

## 使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CX-MS pH浓缩液和BioAccord系统对mAb电荷异构体进行在线IEX-MS分析

---

Samantha Ippoliti, Andrew Schudlach, Matthew A. Lauber, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

本应用纪要介绍了一种适用范围广泛的直接IEX-MS方法，可以成功检测mAb电荷异构体。使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CX-MS pH浓缩液和BioAccord LC-MS系统轻松开发平台方法，提供稳定、可重现的分离结果和高质量质谱，从而鉴定不同的mAb电荷异构体。

### 优势

- 展示了一种能够通过挥发性盐直接联用质谱、创新的盐介质介导pH梯度离子交换(IEX)方法。
- 能够直接联用IEX-MS，帮助实现直接、简单的色谱峰鉴定，降低了对传统分馏方法的依赖。

### 简介

电荷异质性表征对生物治疗药物的开发至关重要，许多电荷异构体都会影响药物的效价和疗效<sup>1,2</sup>。因此，需要尽可能掌握电荷异构体可能产生的影响，并在整个发现、开发和生产过程中对电荷异构体进行监测。目前电荷异构

---

体表征分析技术有离子交换色谱(IEX)和毛细管电泳(CE)类方法，例如毛细管区带电泳(CZE)或等电聚焦(IEF)。这些方法都可以用于分析电荷异构体异质性，但均各有优缺点。

CE类方法的优点包括：由于不存在固定相，所以发生非特异性相互作用的风险较低<sup>3,4</sup>，从而提高了与质谱分析法(MS)联用的可行性。CE的缺点包括：上样量受限以及重现性差，继而影响或限制馏分收集功能<sup>5,6</sup>。而IEX色谱重现性好，上样量也明显更高。过去，IEX分析需要高浓度盐，与质谱(MS)分析不兼容，无法表征电荷异构体。

而最近已经证实<sup>7,8</sup>，如果使用挥发性盐，可以直接使用IEX-MS法表征电荷异构体。本应用纪要展示了一种使用铵类流动相的创新型直接IEX-MS法，适用于各种单克隆抗体(mAb)。该分析方法使用BioResolve SCX色谱柱、经认证的IonHance CX-MS pH浓缩液以及BioAccord LC-MS系统。BioAccord (图1)是一套用户可访问系统，由ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统、TUV检测器和ACQUITY RDa检测器组成，使用符合法规要求的UNIFI软件进行控制。

