

使用2D-LC-MS系统和UNIFI信息学工具对单克隆抗体效价和主要结构属性进行合规监测

Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本研究采用2D-LC/MS方法评估单克隆抗体(mAb)效价和确证产品质量数和糖基化谱图，同一平台被配置为第一维进行效价测定，第二维运用MS检测技术进行产品质量属性分析，充分展示了在单一平台上进行数据采集的简便性。

优势

- 通过将不兼容MS的方法与2D系统联用提升质谱检测能力。
- 在配备光学和/或质谱检测器的单一平台上使用1D和2D分析方法进行灵活分析。
- 利用合规UNIFI软件自动化采集和处理数据。

简介

二维液相色谱(2D-LC)广泛应用于整个生物制药行业。随着治疗药物变得越来越复杂以及人们不断探索新型药物

，为了获取高质量数据，进而做出明智的决策，人们对分析方法和仪器性能的要求越来越高。各项行业举措也针对提升方法稳定性和操作合规性提出了额外要求。为满足这些不断变化的需求，我们研究了在UNIFI合规信息学平台上运行2D-LC联用高分辨率质谱的分析方法。该方法采用单中心切割配置，将Protein A亲和色谱与反相色谱/质谱联用(Pro A-RPLC-MS)，用于评估抗体效价及其主要结构属性。本研究的目的是开发出简单的实验设计，开发过程中参考了成功将Pro A与各种二维分析联用的多篇文献报道¹⁻³。

配备光学检测器的Protein A亲和色谱是对纯化细胞培养物中含Fc的分子进行定量分析的传统方法。在分析级分析中，上述分析对于需要选出最高产细胞系的克隆选择至关重要。确定高效价之后，还需要进行其它分析来评价产品质量属性。常用方法首先用制备型色谱或样品板捕获技术纯化细胞培养物，得到治疗性分子，然后对纯化得到的物质进行第一维(1D)分析，常用的技术包括体积排阻色谱(SEC)、离子交换色谱(IEX)和反相完整质量数分析等。运用二维(2D)方法可省去大量的样品处理和下游处理工作。

本研究采用2D-LC-MS方法评估单克隆抗体(mAb)效价和确证产品质量数和糖基化谱图，同一平台被配置为第一维进行效价测定，第二维运用MS检测技术进行产品质量属性分析，充分展示了在单一平台上进行数据采集的简便性。

实验

样品描述

使用曲妥珠单抗制剂药(21 mg/mL)和0.1% (v/v)甲酸水溶液制备浓度为4 mg/mL的曲妥珠单抗储备液。进行二倍连续稀释，直至达到1D Pro A研究的光学检测限。

LC条件

系统：	使用2D技术的ACQUITY UPLC I-Class PLUS 四元溶剂管理器(QSM) (第一维) 二元溶剂管理器(BSM) (第二维)
检测器：	ACQUITY UPLC可变波长紫外(TUV)检测器 (第一维)

波长: 280 nm

样品温度: 6 °C

进样体积: 2 μ L

Protein A (第一维)

色谱柱: POROS A 20 μ m 色谱柱, 2.1 \times 30 mm

柱温: 25 °C

流速: 1.000 mL/min

流动相A: 50 mM 磷酸盐, 150 mM NaCl, pH 7

流动相B: 500 mM 乙酸

梯度：

时间 (min)	流速 (mL/min)	MPA (%)	MPB (%)	曲线
0.00	1.000	100.0	0.0	
1.50	1.000	100.0	0.0	6
1.51	1.000	0.0	100.0	6
4.50	1.000	0.0	100.0	6
4.51	1.000	100.0	0.0	6
9.00	1.000	100.0	0.0	6

反相（第二维）

色谱柱：	XBridge BEH C ₄ 蛋白分析专用柱, 300 Å, 3.5 μm, 4.6 × 50 mm（部件号：186004502）
柱温：	80 °C
流速：	0.500 mL/min（空闲状态0.100 mL/min）
流动相A：	水, 0.1%甲酸(v/v)
流动相B：	乙腈, 0.1%甲酸(v/v)

梯度：

时间 (min)	流速 (mL/min)	MPA (%)	MPB (%)	曲线
0.00	0.500	95.0	5.0	
1.00	0.500	95.0	5.0	6
3.50	0.500	50.0	50.0	6
5.00	0.500	50.0	50.0	6
5.50	0.500	5.0	95.0	6
7.50	0.500	5.0	95.0	6
7.60	0.500	95.0	5.0	6
10.00	0.500	95.0	5.0	6

