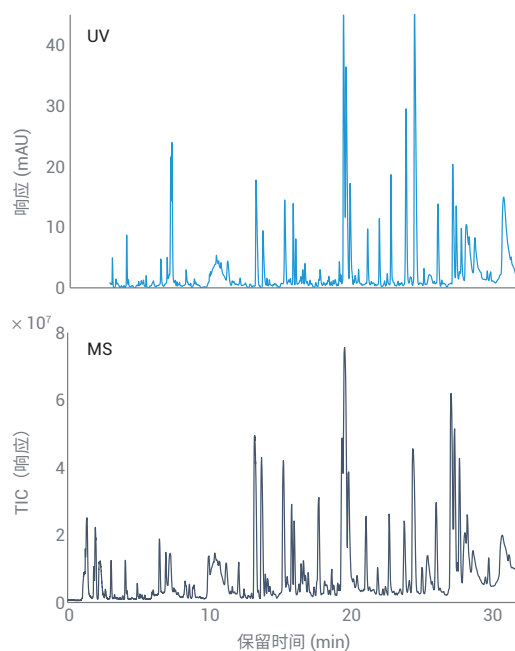


稳定可靠的肽谱分析

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统 — 基于 UV 和 MS 的 mAbs 一级结构和 PTMs 分析新平台



作者

André Feith
安捷伦科技有限公司

摘要

肽谱分析是阐明单克隆抗体 (mAbs) 一级结构的金标准。而成功进行肽谱分析的关键在于能够实现高质量多肽分离的稳定可靠的液相色谱系统。在本应用简报中，我们介绍了肽谱分析的首选系统 — Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统。对已发表的 NISTmAb 全面肽谱分析方法的重建表明，即使采用非常平缓的梯度，其相对保留时间偏差也十分出色（小于 0.1%）。进一步的方法开发使总运行时间缩短了 60%，并能够保持出色的相对标准偏差和峰容量值。此外，将 1290 Infinity II 生物液相色谱系统直接连接至 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，作为方法开发系统配置的示例，可轻松实现整个生物药物生产链的方法转移。

前言

肽谱分析是一种用于生物药物一级结构和翻译后修饰 (PTMs) 分析的技术, 广泛应用于当今工业生物技术领域。一般而言, 采用自下而上的方法进行 mAb 的变性、烷基化和酶解。随后, 使用反相液相色谱甚至在某些情况下使用亲水相互作用色谱通过 HPLC 或 UHPLC 分离得到的肽段。涉及的检测方式有两种, 可以使用质谱 (MS) 鉴定药用物质, 或者在质量控制 (QC) 环境中使用紫外 (UV) 吸光度检测比较样品色谱图与参比谱图的一致性。肽谱分析可作为生物药品评估的验收标准的一部分, ICH Q6B 指南中对此进行了阐述^[1]。通过使用 LC/MS 或 UV, 可以评估肽谱的变化 (例如增加的氧化或脱酰胺基化^[2], 新的序列异构体的出现^[3] 或多聚糖组成的变化^[4])。因此, 精密度和稳定性对于放行和开发安全有效的生物药物至关重要, 使用紫外线检测器时尤其如此。

本应用简报展示了用于肽谱分析的新型平台 — 全新 1290 Infinity II 生物液相色谱系统。该系统利用高精度的 Agilent 1290 Infinity II 生物高速二元泵和生物兼容的不含铁流路, 特别适用于多肽、蛋白质和代谢物等生物分子分析。

实验部分

设备

与 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 联用的 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A), 配备一个标准流速 Quick Connect 快速连接生物热交换器 (G7116-60071) 和两个安捷伦热平衡装置 (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD)(G7114B), 配备生物微量流通池 (用于 VWD, 3 mm, 2 μ L, RFID)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

软件

- Agilent MassHunter 工作站数据采集软件 (B.09.00)
- Agilent MassHunter 定性分析软件 (B.10.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm (B.10.00)

色谱柱

- Agilent AdvanceBio 肽谱分析柱, 2.1 $\times$ 250 mm, 2.7 μ m (部件号 651750-902)
- Agilent AdvanceBio 肽谱分析快速保护柱, 2.1 $\times$ 5 mm, 2.7 μ m (部件号 851725-911)

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 150 mm, 1.8 μ m (部件号 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 快速保护柱, 2.1 $\times$ 5 mm, 1.8 μ m (部件号 821725-901)

化学品

LC 级乙腈、碳酸氢铵、三(2-羧乙基)膦和 2-碘乙酰胺购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 VWR (Darmstadt, Germany)。胰蛋白酶 (猪, 质谱级) 购自 G-Biosciences (St. Louis, USA)。