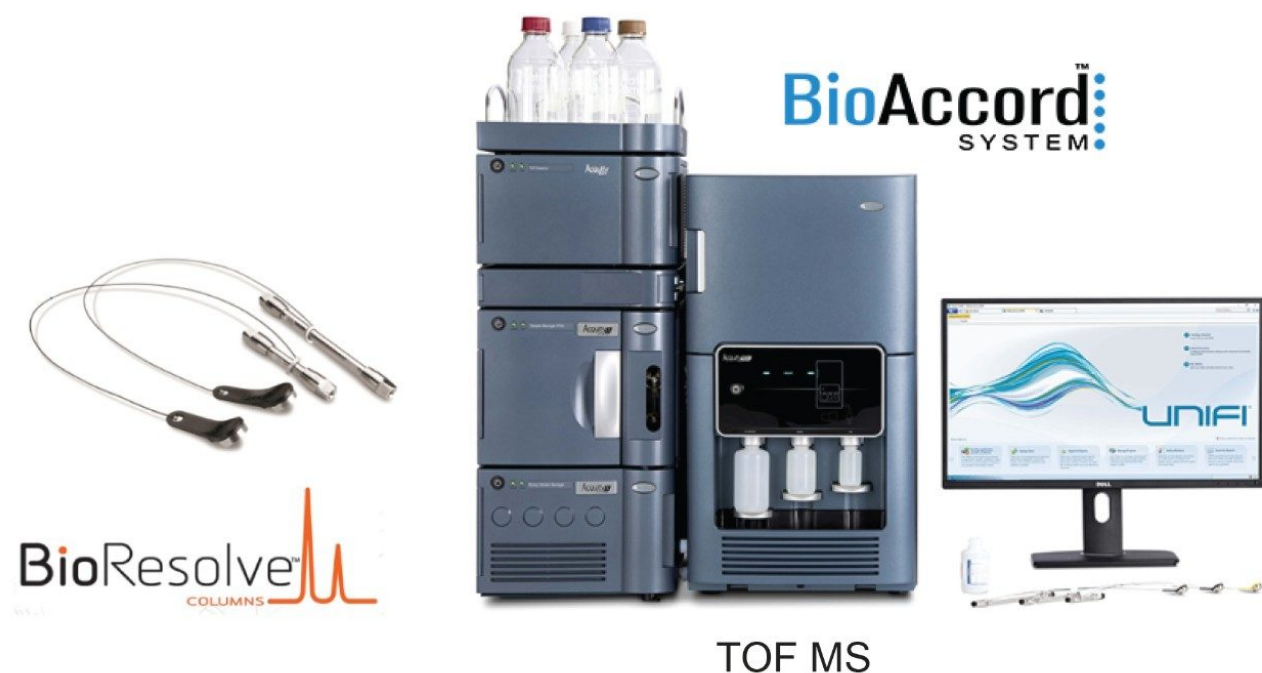


图1. BioResolve SCX色谱柱和BioAccord系统（带有TUV系统和RDa检测器的ACQUITY UPLC I-Class，由UNIFI软件控制进行数据采集和数据处理）。

I-Class能够进行可靠的色谱分离，采用SmartMS™技术的RDa能够提供准确的质谱信息，用户操作更加简便。

本应用纪要将展示BioAccord LC-MS系统方法的广泛适用性，及其鉴定mAb强制降解所得电荷异构体的优势。直

使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CX-MS pH浓缩液和BioAccord系统对mAb电荷异构体进行在线IEX-MS分析2

接联用IEX分离和MS可降低对分馏的依赖，从而实现简单准确的鉴定。

---

## 实验

### 样品前处理

#### 强制降解曲妥珠单抗

按照制造商提供的方案，使用BioRad Micro Bio-Spin色谱柱(#732-6221)将曲妥珠单抗样品（50  $\mu$ L @ 20 mg/mL）交换至100 mM磷酸钠(pH 8.0)缓冲液中。使用100 mM磷酸钠(pH 8.0)将完成缓冲液置换的曲妥珠单抗样品进一步稀释至2 mg/mL，然后分成两份。一份在-80  $^{\circ}$ C条件下冷冻储存至分析，另一份在25  $^{\circ}$ C下温育一周。

#### IdeS酶解mAb样品

在37  $^{\circ}$ C下，取抗体样品（NIST mAb、利妥昔单抗、英夫利昔单抗和曲妥珠单抗[T0和降解一周后]）各50  $\mu$ g，与50个单位的FabRICATOR酶（Genovis, A0-FR1-008）在含25 mM NaCl、25 mM Tris、1 mM EDTA且pH 8.0的溶液中温育30 min，进行酶解（最终样品浓度为1 mg/mL）。同时各制备一份1 mg/mL的非还原型抗体样品，进样10  $\mu$ g进行IEX-MS分析。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	ACQUITY TUV检测器，ACQUITY RDa MS检测器
LC色谱柱：	BioResolve SCX mAb, 3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 50 mm和 mAb电荷异构体标准品（部件号：176004342）
柱温：	30 $^{\circ}$ C
样品瓶：	12 $\times$ 32 mm玻璃样品瓶，全回收（部件号 ：600000750CV）

流动相A: IonHance CX-MS pH浓缩液A的10倍稀释液（部件号：186009280）（50 mM醋酸铵，pH 5.0，2%乙腈）

流动相B: IonHance CX-MS pH浓缩液B的10倍稀释液（部件号：186009281）（160 mM醋酸铵，pH 8.5，2%乙腈）

### 梯度表（完整mAb）：

时间(min)	流速(min)*	%A	%B
初始	0.100	60.0	40.0
1.00	0.100	60.0	40.0
21.00	0.100	2.0	98.0
22.00	0.100	2.0	98.0
23.00	0.100	60.0	40.0
30.00	0.100	60.0	40.0

