

使用BioResolve SCX mAb色谱柱开发单克隆抗体电荷异构体分析方法

Hua Yang, William J. Warren, Stephan M. Koza

Waters Corporation

摘要

本应用纪要重点介绍了开发阳离子交换色谱(CEX)固定pH盐梯度方法时需要考虑的因素。

简介

由于蛋白质治疗药物（包括单克隆抗体(mAb)）的电荷异质性可能会影响生物治疗药物的生物活性、安全性和稳定性，所以需要对这种电荷异质性进行表征和监测¹。离子交换色谱(IEX)一直被广泛应用于蛋白质电荷异构体的纯化、表征和常规监测分析。由于mAb的等电点(pI)相对较高，与阴离子交换色谱分离相比，阳离子交换色谱(CEX)更适合用于mAb电荷异构体的表征分析。本应用纪要介绍了开发CEX固定pH盐梯度方法时需要考虑的因素。其它与使用pH梯度有关的信息请参阅单独的沃特世应用纪要²。

借助沃特世高分离度强阳离子交换色谱柱（即BioResolve SCX mAb）和Waters AutoBlend Plus技术，可以高效实现盐梯度方法开发，得到可重现、稳定的分离。

实验

样品描述

用水将曲妥珠单抗、阿达木单抗和贝伐单抗稀释至5 mg/mL，将西妥昔单抗稀释至1 mg/mL。在药品过期后进行分析。

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
样品温度：	10 °C
柱温：	30 °C
流速：	0.8 mL/min（除非特别说明）
进样体积：	1-2 µL（4.6 mm内径色谱柱）；0.2 µL（2.1 mm内径色谱柱）
色谱柱：	BioResolve SCX mAb, 3 µm, 4.6 × 50 mm（部件号：186009058） BioResolve SCX mAb, 3 µm, 4.6 × 100 mm（部件号：186009060） BioResolve SCX mAb, 3 µm, 2.1 × 50 mm（部件号：186009054）
检测：	配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC TUV检测器，280 nm
样品收集/样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 × 32 mm螺纹颈口全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，1 mL体积，100个/包（部件号：186000385C）
流动相A：	100 mM MES—水合物*
流动相B：	100 mM MES钠盐*

流动相C: 1 M NaCl

流动相D: 水

4.6 × 50 mm色谱柱的典型梯度（Auto · Blend Plus方法）

系统预先设定为输送20 mM MES缓冲液。

时间	流速(mL/min)	pH **	盐梯度	盐曲线
0	0.8	6.7	0	
1	0.8	6.7	0	11
2	0.8	6.7	50**	6
4	0.8	6.7	50**	6
9	0.8	6.7	85**	6
10	0.8	6.7	700	6
10.1	0.8	6.7	0	11
25	0	6.7	0	11

* MES: 2-(N-吗啉)乙磺酸

** pH值、开始盐浓度和结束盐浓度随mAb不同而变化。典型优化梯度会在5 min内在35–40 mM的盐浓度内更改。

数据管理: Empower 3软件

结果与讨论

方法开发工具

使用盐梯度的阳离子交换色谱(CEX)是表征mAb电荷异质性的标准方法。通常会针对单独的mAb 优化方法参数，包括pH、盐浓度、梯度时间、流速、有机改性剂、温度等。此外，不同市售色谱柱之间的差异对方法开发也非常重要，例如颗粒特性、填料效率、稳定性以及配体类型和密度。鉴于这些差异，通常最好对评估的每根色谱柱进行条件优化。同时可以使用多因子设计或每次优化一个变量的线性优化来优化参数。我们选择了后者，以便更好地说明各参数的影响。

