

Performance chromatographique en progrès dans la cartographie peptidique

Utilisation de la colonne inerte Altura ZORBAX
Eclipse Plus C18

Auteurs

Jordy Hsiao, Mahsan Miladi,
Li Gu, Stephen Sciuto,
Guannan Li et
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Cette étude met en valeur les performances avantageuses de la colonne inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 pour la cartographie peptidique. Comparée à une colonne en inox, la colonne Altura améliore la forme de pic, la reproductibilité et la résolution, particulièrement pour les peptides hydrophobes et modifiés. Dans l'analyse par LC/MS des peptides mAb synthétiques et de l'Herceptin digéré par la trypsine, la colonne inerte a permis une identification en toute confiance des modifications post-traductionnelles, avec des formes de pic et une résolution améliorées pour les peptides désamidés. La séparation améliorée des variantes désamidées démontre la valeur de la colonne pour les solutions biopharmaceutiques nécessitant une sensibilité et une précision élevées.

Introduction

La cartographie peptidique est une technique essentielle dans le développement biopharmaceutique. Elle sert à confirmer les séquences de protéines et à identifier les modifications post-traductionnelles (MPT). Cependant, les interactions entre les analytes et les surfaces métalliques du système de chromatographie en phase liquide (LC) peuvent compromettre la sensibilité et la résolution, particulièrement pour les peptides chargés ou phosphorylés. Des études récentes ont souligné l'importance de la désactivation des circuits analytiques et des colonnes pour réduire ces défis.^{1,2}

Dans une étude précédente, une méthode de cartographie peptidique qui utilisait la colonne Agilent AdvanceBio Peptide Mapping a été optimisée pour réduire le temps d'analyse de 2,5 heures à 1 heure en tirant profit des particules de moins de 2 µm de la colonne ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 et un système UHPLC.³ Malgré la réduction importante du temps d'analyse, des modèles d'élution de peptides comparables ont été observés entre la Colonne Agilent AdvanceBio Peptide Mapping et la colonne ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, garantissant la transférabilité des méthodes et des résultats analytiques homogènes sur plusieurs technologies de colonnes différentes. Cette amélioration permet un débit d'échantillon plus élevé et réduit la consommation de solvant sans compromettre les performances.

Pour améliorer encore plus les performances, les colonnes inertes Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 incorporent la technologie Ultra Inert conçue pour minimiser les interactions des analytes avec le métal, tout en conservant la résistance mécanique de l'inox. Dans cette étude, nous comparons les performances des colonnes inertes Altura à celles des colonnes en inox conventionnelles à l'aide des systèmes LC Agilent 1290 Infinity II Bio et LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT pour l'analyse par LC/MS/MS des peptides synthétiques et des échantillons d'anticorps monoclonaux (mAb) digérés.

Méthode expérimentale

Préparation d'échantillons

L'Herceptin a été digéré avec de la trypsine suivant un protocole⁴ décrit précédemment, avec des modifications. Spécifiquement, la digestion a été effectuée avec de la trypsine et avec un rapport protéine-enzyme de 50:1. Dans le protocole précédent, de la trypsine/LysC a été utilisé avec un rapport protéine-enzyme de 25:1 sans étape de purification des échantillons.

Avant l'analyse par LC/MS, les échantillons ont été purifiés avec une cartouche de centrifugation C18 pour éliminer les impuretés et ainsi améliorer la longévité de la colonne.

Colonnes analytiques

Colonne Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18
2,1 mm x 150 mm, 1,8 µm, (réf. 959759-902)

Colonne inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18,
2,1 mm x 150 mm, 1,8 µm (réf. 204215-308)

Instruments

Les analyses LC/MS ont été réalisées avec la configuration instrumentale suivante :

- Pompe Bio High-Speed Agilent 1290 Infinity II (G7132A)
- Multisampler Bio Agilent 1290 Infinity II avec thermostat d'échantillon (G7137A)
- Thermostat multicolonne Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT (G6549AA)

Tableau 1. Paramètres LC

Système LC Bio Agilent 1290 Infinity II		
Paramètre	Valeur	
Phase mobile A	Eau avec acide formique à 0,1 %	
Phase mobile B	Acétonitrile avec acide formique à 0,1 %	
Température de colonne	60 °C	
Débit	0,4 mL/min	
Température d'échantillonneur	8 °C	
Gradient 1 pour les peptides synthétiques	Temps (min)	%B
	0,00	2
	1,00	2
	7,00	38
	7,10	80
	9,00	80
	9,10	2
	14,0	2
Gradient 2 pour la digestion tryptique de Herceptin	Temps (min)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

Tableau 2. Paramètres de MS.

Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
Paramètre	Valeur
Source	ESI positif de source d'ionisation Jet Stream (AJS) DUAL
Source	
Température du gaz de séchage	250 °C
Débit du gaz de séchage	10 L/min
Température du gaz de gainage	250 °C
Débit de gaz de gainage	12 L/min
Pression du nébuliseur	25 psi
Tension capillaire	3 500 V
Tension de la buse	0 V
Fragmenteur	95 V
Cône écreteur	50 V

Paramètre	Valeur
Acquisition - MS	
Mode d'acquisition	Gamme dynamique étendue (2 GHz)
Gamme de masse	m/z 100 à 3 000
Taux de balayage	1 spectre/s
Masse de référence	121,0509, 922,0098
Acquisition - MS/MS	
Mode d'acquisition	MS/MS auto
Gamme de masse	m/z 100 à 3 000
Taux de balayage	3 spectres/s
Largeur d'isolement (MS/MS)	Moyenne (~4 uma)
Nombre maximum de précurseurs par cycle	5
Seuil en MS/MS	6 000 coups et 0,001 %
Précharge	2+, 3+, > 3+
Cible	50 000 coups/spectre

Tableau 3. Paramètres d'énergie de collision MS/MS.

Énergie de collision augmentée		
Charge	Pente	A1
2	3,1	1
3	3,6	-4,8
> 3	3,6	-4,8

Tableau 4. Logiciel Agilent MassHunter BioConfirm, paramètres de traitement de la version 12.1.

Processus et séquençages		
Processus	Digestion protéique	
Conditions	Réduit	
Séquences	Herceptin (directement alkylé), trypsine	
Modifications des variables	Désamidation, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, méthylation, oxydation (M, W), pyroGlu (E)	
Enzymes	Trypsine	
Recherche de peptides		
Filtres de biomolécules	Affichage des scans MS/MS contenant des molécules	Enabled (Activé)
Extraction	Utilisation de pics avec hauteur	≥ 600 coups
Espèces ioniques	Ions positifs	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
État de la charge	Modèle isotopique	Peptides
	Limitation des états de charge affectés à une plage de	1 à 5
Filtres de pics (MS/MS)	Filtres de hauteur, hauteur absolue activée	≥ 50 coups
Tolérances de correspondance		
Correspondance de masse	± 5 ppm MS1, ± 20 ppm MS2	
Score	Avertissement si le score est < 7,00	
	Ne pas mettre en correspondance si le score est < 5,00 (couverture de séquence)	
Règles de mise en correspondance	Type de fragmentation MS/MS	CID
	Nombre de clivages manqués	2
	Nombre maximal de correspondances par biomolécule	3
	Plage de longueurs de peptides	3 à 70
	Autoriser uniquement la troncation N-Term ou C-Term	Sélectionné
	Nombre maximum de modules	2

Résultats et discussion

Évaluation des améliorations chromatographiques permises par le matériau inerte de la colonne

Pour évaluer les avantages en matière de performances de la colonne inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 dans les processus de cartographie peptidique, nous l'avons comparée à la colonne en inox ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18. Un mélange de peptides synthétiques contenant des séquences mAb a été analysé à l'aide du système 1290 Infinity II Bio LC couplé à un LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT.

Initialement, la superposition des chromatogrammes d'ions extraits (figure 1) a montré des temps de rétention comparables sur les deux colonnes. Cependant, une inspection détaillée des peptides individuels a révélé des différences notables d'intensité de signal, de forme de pic et de résolution (figure 2). Par exemple, le peptide hydrophobe et basique VVSVLTVLHQDWLNGK a montré des pics plus larges et une intensité réduite du signal sur la colonne en inox par rapport à la colonne Altura. Cela suggère que des interactions entre l'analyte et le métal présent dans la colonne en inox peuvent avoir un impact négatif sur le rendement des échantillons et/ou les performances chromatographiques.

