

# 单克隆抗体化学诱导脱酰胺化和氧化的定量分析

采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 Agilent MassHunter BioConfirm 软件

## 作者

Linfeng Wu  
安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, CA, USA

## 前言

天冬酰胺 (Asn) 脱酰胺化、天冬氨酸 (Asp) 异构化和甲硫氨酸 (Met) 氧化等修饰是重组抗体的典型降解产物。研究表明，单克隆抗体中 Asn、Asp 和 Met 残基的降解会影响蛋白质活性<sup>1-4</sup>。因此，蛋白质候选药物（例如 mAb）中的上述修饰是关键质量属性 (CQA)，需在储存和制剂条件下进行密切监测。它们通常是药物开发过程中进行的影响因素试验和强制降解研究的重点。要评估上述 CQA，需要同时进行鉴定和定量分析。

本应用简报介绍了采用一体化工作流程（包括 Agilent AssayMAP Bravo 平台、Agilent 1290 Infinity II LC、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 Agilent MassHunter BioConfirm 软件），通过肽谱分析方法同时鉴定和定量分析重组 mAb 的化学诱导脱酰胺化和氧化修饰（图 1）。



图 1. 肽谱分析的一体化工作流程

## 实验部分

### 材料

mAb1 样品为重组的 CHO 细胞培养的 IgG1 mAb，由第三方合作伙伴生产和纯化。NISTmAb 购自美国国家标准技术研究院 (NIST)。

### 仪器

- Agilent AssayMAP Bravo 系统 (G5571AA)
- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统，包括：
  - Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
  - Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备样品冷却装置 (选件 100)
  - Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549A)
- 安捷伦双喷射流 ESI 离子源 (G1958-65268)

### 化学诱导和样品前处理

为了诱导显著水平的 Asn 脱酰胺化，将 mAb1 样品分别在 pH 8.7 的 Tris-HCl 缓冲液体系中暴露于较高温度 (37 °C) 下 0、3、6 和 13 天。为了诱导 Met 氧化，将 mAb1 和 NISTmAb 样品在含有不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化剂 (范围 0%–0.2% v/v) 的 Tris-HCl 缓冲液中于室温下培养过夜。将所有样品冻干并储存在 -80 °C，以待后续样品消解。

使用 AssayMAP Bravo 平台对所有样品进行还原、烷基化、胰蛋白酶消解和脱盐<sup>5</sup>。再对消解样品进行 LC/MS 分析。

### LC/MS 分析

采用表面带电荷的安捷伦反相 C18 色谱柱 (2.1 × 150 mm, 2.7 μm) 进行 LC 分离，

使用 30 分钟梯度 (表 1)。采用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 采集原始数据 (表 2)。

表 1. 液相色谱参数

液相色谱参数	
分析柱	表面带电荷的安捷伦反相 C18 色谱柱
流动相 A	H <sub>2</sub> O, 0.1% 甲酸
流动相 B	90% 乙腈和 0.1% 甲酸的水溶液
柱温	60 °C
流速	0.4 mL/min
梯度	0.0 分钟时 B 为 3% 30.0 分钟时 B 为 22% 32.0 分钟时 B 为 90% 35.0 分钟时 B 为 90% 37.0 分钟时 B 为 3%
停止时间	40 分钟

表 2. 质谱参数

参数	值
仪器	6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
气体温度	325 °C
干燥气流速	13 L/min
雾化器	35 psig
鞘气温度	275 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
采集模式	扩展动态范围 (2 GHz)
质量数范围	m/z 300–1700
采集速率	8 张谱图/秒
自动 MS/MS 范围	m/z 50–1700
最小 MS/MS 采集速率	3 张谱图/秒
分离峰宽	窄 (约 m/z 1.3)
母离子/循环	前 10
碰撞能量	对于电荷数为 2 的离子，为 $3.1 * (m/z)/100 + 1$ ； 对于电荷数为 3 或大于 3 的离子，为 $3.6 * (m/z)/100 - 4.8$
MS/MS 阈值	1000 响应值和 0.001%
动态排除开启	重复 1 次，然后排除 0.2 min
基于母离子丰度的扫描速率	是
目标值	25000 响应值/质谱图
使用 MS/MS 累积时间限	是
纯度	严格性 100%，截留率 30%
同位素模型	肽段
母离子排序	先按电荷态，再按丰度进行排序；+2, +3, > +3

