

表征贝伐珠单抗的 N- 聚糖微观异质性 - Erexim™ 技术的应用

LCMSMS-264

摘要: Erexim™(Energy-resolved oxonium ion monitoring) 是在三重四极串联质谱 MRM 分析模式下, 对 N- 糖基化糖肽结构进行结构表征的一项技术, 可用于预测糖链的结构差异。凭借 Erexim™ 技术, 本文通过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, 完成了贝伐珠单抗 N- 聚糖异质性的结构表征。实验中发现, 贝伐珠单抗药物的 N- 糖基化糖肽中主要糖链为 ID: 44100 和 33100, 它们的结构与标准谱图中 ID: 44100 和 33100a 的结构相似。

关键词: Erexim N- 聚糖 贝伐珠单抗 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

血管靶向药物贝伐珠单抗 (Bevacizumab) 是一类人源化单抗, 能够特异性结合血管内皮生长因子 (VEGF) 并阻断其信号通路, 从而抑制肿瘤血管生成。因此, 贝伐珠单抗对伴有新生血管生成的实体瘤具有良好的疗效。2004 年, 贝伐珠单抗获 FDA 批准上市, 用于治疗转移性结直肠癌, 是全球首个获准上市的抗血管生成的单抗药物。2010 年, 贝伐珠单抗也在中国上市。目前, 贝伐珠单抗已用于诊疗晚期结直肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、恶性胶质瘤等肿瘤疾病。

近年来, 单克隆抗体等生物仿制药已成为当今医药公司关注的重点。由于生物仿制药是一类大分子蛋白异构体的集合, 生物仿制药和原研药在生物化学结构、有效成分等方面基本不可能做到完全一致, 因此有必要对生物仿制药进行鉴定分析。其中, 糖基化分析是一项重

要内容, 糖基化属性匹配是达到生物相似性的关键, 这会影响 PK/PD 性质、安全性和有效性。

依据糖苷链类型不同, 可将蛋白质糖基化分为 N-糖基化和 O-糖基化。其中, 研究最多的是 N-糖基化, 即肽链上天冬酰胺的酰胺基与糖链之间通过 N-糖苷键连接。单克隆抗体经胰蛋白酶水解后, 可得到一系列糖肽片段, 利用 Erexim 技术进行分析, 可研究特定糖基化位点的糖链不均一性等信息。

本文选取贝伐珠单抗药物进行研究, 通过 Erexim™ 技术结合岛津液质联用仪, 完成该贝伐珠单抗糖链结构异质性的表征。该方法有助于考察单克隆抗体药物糖基化位点及糖型, 可用于分析生物仿制药与原药, 或不同批次生产的生物仿制药之间的差异性。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 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。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Phenomenex, Aeris™ 1.7 μm Peptide XB-C18, 2.1 × 150 mm

流动相: A-0.1% 甲酸水溶液; B-90% 乙腈 (含 0.1% 甲酸)

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 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

Step 1: 糖型定量

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

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

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 3: 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)	Pause Time (ms)
1	33100	810.99	138.00	-180 ~ 0	4	2
2	33100	810.99	147.07	-180 ~ 0	4	2
3	33100	810.99	163.06	-180 ~ 0	4	2
4	33100	810.99	204.09	-180 ~ 0	4	2
5	33100	810.99	366.14	-180 ~ 0	4	2
6	43100	878.69	138.00	-180 ~ 0	4	2
7	43100	878.69	147.07	-180 ~ 0	4	2
8	43100	878.69	163.06	-180 ~ 0	4	2
9	43100	878.69	204.09	-180 ~ 0	4	2
10	43100	878.69	366.14	-180 ~ 0	4	2

1.2 样品制备

1.2.1 糖蛋白的溶液消化

200 μ L 的 EP 管中, 依次加入 25 μ L 100 mM 碳酸氢铵水溶液、10 μ L 水和 5 μ L 10 μ g/ μ L 单克隆抗体溶液, 随后加入 10 μ L 500 ng/ μ L 胰蛋白酶溶液, 充分混合。将 EP 管置于 37°C 热反应箱中, 反应 2 小时。反应结束后, 将 EP 管置于 4°C 的环境下保存。

