Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

单克隆抗体及其电荷变体的IEX方法开发

Paula Hong, Kenneth J. Fountain, Thomas E. Wheat, Damian Morrison

应用优势

- 确认单克隆抗体电荷变体的稳定方法
- 简化方法开发过程并提高可重现性，无需额外制备缓冲液
- 在整个生产过程中监测生物制药电荷变体的理想方法

沃特世解决方案

Protein-Pak™ Hi Res IEX色谱柱
ACQUITY UPLC® H-Class Bio系统
Auto•Blend Plus™技术

关键词

IEX，单克隆抗体，Protein-Pak Hi Res，赖氨酸变体

简介

在过去20年中，包括单克隆抗体在内的生物治疗药物的应用发展迅速。要完整地分析和表征这类复杂的大分子物质，我们必须采用正交分析技术。离子交换色谱(IEX)技术常被用于电荷异质性生物治疗药物的分析。由于每种蛋白质都具有独特的电荷分布，因此可以通过改变pH来调节色谱的选择性，但是，使用该方法进行分离通常分离度不够且缺乏一致性，从而使得方法开发变得更加困难。为了解决这些问题，我们开发了一种使用纯净溶液和浓缩储备液的溶剂管理系统，该系统能够混合四种溶剂以制备和调整色谱流动相，并且结合了高分离度离子交换色谱柱，可用于开发嵌合单克隆抗体中去赖氨酸变体的分离方法。弱阳离子交换色谱柱使得我们能够在一系列pH范围内使用多种缓冲液进行方法开发，以实现这些电荷变体的最佳分离。本文将通过一种分析嵌合抗体的具体方法来阐述这一点。

实验

样品描述：使用20 mM的MES缓冲液(pH=6)制备含C端去去赖氨酸变体的嵌合单克隆抗体样品，浓度为1.25 mg/mL。

使用羧肽酶B (CpB) (Worthington Biochemical Corp.，部件号LS005304) 裂解C端赖氨酸，酶浓度为1 mg/mL。混合单克隆抗体 (1000 µL，1.25 mg/mL) 和CpB (12.2 µL，1 mg/mL)。分别在预定的时间间隔 (t= 0、1、2.5、5、7.5、10、12.5、15及20 min) 处取出100 µL混合物并将其与冰醋酸 (1.7 µL) 混合以终止反应。

LC条件

LC 系统:	采用Auto•Blend Plus技术的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
检测器:	配备钛合金流通池的PDA检测器
波长:	280 nm
采样速率:	20pt/s
过滤时间常数:	正常
色谱柱:	Protein-Pak Hi Res IEX CM, 4.6 x 100 mm, 7 µm (部件号186004929)
柱温:	30°C
样品温度:	4°C
进样体积:	10 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	100 mM磷酸二氢钠，或100 mM MES—水合物
流动相B:	100 mM磷酸氢二钠，或100 mM MES钠盐
流动相C:	1000 mM 氯化钠(NaCl)
流动相D:	水
清除溶剂和清洗溶剂:	20 mM磷酸钠，pH 6.0或20 mM MES，pH 6.0
梯度:	流动相C在60 min内从0增加至10% (pH如图所示)

数据管理

软件:	采用Auto•Blend Plus技术的Empower® 2

结果与讨论

单克隆抗体的电荷异质性可能是由包括C端赖氨酸处理在内的多种结构变化造成的[1]。当生物治疗药物具有电荷异质性时，我们通常会对整个生产过程中的电荷变体进行监测以确保对生产过程的控制。在下面的研究中，我们开发了一种用于确认和定量分析嵌合单克隆抗体药物中C端去去赖氨酸变体的IEX方法。该方法的开发是通过在弱阳离子交换色谱柱 (Protein-Pak Hi Res CM, 4.6 x 100 mm, 7 µm) 上调节pH和离子强度进行的。我们采用了四元溶液混合系统，使用弱酸 (管路A) 及其同源碱 (管路B) 调节pH缓冲液，并使用氯化钠 (NaCl，管路C) 和水 (管路D) 调节缓冲液的离子强度。以上调节均通过Auto•Blend Plus技术实施，该技术能够直接将梯度表示为pH和离子强度。操作软件可针对所选缓冲液系统根据已知或测得的pKa自动计算要达到指定pH所需的酸碱百分比。

