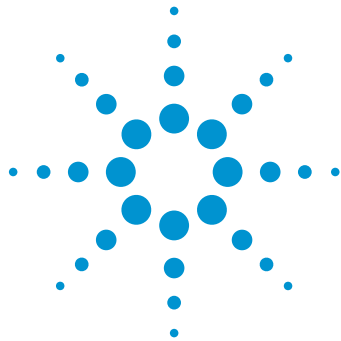




使用 UHPLC 和荧光检测对单克隆抗体和其他糖蛋白的 N-糖链进行分析

配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统

应用简报

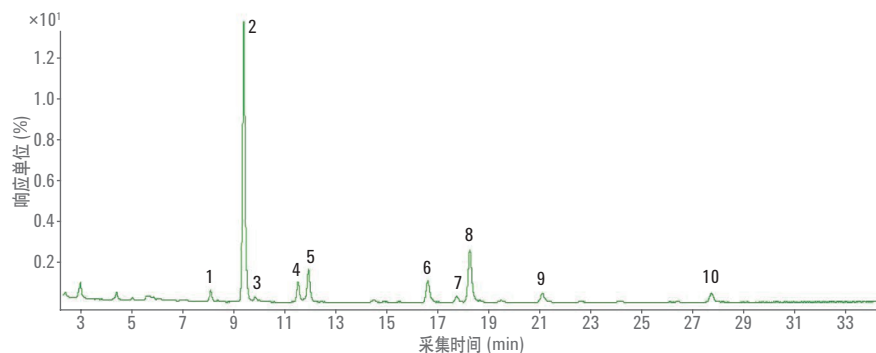
生物制剂和生物仿制药

作者

Sonja Schneider 和 Oscar Potter
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔特布隆

摘要

本文描述了使用配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，通过亲水相互作用色谱 (HILIC) 对 N-连接糖链的分析。使用 PNGase F 对单克隆抗体 (mAb) 及两种其他糖蛋白（胎球蛋白和卵清蛋白）进行酶解后，再利用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对释放所得的糖链进行衍生化反应。Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有的出色分离度使我们可以对 mAb 样品中所有主要的 N-糖链进行检测和鉴定。此外，从胎球蛋白和卵清蛋白中释放出的多种高度复杂的 N-糖链可以得到良好分离。



Agilent Technologies

前言

糖基化是一种最为常见的翻译后修饰。哺乳动物糖蛋白包括三种主要类型的糖链：即由一个或多个单糖单元构成的 N-连接糖链、O-连接糖链以及糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 脂锚。单个糖基化位点即可使糖蛋白质量和电荷数产生可观的异质性。这些低聚糖参与许多生物调节和识别过程，例如蛋白质分选、免疫及受体识别、炎症、致病性、新陈代谢及其他细胞过程^{1,2}。此外，治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会受到其糖基化模式的影响。

重组单克隆抗体治疗药物 (mAb) 是最大的 一类治疗性蛋白药物。此类治疗性药物的有效性高度依赖于 mAb 正确的糖基化模式，且迄今为止，所有批准的治疗性 mAb 均为免疫球蛋白 G (IgG)³。人 IgG 有一个单独的保守 N-连接糖基化位点，位于每条重链 Fc 区域的 Asn297⁴（图 1），这使得每个 IgG 上存在两条 N-糖链。它通常包含少量主结构和众多细微结构⁵。再加上 Fc 段中这两个糖基化位点上不同糖链的组合，导致每批 mAb 产品中包含大量不同的糖型。

糖链的结构在补体激活和受体亲和性上发挥着至关重要的作用⁶，可影响治疗性 mAb 的有效性。此外，非人类来源的糖链还存在安全性问题，因为它们会引发免疫反应。因此，糖基化模式分析是表征治疗性糖蛋白（尤其是 mAb）的一个重要部分。

本文依照美国功能性糖组学协会 (CFG) 的规定使用符号式糖链结构，如图 2 所示。归属的糖链也采用 Oxford 糖链命名法和另一种风格的命名法来描述，后者对于 mAb 糖链更常见。

图 2A 中展示了用于描述蛋白质不同糖链结构的糖残基的一般命名法。图 2B 中展示了

出现在人 IgG Asn-297 位点上的一些主要糖链结构。通常 N-糖链有一个核心结构，包括两个 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 及三个甘露糖 (Man) 单元。IgG Fc N-糖链主要为二分支复合型结构，部分经核心岩藻糖糖基化（例如 FA2 或 G0F）。

