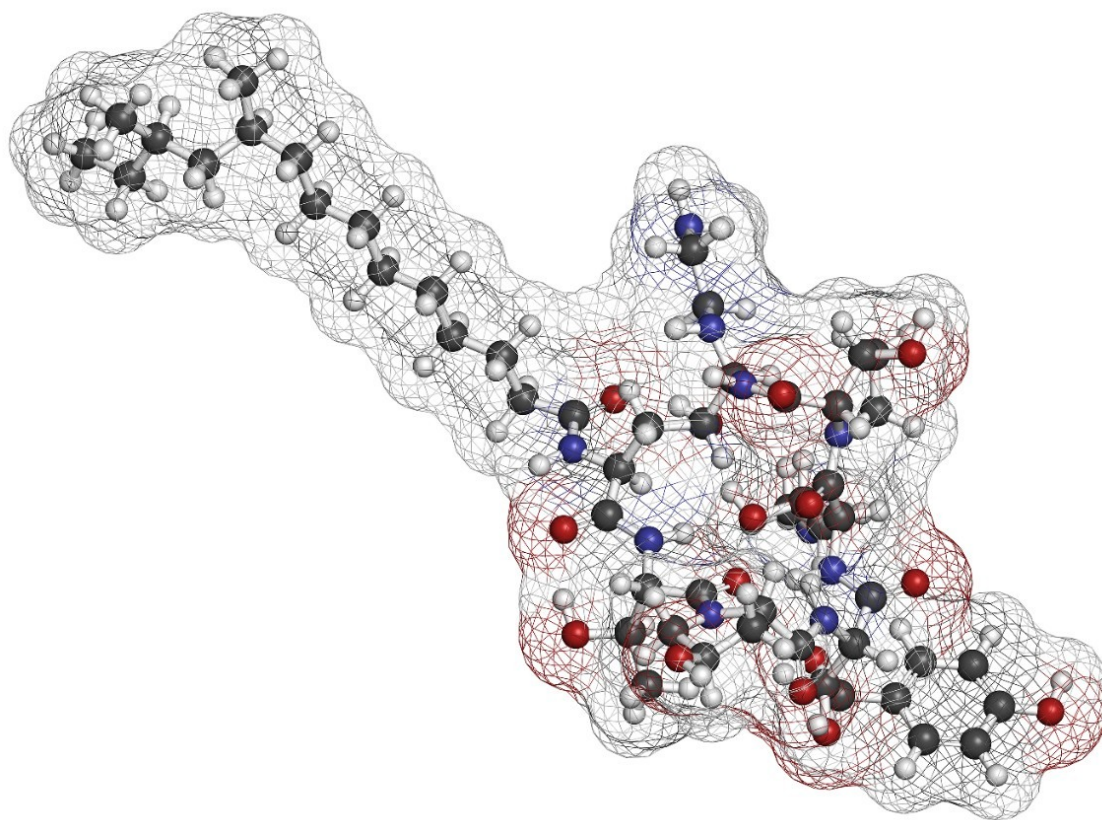


应用纪要

使用配备MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案改善生物治疗药物开发中的游离N-糖分析

Ximo Zhang, Jacob Kellett, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



摘要

在生物治疗药物的开发和生产过程中，要确保药品的一致性、安全性和有效性，必须对糖基化进行表征和监测。糖基化作为一项关键质量属性，通常通过对游离N-糖进行荧光标记，然后进行亲水作用色谱(HILIC)和荧光(FLR)检测来评估。随着兼容FLR和MS的糖基标记试剂（例如RapiFluor-MS (RFMS)）不断发展，结合FLR/MS分析的技术变得越来越普遍，即使在常规分析中也是如此。生物制药实验室已经开发出稳定的标准分析程序来分析糖基化修饰。但是，酸性糖基（尤其是复杂的磷酸化糖基）在HILIC-FLR/MS分析过程中可能与金属表面发生离子相互作用而表现出低回收率。为解决这一问题，我们使用新型BioAccord系统和ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱优化了现有的RFMS标记N-糖HILIC色谱分离方法，旨在避免发生这些不必要的分析物-表面相互作用。

