

采用大孔径酰胺键合固定相开发完整糖基化蛋白的高分离度HILIC方法

Matthew A. Lauber, Scott A. McCall, Bonnie A. Alden, Pamela C. Iraneta, Stephan M. Koza

Waters Corporation

摘要

亲水作用色谱(HILIC)已经作为一种分离强极性化合物的工具得到广泛应用,并且已经成为一种较为普遍的小分子分离技术。相比之下,即使HILIC的分离选择性在某些情况下(如在糖基化蛋白质的表征中)具有很大价值,HILIC在大分子方面的应用仍相对有限。

分析蛋白糖基的一种典型方法是通过酶或化学方法将其从对应蛋白质中释放出来,然后采用HILIC进行色谱分离。以经过优化的亚2 μm 酰胺键合固定相为基础的UPLC型分离通过提高分离速度与分离度,彻底颠覆了游离蛋白糖基的HILIC分离。

为了在糖基仍连接在对应蛋白质上时对其进行分析,我们在本应用纪要中介绍了一种经过优化的HILIC色谱柱及相应方法,用于分离质量数范围介于10~150 kDa之间的完整糖蛋白和消化糖蛋白的糖型。研究采用了大孔径(300Å)酰胺键合有机硅(亚乙基桥杂化,BEH)固定相。

与采用反相分离法分离不同疏水性的蛋白质异构体一样,本文研究了使用BEH Amide 300Å的HILIC分离法分离具有不同亲水性的蛋白质异构体,例如糖基占据不同的异构体。

有了这些新的分离能力,未来我们可以将HILIC与光学检测或ESI-MS相结合,对完整糖蛋白进行更为详细的表征。

优势

- 通过优化固定相（键合相与孔径）、离子对、色谱柱增压以及进样方法改善完整蛋白质糖型的HILIC分离。
- 采用MS兼容的HILIC实现对样品成分的详细研究。
- 具备常规反相(RP)分离的正交选择性，可增强糖蛋白样品的表征能力。
- 通过糖蛋白分离对BEH Amide, 300Å, 1.7 μm糖蛋白分析专用柱固定相进行QC测试，确保批次间重现性保持一致。

简介

亲水作用色谱(HILIC)已经作为一种分离强极性化合物的工具得到广泛应用。事实上，它已经成为一种较为普遍的小分子分离技术。相比之下，即使HILIC的分离选择性在某些情况下（如在糖基化蛋白质的表征中）具有很大价值，HILIC在大分子方面的应用仍相对有限。分析蛋白糖基的一种标准方法是通过酶或化学方法将其从对应蛋白质中释放出来，然后采用HILIC进行色谱分离。以经过优化的亚2 μm酰胺键合固定相为基础的UPLC型分离通过提高分离速度与分离度，彻底颠覆了游离蛋白糖基的HILIC分离¹⁻²。尽管游离糖基分析是一种黄金标准方法，但一直以来它都需要冗长而繁琐的样品制备技术。虽然最近推出的GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒能够弥补多数不足³，但在有些情况下仍需要研究表征糖基化蛋白的替代方法⁴⁻⁶，例如在需要阐明修饰位点时⁷。

为了在糖基仍连接在对应蛋白质上时即对其进行补充分析，我们推出了经优化的HILIC固定相及相应方法用于分离完整糖蛋白和消化糖蛋白的糖型。研究采用大孔径(300Å)酰胺键合有机硅（亚乙基桥杂化，BEH）⁸固定相和精心开发的方法，实现了对质量范围为10~150 kDa的完整蛋白质糖型前所未有的出色分离。

实验

样品描述

将糖蛋白性能测试标准品（牛核糖核酸酶A和核糖核酸酶B的混合物，部件号186008010）与核糖核酸酶B (Sigma R7884)复溶于18.2 MΩ的水中制成浓度为2 mg/mL的溶液。用水将浓度为21 mg/mL的曲妥珠单抗稀释至2 mg/mL的浓度。

将一瓶糖蛋白性能测试标准品(100 μg)中的组分溶于25 μL的0.1%三氟乙酸(TFA)和80%乙腈(ACN)中，制得的4

mg/mL蛋白质溶液可用于色谱柱平衡。

为了研究糖基占据异构体的分离度，实验人员使用以下技术对完整单克隆抗体质量数检查标准品（部件号 186006552）进行糖基释放。将糖蛋白(15 µg)复溶于28.2 µL的1% (w/v) *RapiGest* SF表面活性剂和50 mM HEPES (pH 7.9)溶液中，使糖蛋白浓度为0.52 mg/mL。在3分钟内将这一溶液加热至90 °C并冷却至50 °C，然后与1.2 µL GlycoWorks Rapid PNGase F溶液混合。将样品在50 °C下温育5 min，以完成糖基释放。仅用PNGase F将完整单克隆抗体质量数检查标准品在50 °C下温育5 min而不经过热辅助预变性，即可产生部分糖基释放。

方法条件（除非另有说明）

色谱柱平衡

全新（之前未使用过的）ACQUITY UPLC BEH Amide, 300Å, 1.7 µm糖蛋白分析专用柱在分析实际待测样品之前，应通过40 µg糖蛋白性能测试标准品（进样量10 µL，溶于0.1% TFA和80% ACN中，浓度为4 mg/mL）或结合这款色谱柱曾经采集过的等量待测样品的两次连续进样与分离来进行平衡。图2所示的分离可用于与糖蛋白性能测试标准品结合进行平衡。

液相条件

LC系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统
样品温度：	5 °C
分析柱柱温：	30 °C（除非标题中另有注明）
UV检测条件：	214/280 nm，2 Hz
荧光检测条件：	激发波长280 nm/发射波长320 nm，10 Hz
流速：	0.2 mL/min
进样体积：	≤1 µL（水相稀释剂）。注：由于蛋白质在室温条件下有沉淀的倾向，因此某些样品可能需要避免高有机含量的稀释剂。在不对色谱性能造成负面影响

的前提下，一根2.1 mm内径色谱柱最多可承受1.2 μL的水相进样。

色谱柱：

ACQUITY UPLC BEH Amide 300Å 1.7 μm,
2.1 × 150 mm糖蛋白分析专用柱（配备糖蛋白性能
测试标准品）；

ACQUITY UPLC BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x
100 mm糖蛋白分析专用柱（配备糖蛋白性能测试
标准品）；

ACQUITY UPLC BEH HILIC, 130Å, 1.7 μm, 2.1 x
150 mm；

XBridge BEH HILIC, 130Å, 5 μm, 2.1 x 150 mm；

ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 μ
m, 2.1 x 150 mm；

ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1.7 μ
m, 2.1 x 100 mm

竞争产品色谱柱：

PolyHYDROXYETHYL A, 300Å, 3 μm, 2.1 x 100
mm；

Glycoplex A, 3 μm, 2.1 x 100 mm； ZORBAX.
RRHD 300-HILIC, 300Å, 1.8 μm, 2.1 x 100 mm；

Halo PentaHILIC, 90Å, 2.7 μm, 2.1 x 100 mm；

SeQuant ZIC-HILIC, 200Å, 3.5 μm, 2.1 x 100
mm；

Accucore Amide, 150Å, 2.6 μm, 2.1 x 100 mm；

TSKgel Amide-80, 80Å, 3 μm, 2.0 x 100 mm

色谱柱接头（用于串联150 mm色谱柱）：

0.005 x 1.75 mm UPLC SEC连接管路

样品瓶：聚丙烯材质12×32 mm，300 μL
螺纹口样品瓶

用于演示HILIC分离技术进展的梯度（图1）：

色谱柱尺寸：2.1 × 150 mm

流动相A：0.1% (v/v) TFA水溶液

流动相B：0.1% (v/v) TFA乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
0	20	80	6
20	80	20	6
21	20	80	6
30	20	80	6

