

利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 精确表征完整单克隆抗体

应用简报

作者

David L. Wong
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

前言

单克隆抗体 (mAb) 是一类非常重要的生物药物分子。mAb 作为一种蛋白质药物，在生产步骤的每一步都需要对其进行全面表征。完整 mAb 分析提供了一种快速测定 mAb 产物准确分子量及其异质性（如翻译后修饰 (PTM)、抗体药物偶联物 (ADC)、mAb 序列变异或降解产物）程度的评估方法。四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统通常用于分析完整蛋白质或抗体，因为它在高质量数范围内具有优异的分辨率¹⁻³。Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统的硬件和软件功能有助于显著提高对高达 30000 m/z 生物分子的测量。本应用简报介绍了一种用于分析各种 mAb 产物的无缝工作流程，该工作流程使用 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 Agilent MassHunter BioConfirm 软件的自动化数据处理工具。



图 1. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统

实验部分

材料与与方法

单克隆抗体标准品 RM 8671 购自美国国家标准技术研究院 (NIST)。赫赛汀 (曲妥单抗) 制剂和 ADC (T-DM1) 制剂购自基因泰克 (So. San Francisco, California, USA)。所有 mAb 样品均用去离子水稀释至 1.0 µg/µL。

LC/MS 分析

采用 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统与配备安捷伦双喷射流离子源的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统联用进行 LC/MS 分析。利用 Agilent PLRP-S 1000 Å 色谱柱 (2.1 × 50 mm, 5 µm) 进行液相色谱分离。表 1 和表 2 列出了所用的 LC/MS 参数。每次分析的 mAb 样品进样量约为 0.5 µg。

数据处理

使用 MassHunter BioConfirm B.08.00 软件的蛋白质解卷积功能对 mAb 的所有质谱数据进行分析，该软件利用最大熵算法实现准确的分子量计算。利用 2000 至 5000 m/z 的质量范围内前 25% 峰高的平均谱图进行质谱解卷积。将解卷积质量范围设置为 140000-160000 道尔顿。

结果与讨论

尽管分析了多种 mAb，但这种通用的方法使检测的所有样品均获得了优异的数据质量。图 2 示出了对 NIST mAb 标准品的完整蛋白质分析结果。在 Agilent PLRP-S 色谱柱上进样约 0.5 µg 样品 (不经样品脱盐前处理)，使用 4 分钟的梯度，且流速为 0.5 mL/min。

获得了质量范围 2000-5000 m/z 内完整 mAb 的高质量质谱图和多电荷离子包迹。每个电荷态的放大谱图 (图 2 插图) 清晰显示了 NIST mAb 的六种主要糖型。

BioConfirm B.08 蛋白质解卷积功能不仅可以实现自动化质量范围检测，而且还能准确测定零电荷态谱图，从而获得优异的质量准确度。图 3 示出了完整 NIST mAb 的质谱解卷积结果。NIST mAb 的所有六种主要糖型均获得了低

至 ppm 级的误差 (平均值: < 0.5 ppm) 和出色的质谱分辨率。除 mAb 的主要特征以外，还可轻松鉴定其他较小的糖基化异质性，例如 GlcNAc 残基缺失。利用 LC/Q-TOF 采集的原始数据和最大熵解卷积算法的极少数据处理使用户能够检测并保留有关完整蛋白质组成的详细信息。这点很重要，与采用更复杂数据处理和操纵的分析技术比较时尤其如此，这些复杂的数据处理可能掩盖细微的蛋白质结构信息。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统	
色谱柱	Agilent PLRP-S, 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm (部件号 PL1912-1502)
恒温器	4 °C
溶剂 A	0.1% 甲酸的去离子水溶液
溶剂 B	0.1% 甲酸的 100% 乙腈溶液
梯度	0-1 min, 0%-20% B 1-3 min, 20%-50% B 3-4 min, 50%-70% B
柱温	60 °C
流速	0.5 mL/min
进样量	0.5 µL

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
离子源	安捷伦双喷射流
干燥气温度	350 °C
干燥气流量	12 L/min
雾化器	60 psig
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	5500 V
喷嘴电压	2000 V
碎裂电压	380 V
锥孔电压	140 V
四极杆 AMU	500 m/z
质量范围	100-10000 m/z
采集速率	1.0 幅谱图/秒
参比质量	922.0098
采集模式	正离子, 扩展的 (10000 m/z) 质量范围

