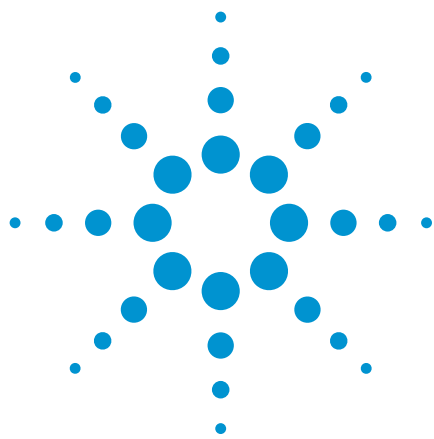
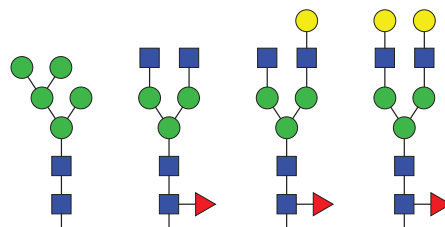




Analyse des N-glycanes d'anticorps monoclonaux par détection de fluorescence et détection de masse robuste avec le système Agilent LC/MSD XT

Note d'application

Produits biothérapeutiques
et biopharmaceutiques



Auteurs

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



Agilent LC/MSD XT

Introduction

La N-glycosylation de protéines thérapeutiques est contrôlée pendant le développement du produit et du procédé, et les étapes de CQ. De nombreux analystes procèdent par clivage enzymatique des N-glycanes suivi par l'ajout d'un marqueur fluorescent avant de réaliser une analyse HILIC-FLD. Le marqueur InstantPC de Prozyme Inc. permet la préparation d'échantillons en 1 heure, ou bien, le traitement à haut débit en parallèle avec la station automatique de pipetage Agilent AssayMap Bravo. Une séparation haute résolution peut être obtenue en peu de temps en utilisant la colonne Agilent AdvanceBio Glycan Mapping (voir 5991-4886EN).

Si la détection par fluorescence est une technique de détection répandue, les analystes travaillant avec des procédures de type HILIC-FLD peuvent rencontrer des difficultés lors de l'attribution des pics, notamment avec de nouveaux types d'échantillons ou en présence de pics inattendus. Dans de tels cas, les analystes ont parfois recours à des analyses complémentaires des échantillons, par LC-Q-TOF ou MALDI-TOF par exemple, mais cela retarde la procédure et représente des coûts supplémentaires.

Nous avons précédemment démontré que la procédure d'analyse pouvait être améliorée par couplage en ligne d'un système HILIC-FLD à un spectromètre de masse Q-TOF haute résolution (voir 5991-6958EN). Cette approche associe les bénéfices de la robustesse de la quantification par fluorescence aux capacités d'élucidation structurelle performantes de la spectrométrie de masse. Cependant, les analystes à la recherche d'une solution de routine rentable préféreront sans doute travailler avec un détecteur de masse (MSD) robuste et peu encombrant de type simple quadripôle. Nous présentons par conséquent une méthode reposant sur le couplage HILIC-FLD à un système LC Agilent LC/MSD XT simple quadripôle robuste, sensible et empilable. Les données de MSD fournissent les informations de masse nécessaires pour résoudre les attributions de pic ambiguës et permettent de détecter les structures coéluantes. La méthode fonctionne à une pression de moins de 600 bars afin de rester compatible avec un maximum de systèmes de LC.



