

从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-连接糖链全面分析方法

作者

David L. Wong、Oscar Potter、
Jordy Hsiao 和 Te-Wei Chu
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

前言

单克隆抗体 (mAb) 及其衍生物包含一类非常重要的生物分子，它们具有广泛的应用。由于 mAb 的异质性，必须对此类生物分子进行全面的分析表征。分析包括测定 mAb 及其异构体的完整氨基酸序列，以及糖基化、氧化和脱酰氨基化等翻译后修饰 (PTM) 的表征。

糖基化在许多生物过程中起着重要的作用。它还会对治疗效果、稳定性、药代动力学和免疫原性产生影响¹。糖链表征通常会涉及到 NMR、HPLC 或质谱 (MS) 等技术。由于糖链在组成和结构方面十分多样，并且很难采用电喷雾电离，因此基于质谱方法的糖链表征具有挑战性。InstantPC 是一种 ProZyme Inc. 推出的新型荧光标签 (图 1)，已开发用于改善 N-糖链分子的 MS 电离效果和检测灵敏度。

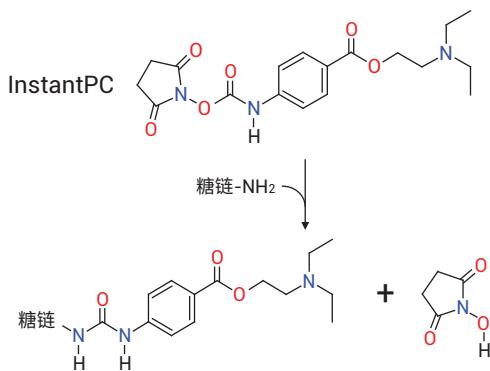


图 1. mAb 释放的 InstantPC 标记 N-糖链示意图

传统的糖链分析方法费时费力，而且步骤繁琐，首先通过 PNGaseF 酶解释放糖链（过夜），然后进行样品净化，通过还原胺化反应进行荧光标记（2-AB 或 InstantPC），最后在 LC-FLD 或 LC/MS 分析之前对释放的标记 N-糖链进行净化^{2,3}。尽管使用荧光标签可显著提高 MS 灵敏度，但是手动样品前处理费时费力、重现性低以及不便扩大样品处理规模是生物制药行业面临的主要问题。

本研究展示了如何使用 AssayMAP Bravo 液体处理平台增加糖链表征工作流程的样品通量。该解决方案结合了 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统、Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱、安捷伦高灵敏度荧光检测器 (FLD) 以及 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF。Q-TOF 数据使用 Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件自动进行分析（图 2）。该解决方案通过便捷的样品前处理、简化的数据采集和数据分析显著提高了效率，另外还可基于 FLD 或 MS 信号灵活进行定量分析，并从 N-糖链质量数数据库获得精确质量数峰归属结果。

实验部分

样品前处理

本研究中使用四种单克隆抗体 (mAb)：

- 单克隆抗体标准品 RM 8671，购自美国国家标准技术研究院 (NIST)，又名 NISTmAb
- 赫塞汀（曲妥珠单抗）制剂，购自基因泰克 (So. San Francisco, California, USA)
- Sigma SiLu mAb，购自 Sigma-Aldrich (SiLu Lite，部件号：MSQC4)
- 经安捷伦研发实验室表达和纯化的 CHO mAb1

将所有 mAb 样品用去离子水稀释至 1.0 µg/µL，之后使用 AssayMAP Bravo 液体处理系统 (G5542A) 以及带 InstantPC (96%) 的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖链样品前处理产品（购自 ProZyme Inc.）进行样品前处理。样品前处理的详细步骤请见 ProZyme 的应用简报（产品代码：GPPNG-PC）。在最终的净化步骤之后，经洗脱、释放和标记的 N-糖链最终体积为 50 µL，因此每 1 µL 制得的样品含有 1 µg mAb 中的 N-糖链。



图 2. mAb 糖链表征工作流程

LC/MS 分析

在配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B) 的 1290 Infinity II 液相色谱系统，以及配备双安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统上进行 LC/MS 分析。将检测器设置为 $\lambda_{\text{激发}} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}} = 345 \text{ nm}$, PMT 增益 = 10。用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) 对糖链进行色谱分离。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。在 LC/MS 分析中每次进样约 1–2 μL 的 N-糖链样品。

