

基于 Erexim™ 技术对曲妥珠单抗的 N- 多糖微观异质性进行结构表征

LCMSMS-258

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，基于 Erexim™(Energy-resolved oxonium ion monitoring) 技术来对曲妥珠单抗进行多糖异质性的结构表征。结果表明：样品中糖链 ID 43100 与和 ID 44100 结构与谱库中参比物的 ID 43100 与和 ID 44100b 结构吻合，表明该曲妥珠单抗药物中含有糖链 ID 43100 与和 ID 44100b。可供相关研究者参考。

关键词： Erexim 曲妥珠单抗 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 糖链

蛋白质糖基化分为 N-糖基化和 O-糖基化两种类型。目前研究最多的是通过 N-糖苷键与多肽链中的天门冬酰胺链接的糖基化类型，即 N-糖基化。对于单克隆抗体，在 (Fc 段) 重链区，有一个共同的 N-糖基化序列，N-糖基化修饰后的表达会影响这些单克隆抗体药效和安全性。因此有必要探讨 N-糖基化位点的多糖异质性。分析 N-糖基通常首先从蛋白质上解离糖链，进而准确的定量与定性，但是得到的糖链是来自所有可能的糖蛋白和糖基化位点上糖链的平均结果；但是，利用 Erexim™ 作为分析辅助软件，可研究特定糖基化位点的多糖异质性的信息。

曲妥珠单抗是一种抗 Her2 的重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体，它通过将自己附着在 Her2 上来阻止人体表皮生长因子在 Her2 上的附着，从而阻断癌细胞的生长，曲妥珠单抗还可以刺激身体自身的免疫细胞去摧毁癌细胞。

本文以曲妥珠单抗为例，来展示如何基于 Erexim™ 技术来对生物药物的多糖异质性进行定性结构表征，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵)，DGU-20A5R(在线脱气机)，SIL-30ACMP(自动进样器)，CTO-30A(柱温箱)，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站，Erexim™ 应用软件。

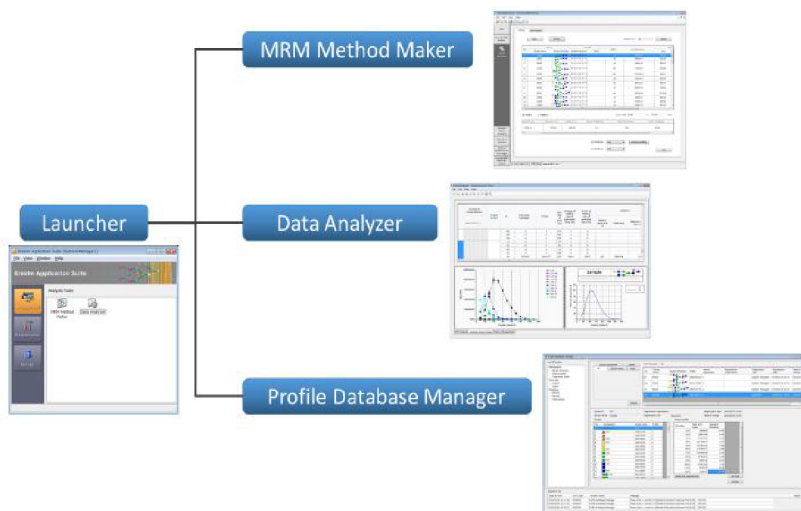
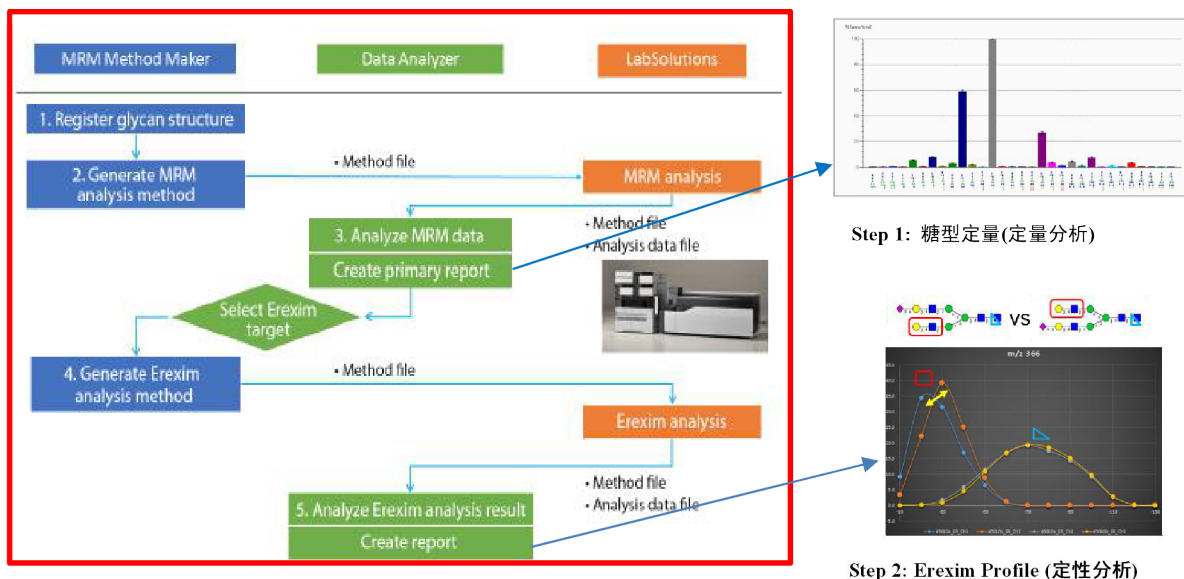