Agilent Technologies

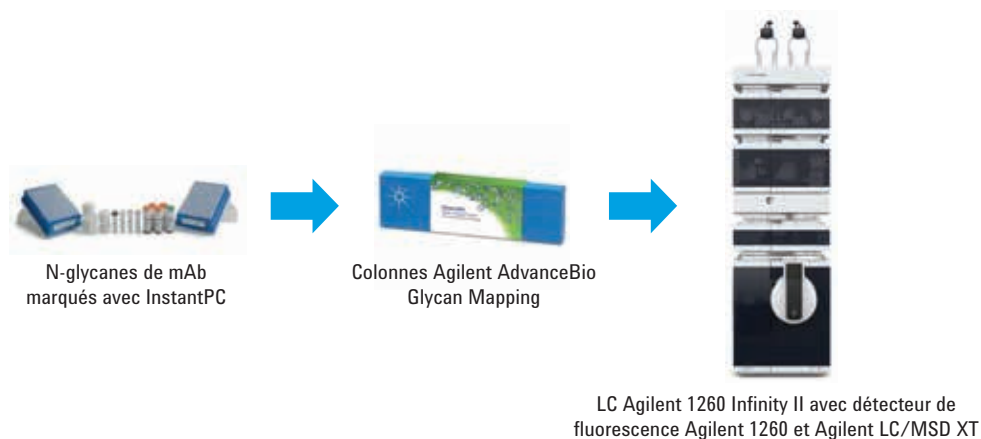


Figure 1. Illustration des étapes d'identification et de quantification des N-glycans marqués par InstantPC : préparation d'échantillons, colonne LC et instruments.

Données expérimentales

Préparation d'échantillons

Des échantillons d'anticorps monoclonaux (mAb) ont été produits dans notre laboratoire (mAb 1 CHO) ou achetés auprès de Sigma-Aldrich (SiLu Lite réf. MSQC4) et du NIST (mAb NIST, matériau de référence 8671). Tous les échantillons ont été ajustés à une concentration de 1 µg/µL avant traitement par le kit de préparation rapide d'échantillons N-glycane GlykoPrep-plus avec le marqueur InstantPC (96-ct) de Prozyme Inc. (GPPNG-PC). La manipulation des échantillons a été automatisée en utilisant la station automatique de pipetage Agilent AssayMap Bravo (G5542A). L'étape finale de ce protocole permet l'élution des glycanes marqués dans un volume de 50 µL, de sorte que chaque µL de cette solution finale d'échantillon contienne les N-glycans libérés à partir de 1 µg de mAb. Cette procédure présente l'avantage pratique de ne pas nécessiter d'étapes de centrifugation ou de lyophilisation.

Conditions de chromatographie

Pompe

Pompe binaire Agilent 1260 Infinity II (G7112B)

Phase mobile A

50 mM d'acide formique ajusté à pH 4,5 avec de l'hydroxyde d'ammonium

Phase mobile B

Acétonitrile

Échantillonneur

Multi-échantillonneur Agilent 1260 Infinity II (G7167A) thermostaté à 11 °C

Colonnes

- Colonne AdvanceBio Glycan Mapping 1,8 µm, 2,1 × 100 mm utilisée avec la méthode A
- Colonne AdvanceBio Glycan Mapping 2,7 µm, 2,1 × 150 mm utilisée avec la méthode B
- Colonne AdvanceBio Glycan Mapping 1,8 µm, 2,1 × 150 mm utilisée avec la méthode C

Système de chauffage de la colonne

Compartiment à colonne thermostaté Agilent 1260
Infinity II G7116 avec système de pré-chauffage du solvant
G7116-60015 réglé sur 40 °C

Les colonnes ont été reliées par des tubes SSTL de 100 µm de d.i. à un détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity (G1321B) muni d'une cellule de 8 µL (G1321-60005). Les paramètres suivants ont été définis pour le détecteur : λEx à 285 nm, λEm à 345 nm et gain PMT = 10.

Paramètres de LC/MSD XT

Paramètre	Valeur
Source d'ionisation	
Source	Agilent Jet Stream en mode positif
Gaz de gainage	300 °C à 10,0 L/min
Température du gaz séchant	150 °C à 9,0 L/min
Pression du nébuliseur	35 psig
VCap	2 500 V Buse : 500 V
Paramètres d'acquisition	
Gamme de masse	500 à 1 400 <i>m/z</i>
Fragmenteur	100 V
Gain EMV	1,0
Valeur du pas	0,10
Largeur de pic	0,2

Logiciel

OpenLab CDS ChemStation Edition Rév. C.01.07 SR3

Réactifs

Tous les réactifs et solvants utilisés étaient de la qualité la plus élevée disponible.