对实验结果进行定性和定量分析。探讨以下两个定量特性，即有效峰容量(P_c^*)和峰谷比(p/v)。

P_c^* 的计算方式如下：

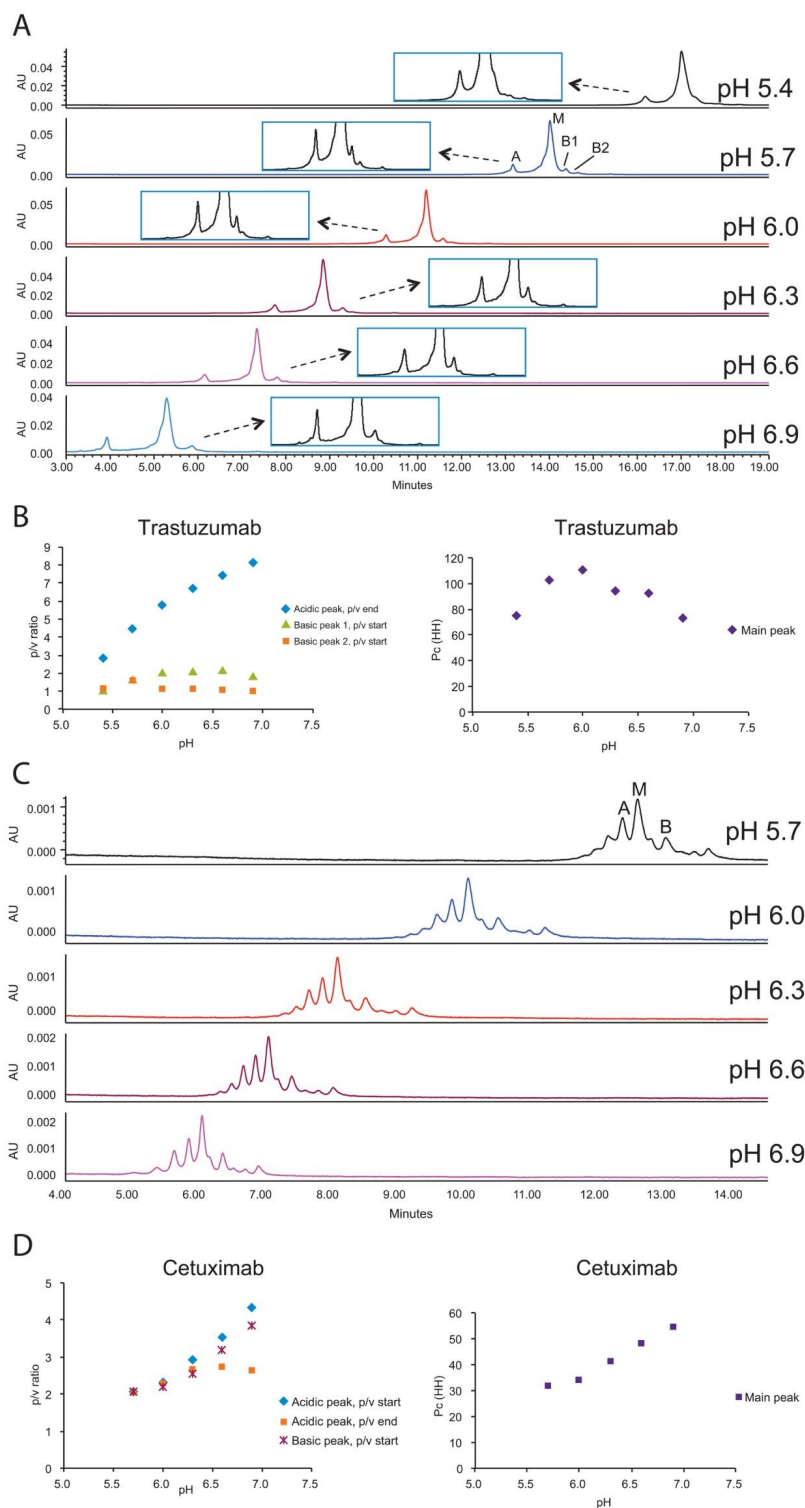
有效峰容量 = $1 + (\text{最后一个峰的保留时间} - \text{第一个峰的保留时间}) / \text{峰宽}$

从计算公式中可以看出， P_c^* 方程使用的是峰洗脱的时间段。

p/v 定义为基线峰高与基线峰谷的比率，峰谷可以在峰前($p/v_{\text{开始}}$)，也可以在峰后($p/v_{\text{结束}}$)。

流动相pH值

流动相pH值是方法开发过程中最重要，通常也是第一个优化的参数，因为pH会明显影响选择性。图1A – 1D展示了流动相pH值对曲妥珠单抗和西妥昔单抗CEX分离的影响。使用CEX时，pH值越高，保留时间越小（图1A、1C）。



图

1. pH值对mAb电荷异构体分离的影响。A和B：曲妥珠单抗，20 mM

MES，15 min内50–155 mM NaCl。C和D：西妥昔单抗，20 mM MES缓冲

液，10 min内25–110 mM NaCl。箭头指示的是放大图，显示低丰度峰分离

当pH值不同时，通常必须在酸性峰分离度和碱性峰分离度间进行权衡。对于曲妥珠单抗和西妥昔单抗，pH值增加的详细情况。

时，酸性峰的p/v比增加，碱性峰的p/v比减小。pH值对分离的影响具体取决于样品，由于在酸性峰和碱性峰分离度之间观察到平衡，在选择稳定的pH值时，必须考虑多种因素，包括选择性差异、积分重现性，甚至还要考虑所定量电荷异构体的重要程度。

盐梯度斜率

盐浓度

盐梯度斜率是CEX分离中的另一个重要参数。如图2A、2B所示，首先运行宽范围的开始和结束盐浓度，得出分析物在梯度中洗脱的大致位置。此时的梯度斜率非常大。随着开始和结束盐浓度的范围变窄，梯度斜率更加平缓，分析时间不受影响，同时电荷异构体的分离有所改善，如分离度(Rs)和峰谷比(p/v)所示。

梯度斜率用每柱体积(CV)的盐浓度变化 (Δ mM) 表示。计算方法如下所示：

色谱柱内径= 4.6 mm

色谱柱柱长 = 50 mm

流速 = 0.8 mL/min

梯度时间 = 5 min

柱体积 = $3.14 * (4.6 \text{ mm}/2)^2 * 50 \text{ mm} * 10^{-3} = 0.83 \text{ mL}$

梯度斜率 = 结束盐浓度-开始盐浓度 / #柱体积换算 = $(200-0)\text{mM NaCl} / (0.8 \text{ mL} / \text{min}) * 5 \text{ min} / 0.83 \text{ mL} = 42 \text{ mM NaCl/CV}$

