

用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程

作者

Anna Fong, John Yan,
Ace G. Galermo, Tom Rice,
Aled Jones, Ted Haxo
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒（部件号 GS24-SAP）对生物治疗性糖蛋白以及 NISTmAb 中的唾液酸进行分析和绝对定量。该试剂盒使用改进的全新高通量工作流程进行前处理、分离，并检测标记有 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB) 的唾液酸。N-糖或 O-糖非还原末端的唾液酸在调节生物治疗性糖蛋白的有效性中发挥着关键作用^[1]。

本文介绍的工作流程展示了使用 AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒，通过酸水解释放末端唾液酸，然后进行 DMB 标记以及定性和定量分析。样品和标准品中经 DMB 标记的唾液酸通过反相液相色谱 (LC) 进行分离，然后使用荧光检测 (FLD) 进行定量，并通过质谱 (MS) 进行结构确认。

前言

生物治疗性糖蛋白上多聚糖的组成会影响免疫原性、药代动力学和药效学^[2]。多聚糖是由单糖组成的碳水化合物，根据组成和键合位置的不同可排列成多种不同的寡糖结构。根据分子和应用的不同，末端唾液酸可能会降低清除率，降低抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性或具有抗炎作用^[3-5]。生物治疗药物中常见的两种形式是 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (Neu5Gc)。Neu5Ac 通常为主要形态，而 Neu5Gc 不能由人类合成，它存在于生物治疗药物中使其可能具有免疫原性。因此，监测唾液酸的绝对含量以及治疗性糖蛋白中不同唾液酸种类的水平都至关重要。

本文展示了全新的高通量工作流程，其采用 96 孔微孔板对治疗性糖蛋白中的唾液酸进行释放、标记和分析，此处以利妥昔单抗、依那西普、NISTmAb 和西妥昔单抗为例。唾液酸残基被释放后，使用 1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧基苯 (DMB)，通过两步法进行标记。然后使用基于反相超高效液相色谱 (UHPLC) 的 10 分钟快速方法对 DMB 标记的唾液酸进行分离和分析，采用 FLD 检测进行定量，还可以选择 MS 检测进行质量分析。本工作流程可以使用唾液酸参比组合 (SARP) 对 Neu5Ac、Neu5Gc 和其他唾液酸种类进行定性表征，还可以使用包含的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 定量标准品实现皮摩尔水平的绝对定量。本工作流程能够实现可靠且

可重现的高通量样品前处理，以备唾液酸分析和定量。本试剂盒对于低唾液酸化水平的分子具有更宽的检测范围和更高的灵敏度。

实验部分

样品前处理

在 96 孔板中对样品进行前处理。通过酸水解反应从利妥昔单抗（美罗华，批号 M190170）、依那西普（恩利，批号 M190088）、NISTmAb（批号 14HB-D-002）和爱必妥（西妥昔单抗，批号 MI60886）中释放出唾液酸。该方法无需干燥步骤，从而将整个样品前处理时间减少了 1-2 个小时。所需样品量通常为 200 µg 唾液酸化水平较低的糖蛋白或 5 µg 唾液酸化水平较高的糖蛋白。使用唾液酸参比标样 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的连续稀释液配制标准曲线，确定分析的定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。然后按照图 1 所示的工作流程，用 DMB 对游离唾液酸、SARP 和标样进行衍生化，释放和标记步骤在热循环仪中进行。

使用 LC/FLD/MS 分析 DMB 标记的唾液酸

使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统对来自美罗华、恩利、NISTmAb 和爱必妥且经 DMB 标记的唾液酸进行反相 (RP) 分离，使用荧光检测 (FLD) 进行定量分析。所有 RP-UHPLC 分离均在表 1 中描述的条件下进行。此外，使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 质谱仪

（表 2）进行在线分析，以确认 SARP 中 DMB 标记的唾液酸种类的洗脱顺序。FLD 后使用固定分流器将大约 50% 的液流分至废液，50% 分至 MS。使用 Agilent OpenLab CDS 2.3 和 MassHunter 定性分析软件 10.0 进行数据分析。通过校准曲线对 Neu5Gc 和 Neu5Ac 定量。

