

Fehérjekromatográfia

Bobály Balázs

BME-VBK, Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék, HPLC csoport

Analitikai Kémia II (BIO)

Gyógyszeranalitika (GYV)

2015

Tematika

1. Bevezető
2. Molekulaszerkezetből adódó, eltérő kromatográfiás alapjelenségek
3. Heterogenitás jellemzésére szolgáló kromatográfiás módszerek

Sok empirikus adat lesz, csak az alapelveket kell megtanulni!

1. Miért kell a fehérjéket analizálni?

- Biológiai rendszerek működésének megértése
koncentráció/szerkezet/aktivitás időbeli/térbeli változása
- Hatásos fehérjealapú gyógyszerek előállítása
szerkezet-funkció-aktivitás kapcsolat megértése, hatóanyag/termék
minőségének ismerete

Nehézségek:

- A minták általában összetettek: szövetek, testfolyadékok, sejt kultúra
szükség van a mátrix egyszerűsítésére
- Adott szekvenciával definiált fehérjemolekulák is nagymértékű
heterogenitást mutatnak:
mutációk (pl. aminosavcsere a láncban)
transzlációs módosítások (pl. foszforiláció, glikoziláció)
környezeti hatások (pl. oxidáció, aggregáció)
- A nagyfokú variabilitás miatt nem érhetőek el homogén analitikai
standardok

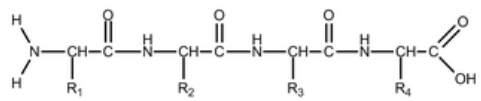
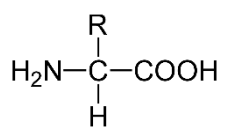
1. Miben segítenek az elválasztástechnikai módszerek?

- Mátrix egyszerűsítése:
analitikai (pl. MS vizsgálatok)/preparatív céllal (további vizsgálatok)
- Heterogenitás jellemzése:
megfelelő módszer megválasztása
- Mennyiségi meghatározás:
referenciaanyag megválasztása alapvető

Technikák:

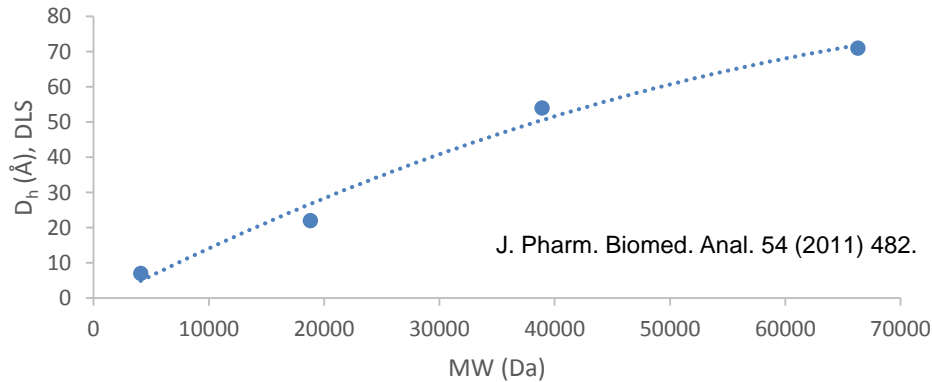
- elektroforézis (2D-gél, CGE, cIEF, CEC, CZE)
- folyadékkromatográfia 1. (SEC, IEC, RP, HIC, HILIC):
analitikai módszerek
- folyadékkromatográfia 2. (HIC, AC, IEC):
preparatív módszerek
- „tömegspektrometria” (ionok elválasztása)
- GC: NEM!! SFC: NEM!!

2. Fehérjék általános folyadékkromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól – méret és diffúzió



	kismolekula	közepes méretű molekula (peptid)	makromolekula (fehérje)
MW [Da]	<1000	1000-5000	>5000
D _h (Å)	5-10	10-15	>10-15
D _m [cm ² /s]	10 ⁻⁵	5*10 ⁻⁶	5*10 ⁻⁷
konformáció	jól definiált	„rugalmas” molekula	statisztikus eloszlású (környezet)

Molekulaméret növekedése a molekulatömeggel

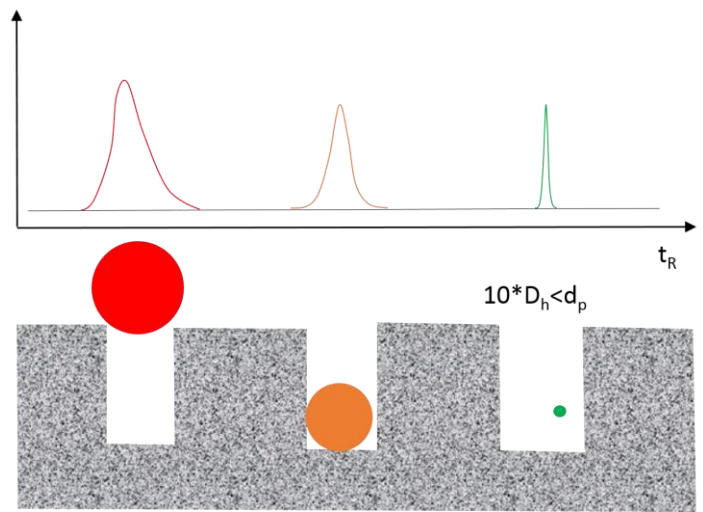


$$D_m = 8.34 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{T}{\eta M^{1/3}}$$

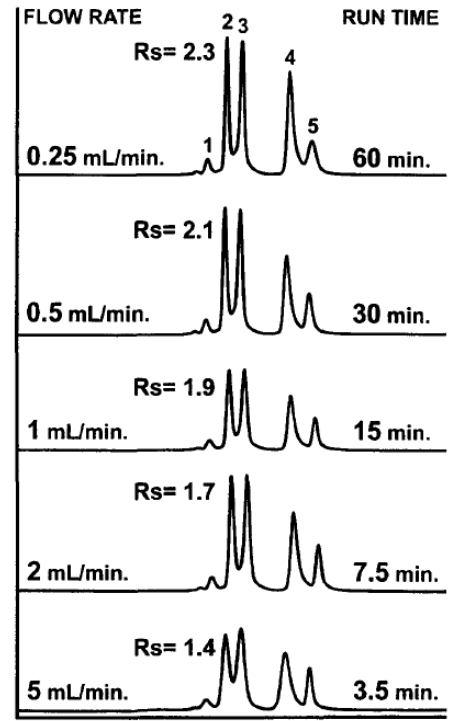
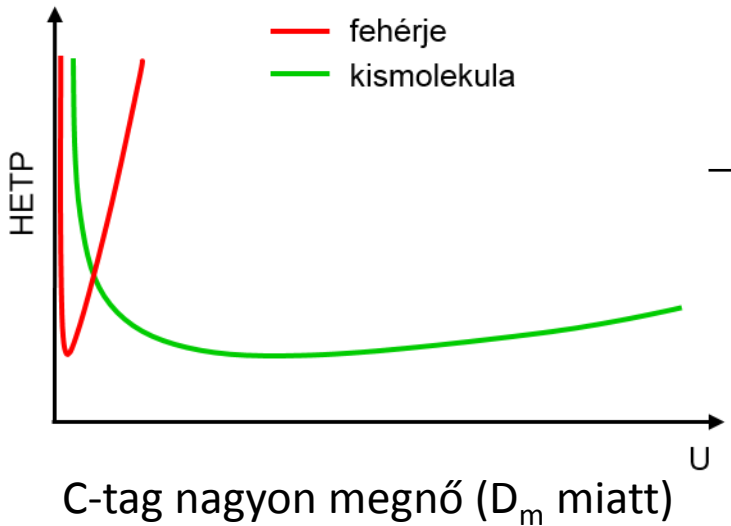
**A diffúziós állandó csökken a molekulamérettel:
Meghatározza a mérés sebességét az anyagátadási ellenállás növekedése miatt**

**A hidrodinamikai átmérő nő a molekulasúllyal:
Meghatározza a töltet pórusméretét**

2. Fehérjék általános folyadékkromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól – méret és diffúzió



	Kis- molekula	közepes méretű molekula (peptid)	makromolekula (fehérje)
d_p (Å)	60-100	100-150	150-500 (ált. 200-300)



