

## 使用BioAccord™ LC-MS系统比较mAb生物类似药物产品中的游离N-糖

---

Kellen DeLaney, Yamin Htet, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

N-糖通常属于治疗性单克隆抗体(mAb)中关键质量属性的一部分，因为它们在安全性和有效性方面发挥着重要作用。因此，无论是原研药还是后续的候选mAb生物类似药，都需要对N-糖进行充分表征。本研究展示了如何使用一个体积小、合规的LC-MS平台执行游离N-糖的分析工作流程，用于mAb生物类似药产品评估。符合法规要求的waters\_connect™平台提供了一个精简的信息学工作流程，可基于HILIC分离、荧光和质谱检测，利用校准后的游离寡糖单元保留时间和精确质量数确认自动归类标记的游离寡糖。本研究利用该工作流程比较了英夫利昔单抗生物类似药物产品与原研药的糖基化谱图。使用Andrew+™移液机器人按照GlycoWorks™ RapiFluor-MS™方案，通过自动化方案制备样品，然后在BioAccord LC-MS系统上进行分析。在四个样品中共检测到36种N-糖，并在鉴定的游离寡糖以及样品之间每种游离寡糖的相对丰度方面观察到显著差异。结果表明，这一工作流程可以轻松部署用于mAb药物产品中游离寡糖的分析和监测。

### 优势

- 易于部署的自动化方案，可实现可重现的样品前处理
  - 简化的信息学工作流程，通过游离寡糖标准品校准的色谱保留时间和精确质量数确认，实现自动标记游离N-糖的归类
  - 对归类的N-糖及其在样品之间的相对丰度进行定量比较
-

---

## 简介

糖基化修饰是一种重要的修饰作用，会影响生物治疗药物产品的质量。由于N-糖生物合成的各个阶段涉及复杂的酶网络，因此每个位点的N-糖结构各不相同，可能因上游和下游生物工艺以及宿主细胞系的不同而发生变化<sup>1</sup>。这些翻译后的修饰作用会影响蛋白质的关键功能，包括蛋白质折叠、构象、稳定性、受体相互作用以及细胞内外的靶向性<sup>2</sup>。糖基化修饰的类型和程度会影响药物的安全性、有效性和稳定性。因此，N-糖通常被选为药品开发和生产过程中要监测的关键质量属性(CQA)。即使是生物类似药产品，糖型表征也至关重要，因为生产工艺的差异可能导致糖基化修饰谱图发生变化，尤其是当药品来源于不同的细胞系时。这些糖基化差异可能导致药物的免疫原性、生物学功能和循环半衰期出现差异，因此，系统地评估生物类似药产品与原研药之间的任何糖基化差异至关重要<sup>1</sup>。

本研究展示了如何通过一个工作流程快速归类N-糖、比较谱图，以及确定潜在的CQA以供后续监测。糖基化谱图可以在不同层面上进行表征，包括完整糖蛋白、糖蛋白亚基、糖肽和游离寡糖分析。全面表征一组游离寡糖可以提供组成糖蛋白N-糖的单糖组成、糖链和相对丰度，但对于大多数抗体，预计会得到一组已知的双天线游离寡糖。游离寡糖分析可能颇具挑战，因为游离寡糖不含发色团，并且通常以低丰度存在于各种结构中。为解决问题，可以使用荧光标记对游离寡糖进行标记，然后将荧光检测器与液相色谱(LC)和质谱(MS)联用，进行高灵敏度检测。GlycoWorks RapiFluor-MS标记的优势在于能够通过HILIC色谱实现有效的糖型分离、高灵敏度的荧光检测和高MS电离效率<sup>3</sup>。本文介绍了如何使用搭载waters\_connect信息学软件的BioAccord LC-MS (ToF)系统实施游离寡糖分析工作流程，比较英夫利昔单抗生物类似药物产品与原研药的糖谱。使用Andrew+移液机器人进行样品前处理，所得游离寡糖样品随后使用配备在线ACQUITY™ Premier FLR检测器的BioAccord LC-MS系统进行分析。本研究分析了每种英夫利昔单抗产品的糖基化谱图，并比较了不同产品的N-糖相对丰度。

