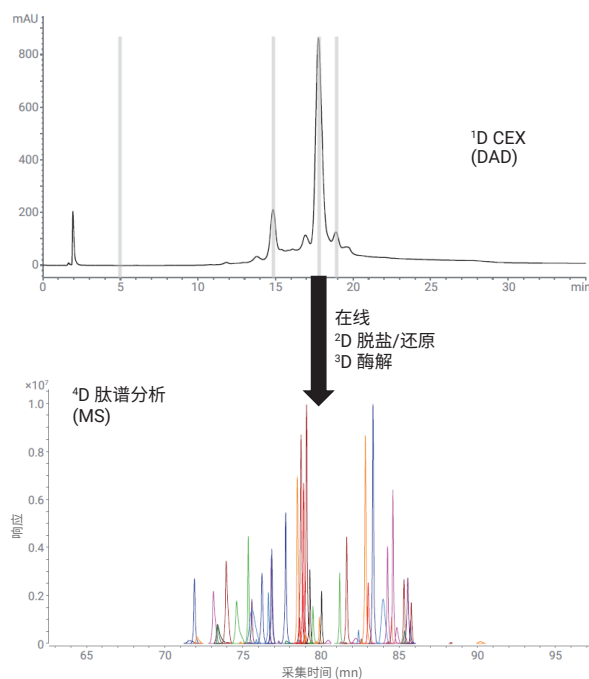


使用 4D-LC/MS 对单克隆抗体电荷异构体进行全自动化表征



作者

Liesja Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra 和 Koen Sandra
RIC Biologics
比利时

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider,
Udo Huber
安捷伦科技有限公司
德国

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 Agilent 6545 LC/Q-TOF 系统的四维液相色谱/质谱 (4D-LC/MS) 对单克隆抗体 (mAb) 电荷异构体进行的全自动化深入表征。通过阳离子交换色谱 (CEX) 分离的电荷异构体被收集在安装于多中心切割阀上的定量环中，在对其进行基于 LC/MS 的肽谱分析之前，依次进行在线脱盐、变性、还原和胰蛋白酶酶解。

前言

蛋白质生物药物已成为治疗各种疾病的重要药物，包括癌症、心血管疾病、糖尿病、感染、炎症和自身免疫性疾病^[1-3]。蛋白质生物药物有多种形式，包括单克隆抗体 (mAb)、抗体药物偶联物 (ADC)、融合蛋白、激素、生长因子、细胞因子、治疗性酶、血液因子、疫苗和抗凝血剂。这些分子在安全性和有效性方面具有明显的优势，极大地改变了制药市场，迄今为止，已有超过 350 种产品获得美国和欧盟的批准可用于人类^[1-3]。这大约占了整个制药市场的四分之一，其中 mAb 是发展最快的一类药物。

伴随着巨大的治疗潜力，这些分子的结构非常复杂，对分析的要求极为苛刻^[1,2]。与小分子药物相比，生物药物具有较大的质量数 (mAb 的 MW 约为 150 kDa) 和异质性。生物药物是一个或多个基因的产物。然而，可能同时存在数百种在翻译后修饰 (PTM)、氨基酸序列、高阶结构等方面有所不同的异构体，这些因素共同构成了产品的特征、安全性和有效性^[1-3]。因此，它们的深入结构表征涉及大量的分析工具，而色谱 (LC) 和质谱 (MS) 是其中的前沿技术。

CEX 是研究可能因 PTM [例如天冬酰胺脱酰胺、C 端赖氨酸截短、N 端环化 (焦谷氨酸构造) 和唾液酸化等] 产生的电荷异构体的关键技术。在 CEX 技术中，固定相的阴离子基团和蛋白质表面的阳离子基团之间的静电相互作用为分离奠定了基础。在流动相 pH 低于其等电点 (pI) 时，将蛋白质加载到色谱柱上，并使用盐梯度或 pH 梯度实现洗脱。CEX 缓冲液通常由非挥发性成分组成，使得这些方法与质谱不兼容。峰鉴定是一项繁琐的任务，涉及在质谱分析之前进行峰采集和脱盐^[4]。随着稳定的商用二维液相色谱仪器的最新推出，这一系列任务现在通常以在线、自动化的方式进行^[5-9]。从 CEX 色谱柱洗脱的物质存储在定量环中，并在质谱测量之前使用反相液相色谱 (RPLC) 或体积排阻色谱 (SEC) 进行在线脱盐。全二维液相色谱 (LC × LC) 和 (多) 中心切割二维液相色谱 (LC-LC) 均得到使用^[5-9]。

