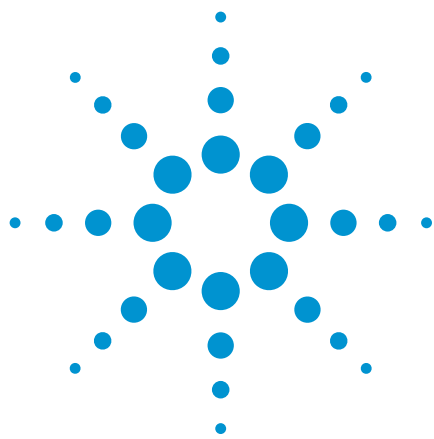
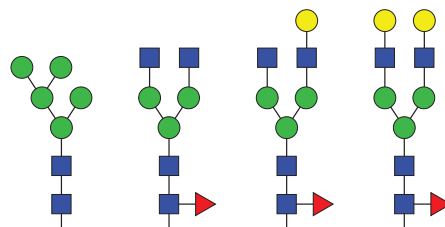




Analisi di N-glicani di anticorpi monoclonali mediante rivelazione a fluorescenza e rivelazione a selezione di massa affidabile con il rivelatore Agilent LC/MSD XT

Nota applicativa

Bioterapeutici e farmaci biologici



Autori

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



Agilent LC/MSD XT

Introduzione

La N-glicosilazione di proteine bioterapeutiche è monitorata durante lo sviluppo dei prodotti e dei processi e durante il controllo qualità (CQ). Molti analisti eseguono il rilascio enzimatico degli N-glicani seguito da marcatura con un tag fluorescente per l'analisi HILIC-FLD. Il tag InstantPC di Prozyme Inc. consente la preparazione manuale del campione in un'ora o, in alternativa, rende possibile l'elaborazione parallela a elevata produttività con la piattaforma di gestione dei liquidi Agilent AssayMap Bravo. La separazione a elevata risoluzione può essere completata con cicli di breve durata usando la colonna Agilent AdvanceBio Glycan Mapping (consultare 5991-4886EN).

Nonostante la rivelazione a fluorescenza sia una tecnica di rivelazione molto usata, gli analisti che eseguono flussi di lavoro HILIC-FLD devono a volte affrontare difficoltà come l'assegnazione di picchi ambigui, in particolare nel caso di nuove tipologie di campioni, o di picchi imprevisti. In questi casi, gli analisti ricorrono ad analisi complementari dei campioni, in LC-Q-TOF o MALDI-TOF, con conseguente perdita di tempo e spese aggiuntive.

In precedenza abbiamo dimostrato il miglioramento di un flusso di lavoro in cui un sistema HILIC-FLD è stato abbinato online a uno spettrometro di massa Q-TOF ad alta risoluzione (vedere 5991-6958EN). Questo approccio combina i vantaggi di una quantificazione affidabile in fluorescenza con le potenti capacità di identificazione strutturale della spettrometria di massa. Tuttavia, quegli analisti che desiderano una soluzione di routine economicamente conveniente potrebbero preferire lavorare con un solido rivelatore MSD (Mass Selective Detector) a ingombro ridotto, che si basa sulla tecnologia a singolo quadrupolo. Presentiamo quindi un metodo in cui un sistema HILIC-FLD è abbinato a un solido, sensibile e impilabile rivelatore a singolo quadrupolo Agilent LC/MSD XT. I dati MSD forniscono informazioni sulla massa per risolvere l'assegnazione dei picchi ambigui e per rivelare strutture coeluenti. Il metodo funziona a meno di 600 bar per mantenere la compatibilità con i vari sistemi LC esistenti.



