

提高 PTM 分析中肽谱分离的质量

应用简报

生物治疗药物和生物仿制药

作者

Suresh Babu C.V.
安捷伦科技公司

前言

单克隆抗体 (mAb) 等蛋白质的翻译后修饰 (PTM) 是确定药品有效性和安全性的关键质量属性 (CQA)。分析技术的进步加快了 PTM 表征这项艰巨任务的速度。在生物制药行业，肽谱分析是蛋白质鉴定的常用方法。其中包括通过酶解生成肽片段，然后进行液相色谱 (LC) 分离、检测和肽段鉴定。肽谱分析与质谱 (MS) 检测联用，可鉴定单个氨基酸变化和 PTM。LC/MS 是 PTM 分析的首选技术。但由于蛋白质酶解物较为复杂，肽谱分离始终是一项具有挑战性的工作。高分离度和可靠的肽谱分离是可靠鉴定 PTM 的关键。目前的 LC/MS 方法中，采用质谱兼容的甲酸 (FA) 离子对试剂法，信号强度要优于其他改性剂。但 FA 的缺点是，与多种 C18 固定相配合使用时峰形较宽并会出现拖尾峰，从而导致肽对发生共洗脱。表征 PTM 时，需要对复杂的胰蛋白酶酶解物中经过修饰和未经修饰的肽进行高分离度液相色谱分离。肽保留和 MS 信号分别会受到所选反相液相色谱柱和流动相离子对试剂的影响。因此，选择正确的液相色谱柱对于提高含 PTM 肽的分离度至关重要。



Agilent Technologies

我们之前的研究证明，使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱可提高肽的分离度 [1]。这款色谱柱的特点是表面带正电荷以及采用 C18 固定相，能够高效分离肽，获得较窄的峰形。在本研究中，我们评估了 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对含 PTM 肽的分离效果。将这款新型电荷杂化/C18 杂化表面多孔色谱柱与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统联用，可对治疗性 mAb 进行肽谱分析。AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱性能卓越，可实现高效肽谱分离，而且质量准确度高，能够生成序列覆盖率高的 mAb 肽谱。

材料

曲妥单抗购自当地药房，并遵照制造商的使用说明进行储存。DL-二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAA)、甲酸 (FA) 和 LC/MS 级溶剂购自 Sigma-Aldrich。高品质测序级胰蛋白酶来自安捷伦科技公司。

胰蛋白酶消化

在用胰蛋白酶酶解 mAb 前，先在变性条件下（盐酸胍）对二硫键进行还原 (DTT) 与烷基化 (IAA)。这一预处理可确保 mAb 彻底变性、溶解并使蛋白酶能够与目标底物有效接触。还原和烷基化步骤完成后，将溶液 pH 调至 pH 7–8 并由胰蛋白酶酶解（蛋白质:蛋白酶 20:1 (w/w)），在 37 °C 下温育过夜。然后或立即采用 LC/MS 分析样品，或使用前于 -80 °C 下储存。使用公式 1 计算相对修饰率。

$$\text{相对修饰百分比} = \frac{(\sum \text{经修饰肽离子的峰面积})}{(\sum \text{经修饰肽离子的峰面积}) + (\sum \text{未经修饰肽离子的峰面积})} \times 100$$

公式 1.

液相色谱条件

参数	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
色谱柱:	Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.1 × 150 mm, 2.7 μm, 120 Å (部件号 675950-902)
进样量:	1 μL (1 μg/μL)
样品恒温箱:	5 °C
流动相 A:	0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B:	0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度:	0 分钟 → 3% B 1 分钟 → 3% B 31 分钟 → 40% B 33 分钟 → 95% B 34 分钟 → 95% B 34.1 分钟 → 3% B
停止时间:	34.1 分钟
后运行时间:	5 分钟
柱温:	55 °C
流速:	0.5 mL/min

