

采用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒

与 Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒对精选生物治疗药物的比较分析

作者

YashoNandini Singh,
Aled Jones
安捷伦科技有限公司

摘要

表征糖基化是生物治疗药物开发和生产过程中必要的检查点之一。N-糖含量分析已成为开发过程中的重要组成部分，旨在确保这些产品的稳定性、安全性、免疫原性和血清半衰期的一致性。单克隆抗体 (mAbs) 是生物制药行业领域的主要产品之一。通常使用亲水作用液相色谱 (HILIC) 以及促进荧光 (FLD) 和质谱 (MS) 检测的标记试剂对治疗性抗体进行游离 N-糖分析，以此作为检查点来确保产品质量和批次间的一致性。一些 N-糖样品前处理试剂盒有助于简化这一分析过程，例如安捷伦科技公司的采用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒和沃特世公司的 GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒。这些试剂盒为 N-糖分析提供了端到端样品前处理，其包括三个模块：释放 N-糖（变性/去糖基化）、标记和纯化（净化）。尽管去糖基化和净化模块相似，但标记模块的荧光染料组成有所不同，会影响游离 N-糖的 FLD 和 MS 灵敏度。本应用简报并列比较了 AdvanceBio 和 GlycoWorks 试剂盒在制备和分析来自不同生物治疗性糖蛋白（例如美罗华、恩利和恩瑞舒）的游离 N-糖中的应用，其中在安捷伦 LC/FLD/MS 仪器上使用 HILIC 模式进行分离并使用 MS 进行分析（包括 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱并通过 FLD 和 Q-TOF 进行检测）。本应用简报将帮助用户评估两种工作流程的重现性和通量，特别是评估来自相同量的糖蛋白的释放和标记的 N-糖的荧光信号和 MS 电离效率，从而帮助他们完成生物治疗药物开发过程。

前言

糖基化是生物治疗性蛋白质开发的关键质量属性 (CQA)，因为 N-糖的结构会显著影响蛋白质功能^[1]。N-糖的表征通常使用酶促释放 N-糖并使用信号增强标签进行标记，然后进行 LC/MS 数据采集和解析^[2]。本应用简报讨论了采用 InstantPC (IPC) 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒与 GlycoWorks RapiFluor-MS (RFMS) N-糖试剂盒用于评估不同生物治疗性糖蛋白（包括单克隆抗体 (mAbs) 和 Fc 融合蛋白）的 N-糖谱的重现性和通量。两种试剂盒均为提供了端到端 N-糖

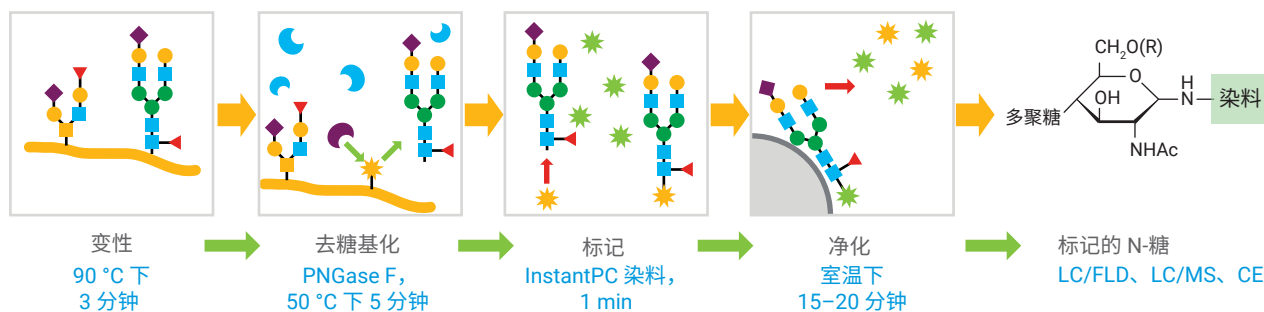
分析工作流程，其包括三个模块：释放 N-糖（变性/去糖基化）、标记和纯化（净化），能够在 1 小时内对 24–96 个多聚糖样品进行前处理，并使用配备 FLD 和 MS 检测器的 HILIC 立即进行表征（图 1）。

尽管两种试剂盒在酶促释放和标记 N-糖方面具有相似的步骤，但它们在荧光染料的组成、工作流程所需的蛋白质的量和净化条件方面有所不同，从而影响到 FLD 和 MS 灵敏度。在所有实验中，N-糖通过 PNGase F 释放，并使用含有 N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯官能团的 IPC 或 RFMS 进行荧光标记，用于快速标记

N-糖（将糖胺修饰为稳定的脲键），并使用碱性叔胺以获得增强的 MS 信号^[3]。对于 AdvanceBio 试剂盒，从 15–40 µg 蛋白质中处理 N-糖并用 IPC 进行标记；而对于 GlycoWorks 试剂盒，则从 15 µg 蛋白质中处理 N-糖并用 RFMS 进行标记（根据用户手册）。RFMS 标记物含有喹啉，而 IPC 标记物含有普鲁卡因作为荧光团，因此与 RFMS 标记的 N-糖相比，IPC 标记的 N-糖的 FLD 信号明显更高（大于 3 倍）（取决于 LC/MS 设置中使用的 FLD 检测器的型号）。

A 采用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒 N-糖分析工作流程

1–40 µg 糖蛋白样品，0.05–2 mg/mL



B GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析工作流程

15 µg 糖蛋白样品，2 mg/mL



图 1. 游离 N-糖分析工作流程：(A) 采用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒和 (B) Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒

制造商用户手册中提供的试剂储存指南对于样品前处理灵活性和实验计划至关重要（表 1）。在 AdvanceBio 试剂盒中，变性剂溶液在 4 °C 下可稳定保存数月；而在 GlycoWorks 试剂盒中，RapiGest 表面活性剂在复溶后在 2–8 °C 下仅能稳定保存一周。此外，IPC 染料溶液在 -20 °C 下可稳定保存三个月，并可承受 10 次冻融循环，而 RFMS 染料溶液只能

承受一次冻融循环。除储存指南以外，AdvanceBio 试剂盒在可用糖蛋白的量以及 LC/MS 上进样所需的最少步骤方面提供了更高的灵活性。本应用简报中的结果还将总结使用 AdvanceBio 试剂盒能够获得的更高荧光和 MS 信号的优势，以及使用一系列 IPC 标记的单个标准品和文库确认 N-糖的更简单的方法（表 1）。

