Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用BioResolve RP色谱柱对抗体亚基进行LC-MS表征

Nilini Ranbaduge、Henry Shion、Matthew A. Lauber和Ying Qing Yu
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德市)

目的

使用Waters® BioResolve™ RP色谱柱改进抗体亚基的LC-MS分析。

背景

反相液相色谱(RPLC)与高分辨质谱(RPLC-HRMS)联用是测定治疗性单克隆抗体(mAb)分子量的常用工具。除了能够提供精确质量信息，HRMS的另一项极具吸引力的优势在于其能够发掘相关物质和蛋白质修饰的信息。

大多数这类修饰信息都被视为关键质量属性(CQA)，可能会对抗体的安全性和疗效产生重大影响。有趣的是，LC-HRMS还能高效地表征抗体对应的亚基，作为一种快速简单的分析方法协助分析人员确认鉴定结果，并提供功能区特有CQA的相对丰度信息作为保障产品质量的参考信息[1-2]。

可实现抗体亚基高分离度LC-MS表征的新型反相色谱柱。

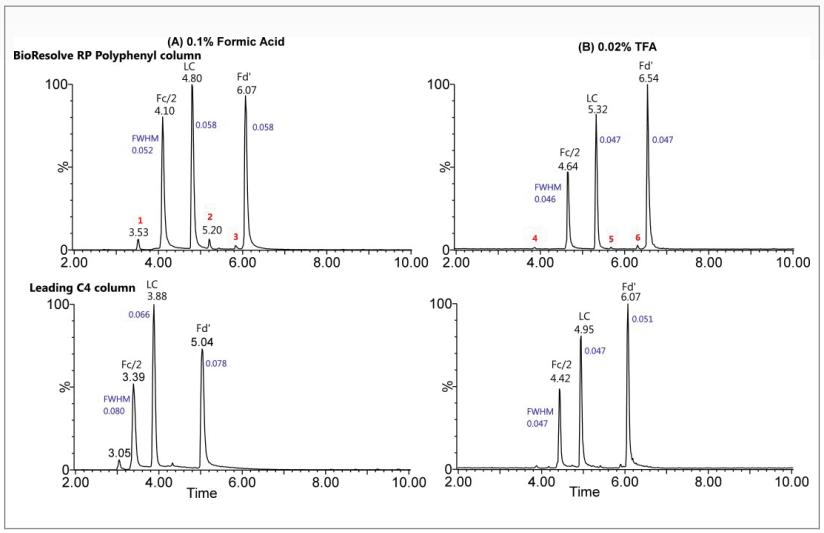

图1. 使用BioResolve RP色谱柱和业内领先的C_4色谱柱分析沃特世抗体亚基标准品(部件号：186008927)得到的总离子流色谱图(TIC)，此标准品为经过还原的IdeS酶解NIST mAb参比物质8671。图中标出了Fc/2、LC和Fd'亚基以及数个小峰(1–6)。将ACQUITY® UPLC® H-Class Bio系统与SYNAPT® G2-Si HDMS联用进行分析，使用2.1 × 50 mm色谱柱，分析条件如下：10 min梯度（15%~55%乙腈），流速0.4 mL/min，色谱柱温度80 °C，流动相用(A) 0.1%甲酸或(B) 0.02%三氟乙酸(TFA)改性。

前文提到的鉴定分析依赖于从LC-MS中提取的去卷积质量数，而低浓度CQA物质的MS信号往往会被占据主导地位的离子抑制，导致可靠检测低丰度物质的难度极大。鉴于此，可改善色谱分离度的RPLC色谱柱对提升亚基LC-MS分析的总体能力有积极影响。此外，改善色谱分离还有助于缩短运行时间，进而简化数据分析。

解决方案

本研究采用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统与SYNAPT G2-Si联用的方法来表征mAb亚基。

本应用展示了BioResolve RP 色谱柱的优势，该色谱柱经过专门设计，填充有被多孔涂层(即SCP)包裹的硅基实心核颗粒，可缩短色谱分析中蛋白质在颗粒内的扩散距离，从而减少峰展宽(相较于经常出现峰展宽现象的全多孔颗粒)。包裹颗粒的多孔涂层上有450 Å的孔隙，颗粒总粒径为2.7 µm。得益于这些特性，这款填充色谱柱在分离完整mAb和mAb亚基时可获得出色的组分分离度、优异的回收率，而且进样之间残留极低[3-4]。

右侧所示为Waters® 抗体亚基标准品(部件号：186008927)的示例色谱图。这种新的标准品是经过还原的IdeS酶解NIST 抗体，可用于基准检查、能力测试或系统适应性测试。

该标准品中Fc/2、LC和Fd'肽段的理论质量数分别为23790.81 Da、23127.51 Da和25705.89 Da。

实验证明，采用10 min梯度(图1)和2.1 × 50 mm色谱柱或4.6 × 50 mm色谱柱，这三种亚基均可实现基线分离。如图1所示，BioResolve RP色谱柱使用两种兼容MS的流动相(一种基于0.1%甲酸，另一种基于0.02% TFA)均可获得出色的色谱分离结果。由于BioResolve RP色谱柱的分离能力更强，相较于业内领先的C_4色谱柱，其得到的峰更窄，实现基线分离的杂质峰也更多。

为得到这些示例结果，我们对分析的载样量进行了优化，最终决定采用0.5 µg的载样量。单独的实验表明，实验所用的2.1 mm内径色谱柱的推荐柱上载样量介于0.05~2.50 µg之间，我们需要仔细考虑这个变量，以便在保证MS检测器未饱和的前提下达到检测低浓度物质的最佳性能。

