

利用自动化分析型阳离子交换色谱对单克隆抗体电荷异构体进行馏分收集和结构表征

Hua Yang, Stephan M. Koza

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，我们利用BioResolve SCX mAb色谱柱分离英夫利昔单抗和曲妥珠单抗，并使用沃特世分析型馏分管理器(WFM-A)收集其电荷异构体馏分。再用LC-MS进一步分析馏分，包括完整蛋白质量数分析、亚基分析和肽图分析。

优势

- 利用BioResolve SCX mAb色谱柱通过阳离子交换进行分离
- 利用沃特世分析型馏分管理器(WFM-A)收集阳离子交换分离所得馏分
- 利用LC-MS分析阳离子交换分离所得馏分（完整蛋白质量数分析、亚基分析和肽图分析）

简介

蛋白质治疗药物（包括单克隆抗体(mAb)）的电荷异构体水平常被视为关键质量属性(CQA)，因为它们可能会影响生物治疗药物的生物活性和安全性¹。蛋白质电荷异构体的纯化、表征和常规监测的一项常用技术是离子交换色谱(IEX)。IEX是一种非变性技术，与电泳技术（例如，CE和cIEF）相比，其优势在于，不仅可以通过IEX分离收集电荷异构体进行组分鉴定，还可以使用其他方法获得结构-功能信息。

在本应用纪要中，我们利用BioResolve SCX mAb色谱柱分离英夫利昔单抗和曲妥珠单抗，并使用沃特世分析型馏

分管理器(WFM-A)收集其电荷异构体馏分。再用LC-MS进一步分析馏分，包括完整蛋白质量数分析、亚基分析和肽图分析。

实验

通过阳离子交换进行分离和馏分收集

样品描述

将曲妥珠单抗(21 mg/mL)和英夫利昔单抗(10 mg/mL)直接进样至IEX色谱柱，不经稀释。在药品过期后进行分析。

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
附加	沃特世分析型馏分管理器
组件：	(WFM-A)
样品温度：	10 °C
分析柱	30 °C
温度：	
流速：	0.8 mL/min
进样体积：	1~50 µL
色谱柱：	BioResolve SCX mAb, 3 µm, 4.6 × 50 mm BioResolve SCX mAb, 3 µm, 4.6 × 100 mm

检测：	ACQUITY UPLC TUV检测器 配备5 mm钛合金流通池，280 nm
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 × 32 mm 螺纹颈口全回收样品瓶，配有盖子 和预开口PTFE/硅胶隔垫，容积1 mL， 100个/包

Auto · Blend Plus方法

流动相A：	100 mM MES一水合物
流动相B：	100 mM MES钠盐
流动相C：	1 M NaCl
流动相D：	水
对于英夫利昔单抗：	20 mM MES，10~45 mM NaCl，pH 7.0 运行10 min（适用于长100 mm的色谱柱）， 或5 min（适用于长50 mm的色谱柱）
对于曲妥珠单抗：	20 mM MES，50~85 mM NaCl，pH 6.7 运行10 min（适用于长100 mm的色谱柱）， 或5 min（适用于长50 mm的色谱柱）

IEX馏分的完整蛋白质量数分析

样品描述

将馏分直接进样至色谱柱中。

LC条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
样品温度：	10 °C
分析柱	80 °C
温度：	
流速：	0.4 mL/min
进样体积：	10 µL
色谱柱：	BioResolve RP, 450 Å, 2.7 µm, 2.1 × 150 mm
检测：	ACQUITY UPLC TUV检测器， 配备5 mm钛合金流通池，214 nm Xevo G2-XS质谱仪
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 × 32 mm 螺纹颈口全回收样品瓶， 配有盖子和预开口PTFE/硅胶隔垫， 容积1 mL，100个/包
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

时间	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	95	5	-
0.5	0.4	70	30	6
1.0	0.4	70	30	11
3.5	0.4	60	40	6
4.5	0.4	5	95	6
5.0	0.4	5	95	11
5.1	0.4	95	5	11
10.0	0.0	95	5	11

IEX馏分的亚基分析

样品描述

使用截留分子量(MWCO)为10 kDa的再生纤维素离心滤膜对英夫利昔单抗馏分进行预浓缩。馏分的浓度范围为1.4~2.5 mg/mL。将10 µg浓缩英夫利昔单抗馏分样品在37 °C下用IdeS酶（蛋白质:酶=1:1）酶解30 min，然后将5 µg酶解后的馏分在37 °C下用DTT进一步还原30 min。所有样品用最终浓度为3%乙腈/0.1%甲酸的混合液淬灭。

