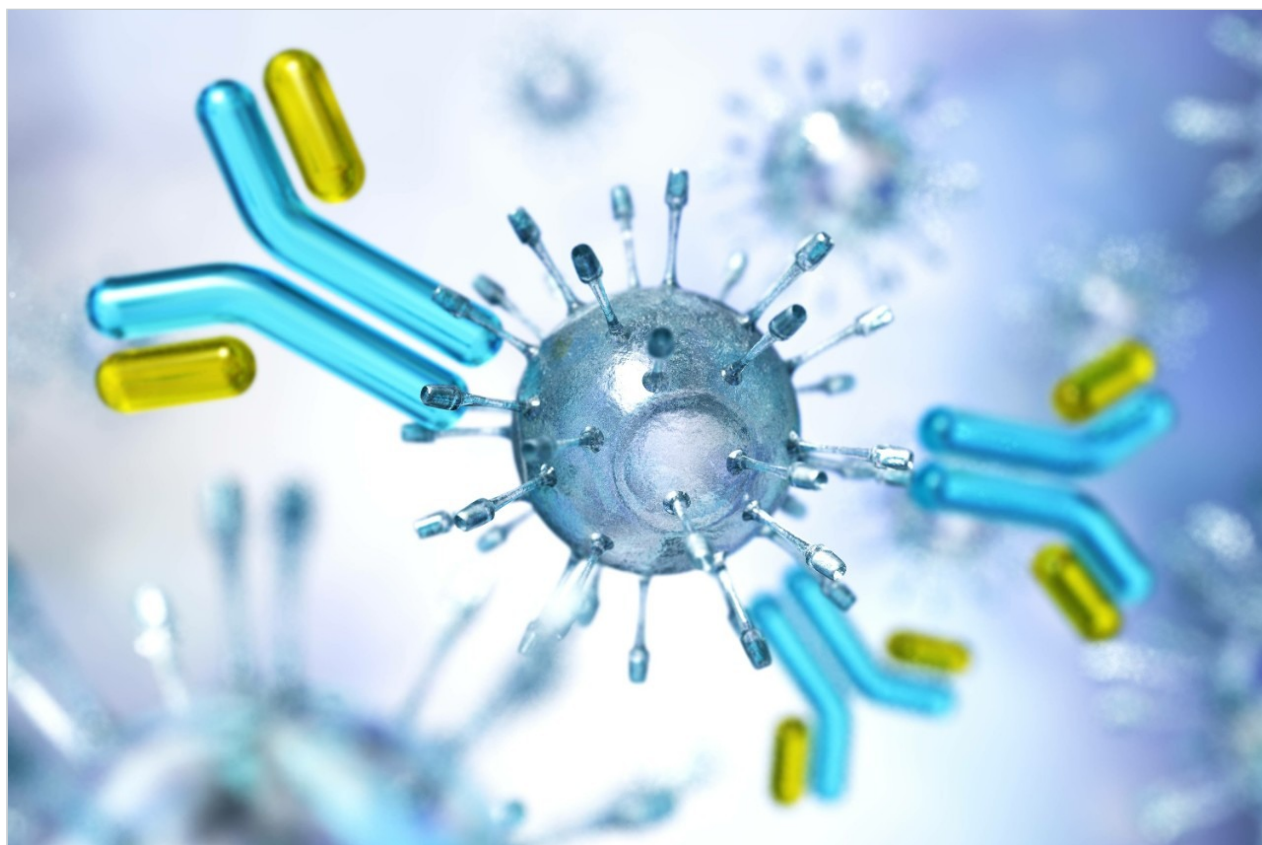


应用纪要

使用SYNAPT XS高分辨率质谱仪进行mAb 亚基分析

Henry Shion, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

SYNAPT XS是一款通用的高分辨率质谱仪，可灵活应用于生物药物的常规属性分析以及高级表征（例如，HDX、CIU及其他高级结构分析方法）。针对这些目的，SYNAPT XS有多种采集和碎裂模式，科学家可以利用这些模式实现其分析目标。

