

# 采用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对单克隆抗体进行三个 不同层次的糖基化分析

## 作者

David L. Wong  
安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, CA, USA

## 前言

单克隆抗体 (mAb) 及其衍生物代表一类非常重要的生物分子，它们具有广泛的应用。随着 mAb 产品越来越多地被批准上市及其近年来销售量的不断增长，对其进行全面分析表征的需求也逐渐增加。mAb 本质上是异质性分子，其中包括多种类型的序列、修饰和结构异构体。蛋白糖基化是 mAb 中一种主要的翻译后修饰 (PTM)，在多个生物学过程中起到重要的作用。与 mAb 分子连接的糖链的分布和组成可影响疗效和免疫原性；治疗性 mAb 中与糖基化有关的一致性质量控制已成为药物生物处理中的首要环节<sup>1</sup>。

四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液相色谱/质谱 (LC/MS) 系统因其在高质量范围内仍具有极高的质量数准确度和分辨率，已广泛用于分析完整 mAb 和 mAb 亚基，进行 mAb 肽序列谱分析，以及表征 PTM<sup>2-4</sup>。

通常，糖链/糖型表征包括四个层次的 LC/MS 工作流程（图 1）：

- 第 1 层和第 2 层重点关注完整和还原 mAb 分子的糖型分析
- 第 3 层分析 mAb 经蛋白酶解后产生的糖肽，该分析通常属于肽谱分析工作流程的一部分
- 第 4 层表征通过酶切或其他机制释放出的糖链

鉴于我们已在之前的应用简报中报道过对一种 IgG 蛋白质的糖肽分析（第 3 层）<sup>5</sup>，因此在本研究中采用 NISTmAb 对其他三个基于 LC/MS 的主要工作流程进行评价（第 1、2 和 4 层）。在本研究中，采用的全部三种方法均用于给定蛋白质的定量糖基化分析。这些工作流程包括以下设备：

- Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台
- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统
- Agilent PLRP-S 或 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱
- 高灵敏度安捷伦荧光检测器 (FLD)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统

数据由 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 采集，并由 Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件自动分析（图 2）。该解决方案通过便捷的样品前处理和简化的数据采集，不仅显著提高了效率，还提高了数据分析中的准确度。