样品温度：10 °C

分析柱 80 °C

温度：

流速：0.8 mL/min

进样体积：	非还原样品2 μ L， 还原样品4 μ L，
色谱柱：	BioResolve RP， 450 Å, 2.7 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm
检测：	ACQUITY UPLC TUV检测器 配备5 mm钛合金流通池，214 nm Xevo G2-XS质谱仪
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 $\times$ 32 mm 螺纹颈口全回收样品瓶， 配有盖子和预开口PTFE/硅胶隔垫， 容积1 mL，100个/包
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

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.4	95	5	-
0.50	0.4	88	12	6
1.00	0.4	88	12	11
11.00	0.4	58	42	6
12.00	0.4	5	95	6

13.00	0.4	5	95	11
13.10	0.4	95	5	11
20.00	0.0	95	5	11

IEX馏分的肽图分析

样品描述

使用截留分子量(MWCO)为10 kDa的再生纤维素离心滤膜对曲妥珠单抗馏分进行预浓缩。馏分的浓度范围为3.1~4.2 mg/mL。将50 µg浓缩曲妥珠单抗馏分样品在37 °C和pH 6.0的条件下用胰蛋白酶（蛋白质:酶=25:1）和Lys-C（蛋白质:酶=25:1）酶解过夜。
样品用甲酸淬灭。

样品温度：	10 °C
分析柱	60 °C
温度：	
流速：	0.2 mL/min
进样体积：	10 µL
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 肽分析专用柱， 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm
检测：	ACQUITY UPLC TUV检测器 配备5 mm钛合金流通池，214 nm Xevo G2-XS质谱仪
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12 × 32 mm 螺纹颈口全回收样品瓶，

配有盖子和预开口PTFE/硅胶隔垫，

容积1 mL，100个/包

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

时间	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.2	98	2	-
10.0	0.2	98	2	11
70.0	0.2	50	50	6
72.0	0.2	5	95	6
72.1	0.2	98	2	11
90.0	0.0	98	2	11

数据管理：

Empower 3

MassLynx v4.1

UNIFI v1.9

结果与讨论

利用WFM-A进行mAb电荷异构体馏分收集

沃特世分析型馏分管理器(WFM-A)是一款分析型馏分收集器，专为收集UPLC（即，扩散体积<20 μ L）、UHPLC（

即，扩散体积 $>20\ \mu\text{L}$ 但 $<40\ \mu\text{L}$)和HPLC(即，扩散体积 $>40\ \mu\text{L}$)产生的小体积峰而设计(图1)。低容量的快速切换阀降低了扩散性，可精确收集UPLC窄峰所对应的馏分²。WFM-A采用生物相容性流路，可轻松集成至UPLC或HPLC系统，适用于所有生物分子应用。因此，可以作为mAb电荷异构体馏分收集的理想选择。



图1.沃特世分析型馏分管理器(WFM-A)可轻松集成至液相色谱系统

收集馏分之前，建议先进行上样研究，以确定色谱柱的最佳上样量。与分析方法的最佳上样量不同，此项研究的目标是在分离度仍符合可接受标准的前提下确定最大上样量。该评估还可以考虑是否对收集的馏分再次进行色谱分离。图2A展示了利用BioResolve SCX mAb, $4.6 \times 50\ \text{mm}$ 色谱柱获得的曲妥珠单抗电荷异构体分离结果。正如预期所料，分离度随上样量的增加而降低。还值得注意的是，随着上样量的增加，保留时间缩短。这是由于颗粒表面可用配体的饱和度增加所致。此外，较早洗脱峰的保留时间偏移更大，表明在这些条件下，结合力更强的电荷异构体取代了柱头先前结合较弱的部分。保留时间的这种偏移表明，采用自动化馏分收集时，色谱柱可重现的上样非常重要。

如图2B所示，增加色谱柱柱长有助于降低分离度损失。在梯度时间加倍时，上样量增加至2.5倍产生的分离度与50 mm色谱柱相当，纯化效率提高了25%。总体而言，上述结果表明BioResolve SCX mAb, $4.6 \times 100\ \text{mm}$ 色谱柱的上样量范围为1~2 mg mAb³。根据分离的蛋白质样品不同，上样量可能存在明显差异。

