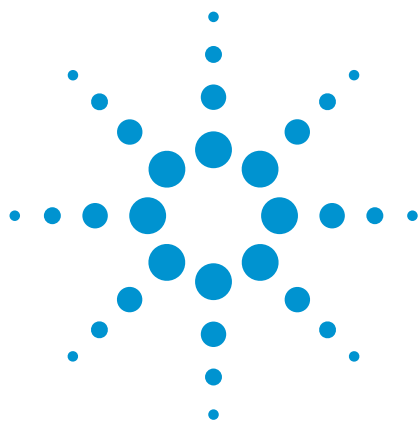




人免疫球蛋白 G 糖基化的高灵敏度高重现性分析

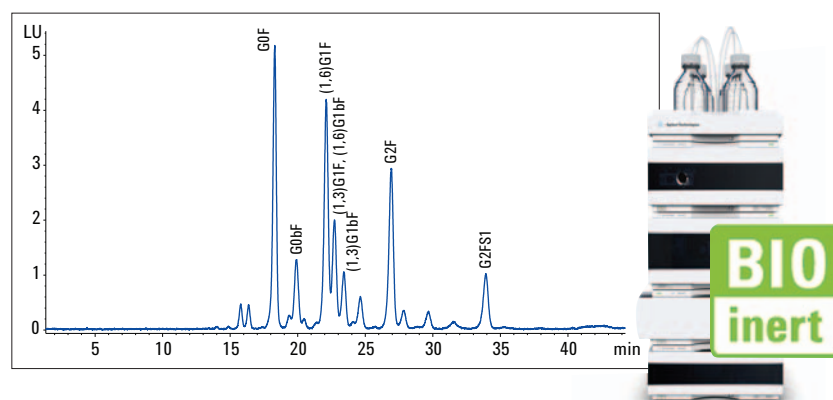
配有荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

应用简报

生物制药

作者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany



摘要

在本应用简报中，我们使用配有荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统展示了对人免疫球蛋白 G 的 N-连接多糖灵敏而可重现的 HPLC 分析。利用 N-连接人 IgG 多糖文库，我们测定了分析方法的保留时间和峰面积的精密性。此外，通过对 5 种多糖标准品（Man5、G2、G2S1、G2FS1 和 G2S2）的混合物分析得知，该方法的检测限和定量限很低，在 0.008 至 1 pmol 的浓度范围内线性良好。

因此，要实现对人免疫球蛋白 G 的 N-糖基 2-AB 衍生物的高灵敏度高重现性分析，配有荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统是最佳选择。



Agilent Technologies

前言

作为一大类新型药物，抗体代表了重组产生的治疗性蛋白中最大的一类。这些治疗剂的疗效与其糖基化模式正确与否高度相关，迄今为止，所有获得许可的治疗性单克隆抗体 (mAb) 均是免疫球蛋白 G (IgG)¹。因此，糖基化模式分析是质量保证/质量控制 (QA/QC) 过程的一个重要部分。此外，患者血浆中 IgG 的糖基化模式可以反映其健康状况²。

人 IgG 含有一个保守的 N-连接糖基化位点，它位于每条重链 Fc 区的 Asn-297 位³。这使得每个 IgG 分子含有高度异质性的两个糖基，并会产生至少 30 种糖型的混合物¹。血浆中的人 IgG N-连接多糖主要为二天线复合型结构，大多数包括核心岩藻糖并具有 0-2 个半乳糖残基和 1-2 个唾液酸。此外，人 IgG 还携带有少量的二等分 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 残基。一般而言，缺失非岩藻糖化或二等分 GlcNAc 多糖结构，基本不会降低重组单克隆抗体 (mAbs) 的模式复杂性⁴。同时，还发现了其他更多未成熟结构，例如像 mannose-5 一样的高甘露糖型结构，虽然它们的量大都较低⁵。

蛋白糖基化模式的分析极具挑战性，特别是因为复杂生物样品中多糖分析物的丰度常常很低。利用亲水相互作用色谱 (HILIC)-HPLC 结合荧光检测器分离 AB 标记的多糖结构是一种稳定、灵敏的多糖分析方法⁶。在本应用简报中，我们使用了这种方法并检验了其精密度、线性和灵敏度。

图 1 显示了本应用简报中所用的多糖结构、亚型及命名，它们也曾用于之前的出版物中⁷。根据所连的末端半乳糖残基数，将与 IgG 连接的多糖划分成不同的亚型，如图 1b 所示。G0、G1 和 G2 分别含有 0、1 和 2 个末端半乳糖残基。

