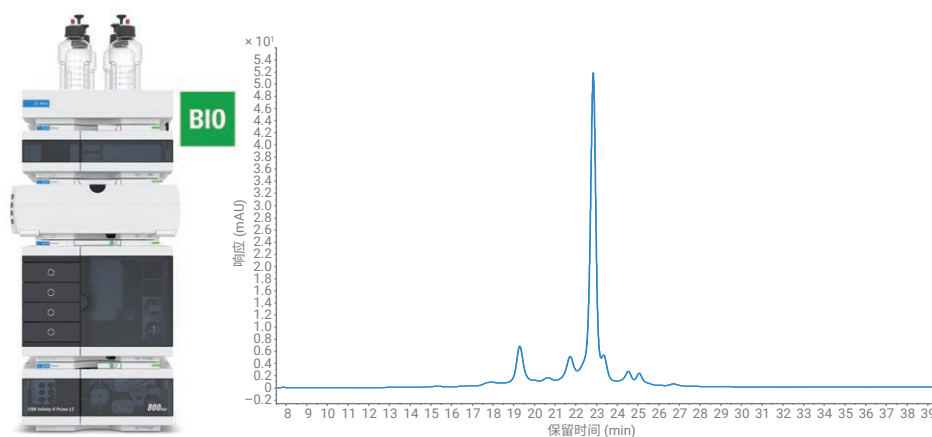


便捷定制阳离子交换分析

结合使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统、安捷伦缓冲液顾问软件和用于高分离度电荷异构体分析的 pH 梯度



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

单克隆抗体的电荷异构体分离对于色谱工作者而言是一项充满挑战性的工作。由于所分析的单克隆抗体的微异质性，需要进行大量的方法开发才能找到所需的理想分离度。pH 梯度的分离能力优于许多传统的盐梯度，能够以非常有效的方式分离电荷异构体。本应用简报展示了使用不同类型的 pH 梯度对两种单克隆抗体（曲妥珠单抗和 NIST mAb）进行高分离度和可重现的电荷异构体分析。

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统配备完全不含铁的流路和 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵，能够使用安捷伦缓冲液顾问软件对来自四种储备溶液的溶剂进行动态混合。

前言

治疗性单克隆抗体 (mAb) 是高度异质的分子，由大量异构体组成。它们天然存在于这种生物药物中，不一定被视为杂质。溶液中的蛋白质在与水性介质的界面处主要具有极性和带电荷的氨基酸，而疏水性残基则因疏水相互作用而倾向于自缔合。位于蛋白质“外部”并与周围液体接触的氨基酸更容易被修饰^[1]。

变异（也称为蛋白质微异质性）可能源自抗体生产过程中的翻译后修饰。此外，纯化过程、配制和/或存储之后的修饰也可形成^[2]。然而，如果这些变异存在于药物蛋白中，它们的生物活性可能会有所不同，免疫原性可能会增强^[2]。因此，需要对 mAb 的微异质性进行广泛的分析表征，确保生物药物的安全性和有效性。

阳离子交换色谱 (CEX) 是单克隆抗体电荷异构体分析的金标准^[3]。经典盐梯度方法经全面优化后具有较高的分离度。然而，开发用于蛋白质分离的高分离度离子交换方法的工作量非常大。需要优化包括盐浓度、流动相 pH 值和添加剂在内的许多参数。此外，每个分子（尤其是生物分子）可能表现出不同的行为，并且开发的方法不允许实验参数发生较大的变化，尤其是 pH 值的变化^[1,4]。

基于 pH 梯度的 CEX（也被称为色谱聚焦）为分离 mAb 电荷异构体提供了高分离度且稳定的方法^[1,4,5]。在典型的离子交换色谱 (IEX) 中，分子通过增加缓冲液的离子强度（主要是盐类，例如 NaCl）从色谱柱中洗脱出来。相比之下，在使用 pH 梯度时，结合的分子会随着缓冲液 pH 值的变化而洗脱。这会改变它们的表面净电荷，使结合的分子在其等电点 (pI) 洗脱，此时的分子呈电中性。

