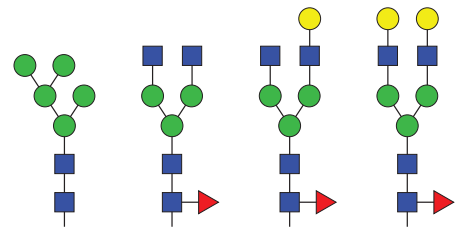


# Análisis de N-glicanos de anticuerpos monoclonales por detección de fluorescencia y detección selectiva de masas robusta empleando el sistema LC/MSD XT de Agilent

## Nota de aplicación

Productos bioterapéuticos y biológicos



## Autores

Oscar Potter, Gregory Staples,  
Jordy Hsaio y Te-Wei Chu

## Introducción

La N-glicosilación de las proteínas terapéuticas se monitoriza durante el desarrollo de los productos, el desarrollo de los procesos y el control de calidad. Muchos analistas realizan ensayos de liberación enzimática de N-glicanos, seguidos de una identificación con un marcador fluorescente para realizar un análisis por HILIC-FLD. El marcador InstantPC de Prozyme Inc. permite llevar a cabo la preparación manual de muestras en 1 hora, o bien un procesamiento en paralelo de gran rendimiento con la plataforma de manipulación de líquidos Agilent AssayMap Bravo. La duración del ciclo de separación de alta resolución puede acortarse empleando la columna para mapeo de glicanos Agilent AdvanceBio (consulte el documento 5991-4886EN).

Si bien la detección de fluorescencia es una técnica común de detección, los analistas que utilicen flujos de trabajo de HILIC-FLD pueden encontrarse con problemas en forma de asignación ambigua de picos, particularmente en el caso de nuevos tipos de muestras o de picos inesperados. En tales casos, los analistas podrían recurrir a la realización de análisis complementarios de las muestras (por ejemplo, por LC-Q-TOF o MALDI-TOF), pero esto conlleva un tiempo extra y supone un gasto adicional.

Con anterioridad, describimos un flujo de trabajo en el que un sistema HILIC-FLD se acoplaba on-line con un espectrómetro de masas Q-TOF de alta resolución (consulte el documento 5991-6958EN). Este planteamiento aúna las ventajas de una cuantificación robusta basada en la fluorescencia con las potentes capacidades de elucidación estructural de la espectrometría de masas. Sin embargo, es posible que los analistas que buscan una solución rutinaria económica prefieran trabajar con un detector selectivo de masas (MSD) robusto y compacto, basado en la tecnología de cuadrupolo simple. Por este motivo, presentamos un método en el que se acopla un sistema HILIC-FLD a un sistema LC/MSD XT de cuadrupolo simple de Agilent, un instrumento robusto, sensible y apilable. Los datos de MSD proporcionan información de masas para poder asignar los picos ambiguos y detectar estructuras coeluyentes. El método transcurre a menos de 600 bar para poder mantener la compatibilidad con muchos de los sistemas LC actuales.



Sistema LC/MSD XT de Agilent



**Agilent Technologies**

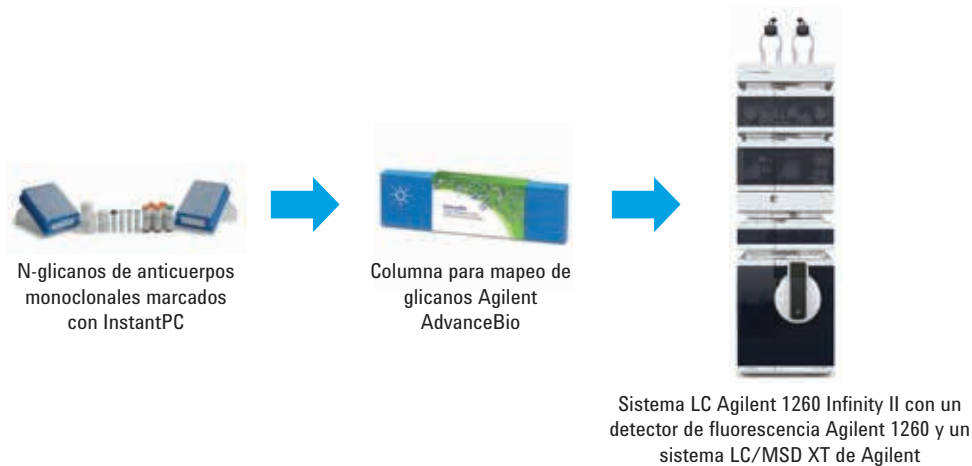


Figura 1. Diagrama de flujo de la preparación de muestras, la columna LC y los instrumentos empleados para la identificación y la cuantificación de N-glicanos marcados con InstantPC.

