

应用纪要

开发特征性肽段定量测定方法 – 通过MRM优化进行肽图分析以在大鼠PK研究中测定度拉糖肽

Caitlin Dunning, Mark Wrona

Waters Corporation



摘要

度拉糖肽(TRULICITY™)等融合蛋白治疗药物的开发日益增加,因此需要可用于快速开发LC-MS/MS定量测定方法的通用工作流程。本文介绍含Fc的治疗药物测定方法开发的完整工作流程。利用肽图分析实验表征和鉴定适合定量的肽。然后通过自动化MassLynx Skyline Interface工作流程优化MRM。以通用的免疫亲和捕获方法、快速且可重现的酶解工作流程以及选择性肽SPE制备样品以进行分析。该测定方法使度拉糖肽的定量下限达到1 ng/mL,成功用于大鼠PK研究中的分析。

优势

- 使用Xevo G2-XS进行肽图分析,以鉴定并选择独特的特征性肽段
- MassLynx Skyline Interface (MSI)可快速选择和优化肽段MRM通道
- 使用BEH颗粒和ACQUITY UPLC I-Class Plus技术进行高性能分离
- 使用Xevo TQ-XS质谱仪对度拉糖肽进行高灵敏度定量分析

简介

对于诸如融合蛋白这样的新一代治疗药物,使用支持快速开发LC-MS/MS定量测定方法的工作流程非常重要。虽然LC-MS/MS测定在药物发现和开发实验室中无处不在,但在快速表征和选择待优化的目标肽段方面,方法开发过程仍有改进的空间。本文介绍依次使用Xevo G2-XS QToF(快速表征)和三重四极杆Xevo TQ-XS系统(快速定量)对度拉糖肽(GLP-1类似物与IgG4 Fc的融合蛋白)进行快速蛋白质确认、肽鉴定、选择和优化的整个过程。本应用纪要的姊妹篇([720006823EN <](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf)

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf>)¹更详细地讨论了最终LC-MS/MS方法和生物分析测定的优点。

理想情况下,设计测定方法的工作流程由以下步骤组成(图1);

1) HRMS确认和表征

a. 执行肽图分析实验以确认肽段

b. 确定适合定量监测的肽(稳定性、脱酰胺、修饰水平)

2) 三重四极杆优化和分析

a. MRM通道的快速选择和优化

b. 样品前处理方法的优化 (详见应用纪要720006823EN <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf>>)¹

本应用纪要展示了快速表征、确认序列以及应用这些信息创建大鼠药代动力学(PK)研究中度拉糖肽分析方法所需的步骤。HRMS平台本身也具有运行测定方法的能力,但本工作流程介绍在三重四极杆平台上运行分析以大幅提升通量的更常规的方法²。该方法使定量下限达到1 ng/mL (0.02 M),因此能够对度拉糖肽进行高灵敏度定量分析。



图1.利用肽图分析、MassLynx Skyline Interface (MSI) MRM优化、高灵敏度和高选择性样品前处理技术以及Xevo TQ-XS进行LC-MS/MS定量分析的定量测定方法开发工作流程

实验

样品前处理

用于肽图分析和Skyline优化的样品前处理

利用ProteinWorks Auto eXpress小体积方案 (部件号: 176004077 <

<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/application-kits/176004077-proteinworks-auto-express-low-3-digest-kit.html>>) 对度拉糖肽的净稀释液进行酶解。简单来讲,就是将度拉糖肽稀释至300

µg/mL (24 µg), 用RapiGest SF表面活性剂进行变性处理, 然后用二巯基苏糖醇还原, 再用碘乙酰胺烷基化。

使用胰蛋白酶按照1:10胰蛋白酶:蛋白质(w/w)的比率酶解样品, 并用甲酸淬灭。将10 µL (约1.5 µg) 样品注入ACQUITY UPLC I-Class PLUS和Xevo G2-XS QToF质谱仪系统, 使用LC-MS^E进行肽图分析。使用Xevo TQ-XS质谱仪进行MassLynx Skyline Interface MRM优化实验, 每次运行的进样体积为1 µL。

大鼠PK样品的制备

以1 mg/kg的剂量向六只大鼠皮下注射度拉糖肽，在给药前采集血样，并在给药后2、4、7、24、48、72、96、120和168小时再次采集血样。完整的样品前处理说明请参见应用纪要720006823EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf>>。

