

利用全自动毛细管等电聚焦-质谱联用技术鉴定单克隆抗体的电荷异构体

作者

Tony Wang, James Xia,
Rena Wang
CMP Scientific Corp,
Brooklyn, NY, USA

Jens Meixner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了使用质谱 (MS) 直接测定单克隆抗体 (mAb) 电荷异构体的方法。所采用的工作流程包括配备 CMP Scientific EMASS-II 毛细管电泳/质谱 (CE/MS) 离子源的 Agilent 7100A 毛细管电泳仪。质谱实验在 Agilent 6230 精确质量数 TOF LC/MS 或 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 上进行。

前言

由于存在翻译后修饰，例如脱酰胺基化、C 端赖氨酸、糖基化、赖氨酸糖化和 N 端焦谷氨酸等，mAb 治疗药物往往表现出电荷异质性。等电聚焦凝胶电泳、毛细管等电聚焦 (CIEF) 和成像毛细管等电聚焦方法通常用于生物治疗药物的电荷异构体定量分析。然而，每种潜在的电荷异构体的质谱鉴定一直都充满挑战。本文中，我们展示了在 Agilent 7100A 毛细管电泳仪和 TOF/Q-TOF 系统上使用 CMP Scientific EMASS-II CE/MS 离子源对 mAb 治疗药物的电荷异构体直接进行质谱鉴定。

实验部分

材料

载体两性电解质、pH 范围为 3.0 至 10.0 的 Pharmalyte、mAb 标准品和 SILu Lite SigmaMAb 通用抗体标准品（目录号 MSQC4-1MG）均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。用 50% 的甘油配制浓度为 5 mg/mL 的 SigmaMAb 储备液，并于 -20 °C 储存。水、甲酸、氢氧化铵、乙腈和甲醇等 LC/MS 级试剂均购自 Millipore-Sigma (Burlington, MA)。

在线 CIEF-MS

使用 EMASS-II CE/MS 离子源 (CMP Scientific Corp, Brooklyn, NY, USA) 在 7100A 毛细管电泳仪（安捷伦科技公司，Santa Clara, CA, USA）与 6230 精确质量数 TOF LC/MS 或 6545 Q-TOF LC/MS 的联用系统上进行在线 CIEF-MS 分析。用于在线 CIEF-MS 分析的电喷雾发射器（外径 1.0 mm，内径 0.75 mm，喷嘴尺寸 30 μm）和用于分离的中性涂层 PS1 毛细管（外径 360 μm，内径 50 μm）均购自

CMP Scientific。阴极液是含 0.2 mol/L 氢氧化铵的 15% 甘油 (v/v)。阳极液是含 1% 甲酸的 15% 甘油 (v/v)。电喷雾电离正电压（介于 2.2 kV 和 2.4 kV 之间）由 EMASS-II 离子源附带的外部台式高压电源提供。鞘流溶液为 20% 乙酸和 25% 乙腈 (v/v) 的混合溶液。将 6230 和 6545 的毛细管电压 (Vcap) 设置为 0。使用单孔在线纳流喷雾罩防止干燥气体进入 MS，最大程度减小对 EMASS-II 离子源纳流喷雾的干扰。通过显微镜摄像头将发射器喷嘴到质谱仪的距离调整为 3 到 4 mm 之间。样品 (0.1–0.5 mg/mL) 配制于 5 mmol/L 乙酸铵、1%–1.5% 两性电解质和 15% 甘油中。

样品进样和分离

在 75 cm 长的毛细管（内径 50 μm）中，在 950 mbar 的条件下进行 10 秒的阴极液注入，然后进行 75 秒的样品溶液进样。然后在毛细管进样口端施加 CE 分离正电压 (18.8 kV) 以开始电聚焦。在毛细管进样口施加恒定压力 (5–10 mbar)，使其产生流体动力学流动，缩短分析时间。

质谱参数

将 Q-TOF 毛细管电压设置为 0。干燥气温度为 365 °C，流速为 6 L/min；碎裂电压为 380 V。使用 Agilent MassHunter 工作站软件 (B.09 版) 进行 CE/MS 方法设置、数据采集和分析。表 1 汇总了此 CIEF-MS 方法。