MS条件

系统：	Vion IMS QTof
电离模式：	ESI+，灵敏度模式
质量数范围：	m/z 750~4000
毛细管电压：	2.75 kV
锥孔电压：	140 V
离子源温度：	150 °C

脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	600 L/h
锁定质量数参比化合物:	Glu血纤维蛋白肽B, 浓度2.2 pmol/μL, 溶于含0.1%甲酸(v/v)的水/乙腈(50:50)

数据管理

UNIFI科学信息系统1.9.4版

Vion IMS QToF驱动程序包2.2.0

结果与讨论

单克隆抗体的1D定量分析

配备光学检测器的Pro A色谱是评估mAb效价常用的高通量单一分析方法。传统的1D效价分析方法使用经过纯化的标准品生成标准曲线, 然后进行线性回归拟合用于定量。图1所示为曲妥珠单抗稀释系列 (0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0和4.0 mg/mL) 所生成的校准曲线。稀释系列进样的叠加色谱图显示, 保留时间重现性良好。峰面积 (TUV, 280 nm处) 与进样浓度(mg/mL)的关系图呈现优异的相关性, 这是该方法的典型特征 (见插图)。

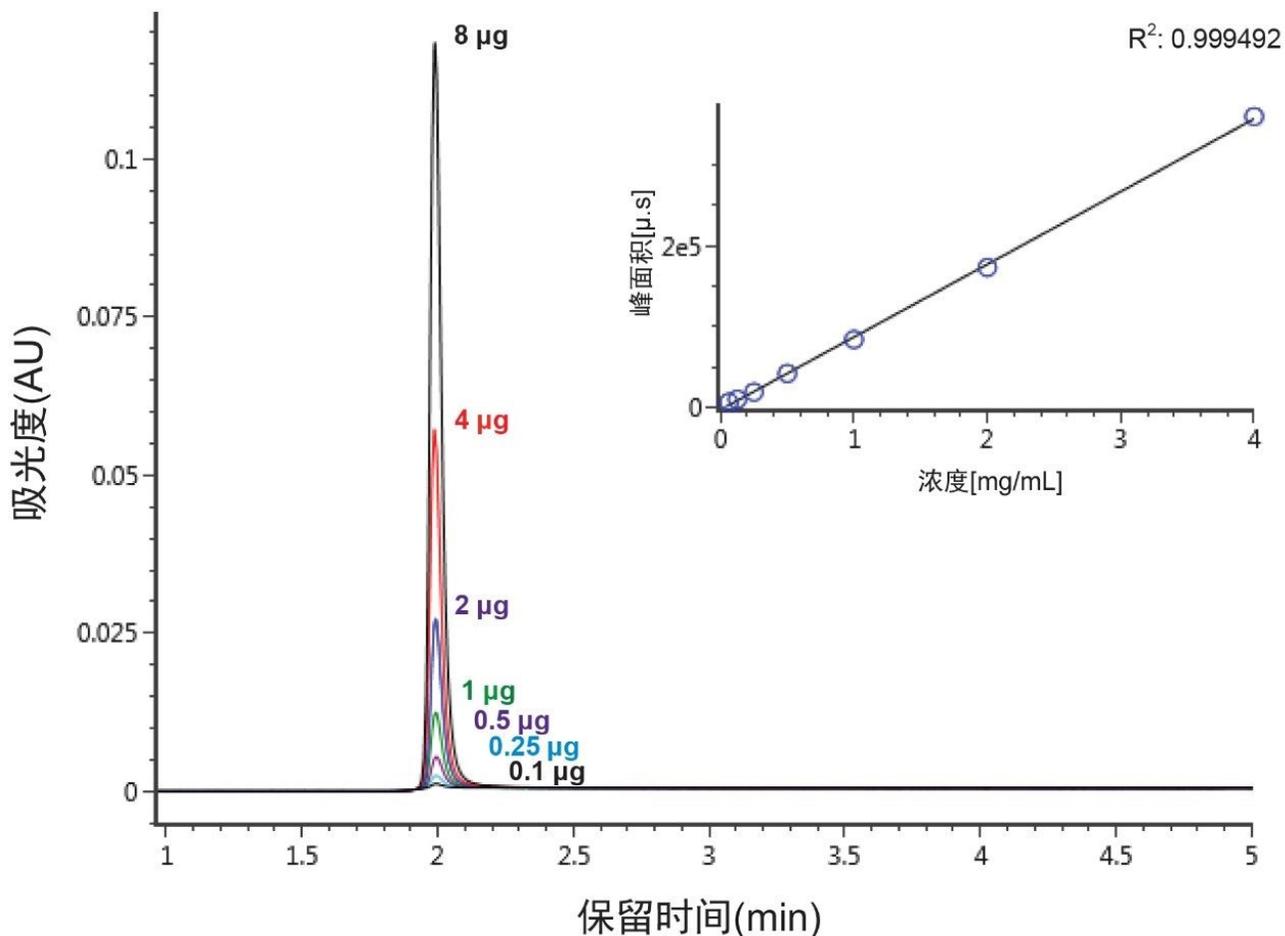