## 数据处理

使用 MassHunter BioConfirm 10.0 软件对 LC/MS/MS 采集的数据进行分析。对于化学诱导的脱酰胺化研究，搜索参数设置为允许 N/C 端剪切和最多两个漏切位点，固定修饰为半胱氨酸 (C) 烷基化和 N 端焦谷氨酸，可变修饰为天冬酰胺 (N) 或谷氨酰胺 (Q) 脱酰胺化和甲硫氨酸 (M) 氧化。MS1 和 MS2 允许的质量偏差分别为 10 ppm 和 20 ppm。肽段长度限制为 5 到 60 个氨基酸 (AA)。肽段谱图匹配需要用到 MS/MS 功能，并由 0.1% 假阳性率 (FDR) 过滤结果。化学诱导氧化研究的搜索参数除上述设置外，还包括了色氨酸 (W) 氧化 (+4 Da、+16 Da 或 +32 Da) 的可变修饰<sup>6</sup>。

## 结果与讨论

### 脱酰胺化肽的分离和鉴定

Asn 脱酰胺化是蛋白质和多肽中最常见的修饰之一。它是导致生物药物生产过程中在制剂和储存条件下不稳定的主要原因。Asn 残基脱酰胺化有两种方式：通过水解生成 Asp 或通过琥珀酰亚胺中间体生成天冬氨酸或异天冬氨酸。由于脱酰胺基化仅有 0.984 Da 偏移，当不同形式发生共洗脱时，可能难以准确鉴定和定量分析脱酰胺基化和天冬氨酸异构化。

在之前的报道中，已鉴定出 CH<sub>3</sub> 保守区域中的 Asn 脱酰胺基化是溶剂可及的且对化学降解敏感<sup>3,4</sup>。位于该区域的 PENNY 肽 (重链序列位置 376–397，

GFYPSDIAVEWESN<sub>389</sub>GQPEN<sub>394</sub>N<sub>395</sub>YK) 含有三个 Asn 残基，每个残基在暴露于高 pH 条件下对脱酰胺基化具有不同程度的敏感性。我们使用这条肽来展示使用安捷伦肽谱分析工作流程同时鉴定和定量分析 Asn 脱酰胺基化和 Asp 异构化。

图 2 显示了采用 30 分钟液相色谱梯度分离 PENNY 肽的各种 PTM 形式的提取化合物色谱图 (ECC)。图中显示了 PENNY 肽的七种不同形式，包括未修饰的野生型 (WT) 肽、N<sub>389</sub> Asn 脱酰胺基化/Asp 异构化和双脱酰胺基化/Asp 异构化形式。结果表明，所有形式都分散在六分钟的时间窗口内，且修饰后的形式与未修饰的形式能够很好地分离。

