

# Entwicklung eines Arbeitsablaufs für die schnelle Probenvorbereitung zur N-Glykan-Freisetzung und -Markierung mit APTS

## Autoren

Andres Guerrero, John Yan,  
Ace G. Galermo, Tom Rice,  
Jim Torrence, Justin Hyche,  
Ted Haxo, Sergey Vlasenko  
und Aled Jones  
Agilent Technologies, Inc.,  
Hayward, CA, USA

Aarti Jashnani  
Bristol-Myers Squibb  
Redwood City, CA, USA

## Zusammenfassung

Die N-Glykan-Einheiten von Biotherapeutika können die Immunogenität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflussen und machen die N-Glykan-Charakterisierung zu einem wichtigen Teil des Entwicklungsprozesses. Ein üblicher Ansatz ist die Derivatisierung enzymatisch freigesetzter N-Glykane mit einem Fluoreszenzfarbstoff zur Trennung und Detektion der Glykanmischung, um die relative Verteilung der Glykanspezies zu ermitteln. Für die Trennung mittels Kapillarelektrophorese (CE) wird häufig der negativ geladene Farbstoff 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonat (APTS) verwendet, um für eine Migration der neutralen Glykanspezies zu sorgen. Mit herkömmlichen Methoden erfordert die Vorbereitung APTS-markierter N-Glykane in der Durchführung häufig zahlreiche Stunden oder Tage.

Wir stellen einen APTS-Arbeitsablauf als Ergänzung zur Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Vorbereitungsplattform (früher ProZyme) vor, bei dem APTS-markierte N-Glykane innerhalb von ~2,5 Stunden bereit für CE- oder UHPLC-Analysen sind. Es werden Trennungen auf zwei CE-Plattformen und UHPLC-HILIC-Trennungen von APTS-markierten Glykanen aus Rituxan und Enbrel gezeigt.

## Einleitung

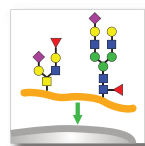
Mehr als 60 % der Biotherapeutika sind glykosyliert<sup>1</sup>, einschließlich monoklonaler Antikörper (mAb), Fc-Fusionsproteine, Gerinnungsfaktoren und Zytokine wie beispielsweise Erythropoietin. Die Struktur von N-verknüpften Glykanen kann eine entscheidende Rolle in der Pharmakologie therapeutischer Proteine spielen und gegebenenfalls die Immunogenität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflussen.<sup>2,3</sup> Dies macht die Charakterisierung von N-Glykanen zu einem wesentlichen Bestandteil des Entwicklungsverfahrens von Biotherapeutika. N-Glykane enthalten kein Chromophor oder Fluorophor, die für die Online-Detektion geeignet sind, sodass sie für die Trennung mittels CE üblicherweise mit Fluoreszenzmarkern wie APTS durch reduktive Aminierung nach der enzymatischen Freisetzung mit PNGase F derivatisiert werden.

Herkömmliche Markierungsmethoden für APTS erfordern mehrere Schritte, einschließlich der Trocknung der freigesetzten Glykane vor deren Markierung und anschließender Entfernung des überschüssigen APTS-Markers, was in der Durchführung Stunden oder sogar Tage dauern kann. GlykoPrep RapID N-Glykan-Prep mit APTS verkürzt das Probenvorbereitungsverfahren auf vier bis fünf Stunden.<sup>4</sup> Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit APTS Express (früher ProZyme) ist ein vereinfachter Arbeitsablauf, bei dem die Proben typischerweise nach 2,5 Stunden für die Analyse bereit sind (Abbildung 1). Eine fünfminütige Deglykosylierung in Lösung mit PNGase F im 96-Well-PCR-Plattenformat setzt die N-Glykane frei, nachdem ein Denaturierungsreagens die Exposition der N-Glykosylierungsstellen bei erhöhter Temperatur für eine schnelle enzymatische Spaltung verbessert hat.

