

# 采用 LCMS-9030 进行曲妥珠单抗药物二硫键分析

## LCMS-QTOF-034

**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二硫键分析, 并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件进行结果解析。结果显示, 在使用胰蛋白酶的条件下, 曲妥珠单抗所有 9 对非冗余的二硫键都得到了鉴定。使用 Protein metrics 软件还可对鉴定到的二硫键连接肽段的提取离子流色谱图、一级质谱图和二级质谱图进行查看, 对结果进行进一步确认。该方法快速、准确, 为单抗药物的二硫键鉴定提供参考。

**关键词:** Q-TOF 单抗 二硫键分析

曲妥珠单抗(商品名: 赫赛汀; 英文名: Trastuzumab), 是第一个抗 HER-2(人类表皮生长因子 2) 的人源化单克隆抗体药物。主要被用于治疗 HER-2 过度表达的转移性乳腺癌。

二硫键是交联多肽链内或链间的两个半胱氨酸的共价键, 是一种常见的单克隆抗体翻译后修饰, 在形成稳定的蛋白质空间结构、保持正确的空间构象、调

节生物学活性方面至关重要。二硫键还是影响单克隆抗体药物有效性和安全性的重要因素, 也是产品结构表征的关键环节。

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非还原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, 快速进行二硫键定位。

## ■ 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:

具体配置为:

系统控制器: CBM-20Alite

脱气机: DGU-20A<sub>5</sub>

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: 2 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	

### 质谱条件

离子化模式: ESI+	加热模块温度: 400°C
雾化气流速: 3.0 L/min	干燥气流速: 10.0 L/min
加热气流速: 10.0 L/min	扫描模式: MS 和 MS/MS (DDA)
接口温度: 300°C	接口电压: 4.5 kV
DL 温度: 250°C	事件时间: 0.1 s

## ■ 样品前处理

使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 μL 该溶液样品，加入 80 μL 变性溶液（50 mM Tris-HCl，含 8 M 尿素），在 37°C 下震荡 60 min，结束后加入 4 μL IAA 溶液（500 mM），在室温条件下避光震荡 30 min，然后加入 600 μL 酶解缓冲液（50 mM Tris-HCl）和 5 μL 胰蛋白酶溶液（含 1 μg 胰蛋白酶），在 37°C 下反应 6 小时，酶解结束后加入 10 μL 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 曲妥珠单抗非还原酶解肽段总离子流色谱图

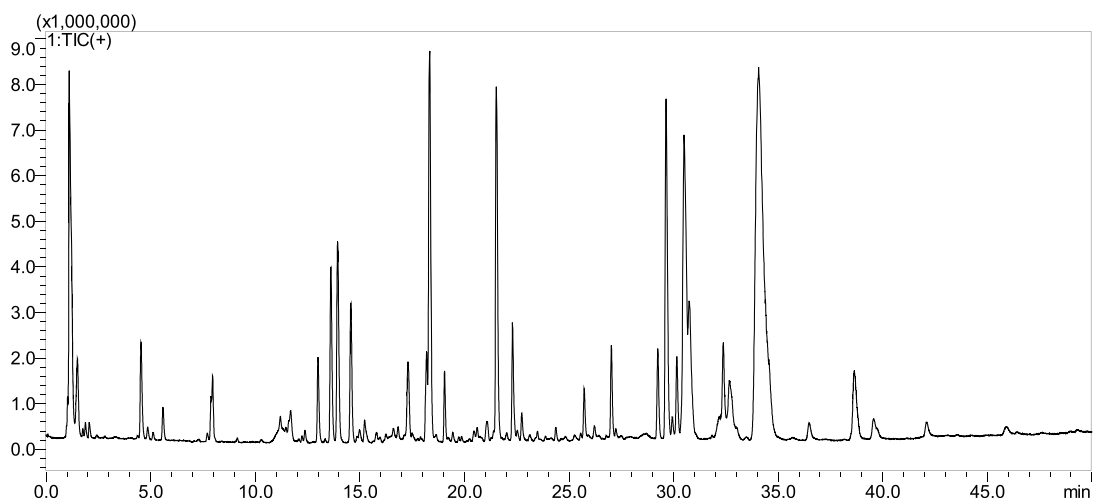
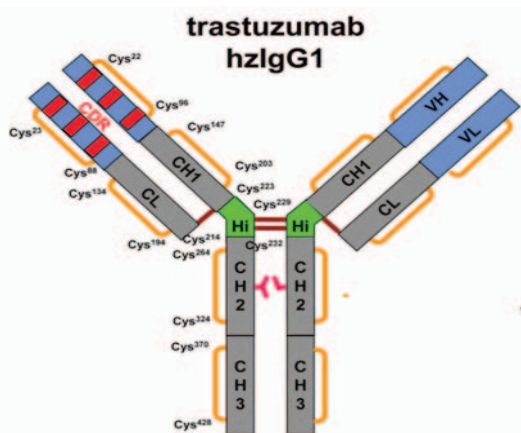