优势

采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案具有以下优势：

- 提高酸性糖基（与金属表面发生较强相互作用）的回收率
- 改善受这些相互作用影响较大的磷酸化糖基的回收率和峰形
- 使用现有的UNIFI糖基科学库GU（葡萄糖单位）数据库校准糖基保留时间，辅助自动化糖基分配工作

简介

生物治疗药物的糖基化可能影响药物的安全性、有效性和稳定性，因此在生物药物开发中，通常将其指定为关键质量属性(CQA)¹。鉴于糖基化对上游工艺条件的敏感性，它也可以作为工艺稳定性和稳健性的关键指标之一²。除整体产品糖谱外，特定种类的糖基（例如高甘露糖和唾液酸化糖基）尤其重要，因为它们可能会不成比例地影响药品特性。糖基化评估通常采用亲水作用色谱(HILIC)结合荧光(FLR)和/或质谱检测分析游离N-糖和荧光标记N-糖的方式进行，以提供全面信息（包括糖基物质的鉴定和相对丰度）^{3,4}。但使用这种方法时，酸性糖基（尤其是磷酸化糖基）在HILIC-FLR/MS分析过程中可能存在回收率低的问题。近期研究将这些损失部分归因于糖基中带负电荷的官能团与液相色谱系统和分析柱的金属表面发生了离子相互作用。此挑战在分析包含高度唾液酸化糖结构的生物治疗药物（例如融合蛋白）时尤其明显，而唾液酸化糖基可能同时影响药品的免疫原性和清除率。磷酸化糖基由于这些与金属表面的不必要相互作用，还带来了另一项挑战，例如在甘露糖-6-磷酸糖基的分析中，该糖基在溶酶体贮积病的治疗中会影响细胞受体摄取和溶酶体靶向。

为确保产品质量和一致性，在蛋白质药物的整个开发和生产过程中需要对糖基化进行准确表征和监测²。为此，非常需要开发新型方法，以减少金属介导的样品损失并改善生物治疗药物工艺开发和质量控制中的游离寡糖分析。

采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案可减少非特异性吸附损失，改善金属敏感分

析物的回收率和分析结果⁵⁻⁷。该解决方案的原理是：在金属基材表面添加稳定的屏障层，尽量减少金属敏感物质的分析物/表面相互作用⁵。考虑到这一点以及磷酸化糖基所发生的吸附损失，ACQUITY Premier解决方案应当特别适合分析复杂糖基。

本研究报道了一种集成式游离寡糖分析解决方案，旨在大幅提高样品回收率以及分析性能和稳健性。ACQUITY BEH Amide色谱柱和ACQUITY UPLC系列已在各种糖基分析中应用，为生物工艺开发和生物治疗药物的放行提供支持。为充分发挥复杂糖基样品无偏差分析的潜力，将由ACQUITY Premier BSM系统和ACQUITY RDa飞行时间质谱检测器组成的BioAccord LC-MS系统与搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱和QuanRecovery样品瓶结合使用⁸。为促进高效、简单的方法开发和数据分析，采用符合法规要求的waters_connect信息学平台控制集成式LC-FLR/MS平台，为N-糖分析提供一种系统方法，该方法可轻松部署在整个组织中，用于治疗性蛋白质的开发、生产和放行。

本应用纪要的目的是：

- 比较标准ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱配合ACQUITY UPLC I-Class BioAccord系统与ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱结合搭载ACQUITY Premier技术的BioAccord系统分析酸性糖基得到的回收率
- 展示方法转换，重点关注UNIFI GU数据库在不同仪器平台上的持续实用性