实验部分

材料

采用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒，24 位（货号 GX24-IPC），由三个模块组成，包括：Gly-X 去糖基化模块（货号 GX24-100）、Gly-X InstantPC 标记模块（货号 GX24-101）和 Gly-X InstantPC 净化模块（货号 GX96-102）。

Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒，24 位（货号 176003713），由三个模块组成，包括：GlycoWorks 去糖基化模块（货号 186008939）、RapiFluor-MS 标记模块（货号 186008091）和 GlycoWorks RFMS 净化模块（货号 186008913）。

表 1. 与 Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒相比，采用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒的特点、优势和益处

AdvanceBio Gly-X InstantPC 的特点	优势	Advantages of AdvanceBio Gly-X InstantPC vs. GlycoWorks RapiFluor-MS
1. 在 4 °C 下，AdvanceBio Gly-X 变性剂可在溶液中（出厂包装）稳定保存数月	<ul style="list-style-type: none"> - Gly-X 变性剂可稳定储存于 4 °C，无需复溶 - 一次可灵活运行 1–96 个样品；不受一次必须使用整个小瓶的限制 - 支持低通量使用 	<ul style="list-style-type: none"> - GlycoWorks RapiGest 在复溶后可在 2–8 °C 下稳定保存一周 - 4 个小瓶，96 位试剂盒（4 × 24 个样品）；3 个小瓶，24 位试剂盒（3 × 8 个样品） - 限制了低通量使用的灵活性
2. 重组的 InstantPC N-糖染料在复溶后可在 -20 °C 下稳定保存三个月	InstantPC 染料使用灵活	<ul style="list-style-type: none"> - GlycoWorks RFMS 在复溶后仅允许经历一次冻融循环。建议在 -80 °C 下以 12 µL 等分试样储存（无有效期） - 打开安瓿瓶后必须直接使用染料溶液 <p>对于适用于使用 200 µL PCR 管 (66 µL) 的方案（无论管尺寸如何，体积都应为 131 µL），染料复溶体积不正确。</p>
3. 最多 10 次冻融循环		
4. 净化板储存于室温下	Gly-X 净化板便于储存	GlycoWorks 净化板的储存更加复杂。部分使用后储存在开口袋，挤出空气，折叠袋的开口端并用胶带密封。存放在干燥器中。
5. Gly-X 糖蛋白量：高达 40 µg 标准品方案，根据分子的不同，最高可达 100 µg	Gly-X InstantPC 更加灵活，支持更高的起始蛋白量	GlycoWorks 试剂盒可支持最多 15 µg
6. Gly-X 进样量：直接进样 1 µL 洗脱液或用 DMF/ACN 稀释进行更大体积进样量	Gly-X InstantPC 标记的多聚糖样品的进样更简单	GlycoWorks：进样前用 DMF/ACN 稀释，或进样干燥 SPE 洗脱液 1 µL。
7. 荧光	使用 FLD 增强了通过 Gly-X InstantPC 检查丰度较低的多聚糖种类的能力	对于某些生物治疗药物，InstantPC 具有比 RFMS 更明亮的 FLD 信号（取决于 FLD 检测器的型号）。
8. MS 信号		与 RFMS 相当，但 Gly-X 可以在前处理中加入更多蛋白质。
9. 多聚糖标准品	RFMS 多糖标准品的范围有限（人 IgG、胎球蛋白、高甘露糖文库和分子量标准品）	AdvanceBio InstantPC 多聚糖标准品和文库种类丰富 ^[4]

测试的对照品

- Agilent AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品 (货号 GKPC-503)
- RapiFluor-MS 葡聚糖校准分子量标准品 (货号 186007982)
- Agilent AdvanceBio InstantPC 人 IgG N-糖文库 (货号 GKPC-005)
- RapiFluor-MS 多聚糖性能测试标准品 (人 IgG) (货号 186007983)

测试的糖蛋白

- 安捷伦 NISTmAb (货号 5191-5744)
- 安捷伦 CHO mAb (货号 GKP-020)
- 恩利 (依那西普; 批次号 X44248)
- 恩瑞舒 (阿巴西普; 批次号 ABS2028)
- 随沃特世试剂盒提供的完整 mAb 质量校验标准品

美罗华 (利妥昔单抗; 批号 M190170)
HPLC 级乙腈和水购自 Honeywell Research Chemicals。

仪器

使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (表 2 显示方法详细信息) 在安捷伦 LC/MS 上分离标记的 N-糖样品, 仪器配置包括:

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity II 荧光检测器 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (参数见表 3)

方法

N-糖样品前处理

将采用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒和 GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒用于从 mAbs、CHO、恩利、NIST、恩瑞舒、完整 mAb 质量校验标准品和美罗华制备标记的 N-糖; 对于采用 InstantPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒, 每次制备使用 15 µg 和 40 µg 蛋白质; 对于 GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖, 每次制备使用 15 µg 蛋白质。

去糖基化模块

根据采用 IPC 的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒或 GlycoWorks RFMS N-糖试剂盒的说明, 对蛋白质样品进行溶液内酶促糖基化。

1. 用水稀释蛋白质样品 (对于两种试剂盒, 均使用 15 µg 样品 (7.5 µL, 浓度为 2 mg/mL); 对于 AdvanceBio 试剂盒, 使用 40 µg 样品 (20 µL, 浓度为 2 mg/mL)), 使最终体积达到 20 µL
2. 对于 AdvanceBio 试剂盒, 加入 2 µL Gly-X 变性剂。对于 GlycoWorks 试剂盒, 向板中加入 3 µL 5% (w/v) RapiGest 表面活性剂缓冲溶液。充分混合
3. 将样品在 90 °C 下孵育 3 分钟
4. 对于 AdvanceBio 试剂盒, 向 20 µL 蛋白质样品中加入 2 µL N-糖酶并充分混合。对于 GlycoWorks 试剂盒, 加入 1.2 µL GlycoWorks Rapid PNGase F 并充分混合
5. 在 50 °C 下孵育 5 分钟

用 InstantPC/RapiFluor-MS 快速标记

6. 对于 AdvanceBio 试剂盒, 向制得的样品中加入 5 µL IPC 染料溶液并充分混合。对于 GlycoWorks 试剂盒, 向制得的样品中加入 6 µL RFMS 试剂溶液并充分混合