宽 pH 梯度方法更通用，可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外，与基于离子强度的传统 IEX 相比，基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

宽 pH 梯度方法更通用，可以在单个缓冲液系统中分离来自不同抗体的异构体^[1]。此外，与基于离子强度的传统 IEX 相比，基于 pH 梯度的方法开发更简单、快捷。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统，专为生物色谱条件而设计：样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁；贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N（一种镍钴合金）制成。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀，避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰（如氧化、蛋白质复合物形成）。

将 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用缓冲液顾问软件帮助动态混合来自四种储备溶液的溶剂，简化生物分析工作流程，并显著缩短缓冲液制备所需的时间。使用缓冲液顾问软件，可以通过计算 IEX 的泵时间表快速、简单地生成四元盐梯度和 pH 梯度。

本应用简报介绍了使用两种不同的 pH 梯度对曲妥珠单抗和 NIST mAb 参比标样的电荷异构体的分析。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

色谱柱

Bio MAb, NP5, 2.1 $\times$ 250 mm, PEEK（部件号 5190-2411）

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物、氯化钠、tris（三羟甲基甲胺）、咪唑、盐酸和哌嗪六水合物购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent NISTmAb（部件号 5191-5744）
- 人源化单克隆抗体曲妥珠单抗（商品名为赫赛汀）购自 Roche (Basel, Switzerland)。曲妥珠单抗溶于 30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中，pH 6.8

缓冲液配制

根据缓冲液顾问软件的储备溶液配方配制缓冲液（见图 1）。

由缓冲液顾问软件计算得到的四元磷酸盐缓冲液系统

A：水

B：1700 mmol/L 氯化钠

C：44.5 mmol/L 磷酸二氢钠

D：55 mmol/L 磷酸氢二钠

注：此设置可用于盐梯度和 pH 梯度洗脱，实现直接比较，并增加方法开发的可能性。

由缓冲液顾问软件计算得到的二元宽 pH 梯度缓冲液系统

使用缓冲液顾问软件，还可以创建宽范围的 pH 梯度（也称为复合缓冲液）。在这些情况下，仅使用 C 和 D 通道来创建梯度。本实验使用 Farnan 和 Moreno 描述的 pH 梯度^[1]，并将缓冲液组分以用户混合物的形式插入缓冲液顾问软件的储备溶液组成中（2.4 mmol/L tris、1.5 mmol/L 咪唑、11.6 mmol/L 哌嗪，以及用于将 pH 调节至 pH 6 & C 和 10.5 & D 的 HCl）。利用此选项，用户可以构建自制的缓冲液组成，获得所需的 pH 范围。缓冲液顾问软件计算两种缓冲混合物的离子强度 (IS) 和缓冲容量 (BC)。

A：水

B：n/a

C：pH = 6；IS = 22.5 mmol/L；BC = 6.19 mmol/L

D：pH = 10.5；IS = 0.717 mmol/L；BC = 2.31 mmol/L

注：使用高浓度盐溶液作为洗脱液时，需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如，对于磷酸盐缓冲梯度中含 1700 mmol/L 氯化钠的溶剂 B，在泵方法的溶剂选择字段使用氯化钠 1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数，因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

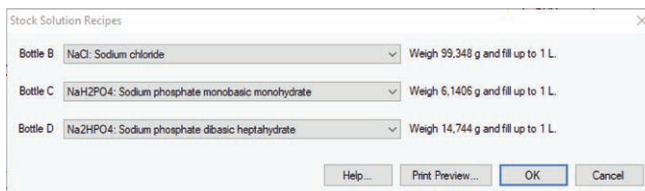


图 1. 安捷伦缓冲液顾问软件储备溶液配方 — 四元磷酸盐缓冲液系统

方法

表 1. 四元磷酸盐缓冲液系统 — 盐梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟：30 mmol/L 磷酸盐缓冲液中 NaCl 的浓度从 10 mmol/L 升至 110 mmol/L；30–31 分钟：500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间：31 分钟 后运行时间：15 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量：4 µL 样品温度：8 °C 进样针清洗：用水清洗 3 秒