表 1. CIEF-MS 方法参数

参数	值
毛细管电泳	7100A CE
质谱	6230 精确质量数 TOF LC/MS；6545 Q-TOF LC/MS
CE/MS 联用	CMP Scientific EMASS-II CE/MS 离子源
分离毛细管	75 cm PS1 毛细管 (CMP Scientific Corp)
阳极液	1% 甲酸，15% 甘油
阴极液	0.2 mol/L 氢氧化铵，15% 甘油
鞘流溶液	20% 乙酸，25% 乙腈
样品缓冲液	5 mmol/L 乙酸铵，1%–1.5% Pharmalyte 3–10，15% 甘油
进样	冲洗，10 秒（阴极液） 冲洗，75 秒（样品溶液）
分离	15.0–18.8 kV，5–10 mbar
电喷雾发射器	喷嘴尺寸 30 μm (CMP Scientific Corp)
ESI 电压	2.4 kV
发射器与质谱仪之间的距离	4 mm
毛细管末端与发射器喷嘴之间的距离	0.8 mm
碎裂电压	380 V
毛细管电压	0 V
干燥气流速	6 L/min
干燥气温度	365 °C

结果与讨论

全自动 CIEF-MS 方法的原理

有关在线 CIEF-MS 方法的详细介绍，请参阅参考文献部分列出的文章¹⁻⁴。简言之，为了在分离毛细管内建立 pH 梯度，首先应通过毛细管进样口注入一小段氢氧化铵（图 1，步骤 1）。然后从毛细管进样口注入一长段与两性电解质混合的样品。样品溶液将氢氧化铵推向毛细管出口，形成阴极液末端，用于随后的等电聚焦（图 1，步骤 2）。当在毛细管内部形成 pH 梯度时，使用酸性鞘流溶液逐渐滴定氢氧化铵。对于单克隆抗体，最佳鞘流溶液为 20% 乙酸和 25% 乙腈的混合溶液。一旦阴极液完全耗尽，聚焦的蛋白区域就会开始向毛细管出口迁移。这种迁移的原理与传统的两步法 CIEF-MS 方法相同（图 1，步骤 3）。因此，聚焦（利用毛细管内的氢氧化铵）和迁移（通过酸性鞘流溶液完全滴定氢氧化铵）连续进行。这极大地简化了操作，同时大幅提高了电荷异构体分析的成功率。

使用碱性蛋白质混合物检查

Agilent-CMP CE/MS 系统的性能

我们建议通过进样少量溶菌酶和核糖核酸酶 A 的混合物来评估 Agilent-CMP CE/MS 系统的性能。利用含 100 mmol/L 乙酸铵的 4% 乙酸 (v/v) 配制样品，其中溶菌酶浓度为 0.1 mg/mL，核糖核酸酶 A 为 0.3 mg/mL。背景电解质为 10% 的乙酸 (v/v)。鞘流溶液为 5% 乙酸和 10% 甲醇 (v/v) 的混合溶液。进样压力为 100 mbar，进样 7 秒。分离电压为 30 kV。图 2 显示

了在性能良好的系统上获得的该碱性蛋白质混合物的毛细管区带电泳 (CZE)-质谱结果。应检查是否符合以下标准：两个蛋白质峰均不出现明显拖尾；溶菌酶和核糖核酸酶 A 之间的分离窗口超过 1 分钟；峰高相似；峰宽小于 30 秒。

