

电子期刊

— 抗体药物异构体的HPLC色谱柱分析

2014
NO.58

HIGH QUALITY & EXPERT



抗体药物异构体的 HPLC 色谱柱分析

抗体药物的开发是目前全球生物技术产业的热点，在生物制药领域占有极其重要的地位，被认为是目前生物医药研发的主流方向之一。目前在世界销售额前 10 位的生物药物中，抗体药物就占了 4 个。

单抗药物由于具有靶向性强、半衰期长、副作用小等优点，在治疗重大疾病方面受到重视。单克隆抗体是一种生物大分子，由多个氨基酸组成，结构复杂，在细胞培养、纯化、储存过程中易发生化学修饰如糖基化、磷酸化、化学降解等，所以需要多种方法进行检测分析。

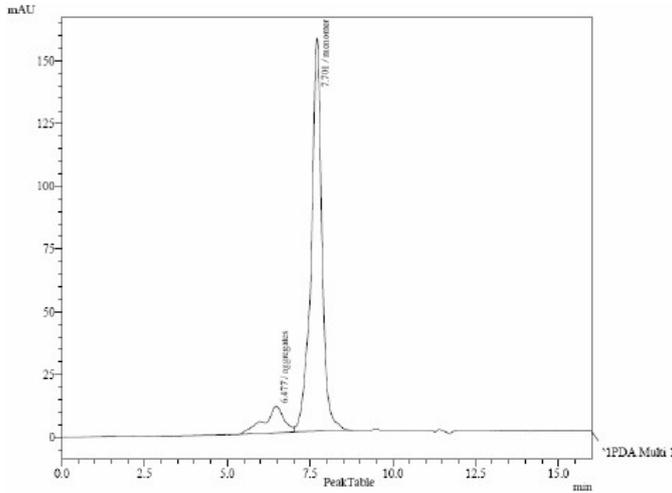
高效液相色谱法 (HPLC) 可以对抗体药物以及重组蛋白等蛋白药物的不均一性进行有效的分析。多种色谱分析方法的有效组合，能够更好地进行蛋白药物的定量和定性分析。例如，分子尺寸排阻色谱法 (SEC) 可以利用分子尺寸的不同，对多聚体、片段、PEG 化蛋白等样品进行有效的分析；离子交换色谱法 (IEC)、疏水作用色谱法 (HIC)、反相色谱法 (RPC)、正相色谱法 (NPC/HILIC) 可以对带电异构体、构造异构体、糖基化、脱酰胺化及氧化等变化引起的杂质进行高分辨率、高效分析。分离选择性取决于色谱分离模式、色谱柱的种类和色谱条件等。

以下对抗体药物异构体的 HPLC 分析，进行简单的介绍。抗体药物的高效液相色谱分析的分模式，主要有以下几种：

一、尺寸排阻色谱法 (SEC) --根据分子尺寸的不同，对多聚体、分解片断进行分析

常用的柱子是TSKgel G3000SW_{XL}。TSKgel SW 型色谱柱属于硅胶基质色谱柱，键合了亲水性二醇基官能团以保护硅胶表面不与蛋白样品相互作用。与其他竞争产品比较，SW型色谱柱单位柱体积的孔隙容量更大，能产生更高的分子量选择性范围和更高的分辨率。低吸附作用和均匀的孔径分布能实现蛋白质的高效分离。

