



使用半制备型 FcR 亲和色谱柱和 HILIC-MS 表征单克隆抗体

单克隆抗体 (mAb) 是一类重要的治疗药物, 拥有治疗多种疾病的巨大潜力。由于其结构具有高度复杂性和聚糖异质性, 因此必须对其关键质量属性进行表征和严格控制, 才能保证药物的质量和功效。与 Fc 区 Asn-297 糖基化位点相连的 mAb 聚糖会影响生物活性, 如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和稳定性。

TSKgel® FcR-III A 色谱柱根据单克隆抗体对 FcγRIII A 配体的亲和力, 将其分为 3 个组分: 低亲和力、中亲和力和高亲和力。这主要取决于 mAb 的糖型及其 ADCC 活性。为了定量和阐明基于 FcR-III A 亲和力分离的不同组分糖型聚糖谱, 需要首先对馏分中的抗体聚糖进行释放并标记, 再使用 HILIC-MS 的分析。

TSKgel FcR-III A-5PW 是一种半制备型亲和色谱柱, 其固定相是将重组 FcγRIII A 配基, 键合到 10 μm 粒径的多孔聚甲基丙烯酸酯聚合物基质上, 上样量最高可达 5 mg mAb。它与分析柱 (TSKgel FcR-III A-NPR) 不同, 分析柱采用的是无孔填料基质, 上样量通常 ≤50 μg mAb。因此, 使用半制备型 TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱, 单次可收集更多的样品, 对这一工作流程大有裨益 (图 1)。

该半制备型色谱柱的附加效用是可以收集足量的样品, 通过酶促聚糖释放和 HILIC-MS 方法对 mAb 糖型进行深度分析。

图 1. 分析释放聚糖的新工作流程



材料与amp;方法:

TSKgel FcR-III A 条件

色谱柱: TSKgel FcR-III A-5PW (10 μm, 7.8 mm ID × 7.5 cm)
 流动相: A: 50 mmol/L 柠檬酸盐/NaOH (pH 6.0)
 B: 50 mmol/L 柠檬酸盐/NaOH (pH 4.0)
 方法: 平衡: 5 CV MP A
 清洗: 4 CV 25% MP B
 洗脱: 线性梯度 25-90% B, 14 CV 以上在 90% B 和 100% B 下保持 4 CV
 流速: 平衡、进液和清洗步骤: 0.5 mL/min
 洗脱和保持步骤: 0.25 mL/min
 设备: ÄKTA™ avant 25 FPLC
 检测器: UV @ 280 nm
 温度: 室温
 样品: 5 mg Protein A 纯化后的曲妥珠单抗 (Herceptin 生物仿制药)

HILIC-MS 条件

色谱柱: TSKgel Amide-80 (2 μm, 2.1 mm ID × 15 cm)
 流动相: A: 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4)
 B: 100% 乙腈
 梯度: 35 分钟内从 65-58% B
 流速: 0.2 mL/min
 设备: Shimadzu Nexera® XR UHPLC
 检测器: 荧光: Ex 265 nm, Em 425 nm
 MS: SCIEX X500B Q-TOF, ESI 阳性, m/z 200-3500
 温度: 50 °C
 样品: 载入样品 5 μL, 收集样品 10 μL FcR 色谱柱的洗脱峰