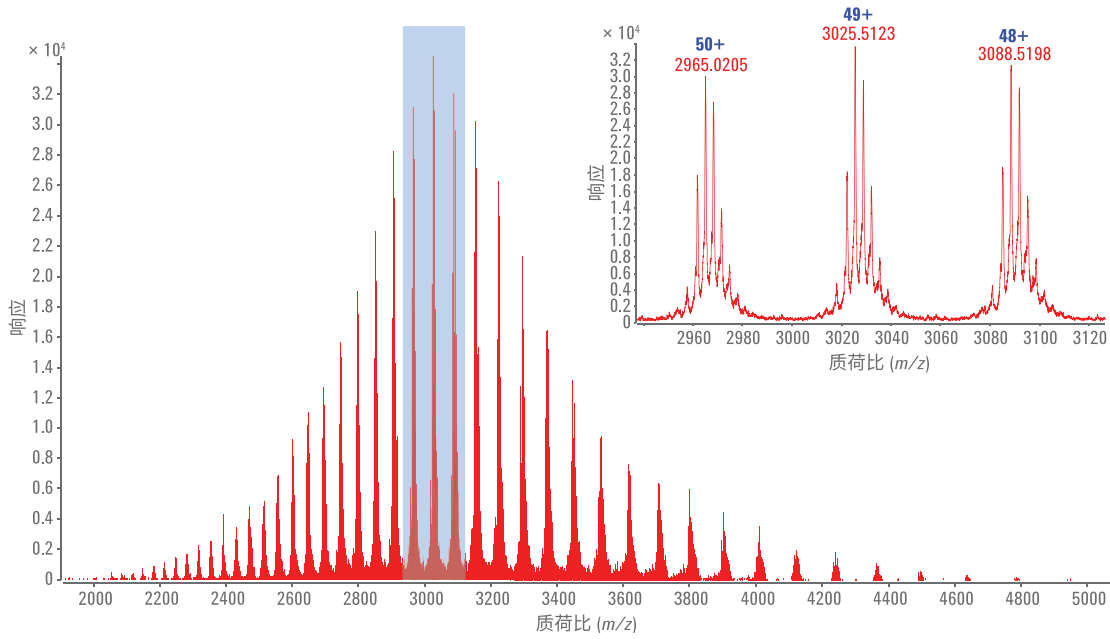


图 2. 完整 NIST mAb 分析 (进样量 0.5 μ g)

