

阳离子交换/疏水相互作用混合模式色谱固定相设计及其在抗体纯化中的应用研究进展

范佳琪, 孙泽帅, 张睿, 谷庆阳, 乔娟, 李楠, 王敏, 张荣月*

(北京石油化工学院 生物医药与健康学院, 北京 102617)

摘要: 随着单克隆抗体、双特异性抗体等抗体药物的发展, 下游纯化过程中聚集体、宿主细胞蛋白及结构相近副产物的去除面临更大挑战。Protein A/G亲和色谱虽可实现抗体的高选择性捕获, 但对抗体单体、聚集体及结构相近副产物的区分能力有限, 仍需具有正交选择性的精纯步骤。近年来, 阳离子交换/疏水相互作用混合模式色谱(CEX/HIC)因可在水相条件下协同利用静电和疏水作用而受到关注。该文围绕CEX/HIC固定相设计, 综述其多重保留机制以及基质、孔结构、间隔臂、配基组成和固定化方式对蛋白吸附、洗脱与分离选择性的影响。结合单克隆抗体和双特异性抗体纯化实例, 总结其在聚集体、宿主细胞蛋白及结构相近副产物去除中的应用。该文可为介质设计与抗体纯化工艺优化提供参考。

关键词: 混合模式色谱; 阳离子交换; 疏水相互作用; 配基设计; 单克隆抗体; 双特异性抗体

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-11

Advances in Cation-exchange/Hydrophobic Interaction Mixed-mode Chromatography: Stationary-phase Design and Applications in Antibody Purification

FAN Jia-qi, SUN Ze-shuai, ZHANG Rui, GU Qing-yang, QIAO Juan, LI Nan, WANG Min, ZHANG Rong-yue*

(College of Biomedicine and Health Science, Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China)

Abstract: The continued development of antibody therapeutics—including monoclonal antibodies and bispecific antibodies—intensifies downstream purification challenges, particularly in removing aggregates, host cell proteins, charge variants, and structurally related byproducts. Protein A/G affinity chromatography enables highly selective antibody capture; however, it provides insufficient discrimination between antibody monomers and closely related impurities. Therefore, orthogonal polishing steps with complementary selectivity remain essential. Cation-exchange/hydrophobic interaction mixed-mode chromatography (CEX/HIC) has been widely investigated because it combines electrostatic and hydrophobic interactions under aqueous conditions. This review summarizes the multiple retention mechanisms of CEX/HIC and analyzes the effects of pH, salt type, salt concentration, protein surface charge, and exposed hydrophobic regions on adsorption and elution. It further discusses the effects of matrix properties, pore structure, spacer-arm characteristics, ligand composition, and immobilization strategies on mass transfer, binding capacity, elution reversibility, and separation selectivity. Representative applications in monoclonal antibody purification are reviewed, including aggregate removal and host-cell protein clearance. Additionally, applications in bispecific antibody purification are examined, particularly for separating half-antibodies, homodimers, light-chain-deficient species, and other product-related variants. Compared with conventional cation-exchange or hydrophobic interaction chromatography alone, some CEX/HIC media can maintain useful selectivity at elevated conductivity while reducing dependence on highly concentrated salting-out conditions. Future studies should establish quantitative relationships among stationary-

收稿日期: 2026-06-25; 修回日期: 2026-07-24

基金项目: 国家自然科学基金(32372445); 北京市自然科学基金(2242005); 北京石油化工学院致远科研基金(2024004)

* 通讯作者: 张荣月, 博士, 教授, 研究方向: 高通量聚合物层析介质制备及其在生化分离纯化中的应用研究, E-mail: zhangrongyue@bipt.edu.cn

phase structure, multimodal interactions, protein properties, and impurity clearance to support more predictable media design and robust process optimization.

Key words: mixed-mode chromatography; cation exchange; hydrophobic interaction; ligand design; monoclonal antibody; bispecific antibody

随着单克隆抗体、双特异性抗体等抗体药物的发展,下游纯化过程需要处理的杂质类型也更加多样^[1]。在实际纯化过程中,单克隆抗体纯化中常见聚集体、宿主细胞蛋白(HCP)和电荷变体等杂质^[2];双特异性抗体由于结构组装过程更复杂,还可能产生半抗体、同源二聚体、轻链缺失体等结构相近副产物^[3]。这些杂质和副产物与目标抗体在分子大小、表面电荷分布和疏水性等方面具有较高相似性^[4],因此增加了分离纯化的难度。

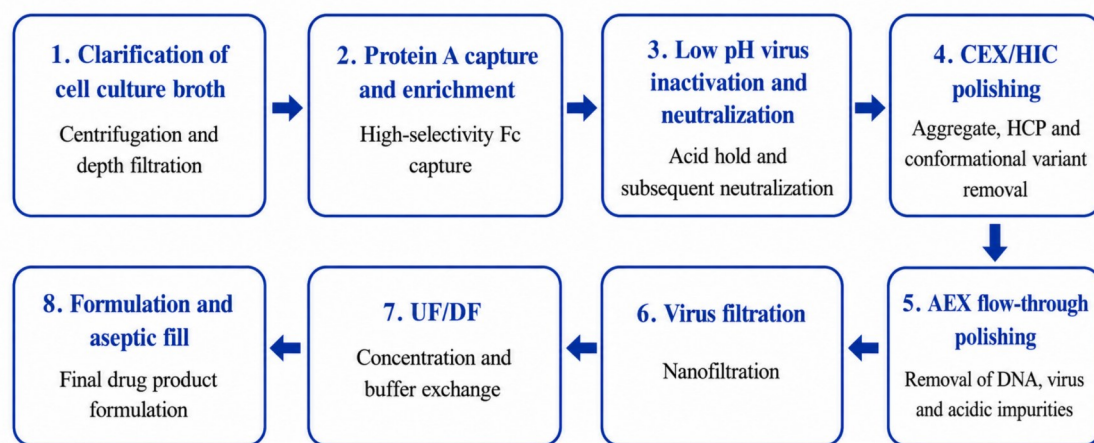


图1 抗体下游纯化中的应用环节示意图

Fig. 1 Schematic diagram of application steps in downstream antibody purification

在工业化抗体纯化平台中,其典型的单克隆抗体下游纯化流程如图1所示。Protein A亲和色谱通常作为核心捕获步骤^[5];Protein G则更多用于实验室规模免疫球蛋白G(IgG)纯化^[6],或作为部分Protein A结合能力较弱抗体类型的替代配基^[7]。Protein A和Protein G主要通过和抗体可结晶片段(Fc)区的特异性结合,高选择性地富集目标抗体并去除大量料液杂质。然而,部分HCP、抗体聚集体和结构相近的产品相关杂质仍可能进入亲和色谱洗脱组分,需在后续精纯步骤进一步去除^[8]。此外,Protein A亲和色谱通常采用酸性条件洗脱,低pH值暴露可能增加部分抗体的构象不稳定性及聚集风险^[9]。因此,Protein A/G主要承担高选择性捕获功能,后续仍需结合离子交换、疏水相互作用或混合模式色谱,进一步去除聚集体、HCP及产品相关变体。

