

利用 LCMS-9030 对 NISTmAb 进行整体蛋白分析

LCMS-QTOF-015

摘要： 本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对重组人源化单抗 IgG1 κ NISTmAb 进行整体蛋白分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics (PMi 公司) 软件对多电荷分析结果进行解卷积和修饰基团确认。结果显示该重组人单抗含有不同的糖基修饰，包含 G2F/G2F, G1F/G2F, G1F/G1F, G0F/G0F, G0F/G1F, G0F/G1F+NeuAc, 和理论值的偏差均小于 5Da。

关键词： Q-TOF 整体蛋白分析 糖基化

单克隆抗体药物作为一种具有独特优势的生物靶向治疗药物，已经成为目前全球药物研发的热点。单克隆抗体的制备可以有杂交瘤制备与基因重组制备两种方法，得到的单克隆抗体分别为免疫单克隆抗体和重组单克隆抗体。相较于免疫动物的制备方法，基因重组的方法需要事先知道抗体的基因序列，而优势是可以对抗体进行抗体的人源化。按照抗体人源化流程，可以将单克隆抗体分为：鼠源性抗体、人鼠嵌合抗体、改型抗体、全人源化抗体。目前正在进行临床试验的抗体药物多达几百种，尤其是全人源化单克隆抗体（单抗，mAb），由于其安全性，已经成为抗体制剂开发的主流，是目前生物技术药物研究中最活跃的部分。

良好的质量控制是单抗药物研发、生产的重要

环节。单抗药物的关键质量因素包括多个方面，分子量测定（整体蛋白分析、亚基分析等）、糖型分析、一级结构、高级结构、大小异质体分析、电荷异质性分析等，此类关键质量因素分析需要色谱、质谱、光谱等多机型分析手段进行监测分析。其中整体蛋白分析是蛋白类药物研发和质控的必测项目，一般利用高分辨质谱进行分析，在 ESI 源电离模式下单抗分子带 40~70 个电荷，质荷比 (m/z) 范围在 2000~4000 之间。

本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对重组人源化单抗 IgG1 κ NIST mAb 进行整体蛋白分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics (PMi 公司) 软件对多电荷分析结果进行解卷积和修饰基团确认。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 系统。具体配置为 LC-30AD 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20Alite 系统控制器，LCMS-9030 Q-TOF 质谱仪，LabSolutions Ver. 5.96 色谱工作站，Protein Metrics 数据处理软件 (PMi 公司)。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：YMC-Triart Bio C4 2.1 mm I.D. × 50 mm L., 1.9 μ m, 30nm

流动相：A 相 - 0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 0.1% 甲酸乙腈溶液

流速：0.4 mL/min 柱温：60°C

进样体积：2 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	pump	B.Conc	10
2.50	pump	B.Conc	90
3.50	pump	B.Conc	90
3.60	pump	B.Conc	10
4.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI+

