

生物兼容液相在单抗样品电荷异质性分析中的应用

LC-259

摘要： 本文利用岛津生物兼容液相色谱系统（Nexera Bio）和弱阳离子交换技术（WCX），建立了单抗样品的电荷异质性分析方法。贝伐珠单抗、曲妥珠单抗以及帕妥珠单抗酸性和碱性变异体与主峰分离度良好，方法简单、稳定、可靠，供相关行业参考。

关键词： 生物兼容液相系统 电荷变异体 单克隆抗体 弱阳离子交换色谱

电荷异质性是重组类蛋白药物的关键质量属性。各种不同的影响因素均能通过改变电荷基团的数量，使重组蛋白制品的电荷属性发生异质性改变，从而在同一蛋白制品中产生酸性、碱性电荷变异体。重组蛋白类药物电荷变异体主要来源于生产、存储及使用过程中的多种翻译后修饰和降解反应。常见的脱酰胺化、N端修饰、异构化、唾液酸化聚糖和C端剪切等都会产生电荷变异体。电荷变异体的存在会影响重组蛋白的结合能力、生物学活性、免疫原性、药代动力学等，进而影响药物临床使用的有效性和安全性。

目前用于蛋白等电点评价的检测方法主要有平板胶等电聚焦电泳（IEF），离子交换色谱（IEC），毛细管等电聚焦电泳（cIEF）等三类技术。其中，IEF和cIEF是基于蛋白质等电点来分离的，因此二者均无法

分离由于空间电荷分布不一致而引起的电荷变体；而IEC能同时分离由于蛋白质等电点不同以及空间电荷分布不一致而导致的电荷变体，且可维持蛋白质原有的空间结构及活性。IEC不仅是重组蛋白电荷异质性的常用方法之一，同时也是分离纯化过程中除杂（宿主蛋白、DNA）的首选方法。

用于单抗异质性的IEC分为pH梯度和盐梯度法。pH梯度需用到3-4种流动相，仪器硬件要求更复杂，因混合而产生的盐析问题导致仪器故障率增高。而盐梯度法作为经典的抗体电荷异质性方法，简单、耐用，分离度好。本文采用岛津生物兼容液相色谱系统，针对单克隆抗体偏弱碱性的特点，选用盐梯度IEC色谱进行分析，可以实现主峰与酸性峰、碱性峰的有效识别。该方法简单、可靠，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 WCX, 250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm
P/N 380-01215-13, 岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A相 -10 mmol/L 磷酸钠水溶液，用磷酸溶液调 pH 至 6.6

B相 -10 mmol/L 磷酸钠，0.1 mol/L 氯化钠水溶液，用磷酸溶液调 pH 至 6.6

流速：0.6 mL/min

柱温：30 °C

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始 20% B 相，详见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
50.00	Pumps	Pump B Conc.	60
55.00	Pumps	Pump B Conc.	90
60.00	Pumps	Pump B Conc.	20
63.00	Pumps	Pump B Conc.	20
70.00	Controller	Stop	

1.3 样品前处理方法

贝伐珠、曲妥珠、帕妥珠样品用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.6) 稀释至相应浓度后直接进样，上机浓度分别为 1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、5.0 mg/mL。

■ 结果与讨论

2.1 空白溶剂色谱图

以 10 mmol/L 磷酸钠水溶液进行空白溶剂分析，色谱峰出峰情况如图 1 所示，基线平稳，无干扰峰。

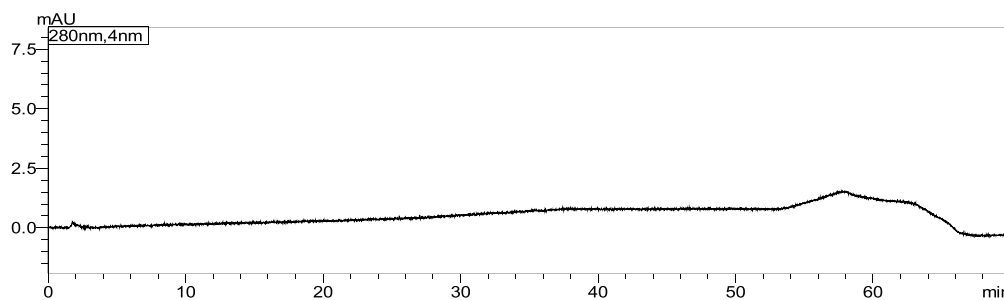


图 1 空白溶剂

2.2 贝伐珠单抗样品色谱图

在 IEC 模式下，随着盐离子浓度增加，贝伐珠单抗酸性、中性及碱性变异体依次洗脱；由于是弱阳离子洗脱体系，一般碱性峰与中性峰（主峰）分离度较好。贝伐珠单抗克隆抗体色谱图如下图 2 所示，酸性峰、碱性峰、主峰面积归一化含量分别为 1.439%、1.784%、96.777%。

