

蛋白A纯化单克隆抗体的自动化高通量N-糖标记和LC-MS分析

Caitlin M. Hanna, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

N-糖会影响治疗性蛋白质的安全性和有效性，因此在生物治疗药物的开发过程中受到常规监测。Waters™自动化GlycoWorks™ RapiFluor-MS™样品前处理方案是一种快速而又耐用的糖蛋白糖谱分析方法，但它只适合在非亲核缓冲液中制备窄浓度范围的样品。本研究介绍了一种互补的样品前处理和分析方法，该方法使用Andrew+™移液机器人和BioAccord™ LC-MS系统，对蛋白A纯化单克隆抗体(mAb)释放的N-糖提供了可重现的糖谱。这种自动透析方案可以轻松适用于在任何缓冲液中制备任何浓度的样品。

优势

- 快速、自动地制备游离和标记N-糖样品，48个样品用时不到3小时，然后使用BioAccord LC-MS分析所有样品，分析时间不到4小时
- mAb在各种样品浓度和缓冲液中都能获得可重现的N-糖谱
- 一种评估亲和纯化生物反应器样品或下游分析样品关键质量属性(CQA)“糖谱”的高通量方法

简介

生物治疗药物的N-糖基化会影响抗体的免疫原性、清除率和效应器功能，因此在药物安全性和有效性方面起着关键作用^{1,2}。因此，在药物开发和生产过程中，糖基化作为一项关键质量属性(CQA)受到密切监测。N-糖分析在生物类似药的开发中尤为重要，因为不同表达系统的异质性会使糖基化难以控制³。因此，快速且耐用的N-糖分析方法对于生物治疗药物的高效开发和审批至关重要。

糖基化的评估方法通常为：从蛋白质骨架释放出N-糖，用发色团标记游离糖以便UV或荧光检测。标记游离N-糖的传统方法非常耗时，还会使用有害的标记试剂，并且所产生的标记糖的MS响应较弱⁴。Waters GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖标记试剂盒提供了一种替代方法，能够在五分钟内标记游离N-糖⁵。*RapiFluor*-MS标记含有喹啉荧光基团和叔胺，可增强荧光和MS检测。在快速标记之前，先进行快速PNGase F糖基释放和定量HILIC-SPE净化程序，以促进对游离和标记糖的即时LC-FLR/MS分析。

GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案最近使用Andrew+移液机器人进行了自动化改造，并与五分钟UPLC-MS方法结合使用，进一步提高了样品通量⁴。这些高通量样品前处理和UPLC-MS方法可在八小时内制备和分析从48个英夫利昔单抗(Remicade®)样品中释放的N-糖。该分析对临界和痕量水平的高甘露糖和唾液酸化糖型产生了一致的结果。此工作流程可用于药物开发的各个阶段，以提高通量和生产力。然而，由于*RapiFluor*-MS与高浓度亲核试剂不相容，它对mAb的使用仅限于在非亲核缓冲液中制备窄浓度范围(0.5–3 mg/mL)的样品⁶。

GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案的浓度和缓冲液限制使其在药物开发中的使用更加复杂。例如，如果使用蛋白A亲和色谱纯化生物治疗性单克隆抗体，则在使用甘氨酸和Tris等亲核试剂进行洗脱和中和时，在N-糖分析之前需要进行缓冲液置换以确保与*RapiFluor*-MS相容。考虑到以低浓度或亲核缓冲液制备mAb的情况，我们在自动化GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案中整合了高通量透析步骤。透析步骤与Andrew+液体移取器搭配使用的Vacuum+™和Extraction+™设备兼容，可以在N-糖释放和标记之前对多达48个样品进行浓缩和缓冲液置换。

完成自动化样品前处理后，使用由waters_connect™信息学软件控制的BioAccord LC-MS系统优化了快速UPLC-MS方法以进行高通量分析。图1所示为高通量游离糖分析的整个分析设置。

