

使用 Agilent 6530 Q-TOF 对单克隆抗体药物的二硫键连接进行确认

应用简报

制药行业

作者

左帅
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文介绍了使用 Agilent 6530 Q-TOF 采集肽段数据，采用整合有 BioConfirm 的 MassHunter 定性软件，通过软件中的蛋白酶解产物比较功能 (Compare Protein Digest Files)，实现了对单克隆抗体药物中二硫键连接的确证。此方法无需对样品进行额外的标记，仅通过对还原和非还原组样品的一级质谱进行比对，即可实现对样品二硫键连接的确认。



Agilent Technologies

前言

二硫键 (S-S 键) 是通过蛋白质中两个半胱氨酸上的巯基 (-SH) 氧化而形成的, 在稳定蛋白质构象和保持其活性方面起着重要的作用。抗体药物中二硫键的排布是对其结构特性的一种反映, 因此二硫键连接形式的确认成为抗体药物结构确认过程中非常重要的一环。本文介绍了使用 Agilent 6530 Q-TOF 采集肽段数据, 采用整合有 BioConfirm 的 MassHunter 定性软件, 通过软件中的蛋白酶解产物比较功能 (Compare Protein Digest Files), 实现了对单克隆抗体药物中二硫键连接的确证。本文采用一级质谱比对的方法对抗体药物的二硫键连接进行确认。在通常的肽段质谱分析中, 一级质谱的信号明显强于二级质谱。且以二硫键连接的肽段通常会含有两条甚至两条以上的肽段, 其二级质谱较为复杂。因此, 使用一级质谱进行二硫键连接肽段的分析更容易被软件识别和匹配, 避免了对其复杂二级碎片的识别和鉴定。

实验部分

试剂

盐酸胍 (Sigma, G4505), N- 乙基马来酰亚胺 (Fluka, 04260), 二硫苏糖醇 (Fluka, 43819), 碘乙酰胺 (Sigma, I1149), 碳酸氢铵 (Sigma, 09830), 超滤管 (Millipore, Amicon Ultra-0.5 mL 10K)

仪器

实验在 Agilent UHPLC/Q-TOF 系统上进行, 该系统包括 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和双喷雾 AJS 源 (正模式) 的 Agilent 6530 精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统。

样品制备

取 40 µg 单克隆抗体药物溶解于 25 µL 的 6 mol/L 盐酸胍中, 加入 1 µL 100 mmol/L pH 6.6 的 N- 乙基马来酰亚胺 (NEM), 使 NEM 的摩尔量为抗体样品中半胱氨酸残基含量的 5 倍, 37 °C 孵育 2 小时。将溶液调节至 pH 8, 并均匀分成两组, 分别为还原组和非还原组。在还原组样品中加入 3 µL 100 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 使 DTT 的最终摩尔量高于样品中半胱氨酸残基含量的 25 倍, 37 °C 孵育 1 小时。在还原组与非还原组样品中均加入 9 µL 100 mmol/L 碘乙酰胺 (IAM), IAM 的摩尔量为样品中半胱氨酸残基含量的 75 倍以上, 室温避光孵育 20 分钟。将两组样品溶液超滤, 使其盐酸胍浓度降低至 0.1 mol/L 以下, 并将缓冲液体系替换成 50 mmol/L 碳酸氢铵, 按胰酶: 蛋白 1:50 的比例加入胰蛋白酶, 37 °C 过夜酶解。

实验条件

采用相同的反相液相色谱 - 质谱条件, 对胰蛋白酶消化的 DTT 还原和非还原的单克隆抗体药物的酶解多肽溶液分别进行分离和检测。

反相液相色谱条件

色谱柱: AdvanceBio Peptide Map 色谱柱, 2.1×150 mm, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 653750-902)