实验

样品描述

RapiFluor-MS糖基性能测试标准品（部件号：[186007983 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html)）。将1瓶标样复溶于20 μL水中，得到最终浓度为20 pmol/μL的溶液。

RapiFluor-MS唾液酸化糖基性能测试标准品（部件号：[186008660 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008660-rapifluor-ms-sialylated-glycan-performance-test-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008660-rapifluor-ms-sialylated-glycan-performance-test-standard.html)）。将1瓶唾液酸化糖基标样复溶于20 μL水中，得到最终浓度为20 pmol/μL的溶液。

磷酸化糖蛋白（组织蛋白酶D）购自Thermo Fisher。按照适用于富含二硫键的蛋白质的《GlycoWorks快速入门方案》（[720006992EN < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135073129&cid=135073128>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135073129&cid=135073128)），使用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒（部件号：[176004082 < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135073129&cid=135073128>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135073129&cid=135073128)）。

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/176004082-glycoworks-rfms-n-glycan-kit---8-x-12.html>) 从15 µg组织蛋白酶D中释放出N-糖并进行标记。二硫苏糖醇(DTT)购自Thermo Scientific (马萨诸塞州沃尔瑟姆)，在变性过程中用于还原二硫键。

方法条件

分析采用搭载ACQUITY UPLC I-Class PLUS的BioAccord LC-MS系统或搭载ACQUITY Premier BSM的BioAccord LC-MS系统。

液相色谱条件

系统配置	标准配置	ACQUITY Premier解决方案
液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS	ACQUITY Premier BSM UPLC
检测条件:	ACQUITY FLR检测器 ($\lambda_{\text{激发}}=265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=425 \text{ nm}$, 2Hz)	ACQUITY Premier FLR检测器 ($\lambda_{\text{激发}}=265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=425 \text{ nm}$, 2Hz)
色谱柱:	ACQUITY BEH Amide糖基分析柱 1.7 µm, 130 Å, 2.1 × 150 mm (部件号186004742)	ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱 1.7 µm, 130 Å, 2.1 × 150 mm (部件号186009524)
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶, 300 µL (部件号186009186)	
柱温:	60 °C	
样品温度:	6 °C	
进样量:	1 µL	
密封件清洗液:	含20%乙腈的水溶液	
流动相A:	50 mM NH_4HCO_2 水溶液	
流动相B:	乙腈	

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.4	25	75	6
35.00	0.4	46	54	6
36.50	0.2	80	20	6
39.50	0.2	80	20	6
43.10	0.2	25	75	6
47.60	0.4	25	75	6
55.00	0.4	25	75	6

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY RDa质谱检测器
电离模式:	ESI正
采集范围:	50–2,000 m/z
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压(CV):	45 V
碎裂CV:	70–90 V

数据管理

信息学软件:	搭载UNIFI 1.9.4的waters_connect
工作流程:	“糖基FLR和MS确证”

结果与讨论

常见酸性糖基的分析

酸性糖基（包括NeuAC、NeuGC、磷酸化和硫酸化糖基）的水平可能影响药物质量和有效性，因此需要在治疗性蛋白质的开发和生产过程中进行充分表征和监测。一般来说，当前使用ACQUITY BEH Amide色谱柱的HILIC方法已经非常适合分析RFMS标记的mAb糖基，这些糖基中主要包含中性或单唾液酸化结构。但是，新物质（例如融合蛋白）通常具有更复杂的糖谱，包括高度唾液酸化、修饰和更广泛支化的糖基。这些糖基在LC-FLR/MS分析过程中可能存在回收率低的问题，从而使产品谱图中的结果存在偏差。