质谱条件

参数	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
离子模式:	正离子模式, 双 AJS ESI (profile)
干燥气温度:	325 °C
干燥气流速:	13 L/min
鞘气温度:	275 °C
鞘气流速:	12 L/min
雾化器压力:	35 psi
毛细管电压:	4000 V
碎裂电压:	175 V
锥孔电压:	65 V
Oct RF Vpp:	750 V
采集参数 MS 模式	
数据在扩展的动态范围内采集	
MS 质量数范围:	100–1700 m/z
MS/MS 质量数范围:	50–1700 m/z
MS 扫描速率 (质谱图/秒):	8
MS/MS 扫描速率 (质谱图/秒):	3
斜升的碰撞能量	电荷态 斜率 偏移
	2 3.1 1
	3 及 3 以上 3.6 -4.8
数据分析	Agilent BioConfirm 软件 B.08.00

仪器

液相色谱系统

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，包括：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B)

质谱系统

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

结果与讨论

肽谱分析

采用 LC/MS 分析 mAb 胰蛋白酶酶解物。图 1A 展示的是使用 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱鉴定出的肽色谱图。所有肽均在前 23 分钟内检出，且峰间分离度较高。利用分子特征提取 (MFE) 和 BioConfirm 序列编辑器将通过 LC/MS 分析得到的肽质量数与理论酶解物进行匹配，该酶解物与抗体序列中首选修饰间的误差不超过 5 ppm。BioConfirm 分析结果表明序列覆盖率达 99.26%。AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱的

