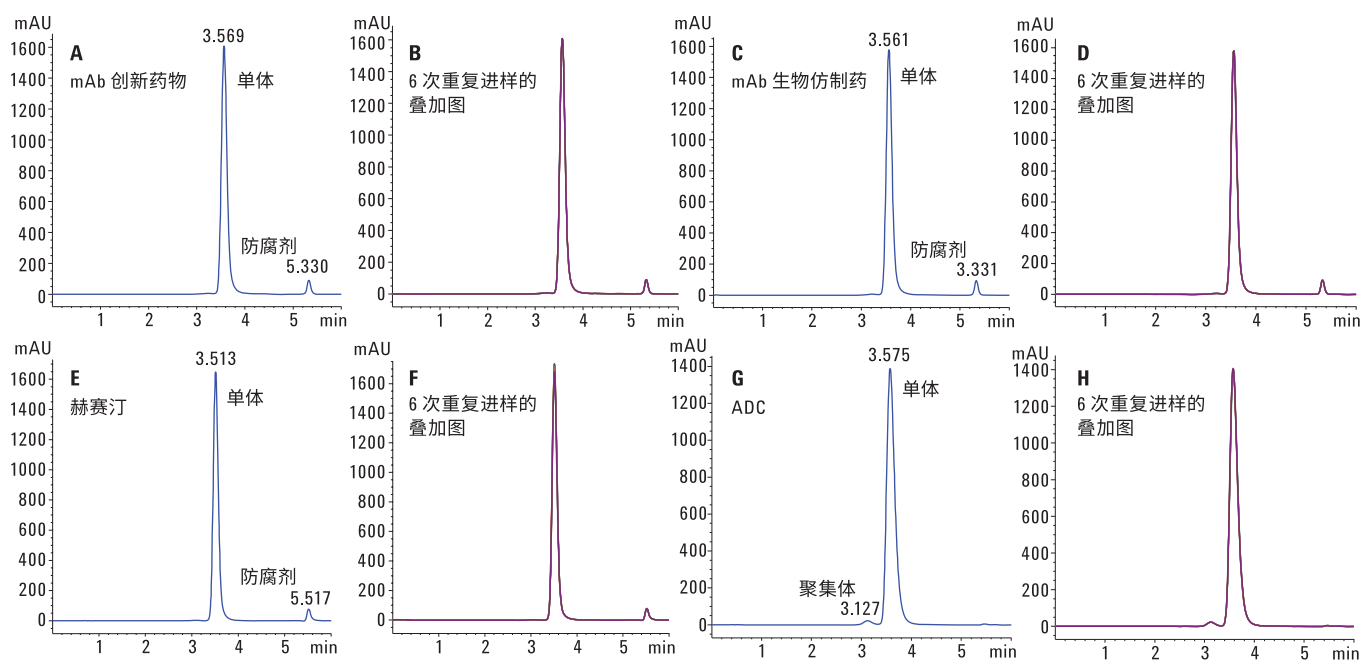


图 2. 原始利妥昔单抗创新药物和生物仿制药、赫赛汀以及 ADC 在 Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱上的 SEC 色谱图