样品前处理

向含有 0.8 mg Agilent-NISTmAb (部件号 5191-5744) 的 100 μ L 碳酸氢铵 (100 mmol/L) 中加入 2 μ L 三(2-羧乙基)膦 (TCEP, 200 mmol/L) 进行变性和还原, 并在 60 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。使用 4 μ L 2-碘乙酰胺 (IAM, 200 mmol/L, 室温下 1 小时) 对其进行烷基化处理后, 用 2 μ L TCEP 淬灭过量的 IAM (室温下 1 小时), 然后用 0.8 mL 25 mmol/L 碳酸氢铵进行稀释, 加入胰蛋白酶 (NISTmAb 与胰蛋白酶比例 20:1, w/w)。在 37 $^{\circ}$ C 下过夜酶解后, 加入 2 μ L 甲酸使所得悬液的 pH 值低于 4。

表 1. 方法 A: NISTmAb 全面肽谱分析方法，摘自 Mouchahoir & Schiel, 2018^[5]

参数	值
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm + 快速保护柱 2.1 × 5 mm
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min 时 B 为 2% 110.00 min 时 B 为 45% 110.01 min 时 B 为 97% 125.00 min 时 B 为 97% 125.01 min 时 B 为 2% 150.00 min 时 B 为 2%
流速	0.200 mL/min
温度	40 °C, 装有热平衡装置
检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 3
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 2. 方法 B: 优化且时间缩短的肽谱分析方法

参数	值
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm + 快速保护柱 2.1 × 5 mm
溶剂	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 乙腈 + 0.1% 甲酸
梯度	0.00 min 时 B 为 2% 44.00 min 时 B 为 45% 44.01 min 时 B 为 97% 50.00 min 时 B 为 97% 50.01 min 时 B 为 2% 60.00 min 时 B 为 2%
流速	0.300 mL/min
温度	40 °C, 装有热平衡装置
紫外检测	VWD: 214 nm, 10 Hz/MS: 见表 3
进样	进样量: 15 μL 样品温度: 4 °C 冲洗: 用水冲洗 3 s (清洗口)

表 3. 多肽迭代 MS/MS 分析的离子源和质谱参数

参数	值
仪器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
干燥气温度	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	<i>m/z</i> 100–1700
采集速率	8 质谱图/秒
自动 MS/MS 范围	<i>m/z</i> 50–1700
分离峰宽	窄 (约 <i>m/z</i> 1.3)
母离子/循环	10
碰撞能量	电荷态 2: 3.1 (斜率) 和 1 (偏移) 电荷态 3 和 > 3: 3.6 (斜率) 和 -4.8 (偏移)
母离子阈值	1000 响应值和 0.001%
主动排除	采集一个谱图后排除 0.2 min
扫描速度基于母离子丰度	是, 25000 响应值/质谱图
MS/MS 累积时间限	是
纯度	严格性: 100%/截留率: 30%
同位素模型	肽
母离子排序	先按电荷态, 再按丰度进行排序

结果与讨论

蛋白质生物药物（例如 mAbs）的胰蛋白酶酶解产物存在高度复杂的大量肽段混合物。为测定和分析这些生物药物的一级结构，需要使用很长时间的平缓梯度，其运行时间可长达数小时，对仪器的要求较高。为了展示 1290 Infinity II 生物液相色谱系统对这一挑战性分析的适用性，我们选择重建了之前由美国国家标准技术研究院 (NIST) 发布用于 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物的 LC/UV 和 MS 方法^[5]。在本研究中，使用长度为 250 mm 的 AdvanceBio 肽谱分析色谱柱，方法总运行时间为 2.5 小时（方法 A，表 1）。此外还开发了第二种液相色谱方法，利用 ZORBAX RRHD Eclipse Plus 色谱柱的亚 2 μ m 填料缩短运行时间（方法 B，表 2）。图 1 显示了使用 Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (VWD) 检测的两种方法的色谱图。

在两幅色谱图中可以观察到相似的肽谱。但是，与最初发布的 NIST 方法 A 的 80 分钟运行时间相比，使用方法 B 可使大多数分析物在 30 分钟内洗脱。因此，总运行时间可以缩短 60%。为系统地评价 1290 Infinity II 生物液相色谱系统的精密度和稳定性，两种方法均选择了 8 个峰。然后，基于 10 次连续进样计算保留时间标准偏差（图 2）。