用于核糖核酸酶B HILIC分离的集中梯度（图2和图5）：

色谱柱尺寸：2.1 × 150 mm

流动相A：0.1% (v/v) TFA水溶液

流动相B：0.1% (v/v) TFA乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
0	20	80	6
1	34	66	6
21	41	59	6
22	100	0	6
24	100	0	6
25	20	80	6
35	20	80	6

基准/评估梯度（图3）

色谱柱尺寸：2.1 × 150 mm

流动相A：0.1% (v/v) TFA水溶液

流动相B：0.1% (v/v) TFA乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
0.0	20	80	6
0.7	30	70	6

时间(min)	%A	%B	曲线
29.3	45	55	6
30.0	80	20	6
31.3	80	20	6
32.0	20	80	6
40.0	20	80	6

用于选择流动相添加剂的梯度（图4）：

色谱柱尺寸：	2.1 × 150 mm
流动相A：	0.1% (v/v) TFA水溶液或50 mM甲酸铵，pH 4.4或 0.5% (w/v)甲酸水溶液
流动相B：	乙腈

时间(min)	%A	%B	曲线
0	20	80	6
20	80	20	6
21	20	80	6

时间(min)	%A	%B	曲线
-------------	----	----	----

30	20	80	6
----	----	----	---

用于核糖核酸酶B反相分离的集中梯度（图6）：

色谱柱尺寸：2.1 × 150 mm

流动相A：0.1% (v/v) TFA水溶液

流动相B：0.1% (v/v) TFA乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
-------------	----	----	----

0	95	5	6
---	----	---	---

1	74.5	25.5	6
---	------	------	---

21	67.5	32.5	6
----	------	------	---

22	10	90	6
----	----	----	---

24	10	90	6
----	----	----	---

25	95	5	6
----	----	---	---

35	95	5	6
----	----	---	---

用于完整曲妥珠单抗的集中梯度（图7和图8）

色谱柱尺寸：2.1 × 150 mm，具有不同长度
25 μm内径PEEK柱后管路
或者两根串联2.1 x 150 mm色
谱柱

流动相A：0.1% (v/v) TFA水溶液

流动相B：0.1% (v/v) TFA乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
0	20	80	6
1	30	70	6
21	37	63	6
22	70	30	6
24	70	30	6
25	20	80	6
45	20	80	6

用于分离IgG糖基占据异构体的条件（图9）：

色谱柱尺寸：两根2.1 x 150 mm串联色谱柱
或一根2.1 x 150 mm色谱柱

柱温：80 °C

流动相A：0.1%TFA，0.3% HFIP水溶液

流动相B：0.1% TFA，0.3% HFIP乙腈溶液

时间(min)	%A	%B	曲线
---------	----	----	----

0	20	80	6
---	----	----	---

10	50	50	6
----	----	----	---

11	100	0	6
----	-----	---	---

14	100	0	6
----	-----	---	---

15	20	80	6
----	----	----	---

25	20	80	6
----	----	----	---

MS条件

MS系统：Xevo G2 QTof

电离模式：ESI+

分析仪模式：分辨率(~20 K)

毛细管电压：3.0 kV

锥孔电压：	45 V
样品温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	350 °C
脱溶剂气流速：	800 L/h
校正：	NaI, 2 µg/µL, 100~2000 <i>m/z</i>
采集：	500-4000 <i>m/z</i> , 0.5 s扫描速率
数据管理：	MassLynx软件 (4.1版)

结果与讨论

用于糖蛋白分离的HILIC技术进展

HILIC起源于20世纪90年代初期，是一种使用源于反相色谱的流动相分离强极性分子的分离技术⁹。

一般认为HILIC的分离机制以采用固定水层的极性固定相为基础⁹。亲水分析物组分进入这一固定水层，并通过氢键、偶极-偶极和离子相互作用等多种方式的组合与固定相发生相互作用。在这种方式下，亲水分析物将在非极性初始流动相条件下保留在HILIC固定相中，随后通过使用LC梯度增加极性流动相浓度而被洗脱⁹。

在过去二十年中，研究人员开发出了大量的HILIC或HILIC类固定相。多数仅基于未键合硅胶颗粒的固定相得到了广泛应用，两性离子键合固定相等基于多元醇键合或带电表面的HILIC固定相亦是如此。酰胺键合相因其出色的蛋白糖基保留性能与选择性而受到日益青睐。例如，Waters Glycan色谱柱中的ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide固定相在高分离度释放糖基分离中得到了广泛应用。

然而如前文所述，HILIC到目前为止仍然未能广泛应用于完整大分子领域。大多数色谱工作者未能尝试开发基于HILIC的蛋白质分离方法，很可能是因为担心高有机溶剂浓度会导致蛋白质沉淀。我们努力冲破这些固有观念的束缚，成功开发出了一种以专为大分子分离而设计的大孔径有机硅（亚乙基桥杂化，BEH）颗粒为基础的新型酰胺

键合固定相。其多孔网络可允许多数蛋白质通过，同时其平均孔径由于扩散受限而不会造成明显的峰展宽，而峰展宽现象在蛋白质分析物尺寸极其接近于固定相平均孔径（即因数小于3）时可能发生。

这种新型固定相的问世使得HILIC技术的进展受到了前所未有的瞩目。这一新兴的大分子HILIC技术可以通过牛核糖核酸酶B (RNase B)的分离得到体现，这种物质是由若干种高甘露糖（Man5~Man9）糖型组成的一种13 kDa的蛋白质。图1显示了使用多种不同固定相分离核糖核酸酶B得到的结果。自下而上采用的颗粒依次从5 μm 到1.7 μm 、从未键合到酰胺键合、从标准孔径(130Å)到大孔径(300Å)，随着所采用色谱技术的日益更新，核糖核酸酶B的分离性能也在不断改进。采用BEH Amide, 300Å, 1.7 μm 颗粒能够实现核糖核酸酶B糖型分离的最佳效果。大孔径固定相的使用对于实现最佳分离度发挥了重要作用。相关数据突出显示于图2中，图中显示了采用新开发的测试混合物得到的基准结果，这一混合物称为糖蛋白性能测试标准品，其中含有牛核糖核酸酶B、与其对应的糖型及其无糖基化异构体（核糖核酸酶A）。此标准品的分离示例中采用了聚焦梯度、大孔径(300Å) BEH Amide以及标准孔径(130Å) BEH Amide固定相。请注意，大孔径酰胺色谱柱使糖基释放核糖核酸酶A异构体和核糖核酸酶B的Man5糖型之间的分离度得到了显著提高(24%)，此外还能够大大改善整个分离过程的分离度。