图 1 曲妥珠单抗非还原酶解肽段总离子流色谱图

### 3.2 曲妥珠单抗理论二硫键连接

曲妥珠单抗属于 IgG1 型的单抗药物，此类抗体主要存在 16 对二硫键。其中重链内部有 8 对，轻链内部有 4 对，轻链和重链链间有 2 对，重链链间有 2 对。由于单抗结构的对称性，故非冗余的二硫键共有 9 对。曲妥珠单抗理论二硫键连接示意图和 9 对非冗余的二硫键清单见图 2。



序号	所在肽链位置	理论二硫键连接
1	重链内	Cys22-Cys96
2		Cys147-Cys203
3		Cys264-Cys324
4		Cys428-Cys370
5	重链间	Cys229-Cys229
6		Cys232-Cys232
7	重链与轻链之间	Cys223-Cys214
8	轻链内	Cys23-Cys88
9		Cys134-Cys194

图 2 曲妥珠单抗理论二硫键连接示意图（左）和非冗余的 9 对二硫键清单（右）

### 3.3 Protein Metrics 结果解析

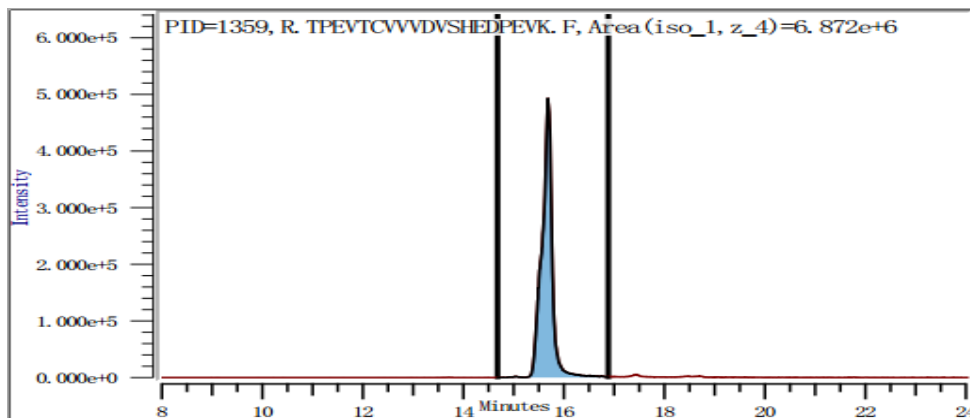
将 LabSolutions 采集好的数据直接导入到 Protein Metrics 软件的 PMi\_S-S 模块，并导入曲妥珠单抗的氨基酸序列，即可进行二硫键快速自动解析。曲妥珠单抗 Protein Metrics 二硫键解析结果软件截图见图 3，在仅使用胰蛋白酶的条件下，曲妥珠单抗所有 9 对非冗余的二硫键都得到了鉴定。通过 PMi\_S-S 模块，还可以进一步查看鉴定到的二硫键连接肽段对应的提取离子流色谱图、一级质谱图和二级质谱图，可对鉴定结果进行确认。重链内二硫键连接 Cys264-Cys324 的色谱图和质谱图见图 4。

Xlink Class ↑	Protein name ↑	Xlink Base Peptide Xlink Pos. in Protein	Xlink Partner Peptide Xlink Pos. in Protein ↑
Expected	Anti-HER2 Heavy chain (1 and 2)	22	96
		147	203
		223	214
		229, 232	229, 232
		264	324
		428	370
		23	88
	Anti-HER2 Light chain (1 and 2)	134	194

