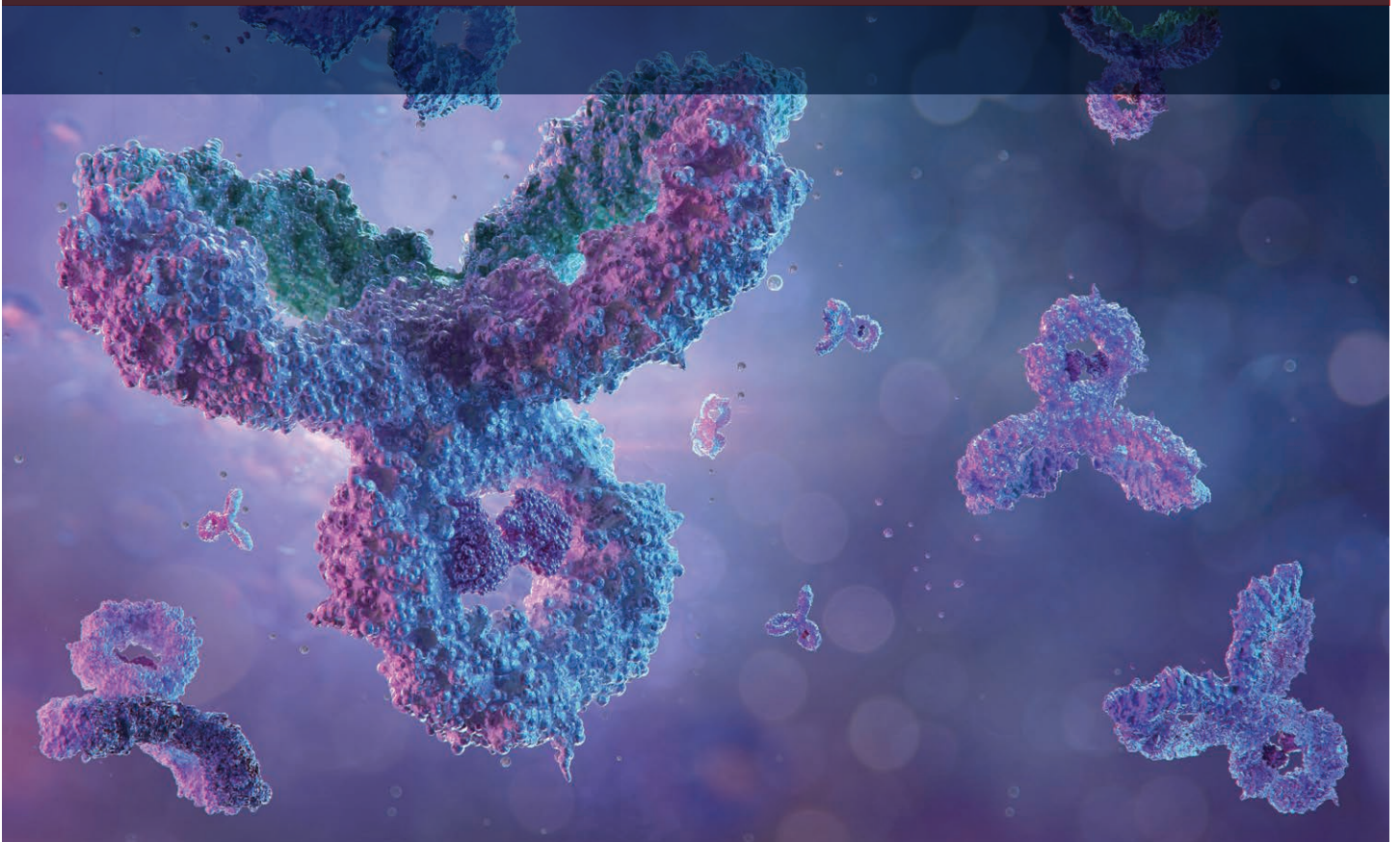


安捷伦生物色谱柱

# 多聚糖分析

应用文集



# 目录

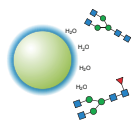
背景	2
入门指南	3
糖谱分析指南	4
精选应用简报	16
使用 Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 和 2-AB Express 样品 前处理与 LC/FLD/MS 简化生物治疗药物的 N-糖分析工作流程 — 5994-1348ZHCN	16
用于生物治疗药物中唾液酸分析与定量的改进工作流程 — 5994-2352ZHCN	26
使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较 — 5991-6958EN	34
从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法 — 5991-8550CHCN	43
使用快速高效的 HILIC 方法提高对复杂多聚糖结构的分析能力 — 5991-4896EN	53
使用 UHPLC 和荧光检测对单克隆抗体和其他糖蛋白的 N-糖进行分析 — 5991-5253CHCN	58
用于生物治疗药物 N-糖高通量分析的安捷伦解决方案 — 5991-6904EN	66
更多应用简报	71
更多信息	71

# 多聚糖分析

## 背景

糖基化是一种重要的翻译后修饰，因为多聚糖在蛋白质识别和生物治疗药物疗效方面起着关键作用。人体细胞中的糖基化模式遵循基于共同核心结构的典型天线样模式，而重组蛋白质制造商的目标是使用细胞培养的方式尝试复制该模式。这需要采用哺乳动物细胞系，但糖基化途径非常复杂，而且并非所有克隆都能产生所需的糖谱。监管机构认为这是一项重大挑战，并就如何确定糖指纹谱提供了指导，包括使用特定的酶 PNGase F 切割 N-糖，用荧光团标记它们以提高检测灵敏度，然后使用亲水相互作用色谱 (HILIC) 柱（通常与荧光检测器结合使用，但也可使用质谱）将它们分离。

安捷伦提供多种试剂盒，其中含有用各种标签（包括 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB)、InstantPC 和 APTS）手动进行去糖基化和标记反应所需的所有试剂。或者也可使用只需极短时间即可处理更多样品的全自动 AssayMAP 平台获得更高通量。该方法的示意图见第 66 页的应用简报。



## 多聚糖分析

### 亲水相互作用色谱

快速、高分离度、可重现的  
多聚糖分离

### AdvanceBio 糖谱分析柱

一种酰胺 HILIC 色谱柱

属性	优势
2.7 $\mu\text{m}$ 表面多孔颗粒填料	低反压，高分离度
1.8 $\mu\text{m}$ 全多孔颗粒填料	超高分离度
兼容荧光和质谱检测	方法转移简单

### 入门指南

亲水相互作用色谱 (HILIC) 是一种正相色谱。在某些方面与更常见的反相色谱相反，梯度从高有机溶剂含量（而不是高含水量）开始。分析物与固定相之间相互作用的机理是从有机溶剂含量较高的洗脱液分配到固定相表面上的水层。水也是强洗脱溶剂。方法结束时充足的再平衡时间和极小的进样量对色谱重现性和良好的峰形至关重要。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供表面多孔 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱（适用于所有 HPLC 仪器），或全多孔 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱（适用于 UHPLC 仪器）。在本节详述的工作流程操作指南中，可以找到密切相关的难分离多聚糖结构达到理想分离度所需的相应方法条件。

# 糖谱分析： 操作指南

## 前言

一级氨基酸序列的翻译后修饰（包括糖基化）将会造成功能上的变化，并且可能影响生物药物的疗效和免疫源性。多聚糖结构还会影响血浆中的蛋白质清除率以及单克隆抗体触发具有治疗意义的免疫应答的能力。许多监管机构将糖基化归为生物分子的关键质量属性，因此在糖蛋白原研药、生物仿制药或改良型生物相似药的开发阶段，研究人员必须对糖基化进行表征和定量，并确定可接受范围。

Agilent AdvanceBio 糖谱分析解决方案提供的优化工作流程专为实现荧光标记多聚糖的重现性分析而设计，用以实现准确鉴定与定量。

## 样品前处理 — AdvanceBio N-糖样品前处理试剂盒

对糖蛋白（包括单克隆抗体）的 N-糖组分谱进行分析时，需要使用 PNGase F 将 N-糖从蛋白质氨基酸主链上酶切下来。切下的 N-糖可使用亲水相互作用色谱 (HILIC) 联用质谱检测进行分析。更常见的是用一种荧光团标记 N-糖，并使用 HILIC 色谱进行分离，然后再进行荧光或质谱检测。

AdvanceBio 多聚糖样品前处理试剂盒可提供样品前处理所需的全部试剂。安捷伦的样品前处理试剂盒采用模块化形式，通常分为用于去糖基化、标记和净化的子试剂盒。此外，工作流程每个步骤所使用的模块都有独立的部件号，灵活方便。通过该工作流程，可得到适合液相色谱分析（通常为 HILIC 分析）的样品。

## 色谱柱选择

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱经过精心设计和制造，可通过 HILIC 色谱提供快速、高分离度和高重现性的多聚糖鉴定。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱应用了先进技术，能够提高质谱和荧光检测结果的准确性。有以下两种 UHPLC 配置可供选择：2.7  $\mu\text{m}$  的表面多孔填料和 1.8  $\mu\text{m}$  的表面多孔填料，前者可实现更低反压下的高分离度分析，而后者则可实现超高分离度分析。

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	氨基键合相可缩短平衡时间并提高多聚糖选择性。
1.8 $\mu\text{m}$	该色谱柱基于全多孔颗粒填料，适合高速分离和高通量应用。耐压高达 1200 bar，可与 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪一起使用。
2.7 $\mu\text{m}$	该色谱柱基于 Poroshell 技术，可提供表面多孔填料颗粒，减少了扩散距离，在更低的压力下可实现高分离度分离，并且能够使用更长的色谱柱来提升分离效率。

## 分析速度

AdvanceBio 糖谱分析 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱可实现高通量的 N-糖分析，适合由于样品数量庞大或需要快速得到数据而需要将速度作为主要考虑因素的应用。这些色谱柱可提供出色的结果，同时比竞争对手节约 40% 的时间。

## 条件

参数	值
色谱柱 A	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 $\times$ 150 mm, 1.8 $\mu\text{m}$
色谱柱 B	竞争产品亚 2 $\mu\text{m}$ 糖谱分析色谱柱
仪器	配备 1260 Infinity 荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱柱
柱温	55 $^{\circ}\text{C}$
样品恒温箱	105 $^{\circ}\text{C}$
流动相	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B: ACN
FLD	激发波长 = 260 发射波长 = 430
进样量	2 $\mu\text{L}$ , 溶液为 70:30 乙腈: 100 mmol/L 甲酸铵
样品	安捷伦 2-AB 标记的人 IgG N-糖文库 (部件号 5190-6996)

## 分离度

使用 AdvanceBio 糖谱分析 2.7  $\mu\text{m}$  填料和 250 mm 柱长的色谱柱实现高分离度分离。这种更高的分离度可对目标多糖以及表达过程中可能出现的蛋白糖基化谱图变化进行准确的定量分析。

时间	%A	%B	流速 (mL/min)
0	20	80	0.5
25	40	60	0.5
26	100	0	0.5
27	40	80	0.5

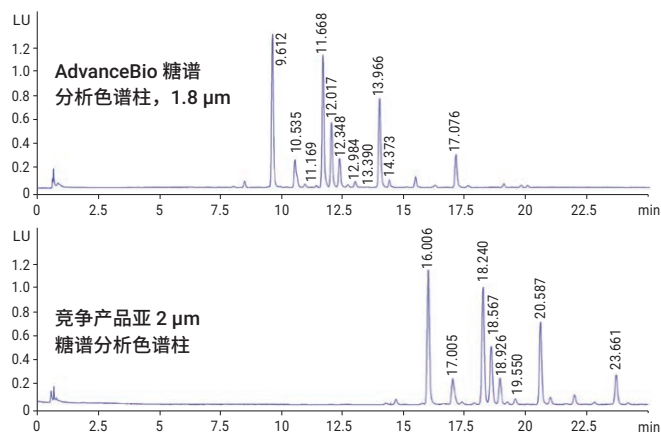


图 1. 与 2.1  $\times$  150 mm 规格的非安捷伦亚 2  $\mu\text{m}$  糖分析色谱柱相比, Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可提供更高的分离度、更窄的色谱峰以及更高的峰容量

## 利用多聚糖标准品确保性能测试与保留谱分析获得一致的结果

开发早期阶段丢失信息可能引起下游过程严重受挫。此外，生产过程中的不一致将导致糖基化改变，从而对免疫原性和功效产生负面影响。安捷伦参比标准品有助于可靠地采集重要数据，并使每个工作流程组件都处于理想工作状态。安捷伦提供全系列预标记的多聚糖标准品和文库，以及未标记的多聚糖标准品。第 12-15 页提供了包含结构图和部件号的完整列表。

## 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的分离

### 条件

参数	值
色谱柱	AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 859700-913 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
流动相	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B: ACN
FLD	激发波长 = 260 发射波长 = 430
进样量	2 μL (10 pmol 总多聚糖/1 μL, 75:25 乙腈:水)
样品	安捷伦 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品 (部件号 GKSB-503)

## 灵活高效的液相色谱仪

可靠稳定、简便易用：

100% 生物惰性的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统具有低表面活性、耐腐蚀性、主动密封垫冲洗和四元缓冲液混合功能，可获得出色的分析结果。

效率的新标杆：

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统是新一代 UHPLC，可大大提高分析效率、仪器效率与实验室效率，最高压力 1300 bar，最高流速为 5 mL/min。

更高的效率与互不影响的结果：安捷伦生物惰性液相色谱凭借更尖锐的峰形与更高的重现性大大提高色谱分析的可靠性。

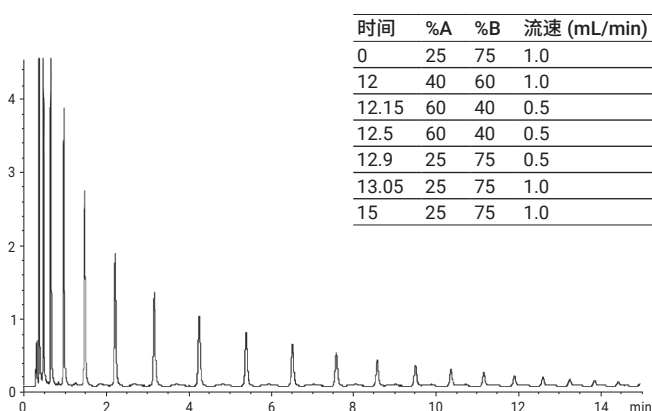


图 2. 本次分析使用安捷伦葡聚糖分子量标准品与 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，以便关联未知多聚糖的保留时间。图片来自 5990-9384CHCN

## 条件

### 流动相

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱保存在储存缓冲液乙腈:水溶液中运输，可直接用于 HILIC 分离。HILIC 色谱柱可兼容多聚糖分析最常用水性缓冲液和乙腈。多聚糖分析使用的典型流动相是：

缓冲液 A：100 mmol/L 甲酸铵水溶液，pH 4.5

缓冲液 B：乙腈（可兼容质谱）

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱运行的 pH 范围为 2 至 7。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱是具有 HILIC 酰胺固定相的硅胶基色谱柱。所有硅胶在 pH 值大于 6 的水相流动相中均有一定的溶解度，因此在 pH 7 以上使用色谱柱会缩短其使用寿命。

### 进样

为实现更高分离度，进样量应为 1 至 2  $\mu\text{L}$ 。样品应首先溶解于水中，然后配制成 70:30 乙腈:水溶液。自动进样器应冷却，以保持样品的完整性。此外，在进样到色谱柱前应先对样品进行过滤。对于 UHPLC 分析，建议进样 1  $\mu\text{L}$  水溶液。对于 AdvanceBio 糖谱分析 1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱，色谱柱入口筛板的标称值为 0.5  $\mu\text{m}$ ，对于 AdvanceBio 糖谱分析 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱，色谱柱入口筛板的标称值为 2  $\mu\text{m}$ 。因此，应通过 0.2  $\mu\text{m}$  样品过滤器对样品进行过滤。

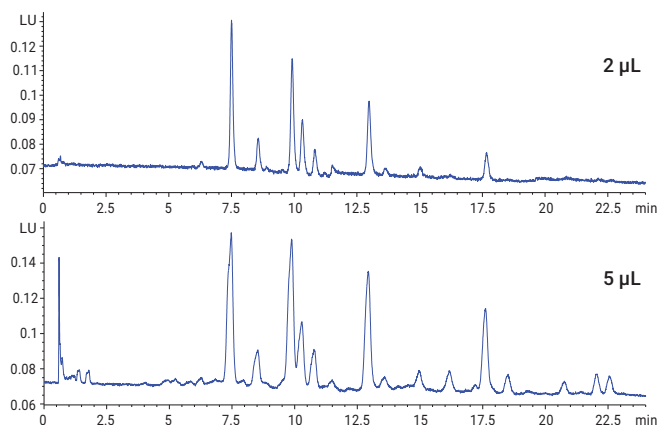


图 3. 所示为 AdvanceBio 糖谱分析 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm 色谱柱上进样量为 5  $\mu\text{L}$  的结果（底部色谱图），与进样量为 2  $\mu\text{L}$  的结果（顶部色谱图）相比，色谱峰宽度增加并且分离度有所损失。图片来自 5991-6183CHCN

### 流速

高分离度分离时应采用 0.5 mL/min 的流速，而高速分离时最高可采用 1.0 mL/min 的流速。高含水量净化务必在低流速下运行。

1.8  $\mu\text{m}$  色谱柱的最大运行压力为 1200 bar，而 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱的最大运行压力为 600 bar。运行时不超过最大压力的 80%，可达到理想色谱柱使用寿命。

## AdvanceBio 糖谱分析 2.7 $\mu\text{m}$ 色谱柱的建议梯度

### 提高分离度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.5 mL/min
32	40%	60%	0.5 mL/min
33	80%	20%	0.5 mL/min
35	80%	20%	0.5 mL/min
36	20%	80%	0.5 mL/min
45	20%	80%	0.5 mL/min

### 加快分析速度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.7 mL/min
12	40%	60%	0.7 mL/min
12.5	80%	20%	0.5 mL/min
13.5	80%	20%	0.5 mL/min
16	20%	80%	0.5 mL/min
17	20%	80%	0.7 mL/min
18	20%	80%	0.7 mL/min

## AdvanceBio 糖谱分析 1.8 $\mu\text{m}$ 色谱柱的建议梯度

### 提高分离度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	20%	80%	0.5 mL/min
32	40%	60%	0.5 mL/min
33	80%	20%	0.5 mL/min
35	80%	20%	0.5 mL/min
36	20%	80%	0.5 mL/min
45	20%	80%	0.5 mL/min

### 加快分析速度的建议梯度

时间	洗脱液 A	洗脱液 B	流速
0	25%	75%	1.0 mL/min
12	40%	60%	1.0 mL/min
12.5	80%	20%	0.5 mL/min
13.5	80%	20%	0.5 mL/min
14	25%	75%	0.5 mL/min
15	25%	75%	1.0 mL/min
20	25%	75%	1.0 mL/min

可能需要调整起点和终点，使包含不同类型多聚糖的样品获得更高的分离度。例如，较大的多聚糖结构可能需要采用 75%–55% 的乙腈梯度以获得理想结果。

### 温度

为得到尖锐的峰形，典型运行温度为 60 °C。可以在更高温度下使用，但可能会缩短色谱柱使用寿命。为延长色谱柱寿命，建议在 40 °C 下使用。选择性和分离度可随温度发生变化。

### 检测

可使用质谱检测 N-糖。然而，荧光检测是标记 N-糖最常用的分析方法。激发和发射波长具有染料特异性，Agilent 1260 Infinity 荧光检测器的值请参见样品前处理试剂盒的说明书。

## 大幅延长色谱柱寿命并提升柱效

### 色谱柱活化

AdvanceBio 糖谱分析色谱柱专为分离从糖蛋白和糖肽上裂解下来的 N-糖。为使 HILIC 机制有效发挥作用，色谱柱在使用前必须达到完全平衡。

- 使用至少 10 倍色谱柱体积的 100% 乙腈冲洗色谱柱
- 再使用 10 倍色谱柱体积的含有 15% 乙腈的水性相冲洗色谱柱
- 最后，使用分析开始时要使用的流动相以 20 倍色谱柱体积冲洗色谱柱

为检查色谱柱是否已达到完全平衡，可以运行两到三次分析以检查重现性。

### 反压过高故障排除

如果溶剂流动受阻（色谱柱反压异常偏高），首先应检查色谱柱入口前的溶剂流是否畅通。如果堵塞出现在色谱柱之前，应更换相应一段管线或受堵的过滤器。如果色谱柱堵塞，不要反冲色谱柱，应更换色谱柱。

### 储存色谱柱

推荐使用乙腈:水 (95:5) 进行长期储存。在切换至储存溶剂前，可能需要使用 60% 乙腈: 40% 水冲洗色谱柱，以去除缓冲液。储存色谱柱之前将堵头紧紧密封在柱端接头上，以免填料变干。

色谱柱可以在短时间内安全储存于流动相中。然而，为了保护仪器，最好采用无缓冲液的相同流动相冲洗色谱柱以除去仪器和色谱柱中的盐。例如采用 90:10 ACN:H<sub>2</sub>O 去除 90:10 乙腈:0.01 mol/L 甲酸盐缓冲液的流动相。

对于短期储存，将色谱柱储存在 80% 乙腈:20% 5 mmol/L 甲酸铵中时，再平衡的速度会更快。应进行数次（3 至 6 次）进样来验证色谱柱是否达到平衡。

## 订购信息

### AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

#### 1.8 $\mu\text{m}$ ，最高耐压 1200 bar

描述	部件号
2.1 $\times$ 100 mm	858700-913
2.1 $\times$ 150 mm*	859700-913
快速保护柱, 2.1 mm, 1.8 $\mu\text{m}$	651750-913

\* 推荐的初始色谱柱尺寸

#### 2.7 $\mu\text{m}$ 表面多孔颗粒填料，在 600 bar 下稳定

描述	部件号
2.1 $\times$ 100 mm	685775-913
2.1 $\times$ 150 mm*	683775-913
2.1 $\times$ 250 mm	651750-913
快速保护柱, 2.1 mm, 2.7 $\mu\text{m}$	821725-906
4.6 $\times$ 100 mm	685975-913
4.6 $\times$ 150 mm	683975-913
4.6 $\times$ 250 mm	680975-913

\* 推荐的初始色谱柱尺寸

如需了解关于多聚糖标准品的更多信息，  
请参阅第 12–15 页的 5994-2202ZHCN

## AdvanceBio 多聚糖标准品 InstantPC、2-AB、2-AA、APTS、InstantAB 和未标记的标准品

### 多聚糖标准品结构

多聚糖结构图遵循功能性糖组学协会 (CFG) 的建议<sup>[3]</sup>，并使用 GlycoWorkbench 2.1 绘制<sup>[4]</sup>。

Neu5Ac = N-乙酰神经氨酸；

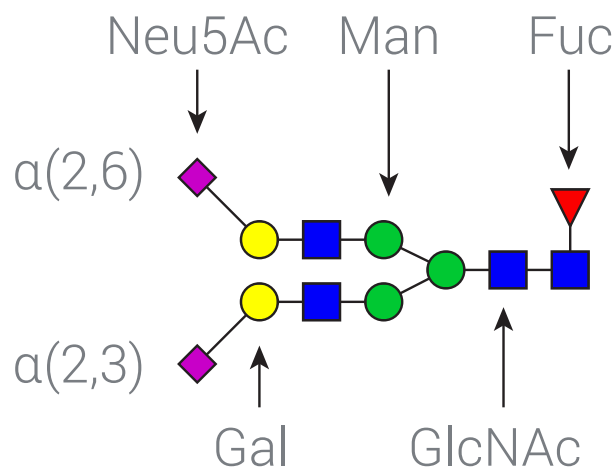
Gal = 半乳糖；

Man = 甘露糖；

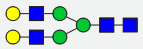


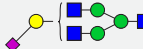


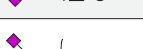
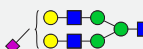





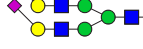





GlcNAc = N-乙酰氨基葡萄糖；

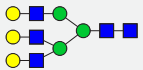
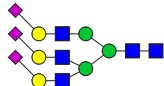
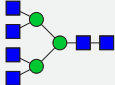
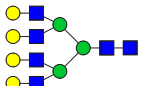

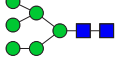

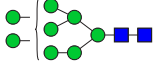
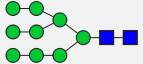
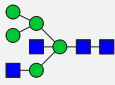







Fuc = 岩藻糖。

在由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的糖蛋白上发现  $\alpha(2,3)$  唾液酸结合位点<sup>[5]</sup>。不同的是，静脉注射用人免疫球蛋白 (IVIG) IgG Fc N-糖主要为  $\alpha(2,6)$ -唾液酸化<sup>[6]</sup>。



