



使用分析和半制备色谱表征 mAb 对 FcγRIIIa 配基的亲合力

简介

单克隆抗体 (mAb) 和效应细胞之间的结合直接影响伴随的免疫反应或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。Fc 区 Asn297 位置的 N-聚糖会影响 IgG 对效应细胞 FcγRIIIa 受体的特异性, 进而影响其结合。为监测 FcR 受体的结合情况, 我们将高效液相亲和色谱(AFC)柱 TSKgel FcR-IIIa 实现了商品化, 该色谱柱可根据抗体与 FcγRIIIa 之间亲和力的差异来分离抗体。

TSKgel FcR-IIIa-NPR 色谱柱的载量范围为 5-50 μg mAb, 呈线性分布。该特性对于分析应用比较实用, 但如需收集洗脱产物进行进一步纯化或分析时, 则十分受限。而半制备型 TSKgel FcR-IIIa-5PW 色谱柱有效解决了该难题, 可在短时间内收集到足够的样品, 有效改善了分析流程。

具有更稳定理化性质的重组 FcγRIIIa 配基, 固定到无孔颗粒填料及大孔颗粒填料上以分别对应于分析应用和半制备应用。这两种色谱柱具有类似的分辨率, 其中 TSKgel FcR-IIIa-5PW 色谱柱具有更高的载量和洗脱体积。

这里, 我们采用了完整 mAb 和木瓜蛋白酶消化后的 mAb 比较了半制备型 TSKgel FcR-IIIa-5PW 的可扩展性, 并在保持两种不同载量色谱柱类似分辨率的情况下, 提供了一种可以从分析模式扩展到半制备模式的解决方案。

表 1 列出了分析型和半制备型 TSKgel FcR-IIIa 色谱柱的规格和操作条件。

参数	FcR-IIIa-NPR	FcR-IIIa-5PW
配基	重组 FcγIIIa 受体	
多孔	否	是
粒径(μm)	5	10
尺寸	4.6 mm ID × 7.5 cm	7.8 mm ID × 7.5 cm
容积 (mL)	1.25	3.58
最大流速(mL/min)	1.0	1.2
操作流速(mL/min)	1.0	0.25 - 1.0
压力限值(MPa)	9.0	1.0

材料与方法

TSKgel FcR-IIIa 色谱条件

色谱柱: TSKgel FcR-IIIa-5PW (10 μm, 7.8 mm ID × 7.5 cm)

TSKgel FcR-IIIa-NPR (5 μm, 4.6 mm ID × 7.5 cm)

流动相: A:50 mmol/L 柠檬酸盐/NaOH (pH 6.0)

B:50 mmol/L 柠檬酸盐/NaOH (pH 4.0)

方法: 平衡: 5 CV 流动相 A

清洗: 4 CV 25%流动相 B

TSKgel FcR-IIIa-5PW 的洗脱:

线性梯度 25-90% B 14 CV 以上;

在 90% B 和 100% B 下保持 4 CV

TSKgel FcR-IIIa-NPR 的洗脱:

线性梯度 0-100% B (15 分钟内)

流速: TSKgel FcR-IIIa-5PW:

平衡、进液和清洗步骤: 0.5 mL/min

洗脱和保持步骤: 0.25 mL/min

TSKgel FcR-IIIa-NPR:

0.5 mL/min

设备: ÄKTA™ avant 25 FPLC

检测器: UV @ 280 nm

温度: 室温

样品: Protein A 纯化后的曲妥珠单抗
(Herceptin®生物仿制药)

进样量: 2.7 mg (TSKgel FcR-IIIa-5PW)

54 μg (TSKgel FcR-IIIa-NPR)