Tables des gradients

Méthode A (avec colonne de 2,1 × 100 mm 1,8 µm)

Chronologie			
Temps (min)	%A	%B	Débit (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

Fin d'analyse = 18 minutes

Méthode B (avec colonne de 2,1 × 150 mm 2,7 µm)

Chronologie			
Temps (min)	%A	%B	Débit (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

Fin d'analyse = 30 minutes

Méthode C (avec colonne de 2,1 × 150 mm 1,8 µm)

Temps (min)	%A	%B	Débit (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

Fin d'analyse = 37 minutes

Résultats et discussion

Séparation

Nous avons optimisé la séparation des profils types de glycane de mAb thérapeutiques sur trois colonnes différentes, en travaillant avec plusieurs temps d'analyse cibles. Les méthodes commencent avec un faible gradient maximisant la résolution des glycanes neutres courants contenus dans la plupart des échantillons de mAb thérapeutiques. La pente du gradient a été augmentée au milieu de l'analyse afin d'éluer plus efficacement les glycanes acides de plus grosse taille si présents. Ces méthodes ont toutes été conçues pour rester bien en-dessous de 600 bars et optimiser ainsi la robustesse et assurer la compatibilité avec une large gamme d'instruments de LC. Les trois méthodes de séparation sont illustrées dans la figure 2. Nous avons choisi de retenir la méthode C pour la suite des analyses car elle présente la meilleure performance globale pour nos trois échantillons de N-glycanes de mAb.

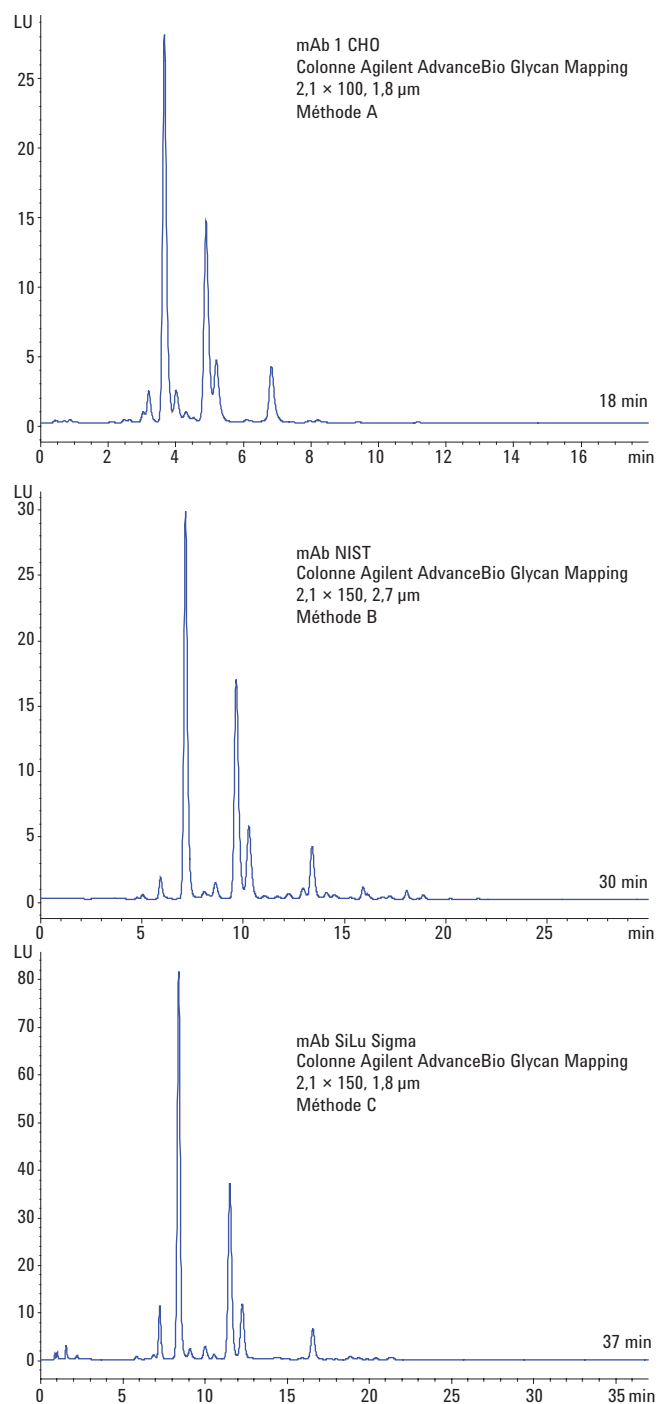


Figure 2. Trois méthodes de séparation utilisant différents formats de colonne avec trois échantillons de mAb.

