

中性涂层毛细管 cIEF-MS 方法对单克隆抗体电荷异质性的快速分析

目的

采用 PS1 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, 实现毛细管等点聚焦电泳-质谱 (cIEF-MS) 对单克隆抗体电荷异质性的快速分析。

背景

单抗药物在生产或储存过程中会发生多种翻译后修饰, 如脱酰胺修饰、C 端赖氨酸、糖基化、赖氨酸糖基化和N端焦谷氨酸环化等, 这些翻译后修饰会导致单抗药物存在较复杂的电荷异质性。由于不同电荷变异体的等电点存在差异, 毛细管等电聚焦电泳成为电荷异质性研究的理想分析工具。本方法利用电渗流驱动的同轴鞘液 EMASS-II 型离子源和 cIEF-MS 试剂盒, 实现 cIEF 与高分辨质谱联用, 对单抗药物中的电荷变异体进行表征分析。

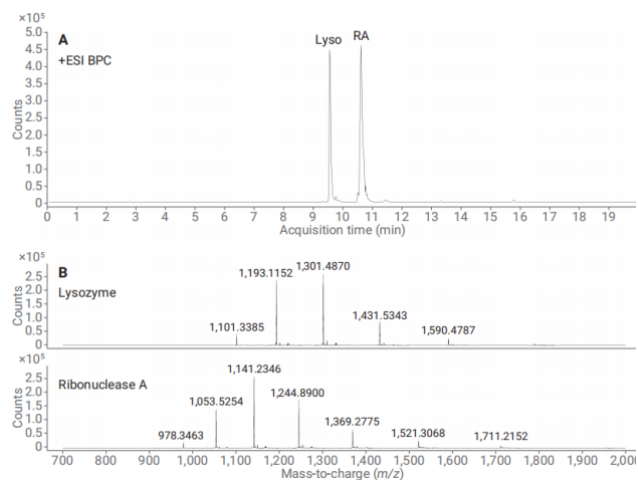


图1. 溶菌酶和核糖核酸酶a的混合物基峰电泳图(A)及其质谱图(B)。

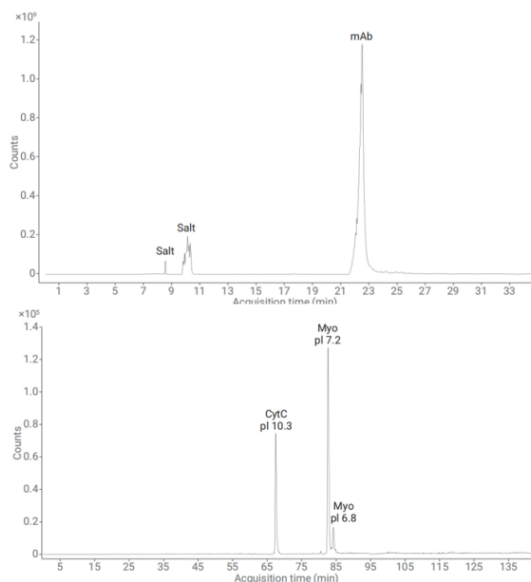


图2. cIEF-MS对单抗药物 (上图) 及细胞色素C和肌红蛋白混合物 (下图) 的分析结果。

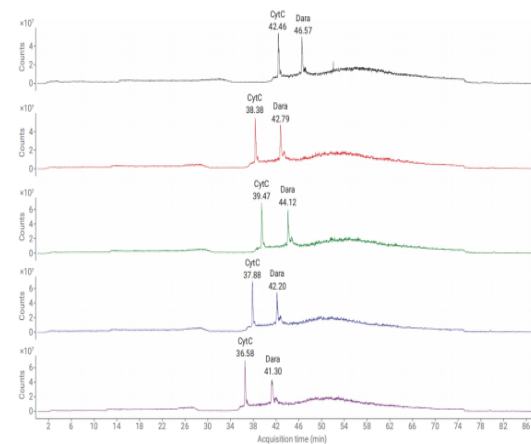


图3. 达雷妥单抗的5次重复分析电泳图。

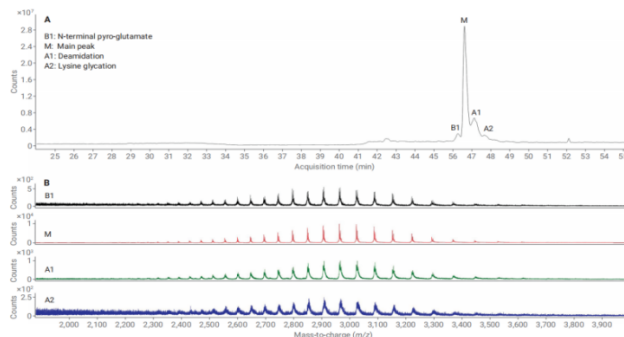


图4. 达雷妥单抗进行cIEF-MS分析的结果。

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)。75 cm PS1 型中涂层分离毛细管 (CMP Scientific, P/N: E-SC-PS1-360/150-50-75-B1)。cIEF-MS 试剂盒 CR 3520。两性电解质 (pH 3-10)。

实验方法:

阴极电解液进样 950 mbar, 10 s。样品进样 950 mbar, 75 s。分离电离电压 +18.8 kV, 同时施加 5-10 mbar 压力以缩短分析时间。外接电源电喷雾电压 2.4 kV。喷针尖端到质谱距离 4 mm, 毛细管尖端到喷针尖端距离 0.8 mm。

质谱参数:

采用 Nanospray shield, 干燥气温度为 365°C, 6 L/min。Fragmentor 电压 380V, Vcap 0 V。

样品制备:

样本直接用 CR 3520 试剂盒中的 Buffer C 进行稀释, 稀释后浓度为 0.1-0.5 mg/mL。

结果

图1 显示了用溶菌酶和核糖核酸酶a的混合物来评估 cIEF-MS 联用的性能结果, 两蛋白峰无明显拖尾, 且二者分离窗口超过 1 min, 峰高相似, 峰宽小于 30 s, 表明PS1型毛细管对蛋白样品具有很高的分离度。图2 是使用 Sigma mAb 和蛋白标准品混合物对 cIEF-MS 进行性能测试的结果, 电泳图显示单抗和蛋白标准品均可得到很好的分离, 其分离条件可为后续实验提供依据。图3 显示了对达雷妥尤单抗进行 5 次 cIEF-MS 分析的结果, 峰的相对迁移时间稳定, 稳定性和重现性良好。图4 是 cIEF-MS 对达雷妥尤单抗进行分析的结果, 可以鉴定出的电荷异质体有: 一个碱性异质体, 两种酸性异质体, 碱峰被确定为N端焦谷氨酸 (峰 B1), 酸峰1 为脱酰胺化 (峰A1), 酸峰2 为赖氨酸糖基化 (峰A2)。

总结

在本方法中, 采用 PS1 型中性涂层毛细管和 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源, 建立了适合于抗体电荷异质性分析的 cIEF-MS 分析方法。此方法使用 cIEF-MS 试剂盒 CR 3520, 对达雷妥尤单抗的电荷变异体进行分离, 并通过高分辨质谱实现对各电荷变异体的鉴定工作。此方法简单快速、分离效率高、测定结果准确、稳定性好, 是单抗电荷异质性分析的理想工具。