

# 超高分辨质谱和 iCIEF 用于依那西普类融合蛋白的序列覆盖度和翻译后修饰表征

龙珍<sup>a</sup> 祝翔<sup>a</sup> Tong Chen<sup>b</sup>

赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京100080, 中国

Advanced electrophoresis solutions LTD., Cambridge, Ontario, Canada

关键词: 依那西普类似物; Orbitrap; 电荷异构体; 翻译后修饰; iCIEF

## 1.引言

依那西普(商品名: Enbrel)是1998年美国FDA批准的一种人源化TNF- $\alpha$ 受体与IgG1 Fc端的融合形成的治疗性蛋白,用于治疗风湿关节炎(RA)和强直性脊柱炎(AS)。Enbrel成功后,大量依那西普类似物开始研制并商品化。

与原研药结构的一致性生物类似药质量评价的关键属性,如表1所示<sup>[1]</sup>。但依那西普复杂的结构,为质量评价带来极大的挑战。虽然依那西普只有IgG1单抗分子量的三分之二(100 kD),但具有26对二硫键、3个N糖基化位点和13个O糖基化位点<sup>[2]</sup>。糖基化位点的增加,尤其是糖链中唾液酸化的增加,增强了蛋白的电荷异质性和表征难度。本文以Orbitrap质量分析器为基础解析依那西普类似物的氨基酸序列覆盖度和翻译后修饰,并将翻译后修饰结果与iCIEF<sup>[3]</sup>结果结合,为依那西普类似物的质量研究提供思路。

表1 依那西普原研药物和仿制药的关键质量属性

| 检测项目                  | 检测内容               | 检测方法   |
|-----------------------|--------------------|--|
| 鉴别                    | 分子量、氨基酸序列、二硫键等     | LC-MS等   |
| 纯度及异质性分析              | 体积异构体、电荷异构体、翻译后修饰等 | LC-MS, SDS-PAGE、IEX (MS)、CE-SDS、iCIEF (MS)、CIEF (MS) 等 |
| 糖基化修饰分析               | N糖肽、O糖肽、糖链等        | LC-MS等   |
| 目标蛋白与响应受体或配体的结合活性分析   | / <sup>a</sup>     | / <sup>a</sup>   |
| 抗体Fc依那西普与不同Fc受体结合活性分析 | / <sup>a</sup>     | / <sup>a</sup>   |
| 工艺相关残留物质检测            | HCP等               | 试剂盒、LC-MS等   |
| 生物学活性测定               | / <sup>a</sup>     | / <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup>:生物分析方法

## 2. 实验部分

### 2.1 前处理

#### 2.1.1 肽谱分析

取100 µg依那西普样品于1.5 mL离心管中，用同等体积RapiGest™ 混匀后于60 °C变性15 min。在上述样品中加入10 µL 浓度为500 mM的二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)于60 °C反应1 h，然后将样品冷却至室温。在上述样品中加入10 µL 浓度为1 M的碘代乙酰胺(Iodoacetamide, IAM)在室温、避光反应30 min。取出样品，21,000 g离心10 min后，加入100 µL浓度为50 mM的碳酸氢铵溶液和4 µg胰蛋白酶(Trypsin)，于37 °C过夜反应后加1%甲酸(FA)终止酶解。21,000 g离心10 min上述样品，取滤过液做LC-MS分析。

#### 2.1.2 iCIEF分析

10 µL依那西普样品，pI 为7.9的 marker溶液 5 µL，1%甲基纤维素35 µL，AESlyte UH3-10两性电解质4 µL，水补齐到100 µL。

### 2.2 仪器及试剂

质谱仪器：Orbitrap Exploris 240 (赛默飞世尔科技，美国)；

色谱仪器：Vanquish Flex液相色谱系统 (赛默飞世尔科技，美国)；

iCIEF仪器：CEInfinite全柱成像等电聚焦电泳仪 (AES, 加拿大)

色谱柱：C18 (2.1 x 150 mm, 1.7 µm)

MabPacRP (2.1 x 50 mm, 4 µm)

