

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^a 祝翔^a Tong Chen^b

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- α 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^[1]。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^[2]。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^[3]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	/ ^a	/ ^a
抗体Fc依那西普与不同Fc受体结合活性分析	/ ^a	/ ^a
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	/ ^a	/ ^a

^a:生物分析方法

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。

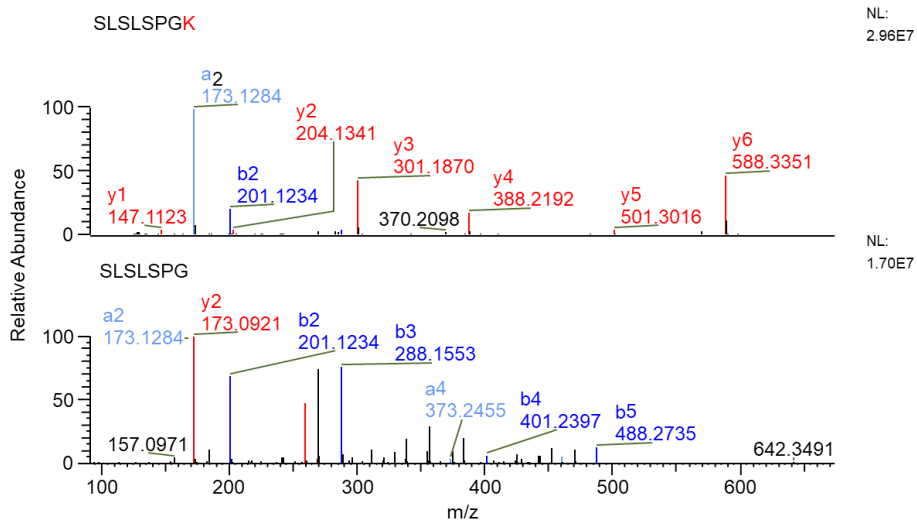
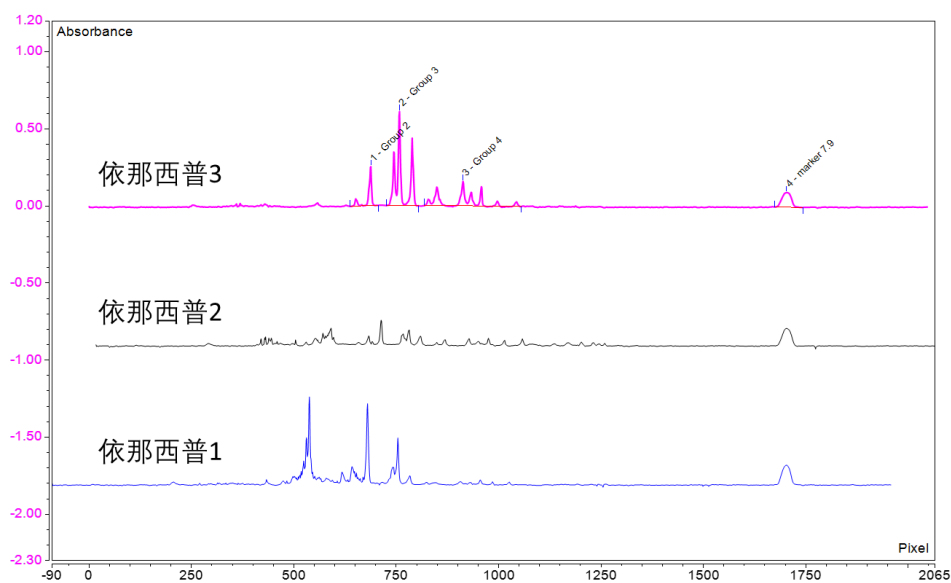


图2 依那西普类蛋白K未丢失（上）和K丢失（下）典型肽段二级质谱图。两条肽段y2离子的差异证明了K丢失的存在



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		

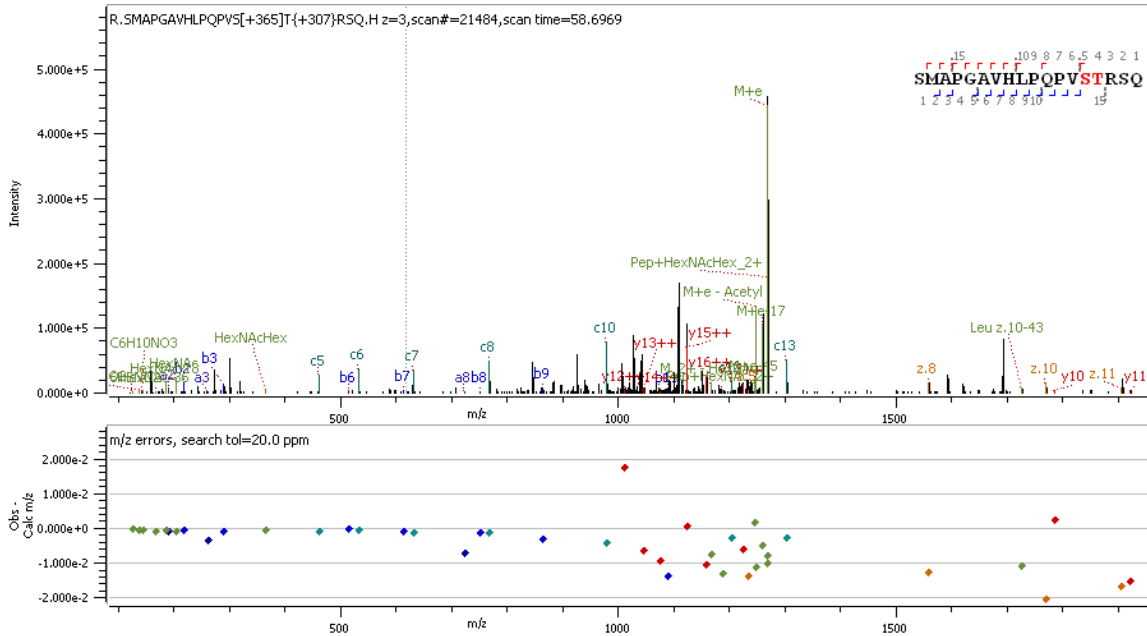


图4依那西普中两个O糖基化位点相邻的糖肽

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