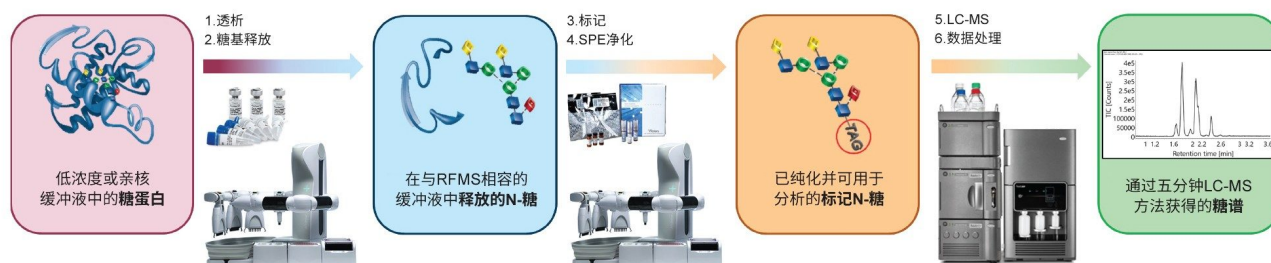


图1.使用Andrew+移液机器人以低浓度或亲核缓冲液自动制备标记N-糖样品，以及在BioAccord LC-MS系统上使用五分钟LC-MS方法进行快速样品分析的工作流程。

实验

GlycoWorks样品前处理方案改编自应用纪要720005506中的QC/自动化支持方案，加入了使用Andrew+移液机器人的透析和自动化步骤。在自动化之前，按如下所述配制GlycoWorks试剂（P/N: 186008840 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186008840-glycoworks-rapid-deglycosylation-kit---4-x-24.html>> 和186007989 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186007989-glycoworks-rapifluor-ms-label-96-sample.html>>）。将三瓶RapiGest™表面活性剂(10 mg)各用200 μ L GlycoWorks Rapid缓冲液和135 μ L 18.2 M Ω 水复溶，合并，并用1 mL PBS（pH 7.4，1 mM磷酸二氢钾，3 mM磷酸二氢钾，155 mM氯化钠；Thermo Fisher Scientific，P/N: 10010031）稀释。将四瓶GlycoWorks Rapid PNGase F酶各用270 μ L 18.2 M Ω 水复溶并合并。将三瓶GlycoWorks RapiFluor-MS (23 mg)各用280 μ L无水DMSO溶解并合并。此外，用18.2 M Ω 水制备20 mL 25 mM HEPES、50 mM NaCl (pH 7.9)。使用配备Extraction+的Andrew+移液机器人执行透析、糖基释放、标记和HILIC SPE净化（P/N: 186008747 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/186008747-glycoworks-spe-reagents-automation.html>> 和186002780 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/186002780-glycoworks-hilic--elution-plate.html>>）。使用Pall AcroPrep™ Advance Omega 10 K MWCO滤板进行透析。本研究在GlycoWorks标记方案中用无水DMSO（Thermo Fisher Scientific，P/N: D12345）代替DMF，在净化方案中用ACS级DMSO（Fisher Scientific，P/N: D128-500）代替DMF。在单独的实验（数据未显示）中证明了DMSO代替DMF用于这些程序时产生的结果相当，并且暴露风险更低。

本研究使用的单克隆抗体是Kanjinti™（曲妥珠单抗-anns），一种Herceptin™的生物类似药。分析了四个曲妥珠单抗-anns样品：用PBS制备的1 mg/mL样品；用100 mM甘氨酸、100 mM Tris缓冲液(pH 6.8)制备的1 mg/mL样品，作为模拟蛋白A纯化样品；用PBS制备并经蛋白A纯化的1 mg/mL样品；以及加入澄清的未转染的CHO细胞培养基(NTM)并经蛋白A纯化的1 mg/mL样品。NTM由Syd Labs, Inc.制备。简而言之，在第1天将 6×10^6 个未转染的CHO-K1细胞/mL接种到转瓶中，并在120 mL培养基中温育。于第2天到第15天收集瓶中的100 mL消耗型培养基，用0.2 μ m滤膜过滤。所有收集的培养基的平均细胞活力约90%，然后合并，储存于4 °C下。

使用由waters_connect软件控制的BioAccord LC-MS系统收集所有数据。使用软件中嵌入的精确质量数筛查工作流程执行数据处理。使用糖基数据库进行糖基指认；基于分子量和保留时间进行指认。