为评价ACQUITY Premier仪器和色谱柱技术在酸性糖基分析中的潜在优势，我们使用标准ACQUITY色谱柱结合BioAccord系统以及ACQUITY Premier色谱柱结合搭载ACQUITY Premier液相色谱技术的BioAccord系统同时分析了中性和唾液酸化RFMS标记的糖基性能测试标准品。分析结果的并排比较如图1A所示。虽然色谱图高度相似，但使用搭载ACQUITY Premier液相色谱技术和色谱柱的BioAccord系统获得的唾液酸化糖基的回收率更高。图1B所示为三次连续进样得到的积分峰面积，采用ACQUITY Premier解决方案时，唾液酸化糖基的平均相对丰度为2.22%，相比之下，采用标准配置所得到的结果为2.11%，而中性糖基的平均相对丰度则保持

一致（对于FA2，分别为20.5%和20.5%）。为确认观察到的糖基丰度差异，使用唾液酸化糖基标样的四个代表性峰（包括A2G2S2、A3G3S3、A2S1G3S3和A2S2G3S3）进行更系统的比较。如图1C所示，采用ACQUITY Premier解决方案时，观察到所有四种糖基均具有更高的FLR信号响应，由此确认唾液酸化糖基的回收率提高。这些结果证明，使用搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案可大幅提高糖基回收率，得到一致的改善，这对于分析包含高度唾液酸化糖基（例如融合蛋白）的药物尤其有利。

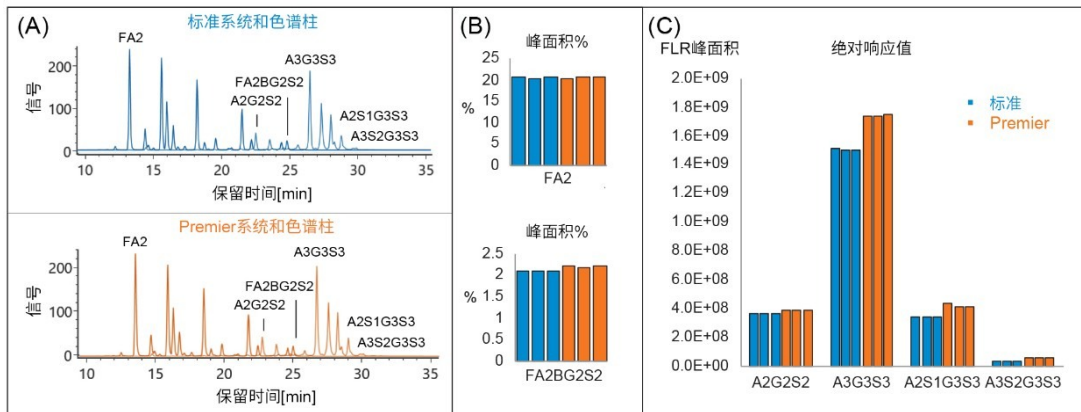


图1.使用搭载ACQUITY Premier液相色谱技术和色谱柱的BioAccord系统所得到的唾液酸化糖基的回收率略高。(A)在标准系统和色谱柱以及ACQUITY Premier系统和色谱柱上分离中性和唾液酸化RFMS标记的糖基性能测试标准品(GPTS)得到的叠加色谱图。(B)中性GPTS中的中性糖基FA2与唾液酸化糖基FA2BG2S2的相对丰度比较。(C)唾液酸化GPTS中代表性糖基的绝对响应值比较。

磷酸化糖基的分析

在许多溶酶体酶替代疗法中，药物中磷酸化糖基的丰度是开发和生产过程中需要监测的关键质量属性，因为它决定了溶酶体酶递送的效率⁹。但是，由于磷酸基团对金属表面的亲和力，磷酸化糖基在LC-MS分析中也面临回收率低的挑战。为证明采用HPS技术的ACQUITY Premier解决方案也能减轻这些影响，我们利用溶酶体酶（组织蛋白酶D）作为模型蛋白，考察了HILIC-FLR/MS分析中磷酸化糖基的回收率。