1. 抗体多聚体的SEC分析

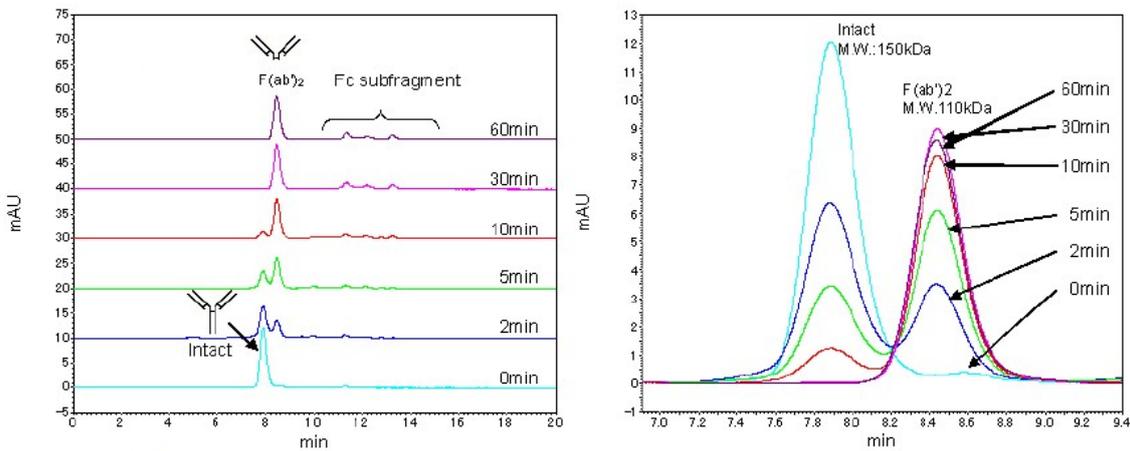


色谱峰	峰面积 %
多聚体	11.08
单体	88.92

色谱条件

色谱柱 : TSKgel G3000SW_{XL} (7.8 mmID x 30 cm)
 流动相 : 0.1 M NaP, 0.1 M NaSulfate, pH 6,7
 流速 : 1.0 mL/min
 检测 : UV (280nm)
 温度 : 室温
 进样体积 : 20 μL
 样品 : 人单克隆抗体

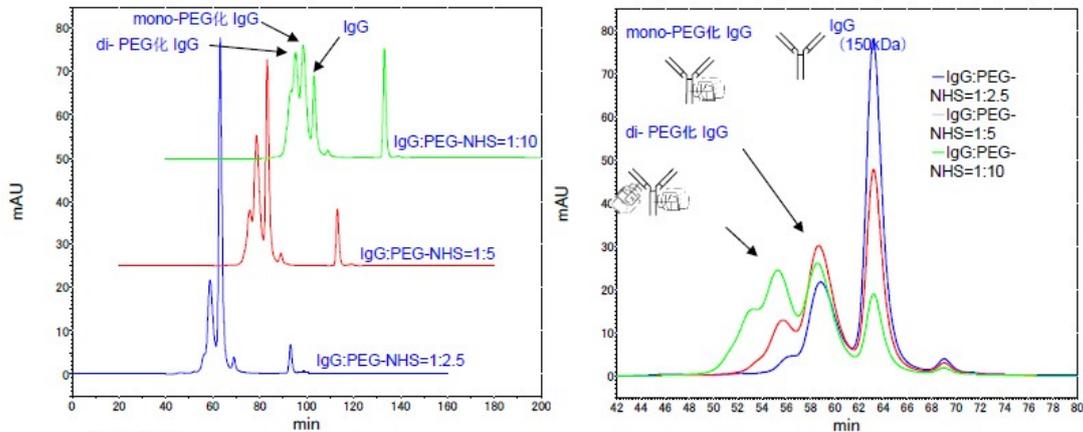
2. 胃蛋白酶酶解抗体的过程跟踪



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

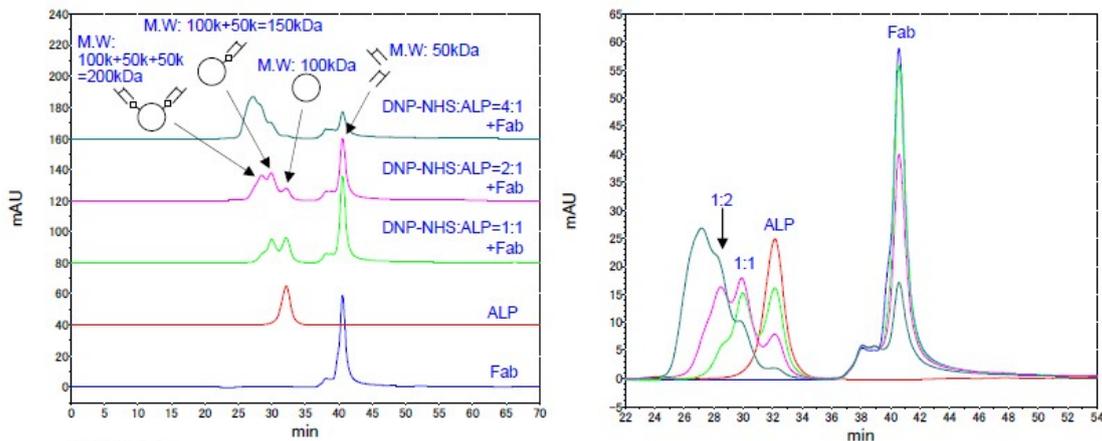
3. 单抗PEG化的分析(PEG:5 kDa)



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

4. 半抗原结合抗体片段的分析

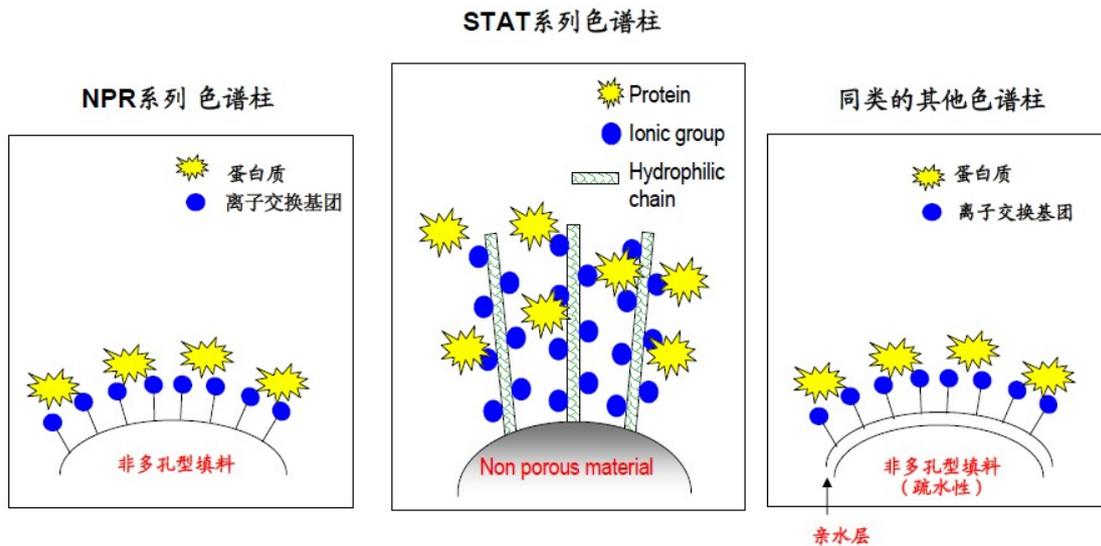


色谱方法

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

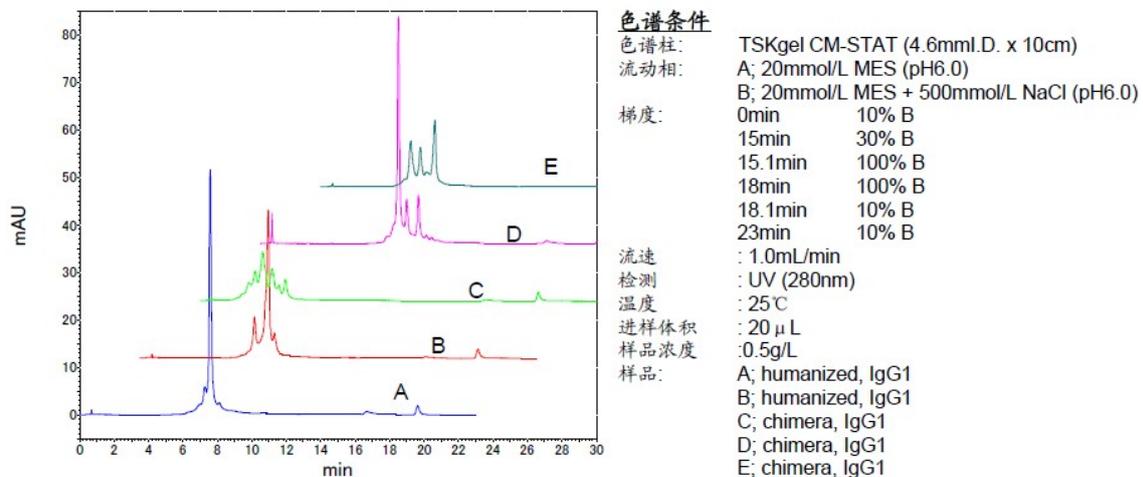
二、离子交换色谱法 (IEC) --根据带电性的不同,对氨基酸残基的不同、脱氨基化、N末端和C末端的变化进行分析