材料

乙腈 (LC/MS 级，Honeywell Burdick & Jackson) 购自 VWR。甲醇 (Optima LC/MS 级) 购自 Fisher Scientific。使用实验室内部制备的 Nanopure 水进行所有实验。

仪器

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (2.1 × 75 mm, 2.7 µm; 部件号 697775-902)，采用表 1 中的方法详细信息分离 DMB 标记的唾液酸样品。安捷伦 LC/MS 配置如下：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent Infinity Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (参数见表 2)

软件

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter 定性分析软件 10.0

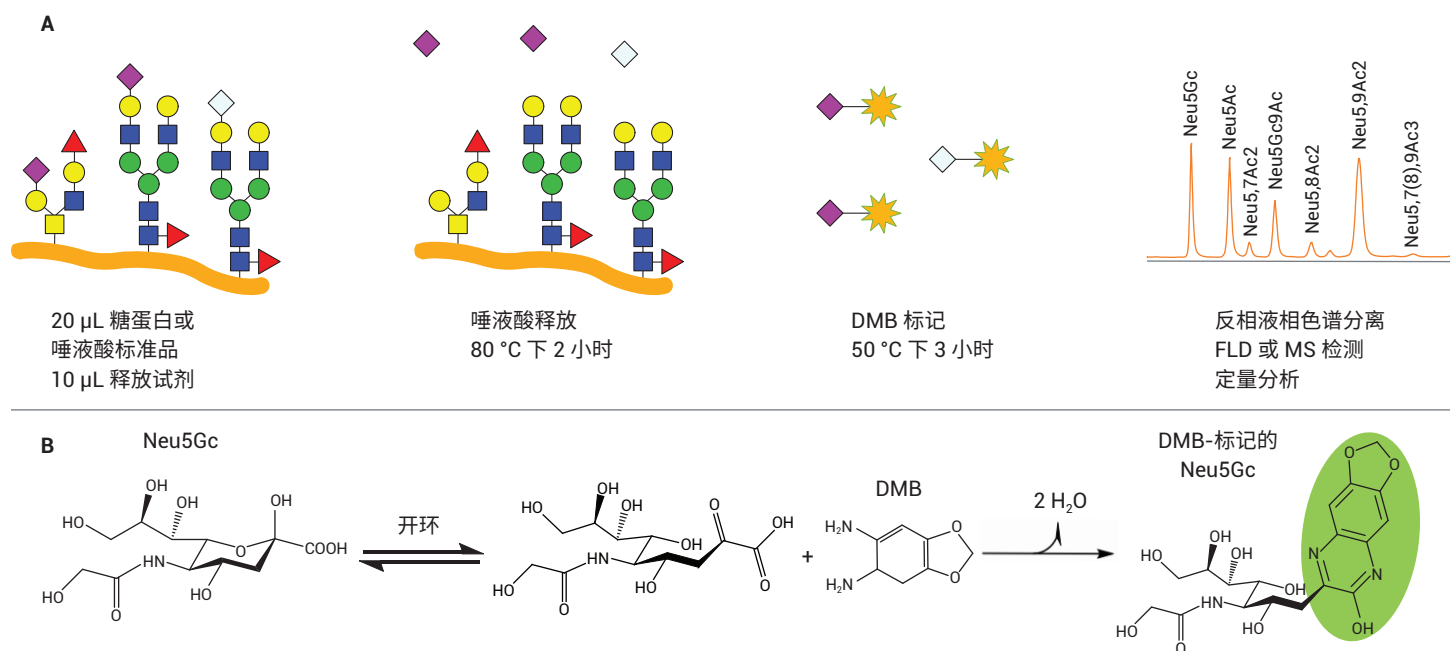


图 1. (A) 唾液酸释放和 DMB 标记工作流程概览, (B) 唾液酸 Neu5Gc 的 DMB 标记机制

表 1. 反相 UHPLC 条件

参数	值																																			
仪器	Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统																																			
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 μm (部件号 697775-902)																																			
柱温	30 °C																																			
流动相	A) 甲醇:乙腈:水 (4:8:88) B) 乙腈																																			
梯度程序	<table><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%A</th><th>%B</th><th>流速 (mL/min)</th><th></th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td><td>等度</td></tr><tr><td>6.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td><td>洗脱</td></tr><tr><td>6.25</td><td>20</td><td>80</td><td>0.4</td><td></td></tr><tr><td>7.30</td><td>20</td><td>80</td><td>0.4</td><td>清洗</td></tr><tr><td>7.50</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td><td>再平衡</td></tr><tr><td>10.00</td><td>100</td><td>0</td><td>0.4</td><td></td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)		0.00	100	0	0.4	等度	6.00	100	0	0.4	洗脱	6.25	20	80	0.4		7.30	20	80	0.4	清洗	7.50	100	0	0.4	再平衡	10.00	100	0	0.4	
