

# 毛细管电泳法检测含聚乙二醇的曲妥珠单抗的纯度

麻旭<sup>1,2</sup>, 屈晨<sup>2</sup>, 田橙<sup>2</sup>, 武涛<sup>2</sup>, 丁晓娜<sup>2</sup>, 李志国<sup>2</sup>, 曹晓林<sup>2</sup>, 黄岗<sup>2</sup>, 狄斌<sup>1</sup>

(1.中国药科大学 药学院,南京 211198;2.上海药明生物技术有限公司 分析科学部,上海 200131)

**摘要:**在抗体制剂中,处方中的聚乙二醇(PEG)会影响利用十二烷基硫酸钠毛细管电泳技术(CE-SDS)对蛋白进行纯度检测.当使用 CE-SDS 技术分析处方辅料中含有聚乙二醇 8000(PEG8000)的曲妥珠单抗时,电泳谱图中的主峰后会出现由此分析方法造成的伪高分子量峰(伪 HMW 峰),对峰面积法计算蛋白纯度造成干扰.针对含质量分数为 2%~7% PEG8000 的曲妥珠单抗,尝试采用样品溶液替换、提高样品溶液制备时的变性孵育温度和在样品溶液中添加尿素的方式消除该伪 HMW 峰.结果表明,以下 3 种条件可用于消除由 2%~7% PEG8000 造成的伪 HMW 峰:提升样品溶液制备时的变性孵育温度至 80 ℃;提升样品溶液制备时的变性孵育温度至 70 ℃并在样品溶液中加入 2 mol/L 尿素;提升样品溶液制备时的变性孵育温度至 60 ℃并在样品溶液中加入 4 mol/L 尿素.该研究拓展了毛细管电泳技术在单克隆抗体产品纯度分析的应用,并为其他抗体药物的纯度分析方法提供了参考.

**关键词:**毛细管电泳;抗体;聚乙二醇;纯度

**中图分类号:**R917

**文献标志码:**A

近年来,单克隆抗体类药物发展迅速,其制药工艺愈发成熟和多样化,抗体类生物制剂在全球医药市场的销售额和市场占有率逐年上升.在此大环境下,系统化的质量控制体系对确保该类药物的安全性和有效性至关重要,也给抗体药物的质量控制工作带来了巨大挑战.在质量控制工作中,关键质量属性(CQA)的检测是极其重要的部分,而纯度性质又是 CQA 中最常见、最普遍的产品属性之一.现如今,在全球医药监管领域,包括中国、美国、欧洲、日本、新加坡、俄罗斯等各国家和地区的药典中均要求在抗体药物工艺开发的整个生命周期中进行持续的产品纯度检测和控制.

毛细管电泳(CE)和液相色谱(LC)是两种主要的抗体药物纯度分析方法.CE 是分离和分析蛋白质分子片段和电荷变异体的关键分析技术.在所有的毛细管电泳方法中,毛细管凝胶电泳法(CGGE)是抗体蛋白纯度分析和质量控制体系最常用到的方法<sup>[1]</sup>.随着 CGE 技术的发展,后续衍生出的十二烷基硫酸钠毛细管凝胶电泳技术(CE-SDS)也逐渐成熟,成为制药工业界目前常用的分析方法.CE-SDS 的分离介质是填充在毛细管中的连续凝胶,该凝胶作为样品分离通道,在毛细管中形成分子筛.此外,该方法还利用十二烷基硫酸钠(SDS)掩盖蛋白质的固有电荷,使所有的蛋白分子带有相同的电荷质量比( $z/m$ ),并打破了蛋白分子内的非共价相互作用.在施加恒定电场后,蛋白质会根据其分子量大小以不同的速度迁移,从而实现抗体药物的纯度分析.据报道,已有多位科学家使用 CE-SDS 方法检测抗体的纯度<sup>[2-5]</sup>.

抗体药物制备过程中引入的添加剂,如聚乙二醇(PEG),会影响 CE-SDS 的纯度分析.PEG 是抗体类产品制剂配方中的常见辅料,并可作为添加剂辅助蛋白纯化工艺.据报道,PEG 可防止蛋白质聚集<sup>[6]</sup>,也可防止蛋白质在纯化过程中发生变性<sup>[7]</sup>.然而,在毛细管电泳检测过程中,PEG 组分和 SDS 在供试品混合溶液中具有相反的电荷,PEG 可通过静电力与 SDS 结合<sup>[7]</sup>.在混合溶液中,蛋白质分子也会通过疏水作用与过量的 SDS 结合,形成相同荷质比的复合体<sup>[8]</sup>.荷质比相同的组分在电泳过程中受到相同的驱动力.但随着 PEG 质

收稿日期:2020-05-07;修回日期:2021-01-20.

