Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

N-链接寡糖的表征与分析：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

Ying Qing Yu
沃特世公司

应用优势

沃特世UNIFI®生物制药平台化方案以UPLC（超高效液相色谱）- FLR（荧光检测器）- QTof MS（串联四极杆飞行时间质谱仪器）为核心，是生物制药领域最优的糖基化分析表征工具，涵盖从药物研发到QC检测的各个环节。此方案可作为常规分析手段用于N-链接寡糖分析：保留时间经校准后，使用相应的荧光和质谱检测数据和基于保留时间的糖数据，对N-链接寡糖结构进行分析。这种方法适用于单个蛋白质的糖型分析，也适用于多批次生物药以及生物仿制药与创新药的比较性研究。

沃特世解决方案

UNIFI生物制药平台化方案

ACQUITY UPLC® H-Class Bio系统

ACQUITY UPLC BEH Glycan色谱柱

ACQUITY UPLC FLR检测器

Xevo® G2-S QTof

GlycoWorks样品制备试剂盒

沃特世分析标准品与试剂：2-AB标记Dextran Ladder标准品和仪器性能测试标准品

关键词

生物仿制药，依那西普，沃特世寡糖GU数据库，葡萄糖单位

简介

沃特世UNIFI生物制药平台化方案以业内领先的UPLC®（超高效液相色谱）生物分离色谱柱和仪器系统为核心，结合光学和质谱检测，能对蛋白质药物进行全面的结构分析和表征。UNIFI科学信息系统基于法规依从性架构，将数据采集、数据处理、生物信息学以及报告功能自动整合在一起。

本应用纪要详细介绍了一个用于蛋白质游离寡糖分析的新流程。利用最新版本的UNIFI生物制药平台化方案，通过使用荧光检测和精确质量对糖结构进行分析。以寡糖生物仿制药与创新药的荧光标记（2-AB）N-链接寡糖分析的比较性研究为例，来展示此流程在寡糖分析的实际应用。

本研究中所使用的分析平台由ACQUITY UPLC H-Class Bio系统、ACQUITY UPLC荧光检测器和Xevo G2-S QTof串联四极杆飞行时间质谱仪组成。UNIFI寡糖方案基于校正的保留时间（以葡萄糖单位表示，也称为GU）和沃特世寡糖GU数据库中的精确质量数（整合于UNIFI 1.7软件及更高版本），实现了对2-AB标记的游离N-链接寡糖进行确证和表征分析。

经证实，精确质量数信息对进一步确认糖结构非常有用，因为在实际分析工作中，有时一个峰的GU值会对应数据库中多个寡糖结构。UNIFI生物制药平台化方案还可用于采集和处理其它如寡糖DDA MS/MS数据，或者通过使用外切糖苷酶进行寡糖序列研究等，这些补充性数据信息能够帮助对糖结构进行充分寡糖确证，相关的具体细节我们会在近期的应用纪要中加以说明。

液相色谱条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class Bio
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH Glycan色谱柱 1.7 µm，2.1 × 150 mm
柱温：	40 ˚C
流动相A：	50 mM甲酸铵（pH 4.4）
流动相B：	乙腈
注：	本实验使用了LC/MS级别的水和乙腈

质谱条件

MS系统：	Xevo G2-S QTof MS
模式：	ESI+，灵敏度模式
毛细管电压：	3.0 kV
锥孔电压：	80 V
源温度：	120 ˚C
脱溶剂气温度：	300 ˚C
脱溶剂气流速：	800 L/h
扫描时间：	0.5 s
间隔时间：	20 s

