

# Анализ N-гликанов, выделенных из моноклонального антитела, методом капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии

## Методическая информация

Биофармацевтические препараты



## Авторы

Суреш Бабу (Suresh Babu C.V) и  
Равиндра Гудихал (Ravindra Gudihal)  
Agilent Technologies India Pvt. Ltd  
Бангалор, Индия

## Резюме

Гликозилирование является одной из наиболее важных посттрансляционных модификаций, включающих присоединение остатка гликана к белку. Изменение профиля гликозилирования оказывает сильное влияние на иммуногенность и общую биологическую активность. Определение характеристик гликанов имеет исключительно важное значение для решения задач в области биофармацевтики. Для определения профилей N-гликанов широко используются различные аналитические методики, но при этом возникают серьезные проблемы, связанные с точным обнаружением гликанов при низких концентрациях.

В данной работе продемонстрирован анализ гликанов рекомбинантных моноклональных антител (mAb) с применением капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии (КЭ-МС). Данный метод подразумевает ферментативное расщепление гликанов, полученных из mAb, пептид-N-гликозидазой F (PNGase F) с последующей флуоресцентной (тринатриевая соль 8-аминопирин-1,3,6-трисульфоновой кислоты — APTS) маркировкой гликанов, а также анализом гликанов с помощью системы КЭ Agilent 7100, подключенной к квадрупольно-времяпролетному ЖХ-МС Agilent 6520 с точным определением массы. Была проведена идентификация семи гликанов, выделенных из рекомбинантных mAb; и на основании относительного процентного соотношения отдельных остатков гликанов было установлено наличие как основных, так и второстепенных форм модификации гликанов. В данной работе продемонстрировано более быстрое разделение посредством КЭ наряду с низкими пределами обнаружения МС. Результаты указывают на то, что сочетание КЭ-МС является удачной и многообещающей альтернативой ЖХ-МС для определения характеристик гликанов, выделенных из mAb, или гликопротеинов.



**Agilent Technologies**

## Введение

За последние годы в биофармацевтической промышленности значительно вырос интерес к моноклональным антителам (mAb) в качестве потенциальных белковых лекарственных средств. Процесс разработки новых лекарственных препаратов включает в себя ряд тщательно контролируемых и оцениваемых этапов, которые требуют осторожного и критического контроля терапевтической стабильности и эффективности целевых соединений. Поэтому детальное определение характеристик моноклональных антител на каждом этапе до вывода лекарственного препарата на рынок является в высшей степени целесообразным. Среди множества хорошо изученных посттрансляционных модификаций белков гликозилирование, как известно, играет основополагающую роль в нескольких биологических процессах, например в деградации и транскрипции белков, влияя на здоровье и развитие болезни<sup>1</sup>. Для идентификации гликанов, присоединенных к молекулам исследуемых белков, нужна надежная и чувствительная аналитическая методика.

В последнее время при анализе гликопротеинов большое внимание уделялось капиллярному электрофорезу (КЭ), который обеспечивает высокоэффективное разделение при сокращенном времени цикла. Выделенные под воздействием ферментов гликаны маркируют флуоресцентным хромофором (тринатриевая соль 8-аминопирин-1,3,6-трисульфоновой кислоты — APTS, анионная) и подвергают разделению методом КЭ с высокочувствительной лазерно-индуцированной флуоресценцией

(ЛИФ) или масс-спектрометрической (МС) регистрацией. При маркировке с помощью APTS гликанам сообщается отрицательный заряд. Это способствует улучшению электрофоретического разделения, а также подходит для ионизации электроспреем (режим регистрации отрицательных ионов), благодаря чему весь процесс разделения и обнаружения хорошо сочетается с химией флуоресцентного мечения. Сочетание КЭ и МС является целесообразным при идентификации неизвестных соединений и оценке информации о модификации или массе гликанов<sup>2</sup>.

В данной работе продемонстрирован анализ N-гликанов, полученных из рекомбинантных mAb, методом капиллярного электрофореза и квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии. Метод КЭ-МС с APTS-мечением помогает идентифицировать все остатки гликанов, присоединенные к mAb. Дополнительно были представлены относительные процентные соотношения каждого гликана для демонстрации основных и второстепенных форм модификации гликанов.