表 2. 四元磷酸盐缓冲液系统 — pH 梯度色谱条件

参数	值
溶剂	A) 水 B) 1700 mmol/L 氯化钠 C) 44.5 mmol/L 磷酸二氢钠 D) 55 mmol/L 磷酸氢二钠
梯度	梯度 0–30 分钟：30 mmol/L 磷酸盐缓冲液 pH 从 7 升至 8.4；30–31 分钟：500 mmol/L NaCl (pH 6.8) 清洗步骤 停止时间：31 分钟 后运行时间：15 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量：4 µL 样品温度：8 °C 进样针清洗：用水清洗 3 秒

表 3. 二元宽 pH 梯度缓冲液系统/Farnan pH 梯度

参数	值
溶剂	A) n/a B) n/a C) pH = 6；IS = 22.4 mmol/L；BC = 6.14 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1]) D) pH = 10.5；IS = 0.717 mmol/L；BC = 2.31 mmol/L (Farnan 缓冲液 ^[1])
梯度	曲妥珠单抗梯度：梯度 0–50 分钟：pH 从 8.3 升至 10；然后在 51–55 分钟，在 pH 10.5 下进行“清洗”步骤 停止时间：55 分钟 后运行时间：20 分钟 NISTmAb 梯度：梯度 0–45 分钟：pH 从 8.9 升至 10.5 停止时间：50 分钟 后运行时间：20 分钟
流速	0.200 mL/min
温度	30 °C
紫外检测	280 nm 10 Hz
进样	进样量：4 µL 样品温度：8 °C 进样针清洗：用水清洗 3 秒

结果与讨论

使用缓冲液顾问软件，可以计算盐梯度和 pH 梯度。使用本应用简报实验部分描述的四元磷酸盐缓冲液，可以计算用于分离曲妥珠单抗电荷异构体的两种梯度。

图 2 显示了在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7–8.4）（绿色）下分离曲妥珠单抗电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图。通过盐梯度和 pH 梯度实现的分离性能相当，使用 pH 梯度时的分离度略有提高。

缓冲液顾问软件的一个功能是通过在给定梯度内添加额外的梯度阶梯来改进线性梯度（盐梯度和 pH 梯度）的计算，从而实现出色的线性，而不会与所需/预设 pH 产生重大偏差。要启用此功能，需要选中缓冲液顾问软件用户界面 (UI) 中的 4. 创建 % 时间表的优化梯度选项框（见图 3A 和 3B 中的红色圆圈）。

图 3A 和 3B 展示了在未选中 (A) 和 (B) 选项框的情况下，预设 pH 值和实际 pH 值之间的差异。在不进一步优化缓冲液顾问软件的情况下，实际 pH 值可能与预设 pH 值偏离 0.4 个单位，这使得用户难以信任运行梯度线性。通过选中优化梯度选项框（图 3B），将额外的阶梯插入原始梯度中，确保 pH 梯度的线性。左下角的最终泵梯度时间表显示了额外插入的阶梯，它们使实际梯度尽可能接近预设梯度。然后，可以将此梯度时间表导出到 OpenLab 的方法中，实现轻松传输，而无需额外输入。