数据处理

使用 MassHunter BioConfirm B.09.00 软件的释放糖链工作流程对经 InstantPC 标记的释放 N-糖链进行分析。分析工作流程中采用安捷伦个人化合物数据库 (PCD) 糖链数据库。PCD 糖链数据库能够提供准确的糖链鉴定和确认结果。最后，使用 BioConfirm B.09.00 软件中的报告生成器程序生成 PDF 格式的分析物总结报告。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统	
色谱柱	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm
柱温箱	4 °C
溶剂 A	50 mM 甲酸, 用氢氧化铵将 pH 调至 4.5
溶剂 B	乙腈
梯度	0–0.5 min 内 B 由 75% 降至 71% 0.5–16 min 内 B 由 71% 降至 67.5% 1–22 min 内 B 由 67.5% 降至 60% 22–22.5 min 内 B 由 60% 降至 40% 22.5–23.5 min 内 B 为 40% (0.7 mL/min) 23.5–24 min 内 B 由 40% 升至 75% (0.7 mL/min) 24–30 min 时 B 为 75% (0.9 mL/min)
柱温	40 °C
流速	0.4 mL/min
进样量	2.0 μL

使用 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)。将检测器设置为 $\lambda_{\text{激发}} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}} = 345 \text{ nm}$, PMT 增益 = 10。

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
干燥气温度	150 °C
干燥气	9 L/min
雾化器 (psig)	35
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	10 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	500 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
四极杆 AMU	95
采集模式	低质量数范围, HiRes (4 GHz)
质量数范围	m/z 300–1700
采集速率	2 质谱图/秒

结果与讨论

对释放的标记糖链进行 LC-FLD 分析是测定药用蛋白糖基化最常用的方法之一。我们在之前发布的应用简报中展示了使用各色谱柱尺寸和运行条件对几种 mAb 糖链结构的优化分离^{4,5}。本报告中的分离方法代表了本研究中几种不同 mAb N-糖链样品的最佳总体性能，即具有最高的峰分离度和优异的稳定性。

图 3 所示为 NISTmAb N-糖链的代表性色谱图（FLD 和 MS EIC）。FLD 色谱图（图 3 上图放大图）表明检测到 15 个以上的糖链峰。丰度较高的糖链（例如 G0F、G1F 异构体和 G2F）糖基化模式的荧光和质谱数据将近（图 7）。