### 梯度表（IdeS酶解）：

时间(min)	流速(min)*	%A	%B
初始	0.100	98.0	2.0

时间( min)	流速( min)*	%A	%B
1.00	0.100	98.0	2.0
21.00	0.100	2.0	98.0
22.00	0.100	2.0	98.0
23.00	0.100	98.0	2.0
30.00	0.100	98.0	2.0

\*推荐使用低扩散性ACQUITY UPLC I-Class仪器以0.1 mL/min的流速运行此类梯度。如使用其他仪器，建议进行方法缩放，将流速至少提升至0.15 mL/min，提高梯度准确度。

## ACQUITY RDa检测器设置

质量范围：	m/z 400-7000
模式：	ESI+
锥孔电压：	150 V
脱溶剂气温度：	350 °C
毛细管电压：	1.5 kV
实时校正标准液：	亮氨酸脑啡肽，50 fmol/μL，溶于含0.1%甲酸的50/50水/乙腈中
信息学软件：	UNIFI科学信息系统

---

## 结果与讨论

传统的电荷异构体研究需要繁琐的馏分收集和缓冲液置换，或是复杂的2D-LC仪器设置，才能采集到质谱数据。最近，沃特世设计了一种基于IonHance CX-MS pH浓缩液的流动相体系。分析这种浓缩液能够迅速制备出经过优化的铵类流动相，进行兼容MS的IEX分离。经认证的IonHance CX-MS pH浓缩液按10倍缓冲液强度制备，封装在经痕量金属认证的1 L低密度聚乙烯瓶中，确保不影响MS质量。浓缩液A用于制备pH 5.0流动相，而浓缩液B用于制备离子强度更高的pH 8.5流动相。

所得流动相体系、BioResolve SCX色谱柱以及BioAccord系统构成了一种强大的新型电荷异构体分析方法。电荷异构体分析作为药物表征和稳定性研究中广泛采用的分析，这一方法对生物制药行业大有裨益。电荷异构体谱图会随时间或降解条件变化，是关键的品质构成因素。在IEX电荷异构体分析中使用兼容MS的流动相，直接研究新出现或增强的峰，可以缩短时间，减少向专业表征实验室送样的次数。此外，该方法还消除了制备收集过程中处理样品可能导致的人为降解。

方法最初分别以NIST mAb、利妥昔单抗和英夫利昔单抗为对象建立，如图2所示。ToF设置经过调谐后可对原始状态下的完整mAb和亚基实现最佳电离。离子源参数的设定依据是平衡MS信号强度与质量数分辨率，并尽量保留抗体和亚基原始状态。对于NIST mAb和英夫利昔单抗，电荷异构体主要与C端赖氨酸的存在有关。使用该方法时，IEX色谱分析能够很好地分离C端赖氨酸变体，之后通过MS检测轻松确认。因此，该IEX方法可应用于各种mAb样品，且无需大范围地逐个进行梯度优化。10 µg载样量配合2.1 mm内径色谱柱便足以检测相对丰度低至1%的变体。此外，该技术还可以得到高质量的质谱，几乎不受盐加合物形成的干扰。