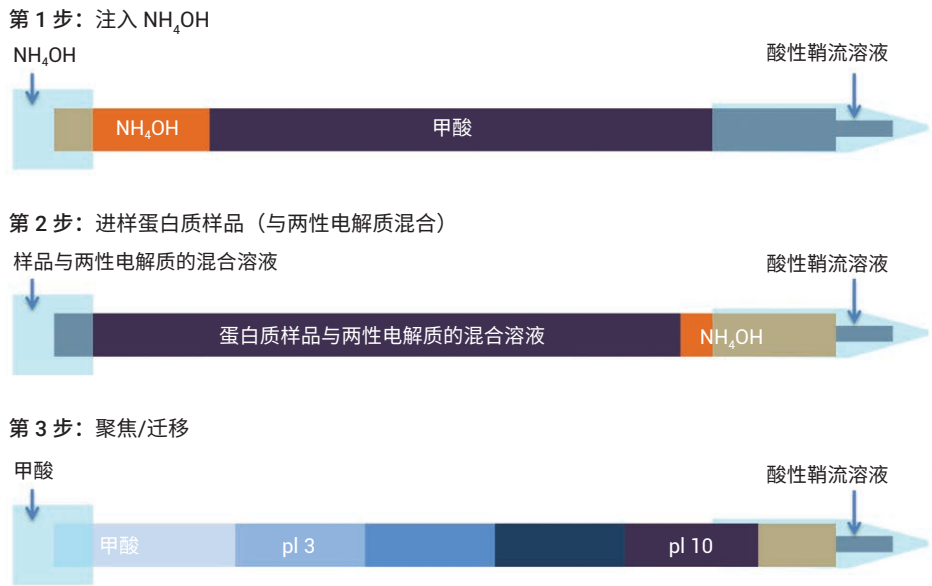


图 1. CIEF-MS 方法原理

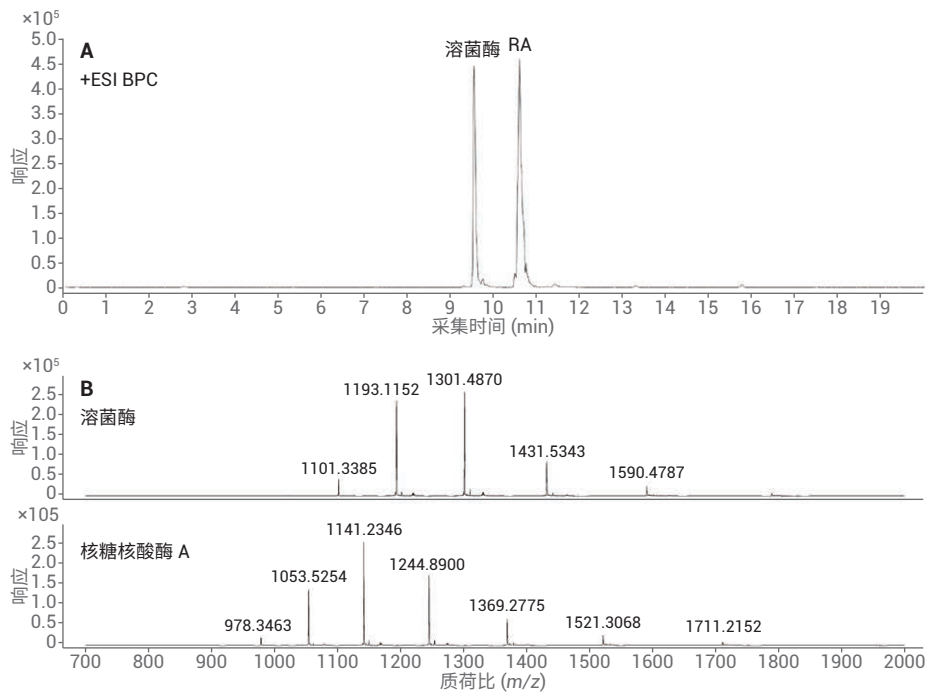


图 2. 使用溶菌酶与核糖核酸酶 A 蛋白质混合物检查 Agilent-CMP CE/MS 系统性能

使用单克隆抗体标准品进行

Agilent-CMP CE/MS 系统性能验证

在开展 CIEF-MS 实验进行 mAb 电荷异构体分析之前,通过进样 mAb 样品进一步测试系统性能是一种很好的做法。以 SigmaMAb 为例,预计 IgG 分子在 20 分钟后进行迁移(图 3)。这一长迁移时间表明 PS1 毛细管上存在极小的电渗流。没有出现峰拖尾则表明毛细管壁的蛋白质吸附率很小。实验条件如下:

- **样品:** 0.2 mg/mL SigmaMAb, 溶于 100 mmol/L 乙酸铵和 4% 乙酸 (v/v) 的混合溶液
- **背景电解质:** 30% 乙酸 (v/v)
- **鞘流溶液:** 20% 乙酸, 25% 乙腈
- **进样:** 样品在 950 mbar 下进样 3 秒, 然后在 950 mbar 下对背景电解质进样 3 秒
- **分离:** 30 kV