1.2.2 糖肽的选择性提取

在 Supel-Select HLB SPE 30 mg/1 mL 固相萃取柱中依次加入 1 mL 甲醇, 1 mL 水, 清洗并活化萃取柱。然后用点样吸头在靠近 SPE 柱的固体层上方加入上述反应溶液, 减压萃取, 用 1.5 mL 样品瓶收集流出组分, 当液体液面和固体层面平行, 恢复常压, 液体不再流出。再在萃取柱中加入 400 μ L 5% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸), 减压洗脱, 合并流出组分, 用于 LCMS 分析。

结果讨论

2.1 糖型定量

2.1.1 糖链相对定量的 MRM 方法建立

使用 Erexim Application Suite 工作站可创建糖肽的 MRM 方法。首先选定目标糖链, 随后输入相关肽段序列 EEQYNSTYR, 软件即自动生成目标糖肽列表。再分别输入驻留时间、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。导入液相条件, 生成仪器分析方法。

2.1.2 采集的 MRM 色谱图

依据上述仪器条件采集的 MRM 色谱图, 结果如图 1 所示。

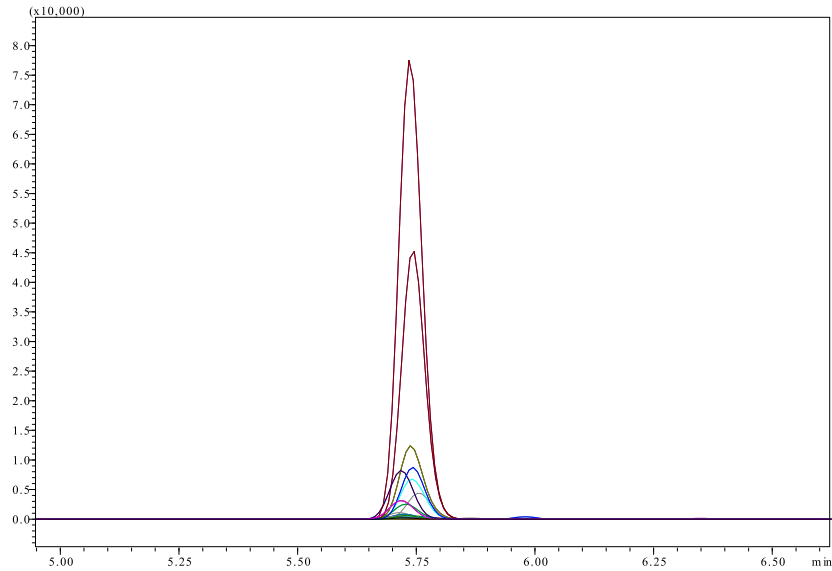


图1 糖型定量的MRM图

2.2.3 N-糖链比例图谱 (氨基酸序列为EEQYNSTYR)

通过 LabSolutions 软件完成各个色谱峰积分, 然后将数据导入 Erexim 数据处理软件, 即可自动生成指定肽段上 N-糖链比例图谱, 如图 2 所示。

