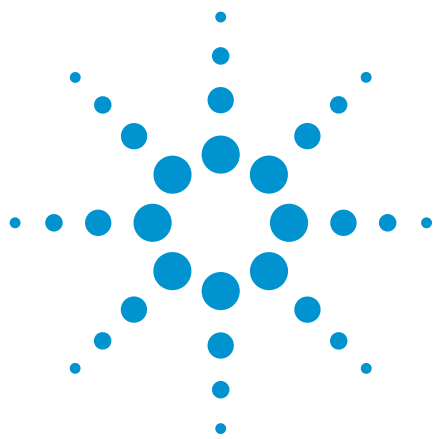




用于 mAb 和 ADC LC/MS 分离的 PLRP-S 聚合物型反相色谱柱

完整和片段化 mAb 与 ADC 的分析

应用简报

生物治疗药物与生物制药

作者

Suresh Babu C.V.
安捷伦科技公司

摘要

本应用简报介绍了聚合物型反相色谱柱在单克隆抗体 (mAb) 和抗体药物偶联物 (ADC) 等生物大分子表征中的应用。通过研究完整和片段级 mAb 了解聚合物色谱柱的性能。结果表明该色谱柱具有卓越的分​​离性能，并适用于 mAb 和 ADC 的常规 LC/MS 分析。

前言

单克隆抗体 (mAb) 和抗体药物偶联物 (ADC) 是具有异质性的治疗分子 [1]。药物开发过程中可对这些分子进行各种修饰，因此需要全面的表征来确保安全性和药效。反相液相色谱与质谱检测结合最常用于 mAb 和 ADC 的初步表征。选择正确的液相色谱柱和方法对于获得可重现的高分离度分离和高质量质谱数据至关重要。通常，在传统硅胶反相色谱柱的流动相中使用甲酸 (FA，一种可用于质谱的离子对试剂) 可导致总离子流图 (TIC) 峰形变差，从而影响 LC/MS 结果 (分离度、灵敏度、质谱信号、准确分子量信息等等)。因此，液相色谱柱必须与甲酸条件兼容，以便改进生物大分子的 LC/MS 分析。



Agilent Technologies

本研究使用聚合物型反相色谱柱 (Agilent PLRP-S) 展示了 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分析。PLRP-S 柱含有硬质、大孔的球形聚苯乙烯和二乙烯基苯填料。这些填料在整个 pH 范围内具有物理和化学稳定性。这些填料本质上是疏水的，因此既没有键合相也没有烷基配体需要进行反相分离，从而确保了这种高重现性材料不含硅醇基与重金属离子。本文使用 PLRP-S 色谱柱结合 LC/MS 方法对 ADC 等多种治疗性 mAb 进行了分析。该方法可获得更好的 LC/MS 结果，可实现完整和片段化 mAb 与 ADC 的精确质量数测定。

材料与amp;方法

样品

- 治疗性 mAb1、mAb2 和 ADC（赖氨酸偶联）购自当地药店并根据制造商的说明进行储存
- **完整**：使用 0.1% 甲酸的 3% 乙腈 (ACN) 溶液将 mAb1、mAb2 和 ADC 稀释到 2 µg/µL 的浓度，进样量 1 µL
- **还原**：将 20 µL mAb (2 µg/µL) 样品与 5 µL 二硫苏糖醇 (DTT) (1 M) 混合，然后在 37 °C 下温育 1 h
- **木瓜蛋白酶消化**：将 10 µL mAb (2 µg/µL) 样品与 5 µL 水解缓冲液（含半胱氨酸）和 5 µL 活化木瓜蛋白酶 (Sigma) 混合。将混合物在 37 °C 下温育 3 h
- **Ides 蛋白酶消化**：将 20 µL mAb (2 µg/µL) 样品与 0.5 µL FabRICATOR（30 个单位）(Sigma) 混合，将混合物在 37 °C 下温育 1 h

仪器

- **液相色谱**：Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
- **质谱**：配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6530 精确质量数四极杆飞行时间 (Q-TOF) 质谱仪

条件

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统

色谱柱：	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 µm, 1000Å (部件号 PL 1912-1502)	
进样量：	1 µL	
样品恒温箱：	5 °C	
流动相 A：	0.1% 甲酸的水溶液	
流动相 B：	0.1% 甲酸的乙腈溶液	
梯度：	完整	片段
	0 min 时 → 20% B	0 min 时 → 20% B
	4 min 时 → 20% B	10 min 时 → 50% B
	5 min 时 → 40% B	10.1 min 时 → 85% B
	10 min 时 → 70% B	11 min 时 → 85% B
	11 min 时 → 90% B	11.1 min 时 → 20% B
	11.1 min 时 → 20% B	
停止时间：	11.1 min	
后运行时间：	4 min	
柱温：	80 °C	
流速：	0.6 mL/min	

Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS

离子模式：	正离子模式，双 AJS ESI (profile)
干燥气温度：	350 °C
干燥气流速：	8 L/min
鞘气温度：	400 °C
鞘气流速：	11 L/min
雾化器压力：	35 psi
毛细管电压：	5500 V
碎裂电压：	380 V
锥孔电压：	65 V
Oct RF Vpp：	750 V
采集参数 MS 模式：	数据在 1 GHz 下采集，仅 MS 模式，质量数范围为 600-4000 <i>m/z</i> （片段），2000-6000 <i>m/z</i> （完整）
数据分析：	LC/MS 的数据采用 Agilent MassHunter 定性分析软件及 Agilent MassHunter BioConfirm 软件进行分析。最大熵和 pMod 解卷积算法分别用于获得药物偶联抗体 (ADC) 和 mAb1/mAb2 的零电荷谱图。

结果与讨论

为获得更好的色谱性能，通常将三氟乙酸 (TFA) 添加到流动相中作为离子对试剂，以获得更尖锐的色谱峰。然而，TFA 因其信号抑制效应而不适用于质谱分析 [2]。甲酸是用于生物分子应用的质谱最适用的离子对试剂，但可能会使传统硅胶色谱柱形成较差的峰形。在用于 mAb 等高分子量蛋白质时，需要在获得良好色谱峰形和高信噪比 (S/N) m/z 质谱之间进行权衡 [3]。选择合适的液相色谱柱对于获得质谱兼容性和提高 mAb 和 ADC 分离度十分重要。有关联用硅胶色谱柱与 LC/MS 进行 mAb 分离的指南，请参阅安捷伦应用简报：5991-6296EN、5991-4266EN、5991-2116EN 和 5990-9631CHCN [3-6]。

在本研究中，使用聚合物型 PLRP-S 色谱柱分析完整和片段级 mAb 和 ADC。PLRP-S 经久耐用且具有机械稳定性，可提供各种适用于生物大分子应用的孔径和填料尺寸。

完整分析

图 1 展示了使用 PLRP-S, 2.1×50 mm, $5 \mu\text{m}$, $1000\text{\AA}$ 色谱柱对完整 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分析。这款色谱柱具有出色的 TIC 峰形，mAb 的半峰宽 (FWHM) ≤ 0.1 min，ADC 的半峰宽 (FWHM) 为 0.25 min。使用标准 RP 流动相体系 (乙腈 + 甲酸) 获得了较窄的 TIC 峰宽。两种 mAb 表现出的峰宽类似，表明该方法适用于各种 mAb 样品。具有高度异质性的 ADC 样品也表现出较窄的峰宽。另外还使用紫外检测在相同的方法条件和色谱柱下进行了测试，得到了相同的保留时间曲线，结果令人满意 (数据未示出)。

