

CE-MS 方法对小鼠血清中完整单克隆抗体药物的在线定量分析

目的

采用 CC1 型阳离子涂层毛细管, 通过电渗流泵驱动的同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 使用 CZE-MS 方法对小鼠血清中完整单克隆抗体实现在线定量分析。

背景

单克隆抗体 (mAbs) 及其衍生物是一类重要的蛋白类生物药物分子, 在疾病治疗和诊断中已得到广泛的应用。近年来基于 LC-MS 技术的单克隆抗体的完整表征 (检测、识别、监测和定量) 已取得有效的进展。对于完整蛋白的分离, 毛细管电泳技术相比传统 LC-MS 方法, 仍具有无法比拟的优势。为此, 我们开发了 CE-MS 方法, 利用 CE 对完整蛋白进行高效分离, 同时使用高分辨质谱对分离后的蛋白进行表征和定量分析, CE-MS 技术可在完整蛋白水平上对血清中的蛋白药物进行分析, 灵敏度更高、分离效果更好。

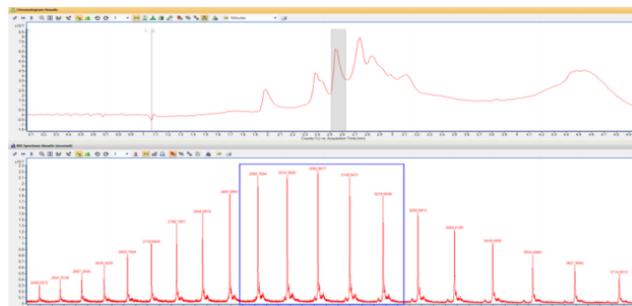


图1. 小鼠血清中完整 单抗药物 mAb 的总离子图和原始质谱图。在数据处理过程中, 选取质谱峰时采用响应最高的5个电荷态的离子 (蓝色框内), 总离子流为这些离子的响应之和。

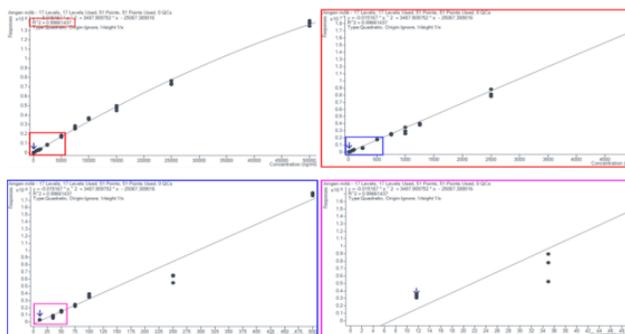


图2. LC-MS 分析得到的小鼠血清中非糖基化单抗在 35-50,000 ng/mL 范围内的校正曲线。

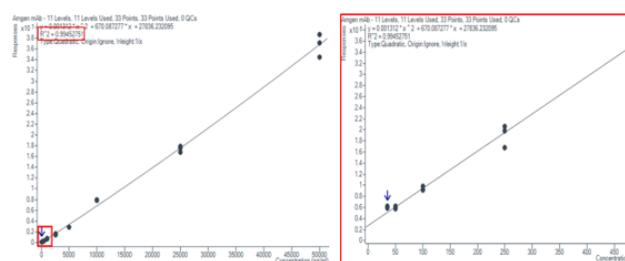


图3. CE-MS 得到的小鼠血清中非糖基化单抗在 50-50,000 ng/mL 范围内的校正曲线。

	Herceptin (in Neat Solution)	Intact Amgen mAb in Mouse Serum (Non-Glycosylated)	
Analytical Method	LC/MS	LC/MS	CE/MS
Injection Volume (µL)	1.0	3.0	0.315
LOD (ng/mL)		35	50
LOD: total on column (ng)	0.025	0.105	0.015
LOQ (ng/mL)		50	100
LOQ: total on Column (ng)	0.05	0.15	0.0315
Standard Curve	0.025 – 50 ng	35 – 50000 ng/mL	50 – 50000 ng/mL
Dynamic Range	3.3 X	3.15 X	3 X

表1. 各种完整单抗分子的定量分析结果的总结。在采用相同的数据处理方法的前提下, 与 LC-MS 方法相比, CE-MS 具有更高的灵敏度。

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001 型毛细管电泳仪。EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-A)。70cm CC1 阳离子涂层毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-CC1-360/150-50-70-B1)。BGE 为 30% 醋酸。SL 为 5% 甲酸和 10% 甲醇。

实验方法:

将不同数量的单抗药物 mAbs 加入小鼠血清中,使其浓度范围从 35 ng/mL 到 50,000 ng/mL。

质谱参数:

扫描范围为 300-8,000 m/z。

结果

图1 和 图2 是 LC-MS 方法对小鼠血清中非糖基化的完整单抗定量分析的结果,图3 是本方法使用 CE-MS 对小鼠血清中非糖基化的完整单抗定量分析的结果。在本方法中使用 LC-MS 和 CE-MS 两种方法对血清中完整单抗进行了定量分析。表1 为两种方法所得结果的比较,从比较结果可以看出,在线性范围在检出限和定量限的两项重要定量指标中,CE-MS 需要的绝对上样量都远远低于 LC-MS,这表明 CE-MS 的灵敏度远超 LC-MS。CE-MS 的高灵敏度主要得益于自于 EMASS-II 型离子源带来的最大化的离子化效率,同时也跟毛细管电泳技术固有的高分离能力有关。本方法中开发的 CE-MS 方法可以对血清中完整单抗进行在线分析,与传统方法相比,检测限更低,分离效率更好,所需的样品量也更少。

总结

在本方法中,通过 ECE-001 型毛细管电泳仪与 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源成功实现 CE 与 MS 联用,完成对小鼠血清中完整单抗的在线分析。本实验结果表明,在对蛋白药物进行定量分析时,CE-MS 不仅具有与 LC-MS 比拟的线性范围,还展现出传统方法无法达到的更高灵敏度,CE-MS 在对生物药表征分析中必将发挥越来越重要的作用。



扫一扫,关注永道致远微信

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