Agilent Technologies

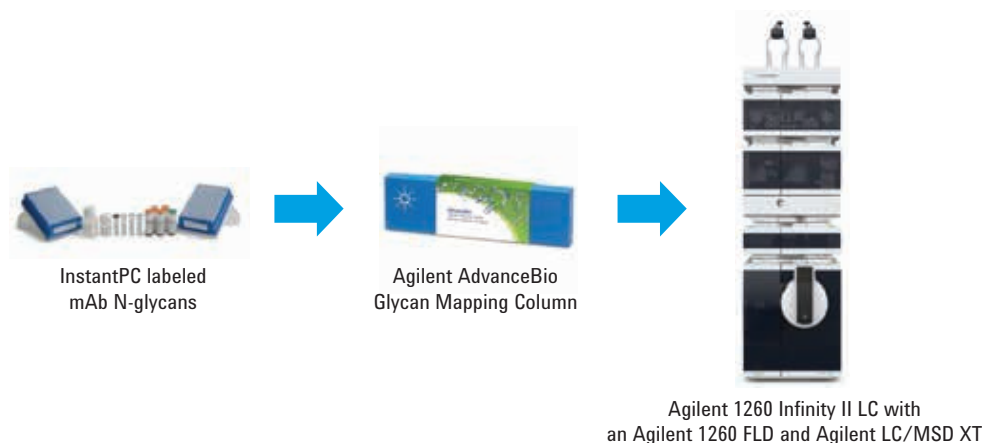


Figura 1. Diagramma di flusso della preparazione del campione, colonna LC e strumenti usati per l'identificazione e quantificazione degli N-glicani marcati con InstantPC.

Condizioni sperimentali

Preparazione del campione

Campioni dell'anticorpo monoclonale (mAb) sono stati espressi nel nostro laboratorio (CHO mAb 1) o acquistati da Sigma-Aldrich (SiLu Lite P/N MSQC4) e da NIST (NIST, Materiale di riferimento 8671). Tutti i campioni sono stati portati a 1 µg/µL prima di essere trattati con GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with InstantPC (96-ct) di Prozyme Inc. (GPPNG-PC). Il trattamento del campione è stato condotto automaticamente usando la piattaforma di gestione dei liquidi Agilent AssayMap Bravo (G5542A). Il passaggio finale di questo protocollo prevede l'eluizione dei glicani marcati in 50 µL in modo che ogni µL di questa soluzione finale di campione rappresenti gli N-glicani rilasciati da 1 µg di mAb. Questo flusso di lavoro ha il vantaggio di non richiedere centrifugazioni o passaggi di essiccazione.

Condizioni cromatografiche

Pompa

Pompa binaria Agilent 1260 Infinity II G7112B

Fase mobile A

50 mM di acido formico portato a pH 4,5 con idrossido di ammonio

Fase mobile B

Acetonitrile

Campionatore

Agilent 1260 Infinity II Multisampler (G7167A) con termostato impostato a 11 °C

Colonne

- Colonna AdvanceBio Glycan Mapping 1,8 µm, 2,1 × 100 mm usata con il metodo A
- Colonna AdvanceBio Glycan Mapping 2,7 µm, 2,1 × 150 mm usata con il metodo B
- Colonna AdvanceBio Glycan Mapping 1,8 µm, 2,1 × 150 mm usata con il metodo C

Riscaldatore della colonna

Comparto colonna termostato Agilent 1260 Infinity II G7116 con preriscaldatore del solvente G7116-60015 impostato a 40 °C

Le colonne sono state collegate usando tubi SSTL con d.i. di 100 µm a un rivelatore a fluorescenza Agilent 1260 Infinity (G1321B) con una cella da 8 µL (G1321-60005). Il rivelatore è stato impostato con λEx a 285 nm, λEm a 345 nm e con PMT gain = 10.

Parametri del sistema LC/MSD XT

Parametro	Valore
Sorgente ionica	
Sorgente	Agilent Jet Stream in modalità positiva
Sheath gas	300 °C a 10,0 L/min
Temperatura del dry gas	150 °C a 9,0 L/min
Pressione del nebulizzatore	35 psig
VCap	2.550 V
	Nozzle: 500 V
Impostazioni di acquisizione	
Intervallo di massa	500-1.400 <i>m/z</i>
Fragmentor	100 V
Gain EMV	1,0
Step size	0,10
Larghezza del picco	0,2

Software

OpenLab CDS Chemstation Edition Rev C.01.07 SR3

Reagenti

I reagenti e i solventi usati erano tutti della massima purezza disponibile.