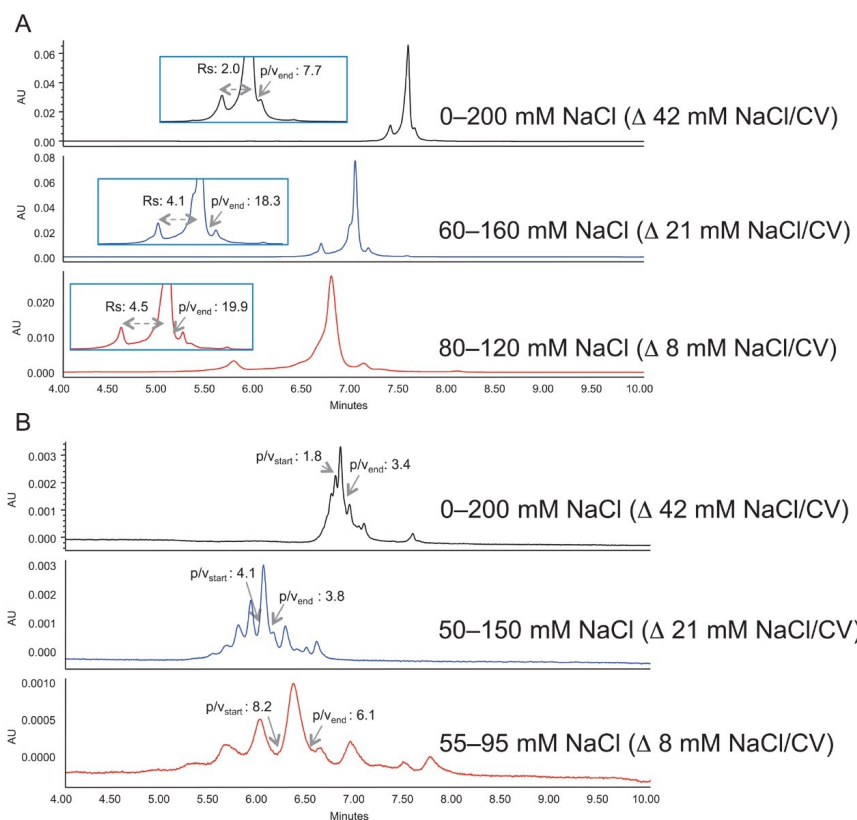


图2.盐浓度对mAb电荷异构体分离的影响。A：曲妥珠单抗；B：西妥昔单抗；20 mM MES，pH 6.0，梯度时间 = 5 min。

图3展示了开始盐浓度的影响。正如预期所料，开始盐浓度越高，阿达木单抗电荷异构体的保留时间越短。请注意，由于本例中的梯度斜率为常数，因此保留时间差异没有明显变化。

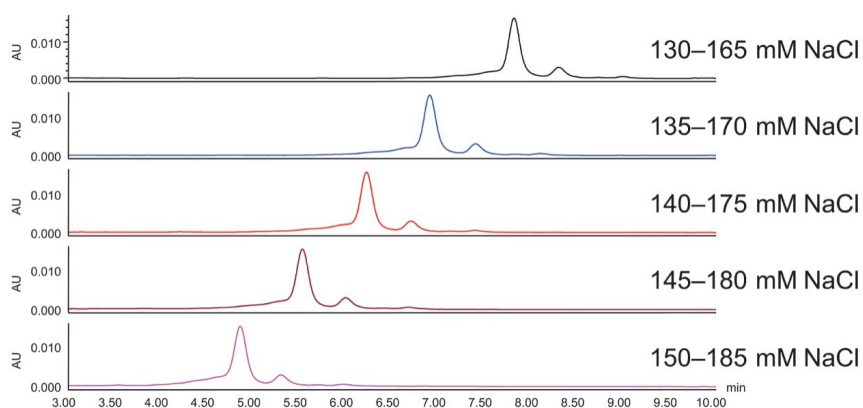


图3. 开始盐浓度对阿达木单抗电荷异构体分离的影响；20 mM MES，pH 5.7，梯度时间 = 5 min。

梯度时间

就柱体积而言，梯度时间不同，梯度斜率也有所不同。图4A–C展示了延长梯度时间对曲妥珠单抗和贝伐单抗的电荷异构体分离产生的影响。对于曲妥珠单抗，梯度时间增加， P_c^* 比没有明显变化。对于贝伐单抗，梯度时间增加， p/v 和 P_c^* 随之略微增加（图4C）。

上述结果表明，通过减小梯度斜率的方式增加分离度在实际应用中会受到限制。我们有必要讨论其中的一些原因。通常情况下，您需要了解主峰和次峰中可能有未完全分离的低丰度电荷异构体。这些低丰度电荷异构体可能不太常见，也有可能是经过多番修饰。此外，蛋白质二级结构由于细微差异而无法完全分离，也会增加峰宽。这些构象异构体可能是制备的蛋白质所固有的，也有可能是色谱法引入的³。谱带展宽的第三个原因还可能是蛋白质相对于颗粒表面配体的朝向，此因素可能与分离的上样条件有关⁴。

