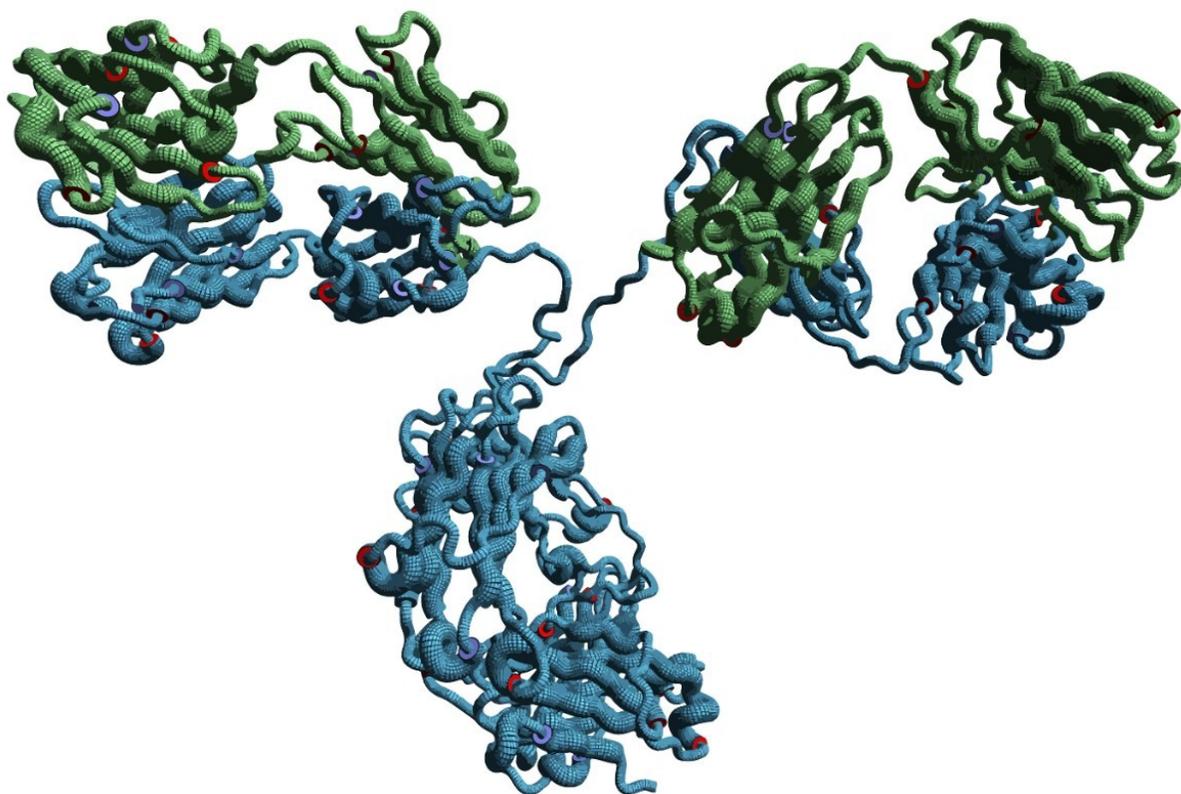


使用二氟乙酸和反相色谱法对IgG2异构体进行LC-MS分析

Martin DeCecco, Marina Sole Espeso, Jennifer M. Nguyen, Matthew A. Lauber

Sartorius Stedim BioOutsource, Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报展示如何改善IgG2二硫键异构体的分离效果，同时提高MS灵敏度。

优势

IgG2抗体由于形成二硫键异构体而表现出独特的异质性。提高实验室对这些异构体的分析检测能力，可以获得关乎抗体有效性和生物转化的新认识。

简介

单克隆抗体(mAb)治疗药物广泛用于治疗不同类型的癌症、自身免疫性疾病和其他疾病。免疫球蛋白G (IgG)是mAb的主要类型，包括四个亚类：IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。截至目前，开发的大多数治疗性mAb都属于IgG1亚类，部分属于IgG2或IgG4亚类。不同的IgG亚类在二硫键的连接性方面存在差异。

IgG1分子通常只有一种确定的结构，而IgG2抗体存在三种异构体（A、B和中间体A/B），每种异构体具有不同的二硫键模式¹。已有研究证明，IgG2亚类中二硫键键合的性质会影响体外抗原结合活性²。不同二硫键异构体造成的异质性增加了IgG2的结构复杂性，对表征这些分子提出了额外挑战。