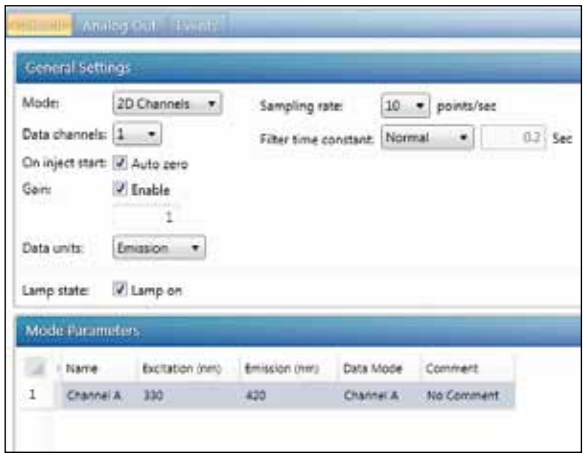
数据采集、处理和报告

UNIFI科学信息系统，1.7版本

本研究中，我们展示了寡糖分析平台的多项特点：

- 通过FLR和MS数据通道的自动采集和时间校准，分析工作流程从数据采集无缝推进到数据处理，从而形成常规、可重复的数据处理和报告方法。
- 依据经精确质量数确证的保留时间（以GU表示），沃特世多聚糖GU数据库实现了多聚糖结构的可靠表征分析。
- 通过生成N-链接寡糖的定量（相对百分比）和定性分析报告，这一精简的工作流程让科学家能够轻松传达关键信息，而不需要将信息导出至外部数据包，从源头减少了数据处理出错的几率。因此，实验室符合法规依从性和数据完整性能力得以增强。

ACQUITY UPLC FLR检测器参数设置



UPLC HILIC梯度表

	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	Composition A (%)	Composition B (%)	Composition C (%)	Composition D (%)	Curve
1	0.00	0.400	30.0	70.0	0.0	0.0	Initial
2	2.06	0.400	30.0	70.0	0.0	0.0	6
3	34.80	0.400	47.0	53.0	0.0	0.0	6
4	36.00	0.250	80.0	20.0	0.0	0.0	6
5	39.00	0.250	80.0	20.0	0.0	0.0	6
6	40.00	0.400	30.0	70.0	0.0	0.0	6
7	45.00	0.400	30.0	70.0	0.0	0.0	6

样品制备和保留时间校正的GU值

2-AB标记的葡萄糖均聚物（Dextran Ladder样）和寡糖分析仪器性能测试标准品由沃特世公司提供。使用Dextran Ladder标准品对寡糖的保留时间进行校正和归一化标记，以实现日间、系统间和实验室间的卓越重现性。同时，通过沃特世寡糖GU数据库的常规使用可以实现主要寡糖的结构鉴定。

选取聚合度为4至12个葡萄糖单位的色谱峰，其保留时间用于生成葡萄糖单位（GU）与保留时间的五阶导数拟合的校准曲线。利用校正后的GU值对实验样品峰进行自动分配并生成报告。寡糖分析仪器性能测试标准品包括一组双天线寡糖，其中包含高甘露糖和唾液酸化糖，是治疗性单克隆抗体中典型的糖型。

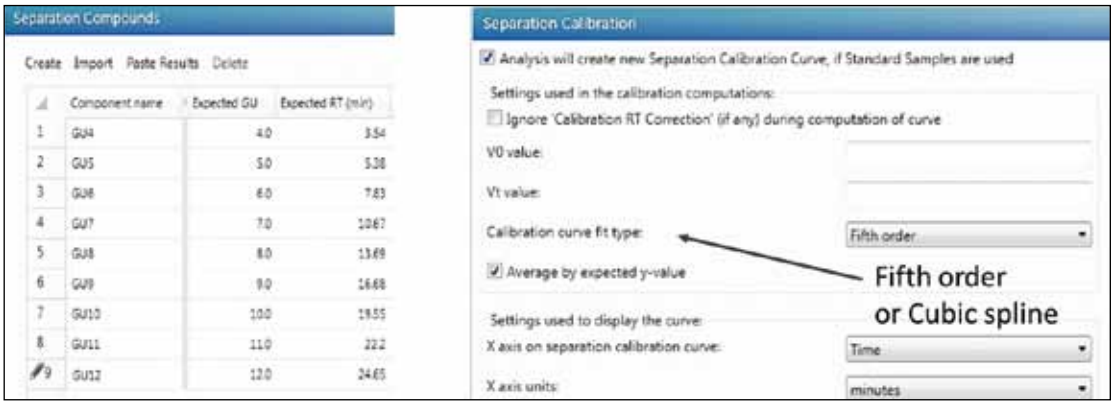
使用沃特世GlycoWorks样品制备试剂盒从依那西普的生物创新药和候选生物仿制药中制备出2-AB标记的游离N-链接寡糖。请参照试剂盒说明书中的详细信息进行操作。

荧光和MS图谱校正

在仪器控制台页面中输入实验数据，在数据采集过程中对荧光和MS图谱进行自动校正。时间补偿值取决于管路（FLR和MS入口之间连接部分的管线）长度和流速，因不同系统而异。

重要设置

在UNIFI处理方法中，对2-AB标记的Dextran Ladder标准品样进行保留时间校正设定（对于单克隆抗体的寡糖样品，常用的校正范围为GU 4-12）。五阶导数拟合和三次样条曲线拟合都适用于保留时间校正。