时间 (min)	%A	%B	流速 (mL/min)																																	
0.00	100	0	0.4	等度																																
6.00	100	0	0.4	洗脱																																
6.25	20	80	0.4																																	
7.30	20	80	0.4	清洗																																
7.50	100	0	0.4	再平衡																																
10.00	100	0	0.4																																	
进样量	10 μL																																			
检测	Agilent 1260 Infinity II FLD λ _{Ex} 373 nm, λ _{Em} 448 nm																																			

表 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
离子源	双 AJS ESI
气体温度	350 °C
干燥气流速	11 L/min
雾化器	15 psi
鞘气温度	400 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	1400 V
喷嘴电压	1800 V
碎裂电压	120 V
锥孔电压	65 V
质量数范围 (MS)	m/z 400–1000
质量数范围 (MS/MS)	m/z 100–550
采集模式	高分辨率 (4 GHz)

结果与讨论

使用 LC/FLD/MS 分析 DMB 标记的唾液酸

对 DMB 标记的 SARP 进行 RP-UHPLC 分析，最终分离并检测到 7 种唾液酸衍生物：Neu5Gc、Neu5Ac、Neu5,7Ac2、Neu5Gc,9Ac、Neu5,8Ac2、Neu5,9Ac2 和 Neu5,7(8),9Ac3。虽然使用不同的色谱柱、流速、溶剂或在不同的实验室条件下可能会观察到保留时间的差异，但 DMB 衍生的唾液酸的洗脱顺序保持一致。参比组合用于在样品序列开始时评估色谱系统的分离度和准确度。图 2A 展示了 DMB 标记的 SARP 的典型 FLD 色谱图。使用质谱确认了 DMB-唾液酸衍生物的鉴定结果（图 2B）。

分析生物治疗药物和 NISTmAb 的唾液酸含量

将工作流程应用于美罗华、恩利、NISTmAb 和爱必妥，鉴定出的 DMB 标记的唾液酸如图 3 所示。美罗华（图 3A）和恩利（图 3B）主要包含 Neu5Ac，而 NISTmAb（图 3C）和爱必妥（图 3D）主要包含 Neu5Gc。来自恩利和爱必妥的 DMB 标记样品中主峰的质谱证实它们分别为 Neu5Ac 和 Neu5Gc（图 4）。