使用Waters GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖分析试剂盒，从组织蛋白酶D中释放出N-糖，用RFMS标记，然后使用ACQUITY BEH Amide糖基分析柱和BioAccord系统（标准系统）进行HILIC-FLR/MS分析。如图2A所示，使用35 min梯度分离组织蛋白酶D的游离N-糖，根据主峰的精确质量数将其鉴定为高甘露糖结构(3-7)。在大约20.7 min处观察到与甘露糖-6-磷酸(M6P)对应的m/z，该化合物在ESI谱图中具有良好的信噪比(S/N)（图2A插图），实测单同位素质量数1788.6461 Da的质量数偏差仅为1.4 ppm。在M6P的提取离子色谱图(XIC)中（图2B），观察到两个具有相同m/z的峰，将其鉴定为一对结构异构体并分别标注为M6P-1和M6P-2。M6P-2的峰表现出明显拖尾，表明存在可能由金属螯合引起的次级相互作用。为进行比较，使用搭载ACQUITY Premier液相色谱技术和色谱柱的BioAccord系统以相同的方式分析组织蛋白酶D的游离N-糖。如图2C所示

，获得了高度相似的色谱图，表明这两种仪器配置在游离寡糖分析中总体上相当。但是，虽然在相似的保留时间(25.8 min)处观察到M6P的m/z (图2C插图)，但M6P-2的MS响应在M6P的XIC中增加至大约3倍 (图2D)，峰形得到显著改善。由此证明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案能够减少磷酸化糖基在金属表面上的吸附损失。15次进样所得到的M6P的MS响应的%RSD为3.96%，表明分析具有较高重现性。因此，在游离寡糖分析中使用ACQUITY Premier技术可以更准确地定量磷酸化糖基。