Sensibilité du LC/MSD XT

Traditionnellement, les analystes évitaient d'utiliser des spectromètres de masse à simple quadripôle pour l'analyse LC/MS des N-glycanes pour des raisons de sensibilité. Cependant, une amélioration spectaculaire de la limite de détection des N-glycanes a été obtenue grâce à deux innovations techniques. La première est la disponibilité d'une source d'ionisation extrêmement sensible, Agilent Jet Stream, qui utilise un débit de gaz de gainage surchauffé autour du nuage électrospray et permet ainsi d'améliorer l'ionisation de manière drastique. La deuxième innovation est la disponibilité d'un marqueur Instant PC de Prozyme Inc. qui augmente de manière radicale l'efficacité d'ionisation par rapport à d'autres marqueurs fluorescents conventionnels.

Nous avons optimisé les paramètres de MSD afin d'optimiser la sensibilité. Les N-glycanes marqués avec InstantPC sont observés presque uniquement sous forme d'ions à double charge de type $[M+2H]^{2+}$, avec quelques $[M+NH_4+H]^{2+}$ et $[M+H+Na]^{2+}$. Le fait d'augmenter la température du gaz séchant ou la tension du fragmenteur peut provoquer la dissociation induite par collision des N-glycanes, offrant ainsi des stratégies performantes d'élucidation structurales comparables à celles pouvant être obtenues avec un Q-TOF (voir 5991-5253EN).

Des signaux permettant l'identification ont été obtenus pour des glycanes ne représentant que 0,1 % du profil total. Lors de la comparaison de la sensibilité obtenue à celle d'autres procédures, il faut garder à l'esprit que ces résultats ont été obtenus sans étape de préconcentration à la fin de la préparation des échantillons, ce qui représente un gain de temps considérable. La sensibilité pourrait encore être améliorée par lyophilisation des échantillons et reconstitution dans un volume plus faible de matrice d'échantillon.