基金项目:国家自然科学基金(81773693)

作者简介:麻旭(1995-),男,河北邢台人,中国药科大学硕士研究生,主要从事药物分析研究,E-mail:18360860369@163.com.

通信作者:狄斌(1973-),男,湖南长沙人,中国药科大学教授,博士,主要从事药物分析研究,E-mail:dibin@cpu.edu.cn.

量分数的增加,PEG 捕获本应与蛋白质结合的 SDS,使某些蛋白质分子无法被 SDS 完全包裹,从而导致荷质比减小,缺少 SDS 包裹的蛋白质组分的移动速度慢于完全包裹 SDS 的蛋白质组分,导致这些蛋白质组分在主峰后出峰,形成高分子量峰<sup>[7]</sup>.此高分子量峰会影响抗体纯度的判断,给抗体药物的工艺开发、质量控制和商业生产带来不利影响.到目前为止,还没有针对此问题解决方法的报道.

曲妥珠单抗是一种主要作用于人类表皮生长因子受体 2(HER2)胞外结构域的重组人源化单克隆抗体,曲妥珠单抗可通过阻止 HER2 胞外结构域分裂、阻断细胞内信号通路、干扰 DNA 修复等方式杀灭肿瘤细胞,其被 FDA 批准作为治疗 HER2 阳性乳腺癌的单一用药或化疗联合用药<sup>[9-10]</sup>.本研究以曲妥珠单抗为模型,首先使用体积排阻色谱技术证明在非变性的原始条件下,PEG8000 不会诱导抗体聚集.毛细管电泳谱图中的高分子量峰是由 CE-SDS 样品处理不完全导致.为消除该高分子量峰,本研究考察了样品溶液替换、样品溶液制备时的变性孵育温度、样品溶液中添加尿素的浓度 3 个因素对含有 PEG 的曲妥珠单抗 CE-SDS 纯度分析的影响.本研究找到了显著降低高分子量峰的方法,保证了抗体药物纯度分析的准确性.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

本研究中使用的抗体样品为注射用曲妥珠单抗(Roche Pharma 公司,商品名为赫赛汀),PEG8000(SIGMA-ALDRICH 公司,BCBZ7337),尿素(SIGMA 公司,BCBV3136),SDS-MW 凝胶缓冲液(Beckman Coulter 公司,M710117),十二烷基硫酸钠(SIGMA 公司,STBH0756),N-乙基马来酰亚胺(Thermo SCIENTIFIC 公司,TD264408),柠檬酸一水合物(上海波尔化学试剂有限公司,20170701),无水磷酸氢二钠(上海实验试剂有限公司,20180227),无水磷酸二氢钠(上海实验试剂有限公司,20171227),氯化钠(上海实验试剂有限公司,20190122).超纯水来自 Thermo SCIENTIFIC GenPure UV-TOC / UF \* CAD plus.

### 1.2 仪器和软件

毛细管电泳分析在配备 100  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  孔径检测窗口(Beckman Coulter,144558)和光电二极管阵列(PDA)检测器的 SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统上进行.毛细管由贝克曼库尔特公司制造(总长度 30.2 cm,有效长度 20.2 cm,内径 50  $\mu\text{m}$ ,外径 375  $\mu\text{m}$ ,批号:M808561).体积排阻色谱分析在 Agilent1260 分析系统上进行.色谱柱选用 TSKgel G3000SWXL 色谱柱(7.8 mm  $\times$  300 mm,5  $\mu\text{m}$ ).加热块由 Fisher Scientific 制造(LS-D202).离心机由 Eppendorf 制造(5424R).涡旋振荡器由 IKA 制造(MS3 digital).10 kDa 过滤膜由 Amicon 制造(批号:R8NA38121).Empower<sup>®</sup>3(Waters)用于数据分析.

