应用简报

制药与生物制药

Agilent

Trusted Answers

使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理对单克隆抗体 EG2-hFc 和利妥昔单抗的高通量 N-糖谱图分析

作者

Yongjing Xie，
Letícia Martins Mota，
Michael Butler
National Institute for Bioprocessing Research & Training (NIBRT), Foster Avenue, Mount Merrion, Blackrock, Co. Dublin, Ireland

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

摘要

蛋白质糖基化是治疗性糖蛋白异质性的主要来源之一，对安全性和有效性具有潜在影响，因此被认为是关键质量属性 (CQA)。应定期对治疗药物的多聚糖谱图分析进行详细表征和定量，确保达到期望的产品质量。然而，糖基化会给治疗药物带来相当大的复杂性和异质性，这会严重阻碍生物制药多聚糖表征和质量控制的进展。本应用简报介绍了使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct (GX96-IPC) 进行高通量、高灵敏度的多聚糖谱图分析。这款试剂盒可对来自 EG2-hFc 和利妥昔单抗的两种不同分子大小单克隆抗体的 InstantPC 标记 N-糖进行快速的糖蛋白变性、去糖基化、多聚糖衍生、纯化和检测。多聚糖前处理总流程包括高灵敏度的荧光检测，总时间大幅缩短至 1 小时内。因此，对用于高通量多聚糖谱图分析和定量的可靠、重现的样品前处理，这种类型的工作流程具有巨大的潜力，它还可以轻松适应任何实验室的要求。

前言

糖基化是治疗性蛋白常见且复杂的翻译后修饰手段[1-3]。生物药物的糖基化通过调节蛋白质折叠、稳定性、药代动力学、免疫原性和效应功能等许多特性，在药物安全性和有效性方面发挥了关键作用[4-6]。因此，糖基化通常被认为是治疗性糖蛋白的关键质量属性 (CQA)[7]，需要对治疗药物的多聚糖谱图分析进行彻底的表征和定量，确保达到期望的一致产品质量。然而，哺乳动物宿主细胞系、培养基、生物过程条件以及下游纯化策略等多种因素都会影响糖基化谱图[8-10]。因此，糖基化给治疗药物带来了相当大的复杂性和异质性，在单糖组成、糖苷键和多聚糖分支方面有所不同[11]。这严重阻碍了生物制药多聚糖表征和质量控制的进展。

目前正在开发多种用于多聚糖谱图分析的技术，包括高效液相色谱 (HPLC)、毛细管电泳 (CE)、质谱 (MS)、核磁共振 (NMR) 和基于微阵列芯片的技术[12]。然而，亲水相互作用液相色谱结合荧光检测 (HILIC/FLD) 作为标准方法选择，使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 进行后衍生化[13]。多聚糖谱图分析的一个主要缺点是样品前处理耗时，导致重现性差、灵敏度低。此前我们已经开发并简化了工作流程，采用基于 96 孔板的平台进行高通量和高灵敏度的多聚糖谱图分析，有望应用于生物制药开发和疾病生物标志物发现领域[14]。

单克隆抗体 (mAbs) 是糖蛋白类治疗药物的主要类别[15]。本应用简报使用了 EG2-hFc 和利妥昔单抗 mAbs 展示这一创新工作流程的可行性。EG2-hFc 是一种人源化骆驼类抗体，无轻链，分子大小减少了 80 kDa 左右。EG2-hFc 靶向表皮生长因子受体 (EGFR)，该受体常在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中过表达[16]。利妥昔单抗是世界上首个与肿瘤学相关的单克隆抗体疗法。它经过基因工程改造，包含小鼠轻链和重链可变区序列，以及人类恒定区序列，分子大小约为 145 kDa。利妥昔单抗靶向并结合 CD20 抗原，该抗原主要存在于正常和恶性免疫系统 B 细胞的表面。它通常用于治疗患有非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 或慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的成年人[17,18]。通过使用工作流程中的“即时”糖蛋白进行去糖基化和荧光衍生化，总多聚糖前处理过程大幅缩短到 10 分钟内，且对荧光检测具有高灵敏度。因此，先进、稳定的工作流程为高通量多聚糖谱图分析和 mAbs 定量实现可靠、重现的样品前处理提供了巨大潜力，且只需极少修饰即可适应其他任何糖蛋白类治疗药物。

