

CESI 8000 Plus进行CE-SDS蛋白纯度分析方法的联合验证

Multi-Laboratory Validation for the Purity Analysis of Protein Products in CE-SDS Method Using CESI 8000 Plus

高铁, 任挺钧, 张晓霞, 陈泓序

Gao Tie, Ren Tingjun, Zhang Xiaoxia, Chen Hongxu

SCIEX, 中国

SCIEX, China

Keywords: Multi-laboratory validation; Biopharmaceutical analysis; CESI 8000 Plus; CE-SDS;

前言

十二烷基硫酸钠毛细管电泳法 (Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate, CE-SDS) 是目前生物制药企业中单克隆抗体药物 (monoclonal antibody, mAb) 纯度/大小异质性表征的主要手段。与传统的SDS-PAGE相比, CE-SDS可以提供更高的分辨率和重现性, 并可实现自动的紫外检测器 (UV) 或激光诱导荧光检测器 (LIF) 检测。因此, 成为各企业进行蛋白药物研发和质控中纯度测定的标准方法而被广泛应用。继2006年完成了CE-SDS方法的全球多实验室联合验证后¹, 中国食品药品检定研究院于2012年组织了国内实验室的联合验证。参加验证的仪器全部为PA 800 Plus。实验结果满意, CE-SDS方法被收录中国药典2015版第三部中²。

SCIEX于2015年推出了CESI 8000 Plus。该系统既可通过无鞘液的方式实现CE与MS的联用, 同时还保留了毛细管电泳仪的光学检测功能, 上市以来受到越来越多的企业关注和使用。为了进一步验证CESI 8000 Plus匹配光学检测器进行CE-SDS蛋白纯度分析的稳定性与可靠性, 我们在3个实验室的CESI 8000 Plus上进行了CE-SDS方法的多实验室联合验证。

本研究遵循ICH的指导原则, 进行了系统完整的方法验证。主要考察了方法的特异性、精密度、准确度、线性范围和定量限等, 各项指标均获得了满意的验证结果。结果表明, CESI 8000 Plus匹配光学检测器进行蛋白纯度分析在不同实验室之间获得准确、重现和一致的结果, 适用于CE-SDS单克隆抗体纯度/大小异质性的表征。

试剂和方法

试剂和样品

样品缓冲液: 40 mM、pH 6.5 的磷酸盐缓冲液 (NaH₂PO₄(VWR, PN 0571), Na₂HPO₄·7H₂O (MP, PN 191441)); 1% (W/V) SDS (Sigma, PN 436143));

还原剂: 2-巯基乙醇(Sigma, PN 97622);

烷基化试剂: 0.8 mol/L碘乙酰胺 (Sigma, PN 11149);

毛细管冲洗液: 0.1 mol/L 氢氧化钠 (SCIEX), 0.1 mol/L 盐酸 (SCIEX), 二次去离子水 (Millipore);

分离缓冲液: SDS 凝胶缓冲液 (SCIEX, PN A30341)。

单抗样品: IgG1, 中国食品药品检定研究院提供。初始浓度为 49.9 mg/mL, 实验时用样品缓冲液稀释至1 mg/mL。

空白试剂: 样品缓冲液。

样品前处理方法

还原样品制备: 取单抗样品溶液(1 mg/mL) 95 μ L, 加入2-巯基乙醇5 μ L, 涡旋混匀; 68-72 $^{\circ}$ C孵育 15 min, 冷却至室温后 6000 rpm 离心 1 min。取 75 μ L 转移至毛细管电泳仪的样品瓶中, 立即进行分析。

非还原样品制备: 取样品溶液(1 mg/mL) 95 μ L, 加入 0.8 mol/L 碘乙酰胺 5 μ L, 涡旋混匀; 68-72 $^{\circ}$ C孵育 5 min, 冷却至室温后 6000 rpm 离心 1 min。取 75 μ L 转移至毛细管电泳仪的样品瓶中, 立即进行分析。