---

## 实验

### 样品描述

使用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游离寡糖样品（包括Remicade™、Inflectra™、Avsola™和Renflexis™）（图1）<sup>4</sup>。每个样品向色谱柱中的进样量为5 μL（约2 μg mAb）。将RapiFluor-MS葡聚糖校准曲线标准品（P/N: 186007982 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007982-rapifluor-ms-dextran-calibration-ladder.html>>）复溶于100 μL水中，然后进样2 μL至色谱柱中。将RapiFluor-MS糖基性能测试标准品（P/N: 186007983 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007983->

[rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html](#)> ) 复溶于50  $\mu\text{L}$ 水中，然后进样2.5  $\mu\text{L}$ 至色谱柱中。

## 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的 QuanRecovery™样品瓶 (部件号 : 186009186)
色谱柱:	ACQUITY Premier BEH™ Amide糖基 分析专用柱(1.7 $\mu\text{m}$ , 130 Å, 2.1 $\times$ 150 mm, P/N: 186009524)
柱温:	60 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	5 $\mu\text{L}$
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

## MS条件

MS系统： BioAccord系统

电离模式： ESI, 正离子

采集范围： 50–2,000 *m/z*

毛细管电压： 1.5 kV

低能量锥孔电压： 45 V

高能量锥孔电压： 70–90 V

脱溶剂气温度： 350 °C

智能数据捕获(IDC)： 开

## 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，利用游离寡糖FLR和MS确证和精确质量数筛查工作流程进行数据的采集和处理。

---

## 结果与讨论

对于mAb生物类似药制造商而言，表征和监测N-糖可能具有挑战性，因为与原研药产品相比，生物类似药产品中的N-糖水平可能存在很大差异。本文介绍了一种稳定且易于部署的自动化工作流程，用于归类和比较英夫利昔单抗药品中的游离寡糖，这一过程通过BioAccord LC-MS系统，使用自动化数据处理功能对RapiFluor-MS标记的游离N-糖进行处理。

### 使用Andrew+移液机器人制备样品

游离寡糖样品前处理工作流程在LC-MS分析之前包括三个步骤：(1) 使用PNGase F酶进行糖基释放，(2) 使用RapiFluor-MS标签进行标记，(3) 通过SPE净化去除多余的标签。这些步骤的自动化有利于确保样品之间的重现性，无论是评估单个样品还是比较不同样品间的谱图。Andrew+移液机器人使用图1所示的配置对16个样品执行了样品前处理工作流程<sup>4</sup>。该方案可在90分钟内制备多达48个样品。利用该方案对四种英夫利昔单抗产品（包括原研药和三种生物类似药）各制备四份重复样品。此外的优势是，有了方案自动化，用户在样品前准备过程中就能腾出时间执行其他任务。这种自动化游离寡糖样品前准备程序包含在预配置的Andrew+ OneLab™脚本中，供用户下载和应用。

### 保留时间校准和性能检查

为确保通过基于数据库的搜索准确归类样品中的游离寡糖，本研究将色谱峰保留值与葡萄糖单元(GU)科学数据库中的条目进行了匹配，该数据库包含177种N-糖结构<sup>5</sup>。数据库中包含各种游离寡糖的GU值（以葡萄糖单元值校准的保留时间）和精确质量数，可用于更可靠地确认游离寡糖峰。在使用BioAccord系统运行样品之前，先使用RapiFluor-MS葡聚糖校准曲线标准品（P/N: [186007982](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007982-rapifluor-ms-dextran-calibration-ladder.html>>）校准系统，并使用ACQUITY Premier BEH游离寡糖分析专用柱来展示基于GU保留时间的游离N-糖归类的系统适应性<sup>6</sup>。校准时使用4~12的GU值，覆盖样品中N-糖的洗脱范围。图2中展示了葡聚糖校准曲线标准品，其中标出了GU值和保留时间。使用RapiFluor-MS糖基性能测试标准品（P/N: [186007983](#) <  
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan->

[performance-test-standard.html](#)> ) 确认校准的准确度，如图2下图所示。色谱图中显示了几种已鉴定的游离寡糖结构，以及实测GU值，和预期GU值与实测GU值之间的差异( $\Delta$  GU)。鉴定出的游离寡糖的 $\Delta$  GU值小于0.10，表明保留时间校准精度出色。

## 英夫利昔单抗样品中N-糖的鉴定

确认系统经过适当的保留时间校准后，使用相同的分离条件在系统上运行四种英夫利昔单抗样品。结果在waters\_connect的UNIFI应用程序中使用游离寡糖分析（FLR和MS确证）工作流程进行处理<sup>5</sup>。使用该工作流程，将游离寡糖的保留时间和 $m/z$ 值经色谱校准后用于游离寡糖结构的确定，具体做法是在UNIFI科学数据库中匹配游离寡糖条目（基于GU值和MW的最接近匹配）。利用FLR峰面积进行相对定量测量。图3展示了使用此工作流程处理数据的结果页面示例。组分汇总表列出了已鉴定的游离寡糖及其相关信息。色谱图窗口显示了检测到的峰以及相应游离寡糖的名称和结构。单击表中的组分或色谱图中的峰，软件将弹出库搜索结果列表，如右下图所示。图中显示了所有可能的谱库匹配结果以及相关信息（包括 $\Delta$  GU和 $\Delta$   $m/z$ ），以便快速查看每个峰匹配结果。在图3的示例中，12.80分钟处洗脱的峰有两个可能的谱库匹配，即A2和F(6)M4。但是，只有A2与预期的 $m/z$ 匹配，并且匹配的GU值更接近。因此，软件自动确认A2为该峰对应的游离寡糖结构。

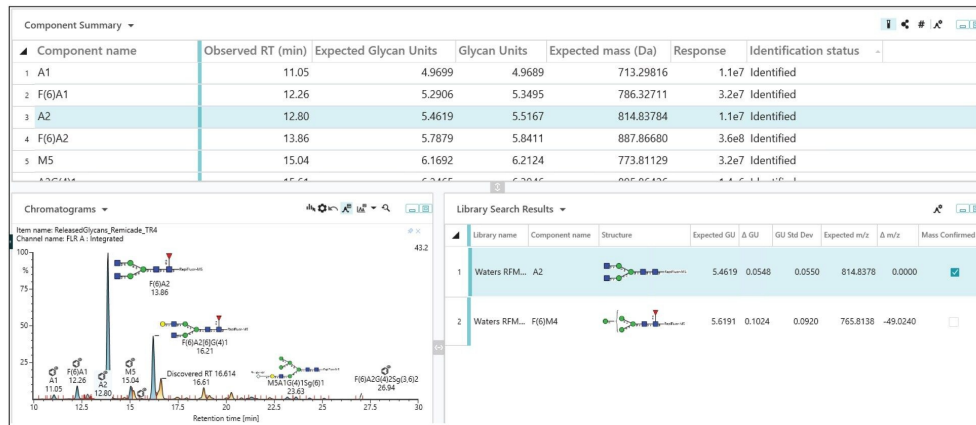


图3.在waters\_connect的UNIFI应用程序中使用游离寡糖分析（FLR和MS确证）工作流程进行基于游离寡糖单元的游离N-糖归类。

在所有四个英夫利昔单抗样品中，共归类出36种独特的N-糖结构，但不同样品中的N-糖结构分布存在很大差异，每个样品测得的游离寡糖在18至21种之间。图4比较了样品之间已鉴定的N-糖。左侧的文氏图展示了各样品间