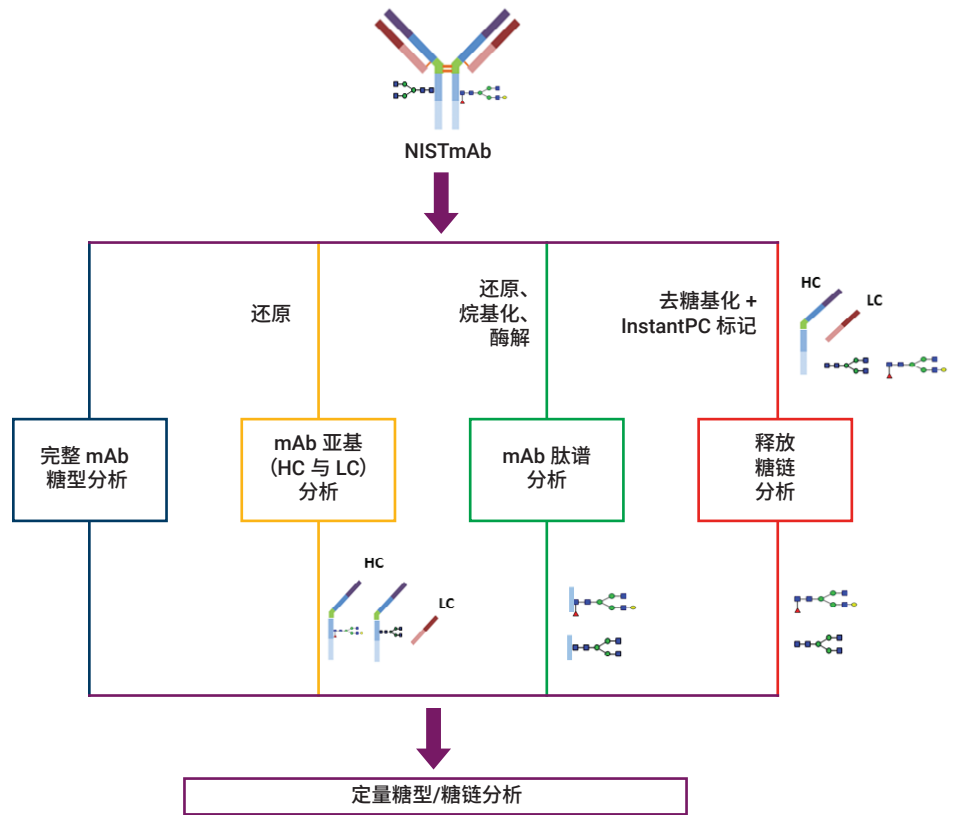


图 1. 不同糖型/糖链定量分析工作流程



图 2. mAb 糖型/糖链表征工作流程的分析组件

## 实验部分

### 材料与方法

单克隆抗体标准品 RM 8671, 购自美国国家标准技术研究院 (NIST), 该标准品通常被称为 NISTmAb。2,2,2-三氟乙醇 (TFE)、DL-二硫苏糖醇 (DTT) 和三羧甲基磷酸 (TCEP) 购自 Sigma-Aldrich。快速 PNGase F 购自 New England Biolabs。带 InstantPC (96 ct) 的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖链样品前处理产品购自 ProZyme 公司。所有工作流程中使用的 NISTmAb 样品均用 DI 水稀释至 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

### 样品前处理

完整 mAb 糖型分析工作流程无需样品前处理。准确定量分析 NISTmAb 亚基 (重链) 的糖型需要对蛋白质进行完全还原。因此, 首先用 40 mM DTT 在 60 °C 下进

行 30 分钟还原反应, 然后再加入 25 mM TCEP 在室温下反应 30 分钟。最后, 将 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理系统 (G5542A) 用于释放糖链的定量工作流程。样品前处理的详细步骤在 Prozyme 的应用简报 (产品编码: GPPNG-PC) 中有描述。经过最终净化步骤后, 释放的标记 N-糖链的最终洗脱浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

### LC/MS 分析

在配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B) 的 Agilent 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。采用 Agilent PLRP-S 色谱柱 (2.1  $\times$  50 mm, 1,000 Å, 5  $\mu\text{m}$ ) 进行完整 NISTmAb 和还原 NISTmAb 的液相色谱分离。用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (2.1  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) 对糖

链进行色谱分离。将荧光检测器设置为  $\lambda_{\text{激发}} = 285 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{发射}} = 345 \text{ nm}$ , PMT 增益 = 10。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。在完整蛋白质和亚基分析中, 蛋白质进样量约为 0.5  $\mu\text{g}$ 。在 N-糖链实验中, 对 1–2  $\mu\text{g}$  完整蛋白质释放的游离糖链进行进样。

### 数据处理

本研究所有数据处理均采用 MassHunter BioConfirm B.09.00, 该软件包含三种主要的生物制药工作流程 (完整 mAb、肽谱和释放糖链分析)。这款软件程序功能强大, 可简化下游数据分析, 从而实现目标生物分子的自动化鉴定和相对定量。在释放糖链工作流程中, 采用了安捷伦个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 的糖链数据库, 可实现准确糖链鉴定和确证。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统			
样品类型	完整 mAb	mAb 亚基 (HC 与 LC)	mAb 释放糖链
色谱柱	Agilent PLRP-S, 2.1 $\times$ 50 mm, 1000 Å, 5 $\mu\text{m}$ (部件号 PL1912-1502)	Agilent PLRP-S, 2.1 $\times$ 50 mm, 1000 Å, 5 $\mu\text{m}$ (部件号 PL1912-1502)	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ (部件号 858700-913)
温控器	4 °C	4 °C	4 °C
溶剂 A	0.1% 甲酸去离子水溶液	0.1% 甲酸去离子水溶液	50 mM 甲酸, 用氢氧化铵将 pH 调至 4.5
溶剂 B	0.1% 甲酸的 100% 乙腈溶液	0.1% 甲酸的 100% 乙腈溶液	乙腈
梯度	0–1 min 内 B 由 0 升至 20% 1–3 min 内 B 由 20% 升至 50% 3–4 min 内 B 由 50% 升至 70%	0–5 min 内 B 由 25% 升至 45% 5–6 min 内 B 由 45% 升至 60% 6–7 min 内 B 为 60%	0–0.5 min 内 B 由 75% 降至 71% 0.5–16 min 内 B 由 71% 降至 67.5% 16–22 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	60 °C	60 °C	40 °C
流速	0.5 mL/min	0.8 mL/min	0.4 mL/min
进样量	0.5 $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$	2.0 $\mu\text{L}$

