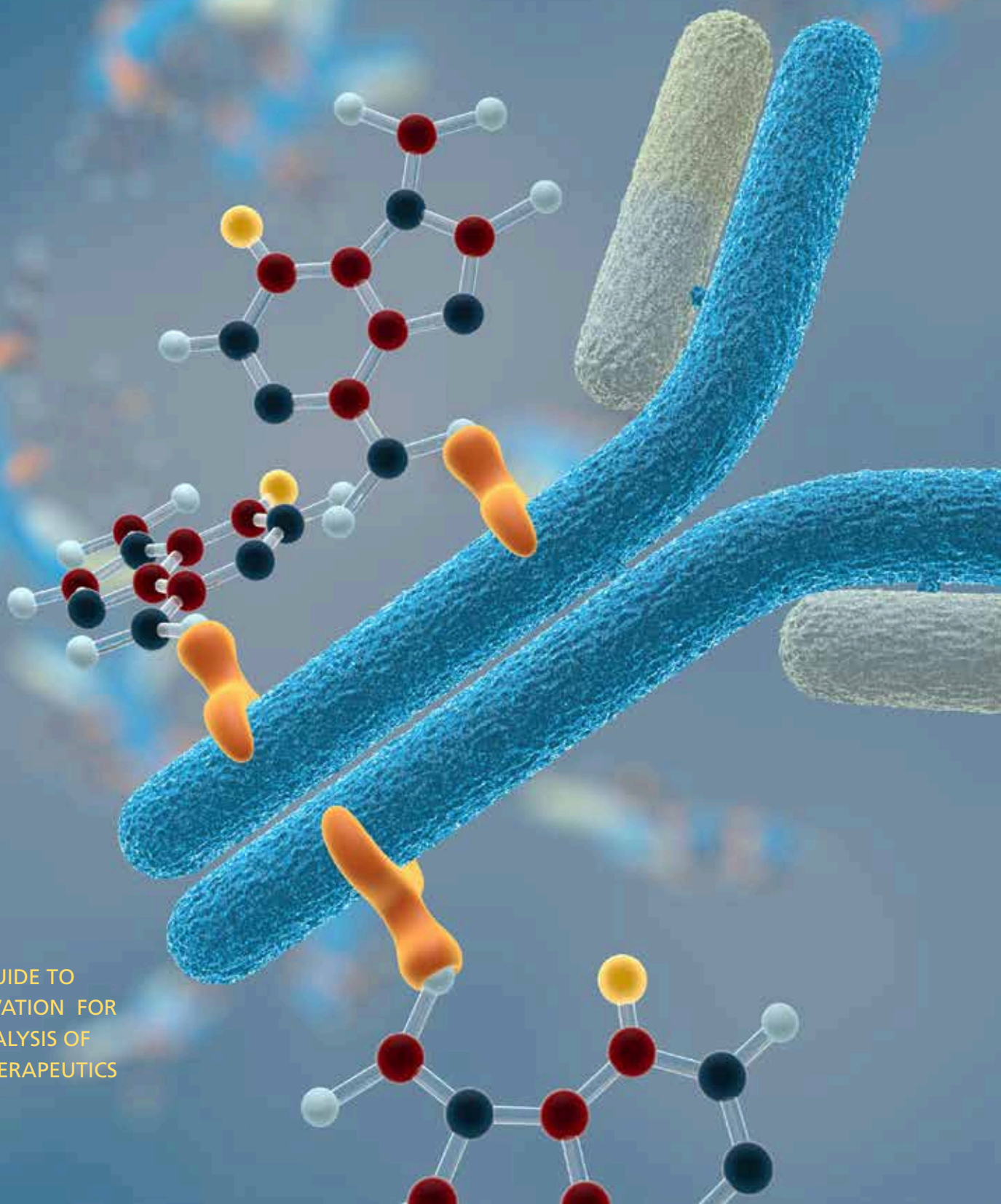




# 生物药分析解决方案



GUIDE TO  
INNOVATION FOR  
ANALYSIS OF  
BIOTHERAPEUTICS

# 简化工作流程，助您高效实现：

## 抗体-药物偶联物 (ADC)

- 药物偶联比 (DAR) 测定
- 药物结合位点测定

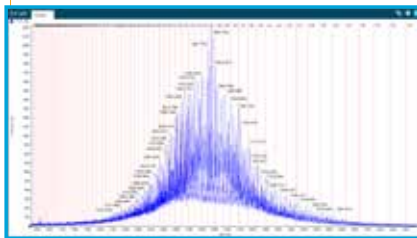
## 肽谱图

- 序列覆盖
- 自动定位二硫键

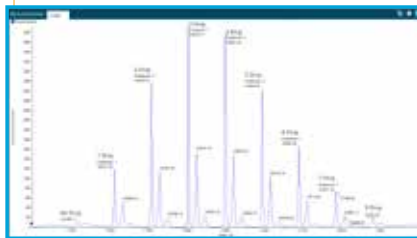
## 翻译后修饰

- 糖基化、脱酰胺化、氧化
- 末端剪切

表征ADC分子量，电荷分布呈现出高质量的高斯分布。



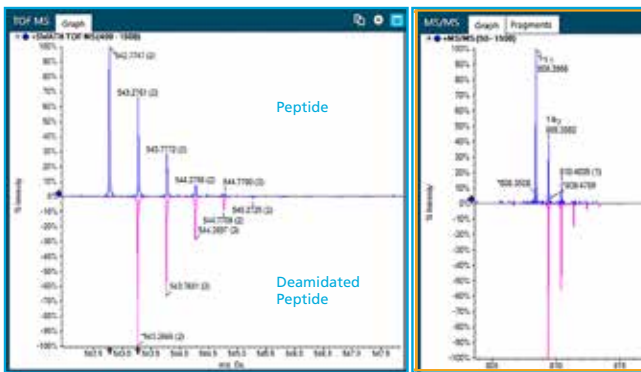
高效去卷积，保证各个亚型的高质量准确度及ADC药物状态。



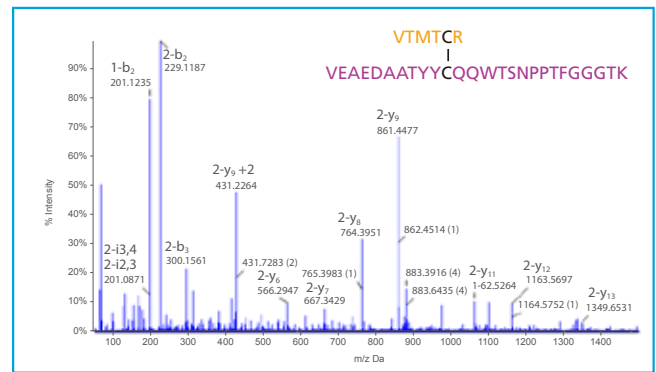
快速自动计算ADC药物载量和DAR值。



使用SWATH®采集技术并通过BioPharmaView™软件可对任何修饰同时进行定性定量分析。



快速、准确地定位二硫键，简化您的数据分析





## 工艺相关杂质：HCP



### 全景式SWATH®采集

- TripleTOF®系统结合全景式SWATH®采集方法，可以助您鉴定和定量低含量HCPs，甚至包含预先未知的HCP。

## 产品相关杂质



### 高分辨率，灵敏度和速度

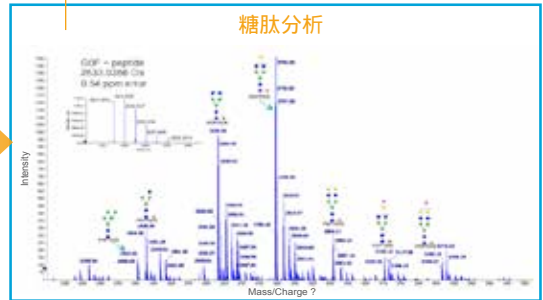
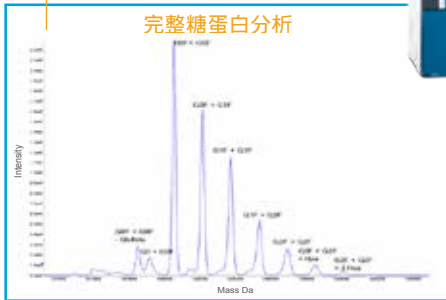
- 使用CE-SDS可检测和定量低至0.01%的分子大小变异体杂质；
- 高分离度cIEF进行酸碱峰含量分析；
- 采用CESI-MS进行全面的单克隆抗体电荷变异体、纯度和分子量分析工作。



# 使用高分辨质谱对糖蛋白进行全面表征

完整糖蛋白分析，快速获得蛋白主要的糖基化类型及相对含量方面的信息。

糖肽分析，获取糖基化位点以及该位点下糖基化异质性方面的信息。

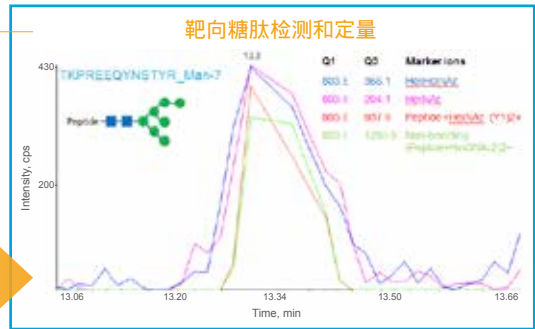


在高分辨率、高质量精度的 QTOF LC-MS 系统上，分别在完整糖蛋白水平和糖肽水平进行糖基化的表征。

完整蛋白水平检测低丰度英夫利昔单抗糖蛋白形态。

检测源自一种治疗性单抗的一组糖肽。

在 QTRAP LC-MS 系统上鉴定和定量特定的糖肽，并使用特定的靶向 MRM 离子对增强选择性。



使用特定的 MRM 标记离子对源自抗体消化物的 TKPREEQYNSTYR\_Man-7 糖肽进行靶向分析的示例。

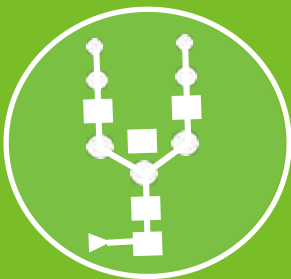
## 在最短的时间内对糖基进行分析

SCIEX 屡获殊荣的快速糖基标记及分析技术通过样品前处理，帮助您从完整蛋白快速获取糖基

- 一小时即可制备多个样品
- 采用自动化工作站，可在两小时内制备 96 个样品



使用 C100HT 生物制品分析系统，轻松筛查大量样品



## 糖基化分析



# BioPharmaView™软件

一站式解决您全部的生物药物表征分析需求。  
数据处理速度之快，超出您想象！

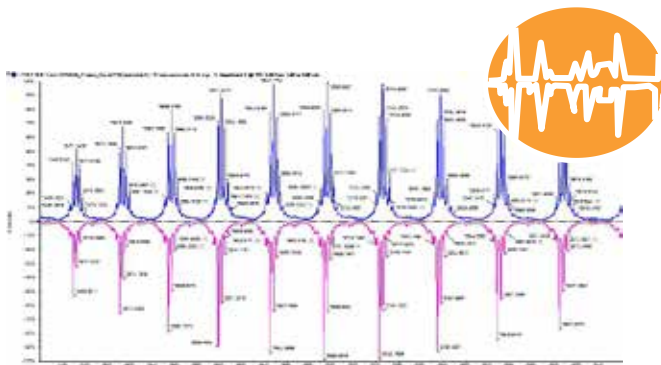
在完整蛋白层面快速自动化处理不同翻译后修饰的比例。



生物 PQA 评估	LC-MS MAM 工作流程	SEC	CEX	CE-SDS	HILIC	ELISA
脱酰胺作用						
糖化						
高甘露糖						
甲硫氨酸氧化						
信号肽						
糖基化						
CDR 色氨酸降解						
C 端赖氨酸						
错误插入						
C 端酰胺化						
岩藻糖基化						
残留蛋白 A						
宿主细胞蛋白						
聚集体						
半胱氨酸加合物评估						



BioPharmaView实现一站式MAM解决方案



不同批次妥珠单抗比对显示糖型变化



# 目 录

## 1. 完整蛋白和亚基分子量测定：

使用先进的TripleTOF®高分辨质谱平台进行完整蛋白分析.....	8
在X500B QTOF质谱平台上同位素分辨抗体亚基.....	11

## 2. ADC药物DAR值测定：

抗体-药物偶联物的完整分析.....	15
应用 SCIEX X500B QTOF质谱系统分析Kadcyla® (Ado-trastuzumab Emtansine).....	19

## 3. 序列覆盖及翻译后修饰：

SWATH®——数据非依赖型采集模式在生物药肽图表征研究中的应用.....	22
---------------------------------------	----

## 4. 二硫键：

生物药二硫键分析.....	25
---------------	----

## 5. 糖基化分析

使用SCIEX X500B QTOF质谱系统对人源C1酯酶抑制剂 ( Human C1 esterase inhibitor ) 的O连接糖型表征分析.....	30
---	----

## 6. MAM多重质量属性监测.

利用单一软件多属性方法 ( MAM ) 评估生物制药产品质量属性.....	33
使用 BioPharmaView™ 软件 3.0 检测和定义多质量属性.....	37

## 7. 相似性比对

基于X500B QTOF系统对多个供应商的曲妥珠单抗进行亚基分析 .....	41
生物药相似性评估的常规工作流程 .....	45
CESI-MS对不同单克隆抗体的酶解产物进行生物类似药评估 .....	48

## 8. 电荷异质体：

通用的单克隆抗体电荷异质性、纯度和分子量分析工作流程 .....	52
----------------------------------	----

## 9. HCP残留：

利用TripleTOF®非数据依赖采集模式建立IgG1单克隆抗体中宿主细胞蛋白 高灵敏度定量分析方法 .....	59
CESI-MS结合SWATH®采集模式对宿主细胞蛋白进行超灵敏度的检测 .....	63

## 10. 药代动力学

使用微升流速液质联用法测定生物体液中单克隆抗体的通用性方法 .....	67
MetabolitePilot™ 2.0 软件和 TripleTOF® 6600液质联用系统应用于 抗体偶联药物（ADC）代谢物分析 .....	72



# 使用先进的TripleTOF<sup>®</sup>高分辨质谱平台进行完整蛋白分析

Zoe Zhang<sup>1</sup>, Sibylle Heidelberger<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, USA, <sup>2</sup> SCIEX, Canada

## 前言

对于药物研究机构的研究人员来说，他们总是希望能在最短的时间内获得尽可能全面的产品质量属性方面的信息。在生物制药领域，蛋白质药物分子量的测定是监控产品质量属性的关键步骤，从生物药早期的开发一直到生产阶段的QC放行，快速、准确的测定蛋白质药物的分子量就显得至关重要。对于生物大分子分析，飞行时间质谱的优势在于质荷比范围宽，理论上没有上限，除此之外能提供高分辨率以及非常宽的动态范围，因此飞行时间高分辨质谱是生物药分析的不二之选。在本文中我们将展示SCIEX TripleTOF<sup>®</sup> 6600高分辨质谱平台在完整蛋白分析方面的优势。

在选择质谱平台进行完整蛋白分子量测定的时候，其中一个最重要的指标就是单次扫描谱图内的动态范围。SCIEX TripleTOF<sup>®</sup>飞行时间高分辨质谱在维持高分辨率的同时并不会损失动态范围，单次扫描仍能够获得4-5个数量级的动态范围，在完整蛋白分子量测定的时候，



除了主要的蛋白变体之外，同时能检测到低丰度的蛋白质的修饰变体，不会丢失任何有价值的信息。

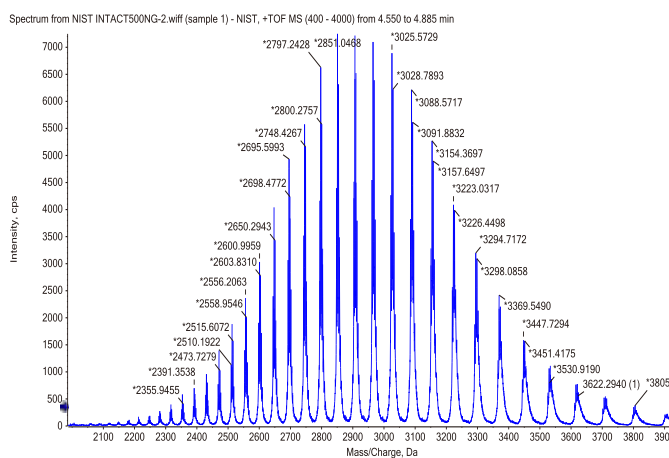


图1. NIST单抗完整蛋白电喷雾离子化原始质谱图，完整蛋白呈现多电荷态，跨越非常宽的质荷比范围，难以人工计算蛋白的分子量。

## TripleTOF<sup>®</sup>高分辨质谱在完整蛋白分析方面的优势：

- TripleTOF<sup>®</sup>高分辨质谱的动态范围宽，单次扫描能同时检测蛋白分子的高丰度和低丰度的变体
- BioPharmaView<sup>™</sup> 数据处理软件功能强大，操作简便，对于所有的实验人员都能快速获得蛋白分子量分析的结果
- 数据处理参数可扩展，针对不同的蛋白质分子，用户可以优化数据处理参数以获得最佳的实验结果
- 数据展示更直观，便于用户快速获得准确的实验结果

## 蛋白去卷积和分子量测定

对于蛋白大分子来说，同位素峰的重心会向高质量端偏移，分子量越大，单同位素峰的丰度越低，对于蛋白质药物来说，分子量通常在150000以上，这时候单同位素峰已经检测不到，因此蛋白分子量测定最终结果报告的都是平均分子量。目前所有的去卷积的软件都是通过迭代的方法测定蛋白的分子量，可以通过对比最终结果和原始谱图蛋白的峰型确定最佳的迭代次数。蛋白去卷积参数设置会最终影响实验结果，通常来说，对原始数据进行平滑、扣除背景噪音以及增加迭代次数等操作会使最终结果变的简单，方便实验人员快速锁定高分度的蛋白变体，但是潜在的风险是会掩盖一些低丰度蛋白变体的信息，造成部分有价值的信息的遗漏。在本应用文档中，我们将展示SCIEX TripleTOF® 6600高分辨质谱平台同时获得高丰度和低丰度蛋白质变体的能力，用户无需再进行过多的去卷积参数的优化和重复分析。

图1和图2展示的是一个分子量在148000左右的单克隆抗体完整蛋白分子量测定的结果，图1显示抗体在质谱图上呈现多电荷的状态，跨越了非常宽的质荷比的范围。图2显示的是未经任何处理的原始谱图的放大图，从蛋白单个电荷态原始谱图中，可以同时检测到蛋白高丰度和低丰度的蛋白的变体，可以通过峰面积基峰计算每一种蛋白变体的相对含量。

图3展示的是将原始数据进行基线扣除和高斯平滑后的结果，原始数据经过度处理后变的简单，所有的峰

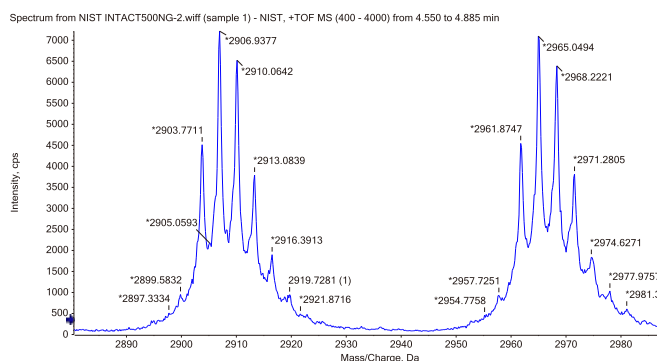


图2. NIST单抗完整蛋白分子量测定放大图，在未经处理的原始谱图中能同时检测到低丰度和高丰度的蛋白变体。

都达到了基线分离，但是会丢失一些低丰度的蛋白变体的信息。尽管原始谱图经过处理前后都能获得一致的平均分子量的测定结果，但是对于SCIEX TripleTOF® 6600的用户来说，无需对原始谱图进行任何处理就可以得到准确、全面的分析结果。SCIEX TripleTOF® 6600高分辨质谱平台有非常宽的动态范围，可以帮助实验人员在完整蛋白水平上深度、全面的检测可能的蛋白变体，特别是一些低丰度的翻译后修饰，不需要使用耗时耗力的肽图分析技术。完整蛋白分子量测定时质谱可以与多种色谱分离模式联用（反相、体积排阻、亲水作用等），配合BioPharmaView™数据处理软件，可以确保快速、准确、重复的获得蛋白高丰度和低丰度翻译后修饰方面的信息。

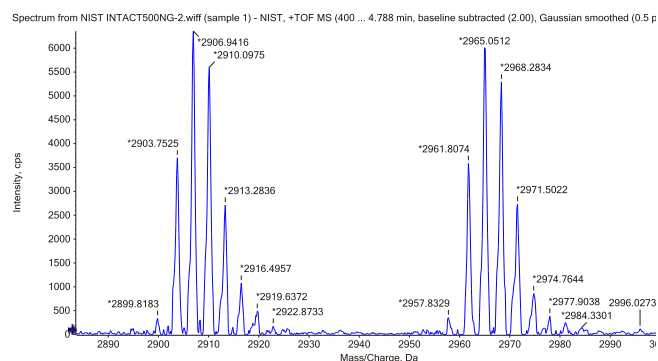


图3. NIST单抗原始谱图经过度处理后的结果，经处理后实现了主要的蛋白变体，峰的分度度有明显提高。这种数据处理方法能简化数据，但是会改变蛋白组分的相对丰度，在出具报告的时候要谨慎。

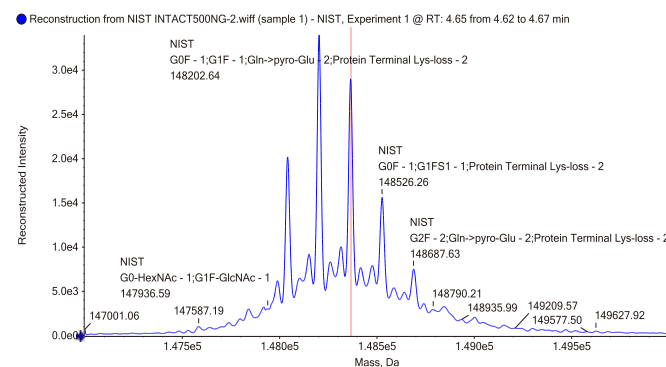


图4. NIST抗体原始谱图未经处理的去卷积结果，数据结果展示了主要的蛋白变体的分子量，低丰度蛋白变体也清晰可见。

Spectrum from NIST INTACT500NG-2.wiff (sample 1) - NIST, \*TOF MS (400 ... 4.788 min, baseline subtracted (2.00), Gaussian smoothed (0.5 points) Reconstruction, New, Input m/z: 2200.0 to 3800.0 Da, Resolution: 2300

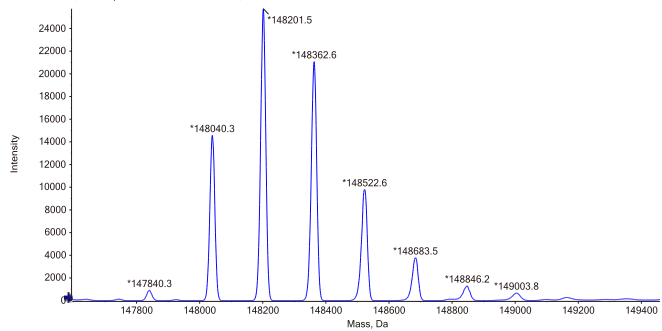


图5. NIST抗体原始谱图处理后的去卷积结果，原始谱图经过度处理（图3），显示主要的蛋白变体的平均分子量。注意：原始谱图过度处理会掩盖低丰度的蛋白变体，丢失部分有价值的信息。

## 结论

完整蛋白分子量的测定是生物药表征和质量控制的第一步，在SCIEX TripleTOF® 6600高分辨质谱平台能同时获得高分辨率、高灵敏度和4-5个数量级的动态范围，可以确保实验人员在获得主要的蛋白变体的分子量信息的同时检测到低丰度的蛋白翻译后修饰，获得全面的生物药的质量属性方面的信息。先进的质谱平台配合BioPharmaView™数据处理软件可以确保实验人员快速、可重现的获得准确的实验结果。



图6. 使用BioPharmaView™软件对未经处理的原始谱图去卷积的分子量测定结果，软件可以全自动的进行样品批处理和可视化对比，节省数据分析时间。

## 致谢

SCIEX中国团队肖志良的翻译工作！



## 在X500B QTOF质谱平台上同位素分辨抗体亚基

Fan Zhang<sup>2</sup>, Sean McCarthy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, MA, USA, <sup>2</sup> SCIEX, CA USA

### 前言

使用高分辨质谱进行蛋白亚基的分析是生物药开发过程中常用的分析技术。相对于完整蛋白分析，蛋白亚基在色谱上更容易获得好的分离效果，质谱分析的灵敏度也更高。近年来，随着质谱分辨率的不断提升，在蛋白亚基分子量测定时获得同位素峰分辨率能提高定性分析的准确度。SCIEX X500B QTOF是专门为生物药表征而设计的高分辨质谱平台，在完整蛋白分析、亚基分析及肽图分析等生物药分析流程方面均能获得高质量的数据。在本技术文档中我们将展示使用SCIEX X500B QTOF高分辨质谱进行Ides酶切后抗体的亚基分子量分析，对于分子量相近的蛋白或者蛋白亚基分子量测定时能获得同位素峰的分辨，我们将展示如何优化质谱以及数据处理参数获得高质量的数据结果。

### X500B QTOF高分辨质谱平台的技术优势

- 分辨率高，能满足不同层次生物药表征的需求
- 在蛋白亚基分子量测定时能获得同位素峰分辨



- 紧凑型台式质谱仪，节省实验室空间
- 硬件和软件重新设计，接受度高，适合于不同层次的用户

### 实验条件和方法

#### 样品前处理

NIST单抗首先经Ides (V7511, 普洛麦格) 酶切，在磷酸盐缓冲溶液中，1U的蛋白酶可以酶切1微克的蛋白

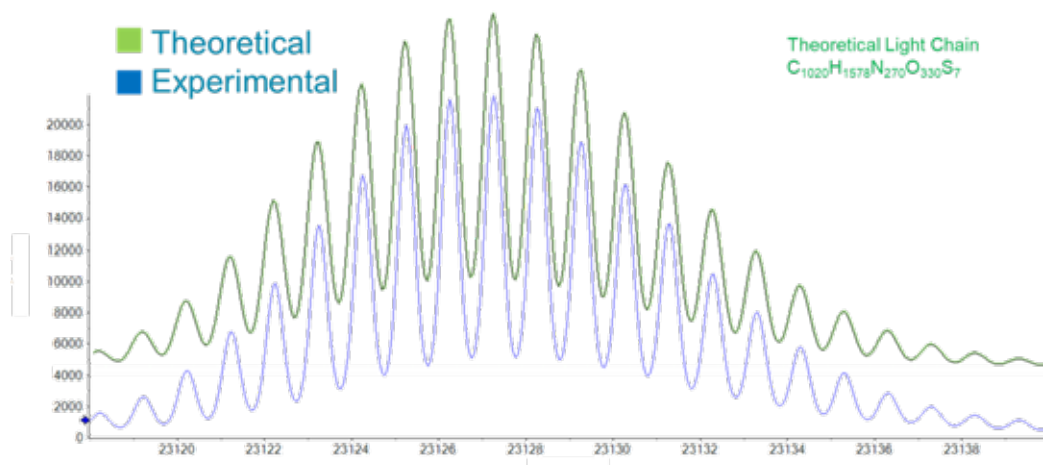


图1. NIST单抗轻链理论和实际检测分子量对比。

质，酶切反应在37度水浴中进行1个小时。酶切后的样品进一步使用TCEP还原，样品处理完成后直接进行液质分析，进样量为5微升。

### 色谱条件

色谱分离在岛津ExionLC™液相色谱系统上进行，色谱柱使用安捷伦PLRP-S (2.1mm × 50mm, 300Å, 5 μm)，柱温为80摄氏度，色谱梯度如表1所示。流动相A是纯水加0.1%甲酸，流动相B是乙腈加0.1%甲酸。

表1. 液相色谱分离梯度表。

Time (min)	%A	%B	Flow Rate ml/min
Initial	75	25	0.25
3.0	75	25	0.25
9.0	10	90	0.25
11.4	10	90	0.25
11.5	75	25	0.25
17.0	75	25	0.25

### 质谱条件

质谱分析使用配备Turbo V离子源的SCIEX X500B高分辨质谱，数据采集使用的是TOF-MS采集模式，关闭完整蛋白功能。质谱采集参数如表2所示。

Table 2. MS Parameters.

Parameter	Setting
Scan Mode	Positive
GS1	50
GS2	50
Curtain Gas	35
Temperature	400°C
Ion Spray Voltage	5000 V
Time Bins to Sum	6
Accumulation Time (ms)	0.5 sec
TOF Start Mas (Da)	400
TOF Stop Mas (Da)	3000
Declustering Potential	150.0
Collision Energy	10

### 数据处理

数据处理使用SCIEX OS软件和Bio Tool Kit软件。蛋白亚基去卷积参数如表3所示。

Table 3. Reconstruction Parameters.

Parameter	Setting
Start Mass	Fc 25000 Da
	LC 22600 Da
	Fd 25200 Da
Stop Mass	Fc 26000 Da
	LC 23600 Da
	Fd 26200 Da
Step Mass	0.05 Da
Input Spectrum Isotope Resolution	30000

### 结果与讨论

单克隆抗体经Ides酶切和TCEP还原后，生成三种分子量相近的片段，分别为轻链，Fc/2和Fd三种亚基。Ides蛋白酶在第一次被报道处理单克隆抗体之后就获得了广泛的关注<sup>[1]</sup>。相对于完整蛋白分析，Ides酶切生成的抗体片段能显著降低样品的复杂程度，相对于肽图分析，样品前处理和数据分析更为简便。单抗样品经Ides酶切后生成的三种亚基片段的分子量都在25000左右，使用高分辨质谱进行分子量测定时能达到同位素峰的分辨，相对于完整蛋白分子量测定，蛋白亚基水平分子量测定的准确度要更高。图2-4展示的是NIST单抗经Ides酶切后三种亚基片段分子量测定结果，每一种片段都能达到同位素峰分辨，实验结果与之前文献报道结果一致<sup>[2]</sup>。

为了验证数据结果的准确性，我们根据NIST单抗轻链的元素组成模拟了轻链的理论分子量的质谱图，理论质谱图和实际观测的质谱图使用相同的分辨率（30000），图1展示的是轻链理论模拟的质谱图和实际观测质谱图对比，实验观测分子量的结果（蓝线）与理论模拟的分子量测结果（绿线）的匹配度非常高。

NIST单抗经Ides酶切后生成的三个亚基的单同位素峰由于丰度太低而不能被检测到，这个结果也与之前的文献报道结果一致<sup>[2]</sup>。在这种情况下，我们使用实际观测到的可分辨的同位素峰与之相对应的理论同位素峰的分子量进行比较来验证分析结果的准确度，分析结果如表4所示，实际观测到的可分辨的同位素峰和与之对应的理

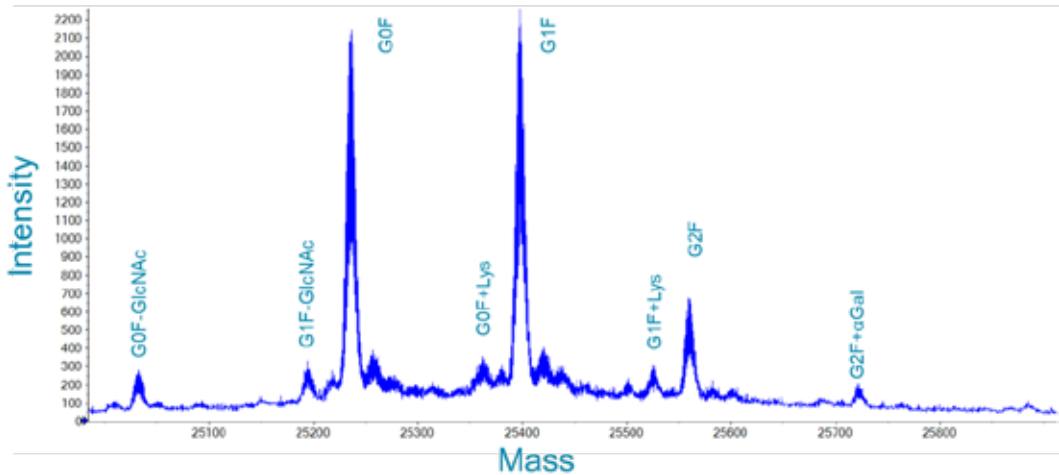


图2. NIST单抗经Ides酶切后Fc/2片段的去卷积分子量结果。

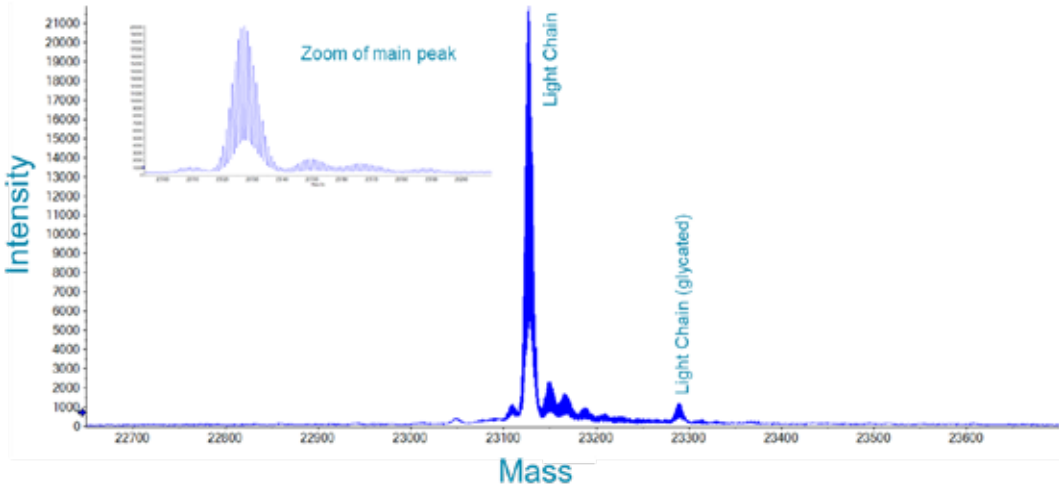


图3. NIST单抗经Ides酶切后轻链片段的去卷积分子量结果。

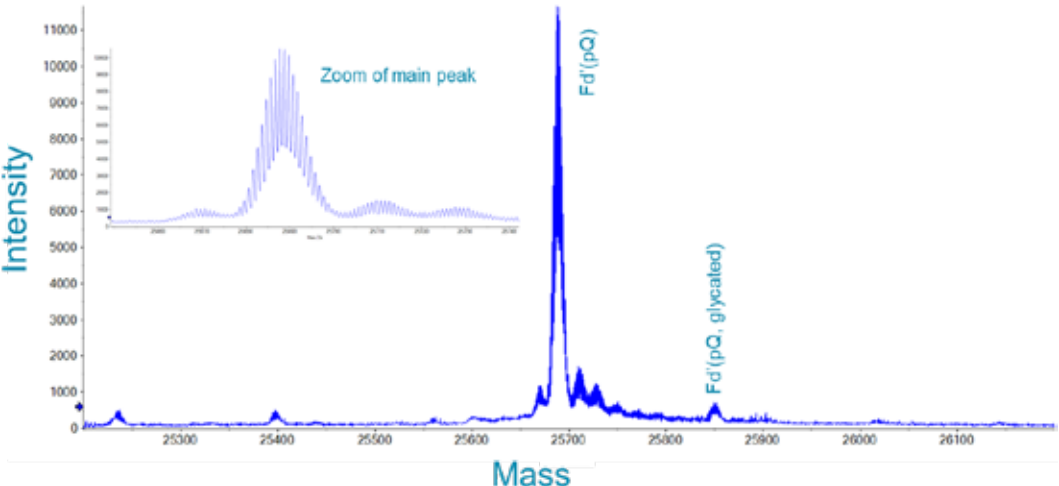


图4. NIST单抗经Ides酶切后Fd片段的去卷积分子量结果。



论的同位素峰的分子量的平均质量偏差为3.46 ppm，结果显示使用X500B QTOF高分辨质谱进行蛋白亚基分子量测定时能获得非常高的准确度。

表4. NIST单抗轻链分子量测定结果以及对应的质量偏差。

Theoretical	Observed	PPM
23118.318	23118.222	-4.13
23119.320	23119.222	-4.25
23120.323	23120.226	-4.19
23121.325	23121.237	-3.82
23122.328	23122.238	-3.89
23123.330	23123.25	-3.48
23124.333	23124.256	-3.33
23125.335	23125.257	-3.39
23126.338	23126.255	-3.58
23127.340	23127.257	-3.60
23128.343	23128.264	-3.40
23129.345	23129.267	-3.37
23130.347	23130.273	-3.22
23131.350	23131.277	-3.14
23132.352	23132.281	-3.07
23133.354	23133.292	-2.70
23134.357	23134.291	-2.84
23135.359	23135.294	-2.81
<b>AVERAGE</b>		<b>3.46</b>

## 结论

- 使用X500B高分辨质谱平台对经Ides酶切后的单抗的亚基分子量测定时能达到同位素峰分辨的效果，在鉴定蛋白翻译后修饰方面准确度更高。
- 蛋白亚基分子量测定时，理论模拟与实际观测到的结果的匹配度非常高。
- 使用X500B进行蛋白亚基分子量的测定结果与之前文献中报道的结果一致。

## 参考文献

1. An, Y., Zhang, Y., Mueller, H.-M., Shameem, M., Chen, X., A New Tool for Monoclonal Antibody Analysis. mAbs. 2014;6(4) :879-893. doi: 10.4161/mabs.28762.
2. John E. Schiel, Darryl L. Davis, Oleg V. Borisov (Eds.). Vol 1201, 2015 State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study. Vol 1201, American Chemical Society.