结果与讨论

本研究中，我们提供了使用UNIFI生物制药平台化方案进行寡糖UPLC/FLR/MS分析工作流程（图1）的具体细节，包括单一寡糖样品的有效分析和复杂寡糖的比较性研究中所用到的分析方法、数据查看工作流程以及报告方案的详细信息。

图1. 使用FLR与MS确证进行寡糖检测工作流程。

第1步：数据采集

使用配备FLR和MS检测器（后者采用Xevo G2-S QTof MS）的ACQUITY UPLC H-Class Bio系统对荧光标记寡糖进行分离。将ACQUITY UPLC FLR检测器直接与QTof MS相连，不对流路做任何改变。FLR 与MS图谱将按上述操作对保留时间进行自动匹配。图2给出了UPLC/FLR/QTof MS色谱图的一个示例。

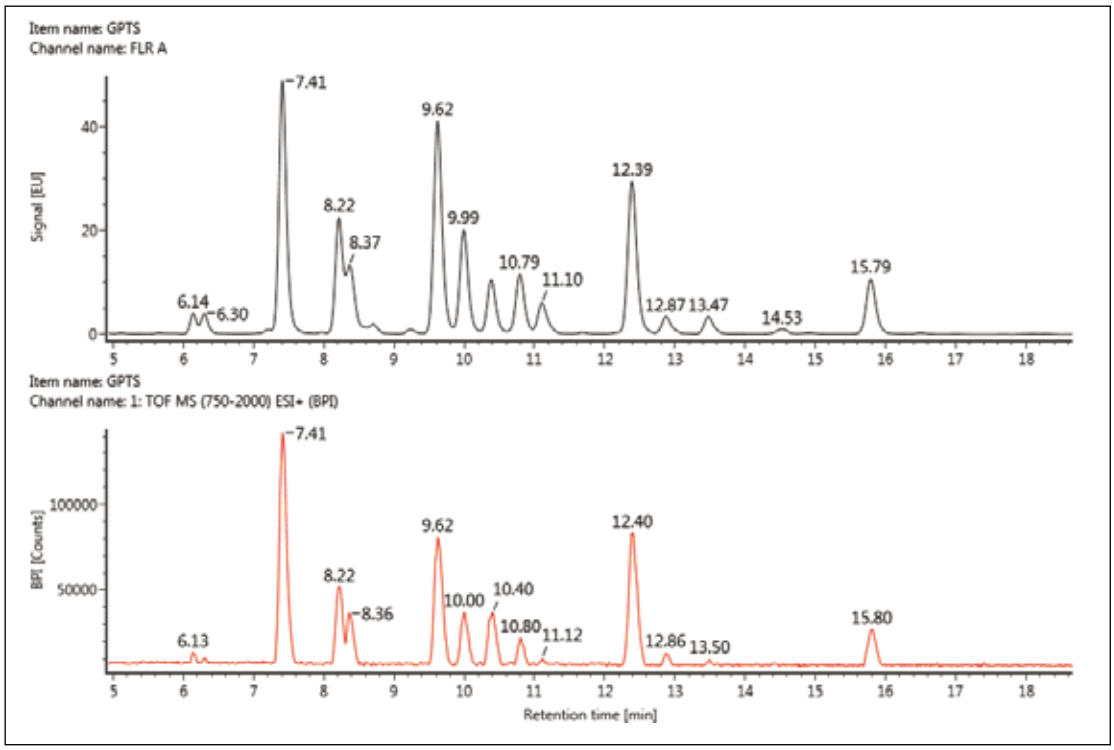


图2. 2-AB标记寡糖标准品（寡糖分析仪器性能测试标准品，GPTS）的UPLC/FLR/MS色谱图。上图为FLR色谱图，下图为BPI MS色谱图。在数据采集过程中以FLR对BPI MS迹线进行时间校正。

以2-AB标记的Dextran Ladder标准品作为保留时间校正标准品。通常，目标样品就像三明治夹在多个Dextran Ladder标样之间进样。通过全部标准品的平均值自动计算保留时间与葡萄糖单元值之间的五阶导数拟合曲线或三次样条曲线，随后该曲线被用于寡糖实验色谱图的数据处理过程。保留时间校正的好处在于可以调整保留时间的变化，从而适应任何流动相配制、仪器配置的变化以及用户和实验室的其它可变因素。

