

使用Xevo™ G3 QToF表征mAb生物类似药中的游离N-糖

Kellen DeLaney, Yamin Htet, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

随着越来越多的单克隆抗体(mAb)生物类似药被开发出来,人们亟需精简的表征方法来确保产品投放市场前满足相应的要求。尽管mAb生物类似药的氨基酸序列不变,但它们在糖基化修饰等方面通常存在差异。糖基化会影响免疫原性和其他生物活性,因此表征游离寡糖非常重要。然而,由于游离寡糖丰度低、具有复杂的支链和同分异构结构,分析难度可能相当大。本研究展示了如何结合Xevo G3 QToF质谱仪与GlycoWorks™ RapiFluor-MS™标记、HILIC色谱分离和waters_connect™信息学工具表征一系列游离N-糖。我们使用低能量和高能量MS数据以及荧光检测数据比较了Remicade™(原研药)和Renflexis™(生物类似药)英夫利昔单抗的糖基化图谱。结果表明,使用该工作流程可达到出色的灵敏度并获得结构信息,对N-糖表征很有帮助。

优势

- Xevo G3 QToF质谱仪灵敏度高、专属性强,有助于N-糖表征
- MS^F采集(DIA)功能可以深入评估生物类似药的可比性,并基于高能量碎片离子谱图确认游离寡糖的结构指配
- 使用waters_connect中的精简工作流程深度解析mAb生物类似药的产品差异

简介

随着开发中的单克隆抗体(mAb)生物类似药管线不断增加，人们需要精简的产品属性分析方法来确保生物类似药在相较于原研药的分析可比性方面满足有关要求。必须设法证明生物类似与原研药高度相似，并仔细评估任何差异，才能确保产品安全性和有效性不会受到负面影响。糖基化是一种重要的修饰，可影响免疫原性和其他生物活性¹。这还是一种不同mAb产品间可能存在显著差异的修饰，即使mAb的蛋白质氨基酸序列相同亦如此，其原因是生产工艺和生产药品的细胞系有差异²。全面表征mAb产品中的游离寡糖可提供有关单糖组成和连接的信息，协助实施相关评估。

虽然表征糖基化修饰是确保生物类似药满足相关标准的关键步骤，但它的实施难度可能会很大。造成这个问题的原因在于许多糖型的丰度较低、缺少适合光学检测的发色团，以及存在复杂的支链和同分异构结构。本研究展示了如何使用Xevo G3 QTof质谱仪表征mAb药品中的游离N-糖，以足够高的灵敏度进行可比性评估。除了测定游离寡糖母离子的准确质量数之外，本研究还利用了通过碰撞诱导碎裂采集到的丰富结构信息，以及在线荧光检测器获得的相对定量数据。

本研究利用GlycoWorks RapiFluor-MS实现了高分离度的HILIC色谱分离、高灵敏度的荧光检测以及出色的MS电离效率³。游离寡糖样品由Andrew+™移液机器人使用GlycoWorks RapiFluor-MS自动化试剂盒制备而成，然后在ACQUITY™ Premier LC系统与在线ACQUITY FLR和Xevo G3 QTof检测器组成的联用系统上进行HILIC UPLC分离。实验生成了英夫利昔单抗原研药(Remicade)和一款已获批的生物类似药(Renflexis)的游离N-糖谱。该分析确认了生物类似药相较于原研药在糖变体模式方面的几点差异，并且成功为这些差异指配了专属结构，这是建立令人信服的生物相似性证据的重要一步。

实验

样品描述

由Andrew+移液机器人按照GlycoWorks RapiFluor-MS (RFMS)自动化方案制备英夫利昔单抗原研药(Remicade)和一款已获批生物类似药(Renflexis)的酶解游离寡糖样品⁴。从每个样品中取2 μL标记的游离寡糖（来自约0.5 μg mAb）进样至色谱柱。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier BSM UPLC
检测:	ACQUITY Premier FLR检测器 ($\lambda_{\text{激发}}=265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=425 \text{ nm}$, 2 Hz)
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery™样品瓶 (P/N: 186009186)
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH™ Amide游离寡糖分析专用 柱(1.7 μm , 130 Å, 2.1 × 150 mm, P/N: 186009524)
柱温:	60 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	2 μL
流动相A:	50 mM甲酸铵溶液(pH 4.4), 使用Waters™甲酸铵 溶液 - 用于游离寡糖分析 (P/N: 186007081) 制 备而成
流动相B:	乙腈

