

使用 Middle-Up 方法实现单克隆抗体电荷异质性的 cIEF-MS 在线深度解析

JunDai、Yingru Zhang

百时美施贵宝

目的

使用 Middle-Up 方法, 结合 cIEF-MS 联用技术, 对具有复杂电荷异质性的单克隆抗体进行深度解析和鉴定。

背景

随着生物治疗模式的发展, 生物药的设计也越来越多样化, 具有复杂电荷异质性的完整单克隆抗体分子发生的微弱变化, 如脱酰胺修饰 (deamidation), 利用常规质谱检测方法难以检测到, 高度糖基化修饰引起质谱图中峰的重叠也会降低质谱的分辨效果。Middle-Up 分析法采用 IdeS 酶切能够将完整单克隆抗体分子切割成一个抗原结合域 $F(ab')_2$ 和两个单链 Fc 亚基, 另外, 利用 IdeS 酶切加上 DTT 或 TCEP 还原, 能够将完整抗体分子切割成两个 LC 亚基、两个 Fd' 亚基和两个单链 Fc 亚基, 从而在质谱层面实现将对完整复杂抗体分析转换成对较小亚基的分析。

以 cetuximab 为例, 通过 Middle-Up 分析方法, 我们利用 cIEF-MS 对亚基水平的复杂电荷异质体进行了解析鉴定。其中, IdeS 酶切 cetuximab 后, cIEF-MS 可以分离出 8 个电荷异质体, IdeS 酶切加上 DTT 还原 cetuximab 后, cIEF-MS 可以分离出 11 个电荷异质体。对电荷异质体深度的鉴定分析发现, cetuximab 电荷异质性产生的主要原因是, 1) Fc 亚基 C 末端的赖氨酸 (每个单链 Fc 上至多一个), 2) Fd' 亚基上的 N-羟乙酰基神经氨酸 (每个 Fd' 亚基至多两个), 3) Fd' 亚基上的脱乙酰氨修饰。

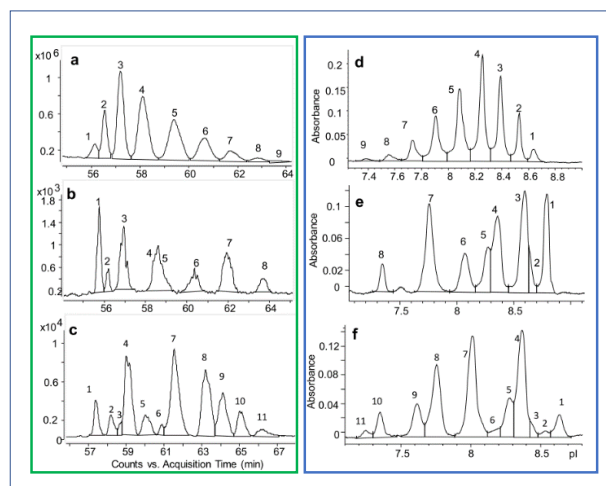
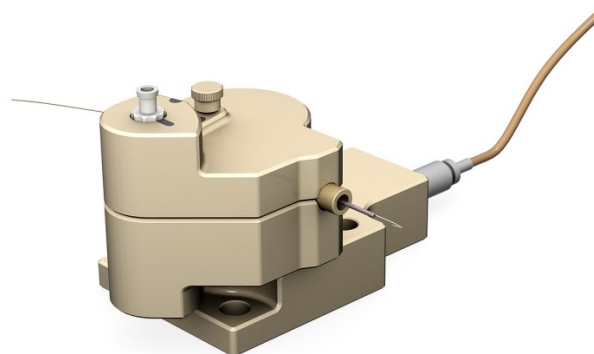


图 1. cIEF 分离完整的和裂解的 cetuximab。cIEF-MS 电泳图: (a) 在质荷比 2960–3200 范围提取完整 mAb 离子图, (b) 在质荷比 1500–2600 范围提取 IdeS 酶解后的 mAb 基峰图, (c) 在质荷比 1000–2000 范围提取 IdeS 酶解加 DTT 还原 mAb 后的基峰图; iCIEF-UV 电泳图, (d) 完整 mAb, (e) IdeS 酶解 mAb, (f) IdeS 酶解加 DTT 还原 mAb

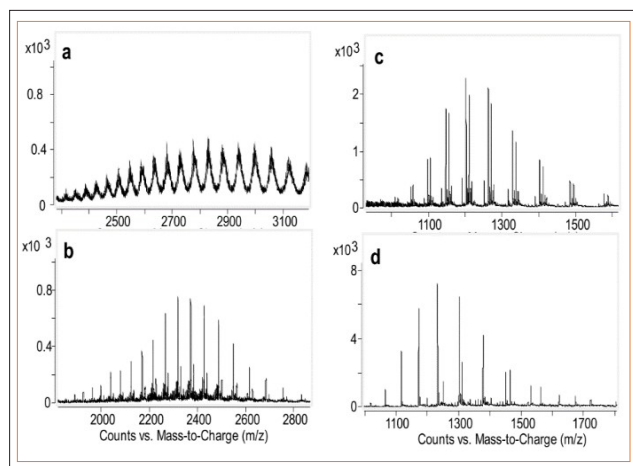


图 2. 完整的和裂解的 cetuximab 质谱图。(a)完整 cetuximab, (b) IdeS 酶解后的 F(ab')₂, (c)IdeS 酶解后的 scFc, (d)IdeS 酶解加 DTT 还原后的 LC 和 Fd'。

总结

本研究通过对 cetuximab 复杂的电荷异质体的研究验证了 Middle-Up cIEF-MS 方法的显著能力。这种新型工作流程对带有复杂电荷异质性蛋白的检测和解析具有巨大潜能。

解决方案

电离电压由 EMASS-II 离子源 (CMP Scientific Corp., Brooklyn, NY) 附带外接高压电源提供, 设定电压为 2kV。电喷雾喷针型号为外径 1.0mm, 内径 0.75mm, 尖端开口 30 μ m (CMP Scientific Corp., Brooklyn, NY)。中性涂层毛细管 PS1 型号为, 长度 75cm, 外径 360 μ m, 内径 50 μ m (CMP Scientific Corp., Brooklyn, NY)。阴极电解液为 0.2 N 氢氧化铵溶液, 阳极电解液为 1% 甲酸, 二者都加入 15% 甘油。鞘流液为 20% 醋酸和 25% 乙腈。蛋白质样品(0.5mg/mL) 中加入 1.5% Pharmalyte 和 20% 甘油。阴极电解液 950 mbar 注入 10s, 样品 950 mbar 进样75s。cIEF 电泳分离条件为250V/cm, 同时施加 10 mbar 内部压力。



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