## Experimento

### Preparación de muestras

Las muestras de anticuerpos monoclonales se prepararon en nuestro propio laboratorio (CHO mAb 1) o se compraron a Sigma-Aldrich (SiLu Lite, ref. MSQC4) y al NIST (NIST mAb, material de referencia 8671). Todas las muestras se ajustaron a 1 µg/µl antes de procesarlas con el kit de preparación de muestras de N-glicanos GlykoPrep-plus Rapid con InstantPC (96-ct) de Prozyme Inc. (GPPNG-PC). La manipulación de las muestras se realizó de forma automatizada empleando la plataforma de manipulación de líquidos AssayMap Bravo (G5542A). El último paso de este protocolo fue la elución de los glicanos marcados en 50 µl, de manera que cada µl de esta solución de muestra final representara los N-glicanos liberados a partir de 1 µg de anticuerpo monoclonal. Este flujo de trabajo presenta la ventaja de que no requiere etapas de centrifugación o secado.

### Condiciones cromatográficas

#### Bomba

Bomba binaria Agilent 1260 Infinity II (G7112B)

#### Fase móvil A

Ácido fórmico 50 mM ajustado a un pH de 4,5 con hidróxido de amonio

#### Fase móvil B

Acetonitrilo

#### Inyector

Muestreador múltiple Agilent 1260 Infinity II (G7167A) con termostato ajustado a 11 °C

#### Columnas

- Columna para mapeo de glicanos AdvanceBio 1,8 µm, 2,1 × 100 mm para el método A
- Columna para mapeo de glicanos AdvanceBio 2,7 µm, 2,1 × 150 mm para el método B
- Columna para mapeo de glicanos AdvanceBio 1,8 µm, 2,1 × 150 mm para el método C

## Calentador de columna

Compartimento de columna termostatzado Agilent 1260 Infinity II (G7116) con precalentador de disolvente (G7116-60015) ajustado a 40 °C.

Las columnas se conectaron empleando capilares de acero inoxidable de 100 µm de diámetro interno a un detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity (G1321B) con una celda de flujo de 8 µl (G1321-60005). El detector se ajustó con λEx a 285 nm y λEm a 345 nm con una ganancia del tubo fotomultiplicador igual a 10.

## Parámetros del sistema LC/MSD XT

Parámetro	Valor
<b>Fuente de iones</b>	
Fuente	Agilent Jet Stream en modo positivo
Gas de impulsión	300 °C (10,0 l/min)
Temperatura del gas de secado	150 °C (9,0 l/min)
Presión del nebulizador	35 psig
Vcap	2.500 V Boquilla: 500 V
<b>Ajustes de adquisición</b>	
Rango de masas	$m/z = 500-1.400$
Fragmentador	100 V
Ganancia EMV	1,0
Tamaño del paso	0,10
Anchura de pico	0,2

## Software

OpenLAB CDS ChemStation Edition (versión C.01.07 SR3)

## Reactivos

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de la mayor pureza disponible.

## Tablas de gradiente

### Método A (para la columna de 2,1 × 100 mm y 1,8 µm)

Tabla de tiempos

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
0,00	25,0	75,0	0,70
0,50	27,0	73,0	0,70
4,00	28,0	72,0	0,70
9,00	33,0	67,0	0,70
9,20	50,0	50,0	0,70
9,70	50,0	50,0	0,70
10,00	25,0	75,0	0,70
11,50	25,0	75,0	0,70
11,80	25,0	75,0	0,80
14,50	25,0	75,0	0,90
15,30	25,0	75,0	0,70

Tiempo de parada = 18 minutos

### Método B (para la columna de 2,1 × 150 mm y 2,7 µm)

Tabla de tiempos

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
0,00	27,0	73,0	0,50
1,00	28,5	71,5	0,50
9,00	29,5	70,5	0,50
22,00	41,0	59,0	0,50
22,50	50,0	50,0	0,80
23,50	50,0	50,0	0,70
23,70	27,0	73,0	0,70
25,00	27,0	73,0	0,70
25,50	27,0	73,0	0,80
27,50	27,0	73,0	0,90
28,00	27,0	73,0	0,50

