

利妥昔单抗创新药物与生物仿制药的 LC/MS/MS 肽谱分析比较

作者

Suresh Babu C.V.
安捷伦科技有限公司

摘要

生物仿制药的开发和生产需要与创新生物治疗产品进行可比性研究。本应用简报介绍了使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统对单克隆抗体 (mAb) 生物制剂进行肽谱分析，以评估利妥昔单抗的创新药物与两种生物仿制药之间的相似性和差异性。胰蛋白酶酶解后的 mAb 序列覆盖率 > 97%。液相色谱/质谱联用系统 (LC/MS) 肽分离谱图显示了创新药物和生物仿制药 mAb 之间的肽丰度差异，揭示了脱酰胺基化和氧化等不同程度的翻译后修饰 (PTM)。

前言

mAb 型治疗药物的生产发展迅速^[1]。大约 20 年前进入市场的创新药物 mAb 的专利即将到期，这为开发高性价比的生物仿制药提供了机会。生物仿制药是其对照药品的近似复制，但由于两者生产工艺中不可避免的差异，因此并非完全相同。这些过程高度复杂，即使是微小偏差也可能会给产品带来变异性和内在的分子异质性。监管机构要求对生物仿制药进行全面表征，以证明其在安全性、纯度和有效性方面与创新药物产品相当。生物仿制药产品的开

发目的在于阐明创新药物与生物仿制药之间的相似性和差异性。分析可比性是显示生物相似性的基本要求。

生物制剂的关键质量属性 (CQA) 决定了它们的有效性和安全性。糖基化、氧化和脱酰胺基化等 PTM 变异属于能够显著影响生物学功能的 CQA。在生物制药行业，基于 LC/MS 的肽谱分析是蛋白质鉴定和监测 PTM 的主要工具。高分离度的可靠色谱分离和精确质量数测量对于成功进行肽谱分析实验至关重要。

在本研究中，使用由 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台、Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF，以及用于数据分析的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件组成的一体化工作流程，对利妥昔单抗的创新药物与两种生物仿制药 mAb 进行肽谱分析（图 1）。通过比较重链、轻链和完整 mAb 的序列相似性百分比，确定氨基酸覆盖率。研究结果证明，安捷伦的肽谱分析工作流程适用于鉴定和监测重要 PTM（例如脱酰胺基化和氧化）。



图 1. 安捷伦肽谱分析工作流程

实验部分

材料

创新药物和生物仿制药单克隆抗体购自当地经销商（新加坡），并根据制造商的使用说明进行储存。三羟甲基氨基甲烷、盐酸胍、三羧甲基磷酸 (TCEP)、碘乙酰胺 (IAA)、甲酸、三氟乙酸和 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。

样品前处理：胰蛋白酶酶解

将创新药物和生物仿制药 mAb 还原/烷基化，并用胰蛋白酶酶解，然后使用 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台对其进行脱盐处理。简而言之，将含有 mAb (10 µg/µL) 的样品板复溶于变性缓冲液 (含 5 mmol/L TCEP 和 150 mmol/L Tris 的 8 mol/L 盐酸胍, pH 8) 中，并在 60 °C 下温育 60 分钟。在进行变性和二硫键还原后，加入 133 mmol/L 碘乙酰胺 (室温下 40 分钟，避光) 对游离的半胱氨酸进行烷基化。降低盐酸胍的浓度，并在胰蛋白酶酶解前使用 150 mmol/L Tris-HCl 将溶液 pH 调至 7-8。在 37 °C 下进行胰

蛋白酶过夜酶解 (蛋白质与蛋白酶比例 20:1, w/w)。随后，通过 AssayMAP 试剂转移工具使用 0.1% 甲酸对样品进行酸化，以停止胰蛋白酶作用。使用 C18 反相柱执行 AssayMAP Bravo 肽段纯化方案 (脱盐)。使用 100 µL 60% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸灌注小柱，并用 50 µL 0.1% 三氟乙酸使其达到平衡，以 5 µL/min 的流速向小柱中注入 50 µL mAb 胰蛋白酶酶解样品，再使用 50 µL 0.1% 三氟乙酸对小柱进行清洗，然后使用 15 µL 60% 乙腈和 0.1% 三氟乙酸以 5 µL/min 的流速洗脱并混合至 160 µL 0.1% 甲酸中。