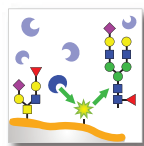
Nach einer schnellen Umwandlung der Glykosylaminform ( $-NH_2$ ) in die Form mit freiem reduzierendem Ende ( $-OH$ ) können die N-Glykane auf eine Reinigungsmatrix in einer 96-Well-Vakuumfiltrationsplatte geladen werden. Die Markierung der N-Glykane mit APTS Express durch reduktive Aminierung (eine Stunde) wird auf der Reinigungsmatrix durchgeführt. Dadurch wird eine Trocknung der Glykanproben vor der Markierung im Gegensatz zum herkömmlichen Arbeitsablauf mit APTS überflüssig. Nach der Markierung werden freies APTS und andere Reaktionskomponenten aus den APTS-markierten Glykanen, die an die Matrix gebunden sind, herausgewaschen. Anschließend werden die APTS-markierten N-Glykanproben mit Wasser eluiert. Der APTS-Arbeitsablauf wird von einer Reihe von APTS-markierten Migrationsstandards, darunter individuelle N-Glykane und N-Glykan-Bibliotheken<sup>5</sup> sowie Exoglycosidasen, unterstützt.

### Arbeitsabläufe Probenvorbereitung von N-Glykanen mit APTS

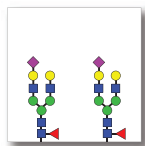
Agilent GlykoPrep mit APTS  
Gesamtzeit ~4-5 Stunden  
Deglykosylierung auf der Matrix  
Markierung in Lösung  
Aufreinigung auf der Matrix  
Automatisierungsfähiges Format



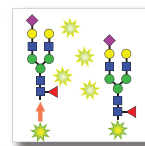
Denaturierung  
5 min



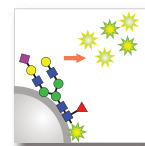
Deglykosylierung  
15 bis 60 min



Trocknung  
30 bis 60 min

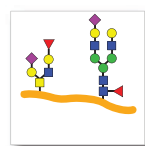


Markierung  
60 min

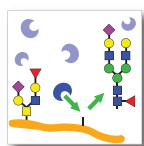


Aufreinigung  
15 bis 30 min

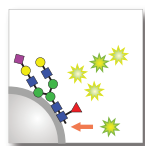
Agilent AdvanceBio Gly-X  
mit APTS Express  
Gesamtzeit ~2,5 Stunden  
Deglykosylierung in Lösung  
Markierung und Aufreinigung auf  
der Matrix  
Automatisierungsfähiges Format



Denaturierung  
3 min

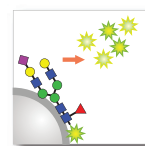


Deglykosylierung  
5 min



Markierung  
60 min

Keine Trocknung



Aufreinigung  
15 bis 30 min



• Festphase  
• Vakuumunterstützt

**Abbildung 1:** Arbeitsabläufe der Probenvorbereitung von N-Glykanen: Agilent GlykoPrep mit APTS und Agilent AdvanceBio Gly-X mit APTS Express der nächsten Generation.

## Material und Methoden

### Probenvorbereitung

N-Glykanproben aus MabThera Chargen-Nr. H0102B03 (Rituximab) und Enbrel Chargen-Nr. R170724 (Etanercept) wurden mit dem Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit APTS Express-Kit (GX96-APTS) und mit Agilent GlykoPrep RapID N-Glykan-Prep mit APTS (GP96NG-APTS) nach den empfohlenen Standardprotokollen vorbereitet. Dabei wurden 40 µg Protein pro Gly-X-Vorbereitung und 50 µg Protein für Agilent GlykoPrep verwendet.

### CE-Trennungen

Die APTS-markierten N-Glykane wurden auf folgenden Systemen getrennt:

- Agilent Gly-Q Glykananalyse-System (früher ProZyme) mit LED-induzierter Fluoreszenz-Detektion (LEDIF), Ex/Em (nm) 310/>385 (Produktcode GQ2100), mit elektrokinetischer Injektion und Trennung innerhalb von zwei Minuten.
- Sciex PA800-plus CE-System mit Detektion mittels laserinduzierter Fluoreszenz (LIF), Ex/Em (nm) 488/520. N-CHO-Kapillare, Länge zum Fenster: 50 cm; Gesamtlänge: 60 cm, Elektrolyt: Puffer zur Trennung von Kohlenhydraten. Druck der Probenaufgabe: 0,5 psi über 10 Sekunden. Spannung des Trennvorgangs und Dauer: 30 kV über 27 Minuten, Temperatur der Kartusche: 20 °C.