### 1.3 体积排阻色谱分析

将 200  $\mu\text{g}$  抗体样品与 14 mg PEG8000 转移至 1.5 mL 离心管中,加入超纯水使溶液的最终体积达到 200  $\mu\text{L}$ ,充分溶解并转移至高效液相色谱进样小瓶.使用配备有 TSKgel G3000SWXL 色谱柱的 Agilent 1260 高效液相色谱仪进行试验.流动相采用 300 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 磷酸氢二钠溶液,并使用 300 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液将流动相 pH 值调至 6.8.检测波长选用 280 nm,柱温选用 25  $^{\circ}\text{C}$ ,流速选用 1.0 mL/min,洗脱时间为 20 min,进样体积为 100  $\mu\text{L}$ .

### 1.4 缓冲溶液替换

将 500  $\mu\text{g}$  抗体样品与 48.5 mg PEG8000 转移到具有 10 kDa 过滤膜的 500  $\mu\text{L}$  滤杯中,加入超纯水,使溶液的最终体积达到 500  $\mu\text{L}$ ,并充分溶解.将滤杯放置在滤液收集管中,并将滤液收集管在 14 000 r/min 和 4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 10 min.滤杯中的剩余样品是无法通过滤杯滤膜的抗体分子,缓冲溶液被收集在滤液收集管中.

### 1.5 毛细管电泳所需溶液的制备

100 mmol/L N-乙基马来酰亚胺溶液(NEM):称取 12.5 mg NEM,加入到 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL 超纯水使其充分溶解.避光并在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存以备使用.

磷酸盐-柠檬酸缓冲液(PB-CA):称取 225 mg 无水磷酸氢二钠和 95 mg 一水合柠檬酸,加入 50 mL 超纯水使其充分溶解,转移至 100 mL 容量瓶中并加超纯水定容.混匀后经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤并在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存.

十二烷基硫酸钠(SDS)样品缓冲液:称取 225 mg 无水磷酸氢二钠,95 mg 一水合柠檬酸和 1 000 mg 十二烷基硫酸钠,加入 50 mL 超纯水使其充分溶解,转移至 100 mL 容量瓶中并加超纯水定容.混匀后经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤并在室温保存.

酸性冲洗液(0.1 mol/L HCl):取 0.9 mL 盐酸溶液(37%,质量分数)加入 50 mL 超纯水中,混匀后转移至 100 mL 容量瓶中,加超纯水定容.混匀后经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,2~8  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存.

碱性冲洗液(0.1 mol/L NaOH):取 400 mg 氢氧化钠,在 50 mL 超纯水中充分溶解,混匀后转移至 100 mL 容量瓶中,加超纯水定容.混匀后经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,2~8  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存.

## 1.6 毛细管电泳分析样品的制备

空白对照样品制备:将 5  $\mu\text{L}$  的 100 mmol/L N-乙基马来酰亚胺、25  $\mu\text{L}$  PB-CA 溶液和 75  $\mu\text{L}$  SDS 样品缓冲液转移至 1.5 mL 离心管中,混匀并在 14 000 r/min 下离心 1 min,在 60  $^{\circ}\text{C}$  加热孵育 10 min.最后,将 90  $\mu\text{L}$  的溶液转移到 200  $\mu\text{L}$  的塑料小瓶中,用于 CE-SDS 分析.

样品制备:将 5  $\mu\text{L}$  的 100 mmol/L N-乙基马来酰亚胺、100  $\mu\text{g}$  赫赛汀、7.35 mg PEG8000、0.75 mg SDS 和 0.0~63.0 mg 尿素转移至 1.5 mL 离心管中.加入 PB-CA 溶液,使溶液总体积达到 105  $\mu\text{L}$ ,溶液中 SDS 的最终质量分数为 0.71%,溶液中 PEG8000 的最终质量分数为 7%,溶液中尿素的最终浓度达到 0~10 mol/L.混匀并在 14 000 r/min 下离心 1 min,在 50~80  $^{\circ}\text{C}$  加热孵育 10 min.最后,将 90  $\mu\text{L}$  的溶液转移到 200  $\mu\text{L}$  的塑料小瓶中,用于 CE-SDS 分析.