离子交换色谱(IEC)和疏水相互作用色谱(HIC)是抗体纯化中的常用方法。IEC主要依赖电荷差异实现分离^[1],可用于去除HCP、聚集体和电荷变体^[10-11];HIC主要利用蛋白表面疏水性差异进行保留^[12],常用于抗体聚集体及产品相关杂质的去除^[13]。然而,在高电导料液处理中,高浓度离子可能削弱蛋白与离子交换配基之间的电荷作用,使传统阳离子交换色谱(CEX)的结合容量下降;HIC虽可在盐析条件下增强疏水保留,但高盐要求会增加缓冲液消耗,且目标抗体、聚集体和疏水性HCP之间仍可能发生共保留^[14-15]。因此,单一IEC或HIC往往难以满足复杂抗体样品的高选择性纯化需求。

在此背景下,混合模式色谱(MMC)因能够在同一固定相中引入两种或两种以上可参与保留的作用机制而受到关注^[16]。按固定相表面配基对分子的保留机制分类,MMC包括反相/离子交换、反相/亲水作用、亲水/离子交换、反相/亲水/离子交换以及生物大分子制备中常见的IEC/HIC等类型^[16-17]。其中,含反相或亲水相互作用的混合模式多用于小分子和肽类的分析分离,其流动相通常含有一定比例的有机溶剂;但较高浓度的有机溶剂可能改变部分抗体的构象、聚集状态和结合活性^[18]。

阳离子交换/疏水相互作用混合模式色谱(CEX/HIC)是IEC/HIC类MMC中的重要类型。相比之下,CEX/HIC可在水相缓冲体系中通过pH值和盐浓度调节静电作用与疏水作用的相对贡献,与制备型

抗体纯化具有较好的条件兼容性^[19]。阴离子交换/疏水型介质和疏水电荷诱导色谱等其他混合模式也可用于抗体纯化，其适用性取决于抗体的等电点（pI）、表面疏水性及具体工艺环节。在结合洗脱模式下，CEX/HIC 通常更适用于目标抗体在分离 pH 值条件下整体带正电，且目标抗体与杂质在表面电荷分布或疏水区域暴露程度方面存在差异的体系。

CEX/HIC 固定相通常通过离子交换作用和疏水作用共同实现蛋白保留。该类固定相一方面通过羧基、磺酸基等阳离子交换位点识别带正电蛋白、抗体及其电荷变体^[20]；另一方面，芳香环、脂肪链或杂环结构可增强对蛋白表面疏水区域的区分，并在静电作用被部分屏蔽时提供补充保留^[21]。其分离行为并非两种作用的简单叠加，而是同时受到 pH 值、盐种类、盐浓度、蛋白表面电荷分布和疏水区域暴露程度等因素影响。

近年已有多篇综述从混合模式色谱的固定相类型、商品化介质、二维色谱应用和抗体纯化等角度进行了总结。表 1 列出了其中与本文主题相关的代表性综述。这些研究为认识混合模式色谱的发展提供了基础，但对 CEX/HIC 固定相中阳离子交换位点与疏水结构之间的组合关系，以及这种结构设计如何影响蛋白吸附、洗脱和抗体杂质去除效果，仍缺少相对集中的归纳。基于此，本文以 CEX/HIC 固定相设计为主线，系统梳理其多重保留机制、基质与孔结构、配基官能团组成、固定化方式和功能层调控，并结合单克隆抗体和双特异性抗体纯化实例，分析该类介质在高电导料液处理、聚集体去除、HCP 清除和复杂抗体副产物分离中的应用价值。

表 1 与 CEX/HIC 固定相设计及抗体纯化相关的代表性综述
Table 1 Representative reviews relevant to CEX/HIC stationary-phase design and antibody purification

Year	Author	Review focus	Comments / Features
2019	Santarelli et al. ^[22]	Commercial multimodal chromatography media and their selectivity in protein and monoclonal antibody purification.	The relationship between ligand structure and protein selectivity was emphasized, but the structure-property relationships of CEX/HIC stationary phases were discussed only to a limited extent.
2023	Milne et al. ^[23]	Applications of multimodal chromatography in monoclonal antibody capture, polishing, and aggregate removal.	The review is directly relevant to antibody purification processes, but provides limited discussion of matrices, spacer arms, and immobilization strategies.
2025	Rupčíková et al. ^[24]	Mechanisms, media, and process conditions for antibody aggregate removal using multimodal media.	The review focuses on aggregate selectivity, but provides limited discussion of CEX/HIC ligand configurations and stationary-phase preparation.
2026	Javidanbardan et al. ^[25]	Retention mechanisms, commercial media, and applications of multimodal chromatography in the purification of different antibody-based products.	The review is relatively comprehensive, but systematic comparisons of CEX/HIC ligand combinations, spacer arms, and immobilization strategies remain limited.

1 分离机理与固定相构成

1.1 CEX/HIC 的多重保留机制

CEX/HIC 的保留行为并不是离子交换作用与疏水作用的简单叠加，而是受蛋白表面电荷分布、疏水区域暴露程度、配基电离状态、基质微环境和流动相组成共同影响。Krázek Adamíková 等^[26]以多种模型蛋白考察 Capto MMC 上的吸附与洗脱行为，发现 pI 约为 4~5 的酸性蛋白在流动相 pH 值高于其 pI 时仍可能被固定相保留。其中，疏水性较强的牛血清白蛋白和胎球蛋白仍表现出明显吸附，而较亲水的卵清蛋白吸附较弱。这表明，即使蛋白的净电荷相近，其表面疏水性差异仍可能导致不同的保留行为。该研究还发现，不同种类的盐对蛋白吸附的影响不同，表明 CEX/HIC 的保留行为不能仅以电导率判断，还需结合 pH 值、盐的种类及蛋白和配基性质进行分析。

Zhang 等^[27]在 IgG4 单体/聚集体分离中比较了 Capto MMC 与粒径更小的 Capto MMC ImpRes：前者获得 99.0% 的单体纯度和 78.6% 的收率，后者分别提高至 99.3% 和 87.9%，说明相同配基体系下，介质粒径及结构特征仍会影响蛋白传质和产品回收率。Lee 等^[28]则发现，双特异性抗体在 pH ≤ 5.0 时即使盐浓度达到 1 mol/L 仍难以完全洗脱，而 pH > 6.0 后高盐洗脱明显改善，进一步说明盐浓度的作用取决于蛋白电荷、配基电离及疏水贡献，不能脱离 pH 值单独判断。