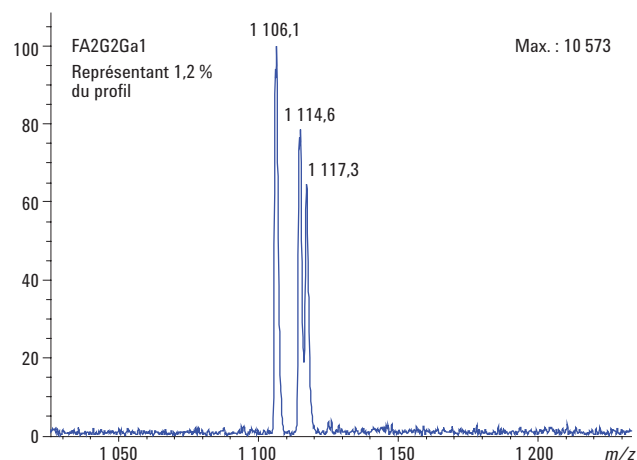
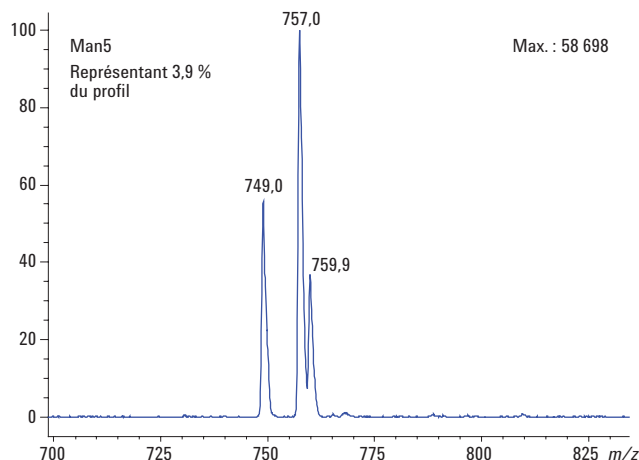
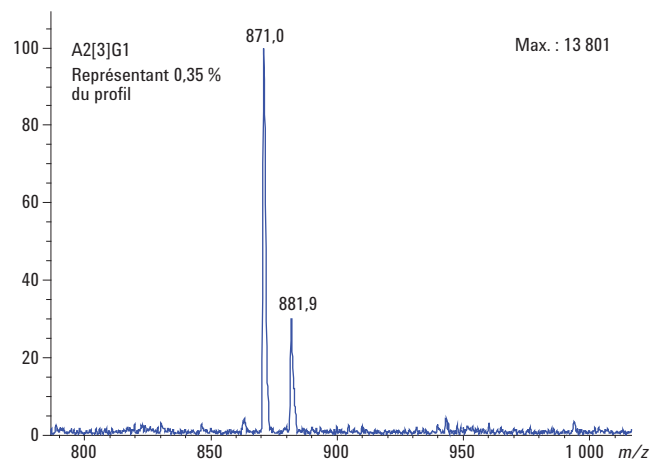
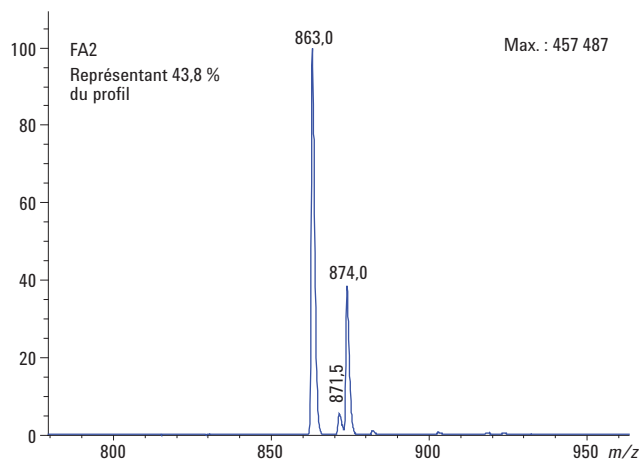


Figure 3. Spectres de masse de quatre glycanes représentatifs provenant de 3 µg de mAb avec différents niveaux d'abondance relative. Le signal pour A2[3]G1, qui ne constitue que 0,35 % du profil de glycanes, est observé très clairement avec un rapport signal sur bruit élevé.

Attribution des pics

Les données pour les trois échantillons (avec la méthode C) ont été intégrés et les pics ont été attribués pour définir la composition des glycanes par une approche similaire à celle indiquée dans la note d'application 5991-5253EN.

Remarque : Le marquage InstantPC provoque une augmentation de la masse de 261,1477 m/z par rapport aux glycanes libres à extrémité réductrice.

Le tableau 1 présente la composition des glycanes détectés pour l'ensemble des trois échantillons. Les compositions des glycanes sont présentées de la forme suivante : $HxNxSgx$ + Noyau (où H = Galactose ou Mannose, N = N-acétylglucosamine, F = Fucose, Sg = Acide N-glycolylneuraminique, et Noyau = trimannosyl, un noyau commun à tous les N-glycanes). En prenant en compte les connaissances de base sur les motifs de glycosylation des mAb thérapeutiques et l'ordre de rétention en HILIC, ces compositions nous ont permis de proposer des structures de glycanes dans de nombreux cas. Étant donné que la plupart des mAb thérapeutiques contiennent un ensemble limité de structures de N-glycanes communs semblables, le tableau 1 représente un outil de référence utile pour l'attribution des N-glycanes avec cette procédure d'analyse.