#### •分析参数

##### 1) 液相条件

流动相：A: 0.1% FA-水； B: 0.1% FA-乙腈；分析流速：0.2 mL/min；进样体积：20 µL。梯度：0-3 min 3%B，3-85 min 3%-32%B，85-90 min 32%-90%B，90-95 min 90%B，95-95.1 min 90%-3%B，95.1-100 min 3%B。

##### 2) 质谱条件

检测模式：ESI+，喷雾电压：3.8 kV；毛细管温度：320 °C；蒸发温度：350 °C；鞘气：35；辅助气：10；分辨率：一级60,000@m/z 200；二级15,000@m/z 200；母离子扫描范围：m/z 350-200；AGC：一级300%；二级100%；(n)CE:30%。

##### 3) iCIEF条件

1 min 1000 V；1 min 2000 V；10 min 3000 V。进样体积：17 µL。81号位pre-condition，20 µL。81号位样品为0.35%MC和4 M尿素的水溶液。

## 3. 结果与讨论

仅胰蛋白酶酶解结果即可实现三种依那西普类蛋白氨基酸序列的100%覆盖（图1），说明目标蛋白可被完整表达。

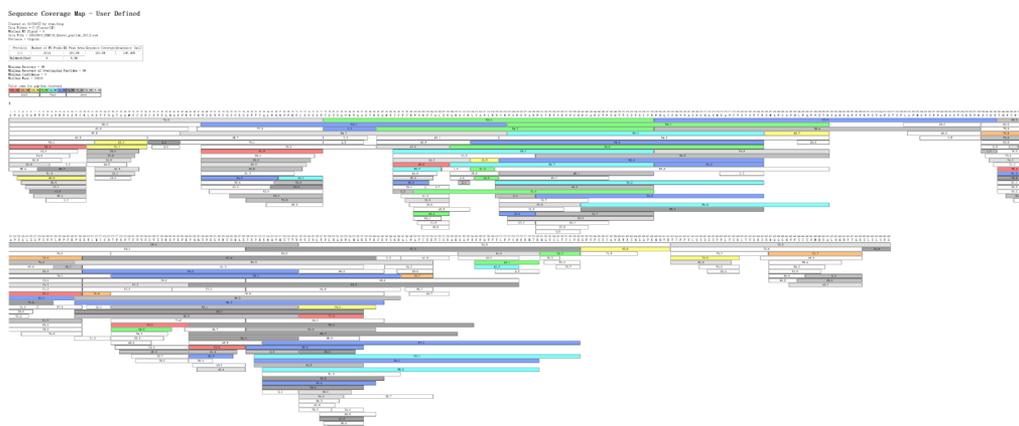


图1 依那西普胰蛋白酶酶解所得蛋白序列覆盖度

依那西普类融合蛋白的翻译后修饰主要包括脱酰胺、氧化、异构化和糖基化等。其中，脱酰胺如表1所示。三种依那西普中的位点Q29、Q63、Q82和N335脱酰胺比例均超过10%。与依那西普2和3相比，依那西普1脱酰胺的位点以及比例更多，脱酰胺比例超过10%的位点共8个。

表1 脱酰胺位点和脱酰胺修饰比例

| 依那西普1 |        | 依那西普2 |        | 依那西普3 |        |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 |
| Q4    | 10.34  | Q4    | 7.16   | Q4    | 7.64   |
| Q29   | 17.04  | Q29   | 12.86  | Q29   | 12.82  |
| Q63   | 22.11  | Q63   | 16.13  | Q63   | 18.99  |
| N66   | 6.85   | N66   | 4.52   | Q82   | 28.46  |
| Q82   | 35.83  | Q82   | 27.29  | Q86   | 4.18   |
| N296  | 3.77   | Q86   | 4.14   | N296  | 2.85   |
| N306  | 1.62   | N296  | 2.79   | N306  | 1.38   |
| N317  | 0.32   | N306  | 1.60   | Q331  | 4.04   |
| Q331  | 5.55   | N317  | 0.34   | N335  | 9.06   |
| N335  | 12.92  | N335  | 13.93  | N381  | 10.00  |
| N381  | 7.57   | N381  | 6.80   | N404  | 9.51   |
| Q382  | 4.97   | Q382  | 3.76   | Q438  | 4.05   |
| N404  | 2.76   | N404  | 2.40   | Q439  | 8.09   |
| Q406  | 10.18  | Q406  | 9.09   | N454  | 7.90   |
| Q439  | 11.29  | Q438  | 3.69   |       |        |
| N454  | 11.07  | Q439  | 8.11   |       |        |
|       |        | N454  | 8.53   |       |        |