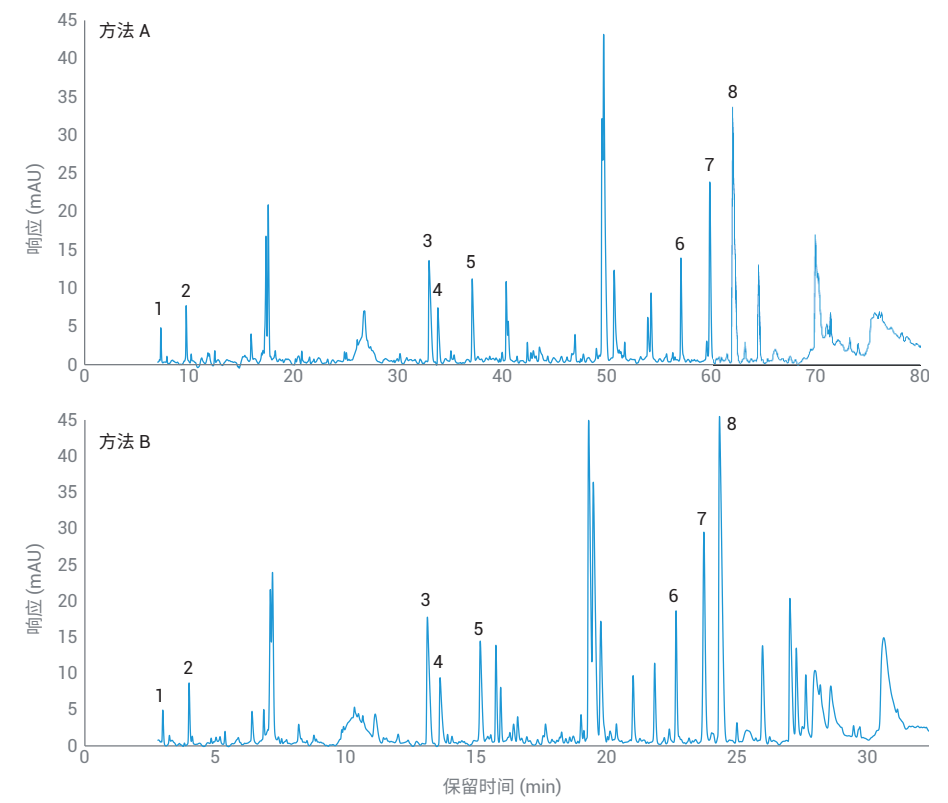
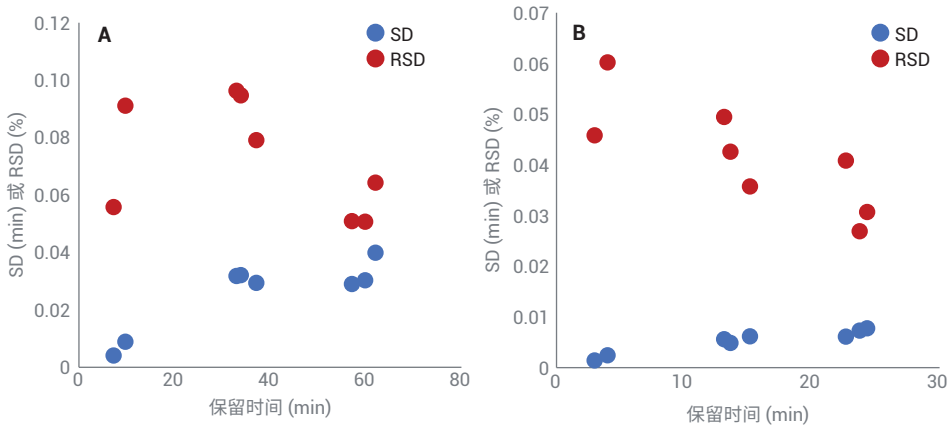


图 1. 使用方法 A 和 B，通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图。选取 8 个峰用于后续的保留时间精度和峰容量计算



	梯度斜率 (%B/min)	Ø SD (min)	Ø RSD (%)	P _{C,4σ} (-)
方法 A	0.39	0.026	0.073	428
方法 B	0.98	0.005	0.039	348

图 2. 通过 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统获得的方法 A 和 B 的保留时间精度绝对 (SD) 值和相对 (RSD) 值。梯度斜率和峰容量如表所示

方法 A 和 B 的相对保留时间偏差均小于 0.1%，表明 1290 Infinity II 生物高速泵即使在非常平缓的梯度斜率（分别为 0.39 和 0.98% B/min）下仍可实现卓越的性能。为评估液相色谱方法的综合分离特性，计算了 4 σ 峰容量，并将其作为分离质量的衡量指标。由于方法 A 的运行时间更长，其相应的峰容量值最高，为 428。但是，方法 B 凭借出色的平均 RSD (0.039%) 和高峰容量 (348)，成为 NIST 提供的已发表肽谱分析方法的重要替代选择，并可大大缩短运行时间。