离子交换介质的表面构造如下图。

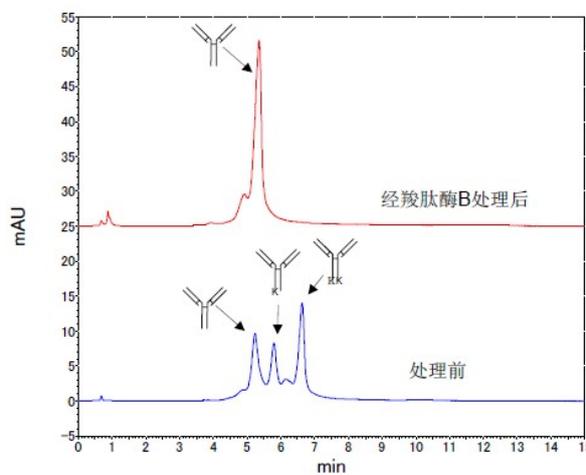


常用的柱子是 TSKgel CM-STAT。TSKgel STAT 系列为生物高分子 (蛋白质, 多肽, 核酸) 分离用的聚合物系离子交换色谱柱。使用非多孔性填料, 在通用 HPLC 系统中可实现超高速、超高效分离。

1. 抗体药物IEC分析实例1 (单抗带电异构体的分析)



2. 抗体药物IEC分析实例2 (C末端赖氨酸残基的酶处理)



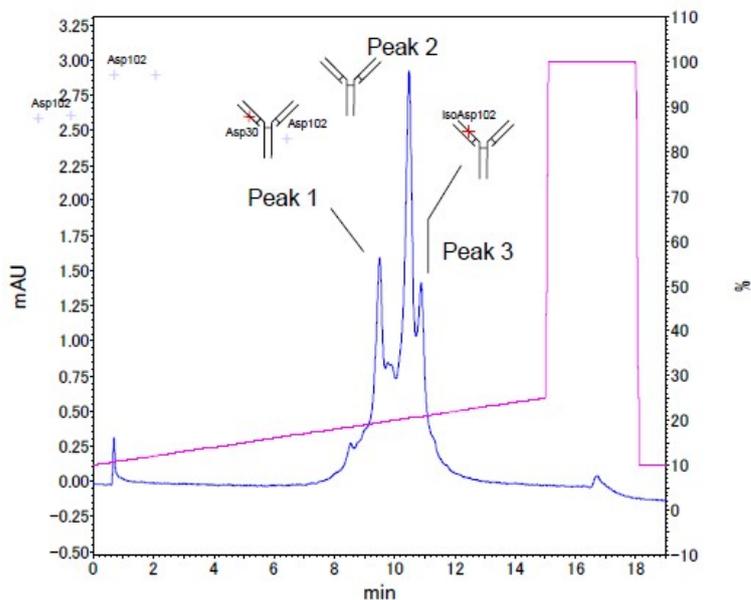
色谱条件

色谱柱: TSKgel CM-STAT (4.6mmI.D. x 10cm)
 流动相: A; 20mmol/L MES (pH6.0)
 B; 20mmol/L MES + 500mmol/L NaCl (pH6.0)
 梯度: 0min 10% B
 15min 30% B
 15.1min 100% B
 18min 100% B
 18.1min 10% B
 23min 10% B
 流速: 1.0mL/min
 检测: UV (280nm)
 温度: 25℃
 进样体积: 20 μL
 样品浓度: 0.5g/L
 样品: 经羧肽酶B处理和未经羧肽酶处理的治疗性抗体药物