Sequence	Xlink Partner Peptide Sequence	Xlink Partner Peptide Protein Name ↓
R.LSeAASCFNIK.D	R.AEDTAVYYCSR.W	(self)
K.STSGCTAALGeLVK.D	K.DYFPEPITVSWNSCALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGVTQYICNVNHNKPSNTK.V	(self)
K.SeDK.T	R.GEC.-	Anti-HER2 Light chain (1 and 2)
K.THTcPPcPAPELLGGPSVFLFPPKPK.D	K.THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK.D	(self)
R.TPEVTcVVVDVSHEDPEVK.F	K.CK.V	(self)
R.WQQCNVFScSVMHEALHNHYTQKS	K.NQVSLTCLVK.G	(self)
R.VTITcR.A	R.SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFCGQTK.V	(self)
K.SGTASVcLLNNFYPRE	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S	(self)

图 3 曲妥珠单抗 Protein metrics 二硫键解析结果软件截图



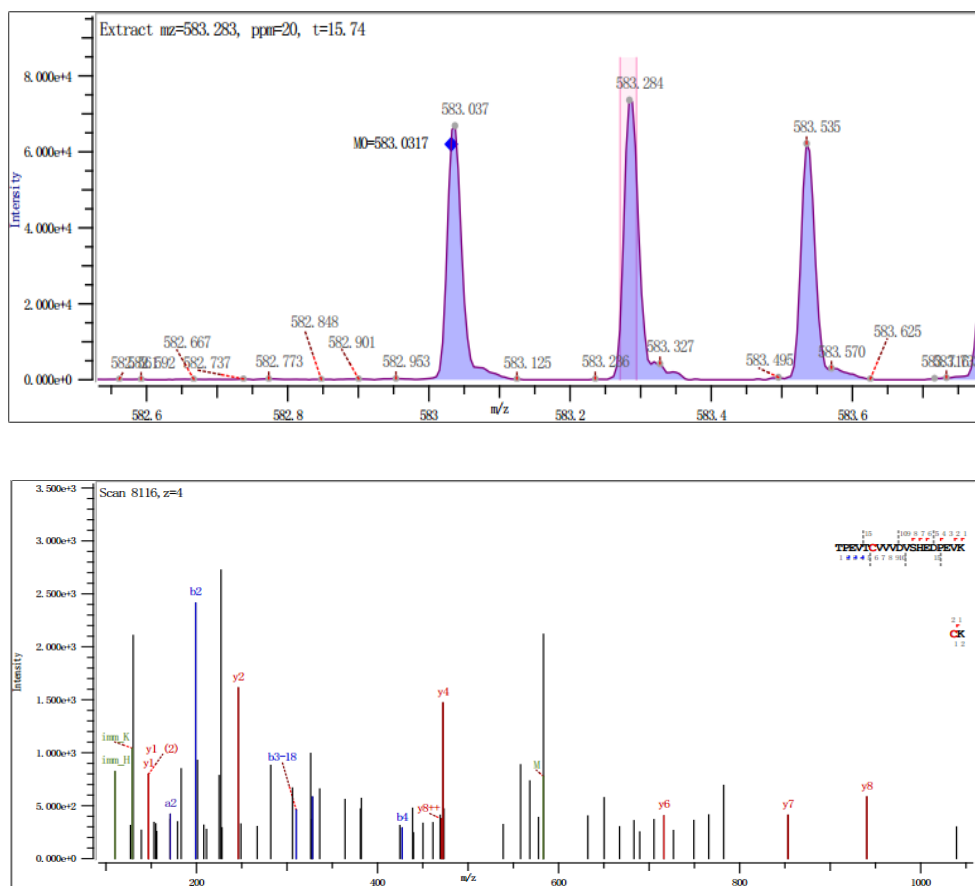


图 4 重链内二硫键连接 Cys264-Cys324 的色谱图和质谱图  
提取离子流图（上）、一级质谱图（中）和二级质谱图（下）

## 结论

本文基于岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪和 Protein Metrics 数据分析软件，成功鉴定到曲妥珠单抗中所有非冗余的 9 对二硫键。LCMS-9030 高分辨、高质量数准确度的质谱数据，结合 Protein Metrics 快速、自动的二硫键鉴定流程，助力单抗药物二硫键结构表征，为生物药研发和产品质量保驾护航。

岛津应用云