流动相: A, 100% 水, 0.1% 甲酸
B, 100% 乙腈, 0.1% 甲酸

流速: 0.25 mL/min

梯度: 时间 (min)	% B
0	3
2	3
72	37
75	95
78	95
78.1	3

温度: 40 °C

质谱条件

气体温度: 325 °C

气体流速: 8 L/min

雾化气: 30 psi

鞘气温度: 325 °C

鞘气流速: 12 L/min

毛细管电压: 3500 V

喷嘴电压: 500 V

碎裂电压: 175 V

一级质谱扫描速率: 3 spec/s

一级质谱质量数范围: 200 m/z - 2500 m/z

二级质谱扫描速率: 3 spec/s

二级质谱质量数范围: 50 m/z - 3200 m/z

结果与讨论

二硫键连接会影响蛋白的折叠、结构和稳定性, 是治疗性蛋白药物活性相关的关键特征之一。为了保证单克隆抗体药物的质量, 需要对其二硫键连接进行确认。对于重组蛋白, 由于氨基酸序列和正确的二硫键连接已知, 因此对单克隆抗体二硫键连接方式的确认变得相对容易。单克隆抗体 IgG1 的典型二硫键连接方式如图 1^[1] 所示。

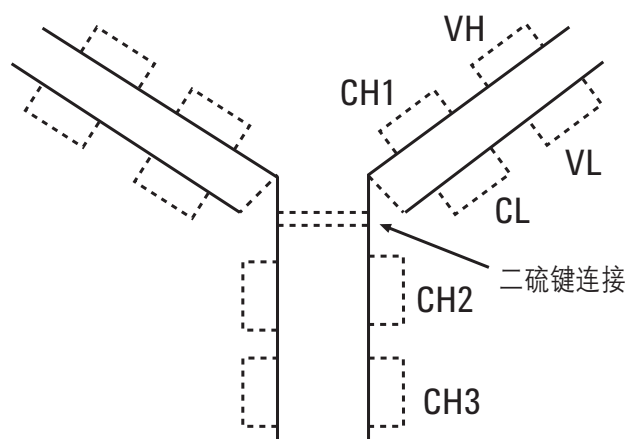


图 1. IgG1 抗体的典型二硫键连接示意图

本文以单克隆抗体药物为研究对象, 对其二硫键的连接进行确认。将样品均分成两组, 分别为还原组和非还原组。两组样品中均加入 NEM 封闭其中没有形成二硫键的自由半胱氨酸, 之后还原组样品通过加入 DTT 还原二硫键, 新裸露出来的巯基再通过 IAM 封闭; 非还原组样品不使用 DTT 还原, 保留二硫键连接。两组样品均使用胰蛋白酶进行酶解形成肽段后, 使用相同的色谱 - 质谱条件进行分离和检测。由于还原组样品中的二硫键已经被打断, 不存在二硫键连接肽段 (若 DTT 还原不完全, 有可能检测到少量的二硫键连接肽段)。因此, 在与非还原组样品中

二硫键连接肽段出峰的相同时间段处，还原组中应检测不到相应的肽段。通过对两组样品的质谱结果进行比对，就可以对样品中的二硫键连接进行确认。

图 2 是采用 MassHunter 定性软件中的 BioConfirm 肽段比较功能对两组样品进行平行比对的结果。通过肽段比对能够直观地看到，非还原组样品中检测到二硫键连接的肽

段信号，而相应保留时间处的还原组样品中却基本检测不到信号，从而对单克隆抗体药物的二硫键连接进行确认。图 3 展示了两组样品的提取化合物色谱图（为了简化色谱图，只提取了带电荷数在 3 以上的化合物离子）及镜像对比图，镜像图中标出了各二硫键连接肽段相应的保留时间。