图1.曲妥珠单抗标准品的Protein A亲和色谱图。图中所示为样品稀释系列的叠加图（标记有载样量）。制备样品的浓度范围是0.05-4 mg/mL，对应的载样量范围是0.1-8 µg（进样体积2 µL）。标准曲线（插图）显示峰面积与浓度在上述范围内呈线性相关。

完整mAb的RPLC-MS分析能够确认质量数并快速给出生物治疗药物产品的糖基化谱图，因此可以辅助克隆选择、工艺开发和工艺监测。尽管Pro A缓冲液组分不直接兼容质谱分析，但可以采用2D技术对第一维的目标分析物进行选择性的中心切割，然后将其转移至第二维色谱柱，使用兼容MS的洗脱溶液运行第二维分离。

在UNIFI平台上配置2D系统非常简单，成功创建系统后，用户就可以使用该系统在传统1D分析和2D工作流程之间轻松切换。用户可以通过Administration（管理）选项卡访问Device Management（设备管理）界面配置2D系统（图2）。先向新系统中添加第一维的组件，然后添加第二维的组件，UNIFI随后会按照添加顺序分配这些组件，以便于识别。当方法变得越来越复杂并且额外加装了泵，或者需要加装容纳捕集柱的色谱柱管理器用于多中心

切割分析时，该方法尤为适用。

设备管理→仪器系统

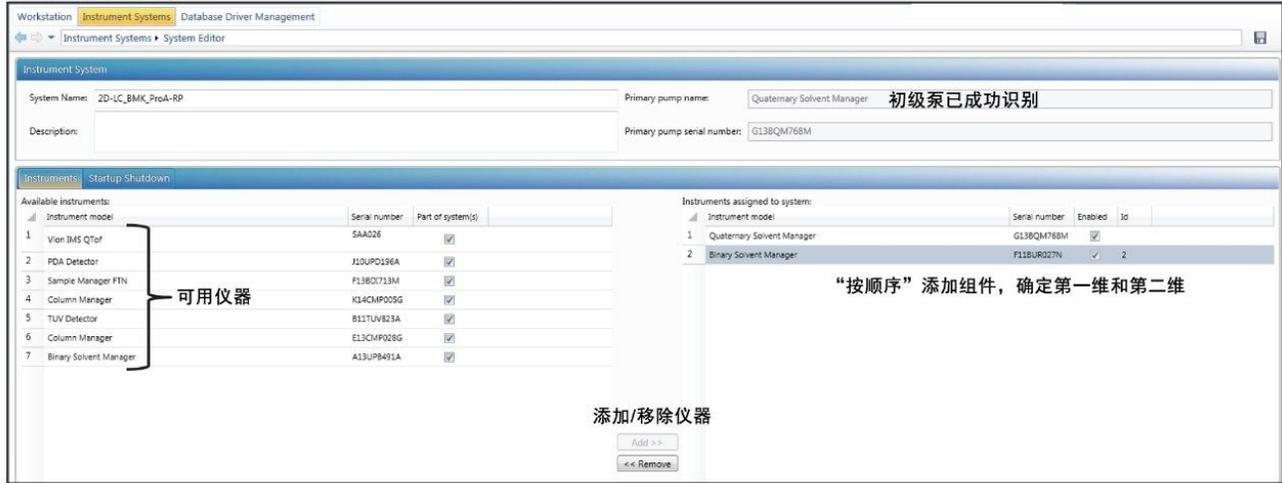


图2.2D系统配置。配置色谱系统时，直接添加和移除列表中的可用仪器组件即可。用户可以“按顺序”添加第一维和第二维的模块，以便于区分。用户可以为1D和2D工作流程分别创建独立系统，并在采集数据之前进行选择。

