

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，然后将实际观测到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的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。

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。

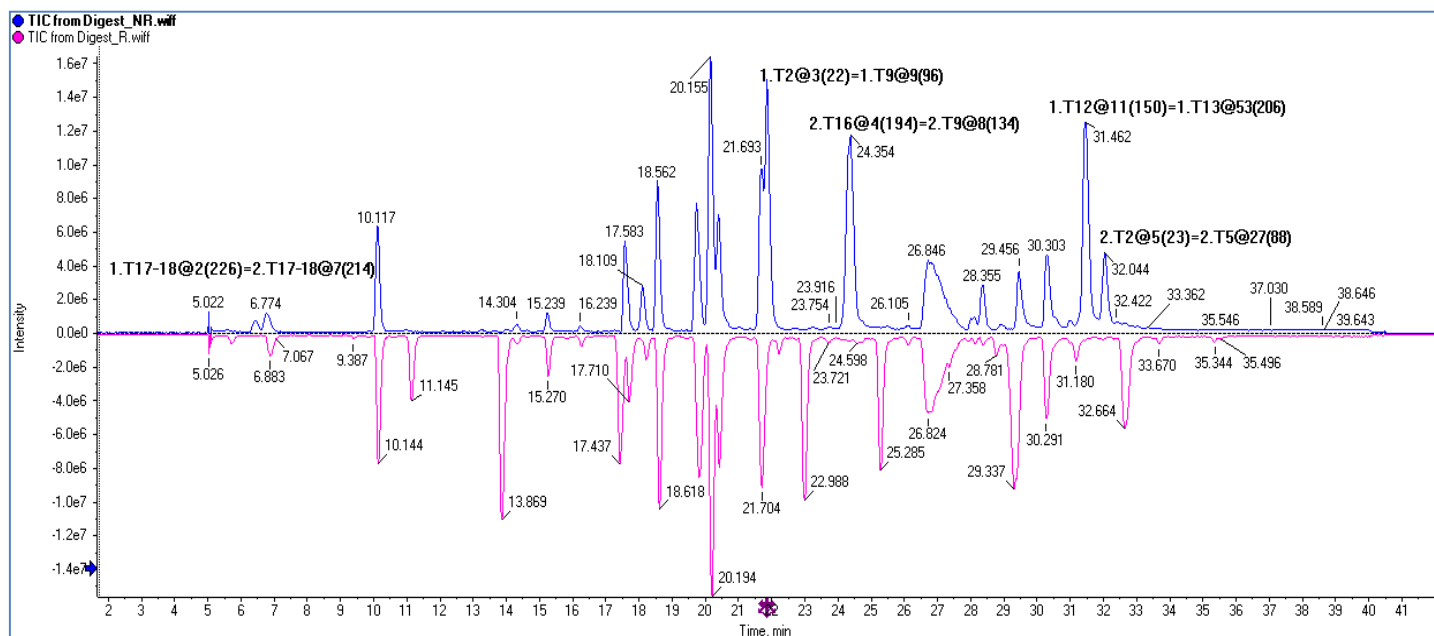


图1. 单抗还原（红色）和非还原（蓝色）状态下肽图对比，非还原肽图中多出来的峰即为含二硫键的肽段。

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2-4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。

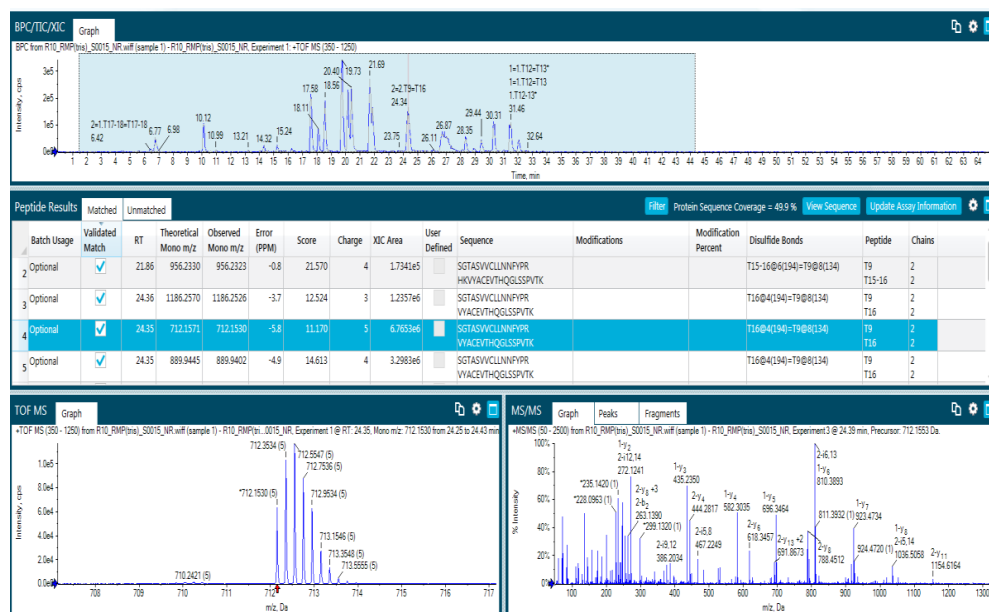


图2. 轻链链内C134-C194二硫键的鉴定结果，第一栏展示的是对应肽段的一级提取离子色谱图，第二栏展示的是C134-C194二硫键通过软件确认的4个电荷态以及二级的得分，第三栏展示的是对应二硫键肽段的一级和二级质谱图。