三种依那西普类似物的氧化和异构化位点和比例均不高（表2和表3所示）。

表2 异构化位点和修饰比例

| 依那西普1 |        | 依那西普2 |        | 依那西普3 |        |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 |
| D50   | 5.67   | D50   | 6.26   | D50   | 1.71   |
| D285  | 0.07   | D285  | 0.05   | D175  | 2.20   |
| D300  | 2.16   | D300  | 2.18   | D300  | 2.05   |
| D332  | 0.18   | D332  | 0.15   | D332  | 0.12   |
| D421  | 1.19   | D421  | 1.02   | D421  | 1.18   |

表3 氧化位点和氧化修饰比例

| 依那西普1 |        | 依那西普2 |        | 依那西普3 |        |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 | 位点    | % 修饰比例 |
| M272  | 2.39   | M30   | 1.43   | M272  | 2.29   |
|       |        | W67   | 0.20   | M448  | 0.23   |
|       |        | M272  | 4.52   |       |        |
|       |        | M448  | 0.48   |       |        |

由于CpB酶的作用，抗体Fc端的K残基容易在生产的过程中丢失。虽然K丢失的程度对抗体的活性影响较小，但K丢失的比例差异对抗体的批次一致性影响较大。本文基于LC-MS肽谱研究三种依那西普类融合蛋白的K丢失情况（图2）。K丢失比例由公式1计算，K丢失比例% =  $\frac{\text{K丢失肽段峰面积之和}}{\text{C末端肽段峰面积之和}} \times 100\%$  (公式1)。依那西普1、2、3的K丢失比例依次为83.01%、60.7%和35.4%。该结果与iCIEF

结果一致。C末端K丢失比例越高，蛋白的酸性变异体信号越强，蛋白的碱性变异体信号越弱。按pI的不同，将依那西普类融合蛋白的iCIEF信号峰分四个区域（Group1-4），如图3所示。其中Group1酸性最强，Group4碱性最强。按Group4信号峰的个数和强度从多（强）到少（弱）排序，依次为依那西普3>依那西普2>依那西普1，与三种蛋白K丢失的比例趋势一致。