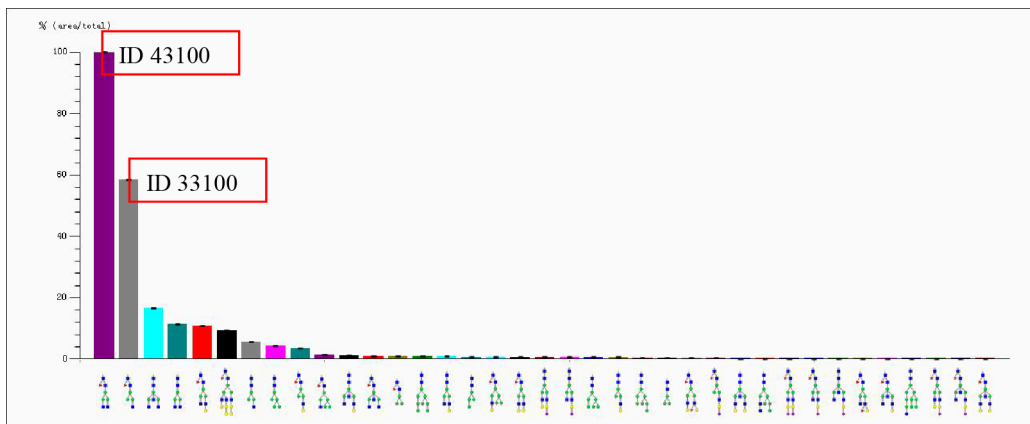


图2 N-糖链比例图谱 (氨基酸序列为EEQYNSTYR)

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	20	44010	10147	1.15
2	33100	595022	67.54	21	26000	9930	1.13
3	53000	257751	29.26	22	34000	9653	1.10
4	43000	146120	16.59	23	27000	9015	1.02
5	44100	135480	15.38	24	23000	8105	0.92
6	58100	118814	13.49	25	45200Le	8025	0.91
7	33000	108635	12.33	26	34110	6407	0.73
8	25000	89725	10.18	27	55000	5948	0.68
9	34100	83131	9.44	28	46000	5804	0.66
10	35100	74798	8.49	29	45120	4856	0.55
11	54000	66105	7.50	30	44110	3892	0.44
12	53100	43809	4.97	31	54010	3162	0.36
13	23100	33839	3.84	32	44200Le	2717	0.31
14	28000	32222	3.66	33	54100	2572	0.29
15	44000	26814	3.04	34	2-10-000	2130	0.24
16	24000	25112	2.85	35	45110	1689	0.19
17	36100	13618	1.55	36	54110	1393	0.16
18	45100	13044	1.48	37	55100	1394	0.16
19	45010	11720	1.33				

根据以上数据(图2和表5),糖链ID 43100和33100相对含量显著高于其它糖链,说明贝伐珠单抗的N-糖基化糖肽中主要含有这两种糖链,因此我们选择糖链ID 43100和33100为目标物,用于进一步Erexim分析。

2.3 Erexim Profile(定性分析)

2.3.1 糖链定性的MRM方法建立

继续采用Erexim软件进行MRM方法的创建,选择糖链结构ID 43100和33100为目标物,前体离子选择是3电荷m/z,产物离子选择m/z 138/163/204/147/366,碰撞能范围为-180~0 V,以10 V为间隔步进。

2.3.2 采集的MRM色谱图

依据1.2.1的仪器条件,采集Glycan ID43100和33100在不同CE能量下的MRM图,如图3和图4所示。

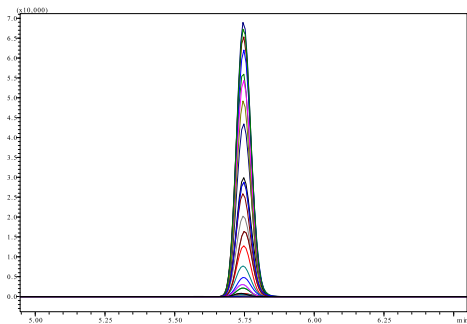


图3 Glycan ID43100在不同CE能量下的MRM图

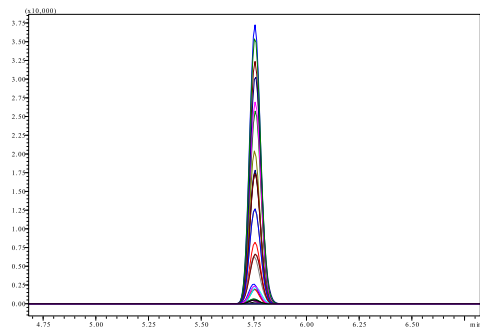


图4 Glycan ID33100在不同CE能量下的MRM图

2.3.3 Erexim profile(Erexim 趋势轮廓图)

首先使用 LabSolutions 软件对各个色谱峰进行积分，然后将数据保存并加载至 Erexim 软件进行数据处理。最终绘制 Erexim 趋势轮廓图，通过与 Erexim 谱库进行对比(图6)，判断糖肽中糖链结构是否为目标糖链。

