

## 使用SELECT SERIES Cyclic IMS系统的ECD功能对ENBREL（依那西普）进行可靠的O-糖基化位点鉴定

---

Samantha Ippoliti, Dale Cooper-Shepherd, Ying Qing Yu, James I. Langridge

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

采用反相液相色谱与串联质谱联用系统（RPLC-MS/MS或MS<sup>E</sup>）的传统肽图分析方法表征糖肽水平的糖基化可能具有挑战性。这些方法通常采用碰撞诱导解离(CID)作为碎裂技术，该技术对于不稳定修饰的位点特异性分析具有局限性。电子捕获解离(ECD)使糖基基团能够保留在肽骨架上，并允许使用所得碎片离子可靠地分配位点。本研究证明，采用SELECT SERIES Cyclic IMS仪器上的ECD功能能够对ENBREL（依那西普）的11种O-糖肽进行明确的糖基化位点位置匹配。

### 优势

- ECD碎裂产生关键的位点特异性O-糖基化信息
- SELECT SERIES Cyclic IMS仪器具有更高的灵敏度、分离度和IMS功能，提供全面的分析工具来揭示这组复杂的生物治疗药物属性

## 简介

在哺乳动物系统中生产的重组生物治疗药物通常包含各种翻译后修饰(PTM)，其中最复杂的一种翻译后修饰是糖基化。糖基化在生物治疗药物的稳定性、活性和免疫原性方面发挥重要作用<sup>1</sup>，必须得到明确表征和监测。与N-糖基化中存在占据天冬酰胺位点的共有序列不同<sup>1</sup>，如果以适当的3D结构基序呈现给糖基转移酶和糖苷酶，任何暴露的丝氨酸或苏氨酸位点都可能发生O-糖基化。这意味着在缺少背景结构知识的情况下，它们可能无法预测且难以表征。

利用肽图分析技术在位点水平上分析PTM，通常通过具有CID碎裂功能的RPLC-MS/MS，经b和y离子的形成来确认肽序列。CID的缺点在糖基化等不稳定修饰中很明显，在这些条件下容易发生糖苷键去除，从而产生截断的糖基链，而全长长度的糖肽不会。另一方面，ECD是一种正交碎裂技术，其中多电荷肽离子通过受限的低能量电子束<sup>2</sup>。高能电子直接转移到母离子上，所得自由物质可以促进肽骨架在N-C $\alpha$ 键处快速碎裂，从而产生c型和z型离子<sup>3</sup>。SELECT SERIES Cyclic IMS仪器可以根据实验需要把ECD池灵活地安装在IMS之前或之后，如图1所示。

