

# 生物兼容液相在双抗样品分析中的应用

LC-245

**摘要：** 本文利用岛津生物兼容液相色谱系统（Nexera Bio）和尺寸排阻色谱技术（SEC），建立了双抗样品的大小异质性分析方法。色谱峰分离度良好，重复性实验结果显示，其保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD%）分别小于 0.2% 和 2%，表明重复性良好，方法稳定可靠。

**关键词：** 生物兼容液相系统 双特异性抗体 尺寸排阻色谱

双特异性抗体（以下简称双抗）是同时能够结合两个不同表位或者抗原的抗体，从而阻断或激活双靶点信号通路，介导免疫细胞对肿瘤细胞更好的杀伤，因此可能会获得比单一抗体更好的临床结果，双抗研发也备受关注。

双抗种类繁多，有基于片段化设计的分子，直接将多个抗原结合单元结合在一个没有 Fc 区域的分子上，设计简单，但缺乏 Fc 端，血浆半衰期相对较短，可能存在稳定性和聚集性问题；也有基于保留 Fc 区域设计的对称性分子设计和非对称性分子设计模式，保留 Fc 区域的双抗药物，血浆半衰期较长，可发挥类似于 IgG 的抗体特点。目前已有超过 150 多个双抗产品处于临床试验阶段，国内众多生物制药公司已形成独特专

利技术的双抗构建平台，为双抗产品研发助力。

在双抗产品研发生产过程中，需要对其大小异质性进行分析，反映双抗连接情况，保障产品质量，非片段化设计的双抗分子量较大，故通常采用尺寸排阻色谱法（SEC）进行其大小异质性分析。

本文采用岛津生物兼容液相色谱系统，针对不同尺寸色谱柱在其最佳流速下配置了不同尺寸检测器流通池，以获得优异的分选度和峰形。避免因流通池尺寸不合适而产生峰形扩散导致分选度不佳的现象。依据上述原理，特建立了双抗样品（Fc 端融合型对称分子）大小异质性相关分析检测方法（方法一和方法二），供相关检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津生物兼容液相色谱系统（Nexera Bio）。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A	脱气机：DGU-20A 5R
输液泵：LC-20AD XR	自动进样器：SIL-20A XR
柱温箱：CTO-20AC	检测器：SPD-M20A
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98	

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：SHIMEN Ankylo SEC-300, 300 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm  
P/N 380-01215-11（方法一）  
SHIMEN Ankylo SEC-300, 300 mm x 7.8 mm I.D., 3 μm  
P/N 380-01215-10（方法二）  
岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相 -50 mM 磷酸盐缓冲液 +300 mM NaCl (pH6.8)  
B 相 - 乙腈

流速：0.21 mL/min（方法一）  
0.70 mL/min（方法二）

柱温：30 °C

进样量：5 μL

洗脱方式：等度洗脱，10% B 相

流通池：半微量流通池 -（方法一）、标准流通池 -（方法二）

### 1.3 样品前处理方法

双抗样品用水溶解后直接进样，浓度为 5.0 mg/mL

## ■ 结果与讨论

### 2.1 分离度实验（方法一）

本方法使用 SHIMEN Ankylo SEC-300, 300 mm x 4.6 mm I.D., 3 μm 色谱柱，最佳流速为 0.21 mL/min，因此该方法采用了半微量流通池，避免在低流速下使用标准流通池而产生峰扩散导致分离度不佳的现象。色谱峰出峰情况如图 1 所示。从图中可见：双抗样品共出现 4 个主要色谱峰，该双抗样品为单抗 Fc 端融合型，根据尺寸排阻色谱出峰顺序，4 个主要色谱峰分为双抗，单抗（未能融合），ScFv（单链抗体）以及碎片。各个色谱峰峰形良好，且分离度都大于 1.5，表明分离良好。分离度结果如下表 1 所示。

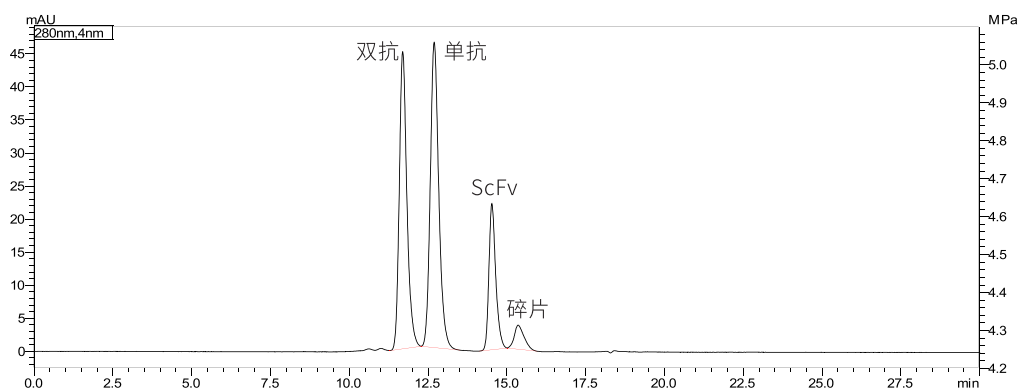


图 1 双抗样品分离色谱图

表 1 分离度测试

名称	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
分离度	-	2.1	4.1	1.7
拖尾因子	1.2	1.1	1.2	1.2