共有的游离寡糖。虽然已鉴定游离寡糖中有大约三分之一在所有四个样品中得到一致鉴定，但每个样品也存在特有的游离寡糖。不出所料，来自相同细胞系的mAb样品表现出更高的谱图相似性，即，Remicade和Inflectra（均来自小鼠细胞系），以及Renflexis和Inflectra（均来自中国仓鼠卵巢细胞系）。图4中还包含所有四个样品的叠加色谱图，其中标记了丰度较高的游离寡糖。

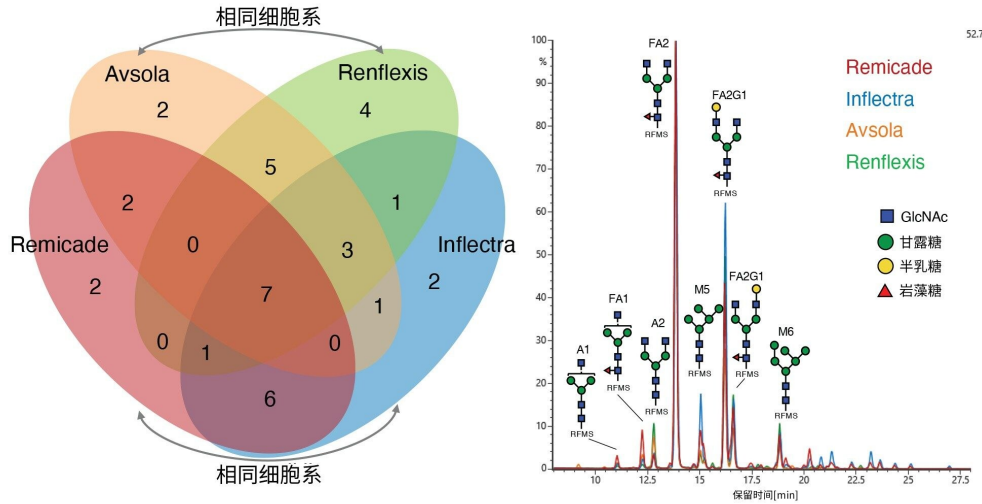


图4. 英夫利昔单抗原研药和三种生物类似药样品中鉴定出的N-糖比较。生成的文氏图（左）展示了不同样品中独有和共有的游离寡糖数量。四种英夫利昔单抗样品的叠加色谱图均已标记出主要的游离寡糖，表明各样品中糖型的相对丰度存在差异。

从色谱图中可以明显看出，即使是在所有四个样品中都鉴定出的游离寡糖，在相对丰度上也表现出差异。图5以镜像图更详细地展示了原研药与其中两种生物类似药产品之间的差异。上图为生物类似药的色谱图，下图为原研药的色谱图。峰强度差异以紫色迹线显示。每幅图中的插图展示了低丰度后洗脱N-糖的放大图。这些图能够快速显示两个样品之间的差异。图中还显示了简化的文氏图，比较了每个样品中测得的游离寡糖。

## 使用精确质量数筛查工作流程定量分析英夫利昔单抗样品中的N-糖

游离寡糖鉴定完成后，即可实施精确质量数筛查工作流程，对样品中的目标游离寡糖进行监测和定量。为定量分析每个样品中游离寡糖的相对丰度差异，研究中计算并比较了已鉴定游离寡糖目标列表中的游离寡糖在各样品中的相对百分比。例如，图6展示了在所有样品中鉴定出的七种N-糖的相对峰面积百分比。FA2和FA2G1是所有四个样品中丰度最高的游离寡糖，在每个样品中的相对丰度相似。A2（一种双天线游离寡糖）在Avsola和Renflexis中



的丰度往往更高，而Man5（一种高甘露糖）在Remicade和Inflectra中的丰度更高。和预期一样，来自相同细胞系类型（Remicade/Inflectra和Avsola/Renflexis）的英夫利昔单抗样品往往具有更高的谱图相似性。然而，所有样品之间仍然存在显著差异，因此，糖谱的系统分析就显得尤为重要。