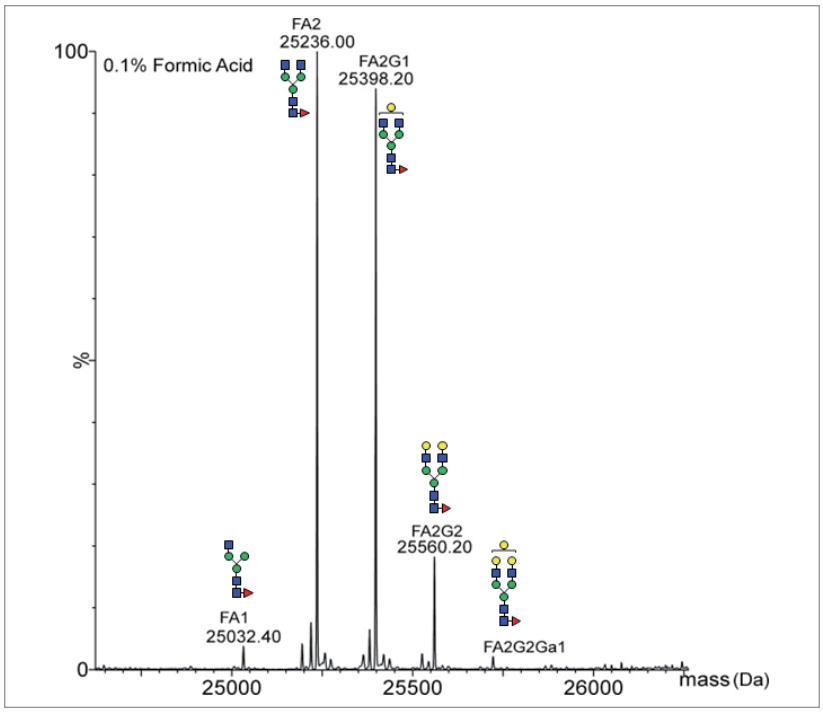

图2. 对scFc片段进行MaxEnt 1电荷去卷积后所得的示例谱图。图中标出了主要糖型及其分子量。

亚基	修饰	保留时间 (min)	预期质量数 (Da)	相对丰度 (%)
Fc/2	FA1 N	A-4.10 B-4.64	25032.78	1.7
	FA2 N		25235.98	46.0
	FA2G1 N		25398.12	44.2
	FA2G2 N		25560.26	7.8
	FA2G2Ga2 N		25884.41	0.3
LC		A-4.80 B-5.32	23127.51	97.7
	糖基化		23289.65	2.3
Fd'	N端形成焦谷氨酸Q	A-6.07 B-6.54	25688.86	98.4
	N端形成焦谷氨酸Q，糖基化		25851	1.6

表1. 每种亚基的中性质量数及其对应的修饰。相对于每种亚基所有修饰的总MS响应值计算出了每种修饰的相对丰度(%)，结果如表中所示。

在这些条件下，每种亚基的提取离子流图都得到了基线分离的窄峰；图1中报告的半高峰宽证实了这一观察结果。这些有明显峰形的色谱峰得到了高质量的去卷积质谱图，如Fc/2峰对应的质谱图(图2)所示。将此分析应用到整个色谱图，可生成样品的详细谱图，以及沃特世mAb亚基标准品中丰度最高的蛋白质修饰的质量数列表和相对丰度信息(表1)。

这些示例分析的色谱图中还额外出现了几个低丰度峰，在图1 BioResolve RP色谱柱所得的色谱图中，这些峰被标记为峰1至6。BioResolve RP色谱柱的分离能力使得分析物实现了基线分离，从而为基于MS的“产品相关”杂质鉴定提供支持。例如，峰2和峰5可以归属为Fd'亚基的碎片(PQ [1-88]D)，该碎片存在于标准品中，其典型平均质量数为9832.2 Da5。

总结

BioResolve RP色谱拥有具体应用所需的特性，有助于改善抗体亚基分离。本研究证明，该色谱柱可用于传统的RPLC-MS方法，提高亚基分析能力。更强的色谱分离能力和经过彻底优化的载样量使得分析人员能够清楚地掌握样品异质性，进而更深入地研究mAb结构及功能。

参考文献

1. Sokolowska, I.; Mo, J.; Dong, J.; Lewis, M. J.; Hu, P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation. *mAbs* 2017, 9 (3), 498–505.
2. Ranbaduge, N.; Shion, H.; Yu, Y. Q. Automated Protein Modification Characterization of the Intact and Subunit NIST Monoclonal Antibody Reference Standard with Waters UNIFI Scientific Information System 2017. 720006085EN.
3. Nguyen, J., et al. Designing a New Particle Technology for Reversed Phase Protein Separations Through the Optimization of Diffusion Properties, Waters Application Note, 720006168EN, Jan 2018.
4. Nguyen, J., et al. A Novel Phenyl Bonded Phase for Improved Protein Reversed Phase Separation, Waters Application Note, 720006169EN, Jan 2018.
5. Formolo, T.; Ly, M.; Levy, M.; Kilpatrick, L.; Lute, S.; Phinney, K.; Marzilli, L.; Brorson, K.; Boyne, M.; Davis, D.; Schiel, J. Determination of the NISTmAb Primary Structure. In *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2*. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study, American Chemical Society: 2015; Vol. 1201, pp 1–62.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、ACQUITY UPLC和SYNAPT是沃特世公司的注册商标。BioResolve和
The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

©2018年 沃特世公司。中国印刷。2018年1月 720006199ZH TC-PDF