肽图分析的LC-MS/MS方法条件：

LC系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS（固定定量环）
检测条件：	Xevo G2-XS QToF质谱仪，ESI+
样品板：	具有MaxPeak高性能表面的QuanRecovery 96孔板
色谱柱：	ACQUITY UPLC Peptide BEH C ₁₈ , 300 Å, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm
柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 μL
流速：	0.2 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度：	流动相B在50分钟内由1%增加至35%，流速0.2 mL/min，然后进行色谱柱清洗和平衡
MS系统：	Xevo G2-XS QToF质谱仪，ESI+
电离模式：	ESI+

毛细管电压:	1.2 kV
锥孔电压:	40 V
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	350 °C
锥孔气流速:	20 L/h
脱溶剂气流速	600 L/h
MS软件	UNIFI (v.1.9.4)
信息学软件	UNIFI (v.1.9.4)

Skyline和PK研究的LC-MS/MS方法条件:

完整的LC-MS/MS条件参见应用纪要720006823EN <

<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf>>。

结果与讨论

执行肽图分析以鉴定可定量肽

可通过肽图分析实验鉴定适合定量的肽。下游样品前处理步骤包括通过ProteinWorks Auto eXpress Low快速酶解试剂盒酶解度拉糖肽。尽管该试剂盒不适用于通常使用测序级物质（成本较高）的肽图分析应用，但它使我们能够通过胰蛋白酶酶解（使用预期的样品前处理方法）来鉴定从蛋白质中释放出的肽段并评估其行为。这些方法鉴定度拉糖肽肽段的序列覆盖率高达93%（图2，A图）。

肽修饰和缺失的裂解也能轻松鉴定。度拉糖肽的肽图分析实验确定了15种胰蛋白酶解肽，长度范围在6~33个氨基酸内（少于6个氨基酸的肽由于特异性和保留性较差，已从该列表中排除）。在该列表（图2，B图）中，基于氨基酸长度（8~25个残基）和确定的修饰百分比进一步筛选肽段。EFIAWLVK是一种发生高水平修饰的肽，由于在Fc融合蛋白中处于独特位置，因此也保留在筛选后的肽列表中。这种肽来自蛋白质的GLP-1区域

，是该区域中仅有的2个肽段之一。筛选后的肽列表构成下一步开发测定方法、优化MRM通道的基础。



图2.通过肽图分析实验使度拉糖肽的序列覆盖率达到93% (A图)。鉴定出15种具有合适长度的肽进行定量分析，并鉴定出7种满足筛选标准的肽 (B图)

MassLynx Skyline Interface MRM鉴定和优化

Skyline (华盛顿大学MacCoss Labs) 是一款开源软件，已与MassLynx软件集成，可以提供无缝工作流程进行MRM鉴定和优化(碰撞能量、保留时间安排、驻留时间等)，还可以节省数天至数周的优化和开发时间³。MSI可自动执行采集方法创建、数据采集和数据查看等多个步骤，筛选每种蛋白质中高度灵敏的肽以及每种肽