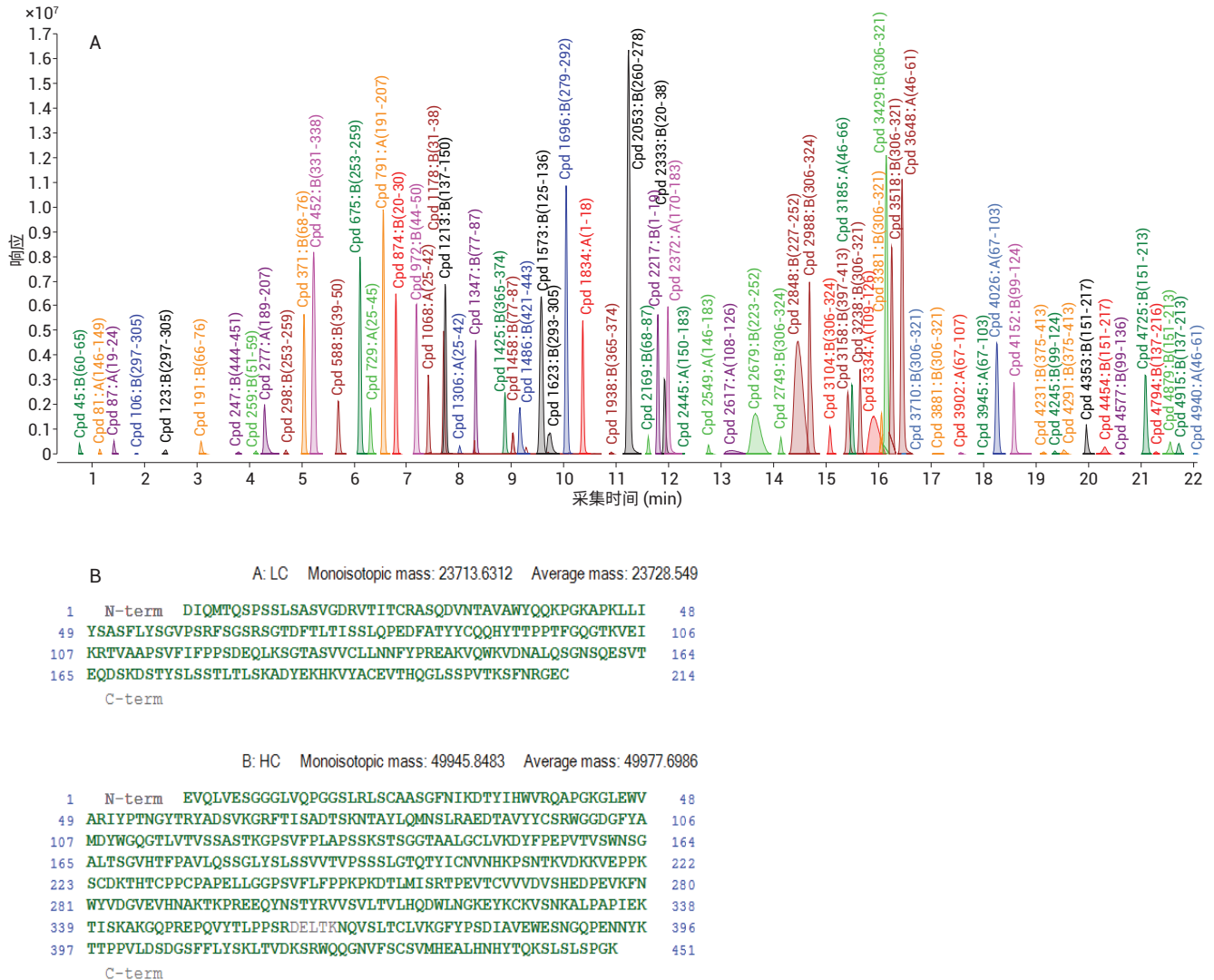


图 1. A) 使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱得到的已鉴定多肽的提取化合物叠加色谱图。

B) Agilent Bioconfirm 分析提供的重链和轻链序列覆盖 (99.26%) 图。匹配肽以绿色标示

性能提升所带来的高分离度和高分离效率配合高准确度 MS，能够鉴定多数 mAb 胰蛋白酶酶解肽。图 1B 为 BioConfirm 软件窗口中重链和轻链详细序列覆盖率的截图。方法的稳定性按 mAb 胰蛋白酶酶解物的五次连续重复进样（每次进样 1 µg）结果进行评估。每次运行的序列覆盖率如表 1 所示。结果表明，每次运行时序列覆盖率都有较高的重现性。

表 1. 序列覆盖图的重现性

重复次数	序列覆盖率 (%)
第 1 次重复进样	99.26
第 2 次重复进样	98.89
第 3 次重复进样	98.35
第 4 次重复进样	99.10
第 5 次重复进样	97.29

分析 mAb 胰蛋白酶酶解物时，更大的挑战在于样品复杂性。含 PTM 的肽仅占胰蛋白酶解混合物中的小部分，其信号常被主要肽所掩盖。因此，对这些复杂酶解

物的分离就成为了鉴定全部含 PTM 肽的关键。后面的章节中，将评估 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对氧化、脱酰胺化和糖基化等 PTM 的分离和鉴定性能。

氧化

甲硫氨酸 (Met 或 M) 氧化是 mAb 的一种常见 PTM。氧化速度和范围取决于工艺和储存条件。重链区的 DLTMISR 肽最易发生氧化。图 2A 为氧化和未氧化的 DLTMISR 肽的分离结果。Met 氧化会降低肽的疏水性，从而导致提前洗脱。16 分钟处的峰对应的是与天然肽完全分离的氧化形式。19 分钟处的峰表明 DLTMISR 肽尚未完全氧化。色谱柱对上述两种形式的分离性能完全足以计算出相对氧化百分比，为 1.6%。图 2B 为修饰和未经修饰的 DLTMISR 肽的代表性 MS/MS 谱图。y₄ 与 y₅ 离子质量数的比较结果表明，修饰肽的质量数增加 16 Da 左右，表明发生了 Met 氧化。