然而，为了明确鉴定 CEX 峰，需要进行肽谱分析。虽然蛋白质测定可表明身份，并突出显示质量数差异超出质谱仪质量数准确度的主要修饰，但它通常不提供实际的氨基酸序列，也不允许我们定位修饰。针对后者，受之前研究工作的启发^[10-12]，本应用简报介绍了一种完全自动化的在线 ⁴D-LC/MS 设置，通过整合第一维 (¹D) CEX、峰采集、²D 脱盐、变性、还原、³D 胰蛋白酶酶解以及基于 ⁴D RPLC/MS 的肽谱分析，对 mAb 电荷异构体进行深入表征。

实验部分

材料

乙腈 (HPLC-S)、水 (ULC/MS) 和甲酸 (ULC/MS) 来自 Biosolve (valkeniswade, The Netherlands)。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、NaCl、NH₄HCO₃、三羟甲基氨基甲烷和二巯基糖醇 (DTT) 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。超纯 Tris-HCl (pH 7.5) 购自 ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。I 级水由 Sartorius (Göttingen, Germany) Arium Pro 超纯实验室水纯化系统使用自来水生成。人源化单克隆抗体曲妥珠单抗 (商品名为赫赛汀) 购自 Roche (Basel, Switzerland)。

样品前处理

用一维 CEX 流动相 A (MPA: 10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65) 将曲妥珠单抗稀释至 7 mg/mL。在高 pH (100 mmol/L Tris, pH 9.0) 和 37 °C 条件下将曲妥珠单抗孵育 3 天，然后用一维 CEX 流动相 A 通过缓冲液交换至 7 mg/mL，从而诱导脱酰胺基化。

仪器

使用配备多中心切割选件的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统、额外的 Agilent 1260 Infinity II 四元泵和 Agilent 1260 Infinity II 等度泵，以及两个额外的 2 位/6 通阀和零死体积 T 形管。使用内径为 0.12 mm 的不锈钢管。配置的示意图如图 1 所示，并在本应用简报中进行了汇总。使用二极管阵列检测 (DAD) 进行第一维 (CEX) 和第四维 (RPLC) 检测。此外，使用配备喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 进行第四维和最后维度的检测。

