

十六烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳法用于双抗的纯度分析

Purity analysis of bispecific antibody by capillary electrophoresis sodium hexadecyl sulfate (CE-SHS)

王文涛, 罗继, 陈泓序, 郭立海

Wang Wentao, Luo Ji, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key words: 十六烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳法, 双抗, 纯度分析

1. 前言

十二烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳 (CE-SDS) 从2015年写入中国药典以来, 被各大生物制药公司广泛用于检测治疗性蛋白制品的纯度分析, 监控其生产过程中产生的可能影响药物疗效或患者安全的杂质, 为产品放行提供纯度相关的检测数据。其中, SDS是在CE-SDS分析中常用的蛋白变性剂, 主要有两方面作用: 1) 添加在前处理过程中使用的样品缓冲液中, 用于蛋白的变性, 并与蛋白进行有效结合 (1g蛋白结合1.4g SDS) 形成蛋白-SDS复合物, 屏蔽了蛋白本身表面的电荷, 保证不同分子量大小的蛋白具有一致的荷质比; 2) 添加到分离凝胶缓冲液中, 用于保持蛋白-SDS复合物在分离过程中的稳定性。但随着蛋白药种类的增多, 由于不同蛋白表面的带电性和糖基化存在差异, SDS并不能与所有蛋白都能实现较好的结合, 常规CE-SDS方法的参数就不能有效适用于所有蛋白药物的分析。为此, 需要根据样品特点, 对CE-SDS方法中使用的样品缓冲液和分离凝胶缓冲液进行适当的优化。近年来, 已有文献报道¹, 在分离缓冲液中添加更长烷基链的蛋白变性剂, 如十六烷基磺酸钠 (Sodium Hexadecyl Sulfate, SHS), 能够有效增加变性剂与蛋白的结合, 从而有效改善蛋白的分离。Jeff Beckman等人¹研究发现, 对于疏水性较强的单抗样品纯度分析来说, 使用含有一定比例SHS的分离凝胶缓冲液相比于仅含有SDS的分离凝胶缓冲液来说, 分离度提高了5倍, 理论塔板数提高了8倍。本文将使用添加SHS的分离凝胶缓冲液进行的毛细管凝胶电泳纯度分析方法称为CE-SHS方法。

本文基于SCIEX成熟稳定的商品化分离凝胶 (内含0.2%SDS, 质量体积比, 下同) 和样品缓冲液 (内含1%SDS), 通过外加一定比例的SHS配置得到SHS分离凝胶缓冲液和SHS样品缓冲液, 极大程度上改善了双抗样品在还原模式下分子量相差仅为1 kDa的两条重链的分离。此外, 本文还详细探讨了在分离凝胶缓冲液和样品缓冲液中添加SHS对分离结果的影响, 并对其可能的机理进行了阐述。

2. 仪器和试剂

2.1 仪器

SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统, 配备二极管阵列检测器 (PDA, 波长220 nm), 32 Karat™ 软件10.3 (SCIEX); 离心机; 分析天平; 水浴锅。

2.2 试剂及耗材

IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit (SCIEX, PN: A10663), 其中分离凝胶缓冲液含有0.2%SDS。2-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich, PN M7154), Centricon YM-30超滤管 (Millipore, PN 4208), 十六烷基磺酸钠 (Sigma-Aldrich, PN CDS000697)。Low pH Sample buffer (pH 6.5) (SCIEX, C57805), 其中含有1%SDS。

2.3 SHS分离凝胶缓冲液和SHS样品缓冲液的配置

1) 固定SDS浓度比例不变 (0.2%), 不同SHS浓度的分离凝胶缓冲液配置: 取10 mL IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit中的商品化分离凝胶, 分别加入0.02g、0.04g、0.06g SHS配置得到含有

不同SHS浓度的分离凝胶缓冲液，分别记为0.2%SHS、0.4%SHS、0.6%SHS分离凝胶缓冲液。由于SHS的烷基链更长，溶解性较SDS低，需要加热促进其溶解。

2) 固定SHS浓度比例不变(0.2%)，不同SDS浓度的分离凝胶缓冲液配置：取10 mL 0.2% SHS凝胶，其中已经含有0.2%SDS和0.2%SHS，分别加入0.03g、0.08g、0.18g SDS配置得到含有不同SDS浓度的分离凝胶缓冲液，最终三种凝胶中SDS的浓度一次为0.5%、1%、2%。SDS的溶解性好，无需加热即可很快溶解。