在分析单克隆抗体 (mAb) IdeS酶解亚基时，比较了在四种不同质量分辨率模式（灵敏度[Rs约12,500]、分辨率[25,000]、高分辨率[56,000]和增强分辨率[75,000]）下采集数据所得到的实验结果。本研究发现，使用MaxEnt1电荷态去卷积处理时，在所有分辨率模式下均得到高质量数据，获得了相似的低ppm质量精度和一致的相对产物变体丰度。此外，我们还证明BayesSpray²去卷积算法可以提高单同位素分辨质谱图（使用增强分辨率模式采集得到）的质量精度。

优势

- SYNAPT XS – 一款通用、灵活的质谱仪，适用于生物药物的常规分析和高级表征
- 在mAb亚基分析中使用MaxEnt1去卷积处理方法，鉴定的组分（例如，糖型）在所有分辨率模式下均获得相似的低ppm质量精度和一致的相对丰度
- 增强分辨率模式能够实现25 kD IdeS mAb亚基的单同位素分辨率，且BayesSpray去卷积处理可产生更高的质量精度，但需要采用更高的载样量

简介

SYNAPT XS是一种用于生物治疗药物表征的灵活工具，提供了多种采集模式、碎裂模式以及可选择的分辨率选项，用户可以选择这些选项来优化生物制药分析应用。SYNAPT XS平台的功能包括完整蛋白质质量数、天然MS¹、蛋白亚基、肽图分析、游离寡糖及寡核苷酸分析等常规分析。对于高级结构（即超越一级结构）的问题，例如HCP（宿主细胞蛋白），“自上而下”蛋白质碎裂、HDX（氢氘交换）和CIU（碰撞诱导去折叠）质谱分析是更先进的技术，这些技术都利用了SYNAPT XS的更高分辨率和离子淌度功能。

本研究比较了单克隆抗体(mAb) IdeS酶解亚基（约25 kD）分析在以下四种不同分辨率模式下采集的数据：灵敏度[Rs 12,500]、分辨率[25,000]、高分辨率[56,000]和增强分辨率[75,000]。结果发现，鉴定的组分在所有分辨率模式下生成的精确质量数数据拥有相当的质量精度（使用MaxEnt1进行去卷积处理）和相对丰度。此外，我们还证明BayesSpray去卷积算法可以提高单同位素分辨质谱图（使用最高分辨率模式 - 增强分辨率采集得到）的质量精度。