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

LC/MS 分析

采用 30 分钟的梯度，在 Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱 (2.1 × 150 mm, 2.7 µm) 上进行 LC/MS 肽谱分离。在迭代 MS/MS 模式下进行数据采集 (表 1)。

数据分析

使用 Agilent MassHunter BioConfirm 10 中的肽谱分析工作流程对数据进行处理。简而言之，提取分子特征并与固定修饰 (烷基化: C) 和可变修饰 (氧化: M, 脱酰胺基化: N、Q, 赖氨酸损失: K, 以及焦谷氨酸化: E) 的创新药物 mAb 序列进行匹配。MS 的质量容差为 10 ppm, MS/MS 为 30 ppm。根据与 MS/MS 特征匹配的肽段谱图计算序列覆盖率，并以 1% 假阳性率 (FDR) 过滤结果。

表 1. LC/MS 条件

参数	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
色谱柱	Agilent AdvanceBio 肽谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm, 120 Å
进样量	2 μL (2 μg/μL)
样品恒温箱	5 °C
流动相 A	0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度	0 分钟时 → 3% B 30 分钟时 → 40% B 33 分钟时 → 90% B 35 分钟时 → 90% B 37 分钟时 → 3% B 40 分钟时 → 3% B
停止时间	40.1 分钟
柱温	60 °C
流速	0.4 mL/min

参数	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
离子模式	正离子模式, 双 AJS ESI
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	35 psi
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	175 V
锥孔电压	65 V
Oct RF Vpp	750 V
参比质量	121.050873, 922.009798
采集模式	数据在扩展的动态范围 (2 GHz) 内采集
MS 质量数范围	110–1700 m/z
采集速率	8 张谱图/秒
自动 MS/MS 范围	50–1700 m/z
MS/MS 采集速率	3 张谱图/秒
分离峰宽	窄 (约 1.3 m/z)
母离子/循环	前 10
碰撞能量	电荷态 斜率 偏移 2 3.1 1 3 和 > 3 3.6 -4.8
MS/MS 阈值	1000 响应值和 0.001%
动态排除开启	重复一次, 然后排除 0.1 或 0.2 min
基于母离子丰度的扫描速率	是
靶标	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
母离子排序	先按电荷态, 再按丰度进行排序; +2, +3, > +3

结果与讨论

MassHunter BioConfirm 是用于蛋白质分析的全面而用户友好的数据分析工具。图 2 所示为 BioConfirm 10.0 软件的肽谱分析工作流程布局。对于肽谱分析实验，

该软件通过肽查找算法自动提取肽特征，并将 MS/MS 谱图与可能的 PTM 匹配，对肽序列进行确认和验证^[2]。此外，该软件还能自动对 PTM 进行相对定量，并以直方图的形式显示所获信息，以便快速查看数据，从而帮助用户更快做出决策。可

以处理和比较不同蛋白质酶解样品的多个肽谱分析文件。凭借这些强大而用户友好的功能，MassHunter BioConfirm 软件非常适合创新药物和生物仿制药肽谱分析实验的可比性评估。



图 2. Agilent MassHunter BioConfirm 10.0 软件的肽谱分析屏幕截图

肽谱分析常用于通过确认氨基酸序列鉴定蛋白质，它还是表征和监测 PTM 的首选方法。本研究选择一种创新药物和两种生物仿制药 mAb 进行可比性评估。图 3 显示了创新药物和生物仿制药 mAb 胰

蛋白酶肽谱的 LC/MS 结果。AdvanceBio 肽谱分析色谱柱的 30 分钟梯度实现了高分辨率的肽分离。利用 MassHunter BioConfirm 软件中的自动化肽谱分析工作流程，将通过 LC/MS/MS 分析得到的肽