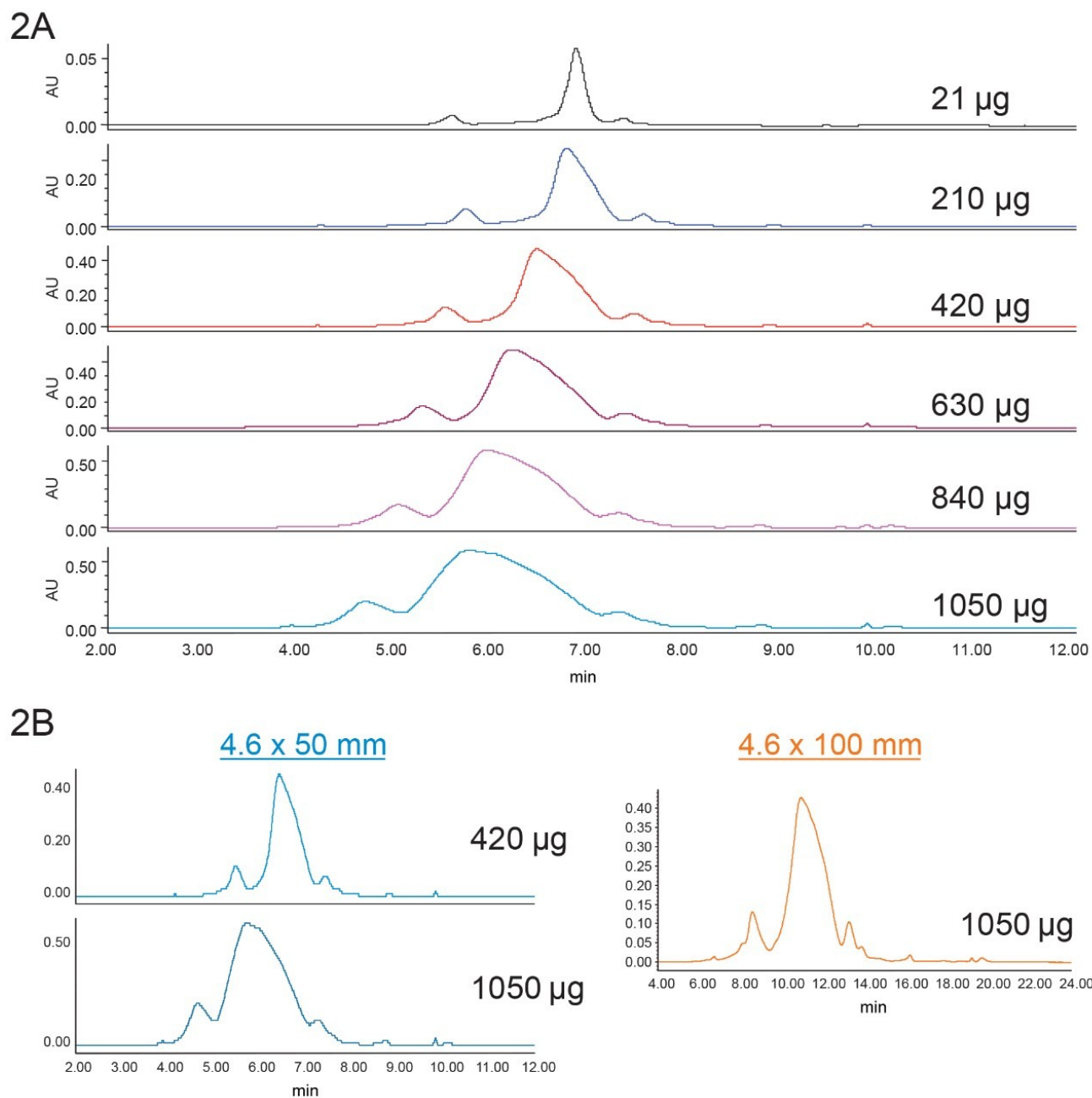


图2.上样研究。(A) 利用BioResolve SCX mAb, 4.6×50 mm色谱柱上样并分离各种量的曲妥珠单抗(21 mg/mL)。(B) 利用内径为50 mm和100 mm的BioResolve SCX mAb色谱柱上样并分离不同量的曲妥珠单抗(21 mg/mL)。

图3A展示了采用WFM-A收集到的英夫利昔单抗电荷异构体馏分。然后将这些馏分合并、稀释并重新进样至BioResolve SCX mAb色谱柱。通过重叠馏分色谱图，可以观察到交替馏分（例如，馏分2、4、6、8和10）获得了合理的基线分离（图3B）。因此，可以只用一次运行对多个交替馏分进行再次色谱分离，从而节省大量时间。图3C显示的色谱图中，在低盐浓度上样条件下将多种馏分重新进样至BioResolve SCX mAb色谱柱，然后利用盐

梯度法进行洗脱。所有馏分均用上样缓冲液稀释（稀释比1:1）以降低盐浓度。此外，交替馏分的进样顺序应与洗脱顺序相反。例如，首先进样馏分10，然后是馏分8和馏分6，以此类推。这样做可以防止在加载离子强度更高的馏分时，保留性能较弱的馏分可能会从色谱柱中被洗脱出来。从图中可以看出，只用一次运行就能很好地分离交替馏分。