CEX/HIC 的盐耐受性通常表现为，相较传统 CEX 在一定离子强度范围内仍能维持具有工艺意义的结合容量或分离选择性，但这并不意味着提高盐浓度必然有利于蛋白吸附^[21]。当 pH 值低于蛋白 pI 且配基保持充分解离时，低电导条件通常更有利于静电结合^[29]。随着盐浓度升高，静电作用受到屏蔽，

而盐析效应可能增强疏水作用,二者的相对贡献共同决定蛋白的实际保留强度^[26]。因此,高电导上样的主要工艺价值在于部分 CEX/HIC 介质可减少上样前的稀释、脱盐或缓冲液置换步骤,而不应将高盐条件视为普遍适用的最佳吸附条件。工艺开发中仍需综合考察 pH 值、盐种类、盐浓度、动态结合容量和洗脱回收率^[30]。

除静电作用和疏水作用外,部分 CEX/HIC 固定相还可能引入氢键、 $\pi-\pi$ 作用或电荷诱导作用^[16, 31]。含芳香环的配基可能增强对芳香族氨基酸残基暴露较多蛋白的识别^[32];咪唑、吡啶等杂环结构则可能随 pH 值变化改变电离状态,从而影响蛋白的结合和洗脱行为^[33]。因此,配基设计的重点不应只是提高电荷密度或疏水强度,而应在结合能力、洗脱可逆性和蛋白稳定性之间取得平衡,其多重保留机制如图 2 所示。

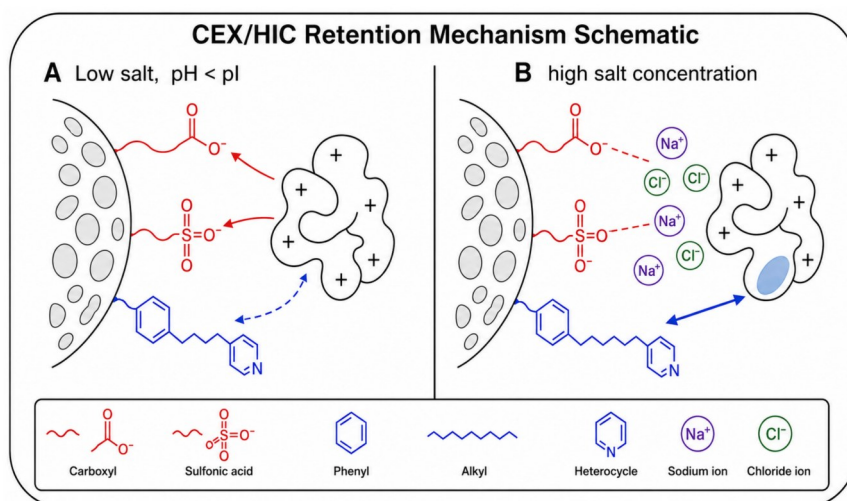


图 2 蛋白与 CEX/HIC 固定相之间多重相互作用示意图

Fig. 2 Schematic illustration of multiple interactions between proteins and CEX/HIC stationary phases

1.2 固定相构成

固定相通常由基质、间隔臂和配基等部分共同构成^[34],其典型结构组成如图 3 所示。其中,基质提供机械支撑、孔道结构和传质通道^[35];配基提供主要识别位点,并直接影响蛋白的保留和洗脱行为^[36];间隔臂则连接基质与配基,并调节配基在孔道内的空间位置、自由度和局部微环境^[37]。因此,CEX/HIC 固定相的性能不能只用配基种类解释,还需要同时考虑基质表面性质、孔径分布、间隔臂结构、pH 值耐受范围和偶联方式^[38-39]。

间隔臂可增大配基与基质表面或孔壁之间的距离,降低基质对识别位点的空间遮蔽效应,有利于抗体等大分子接近配基^[37]。间隔臂过短时,基质表面或孔壁可能遮蔽配基,并增加目标蛋白接近识别位点时的空间位阻^[40];适度延长间隔臂则有利于提高配基的可及性和构象自由度。但过长或过密的柔性链可能发生回折、缠结或形成过厚的功能层,从而增加传质阻力并降低有效位点利用率^[41]。聚乙二醇类亲水间隔单体还可促进功能层水化和溶胀,并减弱基质本体引起的非特异性吸附。因此,间隔臂的长度、亲疏水性和接枝程度应结合基质性质、孔结构及目标蛋白尺寸进行优化。

琼脂糖等亲水柔性基质背景吸附较低,对抗体等大分子较温和,常用于制备型蛋白纯化。但这类基质的机械强度和耐压性相对有限,在高流速或大规模柱层析中可能受到限制^[42]。甲基丙烯酸酯^[43]、聚苯乙烯-二乙烯基苯和其他聚合物微球通常具有较好的机械强度,也便于通过表面改性引入不同类型的功能配基^[44-45]。不过,部分聚合物骨架本身具有一定疏水性^[34, 46],可能增加蛋白的背景吸附。硅胶基质^[42]通常柱效较高、传质速度较快,常用于分析色谱;但硅胶在强酸或强碱条件下稳定性有限,pH 值适用范围通常窄于多数聚合物基质。常见色谱基质的主要特性及其配基适配性见表 2。

对于疏水性较强的聚合物基质,如果再引入强疏水配基,蛋白可能出现吸附过强、峰拖尾或回收率下降^[47]。因此,固定相设计中常通过引入亲水间隔臂或两性离子基团,以降低疏水性基质引起的非特异性吸附^[48]。相较而言,亲水基质自身背景疏水吸附较低,更有利于降低基质本体对蛋白保留的干

扰。近年来，膜吸附体和无纺材料也被用于多模式阳离子交换介质^[49-50]。这类载体主要依赖对流传质，适合高流速操作。Pham 等^[49]将多模式阳离子交换膜用于毕赤酵母上清液中单链抗体片段纯化，在优化条件下可将产物纯度由 83% 提高至约 92%~95%。需要注意的是，功能层过厚会增加传质阻力，配基密度过高也可能造成吸附过强或洗脱困难^[39]。