7. 对于 AdvanceBio 试剂盒, 将样品在 50 °C 下孵育 1 分钟。对于 GlycoWorks 试剂盒, 将样品在室温下孵育 5 分钟

InstantPC 标记的多聚糖的纯化

8. 向每个样品加入 150 µL 上样/清洗溶液 (2.5% 甲酸/97.5% 乙腈) 并充分混合
9. 将全部样品 (约 172 µL) 转移到 Gly-X 净化板的孔中, 每孔含 400 µL 上样/清洗溶液
10. 施加真空使溶液通过净化板后, 用 600 µL 上样/清洗溶液清洗样品 3 次 (根据用户手册)
11. 用 100 µL Gly-X InstantPC 洗脱液 (160 mmol/L 甲酸铵/10% 乙腈 (v/v), pH 4.4) 洗脱 IPC 标记的 N-糖
12. 立即分析收集的 N-糖溶液 (约 100 µL), 无需进一步处理

RapiFluor-MS 标记的多聚糖的纯化

13. 用 179 µL 乙腈稀释样品
14. 用 200 µL 水平衡要在 GlycoWorks µElution 板上使用的孔, 然后用 200 µL 15:85 水:乙腈进行平衡
15. 将全部样品 (约 200 µL) 转移到 GlycoWorks µElution 板的各个孔中
16. 施加真空使溶液通过净化板后, 用 600 µL 上样/清洗溶液 (1:9:90 甲酸:水:乙腈) 清洗样品两次 (根据用户手册)
17. 用三次体积为 30 µL 的 GlycoWorks RapiFluor 洗脱液 (200 mmol/L 乙酸铵/5% 乙腈 (v/v)) 洗脱 RFMS 标记的 N-糖
18. 分析收集的 N-糖溶液 (90 µL)

InstantPC 标记的 N-糖和 RapiFluor-MS 标记的 N-糖的 HILIC/FLD 分析

通过 HILIC/FLD，使用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (2.1 × 150 mm, 1.8 μm, 货号 859700-913) 测定蛋白质样品中的 IPC 标记的 N-糖和 RFMS 标记的 N-糖的谱图，该系统配备带在线荧光检测器的 1290 Infinity II 液相色谱系统 (表 2) 并与 AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF (表 3) 联用。IPC 标记的多聚糖和 RFMS 标记的多聚糖无需进一步处理，直接以 1 μL 的体积进样。以 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) 作为溶剂 A、乙腈作为溶剂 B 分离 N-糖。使用 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) 和乙腈平衡 HPLC 系统，流速为 0.5 mL/min。然后，以 80%–40% 乙腈 (v/v) 的线性梯度进行分离，分析运行时间为 50 分钟，流速为 0.5 mL/min。进样前将样品存放在 4 °C，柱温设为 40 °C。所有 HILIC 分离均在表 2 描述的条件下进行。FLD 后使用固定分流器 (购自 IDEX Health & Science, 货号 UH-427)，将大约 50% 的液流分至废液，并将 50% 分至 MS。使用带个人化合物数据库的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件进行数据处理。

结果与讨论

InstantPC 标记的 N-糖和 RapiFluor-MS 标记的 N-糖的 HILIC 分离

用 IPC 或 RFMS 标记的六种生物治疗药物 (CHO mAb、NIST mAb、美罗华、小鼠 IgG1 或 GlycoWorks 完整 mAb 质量校验标准品、恩利和恩瑞舒) 中 N-糖的 HILIC 分离结果显示，采用表 2 中的 60 分钟方法使主要多聚糖种类获得了充分分离的峰 (图 2 和图 3)。CHO mAb、NISTmAb、美罗华和 IgG1 具有与单克隆

表 2. Agilent 1290 Infinity II LC HILIC/FLD 条件

参数	值																								
色谱柱	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 300 Å, 2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm (货号 859700-913)																								
柱温	40 °C																								
流动相	A) 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B) 乙腈																								
梯度程序	InstantPC 标记的多聚糖和 RapiFluor-MS 标记的多聚糖 <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> <th>流速 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>75</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>48</td> <td>62</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>49</td> <td>40</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>51.5</td> <td>80</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>80</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>80</td> <td>0.5</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)	0	80	0.5	2	75	0.5	48	62	0.5	49	40	0.5	51.5	80	0.5	52	80	0.5	60	80	0.5
时间 (min)	%B	流速 (mL/min)																							
0	80	0.5																							
2	75	0.5																							
48	62	0.5																							
49	40	0.5																							
51.5	80	0.5																							
52	80	0.5																							
60	80	0.5																							
进样量	1 μL (相当于 0.15 μg 或 0.4 μg 蛋白质中的多聚糖)																								
检测	Agilent 1260 Infinity II 荧光检测器 InstantPC: λ _{激发} 285 和 λ _{发射} 345 nm RapiFluor-MS: λ _{激发} 265 和 λ _{发射} 425 nm																								

表 3. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	150 °C
干燥气流速	9 L/min
雾化器	35 psi
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
质量范围	m/z 600–3000
扫描速率	1 幅谱图/秒
采集模式	高分辨率 (4 GHz)

抗体相似的 N-糖谱，在 Fc 区域有一个 N-糖基化位点。谱图主要由具有核心岩藻糖的中性、复杂二天线型 N-糖组成，其次是低丰度的 Man5，而存在的唾液酸化多聚糖几乎可以忽略不计 (图 2 和图 3A 至 3D)。恩利和恩瑞舒 (Fc 融合蛋白) 的 N-糖谱包含更高含量的 G2FS1 和 G2FS2 唾液酸化多聚糖。这是由于细胞外结构域的融伙伴蛋白 (分别为 TNF-α

受体 (TNFR) 或细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 中的另外两个 N-糖基化位点，与由单个 N-糖位点组成的 Fc 部分连接 (图 2 和图 3E 至 3F)^[5]。与其他五种生物治疗药物相比，恩瑞舒在糖基化谱图中也具有最高含量的 G2F 多聚糖 (图 2F 和图 3F)。