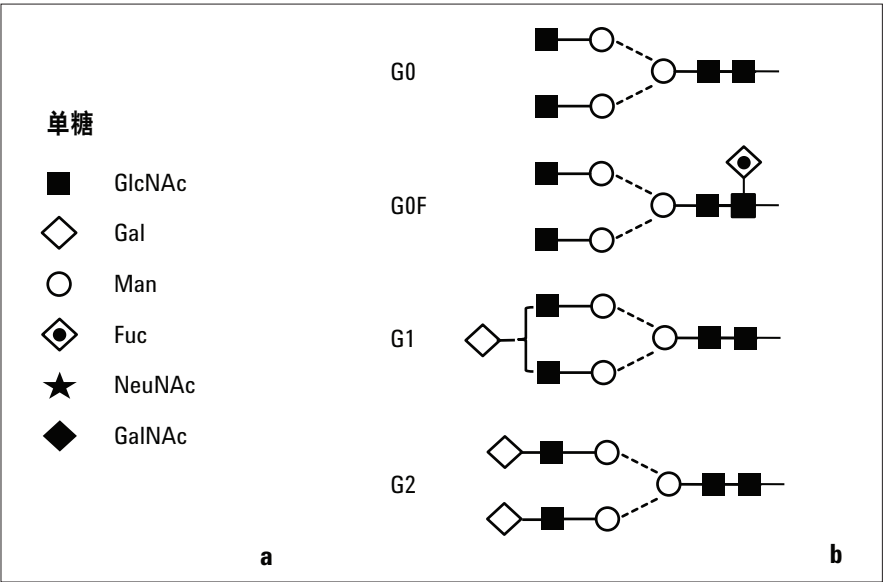


图 1
多糖结构和亚型。a) 多糖的通用命名，b) IgG 中的主要多糖结构。G 表示半乳糖单元，F 表示岩藻糖单元。基于文献 Arnold *et al*¹ 进行修改

实验部分

实验中所用的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高性能生物惰性自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器控温器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 VL (G1315D), 配有生物惰性标准流通池, 10 mm
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1312B), 配有生物惰性 FLD 流通池

色谱柱

TOSOH TSK-GEL Amide-80 色谱柱, 2 × 150 mm, 3 μm

软件

Agilent OpenLAB CDS, 用于 LC 及 LC/MS 系统的 ChemStation 版本, Rev. C.01.02 [14]

溶剂及样品

缓冲液 A: 100 mM 甲酸铵溶液, pH 4.5

缓冲液 B: 乙腈

多糖标准品

- GLYKO 2-AB- (人 IgG N-连接多糖文库), 200 pmol
- GLYKO 2-AB-(MAN-5) & Man5, 100 pmol
- GLYKO 2-AB-(NA2) & G2, 100 pmol
- GLYKO 2-AB(A1) & G2S1, 100 pmol
- GLYKO 2-AB-(A1F) & G2FS1, 100 pmol
- GLYKO 2-AB-(A2) & G2S2, 100 pmol

色谱条件

梯度	分钟	% B	流速 [mL/min]
	0	85	0.65
	5	75	
	10	72	
	30	67	
	40	64	
	40.01		0.65
	42	50	
	42.01		0.4
	45	100	
	50	100	
	55	85	
	55.01		0.4
	60		0.65
停止时间:	60.01		
后运行时间:	20 分钟		
进样体积:	2.5 μL		
柱温:	50 °C		
FLD:	激发波长 260 nm 发射波长 430 nm		
峰宽:	峰宽: > 0.05 分钟 (9.26 Hz)		
PMT:	PMT 增益: 14		

所有的多糖标准品均溶于 50 μL 100 mM 的甲酸铵溶液, pH 值为 4.5。

所有的溶剂均为 LC 级。超纯水由配有 0.22 μm 使用点折叠膜滤芯 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 系统现制。甲酸铵购自西格玛奥德里奇公司 (美国圣路易斯)。AB 标记的多糖标准品购自 Prozyme 公司 (美国海沃德)。

结果与讨论

AB 标记的人 IgG 标准品 N-多糖的可重现分析

图 2 为 AB 标记的人 IgG N-连接多糖文库的色谱分离图。存在于人 IgG 中的所有主要的多糖结构均得到了很好的分离。对于峰标记，采用多种文献中的命名法^{3, 8, 9}。所有主要的多糖均核心岩藻糖化，具有 0、1 或 2 个半乳糖基化结构，具体见表 1。除了单唾液酸化的 G2FS1（最后一个峰）之外，所有指定的多糖均为中性结构。