多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 <sup>[1]</sup>	CFG 结构	未标记 <sup>[2]</sup>	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
复合型天然 N-糖									
G0-N	NGA2-N	A1			GKPC-401		GKSB-401		GKSP-401
G0	NGA2	A2		GKC-004300	GKPC-301	GKIB-301	GKSB-301	GKSA-301	GKSP-301
G0F-N	NGA2F-N	F(6)A1			GKPC-402		GKSB-402		GKSP-402
G0F	NGA2F	F(6)A2		GKC-004301	GKPC-302	GKIB-302	GKSB-302	GKSA-302	GKSP-302
G0FB	NGA2FB	F(6)A2B		GKC-004311			GKSB-303		
G1	NA2G1	A2G1		GKC-014300	GKPC-317	GKIB-317	GKSB-317		GKSP-317
G1F	NA2G1F	F(6)A2G1		GKC-014301	GKPC-316	GKIB-316	GKSB-316	GKSA-316	GKSP-316

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 <sup>[1]</sup>	CFG 结构	未标记 <sup>[2]</sup>	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G2	NA2	A2G(4)2		GKC-024300	GKPC-304	GKIB-304	GKSB-304	GKSA-304	GKSP-304
G2F	NA2F	F(6)A2G(4)2		GKC-024301	GKPC-305	GKIB-305	GKSB-305	GKSA-305	GKSP-305
G2FB	NA2FB	F(6)A2BG(4)2		GKC-024311			GKSB-306		
G1S1 α(2,3)		A2G(4)1S(3)1			GKPC-329				
G1S1 α(2,6)		A2G(4)1S(6)1			GKPC-319				
G1FS1 α(2,3)		FA2G(4)1S(3)1			GKPC-330				
G1FS1 α(2,6)		FA2G(4)1S(6)1			GKPC-320				
G2S1 α(2,3)	A1(α2,3)	A2G(4)2S(3)1			GKPC-321				
G2S1 α(2,6)	A1(α2,6)	A2G(4)2S(6)1		GKC-124300	GKPC-311	GKIB-311	GKSB-311	GKSA-311	GKSP-311
G2FS1 α(2,3)	A1F(α2,3)	F(6)A2G(4)2S(3)1			GKPC-325				
G2FS1 α(2,6)	A1F(α2,6)	F(6)A2G(4)2S(6)1		GKC-124301	GKPC-315	GKIB-315	GKSB-315	GKSA-315	GKSP-315
G2S2 α(2,3)	A2(α2,3)	A2G(4)2S(3)2			GKPC-322				
G2S2 α(2,6)	A2(α2,6)	A2G(4)2S(6)2		GKC-224300	GKPC-312	GKIB-312	GKSB-312	GKSA-312	GKSP-312
G2FS2 α(2,3)	A2F(α2,3)	F(6)A2G(4)2S(3)2			GKPC-323				
G2FS2 α(2,6)	A2F(α2,6)	F(6)A2G(4)2S(6)2		GKC-224301	GKPC-313	GKIB-313	GKSB-313	GKSA-313	GKSP-313
G2F w/2 α-gal	NA2Ga2F	F(6)A2G(4)2Ga(3)2			GKPC-318		GKSB-318		GKSP-318
G1F w/1 α-gal	NA2G 1FGa1	F(6) A2G(4)1Ga(3)1			GKPC-403				
G2F w/1 α-gal	NA2FGa1	F(6)A2G(4)2Ga(3)1			GKPC-404				
A3	NGA3	A3		GKC-005300		GKIB-307	GKSB-307	GKSA-307	

多聚糖	ProZyme 名称	Oxford 名称 <sup>[1]</sup>	CFG 结构	未标记 <sup>[2]</sup>	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
G3	NA3	A3G(4)3		GKC-035300			GKSB-308	GKSA-308	
G3S3 α(2,6)	A3(a2,6)	A3G(4)3S(6)3		GKC-335300			GKSB-314		
A4	NGA4	A4		GKC-006300			GKSB-309	GKSA-309	
G4	NA4	A4G(4)4		GKC-046300			GKSB-310		
高甘露糖型天然 N-糖									
Man5	MAN-5	M5		GKM-002500	GKPC-103	GKIB-103	GKSB-103	GKSA-103	GKSP-103
Man6	MAN-6	M6		GKM-002600	GKPC-104	GKIB-104	GKSB-104	GKSA-104	GKSP-104
Man7	MAN-7	M7		GKM-002700	GKPC-105	GKIB-105	GKSB-105	GKSA-105	GKSP-105
Man8	MAN-8	M8		GKM-002800	GKPC-106	GKIB-106	GKSB-106	GKSA-106	GKSP-106
Man9	MAN-9	M9		GKM-002900	GKPC-107	GKIB-107	GKSB-107	GKSA-107	GKSP-107
杂合型天然 N-糖									
杂合型	HYBR	M5A1B					GKSB-111		
天然 N-糖核心									
NF	NF			GKR-001001					
NN	NN			GKR-002000			GKSB-100		
NNF	NNF			GKR-002001					
Man1	MNN	M1		GKR-002100					
Man1F	MNNF	F(6)M1		GKR-002101					
Man3				GKR-002300			GKSB-101		
Man3F				GKR-002301			GKSB-102		

多聚糖	未标记	InstantPC	InstantAB	2-AB	2-AA	APTS
N-糖文库						
人 IgG N-糖文库	GKLB-005	GKPC-005	GKIB-005	GKSB-005	GKSA-005	GKSP-005
CHO mAb N-糖文库		GKPC-020				
CHO mAb N-糖文库 + CHO mAb 糖蛋白		GKPC-020-P				
人 $\alpha$ 1-酸糖蛋白 N-糖文库	GKLB-001		GKIB-001	GKSB-001	GKSA-001	
牛胎球蛋白 N-糖文库	GKLB-002		GKIB-002	GKSB-002	GKSA-002	
RNase B N-糖文库 (高甘露糖)			GKIB-009			
二天线型与高甘露糖分区文库			GKIB-520	GKSB-520		GKSP-520
唾液酸化二天线型 N-糖文库			GKIB-232	GKSB-232		GKSP-232
$\alpha$ (2,6) 唾液酸化二天线型 N-糖文库				GKSB-262		GKSP-262
$\alpha$ (2,3) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-233	GKIB-233	GKSB-233		GKSP-233
$\alpha$ (2,6) 唾液酸化三天线型 N-糖文库		GKPC-263		GKSB-263		GKSP-263
$\alpha$ (2,3) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-234	GKIB-234	GKSB-234		GKSP-234
$\alpha$ (2,6) 唾液酸化四天线型 N-糖文库		GKPC-264		GKSB-264		GKSP-264
比对标准品						
葡萄糖单元 (GU) 分子量标准品		GKPC-503	GKIB-503	GKSB-503	GKSA-503	GKSP-503
用于毛细管电泳 (CE) 的迁移内标						GKSP-500

## 参考文献

1. Harvey DJ, et al. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and O-linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics*. **2009**, 9(15):3796–801
2. 未显示所有未标记的多聚糖
3. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology*. **2015 Dec**; 25(12): 1323–1324
4. Ceroni A, et al. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res*. **2008 Apr**;7(4):1650-9
5. Lee EU, et al. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem*. **1989**, 264(23), 13848-55
6. Anthony RM, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science*. **2008**, 320(5874), 373-6

# 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

## 作者

John Yan, Aled Jones  
安捷伦科技有限公司

## 前言

本应用简报介绍使用 InstantPC 和 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 两种标记物，从生物治疗性糖蛋白中制备和分析游离 N-糖。N-糖分析对于生物治疗药物的开发和生产至关重要，因为糖基化会影响最终药物产品的治疗功能。本文介绍的工作流程使用 Agilent AdvanceBio Gly-X 配合 InstantPC 和 Gly-X 2-AB Express 试剂盒（原 ProZyme），通过 PNGase F 释放 N-糖，然后分别使用 InstantPC 进行即时糖胺标记或使用 2-AB Express 进行还原胺化标记。使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离标记的 N-糖，并用荧光和质谱 (MS) 进行检测。Gly-X 样品前处理可提供高重现性和通量，InstantPC 的前处理时间为 1 小时，2-AB Express 的前处理时间为 2 小时。此外，InstantPC 标记可改进荧光响应和 MS 电离效率。

## 前言

N-糖表征是生物治疗药物开发过程的重要环节，因为 N-糖的结构会影响糖基化生物治疗药物的功能，这常常使糖基化成为关键质量属性 (CQA)<sup>[1]</sup>。N-糖分析通常涉及用标签标记游离多聚糖，以便进行荧光 (FLD) 检测，并增强质谱 (MS) 的电离，及后续的 N-糖分离、检测和相对定量。与最近推出的染料 (如 InstantPC) 相比，许多常用的荧光标签 (如 2-AB<sup>[2]</sup>) 在 MS 灵敏度方面受到限制，且过往的 N-糖样品前处理工作流程可能非常耗时<sup>[3]</sup>。然而，2-AB 的使用已超过 20 年，因此在文献和许多实验室中得到了明确证实。

本应用简报介绍了简化的工作流程，用于准备 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖，并使用安捷伦 LC/FLD/MS 仪器进行分析。用于 InstantPC 或 2-AB Express 标记 (原 ProZyme) 的 Gly-X N-糖样品前处理试剂盒包括用于 N-糖样品前处理所需的所有试剂：变性、去糖基化、标记和样品净化，如图 1 所示。

## 实验部分

### N-糖样品前处理

使用带 InstantPC 和 Gly-X 2-AB Express 的 Agilent AdvanceBio Gly-X N-糖前处理试剂盒 (部件号分别为 GX96-IPC 和 GX96-2AB)，标记来自单克隆抗体利妥昔单抗 (Rituxan, 批号 M190170) 和 Fc 融合蛋白依那西普 (恩利, 批号 1092537) 的 N-糖，每次前处理 40 µg 蛋白。使用荧光/MS 检测分析每个样品的四次重复进样，并计算多聚糖峰面积的相对百分比。

使用标准手动方案进行 InstantPC 和 2-AB 标记样品的前处理。Gly-X 溶液内去糖基化实验方案在 90 °C 下变性 3 分钟，打开糖蛋白靶标，使 PNGase F 在 50 °C 下进行 5 分钟的去糖基化反应。溶液内去糖基化后，对游离 N-糖进行 1 分钟的糖胺标记，制备 InstantPC 标记样品 (图 2)，然后在真空条件下使用 HILIC 固相萃取 (SPE) 净化游离染料。

使用标准 Gly-X 2-AB Express 方案和还原胺化化学反应制备 2-AB 标记的 N-糖样品。在使用 PNGase F 进行 Gly-X 的 5 分钟去糖基化后，游离 N-糖从糖胺形式 (-NH<sub>2</sub>) 转化为游离还原末端 (-OH)，使 2-AB 能够进行还原胺化标记。然后通过真空过滤将 N-糖去溶剂化到固态基质上，然后在基质上进行 2-AB 标记步骤。该过程无需在 2-AB 标记步骤之前进行多聚糖干燥，从而缩短了总样品前处理时间。

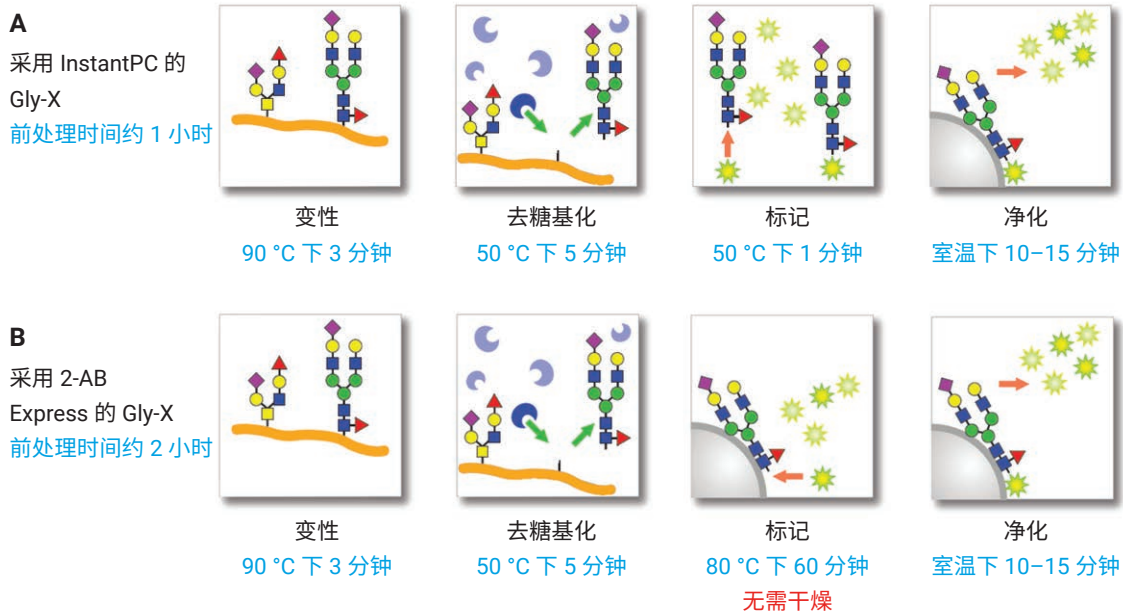
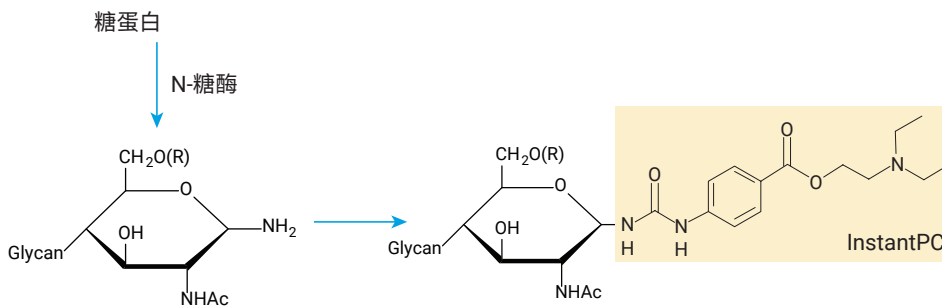


图 1. Gly-X N-糖样品前处理。

A) InstantPC 工作流程，包括溶液内去糖基化和标记，后续基质上净化；  
B) 2-AB 工作流程，在溶液内进行去糖基化，然后进行基质上标记和净化

InstantDyes:  
糖胺标记  
(-NH<sub>2</sub>)



还原胺化:  
自由还原末端  
标记 (-OH)

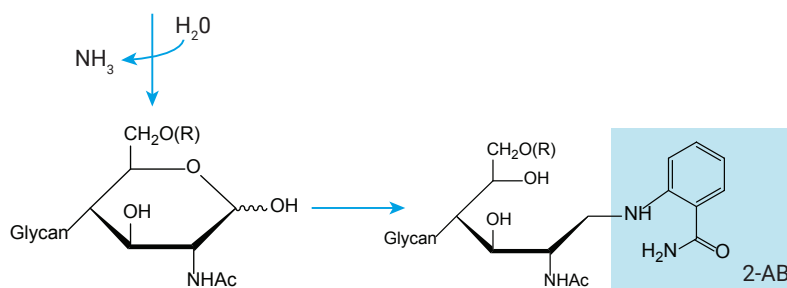


图 2. InstantPC 糖胺标记与传统 2-AB 还原胺化的比较

## N-糖分析

通过亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 分离 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖, 使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913) 以及配备在线荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统 (表 1), 并联用 Agilent AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF (表 2)。

所有 HILIC 分离均在表 1 描述的条件下进行。FLD 后使用固定分流器 (购自 IDEX Health & Science, 部件号 UH-427), 将大约 50% 的液流分至废液, 50% 分至 MS。使用带个人化合物数据库 (PCD) 的 Agilent MassHunter BioConfirm 软件进行数据处理。

## 材料

LC/MS 级乙腈和水购自 Honeywell Research Chemicals。

## 仪器

使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (表 1 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 大容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (参数见表 2)

## 软件

- Agilent MassHunter 采集软件
- Agilent MassHunter 定性分析软件

表 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

### Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

参数	值																
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)																
柱温:	40 °C																
流动相:	A) 50 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5 B) 乙腈																
梯度:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>80</td></tr><tr><td>2</td><td>75</td></tr><tr><td>48</td><td>62</td></tr><tr><td>49</td><td>40</td></tr><tr><td>51.5</td><td>80</td></tr><tr><td>52</td><td>80</td></tr><tr><td>60</td><td>80</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	80	2	75	48	62	49	40	51.5	80	52	80	60	80
时间 (min)	%B																
0	80																
2	75																
48	62																
49	40																
51.5	80																
52	80																
60	80																
流速:	0.5 mL/min																
进样量:	1 μL (相当于 0.4 μg 蛋白质中的多聚糖)																
检测:	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC: λ激发 285 nm, λ发射 345 nm 2-AB: λ激发 260 nm, λ发射 430 nm																

表 2. Agilent 6545XT Q-TOF 参数

Agilent 6545XT Q-TOF 参数	
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
质量数范围	m/z 600–3000
扫描速率	1 质谱图/秒
采集模式	高分辨率 (4GHz)

## 结果与讨论

### 使用 HILIC 分离 InstantPC 和 2-AB N-糖

使用 60 分钟的方法对 Rituxan 和恩利中 InstantPC 或 2-AB 标记的 N-糖进行 HILIC 分离 (图 3 和图 4)，主要多聚糖种类的峰分离良好。Rituxan (图 3A 为 InstantPC; 图 4A 为 2-AB) 是一种免疫球蛋白 G (IgG)，具有典型的单克隆抗体 N-糖谱图，在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的 Fc 区域具有一个 N-糖基化位点，主要为中性复合二天线型 N-糖与核心岩藻糖、部分 Man5 和比例相对较低的唾液酸化多聚糖。恩利为 Fc 融合蛋白，除 Fc 区域中的单个 N-糖位点外，由于融合伙伴蛋白 TNF- $\alpha$  受体 (TNFR) 胞外区有两个额外的 N-糖基化位点，因此其 N-糖谱图 (图 3B 为 InstantPC; 图 4B 为 2-AB) 含有更高水平的唾液酸化多聚糖<sup>[5]</sup>。

尽管 N-糖种类的洗脱顺序相当，2-AB N-糖的 HILIC 保留时间比 InstantPC N-糖的 HILIC 保留时间短。对于 G0F/Man5 和 Man5/G1 等经常在生物治疗药物开发过程中监测的关键物质对，使用 InstantPC 和 2-AB 标记均可得到良好分离，进而可靠地确定组成的相对百分比。G1F 异构体 G1F[6] 和 G1F[3] 也可得到分离。表 3 至表 6 中列出了相对百分比面积、标准偏差和相对标准偏差，表明 4 次样品处理重复进样之间的差异程度较低。差异程度会随多聚糖丰度降低而增加。

与 2-AB (图 4B) 相比，InstantPC 的额外优势在于使用前文所述的色谱条件时，可从恩利中分离异构体 G2S1[6]/[3] 和 G2FS1[6] (图 3B)。使用荧光检测对生物治疗药物 Rituxan 和恩利中 InstantPC 和 2-AB 标记的 N-糖进行分析，得出的主要糖型 G0F、G1F[6]/[3]、G2F、G2S2 和 G2FS2 的相对百分比面积相当。

### 使用 FLD 和 MS 检测 InstantPC 和 2-AB N-糖

当使用相同量的糖蛋白起始材料 (40  $\mu$ g)，且 HILIC 分离的相对进样体积 (100  $\mu$ L 试剂盒洗脱液中的 1  $\mu$ L) 相同时，InstantPC 显示的荧光和 MS 信号高于 2-AB (图 5)。InstantPC 和 2-AB 标记的 Man5 单个谱图表明 InstantPC 的 MS 信号更高 (图 6)。

表 3. 在两种不同培养基中培养的不同 CHO 克隆中测得的曲妥珠单抗生物仿制药绝对浓度

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

表 4. 图 3B 用 InstantPC 标记的恩利 N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0	1.10	0.02	2.09
G0F	19.36	0.16	0.84
Man5	5.08	0.03	0.52
G1[6]	0.48	0.00	0.00
G1F[6]	10.48	0.04	0.39
G1F[3]	3.97	0.01	0.25
G2	2.08	0.01	0.55
G1FS1	1.84	0.05	2.49
G2F	4.26	0.09	1.99
G2S1[6]	1.18	0.01	0.49
G2S1[3]	13.91	0.04	0.31
G2FS1[6]	0.89	0.00	0.00
G2FS1[3]	20.54	0.08	0.37
G2S2	4.26	0.01	0.14
G2FS2	10.54	0.08	0.78

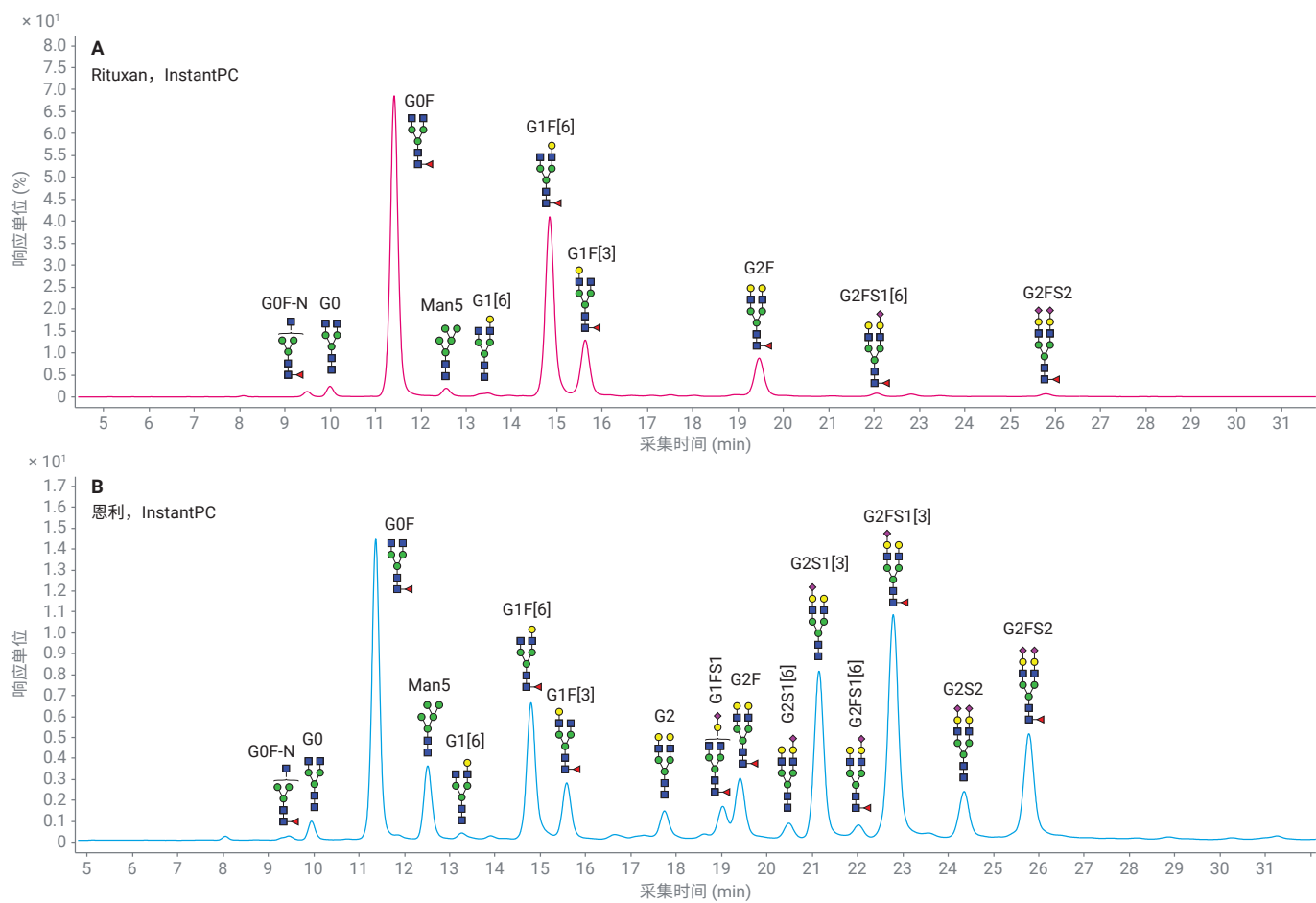


图 3. 用 InstantPC 标记的 A) Rituxan 和 B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 3 和表 4 所示，n = 4