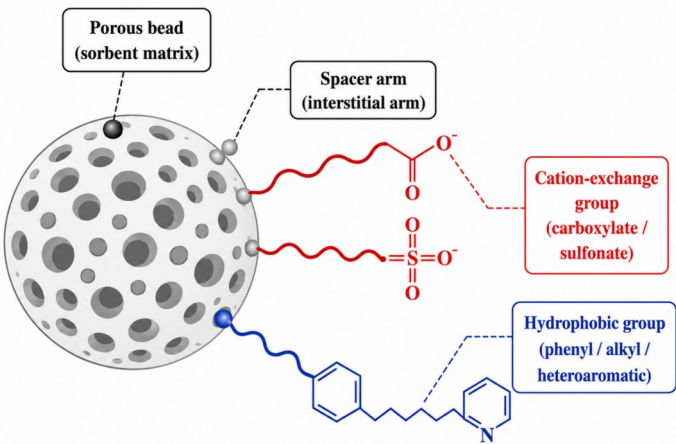


图3 CEX/HIC 固定相结构组成示意图
Fig. 3 Schematic diagram showing structural composition of CEX/HIC stationary phase

表2 常见基质特性与配基适配

Table 2 Common matrix characteristics and ligand compatibility

Matrix type	Representative materials	Main characteristics	Ligand design considerations
Hydrophilic flexible matrix	Agarose	Good biocompatibility and mild separation conditions for biomacromolecules; relatively limited mechanical strength and pressure resistance.	Aromatic or alkyl ligands may be introduced, but ligand hydrophobicity and elution conditions should be carefully controlled.
Hydrophobic polymer matrix	PGMA-DVB and related polymeric materials	Good mechanical strength and ease of functionalization; intrinsic matrix hydrophobicity may cause nonspecific protein adsorption.	Hydrophilic spacer arms or hydrophilic/ionic groups should be introduced to reduce nonspecific adsorption.
Silica or rigid matrix	Silica and rigid polymers	Rapid mass transfer and high column efficiency; silica generally has a relatively narrow applicable pH range.	Suitable for analytical separations or short-chain ligands; surface protection and pH stability should be considered.
Membrane or nonwoven support	Functionalized membranes and PBT nonwoven materials	Convection-dominated mass transfer, making these supports suitable for high-flow-rate and continuous processes.	Pore structure, functional-layer thickness, and ligand density should be simultaneously optimized.

2 CEX/HIC 配基结构设计

CEX/HIC 配基通常由阳离子交换基团（羧基或磺酸基）与疏水基团（苯基、烷基、杂环等）共同构成^[51]。根据阳离子交换基团的解离特性，可将其分为弱阳离子交换/疏水型（WCX/HIC）和强阳离子交换/疏水型（SCX/HIC）两类。

2.1 弱阳离子交换/疏水配基

弱阳离子交换/疏水配基多以羧基为离子交换位点，并通过引入芳香环、脂肪链或杂环结构增强疏水相互作用^[31]。羧基的解离程度随 pH 值改变，Li 等^[52]进一步拆分比较了混合模式配基中羧基和疏水基团对抗体吸附与洗脱的贡献，结果表明羧基主要影响电荷吸附，而疏水结构会改变结合强度和洗脱窗口。因此，WCX/HIC 配基设计不能只提高羧基密度，还需要同时控制疏水基团的类型和暴露程度。

羧基-芳香环类配基包括对氨基马尿酸、苯丙氨酸和 L-色氨酸等结构。芳香环可提供疏水作用，也可通过 π - π 作用提高对某些蛋白或杂质的识别能力^[53]。Gu 等^[32]以苄胺型苯基配基（BA）为基础，引入羟基和羧基构建 4-（氨甲基）苯酚（AMP）和 4-（氨甲基）苯甲酸（AMA）。与 BA 相比，AMP 和 AMA 对牛血清白蛋白（BSA）的饱和吸附容量均降低，而 IgG/BSA 吸附容量比分别提高至 2.43 和 3.10；其中 AMP 还表现出一定盐耐受性，并从模拟血清中获得纯度超过 96% 的 IgG。结果表明，苯环邻近官能团引起的局部极性和电荷变化可显著影响蛋白吸附选择性，因此芳香型 CEX/HIC 配基设计需

同时考虑疏水强度及官能团的极性和电离性质。对于抗体聚集体,芳香型配基可能放大单体与聚集体之间的保留差异,但疏水作用过强也可能增加HCP等杂质的共吸附^[24, 54]。

羧基-脂肪链类配基以氨基己酸、 γ -氨基丁酸等为代表。这类配基通常提供较温和的疏水作用。Koehnlein等^[55]进一步采用含2-氨基-4-甲基戊酸配基的混合模式阳离子交换树脂处理疏水性较强的复杂抗体分子,发现中等疏水作用有助于兼顾杂质去除和抗体回收率。

与典型羧基型WCX/HIC配基不同,部分咪唑、吡啶或硫基杂环配基更接近疏水电荷诱导型多模式配基,其作用特点在于可质子化氮原子随pH值变化改变电荷状态,同时杂环结构可参与疏水作用或 π - π 作用^[56-57]。Ye等^[33]研究了疏水电荷诱导色谱中的蛋白-配基相互作用,结果显示咪唑、吡啶类结构与IgG的结合行为存在差异,提示杂环氮原子的电离状态和疏水骨架共同影响免疫球蛋白吸附。这类配基已被用于免疫球蛋白吸附和分离研究,其pH值响应特征也为较温和的洗脱条件设计提供了依据。

2.2 强阳离子交换/疏水配基

强阳离子交换/疏水配基通常含有磺酸基等强酸性基团。相较WCX/HIC, SCX/HIC在蛋白工艺纯化中的系统应用报道相对较少,更多见于分析分离或模型蛋白研究。与羧基相比,磺酸基在较宽pH值范围内更容易保持解离状态^[58],因此可提供较稳定的阳离子交换作用。若同时引入苄基、苯基、烷基链或咪唑类结构,固定相还可获得一定疏水保留能力^[59-60]。Zhao等^[59]制备的含磺酸基和苄基的SCX/HIC双功能固定相即表现出低盐条件下的离子交换特征和高盐条件下的疏水相互作用特征。

这类配基更常见于强碱性目标物、离子化小分子或需要较强电荷保留的分析场景^[30]。Wolrab等^[58]将制备的强阳离子交换/两性离子交换型混合模式固定相用于药物和生物胺分离,发现磺酸基等强酸性基团适合需要稳定强电荷保留的分析对象。若用于抗体等大分子纯化,较强电荷吸附可能使洗脱更依赖盐浓度或pH值变化,因此需要重点评价回收率、活性保持和吸附可逆性^[30, 61]。表3总结了阳离子交换/疏水混合模式常见的单配基。

3 CEX/HIC 固定化策略与功能层调控

配基固定化方式会影响固定相表面功能基团的密度、空间分布和可及性,从而改变蛋白吸附容量、洗脱行为和分离选择性^[16, 66]。对于CEX/HIC固定相,固定化过程不仅是将配基连接到基质表面,还会影响阳离子交换位点与疏水结构在孔道中的分布状态。因此,介质设计时需要同时考虑基质孔结构、配基密度、功能层厚度和蛋白传质过程。

