

# nSMOL 前处理技术结合 Skyline 软件加速抗体药物 LCMS 分析方法开发

## LCMSMS-251

**摘要：**本文利用 nSMOL 前处理试剂包结合 Skyline 软件，加速抗体药物 LCMS 方法开发过程，仅在一个工作日就可以完成单个抗体药物 LCMS 方法的初步优化。实例中贝伐珠单抗共筛选出 9 个肽段具有典型色谱峰，其中 4 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关，并且这 4 条 Fab 区域的肽段响应远高于其他肽段；曲妥珠单抗共有 10 个肽段具有典型色谱峰，其中 8 条肽段与曲妥珠单抗的 Fab 区域相关。实验证明，利用 nSMOL 技术可以选择性酶解 Fab 区域，从而降低抗体药物定量肽段开发的复杂性。

**关键词：**nSMOL 三重四极杆质谱 Skyline 贝伐珠单抗 曲妥珠单抗 方法开发

LCMS 技术分析蛋白药物或者蛋白标记物，通常需要经过胰酶酶解过程，获得的酶解混合物经过净化后再分析。复杂生物基质例如血浆、血清中目标抗体药物若采用传统酶解方式或 Pellet 酶解方式，获得的酶解产物均为多种肽段的混合物。结合 LCMS 分析的特点，在方法开发的过程中需要针对酶解的备选肽段进行 MRM 通道的筛选和优化，酶解产物越复杂在方法开发过程中所消耗的时间越长。随着技术的发展，我们发现通过纳米表面限制性和导向性酶解抗体药物实现 Fab 区域的选择性酶解技术 (nSMOL) 处理抗体，可以尽可能降低对非特异性区域例如保守区域的酶解，从而极大地减少了酶解肽段的数量，进一步的 LCMS 方法开发过程大为简化。

与传统的基于经验筛选蛋白特征肽段的过程不同，

岛津公司将其超快速液相色谱 - 质谱联用平台和强大的 Skyline 定量蛋白质组学软件集成一体。Skyline 软件为蛋白质定量的研究工作提供了标准化的工作流程，使得方法开发工作不再过度依赖研究人员的经验，降低了肽段筛选和 MRM 通道分析条件优化的复杂程度。

本文利用 nSMOL 前处理试剂包结合 Skyline 软件，加速抗体药物 LCMS 方法开发过程，仅在一个工作日就可以完成单个抗体药物的 LCMS 方法的初步优化，与传统的 ELISA 方法需要制备特异性免疫试剂进行检测消耗的时间比，本方法极大地缩短了方法开发的过程，更灵活快速应对抗体药物和生物类似药的临床前及临床研究等不同阶段生物分析的需求。

## 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站，Skyline Ver.3.5.0.9319 软件，nSMOL 前处理试剂盒。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Waters BEH Peptide C18  
2.0 mm I.D.× 150 mm L., 1.7 μm

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液  
B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，  
洗脱程序：0.0-3.0 min, 5%；3.0-35.0 min, 5%~40%；  
35.0-37.5 min, 40%~95%；37.5~45.0  
min, 95%；45.5-50.0 min, 5%

#### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子化模式：ESI(+)

离子源接口电压：1.0 kV

加热气：空气 15.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 5.0 L/min

碰撞气：氦气

源温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

### 1.3 样品前处理过程

#### 肽段筛选

10 µg/mL 贝伐珠单抗标准品，按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行贝伐珠单抗酶解，获得的酶解混合物直接上机分析。

10 µg/mL 曲妥珠单抗标准品，按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行曲妥珠单抗酶解，获得的酶解混合物直接上机分析。

## ■ 结果讨论

### 2.1 特征肽段的筛选

将数据库搜索获得的贝伐珠单抗和曲妥珠单抗 fasta 文件导入 Skyline 软件，构建合理的肽段和离子对设置的条件下，根据设定导出贝伐珠单抗肽段的 MRM 方法，在 LabSolutions 软件中构建贝伐珠单抗和曲妥珠单抗肽段筛选的 LC-MS/MS 方法，并且贝伐珠单抗和曲妥珠单抗酶解产物进行上机分析，所得结果导入 Skyline 软件后，逐一查看检测出的色谱峰，对未检出的肽段信息进行删除。所筛选出的肽段及 MRM 列表内容保存为新的 Skyline 文件。