中高度灵敏的通道用于最终方法。肽生物分析工作流程的示例见图3。

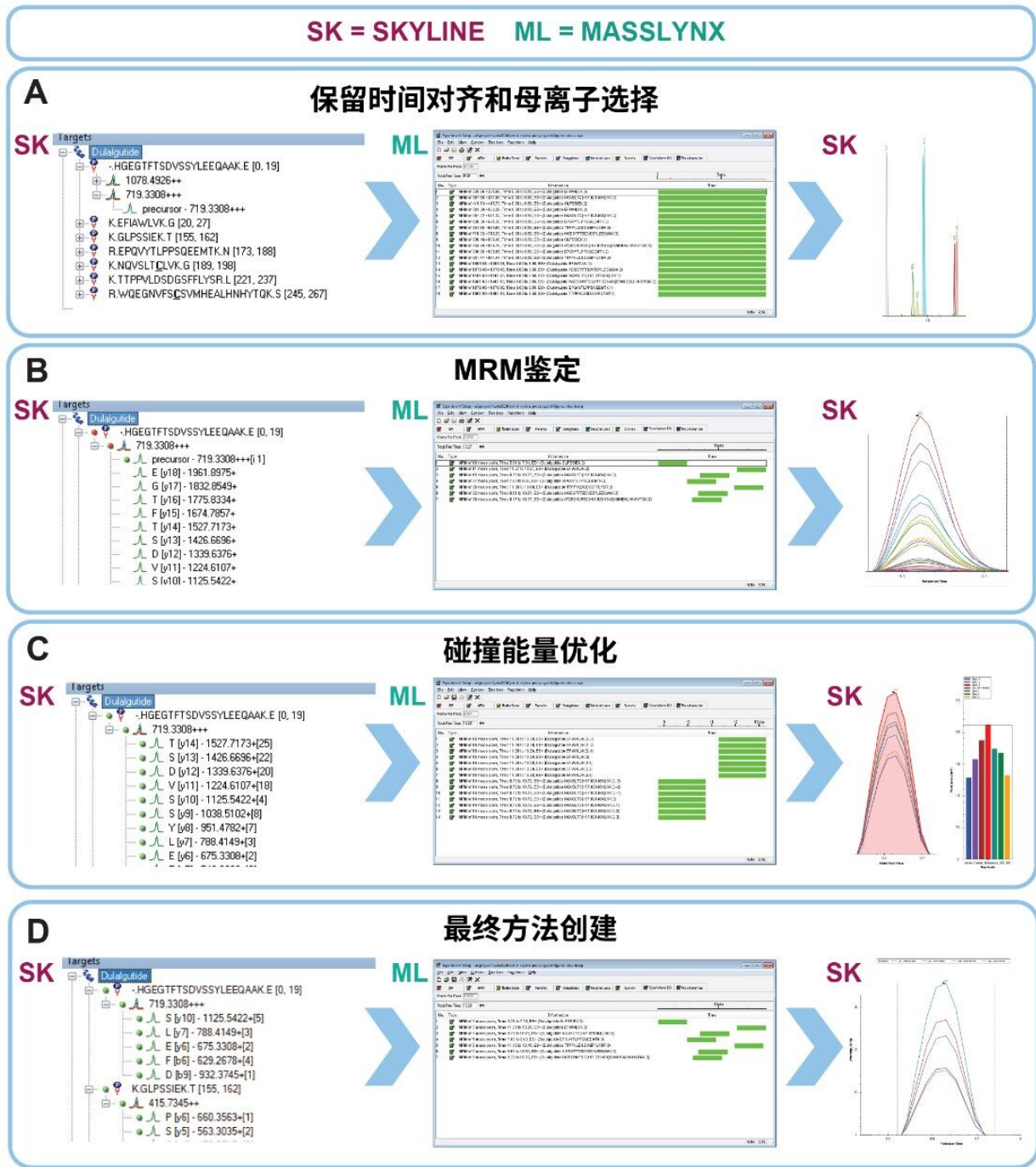


图3.用于MRM通道鉴定和优化的MassLynx Skyline Interface工作流程。步骤包括：保留时间和母离子 m/z 鉴定（A图）、MRM鉴定（B图）、碰撞能量的MRM优化（C图）以及使用优化设置的最终方法创建（D图）。每个导入/导出步骤均标注ML (MassLynx)或SK (Skyline)，以指明所用的软件包。

步骤A – 保留时间对齐和母离子选择

- 通过肽图分析鉴定的候选肽序列被复制到MSI下载包随附的Skyline主文档中。该主文档包含用于肽段MRM鉴定和优化的适当设置。
- 通过Skyline计算每种肽的母离子 m/z ，并自动导出至MassLynx质谱方法文件(.exp)中。
- 使用导出的MassLynx方法将酶解的目标蛋白质进样至LC-MS/MS系统进行分析。然后将结果导入原始Skyline文档中。
- 无需手动干预即可确定各种肽的保留时间。然后鉴定各种肽的最强母离子 m/z 。将这些母离子用于后续优化步骤。

步骤B – MRM鉴定

- 从Skyline中导出包含子离子的新MassLynx时间计划方法文件。
- 再次进样分析酶解后的蛋白质，然后将结果导回Skyline中，鉴定观察到的MRM通道。

步骤C – MRM优化

- 导入数据后，在步骤B中观察到的MRM通道将以绿灯指示。红灯指示未观察到的通道。选择每种肽即可在一张色谱图中显示各MRM通道的强度，方便查看。根据强度对MRM通道列表中的通道进行排序。
- 然后优化所有观察到的MRM通道的碰撞能量。系统将自动创建适当数量的MassLynx方法，以适应该步骤中待优化的肽和MRM通道的数量。
- 在导出的MassLynx方法中，针对每种肽有7个功能通道。每个功能通道都包含上一步观察到的所有MRM通道，且每个功能通道的碰撞能量相差2 eV。再次进样目标蛋白质，并将采集的数据导入Skyline。

