

基于N-聚糖和完整糖肽的单克隆抗体药物糖基化修饰表征

李梦林[#], 朱文文[#], 张金兰^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 近年来生物制药产业快速增长, 其中单克隆抗体药物的市场规模增速显著, 对其进行精确的结构表征和质量控制的需求日益突出。作为抗体药非常重要的翻译后修饰, 糖基化对抗药的疗效、稳定性、免疫原性都具有重要的影响。对糖基化修饰进行表征的主要方式之一是液相色谱串联质谱技术, 但该方法目前主要集中在中高丰度的聚糖表征, 对低丰度的糖基化修饰研究较少。本研究建立了基于 RapiFluor-MS 试剂标记的单克隆抗体药物的 N-聚糖定性和定量分析技术, 该方法样品处理时间短, 灵敏度高, 不仅能够表征 3 种单抗阿达木单抗、贝伐珠单抗和曲妥珠单抗的主要糖型, 而且对低丰度糖基化修饰能够准确的表征并定量分析。基于该方法, 作者研究了上述 3 种单抗主要糖型, 并对不同批次的样品中 N-聚糖的相对丰度进行了对比。同时在完整糖肽水平对 N-聚糖的连接位点和糖型进行解析, 进一步丰富了单抗药的 N-聚糖结构信息。基于 RapiFluor-MS 试剂标记的单克隆抗体药物的 N-聚糖定性和定量分析技术能够实现对单抗药糖基化修饰的深度表征和控制。

关键词: 液质联用; 糖基化修饰; 阿达木单抗; 贝伐珠单抗; 曲妥珠单抗; 游离 N-聚糖; 完整糖肽

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2360-07

N-Glycans and intact glycopeptide-based characterization of N-glycosylation of monoclonal antibody drugs

LI Meng-lin[#], ZHU Wen-wen[#], ZHANG Jin-lan^{*}

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: In recent years, the biopharmaceutical industry has grown rapidly, and the market size of monoclonal antibody drugs has increased significantly. Accurate structural characterization and quality control are the supporting technologies for the development of monoclonal antibody drugs. As a significant post-translational modification of antibody drugs, glycosylation has an important influence on its efficacy, stability, and immunogenicity. The existing literature usually uses liquid chromatography-mass spectrometry to perform major glycosylation modifications of monoclonal antibody drugs. Characterization, there are few studies on low-abundance glycosylation, but the characterization and control of low-abundance glycosylation cannot be ignored. In this study, we have established a qualitative and quantitative analysis technology for N-glycans based on RapiFluor-MS reagent-labeled monoclonal antibody drugs. This method has a short sample processing time and high sensitivity. It can not only characterize the main glycoforms of three monoclonal antibody drugs (adalimumab, bevacizumab, and trastuzumab) but also can quantify low-abundance N-glycans. The results of the study showed that the main glycoforms specified in the Pharmacopoeia could be detected in different batches of monoclonal antibody drugs, but the content of N-glycans

收稿日期: 2021-04-27; 修回日期: 2021-07-19.

基金项目: 国家重点研发计划(高灵敏度糖蛋白鉴定方法研发及其在药物杂质分析中的应用, 2018YFF0212504); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(药物药效和安全性相关的关键分析新技术研究, 2016-I2M-3-017).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-10-83154880, Fax: 86-10-63017757, E-mail: zhjl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0639

in different batches of samples is not identical. After that, we analyzed the N-glycans connection sites and glycoforms at the intact glycopeptide level, further enriching the N-glycans structure information of the monoclonal antibody. The qualitative and quantitative analysis technology of N-glycans based on RapiFluor-MS reagent-labeled monoclonal antibody drugs can realize the in-depth characterization and control of glycosylation modification of monoclonal antibody drugs.

Key words: LC-MS/MS; glycosylation; adalimumab; bevacizumab; trastuzumab; free N-glycan; intact glycopeptide

治疗性单克隆抗体药物 (therapeutic monoclonal antibodies, mAbs, 以下简称单抗药) 是生物制药的重要组成部分, 在自体免疫性疾病如类风湿性关节炎以及肿瘤治疗, 如乳腺癌、消化系统肿瘤的治疗中发挥重要的作用^[1,2]。单抗药是一类以 γ 型免疫球蛋白 G (IgG) 为基础的大分子糖蛋白类药物, 其重链 Fc 片段特定位点的天冬酰胺上具有一个重要的 N-糖基化修饰位点。单抗药的 N-糖基化修饰与半衰期, 抗炎特性, 免疫原性, 抗体依赖细胞毒性 (ADCC)、补体依赖细胞毒作用 (CDC) 等密切相关, 影响药物的临床疗效^[3]。如去岩藻糖化的曲妥珠单抗与 Fc γ RIIIa 的结合亲和力可提高 50 倍, ADCC 作用提高 100 倍, 抑制肿瘤增长能力显著增强^[4]; 具有高甘露糖修饰的抗体药比复杂岩藻糖修饰具有更快的血清清除率^[5]。作为单抗药最为常见和复杂的翻译后修饰之一, N-糖基化修饰也是单抗上游生产工艺稳定性的重要指征, 其一致性是确保生物技术药物治疗有效性和安全性的关键因素^[6]。随着抗体药市场的逐渐增长, 以及一系列生物药专利的到期, 势必迎来抗体药相关产业的飞速发展。因此, 建立稳定可靠的分析方法, 进行单抗药糖基化修饰的表征具有重要意义。

