

白皮书

用于测定蛋白质流体力学半径的 体积排阻色谱法 - 重新校准曲线

Dr. Ivan Lebedev, Dr. Laurence Brill, Brian Rivera, and Dr. Bryan Tackett
Phenomenex, Inc., 411 Madrid Ave., Torrance, CA 90501 USA

简介

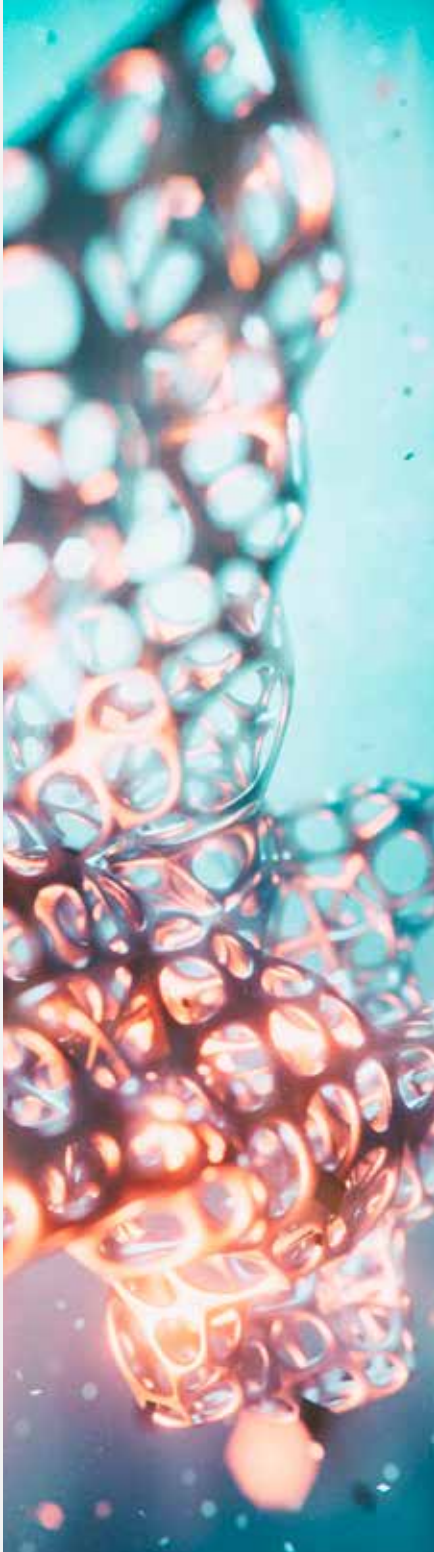
体积排阻色谱法 (SEC) 是一种非吸附色谱形式。其中,大分子 (如蛋白质或聚合物) 根据流体力学半径进行分离。不能渗透色谱填料中所有孔的大分子部分被排阻,因此洗脱较早,而能渗透更多孔的小分子则较晚洗脱。理解分析物流体力学半径 (Rh), 以及体积排阻色谱柱孔径和分布, 对于理解分析物在 SEC 中的行为是至关重要的。在本白皮书中,我们将探讨几种已知流体力学半径的蛋白质标准品, 以及如何使用它来确定适合方法性能的理想体积排阻条件。

背景

由于可转移性和相对简单性, SEC 是用于蛋白质治疗药物的聚集体分析的主要方法, 支持整个产品研发生产周期。¹ 高效液相色谱柱的发展极大提高了聚集体分析的数据质量, 尤其是单克隆抗体 (mAb) 的数据质量。例如, 如果优化了诸如流动相和色谱柱选择等方法参数, SEC 方法既可以分离 mAb 高分子量聚集体 (HMW), 也可以分离低分子量聚集体 (LMW)。² 除了 LC 的进步之外, 对诸如高分离度质谱仪等检测器的使用也使得 SEC 早已被用于简单的聚集体定量分析之外的工作。事实上, SEC 可以有效地用于多种表征方法。

有一项成熟的 SEC 应用是测定未知聚合物的分子量。简而言之, 用聚合物标准品生成校准曲线, 并根据每个标准品的 log MW 得出相对保留时间, 然后进行多项式回归分析。这一简单的方法可以用来推算确定未知物分子量的点, 只要该未知物具有与用于生成回归的标准品相似的物理化学性质。³ 这种方法在蛋白质上的尝试取得了比较有限的成功率。⁴ 这主要是因为蛋白质的物理化学性质不同, 因此会影响其在体积排阻法中的行为。影响最大的就是次级的、非理想的 SEC 相互作用, 这可能导致保留时间的变化, 使确定未知物质量的推算出现偏差。此外, 由于蛋白质在三级和四级结构上存在本质差异, 它们的分子量可能不容易通过蛋白质标准品生成的校准曲线中推断出来。因此, 使用校准曲线 - 至少通过使用分子量或分子质量进行推算 - 在蛋白质表征中并不常见。