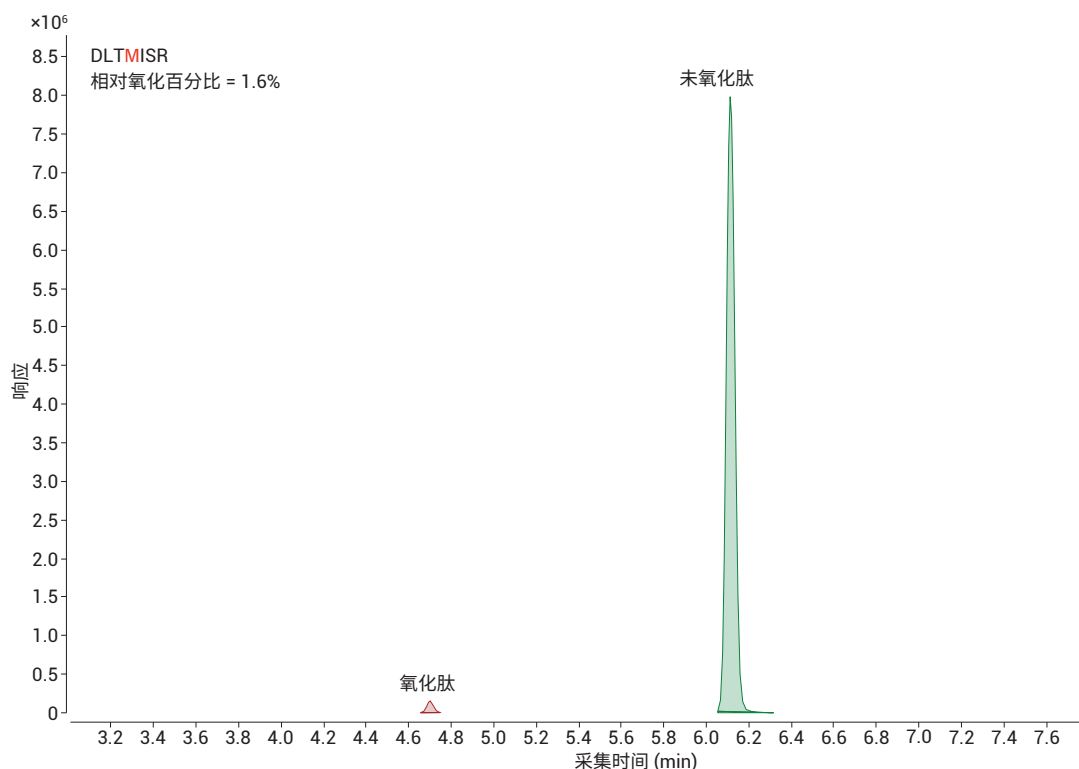


图 2A. 显示 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对未氧化和氧化 DLTMISR 肽分离结果的提取化合物叠加色谱图