目前有多种策略可用于 N-糖基化修饰分析, 包括采用蛋白酶处理将聚糖从蛋白游离, 然后采用化学试剂标记的方法进行荧光或者质谱检测, 即在游离 N-聚糖的层次进行分析, 该方法目前是工业界中 N-聚糖质控的金标准^[7]。该方法的优势在于可借助一系列的聚糖标准品, 对多种糖型进行定量分析。另一种常用的方法是在完整糖肽 (bottom-up) 的水平进行, 即将单抗药酶解后富集糖肽进行 LC-MS/MS 分析。该方法不依赖于糖标准品, 在获得更加丰富的糖型信息的同时, 且提供糖基化修饰的位点信息^[8]。近年来随着质谱技术的进步, 更多聚糖修饰分析方法也逐渐涌现, 包括在完整蛋白以及蛋白亚基层次的糖型解析^[9-11]。这两种分析方式可以部分获取抗体药的氨基酸序列信息和糖基化修饰信息, 但定性、定量能力相对不足。

上述常用的 N-聚糖分析方法在样品处理、仪器操作、定性和定量能力中有着各自的特点^[12]。游离 N-聚

糖分析较为稳定, 易操作, 可同时获取定性、定量信息, 但该方法依赖于聚糖标准品, 且无法获得 N-聚糖的连接位点信息。糖肽分析不依赖聚糖标准品, 能够获取更加全面的糖型信息, 包括未知的糖型以及糖基化位点, 但样品处理和数据解析步骤相对复杂。

本研究选择的研究对象分别为: 阿达木单抗 (adalimumab)、贝伐珠单抗 (bevacizumab) 和曲妥珠单抗 (trastuzumab)。阿达木单抗 (修美乐) 于 2003 年 1 月首次在美国上市, 现主要用于治疗类风湿关节炎和强直性脊柱炎^[13]。贝伐珠单抗 (安维汀) 是一种人源化重组单克隆抗体, 是美国第一个批准上市的抑制肿瘤血管生成的抗体药物, 主要用于治疗转移性结直肠癌或晚期非小细胞肺癌^[14]。曲妥珠单抗 (赫赛汀) 临床上目前主要用于 Her-2 过度表达的转移性乳腺癌^[15]。在这三种单抗药重链的 Fc 片段上, 均具有一个高度保守的 N-糖基化修饰位点^[16]。修饰的 N-聚糖通常具有双天线结构, 可发生岩藻糖化和唾液酸化, 进而影响其药效和安全性, 因此对其糖基化修饰进行表征具有重要意义。

为了更加全面的表征单抗药的 N-糖基化修饰, 本研究以阿达木单抗、贝伐珠单抗和曲妥珠单抗为对象, 采用高分辨质谱仪对 3 种单克隆抗体药的糖基化修饰进行了全面表征。基于各种分析方法的特点, 采用了两种分析策略: ① 游离 N-聚糖层次: 采用糖苷酶将 N-聚糖从单抗药游离, 通过与糖标准品比对获取糖型的定性定量信息; ② 完整糖肽层次: 通过胰蛋白酶酶切获得糖肽, 鉴定糖肽的氨基酸序列、糖基化修饰位点和糖型。

材料与方 法

试剂 贝伐珠单抗注射液 (商品名安维汀, 100 mg 规格, 4 mL/瓶, 罗氏公司生产); 注射用曲妥珠单抗 (商品名赫赛汀, 440 mg/瓶, 罗氏公司生产); 阿达木单抗注射液 (商品名修美乐, 40 mg/支, 雅培制药生产); 肽 N-糖苷酶 F (PNGase F) 购自美国 New England Biolabs 公司; 胰蛋白酶 trypsin 购自 Promega 公司; 甲酸、乙腈 (质谱级)、碘乙酰胺 (IAA)、二硫苏糖醇 (DTT)、三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP)、盐酸胍、乙酸铵 (质谱级) 和碳酸氢铵均购自 Sigma 公司; 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液购自