试剂	自动透析方案 (新方案)	QC/自动化支持方案 (标准方案) ⁷
透析、糖基释放和标记		
mAb	20 µL (1 mg/mL)	10 µL (1.5 mg/mL)
25 mM HEPES、50 mM NaCl 稀释缓冲液(pH 7.9)	200 µL	NA
<i>RapiGest SF</i>	20 µL (1:1 PBS: <i>RapiGest SF</i>)	10 µL
GlycoWorks Rapid PNGase F酶	12 µL (5:1 GlycoWorks Rapid PNGase F酶:H ₂ O)	10 µL
DMSO或DMF中的GlycoWorks <i>RapiFluor-MS</i> 溶液	10 µL无水DMSO溶液 (ThermoFisher Scientific, P/N D12345)	10 µL无水DMF溶液 (GlycoWorks试剂盒)
净化		
乙腈稀释	300 µL (2 × 150 µL)	300 µL (2 × 150 µL)
水 (活化)	200 µL	200 µL
平衡缓冲液 (85:15乙腈:水)	200 µL	200 µL
清洗缓冲液 (含1%甲酸的9:1乙腈:水溶液)	4 × 290 µL	4 × 290 µL
洗脱缓冲液 (200 mM 醋酸铵的95:5甲醇:水溶液)	90 µL (3 × 30 µL)	90 µL (3 × 30 µL)
样品稀释剂 (21:10乙腈:DMSO或DMF)	310 µL (2 × 155 µL, DMSO, Fisher, P/N D128-500)	310 µL (2 × 155 µL, DMF)
最终体积	400 µL	400 µL

表1.本应用纪要中自动和手动方案的溶剂用量。有关试剂制备的更多详细信息，参见上文实验部分。

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY™ UPLC I-Class PLUS

样品收集:

Waters QuanRecovery™ 700 µL 96孔板,
P/N: 186009184

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH™ Amide糖基分析柱,
P/N: 186004742
(1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm, 130 Å)

柱温: 60 °C

样品温度: 6 °C

进样体积: 15 μL

流动相A: 50 mM甲酸铵, pH 4.4 (LC-MS级,
P/N: 186007081)

流动相B: 乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	1.0	25	75	初始
3.50	1.0	42	58	6
3.55	1.0	60	40	6
3.75	1.0	60	40	6
3.80	1.0	25	75	6
5.00	1.0	25	75	6

ACQUITY RDa检测器设置

质量范围: 400-7000 *m/z*

模式: ESI+

采样速率:	10 Hz
锥孔电压:	45
脱溶剂气温度:	300
毛细管电压:	1.50 kV
信息学软件:	使用糖基数据库进行精确质量筛查

数据管理

色谱软件: waters_connect

结果与讨论

自动透析GlycoWorks RapiFluor-MS方案

我们最初尝试直接从蛋白A结合的mAb上释放和标记N-糖。将mAb与蛋白A磁珠结合，洗涤后用PNGase F酶处理，直接从表面结合的mAb上释放出N-糖。然而，这种方法的自动化产生了不一致的结果，回收率低。相反，使用96孔10 K截留分子量(MWCO)板的自动透析对蛋白A纯化的mAb进行缓冲液置换，然后按照改良过的GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案执行N-糖释放和标记，回收率和精密度俱佳（图2）。

该程序将配备Extraction+的Andrew+移液机器人放置在化学通风橱中（尺寸：宽1.83 m x 深0.85 m；1.28平方米；型号：HBBV6，Lab Crafters Inc.）。由于通风橱内空间有限，因此我们采用了两步方案。第1步执行透析、糖基释放和标记，第2步执行纯化。图2为概述自动透析GlycoWorks *RapiFluor*-MS方案的流程图。