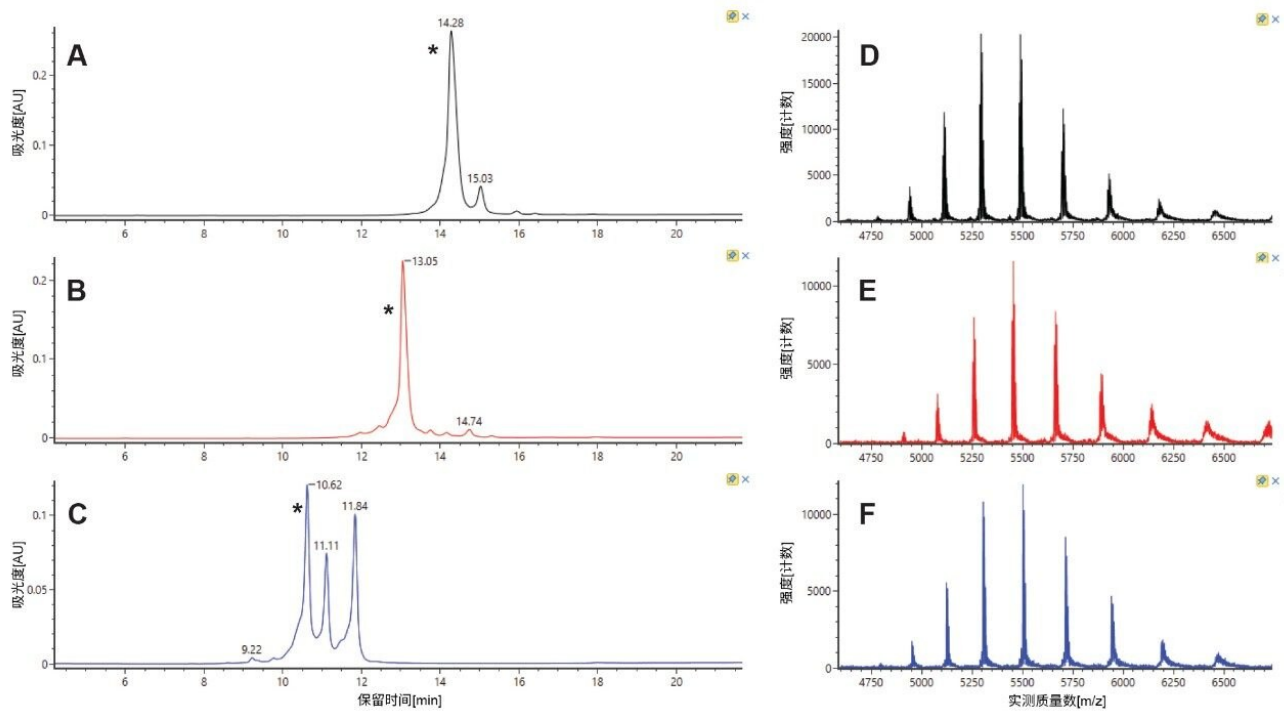


图2.完整mAb的IEX-MS。左侧为(A) NIST mAb、(B)利妥昔单抗和(C)英夫利昔单抗的280 nm紫外谱图。右侧 (D、E和F) 分别为NIST mAb、利妥昔单抗和英夫利昔单抗主峰（带有“\*”标记）的组合原始质谱。

该IEX-MS方法示例同样适用于药物稳定性监测。为展示这一点，本研究选择了曲妥珠单抗（一种众所周知在pH和温度升高条件下容易脱酰胺的mAb）进行强制降解研究。图3为曲妥珠单抗的IdeS酶解物在未降解(T0)与降解后的谱图。在降解条件下，Fab区（峰C和D）的酸性变异体增加了14.1%，而Fc区（峰A）的酸性变异体增加了4.5%。IdeS酶解物中酸性变异体的增加与非还原样品分析中实测的酸性变异体增加非常一致(18.7%)，如图4所示。