Tiempo de parada = 30 minutos

### Método B (para la columna de 2,1 × 150 mm y 1,8 µm)

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
0,00	22,0	78,0	0,60
0,50	26,0	74,0	0,60
13,00	27,5	72,5	0,60
28,00	39,0	61,0	0,60
28,50	50,0	50,0	0,50
28,60	50,0	50,0	0,40
28,80	22,0	78,0	0,40
31,00	22,0	78,0	0,50
31,50	22,0	78,0	0,55
33,50	22,0	78,0	0,60

Tiempo de parada = 37 minutos

## Resultados y comentarios

### Separación

Optimizamos la separación de los perfiles de glicanos de anticuerpos monoclonales terapéuticos típicos en tres columnas diferentes, con distintas duraciones del ciclo de análisis. Los métodos comienzan con un gradiente suave que maximiza la resolución de los glicanos neutros que suelen aparecer en la mayoría de muestras de anticuerpos monoclonales terapéuticos. La pendiente del gradiente se aumentó a mitad del análisis para eluir de forma más eficiente las estructuras de glicanos ácidos de mayor tamaño. Todos estos métodos se diseñaron para mantener la presión por debajo de 600 bar con el fin de maximizar la robustez y resultar compatibles con una amplia gama de instrumentos LC. Si bien en la Figura 2 se muestran los tres métodos de separación, decidimos emplear el método C para el resto de experimentos, puesto que comprobamos que ofrecía el mejor rendimiento global para las tres muestras de N-glicanos de anticuerpos monoclonales.

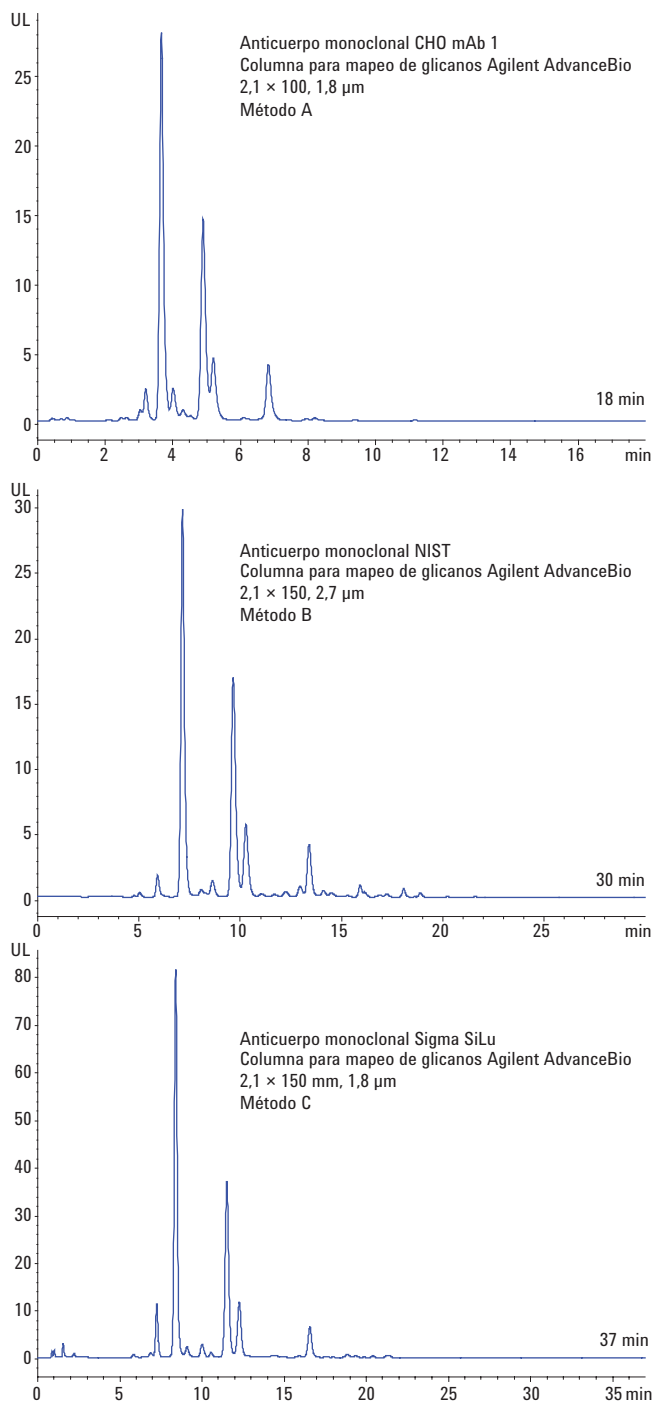


Figura 2. Tres métodos de separación con diferentes formatos de columna para tres muestras de anticuerpos monoclonales.