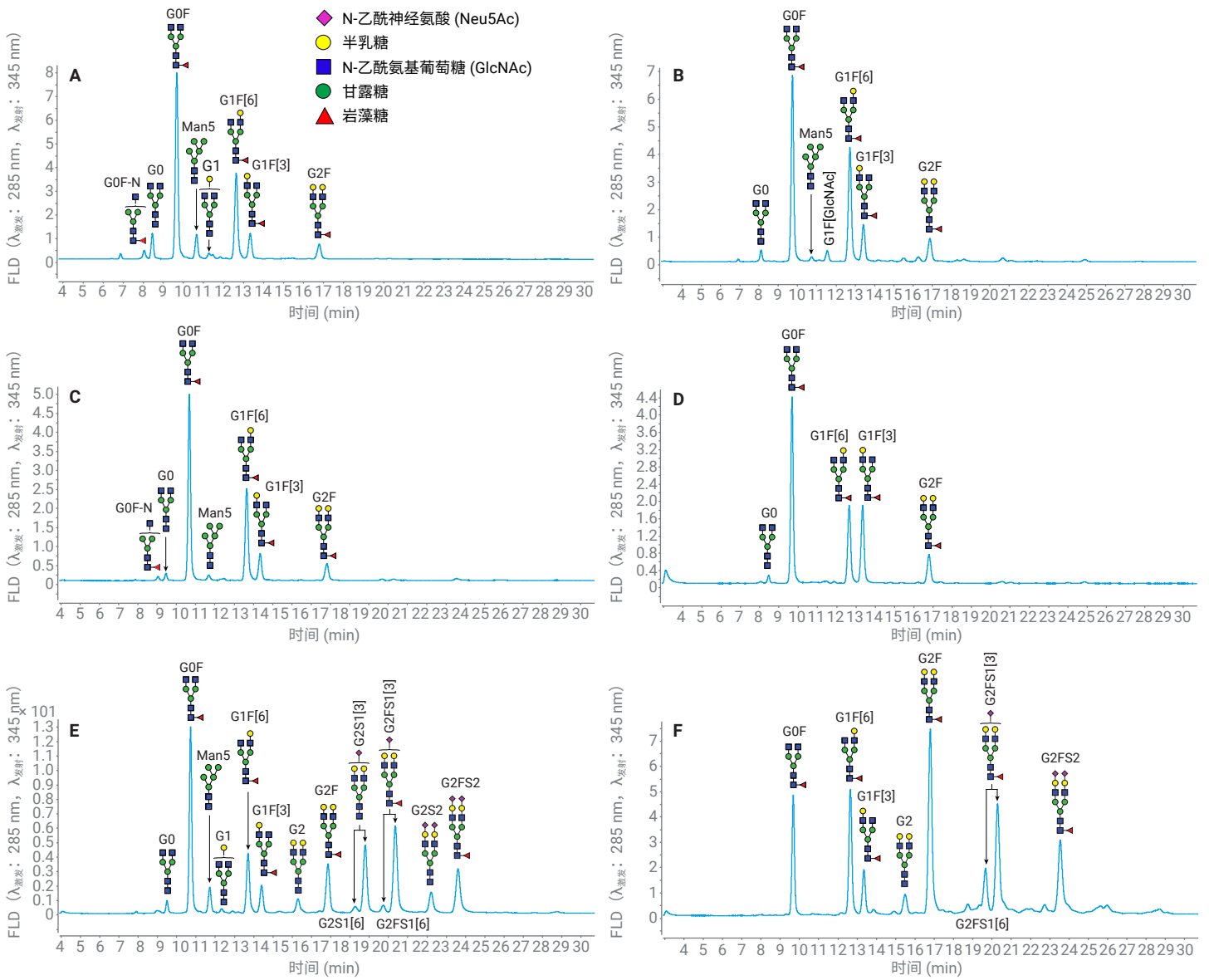


图2. 用 InstantPC 标记的 (A) CHO mAb、(B) N1ST mAb、(C) 美罗华、(D) IgG1、(E) 恩利和 (F) 恩瑞舒 (15 μg) 的 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对峰面积 (%) 如表 4 所示, n = 3