## 1.7 毛细管电泳分析

使用配备有 100  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  检测窗口和 PDA 检测器的 SCIEX PA 800 Plus 毛细管电泳抗体药物分析系统进行实验.分离毛细管采用内径为 50.0  $\mu\text{m}$ 、长度为 30.2 cm(有效长度为 20.2 cm)的非涂层毛细管.进样电压为 5.00 kV,进样时间为 20 s.分离电压为 15.0 kV,分离时间为 35 min.检测波长为 220 nm.每次进样前,毛细管用碱性冲洗液冲洗 3 min、酸性冲洗液冲洗 1 min、水冲洗 1 min 并填充进 SDS-MW 凝胶缓冲液以备样品电泳分析.

# 2 结果与讨论

## 2.1 处方辅料中含有 PEG8000 的曲妥珠单抗样品毛细管电泳谱图

本研究首先对由 PEG8000 导致毛细管电泳谱图中出现高分子量峰的情况进行了考察.通过调查处方辅料中使用的不同聚合度的 PEG,选择了可导致较明显高分子量峰出现的 PEG8000<sup>[7]</sup>.PEG8000 的质量分数选用了较常用的 7%<sup>[11-12]</sup>.在 CE-SDS 分析中,需要将蛋白样品稀释至 1 mg/mL 用于进样检测,最终进样溶液中的 PEG 质量分数取决于蛋白样品的初始质量浓度.为了建立一种通用的方法,本文中的 PEG8000 质量分数均指最终进样溶液中的质量分数.毛细管电泳结果如图 1 所示.当进样溶液中含有 7% 的 PEG8000 时,毛细管电泳谱图中会出现明显的高分子量峰,其峰面积占比为 74.0%.当换用 2%~7% 范围内的其他 PEG8000 质量分数时,也会有高分子量峰出现,其峰面积占比随着 PEG8000 质量分数的增加而增大.不含 PEG8000 的普通样品中则无高分子量峰.该高分子量峰已被体积排阻色谱技术证明是由 CE-SDS 样品处理不完全造成的伪高分子量峰(伪 HMW 峰).使用体积排阻色谱技术检测处方辅料中含有 PEG8000 的曲妥珠单抗样品所得结果中无高分子量峰出现,表明在非变性的原始条件下,PEG8000 不会诱导抗体聚集.伪 HMW 峰的出现会严重干扰样品纯度的检测,使毛细管电泳检测结果无法体现样品的实际纯度.本研究采用 3 种解决方式来消除毛细管电泳谱图中的伪 HMW 峰,分别为样品溶液替换、升高样品溶液制备时的变性孵育温度和在样品溶液中添加尿素.

## 2.2 样品溶液替换对伪 HMW 峰的消除作用

本研究测试了含有质量分数为 7% 的 PEG8000 的曲妥珠单抗样品,毛细管电泳检测结果如图 2 所示.由于 PEG8000 的聚合度较高,导致其无法透过样品溶液替换所使用的滤膜,无法分离抗体分子与 PEG8000 分子,所以经一次或两次样品缓冲溶液替换后,样品中伪 HMW 峰峰面积占比无明显改善.含有 7% PEG8000 未经溶液替换的样品伪 HMW 峰峰面积占比为 71.2%,含有 7% PEG8000 经一次溶液替换的样品伪 HMW

峰峰面积占比为 61.0%,含有 7% PEG8000 经两次溶液替换的样品伪 HMW 峰峰面积占比为 61.6%,当换用 2%~7% 范围内的其他 PEG8000 质量分数时,此方法也无法消除伪 HMW 峰.可见样品溶液替换法不能有效改善伪高分子量峰这一问题.