曲妥珠单抗在分析型和半制备型色谱柱上的分离结果如图 1 所示, 结果显示二者的峰轮廓相似且使用相同流动相和流速时易于扩展。

图 1. 曲妥珠单抗基于其糖型模式在分析型(A)和半制备型(B) TSKgel FcR-IIIa 色谱柱上的分离结果

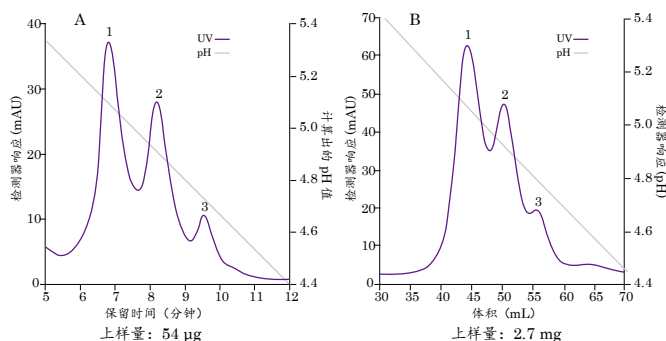


图 2 (图 A) 所示为从半制备型 TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱进行组分收集和各个峰纯度分析的结果。对于载量为 5 mg 的半制备峰 (左图), 我们将方框区域的收集组分进行了合并、置换缓冲溶液、使用离心浓缩器浓缩, 并使用 TSKgel FcR-III A-NPR 分析柱进行了纯度评估。分析型 FcR 的运行结果 (图 B-D) 表明, 各合并组分主要包含均质的峰物质, 除此之外, 仅包含少量的其他峰。

图 2. 半制备柱的组分收集和各个峰的纯度分析

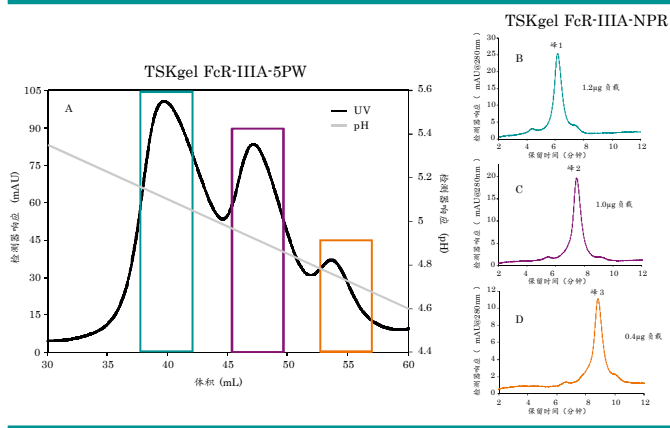
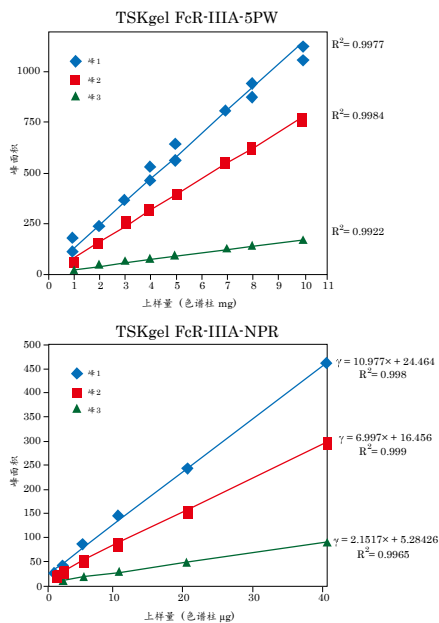