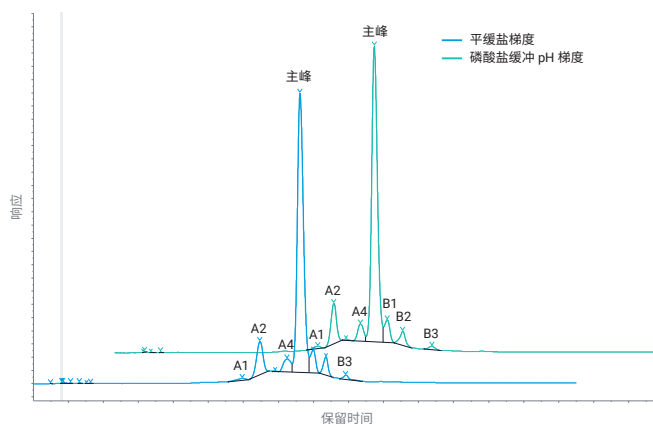


图 2. 在平缓的盐梯度（蓝色）和磷酸盐缓冲 pH 梯度（pH 7–8.4）（绿色）下分离电荷异构体得到的两幅色谱图的叠加图

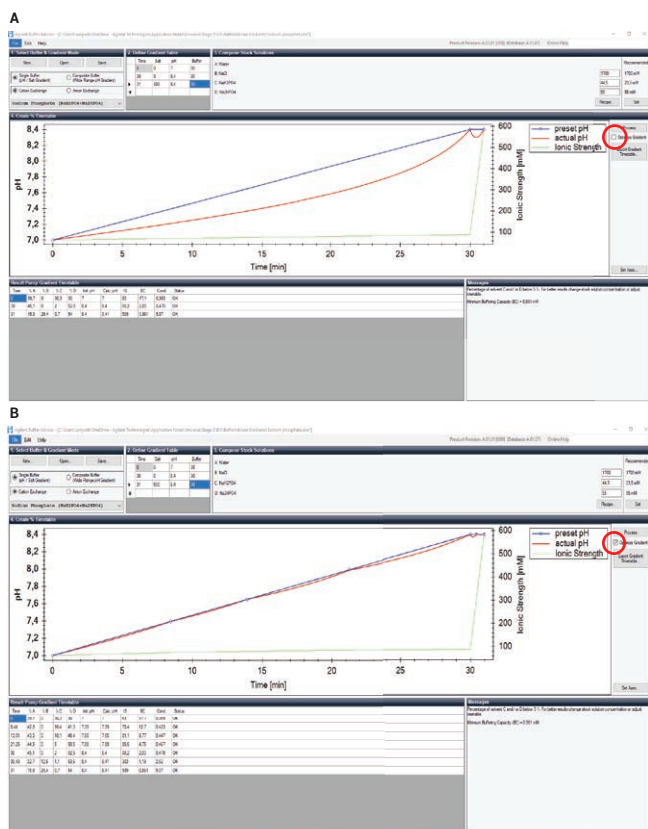


图 3. 优化安捷伦缓冲液顾问软件中的梯度功能，实现高度线性的 pH 梯度。A 显示优化前的梯度，B 显示优化后的梯度

图 4 显示了在磷酸盐缓冲 pH 梯度 (pH 7–8.4) 下 7 次后续曲妥珠单抗电荷异构体分析运行的叠加色谱图。除前两个峰外，其余峰的保留时间 (RT) 均具有出色的重现性 (相对标准偏差 (RSD) 小于 0.085%)。由于异构体 A3 和 B3 的峰面积和高度都很小，因此峰面积重现性高于 1%。

在磷酸盐缓冲系统中，方法开发受到限制，尤其是在目标分子的 pI 不在 pH 6–8 缓冲范围内的情况下。如果分子的 pI 太高，则无法使用该缓冲液系统完成洗脱。例如，pI 为 9.186 的 NIST mAb 需要使用不同的缓冲液系统才能从 CEX 色谱柱中洗脱。

更通用的一种方法是使用由多个缓冲液系统组成的宽范围 pH 梯度。该设置也以复合缓冲液 (宽范围 pH 梯度) 的名称包含在缓冲液顾问软件中。Farnan 和 Moreno (2009) 提出的 pH 6.0–10.5 的 pH 梯度^[1]是一种适用于分析单克隆抗体电荷异构体的缓冲液系统。