采用图3所示的系统配置，用户既可以切换至传统1D工作流程（图3A），又可以通过一系列阀切换操作调整现有系统，使其适用于2D工作流程，而无需对系统管路连接做任何更改。这样一来，当不需要质谱信息时，1D效价分析可作为高通量筛查的主力工具。当需要确认鉴定结果时，可执行第二次分析物进样，然后将中心切割部分转移至第二维（图3B）。确定中心切割窗口后，通过柱头稀释(ACD)将第一维和第二维液流合并。然后将阀切换回原始位置，再次隔离流路，随后即可运行第二维分离（图3C）。

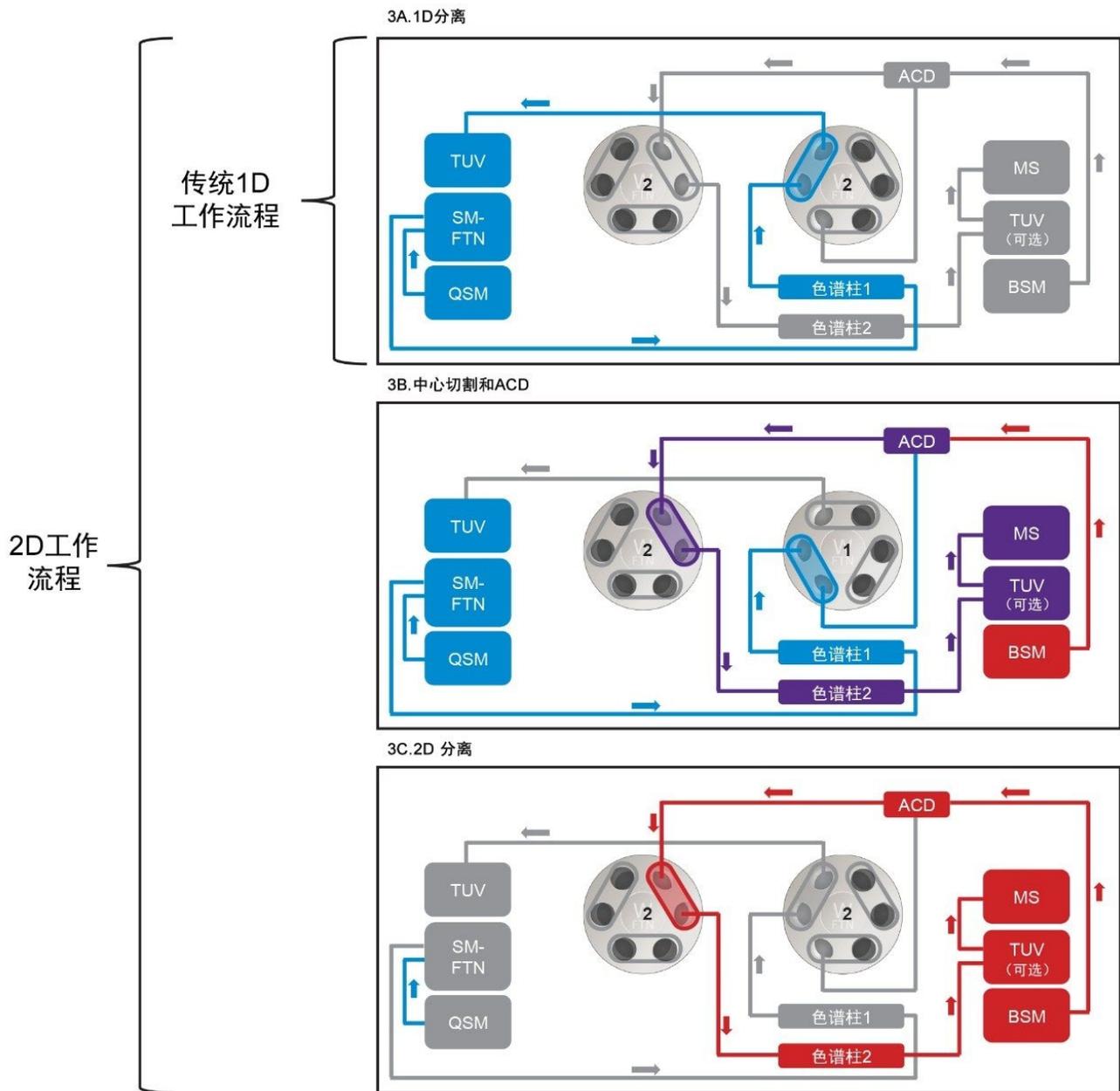


图3.1D和2D工作流程的系统配置。在传统1D分析方法中，液流被导入光学检测器(3A)。同样的配置也可用于监测2D工作流程的保留时间重现性。确定目标分析物从第一维色谱柱洗脱的时间后，改变流路，将液流导入第二维(3B)。启动ACD泵送兼容MS的流动相冲洗样品。然后再次隔离流路，使用第二维泵驱动第二维分离(3C)。第二维分离可以额外配置在线TUV检测器，以便在方法开发阶段协助进行故障排除。泵送来自色谱柱2的洗脱液时，也可以绕过光学检测器，直接将液流导入MS。

在UNIFI平台中配置2D系统后，即可单独创建1D和2D方法。在Analysis Method（分析方法）中，向Sample list setup（样品列表设置）中添加Acquisition Method Name（采集方法名称）字段，以便为数据采集选择相应的方法（图4A）。另外，还可以为多中心切割分析创建其它方法用于脱盐或独立运行，但是Pro A-RPLC/MS分析不需要附加其它步骤。独立方法创建完成后，即可创建Sample Set（样品组）（图4B），以便自动执行分析中的所有方法。