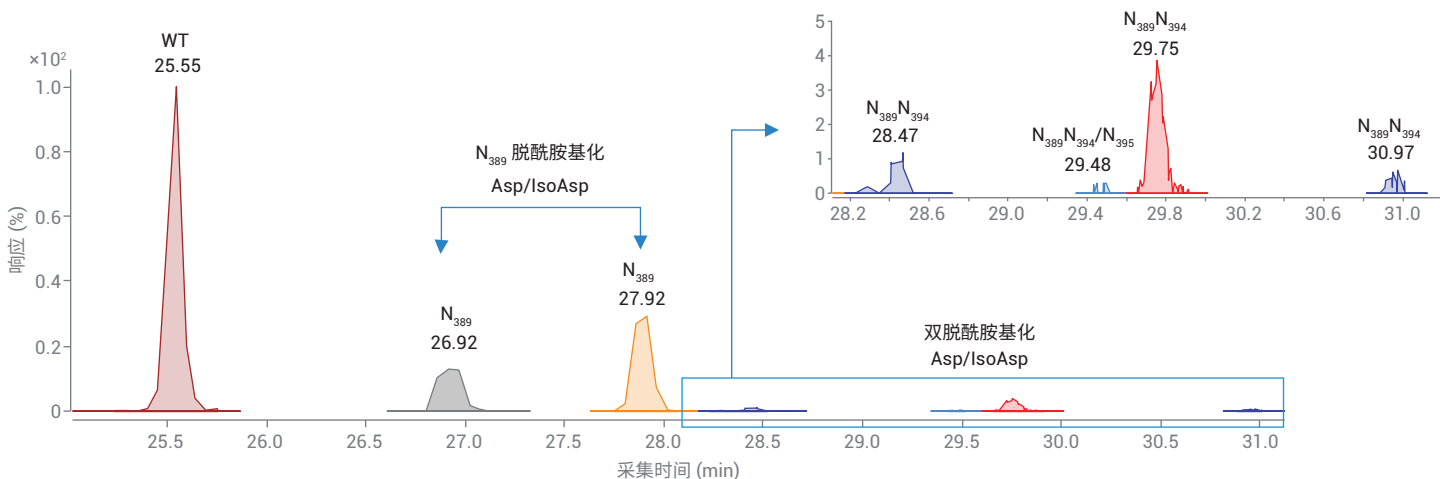


图 2. 采用表面带电荷的反相 C18 色谱柱使用 30 分钟液相色谱梯度获得的 Asn 脱酰胺基化、Asp 异构化和野生型 GFYPSDIAVEWESN<sub>389</sub>GQPEN<sub>394</sub>N<sub>395</sub>YK 肽段的 ECC

MassHunter BioConfirm 软件为 PTM 分析提供了用户友好的界面 (图 3)。软件功能允许分析人员在生物分子表中选择目标肽段, 对其 MS/MS 谱图进行并列比较。图 4 显示了使用 BioConfirm 软件对 PENNY 肽野生型 (WT, RT = 25.55 分钟) 和双脱酰胺基化形式 (N<sub>389</sub>N<sub>394</sub>, RT = 30.97 分钟) MS/MS 谱图的比较。

可同步缩放谱图以进行详细的碎片离子比较。 $y_3$  子离子在 WT 和脱酰胺基化形式中具有相同的  $m/z$ , 说明在 N<sub>395</sub> 上没有发生脱酰胺基化。 $y_6$  子离子具有 +1 Da 质量数偏移, 且  $y_{10}$  子离子在脱酰胺基化肽上具有 +2 Da 质量数偏移, 表明双脱酰胺基化位点在 N<sub>389</sub> 和 N<sub>394</sub> 处。

对图 2 中所示多肽形式的所有 MS/MS 谱

图进行了检查, 以验证脱酰胺基化定位的归属。几乎所有脱酰胺基化形式都通过其脱酰胺基化定位得到明确鉴定。保留时间为 29.48 分钟的双脱酰胺基化形式 (N<sub>389</sub>N<sub>394</sub>/N<sub>395</sub>) 是一个例外, 它含有不确定的 Asn 脱酰胺基化归属 (N<sub>394</sub> 或 N<sub>395</sub>)。