图3显示出了Dextran Ladder标样的校正结果。

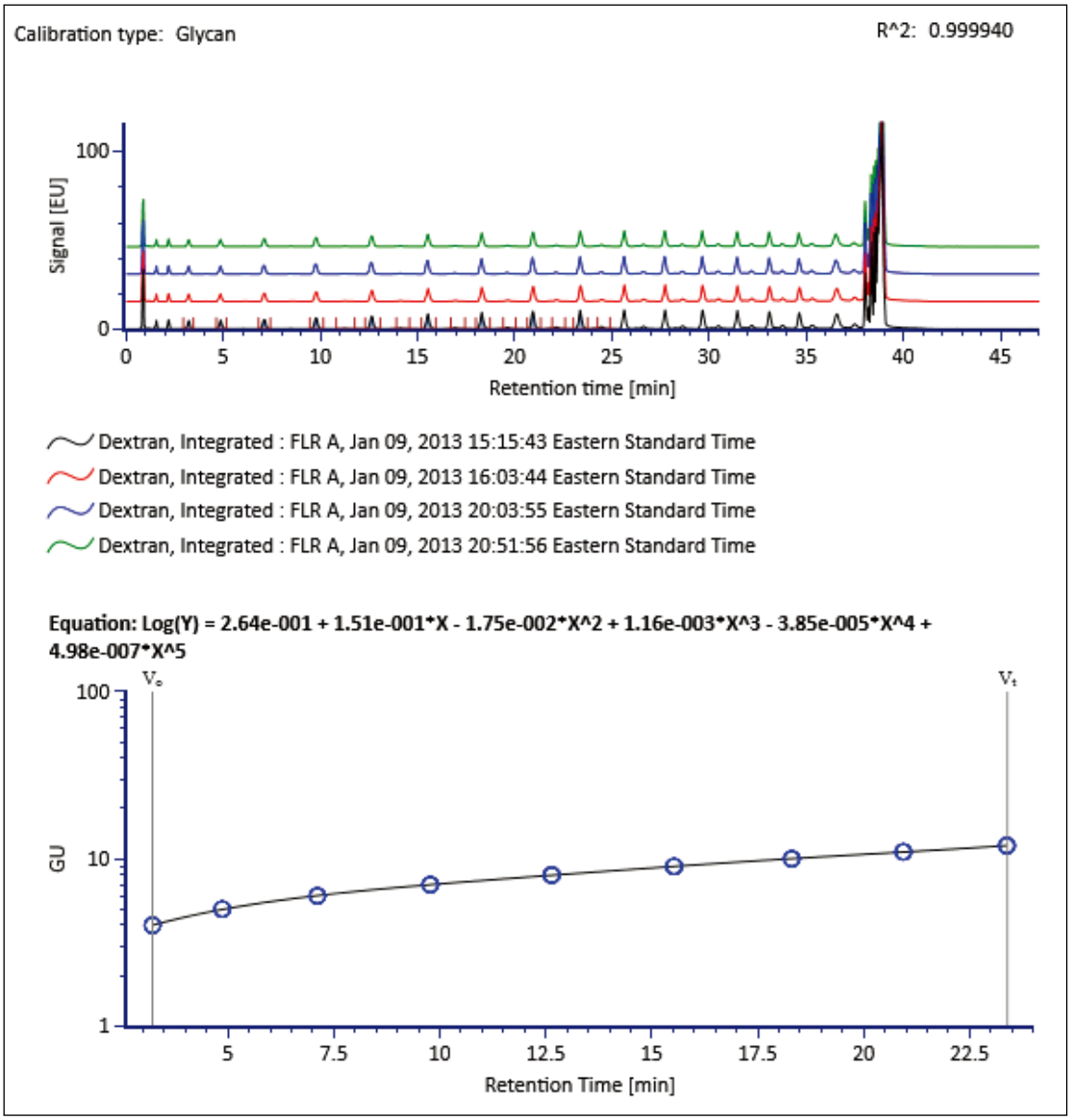


图3. Dextran Ladder标样校准示例。上方色谱图显示了葡聚糖校准曲线标准品四次进样的叠加图，分别采集于两次样品运行前后。下图为由这些进样生成的五阶导数拟合曲线。R^2（0.999963）和重叠的数据点显示出这些进样间极佳的保留时间相关性。

第2步：数据处理和科学数据库检索

沃特世寡糖GU数据库包含来自多种不同糖蛋白如人血清中的2AB标记N-链接寡糖的保留时间（以GU表示）和质量数信息。现有寡糖的种类数量为300。每种寡糖都有相应的GU值、分子式、寡糖结构和单一同位素质量数。科研人员可在数据库中对某种寡糖或特定类别的寡糖进行检索。

