

领先的色谱柱、填料、树脂、层析设备、分析液相专业供应商

慧德易科技

出色源于高品质和专业

H&E

High quality & Expert

2012年第四十八期

HPLC在抗体药物分析中的应用

——TOSOH系列产品专题



HPLC 在抗体药物分析中的应用

——TOSOH 系列产品专题

抗体药物及重组蛋白等已经被广泛应用于治疗方面,因此蛋白质差异性的品质管理工作极其重要,因为这些物质的聚合物、变性物质等都有可能引起过敏性休克或免疫反应。高效液相色谱法(HPLC)可以对抗体药物以及重组蛋白等蛋白药物的不均一性进行有效的分析,尤其当多种色谱分析方法有效组合时,可以更好对蛋白药物进行定量和定性分析,除此还可使用分析检测方法有等电聚焦电泳、氨基酸序列分析、MALDI-TPF MS、CD Spectrum分析及NMR分析。

蛋白药物的不均一性(差异性)

- 翻译后的修饰(酶的作用等)

磷酸化(脱磷酸化)、糖基化、脂质化、甲基化、乙酰化、多肽部分的酶切等。

- 降解(酶的作用及非酶的作用)

蛋白酶的酶解、脱酰胺、氧化等。

- 其他

化学修饰(PEG化等)、变性、聚合等

抗体异构体出现的原因

- 氨基酸序列的不同(重组、转录异常)

- 氧化(Met, Trp), C末端Lys的分解, N末端焦谷氨酸(Glu), 脱酰胺化(Asn)。

- 二硫键结合的有无及S-S结合力的不同。

- 复合糖链的不同。

抗体异构体对药物性能的影响

- 免疫抑制效果

- Fc效应功能

- 发烧等副作用

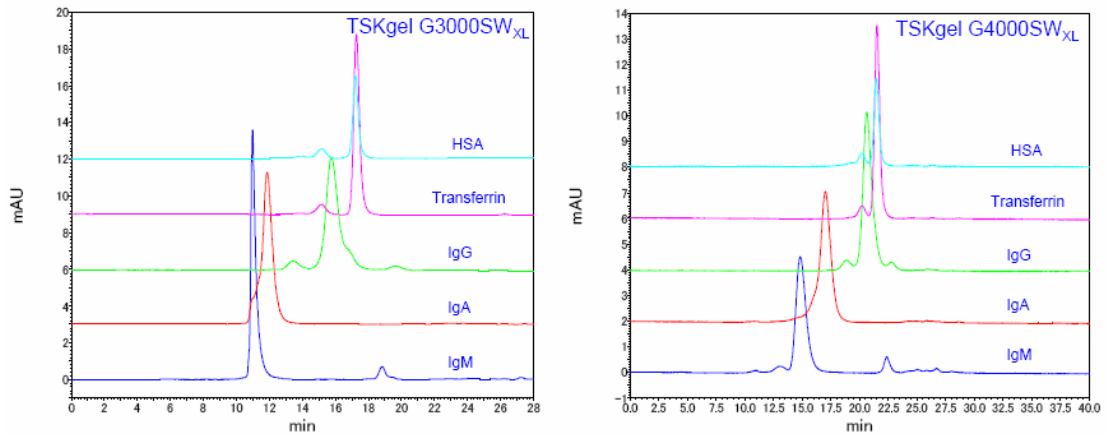
- 溶解性及保存稳定性(分解性)

色谱分析分离模式

1、尺寸排阻色谱法(SEC)