### 2.2 nSMOL 前处理技术加速单抗药物特征肽段分析条件优化过程

本方法因为选择 nSMOL 作为前处理方法，该方法利用纳米颗粒表面固定化胰酶技术实现抗体药物的 Fab 区域的选择性酶解，从而大大缩小了目标肽段的筛选范围。根据抗体药物的结构特点，绝大多数抗体药物的保守区域氨基酸序列差异较小，可变区域的氨基酸序列具有较大差异。在 LCMS 定量分析目标蛋白方法开发的过程中，主要工作即是挑选出目标蛋白的特异性肽段。所以 nSMOL 前处理方法极大地降低了酶解产物的复杂性。检测出的色谱峰，对未检出的肽段信息进行删除。所筛选出的肽段及 MRM 列表内容保存为新的 Skyline 文件。

表1 贝伐珠单抗MRM参数 (Skyline筛选肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
STAYLQMNSLR	642.30 [M+2H] <sup>2+</sup>	1095.55 [y9 <sup>+</sup> ]	-25.2	CH <sub>2</sub> /Fab
		620.30 [y5 <sup>+</sup> ]	-24.2	
		861.45 [y7 <sup>+</sup> ]	-23.2	
		748.40 [y6 <sup>+</sup> ]	-23.2	
GPSVFPLAPSSK	593.85 [M+2H] <sup>2+</sup>	846.45 [y8 <sup>+</sup> ]	-19.2	CH <sub>2</sub> /Fab
		699.40 [y7 <sup>+</sup> ]	-21.2	
		418.25 [y4 <sup>+</sup> ]	-29.2	
FTFSLDTSK	523.25 [M+2H] <sup>2+</sup>	898.45 [y8 <sup>+</sup> ]	-20.4	VH/Fab
		797.40 [y7 <sup>+</sup> ]	-18.4	
		650.35 [y6 <sup>+</sup> ]	-18.4	
VLIYFTSSLHSGVPSR	588.30 [M+3H] <sup>3+</sup>	939.50 [y9 <sup>+</sup> ]	-26.9	VL/CDR <sub>2</sub>
		602.35 [y8 <sup>+</sup> ]	-27.9	
		775.90 [y7 <sup>++</sup> ]	-16.9	
VVSVLTVLHQDWLNGK	603.35 [M+3H] <sup>3+</sup>	719.35 [y6 <sup>++</sup> ]	-16.9	CH <sub>2</sub> /Fc
		805.45 [y14 <sup>++</sup> ]	-17.5	
ALPAPIEK	419.75 [M+2H] <sup>2+</sup>	712.40 [y12 <sup>++</sup> ]	-19.5	CH <sub>2</sub> /Fc
		654.38 [y6 <sup>+</sup> ]	-14.3	
DTLMISR	418.20 [M+2H] <sup>2+</sup>	486.29 [y4 <sup>+</sup> ]	-20.3	CH <sub>2</sub> /Fc
		327.69 [y6 <sup>++</sup> ]	-12.3	
DSTYLSSTLTLSK	501.60 [M+3H] <sup>3+</sup>	619.35 [y5 <sup>+</sup> ]	-16.2	CH <sub>2</sub> /Fc
		506.30 [y4 <sup>+</sup> ]	-16.2	
FNWYVDGVEVHNAK	839.40 [M+2H] <sup>2+</sup>	694.35 [y13 <sup>++</sup> ]	-13.7	CH <sub>2</sub> /Fc
		600.35 [y11 <sup>++</sup> ]	-25.7	
		518.80 [y10 <sup>++</sup> ]	-19.7	
VVSVLTVLHQDWLNGK	839.40 [M+2H] <sup>2+</sup>	1416.70 [y12 <sup>+</sup> ]	-37.1	CH <sub>2</sub> /Fc
		1230.60 [y11 <sup>+</sup> ]	-35.1	
		853.45 [y8 <sup>+</sup> ]	-37.1	