### UHPLC-HILIC

Die Trennung mittels hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) der APTS-markierten Glykane mit Fluoreszenzdetektion (FLD) wurde auf einer Amidsäule (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) bei einer Säulentemperatur von 60 °C, einem Gradienten von 30 bis 60 % 50 mM Ammoniumformiat bei pH 4,4 zwischen Minute 2 und Minute 50 und einer Flussrate von 0,4 ml/min durchgeführt.

Die markierten Glykane wurden mittels Fluoreszenzdetektion, Ex/Em (nm) 473/520, analysiert. Die Glykanzuordnung erfolgte durch den Vergleich mit vorhandenen Daten von Agilent und aus der Literatur.<sup>6</sup>

### Behandlung der APTS Express-Glykane mit Sialidase A

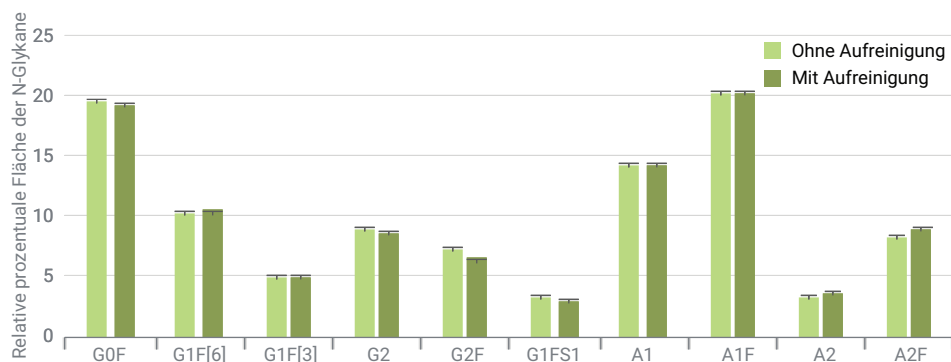
In einer PCR-Platte wurde 1 µl Sialidase A (GK80040) zu 75 µl Gly-X APTS-markierten Glykanen gegeben und 10 Minuten lang bei 50 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden sie in das Gly-Q CE-System injiziert.

## Ergebnisse und Diskussion

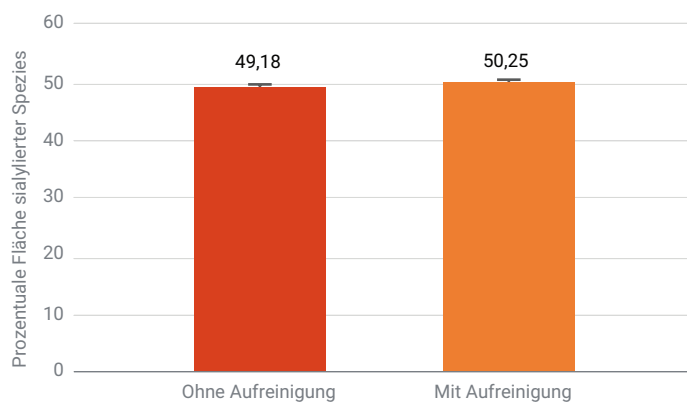
### Leistung von APTS Express

Für APTS Express wird eine Probenmenge von 10 bis 40 µg empfohlen. Ähnliche Glykanprofile wurden im Bereich von 1 bis 200 µg für MabThera und von 10 bis 200 µg für Enbrel (Daten nicht gezeigt) beobachtet.

Die Reinigung mit APTS Express entfernt mehr als 99 % des freien Farbstoffs (Daten nicht gezeigt) und minimiert eine Bevorzugung einzelner Glykane (Abbildung 2). Wie in Abbildung 3 gezeigt, lässt die Aufreinigung auch sialylierte Glykane unverändert.



**Abbildung 2:** Arbeitsabläufe der Probenvorbereitung von N-Glykanen: Agilent GlykoPrep mit APTS und Agilent AdvanceBio Gly-X mit APTS Express der nächsten Generation.