依据组分分子空间尺寸大小进行分离,主要用于多聚体、降解片段,PEG化修饰蛋白等样品的分析。

例 1 免疫球蛋白的分析

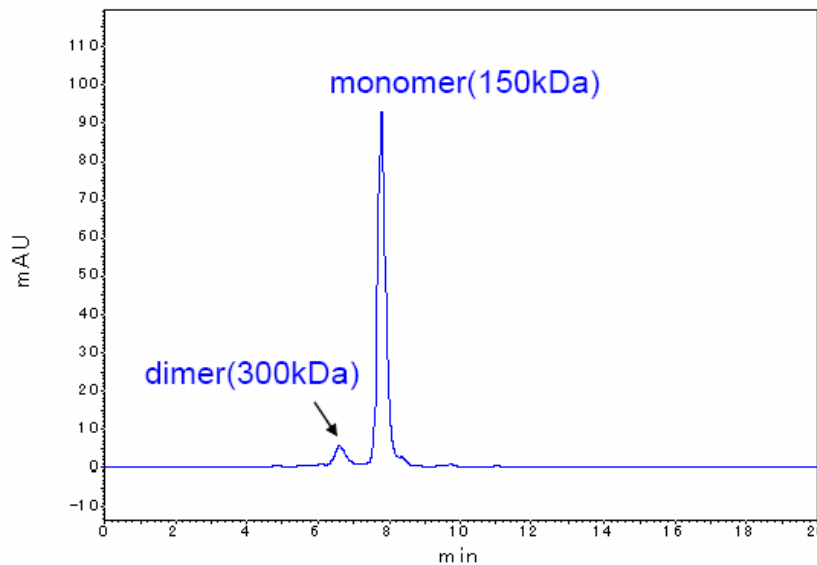


色谱条件

色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
TSKgel G4000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
流动相: 20mmol/L Phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
流速: 0.5mL/min
检测: UV (280nm)
温度: 25℃

进样体积: 15 μ L
进样浓度: 0.17g/L
样品: 1. Human IgM (from myeloma, M.W.:970kDa)
2. Human IgA (colostrum, M.W.:390kDa)
3. Human IgG (M.W.:150kDa)
4. Transferrin (M.W.:80kDa)
5. Human serum albumin (M.W.:66kDa)

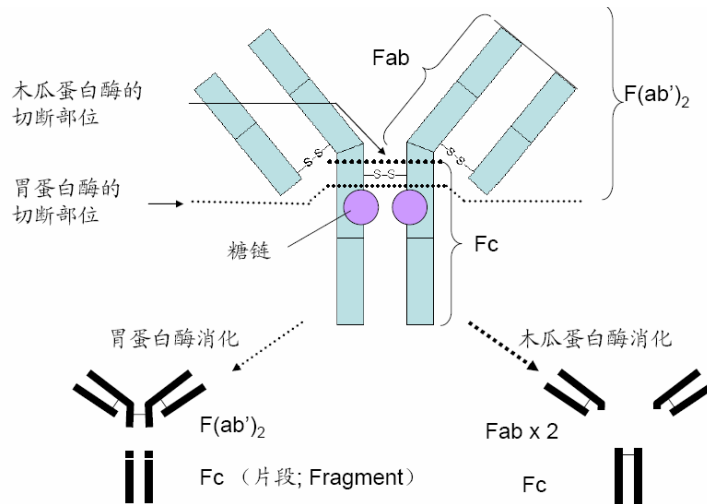
例 2 抗体多聚体的分析



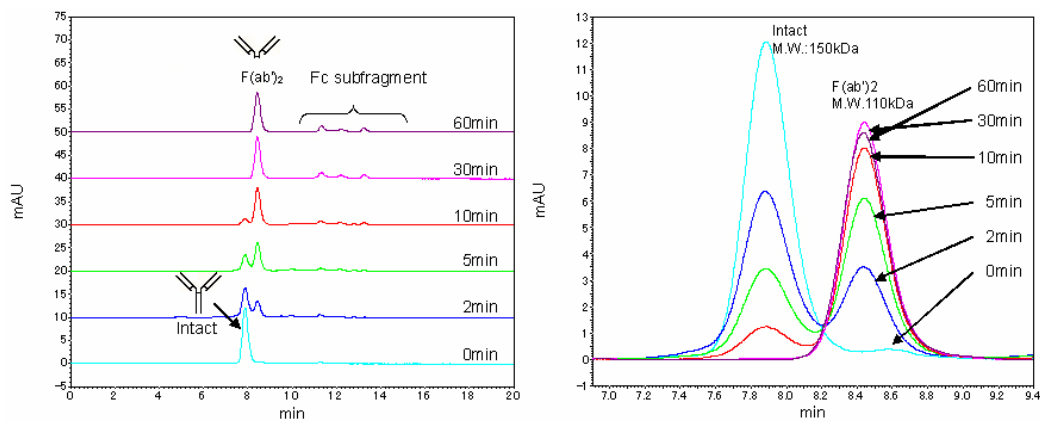
色谱条件

色谱柱 : TSKgel SuperSW3000 (4.6mmI.D. x 30cm)
流动相 : 20mmol/L phosphate buffer + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
流速 : 0.35mL/min
检测 : UV (280nm)
温度 : 室温
进样体积 : 5 μ L
样品 : 人单克隆抗体(4.6g/L, IgG1)

