

利用 LCMS-9030 进行英夫利昔单抗药物肽图分析

LCMS-QTOF-023

摘要： 本文采用岛津 LCMS-9030 高分辨 Q-TOF 液质联用仪对英夫利昔单抗进行肽图分析，并结合岛津 LabSolutions 和 Protein Metrics 软件对肽图分析结果进行解析。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 93.46% 和 92.0%。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脱酰胺（Deamidated）、糖基化（NGlycan）、氧化（Oxidation）、氨甲酰化（Carbamyl）等，大部分修饰肽段的比例在 0.5% 以下。

关键词： Q-TOF 单抗 肽段

英夫利昔单抗（Infliximab）是 1998 年美国食品药品监督管理局（FDA）批准的第一个生物治疗药物。其机制包括拮抗肿瘤坏死因子（TNF- α ）活性，对免疫细胞的直接细胞毒性和诱导 T 细胞凋亡。作为批准用于人治疗的第一个单克隆 TNF 抗体，英夫利昔单抗是纯化的重组 DNA 衍生嵌合人 - 小鼠 IgG 单克隆抗体，并且含有鼠重链和轻链可变区，连接到人基因组重链和轻链恒定区。

英夫利昔单抗可以迅速与人类可溶性或膜形式的 TNF 形成稳定的复合物，并终止 TNF 的生物活性以及

信号。1998 年被 FDA 批准后，英夫利昔单抗用于炎症性肠病（IBD）治疗约 18 年，其临床疗效已得到很好的研究。

在单抗药物的生产过程中的质量控制环节，为了更好地控制单抗药物的质量，需要将单抗酶解成肽段，在肽段水平评估单抗中出现的各种修饰，例如氧化、脱酰胺、酰胺化、异构化等。本文采用岛津 LCMS-9030 Q-TOF 四极杆 - 飞行时间液质联用仪对英夫利昔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 LCMS-9030 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-20A lite 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：Shim-pack GISS C18 2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.9 μ m (P/N:227-30048-02, SGLC)

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：10 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
50.00	Pump	B.Conc	40
51.00	Pump	B.Conc	90
56.00	Pump	B.Conc	90
56.10	Pump	B.Conc	5
60.00	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 和 MS/MS (DDA)

接口电压: 4.5 KV

事件时间: 0.1 s

1.3 样品前处理

利用超纯水将英夫利昔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。

■ 结果与讨论

2.1 英夫利昔单抗肽段色谱图

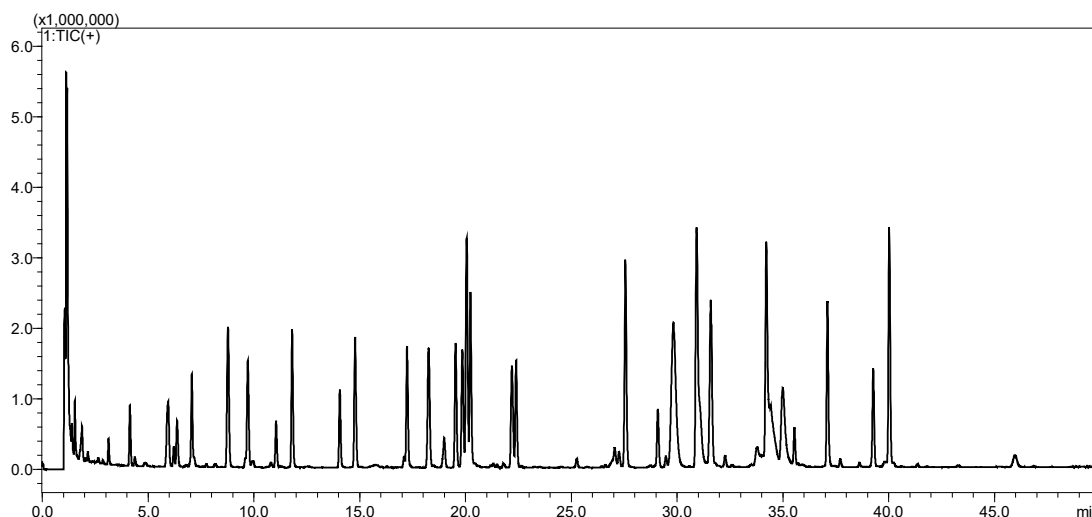


图 1 英夫利昔单抗酶解后的总离子流色谱图

2.2 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, 并导入英夫利昔单抗的氨基酸序列, 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 可知英夫利昔单抗重链的序列覆盖率为 92.00%, 轻链覆盖率为 93.46% (表 2 和图 2)。通过该软件 PMi-PTM 模块不仅查看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 DSTYLSSTLTLSK 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)。