**Abbildung 3:** Erhaltung sialylierter Spezies. APTS-markierte N-Glykane aus Enbrel wurden mittels UHPLC analysiert; die summierten relativen prozentualen Flächen der sialylierten Spezies wurden für die Durchführung mit und ohne Aufreinigung verglichen.

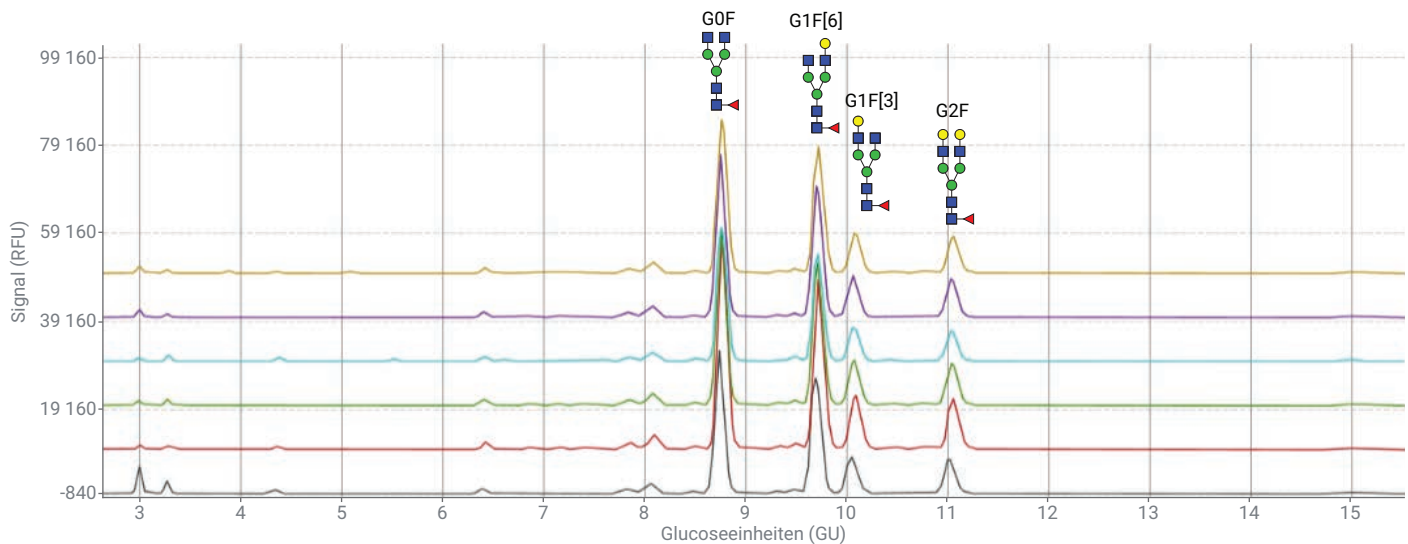
Für die Methode wurde die Reproduzierbarkeit bestimmt. Dazu wurden sechs Replikate von Mab Thera vorbereitet und mit dem Agilent Gly-Q CE-System getrennt (Abbildung 4). Für die wichtigsten Glykanpeaks lag der Wert für % VK bei unter 3 %.

