

在线二维液相色谱应用于单抗样品分析

张婷婷 戴振宇 金燕
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

目标

基于双三元液相色谱仪（DGLC），建立在线二维液相色谱方法，全自动实现单抗样品的滴度分析和聚体分离，提高单抗药物生产的工作效率。

引言

生物制药被誉为 21 世纪的金苹果，当许多化学药物因耐药性和副作用即将隐退江湖时，生物制药行业越来越显示出无穷的生命力，其利用现代生物技术（组织提取、发酵和细胞培养等等）为人类健康带来诸多良药。通过淋巴细胞杂交瘤技术或基因工程技术制备单克隆抗体药物，已经成为生物制药领域的一个重要方面，由于单克隆抗体药物专一性强、疗效显著，尤其是在癌症的治疗过程中发挥重要的作用，成为近年来研究的热点药物之一。已经商品化的单抗药物包括罗氏公司的帕妥珠单抗、诺华公司的依维莫司等等。

在单克隆抗体药物的每个生产过程中，必须采用合适的方法进行产品的纯化和质量控制，测定其效价、聚集体和电荷亚型变体等。单抗药物中的聚集体和电荷亚型变体会在药品的生产、储存和运输过程中产生，这些副产物会产生与主产品不同的药效，有时会引起严重的副作用。因此必须对这些副产物进行严格的质量控制，从而更好地保证患者的用药安全。

本文以双三元液相色谱系统（DGLC）和变色龙软件为基础，建立在线二维液相色谱分析方法，全自动实现单抗药物的滴度分析和聚体含量监控，大大提高了单抗药物分离分析的工作效率，适合在单抗药物研发和生产领域内进行推广。

测试条件

仪器

Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 × 2 LC 系统，包括：

- DGP 3600 AB 双三元液相色谱梯度泵系统（包括在线脱气单元）（P/N 5037.0014）
- WPS-3000TBFC 带温控自动进样器（P/N 5825.0020）
- TCC-3000SD 柱温箱带两个十通阀（P/N 5730.0010）
- DAD 3000 紫外二极管阵列检测器（P/N 5082.0010）

Thermo Scientific™ Dionex™ Chromleon™ 7.2 色谱数据系统
仪器连接参见图 1 和图 2；

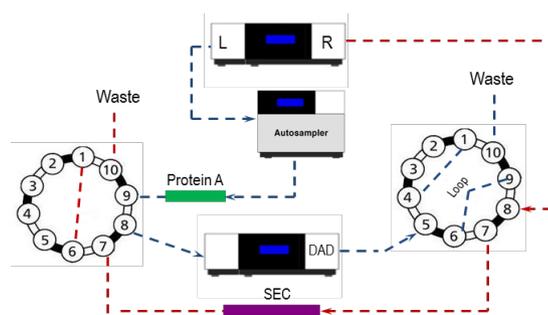


图 1. 在线二维装置图 - 在线 Loop 环

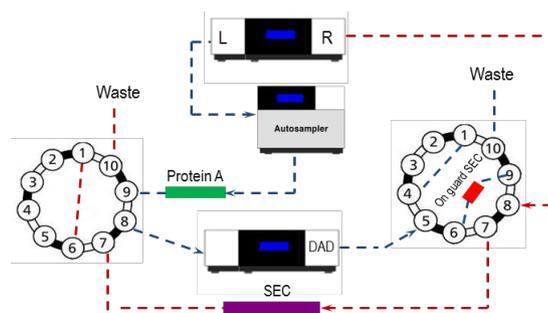


图 2. 在线二维装置图 - 在线 On guard SEC

表 1. 流动相梯度变化及阀切换

时间 / min	左阀切换	右阀切换	左泵流速 / ml/min	左泵 A / %	左泵 B / %	右泵流速 / ml/min	右泵 A / %
0	1-10	1-10	1.5	100	0	0.8	100
0.8	1-10	1-10	1.5	100	0	0.8	100
0.81	1-10	1-10	1.5	0	100	0.8	100
1.3	1-10	1-10	1.5	0	100	0.8	100
1.31	1-10	1-10	1.5	100	0	0.8	100
1.52	1-10	1-2	1.5	100	0	0.8	100
1.58	1-10	1-10	1.5	100	0	0.8	100
5	1-2	1-10	1.5	100	0	0.8	100
8	1-2	1-10	1.5	100	0	0.8	100
8.1	1-2	1-10	0.2	100	0	0.8	100
18	1-10	1-10	0.2	100	0	0.8	100
20	1-10	1-10	1.5	100	0	0.8	100