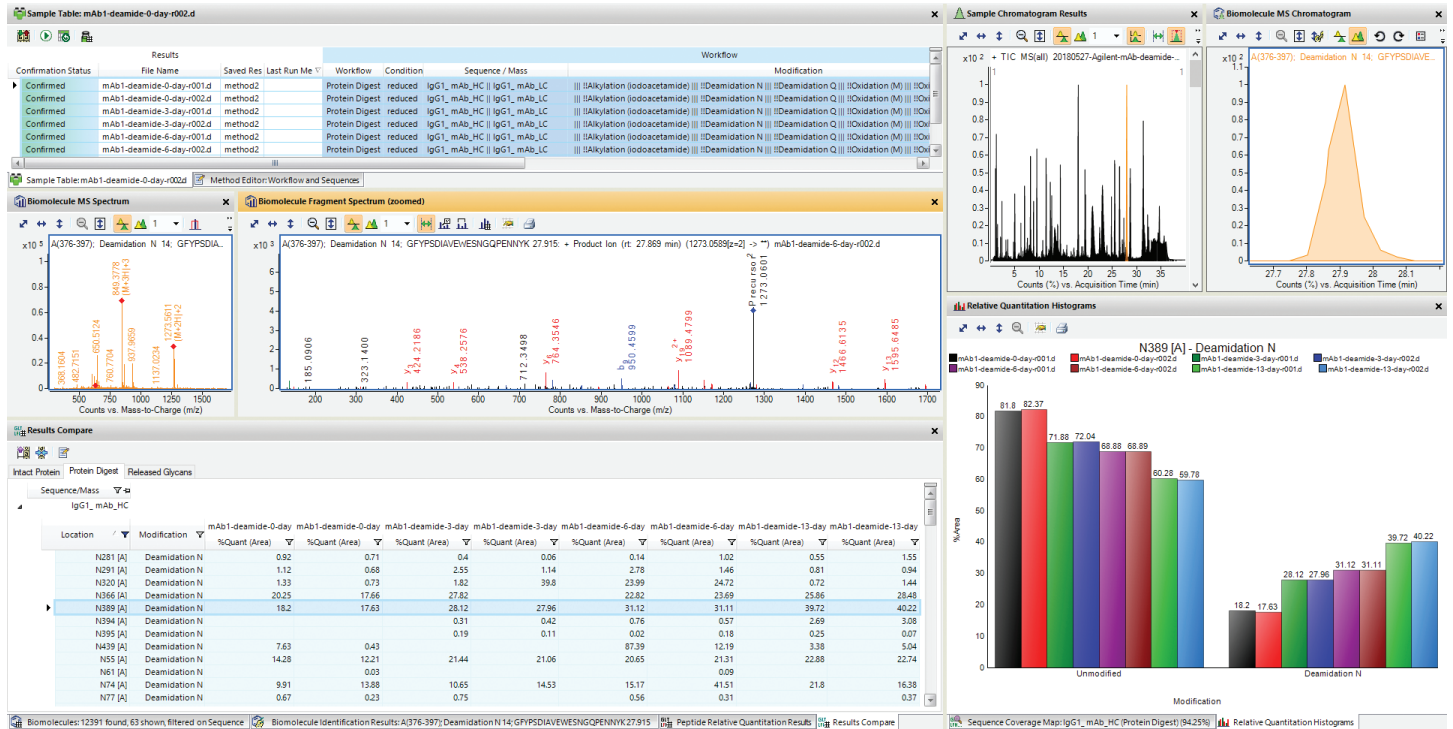


图 3. MassHunter BioConfirm 10.0 软件用于 PTM 鉴定和定量分析的屏幕截图

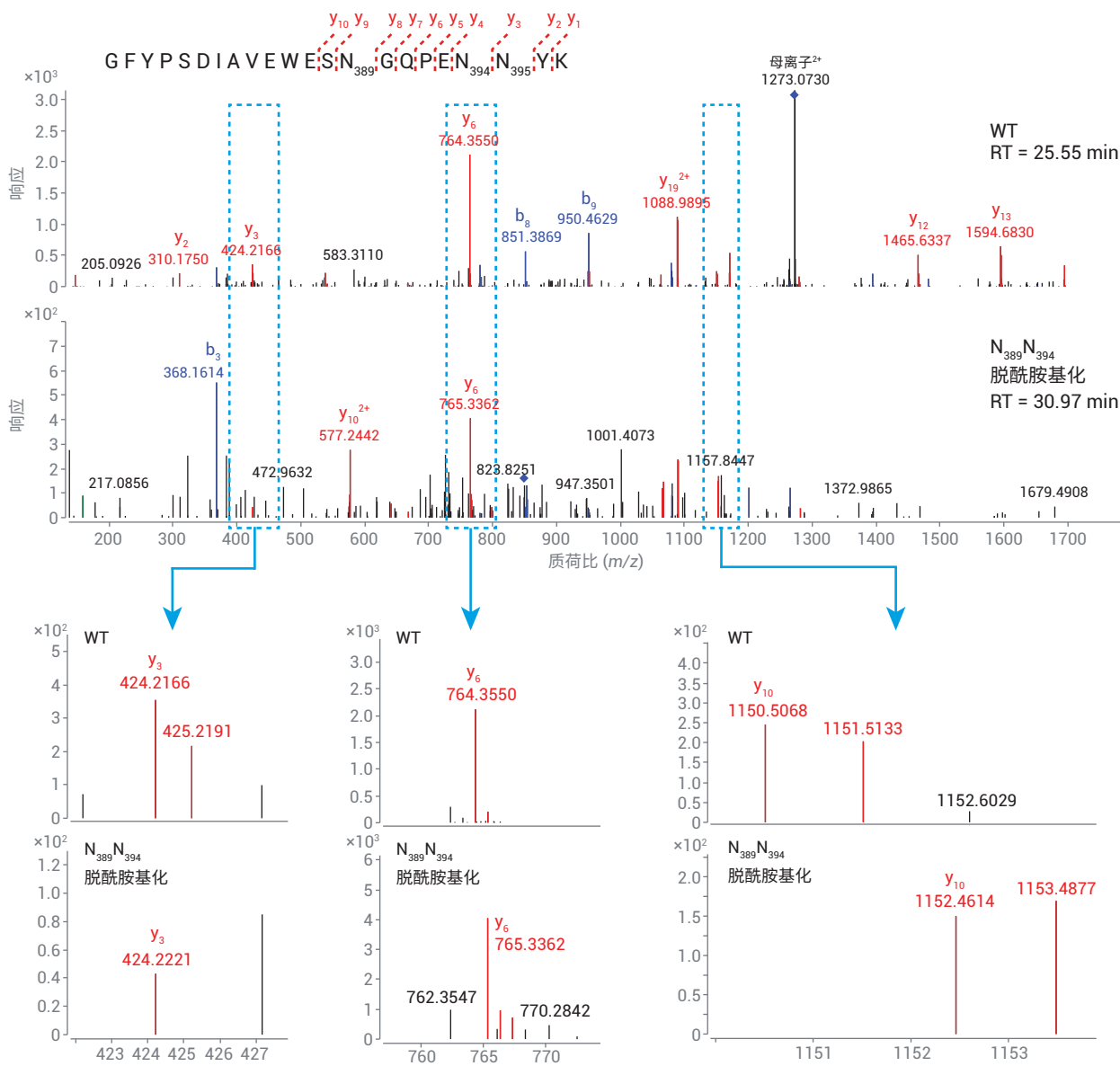


图 4. 使用 MassHunter BioConfirm 软件比较野生型和双脱酰胺基化形式 (N<sub>389</sub>N<sub>394</sub>, RT = 30.97 分钟) GFYPSDIAVEWESIN<sub>389</sub>GQPIEN<sub>394</sub>N<sub>395</sub>YK 肽段的 MS/MS 谱图。放大具有差异特征的用于 PTM 定位归属的碎片离子以进行详细比较

## 脱酰胺化定量分析

MassHunter BioConfirm 软件使分析人员能够定量分析一系列样品的所有修饰残基的 PTM 程度。它计算修饰肽相对于修饰和未经修饰形式总和的峰面积百分比（或峰高百分比作为一个选项）。它还将比较结果汇总于表中（图 5）。通过此“结果对比”表，分析人员可了解一系列样品所有修饰残基的 PTM 定量分析结果。除“结果对比”表外，BioConfirm 还可使用直方图显示定量分析结果。要显示每个修饰残基的直方图，用户只需在“结果对比”表中单击目标残基行。

The screenshot shows the 'Results Compare' window with two tables. The top table is for the heavy chain (IgG1\_mAb\_HC) and the bottom table is for the light chain (IgG1\_mAb\_LC). Both tables compare the percentage of deamidated peptides at four different time points: 0-day, 3-day, 6-day, and 13-day. The data shows a clear increase in deamidation over time for both chains.