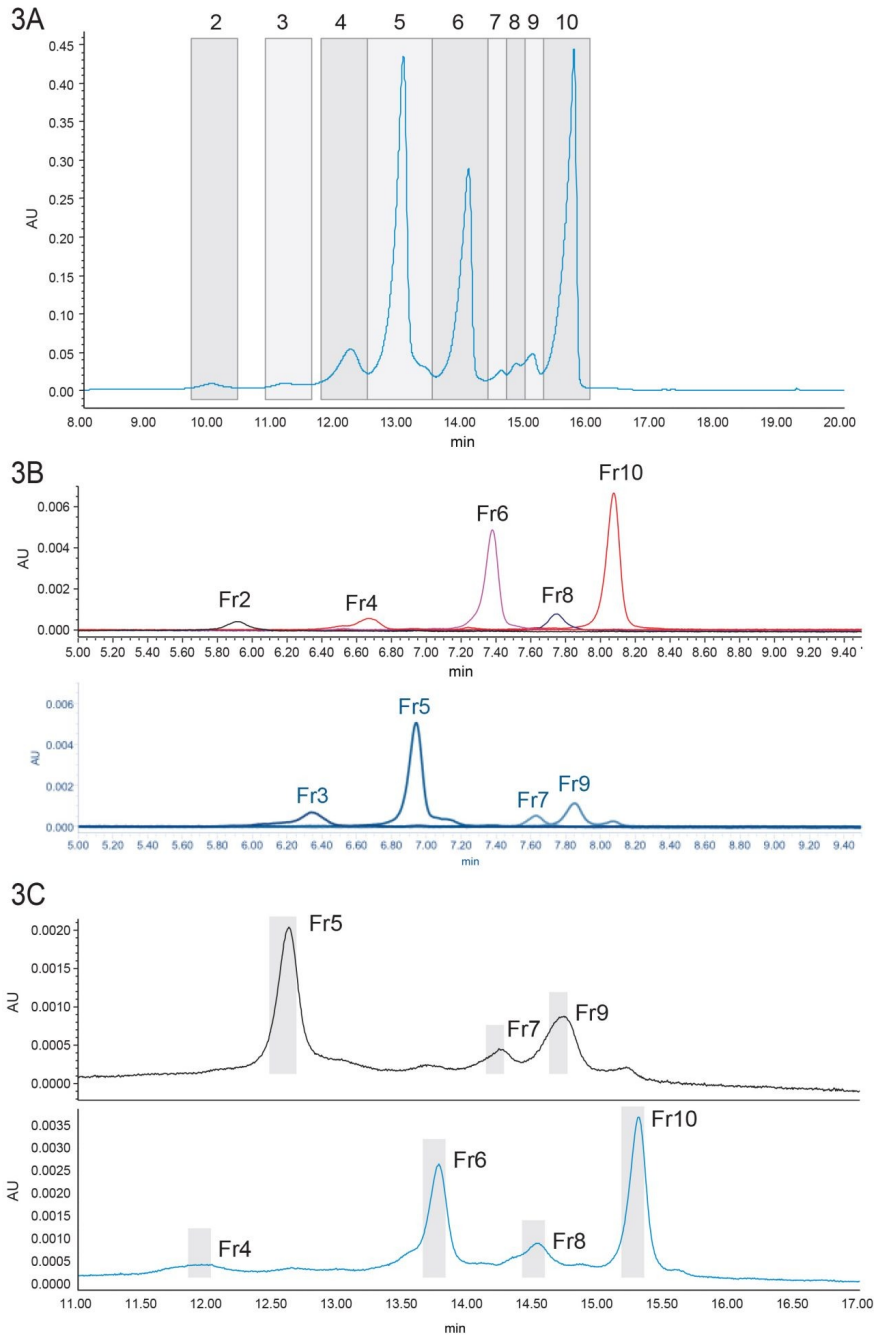


图3.馏分收集和重新纯化。(A) 采用WFM-A收集到的英夫利昔单抗电荷异构体馏分。(B) 各种馏分重新进样后得到的叠加色谱图。(C) 同时重新纯化多种馏分。

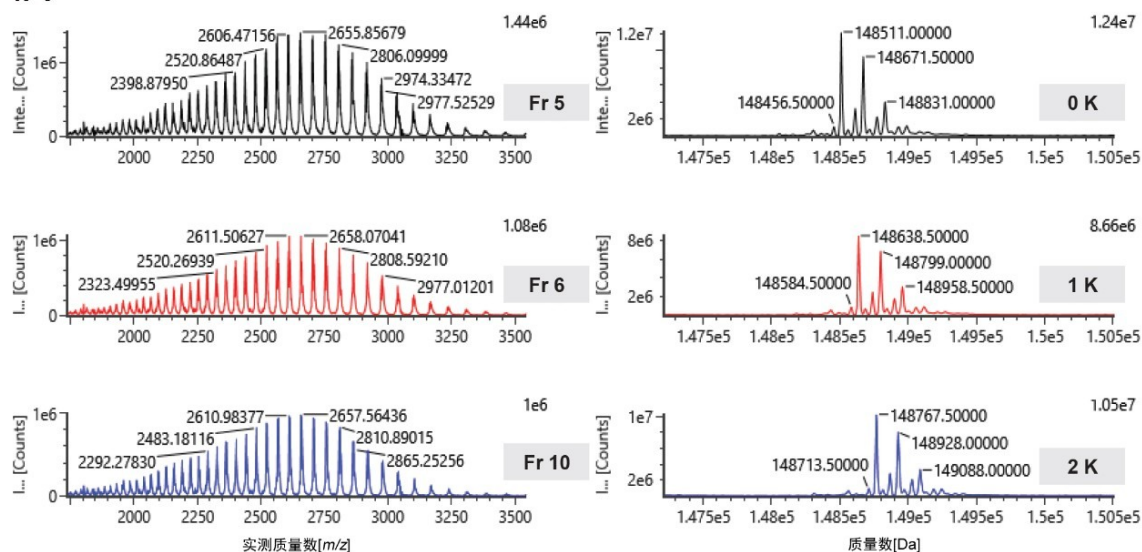
进一步分析mAb电荷异构体馏分

收集到馏分后，即可通过各种结构和功能分析来表征蛋白质电荷异构体。提供选定英夫利昔单抗馏分的完整蛋白质和亚基LC-MS分析以及选定曲妥珠单抗馏分的肽图分析作为示例。

英夫利昔单抗的完整蛋白质质量数分析

利用BioResolve RP色谱柱分析英夫利昔单抗馏分5~10，并使用Xevo G2-XS质谱仪进行检测。将MassLynx数据导入UNIFI软件中进行分析。图4展示了英夫利昔单抗馏分的质谱图。正如预期所料，馏分5、6和10的区别在于COOH末端的赖氨酸数量（图4A）⁴。