步骤D – 最终方法创建

- Skyline会使用上一步获得的结果确定每个MRM通道的最佳碰撞能量值，并将这些信息存储在文档中。
- 优化该文档，将强度最高的MRM通道之外的所有通道移除。
- 将具有最高强度MRM通道及优化碰撞能量的最终MassLynx方法从Skyline导出用于后续方法开发。

通过Skyline优化肽段后，必须评估MRM通道在所需生物基质中的灵敏度和选择性。选择性最高的MRM通道，其母离子和子离子 m/z 值通常较高。

工作流程在大鼠PK研究中的应用

将本文所述工作流程应用于开发灵敏的测定方法，以支持定量分析从大鼠血浆中提取的度拉糖肽。给予大鼠度拉糖肽，并在给药前，以及给药后168小时采集样品，检查度拉糖肽在大鼠中的药代动力学(PK)特性。为深入

了解整个度拉糖肽蛋白，同时从GLP-1和Fc区域中选择特征性肽段。选择GLP-1的N端肽 HEGTFTSDVSSYLEEQA AK (HGEG)作为包含至少一个GLP-1序列拷贝的完整融合蛋白的替代物。从蛋白质的 Fc区域中选择GLPSSIEK (GLPS)代替总体Fc水平。

PK特征 (图4) 展示了HGEG和GLPS肽的差异清除。测得生物治疗药物的半衰期 (使用HGEG肽) 为22.9小时 (使用PKSolver计算), 与先前文献报道的结果一致⁴⁻⁶。GLPS肽的半衰期延长了大约3倍, 可能是由于血浆中有完整GLPS肽以及度拉糖肽的GLP-1区域发生蛋白酶裂解产生了游离GLPS⁷。必须了解生物治疗药物的性质, 才能明智地选择肽, 并在PK研究中清楚地了解整个蛋白质行为。