**表 5.** 图 4A 用 2-AB 标记的 Rituxan N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.78	0.09	11.94
G0	1.64	0.05	3.12
G0F	44.89	0.39	0.87
Man5	1.54	0.14	8.83
G1F[6]	31.39	0.09	0.27
G1F[3]	10.40	0.14	1.34
G2F	7.52	0.16	2.10
G2FS1	1.17	0.03	2.13
G2FS2	0.67	0.02	3.58

**表 6.** 图 4B 用 2-AB 标记的 Rituxan N-糖的相对峰面积百分比、SD 和 %CV, n = 4

	平均相对峰面积 (%)	标准偏差	%CV
G0F-N	0.32	0.02	7.44
G0	1.27	0.07	5.34
G0F	20.18	0.45	2.22
Man5	5.50	0.34	6.17
G1[6]	0.45	0.02	3.89
G1F[6]	10.35	0.33	3.18
G1F[3]	3.92	0.17	4.39
G2	2.21	0.15	6.78
G2F/G1FS1	7.00	0.25	3.63
G2S1	15.19	0.17	1.09
G2FS1	20.10	0.32	1.59
G2S2	4.19	0.25	5.95
G2SF2	9.35	0.74	7.93

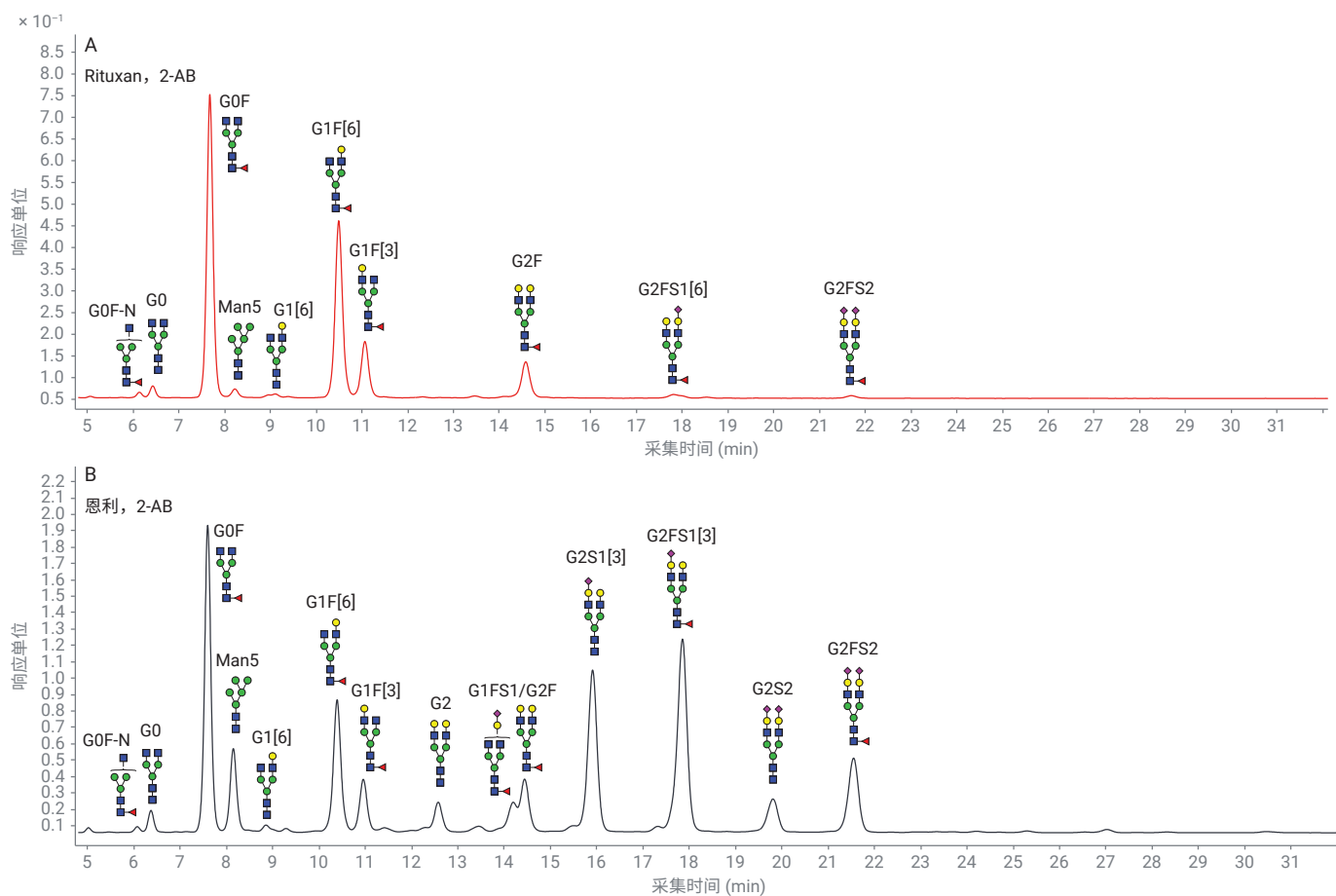


图 4. 用 2-AB 标记的 A) Rituxan 和 B) 恩利 N-糖 HILIC-UHPLC 荧光谱图。N-糖相对面积百分比如表 5 和表 6 所示，n = 4

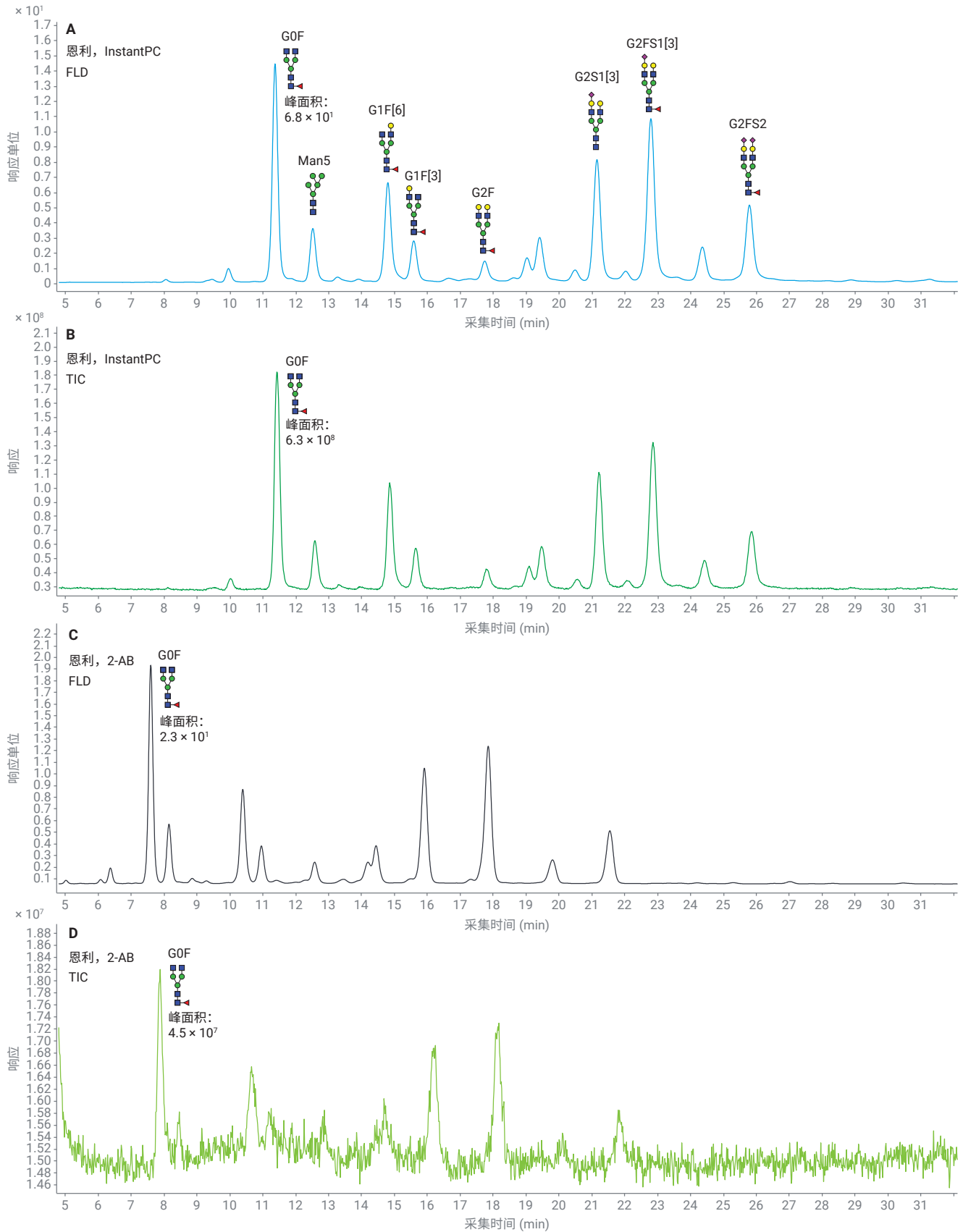


图 5. 用 InstantPC 和 2-AB 标记的恩利 N-糖的 FLD 和 MS 结果。A) InstantPC FLD; B) InstantPC 总离子流色谱图 (TIC); C) 2-AB FLD; D) 2-AB TIC

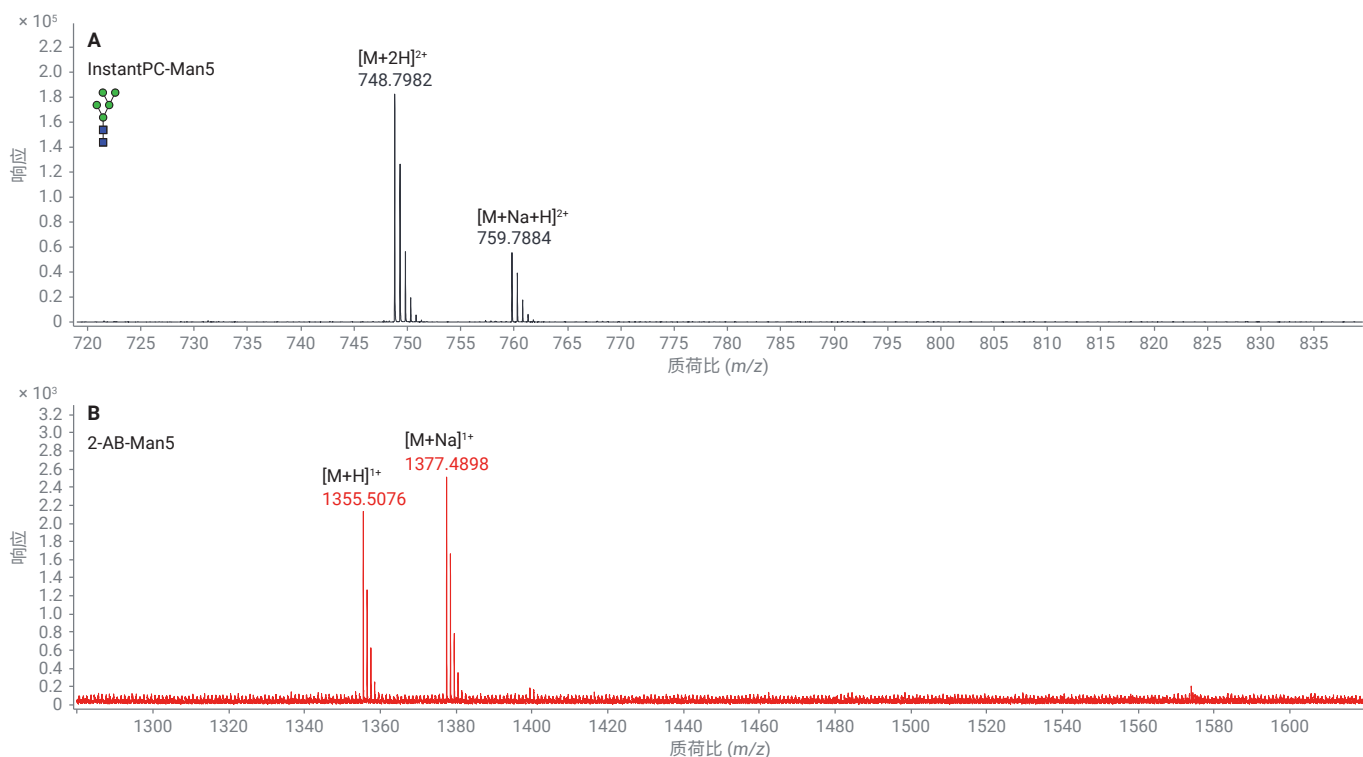


图 6. 用 A) InstantPC 和 B) 2-AB 标记的恩利 Man5 的质谱比较

## 结论

糖基化为许多生物治疗蛋白的特征之一，常作为必须监测的 CQA。N-糖分析在治疗性蛋白质的开发和生产中十分重要。Gly-X N-糖样品前处理工作流程可在 5 分钟内释放 N-糖，同时适合使用 InstantPC 进行糖胺标记和使用 2-AB 进行还原胺化化学标记。该工作流程可使用 InstantPC 进行即时糖胺标记，或者在无需干燥的情况下使用 2-AB 进行基质还原胺化标记。根据相对荧光峰面积百分比对多聚糖种类进行谱图分析，并使用高分辨率质谱确认峰归属。与 2-AB 相比，InstantPC 标记的多聚糖在正离子模式下显示出更高的 FLD 信号和更高的 MS 电离效率，从而能够可靠地检测低丰度的多聚糖种类。尽管 InstantPC 的性能优势明显，但 2-AB 是已使用多年的 N-糖标记。因此，快速的 2-AB 工作流程可保证与 2-AB N-糖历史数据集的连续性。

## 参考文献

1. 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
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. Kimzey, M. et al. Development of a 5-Minute Deglycosylation Method for High Throughput N-Glycan Analysis by Mass Spectrometry. ProZyme Technical Note, Bulletin 4001, Rev E
4. Yan, J. 等人，采用 Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express 由单克隆抗体进行用于液相色谱-荧光分析的游离 N-糖样品前处理，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0682ZHCN，2019
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*, 576–584

# 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

## 前言

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<sup>[1]</sup>。

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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3-5]</sup>。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 (Rituxan, 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 Rituxan、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

表 1. 反相 UHPLC 条件

### Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统条件

参数	值																												
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:	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%A</th><th>%B</th><th></th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>100</td><td>0</td><td>等度</td></tr><tr><td>6</td><td>100</td><td>0</td><td>洗脱</td></tr><tr><td>6.25</td><td>20</td><td>80</td><td></td></tr><tr><td>7.3</td><td>20</td><td>80</td><td>清洗</td></tr><tr><td>7.5</td><td>100</td><td>0</td><td>再平衡</td></tr><tr><td>10</td><td>100</td><td>0</td><td></td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%A	%B		0	100	0	等度	6	100	0	洗脱	6.25	20	80		7.3	20	80	清洗	7.5	100	0	再平衡	10	100	0	
时间 (min)	%A	%B																											
0	100	0	等度																										
6	100	0	洗脱																										
6.25	20	80																											
7.3	20	80	清洗																										
7.5	100	0	再平衡																										
10	100	0																											
流速:	0.4 mL/min																												
进样量:	10 μL																												
检测:	Agilent 1260 Infinity II FLD λ激发 373 nm, λ发射 448 nm																												

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

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 参数	
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 (4GHz)

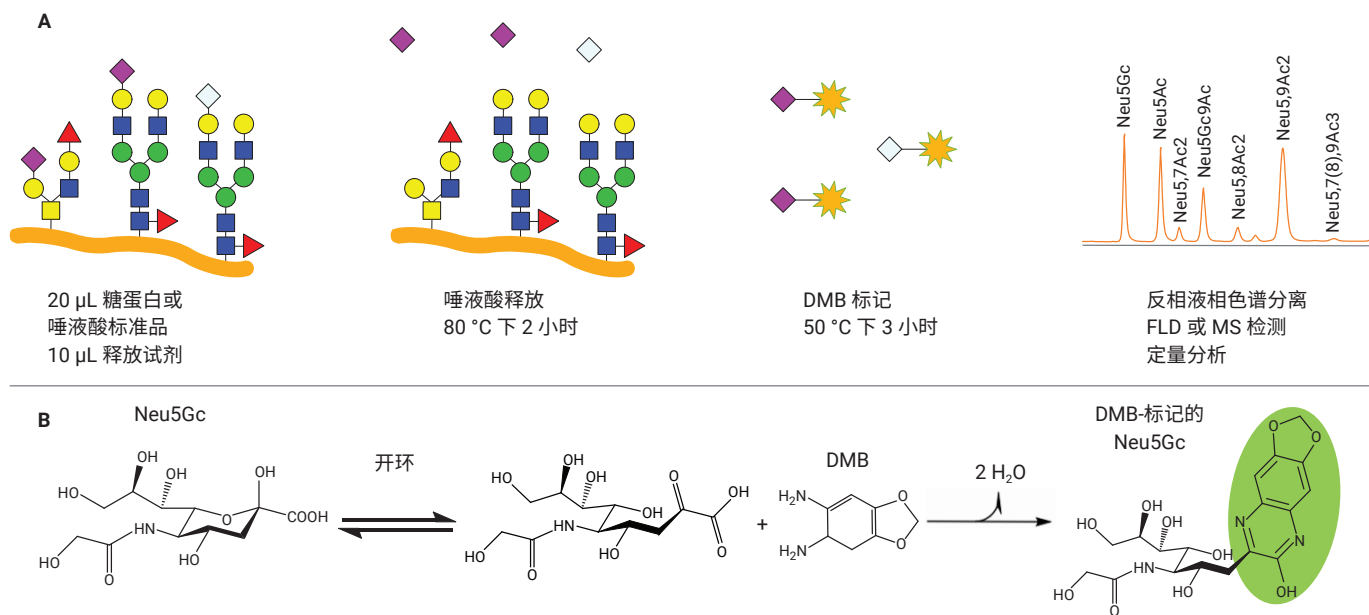


图 1. (A) 唾液酸释放和 DMB 标记工作流程概览, (B) 唾液酸 Neu5Gc 的 DMB 标记机制

## 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 Rituxan、恩利、NISTmAb 和爱必妥, 鉴定出的 DMB 标记的唾液酸如图 3 所示。Rituxan (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)。

### 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 Rituxan、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。

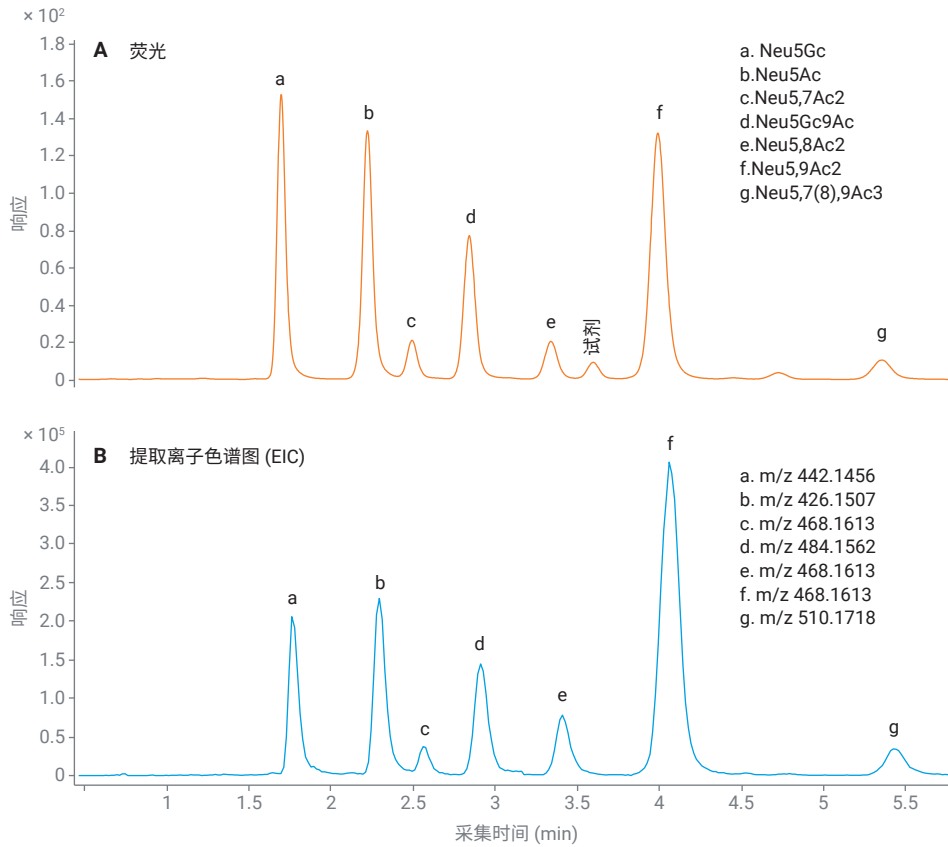


图 2. DMB 标记 SARP 的 UHPLC 色谱图。DMB 标记的唾液酸参比组合的 (A) 荧光分析谱图和 (B) 提取离子色谱图, [M+H]<sup>1+</sup>

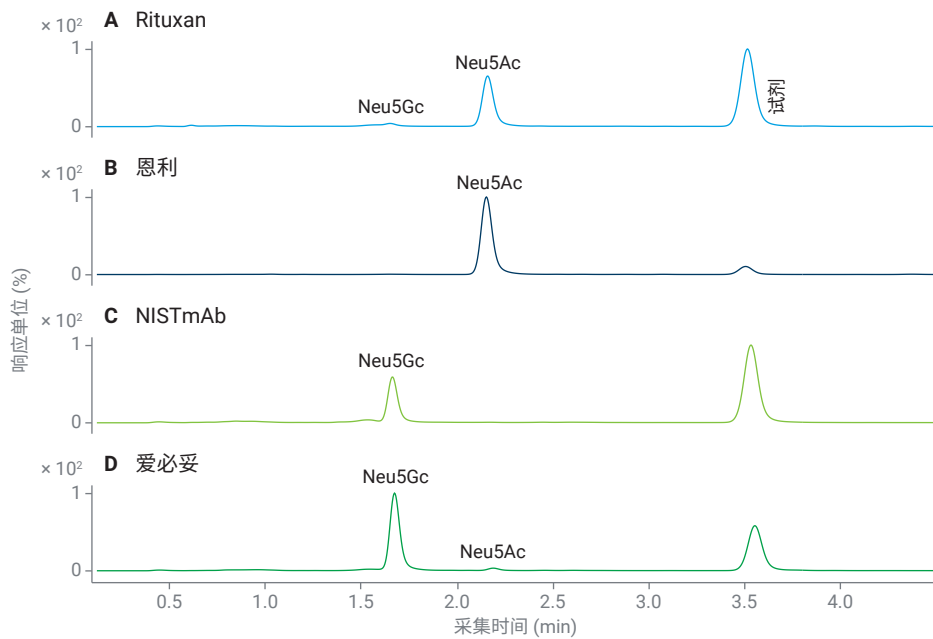


图 3. 来自不同糖蛋白的 DMB 标记唾液酸的 UHPLC 荧光谱图 (A) Rituxan; (B) 恩利; (C) NISTmAb; (D) 爱必妥

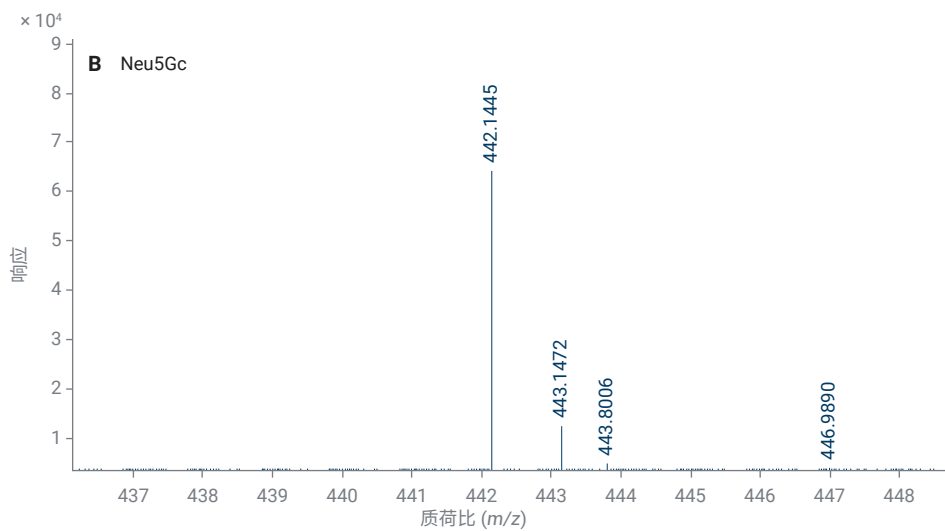
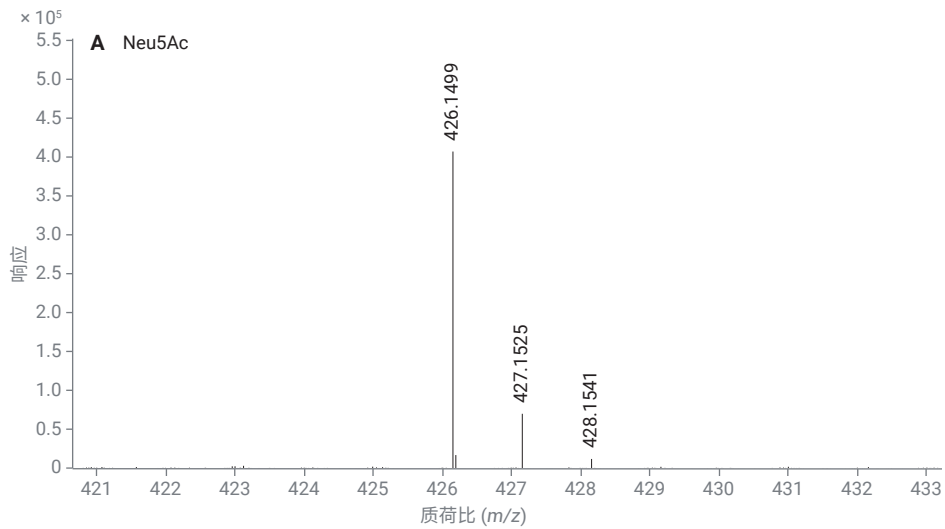