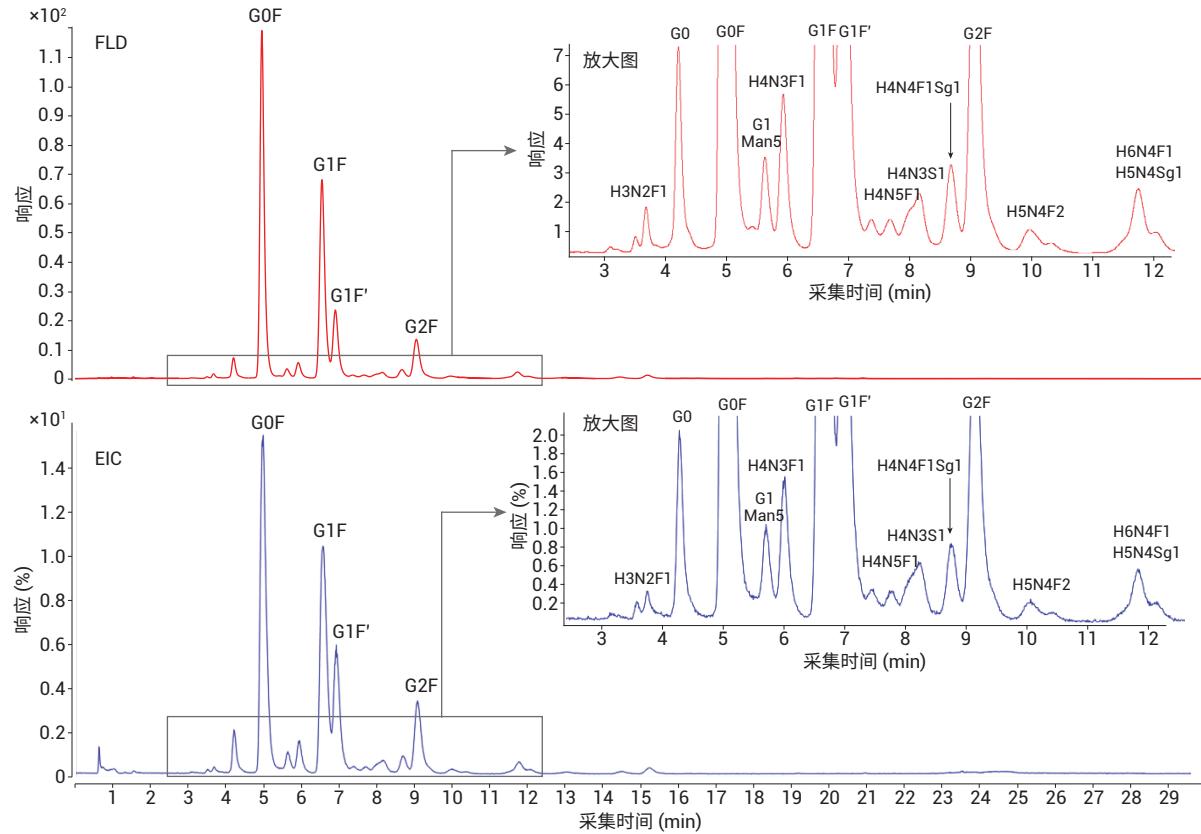


图 3. NISTmAb 得到的 InstantPC 标记 N-糖链的 FLD 色谱图和质谱图 (EIC)

虽然荧光检测不能直接进行结构解析，但 mAb 糖链的质谱分析可以用于确定糖链的单糖组成。即使在有很多 mAb N-糖链的情况下，这一组成信息也足够获得可信度较高的结构归属结果。带正电荷的 InstantPC 标签和高灵敏度安捷伦喷射流离子源 (AJS) 电喷雾电离 (ESI) 离子源技术的结合显著提高了 N-糖链的质谱检测灵敏度。此外我们优化了质谱参数，在最大程度提升 InstantPC 标记 N-糖链灵敏度的同时，最大程度减少不稳定

分子的源内裂解。经优化的条件大大提高了质谱图的质量，从而实现准确的 N-糖链鉴定和相对定量结果。图 4 所示为一个 InstantPC 标记 N-糖链 (G2F) 的质谱图，其中只有双电荷离子 $[M+2H]^{2+}$ 及其加合物 $[M+H+Na]^{2+}$ 和 $[M+H+K]^{2+}$ 以质子化形式存在（请注意：InstantPC 标签与糖链的自由还原末端形式相比具有 261.1477 Da 的质量数增加）。