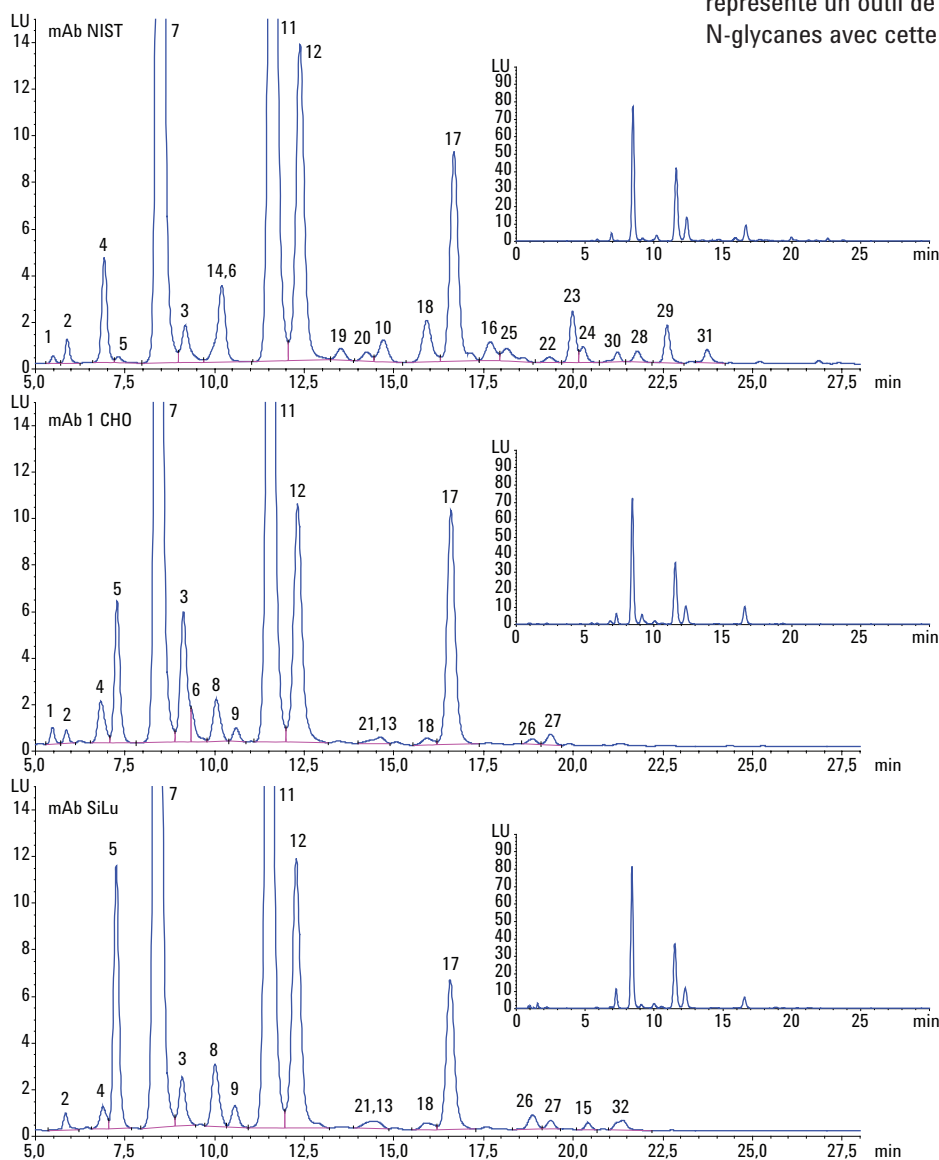


Figure 4. Zoom sur des chromatogrammes FLD des trois échantillons de N-glycanes de mAb montrant la détection des glycanes principaux et mineurs par la méthode C. Les encarts montrent les données non agrandies. Les annotations se rapportent au tableau 1.

Tableau 1.