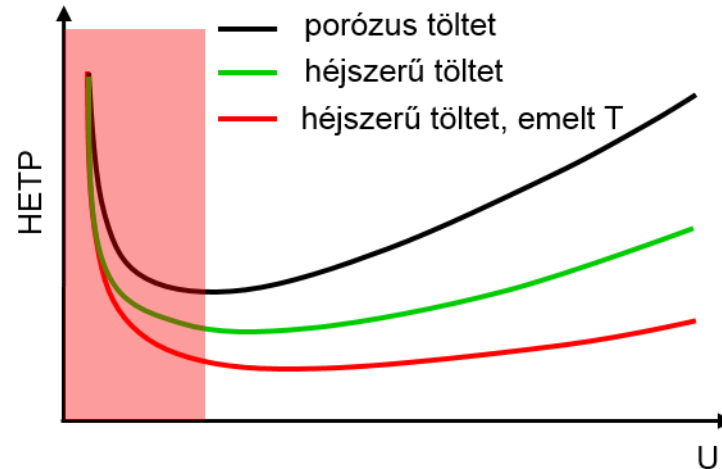
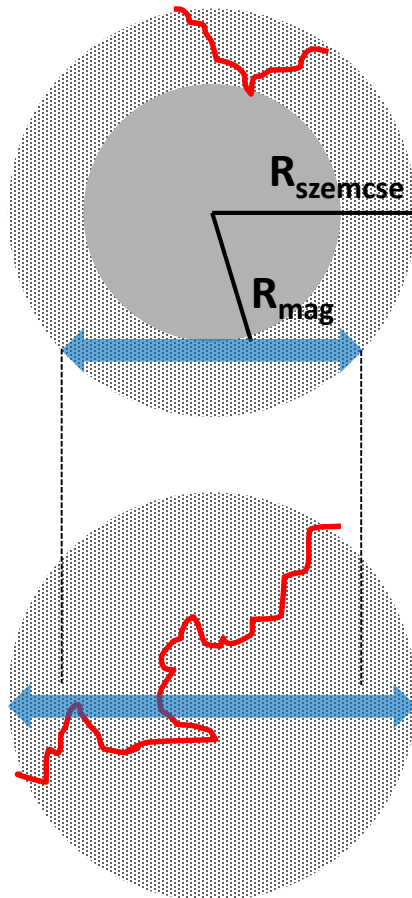
Kompromisszum: R_s vs. mérési idő

2. Fehérjék általános folyadékkromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól – méret és diffúzió

B-tag kisebb: diffúziós úthossz (kék nyilak) ~5%

C-tag kisebb: diffúziós úthossz (piros vonalak) ~5%

A-tag kisebb: találgatások ~30-40%



C-tag csökkentése=hatékonyság növelése

Nemporózus töletetek:

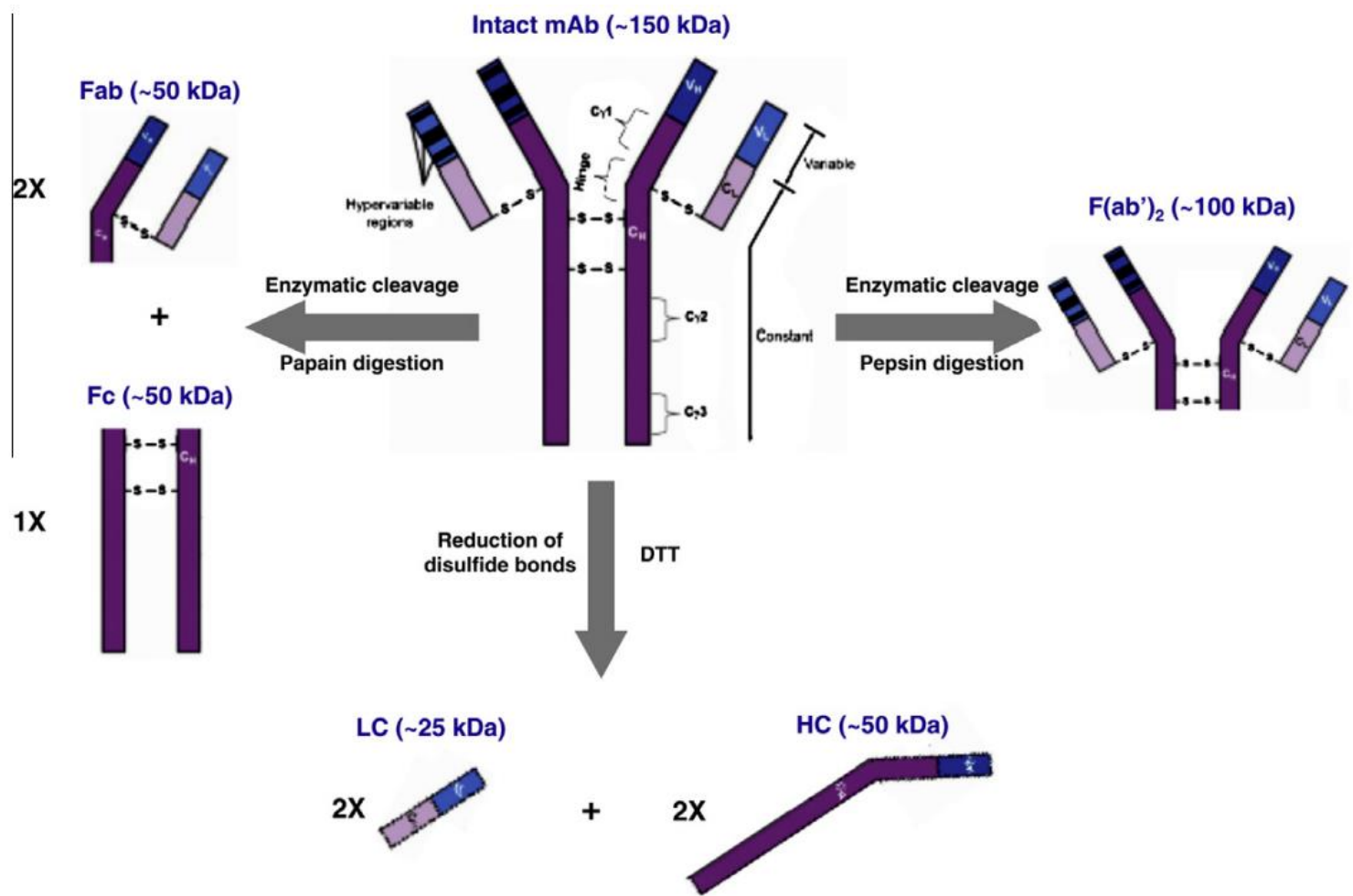
- Nagy hatékonyság
- Kis terhelhetőség
- Kis visszatartás

Csak indokolt esetben:

ha a felületi kölcsönhatás kinetikája lassú és így kisebb a hatékonyság

Kis szemcseméret, héjszerű, nagyobb pórusméretű töltetek, magasabb hőmérséklet

2. Fehérjék általános folyadék-kromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól – méret és diffúzió



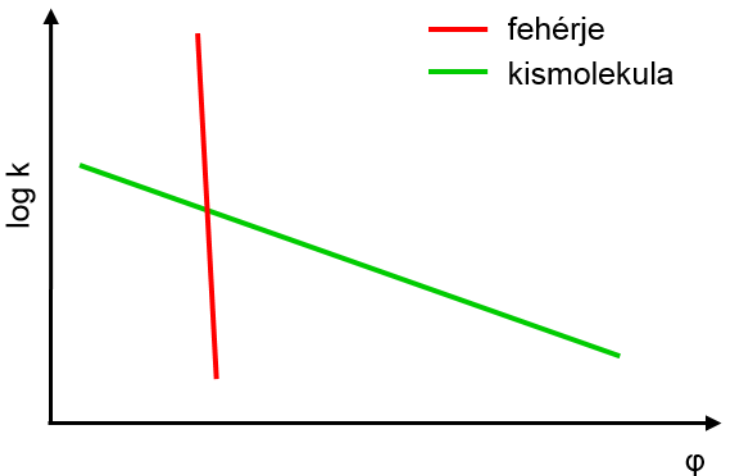
Molekulaméret csökkentése: (bővebben fehérje MS)

- Nagyobb hatékonyság
- Variabilitás jobban elemezhető-kis különbsége relatíve nagyobbak lesznek

2. Fehérjék általános folyadékkromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól - visszatartás

kismolekula: a megoszlás (visszatartás) jól szabályozható a mozgófázis összetételével: alkalmazható izokratikus elúció (nagyobb szelektivitás hasonló vegyületek esetén).

