

单克隆抗体 N-糖基化的毛细管电泳和质谱分析

应用简报

生物制药

作者

Suresh Babu C.V and Ravindra Gudihal
Agilent Technologies India Pvt. Ltd
Bangalore, India



摘要

糖基化是最重要的一种翻译后修饰，指的是将糖基部分连接到蛋白质上。糖基化模式的改变对免疫原性和整体生物活性有很大影响。因此，糖基化表征对基于生物医药的应用至关重要。虽然现在已有多种分析技术被应用于分析 N-糖基化，但低水平糖基化的精确测定仍面临着极大的挑战。

本应用简报展示了利用毛细管电泳和质谱 (CEMS) 对重组单克隆抗体 (mAb) 糖基化进行分析。此方法包括利用 N-糖苷酶 F (PNGase F) 酶解 mAb 得到多糖，对多糖进行荧光标记 (8-氨基吡-1,3,6-三磷酸三钠盐, ATPS)，并利用 Agilent 7100 CE 串联 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 进行分析。从使用的重组 mAb 中，我们共鉴定出 7 种多糖，从每种多糖成分的相对百分比可知，主要及次要糖基化修饰均有存在。本应用简报证明了高分离速度的 CE 与高灵敏度检测限的 MS 相结合，使 CE-MS 成为一种替代 LC/MS 方法对 mAb 或其它糖蛋白进行糖基化表征的有效且最有前景的方法。



Agilent Technologies

前言

近年来，单克隆抗体 (mAb) 已成为生物制药行业具有潜力的新兴蛋白候选药物。其药物研发流程包括一系列精细的控制和评估步骤，需要仔细、严格地监测目标化合物的治疗稳定性及有效性。因此，在商业化前的每个阶段对 mAb 进行全面表征是极其有益的。在大量研究成熟的蛋白翻译后修饰中，已知糖基化在很多生物过程中都扮演着重要的角色（例如蛋白降解和转录），从而影响健康和疾病进展¹。而鉴定重要蛋白分子中连接的糖基则需要一种可靠、稳定、灵敏的分析技术。

近来，毛细管电泳 (CE) 在糖蛋白分析领域得到了众多关注，主要是由于其可以缩短分析时间，并保持高效分离。使用一种荧光发色团 (ATPS, 阴离子) 对酶解所得多糖进行标记，CE 分离后，利用高灵敏度的激光诱导荧光 (LIF) 或质谱 (MS) 进行检测。APTS 标记将负电荷传递给多糖，可提高电泳分离能力，并使之更适用于电喷雾电离 (负模式)，使整个分离和检测过程与荧光标记化学高度兼容。将 CE 与 MS 串联有益于鉴定未知的糖基化修饰或质量信息，并进行峰指认²。

本应用简报展示了利用 CE-QTOF MS 对重组 mAb 所得的 N-糖基进行分析。APTS 标记的 CE-MS 方法有助于鉴定 mAb 上的所有糖基。此外，还可得到每种多糖的相对百分比，以表征主要及次要糖基化修饰。

材料与方法

化学试剂

单克隆抗体，PNGase F 和 PVA 涂层毛细管来自安捷伦科技有限公司。 ϵ -氨基己酸和 1 M 氰基硼氢化钠的四氢呋喃 (THF) 溶液购自西格玛奥德里奇公司 (美国密苏里州圣路易斯)。APTS 购自 Invitrogen 公司 Molecular Probes (美国俄勒冈州尤金)。多糖标准品购自 Prozyme 公司 (美国加州海沃德)。PhyTip 柱购自 PhyNexus 公司 (美国加州圣何塞)。

酶解去糖基化，多糖提取和 APTS 标记

利用 PNGase F 进行 mAb 去糖基化。在 mAb (15 mg/mL) 中加入 PNGase F (溶于 0.25 M Tris 缓冲液，pH 值 7.6)，37 °C 下过夜。加热后，去糖基化的蛋白沉淀，然后离心。干燥含有多糖的上清液，然后通过还原胺化进行 APTS 标记。

在干燥的多糖样品中，加入 2.5 μ L 50 mM APTS 的 1.2 M 柠檬酸溶液，2.5 μ L 1 M 氰基硼氢化钠的 THF 溶液，水浴 37 °C 下过夜。加入 50 μ L 水稀释反应混合物以停止反应。利用含有 PhyNexus 正相聚酰胺树脂的 PhyTip (使用前以 95% ACN 平衡) 去除未连接的多余染料。上样后，用 95% ACN 冲洗柱子，最终用 20% ACN 洗脱得到 N-糖基。