实验部分

材料

使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，96 ct (GX96-IPC)，由三个模块组成：

- Gly-X 去糖基化模块 (GX96-100)
- Gly-X InstantPC 标记模块 (GX96-101)
- Gly-X InstantPC 净化模块 (GX96-102)

Agilent AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品 (GKPC-503)

EG2-hFc 和利妥昔单抗的单克隆抗体由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生，使用前述 AKTA Avant 系统 (GE Healthcare) 由 Protein A 亲和色谱纯化[14]。HPLC 级乙腈购自 Sigma，所有前处理均使用 Milli-Q 水。所有常用化学品均购自 Sigma-Aldrich。

样品前处理

去糖基化

根据使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理 (GX96-IPC) 说明书，对单克隆抗体 EG2-hFc 和利妥昔单抗进行溶液内酶促去糖基化。

1. 用 50 mmol/L 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液 (pH 8.0) 稀释单克隆抗体 EG2-hFc 和利妥昔单抗 (40 µg)，使最终体积为 20 µL
2. 将 2 µL Gly-X 变性剂加入 20 µL EG2-hFc 和利妥昔单抗溶液中，充分混合
3. 在 90 °C 下孵育 3 分钟，室温下静置 2 分钟

4. 加入 2 µL N-糖酶工作溶液，充分混合
5. 在 50 °C 下孵育 5 分钟

使用 InstantPC 进行荧光衍生化

6. 配制 InstantPC 染料溶液：将一小瓶 InstantPC 染料溶于 150 µL 附带溶剂中，混合均匀
7. 在上述配制样品中加入 5 µL InstantPC 染料溶液，并充分混合
8. 在 50 °C 下孵育 1 分钟

InstantPC 标记多聚糖的纯化

9. 向每个样品加入 150 µL 上样/清洗溶液 (2.5% 甲酸/97.5% 乙腈)
10. 将全部样品 (179 µL) 转移到 Gly-X 净化板的孔中，每孔含 400 µL 上样/清洗溶液
11. 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
12. 用 100 µL Gly-X InstantPC 洗脱液（160 mmol/L 甲酸铵/10% (v/v) 乙腈，pH 4.4）洗脱 InstantPC 标记的 N-糖
13. 立即分析收集的 N-糖溶液，无需进一步处理，或储存在 –20 °C 待后续分析

InstantPC 标记 N-糖的 HILIC-FLD 分析

使用配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱（120 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm，部件号 683775-913）的 Agilent 1260 Infinity 系统和 Agilent OpenLab ChemStation 软件，对来自 EG2-hFc 和利妥昔单抗的 InstantPC 标记 N-糖进行 HILIC/FLD 谱图分析。色谱系统包括四元溶剂泵、自动进样器和荧光检测器。对于 InstantPC，将检测器的激发和发射波长分别设为 285 和 345 nm。将 InstantPC 标记的多聚糖样品进样 1 µL，进样前无需任何进一步处理。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 (27/73, v/v) 平衡 HPLC 系统 1.5 分钟，流速为 0.5 mL/min。之后，用 73%–62% 乙腈 (v/v) 的线性梯度在 30 分钟内完成分离。进样前将样品储存在 5 °C，柱温设为 60 °C。系统使用 AdvanceBio InstantPC 麦芽糊精分子量标准品 (GKPC-503) 进行校准。将葡萄糖单元 (GU) 值和保留时间 T（分钟）数据拟合为五阶多项式曲线，得到标准曲线。

结果与讨论

用于快速多聚糖前处理的 AdvanceBio Gly-X 技术

如图 1 所示，本研究采用使用 InstantPC 试剂盒的 AdvanceBio Gly-X N-糖前处理，可在 96 孔板形式的工作流程中简化 N-糖样品前处理。该试剂盒可在 90 °C 下