Invitrogen 公司; Glycoworks RapiFluor 糖分析试剂盒购自 Waters 公司; 超纯水由美国 Milli-Q 净化系统制备。

游离 N-聚糖处理方法 取 15 μg 贝伐珠单抗, 与 15.3 μL 双蒸水和 6 μL 的 5% RapiGest SF 溶液混合, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 min。冷却至室温后加入 1.2 μL 的 PNGase F 酶, 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 将 N-聚糖游离。溶液冷却至室温后加入 12 μL 的 RapiFluor-MS (RFMS) 标记试剂, 室温反应 5 min。使用 GlycoWorks $\mu\text{Elution}$ 提取板纯化 N-聚糖, 用 30 μL 洗脱液 (含 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵的 5% 乙腈溶液) 洗脱 3 次。合并 3 次的洗脱液, 加入 100 μL DMF 和 210 μL 乙腈混匀后, 取 10 μL 进行质谱检测。在分析待测样品前, 将 RapiFluor-MS 聚糖性能测试标准品和葡聚糖校准标准品各进样 1 μL 进行分析, 用于仪器性能评估与葡萄糖单元 (GU, glucose unit) 值校准。

完整糖肽处理方法 取 100 μg 贝伐珠单抗转移至 10 kDa 滤膜上, 将缓冲液置换为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸氢铵缓冲液 (pH 8.5)。加入 DTT 至终浓度为 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 后, 加入终浓度为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IAA, 室温避光反应 30 min。之后加入 4 μg 的胰蛋白酶, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 12 h 进行蛋白酶解。采用 OASIS SPE 固相萃取柱除盐 (Waters 公司) 后真空浓缩至干燥。将酶解得到的多肽样品用 0.1% 甲酸水溶液稀释至终浓度约 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 取 2 μL 进行质谱分析。

游离 N-聚糖质谱检测方法 采用 Agilent 1290 Infinity II 高效液相色谱仪串联 Agilent 6550 Q-TOF 质谱进行样品分析。色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Glycan Amide (1.7 μm , 150 $\text{mm}\times 2.1$ mm), 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。流动相 A 为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液 (pH 4.4), 流动相 B 为乙腈。洗脱梯度设置如下: 平衡 10 min 后, 流动相 B 于 50 min 内由 75% 降低至 54%, 之后于 2 min 内降低至 5% 并维持 3 min, 然后于 4 min 内升至 75% 进行平衡。质谱参数设置如下: 干燥气温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气温度 325 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 3.5 kV。质量扫描范围 m/z 100~3 200。碰撞能量设定公式为 $\text{CE} = 3.4 \text{ V} \times (m/z) / 100 + 10 \text{ V}$ 。

完整糖肽质谱检测方法 使用 Thermo EASY-nLC 1000 液相色谱仪串联 Thermo Fusion Lumos 高分辨质谱仪进行液质联用分析。色谱柱为 C18 柱 (2 μm , 100 \AA , 75 $\mu\text{m}\times 50$ cm), 柱温为 60 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 的甲酸和 2% 的水的乙腈溶液。洗脱梯度设置如下: 平衡 5 min 后, 流动相 B 于 15 min 内由 5% 上升至 40%, 之后于 5 min 内上升到 90% 并维持 5 min。质谱参数设置如下: 喷雾电压 2.3 kV, 毛细管温度为 275 $^{\circ}\text{C}$, MS1 扫描范围 m/z 400~3 250, 分辨率为 60 000。MS/MS 参数设置如下:

离子碎裂模式为高能碰撞解离 (HCD), 碎裂能量为 35%, 扫描范围 m/z 100~3 500, 分辨率 30 000, 动态排除时间为 30 s。

游离 N-聚糖的质谱数据分析 利用 Agilent MassHunter QQQ Quantitative Analysis 软件 (版本 B.07.01) 对仪器采集的 N-聚糖数据进行定性分析, 并基于 EIC 峰面积手动计算糖型的相对丰度。使用 GlycoWorkbench 2.1 软件绘制糖型结构。

完整糖肽的数据分析 采用软件 Byonic 对质谱数据进行解析, 以鉴定糖肽和糖型修饰。软件参数设置如下: 蛋白酶为 trypsin (KR), 最大 2 个漏切位点; 母离子质量误差为 2×10^{-5} , 子离子质量误差为 0.02 Da; 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化-Carbamidomethyl (C); 可变修饰为甲硫氨酸氧化-Oxidation (M), Gln->pyro-Glu (N-term Q); N 末端糖基化修饰, 糖基化修饰数据库为来源于哺乳动物中的 309 种已知糖型。