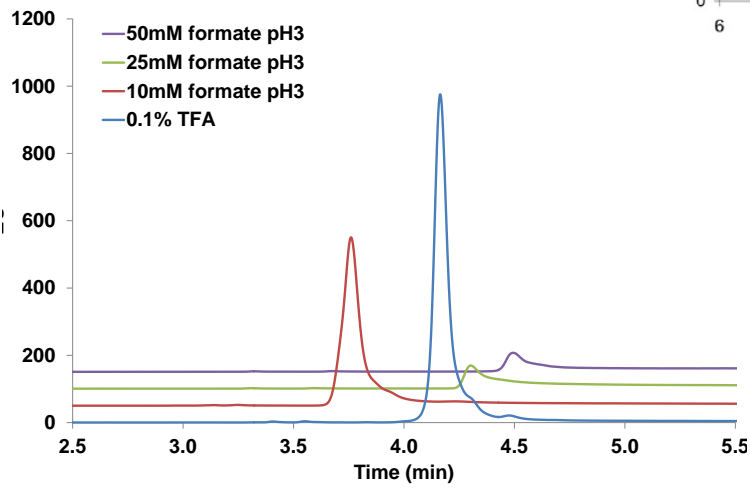
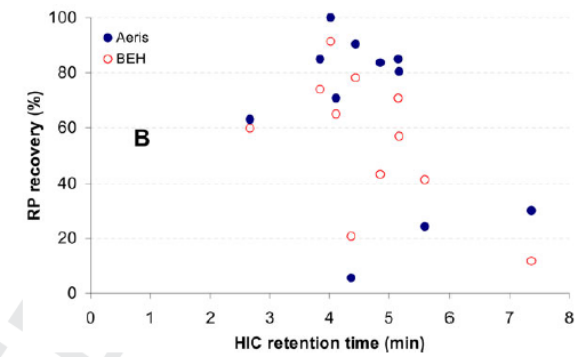
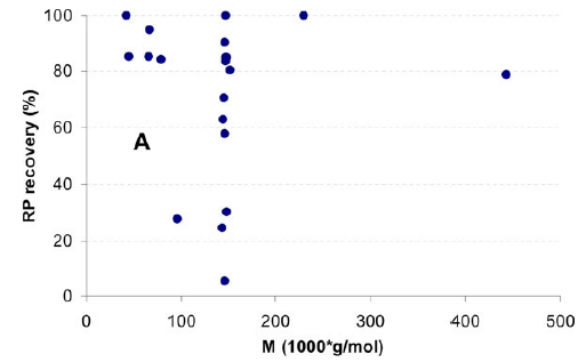
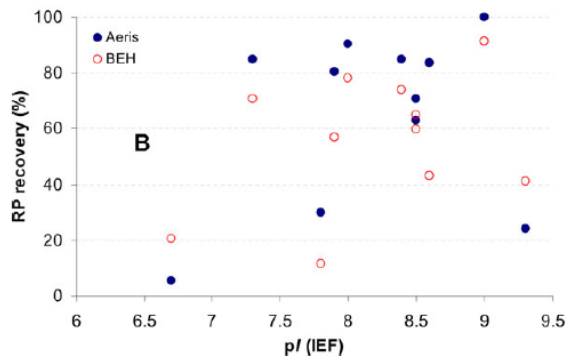
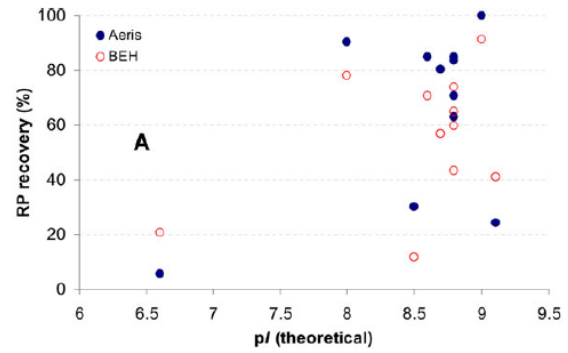
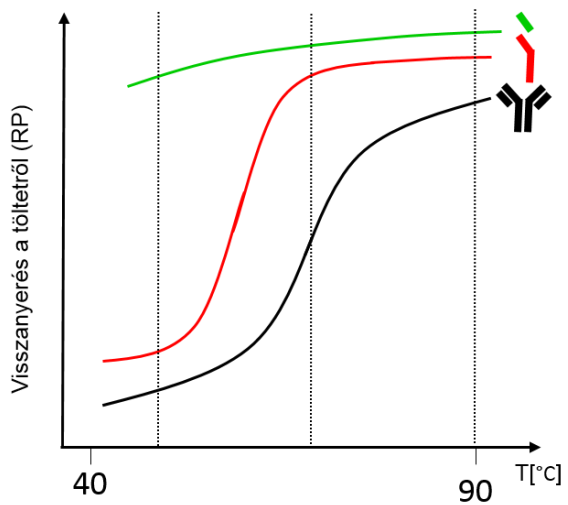
fehérje: sztöchiometrikus kiszorítás - Z számú szolvens molekula szükséges az elúcióhoz:
I/O viselkedés



~1% változás ϕ -ben eldöntheti, hogy $k \approx 0$, vagy $k \approx \infty$

gradiens elúció szükséges!

2. Fehérjék általános folyadék-kromatográfiás tulajdonságai eltérések a kismolekuláktól - adszorpció



Adszorpció mértéke:

- Mérési körülmények oldaláról: T, C_{additív}, P, kolonna, stb...
- Molekula oldaláról: ???