例 3 酶解片段的分析 (胃蛋白酶酶解片段及木瓜蛋白酶酶解片段)



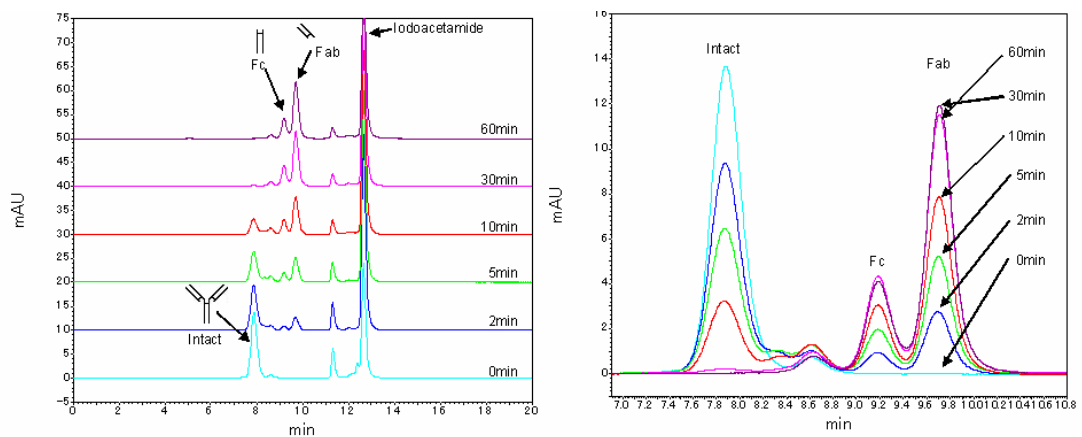
胃蛋白酶酶解抗体的过程跟踪图谱



色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流动相 : 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 室温
 进样体积 : 10 μL
 样品浓度 : 0.19g/L

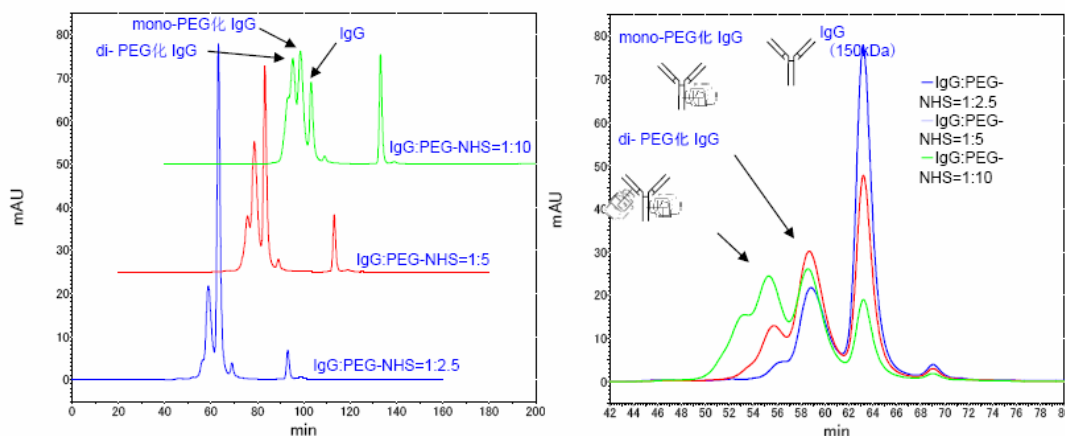
木瓜蛋白酶酶解抗体的过程跟踪图谱



色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流动相 : 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 室温
 进样体积 : 10 μL
 样品浓度 : 0.24g/L