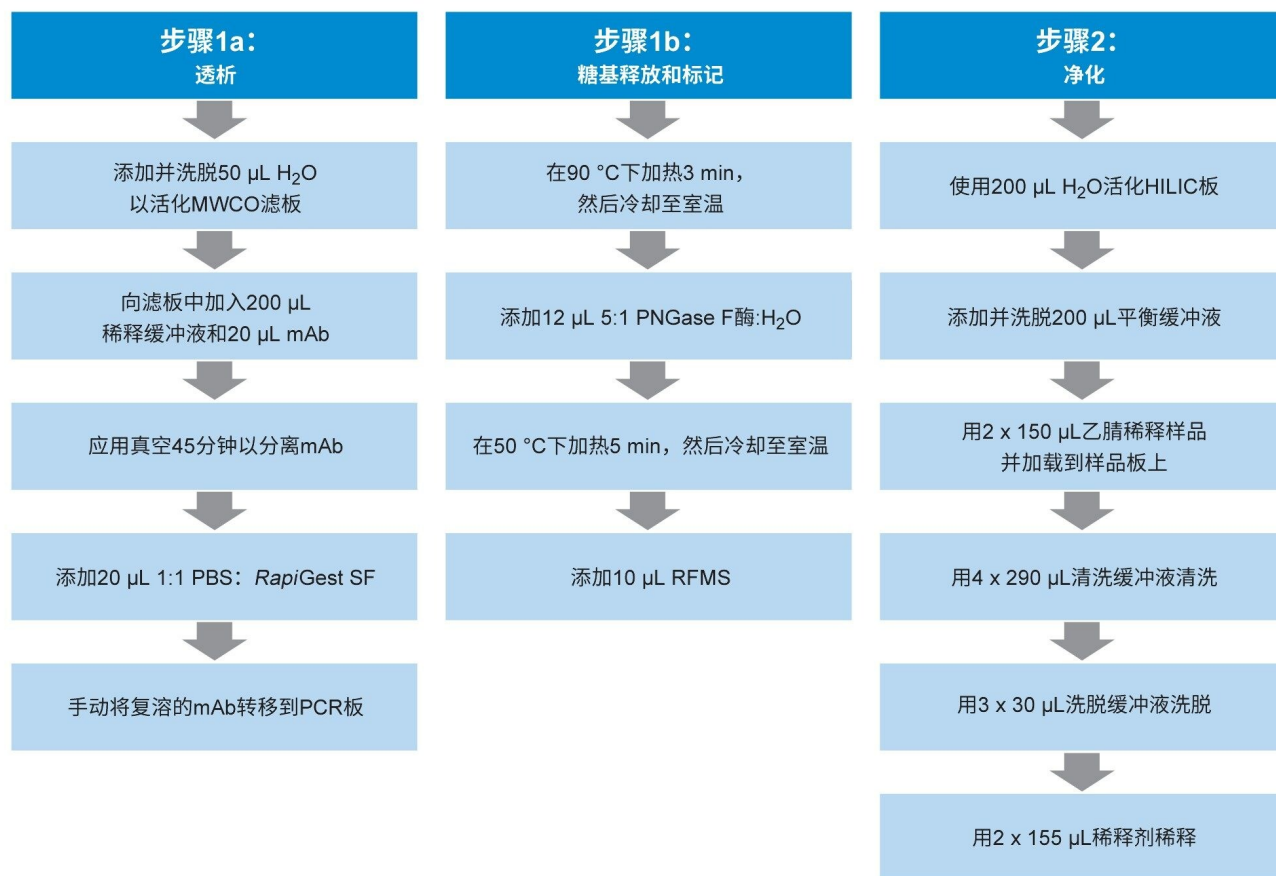


图2.概述自动透析GlycoWorks RapiFluor-MS方案的流程图，用于从低浓度或亲核缓冲液中的mAb样品快速制备标记N-糖。

第1步首先执行透析；将HEPES稀释缓冲液添加到MWCO板，然后添加mAb。在此程序中，mAb上样量相对于标准QC/自动化支持方案有所增加，目的是补偿透析过程中的样品损失⁷。如果使用更低或更高的样品浓度，可以调整mAb的体积以达到所需的上样量。接下来，Andrew+移液机器人通过真空过滤分离MWCO板上的样品，并用1:1 PBS:RapiGest SF溶液复溶。必须向复溶溶液中加入PBS，确保样品完全酶解。由于Andrew+的限制，MWCO板和PCR收集板之间的转移需要用户干预。为避免费力的手动移液，可以将MWCO板倒置在PCR收集板上并以500 RPM离心两分钟，将样品转移至PCR收集板供进一步处理。务必注意，此离心程序将颠倒样品在各自色谱柱中的顺序。