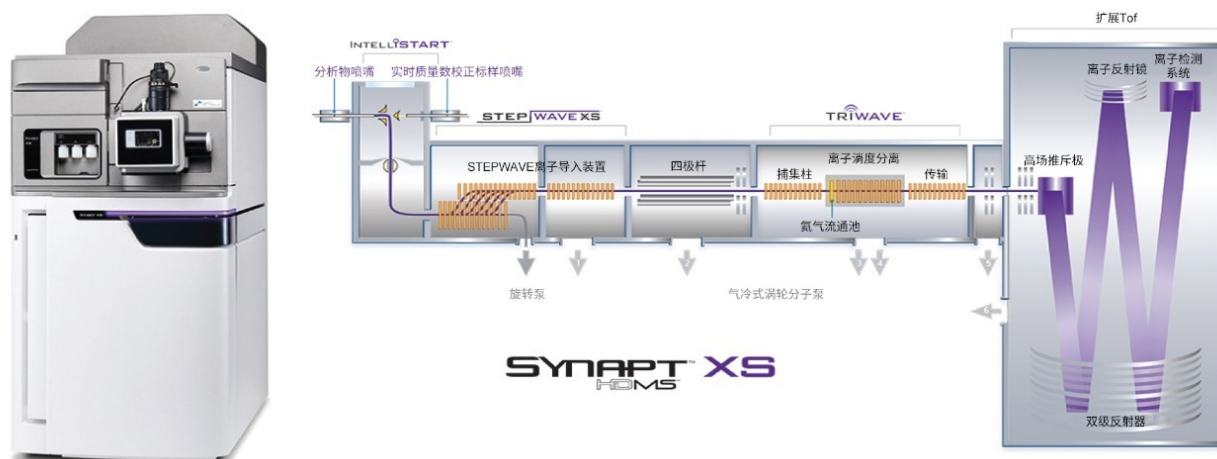


图1.SYNAPT XS系统（左图）和SYNAPT XS系统示意图（右图）

结果与讨论

质量分辨率对电荷去卷积亚基的影响

本研究报告了在SYNAPT XS系统上运行的单克隆抗体(mAb) IdeS酶解亚基的RP LC-MS分析。所用样品包括1种NISTmAb亚基标准品（沃特世部件号186008927 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>>）以及2种在IdeS酶解前经过强制降解（氧化）的曲妥珠单抗亚基。我们比较了四种不同的分辨率模式（灵敏度、分辨率、高分辨率和增强分辨率）下生成的数据中scFc（单链Fc）、LC（轻链）和Fd亚基的灵敏度、相对变体丰度和质量精度。此外还评价了使用BayesSpray去卷积算法处理增强分辨率模式下所得单同位素分辨数据的潜在优势。

配合SYNAPT XS QToF使用的入口液相色谱系统是ACQUITY UPLC I-Class PLUS。流动相为：(A) 0.1%甲酸(FA)的去离子水溶液和(B) 0.1% FA的乙腈溶液。流动相B的梯度为在10.5 min内从25%增至35%，每次进样的总运行时间为20 min。使用Waters BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 50 mm（部件号186008944 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186008944-bioresolve-rp-mabpolyphenyl-column-450a-27--m-21--mm-x-50--mm-1-p.html>>）进行亚基分离(80 °C)。每次进样的上样量为0.4 μg样品。SYNAPT XS在ESI正离子模式下运行，使用灵敏度、分辨率、高分辨率或增强分辨率模式。在所有分析中，将毛细管电压设置为2.0 kV，采样锥孔电压设置为50 V，离子源补偿电压设置为30 V。离子源温度和脱溶剂气温度分别保持在125 °C和400 °C。脱溶剂气流速为800 L/h，锥孔气流速为50 L/h，雾化气流速为6.5 Bar。该系统由MassLynx（4.1.2版）控制。在UNIFI完整蛋白质质量数数据处理工作流程中，使用

MaxEnt1和BayesSpray去卷积处理，将所有数据导入waters_connect (1.9.7)中，然后进行处理。

图2展示了NISTmAb IdeS酶解亚基标准品（沃特世部件号186008927 <

[https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html)

[standard.html](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html)>) 在灵敏度、分辨率、高分辨率和增强分辨率模式下采集数据所得到的TIC（总离子流）色

谱图。样品中scFc、轻链(LC)和Fd的三个主要亚基片段（约25 kD）分离良好，且保留时间一致。四种质量分辨率模式下得到的TIC响应各不相同，因为从较低分辨率模式转移为较高分辨率模式时，离子传输效率下降。