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.400	25	75	6
35.00	0.400	46	54	6
36.50	0.200	80	20	6
39.50	0.200	80	20	6
43.10	0.200	25	75	6
47.60	0.400	25	75	6
55.00	0.400	25	75	6

质谱条件

质谱系统:	Xevo G3 QTof
电离模式:	ESI, 正离子
采集范围:	100~2000 <i>m/z</i>
毛细管电压:	3.0 V
碰撞能量:	低能量: 6 V 高能量梯度: 15~40 V
锥孔电压:	40 V
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	300 °C
锥孔气流速:	35 L/h

脱溶剂气流速： 800 L/h

智能数据捕获(IDC)设置： 低(5)

数据管理

使用集成了UNIFI™应用程序（3.1.0.16版）的waters_connect信息学平台采集和处理数据。使用游离寡糖FLR和MS确认工作流程鉴定各样品中的游离寡糖。然后使用鉴定出的游离寡糖汇编列表，遵循准确质量数筛查工作流程重新处理相同的数据，协助比较原研药与生物类似药。

结果与讨论

评估生物相似性时，在糖变体图谱中发现任何差异都会催生快速鉴定候选生物类似药中检测到的任何其他物质的需求。此外，确认这些图谱的丰度差异是由两个样品中的相同物质引起也同样重要，这能有效地重新启动产品表征工作。要表征mAb样品中的游离寡糖，所用方法必须有足够高的灵敏度，能够检测复杂的标记游离寡糖混合物中的低丰度N-糖型，从而明确指配每种结构的单糖组成和连接。如果使用GlycoWorks RapiFluor-MS标记游离寡糖，一方面可采用荧光检测器进行高灵敏度的光学检测，实现全面的游离寡糖谱定量，另一方面，母离子和碎片离子准确质量数数据可提供有关游离寡糖单糖组成和结构的信息。

图1所示为这两种检测器获得的丰富信息，包括荧光检测器采集的色谱图，还包括低碰撞能量和高碰撞能量MS通道采集的色谱图，这些通道可生成指定峰的母离子和碎片离子质谱图（DIA模式）。结合基于葡萄糖单位的校准保留时间值和比对综合游离寡糖数据库搜索到的MS1质量数确认结果，这些数据可用于游离寡糖谱的常规分析和准确确认。此类应用通常会结合使用UNIFI中的FLR + 质量数确认工作流程与Waters RFMS游离寡糖GU数据库，该数据库收录了177种N-糖，涵盖mAb样品中的常见结构⁵。根据这些信息可以可靠地指配游离寡糖结构，测量mAb药品的糖谱。此工作流程在之前的一篇应用纪要中有更详细的讨论，该应用纪要比较了英夫利昔单抗原研药和生物类似药⁶。