值得注意的是，无论峰分离程度是否显著增加，增加梯度运行时间以提高峰积分的可靠性，并提供更稳定且易于转移的方法可能有效。

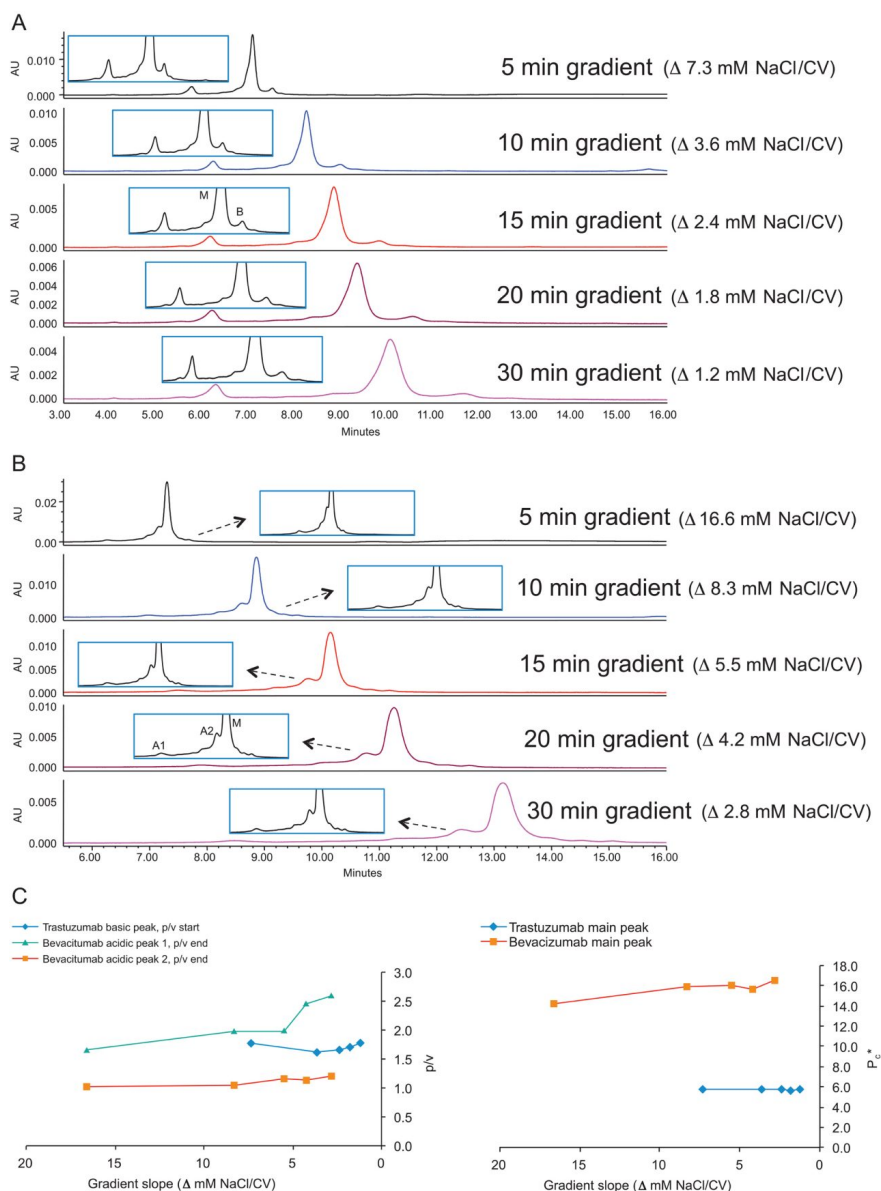


图4.梯度时间对mAb电荷异构体分离的影响。A：曲妥珠单抗，20 mM MES，pH 5.7，50–85 mM NaCl。B：贝伐单抗，20 mM MES，pH 5.4，120–200 mM NaCl。箭头指示的是放大图，显示低丰度峰分离的详细信息。C：梯度时间对p/v和 P_c^* 的影响。由于梯度时间越长，梯度斜率越平缓，所以将x轴反向，以便展示梯度时间增加的影响。

流速

也可以通过更改流速改变梯度斜率。图5A–D展示了两个不同的流速示例。

其中一个示例同时改变流速和梯度时间，从而保持总梯度体积不变（图5A、B）。结果，梯度斜率因此也保持不变。由于BioResolve SCX mAb色谱柱含有无孔颗粒，没有物质扩散（传质）到颗粒中，因此预测流速不会对p/v比

和 P_c^* 产生显著影响。事实也的确如此，如图5B所示，增加流速， p/v 比和 P_c 只略微减小。这可能是因为在更高的流速下，柱外扩散也更高，或蛋白质构象因流动相压力增加而发生了细微改变⁵。

第二个示例则保持梯度时间不变，改变流速（图5C、D）。预测流速越高，分离效果越好，因为流速越高，梯度斜率越小。实际结果与预期一致，随着流速增加，大多数峰的 p/v 比也增加。但是，与增加梯度长度时的现象类似，随着流速不断增加，梯度会更加平缓， P_c 增加到一定程度后会达到平稳状态（图5D）。