图1 Erexim™ 应用软件

1.2 分析条件

1.2.1 分析测试流程



1.2.2 仪器条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Phenomenex, Aeris Peptide XB-C18 2.1 × 150 mm

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；

B- 乙腈 /0.1% 甲酸水溶液 (90/10, v/v)

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 2.00 | Pumps | Pump B Conc. | 2 |
| 10.00 | Pumps | Pump B Conc. | 30 |
| 11.00 | Pumps | Pump B Conc | 98 |
| 12.00 | Pumps | Pump B Conc | 98 |
| 12.10 | Pumps | Pump B Conc. | 2 |
| 15.00 | Controller | Stop | |

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI(+)

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：氮气 10 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300°C

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：10 ms

延迟时间：3 ms

Q1 Bias 和 Q3 Bias：同调谐文件

MRM 参数：见表 3、表 4

Step 1: 糖型定量

Dwell Time: 8 ms, Paust Time: 2 ms.

表2 部分糖型结构

| Glycan ID | Structure | Glycan ID | Structure | Glycan ID | Structure | Glycan ID | Structure | Glycan ID | Structure |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 26000 | | 44000 | | 45110 | | 53000 | | 54110 | |
| 27000 | | 44100 | | 45020 | | 53100 | | 55010 | |
| 28000 | | 45000 | | 45120 | | 54000 | | 55110 | |
| 23100 | | 45100 | | 34000 | | 54100 | | 56000 | |
| 33000 | | 44010 | | 33100 | | 55000 | | 56100 | |
| 43000 | | 44110 | | 34100 | | 55100 | | | |
| 43100 | | 45010 | | 34110 | | 54010 | | | |

表3 糖型定量的MRM参数(电荷为3)