## Sensibilidad del sistema LC/MSD XT

Tradicionalmente, los analistas han evitado el uso de espectrómetros de masas de cuadrupolo simple para el análisis de N-glicanos por LC/MS, debido a cuestiones de sensibilidad. Sin embargo, dos innovaciones técnicas han permitido lograr mejoras notables en el límite de detección de N-glicanos. El primero es la disponibilidad de una fuente de iones de alta sensibilidad: la fuente de focalización del gradiente térmico (Jet Stream) de Agilent, que utiliza un flujo de gas de focalización sobrecalentado alrededor del haz de electrospray que mejora ostensiblemente la ionización. La segunda innovación es la disponibilidad del marcador InstantPC de Prozyme Inc., que incrementa sustancialmente la eficiencia de la ionización frente a los marcadores fluorescentes convencionales.

Hemos optimizado los parámetros de MSD para maximizar la sensibilidad. Se observó que los N-glicanos marcados con InstantPC eran casi exclusivamente iones con doble carga con la estructura  $[M+2H]^{2+}$ , junto con algunos iones  $[M+NH_4+H]^{2+}$  y  $[M+H+Na]^{2+}$ . Un aumento de la temperatura del gas de secado o la tensión del fragmentador podría causar una disociación inducida por colisión de los N-glicanos, ofreciendo estrategias de elucidación estructural potentes y similares a las que se pueden obtener con un instrumento Q-TOF (consulte el documento 5991-5253EN).

Se obtuvieron señales de diagnóstico para los glicanos, incluso en casos en los que constituían tan solo un 0,1 % del perfil. Al comparar esta sensibilidad con la de otros flujos de trabajo, recuerde que estos resultados se obtuvieron sin una etapa de preconcentración al final del flujo de trabajo de preparación de muestras, ahorrando así una cantidad de tiempo considerable. La sensibilidad podría haberse aumentado aún más secando las muestras y reconstituyéndolas en un volumen inferior de matriz de muestra.