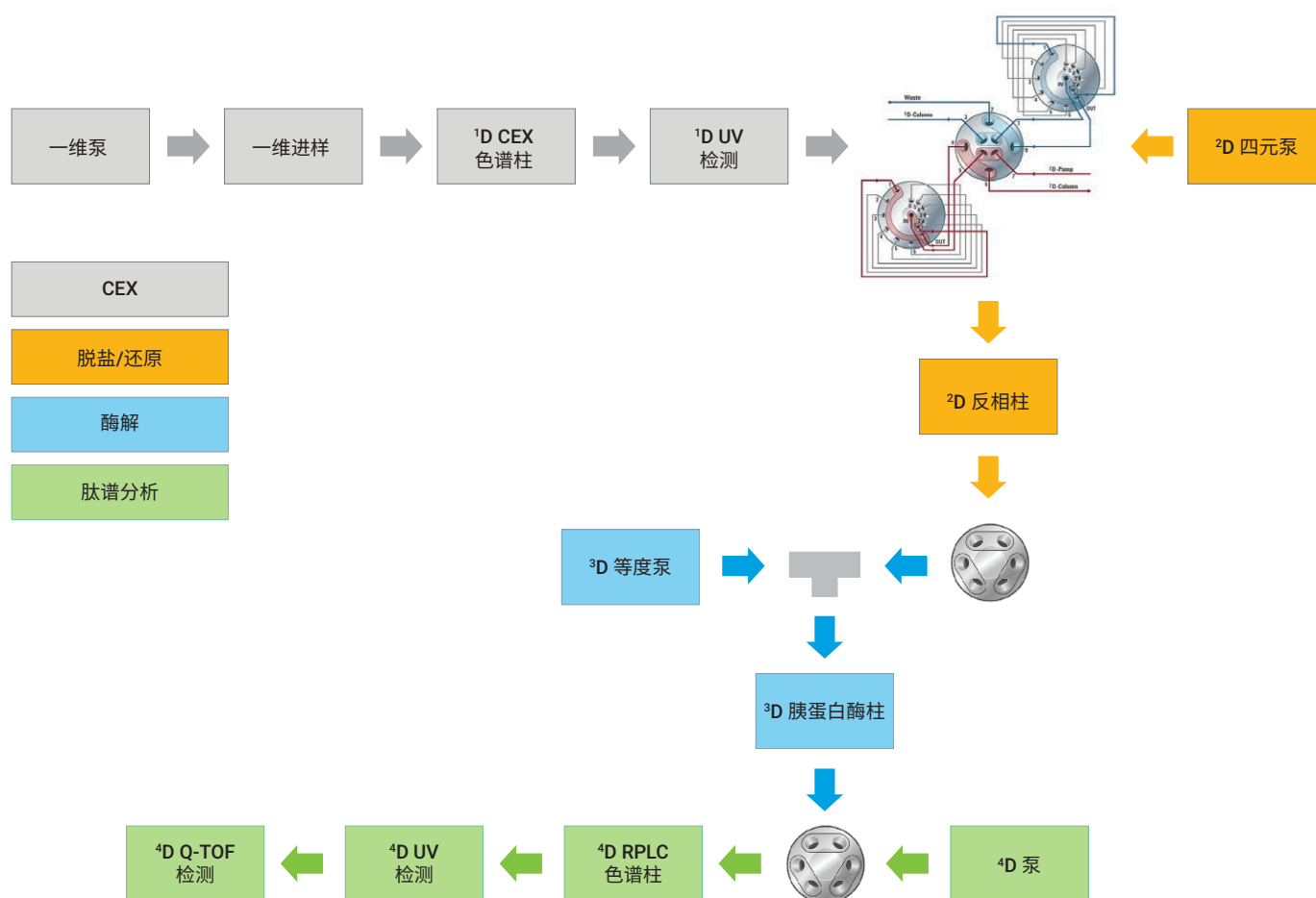


图 1. 4D-LC/MS 配置，包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析

配置

第一维：阳离子交换色谱：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7167B Agilent 1290 Infinity II Multisampler，配备样品恒温箱（选件 101）
- G7116B Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT)，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器，配备 3.7 mm HDR InfinityLab 最大光强卡套式流通池 (G4212-60032)

注：安装了短型 3.7 mm 检测器流通池，以降低信号强度并防止 UV 信号饱和

具有多中心切割功能的二维液相色谱

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备二维液相色谱阀 (G4236A)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40 μ L 定量环的多中心切割阀 (G4242-64000)

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原：

G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第三维：胰蛋白酶酶解

- G7111B Agilent 1260 Infinity II 四元泵，配备主动入口阀 (AIV) (选件 032)

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析：

- G7120A Agilent 1290 Infinity II 高速泵
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT，安装了阀驱动（选件 058），配备 Agilent InfinityLab Quick Change 2 位/6 通快速切换阀（1300 bar，G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD，配备 10 mm InfinityLab 最大光强卡套式流通池（G4212-60008）
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF，配备喷射流电喷雾离子源

注：Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶和 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱位于同一个柱温箱的不同区域，分别保持在 40 °C 和 60 °C。

第一维：阳离子交换色谱			
色谱柱	Agilent Bio MAB, 无孔 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部件号 5190-2411)		
温度	30 °C		
流动相 A	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65		
流动相 B	10 mmol/L 磷酸钠, pH 7.65 + 100 mmol/L NaCl		
流速	0.2 mL/min		
梯度	时间 (min)	B (%)	CEX 分析
	0	5	
	36	70	
	36.5	100	
	46	100	
	46.5	5	
	60	5	
进样量	100 μg		
检测	220 和 280 nm		
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)		

第二维：使用反相色谱进行脱盐、变性和还原（手动输入重复事件）						
色谱柱	聚合物基脱盐小柱，2.1 × 10 mm					
温度	23 °C					
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液					
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液					
流动相 C	20 mmol/L DTT 的 100 mmol/L Tris-HCl 溶液，pH 7.5					
梯度	时间 (min)	A (%)	B (%)	C (%)	流速 (mL/min)	
	10	99	1	0	0.5	脱盐和聚焦
	10.01	0	0	100	0.2	还原
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	
	25	99	1	0	—	脱盐和洗脱
	25.01	40	60	0	—	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	洗脱和酶解
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	—	
	95	99	1	0	—	
	120	99	1	0	—	
阀	27 min：位置 1 & 位置 2（开始胰蛋白酶酶解） 67 min：位置 2 & 位置 1（开始肽谱分析）					