**Valószínűleg a kölcsönható felület minősége a döntő:
konformációfüggő (mérési körülmények)**

3. Mit hoznak a konyhára az egyes LC módszerek?

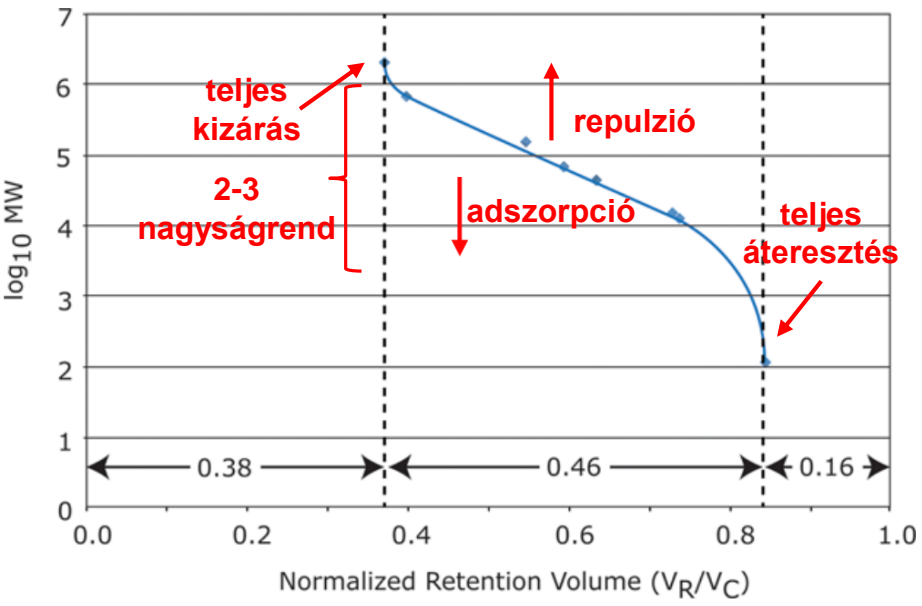
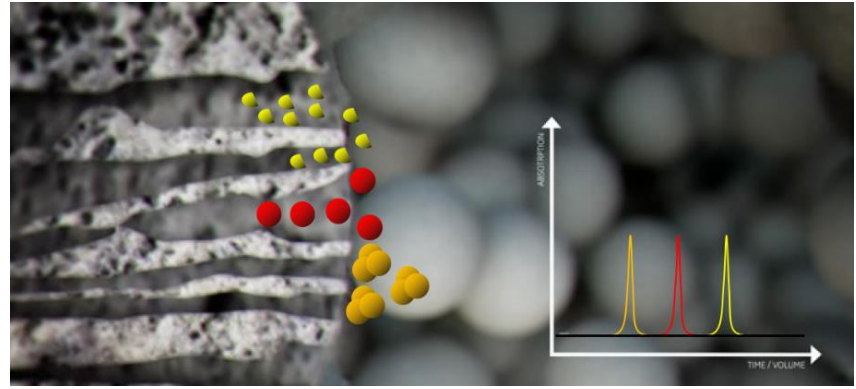
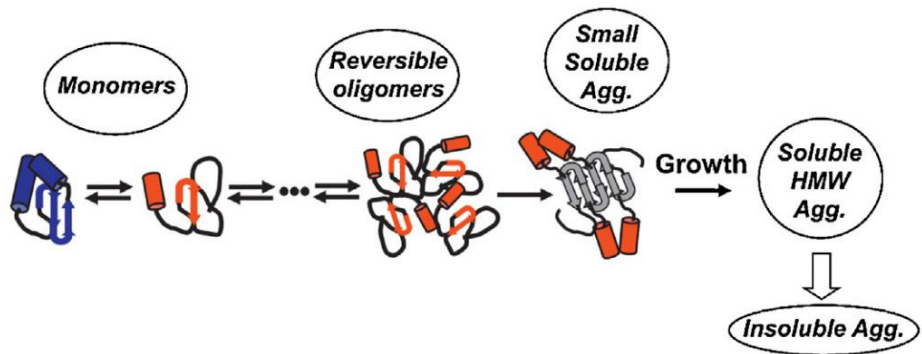
- Méretkizárásos kromatográfia (SEC):
aggregátumok, fragmensek és kismolekulák elválasztása a natív fehérjétől
- Ioncserés kromatográfia (IEC):
anion és kation töltésvariánsok elválasztása
- Fordított fázisú kromatográfia (RP):
oxidált/redukált variánsok, valamint fragmensek elválasztása
- Hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HILIC):
RP-re nagyjából ortogonális, főleg peptidek esetén használható
- Hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia (HIC)
alternatív RP, főleg tisztításra használják

Gyógyszeripari környezetben a megfelelő jellemzéshez különböző módszerek együttes alkalmazása szükséges.

A feladat komplexitása miatt nem elvárás az exakt jellemzés, de az elérhető legrészletesebb, koherens információval kell rendelkezni.

3. LC módszerek – SEC (bioaktív forma izolálása lehetséges)

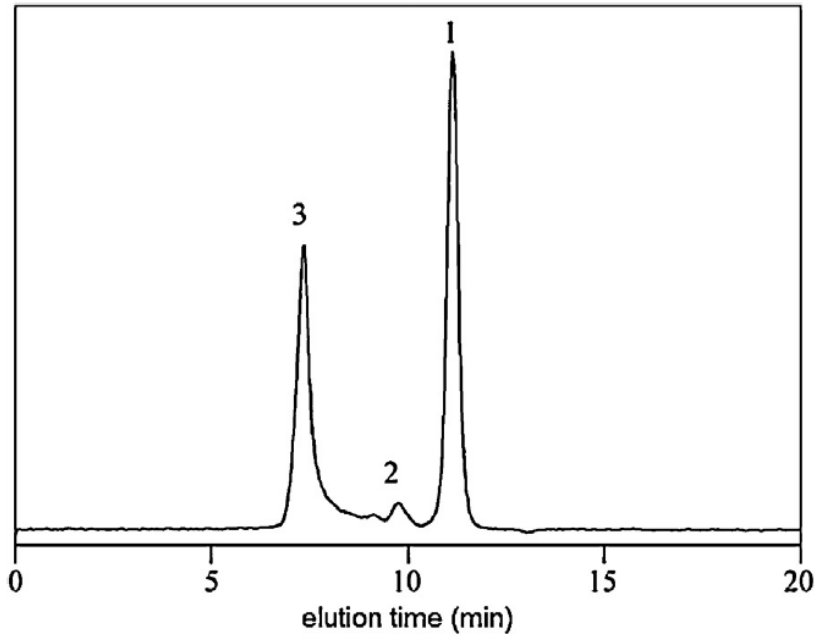
- Aggregáció/fragmensek: terápiás hatékonyság változása, immunreakció
- Kiváltó ok: fizikai/kémiai behatások, tárolás
- Elválasztás hidrodinamikai rádiusz alapján (nem MW!)



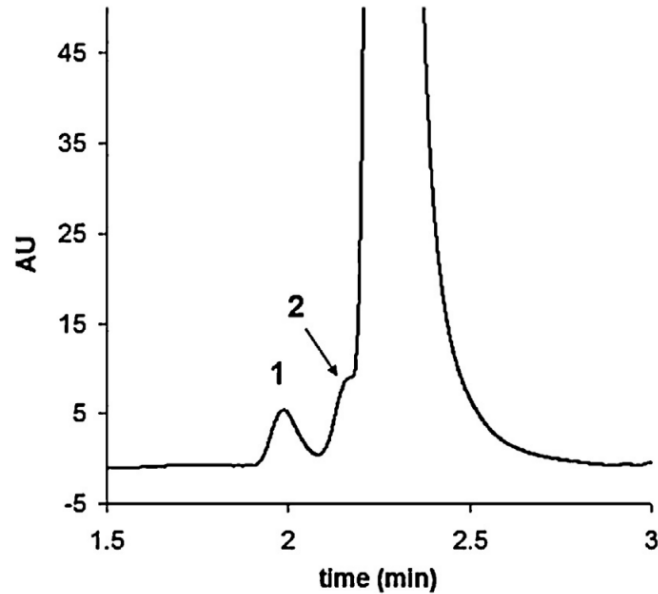
- Főleg diol fázisok: ne legyen adszorpció!
- d_p : 3-20 μ m, d_c : 4.6-8 mm, L: 30 cm
- mérési idő: 20-30 min
- Eltérések a kalibrációs görbétől:
 - adszorpció
 - elektrosztatikus repulzió
 - konformációs változások
- ↪ pH \approx pI beállítása
- ↪ 50-100mM puffer + 50-100mM só
- ↪ 5-10% MeOH/MeCN

pórusméret (Å)	MW (kDa)	példa
100-150	10-100	Interferon
200-300	100-500	mAb
500-1000	>500	PEGilált f.

3. LC módszerek – SEC (bioaktív forma izolálása lehetséges)



- 1: monomer (Interferon, ~19 kDa)
- 2: dimer (~38 kDa)
- 3: nagyobb aggregátumok