| No. | Glycan ID | 前体离子 m/z(+3) | 产物离子 m/z | CE(V) | No. | Glycan ID | 前体离子 m/z(+3) | 产物离子 m/z | CE(V) |
|-----|-----------|-----------------|-------------|-------|-----|-----------|-----------------|-------------|--------|
| 1 | 23000 | 694.62 | 138.00 | -27.7 | 28 | 54000 | 951.71 | 138.00 | -60.6 |
| 2 | 25000 | 802.65 | 138.00 | -41.6 | 29 | 54100 | 1000.40 | 138.00 | -66.9 |
| 3 | 26000 | 856.67 | 138.00 | -48.5 | 30 | 55000 | 1005.73 | 138.00 | -67.6 |
| 4 | 27000 | 910.69 | 138.00 | -55.4 | 31 | 55100 | 1054.42 | 138.00 | -73.8 |
| 5 | 28000 | 964.70 | 138.00 | -62.3 | 32 | 54010 | 1048.74 | 138.00 | -73.1 |
| 6 | 29000 | 1018.72 | 138.00 | -69.2 | 33 | 54110 | 1097.43 | 138.00 | -79.3 |
| 7 | 2-10-000 | 1072.74 | 138.00 | -76.1 | 34 | 55010 | 1102.76 | 138.00 | -80.0 |
| 8 | 23100 | 743.30 | 138.00 | -34.0 | 35 | 55110 | 1151.45 | 138.00 | -86.2 |
| 9 | 33000 | 762.31 | 138.00 | -36.4 | 36 | 55020 | 1199.79 | 138.00 | -92.4 |
| 10 | 43000 | 830.00 | 138.00 | -45.1 | 37 | 55120 | 1248.48 | 138.00 | -98.6 |
| 11 | 43100 | 878.69 | 138.00 | -51.3 | 38 | 44200Le | 981.39 | 138.00 | -64.4 |
| 12 | 44000 | 884.02 | 138.00 | -52.0 | 39 | 45200Le | 1035.41 | 138.00 | -71.4 |
| 13 | 44100 | 932.70 | 138.00 | -58.2 | 40 | 56000 | 1059.75 | 138.00 | -74.5 |
| 14 | 45000 | 938.04 | 138.00 | -58.9 | 41 | 56100 | 1108.43 | 138.00 | -80.7 |
| 15 | 45100 | 986.72 | 138.00 | -65.1 | 42 | 56010 | 1156.78 | 138.00 | -86.9 |
| 16 | 44010 | 981.05 | 138.00 | -64.4 | 43 | 56020 | 1253.81 | 138.00 | -99.3 |
| 17 | 44110 | 1029.74 | 138.00 | -70.6 | 44 | 56030 | 1350.84 | 138.00 | -111.7 |
| 18 | 45010 | 1035.07 | 138.00 | -71.3 | 45 | 56110 | 1205.47 | 138.00 | -93.1 |
| 19 | 45110 | 1083.75 | 138.00 | -77.5 | 46 | 56120 | 1302.50 | 138.00 | -105.6 |
| 20 | 45020 | 1132.10 | 138.00 | -83.7 | 47 | 56130 | 1399.53 | 138.00 | -118.0 |
| 21 | 45120 | 1180.79 | 138.00 | -90.0 | 48 | 562130Le | 1448.21 | 138.00 | -124.2 |
| 22 | 34000 | 816.33 | 138.00 | -43.3 | 49 | 56200Le | 1157.12 | 138.00 | -86.9 |
| 23 | 33100 | 810.99 | 138.00 | -42.6 | 50 | 24000 | 748.63 | 138.00 | -34.6 |
| 24 | 34100 | 865.01 | 138.00 | -49.5 | 51 | 35100 | 919.03 | 138.00 | -56.5 |
| 25 | 34110 | 962.04 | 138.00 | -62.0 | 52 | 36100 | 973.05 | 138.00 | -63.4 |
| 26 | 53000 | 897.69 | 138.00 | -53.7 | 53 | 46000 | 992.05 | 138.00 | -65.8 |
| 27 | 53100 | 946.38 | 138.00 | -60.0 | 54 | 58100 | 1216.47 | 138.00 | -94.5 |