硫醇-烯点击反应和表面接枝聚合是构建CEX/HIC固定相的常用策略,其固定化方式和功能层组成会共同影响介质的保留行为。硫醇-烯点击反应条件相对温和,适合用于固定组成明确的混合模式配基。Yang等^[20]利用该方法制备了弱阳离子交换/疏水双功能聚合物固定相,配基密度达到0.28 mmol/g,蛋白回收率超过96%。表面接枝聚合则可通过改变单体比例调节功能层组成。徐千惠等^[67]发现,不同接枝比例会影响微球表面离子功能层分布及蛋白结合能力;Bo等^[68]也指出,共聚单体比例变化可调节混合模式固定相选择性;Vonk等^[69]则通过后聚合光接枝实现了整体柱表面功能化,并用于完整蛋白和蛋白酶解产物分离。

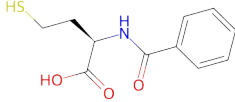
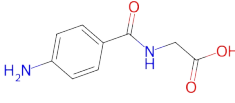
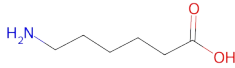
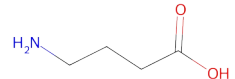
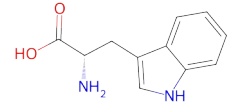
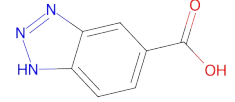
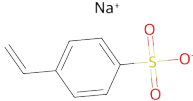
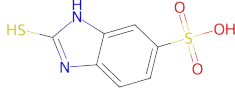
然而,配基密度和功能层厚度并非越高越好。较高的配基密度可增加结合位点,但也可能增强局部电荷作用或疏水作用,使蛋白吸附过强、峰形变宽或洗脱困难;接枝层过厚则可能限制抗体等大分子进入孔道,导致传质受阻和动态结合容量下降^[39]。因此,CEX/HIC固定相设计应在结合容量、洗脱可逆性和分离选择性之间取得平衡。除点击反应和接枝聚合外,席夫碱偶联、离子液体修饰和分子印迹等方法也可用于构建多相互作用固定相^[70-73],但目前这些方法在CEX/HIC抗体纯化中的系统应用仍较少,后续还需进一步评价其批间重复性、配基稳定性和放大制备可行性。

4 在抗体纯化中的应用

CEX/HIC在生物制药领域主要用于单克隆抗体(mAb)^[2]和双特异性抗体(bsAb)^[74]的纯化。与Protein A亲和层析相比,CEX/HIC不依赖生物亲和配基,其保留和洗脱行为可通过pH值和盐浓度调

节^[75]，部分体系还可采用较温和的洗脱条件，从而降低抗体长时间暴露于低pH值环境所带来的构象不稳定和聚集风险^[76]。但CEX/HIC通常不能替代Protein A捕获步骤，其应用价值主要体现在亲和捕获后的正交精纯，以及抗体变体、聚集体和bsAb相关副产物的去除^[77]。

表3 CEX/HIC常见配基的官能团组成与作用特点

Ligand type	Functional group combination	Representative ligands	Representative ligand structures	Interaction sites	Refs.
WCX/ HIC	Carboxyl - aromatic group (羧基 - 芳香环)	2-Benzamido-4-mercaptoputyric acid		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; phenyl ring: hydrophobic interaction.	[29]
		p-Aminohippuric acid		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; phenyl ring: hydrophobic interaction.	[53]
	Carboxyl - alkyl group (羧基 - 烷基)	6-Aminohexanoic acid		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; alkyl chain: hydrophobic interaction.	[62]
		4-Aminobutyric acid		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; alkyl chain: hydrophobic interaction.	[63]
	Carboxyl - heterocyclic group (羧基 - 杂环)	L-Tryptophan		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; indole ring: hydrophobic and $\pi - \pi$ interactions.	[54]
		1H-Benzotriazole-5-carboxylic acid		Carboxyl group: weak cation-exchange interaction; benzotriazole ring: hydrophobic interaction, hydrogen bonding, and possible π interactions.	[64]
SCX/ HIC	Sulfonate - phenyl group (磺酸基 - 苯基)	Sodium 4-styrenesulfonate		Sulfonate group: strong cation-exchange interaction; phenyl ring: hydrophobic interaction.	[65]
	Sulfonate - imidazole group (磺酸基 - 咪唑)	2-Mercaptobenzimidazole-5-sulfonic acid		Sulfonate group: strong cation-exchange interaction; benzimidazole aromatic heterocycle: hydrophobic and $\pi - \pi$ interactions.	[59]

Johansson等^[21]发现多模式固定相在较高盐浓度下仍可捕获带正电生物分子，说明当静电作用受到部分屏蔽时，疏水作用仍可提供补充保留。需要指出的是，盐耐受性是指介质在一定离子强度范围内仍能维持可利用的结合容量或分离选择性^[78]，并不意味着升高盐浓度必然有利于蛋白吸附。当pH值低于蛋白pI且配基保持解离时，低电导条件通常更有利于静电结合；随着盐浓度升高，实际保留强度由静电屏蔽与疏水盐析效应共同决定。因此，盐耐受性的主要工艺价值在于提高介质对高电导料液的适配性，并减少上样前的稀释、脱盐或缓冲液置换。

膜层析以对流传质为主，已广泛用于生物制药下游过程中的流穿抛光和杂质去除。近年来，多模式阳离子交换功能化膜和无纺载体也被用于高电导料液中抗体及抗体片段的捕获与精纯^[79]。Fan等^[80]制备了以2-巯基吡啶-3-羧酸为配基的多模式阳离子交换无纺膜，并用于单克隆抗体纯化，结果表明pH值和电导均会显著影响抗体结合行为。Kr zel Adam kov 等^[26]对Capto MMC的研究进一步表明，

CEX/HIC 的保留行为不能仅用电导率解释, 还需综合考虑 pH 值、盐种类、盐浓度及蛋白性质。通过调节 pH 值和盐浓度, 可改变抗体单体与聚集体之间的保留差异, 其典型结合-洗脱过程如图 4 所示。CEX/HIC 在抗体捕获、精纯及相关杂质去除中的主要应用类型、代表性介质及作用机制见表 4。

表 4 CEX/HIC 在抗体纯化中的应用类型及作用特点

Table 4 Application types and functional characteristics of CEX/HIC in antibody purification