这是一个典型的观察结果，因为产生更窄的离子束和更长的TOF检测光程所需的光学器件会导致传输效率下降。

灵敏度模式下的响应约为分辨率模式下结果的2倍；高分辨率模式下结果的20倍；增强分辨率模式下结果的

约80倍。

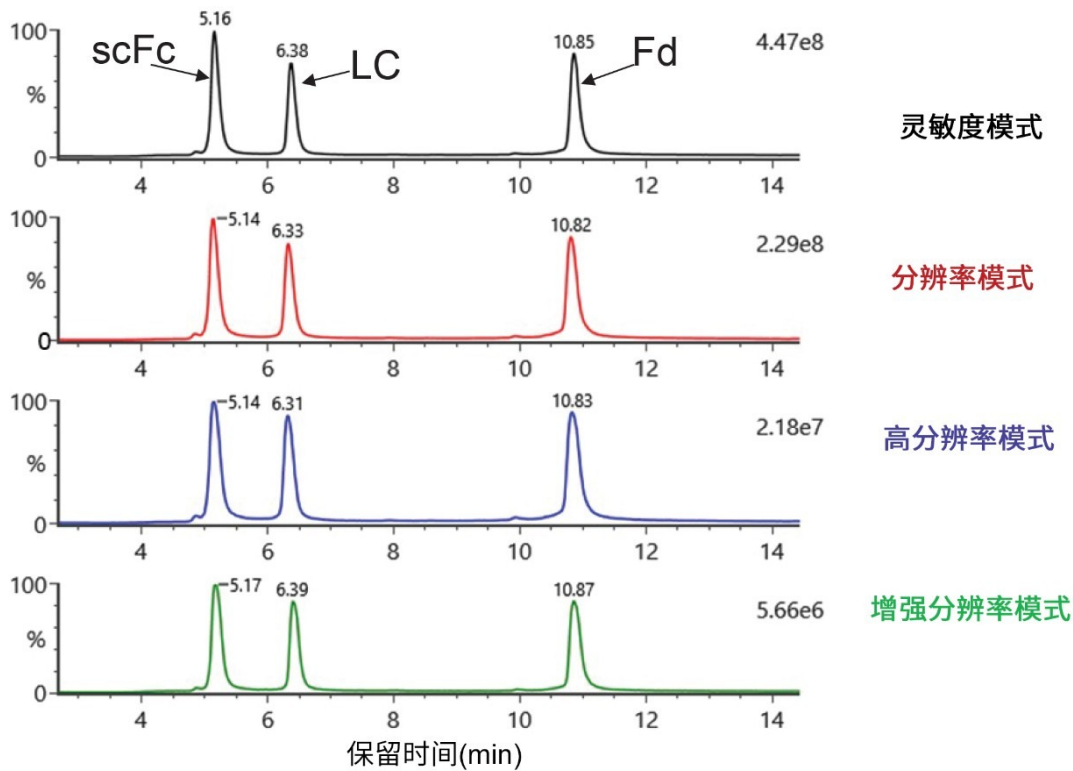


图2.在灵敏度、分辨率、高分辨率和增强分辨率模式（质量分辨率分别为12,500、25,000、56,000和75,000）下采集数据所得到的TIC比较证明，MS灵敏度与ToF检测分辨率之间呈反比关系。

组合原始谱图和MaxEnt1去卷积谱图表现出相同的趋势（数据未显示）。虽然观察到MS响应随分辨率不同而变化，但是经过MaxEnt1去卷积后，鉴定的组分在四种分辨率模式下得到的质量精度无明显差异（数据未显示）。在所有四种模式下，指定组分与预测平均质量数的差异均小于15 ppm，且大部分差异处于<10 ppm的范围内。

图3包含应用四种MS分辨率模式分析NISTmAb亚基主要蛋白形态获得的相对百分比。如质谱图中所示，主要蛋白形态的相对百分比一致，与采集的MS分辨率无关。所有模式下的低ppm质量精度和一致结果表明，在亚基分析中，灵敏度模式应为推荐分辨率模式的默认选择。该模式将为用户提供最高的灵敏度、优异的质量精度和一致的IdeS亚基变体相对丰度（在该样品中鉴定出的相对丰度水平低至约3%）。