与之相反, 其它的体积排阻色谱正交方法得到了青睐。这包括光散射, 它可以使用传统的 SEC 柱和方法提供表征。然而, 动态光散射和多角度光散射都有一定的局限性, 其中仪器的局限性尤为突出。在这里, 我们演示了使用具有良好表征的流体力学半径和分子质量的蛋白质标准品来生成校准曲线。这不仅可以用于确定一个未知物的流体力学半径, 而且可能还可以用于稳定性指示或生物相似性方法, 因为翻译后修饰的变化 (如脱酰胺和糖基化) 可以用成熟的分析 SEC 方法检测。



材料和方法

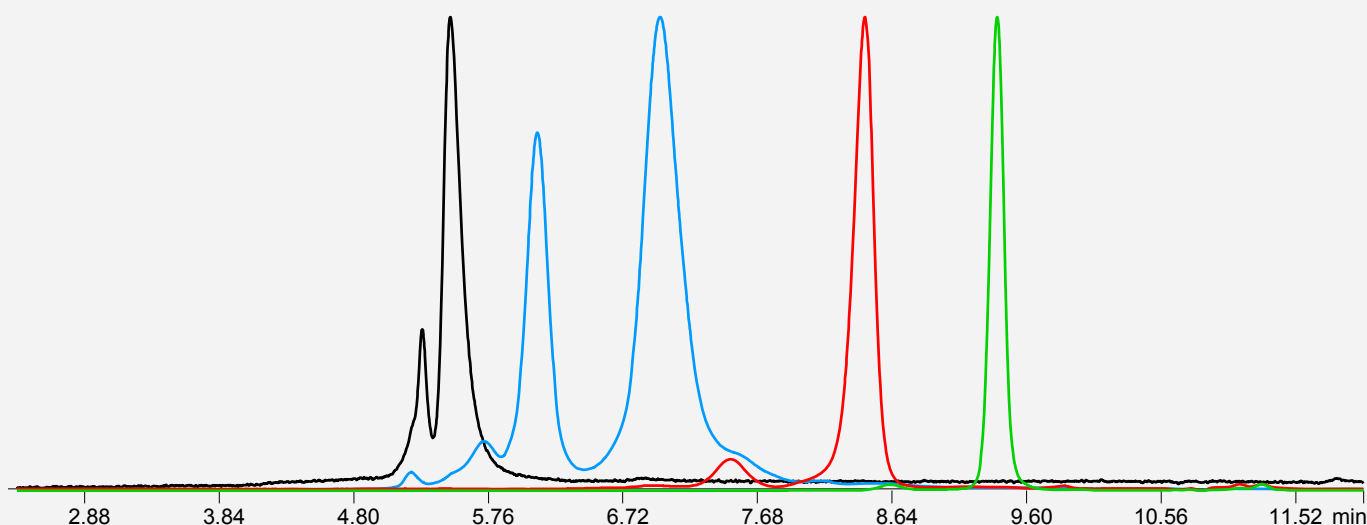
包括 NIST mAb (RM 8671) 在内的蛋白标准品均购自 Millipore-Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。单克隆抗体 (曲妥单抗、英夫利昔、西妥昔) 和融合蛋白均购自 Myonex 公司 (Norristown, PA, USA)。外糖苷酶和内糖苷酶均购自 Genovis (瑞典隆德), 并按照制造商的方案进行消化。

所有 SEC 分析都是在 Waters H-Class Bio, UPLC 系统上进行的, 该系统具有 280 nm 紫外检测器。使用 Empower 软件进行数据分析。各标准品及样品用 1X PBS 稀释至 10 mg/mL。进样量为 10 μ L。流动相为 200mM 磷酸钾和 250mM 氯化钾, pH 为 6.8, 按照第 129 章 USP 专论 42/NF37 制备。⁵ 每次 LC-UV 分析均使用 Phenomenex bioZen 1.8 μ m, 200 \AA 色谱柱, 内径 4.6 mm, 长度 300 mm, 运行流速为 0.35 mL/min。柱温箱温度为 25°C。使用相对洗脱体积和已知蛋白标准品的分子质量或流体力学半径, 使用 Microsoft Excel 生成校准曲线, 并进行第三级多项式回归分析。

结果

图 1 突出显示了常用蛋白标准品的分离, 这些标准品用作分析和大规模体积排阻分析的凝胶过滤标准品。虽然校准曲线通常是使用混合物生成的, 但保留时间是由单个标准品的进样决定的。这种方法提供了更一致的结果, 因为可能会发生由于柱超载而产生的二次排阻, 特别是在该数据集中使用的孔隙体积相对较低的硅胶。此外, 单蛋白进样可以评估用于生成校准曲线的蛋白标准品是否提供了最佳色谱结果, 因为这样可以得到对二聚体/HMW 聚集体的峰拖尾和分离度的正确评估。