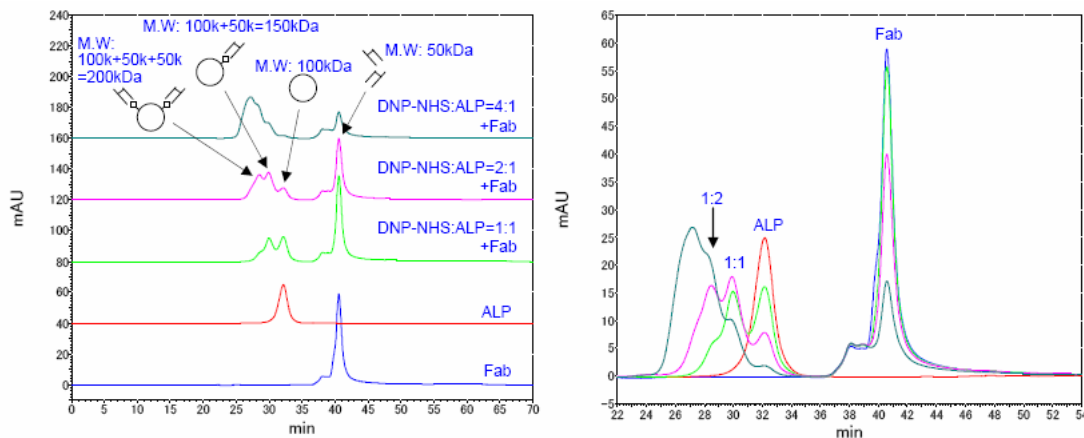
例 4 单 PEG 化蛋白的分析 (PEG:5KDa)



色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm), 2 columns
 流动相 : 20mmol/L Phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 0.25mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 25℃
 进样体积 : 20 μL
 样品浓度 : 0.5g/L

例 5 半抗原结合抗体片段的分析



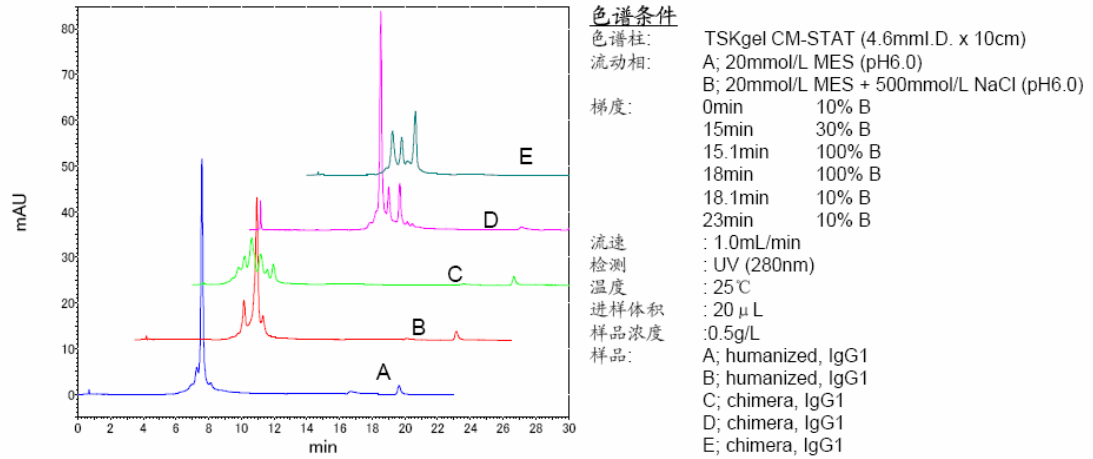
色谱方法

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8mmI.D. x 30cm)
 流动相 : 20mmol/L phosphate + 0.3mol/L NaCl (pH7.0)
 流速 : 0.25mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 25℃
 进样体积 : 20 μL
 样品浓度 : DNP-ALP; 0.67g/L, anti DNP Fab; 1g/L

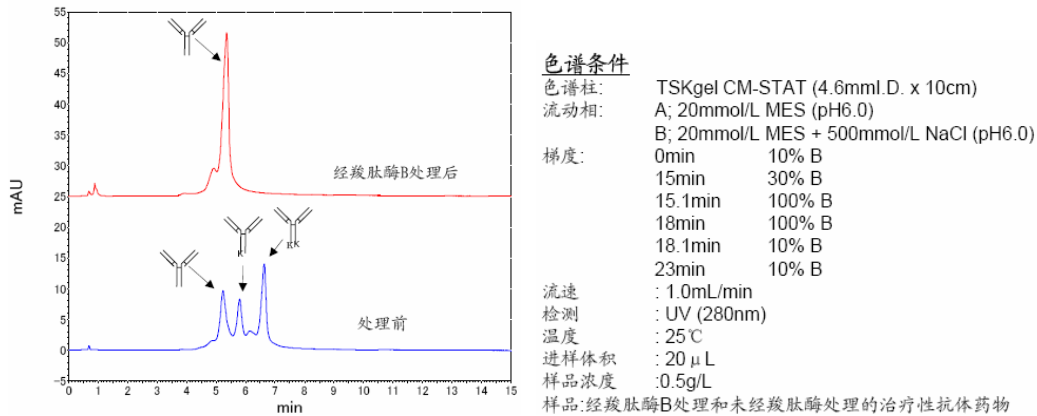
2、离子交换色谱法 (IEC)