Identification	[M+2H] ²⁺ observés	Composition proposée	[M+2H] ²⁺ théoriques	Structure proposée	
				Oxford	Alternative
1	659,9	F1+Noyau	659,774	F1M3	G0F-2GlcNAc
2	688,4	N1+Noyau	688,284	A1	G1-GlcNAc
3	748,9	H2+Noyau	748,798	M5	Man5
4	761,5	N1F1+Noyau	761,313	FA1	G0F-GlcNAc
5	790,0	N2+Noyau	789,824	A2	G0
6	842,4	H1N1F1+Noyau	842,340	FA1G1	G1F-GlcNAc
7	863,0	N2F1+Noyau	862,853	FA2	G0F
8	871,0	H1N2+Noyau	870,851	A2[6]G1	G1
9	871,0	H1N2+Noyau	870,851	A2[3]G1	G1'
10	923,6	H2N1F1+Noyau	923,366	-	-
11	944,0	H1N2F1+Noyau	943,879	FA2[6]G1	G1F
12	944,0	H1N2F1+Noyau	943,879	FA2[3]G1	G1F'
13	952,0	H2N2+Noyau	951,877	A2G2	G2
14	964,7	N3F1+Noyau	964,393	FA2B	G0FB
15	991,9	H5+Noyau	991,877	M8	Man8
16	996,1	H1N1Sg1F1+Noyau	995,885	FA1G1Sg1	G1Sg1F-GlcNAc
17	1025,1	H2N2F1+Noyau	1024,906	FA2G2	G2F
18	1025,1	H2N2F1+Noyau	1024,906	FA2G1Ga1	G1F+αGal
19	1045,6	H1N3F1+Noyau	1045,419	FA2[6]B1G1	G1FB
20	1045,7	H1N3F1+Noyau	1045,419	FA2[3]B1G1	G1FB'
21	1089,5	H1N1F1S1+Noyau	1089,427	FA1G1S1	G1S1F-GlcNAc
22	1097,7	H1N2F1Sg1+Noyau	1097,425	FA2G1Sg1	G1Sg1F
23	1106,1	H3N2F1+Noyau	1105,932	FA2G2Ga1	G2F+αGal
24	1106,1	H3N2F1+Noyau	1105,932	FA2G2Ga1 iso	G2F+αGal'
25	1126,5	H2N3F1+Noyau	1126,446	FA2BG2	G2FB
26	1170,4	H2N2F1S1+Noyau	1170,454	FA2G2S1	A1F
27	1170,4	H2N2F1S1+Noyau	1170,454	FA2G2S1 iso	A1F iso
28	1178,7	H2N2F1Sg1+Noyau	1178,451	FA2G2Sg1	Ag1F
29	1187,1	H4N2F1+Noyau	1186,959	FA2G2Ga2	G2F+(αGal)2
30	1207,7	H3N3F1+Noyau	1207,472	FA2BG2Ga1	G2FB+αGal
31	1259,4	H3N2F1Sg1+Noyau	1259,477	FA2G2Sg1Gal1	Ag1F+αGal
32	1316,2	H2N2F1S2+Noyau	1316,001	FA2G2S2	A2F

Tableaux de résultats

Les pics des chromatogrammes FLD ont été rapportés en tant que pourcentage relatif de la somme des profils de tous les glycanes présents. La figure 5 illustre les résultats.

Certains profils contenaient des pics correspondants à des structures de glycanes coéluants. Ces coélutions impliquaient des glycanes mineurs et une quantification par fluorescence uniquement rapporterait la surface de pic comme la contribution combinée des deux structures.