图 4. DMB 标记唾液酸的质谱图, (A) 来自恩利的 Neu5Ac; (B) 来自爱必妥的 Neu5Gc

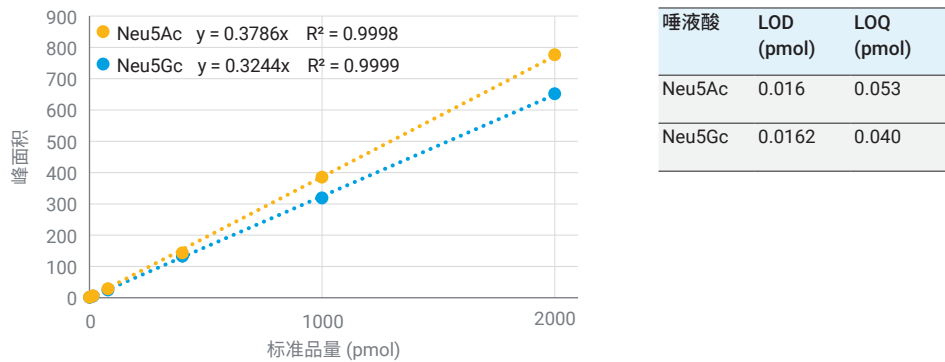


图 5. Neu5Ac 和 Neu5Gc 校准曲线, n = 2。表中显示了 Neu5Ac 和 Neu5Gc 的 LOD 和 LOQ

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

色谱柱	浓度 (mg/mL)	样品质量 (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	%CV	Neu5Gc (pmol/μg)	%CV
Rituxan	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

糖蛋白	唾液酸	GKK-407		Agilent AdvanceBio 唾液酸分析与定量试剂盒	
		pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
Rituxan	Neu5Gc	ND	-	40.02	1.75%
	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	-	10.9%	3.72
	Neu5Ac	201	1.47%	222	4.44%

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

峰	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
Rituxan	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%

## 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

1. Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*(8), 351–360
2. 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
3. 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
4. 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
5. Kaneko, Y. *et al.* Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, *313*, 670–673

# 使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较

## 作者

Oscar Potter 和  
Gregory Staples  
安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, California, USA

## 前言

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<sup>[1]</sup>。

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

单克隆抗体 (mAb) 在细胞培养的生物合成过程中发生 N-糖修饰。典型的 mAb 包含两个 N-糖基化位点，分子的每个 Fc 区域各包含一个位点。一些 mAb 还有额外的糖基化位点，包括 Fab 区域中的 N-糖基化或 O-糖基化位点。多聚糖会影响 mAb 的功能，因此使用适当的分析方法监测糖基化谱图非常重要。

常用的多聚糖分析方法包括 NMR、CE-LIF、具备荧光检测功能 (FLD) 的 HPLC，以及最近的 LC/MS 方法。CE-LIF 和 HPLC-FLD 都需要用染料标记多聚糖，以进行光学检测。传统上，与未标记的物质相比，染料还能提高多聚糖的电离效率，但使用质谱仍只能检测到丰度最高的组分。最近开发出一种新型染料 (ProZyme 公司推出的 InstantPC，如图 1 所示)，它在一定程度上提高了荧光活性，并显著改善了质谱分析的电离效率。借助这种标签，研究人员现在可以使用质谱 (以精确质量或串联质谱的形式) 来鉴定通过 LC 分离的多聚糖。此外，他们可以选择使用质谱而非荧光检测进行相对定量。

本应用简报考察了 InstantPC 在对两种 mAb 制剂释放的 N-糖进行相对定量方面的性能。使用 ProZyme 公司推出的 InstantPC 试剂盒处理 mAb 样品，一式四份。然后在 UHPLC 系统上进行 HILIC 分离，并进行 FLD 和质谱检测。对液相色谱分离条件进行了优化，以实现更出色的色谱分离。这样做的目的是减少重叠峰的数量，否则单独使用 FLD 检测无法辨别这些峰。最终，我们能够比较两种检测方法对几乎所有重要多聚糖结构的相对定量结果。获得了所有多聚糖组分的精确质量和串联质谱图，并将其用于鉴定 mAb 制剂中存在的多聚糖。图 2 显示了完整工作流程。

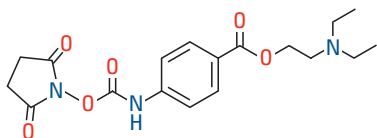


图 1. InstantPC (ProZyme 公司) 的示意图，它是一种胺类反应性即时标记，用于多聚糖的荧光和质谱检测

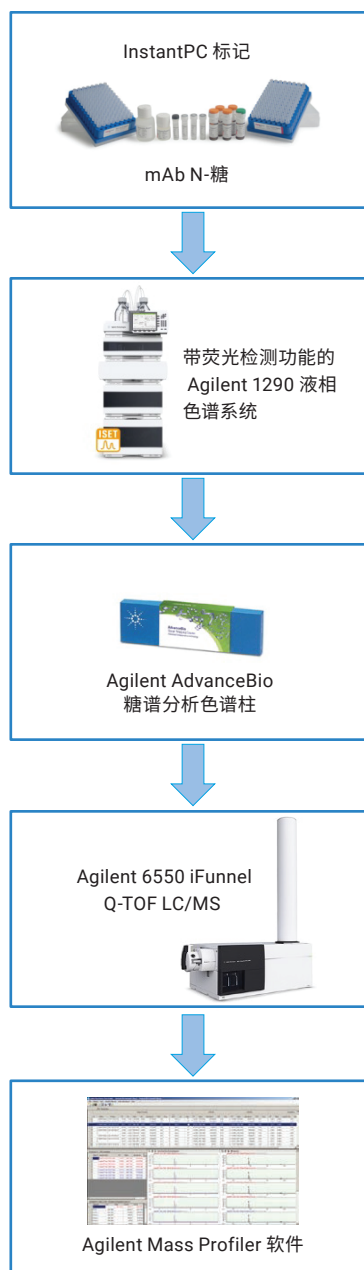


图 2. 用于鉴定和定量 mAb 中 InstantPC 标记的 N-糖的工作流程

## 实验部分

本研究所用的安捷伦 LC/MS 系统由下列模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)，配备 Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)

## 质谱系统

配备双雾化器 AJS 离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统。

## 色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 × 150 mm，1.8 μm，与另一根 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1 × 100 mm 连接。

## 软件

- Agilent PCDL Manager (版本 B.07.00 Build 7024.0) 和 Agilent Mass Profiler (版本 B.07.01 Build 99.0)
- Agilent MassHunter 工作站软件，版本 B.05.01，Build 5.01.5125.1

## 溶剂和样品

使用的所有试剂和溶剂均达到超高纯度。

## 色谱条件

参数	值
柱温：	40 °C
流动相：	A) 50 mmol/L 甲酸铵，pH 4.4 B) 乙腈
梯度：	时间 (min)    %B
	0                75
	32               69
	48               60
	48.5            25
	50.5            25
	52               75
流速：	0.4 mL/min
进样量：	2 μL 20% DMSO 溶液 (相当于 1 μg IgG)
自动进样器温度：	4 °C
FLD：	激发波长285，发射波长345
柱温：	40 °C

## 结果与讨论

mAb 1 和 mAb 2 的 FLD 色谱图表明，每个分子都被一组非常相似的糖型修饰，如图 3 所示。图中标注了一些结构，并根据功能性糖组学协会 (CFG)<sup>[1]</sup> 的指南用符号进行了表示。

使用精确质量和串联质谱信息，将 FLD 峰以下列形式归属至多聚糖组分：

HxNxFxSgx + 核

H = 半乳糖或甘露糖，

N = N-乙酰氨基葡萄糖，

F = 岩藻糖，

Sg = N-羟乙酰神经氨酸，

核 = 三甘露糖苷，这是所有 N-糖共有的核心结构。

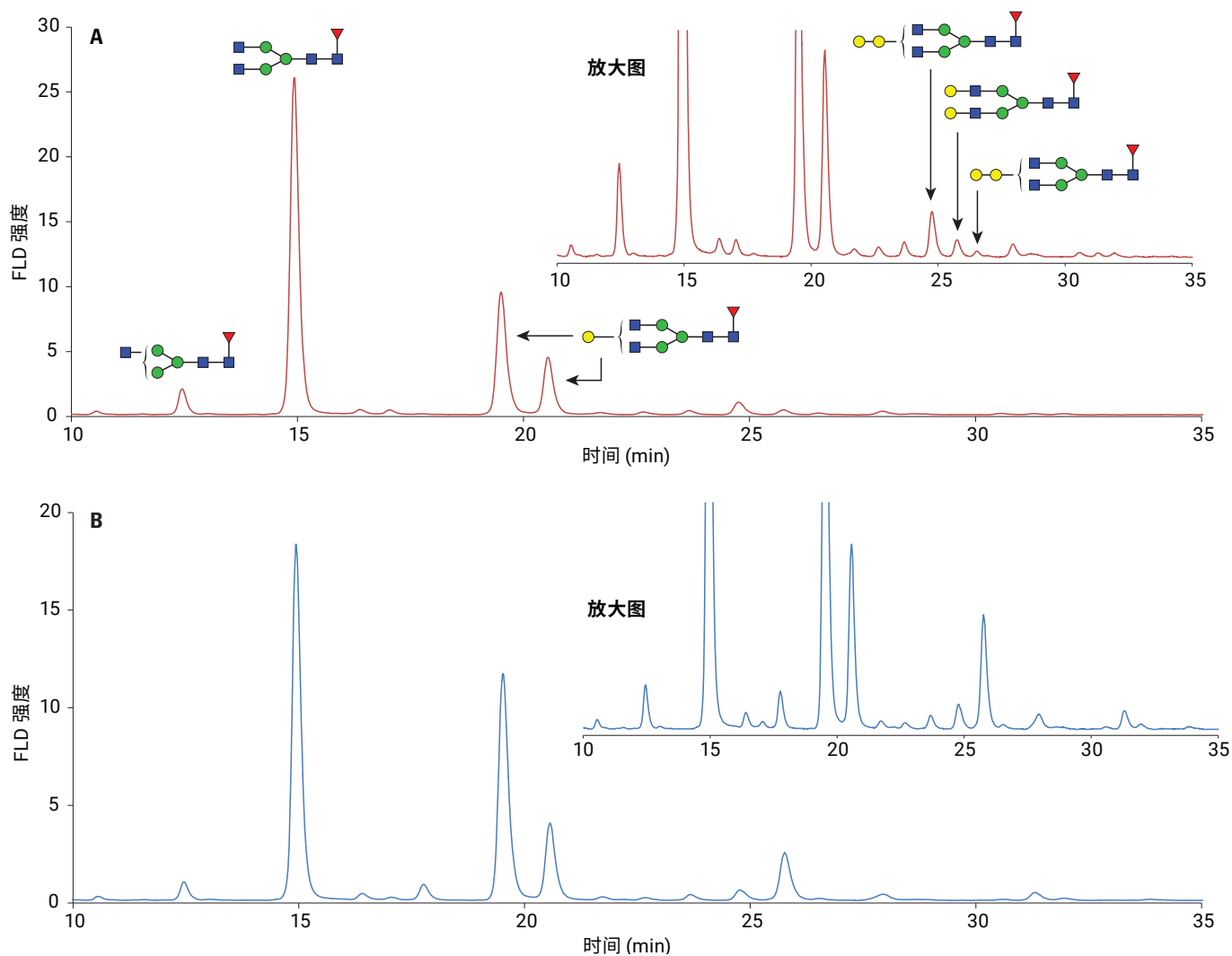


图 3. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的 FLD 色谱图。A) mAb 1 的 FLD 色谱图。B) mAb 2 的 FLD 色谱图

根据 FLD 色谱图的峰面积，以所有组分的总 FLD 峰面积的相对百分比之和对每种组分进行定量。结果如图 4 中的直方图所示。

总体而言，基于 FLD 数据对 21 种多聚糖组分进行了定量。FLD 定量的纳入标准为相对丰度  $\geq 0.1\%$ ，并与相邻峰适当分离。一个例外是 H2N1F1Sg1 + 核/H2N3F1 + 核。这些共洗脱组分具有足够高的丰度，满足 FLD 定量的纳入标准。因此，根据质谱测定的各峰的相对丰度，将该峰的 FLD 信号区域分为两个部分。

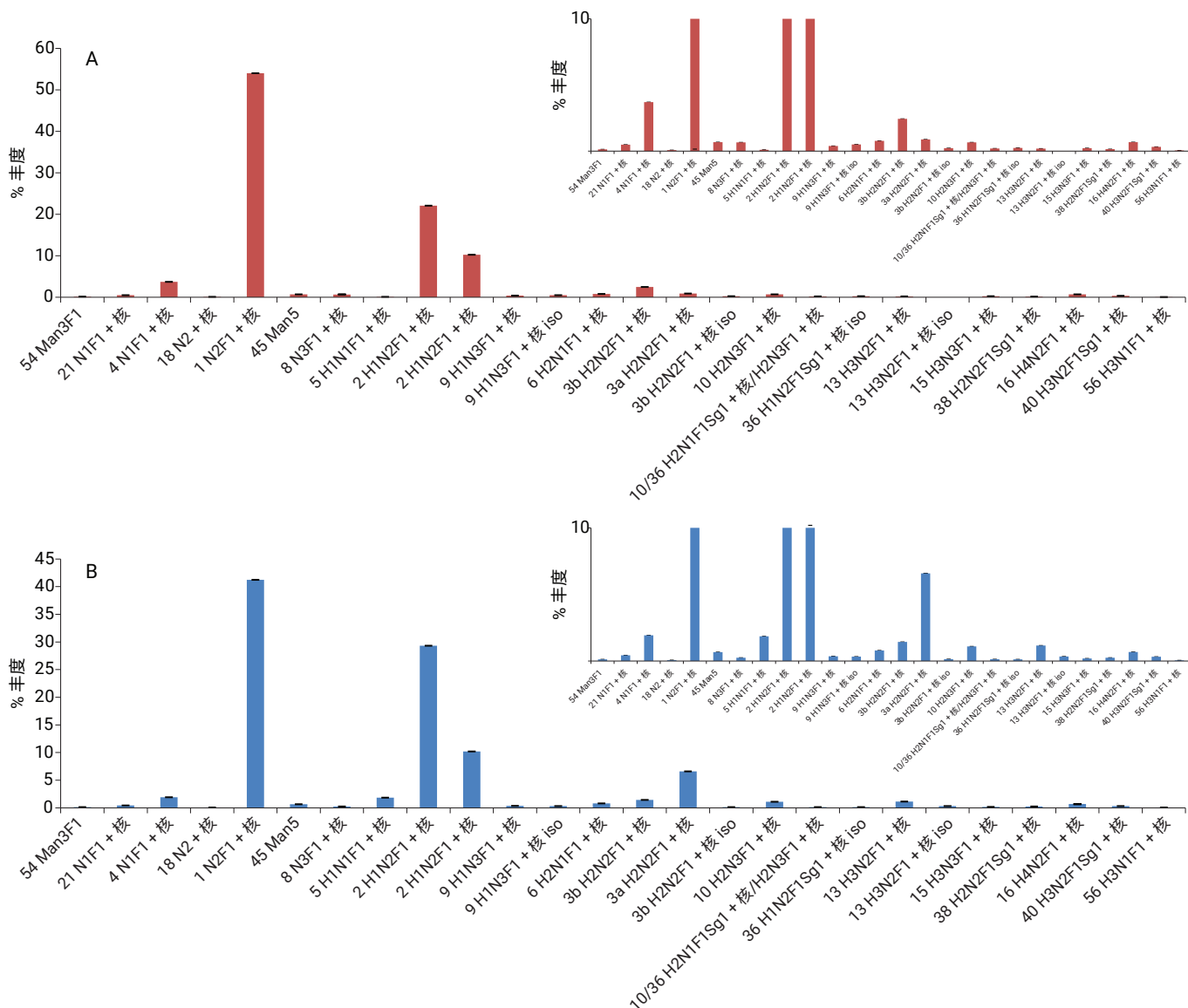


图 4. A) mAb 1 多聚糖的相对 FLD 定量结果。B) mAb 2 多聚糖的相对 FLD 定量结果。误差线表示经过完整工作流程的四次重复进样的  $\pm$  标准偏差。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件对 FLD 信号进行积分。插图为相同数据的放大图，以便更好地显示相对丰度  $< 10\%$  的组分

InstantPC 为 N-糖提供了更高的电离效率。因此，可以使用质谱检测得到的提取离子色谱图的峰面积进行相对定量。为了评估这种可能性，我们将 FLD 色谱图与离子色谱图进行了比较。从图 5 可以看出，FLD 和 MS 色谱图高度相似。检测到的每个 FLD 峰都有对应的质谱峰。

基于图 5 所示的高度相似性，我们根据质谱数据对 mAb 1 和 mAb 2 中的多聚糖进行了相对定量。使用 Agilent Mass Profiler 软件创建每个特征组分的离子色谱图（定义为质量-保留时间对，包括所有电荷态和加合物的信号）。在本例中，没有设置检测阈值下限。使用为这些实验构建的个人化合物数据库 (PCD) 鉴定了 Mass Profiler 确定的特征。

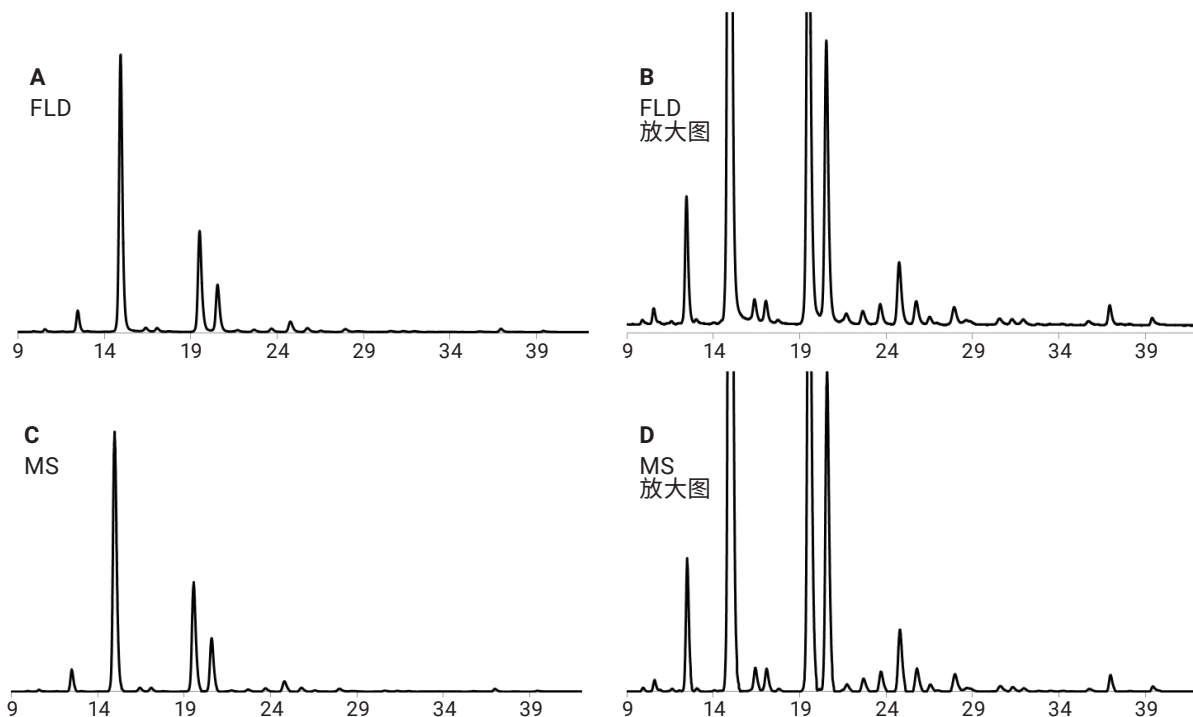


图 5. mAb 1 的 FLD 和 MS 色谱图比较。A) mAb 1 多聚糖的 FLD 色谱图。B) mAb 1 多聚糖的 FLD 色谱图放大图。C) mAb 1 多聚糖的 MS 色谱图。D) mAb 1 的 MS 色谱图放大图

PCD 包含 mAb 多聚糖的精确质量和保留时间信息。该数据库基于当前研究获得的串联质谱信息，以及多聚糖生物合成规则的知识构建。图 6 显示了使用串联质谱确定多聚糖组成的示例。需要特别注意的是，图 6B 中所示的示例说明了一种常见情况，即仅使用质量可能不足以确定组成，因为 NeuGc + 岩藻糖的质量与 NeuAc + 半乳糖的质量相等。串联质谱可以解决这一问题，因为 m/z 673 处存在的碎片离子有力地证明了该结构包含 NeuGc 天线。

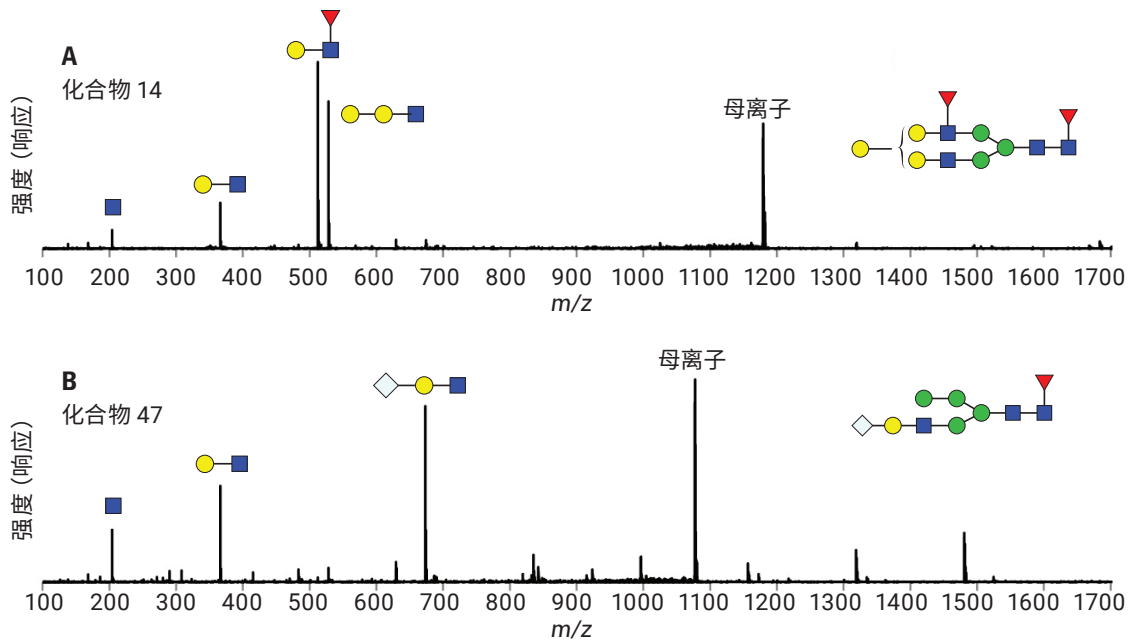


图 6. 采集了所有多聚糖的串联质谱数据。当精确质量不足以实现化合物鉴定时，MS/MS 可以提供帮助。上述两个例子与半乳糖-半乳糖和外臂岩藻糖 (A) 及 NeuGC (B) 修饰一致

