

Avanço no desempenho cromatográfico no mapeamento de peptídeos

Pela coluna inerte Agilent Altura ZORBAX
Eclipse Plus C18

Autores

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

Resumo

Este estudo destaca os benefícios de desempenho da coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 para mapeamento de peptídeos. Em comparação com o corpo de aço inoxidável, a coluna Altura melhora o formato do pico, a reprodutibilidade e a resolução, especialmente para peptídeos hidrofóbicos e modificados. Na análise de LC/MS de peptídeos mAb sintéticos e de Herceptin digerido por tripsina, a coluna inerte permitiu a identificação confiável de modificações pós-translacionais, com formas de pico e resolução aprimoradas para peptídeos desaminados. A separação aprimorada de variantes desaminadas demonstra o valor da coluna em fluxos de trabalho biofarmacêuticos que exigem alta sensibilidade e precisão.

Introdução

O mapeamento de peptídeos é uma técnica fundamental no desenvolvimento biofarmacêutico, usada para confirmar sequências de proteínas e identificar modificações pós-translacionais (PTMs). No entanto, as interações entre os analitos e as superfícies metálicas dentro do corpo de cromatografia líquida (LC) podem comprometer a sensibilidade e a resolução, especialmente para peptídeos carregados ou fosforilados. Estudos recentes destacaram a importância de trajetórias de fluxo inertes e corpo de coluna para mitigar esses desafios.^{1,2}

Em um estudo anterior, um método de mapeamento de peptídeos usando a coluna Mapeamento de peptídeos AdvanceBio foi otimizado para reduzir o tempo de execução de 2,5 horas para 1 hora, aproveitando as partículas sub-2 µm da coluna ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 e um sistema de UHPLC.³ Apesar da redução significativa no tempo de execução, padrões de eluição de peptídeos comparáveis foram observados entre a coluna Mapeamento de peptídeos AdvanceBio e a coluna ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, garantindo a transferibilidade do método e resultados analíticos consistentes em diferentes tecnologias de coluna. Essa melhoria permite uma maior produtividade de amostras e reduz o consumo de solvente sem comprometer o desempenho.

Para melhorar ainda mais o desempenho, as colunas inertes Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 incorporam a tecnologia Ultra Inert, projetada para minimizar as interações entre metais e analitos, mantendo a resistência mecânica do aço inoxidável (SS). Neste estudo, comparamos o desempenho das colunas inertes Altura com as colunas SS convencionais usando os sistemas de LC 1290 Infinity II Bio Agilent e Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF para análise de LC/MS/MS de peptídeos sintéticos e amostras de anticorpos monoclonais (mAb) digeridos.

Parte Experimental

Preparo de amostras

O Herceptin foi digerido com tripsina seguindo um protocolo descrito anteriormente⁴, com modificações. Especificamente, a digestão foi realizada com tripsina usando uma proporção de proteína para enzima de 50:1. No protocolo anterior, a tripsina/LysC foi usada em uma proporção proteína/enzima de 25:1, sem etapa de limpeza da amostra.

Antes da análise de LC/MS, as amostras foram limpas usando uma coluna de centrifugação C18 para remover impurezas e aumentar a longevidade da coluna.

Colunas analíticas

Coluna Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (número de peça 959759-902)

Coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (número de peça 204215-308)

Instrumentos

A análise de LC/MS foi realizada com a seguinte configuração de instrumentos:

- Bomba de alta velocidade Agilent 1290 Infinity II Bio (G7132A)
- Multiamostrador com termostato de amostras Agilent 1290 Infinity II Bio (G7137A)
- Termostato de múltiplas colunas Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549AA)

Tabela 1. Parâmetros de LC.

Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II Bio		
Parâmetro	Valor	
Fase móvel A	Água com 0,1% de ácido fórmico	
Fase móvel B	Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico	
Temperatura da coluna	60°C	
Vazão	0,4 mL/min	
Temperatura do amostrador	8°C	
Gradiente 1 para peptídeos sintéticos	Tempo (min)	%B
	0,00	2
	1,00	2
	7,00	38
	7,10	80
	9,00	80
	9,10	2
	14,0	2
Gradiente 2 para digestão triptica de Herceptin	Tempo (min)	%B
	0	2
	2	2
	42	42
	43	80
	47	80
	48	2
	55	2

Tabela 2. Parâmetros de MS.