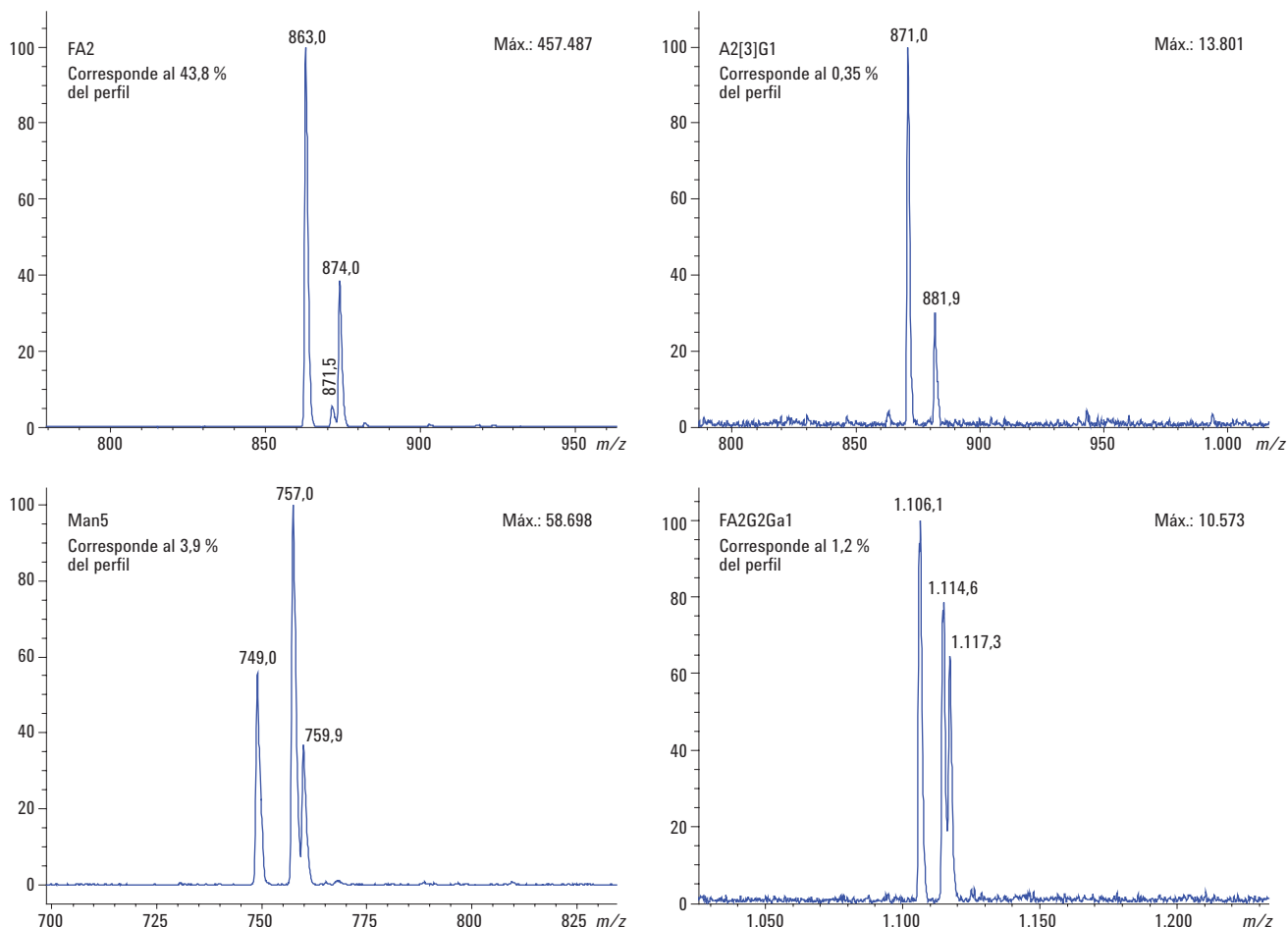


Figura 3. Espectros de masas de cuatro glicanos representativos a partir de 3  $\mu$ g de anticuerpo monoclonal y con diferentes niveles de abundancia relativa. La señal para el A2[3]G1, que supone el 0,35 % del perfil de glicanos, se observa claramente con una alta relación señal-ruido.

## Asignación de picos

Se integraron los datos de las tres muestras (empleando el método C) y se asignaron los picos a compuestos de glicanos empleando un planteamiento similar al que se muestra en la nota de aplicación 5991-5253EN.

**Nota:** El marcado con InstantPC hace que la masa aumente; en concreto, la relación  $m/z$  se incrementa en 261,1477 frente a la forma reducida libre de los glicanos.

La Tabla 1 se elaboró para mostrar la composición de los glicanos que se detectaron en las tres muestras. La composición de los glicanos se indica de la siguiente forma:  $H_xN_xF_xS_gx$  + Núcleo (donde H = galactosa o manosa; N = N-acetilglucosamina; F = fucosa;  $S_g$  = ácido N-glicolilneuramínico; y Núcleo = trimasosil, un núcleo común a todos los N-glicanos). En muchos casos, estas composiciones nos permitieron proponer estructuras de glicanos usando de forma complementaria los conocimientos básicos sobre patrones de glicosilación de anticuerpos monoclonales terapéuticos y el orden de retención de la HILIC. Puesto que la mayoría de anticuerpos monoclonales terapéuticos contienen una cantidad similar y limitada de estructuras de N-glicanos, la Tabla 1 puede servir como referencia útil para la asignación de N-glicanos en este flujo de trabajo.

