Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

APPLICATION HIGHLIGHT:

曲妥珠单抗(Trastuzumab)的体积排阻超高效液相色谱分析

若需要详细的实验信息，请参阅完整的应用文献720004416EN，www.waters.com

简述

体积排阻色谱(SEC)已经成为蛋白聚集物分析的主要手段。但是，在非变性条件下通过SEC发现单克隆抗体的另一个降解途径是非酶性的肽键水解，该水解发生在铰链区，从而产生了丢失一个或两个FAb臂的mAb片段，有可能损失活性。使用体积排阻超高效液相色谱来监测mAb的聚集体水平以及其铰链区碎片化程度的优势，现在通过对曲妥珠单抗(Trastuzumab)——一个抗-HER2 lgG1单抗——的检测分析加以评估。就像任何一个SEC方法，可以通过调节很多参数来提高分离度和方法耐受性。在下面的应用中，我们介绍了流动相组成(pH和离子强度)对这种分离的影响。另外，我们会讨论成功转换SE-UPLC方法时需要考虑的基本问题。

实验仪器和消耗品

LC条件

仪器: ACQUITY UPLC® H-Class Bio 系统，TUV检测器，钛流通池

波长: 280nm

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7µm, 4.6x300mm (p/n 186005226)

色谱柱和样品

柱温: 25°C和4°C

进样量: 5µL

流速: 0.4mL/min

流动相: 使用Auto Blend™ Plus技术配制:

A: 100mM 磷酸二氢钠

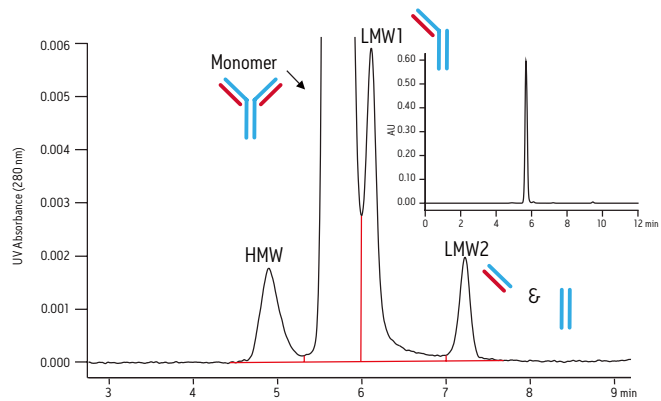
B: 100mM 磷酸氢二钠

C: 1.0M氯化钠

D: 水

结果和讨论

这篇应用开发了曲妥珠单抗(Trastuzumab)的SE-UPLC方法，为蛋白分析的SE-UPLC方法开发提供了一个范例。包括pH(6.0到7.5)和离子强度(150到350mM NaCl)在内的主要的流动相特性得到评估；同时这些参数对色谱行为的影响也得到考察，包括峰形、组分分离度和定量重现性。根据实验，最佳的pH(25mM磷酸缓冲盐)和氯化钠浓度分别是6.25和300mM(图1)。一旦一个可靠的SE-UPLC方法开发出来，就需要成功的将其转换到其它的UPLC系统。这种情况下，新的UPLC系统必须没有额外的柱外扩散。例如，在色谱柱入口处1µL的空隙会造成单体拖尾增加，从而导致LMW1峰面积百分比大约10%的增加(图1)。但是，由于洗脱顺序和分离度的原因，HMW和LMW2的百分比没有受到影响。



Evaluation (n=4)		HMW	Monomer	LMW1	LMW2
Average Peak	Area (%)	0.51	98.02	1.15	0.33
%RSD	Area (%)	0.98	0.03	1.31	3.08

图1：使用Waters ACQUITY BEH200柱得到的曲妥珠单抗的典型色谱图(插图中的全量程图)和定量结果。峰的定性基于Waters应用文献720004254EN中的结果。

结论

本应用开发了一个使用ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7µm,4.6 300mm色谱柱来监测曲妥珠单抗聚合物和降解物的SE-UPLC方法。将SE-UPLC方法成功转换到其它系统平台时需要对柱外体积进行严格控制。

订购信息

应用中用到的产品	货号
ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7µm, 4.6x300mm色谱柱	186005226

©Waters Corporation. Waters, The Science of What's Possible, UPLC, ACQUITY UPLC and Auto•Blend are trademarks of Waters Corporation. IH-PDF

Waters Corporation
34 Maple Street Milford, MA 01757 U.S.A. T: 1 508 478 2000 F: 1 508 872 1990