结果

1 游离 N-聚糖分析方法的建立

在进行单抗药游离 N-聚糖分析之前, 先对 RapiFluor 标记的聚糖性能测试标准品进行分析, 评估仪器性能, 并优化质谱参数。葡聚糖标准品的结果显示, 本方法可对 GU 2-18 提供良好的分离性能 (图 1A), 保留时间与 GU 值相关性良好 (图 1B)。多聚糖性能测试标准品结果显示, 19 种标准品的分离效果良好 (图 1C), 并且能够实现部分同分异构体的分离, 如 F(6)A2[6]G(4)1 和 F(6)A2[3]G(4)1 (分别对应图 2C 的 G1F 和 G1F'), 以及 A2[6]G(4)1 和 A2[3]G(4)1 (分别对应图 1C 的 G1 和 G1')。对标准品中各聚糖的相对丰度进行估算可知, 本方法可以实现浓度低至 3 $\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 G2S2 (图 1C) 聚糖检测。

2 游离 N-聚糖层次检测单抗药糖基化修饰

在游离 N-聚糖水平检测单抗糖基化修饰水平已成为制药工业中常规的质控手段。本研究采用该策略检测了 3 种单抗药的 N-聚糖修饰类型, 并对其相对定量。单抗药经蛋白酶 PNGase F 处理后, N-连接糖从 Fc 端游离, 之后采用试剂 RapiFluor-MS 标记游离 N 糖, 以增加其稳定性并提高分析的灵敏度, 然后采用 LC-MS/MS 方式鉴定。根据文献^[17]报道, 与 2-AB 标记相比, RFMS 标记更加快速 (5 min), 标记效率约为 95% (2-AB 约为 50%), 反应没有歧视效应。RFMS 标记能够显著提高 FLR (是 2-AB 标记的 10 倍) 和 MS (是 2AB 标记的 150 倍) 检测灵敏度, 保持糖链的完整性。将采集的糖型保留时间 (RT) 转换为葡萄糖单元 (GU), 与数据库中已知糖标准品的 GU 值进行比对, 并结合一级、二级高分辨数据, N-聚糖特征碎片等信息, 进一

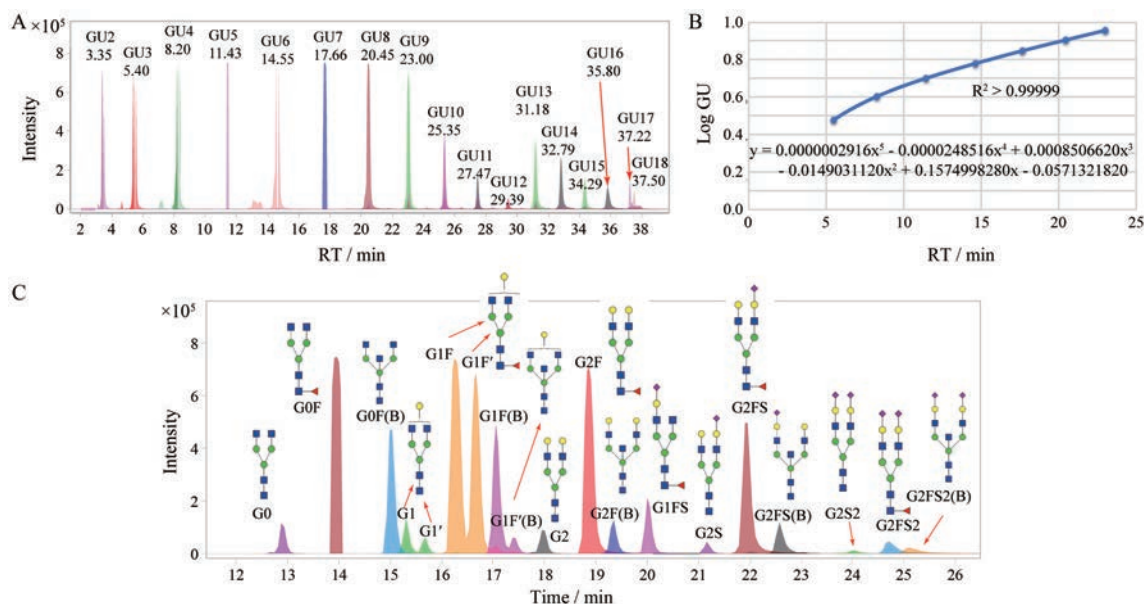


Figure 1 Performance of HILIC-MS analysis of glycan standards. A: RFMS labeled Dextran Calibration Ladder was used as a separation standard; B: The glucose unit (2-18) calibration from the separation standard was fitted by a fifth order polynomial curve. The measured GU value was searched using the glycoBase entries to assign structures from GU values; C: HILIC-MS analysis of RFMS labeled glycan standards. 1 pmol of glycan mixture was injected. RT: Retention time; GU: Glucose unit