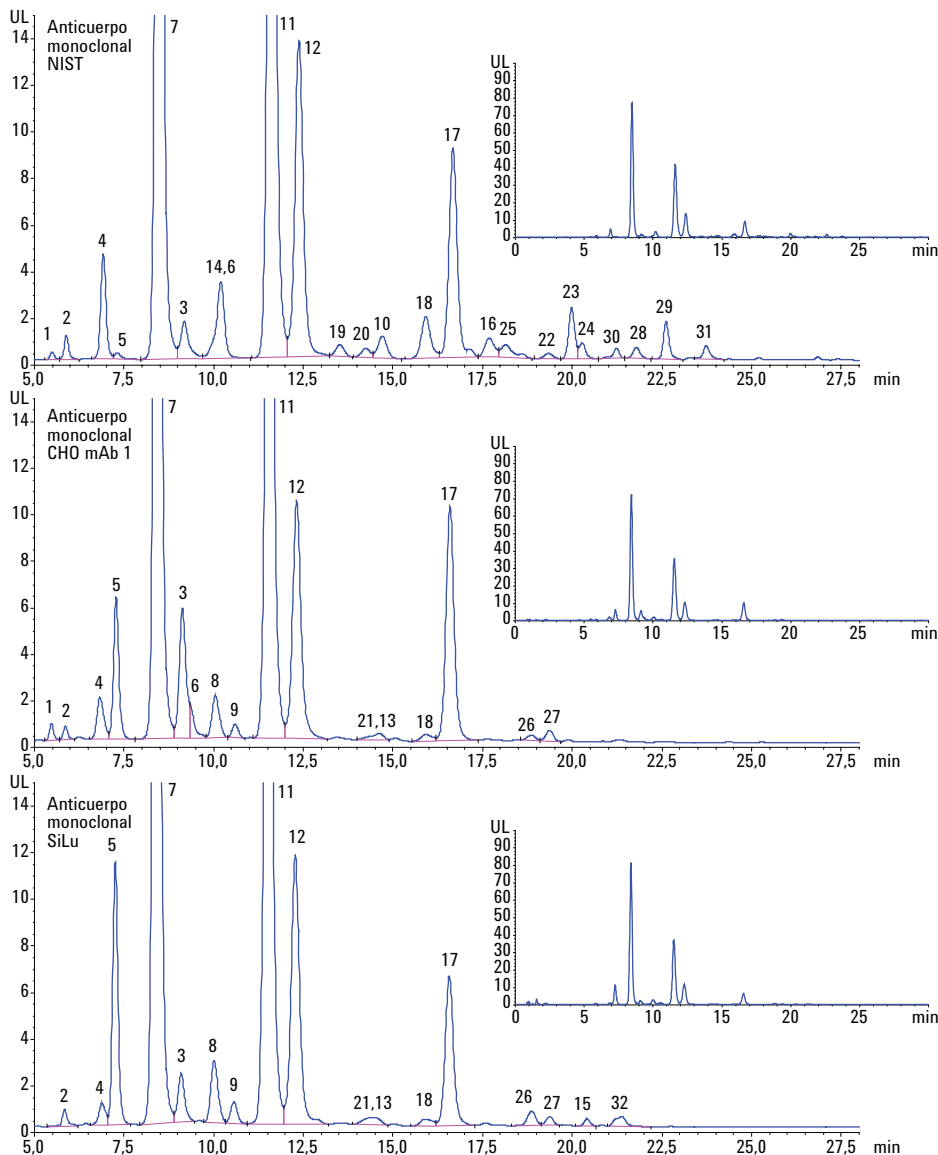


Figura 4. Cromatogramas ampliados de FLD de las tres muestras de N-glicanos de anticuerpos monoclonales que muestran la detección de glicanos mayoritarios y minoritarios mediante el método C. Las gráficas pequeñas muestran el cromatograma completo. Las anotaciones se corresponden con la Tabla 1.

Tabla 1.

