

针对IgG1抗体中N糖型的定性和定量 —LC-FLD、LC-MS/MS不同分析方法的比较

孙佳楠 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:

单克隆抗体, 游离糖型, 糖肽, 完整蛋白, Q Exactive Plus超高分辨质谱仪, Vanquish Flex Binary超高压二元液相色谱仪, 荧光检测器

前言

重组单克隆抗体 (mAbs) 已是日益广泛使用的治疗性蛋白质药物, 其中以IgG1和IgG2类型最为常见。其恒定区的N糖基化在不同的细胞系、克隆和生产条件之间的差异很大, 且具有高度的异质性, 聚糖结构或不同聚糖类型含量的改变通常影响抗体生物学活性、稳定性、免疫原性和半衰期, 是许多治疗性抗体的关键质量属性, 对控制产品一致性至关重要^[1]。

分析不同寡糖结构和含量的传统策略为通过PNGase F糖苷内切酶将寡糖从抗体中释放, 对糖链进行标记、荧光对其进行定性和定量, 然而其局限于需要寡糖标准品, 且当抗体中含有多个N糖基化位点时, 不能区分位点的异质性, 而基于高分辨质谱对寡糖及糖肽的定性和定量则能够解决上述问题, 但定量时需考虑不同离子的离子化效率不同。本文采用LC-MS/MS法对原研IgG1抗体药物的N糖肽及游离寡糖进行鉴定和相对定量, 同时与经典方法LC-FLD进行定量结果的比较。

实验方法

1. 试剂

10 kD超滤管 (P/N MRCPRT010, Merck), 8 M盐酸胍 (P/N 24415, Thermo Fisher), 1 M Tris-HCl pH=8.0 (P/N 15568025, Thermo Fisher), 二硫苏糖醇 (P/N D9163-5G, Sigma-Aldrich), 碘乙酰胺 (P/N I6125-10G, Sigma-

Aldrich), 胰蛋白酶 (P/N V5117, Promega), Glycoworks RapiFluor-MS (P/N 176003635, Waters), 质谱级甲酸 (P/N 85178, Thermo Fisher), 质谱级乙腈 (P/N 51101, Thermo Fisher), 质谱级水 (P/N 51140, Thermo Fisher)

2. 样品制备

单抗样品酶解: 加入200 μ L ddH₂O 到10 kD 超滤管中, 11,000 g离心1 min, 去除超滤管中少量的甘油。加入100 μ g单抗, 11,000 g离心3 min。加入200 μ L ddH₂O 置换一次去除样品中的盐。加入98 μ L 8 M盐酸胍, 加入2 μ L 500 mM DTT, 终浓度10 mM, 56 $^{\circ}$ C, 反应30 min。加入2 μ L 1 M 碘乙酰胺, 终浓度20 mM, 室温, 避光, 反应30 min。反应液11,000 g离心10 min。加入200 μ L 终浓度为100 mM Tris-HCl (pH=8.0), 11,000 g离心10 min, 重复一次。用100 μ L 100 mM Tris-HCl 复溶, 加入2.5 μ g Trypsin 37 $^{\circ}$ C 孵育4 h。加入10 μ L 10% 甲酸酸化 (终浓度约为1%甲酸), 单抗肽段终浓度约1 μ g/ μ L。

糖链的释放及荧光标记: 参照Glycoworks RapiFluor-MS试剂盒说明书, 即使用RapiGest SF和Rapid PNGaseF酶将糖链快速释放; 将糖链释放混合物与RapiFluor-MS混合, 室温标记5min后, 用乙腈稀释该反应混合物; 利用GlycoWorks HILIC μ Elution 提取板对已标记的糖胺进行纯化, 实验详细步骤参照相应说明书。

3.液相、质谱设备及分析方法

质谱仪器: Thermo Fisher Q Exactive Plus高分辨质谱仪

液相色谱: Thermo Fisher Vanquish Flex Binary超高压二元液相色谱仪, 包括二元梯度泵 (P/N VF-P10-A), 柱温箱 (P/N VH-C10-A), 进样器 (P/N VF-A10-A-02), 基座 (VF-S01-A), 荧光检测器 (P/N VF-D51-A), 荧光流通池 (P/N 6079.4330)

色谱柱: Accucore™ C18 2.1×150 mm色谱柱 (P/N 27101-152130, Thermo Fisher), ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 1.7µm, 2.1mm×150mm色谱柱 (P/N 186004742, Waters)