## 致谢

SCIEX中国团队肖志良的翻译工作!

## 抗体-药物偶联物的完整分析

使用台式X500B QTOF质谱仪分析曲妥珠单抗-恩他辛抗体-药物偶联物

### Intact Analysis of Antibody Drug Conjugates

Trastuzumab Emtansine Analysis using Benchtop X500B QTOF Mass Spectrometer

Wen Jin<sup>1</sup>, Suya Liu<sup>1</sup>, Doug Simmons<sup>1</sup>, Ian Moore<sup>1</sup>, Sean McCarthy<sup>2</sup> and Sibylle Heidelberger<sup>1</sup>

71 Four Valley Dr. Concord, ON L4K 4V8, Canada

500 Old Connecticut Path, Framingham, MA, 01701, USA

#### 引言

抗体-药物偶联物 (ADCs) 是一类新兴的生物治疗药物。这些药物采用特定的连接子将抗体和小分子细胞毒药物连接起来, 因而ADCs既具有单克隆抗体的靶向特异性, 又可以通过细胞毒性分子有效杀死目标感染细胞。然而ADCs的结构组成非常复杂, 在分析表征过程中将会涉及到抗体主链和抗体上结合的细胞毒药物两个部分的表征, 其中药物抗体比 (DAR值) 的分析检测是ADCs药物评估中重要指标。目前已经有研究表明, 抗体上结合药物的数量会显著影响ADCs的安全性和有效性, 因此必须开发有效的方法对其进行表征和监测<sup>[1-3]</sup>。

本文基于SCIEX公司推出的紧凑型X500B QTOF高分辨质谱系统, 提出了一种新型简便的ADCs分析方法快速准确地计算DAR值。该系统使用SCIEX OS软件进行数据采集, 并且搭配 BioPharmaView™ 2.0.1软件进行数据处理, 不仅可以对ADCs进行常规表征, 也可以对ADCs糖基化和去糖基化两种形态进行分析, 分别得到准确的DAR值。

#### 实验部分

样品分为原始的含有糖基化的ADCs, 以及使用PNGase F酶 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) 脱去N-糖的脱糖ADCs, 具体步骤参照PNGase F酶的使用说明。

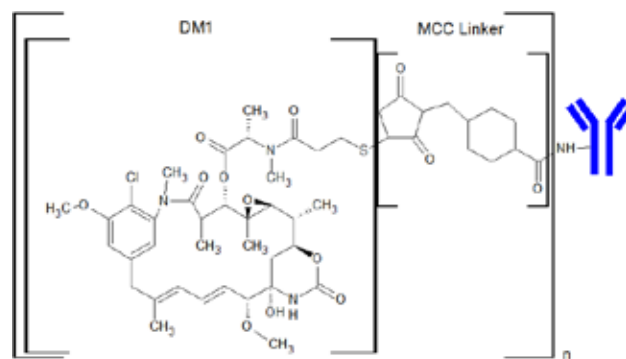


图1. 曲妥珠单抗-恩他辛的分子结构图。T-DM1由一个曲妥珠单抗主链、多个MCC连接子以及DM1药物组成, DM1是一种细胞毒性药物, DM1与MCC连接子反应后与通过赖氨酸残基与抗体结合。

LCMS分析仪器配置: 台式X500B QTOF高分辨质谱联接Exion LC™系统, 并且搭载SCIEX OS操作系统。表1列出了使用Exion LC™系统分离过程中使用的液相色谱条件, 表2列出了使用台式X500B QTOF高分辨质谱分析过程中用到的各种参数。所得到的数据使用BioPharmaView™软件进行从原始质谱图到完整蛋白分子量的数据处理, 并计算DAR值。

表1. Exion LC™液相色谱条件。

Column	Agilent Poroshell 300SB-C8 1.0 x 75mm 5 μm
Mobile phase A	0.1 % Formic acid in water
Mobile Phase B	0.1% Formic acid in acetonitrile
Flow rate	0.2 mL/min
Column Temperature	75 °C

表2. X500B QTOF质谱分析条件。

Source parameters:	
CUR	30
GS1	50
GS2	50
Ion Spray Voltage	5000 V
Source Temperature	400°C
TOFMS mass range	900 – 4000 m/z
DP	250 V
Accumulation time	0.5 s
Time bins to sum	80
Intact Protein Mode (IPM)	On
Large Proteins (>70kDa)	On
Decrease Detector Voltage	On
DP	250 V

## 结果与讨论

### 糖基化的T-DM1

在本研究中，我们选用曲妥珠单抗-恩他辛 (T-DM1) 作为研究对象，主要用于治疗HER-2阳性转移性乳腺癌。T-DM1由曲妥珠单抗通过赖氨酸残基共价结合具有细胞毒性的DM1药物分子，结构如图1所示。当T-DM1被靶细胞内化后，细胞毒性药物分子将被释放，来执行它的作用。因此，在T-DM1药物开发和生产过程中，药物分子与抗体结合效果即DAR值的测定是药效评估必不可少的一环。

本文首先通过X500B质谱平台来测定糖基化T-DM1的DAR值。如图2A所示，由于ADCs分子中含有多种糖基化修饰，所以分析得到的原始质谱图非常复杂。我们借助BioPharmaView™软件的重建算法，生成了高质量的完整分子量图。由图B，我们可以看到一系列不同DAR值完整蛋白分子量的信号。这些ADCs分别是由0-8个药物分子与曲妥珠单抗相连。每个DAR值对应的完整分子量图中都能够看到清晰的糖型轮廓，且各个轮廓分布均一致。

通过对每一个DAR值对应的完整分子量图进行分析（图3），我们清楚地看到了各个主要糖型的轮廓。其中有三组峰的质量差为221 Da，而不是219 Da，初步判断是连接子自身的质量造成的。此前有报道称，这是由于赖氨酸残基发生了化学交联反应。曲妥珠单抗与MCC连接子的初始反应过程中将会产生一种中间体。在某些条件下，由于赖氨酸的位置更加接近该中间体，从而发生了两者之间的链间交联反应。针对这种情况，我们可以通过计算质量数的差值来判断，因为该连接子的质量数为221 Da。<sup>[2]</sup>

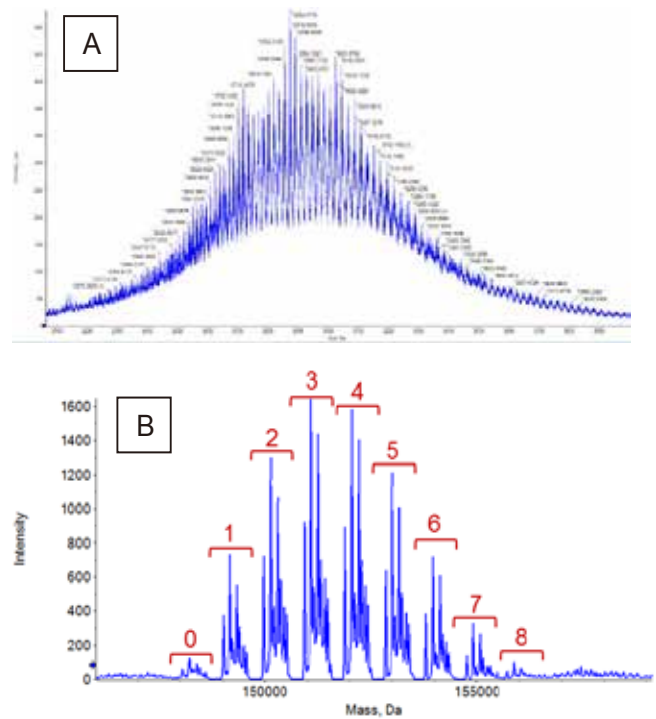


图2. T-DM1原始质谱图(A)和完整分子量图 (B)。原始质谱图(2A)既包括不同的糖基化修饰又包含不同DAR值的信息，因而增加了抗体谱的一般复杂程度，而经过BioPharmaView™软件处理后得到了完整分子量图，并且计算得出样本中有0-8个药物分子连接在曲妥珠单抗上。

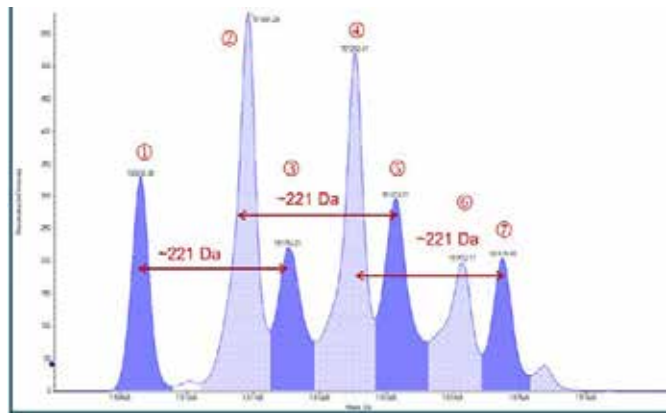


图3. 3个药物分子结合的曲妥珠单抗-恩他辛完整分子量图。图上可以发现主要的糖型式为1: G0F/G0F, 2: G0F/G1F, 3: G1F/G1F和4: G1F/G2F。除此之外，图上还观察到质量数增加了一个MCC连接子的信号。

利用BioPharmaView™，DAR值可以根据不同药物偶联抗体的重建峰面积分布来计算。图4中可以看到，DAR值的计算结果为3.49，与文献中报道的3.5值吻合较好<sup>[1-3]</sup>。



图4. 使用BioPharmaView™计算曲妥珠单抗-恩他辛的DAR值。软件给出了非常直观的表格和图形，显示了不同比值的分布情况，并在右上角用高亮显示出计算结果：3.49。

### 脱糖基化的 T-DM1

我们使用PNGase F酶去除N-糖链，得到脱糖基化的T-DM1。由于与糖型相关的峰被去除，我们得到一个复杂度相对较低的原始质谱图（如图5A所示）。在图5B中，我们可以清楚地看到由糖型导致的复杂性已经降低。此外，在不同DAR值对应的每簇信号中，质量数增加221 Da的峰信号仍然非常明显，这一现象进一步证实了我们前文的推断。

去糖基化曲妥珠单抗-恩他辛的完整分子量图进一步证实了图2中对糖型的分析结果。通过对原始曲妥珠单抗-恩他辛和脱糖基化曲妥珠单抗-恩他辛这两种样本进行检测，均得到了相同的结果，即有0-8个药物分子连接在曲妥珠单抗主链上。利用BioPharmaView™软件计算得到的DAR结果也与文献报道一致。<sup>[2]</sup>

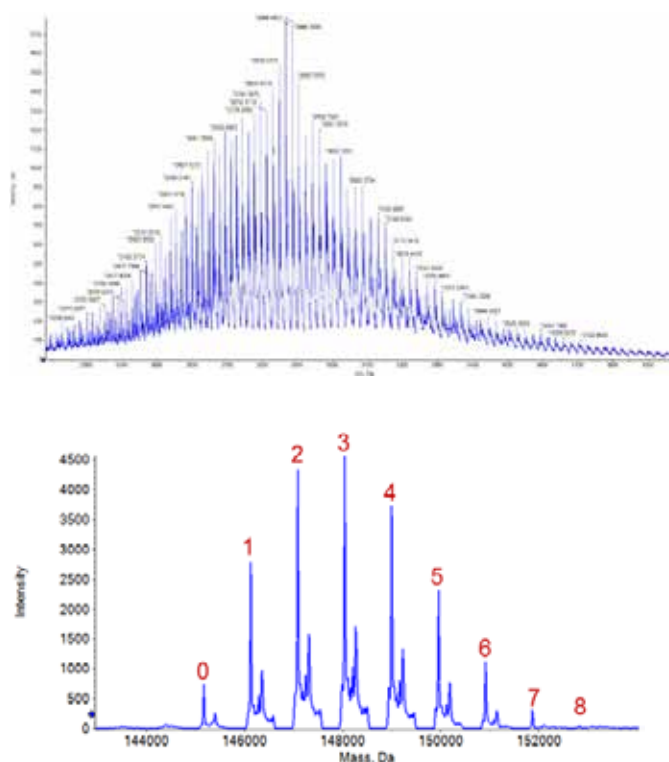


图5. 5A：脱糖基化T-DM1的原始质谱图，5B：由5A重建得到的：脱糖基化T-DM1的分子量图。

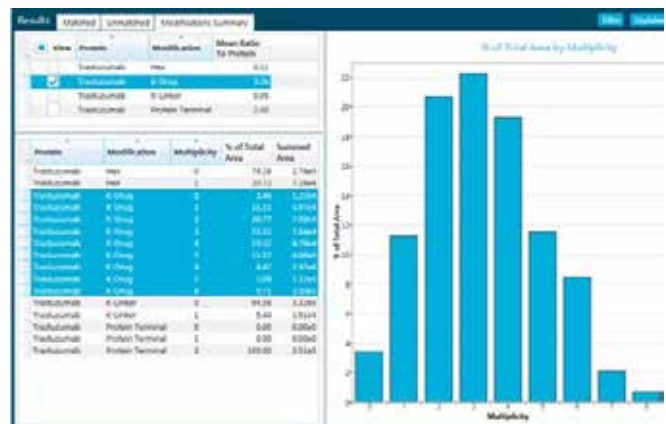


图6. 去糖基化的曲妥珠单抗-恩他辛的DAR计算结果。使用0-8个药物分子的偶联物（左上对话框中高亮标出）来计算得到DAR值（左上对话框中高亮标出）为3.26。



## 结论

通过实验结果证明，SCIEX台式X500B QTOF高分辨质谱系统可以为广大生物制药的分析工作者提供非常高质量的数据。X500B QTOF的超高分辨可以识别糖基化和与抗体结合的药物分子数量，因此对结构复杂的ADCs类药物的分析质控具有很好的应用。也正是X500B QTOF超高的质量精度帮助我们判定了221 Da质量偏差的归属：所得到的数据结果与Jacobson等人的研究结论完全吻合，曲妥珠单抗 - MCC连接子中间体与赖氨酸残基会发生交联反应，而221Da正是对应于一个MCC连接子。数据处理和谱图的重建采用BioPharmaView™软件进行，分析速度快，计算结果准确：含糖基化的样本通过软件计算得到的DAR值为3.49，非常接近与文献中给出的DAR值3.5。<sup>[2]</sup>

## 参考文献

- [1] Michael T. Kim, Yan Chen, Joseph Marhoul and Fred Jacobson. Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 1223-1232
- [2] Yan Chen, Michael T. Kim, Laura Zheng, Galahad Deperalta, and Fred Jacobson. Structural Characterization of Cross-Linked Species in Trastuzumab Emtansine (Kadcyla). *Bioconjugate Chem.* 2016, 27, 2037-2047
- [3] Liuxi Chen, Lan Wang, Henry Shion, Chuanfei Yu, Ying Qing Yu, Lei Zhu, Meng Li, Weibin Chen, and Kai Gao. In-depth structural characterization of Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *MABS*, 2016, VOL. 8, NO. 7, 1210-1223

## 致谢

SCIEX中国团队刘一颖的翻译工作!

# 应用 SCIEX X500B QTOF质谱系统分析Kadcyla<sup>®</sup> (Ado-trastuzumab Emtansine)

## Characterization of Kadcyla<sup>®</sup> (Ado-trastuzumab Emtansine) Using SCIEX X500B system

章伟平<sup>1</sup>, 刘军<sup>1</sup>, 罗继<sup>2</sup>, 窦鹏<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 东曜药业有限公司, 苏州, 中国

<sup>2</sup> SCIEX中国

抗体偶联药物 (ADC) 是一种新型的癌症治疗方式, 它是由靶向特异性抗原的单克隆抗体与高效细胞毒性的小分子化学药物偶联而成。目前经FDA批准上市的ADC药物有Mylotarg<sup>®</sup>、Adcetris<sup>®</sup>、Kadcyla<sup>®</sup>及Besponsa<sup>®</sup>, 其中Kadcyla<sup>®</sup>是由曲妥珠单抗的赖氨酸通过非切除的硫醚连接子SMCC与美坦新衍生物DM1偶联而成。

抗体偶联药物的表征和理化分析依赖于多种多样的分析技术, 这其中质谱发挥着重要作用, 在本文我们应用SCIEX X500B质谱对Kadcyla<sup>®</sup>的药物偶联分布、药物抗体偶联比、药物偶联位点以及位点偶联程度进行了分析。

### 材料与amp;方法

#### 完整分子量分析

**样品制备:** 用 50 mM 碳酸氢铵溶液稀释ADC样品, 添加PNGase F酶, 37°C孵育3小时。

#### 液相条件:

表1. 完整分子量分析液相条件。

色谱仪	Sciex ExionLC
色谱柱	ACQUITY UPLC BEH200, SEC 1.7 μm, 4.6 × 300 mm
流动相	超纯水, 含25% ACN, 0.1% FA
柱温	室温
流速	200 μL/min
梯度	等度

#### 质谱条件:

本文中使用的SCIEX X500B QTOF<sup>®</sup>质谱方法设置如表2所示。

表2. 完整分子量分析质谱参数。

Parameter	Value	Parameter	Value
Curtain gas:	30	Time bins to sum	80
Ion Source Gas 1 (psi)	45	TOF start mass (Da)	1000
Ion Source Gas 2 (psi)	45	TOF stop mass (Da)	5000
Temperature (° C)	450	Accumulation time	1
Scan type:	TOF MS	Declustering potential (V)	250
Polarity	Positive	Collision energy (V)	10
Ionspray Voltage (V)	5500	CAD gas	7

#### 肽图分析

**样品制备:** ADC样品用8 M盐酸胍溶液变性后, 加入二硫苏糖醇在37°C条件下保持30分钟还原二硫键, 然后加入碘乙酰胺室温避光反应30分钟进行烷基化, 用50 mM 甲酸铵溶液置换缓冲液后分别添加胰蛋白酶或糜蛋白酶37°C孵育过夜。

表3. 肽图分析液相条件。

仪器	Sciex ExionLC
色谱柱	ACQUITY UPLC BEH300, C18 1.7 μm, 2.1 × 150 mm
流动相	A: 超纯水, 含0.1% FA B: 乙腈, 含0.1% FA
柱温	室温
流速	160 μL/min
梯度	见表4

液相条件：

表4. 肽图分析液相梯度。

时间 (min)	流速 (mL/min)	A相百分比	B相百分比
0	0.16	95	5
5	0.16	95	5
65	0.16	60	40
70	0.16	50	50
71	0.16	20	80
79	0.16	20	80
80	0.16	95	5
90	0.16	95	5

质谱条件：

表5. 肽图分析质谱参数。

Parameter	Value	Parameter	Value
Curtain gas:	30	Scan type:	TOF MS
Ion Source Gas 1 (psi)	50	TOF start mass (Da)	200
Ion Source Gas 2 (psi)	50	TOF stop mass (Da)	1800
CAD Gas	7	Collision energy (V)	10
Temperature (° C)	500	Accumulation time	0.25
Declustering potential (V)	80	Scan type:	TOF MSMS
Polarity	Positive	TOF start mass (Da)	100
Ionspray Voltage (V)	5500	TOF stop mass (Da)	1800
Time bins to sum	4	Accumulation time	0.1
IDA Criteria	Peptide	Collision energy (V)	Dynamic

结果与讨论

药物偶联分布(Drug Load Distribution)及药物抗体偶联比(Drug Antibody Ratio)

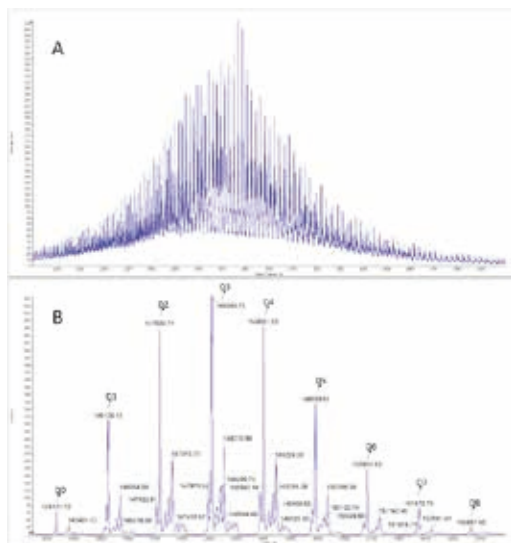


图1. Kadcyla®经PNGase F酶处理去除N糖后的完整分子量分析谱图。A) 一级质谱原始谱图 (m/z范围 2000-4000)；B)去卷积后的质谱谱图。

表6. 药物偶联分布及药物抗体偶联比。

Drug-Load (%)									DAR
0	1	2	3	4	5	6	7	8	
2.56	9.39	19.83	24.26	20.70	12.48	6.30	2.86	1.62	3.38

通过去卷积质谱谱图我们能够清楚的观察到D0至D8的药物偶联分布，因为D0至D8除了主峰外还有连接子MCC与曲妥珠单抗的其它氨基酸发生副反应所致的错配产物的质谱峰，所以在计算DAR值时采用了D0至D8各自对应的区域质谱峰面积，而不是D0至D8各自对应的主峰的质谱峰面积。

该样品由D0至D8各自对应区域质谱峰面积计算出来的DAR值为3.38，而依据UV/VIS法计算出来的DAR值为3.52（UV/VIS法未区分游离的药物和偶联在单抗上的药物）。我们比较了不同批次样品分别通过LC-MS法和UV/VIS法计算的DAR值，发现两种方法计算出来的DAR值相关性很好（该部分数据本文中未展示）。

药物偶联位点(Conjugation Site)及位点偶联程度(Conjugation Level)

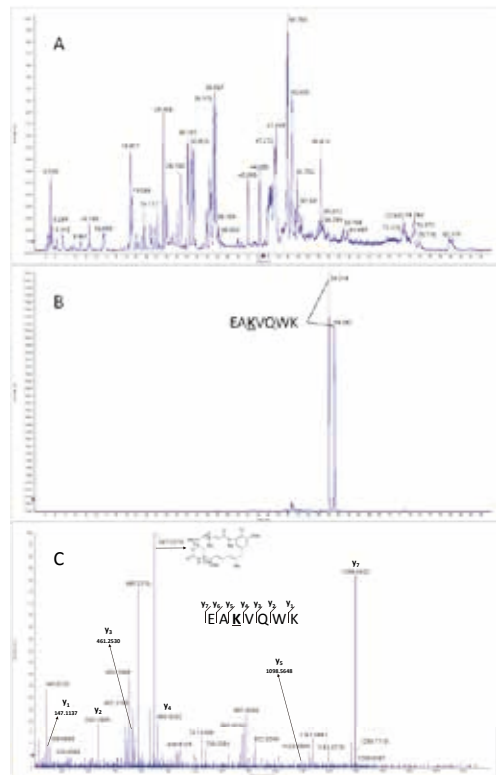


图2. A) ADC样品经胰蛋白酶酶解后质谱分析总离子流色谱图 (TIC)；B) 偶联DM1肽段EAKVQWK的提取离子流色谱图 (XIC)，双峰为非对映异构体所致；C) 偶联DM1肽段EAKVQWK的二级质谱谱图

在本文中，二级质谱解离方式CID被用于分析偶联DM1的肽段，以EAKVQWK（下划线K为偶联位点）肽段为例，两个与偶联DM1的EAKVQWK肽段质荷比精确匹配的色谱峰被发现，如图2B所示，双峰是由MCC-DM1的非对映异构体所致；在二级质谱图2C中我们能观察到DM1的特征碎片离子峰547.22。

Kadcyla<sup>®</sup>有92个可能的偶联位点，其中包括88个赖氨酸残基和4个N端氨基酸残基，本文中主要通过胰蛋白酶酶解样品质谱分析来分析偶联位点，糜蛋白酶酶解样品用于分析胰蛋白酶酶解样品质谱分析所未覆盖到的偶联位点。我们通过质谱分析发现了82个偶联位点，其中包括78个赖氨酸残基和4个N端氨基酸残基，偶联位点及位点偶联程度如表7所示，其中位点偶联程度的计算忽略了不同肽段及是否偶联DM1药物带来的离子化效率的差异，因此该计算值仅是一个相对数值，具备参考意义。偶联药物肽段的出峰时间集中于51 min至73 min之间，这是因为偶联药物导致了肽段的非极性的增强。由所有位点偶联率相加计算得出的DAR值为3.15，而这与由去糖Kadcyla<sup>®</sup>完整分子量质谱分析计算得出的DAR值3.38是有可比性的。

## 总结

SCIEX X500B质谱在质量精度、灵敏度及扫描速度等方面的优秀表现，辅以最新的Sciex OS操作系统和生物制药分析专用软件BioPharmaView，帮助我们对Kadcyla<sup>®</sup>这一赖氨酸偶联ADC药物的药物偶联分布、药物抗体偶联比、药物偶联位点以及位点偶联程度进行了全面的分析。

表7. 药物偶联位点及位点偶联程度汇总。

Conjugation Site	Theoretical m/z	Observed m/z	RT (min)		Mass Error (ppm)	Lys conjugated	
VL	N-term NH2	945.7555(3+)	945.7528(3+)	62.70	63.60	-2.9	0.15%
	39	983.1257(3+)	983.1240(3+)	57.81	58.71	-1.7	0.15%
	45	1009.1740(3+)	1009.1715(3+)	69.83	70.15	-2.5	0.10%
	107	800.8903(2+)	800.8879(2+)	56.75	57.94	-3.0	15.33%
CL	126	1171.0727(4+)	1171.0701(4+)	71.95	72.69	-2.2	0.07%
	145	922.9327(2+)	922.9302(2+)	58.02	59.08	-2.7	4.00%
	149	909.1641(4+)	909.1608(4+)	58.67	59.45	-3.6	0.34%
	169	1144.7739(4+)	1144.7712(4+)	58.61	59.52	-2.4	0.17%
	*183	877.3878(2+)	877.3864(2+)	61.47	62.59	-1.6	1.71%
	188	616.2719(3+)	616.2699(3+)	51.34	52.65	-3.2	4.22%
	190	775.1168(4+)	775.1143(4+)	49.82	50.82	-3.2	1.77%
207	1112.8501(3+)	1112.8469(3+)	56.09	56.93	-2.9	1.74%	
VH	N-term NH2	946.7944(3+)	946.7912(3+)	65.63	66.43	-3.4	0.57%
	30	1065.4971(3+)	1065.4950(3+)	63.66	64.19	-2.0	0.22%
	43	756.6986(3+)	756.6965(3+)	61.23	62.13	-2.8	1.57%
	65	926.4175(2+)	926.4147(2+)	55.98	57.16	-3.0	24.01%
	76	1073.1673(3+)	1073.1658(3+)	60.55	61.47	-1.4	0.52%
CH1	124	1227.8195(4+)	1227.8161(4+)	68.31	68.94	-2.8	0.11%
	136	1149.2286(3+)	1149.2265(3+)	63.27	64.17	-1.8	0.38%
	208	1534.7416(5+)	1534.7350(5+)	64.07	64.58	-4.3	2.02%
	213	1357.4958(6+)	1357.4955(6+)	60.75	61.22	-2.2	1.36%
	216	723.3374(2+)	723.3355(2+)	54.72	56.11	-2.6	12.87%
Hinge	217	633.6469(3+)	633.6461(3+)	51.15	52.41	-1.3	9.71%
	221	640.2800(3+)	640.2785(3+)	53.79	55.08	-2.3	1.42%
CH2	225	1073.5071(4+)	1073.5032(4+)	60.81	61.60	-3.6	3.13%
	249	950.9610(4+)	950.9610(4+)	67.05	67.68	0	0.50%
	251	1155.0650(4+)	1155.0631(4+)	65.23	65.94	-1.6	0.09%
	277	1189.2995(4+)	1189.2967(4+)	62.31	62.69	-2.4	0.05%
	291	779.8712(4+)	779.8686(4+)	55.38	56.25	-3.3	1.15%
	293	729.3430(2+)	729.3413(2+)	54.37	55.73	-2.3	9.00%
	320	796.8984(4+)	796.8967(4+)	66.88	67.50	-2.1	0.06%
	323	842.3580(2+)	842.3559(2+)	54.38	55.69	-2.5	10.31%
	325	846.3767(2+)	846.3750(2+)	53.57	54.92	-2.0	13.76%
	329	741.7069(3+)	741.7050(3+)	57.79	58.79	-2.6	5.17%
	337	742.0470(3+)	742.0449(3+)	60.50	61.38	-2.8	7.53%
	341	802.3902(2+)	802.3883(2+)	55.04	56.30	-2.4	1.40%
CH3	343	806.8778(2+)	806.8762(2+)	54.14	55.50	-2.0	10.72%
	363	912.7590(3+)	912.7565(3+)	60.69	61.60	-2.7	1.41%
	*373	823.0455(3+)	823.0390(3+)	67.09	68.11	-7.9	0.46%
	395	1339.6059(4+)	1339.6045(4+)	65.81	66.52	-1.0	0.12%
	417	887.9224(2+)	887.9200(2+)	56.29	57.53	-2.7	7.81%

\*表示该偶联位点为通过糜蛋白酶酶解样品肽图分析所确认。



# SWATH®——数据非依赖型采集模式在生物药肽图表征研究中的应用

SCIEX X500B QTOF质谱系统SWATH®方案特辑

Zoe Zhang<sup>1</sup>, Annu Uppal<sup>2</sup>; Harini Kaluarachchi<sup>3</sup>; Sibylle Heidelberger<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SCIEX Redwood City, California (USA); <sup>2</sup> SCIEX Gurgaon Haryana (India), <sup>3</sup> SCIEX Ontario (Canada)

## 生物药表征研究中的主要挑战

- 目标样品的全覆盖信息
- 低丰度分析物的鉴定和确证
- 翻译后修饰的准确定量

## SCIEX SWATH®采集模式的特点

- 一个采集方法适用于所有的分析物
- 能够采集所有潜在化合物的碎片离子信息
- 更宽的动态范围
- 重现性和灵敏度更佳
- 使用BioPharmaView™软件能够实现对低丰度修饰的鉴定和定量

## 背景介绍

肽图分析是生物制药分析流程中常见的一种分析项目。它通过对抗体药的深入分析，能够鉴定到所有预期的和非预期的肽段修饰，进而保证产品的质量、安全性和效价始终如一。其中对于低丰度肽段修饰的鉴定则是保证生物药产品质量和安全性的关键环节。

在本次研究中，我们通过SCIEX数据非依赖型采集模式——SWATH®对曲妥珠单抗（Trastuzumab）进行分析。SWATH®是一种对化合物无歧视的采集方式，在采用SWATH®模式采集数据的时候，质谱会将需要扫描的质荷比范围划分为多个特定宽度的窗口，每次二级扫描时Q1会将其中一个窗口内的所有化合物送到碰撞室中同时打碎，质谱就能够采集到该窗口内所有化合物的MS/MS谱图，实现化合物的深度分析。肽图分析的工作流程中，在分析共洗脱的肽段时，不同于数据依赖型采集模



图1. SCIEX SWATH®在样品全信息覆盖度采集上的工作流程展示。

式（Data dependent acquisition, DDA）需要通过设置筛选参数对肽段母离子进行选择从而依次对肽段进行分析，SWATH®可以直接采集所有肽段的MS/MS谱图，从而在对低丰度化合物的定性和定量分析中有更好的覆盖度和重现性。

## 实验方案：

### 样品制备：

曲妥珠单抗购自Myoderm (Norristown, PA, USA)，胰蛋白酶增强剂ProteaseMax和胰蛋白酶均购自Promega (Madison WI, USA)。抗体使用ProteaseMax变性后溶解于pH为7.8的50 mM Tris缓冲液中。接下来使用DL-dithiothreitol进行还原，使用2-iodoacetamide进行烷基化封闭（均购自Sigma Aldrich）。之后按照质量比1:25加入胰蛋白酶，37摄氏度孵育3小时，最后加入TFA酸化。离心取上清后送到LC-MS系统上进行分析。