ID	[M+2H] <sup>2+</sup> observado	Composición propuesta	[M+2H] <sup>2+</sup> teórico	Estructura propuesta	
				Oxford	Alternativa
1	659,9	F1 + Núcleo	659,774	F1M3	G0F-2GlcNAc
2	688,4	N1 + Núcleo	688,284	A1	G1-GlcNAc
3	748,9	H2 + Núcleo	748,798	M5	Man5
4	761,5	N1F1 + Núcleo	761,313	FA1	G0F-GlcNAc
5	790,0	N2 + Núcleo	789,824	A2	G0
6	842,4	H1N1F1 + Núcleo	842,340	FA1G1	G1F-GlcNAc
7	863,0	N2F1 + Núcleo	862,853	FA2	G0F
8	871,0	H1N2 + Núcleo	870,851	A2[6]G1	G1
9	871,0	H1N2 + Núcleo	870,851	A2[3]G1	G1'
10	923,6	H2N1F1 + Núcleo	923,366	-	-
11	944,0	H1N2F1 + Núcleo	943,879	FA2[6]G1	G1F
12	944,0	H1N2F1 + Núcleo	943,879	FA2[3]G1	G1F'
13	952,0	H2N2 + Núcleo	951,877	A2G2	G2
14	964,7	N3F1 + Núcleo	964,393	FA2B	G0FB
15	991,9	H5 + Núcleo	991,877	M8	Man8
16	996,1	H1N1Sg1F1 + Núcleo	995,885	FA1G1Sg1	G1Sg1F-GlcNAc
17	1.025,1	H2N2F1 + Núcleo	1.024,906	FA2G2	G2F
18	1.025,1	H2N2F1 + Núcleo	1.024,906	FA2G1Ga1	G1F + αGal
19	1.045,6	H1N3F1 + Núcleo	1.045,419	FA2[6]B1G1	G1FB
20	1.045,7	H1N3F1 + Núcleo	1.045,419	FA2[3]B1G1	G1FB'
21	1.089,5	H1N1F1S1 + Núcleo	1.089,427	FA1G1S1	G1S1F-GlcNAc
22	1.097,7	H1N2F1Sg1 + Núcleo	1.097,425	FA2G1Sg1	G1Sg1F
23	1.106,1	H3N2F1 + Núcleo	1.105,932	FA2G2Ga1	G2F + αGal
24	1.106,1	H3N2F1 + Núcleo	1.105,932	FA2G2Ga1 iso	G2F + αGal'
25	1.126,5	H2N3F1 + Núcleo	1.126,446	FA2BG2	G2FB
26	1.170,4	H2N2F1S1 + Núcleo	1.170,454	FA2G2S1	A1F
27	1.170,4	H2N2F1S1 + Núcleo	1.170,454	FA2G2S1 iso	A1F iso
28	1.178,7	H2N2F1Sg1 + Núcleo	1.178,451	FA2G2Sg1	Ag1F
29	1.187,1	H4N2F1 + Núcleo	1.186,959	FA2G2Ga2	G2F + (αGal)2
30	1.207,7	H3N3F1 + Núcleo	1.207,472	FA2BG2Ga1	G2FB + αGal
31	1.259,4	H3N2F1Sg1 + Núcleo	1.259,477	FA2G2Sg1Gal1	Ag1F + αGal
32	1.316,2	H2N2F1S2 + Núcleo	1.316,001	FA2G2S2	A2F

## Tablas de resultados

Los picos de los cromatogramas de FLD se expresaron como suma relativa (en %) de los perfiles de glicanos totales. En la Figura 5 se muestran los resultados.

Algunos de los perfiles contenían picos que representaban a estructuras de glicanos coeluyentes. Estas coeluciones implicaban a glicanos menores, y la cuantificación basada únicamente en la FLD expresaría las áreas de pico como la contribución combinada de dos estructuras.