使用蛋白质标准品进行 Agilent-CMP CIEF/MS 系统性能验证

在 CZE-MS 评估后,可以使用细胞色素 C (pI 值 10.3) 和肌红蛋白 (pI 值 7.2 和 6.8) 的混合物测试 CIEF-MS 方法。图 4 显示了这种混合物在 100 cm PS1 毛细管上的 CIEF-MS 结果。实验条件如下:

- **样品:** 0.1 mg/mL 细胞色素 C, 0.08 mg/mL 肌红蛋白, 溶于 1.2% Pharmalyte 3-10、4 mmol/L 乙酸铵和 12% 甘油的混合溶液

- **阳极液:** 1% 甲酸, 15% 甘油
- **阴极液:** 0.2 mol/L 氢氧化铵, 15% 甘油
- **鞘流溶液:** 30% 乙酸
- **进样:** 阴极液在 950 mbar 下进样 25 秒, 然后在 950 mbar 下对样品进样 110 秒
- **聚焦和迁移:** 15 kV, 10 mbar

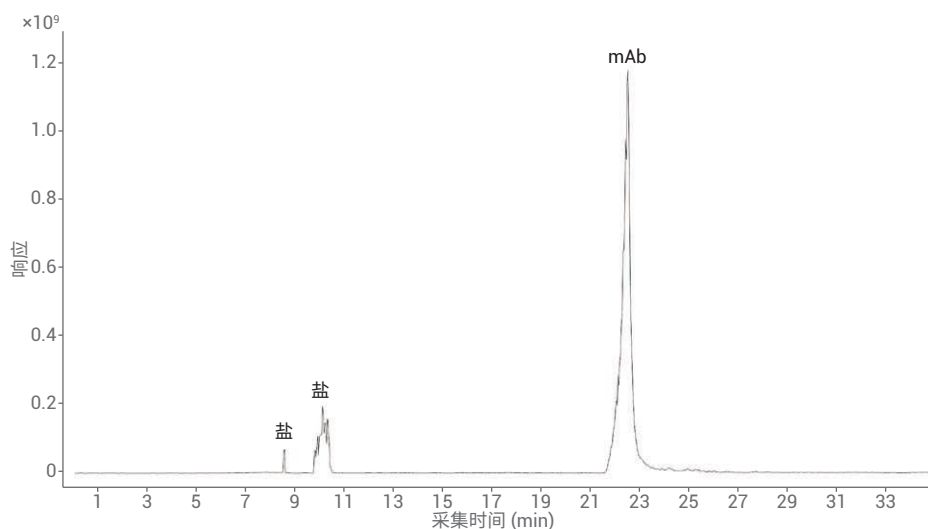


图 3. 使用单克隆抗体标准品检查分离毛细管的性能

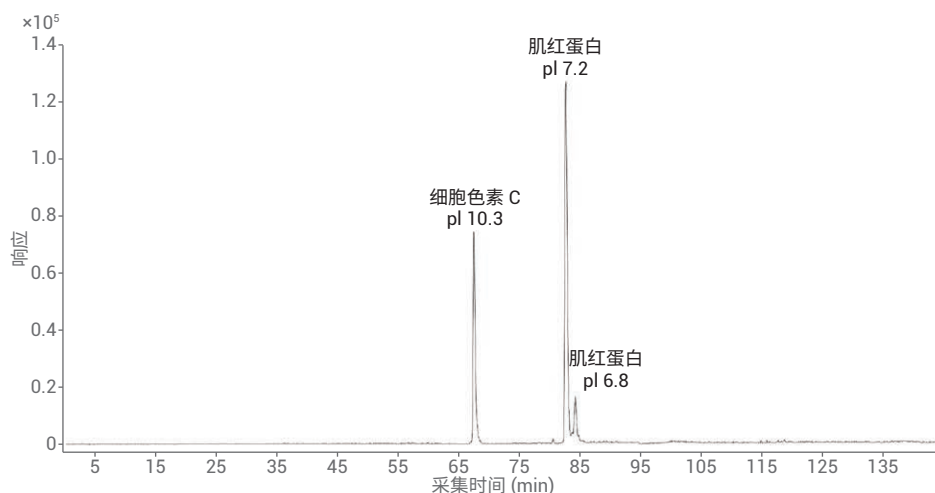


图 4. 使用细胞色素 C 与肌红蛋白的混合物检查 CIEF-MS 系统性能