Application context	Application object	Representative media/ligands	Main mechanism	Refs.
Monoclonal antibody capture or polishing	IgG, IgG4, and other monoclonal antibodies	Capto MMC; Capto MMC ImpRes	pH and salt concentration jointly regulate electrostatic and hydrophobic interactions, thereby amplifying retention differences between antibody monomers and aggregates.	[27]
Separation of bi-specific antibody-related by-products	Half-antibodies, homodimers, light-chain-deficient species, and aggregates	Capto MMC ImpRes	Structurally related by-products are differentiated on the basis of differences in charge, hydrophobicity, and conformation.	[28]
Capture from high-conductivity feedstocks	Fermentation supernatants, cell-culture supernatants, and intermediate process streams	Multimodal cation-exchange membranes; 2-mercaptopropyl-3-carboxylic acid-functionalized nonwoven membranes	Hydrophobic interactions provide supplementary retention when electrostatic interactions are partially screened, while membrane or nonwoven supports enhance mass-transfer efficiency.	[21, 49, 79–80]

4.1 单克隆抗体

De Sousa 等^[81]以 Capto MMC 树脂纯化人免疫球蛋白 G, 在 60 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.75) 且未额外添加盐的条件下, 采用 Langmuir 模型拟合得到的最大吸附容量为 549.2 mg/g。需要注意的是, 该数值属于模型拟合的静态吸附参数, 不能直接等同于工业柱运行中的动态结合容量。在一项针对 IgG4 单抗单体和聚集体分离的研究中, Capto MMC 在结合-洗脱模式下可从 3 种聚集体中分离单抗单体, 聚集体去除后单体纯度达到 99%, 收率为 78.6%; 采用粒径更小的 Capto MMC ImpRes 填料时^[27], 单体纯度提高至 99.3%, 收率提高至 87.9%。Hahn 等^[30]进一步提出 pH 值控制的结合-洗脱模式, 证明调节 pH 值可以改变离子交换作用与疏水作用的相对贡献, 从而改善抗体中 HCP 和聚集体的去除效果。这些研究说明, CEX/HIC 用于单抗纯化时, 关键不只是提高结合容量, 还在于利用 pH 值、盐浓度和配基结构调节不同组分之间的保留差异。

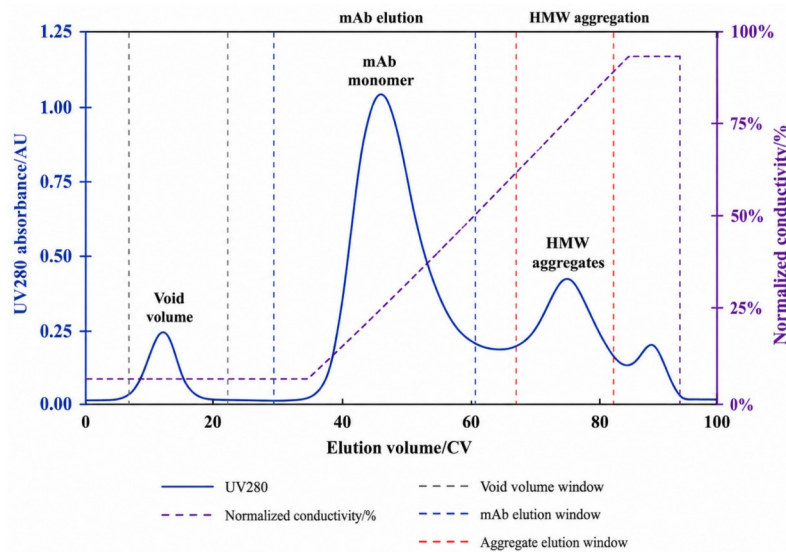


图 4 CEX/HIC 分离抗体单体与聚集体的示意洗脱色谱图^[27]

Fig. 4 Schematic elution chromatogram illustrating separation of antibody monomers and aggregates via CEX/HIC^[27]

4.2 双特异性抗体

Li 等^[74]指出, bsAb 下游纯化不仅要完成目标产物捕获, 还需要同时处理产品相关杂质和工艺相关杂质。因此, bsAb 纯化更需要能够同时区分电荷、疏水性和构象差异的色谱步骤。双特异性抗体结

构较单抗更复杂^[3]，纯化过程中常见半抗体、同源二聚体、轻链缺失体和聚集体等副产物^[74, 77, 82-83]。Lee等^[28]研究了bsAb在混合模式阳离子交换色谱中的盐-pH协同洗脱行为。结果显示，当pH ≤ 5.0时，即使在1 mol/L盐浓度下抗体仍难以洗脱，说明低pH值条件下静电作用和疏水作用可能同时增强；当pH > 6.0时，高盐条件下洗脱明显改善，其中pH 7.0在该体系中兼顾了收率和抗体活性。在WuXiBody双抗纯化中^[83]，经Capto MMC ImpRes层析后，轻链缺失副产物含量降至0.2%，聚集体含量降至1.2%，较上样样品分别降低15.3%和9.6%。Tang等^[77]也报道，Capto MMC ImpRes在优化条件下可降低半抗体、hole-hole同源二聚体和聚集体等副产物含量。上述研究说明，CEX/HIC在bsAb纯化中的作用不仅来自结合容量，还来自pH值、盐浓度和配基结构对不同副产物保留差异的调节。但不同bsAb的电荷分布、疏水性和构象稳定性差别较大，故不同种类的该类抗体均需系统优化分离工艺。

5 结论与展望

总体来看，CEX/HIC固定相以带负电的阳离子交换位点和中等强度疏水结构为核心，并可叠加氢键、 π - π 或电荷诱导作用。其特点是在水相体系中利用pH值和盐条件连续调节多种相互作用，对蛋白表面电荷和疏水性差异进行协同识别。相较单一CEX，部分CEX/HIC介质在较高电导下仍可保持可利用的结合能力；相较单一HIC，其可降低对高浓度盐析剂的依赖，并通过电荷选择性扩大分离窗口。该类介质适用于单克隆抗体和双特异性抗体的捕获或精纯，尤其可用于聚集体、HCP、电荷变体以及半抗体、同源二聚体、轻链缺失体等结构相近副产物去除，但通常作为Protein A之后的正交抛光步骤，而不是亲和捕获的普遍替代。

后续研究可聚焦两个方向。第一，建立基质、孔结构、间隔臂、配基电荷/疏水参数与蛋白表面性质之间的定量关系，明确“结构-相互作用-保留-杂质清除”的因果链。第二，统一静态容量、动态结合容量、回收率、HCP清除率和聚集体去除率等评价条件，并将高通量筛选、分子模拟和机理模型用于介质比较及工艺放大。通过上述工作，CEX/HIC的开发可由经验性条件筛选进一步转向可预测的固定相设计和稳健工艺优化。