色谱条件

一维色谱柱: Thermo Scientific™ MAbPac Protein A,
4 mm × 35 mm (P/N 082539);

二维色谱柱: Thermo Scientific™ MAbPac SEC-1,
7.8 mm × 300 mm (P/N 088460);

Loop 环规格: 250 μ L;

富集柱: Thermo Scientific™ MAbPac SEC-1,
4 mm × 50 mm (P/N 074697);

一维流动相: (A) 0.05 M NaH_2PO_4 +0.15 M NaCl, pH 7.0;
(B) 0.05 M NaH_2PO_4 +0.15 M NaCl, pH 2.5;

二维流动相: (A) 0.05 M NaH_2PO_4 +0.3 M NaCl, pH 6.8;

一维梯度条件: 参见表 1;

二维梯度条件: 参见表 1;

左阀和右阀切换时间: 参见表 1;

温度: 30 $^{\circ}$ C

UV 检测波长: 214/280 nm

进样量: 5 μ L;

样品前处理

合作客户提供 2 mg/ml 的单抗溶液样品, 用超纯水稀释 5 倍, 得到 0.4 mg/ml 样品溶液后直接进样分析。

空白及单抗分离色谱图

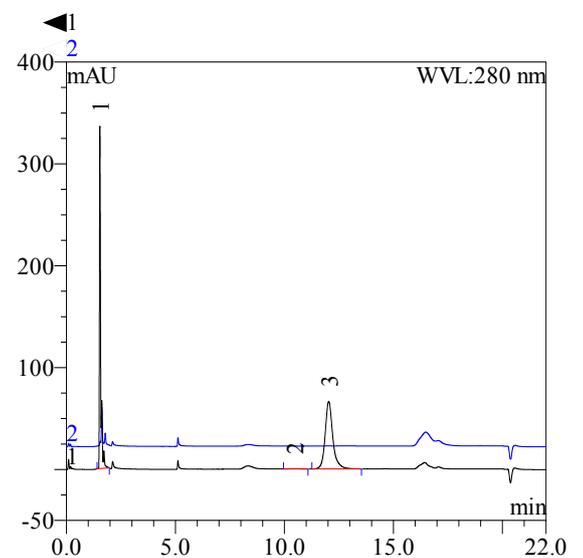


图 3. 空白和单抗样品分离图谱 (1- 单抗样品; 2- 空白)
(0-5min, 一维 Protein A 分离色谱图, 5-20min 为二维 SEC 分离色谱图;
Peak1- 一维 Mab 峰; Peak2- 二维 Mab 二聚体峰; Peak3- 二维 Mab 峰)

在线二维 loop 环装置色谱图

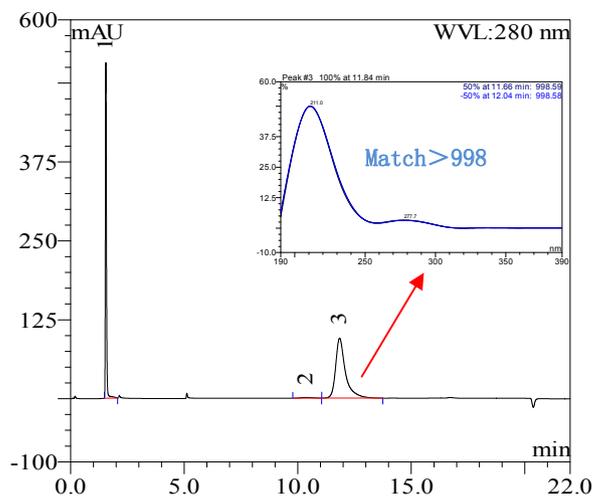


图 4. 在线二维 loop 环装置色谱图

(Peak1-一维 Mab 峰, Peak2-二维 Mab 二聚体峰, Peak3-二维 Mab 峰)