### CE-Trennungen

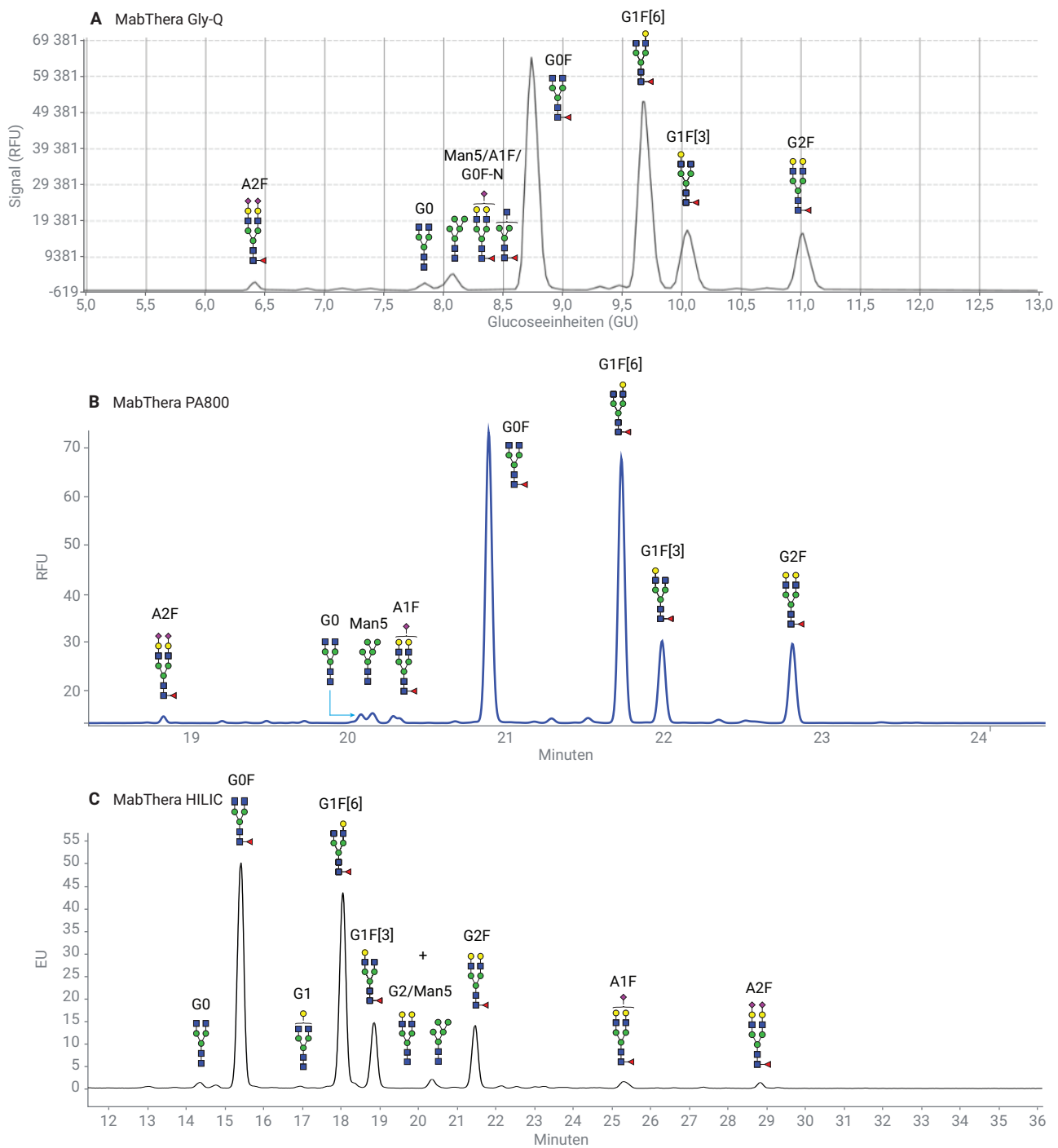
Agilent AdvanceBio Gly-X mit APTS Express ist ein Kit in einem offenen Format, das die Trennung auf unterschiedlichen CE-Systemen ermöglicht.

Die N-Glykane aus Rituxan und Enbrel wurden auf dem Agilent Gly-Q CE-System (Abbildungen 5A und 6A) und auf dem Sciex PA800 plus (Abbildungen 5B und 6B) getrennt.