数据分析软件: Thermo Fisher BioPharmaFinder3.1, 免费软件 GlycoWorkbench

色谱方法: 见表1A, 表1B

质谱方法: 见表2A, 表2B

表1A. 肽图测定的液相方法

流动相 A: 0.1%FA-H2O B: 0.1%FA-ACN		柱温: 45°C 上样量: 15µg 流速: 0.2mL/min	
Time(min)	%B		
0	2		
5	2		
48	40		
50	90		
60	90		
61	2		
70	2		

表1B. 寡糖链测定的液相方法

流动相 A: 50mM甲酸铵 pH=3.0 H2O B: ACN 柱温: 60°C 上样量: 20µL 流速: 0.4mL/min 激发波长265nm 发射波长425nm			
Time(min)	%B		
0	78		
2	78		
40.5	55.9		
41.5	20		
46.5	20		
48.5	78		
60	78		

表2A. 肽图测定的质谱方法

肽图质谱源区参数设置	
Sheath gas flow rate	35
Aux gas flow rate	10
Sweep gas flow rate	0
Spray voltage (kV)	3.8
Capillary temp. (°C)	320
S-Lens RF Level	50
Aux gas heater temp. (°C)	350
General	
Runtime	0 to 70 min
Polarity	positive
In-source CID	0 eV
Default charge stste	2
Full MS	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	100 ms
Scan range	200 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile
dd-MS2/dd-SIM	
Microscans	1
Resolution	17,500
AGC target	2e5
Maximum IT	100 ms
Loop count	5
MSX count	1
TopN	5
Isolation window	1.6m/z
Isolation offset	0
Fixed first mass	110
NCE	27
Spectrum data type	Centroid

表2B. 糖链测定的质谱方法

糖链质谱源区参数设置	
Sheath gas flow rate	40
Aux gas flow rate	10
Sweep gas flow rate	0
Spray voltage (kV)	3.8
Capillary temp. (°C)	280
S-Lens RF Level	50
Aux gas heater temp. (°C)	350
General	
Runtime	2 to 50 min
Polarity	positive
In-source CID	0 eV
Default charge stste	2
Full MS	
Microscans	1
Resolution	70,000
AGC target	3e6
Maximum IT	100 ms
Scan range	200 to 2000 m/z
Spectrum data type	Profile
dd-MS2/dd-SIM	
Microscans	1
Resolution	17,500
AGC target	2e5
Maximum IT	100 ms
Loop count	5
MSX count	1
TopN	5
Isolation window	1.6m/z
Isolation offset	0
Fixed first mass	100
NCE	10,15,20
Spectrum data type	Centroid

4. 数据分析

使用BioPharma Finder 3.1软件分别对LC-MS/MS采集的抗体完整分子量和糖肽进行鉴定和相对定量，主要分为：第一步序列编辑，使用BPF 3.1自带的CHO糖型库，第二步设置具体解析参数，第三步查看结果，肽图分析具体参数设置如图1A所示；完整蛋白分子量测定具体参数设置如图1B所示。根据BPF 3.1软件中182种糖型，对LC-MS/MS采集的游离糖型进行一级精确分子量的提取，并使用GlycoWorkbench软件对提取到的糖型进行二级碎片离子的确证。