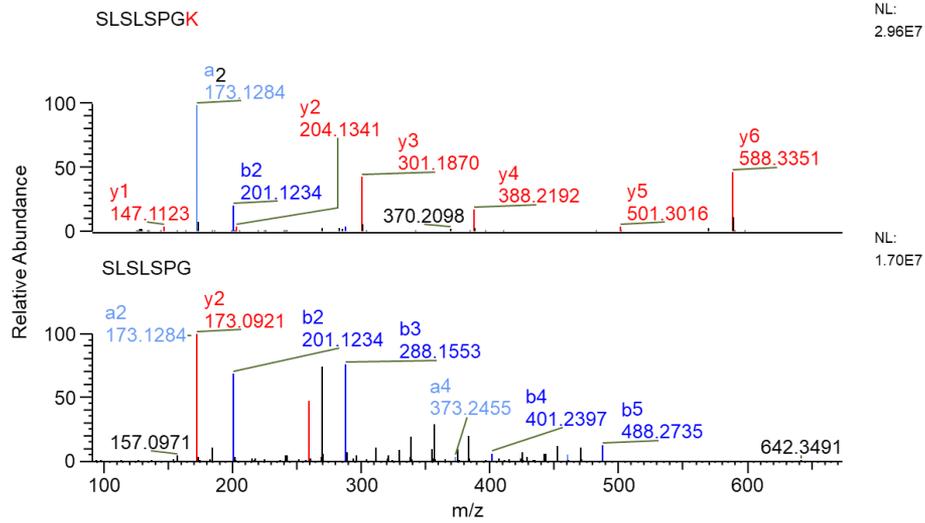
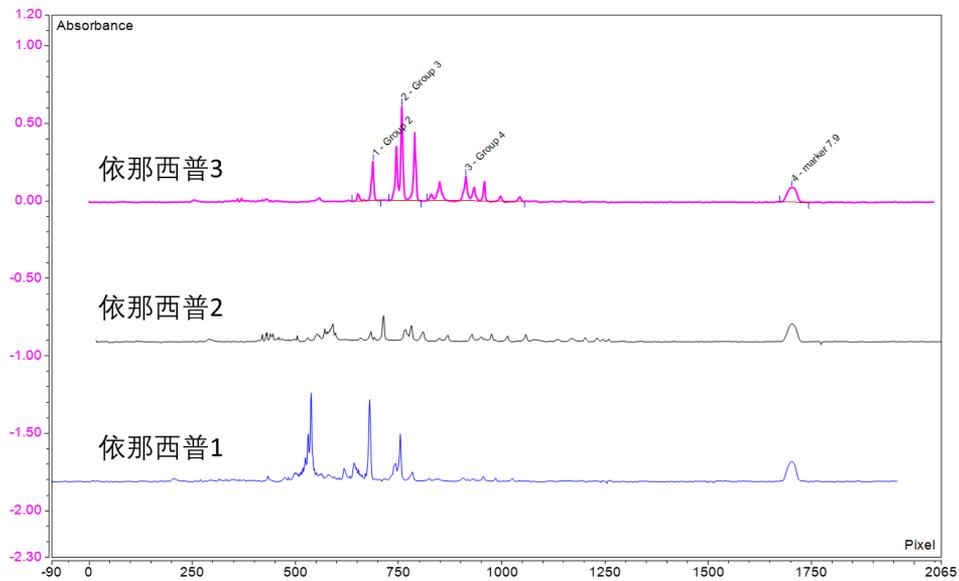


图2 依那西普类蛋白K未丢失（上）和K丢失（下）典型肽段二级质谱图。两条肽段y2离子的差异证明了K丢失的存在



| Group No. | 依那西普1 | 依那西普2 | 依那西普3 |
|-----------|-------|-------|-------|
| 1         | 45.55 | 38.02 | 2.21  |
| 2         | 29.47 | 13.75 | 12.29 |
| 3         | 19.25 | 19.72 | 56.20 |
| 4         | 5.74  | 28.51 | 29.29 |

图3 三种依那西普iCIEF谱图（上）和各区域峰面积百分比（下）。

糖基化是依那西普类融合蛋白典型的翻译后修饰。三种依那西普类融合蛋白典型的糖基化位点及其比例如表4所示。在HCD碎裂中，依那西普1和2的三种理论N糖基化位点全部检出，分别是N149、N171和N317。其中，N149和N171来源于人肿瘤坏死因子受体2（TNFR2），N317来源于IgG1的Fc端。三种蛋白的共同之处在于，N149糖基化位点均以唾液酸化的糖型为主（大于70%）。依那西普1中检测到N171多种糖链结构，其中唾液酸化的糖型比例高达12.3%。由于依那西普1的唾液酸化位点和比例更高，理论上会造成依那西普1酸性异构体高于依那西普2和3。iCIEF的结果证实了上述猜想。将依那西普融合蛋白的iCIEF信号峰分四个区域（Group1-4）并用变色龙积分，如图3所示。由于依那西普1具有更多的唾液酸化糖型和高比例脱酰胺位点，依那西普1的Group1比例高于依那西普2和3。依那西普1、2和3的Group1峰面积百分比依次为45.55%，38.02%和2.21%。

13个理论O糖基化位点中，糖型类别比较多的3个位点T8、T200和S259在HCD碎裂中被检测出来。在这些位点中均可检测到唾液酸化的糖链结构，在一定程度上将造成依那西普的酸性变体。所有依那西普理论O糖基化位点，在以ETHcD为碎裂方式的检测中完全检出（Lumos）。由于Orbitrap的高灵敏度，一些含量较低的O糖肽也可被检出，如两个O糖基化位点相邻的糖肽（图4）。

