



使用 SEC-MALS 分析聚乙二醇化 抗体片段

客户面临的挑战

- ▶ 需精确测定蛋白质的聚乙二醇化水平
- ▶ 需识别游离蛋白、游离 PEG 和 PEG-蛋白偶联物

东曹的解决方案

TSKgel UP-SW2000 和 LenS3 MALS 检测器

- ▶ 样品成分的分​​离和鉴定

做了什么？

- ▶ 分离聚乙二醇化 Fab 和 scFv 样本，并使用 MALS、RI 和 UV 检测进行成分分析

结果如何？

- ▶ 有效分离了 PEG、蛋白质和 PEG-蛋白质，测定了偶联度

使用光散射专用 UHPLC 色谱柱与 LenS3 MALS、UV 和 RI 检测器联用测定 PEG 修饰蛋白质的成分。

客户权益

使用高灵敏度 MALS 检测器快速实现聚乙二醇化分析



分析蛋白质



使用 SEC-MALS 分析聚乙二醇化抗体片段

通过偶联聚乙二醇 (PEG) 对蛋白质进行共价修饰是一种改善小分子生物治疗药物如抗体片段 (如 Fab 或 scFv) 和肽的药代动力学行为的先进方法。PEG 化修饰主要通过掩盖生物治疗药物的理化特性 (如构象和疏水性) 来提高药物的溶解性、增加血清的半衰期、降低蛋白水解的敏感性、减少肾脏的摄取量, 从而降低免疫原性, 开创药物递送的新前景^[1]。

其主要挑战之一是如何完整表征 PEG 化蛋白质样品。PEG 化是非特异性反应, 因此可能存在单 PEG 化蛋白和多 PEG 化蛋白。另外, 通过评估 PEG 化蛋白、游离蛋白和游离 PEG 的量, 可确定 PEG 化的效率, 优化 PEG 化的反应条件。

PEG 化改变了分子的流体动力学体积, 不同 PEG 化程度的蛋白质可使用尺寸排阻色谱 (SEC) 法进行分离。本文中, 我们使用 SEC 与多角度光散射 (MALS)、折射率 (RI) 和 UV 检测器联用计算了 PEG 化 Fab 和 scFv 样品中单个峰的分子量 (MW) (图 1)。使用该方法可测定其偶联度 (DOC)、分析生物治疗成品的反应副产物。

实验条件

仪器:	Vanquish™ UHPLC 系统 折射率 (RI) 检测器 LenS ₃ ™ MALS 检测器
色谱柱:	TSKgel® UP-SW2000, 2 μm, 4.6 mm ID × 30 cm
流动相:	100 mmol/L 磷酸钠 (pH 6.2) + 300 mmol/L 精氨酸+ 10%异丙醇
流速:	0.175 mL/min
温度:	25 °C
进样量:	10 μL
检测:	UV @ 280 nm; RI 和 MALS
校准标准:	牛血清白蛋白 (BSA)
样品:	20 kDa PEG 化抗原结合片段偶联物 (20 kDa PEG-Fab) 10 kDa PEG 化单链可变片段偶联物 (10 kDa PEG-scFv)
数据采集和处理:	SECview™软件

结果和讨论

分析 PEG 化 scFv

我们使用 BSA 校准了检测器 (RI、RALS、UV), 如全部信号的重叠图所示 (图 2)。SECview 软件校准程序可校准检测器间因死体积导致的信号谱带扩张偏移和差异。另外, 还可计算 UV、RI 和 MALS 的检测器常数, 归一化 MALS 检测器的三个角度。