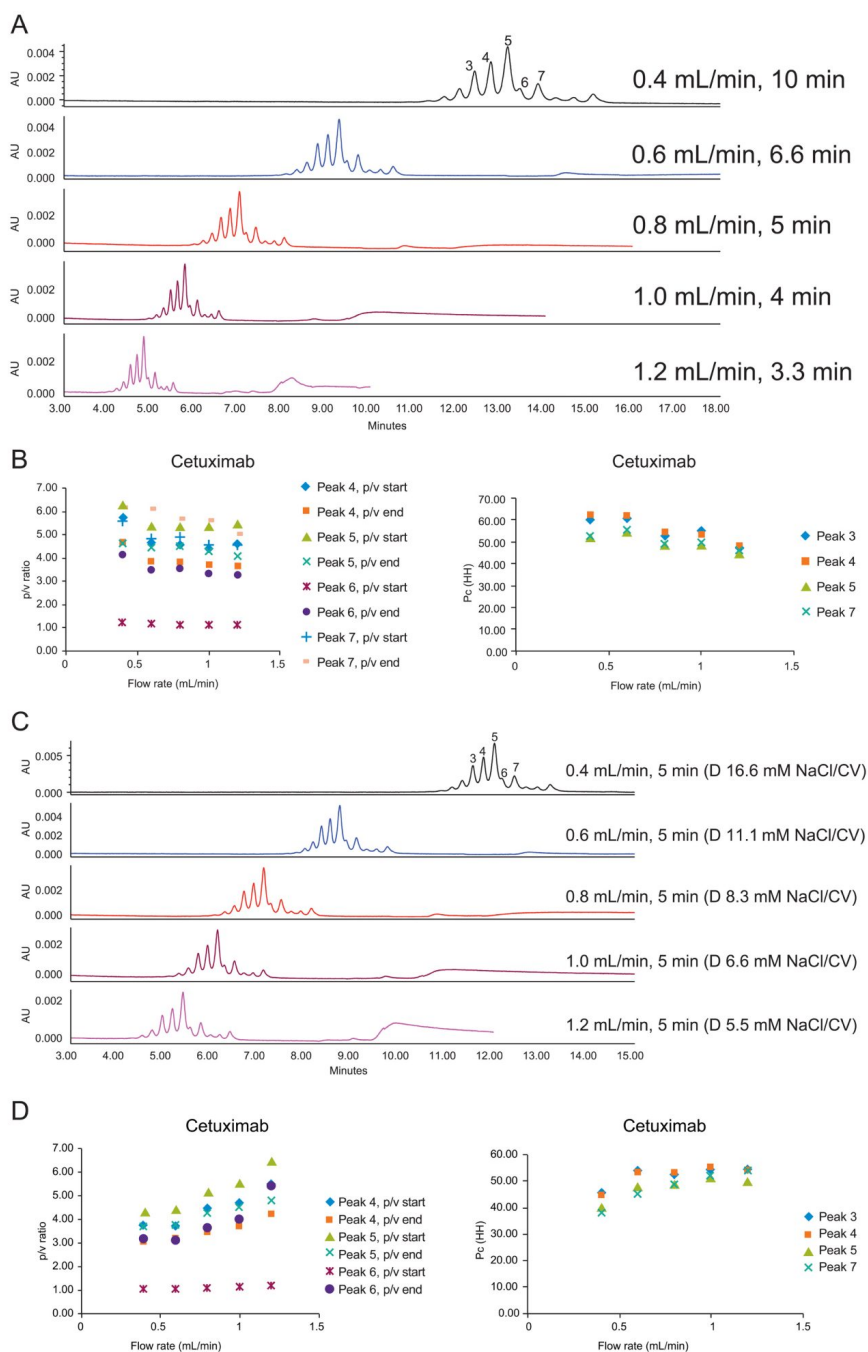


图5.流速对西妥昔单抗电荷异构体分离的影响。A和B：梯度体积保持不变，梯度斜率 = Δ 8 mM NaCl/CV。C和D：梯度时间保持不变。

柱温

图6A–C展示了改变温度的示例。由于CEX是一种非变性技术，因此柱温最高只能增加到37 °C。

保留因子和温度之间的关系可以范特霍夫方程表示：

$$\log k = -(\Delta H / RT) + (\Delta S / R) + \log \beta$$

k是保留因子，T是绝对温度（单位为开氏度），ΔH是与分析物相转移相关的焓变，ΔS是熵变，R是摩尔气体常数。

用log k对1/T作图应得到线性关系，根据斜率和Y轴截距分别可以推断出焓变和熵变信息⁶。如图6B所示，阿达木单抗得到了线性关系。但即使保留时间会随着温度增加而增加（图6B，右图），p/v比、Pc和选择性仍不会随温度发生明显变化（图6C）。对西妥昔单抗，曲妥珠单抗，贝伐单抗（日期未显示）和文献中的其它单克隆抗体进行了类似观察⁷。

根据所有观察结果得出结论：虽然温度可能影响阳离子交换分离中蛋白质的总体保留效果，但它通常不会对选择性差异产生显著影响，从而最终影响mAb电荷异构体之间的分离度。因此，虽然温度优化可能不是必需的，但是建议控制分离温度以便提高保留时间的重现性。