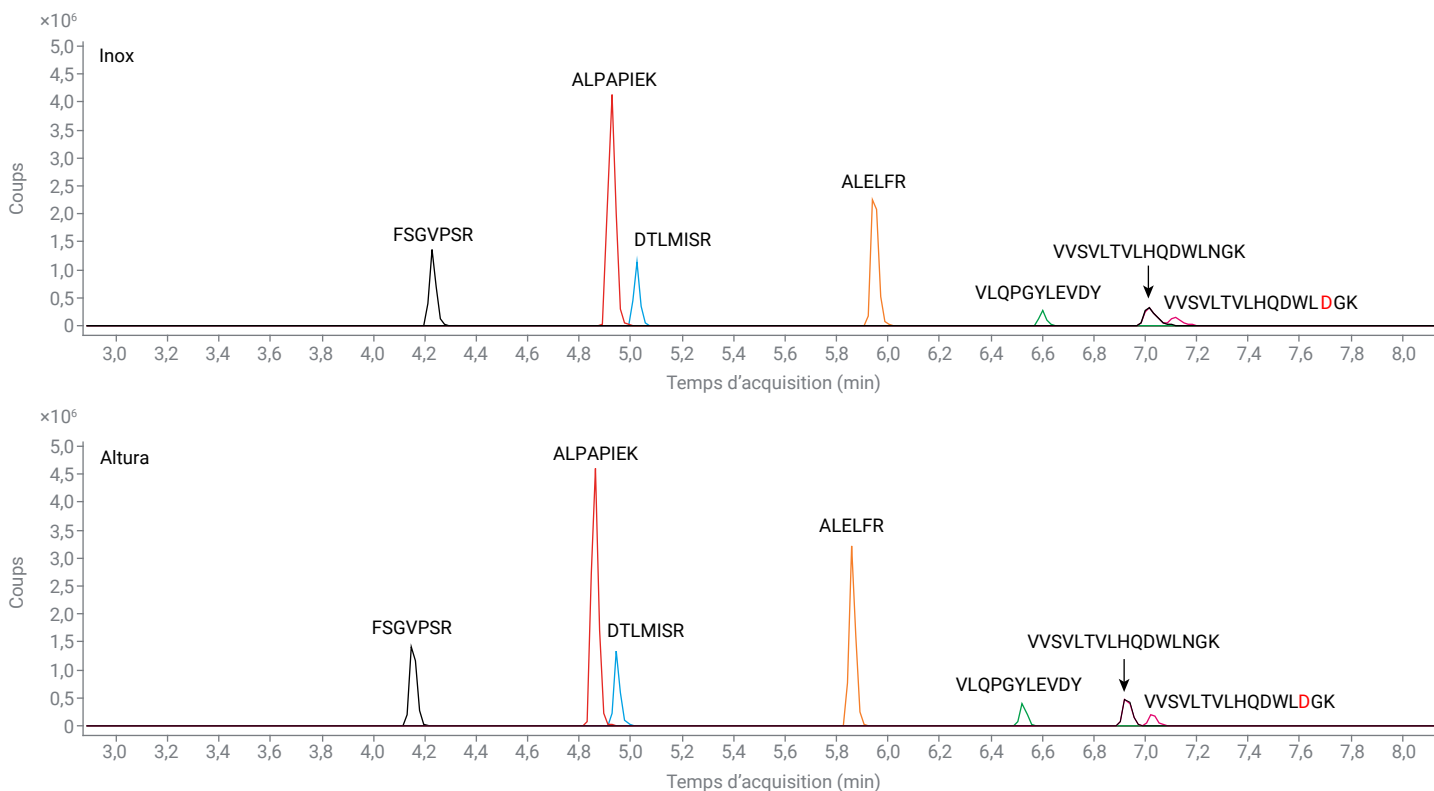


Figure 1. Séparation chromatographique de peptides d'anticorps monoclonal synthétiques utilisant de l'inox et le matériau de colonne inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18.

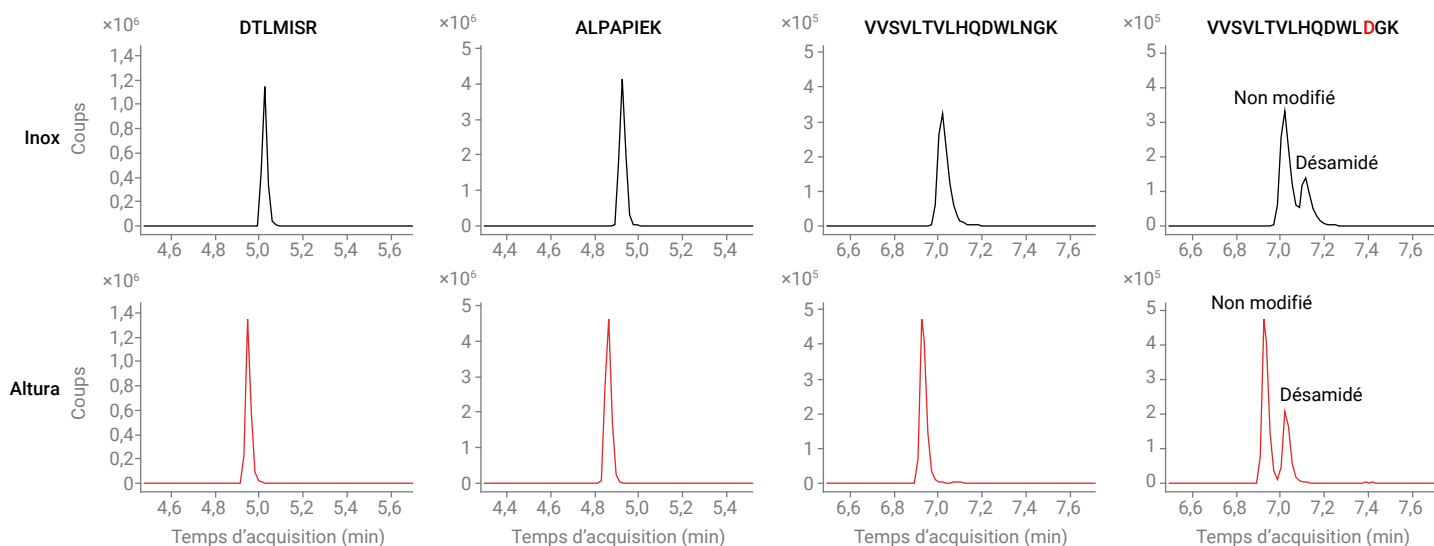


Figure 2. Forme de pic et résolution améliorées de peptides désamidés avec le matériau de la colonne inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 par rapport au matériau de la colonne en inox.