处理流程:

在35uL的治疗性抗体(10mg/mL)中加入1uL的羧肽酶B(Sigma C9584, 140U/mg protein, 5g/L in PBS), 37度下解化3个小时。然后加入664uL的20mmol/L的MES(pH6.0)以将抗体样品浓度稀释至0.5g/L。最后取20uL的稀释样品进样。

3. 抗体药物IEC分析实例3 (Asn脱酰胺化及异性化分析)



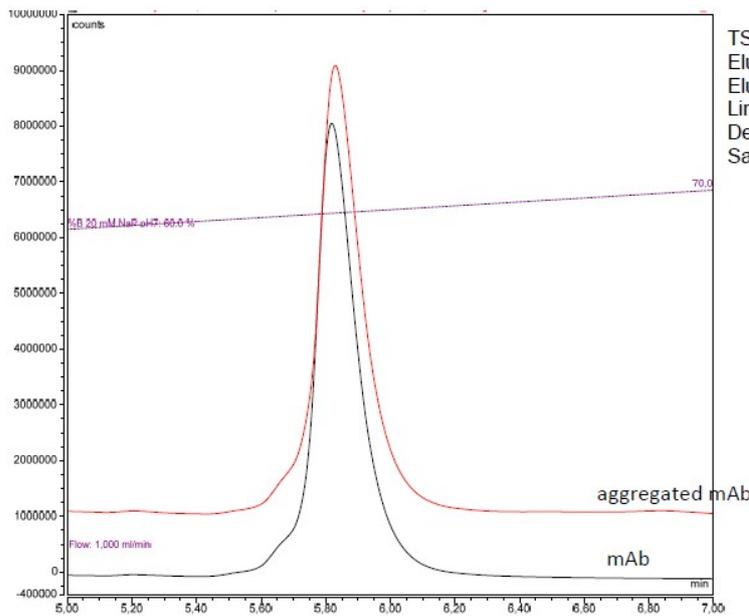
Conditions

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℃
 Sample : monoclonal IgG, 0.2 g/L, 20 μL

三、疏水相互作用色谱法 (HIC) --根据立体构造 (疏水性) 的不同, 对氨基酸残基的不同、多聚体进行分析

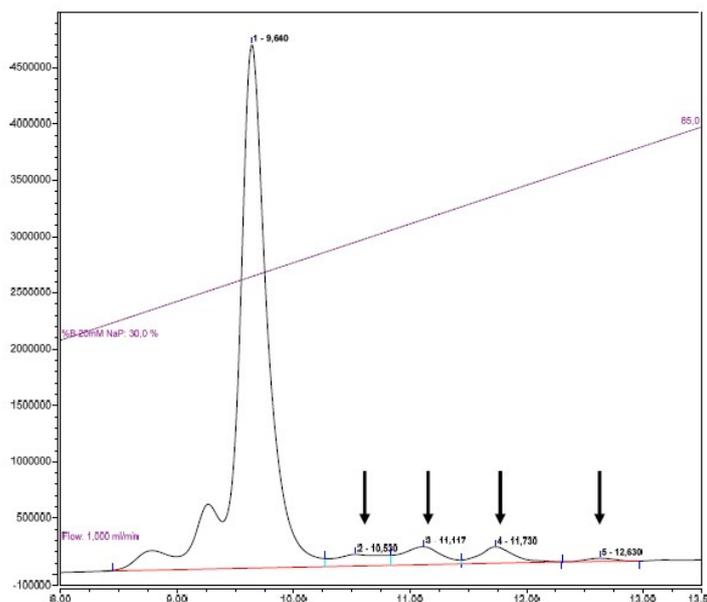
常用的柱子是TSKgel Butyl-NPR。TSKgel Butyl-NPR是一款以粒径为2.5 μ m的, 丁基键合无孔型亲水性聚合物基质为填充物的疏水作用色谱柱。适用于蛋白质、单抗、酶等生物大分子的分离分析。