图4显示了一个例子。所选试剂为2-氨基苯甲酰胺（2-AB），因为沃特世寡糖GU数据库中的实验GU值取决于2AB标记蛋白质。搜索标准功能可作为过滤器，通过限制多种类型寡糖应用属性来缩小寡糖GU检索范围。沃特世寡糖GU数据库是UNIFI生物制药平台解决方案中附带的默认数据库，但用户也可以自己创建GU数据库用以替代或补充沃特世数据库。

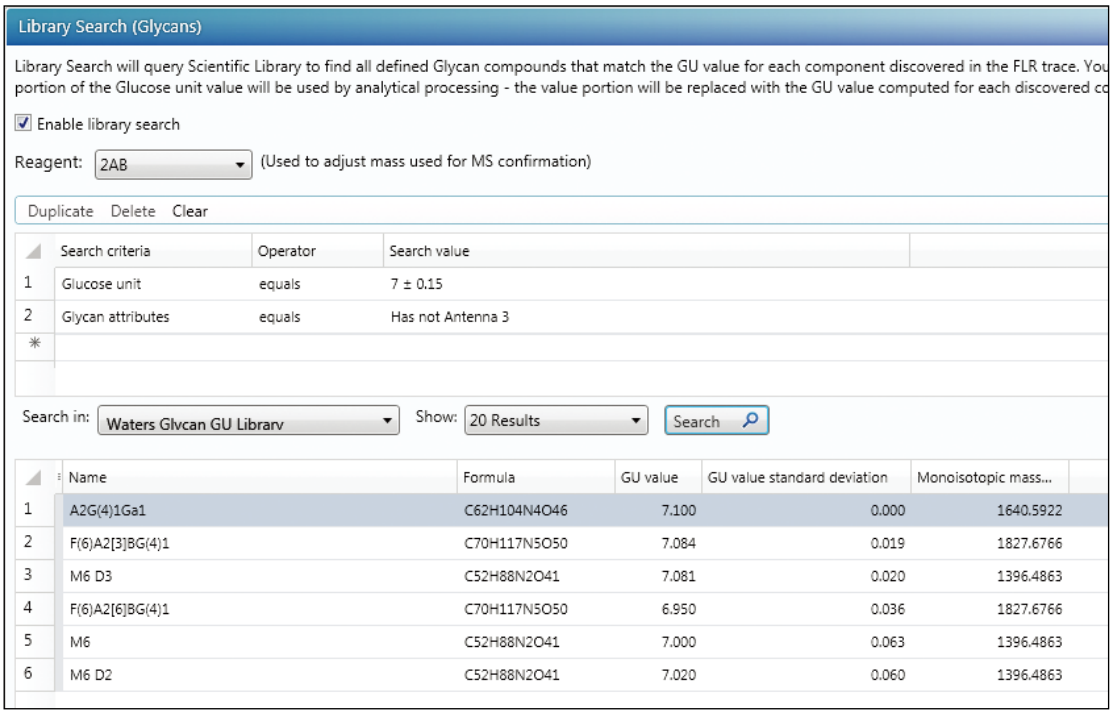


图4. 沃特世寡糖GU数据库的数据库检索设置。

沃特世寡糖GU数据库

UNIFI软件的自动化数据处理包括GU值的计算（用于FLR峰积分），相关峰的精确质量数的测定，以及由此产生的科学数据库检索。具体操作遵循以下规则：

1. 在GU值数据库范围内检索所有实验糖苷的GU值（实验数据与数据库比对）都必须有相应的FLR峰。
2. 在所有可能配型过程中，已确证精确质量数的寡糖优先进行匹配，与搜索结果最接近的GU值通常作为默认备选。
3. 由于FLR比质谱更为灵敏，因此，那些含量比较低的寡糖可能会有良好的FLR信号，却没有或者只有很低的MS信号。对于这种情况下的寡糖只能根据数据库中GU值的差异来确定糖型。
4. 对于共流出或具有相同GU值的寡糖，如具有最高丰度的（根据质谱信号）可得到默认分配。而较低丰度的寡糖（如果存在）仍作为备选分配（经质量数确证）。
5. 当在数据库中按照给定的搜索条件未能找到GU值时，这样的峰将会被标记为“未覆盖”组分。这些峰的确证还需进一步的研究，一旦结构确证后，便可创建一个新的数据库条目。
6. 互为结构异构体的寡糖往往具有相近的GU值和相同的质量数。在这种情况下，匹配的异构体将会被标记为质量数已确证；而具有最接近GU值的异构体将会突出显示为首要分配任务。但可能还需要进行糖苷酶处理或MS/MS分析以便直接分配。