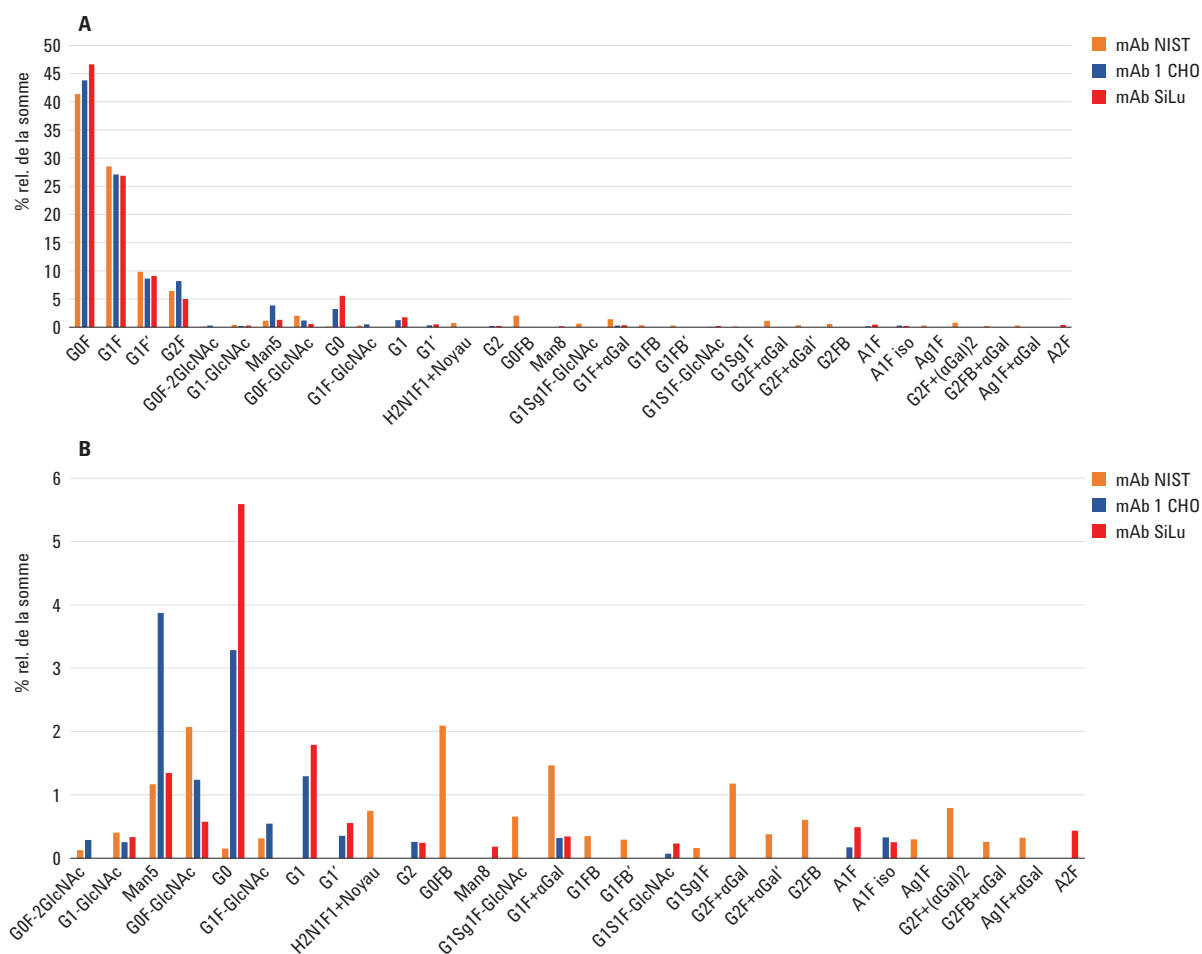


Figure 5. A) Abondance relative de N-glycanes dans les trois échantillons de mAb. B) Zoom sur le chromatogramme pour montrer uniquement les composantes mineures. Les glycanes mineurs présents à moins de 1 % ont été facilement détectés.

Pour les analystes qui ont besoin de quantifier de manière exacte ces structures coéluantes de faible abondance, nous proposons d'utiliser les données de LC/MSD XT en plus de la FLD. Le spectre de masse peut être intégré sur la plage de temps correspondant aux pics de FLD coéluants. La surface de pic détectée par FLD peut alors être attribuée aux différentes structures sur la base de l'intensité relative combinée des ions de N-glycane à double charge présents dans ce spectre. Nous avons établi précédemment que les signaux de MS pour les marqueurs InstantPC correspondent étroitement à leur véritable abondance telle que définie par l'intensité de fluorescence (voir 5991-6958EN).

Conclusion

Le système Agilent LC/MSD XT à technologie simple quadripôle peut être couplé en ligne à un système UHPLC HILIC-FLD classique et permettre l'identification facultative par spectrométrie de masse de chaque pic de chaque échantillon. L'utilisation d'une source d'ionisation Agilent Jet Stream associée au marqueur de glycane InstantPC procure la sensibilité nécessaire pour détecter les signaux MS pour les pics principaux et mineurs d'échantillons d'anticorps classiques sans recourir à une étape de concentration des échantillons. Pour les échantillons d'anticorps monoclonaux classiques, ceci permet une attribution fiable des structures de glycanes. L'approche décrite dans cette note d'application s'appuie sur la méthode conventionnelle de quantification relative par détection robuste de la fluorescence, les données MS pouvant être utilisées en complément pour élucider la quantification en cas de coélution de pics.

Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
Imprimé aux États-Unis
22 mai 2017
5991-8071FR



Agilent Technologies