在90 °C下加热三分钟继续酶解，使mAb变性。然后添加5:1 GlycoWorks Rapid PNGase F酶:H₂O并在50 °C下加热五分钟，释放N-糖。此程序中稀释PNGase F酶的用量增加，以补偿无盖加热步骤期间的溶剂损失（表1）。最

后，用RapiFluor-MS (RFMS)标记N-糖，并在第2步中按照标准QC/自动化支持方案使用DMSO代替DMF进行纯化。

自动透析方案与标准手动方案的比较

为了评估新的自动透析GlycoWorks RapiFluor-MS方案的有效性，我们使用模拟蛋白A纯化的mAb样品进行N-糖释放、标记并通过UPLC-FLR进行分析。该样品模拟蛋白A纯化的mAb溶液，由于Tris和甘氨酸都具有亲核性，如果在分析前它们的浓度没有显著降低，会影响标记步骤。从该程序中获得的曲妥珠单抗-anns N-糖的代表性色谱图如图3所示。为进行比较，图3还显示了使用标准QC/自动化支持方案从用PBS制备的曲妥珠单抗-anns中手动释放和标记N-糖的色谱图。自动透析方案获得的N-糖谱与手动方案获得的N-糖谱相比偏差更小。

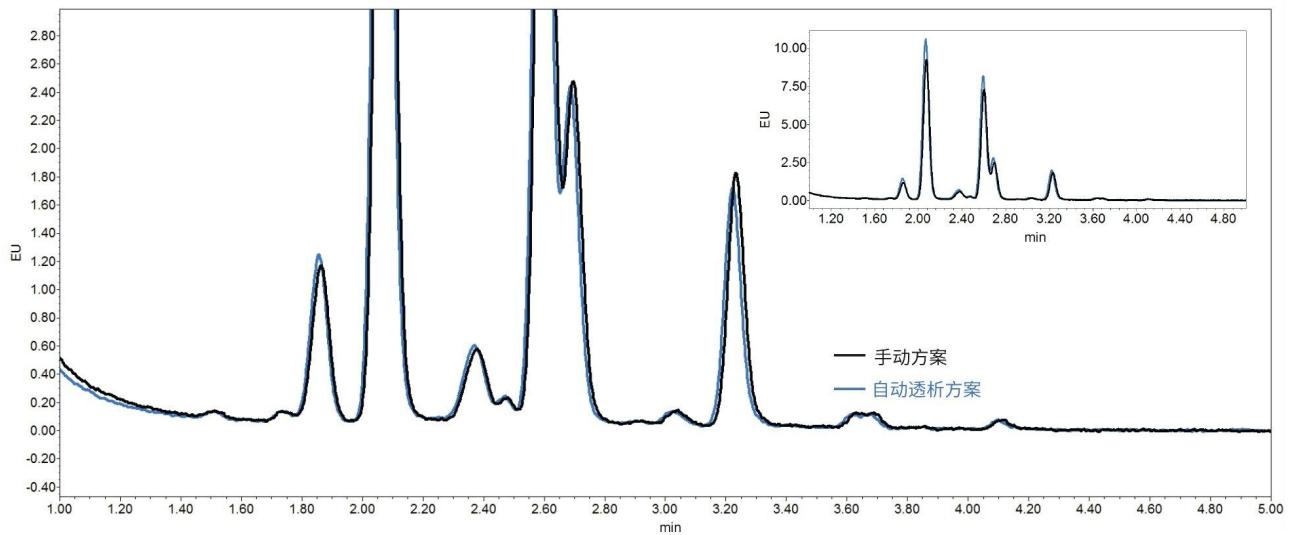


图3.使用手动方案（黑色迹线）和自动透析方案（蓝色迹线）从曲妥珠单抗-anns释放和标记N-糖的UPLC-FLR色谱图。放大的色谱图y轴经过归一化处理；插图为绝对的全尺寸色谱图。

