

CR3520 cIEF-MS 方法对单抗药物整体分子量电荷异质性实现在线分析



图1 EMASS-II型CE-MS联用离子源 (A) 和CR3520 cIEF-MS试剂盒 (B)解决方案

背景

目前将重组单克隆抗体作为治疗疾病药物，与合成的化学药物不同，生物药制剂是细胞分泌而来，并经常会发生翻译后修饰 (PTMs)，如糖基化、C端赖氨酸丢失、脱氨胺化、二硫键干扰、糖化、蛋氨酸或色氨酸氧化等等，由而这些经过翻译后修饰的物质通常导致蛋白质等电点 (pI) 的变化，单抗药物就会表现出以不同 pI 的多个电荷异质体。单抗电荷异质性的全面表征是至关重要的，因为这些异质体可能会影响与其活性、安全性、可开发性和质量相关的体外和体内特性。基于电荷的分离技术，如离子交换色谱、毛细管区电泳 (CZE) 和等电聚焦 (cIEF) 等。cIEF和后来开发的成像 cIEF(icIEF) 已经成为电荷异质体分析的重要技术，但这些技术

目的

采用电渗流驱动鞘流液EMASS-II型离子源对单抗电荷异质性实现cIEF-MS在线分析。

主要使用光学检测方法。EMASS-II 型离子源成功将cIEF 的高分辨率能力和 MS 无与伦比的表征能力进行联接，第一次实现了抗体药物电荷异质性的全自动在线质谱分析、极大地提高了抗体药物电荷异质性质谱分析的效率与准确度。在此基础上永道致远结合 CMP CR3520 型试剂盒开发出了世界首创的“CR3520”新型毛细管等电聚焦电泳与质谱联用 (CR3520 cIEF-MS) 技术，已经在全世界生物制药行业取得了高度的认可。



贝伐珠单抗的主峰分子量为 149202 Da, 碱性峰 B1 和主峰之间的质量差为 +128 Da, 和碳端赖氨酸 (+128 Da, +1K) 异质性匹配; 碱性峰 B2 ($\Delta=-17$ Da) 和氮端焦谷氨酸环化修饰 (-17Da) 匹配; 酸性峰 A1 ($\Delta= 1$ Da) 和脱酰胺修饰匹配。酸性峰 A1 和主峰只有 1 Da 的质量差别, A2 峰的信号非常弱, 可能是高糖基化修饰的峰。曲妥珠单抗的主峰分子量为 148224 Da, 酸性峰 A1 ($\Delta m = +1$ Da) 和酸性峰 A2 ($\Delta m = +2$ Da) 和脱酰胺修饰匹配。英夫利昔单抗的三个电荷异质体峰在 cIEF-MS 上有良好的分离。解卷积结果显示两个碱峰为碳端赖氨酸异质体, 碱性峰 B1 ($\Delta m = +258$ Da) 和两个赖氨酸匹配; 碱性峰 B2 ($\Delta m = +129$ Da) 和一个赖氨酸匹配; 酸性峰 A ($\Delta m = +5$ Da) 小的质量偏差显示其可能为脱酰胺的修饰。西妥昔单抗糖基化很复杂, 因此会造成电荷异质体分离上的困难。采用 cIEF-MS 实现了八个电荷异质体的良好分离, 和 iCIEF-UV 的结果一致。但是由于西妥昔单抗复杂的糖基化修饰, 通过质谱获得的分子量信息不足以反应修饰的情况。

总结

本研究开发了一种新的自动化 cIEF-MS 方法, 该方法可分离实现与 iCIEF-UV 图谱几乎一致的单克隆抗体电荷电荷异质性分析, 并可实现在线实现 TOF-MS 检测和单个单克隆抗体电荷电荷异质的质谱特征鉴定。基于电渗流泵鞘驱动鞘流液电喷雾 EMASS-II 离子源 CE-MS 联用技术与 TOF-MS 实现了 CE-MS 联用系统稳定检测, 该方法即获得高 cIEF 分辨率, 并实现对 mAb 电荷异质体的高灵敏 MS 检测。

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