图 7 显示了 mAb 1 和 mAb 2 多聚糖基于 MS 的定量结果。

借助 Q-TOF 检测提供的质量选择性，相比 FLD 检测可以定量更多组分。在本例中，总共定量了 35 种组分。对于不受丰度影响的所有特征，mAb 1 的平均 RSD 为 3.2%，mAb 2 的平均 RSD 为 3.9%。对于相对丰度大于或等于 0.1% 的特征，RSD 分别为 2.7% 和 3.4%。

最后，我们使用 FLD 和 MS 直接比较了 mAb 1 和 mAb 2 释放的多聚糖的相对定量结果。图 8 用直方图比较了每种方法的结果。

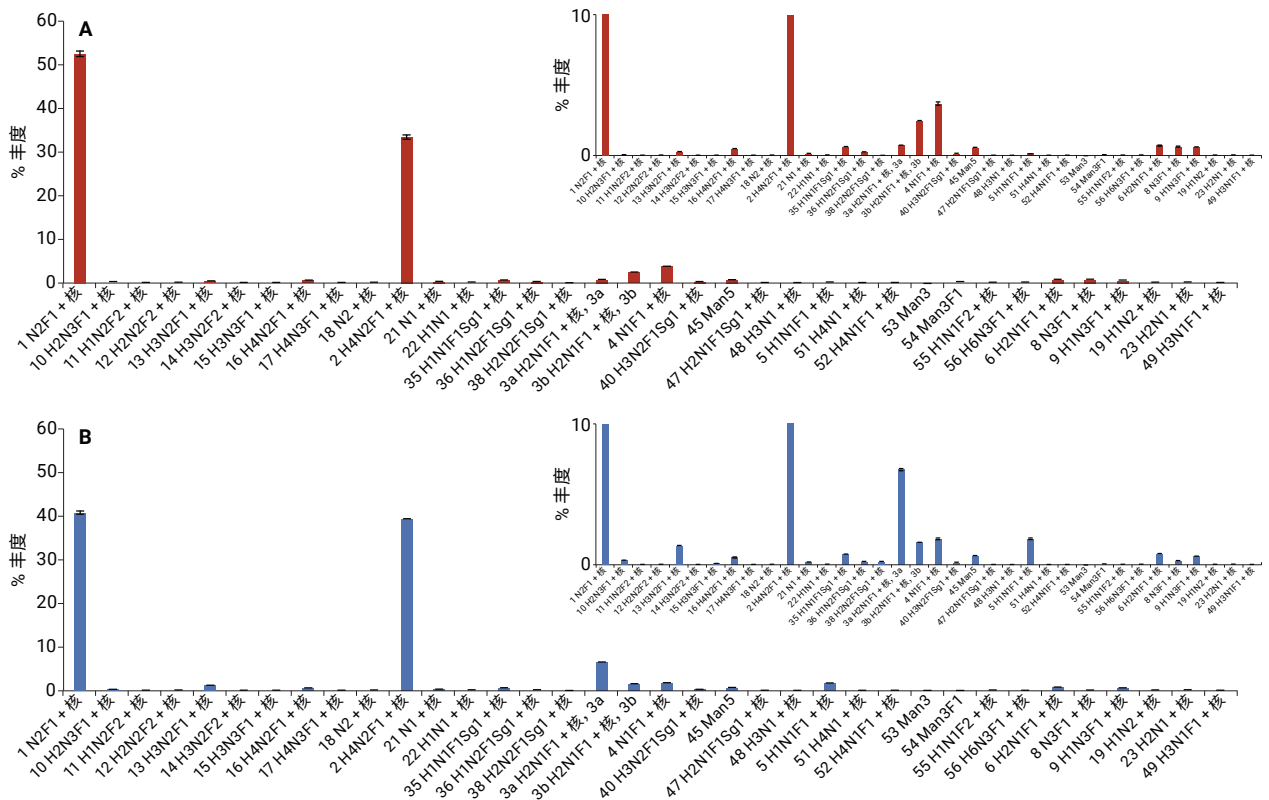


图 7. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的相对质谱定量结果。A) mAb 1 多聚糖的相对质谱定量结果。B) mAb 2 多聚糖的相对质谱定量结果。误差线表示经过完整工作流程的四次重复进样的  $\pm$  标准偏差。插图为相同数据的放大图，以便更好地显示相对丰度 < 10% 的组分

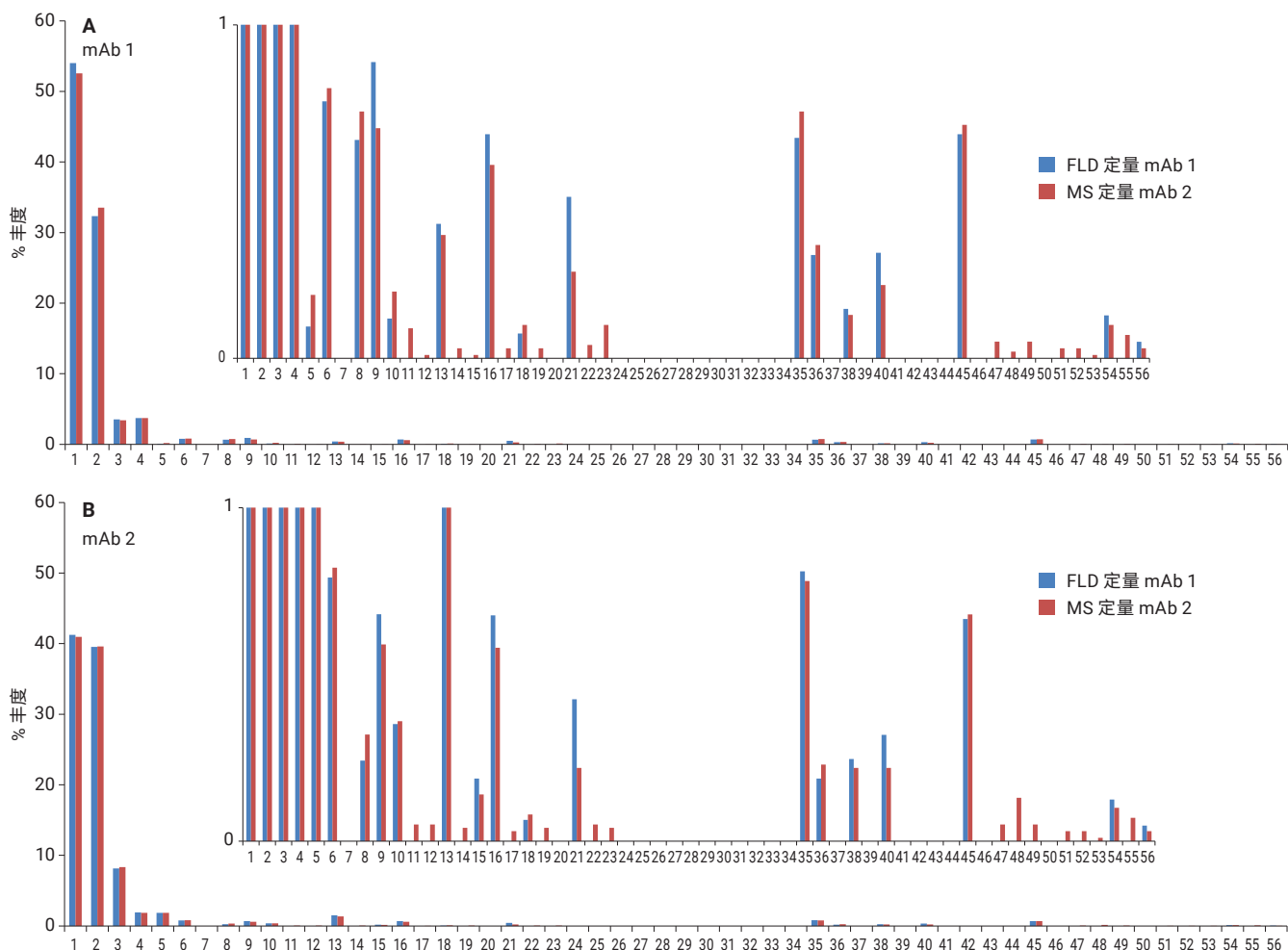


图 8. mAb 1 和 mAb 2 释放的 InstantPC 标记 N-糖的荧光和相对 MS 丰度（面积之和百分比）比较。X 轴表示研究中定量的单个多聚糖组分

## 结论

如图 8 所示，FLD 和 MS 的相对定量结果非常相似。两种方法获得的结果之间的微小差异可能是因为两种方法定量的组分数量不同（FLD 定量了 21 种，MS 定量了 35 种）。本研究的结果表明，Prozyme 的 InstantPC 标记与安捷伦 LC/MS 系统相结合，使研究人员能够对 mAb 释放的多聚糖进行基于 MS 的定量分析。尽管如此，FLD 可能仍然是此类化合物的检测方法金标准。在这种情况下，高质量的 Q-TOF MS 数据可以为 FLD 检测到的每种 InstantPC 标记多聚糖提供精确质量和串联质谱信息，极大地促进了峰归属。

## 致谢

衷心感谢 NIST 为本研究提供的两种 mAb 样品。

## 参考文献

1. <http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf>

# 从样品前处理到数据分析的单克隆抗体 N-糖全面分析方法

## 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、氧化和脱酰胺等翻译后修饰 (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<sup>[1]</sup>。多聚糖表征通常会涉及到 NMR、HPLC 或质谱 (MS) 等技术。由于多聚糖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多聚糖表征具有挑战性。InstantPC 是 ProZyme 公司推出的一种新型荧光标签 (图 1)，已开发用于改善 N-糖分子的 MS 电离效率和检测灵敏度。

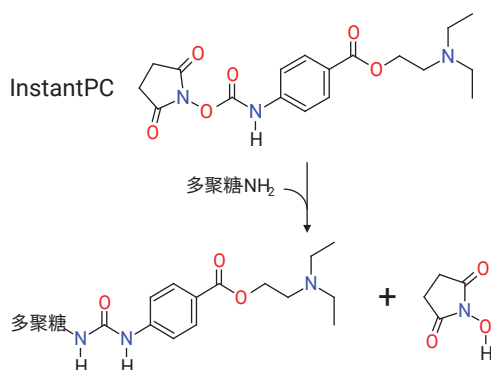


图 1. mAb 释放的 InstantPC 标记 N-糖示意图

传统的多聚糖分析方法费时费力，而且步骤繁琐，首先通过 PNGaseF 酶解释放多聚糖（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-糖进行净化<sup>[2,3]</sup>。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 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台增加多聚糖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-糖质量数数据库获得精确质量峰归属结果。

## 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
- 赫赛汀（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。配备双雾化器 AJS 离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统

将所有 mAb 样品用去离子水稀释至 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，之后使用 AssayMAP Bravo 液体处理系统 (G5542A) 以及带 InstantPC (96 ct) 的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖样品前处理产品（购自 ProZyme 公司）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-糖最终体积为 50  $\mu\text{L}$ ，因此每 1  $\mu\text{L}$  制得的样品含有 1  $\mu\text{g}$  mAb 中的 N-糖。



图 2. mAb 多聚糖表征工作流程

## 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  $\lambda$  激发 = 285 nm,  $\lambda$  发射 = 345 nm, PMT 增益 = 10。用 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱 (2.1 × 100 mm, 1.8  $\mu$ m) 对多聚糖进行色谱分离。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  $\mu$ L 的 N-糖样品。

## 数据处理

使用 MassHunter BioConfirm B.09.00 软件的游离多聚糖工作流程对经 InstantPC 标记的游离 N-糖进行分析。分析工作流程中采用安捷伦个人化合物数据库 (PCD) 多聚糖数据库。PCD 多聚糖数据库能够提供准确的多聚糖鉴定和确认结果。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 液相色谱系统条件

参数	值
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 100 mm, 1.8 $\mu$ m
柱温:	40 °C
恒温箱:	4 °C
溶剂:	A) 50 mmol/L 甲酸, 用氢氧化铵将 pH 调至 4.5 B) 乙腈
梯度:	时间 (min)      %B 0–0.5            75–71 0.5–1.6         71–67.5 1–22             67.5–60 22–22.5         60–40 22.5–23.5       40 (0.7 mL/min) 23.5–24         40–75 (0.7 mL/min) 24–30            75 (0.9 mL/min)
流速:	0.4 mL/min
进样量:	2.0 $\mu$ L

使用 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)。

将检测器设置为  $\lambda$  激发 = 285 nm,  $\lambda$  发射 = 345 nm, PMT 增益 = 10。

表 2. 质谱采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统	
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
采集模式	低质量数范围, HiRes (4 GHz)
质量数范围 (MS)	m/z 300-1700
采集速率	2 质谱图/秒

## 结果与讨论

对释放的标记多聚糖进行 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种色谱柱尺寸和运行条件对几种 mAb 多聚糖结构的优化分离<sup>[4,5]</sup>。本报告中的分离方法代表了本研究中几种不同 mAb N-糖样品的理想总体性能，即具有出色的峰分离度和优异的稳定性。

图 3 所示为 NISTmAb N-糖的代表性色谱图 (FLD 和 MS EIC)。FLD 色谱图 (图 3 上图放大图) 表明检测到 15 个以上的多聚糖峰。丰度较高的多聚糖 (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 7)。

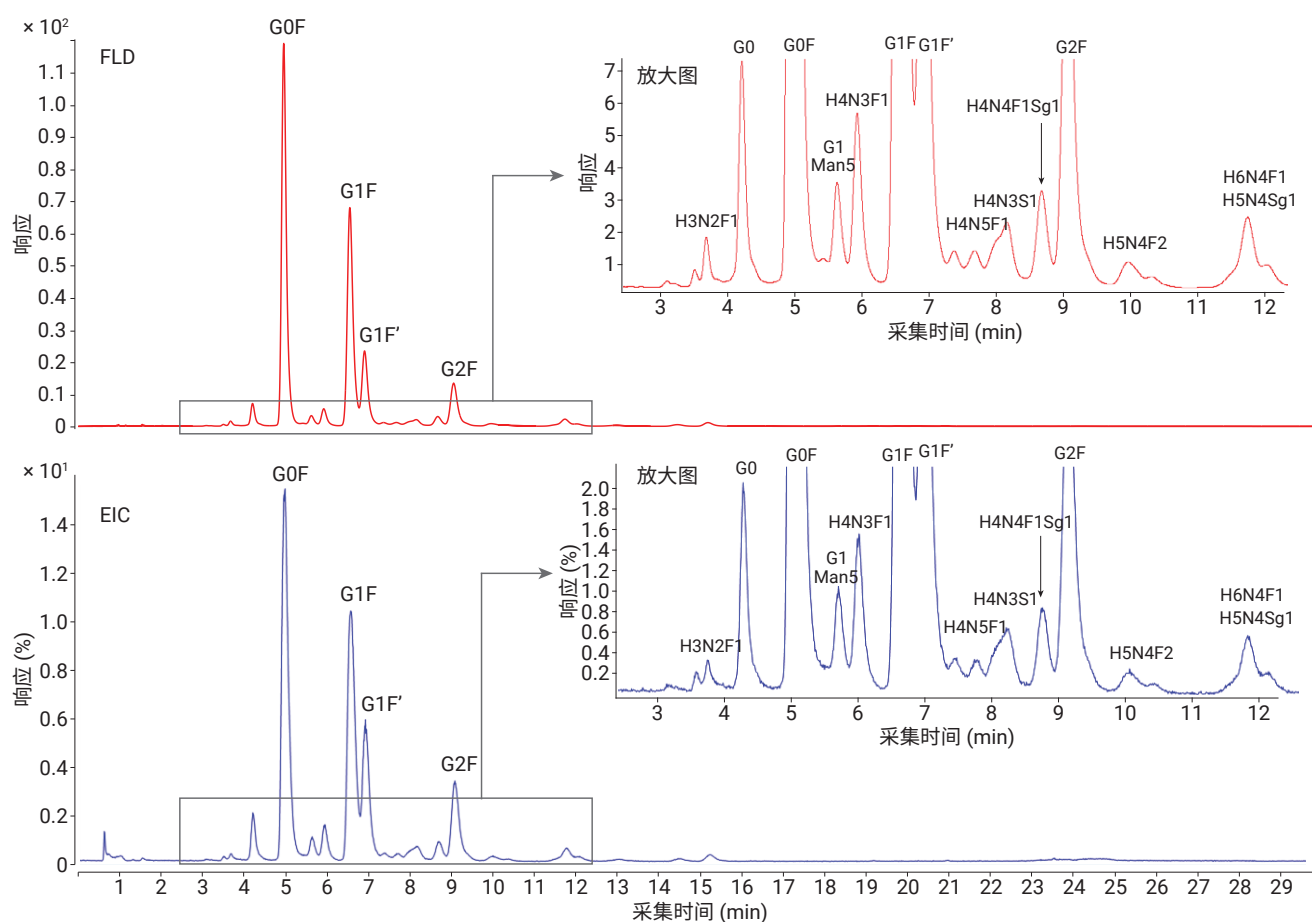


图 3. NISTmAb 得到的 InstantPC 标记 N-糖的 FLD 色谱图和质谱图 (EIC)

虽然荧光检测不能直接进行结构解析，但 mAb 多聚糖的质谱分析可以用于确定多聚糖的单糖组成。即使在有很多 mAb N-糖的情况下，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 (AJS) 电喷雾电离 (ESI) 离子源技术的结合显著提高了 N-糖的质谱检测灵敏度。此外我们优化了质谱参数，在大幅提升 InstantPC 标记 N-糖灵敏度的同时，大大减少了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-糖鉴定和相对定量结果。图 4 所示为一个 InstantPC 标记 N-糖 (G2F) 的质谱图，其中只观察到其质子化形式的双电荷离子  $[M+2H]^{2+}$  及其加合物  $[M+H+Na]^{2+}$  和  $[M+H+K]^{2+}$  (请注意：InstantPC 标签与多聚糖的自由还原末端形式相比具有 261.1477 Da 的质量数增加)。

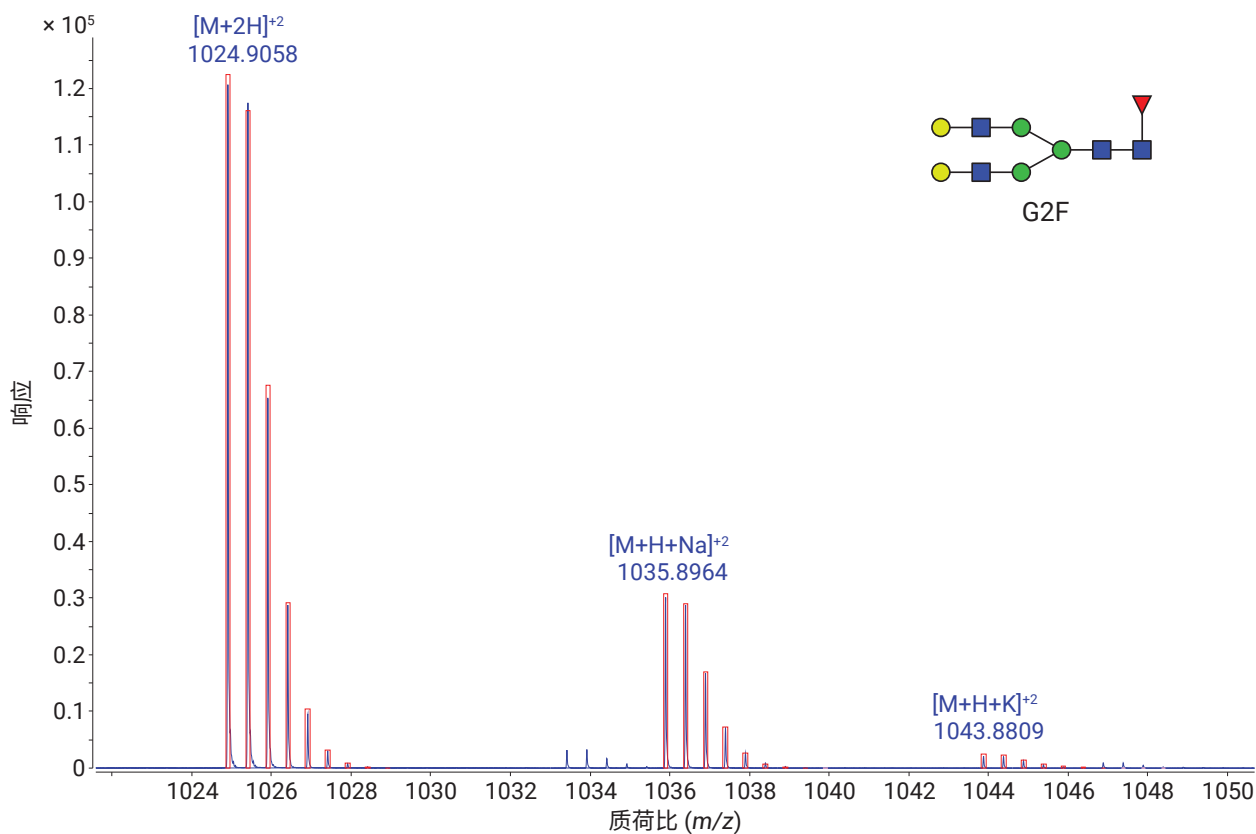


图 4. InstantPC 标记 N-糖 (G2F) 的代表性谱图。InstantPC 标记 G2F 多聚糖及其加合物的电荷态具有优异的同位素保真性。红色方框代表理论同位素模式，蓝色方框代表实际的原始质谱图

我们在 MassHunter BioConfirm 软件中引入一个用于游离多聚糖分析的工作流程。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) 包含多聚糖的精确质量和结构信息, 用于凭借安捷伦独特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 所示为鉴定出的多聚糖的提取离子色谱图 (EIC)。

BioConfirm 中的生物分子结果表 (图 6) 方便快速查看详细的多聚糖信息, 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多聚糖显示了多个 ID。这使用户能够查看样品的 TIC 和各个多聚糖的质谱图。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多聚糖的峰面积进行相对定量分析。

之前的研究证明, InstantPC 标记的多聚糖在 MS 和 FLD 分析中得出了相似的相对定量分析结果<sup>[4]</sup>。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  $\mu\text{g}$  mAb 中释放的 N-糖。