软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 修正版 C.01.07 SR4 [505]
- 二维液相色谱附加软件修正版 A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter 仪器控制软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm 数据分析软件 (B.07.00)

方法

在二维液相色谱软件中对第一维和第四维进行配置，在常规方法设置中对第二维和第三维进行控制，并将其设定为重复事件。这些事件的循环时间为 110 分钟，与二维液相色谱软件中设定的第四维的循环时间相同。MassHunter 采集软件由二维液相色谱系统的远程启动触发。

在整个 CEX 分析过程中进行了四次中心切割。4.8 分钟时进行的第一次中心切割为空白切割，它使我们可以在分析实际的目标 CEX 中心切割之前对所有维度进行预处理。

多中心切割第一维 > 第二维	
曲妥珠单抗采样时间表	
切割	时间 (min)
1 - 空白	4.80
2 - 前峰	14.93
3 - 主峰	17.55
4 - 后峰	18.99

第三维：胰蛋白酶酶解（手动输入的重复事件）			
色谱柱	Orachrom StyrosZyme TPCK-胰蛋白酶 PEEK (2.1 × 150 mm)		
温度	40 °C		
流动相	50 mmol/L NH ₄ HCO ₃ , pH 8		
梯度	时间 (min)	流速 (mL/min)	酶解
	25	0.06	
	25.01	0.135	
	67	0.135	
	67.01	0.06	
	135	0.06	
阀	27 min: 位置 1 -> 位置 2（开始胰蛋白酶酶解）		
	67 min: 位置 2 -> 位置 1（开始肽谱分析）		

数据处理

使用集成于 MassHunter 软件中的 BioConfirm 算法，将测量得到的信号与曲妥珠单抗轻链和重链序列进行匹配。将实验数据与序列匹配的质量容差设置为 8 ppm。在 20 ppm 质量数准确度下获得的提取离子色谱图 (EIC) 用于监测 PTM（例如脱酰胺基化）。

结果与讨论

完全自动化的在线 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括 CEX、峰采集、脱盐、变性、还原、胰蛋白酶酶解以及肽谱分析）的分析流程图如图 1 所示。将 CEX 分离的物质收集在安装于多中心切割阀上的 40 µL 定量环中，并逐一转移到聚合物 RP 小柱中进行脱盐、变性和还原。随后，通过升高乙腈浓度使捕集于小柱上的还原 mAb 洗脱到胰蛋白酶柱中。使用 T 形管将胰蛋白酶酶解缓冲液与反相流动相混合，以获得理想酶解条件并降低乙腈浓度。

第四维：使用反相色谱进行肽谱分析（由二维液相色谱软件控制的重复事件）		
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱 (2.1 × 150 mm × 2.7 μm) (部件号 651750-902)	
温度	60 °C	
流动相 A	0.1% (v/v) 甲酸水溶液	
流动相 B	0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶液	
流速	0.4 mL/min	
梯度	时间 (min)	B (%)
	0	1
	8.5	1
	9	100
	15	100
	16	1
	20	1
	64	1
	64	1
	97	45
	98	100
	103	100
104	1	
110	1	
DAD 检测	214 和 280 nm	
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)	

质谱检测	
参数	离子源
正离子模式	
干燥气温度	300 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	8 L/min
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	175 V

参数	采集
模式	扩展动态范围 (2 GHz)
数据采集范围	<i>m/z</i> 100–3200
	1 幅谱图/s
	重点采集模式
67 分钟后将分流阀切换至 MS	

在酶解过程中，胰蛋白酶柱与肽谱分析柱对齐，生成的肽段集中在 RPLC 柱头。20 分钟后，阀切换使酶解产物开始洗脱到质谱中。

mAb 曲妥珠单抗的 CEX 色谱图如图 2 所示。曲妥珠单抗，商品名赫赛汀，是一种结合 HER2 受体的人源 IgG1，因此可用于治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。mAb 的 pI 为 8.45，在 CEX 流动相 pH 下带正电荷，以此控制与带负电荷的色谱树脂之间的相互作用。使用 NaCl 盐梯度洗脱 mAb 后，出现了多种电荷异构体，随后对其进行在线肽谱分析。图 3A 示意图展示了涉及三个 CEX 峰（前峰、主峰和后峰）和一个 CEX 空白（如图 2 所示）的分析的 4D-LC/MS 实验。图 3B 为一个循环中压力和 DAD 谱图的放大图，并显示了 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析。可实现超过 90% 的序列覆盖率。鉴定出的肽段如表 1 所示，LC/MS 化合物色谱图的叠加图如图 4 所示。未覆盖的肽段通常较小且/或具有亲水性，且在酶解过程中不会集中于肽谱分析柱的柱头。出于此原因，它们被转移到废液瓶中。