生物技术环境中进行肽谱分析的典型工作流程依次使用 UV 和 MS 检测器。采用这一设置后，可使用两个检测器进行 MS 鉴定肽段的方法开发。建立该方法后，可以将分析轻松转移到紫外检测器，实现 QC 环境中的高通量分析。为证明这一情况，将 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 直接连接，并使用方法 B 重新分析 NISTmAb 的胰蛋白酶酶解产物。如表 3 所示，MS 检测在迭代 MS/MS 模式下进行。得到的色谱图如图 3 所示。

即使没有采取任何特殊措施来防止峰展宽，分离度仍足够满足可靠 MS 检测的需要。使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件，可以方便地对 mAbs 的一级结构进行鉴定和确认。将 MS 和/或 MS/MS 水平上鉴定得到的多肽与所选生物药物的参考序列进行比较，可实现 PTMs 的分析与相对定量。采用这种方法，可鉴定出所谓的 PENNY 肽 (GFYPDSIAVEWESNGQPENNYK)^[6] 以及

相应的脱酰胺基化异构体。PENNY 肽是几乎所有人源或人源化 mAbs 共有的保守区域 (Fc) 的一部分，可用作诱导脱酰胺化的良好指标。图 4 所示为这些肽段的放大图。

完成肽段鉴定后，凭借优化的肽谱分析方法 B 的强大分离能力以及 1290 Infinity II 生物液相色谱系统出色的保留时间精度，在这种情况下也可以通过紫外检测进行相对定量。

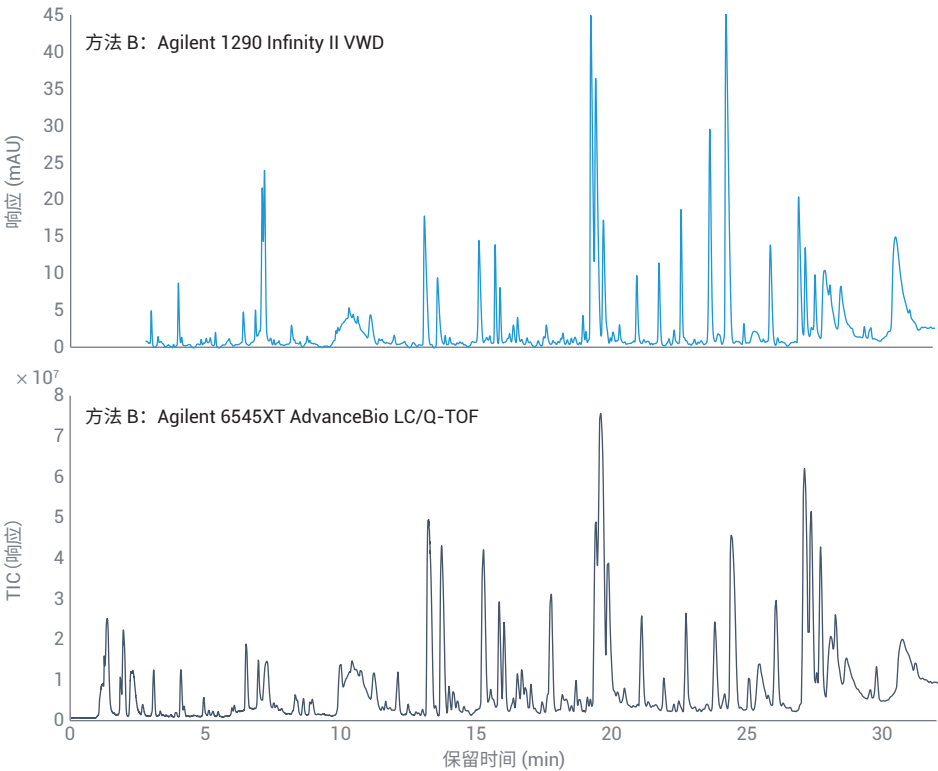


图 3. 使用配备生物兼容性微量流池的 Agilent 1290 Infinity II VWD（上图）和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（下图），检测 NISTmAb 胰蛋白酶酶解产物得到的色谱图

