

## CE-MS 方法对重组Fc融合蛋白药物的临床前动物体内稳定性分析

### 目的

采用 PS2 型中性涂层毛细管, 通过电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 用 CE-MS 平台对 Fc 重组蛋白进行体内稳定性分析。

### 背景

重组蛋白药物的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 的相关研究, 对于验证药物的稳定性和活性十分重要。尽管通过高分辨质谱可以得到准确分子量数据, 以获取蛋白或多肽药物的完整性信息, 但对血清样本中的生物药进行质谱分析仍然存在巨大挑战。

在本研究中, 借助免疫亲和富集技术, 通过毛细管电泳-质谱 (CE-MS) 系统对野生型 Fc-FGF21RG 重组Fc融合蛋白和突变型 Fc-FGF21RG 重组Fc融合蛋白进行了体内稳定性分析。通过 CE-MS 分析结果, 可以观察到重组蛋白药物多个截短体形式, 另外发现野生型和突变型 Fc-FGF21RG 重组 Fc 融合蛋白在体内的蛋白水解产物随时间推移发生不同变化。CE-MS 结果中重组蛋白完整分子和截短体的丰度为生物药 ADME 特性的半定量分析提供了基础。

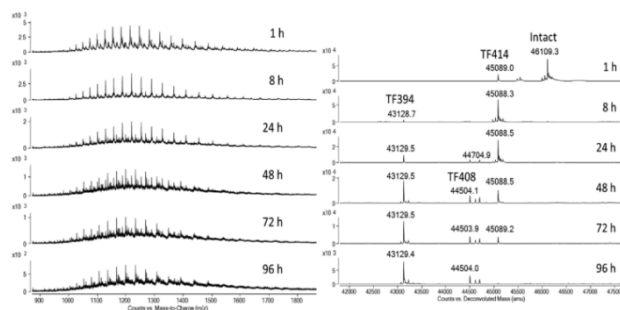


图1. 血清中 Fc-FGF21WT (野生型) 重组 Fc 融合蛋白的 CE-MS 分析结果, 左图为不同时间下的质谱图, 右图为解卷积的质谱图。

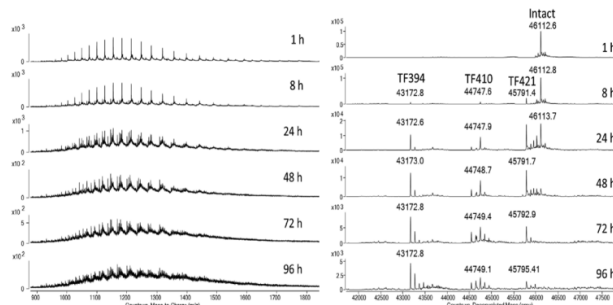


图2. 血清中 Fc-FGF21RG (突变型) 重组Fc融合蛋白的 CE-MS 分析结果。左图为不同时间下的质谱图, 右图为解卷积的质谱图。

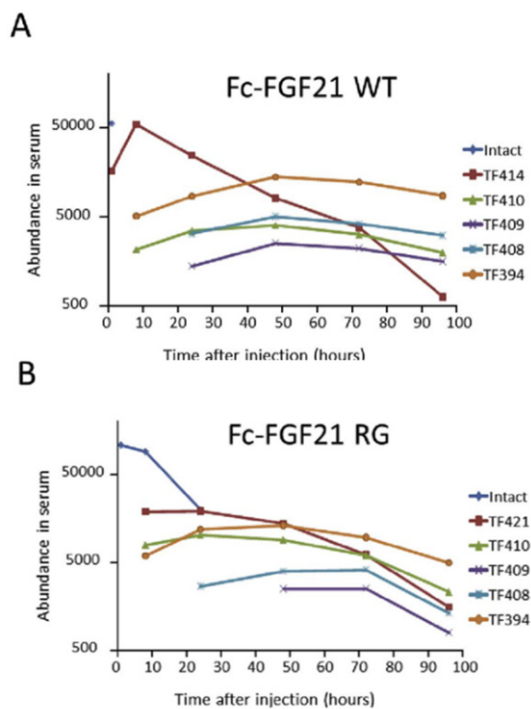


图3. 血清中 Fc-FGF21WT 和 Fc-FGF21RG 重组 Fc 融合蛋白药物的 PK 分析结果。

## 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)。70 cm PS2 型中性涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS2-360/150-50-70-B1)。BGE 为 30% 醋酸。SL 为 0.5% 甲酸, 10% 异丙醇。

### 实验方法:

样品压力进样 950 mbar。分离电离电压+30.8 kV, 10 分钟 min 后同时施加 940 mbar 压力。外接电源电喷雾电压 1.9 kV。喷针尖端到质谱距离 2 mm, 毛细管尖端到喷针尖端距离 0.6 mm。

### 质谱参数:

采集范围 700-3,200 m/z。使用 Nanospray shield。干燥气温度为 350°C, 2L/min。Fragmentor 电压 300 V, Vcap 0V, Skimmer 电压 65 V。

## 结果

图1 和图2 是对野生型 (WT) 和突变型 (RG)Fc-FGF21 重组 Fc 融合蛋白药物进行 CE-MS 分析的结果。野生型 (WT) 质量鉴定为 46,109 Da, 与还原后分析的完整蛋白匹配。在 1 h 后的分析中无法检测到完整形式的野生型 (WT), 可检测到 45,089 Da 的主要截短形式 TF414 (P414), 其最大浓度出现在 8 h, 随后出现快速衰减。在突变型 (RG) 的结果中观察到完整形式的 Fc-FGF21 保留长达 48 h, 同时暴露出了新的蛋白水解位点。图3 是利用各时间点的 WT 和 RG 解卷积质谱中的峰丰度绘制的分解产物变化结果, TF414 的变化表明 Fc-FGF21 经 P414 的初始截短后经历了降解途径, 但主要蛋白降解途径尚不清楚。

## 总结

在本方法中, 采用 PS2 型中性涂层毛细管和 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 对血清中两种 Fc 融合蛋白药物进行 CE-MS 分析, 得到了蛋白稳定性和蛋白水解产物的定性定量信息。本方法可用于对完整蛋白的常规质量分析和体内稳定性的评估, 以实现蛋白药物 ADME 特性的研究, 在重组蛋白药物的生产和临床评估分析中有巨大的应用潜力。



扫一扫, 关注永道致远微信

[www.evergauge.cn](http://www.evergauge.cn)

[www.cmpscientific.com](http://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