。

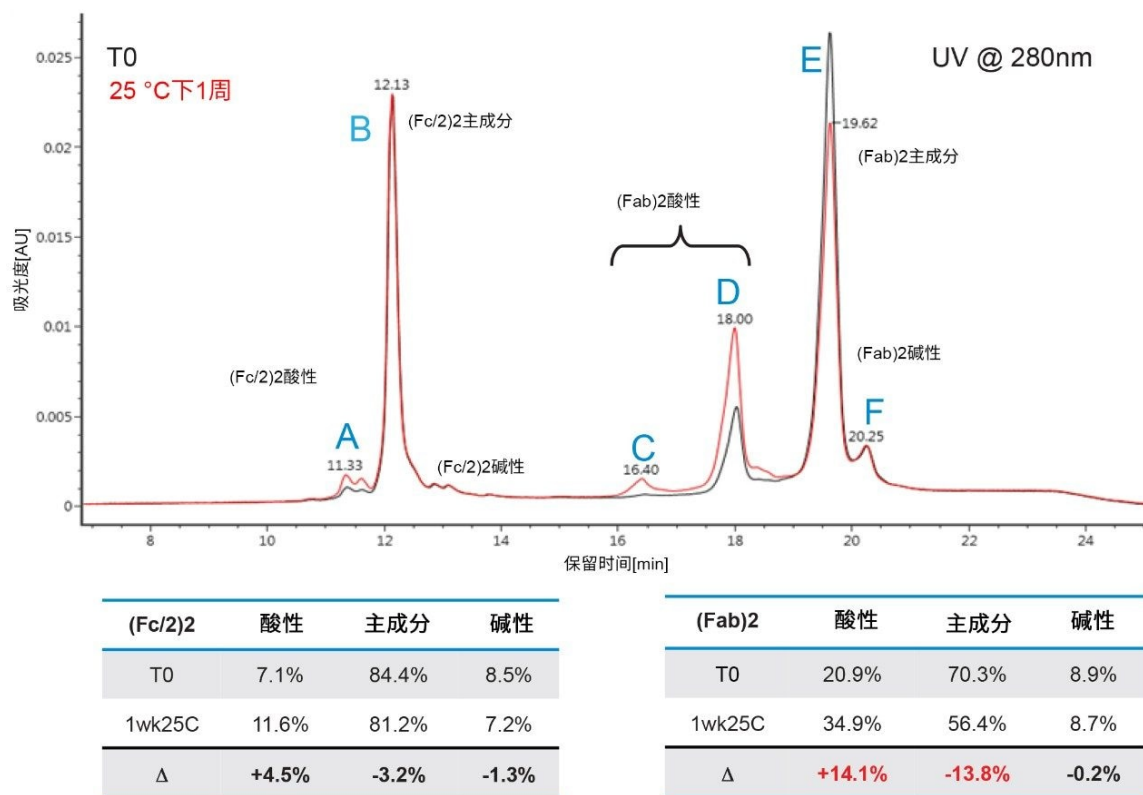


图3.经IdeS酶解后，曲妥珠单抗在T0与降解一周的紫外叠加色谱图(280 nm)，同时显示了酸性和碱性变异体的代表性积分结果。



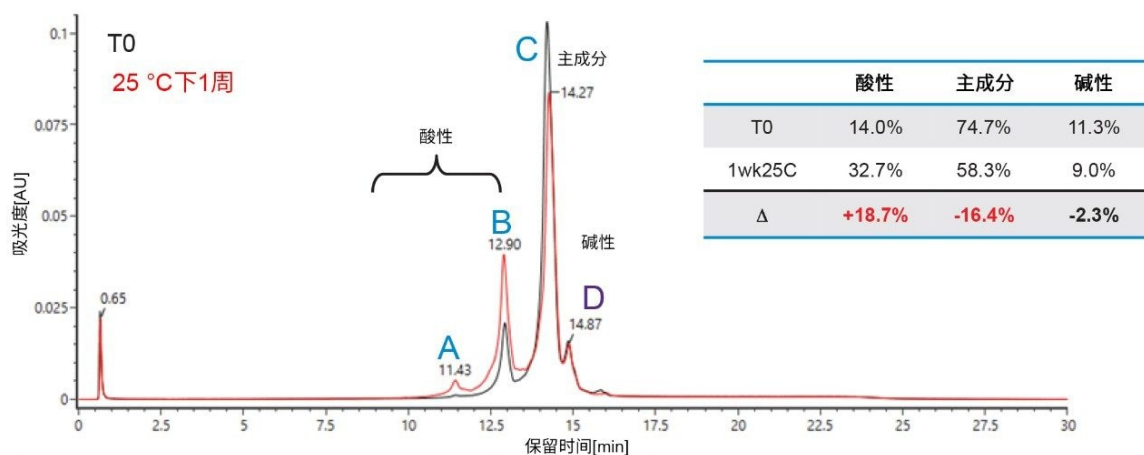


图4.完整单抗分析中曲妥珠单抗在T0与降解一周后的紫外叠加色谱图(280 nm)，同时显示了酸性和碱性变异体的代表性峰积分结果。

图5和图6分别为IdeS酶解后的曲妥珠单抗与非还原曲妥珠单抗中每种电荷异构体的在线MS数据（组合谱图）采集结果。IdeS酶解样品中的主峰对应的是 $(Fc/2)_2$ 和 $(Fab')_2$ ，其质谱图分别为5B和5E。可以看到实测质量数在理论质量数的 $\pm 20$  ppm范围内。图5A所示的酸性变异体种类可能是脱酰胺的 $(Fc/2)_2$ 以及含有唾液酸的N-糖类。图5C和5D质谱所代表的酸性变异体种类可能是已经明确表征的 $(Fab')_2$ 脱酰胺种类，而图5F所代表的种类可能是一种构象变异体。在非还原样品中，图6C对应的是主要物质（在曲妥珠单抗G0F/G0F糖型质量数计算值的 $\pm 20$  ppm范围内）。图6A~6B和6D可能分别对应的是脱酰胺类和构象变异体。