## 结果与讨论

糖类组成、结构及其相对定量水平对治疗性蛋白质的安全性和有效性十分重要。对糖链结构的详细研究也可能有助于改善新药的研发。

在完整蛋白质水平表征 mAb 糖型，是药物生物处理中快速评价和监控 mAb 糖基化最为常用的方法。

完整 NISTmAb 样品分析采用 Agilent PLRP-S 色谱柱，在 1290 Infinity II 液相与 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 质谱的联用系统中进行。原始质谱图经 MassHunter BioConfirm B.09.00 软件中的最大熵算法解卷积，如图 3 所示。

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统			
样品类型	完整 mAb	mAb 亚基 (HC 与 LC)	mAb 释放糖链
离子源	双安捷伦喷射流	双安捷伦喷射流	双安捷伦喷射流
干燥气温度	350 °C	350 °C	150 °C
干燥气流速	12 L/min	12 L/min	9 L/min
雾化器	60 psig	35 psig	35 psig
鞘气温度	400 °C	350 °C	300 °C
鞘气流速	11 L/min	11 L/min	10 L/min
毛细管电压	5500 V	4000 V	3000 V
喷嘴电压	2000 V	500 V	500 V
碎裂电压	380 V	180 V	120 V
锥孔电压	140 V	65 V	65 V
四极杆 AMU	500 m/z	300 m/z	95 m/z
质量数范围	100–10000 m/z	100–3200 m/z	300–1700 m/z
采集速率	1.0 幅谱图/秒	1.0 幅谱图/秒	2.0 幅谱图/秒
参比质量	922.0098	922.0098	922.0098
采集模式	正离子, 扩展 (10000 m/z) 质量范围	正离子, 标准 (3200 m/z) 质量范围, HiRes (4 Gz)	正离子, 低质量数范围, HiRes (4 GHz)