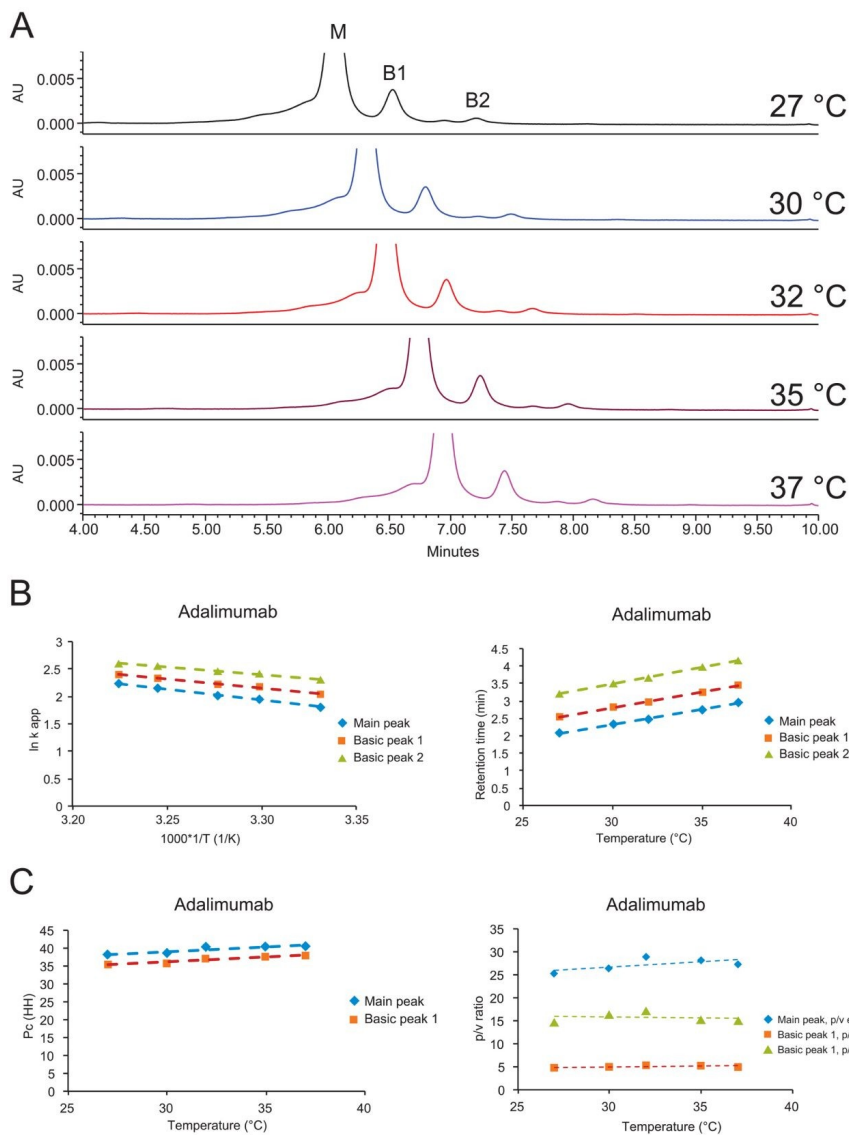


图6. 温度对阿达木单抗电荷异构体分离的影响；20 mM MES, pH 5.7, 5 min内140–175 mM NaCl。

有机添加剂

有机添加剂可能影响IEX分离的选择性以及分离过程中的次级相互作用。向pH为5.4、6.0、6.6的流动相中加入了少量异丙醇或甲醇。图7所示为在阿达木单抗分离中，向pH为6.0的流动相中添加5% 异丙醇得到的示例色谱图。

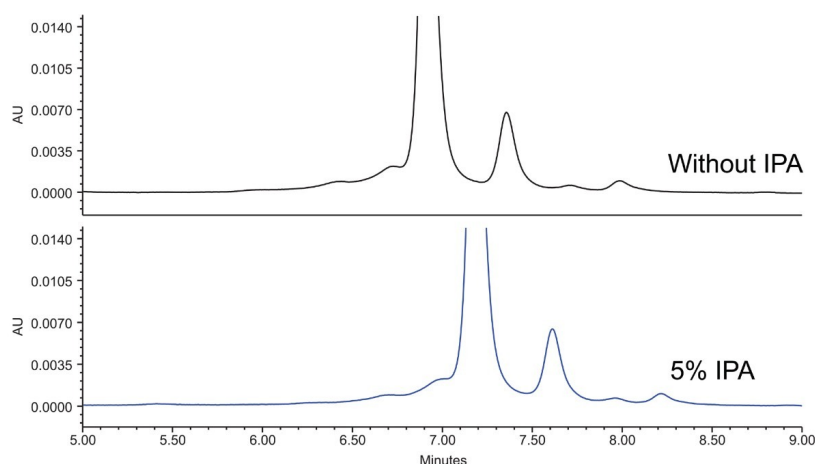


图7. 流动相添加剂异丙醇对阿达木单抗电荷异构体分离的影响；20 mM MES, pH 6.0, 5 min内115-155 mM NaCl。

除保留时间差异外，两张色谱图看起来几乎完全相同，原因可能是只有95%的盐洗脱分析物。

需要重点指出的是，在所有情况下，添加或不添加有机添加剂得到的峰面积非常相似，且保留时间也随着有机改性剂水平的增加而增加，这两个观察结果都表明分析物和固定相之间的疏水作用极小。这一点很重要，因为回收疏水蛋白和修饰蛋白（如抗体偶联物(ADC)）需要颗粒的疏水性表面减至最小。

色谱柱柱长

图8A–D展示了色谱柱柱长对mAb电荷异构体分离的影响。

顶部色谱图为5 min内利用 4.6×50 mm色谱柱进行的分离；底部色谱图为10 min内利用 4.6×100 mm色谱柱进行的分离。梯度斜率的柱体积保持不变，因此分离度的任何改变完全是由于色谱柱柱长的影响，而不是由于选择性的变化。从所有示例都可以看出，100 mm色谱柱相比50 mm色谱柱可以提供更好的分离效果。重要的是，使用100 mm色谱柱可以分离出更多的小峰。

图8A和B中的中间色谱图展示了10 min内利用 4.6×50 mm色谱柱进行的分离。虽然梯度斜率减半，但分离效果不如10 min内利用 4.6×100 mm色谱柱产生的分离效果，表明增加色谱柱柱长对分离质量的影响要大于在较短色谱柱上增加梯度长度产生的影响。