图 1. 蛋白质标准品的色谱重叠, y轴归一化
黑色-甲状腺球蛋白, 蓝色- γ 球蛋白(IgA/IgG), 红色-卵清蛋白, 绿色-肌红蛋白。



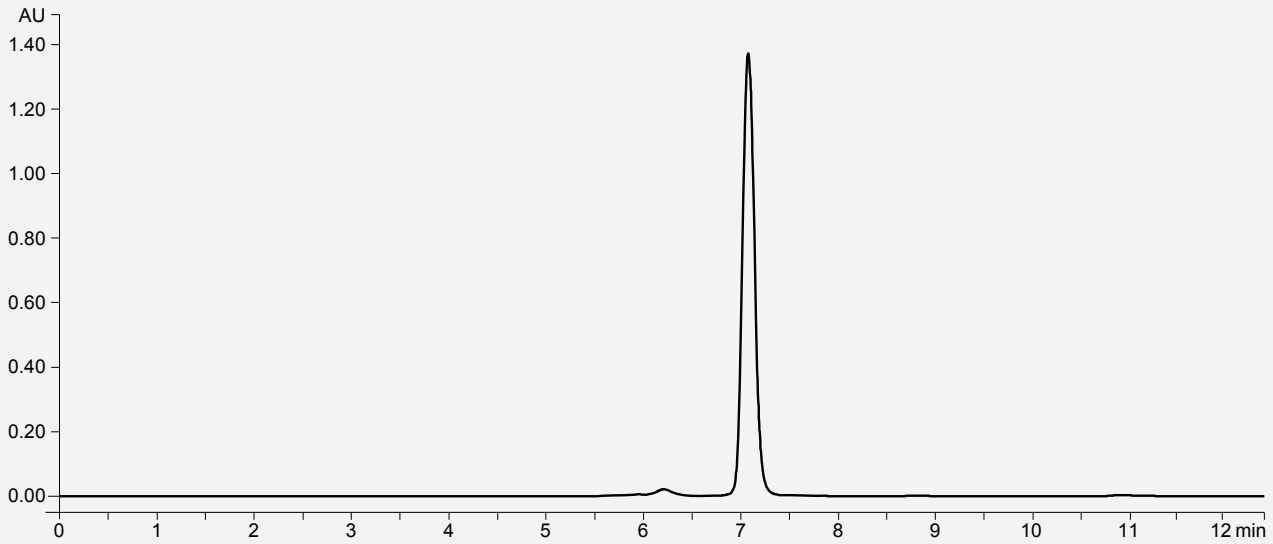
应用编号: 26592



图 2 和图 3 显示了两种单克隆抗体 (NIST mAb 和西妥昔) 的体积排阻色谱图。单体和二聚体的分离良好 (分离度大于 2), 并且两种抗体的片段分离良好。根据 mAb 的物理化学性质, 二次相互作用可能会导致峰拖尾或变宽, 从而降低分离度。然而, NIST mAb 和西妥昔均显示了良好的峰形 (峰不对称度分别为 1.12 和 1.35), 表明分

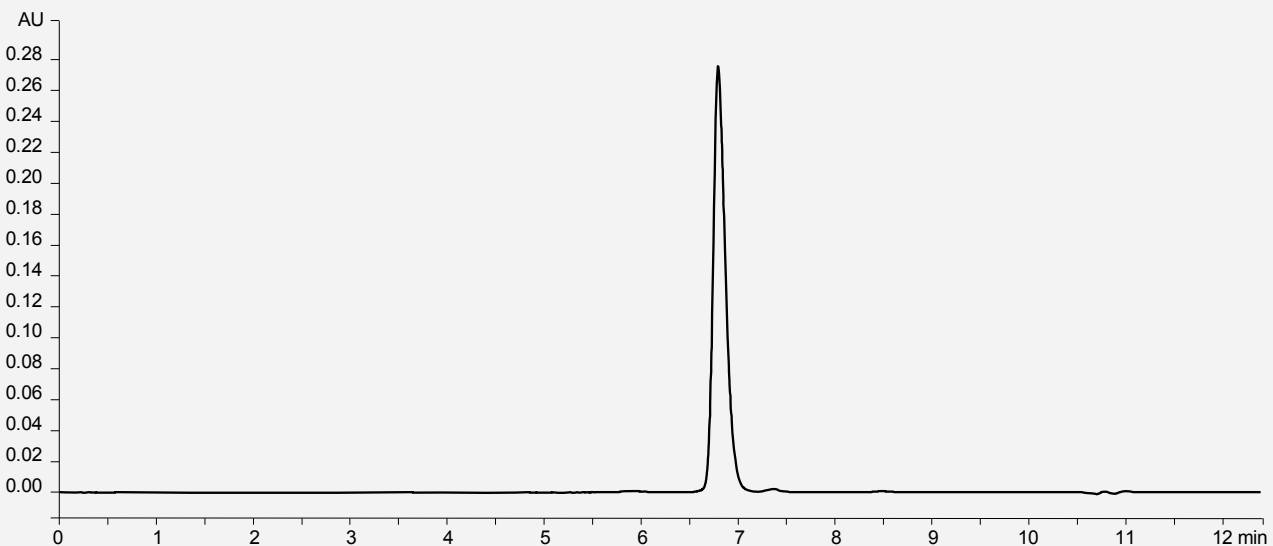
析物与固定相之间的非特异性相互作用极小。分析的其他单克隆抗体 (曲妥珠单抗, 英夫利昔单抗) 和 Fc-fusion 蛋白也得到了良好的峰形 (数据未显示)。