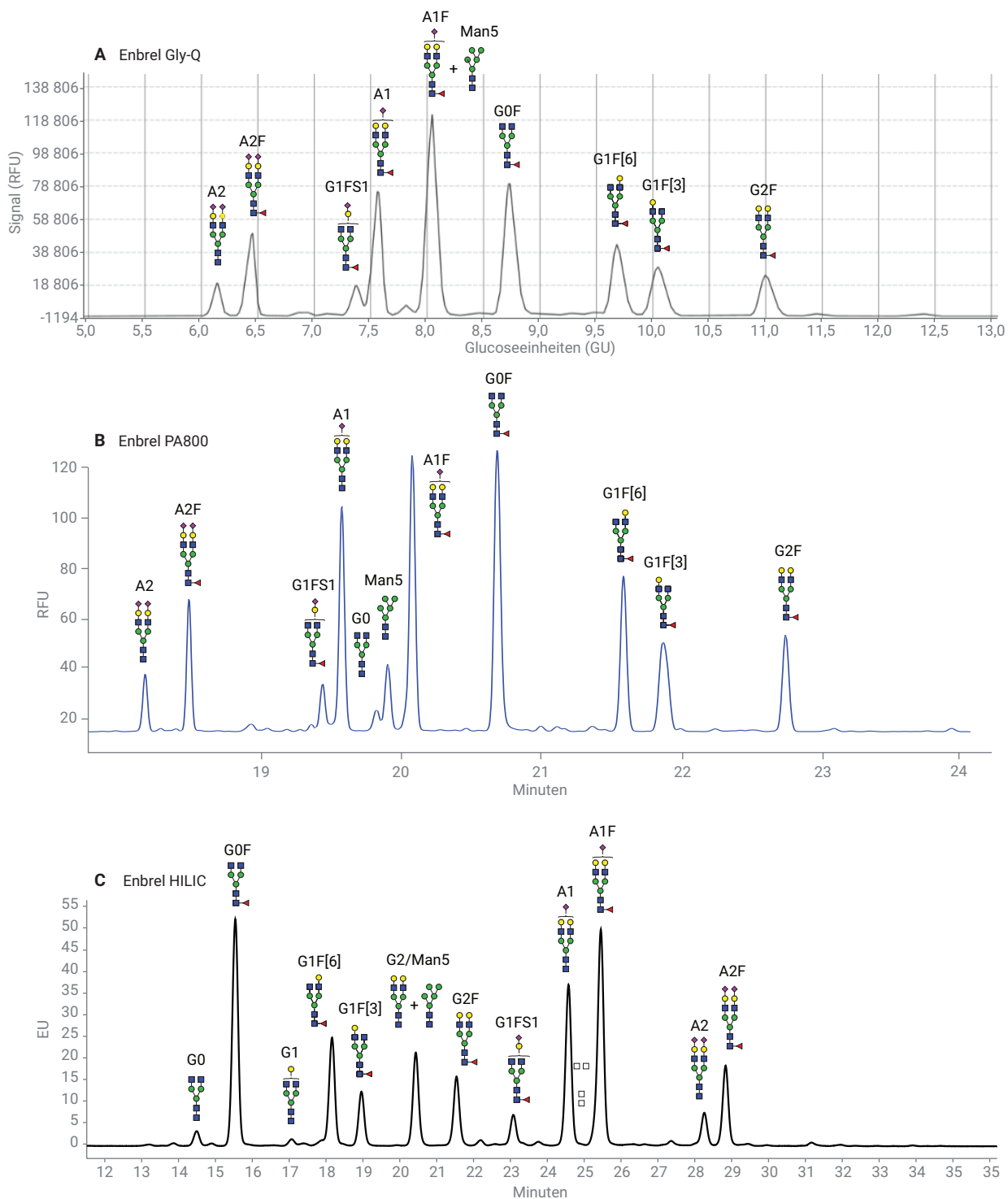
Das AdvanceBio Gly-X APTS Aufreinigungsmodul entfernt mehr als 99 % des freien Farbstoffs und ermöglicht dadurch eine saubere Trennung zu Beginn des Analysenlaufs.



**Abbildung 4:** Reproduzierbarkeit von Agilent Gly-X APTS Express. Sechs Replikate MabThera wurden vorbereitet und auf einem Agilent Gly-Q CE-System getrennt, Abbildungsteil (A). Relative prozentuale Fläche und % VK für wichtige Glykanpeaks sind in Abbildungsteil (B) gezeigt.



**Abbildung 5:** N-Glykane aus MabThera wurden mit Agilent Gly-X APTS Express vorbereitet und getrennt: A) mittels CE auf einem Agilent Gly-Q CE-System, B) mittels CE auf einem PA800 plus und C) mittels UHPLC-HILIC.



**Abbildung 6:** N-Glykane aus Rituxan wurden mit Agilent Gly-X APTS Express vorbereitet und getrennt: A) mittels CE auf einem Agilent Gly-Q CE-System, B) mittels CE auf einem PA800 plus und C) mittels UHPLC-HILIC.