Une analyse plus poussée du variant désamidé VVSVLTVLHQDWLDGK, où l'asparagine à la position 14 est convertie en acide aspartique, a montré une séparation améliorée de son équivalent non modifié lors de l'utilisation de la colonne Altura. Cette meilleure résolution est particulièrement importante pour détecter les modifications post-traductionnelles et chimiques telles que la désamidation, qui représentent des attributs critiques de qualité devant être caractérisés dans le développement biopharmaceutique.

Pour évaluer l'ampleur du gain de performance apporté par le matériau de la colonne inerte, des colonnes neuves en inox et Altura ont été soumises à une seule injection de blanc pour un conditionnement rapide, suivie de 30 injections consécutives du mélange de peptides mAb synthétiques (figure 3). Ces résultats ont montré que la colonne en inox nécessitait au moins 10 injections pour obtenir un rendement de l'aire de pic pour ALPAPIEK et DTLMISR similaire à celui de la colonne Altura. Pour le peptide plus hydrophobe/basique VVSVLTVLHQDWLNGK, il a fallu pratiquement 20 injections pour que la colonne en inox offre les mêmes performances que la colonne Altura, mettant en évidence la stabilisation plus rapide et la reproductibilité supérieure de la colonne inerte.

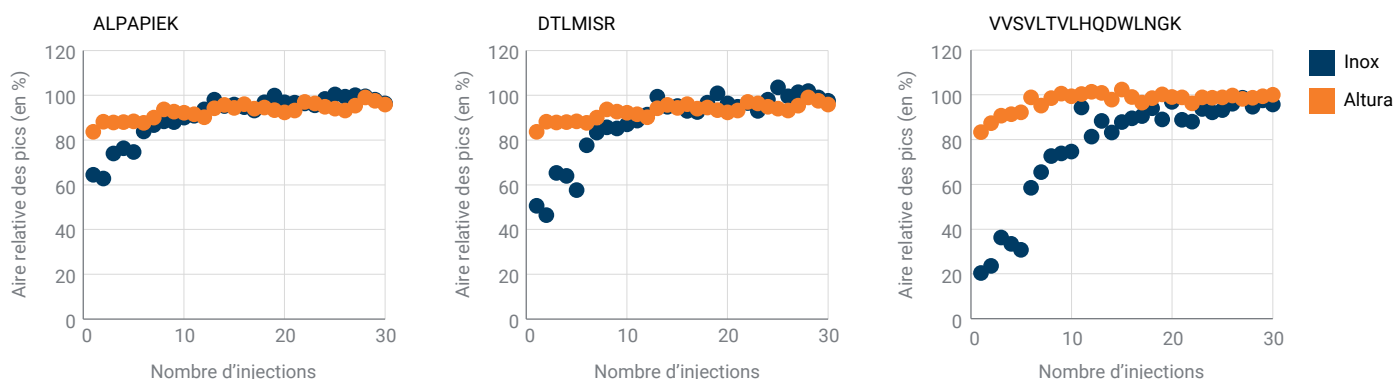


Figure 3. Comparaisons quantitatives pour des peptides synthétiques utilisant les colonnes en inox et Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 inerte. L'évolution de l'aire relative des pics est tracée sur 30 injections. Le matériau Altura montre une stabilisation plus rapide et une reproductibilité plus élevée par rapport à la colonne en inox, notamment pour les peptides hydrophobes et basiques.

Des indicateurs de performances chromatographiques, tels que le facteur de symétrie (TF), une métrique utilisée pour quantifier l'asymétrie des pics, ont corroboré ces résultats (figure 4). Les TF pour ALPAPIEK et DTLMISR étaient similaires entre les deux colonnes, indiquant des formes de pic comparables. Cependant, VSVLTVLHQDWLNGK a montré un bien meilleur TF avec la colonne Altura (TF moyen = 1,3, n = 30) par rapport à la colonne en inox (TF moyen = 1,7, n = 30). Cela correspond bien aux observations qualitatives de la figure 2 et suggère que le matériau inerte améliore la symétrie de pic pour les peptides compliqués.

Le suivi du TF au cours des 30 injections a montré que la colonne en inox s'était progressivement améliorée avec le conditionnement, finissant par s'approcher des performances de la colonne Altura. Néanmoins, une forme de pic initiale médiocre sur la colonne en inox a eu un impact négatif sur la séparation d'analytes éluant de manière rapprochée, comme le peptide désamidé VSVLTVLHQDWLDGK par rapport à l'équivalent non modifié. Comme indiqué dans la figure 4C, la colonne Altura a procuré une meilleure résolution entre ces variants, permettant une identification plus fiable dans la modification chimique.