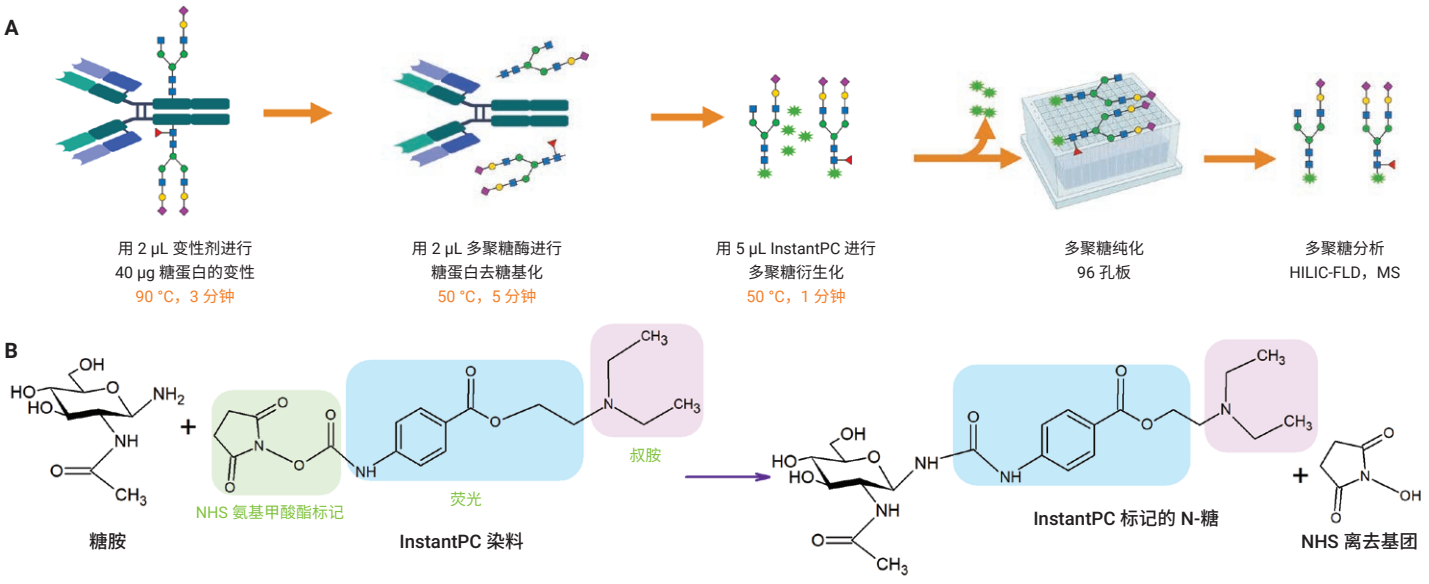


图 1. 用于糖胺释放和 InstantPC 衍生化的 Agilent AdvanceBio Gly-X 技术。(A) 用于溶液内糖蛋白去糖基化、InstantPC 衍生化和基质上纯化的工作流程。(B) 基于活化氨基甲酸酯化学作用的释放糖胺 InstantPC 衍生化的反应方案

进行 3 分钟的糖蛋白变性，然后在 50 °C 下进行 5 分钟的去糖基化，从而以有效方式从靶标糖蛋白中完全释放多聚糖。此外，随着 InstantPC 荧光标记（普鲁卡因的一种活性形式）的引入，释放的糖胺中间体通过活化氨基甲酸酯的化学作用连接在 InstantPC 上，形成稳定的脲键。利用这一创新的工作流程，从多聚糖前处理到多聚糖谱图分析仅需一个小时，即可实现完整的定性和定量多聚糖分析。

通过 HILIC/FLD 对单克隆抗体的 InstantPC 标记多聚糖谱图分析

选择 EG2-hFc 和利妥昔单抗的单克隆抗体作为模型糖蛋白。用 InstantPC 标记它们释放的糖胺中间体，用于 HILIC/FLD 定性和定量分析。在先进的色谱条件下（表 1），来自 EG2-hFc 和利妥昔单抗的 InstantPC 标记 N-糖结果显示所有主要 N-糖类型的峰分离良好（图 2 和图 3）。开发的用于多聚糖谱图分析的 HILIC/FLD 方法显示出良好的重现性（数据未显示）。