还原/非还原空白试剂的制备: 95 μ L 空白试剂代替样品溶液进行相应处理。

仪器及方法

参与本次验证的3台仪器编号为CE01, CE02, CE03。所选用仪器均为CESI 8000 Plus, 匹配UV检测器。毛细管: 20/30 cm(有效/总长度), 50 μm 内径; 分离条件: -15 kV, 40 min; 进样条件: -10 kV, 30 s(还原)/40 s(非还原); 毛细管温度: 20 °C; 样品室温度: 20 °C; 检测波长: 214 nm; 窗口狭缝: 100 × 800 μm。

毛细管针间冲洗和胶填充: 0.1 mol/L氢氧化钠溶液在 60 psi 压力下冲洗3 min, 0.1 mol/L 盐酸溶液在 60 psi 压力下冲洗2 min, 二次去离子水在70 psi 压力下冲洗1 min。SDS 凝胶缓冲液在50 psi 压力下冲洗15 min。

方法验证及结果讨论

根据 ICH 指导性原则进行了特异性、精密度、准确度、线性度范围和定量限的验证。

特异性

在此验证中利用单抗样品及空白试剂进行还原与非还原法的前处理, 进行特异性考察, 结果如图1。与空白试剂图谱(Blank)结果比较, 还原(R)样品的电泳图中呈现轻链(Light Chain, LC)、非糖重链(Non Glycosylated Heavy Chain, NGHC)、重链(Heavy Chain, HC)和 P1-P5共5个杂质峰; 非还原(NR)样品的电泳图中呈现完整IgG(Monomer)和 P1-P5共5个杂质峰, 空白试剂在样品出峰位置无峰信号。证明该方法能够特异性检测样品的特征峰和杂质峰。

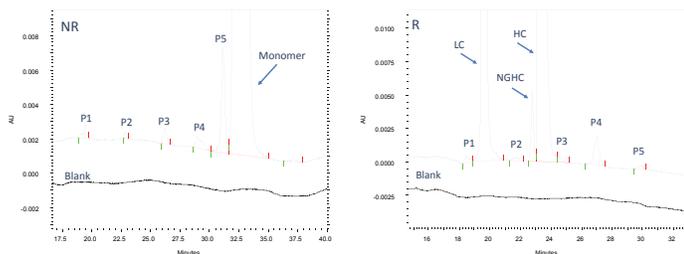


图1. 还原(R)与非还原(NR)单克隆抗体 CE-SDS 分析的典型图谱。

精密度

在 ICH 指导原则中, 精密度分为进样重复性、中间精密度及样品制备重复性。

进样重复性

在进样重复性的验证中, 利用单抗样品分别制备为系统适应性标准品和样品, 根据表 1 中提到的顺序进行还原和非还原样品的运行。还原样品的 CE-SDS 实验中以 LC、NGHC和HC为目标峰, 非还原样品的 CE-SDS 实验中以Monomer为目标峰。

每个实验室连续运行 6 针同一目标浓度样品(1 mg/mL), 结果显示四个主峰的含量和迁移时间具有良好的重复性。3个实验室对四个目标峰的迁移时间的RSD均小于3%, 如表2; 而校正峰面积百分比在每个实验室也具有较好的重现性, 从表3中可看出, LC 校正峰面积百分比的 RSD 为0.846%, HC 校正峰面积百分比的 RSD 为1.975%, NGHC 校正峰面积百分比的 RSD 为0.528%, IgG Monomer 校正峰面积百分比的 RSD 为 0.096%。

表1. 重复性验证中的进样顺序。

Injection number	Sample ID	
	Reduced	Non-reduced
1	Ref-R-1	Ref-NR-1
2	Sample1-R	Sample1-NR
3	Sample2-R	Sample2-NR
4	Sample3-R	Sample3-NR
5	Sample4-R	Sample4-NR
6	Sample5-R	Sample5-NR
7	Sample6-R	Sample6-NR
8	Ref-R-2	Ref-NR-2
9	Blank-R	Blank-NR

