

使用 ZF-LC-0001 分子排阻色谱 (SEC-HPLC) 通用流动相对单克 隆抗体与抗体偶联药物进行分析



作者

杭州舟帆生物科技有限公司

应用简报

生物制药

蛋白类药物如单克隆抗体和抗体偶联药物因具有极佳的治疗效果与靶向作用正以火箭般的速度飞速发展，但这些药物为患者带来健康的同时，也为药品研发人员带来更大的压力。因其在诸多环境暴露下的不稳定性，需要制药科学家们对药物质量进行持续监控，以满足生产和临床需要。蛋白质在制备，生产和运输存储过程中可能面对着如冻融，高温和震荡的多重压力，随之而来的是对蛋白聚集体增多的担忧，蛋白聚集会影响用药安全，严重的蛋白聚集还可能增加临床使用时患者免疫源性的风险。令人欣慰的是，分子排阻色谱法作为监控蛋白类药物聚集体的有效手段已经成为一项金标准。我们使用 ZF-LC-0001 分子排阻色谱 (SEC-HPLC) 通用流动相对单克隆抗体与抗体偶联药物进行分析，获得了令人及其满意的效果。



前言

蛋白类药物如多肽，重组蛋白，单/多克隆抗体或抗体偶联药物在生产，运输，储存过程中多会发生聚集。蛋白质药物聚集可能发生于细胞培养收获，纯化，预制剂处方研究与货架存储阶段，监管部门要求药品生产商或研究单位必须对聚集体进行定性和定量分析。定性分析可以使用如分析型超速离心技术（AUC）或分子排阻色谱法与多角度静态光散射技术联用（SEC-MALS）等高灵敏技术，定性分析的目的主要在于确定蛋白质聚集物是由多少个单体分子聚集而成，而定量分析则使用分子排阻色谱法（SEC-HPLC）进行。SEC-HPLC 的使用已经标准化，各研究单位可以根据各自的蛋白分子量选择标准的商业化色谱柱进行定量分析，并且使用工业界经验选择流动相，这些流动相一般为含盐的水溶液，并调配到一定的 pH 值使分析可以顺利进行。一般的，聚体的定性分析可以在新药注册上市销售之前，而定量分析则需要贯穿蛋白药物研究的始终，盖因蛋白聚集量要在最初就需予以控制，防止在研发最终阶段引起的不便。令人担忧的是，含盐流动相在 SEC-HPLC 分析过程中会面临流动相的细菌生长，在流动相中加入 0.5-1M 氯化钠会产生一定的抑菌效果，可效果有限并且带来盐析出堵塞仪器的风险，一般向流动相中加入 0.2M 氯化钠以平衡风险，但流动相仍然长菌。之前，在含盐流动相中加入少许叠氮化钠可以抑制细菌生长，随着化学品监管逐渐严格，这项手段也成为不可能。在蛋白药物研发阶段，如预制剂处方开发阶段，往往需要进行多处方筛选设计与全面的应力实验，这些应力实验包括高温，冻融，光照与振荡，实验的全面设计会带来分析量的增加，如一次头碰头 SEC-HPLC 分析会大于 200 个样本 (N=3)，这使得液相分析的时间大于 4 天。通常，一个序列的分析中间不可以中断，若意外中断会带来新的校准和系统平衡，且中断前的数据仍需要进行质量保证评估才可以使用。ZF-LC-0001 SEC-HPLC 通用流动相可以进行持续分析，常规条件下十天之内不会影响分析。

材料与方法

样品与试剂

实验中所用到的样品包括 5 个单克隆抗体与 2 个抗体偶联药物均来着合作方浙江大学药学院生物药制剂与分析团队。实验中所用的相关实际采购自国药集团、上海麦克林生化科技有限公司与上海阿拉丁生化科技股份有限公司，均为分析级。