## Материалы и метод

### Химреактивы

Моноклональное антитело, PNGase F и капилляры, покрытые поливинилацетатом (ПВА), были предоставлены компанией Agilent Technologies, Inc.  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота и 1 М цианоборогидрид натрия в тетрагидрофуране (ТГФ) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США). APTS был приобретен у компании Molecular Probes, Invitrogen (Юджин, штат Орегон, США). Стандарты гликанов были куплены у компании Prozyme (Хейворд, штат Калифорния, США). Колонки PhyTip предоставила компания PhyNexus (Сан-Хосе, штат Калифорния, США).

## Ферментативное дегликозилирование, извлечение гликана и мечение APTS

Дегликозилирование mAb проводили с использованием фермента PNGase F. Раствор mAb с концентрацией 15 мг/мл обрабатывали PNGase F в 0,25 М Трис-буфере (pH 7,6) при 37 °C в течение ночи. Дегликозилированный белок подвергли термическому осаждению и центрифугированию. Надосадочную жидкость, содержащую гликаны, высушили и поместили APTS путем восстановительного аминирования. К высушенному образцу гликанов добавили 2,5 мкл раствора 50 мМ APTS в 1,2 М лимонной кислоты и 2,5 мкл раствора 1 М цианоборогидрида натрия в ТГФ, затем выдержали на водяной бане при 37 °C в течение ночи. Для прекращения реакции реакционную смесь разбавили 50 мкл воды. Несвязанный избыточный краситель удалили, используя колонки PhyTip с прямой фазой на полиамидной смоле от компании PhyNexus, предварительно кондиционированные 95% ацетонитрилом. После введения образца колонку промыли 95% ацетонитрилом и окончательно элюировали N-гликаны, используя 20% ацетонитрил.

### Оборудование для КЭ-МС

Анализ КЭ-МС с ионизацией электроспреем выполняли с помощью системы КЭ 7100 с кассетным капилляром (G1603A), подключенной к квадрупольно-времяпролетному ЖХ-МС Agilent 6520 с точным определением массы, оборудованному сдвоенным электрораспылителем и ортогональным коаксиальным интерфейсом обволакивающей жидкости (G1607B)<sup>3</sup>. Разделение и стабильность распыления были оптимизированы с помощью холостых буферных растворов и стандарта. Для поддержания высокой эффективности разделения при КЭ-МС и обеспечения стабильного потока и

условий распыления, существенных для ионизации электроспреем, в интерфейсе КЭ-МС поддерживалась низкая скорость потока (5 мкл/мин) обволакивающей жидкости. Параметры квадрупольно-времяпролетной системы оптимизировались автоматически с помощью программ настройки МС, а система МС была откалибрована с использованием смеси для настройки электроспрея.

Параметры КЭ-МС приведены в табл. 1. Общий перечень соединений был извлечен с использованием алгоритма выделения молекулярных признаков MassHunter MFE.

#### Капиллярный электрофорез (КЭ)

КЭ:	система для капиллярного электрофореза Agilent 7100
Проба:	N-гликаны, выделенные из тАб
Ввод пробы:	40 секунд при давлении 30 мбар
Капилляры:	покрытые поливиниловым спиртом, общая длина 60 см, внутренний диаметр 50 мкм
Буфер:	40 мМ $\epsilon$ -аминокапроновая кислота, pH 4,5
Напряжение:	-25 кВ
Внешнее давление:	10 мбар
Температура:	20 °С

#### Масс-спектрометрия (МС)

МС:	квадрупольно-времяпролетный ЖХ-МС Agilent 6520 с точным определением массы
Режим ионизации:	электроспрей
Режим сбора данных:	МС (диапазон массы 400–3 200 $m/z$ )
Обволакивающая жидкость:	изопропанол:вода (1:1 об.) с 0,2% $\text{NH}_3$ при 5 мкл/мин
Скорость потока осушающего газа:	5 л/мин
Распылитель:	8 psi
Температура осушающего газа:	250 °С
Фрагментационная ячейка:	175 В
V наконечника:	3 200 В
Время сканирования:	980,3 мс/спектр
Скорость сканирования:	1,02 спектра/с

