

## 使用ACQUITY UPLC H-Class系统和Auto•Blend Plus开发高效稳定的离子交换 (IEX) 方法用于生物治疗性药物电荷变异体分析

Robert Birdsall, Thomas Wheat, and Weibin Chen  
沃特世公司 (美国马萨诸塞州米尔福德市)

### 应用优势

- 通过自动化分析技术提高工作效率
- 稳健的方法开发为生物治疗性药物电荷变异体的确证和定量带来一致且重现性良好的结果
- 无需制备额外缓冲液, 简化方法开发过程并提高方法重现性

### 沃特世解决方案

UNIFI® 生物制药平台解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ACQUITY UPLC可变波长紫外 (TUV) 检测器

Protein-Pak™ Hi Res SP SCX色谱柱

UNIFI科学信息系统

### 关键词

Auto•Blend Plus™ 技术, 阳离子交换, 抗体, IEX, SCX, 色谱, 生物分离, 蛋白质, 方法开发, 稳定性

### 简介

在表征和监测治疗性蛋白质的质量属性时, 电荷变异体分析非常关键。脱酰胺化、N端焦谷氨酸基团修饰、异构化、唾液酸化聚糖和C端赖氨酸裁剪等蛋白质修饰作用都会导致电荷变异体的形成<sup>1</sup>。在某些情况下, 这些变化会影响治疗性蛋白质的键合、生物活性、患者安全性和保质期。

生物制药行业通过离子交换色谱 (IEX) 和等电聚焦 (IEF) 凝胶电泳等方法来对电荷变异体进行表征。离子交换色谱法使用方便、适用性广并且分离度高, 因此对于生物治疗性药物开发特别有用。

如果要对生物制药开发过程中治疗性蛋白质的电荷异质性进行深入表征, 就需要稳定高效的IEX方法。在开发方法时, 通常会对所有可能涉及到的实验参数进行全面评估, 例如缓冲液/离子强度、缓冲液pH值、盐梯度、流速和柱温等。然而, 想要系统性地评估各个实验参数对分离性能的影响, 往往需要进行冗长的迭代过程, 这涉及到各种不同成分缓冲液的制备和测试。

缓冲液制备的差异可能会导致结果不一致, 进而延长方法开发时间。Waters® Auto•Blend Plus技术利用ACQUITY UPLC H-Class系统的四元溶剂管理技术, 使用纯溶剂和高浓度修饰剂储备液来解决这些问题。利用Auto•Blend Plus技术计算每种储备液的混合百分比获得所需pH值, 从而减少错误、降低耗材用量并缩短开发时间。

UNIFI生物制药平台解决方案因集成了上述特性, 非常适用于稳定的方法开发, 并轻松实现自动化, 从而提高工作效率。本应用纪要旨在展示Auto•Blend Plus技术在使用离子交换 (IEX) 方法进行电荷变异体分离方法优化过程中的高效率 and 稳定性。本应用纪要使用嵌合单克隆抗体英夫利昔单抗作为治疗性蛋白质应用示例。

## 实验

### 样品描述

按照制造商说明对Waters Protein-Pak Hi Res强阳离子交换色谱柱（4.6 × 100 mm, 7 μm, 部件号186004930）进行平衡。MES一水合物（部件号AC327761000）、MES钠盐（部件号AC397351000）和氯化钠（部件号S640-500）均购自Fisher Scientific公司。本研究中评估的嵌合单克隆抗体在所有实验中均接收到的原样使用，浓度为20 μg/μL。

### 液相色谱条件

LC系统:	配备Auto•Blend Plus的 ACQUITY UPLC H-Class系统
检测器:	ACQUITY UPLC TUV
吸收波长:	280 nm
样品瓶:	总回收样品瓶: 12 × 32 mm玻璃, 螺口, 带盖, 无切口
色谱柱:	Protein-Pak Hi Res SP, 4.6 × 100 mm, 7 μm
柱温:	25 °C
样品温度:	4 °C
进样体积:	3 μL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	100 mM MES 一水合物
流动相B:	100 mM MES 钠盐
流动相C:	1000 mM NaCl
流动相D:	18 M Ω H <sub>2</sub> O
缓冲条件:	20 mM MES, pH 6.8
梯度:	NaCl在25分钟内从 25 mM升至65 mM (见图2)

### 数据采集和处理信息学软件

UNIFI科学信息系统, 1.6版

## 结果与讨论

### Auto•Blend Plus技术

离子交换色谱（IEX）技术的方法开发常会包含耗时的试验和错误的方法。在迭代过程中，通常需要制备多种具有特定pH值和离子强度的缓冲液，然后对每种缓冲液系统进行测试，直至达到足够的分离效果。