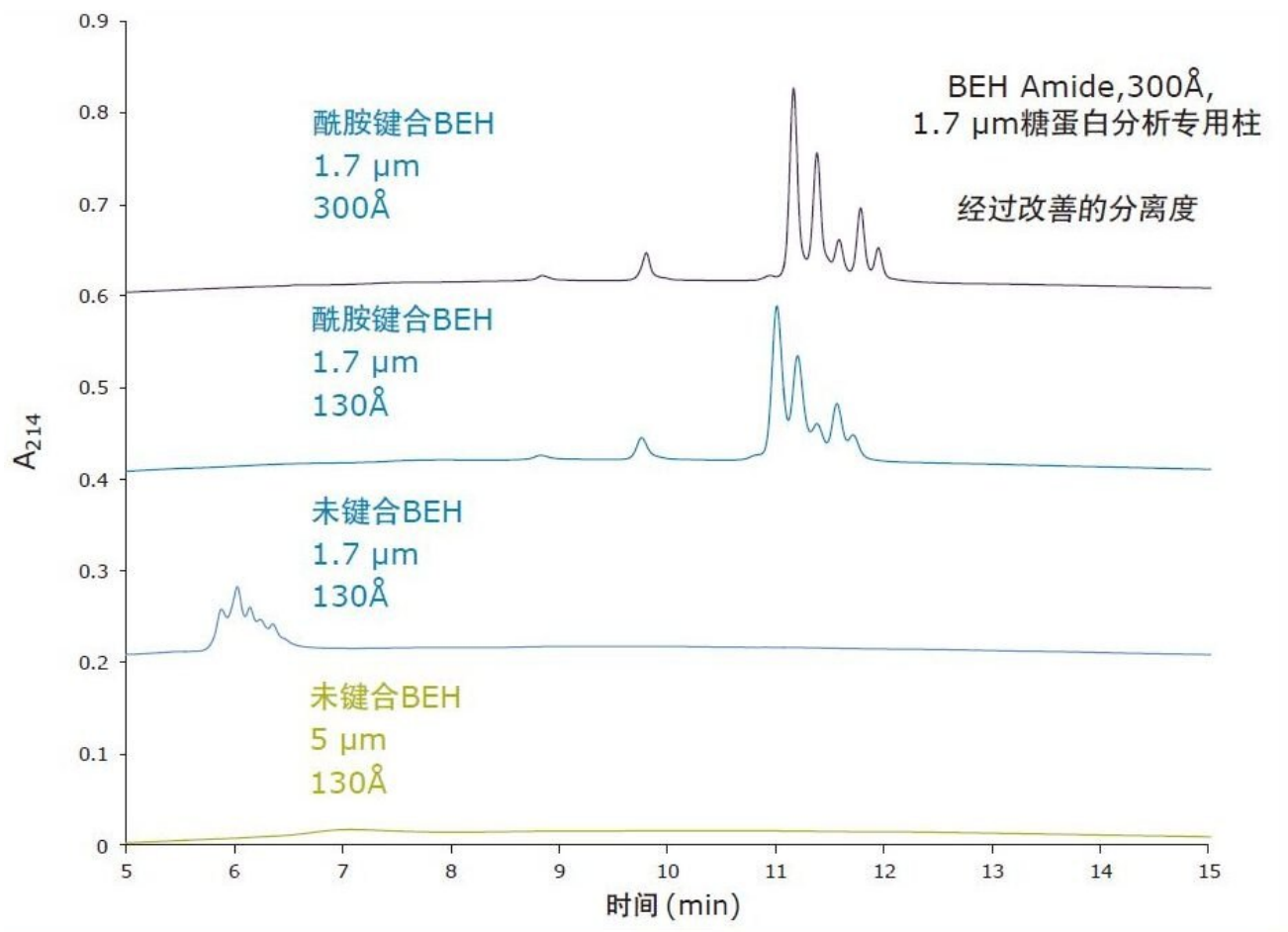


图1.用于完整糖蛋白分离的HILIC固定相技术进展。采用固定相填充的 $2.1 \times 150 \text{ mm}$ 色谱柱对 $1 \mu\text{g}$ 核糖核酸酶B的分离结果。固定相范围涵盖HPLC级未键合杂化颗粒（XBridge BEH HILIC, $130\text{\AA}$, $5 \mu\text{m}$ ）到亚 $2 \mu\text{m}$ 酰胺键合杂化颗粒 $300\text{\AA}$, $1.7 \mu\text{m}$ 颗粒（ACQUITY UPLC BEH Amide $300\text{\AA}$, $1.7 \mu\text{m}$ 糖蛋白分析专用柱）。

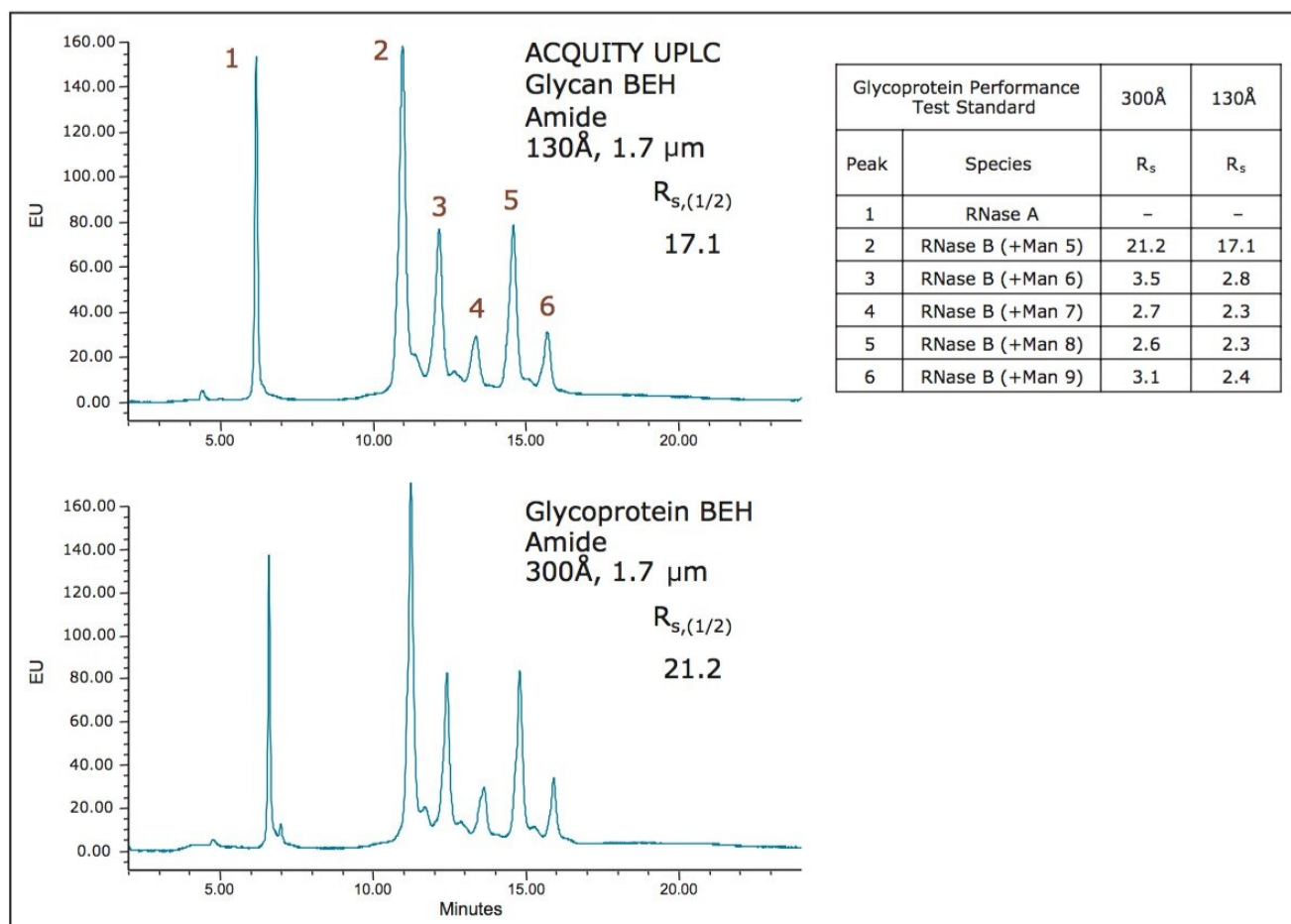


图2.分别采用BEH Amide 300Å, 1.7 μm糖蛋白分析专用柱和BEH Amide, 130Å, 1.7 μm色谱柱得到的糖蛋白性能测试标准品（核糖核酸酶A +核糖核酸酶B糖型）的分离结果。报告的分离度值采用物质1和物质2（分别为核糖核酸酶A和核糖核酸酶B Man5糖型）的半高峰宽计算得出。本示例中采用的荧光检测条件为Ex 280 nm/Em 320 nm，柱温为45 °C。