Tabelle dei gradienti

Metodo A (per colonne da 1,8 µm 2,1 × 100 mm)

Tabella di programmazione

Tempo (min)	%A	%B	Flusso (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

Tempo finale = 18 minuti

Metodo B (per colonne da 2,7 µm 2,1 × 150 mm)

Tabella di programmazione

Tempo (min)	%A	%B	Flusso (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

Tempo finale = 30 minuti

Metodo C (per colonne da 1,8 µm 2,1 × 150 mm)

Tempo (min)	%A	%B	Flusso (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

Tempo finale = 37 minuti

Risultati e discussione

Separazione

Abbiamo ottimizzato la separazione dei profili di glicani di tipici anticorpi monoclonali terapeutici su tre colonne differenti, focalizzandoci su varie durate del ciclo. I metodi iniziano con un gradiente debole che massimizza la risoluzione dei comuni glicani neutri presenti nella maggior parte dei campioni di anticorpi monoclonali terapeutici. La pendenza del gradiente è stata aumentata a metà del ciclo per eluire in modo più efficiente eventuali strutture glicaniche acide di maggiori dimensioni. Tutti questi metodi sono progettati per rimanere ben al di sotto di 600 bar, così da massimizzarne l'affidabilità, oltre che a renderli compatibili con un'ampia gamma di strumenti LC. Nonostante tutti e tre i metodi siano mostrati in Figura 2, abbiamo scelto di usare il Metodo C per il resto degli esperimenti perché è risultato quello con le migliori prestazioni globali per i tre campioni di N-glicani di mAb.

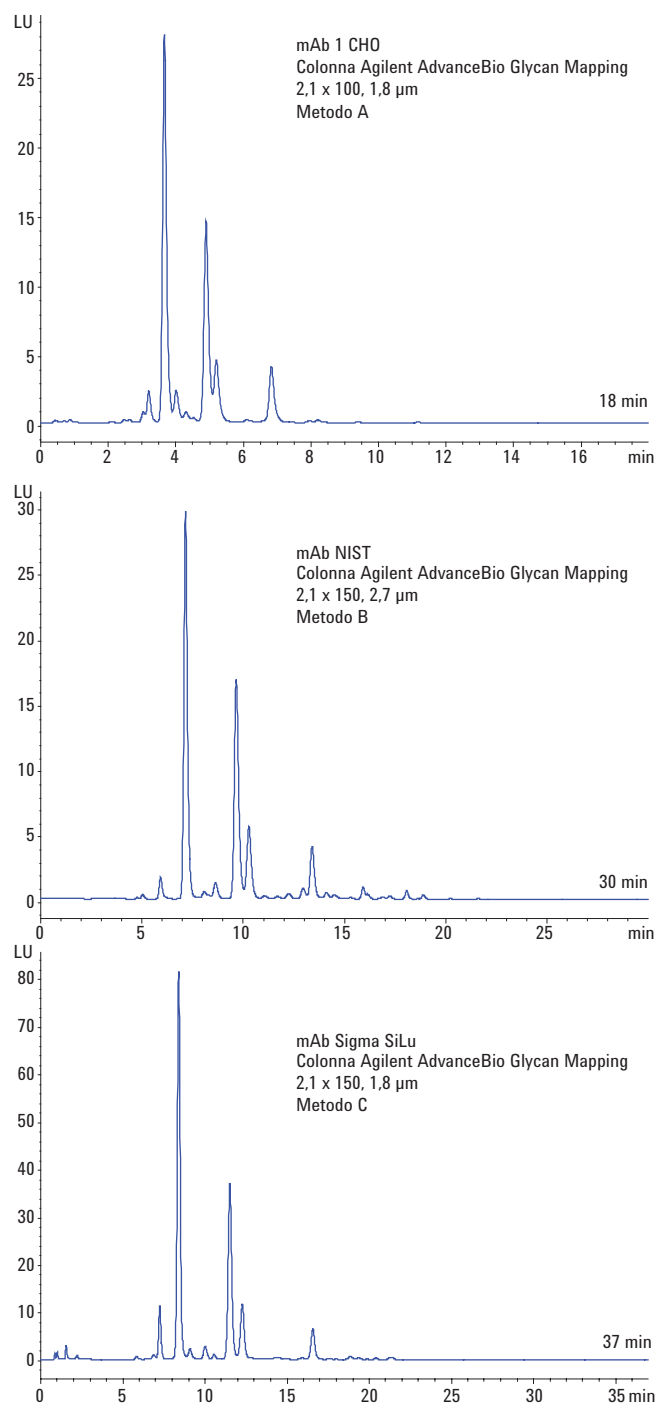


Figura 2. Tre metodi di separazione usando formati di colonne differenti con tre campioni di mAb.