Malgré l'utilisation d'un gradient relativement abrupt (6 %, B/min sur 6 minutes), la colonne Altura a permis une séparation supérieure. Ce résultat indique un potentiel d'optimisation supplémentaire en allongeant le gradient ou en réduisant sa pente pour améliorer encore plus la résolution. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que non seulement la colonne inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 améliore les performances chromatographiques pour la résolution de la MPT et de la modification chimique, mais elle prend aussi en charge un débit plus élevé d'échantillons et un meilleur profilage des impuretés, ce qui en fait un outil précieux pour des méthodes de cartographie peptidique robustes.

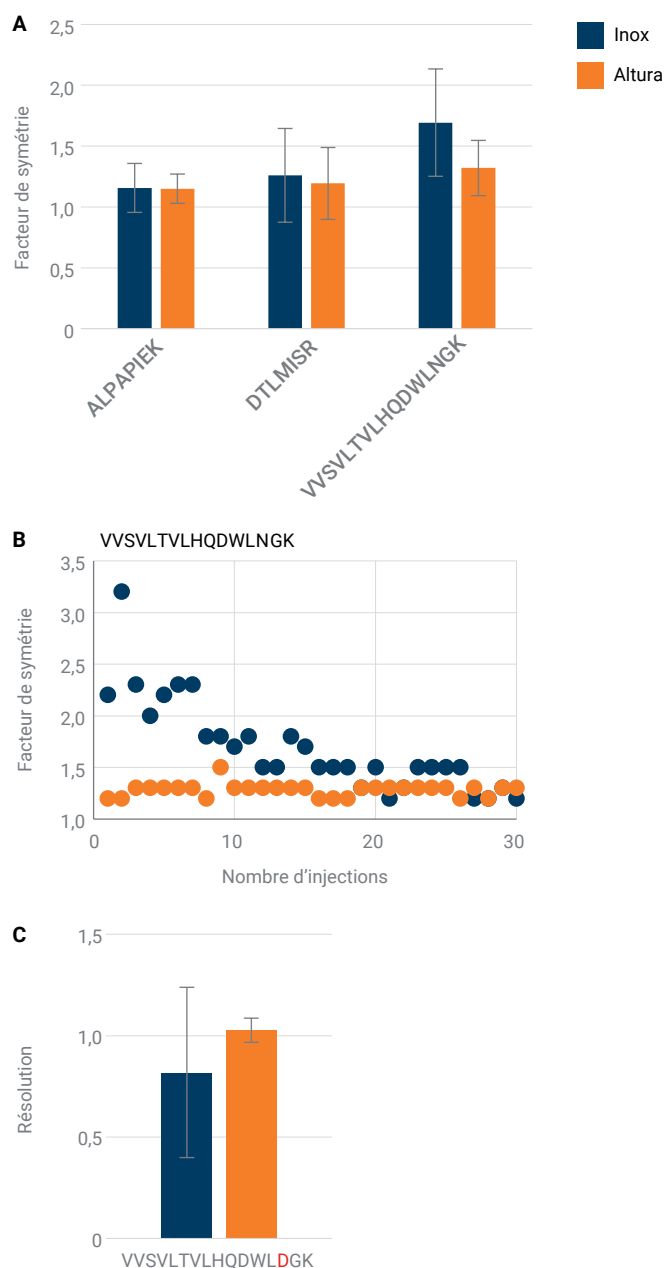
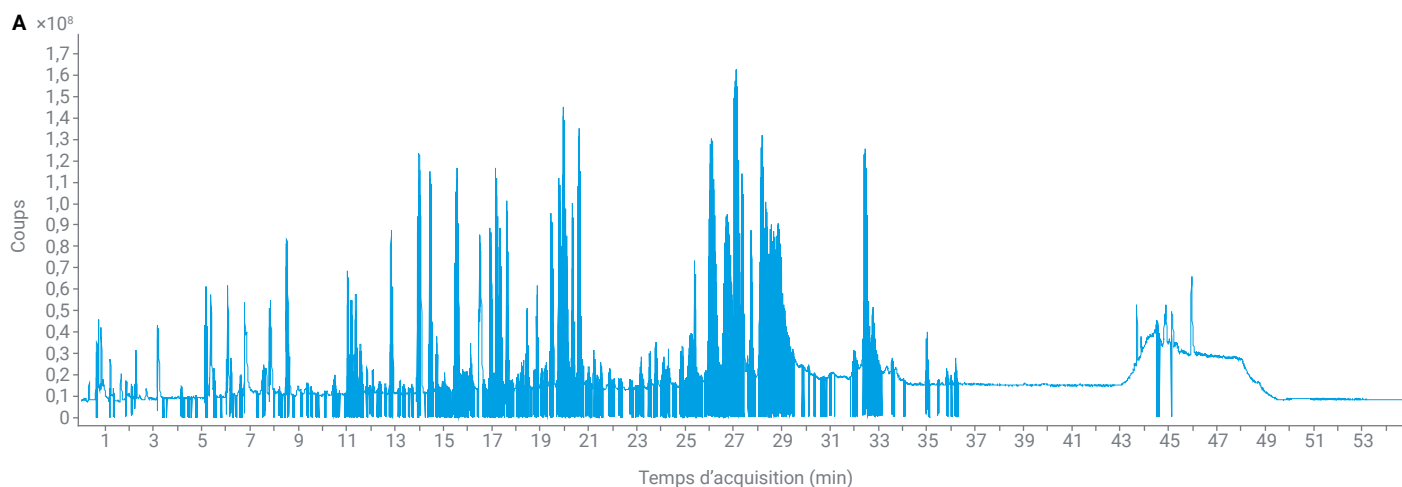