1. 抗体的HIC分析实例1 (使用硫酸铵作为盐淋洗液)



TSKgel Butyl NPR (4.6 mm I.D. X 3.5 cm)
Eluent A: 1.5 M Ams (c = 188 mS/cm)
Eluent B: water
Linear gradient of 0-100 % B in 10 min
Detection; FS: Ex. 280 nm; Em. 348 nm
Sample; mAb, 5 μ g injection

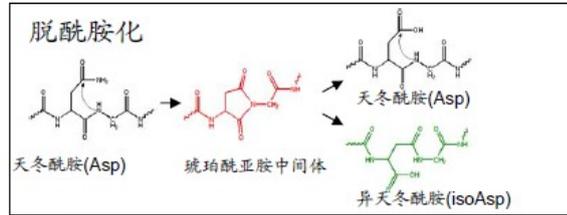
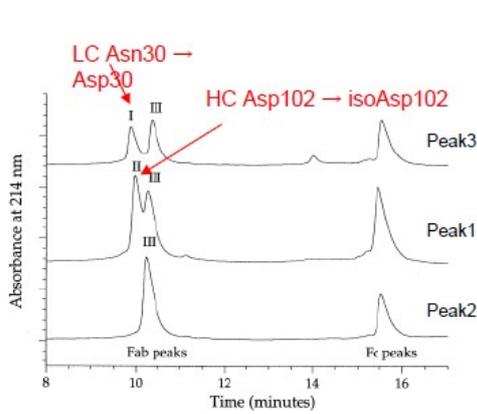
2. 抗体的HIC分析实例2 (使用NaCl作为盐淋洗液)



TSKgel Butyl NPR (4.6 mm I.D. X 3.5 cm)
Eluent A: 3 M NaCl (c = 234 mS/cm)
Eluent B: water
Linear gradient of 0-100 % B in 10 min
Detection; FS: Ex. 280 nm; Em. 348 nm
Sample; mAb, 5 μ g injection

色谱峰	峰面积 %
多聚体	10.64
单体	89.36

3. 抗体的HIC分析实例3 (脱酰胺化异构体分析)



色谱条件

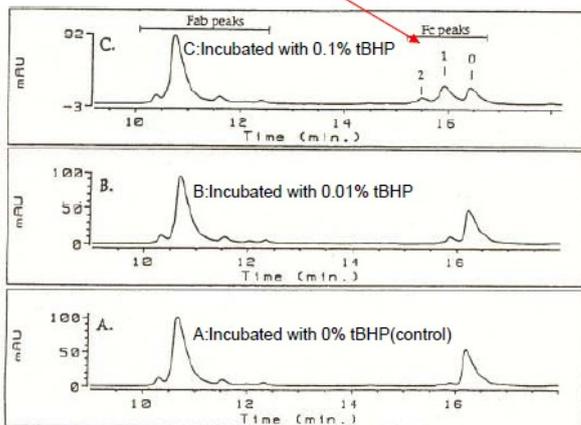
色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV (214nm)
 温度 : 30℃
 进样体积 : 20 μL

rhuMab HER2 cation-exchange peak assignments

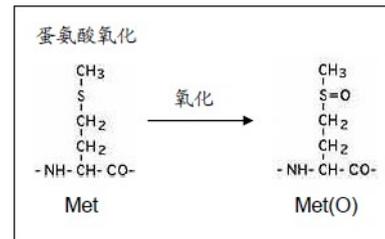
Peak	Peak area %	Structural difference(s)	At LC Asn30	At HC Asn55	At HC Asp102
1	13.6	Deamidated (to Asp) at Asn30 of one light chain	Asn/Asp	Asn/Asn	Asp/Asp
2	73.8	Main peak form	Asn/Asn	Asn/Asn	Asp/Asp
3	8.5	Isomerized (to isoAsp) at Asp102 of one heavy chain	Asn/Asn	Asn/Asn	Asp/isoAsp