## UHPLC-HILIC-Trennung

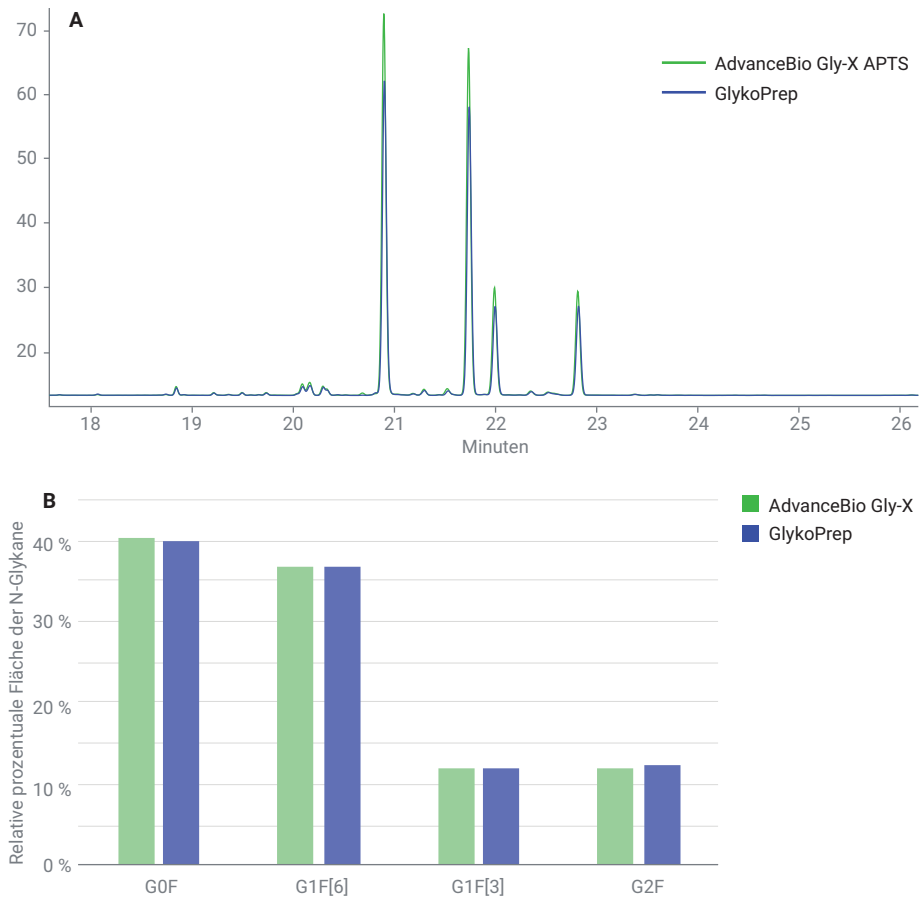
Beispiele von N-Glykanen aus MabThera und Enbrel, die mit AdvanceBio APTS Express markiert und mittels HILIC getrennt wurden, werden in den Abbildungen 5C bzw. 6C gezeigt.

APTS-markierte Glykane können mittels HILIC auf UHPLC- oder HPLC-Geräten getrennt werden. Die APTS-Glykanpeaks sind jedoch breiter als die Peaks von N-Glykanen, die mit anderen Farbstoffen markiert und in der Regel für die HILIC verwendet werden (beispielsweise InstantPC und 2-AB). Außerdem ist gegebenenfalls ein HILIC-Gradient erforderlich, der bei einem geringeren organischen Anteil in der mobilen Phase startet, da APTS-Glykane polarer sind und bei der hydrophilen Interaktionschromatographie stärker retardiert werden als 2-AB-Glykane und Glykane, die mit anderen Farbstoffen markiert sind.