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

干燥气流速: 10.0 L/min

扫描模式: MS 一级质谱扫描

接口电压: 4.5 kV

事件时间: 0.2 s

■ 样品前处理

将购买的 NISTmAb (重组人单抗 IgG1κ) 标准品溶液用超纯水稀释至 100 μg/ml, 待测。

■ 结果与讨论

3.1 整体蛋白分析色谱图和质谱图

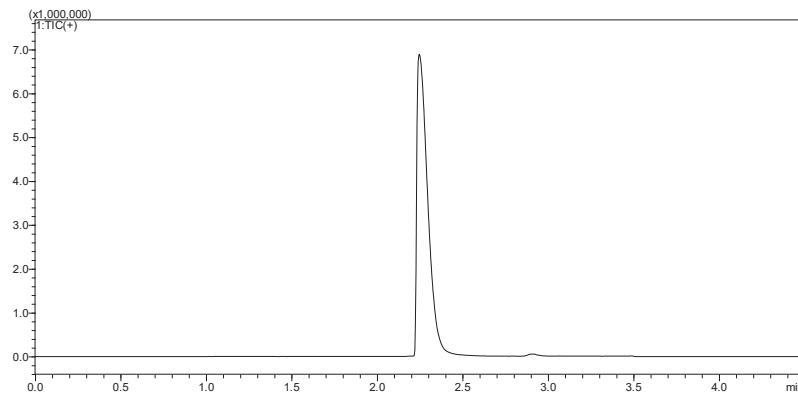


图 1 NISTmAb 色谱图

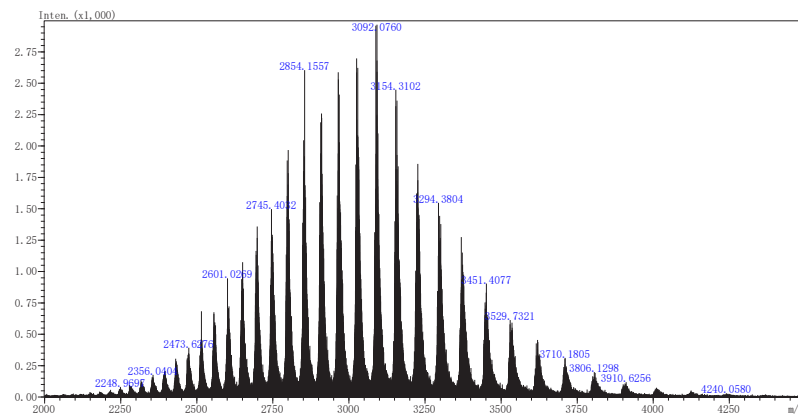


图 2 NISTmAb 质谱图

3.2 数据处理

将 LabSolutions 采集好的数据直接导入到 Protein Metrics 软件的 PMi-Intact 模块，并导入 NIST mAb 的氨基酸序列，进行数据解卷积和修饰基团分析，在软件中勾选可能的修饰基团（图 3），并设置解卷积的其他相关参数。

Enable auto assign	Mass name	Mass (Dalton)
<input checked="" type="checkbox"/>	G0F/G0F-GlcNAc	2687.6
<input checked="" type="checkbox"/>	G0F/G0F-Fuc	2744.6
<input checked="" type="checkbox"/>	G0F/G0F-Lys	2762.6
<input checked="" type="checkbox"/>	G0F/G0F	2890.8
<input checked="" type="checkbox"/>	G0F/G1F	3053
<input checked="" type="checkbox"/>	G1F/G1F	3215.1
<input checked="" type="checkbox"/>	G1F/G2F	3377.3
<input checked="" type="checkbox"/>	G2F/G2F	3539.4
<input checked="" type="checkbox"/>	G2F/G2F+NeuAc	3830.7
<input checked="" type="checkbox"/>	- G0F	-1445.4
<input checked="" type="checkbox"/>	- 2Lys	-256.3
<input checked="" type="checkbox"/>	- GlcNAc	-203.2
<input checked="" type="checkbox"/>	- Fuc	-146.1
<input checked="" type="checkbox"/>	- Lys	-128.2

图 3 PMi-Intact 模块参数设置

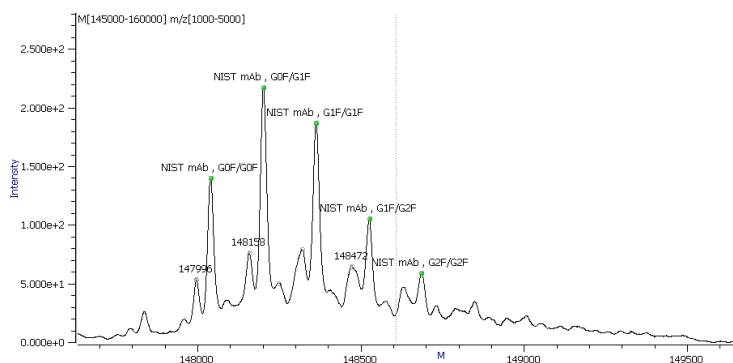


图 4 解卷积后的谱图

表 2 软件自动识别的不同修饰的 NIST mAb 结构

名称	实测值	理论值	偏差 (Da)	偏差 (ppm)
NISTmAb+G2F/G2F	148685.16	148685.88	-0.72	-4.87
NISTmAb+G1F/G2F	148525.65	148523.78	1.87	12.56
NISTmAb+G1F/G1F	148362.90	148361.58	1.32	8.87
NISTmAb+G0F/G1F	148201.37	148199.48	1.89	12.73
NISTmAb+G0F/G0F	148039.33	148037.28	2.05	13.84

结论

本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对重组人源化单抗 IgG1k NISTmAb 进行整体蛋白分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics (PMi 公司) 软件对多电荷分析结果进行解卷积和修饰基团确认。结果显示该重组人单抗含有不同的糖基修饰，包含 G2F/G2F, G1F/G2F, G1F/G1F, G0F/G0F, G0F/G1F, 和理论值的偏差均小于 3Da。