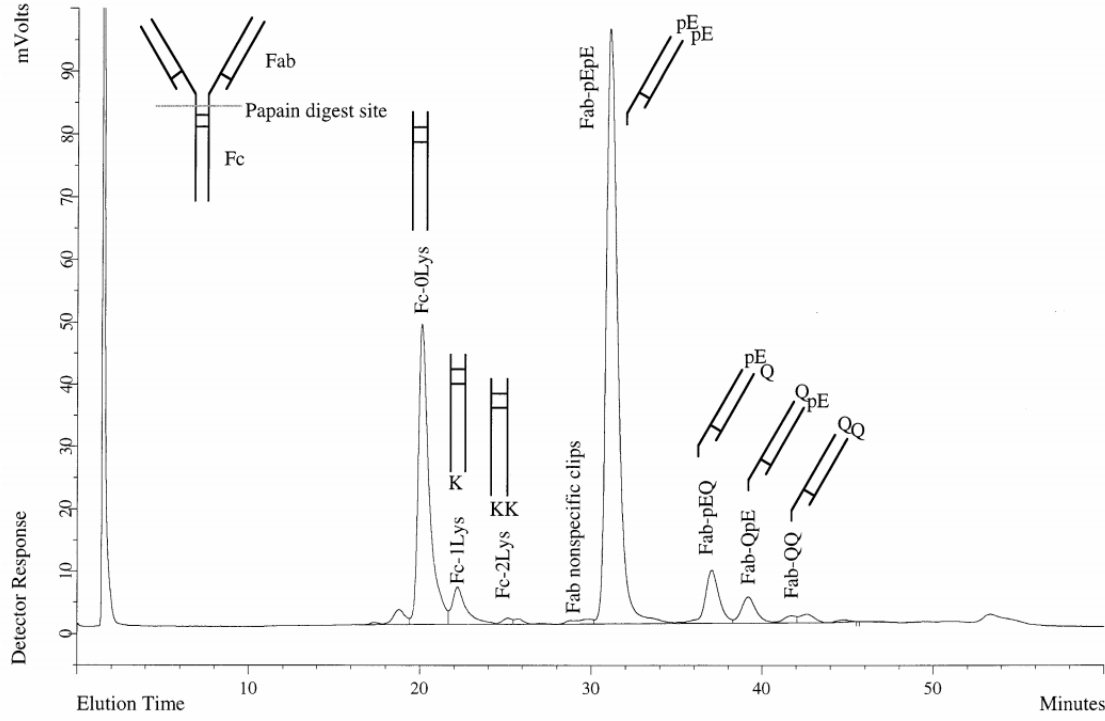
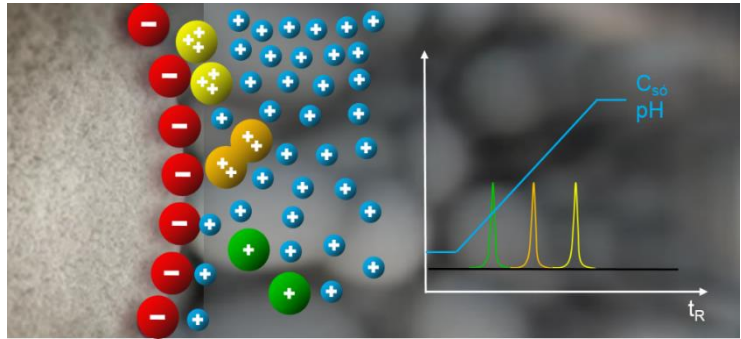
- főcsúcs(mAb, ~150 kDa)
- 2: dimer (~300 kDa)
- 1: nagyobb aggregátumok

Aggregátumok jellemzése:

- molttömeg meghatározása fényszórás detektorral (nehéz, sok a hibalehetőség)
- molttömeg meghatározása off-line MS-sel (egyszerű, lassú)
- molttömeg meghatározása on-line SEC-MS-sel (egyszerű, gyors, kevés tapasztalat: MS barát körülmények)

3. LC módszerek – IEC (bioaktív forma izolálása lehetséges)

- Elsősorban erős kationcserélő töltetek:
nemporózus, szilika/polimer, vagy gyanta
- 5-10 µm-es szemcsék, kolonnahossz nem kulcskérdés R_s szempontjából
- pH < pI -1, gradiens: 1-2M NaCl, vagy kereskedelmi pH gradiens puffer
- Töltésvarinások: pl. C_{term} -lizin, N_{term} -glutamin/piroglutamát variábilítás
→ eltérő bioaktivitás
- Molekulaméret csökkentésével javul a szelektivitás: limitált proteolízis



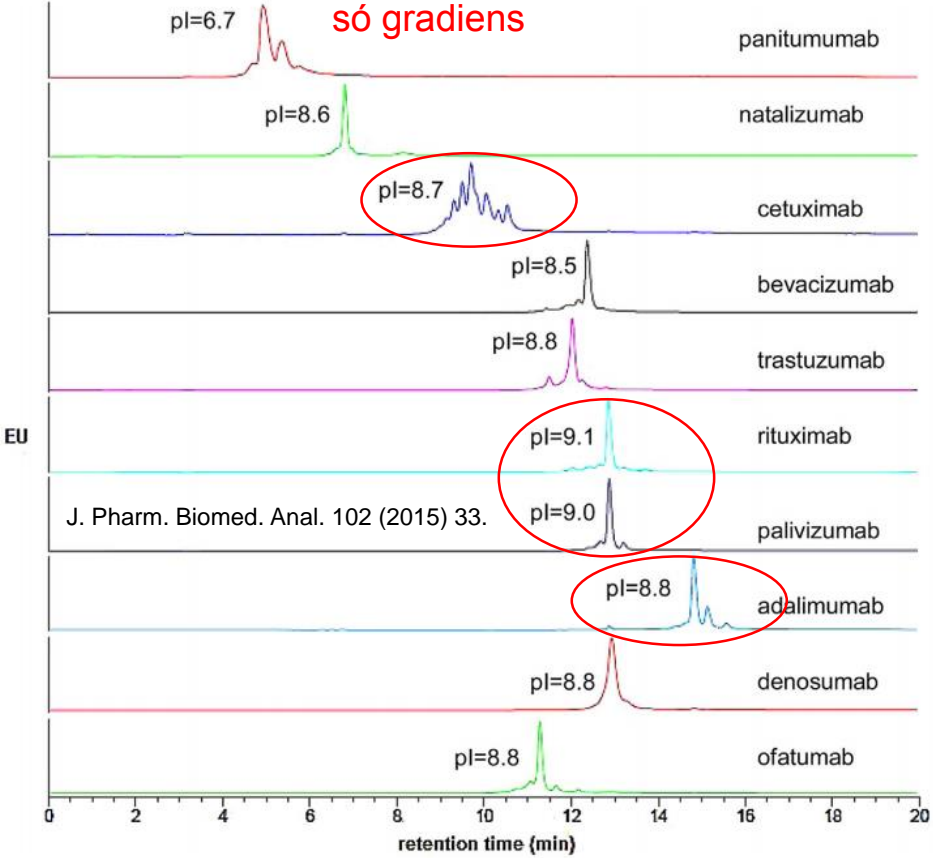
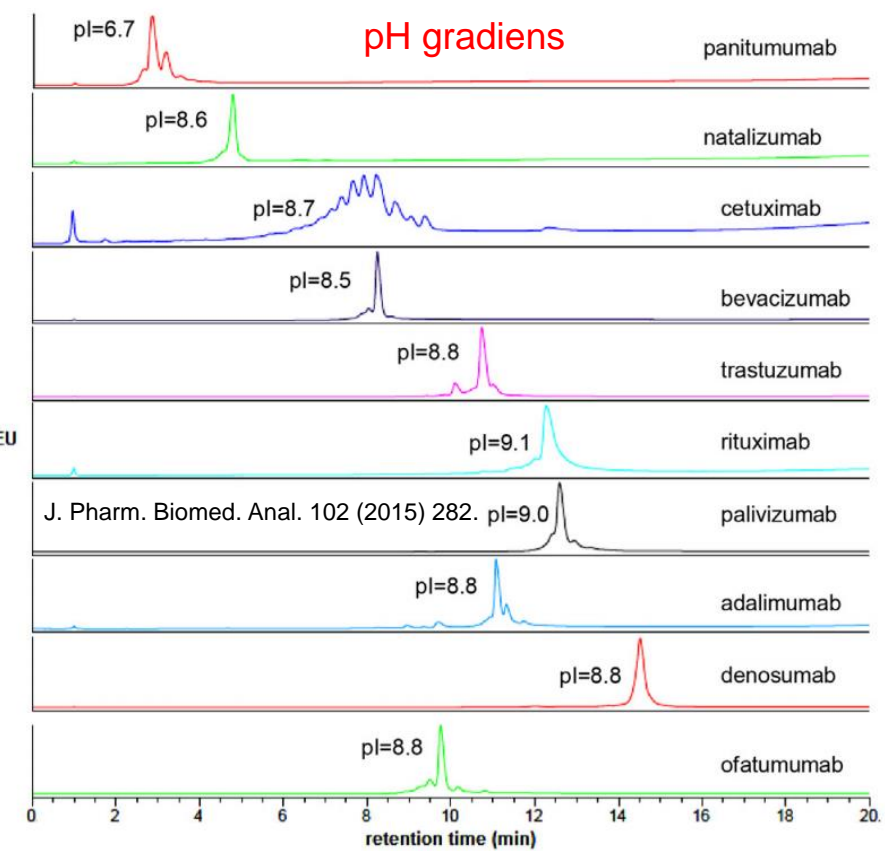
Töltésvariánsok
(aminosavcsere/transzlációs
módosítás) elválasztása

pH vagy só gradiens alkalmazásával

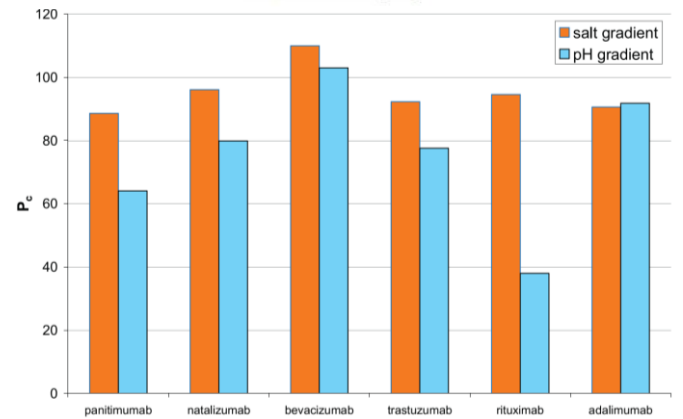
Ioncserélő (kation v. anion) tölteten

A töltet töltése ellentétes a variánsok
töltésével!