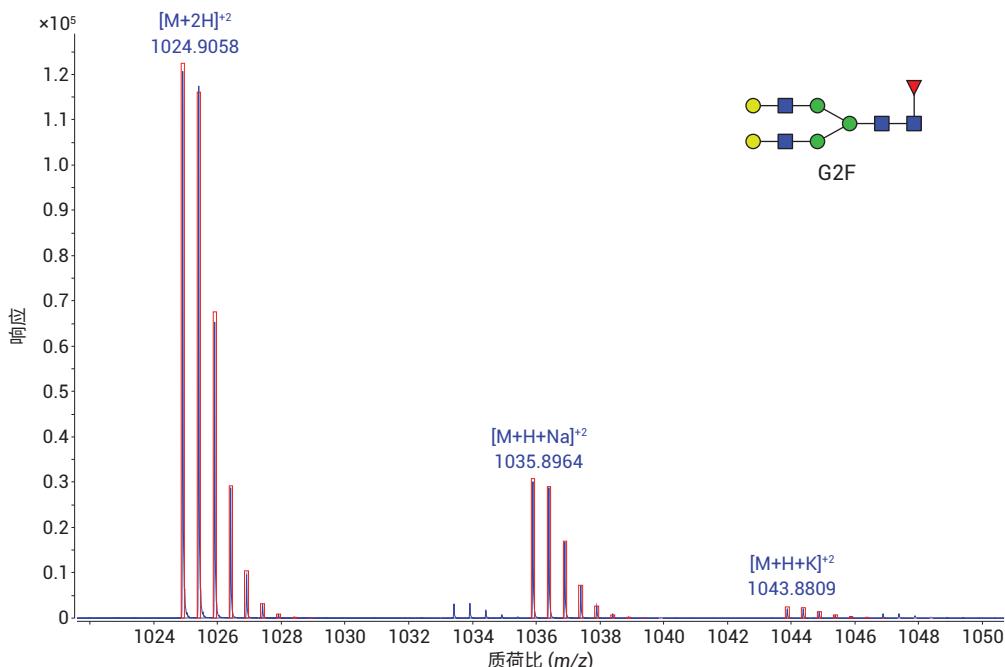


图 4. InstantPC 标记 N-糖链 (G2F) 的代表性谱图。InstantPC 标记 G2F 糖链及其加合物的电荷态具有优异的同位素保真性。红色方框代表理论同位素模式，蓝色方框代表实际的原始质谱图

我们在 MassHunter BioConfirm 软件中引入一个用于释放糖链分析的工作流程。这一工作流程能够轻松设置样品的批量分析。该软件适用于各种市售或定制的荧光标签。个人化合物数据库 (PCD) 包含糖链的精确质量数和结构信息，用于凭借安捷伦专有的分子式查找算法进行鉴定。随后，可以客户自定义的报告格式创建总结分析报告。图 5 所示为鉴定出糖链的提取离子流色谱图 (EIC)。

BioConfirm 中的生物分子结果表 (图 6) 方便快速查看详细的糖链信息，包括名称、质量数、保留时间、峰面积、组成和数据库匹配得分。对于可能有异构体结构的糖链显示了多个

ID。这使用户能够查看样品的 TIC 和各个糖链的质谱图。另外，多个数据文件也可以批量模式进行处理和分析。用户可以使用结果表中选中糖链的峰面积进行相对定量分析。

之前的研究证明，InstantPC 标记的糖链在 MS 和 FLD 分析中得出了相似的相对定量分析结果⁴。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件对 CHO mAb1 样品的 FLD 色谱图进行积分。计算丰度较高的前 7 个 N-糖链的相对总丰度，并与质谱分析中所得的相同数据进行比较 (图 7)。为得到等效结果，不要使质谱检测器饱和。该工作流程的理想进样量是约 0.5 μg mAb 中释放的 N-糖链。