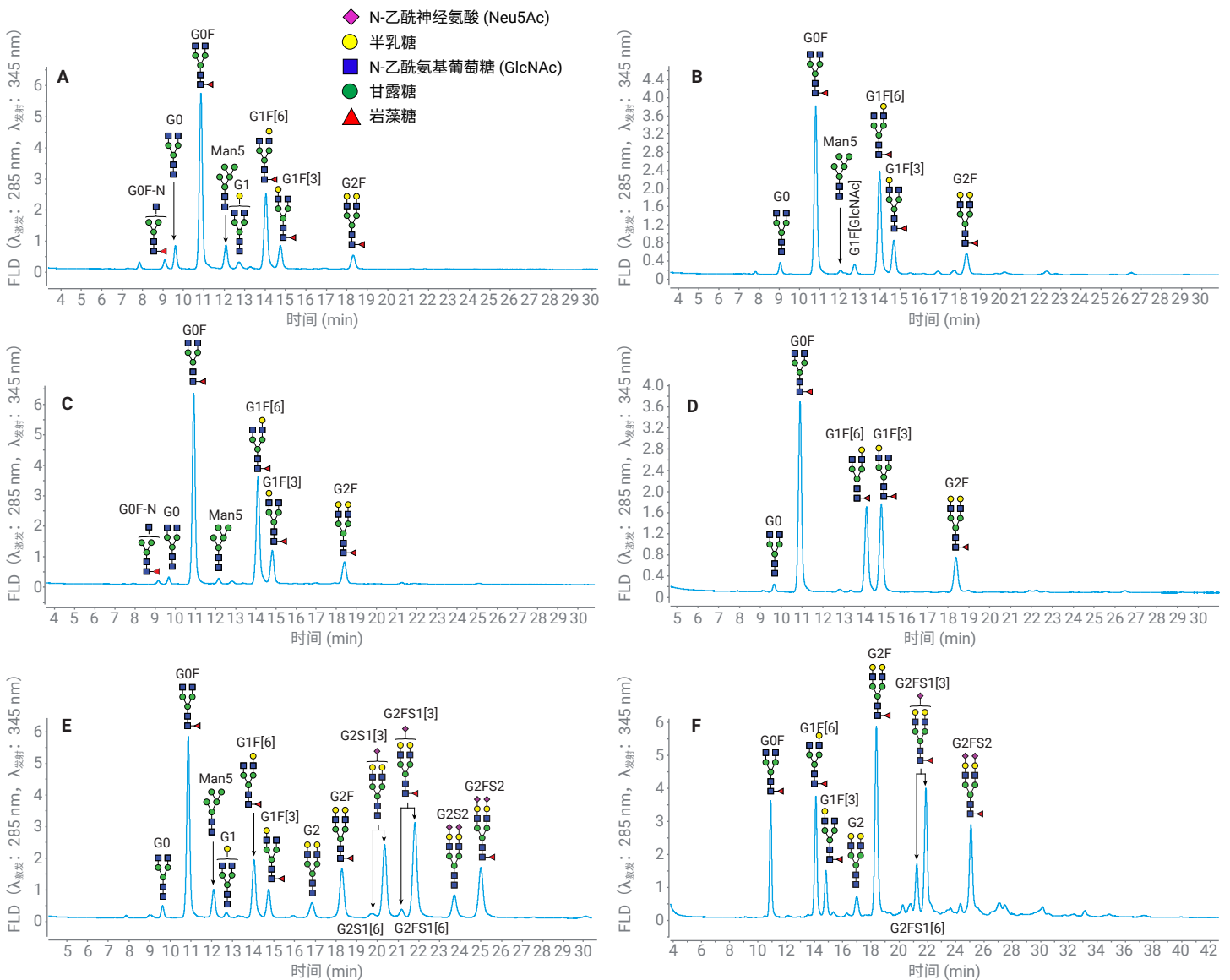


图 3. 用 RapiFluor-MS 标记的 (A) CHO mAb、(B) NIST mAb、(C) 美罗华、(D) IgG1、(E) 恩利和 (F) 恩瑞舒 (15 μ g) 的 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对峰面积 (%) 如表 4 所示, n = 3

IPC N-糖的 HILIC 保留时间短于 RFMS N-糖, 前者比后者早洗脱约 1 分钟。IPC 标记的 N-糖种类与 RFMS 标记的 N-糖种类的洗脱顺序相当。对于 IPC 和 RFMS 标记物, CHO mAb、NIST mAb 和美罗华均显示出充分分离的多聚糖关键物质对, 例如 G0F/Man5 和 Man5/G1 (通常在生

物治疗药物开发过程中进行监测)。此外, IgG1 mAb 显示出 G1F 异构体 G1F[6] 和 G1F[3] 以相同的丰度存在, 并且使用两种标记物均使其充分分离。Fc 融合蛋白恩利和恩瑞舒有助于我们对 IPC 标记的唾液酸化 N-糖和 RFMS 标记的唾液酸化 N-糖的 HILIC 分离进行分析。两者均分别

显示了 G2S1 和 G2FS1 异构体 (G2S1[6] 与 G2S1[3]/G2FS1[6] 与 G2FS1[3]) 的分离, 以及分离的 G2S2 和 G2FS2 多聚糖, 从而能够可靠地确定相对百分比组成。表 4 和表 5 中列出了三次样品前处理重复进样的相对峰面积百分比、标准偏差和相对标准偏差。

表 4. 图 2 中的相对峰面积 (%), SD 和 %CV 值: 用 InstantPC 和 RapiFluor-MS 标记的 A) CHO mAb、B) NIST mAb、C) 美罗华、D) IgG1、E) 恩利和 F) 恩瑞舒 (15 µg), n = 3

A

CHO mAb	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0F-N	1.91	0.10	5.20	2.40	0.15	6.36
G0	5.71	0.19	3.29	5.37	0.08	1.56
G0F	46.66	1.15	2.46	47.95	0.80	1.68
Man5	6.48	0.39	6.04	6.84	0.19	2.77
G1	2.27	0.04	1.81	1.89	0.19	9.86
G1F[6]	25.14	0.76	3.03	23.91	0.29	1.21
G1F[3]	6.93	0.70	10.05	6.75	0.07	1.07
G2F	4.90	0.39	8.01	4.89	0.10	1.96

B

NIST mAb	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0	2.58	0.52	19.99	2.62	0.15	5.77
G0F	46.24	1.87	4.03	45.62	0.87	1.91
Man5	0.93	0.09	9.89	0.73	0.16	22.12
G1F-GlcNAc	2.68	0.13	4.75	2.39	0.58	24.43
G1F[6]	31.21	1.34	4.28	31.63	0.72	2.27
G1F[3]	9.35	0.64	6.83	9.75	0.25	2.61
G2F	7.00	0.66	9.41	7.28	0.39	5.40

C

美罗华	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0	1.64	0.02	1.51	1.47	0.43	0.88
G0F	52.14	0.29	0.56	48.54	0.06	4.87
Man5	1.43	0.12	8.61	1.28	0.39	1.21
G1F[6]	30.15	0.19	0.63	32.23	0.09	0.92
G1F[3]	8.37	0.24	2.84	9.26	0.25	3.40
G2F	6.29	0.13	2.12	7.23	0.12	8.23

D

IgG1	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0	1.59	0.06	3.65	1.71	0.23	13.29
G0F	45.33	0.40	0.89	43.62	1.06	2.44
G1F[6]	21.91	0.49	2.25	21.94	0.30	1.36
G1F[3]	21.93	0.63	2.89	22.82	0.37	1.64
G2F	9.25	0.09	0.92	9.91	0.21	2.07

E

恩利	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0	1.33	0.03	2.46	1.43	0.08	5.67
G0F	23.83	0.29	1.22	25.08	0.94	3.74
Man5	3.58	0.15	4.15	3.92	0.15	3.85
G1	0.63	0.00	0.66	0.61	0.11	18.02
G1F[6]	9.14	0.06	0.60	9.27	0.30	3.27
G1F[3]	4.10	0.01	0.26	4.14	0.09	2.19
G2	2.62	0.04	1.54	2.66	0.06	2.13
G2F	8.51	0.09	1.02	8.57	0.50	5.83
G2S1[6]	1.18	0.07	5.72	0.92	0.55	60.07
G2S1[3]	12.33	0.24	1.94	12.03	0.66	5.52
G2FS1[6]	1.20	0.02	1.46	1.00	0.10	9.78
G2FS1[3]	17.46	0.10	0.56	16.70	0.98	5.87
G2S2	4.11	0.03	0.62	3.61	0.10	2.81
G2FS2	9.98	0.16	1.59	9.99	0.32	3.24