依据样品带电性及电荷量的差异分离分析, 如氨基酸残基不同、脱氨基化、PEG 化修饰、N 末端和 C 末端的不同等。

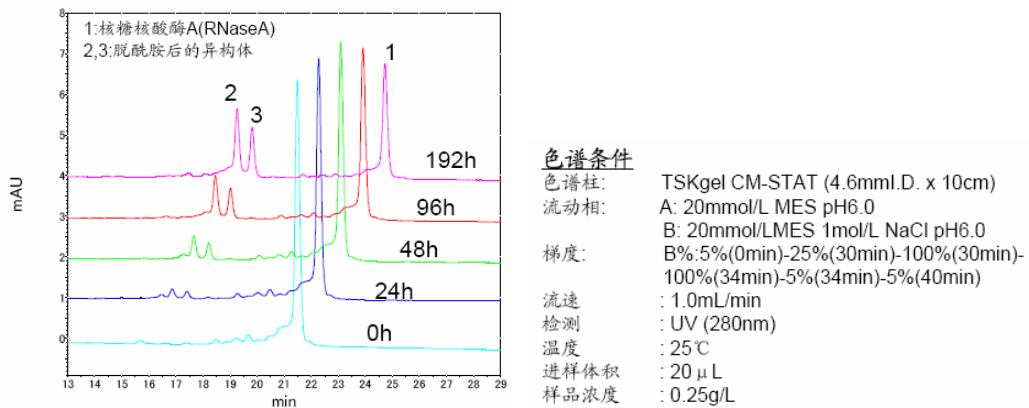
例 1 单抗带电异构体的分析



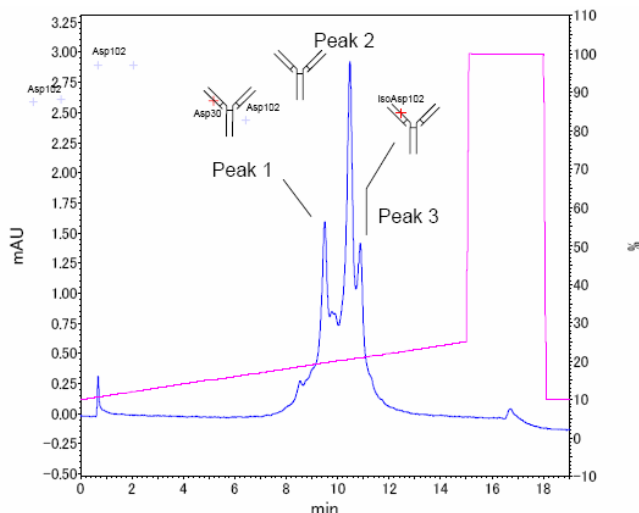
例 2 C 末端赖氨酸残基经羧肽酶 B 处理



例 3 Asn 脱酰胺化及异性化分析

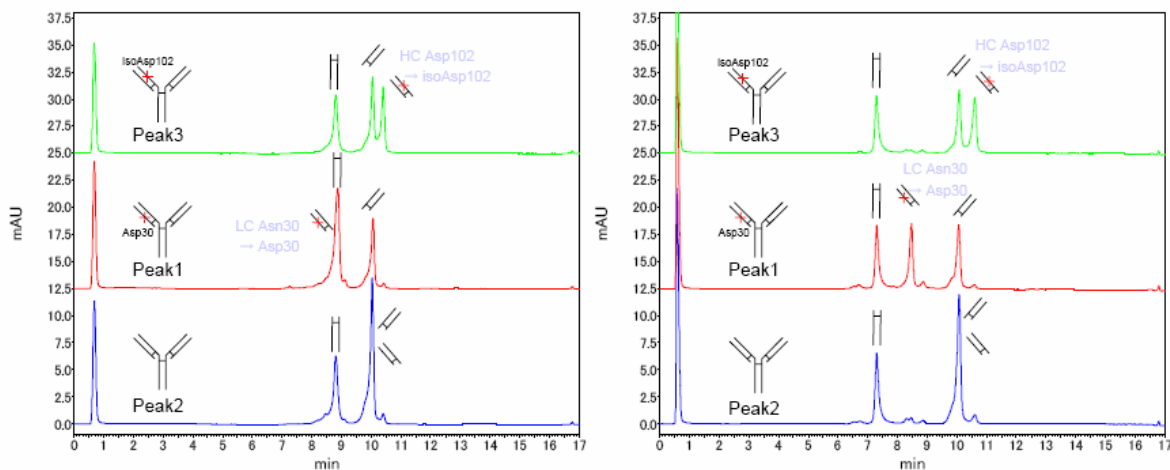


备注: 核糖核酸酶 A 在中等碱性条件下可以引起 Asn67 位点脱酰胺作用并生成 2 种异构体 (Asp67 和 iso-Asp67)。



Conditions
 Column : TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 Eluent : A; 20mmol/L MES (pH6.0)
 B; 20mmol/L MES + 0.5mol/L NaCl (pH6.0)
 Gradient : 0min 10% B; 15min 25% B; 15.1min 100% B; 18min 100% B
 Flow rate : 1.0 mL/min, Detection: UV (280nm), Temp.: 30°C
 Sample : monoclonal IgG, 0.2 g/L, 20 μL

例 4 Asn 脱酰胺化抗体酶解片段分析



Conditions