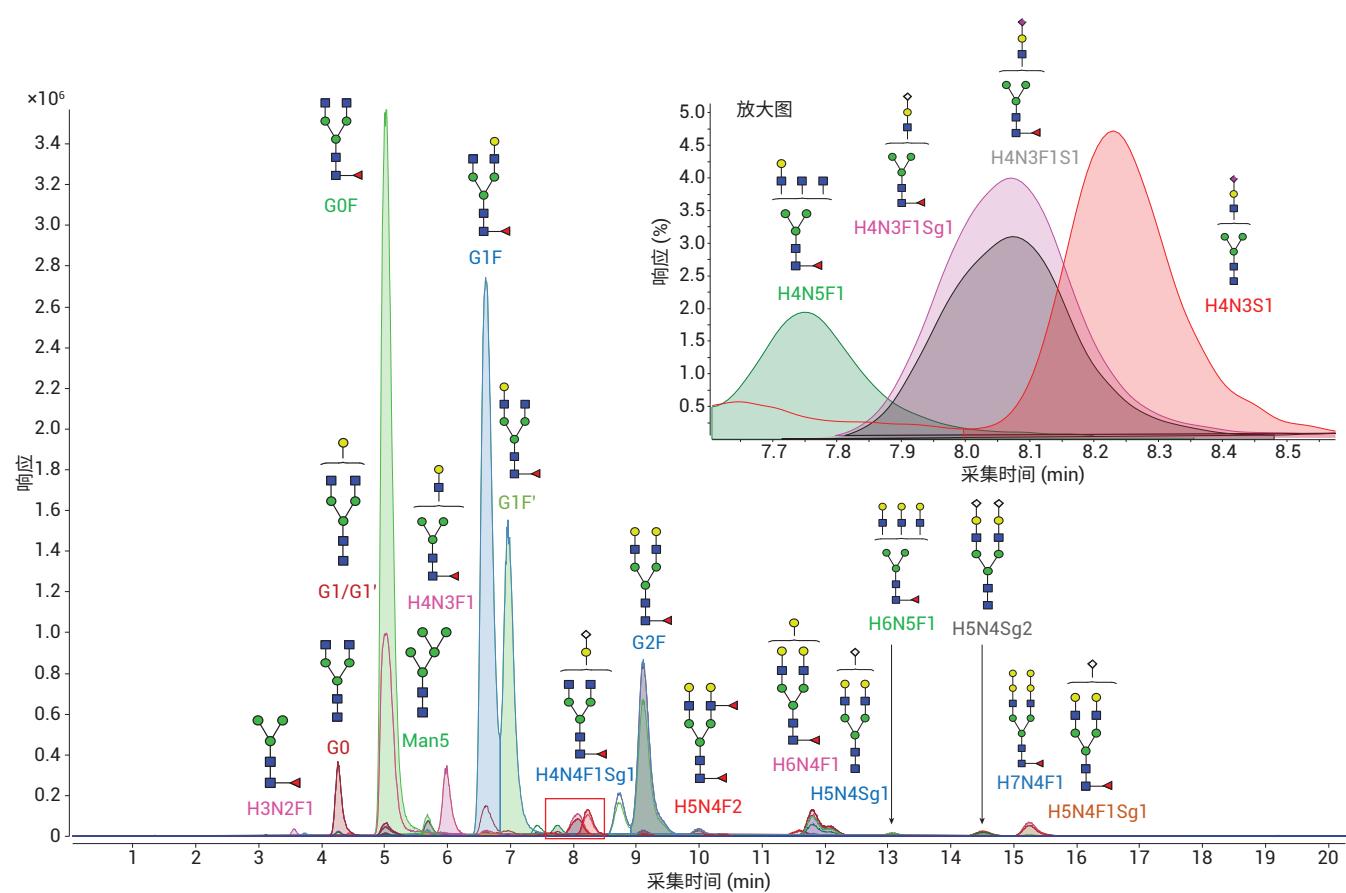


图 5. NISTmAb 中鉴定的糖链提取离子色谱图。插图：所鉴定糖链在 7.6–8.6 min 的保留时间范围内洗脱的 EIC 放大图

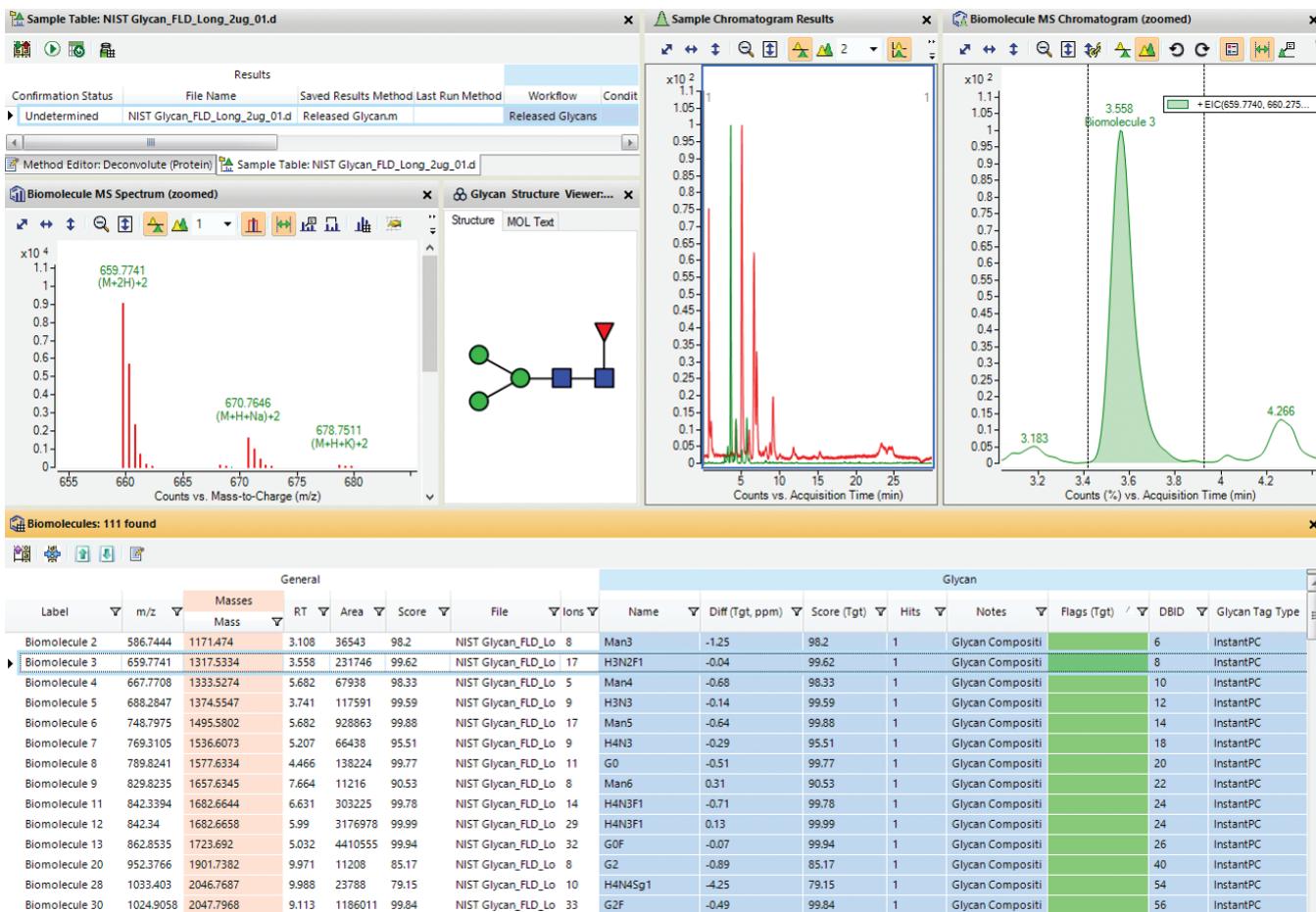


图 6. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件与代表性糖谱结果的截屏