Sensibilità del sistema LC/MSD XT

Solitamente gli analisti evitavano l'uso di spettrometri di massa a singolo quadrupolo per le analisi LC/MS degli N-glicani a causa di problemi di sensibilità. Due innovazioni tecniche hanno tuttavia portato a miglioramenti significativi nel limite di rivelazione per gli N-glicani. La prima è la disponibilità di una sorgente ionica altamente sensibile, Agilent Jet Stream, che utilizza un flusso di sheath gas surriscaldato attorno al getto dell'elettrospray per migliorare sensibilmente la ionizzazione. La seconda innovazione è la disponibilità di un tag InstantPC di Prozyme Inc. che aumenta radicalmente l'efficienza di ionizzazione rispetto alle marcature fluorescenti tradizionali.

Abbiamo ottimizzato i parametri MSD per aumentare al massimo la sensibilità. Gli N-glicani marcati con InstantPC sono stati osservati quasi esclusivamente come ioni a carica doppia nelle forme $[M+2H]^{2+}$, con alcune $[M+NH_4+H]^{2+}$, e $[M+H+Na]^{2+}$. L'aumento di temperatura del dry gas o del voltaggio del fragmentor può causare la dissociazione indotta da collisione degli N-glicani, offrendo potenti strategie di identificazione strutturale simili a quelle ottenibili con un sistema Q-TOF (vedere 5991-5253EN).

Sono stati ottenuti segnali diagnostici per i glicani pari appena allo 0,1% del profilo. Nel confrontare questa sensibilità con altri tipi di flusso di lavoro occorre ricordare che questi risultati sono stati ottenuti senza una fase di preconcentrazione alla fine della preparazione del campione, con un considerevole risparmio di tempo. Si potrebbe aumentare ulteriormente la sensibilità essiccando i campioni e ricostituendoli in un volume ridotto di matrice del campione.