达雷木单抗的 CIEF-MS 分析

达雷木单抗是一种商业化的治疗性 IgG1 单克隆抗体。图 5 为达雷木单抗样品在 CIEF-MS 分析过程中，Agilent MassHunter 数据采集软件的屏幕截图。在左边中间的图中，蓝线为总离子电泳图 (TIE)，红线为 CE 电流图。在样品中加入细胞色素 C，其显示为 TIE 中的第一个峰。细胞色素 C 的 pI 值为 10.3，因此，它适合作为 pH 3-10 范围内的两性电解质的前标记物。如图 5 所示，达雷木单抗处的两

性电解质背景最低，表明电喷雾电离条件有利于抗体分子的分析。研究表明，20% 乙酸和 25% 乙腈组成的鞘流溶液适用于许多 mAb 治疗药物²。实验条件如下：

- **样品：**0.33 mg/mL 达雷木单抗，0.11 mg/mL 细胞色素 C，溶于 5 mmol/L AA、1% Pharmalyte 3-10 和 15% 甘油的混合溶液
- **阴极液：**0.2 mol/L 氢氧化铵，15% 甘油

- **阳极液：**1% 甲酸，15% 甘油
- **鞘流溶液：**20% 乙酸，25% 乙腈
- **进样：**阳极液在 950 mbar 下进样 10 秒，然后在 950 mbar 下对样品进样 75 秒
- **聚焦和迁移：**18.8 kV，5 mbar