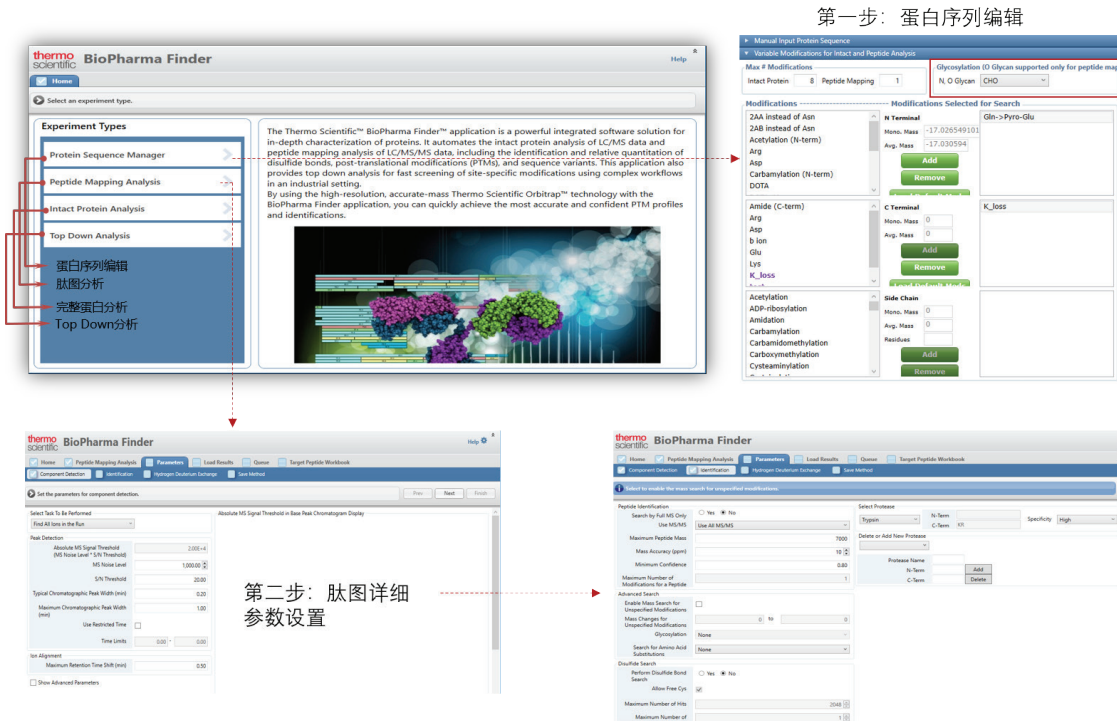


图1A. 肽图分析具体参数设置

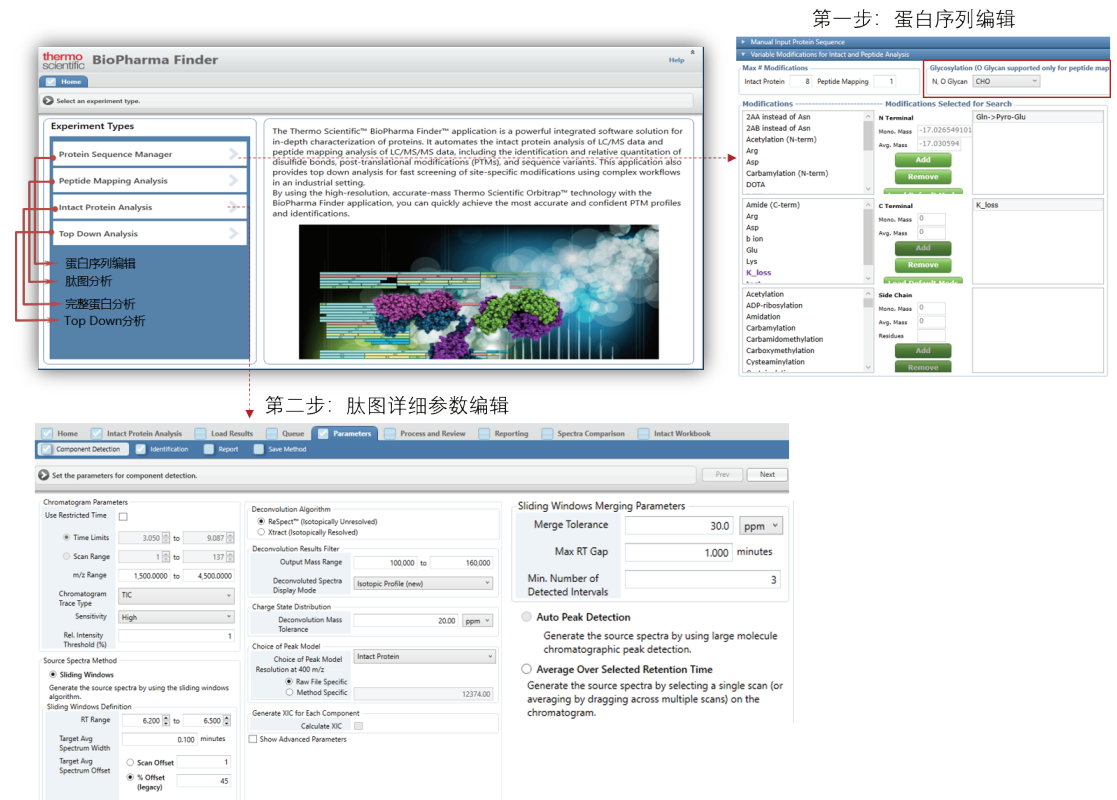


图1B. 完整分子量解析具体参数设置

实验结果

1. 基于LC-MS/MS方法对游离糖型、糖肽和完整蛋白水平糖型鉴定结果的分析

在没有游离糖标准品时，利用Orbitrap高分辨质谱一级精确分子量和丰富的糖碎片离子能够实现对未知糖型的鉴定，同时与糖肽鉴定结果进行相互的验证。本次实验利用软件GlycoWorkbench对糖型结构进行鉴定，如图2所示以A2G0F糖型为例的碎片离子匹配图，本次实验中共鉴定到16种游离糖型。

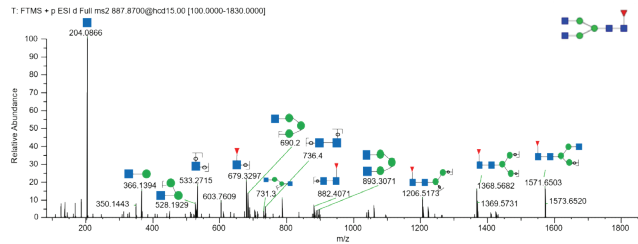


图2. 糖型A2G0F的碎片离子匹配图（备注：未标注同分异构碎片离子结构图）

此外，基于Orbitrap高灵敏度、HCD产生的丰富碎片离子及BioPharmaFinder软件含有的182种CHO