如图 2A 所示，EG2-hFc 多聚糖谱图分析是 CHO 细胞产生的 mAbs 的典型特征。它们主要由经过核心岩藻糖基化的中性复合二天线型 N-糖，以及比例相对较低的唾液酸化 N-糖组成，无 GlcNAc 二分支多聚糖。如图 2B 和表 2 所示，丰度最高的多聚糖是 FA2G2 (33.138%)，其次是 FA2G1 (27.200%)、FA2G2S1 (14.324%)、FA2 (9.878%) 和 FA2G2S2 (9.249%)。同样，在图 3A 中，利妥昔单抗也具有由 CHO 细胞产生的典型 mAbs N-糖谱图，与其对应的 EG2-hFc 类似。不过可以发现每个 N-糖峰的相对丰度都有显著差异。如图 3B 和表 2 所示，丰度

表 1. 用于 InstantPC 标记 N-糖谱图分析的 HILIC/FLD 参数

参数	值
仪器	Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统
色谱柱	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 120 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 µm（部件号 683775-913）
柱温	60 °C
流动相	A) 50 mmol/L 甲酸铵 (pH 4.4) B) 乙腈
梯度程序	时间 (min) A (%) B (%) 流速 (mL/min) 0 27 73 0.5 1.5 27 73 0.5 31.5 38 62 0.5 33 70 30 0.4 34 27 73 0.25 35 27 73 0.5 50 27 73 0.5
进样量	1 µL（相当于 0.4 µg 糖蛋白中的多聚糖）
检测	Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统 FLD $\lambda_{激发}$ 285 nm 和 $\lambda_{发射}$ 345 nm

