

利用 LCMS-9030 进行曲妥珠单抗药物肽图分析

LCMS-QTOF-029

摘要： 本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对曲妥珠单抗进行肽图分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件对肽图分析的结果进行解析。结果显示，在只应用胰蛋白酶的情况下，轻链和重链的序列覆盖率分别为 97.20% 和 88.44%。利用 Protein metrics 软件对肽段上的修饰基团进行解析，结果显示，该单抗的修饰类型主要有糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation)、脱酰胺 (Deamidated) 等。该方法快速、准确，分析精确度高，成功应用于曲妥珠单抗药物的检测，为单抗药物的肽图分析提供参考。

关键词： Q-TOF 单抗 肽图分析

曲妥珠单抗 (Trastuzumab)，是抗 ErbB2/HER2 (原癌基因人类表皮生长因子 2) 的单克隆抗体，为重组 DNA 衍生的人源化抗 P185 糖蛋白单克隆抗体，属 IgG1 抗体，含人的框架区以及能与 HER2 结合的鼠抗 -p185 HER2 抗体的互补决定区，人源化部分占 95%，鼠抗部分占 5%。曲妥珠单抗被广泛应用于各期 HER-2 阳性乳腺癌的治疗，于 1998 年被美国 FDA 批准，是第一个抗 HER-2 的人源化单克隆抗体，对 HER-2 高表达的转移性乳腺癌，具有独特功效，其在局部晚期乳腺癌、低危早期乳腺癌治疗中的应用疗效及安全性已经更新并在进行跟深入的研究，这对 HER-2 阳性乳腺癌治疗的优化和患者长期生存率的提

高都将产生深远影响。

在单克隆抗体的生产过程中，不同的理化因素易产生各种翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 变异体，如糖基化、氧化、脱酰胺、异构化等，这些 PTM 可能引起抗体理化性质变化，这些变化会对抗体效力、免疫原性和稳定性产生负面影响。因此抗体的 PTM 与产品的安全性、有效性和稳定性息息相关。本文采用岛津 LCMS-9030 Q-TOF 四极杆 - 飞行时间液质联用仪对曲妥珠单抗酶解后肽段进行分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件对检测结果进行解析。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用高效液相色谱仪 LC-30AD 与四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20Alite

脱气机：DGU-20A₅

输液泵：LC-30AD × 2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.96

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (150 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)，PN:227-30048-03，岛津 (上海) 实验器材有限公司

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：50°C

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 3%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pump	B.Conc	3
50.00	Pump	B.Conc	50
51.00	Pump	B.Conc	90
56.00	Pump	B.Conc	90
56.10	Pump	B.Conc	3
60.00	Controller	Stop	
26.00	控制器	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 和 MS/MS (DDA)

接口电压: 4.5 KV

事件时间: 0.1 s

■ 样品前处理

利用超纯水将曲妥珠单抗粉末制剂配制成 1.0 mg/mL 的溶液，然后吸取 10 μ L 该溶液样品，加入 80 μ L 还原溶液（50 mM Tris-HCl，含 8 M 尿素和 5 mM DTT），在 37°C 下震荡 60 min，结束后加入 4 μ L IAA 溶液（500 mM），在室温条件下避光震荡 30 min，然后加入 600 μ L 酶解缓冲液（50 mM Tris-HCl）和 5 μ L 胰蛋白酶溶液（含 1 μ g 胰蛋白酶），在 37°C 下反应 6 小时，酶解结束后加入 10 μ L 50% 甲酸水溶液终止酶解反应，然后转入低吸附 PP 材质的样品瓶，进行 LC/MS 分析。