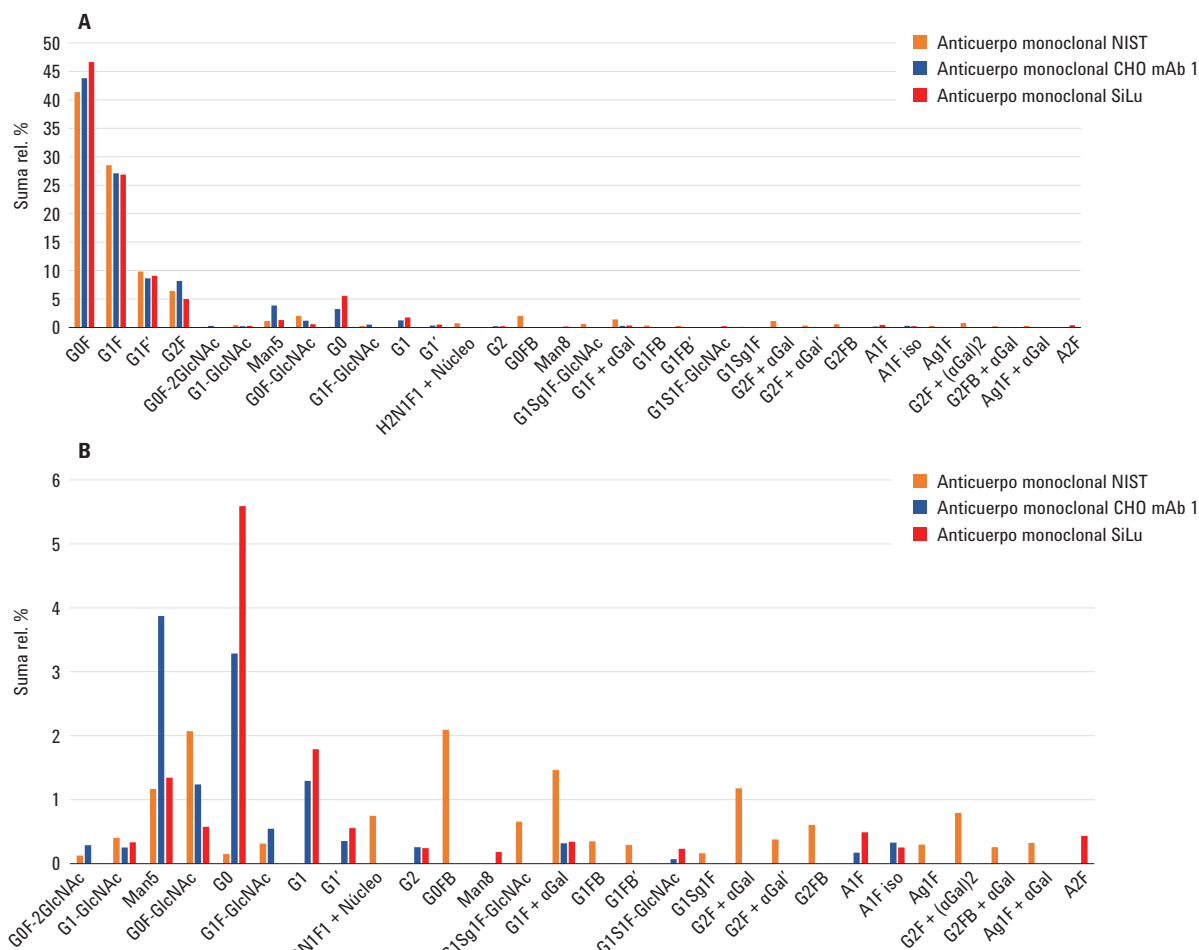


Figura 5. A) Abundancia relativa de N-glicanos en las tres muestras de anticuerpos monoclonales. B) Diagrama ampliado que muestra solamente los componentes minoritarios. Se detectaron con facilidad glicanos minoritarios con una abundancia inferior al 1 %.



Para aquellos analistas que necesiten una cuantificación precisa de estas estructuras coeluyentes de baja abundancia, proponemos el uso de los datos del sistema LC/MSD XT como complemento de los obtenidos por FLD. El espectro de masas puede integrarse a lo largo del periodo de tiempo correspondiente a los picos coeluyentes del detector FLD. Después, el área de FLD puede repartirse entre las diferentes estructuras en función de la intensidad relativa combinada de los iones de N-glicanos con doble carga presentes en este espectro. Como ya hemos indicado anteriormente, las señales de MS para los marcadores InstantPC se corresponden estrechamente con su abundancia real, definida por la intensidad de fluorescencia (consulte el documento 5991-6958EN).

## **Conclusión**

El sistema LC/MSD XT de Agilent, basado en la tecnología de cuadrupolo simple, puede acoplarse on-line a un sistema UHPLC HILIC-FLD típico para posibilitar la identificación basada en espectros de masas para cada pico en todas las muestras. El uso de una fuente de iones con focalización del gradiente térmico (Jet Stream) de Agilent en combinación con el marcado de glicanos con InstantPC ofrece una sensibilidad excelente para detectar señales de MS de picos de compuestos mayoritarios y minoritarios presentes en muestras de anticuerpos típicos sin necesidad de concentrar las muestras. Para muestras de anticuerpos monoclonales típicos, esto permite la asignación fiable de las estructuras de glicanos. Aunque en esta nota de aplicación se utilizó el planteamiento tradicional que basa la cuantificación relativa en la detección de fluorescencia robusta, los datos de MS pueden emplearse para facilitar la cuantificación en caso de que haya picos coeluyentes.

## Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

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

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2017  
Impreso en EE. UU.  
22 de mayo de 2017  
5991-8071ES



**Agilent Technologies**