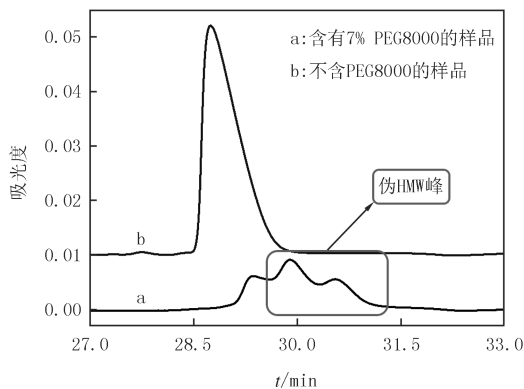


图1 7% PEG8000对毛细管电泳结果影响

Fig.1 The effect of 7% PEG8000 on capillary electrophoresis results

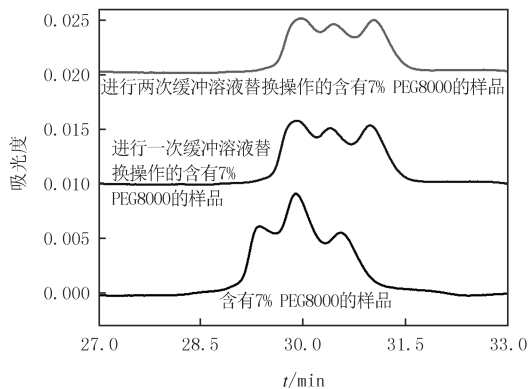


图2 替换缓冲溶液毛细管电泳结果图

Fig.2 The electropherograms of the samples with or without buffer exchange

### 2.3 提高样品溶液制备时的孵育温度对伪 HMW 峰的消除作用

样品溶液制备时较高的孵育温度会增加抗体分子内部动能,使抗体分子剧烈振动,破坏分子内部氢键和非极性疏水相互作用<sup>[13-14]</sup>,从而有利于抗体蛋白结构的展开,并增强其与 SDS 的结合竞争力.本研究分别尝试使用 50、60、70 和 80 °C 4 种孵育温度,曲妥珠单抗样品中 PEG8000 的质量分数为 7%,毛细管电泳检测结果如图 3 所示.50、60、70 和 80 °C 4 种孵育温度下的伪 HMW 峰峰面积占比分别为 90.2%、70.8%、4.8% 和 0.0%,可见升高样品溶液制备时的孵育温度可消除由 PEG8000 带来的伪 HMW 峰.当孵育温度上升到 80 °C 时,毛细管电泳结果中的伪 HMW 峰消失.当换用 2%~7% 范围内的其他 PEG8000 质量分数时,相应地提高孵育温度也可消除伪 HMW 峰.

### 2.4 在样品溶液中添加尿素对伪 HMW 峰的消除作用

在样品溶液中加入尿素可以大幅度降低抗体分子蛋白结构与溶剂的 Lennard-Jones 相互作用能,并且不会影响静电相互作用.它还可以降低抗体分子蛋白结构中亲水性侧链和疏水性侧链与骨架之间的相互作用能<sup>[15-16]</sup>.所以尿素也可以促进抗体分子蛋白结构的展开,并增强抗体分子蛋白结构与 SDS 结合的竞争力.本研究分别在 60 °C 和 70 °C 的样品制备孵育温度下尝试在样品溶液中加入不同浓度尿素消除伪 HMW 峰.

在 60 °C 的孵育温度下,尝试使用 0、2、4 和 6 mol/L 的 4 种尿素浓度消除伪 HMW 峰,曲妥珠单抗样品 PEG8000 的质量分数为 7%,毛细管电泳检测结果如图 4 所示.0、2、4 和 6 mol/L 的 4 种尿素浓度下的伪 HMW 峰峰面积占比分别为 74.2%、8.7%、0.0% 和 0.0%,可见在样品溶液中添加尿素可消除由 PEG8000 带来的伪 HMW 峰.当尿素浓度上升到 4 mol/L 时,毛细管电泳结果中的伪 HMW 峰消失.所以当孵育温度为 60 °C 时,可以通过加入 4 mol/L 尿素,消除由 7% PEG8000 产生的伪 HMW 峰.

在 70 °C 的孵育温度下,尝试使用 0、1、2、4、6 mol/L 的 5 种尿素浓度消除伪 HMW 峰,曲妥珠单抗样品中 PEG8000 的质量分数为 7%,毛细管电泳检测结果如图 5 所示.0、1、2、4 和 6 mol/L 的 5 种尿素浓度下的伪 HMW 峰峰面积占比分别为 5.2%、3.7%、0.0%、0.0% 和 0.0%,可见在样品溶液中添加尿素可消除由 PEG8000 带来的伪 HMW 峰.当尿素浓度上升到 2 mol/L 时,毛细管电泳结果中的伪 HMW 峰消失.所以当孵育温度为 70 °C 时,可以通过加入 2 mol/L 尿素,消除由 7% PEG8000 带来的伪 HMW 峰.当换用 2%~7% 范围内的其他 PEG8000 质量分数时,采用升高样品溶液制备时的变性孵育温度与在样品溶液中添加尿素相结合的方法也可消除伪 HMW 峰.根据以上数据,适当在样品溶液中添加尿素可以消除 PEG8000 对 CE-SDS 检测的影响.对于一些不能耐受较高变性温度的特定抗体样品,在样品溶液中添加尿素是解决该问题的一种有效方法.