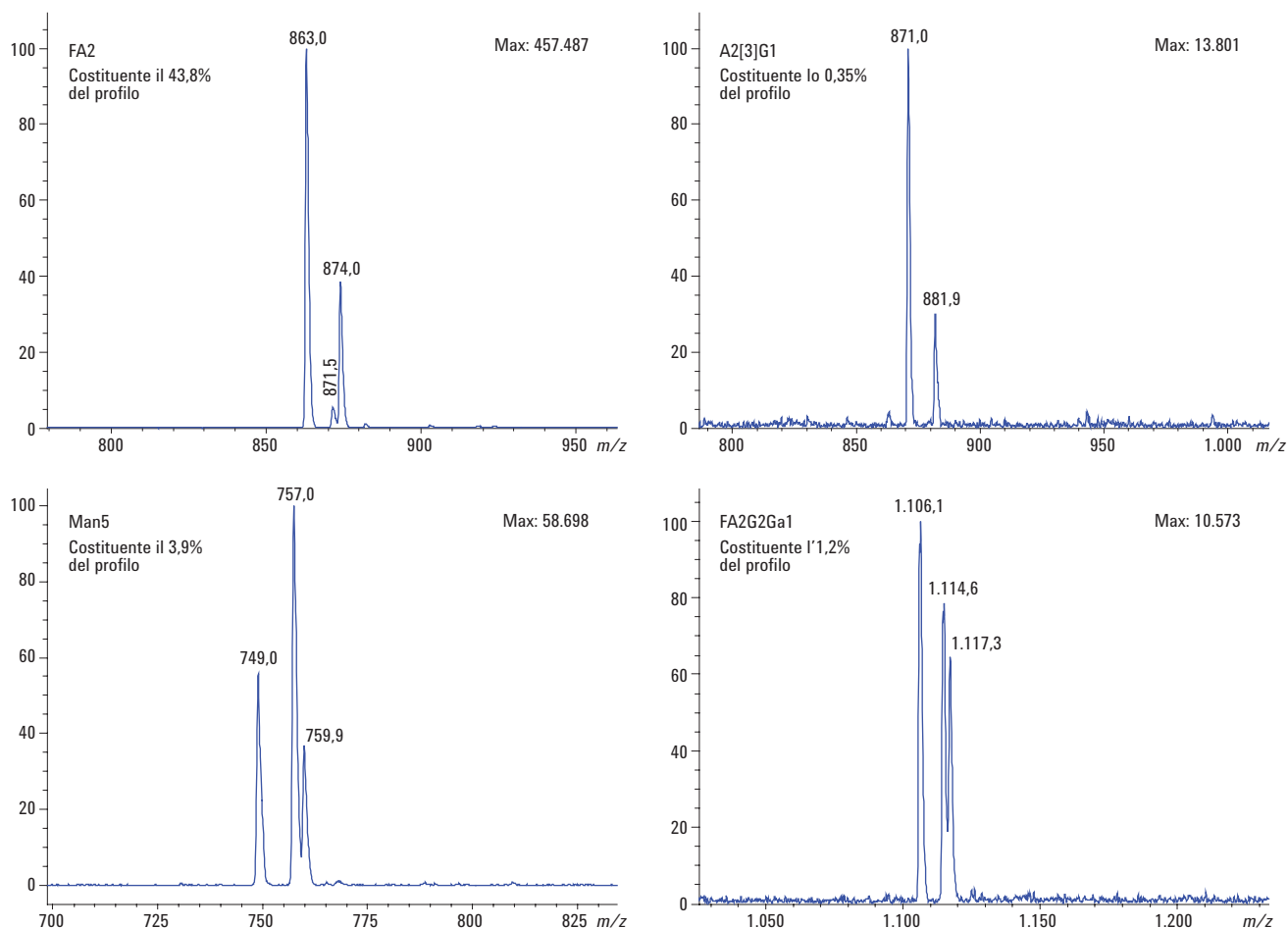


Figura 3. Spettro di massa di quattro glicani rappresentativi ottenuti da 3 µg di mAb a vari livelli di abbondanza relativa. Il segnale per A2[3]G1, che costituisce appena lo 0,35% del profilo glicanico, è chiaramente osservabile con un rapporto segnale-rumore elevato.

Assegnazione dei picchi

I dati di tutti e tre i campioni (usando il metodo C) sono stati integrati e i picchi sono stati assegnati a composizioni glicaniche usando un approccio simile a quello mostrato nella nota applicativa 5991-5253EN.

Nota: La marcatura con InstantPC causa un aumento di massa di 261,1477 m/z rispetto alla forma libera con estremità riducente dei glicani.

La Tabella 1 è stata creata per mostrare la composizione dei glicani che sono stati rivelati nei tre campioni. Le composizioni glicaniche sono mostrate nella forma: $HxNxSg$ + Core (dove H = Galattosio o Mannosio, N = N-acetilglucosammina, F = Fucosio, Sg = Acido N-glicolilneuraminico e Core = 3 mannosio, un core comune a tutti gli N-glicani). In molti casi, queste composizioni ci consentono di proporre strutture glicaniche integrando le conoscenze di base sui pattern di glicosilazione degli mAb terapeutici con l'ordine di ritenzione nella HILIC. Dal momento che la maggior parte degli mAb terapeutici contiene un insieme limitato di strutture di N-glicani comuni, la Tabella 1 può essere un utile riferimento durante l'assegnazione degli N-glicani in questo flusso di lavoro.