反相液相色谱(LC)与高分辨率质谱(MS)联用是mAb治疗药物分析的强大方法。高性能分离与精确质量数信息相结合，可提供有关抗体异质性和稳定性的详细信息³。但是，要使完整蛋白实现满意的高分离度色谱分离，往往离不开离子对试剂，这些试剂可能影响MS的灵敏度。为促进IgG2异构体的表征，仍然需要能够同时实现高分离度完整蛋白分离与高MS灵敏度的方法。

结果与讨论

新型色谱柱技术有望提高蛋白质（特别是单克隆抗体）反相分离的分离能力。BioResolve RP色谱柱是首要选择，这款色谱柱采用表面多孔硅胶颗粒与独特、高覆盖率的苯基键合技术^{4,5}。研究人员根据其化学性质发现，这款色谱柱适用于较温和的洗脱条件，即较低温度和弱酸性条件。

之前的IgG2异构体分析方法通常需要使用高柱温，由此产生在柱温 ≥ 80 °C时酸催化降解样品（尤其是中间体）的问题。分离IgG2二硫键异构体需要使用三氟乙酸(TFA)，但是由于存在离子抑制效应，TFA会影响MS灵敏度。甲酸有助于改善电离效率并降低流动相酸性，但会减弱色谱分离能力。之前的技术几乎不存在更适合MS和样品的替代分离方法。为此，利用市场上主要的C₄色谱柱分离IgG2，示例见图1，所示结果使用TFA和FA获得。通过本例可以清楚观察到二硫键异构体分离所具有的挑战：使用甲酸无法实现分离，使用TFA时则仅观察到部分分离。因此，使