3. LC módszerek – IEC (bioaktív forma izolálása lehetséges)



- Szelektivitás egyes esetekben változik
- Sógradiens mellett ált. nagyobb a hatékonyság
- Sógradiens mellett ált. mérsékelt adszorpció
- Sógradiens egyszerűbben megvalósítható

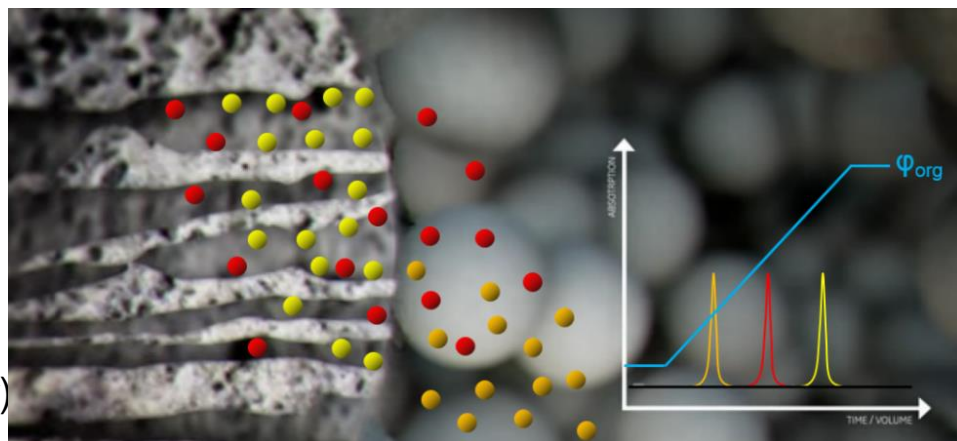


LC módszerek – RP (bioaktív forma izolálása ált. nem lehetséges)

- Fragmensek, oxidált/redukált variánsok, peptidterkép: főként minőségellenőrzési vizsgálatokban
- Elválasztás: főként hidrofób, kisebb mértékben poláris szelektivitás alapján (állófázisfüggő)
- Kapcsolható MS-sel!
- Robusztus, nagy felbontó erő jellemzi

Alapvető körülmények:

- 200-300 Å C4-C18, bifenil, stb...
- héjszerű (hatékony)
- T: 50-90°C
- MeCN gradiens (0,1% trifluoecetsav)
- 200-400 µl/min (2.1 mm i.d.)

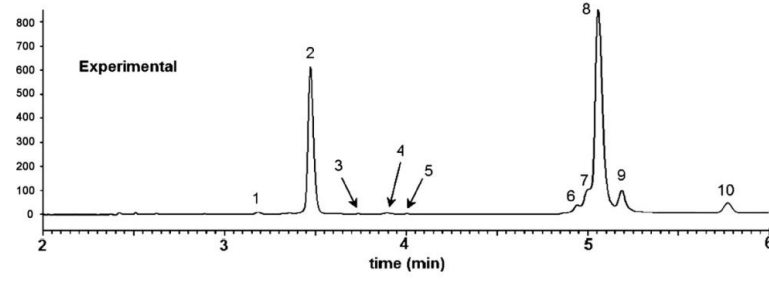
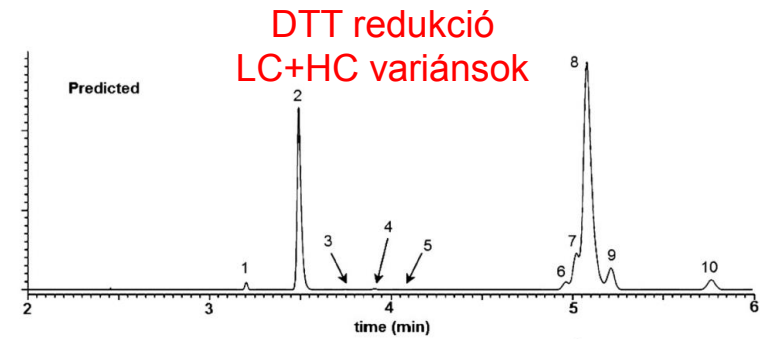
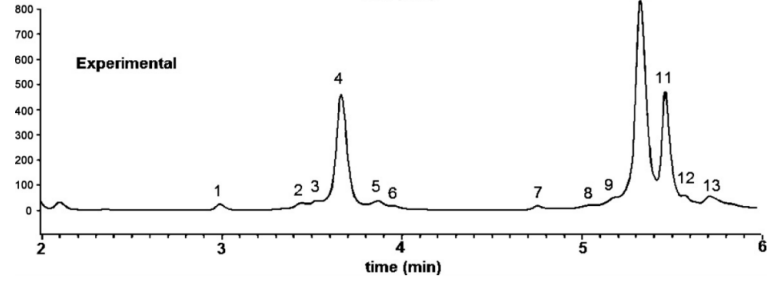
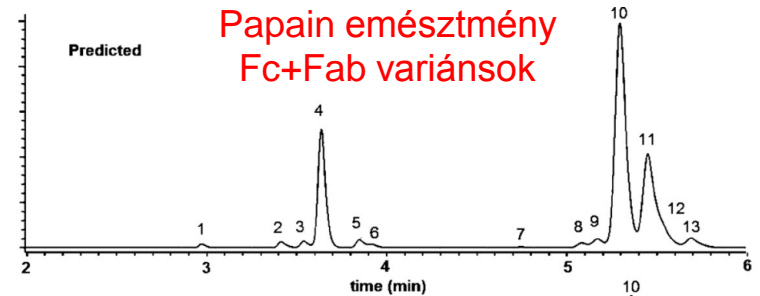
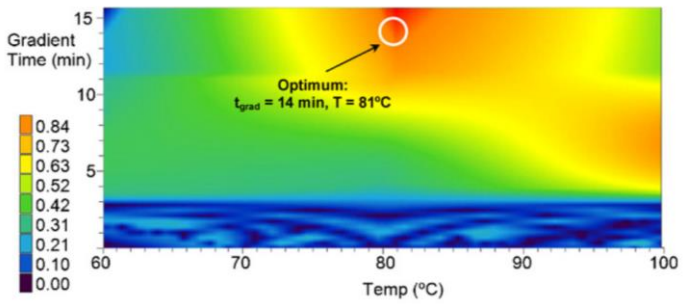
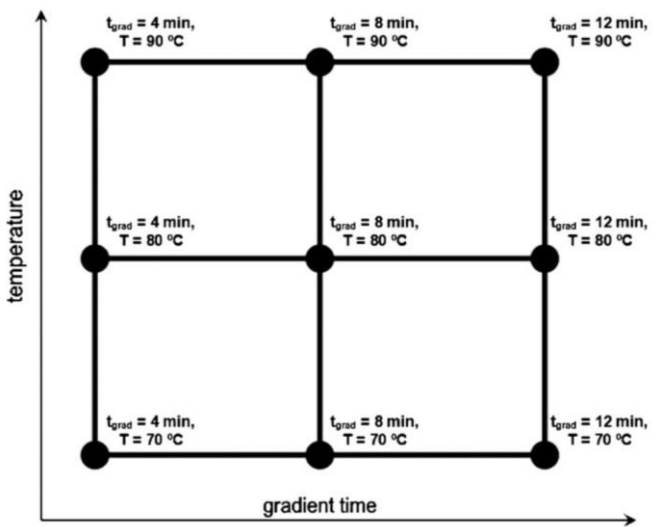
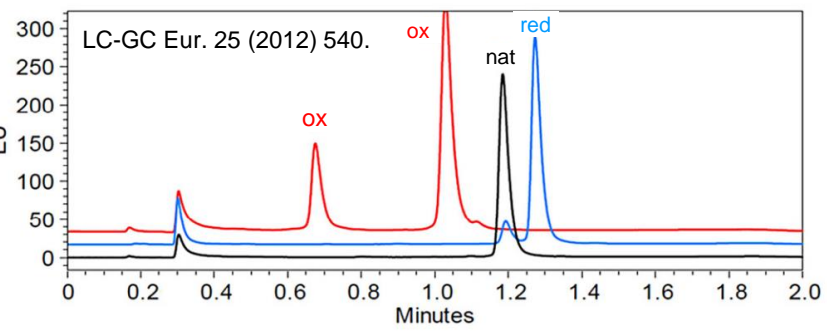