在上述条件下，在 75 cm PS1 毛细管上，细胞色素 C 通常在 40 分钟后出峰。达雷木单抗在随后的 5 分钟内出峰。

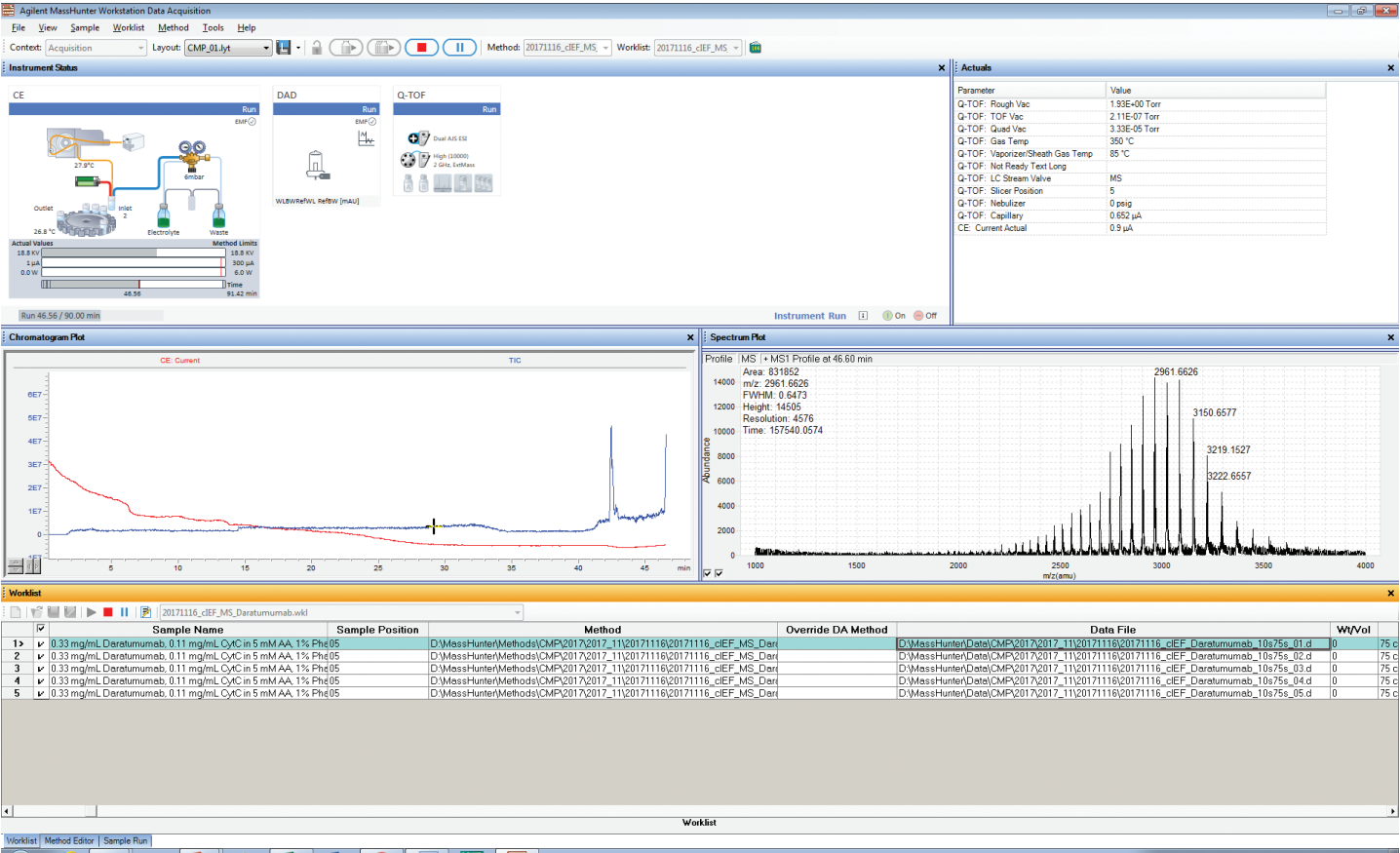


图 5. 达雷木单抗样品在 CIEF-MS 分析过程中的 MassHunter 数据采集软件的屏幕截图

通过 CIEF-MS 分析鉴定达雷木单抗电荷异构体

图 6 为鉴定出的达雷木单抗电荷异构体。其中 1 个为碱性异构体，2 个为酸性异构

体。使用 MassHunter BioConfirm 软件进行解卷积后，基于电荷异构体峰和主峰的完整质量数差异，鉴定出这几种电荷异构体为 N-端焦谷氨酸（碱性异构体，