以其它市售HILIC固定相作为标准更加能够凸显出这些最新研究进展的重要意义。图3展示了对10种不同HILIC固定相评估得到的核糖核酸酶B的分离结果。从图中可以看出，10种接受评估的材料中有6种表现出不良特性，包括较差的回收率和保留时间等。结果证明只有酰胺键合固定相以及基于100Å或更大孔径的颗粒技术能够使核糖核酸酶B糖型实现良好分离。

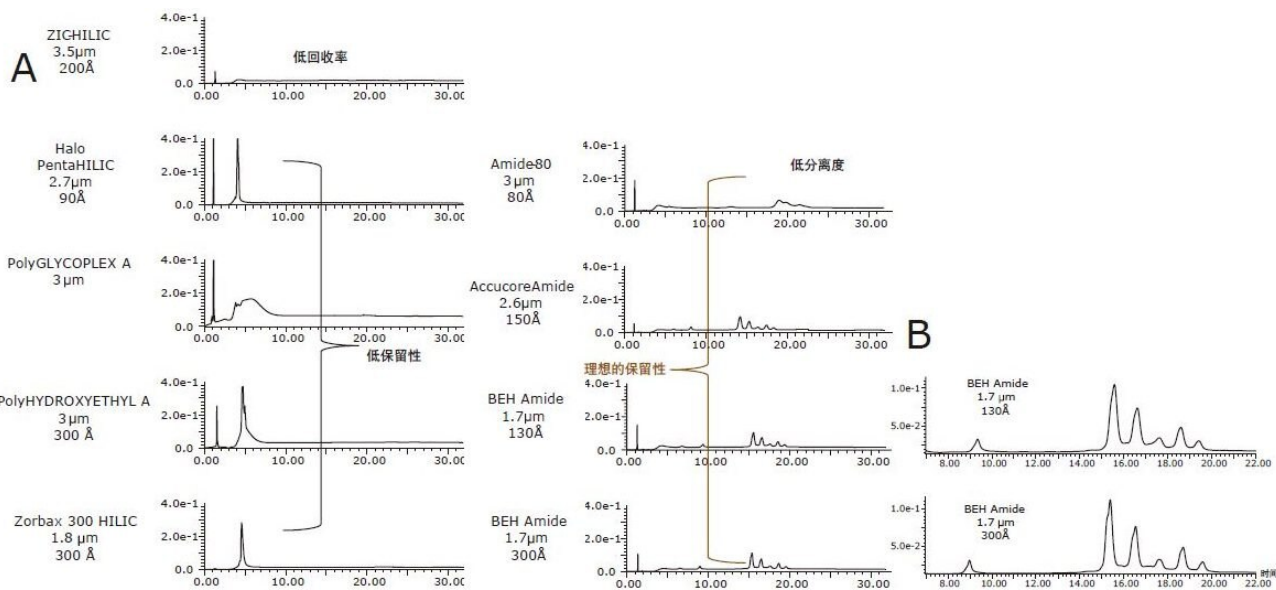


图3.市售HILIC色谱柱的完整糖蛋白分离效果评估。(A) 采用10种不同固定相获得的核糖核酸酶B UV色谱图。(B) 分离度最高的 HILIC UV放大色谱图。

流动相优化、MS兼容性与反相正交性

蛋白质糖型的高效HILIC分离需要在选择流动相时深思熟虑。多数HILIC分离方法在开发时都依赖铵盐（甲酸铵或乙酸铵）来减弱明显的离子相互作用并控制流动相的pH值。而此类流动相系统对糖蛋白的适用性可通过核糖核酸酶B来评估。

图4显示了使用0.1% TFA代替HILIC分离中更常使用的两种流动相组分（50 mM甲酸铵或0.5%甲酸）作为流动相改性剂获得的对应核糖核酸酶B色谱图^{2,7}。采用0.1% TFA的糖型分离效果最好。TFA改性的流动相不仅提高了糖型分离度，还缩短了核糖核酸酶B的保留时间。这些现象相结合突出了使用HILIC时，酸性离子对流动相能够实现糖蛋白高分离度分离的重要意义。有人提出，TFA提供的酸性条件确保了蛋白质的酸性残基完全质子化，从而以疏水性更强的形态存在。此外，TFA的抗衡离子与碱性残基的离子对确保了阳离子残基也能以疏水性更强的形态分离出来。通过这种方式，糖蛋白在HILIC相中的保留主要由糖基驱动，并且实现了糖基修饰方面更具选择性的分离差异。

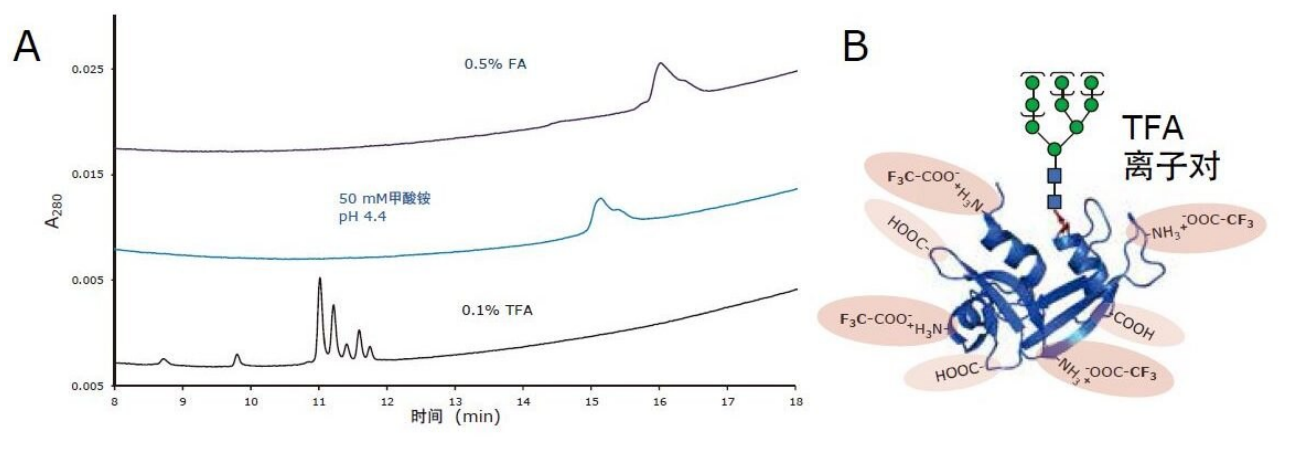


图4.完整糖蛋白和消化糖蛋白分离的流动相条件优化。(A)使用不同流动相和BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱时获得的核糖核酸酶B的UV色谱图。(B)展示离子对在糖蛋白HILIC分离中的作用的示意图。由疏水性强酸离子对导致的亲水性降低用阴影表示。[PDB:1RBB]