馏分7、8和9的数据与N-糖中唾液酸和核心岩藻糖含量的差异一致（图4B）。虽然唾液酸含量差异会导致电荷异构体，但是已有研究表明，核心岩藻糖含量差异会改变mAb的Fc结构域构象⁵，可能导致IEX分离中出现单独的峰。有关这些馏分的游离N-糖分析将提供更多信息。

4A



4B

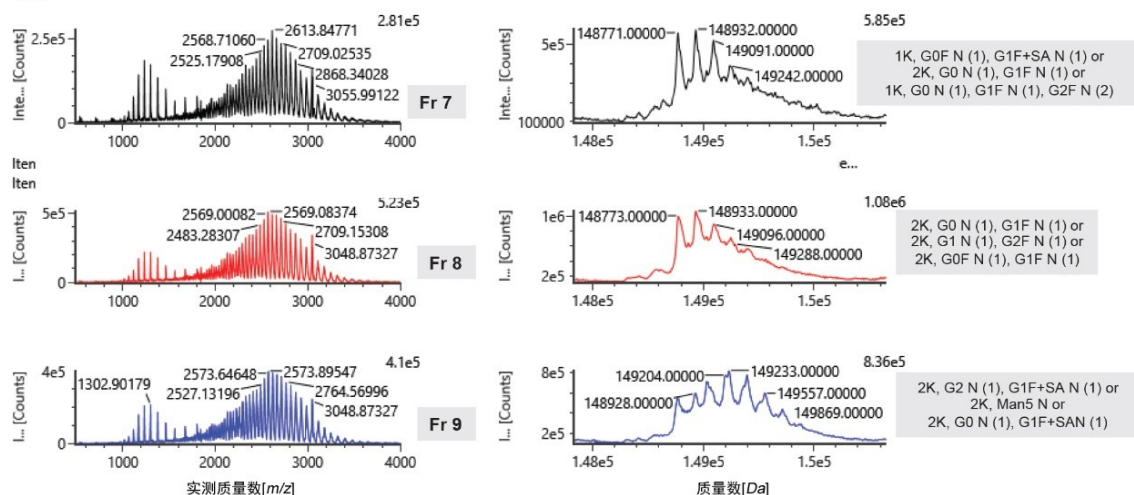


图4.英夫利昔单抗馏分的完整蛋白质量数分析。(A) 馏分5、6和10的质谱图。(B) 馏分7、8和9的质谱图。左图：原始数据；右图：去卷积谱图。

英夫利昔单抗的亚基分析

用IdeS将英夫利昔单抗馏分5、6和10酶解后进行亚基分析。之后，再向每份样品中加入DTT（二硫苏糖醇）进行二硫键还原。非还原样品和还原样品均利用BioResolve RP色谱柱进行分离，并使用Xevo G2-XS质谱仪进行检测。