 Column : left: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm), right: TSKgel SP-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 Eluent : A; 20mmol/L MES (pH6.0), B; 20mmol/L MES + 0.5mol/L NaCl (pH6.0)
 Gradient :
 0min 0% B
 15min 25% B
 15.1min 100% B
 18min 100% B
 Flow rate : 1.0mL/min
 Detection : UV (280nm)
 Temp. : 30°C
 Sample : monoclonal IgG1 (0.2 g/L, 20 μL)

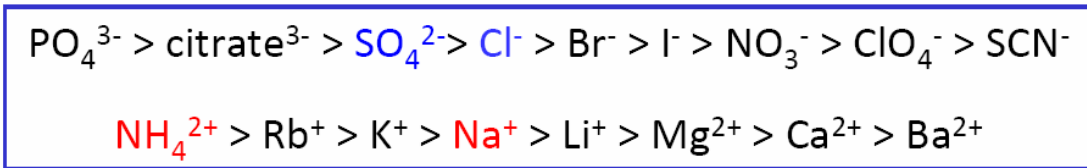
3、疏水相互作用色谱法 (HIC)

依据样品中各组分疏水性的不同而分离分析，如立体构造的不同、氨基酸残基的不同，多聚体、PEG 化修饰等。

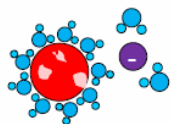
Hofmeister 效应：盐通过水对于蛋白质等生物大分子的影响，下表离子序列中，从右至左离子依次增强非极性溶质的溶解度，增加水的有序性，降低疏水作用。

kosmotropic

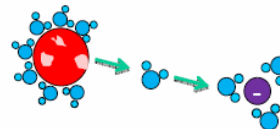
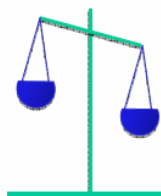
chaotropic