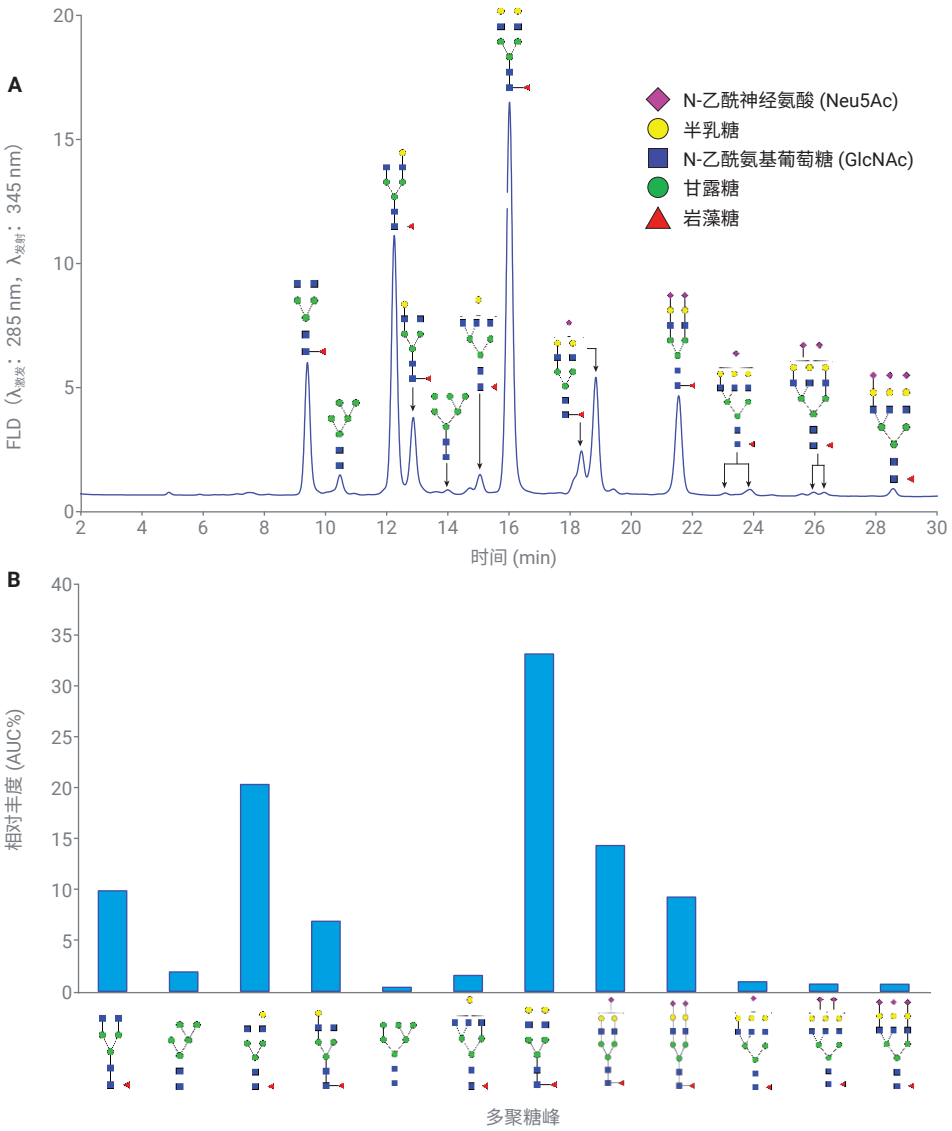


图 2. (A) 来自 EG2-hFc 的 InstantPC 标记 N-糖的 HILIC/FLD 色谱图。(B) 每种 N-糖类型的相对丰度

最高的多聚糖是 FA2 (40.208%)，其次是 FA2G1 (35.672%) 和 FA2G2 (10.734%)。同时还检出了低水平的高甘露多聚糖类型，分别为 M5 (6.173%)、M6 (0.941%) 和 M7 (0.440%)。至于唾液酸化多聚糖类型，其相对丰度可忽略不计，分别为 FA2G2S1 (1.757%)、FA2G2S2 (0.828%) 和 FA1G1S1 (0.431%)。平均曲线下面积 (%AUC) 值与之前采用 InstantPC 标记并使用安捷伦 LC/FLD/MS 仪器分析的利妥昔单抗 N-糖值一致[19]。然而，观察到 M5 类型的丰度高于普遍值，这归因于利妥昔单抗在 CHO 细胞内部的表达，以及由此产生的低丰度多聚糖类型之间的批间差异[20]。

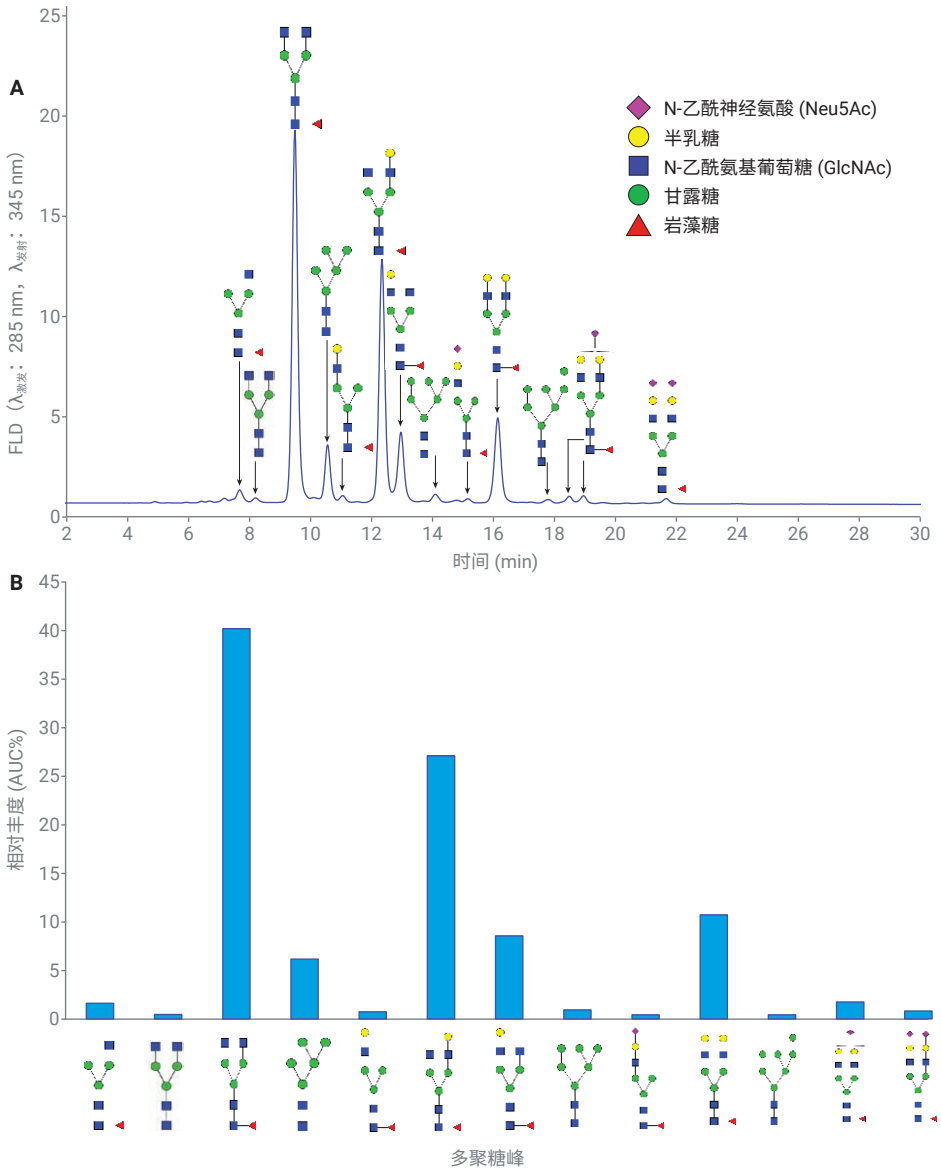
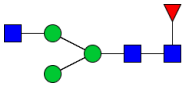
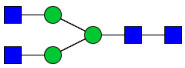
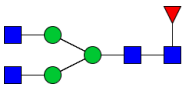
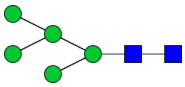
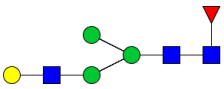
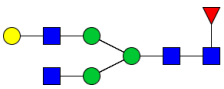
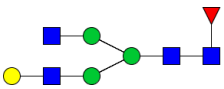
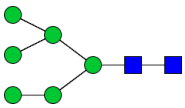
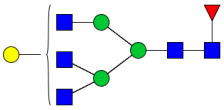
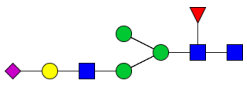
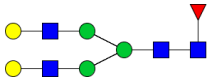
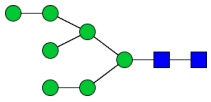
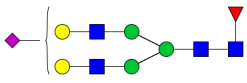
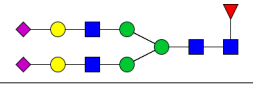
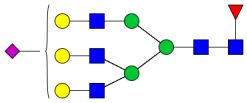
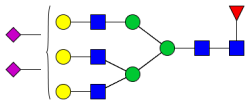
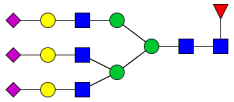


