

# 人免疫球蛋白 G 的高灵敏度和高重现性糖基化分析

使用配备 Agilent AdvanceBio 2.7  $\mu\text{m}$  糖谱分析色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统

## 应用简报

生物治疗药物与生物仿制药

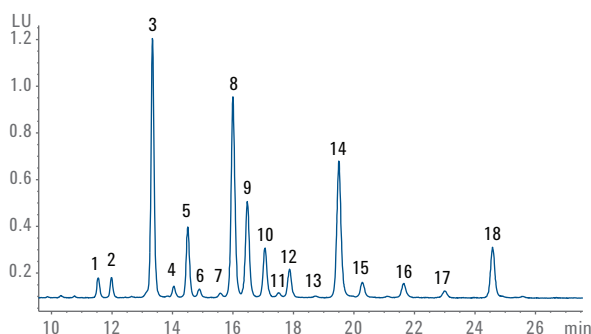
### 作者

Sonja Schneider  
安捷伦科技公司  
Waldbronn, Germany

### 摘要

本应用简报证实，使用配备新型 HILIC 色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪，可对人免疫球蛋白 G 的 N-连接糖链进行灵敏、重现的分析。对人 IgG N-连接糖链文库分析的保留时间和峰面积精度进行测定。此外，对于具有低检测限和低定量限的五种糖链标准品（M5、A2G2、A2G2S1、FA2G2S1 和 A2G2S2）混合物，在 0.016-1 pmol 的范围内具有良好的线性。

配备 Agilent AdvanceBio 2.7  $\mu\text{m}$  糖谱分析色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪是一款出色的系统，可实现灵敏且重现的 2-AB 衍生人免疫球蛋白 G 释放 N-连接糖链分析。



Agilent Technologies

## 前言

抗体代表一大类重组的治疗性蛋白质，是一种主要的药物类别。此类治疗性药物的疗效高度依赖于正确的糖基化模式。目前，获批的所有治疗性单克隆抗体 (mAb) 均为免疫球蛋白 G (IgG)<sup>1</sup>。对其糖基化模式的分析是 QA/QC 流程中一个重要的环节。此外，来自血浆的人 IgG 的糖基化模式可以反映患者的健康或疾病状态<sup>2</sup>。

人 IgG 中有一个单独的保守 N-连接糖基化位点，位于每条重链 Fc 段的 Asn-297 处<sup>3</sup>。因此每个 IgG 可连接具有高异质性的两个糖基，并可产生含至少 30 种糖型的混合物<sup>1</sup>。来自血浆的人 IgG N-连接糖链主要为二分支复合型结构，主要由零至两个半乳糖残基以及一至两个唾液酸进行核心岩藻糖基化。此外，人 IgG 携带少量的二分支 N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基。一般来说，重组产生的 mAb 具有稍简单的模式，不具有非岩藻糖基化或二分支 GlcNAc 糖链结构<sup>4</sup>。

这种 mAb 中还发现了甘露糖-5 等其他更不成熟的高甘露糖结构，大多数量较少<sup>5</sup>。

由于复杂生物样品的糖基化分析得到的丰度通常很低，因此蛋白质糖基化模式的分析极具挑战性。使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 联用带荧光检测器的 HPLC 分离 AB 标记的糖链结构，是一种可靠且灵敏的糖基化分析方法<sup>6</sup>。本应用简报使用这种方法来测定精度、线性和灵敏度。

本文特别展示了使用配备 Agilent

AdvanceBio 2.7  $\mu$ m 糖谱分析色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪，可对免疫球蛋白 G 的 N-连接糖链进行灵敏且重现的 HPLC 分析。

本文依照美国功能性糖组学协会 (CFG) 的规定，使用糖链符号式结构归属糖链 (图 1)。归属的糖链采用 Oxford 糖链命名法和生物制药 mAb 风格。

## 实验部分

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 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器温控器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，配备生物惰性溶剂热交换器 (G5616-81000)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配备生物惰性标准 FLD 流通池