N糖型库，在本次实验中共鉴定并相对定量到20种不同的N糖肽，其一级质量偏差均小于5ppm，且含有较为丰富的碎片离子，如Y1，Y1-F及糖的碎片离子，以丰度最低的N糖肽M8（相对含量为0.07%）为例，其一级质量偏差为1.8ppm，二级仍具有丰富的碎片离子，如图3所示，得以充分确证并准确定量各种低含量的翻译后修饰。

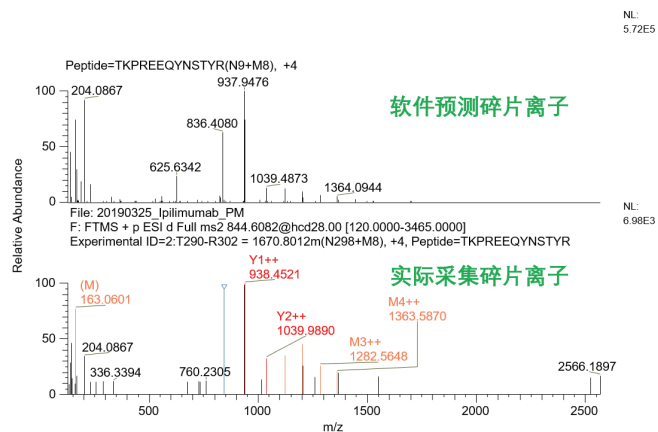


图3. 丰度最低的N糖肽M8的二级碎片离子匹配图

完整蛋白水平糖型的鉴定无需样品前处理，是最为直接的方法，但由于完整蛋白分子量大、异质性高且在色谱上难分离，对质谱的检测要求更高，如图4所示本次实验中共鉴定并相对定量到6种高丰度的不同糖型。

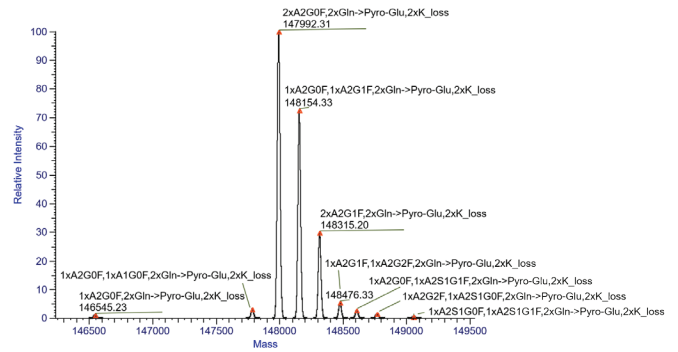


图4. 完整蛋白水平不同成分的匹配及相对含量图

2. 比较LC-MS/MS和荧光法对游离糖型、糖肽和完整蛋白水平的定量结果

表3中荧光和质谱法对游离糖型的定量及糖肽水平定量结果显示，两者对含量高于1%的糖型定量结果趋势一致，可以说明高含量的这几种糖型在质谱源区的离子化效率对定量结果影响不大，对于低丰度糖型定量趋势出现差异，可能由样品前处理或质谱离子化效率导致，需进一步验证。完整蛋白水平对高含量糖型的定量与糖肽和游离糖型的结果趋于一致，可用于日常快速监测高丰度糖型的变化。