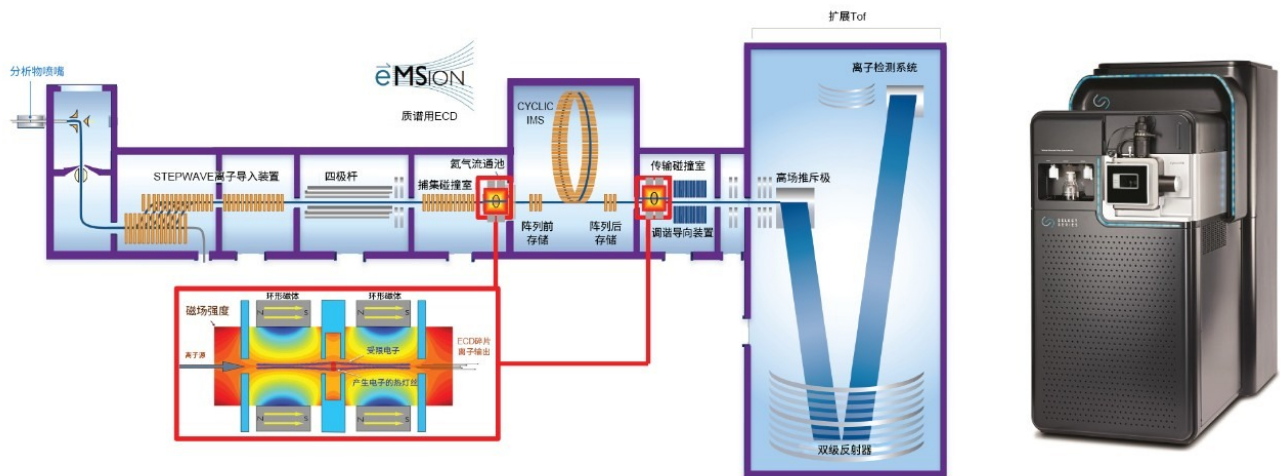


图1.在IMS之前或之后安装有ECD的SELECT SERIES Cyclic IMS仪器配置

本研究使用ENBREL（依那西普）作为模型化合物，通过LC-HDMS<sup>E</sup> CID碎裂或LC-HDMS (ECD MS)碎裂机制研究O-糖基化位点鉴定。ENBREL是一种高度糖基化的二聚体融合蛋白，其包含通过延伸的O-糖基化过渡结构域与单克隆抗体Fc结构域融合的TNFR结构域。据之前的研究<sup>4</sup>所报道，在该过渡区域中存在3个N-糖基化位点和多达13个O-糖基化位点。其中许多O-糖基化位点彼此非常接近，因此使用ECD碎裂模式区分位置异构体至关重要。

## 结果与讨论

使用与SELECT SERIES Cyclic IMS仪器联用的ACQUITY UPLC I-Class系统，通过LC-MS分析ENBREL（依那西普）的还原和烷基化胰蛋白酶酶解物。利用柱温保持在60 °C的ACQUITY Premier CSH C<sub>18</sub>色谱柱（130 Å，1.7 mm，2.1 × 100 mm，部件号：186009488 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009488-acquity-premier-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-x-100-mm-1-.html>>），对酶解物进行色谱分离。流动相A和B分别为0.1%甲酸的水溶液和0.1%甲酸的乙腈溶液，使用的线性梯度为流动相B在25 min内从1%增加到35%。对于HDMS<sup>E</sup>，将SELECT SERIES Cyclic IMS设置为单圈IMS模式（离子淌度设置如下：行波高度以1.8 V/ms的速率从12 V增加到26 V；进样时间为10 ms；分离时间为2 ms；总运行周期为46 ms）。

图2显示了利用LC-HDMS<sup>E</sup>分析ENBREL胰蛋白酶酶解物得到的BPI色谱图。通过MS1检测到11种O-糖肽物质，并通过具有ECD碎裂功能的靶向LC-HDMS/MS（ECD池位于cIMS之后）进一步研究了特征性糖苷碎裂模式。手动分析糖肽的ECD片段，评估其中各种物质的占位信息。