NISTmAb亚基主要已鉴定组分	预期平均质量数 (Da)	蛋白质Mod-MS(%)			
		灵敏度模式	分辨率模式	高分辨率模式	增强分辨率模式
LC	23127.51	95.5	95.5	95.6	95.8
LC+Gly	23289.65	4.5	4.5	4.4	4.2
Fc+Gly+G0F N	25235.98	40.9	40.6	39.8	41.1
Fc+Gly+ G0F-GlcNAc N	25032.78	3.1	2.9	3.2	3.0
Fc+Gly+G1F N	25398.12	39.7	40.0	39.9	39.3
Fc+Gly+G1F-GlcNAc N	25194.92	3.7	3.5	3.8	4.7
Fc+Gly+G2F N	25560.26	10.1	10.3	10.5	10.1
Fc+Gly+G2F N+Alpha-Gal	25722.40	2.6	2.6	2.8	1.9
Fd+Pyrog Q N-Term	25688.86	96.5	96.5	96.4	96.2
Fd+Pyrog Q N-Term+Gly	25851.00	3.5	3.5	3.6	3.8

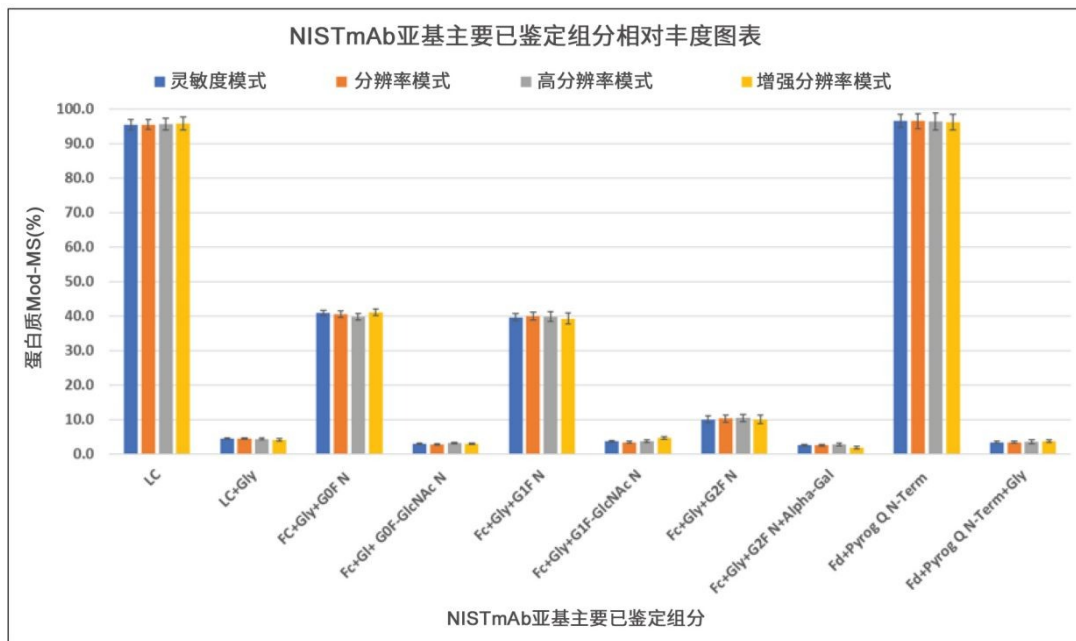


图3.在所有MS分辨率模式下，经重复进样后鉴定出的NISTmAb Fc亚基糖型与Fd和轻链变体表现出一致的相对响应。

用于增强质量分辨率模式的BayesSpray电荷去卷积

增强分辨率模式的标准为75,000 FWHM，该值根据牛胰岛素的(M+6H)⁶⁺同位素簇(m/z 956)测得，可以使25

kD mAb IdeS酶解亚基实现同位素分辨率。为进一步考察增强分辨率模式的结果，以4.0 μg的上样量运行了IdeS酶解的曲妥珠单抗亚基样品。酶解前，将曲妥珠单抗与0.03%过氧化氢(H₂O₂)在37 °C下温育4 h。比较MaxEnt1和BayesSpray去卷积处理得到的去卷积谱图，发现BayesSpray去卷积谱图的质量数误差低于由MaxEnt1处理所得到的结果，且质量数更紧凑（图4）。在该分析中，选择MaxEnt1峰宽生成平均质谱图，同时优化使用BayesSpray算法进行的处理以返回单同位素质量数。虽然结果表明BayesSpray去卷积方法具有优异的质量精度，但这些差异不会使典型亚基谱图的解析产生实际差异。