图 1. 使用 SEC-MALS 分析 mAb 片段的 PEG 化

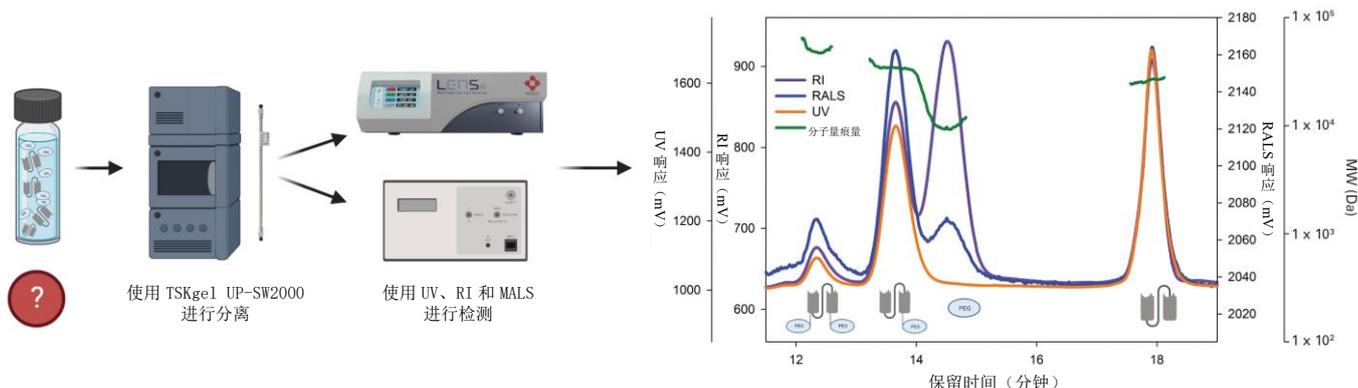


图2. 使用BSA标准校准检测器

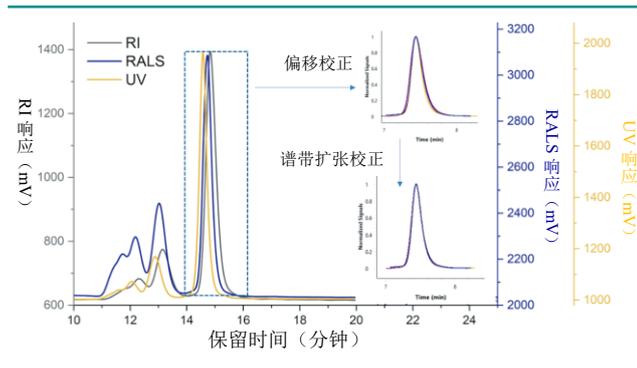
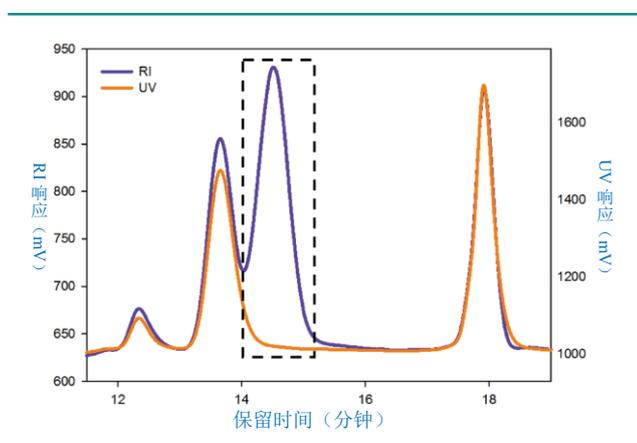


图3所示为10 kDa-PEG-scFv的UV和RI检测器信号重叠图。色谱图框选部分为未反应PEG的信号，PEG无UV响应，但RI响应信号强。

图3. 10-PEG-scFv样品的RI和UV检测器信号重叠图



使用光散射测定复合蛋白偶联混合物的分子量时，需明确各成分的浓度和折射率增量 (dn/dc) (公式1)。

$$MW \sim \frac{LS \text{ 信号}}{\text{浓度} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2} \quad (1)$$