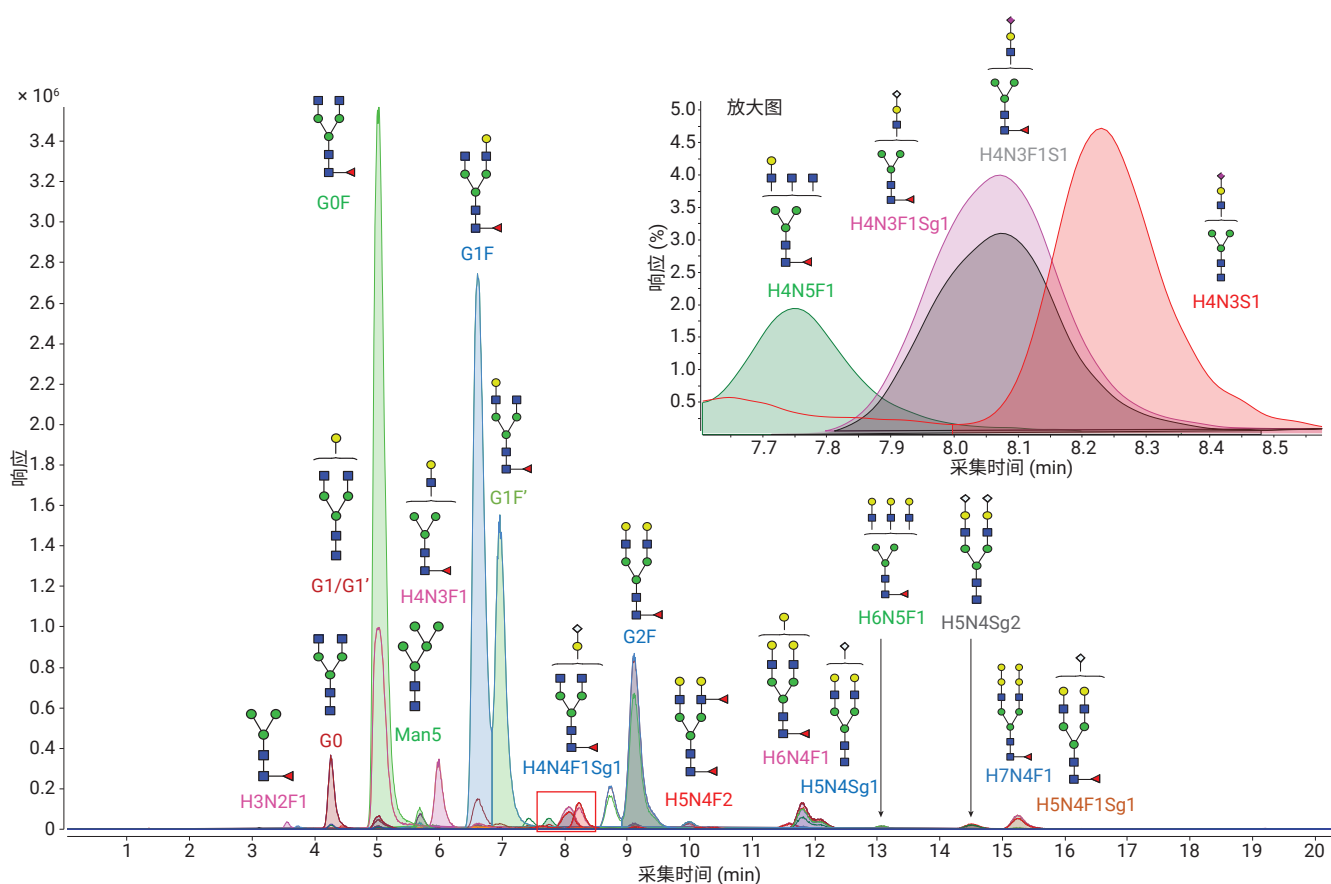


图 5. NISTmAb 中鉴定的多聚糖提取离子色谱图。插图: 所鉴定多聚糖在 7.6–8.6 min 的保留时间范围内洗脱的 EIC 放大图

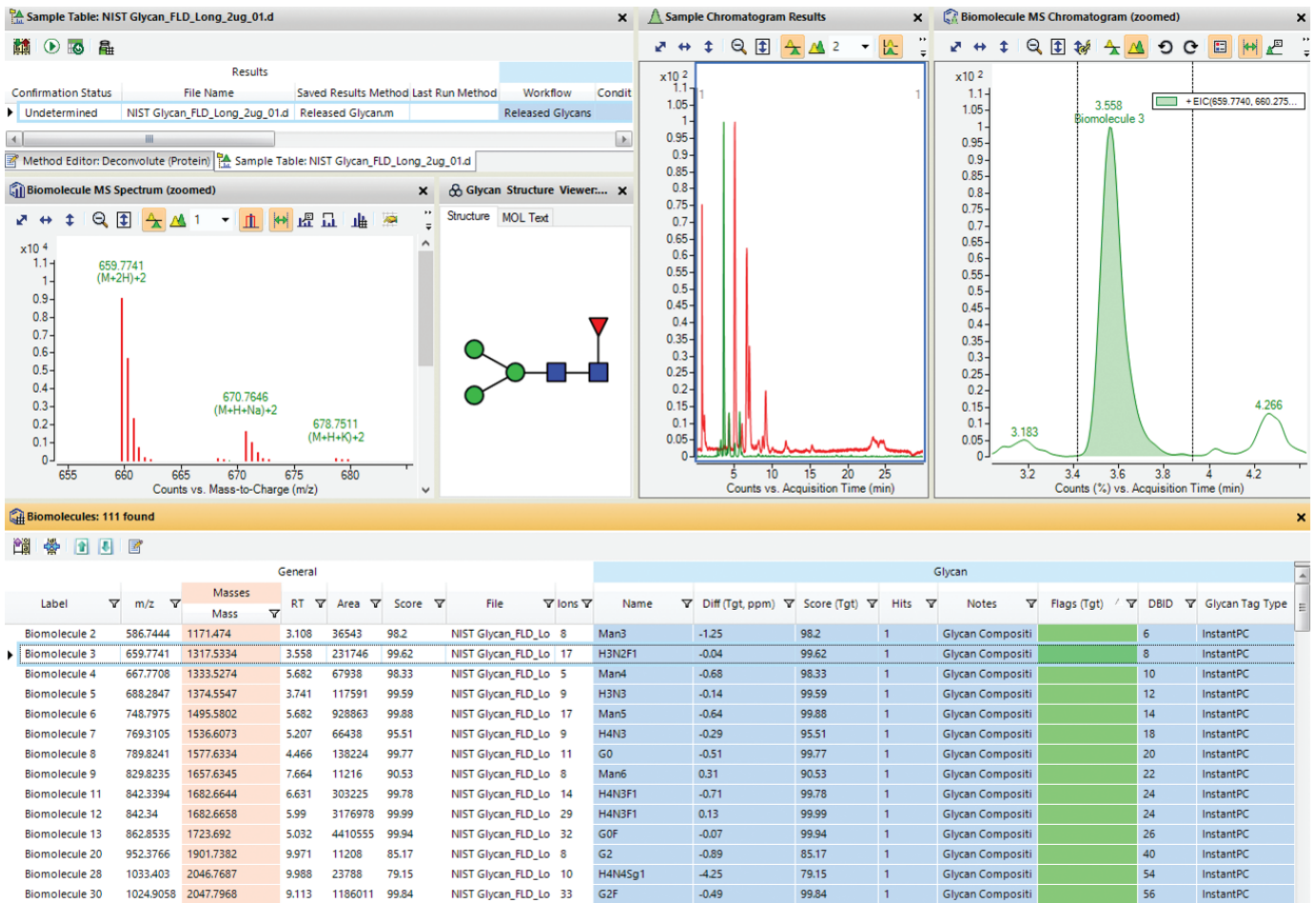


图 6. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件与代表性糖谱结果的截图

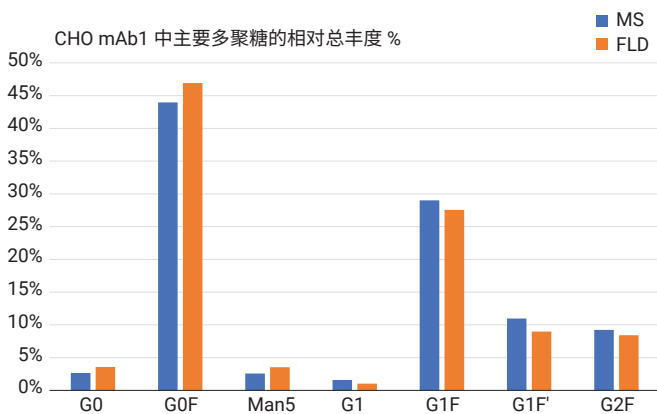


图 7. CHO mAb1 (0.5 µg) 中主要 N-糖的相对总丰度 %, 以及 MS 检测量 (蓝色) 和 FLD 检测量 (橙色) 的结果对比

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。

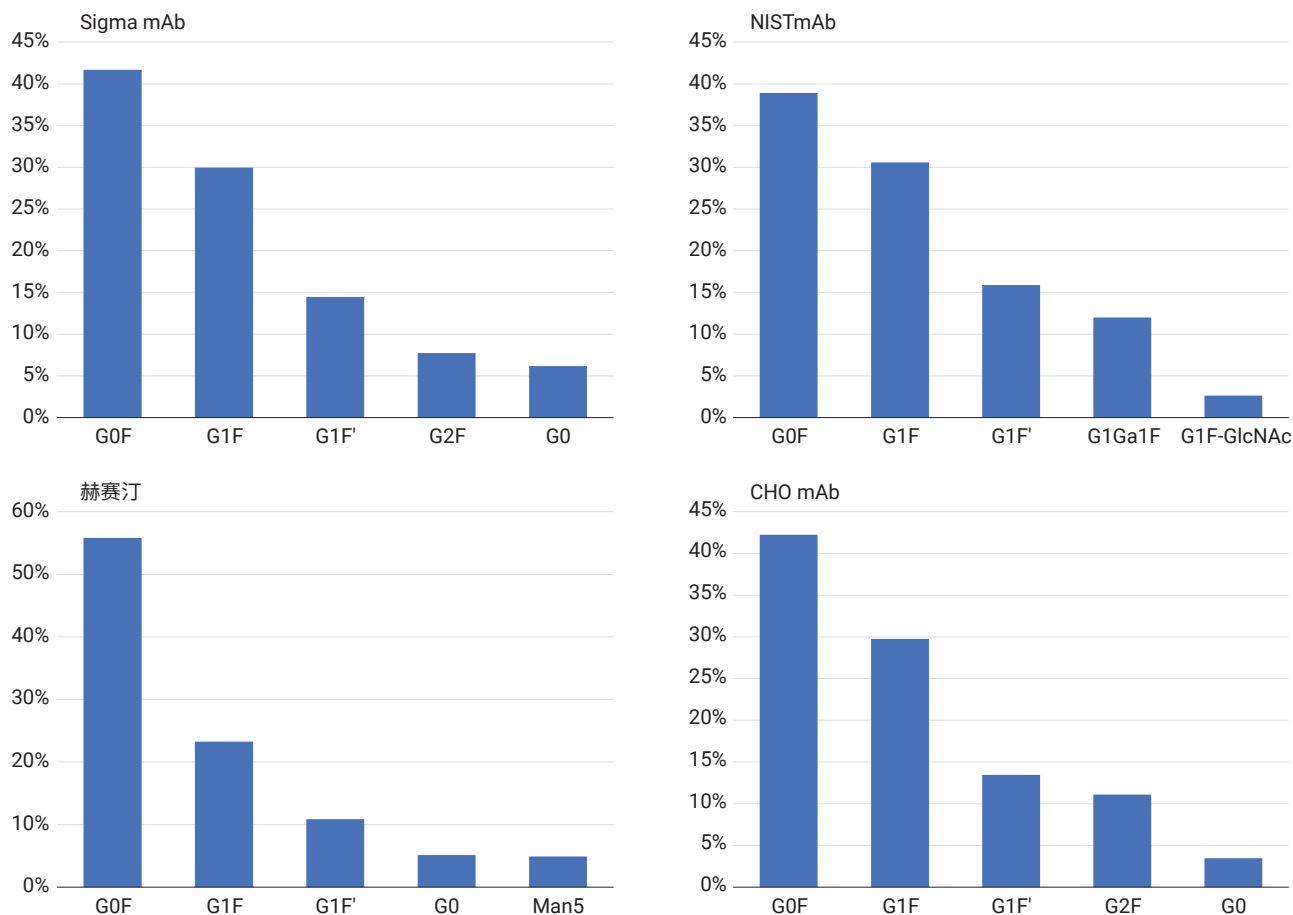


图 8. 四种 mAb 样品中丰度较高的 5 个 N-糖的相对总丰度 %  
注：NISTmAb 中含有疑似 G1F 的结构，另外还有标记为 G1Ga1F 的  $\alpha$ -1,3-半乳糖

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 所示为游离多聚糖报告的一个示例。在报告生成器中，用户可以使用样品信息、样品色谱图、生物分子总结与生物分子详情等信息来自定义报告页面。相应的多聚糖结构与所鉴定的多聚糖一同显示。

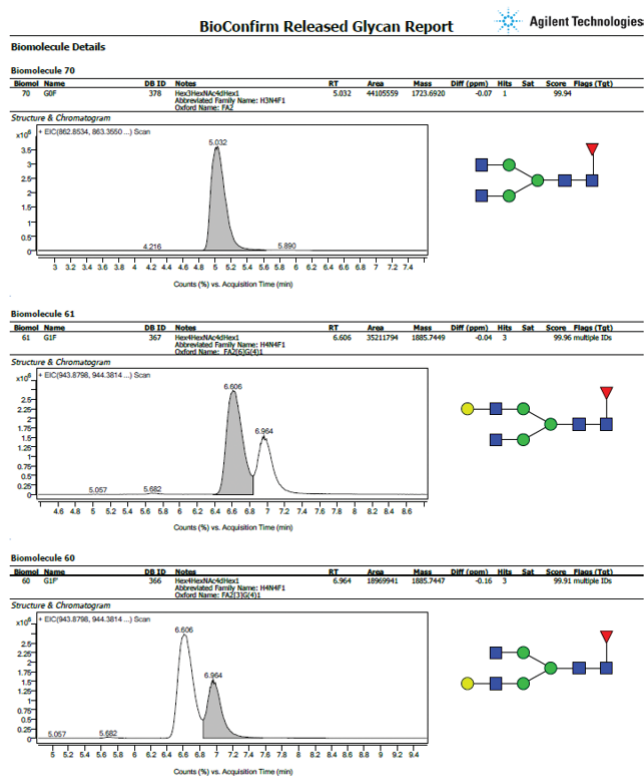
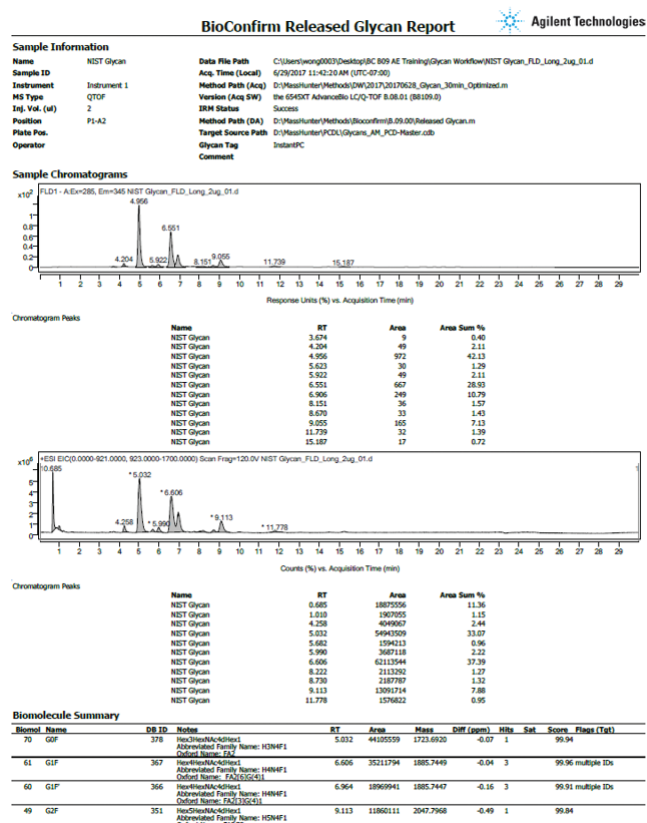


图 9. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 软件 — 游离多聚糖报告

## 结论

本研究展示了 Agilent AssayMap Bravo、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 和 MassHunter BioConfirm 软件作为游离多聚糖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 包含的多聚糖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 多聚糖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，为多聚糖分析提供了高灵敏度和出色定量结果。

## 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-糖进行分析, *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-5253CHCN
4. Comparison of Relative Quantification of Monoclonal Antibody N-glycans Using Fluorescence and MS Detection (使用荧光检测和质谱检测对单克隆抗体 N-糖相对定量结果的比较), *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-6958EN
5. 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-糖分析, *安捷伦科技公司*, 出版号 5991-8071ZHCN

## 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信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

# 使用快速高效的 HILIC 方法提高对复杂多聚糖结构的分析能力

## 作者

James Martosella, Oscar Potter, Danny Mancheno 和 Jia Liu  
安捷伦科技有限公司

## 前言

N 连接糖基化是一种极其重要且非常复杂的翻译后修饰，因此需要在糖蛋白药物开发、处理和生产的每个阶段对其进行控制和监测。治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会因糖基化模式的不同而受到影响，所以对这些模式进行分析是表征治疗性糖蛋白（尤其是 mAb）的一个重要环节。采用配合荧光检测的 HILIC 分离是一种非常稳健的糖基化分析方法，同时 HILIC/LC 还可与质谱联用，以获得重要的质量及结构信息。

然而，HILIC/LC 领域日益严峻的挑战之一是在较短的分析时间内实现高分离度分离。随着对提高生物表征通量的需求不断增长，研究人员正在寻找不会损失分离性能的改进分离 (HILIC) 方法。由于多聚糖包括许多密切相关的结构，因此至关重要的是尽可能提高分离度，并且最好是在较短的分析时间内。

在本研究中，我们使用一种采用酰胺化学技术的亚 2  $\mu\text{m}$  UHPLC HILIC 色谱柱进行高通量糖基化分析。具体而言，我们使用配备荧光检测器的 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm 色谱柱分析 2-AB 标记的人 IgG 和牛胎球蛋白 N-糖。实现了快速灵敏的高选择性分离，运行时间仅 9 分钟，即可提供这些复杂多聚糖的超高分离度。与目前可用的 UHPLC 糖谱分析色谱柱的运行时间比较，我们观察到在相同条件下人 IgG N-糖的分析时间缩短了 40%。

## 材料与amp;方法

### 重组人 IgG1 条件

参数	值
样品:	安捷伦 2-AB 标记的 IgG N-糖文库, 200 pmol (部件号 5190-6996)
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	2 μL, 溶液为 70:30 乙腈:水
柱温:	55 °C
样品恒温箱:	10 °C
检测:	荧光, 激发波长 = 260 nm, 发射波长 = 430 nm
仪器:	配备 1260 荧光检测器的 Agilent 1290 Infinity LC

### 牛胎球蛋白条件

参数	值
样品:	AdvanceBio 2-AB 牛胎球蛋白 N-糖文库 (部件号 GKSB-002)
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	5 μL (20 pmol), 溶液为 70:30 乙腈:水
柱温:	55 °C
	其他条件同上

### 葡聚糖分子量标准品条件

参数	值
样品:	安捷伦 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品 GKSB-503
色谱柱:	Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 859700-913)
流动相:	A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 4.5; B: 乙腈
进样量:	2 L 75:25 乙腈:水 (10 pmol 总多聚糖)
	其他条件同上

### 重组人 IgG1 质谱条件

参数	值
仪器:	Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS
离子源:	安捷伦双喷射流离子源
干燥气温度:	200 °C
干燥气流速:	12 L/min
鞘气温度:	250 °C
鞘气流速:	12 L/min
雾化器压力:	25 psi
毛细管电压:	3500 V
喷嘴电压:	500 V
碎裂电压:	250 V
锥孔电压:	45 V
八极杆 RF Vpp:	550 V
MS 范围:	100–1700 m/z
MS 扫描速率:	2 幅谱图/秒

工作流程见图 1。

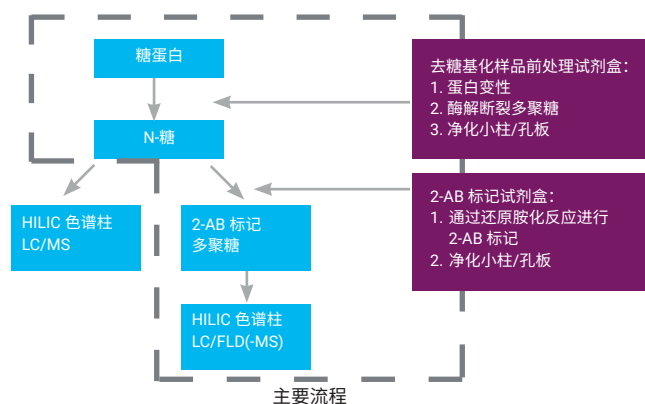


图 1. 采用 AdvanceBio 糖谱分析 HILIC 色谱柱及荧光检测进行 2-AB 标记天线型多聚糖研究的总工作流程解决方案

## 结果与讨论

### 葡聚糖分子量标准品

图 2 所示为 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的分离。本次分离中，均聚物系列的 20 种葡萄糖低聚物在不到 15 分钟的时间内实现了有效的基线分离。

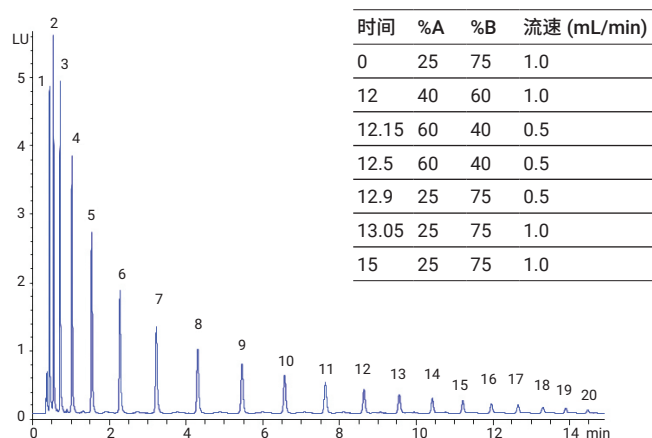


图 2. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在不到 15 分钟内实现 2-AB 标记葡聚糖分子量标准品的基线分离

### 人 IgG 多聚糖

图 3 所示为 2-AB 标记人 IgG N-糖的超高分离度分离。

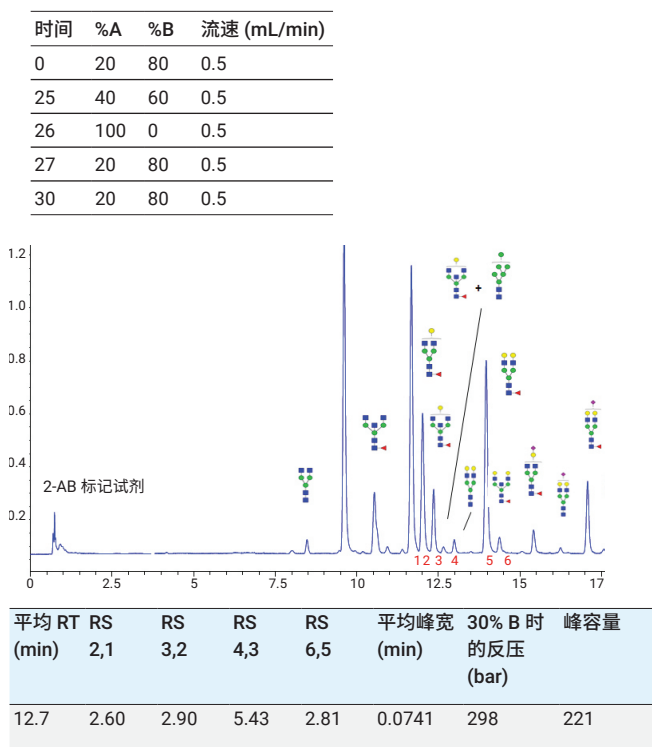


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱实现 2-AB 标记人 IgG N-糖的超高分离度分离

同时也在不到 10 分钟的时间内实现了快速分离，如图 4 所示。

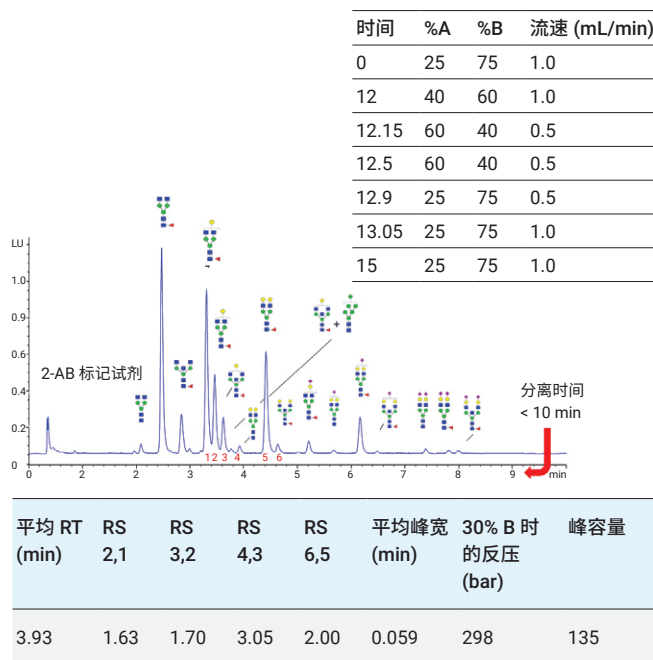


图 4. Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在不到 10 分钟内实现 2-AB 标记人 IgG N-糖的分离