CE-MS 仪器方法

CE-ESI-MS 分析中使用 7100 CE 系统 (配有 CE-MS 毛细管卡套，部件号 G1603A)，串联 6520 精确质量 Q-TOF (配有双离子源及正交共轴鞘液接口，部件号 G1607B)³。使用空缓冲液和标准品最优化分离条件和喷雾稳定性。鞘液 CE-MS 接口处维持一个较低的流速 (5 μ L/min) 以保持 CE 分离的高效性，并为电喷雾电离提供一个稳定流及其它必要的喷雾条件。Q-TOF 参数由 MS 调谐系统自动最优化，并利用 ESI 调谐混合物对 MS 系统进行校正。

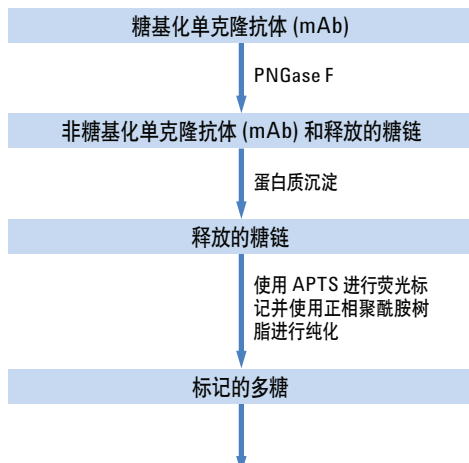
表 1 列出了 CE-MS 的参数。所有化合物列表由 MassHunter 分子特征提取 (MFE) 算法提取所得。

| 毛细管电泳 (CE) | |
|------------|--|
| CE: | Agilent 7100 毛细管电泳系统 |
| 样品: | mAb 所得的 N-糖基 |
| 进样: | 30 mbar 下 40 秒 |
| 毛细管: | PVA, 总长 60 cm, 50 μ m 内径 |
| 缓冲液: | 40 mM ϵ -氨基己酸 pH 值 4.5 |
| 电压: | -25 kV |
| 外压力: | 10 mbar |
| 温度: | 20 $^{\circ}$ C |
| 质谱 (MS) | |
| MS: | Agilent 6520 精确质量飞行时间液质联用系统 |
| 电离模式: | ESI |
| 采集模式: | MS (质量范围 400–3,200 m/z) |
| 鞘液: | 异丙醇: 水 (1:1 v/v), 含有 0.2% NH_3 , 流速 5 μ L/min |
| 干燥气流量: | 5 L/min |
| 雾化器: | 8 psi |
| 干燥气温度: | 250 $^{\circ}$ C |
| 裂解电压: | 175 V |
| 毛细管电压: | 3,200 V |
| 采集时间: | 980.3 ms/谱图 |
| 采集速率: | 1.02 谱图/s |

表 1
CE-MS 条件

结果与讨论

尽管 CE-LIF 常用于多糖分析，但 CE-MS 能提供分子量信息，所以在鉴定电泳结果中的未知迁移条带方面具有优势。在本应用简报中，将 CE 与配有鞘液接口的 Q-TOF MS 串联，以指认 mAb 所得多糖的质量信息。方案 1 描述了 mAb 糖谱的 CE-MS 分析步骤。简单地说，抗体释放的多糖先进行 APTS 标记，然后进行 CE-MS 分析。图 1 为重组 mAb 中释放所得的 N-糖基的 CE-MS 总化合物谱。利用 PVA 涂层毛细管，所有 mAb 多糖均可在 15 分钟分离时间内实现迁移。通过重复实验，我们成功鉴定了未带电荷的 N-糖基类化合物，包括 G0、G0F、G1、G1F、G2 和 G2F。此外，还观察到了单唾液酸化的多糖 G2F+1NANA。所有峰的指认均基于 Q-TOF 分析测得的精确分子量。