质量数与理论酶解物进行匹配，该酶解物 mAb 序列经过首选修饰。BioConfirm 软件自动鉴定并分配 MS/MS 数据对应的肽。在迭代 MS/MS 下，重链和轻链序列覆盖率 > 97% (表 2)。

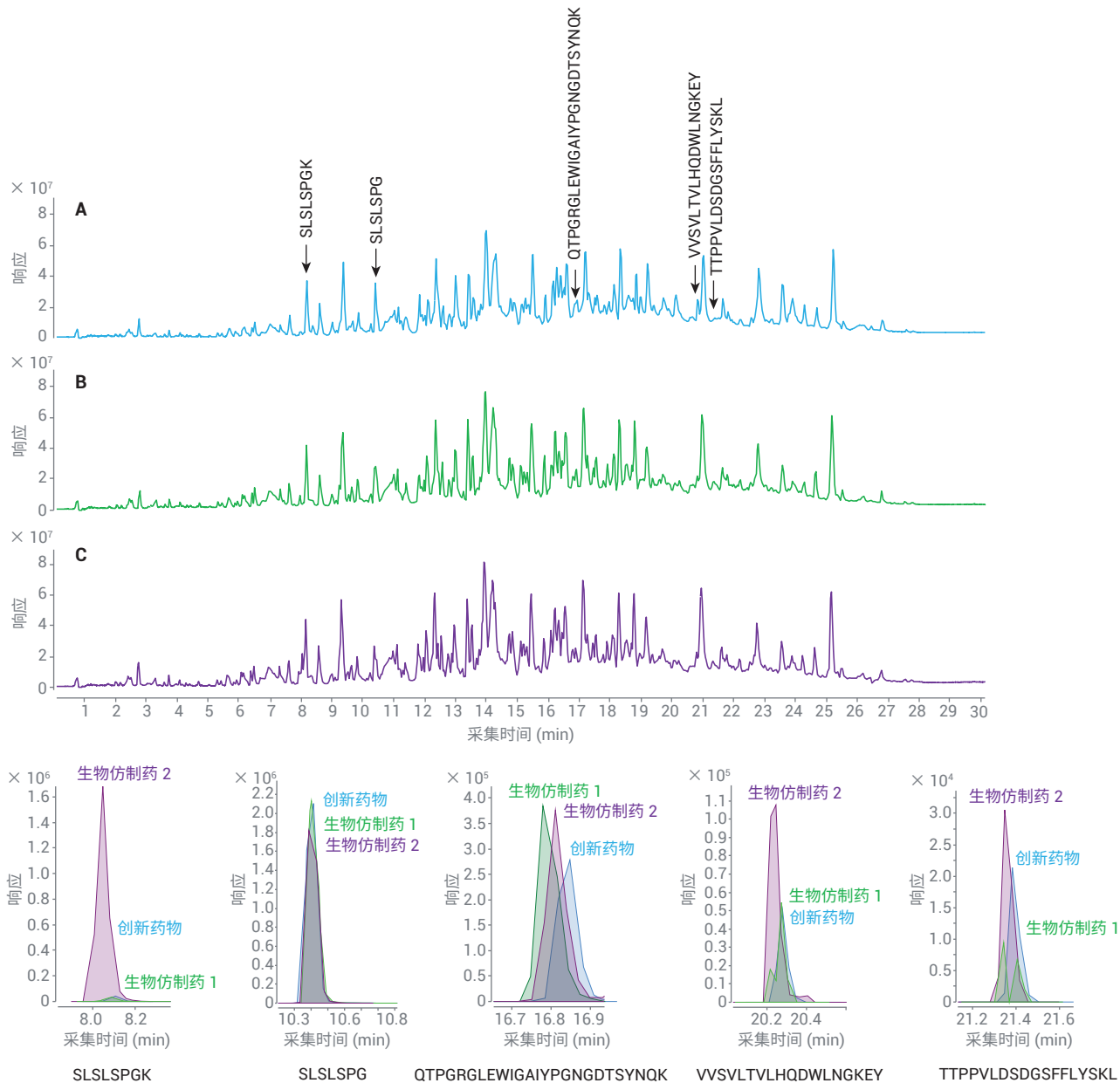


图 3. 胰蛋白酶酶解后的 mAb 比较。(A) 创新药物、(B) 生物仿制药 1 和 (C) 生物仿制药 2 的 TIC。箭头突出显示了 TIC 曲线的差异，下方 ECC 表示相应的肽