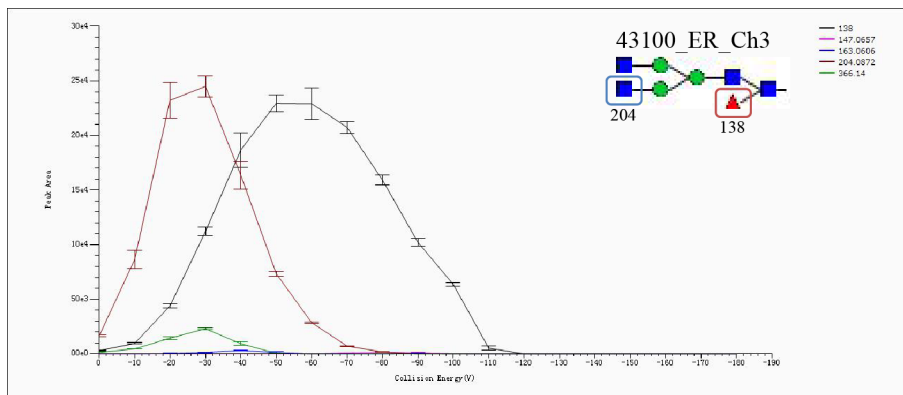


图5 Glycan ID43100的Erexim趋势轮廓图

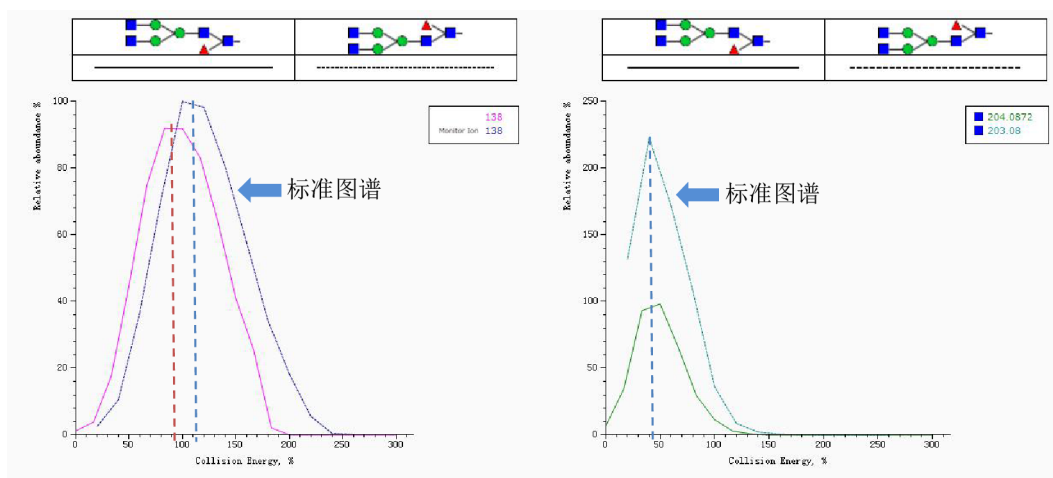


图6 Glycan ID43100的Erexim趋势轮廓图与谱库对比结果

将样品糖链 ID 43100 的分析结果与 Erexim 数据库中标准的趋势曲线进行对比，可以发现：

糖链 ID 43100 核心糖基 m/z138(岩藻糖)趋势图与标准图谱相比，二者在轮廓上相似，但最佳CID能量(虚线表示)略有不同。m/z 204(GlcNAc N-乙酰葡萄糖胺)最佳CID能量(虚线表示)与标准相同，但响应强度偏低。在多数情况下，CID能量相同表明结构中存在与标准相同(或相似)的糖链结构，但有时由于存在其他高聚合糖链发生源内裂解会干扰到糖链 ID 43100 检测，从而导致与标准图谱略有不同。