图 2. 通过 BioConfirm 的肽段比对功能比较还原组样品与非还原组样品中的肽段信息

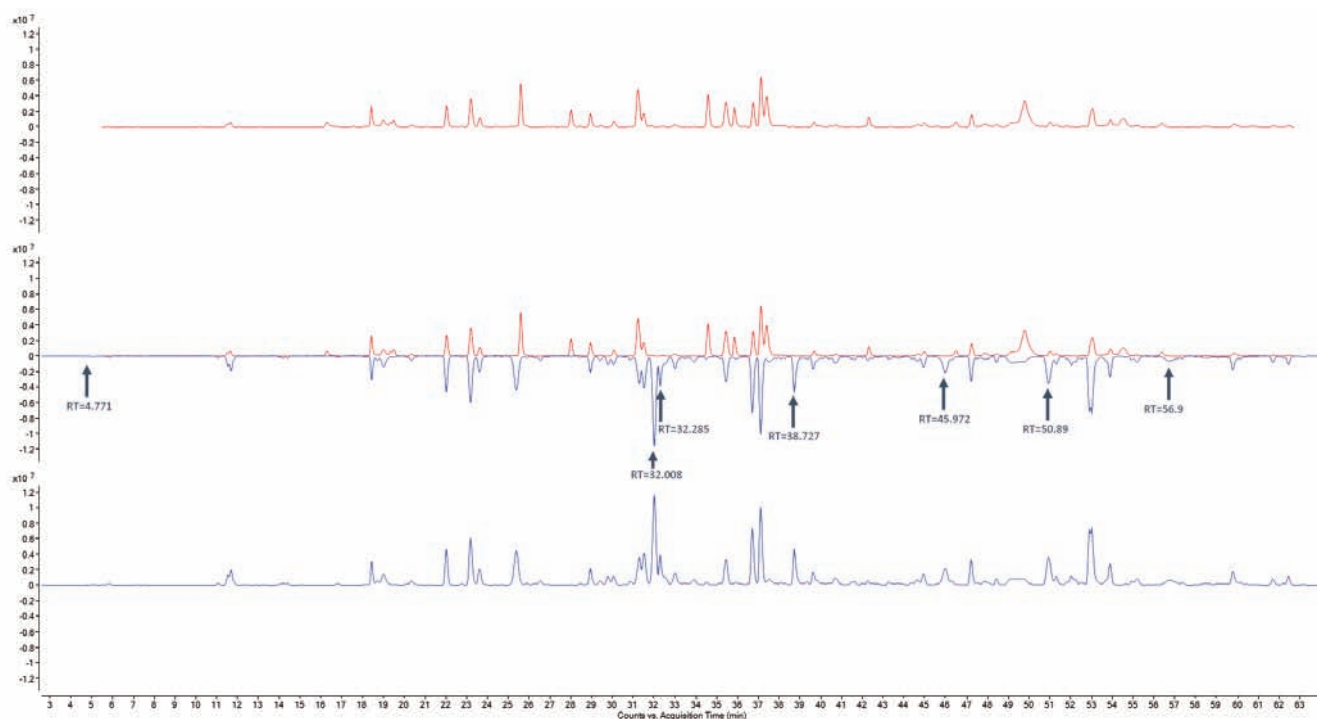


图 3. 还原组样品（上）与非还原组样品（下）的提取化合物色谱图及镜像对比图（中）

以其中一条二硫键连接肽段 **NQVSLTCLVK + WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK** 为例。**NQVSLTCLVK** 的理论分子质量为 **1103.60088 Da**，**WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK** 的理论分子质量为 **2743.23838 Da**，两条肽段的半胱氨酸上的巯基各脱一个氢形成二硫键，因此，此二硫键连接肽段的理论分子质量

为 **3844.82366 Da** ($1103.60088 + 2743.23838 - 2 \times 1.0078$)，其 6 电荷离子的质荷比为 **641.81**。分别对还原组样品和非还原组样品提取 **m/z 641.81**，可以明显看到该离子在两组样品中的变化（图 4）。非还原组样品可检测到 **m/z 641.81**，而还原组样品在相同保留时间处未检测到此离子，从而能够确定该二硫键连接肽段的存在。