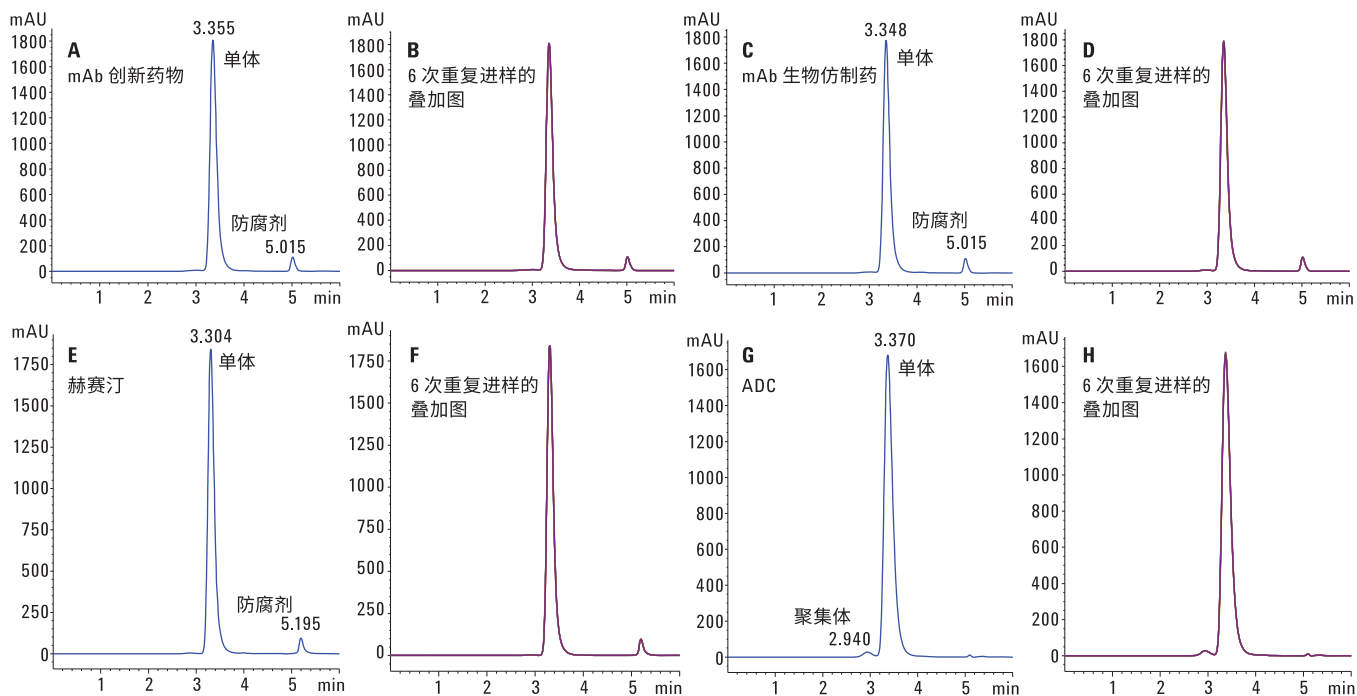


图 3. 原始利妥昔单抗创新药物和生物仿制药、赫赛汀以及 ADC 在 Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱上的 SEC 色谱图

### 保留时间和峰面积精度

为确定方法的精度，我们计算了柱上浓度分别为 10 μg (7.8 × 150 mm 柱) 和 4 μg (4.6 × 150 mm 柱) 时，全部四种生物制剂保留时间和峰面积的相对标准偏差值 (RSD)。表 2 显示了样品 6 次重复进样得到的平均保留时间和峰面积 RSD 值。最高的峰面积 RSD 值为 0.21%，保留时间 RSD 为 0.02%。峰面积和保留时间 RSD 表明该方法具有出色的重现性和系统精度。

表 2. 样品的保留时间和峰面积精度 (n = 6)

样品	Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 × 150 mm, 2.7 μm		Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm	
	保留时间 RSD	峰面积 RSD	保留时间 RSD	峰面积 RSD
利妥昔单抗创新药物	0	0.15	0.02	0.02
利妥昔单抗生物仿制药	0	0.04	0.01	0.01
赫赛汀	0	0.21	0.01	0.02
ADC	0	0.01	0	0.02

## 使用短柱长小孔径 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱定量分析赫赛汀和 ADC

### LOD 和 LOQ

使用  $7.8 \times 150$  mm 和  $4.6 \times 150$  mm 色谱柱得到的赫赛汀和 ADC 的柱上 LOD 和 LOQ 结果汇总于表 3 中。图 4 展示了赫赛汀和 ADC 样品 LOD 和 LOQ 与空白的叠加色谱图。请注意，小孔径  $4.6 \times 150$  mm 色谱可实现生物制剂的高灵敏度分析。