样品为PEG-scFv时，PEG部分无UV响应，scFv有UV吸收，且两种成分由于 dn/dc 值不同，产生的RI响应也不同(图3)。比较不同峰的RI和UV信号，可确定不同峰的准确组成(如两个成分的重量分数)，进而确定其对应物种的 dn/dc (公式2和3)

$$RI \text{ 信号} \sim dn/dc_{PEG} \cdot \text{浓度}_{PEG} + dn/dc_{\text{蛋白质}} \cdot \text{浓度}_{\text{蛋白质}} \quad (2)$$

$$UV \text{ 信号} \sim dA/dc_{PEG} \cdot \text{浓度}_{PEG} + dA/dc_{\text{蛋白质}} \cdot \text{浓度}_{\text{蛋白质}} \quad (3)$$

表1所示为 dn/dc 、 dA/dc 的文献值以及本研究所用分子的预期分子量。

表1. 所用分子 dn/dc 、 dA/dc 的文献值及其预期分子量

分子	dn/dc	dA/dc	预期 MW [kDa]
scFv	0.185	1.927	26.8
Fab	0.185	1.440	47.6
10 kDa PEG	0.134	0	10
20 kDa PEG	0.134	0	20

图4所示为使用SECview对10 kDa PEG-scFv的成分进行分析时的结果。不同峰的PEG和scFv重量分数(WF)及其对应 dn/dc 值见表2。

图4. 10-PEG-scFv样品的成分分析 常规校准(CC)

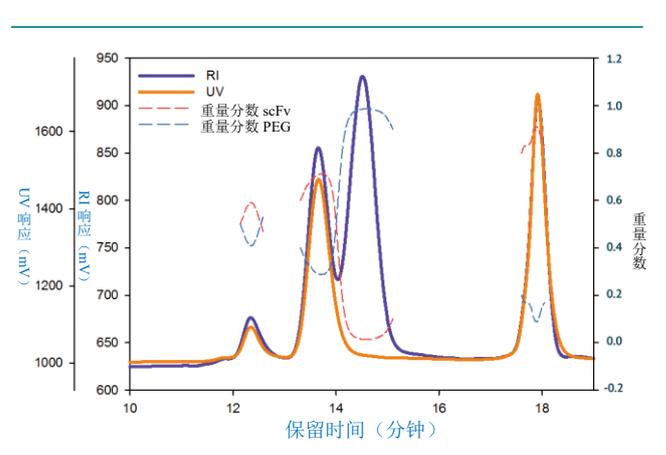
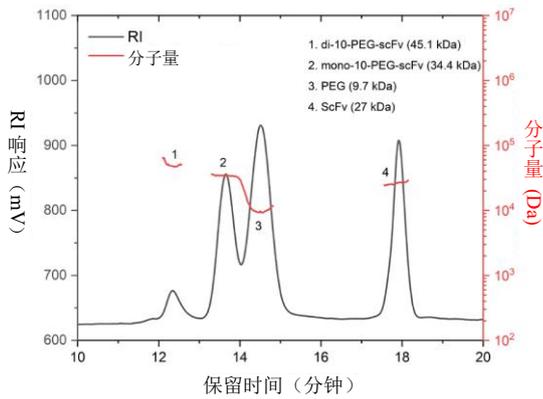


表2. 图4中各个峰的重量分数及其对应的 dn/dc 值

峰编号	WF (scFv) [%]	WF (PEG) [%]	dn/dc [mL/g]
1	59	41	0.164
2	71	29	0.17
3	0	100	0.134
4	100	0	0.185

我们使用了完整色谱图上的 dn/dc 分布计算了10-PEG-scFv样品中多个组分的相对分子量。所得分子量示踪曲线如图5所示。RI信号显示色谱图(~11.8 min)高分子量区域存在一个小肩部，形成了一个双峰图案，表示PEG化偶联物。峰4和峰3的分子量分别为27 kDa和9.7 kDa，符合未反应的游离scFv和PEG的预期分子量。峰1的分子量为45.1 kDa，对应di-10-PEG-scFv，峰2的分子量为34.4 kDa，对应mono-10-PEG-scFv。