在本实验中筛选阶段, 贝伐珠单抗共有 9 个肽段具有典型色谱峰, 其中 4 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关, 而贝伐珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域; 曲妥珠单抗共有 10 个肽段典型色谱峰, 其中 7 条肽段与曲妥珠单抗的 Fab 区域相关。表 1 涉及到贝伐珠单抗中与 Fab 区域相关的特征肽段包括 STAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK、FTFSLDTSK、VLIYFTSSLHSGVPSR; 与 Fc 区域相关的特征肽段包括 ALPAPIEK、DTLMISR、DSTYLSSTLTLSK、FNWYVDGVEVHNAK、VVSVLTVLHQDWLNGK, 由图 1 可以看到 4 条 Fab 区域的肽段响应远高于其他肽段, 进一步提高了筛选的有效性。表 2 中所涉及到曲妥珠单抗相关肽段与 Fab 区域相关的特征肽段包括 LLIYSASFLYSGVPSR、DTYIHWVR、GLEWVAR、IYPTNGYTR、YADSVK、FTISADTSK、NTAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK, 与 Fc 区域相关的特征肽段包括 DTLMISR、ALPAPIEK; 由图 2 可以看到 8 条 Fab 区域的肽段绝大多数色谱图响应较好。因此利用 nSMOL 前处理技术可以简化酶解产物的肽段组成, 明确方法开发的目标物, 简化筛选过程, 提高方法开发的速度。