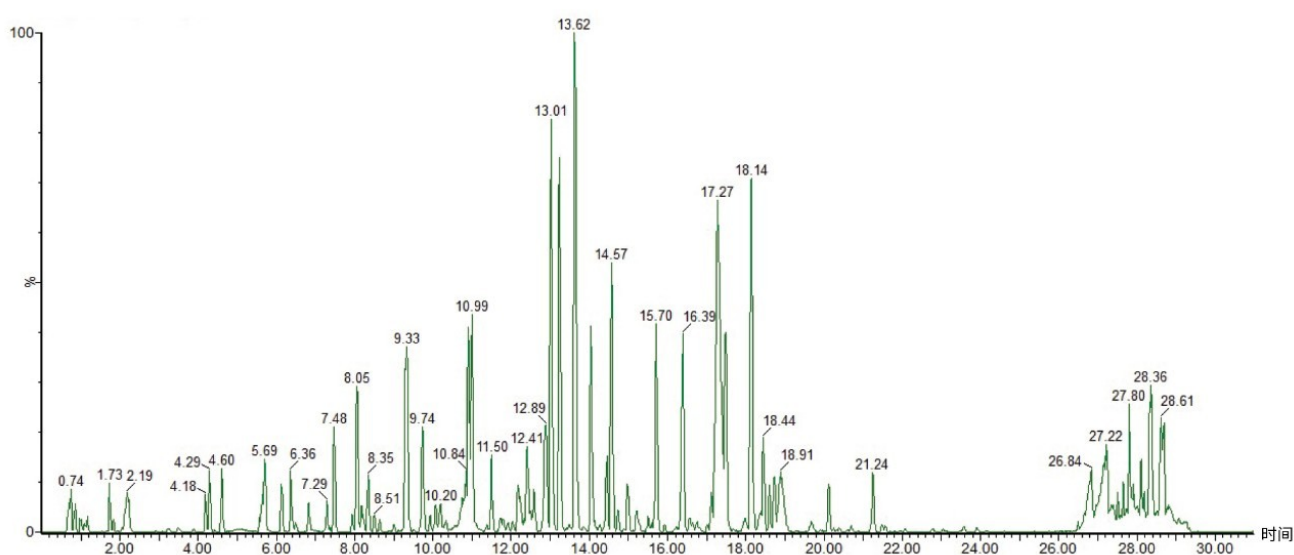


图2.通过RPLC/HDMS<sup>E</sup>（单圈IMS）分析ENBREL（依那西普）的胰蛋白酶酶解物得到的BPI色谱图

ECD是一种快速碎裂技术，可生成c和z肽骨架离子，同时保留游离寡糖结构并提供占位信息。该技术特别适用于区分单糖基化肽和多糖基化肽的位置异构体。在许多情况下，这些异构体通过色谱分离，但如果缺少ECD碎裂进

行明确分析，分析人员将无法知道哪些位点经过修饰。

一个显著的例子（图3）显示了两种同分异构体糖肽T19 (SMAPGAVHLPQPVSTR) + 2个HexNAc + 2个Hex + 1个NeuAc ( $m/z$  890.7, 3+)的ECD谱图。c系列中的碎片离子对于两种异构体而言是相同的，直到c14碎片离子才有所不同，其对应于位置Ser<sub>199</sub>。来自RT 11.7 min处色谱峰的c14离子确认了Ser<sub>199</sub>上存在1个唾液酸化“核心1”O-糖。来自该峰的c15离子包含Ser<sub>199</sub>上的该唾液酸化核心1 O-糖以及位置Thr<sub>200</sub>上的非唾液酸化O-糖。该系列中的z离子支持这一分配结果，因为存在带有非唾液酸化O-糖的z2（对应于Thr<sub>200</sub>），并且存在带有唾液酸化及非唾液酸化O-糖的z3（包含S<sub>199</sub>和Thr<sub>200</sub>两者）。对于RT 11.9 min处的第二个T19峰，ECD谱图支持相反的分配结果：可以观察到带有非唾液酸化O-糖的Ser<sub>199</sub>以及带有唾液酸化O-糖的Thr<sub>200</sub>。

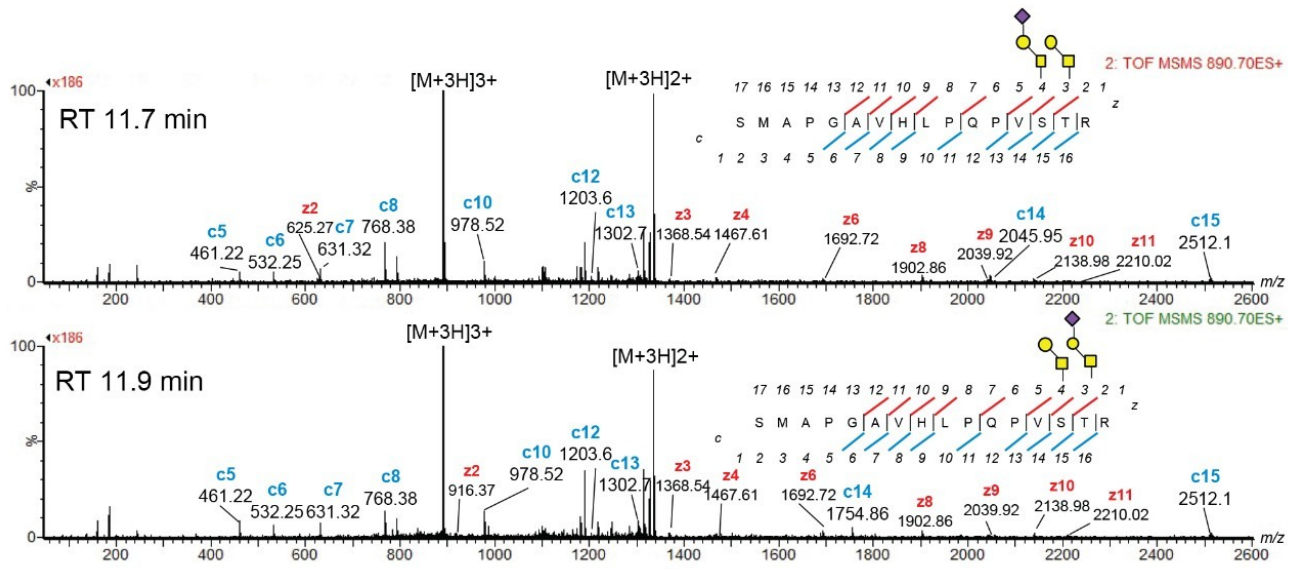


图3. RT 11.7 min和11.9 min处LC-HDMS/MS峰( $m/z$  890.7, 3+)的ECD质谱图。带有2个HexNAc + 2个Hex + 1个NeuAc的T19胰蛋白酶肽(SMAPGAVHLPQPVSTR)的选定 $m/z$ 。ECD碎裂确认了两种核心1 O-糖的位置以及位置14和15处的鉴定结果。