Sequence/Mass		mAb1-deamide-0-day-r001.d	mAb1-deamide-3-day-r001.d	mAb1-deamide-6-day-r001.d	mAb1-deamide-13-day-r001.d
Location	Modification	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)
N104 [A]	Deamidation N	97.7	53.22	18.19	23.41
N206 [A]	Deamidation N	7.25		2.84	0.28
N208 [A]	Deamidation N	7.25	15	6.49	7.96
N213 [A]	Deamidation N		0.37		
N281 [A]	Deamidation N	0.93	19.38	2.95	14.37
N291 [A]	Deamidation N	1.13	2.57	2.81	0.82
N320 [A]	Deamidation N	0.66	0.9	24.16	38.89
N366 [A]	Deamidation N	20.25	27.82	22.82	25.86
N389 [A]	Deamidation N	18.27	28.27	31.22	39.73
N394 [A]	Deamidation N		0.32	0.77	2.69
N395 [A]	Deamidation N		0.2	0.02	0.2
N426 [A]	Deamidation N	78.89	79.32	5.09	91.17
N439 [A]	Deamidation N	89.32	8.73	87.36	7.88
N55 [A]	Deamidation N	14.31	21.51	20.65	22.88
N74 [A]	Deamidation N	9.91	10.65	15.17	21.8
N77 [A]	Deamidation N	0.67	0.75	0.56	
N84 [A]	Deamidation N	1.74	3.19	2.69	3.69