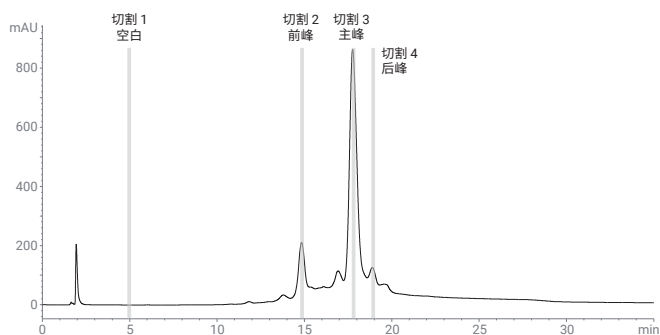
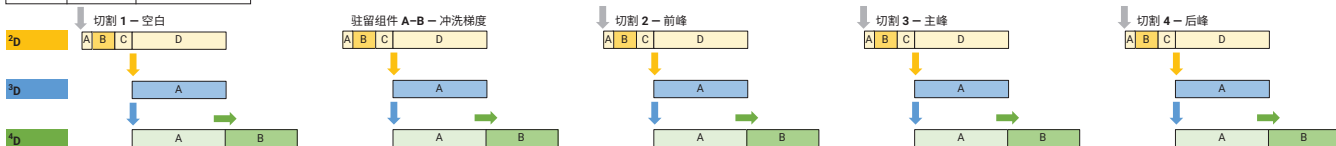


图 2. 单克隆抗体曲妥珠单抗的 CEX 色谱图。根据参考文献 13 设定条件。灰色表示进行的中心切割

除序列信息之外，肽谱分析还可揭示修饰和修饰位点信息。图 5 显示了 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析，并重点展示了两个肽段（即在 30 位处包含潜在脱酰胺基化位点的轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)，以及在 102 位处包含潜在异构化位点的重链肽段 WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124)）的 EIC。从数据可以推断出，前峰对应于脱酰胺基化异构体，在其中一条轻链的 30 位处，天冬酰胺转变为天冬氨酸。还可以证明后峰在其中一条重链的 102 位处携带异天冬氨酸。对应于修饰和未修饰异构体的双组分峰清楚、直观地说明了这一点。这些结果与 Harris 等人报告的结果一致，他们对赫赛汀的酸性和碱性异构体进行了离线馏分收集和肽谱分析^[4]。

我们对高 pH 处理后的赫赛汀样品进行了相同的实验（图 6）。此类条件会诱导脱酰胺基化，从而使 mAb 具有更强的酸性。图 6 中呈现的 CEX 谱图显示了一种酸性位移，CEX 峰 1 和峰 2 的肽谱数据表示双脱酰胺基化异构体，其两条轻链均在 30 位处发生了脱酰胺基化。CEX 峰 3 和峰 4 对应于单次脱酰胺基化事件，一条轻链在 30 位处发生了脱酰胺基化。峰 1 和峰 2 以及峰 3 和峰 4 之间的差异源自另一次脱酰胺基化，这次发生在重链的 387 位。该脱酰胺基化位点出现在两个肽段（一个完全裂解，一个未裂解）中，当发生脱酰胺基化时，它们的酶解方式明显不同。

[illegible]

图例	¹ D	A	CEX 分析	² D	A	脱盐和聚焦	³ D	A	酶解	⁴ D	A	将酶解产物加载到肽谱分析色谱柱
	B		CEX 调节和准备	B		还原				B		肽谱分析
				C		脱盐和洗脱						
				D		洗脱和酶解						

- 高压 CEX
- 高压还原/脱盐
- 高压酶解
- 高压肽谱分析
- DAD 肽谱分析

图 3. (A) 4D-LC/MS 实验不同阶段的示意图, 重点显示前峰、主峰和后峰以及 CEX 空白 (如图 2 所示) 区域。(B) 重点显示 CEX 主峰的脱盐、变性、还原、酶解和肽谱分析