幸运的是，TFA改性流动相具有挥发性，因此可以轻松与ESI-MS联用。HILIC方法的这一特点可以对分离的糖型进行在线表征，并且为分析糖基化蛋白质的样品提供了新的选择。为此，通过ESI-MS对使用BEH Amide, 300Å, 1.7 μm从核糖核酸酶B中分离得到的峰进行查询。

图5展示了分离核糖核酸酶B时获得的UV色谱图和对应的总离子色谱图(TIC)。通过对六个标记峰的质谱进行求和和去卷积(MaxEnt 1)，确证了检测到的核糖核酸酶B糖型。实际上，求得的去卷积质量数支持去糖基化核糖核酸酶B（核糖核酸酶A）以及通过Man5到Man9修饰的核糖核酸酶B的鉴定。

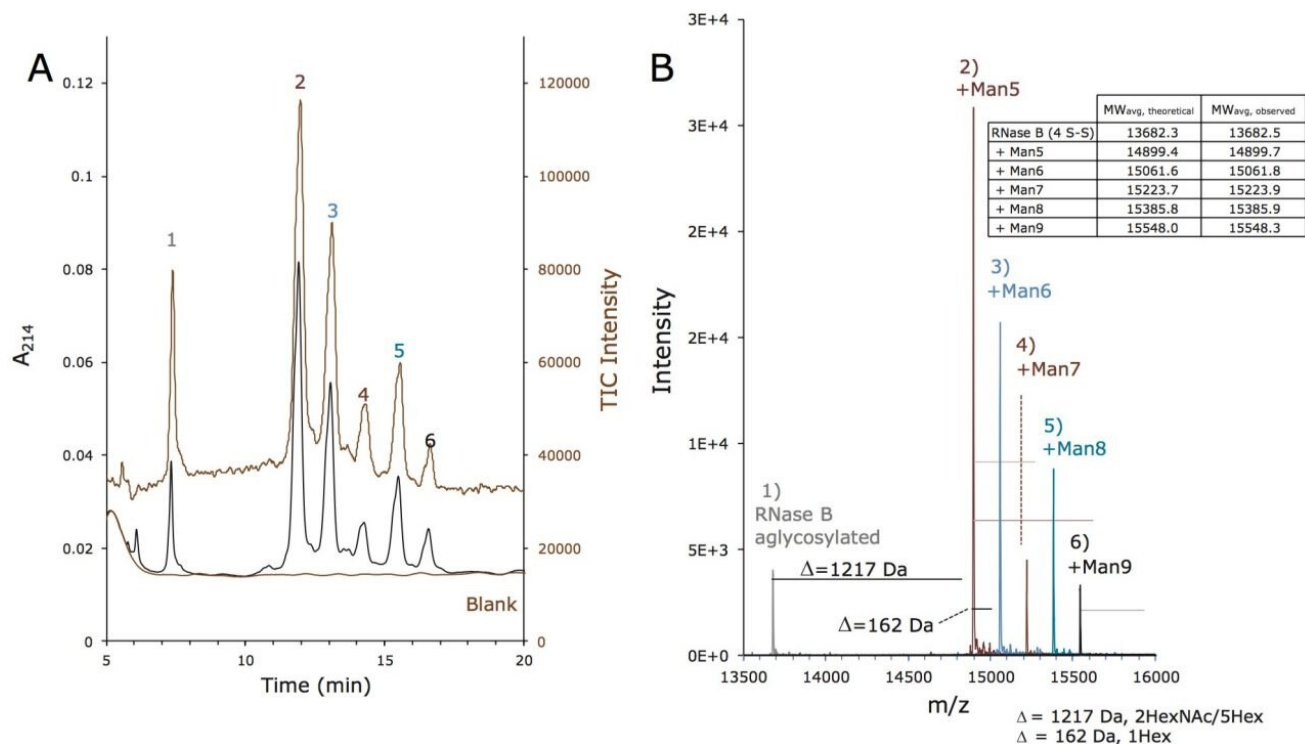


图5.核糖核酸酶B的HILIC-MS结果。(A)使用聚焦梯度和BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白专用柱得到的核糖核酸酶B的UV（下图）和TIC（上图）色谱图。(B)各个标记峰的去卷积质谱与对应的糖型鉴定。

最后，应当指出的是新开发的固定相和本文展示的方法提供了新的分离选择性，具有正交性并且与常规反相分离互补。例如，图6A显示核糖核酸酶B可采用BEH C₄, 300Å, 1.7 μm色谱柱进行反相色谱分离，从而实现去糖基化核糖核酸酶B (RNase B)与其糖基化异构体的高分离度分离。但是，反相色谱无法分离核糖核酸酶B的各种高甘露糖糖型。相反，采用BEH Amide, 300Å, 1.7 μm色谱柱可以实现各种主要糖型的基线分离（图6B）。

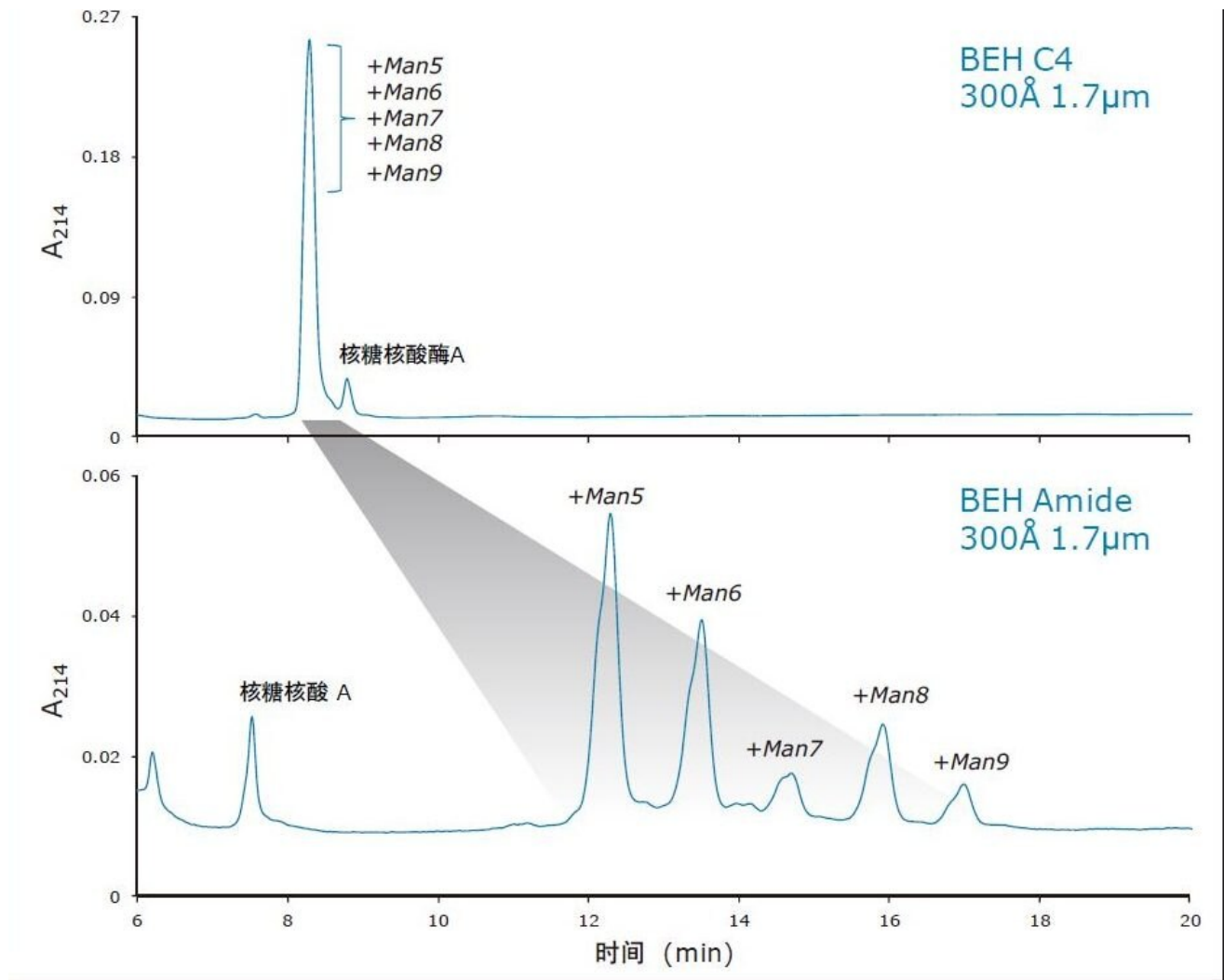


图6. BEH C₄, 300 Å, 1.7 μm 色谱柱的反相分离与 BEH Amide, 300 Å, 1.7 μm 色谱柱的 HILIC 分离的正交性。(A) 使用 ACQUITY UPLC BEH C₄, 300 Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm 蛋白分析专用柱分离核糖核酸酶 B (1 μg)。(B) 使用 ACQUITY UPLC BEH Amide, 300 Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm 糖蛋白分析专用柱分离核糖核酸酶 B (1 μg)。

完整单克隆抗体异质性糖型的分离

为了探索这一新技术的极限，我们研究了其分离完整单克隆抗体糖型的能力。具体来说研究了曲妥珠单抗的分离。这些实验需要特别注意进样，原因在于曲妥珠单抗和许多其它糖蛋白不易溶于高浓度有机相。实际上，70–80%的乙腈溶液条件通常会使蛋白质（例如 IgG）开始沉淀。因此，我们开发了水相稀释剂的最佳进样条件。结果显示，一根 2.1 mm 内径的色谱柱最多可进样 1 μL 的水相样品。可以加载适当样品量的 2 mg/mL 曲妥珠单抗水相样品，从而进行 IgG 的 HILIC 分离。需要提到的是，高浓度乙腈稀释剂可用于完整蛋白质 HILIC 分析，但必须注

意通过使用浓度为0.2–1.0%之间的TFA离子对，联合应用TFA和六氟异丙醇(HFIP)，或是使用共溶剂（例如二甲基亚砜(DMSO)）来提高蛋白质样品的溶解性（数据未显示）。

如图7所示，使用BEH Amide, 300Å, 1.7 μm色谱柱和简单的100%水相稀释剂进样确实可将曲妥珠单抗分离成多个色谱峰。但是，在仅仅150 mm柱长产生的反压下观察到了明显的拖尾峰形。MS分析显示第一组峰可准确地匹配完整曲妥珠单抗的G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F和G1F/G2F糖型。完整的IgG为二聚体结构，两条重链上最少有两个N-糖位点，解释了观察到的结合型糖型结果。这与IgG完整质量数分析的结果一致¹⁰。相比之下，通过MS发现的色谱图的拖尾组分对应多种共洗脱曲妥珠单抗糖型。通过该结果，我们确定发生了柱上聚集，升高柱压可能是完整免疫球蛋白HILIC的一种解决方案，特别是因为此前曾报道过超高压可能有利于减少完整蛋白质反相期间的残留和鬼峰¹¹。本文通过引入不同长度的窄内径柱后PEEK管路，研究了引入额外柱压的效果。图7（深色线）显示了不断增大柱压的效果。将柱压升高一倍后，曲妥珠单抗可以在大约7,500 psi条件下洗脱，从而消除了色谱图中的推测聚集峰。令人振奋的是，在这些条件下得到的色谱图用5种主要糖型表示，结果仍然与完整曲妥珠单抗的ESI-MS一致。¹⁰ 同时值得注意的是，随着柱压升高，保留时间会缩短。之前的单糖HILIC分离中介绍过这种现象。¹² 我们推测，压力升高会导致水和分析物的配位减弱，从而缩短保留时间，这与反相色谱观察到的效果相反。¹²

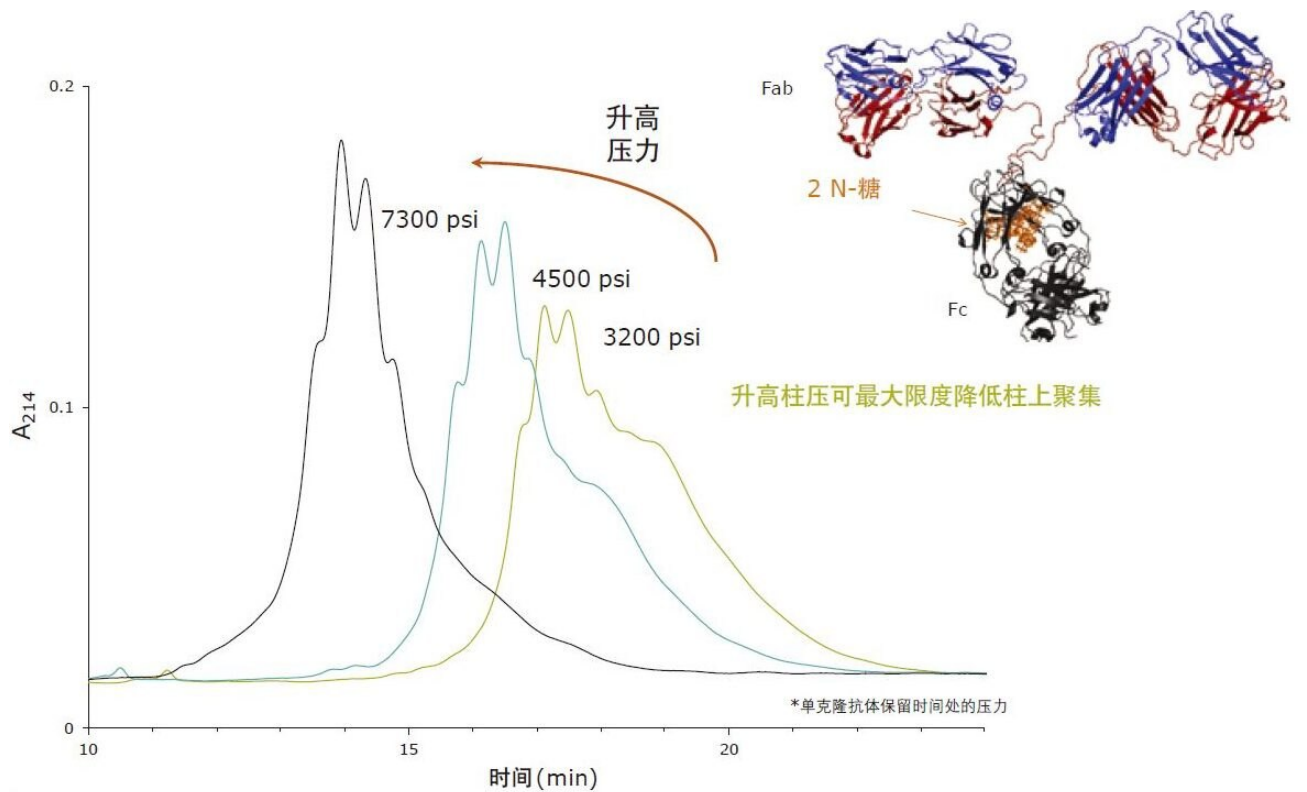


图7.柱压对IgG的HILIC分离的影响。使用BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱，在有流速限制和没有流速限制的条件下分离曲妥珠单抗(1 μg)。[PDB:1IGT]

由于超高压对于分离完整IgG有利，因此我们将两根BEH amide 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm色谱柱与小体积高压色谱柱接头联用进行分离。图8显示了采用这种串联色谱柱得到的完整曲妥珠单抗分离结果，以及证明实现糖型分离的提取离子色谱图。这种300 mm的配置提供了最佳HILIC分离必需的柱压，此外使不同糖型之间实现了更高的分离度。显然，即使在极高分子量物质的HILIC中，额外的理论塔板也具有极大的优势，这证明了分配对于这种分离具有重要意义。

一种分析糖基占据的LC方法

完整IgG的UPLC HILIC分离除了分离单个糖型外，还具有更多用途。使用这些新的分离能力来分析糖基占据有关的信息同样很有意义。为此，我们评估了BEH Amide, 300Å色谱柱分析IgG糖基占据的能力。以研究多种PNGase F去糖基化处理所得的反应产物为例。我们使用80 °C高柱温、TFA离子对和HFIP流动相添加剂，成功地提高了IgG的溶解性，破坏了为单个异质性完整IgG糖型（即，G0F/G0F与G0F/G1F）捕获的精细结构。图9展示了对内源性完整单克隆抗体质量数检查标准品（小鼠IgG1 mAb）及其部分和完全糖基释放异构体进行这种分离得到的

HILIC荧光色谱图。如图所示，这三种样品的HILIC荧光谱图差异显著。在线质谱检测已经确证了这些谱图中的峰对应不同的糖基占据状态。

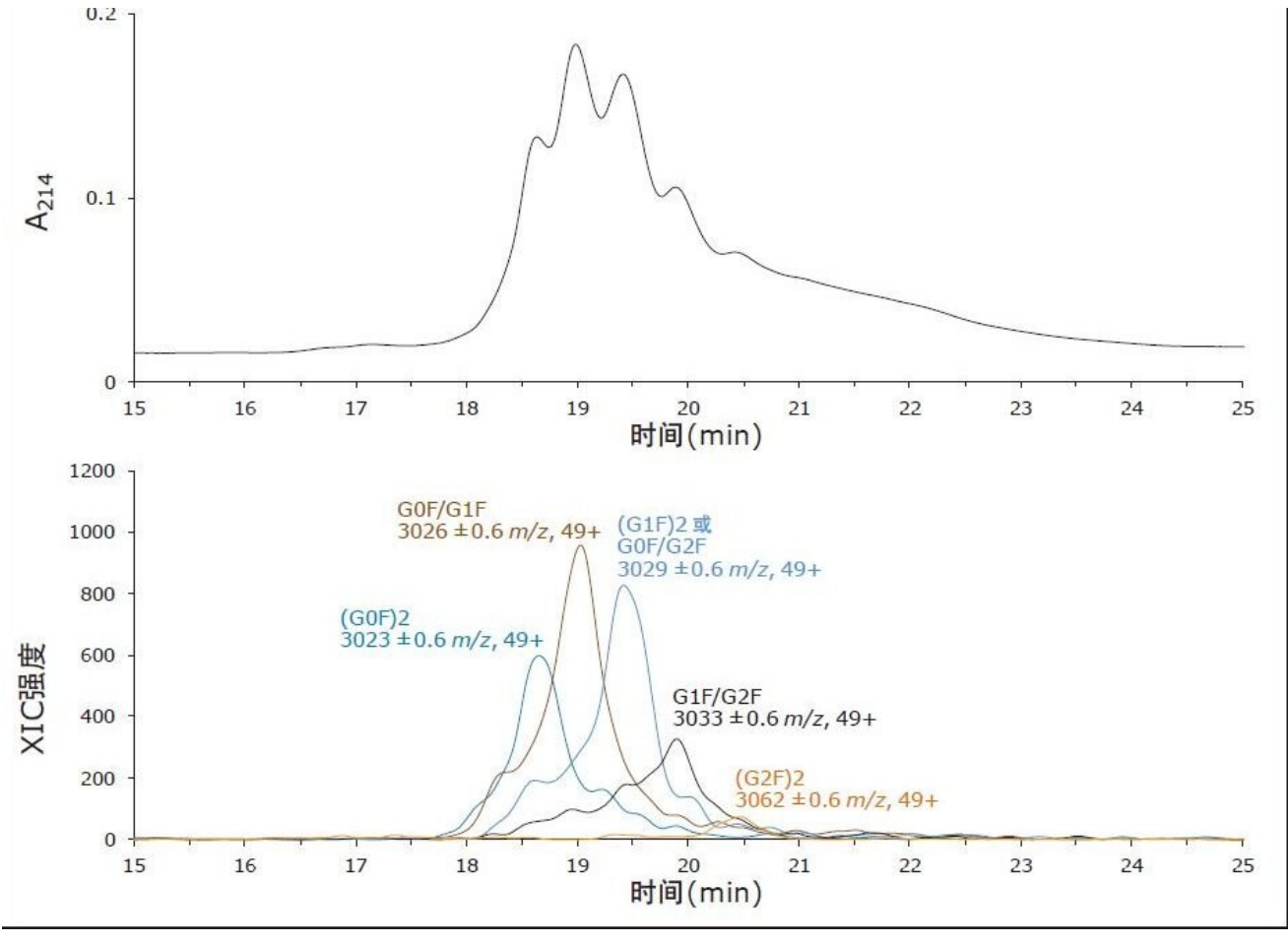


图8.使用串联ACQUITY UPLC BEH Amide, 300Å, 1.7 μ m, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱分离完整曲妥珠单抗糖型。显示了曲妥珠单抗各种主要异质性糖型的UV色谱图和提取离子色谱图。单克隆抗体保留时间处的柱压大约为7,000 psi。