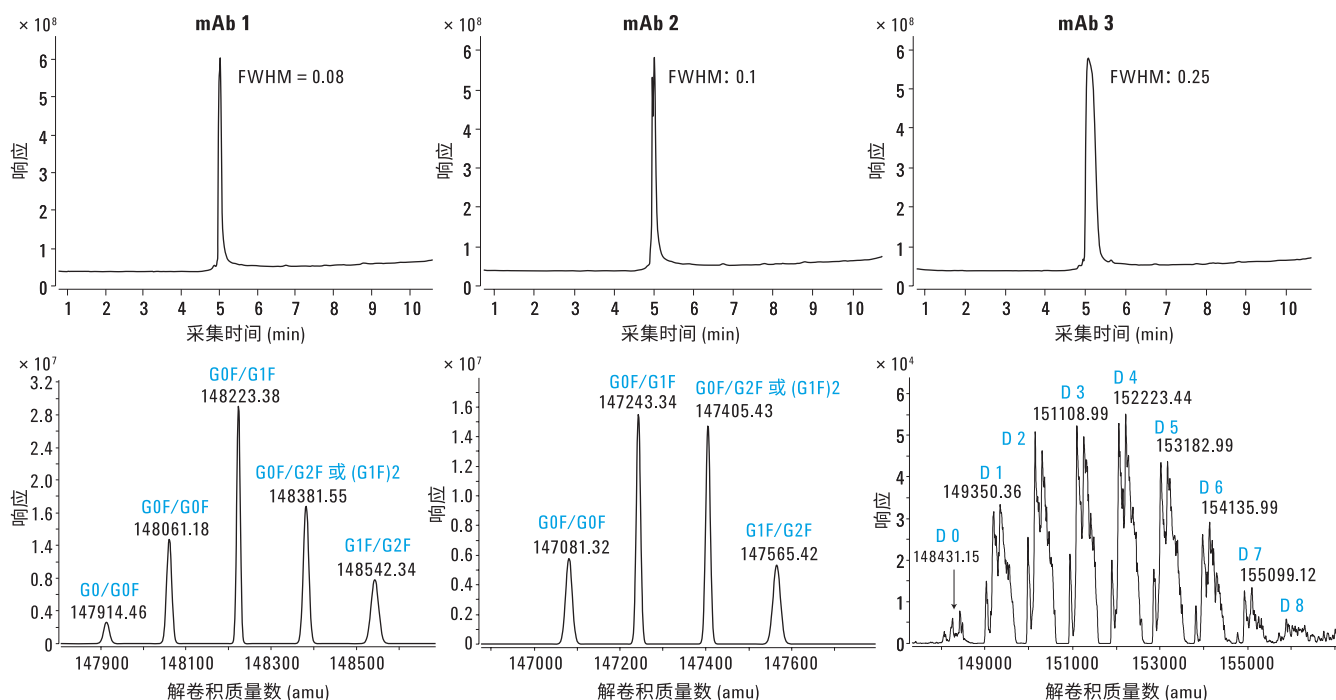


图 1. 采用 Agilent PLRP-S, 2.1×50 mm, $5 \mu\text{m}$, $1000\text{\AA}$ 色谱柱对完整 mAb/ADC 的 LC/MS 分析结果。上图：总离子流色谱图；下图：解卷积质谱图。FWHM：半峰宽

使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件将原始质谱转换为零电荷质谱。图 1 显示了解卷积谱图。mAb1 解卷积谱图中显示了五种主要糖型，而 mAb2 谱图中则显示了四种主要糖型。ADC 的解卷积质谱显示，一种药物在加载八个主要药物偶联物 (D0 至 D8) 的步骤中有效载荷有增大趋势。

片段分析

为对生成的片段进行分析，对样品进行了化学反应和酶反应。图 2 展示了使用 PLRP-S, 2.1×50 mm, $5 \mu\text{m}$, $1000\text{\AA}$ 色谱柱对还原态 IdeS 和木瓜蛋白酶消化的 mAb 和 ADC 的 LC/MS 分离。利用标准流动相体系 (乙腈 + 甲酸) 可使片段峰 (LC、HC、ScFc、F(ab')₂、Fc、2 * Fab2 和带有不同类型药物偶联物的 ADC) 在 PLRP-S 柱上得到充分的分离。与预期结果相同，两种 mAb 样品经消化后形成了两种主要片段。