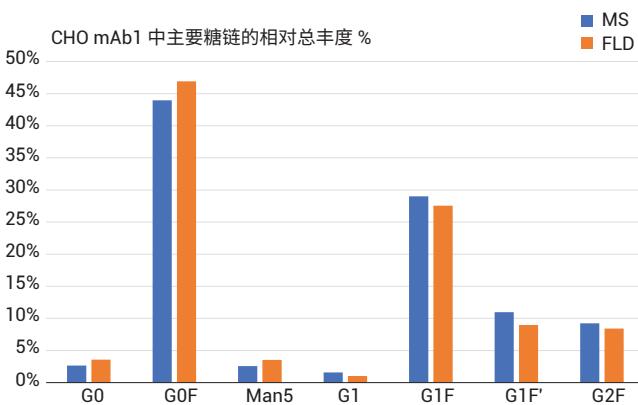


图 7. CHO mAb1 (0.5 μg) 中主要 N-糖链的相对总丰度 %, 以及 MS 检测定量 (蓝色) 和 FLD 检测定量 (橙色) 的结果对比

为总结和比较质谱结果，使用每种 mAb 样品中丰度较高的 5 个 N-糖链来计算相对总丰度 %。图 8 所示为得到的数据。

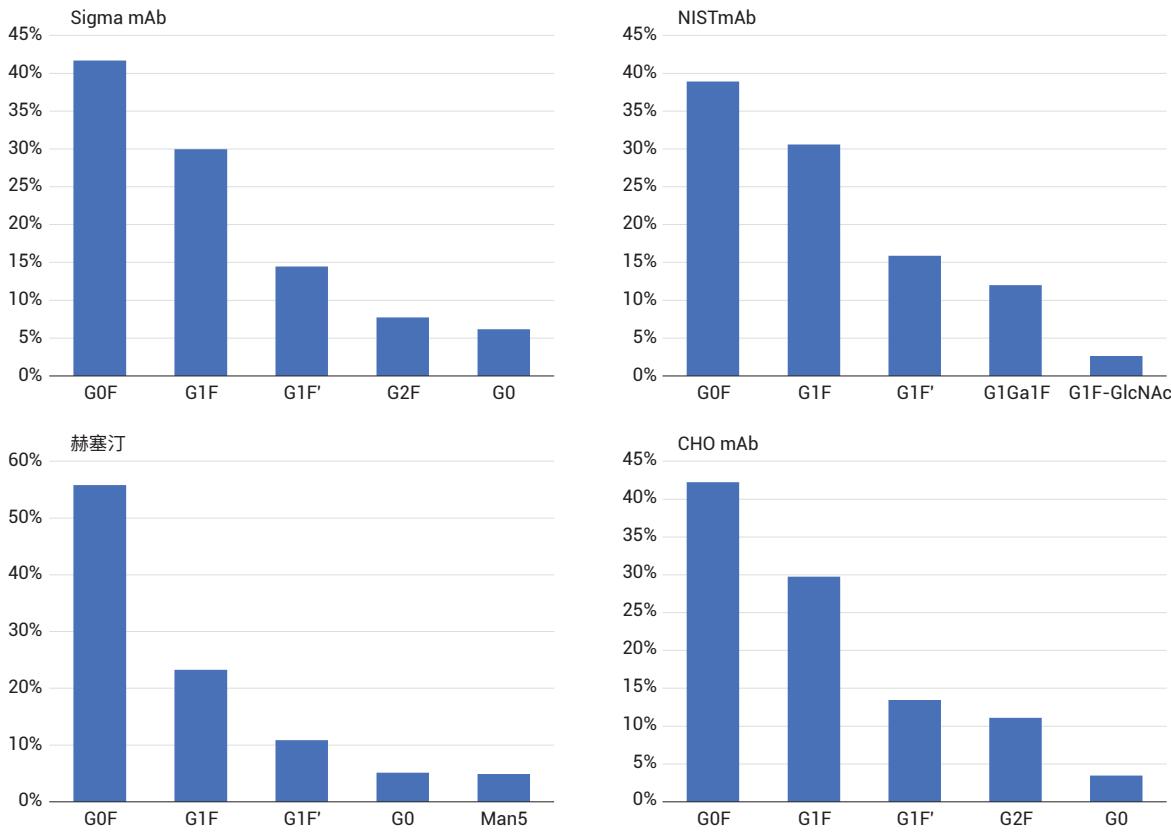


图 8. 四种 mAb 样品中丰度较高的 5 个 N-糖链的相对总丰度 %。注：NISTmAb 中含有疑似 G1F 的结构，另外还有标记为 G1Ga1F 的 α-1,3-半乳糖

BioConfirm B.09.00 软件允许用户使用报告生成器程序来生成自己的糖谱报告。图 9 所示为释放糖链报告的一个示例。在报告生成器中，用户可以使用样品信息、样品色谱图、生物分子总结和生物分子详情等信息来自定义报告页面。相应的糖链结构与所鉴定的糖链一同显示。