### N-糖质谱

图 5 所示为人 IgG 多聚糖超高分离度分离的八张代表性质谱图。这些质谱由 Q-TOF 分析（实验）生成。所有谱图与理论质量数的误差均不超过 6 ppm。

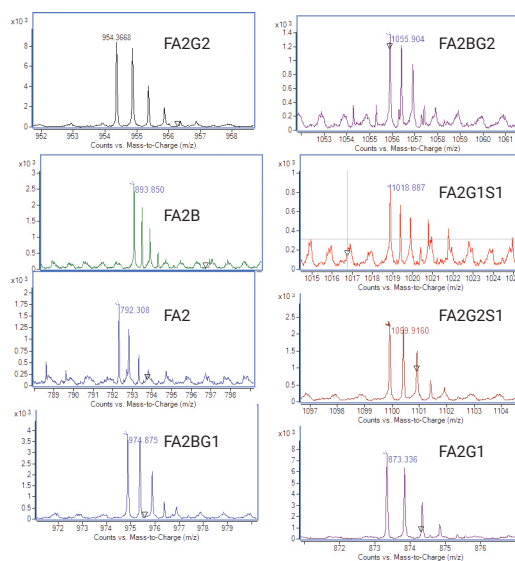
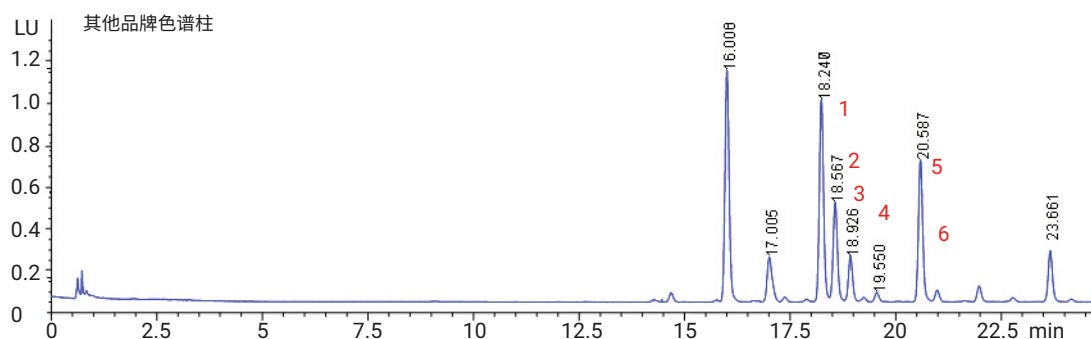
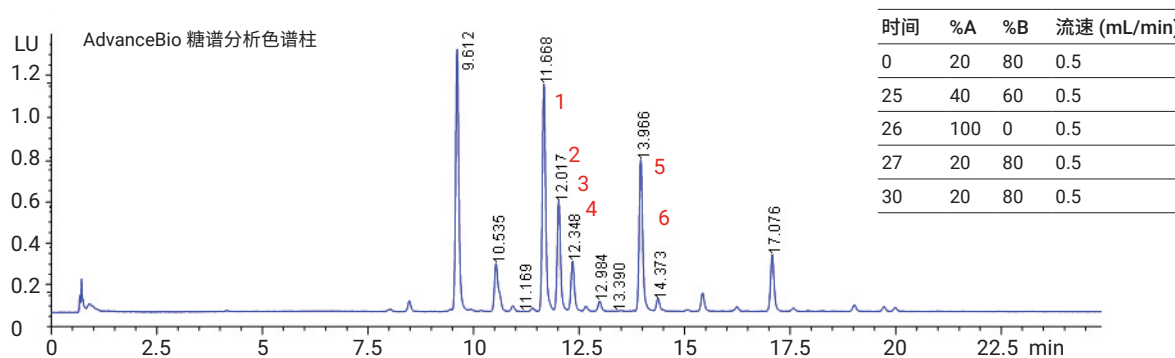


图 5. 人 IgG 多聚糖超高分离度分离的八张代表性质谱图（左图所示为荧光检测器分离）

## 亚 2 μm HILIC 对比

图 6 为糖谱分析酰胺色谱柱的对比结果。在相同色谱条件下，与另一品牌 2.1 × 150 mm 配置的亚 2 μm HILIC 色谱柱相比，AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供了更高的分离度、更窄的色谱峰和更高的峰容量，且分离时间缩短了 40 %。



色谱柱	平均 RT (min)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均峰宽 (min)	30% B 时的反压 (bar)	峰容量
Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221
其他品牌	20.2	1.77	1.94	3.39	2.10	0.1085	349	214

图 6. AdvanceBio 糖谱分析色谱柱提供更高的分离度、更窄的色谱峰和更高的峰容量，且分离时间缩短 40%。

## 胎球蛋白多聚糖

最后, AdvanceBio 糖谱分析色谱柱在分离 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖中表现出快速高效的性能 (图 7)。

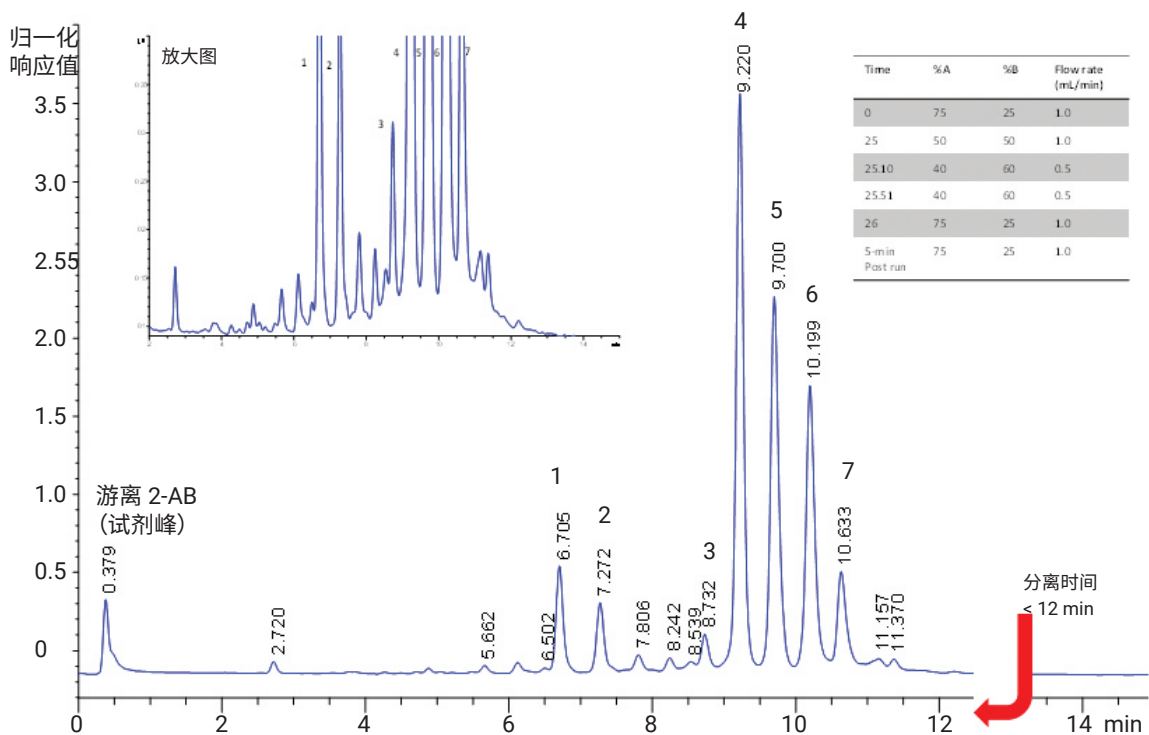


图 7. 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖的快速高效分离, 2.1 × 150 mm 1.8 μm AdvanceBio 糖谱分析色谱柱

表 1. 图 7 顶部色谱图所示 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖优化快速分离的多聚糖命名和结构归属

峰	保留时间	GU 值	多聚糖结构	结构
1	6.70	9.4	A2G2S2	
2	7.27	9.8	A2G2S2	
3	8.73	10.8	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
4	9.22	11.2	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
5	9.70	11.6	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
6	10.20	12	A3G3S4, A3G3S3	
7	10.63	12.4	A3G3S4	



## 结论

Agilent 1.8 μm HILIC 酰胺 AdvanceBio 糖谱分析色谱柱可实现快速、高效、分离度出色的 N-糖分离。在 2.1 × 150 mm 的配置和同样的色谱条件下, 该色谱柱能够很好地分离 2-AB 标记 IgG N-糖, 同时与另一品牌的亚 2 μm HILIC 色谱柱相比, 洗脱时间缩短 40%。通过分离 2-AB 标记牛胎球蛋白 N-糖, 展示了该色谱柱出色的分析选择性和针对这类复杂双天线和三天线多聚糖的分离能力。

## 致谢

本研究已在 2014 年 6 月 15 日至 19 日于巴尔的摩举行的第 62 届 ASMS 质谱与相关专题会议的海报展上展示。

# 使用 UHPLC 和荧光检测对单克隆抗体和其他糖蛋白的 N-糖进行分析

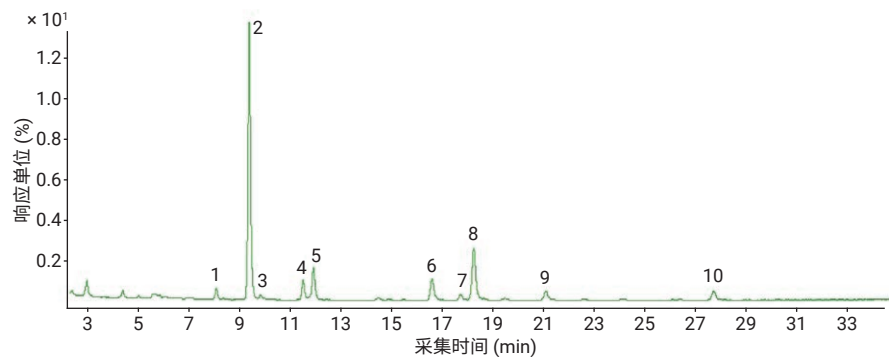
配备 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统

## 作者

Sonja Schneider 和  
Oscar Potter  
安捷伦科技有限公司  
Waldbronn, Germany

## 摘要

本文描述了使用配备 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 的 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，通过亲水相互作用色谱 (HILIC) 对 N-糖的分析。使用 PNGase F 对单克隆抗体 (mAb) 及另外两种糖蛋白 (胎球蛋白和卵清蛋白) 进行酶解后，再利用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对释放所得的多聚糖进行衍生化反应。Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有的出色分离度使我们可以对 mAb 样品中所有主要的 N-糖进行检测和鉴定。此外，从胎球蛋白和卵清蛋白中释放出的多种高度复杂的 N-糖可以得到良好分离。



## 前言

糖基化是一种最为常见的翻译后修饰。哺乳动物糖蛋白包括三种主要类型的多聚糖：即由一个或多个单糖单元构成的 N-糖、O-糖以及糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 脂锚。单个糖基化位点即可使糖蛋白质量和电荷数产生可观的异质性。这些低聚糖参与许多生物调节和识别过程，例如蛋白质分选、免疫及受体识别、炎症、致病性、新陈代谢及其他细胞过程<sup>[1,2]</sup>。此外，治疗性蛋白的安全性、有效性和血清半衰期等特性也会受到其糖基化模式的影响。

重组单克隆抗体治疗药物 (mAb) 是最大的一组治疗性蛋白药物。此类治疗性药物的有效性高度依赖于 mAb 正确的糖基化模式，且迄今为止，所有批准的治疗性 mAb 均为免疫球蛋白 G (IgG)<sup>[3]</sup>。人 IgG 有一个单独的保守 N 连接糖基化位点，位于每条重链 Fc 区域的 Asn297<sup>[4]</sup> (图 1)，这使得每个 IgG 上存在两种 N-糖。它通常包含少量主结构和众多细微结构<sup>[5]</sup>。再加上 Fc 段中这两个糖基化位点上不同多聚糖的组合，导致每批 mAb 产品中包含有大量不同的糖型。

多聚糖的结构在补体激活和受体亲和性上发挥着至关重要的作用<sup>[6]</sup>，可影响治疗性 mAb 的有效性。此外，非人类来源的多聚糖还存在安全性问题，因为它们会引发免疫反应。因此，糖基化模式分析是表征治疗性糖蛋白 (尤其是 mAb) 的一个重要部分。

本应用简报依照美国功能性糖组学协会 (CFG) 的规定使用符号式多聚糖结构，如图 2 所示。归属的多聚糖也采用 Oxford 多聚糖命名法和另一种风格的命名法来描述，后者对于 mAb 多聚糖更常见。

图 2A 中展示了用于描述蛋白质不同多聚糖结构的糖残基的一般命名法。图 2B 中展示了出现在人 IgG Asn-297 位点上的一些主要多聚糖结构。通常 N-糖有一个核心结构，包括两个 b-D-N-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 及三个甘露糖 (Man) 单元。IgG Fc N-糖主要为双天线复合型结构，部分经核心岩藻糖糖基化 (例如 FA2 或 G0F)。

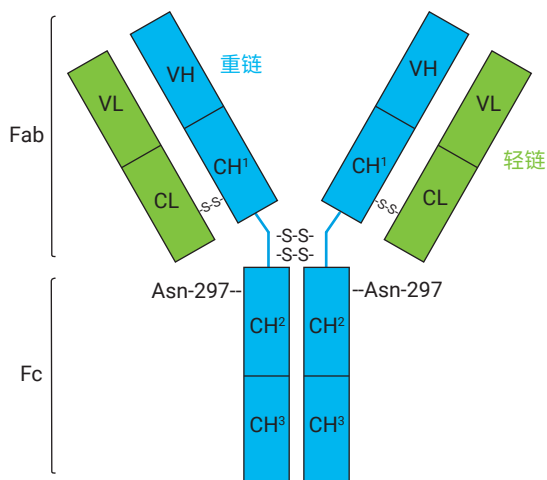


图 1. IgG 抗体结构

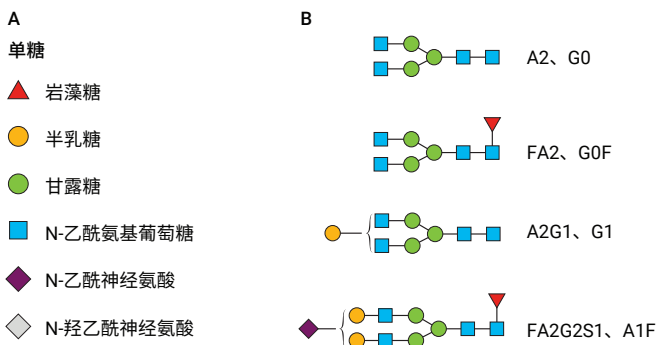


图 2. 多聚糖结构及异构体。A) 基于功能性糖组学协会的单糖描述，B) 人 IgG 的主要多聚糖结构

关于 N-糖分析，已有一些不同的方法策略。多数方法均基于通过 PNGase F 对蛋白质 N-糖进行酶促释放。由于缺乏内在发色团，分析前通常还会使用荧光标记物对多聚糖进行衍生化<sup>[7]</sup>。每个 N-糖包含一个可以与过量荧光标记物反应的还原端位点，因此每条 N-糖将与一个荧光基团连接。因此，处理后的样品即适用于通过分离和荧光检测进行相对定量分析，无需任何定量标样或校准步骤。2-AB 是一种稳定的中性标记物，常用于 N-糖的分析<sup>[7,8,9]</sup>。图 3 说明了 2-AB 通过还原胺化反应进行标记（希夫碱中间体未展示）。

后续的纯化过程采用亲水相互作用色谱/固相萃取 (HILIC/SPE) 法以去除大量过量的 2-AB，从而不对 HILIC/FLD 分析产生干扰。

本文中，我们描述了通过 PNGase F 对 N-糖进行酶促释放，并在采用 HILIC UHPLC 分离前使用 2-AB 进行衍生化反应，以及采用荧光检测和通过在线四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF/MS) 进行鉴定。

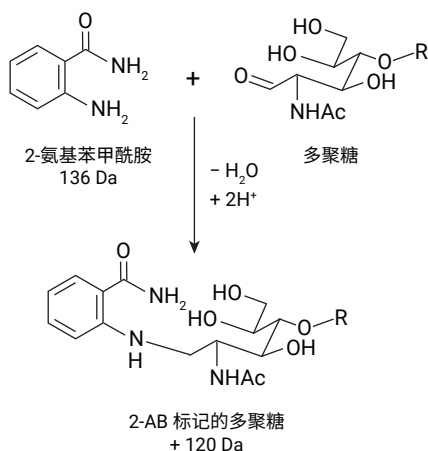


图 3. 采用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 对多聚糖进行的标记

## 实验部分

### 试剂、样品与材料

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统由如下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)，带 35  $\mu$ L Jet Weaver 混合器
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 恒温箱 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1321B)，配有标准流通池

### 试剂、样品与材料

Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS

### 色谱柱

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱，2.1  $\times$  150 mm，1.8  $\mu$ m（部件号 859700-913）

### 软件

用于 LC 与 LC/MS 系统的 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，修订版 C.01.05 [38]，以及 Agilent MassHunter 工作站软件，版本 B.05.01, Build 4.0.479.0。采用 2.1 稳定版 GlycoWorkbench (146) 创建多聚糖结构。

### 样品前处理

去糖基化步骤：

使用 PNGase F 将 N-糖从单克隆抗体、胎球蛋白和卵清蛋白上裂解下来。此酶可用于从糖蛋白上分离天冬酰胺连接的高甘露糖和复杂的混合型低聚糖，并且保持多聚糖的完整性。胎球蛋白上有三个 N 糖基化位点 (Asn-81、Asn-138 和 Asn-158) 以及四个 O-连接位点 (Ser-253、Thr-262、Ser-264 和 Ser-323)<sup>[11]</sup>。卵清蛋白只有一个糖基化位点，而 mAb 有两个糖基化位点。需根据 N 糖基化位点的数量调整 PNGase F 的用量。蛋白的去糖基化过程依据说明书，在 37  $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。然后停止反应，对样品真空干燥以进行进一步处理。

### 利用 2-AB 标记进行荧光检测及样品纯化

根据实验步骤使用 2-氨基苯甲酰胺对干燥的多聚糖样品进行标记，在 65  $^{\circ}$ C 下反应 3 小时。标记过程完成后，根据说明书使用 HILIC 纯化小柱对样品进行纯化。纯化步骤完成后，对样品进行真空干燥，并采用超纯水:乙腈 30:70 (v/v) 复溶以便分析。

### 溶剂和样品

缓冲液 A 为 100 mmol/L 甲酸铵水溶液，pH 为 4.5，缓冲液 B 为乙腈。所有试剂纯度均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22  $\mu$ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。单克隆抗体为大鼠抗 DYKDDDDK 标记抗体。甲酸铵、胎球蛋白和卵清蛋白、Elizabethkingia miricola 源 PNGase F、GlycoProfil 2-AB 标记试剂盒及 GlycoProfil 多聚糖纯化小柱均购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA)。

## 仪器条件

	抗体标准梯度	胎球蛋白梯度	卵清蛋白梯度
初始流速	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
梯度	0 min 85 % B	0 min 75% B	0-6 min 85% B
	5 min 75% B	45 min 50% B	10 min 80% B
	35 min 64% B	47 min 40% B, 流速 0.5 mL/min	60 min 70% B
	40 min 50% B	47.01 min, 流速 0.25 mL/min	65 min 50% B, 流速 0.5 mL/min
	42 min, 流速 0.5 mL/min 42.01 min, 流速 0.25 mL/min	49 min 0 % B	65.01 min, 流速 0.25 mL/min
	43 min 0% B	51 min 0% B	68 min 0% B
	48 min 0% B	51.01 min 75% B, 流速 0.25 mL/min	73 min 0% B
	50 min 85% B 50.01 min, 流速 0.25 mL/min	52.00 min, 流速 0.5 mL/min	74 min 85% B, 流速 0.25 mL/min
	51 min, 流速 0.5 mL/min		75.00 min, 流速 0.5 mL/min
	停止时间	51 分钟	52 分钟
后运行时间	20 分钟	20 分钟	20 分钟
进样量	5 µL	1 µL	1 µL
温控自动进样器	5 °C		
柱温	60 °C		
FLD	激发波长260 nm, 发射波长430 nm		
峰宽	> 0.013 min (响应时间为 0.25 s) (37.04 Hz)		

质谱参数	
气体温度	250 °C
鞘气温度	250 °C
气体流速	8 L/min
鞘气流速	8 L/min
雾化器	25 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1000 V
碎裂电压	200 V
锥孔电压	45 V
Oct 1 RF Vpp	550
碰撞能量	15 V 和 30 V
模式	MS 和靶向 MS/MS

## 结果与讨论

### 分析源自单克隆抗体的 N-糖

图 4 中显示了 mAb N-糖的分离情况。mAb 多聚糖模式实现了出色分离，所有主要的 N-糖均得到分离并可积分。根据峰面积百分比的计算结果进行了相对定量分析。通过设置 1260 Infinity 荧光检测器的最佳多聚糖检测波长，可实现标记后多聚糖的高强度响应，其中激发波长为 260 nm，发射波长为 430 nm<sup>[10]</sup>。

根据观察到的母离子质量和相关的 MS/MS 谱图，可将得到的 HILIC 多聚糖图谱归属至相应的多聚糖结构。将母离子质量输入 Expsy 的 GlycoMod 工具中以查找相关多聚糖结构。

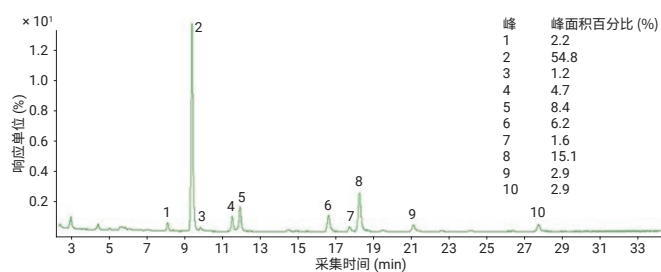


图 4. 以 260 nm 为激发波长进行 mAb N-糖分离的荧光检测

根据实验测得的质量，GlycoMod 可预测已标记或未标记的可能多聚糖结构 (<http://web.expasy.org/glycomod/>)。用于多聚糖归属和多聚糖结构设计的另一款有用的工具是 GlycoWorkbench<sup>[15]</sup>，本研究中使用该工具制作多聚糖结构动画。

作为该工作流程的一个实例，我们选择了母离子质量为 1026.88 [z = 2] (峰 7 和 8) 的 N-糖 FA2G1Sg1。针对此质量，多聚糖数据库中不存在两种最可能的多聚糖结构 (图 5)。

随后利用 MS/MS 数据来区分这两种潜在的结构。图 6 展示了 N-糖 FA2G1Sg1 的碰撞诱导解离 (CID) MS/MS 谱图。这些 MS/MS 数据确定了一种唾液酸，即 N-羟乙酰神经氨酸 (NeuGc) 的存在，它在 m/z 308 (NeuGc) 和 m/z 673 (与半乳糖和 N-乙酰氨基葡萄糖连接的 NeuGc) 处的碎片离子有强信号。同时，在 m/z 292 或 m/z 657 处未产生信号，这表明不存在 N-乙酰神经氨酸 (NeuAc)。因此，这些结果有力地证明了此多聚糖结构为含有 NeuGc 的 FA2G1Sg1，而不是含有 NeuAc 的 A2G2S1。支持将一个结构归属为含有核心岩藻糖的原因是 MS/MS 数据在 m/z 512 或 m/z 350 处没有强碎片离子信号，而如果岩藻糖位于外臂区，则这两处应存在信号。

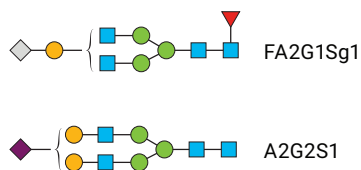


图 5. 对于 1026.88 [z = 2] 的母离子质量，两个最可能的多聚糖结构 FA2G1Sg1 和 A2G2S1

所有其他峰都通过分析其 MS 和 MS/MS 谱图，以类似的方式进行归属。归属结构如表 1 所列。结果表明，mAb 主要含有核心岩藻糖基化的复杂多聚糖，包括一些带有 NeuGc 的结构。这些发现一般适用于由大鼠细胞产生的 IgG 抗体。正常情况下人糖蛋白中不含 NeuGc，并且这一结构不适合用于治疗性蛋白<sup>[12]</sup>。人糖蛋白中的唾液酸通常是 N-乙酰神经氨酸。

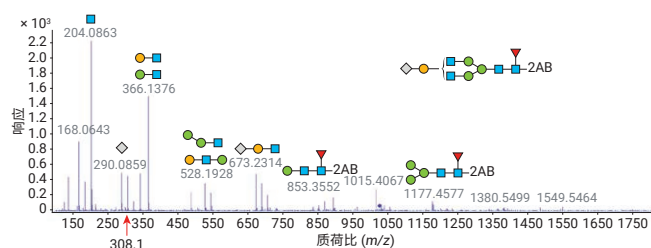


图 6. FA2G1Sg1 的 MS/MS 谱图 - 1026.88 [z = 2] - 1931.6876 Da

表 1. 大鼠单克隆抗体质量和 2-AB 多聚糖结构归属概述

峰	Oxford	生物制药 mAb 类型	质谱检测器 (Da)	结构
1	FA1	G0-GlcNAc	A2G2S2	
2	FA2	G0F	792.3130 [z = 2]	
3	M5	Man5	1355.5 [z = 1]	
4,5	FA2G1	G1F	873.34 [z = 2]	
6	FA1G1Sg1	G1FSg1-GlcNAc	925.34 [z = 2]	
7,8	FA2G1Sg1	G1FSg1	1026.88 [z = 2]	
9	FA2G2Sg1	Ag1F	1107.9135 [z = 2]	
10	FA2G2Sg2	Ag2F	1261.446 [z = 2]	