用该色谱柱技术时，必须使用TFA，并且还需在方法中设置锯齿状重复梯度，以便尽可能减少残留。

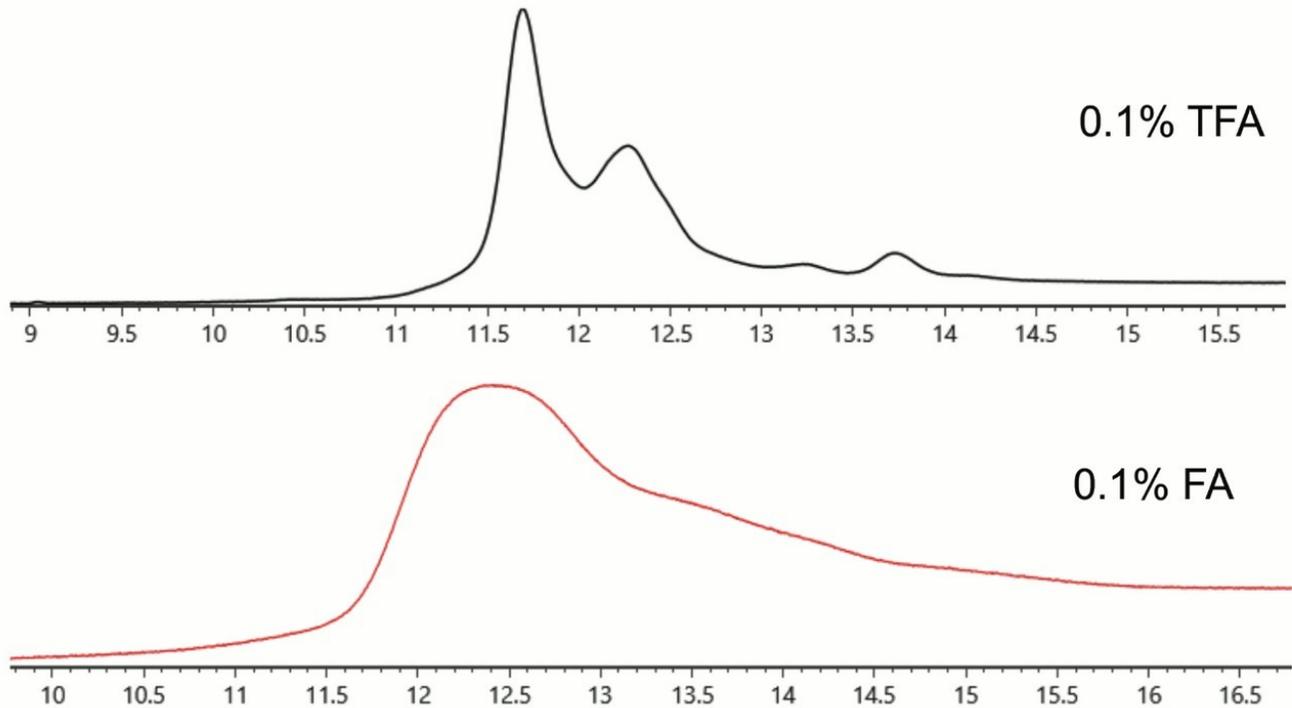


图1.使用主要的C₄色谱柱，在由水/乙腈/异丙醇组成的流动相中添加0.1% TFA和0.1%甲酸作为改性剂，获得的IgG₂的UV色谱图。分析采用ACQUITY UPLC H-Class Bio与Xevo G2-XS QToF质谱仪联用系统、2.1 × 100 mm色谱柱、21 min梯度、流速0.2 mL/min、柱温80 °C。

使用BioResolve RP 450 Å, 2.7 μm, 2.1 x 100 mm色谱柱（部件号186008945）时，柱温可以降至70 °C，且不会造成回收率降低。此外，完成分析后不再需要执行锯齿梯度，因为在改变色谱柱填料后未观察到残留峰。观察到预期的IgG₂异构体具有优异的分离度。事实上，还检测到许多其他物质。结合这些方法变更，我们还探讨了二氟乙酸(DFA)的使用，这是一种新型离子对试剂，于2002年首次提出用于肽质谱分析⁶，最近因其在蛋白质LC-MS中的应用价值而受到关注⁷。IonHance二氟乙酸（第一款K/Na含量低于50 ppb的MS级DFA，部件号186009201）上市后，色谱性能得以优化，可以实现类似于TFA的分离能力（图2），同时提高MS灵敏度和MS数据质量（图3）。简而言之，使用该试剂获得了高质量质谱图，并且不存在明显的盐加合物或气相离子对响应，不会加大数据解析难度。

每个主要色谱峰都表现出相同的糖型谱图以及与完整蛋白一致的质量数，无需额外修饰。由此可以得出以下结论：这些峰仅在其高级结构上存在差异。使用氧化还原实验所得到的数据（未显示），可以将区域(i)、(ii)和(iii)的峰分别归属于二硫键异构体B、A/B和A。区域(i)和(iii)中存在两个不同峰的结构基础尚不清楚。在所有可能性中，这些峰可能对应于铰链区内紧密间隔的半胱氨酸之间不同的二硫键排列。