如果未还原二硫键，预计IdeS酶解的mAb会出现两种主要片段：一半Fc片段（被称为scFc）；以及二硫键连接的Fab结构域（被称为F(ab')₂片段）。图5A和5B显示，馏分5在7.00 min处出现一个主要的RP亚基峰，其质量数与COOH末端不含预测赖氨酸的scFc片段一致。馏分10在6.92 min处产生一个主要的RP亚基峰，其质量数与COOH末端带赖氨酸的scFc片段一致。而对于馏分6，COOH末端含/不含赖氨酸的scFc片段都能明显观察到。LC—

MS数据与馏分5、6和10一致，这三种馏分分别主要由无重链、一条重链或两条重链上带有COOH末端赖氨酸的mAb组成。

在还原条件下，mAb通常会产生三个峰：scFc片段、轻链(LC)和Fd'片段。如图5C所示，将所有馏分在大约8.28 min保留时间处的峰鉴定为LC，将大约8.54 min保留时间处的峰鉴定为Fd'片段。6.98 min~7.26 min之间的峰拟定鉴定结果见表1。此范围内的峰被鉴定为scFc片段，其中每个赖氨酸的二硫键还原程度可能不同。图5D和5E展示了Fc片段峰的去卷积质量数差异，可用作支持信息。

总体而言，亚基分析结果与完整蛋白质量数分析结果一致，即馏分5、6和10的区别在于COOH末端的赖氨酸数量。

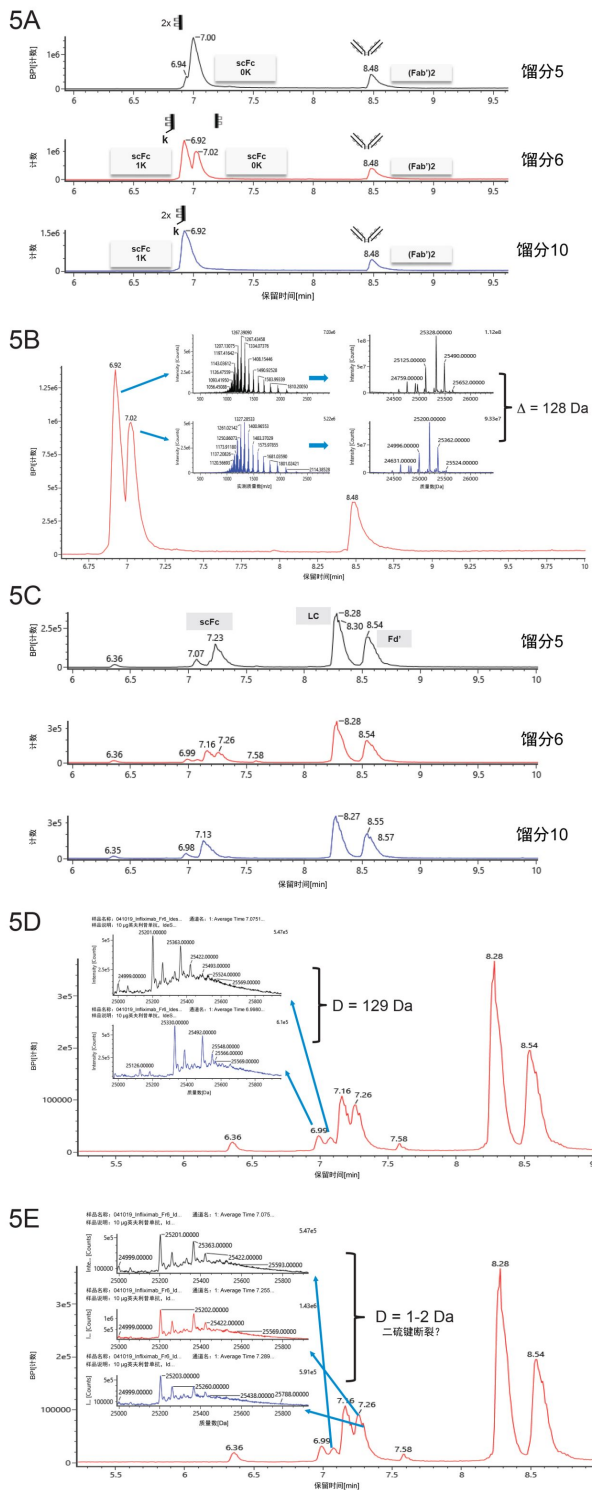


图5. 英夫利昔单抗馏分的亚基分析。(A) 非还原条件下的馏分5、6和10。(B) 非还原条件下的馏分6。质谱图显示，6.92 min处的峰比7.02 min处的峰多一个赖氨酸。(C) 还原条件下的馏分5、6和10。(D和E) 还原条件下的馏分6。质谱图显示，6.99 min处的峰比7.07 min处的峰多一个赖氨酸，并且7.07 min、7.26 min和7.29 min处的峰可能具有不同的二硫键还原程度。

馏分	保留时间(min)	推荐的鉴定结果
馏分5	7.07	scFc, 部分还原
	7.23	scFc, 还原
馏分6	6.99	scFc, 带1个赖氨酸, 部分还原
	7.07	scFc, 部分还原
	7.16	scFc, 带1个赖氨酸, 还原
	7.26	scFc, 还原
馏分10	6.98	scFc, 带1个赖氨酸, 部分还原
	7.13	scFc, 带1个赖氨酸, 还原

表1.还原条件下英夫利昔单抗的馏分5、6和10的峰拟定鉴定结果

曲妥珠单抗的肽图分析

图6A展示了利用BioResolve SCX mAb色谱柱获得的曲妥珠单抗电荷异构体分离结果。使用WFM-A收集馏分，对馏分5（酸性峰）和馏分7（主峰）进行肽图分析。对馏分进行预浓缩并使用胰蛋白酶和Lys-C进行酶解。利用BEH300 C₁₈, 1.7 μm色谱柱分离肽。

图6B为馏分5和馏分7的肽图镜像对比图。在馏分5中观察到保留时间为30.24 min的峰，而馏分7在相同保留时间处的吸光度非常小。提取离子色谱图(XIC)显示，馏分5中30.26 min保留时间处的峰面积大幅增加，UNIFI软件将该峰鉴定为肽ASQDVNTAWAYQQKPGK的脱酰胺产物。未经修饰的肽峰出现在保留时间29.63 min处（图6C）。比较修饰峰和未经修饰峰的MS-MS碎片数据，发现在片段中不含天冬酰胺(N)时，碎片离子的*m/z*相同。而片段中含有天冬酰胺时，质量数差异为1 Da，与肽的脱酰胺结果一致（图6D）。曲妥珠单抗的强制脱酰胺结果显示，馏分5大量增加，进一步表明该酸性峰的主要成分是脱酰胺的曲妥珠单抗（数据未显示）。