Figure 4. Mesures de performances chromatographiques pour des peptides synthétiques utilisant les colonnes en inox et Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 inerte. (A) Facteurs de symétrie moyens pour ALPAPIEK, DTLMISR et VSVLTVLHQDWLNGK. (B) L'évolution des facteurs de symétrie est tracée sur 30 injections. (C) Résolution entre le peptide désamidé VSVLTVLHQDWLDGK et natif VSVLTVLHQDWLNGK. La colonne Altura offre une plus grande symétrie de pic et une meilleure séparation pour les variants éluant proche l'un de l'autre, par rapport à la colonne en inox.

Cartographie peptidique de l'Herceptin digéré par la trypsine

Puisant sur les avantages démontrés de la colonne inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, nous avons appliqué cette technologie à la cartographie peptidique d'un échantillon d'Herceptin digéré par la trypsine. L'échantillon a été analysé par LC/MS/MS avec la colonne Altura ; le chromatogramme d'ions totaux (TIC) résultant et la couverture de séquence sont présentés à la figure 5. L'analyse a donné une couverture de séquence de 87,03 %, les peptides tryptiques manquants étant les plus courts et plus hydrophiles par nature.

Il convient de noter que l'étape de nettoyage C18 effectuée avant l'analyse par LC/MS/MS, comme décrit dans la section Méthode expérimentale, a pu contribuer à la perte de ces peptides hydrophiles courts. Cette observation constitue une considération importante pour les conceptions expérimentales futures visant une couverture de séquence complète. Une note d'application précédente qui n'utilisait pas la purification des échantillons pour la digestion de l'Herceptin a permis d'obtenir une couverture de séquence de ~98 %.⁴



B Cartographie peptidique de l'Herceptin digéré avec de la trypsine (couverture de séquence : 87,03%)

Chaîne lourde

1	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR
51	IYPTNGYTRY	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG
101	GDGFYAMDYW	GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
151	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
201	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPG

Chaîne légère

1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
51	ASFLYSGVPS	RFGSRSRGT	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ
101	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV
151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
201	LSPVTKSFN	RGEC			

Figure 5. Cartographie peptidique de l'Herceptin digéré par la trypsine à l'aide de la colonne inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. (A) Chromatogramme d'ions totaux (TIC) pour l'analyse par LC/MS/MS de l'Herceptin digéré par la trypsine. (B) Carte de couverture de séquence montrant une couverture de 87,03 % avec les peptides identifiés en bleu foncé. Les peptides tryptiques manquants (en bleu clair) avec des groupements chimiques courts et hydrophiles sont enclins à la perte d'échantillon pendant l'étape de nettoyage C18.

La figure 6 présente les spectres CID MS/MS du peptide NTAYLQMDSLRL dans sa forme désamidée. Les données sur les ions fragments ont permis une affectation du site de désamidation à la position 8, démontrant l'utilité de la MS/MS dans la caractérisation des modifications post-traductionnelles et chimiques.

Pour souligner l'importance de la séparation chromatographique pour caractériser les peptides désamidés, la figure 7 montre les chromatogrammes d'ions extraits (EIC) pour NTAYLQMNSLR dans ses formes native et désamidée. En raison du petit changement de masse de 0,98 Da et de l'intensité de signal relativement faible du variant désamidé, la résolution chromatographique de ces formes est essentielle. La spectrométrie de masse toute seule ne peut pas les distinguer de manière efficace, car le pic monoisotopique du peptide désamidé (656,3221 m/z) interfère avec le second pic isotopique du peptide natif (pic monoisotopique : 655,8318 m/z , second pic isotopique : 656,3328 m/z) (différence de 16 ppm). Par conséquent, une séparation à haute résolution permise par le matériau inerte de la colonne est essentielle pour une identification et une quantification exactes de la désamidation des peptides.