表 1. 通过基于 RPLC/MS 的在线肽谱分析, 在 CEX 主峰中鉴定出的肽段

RT	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列 质量数	误差 (ppm)	漏切位点
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC(001-019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC(020-030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	HC(020-038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHWVR	HC(031-038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC(044-050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC(051-059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC(066-076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC(068-076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC(068-087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(068-098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC(077-087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC(077-098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDTAVYYCSR	HC(088-098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK	HC(099-124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC(125-136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC(137-150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTWSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC(151-213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKEVEPKSCDK	HC(214-225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC(226-251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC(252-258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(252-277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(252-291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC(259-277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC(259-291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC(278-291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC(305-320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC(305-323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYCK	HC(305-325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNK	HC(305-329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAIEK	HC(330-337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC(348-358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC(348-363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC(348-373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC(359-373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC(364-373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC(374-395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK	HC(374-412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(374-417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TPPVLDSDGSFFLYSK	HC(396-412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC(396-417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	HC(418-442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	HC(420-442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC(443-449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDR	LC(001-018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCR	LC(001-024)	2551.2371	1.1	1

表 1. 续

RT	质量数	进样量	进样量%	序列	测序位置	靶向序列 质量数	误差 (ppm)	漏切位点
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC(025-042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC(025-045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC(046-061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGGTK	LC(067-103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGGTKVEIK	LC(067-107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHHYTPPTFGQGGTKVEIKR	LC(067-108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(108-126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC(109-126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPR	LC(109-142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVCLLNFFYPR	LC(127-142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC(146-169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK	LC(146-183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK	LC(146-188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK	LC(150-183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK	LC(150-188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK	LC(150-190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(150-207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYSLSTLTLSK	LC(170-183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(184-207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC(189-207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC(191-207)	1817.8982	0.3	0