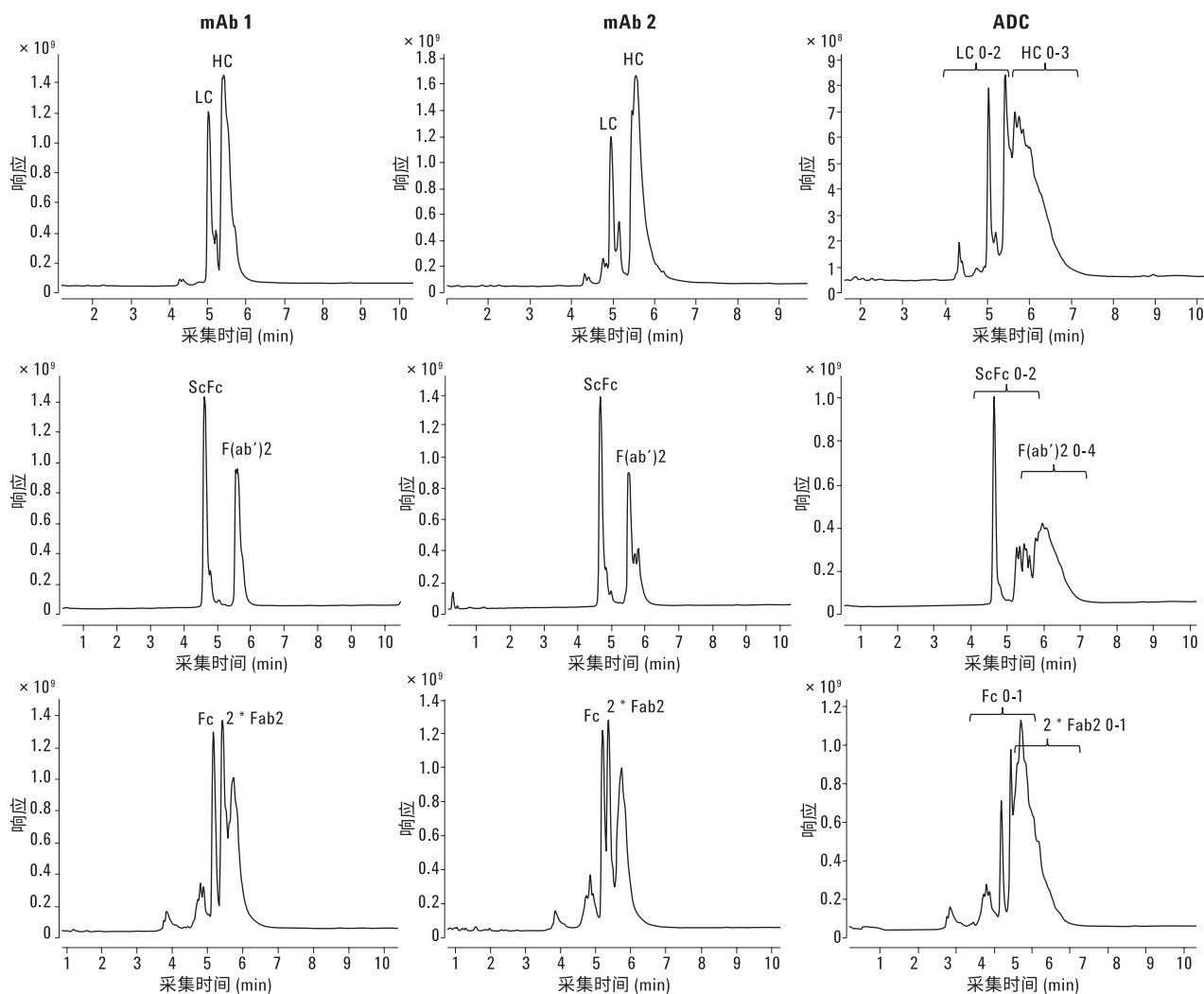


图 2. 采用 Agilent PLRP-S, 2.1×50 mm, $5 \mu\text{m}$, $1000\text{\AA}$ 色谱柱对 mAb 片段的 LC/MS 分析结果。上图：还原；中图：IdeS 消化；下图：木瓜蛋白酶消化

这些主要片段峰之间的分离足以获得更好的质谱灵敏度，实现准确的分子量测定（图 3）。ADC 样品中各类片段的分离具有挑战性，因为在不同的可用赖氨酸残基处的偶联会引发高度异质性。图 2 显示了 PLRP-S 色谱柱对糖基化 ADC 片段的分离结果。显然，不同药物偶联物在上述 LC/MS 条件下得到了良好的分离，从而证明了 PLRP-S 色谱柱的分离性能。图 3 显示了 mAb1 和 ADC 片段的代表性解卷积质谱图。

结论

- Agilent PLRP-S 色谱柱对完整和片段级 mAb 和 ADC 的分析表现出卓越的分离性能
- Agilent PLRP-S 采用含有甲酸的流动相，可提供更高的色谱性能和高质量质谱响应
- 本文展示了 Agilent PLRP-S 色谱柱联用 Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统对 mAb 和 ADC 的分析