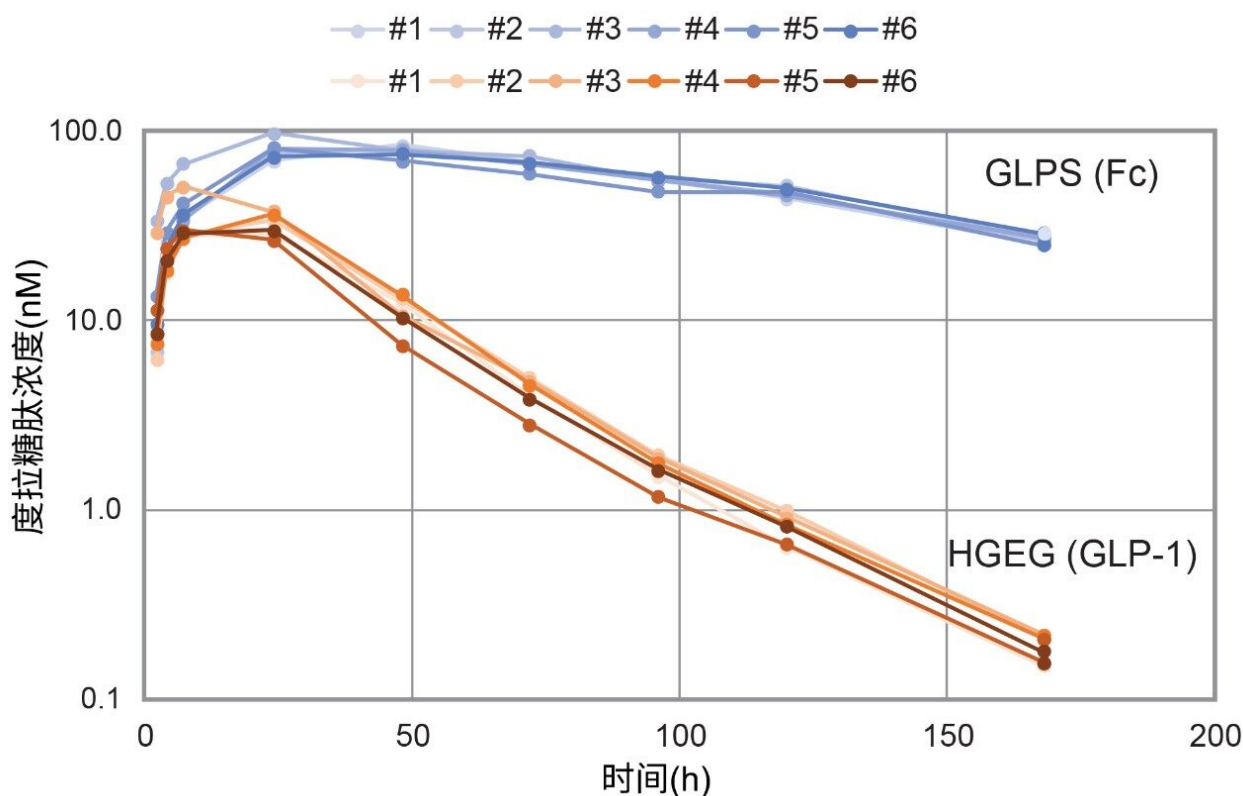


图4.接受度拉糖肽给药的大鼠的药代动力学特征。将GLPS肽用作度拉糖肽Fc区域的替代物, 将HGEG肽用作GLP-1区域的替代物

使用50 μ L大鼠血浆, 经过免疫纯化、酶解和SPE纯化后, 对度拉糖肽实现了线性、精密且准确的定量分析。定量下限(LLOQ)达到1 ng/mL (0.02 nM), 使用 $1/X^2$ 线性拟合获得的校准曲线在1~10,000 ng/mL (0.02~167.59 nM)范围内呈线性($r^2>0.99$) (表1)。QC水平准确度在 $\pm 15\%$ 范围内, CV<7%, 与标准生物分析方法验证指南的指标一致。所有运行的QC性能统计数据见表2。

校准曲线统计数据				
肽段	曲线 (ng/mL)	加权	线性拟合 结果(r^2)	准确度范围(%)
GLPSSIEK	1-10,000	1/ X^2	0.994	89.9-107.1
HGEGTFTSDVSSYLEEQAQK	1-10,000		0.991	86.2-108.3

表1.从大鼠血浆中提取的度拉糖肽的线性动态范围和标准曲线统计数据

肽段	QC统计数据				
	QC水平	QC浓度(ng/mL)	平均QC浓度计算值 (ng/mL) (N=3)	平均准确度% (N=3)	平均%CV (N=3)
GLPS	LLOQ	3	2.6	85.9	0.8
	LQC	75	74.6	99.4	2.4
	MQC	750	783.6	104.5	0.3
	HQC	7500	8169.5	108.9	1.0
HGEG	LLOQ	3	3.0	100.7	5.9
	LQC	75	79.2	105.6	5.8
	MQC	750	800.9	106.8	7.1
	HQC	7500	8239.9	109.9	5.6

表2.从大鼠血浆中提取的度拉糖肽的QC定量性能

结论

本文介绍用于特征性肽段鉴定和优化的完整工作流程，并将该工作流程应用于度拉糖肽定量测定方法的开发。结合先进的样品前处理技术，以高准确度和高精密度分析大鼠PK样品。

- 利用肽图分析实验鉴定并完善用于度拉糖肽定量分析的特征性肽段列表
- 使用MassLynx Skyline Interface软件鉴定并优化所选特征性肽段的MRM通道
- 对大鼠PK样品中浓度为0.15~98.21 nM的度拉糖肽进行高精密度、高准确度的定量分析

参考文献

1. Dunning CM, Wrona MD. How to Maximize Bioanalytical Performance of Fc-Fusion Proteins: Practical Sample Preparation and LC-MS/MS Workflows for Dulaglutide Quantification from Plasma. Waters Application Note 720006823EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006823en.pdf>> .
2. Kellie JF, Kehler JR, Szapacs ME. Application of High-Resolution MS for Development of Peptide and Large-Molecule Drug Candidates. *Bioanalysis*. 2016;8(3):169-177.
3. Skyline targeted mass spec environment (2020). 下载网站:
<<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>>
<<https://skyline.ms/project/home/software/Skyline/begin.view>>
4. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An Add-In Program for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* .2010;99(3):306-314.
5. Australian Public Assessment Report for dulaglutide rch (2015). Accessed March 2020 from
<<https://www.tga.gov.au/auspar/auspar-dulaglutide-rch>> <<https://www.tga.gov.au/auspar/auspar-dulaglutide-rch>>
6. Center for Drug Evaluation and Research, Pharmacology Review of dulaglutide (2013). Accessed March 2020 from
<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/125469Orig1s000PharmR.pdf>
<https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/125469Orig1s000PharmR.pdf>
7. Kang L, Camacho RC, Li W, D' Aquino K, You S, Chuo V, Weng N, Jian W. Simultaneous Catabolite Identification and Quantitation of Large Therapeutic Protein at the Intact Level by Immunoaffinity Capture Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem* .2017;89(11):6065-6075.

特色产品

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

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/10195515>>

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

720006969ZH, 2020年8月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.