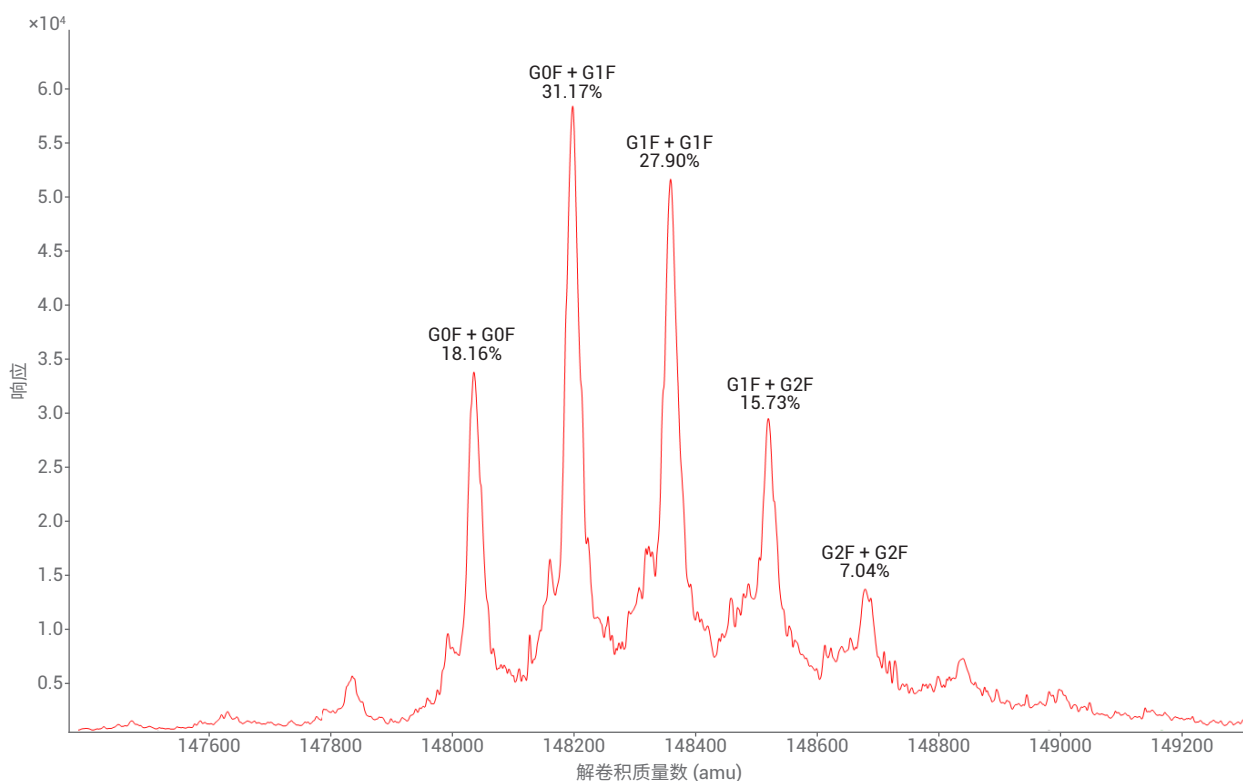


图 3. 完整 NISTmAb 标准品的解卷积质谱图（最大熵），标出了 5 种主要糖型的相对定量

通常情况下，采集质谱原始数据后，采用 BioConfirm 完整蛋白质工作流程在自动模式下将色谱峰对应的谱图相加，再解卷积为 mAb 的完整质量数。然后通过匹配实测质量数与蛋白质数据库中基于已知 mAb 序列所得的理论质量数，可确定生物分子峰。同时可用解卷积质谱图的峰高或峰面积，自动计算所有鉴定糖型的相对定量结果。BioConfirm 可重新计算列表中删除或新增的所有糖型的相对定量百分比。

图 4 总结了 NISTmAb 5 种主要糖型的相对定量和重现性结果，数据来自 10 次柱上重复进样，每次 0.5  $\mu\text{g}$ 。基于峰高分析所得的定量结果与基于峰面积计算所得结果近似。但是，峰高分析结果显示所有糖型的平均标准偏差 (SD) 小于 1%，而峰面积结果所得的平均 SD 约为 1.62%。

BioConfirm B.09.00 软件的一个功能是允许用户比较不同样品间特定糖型的相对定量结果。图 5 展示了两个 NISTmAb 样品 (1 和 2) 解卷积谱图的镜像图。其中选择 G1F + G1F 糖型 (阴影部分) 进行详细分析。图 5 中的表表明，无论采用峰高还是峰面积数据，两个样品均得到十分近似的定量结果。