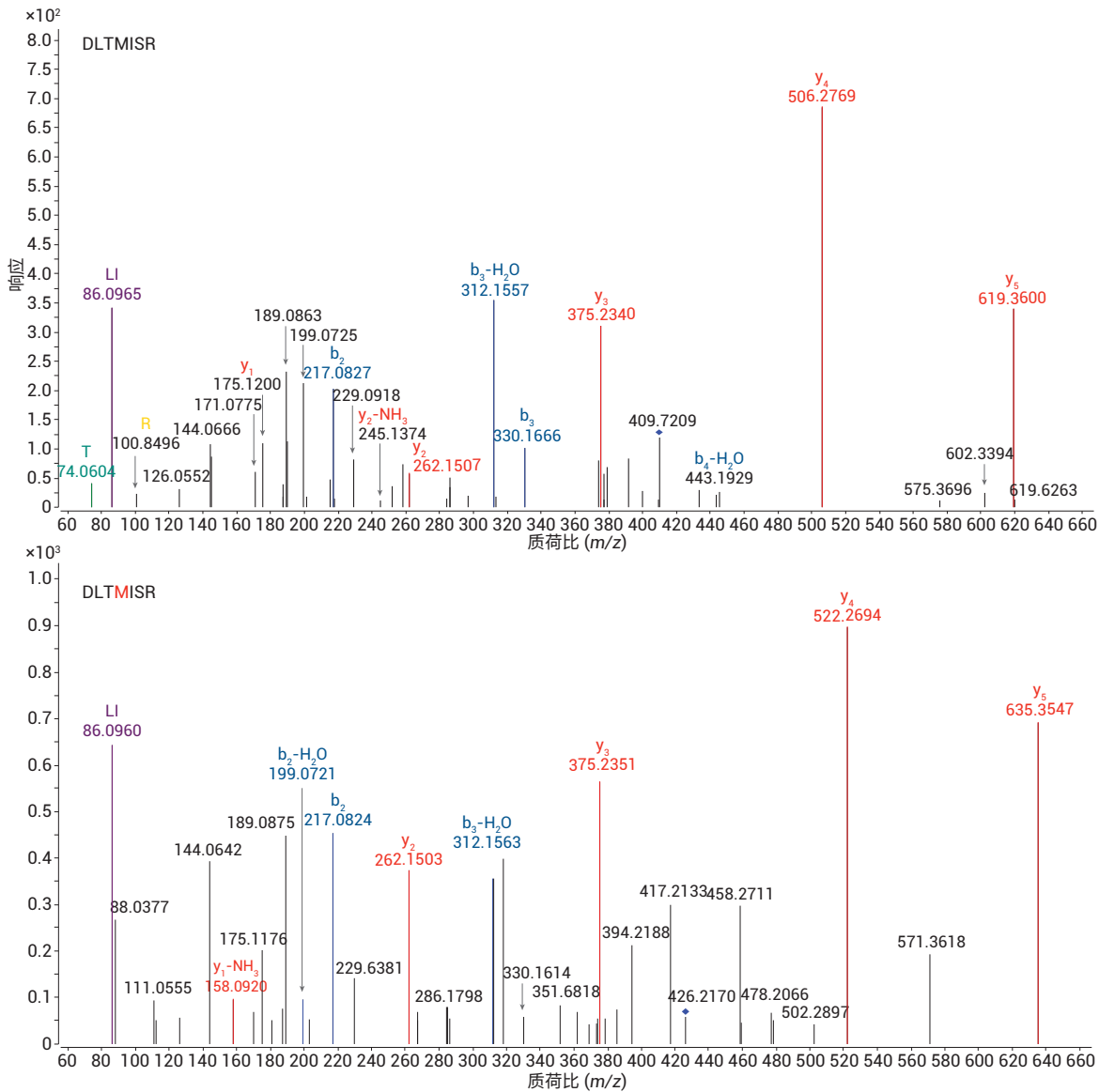


图 2B. 未氧化（上图）和氧化（下图）DLTMISR 肽的 MS/MS 谱图

脱酰氨基化

脱酰氨基化是最常见的蛋白质修饰，也是 mAb 生物药物生产过程中重点关注的问题。天冬酰胺（Asn 或 N）残基的脱酰氨基化会在蛋白质上引入带负电的官能团，从而使 Asn 变为酸性异构体天冬氨酸（Asp 或 D）和异天冬氨酸（isoAsp）。谷氨酰胺（Gln 或 Q）残基也会通

过脱酰氨基化变为谷氨酸（Glu 或 E），但转化速度远低于 Asn。脱酰氨基化会导致 +0.98 Da 的偏移，这一点可通过 MS 得到鉴定。但要通过 MS 来鉴别同分异构的脱酰氨基化产物却十分困难。肽中 isoAsp 与 Asp 残基的结构差异会改变反相分离的保留时间，因此这一保留时间偏移可用于归属肽段修饰。

例如，图 3 显示了两个代表性肽对的脱酰氨基化和未脱酰氨基化形式的分离结果。NTAYLQMNSLR 肽的多个位点均出现了不同程度的脱酰氨基化。AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱能够将所有的脱酰氨基化形式与天

然形式分离开，证明了这款色谱柱强大的分离能力。而 NTAYLQMNSLR 肽的相对脱酰氨基化百分比为 15.9%–0.21%。图 4B 为脱酰氨基化和未脱酰氨基化 NTAYLQMNSLR 肽的代表性 MS/MS 谱图。