Agilent AdvanceBio 6545 XT LC/Q-TOF	
Parâmetro	Valor
Fonte	AJS duplo ESI positivo
Fonte	
Temperatura do gás de secagem	250°C
Fluxo do gás de secagem	10 L/min
Temperatura do gás de focalização	250°C
Fluxo do gás de focalização	12 L/min
Pressão do nebulizador	25 psi
Voltagem do capilar	3.500 V
Voltagem do nozzle	0 V
Fragmentador	95 V
Skimmer	50 V

Parâmetro	Valor
Aquisição – MS	
Modo de aquisição	Faixa dinâmica estendida (2 GHz)
Faixa de massa	m/z de 100 a 3.000
Taxa de varredura	1 espectro/s
Massa de referência	121,0509, 922,0098
Aquisição – MS/MS	
Modo de aquisição	MS/MS automático
Faixa de massa	m/z de 100 a 3.000
Taxa de varredura	3 espectros/s
Largura do isolamento (MS/MS)	Médio (~4 amu)
Máximo de precursores por ciclo	5
Limiar para MS/MS	6.000 contagens e 0,001%
Carga do precursor	2+, 3+, > 3+
Alvo	50.000 contagens/espectro

Tabela 3. Parâmetros de energia de colisão MS/MS.

Energia de colisão aumentada		
Carga	Inclinação	Desvio (offset)
2	3,1	1
3	3,6	-4,8
> 3	3,6	-4,8

Tabela 4. Software Agilent MassHunter BioConfirm, versão 12.1, parâmetros de processamento.

Fluxo de trabalho e sequenciamentos		
Fluxo de trabalho	Digestão de proteína	
Condições	Reduzida	
Sequências	Herceptin (alquilado diretamente), tripsina	
Modificações variáveis	Desamidação, G0, G0F, G0F-GlcNAc, G2, G2F, H5N3F1-1, metilação, oxidação (M, W), piroGlu (E)	
Enzimas	Tripsina	
Encontrar peptídeos		
Filtros de biomoléculas	Exibir moléculas que contêm varreduras MS/MS	Permitido
Extração	Usar picos com altura	≥ 600 contagens
Espécies iônicas	Íons positivos	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺
Estado de carga	Modelo isotópico	Peptídeos
	Limitar os estados de carga atribuídos a um intervalo de	1 a 5
Filtros de pico (MS/MS)	Filtros de altura, altura absoluta permitida	≥ 50 contagens
Tolerâncias de correspondência		
Correspondência em massa	± 5 ppm MS1, ± 20 ppm MS2	
Pontuação	Avisar se a pontuação for < 7,00	
	Não corresponder se a pontuação for < 5,00 (cobertura de sequências)	
Regras de correspondência	Tipo de fragmentação MS/MS	CID
	Número de clivagens perdidas	2
	Número máximo de correspondências por biomolécula	3
	Intervalo de comprimento do peptídeo	3 a 70
	Permitir apenas truncamento N-Term ou C-Term	Selecionado
	Número máximo de Mods	2

Resultados e discussão

Avaliação das melhorias cromatográficas permitidas pelo corpo de coluna inerte

Para avaliar as vantagens de desempenho do corpo de coluna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 em fluxos de trabalho de mapeamento de peptídeos, nós fizemos uma comparação com a coluna SS ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18.

Uma mistura de peptídeos sintéticos contendo sequências de mAb foi analisada usando o sistema de LC Bio 1290 Infinity II acoplado a um LC/Q-TOF AdvanceBio 6545XT.

As sobreposições iniciais dos cromatogramas de íon extraído (Figura 1) mostraram tempos de retenção comparáveis nas duas colunas. No entanto, uma inspeção detalhada de peptídeos individuais revelou diferenças notáveis na intensidade do sinal, formato do pico e resolução (Figura 2). Por exemplo, o peptídeo hidrofóbico e básico VVSVLTVLHQDWLNGK exibiu picos mais amplos e intensidade de sinal reduzida na coluna SS em comparação com a coluna Altura. Isso sugere que as interações entre metais e analitos no corpo de SS podem afetar a recuperação da amostra e/ou o desempenho cromatográfico.