www.laborjournal.de bzw. www.lsbu.ac.uk

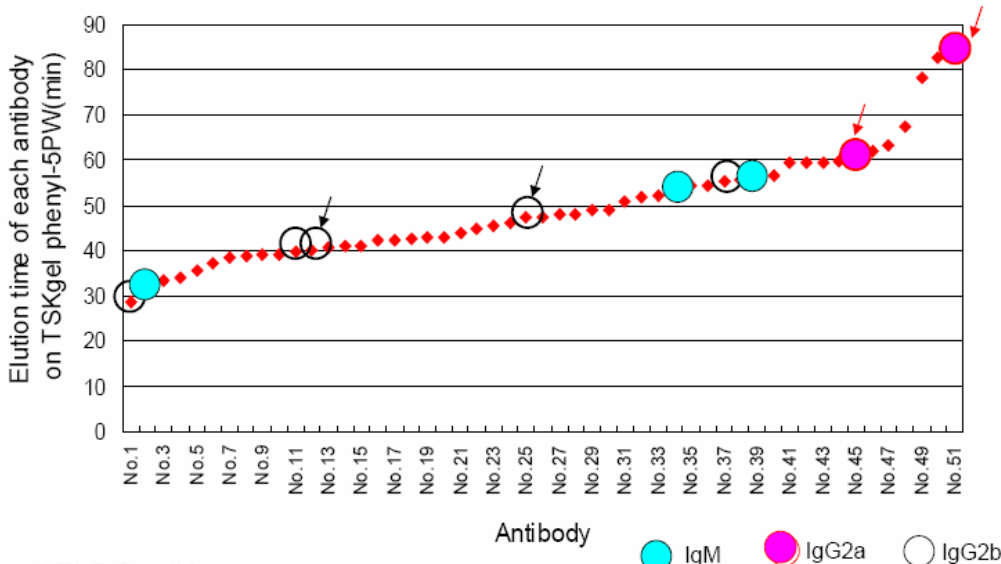


水和构造安定化



水和构造被破坏

例 1 抗体在疏水模式下展示的多变性



HPLC Condition

Column : TSKgel Phenyl-5PW (7.5 mm I.D. x 7.5 cm)

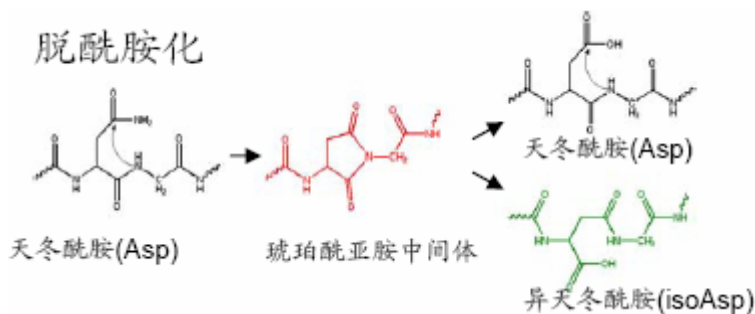
Eluent : (A) 0.1 mol/L phosphate buffer containing 1.8 mol/L ammonium sulfate (pH 7.0)

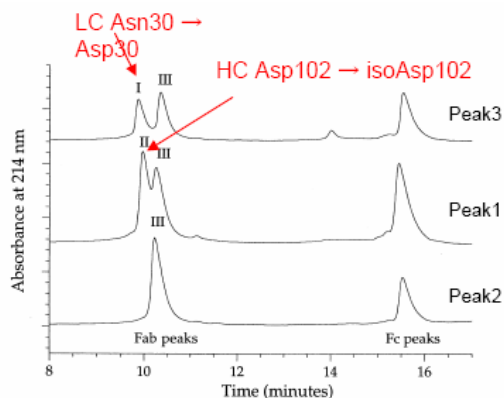
(B) 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.0)

Gradient : (B) 0%(0min)--0%(5min)--100%(65min) linear

Flow Rate : 1 mL/min, Samples : 51 kinds of mouse monoclonal antibodies

例 2 脱酰胺化异构体分析

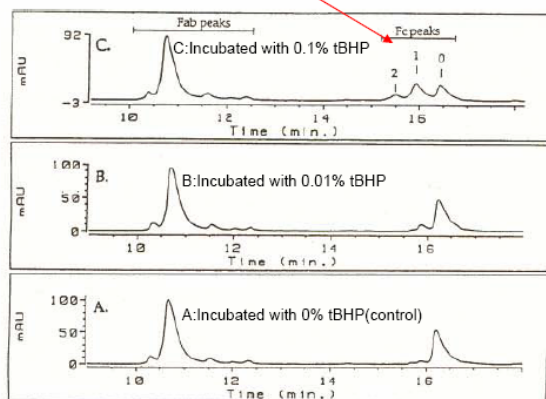




色谱条件
 色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (214nm)
 温度 : 30℃
 进样体积 : 20 μL