### 液相色谱条件：

使用搭载Phenomenex Kinetex 1.7 μm C18 100 Å

50 × 2.1 mm 色谱柱的 ExionLC 液相系统在 40 °C 进行分析。流动相 A: 水+0.1% 甲酸, 流动相 B: 乙腈+0.1% 甲酸, 流速设定为 250 μL/min, 在 25 分钟的时间内 B 相浓度从 5% 至 40%, 上样量为 8 μL。

**质谱条件:**

使用搭载 IonDrive™ 离子源和电喷雾电离喷针的 SCIEX X500B QTOF 系统进行 SWATH® 数据的采集, 对于 SWATH® 采集方法而言, 每个 150 ms 时长的 TOF-MS 扫描后接 28 个窗口的二级扫描, 每个二级扫描的时长为 50 ms。

**数据处理:**

使用 BioPharmaView™ 软件的默认参数来处理 SWATH® 数据, 通过批处理的方法来处理重复样本。

**结果与讨论:**

我们使用相同的液相方法和 SWATH® 数据采集模式对曲妥珠单抗的肽图数据进行了三次重复采集。Figure.2A 是这三次重复数据的色谱叠加图, 可以看到液

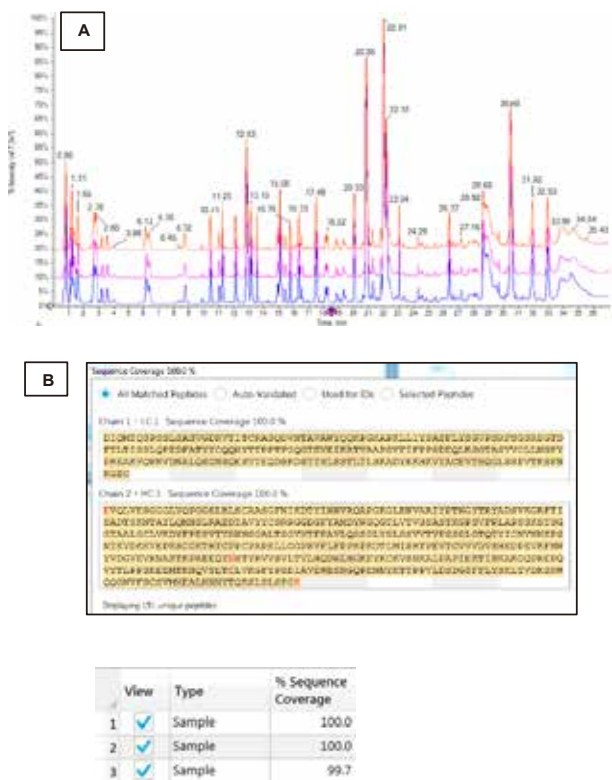


图2. (A) 三次重复采集的曲妥珠单抗肽图的 TIC 叠加图; (B) 三次重复均能够提供非常接近 100% 的肽段覆盖度。

相和 X500B QTOF 系统的稳定性和重现性都非常的好。三次重复数据的肽段覆盖率都超过 99%, 绝大部分鉴定到的修饰的质量偏差都在 5 ppm 以内 (Figure 2B)。

使用 SWATH® 模式采集的数据能够尽可能多的发现低丰度的肽段及其修饰。例如我们在 2.44 分钟发现了 EEQYNSTYR 肽段上发生的低丰度的 deamidation 修饰。在三次重复中, 该修饰在这条肽段上的平均修饰比例为 0.1% (表 1)。由于其糖基化形式是高丰度形式且与 deamidation 修饰形式存在共洗脱, 所以如果使用传统的数据依赖型采集模式则会存在丢失这条肽段信息的可能。而 SWATH® 则不受 cycle time, 母离子信号强度和共洗脱母离子的影响, 因此能够对所有高丰度和低丰度的肽段均进行很好的二级谱图的采集, 进而达到最高的序列覆盖度和修饰鉴定率。

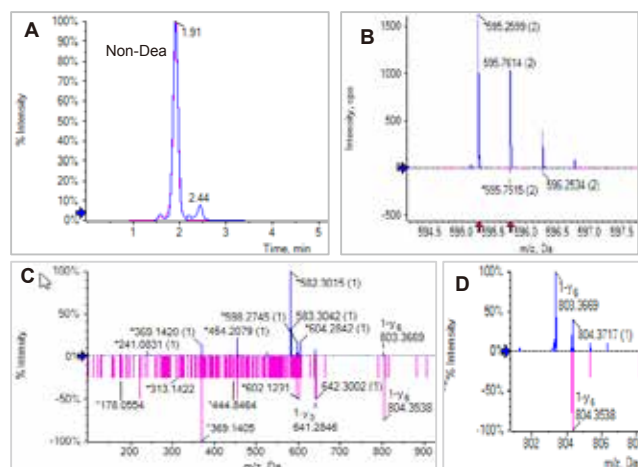


图3. EEQYNSTYR 肽段无 deamidation 修饰 (蓝色) 和 deamidation 修饰 (粉色) 的 (A) XIC 图 (B) SWATH® 一级谱图 (C) SWATH® 二级谱图 (D) y6 离子谱图。

表 1. BioPharmaView™ 软件所检测到的肽段 EEQYNSTYR 和 FNWYVDGVEVHNAK 上 deamidation 的修饰比例信息。

	Sample	% modification	Average	% CV
EEQYNSTYR	1	0.11%	0.11%	5.1%
	2	0.12%		
	3	0.11%		
FNWYVDGVEVHNAK	1	0.40%	0.44%	8.2%
	2	0.45%		
	3	0.47%		

Figure 4展示了BioPharmaView™软件鉴定到的另外一个存在于FNWYVDGVEVHNAK肽段上的低丰度的deamidation修饰。

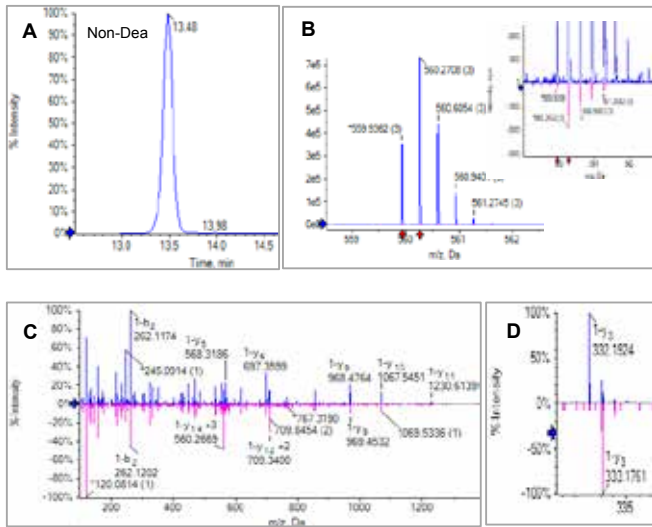


图4. SWATH®数据中肽段FNWYVDGVEVHNAK上无deamidation修饰（蓝色）和deamidation修饰（粉色）的（A）XIC图，（B）SWATH®一级谱图，（C）SWATH®二级谱图以及（D）确证deamidation修饰的谱图。

此外，我们还从EEQYNSTYR肽段上发现了糖基化修饰。数据经过BioPharmaView™处理后，我们发现该条肽段上存在低丰度的mannose-5糖基化修饰。我们可以通过SWATH®采集到的高质量MS/MS数据进行进一步的确证（Figure 4B）。无论目标肽段是高丰度还是低丰度，SWATH®数据采集模式不需要设置母离子的选择规则就能够提供高质量的MS/MS信息，为糖基化修饰的进一步确证提供可靠的依据。

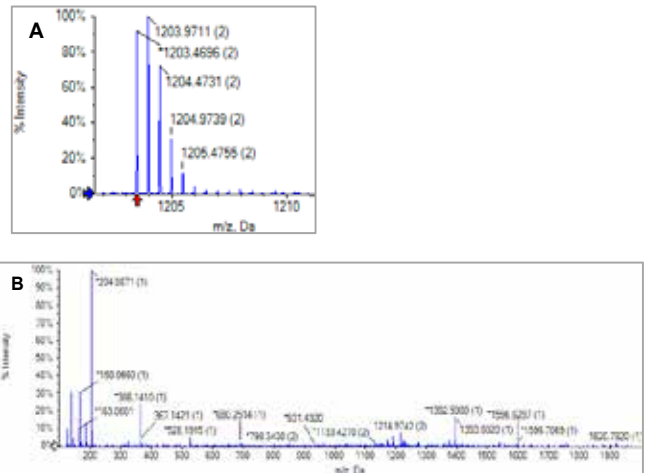


图5. 肽段EEQYNSTYR上Mannose 5修饰的（A）TOF-MS谱图（B）MS/MS谱图。

## 结论

SWATH®解决方案能够提供几乎全覆盖的曲妥珠单抗肽段信息，通过提供高分辨率的碎片离子XIC图来降低其他肽段的干扰，能够对低丰度的肽段修饰进行可靠的鉴定和确证。这种非常低丰度肽段修饰的鉴定能力对于提高可信肽段覆盖度和鉴定生物分子的潜在重要质控指标提供了很大的帮助。

## 参考文献：

1. MS/MSALL with SWATH® Acquisition - Comprehensive Quantification with Qualitative Confirmation using the TripleTOF® 5600+ System. AB SCIEX Technical note, 3330111-03.

## 致谢

SCIEX中国团队陈晨的翻译工作！

# 生物药二硫键分析

使用BioPharmaView™软件快速、自动分析链内和链间的二硫键

Annu Uppal and Manoj Pillai

SCIEX, 121, Udyog Vihar, Phase IV, Gurgaon, Haryana, India

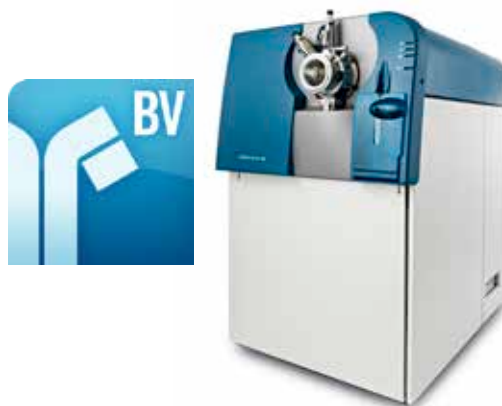
## 前言

二硫键对于维持蛋白质药物的结构和功能至关重要，因此在重组蛋白质药物生产的阶段需要准确的分析生物药的二硫键。对于单克隆抗体来说，错配的二硫键会影响蛋白的结构和功能，甚至引发抗体团聚。二硫键错配可能发生在细胞发酵或者纯化工艺的每一个阶段，因此准确的分析抗体的二硫键有助于研究人员及时发现工艺过程中的问题，及时调整工艺参数确保终产品的质量。

单抗的分子量非常大，分子的异质性高而且所含半胱氨酸残基多，这些因素导致单抗的二硫键分析极具挑战性。二硫键分析通常需要多酶酶切然后进行液质联用分析，但是传统的方法需要大量的人工确认和比对，数据分析耗时耗力，因此对于生物制药公司来说，急需要专业且智能的软件来辅助分析二硫键。针对生物药用户的这种需求，SCIEX公司开发了针对生物药表征的软件BioPharmaView™，将复杂的数据处理过程变的异常简单。BioPharmaView™软件能快速、自动处理像肽图、二硫键分析等生物药表征的数据，软件自动对峰进行确认，对峰面积进行积分，最终给出分析报告。

BioPharmaView™软件能自动对多肽二级谱图中的b、y离子进行归属，然后将实际观测的二级谱图中的碎片离子与理论的二级碎片离子进行匹配，以此来确认多肽的氨基酸序列，用同样的方法也可以确认非还原肽图中含二硫键的肽段。使用二级谱图的得分、电荷态以及保留时间等限制条件能进一步提高数据的分析速度和分析结果的准确度。

在这篇技术文档中，我们将展示在Q-TOF高分辨质谱平台上结合BioPharmaView™软件快速分析单抗Fab区域中5对二硫键的连接方式。TripleTOF® 5600高分辨质谱拥有非常快的扫描速度，能快速获得样品准确的一级和二级信息，结合功能强大的BioPharmaView™软件能快速的完成生物药二硫键的分析。



## 实验条件和方法

**色谱条件：**使用胰蛋白酶，将单抗样品分别在还原和非还原两种条件下进行酶切，多肽分离在ExionLC™ AC上进行，色谱柱为 Kinetex C18 (Phenomenex, 2.1 × 100 mm, 3 μm)，流动相A为2%乙腈/水，含0.1%的甲酸；流动相B为98%乙腈/水，含0.1%的甲酸。色谱流速为0.2 mL/min。

**质谱条件：**质谱分析在TripleTOF® 5600高分辨质谱上进行，配备双喷雾离子源。数据采集使用信息依赖性的采集模式，一级的离子累积时间为250 ms，随后跟着20张二级，离子累积时间分别为50 ms。动态排除的时间设置为5S，碰撞能量使用rolling CE，碰撞能量扩展设置为5V。

**数据处理：**使用BioPharmaView™软件自动进行二硫键的分析，将实际观测到的肽段的分子量与理论分子量进行比对来确认二硫键的连接方式，使用二级谱图的得分、电荷态以及保留时间等限制条件能进一步提高分析结果的准确度。



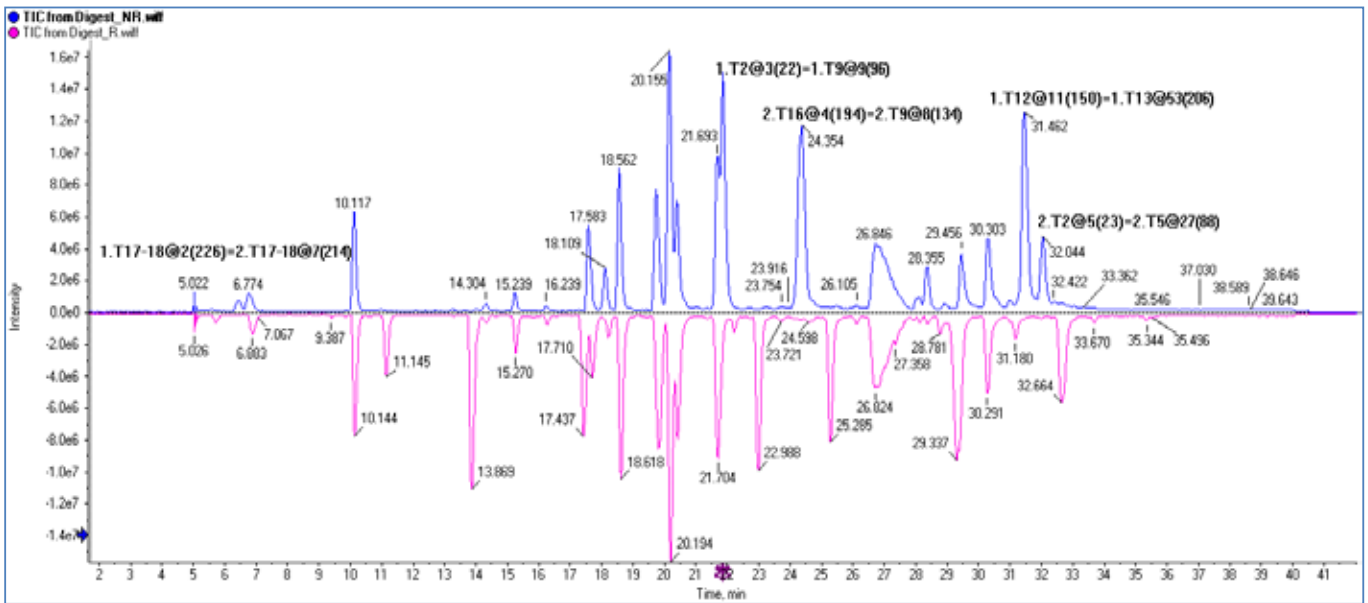


图1. 单抗还原（红色）和非还原（蓝色）状态下肽图对比，非还原肽图中多出来的峰即为含二硫键的肽段。

## 结果

为了确认抗体Fab区域二硫键的连接方式，还原和非还原状态下的酶切样品分别使用TripleTOF® 5600高分辨质谱进行分析，使用信息依赖型的采集模式，TripleTOF® 5600能全面的获得准确的一级和二级质谱信息，BioPharmaView™软件能自动处理高质量的数据，对含二硫键的肽段进行归属。

图1展示的是单抗还原和非还原两种状态下肽图的镜像对比，在非还原肽图中多出来的峰即为含二硫键的肽段。通过数据分析，最终确认了抗体Fab区域中5对二硫键，包括两对轻链链内的二硫键，C23-C88和C134-C194；两对重链链内的二硫键，C22-C96和C150-C206以及一对链间的二硫键C214-C226。图2-4展示的分别是轻链链内C134-C194，重链链内C22-C96以及轻链和重链链间C214-C226三对二硫键一级和二级质谱的鉴定结果。



图2. 轻链链内C134-C194二硫键的鉴定结果，第一栏展示的是对应肽段的一级提取离子色谱图，第二栏展示的是C134-C194二硫键通过软件确认的4个电荷态以及二级的得分，第三栏展示的是对应二硫键肽段的一级和二级质谱图。

图2-4中提取的离子色谱图即为对应的含二硫键的肽段，中间一栏展示的是保留时间、电荷态、理论和实际的质荷比以及二级谱图得分等相关信息。由于一级和二级质谱图的质量非常高，含二硫键肽段的多个电荷态均能被确认，进一步提高分析结果的准确度。



BiopharmaView™软件通过一级的质量精度和二级谱图的得分自动对肽段进行鉴定，二级谱图的打分是基于b,y离子，质量精度以及其它参数。用户可以方便的设置二硫键肽段得分的阈值，软件可以自动的鉴定得分在

阈值之上的含二硫键的肽段。图5和表1展示的是轻链和重链链间C214-C226二硫键二级碎片的信息，通过这些二级碎片可以确认二硫键的连接位点。

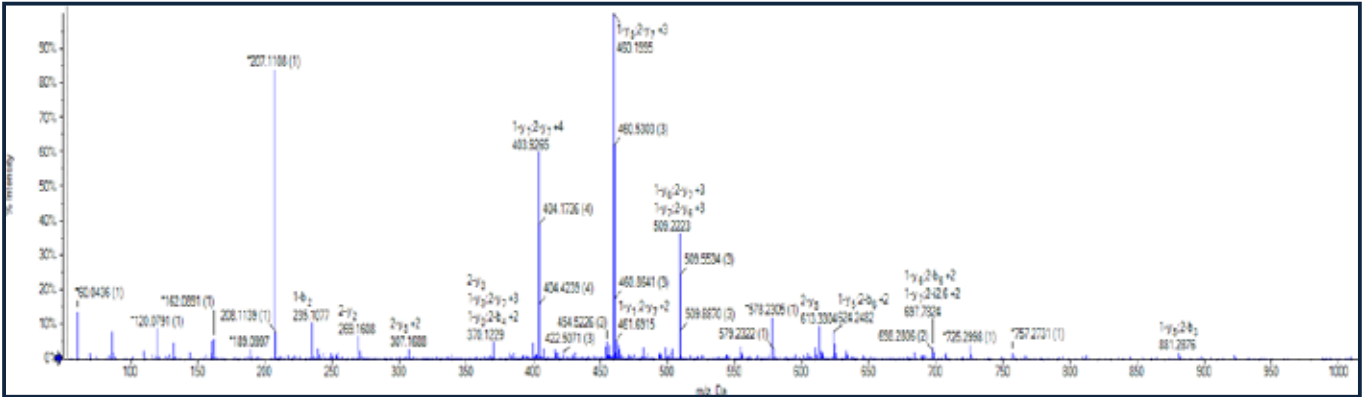


图5. 轻链和重链链间C214-C226二硫键二级碎片的归属，通过b,y离子能确认肽段的序列以及二硫键的连接位点。

表1. 轻链和重链链间C214-C226二硫键二级碎片的信息，BiopharmaView™软件能自动对二级碎片进行归属，确定二硫键的连接位点。

Fragment	Type	Mono. m/z	Error (Da)	Charge	Mono. Mass	Nomenclature	Fragment
RGEC[*1] / SC[*1]D	b,y	384.13	0.032	2	766.24	1-y4; 2-b3, +2	RGEC[*1] / SC[*1]D
C[*1] / C[*1]DKTHL	2y	418.18	-0.004	2	834.34	1-y1;2-y6, +2	C[*1] / C[*1]DKTHL
C[*1] / SC[*1]DKTHL	y	461.69	-0.004	2	921.37	1-y1;2-y7, +2	C[*1] / SC[*1]DKTHL
SFNRGEC[*1] / SC[*1]DKTHL	y	538.23	-0.003	3	1611.68	1-y7; 2-y7, +3	SFNRGEC[*1] / SC[*1]DKTHL
NRGEC[*1] / SC[*1]DKTH	b,y	624.25	-0.006	2	1246.48	1-y5; 2-b6, +2	NRGEC[*1] / SC[*1]DKTH
SFNRGEC[*1] / C[*1]DKT	b,y	629.25	-0.010	2	1256.49	1-y6; 2-b5, +2	SFNRGEC[*1] / C[*1]DKT
FNRGEC[*1] / SC[*1]DKT	b,y	629.25	-0.010	2	1256.49	1-y7; 2-i2,5, +2	FNRGEC[*1] / SC[*1]DKT
NRGEC[*1] / SC[*1]DKTHL	y	689.80	-0.004	2	1377.58	1-y5; 2-y7, +2	NRGEC[*1] / SC[*1]DKTHL
SFNRGEC[*1] / SC[*1]DKTH	b	741.30	-0.005	2	1480.58	1-y7;2-2-b6	SFNRGEC[*1] / SC[*1]DKTH
C[*1] / C[*1]DKTHL	2y	835.34	-0.006	1	834.34	1-y1;2-y6	C[*1] / C[*1]DKTHL
NRGEC[*1] / SC[*1]D	b,y	881.29	0.003	1	880.28	1-y5;2-b3	NRGEC[*1] / SC[*1]D
C[*1] / SC[*1]DKTHL	y	922.38	-0.005	1	921.37	1-y1;2-y7	C[*1] / SC[*1]DKTHL
SFNRGEC[*1] / SC[*1]	b	1000.36	0.001	1	999.35	1-y6;2-b2	SFNRGEC[*1] / SC[*1]
SFNRGEC[*1] / C[*1]D	b,y	1028.36	0.006	1	1027.35	1-y6;2-b3	SFNRGEC[*1] / C[*1]D
FNRGEC[*1] / SC[*1]D	b,y	1028.36	0.006	1	1027.35	1-y7;2-i2,3	FNRGEC[*1] / SC[*1]D
SFNRGEC[*1] / SC[*1]D	b	1115.39	0.004	1	1114.38	1-y7;2-b3	SFNRGEC[*1] / SC[*1]D
SFNRGEC[*1] / C[*1]DK	b,y	1156.45	-0.022	1	1155.44	1-y6;2-b4	SFNRGEC[*1] / C[*1]DK
FNRGEC[*1] / SC[*1]DK	b,y	1156.45	-0.022	1	1155.44	1-y7;2-i2,4	FNRGEC[*1] / SC[*1]DK

## 结论

BiopharmaView™软件能自动、快速的处理肽图的分析数据，确认抗体Fab区域内所有的含二硫键的肽段。在二硫键分析的过程中，首先将还原和非还原的肽图数据进行比对，锁定含二硫键的肽段，BiopharmaView™软件通过b,y离子，二级谱图得分，电荷态，保留时间，质量精度等指标对含二硫键的肽段进行确认。在整个二硫键的分析流程中，TripleTOF®高分辨质谱仪能获得全面的、精确的一级和二级质谱信息，配合全自动的搜索软件能极大的提升二硫键的分析速度。

## 致谢

SCIEX中国团队肖志良的翻译工作!



# 使用SCIEX X500B QTOF质谱系统对人源C1酯酶抑制剂 ( Human C1 esterase inhibitor ) 的O连接糖型表征分析

*Method Development for O glycan Detection in Human C1 esterase inhibitor using SCIEX X500B system*

罗继, 郭立海, 靳文海, 窦鹏

SCIEX, 中国

## 引言

众多重组治疗性蛋白中, 蛋白糖基化在蛋白稳定性、体内活性、溶解性、半衰期及免疫原性等方面起着至关重要的作用。糖基化信息的获得有利于帮助建立重组蛋白药物中结构-功能的关系。常见蛋白糖基化糖型分为N连接糖基化和O连接糖基化两种。其中N糖基化糖型分析具有成熟的分析方案, 通常采用单一内切酶 ( PNGF ) 将N糖基化糖型从蛋白上酶切释放并采用2AB等试剂标记, 从而进行LC-MS分析进行糖型表征并定量。而由于不存在单一酶能将O糖基化糖型进行酶切释放, O糖基化糖型的表征一直是业内难点。因此急需开发一种广谱、快速的方法对重组蛋白中所有O糖基化糖型进行表征分析。

人源C1酯酶抑制剂是一种包含478个氨基酸的糖蛋白, 在其蛋白N端包含数个可能的O糖基化位点。本文我们基于SCIEX X500B QTOF高分辨质谱系统开发了一种快速、综合的分析方法对重组蛋白人源C1酯酶抑制剂中的O糖基化糖型进行表征分析, 单针进样共鉴定到样本中四种不同的O-糖基化糖型。该方法省事、快速, 同时也适用于其他具有挑战性的蛋白O糖基化糖型分析。

## 材料和方法

人源C1酯酶抑制剂来自于商品化产品。BlotGlyco® O糖前处理试剂盒由日本住友电木株式会社友情提供。三乙胺、乙酸、乙酸酐、二甲基亚砷、水、甲醇、乙腈等试剂购自Sigma公司。

### 人源C1酯酶抑制剂中O糖基化糖型制备

#### A) 释放糖蛋白中的O-糖

1. 向含有O-糖释放试剂的反应管中加入糖蛋白溶液
2. 密封55 反应5小时
3. 60 真空离心过夜, 去除剩余反应试剂

#### B) O-糖纯化

离心浓缩处理后O-糖样品溶于20  $\mu$ L水

4. 向反应管中加入O-糖捕获磁珠 ( Beads )
5. 80 反应1小时以捕获O-糖
6. 冲洗磁珠并离心
7. 室温下加入封闭试剂反应半小时以封闭磁珠上多余的活性基团
8. 冲洗磁珠并离心
9. 在 70 反应1.5小时从磁珠上释放O-糖.

#### C) 普鲁卡因胺标记纯化后O-糖

10. 反应管中加入普鲁卡因胺标记试剂60 反应2小时并回收标记后的O-糖样品
11. 乙腈稀释后用纯化小柱纯化去除多余标记试剂
12. 30  $\mu$ L水洗脱, 回收纯化后样品以备后续分析

## 色谱条件

色谱柱: 2.1  $\times$  100 mm, 3  $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$  氨基柱

流动相A: 40% ACN in 0.1% Formic Acid

流动相B: 90% ACN in 0.1% Formic Acid

流速: 0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样量：6 µL

梯度：

Time	Module	Event	Parameter
1.00	Pumps	Pump B Conc.	98
48.00	Pumps	Pump B Conc.	8
52.00	Pumps	Pump B Conc.	8
52.50	Pumps	Pump B Conc.	98
62.00	System Controller	Stop	

### 质谱条件

质谱采用SCIEX X500B高分辨质谱系统，正离子模式数据采集。扫描方式为经典的数据依赖性扫描（IDA）。1次一级质谱扫描（250ms）触发5次二级质谱扫描（75ms）。动态背景扣除（DBS）功能开启。具体参数如下所示：

Mass rang(TOF MS)	200m/z-1500m/z
Mass rang(TOF MSMS)	100m/z-1500m/z
CUR	30psi
GS1	50psi
GS2	50psi
Temp	500°C
ISV	5500
DP	100
CE	20 ± 10

### 数据处理

数据采集及峰导出由SCIEX OS 1.2完成，导出后的峰列表数据再导入GlycoWorkbench 2软件进行O-糖型鉴定。最后利用高质量的MSMS图谱对鉴定到的O-糖糖型进行手动确认。

### 结果

通过将数据导入GlycoWorkbench 2软件，共鉴定到六种不同的O-糖糖型，其中包括两种peeling产物，剩下四种糖型为人源C1酯酶抑制剂中可能存在的糖型。六种O-糖糖型分别为GlaNAc、Hex、(Hex)1(NeuAc)1、(GlaNAc)1(Hex)1、(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)1、

(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)2。其中Hex及(Hex)1(NeuAc)1为Peeling产物，即该类物质为在样本前处理过程中由其他糖型产生中性丢失单糖而成的产物。

X500B质谱系统在获得复杂O-糖糖型一级 (MS) 质谱图的同时获得其对应的二级质谱 (MSMS) 谱图，可利用二级碎片离子对O-糖糖型结构做进一步手动确认。

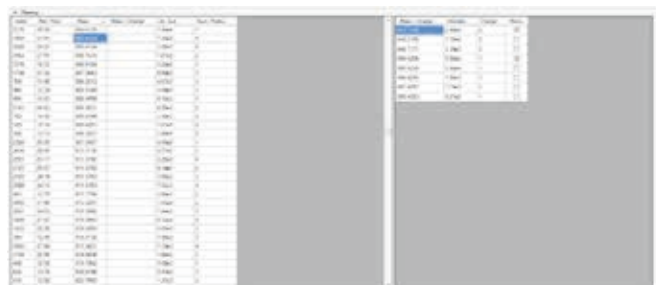


图1. 在SCIEX OS软件中对所测质谱峰进行去卷积并导出峰列表用于糖型检索。

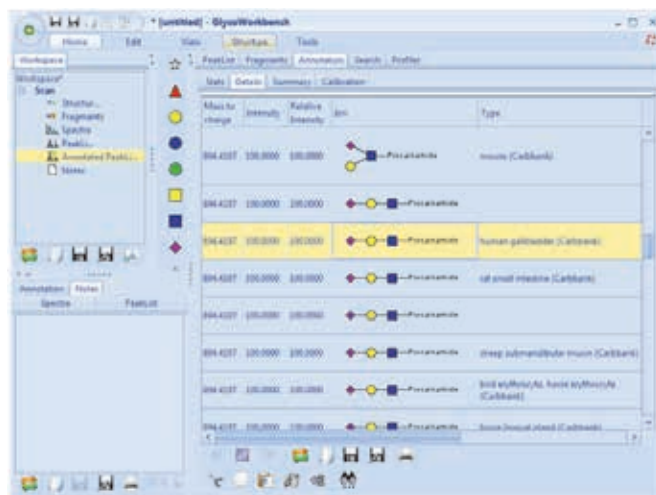


图2. Glycoworkbench2软件中利用一级精确分子量对糖型进行鉴定。

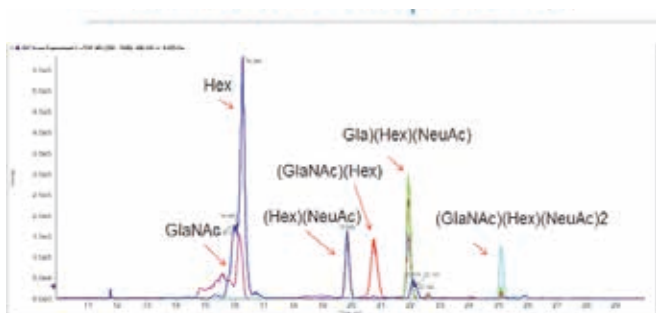


图3. 实验鉴定六种O-糖糖型一级质谱提取离子流量 (XIC) 图。

表1. 六种O-糖糖型一级检索结果 (GlycoWorkbench 2)。

保留时间	离子类型	理论m/z	实测m/z	糖型
16.172	[M+H] <sup>+</sup>	400.2447	400.2445	Hex
16.264	[M+H] <sup>+</sup>	441.2713	441.2711	GlaNAc
19.769	[M+H] <sup>+</sup>	691.3401	691.3394	(Hex)1(NeuAc)1
20.743	[M+H] <sup>+</sup>	603.3241	603.3233	(GlaNAc)1(Hex)1
21.931	[M+H] <sup>+</sup>	894.4195	894.4202	(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)1
25.102	[M+2H] <sup>2+</sup>	593.2603	593.2621	(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)2

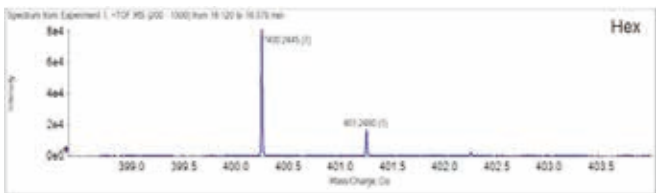


图4. O-糖糖型Hex对应一级谱图。

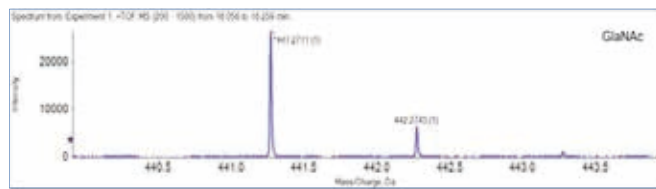


图5. O-糖糖型GlaNAc对应一级谱图。

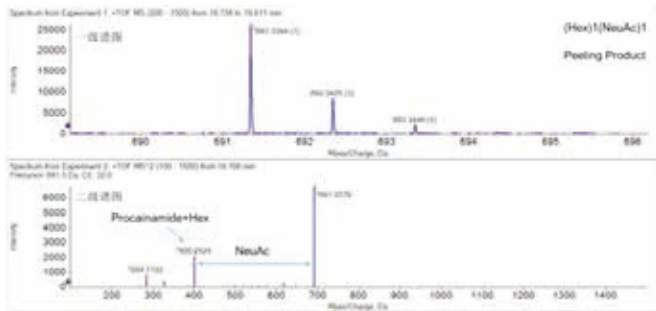


图6. O-糖糖型(Hex)1(NeuAc)1对应一级谱图及二级谱图。

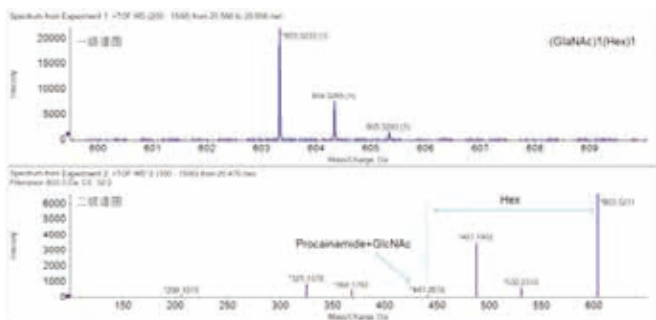


图7. O-糖糖型(GlaNAc)1(Hex)1对应一级谱图及二级谱图。

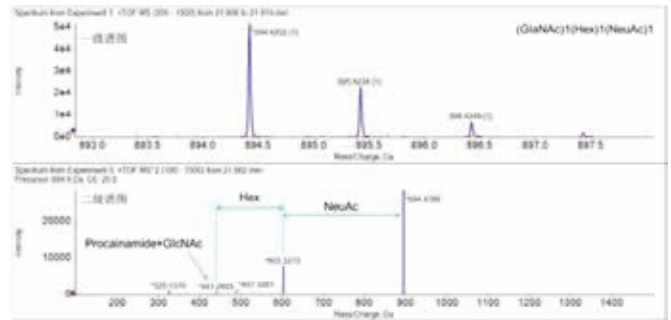


图8. O-糖糖型(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)1对应一级谱图及二级谱图。

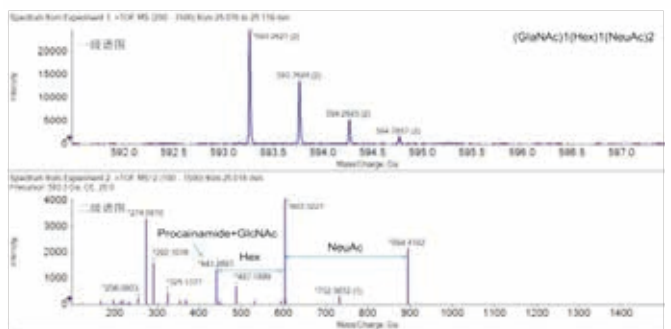


图9. O-糖糖型(GlaNAc)1(Hex)1(NeuAc)2对应一级谱图及二级谱图。

## 结论

生物药中O-糖糖型分析一直是业内难点。在对生物药表征过程中，如果未对样本中O-糖糖型进行鉴定，同时也会影响其他表征实验结果，如影响蛋白序列覆盖度等。本次实验采用一种快速、简便的O糖分析LCMS方法，在SCIEX X500B QTOF质谱上对入源C1酯酶抑制剂蛋白中的O糖糖型进行了准确的鉴定。该方法为O糖糖型定性分析提供了一种新的途径。