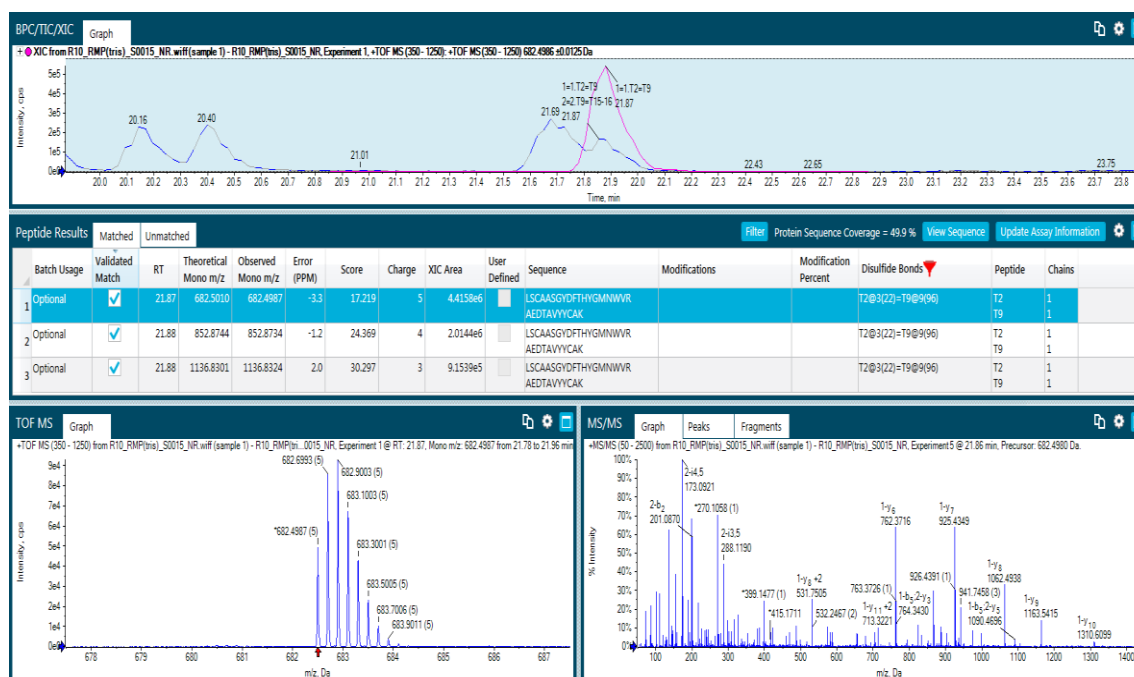


图3. 重链链内C22-C96二硫键的鉴定结果，第一栏展示的是对应肽段的一级提取离子色谱图，第二栏展示的是C22-C96二硫键通过软件确认的3个电荷态以及二级的得分，第三栏展示的是对应二硫键肽段的一级和二级质谱图。



图4. 轻链和重链链间C214-C226二硫键的鉴定结果，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C214-C226二硫键通过软件确认的2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。

BiopharmaView™软件通过一级的质量精度和二级谱图的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。

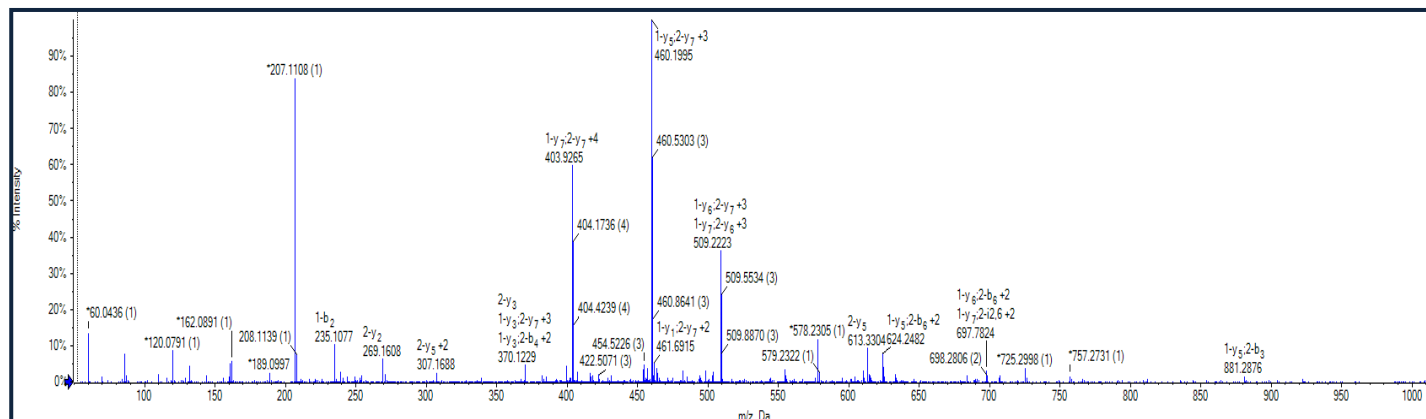


图5. 轻链和重链链间C214-C226二硫键二级碎片的归属，通过b,y离子能确认肽段的序列以及二硫键的连接位点。

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。

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

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-3213-ZH-A



SCIEX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

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

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

网址：www.sciex.com.cn

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

微博：@SCIEX