3) SHS样品缓冲液配置：取10 mL低pH样品缓冲液(pH 6.5)，加入0.02g SHS，配置得到本实验中使用的0.2% SHS样品缓冲液。

2.4 样品及前处理

本实验使用的双抗样品浓度为10 mg/mL，所含盐的终浓度小于50 mmol/L。准备两个1.5 mL离心管，其中一个离心管加入85 μ L商品化样品缓冲液(40 mM 磷酸缓冲液体系，pH 6.5，1%SDS)，另一个离心管加入85 μ L自制0.2% SHS样品缓冲液(40 mM 磷酸缓冲液体系，pH 6.5，1%SDS+0.2%SHS)。然后分别依次加入10 μ L双抗样品、5 μ L 2-巯基乙醇。盖上瓶盖，充分混合后离心1 min。置于70 $^{\circ}$ C水浴加热10 min，取出后冷却至室温即可上机实验。

2.5 运行方法

PA 800 Plus毛细管电泳仪，检测器：二极管阵列检测器，220 nm；采集频率：4 Hz；样品室温度：25 $^{\circ}$ C；毛细管温度：25 $^{\circ}$ C；窗口狭缝：2号(200 μ m \times 100 μ m)；毛细管：熔融石英毛细管，内径50 μ m，20/30.2 cm有效/总长。

本实验使用的毛细管活化和关机方法请参考IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit试剂盒说明书，分离方法采用快速冲洗CE-SDS分离方法²，具体设置如下：

图1. CE-SDS快速冲分离方法

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	
1		Rinse - Pressure	70.0 psi	3.00 min	BI:B1	BO:B1	forward, In / Out vial inc 8	SDS Gel rinse to fill the capillary with SDS gel
2		Wait		0.00 min	BI:A1	BO:A1	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip
3		Wait		0.00 min	BI:A4	BO:A4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to clean capillary tip
4		Inject - Voltage	5.0 KV	20.0 sec	SI:A1	BO:C1	Override, reverse polarity	Sample injection
5		Wait		0.00 min	BI:B4	BO:B4	In / Out vial inc 8	ddH2O, use for dipping to avoid sample carry over
6	0.00	Separate - Voltage	15.0 KV	30.00 min	BI:C1	BO:C1	1.00 Min ramp, reverse polarity, both, In / Out vial inc 8	SDS Gel for separation
7	5.00	Autozero						
8								

3. 结果与讨论

3.1 CE-SHS方法对双抗纯度的分析

本实验采用的双抗样品中，重链部分由于糖基化修饰的差异，两条重链分子量仅相差1 kDa左右(分别记为HC1和HC2)，LC-MS分析结果如图2A所示。由于分子量差异较小，采用商品化试剂盒方法中的分离凝胶缓冲液和样品缓冲液，HC1和HC2之间无法实现有效分离，如图2B(下)所示。分别在凝胶缓冲液和样品缓冲液中加入0.2%SHS后，双抗的两条重链HC1和HC2在分离度上发生明显的改善。实验结果可以看出：通过对分离凝胶缓冲液和样品缓冲液中变性剂的优化，极大程度上改善了蛋白的分离，这将有助于生物制药公司对其产品生产工艺的优化和完善。

3.2 SHS对双抗还原CE-SHS纯度分析的影响

为了更好的明确是在分离凝胶缓冲液中还是在样品缓冲液中添加SHS对双抗两条重链的分离度改善更大，本文通过设计单一变量实验进行了确认。如图3A所示，在保持分离凝胶缓冲液为0.2%SHS凝胶不变的情况下，不管是采用自配的0.2%SHS样品缓冲液(图3A上)还是采用商品化样品缓冲液(图3A中)，双抗的两条重链的分离效果基本一致，分离度分别为0.53和0.55；该双抗的还原CE-SHS纯度分析结果也一致，纯度分别为96.07%和96.08%，如表1中实验1和2。相比而言，在保持样品缓冲液为自配的0.2%SHS样品缓冲液不变的情况下，在分离凝胶缓冲液中添加0.2%SHS较商品化分离凝胶(图3A下)来说具有更好的分离效果，如表1中实验1和3。实验结果可以说明：在分离凝胶缓冲液中添加变性剂SHS更加有助于对该双抗在还原模式下两条重链的分离。

为了实现更佳分离效果，本文还对分离凝胶缓冲液中的SHS浓度进行了考察，分别设置为0.2%、0.4%、0.6%。如图3B所示，由上往下，随着分离凝胶缓冲液中的SHS比例逐渐升高，该双抗的两条重链分离逐渐提高，分别为：0.53、0.86、0.93，如表1中对应的实验1、4、5所示。这可能是由于SHS的疏水性较SDS更强，SHS