## 参考文献

1. BlotGlyco O-Glycan Manual Jul 2015 Rev A, Sumitomo Bakelite
2. N-and O-Glycosylation Analysis of Etabercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. Anal. Chem. 2014, 86, 576-584
3. Product Guide for LudgerTag™ PROC (procainamide) Glycan Labeling Kit containing 2-picoline borane

# 利用单一软件多属性方法（MAM）评估生物制药产品质量属性

BioPharmaView™ 3.0 软件在精简的MAM流程中的应用

Zoe Zhang<sup>2</sup>, Fan Zhang<sup>2</sup>, Sean McCarthy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX Framingham, MA (USA), <sup>2</sup> SCIEX Redwood City, CA (USA)

生物制药的开发和生产过程非常复杂，即使是微量杂质，或诸如糖基化及电荷异质性等属性的变化，也会对最终产品的安全性和功效产生重要的影响。传统方法通常需要多种分析技术来评估生物制药产品的所有属性，但其必然带来更多时间和资源的支出。

多属性方法学（MAM）是一种基于肽图分离与高分辨率质谱联用的正交方法，正迅速成为表征和监测生物制药属性的有力工具。利用此方法可对广泛的属性范围进行监测。MAM可用于评估，跟踪和提供肽段水平上多种特定生物产品质量属性的详细数据（图1）。除了跟踪制剂分子本身之外，MAM还可用于检测与生物制剂生产相关的已知杂质，以及样品中未知的、不存在相应标准的杂质（新峰）。

MAM工作流程成功实现的关键是可对工作流程所有方面进行管理的软件，包括：产品质量属性（PQA）定义，跟踪和量化；检测已知和未知杂质，以及产出报告。本文描述了SCIEX BioPharmaView™ 3.0软件在MAM工作流程管理中的应用。BioPharmaView™软件可以在一个项目中管理MAM工作流程的所有方面，消除了使多个软件包带来的不必要的复杂性。

## 主要特点

- 除传统的核心表征工作流程外，BioPharmaView™软件还为MAM工作流程提供单一软件解决方案，例如完整质量分析，亚基分析和肽谱分析
- 可在单个平台上创建简单方法
- 强大的产品表征，属性定义和跟踪及定量能力

生物制剂PQA评价	LC-MS MAM流程	SEC	CEX	CE-SDS	HILIC	ELISA
脱酰胺化	■	■	■	■	■	■
糖化	■	■	■	■	■	■
高甘露糖型	■	■	■	■	■	■
单肽段	■	■	■	■	■	■
糖基化	■	■	■	■	■	■
CDR色氨酸降解	■	■	■	■	■	■
C-端赖氨酸缺失	■	■	■	■	■	■
错误插入	■	■	■	■	■	■
C端酰胺化	■	■	■	■	■	■
岩藻糖基化	■	■	■	■	■	■
残余蛋白A	■	■	■	■	■	■
宿主细胞蛋白	■	■	■	■	■	■
聚集	■	■	■	■	■	■
半胱氨酸加合物评价	■	■	■	■	■	■

图1. 传统测定与精确质量LC-MS MAM测定对一组选定的生物治疗属性的比较。

- 根据特定用户需求，灵活地进行属性评估的自定义计算
- 可靠地检测和监测指定和未指定的杂质
- 诊断目标属性产出简明的审查和报告

## 方法创建

在BioPharmaView™软件中创建多属性分析非常简便。MAM分析从目标蛋白质序列的定义开始。如果目标蛋白具有多个链，则需如图2所示单独定义。添加已知的二硫键和可能存在的任何修饰，将其定位于序列内的特定氨基酸上。未包含在BioPharmaView™软件



中的修饰可在设置中轻松自定义添加，并应用于所有 BioPharmaView™ 项目中。

除了目标蛋白序列之外，也可输入任何已知的杂质序列可作为靶向肽或蛋白质序列。使用为目标蛋白定义的参数，在计算机模拟消化时可将杂质序列进行相同的处理。在整个工作流程中，杂质序列也会被搜索和呈现，以便于与目标蛋白区分。



图2. BioPharmaView™ 软件中蛋白质序列，二硫键和修饰的定义。

进一步完成分析信息 ( Assay information ) 需要设置一系列内置的半胱氨酸烷基化试剂和消化酶等消化参数，以及在数据中搜索时的最大修饰数目和漏切数目，如图3所示。

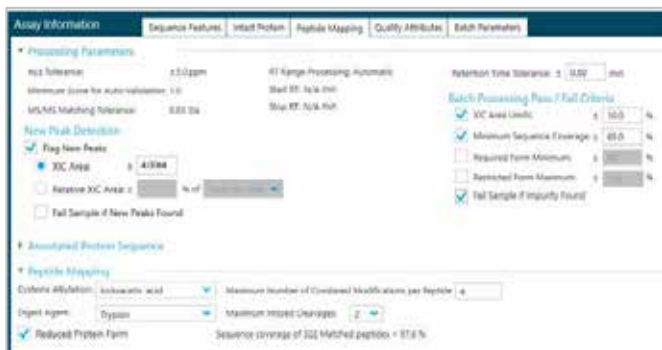


图3. 搜索参数的定义和批量分析中新峰检测标准的定义。

## 描述

使用以上所定义的分析信息，提交质谱产出的数据

进行处理，BioPharmaView™ 软件即可自动对样品进行表征。基于已定义的搜索参数，通过MS和MS/MS数据的关联进行肽段的匹配。处理完成后即可在单一界面轻松查看肽图结果。为了加快结果分析，可以使用各种可用的过滤条件轻松地对结果进行排序。

已定义的肽段修饰在肽图结果中可自动注释，并且在结果分析中可方便地进行筛选。在修饰无自动定位的情况下，可根据处理的数据中预填充评分结果来指导修饰位置的分配。修改完成后，定位信息将用于正在进行的研究中。表征完成后，更新的分析信息可用于批量分析。

## 属性定义

在BioPharmaView™ 软件中可以轻松定义目标属性，如图4所示。在表征中使用相同的过滤标准，可以在肽集中编译目标属性。每个属性都在其所在的肽集中捕获，该肽集包含与定义的过滤条件匹配的所有数据。属性肽集可被命名，并可在项目内和项目之间共享。共享肽集可减少定义分析所需的总时间，并可减少定义肽集时的变异性。

使用定义的肽集，可根据高度灵活的自定义计算引擎计算属性水平。自定义计算可使用户能够自行确定每个属性级别，如图4所示。定义每个属性后，计算值将添加分析中，展示在同一个表内。可定义或监测的属性数量没有实际限制，提供了同时监测大量属性的灵活性。

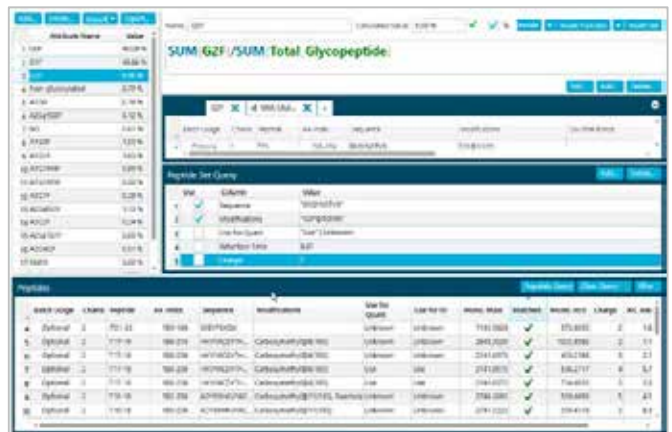


图4. BioPharmaView™ 软件中质量属性和自定义计算的定义。



对于分析中定义每个属性，接受标准同样也被定义了。每个计算出的属性响应的可接受值范围都是独立定义的。此范围可基于与定义值的百分比偏差来设置，或者根据需要设置为大于/小于特定值，定义的范围用于确定其相应属性的总体处于通过/未通过状态。

## 属性量化

在BioPharmaView™软件中提交批量处理，可跟踪提交的一组样品中所定义的属性。批量处理可以对TOF-MS数据或SWATH®采集数据进行分析。通过为每个样品中所有可检测的组分生成MS和MS/MS数据，SWATH®采集模式可提供更多细节。SWATH®采集模式提供的更多的二级数据，可以对检测到的新组分进行识别，而无需重新分析。

处理一批包括两个或更多数据文件可以对同批处理的样品进行比较。对于分析中的每个选定属性，将在“Attribute”选项卡中显示简明摘要。此选项卡概述了每个样本中计算出的属性水平，通过/失败标识以及属性是否通过的范围（图5）。

每个属性可以被单独选择以查看每次计算中应用的基础数据。在肽段结果中选择鉴定的肽段可显示相关的MS和MS/MS（如果采集到）的视图。匹配到但没有包括在属性方法中的肽段数据显示在“Matched”选项卡中。通过此功能可单独对多个样品或对两个甚至更多个样品之间的比较进行分析研究。



图5. 在BioPharmaView™软件中查看批量分析结果。已定义属性的结果展示在页面中，包括通过/失败标识以及接受范围。可以在同一窗口中轻松访问质谱数据。

## 监测已知杂质

若在分析中进行了定义，已知的杂质结果将会呈现在肽图结果的“Impurities”选项卡中（图6），与定义的目标蛋白是分开的。每种杂质都清楚地用不同的命名法表示，并指出哪些肽段被鉴定了出来。



图6. 检测定义的杂质。杂质信息显示在单独的选项卡中，并清楚地标记为杂质。

## 新峰检测

如果在分析中选择了此功能，BioPharmaView™软件即可在批量分析时进行新峰（未知杂质）检测。新峰检测是通过将每个样品与对照进行比较进行的。重要的是，对照和样品应在同一研究中进行制备和分析，以解释样品制备中的变异性。新峰检测应根据当前表征工作的指导来定义检测阈值，阈值可以根据绝对或相对信号强度来定义（图3）。如果检测到新峰，即使所有其他属性参数都通过，样本也可能会自动认定为失败。

在批量处理分析中执行新峰检测时，必须将其中的一个数据文件定义为对照，对照样品用作其他样品进行比较时的基准。通常对照样品是先前已经被表征并且充分了解样品。

新峰检测的结果在批量处理结果中进行了简明摘要显示。如图7所示，结果中列出了每个样品的肽段总数，以及检测到的杂质，还提供了检测到的新峰数量。

如果需要进一步研究新峰，则可以方便地过滤肽段结果，仅显示标记为新检测到的组分。有关新峰的详细信息，可以选中每个峰，并查看其相应的MS和MS/MS谱图。如果是在之前的表征工作中已检测到的新峰，或者不是特定关注的峰，则可轻松地改变其标注。更改新

峰的状态需要提供更改的理由，该理由也被作为分析的一部分。检测到新峰也会导致样品自动失败，显示为红点，如图7所示。

The screenshot shows two windows from the BioPharmaView software. The top window, titled 'Peptide Mapping Batch Results', has a sub-tab 'New Peak Detection' and displays a table with columns: View, #, Type, Filename, S#..., E..., # Unique Peptides, # Impurities, # Newly Detected, % Sequence Coverage, and Pass/Marginal/Fail. The bottom window, titled 'Peptide Results', has a sub-tab 'Impurities' and displays a table with columns: Filename, #, Change, Observed Mono m/z, RT, XIC Area, Newly Detected, and Details. The 'Newly Detected' column in this table contains red dots, indicating new peaks.

图7. BioPharmaView™软件中新峰检测的结果。可轻松显示新峰的数量以及其质谱数据。

## 报告

批量分析的结果可汇总成简明的报告，其中包括分析信息，处理参数以及分析中定义的属性汇总表。报告模板是软件中的标准模板。在报告中，每个属性都被标记为通过或失败，还展示了检测到的杂质和新峰的数量。对于每个样本，也提供了整体通过/未通过的标识以加快审查。

## 结论

BioPharmaView™软件提供了单一软件包，用于实现自动化的、完整的MAM工作流程，包括：表征，属性定义，自定义计算，已知杂质检测，未知杂质（新峰）检测和报告。利用此单软件解决方案完成整个MAM工作流程，很大程度上减少了工作量，并消除了使用多个软件解决方案时潜在的转换错误。总而言之，BioPharmaView™软件为MAM分析的开发和执行提供了卓越的解决方案。

## 致谢

SCIEX中国团队赵颖华的翻译工作！

# 使用 BioPharmaView™ 软件 3.0 检测和定义多质量属性

表征分析和质量属性鉴别

Zoe Zhang、Fan Zhang、Sean McCarthy

SCIEX, USA

## 前言

在生物制药开发过程中，全面表征产品特性至关重要。在表征分析中，质谱可以提供有关生物治疗产品独一无二的深入见解，这是使用其他正交分析技术难以实现的。近年来，有人提出了多属性方法（MAM）的概念，这种方法可进行正交分析，在某些情况下甚至可以取代传统方法，极大地拓展了质谱在评估潜在的产品质量属性方面的应用（图 1）<sup>1</sup>。质谱方法的优势在于专属性强，能够直接用于监测各项属性。简而言之，MAM就是通过一系列步骤表征产品特性、定义产品质量属性及其可接受范围、追踪已知杂质，以及使用创新的峰检测方法进行纯度评估。

在本文中，我们使用 BioPharmaView™ 软件 3.0 表征了一种生物治疗产品。文中主要展示了为定义需要追踪的关键质量属性而进行的表征分析。有关此工作流程中其他步骤的讨论，请参阅本系列的其他技术概要。



## BioPharmaView™ 软件 3.0 的主要功能

- 专为 MAM 工作流程打造的一体化软件解决方案
- 能够便捷地进行分子表征，适合用于 MAM 分析
- 轻松定义质量属性和自定义计算，便于追踪
- 使用附加的软件在同一工作流程中定义和追踪已知蛋白质和肽类的杂质
- 采用全新的峰检测功能评估产品纯度
- 精简的报告流程，轻松报告定义的属性

## 方法

**样品制备：**NIST 单克隆抗体（mAb）标准品（#RM8671）购自 NIST 公司。取 10 μL 试样，在室温下用 10 mM DTT 进行变性和还原，反应时间为 30 分钟。接着用 20 mM 碘乙酸在室温、避光条件下对样品进行烷基化，反应时间为 20 分钟。脱盐后，用胰蛋白酶（Roche，测序级）在 37 °C 下酶解 30 分钟，之后用三氟乙酸淬灭，直接用于分析。

**色谱方法：**使用配备 Agilent ZORBAX 300 SB-C18，2.1 × 150 mm，1.8 μm 色谱柱的 ExionLC™ 系统进行色谱分离，柱温 50°C，梯度程序如表 1 所示。流动相 A 为 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 为 0.1% 甲酸的乙腈溶液。

生物 PQA 评估	LC-MS MAM 工作流程	SEC	CEX	CE-SDS	HILIC	ELISA
脱酰胺作用	绿色	红色	绿色	红色	红色	红色
糖化	绿色	红色	红色	绿色	红色	红色
高甘露糖	绿色	红色	红色	红色	绿色	红色
甲硫氨酸氧化	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
信号肽	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
糖基化	绿色	红色	绿色	黄色	绿色	红色
CDR 色氨酸降解	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
C 端赖氨酸	绿色	红色	绿色	红色	红色	红色
错误掺入	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
C 端酰胺化	绿色	红色	绿色	红色	红色	红色
岩藻糖基化	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
残留蛋白 A	绿色	红色	红色	红色	红色	红色
宿主细胞蛋白	绿色	红色	红色	红色	红色	绿色
聚集体	红色	绿色	绿色	绿色	红色	红色
半胱氨酸加合物评估	黄色	红色	黄色	红色	红色	红色

图 1. 可使用 MAM 方法进行评估的属性。

**质谱方法：**使用 TripleTOF® 6600 和 X500B 平台进行质谱分析。两个平台的仪器条件请参阅各平台的应用纪要。

**数据处理：**所有数据处理均使用 BioPharmaView™ 软件 3.0 进行。

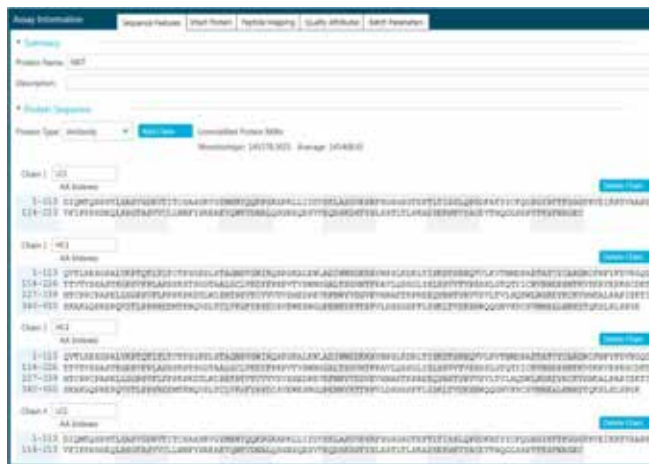


图 2. 定义蛋白质序列。用户可以单独输入蛋白质的每条链，并且可以便捷地添加链。杂质序列以相同的方式输入，但会作为杂质进行谨慎筛查。

表 1. LC 梯度。

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
初始	0.3	99	1
5.0	0.3	99	1
6.0	0.3	90	10
50.0	0.3	65	35
55.0	0.3	40	60
56.0	0.3	10	90
60.0	0.3	10	90
62.0	0.3	99	1
64.0	0.3	99	1
66.0	0.3	10	90
70.0	0.3	10	90
72.0	0.3	99	1
74.0	0.3	99	1
76.0	0.3	10	90
80.0	0.3	10	90
82.0	0.3	99	1
95.0	0.3	99	1

## 检测定义

生物治疗产品的表征需要进行全面分析，这通常涉及各种不同的实验，旨在掌握分子异质性和鉴别关键质量属性 (CQA)。使用 BioPharmaView™ 3.0 软件进行表征分析时，我们可以利用详尽的产品表征数据针对目标属性开发常规肽图分析方法，并将其整合到正在进行的表征研究中。

开发测定方法时，首先定义治疗产品的序列。如果分子内存在多条链，则单独定义每条链，以提升检测不同分子结构的灵活性。如图 2 所示，蛋白质名称以及每条链的名称可以单独定义，并单独输入每条链的序列。如果需要添加链，可将它们添加到测定信息中，提升检测定义的灵活性。

使用多种预设修饰来定义每种蛋白质的修饰，包括 C 端和 N 端修饰以及一系列内部修饰。每种修饰都可以根据需要应用于某种类型的氨基酸或每条肽链内的特定残基，例如糖基化 (图 3)。

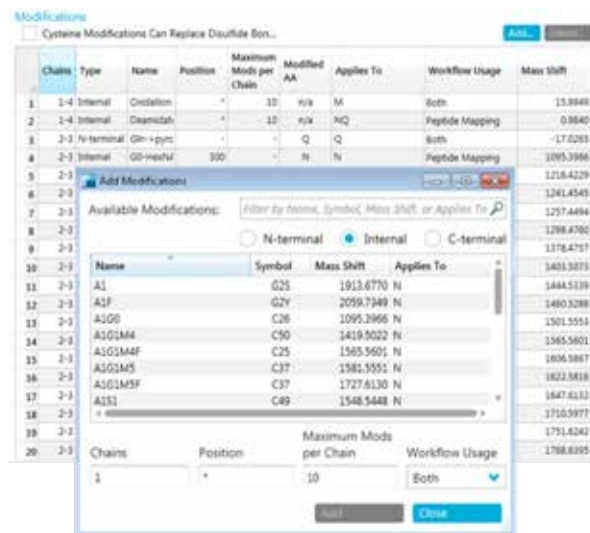


图 3. 定义修饰并将修饰应用于工作流程。用户可以便捷地搜索修饰，从而加快检测定义。

如果所需的特定修饰未在 BioPharmaView™ 软件中预先定义，用户可以便捷地添加修饰。每个新添加的修饰都可以命名，还可以定义它适用的特定残基，如图 4 所示。输入元素组成后，软件会自动计算分子量。用户



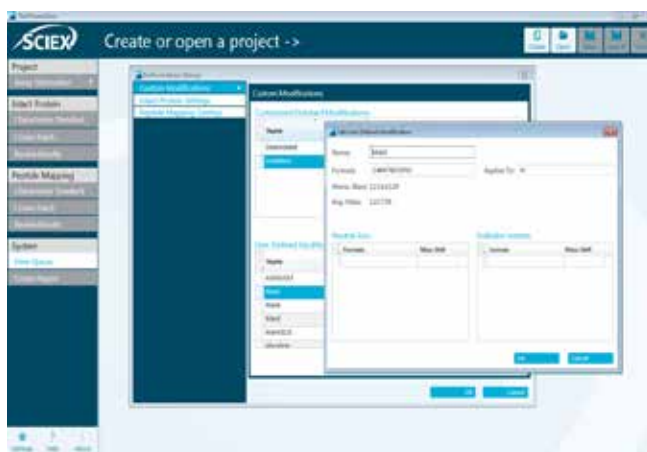


图 4. 在 BioPharmaView 软件中定义自定义修饰。定义的修饰可用于所有项目。

定义的所有修饰都可以在 BioPharmaView™ 软件的各项中使用，减少了进行研究时定义修饰的工作量。

定义的序列和相关修饰将用于模拟酶解。我们使用一系列预设的还原/烷基化条件和蛋白水解酶生成了组分数据库，供处理数据时进行检索。

在表征分析中，用户可以便捷地提交信息依赖型分析 (IDA) 和 SWATH® 采集数据集进行处理。BioPharmaView™ 软件 3.0 会自动整合提交的数据集，根据分析中定义的参数将质谱数据与预期的肽匹配。根

据用户定义的质量准确度要求和实测 MS/MS 数据与理论碎片谱图的总体匹配度，软件对肽匹配结果进行评分。除了鉴定肽之外，软件还会自动定位修饰并计算其相对丰度。

在某些情况下，修饰的位置需要通过人工审查确保分配结果的准确性。在这些情况下，修饰会标注星号。利用 BioPharmaView™ 软件强大的筛选功能，用户可以便捷地筛选肽分析结果，从而根据各种标准有针对性地分析具体特征。如图 5 所示，使用修饰筛选器，我们可以轻易地筛选出脱酰胺物质。筛选之后，未自动定位的修饰可通过选择结果表中的修饰进行手动定位。软件会向用户展示列有潜在修饰位点的列表。每个潜在修饰位点都会标注评分，用于指导定位。定位修饰位点之后，该位点将被保存起来，以备将来检测之用。

总体肽图结果展示在综合表格中，其中包括匹配和不匹配的数据，并附有基于每个蛋白质链的匹配 MS 数据和 MS/MS 数据生成的序列覆盖图，可方便查阅。软件可以根据用户通过交互式界面输入的值调整匹配参数，这个交互式界面会展示匹配参数对错误发现率 (FDR) 的影响。

完成表征分析和审查之后，用户可保存检测方法并将其用于正在进行的研究，例如下游 MAM 工作流程的属性定义。

Batch Usage	Aut. Valid	Score	Charge	KIC Area	User Defined	Sequence	Modifications
28	Optional	0.946	4	3.6441e3		VDNALQSGNSQESVTEQSSDST...	Deamidated@*
29	Optional	5.000	2	4.7331e3		DIQMTQSPSTLSASVGDR	Deamidated@*
30	Optional	6.150	2	5.5555e3		DIQMTQSPSTLSASVGDR	Deamidated@*
31	Optional	0.000	3	6.4117e5		SGTASVWCLLNIPYPR	Carboxymethyl@193, Deamidated@*
32	Optional	7.592	3	6.7041e3		VDNALQSGNSQESVTEQSSK	Deamidated@*
33	Optional	2.881	2	7.2658e3		SGTASVWCLLNIPYPR	Carboxymethyl@193, Deamidated@*
34	Optional	3.414	3	8.0780e1		DIQMTQSPSTLSASVGDR	Deamidated@*
35	Optional	0.522	4	6.6171e3		WQQGNVFSCVMEALAHNHYTQK	Carboxymethyl@9428, Deamidated@*
36	Optional	0.003	5	8.7246e3		YNPREEQYNSTYRVVSVTVMHQS...	GFPS@9300, Deamidated@*
37	Optional	0.457	5	8.6525e3		DYRPPVTVSWNGALTSQVHFFP...	Carboxymethyl@53203, Deamidated@*
38	Optional	5.606	5	6.9215e3		WQQGNVFSCVMEALAHNHYTQK	Carboxymethyl@9428, Deamidated@*
39	Optional	0.067	2	9.3317e3		NQVSRICLVK	Deamidated@1304, Deamidated@*
40	Optional	0.000	5	1.0946e4		IVLVHQTQVNLN...	A757@5300, Deamidated@*
41	Optional	5.078	3	1.1598e4		QESVTEQDEK	Deamidated@*
42	Optional	2.132	4	1.1847e4		YVMEALHFNHYTQK	Carboxymethyl@9428, Deamidated@*
43	Optional	0.291	3	1.3815e4		SSPVYK	Carboxymethyl@4193, Deamidated@*
44	Optional	7.902	2	2.5057e4			Carboxymethyl@7970, Deamidated@*
45	Optional	12.084	3	5.1665e4			

图 5. 根据一系列标准筛选实验结果 (此处根据修饰进行筛选)。此外，可手动定位未自动定位的修饰。软件会显示特定修饰的每个潜在位置的评分，并可与支持数据相关联。



## 结论

- 使用 BioPharmaView™ 软件可以灵活、便捷地表征生物治疗产品
- 修饰定义非常灵活，可应对新出现的分析挑战
- 使用强大的筛选功能查看肽图，专注于手边的科学问题
- 使用内置评分功能对修饰位置进行评分，用以指导定位
- 可便捷地查看 MS 和 MS/MS 数据的蛋白质整体序列覆盖率
- 可便捷地构建 MAM 分析方法，有望实现高通量分析

## 参考文献

1. Richard S Rogers, Nancy S Nightlinger, Brittney Livingston, Phil Campbell, Robert Bailey & Alain Balland(2015) Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics, mAbs, 7:5, 881-890, DOI: 10.1080/19420862.2015.1069454

# 基于X500B QTOF系统对多个供应商的曲妥珠单抗进行亚基分析

## Trastuzumab Subunit Analysis using Benchtop X500B QTOF Mass Spectrometer

Sibylle Heidelberger<sup>1</sup> and Sean McCarthy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 71 Four Valley Dr. Concord, ON L4K 4V8, Canada

<sup>2</sup> 500 Old Connecticut Path, Framingham, MA, 01701, USA

### 引言

生物类似药的常规特性或者不同厂家之间生物样品的批量比较对于保证整个开发和生产过程中生物治疗药物的质量至关重要。生物制剂的大分子量和固有的异质性使得这些药物高度复杂，要求可靠的质量分析技术以确保蛋白骨架构成和翻译后修饰检测时的准确性。质谱分析是一种强大而灵活的生物治疗表征工具，高质量准确度使它具有分析大分子和小分子的能力。

在此我们展示了在X500B QTOF系统上，结合使用BioPharmaView™软件的简化和快速批处理以及产品比较的功能，使用一种快速、可重复和可靠的方法进行生物药亚基分析。

### 材料与方法

生物类似药曲妥珠单抗制剂来自于两个不同厂家（标记为TRAST-1和TRAST-2），使用50 mM TCEP (0.1% v/v) 在 65 °C 处理 30分钟进行还原反应。

1 mg/mL曲妥珠单抗，在pH7.5, 37 °C 条件下用IdeS蛋白酶（IdeZ, Promega, Madison, WI, USA）孵育30分钟。样品中加入50 mM TCEP (0.1% v/v)，在 65 °C 处理 30分钟进行还原反应。

所有样品在分析之前都使用0.2%的甲酸溶液进行稀释。

#### 高效液相色谱

使用 ExionLC™液相，上样量为0.5 µg蛋白，连接Waters Acquity UPLC® Protein BEH C4 色谱柱（300Å 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm）进行分离，柱温 40 °C。流动相为（A：水+0.1%甲酸，B：乙腈+0.1%甲酸），20分钟梯

度（15-40% B），总时间30分钟，流速为0.2 mL/min。使用切换阀将每针进样时前0.5分钟的液体排入废液中。

#### 质谱

在配备了 Turbo V™离子源的X500B QTOF系统上进行数据采集，采用large protein 模式并降低检测器电压，扫描范围设置为600-4000 m/z。离子源参数如下：

气帘气 Curtain gas:	35
雾化气 Ion source gas 1 (psi):	50
辅助气 Ion source gas 2 (psi):	50
源温度 Temperature (° C):	400
去簇电压 Declustering Potential:	150
Bins to sum:	60

#### 数据处理

数据在BioPharmaView™软件中进行处理并使用曲妥珠单抗标准品作为参照。

### 结果与讨论

曲妥珠单抗是一种重组的免疫球蛋白G1（IgG1）单克隆抗体，用来治疗Her2阳性的乳腺癌。在本次实验中，对来自两个不同厂家的曲妥珠单抗进行了比较和表征分析。采用了两种样品制备方法来进行亚基分析：还原法和IdeS酶解/还原法。

#### 还原的曲妥珠单抗

还原的抗体生物治疗药物的LC-MS/MS原始数据解析起来非常复杂。亚基分析采用部分还原的方法，通过还原链间的二硫键产生一条重链和一条轻链，从而降低复杂程度。TRAST-1和TRAST-2的轻链的LC-MS/MS数据显示

了预期的多个电荷状态（图1A）。样品之间去卷积之后算出的轻链的质量是一致的（图1B），证实了轻链是彼此一致的。

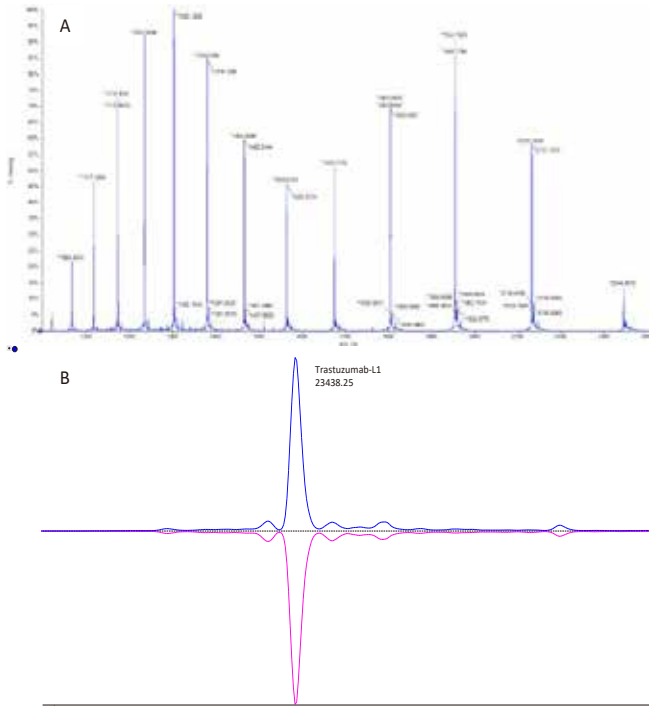


图1. 在高准确性的数据采集的同时实现多个生物治疗样品的快速比较。原始数据（1A）和样品TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）的曲妥珠单抗轻链去卷积后的镜像图，显示了蛋白的相对分子量。

重链分析可以用来评估两个样品之间的可比性。重链的原始质谱图如图2所示。总体上看每个样品的质荷比分布很相似，但是相对强度不同。

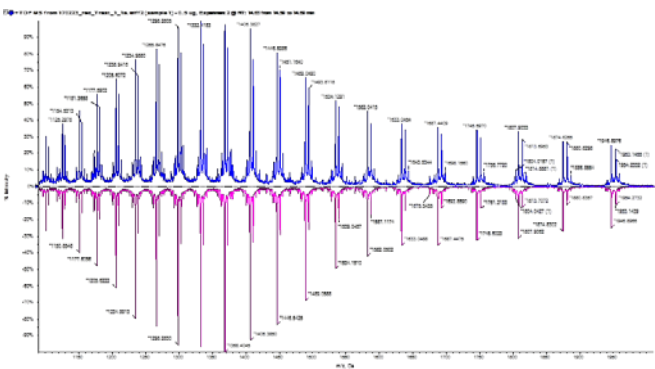


图2. 样品TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）原始谱图带电状态的比较表明两者之间在蛋白的糖型上有所不同。

两个样品之间检测到的差异从原始谱图上很容易看到（图2），当m/z坐标轴放大以后更容易观察到，聚焦于某些带电状态（图3）

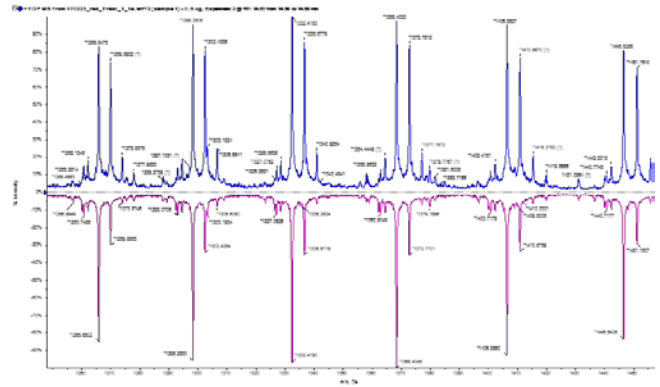


图3. 样品TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）原始谱图m/z轴放大后的视图，表明糖型的分布有变化。

使用BioPharmaView™软件可以实现对原始质谱图进行去卷积从而获得重链的相对分子量，软件还可以对每个样品设定翻译后修饰。高分辨率高质量准确度的X500B QTOF系统提供了高质量可重复的质谱数据，可以实现两个样品之间的精确比较（图4）。

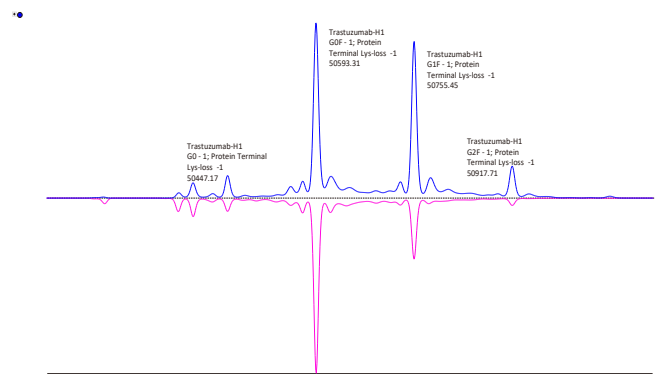


图4. 样品TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）重链去卷积后的结果显示了显示了在糖型上的不同。

糖型的相对强度在两个样品之间显示出明显的差异。一些像G0F和G1F这样的糖型非常明显（图4），通过肉眼就可以看到。其他的糖型比如M5从去卷积的谱图上就很难看到。通过BioPharmaView™软件的批量数据处理可以产生易于查看的图形，以便快速精准地确定两个样本之间准确的糖型变化（图5）。

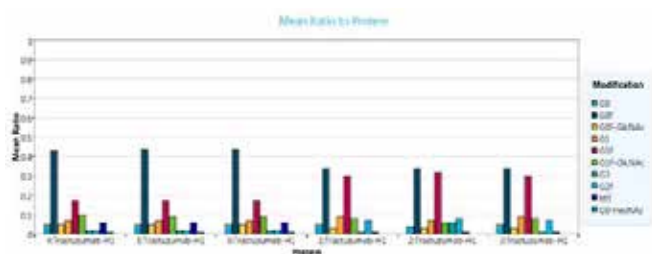


图5. 糖型丰度的图示可以实现两个曲妥珠单抗批次之间重链差异的快速鉴定。TRAST-1（右1:Trastuzumab-3:Trastuzumab）和TRAST-2（左4:Trastuzumab – 6:Trastuzumab）修饰的相对丰度是可视化的。所有的翻译后修饰的变化都在图形中展现，并且将鼠标悬停在修饰上可以很容易得到平均的比值。

这一数据证实了两个样品之间G0F 和 G1F相对丰度的变化，并表明在两个样品的亚基水平上都可以检测到M5糖型。另外，还可以观察到更多的糖型在丰度上微小的变化，比如G0F HexNAc, G0F-GlcNAc, G1F –GlcNAc, 和G2F.