SEC-HPLC 参数

表 1 列出了使用 ZF-LC-0001 流动相 (10×) 进行 SEC 液相分析的色谱参数

参数	条件
ZF-LC-0001 流动相 (10×)	稀释十倍使用
柱温箱温度	25°C
流速	0.5mL/min
紫外检测	280nm

实验参数

- 按照常规配方进行配比制备本次实验所用不含舟帆生物特有配方流动相。分别将对照组与 ZF-LC-0001 流动相 (1×) 罐装至干净透明透明的 1L 流动相瓶中，于 0, 1, 2, 5, 10 天时拍照留样，记录图片。
- 将 mAb-X 样品平行制备 6 份，前 3 份在一日之内进样分析两个轮次，后 3 份于次日进样一个轮次，用以验证日内精密度和日间精密度。并将此样品分别以 8 个梯度进样量浓度做标准曲线。
- 最后，分析了 5 种单克隆抗体与 2 种抗体偶联药物并对比检验与常规流动相差异。

结果

与对照组流动相相比，ZF-LC-0001 流动相显示出优异的抗菌效力，结果显示对照组流动相于第 1 天即出现肉眼可见异物，并于第 2 天现象加重，第 5 天取样与第 10 天取样拍照后发现两者状态相似。ZF-LC-0001 流动相直至第 10 天仍然保持清澈透明，见图 1，此留样阶段的流动相被用于后面实验的分析。使用 ZF-LC-0001 在常规分析环境下放置 10 天后的流动相对重组抗人 ER2 抗体因子单克隆抗体样品进行日内精密度与日间精密的分析，见图 2。

数据表明流动相在放置 10 天后仍然有非常好的日内精密度与日间精密度：[保留时间 (Time) 与总峰面积 (mAU) 分别为图 A, C]，以区分序列间日内的精密度。后 3 份于第 2 日进样一个轮次，与第 1 日第二轮次进样进行日间精密度的对比 (保留时间与总峰面积分别为图 B, D)。

图 C 两组数据平均值的变异系数为 0.08, 1.59%，图 D 两组数据的变异系数为 0.32, 0.08%，图 C, D 三组数据间的变异系数为 1.65%。各数据点均为所属相应 3 份样品数据的平均值。

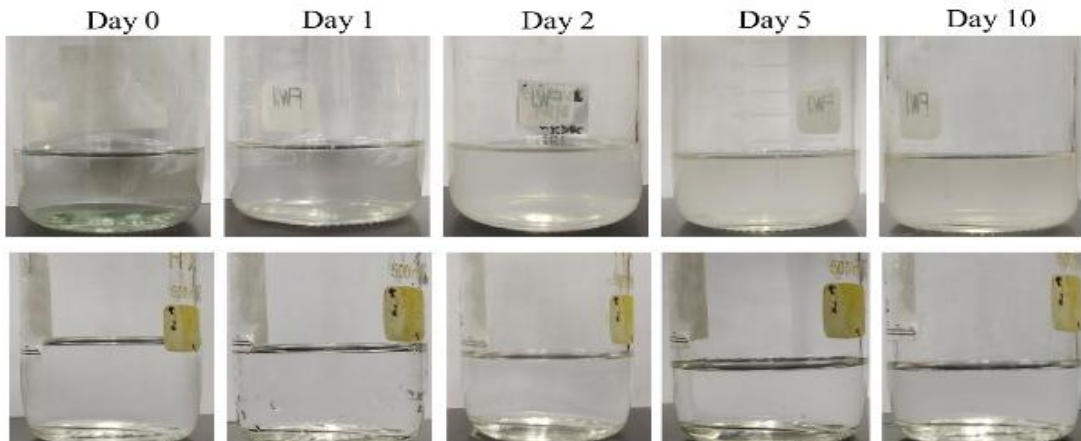


图 1 常规流动相与舟帆生物 ZF-LC-0001 流动相抑菌效力对比

图 3 显示了使用 ZF-LC-0001 分析重组抗人 ER2 抗体因子单克隆抗体 8 个进样量梯度的过程， $R^2=0.9999$ ，数据表明，在仪器最大分析限度内，进样梯度的变化对数据的准确性影响较小。