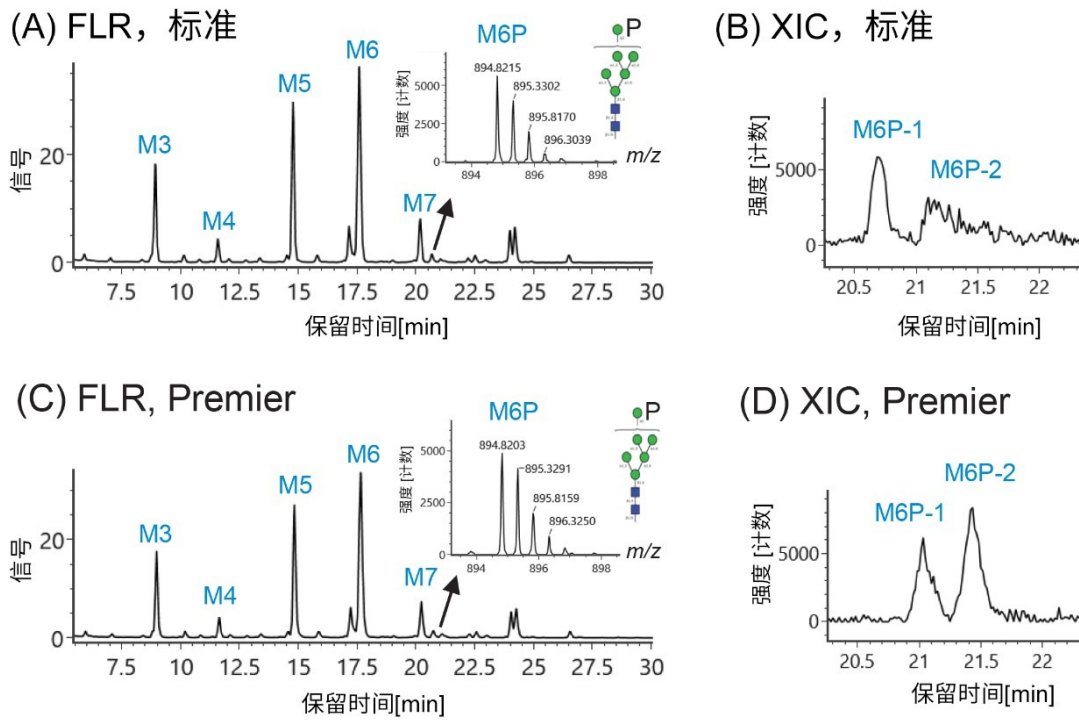


图2.在不同分析平台上分析磷酸化糖基（甘露糖-6-磷酸，M6P）得到的信号响应比较。组织蛋白酶D的游离N-糖谱图采用以下系统获得：(A)配备ACQUITY BEH Amide色谱柱的标准BioAccord系统；(C)搭载ACQUITY Premier液相色谱技术和BEH Amide色谱柱的BioAccord系统。插图为M6P的质谱图。(B)和(D)为采用两种系统配置得到的M6P的提取离子色谱图。观察到M6P-1和M6P-2具有相同的质量数。

使用UNIFI GU数据库生成糖基结构分配结果

在游离寡糖分析工作流程中，UNIFI GU数据库旨在根据葡萄糖单位(GU)和精确质量数自动鉴定糖基峰，从而改善游离寡糖分析的工作效率和可信度。GU值基于指定方法条件下糖基的校准后保留时间生成，该条件依赖于色谱柱填料和色谱方法条件。因此，需要确认采用两种液相色谱仪器配置（标准配置与ACQUITY Premier色谱柱）所采集的GU值的可比性。

使用waters_connect平台中的游离寡糖分析工作流程，对先前使用糖基性能标准品采集的数据进行处理以比

较GU值。如表1所示，标样中19种糖基的GU值与预期GU值一致，并且在不同仪器配置（BioAccord系统与搭载ACQUITY Premier技术的BioAccord系统）之间具有可比性。因此，游离寡糖分析工作流程与建立的GU数据库可无缝转换至ACQUITY Premier系统配置。3次连续进样得到的标准偏差为0.001 GU，证明分析具有较高重现性。为此，可以将搭载MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案与UNIFI中成熟的游离寡糖分析工作流程结合使用，简化N-糖分析，提高工作效率和样品回收率。

峰	名称	预期GU	标准GU	Premier GU
1	A2	5.46	5.53±0.001	5.50±0.001
2	FA2	5.79	5.84±0.001	5.81±0.001
3	FA2B	6.12	6.19±0.001	6.16±0.001
4	A2G1a	6.25	6.27±0.001	6.25±0.001
5	A2G1b	6.29	6.39±0.001	6.37±0.001
6	FA2G1a	6.53	6.58±0.001	6.55±0.001
7	FA2G1b	6.66	6.71±0.001	6.68±0.001
8	FA2BG1a	6.80	6.86±0.001	6.83±0.001
9	FA2BG1b	6.91	6.98±0.001	6.94±0.001
10	A2G2	7.10	7.15±0.001	7.13±0.001
11	FA2G2	7.43	7.46±0.001	7.43±0.001
12	FA2BG2	7.61	7.65±0.001	7.61±0.001
13	FA2G1S1	7.84	7.94±0.001	7.88±0.001
14	A2G1S1	8.40	8.37±0.001	8.32±0.001
15	FA2G2S1	8.55	8.66±0.001	8.60±0.001
16	FA2BG2S1	8.82	8.94±0.001	8.87±0.001
17	A2G2S2	9.42	9.56±0.001	9.47±0.001
18	FA2G2S2	9.69	9.85±0.002	9.75±0.001
19	FA2BG2S2	9.86	10.03±0.002	9.92±0.001

表1.使用ACQUITY Premier系统与标准版BioAccord系统和色谱柱所获得的糖基性能测试标准品中已分离峰的GU值。ACQUITY Premier GU和标准配置所得GU值的范围代表标准偏差，由3次连续进样计算得出。