在线二维 On guard SEC 装置色谱图

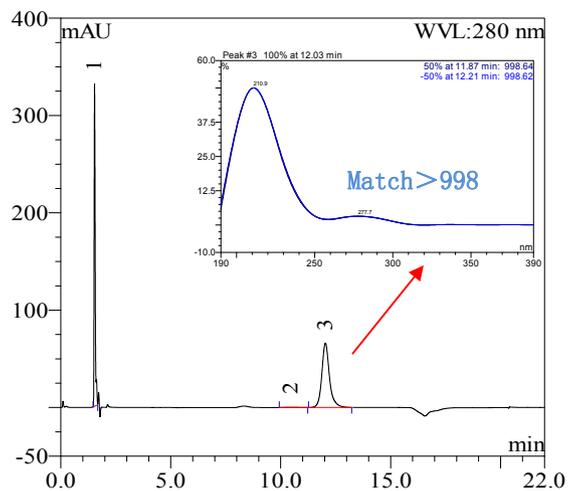


图 6. 在线二维 On guard SEC 装置色谱图

(Peak1-一维 Mab 峰, Peak2-二维 Mab 二聚体峰, Peak3-二维 Mab 峰)

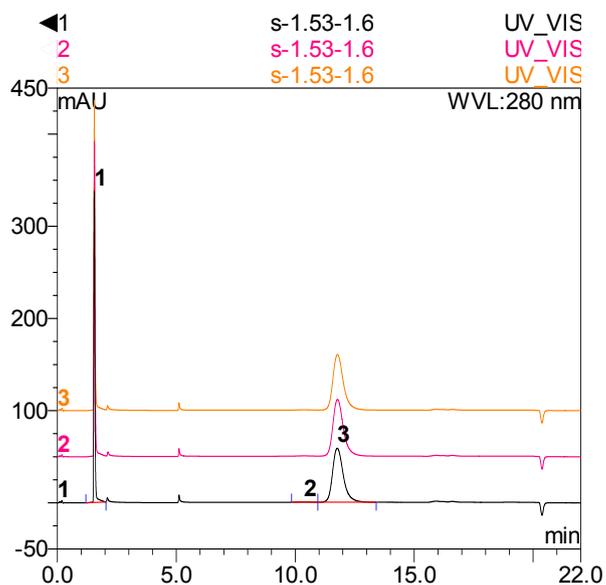


图 5. 在线二维 loop 装置重现性图谱

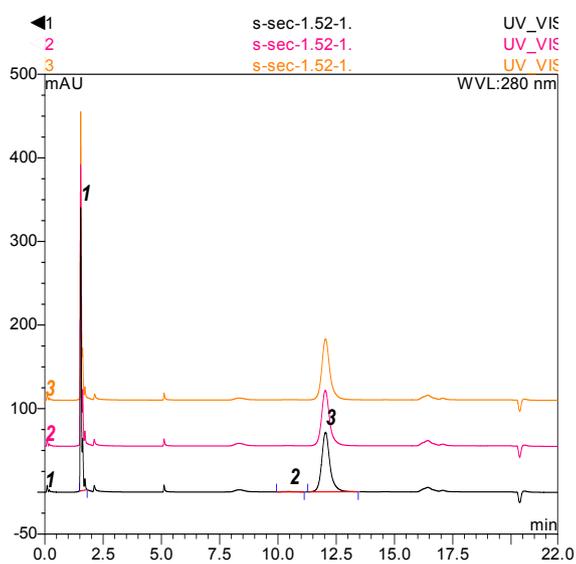


图 7. 在线二维 On guard SEC 装置重现性图谱

表 2. 单抗主峰面积及二聚体的含量（收集时间一致）

编号	峰面积 mAU*min	二聚体峰面积 mAU*min	二聚体含量
1	29.6106	0.1507	0.0051
2	29.0603	0.1574	0.0054
3	29.9697	0.1566	0.0052
RSD/%	1.550	2.364	

表 3. 单抗主峰面积及二聚体的含量（收集时间差异较大）

编号	峰面积 mAU*min	二聚体峰面积 mAU*min	二聚体含量
1	18.5631	0.0984	0.0053
2	21.1426	0.1133	0.0054
3	26.5703	0.1488	0.0056
4	29.9697	0.1566	0.0052
5	30.6837	0.1718	0.0056