方案 1
mAb 糖谱 CE-MS 分析的概述图

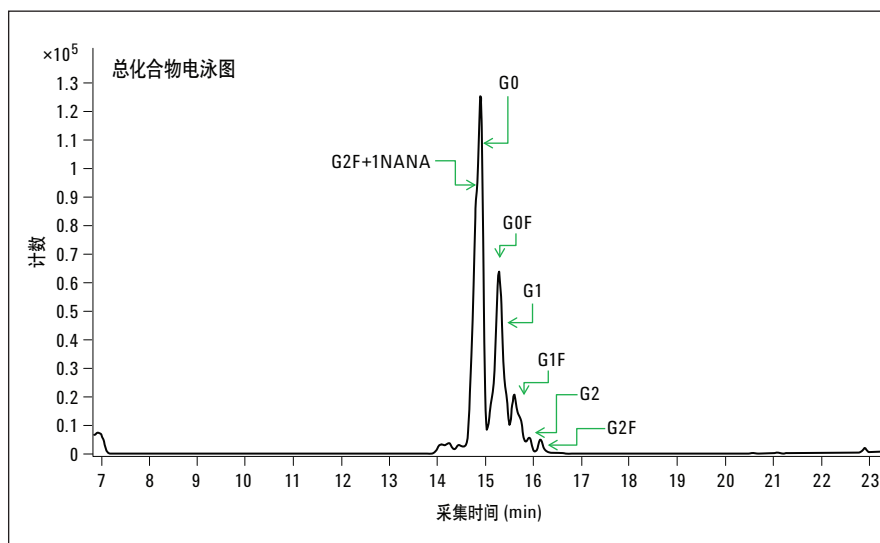


图 1
APTS 标记的 mAb 释放多糖的 CE-MS 图

表 2 总结了本研究中鉴定的多糖。需要注意的是，在 CE-MS 分析中成功鉴定出 G2 类，但 LC/MS 分析中并未鉴定出（数据未列出），表明基于 CE-MS 的分析有显著优势（即 CE-MS 的互补价值）。

| 糖链缩写 | 单同位素测定质量 | 测得丰度最高的电荷状态 | 糖链结构 | 单同位素理论质量 | 相对百分比 |
|----------|------------|-----------------|---|------------|-------|
| G0 | 1,757.4575 | 877.7212 (-2) |  | 1,757.4512 | 20.8 |
| G0F | 1,903.5121 | 950.7484 (-2) |  | 1,903.5091 | 34.0 |
| G1 | 1,919.5071 | 958.7389 (-2) |  | 1,919.5040 | 2.3 |
| G1F | 2,065.5649 | 1,031.7756 (-2) |  | 2,065.5619 | 4.2 |
| G2 | 2,081.5666 | 1,039.7751 (-2) |  | 2,081.5568 | 3.1 |
| G2F | 2,227.6228 | 1,112.8041 (-2) |  | 2,227.6147 | 1.2 |
| G2+1NANA | 2,518.7191 | 838.5664 (-3) |  | 2,518.7101 | 34.4 |

● 半乳糖 ● 甘露糖 ▲ 岩藻糖 ■ N-乙酰氨基葡萄糖 ◆ 唾液酸

表 2
CE-MS 鉴定的 mAb N-糖基总结

表 2 总结了本研究中鉴定的多糖。需要注意的是，在 CE-MS 分析中成功鉴定出 G2 类，但 LC/MS 分析中并未鉴定出（数据未列出），表明基于 CE-MS 的分析有显著优势（即 CE-MS 的互补价值）。

单个多糖的质谱图如图 2 中所示。其中标出了质谱图中丰度最高的价态。估算绝对/相对多糖含量水平对于治疗性产品的开发体系是至关重要的。这是因为治疗性产品对于降解和任何微小的修饰都