**Таблица 1**  
**Параметры КЭ-МС.**

## Результаты и обсуждение

Хотя анализ гликанов обычно проводится посредством КЭ-ЛИФ, использование метода КЭ-МС имеет преимущество при идентификации неизвестных мигрирующих видов гликанов, присутствующих в электрофоретическом цикле, поскольку он дает информацию о молекулярной массе. В данной работе КЭ был соединен с квадрупольно-времяпролетным МС посредством интерфейса обволакивающей жидкости для определения массы гликанов, полученных из mAb. На схеме 1 приведены этапы определения профиля гликанов, полученных из mAb, с использованием КЭ-МС. Вкратце, выделенные из антитела гликаны поместили с помощью APTS и затем проанализировали методом КЭ-МС. На рис. 1 показан полученный методом КЭ-МС общий профиль соединений для N-связанных гликанов, выделенных из рекомбинантного mAb. Все гликаны антитела мигрировали в течение 15-минутного разделения с использованием капилляров, покрытых поливинилацетатом. При многократном повторении циклов удалось успешно идентифицировать следующие виды незаряженных N-связанных гликанов: G0, G0F, G1, G1F, G2 и G2F. Кроме того, был обнаружен моносиалированный остаток гликана G2F+1NANA. Определение пиков проводилось на основании точно измеренных масс, полученных в результате анализа методом квадрупольно-времяпролетной МС.

Обнаруженные в ходе данного



Схема 1  
Схематическое изображение определения гликопрофиля mAb методом КЭ-МС.

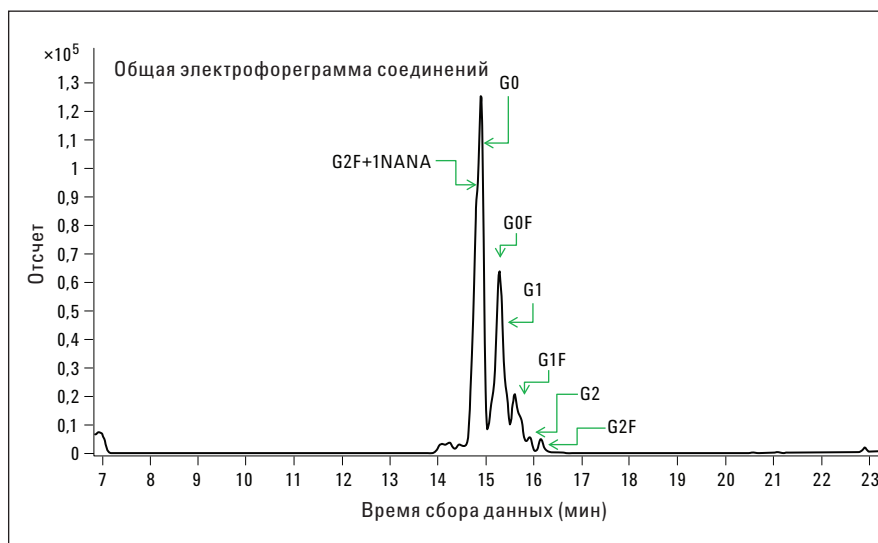

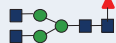







Рисунок 1  
КЭ-МС меченых APTS N-гликанов, выделенных из mAb.

исследования гликаны сведены в табл. 2. Обратите внимание, что виды G2 были успешно идентифицированы методом КЭ-МС, но не ЖХ-МС (данные не приведены). Это свидетельствует о значительном преимуществе анализа на основе КЭ-МС (взаимодополняющее значение методов КЭ-МС).