图 3. (A) 来自利妥昔单抗的 InstantPC 标记 N-糖的 HILIC/FLD 色谱图。(B) 每种 N-糖类型的相对丰度

表 2. InstantPC 标记的 EG2-hFc 和利妥昔单抗单克隆抗体的 N-糖谱图分析

Oxford 标记名称	N-糖结构	GU	EG2-hFc		利妥昔单抗	
			AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
FA1[6]		5.202	–	–	9.848	1.616
A2		5.425	–	–	2.839	0.465
FA2		5.922	71.368	9.878	244.882	40.208
M5		6.320	13.735	1.901	37.594	6.173
FA1[3]G1		6.515	–	–	4.487	0.737
FA2[6]G1		6.942	146.760	20.313	165.128	27.113
FA2[3]G1		7.152	49.752	6.886	52.128	8.559
M6		7.526	2.885	0.399	5.730	0.941
FA3G1		7.859	11.298	1.563	–	–
FA1[3]G1S1		7.891	–	–	2.625	0.431
FA2G2		8.194	239.420	33.138	65.368	10.734
M7		8.754	–	–	2.679	0.440
FA2G2S1		8.968 9.124	103.495	14.324	10.699	1.757
FA2G2S2		10.048	66.820	9.249	5.042	0.828
FA3G3S1		10.564 10.846	6.799	0.941	–	–

Oxford 标记名称	N-糖结构	GU	EG2-hFc		利妥昔单抗	
			AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
FA3G3S2		11.594 11.720	5.124	0.709	–	–
FA3G3S3		12.553	5.045	0.698	–	–