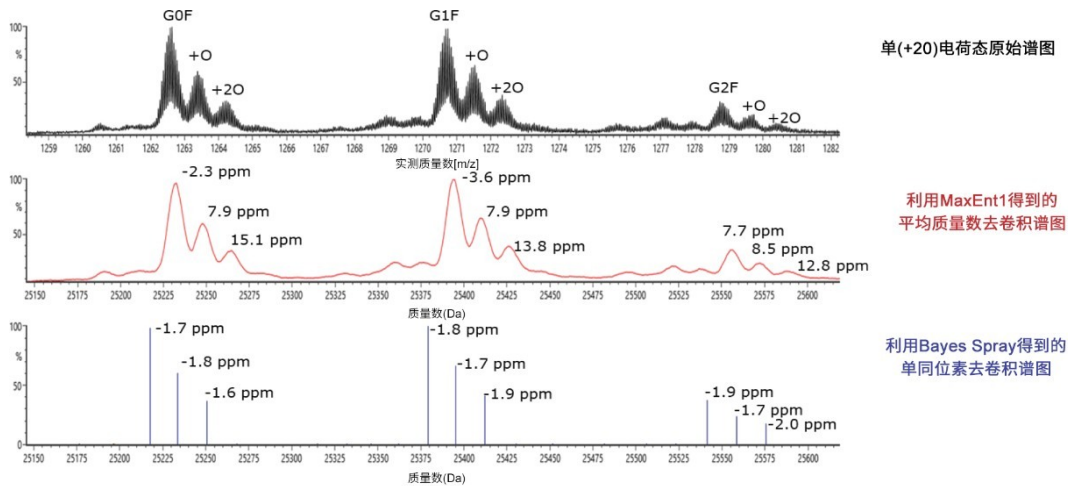


图4.氧化曲妥珠单抗scFc亚基片段在电荷态去卷积前后的谱图比较。上图：单同位素分辨的scFc亚基峰的单(20+)电荷态原始谱图，展示了三种主要糖型的未修饰、单氧化和双氧化变体。中图：经平均质量数去卷积的MaxEnt1去卷积谱图，图上标注了质心平均质量数误差。下图：由BayesSpray去卷积获得的单同位素质心谱图，图上标注了相对于单同位素质量数计算值的质量数误差。

结论

SYNAPT XS是一种通用的质谱系统，拥有多种质量分辨率模式，可灵活用于常规和高级生物治疗药物分析。在分析单克隆抗体(mAb) IdeS酶解亚基时，建议使用灵敏度数据采集模式以获得最佳MS灵敏度、低ppm质量精度，同时让酶解组分获得一致的相对丰度。虽然典型的亚基分析工作流程不需要采用增强分辨率模式，但是该模式可生成单同位素分辨的IdeS亚基谱图，当使用BayesSpray电荷去卷积处理时，这些谱图可能具有更出色的质量精度(<2 ppm)。当使用该模式时，需要增加进样量以补偿灵敏度损失。

参考资料

1. Shion H, Quinn C, Berger S, Yu Y. W. 在SYNAPT XS上使用非变性SEC LC-MS工作流程分析半胱氨酸偶联的抗体偶联药物(ADC). 沃特世应用纪要, 720007026ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/analysis-of-cysteine-conjugated-antibody-drug-conjugates-adcs-using-a-native-sec-lc-ms-workflow-on-the-synapt-xs.html>> .2020年10月.
2. Skilling, J and Richardson K. Method and System of Identifying a Sample by Analysing a Mass Spectrum by the Use of a Bayesian Inference Technique. EU patent EP2558979A1, 2011.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720007279ZH, 2021年6月