步确认 N-聚糖信息以提高鉴定的可信度。采用上述策略, 最终在阿达木单抗、贝伐珠单抗和曲妥珠单抗中分别鉴定 18、11 和 20 种糖型 (图 2)。美国药典 (USP) 中分别规定贝伐珠单抗和曲妥珠单抗中需包括 5 种和 16 种糖型, 对阿达木单抗无明确要求。本实验在曲妥珠单抗游离 N-聚糖样品中鉴定到药典规定的 14 种糖型 (未检测到 Man8、Man9) 外, 还鉴定到 6 种低丰度糖型 (FMan3、G0-GN、G1-GN、Man5+GN、G1F+GN、G1FS)。在贝伐珠单抗游离 N-聚糖样品中鉴定到药典规定的 5 种糖型外, 还鉴定到 6 种低丰度糖型 (FMan3、G0-GN、Man5、G1F-GN、G0F+GN、G2F)。

N-聚糖相对定量结果显示 (表 1), 阿达木单抗中 G0F 的相对丰度最高, 约占 22%~45%, 其次为 G1F 和 G0F-GN。贝伐珠单抗中, G0F 相对丰度占 38%~47%, 其次为 G0F-GN 和 G1F (包括其同分异构体 G1F')。而在曲妥珠单抗中, G1F 含量最高, 占 28%~32%, 其次为其同分异构体 G1F'、G0 和 G0F。这些主要糖型的相对丰度之和可达总糖型的 70% 以上 (表 1)。此外, 本方法能够检测相对丰度低至 0.1% 的聚糖, 如阿达木单抗中的 G1F+GN (0.1%)、曲妥珠单抗中的 FMan3 (0.07%) 和 Man5+GN (0.1%)。

对 3 个不同批次单抗药进行分析可知, 部分 N-聚糖在不同批次中相对丰度存在差异。在分析实际样品前, 首先对标准品进行检测, 19 种糖型的相对丰度与理论值一致, 表明不同批次单抗药中 N-聚糖相对丰度

的差异不是由分析方法造成的。在阿达木单抗中, G0F 在 3 批中的相对丰度分别为 34.33%、45.4% 和 22.36%, G0F+GN 的相对丰度分别为 3.02%、0.23% 和 3.52%。3 个批次的曲妥珠单抗中, Man5 的相对丰度分别为 6.03%、4.28% 和 1.87%。此外, 结合 GU 值, 对照品谱图和二级碎片信息, 可以获取 G1F 和 G1 的同分异构体的相对丰度差异 (表 1)。

3 完整糖肽层次表征 N-聚糖修饰

基于完整糖肽的分析策略则将蛋白酶解成肽段后进行 LC-MS/MS 分析, 该方法可同时获取 N-聚糖的组成和糖基化修饰位点信息^[18]。采用该策略对 3 种单抗药进行修饰位点确认和糖型表征。在上样量为 2 μ g 时, 贝伐珠单抗的多肽总离子色谱图如图 3A 所示, 糖肽的提取离子流色谱图如图 3B 所示。糖肽的代表性谱图见图 3C。最终在贝伐珠单抗中共鉴定 15 种 N-聚糖 (图 3D)。

多数糖型在游离 N-聚糖和糖肽水平均可得到检测, 如 G0、G0F、G1F 等。此外, 在完整糖肽水平还可获得额外的糖型信息, 如 FMan5、Man5+GN、G2FS+GN 等。在贝伐珠单抗中, N-聚糖修饰主要位于肽段 EEQYN*STYR 上。糖肽 EEQYN*STYR 在 3 min 左右洗脱 (图 3B)。该肽段上的主要糖型包括 G0、G0F、G0F-GN (图 3D), 其他相对丰度较低的糖型包括 FMan3、G1FS-GN、Man5、Man7 等。糖基化修饰位点可通过二级质谱图进一步判断 (图 3C)。通过质谱碎片信息可