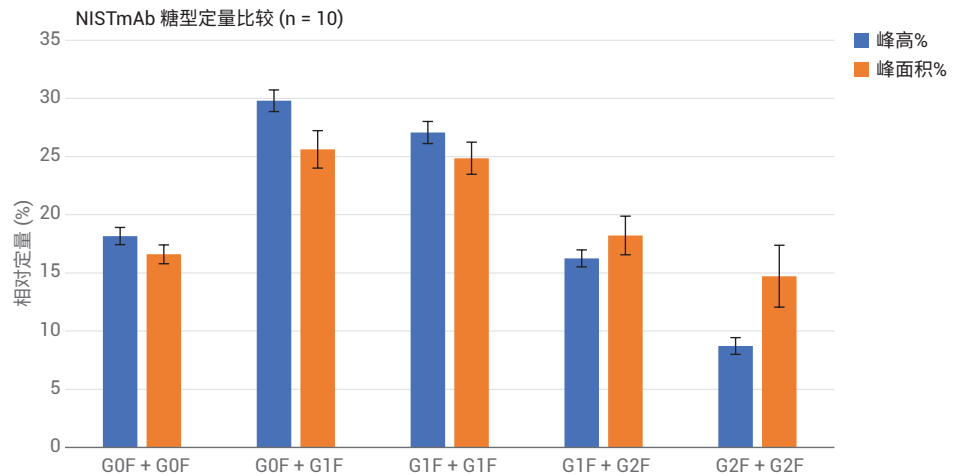
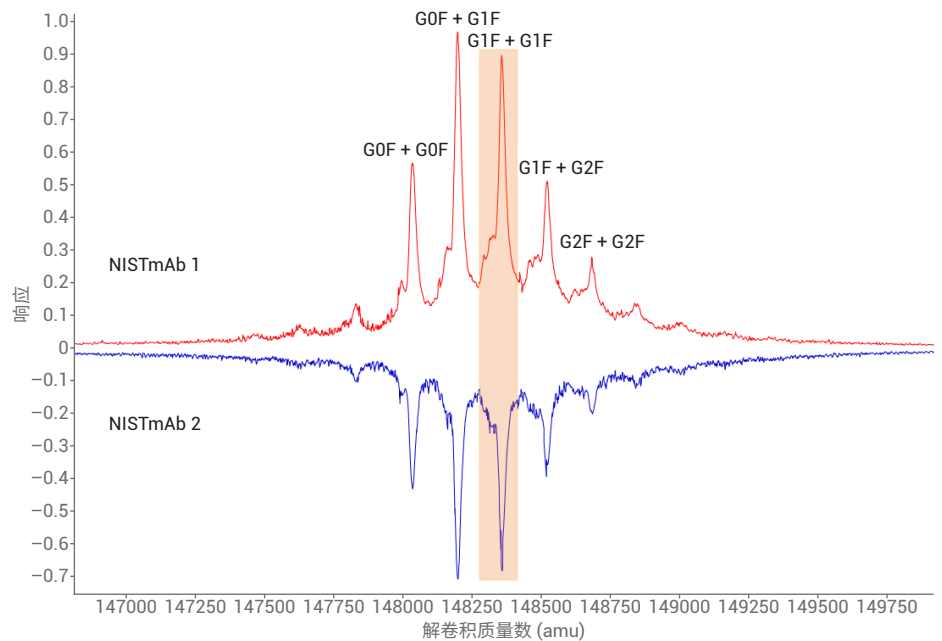


图 4. 完整 NISTmAb 糖型分析的定量结果 (10 次重复)



一般参数			定量%				序列匹配	
质量数	RT	文件	用于定量%	峰高 (质谱)	定量% (峰高)	峰面积 (质谱)	定量% (峰面积)	预测模块
148363.0381	2.229	NIST mab_1.d	<input checked="" type="checkbox"/>	8387	28.43	6527163	27.71	2*G1F (1607.5013)
148362.5884	2.261	NIST mab_2.d	<input checked="" type="checkbox"/>	6268	29.5	4936695	28	2*G1F (1607.5013)

图 5. 两个 NISTmAb 样品间糖型 (G1F + G1F) 的定量结果比较

NISTmAb 样品还用于 mAb 亚基分析 (第 2 层)。为了获得 NISTmAb 重链连接糖链的准确定量结果,关键在于生成 NISTmAb 重链(HC)和轻链(LC)的同质形式。因此,结合运用 DTT 和 TECP 反应实现完全的蛋白质还原,以便完全还原分子间和分子内的二硫键连接。图 6A 展示了还原态 NISTmAb 的总离子流色

谱图,可分离为两种主要的亚基。在极短的 HPLC 梯度时间内,LC 和 HC 实现了出色的液相色谱分离。图 6B 展示了 NISTmAb 重链(图 6A 中浅绿色阴影部分)的解卷积谱图。图中可观察到三种主要的糖型(G0F、G1F 和 G2F),并显示了它们的相对丰度计算结果。