■ 结果与讨论

3.1 曲妥珠单抗肽段色谱图

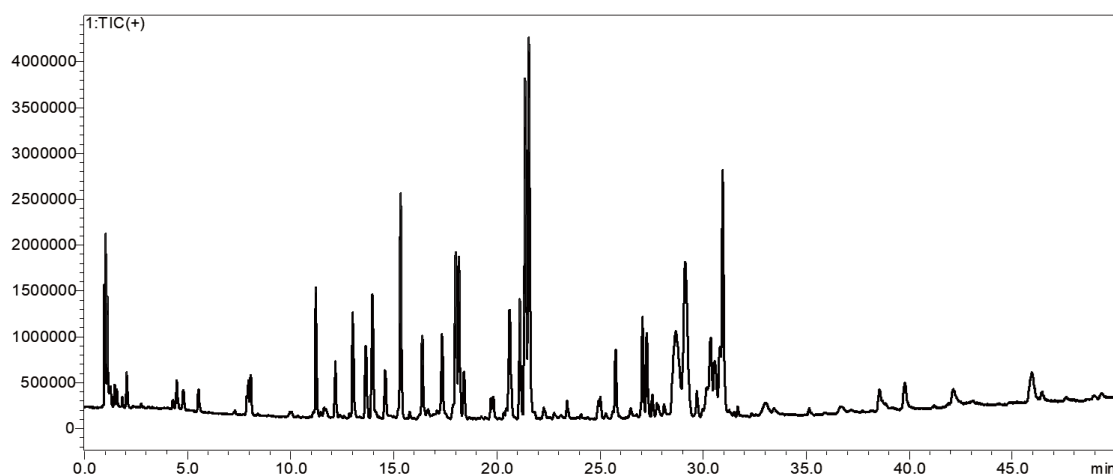


图 1 曲妥珠单抗酶解后的总离子流色谱图

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-PTM 模块，并导入曲妥珠单抗的氨基酸序列，进行蛋白序列覆盖率的计算和蛋白修饰基团分析。在仅使用胰蛋白酶的条件下，由图 2 可知曲妥

珠单抗重链的序列覆盖率为 88.44%，轻链覆盖率为 97.20%（表 2 和图 2）。通过该软件 PMi-PTM 模块不仅能查看每个肽段的一级质谱图，还可以根据二级质谱图校对肽段的碎片，尤其是带修饰的碎片基团，以肽段 EVQLVESGGGLVQPGGSLR 为例，可以根据二级质谱图清晰判断每个碎片的断裂位置（图 3）。

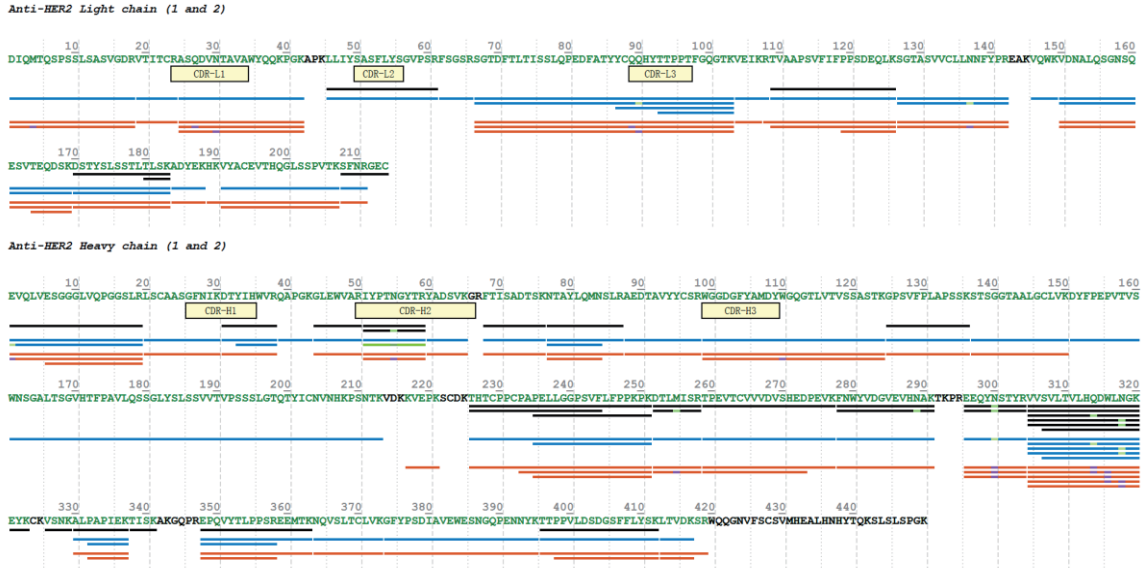
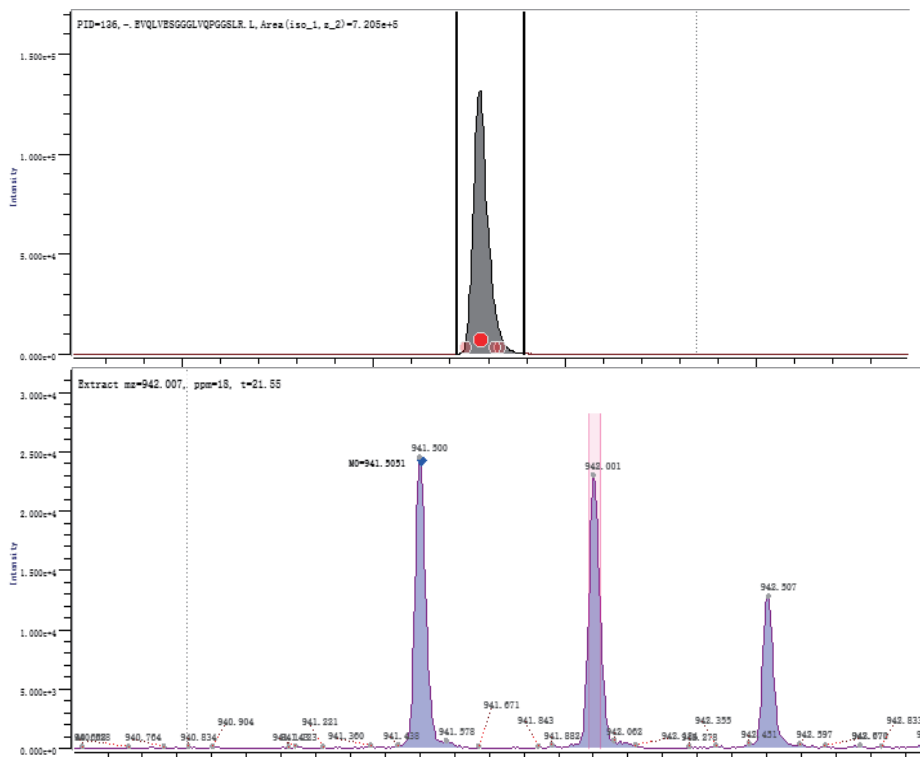