Problémák:

- ált. denaturáló körülmények: aktív formában nem frakcionálható a fehérje (SEC, IEX OK.)
- magas hőmérséklet: hődegradáció veszélye
- konformáció nagyon függ a mérési körülményektől (additívek, P, T):
adszorpció, retenció változhat
- A nagy hatékonyság érzékeny az anyagátadási ellenállásra: nagy MW → kis D_m
 - limitált proteolízissel jelentősen javítható (az adszorpció hajlam is)

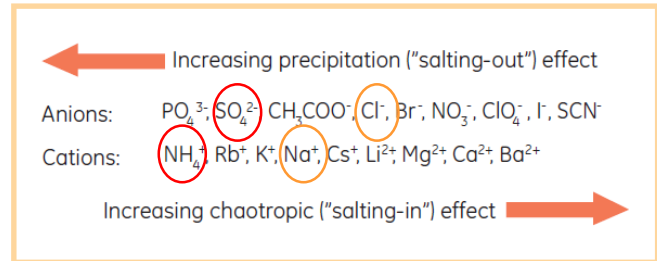
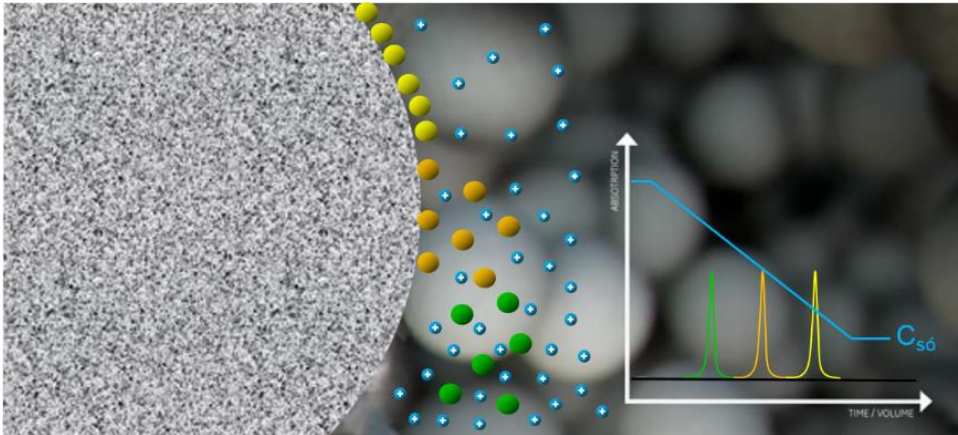
LC módszerek – RP (bioaktív forma izolálása ált. nem lehetséges)

Filgrastim (18,8 kDa) variánsok, BEH300 1.7 μm, 50*2,1 mm

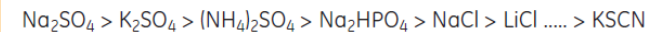


3. LC módszerek – HIC (bioaktív forma izolálása lehetséges)

- Hidrofób az állófázis felületete
- Kezdeti magas sókoncentrációval „kisózzuk” a fehérjéket az állófázis felületére
- A sókoncentráció csökkentésével megtörténik a deszorpció/elúció
- Főként preparatív elválasztásokban használják: bioaktív RP
- Nagyon érzékeny a fehérje felületi hidrofóbicitásának változásaira



Hofmeister series: showing the effect of some anions and cations on protein precipitation.



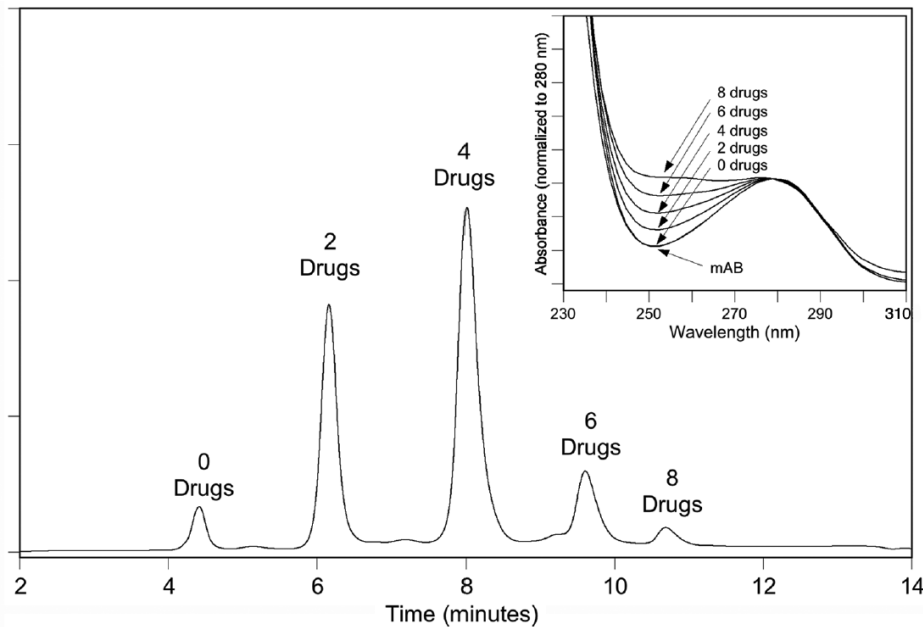
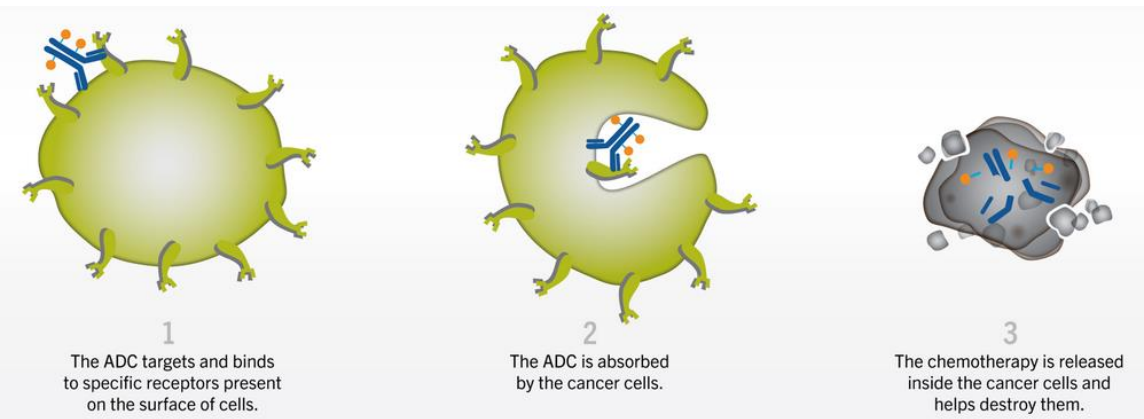
Relative effects of some salts on protein precipitation.