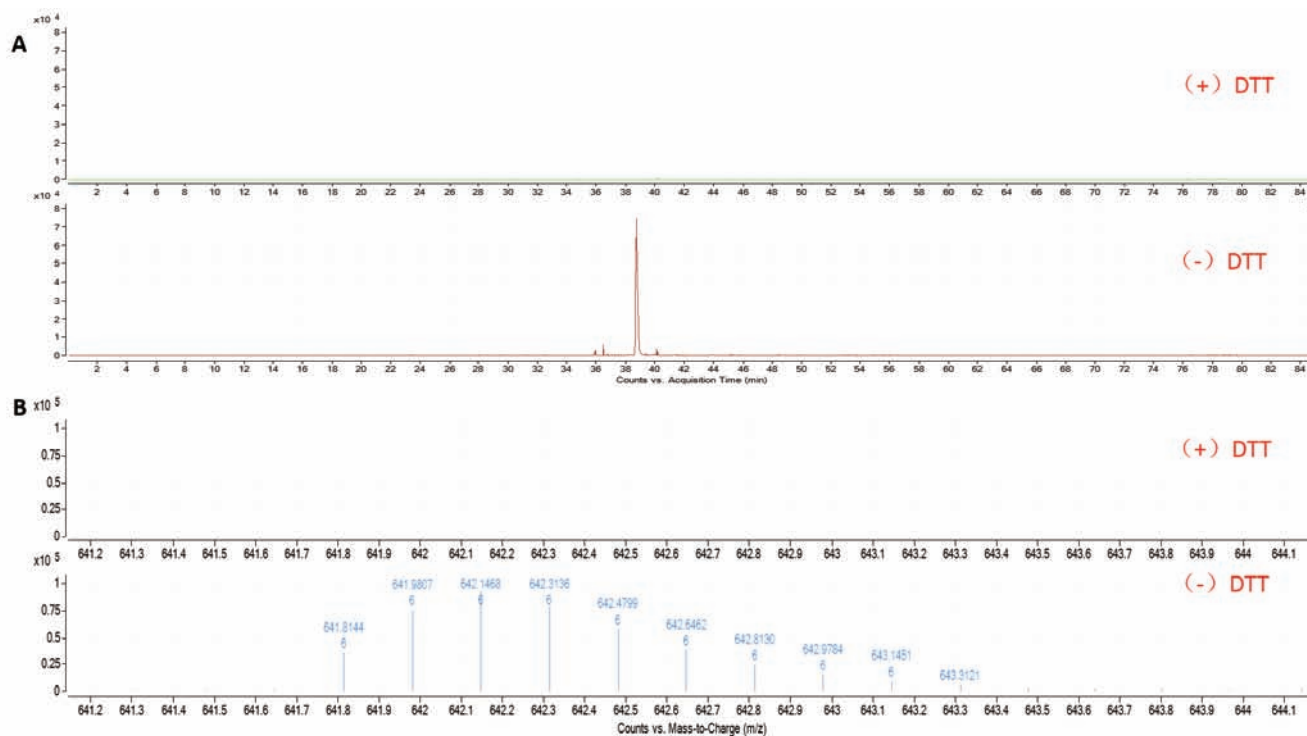


图 4. 含二硫键连接的肽段 NQVSLTCLVK + WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK 的 6 电荷离子 m/z 641.81 在两组样品中的 EIC 图 (A) 和相应质谱图 (B)

对于不含二硫键连接的肽段，在两组样品的一级质谱中并没有显著差异。如图 5 所示为不含二硫键连接的肽段 VDNALQSGNSQESVTEQDSK 的 3 电荷离子 m/z 712.66 的提取离子色谱图 (EIC 图) 与质谱图。