结果与讨论

在单抗药物生产过程中，首先通过 Protein A 亲和柱对抗药物进行的滴度分析，使其纯度达到 95% 以上，然后通过体积排阻色谱（SEC）对单抗样品中的聚体进行监控，保证药品的质量。目前大部分制药公司这两个分离分析步骤分别在两套液相色谱仪上进行，浪费了时间和人力成本。

本方法基于 DGLC 液相色谱系统，一维使用 MabPac Protein A 亲和色谱柱对抗溶液进行分离，通过阀切换将收集到 loop 环（或者富集柱）中的单抗样品转移到二维，利用 SEC 色谱柱将样品中的聚体和单抗进行分离（仪器连接图见图 1 和图 2），从而实现全自动在线二维液相分离单抗药物的目的。

比较了采用 loop 环和富集柱两种不同的收集方式对分离的影响，采用 loop 环收集，一维系统压力比较稳定，对 Protein A 色谱柱影响比较小，延长其使用寿命，但是二维的色谱峰略有展宽；采用 SEC 富集柱收集样品，一维压力波动比较大，但是样品经富集柱富集后在二维的色谱峰柱效显著提高；综合考虑在一维流速较低的情况下采用 SEC 富集柱收集样品后进二维分离，一维流速较高时可选择 loop 环收集后二维进行分析。

柱温箱上分别安装左右两个十通阀，其中右阀上安装 loop 收集环（或者富集柱），通过阀切换将一维收集的

样品转移到二维进行分离，在此过程中压力稳定，一维和二维的流动相 pH 比较接近，不会对色谱柱产生不利的影 响；左阀分别连接一维、二维的色谱柱和紫外检测器，使紫外检测器在一维和二维之间切换，实现只用一台检测器就可以满足二维实时检测的功能。0-5min 为一维 Protein A 分离色谱图，5-20min 为二维 SEC 分离色谱图，在 20min 之内完成二维分析。

考察了二维 SEC 分离色谱峰的纯度，由图 4 和图 6 可知，主峰的峰纯度大于 99.8%，且由全波长扫描图谱（190-360nm）进一步表明主峰的纯度非常高；重复进样结果见图 5 和图 7，对于两种不同收集的方法，保留时间的 RSD 小于 0.3%，峰面积的 RSD 小于 1.62%，峰高的 RSD 小于 1.5%，该结果对于二维液相色谱来说是非常理想的。

作为二维液相色谱，我们比较关注经过一维分离收集后，在不同的收集时间窗口收集的样品再进样其聚体占总量的比例是否有变化，因此考察了在收集时间一致和相差较大的情况下二聚体所占比例：由表 2 可知，在收集时间较一致的情况下，二聚体比例在 0.51-0.54% 之间；由表 3 可知，在收集时间相差较大的情况下，二聚体比例在 0.52-0.56% 之间；两次结果比较接近，说明二维液相色谱图中聚体占总量的比例不会因为收集窗口的改变而变化，因此只要选择合适的收集时间就可以在二维对聚体进行很好的监控。

可行性分析

在线二维液相色谱可以实现单抗药物的全自动滴度分析和聚体分离，节约时间，提高工作效率，同样该方法也适用于全自动滴度分析和电荷异构单抗分离。因此本方法可以整合不同分离原理的液相色谱方法，为生物制药和蛋白分析建立一个方法开发平台，从而让双三元液相更好地为生物制药行业服务。

参考文献

- [1] Dionex Corporation. Gurmil Gendeh, Wim Decrop, Remco Swart. Development of an Automated Method for Monoclonal Antibody Purification and Analysis
- [2] Shanhua Lin, Zhiqi Hao, Andreas Huhmer, Srinivasa Rao, Yury Agroskin, Chris Pohl. Automated MAb Workflow: from Harvest Cell Culture to Intact Mass Analysis of Variants
- [3] Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* 2009, 81 (21), 8846–8857.
- [4] Rea, J. C.; Moreno, T.; Lou, Y; Farnan, D. Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54 (2), 317-323.

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)