

使用快速冲洗CE-SDS分离方法提高IgG纯度分析的检测通量

High Throughput Detection of IgG Purity by Using Quick Rinse CE-SDS Separation Method

高铁, 刘冬科, 陈泓序

Gao Tie, Liu Dongke, Chen Hongxu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Key Words : CE-SDS; Quick Rinse; PA 800 Plus; Capillary Gel Electrophoresis; IgG

1. 前言

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (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监测治疗性单抗产品在生产过程中产生的可能影响药物疗效或患者安全的杂质, 为产品放行提供了纯度相关的检测数据。

随着生物制药公司项目的增多, 相关单抗的检测数量也急剧上升。为满足生物制药企业更高通量, 更快速检测的需求, 本文介绍了快速冲洗的CE-SDS分离方法用于单抗类药物的分离和纯度分析。在快速冲洗分离方法下, 针间冲洗时间大幅减少, 还原法制备单抗类药物 (IgG-R) 和非还原法制备单抗类药物 (IgG-NR) 分析方法中的针间冲洗时间由之前的15 min减少至3 min, 每针节省12 min; 在该条件下, 本技术说明考察了连续8针IgG-R、IgG-NR样品中各峰迁移时间、校正峰面积百分比、分离度, 统计结果均显示出良好的重现性。还原结果中LC和HC的迁移时间、校正峰面积百分比的RSD均小于1, NGHC和HC的分离度均大于1; 非还原结果中主峰的迁移时间、校正峰面积百分比的RSD均小于1, 分离度均大于0.9, 并符合药典要求的系统适用性标准。该方法可有效缩短检测时间, 有利于提高样品的采集通量和分析效率。

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10.1 (SCIEX); 离心机; 分析天平; 金属浴。

2.2 试剂及耗材

IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit (PN: A10663), 该试剂盒内容见表1。2-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich PN M7154), 碘乙酰胺 (Sigma-Aldrich PN I1149)。Centricon YM-30超滤管 (Millipore PN 4208)。

250 mM碘乙酰胺配置: 称取碘乙酰胺46 mg, 加入去离子水1 mL。盖紧瓶盖然后充分混匀直到完全溶解, 尽快取用并避免光照。碘乙酰胺需用现配, 避光保存。

表1. IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit

成分	规格
Gel Buffer, 专利配方, pH 8, 0.2% SDS	140 mL
Sample Buffer-100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% SDS	50 mL
熔融石英毛细管, 50 μm I.D.	2根
IgG Control Standard	1 mL
Internal Standard, 10 kDa protein, 5 mg/mL	0.4 mL
酸性冲洗液, 0.1N HCl	100 mL
碱性冲洗液, 0.1N NaOH	100 mL

2.3 样品及前处理

本实验所用IgG样品浓度为10 mg/mL, 且所含盐的终浓度小于50 mmol/L (如超出, 需进行超滤), 准备两个1.5 mL离心管, 分别依次加入10 μL样品溶液、90 μL样品缓冲液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% SDS)、2 μL 10 kDa内标, 其中一个离心管加入5 μL 2-巯基乙醇作为还原法制备IgG样品, 另一个离心管加入5 μL碘乙酰胺溶液作为非还原法制备IgG样品。盖上瓶盖, 充分混合后离心1 min。然后置于70 °C金属浴10 min。取出后冷却即可上机实验。

2.4 运行方法

PA 800 Plus毛细管电泳仪，检测器：PDA，220 nm；采集频率：4 Hz；样品室温度：25 °C；毛细管温度：25 °C；窗口狭缝：2号（200 μm × 100 μm）；毛细管：熔融石英毛细管，内径50 μm，20/30.2 cm有效/总长。

还原法制备单抗类药物（IgG-R），非还原法制备单抗类药物（IgG-NR）的CE-SDS快速冲洗分离方法与常规CE-SDS分离方法的时间对比见表2。在常规分离方法的基础上，IgG-R、IgG-NR快速冲洗分离方法均取消了NaOH，HCl，H₂O的冲洗，并将SDS Gel的冲洗时间由原来的10 min缩短至3 min。IgG-R分析中电压分离时间为25 min，IgG-NR分析中电压分离时间为35 min。

表2. IgG-R、IgG-NR CE-SDS快速冲洗分离方法与常规CE-SDS分离方法时间对比表

事件	时间	
	常规方法	快速冲洗方法
NaOH冲洗	3 min	0 min
HCl冲洗	1 min	0 min
H ₂ O冲洗	1 min	0 min
SDS Gel冲洗	10 min	3 min
等待	0 min	0 min
等待	0 min	0 min
进样	20 sec	20 sec
等待	0 min	0 min
电压分离	25/35 min (R/NR)	25/35 min (R/NR)
总分析时间	40.33/50.33 min (R/NR)	28.33/38.33 min (R/NR)
节省时间/针	12 min	