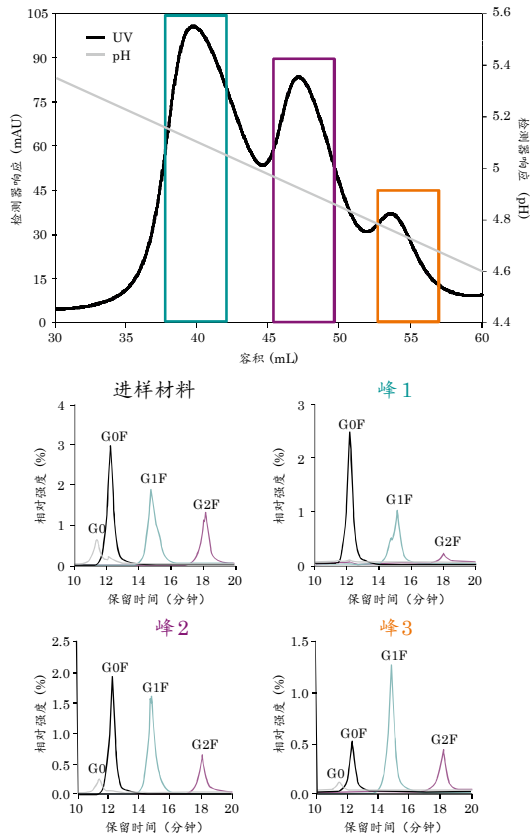
MS 条件

气体源 1	60 psi	喷雾电压	5000 V
气体源 2	60 psi	去簇电压	20 + 0V
气帘气	45 psi	碰撞能量	7 + 0V
CAD 气体	7 psi	源温度	450 °C
积累时间	0.5 sec	合计时间段	4

结果

图 2 所示为使用 TSKgel FcR-III A-5PW 半制备型色谱柱分析 Protein A 纯化后的曲妥珠单抗的色谱图。该峰轮廓与 TSKgel FcR-III A-NPR 分析柱 (本文中未显示) 相当, 随着 pH 值的降低, 首先显示的是低亲和力, 其后依次是中亲和力和高亲和力组分。我们从收集的峰 1、2 和 3 中释放并标记了聚糖, 然后将其进样到与 MS 相连的 TSKgel Amide-80 HILIC 色谱柱中对聚糖进行定量分析。

图 2. Herceptin 生物仿制药在 TSKgel FcR-III A-5PW 上的洗脱曲线 (上图) 以及 HILIC-MS 分析 FcR 组分释放的聚糖时的相对强度 (下图)



如图 3 所示, TSKgel Amide-80 色谱柱与质谱联用表明, 与 FcγRIIIA 配基 (峰 3) 亲和力最高的 mAb 糖型, 其 N-聚糖结构 (G1F 和 G2F 聚糖符号) 中半乳糖的含量也最高。峰 2 相对于峰 1 显示出了更高的 G1F 水平, 峰 1 含有更丰富的岩藻糖聚糖, 不含末端半乳糖 (G0F)。

图 3. HILIC-MS: TSKgel FcR-III A-5PW 色谱柱收集的组分中 3 个峰内 6 种不同 N-聚糖的相对丰度

聚糖	结构	进样材料 (%)
G2		0.00 ± 0.00
G2F		2.06 ± 0.01
G1		0.16 ± 0.01
G1F		26.76 ± 0.29
G0		1.15 ± 0.03
G0F		69.87 ± 0.34

聚糖	峰 1 (%)
G2	0.00 ± 0.00
G2F	0.00 ± 0.00
G1	0.00 ± 0.00
G1F	7.60 ± 1.12
G0	0.00 ± 0.00
G0F	92.40 ± 1.12

聚糖	峰 2 (%)
G2	0.00 ± 0.00
G2F	2.89 ± 0.11
G1	0.00 ± 0.00
G1F	40.56 ± 0.37
G0	2.05 ± 0.48
G0F	54.51 ± 0.27

聚糖	峰 3 (%)
G2	0.00 ± 0.00
G2F	5.47 ± 1.10
G1	0.00 ± 0.00
G1F	71.69 ± 1.16
G0	2.29 ± 0.40
G0F	20.55 ± 0.44

结论

半制备型 TSKgel FcR-III A 亲和色谱分离和 HILIC 分析, 组成了一个两步工作流程, 可快速筛选上下游的 mAb 产品。利用 HILIC-MS 可以确认不同 mAb 糖型中 N-聚糖的有无及其相对数量, 从而对 mAb 进行深度表征。此类分析几乎可在任何质谱仪上进行, 无需高分辨率设备。在正交色谱方法中使用相同样品材料的额外好处是, 为药物开发和质量控制创造了全新优势。该工作流程的优势还包括, 无需进行昂贵且费时费力的生物活性测定, 就能够监测到 FcγRIIIA 的亲和力及其相对 ADCC 活性。

TSKgel 和 Tosoh Bioscience 是 Tosoh Corporation 的注册商标。

AKTA 是 GE Healthcare Bio-Sciences 的商标。

Herceptin 是 Genentech, Inc. 的注册商标。

Nexera 是 Shimadzu Corporation 的注册商标。