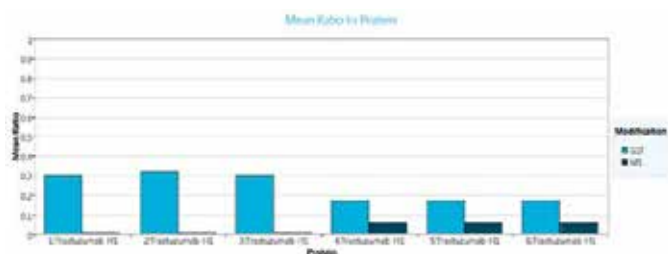


图5. 从BioPharmaView™软件的图示中可以实现样品之间M5和G1F糖型变化的快速鉴定。

基于样品中已知的存在的糖型，软件可以自动的计算出修饰的相对比例，并确保平均比值的准确性不会受到生物制剂蛋白进样量的影响。在这一实验中，M5糖型在TRAST-1样品的批次中几乎没有检测到(1:Trastuzumab-H1 – 3:Trastuzumab-H1)，然而在TRAST-2样品的批次可以检测到(4:Trastuzuma-H1 – 6:Trastuzumab-H1).

### IdeS酶解和还原后的曲妥珠单抗

进一步的亚基分析通过IdeS蛋白酶来实现，这种酶可以特异性的切割mAb铰链区的保守序列CPAPELLG / GPSVF。产生的蛋白亚基经过还原剂处理产生3种片段；轻链（图6），Fab链（图7）和Fc链（图8），进行LC-MS/MS分析。

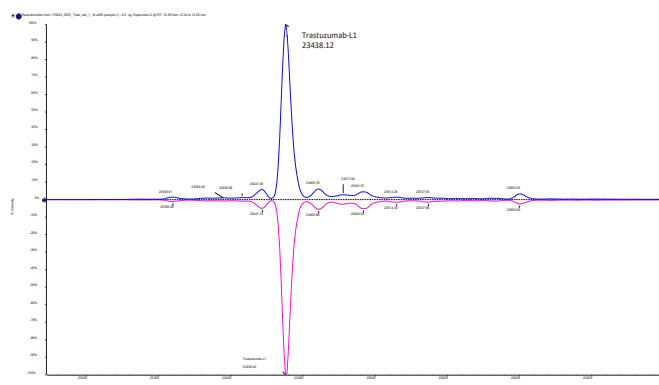


图6. 经过IdeS酶解和还原处理后，去卷积得到的轻链谱图。TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）轻链的质量一致。

如镜像图所示（图6），两者的轻链质量一致。TRAST-1和TRAST-2的Fab片段（图7）也保持一致。

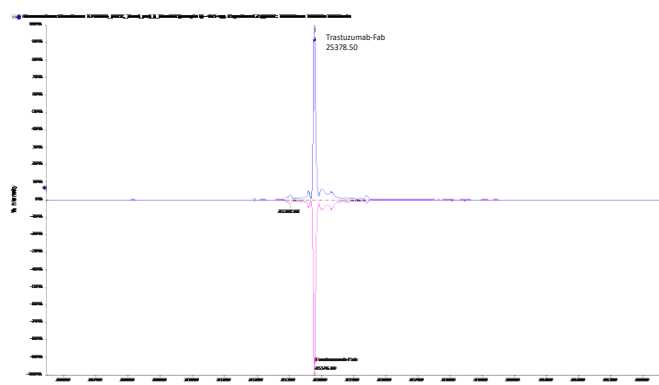


图7. TRAST-1（蓝色）和TRAST-2（粉色）的Fab片段，经过IdeS酶解和还原处理后，去卷积得到的谱图。两个Fab片段之间有很好的相关性。

其它的低丰度片段也出现在Fab链的去卷积结果中，在两个样品之间的相关性很好，并且如图8所示，它们是Fc链的组成部分。

Fc片段最受关注，因为它包含曲妥珠单抗的可变糖基化区域。主要的糖型如G1F和G2F有差异，次要的糖型的强度也有一些微小的差异。然而，总的来说，相对而言，大多数糖型都存在，这两种样品糖型的质量分布一致但又有所不同。其中一个主要差异是TRAST-1中几乎无法检测到M5的信号，在还原处理的样品和IdeS酶解并还原处理的样品中都是这样。计算了两组实验中M5和G1F之间的相对比值并进行了总结。

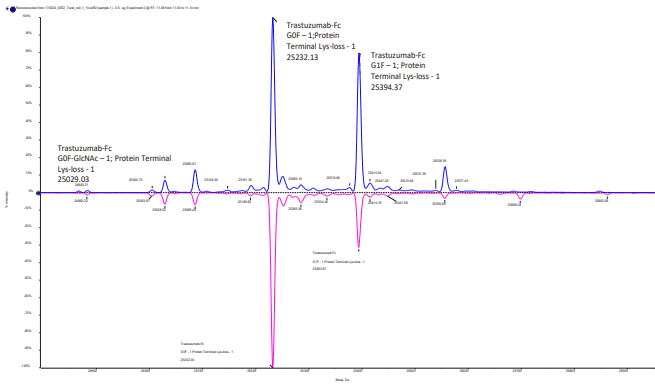


图8. TRAST-1 (蓝色)和TRAST-2 (粉色)的Fc片段,去卷积得到的谱图,糖基化修饰的强度不同。

表1. 还原处理的样品和IdeS酶解并还原处理的样品中都是这样M5和G1F糖型之间的相对比值。

Sample	M5 Reduced	G1F Reduced	M5/G1F Reduced	M5 IdeS	G1F IdeS	M5/G1F IdeS
TRAST-1-1	0.01	0.30	0.033	0.01	0.28	0.036
TRAST-1-2	0.01	0.32	0.031	0.01	0.27	0.037
TRAST-1-3	0.01	0.3	0.033	0.01	0.28	0.036
MEAN	0.01	0.31	0.032	0.01	0.28	0.037
TRAST-2-1	0.06	0.17	0.35	0.06	0.22	0.27
TRAST-2-2	0.06	0.17	0.35	0.06	0.22	0.27
TRAST-2-3	0.06	0.17	0.35	0.06	0.21	0.28
MEAN	0.06	0.17	0.35	0.06	0.22	0.27

将平均比值自动提取到表格中可以快速确认两个样本之间的糖型表达变化。两种样品处理方法都显示出一一致的糖型比例,包括TRAST-1中低丰度的M5糖型,并且两种方法中M5与G1F的相对比例的计算得到了一致的结果。使用样品的相对面积比,M5与G1F的相对比例的计算结果在两种分析方法中是一致的。

## 结论

基于X500B QTOF系统采集到的高质量mAb亚基数据,以及BioPharmaView™软件的快速数据处理,可以准确有效地识别两批曲妥珠单抗翻译后修饰的相对变化。样品经过还原处理后得到的结果与IdeS蛋白酶酶解并还原处理后获得的数据一致,表明样品制备方法之间没有偏差。作为一种样品制备步骤,简单的样品还原方法效率很高,但是IdeS酶解并还原处理可以为定位和鉴定翻译后修饰提供额外的特异性,因为亚基的分子量较小。X500B QTOF系统的质量准确度、分辨率和可靠性,对于提供高质量的数据以识别和确认两组曲妥珠单抗样品之间糖蛋白形式的复杂变化是必不可少的。

## 致谢

SCIEX中国团队吕小磊的翻译工作!



# 生物药相似性评估的常规工作流程

使用台式X500B QTOF质谱仪进行曲妥珠完整单抗分析

Sibylle Heidelberger<sup>1</sup> and Sean McCarthy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 71 Four Valley Dr. Concord, ON L4K 4V8, Canada

<sup>2</sup> 500 Old Connecticut Path, Framingham, MA, 01701, USA

## 引言

生物药的研发过程是十分复杂的，在产品开发的过程中，需要大量的表征工作来确保药物的安全性和有效性。虽然有许多评估相似性的方法，但使用LC-MS进行完整蛋白分析可提供产品的异质性和杂质方面的相关信息。这种快速分析的能力使LC-MS检测成为开展其他研究之前的关键分析步骤。

在这里，我们展示了一种使用X500B QTOF系统高可重现性和耐用的分析生物药完整蛋白的方法，并使用BiopharmaView™软件进行简单快速的批处理分析。

## 实验条件和方法

生物类似药曲妥珠单抗由两处不同的制造商获得（标记，trast-1和trast-2）。样品使用0.2%甲酸稀释，或使用PNGase F（新英格兰生物实验室（伊普斯维奇，马萨诸塞州，美国））按标准流程去糖基化。

### 色谱条件

液相色谱系统为ExionLC™，蛋白质进样量为0.5 µg，使用Protein BEH C4柱、300A 1.7 µm、2.1 mm × 50 mm柱在80 °C条件下分离。使用标准流动相（流动相A：水中0.1%甲酸，流动相B：乙腈中0.1%甲酸），色谱流速0.2-0.5 mL/min，总运行时间为5分钟。每次进样后前0.5 min切换至废液。

### 质谱条件

使用配备了Turbo V™ 离子源的X500B QTOF进行数据采集，large protein模式，扫描范围900-4000 m/z。

电喷雾参数如下：

Curtain gas:	35
Ion source gas 1 (psi):	50
Ion source gas 2 (psi):	50
Temperature ( °C):	400

### 数据处理

使用BioPharmaView™进行数据处理，采用曲妥珠单抗标准样品作为参照。

## 结果和讨论

### 糖基化曲妥珠单抗

在这项研究中，我们使用了两种不同批次的曲妥珠单抗。我们从一个快速和简单的色谱方法开始，提供脱盐样品用于MS分析。使用X500B上的分流阀将色谱分离的初始部分排废液，脱盐后，切换阀门将样品注入MS源。如图1所示，色谱分离具有很高的重现性。

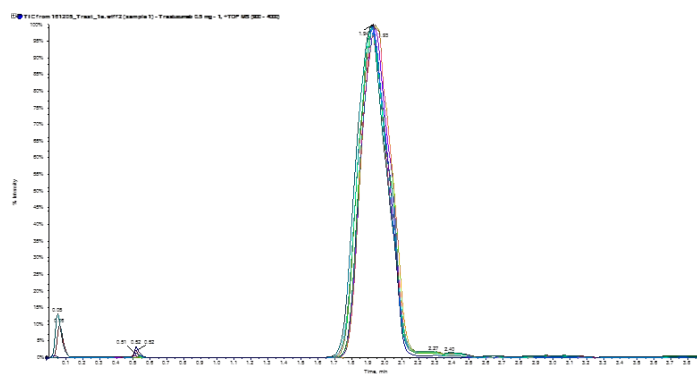


图1. 两个不同制造商的曲妥珠单抗高可重复性的色谱分离。

使用BiopharmaView™完整蛋白工作流程处理数据。首先在软件中输入蛋白的理论序列以及可能发生的翻译后修饰，一旦确定了蛋白的序列和预期的翻译后修饰，就可以确定色谱窗来选择数据。图2所示为三次重复进样同一批曲妥珠单抗的原始谱图。谱图重现性优异。

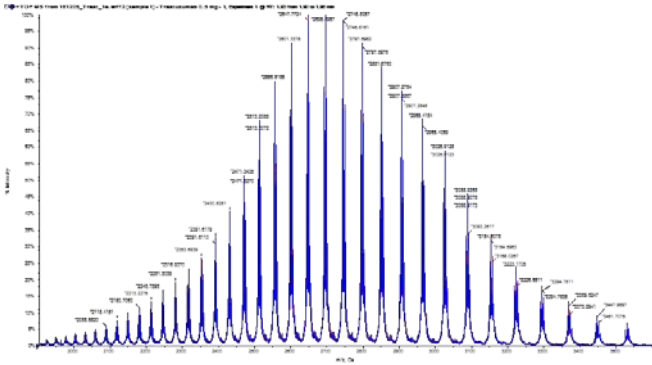


图2. 三次重复进样曲妥珠单抗的原始谱图。以不同的颜色（蓝色、粉色、红色）表示，并以m/z的形式反映高斯分布。

使用Biopharmaview™将此样品的原始谱图与第二批曲妥珠单抗进行比较（图3）。如图所示，糖型的信号强度存在一些差异，但是每个电荷态的谱图质量非常相似。

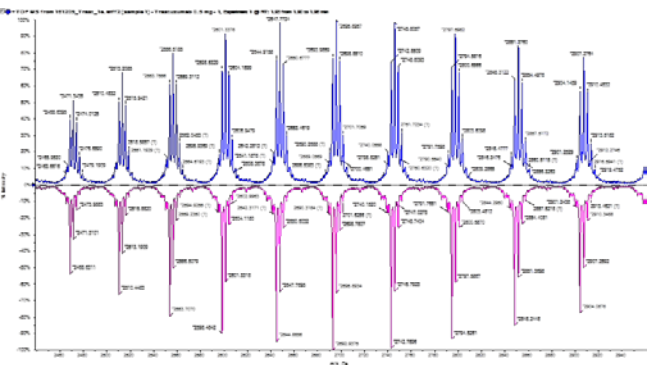


图3. 一批曲妥珠单抗（蓝色）与第二批曲妥珠单抗（粉红色）的镜像图显示了糖型模式的明显变化。

虽然原始谱图的评估对于评估不同电荷状态的轮廓相似性很重要，但完整分子量数据的构建是进行数据比较的最常用方法。通过对第一批抗体进行表征，并根据以前的报告对所得质谱图中每个峰进行识别和验证（图4）。

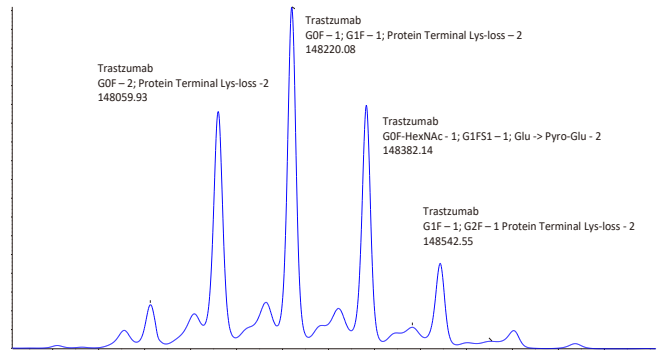


图4. 带注释的曲妥珠单抗重建谱图，包括N端赖氨酸损失和糖基化的所有修饰。

提交一个批次的数据分析，将第二批曲妥珠单抗与我们最初的表征样品进行比较。重建的谱图与原始数据一致，在每种糖型的质量上显示出很好的一致性，但是样品之间的强度不同（图5）。

每个批次重复进样结果绘制在条形图中，以显示每个主要糖型的相对丰度，如图6所示。所示的图是在BPV中自动生成的，可以快速评估翻译后修饰的强度。

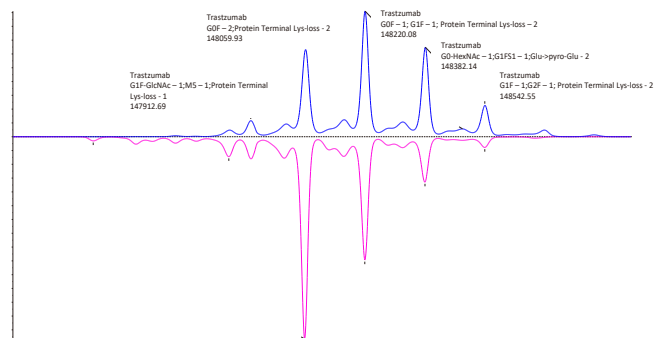


图5. 两批曲妥珠单抗重建谱图的糖型和强度比较。蓝色为第一批，粉色为第二批。

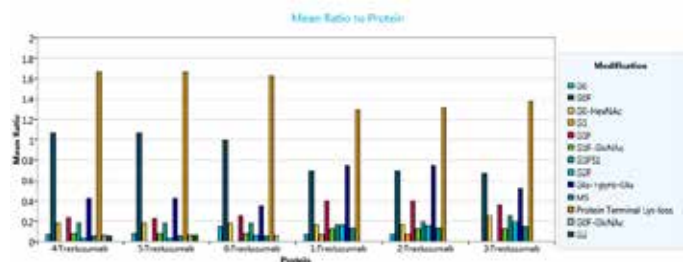


图6. 两个批次样品主要糖型和其他修饰的相对丰度比较。批次1（1:Trastuzumab-3:Trastuzumab）和批次2（4:Trastuzumab-6:Trastuzumab）。

回顾图3的结果，显示了主要糖型的强度变化，以及mannose-5 (MAN5) 种类存在的证据。绘制了该糖型与G1F图的对比图，以探究MAN5种类的水平。如图所示，与第二个样品相比，第一个样品中的MAN5峰更大。且重复分析结果一致。

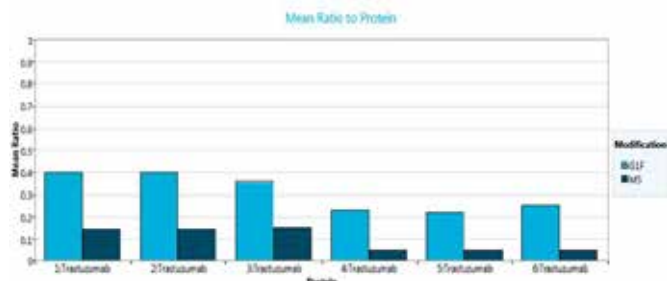


图 7. Man5 与 G1F 丰度比对，批次 1 ( 1:Trastuzumab-3:Trastuzumab )，批次 2 ( 4:Trastuzumab-6:Trastuzumab )。

## 结论

在生物药生产过程中，批次间的比对是非常重要的工作。能够快速地对批次内或批次间样品进行比较可以有效监控和保证产品质量。台式的X500B QTOF质谱仪结合BioPharmaView™软件，非常适用于此类批次比对工作。本文中，BioPharmaView™软件通过样品独特的糖型特征，轻松快速地识别两个曲妥珠单抗生产批次之间的差异。该可视化工具可以使用户能够识别、量化和跟踪这些在生产批次之间的差异。

## 致谢

SCIEX中国团队肖志良的翻译工作!

# CESI-MS对不同单克隆抗体的酶解产物进行生物类似药评估

Dr. Stephen Lock<sup>1</sup>, Dr. Rabah Gahoual<sup>2</sup>, Dr. Michael Biacchi, Dr. Alain Beck<sup>3</sup>, Dr. Yannis-Nicolas Francois<sup>2</sup> and Dr. Emmanulle Leize-Wagner<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SCIEX, Warrington, United Kingdom and <sup>2</sup>Laboratoire de Spectrometrie de Masses des Interactions et des Systemes (LSMIS), Universite de Strasbourg, France and <sup>3</sup>Centre d'immunologie Pierre Fabre; Saint-Julien-en-Genevois, France

## 引言

在销量排名前十的单克隆抗体药物中，有一部分已经或很快将失去专利保护，<sup>1</sup>随着专利保护的失效，这些生物类似药开始进入市场。生物类似药需要包括原研药的活性结构。<sup>2</sup>单克隆抗体是具有复杂的异质性糖蛋白。因此，需要使用多种方法对其进行详尽的表征，结构评估、生产监控和生物相似性研究。生物类似药包括某种授权生物原药的活性结构。生物类似药为了得到FDA的认可需要格外的分析和数据的表征。<sup>2</sup>随着药物专利保护的过时，这些生物类似药开始进入市场。

毛细管电喷雾 (CESI) 是将毛细管电泳 (CE) 和电喷雾离子化 (ESI) 整合在一根毛细管中的装置 (如图1所示)。CESI-MS在低至纳升/分钟的流速下运作，拥有许多技术优势。包括离子化效率高和离子抑制效应低。这些优点包括高的离子化效率和低的离子抑制效应。CESI-MS依靠待分析物的电荷和大小来进行分离，因此可以作为一些传统分离技术，如反相液相色谱的补充分离手段。CESI-MS已被用于单克隆抗体的分析。<sup>4</sup>

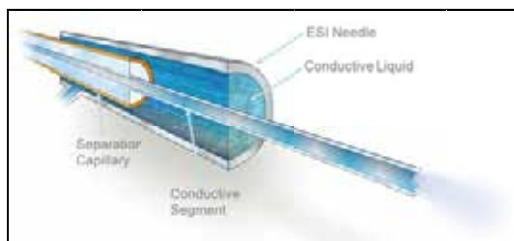


图1. OptiMS<sup>®</sup>-超低流速喷嘴。

本文总结了最近LSMIS研究组发表的工作。<sup>5</sup>在本文中，我们将介绍如何利用CESI-MS分析并比较市场上的单克隆抗体药物和其他候选的生物类似药。一次CESI-MS的进样分析可以同时检测蛋白的翻译后修饰和序列覆盖度。这些数据可用于比较单克隆抗体药或生物类似药。

## 材料与方法

**试剂：**所有化学品均为试剂等级，并购自Sigma Aldrich或其他厂家<sup>5</sup>。Trastuzumab和Cetuximab样品为EMA批准的产品购自Roche (Penzberg, GE) 和Merck KGaA (Darmstadt, GE)。生物类似药来自Pierre Fabre (Saint Julien en Genevois)，用于分析方法的开发。RapiGest SF 表面活性剂购自Waters。

**样品准备：**样品首先用MilliQ水稀释，0.1 %的RapiGest，然后用二硫苏糖醇 (DTT)还原，在用碘乙酰胺 (IAM) 烷基化。接下来，利用胰蛋白酶过夜酶解蛋白质 (37 °C)。酶解后，向溶液中加入1%的甲酸 (FA) 用于除去表面活性剂，最后，样品用50 mM 的醋酸铵 (pH = 4.0) 稀释至2.2 μM。<sup>5</sup>

**CESI-MS方法：**本实验使用OptiMS熔融石英毛细管 (30 μm ID × 91 cm)，液体温控控温 (20°C)。样品通过压力进样 (10 psi, 60 sec) 进入分离毛细管，背景缓冲为10 %的醋酸。表1展示了CESI分离方法。

表1. 胰蛋白酶酶解产物的CESI分离条件。

步骤	时间 (min)	压力 (psi)	方向	电压 (kV)	溶液
冲洗Rinse	3.5	100	正向	0	0.1 M NaOH
冲洗Rinse	1.5	100	正向	0	水
冲洗Rinse	3	100	正向	0	0.1 M HCl
冲洗Rinse	5	100	正向	0	10% 醋酸
冲洗Rinse	2	75	反向	0	10% 醋酸
进样Injection	60 sec	6	正向	0	样品
进样Injection	10 sec	5	正向	0	10% 醋酸
分离 Separation	35	0	正向	20	10% 醋酸
电压Voltage	2	10	正向	1	10% 醋酸

本工作的质谱使用的是SCIEX TripleTOF® 5600质谱仪，并配有NanoSpray® III 质谱源。Gas1和2没有使用，源温度设为150 °C。低流速的离子化只需加上1750 V的喷雾电压便可进行，curtain gas设为最低（5 psi）。质谱采集参数为TOF survey扫描（accumulation time 250 ms, m/z 50 - 2000 amu）MS/MS采集模式参数为（accumulation time 100 per scan, m/z 100 - 2000 amu），因此，一次完整扫描循环时间为1.75 sec。

### 结果

氨基酸序列是表征生物类似药的一个关键指标。因此，本工作比较了两类标准单克隆抗体药物（Trastuzumab和Cetuximab）和两类生物类似药候选药（Trastuzumab-B和Cetuximab-B）的序列。对于Trastuzumab和Trastuzumab-B，其酶解产物的单次分析表明，两者在重链（HC）和轻链（LC）上均有100%的序列一致性，证实了以前报道的CESI-MS/MS可以在单次分析中完成100%的序列覆盖。<sup>4</sup>（图2）

当比较这些序列时，研究者们发现，生物类似药和原始的单抗药物间仅在重链的217位置处有一级序列的差别。通过分析MS/MS的谱图，可以确认，Trastuzumab-B在217位置处的赖氨酸残基被一个精氨酸取代。（图3）

trastuzumab	trastuzumab-B
<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG</u> <b>FN</b> <u>IKDT</u>	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG</u> <b>FN</b> <u>IKDT</u>
<u>YHWVRQAPGKGLWVARIPTNGYTR</u> <u>YADSV</u>	<u>YHWVRQAPGKGLWVARIPTNGYTR</u> <u>YADSV</u>
<u>KGRFTISADTSKNTAYLQMNS</u> <u>RAEDTAVYYC</u>	<u>KGRFTISADTSKNTAYLQMNS</u> <u>RAEDTAVYYC</u>
<u>SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVYS</u> <u>ASTKGP</u>	<u>SRWGGDGFYAMDYWGQGLTVYS</u> <u>ASTKGP</u>
<u>SVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTV</u>	<u>SVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>VTV</u>
<u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVTV</u>	<u>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL</u> <u>SSVTV</u>
<u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>V</u> <b>KKV</b> <u>PKSC</u>	<u>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>V</u> <b>KKV</b> <u>PKSC</u>
<u>DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK</u> <u>DTLMI</u>	<u>DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK</u> <u>DTLMI</u>
<u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>DGVEVH</u>	<u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>DGVEVH</u>
<u>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL</u> <u>HQDWLNGK</u>	<u>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL</u> <u>HQDWLNGK</u>
<u>EYKCKVSNKALPAPIEKTI</u> <u>SKAKGQPREPQVYTL</u>	<u>EYKCKVSNKALPAPIEKTI</u> <u>SKAKGQPREPQVYTL</u>
<u>PFSRREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>PSDIAVEWESN</u>	<u>PFSRREEMTKNQVSLTCLVKGF</u> <u>PSDIAVEWESN</u>
<u>QGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRW</u>	<u>QGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRW</u>
<u>QQGNVFC</u> <u>SCVMHEALHNHYTCK</u> <u>LSLSPGK</u>	<u>QQGNVFC</u> <u>SCVMHEALHNHYTCK</u> <u>LSLSPGK</u>
<u>DIQMTQSPSSLSASV</u> <u>GDRTITCRASQ</u> <u>DVNTA</u>	<u>DIQMTQSPSSLSASV</u> <u>GDRTITCRASQ</u> <u>DVNTA</u>
<u>VAWYQQKPGKAPKLLI</u> <u>YASFLYSGVPSRF</u> <u>SG</u>	<u>VAWYQQKPGKAPKLLI</u> <u>YASFLYSGVPSRF</u> <u>SG</u>
<u>SRSGTDFLTISLQPEDFAT</u> <u>YCCQHYTTPPT</u>	<u>SRSGTDFLTISLQPEDFAT</u> <u>YCCQHYTTPPT</u>
<u>FGQGTKEIKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDEQLK</u> <u>SGTA</u>	<u>FGQGTKEIKRTVAAPS</u> <u>VFIFPPSDEQLK</u> <u>SGTA</u>
<u>SVVCLLNFPYREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQE</u>	<u>SVVCLLNFPYREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGNSQE</u>
<u>SVTETEQDSKSTYLS</u> <u>SSTLTLKADYEKHK</u> <u>VY</u>	<u>SVTETEQDSKSTYLS</u> <u>SSTLTLKADYEKHK</u> <u>VY</u>
<u>ACEVTHQGLSSPVTK</u> <u>SFNRGEC</u>	<u>ACEVTHQGLSSPVTK</u> <u>SFNRGEC</u>

图2. 由CESI-MS/MS获得的Trastuzumab（左）和Trastuzumab-B（右）序列覆盖情况。

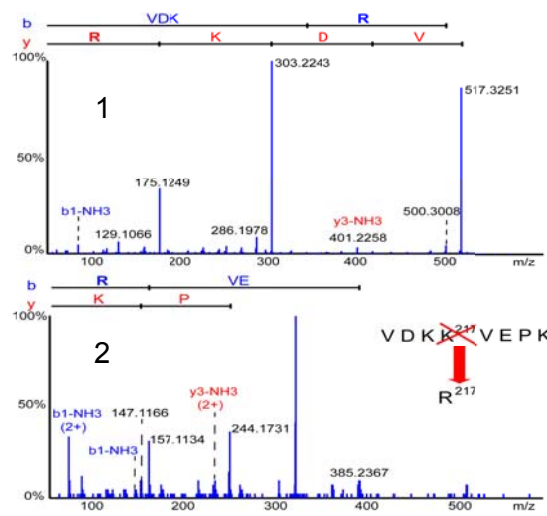


图3. Trastuzumab（1）和Trastuzumab-B（2）的MS/MS质谱图。此图显示Trastuzumab-B中m/z为517.3095（1+）碎片的消失和314.6937（2+）碎片的出现表明了有一个赖氨酸变成了精氨酸。

对Cetuximab和Cetuximab-B也进行了相同的实验，原始的单抗药物原研药和生物类似药在氨基酸序列上也有100%的一致性，同时这些序列也完全一致。为了确认此结果，每次实验都重复了3次，并得到了相同的结果。此外，有多于70%的y/b多肽碎片离子在二级质谱图上



被观测到。在Trastuzumab的实验中，这一数值达到了90%以上。如此高的二级质谱碎片覆盖度只可能在CESI-MS/MS超高的离子化效率（在低于40 nL/min的流速下）和质谱系统快速的扫描相结合的条件才下可达到。这样的组合十分适合于分析蛋白的翻译后修饰情况，并用于区分单抗药物和它的生物类似药。

糖基化是单克隆抗体的重要修饰，它影响着蛋白的稳定性。在本工作中并未将样品上的糖基化修饰酶解掉，因此可以通过鉴定糖肽来直接分析样品的糖基化情况，这使得鉴定糖基化的位点也成为可能。在分析Trastuzumab和Trastuzumab-B时，鉴定出了16种不同的糖型。当对原研单抗药物和生物类似药进行半定量分析比较时（图4），两个生物类似药均表现出与原始单抗药不同的糖型分布。

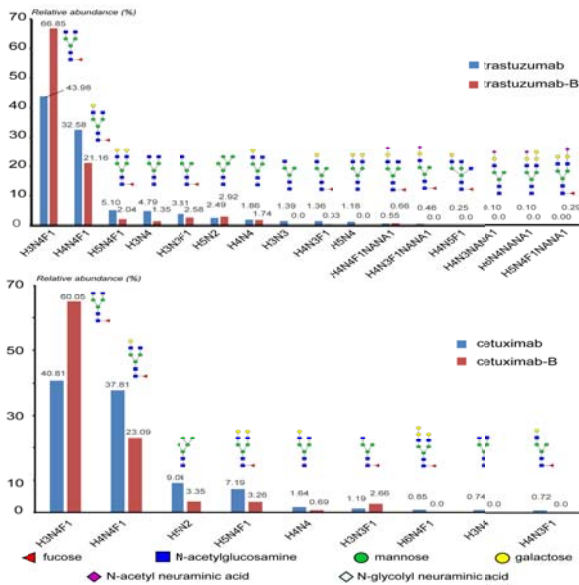


图4. 利用CESI-MS/MS分析得到的Trastuzumab/Trastuzumab-B和Cetuximab/ Cetuximab-B Fc端多肽的不同糖型情况。

在CQA的分析中，翻译后修饰引起的结构变化往往引起多肽电荷改变并影响了它的电泳淌度（如deaN在0.5 min的峰和pE在几分钟处的峰）。这些都帮助了CESI-MS/MS的分离和鉴定。利用CE作为分离多肽的技术有着极大的吸引力。图5便展示了利用电泳可以分离质荷比一致的仅在天冬氨酸处有变化的多肽，这是单用质谱无法得到的结果。当然，高质量的二级质谱图对多肽及其修饰的鉴定起着极大的辅助作用。