Analitikai elválasztásban:

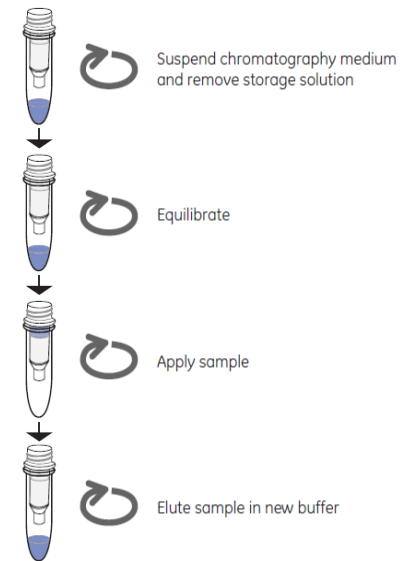
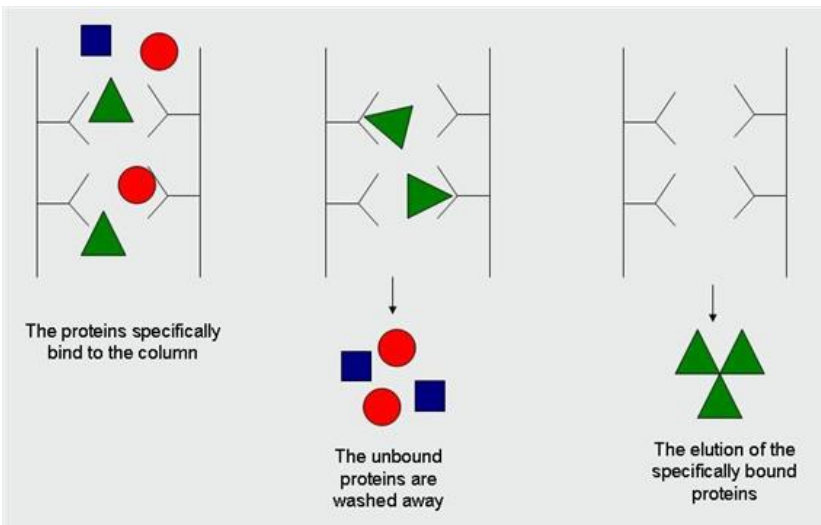
pH \approx pI, 50mM puffer + 1-2 Mm sógradies
nemporózus töltet (polimer/módosított szilikagél),
kis szemcseméret, kis kolonnatérfogat

3. LC módszerek – HIC: ADC-k jellemzése (bioaktív forma izolálása lehetséges)

- Ha a kapcsolás (linker) és a konjugált drog neutrális, egyébként IEC
- Igéretes módszer antitest-drog konjugátumok jellemzésére: érzékeny a felületi hidrofóbicitás változására (Drug-Antibody Ratio: DAR – nagymértékben befolyásolja a szer hatékonyságát)
- Eddig kevés a tapasztalat...

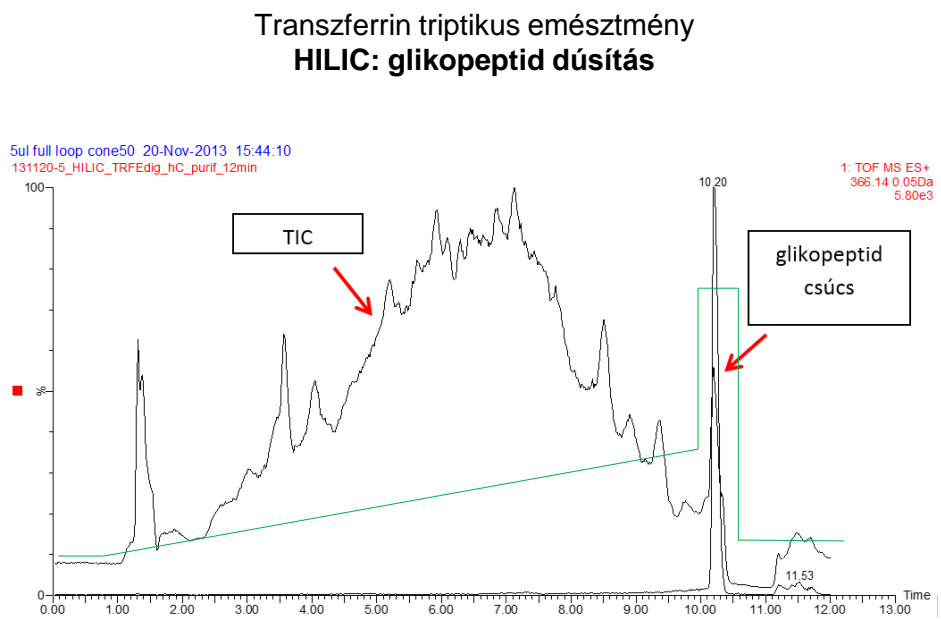
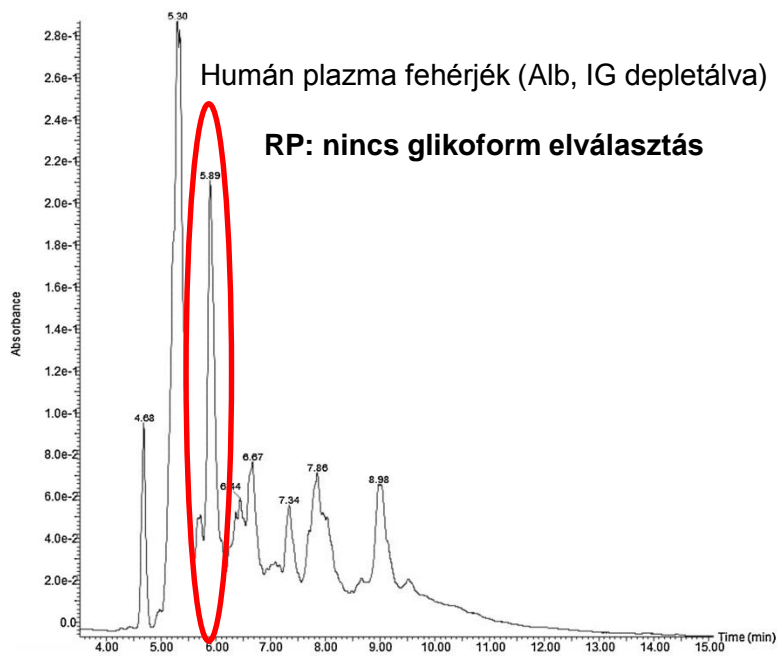


3. LC módszerek – AC

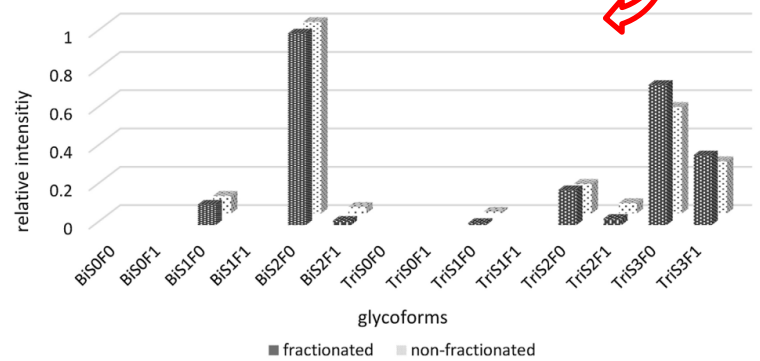


- Rendkívül sokféle állófázis, igényre szabható (\$)
- Főbb típusok:
 - immunaffinitás (antigén megkötése immobilizált antitesttel, vagy fordítva)
 - immobilizált fémion affinitás (IMAC): Co/Cu/Ni: hisztidintartalmú fehérjék
Fe/Zn/Ga: foszfopteinek
 - lektin: glikoproteinek
 - stb...
- Adott fehérje kinyerése további vizsgálatra, vagy mátrix tisztítása zavaró fehérjéktől.
- Kolonnában, SPE, vagy spin-cartridge-ként is elérhető

3. LC módszerek – frakcionálás fehérje és peptid szinten



Helyspecifikus glikoziláció minor glikoformokra is



- Megfelelő szelektivitás kiválasztása
- Frakciószedés, mintaelőkészítés, analízis
- Minor komponensek szelektív dúsítása, „tetszőleges” mértékben.