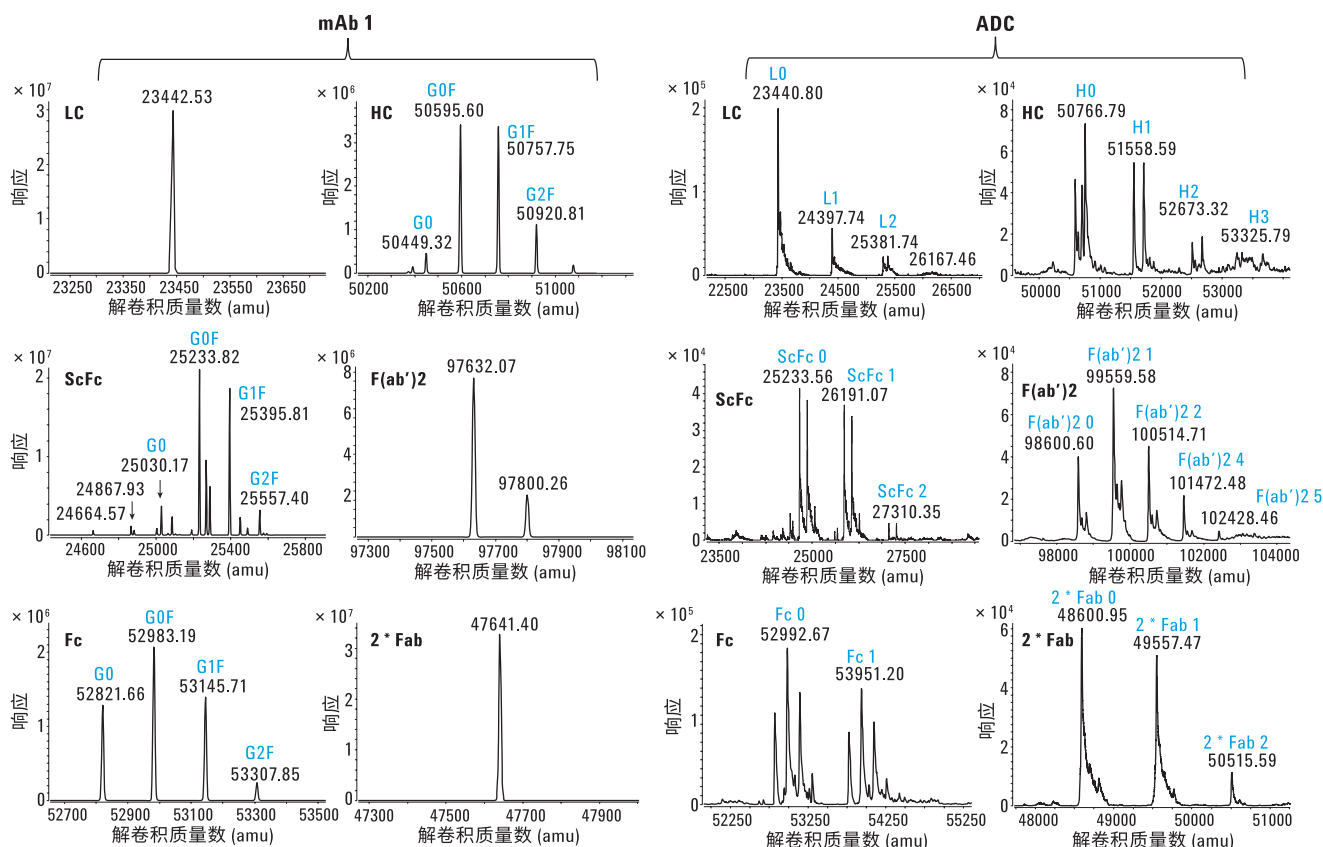


图 3. 代表性解卷积质谱图。上图：还原；中图：IdeS 消化；下图：木瓜蛋白酶消化

参考文献

1. Beck, A.; Reichert, J. M. Antibody-drug conjugates. *mAbs* **2014**, 6:1, 15-17
2. McCalley, D. V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1038, 77-84
3. Gudihal, R.; Suresh Babu C. V.; Tang, N. Analysis of Monoclonal Antibody(mAb) Using Agilent 1290 InfinityLC System Coupled to Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) (将 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间系统联用以分析单克隆抗体 (mAb))；应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-4266EN，**2014**
4. Suresh Babu, C. V. LC/MS of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio RP-mAb (使用 Agilent AdvanceBio RP-mAb 对完整治疗性单克隆抗体进行 LC/MS 分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-6296EN，**2015**
5. Gudihal, R.; Suresh Babu, C. V.; Tang, N.; Madhavi H. N.; Uma, M. Intact Protein Analysis using an Agilent 6550 Q-TOF Mass Spectrometer (使用 Agilent 6550 Q-TOF 质谱仪进行完整蛋白质分析)，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5991-2116EN，**2013**
6. Martosella, J; Duong, P; Moyer, S, 采用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) 300SB-C8 色谱柱对还原态单克隆抗体进行快速 UHPLC 分析，应用简报，安捷伦科技公司，出版号 5990-9631CHCN，**2012**

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/advancebio

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016
2016 年 8 月 1 日，中国出版
5991-7163CHCN



Agilent Technologies