

cIEF 辅助的 CZE-MS 方法在非变性条件下对单克隆抗体药物的快速质谱分析

目的

采用 PS2 型中性涂层毛细管, 通过电渗流驱动的同轴鞘流液 EMAS-II 型 CE-MS 联用离子源, 实现 cIEF-MS 辅助的 CZE-MS 对非变性单克隆抗体药物的非变性质谱分析。

背景

单克隆抗体治疗的特异性优势, 使其成为治疗癌症和自身免疫性疾病的主要治疗手段。在单克隆抗体复杂的生产过程中, 通常会引入各种翻译后修饰(糖基化、氧化、脱酰胺化等)和结构的变化(错误折叠、变性、聚集等), 但会影响药物的效力、稳定性和疗效。因此, 需对单克隆抗体的关键质量属性进行监测。CZE-MS 技术已被广泛用于单克隆抗体的质量控制分析, CZE-MS 对大部分单抗的分析在变性条件下进行, 这可能会导致单抗结构信息的丢失, 而目前非变性条件下的 CZE-MS 分析仍存在一定挑战。本方法采用 cIEF 辅助的 CZE-MS 技术, 在非变性条件下对 Sigma mAb 和 NIST mAb 实现 CZE-MS 分析, 具有更大的载样能力和更好的分离效率。

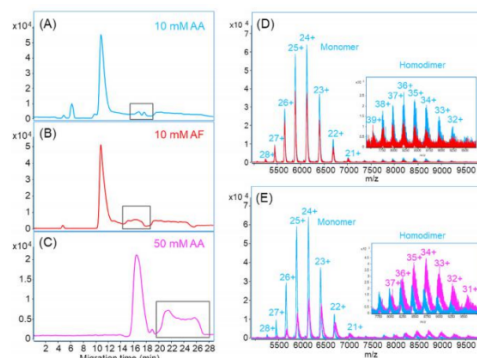


图1. 左图为使用 3 种不同鞘流液在 CZE-MS 的分离结果, 右图为不同条件下质谱响应的叠加比较图。

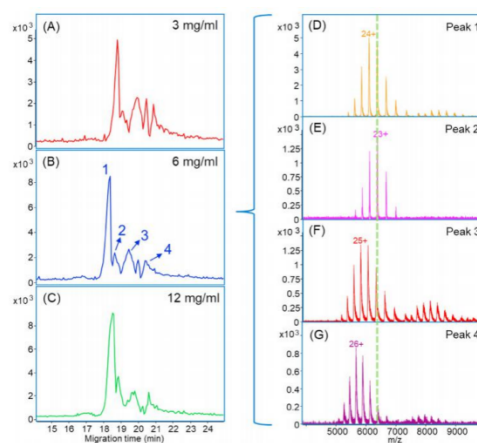


图2. 不同浓度的 Sigma mAb 通过 cIEF 辅助的 CZE-MS 分析得到的结果。右图为 B 图中 4 个峰分别对应的质谱图。

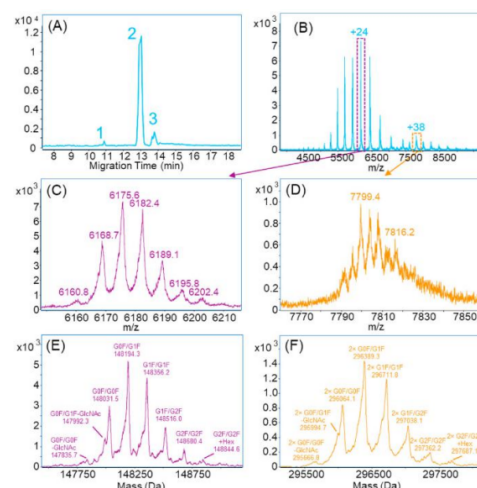


图3. 通过 cIEF 辅助的 CZE-MS 对 NIST mAb 的分析结果。

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)。cIEF-MS 试剂盒为 CR 3520型试剂盒 (CMP Scientific, P/N: CR3520)。BGE 为25 mM 乙酸铵。SL 为 10 mM 乙酸铵。

实验方法:

阴极电解液进样 160 nL(100-950 mbar)。样品进样 200 nL(100-950 mbar)。BGE 进样 12nL(100-950 mbar)。分离电离电压 +30 kV, 聚焦时间 5-20 min。然后施加 50 mbar压力以推动 CZE 分离。外接电源电喷雾电压 2.2-2.5 kV。

质谱参数:

Nanospray shield。采集范围 3,000-10,000m/z。干燥气温度为 365 °C, 1L/min。Fragmentor 电压 380 V, Vcap 0 V。

样品制备:

单抗样品经纯化后, 用 CR 3520 型试剂盒中的 Buffer C 进行稀释。

结果

图1是对本方法 BGE 和 SL 优化的 CZE-MS 分析结果, 综合考虑质谱信号强度、蛋白非变性构象后, 最终选择 10 mM乙酸铵作为 SL, 25 mM 乙酸铵作为 BGE。图2 是对 Sigma mAb 进行 cIEF 辅助的 CZE-MS 分析结果, 观察到四个 CZE-MS 方法未能发现的信号峰, 鉴定出五种糖基化蛋白形式, 表明 cIEF 辅助的 CZE-MS 方法具有更高的分离度, 可以鉴定出样品中潜在的未知杂质。不同浓度下样品的分析结果表明本方法在灵敏度、稳定性和重现性上均表现优异。图3 是通过cIEF辅助的 CZE-MS 对 NIST mAb 进行分析的结果。分析结果有三个主要的峰, 主峰为 mAb 的单体和同型二聚体, 还鉴定到 4 个主要和 4 个次要的双天线糖蛋白形式 (图3E), 并观察到 8 种相应的同源二聚体的糖蛋白形式 (图3D, F)。

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, 成功建立了新型 cIEF 辅助的 CZE-MS 联用方法。此方法可以在非变性条件下, 对单抗糖蛋白形式和电荷异质体进行准确地鉴定分析, 不仅载样量更大, 分离能力也比单独使用CZE时更高。另外, cIEF 辅助的 CZE-MS 技术也适用于在非变性条件下对蛋白复合物的表征分析。