На рис. 2 представлен масс-спектр для

Обозначение гликана	Измеренная моноизотопная масса	Измеренное зарядовое состояние наибольшей интенсивности	Структура гликанов	Теоретическая моноизотопная масса	Относительное процентное содержание
G0	1 757,4575	877,7212 (-2)		1 757,4512	20,8
G0F	1 903,5121	950,7484 (-2)		1 903,5091	34,0
G1	1 919,5071	958,7389 (-2)		1 919,5040	2,3
G1F	2 065,5649	1 031,7756 (-2)		2 065,5619	4,2
G2	2 081,5666	1 039,7751 (-2)		2 081,5568	3,1
G2F	2 227,6228	1 112,8041 (-2)		2 227,6147	1,2
G2+1NANA	2 518,7191	838,5664 (-3)		2 518,7101	34,4

● Галактоза   
● Манноза   
▲ Фукоза   
■ N-ацетилглюкозамин   
◆ Сиаловая кислота

Таблица 2  
Сводка N-гликанов тАб, идентифицированных с использованием КЭ-МС.

отдельных разрешенных гликанов. На масс-спектре отмечены зарядовые состояния, имеющие наибольшую интенсивность. Оценка абсолютных/относительных количественных уровней имеет первостепенное значение в процессе разработки терапевтических

препаратов. Терапевтические препараты чувствительны к деградации и любым, даже незначительным модификациям. Была проведена оценка процента объема отдельного соединения от общего объема пиков соединений, а относительные

количественные данные по выделенным из mAb гликанам приведены в табл. 2. Было установлено, что в данном случае основной гликоформой является G2+1NANA.