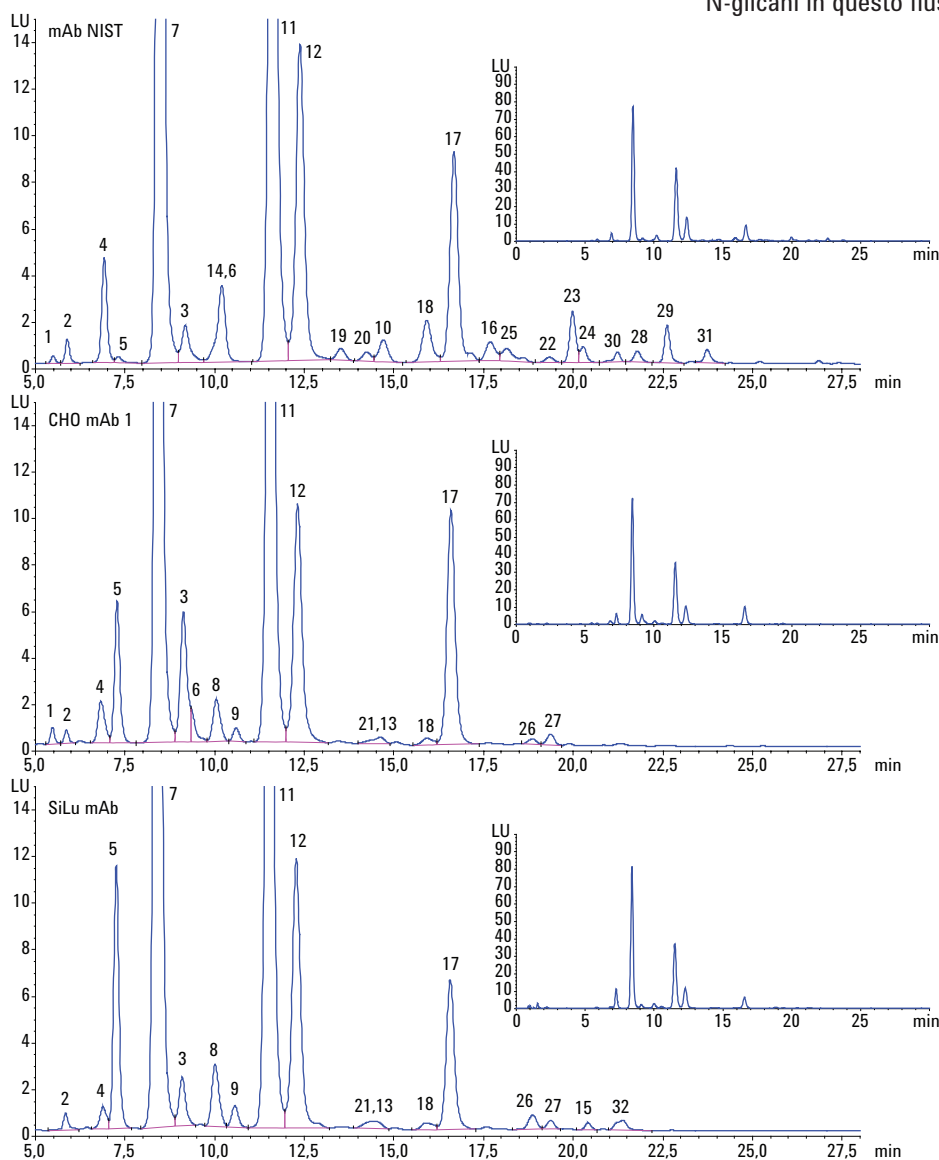


Figura 4. Cromatogrammi FLD ingranditi dei tre campioni di N-glicani di mAb che mostrano la rivelazione dei glicani principali e di quelli in tracce per il metodo C. I riquadri mostrano i dati non ingranditi. Le annotazioni fanno riferimento alla Tabella 1.

Tabella 1.

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

Tabelle dei risultati

I picchi nei cromatogrammi FLD sono stati riportati come % della somma relativa di tutti i profili glicanici. La Figura 5 mostra i risultati.

Alcuni dei profili contenevano picchi che rappresentano strutture glicaniche coeluenti. Queste coeluzioni riguardavano glicani in tracce e la quantificazione sulla sola base FLD avrebbe indicato l'area del picco come il contributo combinato di due strutture.