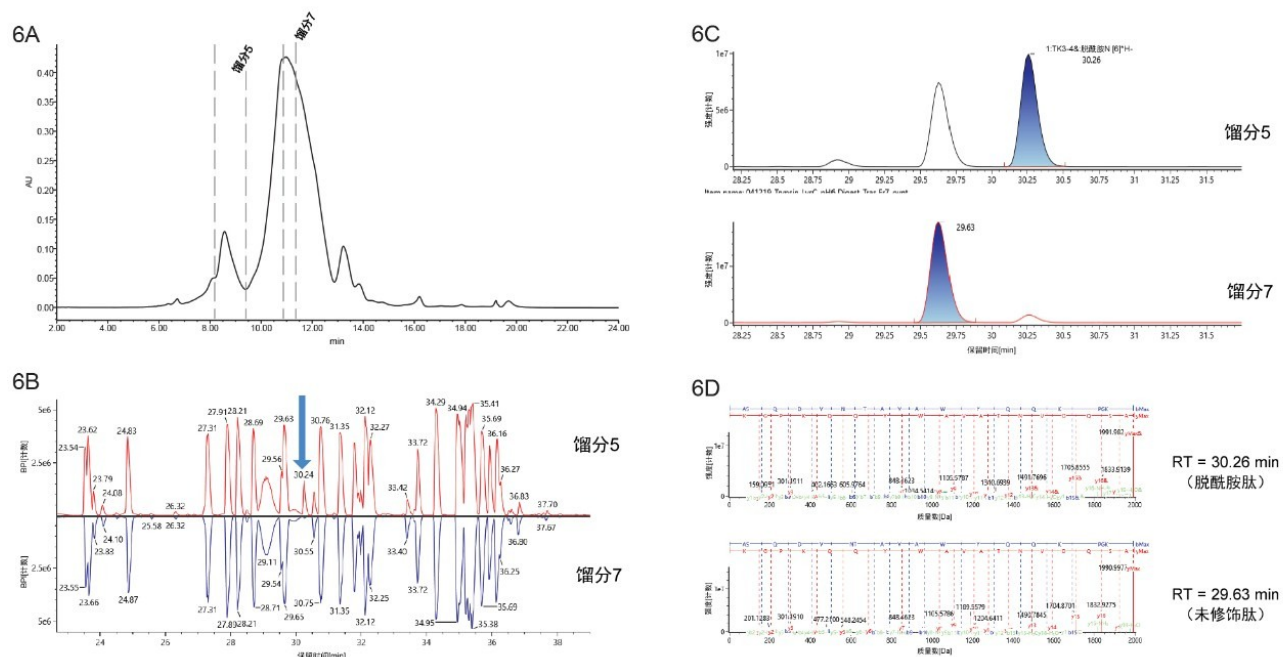


图6. 曲妥珠单抗馏分的肽图分析。(A) 从BioResolve SCX mAb, 4.6 × 100 mm色谱柱上收集的曲妥珠单抗馏分。(B) 馏分5和7的肽图镜像对比图。馏分5中30.24 min保留时间处的峰与馏分7相比显著增加（用蓝色箭头指示）。(C) 肽鉴定结果的提取离子色谱图(XIC)。30.26 min处的峰被鉴定为肽ASQDVNTAWYQQKPGK的脱酰胺产物。未经修饰峰的保留时间为29.63 min。(D) 脱酰胺和未经修饰肽ASQDVNTAWYQQKPGK的MS-MS碎片对比。不含天冬酰胺的碎片具有相同的质量数，而含有天冬酰胺的碎片的质量数相差1 Da。

其它可能的分析

上文展示了针对离子交换分离收集到的mAb进行分析的一些分析类型示例。还可以进行其它类型的结构分析，例如氧化分析或游离寡糖分析，提供关于目标峰的详细信息。此外，使用SPR、生物分析、甚至临床前药代动力学研究对电荷异构体进行功能评估，还可进一步了解生物治疗性蛋白质。

结论

在几乎所有mAb中均观察到与电荷相关的异质性。其诱因可能来源于抗体表达过程，或者抗体的生产和储存过程。电荷异构体可能会影响药物质量、安全性和疗效，因此需要对其进行鉴定和表征。一种常用方法是收集IEX色谱柱分离得到的电荷异构体馏分，然后通过各种结构和功能分析进行表征。

在本应用纪要中，我们展示了在BioResolve SCX mAb色谱柱上进行的上样量优化方案、使用WFM-A的纯化策略以及一些分析示例，这些示例的目的在于通过分析电荷异构体馏分获取有关mAb修饰的有用信息。结果表明，

BioResolve SCX mAb色谱柱与WFM-A配合使用，非常适用于分析级mAb电荷异构体馏分收集和表征。

参考文献

1. Khawli, L. A.; et al. Charge Variants in IgG1.mAbs.2010, 2(6), 613–624.
2. Jablonski, J. M.; et al. Small Scale Peptide and Impurity Isolation Using the ACQUITY UPLC H-Class and Waters Fraction Manager-Analytical Systems. Waters Application Note, [720005500EN <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134871549&locale=109>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134871549&locale=109) (2015).
3. Lauber, M.A.; et al. 设计全新颗粒技术进行稳定的mAb电荷异构体分析，沃特世应用纪要，[720006475ZH <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135007346&locale=109>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135007346&locale=109) (2019).
4. Jung, S. K.; et al. Physicochemical characterization of Remsima.mAbs.2014, 6(5), 1163-1177.
5. Sakae, Y.; et al. Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fcγ receptor IIIa. Scientific Reports.2017, 7, 13780.

特色产品

- 沃特世分析型馏分管理器 <<https://www.waters.com/134782878>>
- ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>
- 蛋白质离子交换色谱柱 <<https://www.waters.com/134810927>>
- Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>
- Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/513188>>
- MassLynx质谱软件 <<https://www.waters.com/513164>>
- UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801359>>

可在线购买

- [BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 μm, 4.6 mm x 50 mm <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009058>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009058)

- [BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 \$\mu\text{m}\$, 4.6 mm x 100 mm <
https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009060>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009060)
- [通过LCGC认证的透明玻璃12×32mm螺纹颈口全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，1 mL体积
<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000385C>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186000385C)
- [BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 \$\mu\text{m}\$, 2.1 x 150 mm，随附完整mAb和mAb亚基标准品 <
https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176004158>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176004158)
- [BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 \$\mu\text{m}\$, 2.1 x 150 mm，随附完整mAb和mAb亚基标准品 <
https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176004158>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=176004158)
- [ACQUITY UPLC BEH C18, 300Å, 1.7 \$\mu\text{m}\$, 2.1 mm X 150 mm肽分析专用柱 <
https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003687>](https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003687)
- [蛋白质离子交换色谱柱 <https://www.waters.com/134810927>](https://www.waters.com/134810927)

720006647ZH, 2019年8月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.