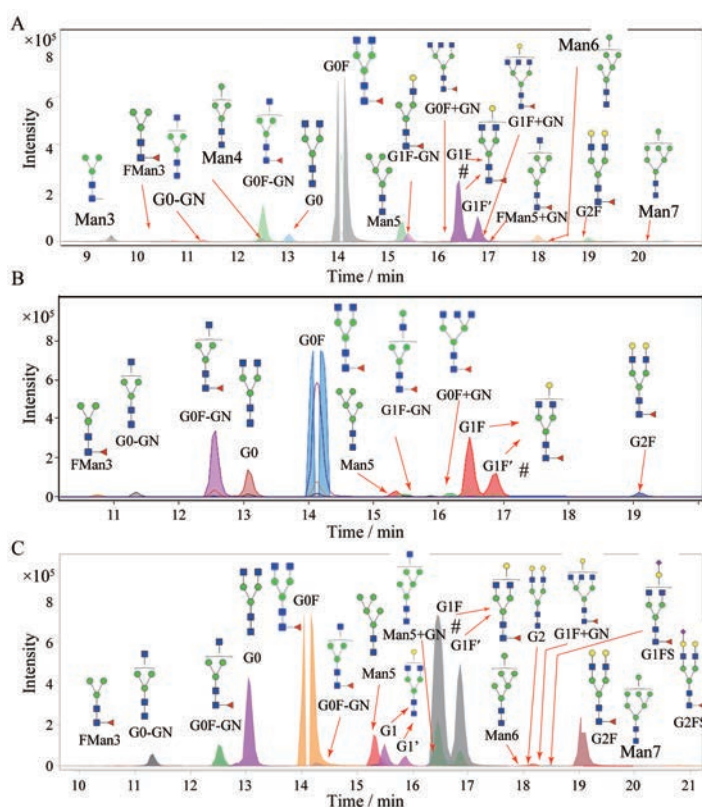


Figure 2 Analysis of N-glycans by PNGase F releasing and RFMS labeling. A: Chromatogram of RFMS-labeled N-glycans released from adalimumab. N-glycan structures for each peak were labeled. G: Galactose; F: Fucose; GN: GlcNAc; and loss of GlcNAc shown as minus (-)GN. # indicates the isoforms of G1F; B, C: Extract ion current chromatogram of N-glycans released from bevacizumab (B) and trastuzumab (C)

Table 1 A list of the mass-confirmed N-linked glycans derived from three therapeutic mAbs. ADA: Adalimumab; BEV: Bevacizumab; TRA: Trastuzumab. G1: A2[6]G(4)1; G1': A2[3]G(4)1; G1F: F(6)A2[6]G(4)1; G1F': F(6)A2[3]G(4)1. "*" indicates isomers; "-" is non-detectable

No.	Monosaccharide composition	Glycoform	Relative abundance/%									RT /min	GU
			ADA_1	ADA_2	ADA_3	BEV_1	BEV_2	BEV_3	TRA_1	TRA_2	TRA_3		
1	HexNAc(2)Hex(3)Fuc(1)	FMan3	0.57	0.26	0.33	0.46	0.54	0.75	0.20	0.13	0.07	10.69	4.77
2	HexNAc(4)Hex(3)	G0	2.72	2.14	3.28	6.93	9.44	7.10	14.29	12.43	12.43	13.04	5.50
3	HexNAc(4)Hex(3)Fuc(1)	G0F	34.33	45.4	22.36	47.05	38.88	46.01	6.17	19.68	18.32	14.05	5.81
4	HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)	G0F+GN	3.02	0.23	3.52	0.93	0.85	0.90	-	-	-	16.10	6.48
5	HexNAc(3)Hex(3)Fuc(1)	G0F-GN	9.92	9.94	13.99	17.07	20.54	21.96	3.79	2.96	1.94	12.50	5.33
6	HexNAc(3)Hex(3)	G0-GN	0.61	0.62	0.85	1.08	1.37	1.41	2.31	1.60	0.83	11.32	4.97
7	HexNAc(4)Hex(4)	G1*	-	-	-	-	-	-	2.82	2.84	3.34	15.50	6.28
8	HexNAc(4)Hex(4)	G1'*	-	-	-	-	-	-	1.40	1.35	1.81	15.88	6.40
9	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)	G1F*	22.52	18.33	25.04	7.56	16.08	11.86	32.46	28.29	30.06	16.45	6.59
10	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)	G1F'*	10.24	7.5	11.2	15.33	8.15	6.33	17.48	15.54	16.64	16.86	6.73
11	HexNAc(5)Hex(4)Fuc(1)	G1F+GN	0.14	0.10	0.20	-	-	-	0.26	0.20	0.16	18.44	7.27
12	HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)	G1F-GN	0.64	2.56	0.87	0.78	0.83	0.80	1.25	1.26	1.56	15.45	6.26
13	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1)	G1FS	-	-	-	-	-	-	0.19	0.14	0.18	18.51	7.30
14	HexNAc(3)Hex(4)	G1-GN	-	-	-	-	-	-	0.58	0.47	0.62	14.28	5.89
15	HexNAc(4)Hex(5)	G2	-	-	-	-	-	-	0.38	0.33	0.46	18.15	7.17
16	HexNAc(4)Hex(5)Fuc(1)	G2F	1.89	1.24	1.85	1.17	1.37	1.07	8.60	7.77	9.30	19.08	7.50
17	HexNAc(3)Hex(5)Fuc(1)	G2F-GN	0.47	0.39	0.54	-	-	-	0.36	0.28	0.41	20.80	8.12
18	HexNAc(2)Hex(3)	Man3	2.04	1.55	2.27	-	-	-	-	-	-	9.45	4.39
19	HexNAc(2)Hex(4)	Man4	0.63	0.92	1.31	-	-	-	-	-	-	12.44	5.31
20	HexNAc(2)Hex(5)	Man5	6.91	6.02	8.05	1.63	1.97	1.80	6.03	4.28	1.87	15.30	6.21
21	HexNAc(3)Hex(5)	Man5+GN	-	-	-	-	-	-	0.24	0.14	0.10	16.69	6.67
22	HexNAc(2)Hex(6)	Man6	2.39	2.00	3.13	-	-	-	0.85	0.22	0.04	18.00	7.12
23	HexNAc(2)Hex(7)	Man7	0.63	0.62	0.83	-	-	-	0.35	0.09	0.02	20.65	8.06
24	HexNAc(2)Hex(7)	Man7 D3	0.35	0.20	0.36	-	-	-	-	-	-	19.59	7.68