图 2 曲妥珠单抗酶解后序列覆盖图

表 2 酶解肽段序列覆盖结果

蛋白名称	覆盖的氨基酸个数 / 总氨基酸个数	序列覆盖率 %
曲妥珠单抗轻链	208 / 214	97.20
曲妥珠单抗重链	398 / 450	88.44



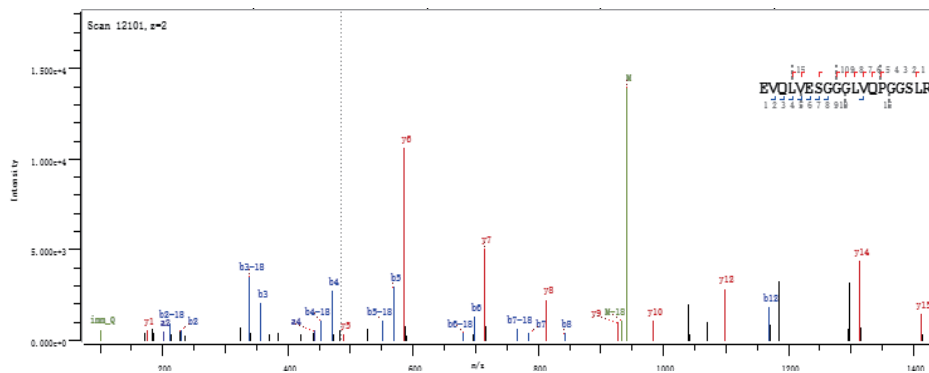


图3 肽段 EVQLVESGGGLVQPGGSLR 的色谱图和质谱图

经软件分析发现该曲妥珠单抗上存在的修饰有脱酰胺 (deamidated)、糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation) 等, 其中, Heavy chain N300 上全部发生了糖基化, W316 上的 52.1% 发生了双氧化, N55 上的 60.9% 发生了脱酰胺, 其余修饰类型所占比例均在 20% 以下 (表 3)。以焦谷氨酸环化 (pyro-Glu) 修饰为例, 肽段 EVQLVESGGGLVQPGGSLR 发生修饰后, 修饰后的肽段疏水性更强, 保留时间也比未修饰的肽段要靠后, 并且从质谱图上也可看出明显差异, 未修饰肽段 m/z 932.497 (带 2 个电荷), 修饰后肽段 m/z 941.505 (带 2 个电荷) (图 4)。