参考文献：

- [1] Tang S, Tao J, Li Y. *Antib. Ther.*, **2024**, 7 (1): 1-12.
- [2] Jafarzadeh Chehraghi E, Akbarzadehlaleh P, Shamsasenan K. *Adv. Pharm. Bull.*, **2025**, 15 (1): 27-45.
- [3] Chen S W, Zhang W. *Antib. Ther.*, **2021**, 4 (2): 73-88.
- [4] Liang X, He Q, Qin G, Li G, Li Q, Tan H, Wang Z, Fan M, Xu D. *J. Chromatogr. B*, **2023**, 1225: 123767.
- [5] LeBarre J, Bhandari D, Barbieri E, Shu Q, Li X, Chandra D, Xu X, Phillips M, Bill J, Williams T, Gilbert P, Major C, Roush D, Cramer S M, Lenhoff A M, Boi C, Carbonell R G, Menegatti S. *Sep. Purif. Technol.*, **2026**, 382: 136113.
- [6] Bourel L, Bray F, Vivier S, Flament S, Guilbert L, Chepy A, Rolando C, Launay D, Dubucquoi S, Sobanski V. *J. Proteome Res.*, **2024**, 23 (9): 3933-3943.
- [7] Yang C, He B, Zhang H, Wang X Q, Zhang Q, Dai W B. *Pharmaceutics*, **2023**, 15 (1): 187.
- [8] Ito T, Lutz H, Tan L, Wang B, Tan J, Patel M, Chen L, Tsunakawa Y, Park B, Banerjee S. *Biotechnol. Prog.*, **2024**, 40 (4): e3448.
- [9] Lin S, Wang Y. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2025**, 13: 1567923.
- [10] Jing S Y, Shi C, Gao D, Wang H B, Yao S J, Lin D Q. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1707: 464292.
- [11] Khanal O, Kumar V, Lenhoff A M. *Biotechnol. Bioeng.*, **2021**, 118 (1): 164-174.
- [12] Eeltink S, Ewonde R E, Papp D, Bui Q D, Broeckhoven K, Scheich D, Lingg N, Pohl C A, Guillarme D. *J. Chromatogr. A*, **2025**, 1756: 466089.
- [13] Dilks A T, Gilchrist J, Lam Y, Nicholes N, Stanley B. *Biotechnol. Prog.*, **2023**, 39 (4): e3351.
- [14] Herman C E, Min L, Choe L H, Maurer R W, Xu X, Ghose S, Lee K H, Lenhoff A M. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1702: 464081.
- [15] Kreusser J, Jirasek F, Hasse H. *Eng. Life Sci.*, **2021**, 21 (11): 753-768.
- [16] Šýkora D, Řezanka P, Záruba K, Král V. *J. Sep. Sci.*, **2019**, 42 (1): 89-129.
- [17] Fukushima T, Koishi M, Sakamoto T, Onozato M. *Molecules*, **2024**, 29 (10): 2341.
- [18] Zhang Y J, Mi J F, Wu W L, Fei J, Lv B C, Yu X Z, Wen K, Shen J Z, Wang Z H. *Adv. Sci.*, **2024**, 11 (31): 2402050.

- [19] Lee Y F, Graalfs H, Frech C. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1464: 87–101.
- [20] Yang F, Bai Q, Zhao K, Gao D, Tian L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407 (6): 1721–1734.
- [21] Johansson B-L, Belew M, Eriksson S, Glad G, Lind O, Maloisel J-L, Norrman N. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1016 (1): 35–49.
- [22] Santarelli X, Cabanne C. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2019**, 20 (1): 14–21.
- [23] Milne J J. *Methods Mol. Biol.*, **2023**, 2699: 15–29.
- [24] Rupčíková V, Molnár T, Kurák T, Polakovič M. *Molecules*, **2025**, 30 (11): 2363.
- [25] Javidanbardan A, Marques M P C, Azevedo A M, Bracewell D G, Goldrick S. *Biotechnol. Bioeng.*, **2026**, 123 (5): 1236–1265.
- [26] Krázel Adamíková J, Antořová M, Kurák T, Polakovič M. *Molecules*, **2025**, 30 (16): 3389.
- [27] Zhang L, Parasnvis S, Li Z, Chen J, Cramer S. *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1602: 317–325.
- [28] Lee Y F, Kluters S, Hillmann M, von Hirschheydt T, Frech C. *J. Sep. Sci.*, **2017**, 40 (18): 3632–3645.
- [29] Gao D, Lin D Q, Yao S J. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 859 (1): 16–23.
- [30] Hahn T, Geng N, Petrushevska-Seebach K, Dolan M E, Scheindel M, Graf P, Takenaka K, Izumida K, Li L, Ma Z. *Biotechnol. Prog.*, **2023**, 39 (2): e3316.
- [31] Zhao G, Dong X Y, Sun Y. *J. Biotechnol.*, **2009**, 144 (1): 3–11.
- [32] Gu J L, Pi W Y, Xie W F, Gu J W, Wang Y J, Xiao L, Li Y J, Li J F. *Biochem. Eng. J.*, **2021**, 176: 108092.
- [33] Ye J, Zhang Y, Meng J. *Appl. Surf. Sci.*, **2022**, 572: 151420.
- [34] Dai N, Wang S, Li H, Zhao L, Jin H, An N, Gong P, Tan Q, Tang X, Wang F. *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1128: 121794.
- [35] Zhang R Y, Chen X Y, Zhang Y, Jiang C W, Huang Y K, Li Q, Ding H, Pan Y T, Liu C. *J. Instrum. Anal.* (张荣月, 陈暄友, 张玮, 姜成伟, 黄逸康, 李强, 丁虹, 潘一廷, 刘才. 分析测试学报), **2016**, 35 (12): 1643–1646.
- [36] Zhang K, Liu X. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 128: 73–88.
- [37] Barredo-Vacchelli G R, Giudicessi S L, Martínez-Ceron M C, Cascone O, Camperi S A. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **2021**, 27: 2905–2921.
- [38] Wang L, Wei W, Xia Z, Jie X, Xia Z Z. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2016**, 80: 495–506.
- [39] Lu H L, Lin D Q, Gao D, Yao S J. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1278: 61–68.
- [40] Yang Y J, Chang H C, Wang M Y, Suen S Y. *Membranes*, **2023**, 13 (3): 271.
- [41] Osuofa J, Husson S M. *Polymers*, **2024**, 16 (2): 239.
- [42] Rodriguez E L, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork A G, Ovbude S, Pekarek A, Walters M, Lott S, Hage D S. *J. Chromatogr. B*, **2020**, 1157: 122332.
- [43] Yu T, Xu C N, Yu Y, Zhao F F, Pan Y T, Liu C, Huang Y D, Zhang R Y. *Chem. J. Chin. Univ.* (虞天, 许成楠, 于 , 赵飞飞, 潘一廷, 刘才, 黄永东, 张荣月. 高等学校化学学报), **2016**, 37 (9): 1740–1743.
- [44] Liu X, Jiang Y, Zhang F, Li Z, Yang B. *J. Chromatogr. A*, **2021**, 1649: 462229.
- [45] Zhang R, Li Q, Gao Y, Li J, Huang Y, Song C, Zhou W, Ma G, Su Z. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1343: 109–118.
- [46] Benítez-Mateos A I, Contente M L. *Catalysts*, **2021**, 11 (7): 814.
- [47] Fekete S, Murisier A, Guillarme D. *LCGC Eur.*, **2021**, 34: 101–105.
- [48] Schlenoff J B. *Langmuir*, **2014**, 30 (32): 9625–9636.
- [49] Pham D N, Linova M Y, Smith W K, Brown H, Elhanafi D, Fan J, Lavoie J, Woodley J M, Carbonell R G. *J. Chromatogr. A*, **2024**, 1718: 464682.
- [50] Wang J, Jenkins E W, Robinson J R, Wilson A, Husson S M. *J. Membr. Sci.*, **2015**, 492: 137–146.
- [51] Schmitt M, Egorycheva M, Frerichs D, Fiedler S, Graumann P L, Seubert A. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1695: 463934.
- [52] Li M, Lin D, Yao S, Zhang Q. *J. Sep. Sci.*, **2022**, 45 (15): 2946–2955.
- [53] Yan J, Zhang Q L, Lin D Q, Yao S J. *J. Chem. Eng. Data*, **2016**, 61 (1): 151–159.
- [54] Vajda J, Mueller E, Bahret E. *Biotechnol. J.*, **2014**, 9 (4): 555–565.
- [55] Koehnlein W, Holzgreve A, Schwendner K, Skudas R, Schelter F. *J. Chromatogr. A*, **2023**, 1687: 463696.
- [56] Lin D Q, Tong H F, Wang H Y, Yao S J. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116 (4): 1393–1400.
- [57] Lu H L, Lin D Q, Zhang Q L, Yao S J. *Biochem. Eng. J.*, **2017**, 119: 34–41.
- [58] Wolrab D, Frühauf P, Kolderova N, Kohout M. *J. Chromatogr. A*, **2021**, 1635: 461751.
- [59] Zhao K, Yang L, Wang X, Bai Q, Yang F, Wang F. *Talanta*, **2012**, 98: 86–94.
- [60] Ren X, Zhang K, Gao D, Fu Q, Zeng J, Zhou D, Wang L, Xia Z. *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1564: 137–144.
- [61] Fekete S, Veuthey J L, Beck A, Guillarme D. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 130: 3–18.
- [62] Wang J S, Xia H J, Wan G P, Liu J Y, Bai Q. *Chin. J. Chromatogr.* (王建山, 夏红军, 万广平, 刘家玮, 白泉. 色谱), **2016**, 34 (12): 1228–1233.