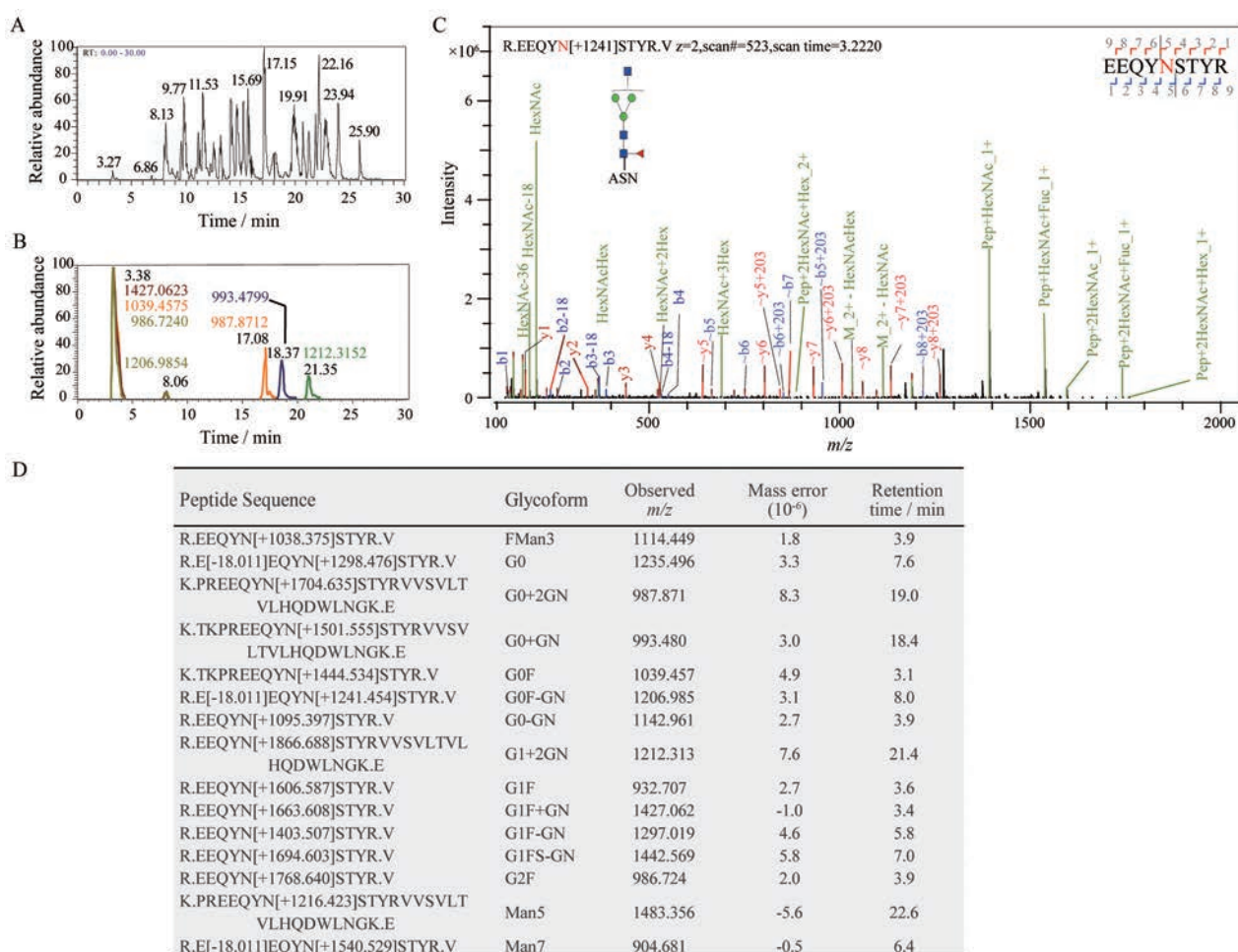


Figure 3 Glycopeptide analysis of trypsin digested bevacizumab. A: Total ion chromatogram of trypsin digested mAb analyzed in nano-LC-MS/MS. B: Extracted ion chromatograms (XICs) of abundant glycopeptides. C: MS/MS data of the glycopeptide with the G0F-GN structure. Relevant fragments were annotated by software Byonic and manually checked. The glycosite (Asn, N) was labelled. D: List of glycopeptides and the attached glycans derived from digested bevacizumab