相当有趣的是，高信噪比谱图也可以清楚观察到每种物质的电荷态分布差异。在反相LC-MS的变性条件下，异构

体A（区域iii）的平均电荷高于异构体B，符合对该二硫键模式预测的更开放结构²。

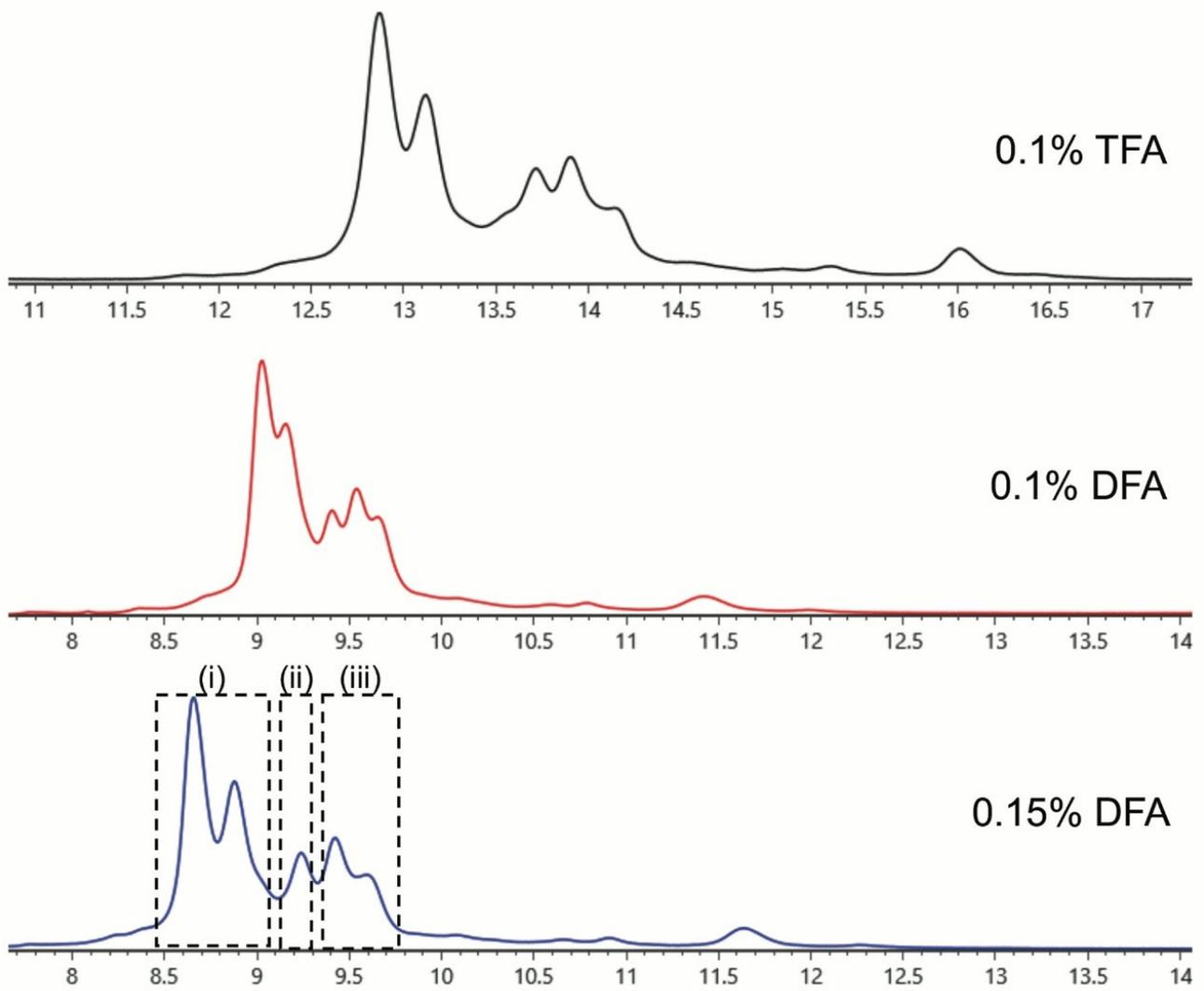


图2.使用BioResolve RP 450 Å, 2.7 μm, 2.1 x 100 mm色谱柱，在由水/乙腈/异丙醇组成的流动相中添加TFA或IonHance DFA作为改性剂，获得的IgG2的UV色谱图。分析采用ACQUITY UPLC H-Class Bio与Xevo G2-XS QTof质谱仪联用系统、21 min梯度、流速0.2 mL/min、柱温70 °C。