表2. 重复性中迁移时间的 RSD (n=6, 3个实验室)。

Lab	Migration time			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	19.09	22.04	22.41	32.01
CE02 Ave.	19.88	22.96	23.40	32.76
CE03 Ave.	18.96	21.91	22.30	31.12
AVERAGE	19.31	22.30	22.70	31.96
SD	0.501	0.574	0.604	0.817
RSD	2.593%	2.574%	2.658%	2.555%

表3. 重复性中校正峰面积百分比的 RSD (n=6, 3个实验室)。

Lab	CPA%			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	30.46	1.15	67.22	95.99
CE02 Ave.	30.93	1.13	66.59	96.15
CE03 Ave.	30.88	1.17	66.64	96.16
AVERAGE	30.76	1.15	66.82	96.10
SD	0.260	0.023	0.353	0.092
RSD	0.846%	1.975%	0.528%	0.096%

中间精密度

本次验证考察了以日期为首要的典型变异因素，样品前处理及进样顺序与进样重复性验证一致，测定三天的重复性。表4和表5为LC、NGHC、HC和Monomer 四个目标峰的迁移时间和校正峰面积百分比的结果。从结果上看3个实验室的迁移时间和校正峰面积百分比具有良好的重复性。四个目标峰的迁移时间的 RSD 在1.193%-1.201%；而校正峰面积百分比的RSD 范围为0.620%-1.643%。

表4. 中间精密度中迁移时间的 RSD (n=3, 3个实验室)。

Lab	Migration time			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	19.01	21.88	22.27	32.22
CE02 Ave.	19.12	22.08	22.50	31.86
CE03 Ave.	18.69	21.56	21.97	31.13
AVERAGE	18.94	21.84	22.24	31.74
SD	0.226	0.261	0.267	0.553
RSD	1.193%	1.194%	1.201%	1.743%

表5. 中间精密度中校正峰面积百分比的 RSD (n=3, 3个实验室)。

Lab	CPA%			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	31.53	1.23	66.04	95.68
CE02 Ave.	30.67	1.21	66.73	94.92
CE03 Ave.	31.59	1.21	66.00	96.19
AVERAGE	31.26	1.22	66.26	95.60
SD	0.514	0.010	0.411	0.637
RSD	1.643%	0.848%	0.620%	0.667%

样品制备重复性

本次验证考察了在 3 个不同实验室的样品制备重现性，每个样品平行配置6份，同样按照表 1 的顺序运行样品，计算重复性。表6和表7为四个目标峰的迁移时间和校正峰面积百分比的结果。从结果上看，3个实验室的样品制备重复性均良好，迁移时间的RSD值在1.944%-2.831%，校正峰面积百分比的RSD值范围为0.142%-3.444%。

表6. 样品制备重复性中迁移时间的 RSD (n=6, 3个实验室)。

Lab	Migration time			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	19.86	22.90	23.28	31.86
CE02 Ave.	19.94	23.03	23.46	32.61
CE03 Ave.	18.94	21.86	22.24	31.38
AVERAGE	19.58	22.60	22.99	31.95
SD	0.554	0.643	0.661	0.621
RSD	2.831%	2.847%	2.875%	1.944%

表7. 样品制备重复性中校正峰面积百分比的 RSD (n=6, 3个实验室)。

Lab	CPA%			
	Reduced		Non-Reduced	
	LC	NGHC	HC	Monomer
CE01 Ave.	31.42	1.23	66.11	95.85
CE02 Ave.	31.13	1.16	66.30	96.05
CE03 Ave.	33.16	1.23	64.41	96.11
AVERAGE	31.90	1.21	65.61	96.00
SD	1.099	0.042	1.041	0.137
RSD	3.444%	3.506%	1.587%	0.142%

准确度

根据 ICH 指导原则，应该在线性范围内进行 9 次测定，以评估方法的准确度。在本次验证中，我们使用加标回收的方法来评估方法的准确性。在实验中，设计样品浓度分别为：0.50 mg/mL、0.75 mg/mL、1.00 mg/mL (目标浓度)、1.25 mg/mL 和 1.50 mg/mL，每个浓度重复三针。利用每种浓度的平均总峰面积建立校准曲线。利用校准曲线和方程式1 计算回收率：