F

恩瑞舒	IPC			RFMS		
	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0F	11.95	0.19	1.56	12.04	0.27	2.25
G1F[6]	15.00	0.12	0.77	13.90	0.27	1.92
G1F[3]	5.16	0.16	3.01	5.32	0.05	0.98
G2	2.89	0.17	6.04	3.02	0.02	0.63
G2F	27.16	0.70	2.58	26.30	0.61	2.32
G2FS1[6]	5.58	0.27	4.83	6.04	0.20	3.37
G2FS1[3]	17.24	0.25	1.45	17.54	1.05	5.99
G2FS2	13.96	0.12	0.84	14.76	0.10	0.69

InstantPC 标记的 N-糖和 RapiFluor-MS 标记的 N-糖的 FLD 检测

通常，当在安捷伦系统上使用相同量的糖蛋白起始材料 (15 µg) 并进样相似的相对体积进行 HILIC 分离 (100 µL AdvanceBio 试剂盒洗脱液中的 1 µL，或 90 µL GlycoWorks 试剂盒洗脱液中的 1 µL) 时，IPC 和 RFMS 显示出相似的荧

光信号 (图 4)。然而，与 RFMS 对应物 (15 µg) 相比，观察到用 IPC 标记的 CHO mAb、NIST mAb、恩利和恩瑞舒的荧光信号略高。按照 AdvanceBio 试剂盒中的指示将糖蛋白的量增加至 40 µg，生物治疗药物显示出明显更高的荧光信号，恩利则显示出最高的响应 (图 4 和图 5)。

与安捷伦系统相比，使用沃特世系统检测来自美罗华或恩利的 15 µg 多聚糖时，与 RFMS 相比，IPC 多聚糖的荧光信号增加了 3 倍 (图 6)。然而，对于两者，当使用 IPC 标记生物治疗药物时，由 40 µg 糖蛋白获得了更高的荧光信号。

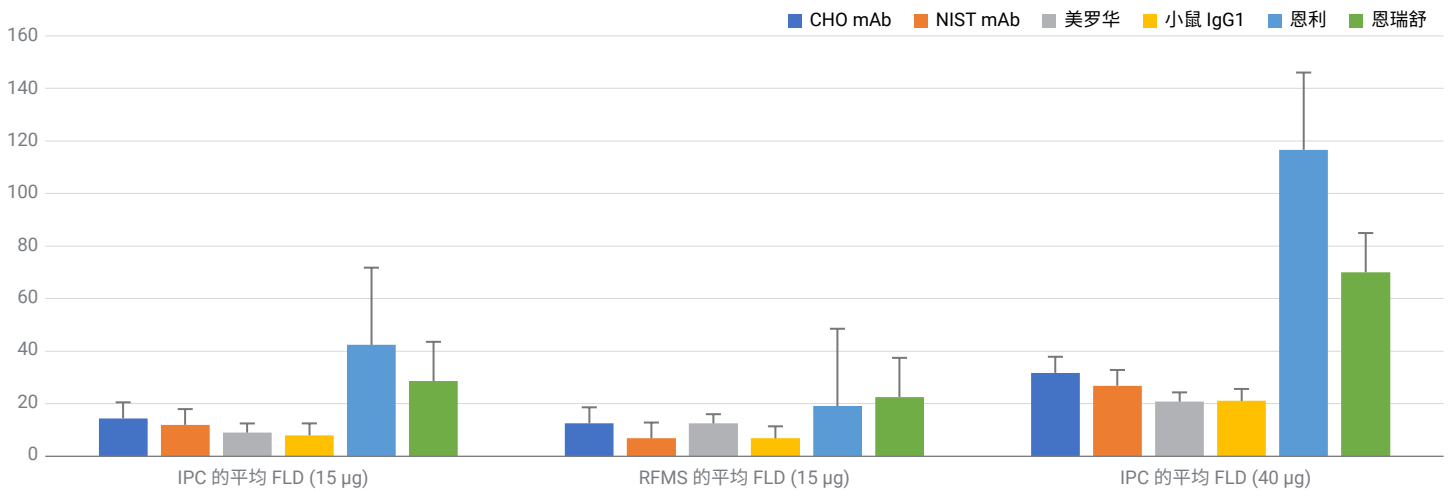


图 4. 分别来自图 2 至 3 和图 7 的用 InstantPC 标记的所有生物治疗药物 (15 µg 和 40 µg) 以及用 RapiFluor-MS 标记的所有生物治疗药物 (15 µg) 的总荧光信号，其中使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱以及配备在线荧光检测器的 1290 Infinity II 液相色谱系统