4. 抗体的 HIC 分析实例 4 (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



色谱条件

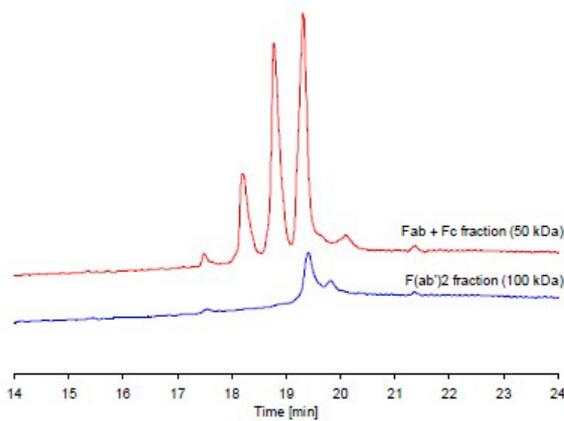
色谱柱 : TSKgel Butyl-NPR (4.6mmI.D. x 3.5cm)
 流动相 : A; 2mol/L (NH₄)₂SO₄ containing 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 B; 20mmol/L Tris-HCl (pH7.0)
 梯度 : 34min linear gradient from 10 to 100%B
 流速 : 1.0mL/min
 检测 : UV
 温度 : 30℃
 进样量 : 5-10 μg

四、反相色谱法 (RPC) --根据分子量的不同 (疏水性) , 对氨基酸残基的不同进行分析

常用的柱子是TSKgel Protein C4-300。色谱柱采用粒径为3 μ m、孔径为30nm、键合了丁基(C4)的硅胶填料充填,是一种用于分离生物大分子的高性能反相色谱分析柱。对蛋白质保留较强,分离选择性优异;对一般水溶性蛋白质的回收率高,能保持尖锐的峰形。3 μ m的填料粒径,可以实现高通量、高分辨率、高灵敏度的分析检测。2mm内径的色谱柱适用于LC/MS/(MS)联用分析检测。

1. 抗体的RPC分析实例1 (抗体木瓜蛋白酶消化物的分析)

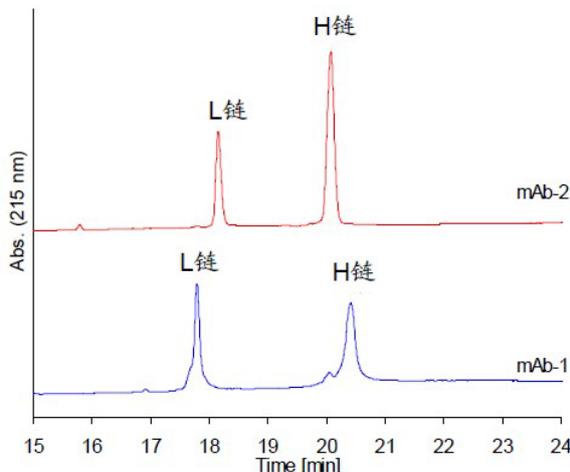
SEC组分的反相分析 (使用TSKgel Protein C₄-300)



测定条件

色谱柱: TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.D. × 15 cm)
 流动相A: H₂O/CH₃CN/TFA=90/10/0.05 (v/v/v)
 流动相B: H₂O/CH₃CN/TFA=20/80/0.05 (v/v/v)
 线性梯度: B液 0%(0min) - 100%(45min)
 流速: 1.0mL/min, 温度: 40℃, 检测: UV 210nm, 进样量: 10 μ L
 样品: papain-digested IgG (SEC fraction)

2. 抗体的RPC分析实例2 (抗体药物二硫键还原物的分析)



检测条件

色谱柱: TSKgel Protein C4-300 (4.6 mm I.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 μ L
 样品: mAb-1, mAb-2, each reduced with dithiothreitol