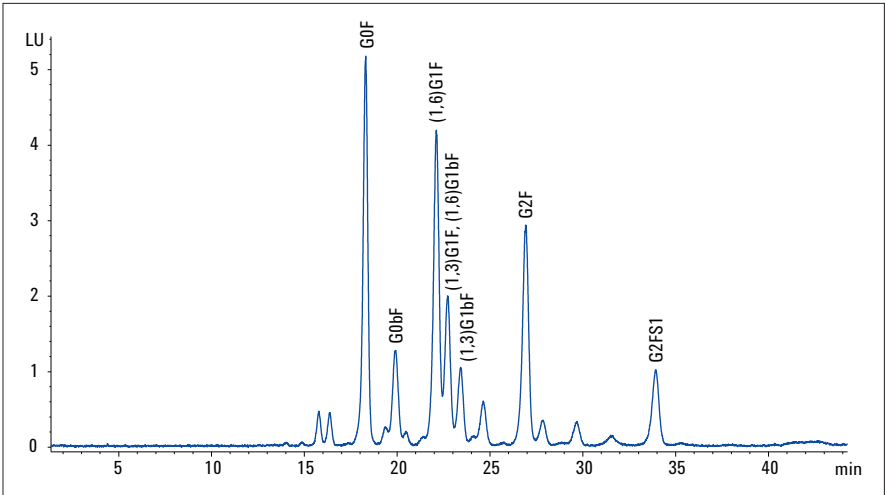


图 2
AB 标记的人 IgG N-连接多糖文库的色谱分离图。基于文献 Omtvedt *et al.* 2006 进行命名

名称	单糖组成	结构
G0F	GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G0bF	GlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
(1,6)G1F	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
(1,3)G1F	GalGlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
(1,6)G1bF	GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
(1,3)G1bF	GalGlcNAc ₃ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G2F	Gal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	
G2FS1	NeuNAcGal ₂ GlcNAc ₂ Man ₃ GlcNAc ₂ Fuc	

表 1
人 IgG 多糖文库中指定的 N-糖基的名称、单糖组成和结构

使用人 IgG N-连接多糖文库，我们测定了 5 次连续进样的保留时间和峰面积的精密密度。所有多糖结构的保留时间精密密度均低于 0.16%，峰面积精密密度在 0.66% 到 4.11% 之间，具体见表 2。所有测得的保留时间和峰面积的 RSD 值均在通常报道的范围内¹⁰。

线性

将 5 种多糖标准品（Man5、G2、G2S1、G2FS1 及 G2S2）的混合物按 1:3 比例连续稀释，得到 0.008 至 1 pmol 的浓度范围，然后计算线性。图 3 为 5 种 N-多糖混合物的色谱分离图，其中柱上样量为 1 pmol。

多糖	保留时间精密密度 [%]	峰面积精密密度 [%]
G0F	0.135	0.74
G0bF	0.146	4.11
G1F	0.142	0.66
G1bF	0.153	1.03
G2	0.149	1.92
G2F	0.155	2.44
G2FS1	0.151	1.82

表 2
人 IgG N-连接多糖文库 5 次连续进样的保留时间及峰面积精密密度

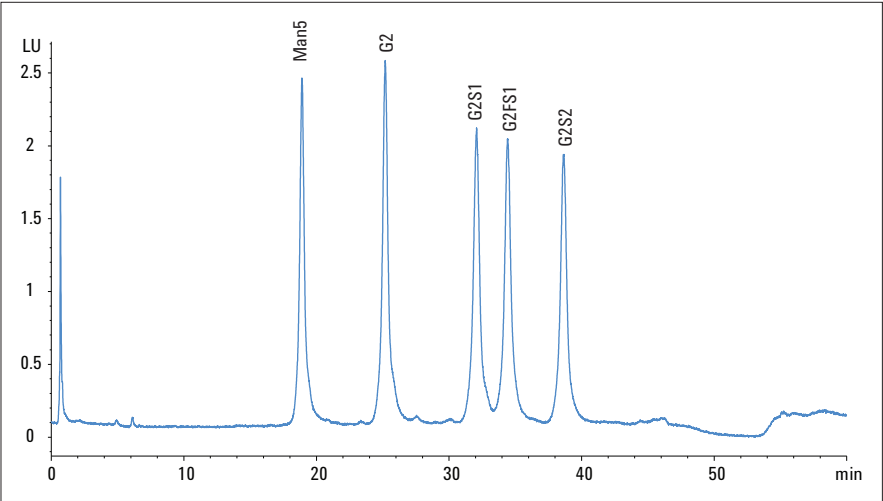


图 3
5 种 AB 标记的 N-连接多糖标准品的混合物

信噪比 (S/N) 为 3 时，检测限 (LOD) 在 10 到 15 fmol 之间。信噪比 (S/N) 为 10 时，定量限 (LOQ) 在 34 到 51 fmol 之间。所有校正曲线均具有良好的线性，相关系数均大于 0.999，具体见表 3。