对其余9种O-糖肽物质的ECD谱图以类似的方式进行检查，O-糖占位结果如表1所示。发现T1肽(LPAQVAFTPYAPEPGSTCR)在位置Thr<sub>8</sub>处包含单一或双唾液酸化O-糖。除之前所述的T19肽的两种O-糖变体外，还检测到另外五种糖型。RT 10.9 min和12.2 min处的物质分别对应于带有1个HexNAc的Ser<sub>199</sub>以及带有1个HexNAc + 1个Hex或1个HexNAc + 1个Hex + 1个NeuAc的Thr<sub>200</sub>。还检测到单O-糖基化形式的T19，其中Ser<sub>199</sub>或Thr<sub>200</sub>被1个HexNAc + 1个Hex + 1个NeuAc占据。最后一种T19糖型被双重占据，Ser<sub>199</sub>和Thr<sub>200</sub>各自被1个HexNAc + 1个Hex + 1个NeuAc占据。最后一个例子是T22-23 (THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK)，它是该融

合蛋白的铰链区的胰蛋白酶肽之一。ECD数据确认了单O-糖基化位点Thr<sub>245</sub>，其中存在单或双唾液酸化核心1 O-糖

。

RT (min)	肽	O-糖	位置
14.7	T1: LPAQVAFT <sub>8</sub> PYAPEPGS <sub>16</sub> T <sub>17</sub> CR		T8
15.3			T8
10.9	T19: S <sub>186</sub> MAPGAVHLPQPVS <sub>199</sub> T <sub>200</sub> R	与	S <sub>199</sub> 与 T <sub>200</sub>
11.7		与	S <sub>199</sub> 与 T <sub>200</sub>
11.9		与	S <sub>199</sub> 与 T <sub>200</sub>
12.2		与	S <sub>199</sub> 与 T <sub>200</sub>
12.3			T <sub>200</sub>
12.6			S <sub>199</sub>
12.8		与	S <sub>199</sub> 与 T <sub>200</sub>
18.3	T22-23: T <sub>243</sub> HT <sub>245</sub> CPPCPAPELLGGPS <sub>259</sub> VFLFPPKPK		T <sub>245</sub>
19.6			T <sub>245</sub>

表1.通过ECD鉴定出的ENBREL（依那西普）O-糖肽和糖基化位点列表

## 结论

ECD是一种强大的正交碎裂技术，与CID互补，通常能够保留不稳定的修饰（例如糖基化），由此实现肽骨架的优选碎裂。这样可以在单个糖肽上的多个位点被占据的情况下更可靠地表征糖基化位点并实现明确的占位分配。

ENBREL（依那西普）这类蛋白质包含多个彼此邻近的O-糖基化位点，本研究证明Cyclic IMS平台上的ECD对该蛋白质实现了成功表征。

ENBREL是IMMUNEX Corporation的商标。Cyclic、SELECT SERIES和ACQUITY是沃特世科技公司的商标。

## 参考资料

1. Houel S, Hilliard M, Yu YQ, McLoughlin N, Martin SM, Rudd PM, Williams JP, 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, 576–584.
2. Voinov, VG; Deinzer, ML; Barofsky, DF. Electron Capture Dissociation in a Linear Radiofrequency-Free Magnetic Cell. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008.22, 3087-3088.
3. Bakhtiar R, Guan Z. Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry in Characterization of Post-translational Modifications. *Biochem and Biophys Res Comm.* 2005, 334(1), 1–8.
4. Mulagapati S; Koppolu V, Raju T.S. Decoding of O-Linked Glycosylation by Mass Spectrometry. *Biochem.* 2017 56 (9), 1218–1226.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

SELECT SERIES Cyclic IMS <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135021297>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007458ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.