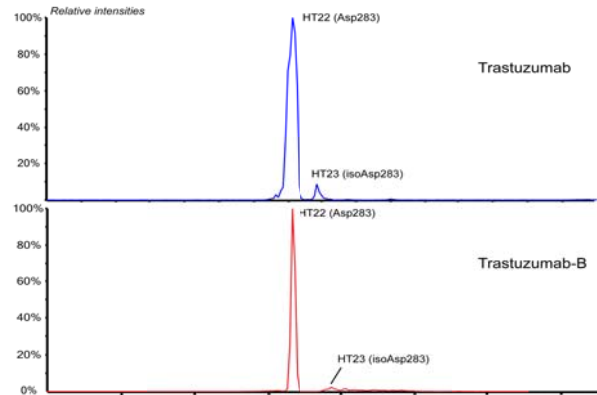


图5. HT22多肽（序列为278-291）质荷比为839.408（2+）的提取离子流图（EIE），两个峰表示着天冬氨酸的不同异构化。

除了糖基化，其他关键质量属性（CQAs）在生物类似药的分析中也十分关键。这些关键质量属性包括一些可能对免疫原性有影响的翻译后修饰热点、蛋白的PK/PD值以及由N端的谷氨酰胺/谷氨酸环化形成的各个位点的N端焦谷氨酸（pE）、天门冬酰胺去酰胺化（deaN）、甲硫氨酸氧化（oxiM）和天冬氨酸异构化（isoD）。CESI-MS/MS的数据可以用于分析不同单抗药物的这些翻译后修饰热点。表2列举出了一些在Cetuximab/Cetuximab-B分析中成功鉴定出的翻译后修饰情况。

表2. CESI-MS/MS分析得到的Cetuximab和Cetuximab-B翻译后修饰情况。通过信号强度可以得到各类翻译后修饰的分布百分比。

M dification	Cetuximab distri bution		Biosi milar distribution	
	% Mod.	% Unmod.	% Mod.	% Unmod.
Q 1 / pQ1	100	0	100	0
N161 /deaN161	25.6	74.4	59.5	40.5
D282 / isoD282	95.2	4.8	96.3	3.7
N386 /deaN386	45.6	54.4	95.7	4.3
D403 / isoD403	100	0	100	0
N4 1 / deaN41	87.8	12.2	94.7	5.3
N158 /deaN158	96.6	3.4	100	0

值得一提的是，在本工作中，每个单克隆抗体的序列覆盖度、翻译后修饰热点位点的检测和糖基化位点的分析均可在一次进样的实验中完成。

## 总结

本工作介绍了一种利用CESI-MS/MS分析单抗药物及其生物类似药的方法。利用此方法，可以在单次进样中分析单克隆抗体样品的多种蛋白质结构性质。这些性质包括：

- 100 %的氨基酸序列覆盖度；
- 糖基化位点的鉴定和分析；
- 翻译后修饰热点的鉴定和分析。

关于此工作的更多信息，请查阅相关文献。<sup>5</sup>

## 参考文献

1. Epstein, M. S, Ehrenpreis E. D., Kulkarni P. M., "Biosimilars: the need, the challenge, the future: the FDA perspective". *Am J Gastroenterol.*, 2014, Dec; 109(12): 1856-9.
2. Natasha Udpa & Ryan P. Million *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 13–14(2016), doi: 10.1038/nrd.2015.12.
3. Busnel, J-M., Schoenmaker, B., Ramautar, R., Carrasco-Pancorbo, A., Ratnayake, C., Feitelson, J. S., Chapman, J. D., Deelder A. M, and Mayboroda, O. A. "High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheath-less Interface with Transient-Isotachopheresis", *Anal. Chem.*, (2010), 82, 9476-9483.
4. Gahoual, R., Busnel, J. M., Beck, A., Francois, Y. -N., Leize-Wagner, E. "Full antibody primary structure and microvariant characterization in a single injection using transient isotachopheresis and sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry", *Anal. Chem.*, (2014), 86, 9074-9081.
5. Gahoual, R., Biacchi, M., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., Back, A., Francois, Y. -N., Leize-Wagner, E. "Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry". *MABs*, (2014)

# 通用的单克隆抗体电荷异质性、纯度和分子量分析工作流程

使用CESI-MS分离和在线检测完整mAb变异体和杂质

Bryan Fonslow, Marcia Santos, Jose-Luis Gallegos-Perez  
SCIEX Separations, USA

## 概述

单克隆抗体 (mAb) 药物的生物研发和生产需要对各种生理化学性质进行常规分析和监测。在这里，我们描述了一种通用的毛细管电泳和电喷雾质谱 (CESI-MS) 工作流程，用于mAb样品的表征。该工作流程将毛细管区带电泳 (CZE) 的独特分离能力与基于MS检测器的优点相结合，以提高mAb结构信息的分辨率和准确的分子量信息。使用少量的mAb (约10 ng) 样品即可进行完整 (非还原) 或还原的分析，以确定电荷异质性 (包括电荷变异体、糖型和碎片)、纯度和分子量。

本文适用读者：资深科学家和实验室管理员

**重点：** 药物开发或生产过程中mAb样品的分析测试。该工作流程的潜在应用包括候选药物筛选中的抗体表征和纯度测定、生产过程开发和产品的质控。

**目标：** 使用单一CESI-MS工作流程，与现有行业认可的方法 (如CE-SDS和毛细管等电聚焦 (cIEF)) 相比具有更高的性能和实用性，从而确定治疗性mAb样品的电荷异质性、纯度和分子量。

**问题：** mAbs易受修饰和降解事件的影响，这些事件可能会改变它们的物理化学性质并最终影响单抗药的稳定性、有效性和安全性。在研发和生产过程中引入的杂质和辅料也会产生相同的影响。因此，需要在研发和生产的各个阶段进行全面的表征。目前，生物制药企业依靠多种方法来获取电荷异质性、纯度和分子量的信息。总之，这些方法会消耗更多的昂贵而且数量有限的mAb样品。并且，由于多数方法依赖还原的mAb样品，而非完整的mAb样品，碎片的识别会具有更大的挑战性，丢失碎片可能会导致对样品处理、储存条件和稳定性信息的不正确假设。



CESI 8000 Plus高效分离模式通过Nanospray III 源，CESI适配器和OptiMS中性涂层毛细管连接TripleTOF® 6600系统

**结果：** 开发CESI-MS工作流程以确定完整和还原mAb样品中的电荷异质性、纯度和分子量信息。mAb样品中确定的种类包括完整mAb、变异体 (例如电荷变异体、糖型和碎片)、杂质和赋形剂组分。结果与使用行业认可方法 (即CE-SDS和cIEF) 相结合的结果相似。值得注意的是，CESI-MS结果提供了mAb的附加结构信息，而这些可以验证的mAb潜在的碎片信息经常会被传统方法丢失。

## 主要优点：

- 单次CESI-MS分析简化多种mAb表征分析的工作流程
- 在相同的质谱检测下，可以分离和鉴定糖型、碎片、杂质和赋形剂

## 介绍

免疫球蛋白  $\gamma$  (IgG) 是用于生产治疗性单克隆抗体 (mAb) 的最常见的分子。高灵敏度和全面表征这些分子的能力是对研发和对疗效、生物利用度和生物安全性管控至关重要。基于CE和MS的电荷异质性、纯度和分子量分析是单抗药表征的主要方法。利用CE进行mAb完整蛋白或还原蛋白分析通常用于单克隆抗体筛选、分析研发和质量控制过程。将CE分离与质谱 (MS) 检测相结合进行mAb分析可以将三种方法进行统一。此外，高分辨率和质量准确的MS检测可以帮助识别未知的CE峰，并且还可以提供比单独使用光学检测更准确和灵敏的纯度和分子量信息。

将毛细管电泳 (CE) 和电喷雾电离 (ESI) 集成到一个过程 (CESI) 中提供了这些可能性，同时还降低了进行分析的样品量的要求。我们使用单次CESI-MS的方法分析完整或还原mAb可以提供电荷异质性、纯度和分子量的信息，集合了当前生物制药企业接受的CE-SDS、cIEF和CZE分析的方法。<sup>1-3</sup> 值得注意的是，CESI-MS进行完整或还原的IgG分析展现了快速筛选、表征候选药物或选定药物的大小/电荷异质性 (强制降解或不稳定性导致) 的能力。

CESI-MS的结果可与现有行业认可的基于CE的电荷异质性、纯度和分子量的分析相比较。基于CZE分离原理进行CESI-MS分离电荷异构体，展现了与基于cIEF方法相似的图谱。<sup>3-6</sup> 对于不同的糖型，MS可以检测分子量的差异，由其引起的电荷异质性又可以在CE中得以分离。电荷异质性分离的其它峰也可能主要归因于样品内潜在的IgG杂质。总的来说，结果证明了使用MS作为基于CZE的电荷异质性分析的优点。

## 材料和方法

**样品制备：**对于CESI-MS实验，使用Zeba旋转柱 (Thermo Fisher Scientific) 将IgG1, IgG2和IgG4分子 (20 mg/mL) 脱盐并置换缓冲液为50 mM、pH 4的乙酸铵。对于还原分析，将IgG分子在10 mM DTT和0.1 % Rapigest SF表面活性剂 (Waters) 中60 °C孵育45 min。

酶切 (0.5% 甲酸、37 °C、10 min) 并进行离心沉淀 (14 K $\times$ g)。加入pH 4的乙酸铵 (2 M)，使终浓度为50 mM。对于独立的CE实验，将IgG分子稀释到尿素-凝胶-两性电解质溶液 (基于cIEF的分析) 或SDS凝胶溶液 (CE-SDS分析) 中。SDS凝胶溶液的还原在10 mM DTT 60°C下孵育10 min。

**CESI 8000 Plus MS模式条件：**CESI实验使用装有温度控制、自动采样器和电源的SCIEX CESI 8000 Plus系统 (P/N A98089) 进行，能够提供高达30 kV的电压。使用具有多孔尖端的OptiMS中性涂层毛细管 (P/N B07368)。3%和10%醋酸溶液分别用作背景电解质 (BGE) 和导电液体。施加压力 (5 psi) 10 s以产生约7.5 nL样品进样。在50 mM乙酸铵样品缓冲液中样品进行富集，通过瞬时等速电泳 (tITP) 进行压力注射。CESI分离在30 kV, 2 psi下进行7 min (预分离)，然后10 psi, 10 min (分离和ESI)。

**MS条件：**使用具有NanoSpray III源和CESI适配器 (P/N B07363) 的SCIEX TripleTOF 6600系统。MS扫描从400 - 4500 m/z，进行完整蛋白检测。

**数据分析：**使用SCIEX PeakView<sup>®</sup>和BioPharmaView™软件进行高分辨率质谱的分析。

**CESI 8000 Plus独立CE模式条件：**CE-SDS和cIEF实验使用SCIEX PA 800 Plus检测器 (P/N B68372)，试剂盒 (P/Ns A10663和A80976) 和标准操作。

## 结果与讨论

基于CESI-MS的分析使用中性涂层毛细管在非还原 (完整) 和还原水平下进行。基于CZE的非还原性IgG1分离 (图1) 产生电荷异质性分离并通过去卷积实现了IgG1和杂质的准确分子量测定。两个完整的IgG1被检测到。主要电荷变异体的平均分子量为146,900 Da，而碱性IgG1电荷变体为151,005 Da。除平均分子量差异之外，它们的糖谱不同。利用高质量准确度去卷积分子量的进一步数据分析将有助于鉴定候选序列和糖型匹配。然而两个主要的IgG异构体被检测为不同的电泳峰和完



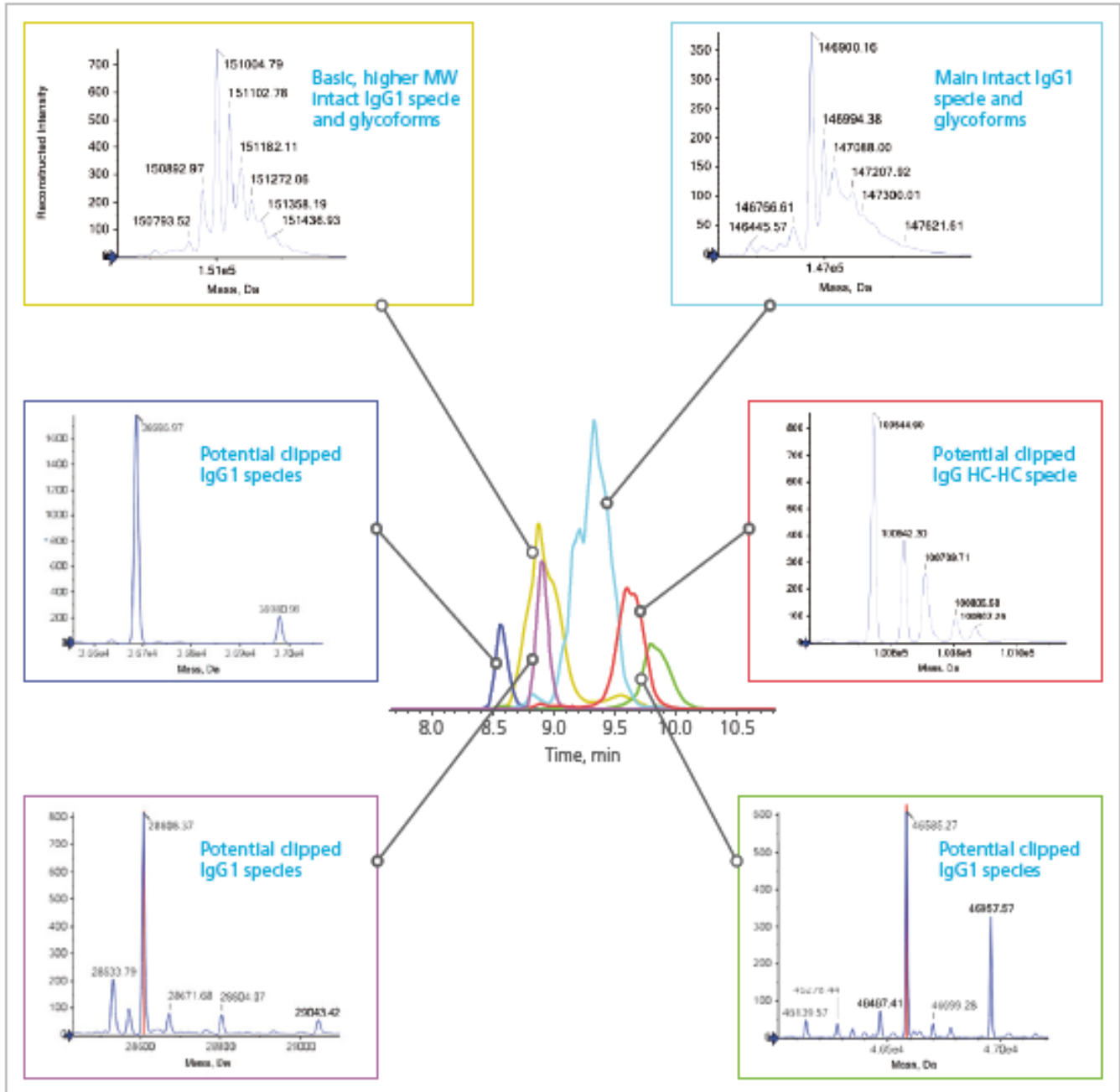


图1. 利用MS检测IgG1的电荷异质性，从CESI分离中提取和去卷积非还原的IgG1的MS谱图，从最高丰度的电荷状态（约 3-6）中提取出来的离子电泳图（XIE）代表平均的电荷状态。图谱使用15-30 sec针对于每一个电泳峰的积分，使用最大半峰高的峰宽作为积分窗口。

整MS谱图，但是它们的糖谱和部分分裂的电泳峰也表明样品中还存在其它异构体。额外的去卷积表明谱图的重合是来自去酰胺、二硫键断裂和糖基异构体（数据未显示）。MS还检测到其他四种IgG1种类，这些杂质似乎是潜在的溶液中的片段。IgG1检测到包括大量分子量为28,608, 36,687和46,585 Da的杂质。最高分子量杂质为100,545 Da，其分子量和糖基化分布与重链二聚体（HC-HC）杂质一致。值得注意的是，基于CESI-MS的电荷异质性分析提供了与相同IgG1样品的cIEF（图2A）和CE-SDS（图2B）分析一致的结果。例如，在cIEF和CESI-MS电荷异质性分离之间检测到类似的分离谱和物种数量。此外，来自CE-SDS分析的分子量杂质的数量也与通过基于CESI-MS的分析检测到的具有独特分子量的种类的数量一致。因此，CESI-MS分析通过基于CZE的电荷异质性分离和MS分子量测定将cIEF和CE-SDS分析的两个方面结合起来。CESI-MS分析可以对IgG剪切片段进行直接分析和候选药物鉴定。这些剪切片段在UV检测器中很难鉴定，经常会被误认为是IgG的电荷异构体。在图3中显示了每个电泳峰从代表性的MS原始数据中进行去卷积的结果。

基于CZE的方法也可用于还原mAb分析。图4显示了还原的IgG1分子的分离和检测。检测到一种IgG1重链，同时检测到两种IgG1轻链。这也与通过CE-SDS分析检测到的三种主要还原的IgG1种类一致。两种IgG1轻链的分子量测定有助于理解完整IgG1形式的分子量差异。

也就是说，较高分子量的IgG1轻链可能存在于酸性、较高分子量的完整IgG1电荷变体中。结合高质量准确度MS的测定，确认不同完整IgG1异构体的进一步分析可以使用还原的IgG1进行分析。

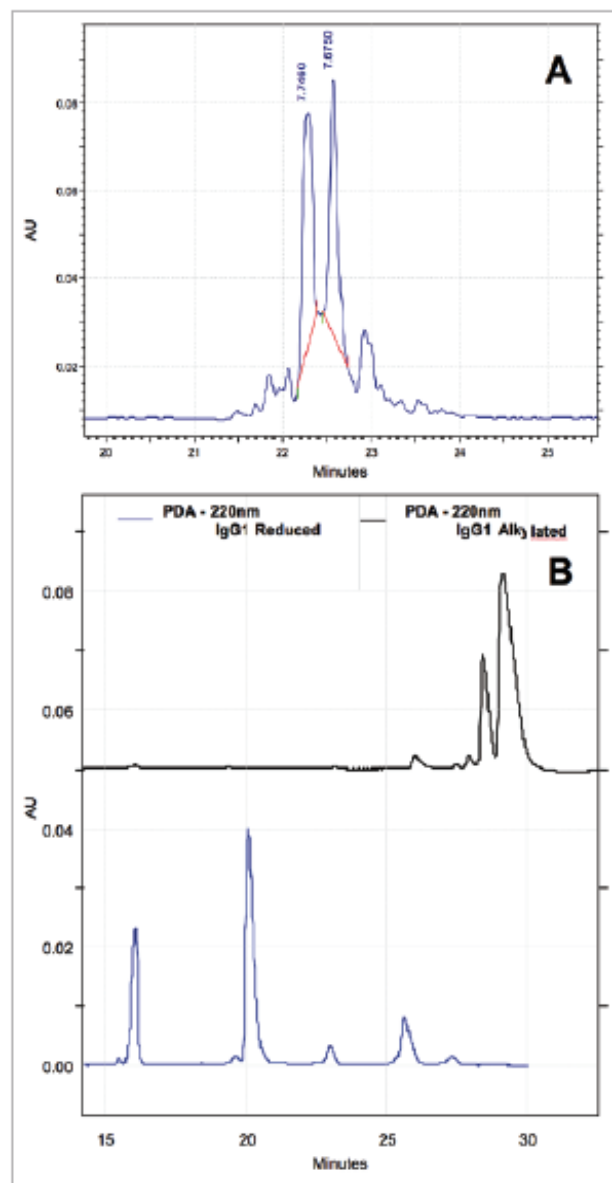


图2. (A) UV检测器进行非还原IgG1的cIEF谱图；(B) PDA检测器分析非还原（烷基化、黑色谱图）和还原（蓝色谱图）的CE-SDS电泳图。

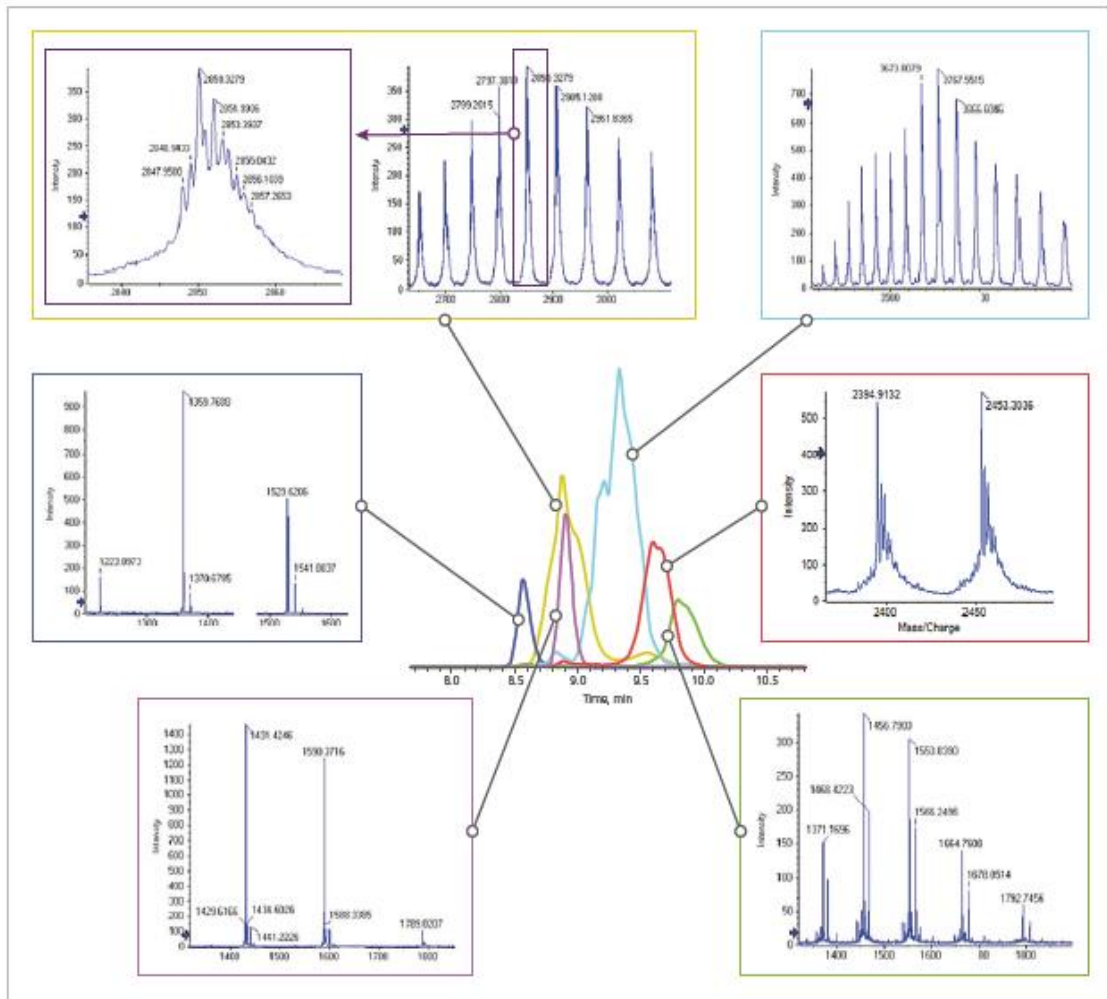


图3. 从图1中的去卷积谱图的非还原IgG1的CESI分离中提取代表性的原始MS，谱图使用每个电泳峰的在最大半峰高的宽度窗口进行15-30 sec的积分。

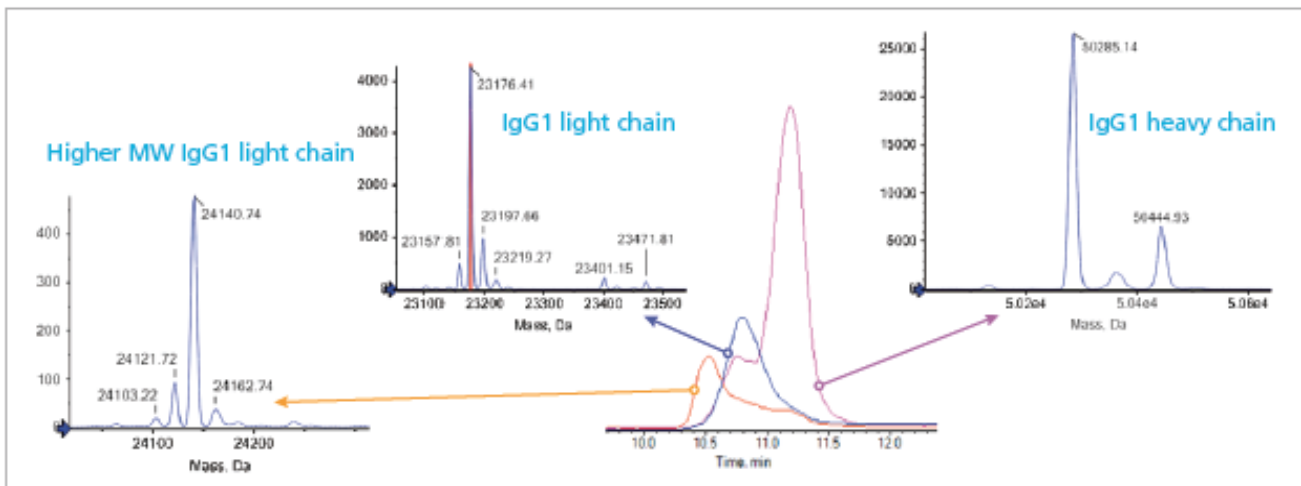


图4. 用MS检测还原IgG1分析，来自CESI分离的还原IgG1物质MS谱的提取和去卷积，从最高丰度的电荷状态（约3-6）中提取出来的离子电泳图（XIE）代表平均的电荷状态。

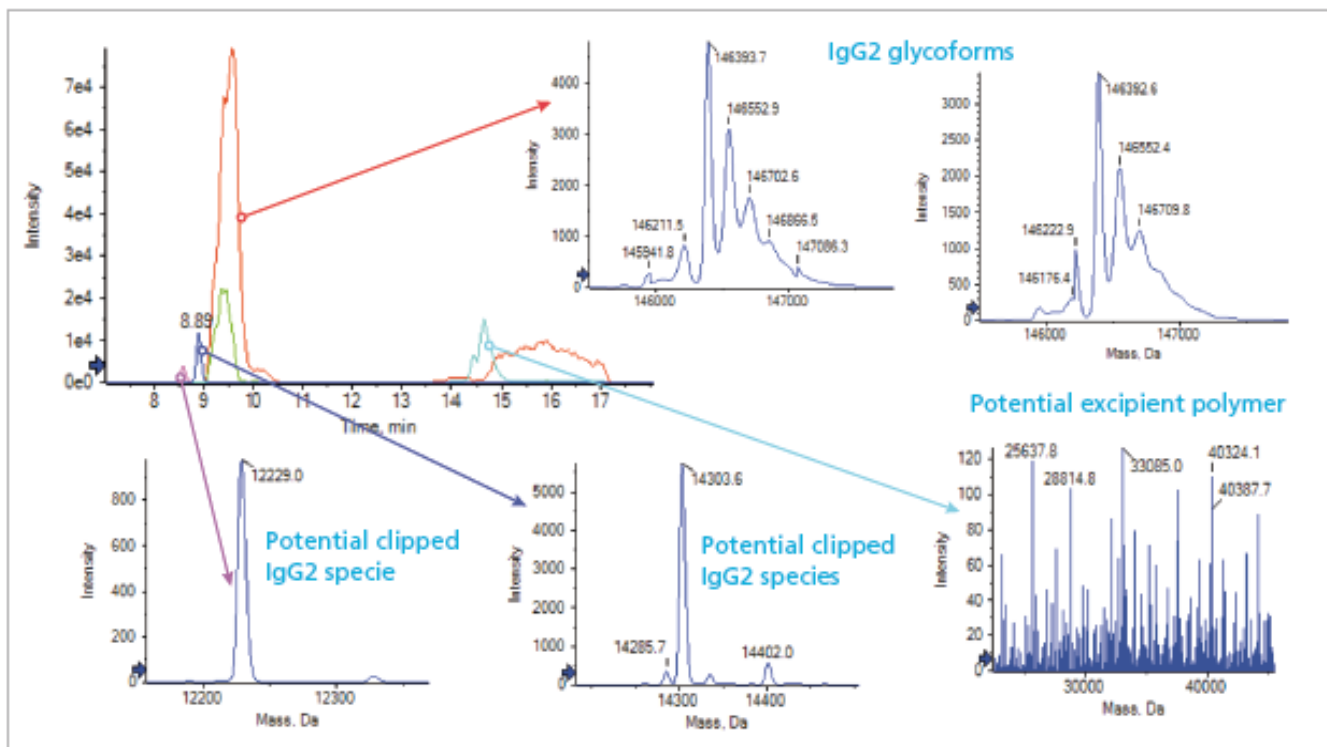


图 5. 使用MS检测器进行IgG2的电荷异质性分离，来自CESI分离的非还原IgG2物质MS谱的提取和去卷积，从最高丰度的电荷状态（约3-6）中提取出来的离子电泳图（XIE）代表平均的电荷状态。

对代表性的IgG2和IgG4分子进行了相同的CESI-MS完整电荷异质性分析（分别见图5和6）。如IgG1分析一样，在每次分析中都检测到多个完整的和片段的IgG2和IgG4种类。尽管完整的IgG2和IgG4以它们各自的形式进行迁移，但谱图去卷积过程中鉴定出两种不同的糖型。同样，潜在的IgG2和IgG4片段会在其完整分子前迁移，从而可以灵敏地鉴定杂质。在IgG2谱图的分析中，潜在的制剂赋形剂（例如聚山梨酸酯80）可以很好地从IgG2中分离出来，否则可能通过基于nanoESI或LC-MS的分析对质谱质量产生不利影响。由于它们具有相同的电泳迁移率和迁移时间，因此可以预期与其它非离子型表面活性剂具有类似的结果。

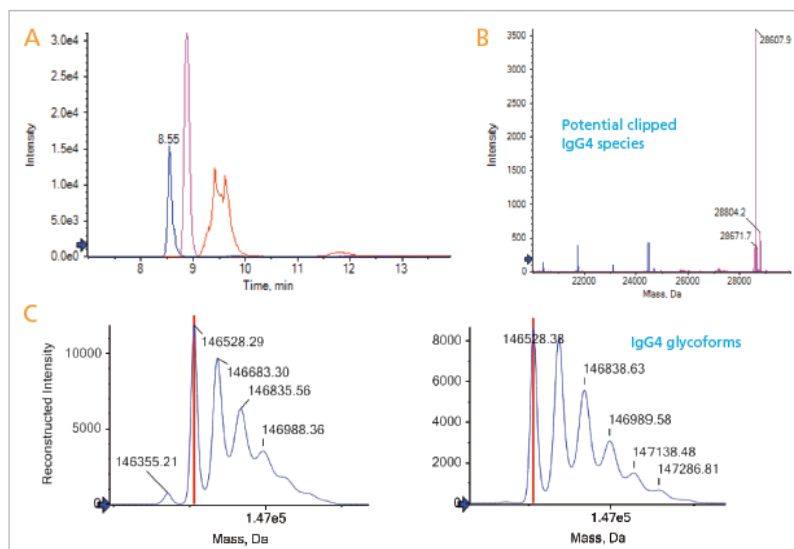


图 6. (A) 使用MS检测器进行IgG4的电荷异质性分离，从最高丰度的电荷状态（约3-6）中提取出来的离子电泳图（XIE）代表平均的电荷状态。(B) 来自CESI分离的潜在的IgG4物质MS图谱的提取和去卷积，去卷积的MS图谱颜色对应于相同的峰颜色。(C) 来自CESI分离的非还原IgG4物质MS图谱的提取和去卷积，左右去卷积图谱对应于橙色分离XIE峰的左侧和右侧的提取图谱。



## 结论

CESI 8000 Plus系统的CESI-MS联用和单独CE功能组合提供了强大的表征完整和还原IgG的方法。两种分析都能提供电荷异质性、纯度和分子量信息。当与TripleTOF® 6600系统配合使用时，使用中性涂层毛细管的CESI-MS分析可提供高分辨率的分离和具有高质量准确度的分子量信息，用于表征mAb电荷异构体、糖型和杂质。此外，高灵敏度CESI-MS的分析结果可从少量样品（约10ng）中获得，特别适用于样品量较少的研发阶段。

## 参考文献

1. Nunnally, B. et al., A series of collaborations between various pharmaceutical companies and regulatory authorities concerning the analysis of biomolecules using CE, *Chromatographia*, 2006, 64, 359-368.
2. Salas-Solano, O., et al., Intercompany study to evaluate the robustness of C-IEF technology for the analysis of monoclonal antibodies, *Chromatographia*, 2011, 73, 1137-1144.
3. Moritz, B. et al., Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies, *J. Chrom. B*, 2015, 983-984, 101-110.
4. He, Y. et al., Analysis of Identity, Charge Variants, and Disulfide Isomers of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in an Uncoated Capillary Column, *Anal. Chem.* 2010, 82, 3222-3230.
5. He, Y. et al., Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 548-555.
6. Santos, M. Analysis of Monoclonal Antibody Charge Variants by Capillary Zone Electrophoresis, Beckman Coulter Technical Information Bulletin, IB-17031A.