图5是UNIFI软件的查看页面的截屏，其中详细列出了经处理的数据库搜索结果。FLR峰均被积分和匹配最佳的糖型。操作人员可在查阅搜索结果后，将某个分配更改为另一个具有相似GU值的寡糖。软件的审计追踪功能将对这一变化进行追踪。

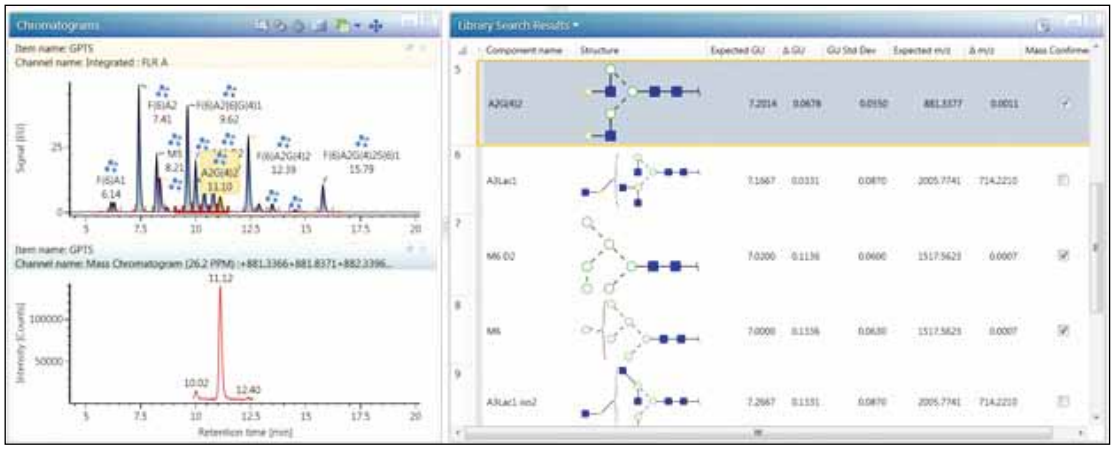


图5. 沃特世寡糖GU数据库搜索结果的查阅窗口。左侧为经处理的FLR色谱图和突出显示的一个寡糖的XIC MS图；右侧为所选寡糖峰的数据库搜索结果。图中列出了诸如结构（采用连接分配）、可能的GU值、可能的质量数、GU差值和质量数差值等信息。此外，如果观察到任何备选寡糖的质量数，则图中“已确证质量数”框会被选中。

应用实例：使用UNIFI进行生物治疗创新药和候选生物仿制药的N-链接寡糖谱图比对

依那西普（商品名为Enbrel）是一种生物治疗单克隆抗体融合蛋白质，用于治疗类风湿性关节炎和其它自身免疫疾病；此药是现今市场上收益最高的生物治疗药物之一。许多生物科技公司正积极努力地研发依那西普的生物仿制药。

本研究中，我们通过UNIFI寡糖应用解决方案及其FLR/MS工作流程，对该生物创新药和候选生物仿制药的2AB标记N-寡糖谱图进行了对比。我们观察到生物仿制药和创新药的N-寡糖谱图高度相似，但还是可以检测到一些不同点。

例如，在候选生物仿制药中观察到丰度更高的高甘露糖结构，包括一些仅在候选生物仿制药中才能检测到的扩展甘露糖（如Man 6和Man 8）结构（图6）。我们还观察到候选生物仿制药中含有相对丰富（高于0.1%）的寡糖，F(6)A2[6]BG(4)1、F(6)A2[3]G(4)1S(3)1、F(6)A3G(4)3S(3,3)2和A2G(4)2S(6)1，但在依那西普中，这些唾液酸化寡糖未被观察到或含量低于0.1%。