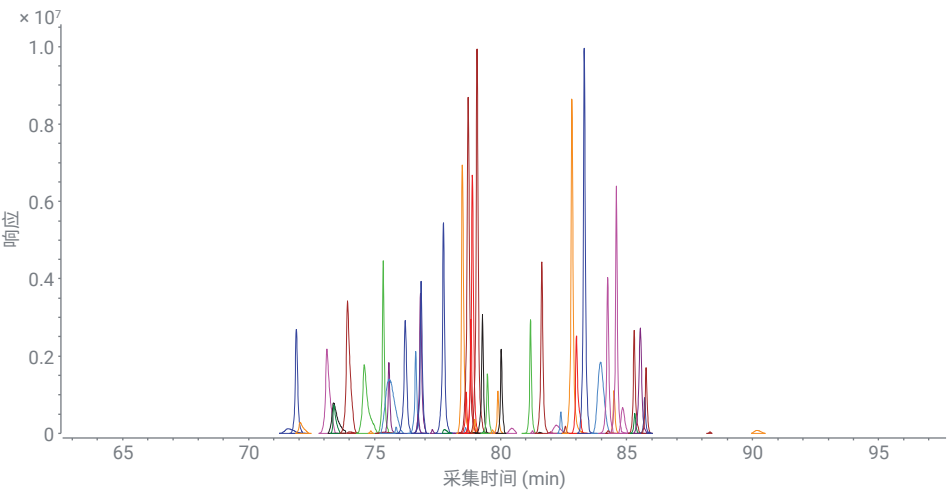


图 4. 通过在线肽谱分析，在 CEX 主峰中 MS 鉴定肽段的 RPLC/MS 化合物色谱图的叠加图

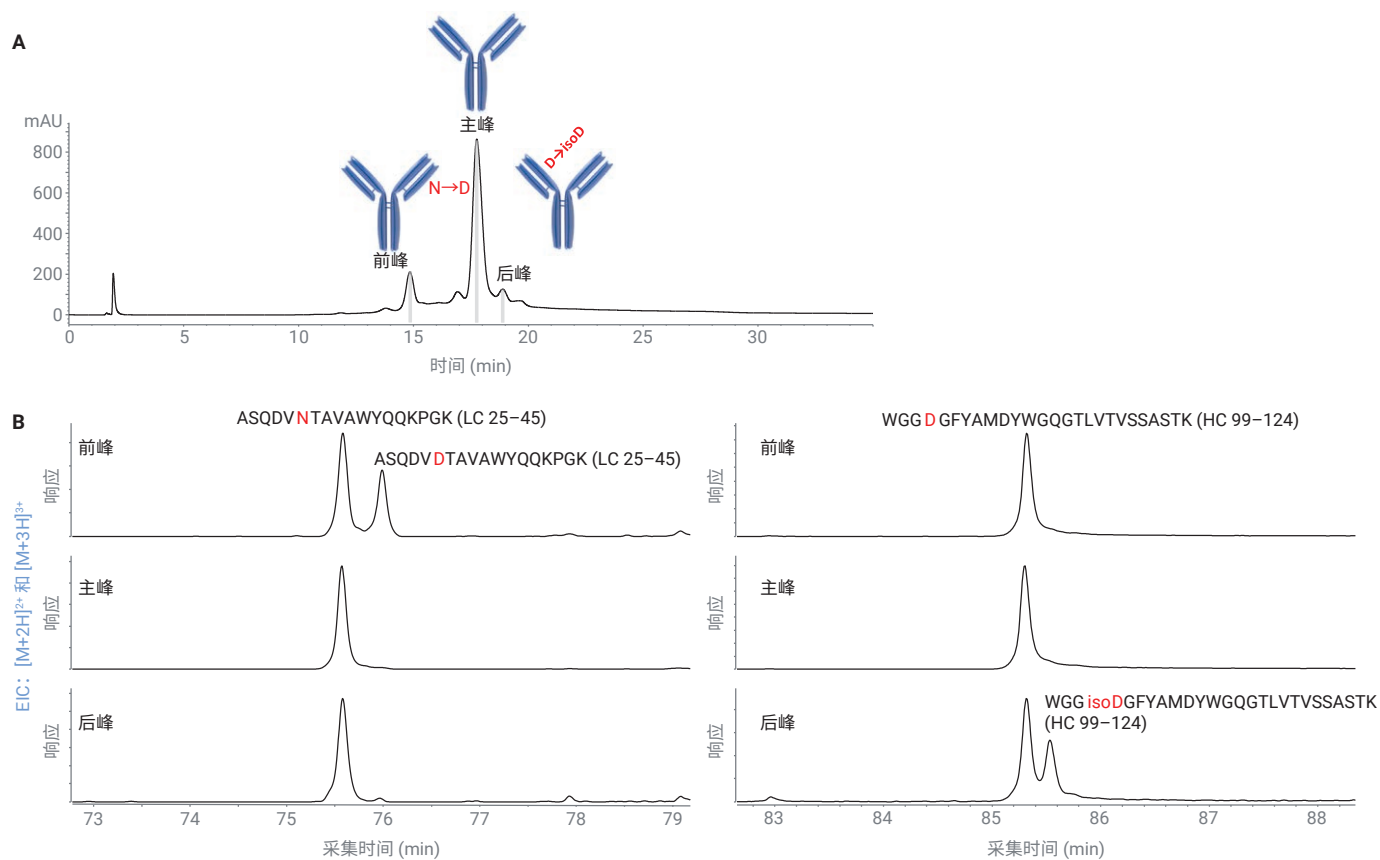


图 5. 曲妥珠单抗 CEX 前峰、主峰和后峰的在线肽谱分析。轻链肽段 ASQDV^NTAWAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDV^DTAWAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 WGG^DGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 和异构化重链肽段 WGG^{isoD}GFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124) 的 (A) CEX 色谱图和 (B) 提取离子色谱图