表 3 曲妥珠单抗酶解后各肽段上检测到的修饰以及修饰肽段占比

肽段名称	修饰类型	轻链 / 重链	修饰氨基酸	修饰位点	修饰比例
ASQDVNTAVAWYQQKPGK	Deamidated/0.9840	轻链	N	30	11
			Q	27	10.9
DIQMTQSPSSLSASVGD	Dethiomethyl/-48.0034	轻链	M	4	6.95
DTLMISR	Dethiomethyl/-48.0034	重链	M	255	13.1
EEQYNSTYR	NGlycan/1241.4545	重链	N	300	49.4
	NGlycan/1444.5339		N	300	20.2
	NGlycan/1606.5867		N	300	30.3
EVQLVESGGGLVQPGGSLR	Glu->pyro-Glu/-18.0106	重链	E	1	1.79
IYPTNGYTR	Deamidated/0.9840	重链	N	55	60.9
SGTASVCLLNNFYPR	Deamidated/0.9840	轻链	N	137	3.89
SGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTK	Deamidated/0.9840	轻链	Q	89	3.92
			Q	90	2.3
	Deamidated/0.9840	重链	N	318	8.78
			Q	314	6.86
	Deamidated/0.9840; Dioxidation/31.9898	重链	Q,W	314,316	14.3
	Dioxidation/31.9898	重链	W	316	52.1
	Dioxidation/31.9898; Deamidated/0.9840	重链	W,N	316,318	18
WGGDGFYAMDYWGQGLVT VSSASTK	Oxidation/15.9949	重链	W	110	11

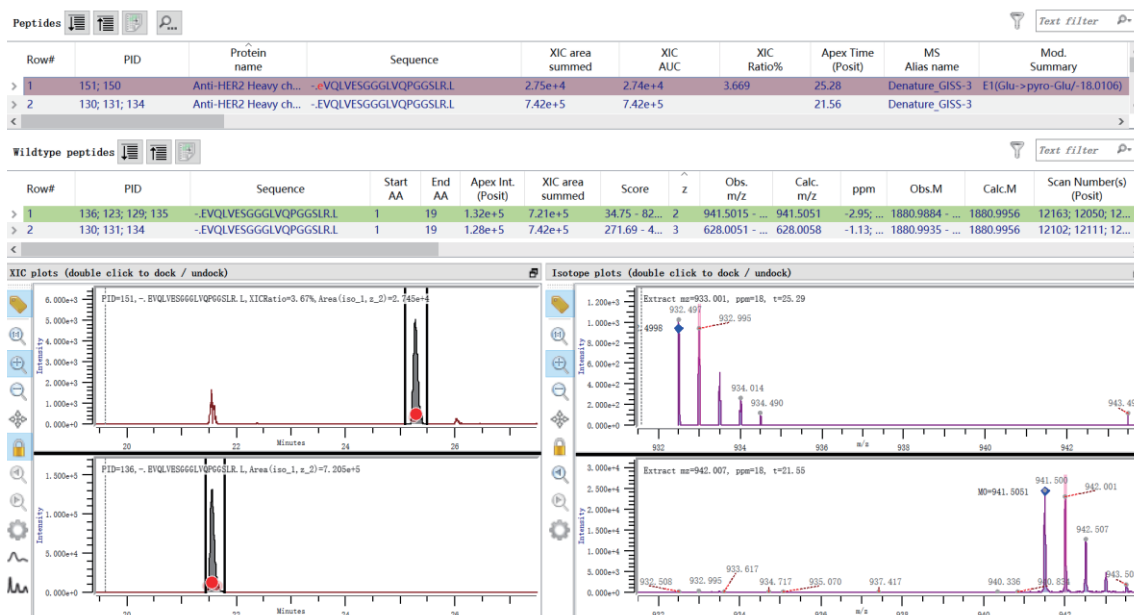


图 4 肽段 EVQLVESGGGLVQP...GSLR 修饰及未修饰肽段的色谱图和质谱图

■ 结论

PTM 构成了抗体产品质量属性系列，应在成药性开发性评估期间予以考虑，尤其是当它们对抗体药物的治疗 and 安全性产生影响时。鉴于 PTM 对抗体药物的影响，应利用并优化现有的技术手段进行检测，以实现 mAb 药物的质量控制。随着人们对 PTM 影响的不断深入了解，通过优化抗体的 PTM, 进而获得优良生物活性、安全性高以及稳定性能好的均一性抗体生物制品，所以，对单抗药物进行肽图分析在药物研发生产过程中显得至关重要。本文采用岛津 LCMS-9030 Q-TOF 液质联用仪对曲妥珠单抗样品进行肽图分析，并结合 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件对肽图分析结果进行解析。结果显示，在仅使用胰蛋白酶的情况下，轻链和重链的序列覆盖率分别为 97.20% 和 88.44%。经 Protein metrics 软件对肽段上的修饰基团进行解析，结果显示，该单抗样品上的修饰类型有糖基化 (NGlycan)、脱酰胺 (deamidated)、氧化 (Oxidation) 等，其中，Heavy chain N300 上全部发生了糖基化，W316 上的 52.1% 发生了双氧化，N55 上的 60.9% 发生了脱酰胺，其余修饰类型所占比例均在 20% 以下。

岛津应用云