表4 糖基化位点、修饰类型和修饰比例

| 依那西普1               |       | 依那西普2             |        | 依那西普3             |       |
|---------------------|-------|-------------------|--------|-------------------|-------|
| 修饰位点+类型             | 修饰比例% | 修饰位点+类型           | 修饰比例%  | 修饰位点+类型           | 修饰比例% |
| N149+A1S1F          | 15.11 | N149+A1S1F        | 23.61  | N149+A1S1M4F      | 70.44 |
| N149+A1S1M4F        | 55.32 | N149+A1S1M4F      | 63.35  | N149+A2G2         | 15.03 |
| N149+A2G2           | 11.39 | N149+A2G2         | 13.04  | N149+A2G2F        | 14.53 |
| N149+A2G2F          | 5.76  | N171+A3G2         | 100.00 | N317+A1G0         | 1.34  |
| N149+A2S1G1         | 12.30 | N317+A1G0         | 2.45   | N317+A1G0F        | 7.26  |
| N171+A3G2           | 56.84 | N317+A1G0F        | 5.89   | N317+A1G1F        | 2.68  |
| N171+A4G3           | 43.16 | N317+A1G1F        | 2.17   | N317+A2G0         | 4.32  |
| N317+A1G0F          | 8.11  | N317+A2G0         | 8.41   | N317+A2G0F        | 50.79 |
| N317+A1G1F          | 2.06  | N317+A2G0F        | 47.27  | N317+A2G1         | 0.56  |
| N317+A2G0           | 2.49  | N317+A2G1         | 1.63   | N317+A2G1F        | 22.72 |
| N317+A2G0F          | 45.79 | N317+A2G1F        | 22.28  | N317+A2G2F        | 2.92  |
| N317+A2G1           | 0.60  | N317+A2G2F        | 4.98   | N317+M3           | 1.42  |
| N317+A2G1F          | 31.00 | N317+A2S1G1F      | 0.53   | N317+M5           | 1.12  |
| N317+A2G2F          | 5.95  | N317+M4           | 0.46   | N317+M7           | 1.77  |
| N317+M4             | 0.55  | N317+M5           | 2.08   | N317+M8           | 0.88  |
| N317+M5             | 2.44  | N317+M8           | 0.54   |                   |       |
| ~T8+GalNAc-3G       | 3.06  | T8+GalNAc         | 0.21   | ~T8+GalNAc-3G     | 2.00  |
| ~T8+GalNAc-3SG      | 2.09  | ~T8+GalNAc-3G     | 3.82   | ~T8+GalNAc-3SG    | 1.73  |
| ~T8+GalNAc-6S-3SG   | 0.45  | ~T8+GalNAc-6S-3SG | 0.72   | ~T8+GalNAc-6S-3SG | 0.50  |
| ~T200+GalNAc-3G     | 35.35 | ~T17+GalNAc-3SG   | 3.31   | ~T200+GalNAc-3G   | 71.15 |
| ~T200+GalNAc-3SG    | 64.65 | ~S199+GalNAc-3G   | 67.36  | ~T200+GalNAc-3SG  | 28.85 |
| ~S259+GalNAc        | 0.15  | ~T200+GalNAc      | 3.49   | ~S259+GalNAc-3G   | 1.64  |
| ~S259+GalNAc-3G     | 2.85  | ~T200+GalNAc-3SG  | 57.37  | ~S259+GalNAc-3SG  | 0.82  |
| ~S259+GalNAc-3SG    | 1.87  | ~S259+GalNAc      | 0.33   | ~S226+GalNAc      | 3.18  |
| ~S259+GalNAc-6S-3SG | 0.26  | ~S259+GalNAc-3G   | 1.41   | ~S226+GalNAc-3G   | 56.17 |
| ~S226+GalNAc        | 17.56 | ~S259+GalNAc-3SG  | 0.74   | ~T243+GalNAc-3SG  | 93.90 |
| ~T243+GalNAc-3SG    | 94.86 | ~S226+GalNAc      | 0.18   |                   |       |
|                     |       | ~T233+GalNAc-3G   | 18.44  |                   |       |
|                     |       | ~T243+GalNAc-3SG  | 98.97  |                   |       |