图4比较了使用自动透析方案和手动方案（每种方案分析四个样品）释放的选定N-糖（FA2、FA2G1、FA2G2）的FLR峰相对丰度和总丰度。两种方案产生的N-糖总丰度和相对丰度相当。手动方案获得的N-糖总回收率高于自动透析方案，因为自动透析方案的平均回收率仅73%。透析过程中的样品损失可能是由于蛋白质吸附到MWCO滤板上，或在转移到PCR收集板期间液体转移不完全。因此，自动透析方案(20 μg)使用的初始上样量相对于手动方案(15 μg)更大。与使用手动方案制备的对照样品相比，使用透析方案制备的最终缓冲液置换样品浓度相当，并且产生的N-糖相对丰度相当。

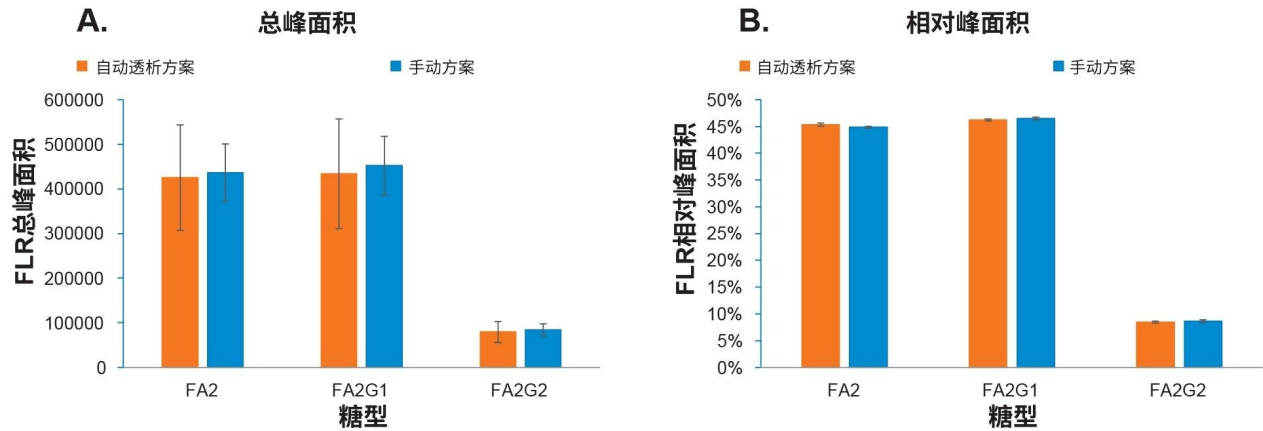


图4.比较使用自动透析和手动方案获得的曲妥珠单抗-anns的UPLC-FLR相对和总N-糖谱。误差条柱显示95%置信区间($n=4$)。两种方案产生的N-糖谱相当。

蛋白A纯化mAb的N-糖分析

使用自动透析方案从蛋白A纯化的曲妥珠单抗-anns中释放和标记N-糖。简单来讲，就是用48-样品方案来释放和标记N-糖，并选择八个样品用于后续UPLC-MS分析。使用了两种样品类型：用PBS制备的mAb纯化样品和用NTM（未转染的培养基）制备的mAb纯化样品。通过五分钟UPLC-MS方法分析释放和标记的N-糖。图5显示了该程序获得的N-糖谱；PBS和NTM样品产生了类似的色谱图。