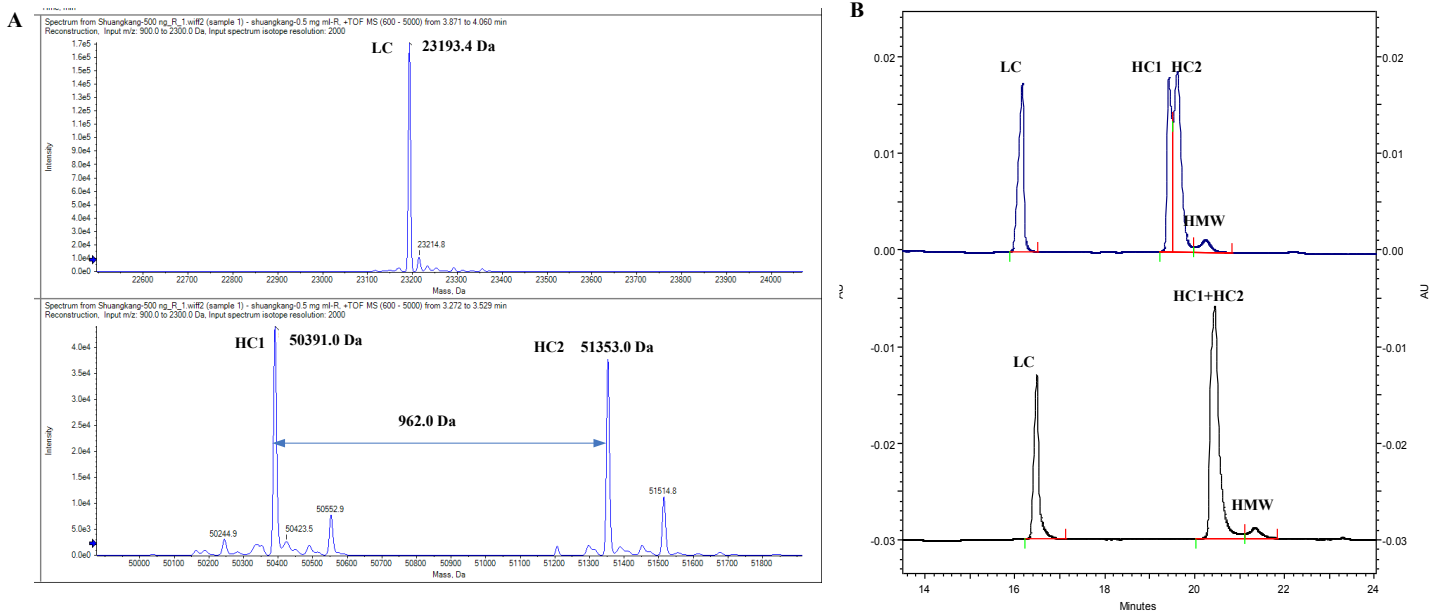


图2. 双抗样品的LC-MS还原分子量分析去卷积谱图 (A) 及还原CE-SHS纯度分析电泳图 (B)。图2A (上) 双抗还原后的轻链 (LC)；图2A (下) 为双抗还原后的两条重链 (HC1、HC2)；图2B (上) 和图2B (下) 中使用的分离凝胶缓冲液和样品缓冲液类型存在差异，分别对应于表1中实验1和3；