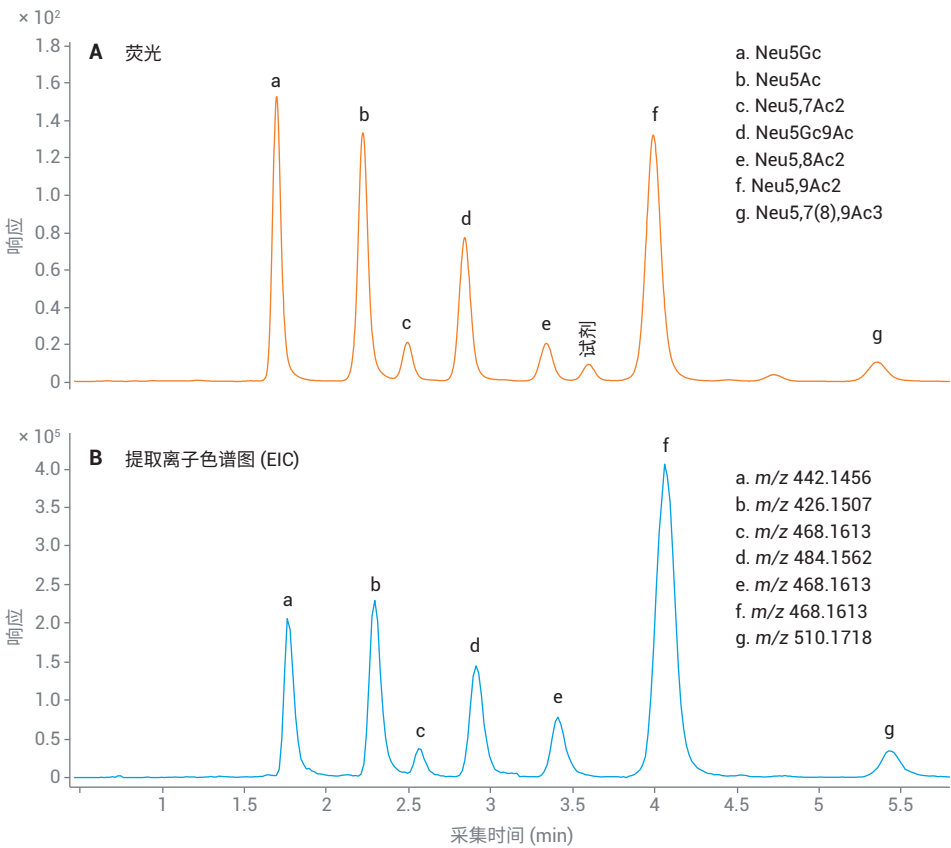


图 2. DMB 标记 SARP 的 UHPLC 色谱图。DMB 标记的唾液酸参比组合的 (A) 荧光分析谱图和 (B) 提取离子色谱图，[M+H]⁺

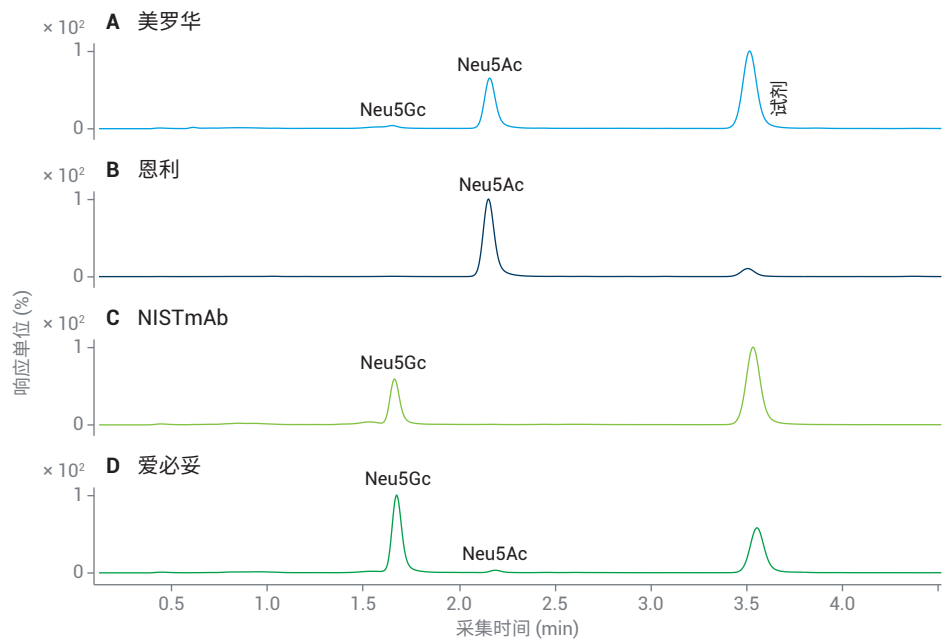


图 3. 来自不同糖蛋白的 DMB 标记唾液酸的 UHPLC 荧光谱图 (A) 美罗华; (B) 恩利; (C) NISTmAb; (D) 爱必妥

唾液酸含量的定量分析

基于 DMB 标记的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 标准品的色谱分离和荧光响应，生成了定量校准曲线（图 5）。使用由 OpenLab CDS 2.3 通过 P2P 噪音计算得到的噪音计算出了 LOD 和 LOQ。基于积分峰面积确定美罗华、恩利、NISTmAb 和爱必妥中 Neu5Gc 和 Neu5Ac 的可检测摩尔量，如表 3 所列。总唾液酸定量结果与通过 AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒（部件号 GS48-SAQ）获得的结果一致（表 4）。与以往的 DMB 标记工作流程（部件号 GKK-407）相比，此试剂盒具有更出色的性能（表 5），其提高了每个样品的糖蛋白浓度，减少了分析前的样品稀释，从而增加了 DMB 标记唾液酸的荧光信号。