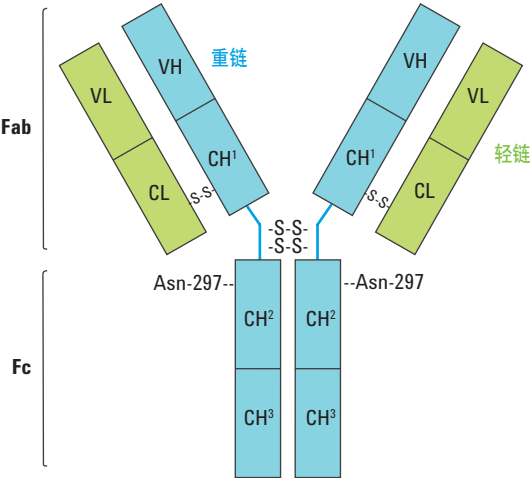


图 1. IgG 抗体结构

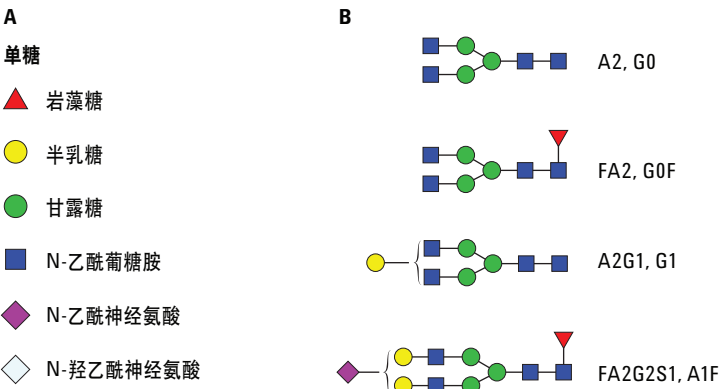


图 2. 糖链结构及异构体。A) 基于功能性糖组学协会的单糖描述，B) 人 IgG 的主要糖链结构

关于 N-糖链分析，已有一些不同的方法策略。多数方法均基于通过 PNGase F 对蛋白质 N-糖链的酶促释放。由于缺乏内在发色团，分析前通常还会使用荧光标记物对糖链进行衍生化⁷。每个 N-糖链包含一个可以与过量荧光标记物反应的还原端位点，因此每条 N-糖链将与一个荧光基团连接。因此，处理后的样品即适用于通过分离和荧光检测的相对定量分析，无需任何定量标样或校准步骤。2-AB 是一种稳定的中性标记物，常用于 N-糖链的分析^{7,8,9}。图 3 说明了 2-AB 通过还原胺化反应进行标记（希夫碱中间体未展示）。

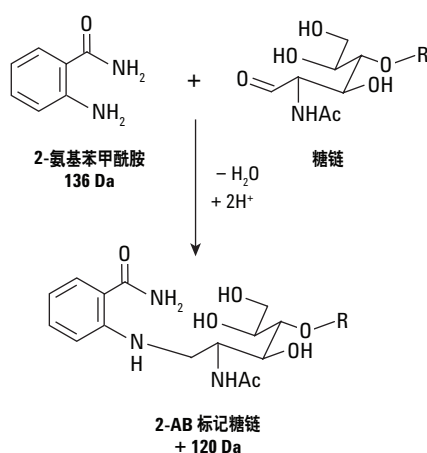


图 3. 采用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对糖链进行的标记

后续的纯化过程采用亲水相互作用色谱/固相萃取 (HILIC/SPE) 法以去除大量过量的 2-AB，从而不对 HILIC/FLD 分析产生干扰。

本文中，我们描述了通过 PNGase F 对 N-糖链进行酶促释放，并在采用 HILIC UHPLC 分离前使用 2-AB 进行衍生化反应，以及采用荧光检测和通过在线四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF/MS) 进行鉴定。

实验部分

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统由如下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)，带 35 μ L Jet Weaver 混合器
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器温控器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配有标准流通池

质谱系统

Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统

色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，
2.1 $\times$ 150 mm，1.8 μ m（部件号
859700-913）

软件

用于 LC 与 LC/MS 系统的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.05 [38]，以及 Agilent MassHunter 工作站软件，版本 B.05.01, Build 4.0.479.0。采用 2.1 稳定版 GlycoWorkbench (146) 创建糖链结构。

样品前处理

去糖基化步骤

使用 PNGase F 将 N-糖链从单克隆抗体、胎球蛋白和卵清蛋白上裂解下来。此酶可用于从糖蛋白上分离天冬酰胺连接的高甘露糖和复杂的混合型低聚糖，并且保持糖链的完整性。胎球蛋白上有三个 N-糖基化位点（Asn 81、Asn 138 和 Asn-158）以及四个 O-连接位点（Ser-253、Thr-262、Ser-264 和 Ser-323）¹¹。卵清蛋白只有一个糖基化位点，而 mAb 有两个糖基化位点。需根据 N-糖基化位点的数量调整 PNGase F 的用量。蛋白的去糖基化过程依据说明书，在 37 $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。然后停止反应，对样品真空干燥以进行进一步处理。

利用 2-AB 标记进行荧光检测及样品纯化

根据实验步骤使用 2-氨基苯甲酰胺对干燥的糖链样品进行标记，在 65 $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。标记过程完成后，根据说明书使用 HILIC 纯化小柱对样品进行纯化。纯化步骤完成后，对样品进行真空干燥，并采用超纯水:乙腈 30:70 (v/v) 复溶以便分析。

溶剂和样品

缓冲液 A 为 100 mM 甲酸铵水溶液，pH 为 4.5，缓冲液 B 为乙腈。所有试剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。单克隆抗体为小鼠抗 DYKDDDDK 标记抗体。甲酸铵、胎球蛋白和卵清蛋白、*Elizabethkingia miricola* 源 PNGase F、GlycoProfil 2-AB 标记试剂盒及 GlycoProfil 糖链纯化小柱均购自西格玛奥德里奇公司（美国圣路易斯）。

仪器条件

	抗体标准梯度	胎球蛋白 梯度	卵清蛋白 梯度
初始流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度	0 min 85% B	0 min 75% B	0 - 6 min 85% B
	5 min 75% B	45 min 50% B	10 min 80% B
	35 min 64% B	47 min 40% B, 流速 0.5 mL/min	60 min 70% B
	40 min 50% B	47.01 min, 流速 0.25 mL/min	65 min 50% B, 流速 0.5 mL/min
	42 min, 流速 0.5 mL/min 42.01 min, 流速 0.25 mL/min	49 min 0% B	65.01 min, 流速 0.25 mL/min
	43 min 0% B	51 min 0% B	68 min 0% B
	48 min 0% B	51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min	73 min 0% B
	50 min 85% B 50.01 min, 流速 0.25 mL/min	52.00 min, 流速 0.5 mL/min	74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min
	51 min, 流速 0.5 mL/min		75.00 min, 流速 0.5 mL/min
停止时间	51 min	52 min	75 min
后运行时间	20 min	20 min	20 min
进样量	5 µL	1 µL	1 µL
温控自动进样器	5 °C		
柱温	60 °C		
FLD	激发波长 260 nm, 发射波长 430 nm		
峰宽	> 0.013 min (响应时间为 0.25 s) (37.04 Hz)		

MS 参数	
干燥气温度	250 °C
鞘气温度	250 °C
干燥气流量	8 L/min
鞘气流速	8 L/min
雾化器电压	25 psi
Vcap	3,500 V
喷嘴电压	1,000 V
碎裂电压	200 V
锥孔电压	45 V
Oct 1 RF Vpp	550
碰撞能量	15 和 30 V
模式	MS 和 目标 MS/MS

结果与讨论

分析源自单克隆抗体的 N-糖链

图4中显示了mAbN-糖链的分离情况。mAb糖链模式实现了最佳分离，所有主要的 N-糖链均得到分离并可积分。根据峰面积百分比的计算结果进行了相对定量分析。通过设置 1260 Infinity 荧光检测器的最佳糖链检测波

长，可实现标记后糖链的高强度响应，其中激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm¹⁰。

根据观察到的母离子质量和相关的 MS/MS 谱图，可将得到的 HILIC 糖链图谱归属至相应的糖链结构。将母离子质量输入 ExPASy 的 GlycoMod 工具中以查找相关糖链结构。

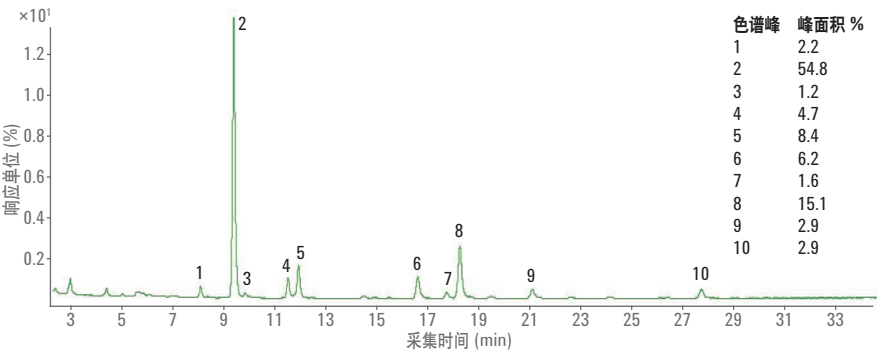


图 4. 以 260 nm 为激发波长进行 mAb N-糖链分离的荧光检测

根据实验测得的质量，GlycoMod 可预测已标记或未标记的可能糖链结构 (<http://web.expasy.org/glycomod/>)。用于糖链归属和糖链结构设计的另一款有用的工具是 GlycoWorkbench¹⁵，本实验中将其用于制作糖链结构动画。

作为该工作流程的一个实例，我们选择了母离子质量为 1026.88 [z = 2] (峰 7 和 8) 的 N-糖链 FA2G1Sg1。针对此质量，糖链数据库中

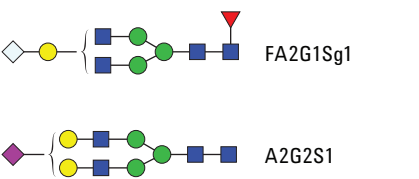


图 5. 对于 1026.88 [z = 2] 的母离子质量，两个最可能的糖链结构 FA2G1Sg1 和 A2G2S1

随后利用 MS/MS 数据来区分这两种潜在的结构。图 6 展示了 N-糖链 FA2G1Sg1 的碰撞诱导解离 (CID) MS/MS 谱图。这个 MS/MS 数据确定了一种唾液酸，即 N-羟乙酰神经氨酸 (NeuGc) 的存在，它在 m/z 308 (NeuGc) 和 m/z 673 (与半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖连接的 NeuGc) 处的碎片离子有强信号。同时，在 m/z 292 或 m/z 657 处未产生信号，这表明不存在 N-乙酰神经氨酸 (NeuAc)。因此，这些结果有力地证明了此糖链结构为含有 NeuGc 的 FA2G1Sg1，而不是含有 NeuAc 的 A2G2S1。支持将一个结构归属为含有核心岩藻糖的原因是 MS/MS 数据在 m/z 512 或 m/z 350 处没有强碎片离子信号，而如果岩藻糖位于外臂区，则这两处应存在信号。

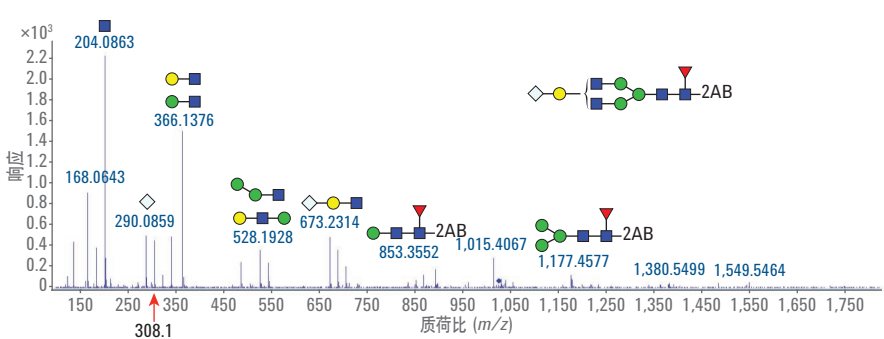


图 6. FA2G1Sg1 的 MS/MS 谱图 - 1026.88 [z = 2] - 1931.6876 Da

所有其他峰都通过分析其 MS 和 MS/MS 谱图，以类似的方式进行归属。归属结构列于表 1 中。结果表明，mAb 主要含有核心岩藻糖基化的复杂糖链，包括一些带有 NeuGc 的结构。这些发现一般适用于由大

鼠细胞产生的 IgG 抗体。正常情况下人糖蛋白中不含 NeuGc，并且这一结构不适合用于治疗性蛋白¹²。人糖蛋白中的唾液酸通常是 N-乙酰神经氨酸。

表 1. 大鼠单克隆抗体质量和 2-AB 糖链结构归属概述

色谱峰	Oxford	生物制药 mAb 风格	检测到的质量 (Da)	结构
1	FA1	G0-GlcNAc	1,380.537 [z = 1]	
2	FA2	G0F	792.3130 [z = 2]	
3	M5	Man5	1,355.5 [z = 1]	
4,5	FA2G1	G1F	873.34 [z = 2]	
6	FA1G1Sg1	G1FSg1-GlcNAc	925.34 [z = 2]	
7,8	FA2G1Sg1	G1FSg1	1,026.88 [z = 2]	
9	FA2G2Sg1	Ag1F	1,107.9135 [z = 2]	
10	FA2G2Sg2	Ag2F	1,261.446 [z = 2]	

胎球蛋白和卵清蛋白中的抗体分析

实验通过 PNGase F 将胎球蛋白和卵清蛋白这两种蛋白质中的 N-糖链裂解下来，以 2-AB 进行衍生化反应并采用配有在线 MS 的 HILIC/UHPLC 进行分析。图 7 展示了牛胎球蛋白 N-糖链 的分离情况。此糖基化谱图主要展示了含 NeuAc 的复杂非岩藻糖基化二分支或三分支糖链。采用 Q-TOF/MS 检测可实现对 9 个主要峰的归属。表 2 展示了已归属的糖链结构。

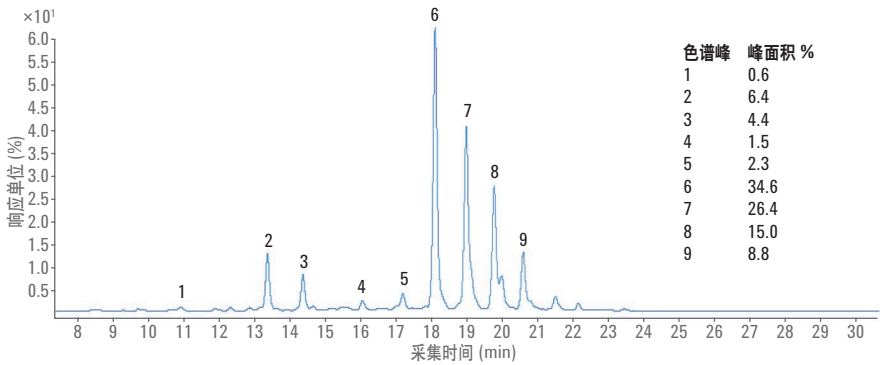


图 7. 2-AB 标记胎球蛋白的分离

表 2. 卵清蛋白 N-糖链的详细信息

色谱峰	Oxford	结构
1	A2G2S1	
2,3	A2G2S2	
4	A3G3S2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
8	A3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

图 8 展示了卵清蛋白糖链的分离情况。卵清蛋白仅在一个位点 (Asn-292) 上发生 N-糖基化，但是与该位点相关的糖基化模式非常复杂¹³。由于该糖链谱图的复杂性，需要调整梯度并延长分离时间，以实现更高的分离度。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的高性能可以实现对 50 多个峰的分离，同时具有良好的信噪 (S/N) 比。实验根据母离子质量数据（表 3）对 20 个主要峰进行了归属。由于同量异位结构存在的很大可能性，而且其中的某些结构不能通过 MS/MS 数据进行区分，因此我们未能对详细结构作出定论。取而代之，我们依据其单糖组成来描述 N-糖链。

与相对简单的 mAb 糖链模式相比，其他两种糖蛋白存在更多种类的糖链结构。与 mAb 糖链相反，在卵清蛋白中没有检测到岩藻糖基化糖链，与先前报道的鸟类卵糖蛋白未经岩藻糖基化的结果吻合¹⁴。