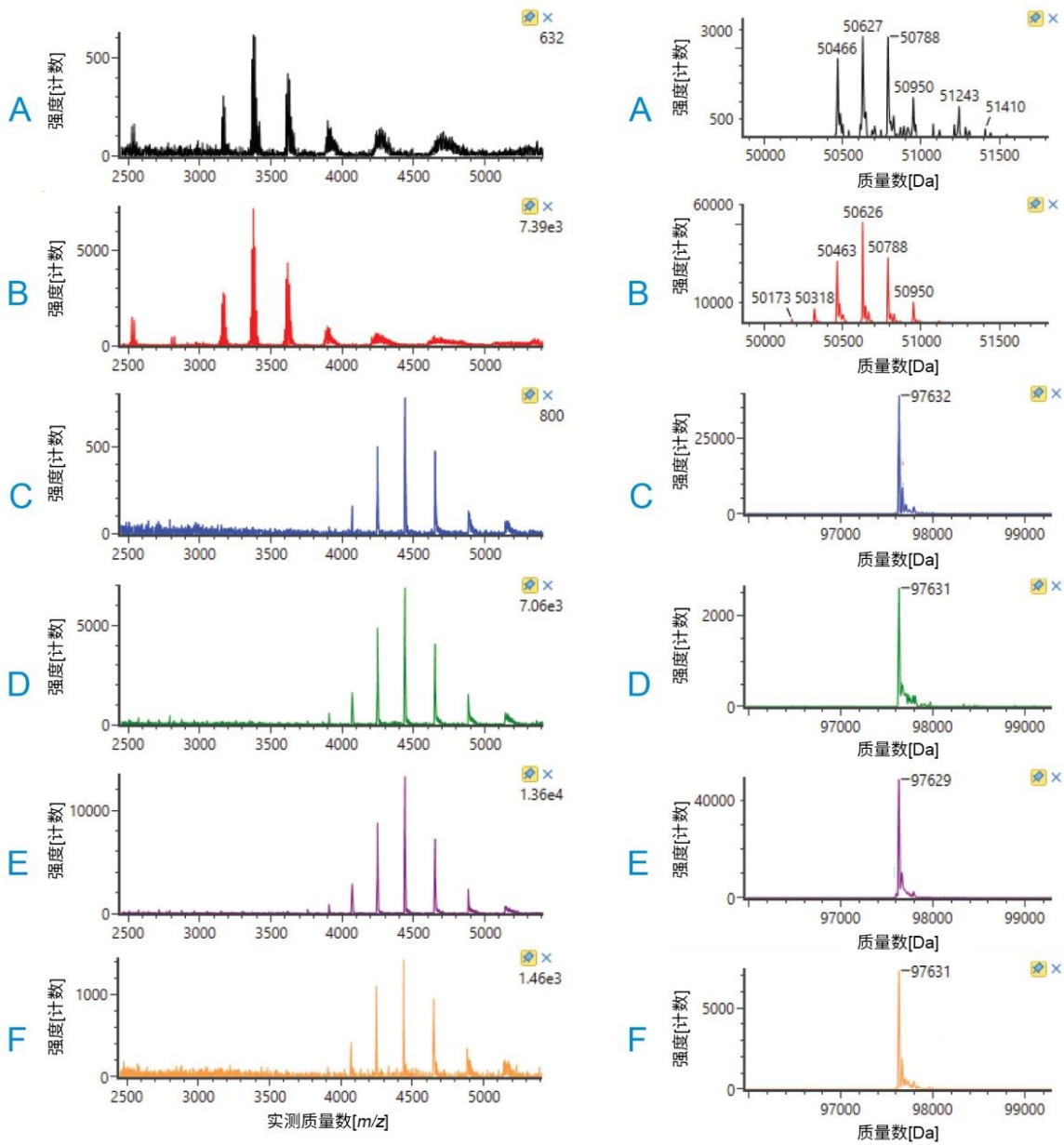


图5.左侧为图3中峰A~F（经过 $IdeS$ 酶解的曲妥珠单抗）的组合原始谱图；右侧为对应的 $MaxEnt1$ 去卷积谱图。

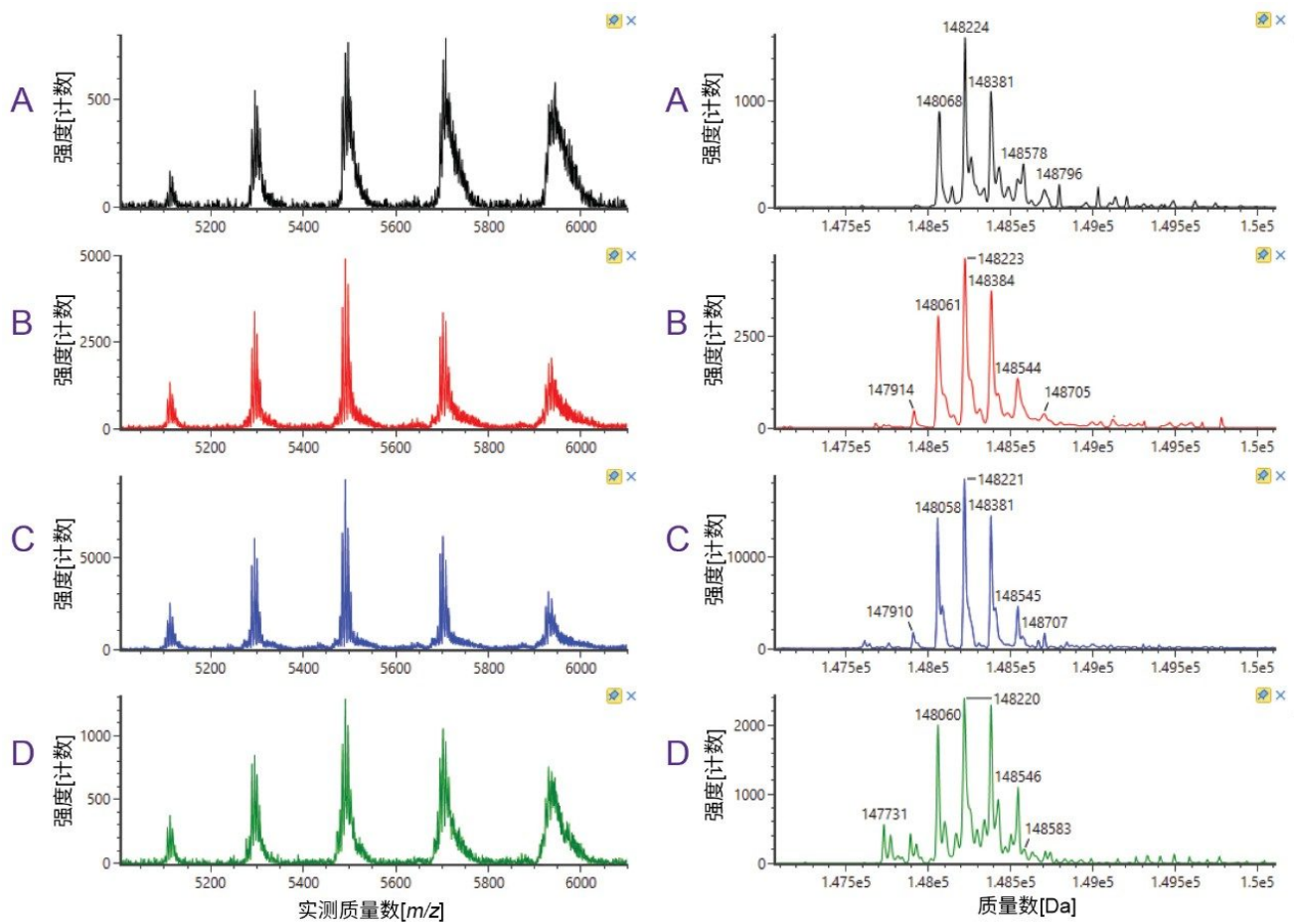


图6.左侧为图4中峰A~D（完整水平的曲妥珠单抗）的原始谱图；右侧为对应的MaxEnt1去卷积谱图。

显然，对分子量相同和分子量相近的物质（例如存在脱酰胺或构象差异）进行评估是该分析所面临的难题之一。上述电荷异构体与完整抗体之间在质量数上几乎没有或者完全没有差异，很难按完整分子量准确地分辨上述变异体。如果这些峰确实具有相同分子量或属于脱酰胺类，则需要可靠的肽水平表征进行确认。在曲妥珠单抗的案例中，实测的酸性变异体水平很好地表征和预测了脱酰胺敏感性<sup>4</sup>。在实际应用中，直接IEX-MS方法对证实分子量相近种类相关假设以及排除其他可能变异体非常有帮助。

此外，采用色谱分离法相较于采用其他电荷类分离方法（例如毛细管电泳或等电聚焦）更便于收集馏分以及进行其他类型的测试，具有明显优势。该IEX方法分离的变异体峰仍可以进行收集并通过肽谱分析确认修饰位置，也可以分离后供药物效价强度分析使用。

---

## 结论

本研究实施了适用范围广泛的直接IEX-MS法，并将其应用于有关mAb电荷异构体检测的案例研究。使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CX-MS pH浓缩液和BioAccord LC-MS系统轻松开发平台方法，提供稳定、可重现的分离结果和高质量质谱，从而鉴定不同的mAb电荷异构体。这一工作流程可以获得基于MS峰匹配的明确结果，同时避免了馏分收集，可以提高电荷异构体的表征和监测效率。简便的缓冲液制备、稳定的色谱分离以及清晰的MS谱图提高了分析通量，加快了生物药物开发的决策速度。

---