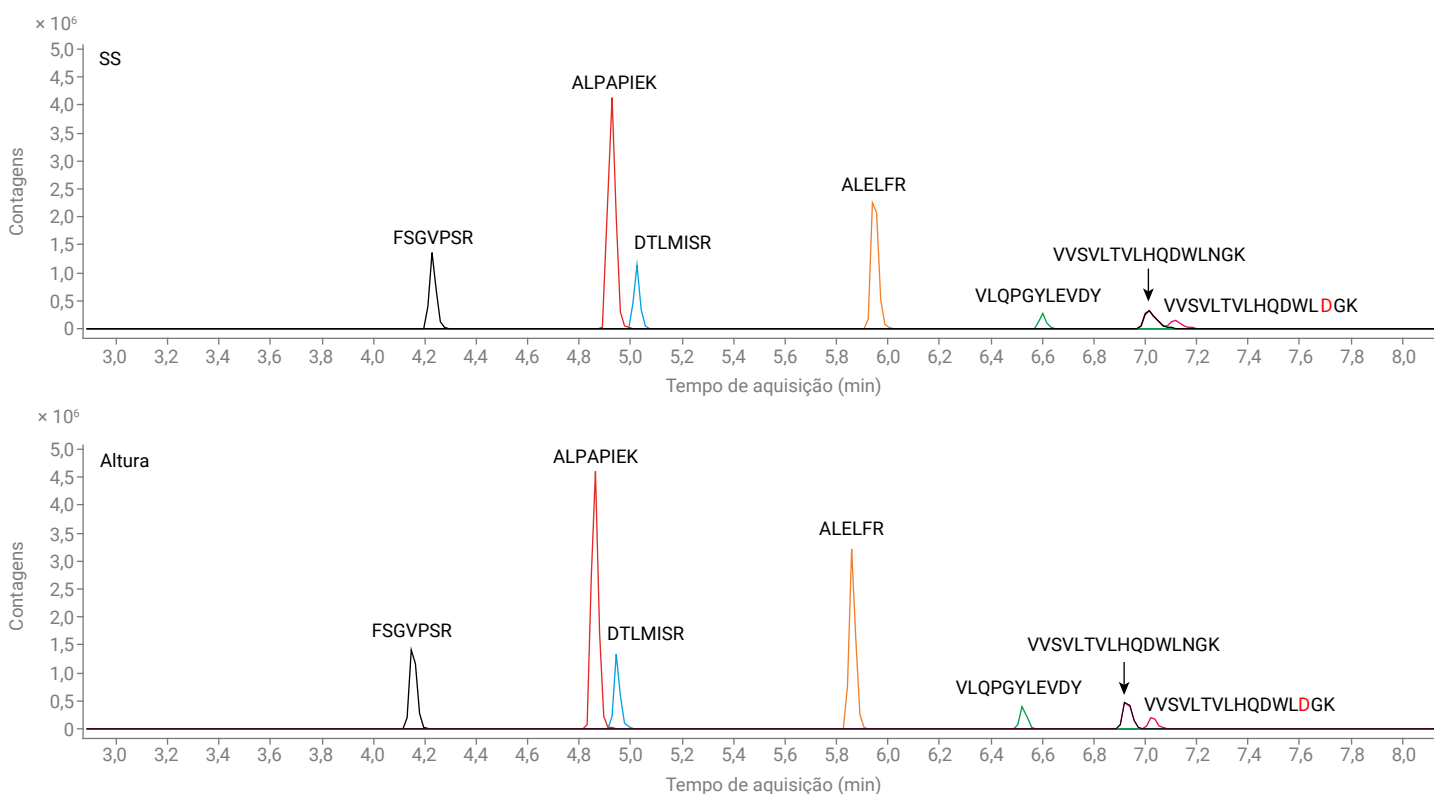


Figura 1. Separação cromatográfica de peptídeos de anticorpos monoclonais sintéticos usando aço inoxidável (SS) e corpo de coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18.

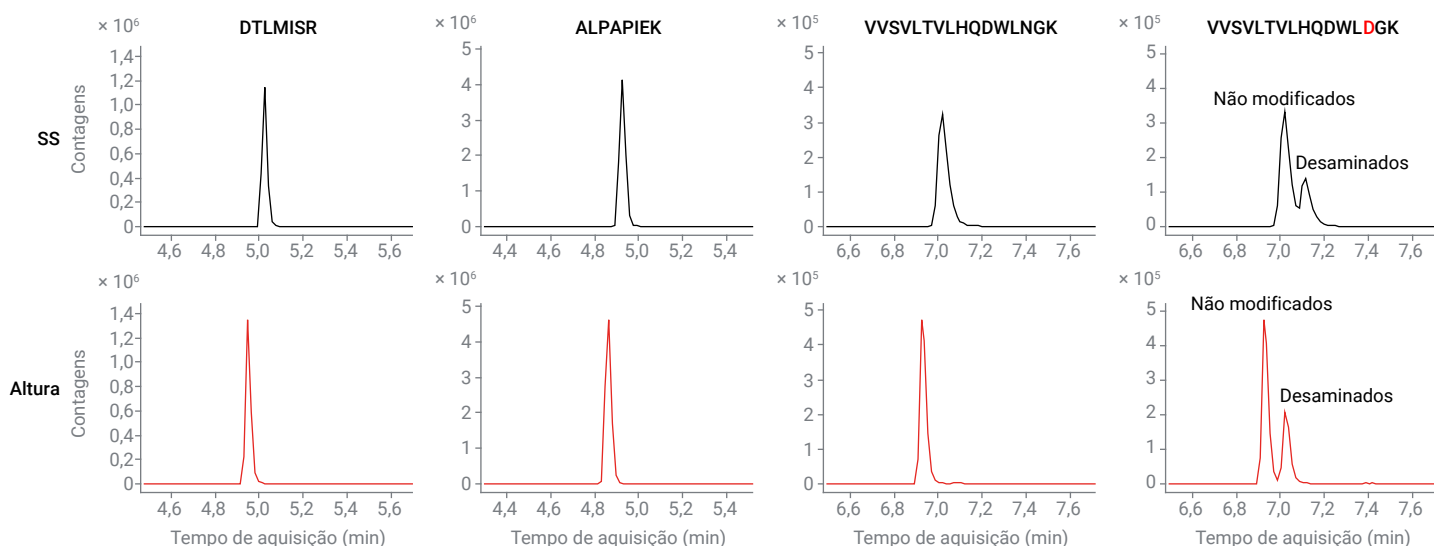


Figura 2. Melhoria no formato do pico e na resolução de peptídeos desaminados usando corpo de coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 em comparação com hardware de coluna de aço inoxidável (SS).