糖型	游离糖型保留时间	荧光定量游离糖型的相对含量	质谱定量游离糖型的相对含量	糖肽水平每种糖型相对含量	完整蛋白水平糖型相对含量
A2G0F	19.97	70.58%	71.60%	66.82%	69.99%
A2G1F	22.6	21.24%	21.46%	26.43%	25.57%
A2G2F	25.5	3.26%	1.76%	2.87%	1.14%
M5	21.1	1.16%	1.35%	1.68%	-
A2S1G0F	24.8	1.01%	0.25%	0.96%	0.69%
A1G0F	18	0.71%	1.10%	0.41%	1.88%
A2G0	18.7	0.66%	1.11%	0.79%	-
A2S2F	29.36	0.51%	0.11%	0.39%	-
A3G0F	22.3	0.37%	0.23%	-	-
A2S1G1F	27.3	0.33%	0.26%	0.58%	0.28%
A1G1F	21.5	0.17%	0.23%	0.21%	-
M3	14.04	-	0.09%	0.06%	-
A1G0	16.55	-	0.07%	0.06%	-
A2G1	21.58	-	0.12%	0.21%	-
A1S1F	24.23	-	0.08%	0.16%	-
A3G1F	24.77	-	0.17%	0.49%	-
M6	-	-	-	0.21%	-
M7	-	-	-	0.10%	-
A3G2F	-	-	-	0.08%	-
M8	-	-	-	0.07%	-
A1S1M5	-	-	-	0.07%	-

表3. 不同的分析方法对游离糖型、糖肽及完整蛋白糖型的鉴定和定量结果（“-”代表未鉴定到的糖型）

总结和讨论

在完整蛋白分子量测定和糖肽水平均可使用高分辨质谱进行糖型分析，高分辨质谱和经典的液相色谱法同样能够对游离糖链进行糖型的鉴定和定量，即目前有4种分析方法能够实现对糖型的分析。基于完整蛋白水平的糖型分析，前处理简单、质谱分析时间短，是最为简单的方法，但对糖型种类多、异质性高的抗体而言，不同成分在质谱离子源区域的离子化程度可能会不同，导致低丰度糖型会鉴定不到，但可用于监测高丰度糖型的变化；基于高分辨质谱的糖肽水平糖型分析，需经过抗体酶解，LC-MS分析时间较长，糖肽上糖型的准确鉴定依赖于高分辨质谱的灵敏度、碎片离子的丰富度及糖型数据库的大小，相对定量时需考察不同糖型的离子化效率，如满足以上条件，此方法作为糖型监测最为高效和灵敏的方法，同时能够准确鉴定糖基化位点，当对含有2种或2种以上不同糖基化位点的蛋白类药物糖型监测时优势更为明显；基于高分辨质谱对游离糖型的定性和定量方法，为提高质谱响应需进行糖型的标记，此标记过程复杂或试剂昂贵，以及是否会影响某类糖型的鉴定和定量

以及不同糖型在质谱离子源区的离子化效率仍需考察，但灵敏度明显高于液相色谱法；基于液相色谱法对游离糖型的定性和定量，前处理同样稍复杂，但无需考察离子化效率问题，依赖于标准品和保留时间，灵敏度稍差，适用于大规模监测生产中的主要糖型。本文中建立的4种方法都可以精确地对单抗的糖型进行表征，基于质谱的表征方法较色谱法有很大的优势，具有灵敏度高、样品处理简单以及获得糖型信息更加完整的优势，有望用于单抗大规模生产中糖型的监测。

参考文献

- [1] Wang T, Chu L, Li W, et al. Application of a quantitative LC-MS multiattribute method for monitoring site-specific glycan heterogeneity on a monoclonal antibody containing two N-linked glycosylation sites[J]. Analytical chemistry, 2017, 89(6): 3562-3567.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC