

利用*Rapi*Fluor-MS标记通过荧光和质谱检测技术监测不同的N-糖结构

Eoin F.J. Cosgrave, Robert E. Birdsall, Sean M. McCarthy

Waters Corporation

摘要

在本应用纪要中，我们将*Rapi*Fluor-MS与UPLC-FLR-MS相结合，用于监测特性、质量和相对丰度各不相同的标记游离寡糖。

糖基化修饰是大多数治疗性蛋白质既复杂又关键的一个方面，我们必须对其进行准确表征。一般来说，N-糖谱图都被视作一项关键品质属性，因此是整个产品生命周期中都要监测的一项属性。如本应用纪要所述，利用GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-糖分析试剂盒制备样品可大大缩短样品制备时间并简化制备过程。

此外，采用*Rapi*Fluor-MS可获得更高的FLR灵敏度，同时大幅提升MS灵敏度。得益于*Rapi*Fluor-MS标记技术对游离寡糖MS检测灵敏度的提升，分析人员现在可以应用ACQUITY QDa进行质谱检测，从而提升在生物制药开发过程中对各种结构进行峰监测时的可信度。

总而言之，*Rapi*Fluor-MS标记与通过ACQUITY UPLC H-Class Bio系统和ACQUITY QDa质谱检测器实现的HILIC-FLR-MS检测相结合，为监测生物治疗药物的N-糖谱图提供了一套卓越的解决方案。

优势

- 缩短游离N-糖分析的样品制备时间

- 获得每个峰的荧光和质谱检测数据，提高游离寡糖监测的可信度

简介

糖基化修饰是蛋白类生物治疗药物最复杂的翻译后修饰之一。糖基化治疗药物的疗效与糖基化分布直接相关。多余的结构可能会对药物的PK/PD特性产生有利或不利的影 响，而且与免疫反应相关。因此，糖基化修饰通常被视为一项关键品质属性(CQA)。在药物开发过程中，我们要对候选分子的糖基化分布进行深入研究和表征。然后在整个工艺开发、产品商业化以及批准后研究中对药物特征进行监测，以确保产品疗效和安全性。

本应用纪要介绍了一种利用*RapiFluor*-MS标记游离N-糖并采用配备荧光(FLR)检测器和ACQUITY QDa质谱检测器的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统分析标记N-糖的精简方法。采用这一全新的监测工作流程，研究人员在30 min内即可完成UPLC-FLR/MS分析的糖蛋白样品制备过程。除了能够缩短样品制备时间，*RapiFluor*-MS与2-AB相比，能够将荧光响应提高14倍，同时将MS响应提高160倍。这些改进使得研究人员能够将FLR检测和通过ACQUITY QDa实现的质谱检测应用到常规分析中。在本应用纪要中，我们将*RapiFluor*-MS与UPLC-FLR-MS相结合，用于监测特性、质量和相对丰度各不相同的标记游离寡糖。

实验

液相条件

LC系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测器：	ACQUITY UPLC FLR检测器和ACQUITY QDa质谱检测器
色谱柱：	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm

柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	2 µL
数据管理：	Empower 3 FR2 CDS

FLR设置

数据采集速率：	5 pts/s
激发波长：	265 nm
发射波长：	425 nm

QDa设置

采样速率：	5 pts/s
质量范围：	500~1250 Da
锥孔电压：	15 V
毛细管电压：	1.5 kV
探头温度：	500 °C
电离模式：	ESI+
流动相A：	乙腈（Pierce，LC-MS级）

流动相B:	50 mM甲酸铵, pH 4.4 (LC-MS级, 沃特世甲酸铵浓缩液)
流动相C:	乙腈 (LC-MS级)
流动相D:	乙腈 (LC-MS级)

梯度

时间	流速(mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始	0.4	75	25	0	0
35	0.4	54	46	0	0
36.5	0.2	0	100	0	0
39.5	0.2	0	100	0	0
42.5	0.2	75	25	0	0
47.4	0.4	75	25	0	0
55	0.4	75	25	0	0

使用随附于GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒（部件号176003606）中的沃特世完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号186006552）制备小鼠IgG1 mAb N-糖样品。另外，使用核糖核酸酶B和牛胎球蛋白(Sigma Aldrich)制备N-糖样品。使用GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒，按照《维护和使用手册》(715004793)中提供的方案制备游离和标记N-糖混合样品。完成释放和标记步骤之后，使用CentriVap干燥样品，并复溶于25 µL乙腈/水/DMF混合物中（比例为22.5%:55.5%:22%）。每个示例中，目标载样量均为30 pmol游离寡糖。使用沃特世甲酸铵浓缩液（部件号186007081）配制甲酸铵流动相。

结果与讨论

N-糖基化修饰根据蛋白质和表达系统不同，可产生大小、电荷和支化程度不同的多种游离寡糖结构。为了评估ACQUITY QDa检测质量范围以内及超出其质量范围的游离寡糖的能力，我们选择了三种糖蛋白（人源IgG、核糖核酸酶B和牛胎球蛋白），代表从中性双天线结构到四唾液酸化结构的常见游离寡糖。使用Rapid PNGase F释放各种蛋白质的N-糖，并按照试剂盒提供的样品制备方案用*RapiFluor*-MS标记样品。通过UPLC-HILIC分离标记的游离寡糖，并使用ACQUITY FLR和ACQUITY QDa两种检测器进行检测。

由图1可以明显看出，采用单一梯度方法就使得所有游离寡糖结构成功实现了色谱分离。此外，在荧光检测谱图（上图）中观察到的所有游离寡糖结构都能在ACQUITY QDa质谱检测器谱图（下图）中观察到，说明ACQUITY QDa能够检测结构和属性各不相同的多种*RapiFluor*-MS标记游离寡糖，而电离效率较低的传统标记技术是无法获得这样的结果的。

利用质谱检测能够观察到游离寡糖结构这一点固然有用，了解所得谱图的质量以及谱图中游离寡糖离子的电荷态也十分重要。为了掌握这方面的信息，我们对特性各异的多个游离寡糖峰进行了积分，并使用FLR积分数据测定了每个样品中不同物质的相对丰度。图2所示的谱图证明，ACQUITY QDa能够为特性和质量不同的多种游离寡糖结构生成高质量谱图。该数据还证明，高丰度及低丰度游离寡糖结构均可轻松检出。我们的数据表明，即使是荧光谱图中丰度低至0.5%的结构，ACQUITY QDa质谱检测也可生成高质量谱图，展现了ACQUITY QDa质谱检测与*RapiFluor*-MS的高电离效率优势相结可实现的灵敏度提升。另外利用*RapiFluor*-MS游离寡糖结构的电荷态，可以使小型结构（如A2）以及极大型的结构（如四唾液酸化A3G3S4）被QDa顺利检出。

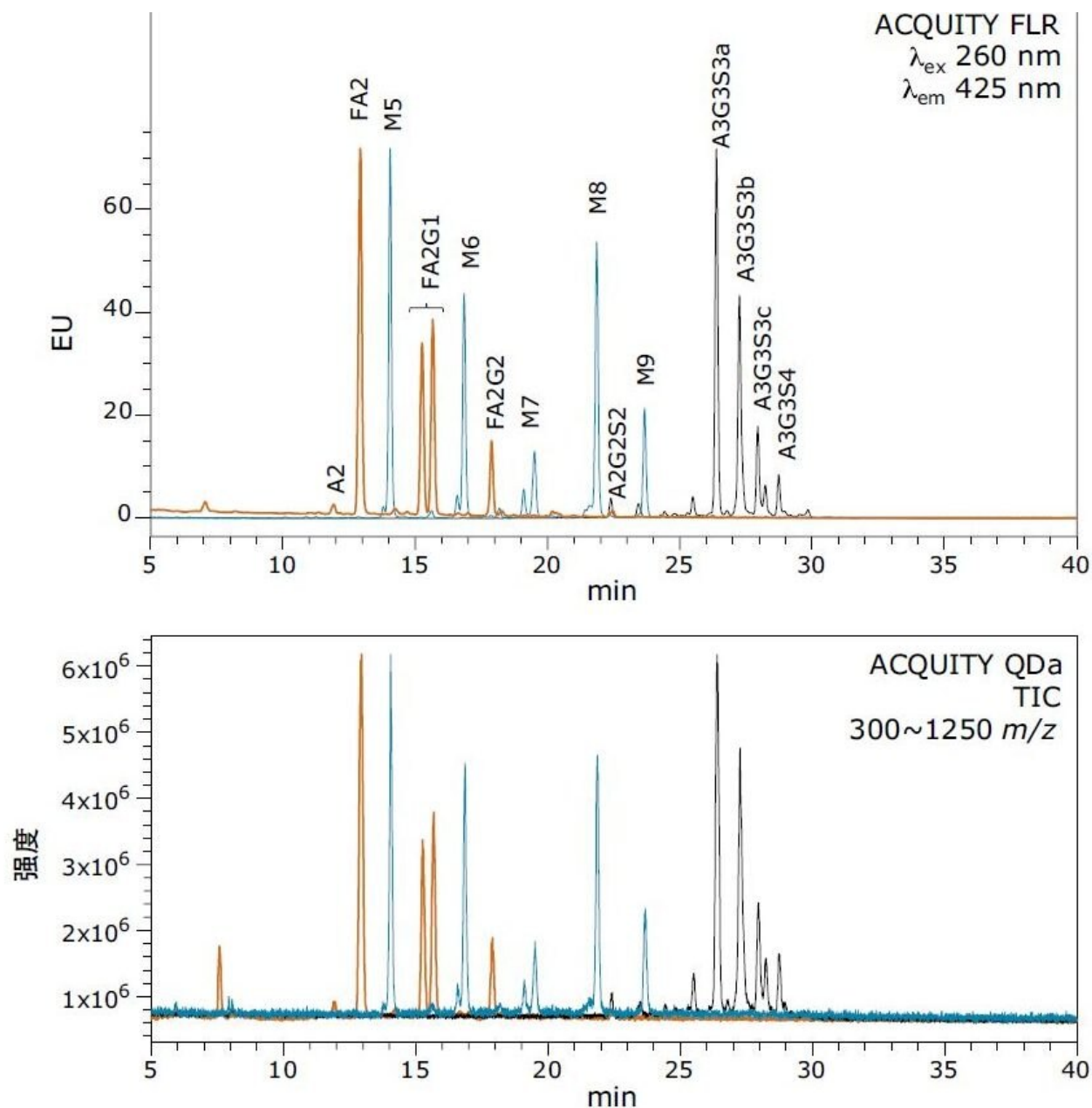


图1.ACQUITY QDa能够检出一系列RapiFluor-MS标记的N-糖。使用Rapid PNGase F从人源IgG（红色迹线）、核糖核酸酶B（黑色迹线）和牛胎球蛋白（蓝色迹线）中释放游离寡糖，然后使用RapiFluor-MS试剂进行标记。然后通过HILIC分离各个游离寡糖混合样品，接着分别通过荧光(A)和质谱检测(B)技术进行检测。

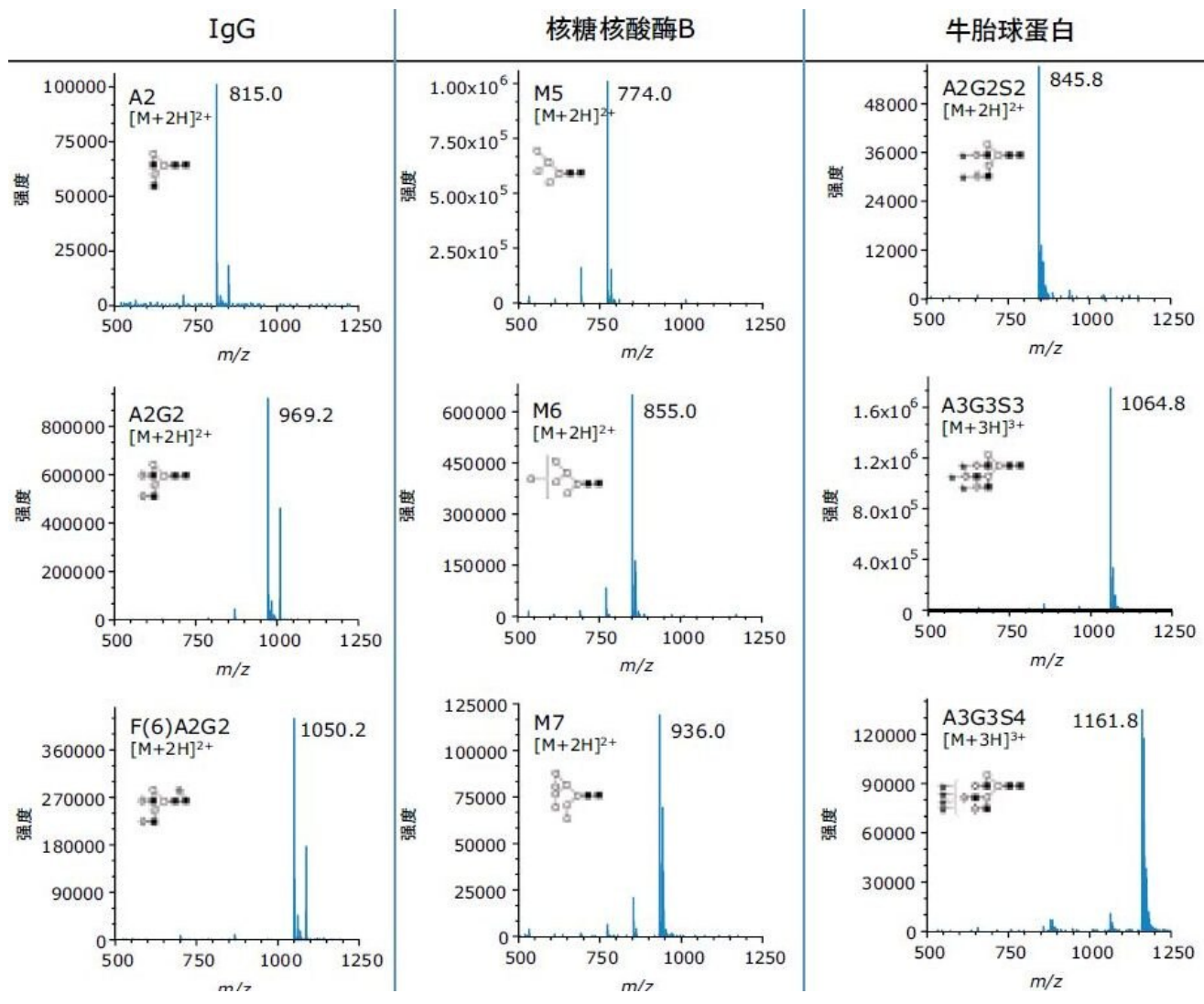


图2.利用ACQUITY QDa质谱检测器检测选定RapiFluor-MS标记游离寡糖所得的谱图。使用Rapid PNGase F释放小鼠IgG1 mAb、核糖核酸酶B和牛胎球蛋白中的游离寡糖，并用RapiFluor-MS试剂进行标记。图中所示为图1分离出的游离寡糖结构中几种结构的代表性谱图。

结论

糖基化修饰是大多数治疗性蛋白质既复杂又关键的一个方面，我们必须对其进行准确表征。一般来说，N-糖谱图

都被视作一项关键品质属性，因此是整个产品生命周期中都要监测的一项属性。如本应用纪要所述，利用 GlycoWorks *RapiFluor*-MS N-糖分析试剂盒制备样品可大大缩短样品制备时间并简化制备过程。此外，采用 *RapiFluor*-MS 可获得更高的 FLR 灵敏度，同时大幅提升 MS 灵敏度。得益于 *RapiFluor*-MS 标记技术对游离寡糖 MS 检测灵敏度的提升，分析人员现在可以应用 ACQUITY QDa 进行质谱检测，从而提升在生物制药开发过程中对各种结构进行峰监测时的可信度。总而言之，*RapiFluor*-MS 标记与通过 ACQUITY UPLC H-Class Bio 系统和 ACQUITY QDa 质谱检测器实现的 HILIC-FLR-MS 检测相结合，为监测生物治疗药物的 N-糖谱图提供了一套卓越的解决方案。

特色产品

720005353ZH, 2015年3月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.