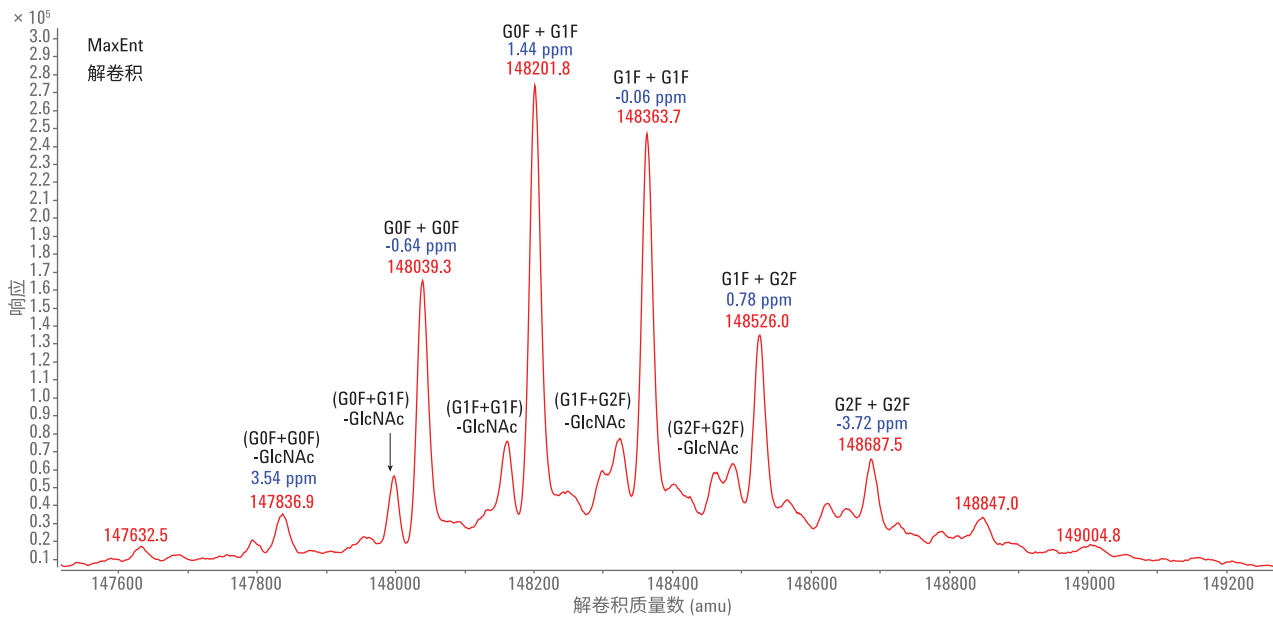


图 3. 完整 NIST mAb 的质谱解卷积结果 (进样量 0.5 μ g)

为确认 6545XT 系统在 mAb 分析中的质量准确度重现性，另外采用相同的进样量和 HPLC 条件分析了几种 mAb。表 3 列出了 NIST mAb 和赫赛汀六种最主要糖型的解卷积质谱结果。结果一致显示了出色的低 ppm 级质量准确度并清晰显示出所有糖型。

ADC 代表新一代靶标特异性有效生物治疗药物。获得准确的药物抗体比率 (DAR) 对于优化 ADC 药效并最大程度减小其毒性至关重要。不同程度的药物偶联会导致复杂性增加，带来更大的分析挑战。图 4 显示了完整糖基化 ADC 的解卷积质谱图。观察到六个质量簇的质量数与 ADC 的 D0-D8 匹配。每个簇组中的三个主峰对应于 G0F/G0F、G0F/G1F 和 G1F/G1F 糖型。更重要的是，使用 BioConfirm DAR 计算器计算得到的平均 DAR 为 3.5，该数值与之前使用其他分析方法获得的数据所报道的完整 ADC 的 DAR 值一致。

表 3. 完整 mAb 分析总结

mAb	NIST mAb		赫赛汀	
	分子量计算值 (Da)	质量数误差 (ppm)	分子量计算值 (Da)	质量数误差 (ppm)
G0 + G0F			147912.6887	0.76
(G0F + G0F) - GlcNAc	147836.3503	3.54		
G0F + G0F	148039.4297	-0.64	148058.8326	4.76
G0F + G1F	148201.5729	1.44	148220.9758	0.16
G1F + G1F	148363.7162	-0.06	148383.1191	-5.07
G1F + G2F	148525.8595	0.78	148545.2623	-6.74
G2F + G2F	148688.0027	-3.72	148707.4056	-13.23

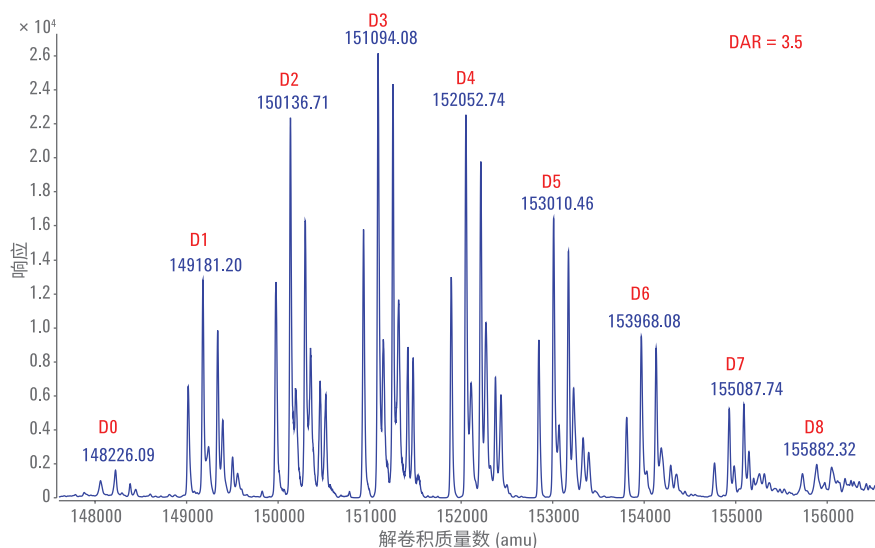


图 4. 完整 T-DM1 分析 (进样量 0.5 μg)