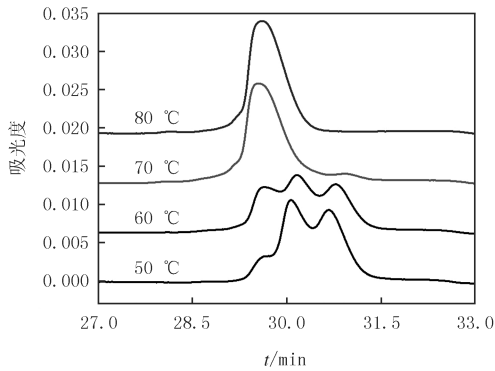


图3 提高孵育温度毛细管电泳结果图

Fig.3 The electropherograms of the samples under different incubation temperatures

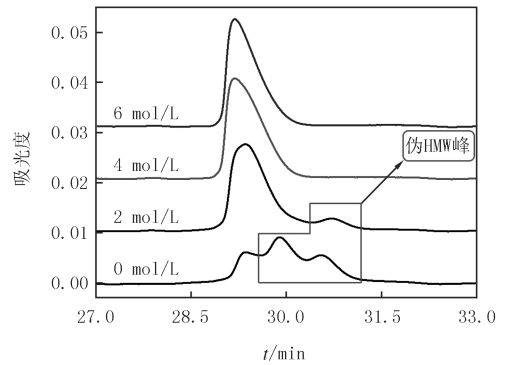
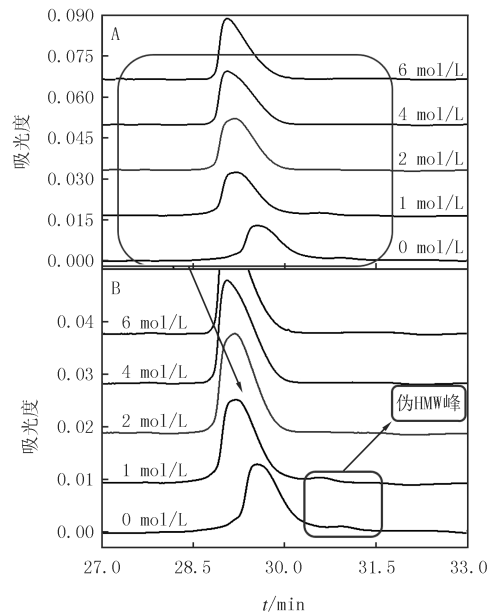


图4 孵育温度为60 °C加入尿素毛细管电泳结果图

Fig.4 The electropherograms of the samples that contain different concentrations of urea with the incubation temperature of 60 °C

### 3 结论

本研究通过尝试样品溶液替换、升高样品溶液制备时的变性孵育温度和样品溶液中添加尿素3种方式,解决了含有7% PEG8000的曲妥珠单抗样品的毛细管电泳图谱中伪HMW峰影响产品纯度分析的问题.结果表明,在毛细管电泳样品预处理时升高样品溶液制备时的变性孵育温度和加入尿素可有效消除蛋白抗体类产品电泳图谱中的伪HMW峰.对于可耐受较高温度的蛋白分子,可提高孵育温度至80 °C消除伪HMW峰;对于无法耐受较高温度的蛋白分子,可使用70 °C加热孵育并添加2 mol/L尿素,或60 °C加热孵育并添加4 mol/L尿素来消除伪HMW峰.此方法同样适用于处方辅料中含有2%~7% PEG8000的曲妥珠单抗样品检测.本研究提供了消除含有PEG的抗体样品毛细管电泳谱图中伪HMW峰的方法,扩展了毛细管电泳技术在抗体分析领域的应用.



A为全图,B为部分放大图.