Sequence/Mass		mAb1-deamide-0-day-r001.d	mAb1-deamide-3-day-r001.d	mAb1-deamide-6-day-r001.d	mAb1-deamide-13-day-r001.d
Location	Modification	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)
N142 [B]	Deamidation N	2.07	2.19	3.89	2.25
N143 [B]	Deamidation N	0.19	1.69		0.46
N157 [B]	Deamidation N	0.53			
N163 [B]	Deamidation N	0.21		0.44	0.16
N215 [B]	Deamidation N			0.28	
N58 [B]	Deamidation N	0.12	0.71	0.29	0.58

图 5. PTM 定量的“结果对比”表，显示了在高 pH 条件下一段时间内 mAb1 重链和轻链中 Asn 脱酰胺基化的定量分析比较

图 6 显示了使用 BioConfirm 软件获得的时序研究中高 pH 条件下 mAb1 重链上三种 Asn 脱酰胺基化 (N<sub>389</sub>、N<sub>394</sub> 和 N<sub>395</sub>) 的定量分析直方图。每个时间点包括两个技术重复。如图所示, 在影响因素试验中, N<sub>389</sub> 在三个残基中具有最高脱酰胺基化程度。该结果与其他组的研究结果一致, 表明 Asn C 端的 Gly 与其他残基相比具有更高的脱酰胺基化速率。在 C 端含有芳香环的大疏水性残基通常也会导致脱酰胺基化速率非常慢<sup>7,8</sup>。由于 N<sub>394</sub> 或 N<sub>395</sub> 上的脱酰胺基化定位归属有时不明确, 因此需要将这两个位点上的脱酰胺基化定量分析结合进行数据分析。

在肽谱分析工作流程中, 首先将治疗性蛋白消解以产生多肽片段, 但有时会消解不完全。由于样品消解的复杂性, 分析人员应检查用于 PTM 定量分析的肽段形式。BioConfirm 软件生成一个名为肽段相对定量结果的表格, 表中列出了每个数据文件的所有修饰残基及其相应肽段(图 7)。图 7 显示了影响因素实验中八个数据文件中 mAb 重链上 N<sub>389</sub> 脱酰胺基化的定量分析。为了显示该数据文件中鉴定的所有相应肽段, 扩展了最后一个数据文件的子表。为了自动确定用于 PTM 定量分析的肽段形式, BioConfirm 应用了一系列与蛋白质消解和 PTM 分析相关的规则。它还允许用户通过单击用于定量%复选框来调整肽段选择。计算的定量%、结果对比表和直方图立即与更新的定量分析结果同步。