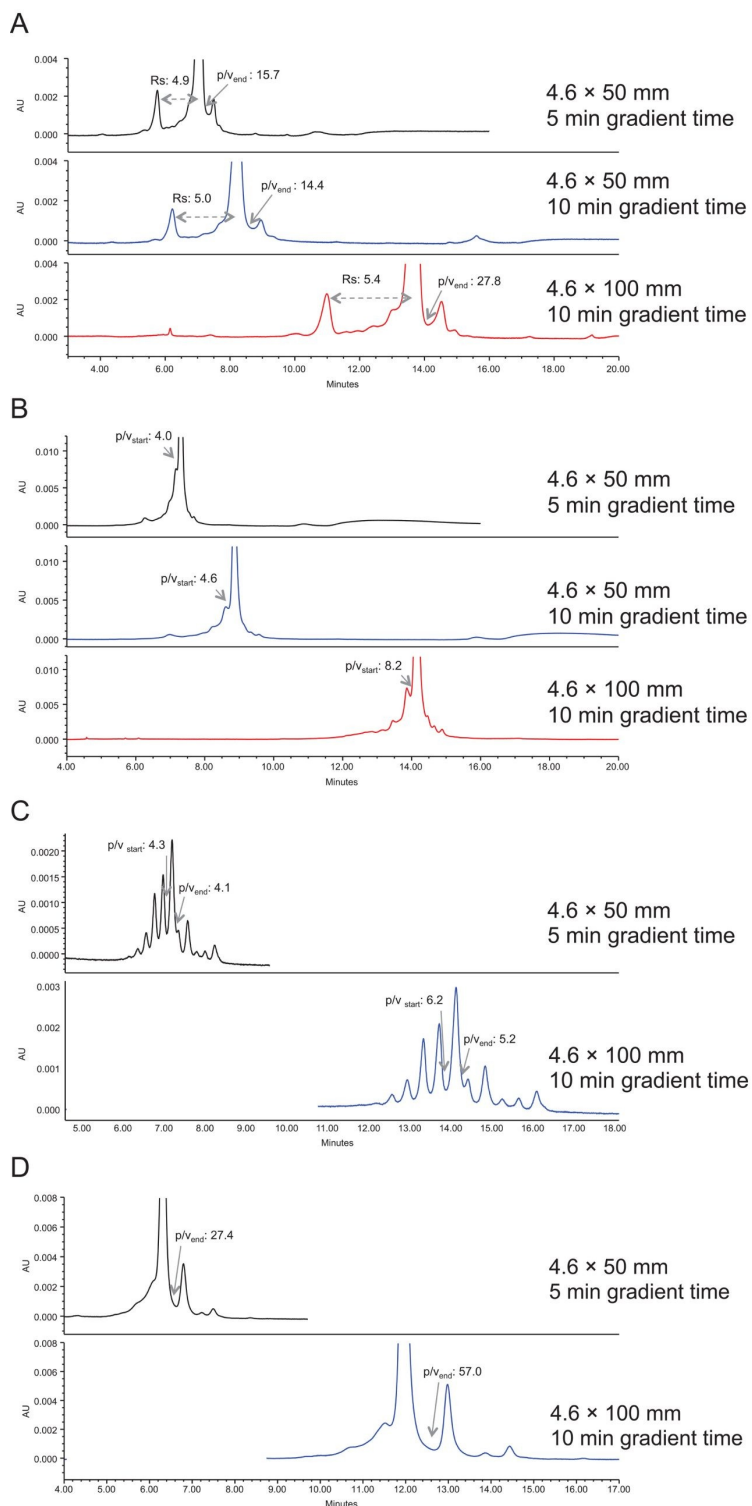


图8.色谱

柱柱长对mAb电荷异构体分离的影响。A: 曲妥珠单抗, 20 mM MES, pH

6.7, 50-85 mM NaCl; B: 贝伐单抗, 20 mM MES, pH 5.4, 120-200

色谱柱内径

mM NaCl; C: 西妥昔单抗, 20 mM MES, pH 6.6, 25-65 mM

图9所示为阿达木单抗在2.1 × 50 mm色谱柱和4.6 × 50 mm色谱柱上的分离结果。由于液相色谱系统的梯度延迟

NaCl; D: 阿达木单抗, 20 mM MES, pH 5.7, 140-175 mM NaCl。

体积对较小内径色谱柱的影响更大，因此2.1 mm内径色谱柱的保留时间更长。在仪器方法中校正梯度延迟体积后（中间色谱图），两根色谱柱的保留时间变得非常相似。

从碱性峰p/v_{开始}和放大色谱图可以看出，4.6 mm内径色谱柱比2.1 mm内径色谱柱的分离效果更好。色谱柱柱出口和检测器之间的管路内径为0.0025英寸，长度为8.5英寸。TUV检测器的流路内径为5 mm。由于较窄内径色谱柱生成的峰体积较小，因此可以预测，柱外扩散对性能的影响较大。

另一方面，使用较窄内径的色谱柱可能具有优势。例如，当样品量有限或者出于成本效益考虑，限制流动相的使用量时。在IEX中使用挥发性流动相，通过电喷雾离子源质谱进行直接分析时也非常有益。在这种情况下，如果使用较窄内径的色谱柱，由于可以采用更兼容的较低流速，因此可能不需要分流。