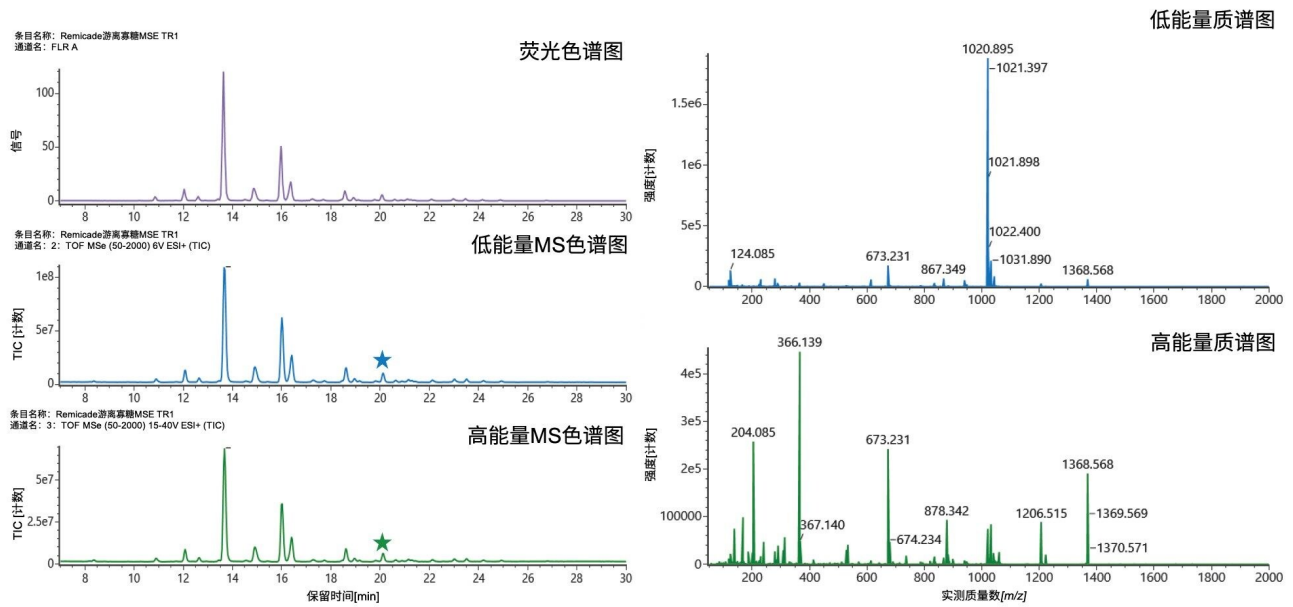


图1.游离N-糖数据，包括荧光检测器色谱图以及低能量MS和高能量MS色谱图（左），还包括星号所指示的唾液酸化游离寡糖FA1G1NeuGc1峰的低能量和高能量质谱图（右）。

图2显示了原研药（Remicade，蓝色迹线）和生物类似药（Renflexis，红色迹线）的TIC色谱图叠加图。从叠加色谱图中可以明显看出，这两种mAb产品之间存在诸多差异。色谱图中标记出了一些值得注意的游离寡糖和它们的GU + 质量数指配结构，这些游离寡糖只在其中一种mAb中检出，或者在两种mAb中的丰度有差异。有趣的是，在观察到差异的游离寡糖中，许多都是在HILIC分离中较晚洗脱的唾液酸化游离寡糖。我们还观察到一些非唾液酸化结构也存在差异，例如高甘露糖游离寡糖（M5和M6）的存在及丰度差异，以及单天线(A1)和双天线(A2) α -半乳糖基化游离寡糖的丰度差异。