表 2. 平均序列覆盖率

mAb 样品	序列覆盖率	
	重链	轻链
创新药物	98.23	100
生物仿制药 1	98.10	99.06
生物仿制药 2	97.59	100

对自动 MS/MS 获得的胰蛋白酶酶解物的总离子流色谱图 (TIC) 进行了比较, 以发现创新药物与生物仿制药 mAb 之间的相似性/差异性。如图 3 所示, 通过检查离子色谱图揭示了肽表达水平的差异。与创新药物和生物仿制药 1 相比, 生物仿制药 2 (约 8 分钟) 中富含 C 端序列 (SLSLSPGK)。相反, 创新药物 mAb (约 10.4 分钟) 中富含赖氨酸截短肽形式 (SLSLSPG)。其他三种肽

(QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK、VVSVLTVLHQDWLNGKEY 和 TTPPVLDSDGSFFLYSKL) 在创新药物和生物仿制药 mAb 之间表现出不同的强度水平。

PTM 是可能与药效和安全性相关的 CQA。因此, 对于生物仿制药与创新药物 mAb 对之间的 PTM 水平的鉴定和比较至关重要。本应用简报展示了关于创新药物和生物仿制药 mAb 之间的两种常见修饰 (氧化和脱酰胺基化) 的结果数据。

氧化

氧化是 mAb 的常见 PTM, 可发生在生物处理开发的各个阶段, 例如纯化、制剂和存储。为比较创新药物和生物仿制

药 mAb 的氧化水平, 本研究选用代表性重链 DLTMISR 肽。图 4 比较了氧化和未修饰的 DLTMISR 肽的 MS/MS 谱图与分离结果, 以及 M256 氧化的相对定量。y₄ 与 y₅ 离子质量数的检查结果表明, 氧化的 MS/MS 谱图中增加 16 Da, 表明 Met 残基发生了氧化。图 4C 以直方图的形式显示了 M256 相对氧化水平的三次重复测定结果, 该直方图是 MassHunter BioConfirm 软件所提供的适用于所有 mAb 的实用功能。创新药物与生物仿制药 1 mAb 的 M256 氧化水平的直方图检查结果相当 (分别为 1.48% 和 1.27%), 而生物仿制药 2 的氧化水平略高 (2.5%)。