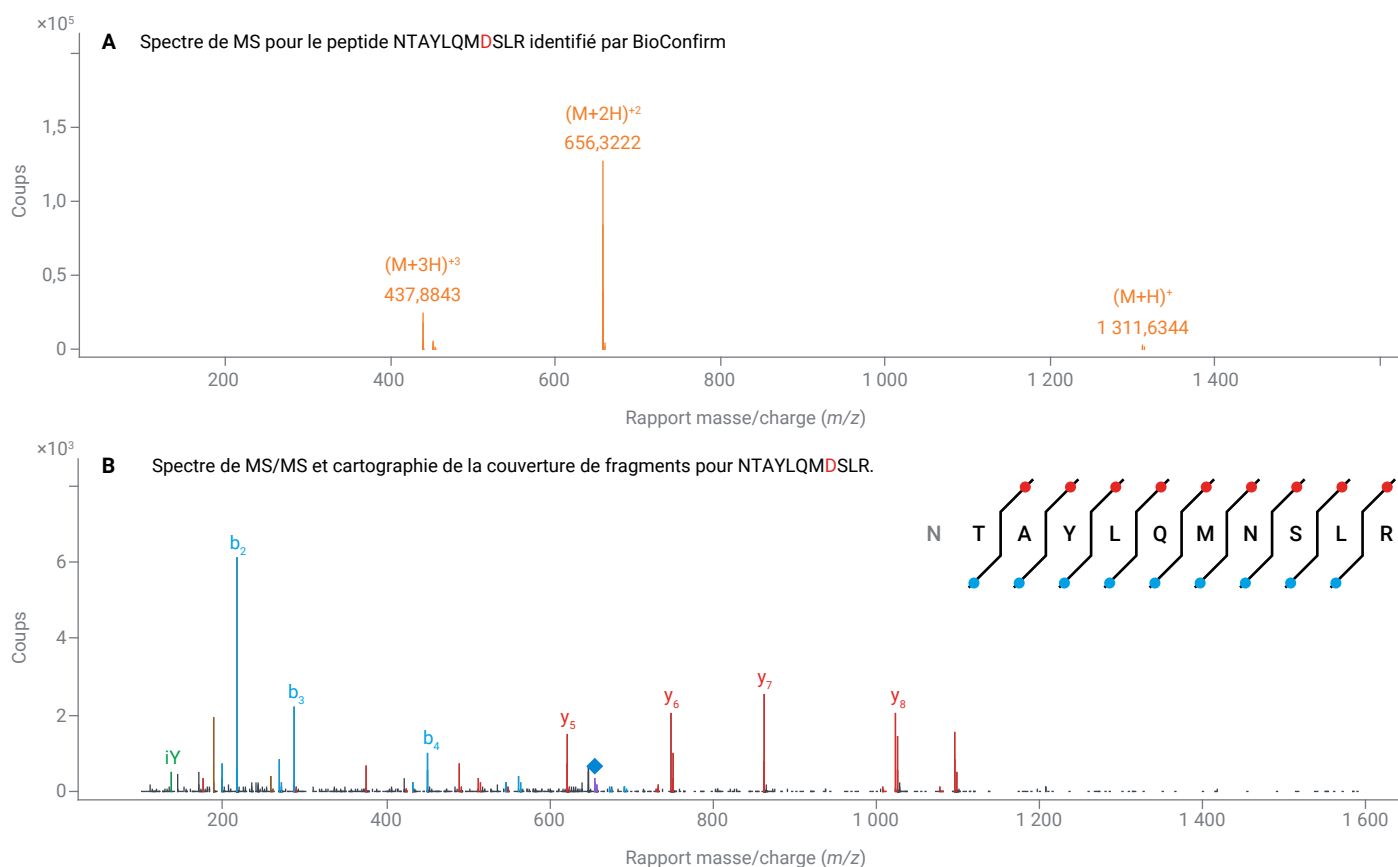


Figure 6. Spectres de MS et cartographie de la couverture de fragments pour le peptide NTAYLQMDSLRL. Les données de fragmentation ont permis d'affecter la désamidation à la position 8 à l'aide du logiciel Agilent MassHunter BioConfirm.