N-链接寡糖表征差别很可能是由细胞培养条件的差异造成。若要确定这些差异对候选生物仿制药安全性或疗效的影响，则需更多的生物检测和临床经验。

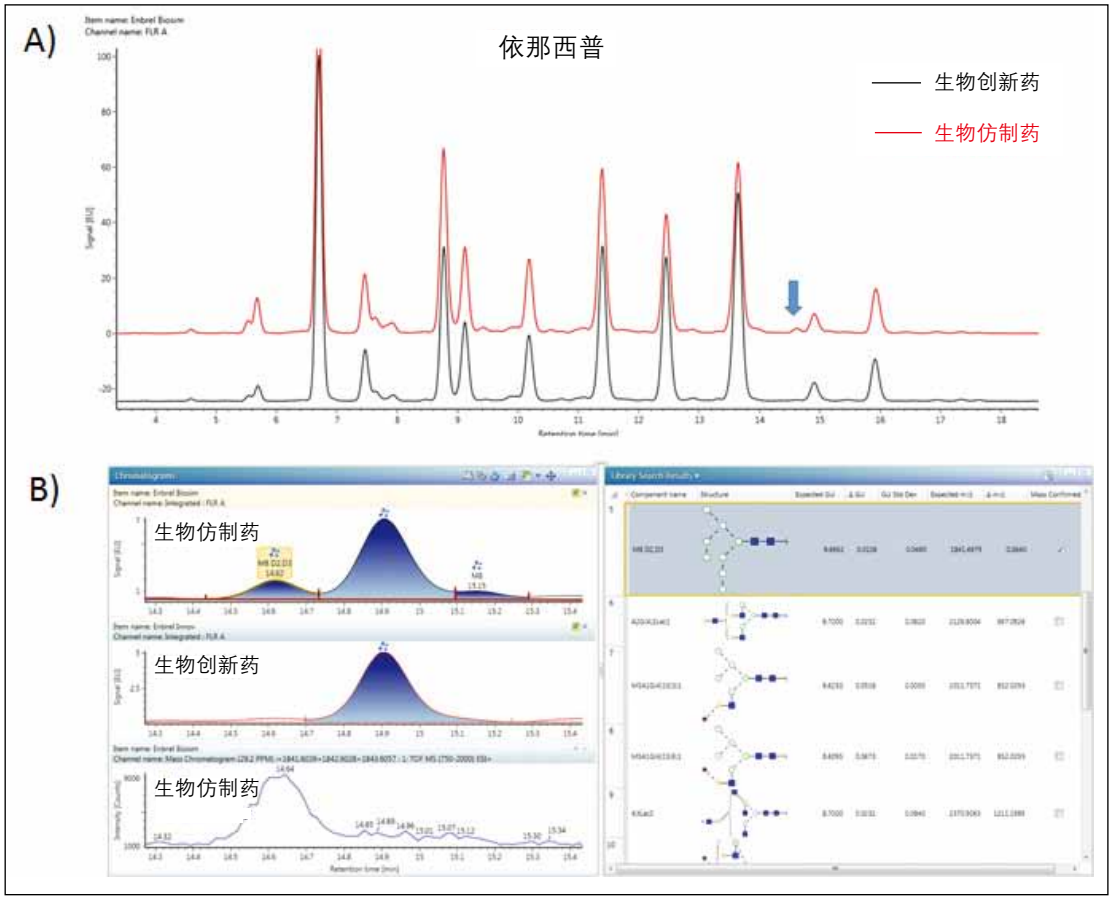


图6. A) 依那西普的生物创新药和候选生物仿制药的N-寡糖叠加色谱图。蓝色箭头指出了仅在候选生物仿制药中观察到的Man8寡糖。B) 沃特世寡糖GU数据库搜索结果表明图 (A) 中标记的峰为Man8。标记峰、Man8、Man8的XIC的数据库搜索结果提供了更多的证据，证明了色谱图窗口中显示的是正确的结构分配。

应用报告

UNIFI软件中包含了针对特定应用的报告模板。默认的寡糖检测报告模板能提供详细的单个样品及对比数据结果。使用者也可方便地对模板进行修改以满足特定的寡糖分析项目的报告需求。