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 提供的详细信息对于开发和分析生物仿制治疗性药物具有明显优势。BioConfirm 支持对解卷积谱图进行直接的镜像图对比（图 5），从而快速观察蛋白质样品之间的差异。在本例中，两个样品在本质上非常接近。可快速观察到可能改变药物产品质量的差异，例如蛋白质序列（突变）、糖基化或蛋白质截短。

结论

单克隆抗体本身高度复杂，需要高分辨率、高精密度和宽动态范围才可对其进行可靠的全面表征。本应用简报介绍了一种高通量的完整 mAb 分析工作流程解决方案，该解决方案将高性能色谱技术、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和用于自动化数据处理的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件相结合。

- 该工作流程能够使完整 mAb 质量分析过程中测得的糖型获得单 ppm 级的优异质量准确度
- 可获得有关 mAb 蛋白质异质性组分的非常详细的信息。除主要糖型以外，还可清晰分辨强度较低且分子量相近的微量组分。可轻松区分 GlcNAc 糖单体缺失的所有主要糖型以及带有重链 C-端赖氨酸的完整长度蛋白质序列等变异

该方法所需的总分析时间非常短，适用于分析大量样品。利用仅 4 分钟的液相色谱梯度和 Agilent BioConfirm 自动化数据处理工具，能够在 8 小时内完成整个 96 孔板的分析。

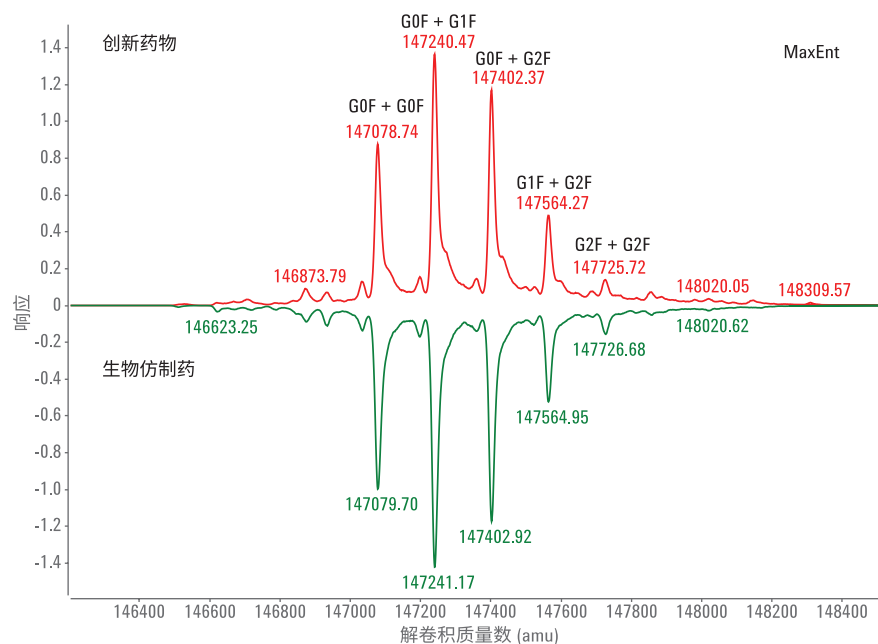


图 5. 完整利妥昔单抗分析（创新药与生物仿制药）（进样量 0.5 μg）

参考文献

1. 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分析), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-2116EN
2. Analysis of Monoclonal Antibody (mAb) Using Agilent 1290 Infinity LC 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 (Q-TOF) 系统联用以分析单克隆抗体 (mAb)), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-4266EN
3. An Integrated Workflow for Automated Calculation of Antibody-Drug Conjugate (ADC) Drug-to-Antibody Ratio (DAR) (自动计算抗体药物偶联物 (ADC) 药物/抗体比率 (DAR) 的一体化工作流程), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-7366EN

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

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, 2017

2017 年 2 月 24 日, 中国出版

5991-7813CHCN



Agilent Technologies