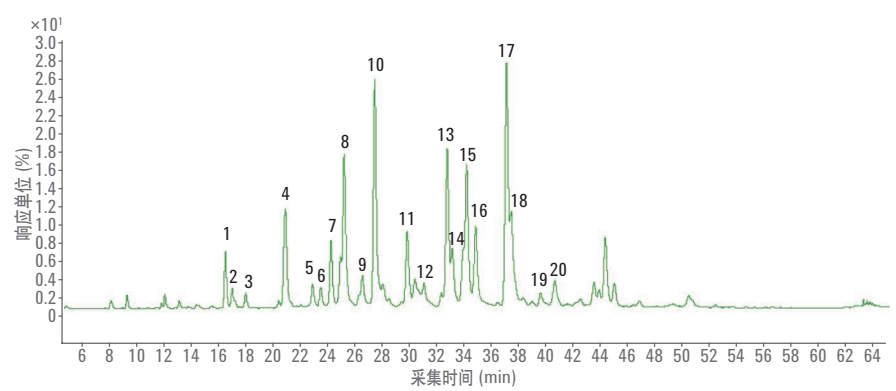


图 8. 卵清蛋白释放的 N-糖链的分离情况

表 3. 卵清蛋白 N-糖链归属的质量和单糖组成。H = 己糖，即半乳糖或甘露糖；N = N-乙酰氨基葡萄糖

色谱峰	质量 + 2AB (Da)	计算的质量 (Da)	组成 (简短格式)	组成 (详细格式)
1,2	1234.48 [M]	1114.48	H3N3	(HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3	1193.45 [M]	1073.45	H4N2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂
4	1437.56 [M]	1317.56	H3N4	(HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
5	1396.53 [M]	1276.53	H4N3	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
6,7	1640.64 [M]	1520.64	H3N5	(HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
8	1355.506 [M]	1235.51	H2N5	(Hex) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
9	1599.61 [M]	1479.61	H4N4	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
10	1843.73 [M]	1723.73	H3N6	(HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
11	1802.74 [M]	1682.74	H4N5	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
12,14	2046.884 [M]	1926.88	H3N7	(HexNAc) ₆ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
13	1517.56 [M]	1397.56	H6N2	(Hex) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
15	1761.6574 [M]	1641.66	H5N4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
16	2005.8098 [M]	1885.81	H4N6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
17	2249.9728 [M]	2129.97	H3N8	(HexNAc) ₆ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
18	1964.82 [M]	1844.82	H5N5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
19,20	2208.87 [M]	2088.87	H4N7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

结论

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统与 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统联用是分析 2-氨基苯甲酰胺衍生的 N-糖链样品的理想组合。本实验对一种单克隆抗体和其他两种糖蛋白样品使用 PNGase F 进行样品前处理以释放 N-连接糖链, 然后利用 2-AB 进行衍生化, 再进行 HILIC 样品纯化。

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有优异的分离能力, 可以实现大鼠 mAb 样品中所有主要 N-糖链的分离和鉴定。这款色谱柱还可对胎球蛋白和卵清蛋白复杂的二分支和三分支 N-糖链进行分析, 表现出极高分离度。经优化的 260 和 430 nm 的荧光激发和发射波长实现了更高的信噪比。根据样品的复杂性, 电喷雾离子化 Q-TOF MS 分析能够归属不同的糖链结构或确定其单糖组成。

参考文献

1. Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, pp 6123-6127.
2. Peracaula, R; *et al.* Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology* **2003**, *13*, pp 227-244.
3. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Progr.* **2005**, *21*, pp 11-16.
4. Arnold, J. N; *et al.* Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, *564*, pp 27-43.
5. Fernandes, D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *Euro. Biopharm. Re.* **2005**, Summer, pp 106-110.
6. Abès, R; Teillaud, J. L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, pp 146-157.
7. Ruhaak, L. R; *et al.* Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *397*, pp 3457-3481.
8. Royle, L; *et al.* HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, pp 1-12.
9. Huhn, C; *et al.* IgG glycosylation analysis. *Proteomics* **2009**, *9*, pp 882-913.
10. Melmer, M; *et al.* HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, pp 905-914.
11. Ding, W; *et al.* Identification and Quantification of Glycoproteins Using Ion-Pairing Normal-phase Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, *8*, pp 2170-2185.
12. Leibiger, H; *et al.* Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem. J.* **1999**, *338*, pp 529-538.
13. Anumula, K. R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, pp 1-23.
14. Montreuil, J; Vliegthart, J. F. G; Schachter, H., Eds.; Glycoproteins II. Elsevier B. V., Amsterdam, **1997**.
15. Ceroni, A; *et al.* GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, pp 1650-1659.

www.agilent.com/chem/cn

本文中的信息如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2014
2014 年 10 月 1 日, 中国印刷
5991-5253CHCN



Agilent Technologies