最后，使用 ZF-LC-0001 分析了 5 个单克隆抗体与 2 个抗体偶联药物的分子排阻色谱，为了使数据带有代表性，我们将 7 个蛋白药物全部使用纯水稀释至 1mg/mL，统一进样，图 4 显示出 ZF-LC-0001 流动相无论在一般的单克隆抗体药物或是疏水性较强的抗体偶联药物中均可以达到普适性分析的效果，并且

于低浓度进样下，蛋白聚集与单体仍然显示出极好的分离度和分辨率。图 5 的数据提示，图 5 中，与常规流动相对比下，ZF-LC-0001 获得更加完美的峰形，峰宽更窄，拖尾得到改善，这避免可能的为减少拖尾向流动相中加入有机溶剂，进一步避免盐溶液析堵塞分析系统，造成序列意外终止的风险。

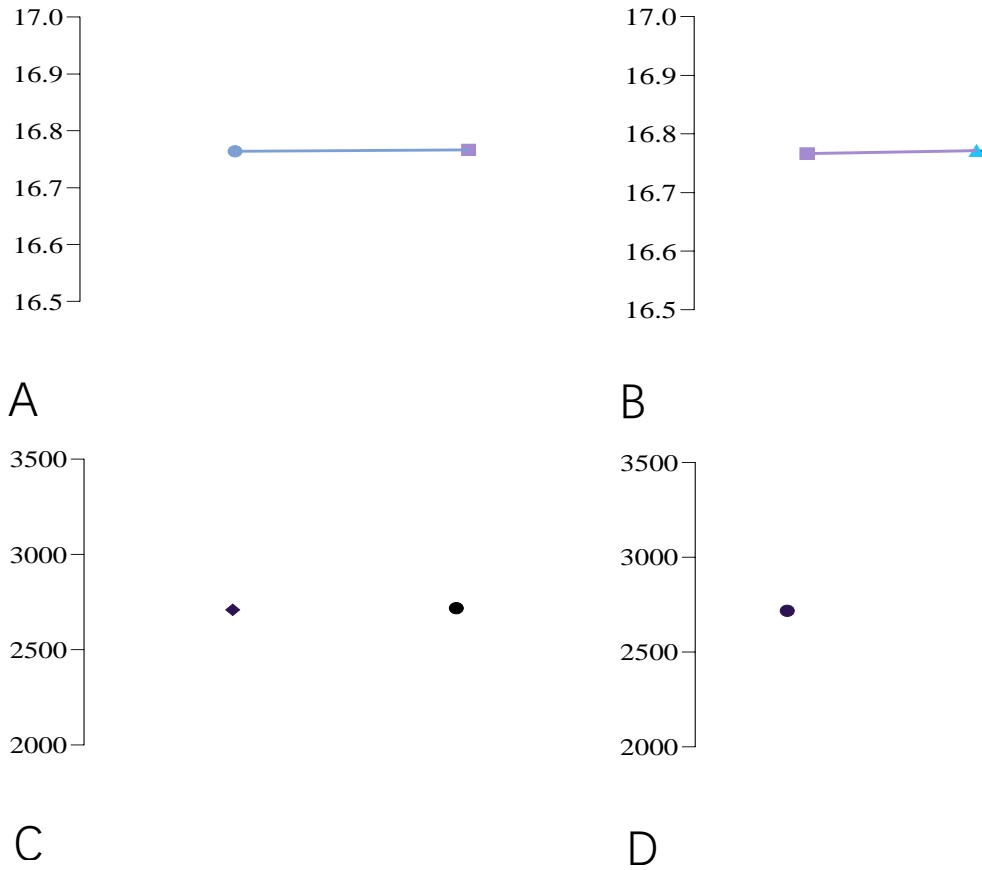


图 2 舟帆生物 ZF-LC-0001 流动相日内精密度和日间精密度的数据表

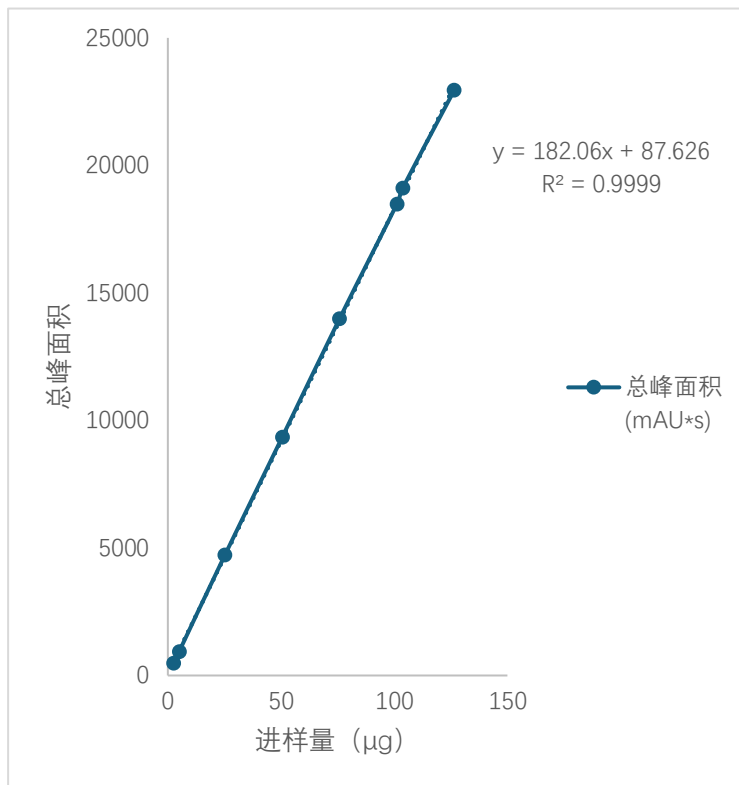


图 3 舟帆生物 ZF-LC-0001 流动相线性数据表

表 2 进样量与总峰面积线性数据表

进样量 (μg)	总峰面积 (mAU*s)
2.53	475.19
5.06	950.76
25.30	4739.83
50.60	9356.50
75.90	13997.90
101.20	18488.70
103.73	19109.80
126.50	22942.00