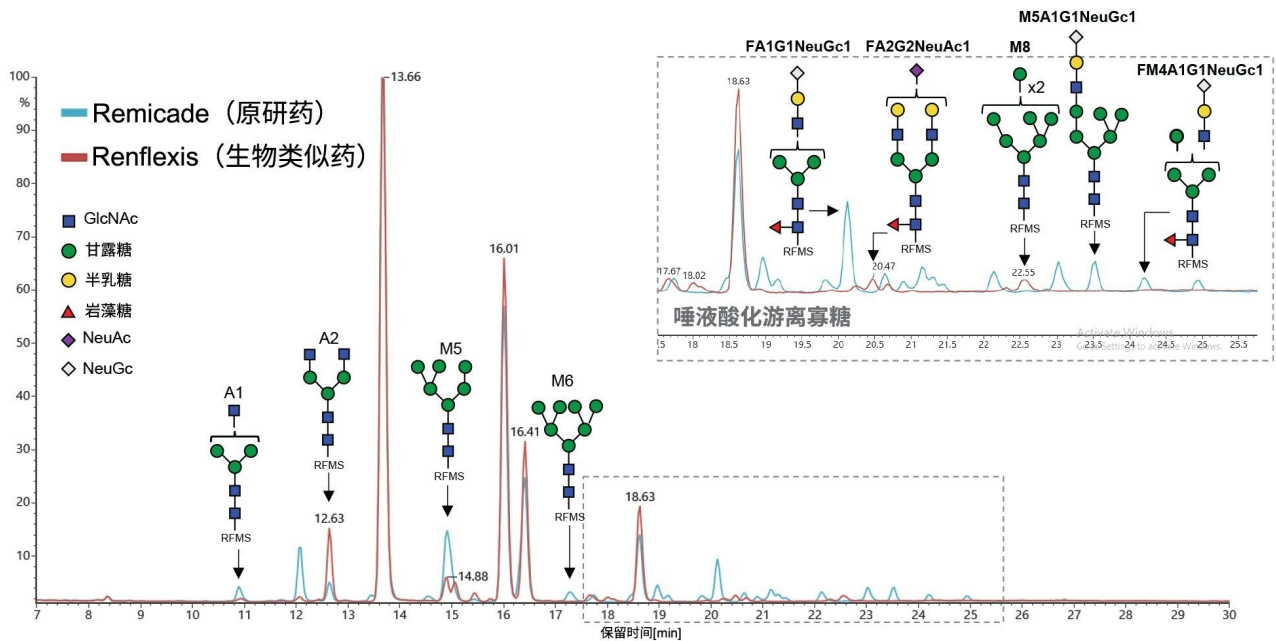


图2.一种英夫利昔单抗原研药(*Remicade*)和一种英夫利昔单抗生物类似药(*Renflexis*)游离N-糖分析的TIC色谱图叠加图。这两个样品中的某些游离寡糖之间存在一定差异，要么是某些游离寡糖只存在于其中一个样品中，要么是游离寡糖的相对丰度有差异，图中标出了这些游离寡糖及其结构。

除了观察MS1 TIC色谱图中的差异外，我们还可以从数据非依赖型采集(DIA, MS^E)模式下得到的高能量质谱图中获取有用信息。MS^E模式交替采集低碰撞能量和高碰撞能量下的质谱图，捕获样品中所有组分的母离子和碎片离子数据。这种采集方法使用户能够通过高能量质谱图获取有关特征碎片离子的信息。例如，唾液酸的两种主要形式NeuAc和NeuGc分别具有不同的质量数291.095和307.090。

在高能量通道中生成这些碎片离子的提取离子流色谱图，可轻松揭示每个样品中的唾液酸化游离寡糖谱。图3显示了Remicade和Renflexis的NeuGc（左）和NeuAc（右）特征氧鎗离子的提取离子流色谱图。从图中可以明显看出Remicade含有更多的NeuGc游离寡糖，而Renflexis含有更多的NeuAc游离寡糖。这种差异在预期内，因为这两种mAb来源于不同的细胞系，Remicade来自鼠源细胞系，Renflexis则来自中国仓鼠鼠卵巢细胞系。但是，确认这些差异非常重要，因为它们可能会影响药品的免疫原性、PK和受体相互作用。

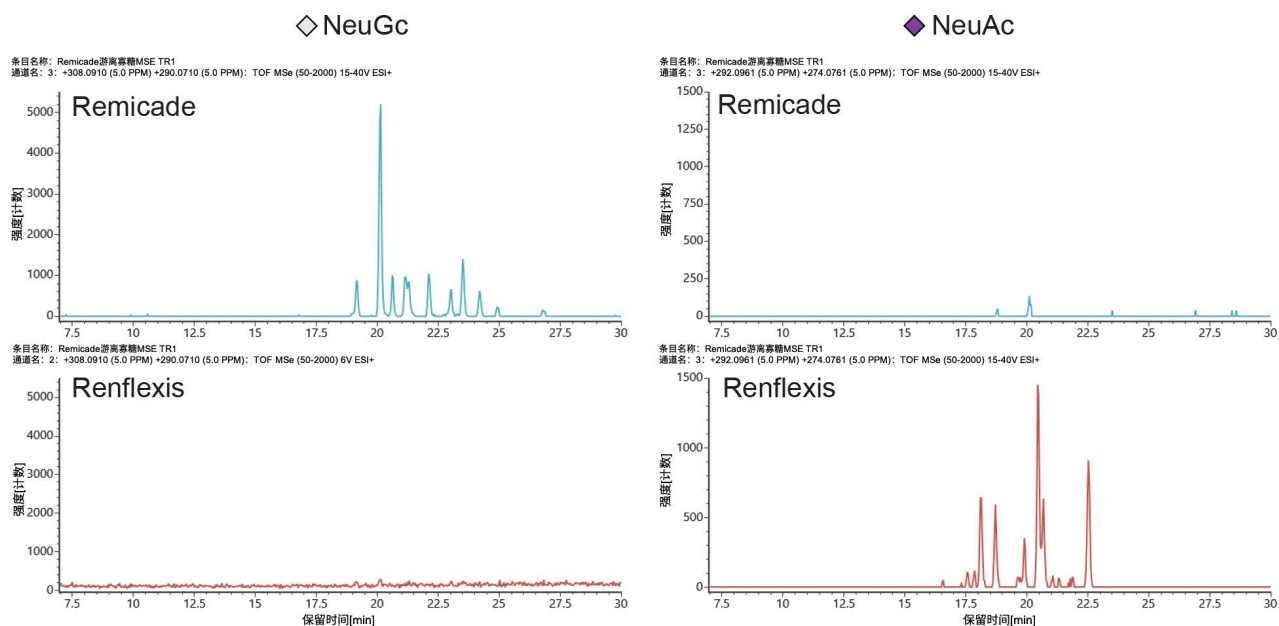


图3.分析两个英夫利昔单抗样品得到的NeuGc (308.091 m/z)和NeuAc (292.096 m/z)特征碎片离子的高能量MS通道 (MS^E)提取离子流色谱图。

高能碎片离子谱图还可用于进一步确认样品中已指配的游离寡糖。虽然指配立体化学结构要用到离子淌度或NMR等其他技术，但该平台可以验证单糖单元和糖苷结构连接的存在。为了从高能谱图中获得丰富的碎片离子信息，我们需要优化碰撞能量，以便能够观察到单糖单元碎裂，但又不会因过度碎裂而导致谱图复杂化或模糊重要信息。本研究发现理想的碰撞能量梯度为15~40 V。

值得一提的是，由于RFMS游离寡糖标记显著增强了电离，因此碎裂模式优先从带有RFMS的末端延伸，简化了结构解析。图4中的上图为N-糖M5A1G1NeuGc1的示例 MS^E 高能谱图。M5A1G1NeuGc1是一种杂化唾液酸化N-糖结构，只存在于原研药中，不存在于生物类似药中。尽管这种N-糖在TIC色谱图中的相对丰度较低（约1.4%），但高能谱图中有足够多的碎片离子用于建立游离寡糖结构。图中标记了几种关键的碎片离子及其匹配结构，显示出指向单糖连接的碎裂。

如果样品较为复杂，色谱图中存在多种共流出物质，则数据依赖型采集(DDA)可以提供更清晰的碎片离子谱图，因为每种母离子都会单独分离出来进行碎裂。图4中的下图是一种复杂唾液酸化N-糖结构(FA2G2NeuAc)的DDA示例谱图，这种物质的丰度较低（约1%），且只存在于生物类似药Renflexis中。事实证明，在结构不明确的情况下，这些碎片离子数据对确认指配结果很有帮助，因为异构体游离寡糖对生物治疗产品的活性和安全性可能产生截