此外,还计算了这三种糖型在 10 次技术重复中的平均百分比定量值,分别为 39.14%、47.68% 和 13.18%。这些结果的平均 SD 小于 0.24% (图 7)。

对于释放糖链的分析(第 4 层),我们已开发了一种新的工作流程解决方案,其中整合了 UHPLC 技术、Agilent AssayMAP

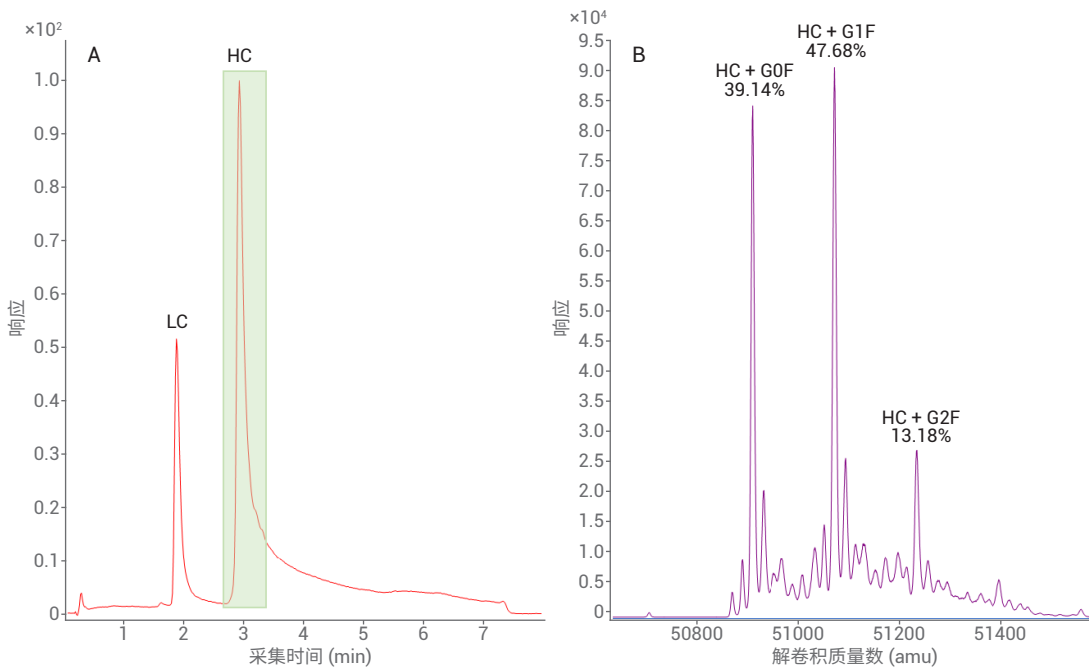


图 6. NISTmAb 亚基的总离子流色谱图 (A) 和解卷积质谱图 (B)

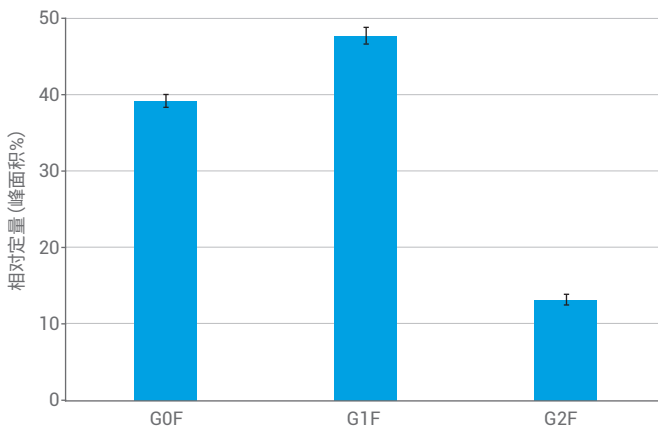


图 7. NISTmAb 亚基工作流程的定量结果

Bravo 液体处理平台、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 以及用于自动化数据处理的 MassHunter BioConfirm 软件<sup>4</sup>。简言之，首先用 PNGaseF 酶解 NISTmAb 释放 N-糖链，然后进行荧光标记 (InstantPC)，最后进行 LC-FLD 或 LC/MS 分析。所有