很敏感。通过计算相对于总化合物峰容量的百分容量，可对 mAb 释放所得的多糖进行相对定量，结果如表 2 所示。在本例中，G2+1NANA 是糖型中的主要形式。

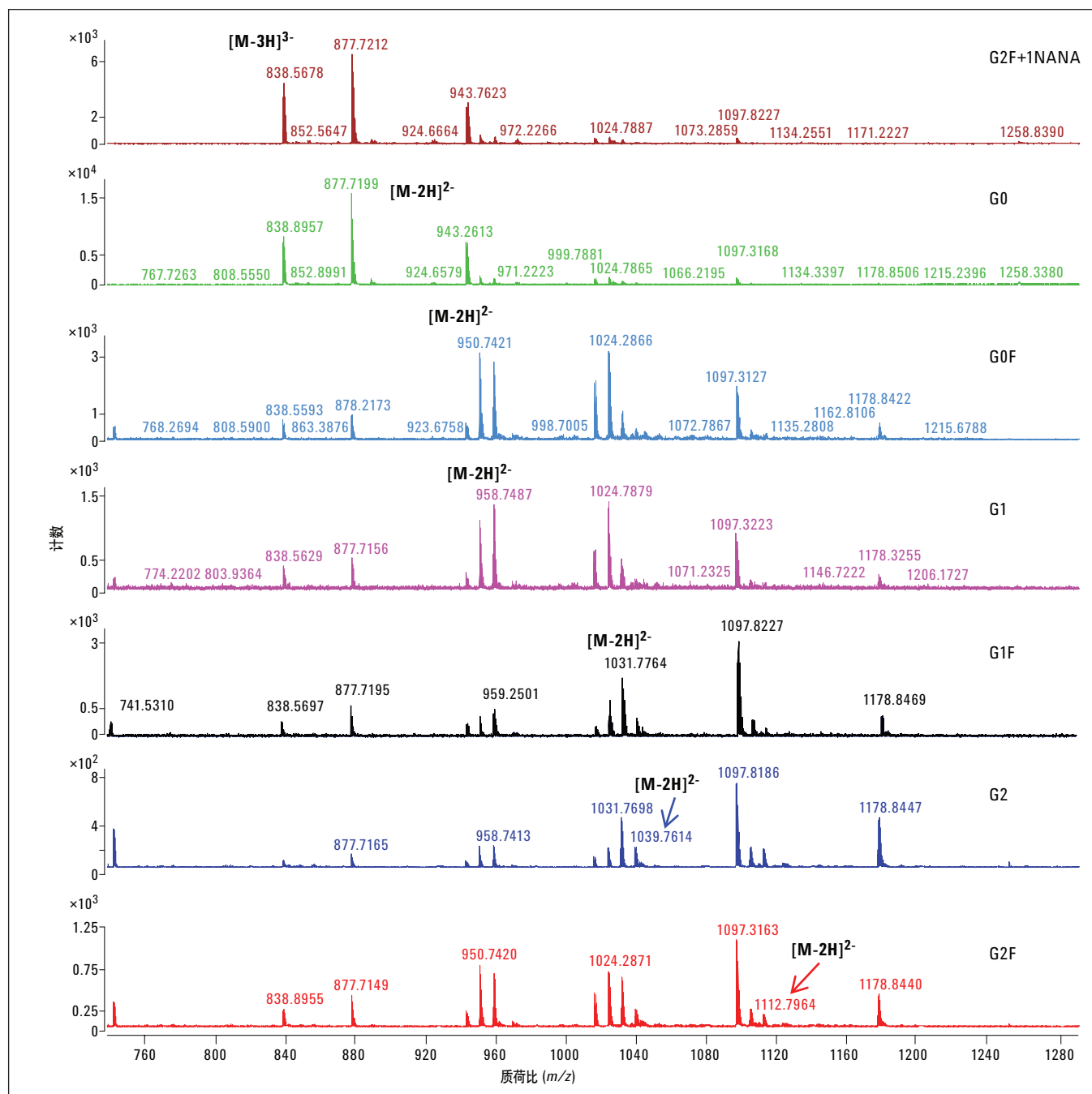


图 2 APTS 标记的 mAb N-糖基的质谱图

这些结果清晰地指出 CE-MS 可成为检测糖谱的一种有效的替代分析工具。串联 CE-MS 分离可避免污染，这是因为样品处理步骤很少，CE 分离使用的缓冲液与电喷雾电离高度兼容。与 CE-LIF 相比，该方法在糖谱分析中更为灵敏、精确。

结论

本应用简报提供了一个基于 Agilent CE-MS 的 mAb 糖谱分析方法。Agilent MassHunter 和 BioConfirm 软件包的强大数据处理能力能够成功、详尽地鉴定并得出 mAb 糖型谱。此外，通过分离主要和次要多糖形式，可合理解析糖基化模式。

参考文献

1. Li Y, Tao SC, Bova GS, Liu AY, Chan DW, Zhu H, Zhang H. Detection and verification of glycosylation patterns of glycoproteins from clinical specimens using lectin microarrays and lectin-based immunosorbent assays. *Anal. Chem.*, 83 (22), pp 8509–8516, **2011**.
2. Gennaro LA, Salas-Solano O. On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies. *Anal. Chem.*, 80 (10), pp 3838-3845, **2008**.
3. Suresh Babu C.V and Ravindra Gudihal, "Glycopeptide Analysis of Antibodies by Capillary Electrophoresis and Q-TOF Mass Spectrometry", (利用毛细管电泳和 Q-TOF 质谱仪分析抗体的糖肽)，安捷伦出版号 5990-7138EN, **2011**.

www.agilent.com/chem/ce

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2012
2012年9月1日出版
5991-1020CHCN



Agilent Technologies