Step 2: Erexim Profile

表4 采集Erexim Profile的MRM参数

| No. | Glycan ID | 前体离子 m/z (+3) | 产物离子 m/z | CE 范围 (V) | Dwell Time (ms) | Paust Time (ms) |
|-----|-----------|------------------|----------|-----------|--------------------|--------------------|
| 1 | 43100 | 878.69 | 138.00 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 2 | 43100 | 878.69 | 147.07 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 3 | 43100 | 878.69 | 163.06 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 4 | 43100 | 878.69 | 204.09 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 5 | 43100 | 878.69 | 366.14 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 6 | 43100 | 878.69 | 528.19 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 7 | 43100 | 878.69 | 690.25 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 8 | 44100 | 932.70 | 138.00 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 9 | 44100 | 932.70 | 147.07 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 10 | 44100 | 932.70 | 163.06 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 11 | 44100 | 932.70 | 204.09 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 12 | 44100 | 932.70 | 366.14 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 13 | 58100 | 1216.47 | 138.00 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 14 | 58100 | 1216.47 | 147.07 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 15 | 58100 | 1216.47 | 163.06 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 16 | 58100 | 1216.47 | 204.09 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 17 | 58100 | 1216.47 | 366.14 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 18 | 58100 | 1216.47 | 528.19 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |
| 19 | 58100 | 1216.47 | 690.25 | -180 ~ 0 | 4 | 2 |

1.3 样品制备

1.3.1 糖蛋白的溶液消化

向 200 μL 的 PE 管中, 加入 25 μL 100 mM 碳酸氢铵水溶液, 再加入 10 μL 水和 5 μL 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 单克隆抗体溶液。最后加入 10 μL 500 ng/ μL 胰蛋白酶, 充分混合, 即得反应溶液。将反应溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 热反应箱中反应 2 小时。反应后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下保存。式采集数据。以浓度作为横坐标, 峰面积作为纵坐标, 绘制各组分的外标曲线如图 2 所示。

1.3.2 糖肽的选择性提取

在 Supel-Select HLB SPE 30 mg/1 mL SPE 软管中依次加入 1 mL 甲醇, 1 mL 水, 来清洗萃取柱。然后用点样枪头在靠近 SPE 柱的固体层上方加入反应溶液, 减压萃取, 用 1.5 mL 样品瓶收集从萃取柱中流出的溶液 (注意: 液体液面和固体层面平行即停), 然后在萃取柱中加入 400 μL 0.1% 甲酸和 5% 乙腈水溶液, 合并流出液, 用于 LCMS 分析。

结果讨论

2.1 EreximTM 原理

EreximTM 是 Energy-resolved oxonium ion monitoring 的缩写。当使用串联质谱分析 N-糖链和糖肽这类主体结构时, 产物离子 (氧鎓离子) 会随着糖链结构的变化而不同。尤其是在三重四极杆串联质谱 MRM 分析方式下分析每种产物离子的时候, 每个氧鎓离子的信号强度也随着碰撞能 (以下用字母 CE 表述) 的改变而不同。由碰撞能变化引起的氧鎓离子丰度比的趋势性变化轮廓图可以预测糖链间的结构差异。糖链中最典型的氧鎓离子是从 N-糖链核心结构中得到的 (m/z 138) 特异性离子。对 N-糖链核心结构及糖链存在比例的分析可实现糖链间相对含量的测定。

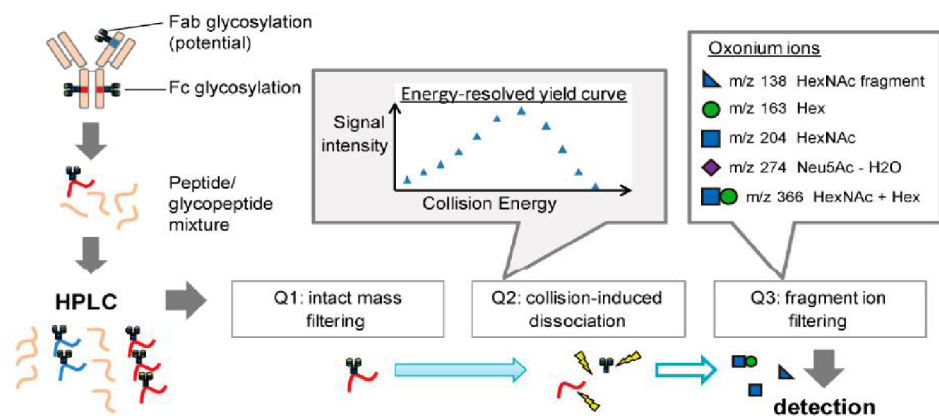


图1 Erexim™原理图

2.2 糖型定量

2.2.1 建立 MRM 方法

使用 MRM 方法创建软件选择合适的糖链，软件自动生成目标糖肽列表。输入肽段的序列是 EEQYNSTYR。将 MS 采集参数 (驻留时间、延迟时间、CE、前体离子电荷 (+3/+4)) 通过化合物列表转化成 MRM 通道信息。分析方法自动填入经过验证的 CE 数值。建立的信息保存在 LabSolutions 方法文件中，方法上传至 LCMS-8060 进行数据采集。