进一步应用该系统，并针对曲妥珠单抗和 NIST mAb 对方法进行了优化。

图 5 显示了使用宽范围 pH 梯度对曲妥珠单抗电荷异构体的分离，将 pH 从 8.3 逐步调整到 10 以实现理想分离度。与磷酸盐缓冲 pH 梯度相比 (见图 2)，可以多分离出两种酸性异构体 (A1–A6，在主峰之前洗脱) 和一种碱性异构体 (在主峰之后洗脱)。图 5B 中的放大图突出显示了主峰周围不同电荷异构体的出色分离度，与图 2 中所示的平缓盐梯度和 pH 梯度相比，具有更尖锐的峰形和更高的分离度。

对所有分离异构体的 RT 和峰面积精度进行了评估 (见图 5 中的峰表)。即使是极小的峰，RT 精度也非常出色，其 RSD 均低于 0.06% (第一个异构体 A1 除外)。除极小的峰外，大多数峰的面积精度都十分出色。

研究还证明，Farnan 和 Moreno 使用的 pH 梯度^[1]是 NISTmAb 分析的理想选择 (见图 6)。针对 NISTmAb，由于其 pI 不同，pH 梯度被修改为不同的 pH 范围。利用这种 pH 8.9–10.5 的平缓梯度，可以分离出三种酸性异构体和两种碱性异构体。

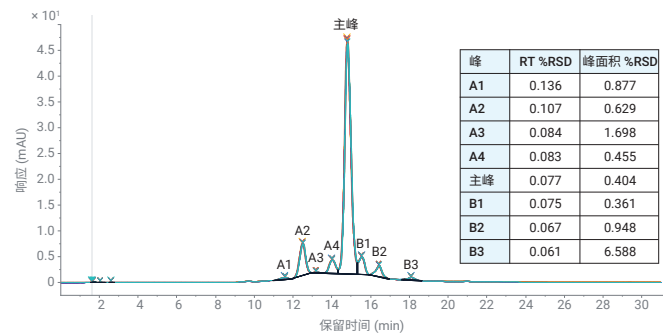


图 4. 采用 pH 7–8.4 的磷酸盐缓冲 pH 梯度分析曲妥珠单抗的七次连续运行的叠加色谱图，包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表

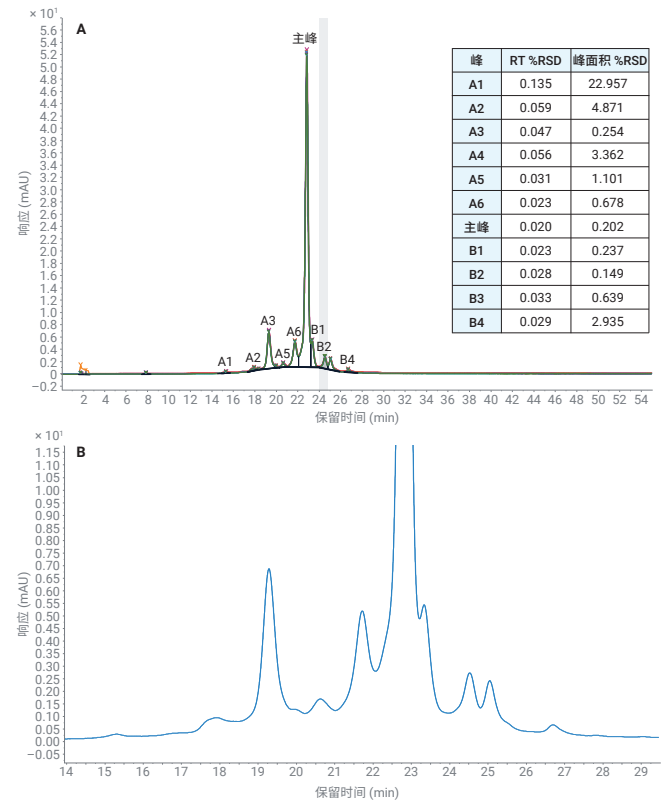


图 5. 采用 pH 8.3–10 的宽 pH 梯度七次连续运行曲妥珠单抗的叠加色谱图，包括保留时间 (RT) 和峰面积精度表 (A)，以及单次进样的放大图 (B)