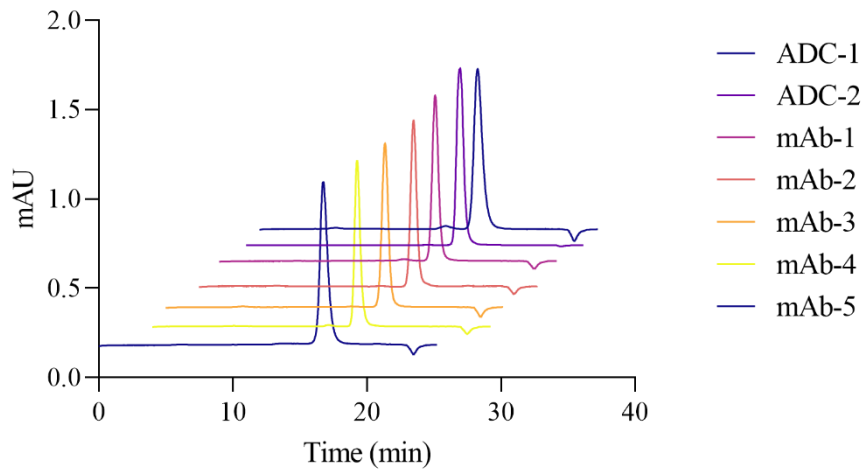


图 4 5 种单克隆抗体与 2 种抗体偶联药物在低浓度下进样的 SEC 色谱图

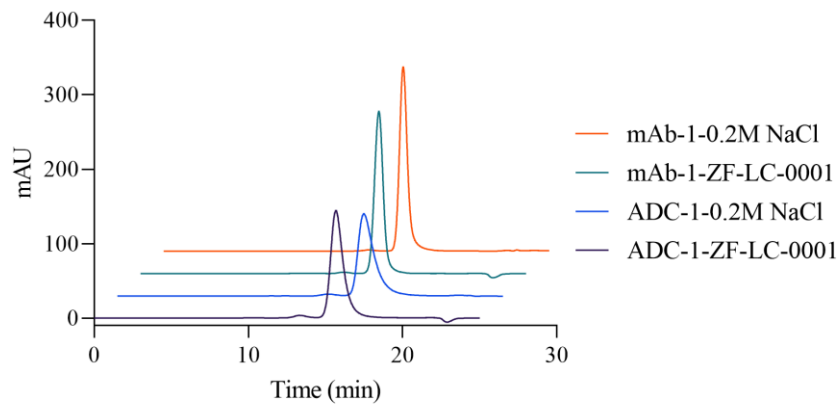
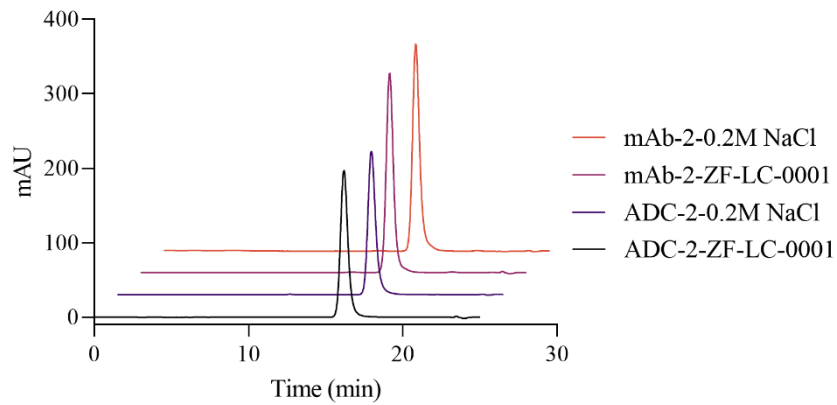


图 5 使用 ZF-LC-0001 分析 2 种单克隆抗体与 2 种抗体偶联药物与常规高盐流动相的 SEC 色谱图

结论

在分析过程中舟帆生物的 ZF-LC-0001 SEC-HPLC 通用流动相表现出优异的抗菌能力，在日常使用时段，可以保持 10 天内不产生肉眼可见异物，这极大的保护贵重仪器和高价值耗材不会在分析过程中受损。使用常规分析条件下放置 10 天的流动相仍然达到令人满意的日内和日间稳定性与可观的线性数据，最后我们普适性的分析单克隆抗体与抗体偶联药物，在与实验室常用的含有 0.2M 氯化钠的流动相对比下，舟帆生物的流动相获得了更好的峰形与优化的拖尾程度，还分析了多肽与重组蛋白（数据未展示），说明舟帆生物的这款流动相可以商品化的替代业内常用的高盐流动相，满足长序列分析的需要，避免分析序列意外终止的风险，且此流动相使用方便，特殊的配方与专有的防腐处方对人体无危害与环境污染风险。

声明

其他法人单位由此文件中产生任何后果产生
均与杭州舟帆生物科技有限公司无关

本文件展示的数据为参考数据，数据更新恕
不另行告知

杭州舟帆生物科技有限公司
公元 2024 年 9 月 23 日

联系我们

试用装申请

杭州舟帆生物技术有限公司
18616342660

北京西美杰科技有限公司
<http://www.xmjsci.com>

技术支持

杭州舟帆生物技术有限公司
18616342660

购买与询价

北京西美杰科技有限公司
010-88597838 400-050-4006