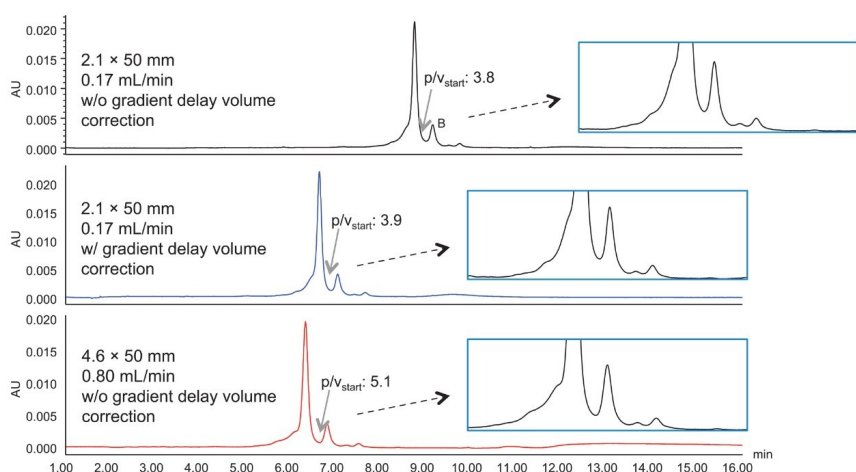


图9.三张色谱图分别为阿达木单抗电荷异构体利用2.1 mm内径色谱柱（在未校正（顶部色谱图）和校正（中间色谱图）梯度延迟体积条件下）和4.6 mm内径色谱柱得到的分离结果。2.1 mm内径色谱柱的流速 = 0.17 mL/min，4.6 mm内径色谱柱的流速 = 0.8 mL/min。

Auto · Blend Plus技术

本应用纪要中展示的所有分离均使用Auto · Blend Plus方法生成。Auto · Blend Plus技术是Empower软件的一部分，适用于沃特世四元泵系统，包括ACQUITY UPLC H-Class/H-Class Bio、ACQUITY Arc/Arc Bio系统。该技术可以使分析员通过设置pH和盐摩尔浓度直接设定方法（请参阅“实验”部分的梯度表）。它可以通过简化流动相制备加快方法开发。此外，Auto · Blend Plus技术还可有助于更好地确定已开发方法的稳定性范围。

结论

方法开发是利用阳离子交换色谱对生物治疗性蛋白质进行电荷异构体分析的重要步骤，有许多因素可以控制。

- 流动相pH值可以对酸性峰和碱性峰的分度产生相反的影响，因此需要仔细选择操作pH，确定分离最佳的方案。
- 梯度斜率会影响选择性和分度。可以通过更改梯度时间或流速改变柱体积，从而改变梯度斜率。更加平缓的梯度斜率可增加分度，但达到某一点后，继续减小梯度斜率将不会进一步改善分离。
- 温度对mAb电荷异构体的选择性影响极小。但是，仍建议控制温度以提高重现性。
- 增加色谱柱柱长对分度的影响大于增加较短色谱柱的梯度时间产生的影响。
- 最后，对于BioResolve SCX mAb色谱柱，有机添加剂对mAb分离和回收的影响极小。这表明分析物与该CEX固定相之间几乎没有疏水作用。

本研究证明，通过一套系统的方法开发过程，可以常规开发出有效的CEX分离方法。使用AutoBlend Plus技术，同时利用高性能BioResolve SCX mAb色谱柱，可以使该过程更加高效。

参考文献

1. Khawli, L.A.; et al. Charge variants in IgG1.mAbs. 2010, 2 (6), 613-624.
2. Wang, Q.等人, Development of pH Gradient Mobile Phase Concentrates for Robust and High Resolution mAb Charge Variant Analysis. 沃特世应用纪要, 720006491EN (2018)。
3. Hlady, V.; Buijs, J. Protein Adsorption on Solid Surfaces. *Current Opinion on Biotechnology*. 1996, 7 (1), 72-77.
4. Kittelmann, J.; et al. Orientation of Monoclonal Antibodies in Ion-Exchange Chromatography: A Predictive Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling Approach. *J. Chrom.A*. 2017, 1510, 33-39.
5. Lauber, M.A.等人, 设计全新颗粒技术进行稳定的mAb电荷异构体分析, 沃特世应用纪要720006475ZH (2018)。
6. Fekete, S.; et al. Ion-Exchange Chromatography for the Characterization of Biopharmaceuticals. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 113, 43-55.
7. Fekete, S.; et al. Method Development for the Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants in

Cation Exchange Chromatography, Part I: Salt Gradient Approach. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, 102, 33-44.

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)
- [Empower 3色谱数据软件 <https://www.waters.com/513188>](https://www.waters.com/513188)
- [Auto · Blend Plus <https://www.waters.com/134623262>](https://www.waters.com/134623262)

可在线购买

- [BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 \$\mu\$ m, 4.6 mm x 50 mm <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009058>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009058)
- [BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 \$\mu\$ m, 4.6 mm x 100 mm <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009060>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009060)
- [BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 \$\mu\$ m, 2.1 mm x 50 mm <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009054>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009054)
- [通过LCGC认证的透明玻璃12×32mm螺纹颈口全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，1 mL体积 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000385C>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000385C)

720006477ZH, 2019年4月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.