峰 B1）、脱酰胺基化（酸性异构体，峰 A1）和赖氨酸糖化（酸性异构体，峰 A2）。

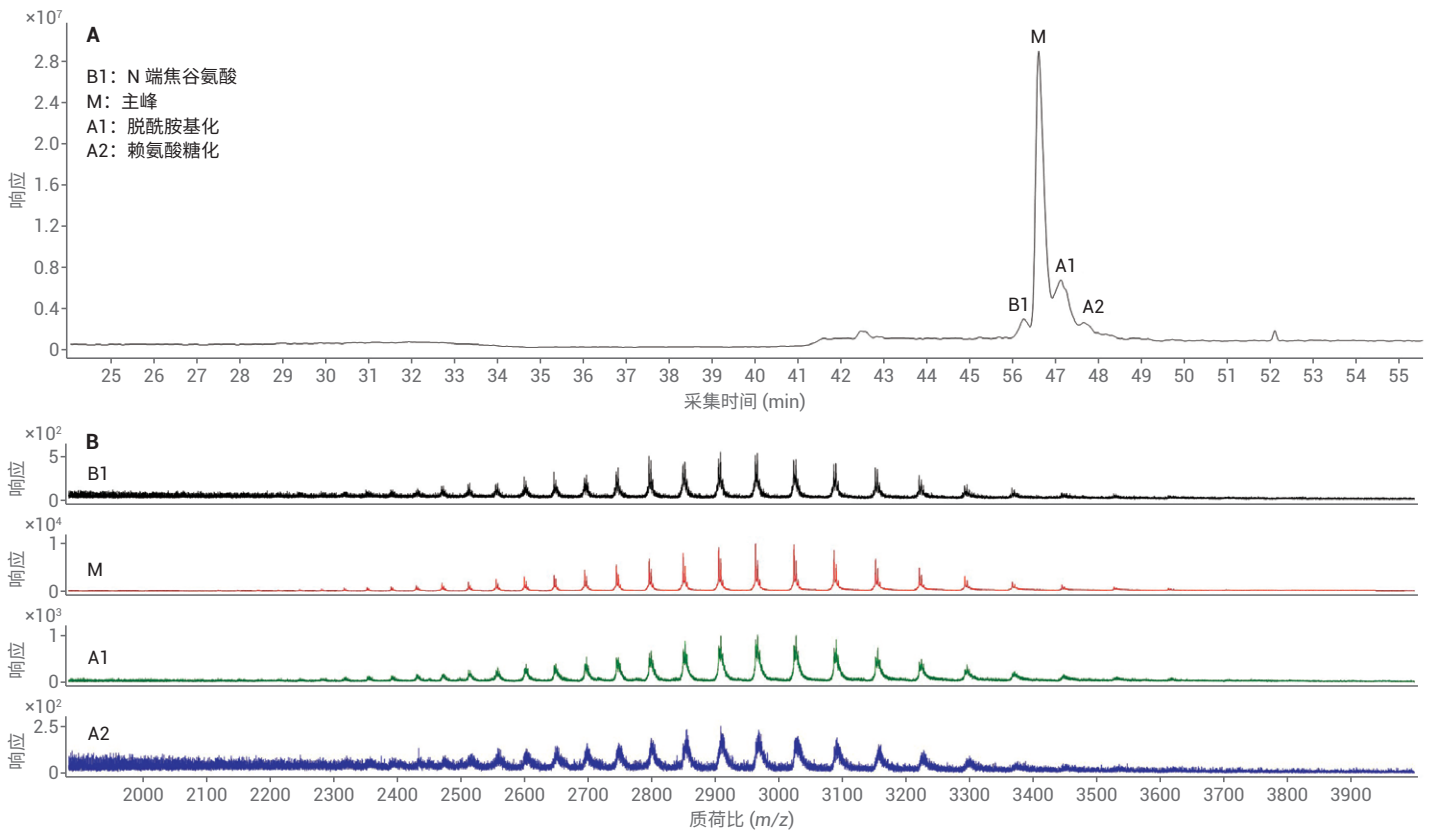


图 6. 使用全自动 CIEF-MS 方法分析达雷木单抗的电荷异构体

达雷木单抗的 CIEF-MS 重复进样

图 7 显示了达雷木单抗样品 5 次 CIEF-MS 过夜进样的结果。氢氧化铵在毛细管内长时间停留会损害毛细管的中性涂层。因此，我们使用高压 (950 mbar) 进行阴极液和样品进样，以便将氢氧化铵从毛细管入口快速移至出口。这一高流速阴极液和样品进样可能产生层流，导致氢氧化铵前端扩散，使样品与氢氧化铵混合。因此，不同进样之间的氢氧化铵和样品区的有效长度可能略有不同。这可能会导致峰迁移

时间产生变化。使用细胞色素 C 作为前标记物时，达雷木单抗主峰的相对迁移时间更加稳定。相对迁移时间 RSD 的计算结果为 5.8%。

结论

本应用简报展示了在 7100 毛细管电泳仪和 TOF/Q-TOF 质谱仪上进行的全自动在线 CIEF-MS 方法。使用电动泵送鞘流溶液纳米喷雾 CE/MS 联用技术实现

该 CIEF-MS 工作流程。碱性蛋白和单克隆抗体的 CZE-MS 结果以及达雷木单抗电荷异构体分析的 CIEF-MS 结果表明，EMASS-II CE/MS 离子源在安捷伦系统上具有出色的性能。还提供了 CIEF-MS 方法的详细信息，包括毛细管性能验证和系统性能检查。在此 Agilent-CMP CIEF-MS 工作流程中，对于通过毛细管等电聚焦分离得到的完整 mAb 电荷异构体，可以直接进行质谱鉴定。