FLD 检测器的光电倍增管 (PMT) 增益设为 14 以最大程度提高灵敏度。此外，使用 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器分析多达 4 种不同的激发和发射波长时，需要对方法进行优化，最终设置激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm。这种组合波长相比多糖分析中常用的波长（例如 Anumula 2005¹¹ 中所推荐的）所得的峰强度要高得多。

结论

本应用简报证实了对于 AB 标记的人 IgG N-连接多糖，配有荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统是 实现其高灵敏度 高重现性 HPLC 分析的理想系统。

人 IgG N-连接多糖文库的分析表明，所有主要的多糖结构均得到了良好的分离。保留时间精密度低于 0.16%，峰面积精密度在 0.66% 和 4.11% 之间。所有测得的保留时间和峰面积的 RSD 值均在通常报道的范围内¹⁰。根据 Campbell 等人¹²提出的结构指认软件可知，保留时间的高精密度对于正确指认多糖结构具有极其重要的意义。

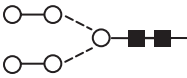
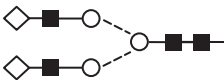
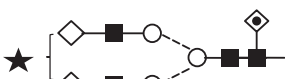
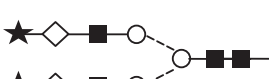
多糖标准品	结构	LOD [fmol]	LOQ [fmol]	相关系数
Man5		10	34	0.9994
G2 (NA2)		11	37	0.9997
G2S1 (A1)		13	45	0.9998
G2FS1 (A1F)		14	47	0.9997
G2S2 (A2)		15	51	0.9993

表 3
5 种 AB-标记的 N-连接多糖标准品的线性、LOD 及 LOQ

将 5 种多糖标准品（Man5、G2、G2S1、G2FS1 及 G2S2）的混合物按 1:3 的比例连续稀释，得到 0.008 至 1 pmol 的浓度范围，然后计算线性。所有校正曲线均具有良好的线性，相关系数均大于 0.999。检测限 (LOD) 在 10 到 15 fmol 之间，定量限 (LOQ) 在 34 到 51 fmol 之间。

优化 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器的荧光波长后，峰强度更高，并因此使所得的信噪比更佳。其中，激发波长并没有使用 330 nm（由 Anumula 2005¹² 推荐），而是使用了更低的 260 nm。

配有荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统是对 2-AB 衍生的 N-连接多糖进行高灵敏度 高重现性 HPLC 分析的最佳系统。

参考文献

1. Jefferis R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress*, 21: 11-16.
2. Omtvedt *et al.* (2006). Glycan Analysis of Monoclonal Antibodies Secreted in Deposition Disorders Indicates That Subsets of Plasma Cells Differentially Process IgG Glycans. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 54(11): 3433-3440.
3. Arnold *et al.* (2005). Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 564: 27-43.
4. Kanda *et al.* (2006). Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology*, 17(1): 104–118.
5. Chen X. and Flynn G.C. (2007). Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 370: 147–161 .
6. Huhn C. *et al.* (2009). IgG glycosylation analysis. *Proteomics*, 9: 882–913.
7. N-Glycan analysis of monoclonal antibodies and other glycoproteins using UHPLC with fluorescence detection (基于 UHPLC 和荧光检测器分析单克隆抗体及其他糖蛋白的 N-糖基化), 安捷伦科技出版物 5990-9774EN, 2012 年
8. Fernandes D. (2005). Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *European Biopharmaceutical Review*, Summer 2005: 106-110.
9. Melmer *et al.* (2010). HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398: 905-914.
10. Domann *et al.* (2007). Separation-based Glycoprofiling Approaches using Fluorescent Labels. *Practical Proteomics*, 1/2007: 70-76.
11. Anumula K.R. (2006). Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 350:1-23
12. Campbell *et al.* (2008). GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, 24(9): 1214–1216.

**[www.agilent.com/chem/
bio-inert](http://www.agilent.com/chem/bio-inert)**

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2012
2012 年 3 月 1 日中国出版
5991-0024CHCN



Agilent Technologies