表 3. 样品的 LOD 和 LOQ 值

样品	Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, $7.8 \times 150$ mm, $2.7 \mu\text{m}$		Agilent AdvanceBio SEC, 300Å, $4.6 \times 150$ mm, $2.7 \mu\text{m}$	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
赫赛汀	78 ng	156 ng	31.2 ng	62.4 ng
ADC	78 ng	156 ng	31.2 ng	62.4 ng

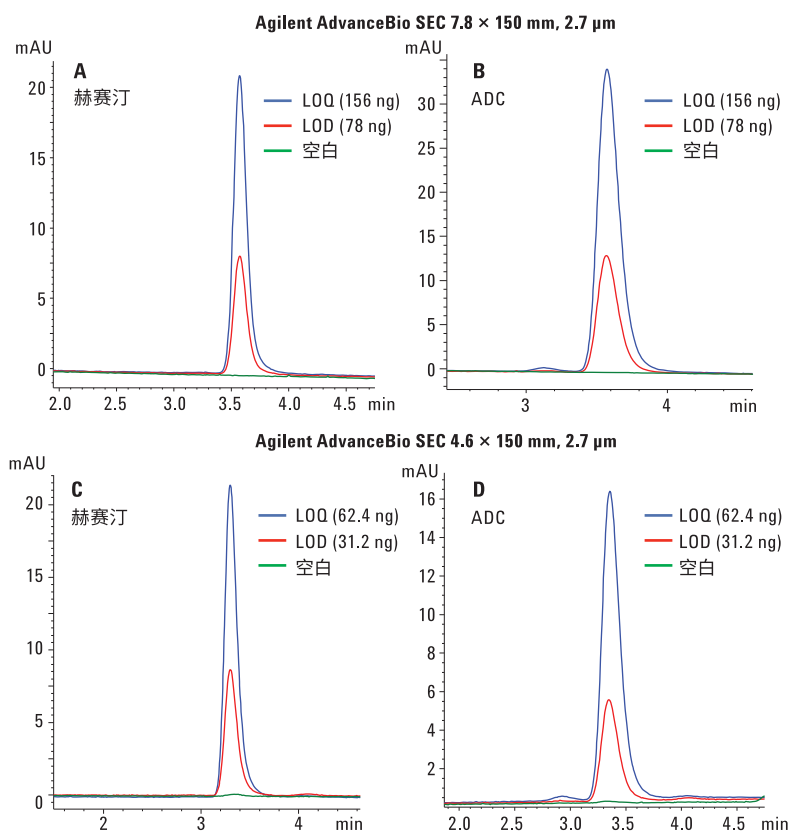


图 4. 赫赛汀和 ADC 的 LOD 和 LOQ 与空白在  $7.8 \times 150$  mm 和  $4.6 \times 150$  mm Agilent AdvanceBio SEC 300Å 色谱柱上的 SEC 叠加色谱图

## 线性

使用面积响应与赫赛汀/ADC 的浓度构建了从 LOQ 到本研究最高浓度的赫赛汀和 ADC 的实测线性曲线。图 5 显示了浓度范围为 15.6-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的赫赛汀和 ADC 在两种色谱柱上得到的线性曲线。mAb 和 ADC 的回归系数 ( $R^2$ ) 测定值表明该方法可在所分析的范围内用于定量分析。