Uma análise adicional da variante desaminada VVSVLTVLHQDWLDGK, em que a asparagina na posição 14 é convertida em ácido aspártico, demonstrou uma melhor separação em relação à sua equivalente não modificada quando se usa a coluna Altura. Essa resolução aprimorada é particularmente valiosa para detectar modificações pós-translacionais e químicas, como a desamidação, que representam atributos críticos de qualidade que devem ser caracterizados no desenvolvimento biofarmacêutico.

Para determinar a extensão do benefício do corpo de coluna inerte, novas colunas SS e Altura foram submetidas a uma injeção em branco para condicionamento rápido, seguida por 30 injeções consecutivas da mistura de peptídeos mAb sintéticos (Figura 3). Esses resultados mostraram que a coluna SS exigiu pelo menos 10 injeções para atingir uma recuperação de área do pico semelhante à da coluna Altura para ALPAIEK e DTLMISR. Para o peptídeo mais hidrofóbico/básico VVSVLTVLHQDWLNGK, foram necessárias quase 20 injeções para que a coluna SS igualasse o desempenho da coluna Altura, destacando a estabilização mais rápida e a reprodutibilidade superior da coluna inerte.

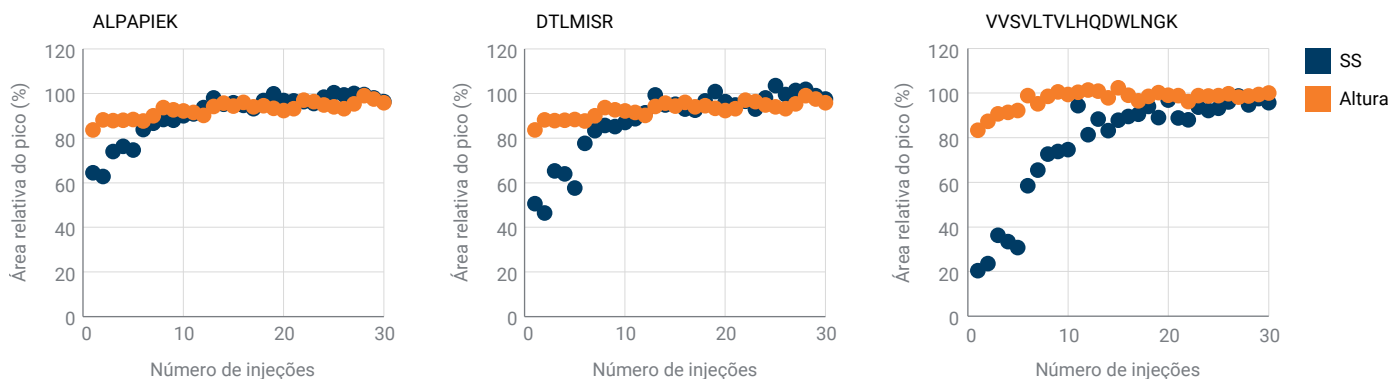


Figura 3. Comparações quantitativas para peptídeos sintéticos usando colunas inertes de aço inoxidável (SS) e Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. As tendências relativas da área do pico são plotadas ao longo de 30 injeções. O corpo de coluna Altura apresenta uma estabilização mais rápida e maior reprodutibilidade em comparação com as colunas SS, especialmente para peptídeos hidrofóbicos e básicos.

Os indicadores de desempenho cromatográfico, como os fatores de distorção (TF), uma métrica usada para quantificar a assimetria do pico, reforçaram ainda mais essas descobertas (Figura 4). O TF para ALPAIEK e DTLMISR foi semelhante entre as duas colunas, indicando formas de pico comparáveis. No entanto, VVSVLTVLHQDWLNGK apresentou um TF significativamente melhor com a coluna Altura (TF médio = 1,3, n = 30) em comparação com a coluna SS (TF médio = 1,7, n = 30). Isso se relaciona bem com as observações qualitativas da Figura 2 e sugere que o corpo inerte melhora a simetria do pico para desafios relacionados a peptídeos.

A plotagem de TF nas 30 injeções revelou que a coluna SS melhorou gradualmente com o condicionamento, aproximando-se eventualmente do desempenho da coluna Altura. Contudo, o formato inicial deficiente do pico na coluna SS afetou negativamente a separação de analitos com eluição próxima, como o peptídeo desaminado VVSVLTVLHQDWLDGK de seu equivalente não modificado. Conforme mostrado na Figura 4C, a coluna Altura alcançou maior resolução entre essas variantes, permitindo uma identificação mais confiável na modificação química.