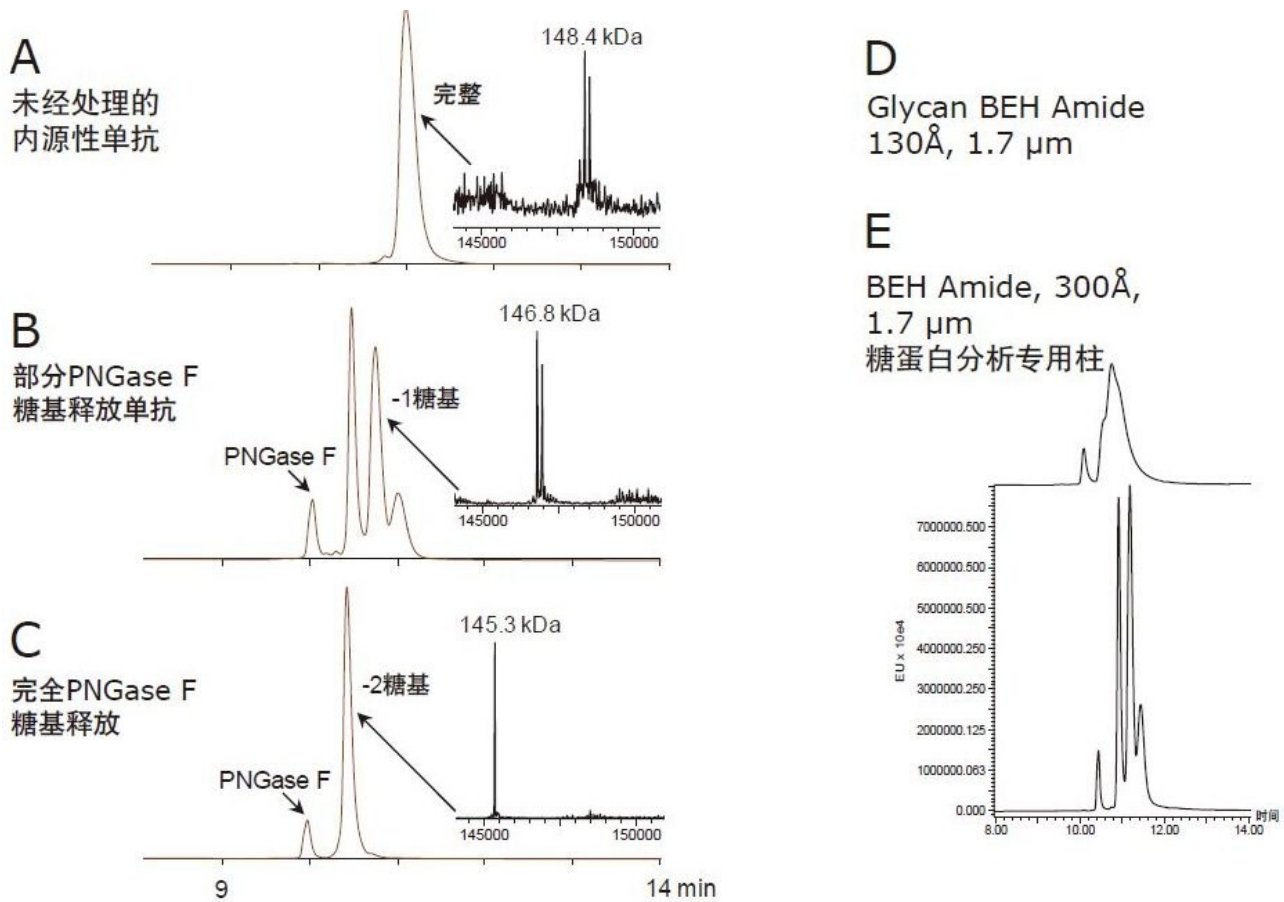


图9.使用完整蛋白质HILIC-FLR-MS分析糖基占据和糖基释放。显示了三种不同样品得到的HILIC荧光谱图：(A)内源性、(B)部分糖基释放和(C)完全糖基释放的完整单克隆抗体质量数检查标准品。使用两根串联的BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱分离单克隆抗体样品(1.5 μg)。使用(D) ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130Å, 1.7 μm色谱柱和(E) BEH Amide, 300Å, 1.7 μm, 2.1 x 150 mm糖蛋白分析专用柱得到的部分糖基释放完整单克隆抗体质量数检查标准品的HILIC荧光谱图。

保留性最强的物质为内源性单克隆抗体样品，对应完整单克隆抗体的双（完全）糖基化形态。同时，部分糖基释放单克隆抗体样品生成了HILIC保留性能较低的若干个额外峰，其中两个具有对应检出分子量的峰代表一次糖基释放和完全糖基释放的单克隆抗体物质，第三个具有对应检出分子量的峰则与PNGase F一致。相反，完全糖基释放的单克隆抗体样品呈现出均相荧光谱图，并且单克隆抗体实测分子量与糖基释放单克隆抗体的预测分子量一致 (145.3 kDa)。值得一提的是，尝试使用BEH Amide, 130Å, 1.7 μm固定相时，无法分离上述任何一个峰（图9D和9E）。事实上，大孔径固定相有利于开发之前无法实现的分离方法。

目前，我们已将上述分析用于开发快速酶糖基释放方案³。但是，我们当然也建议使用相同的方法测量完整治疗性单克隆抗体的糖基占据率，这种情况下去糖基化形态（-2和-1 N-糖）的相对丰度可使用荧光进行监测并通过LC-MS进行确认。

结论

小分子HILIC已经获得了广泛关注和应用。相比之下，这种技术在大分子分离中的应用较为有限。现在，通过上文所述的酰胺键合大孔径HILIC固定相和对应方法的开发，我们能够分离出完整糖基化蛋白质的不同糖型，比如完整曲妥珠单抗的异质性糖型分离。此外，上述技术还可应用于糖基占据研究。与采用反相分离法分离不同疏水性的蛋白质异构体一样，本文研究了使用BEH Amide 300Å的HILIC分离法分离具有不同亲水性的蛋白质异构体，例如糖基占据不同的异构体。有了这些新的分离能力，未来我们可以将HILIC与光学检测或ESI-MS相结合，对完整糖蛋白进行更为详细的表征。

参考文献

1. Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Gilar, M., UPLC-FLR Method Development of 2-AB Labeled Glycan Separation in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). Waters Application Note 720003238EN 2010.
2. Ahn, J.; Bones, J.; Yu, Y. Q.; Rudd, P. M.; Gilar, M., Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010, 878 (3–4), 403–8.
3. Lauber, M. A.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Guthrie, E.; Magnelli, P.; Taron, C. H.; Fountain, K. J., Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Novel Fluorescence and MS-Active Labeling Reagent. Waters Application Note 720005275EN 2015.
4. Wang, B.; Tsybovsky, Y.; Palczewski, K.; Chance, M. R., Reliable Determination of Site-Specific In Vivo Protein N-Glycosylation Based on Collision-Induced MS/MS and Chromatographic Retention Time. *J Am Soc Mass Spectrom* 2014, 25 (5), 729–41.

5. Shah, B.; Jiang, X. G.; Chen, L.; Zhang, Z., LC-MS/MS peptide mapping with automated data processing for routine profiling of N-glycans in immunoglobulins.*J Am Soc Mass Spectrom* 2014, 25 (6), 999–1011.
6. Houel, S.; Hilliard, M.; Yu, Y. Q.; McLoughlin, N.; Martin, S. M.; Rudd, P. M.; Williams, J. P.; Chen, W., 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 (1), 576–84.
7. Gilar, M.; Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Xie, H.; Han, H.; Ying, W.; Qian, X., Characterization of glycoprotein digests with hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry.*Anal Biochem* 2011, 417 (1), 80–8.
8. O' Gara, J. E.; Wyndham, K. D., Porous Hybrid Organic-Inorganic Particles in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2006, 29, 1025–1045.
9. Alpert, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds.*J Chromatogr* 1990, 499, 177–96.
10. Xie, H.; Chakraborty, A.; Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Dakshinamoorthy, D. P.; Gilar, M.; Chen, W.; Skilton, S. J.; Mazzeo, J. R., Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies.*MAbs* 2010, 2 (4).
11. Eschelbach, J. W.; Jorgenson, J. W., Improved protein recovery in reversed-phase liquid chromatography by the use of ultrahigh pressures.*Anal Chem* 2006, 78 (5), 1697-706.
12. Neue, U. D.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C., Influence of pressure on the retention of sugars in hydrophilic interaction chromatography.*J Sep Sci* 2010, 33 (6–7), 838-40.

特色产品

720005380ZH, 2015年4月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.