3. 分析与讨论

快速冲洗CE-SDS分离方法对IgG还原、非还原样品的分析见图1。使用2-巯基乙醇进行样品还原处理，IgG-R快速冲洗分离方法采集得到了IgG-R分析结果，见图A；连续8针采集的IgG-R样品叠加谱图见图C。使用碘乙酰胺进行样品非还原处理，IgG-NR快速冲洗分离方法采集得到了IgG-NR分析结果，见图B；连续8针采集的IgG-NR样品叠加谱图见图D。

8针IgG-R和IgG-NR样品的迁移时间，校正峰面积百分比，分离度的重现性数据见表3。IgG-R分析中，轻链（LC）、重链（HC）

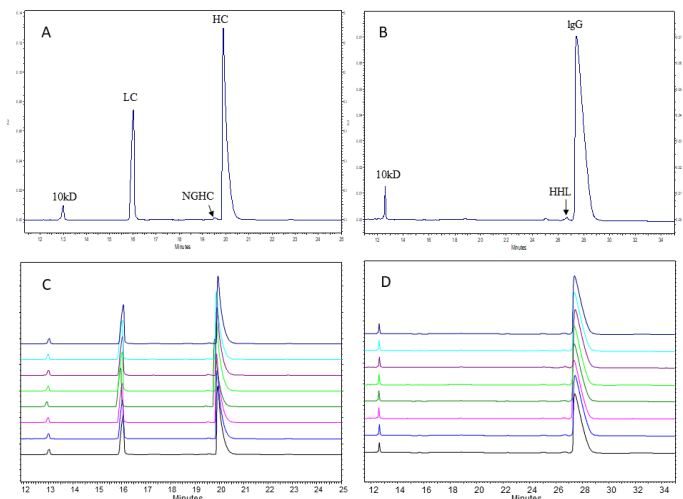


图1. 快速冲洗CE-SDS分离方法对IgG还原、非还原样品的分析。A. IgG-R样品分析图谱，B. IgG-NR样品分析图谱，C. IgG-R重复性考察图谱（n=8），D. IgG-NR重复性考察图谱（n=8）

迁移时间RSD < 0.3%，且第1针和第8针重链的绝对迁移时间仅相差0.02 min，LC、HC校正峰面积百分比RSD < 0.1%，非糖化重链（NGHC）和HC的分离度均大于1.3。IgG-NR分析中，IgG主峰迁移时间RSD < 0.2%，且第1针和第8针主峰的绝对迁移时间仅相差0.02 min，校正峰面积百分比RSD < 0.05%，IgG主峰与重重轻链（HHL）分离度均大于0.9。

表3. 快速冲洗分离方法下IgG-R和IgG-NR重复性数据统计（n=8）
（MT: 迁移时间，min；CAP: 校正峰面积百分比，%；R: 分离度，USP）

Analysts	IgG-R			IgG-NR			
	LC	HC	IgG	LC	HC	IgG	
No.	MT (min)	CAP (%)	R (USP)	MT (min)	CAP (%)	R (USP)	
1	16.03	32.06	1.41	19.90	67.44	27.43	98.67
2	16.01	32.07	1.42	19.88	67.44	27.35	98.63
3	15.95	32.06	1.38	19.79	67.44	27.37	98.65
4	16.01	32.07	1.39	19.88	67.44	27.38	98.59
5	16.03	32.05	1.38	19.89	67.45	27.44	98.57
6	16.01	32.03	1.38	19.87	67.46	27.38	98.59
7	16.06	32.06	1.39	19.93	67.45	27.39	98.59
8	16.05	32.03	1.37	19.92	67.47	27.41	98.54
SD	0.03	0.02	0.02	0.04	0.01	0.03	0.04
Average	16.02	32.05	1.39	19.88	67.45	27.39	98.60
RSD%	0.21%	0.05%	1.22%	0.21%	0.02%	0.11%	0.04%

4. 结论

本文方法将常规CE-SDS时间程序冲洗时间由原来的15 min缩短至现在的3 min, IgG-R与IgG-NR实验的运行时间均可节省12 min/针, 连续8针IgG样品采集结果显示各分析参数均具有良好的重现性。还原结果中LC和HC的迁移时间、校正峰面积百分比的RSD均小于1, NGHC和HC的分离度均大于1; 非还原结果中主峰的迁移时间、校正峰面积百分比的RSD均小于1, 分离度均大于0.9; 且符合药典系统适用性中对HC或IgG绝对迁移时间相差小于1 min的要求。本文的方法可缩短检测时间, 显著提高生物药企业在单抗类药物纯度分析方面的检测通量和分析效率。

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。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15180-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](#)