Apesar do uso de um gradiente relativamente íngreme (6% B/min ao longo de 6 minutos), a coluna Altura alcançou uma separação superior. Esta descoberta indica o potencial para uma maior otimização, prolongando o gradiente ou reduzindo a sua inclinação para melhorar ainda mais a resolução. De modo geral, esses resultados demonstram que a coluna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 não apenas melhora o desempenho cromatográfico de PTM e a resolução de modificações químicas, mas também oferece maior produtividade de amostras e melhor perfil de impurezas, tornando-a uma ferramenta valiosa para fluxos de trabalho robustos de mapeamento de peptídeos.

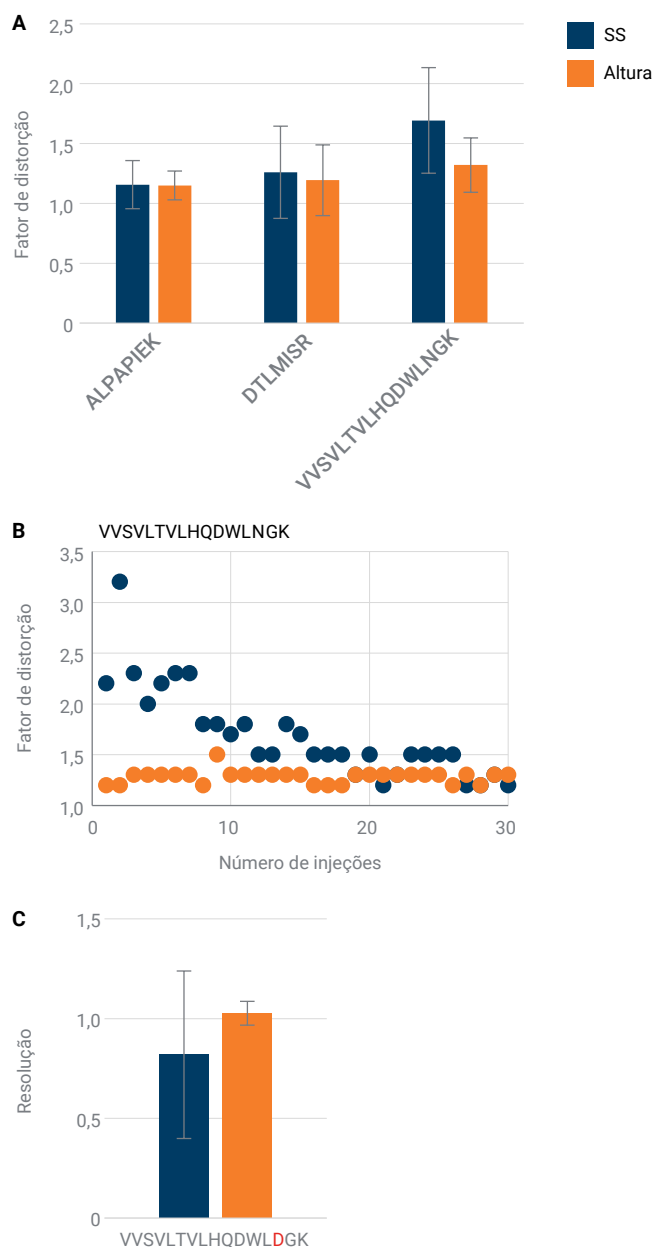
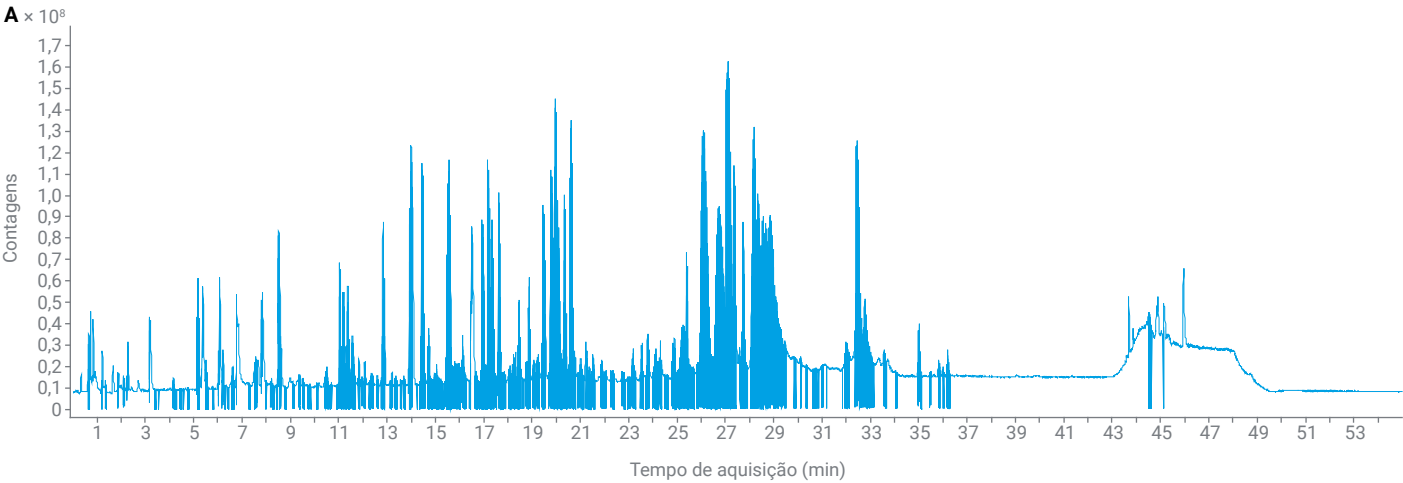