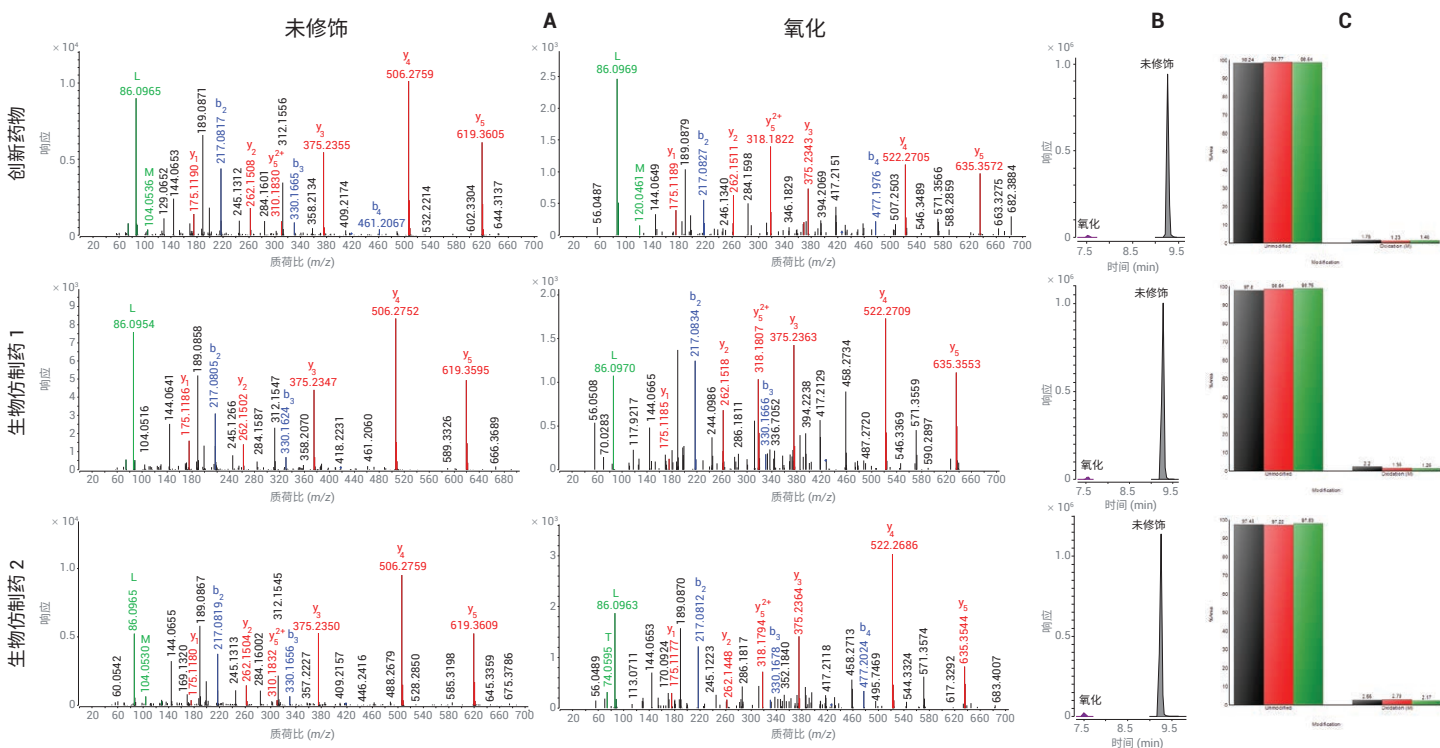


图 4. DLTMISR 肽的氧化分析。(A) 未修饰和氧化肽的 MS/MS 谱图, (B) ECC 叠加图, 以及 (C) M256 的相对定量 (3 次重复测定)

脱酰胺基化

脱酰胺基化是另一种常见的修饰，主要发生在天冬酰胺 (N) 和谷氨酰胺 (Q) 残基上。N 残基上的脱酰胺基化比 Q 残基上的更快。采用重链 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 肽序列

(375–396) 对创新药物和生物仿制药 mAb 的脱酰胺基化水平进行了比较。图 5 显示了 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 的分析结果。MS/MS 谱图的分析结果显示， y_9 子离子具有 +1 Da 质量数正向偏移，同时 y_8 的 y 离子具有相同质量数的

负向偏移，表明发生了 Asn388 脱酰胺基化。相对定量分析结果显示，与创新药物 mAb (10.92%) 相比，生物仿制药 1 和 2 的 Asn388 脱酰胺基化水平（分别为 19.99% 和 19.83%）更高。