# 利用TripleTOF<sup>®</sup>非数据依赖采集模式建立IgG1单克隆抗体中宿主细胞蛋白高灵敏度定量分析方法

Justin Blethrow and Eric Johansen

AB SCIEX, USA

单克隆抗体 (mAb) 是应用于一系列人体疾病的主要靶向生物治疗药物。目前治疗性单克隆抗体是免疫球蛋白 (IgG1) 的衍生物, 主要通过中国仓鼠 (CHO) 卵巢细胞或其他细胞进行细胞培养所得<sup>1</sup>。因此, 为了保证产品质量、有效性和安全性, 需要鉴定及监控与生产过程相关的杂质及其他痕量污染物。

由于宿主细胞蛋白 (HCP) 等污染物会引发病人的不良反应, 所以需要检测和定量分析产品中HCP的含量。从1997年开始, EMA (欧洲药品管理局) 法规已经要求必须证实药品中已经去除HCPs。

"6.2纯化过程的验证……应该证实纯化过程对诸如宿主细胞蛋白等特定污染物的去除能力"。

以往, HCPs的检测通常采用免疫亲和方法 (主要为ELISA)。该方法会对高表达HCPs以及在试剂生成过程中所用动物物种的高度免疫原性HCPs的分析产生偏差。由于低含量HCPs同样也会对病人产生威胁, 并且人体免疫系统可能与动物的反应不同, 因此此类测试的结果可能产生严重误导。对免疫原性污染物分析的失败将会导致产品不耐受性或病人不良反应, 进而威胁病人健康, 影响临床实验结果。因此除了产品之外, 生物药物开发人员同样需要确保准确无误的HCP分析结果。当代质谱技术的发展使其成为HCPs分析的有力工具, 质谱能够在快速有效分析HCPs的同时确保更好的准确度。在鉴定及定量特异蛋白方面, 质谱也展现了其优势。但是, 直到最近, 还不清楚质谱是否能够提供够灵敏、够宽的线性范围以在大量的生物治疗蛋白中检测和定量分析痕量HCP污染物, 与此同时仪器还需要高扫描速度以在合理的时间内完成高置信度的分析。此外, 鸟枪蛋白质组学采用传统数据依赖性扫描模式配合FASTA数据检索技术来检测肽段, 由于该方法本质上随机性较大, 因此导致



其分析结果重现性差, 尤其表现在MS/MS层面。总之, 作为HCP分析的商业化质谱解决方案必须避免实验结果偏差, 不需要操作者提前了解样品信息 (ELISA测试则需要), 并且还要一如既往的保持质谱在速度、灵敏度和稳定性方面的优势。

本文中, 采用高扫描速度, 高灵敏度的TripleTOF<sup>®</sup>质谱仪, 结合强大的SWATH<sup>®</sup>非数据依赖采集模式完成对于IgG1样品中低至10 ppm (wt/wt污染物/主成分) 宿主细胞蛋白的准确, 高重现性定量分析。同时, 通过采用低流速 (20  $\mu$ L/min) 和短分析时间 (不到45分钟) 保证方法的可重现性和通量。

## TripleTOF<sup>®</sup>系统搭配SWATH<sup>®</sup>采集模式在宿主蛋白分析中的优势

- 全面、准确定量分析的同时获得MS/MS信息: 一次进样即可完成任意数量宿主细胞蛋白的定量分析工作。
- 灵敏度和扫描速度: 在30分钟的LC梯度内, 完成ppm级宿主细胞蛋白的含量测定。

- **通量和可靠性：** TripleTOF®系统扫描速度和灵敏度使其能够与微流液相联用于HCPs分析，从而避免采用纳流液相造成的可靠性和通量的问题。

## 实验设计

**样品处理：**对1 mg单克隆鼠IgG1亚型进行尿素变性，TCEP降解和MMTS烷基化处理。变性后的蛋白在37 °C下进行4小时胰酶酶切。将酶切后的溶液与市面上第一款6个蛋白酶解混合液（Michrom, Auburn, CA）混合至一定浓度。

**色谱条件：**样品分析采用Eksigentekspert™ 425系统和ChromXP色谱柱（0.5 mm × 10 cm C18-CL, 3 μm 120Å）。液相梯度见表1。流速为20 μL/min。溶液A含2%乙腈和0.1%甲酸，溶液B含98%乙腈和0.1%甲酸。每次进样10 μg抗体。柱温设为45 °C。

**质谱条件：**采用TripleTOF® 5600系统分析未修饰和混合后的抗体酶解液。实验采用数据依赖性扫描（IDA）LC-MS/MS方法完成多肽初步鉴定，为后续SWATH®数据处理建立肽段库。IDA方法：高分辨TOF MS作为预扫描，每秒同时触发20个MS/MS扫描（最小累积时间为50 ms）。随后再进行非数据依赖性数据采集SWATH®方法，Q1的窗口设置为20 Da，采集质荷比在400至1200

之间所有母离子的MS/MS图谱信息，每个样品重复进样三次。

**数据处理：**利用ProteinPilot™软件，在包含抗体序列信息和宿主细胞蛋白组信息的数据库中搜索处理获得的IDA数据。将搜索结果做为肽段库，利用PeakView®软件内置的SWATH®工具从中提取出碎片离子色谱图进行定量分析。

表1. LCMS梯度条件。

Time	Solvent A	Solvent B
0	95	5
1	95	5
25	65	35
30	10	90
35	10	90
36	95	5
41	95	5

## 肽图和谱库生成

表2展示了混合样品中每个宿主细胞蛋白的含量，单位采用百万分之一（ppm）。IDA定性分析采用“Level1”样品，该样品中HCPs含量大概在100-500 ppm范围。利用前期IDA采集建立肽段的谱库，为后续SWATH®提供信息。图2显示抗体轻链序列覆盖度为100%，重链为99.5%。本方法的一大优势在于所获得的肽段谱库能够用于以后的任意一次SWATH®分析。通常，除非蛋白表达或纯化过程发生巨大变化，否则很少需要重新进行IDA分析。

表2. 样品中添加HCP水平（ppm单位）。

Level	Serum Albumin	Lacto-peroxidase	Carbonic Anhydrase	Glutamate Dehydrogenase	Alpha Casein	Lacto-globulin
1	415	485	182	350	148	114
2	207	242	91	175	74	57
3	104	121	46	88	37	29
4	52	61	23	44	18	14
5	26	30	11	22	9	7

## Comprehensive Quantitation

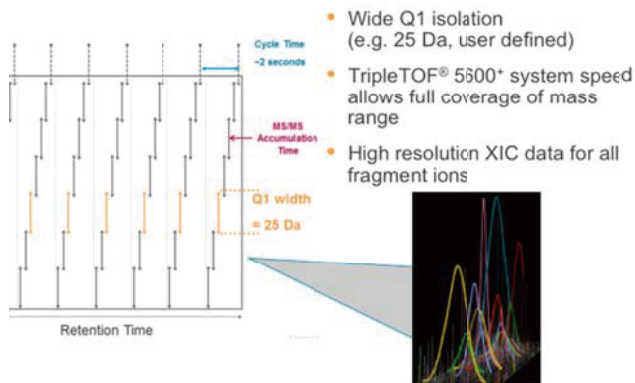


图1. SWATH®模式采集所有离子的MS/MS数据。在设定的质量范围内，MS/MS隔离窗口快速步进，实现色谱峰中所有能检测到的离子的碎片离子采集。

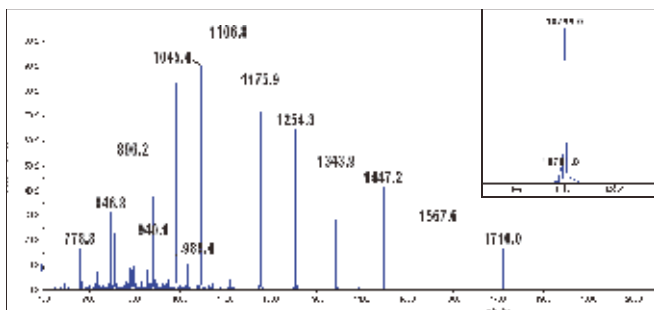


图2. 肽图分析中抗体覆盖率数据。采用Protein Pilot软件实现对轻链和重链超高覆盖率。

### 通过非数据依赖性采集SWATH®方法对宿主细胞蛋白进行定量分析

在IDA定性分析之后，利用非依赖性数据采集SWATH®方法对样品进行定量分析。在前期建立的肽段数据库信息中选择相应的碎片离子，再通过PeakView®软件的SWATH®采集工具，利用肽段的碎片离子产生提取离子流色谱图进行定量分析。图3为利用SWATH®测定血清白蛋白中多肽含量。图中展示了不同添加的HCP浓度水平下，9个肽段碎片提取离子色谱图（XIC）。从图中可见，SWATH®方法可以轻松检测到低至10 ppm的肽段，而在空白对照（F）中则未发现HCPs。

针对每一个HCPs，选择三至四个肽段用于SWATH®

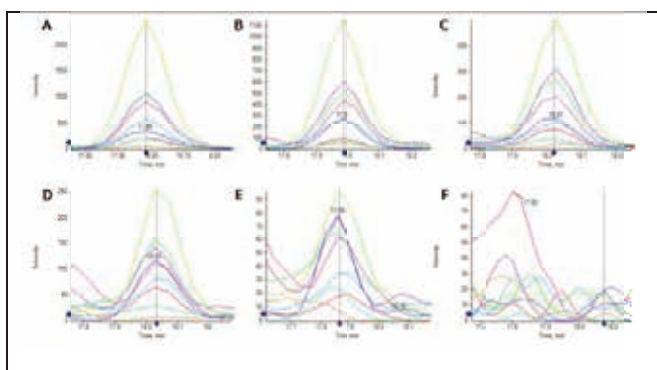


图3. SWATH®检测血清白蛋白中肽段的提取离子流色谱图。图中展示了SLHTLFGDELCK肽段碎片离子的XIC。检测到相关蛋白浓度水平A: 415 ppm, B: 207 ppm, C: 104 ppm, D: 52 ppm, E: 26 ppm及F: 未添加HCP肽段的阴性对样品。

定量。此处需要注意的是，SWATH®是利用MS/MS信息进行定量分析，而不仅仅是将其运用在肽段鉴定上，因此与一级MS定量相比，SWATH®方法具有更高的灵敏度。利用每条肽段所选的所有碎片离子的提取离子流色谱信号加合来定量相关蛋白。实验同样从抗体中选择四条肽段用于定量。尽管产品和污染物之间有着高达100,000倍的浓度差异，HCPs和抗体定量结果仍然能够得到高度重现。此外，可以将抗体定量结果作为参照来归一化HCPs信号，用于消除上样期间产生的HCPs信号的细小差异。采用这种方法可以比较不同日期采集的样品中HCPs水平，该方法具有高度定量准确度，而且避免在维护液相和质谱状态上花费大量精力。同样在任何需要的时候即可开展HCPs检测实验，无需再在一套复杂的系统耗时数天。不同天内采集的抗体样品数据差异通常在10%之内。

### 定量线性和检测限

图4展示了三次进样所测得每个HCP的平均信号响应。图5为测试到的每个蛋白的浓度水平及CV值。在高浓度水平区间，CV值在3-7%。即使在7-30 ppm的最低HCP浓度水平，平均CV值为7%，最大CV值仅有12%。实验结果展示了该方法具有很好的定量重现性，提示将来能够将其广泛应用于低至ppm水平HCPs的准确定量。

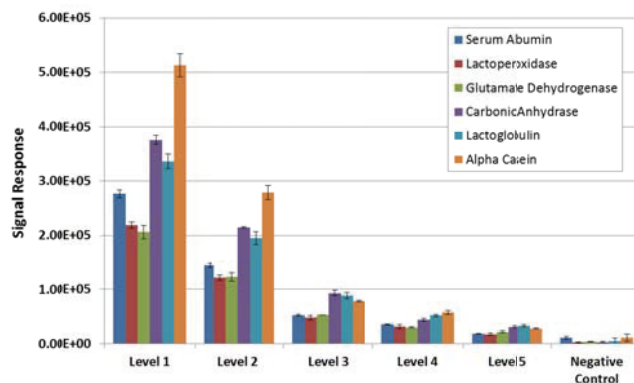


图4. 不同水平蛋白质信号强度。将每个蛋白对应的肽段信号进行加总以进行直接定量分析。数值显示三次进样后的平均值及标准偏差（误差线）。



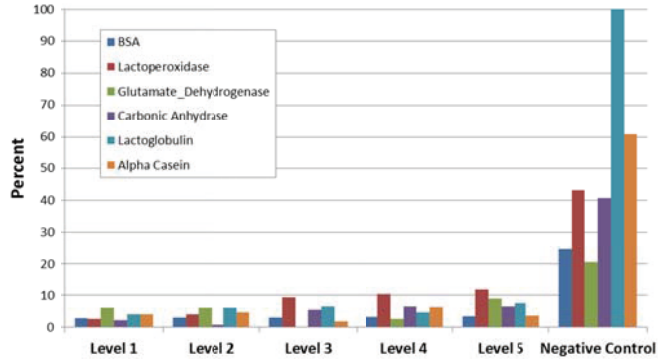


图5. 多次分析中蛋白质水平的变异系数。不同水平HCP分析均得到较低的CVs，意味着采用该方法即使在最低检测限仍然具有优异的定量准确性。阴性对照样品分析的高CV值则证实软件如预期般未能找到可靠的信号。

## 结论

目前选择合适的分析策略以检测宿主细胞蛋白污染水平非常困难。一条路线是以ELIAS方法为主，该方法存在检测盲点，实验结果偏差较大等问题，但分析灵敏度高、速度快；另一条路线是质谱法，该方法检测结果无偏差，但分析通量低，重现性差（以蛋白质组学应用为主）。本文所展示的SWATH<sup>®</sup>方法，依托强大MS/MS<sup>ALL</sup>采集性能，集合上述两种方法的优势的同时消除了相应的不足。由于SWATH<sup>®</sup>采集方法可覆盖所有肽段，因此一次进样就能完成任意数量的蛋白定量分析工作。除此之外，全面的定量谱分析能够避免鸟枪蛋白组学常用的数据依赖性扫描策略产生的不同批次之间的变异。最后，获得这些优势并不意味着要损失通量、可靠性和灵敏度。正如本文所展示的，TripleTOF<sup>®</sup> 5600+系统的SWATH<sup>®</sup> MS/MS<sup>ALL</sup>数据采集方法实现了在1小时内完成宿主细胞蛋白定量分析工作，所采用的几十微升/分钟的流速也消除了nanoLC分析的复杂性及重现性问题。

# CESI-MS结合SWATH<sup>®</sup>采集模式对宿主细胞蛋白进行超灵敏度的检测

通过正交的CE分离和降低离子抑制率，宿主细胞蛋白的检出灵敏度可达ppm级别

Bryan Fonslow<sup>1</sup> and Eric Johansen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SCIEX Separations, Brea, CA; <sup>2</sup>SCIEX, Redwood City, CA

## 主要优点

- 在早期研发阶段从有限样品量检测宿主细胞蛋白质
- 正交的分离机制可用于附加方法开发及检测验证
- 超低流速下通过降低离子抑制和更高的离子化效率提升检测灵敏度

## 介绍

宿主细胞蛋白质（HCPs）是生物药制备过程中需要避免产生的一类杂质，其可能对生物药的质量、药效和安全性产生不利影响。治疗性单克隆抗体（mAb）制备中HCP的定性和定量仍然是一个挑战，需要提高检测方法的灵敏度和专属性。质谱，尤其是具有独立数据采集模式的，如SWATH<sup>®</sup>采集模式，是一种可靠且灵敏的检测技术，能够实现HCP含量在ppm级别的检测。通过将毛细管电泳（CE）技术和电喷雾电离技术（ESI）的结合，得到的CESI技术可以通过两个方式来实现较低含量的HCP的检测，这两种方式分别为降低离子抑制率和通过超低流速（nL/min）来提高离子化效率。

本项研究展示了具有独立数据采集模式的CESI-MS（SWATH<sup>®</sup>）对一种代表性的单克隆抗体中的HCP的检测。为了模拟宿主细胞蛋白的产生，我们添加了一种单克隆抗体降解的标准品，该标准品的大致浓度范围在低于ppm到千分之一浓度范围内。当HCP的浓度在千分之一的浓度时，我们通过CESI-MS信息依赖采集（Information-Dependent Acquisition, IDA）来生成蛋白/肽段数据库。CESI的表征分析是通过SWATH<sup>®</sup>数据采集模式来对一系列梯度浓度的HCP进行分析。使用离子库和SWATH<sup>®</sup>数据来筛选最能代表HCP浓度的肽和片段。然后选择该浓度下的肽段作为计算HCPs线性方程的标准浓



度。HCP的定量范围最低可以达到ppm的级别，甚至能够达到更低的级别，以最低检出量的3倍作为HCP的检出限。

CESI 8000 Plus高性能分离模块通过Nanospray<sup>®</sup> III源、CESI适配器和OptiMS熔融石英毛细管与TripleTOF<sup>®</sup> 5600系统相连

## 实验

**样品制备：**使用RapiGest、DTT、碘乙酰胺和胰蛋白酶4小时酶解方案，将代表性mAb和17蛋白质标准混合物分别酶解为1 mg/mL的肽。主细胞蛋白质将酶解的蛋白标准品加入到单抗的酶解产物中，通过调节其加入的浓度，分别得到ppth、ppm和ppb三种浓度范围，并

以此来模拟宿主细胞蛋白。然后在125 mM、pH4的乙酸铵中将肽段稀释至250 μg/mL。

**CESI条件：**CESI配有温度控制的自动进样和高压电源装置的SCIEX CESI 8000 Plus系统 (P/N A98089) 进行，能够提供高达30 kV的电压。带有多孔尖端的OptiMS熔融石英毛细管 (P/N B07367) 用于进样和肽图谱实验。采用10%乙酸溶液作为背景电解质 (BGE) 和导电液体。压力进样量约25 ng的肽段后，使用瞬时等速电泳 (t-ITP) 进行样品堆积。CESI的分离电压为20 kV。定性和SWATH®采集定量分析采用相同的分离条件。

**MS/MS条件：**使用具有由Analyst\TF 1.7软件控制的Nanospray® III源和CESI接头 (P/N B07366) 的SCIEX TripleTOF® \5600+系统。用15个MS/MS周期 (分别为MS和MS/MS的100和50ms累积时间) 信息依赖采集 (IDA) 进行HCP鉴定。HCP检测和定量分别使用数据独立的SWATH®采集进行，采用150和50 ms的MS和SWATH®扫描累积时间，分别从300-1200 m/z进行30次恒定窗宽扫描 (30 m/z, 1 m/z重叠)。

**数据分析：**高分辨率的MS和MS/MS图谱分析使用SCIEX ProteinPilot™、PeakView®和MultiQuant™软件。

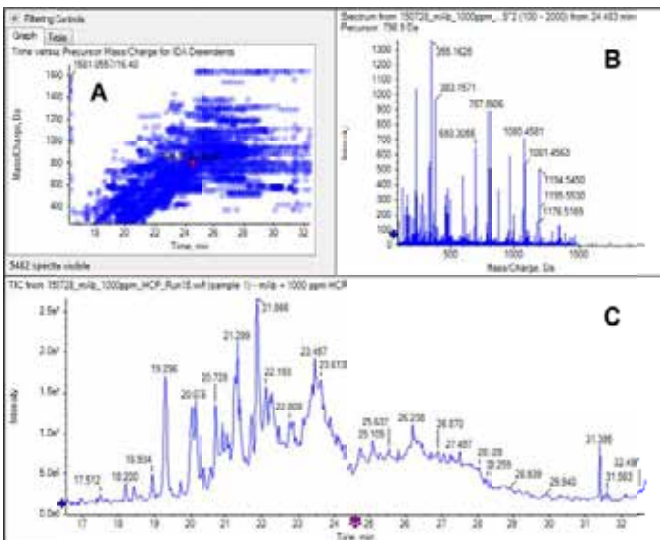


图1. 来自CESI-MS IDA的原始数据以千分之一蛋白质标准物和mAb样品制备物运行。原始数据表示为 (A) MS/MS选择的肽的热点图，(B) CESI肽分离的代表性肽MS/MS谱和 (C) 总离子流图 (TIE)。

## 结果

宿主细胞蛋白检测的第一步是用IDA进行高浓度蛋白的定性分析，实际上，该实验将在部分纯化的mAb制备物上进行。在这里，我们模拟了部分纯化的制剂，其中蛋白标准品相对于单克隆抗体以千分之一质量加标。具有代表性的CESI-MS IDA谱图通过IDA Explorer展现在图1中。即使是在较低浓度下，CESI-MS的IDA数据能够利用宿主细胞蛋白的标准谱图来实现肽段的表征。图2中显示来自IDA实验的ProteinPilot™搜索结果。来自蛋白质和肽



图2. 使用ProteinPilot™鉴定来自CESI-MS的代表性mAb和蛋白质标准品。蛋白质序列中呈绿色的肽代表使用SWATH®值捕获进行定量的最佳候选物，因为它们具有最好的MS/MS信号。将这些肽导入PeakView®/SWATH® microapp进行评估。

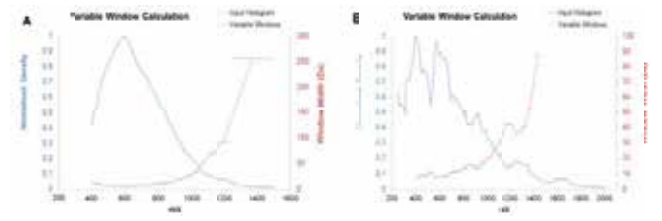


图3. 基于 (A) 酵母裂解物和 (B) 每1千个HCP/mAb制剂的IDA运行的可变SWATH®采集窗口宽度的计算。



数据库匹配的肽片段离子随后可以被SWATH®采集数据系统确定为是否是宿主细胞蛋白。

可以用不同的m/z窗口配置执行SWATH®采集，以聚焦在m/z信息丰富的区域。我们使用CESI-MS研究了使用恒定和可变的检测窗口对HCPs分析的结果。肽段的碎片信息通常在400-800 m/z范围内是最丰富的，因此所测试的可变窗口构型之一是由来自酵母裂解物的常见肽酶解产物的LC-MS IDA分析产生的。其他变量窗口配置我们评估是由来自HCP/mAb制备物的重复CESI-MS IDA运行产生的，如图1所示。两种可变窗口配置结果如图3所示。通过稀释宿主细胞蛋白到一系列的特征浓度，每个浓度下利用SWATH®数据采集系统重复进样3次。图4显示了重复运行的典型总离子电泳图。

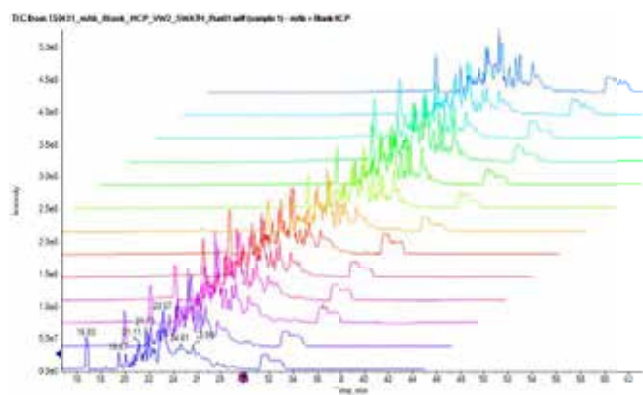


图4. CESI-MS SWATH®采集运行的代表性总离子流图 (TIE)，包括ppb至ppth浓度范围内的空白和HCP加标运行。

可以使用PeakView®中的SWATH®处理来选择肽和碎片离子进行定量。图5显示了选择用于宿主细胞残留蛋白质定量的代表性SWATH®数据。从肌红蛋白VEADIAGHGQEVLR (图5A)中提取的两个的碎片离子电泳图谱具有相同的迁移特征，结果表明它们来自相同的肽段。这两个离子与来自IDA运行的肽文库中发现的相匹配 (图5B)。此外，如果在校准曲线的三次运行之间考虑碎片离子，则观察到适当的定量趋势 (图5C)。这三部分数据共同说明了即使是少量的碎片化离子也同样能够实现HCP中具有代表性肽段的定量。

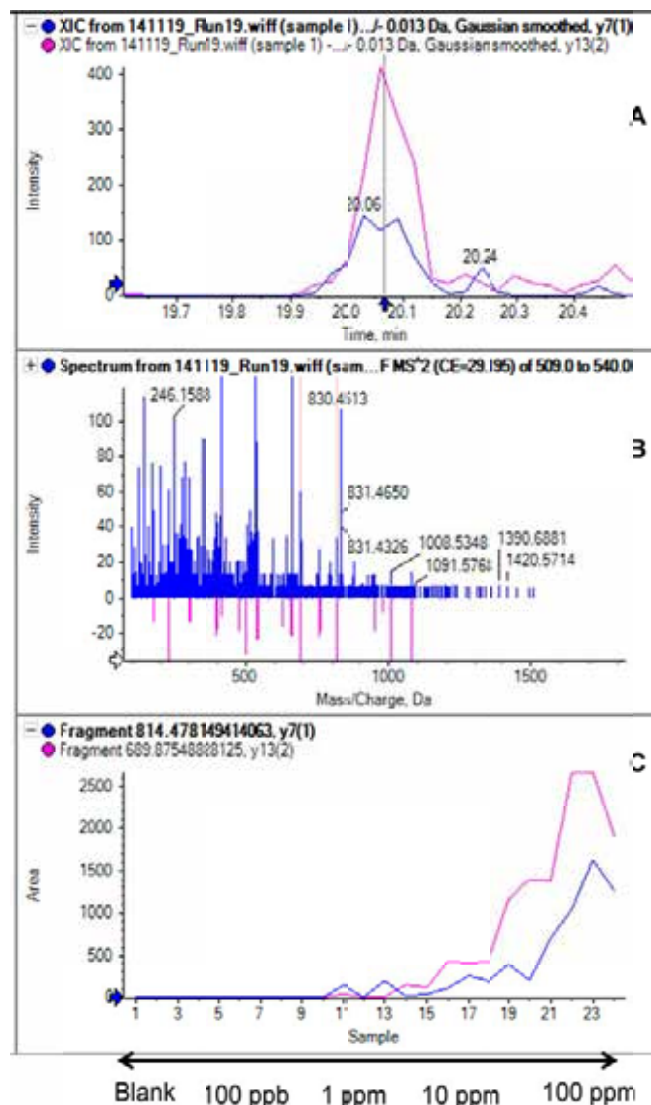


图5. (A) 肌红蛋白肽VEADIAGHGQEVLR y7和y13离子的提取碎片离子电泳图。(B) 将SWATH® MS光谱 (蓝色) 与先前鉴定的肌红蛋白肽碎片离子 (粉红色) 进行匹配。(C) 基于来自三次运行的HCP浓度的片段离子峰面积图。

单抗药制备中的宿主细胞蛋白质的浓度非常低，质谱法的灵敏度通常会被推到极限，可能会进入低S/N水平。超低流速 (20 nL/min) 的CESI技术降低了离子抑制效应，因此可以扩展HCP检测的动态范围和灵敏度。图6显示了先前用LC-MS方法显示的使用SWATH®获取鉴定的肽的常见预期灵敏度和动态范围，优于LC-MS的方法



1. 也就是说，通过采用CESI-MS，SWATH®数据采集系统来进行HCP中候选肽段离子的表征，可以实现肌红蛋白中两个特定的肌红蛋白片段的表征。然而，在我们的分析中有一些肽检测的例子具有更高的灵敏度和动态范围。为了更为具体的说明其中一个量化的S/N比率，我们提取了所示的肌红蛋白肽NDIAAK的片段离子电泳图，如图7所示。即使在0.1 ppm浓度下，NDIAAK的S/N比约为20，便于在低于ppm能够检测到这种代表性HCP。值得注意的是，空白样品信噪比为10，而0.1 ppm样品信噪比约为200。

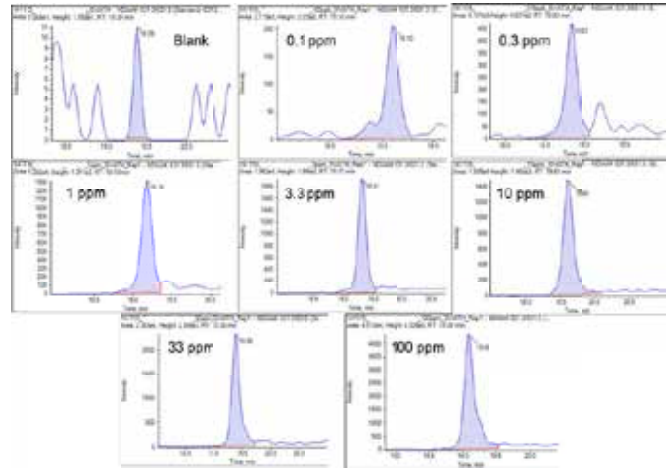


图7. 使用MultiQuant™值浓度范围为0.1 ppm至100 ppm的肌红蛋白肽NDIAAK的提取片段离子电泳图。

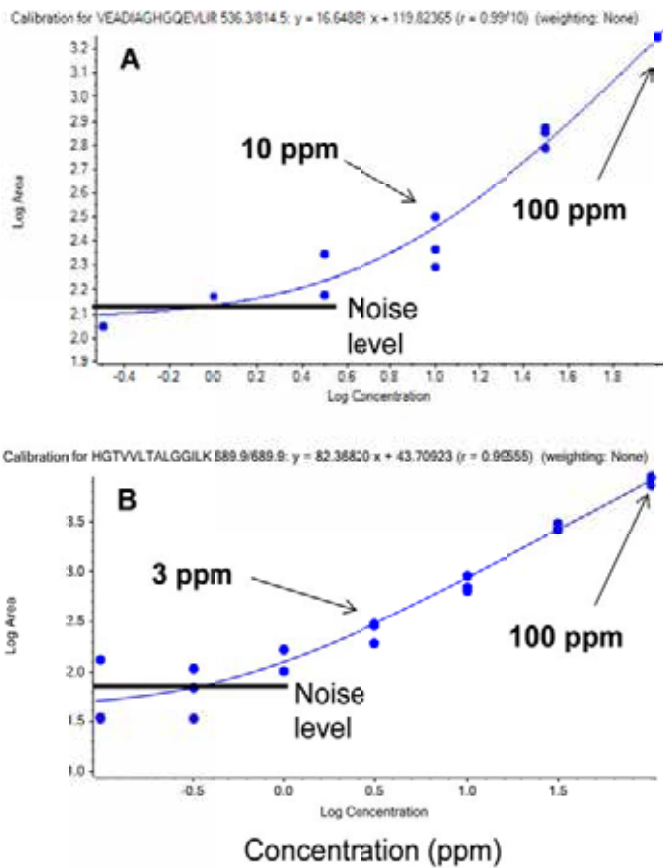


图6.来自肌红蛋白肽 (A) VEADIAGHGQEVLR b2离子和 (B) HGTVVLTALGGLK y7离子的三次CESI-SWATH® MS运行的校准曲线。

## 结论

通过CESI-MS联用技术，该工作流程有助于在治疗性单克隆抗体生产过程中对低含量的宿主蛋白细胞进行检测。CESI与SWATH®采集的结合减小了离子抑制效应，利用数据依赖性采集，为宿主细胞蛋白定量提供了一个强大的工具。该应用提高了毛细管电泳技术在生物药表征中的多样性和效率，是对高流速和微流速LC-MS的补充。

## 参考文献

1. Justin Blethrow and Eric Johansen, High sensitivity host cell protein quantitation in an IgG1 monoclonal antibody preparation via data-independent acquisition with a TripleTOF® System, SCIEX Technical Note, Publication Number 7460213-01.

# 使用微升流速液质联用法测定生物体液中单克隆抗体的通用性方法

SCIEX QTRAP® 6500+ LC-MS/MS系统和OptiFlow™ Turbo V 离子源及 M5 MicroLC 系统

Lei Xiong, Ji Jiang, and Remco van Soest

SCIEX, Redwood City, California, USA

LC-MS/MS作为传统配体结合分析(LBAs)的正交技术,已被广泛应用于日常的生物药定量分析。生物样本的样品量通常是非常有限的,因此需要高灵敏度的分析方法, MicroFlow LC-MS/MS在这方面有非常大的优势。微升流速色谱技术和免疫亲和样品制备方法的实施,大大提高了检测灵敏度。微升流速液相色谱提升了多倍的信号强度,而基于免疫亲和原理的样品制备方法大大提高了样品的净化度,从而减少了基线干扰<sup>1</sup>。本文介绍了一种用于超灵敏定量小鼠血浆中SILuLite SigmaMAb抗体的混合LBA/MicroFlow LC-MS/MS工作流程。这种方法也可以转移到动物基质中其他任何单克隆抗体的定量分析中。

## SCIEX免疫亲和-MicroLC-MS/MS解决方案主要特点

- M5 MicroLC 系统可提供:
  - 微升流速控流量控制,可将流速精确至1  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - 实现快速和大体积进样的捕集-洗脱选项
  - 与任何MicroFlow LC 色谱柱灵活搭配
- 搭配OptiFlow™ Turbo V离子源的QTRAP® 6500+ LC-MS/MS系统可提供(Figure 1)
  - 设置简单,无需优化探头或电极位置
  - 性能稳定,电极寿命长
- 优化的免疫亲和样品制备方法可提供:
  - 降低样本复杂性和基质干扰
  - 满足所需的线性动态范围
  - 缩短样品制备时间



## 方法

目标分析物的免疫捕获: (图2)将涂有链霉亲和素的免疫亲和性磁珠浆等量均分并用PBS缓冲液(1x)洗涤三次。将生物素标记抗人IgG抗体(0.5 mg/mL)加入磁珠中,在室温下摇动孵育1小时。将结合后的磁珠洗涤三次并重新悬浮于PBS缓冲液(1x)中。25  $\mu\text{L}$ 小鼠血浆加入SILuLite标准品,作为校准标准品。血浆中的SILuLite浓度分别为2、10、50、100、500、1000、5000、10000和20000 ng/mL,以SILuMab为内标。在每个校准标准样品中,添加100  $\mu\text{L}$  PBS缓冲液(1x)、50  $\mu\text{L}$ 结合的磁珠浆和内标,并在室温下摇动孵育1小时。用磁力架富集珠粒,然后用PBS缓冲液(1x)和10 mM碳酸氢铵依次清洗。将磁珠在0.1%TFA溶液中旋涡培养10分钟,洗脱目标蛋白。

免疫亲和富集洗脱液的蛋白酶酶解:将洗脱液转移到96个孔板,使用1 mM氯化钙在500 mM碳酸氢铵水中中和。

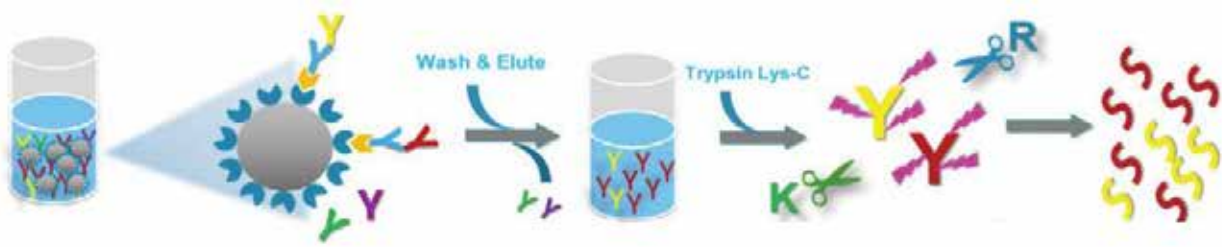


图2. 样品制备工作流程。

将样品板放入加热摇床中，在95 °C下摇匀培养10分钟。随后冷却至室温，并向每个样品中添加1 µg trypsin/Lys-C混合酶。将样品在50 °C下缓慢摇动培养1小时以进行胰蛋白酶消化，然后加入甲酸中止。取上清液进行LC-MS/MS分析。

微升流速液相色谱-质谱条件：样品一式三份，用QTRAP® 6500+ LC-MS/MS结合M5 MicroLC，以捕获-洗脱方式对样品进行分析。表1描述了待测物捕获的色谱条件。表2描述了待测物分离的色谱条件。在样品上样过程中，分析物被捕集柱捕获并脱盐。在待测物分离过程中，辅助阀在前5分钟处于“Injection”位置，以连接捕集器柱和分析柱。

5分钟时，将辅助阀切换到“Load”位置，将捕集器柱与上样泵连接，以进行柱清洗（图3）。

质谱分析采用QTRAP® 6500+ LC-MS/MS及OptiFlow™ Turbo V离子源，装配25 µm Steadyspray™ 探针和电极。优化后的MS参数见表3和表5。使用MultiQuant™ 3.0 software软件进行数据处理。

常规流速液相色谱-质谱条件：为了确定常规流速检测和微升流速检测之间的灵敏度差异，用QTRAP® 6500+ LC-MS/MS系统结合Exion LC™ AC系统对每个样品进行分析。表4描述了常规流速的液相色谱条件。MRM参数与微升流速检测相同（表3）。离子源/气体参数在0.7 mL/min流速下优化，如表5所示。使用MultiQuant™ 3.0处理数据。

表1. 微升流速色谱分析条件：待测物捕获。

Parameter	Value
Stationary phase	Phenomenex Luna 5 µm, C18 Trap Column, 20 × 0.3 mm
Mobile phase A	0.1% formic acid in water
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Flow rate	50 µL/min
Column temperature	Room Temperature
Injection volume	30 µL

Time	Flow Rate (µL/min)	%A	%B
0	50	100	0
7	50	100	0
8	50	10	90
9	50	10	90
9.1	50	100	0
12	50	100	0

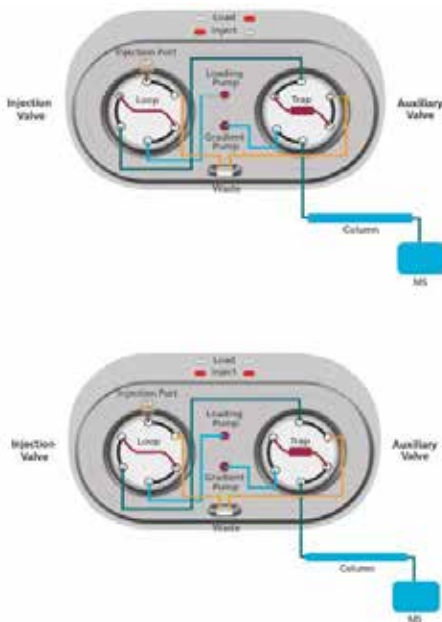


图3. 阀配置. 图示“Load”位置(上图)和“Inject”位置(下图)。

表2. 微升流速色谱分析条件：待测物分离。

Parameter	Value
Stationary phase	Phenomenex Kinetex 2.6 μm, XB-C18 Column, 50 x 0.3 mm
Mobile phase A	0.1% formic acid in water
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Flow rate	5 μL/min
Column temperature	40 °C
Injection volume	NA

Time	Flow Rate(μL/min)	%A	%B	Comment
0	5	97	3	
5	5	65	35	Valve Load
5.2	5	10	90	
9.8	5	10	90	
10	5	97	3	
12	5	97	3	

表3. 微升流速分析的MS条件。

Name	Q1	Q3	DP	CE	CXP
GPSVFPLAPSSK1	593.8	699.4	78	28	15
GPSVFPLAPSSK2 <sup>1</sup>	593.8	846.5	78	28	15
FNWYVDGVEVHNAK1	560.0	708.8	60	22	15
FNWYVDGVEVHNAK2	560.0	615.7	60	23	15
GPSVFPLAPSSK[H] <sup>2</sup>	597.8	854.5	78	28	15
FNWYVDGVEVHNAK[H] <sup>2</sup>	562.9	713.3	60	23	15

<sup>1</sup> Most suitable transition for quantification.