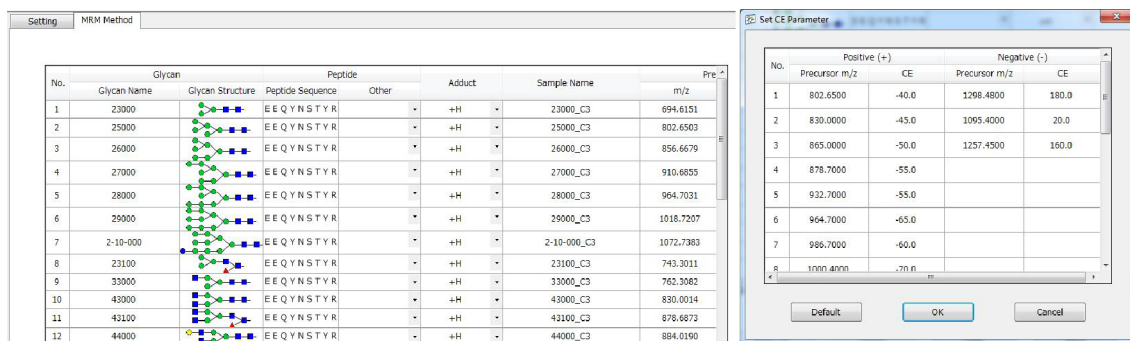


图2 生成的糖链结构 (左图) 和验证后的CE值 (右图)

2.2.2 采集的 MRM 色谱图

依据 1.2.2 的仪器条件采集的 MRM 色谱图，如图 3 所示。

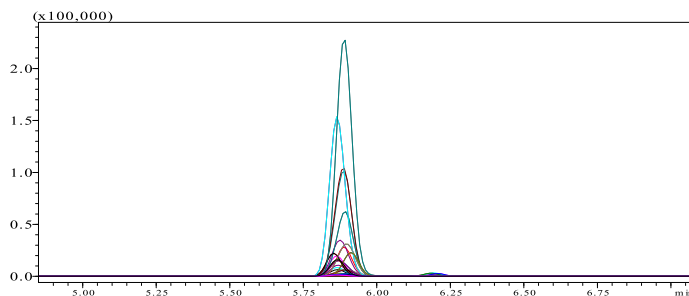


图3 糖型定量的MRM图

2.2.3 N-糖链比例图谱 (氨基酸序列为 EEQYNSTYR)

用 LabSolutions 软件进行峰积分，然后将数据导入 Erexim 数据处理软件，即可自动生成结合在 IgG Fc 区域的 N-糖链比例图谱 (氨基酸序列为 EEQYNSTYR)，如图 4 所示。

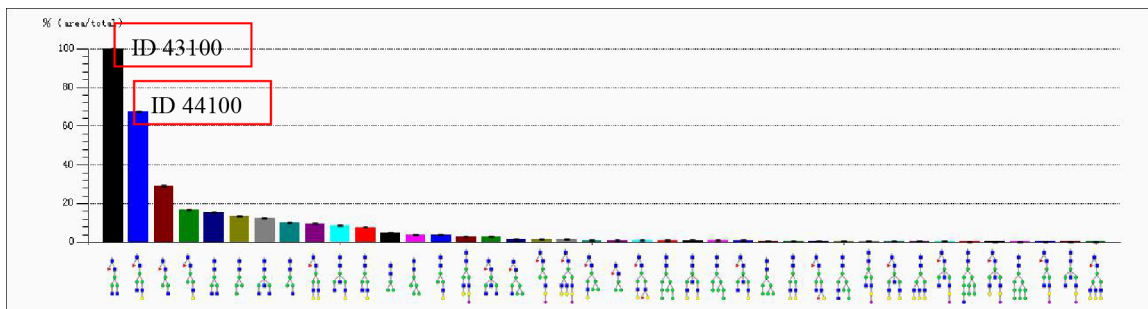


图4 N-糖链比例图谱(氨基酸序列为EEQYNSTYR)