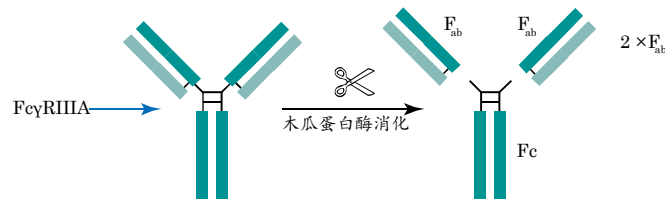
图 3 所示为半制备型 TSKgel FcR-III A-5PW (上图) 和 TSKgel FcR-III A-NPR (下图) 色谱柱上在不同上样量时峰 1、2 和 3 的线性关系。可以确认二者载量的范围很大: NPR 色谱柱为 2-50 μ g, 5PW 色谱柱为 1-5 mg。如果上样量更大, 如高达 10 mg 时, 峰开始混合到一起 (未显示)。因此, 对于半制备型色谱柱, 推荐的上样范围为 0.5 mg 至 5 mg mAb。

图 3. 上样量与总峰面积线性关系图



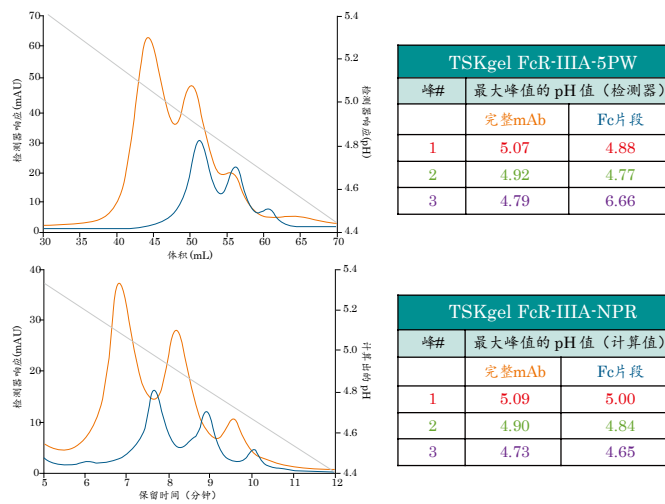
为证明 TSKgel FcR-III A 色谱柱与抗体 Fc 区的特异性结合, 我们使用了木瓜蛋白酶 (图 4; 曲妥珠单抗中 His-228 后面的木瓜蛋白酶的切割位点) 将完整 IgG 消化成了 Fab 和 Fc 组分, 并将反应混合物进样至半制备型和分析型 TSKgel FcR-III A 色谱柱中 (图 5)。完整 mAb 和 Fc 片段都结合到 FcR-III A 色谱柱上并洗脱为三个典型的峰。

图 4. 使用木瓜蛋白酶消化分解 mAb 的示意图



完整 mAb 和 Fc 片段在分析型和半制备型色谱柱上具有相似的峰轮廓, 如图 5 所示。两根色谱柱上均可观察到, 相比完整 mAb, Fc 片段的结合更为紧密, 这可能是由于消除了 Fab 部分的空间位阻。我们将大约 50 倍的样品 (2.7 mg 与 54 μ g) 进样到半制备型 TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱中, 这样可以实现更大的洗脱体积和组分收集。TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱洗脱的三个峰的纯度可以在使用 TSKgel FcR-III A-NPR 分析柱分析时通过峰的轮廓和不同的保留时间进行区分确认。使用分析柱分析的合并组分其均质性均极高。如报告所述, 这些组分与不同的聚糖型有关, 这一点可以通过对其进行更详细的聚糖分析来确认。

图 5. 使用 TSKgel FcR-III A 色谱柱分析完整 mAb 和木瓜蛋白酶消化的 Fc 片段时的洗脱曲线



结论

使用半制备型 TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱时, 即使在高上样量下, 也能够保持完整 mAb 和木瓜蛋白酶消化的 mAb 的良好选择性和分离度。TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱一次进样就可以收集到足够多样品, 这一优势有助于对特定 mAb 糖型或与 Fc 区相关 mAb 形态进行 ADCC 活性更详细地评估。这些抗体形态可通过其他正交方法进行单独的进一步深入研究。

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

AKTA 是 GE Healthcare Bio-Sciences 的商标。

Herceptin 是 Genentech, Inc. 的注册商标。