综上所述，样品糖链 ID 43100 大多数是与标准 ID 43100 结构相似，但是存在部分其他高聚合糖链的干扰。

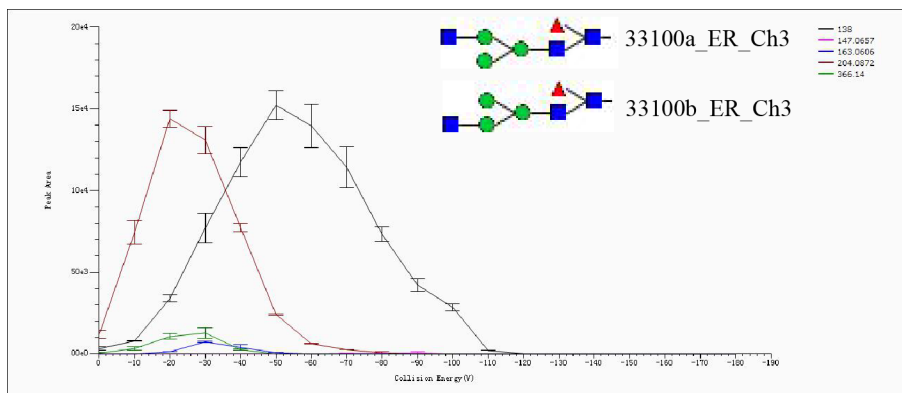


图7 Glycan ID33100的Erexim趋势轮廓图

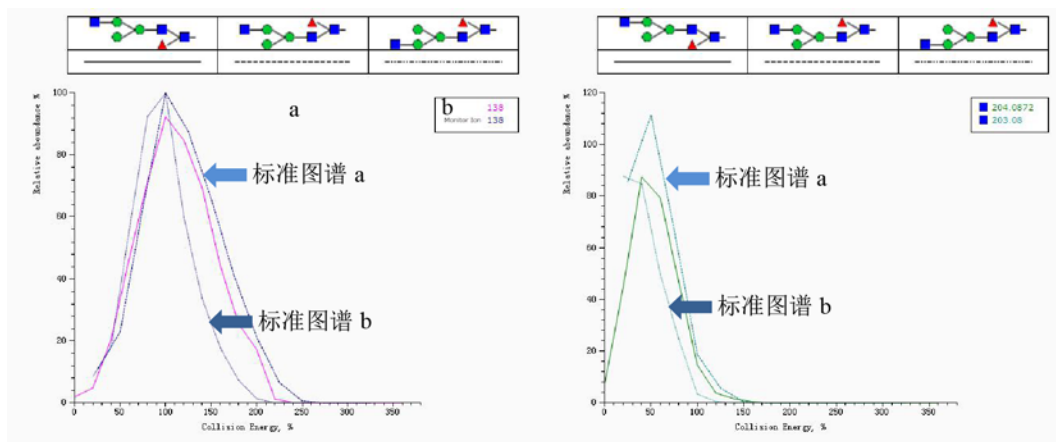


图8 Glycan ID44100的Erexim趋势轮廓图与谱库对比结果

将糖链 ID 33100 样品的采集数据与 Erexim 数据库中标准图谱 (33100a_ER_Ch3 和 33100b_ER_Ch3) 进行对比, 可以看出核心糖基 m/z 138(岩藻糖) 与 m/z 204(N-乙酰葡萄糖胺 GlcNAc) 跟 33100a_ER_Ch3 标准图谱的吻合度较高, 说明在样品中糖链 ID 33100 结构与标准糖链 ID 33100a 结构基本相同或相似度较高。

结论

本次实验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, 使用 Erexim™ 技术, 完成了对贝伐珠单抗药物的多糖异质性的结构表征。实验结果表明: 贝伐珠单抗药物的 N-糖基化糖肽中主要糖链为 ID: 44100 和 33100; 将这两个糖链 ID44100 和 33100 能量趋势轮廓图与标准谱库作比较, 发现样品多数糖链 ID 44100 结构与标准 ID 44100 结构相同或相似, ID33100 与标准 ID33100a 结构相同。

总之, 在单抗药物研究中, 使用 Erexim™ 技术可获得重要的 N-糖基化位点信息, 为分析单抗药物的聚糖微观异质性提供帮助是相关科研人员的得力助手。