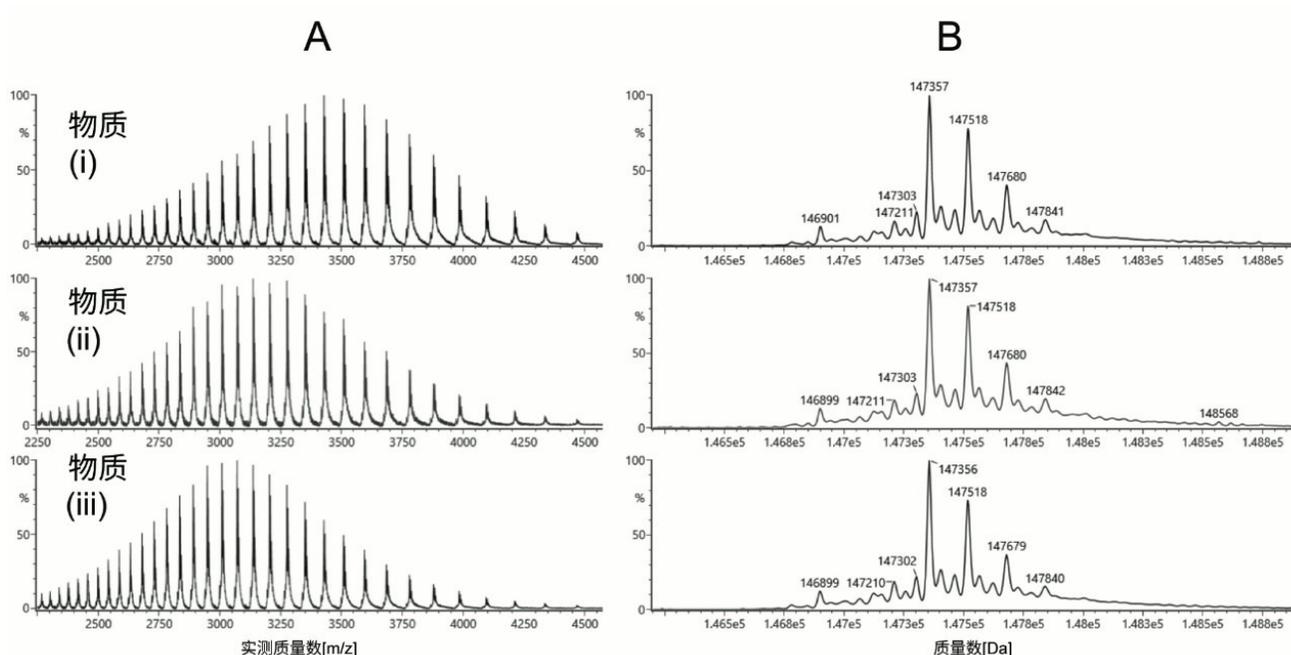


图3.(A) ESI累加质谱图；(B)图2所示区域的MaxEnt1去卷积质谱图，对应于不同的IgG2异构体。使用添加有0.15% IonHance DFA作为改性剂的流动相所得到的分离结果如图2所示。在UNIFI™ 1.9.4软件中对谱图进行去卷积。标注的峰具有相似的分子量，处于典型的测量精密度范围内(150 kDa ± 1 Da)。

结论

充分了解IgG2治疗药物中的二硫键异构体至关重要，因为它们可能关系到药物有效性。另外，该抗体给药后会发生重排⁸，因此异构体分析可能对药效学和生物转化研究有重要意义。

BioResolve RP色谱柱经过专门设计，为实现LC-MS技术现代化以分析IgG2异构体提供了可靠的起点。借助MS级IonHance二氟乙酸，在本研究中展示出令人印象深刻的分析能力。DFA提供了有利的离子对，离子抑制效应低于TFA。因此，使LC-MS技术具有出色的分析能力和灵敏度，有助于收集有关IgG2二硫键异构化的新信息。

参考资料

1. Wypych, J.; Li, M.; Guo, A.; Zhang, Z.; Martinez, T.; Allen, M. J.; Fodor, S.; Kelner, D. N.; Flynn, G. C.; Liu, Y. D.; Bondarenko, P. V.; Ricci, M. S.; Dillon, T. M.; Balland, A. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, 283, 16194.

2. Dillon, T. M.; Ricci, M. S.; Vezina, C.; Flynn, G. C.; Liu, Y. D.; Rehder, D. S.; Plant, M.; Henkle, B.; Li, Y.; Deechongkit, S.; Varnum, B.; Wypych, J.; Balland, A.; Bondarenko, P. V. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, 283, 16206.
3. Dillon, T. M.; Bondarenko, P. V.; Rehder, D. S.; Pipes, G. D.; Kleemann, G. R.; Ricci, M. S. *Journal of Chromatography.A* 2006, 1120, 112.
4. Bobaly, B.; Lauber, M.; Beck, A.; Guillarme, D.; Fekete, S. *Journal of Chromatography.A* 2018, 1549, 63.
5. Bobaly, B.; D' Atri, V.; Lauber, M.; Beck, A.; Guillarme, D.; Fekete, S. *Journal of Chromatography.B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2018, 1096, 1.
6. Monroe, M. E., The University of North Carolina at Chapel Hill, 2002.
7. Wagner, B. M.; Schuster, S.A.; Boyes, B. E.; Miles, W.L.; Nehring, D.R.; Kirkland, J. J. *LCGC North America* 2015, 33.
8. Liu, Y. D.; Chen, X.; Enk, J. Z.; Plant, M.; Dillon, T. M.; Flynn, G. C. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, 283, 29266.

特色产品

- [ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <https://www.waters.com/10166246>](https://www.waters.com/10166246)
- [Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134798222>](https://www.waters.com/134798222)
- [UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

720006473ZH, 2019年1月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.