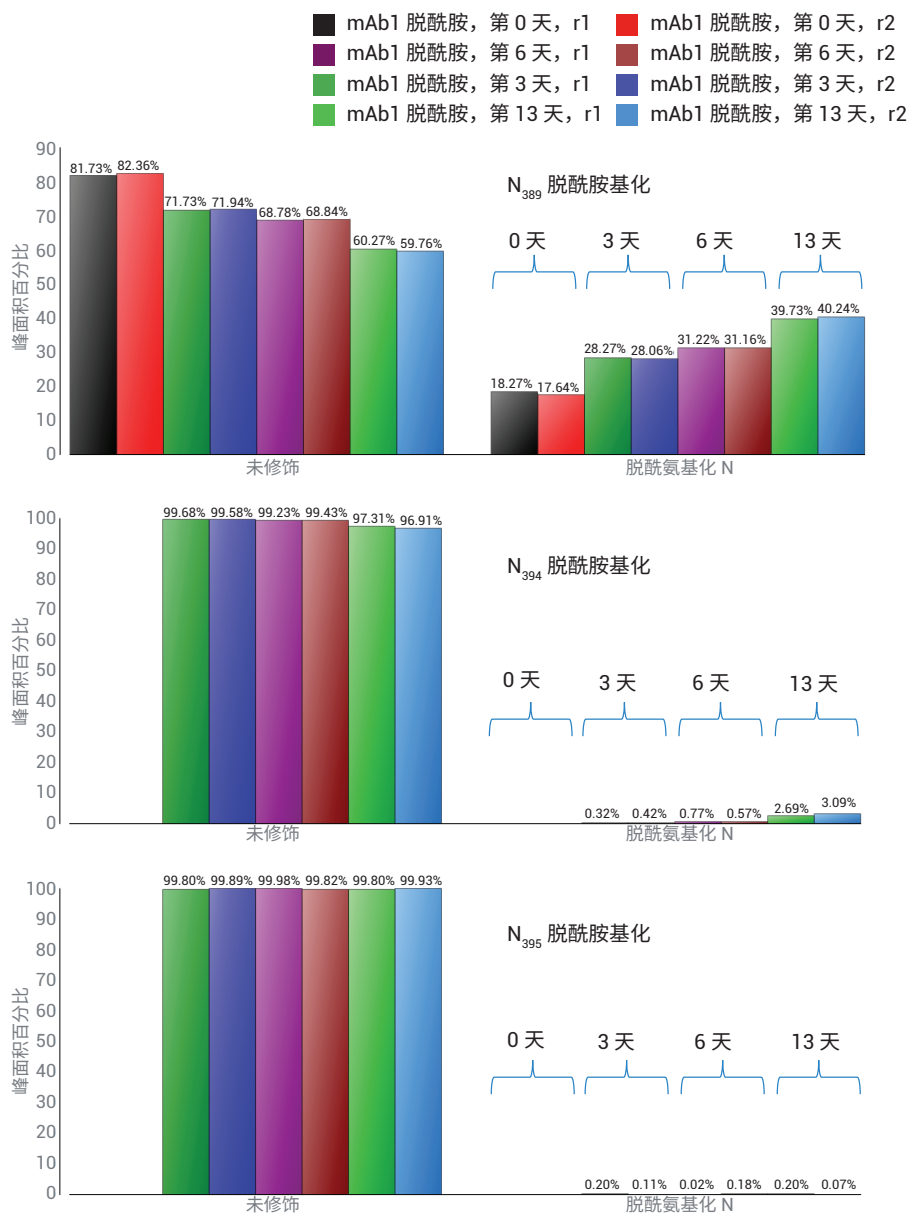


图 6. 使用 MassHunter BioConfirm 软件获得的时序研究中高 pH 条件下 mAb1 重链上三种 Asn 脱酰胺基化 (N<sub>389</sub>、N<sub>394</sub> 和 N<sub>395</sub>) 的定量分析直方图。每个时间点执行两个技术重复样品

Seq Name	Location	Pred Mods	File	%Quant (Area)
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-0-day-r001.d	18.27
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-0-day-r002.d	17.64
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-3-day-r001.d	28.27
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-3-day-r002.d	28.06
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-6-day-r001.d	31.22
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-6-day-r002.d	31.16
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-13-day-r001.d	39.73
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-13-day-r002.d	40.24

Sequence	Seq Loc	Pred Mods	RT	Use for %Quant	Area	Description
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)		25.546	<input checked="" type="checkbox"/>	2009991	Complete digest
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14	26.916	<input checked="" type="checkbox"/>	467513	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14	27.914	<input checked="" type="checkbox"/>	780187	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	28.467	<input checked="" type="checkbox"/>	21433	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 20	29.483	<input checked="" type="checkbox"/>	2197	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	29.753	<input checked="" type="checkbox"/>	73117	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	30.973	<input checked="" type="checkbox"/>	9252	Complete digest, Predicted modifications

图 7. MassHunter BioConfirm 中“肽段相对定量结果”表的部分截图

### 氧化定量分析

本研究还在加速氧化条件下评估了两种 mAb (mAb1 和 NISTmAb) 中 Met 的氧化程度。作为示例, 图 8 显示了使用 BioConfirm 软件得到的在加速 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下 mAb1 和 NISTmAb 的轻链 Met 4 (M4) 氧化的定量分析直方图。正如预期, 在加速氧化条件下两种 mAb 在 M4 处的氧化程度增大, 在不同程度加速 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下具有不同氧化速率。