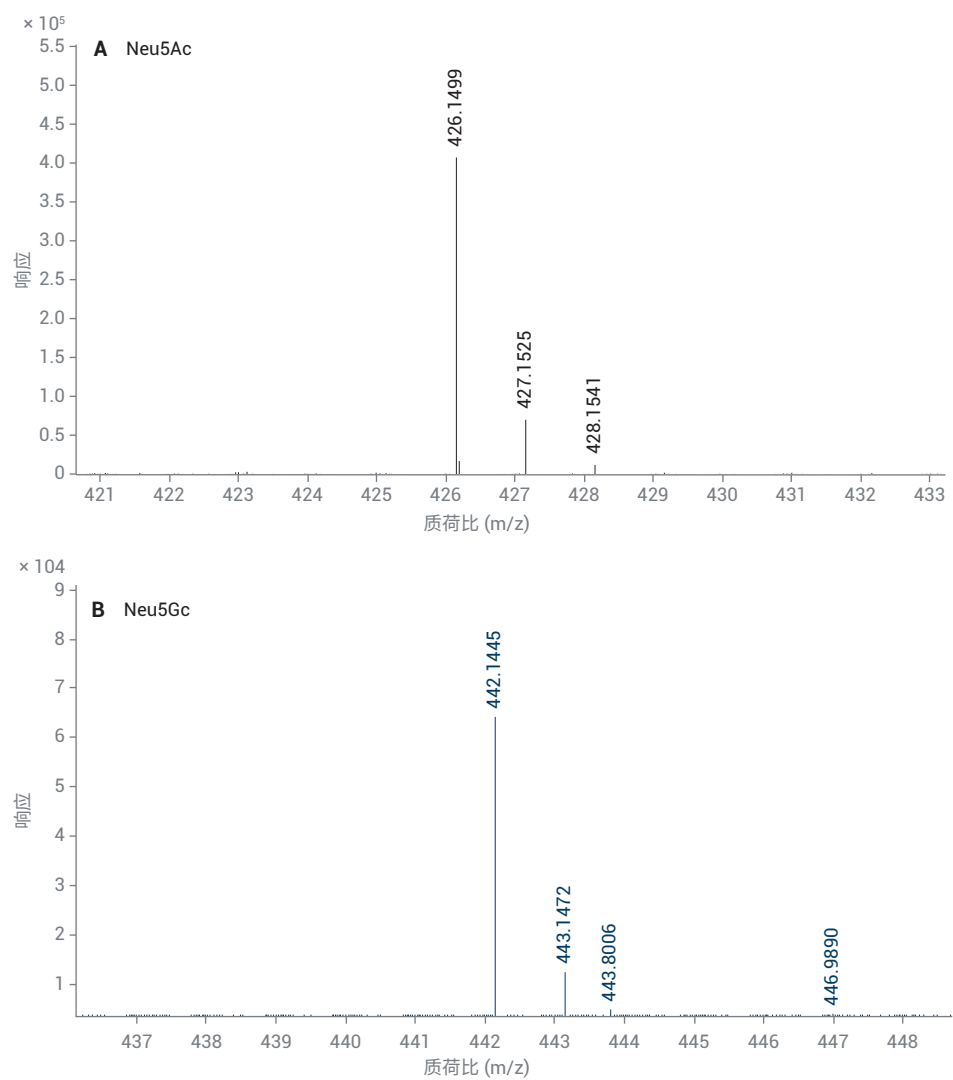


图 4. DMB 标记唾液酸的质谱图，(A) 来自恩利的 Neu5Ac；(B) 来自爱必妥的 Neu5Gc

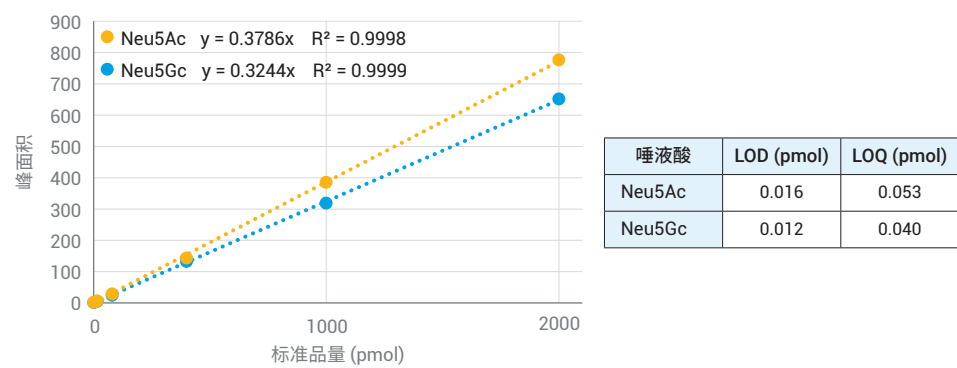


图 5. Neu5Ac 和 Neu5Gc 校准曲线，n = 2。表中显示了 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的 LOD 和 LOQ

表 3. 表中显示了每种糖蛋白 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的 pmol/μg 平均值, n = 3。

ND = 未检出

	浓度 (mg/mL)	样品质量 (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	%CV	Neu5Gc (pmol/μg)	%CV
美罗华	10	200	0.60	4.2%	0.02	1.8%
恩利	0.25	5	228	6.9%	ND	-
NIST mAb	10	200	ND	-	0.36	1.8%
爱必妥	2	40	0.12	10.9%	3.72	7.1%

表 4. 使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (部件号 GS24-SAP) 获得的总唾液酸 (Neu5Ac 和 Neu5Gc) 定量结果与使用 Agilent AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒 (部件号 GS48-SAQ) 获得的结果的比较, n = 3

	Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量 试剂盒		Agilent AdvanceBio 总唾液酸定量分析 试剂盒	
	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
美罗华	0.62	4.17%	0.47	5.04%
恩利	220	1.65%	210	12.34%
爱必妥	3.80	7.26%	3.49	0.69%
胎球蛋白	226	4.45%	232	7.39%

表 5. 使用 Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒 (部件号 GS24-SAP) 获得的 Neu5Ac 和 Neu5Gc 定量结果 (pmol/μg) 与使用 Signal DMB 唾液酸标记试剂盒 (部件号 GKK-407) 获得的结果的比较, n = 3。ND = 未检出

		GKK-407		Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒	
