

# 新型离子交换色谱柱在pH梯度下检测不同类型的双特异性抗体

史俊霞, 金琦芸, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

## 关键词

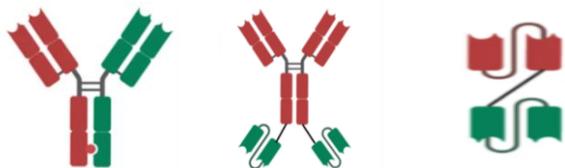
双特异性抗体, ProPac Elite WCX, MAbPac SCX-10 RS, CX-1 pH Buffer

## 摘要

本文使用新型离子交换色谱柱ProPac Elite WCX 5  $\mu$ m 4.0 mmX150 mm色谱柱和CX-1 Buffer缓冲液, 进行pH梯度高分辨率分析非对称型双特异性抗体和对称型的IgG类抗体, 使用MAbPac SCX-10 RS 5 $\mu$ m 4.6 mmX50 mm色谱柱和CX-1 Buffer缓冲液, 进行pH梯度高分辨率分析片段型双特异性抗体。解决了等电聚焦电泳和其他色谱分离模式不能分离的杂质异构体。给双特异性抗体的QC方法控制提供参考。

## 1.引言

双特异性抗体 (Bispecific Antibody) 因其能同时特异性结合两种抗原或者两个表位的抗体分子, 可以发挥两种单抗联合的协同作用, 成为当下最热门的新药研发方向之一。其作用机制主要包括介导免疫细胞杀伤、双靶点信号通路阻断以及促进蛋白形成功能性复合体三种。这些优异的特性, 使得国内外制药巨头纷纷布局该产线, 目前比较常见的双抗结构有: 非对称的IgG型双抗 (图一), 对称的IgG型双抗 (图二) 和片段型双抗 (图三), 结构的复杂性和多样性, 使得表征和制备该类样品困难重重, 本文采用新型离子交换色谱柱ProPac Elite WCX色谱柱和线性CX-1 pH Buffer缓冲液高分辨率分析非对称的IgG型双抗和对称的IgG型双抗, 使用MAbPac SCX-10 RS 5 $\mu$ m 4.6 mmX50 mm色谱柱和CX-1 Buffer缓冲液分析片段型双抗, 方案可用于相关双抗药物质量研究表征和QC放行。



图一 非对称IgG型双抗 图二 对称IgG型双抗 图三 片段型双抗

## 2.实验部分

### 2.1 仪器, 色谱柱与试剂

- 1.1.1 Ultimat 3000 Bio RS
- 1.1.2 Vanquish Flex UHPLC
- 1.1.3 ProPac Elite WCX 5 $\mu$ m 4.0 mm X150 mm (Thermo Fisher公司 P/N302972)
- 1.1.4 MAbPac SCX RS 5 $\mu$ m 4.6 mm X50 mm (Thermo Fisher公司 P/N 082674)
- 1.1.5 超纯水
- 1.1.6 CX-1pH缓冲液 250mL (P/N 085349)

### 2.2 样品信息

- 2.2.1 样品1: 非对称IgG型双抗  
样品2: 对称IgG型双抗  
样品3: 片段型双抗
- 2.2.2 样品制备方法: 样品原始浓度进样

### 2.3 色谱和检测器条件

#### 2.3.1 pH梯度条件下弱阳离子交换柱分离非对称型双抗

色谱柱: ProPac Elite WCX 5 $\mu$ m 4.0 mmX150 mm

流动相: A: CX-1 Buffer A稀释10倍(pH5.6)

B: CX-1 Buffer B稀释10倍(pH10.2)

梯度条件:

时间 (min)	A%	B%
-8	60	40
0	60	40
15	45	55
15.1	0	100
17	0	100

柱温: 40°C  
 流速: 0.8 mL/min  
 样品: 非对称IgG型双抗 6 mg/mL  
 进样体积: 2 μL  
 检测波长: UV 280nm  
 仪器: Ultimat 3000 Bio RS

### 2.3.2 pH梯度条件下弱阳离子交换柱分离对称型双抗

色谱柱: ProPac Elite WCX 5μm 4.0 mmX150 mm  
 流动相: A: CX-1 Buffer A稀释10倍(pH5.6)  
 B: CX-1 Buffer B稀释10倍(pH10.2)

梯度条件:

时间 (min)	A%	B%
-8	60	40
0	60	40
5	30	70
15	0	100
17	0	100

柱温: 室温  
 流速: 0.8 mL/min  
 样品: 对称IgG型双抗 6 mg/mL  
 进样体积: 10 μL  
 检测波长: UV 280 nm  
 仪器: Vanquish Flex UHPLC

### 2.3.3 pH梯度条件下强阳离子交换柱分离片段型双抗

色谱柱: MAbPac SCX RS 5μm 4.6 mmX50mm  
 流动相:  
 A: CX-1 Buffer A稀释10倍+50 mmol/L NaCl(pH5.6)  
 B: CX-1 Buffer B稀释10倍+50 mmol/L NaCl(pH10.2)

梯度条件:

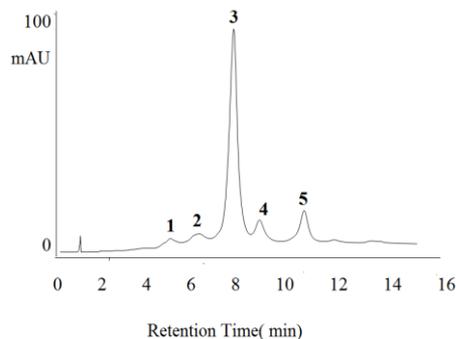
时间 (min)	A%	B%
-4	95	5
0	95	5
18	75	25
18.1	0	100
20	0	100

柱温: 室温  
 流速: 0.5 mL/min  
 样品: 片段型双抗 3 mg/mL  
 进样体积: 10 μL  
 检测波长: UV 280nm  
 仪器: Vanquish Flex UHPLC

## 3.实验结果与讨论

### 3.1.1非对称IgG型双抗分析结果

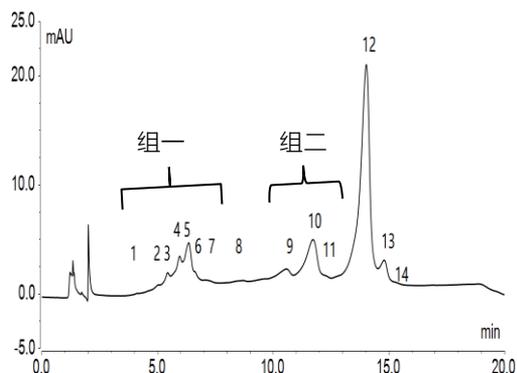
如图四所示本次分析的非对称IgG型双抗在ProPac Elite WCX 色谱柱上,使用CX-1 Buffer 在 pH梯度下洗脱样品,可以得到两个酸性峰和两个碱性峰杂质。



图四 非对称IgG型双抗pH梯度分离谱图

### 3.1.2 对称IgG型双抗分析结果

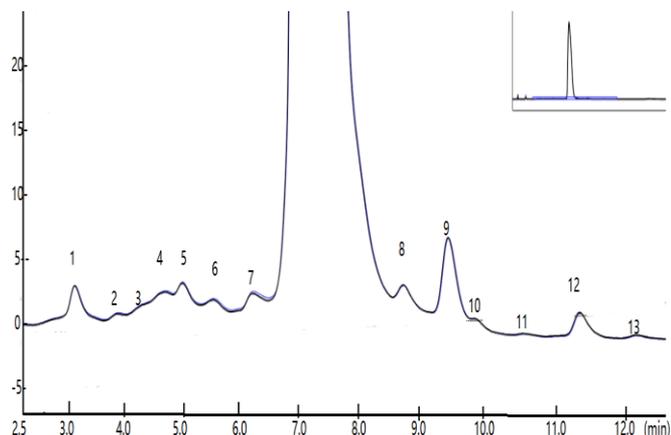
如图五所示本次分析的对称IgG型双抗在ProPac Elite WCX 色谱柱上,使用CX-1 Buffer 在pH梯度下洗脱样品,可以得到两组酸性峰,组一含有8个酸性组分,组二含有3个酸性组分,总计11个酸性峰和2个碱性峰杂质。从此结果看该样品的酸峰组成比一般的单抗更复杂多样。



图五 对称IgG型双抗pH梯度分离谱图

### 3.1.3 片段型双抗分析结果

如图六所示本次分析的片段型双抗在MAbPac SCX-10 RS 色谱柱上，在CX-1 Buffer+50 mmol /L NaCl 体系下，洗脱样品，可以得到7个酸性峰和6个碱性峰杂质。



图六 片段型双抗pH梯度+盐梯度分离谱图

## 4. 实验结论

双特异性抗体作为一类双靶点药物，是近年来最热门的研发领域之一，因生产工艺的差异使得其在电荷异构体分析中更具有挑战性，常规的盐梯度方法很难较好的分离出酸碱变体，本

文使用商品化的CX-1 Buffer在弱阳离子交换柱ProPac Elie WCX和强阳离子交换柱MAbPac SCX-10 RS 柱子上可以实现较好的分离，且该方法只需要将流动相稀释10倍，或者添加少量的NaCl就可以实现较好的分离。本文中研究的非对称IgG型双抗，对称IgG型双抗和片段型双抗在该方法下都可以实现酸碱变体的较好的分离，是一种快速方便的双特异性抗体电荷异构体分析平台方法。该方法为双特异性抗体的表征和质量控制提供了新的解决方案。

## 参考文献

- [1] 双特异性抗体药物研究进展 中国医药生物技术 李锋
- [2] Finney, A.F.(2019) Bispecific Antibodies: New Strategies and Case Studies in Antibody Engineering& Therapeutics 2019 San Diego, CA
- [3] MAbPac SCX-10 Product Manual ThermoFisher Scientific Company
- [4] ProPac Elite WCX Product Manual ThermoFisher Scientific Company
- [5] CX-1 pH Gradient Buffer Product Manual ThermoFisher Scientific Company



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
www.thermofisher.com

**Thermo Fisher**  
SCIENTIFIC