知, 该糖肽上存在的糖型为G0F-GN, 位点在303位的天冬酰胺残基(Asn303)上。在其他保留时间如17~21 min亦有糖肽洗脱, 但其信号强度较低。这些在反向色谱中保留较强的糖肽氨基酸序列较长, 如在19 min洗脱的肽段由27个氨基酸组成(K.PREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGK.E), 可能来源于胰蛋白酶对特定氨基酸(K或R)的漏切。在阿达木单抗和贝伐珠单抗中, 经质谱鉴定, 糖基化修饰位点分别位于301(Asn-301)和297(Asn-297)的天冬酰胺残基上。

讨论

本研究基于两种不同的样本处理方法, 采用液质联用技术分别在游离N-聚糖和糖肽水平对3种单克隆抗体药物的糖基化修饰进行了分析。游离N-聚糖层次的分析方法相对成熟, 在工业界常用作质量放行的标准方法。该方法样本处理时间较短, 经优化后可控

制在2 h以内。在能够获得标准品的条件下, 其定性、定量性能较强, 可辨别不同批次样品中聚糖的含量差异, 并可识别部分同分异构体, 但难以检测未知的糖型修饰。此外, 该方法需要对游离N-聚糖进行标记, 以提高其在质谱中的信号响应, 标记试剂的性能对实验结果影响明显。糖肽层次的分析能准确定位糖基化修饰位点, 同时可获得丰富的糖型信息, 是游离N-聚糖分析方法的进一步补充。此外, 该策略可获得接近100%的氨基酸序列覆盖度, 能够对单抗药的一级结构进行充分表征, 获取其他类型的翻译后修饰信息, 如脱水、氧化、脱酰胺等。但通常该方法样品处理时间较长(12~24 h), 步骤烦琐, 对实验操作技能要求较高, 并且需要专用软件进行数据解析。将这两种策略相结合, 可对单抗药进行更加全面的解读, 包括结构、多种翻译后修饰的定性和定量信息等, 进而深入了解糖基化修饰的宏观和微观异质性。

作者贡献: 李梦林、张金兰负责实验设计; 李梦林和朱文文负责具体实验的实施以及实验数据的分析; 李梦林完成文章初稿; 张金兰对文章进行修订。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market [J]. MAbs, 2015, 7: 9-14.
- [2] Zhao CX, Hu ZW, Cui B. Recent advances in monoclonal antibody-based therapeutics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 52: 837-847.
- [3] Liu LM. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins [J]. J Pharm Sci, 2015, 104: 1866-1884.
- [4] Junttila TT, Parsons K, Olsson C, et al. Superior *in vivo* efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer [J]. Cancer Res, 2010, 70: 4481-4489.
- [5] Yu M, Brown D, Reed C, et al. Production, characterization and pharmacokinetic properties of antibodies with N-linked mannose-5 glycans [J]. MAbs, 2012, 4: 475-487.
- [6] Kirchhoff CF, Wang XZM, Conlon HD, et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools [J]. Biotechnol Bioeng, 2017, 114: 2696-2705.
- [7] Zhang L, Luo S, Zhang BL. Glycan analysis of therapeutic glycoproteins [J]. mAbs, 2016, 8: 205-215.
- [8] Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR, et al. IgG glycosylation analysis [J]. Proteomics, 2009, 9: 882-913.
- [9] Zhang H, Cui Wd, Gross ML. Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies [J]. FEBS Lett, 2014, 588: 308-317.
- [10] Wohlschlager T, Scheffler K, Forstenlehner IC, et al. Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals [J]. Nat Commun, 2018, 9: 1713.
- [11] Fornelli L, Ayoub D, Aizikov K, et al. Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation orbitrap fourier transform mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2014, 86: 3005-3012.
- [12] Leymarie N, Griffin PJ, Jonscher K, et al. Interlaboratory study on differential analysis of protein glycosylation by mass spectrometry: the ABRF glycoprotein research multi-institutional study 2012 [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12: 2935-2951.
- [13] Taylor PC, Keystone EC, van der Heijde D, et al. Baricitinib versus placebo or adalimumab in rheumatoid arthritis [J]. New Engl J Med, 2017, 376: 652-662.
- [14] Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2014, 371: 1609-1618.
- [15] Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer [J]. New Engl J Med, 2019, 382: 610-621.
- [16] Yu C, Zhang F, Xu G, et al. Analytical similarity of a proposed biosimilar BVZ-BC to bevacizumab [J]. Anal Chem, 2020, 92: 3161-3170.
- [17] Schiel JE, Rogstad SM, Boyne MT. Comparison of Traditional 2-AB Fluorescence LC-MS/MS and automated LC-MS for the comparative glycan analysis of monoclonal antibodies [J]. J Pharm Sci, 2015, 104: 2464-2472.
- [18] Stadlmann J, Pabst M, Kolarich D, et al. Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides [J]. Proteomics, 2008, 8: 2858-2871.