表5 N-糖链面积比例结果 (以最大峰为100来表示)

| No. | Glycan ID | Area | Area% | No. | Glycan ID | Area | Area% |
|-----|-----------|--------|--------|-----|-----------|------|-------|
| 1 | 43100 | 881012 | 100.00 | 21 | 23100 | 9930 | 1.13 |
| 2 | 44100 | 595022 | 67.54 | 22 | 45200Le | 9653 | 1.10 |
| 3 | 33100 | 257751 | 29.26 | 23 | 28000 | 9015 | 1.02 |
| 4 | 34100 | 146120 | 16.59 | 24 | 55000 | 8105 | 0.92 |
| 5 | 43000 | 135480 | 15.38 | 25 | 27000 | 8025 | 0.91 |
| 6 | 24000 | 118814 | 13.49 | 26 | 54100 | 6407 | 0.73 |
| 7 | 53000 | 108635 | 12.33 | 27 | 26000 | 5948 | 0.68 |
| 8 | 33000 | 89725 | 10.18 | 28 | 45000 | 5804 | 0.66 |
| 9 | 45100 | 83131 | 9.44 | 29 | 44200Le | 4856 | 0.55 |
| 10 | 54000 | 74798 | 8.49 | 30 | 46000 | 3892 | 0.44 |
| 11 | 44000 | 66105 | 7.50 | 31 | 44010 | 3162 | 0.36 |
| 12 | 23000 | 43809 | 4.97 | 32 | 55100 | 2717 | 0.31 |
| 13 | 25000 | 33839 | 3.84 | 33 | 56000 | 2572 | 0.29 |
| 14 | 34000 | 32222 | 3.66 | 34 | 54110 | 2130 | 0.24 |
| 15 | 45010 | 26814 | 3.04 | 35 | 2-10-000 | 1689 | 0.19 |
| 16 | 53100 | 25112 | 2.85 | 36 | 55110 | 1393 | 0.16 |
| 17 | 35100 | 13618 | 1.55 | 37 | 29000 | 1394 | 0.16 |
| 18 | 34110 | 13044 | 1.48 | 38 | 44110 | 953 | 0.11 |
| 19 | 56110 | 11720 | 1.33 | 39 | 54010 | 655 | 0.07 |
| 20 | 36100 | 10147 | 1.15 | 40 | 56100 | 510 | 0.06 |

根据图 4 和表 5 所示, 选择糖链 ID 43100 和 44100 为目标物用于 Erexim 数据采集。

2.3 Erexim Profile(定性分析)

2.3.1 建立 MRM 方法

采用 Erexim 软件进行 MRM 方法创建, 选择糖链结构 ID 43100 和 44100 为目标物, 前体离子选择是 3 电荷离子, 产物离子选择 m/z 138/163/204/147/366, 碰撞能范围为 -180~0V, 以 10 V 为间隔步进。建立的信息保存在 LabSolutions 方法文件中, 方法上传至 LCMS-8060 进行数据采集。