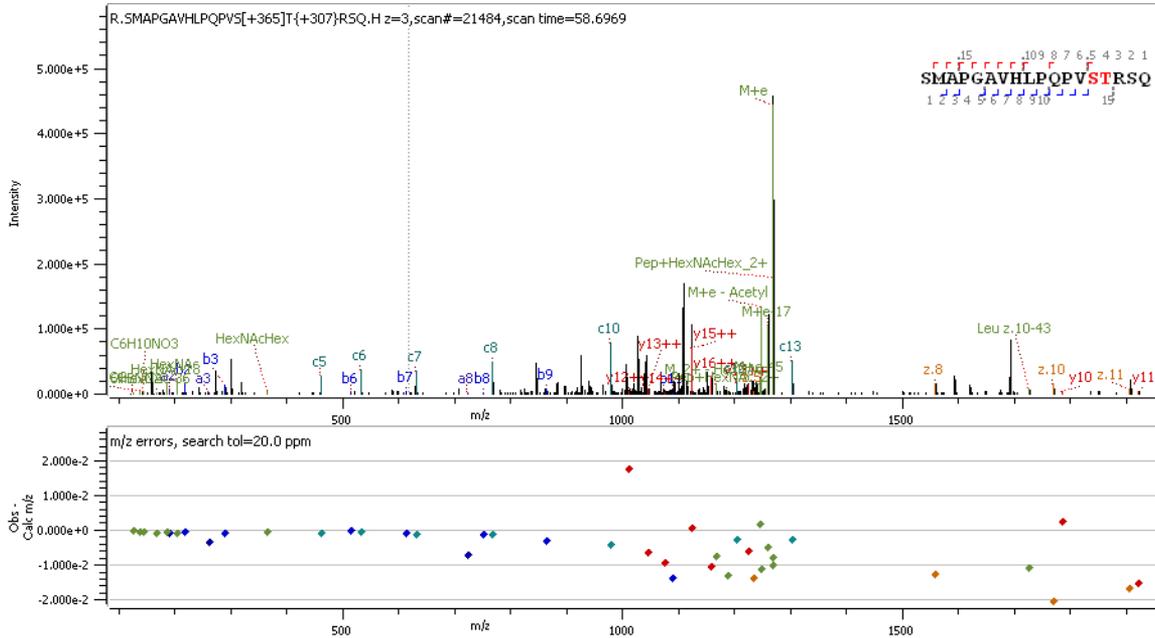


图4依那西普中两个O糖基化位点相邻的糖肽

结论

本文以Orbitrap系列超高分辨质谱和iCIEF为检测平台，表征依那西普类融合蛋白的序列覆盖度、翻译后修饰以及电荷异构体。由于Orbitrap的高灵敏度、高分辨率和高质量精度，仅胰蛋白酶酶解即可实现序列100%覆盖。质谱表征得到的翻译后修饰结果，如脱酰胺、K丢失和唾液酸化糖型比例结果与iCIEF结果吻合。依那西普1中脱酰胺位点和比例均高于依那西普2和3，此外唾液酸化的糖型比例也高于依那西普2和3，造成其Group1区域的峰面积比例高于依那西普2和3。依那西普1的K丢失比例显著高于依那西普2和3，造成依那西普1在Group4的峰面积比例低于依那西普2和3。由于K丢失比例低、脱酰胺比例和糖型唾液酸化比例低，依那西普3的信号峰主要集中在Group2和3区域。综上所述，LC-MS与iCIEF结果具有较好的一致性，可用于依那西普类蛋白的一致性分析。

参考文献

[1] 王军志, 生物技术药物研究开发和质量控制, 科学出版社, 第18章 (2018) pp670-671.

[2] L.-J. Huang, C.-W. Chiang, S.-L. Chen, S.-Y. Wei, S.-H. Chen, Complete mapping of disulfide linkages for etanercept products by multi-enzyme digestion coupled with LC-MS/MS using multi-fragmentations including CID and ETD, Journal of Food and Drug Analysis, 27 (2019) 531-541.

[3] T. Chen, T. Kwok, A.R. Esmine, V. Li, G. Rozing, T. Huang, High-Efficiency Preparative Imaged Capillary Isoelectric Focusing (iCIEF) and iCIEF-MS Protein Charge Variant Characterisation, interface, 7 (2021) 11.



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
www.thermofisher.com