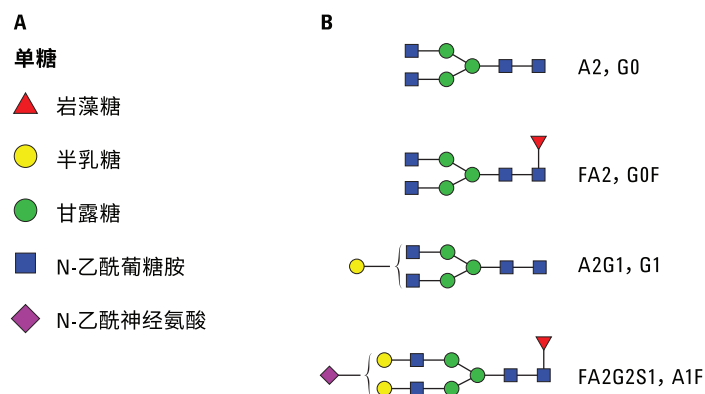


图 1. 糖链结构及异构体。A) 基于功能性糖组学协会 (CFG) 的单糖描述。B) IgG 的主要糖链结构

色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，  
2.1 × 150 mm, 2.7 μm（部件号 683775-913）

软件

Agilent OpenLAB CDS, ChemStation 版  
系统，修订版 C.01.05 [38]

溶剂和样品

溶剂 A) 乙腈

溶剂 B) 100 mM 甲酸铵，pH 4.5

糖链标准品

- 安捷伦 2-AB 标记的 IgG N-连接糖链文库，200 pmol（部件号 5190-6996）
- GLYKO 2-AB-(MAN-5) → M5，  
100 pmol
- GLYKO 2-AB-(NA2) → A2G2，  
100 pmol
- GLYKO 2-AB(A1) → A2G2S1，  
100 pmol
- GLYKO 2-AB-(A1F) → FA2G2S1，  
100 pmol
- GLYKO 2-AB-(A2) → A2G2S2，  
100 pmol

所有糖链标准品均溶于 50 μL 的 100 mM 甲酸铵溶液中，pH 4.5。

所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。甲酸铵购自 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA。所有其他各 2-AB 标记的糖链标准品购自 Prozyme, Hayward, USA。

色谱条件

参数	值		
梯度	min	%B	流速 (mL/min)
	0	15	0.5
	5	25	
	35	36	
	40	50	
	42		0.5
	42.01		0.25
	43	100	
	48	100	
	50	15	0.25
	50.01		0.5
	51		
停止时间	51 分钟		
后运行时间	20 分钟		
进样量	2、2.5 µL		
恒温器	6 °C		
柱温	60 °C		
FLD	激发波长 260 nm，发射波长 430 nm		
峰宽	0.025 min (0.5 秒响应时间) (18.52 Hz)		

结果与讨论

来自 AB 标记人 IgG 标准品的  
N-糖链的重现分析

图 2 显示了 AB 标记人 IgG N-连接糖链文库的分离。人 IgG 中发现的所有主要糖链结构在 2.1 × 150 mm, 2.7 μm Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱上均得到

了有效分离。糖链的归属使用了多篇文献<sup>3,7,8</sup> 中采用的命名法（表 1）。大多数主要的糖链由零、一或两个半乳糖结构进行核心岩藻糖基化。最后三个峰代表唾液酸化糖链结构，而残留的预洗脱峰代表中性糖链。Haxo 等人<sup>9</sup> 对糖链结构进行了归属。