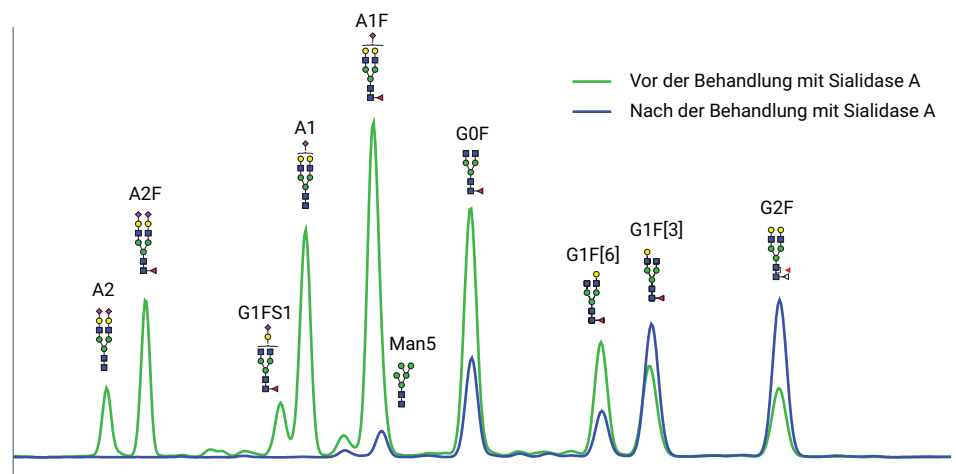
## Behandlung der APTS Express-Glykane mit Sialidase A

Sialidase A (GK80040) setzt  $\alpha(2,3)$ -,  $\alpha(2,6)$ -,  $\alpha(2,8)$ - und  $\alpha(2,9)$ -verknüpfte Sialinsäure aus APTS-markierten Glykanen frei und kann als Hilfe bei der Peakzuordnung herangezogen werden.

Eine zehnminütige Behandlung von N-Glykanen aus Enbrel mit Sialidase A bewirkt, dass Peaks sialylierter Spezies im Gly-Q-Elektropherogramm in eine neutrale Position wandern (Abbildung 8). Beispielsweise wandert A2F zu G2F und A1F zu G1F.



**Abbildung 7:** Vergleich von mit Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express und Agilent GlykoPrep APTS markierten N-Glykanen. Markierte N-Glykane aus MabThera wurden vorbereitet und auf einem PA800 plus getrennt.



**Abbildung 8:** Trennung von APTS-markierten N-Glykanen aus Enbrel auf einem Agilent Gly-Q CE-System vor und nach einem zehnminütigen Verdau mit Sialidase A.

## Schlussfolgerungen

Die Markierung freigesetzter N-Glykane mit Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express liefert reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse, die mit bereits vorhandenen Daten beispielsweise von Agilent GlykoPrep mit APTS direkt verglichen werden können. Die Verwendung des etablierten Markers APTS sichert die Datenkontinuität für laufende Projekte.

AdvanceBio Gly-X mit APTS Express bietet einen schnellen Arbeitsablauf (~2,5 Stunden) für die herkömmliche Markierung mit APTS ohne die zeitraubenden Trocknungsschritte und verkürzt so die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse. Daten von AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit APTS Express sind vergleichbar mit Daten von Agilent GlykoPrep RapID N-Glykan-Prep mit APTS. Das CE-Kit im offenen Format ermöglicht mit AdvanceBio Gly-X APTS Express eine Markierungslösung der nächsten Generation auf anderen CE-Geräten und für die Trennung mittels UHPLC-HILIC.

## Literatur

1. Planinc, A.; *et al.* Glycan Characterization of Biopharmaceuticals: Up-Dates and Perspectives. *Anal. Chim. Acta* **2016**, May 19, 921,13-27.
2. Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(6), 1866-1884.
3. Jones, A. N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins. *BioPharm International* **2017**, 30(6), 20-25.
4. Szekrényes, A.; *et al.* Multi-Site N-glycan Mapping Study 1: Capillary Electrophoresis – Laser Induced Fluorescence. *MAbs* **2016**, 8(1), 56-64.
5. [www.prozyme.com/pages/n-glycan-standards](http://www.prozyme.com/pages/n-glycan-standards)
6. Reusch, D.; *et al.* High-throughput Glycosylation Analysis of Therapeutic Immunoglobulin G by Capillary Gel Electrophoresis Using a DNA Analyzer. *MAbs* **2014**, 6(1), 185-196.

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

DE.5904166667

Änderungen vorbehalten.