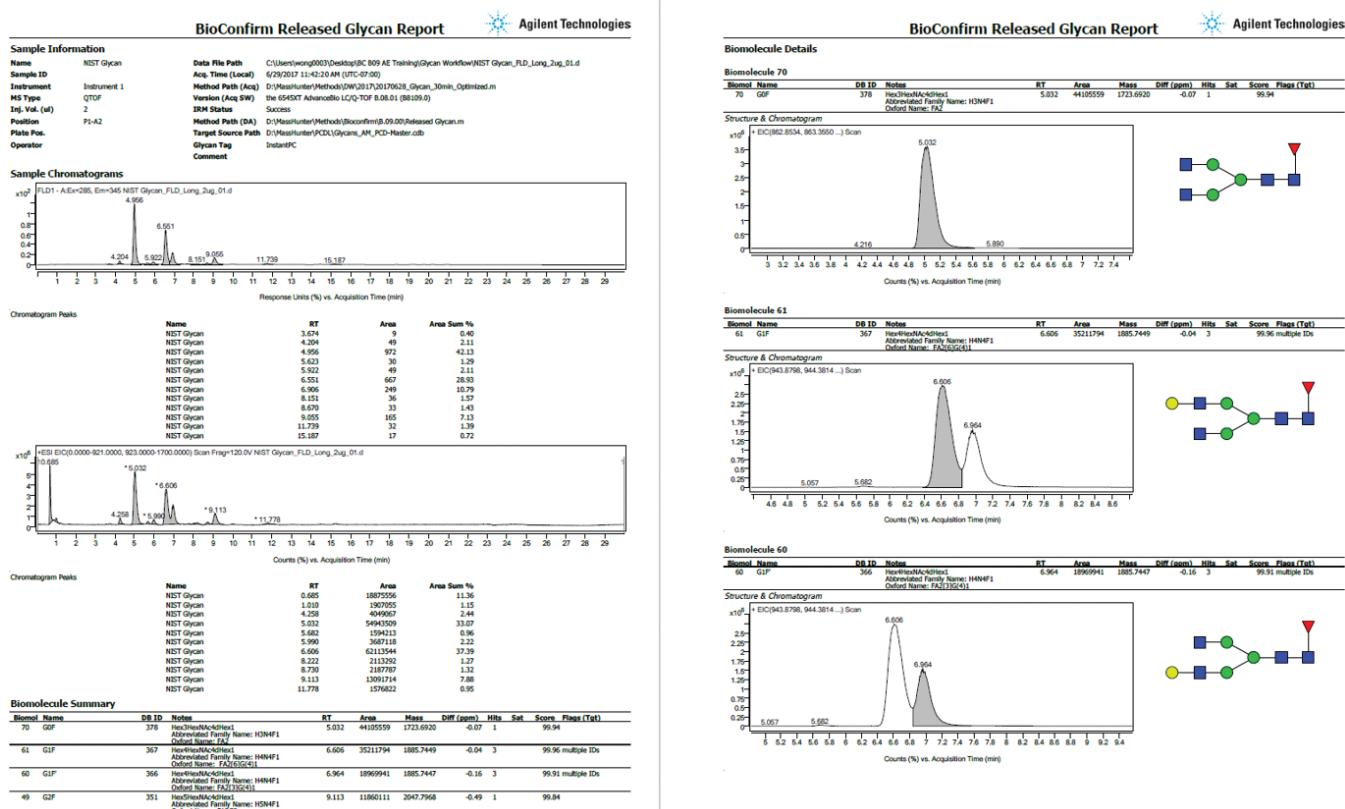


图 9. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件 — 释放糖链报告

结论

本研究展示了 Agilent AssayMap Bravo、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 MassHunter BioConfirm 软件作为释放糖链分析集成解决方案的优异性能。

- 该工作流程在实现高通量样品前处理的同时，还使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱获得优异的色谱分离结果
 - BioConfirm B.09.00 包含的糖链数据库易于设置和使用，具有准确分析、鉴定和执行相对定量的功能
 - 使用 6545XT 糖链分析能够生成与荧光分析相似的定量结果，可用于比较不同 mAb 样品之间的 N-糖链差异
 - BioConfirm B.09.00 的报告生成器功能可以创建定制报告
- 总之，安捷伦的解决方案使 N-糖链分析从样品前处理到高精度数据分析的整个过程实现了自动化。该方法使用荧光和额外的质谱检测鉴定手段，为糖链分析提供了高灵敏度和最佳定量结果。

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, 6123-6127
2. Anumula, K. R. "Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates" *Anal. Biochem.* **2006**, 350, 1-23
3. 使用 UHPLC 和荧光检测对 mAb 和其他糖蛋白的 N-糖链进行分析，安捷伦科技公司，出版号 5991-5253ZHCN
4. Comparison of Relative Quantification of Monoclonal Antibody N-glycans Using Fluorescence and MS Detection (使用荧光和质谱检测获得的单克隆抗体 N-糖链相对定量结果的比较)，安捷伦科技公司，出版号 5991-6958EN
5. Analysis of Monoclonal Antibody N-glycans by Fluorescence Detection and Robust Mass Selective Detection Using the Agilent LC/MSD XT (使用安捷伦 LC/MSD XT 通过荧光检测器和稳定的质量选择检测器进行单克隆抗体的 N-糖链分析)，安捷伦科技公司，出版号 5991-8071EN

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。