Эти результаты ясно показывают,

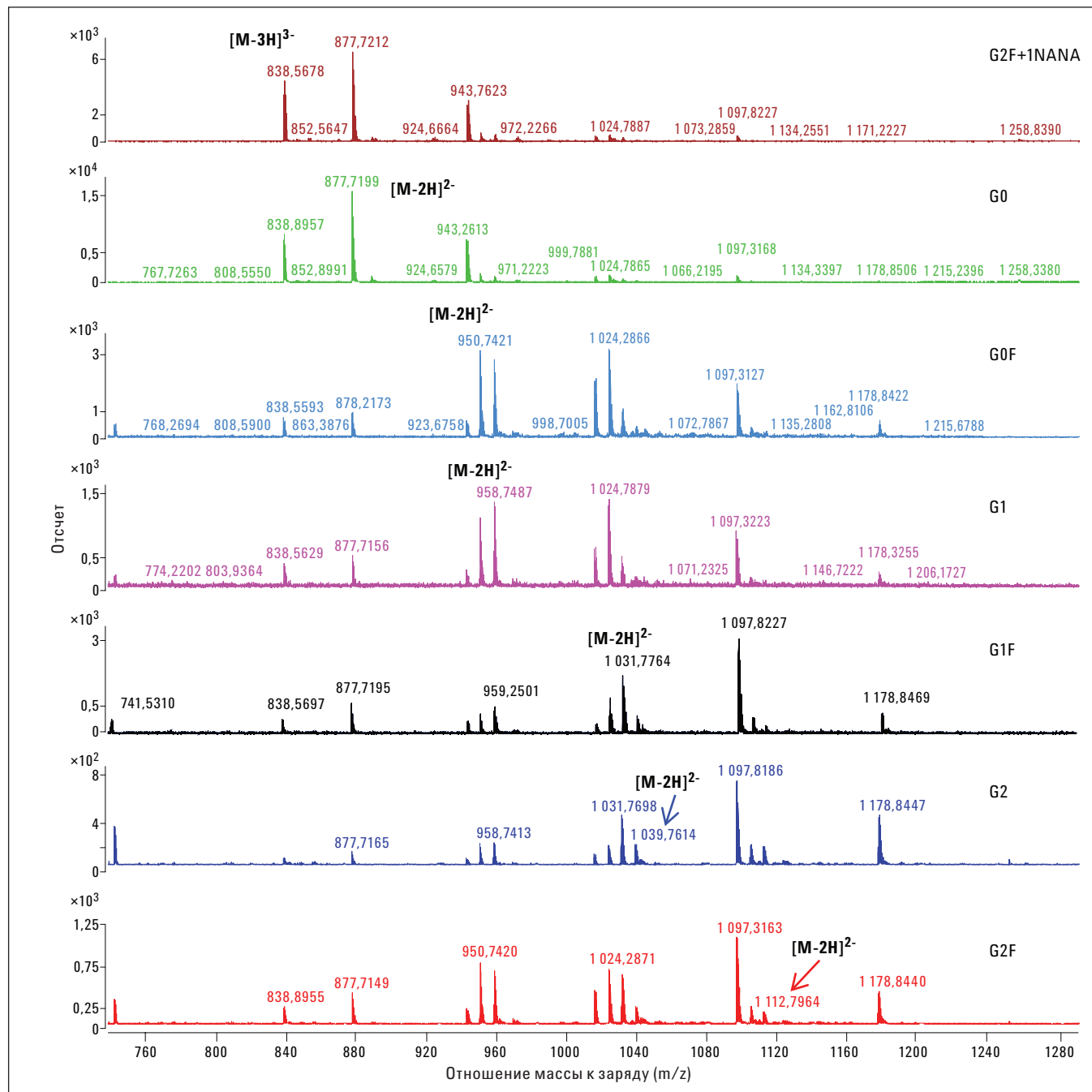


Рисунок 2  
Масс-спектр меченых APTS N-гликанов, выделенных из mAb.

что КЭ-МС может эффективно использоваться как альтернативное решение для контроля профилей гликанов. Использование комбинации КЭ-МС для разделения позволяет избежать загрязнений, поскольку этапы обработки образцов сведены к минимуму, а используемые для КЭ-разделения буферы прекрасно подходят для ионизации электроспреем. Данный метод характеризуется большей чувствительностью и точностью при определении профилей гликанов в сравнении с традиционным КЭ-ЛИФ.

## Выводы

В данном документе представлена методика определения гликанов моноклонального антитела, основанная на использовании системы КЭ-МС от Agilent. Мощные возможности обработки данных пакета ПО Agilent MassHunter и BioConfirm позволяют успешно проводить подробную идентификацию/составление профилей гликоформ mAb. Профиль гликанов был разрешен надлежащим образом, что позволило разделить основные и второстепенные формы гликанов.

## Литература

1. Li Y, Tao SC, Bova GS, Liu AY, Chan DW, Zhu H, Zhang H. Detection and verification of glycosylation patterns of glycoproteins from clinical specimens using lectin microarrays and lectin-based immunosorbent assays. *Anal. Chem.*, 83 (22), 8509–8516, **2011**. [У. Ли, С. С. Тао, Г. С. Бова, А. И. Лю, Д. У. Чан, Х. Чжу, Х. Чжан, Обнаружение и верификация профилей гликозилирования гликопротеинов из клинических образцов с помощью микроматриц лектинов и иммуносорбентных анализов на основе лектина, журнал «*Analytical Chemistry*», № 83 (22), с. 8509–8516, **2011**]
2. Gennaro LA, Salas-Solano O. On-line CE-LIF-MS technology for the direct characterization of N-linked glycans from therapeutic antibodies. *Anal. Chem.*, 80 (10), 3838–3845, **2008**. [Л. А. Дженнaro, О. Солас-Солано, Онлайн-технология КЭ-МС с ионизацией электроспреем для непосредственной характеристики N-связанных гликанов, полученных из терапевтических антител, журнал «*Analytical Chemistry*», № 80 (10), с. 3838–3845, **2008**]
3. Suresh Babu C.V and Ravindra Gudihal, “Glycopeptide Analysis of Antibodies by Capillary Electrophoresis and Q-TOF Mass Spectrometry”, Agilent publication number 5990-7138EN, **2011**. [Суреш Бабу С. В. и Равинда Гудихал, «Анализ гликопептидов антител методом капиллярного электрофореза и квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрии», номер публикации Agilent 5990-7138RU, **2011**]

**[www.agilent.com/chem/ce](http://www.agilent.com/chem/ce)**

© Agilent Technologies, Inc., 2012.  
Напечатано 1 сентября 2012 г.  
5991-1020RU