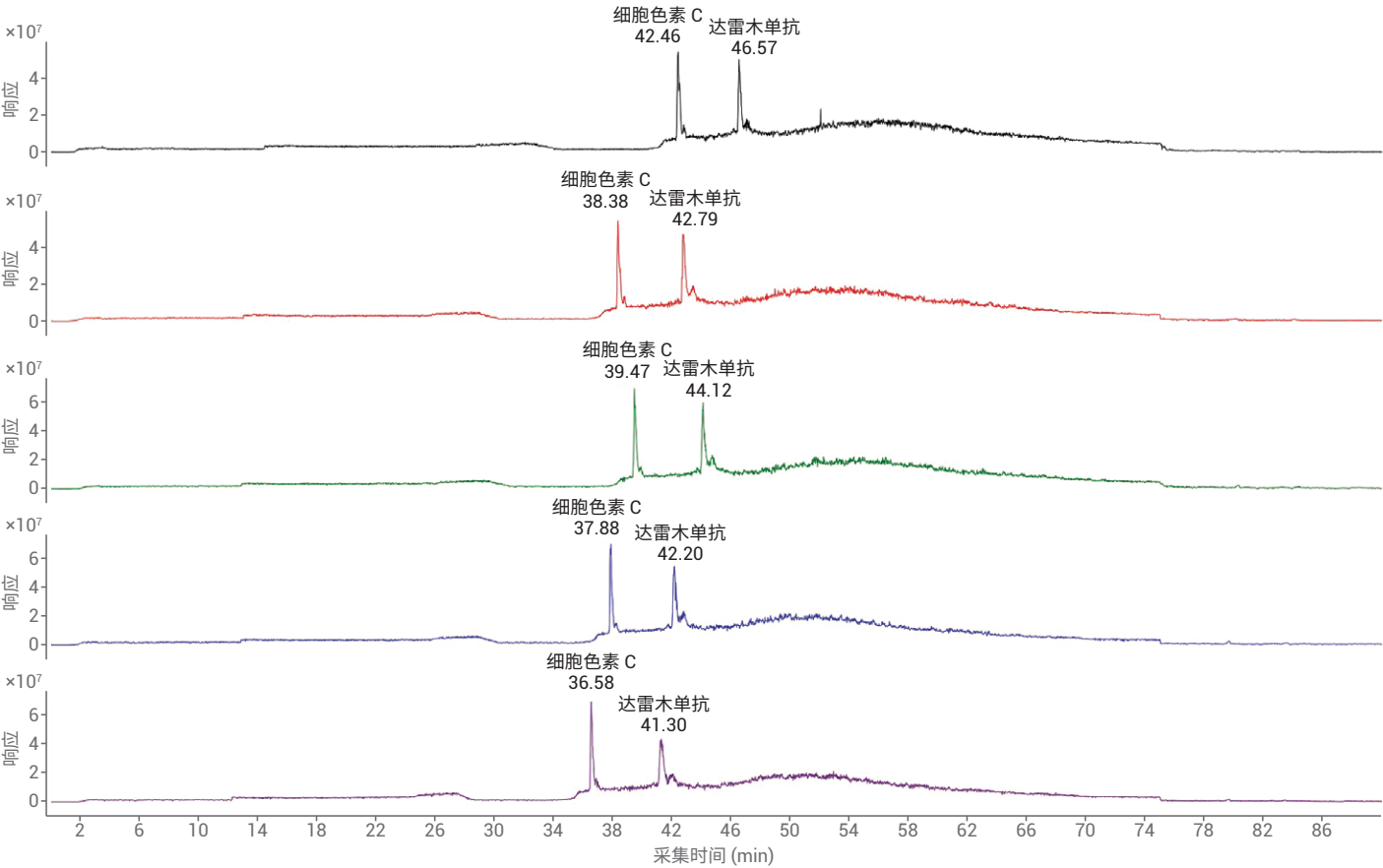


图 7. 达雷木单抗 5 次 CIEF-MS 进样的重现性

参考文献

1. Zhu, G.; Sun, L.; Dovichi, N. J. Simplified Capillary Isoelectric Focusing with Chemical Mobilization for Intact Protein Analysis. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40*(4), 948-953
2. Dai, J.; et al. Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants. *Anal. Chem.* **2018**, *90*(3)
3. Dai, J.; Zhang, Y. A Middle-Up Approach with Online Capillary Isoelectric Focusing/Mass Spectrometry for In-Depth Characterization of Cetuximab Charge Heterogeneity. *Anal. Chem.* **2018**, *90*(24), 14527-14534
4. Ouyang, Y.; et al. Negative-Ion Mode Capillary Isoelectric Focusing Mass Spectrometry for Charge-Based Separation of Acidic Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2019**, *91*(1), 846-853

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

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。