图 2. 具有代表性的 NIST mAb SEC 色谱图



应用编号: 26593

图 3. 具有代表性的西妥昔 SEC 色谱图



应用编号: 26594



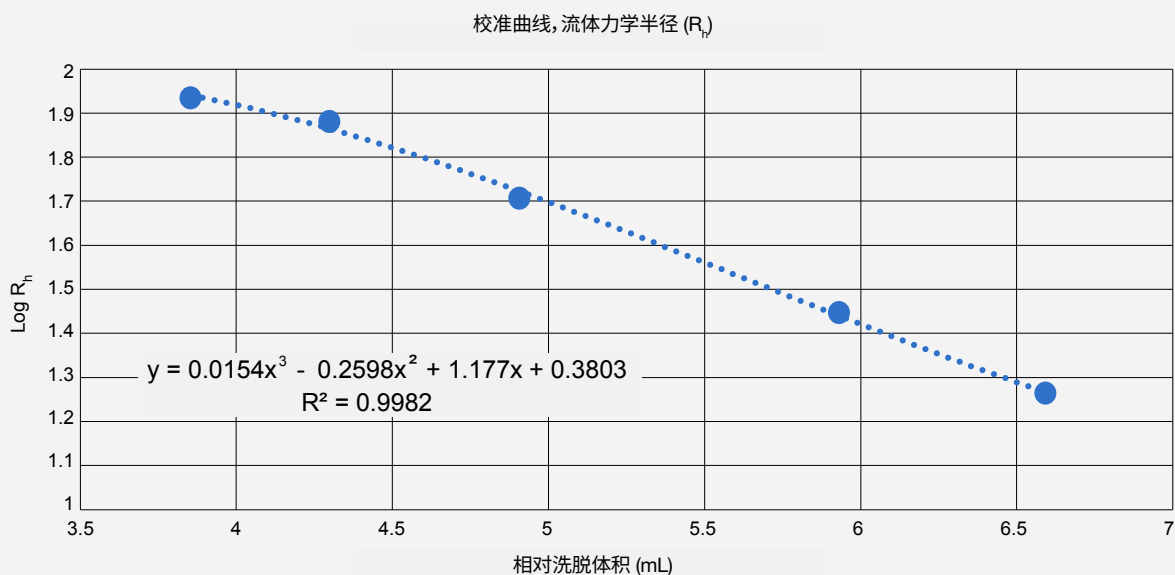
表 1 显示了 SEC 运行的各种标准品和样品的洗脱时间的总结。洗脱时间由流体力学半径校准曲线的 R_h (图 4) 或 MW 校准曲线的摩

尔质量 (图 5) 进行推算。在推算曲妥珠单抗的 R_h 或 MW 值时,我们观察到值与文献中使用任一校准曲线所报道的值比较接近。⁶

表 1. 蛋白质标准品和样品的保留时间

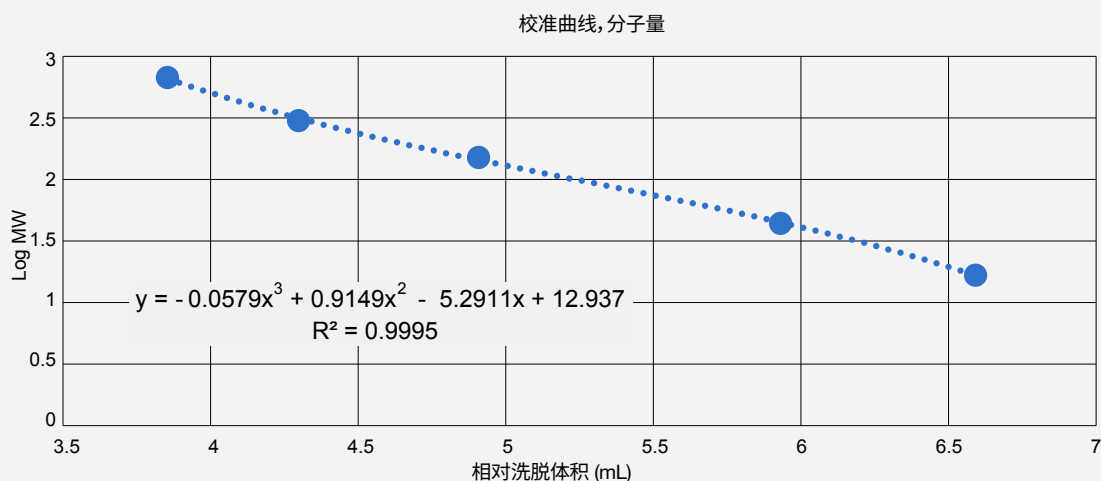
分析物	保留时间 (min)	洗脱体积 (mL)	理论Rh (Å)	理论MW (kDa)	测得Rh (Å)	测得MW	R_h 方法准确度	MW方法准确度
甲状腺球蛋白	5.489	3.85	86	670				
IgA	6.122	4.30	76	300				
IgG	6.99	4.91	51	150				
卵清蛋白	8.447	5.93	28	44				
马心肌红蛋白	9.389	6.59	18.4	16.7				
BSA	7.831	5.50	36	66	36.1	75.8	100.3%	114.9%
胰岛素	9.473	6.65	20	5.8	17.7	15.2	88.3%	262.8%
曲妥单抗	6.977	4.90	54	148	52.7	146.7	97.7%	99.1%
曲妥单抗- PNGase F	6.965	4.89	54	145.5	53	148.2	98.2%	101.8%
曲妥单抗- Beta Gal	6.988	4.91	54	147.8	52.5	145.4	97.2%	98.7%
曲妥单抗- EndoS2	6.969	4.89	54	146	52.9	147.7	98.0%	101.1%
NIST mAb	7.078	4.97	52	150	50.5	135.4	97.2%	90.3%
英夫利昔	6.584	4.62	69	149	61.8	203.9	89.5%	136.8%
西妥昔	6.796	4.77	57	152	56.8	170.1	99.7%	111.9%
依那西普	6.615	4.64	69	150	61.1	198.4	88.5%	132.3%

图 4. 用蛋白标准品的洗脱体积生成的校准曲线, 根据 $\text{Log } R_h$ 标绘。采用三阶多项式回归计算分析样品的 R_h 。



应用编号: 26598

图 5. 用蛋白标准的洗脱体积生成的校准曲线, 根据 Log 分子量标绘。

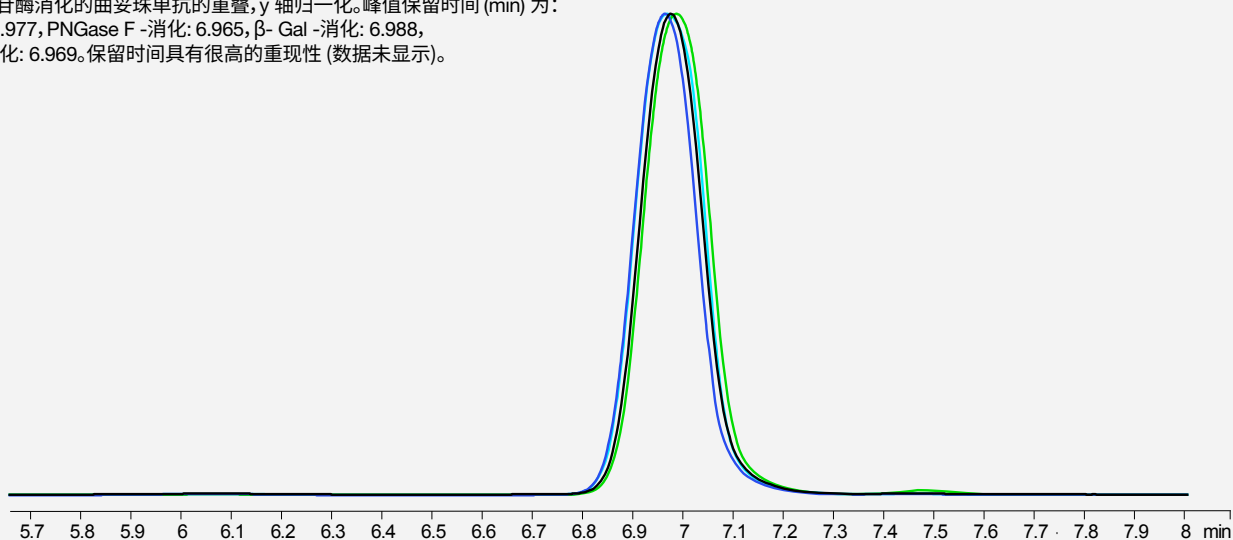


应用编号: 26599

然而, 其他样品和标准品的 R_h 和 MW 值存在较大偏差。例如, 与理论值 (100.3%) 相比, BSA 推算值得到一个非常接近的测量 R_h 值。BSA 的推算 MW 的准确度较低 (114%)。用重组人胰岛素观察到进一步的偏差, 其中 R_h 仅为理论值的 88%, 但用 MW 校准曲线推算的差异更大 (262.8%)。其他单抗 (西妥昔单抗、英夫利昔单抗、NIST) 的测量值与理论 MW 值也有显著差异, 推算值的范围在 90.3-136.8%。然而, 使用 R_h 校准曲线的话, 测量值相对于报告的 R_h 值是相当准确的。有趣的是, 在糖苷酶消化的样品中, 观察到保留时间的变化与预测的分子质量变化无关 (图 6)。

实际上, 经过消化的曲妥珠单抗在每个被消化的末端半乳糖中产生的分子量差异为 162da; 由于 G0F/G1F 是曲妥珠单抗的主要糖形式, 可能的变化应该是源自一种半乳糖的质量差异。这个分子质量理论上应该不能用 SEC 区分; 然而, 保留度略有增加 (图 6)。洗脱体积的变化虽然很小, 但可能表明流体力学半径的变化, 因为单抗的末端半乳糖确实改变了蛋白质折叠, 从而改变了它们的 R_h ,⁷ 从而改变了在 SEC 中的行为。

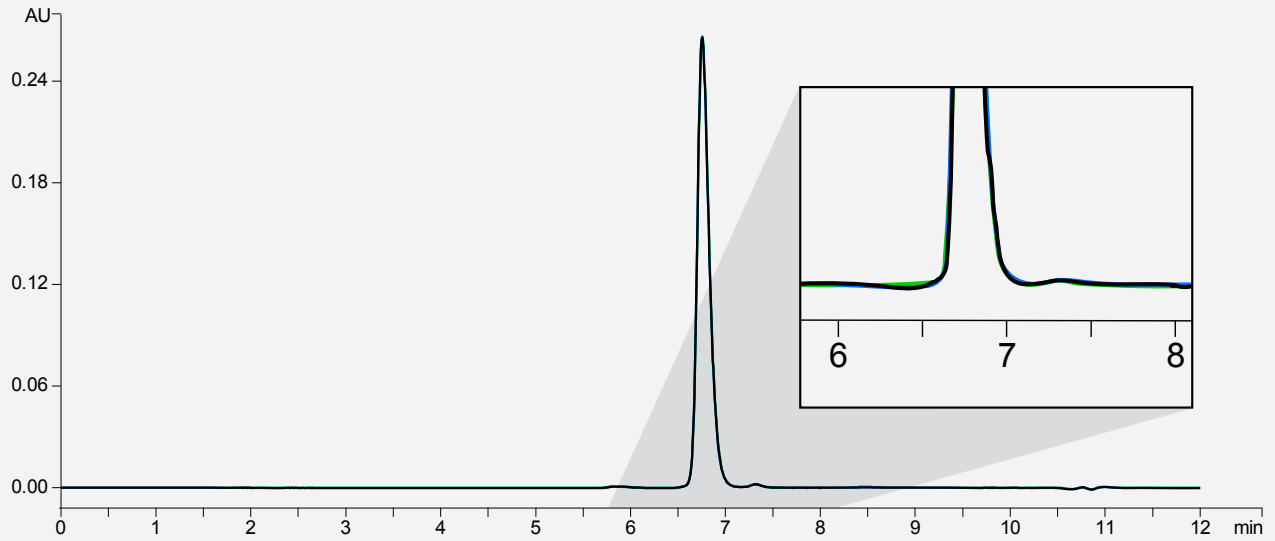
图 6. 内、外糖苷酶消化的曲妥珠单抗的重叠, y 轴归一化。峰值保留时间 (min) 为: 曲妥珠单抗: 6.977, PNGase F -消化: 6.965, β -Gal -消化: 6.988, Endo - S2 -消化: 6.969。保留时间具有很高的重现性 (数据未显示)。



应用编号: 26595

糖苷酶消化单克隆抗体保留时间的相对较小的变化是可重复的。如图所示(图 7), 三次进样重叠基本相同。这在所有非消化和糖苷酶消化的样品中都可以观察到, 这强烈地表明保留时间的变化不是由于方法的变化, 而是由于物理化学性质变化而引起的色谱保留的变化。

图 7. EndoS-消化西妥昔单抗的三重叠加。

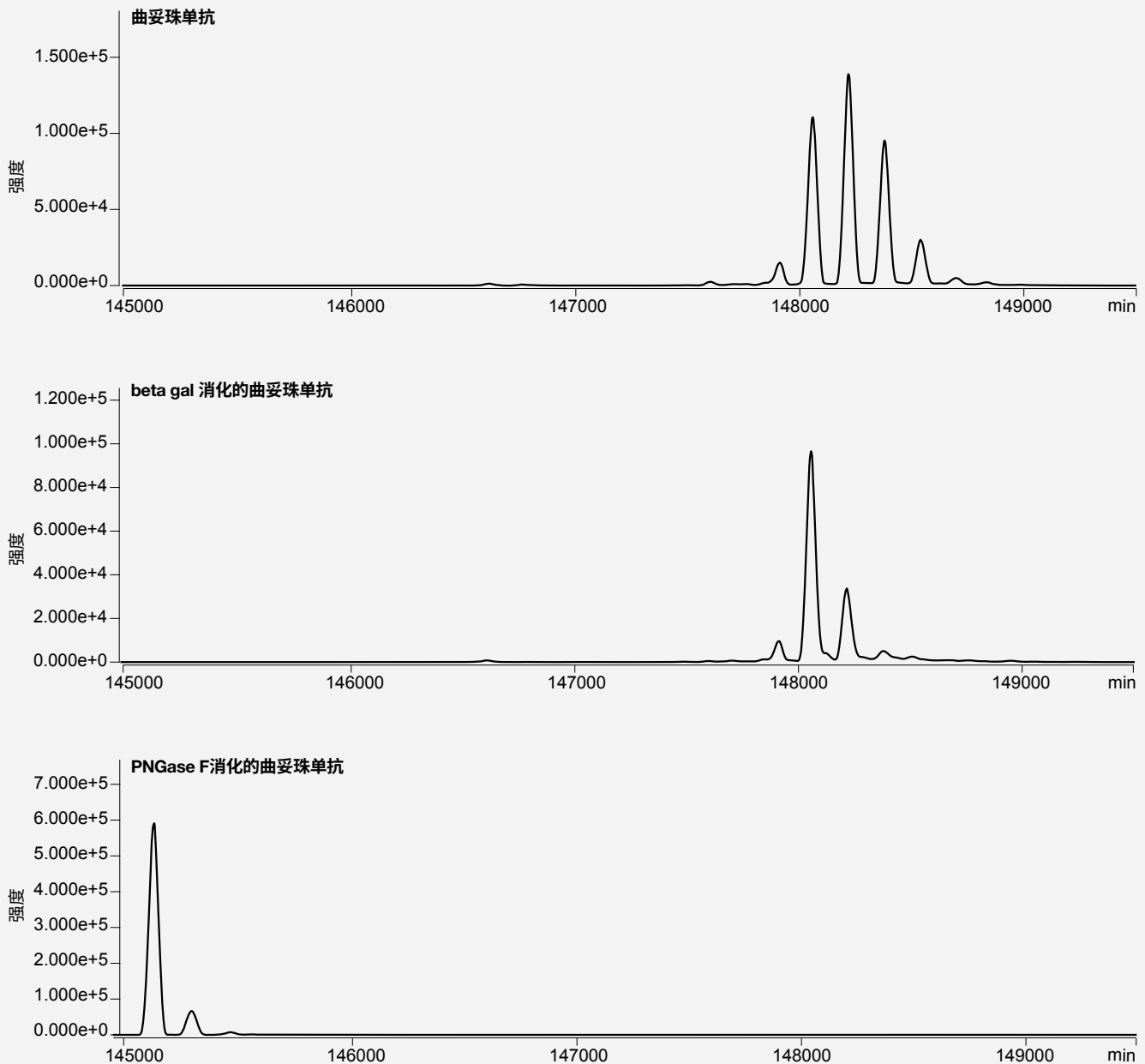


应用编号: 26596



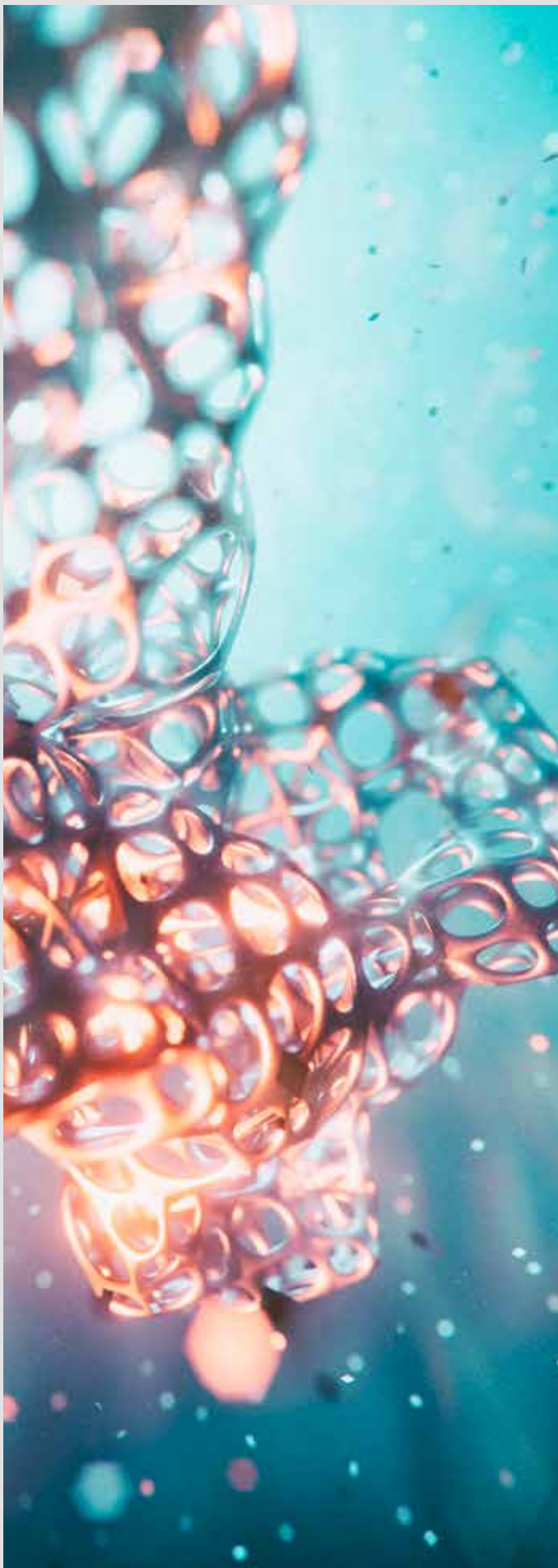
使用 Native SEC-HRMS 获得的进一步数据表明,糖苷酶确实如预期的那样消化了 N-链接聚糖(图 8)。这再次强烈表明,保留时间的变化表明蛋白质折叠的变化与糖基化的变化相关。

图 8. Native SEC-HRMS 反卷积谱图,证实了曲妥珠单抗的外糖苷酶和内糖苷酶消化。使用 Thermo Scientific Vanquish UHPLC 与带有 Biopharma 选项的 Orbitrap Q Exactive Plus 进行数据采集,使用 Biozen dSEC-2 150 x 2.1 mm ID 色谱柱,填充1.8 μm, 200 Å 颗粒。流动相 100mM 醋酸铵,未调整。用 Protein Metrics Inc, Intact Mass 软件进行反卷积。进一步的实验细节将在以后的出版物中提供。



应用编号: 26597





总结

在本白皮书中,我们使用蛋白质标准品的 Log MW 或 R_h 进行多项式回归生成了校准曲线。对于许多样品而言(包括各种单抗样品),在使用流体力学半径而非分子量生成曲线时,使用洗脱体积推算值可获得更准确的结果。此外,糖苷酶酶解样品洗脱体积的变化表明,使用 $2\ \mu\text{m}$ 颗粒的 SEC 足够灵敏,可以检测到由于糖基化异质性导致的蛋白质折叠的微小差异。

应进行进一步的研究以确定流体力学半径的正交方法,如光散射技术(如 SEC-MALS)。此外,与已知的 R_h 和 MW 相比,一些蛋白质标准品和样品的预测结果不太准确。可能需要进一步的优化,特别是具有挑战性的分子,如更小的多肽(如胰岛素),或复杂分子(如依那西普, Fc-Fusion 蛋白)。

参考文献

1. Schenerman MA, Sunday BR, Kozlowski S, Webber K, Gazzano-Santoro H, Mire-Sluis A. CMC strategy forum report: analytical and structural characterization of monoclonal antibodies. *BioProcess International*. **2004**;2:42–52.
2. Mou, Xiaodun. A High Throughput Ultra Performance Size Exclusion Chromatography Assay for the Analysis of Aggregates and Fragments of Monoclonal Antibodies. *Pharmaceutical Bioprocessing*, vol. 2, no. 2, **2014**, pp. 141–156., doi:10.4155/pbp.14.7.
3. Heyden, Y. V., Popovici, S., & Shoenmakers, P. (2002). Evaluation of size-exclusion chromatography and size-exclusion electrochromatography calibration curves. *Journal of Chromatography A*, 957, 127-137.
4. Oliva, A., Llabres, M., & Farina, J. (2001). Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 833-841. doi:10.1016/s0731-7085(01)00359-4
5. Chapter <129> Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies (USP42/NF37)
6. Ramos, J., Vega, J. F., Cruz, V., Sanchez-Sanchez, E., Cortes, J., & Martinez-Salazar, J. (2018). Hydrodynamic and electrophoretic properties of Trastuzumab/HER2 complexes. experiments and modeling. doi:10.1101/483081
7. Zheng K, Yarmarkovich M, Bantog C, Bayer R, Patapoff TW. Influence of glycosylation pattern on the molecular properties of monoclonal antibodies. *MAbs*. **2014**;6(3):649-658. doi:10.4161/mabs.28588

条款和条件

本文档受 Phenomenex 标准条款与条件的约束,具体详情请浏览 www.phenomenex.com.cn/TermsAndConditions。

商标

bioZen 是 Phenomenex 的注册商标。

免责声明

仅用于研究目的。不可用于诊断程序。

本手册中的实验图表及所得出的数据均为本公司在自有实验室中依据所列明的实验条件完成所得。

© 2021 Phenomenex, Inc. 保留所有权利。