结论

通过肽谱分析方法可以分析序列或糖基化变异、氧化和脱酰胺基化等关键质量属性 (CQA)。但是, 必须确保使用的方法和仪器稳定且可靠, 才能实现最佳结果。在本应用简报中, 我们证明了全新 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可以满足这些高预期。通过重建已发表的 NISTmAb 全面肽谱分析方法, 可在常规操作下实现小于 0.1% 的保留时间精度偏差。通过优化这一方法, 采用 1290 Infinity II 生物高速泵, 总运行时间可缩短 60%, 同时不影响出色的精度和分离质量。在方法开发环境中的可用性测试结果表明, 1290 Infinity II 生物液相色谱系统与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的直接连接能力, 使方法能够直接转移到高通量 QC 环境。综上所述, 1290 Infinity II 生物液相色谱系统可用作基于 UV 和 MS 的 mAbs 一级结构和 PTMs 分析的新平台。

参考文献

1. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B.(1999). Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf
2. Li, X. *et al.* High Throughput Peptide Mapping Method for Analysis of Site Specific Monoclonal Antibody Oxidation. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1460, 51–60
3. Li, Y. *et al.* Characterization of Alanine to Valine Sequence Variants in the Fc Region of Nivolumab Biosimilar Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *MAbs* **2016**, 8, 951–960
4. Wang, T. *et al.* Application of a Quantitative LC-MS Multiattribute Method for Monitoring Site-Specific Glycan Heterogeneity on a Monoclonal Antibody Containing Two N-Linked Glycosylation Sites. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 3562–3567
5. Mouchahoir, T.; Schiel, J. E. Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NISTmAb. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 2111–2126
6. Chelius, D.; Rehder, D. S.; Bondarenko, P. V. Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6004–6011

www.agilent.com

DE.1797222222

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, 2020
2020 年 10 月 12 日, 中国出版
5994-2718ZHCN

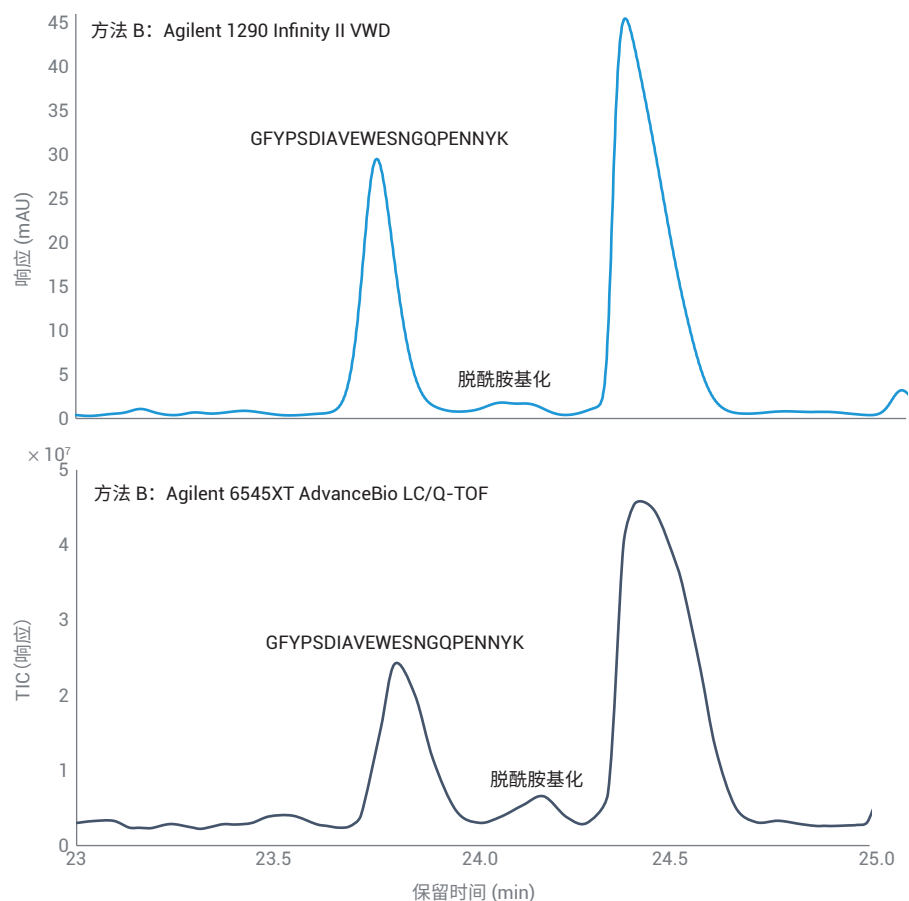


图 4. 先前色谱图的放大视图, 突出显示 PENNY 肽 (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) 和相应脱酰胺基化异构体的分离