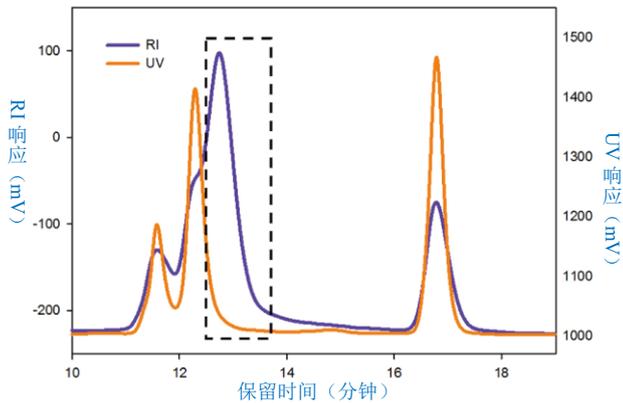
图 5. 10-PEG-scFv 样品的分子量图



分析聚乙二醇化 Fab

同样的方法也被用于分析 PEG-Fab 偶联物，显示了该方法也适用于更大蛋白质。20 kDa-PEG-Fab 样品的 UV 和 RI 检测器信号重叠图如图 6 所示。框选部分为无 UV 响应的 PEG 的 RI 信号。

图 6. 20-PEG-Fab 样品的 RI 和 UV 检测器信号重叠图



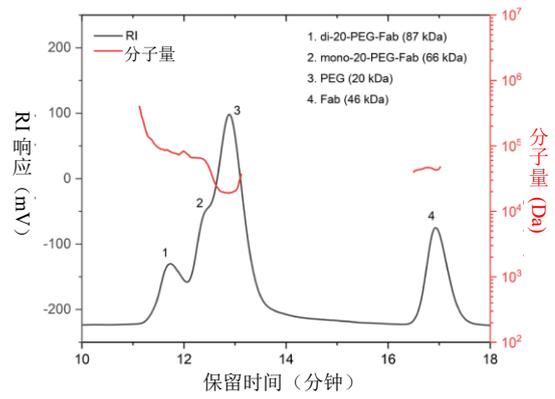
为确定 Fab 和 PEG 的重量分数和平均 dn/dc ，我们进行了成分分析（表 3）。

表 3. 成分分析后测定的 20-PEG-Fab 样品的重量分数和 dn/dc

峰编号	WF (Fab) [%]	WF (PEG) [%]	dn/dc [mL/g]
1	55	45	0.162
2	78	22	0.174
3	0	100	0.134
4	100	0	0.185

借助成分分析后所绘制的 dn/dc 曲线，我们确定了 20-PEG-Fab 样品的分子量分布（图 7）。

图 7. 20-PEG-Fab 样品的分子量图



峰 4 的分子量经测定为 46 kDa，符合未反应 Fab 片段的预期分子量。峰 3 的分子量计算结果为 20 kDa，同样完全符合未反应 PEG 的预期分子量。峰 1 表示 di-20-PEG-Fab 偶联物（87 kDa），峰 2 分子量为 66 kDa，表示 mono-20-PEG-Fab。

结论

SEC-MALS 法成功用于抗体片段非定向 PEG 化生成的复杂混合物的表征。通过使用 TSKgel UP-SW2000 UHPLC 色谱柱分离样品组分，联合 LenS₃ MALS 及 UV 和 RI 检测器检测，建立了一种多用途表征方法。该方法可以通过测定单个峰的分子量确定偶联度。SECview 软件可简化偶联分析至数分钟内完成。其分析结果有利于 PEG 化反应的优化，从而获得高效、稳定的新型生物治疗药物，并测定成品残留杂质。

参考文献

- Gupta et al. J Cell Commun Signal. 2019 9 月; 13(3); Turecek et al. J Pharm Sci, 2016)

精选产品

货号	产品描述
0040000	LenS ₃
0023514	TSKgel UP-SW2000

Tosoh Bioscience 和 TSKgel 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

LenS 和 SECview 是 Tosoh Bioscience LLC 的商标。

Vanquish 是 Thermo Fisher Scientific 的商标。