然不同的影响。

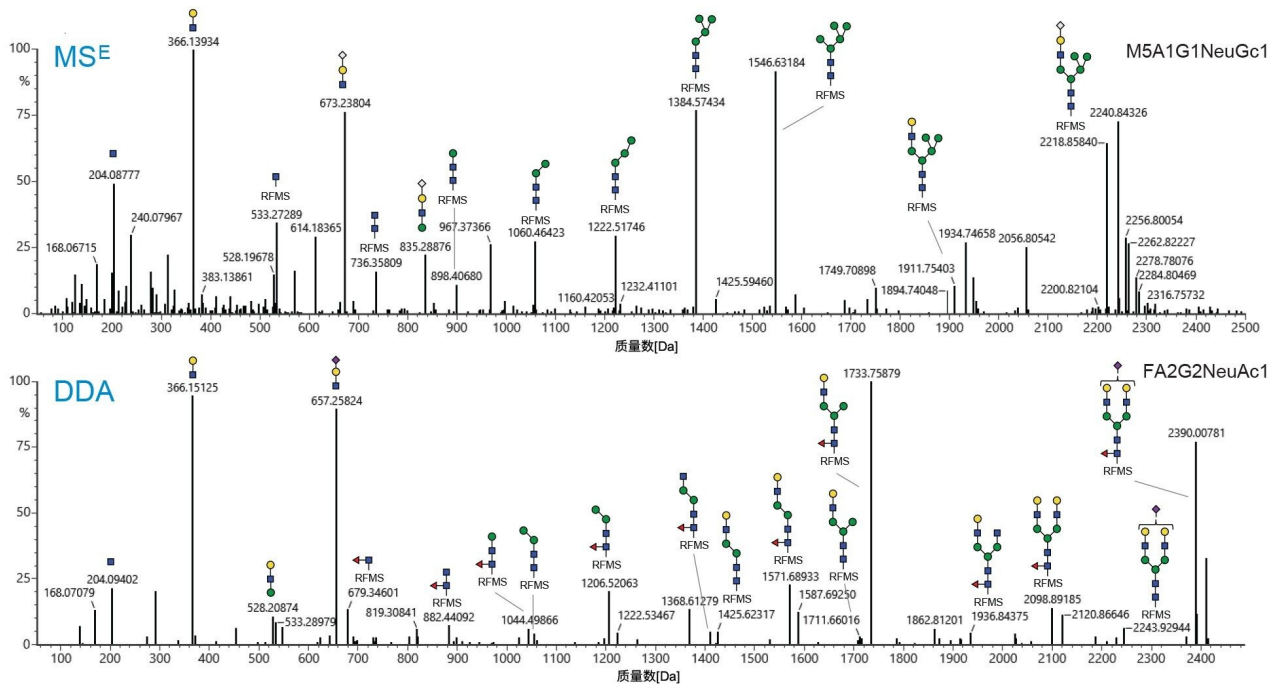


图4.去卷积高能MS谱图，显示了两种RFMS标记的唾液酸化游离寡糖的碎片离子，即Remicade中的M5A1G1NeuGc1（上图）和Renflexis中的FA2G2NeuAc1（下图）。上图为启用MS^E碎裂采集到的谱图，下图为DDA碎裂方法采集到的谱图。显示结构连接信息的碎片离子标有相应的结构。

结论

如果观察到不同批次的分子之间或者原研药与生物类似药之间存在糖变体图谱差异，则需要进行一定程度的扩展产品表征来评估这些差异的潜在影响。表征mAb糖基化修饰对于确保mAb产品与原研药的生物相似性非常重要，但由于游离寡糖的结构多样性，这个过程实施起来可能会很有挑战性。由ACQUITY Premier UPLC、在线ACQUITY FLR和Xevo QToF检测器组成的联用系统可提供定量图谱和RFMS标记游离寡糖的结构信息，协助表征mAb产品生成的游离寡糖，从而全面比较原研药与生物类似药。高能MS^E采集或靶向MS/MS采集产生的碎片离子谱图能够为用户额外提供更多详细信息，用于确认游离寡糖组成和结构指配结果。这套使用Xevo QToF MS的工作流程具有出色的灵敏度和专属性，可用于表征mAb的糖基化修饰图谱，即使糖变体的检出丰度较低也能准确表

征。

参考资料

1. Faid V, Leblanc Y, Berger M, Seifert A, Bihoreau N, Chevreux G. C-terminal Lysine Clipping of IgG1: Impact on Binding to Human FcγRIIIa and Neonatal Fc Receptors. *Eur J Pharm Sci.* 2021 Jan, 159, 105730.
2. Zhang P, Woen S, Wang T, Liao B, Zhao S, Chen C, Yang Y, Song Z, Wormald MR, Yu C, Rudd PM. Challenges of Glycosylation Analysis and Control: An Integrated Approach to Producing Optimal and Consistent Therapeutic Drugs. *Drug Discovery Today.* 2016, 21 (5), 740–765.
3. Lauber M, Yu YQ, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Magnelli P, Guthrie E, Taron CH, Fountain KJ. 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.
4. Lambert P, Cullen D, Davey L, Koza SM, Reed C, Lauber MA, Fournier JL. Robust Automated High-Throughput N-Glycan Analysis Using the GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit for Automation. Waters Application Note. [720006194](#). February 2018.
5. Yu YQ. Released N-linked Glycan Analysis Using the Glycan Application Solution with UNIFI. Waters Technology Brief. [720005598](#). January 2016.
6. DeLaney K, Htet Y, Yu YQ. 使用BioAccord™ LC-MS系统比较mAb生物类似药物产品中的游离N-糖. 沃特世应用纪要. [720008041ZH](#). 2023年10月.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo G3 QToF <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>>

[ACQUITY UPLC FLR检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/10195515>](https://www.waters.com/10195515)

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

720008084ZH, 2023年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)