4A. 分析方法→样品列表



4B. 样品组→采集



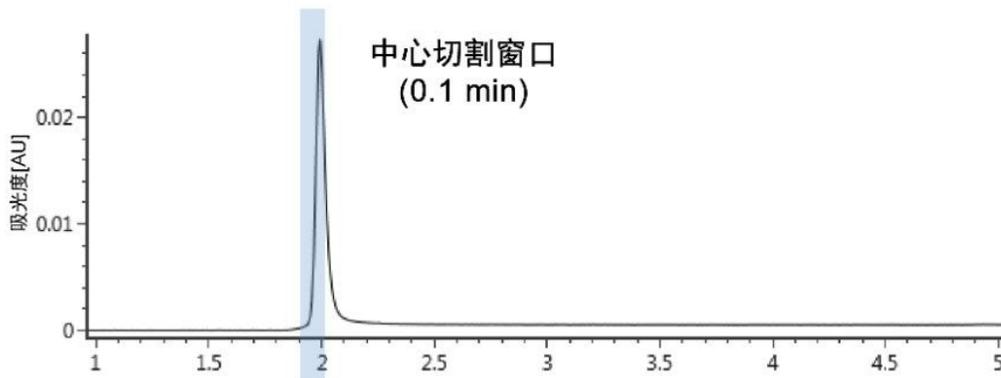
图4. 创建2D数据采集方法。必须在分析方法中加入Acquisition Method Name（采集方法名称）字段才能创建独立的1D和2D方法。将该字段选作已优化参数后，用户即可将单独的采集方法放入队列。所示方法分别用于1D Pro A、1D Pro A中心切割和2D RPLC/MS分析。

Pro A-RPLC/MS工作流程

采用详细信息如图4所示的Pro A 1D方法测定mAb效价（图5A）。根据光谱图中的峰面积和标准曲线（见图1）计算样品浓度。在本示例中，样品浓度的计算结果为大约1 mg/mL。根据同一幅光谱图确定要将分析物转移至第二维接受LC-MS分析的中心切割窗口。第二次进样确定了0.1 min (1.9~2.0 min)的中心切割窗口，将该窗口的分析物转移至在线第二维色谱柱。在样品组的第三行中，流路被再次隔离，并增加了10 min的等度保持时间，目的是冲洗被转移并吸附在第二维色谱柱柱头的分析物，去除Protein A缓冲液污染物。冲洗步骤完成后，运行时长为10 min的RPLC-MS梯度方法。图5B所示为曲妥珠单抗的去卷积谱图，图中标记了糖型。将此质谱数据与根据参比标准品计算出的预期质量数进行比较，即可确认样品组分。糖基化模式监测可以纳入常规分析，用于筛选最佳候选