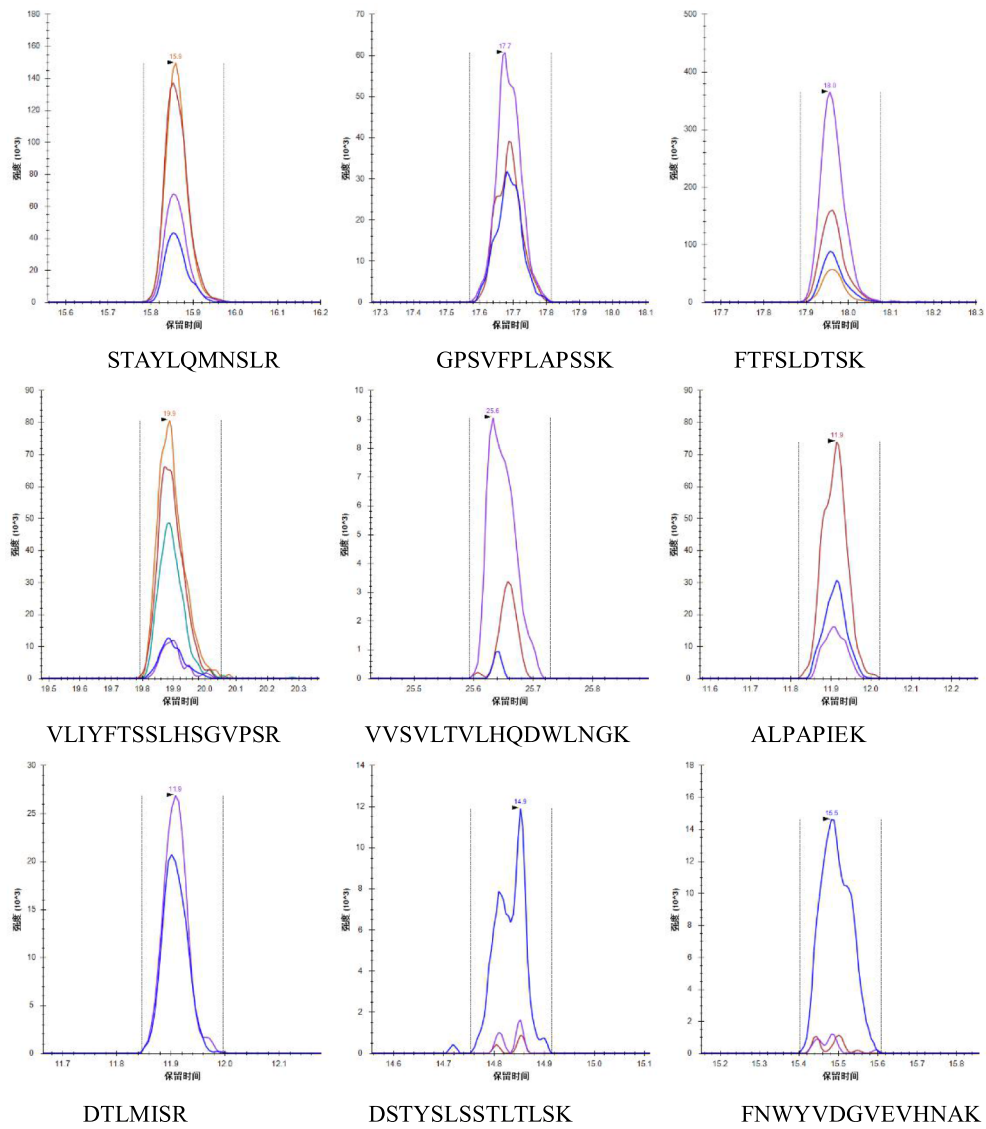


图1 贝伐珠单抗肽段筛选过程获得的多肽信息

表2 曲妥珠单抗MRM参数 (Skyline筛选肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
LLIYSASFLYSGVPSR	886.98	1270.64 [y12 <sup>+</sup> ]	-33.0	VL/CDR2
	[M+2H] <sup>2+</sup>	359.20 [y3 <sup>+</sup> ]	-27.0	
	591.66	765.39 [y7 <sup>+</sup> ]	-19.1	VL/CDR2
	[M+3H] <sup>3+</sup>	602.32 [y6 <sup>+</sup> ]	-21.1	
		359.20 [y3 <sup>+</sup> ]	-15.1	
DTYIHWVR		597.32 [y4 <sup>+</sup> ]	-18.6	VH/CDR1
	363.85	460.27 [y3 <sup>+</sup> ]	-14.6	
	[M+3H] <sup>3+</sup>	487.76 [y7 <sup>++</sup> ]	-14.6	
		437.24 [y7 <sup>++</sup> ]	-10.6	
GLEWVAR	415.73	660.35 [y5 <sup>+</sup> ]	-16.1	VH/CDR2
	[M+2H] <sup>2+</sup>	531.30 [y4 <sup>+</sup> ]	-16.1	
IYPTNGYTR		808.39 [y7 <sup>+</sup> ]	19.2	VH/CDR2
	542.77	711.34 [y6 <sup>+</sup> ]	27.2	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	610.29 [y5 <sup>+</sup> ]	25.2	
		404.70 [y7 <sup>++</sup> ]	17.2	
YADSVK	341.67	519.28 [y5 <sup>+</sup> ]	-15.2	VH/Fab
	[M+3H] <sup>2+</sup>	448.24 [y4 <sup>+</sup> ]	-13.2	
FTISADTSK		721.37 [y7 <sup>+</sup> ]	-14.9	VH/Fab
	485.25	608.29 [y6 <sup>+</sup> ]	-18.9	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	521.26 [y5 <sup>+</sup> ]	-18.9	
NTAYLQMNSLR		1024.52 [y8 <sup>+</sup> ]	-23.7	VH/Fab
	655.83	861.46 [y7 <sup>+</sup> ]	-25.7	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	748.38 [y6 <sup>+</sup> ]	-23.7	
GPSVFPLAPSSK		846.47 [y8 <sup>+</sup> ]	-19.2	CH1/Fab
	593.83	699.40 [y7 <sup>+</sup> ]	-21.2	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	418.23 [y4 <sup>+</sup> ]	-29.2	
DTLMISR	418.22	619.36 [y5 <sup>+</sup> ]	-16.2	CH2/Fc
	[M+2H] <sup>2+</sup>	506.27 [y4 <sup>+</sup> ]	-16.2	
ALPAPIEK		654.38 [y6 <sup>+</sup> ]	-14.3	CH2/Fc
	419.75	486.29 [y4 <sup>+</sup> ]	-20.3	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	327.69 [y6 <sup>++</sup> ]	-14.3	