糖蛋白	唾液酸	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
美罗华	Neu5Gc	ND	-	0.02	1.76%
	Neu5Ac	0.58	1.12%	0.60	4.25%
恩利	Neu5Ac	226	3.57%	223	2.92%
爱必妥	Neu5Gc	ND	-	3.68	1.02%
	Neu5Ac	ND	-	0.12	4.46%
胎球蛋白	Neu5Gc	ND	-	4.78	4.90%
	Neu5Ac	201	1.47%	222	4.44%

结论

AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒提高了对唾液酸化水平较低的蛋白质的分析灵敏度, 例如在 Fc 区域具有单个 N-糖基化位点的单克隆抗体。更新后的 DMB 标记工作流程消除了样品干燥步骤, 减少了样品前处理时间。

该工作流程为确定生物治疗药物中 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的绝对和相对含量提供了一种出色方法。采用 96 孔板进行高通量样品前处理, 并且具有高重现性。定量分析数据与以往的 DMB 标记工作流程

(GKK-407) 和 AdvanceBio 总唾液酸定量分析试剂盒 (GS48-SAQ) 结果相当。

参考文献

- Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(8), 351–360
- Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(6), 1866–1884
- Li, Y. et al. Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* **2017**, 114(31), 8360-8365
- Scallon, B. J. et al. Higher Levels of Sialylated Fc Glycans in Immunoglobulin G Molecules can Adversely Impact Functionality. *Mol. Immunol.* **2007**, 44(7), 1524-1534
- Kaneko, Y. et al. Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, 313, 670-673

www.agilent.com

DE.7541782407

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, 2021
2021 年 3 月 23 日, 中国出版
5994-2352ZHCN

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