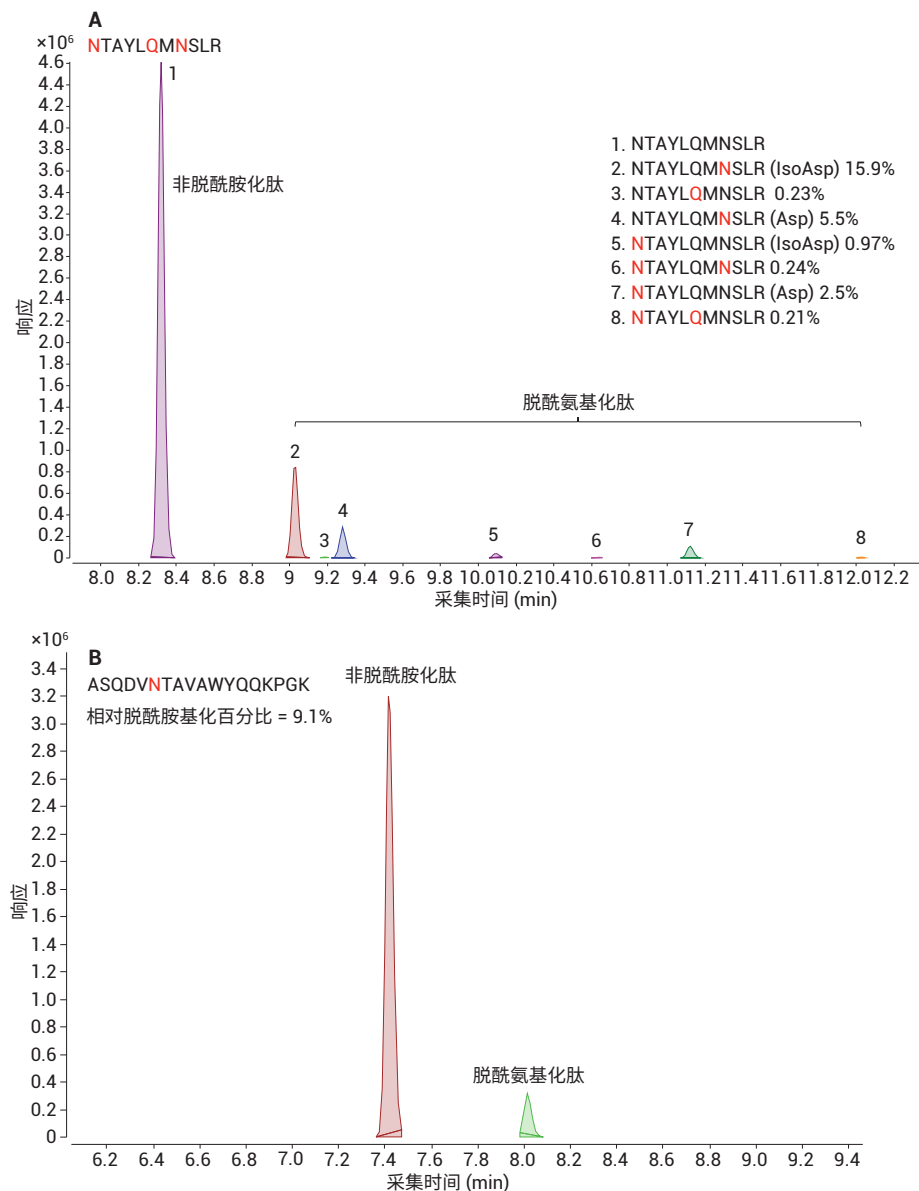


图 3A. 显示 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱对未脱酰氨基化和脱酰氨基化肽分离结果的提取化合物叠加色谱图。经过修饰的位点以红色标示