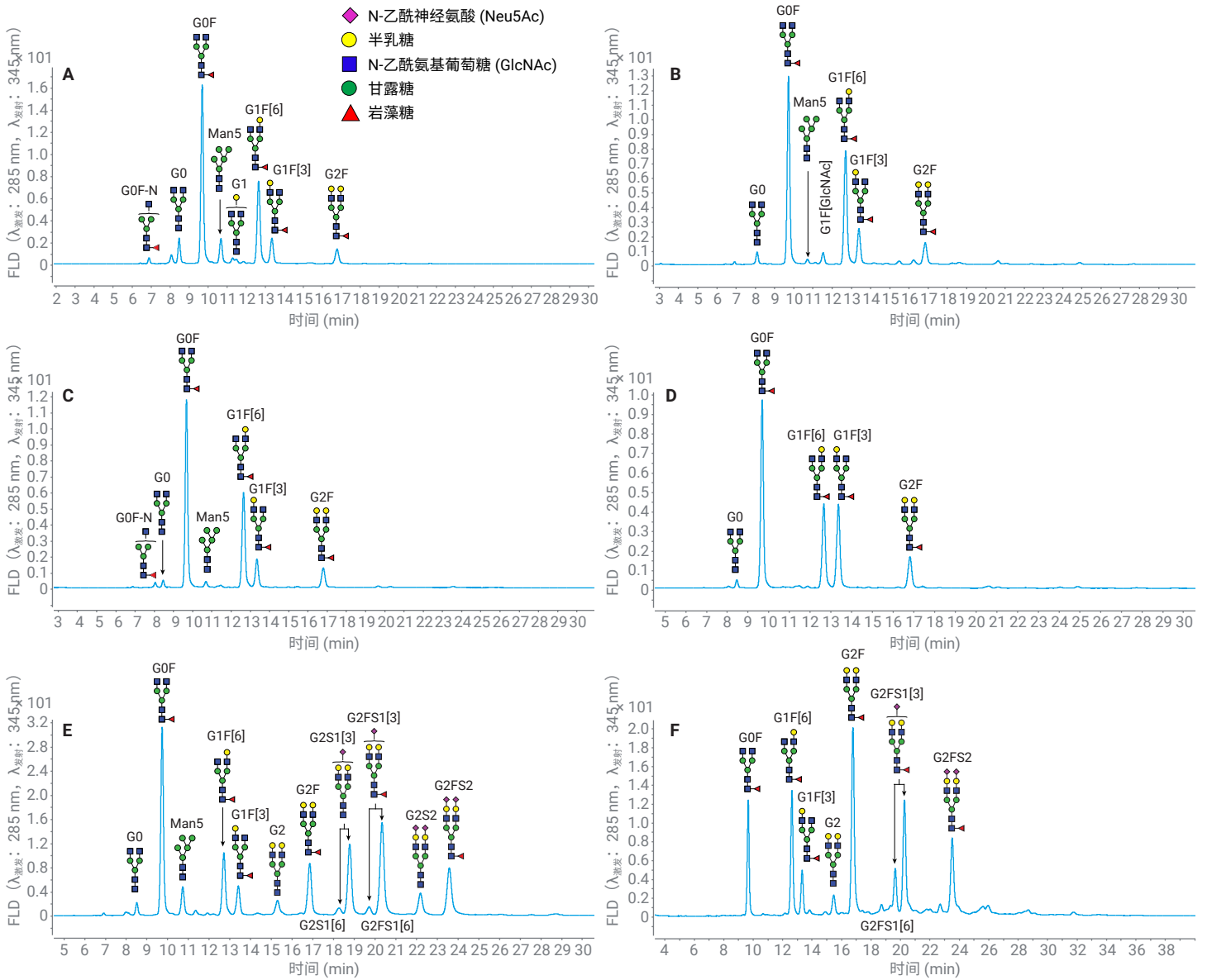


图 5. 用 InstantPC 标记的 A) CHO mAb、B) NIST mAb、C) 美罗华、D) IgG1、E) 恩利和 F) 恩瑞舒 (40 μg) 的 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对峰面积 (%) 如表 5 所示, n = 3

表 5. 图 7 中的相对峰面积 (%), SD 和 %CV 值: 用 InstantPC 标记的 (A) CHO mAb、(B) NIST mAb、(C) 美罗华、(D) IgG1、(E) 恩利和 (F) 恩瑞舒 (40 µg), n = 3

A				B				C			
CHO mAb	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	NIST mAb	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	美罗华	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0F-N	2.23	0.20	8.85	G0	2.36	0.32	13.69	G0F-N	1.00	0.07	6.52
G0	5.68	0.29	5.10	G0F	44.03	1.07	2.44	G0	1.58	0.01	0.48
G0F	45.81	1.18	2.57	Man5	0.98	0.05	4.88	G0F	49.86	0.48	0.97
Man5	6.74	0.14	2.03	G1F-GlcNAc	2.71	0.14	5.03	Man5	1.43	0.17	11.97
G1	2.33	0.06	2.76	G1F[6]	32.50	0.70	2.15	G1F[6]	31.09	0.54	1.74
G1F[6]	25.04	0.86	3.43	G1F[3]	9.91	0.38	3.80	G1F[3]	8.94	0.23	2.59
G1F[3]	7.07	0.25	3.57	G2F	7.52	0.53	7.08	G2F	7.09	0.08	1.11
G2F	5.09	0.48	9.40								

D				E				F			
IgG1	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	恩利	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV	恩瑞舒	平均相对峰面积 (%)	SD	%CV
G0	1.49	0.03	1.77	G0	1.31	0.04	3.21	G0F	12.00	0.18	1.49
G0F	43.25	0.13	0.31	G0F	22.77	0.18	0.81	G1F[6]	15.21	0.35	2.29
G1F[6]	22.66	0.21	0.93	Man5	3.63	0.06	1.72	G1F[3]	5.28	0.03	0.62
G1F[3]	22.96	0.15	0.66	G1[6]	0.60	0.01	2.02	G1FS1[3]	2.97	0.01	0.37
G2F	9.63	0.07	0.74	G1F[6]	8.99	0.09	1.05	G2F	26.66	0.09	0.33
				G1F[3]	4.12	0.03	0.64	G2FS1[6]	5.78	0.33	5.64
				G2	2.67	0.01	0.47	G2FS1[3]	17.32	0.22	1.29
				G2F	8.67	0.12	1.41	G2FS1	1.06	0.02	1.48
				G2S1[6]	1.36	0.04	3.02	G2FS2	13.72	0.20	1.46
				G2S1[3]	12.51	0.03	0.25				
				G2FS1[6]	1.24	0.01	1.12				
				G2FS1[3]	17.65	0.13	0.73				
				G2S2	4.24	0.10	2.39				
				G2FS2	10.25	0.12	1.21				

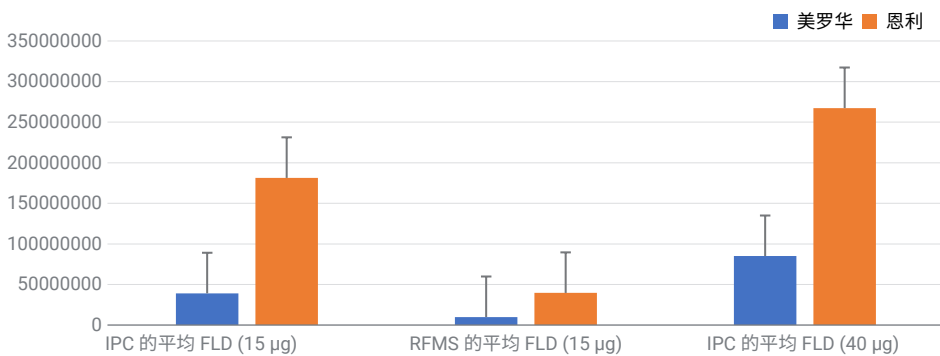


图 6. 用 InstantPC 标记的美罗华和恩利 (15 µg 和 40 µg) 以及用 RapiFluor-MS 标记的美罗华和恩利 (15 µg) 的总荧光信号, 其中使用配备 ACQUITY UPLC BEH 糖基分析专用柱 (130 Å, 2.1 × 150 mm, 1.7 µm, 货号 186004742, 沃特世) 的 Waters ACQUITY UPLC H-Class 系统