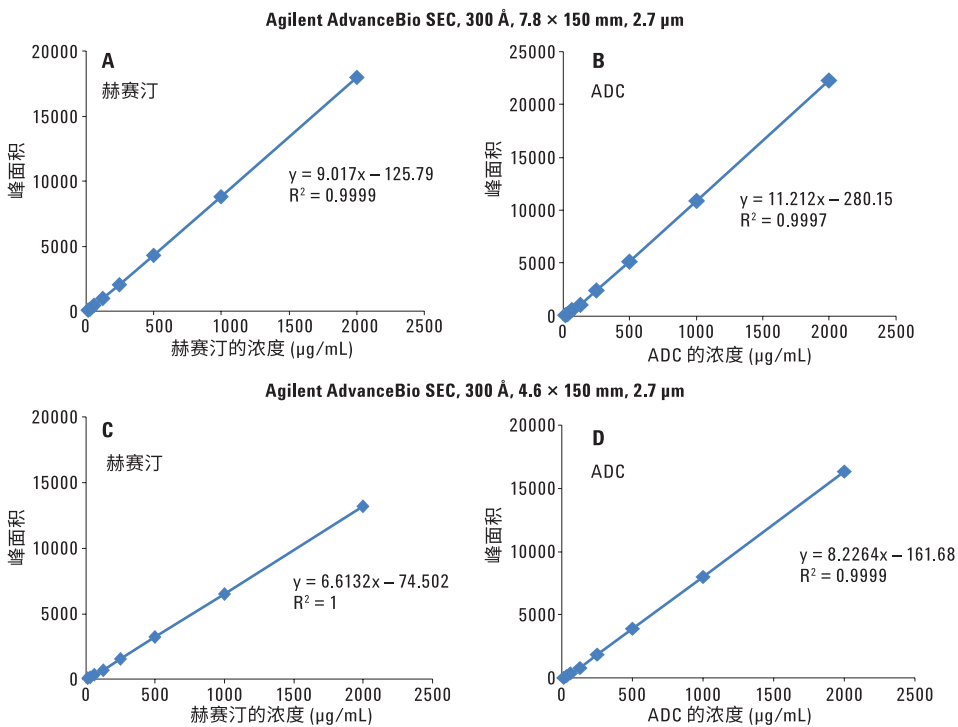


图 5. 浓度范围为 15.6-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 8 个标准浓度赫赛汀和 ADC 在 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱上的线性曲线，显示出极佳的线性相关系数值

## 聚集体/降解物分析

蛋白质聚集体的控制始终是蛋白质产品纯化、配制和生产过程中的大难题。我们利用 AdvanceBio SEC 色谱柱将原始和强应激赫赛汀以及 ADC 进行了对比，以监测聚集体和降解物。在色谱运行中，在单体形式之前洗脱的所有峰被认为是聚集体峰，而之后洗脱的所有峰则被视为片段/降解物峰。

pH/加热诱导的聚集体色谱图表明，以上两种 AdvanceBio SEC 色谱柱均可用于聚集体和片段的分离和检测。如图 6 和图 7 所示，单体、聚集体和降解物彼此间实现了良好分离。此外，单体的峰高因应激而出现了明显降低（数据未示出）。

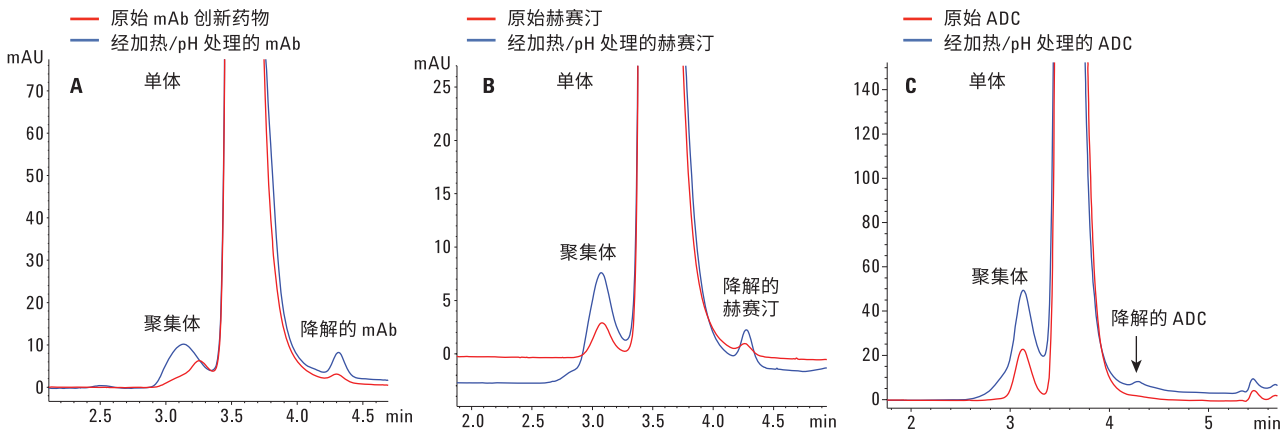


图 6. 原始（对照，红色迹线）与经过加热/pH 处理（蓝色迹线）的创新药物 mAb、赫赛汀和 ADC 在 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱上的叠加色谱图