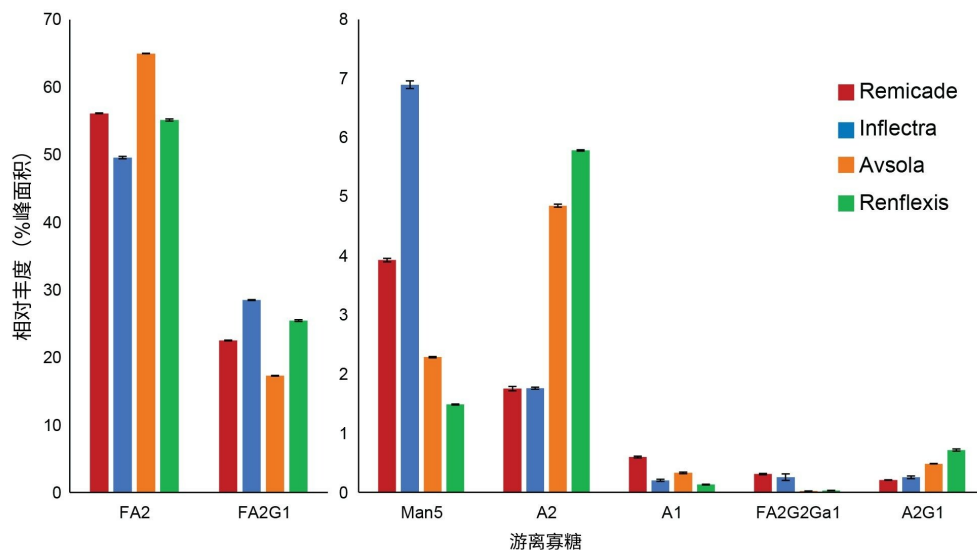


图6.使用精确质量数筛查工作流程比较四个英夫利昔单抗样品中各糖型的相对丰度（%峰面积）。

## 结论

不同mAb生物类似药物产品之间的糖基结构和相对丰度可能存在很大差异，尤其是来自不同细胞系的产品。糖基化会影响生物治疗药物的重要功能，因此游离寡糖通常被视为CQA，需要对样品进行详细表征和严密监测，在原研药与生物类似药之间建立分析对等性。本研究展示了使用BioAccord LC-MS系统比较英夫利昔单抗生物类似药与原研药产品的N-糖基化谱图的工作流程。Andrew+移液机器人采用GlycoWorks RapiFluor-MS方案自动完成样品前处理，waters\_connect UNIFI应用程序中的游离N-糖工作流程可自动采集、处理和报告数据，快速比较N-糖样品的糖谱。该工作流程包括利用荧光和质谱检测数据以及UNIFI RFMS葡萄糖单元(GU)库校准保留时间，以实现糖基归类的高可信度。这些工具能够比较每个样品中的游离寡糖，并监测所有四个样品中关键游离寡糖结构的相对丰度。以上这些结果展示了如何轻松分析mAb生物类似药物产品的糖基化谱图，以便确定工艺差异性、生物类



似药对等性，并有利于选择用于QC产品放行监测的CQA。

---

## 参考资料

1. Zhang P, Woen S, Wang T, Liau 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.
2. 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.
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. 沃特世应用纪要. [720006194](#). 2018年2月.
5. Yu YQ. 使用UNIFI多聚糖应用解决方案进行游离N-糖分析，沃特世应用纪要，[720005598ZH](#)，2016年1月.
6. Zhang X, Kellett J, Birdsall RE, Yu YQ. 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，沃特世应用纪要，[720007261ZH](#)，2021年5月.

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

ACQUITY UPLC和ACQUITY Premier FLR检测器 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography->

[detectors/acquity-uplc-and-acquity-premier-flr-detectors.html](#)>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10195515>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>>

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

<<https://www.andrewalliance.com/>  
Andrew+移液机器人 >  
<https://www.andrewalliance.com/laboratory-software/>

OneLab软件 >

720008041ZH, 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