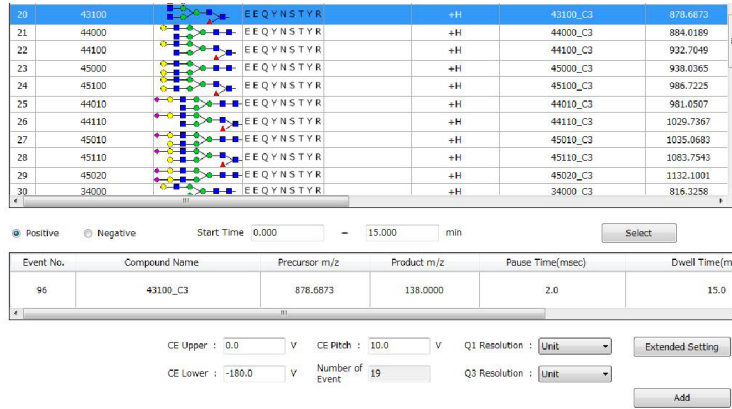


图5 生成Erexim的MRM方法截图

2.3.2 采集的 MRM 色谱图

依据 1.2.2 的仪器条件，采集 Glycan ID43100 和 44100 在不同 CE 能量下的 MRM 图，如图 6 和图 7 所示。

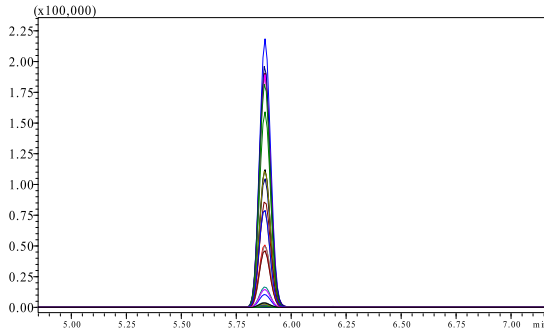


图6 Glycan ID43100在不同CE能量下的MRM图

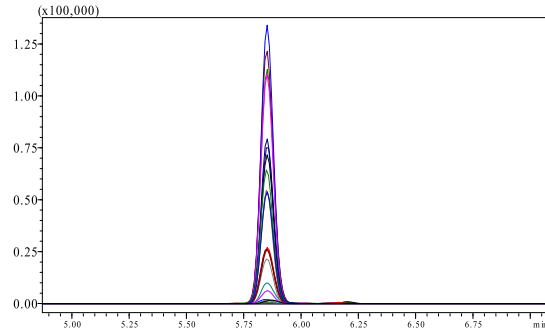


图7 Glycan ID44100在不同CE能量下的MRM图

2.3.3 Erexim profile(Erexim 趋势轮廓图)

在 LabSolutions 软件中进行峰积分，然后将数据保存并上传至 Erexim 软件进行数据处理，从而得到 Erexim 趋势轮廓图，并与 Erexim 谱库进行对比，如图 8-11 所示。