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 %
英夫利昔单抗轻链	200 / 214	93.46
英夫利昔单抗重链	414 / 450	92.00

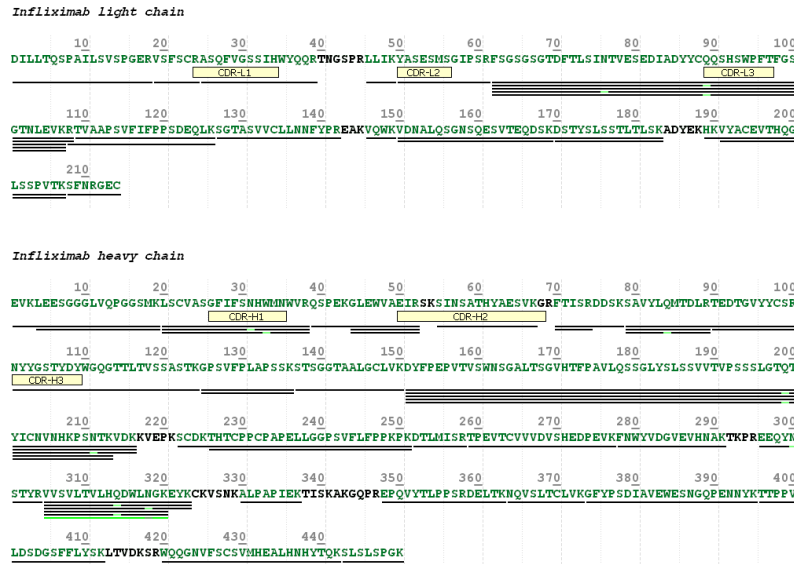


图 2 英夫利昔单抗酶解后序列覆盖图

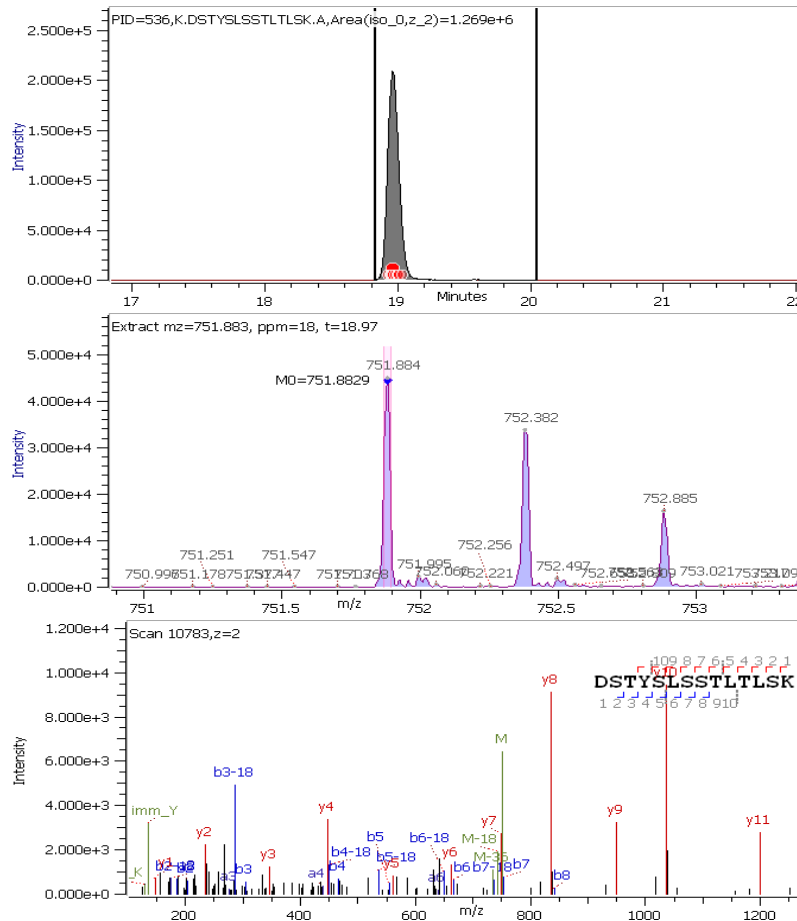


图 3 肽段 DSTYLSLSSTLTLSK 的色谱图和质谱图

经软件分析发现该英夫利昔单抗上存在的修饰有脱酰胺 (deamidated)、糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation)、氨甲酰化 (Carbamyl) 等, 大部分修饰所占比例在 0.5% 以下 (表 3)。以脱酰胺 (deamidated) 修饰为例, 肽段 VVSVLTVLHQDWLNGK 发生修饰后, 修饰后的肽段保留时间比未修饰的肽段要长, 且质谱图上也可看出明显差异, 未修饰肽段 m/z 603.341 (带 3 个电荷), 修饰后肽段 m/z 603.670 (带 3 个电荷) (图 4)。