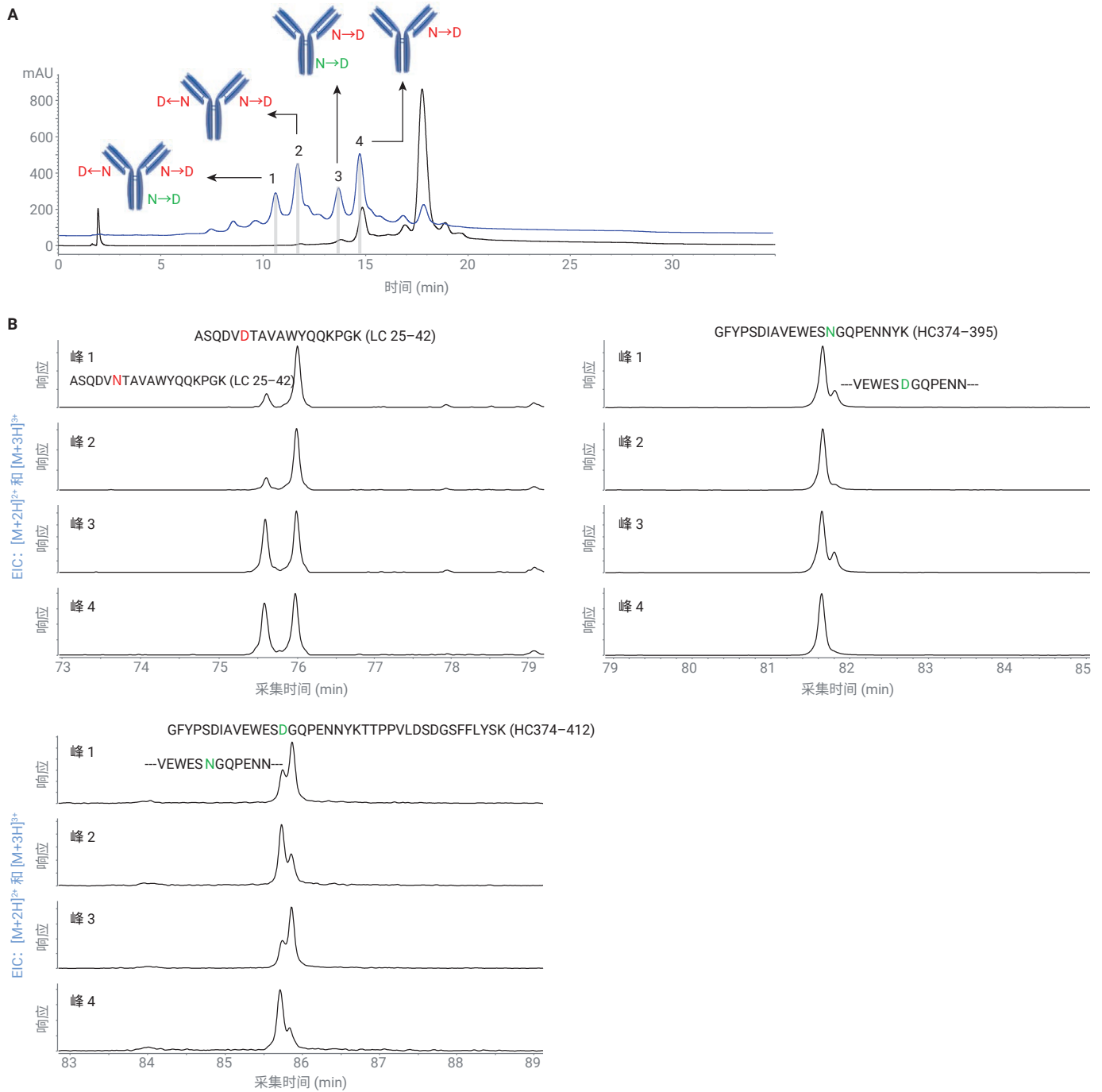


图 6. 高 pH 处理曲妥珠单抗 CEX 峰 1、2、3 和 4 的在线肽谱分析。(A) 未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 色谱图的叠加图，(B) 轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱酰胺基化轻链肽段 ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重链肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (HC 374-395)、脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWESDNGQPENNYK (HC 374-395)、重链肽段 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSK (HC 374-412) 和脱酰胺基化重链肽段 GFYPSDIAVEWESDNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSK (HC 374-412) 的提取离子色谱图

结论

我们介绍并成功应用完全自动化的 4D-LC/MS 蛋白质分析仪（包括在第一维使用多中心切割进行 CEX 分离和电荷异构体峰采集，第二维基于 RPLC 的脱盐、变性、还原，第三维的胰蛋白酶酶解，以及第四维基于 RPLC/MS 的肽谱分析）对在未处理和高 pH 处理曲妥珠单抗的 CEX 谱图中观察到的酸性和碱性异构体进行了表征。该多维系统基于 InfinityLab 二维液相色谱解决方案和 6545 LC/Q-TOF 系统。通过在第一维中用 Protein A 亲和色谱、体积排阻色谱、疏水相互作用色谱等代替 CEX，可以轻松配置这种 4D-LC/MS 设计的不同形式。

参考文献

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992–1000
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233–245
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51–60
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307–8315
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 119–130
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography (使用离子交换和反相色谱对电荷异构体进行 2D-LC/MS 表征)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-6673EN，**2016**
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119–2125
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896–14903
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma. 2019.460740
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography (通过阳离子交换色谱表征 mAb 电荷异构体)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5273EN，**2014**

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

DE.5371643519

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，2020
2020 年 6 月 17 日，中国出版
5994-2020ZHCN