图5 孵育温度为70 °C加入尿素毛细管电泳结果图

Fig.5 The electropherograms of the sample that contain different concentrations of urea with the incubation temperature of 70 °C

### 参 考 文 献

- [1] CREAMER J S, OBORNY N J, LUNTE S M. Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis[J]. Analytical Methods, 2014, 6(15): 5427-5449.
- [2] SHI Y, LI Z, LIN J. Advantages of CE-SDS over SDS-PAGE in Mab purity analysis[J]. Analytical Methods, 2012, 4(6): 1637-1642.
- [3] HUTTERER K M, HONG R W, LULL J, et al. Monoclonal antibody disulfide reduction during manufacturing: Untangling process effects from product effects[J]. mAbs, 2013, 5(4): 608-613.
- [4] MICHELS D A, PARKER M, SALAS-SOLANO O. Quantitative impurity analysis of monoclonal antibody size heterogeneity by CE-LIF: example of development and validation through a quality-by-design framework[J]. Electrophoresis, 2012, 33(5): 815-826.
- [5] NA D H, PARK E J, KIM M S, et al. Application of sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis to the characterization of ricin A-

- chain immunotoxins[J].Chromatographia,2012,75(11/12):679-683.
- [6] CASTELLANOS I J, CRESPO R, GRIEBENOW K. Poly(ethylene glycol) as stabilizer and emulsifying agent: a novel stabilization approach preventing aggregation and inactivation of proteins upon encapsulation in bioerodible polyester microspheres[J]. Journal of Controlled Release, 2003, 88(1): 135-145.
- [7] GUO W, SUN Y W, LUO G S, et al. Interaction of PEG with ionic surfactant SDS to form template for mesoporous material[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2005, 252(1): 71-77.
- [8] GUDIENSEN K L, GITLIN I, MOUSTAKAS D T, et al. Increasing the net charge and decreasing the hydrophobicity of bovine carbonic anhydrase decreases the rate of denaturation with sodium dodecyl sulfate[J]. Biophysical Journal, 2006, 91(1): 298-310.
- [9] YU K T, ZHAO J L, ZHANG Z K, et al. Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 497(1/2): 78-87.
- [10] PEIRIS D, SPECTOR A F, LOMAX-BROWNE H, et al. Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43006.
- [11] KAMIHIRA M, KAUL R, MATTIASSON B. Purification of recombinant protein A by aqueous two-phase extraction integrated with affinity precipitation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40(11): 1381-1387.
- [12] SUTTON R L. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in aqueous cryoprotectant solutions containing polymers[J]. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1991, 87(23): 3747.
- [13] ROCCO A G, MOLLICA L, RICCHIUTO P, et al. Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(6): 2241-2251.
- [14] DAY R, BENNION B J, HAM S, et al. Increasing temperature accelerates protein unfolding without changing the pathway of unfolding[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 322(1): 189-203.
- [15] CANCHI D R, GARCIA A E. Equilibrium studies of protein denaturation by urea-examining backbone and sidechain contributions[J]. Biophysical Journal, 2011, 100(3): 211a.
- [16] LINDGREN M, WESTLUND P O. On the stability of chymotrypsin inhibitor 2 in a 10 M urea solution. The role of interaction energies for urea-induced protein denaturation[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010, 12(32): 9358-9366.

## Determination of the purity of trastuzumab containing polyethylene glycol by capillary electrophoresis

Ma Xu<sup>1,2</sup>, Qu Chen<sup>2</sup>, Tian Cheng<sup>2</sup>, Wu Tao<sup>2</sup>, Ding Xiaona<sup>2</sup>, Li Zhiguo<sup>2</sup>, Cao Xiaolin<sup>2</sup>, Huang Gang<sup>2</sup>, Di Bin<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Analytical Sciences, Wuxi Biologics(Shanghai)Co., Ltd., Shanghai 200131, China)

**Abstract:** While polyethylene glycol is a commonly used additive in antibody drug formulations, it can interfere the purity test of proteins using sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis(CE-SDS). When testing a model monoclonal antibody, trastuzumab, that contains polyethylene glycol 8000(PEG8000) as an excipient in the formulation, a pseudo high molecular weight peak appears after the main peak, consequently disturbing the purity analysis by peak area integration method. In this study, different approaches were explored to eliminate the pseudo HMW peak in trastuzumab sample with mass fraction of PEG from 2% to 7%, including exchanging sample solution, increasing the incubation temperature, and adding urea. The results show that the following three conditions can be applied to eliminate the pseudo HMW peak in the presence of 2%–7% PEG8000: raising the denaturing incubation temperature to 80 °C; raising the denaturing incubation temperature to 70 °C and adding 2 mol/L urea; and raising the denaturing incubation temperature to 60 °C and adding 4 mol/L urea. This study expands the application of capillary electrophoresis in the field of antibody drug analysis.

**Keywords:** capillary electrophoresis; antibody; PEG; purity

[责任编辑 赵晓华 陈留院]