表 3 英夫利昔单抗酶解后各肽段上检测到的修饰以及修饰肽段占比

蛋白名称	肽段名称	修饰类型	修饰氨基酸	修饰位点	修饰比例
重链	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	Deamidated/0.9840	Q	199	0.38
重链	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	Deamidated/0.9840	N	211	1.25
重链	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK	Deamidated/0.9840	Q	199	1.25
重链	EEQYNSTYR	NGlycan/1241.4545	N	300	0.05
重链	GLEWVAEIR	Carbamyl/43.0058	NTerm	43	0.07
重链	GPSVFPLAPSSK	Carbamyl/43.0058	NTerm	124	0.09
重链	LSCVASGFIFSNHWMNWVR	Deamidated/0.9840	N	31	0.13
重链	LSCVASGFIFSNHWMNWVR	Oxidation/15.9949	W	33	0.11
重链	SAVYLQMTDLR	Deamidated/0.9840	Q	84	0.48
重链	VVSVLTVLHQDWLNGK	Deamidated/0.9840	N	318	0.17
重链	VVSVLTVLHQDWLNGK	Deamidated/0.9840	Q	314	0.53
重链	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	Deamidated/0.9840	N	318	1.14
重链	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	Deamidated/0.9840	Q	314	0.38
重链	FSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQ SHSWPFTFGSGTNLEVK	Deamidated/0.9840	N	76	0.4
轻链	FSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQ SHSWPFTFGSGTNLEVK	Deamidated/0.9840	Q	89	0.4
轻链	FSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQQ SHSWPFTFGSGTNLEVKR	Deamidated/0.9840	Q	89	0.22

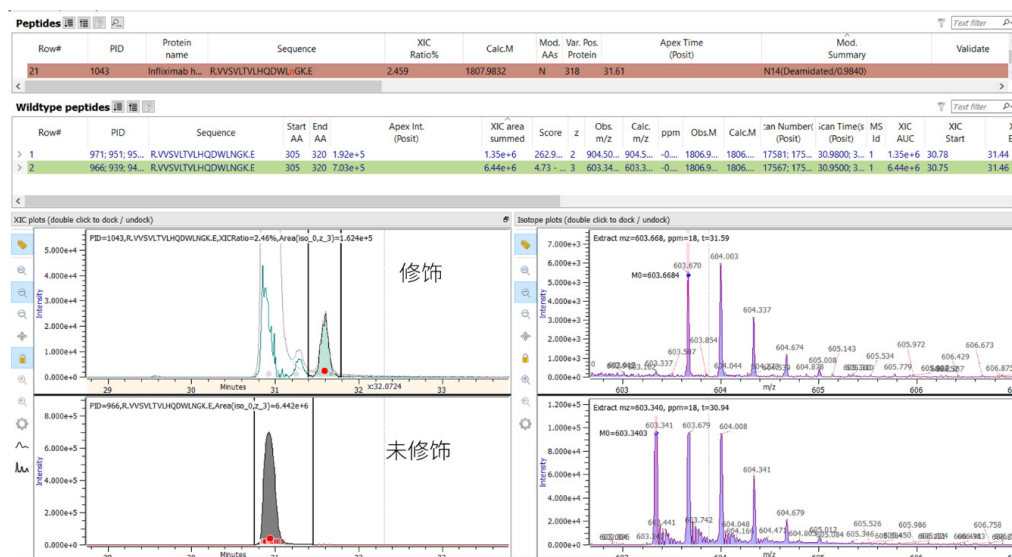


图 4 肽段 VVSVLTVLHQDWLNGK 修饰及未修饰肽段的色谱图和质谱图

■ 结论

本文采用岛津 LCMS-9030 Q-TOF 液质联用仪对英夫利昔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 93.46% 和 92.00%。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脱酰胺 (deamidated)、糖基化 (NGlycan)、氧化 (Oxidation)、氨甲酰化 (Carbamyl) 等，大部分修饰类型所占比例在 0.5% 以下。

岛津应用云

