VVOTECS

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和Stephan M. Koza 沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 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HLLC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。

引言

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™ *Rapi*Fluor-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)[®] 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。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC[®] BEH Amide, 300Å糖蛋白 分析专用柱

糖蛋白性能测试标准品 ACQUITY UPLC H-Class Bio系统

Xevo[®] G2 QTof 质谱仪

关键词

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统, BEH Amide 300Å,蛋白糖基, 糖基化蛋白质,糖基化,HILIC

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 mq/mL的溶液。 用水将浓度为21 mq/mL的曲妥珠单抗稀释至2 mq/mL的浓度。

将一瓶糖蛋白性能测试标准品(100 µq)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测标准品(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℃并冷却至50℃,然后与1.2 止 GlycoWorks Rapid PNGase F溶液混合。将样品在50℃下温 育5 min, 以完成糖基释放。仅用PNGase F将完整单克隆 抗体质量数检测标准品在50 ℃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。

LC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:	Ex 280/Em 320 nm, 10 Hz
流速:	0.2 mL/min
进样体积:	≤lµL(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 x 150 mm糖蛋白分析专用柱
	(<u>部件号176003702</u> , 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
	(<u>部件号176003701</u> , 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 (<u>部件号186003462</u>)
	XBridge BEH HILIC, 130Å, 5 μm , 2.1 x 150 mm
	(部件号186004446)
	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å,
	1.7 μm, 2.1 x 150 mm(<u>部件号186004742</u>);
	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å,
	1.7 μm, 2.1 x 100 mm(<u>部件号186004741</u>);

竞争产品色谱柱:		PolyHYDROXYETHYLA™, 300Å,		基准/评估梯度(图3)					
		3 μm, 2.1 x 100 mm;		色谱柱规格:			2.1 x 10	0 mm	
		Glycoplex [®] A, 3 μm, 2.1 x 100 mm;		流动相A:			0.1% (v/v) TFA水溶液		
			ZORBAX® RHD 300)-HILIC, 300Å,	流动相E	3:		0.1% (v/	v)TFA乙腈溶液
			1.8 μm, 2.1 x 100	mm;	时间	%A	<u>%B</u>	曲线	
			Halo® entaHILIC, 90)Å, 2.7 μm,	0.0	20.0	80.0	6	
			2.1 x 100 mm;		0.7	30.0	70.0	6	
			SeQuant [®] IC-HILIC, 2	200Å,	29.3	45.0	55.0	6	
			3.5 μm, 2.1 x 100 mm;		30.0	80.0	20.0	6	
			Accucore™ Amide, 150Å,		31.3	80.0	20.0	6	
2.6 μm, 2.1 x 100 mm; TSKgel® Amide-80, 80Å, 3 μm, 2.0 x 100 mm			2.6 μm, 2.1 x 100 mm;		32.0	20.0	80.0	6	
			, 80Å,	40.0	20.0	80.0	6		
			3 μm, 2.0 x 100 m	m	用于选择流动相添加剂的			的梯度(图4):	
色谱柱接头					色谱柱尺寸:			2.1 x 150 mm	
(用于串联				流动相A:			0.1% (v/v) TFA水溶液或50 mM甲酸铵,		
150 mm色谱柱): 0.005 x 1.75 mm UPLC SEC连接管路			JPLC SEC连接管路				pH 4.4或	〔0.5% (w/v)甲酸水溶液	
		(部件号186006613) 流动相B: 乙腈				乙腈			
样品瓶:		聚丙烯材质12 x	32 mm, 300 μL	时间	%A	%B	曲线		
			螺纹口样品瓶(部件号186002640)	0	20.0	80.0	6	
用于演示HLLC分离技术进展的梯度(图1):				20	80.0	20.0	6		
色谱柱尺寸: 2.1 x 150 mm		2.1 x 150 mm		21	20.0	80.0	6		
流动相A: 0.1% (v/v) TFA水溶液		容液	30	20.0	80.0	6			
流动相B: 0.1% (v/v) TFA乙腈溶液			青溶液	用于核糖核酸酶B反相分离的集中梯度(图6):					
时间	%A	<u>%B</u>	曲线		色谱柱尺寸:			2.1 x 150 mm	
0	20.0	80.0	6		流动相A:			0.1% (v/v) TFA水溶液	
20	80.0	20.0	6		流动相B:			0.1% (v/v) TFA乙腈溶液	
21	20.0	80.0	6		时间	<u>%A</u>	<u>%B</u>	曲线	
30	20.0	80.0	6		0	95.0	5.0	6	
用于核糖核酸酶B HLIC分离的集中梯度(图2和图5):				2和图5):	1	74.5	25.5	6	
色谱柱尺寸: 2.1 x 150 mm				21	67.5	32.5	6		
流动相A:		0.1% (v/v) TFA水溶液		22	10.0	90.0	6		
流动相B:		0.1% (v/v) TFA乙腈溶液		24	10.0	90.0	6		
时间	<u>%A</u>	<u>%B</u>	曲线		25	95.0	5.0	6	
0	20.0	80.0	6						
1	34.0	66.0	6						
21	41.0	59.0	6						
22	100.0	0.0	6						
24	100.0	0.0	6						
25	20.0	80.0	6						
35	20.0	80.0	6						