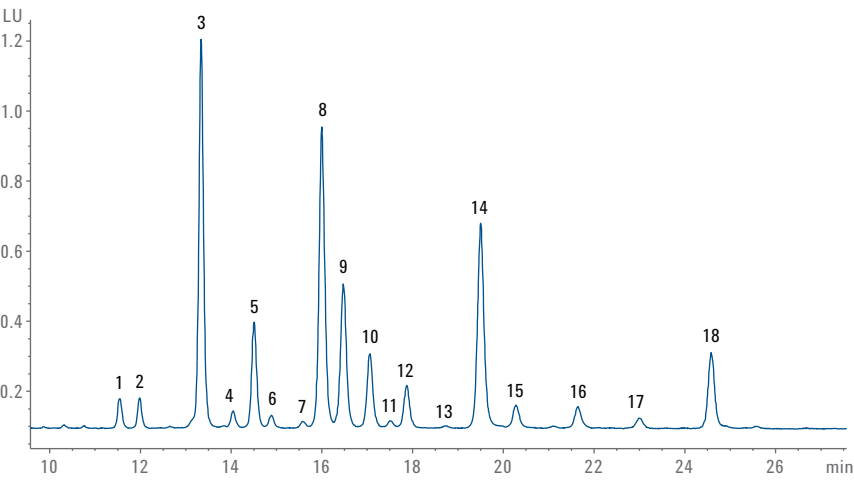


图 2. AB 标记的人 IgG N-连接糖链文库的分离

对人 IgG N-连接糖链文库连续 6 次进样的保留时间和峰面积的精度进行测定。15 个主要糖链结构的保留时间精度低于 0.27%，峰面积精度低于 3.5%（表 2）。保留时间和峰面积的所有 RSD 测量值均处于通常报告的范围<sup>10</sup>。

表 1. 人 IgG 糖链文库的 Oxford 命名风格、mAb 缩写以及归属的 N-糖链结构

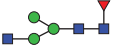
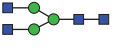
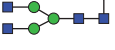







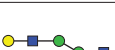
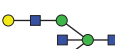
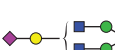
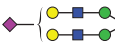
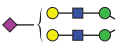

峰	Oxford	生物制药 mAb 风格	结构
1	FA1	G0F-GlcNAc	
2	A2	G0	
3	FA2	G0F	
4	M5	Man5	
5	FA2B	G0FB	
6	A2G1	G1	
7	A2BG1	G1B	
8, 9	FA2G1	G1F	
10, 11	FA2BG1	G1FB	
12	A2G2	G2	
13	A2BG2	G2B	
14	FA2G2	G2F	
15	FA2BG2	G2FB	
16	FA2G1S1	G1FS1	
17	A2G2S1	A1	
18	FA2G2S1	A1F	

表 2. 人 IgG N-连接糖链连续 6 次进样的保留时间和峰面积的精度

峰	RT 精度 (%)	峰面积 精度 (%)
1	0.154	1.19
2	0.16	1.47
3	0.152	0.78
4	0.144	2.49
5	0.146	0.65
6	0.141	1.84
8	0.175	0.96
9	0.183	0.89
10	0.196	0.46
11	0.196	2.64
12	0.192	0.81
14	0.208	0.68
15	0.207	3.44
16	0.228	1.91
18	0.261	1.01

线性

将 0.016-1 pmol 的五种糖链标准品（M5、A2G2、A2G2S1、FA2G2S1 和 A2G2S2）混合物依次以 1:2 进行稀释，并通过 2.1 × 150 mm, 2.7 μm Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行分离，以进行线性测定。图 3 显示了五种 N-糖链混合物以 1 pmol 柱上进样量得到的色谱图。

结果表明，信噪比 (S/N) = 3 时的检测限 (LOD) 范围在 9-12 fmol 之间，S/N = 10 时的定量限 (LOQ) 范围在 30-40 fmol 之间。所有相关性曲线均表现出优异的线性，除 A2G2S1 的 0.997 外，相关系数均超过 0.999（表 3）。

使用选配的 Agilent 1260 系列荧光检测器进行多达四种不同的激发和发射波长的分析可实现最优的方法开发，获得的激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm。这种波长组合与糖基化分析常规使用的波长（如 Anumula 2005<sup>11</sup> 推荐值）相比，可产生更高的强度值。