Figura 4. Métricas de desempenho cromatográfico para peptídeos sintéticos usando colunas inertes de aço inoxidável (SS) e Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. (A) Fatores de distorção médios para ALPAIEK, DTLMISR e VVSVLTVLHQDWLNGK. (B) As tendências do fator de distorção são plotadas ao longo de 30 injeções. (C) Resolução entre o par de peptídeos desaminados VVSVLTVLHQDWLDGK e VVSVLTVLHQDWLNGK. A coluna Altura demonstra uma simetria de pico melhorada e uma separação aprimorada de variantes com eluição próxima em comparação com o corpo de SS.

Mapeamento de peptídeos de Herceptin digerido por tripsina

Com base nos benefícios comprovados da coluna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, aplicamos essa tecnologia ao mapeamento de peptídeos de uma amostra de Herceptin digerida por tripsina. A amostra digerida foi analisada usando LC/MS/MS com a coluna Altura, e o cromatograma de íons total (TIC) e a cobertura de sequências resultantes são mostrados na Figura 5. A análise produziu uma cobertura de sequências de 87,03%, com os peptídeos tripticos ausentes sendo mais curtos e mais hidrofílicos por natureza.

Vale destacar que a etapa de limpeza C18 realizada antes da análise de LC/MS/MS, conforme descrito na seção Experimental, pode ter contribuído para a perda desses peptídeos hidrofílicos mais curtos. Essa observação destaca uma consideração importante para projetos experimentais futuros que visam uma cobertura de sequências abrangente. Uma nota de aplicação anterior que não usou limpeza de amostra para a digestão com Herceptin conseguiu atingir uma cobertura de sequências de ~98%.⁴



B Mapeamento de peptídeos do Herceptin com tripsina (cobertura de sequências: 87,03%)

Cadeia pesada

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	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP
251	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
301	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ
351	VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV
401	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSLSPG

Cadeia leve

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

Figura 5. Mapeamento de peptídeos de Herceptin digerido por tripsina usando a coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18. (A) Cromatograma de íons totais (TIC) para a execução de LC/MS/MS de Herceptin digerido com tripsina. (B) Mapa de cobertura de sequências mostrando 87,03% de cobertura com os peptídeos identificados em texto azul-escuro. Os peptídeos tripticos ausentes (texto em azul claro) têm características químicas curtas e hidrofílicas, propensas à perda de amostra durante a etapa de limpeza C18.

A Figura 6 apresenta os espectros CID MS/MS para o peptídeo NTAYLQMDSLRL em sua forma desaminada. Os dados de íons fragmentos permitiram a atribuição confiável do local de desamidação na posição 8, demonstrando a utilidade do MS/MS na caracterização de modificações pós-translacionais e químicas.

Para enfatizar a importância da separação cromatográfica para caracterizar peptídeos desaminados, a Figura 7 mostra EICs para NTAYLQMNSLR em suas formas nativa e desaminada. Devido à pequena mudança de massa de 0,98 Da e à intensidade de sinal relativamente baixa da variante desaminada, é fundamental resolver essas formas cromatograficamente. A espectrometria de massas sozinha não consegue distingui-las de forma eficaz, uma vez que o pico monoisotópico do peptídeo desaminado (656,3221 m/z) se sobrepõe ao segundo pico isotópico do peptídeo nativo (pico monoisotópico: 655,8318 m/z , segundo pico isotópico: 656,3328 m/z) (diferença de 16 ppm). Portanto, a separação cromatográfica de alta resolução, possibilitada por corpo de coluna inerte, é essencial para a identificação e quantificação precisas da desamidação do peptídeo.