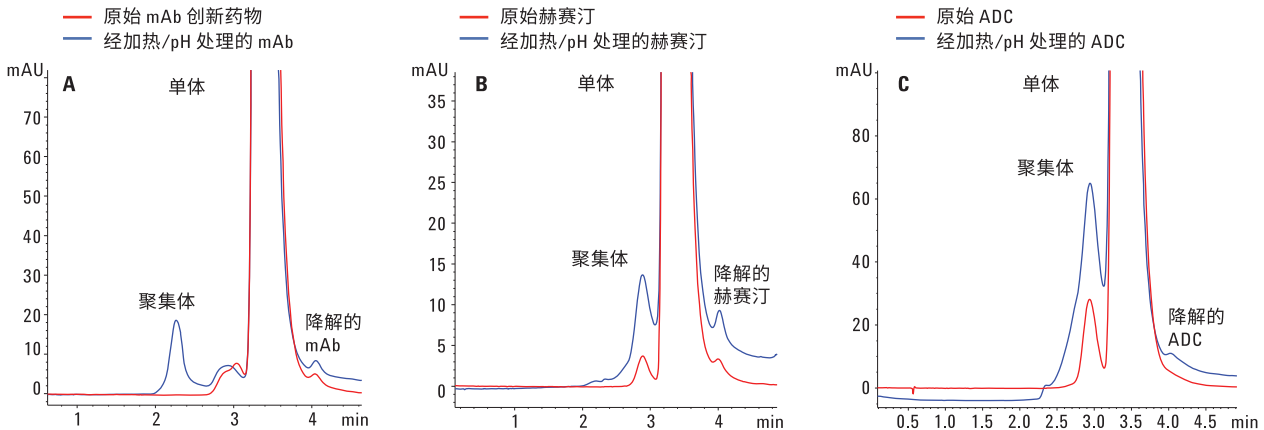


图 7. 原始（对照，红色迹线）与经过加热/pH 处理（蓝色迹线）的创新药物 mAb、赫赛汀和 ADC 在 Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 4.6 × 150 mm, 2.7 μm 色谱柱上的叠加色谱图



## 结论

SEC 广泛用于蛋白质聚集体的表征。由于其具有潜在的免疫原性，因此重组蛋白质的生产过程中必须对聚集体浓度进行彻底控制。本研究证实了使用短柱长小孔径的 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱（填料粒径 2.7  $\mu\text{m}$ ）可在 4 min 内对单体、聚集体和片段实现高通量分离。AdvanceBio SEC 色谱柱可为疏水性 ADC 提供出色的峰形，而无需在流动相中添加有机改性剂。该方法具有优异的峰面积和保留时间精度，表明其对于常规分析具有较高的可靠性。根据所评估浓度范围的线性相关系数值测得的结果，该方法可以实现准确定量。最后，短柱长小孔径的 AdvanceBio SEC 色谱柱能够根据强制应激研究可靠地监测聚集体和片段。以上结果表明这些色谱柱非常适用于需要高通量和高灵敏度的应用。

## 参考文献

1. Fekete, S.; Beck, A.; Veuthey, J-L.; Guillarme, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 161-173
2. Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 2197–2204
3. Coffey, A. 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，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-6458CHCN，**2015**

## 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/chem/advancebio](http://www.agilent.com/chem/advancebio)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016  
2016年8月1日，中国出版  
5991-7165CHCN



**Agilent Technologies**