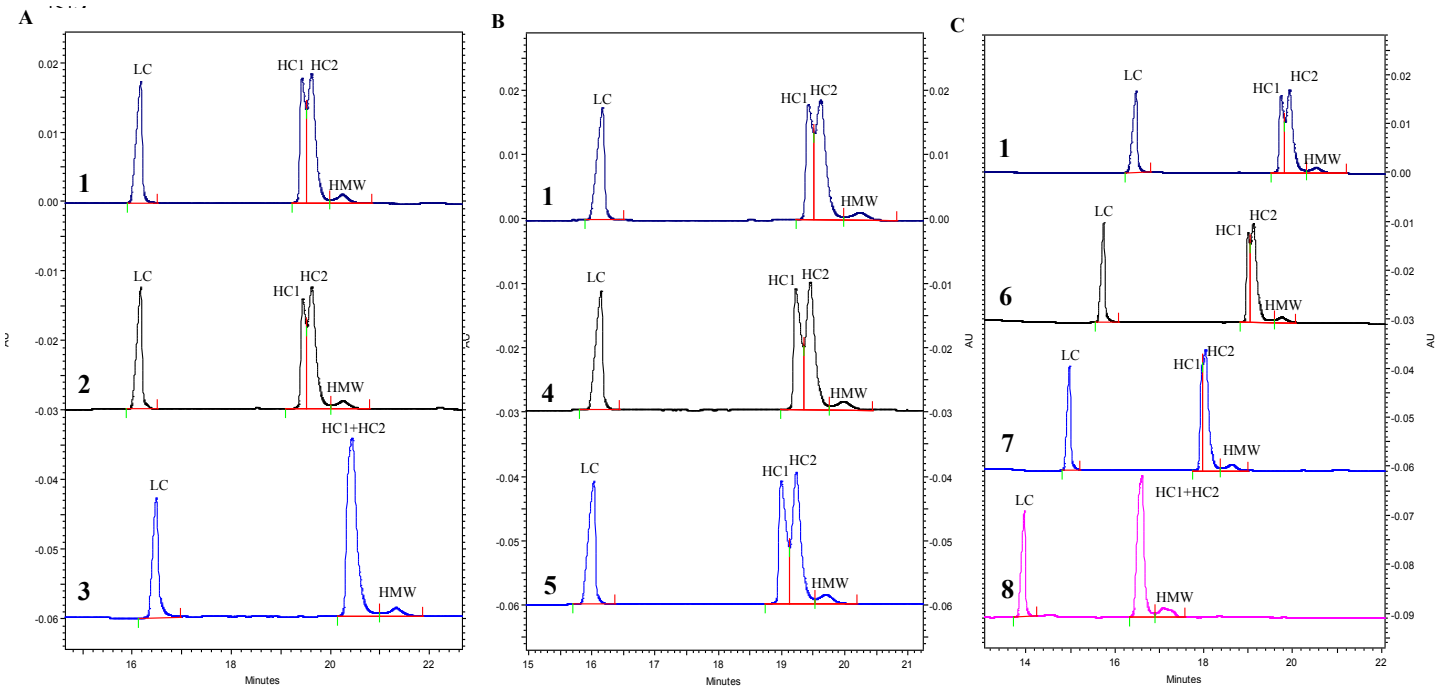


图3. 不同分离凝胶缓冲液和样品缓冲液对双抗还原模式下两条重链分离情况的比较。图中标注的编号为实验编号，不同实验对应的分离凝胶缓冲液和样品缓冲液存在差异，如表1所示。

表1. 变性剂SHS的添加对双抗的还原CE-SHS纯度及HC1-HC2间分离度数据统计表

实验编号	变性剂组成		双抗纯度/%	HC1-HC2间分离度
	分离缓冲液	样品缓冲液		
1	0.2%SDS+0.2%SHS	1%SDS+0.2%SHS	96.07	0.53
2	0.2%SDS+0.2%SHS	1%SDS	96.08	0.55
3	0.2%SDS	1%SDS+0.2%SHS	95.41	0
4	0.2%SDS+0.4%SHS	1%SDS+0.2%SHS	96.09	0.86
5	0.2%SDS+0.6%SHS	1%SDS+0.2%SHS	96.25	0.93
6	0.5%SDS+0.2%SHS	1%SDS+0.2%SHS	96.59	0.35
7	1%SDS+0.2%SHS	1%SDS+0.2%SHS	95.4	0.1
8	2%SDS+0.2%SHS	1%SDS+0.2%SHS	92.65	0

与蛋白的疏水性基团会更容易结合。随着分离凝胶缓冲液中的SHS浓度增多，SHS与SDS竞争与蛋白结合，导致两条重链之间的差异性增大，从而促进了两条重链的分离。但在实验过程中发现，当分离凝胶缓冲液中SHS浓度为0.4%和0.6%时，随着时间延长，由于SHS在常温下的溶解度较低，分离凝胶缓冲液容易出现浑浊，所以本文采用了0.2%作为SHS的最终添加浓度。此外，本文还在0.2%SHS分离凝胶缓冲液的基础上提高了SDS的浓度，分别为1%、2%、4%，探讨了分离凝胶缓冲液中SDS的浓度对该双抗的两条重

链分离度的影响。如图3C所示，由上往下，随着0.2%SHS分离凝胶缓冲液中SDS浓度的逐渐提高，双抗的两条重链的出峰时间逐渐缩短，分离度降低，分别为：0.53、0.35、0.1、0，如表1中实验1、6、7和8所示。这可能是因为随着分离凝胶缓冲液中的SDS增多，一方面SDS会与分离凝胶缓冲液中的SHS竞争，降低了两条重链与变性剂（包括SDS和SHS）结合物的差异，从而导致两条重链的分离度降低；另一方面，分离凝胶缓冲液中更多的SDS与蛋白在分离过程中进一步结合，致使其荷质比升高，从而导致其出峰提前。

综合多个实验因素可以看出：在分离凝胶缓冲液中添加变性剂SHS更加有助于对该双抗在还原模式下两条重链的分离。为此，本文采用自配的0.2% SHS凝胶缓冲液作为对该双抗纯度分析的分凝胶，用于监控其生产工艺的合理性。

3.3 CE-SHS双抗纯度分析重复性考察

为了更好的证明该方法的稳定性，本文采用0.2%SHS分离凝胶和0.2%SHS样品缓冲液对该双抗还原模式下的纯度分析进行了重复性考察，如图4和表2所示，详细展示了连续4针的分析结果。轻链和两条重链（HC1、HC2）的迁移时间RSD均小于0.34%，校正峰面积百分比均小于0.61%，不同蛋白片段之间的分离度RSD均小于1.62%。结果证明：优化后的CE-SHS方法具有很好的重复性，适合于该双抗的纯度分析。

表2. 双抗样品CE-SHS纯度分析的迁移时间、校正峰面积百分比及分离度数据统计表

编号	MT/min				CAP/%				Resolution (USP)		
	LC	HC1	HC2	HMW	LC	HC1	HC2	HMW	LC-HC1	HC1-HC2	HC2-HMW
Rep1	16.34	19.61	19.81	20.43	32.93	25.15	38.08	3.84	12.05	0.60	1.50
Rep2	16.30	19.56	19.76	20.38	32.96	24.85	38.34	3.85	12.06	0.59	1.50
Rep3	16.26	19.51	19.72	20.32	32.96	25.06	38.18	3.81	12.02	0.60	1.48
Rep4	16.22	19.46	19.66	20.27	32.55	25.15	38.37	3.92	12.04	0.58	1.47
RSD/%	0.32	0.33	0.32	0.34	0.61	0.56	0.36	1.02	0.14	1.62	1.01

备注：MT为迁移时间，CAP为校正峰面积百分比

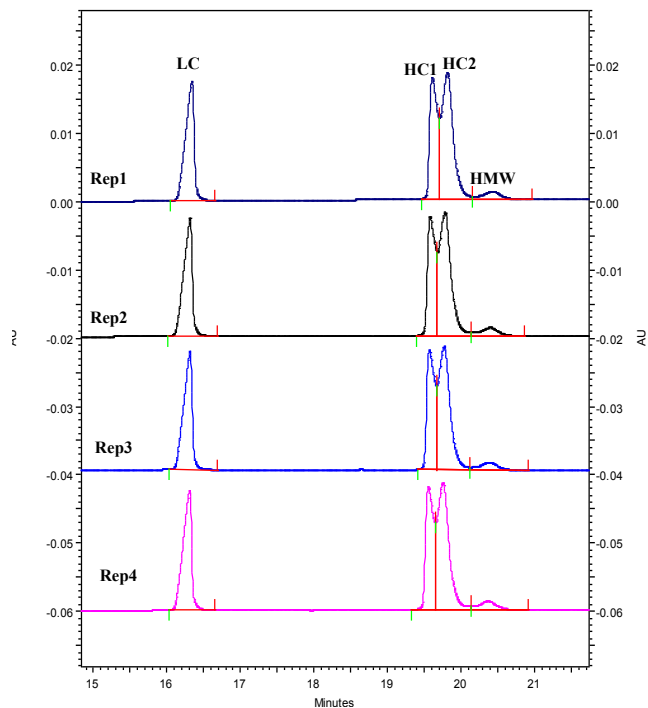


图4. 单抗样品CE-SHS纯度分析的电泳图

4. 结论

本文通过在商品化分离凝胶缓冲液和样品缓冲液中的变性剂进行了优化，开发了对双抗纯度分析的CE-SHS方法，并对其可能影响分离的一些因素进行了考察。该方案主要优势主要体现在：

1. 分离凝胶缓冲液中SHS的加入有效改善了分子量相近的蛋白片段的分离。
2. 该方法重复性好，轻链和两条重链的迁移时间RSD均小于0.34%，校正峰面积百分比均小于0.61%，不同蛋白片段之间的分离度RSD均小于1.62%。
3. 该方案为复杂生物制品的纯度分析提供了一种新的优化思路，如双抗、高糖基化融合蛋白、重组蛋白疫苗等；

参考文献

1. BECKMAN, Jeff, et al. Purity determination by capillary electrophoresis sodium hexadecyl sulfate (CE-SHS): a novel application for therapeutic protein characterization. *Analytical chemistry*, 2018, 90.4: 2542-2547.
2. 高铁, 刘冬科, 陈泓序. 使用快速冲洗CE-SDS分离方法提高IgG纯度分析的检测通量, RUO-MKT-02-15180-ZH-A.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT02-15821-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：SCIEX-China