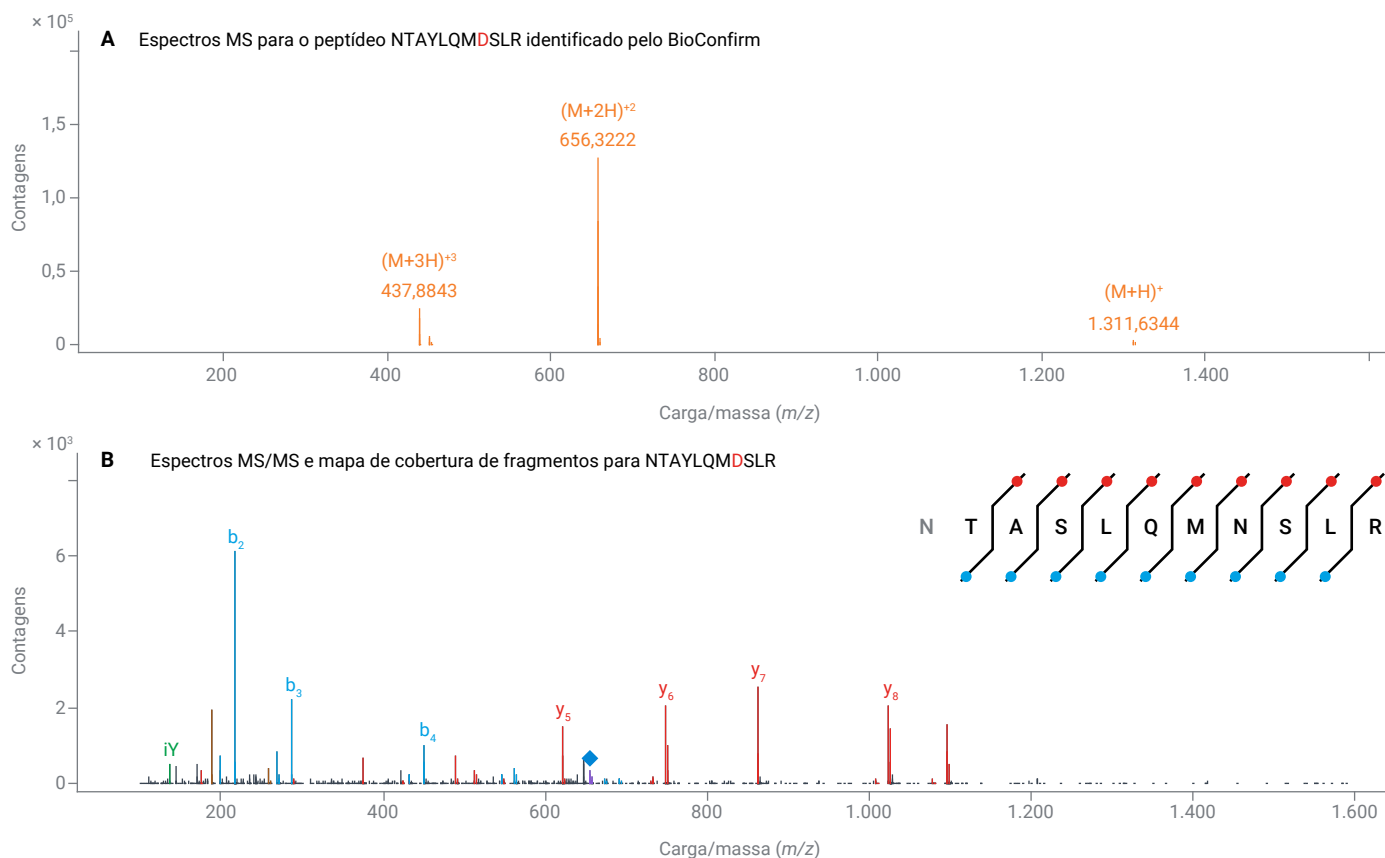


Figura 6. Espectros de MS e mapa de cobertura de fragmentos para o peptídeo NTAYLQMDSLRL. Os dados de fragmentação foram usados para atribuir a desamidação na posição 8, usando o software Agilent MassHunter BioConfirm.

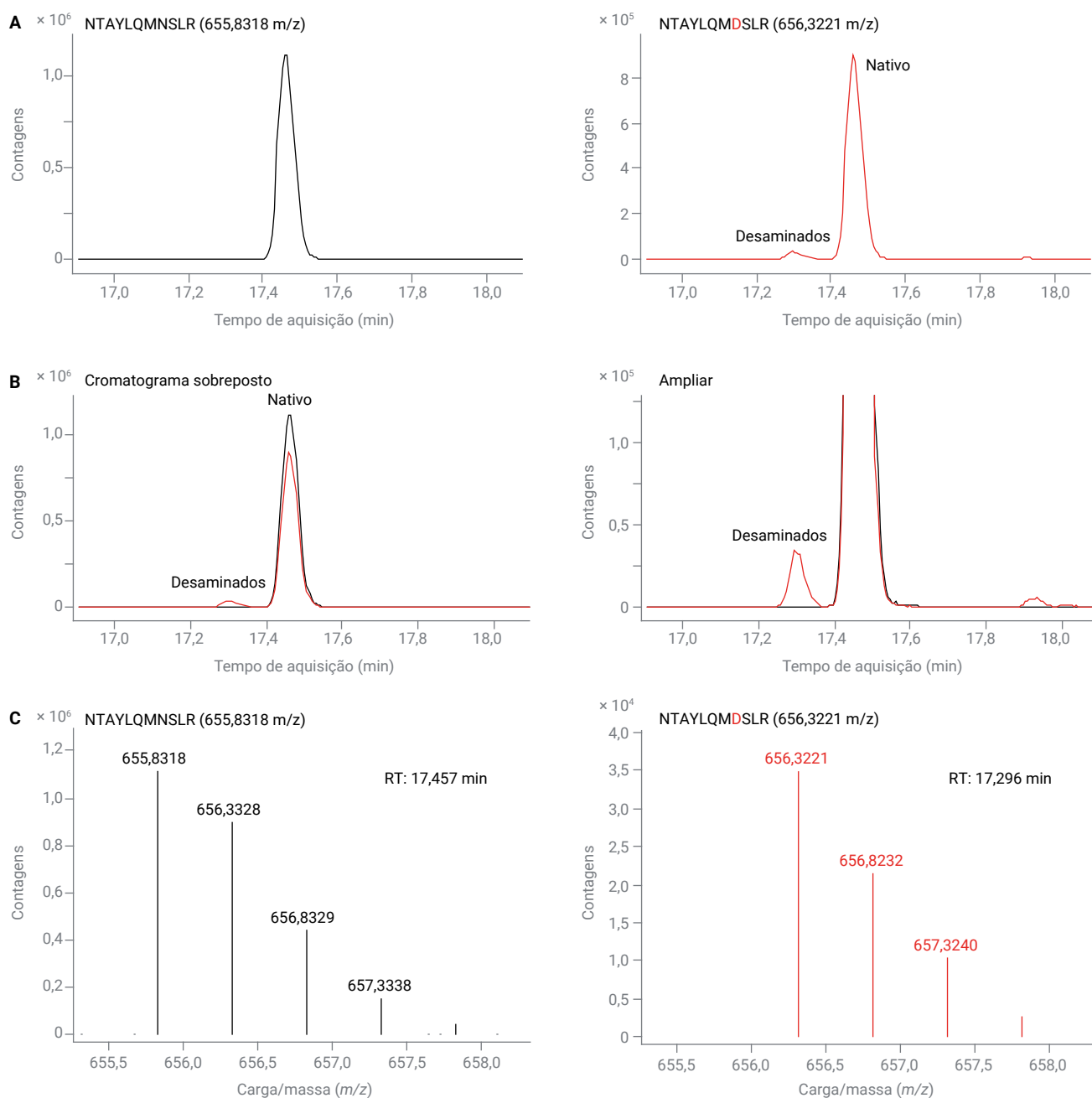


Figura 7. Separação cromatográfica do peptídeo NTAYLQMNSLR nas formas nativa e desaminada. (A) Cromatogramas de íon extraído (EICs) usando massas precursoras das formas nativa (655,8318 m/z) e desaminada (656,3221 m/z) no estado de carga 2+. (B) Os cromatogramas individuais foram sobrepostos para ilustrar a separação cromatográfica entre os peptídeos nativos e desaminados, com o cromatograma ampliado destacando a separação da impureza de baixo nível. (C) O espectro de massas dos peptídeos nativos e desaminados é mostrado para ilustrar a necessidade de resolver cromatograficamente a forma desaminada da nativa, caso contrário, os espectros de massa sozinhos não conseguiriam distinguir as duas formas se elas fossem coeluídas.

Conclusão

Este estudo demonstra as vantagens significativas do corpo de coluna inerte Agilent Altura ZORBAX Eclipse Plus C18 para fluxos de trabalho de mapeamento de peptídeos, particularmente na análise de peptídeos mAb e modificações pós-translacionais e químicas. Em comparação com o corpo convencional da coluna SS, a coluna Altura proporcionou consistentemente um melhor formato do pico, variabilidade reduzida e resolução aprimorada, especialmente para o desafio dos peptídeos hidrofóbicos e modificados.

Dados quantitativos de 30 injeções consecutivas revelaram uma estabilização mais rápida da coluna e uma reprodutibilidade superior com o corpo de coluna Altura, enquanto métricas cromatográficas, como fator de distorção e resolução, confirmaram sua capacidade de separar melhor espécies com eluição próxima. Esses benefícios foram ainda mais validados no mapeamento de peptídeos de Herceptin digerido por tripsina, onde a coluna Altura permitiu a identificação confiável de variantes desaminadas.

De modo geral, a coluna inerte Altura ZORBAX Eclipse Plus C18, juntamente com os sistemas 1290 Infinity II Bio LC e 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, oferecem uma solução robusta e confiável para mapeamento de peptídeos de alta produtividade e caracterização de modificações, apoiando tanto a precisão analítica quanto a eficiência operacional no desenvolvimento biofarmacêutico.

Referências

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