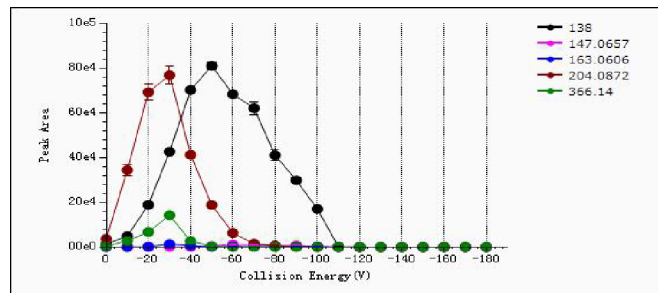


图8 Glycan ID43100的Erexim趋势轮廓图

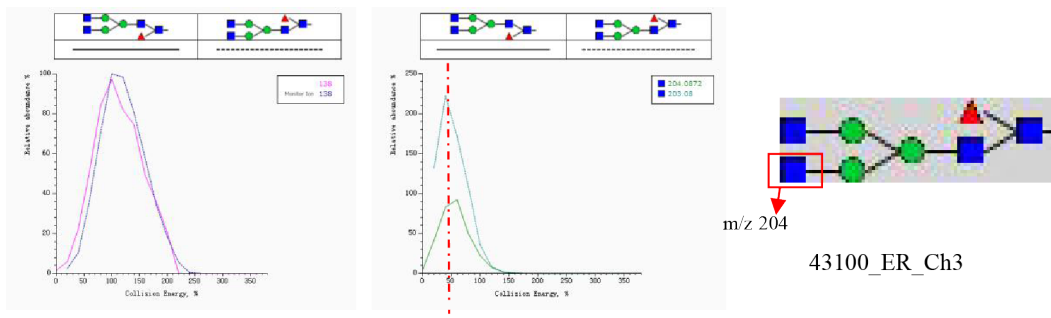


图9 Glycan ID43100的Erexim趋势轮廓图与谱库对比结果

将样品的糖链 ID 43100 趋势轮廓图与 Erexim 谱库中参比趋势轮廓图比较，发现糖链 ID 43100 核心糖基 m/z 138 趋势轮廓图与参比谱图基本吻合， m/z 204(=GlcNAc N-乙酰葡萄糖胺)最佳 CID 能量(虚线表示)与参比谱图相同，说明在样品中糖链 ID 43100 结构与谱库中糖链 ID 43100 有相同或类似糖链结构；但是该 CID 能量下的强度有差异，这说明样品糖链 ID 43100 中还混有其他结构的糖链；当然这个强度差异也可能是较大糖链发生源内裂解引起的干扰问题。

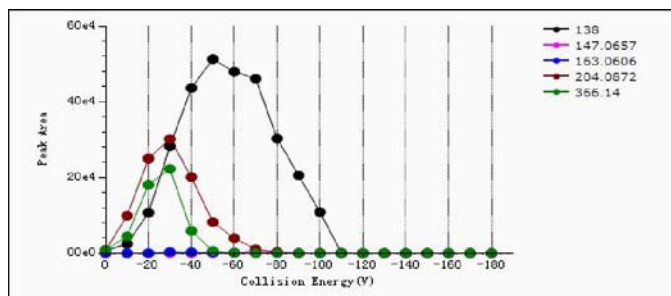


图10 Glycan ID44100的Erexim趋势轮廓图

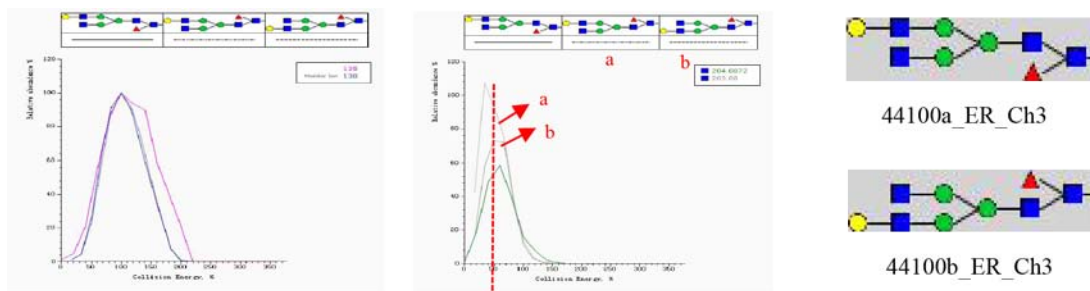


图11 Glycan ID44100的Erexim趋势轮廓图与谱库对比结果

将样品中糖链 ID 44100 与 Erexim 谱库中 2 个参比数据文件比对 (44100a_ER_Ch3 和 44100b_ER_Ch3)，同上分析，发现 m/z 204(=GlcNAc) 跟 44100b_ER_Ch3 谱图更接近，说明在样品中糖链 ID 44100 结构与谱库中糖链 ID 44100b 有相同或类似糖链结构；

总之，通过将特定糖链的产物离子趋势轮廓图与 Erexim 数据库中的趋势轮廓图对比，从而推断出单抗药物 N-糖基化位点的糖基结构。

结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用，结合 Erexim™ 技术建立一种对单抗药物的多聚糖异质性进行结构表征的新方法。并对曲妥珠单抗药物进行多聚糖异质性的结构表征。结果表明：通过糖型定量，测算出样品中糖链 ID43100 与和 ID44100 相对含量较高；利用 Erexim™ 技术这两个糖链进行结构鉴定，其样品中两糖链结构与谱库参比物的结构吻合，表明该曲妥珠单抗药物中确实含有糖链 ID43100 与和 ID44100b。

一般 N-糖链分析主要测试的是蛋白质水解后糖链；传统方法测试的糖链是来自所有可能的糖蛋白和糖基化位点上糖链的平均结果，而 Erexim™ 应用技术是分析糖基化位点上特定糖肽；并且该技术可以在没有标准物质的情况下测算每种糖链的结构和糖链间的相对含量；从而为研究者提供重要的单抗药物 N-糖基化位点的相关信息。