- [63] Zhao S, Luo F, Zhang Y, Zhang Y, He P, Wang Q. *Chromatographia*, **2019**, 82 (3): 661–669.
- [64] Ren J, Xiang X, Ji F, Gao X, Han L, Jia L. *J. Chromatogr. B*, **2021**, 1179: 122652.
- [65] De Smet S, Lynen F. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1404: 81–88.
- [66] Guo D, Zhang M, Zhu Y, Zhao Y, Huang S. *Precis. Chem.*, **2025**, 4 (4): 496–506.
- [67] Xu Q H, Xu Z, Ma Z A, Qiao J, Li N, Ma L, Jin H B, Zhang R Y. *Chem. J. Chin. Univ.* (徐千惠, 徐振, 马子奥, 乔娟, 李楠, 马磊, 靳海波, 张荣月. 高等学校化学学报), **2026**, 47 (3): 143–151.
- [68] Bo C, Wang X, Wang C, Wei Y. *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1487: 201–210.
- [69] Vonk R J, Wouters S, Barcaru A, Vivó-Truyols G, Eeltink S, de Koning L J, Schoenmakers P J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407 (13): 3817–3829.
- [70] Jeanroy F, Demesmay C, Dugas V. *Talanta*, **2022**, 241: 123275.
- [71] Gu J R, Wang N, Ma L, Qiao J, Jin H B, He G X, Zhao L, Huang Y D, Zhang R Y. *Chin. J. Process Eng.* (古嘉如, 王楠, 马磊, 乔娟, 靳海波, 何广湘, 赵岚, 黄永东, 张荣月. 过程工程学报), **2024**, 24 (4): 480–488.
- [72] Hou H Y, Li Z Y, Qiao J, Ma L, Jin H B, Zhang R Y. *J. Instrum. Anal.* (侯恒扬, 李子扬, 乔娟, 马磊, 靳海波, 张荣月. 分析测试学报), **2025**, 44 (7): 1237–1246.
- [73] Shi W, Zhang S Q, Li K B, Jia W P, Han D M. *Sep. Purif. Technol.*, **2018**, 202: 165–173.
- [74] Li Q, Zhao H, Liang X, He Q, Wang Z, Qin G, Li G, Xu D. *Anal. Biochem.*, **2025**, 696: 115692.
- [75] Arakawa T, Tomioka Y, Nakagawa M, Sakuma C, Kurosawa Y, Ejima D, Tsumoto K, Akuta T. *Antibodies*, **2023**, 12 (1): 15.
- [76] Mazzer A R, Perraud X, Halley J, O' Hara J, Bracewell D G. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1415: 83–90.
- [77] Tang J, Zhang X, Chen T, Wang Y, Li Y. *Protein Expr. Purif.*, **2020**, 167: 105529.
- [78] Begić M, Pečenović S, Gajdošik M Š, Josić D, Müller E. *Biotechnol. J.*, **2021**, 16 (11): e2100100.
- [79] Qu Y, Bekard I, Hunt B, Black J, Fabri L, Gras S L, Kentish S E. *Sep. Purif. Rev.*, **2024**, 53 (4): 351–371.
- [80] Fan J, Sripada S A, Pham D N, Linova M Y, Woodley J M, Menegatti S, Boi C, Carbonell R G. *Sep. Purif. Technol.*, **2023**, 317: 123920.
- [81] de Sousa P L R, Tavares P A S, Teixeira E M T S, Dias N A, Lima M de A, Luna F M T, Gondim D R, de Azevedo D C S, Silva Junior I J. *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1125: 121719.
- [82] Chen S W, Hoi K M, Mahfut F B, Yang Y, Zhang W. *Bioresour. Bioprocess.*, **2022**, 9 (1): 72.
- [83] Wan Y, Zhang T, Wang Y, Wang Y, Li Y. *Protein Expr. Purif.*, **2020**, 175: 105712.

(责任编辑: 盛文彦)