样品前处理均由 AssayMAP Bravo 液体处理系统 (G5542A) 以高通量形式完成。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。

图 8 所示为 NISTmAb N-糖链的代表性色谱图 (FLD 和 MS EIC)。FLD 色谱图 (图 8 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相近。

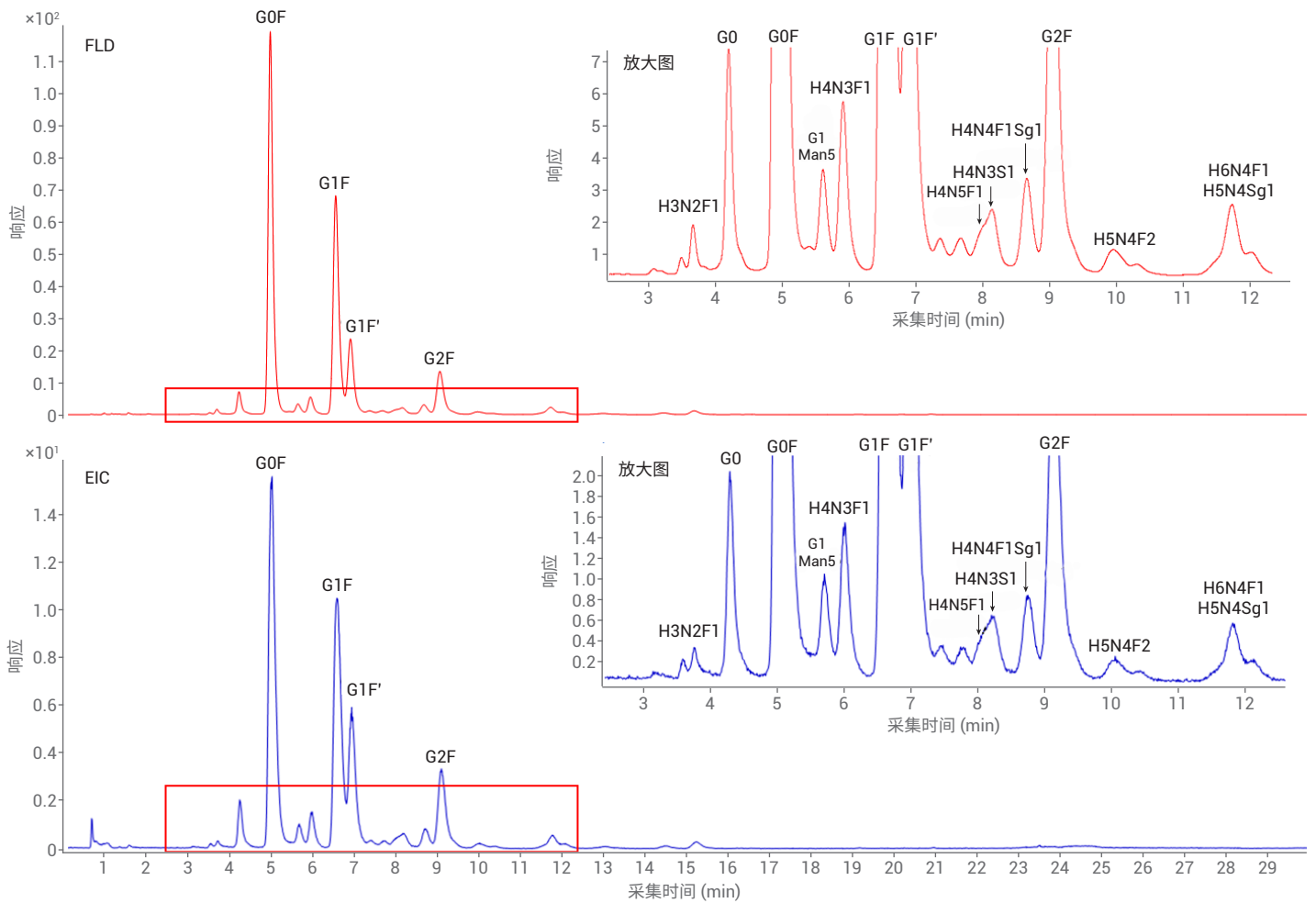


图 8. NISTmAb 得到的 InstantPC 标记 N-糖链的 FLD 色谱图和质谱图 (EIC)