## 参考资料

1. Schmid, I.; *et al.* Assessment of Susceptible Chemical Modification Sites of Trastuzumab and Endogenous Human Immunoglobulins at Physiological Conditions.*Communications Biology* 2018, 1 (28).
2. Diepold, K.; *et al.* Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS Following Incubation at Elevated Temperatures.*PLoS ONE* 2012, 7 (1): e30295.
3. Espinoza-de la Garza, C.; *et al.* Capillary Electrophoresis Separation of Monoclonal Antibody Isoforms Using a Neutral Capillary.*J. Vis. Exp.* 2017, (119): 55082.
4. Giorgetti, J.; *et al.* Intact Monoclonal Antibodies Separation and Analysis by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry.*European Journal of Mass Spectrometry* 2018, 25, 324–332.
5. Piešťanský, J.; *et al.* Two-Dimensional Capillary Electrophoresis with On-Line Sample Preparation and Cyclodextrin Separation Environment for Direct Determination of Serotonin in Human Urine. *Molecules* 2017, 22 (10), 1668.
6. Shaepfer, J.; *et al.* Parameters Affecting Reproducibility in Capillary Electrophoresis.*Electrophoresis* 2000, 21 (7), 1421–1429.
7. Yan, Y.; *et al.* Ultrasensitive Characterization of Charge Heterogeneity of Therapeutic Monoclonal

Antibodies Using Strong Cation Exchange Chromatography Coupled to Native Mass Spectrometry.  
*Anal.Chem.*2018, 90 (21), 13013–13020.

8. Leblanc, Y.; *et al.* Charge Variants Characterization of a Monoclonal Antibody by Ion Exchange Chromatography Coupled On-Line to Native Mass Spectrometry: Case Study After a Long-Term Storage at +5 °C. *J. Chromatogr.B: Anal.Technol.Biomed.Life Sci.* 2017, 1048, 130-139.

---

## 特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801359>>

720006672ZH, 2019年9月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号