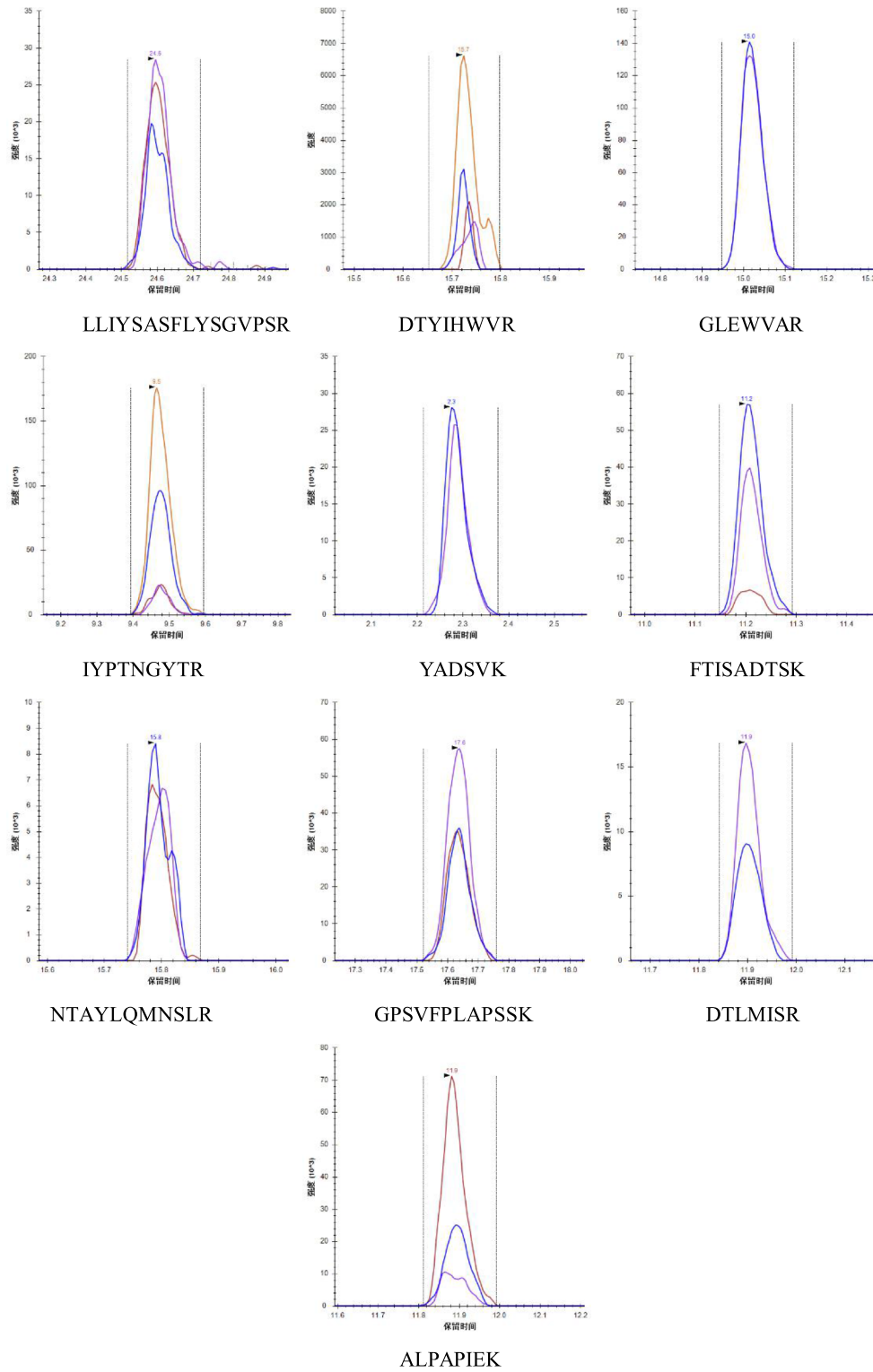


图2 曲妥珠单抗肽段筛选过程获得的多肽信息

## ■ 结论

本文利用 nSMOL 前处理试剂包结合 Skyline 软件，加速抗体药物 LCMS 方法开发过程，仅在一个工作日就可以完成单个抗体药物的 LC-MS/MS 方法的初步优化。在本实验中筛选阶段，贝伐珠单抗共有 9 个肽段具有典型色谱峰，其中 4 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关，而贝伐珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域，4 条 Fab 区域的肽段响应远高于其他肽段；曲妥珠单抗共有 10 个肽段典型色谱峰，其中 8 条肽段与贝伐珠单抗的 Fab 区域相关，80% 的肽段与抗体 Fab 区域相关。与传统的 ELISA 方法需要制备特异性免疫试剂进行检测消耗的时间比，本方法极大地缩短了方法开发的过程，更灵活快速应对抗体药物和生物类似药临床前及临床研究等不同阶段生物分析的需求。