应用简报



cIEF-MS 用于单克隆抗体电荷异质体的表征

目的

通过电渗流泵驱动的同轴鞘流液 EMASS-II型 CE-MS 联用离子源,结合 CR3520型 cIEF-MS 联用试剂盒,实现 cIEF 与高分辨质谱在线联用,完成对 NIST 单抗、曲妥珠单抗、西妥昔单抗和 mAb1 的电荷 异质体的分离和鉴定,开发出单抗药物电荷异质 性分析的普适方法。

背景

单克隆抗体 (mAbs) 作为一类新兴的高特 异性治疗蛋白, 在诸多疾病方面显示出巨大的潜 力。生产过程中常发生转录后修饰 (PTMs), 如 糖基化、C 端赖氨酸丢失、脱氨胺化等。PTMs 可以改变单抗表面电荷分布和构象, 产生多种电 荷异质性, 在很大程度上影响其药理作用。因 此, 抗体电荷异质性和PTMs的常规表征是保证 产品稳定性、安全性和有效性的必要工作。

基于蛋白质等电点的差异, cIEF 和成像 cIEF (icIEF) 已经成为电荷异质性分析的重要 技术, 但这些技术主要使用光学检测器, 无法满 足对复杂电荷异质体的全面鉴定。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源成功将 cIEF 的分离能 力和高分辨质谱的强表征性能相结合, 实现了单 抗药物电荷异质性的在线表征, 极大的提高了抗 体药物电荷异质性的分析效率与表征的准确度。 永道致远首创的"CR3520"新型毛细管等电聚 焦电泳与质谱联用 (CR3520 cIEF-MS) 试剂 盒, 使 cIEF-MS 分析流程更加优化, 目前已经 在全世界生物制药行业取得了高度认可。



图1. NIST mAb 各电荷异质体对应的原始质谱图(A)和解卷 积质谱图(B)。



图2. 曲妥珠单抗通过cIEF-MS分析得到的结果(A) 和各电荷异质体对应的解卷积质谱图(B)。



图3. 西妥昔单抗通过cIEF-MS分析得到的结果(A);基峰图的放大图(B);各电荷异质体对应的解卷积质谱图(C)。



图4.无需脱盐或缓冲液置换,mAbl 通过 cIEF-MS 直接 分析得到的结果(A);基峰图的放大图(B);各电荷异质体对 应的解卷积质谱图(C)。



解决方案

仪器试剂:

ECE-001 型毛细管电泳仪(CMP Scientific, P/N: ECE-001)。 EMASS-II 型离子源(CMP Scientific, P/N: EM3001-A)。75 cm 中性涂层毛细管(CMP Scientific, P/N: E-SC-PS1-360/150(文中 未找到)-50-75-B1)。CR3520 试剂盒(CMP Scientific, P/N: CR3520)。安捷伦 7100 CE 和 6545XT Q-TOF。

样本制备:

NIST mAb (10 mg/mL)、曲妥珠单抗 (5 mg/mL)、西妥昔单抗 (5.1 mg/mL) 单抗样品 各100µg,分别用 CR3520 试剂盒中的Buffer C 置换样品溶液替换样品原缓冲液,得到 ~2 mg/mL 的单抗样品,于 -20℃ 储存。分析前用 Buffer C 进一步稀释,与两性电解质原液按 1:1 的比例混合。

实验方法:

ESI 喷针位于离质谱仪入口 4-5 mm 的 位置, 电喷雾电压范围 2.3-2.5 kV。安装 75 cm PS1 毛细管, cIEF-MS 自动化分析采用 进行 CR3520 试剂盒推荐的"三明治"进样 策略。30 cm 阴极电解液, 45 cm 样品, 0.05 mg/mL 细胞色素 C, 电离电压 20 kV。20 分 钟时施压 10mbar。

质谱参数:

干燥气温度 325℃,1 L/min。Vcap 电 压 0V。Fragmentor 电压 380 V。 Skimmer 电压 300V。Collision 电压10 V。

	Data 1			Data 2			Data 3				
	t_1	t_2	pI	t_1	t_2	pI	t_1	t_2	pI	Mean	SD
M	59.6	57	9.15	53.3	56.9	9.17	56.3	56.9	9.17	9.16	0.01
1	60.5	57.9	9	54.2	57.8	9.01	57.2	57.8	9.01	9.01	0.01
12	61.4	58.8	8.85	55.2	58.8	8.85	58.2	58.8	8.85	8.85	0.00
43	62.1	59.5	8.73	56	59.6	8.71	59	59.6	8.71	8.72	0.01
13	62.1	59.5	8.73	56	59.6	8.71	59	59.6	8.71	8.72	

 a_{t_1} and t_2 represent migration time (min) before and after normalization based on the cyto.c peak.

表1. 通过迁移时间计算得到的 mAb1 各电荷异质体的 pI 值。 t_1 为迁移时间, t_2 为经过内标峰(细胞色素C)归一化处理后的迁移时间。

结果

图1、2、3、4 分别为 NIST单 抗、曲妥珠 单抗、西妥昔单抗、mAb1 经 cIEF-MS 分析 得到的电荷异质性的结果,结果表明 cIEF-MS 系统可以对单抗的复杂电荷异质体进行高效地分 离和准确地鉴定。表1为通过迁移时间计算得到 的 mAb1 各电荷异质体的 pI值,通过经内标峰 归一化处理得到的迁移时间,可以用来准确计算 出各电荷异质体的 pI 值。

总结

本实验通过 EMASS-II 型 CE-MS 联用 离子源,结合 CR3520 型 cIEF-MS 联用试 剂盒, 实现了 cIEF-MS 对 NISTmAb、曲妥 珠单抗、西妥昔单抗和 mAb1 的电荷异质性的 在线分析。其中 mAb1 通过 cIEF-MS 可以分 离得到的 10 种电荷异质体,结果远优于传统的 cIEF-UV。cIEF-MS 在线联用技术将会成为 生物制药领域监测和验证抗体药物电荷异质性 的有力工具。

> www.evergauge.cn www.cmpscientific.com 永道致远科学技术有限公司 上海市浦东新区康新公路3399弄26号楼218室

2