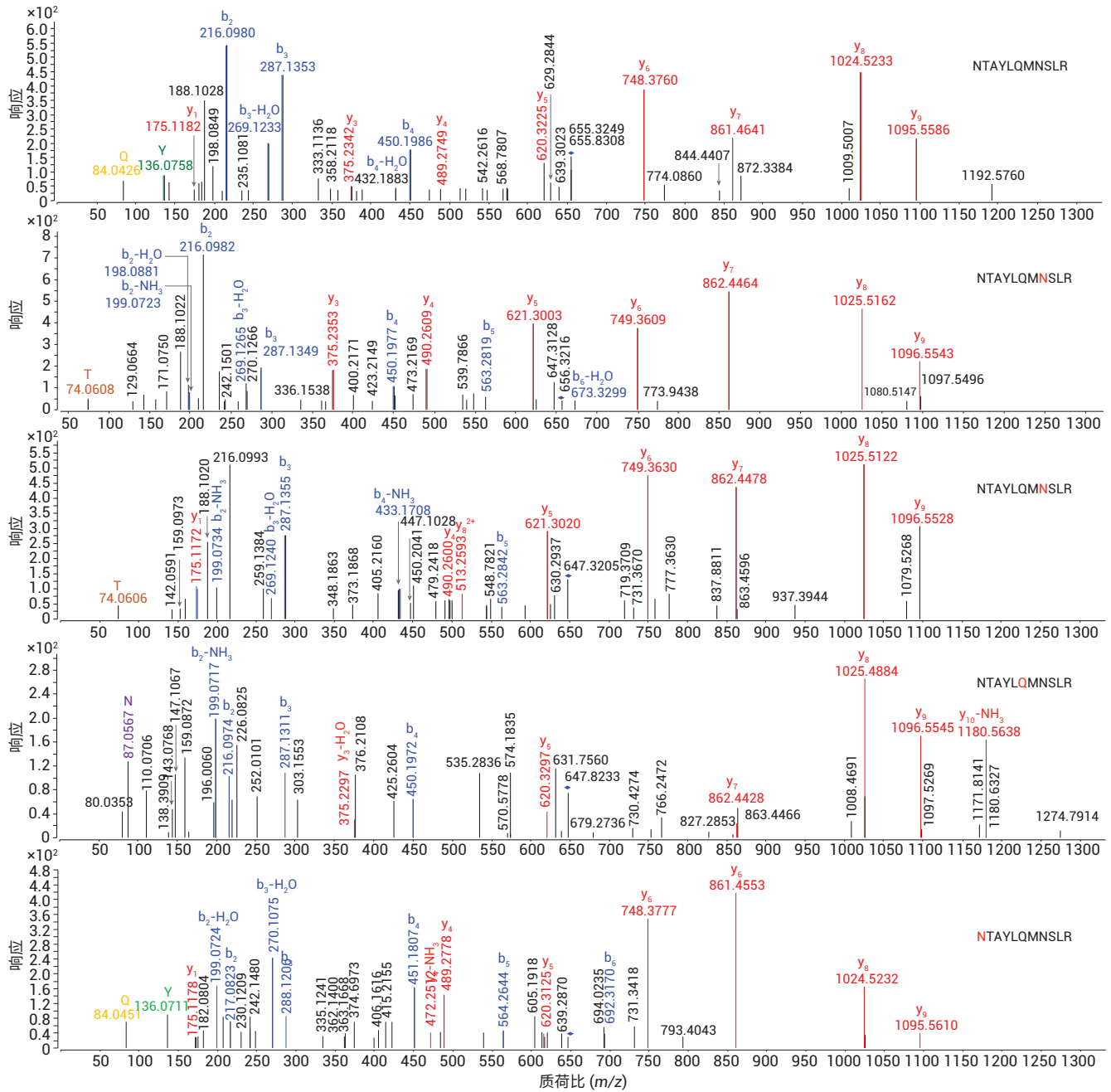


图 3B. 未脱酰氨基化和脱酰氨基化 NTAYLQMNSLR 肽的 MS/MS 谱图

糖基化

糖基化是表征 mAb 的重要质量控制参数。糖基化会产生肽骨架相同但糖链结构不同的糖型混合物。N-连接糖基化主要发生在肽序列的 NXT/S 基序中。由不同的单岩藻糖基化糖链或复合岩藻糖基化糖链的组合体现出糖基化异质的复杂性。关键在于将上述糖型分离开来，以了解结构与功能之间的关系。图 4A 是使用 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱分离糖基化和未糖基化 EEEQYNSTR 肽得到的结果。MS 分析鉴定出 EEEQYNSTR 肽的多种糖型 (G0、G1F、G0F 和 G2F)，这些糖型均与天然肽完全分离。糖肽在反相条件下几乎无保留并会密集洗脱，这与预期相同。采用基于 EIC 峰面积的相对百分比之和进行定量分析。各糖基化种类的整体分布结果为：G0 6.1%、G1F 47%、G0F 39% 和 G2F 7.3%。图 4B 为 BioConfirm 给出的糖肽匹配结果，质量准确度 < 5 ppm。