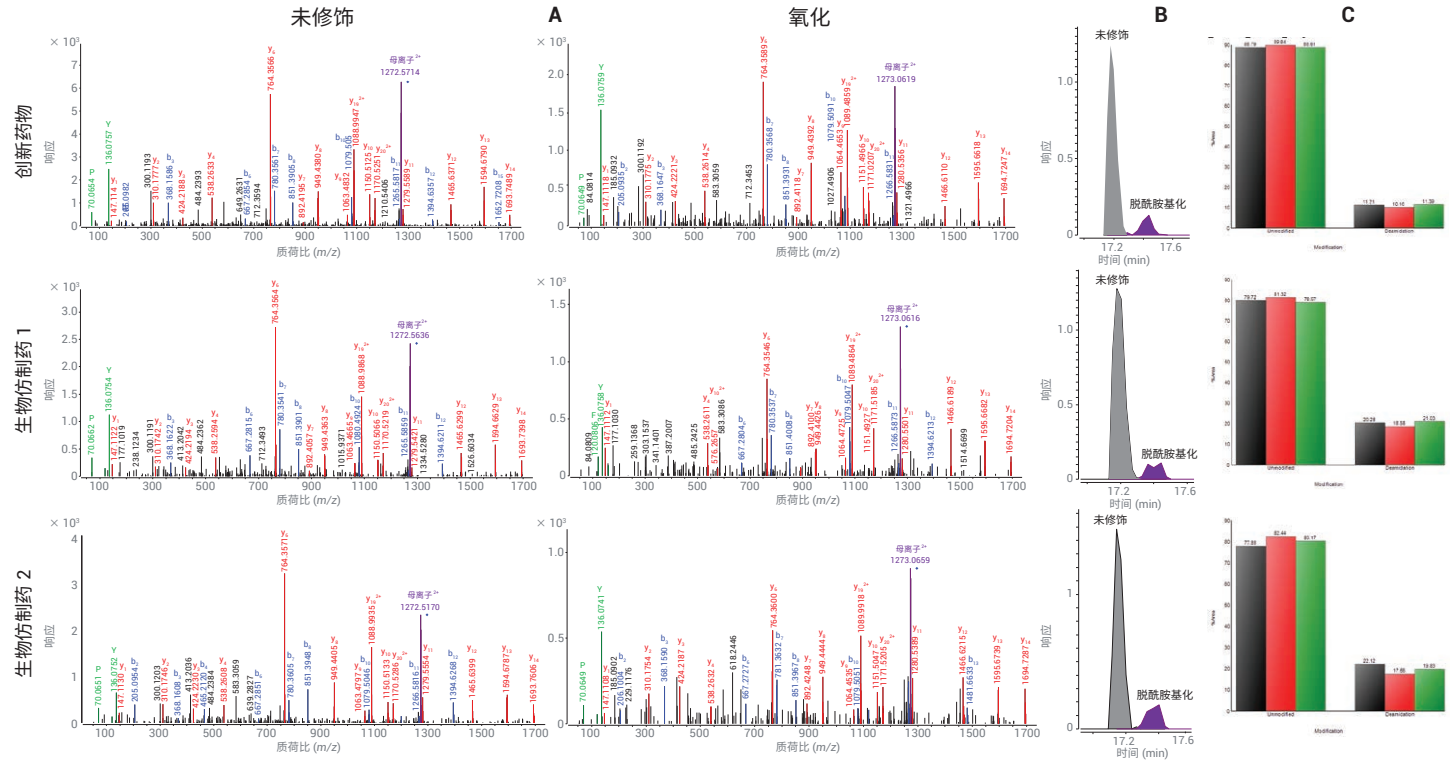


图 5. GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK 肽序列 (375-396) 的脱酰胺基化分析。(A) 未修饰和脱酰胺基化肽的 MS/MS 谱图，(B) ECC 叠加图，以及 (C) N388 的相对定量 (3 次重复测定)

此外，还使用 BioConfirm 的直方图功能对其他肽的 PTM 进行了分析。图 6 显示了创新药物和生物仿制药 mAb 其他修饰残基的代表性相对定量。直方图的对比显示为监测一系列样品的质量属性水平提供了一种简便快捷的方法。