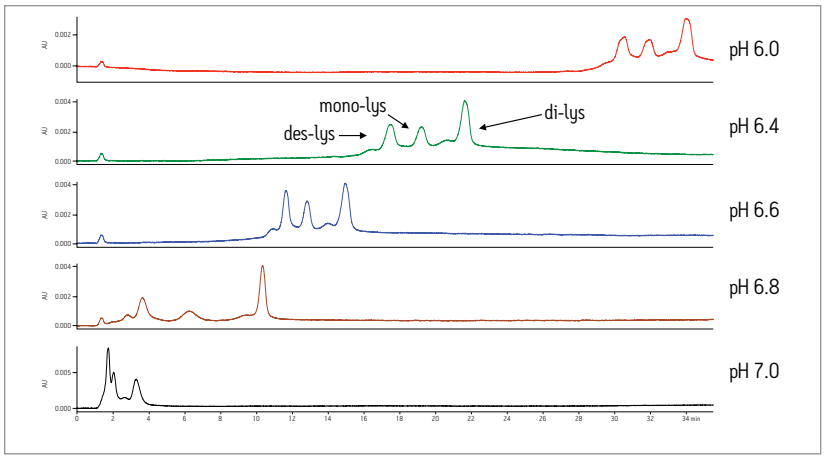

图1. 使用Protein-Pak Hi Res CM色谱柱和磷酸钠缓冲液分析嵌合抗体及其C端去去赖氨酸变体。分离采用了Auto Blend Plus技术，pH范围为6.0-7.0。

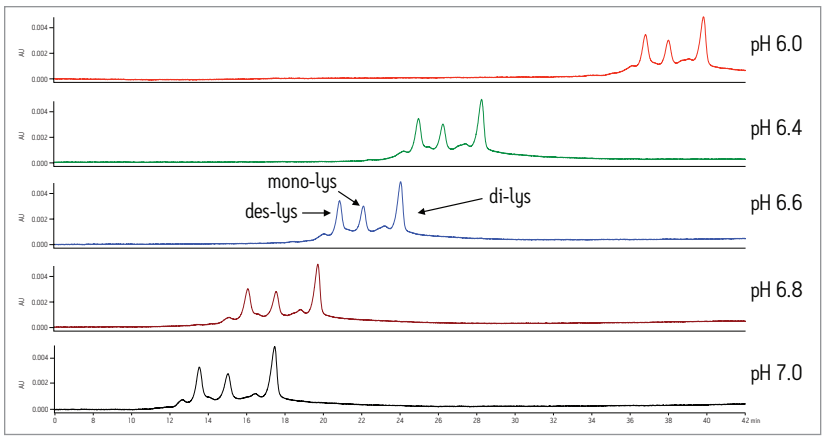

图2. 使用Protein-Pak Hi Res CM色谱柱和MES缓冲液分析嵌合抗体及其C端去去赖氨酸变体。分离采用了Auto Blend Plus技术，pH范围为6.0-7.0。

我们对比了两种常见的阳离子交换缓冲液 — 磷酸钠和MES((N-吗啉)-乙磺酸)，研究了这两种缓冲液系统的pH效应(图1和图2)。在pH 6.0-7.0的范围内测试了单一的盐浓度梯度(在60 min内 0-100 mM NaCl)。

在磷酸钠缓冲液系统中，单克隆抗体(des-lys)和C端去赖氨酸变体的分离度随pH变化而改变。在高pH条件下嵌合抗体和去赖氨酸变体会更早地洗脱出来。这是典型的阳离子交换色谱洗脱结果，蛋白质的总正电荷随pH升高而减少，因此分析物能够在较低的离子强度下被洗脱出来。未被敲除的品种(des-lys)在3.4 min(pH 6.8时)至29.0 min(pH 6.0时)的保留时间范围内洗脱(表1)，与该范围对应的NaCl浓度范围为4 mM(pH 6.8时)至68 mM(pH 6.0时)(表2)。含1个C端赖氨酸的变体(mono-lys)的抗体也具有类似的趋势。但是，在相同条件下，含2个C端赖氨酸的变体(di-lys)在保留时间和NaCl浓度方面的变动则较小。由于变体在pH升高时表现出了保留性的差异，因此与pH较低时相比，当pH为6.8时，mono-lys和di-lys变体之间能够达到更高的分离度(图1)。流动相pH为7时，抗体和电荷变体几乎没有保留。

保留时间(min)

	MES缓冲液			磷酸盐缓冲液		
pH	des-lys	mono-lys	di-lys	des-lys	mono-lys	di-lys
6.0	36.6	37.8	39.6	29.0	30.3	32.1
6.4	25.0	26.3	28.3	16.3	17.9	20.2
6.6	21.0	22.2	24.1	10.9	12.0	14.0
6.8	16.3	17.8	19.9	3.4	5.8	9.7
7.0	13.8	15.3	17.7	1.6	1.9	3.1

表1. 在pH 6.0-7.0范围内分别使用MES和磷酸钠缓冲液系统分离嵌合抗体(des-lys)及其C端去赖氨酸变体(mono-lys和di-lys)的保留时间。

浓度(mM)

	MES缓冲液			磷酸盐缓冲液		
pH	des-lys	mono-lys	di-lys	des-lys	mono-lys	di-lys
6.0	87	90	95	68	71	76
6.4	58	61	66	37	41	46
6.6	48	51	56	23	26	31
6.8	37	40	45	4	10	20
7.0	30	34	40	0	1	3

表2. 在pH 6.0-7.0范围内分别使用MES和磷酸钠缓冲液系统分离嵌合抗体(des-lys)及其C端去赖氨酸变体(mono-lys和di-lys)的保留时间所对应的NaCl浓度(单位 mM)。NaCl浓度的计算基于1 min的梯度保持时间以及0.350 mL的梯度延迟体积。

我们使用MES缓冲液系统进行相同的研究，其结果也证实缓冲液组成的确会影响IEX分离。与磷酸钠缓冲液系统相似，在高pH条件下，抗体和电荷变体的保留时间更短。但是，pH对分离度的影响并不显著(图2)。总的来说，与磷酸钠缓冲液系统相比，MES缓冲液将导致分析物的洗脱时间更长。通过MES缓冲液改变pH将改变分析物的保留时间，但选择性不会发生明显变化。

这两种缓冲液在保留性方面的差异可归因于缓冲液系统的离子强度不同。

缓冲液的离子强度取决于氯化钠和缓冲剂所提供的离子总量。对于本实验所用的两种缓冲剂来说，这一差异主要取决于钠离子的总量。磷酸钠缓冲液系统结合了磷酸盐的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠形式。因此，当弱酸及其同源碱所占的比例相等时，该缓冲液可提供三种形式的钠离子。相反，MES缓冲液系统由MES的弱酸形式及其同源钠碱组成。当MES缓冲液系统中酸和碱的比例相同时，该缓冲液可提供与同源碱等摩尔量(10 mM)的钠离子。因此，当NaCl的离子强度保持不变，且两种缓冲剂的浓度和pH相同时，由于磷酸盐缓冲液系统中存在更多的钠离子，其离子强度会比MES缓冲液更大。从离子数量的角度来说，pH为6.0时，磷酸钠缓冲液系统可为流动相额外提供22.7 mM的钠离子，而MES缓冲液系统可额外提供的钠离子仅为8.9 mM。两种缓冲液所能贡献的离子数量的差异导致抗体和C端去赖氨酸变体在磷酸钠缓冲液中更早地被洗脱出来(表1)。

随着pH升高，与仅能提供17.8 mM钠离子的MES缓冲液系统相比，磷酸钠能够提供更多碱形式的钠离子(pH = 7时32.3 mM)，因此，当NaCl浓度一定时，磷酸钠缓冲液的离子强度更大，从而进一步导致其保留时间将随pH变化而发生更大的改变(表1)。

我们还使用该分离方法进行了峰的确认。为了确认C端去赖氨酸变体，按照之前已发表的方案使用羧肽酶B处理抗体生物治疗药物[2,3]，然后使用pH为6.6的MES缓冲液系统进行分离。除了能够分析洗脱出的较小酸性或碱性变体外，使用这样的缓冲液条件还可分离抗体和C端去赖氨酸变体。我们对反应进行了20 min的监测，在预定的时间点取出等量的样品并将其与乙酸混合以终止反应。

对反应的时间进程研究证明了IEX方法的重现性以及di-lys和mono-lys形态向des-lys形态的转变。在时间进程研究中，所有主要成分的保留时间RSD均小于0.1%(表3)。我们还通过分析峰面积百分比确认了mono-lys和di-lys变体向des-lys抗体的转变。在反应的前2.5 min，最后洗脱的峰(di-lys)的峰面积百分比下降最为明显(图3)。在同一时间段内，des-lys和mono-lys的峰面积百分比均有所增加(图3和图4)。随后的时间点分析结果表明，des-lys的峰面积百分比继续增加，而mono-lys和di-lys变体的峰面积百分比则持续降低，并且在20 min处几乎检测不到这两种物质(图3)。这些结果都证明了di-lys和mono-lys向des-lys抗体的转变。

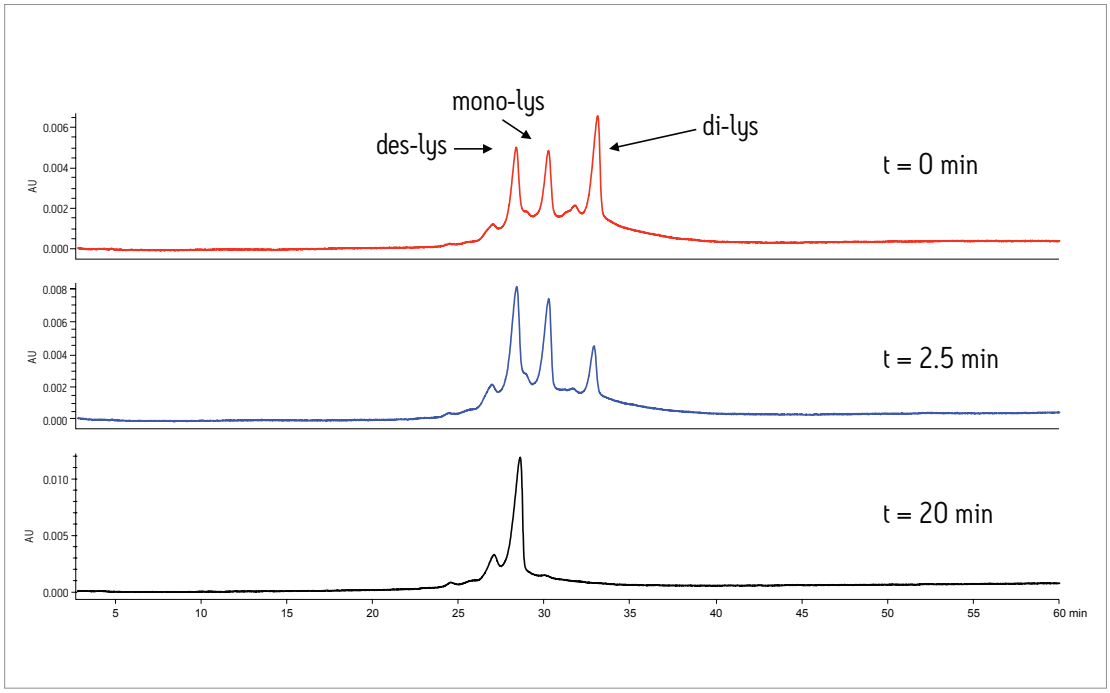

图3. 在pH为6.6的MES缓冲液中使用羧肽酶B处理嵌合抗体20 min。在0、2.5以及20 min处的分析结果证实了C端去赖氨酸变体的存在。

	磷酸盐缓冲液		
保留时间(min)	des-lys	mono-lys	di-lys
0.0	27.77	29.63	32.50
1.0	27.74	29.65	32.45
2.5	27.79	29.65	32.28
5.0	27.82	29.55	32.12
7.5	27.88	29.49	32.08
10.0	27.95	29.48	31.81
12.5	27.93	29.44	N/A
15.0	27.96	29.40	N/A
20.0	27.98	29.42	N/A
平均值	27.87	29.53	32.21
标准差	0.09	0.10	0.26
%RSD	0.33	0.32	0.80

表3. 嵌合抗体及其C端去赖氨酸变体IEX分离的保留时间重现性。使用羧肽酶B处理样品，并按照设定的时间间隔取样进行分析。

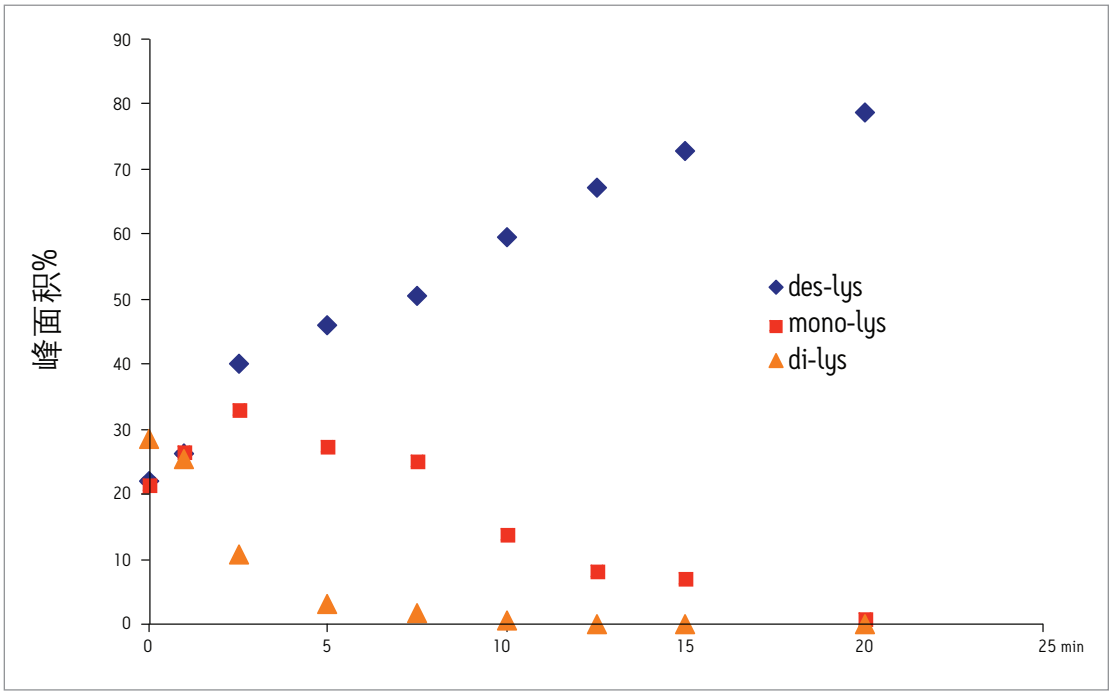

图4. 使用羧肽酶B处理样品的20 min内，不同时间点处嵌合抗体(des-lys)及其C端去赖氨酸变体(mono-lys和di-lys)的分析结果。由于存在其它变体，总的峰面积百分比不等于100%。

结论

为了确保工艺稳定性和实施质量控制，我们通常都会在整个生产过程中监测生物治疗类单克隆抗体及其C端去赖氨酸变体。对于这些电荷变体，Protein-Pak Hi Res CM色谱柱是分析和确认嵌合抗体及其C端去赖氨酸变体的一个有用工具。使用该色谱柱，结合ACQUITY H-Class Bio系统以及Auto•Blend Plus技术，可大大简化pH筛选过程和多个缓冲液系统的评估过程。嵌合抗体的分析方法开发研究表明，磷酸钠缓冲液的pH会对分析结果产生显著影响，而该影响在一定程度上取决于缓冲剂的离子强度。相反，MES缓冲液系统pH的改变几乎不会影响分离。四元溶剂混合系统以及Auto•Blend Plus技术大大简化了我们所进行的所有筛选研究。通过对比分离结果，我们最终得到了一种可用于分析和确认单克隆抗体及其C端去赖氨酸变体的稳定分析方法。

参考文献

1. Vlasak,J and Ionescu, "Hereterogeneity of Monoclonal Anibodies Revelealed by Charge-Sensitive Methods. " Curr. Pham. BioTech. , 2008, 9. 468-481
2. Walker JM and Winder J S, "C Terminal Sequence Analysis woith Carboxypeptidase Y." from Protein Protocols Handbook, Ed Walker, JM. Huamna Press Ince, Totowa, NJ.
3. Chen N, Nguyen M, Jacobsen F, Ouyang, J. "CEX- HPLC and Imaged cIEF of Antibodies with Engineered and Upaired Cysteines: from Multiple Main Peaks to One Peak." APPS, Nov 2008

实际应用解决方案

Auto•Blend Plus教程、IEX技术简报、参考文献720003601ZH。

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible、ACQUITY UPLC、Auto-Blend Plus、Empower是沃特世公司的注册商标。
Protein-Pak是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2011年 沃特世公司 中国印刷 2011年3月 720003836ZH KK-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com