结论

本研究证明，新型ACQUITY Premier系统和色谱柱技术改善了游离N-糖分析的LC-FLR-MS数据质量。磷酸化糖基的回收率和峰形得到显著改善，唾液酸化糖基的回收率有所提高。借助waters_connect信息学平台中的这一游离寡糖分析工作流程，通过根据现有UNIFI GU数据库进行自动峰匹配简化了数据分析。由搭载ACQUITY Premier技术的BioAccord系统获得的GU值与采用标准系统获得的值一致，因此可以将先前开发的ACQUITY UPLC方法转换至新型ACQUITY Premier系统。综上所述，本应用纪要证明，采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier解决方案提高了游离寡糖分析的回收率，有助于开发用于生物治疗药物开发、生产和放行的稳健且无偏差的糖基分析方法。

参考资料

1. Higel F, et al. N-glycans of Complex Glycosylated Biopharmaceuticals and their Impact on Protein Clearance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019; 139, 123–131.
2. Zhang P, et al. 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. Yu, Y. 将新型游离寡糖标记试剂RapiFluor-MS与集成式UPLC-FLR/QToF MS系统相结合用于分析低丰度N-糖. 沃特世应用纪要, 2015. [720005383ZH < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/applying-glycan-tagging-reagent-rapi-fluor-ms-and-integrated-uplc-flr-qtof-ms-system-for-low-abundant-n-glycan-analysis.html > .](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/applying-glycan-tagging-reagent-rapi-fluor-ms-and-integrated-uplc-flr-qtof-ms-system-for-low-abundant-n-glycan-analysis.html)
4. Zhang X, Reed C, Shion H, Alley W, Birdsall R, Yu Y. 使用BioAccord系统提高生物类似药N-糖分析的工作效率和可信度. 沃特世应用纪要, 2019. [720006545ZH < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/increasing-productivity-and-confidence-for-n-linked-glycan-analysis-of-biosimilars-using-the-bioaccord-system.html > .](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/increasing-productivity-and-confidence-for-n-linked-glycan-analysis-of-biosimilars-using-the-bioaccord-system.html)
5. DeLoff M. A Comparison of Premier Columns with MaxPeak HPS Technology Versus PEEK-lined Column Hardware. *Waters Application Note*, 2021. [720007210EN < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/a-comparison-of-premier-columns-with-maxpeak-hps-technology-versus-peek-lined-column-hardware.html > .](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/a-comparison-of-premier-columns-with-maxpeak-hps-technology-versus-peek-lined-column-hardware.html)

6. Isaac G., Plumb R. ACQUITY Premier液相色谱技术显著改善磷酸化和羧化脂质的灵敏度、峰形和回收率.沃特世应用纪要, 2021.720007092ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/acquity-premier-lc-technology-significantly-improves-sensitivity,-peak-shape-and-recovery-for-phosphorylated-and-carboxylate-lipids.html>>
7. Tanna N. and Plumb R. 采用配备MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier系统和色谱柱进行吉非替尼（一种EGFR抑制剂）生物分析的优势.沃特世应用纪要, 2021.720007122ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2021/advantages-of-using-acquity-premier-system-and-columns-with-maxpeak-hps-technology-for-bioanalysis-of-gefitinib-an-egfr-inhibitor.html>>
8. Liu X. and Lauber M. High Performance Surface Technology Improves HILIC Profiling of Released N-Glycans.Waters Application Note, 2021.
9. Kang J.F., et al. Lysosomal Targeting Enhancement by Conjugation of Glycopeptides Containing Mannose-6-phosphate Glycans Derived from Glyco-engineered Yeast.Scientific Reports. 2018; 8, 8730.
10. Yu Y. N-糖的表征与分析：将精确质量、标准GU值和功能强大的UNIFI软件有机结合，更准确地进行寡糖结构确证.沃特世应用纪要, 2016.720004845ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/n-linked-glycan-accurate-mass-reference-glucose-units-glycan-assignments0.html>> .

特色产品

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

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

ACQUITY Premier解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135071970>>

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>>

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

720007261ZH, 2021年5月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.