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{averaged total peak area from 3 injections at a sample concentration}}{\text{total peak area at this sample concentration on the calibration line}} \times 100 \quad (1)$$

3个实验室按照每个浓度重复3针的平均值进行计算回收率，还原样品的CE-SDS回收率范围为96.4%-103.9%，非还原样品的CE-SDS回收率范围为92.6%-104.9%，结果见表8。

表8. 样品准确度结果 (n=5, 3个实验室)。

lab	Accuracy (% Recovery by Sample Dilution)		
	Protein Conc. (mg/mL)	Reduced %R	Non-Reduced %R
CE01	0.5	99.9	92.6
	0.75	103.9	104.9
	1	97.7	102.0
	1.25	96.4	101.9
	1.5	102.6	97.3
CE02	0.5	98.3	102.2
	0.75	101.8	97.3
	1	99.2	100.0
	1.25	100.8	101.3
CE03	1.5	99.5	99.5
	0.5	98.1	99.3
	0.75	100.0	97.8
	1	102.4	102.0
	1.25	99.7	102.2
	1.5	99.4	98.2

线性范围

利用准确度实验中的5个浓度数据进行方法的线性范围测定。3个实验室中，还原样品的CE-SDS方法线性的R²范围为0.997-1.000；非还原样品的CE-SDS方法线性的R²范围为0.988-0.999。结果表明该方法在浓度0.5 mg/mL-1.5 mg/mL之间具有良好的线性。

表9. 样品线性范围结果 (n=5, 3个实验室)。

	R ²	
	Reduced	Non-Reduced
CE01	0.997	0.999
CE02	0.997	0.999
CE03	1.000	0.988

定量限(LOQ)

在定量限的测定中，以目标浓度 (1.00 mg/mL) 进行样品的梯度浓度稀释，共5个浓度梯度，分别为0.250 mg/mL、0.125 mg/mL、0.063 mg/mL、0.031 mg/mL、0.015mg/mL，分别进行还原和非还原的前处理，每个梯度重复运行3次。利用最小二乘回归建立了三次运行的总峰面积和样品浓度之间的校准曲线，并根据校准曲线y截距的标准偏差 (σ) 和平均斜率的标准偏差 (s) 计算了定量限 (10σ/s)。对于还原样品的CE-SDS法，以LC和HC为目标峰。对于非还原样品的CE-SDS法，以Monomer为目标峰。3个实验室的定量限在还原、非还原处理样品的实验中分别为0.001-0.009 mg/mL和0.002 mg/mL，如表10。结果表明CE-SDS方法具有较高的检测灵敏度。

表10. 样品定量限结果 (n=5, 3个实验室)。

	LOQ (mg/mL)	
	Reduced	Non-Reduced
CE01	0.009	0.002
CE02	0.002	0.002
CE03	0.001	0.002
Ave	0.004	0.002

结论

本研究使用CESI 8000 Plus进行了CE-SDS方法的多实验室联合验证，依据ICH的指导原则，对还原样品和非还原样品进行了特异性、精密度、准确度、线性度范围和定量限的验证。进样重复性、中间精密度和样品制备重复性的四个目标峰在迁移时间和校正峰面积百分比上的RSD值均小于3%；准确度实验中，还原样品回收率范围为96.4%-103.9%，非还原样品回收率范围为92.6%-104.9%；线性范围的考察中，在浓度0.5 mg/mL-1.5 mg/mL之间均体现出较好的线性；定量限结果低至0.001 mg/mL。通过同一型号仪器，不同实验室的联合验证结果，证明CESI 8000 Plus具备良好的蛋白纯度/分子大小异质性表征能力，可广泛用于生物制药企业对蛋白药物的研发和质控。

参考文献

1. Chromatogr., 64, 359-368; (2006) A series of collaborations between various pharmaceutical companies and regulatory authorities concerning the analysis of biomolecules using CE.
2. 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 484.

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。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-11122-ZH-A



RUO-MKT-02-11122-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：021-2419-7200
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835

官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)