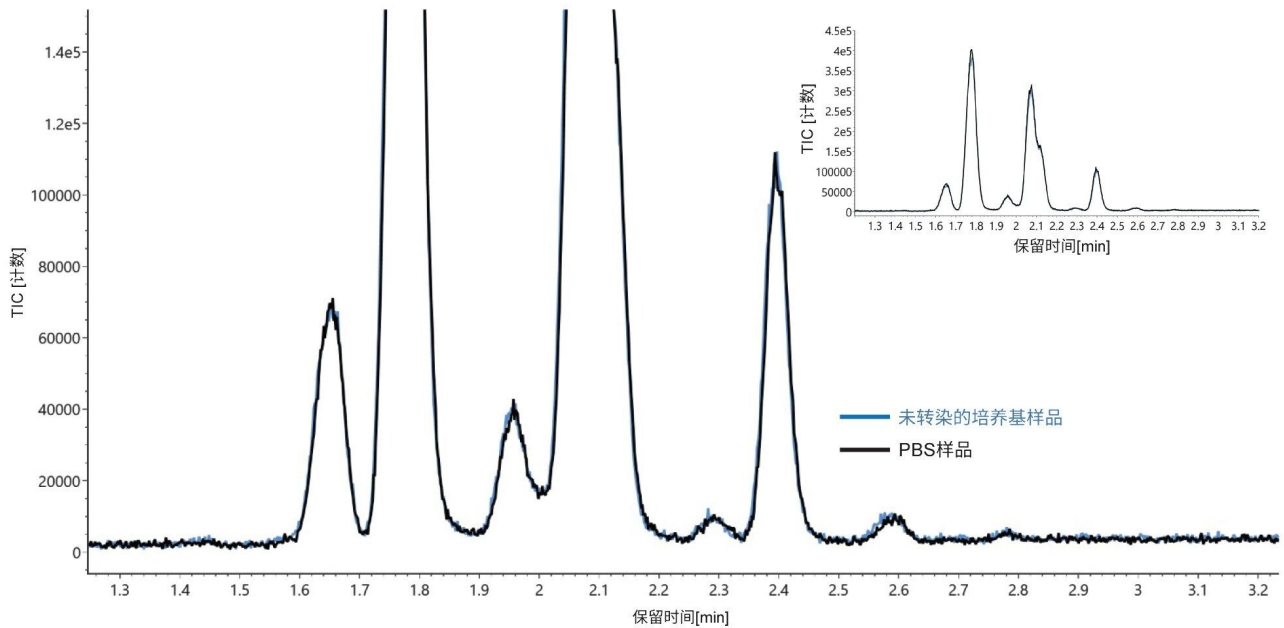


图5.自动透析方案中使用PBS（黑色迹线）和未转染的培养基（蓝色迹线）制备的蛋白A纯化曲妥珠单抗-anns样品释放和标记N-糖的UPLC-MS总离子流色谱图。放大的色谱图y轴经过归一化处理；插图为绝对的全尺寸色谱图。每个样品的总运行时间为五分钟。

使用精确质量筛查工作流程在waters_connect中分析UPLC-MS数据；从糖基科学库中导入15种目标糖基以创建目标列表。此工作流程可以轻松分析高丰度糖基和可能微量存在的免疫原性糖基（即唾液酸化、高甘露糖或无岩藻糖基化糖基）。使用八个分析样品中FA2糖型丰度的相对标准偏差百分比(%RSD)评估了该方案的糖基回收率重现性。计算得出的%RSD为13%，表明该透析方法具有适当的重现性。

用PBS和NTM制备的mAb纯化样品的MS衍生N-糖谱如图6所示。PBS和NTM样品中三种高丰度糖基（FA2、FA2G1和FA2G2）的含量非常相似，并表现出相似的无岩藻糖基化糖基百分比（图6A）。靶向分析三种低丰度糖基：高甘露糖M5、唾液酸化FA2G2S1和二等分FA2BG1。PBS和NTM样品中二等分糖型和唾液酸化糖型的丰度相似。然而，NTM样品中的M5糖型丰度高于PBS样品，如图6B所示，学生t检验(95% CI)证实了这一结果。NTM样品中M5丰度的增加可能是由于蛋白A纯化后样品中残留的痕量宿主细胞糖蛋白所致。值得注意的是，这种UPLC-MS筛查方法可以比较多种样品类型之间的糖谱，甚至能筛查极低丰度(<1%)的糖型。