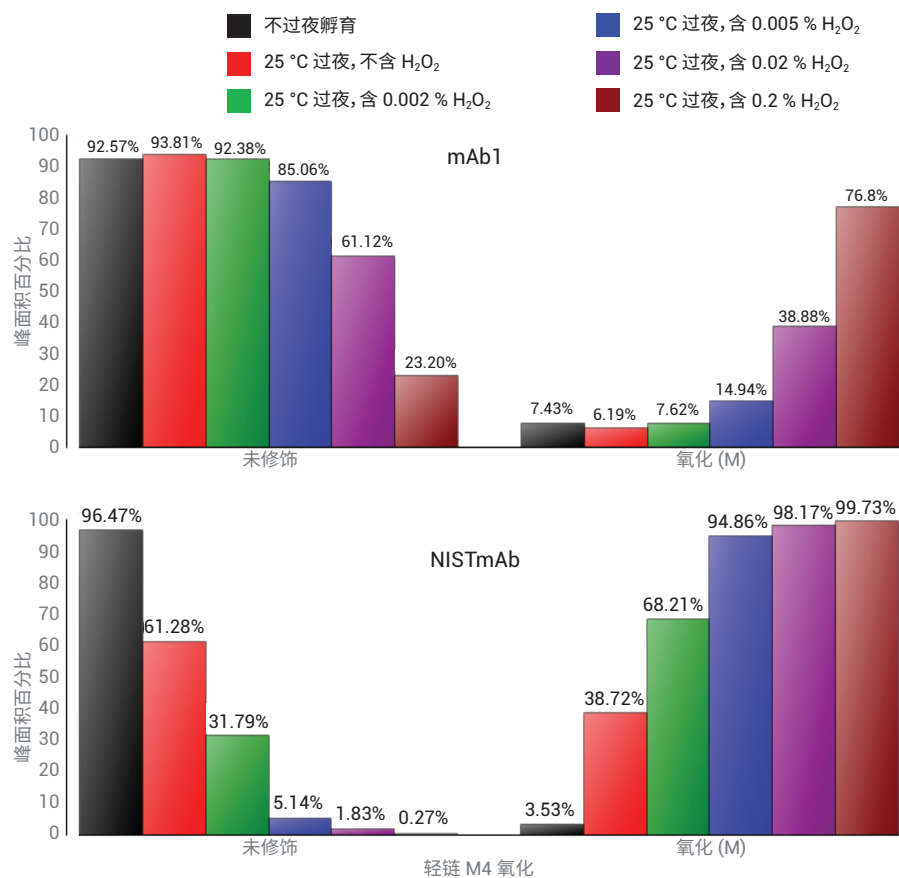


图 8. 使用 MassHunter BioConfirm 软件获得的加速氧化条件下 mAb1 和 NISTmAb 轻链 M4 氧化的定量分析直方图

## 结论

本文展示了一套用于同时鉴定和定量分析 mAb 的化学诱导脱酰胺基化和氧化的完整工作流程，包括使用 AssayMAP Bravo 平台进行自动化样品前处理，使用 1290 Infinity II 液相色谱仪进行液相色谱分离，使用 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行数据采集，以及使用 MassHunter BioConfirm 软件进行数据分析。MassHunter BioConfirm 10.0 软件能够：

- 自动进行数据批处理
- 使用统计得分和 FDR 进行肽段谱图匹配
- 将结果表通过链接导航链接到质谱图和色谱图
- 进行 PTM 定量分析

上述功能组合提升了蛋白类生物治疗药物开发和生产过程中肽谱分析和 PTM 定量分析工作效率。

## 参考文献

1. Huang, L.; *et al.* In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal. Chem.* **2005**, *77*(5), 1432-1439
2. Vlasak, J.; *et al.* Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*(2), 145-154
3. Diepold, K.; *et al.* Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS following Incubation at Elevated Temperatures. *PLoS One* **2012**, *7*(1):e30295
4. Habberger, M.; *et al.* Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. *MAbs.* **2014**, *6*(2), 327-339
5. Automation of Sample Preparation for Accurate and Scalable Quantification and Characterization of Biotherapeutic Proteins Using the Agilent AssayMAP Bravo Platform (利用 Agilent AssayMAP Bravo 平台，通过自动化样品前处理实现生物治疗蛋白质准确而可扩展的定量和表征分析)，安捷伦科技公司，出版号 5991-4872EN
6. Folzer, E.; *et al.* Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*(9), 2824-2831
7. Robinson, N. E.; Robinson, A. B.; Merrifield, R. B. Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides as primary structure models for peptide and protein deamidation. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*(6), 483-493
8. Robinson, N. E.; Robinson, A. B. Prediction of primary structure deamidation rates of asparaginyl and glutaminyl peptides through steric and catalytic effects. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*(5), 437-448

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、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，2018  
2018年11月15日，中国出版  
5994-0406ZHCN

