

cIEF-MS 对西妥昔单抗药物电荷变异体的在线分离和质谱鉴定分析

目的

采用电渗流驱动鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 离子源, 结合 CR3520 型 cIEF-MS 联用试剂盒, 实现毛细管等电聚焦 cIEF 与高分辨质谱的全自动在线联用, 并对西妥昔单抗药物中存在的电荷变异体进行在线分离和质谱鉴定分析。

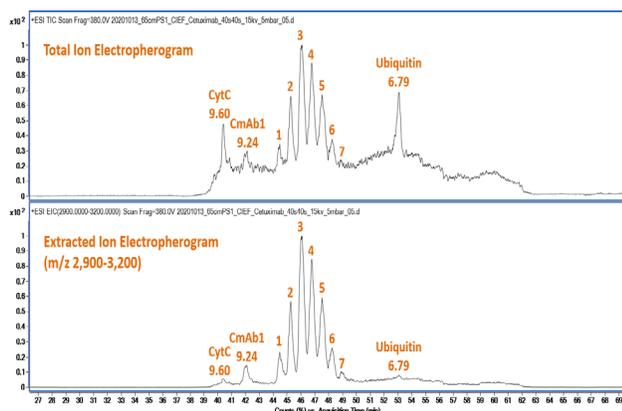


图1. 西妥昔单抗的电荷变异体在 cIEF-MS 上的分离, 上图为总离子流电泳图, 下图为提取离子电泳图。

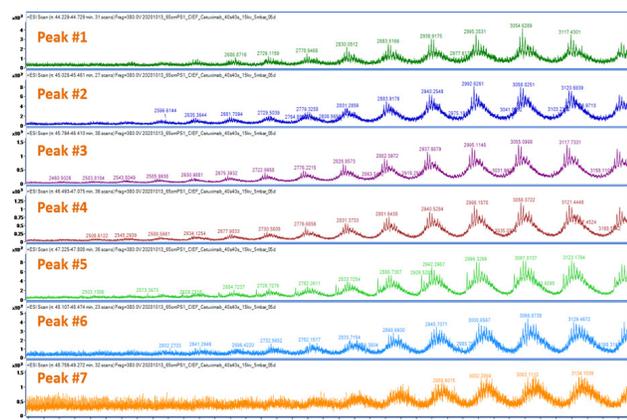


图2. 西妥昔单抗的各电荷变异体的原始质谱图。

背景

西妥昔单抗是一种以表皮生长因子受体 (EGFR) 为靶标的嵌合单克隆抗体 (mAb), 于 2006 年被批准用于转移性结直肠癌和头颈癌的治疗。单抗药物结构通常会发生糖基化、C 端赖氨酸的改变、脱酰胺化、或糖化等翻译后修饰, 这些修饰都可能导致电荷变异体的出现。

在蛋白类药物的质量控制中, 电荷异质性是蛋白类治疗药物非常重要的质量属性之一, 对电荷异质性的调控会直接影响抗体药物的安全性和有效性。

等电聚焦毛细管电泳技术根据分子的等电点的差异进行分离, 是目前抗体电荷异质性分析的主要分离手段。但传统 cIEF 通常采用 UV 等光学检测器, 在对蛋白变异体的定性分析中, 常常需要将未知的电泳组分进行收集后进行离线的质谱分析, 整个过程费时费力, 限制了 cIEF 在未知电荷变异体分析中的应用。

采用电渗流驱动鞘流液的 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 完美解决 cIEF 和高分辨质谱联用的技术难题。本实验通过 cIEF-MS 技术成功对西妥昔单抗中存在的电荷变异体进行了分离和鉴定。这一技术对于抗体药物中未知电荷变异体的定性分析具有非常重要的意义。

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 CE-MS 联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-T)。65 cm PS1 中性涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS1-360/150-50-65-B1)。cIEF-MS 试剂盒为 CR3520 型试剂盒 (CMP Scientific, P/N: CR3520)。

样本制备:

样本直接用 CR3520 试剂盒中的 Buffer C 进行稀释, 稀释后浓度为 0.2 mg/mL, 后与 Buffer S35 稀释的两性电解质按照体积比 1:1 混匀。最终的样本中两性电解质的含量不超过 1.5%。

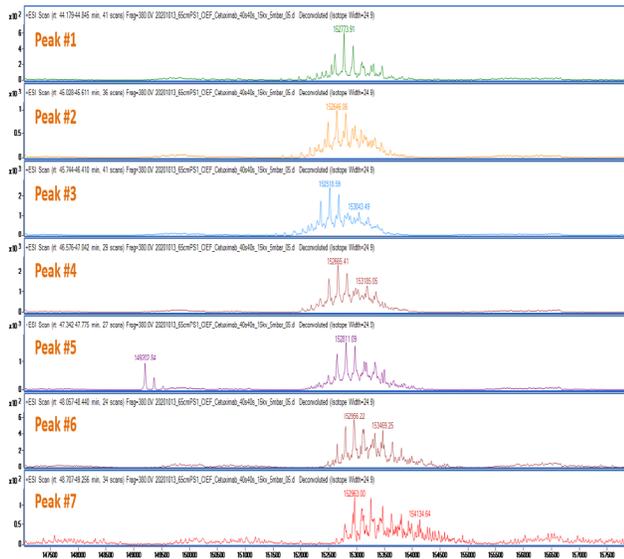


图3. 西妥昔单抗的各电荷变体的解卷积后的质谱图。

结果

通过 cIEF 可以分离得到除了西妥昔单抗主峰外的 6 个电荷变异体, 见图1, 峰1和峰 2 为碱峰, 峰 4-7为酸峰。从提取离子电泳图中可以观察到 7 个电泳峰接近基线分离。在对各峰的质谱图 (图2) 进行解卷积处理后, 得到各峰对应的分子量结果 (图3)。碱性峰 2 和主峰之间的质量差为 +128 Da, 和 C 端赖氨酸(+128 Da,+1K)异质性匹配, 碱性峰 1 跟主峰之间的质量差为 +256 Da, 对应 2 个赖氨酸的质量, 同样由于赖氨酸异质性引起。酸峰4与主峰分别差 +147 Da, 参考文献报道推测可能由于半乳糖变化成N-羟乙酰神经氨酸 (+145 Da), 并同时发生脱氨基修饰 (+2 Da)。酸峰5与主峰相差 +293 Da, 推测可能存在唾液酸 (+291Da), 和脱酰胺修饰 (+2Da)。酸峰 6 与主峰相差+438 Da,可能同时存在峰 4、峰 5 上发生的所有修饰 (+145,+291,+2Da)。峰 7 信号较弱,与峰 6 的质量相差 +7 Da, 推测可能存在进一步的脱酰胺修饰。

总结

本实验采用EMASS-II型CE-MS联用离子源, 结合CR3520型cIEF-MS联用试剂盒, 将 cIEF与高分辨质谱联用技术应用于西妥昔单抗的电荷异质性的质谱分析定性研究中。通过cIEF可以对单抗中存在的多个电荷变异体完全分离, 高性能离子源使离子化效率最大化, 确保低含量的电荷变异体也可以被鉴定出来。本实验采用的工作流程适用于高度糖基化的蛋白类抗体药物电荷异质性的表征分析。