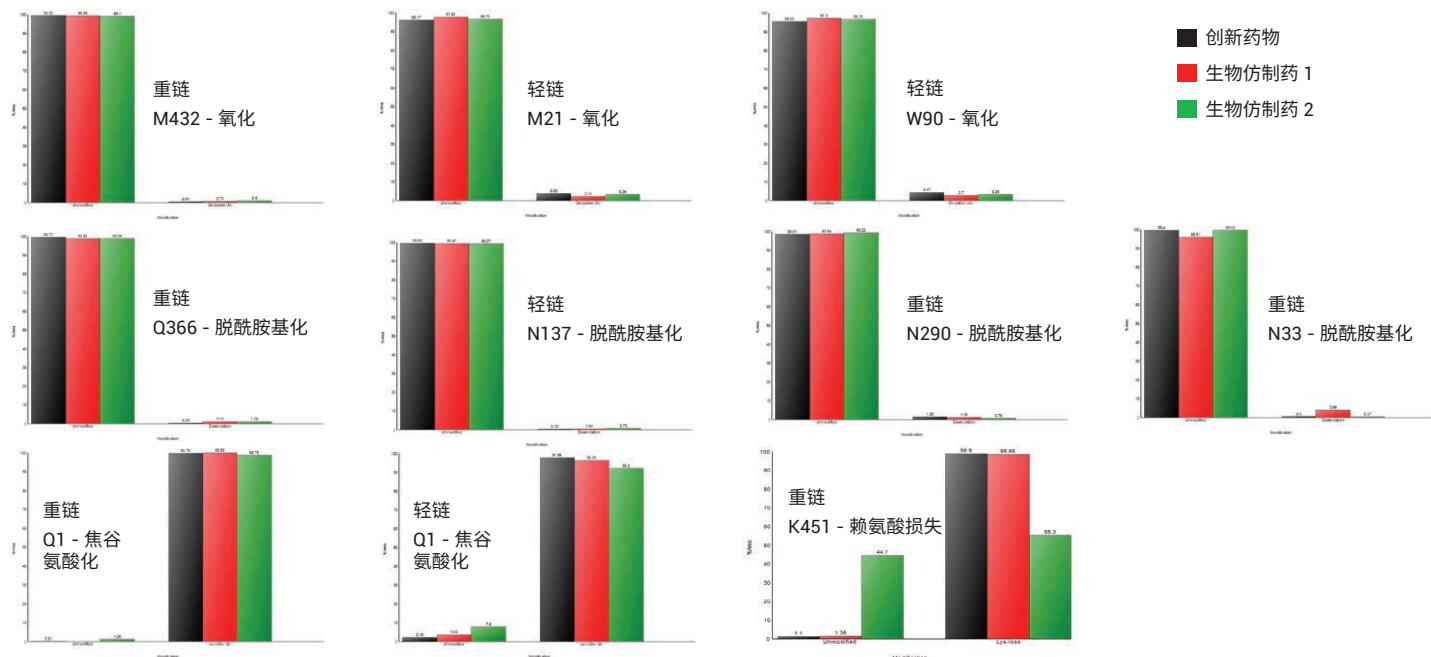


图 6. 显示 PTM (氧化、脱酰胺基化、赖氨酸截短, 以及谷氨酰胺 N 端环化为焦谷氨酸) 相对定量的代表性直方图

结论

本应用简报介绍了一种一体化肽谱分析工作流程，该工作流程采用 Agilent AssayMAP Bravo 平台、安捷伦精确质量数 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 以及用于数据分析的简便易用的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件对创新药物和生物仿制药 mAb 进行研究。肽谱分析获得的结果为创新药物和生物仿制药 mAb 提供了出色的序列覆盖率。通过高效色谱分离和高质量 MS/MS 谱图实现了对 PTM 的精确表征。这种一体化方法还可实现对创新药物和生物仿制药 mAb 之间各种 PTM 的相对定量。

参考文献

1. Ecker DM1, Jones SD, Levine HL. The Therapeutic Monoclonal Antibody Market. MAbs. 7(1):9-14 **2015**
2. 安捷伦科技公司, 出版号 5991-8552ZH-CN

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，2019
2019 年 12 月 18 日，中国出版
5994-1495ZH-CN
DE.0897222222

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