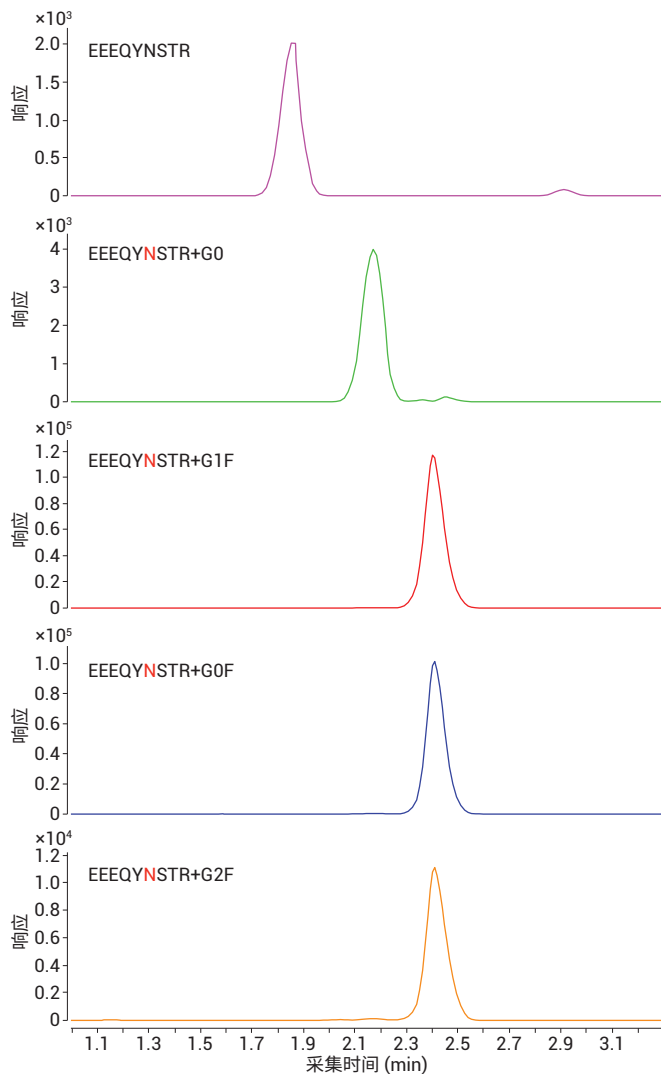


图 4A. 各 m/z 的提取离子色谱图，其比值与糖基化和未糖基化 EEEQYNSTR 肽段相称

General					Sequence Match				Molecular Feature	
Label	m/z	RT	Height	Tgt Seq Mass	Sequence	Pred Mods	Diff (Bio, mDa)	Vol		
Biomolecule 158: B(297-305)	595.2595	1.859	1873	1188.5047	EEQYNSTYR		-0.03	12727		
Biomolecule 165: B(297-305)	829.9992	2.172	2624	2486.9807	EEQYNSTYR	1*G0 (NGA2)(+1298.475971)B301	-6.73	52349		
Biomolecule 192: B(297-305)	932.7057	2.403	23019	2795.0914	EEQYNSTYR	1*G1F(+1606.586706)B301	4.02	401877		
Biomolecule 205: B(297-305)	878.6872	2.408	20598	2633.0386	EEQYNSTYR	1*G0F (NGA2F)(+1444.533881)B301	3.48	332787		
Biomolecule 214: B(297-305)	986.7226	2.409	5146	2957.1443	EEQYNSTYR	1*G2F (NA2F)(+1768.639531)B301	0.24	62854		

图 4B. 显示糖基化和未糖基化 EEEQYNSTR 肽段详细信息的 Agilent BioConfirm 窗口

结论

- 本应用简报展示了使用 Agilent AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱能够实现稳定可靠的肽谱分析
- 在高分离度且高效分离 mAb 肽谱的同时，序列覆盖率 > 99%
- AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱能够很好地分离出肽峰，从而显著提升肽谱分离效果
- 使用 AdvanceBio Peptide Plus 色谱柱配合安捷伦精确质量数 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，可实现对 PTM 的精确表征

参考文献

1. Suresh Babu C. V. *LC/MS analysis of peptide mapping with formic acid ion-pairing agent* (利用甲酸离子对试剂进行 LC/MS 肽谱分析); 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-7979EN, **2017**

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

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/chem/peptidemapping

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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，2017
2017年5月5日，中国出版
5991-8046ZHCN



Agilent Technologies