1. InstantPC 标记的麦芽糊精分子量标准品标准曲线：$GU = 0.007522 + 1.037T - 0.06697T^2 + 0.003039T^3 - 0.00006653T^4 + 0.0000005791T^5$
2. 每种 N-糖的相对丰度用以下等式计算：
   $FLR\ AUC(\%) = FLR\ AUC_{多聚糖\ i} / sum(FLR\ AUC_{多聚糖}) \times 100$
3. 通过平均不同测量值计算葡萄糖单元 (GU)、曲线下面积 (AUC) 和相对丰度 (AUC%)
4. “–”表示未检出

结论

蛋白质糖基化对治疗性糖蛋白的安全性和有效性起着关键作用，是一项关键质量属性。本应用简报表明，使用 InstantPC 试剂盒的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理可实现用于生物治疗多聚糖谱图分析的高通量多聚糖前处理，整个过程不到一小时。InstantPC 是一种创新的荧光染料，它以“即时”方式标记糖胺中间体，具有高 FLD 灵敏度。此外，开发的 HILIC/FLD 方法将 InstantPC 标记的 N-糖从单克隆抗体 EG2-hFc 和利妥昔单抗中分离，得到充分分离的峰。最后，用于多聚糖前处理的简化 96 孔板形式可靠而稳定，具有良好的重现性。

参考文献

1. Bairoch, A.; Apweiler, R. The SWISS-PROT Protein Sequence Database and Its Supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 45–8
2. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the Frequency of Protein Glycosylation, as Deduced from Analysis of the SWISS-PROT Database. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4–8
3. Khoury, G.A.; Baliban, R.C.; Floudas, C.A. Proteome-Wide Post-Translational Modification Statistics: Frequency Analysis and Curation of the Swiss-Prot Database. *Sci. Rep.* **2011**, *1*
4. Zhou, Q.; Qiu, H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 1366–1377
5. Wada, R.; Matsui, M.; Kawasaki, N. Influence of N-Glycosylation on Effector Functions and Thermal Stability of Glycoengineered IgG1 Monoclonal Antibody with Homogeneous Glycoforms. *MAbs* **2019**, *11*, 350–372
6. Higel, F. et al. N-glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc Fusion Proteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *100*, 94–100
7. Delobel, A. Glycosylation of Therapeutic Proteins: A Critical Quality Attribute. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2271*, 1–21
8. Goh, J.B.; Ng, S.K. Impact of Host Cell Line Choice on Glycan Profile. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38*, 851–867
9. Hossler, P.; Khattak, S.F.; Li, Z.J. Optimal and Consistent Protein Glycosylation in Mammalian Cell Culture. *Glycobiology* **2009**, *19*, 936–49

10. Zhang, P. et al. Challenges of Glycosylation Analysis and Control: an Integrated Approach to Producing Optimal and Consistent Therapeutic Drugs. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 740–65
11. Seeberger, P. H. Monosaccharide Diversity. in *Essentials of Glycobiology* (eds. rd *et al.*) 19–30 (Cold Spring Harbor (NY), 2015)
12. Everest-Dass, A. V. et al. Human Disease Glycomics: Technology Advances Enabling Protein Glycosylation Analysis - Part 1. *Expert Rev. Proteomics* **2018**, *15*, 165–182
13. Melmer, M. et al. HILIC Analysis of Fluorescence-Labeled N-Glycans From Recombinant Biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 905–14
14. Xie, Y. et al. High-throughput and High-Sensitivity N-Glycan Profiling: a Platform for Biopharmaceutical Development and Disease Biomarker Discovery. *Anal. Biochem.* **2021**, *623*, 114205
15. Castelli, M. S.; McGonigle, P.; Hornby, P. J. The Pharmacology and Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00535
16. Bell, A. et al. Differential Tumor-Targeting Abilities of Three Single-Domain Antibody Formats. *Cancer Lett.* **2010**, *289*, 81–90
17. Pierpont, T. M.; Limper, C. B.; Richards, K. L. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 163
18. Smith, M.R. Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms of Action and Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7359–68
19. Yan, J. 等人，使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品前处理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1348ZHCN，**2019**
20. Liau, B. 使用高分辨率 LC/MS 对两种利妥昔单抗生物仿制药的完整质量数、亚基质量数和游离多聚糖进行比较研究，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1653ZHCN，**2020**

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

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44495.5528240741

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，2022
2022 年 1 月 24 日，中国出版
5994-4350ZHCN

Agilent
Trusted Answers