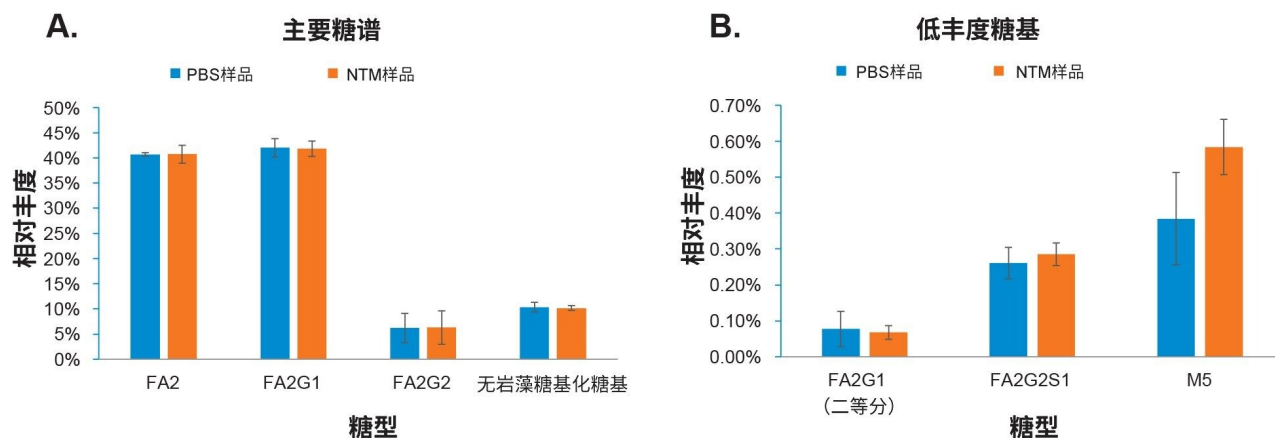


图6.比较使用PBS和NTM制备的曲妥珠单抗-anns纯化样品的UPLC-MS N-糖谱。误差条柱显示95%置信区间($n=4$)。该方法可以比较多种样品类型之间的高丰度和低丰度糖基的N-糖谱。

结论

由于糖基化会影响药物安全性和有效性，因此在药物开发过程中作为一项CQA受到密切监测。快速且耐用的糖基分析方法在生物治疗药物的研究、开发和审批中具有无可估量的价值。在本研究中，我们扩展了Waters GlycoWorks RapiFluor-MS方案的功能，使其能够直接用于蛋白A纯化的mAb。自动透析程序可实现轻松的缓冲液置换或样品浓缩，并以高通量、自动化的方式实现高回收率。此外，自动透析方案产生的N-糖谱与手动QC/自动化支持GlycoWorks RapiFluor-MS方案获得的糖谱一致。当与五分钟UPLC-MS方法结合使用时，该方案可以在三小时内从48个蛋白A纯化样品中制备游离和标记N-糖，在四小时内对这48个mAb样品提供可重现的UPLC-MS糖谱，并定量高丰度和痕量水平的N-糖。重要的是，这种方法适用于在任何缓冲液中以任何浓度制备的样品，无论是否与RFMS相容，并且对其他糖蛋白有潜在用途。

参考资料

- Zhang, P.; Woen, S.; Wang, T.; Liau, B.; Zhao, S.; Chen, C.; Yang, Y.; Song, Z.; Wormald, M. R.; Yu, C.; Rudd, P. M. Challenges of Glycosylation Analysis and Control: An Integrated Approach to Producing

Optimal and Consistent Therapeutic Drugs.*Drug Discovery Today*.2016, 21 (5), 740–765.

2. Reusch, D.; Tejada, M.L. Fc Glycans of Therapeutic Antibodies as Critical Quality Attributes. *Glycobiology*.2015, 25 (12), 1325–1334.
3. Duivelshof, B.L.; Jiskoot, W.; Beck, A.; Veuthey, J.; Guillarme, D.; D' Atri, V. Glycosylation of biosimilars: Recent advances in analytical characterization and clinical implications.*Analytica Chimica Acta*.2019, 1089, 1–18.
4. Zhang, X.; Reed, C. E.; Birdsall, R. E.; Yu, Y. Q.; Chen, W. High-Throughput Analysis of Fluorescently Labeled N-Glycans Derived from Biotherapeutics Using an Automated LC-MS-Based Solution. *SLAS Technology*.2020, 24 (4), 380–387.
5. Lauber, M. A.; Yu, Y.-Q.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Magnelli, P.; Guthrie, E.; Taron, C. H.; Fountain, K. J. Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent That Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection.*Anal.Chem*.2015, 87 (10), 5401–5409.
6. GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒 — 96个样品维护和使用手册 [715004793ZH](#) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134829211&type=USRM>> 沃特世公司 2017年6月.
7. Koza, S. M.; McCall, S. A.; Lauber, M. A.; Chambers, E. E. Quality Control and Automation Friendly GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Sample Preparation.Waters Application note, [720005506](#).May 2020.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007854ZH, 2023年2月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.
[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)