Auto•Blend Plus技术是ACQUITY UPLC H-Class系统标配的集成软件。它的设计目的是避免方法开发中的反复猜测，并提高电荷变异体分析的工作效率。Auto•Blend Plus有助于分析人员对四元溶剂管理系统进行配置，可将纯溶液和浓缩储备液进行混合以获得所需梯度（图1）。最终用户可以得到一个易于使用的梯度表界面，通过这个界面直接用pH值和离子强度来表示梯度。软件会利用所选缓冲液系统的已知pK<sub>a</sub>值或经验校准表（图2），来自动计算特定pH值需要的酸碱对百分比。

Auto•Blend Plus技术可以运用一组纯组分进行多个缓冲液组成的测试，并轻松实现自动化，从而提高工作效率。

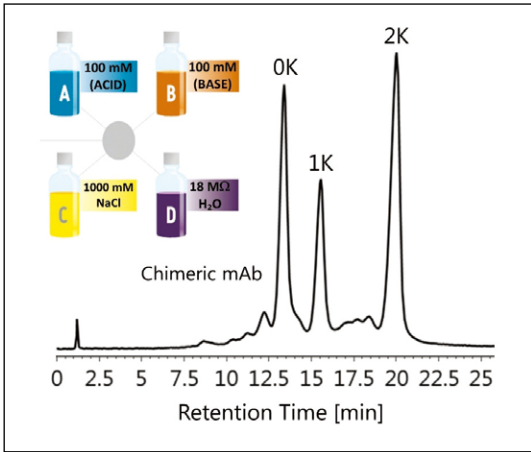


图1. Auto•Blend Plus技术利用ACQUITY UPLC H-Class系统的四元溶剂管理器混合储液瓶中的各种纯缓冲液，稳定分离治疗性蛋白质中的电荷变异体。在本研究中，该技术用于分离嵌合单克隆抗体中的C端赖氨酸截断变异体。

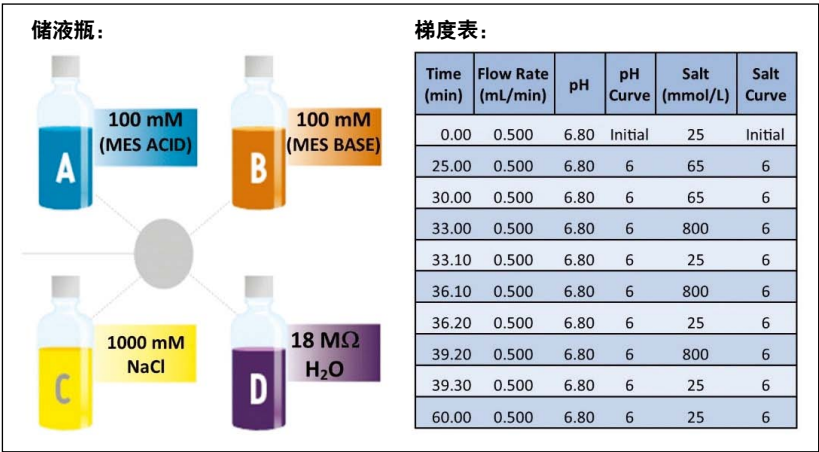


图2. 典型的Auto•Blend Plus技术储液瓶配置图示，附有用于分离嵌合单克隆抗体的梯度表。

稳定的方法开发

稳定性是用以衡量分离方法在系统发生微小变化时保持结果可重复性的能力。对于离子交换色谱而言，这些参数包括pH值、蛋白质载荷量和重现性。而对于制药公司而言，稳定的方法可以缩短在方法验证上花费的时间，从而提高工作效率。本文对这些参数进行了研究，以评估使用Auto•Blend Plus技术进行方法开发的稳定性。

Auto•Blend Plus验证和鉴定方案

在不同仪器、分析人员和实验室之间进行方法转换时，Auto•Blend Plus技术可以实现简便的系统验证和鉴定。

三个不同的MES缓冲液体系按照如下策略进行了制备和检测。从表1可以很容易地看出，每个缓冲液体系的实验pH值均与所需的检测pH值具有良好的一致性。这三个缓冲液体系因具有良好的精度而得出图3所示的可重现色谱图。Auto•Blend Plus技术可以根据鉴定方案轻松地进行调整，最大限度地缩短耗费在系统验证上的时间。

溶液装入

- A：100 mL 1.0 M MES一水合物与900 mL HPLC级水混合
- B：100 mL 1.0 M MES钠盐与900 mL HPLC级水混合
- C和D：HPLC级水

交叉校准pH计

- 低pH参比：混合1.8 mL A、0.2 mL B、8 mL C
- 中pH参比：混合1 mL A、1 mL B、8 mL C
- 高pH参比：混合0.2 mL A、1.8 mL B、8 mL C
- 记录pH值

溶液测试

- 低：低pH参比下0.5 mL/min (pH 5.13)；盐浓度：0
- 中：中pH参比下0.5 mL/min (pH 6.12)；盐浓度：0
- 高：高pH参比下0.5 mL/min (pH 7.10)；盐浓度：0

样品收集

- 运行至废液10分钟
- 用样品瓶收集洗脱液20分钟
- 3种测试方案重复上述步骤

pH测量

- 确证pH计校准情况
- 测量并记录每种测试溶液的pH值

测得pH值	缓冲液混合物1	缓冲液混合物2	缓冲液混合物3	平均值	标准差	RSD%
5.13	5.10	5.02	5.10	5.07	0.05	0.91
6.12	6.19	6.05	6.19	6.14	0.08	1.32
7.10	7.23	7.06	7.23	7.17	0.10	1.37

表1. 3种MES缓冲制备液的pH值实验结果。

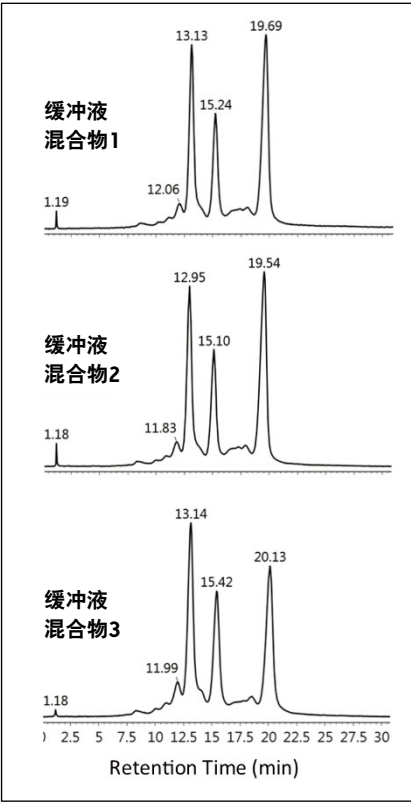


图3. 利用Auto•Blend Plus技术对两周时间内制备的3种不同MES缓冲液进行C端赖氨酸截断变异体分离。



## 随着样品浓度提高，分离性能保持不变

对于IEX色谱柱而言，进样蛋白质的量会影响保留时间和柱效。

进样体积范围1-10  $\mu\text{L}$ ，以1  $\mu\text{L}$ 为间隔，逐次进样嵌合单克隆抗体储液，来测试蛋白质载荷量对柱效的影响。总的峰面积按每次进样采集到5-30 min的积分峰面积计算。当蛋白质载荷量在20-180  $\mu\text{g}$ 之间增加9倍后，保留时间依然表现出良好的重现性，如图4所示。ACQUITY UPLC H-Class系统配合Auto•Blend Plus技术可以实现高度可靠并且准确的生物治疗药物电荷变异体定量和表征。

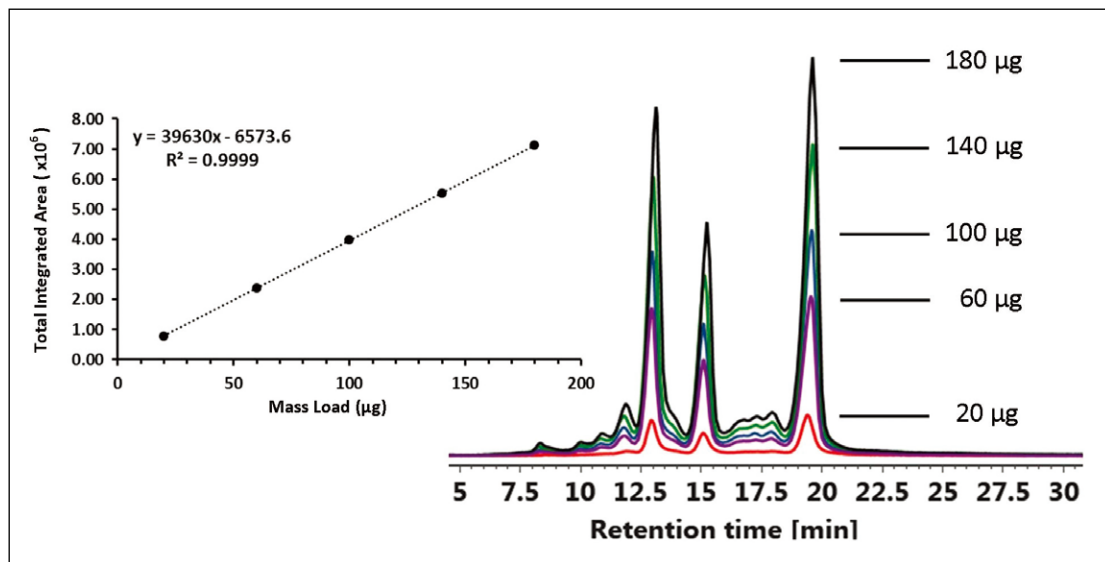


图4. 蛋白质浓度增加时的嵌合单克隆抗体分离色谱图叠加图。将积分总峰面积作为精度测量标准，如图中积分面积与载荷量所示。

## 在重复分析中获得高度可重现的分离结果

自动化分析技术可以最大限度地减少方法开发中的错误，同时提高产能。

通过40次进样模拟为期三天的无人值守分析操作，对Auto•Blend Plus技术进行评估。第1、20和40次进样的色谱图如图所示。60分钟的分离过程如图2所示，包含30分钟的分离梯度和30分钟的清洗和重新平衡时间。5个峰面积（包括3个主要C端赖氨酸截断变异体）的积分间隔以每个色谱图中的垂直线表示。表2中列出了每个峰面积的计算面积和总面积。

由此可见，Auto•Blend Plus技术提供了符合美国FDA指导原则<sup>2</sup>的可重现结果，单个峰的协方差低于12%，总峰面积协方差低于9%。Auto•Blend Plus技术可以实现自动化，并且具有良好重现性，因而为开发稳定的生物治疗药物电荷变异体表征方法提供了可靠的途径。

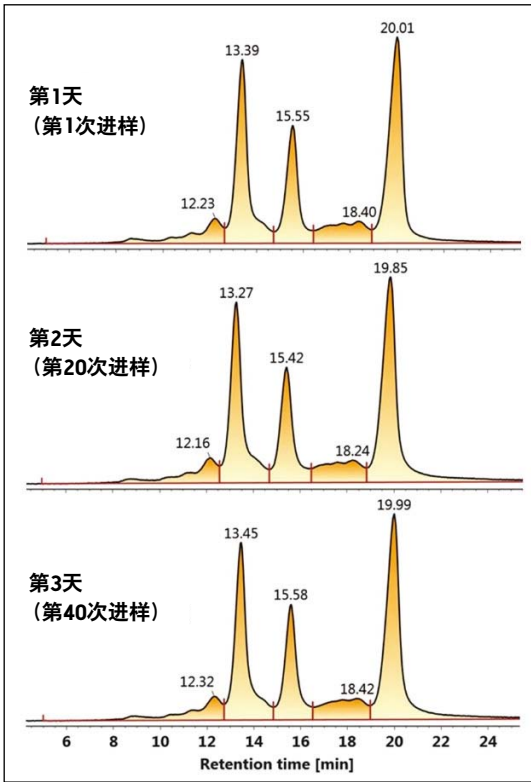


图5. 3天内3组不同时间间隔的嵌合单克隆抗体电荷变异体分离色谱图。积分间隔表示表2中计算的5个峰面积。

进样编号	峰1面积	峰2面积	峰3面积	峰4面积	峰5面积	合计
1	252260.0	788195.0	504001.0	296130.0	1052614.0	2893200.0
20	203498.0	660040.0	427519.0	237894.0	940898.0	2469849.0
40	214836.0	686459.0	437254.0	255744.0	974813.0	2569106.0
平均值	223531.3	711564.7	456258.0	263256.0	989441.7	2644051.7
SD	25517.4	67665.7	41632.2	29835.9	57276.6	221402.7
RSD%	11.42	9.51	9.12	11.33	5.79	8.37

表2. 积分峰面积结果。

## 结论

分析生物制药开发过程中的电荷异质性需要稳定的方法，这种方法不仅要能实现自动化，易于操作，还要能快速吻合生物制药行业的快节奏需求。

Auto•Blend Plus技术与ACQUITY UPLC H-Class系统的结合体现了一种以UV为基础的UNIFI生物制药平台解决方案，通过使用一组纯组分实现多种缓冲配比检测，从而简化了方法开发的过程。具备上述特性的Auto•Blend Plus再结合流程自动化功能，成为开发稳定方法和提高工作效率的强大工具。

## 参考文献

1. Du *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs*. 2012 Sep-Oct; 4(5):578-85.
2. Guidance For Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, May 2001.

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

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

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年11月 720004847ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司  
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 6555  
成都：028 - 6554 5999  
香港：852 - 2964 1800

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