### 2.2 重复性实验（方法一）

连续进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性，结果如下表 2 所示。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 0.2% 和 2%，表明仪器精密度良好。

表 2 重复性测试 (n=6)

名称	峰 1		峰 2		峰 3		峰 4	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	11.706	778,116	12.704	893,651	14.534	346,457	15.370	95,228
2	11.696	776,020	12.695	891,509	14.525	346,685	15.366	95,219
3	11.706	775,261	12.704	891,355	14.533	346,600	15.368	94,472
4	11.701	774,890	12.700	890,889	14.530	347,083	15.367	93,582
5	11.704	774,528	12.702	892,158	14.530	347,296	15.366	94,719
6	11.698	775,728	12.696	893,139	14.524	347,804	15.358	94,784
AVG	11.702	775,757	12.700	892,117	14.529	346,988	15.366	94,667
RSD/%	0.03	0.16	0.03	0.12	0.02	0.14	0.02	0.64

### 2.3 分离度实验 - (方法二)

色谱峰出峰情况如图 2 所示。各个色谱峰峰形良好，且分离度都大于 1.5，表明分离良好。分离度结果如下表 3 所示。

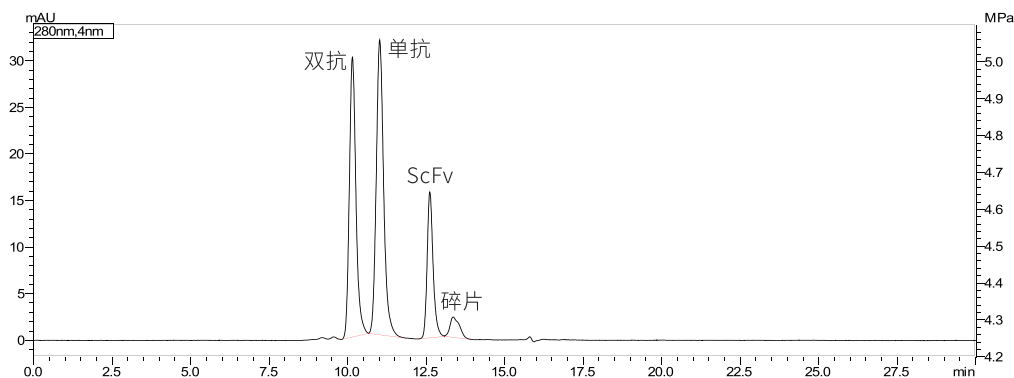


图 2 双抗样品分离色谱图

表 3 分离度测试

名称	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4
分离度	-	2.1	4.1	1.6
拖尾因子	1.1	1.1	1.2	1.2

### 2.4 重复性实验 (方法二)

重复性结果如下表 4 所示。标准溶液的保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别小于 0.2% 和 2%，表明仪器精密度良好。

表 4 重复性测试 (n=6)

名称	峰 1		峰 2		峰 3		峰 4	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	10.177	459,185	11.048	542,096	12.649	213,568	13.395	56,016
2	10.176	456,608	11.046	539,709	12.645	213,905	13.389	55,562
3	10.171	455,557	11.042	538,900	12.640	214,305	13.384	55,469
4	10.149	452,306	11.019	537,355	12.615	213,434	13.356	54,606
5	10.146	453,633	11.014	538,792	12.609	213,830	13.348	54,663
6	10.150	453,658	11.020	539,249	12.615	213,602	13.357	54,525
AVG	10.161	455,158	11.032	539,350	12.629	213,774	13.372	55,140
RSD/%	0.14	0.54	0.14	0.28	0.13	0.14	0.14	1.13

以上结果显示两种方法的分离度和重复性结果良好，表明不同内径尺寸的色谱柱要实现柱效最大化，得到较好的峰形和分离度，需要在其最佳流速下配置合适的紫外检测器流通池，经过优化“方法一”中 4.6 mm 内径的色谱柱最佳流速为 0.21 mL/min，此时需要配置半微量流通池（池体积 2.5 μL，货号 S228-45605-41），如果配置大体积的流通池，样品会在流通池内发生扩散现象，导致峰形变宽，进而使得分离度降低。而对于 8.0 mm 内径的色谱柱，在 0.7 mL/min 的流速下配置标准流通池（池体积 12 μL，货号 S228-37440-44）可以得到最佳峰形和分离度。

## ■ 结论

本实验建立了一种使用岛津生物兼容液相系统（Nexera Bio）结合 SHIMEN Ankylo SEC-300 色谱柱进行双抗样品大小异质性分析的方法。选择不同规格色谱柱，需要配套不同的流通池，以获得优异的分离度和峰形。结果显示，在配套合适的流通池后，两款色谱柱，4 个主要色谱峰拖尾因子均小于 1.2，峰形良好，且分离度都大于 1.5，表明色谱分离良好；双抗样品溶液重复进样 6 针，其保留时间和峰面积的 RSD% 分别为小于 0.2% 和小于 2%，表明重复性良好，方法稳定可靠。建立的方法可应用于双抗样品大小异质性的测试。

岛津应用云