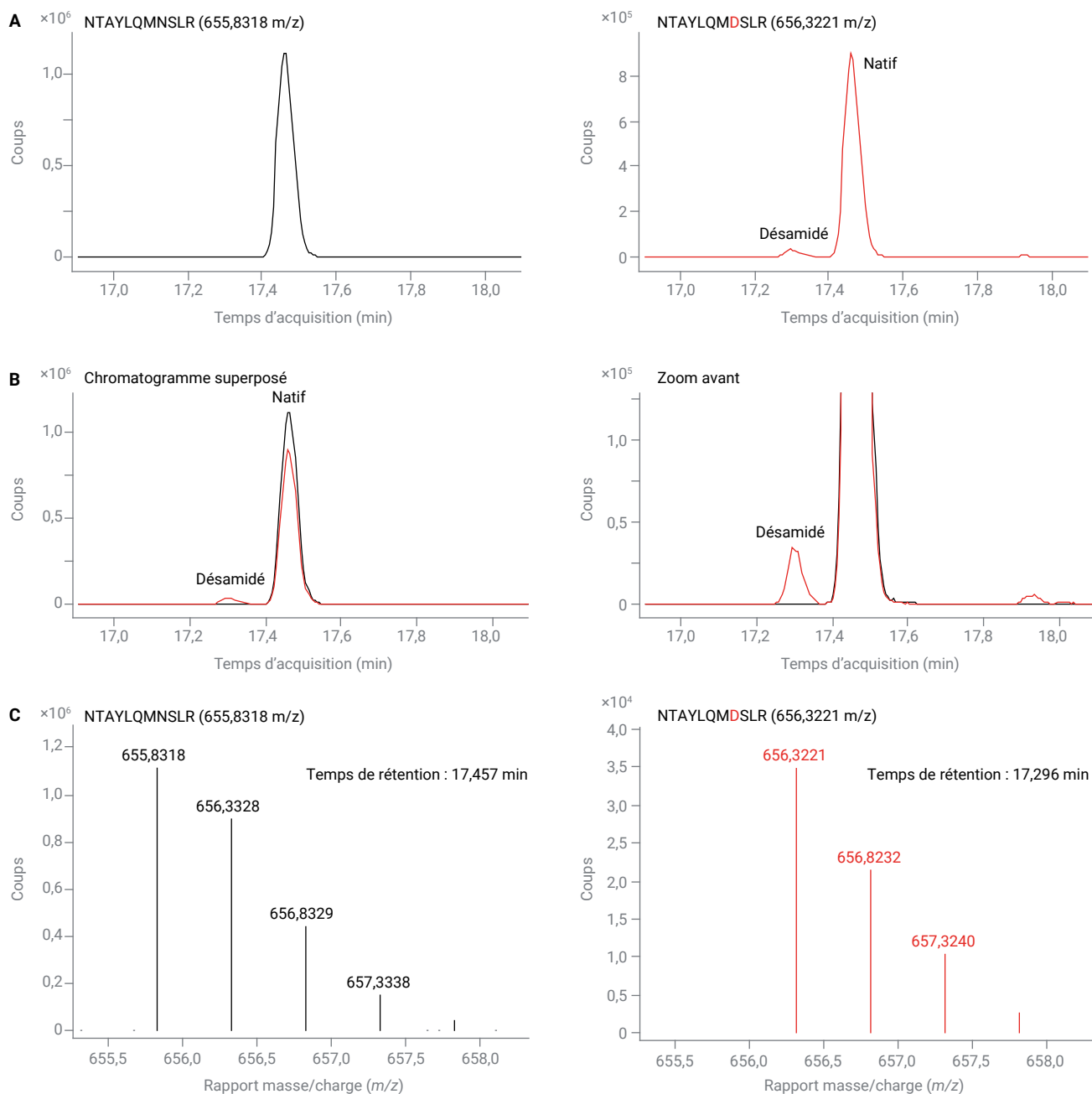


Figure 7. Séparation chromatographique des formes native et désamidée du peptide NTAYLQMNSLR. (A) Chromatogrammes d'ions extraits (EIC) utilisant les masses des précurseurs des formes native (655,8318 m/z) et désamidée (656,3221 m/z) à l'état de charge 2+. (B) Les chromatogrammes individuels ont été superposés pour illustrer la séparation chromatographique entre les peptides natif et désamidé, avec le chromatogramme agrandi mettant en évidence la séparation de l'impureté de bas niveau. (C) Les spectres de masse des peptides natif et désamidé sont présentés pour illustrer le besoin de résoudre de manière chromatographique la forme désamidée de la forme native. Sinon, la spectrométrie de masse seule ne pourrait pas distinguer les deux formes en cas de coélution.

Conclusion

Cette étude démontre les avantages importants du matériau de la colonne inert Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 pour les processus de cartographie peptidique, particulièrement dans l'analyse des peptides mAb et des modifications post-traductionnelles et chimiques. Comparée au matériau de la colonne en inox classique, la colonne Altura a systématiquement apporté une forme de pic améliorée, une variabilité réduite et une résolution améliorée, particulièrement pour les peptides hydrophobes et modifiés compliqués.

Des données quantitatives sur 30 injections consécutives ont révélé une stabilisation plus rapide des colonnes et une reproductibilité supérieure avec la colonne Altura, tandis que des mesures chromatographiques comme le facteur de symétrie et la résolution ont confirmé sa capacité à mieux séparer des espèces éluant proche l'une de l'autre. Ces avantages ont encore été validés dans la cartographie peptidique de l'Herceptin digéré par la trypsine, là où la colonne Altura a permis une identification en toute confiance des variants désamidés.

Globalement, la colonne inerte Altura ZORBAX Eclipse zPlus C18 avec les systèmes 1290 Infinity II Bio LC et LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT offre une solution solide et fiable pour la cartographie peptidique à cadence élevée et la caractérisation des modifications, prenant en charge à la fois la précision analytique et l'efficacité opérationnelle dans le développement biopharmaceutique.

Références

1. Hsiao, J.; *et al.* Pushing the Boundaries of Chromatographic Separation with Inert HPLC Column Hardware. *Note d'application d'Agilent Technologies*, 5994-8618EN, **2025**.
2. Vanluchene, H.; *et al.* mRNA Mapping with IO-RPLC-MS on a Low-Adsorption Flow Path. *Note d'application d'Agilent Technologies*, 5994-8055EN, **2025**.
3. Feith, A. Robust and Reliable Peptide Mapping. *Note d'application d'Agilent Technologies*, 5994-2718EN, **2024**.
4. Sciuto, S. Peptide Mapping of Trastuzumab Tryptic Digests on an Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Note d'application d'Agilent Technologies*, 5994-7969EN, **2024**.