结论

研究表明, 在分析单克隆抗体时, pH 梯度比盐梯度更具优势。即使是与平缓盐梯度相比, pH 梯度的表现也十分突出, 一方面简化了方法开发, 另一方面可生成高分离度色谱结果。盐梯度方法开发的潜力十分有限, 梯度斜率的变化只会增加峰宽, 而不会进一步改变分离度^[7], 而 pH 梯度则可提供进一步提高分离度并保持尖锐峰形的可能性。曲妥珠单抗和 NIST mAb 的分析证明了这一点, 尤其是在使用基于 Farnan 和 Moreno 的宽范围 pH 梯度^[1] 时。缓冲液顾问软件促进磷酸盐缓冲系统四种储备液的动态混合, 消除了实验中耗时的手动缓冲液配制。此外, 缓冲液顾问软件可以轻松计算宽范围 pH 梯度。因此, 使用缓冲液顾问软件开发, 并在配备全能泵和完全不含铁样品流路的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上运行的所有方法均提供了高度可靠且可重现的结果。

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE44286.1248842593

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2021
2021 年 4 月 22 日, 中国出版
5994-3257ZHCN

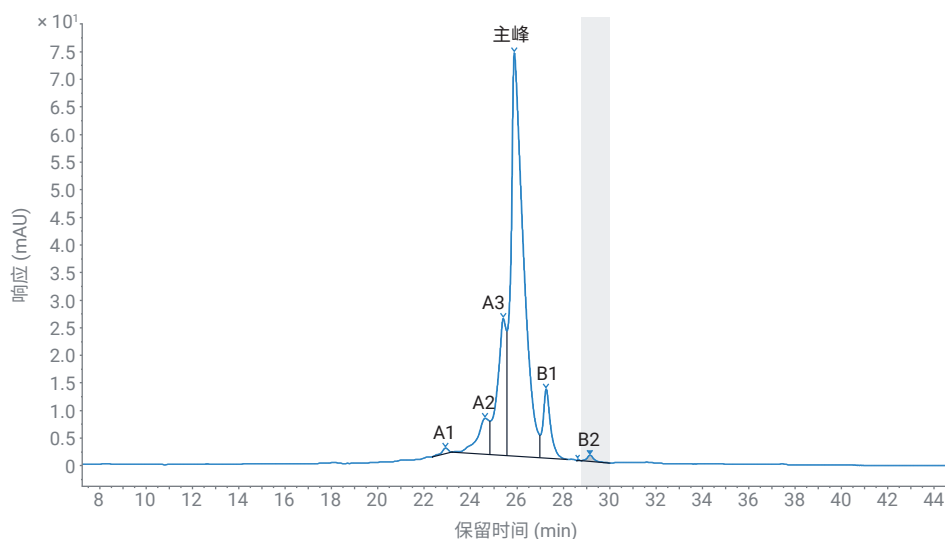


图 6. 使用根据 Farnan 和 Moreno^[1] 修改的 pH 梯度在 pH 8.9–10.5 下分离 NISTmAb

参考文献

1. Farnan, D.; Moreno, G.T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857
2. Liu, H. et al. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 2426–2447
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, 9, 468–481
4. Rea, J. et al. Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 317–323
5. Lingg, N. et al., Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1373, 124–130
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410(8), 2079–2093
7. Schneider, S., 您的分析可以采用多平缓的梯度? Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统助您改进 mAb 电荷异构体分析, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-2692ZHCN, **2020**