## 胎球蛋白和卵清蛋白中的抗体分析

实验通过 PNGase F 将胎球蛋白和卵清蛋白这两种蛋白质中的 N-糖裂解下来，以 2-AB 进行衍生化反应并采用配有在线 MS 的 HILIC/UHPLC 进行分析。图 7 展示了牛胎球蛋白 N-糖的分离情况。此糖基化谱主要展示了含 NeuAc 的复杂非岩藻糖基化双天线或三天线多聚糖。采用 Q-TOF/MS 检测可实现对 9 个主要峰的归属。表 2 展示了已归属的多聚糖结构。

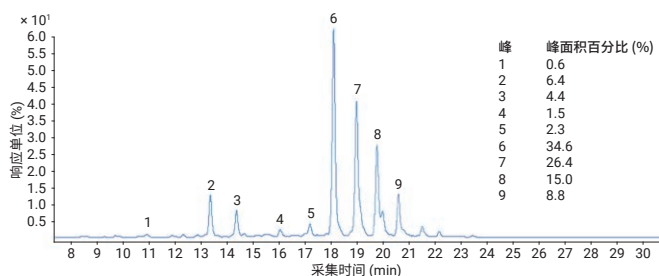


图 7. 2-AB 标记的胎球蛋白的分离

表 2. 卵清蛋白 N-糖的详细信息

峰	Oxford	结构
1	A2G2S1	
2,3	A2G2S2	
4	A3G3S2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (痕量)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (痕量)	
8	FA3G3S4 和 A3G3S3	
9	A3G3S4	

图 8 展示了卵清蛋白多聚糖的分离情况。卵清蛋白仅在一个位点 (Asn-292) 上发生 N-糖基化，但是与该位点相关的糖基化模式非常复杂<sup>[13]</sup>。由于该多聚糖谱的复杂性，需要调整梯度并延长分离时间，以实现更高的分离度。AdvanceBio 糖谱分析色谱柱的高性能可以实现对 50 多个峰的分离，同时具有良好的信噪 (S/N) 比。实验根据母离子质量数据 (表 3) 对 20 个主要峰进行了归属。由于同量异位结构存在的很大可能性，而且其中的某些结构不能通过 MS/MS 数据进行区分，因此我们未能对详细结构作出定论。取而代之，我们依据其单糖组成来描述 N-糖。

与相对简单的 mAb 多聚糖模式相比，其他两种糖蛋白存在更多种类的多聚糖结构。与 mAb 多聚糖相反，在卵清蛋白中没有检测到岩藻糖基化多聚糖，与先前报道的鸟类卵清蛋白未经岩藻糖基化的结果吻合<sup>[14]</sup>。

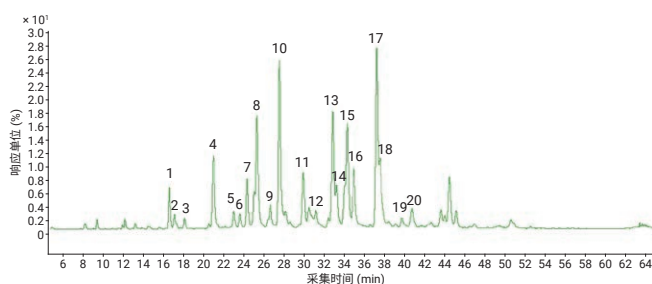


图 8. 卵清蛋白释放的 N-糖的分离情况

表 3. 卵清蛋白 N-糖归属的质量和单糖组成；H = 己糖，即半乳糖或甘露糖；  
N = N-乙酰氨基葡萄糖

峰	质量 + 2AB (Da)	质量 计算值 (Da)	组成 (简短格式)	组成 (详细格式)
1,2	1234.48 [M]	1114.48	H3N3	(HexNAc) <sub>1</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
3	1193.45 [M]	1073.45	H4N2	(Hex) <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>2</sub>
4	1437.56 [M]	1317.56	H3N4	(HexNAc) <sub>2</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
5	1396.53 [M]	1276.53	H4N3	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>1</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
6, 7	1640.64 [M]	1520.64	H3N5	(HexNAc) <sub>3</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
8	1355.506 [M]	1235.51	H3N5	(Hex) <sub>2</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
9	1599.61 [M]	1479.61	H4N4	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
10	1843.73 [M]	1723.73	H3N6	(HexNAc) <sub>4</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
11	1802.74 [M]	1682.74	H4N5	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
12, 14	2046.884 [M]	1926.88	H3N7	(HexNAc) <sub>5</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
13	1517.56 [M]	1397.56	H6N2	(Hex) <sub>3</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
15	1761.6574 [M]	1641.66	H5N4	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
16	2005.8098 [M]	1885.81	H4N6	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
17	2249.9728 [M]	2129.97	H3N8	(HexNAc) <sub>6</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
18	1964.82 [M]	1844.82	H5N5	(Hex) <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>
19, 20	2208.87 [M]	2088.87	H4N7	(Hex) <sub>1</sub> (HexNAc) <sub>5</sub> +(Man) <sub>3</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub>

## 结论

Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统与 Agilent 1260 Infinity 荧光检测器和 Agilent 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统联用是分析 2-氨基苯甲酰胺衍生的 N-糖样品的理想组合。本实验对一种单克隆抗体和其他两种糖蛋白样品使用 PNGase F 进行样品前处理以释放 N-糖，然后利用 2-AB 进行衍生化，再进行 HILIC 样品纯化。

Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱具有优异的分離能力，可以实现大鼠 mAb 样品中所有主要 N-糖的分離和鉴定。这款色谱柱还可对胎球蛋白和卵清蛋白复杂的双天线和三天线 N-糖进行分析，表现出极高分離度。经优化的 260 和 430 nm 的荧光激发和发射波长实现了更高的信噪比。根据样品的复杂性，电喷雾电离 Q-TOF MS 分析能够归属不同的多聚糖结构或确定其单糖组成。

## 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, pp 6123–6127
2. Peracaula, R; et al. Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology* **2003**, 13, pp 227–244.
3. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Progr.* 2005, 21, pp 11–16.4. Arnold, J. N; et al. Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, 564, pp 27–43
4. Fernandes, D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *Euro. Biopharm. Re.* **2005**, Summer, pp 106–110
5. Abès, R; Teillaud, J. L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, pp 146–157
6. Ruhaak, L. R; et al. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 397, pp 3457–3481
7. Royle, L; et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem.* **2008**, 376, pp 1–12
8. Huhn, C; et al. IgG glycosylation analysis. *Proteomics* **2009**, 9, pp 882–913
9. Melmer, M; et al. HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, pp 905–914
10. Ding, W; et al. Identification and Quantification of Glycoproteins Using Ion-Pairing Normal-phase Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, 8, pp 2170–2185
11. Leibiger, H; et al. Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem. J.* **1999**, 338, pp 529–538
12. Anumula, K. R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, 350, pp 1–23.
13. Montreuil, J; Vliegthart, J. F. G; Schachter, H., Eds.; Glycoproteins II. Elsevier B. V., Amsterdam, **1997**
14. Ceroni, A; et al. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, pp 1650–1659

# 用于生物治疗药物 N-糖高通量分析的安捷伦解决方案

## 作者

Arunkumar Padmanaban,  
Sreelakshmy Menon 和 Suresh  
Babu CV

安捷伦科技公司 (印度),  
印度班加罗尔

## 摘要

本应用简报介绍了针对创新药和生物仿制药单克隆抗体 (mAb) 的 2-AB 标记 N-糖的自动化高通量样品前处理和随后的液相色谱 (LC) 分析。Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台用于自动化样品前处理, 包括 mAb 多聚糖裂解和释放、2-AB 标记和纯化。样品准备好接受下游分析后, 使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱进行分析。通过比较创新药和生物仿制药单克隆抗体的色谱图, 分析了样品之间的多聚糖分布差异。

本研究重点介绍 AssayMAP Bravo 平台在自动化和可重现的多聚糖分析样品前处理中的高通量应用, 以及后续使用 1290 Infinity 液相色谱系统进行快速色谱分离。



## 前言

单克隆抗体 (mAb) 作为生物治疗领域的前沿, 彻底改变了疾病的治疗和干预方式。通过临床审批<sup>[1]</sup> 的 20 种第一代单克隆抗体中, 大多数专利已经过期或即将过期。这为生产生物仿制药提供了巨大的机会。美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品管理局 (EMA) 等监管机构发布了生物仿制药蛋白质治疗药物 (包括翻译后修饰) 的表征指南<sup>[2]</sup>。糖基化修饰会造成结构异质性, 从而改变 mAb 的靶标结合能力、稳定性、电荷和质量数<sup>[3]</sup>。在通过细胞系开发抗体的过程中, 需要监测糖基化模式以便改变细胞系和优化培养基。这需要高通量的样品前处理, 并行筛选数种细胞培养条件。Agilent Bravo 自动化液体处理平台是一套精确的液体处理系统, 专为多聚糖分析等高通量应用而设计。Agilent Bravo 采用 Agilent AssayMAP 技术, 将自动化与用于样品前处理的微型 5  $\mu$ L 填充床小柱相结合, 可在更短的时间内实现高通量色谱分析和样品前处理<sup>[4]</sup>。

本应用简报介绍了使用 Agilent AssayMAP Bravo 平台分析 mAb 中 N-糖的工作流程解决方案。该系统使用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 染料自动进行 N-糖的纯化和衍生化, 然后使用安捷伦糖谱分析色谱柱进行安捷伦 HPLC 分析。我们展示了 AssayMAP Bravo 在高通量分析研究所需的自动化样品前处理中的易用性。

## 实验部分

### 材料

使用安捷伦包含 2-AB 的 AdvanceBio GlykoPrep-plus 快速 N 糖样品前处理试剂盒以及 2-AB 标记的低聚甘露糖 5 和 6 进行样品前处理和分析。Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱, 2.1  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu$ m (部件号 859700-913) 和安捷伦 2-AB 标记人 IgG N-糖标准品 (部件号 GKSB-005) 购自安捷伦科技公司。利妥昔单抗创新药和生物仿制药产品购自当地一家药店。其他所有化学品均为 HPLC 纯度, 购自 Sigma。

## 样品前处理

样品前处理使用 Agilent AdvanceBio GlykoPrep-plus 试剂盒中的试剂和 AssayMAP 方案。将创新药和生物仿制药样品稀释至 1 mg/mL, 然后分别加载到 96 孔板的三列上 (每种样品 24 份)。按照指南<sup>[5]</sup> 中的规定放置样品板和试剂板后, 启动 Agilent VWorks 软件中的 N-糖样品前处理: RX 酶解和 2-AB 标记模块, 对样品进行处理。该方案由五个模块组成, 这些模块按顺序依次执行以固定样品, 酶解多聚糖, 洗脱, 用 2-AB 标记, 再完成最终净化以去除多余染料。然后将每个孔中经过最终纯化的标记多聚糖转移至 HPLC 样品瓶中, 立即进行分析或在  $-80^{\circ}\text{C}$  下储存。

图 1 给出了完整工作流程的示意图。



图 1. 多聚糖分离、标记、纯化并随后使用安捷伦解决方案进行液相色谱分析的工作流程示意图。Agilent AssayMAP 步骤显示为蓝色; AdvanceBio 试剂盒显示为橙色

## 仪器

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 G4220A
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 G4226A
- Agilent 1290 Infinity TCC G1316 C
- Agilent 1260 荧光检测器 G1321 B

本研究采取了之前描述过的液相色谱方法<sup>[6]</sup>。每种样品均以四连进样形式进行分析，然后再进行空白进样。

## 软件

- Agilent VWorks 自动化控制 11.4.0.1233
- Agilent AssayMAP Launch Pad 3.0
- 安捷伦 N-糖样品前处理：RX 酶解和 2-AB 标记方案 1.0
- Agilent ChemStation C.01.06

## 结果与讨论

### Agilent AssayMAP 样品前处理

按照由五个模块组成的方案处理样品，如图 2 所示。软件套件包括每个待执行模块的台板布局、实验室器皿表 and 应用程序设置选项卡（图 3）。软件会提示用户将实验室器皿表中列出的相应消耗品和试剂放在指定的台板位置。设置所有实验室器皿后，执行方案，AssayMAP Bravo 会完成方案，并显示确认消息以继续执行下一个模块。

最后的净化方案模块将水性缓冲液中经过标记纯化的多聚糖洗脱到洁净的 96 孔板中。然后下游液相色谱分析使用 Agilent AdvanceBio 糖谱分析色谱柱对样品和空白样品进行四连进样分析。

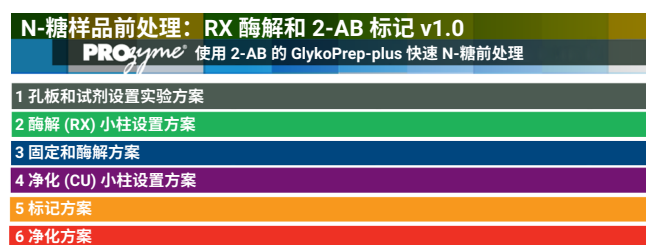


图 2. Agilent AssayMAP N-糖样品前处理的 Agilent VWorks 模块

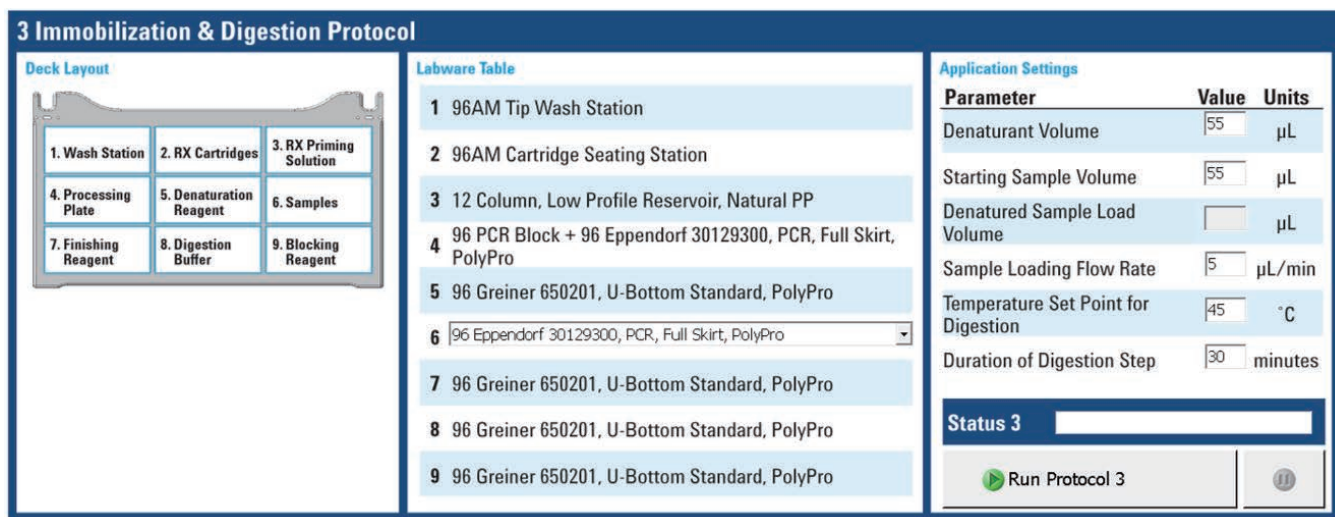


图 3. 固定和酶解方案（Agilent VWorks 软件中五个样品前处理模块之一）的台板布局、实验室器皿表 and 应用程序设置

## HPLC 分析

使用 Agilent 1290 Infinity 系统的快速分析方法，比较创新药和生物仿制药单克隆抗体的 N-糖谱图。使用安捷伦 2-AB 标记 IgG N-糖文库作为标准来评估色谱柱性能并标注 mAb 样品的峰。适合高压的 1290 Infinity 系统可在不到 6 分钟的时间内完成样品分析，从而节省每个样品的分析时间，并提高样品通量。

对每个样品进行 4 次重复 HPLC 分析。图 4 所示为 96 次重复分析中四种主要多聚糖的峰面积，展现了 AssayMAP 微型色谱移液器吸头优异的柱间重现性。峰面积和峰高的重现性标准偏差 (RSD) 计算结果显示，所有多聚糖种类的变异系数 (CV) 均小于 6%。这展示了 AssayMAP Bravo 系统非常强大且可重现的样品前处理能力。

## 创新药与生物仿制药的糖谱分析和对比

将创新药和生物仿制药利妥昔单抗的色谱图与标准 IgG N-糖文库进行比较，并标注多聚糖对应的峰。此外还使用包含 2-AB 标记低聚甘露糖 5 和 6 的单独标准品标注其他的峰。创新药和生物仿制药产品丰度较高的多聚糖（例如 G0F、G1F 异构体和 G2F）糖基化模式相近（图 5）。低丰度多聚糖则观察到微小差异；生物仿制药样品的甘露糖含量较低 (Man5)，如图 6 的放大视图所示。尽管一些低丰度多聚糖存在微小差异，但可认为创新药和生物仿制药利妥昔单抗的多聚糖谱图基本一致。

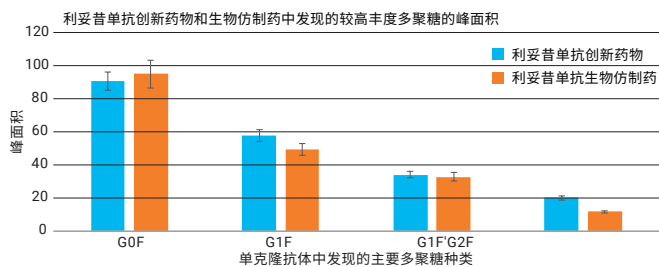


图 4. 每种创新药和生物仿制药样品 96 次重复分析中主要多聚糖种类的峰面积

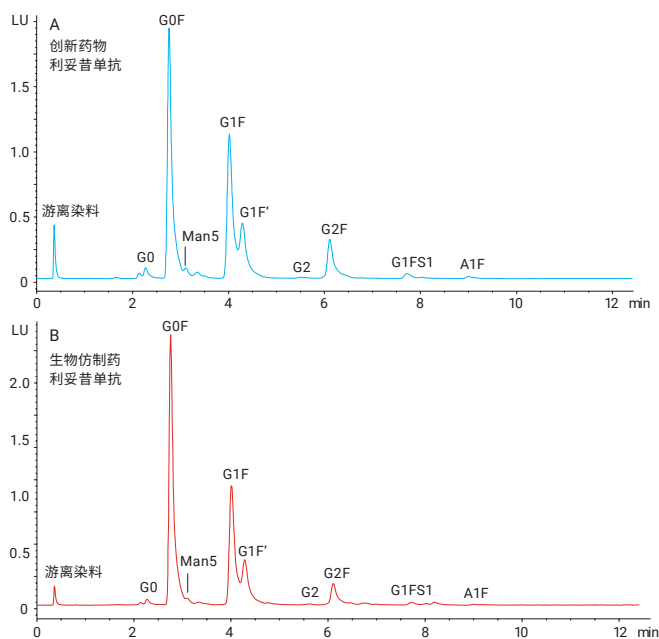


图 5. 创新药与生物仿制药利妥昔单抗的糖基化模式

计算每个 N-糖核心的面积百分比，并将两个样品进行对比。表 1 所示为创新药和生物仿制药利妥昔单抗 N-糖的比例。表中显示，创新药和生物仿制药的 N-糖指纹图谱类似。

两个样品的 N-糖分布中显示出类似的趋势，其中 G0F 为主要糖型，然后是 G1F、G1F' 和 G2F。除了已标注的多聚糖外，还有一些未知的多聚糖形式可以通过正交检测系统进行标注。两个样品面积百分比的关联图（图 7）显示出高相似性，R2 为 0.973。

表 1. 创新药与生物仿制药单克隆抗体的多聚糖面积百分比

N-糖百分比		
N-糖	创新药物	生物仿制药
G0	1.5	0.8
G0F	42.2	50.5
Man5	1.7	1.2
G1F	28.6	26.7
G1F'	13.0	11.6
G2	0.3	0.2
G2F	8.7	5.5
G1FS1	0.9	0.6
A1F	0.2	0.5

## 结论

本研究重点介绍了 Agilent AssayMAP Bravo 系统在高通量样品前处理中丰富的功能。

- Agilent VWorks 自动化控制软件套件通过现成可用的方案简化了样品前处理，使样品可以兼容下游分析，同时大大减少手动操作
- 对 96 孔板中的单克隆抗体样品进行酶促多聚糖裂解、分离、2-AB 衍生化和纯化的并行处理
- AssayMAP 在多聚糖纯化中表现出优异的重现性，性能非常稳定
- 然后，使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和糖谱分析色谱柱对纯化的样品进行分析
- 在短时间内实现了多聚糖种类的良好分离，并使用标准品进行了标注
- 对创新药和生物仿制药的多聚糖种类分布进行了评估，数据表明本研究中使用的创新药和生物仿制药利妥昔单抗的多聚糖谱图基本一致

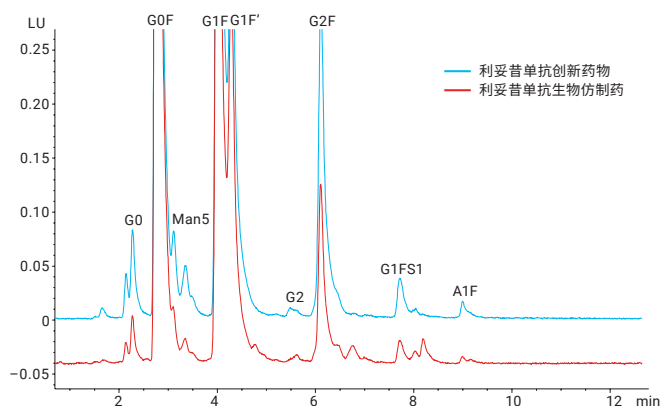


图 6. 图 5 的放大视图：创新药和生物仿制药利妥昔单抗的糖基化模式，低丰度聚糖存在微小差异

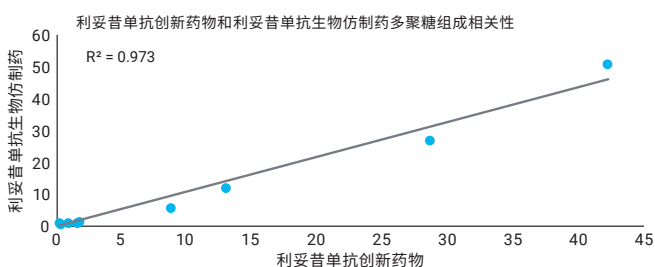


图 7. 创新药和生物仿制药利妥昔单抗释放的多聚糖的面积百分比线图对比

## 参考文献

1. Chames, P.; Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *mAbs* **2009**, 1:6, 539–547
2. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015. [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory Information/Guidances/UCM291128.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf)
3. Zhang, Q.; et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research* **2009**, 8(2), 754–769
4. Agilent AssayMAP Cartridges Automated Sample Preparation (Agilent AssayMAP 小柱自动化样品前处理)，安捷伦科技公司数据表，版本号 5991-1774EN，**2013**
5. AssayMAP with ProZyme GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with 2-AB Protocol Guide（使用 ProZyme 带 2-AB 试剂盒的 GlykoPrep-plus 快速 N-糖样品前处理产品的 AssayMAP 方案指南），安捷伦科技公司手册，版本号 G5409-90012EN，**2013** 年 5 月修订版
6. Martosella, J.; et al. 采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N-糖分析，安捷伦科技公司应用简报，版本号 5991-4886CHCN，**2014**

## 更多应用简报

部件号	标题
5991-4801CHCN	人免疫球蛋白 G 的高灵敏度和高重现性多聚糖分析
5991-4886CHCN	采用新型 HILIC 色谱柱实现快速 N-糖分析
5991-7024EN	使用 Agilent AssayMAP 自动化样品前处理和 Agilent 1290 Infinity 液相系统对抗体药物偶联物 (ADC) N-糖的分析
5991-8071ZHCN	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-糖分析
5991-8796ZHCN	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

## 其他信息

安捷伦提供多聚糖样品前处理试剂盒，包含用于去糖基化、多聚糖标记和样品净化的备件和试剂。详细方案可查看用户指南：5991-9561EN 和 5991-9560EN。

多聚糖标准品可用于协助方法开发、数据分析和系统检查。请参阅第 12–15 页，或下载 [5994-2202ZHCN](#)。

如需了解糖谱分析工作流程的更多信息，请访问 [www.agilent.com/chem/glycoscience](http://www.agilent.com/chem/glycoscience)

如需了解更多信息，请访问：

[www.agilent.com/chem/advancebio](http://www.agilent.com/chem/advancebio)

安捷伦客户服务中心：

**免费专线：800-820-3278**

**400-820-3278（手机用户）**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

DE44509.4271875

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11月15日，中国出版  
5994-0035ZHCN