使用 Gly-X InstantPC 样品前处理时糖蛋白量的灵活性

AdvanceBio 试剂盒能够在前处理中加入更多蛋白质 (40–100 μg ; 图 7) 并得到更高的 FLD 响应, 有利于检测 N-糖的丰度较低的结构异构体。

AdvanceBio 试剂盒的建议起始糖蛋白量为 15–40 μg , 而 GlycoWorks 试剂盒的建议起始糖蛋白量为 15 μg 。图 7 显示, 对于恩利, AdvanceBio 试剂盒可用于从 2 μg 以内开始至最长达 100 μg 的糖蛋白

的量, 能够检测所有主要的 N-糖。较高的糖蛋白量 (> 10 μg) 可用于检测丰度较低的多聚糖, 例如 G2S2; 而较低的糖蛋白量 (< 10 μg) 足以检测主要的多聚糖, 例如 G0F 和 G1F 异构体。

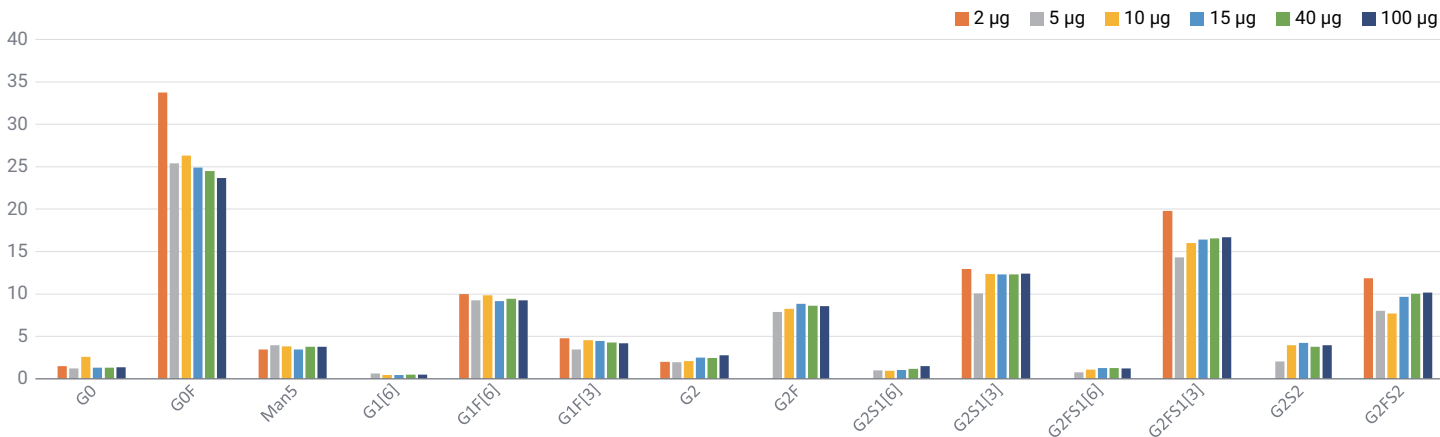


图 7. 用 InstantPC 标记的恩利 (1–100 μg) 的相对峰面积 (%)

结论

糖基化是生物治疗药物的一个重要特征，通常作为生物治疗药物开发和生产过程的 CQA 进行监测。采用 InstantPC 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒和 Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒均包含以下工作流程：快速释放 N-糖，分别使用 InstantPC 和 RapiFluor-MS 标记糖胺，以及通过相对荧光峰面积 (%) 分析多聚糖种类并通过高分辨率质谱确认峰归属。当使用 15 µg 糖蛋白进行样品前处理时，IPC 标记的多聚糖和 RFMS 标记的多聚糖均显示出相似的 FLD 信号；然而，当使用 40 µg 糖蛋白时，IPC 能够获得更高的 FLD 信号，在正离子模式下具有更高的 MS 电离效率，并可靠地检测丰度较低的多聚糖种类。尽管 IPC 和 RFMS 标记物用于各种生物治疗药物中的性能是明确的，但 AdvanceBio 试剂盒为其试剂提供了灵活性，例如 Gly-X 变性剂（可稳定保存数月）和复溶的 IPC 溶液（其与 RapiGest 表面活性剂（可稳定保存一周）和 RFMS 标记物（可承受一次冻融循环）相比，能够承受 10 次冻融循环）。此外，对于某些生物治疗药物，AdvanceBio 试剂盒支持使用多达 100 µg 的蛋白；而 GlycoWorks 试剂盒仅限 15 µg。最后，种类丰富的 IPC 单个多聚糖标准品和文库能够提高通量，为用户简化多聚糖分析过程。

参考文献

1. Delobel A. *In* Mass Spectrometry of Glycoproteins: Methods and Protocols. Glycosylation of Therapeutic Proteins: A Critical Quality Attribute. Delobel, A., Ed.; Springer US: New York, NY, **2021**; pp 1–21. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_1
2. Zhang, X.; Vimalraj, V.; Patel, M. *In* Mass Spectrometry of Glycoproteins: Methods and Protocols. Routine Analysis of N-Glycans Using Liquid Chromatography Coupled to Routine Mass Detection BT Delobel, A., Ed.; Springer US: New York, NY, **2021**; pp 205–219. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_15
3. Keser, T. *et al.* Comparison of 2-Aminobenzamide, Procainamide and RapiFluor-MS as Derivatizing Agents for High-Throughput HILIC-UPLC-FLR-MS N-Glycan Analysis. *Frontiers in Chemistry* **2018**, *6*, 324. DOI: 10.3389/fchem.2018.00324
4. AdvanceBio 多聚糖标准品 InstantPC、2-AB、2-AA、APTS、InstantAB 和未标记的标准品，安捷伦科技公司技术宣传单页，出版号 5994-2202ZHCN，**2015**
5. Houel, S. *et al.* N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. *Anal. Chem.* **2014**, *86(1)*, 576–584. <https://doi.org/10.1021/ac402726h>

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

DE44029575

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，2023
2023 年 5 月 16 日，中国出版
5994-5653ZHCN