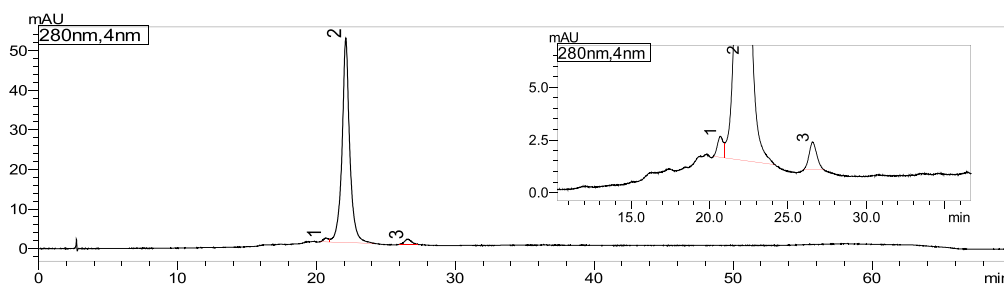


图 2 分离色谱图

表 2 峰表

名称	保留时间	面积	面积 %
酸性 1	17.269	16649	1.439
主峰 2	18.536	1120006	96.777
碱性 3	22.771	20652	1.784

2.3 曲妥珠单抗样品色谱图

曲妥珠单克隆抗体色谱图如下图 3 所示，曲妥珠单抗酸性峰、碱性峰变异体分别有 5 个、3 个，按面积归一化计算，酸性变异体占比 21.722%，碱性变异体占比 8.262%，中性峰 70.016%。峰表见表 3。

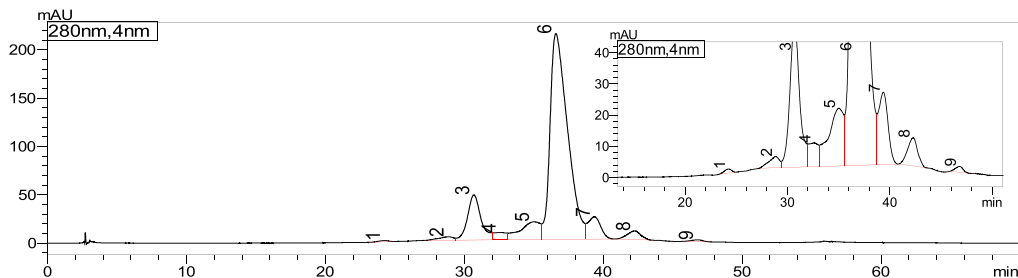


图 3 曲妥珠单抗分离色谱图

表 3 曲妥珠单抗 IEC 分析峰表

名称	保留时间	面积	面积 %
酸性 1	24.257	62989	0.237
酸性 2	28.845	261331	0.981
酸性 3	30.688	3108475	11.672
酸性 4	32.593	493306	1.852
酸性 5	35.000	1858709	6.979
主峰 6	36.595	18645952	70.016
碱性 7	39.371	1480757	5.560
碱性 8	42.278	619393	2.326
碱性 9	46.804	100152	0.376

2.4 帕妥珠单抗样品色谱图

帕妥珠单克隆抗体色谱图如下图 4 所示，帕妥珠单抗酸性峰、碱性峰变异体分别有 3 个、5 个，按面积归一化计算，酸性变异体占比 13.898%，碱性变异体占比 7.819%，中性峰 78.283%。峰表见表 4。

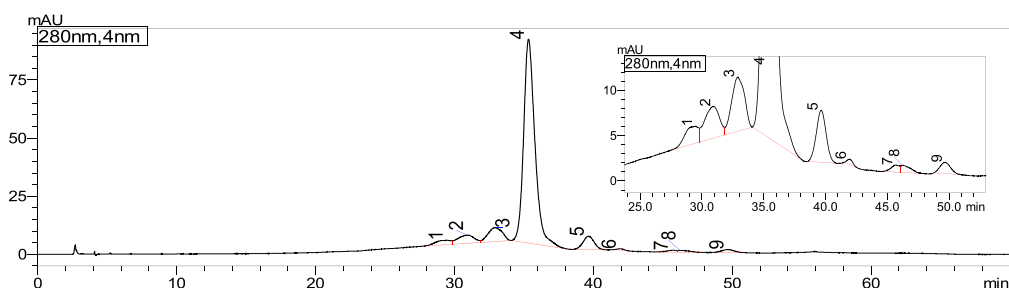


图 4 帕妥珠分离色谱图

表 4 帕妥珠峰表

名称	保留时间	面积	面积 %
酸性 1	29.470	151213	2.394
酸性 2	30.955	295483	4.678
酸性 3	32.884	431180	6.826
主峰 4	35.323	4945069	78.283
碱性 5	39.640	318277	5.038
碱性 6	41.930	18687	0.296
碱性 7	45.687	37932	0.600
碱性 8	46.240	45124	0.714
碱性 9	49.686	73942	1.171

2.5 重复性

对于单抗质量控制而言，控制酸、碱变异体数量及含量，有助于稳定生物制剂产品质量。因此，酸性碱性变异体通常合并计算浓度。贝伐珠、曲妥珠、帕妥珠样品连续进样 3 次，统计酸性、碱性变异体以及主峰的峰面积相对标准偏差（RSD）。结果如下表 5 所示，各电荷变异体均满足 RSD<3.5%，仪器方法稳定，重复性好。

表 5 重复性

名称	酸性变异体 RSD%	主峰 RSD%	碱性变异体 RSD%
贝伐珠	2.98	0.21	1.09
曲妥珠	0.31	0.02	0.10
帕妥珠	3.22	3.50	3.53

■ 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 WCX 色谱柱进行单抗样品电荷异质性分析的方法。空白溶剂无干扰，在盐梯度条件下，贝伐珠、曲妥珠、帕妥珠单抗酸性峰、碱性峰与主峰分离良好。方法简单、易用，可应用于单抗样品电荷异质性的测试。

岛津应用云