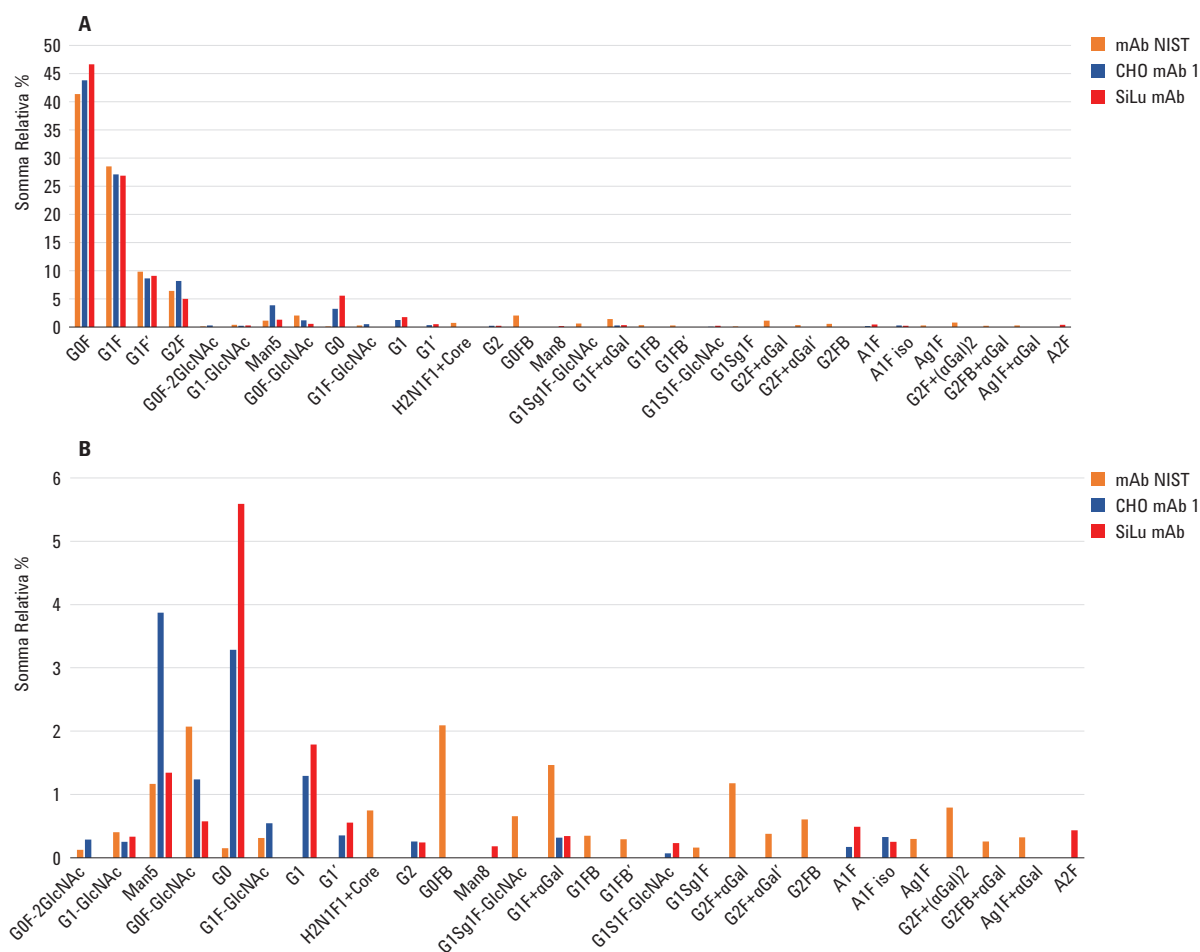


Figura 5. A) Abbondanza relativa degli N-glicani nei tre campioni di mAb. B) Diagramma ingrandito che mostra solo le componenti in tracce. I glicani in tracce sono facilmente rivelati al di sotto dell'1%.

Per analisti che necessitano di quantificazioni accurate di tali strutture coeluenti poco abbondanti, suggeriamo di usare i dati del sistema LC/MSD XT per integrare quelli del sistema FLD. Lo spettro di massa può essere integrato nel periodo corrispondente ai picchi coeluenti in FLD. L'area in FLD può quindi essere ripartita tra le diverse strutture in base all'intensità relativa combinata degli ioni a carica doppia degli N-glicani in questo spettro. In precedenza abbiamo dimostrato che i segnali MS per le marcature con InstantPC corrispondono strettamente alla loro abbondanza effettiva, come definito dalla intensità della fluorescenza (vedere 5991-6958EN).

Conclusione

Il rivelatore Agilent LC/MSD XT che si basa sulla tecnologia a singolo quadrupolo può essere abbinato online a un tipico sistema UHPLC HILIC-FLD per offrire la possibilità dell'identificazione in spettrometria di massa dei singoli picchi in ogni campione. L'utilizzo di una sorgente ionica Agilent Jet Stream in combinazione con il tag per glicani InstantPC fornisce un'ampia sensibilità per rivelare i segnali MS sia per i picchi maggiori che per quelli minori in campioni di anticorpi tipici, senza dover procedere alla concentrazione del campione. Nel caso di campioni di anticorpi monoclonali tipici, questo consente un'assegnazione affidabile delle strutture glicaniche. Nella presente nota applicativa si è utilizzato l'approccio tradizionale in cui la quantificazione relativa si basa sull'affidabile rivelazione a fluorescenza; i dati MS possono comunque essere d'aiuto nella quantificazione nel caso di picchi coeluiti.

Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
Stampato negli Stati Uniti
22 maggio 2017
5991-8071ITE



Agilent Technologies