图 9 展示了 NISTmAb 样品中丰度最高的前四个 N-糖链的相对定量百分比。这些糖型的相对定量 (%) 结果与 NISTmAb 亚基工作流程 (第 2 层) 所得结果近似。而第 2 层和第 4 层结果的细微差异可能是由于第 2 层样品中的次要糖型峰并未用于定量分析。虽然如此, 使用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱仍可对 G1F 异构体实现良好的色谱分离和准确定量分析。因此, 该方法可消除由于 mAb 不完全还原所致样品异质性造成的糖链峰归属和峰定量的不确定性。

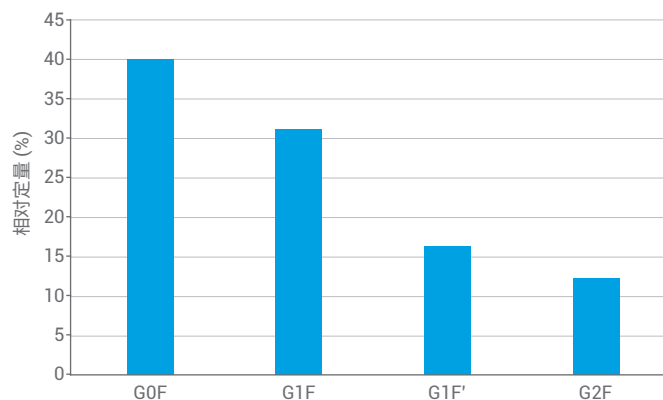


图 9. NISTmAb 释放糖链工作流程的定量结果

## 结论

我们开发了一套完整的抗体糖型表征工作流程解决方案, 方案中整合了 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台、UHPLC 技术、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 Agilent MassHunter BioConfirm 软件。该方法为用户提供了灵活的工作流程, 可在四个不同分析水平进行糖链的相对定量分析:

- 完整 mAb 工作流程实现了对完整 mAb 中主要糖型的快速评估, 可轻松监测和比较同一样品不同时间点或不同批次样品的同一糖型

- mAb 亚基工作流程可为 G0F、G1F 和 G2F 等单个糖链提供详细定量信息。该工作流程整体通量高, 是实现多数 mAb 及其异构体 (包括双特异性 mAb) 准确质量数测定的理想方法
- 采用肽谱分析工作流程进行的糖肽分析不仅可以实现糖链相对定量, 还可获得 N-糖基化位点的信息。Agilent AdvanceBio 糖谱分析 (HILIC) 色谱柱显示出对亲水性糖肽的强保留性和高分离度
- 释放糖链工作流程采用荧光和质谱检测, 为糖链分析提供高分析灵敏度和最佳定量分析。出色的糖链 (G1F 异构体) 分离以及 BioConfirm B.09.00 中提供的糖链数据库, 均有利于实现准确的糖谱分析, 包括鉴定与相对定量

## 参考文献

- Rademacher, T. W; Williams, P; Dwek, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 6123-6127
- 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 精确表征完整单克隆抗体, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-7813CHCN
- 利用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行常规肽谱分析, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-7815CHCN
- 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, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-8550ZHCN
- Separation of IgG Glycopeptides using HILIC-LC-MS in Comparison to RP-LC-MS (IgG 糖肽的 HILIC-LC-MS 与 RP-LC-MS 分离法比较), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-4903EN

[www.agilent.com](http://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。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2018  
2018 年 1 月 2 日, 中国出版  
5991-8796ZHCN

 **Agilent**  
Trusted Answers