<sup>2</sup> Internal standard transitions.

表4. 常规流速的色谱条件。

Parameter	Value
Stationary phase	Phenomenex Kinetex C18 column, 50 x 3.0 mm
Mobile phase A	0.1% formic acid in water
Mobile phase B	0.1% formic acid in acetonitrile
Flow rate	0.7 mL/min
Column temperature	40 °C
Injection volume	30 μL

Time	Flow Rate (ml/min)	%A	%B
0.0	0.7	95	5
0.7	0.7	95	5
0.8	0.7	90	10
3.5	0.7	75	25
4.0	0.7	60	40
4.5	0.7	10	90
6.0	0.7	10	90
6.1	0.7	95	5
7.5	0.7	95	5

表5. 用于微升流速和常规流速分析的MRM离子源/气参数。

Source/Gas Parameter	Microflow Value	Analytical Flow Value
Curtain Gas:	25	30
Ion Source Gas 1:	20	65
Ion Source Gas 2:	15	65
CAD gGs:	High	High
Ion Spray Voltage:	5000	5500
Source Temperature:	150	600



## 结果和讨论

标记肽的选择考虑了离子化和裂解效率、基线噪音和翻译后修饰的几方面。这些肽具有与免疫球蛋白G (IgG) 相同的保守氨基酸序列。因此, MRM方法可以应用于其他基于免疫球蛋白的生物治疗药物而无需修改。对于每一个肽, 选择具有最高S/N的MRM离子对进行定量。为了在有限的样品体积(每个样品25微升血浆)下达到所需的分析灵敏度, 采用了微升流速色谱技术和基于免疫亲和原理的样品制备方法。采用5  $\mu\text{L}/\text{min}$  的HPLC流速来提高离子化效率; 采用捕获-洗脱方式来增加样品注入量和缩短样品加载时间。对标记肽的MRM参数进行了微升流速和常规流速的分别优化。免疫捕获原理的样品制备方法有效降低了基质干扰。

在优化的方法条件下, 所述微升流速分析实现了小鼠血浆中SILuLite 2 ng/mL的LLOQ定量能力(图4)。如表6所示, 所有样品的测定准确度为87-109%, CV %s低于15%。校准曲线覆盖了4.5个数量级(1-20000 ng/mL)(图5), 使用1/x2的权重计算回归系数( $r$ )为0.996。

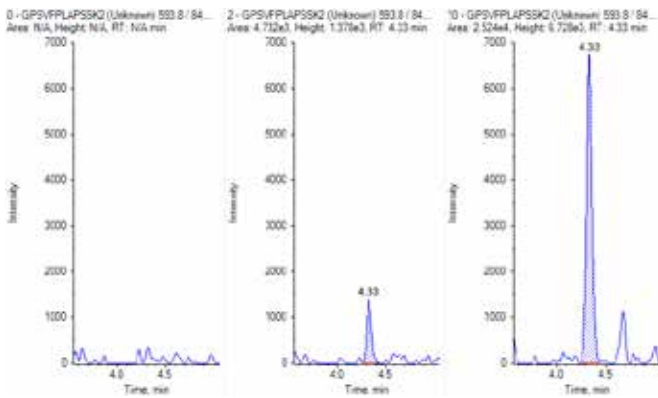


图4. SILuLite的MRM数据。SILuLite MRM的提取离子流图(XICs)。从左到右依次为空白, 2 ng/mL, 10 ng/mL。

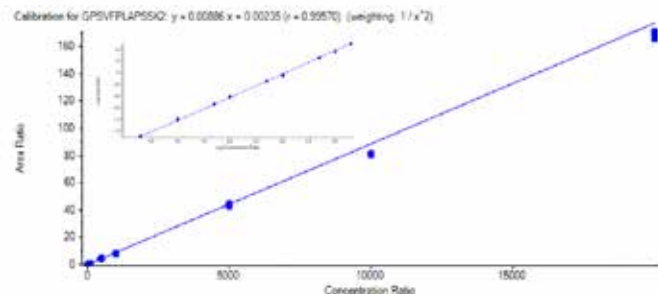


图5. 血浆中2 ng/mL到20000 ng/mL SILuLite校准曲线。

为了进一步确认微升流速分析和常规流速分析之间的灵敏度差异, 在相同进样量的情况下, 同时使用两套LC-MS系统分析了同一样品。如图6所示, 使用微升流速色谱, 低浓度样品峰面积增加3倍以上, S/N增加2倍以上。

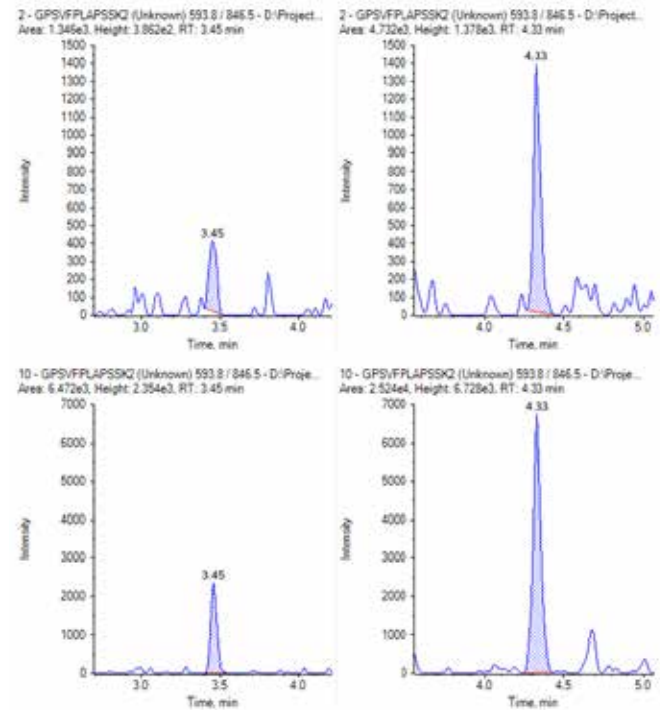


图6. 微升流速与常规流速信号比较。在2 ng/mL(上图)和10 ng/mL(下图)的浓度下, MRM提取离子流图(XICs)。左边是常规流速下的XICs, 右边是微升流速下的XICs。

## 结论

通用免疫亲和和微升流速液相色谱-质谱联用法, 建立了测定小鼠血浆中SILuLite含量的方法。采用QTRAP<sup>®</sup> 6500<sup>+</sup> LC-MS/MS系统, 配以OptiFlow<sup>™</sup> Turbo V离子源和M5 MicroLC系统, 以2 ng/mL的水平对SILuLite进行了定量分析, 具有高重现性、4个数量级的动态范围和最低的离子源优化要求。该方法可应用于其它生物治疗药物的临床前定量分析。

表6. 定量结果汇总。

Actual Conc. (ng/mL)	Calculated Conc. (ng/mL)	Accuracy (%)	CV (%)
2	1.94	96.8	6.1
10	11.5	114.5	7.5
50	52.3	104.7	2.3
100	108.6	108.6	3.5
500	508.2	101.6	1.0
1000	887.5	88.8	4.6
5000	4895.9	97.9	3.3
10000	9200.6	92.0	0.9
20000	19022.9	95.1	1.6

## 参考文献

1. Zhang F, Li Y., etc, Quantification of Trastuzumab in Rat Plasma using an Improved Immunoaffinity-LC-MS/MS Method, SCIEX Technical Note

## 致谢

SCIEX中国团队肖志良的翻译工作!

# MetabolitePilot™ 2.0 软件和 TripleTOF® 6600液质联用系统应用于抗体偶联药物（ADC）代谢物分析

MetabolitePilot™ 2.0 软件和SCIEX TripleTOF® 6600 液质联用系统

Ian Moore and Yuan-Qing Xia  
SCIEX, Concord, ON, Canada

## ADC代谢物研究的难点与挑战

- ADC代谢物研究必须考虑其可能存在的不同状态：药物、药物加linker及可能结合的氨基酸或肽
- 多种存在状态可能发生的潜在生物转化均需研究
- 如何在复杂生物基质中测定低浓度药物代谢物
- 如何一次对代谢物进行全面分析，提高效率，而不用反复进样分析
- 在高通量环境中，如何保证数据质量，同时进行定性定量分析

## MetabolitePilot™ 2.0 软件用于ADC代谢分析的特点

- 具有ADC代谢物分析的专业工作流程，可同时对ADC结合的药物，linker和抗体进行代谢物分析
- 多种功能峰提取策略可以利用一级质谱（MS）及二级质谱（MS<sup>2</sup>）同时进行目标及非目标相关药物代谢物分析
- 专业的ADC结构解析界面可以同时药物及多肽进行MS<sup>2</sup>碎片结构解析
- 内置Correlation功能可以对紫外及质谱数据检测到的代谢物，进行多样本不同时间，或者不同物种代谢物种类和含量进行相互比较分析

## 简介

抗体偶联药物(ADC) 可以将细胞毒性分子经过设计，靶向运输到疾病或者肿瘤细胞，在靶组织或者靶细胞内释放药物。ADC由3部分组成：特异性抗体，毒性小分子药物，及连接两者的linker。设计ADC的目的是最大程度的把药物运输到靶组



图1. SCIEX 代谢物分析解决方案。MetabolitePilot™ 2.0 软件，Exion AD LC- TripleTOF® 6600 液相色谱质谱联用系统。

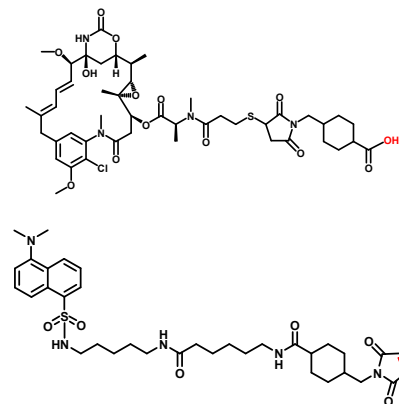


图2. 曲妥珠单抗（Trastuzumab emtansine, T-E）和 SigmaMab Antibody Drug Conjugate mimic (MSQC8) 结构，红色为mAb 链接位点。

织，减少在非目标组织的分布。目前FDA 已批准两个ADC用于治疗癌症，但ADC技术的研究工作已经发展到整个制药业及治疗领域，而不仅仅是癌症。

ADC常用的Linker分为两大类，Cleavable和Noncleavable。Cleavable linker不稳定，进入目标细胞后，被细胞内切酶或者化学环境变化（如pH）来释放毒性药物分子。Noncleavable linker不包含任何有效的药物释放机制，随着单抗在细胞外降解释放活性成分，这种活性成分是毒性药物与Linker结合物或者其降解释放时，从单抗上获得一个及多个氨基酸。

除了研究小分子药物从抗体的分离机制外，ADC研究的关键点是Cleavable和Noncleavable Linker释放的药物以何种形式存在，可能存在哪些代谢物。除了血浆或血清孵化，在体外用纯化的细胞组分（溶酶或S9）或纯化的酶温孵，常被用来识别药物从ADC释放机制及代谢分析。

ADC代谢及分解产物很多，同时必须考虑药物和Linker结合物可能结合的一个及多个氨基酸后可能存在的生物转化、分裂及降解。为解决这一难题，SCIEX在新版的MetabolitePilot™ 2.0软件中引入专业的ADC工作流程。本应用文章利用MetabolitePilot™ 2.0软件中的ADC工作流程，鉴定了两个Noncleavable Linker的ADC药物，经人肝溶酶体和S9孵化后，存在的代谢物。

## 实验

### 试剂

曲妥珠单抗（Trastuzumab emtansine, T-E）商业购买，SigmaMAb Antibody Drug Conjugate mimic (MSQC8) 由Sigma-Aldrich提供，人肝溶酶体（Human liver lysosomes, HLL），S9 Fraction及代谢缓冲液由Xenotech提供。

### 样品制备：孵育

ADC与HLL (0.25 mg/mL) 或S9 Fraction (1 mg/mL)温孵，ADC浓度为50 µg/mL。空白样品制备方式为两种，一种为加ADC不加HLL或S9，另一种为加HLL或S9不加ADC。总反应液体积为200 µL，其中含水70 µL，20 µL代谢缓冲液，100 µL HLL或S9，10 µL分析物储备液。

分别在1h, 2h, 4h, 26h取50 µL溶液用于样品处理，加入250 µL冰乙腈，离心15min (14 x g)，取上清，37°C真空浓缩至干，用50 µL含5%流动相B的溶液复溶，进行分析。

### 质谱数据采集

数据采集使用SCIEX TripleTOF® 6600系统，SWATH®模

式。TOF MS扫描质荷比范围m/z 300到2000，MS/MS数据采集使用25个SWATH®可变窗口，质荷比范围集中在药物加Linker及可能结合的氨基酸。在母体结合物分子量附近有5个13Da的采集窗口(T-E m/z1103, MSQC8 m/z789)，窗口逐渐变大到50, 100, 200覆盖50-2000Da质荷比范围。碰撞能量CE 40，碰撞能量范围±15。SWATH®方法总扫描时间850ms。

### 色谱条件

液相色谱系统SCIEX Exion AD，色谱柱Phenomenex Aeris C18 Peptide (2.0 x 150 mm), 1.7 µm。流动相A: 0.1%甲酸水，流动相B: 0.1%甲酸乙腈，线性梯度洗脱，起始5%B，26min内逐渐升到80%B。

### 数据处理

MetabolitePilot™ 2.0软件建立ADC药物T-E和MSQC8的专业处理方法。第一步，加载药物及Linker结构式，标记氨基酸结合位点，选择共轭类型，导入氨基酸序列。第二步，设置可能与药物结合的抗体蛋白或肽段碎片的大小，两个非特异性裂解肽键加上二硫键可能会链接5个氨基酸。最后选择生物转化途径及药物碎裂后可能发生的代谢反应。由于HLL与S9的温孵体系pH控制在5，药物加Linker生物转化途径主要有脱水，去甲基，水解。

反应是体外试验，不考虑母体的I相及II相代谢反应。DM1+MCC二级质谱图作为对照谱图，指定特征子离子与中性丢失。MSQC8药物不设置对照谱图。

两个ADC药物TOF MS峰查找策略采用预测代谢物与未知峰查找算法，TOF MSMS峰查找算法适用于有对照谱图的T-E，设置2个特征碎片离子(485.22, 547.22)，1个中性丢失，同时高级MS/MS过滤窗口设置为1。检索代谢物的色谱保留时间窗口为3到29min，仅提取样品响应比空白高3倍的色谱峰，代谢物最多带3个电荷。

### 结果

在MetabolitePilot™ 2.0建立批处理分析序列，使用上面描述的数据处理参数，同时处理HLL及S9各个时间点温孵样品采集的SWATH®数据及两种方法处理的空白样品。MetabolitePilot™ 2.0可以同时处理200个样品，较之前的30个效率有很大提高，同时在整个分析批完成之前，可以在结果界面查看已经处理好结果文件。



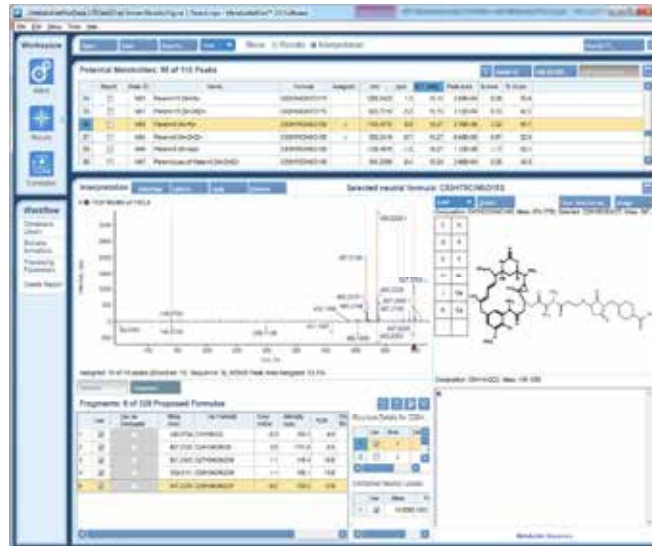


图3. MetabolitePilot™ 2.0软件代谢物鉴定结果界面，图为T-E人肝溶酶体代谢物温孵代谢产物。从图中可以看出，药物加Linker加赖氨酸有1对非对映异构体，提取离子流图保留时间在15.01min与15.27min，药物加Linker的结构显示在左边，结合的氨基酸显示在下边，代谢物对应的一级质谱与二级质谱显示在右边。

图4. MetabolitePilot™ 2.0 软件结构解析界面，图为T-E人肝溶酶体代谢物温孵代谢产物。预测代谢物结构药物加Linker加赖氨酸与实测二级谱匹配，进行二级碎片结构解析，计算匹配度，小分子药物结合物与mAb序列分别在两个窗口显示。

T-E HLL 26h温孵液在3min-29min检测到59个潜在代谢物，由于T-E含有Non-cleavable Linker，释放的药物组成为DM1-MCC加上一个赖氨酸残基，查看MetabolitePilot™ 2.0结果文件发现其存在1对非对映异构体，保留时间分别在15.01min与15.27min（图3），单电荷([M+H]<sup>+</sup> m/z 1103.4763)，双电荷([M+2H]<sup>2+</sup> m/z 552.2145)，还有[M+Na]<sup>+</sup> (m/z 1125.4573)同时存在，质量精度高，质量偏差均小于±2ppm。

结构解析窗口可以结合实测二级谱图进一步确认鉴定到的代谢物（见图4）。第一步，预测代谢物结构药物加Linker会被加载到结构界面，预测肽段序列会被加载到序列界面，共轭的残基被标记。第二步，软件会自动将预测代谢物二级谱图与参比二级谱图比对，计算存在几个相同的特征性。

碎片与中性丢失。单电荷DM1-MCC加上一个赖氨酸残基代谢物与对照谱图相比，存在4个相同的二级碎片离子（标记为橙色），m/z 140.0701、m/z 467.2086、m/z 485.2209、m/z 547.2208 质量偏差±4.0 mDa，其中3个可以与结构匹配，点击质荷比即可看到粗体显示的对应该碎片结构。

在26h温孵样品中，采用类似的工作流程，可以发现与确认其他药物代谢物与抗体序列。鉴定到其余4个代谢物为DM1-MCC结合二个氨基酸序列，至少有2个相同子离子碎片，同时

Table 1. T-E HLL及S9温孵液鉴定到药物加Linker代谢物列表。

代谢物	RT 1	RT 2
Parent	17.6	
Parent+YK	15.17	15.40
Parent+K	15.01	15.27
Parent+KV	15.1	15.4
Parent+KS	15.0	15.3
Parent+KA	14.8	15.1

存在1对非对映异构体，鉴定到代谢物列表见表1。样品中未发现结合二个氨基酸序列的代谢物，原因可能是由于样品前处理采用有机溶剂沉淀。

MetabolitePilot™ 2.0 软件Correlation界面可以展示代谢物在不同时间点及不同温孵条件的变化，图示可以使用x, y坐标，柱状图或者表格。在Correlation界面，选定代谢物的提取离子流图（XIC），TOF MS及TOF MS/MS质谱图均可以重叠显示。图5展示了HLL温孵体系产生的代谢物，药物加Linker加赖氨酸在不同时间点含量的变化，该代谢物在2h, 4h均能检测到，1h未看到。2h到4h该代谢物峰面积(保留时间15.01min及15.27min)增加了4倍，4h到26h增加了5倍。

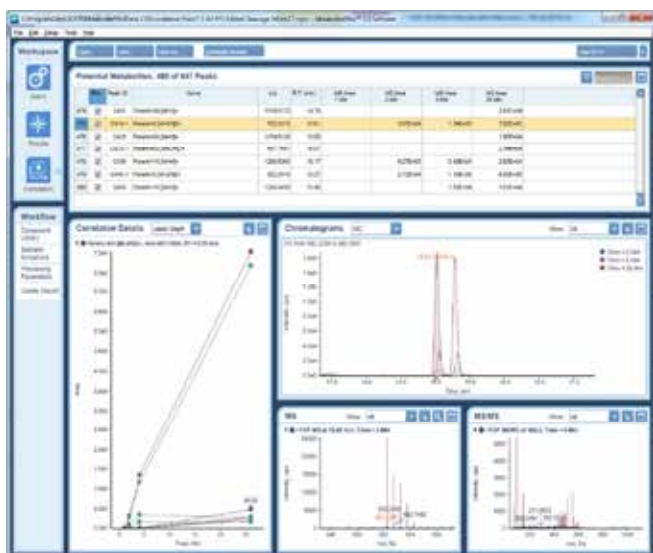


图5. MetabolitePilot™ 2.0 软件Correlation界面可以展示T-E在HLL温孵体系产生的代谢物（药物加Linker加赖氨酸）在不同时间点含量的变化。Correlation界面可以重叠看代谢物的XIC，MS及MS/MS变化，包括丰度高的代谢物药物+Linker+赖氨酸及药物+Linker+含赖氨酸的二肽碎片。

在S9温孵体系中观察到同样的结果。二肽序列代谢物代谢物从4h到26h，并未变化这么明显。究其原因是由于T-E中药物的释放是一个复杂的过程，涉及DAR从0-8的变化，同时不同的DAR值均会结合赖氨酸残基。

MSQC8是半胱氨酸链接的ADC，但它不是治疗分子，而是一个模拟ADC。由于没有可用的丹酰氯+Linker的MS/MS二级谱图，所以代谢物查找策略采用预测代谢物与未知峰查找。在3min到25min共找到119个潜在代谢物，质量偏差±5.0 ppm。MSQC8也是Non-cleavable Linker，释放的结构是丹酰氯+Linker+半胱氨酸，可以同时带单电荷与双电荷，保留时间在14.92min，单峰。在结构解析界面（图6）可以将预测结构与实测二级谱图关联，解析MS/MS对应碎片的结构，这对没有对照谱图的化合物鉴定非常关键。四个主要的MS/MS匹配到合理的碎片，偏差< ±2.0 mDa，其中三个碎片含有丹酰氯环。

在一系列潜在代谢物列表中，发现药物+linker+半胱氨酸去甲基代谢物，通过TOF MS鉴定保留时间在13.05min。在结构解析界面将TOF MS/MS与该代谢物结构关联，进行结构解析与匹配，通过比对发现，3个主要碎片离子均与药物+linker+半胱氨酸对应质荷比差14 Da，通过解析发现为萘环相连的二甲氨基脱甲基代谢物(图7)。



图6. MetabolitePilot™ 2.0 软件结构解析界面，展示MSQC8人肝溶酶体温孵代谢物药物+linker+半胱氨酸结构解析结果，3个碎片m/z 449.2599, m/z 432.2329 及m/z 336.1750均含有丹酰氯基团。

表2. MSQC8 HLL及S9温孵液释放代谢物药物+linker+半胱氨酸与质荷比差14的去甲基代谢物一级二级质谱比对。

代谢物	释放代谢物	脱甲基代谢物
TOF MS	789.3662	775.3502
TOF MS/MS 1	449.2599	435.2390
TOF MS/MS 2	432.2329	418.2311
TOF MS/MS 3	336.1750	322.1596

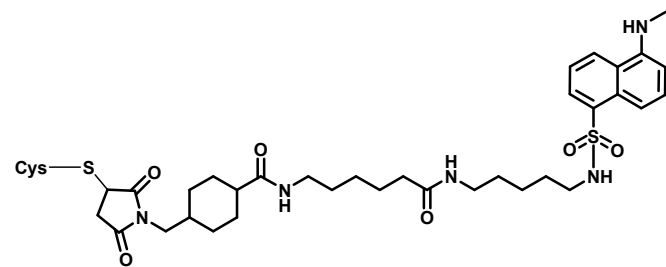


图7. MSQC8去甲基代谢物。

在Correlation界面观察这两个代谢物的在所有时间点与样本中的变化。药物+linker+半胱氨酸在HLL及S9温孵体系中各个时间点均有，同时随着时间的增加含量逐渐升高。去甲基药物+linker+半胱氨酸代谢物，仅在HLL及S9温孵体系4h，26h时间点测定到。

## 结论

SCIEX TripleTOF® 6600 系统结合MetabolitePilot™ 2.0 软件是ADC代谢物分析的专业解决方案，可以结合SWATH®数据采集方法，综合多种峰发现策略，快速准确地发现并鉴定代谢物。MetabolitePilot™ 2.0软件具有ADC代谢物分析的专门工作流程，可同时对ADC结合的药物，Linker和抗体进行代谢物分析。MetabolitePilot™ 2.0软件多种功能峰提取策略可以利用一级质谱（MS）及二级质谱（MS<sup>2</sup>）同时进行目标及非目标相关药物代谢物分析，确保科研工作者全面分析ADC代谢物。

## 致谢

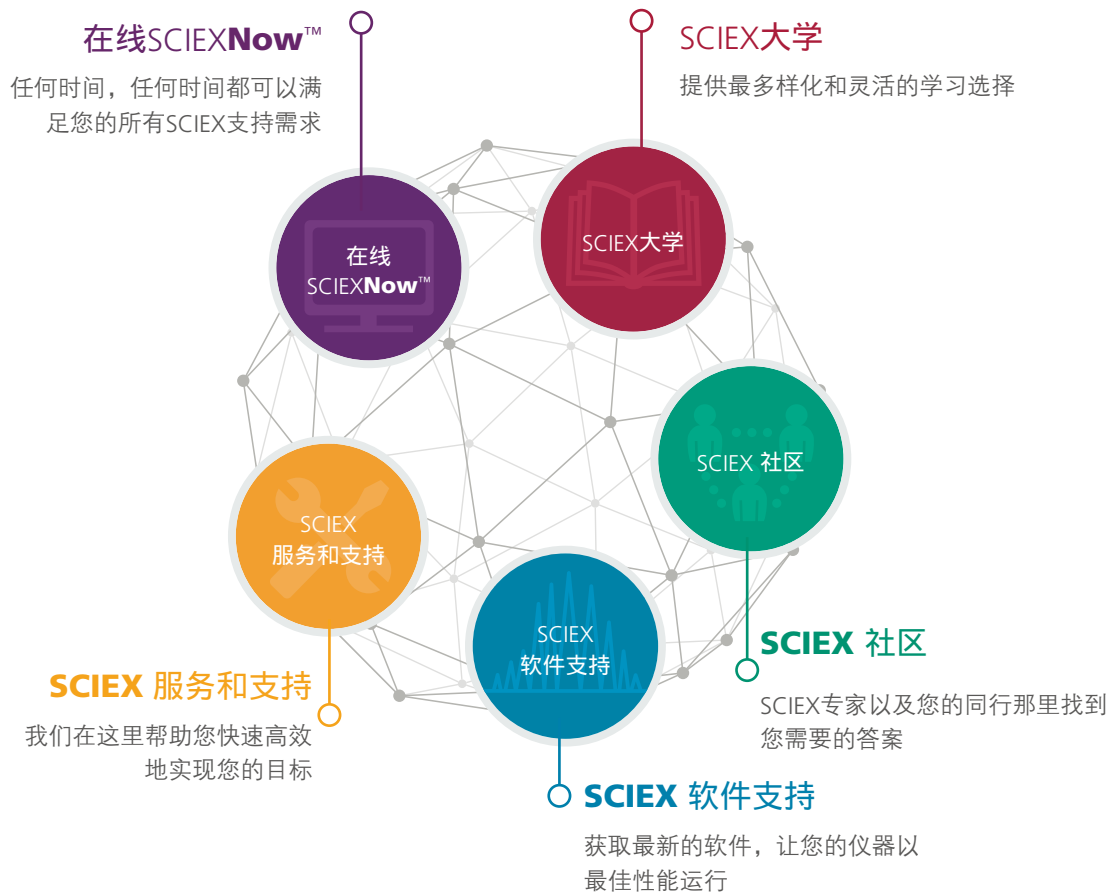
Chris Bohl 对Xenotech 分析的讨论与建议。

SCIEX中国应用支持团队徐晓燕的翻译工作！

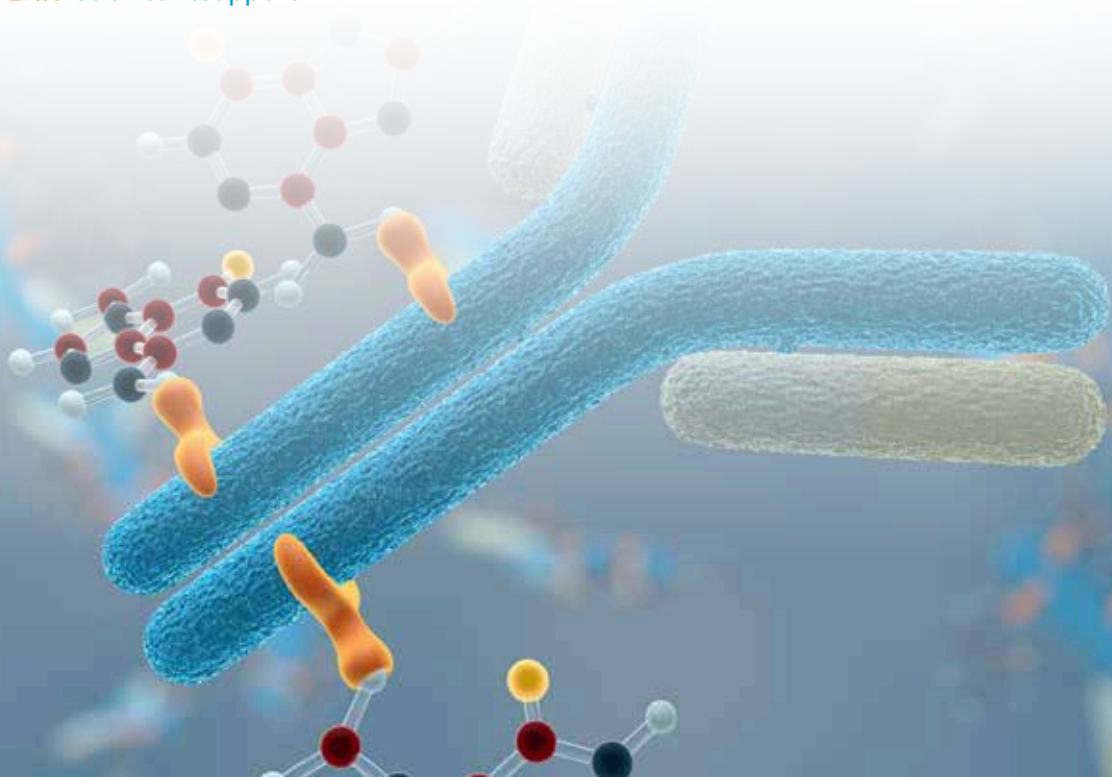
# 连接你的成功之路

了解SCIEX成功网络

加快并简化你的答案路径



立即开始您的成功之路：[sciex.com/support](http://sciex.com/support)





# 360度创新助力生物药研究



SCIEIX  
官方微信



SCIEIX  
客户服务



SCIEIX  
毛细管电泳

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEIX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEIX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9828-ZH-A



## SCIEIX 中国公司

北京分公司  
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808 1388  
传真：010-5808 1390

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419 7200  
传真：021-2419 7333

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

网址：www.scieix.com.cn

微博：@SCIEIX