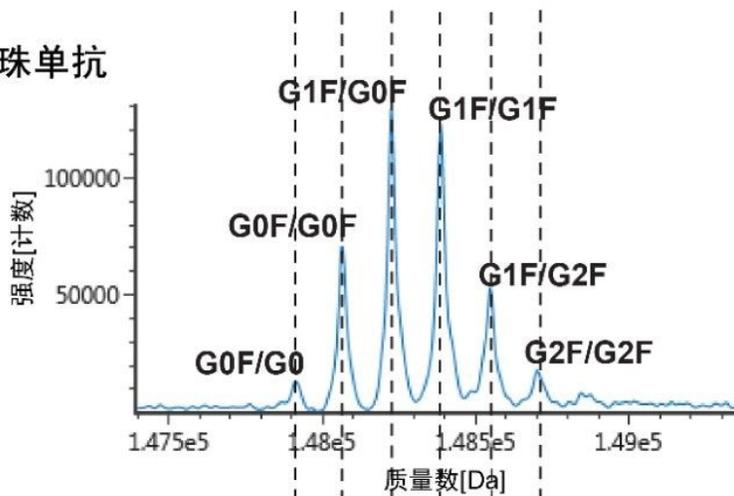
生物类似药和指导工艺开发决策，还有望应用于为生产过程中的旁线分析提供数据。

5A.1D TUV



5B.2D去卷积

曲妥珠单抗



NIST mAb

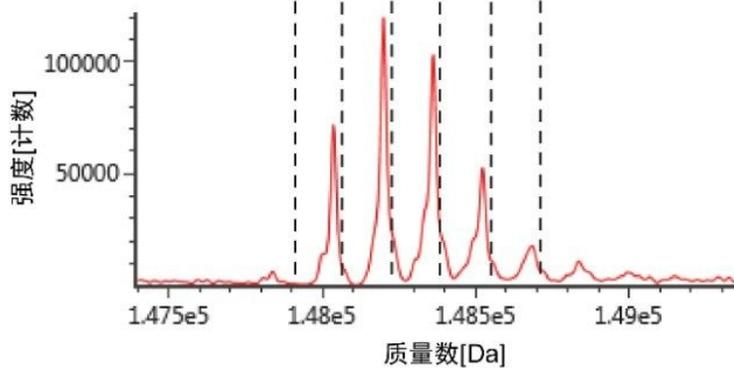


图5.Pro A-RPLC-MS工作流程。将Protein A分析结果与标准曲线（见图1）建立关联，可用于确定mAb效价。然后

采用0.1 min的中心切割窗口将分析物转移至第二维进行MS数据采集。图中所示为标注了已鉴定糖型的去卷积谱图。将曲妥珠单抗谱图与NIST mAb比较，可以发现质量数和相对丰度的变化。

结论

本研究展示了如何使用常见仪器平台扩展传统1D分析方法，为其添加2D功能。借助UNIFI科学信息系统，用户只需完成初始系统配置，即可根据需要在1D与2D工作流程之间自动切换，无需再对仪器进行物理改动。本研究以Pro A-RPLC-MS分析为例，展示了如何使用2D中心切割方法将分析物从不兼容MS的基质转移至兼容MS的流动相，从而在单次自动化运行中同时采集质谱信息。

参考文献

1. Prentice, K. M.; Wallace, A.; Eakin, C. M. Inline Protein A Mass Spectrometry for Characterization of Monoclonal Antibodies. *Anal.Chem.* 2015, 87, 2023-2028.
2. Williams, A.; Read, E. K.; Agarabi, C. D.; Lute, S.; Brorson, K. A. Automated 2D-HPLC Method for Characterization of Protein Aggregation with In-Line Fraction Collection Device. *J. Chromatogr.B* 2017, 1046, 122–130.
3. Sandra, K.; Steenbeke, M.; Vandenheede, I.; Vanhoenacker, G.; Sandra, P. The Versatility of Heart-Cutting and Comprehensive Two- Dimensional Liquid Chromatography in Monoclonal Antibody Clone Selection. *J. Chromatogr.A.* 2017, 1523, 283-292.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

[Vion IMS QToF离子淌度四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134845751>](https://www.waters.com/134845751)

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801359>](https://www.waters.com/134801359)

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

720006691ZH, 2019年10月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#)

[隐私](#)

[商标](#)

[网站地图](#)

[招聘](#)

[Cookie](#)

[Cookie](#)

[设置](#)