用于完	整曲妥珠	\$单抗的	聚焦梯度(图7和图8)				
色谱柱规格:		2.1 x 150 mm, 具有不同长度					
		25 µm内径PEEK柱后管路或者					
		两根串	B联2.1 x 150 mm色谱柱				
流动相	A:	0.1% (v/v) TFA水溶液					
流动相	В:	0.1% (v/v) TFA乙腈溶液					
时间	<u>%A</u>	<u>%B</u>	曲线				
0	20.0	80.0	6				
1	30.0	70.0	6				
21	37.0	63.0	6				
22	70.0	30.0	6				
24	70.0	30.0	6				
25	20.0	80.0	6				
45	20.0	80.0	6				
用于分	离lgG糖基	もおお	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:		℃ 08					
流动相A:		0.1%TFA, 0.3% HFIP水溶液					
流动相	B:	0.1% TF	0.1% TFA, 0.3% HFIP乙腈溶液				
时间	<u>%A</u>	<u>%B</u>	曲线				
0.0	20	80	6				
10.0	50	50	6				
11.0	100	0	6				
14.0	100	0	6				
15.0	20	80	6				
25.0	20	80	6				
MC名	/ /						
M2光	Ŧ						
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 离子源温度:

脱溶剂气温度: 350℃ 脱溶剂气流速: 800 L/h

校正:

采集模式:

数据管理:

150 °C

Nal, 2 µg/µL, 100~2000 m/z

MassLynx[®]软件(4.1版)

500-4000 m/z, 0.5 s扫描速率

结果与讨论

用于糖蛋白分离的HILIC技术进展

HLIC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HLIC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HLLC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HLIC或类 HILIC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HLIC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,HLIC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HLIC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 型酰胺键合固态相。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 干固态相平均孔径(即因数小干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 HLIC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13kDa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去糖基化异构体 (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HLLC固定相技术进展。采用固定相填充的2.1 x 150 mm色谱柱 对1 μg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 HLLC, 130Å, 5 μm)到亚2 μm酰胺键合杂化颗粒300Å, 1.7 μm(ACQUITY UPLC BEH Amide 300Å, 1.7 μm 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 ℃。

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HLIC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BUV色谱图。(B)分离度最高的HLICUV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HLIC分离需要在选择流动相时深思熟虑。多数HLIC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HLLC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并去卷积(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HLIC-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。

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, 300Å, 1.7 μm色谱柱的反相分离与BEH Amide, 300Å, 1.7 μm色谱柱的HLIC分离的正交性。(A)使用 ACQUITY UPLC BEH C4, 300Å, 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, 300Å, 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lgG)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1µL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lgG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%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(DMS0))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GOF/GOF、GOF/G1F、G1F/G1F和G1F/ G2F糖型。完整的lgG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lgG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HLLC的一种解决方法,特别是因为此前曾报道过超高压力可能有 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HLLC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HLLC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]

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分离中,额外的理 论塔板数也具有极大的优势,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lgG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 分析与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lgG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℃高柱温、TFA离子对和HFIP流动相添加剂, 成功地提高了lgG的溶解性,破坏了为单个异 质性完整lgG糖型(即,GOF/GOF与GOF/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lgG1 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 μm, 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。



图9. 使用完整蛋白质HLLC-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 HLLC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 单抗质量数检查标准品的HLLC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HLIC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HLLC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 HLLC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HLLC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HLLC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。



扫一扫,关注沃特世微信



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

©2015年沃特世公司中国印制 2015年4月 720005380ZH AG-PDF

参考文献

- Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Gilar, M., UPLC-FLR Method Development of 2-AB Labeled Glycan Separation in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). Waters Appication Note <u>720003238EN</u> 2010.
- 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.
- 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 <u>720005275EN</u> 2015.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- O'Gara, J. E.; Wyndham, K. D., Porous Hybrid Organic-Inorganic Particles in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *JLiq Chromatogr Relat Technol.* 2006, 29, 1025–1045.
- Alpert, A. J., Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990, 499, 177–96.
- 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).
- 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.

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 5999 成都: 028-6578 4990 香港: 852-2964 1800

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