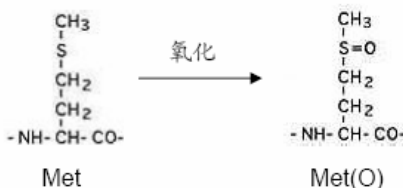
例 3 蛋氨酸 Met 氧化后的片段分析

氧化后蛋氨酸的数量 (Met-255 → Met(O)-255
and/or Met-431 → Met(O)-431)



t-BHP: tert-Butylhydroperoxide

蛋氨酸氧化



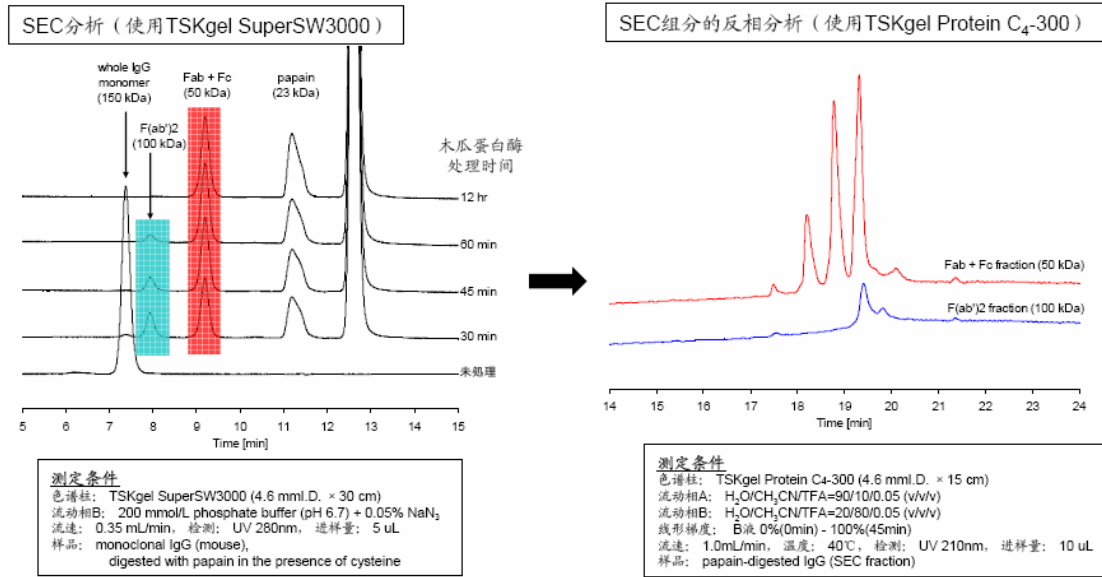
色谱条件

色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV
 温度 : 30℃
 进样量 : 5-10 μg

4、反相色谱法 (RPC)

反相色谱固定相表面烷基链长度对蛋白质的保留和蛋白质的活性回收有很大影响, 烷基链越长 (C18、C22、C30), 固定相疏水性越强, 为使蛋白质等生物分子洗脱, 需使用有机溶剂的含量较高的流动相, 易导致生物分子的不可逆吸附及生物活性损失, 因此短链烷基固定相 (C4、C8、苯基等) 比较适合生物大分子分离分析, 此类型的柱子通常要求碳含量通常在 5% 以下, 孔径 30-100nm, 如 TSKgel Protein C-400, TSKgel Phenyl-5PW RP.

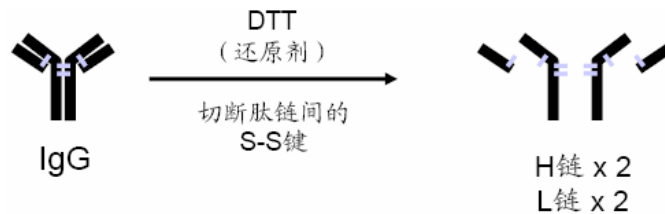
例 1 抗体木瓜蛋白酶消化物的分析



该实验结果表明, 在 SEC 分析的同组分 (100kDa, 50kDa) 中仍有多种疏水性不同的组分。

例 2 抗体药物二硫键还原物的分析

IgG 二硫键还原如下图



检测条件
色谱柱: TSKgel Protein C₄-300 (4.6 mmI.D. × 15 cm)
淋洗液A: H₂O/ACN/TFA = 90/10/0.05 (v/v/v)
淋洗液B: H₂O/ACN/TFA = 20/80/0.05 (v/v/v)
梯度: B 0% (0 min) - 100% (45 min)
流速: 1.00 mL/min, 检测: UV 215nm
温度: 50℃, 进样量: 100 uL
样品: mAb-1, mAb-2, each reduced with dithiothreitol

北京慧德易科技有限责任公司

公司电话: 010-59812370/1/2/3

公司传真: 010-59812400

公司网址: www.prep-hplc.com

全国免费电话: 4008-111-326