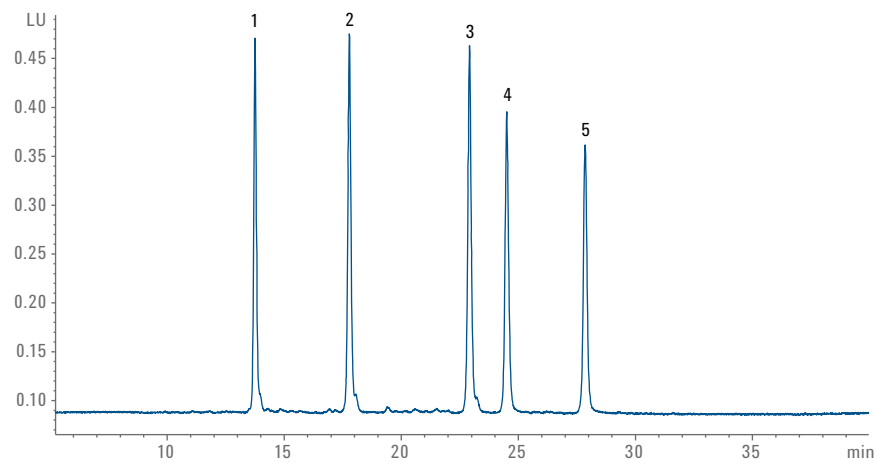


图 3. 五种 AB 标记的 N-连接糖链标准品混合物

表 3. 五种 AB 标记的 N-连接糖链标准品的线性、LOD 和 LOQ

峰	Oxford	生物制药 mAb 风格	结构	LOD (fmol)	LOQ (fmol)	相关系数
1	M5	Man5		9	30	0.9996
2	A2G2	G2		9	30	0.9998
3	A2G2S1	A1		10	33	0.997
4	FA2G2S1	A1F		10	33	0.9997
5	A2G2S2	A2		12	40	0.9999

## 结论

本应用简报展示了配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元泵液相色谱系统是一款出色的系统，适用于对 AB 标记的人 IgG N-连接糖链实现灵敏且重现的 HPLC 分析。

人 IgG N-连接糖链文库的分析对所有主要的多糖结构均显示出良好的分辨率。结果发现保留时间精度低于 0.27%，峰面积精度低于 3.5%。保留时间和峰面积的所有 RSD 测量值均处于通常报告的范围内<sup>10</sup>。对于以 Campbell 等人<sup>12</sup> 提到的结构归属软件而言，高精度的保留时间对正确归属聚糖结构非常重要。

将 0.016-1 pmol 的五种糖链标准品（M5、A2G2、A2G2S1、FA2G2S1 和 A2G2S2）混合物依次以 1:2 进行稀释，以进行线性测定。所有相关性曲线均表现出优异的线性，除 A2G2S1 的 0.997 外，相关系数均超过 0.999。LOD 范围为 9-12 fmol，LOQ 范围为 30-40 fmol。

针对本研究的系统对荧光波长优化后，使用 1260 Infinity 系列荧光检测器获得了更高强度以及更出色的信噪比。系统采用了更低的 260 nm 激发波长，而非 330 nm（Anumula 2005<sup>11</sup> 推荐值）。

配备糖谱分析色谱柱和荧光检测器的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱仪是一款出色的系统，可实现灵敏且重现的 2-AB 衍生 N-连接糖链的 HPLC 分析。

## 参考文献

1. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress* **2005**, *21*, pp 11-16
2. Omtvedt, *et al.* Glycan Analysis of Monoclonal Antibodies Secreted in Deposition Disorders Indicates That Subsets of Plasma Cells Differentially Process IgG Glycans. *Arthritis & Rheumatism* **2006**, *54*(11), pp 3433-3440
3. Arnold, *et al.* Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2005**, *564*, pp 27-43
4. Kanda, *et al.* Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* **2006**, *17*(1), pp 104-118
5. Chen, X.; Flynn, G.C. Analysis of N-glycans from recombinant immunoglobulin G by on-line reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2007**, *370*, pp 147-161
6. Huhn, C., *et al.* IgG glycosylation analysis. *Proteomics* **2009**, *9*, pp 882-913
7. Fernandes, D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *European Biopharmaceutical Review Summer* **2005**, pp 106-110
8. Melmer, *et al.* HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, pp 905-914
9. Haxo, T., *et al.* An Integrated Strategy for N-Glycan Sample Preparation and Analysis Suitable for All Stages of Therapeutic Protein Discovery, Characterization, Manufacture and Quality Release. Poster Prozyme Inc., Hayward, CA
10. Domann, *et al.* Separation-based Glycoproteomic Approaches using Fluorescent Labels. *Practical Proteomics* **2007**, *1*/2007, pp 70-76
11. Anumula, K.R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry* **2006**, *350*, pp 1-23
12. Campbell, *et al.* GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics Applications Note* **2008**, *24*(9), pp 1214-1216

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015  
2015 年 11 月 1 日，中国出版  
5991-4801CHCN



**Agilent Technologies**