以依那西普的生物创新药/生物仿制药中的N-链接寡糖分析为例，图7给出了一份常规的寡糖分析报告所提供的各类信息截图。

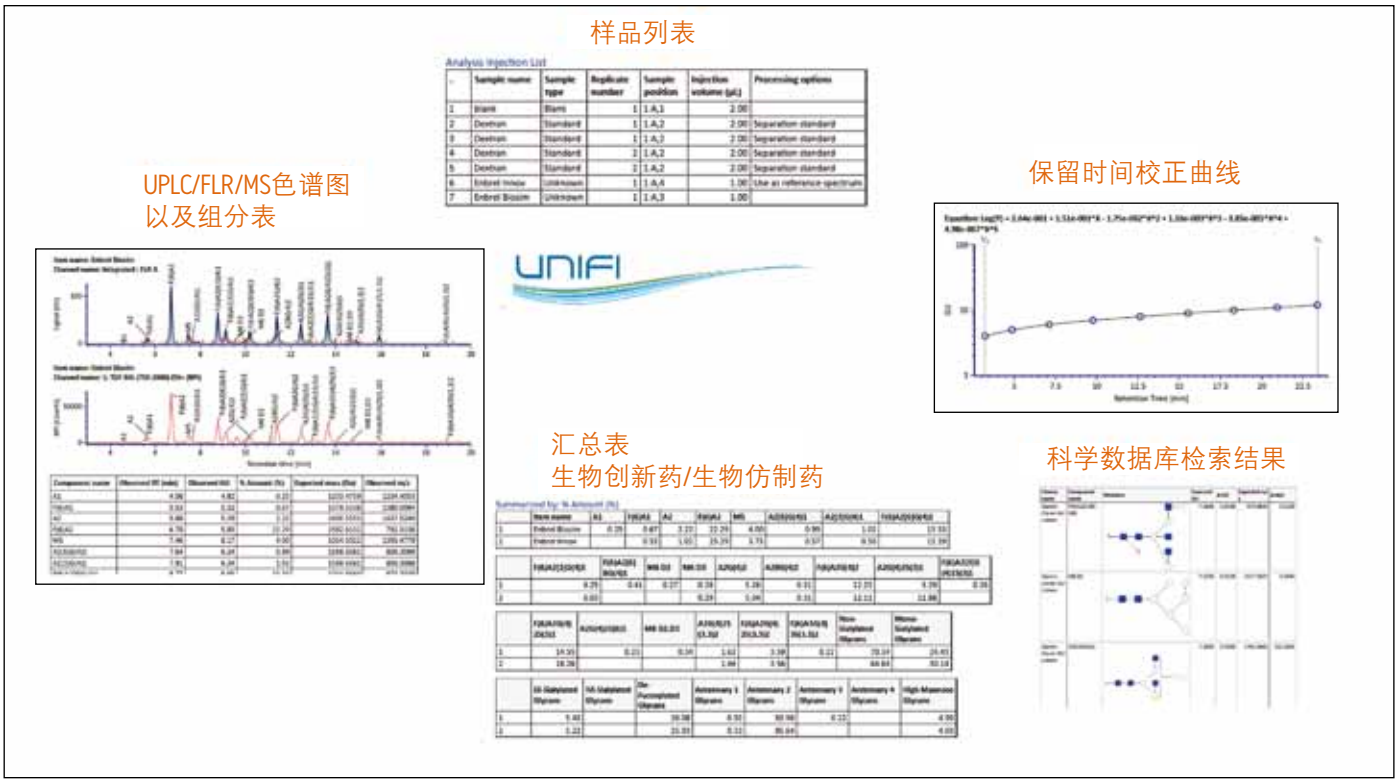


图7. 依那西普生物创新药/生物仿制药寡糖的N-链接寡糖分析和对比的UNIFI报告示例。其中包括各种关键信息，例如样品列表、保留时间校正曲线、每一个检测出的寡糖及相应的科学数据库搜索结果、生物创新药/生物仿制药N-链接寡糖的相对百分比含量汇总表、UPLC/FLR/MS色谱图以及组分表。报告模板可进行自定义，以符合不同分析类型的需求。

结论

相较于大多数实验室的常规分析，如完整蛋白或肽图分析等技术，寡糖的表征仍然是生物治疗药物表征中的一项挑战。UNIFI寡糖应用解决方案中增加了寡糖UPLC/FLR/MS工作流程，采用了基于实验数据的沃特世寡糖GU数据库，通过单个寡糖分析结果的快速采集、查看和传送，以及大量寡糖的对比性研究分析，满足了用户对寡糖结构分配的合规性、自动化和高度可靠性需求。

UNIFI生物制药平台解决方案的其它功能，例如寡糖/糖肽DDA MS/MS分析和执行外切糖苷酶阵列的能力，以及不断完善新的工作流程，提供了额外的正交结果，使得最为复杂的生物治疗糖蛋白表征也能得以实现。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters，The Science of What's Possible，ACQUITY UPLC，UPLC，Xevo和UNIFI是沃特世公司的注册商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013 年沃特世公司。印制于中国。2013年11月 720004845ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com