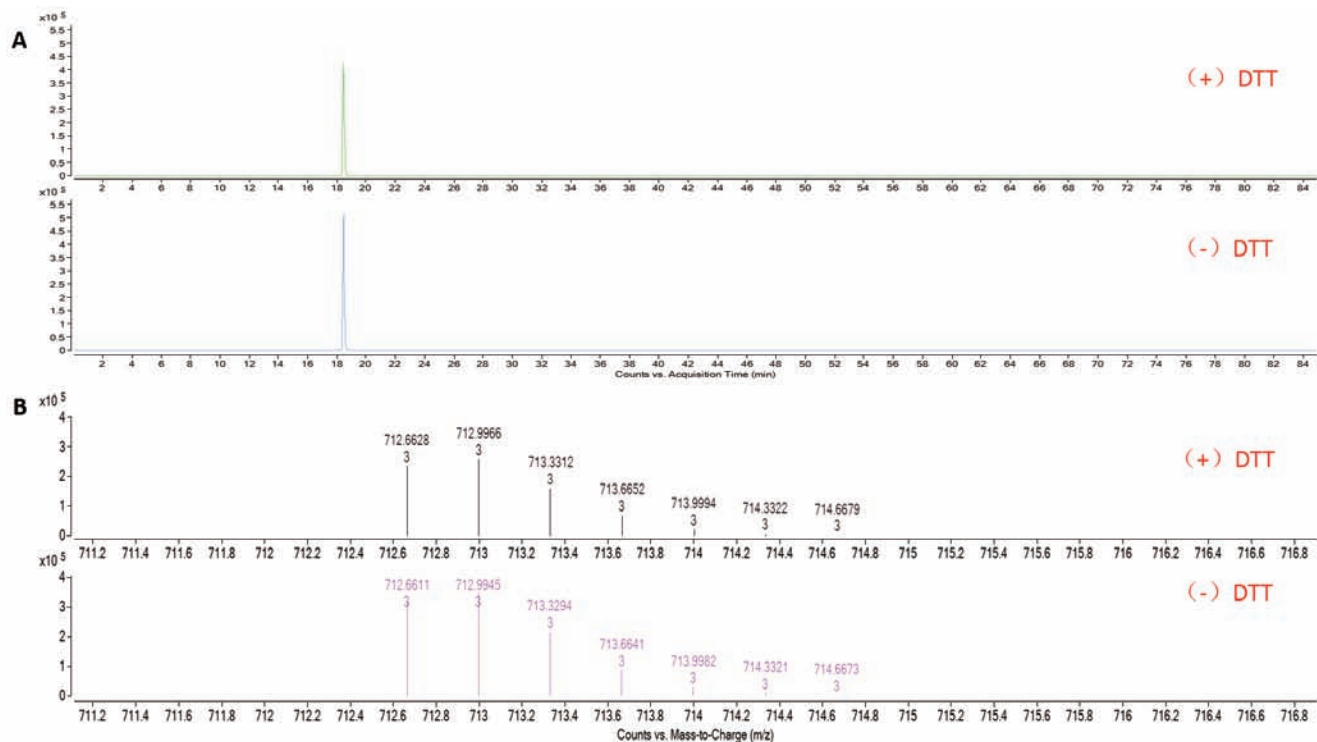


图 5. 不含二硫键连接的肽段 VDNALQSGNSQESVTEQDSK 的 3 电荷离子 m/z 712.66 在两组样品中的 EIC 图 (A) 和相应质谱图 (B)

结论

本文所述方法无需对单克隆抗体药物样品进行额外的标记, 仅通过对还原组和非还原组样品的一级质谱进行比对, 即可实现对样品二硫键连接的确认。Agilent MassHunter BioConfirm 数据分析软件能够根据蛋白的理论二硫键连接, 通过一级质谱自动进行查找和匹配, 同时软件的样品肽段比较功能, 能够轻易地找到两组样品之间的差异, 从而实现对蛋白二硫键连接的快速确认。需要注意的是, 该方法无法辨别两条肽间含有两对以上二硫键的连接方式, 或一条肽含有 3 个以上的半胱氨酸时二硫键的连接方式。此方法简单易用, 能够快速确认蛋白的理论二硫键连接, 但尚不能自动查找蛋白中二硫键的错配。使用柱后部分还原的方法, 能够一定程度上预测错配的二硫键^[2]。

文献

1. Disulfide bond assignment of an IgG1 monoclonal antibody by LC-MS with post-column partial reduction, *Analytical Biochemistry*, 436 (2013) 93–100
2. Liquid chromatography and mass spectrometry with post-column partial reduction for the analysis of native and scrambled disulfide bonds, *Analytical Biochemistry*, 439 (2013) 184–186

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com.cn

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 7 月 10 日出版

出版号：5991-6068CHCN



Agilent Technologies