

Desarrollo de un flujo de trabajo rápido de preparación de muestras para la liberación y el marcado con APTS de N-glucanos

Autores

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

Aarti Jashnani
Bristol-Myers Squibb
Redwood City, CA

Resumen

Los restos de N-glucanos de productos bioterapéuticos pueden afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica, por lo que la caracterización de N-glucanos es una parte esencial del proceso de desarrollo. Un enfoque común es derivatizar los N-glucanos liberados enzimáticamente con un reactivo de tinción fluorescente para la separación y detección de la mezcla de glucanos para evaluar la distribución relativa de las formas de glucanos. Para la separación por electroforesis capilar (EC), el reactivo de tinción de carga negativa, el 8-aminopireno-1,3,6-trisulfonato (APTS), se utiliza con frecuencia para permitir la migración de formas de glucanos neutras. Con los métodos convencionales, la preparación de N-glucanos marcados con APTS suele requerir numerosas horas o días para completarse.

Presentamos un flujo de trabajo con APTS como complemento a la plataforma de Agilent AdvanceBio Gly-X (anteriormente ProZyme) para la preparación de N-glucanos, donde los N-glucanos marcados con APTS están listos para el análisis por CE o UHPLC en aproximadamente 2,5 horas. Se muestran las separaciones de glucanos marcados con APTS de Rituxan y Enbrel en dos plataformas de CE y en UHPLC-HILIC.

Introducción

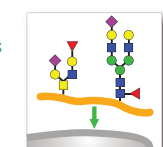
Más del 60 % de los productos bioterapéuticos están glucosilados¹, incluidos los anticuerpos monoclonales (mAb), las proteínas de fusión Fc, los factores de coagulación y las citocinas, como la eritropoyetina. La estructura de los N-glucanos puede desempeñar un papel crítico en la farmacología de las proteínas terapéuticas, y puede afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica^{2,3}. Esto hace que la caracterización de N-glucanos sea una parte esencial del proceso de desarrollo de productos bioterapéuticos. Los N-glucanos no contienen un cromóforo o fluoróforo adecuado para la detección en línea, por lo que para la separación por CE se derivatizan comúnmente con marcadores fluorescentes, como APTS, mediante reacciones de aminación reductora después de la liberación enzimática con PNGasa F. Los métodos convencionales de marcado con APTS

requieren múltiples pasos, incluido el secado de los glucanos liberados antes del marcado y la posterior limpieza del exceso de marcador APTS, que puede requerir horas o incluso días para completarse. La preparación rápida de N-glucanos mediante GlykoPrep con APTS optimizó el proceso de preparación de muestras a cuatro o cinco horas.⁴ La preparación rápida de N-glucanos mediante Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express (anteriormente ProZyme) es un flujo de trabajo simplificado en el que las muestras suelen estar listas para el análisis en 2,5 horas (Figura 1). Una desglucosilación en solución de cinco minutos con PNGasa F en formato de placa para PCR de 96 pocillos libera los N-glucanos y está habilitada por un reactivo de desnaturalización que mejora la exposición de los sitios de glucosilación en N para lograr una rápida escisión enzimática a una temperatura elevada.

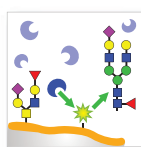
Tras la rápida conversión de las glucosilaminas ($-NH_2$) a su forma con el extremo reductor libre ($-OH$), los N-glucanos se depositan en una matriz de limpieza en un formato de placa de filtración al vacío de 96 pocillos. El marcado con APTS Express de N-glucanos por aminación reductora (una hora) se realiza en la matriz de limpieza, eliminando la necesidad de secar las muestras de glucanos antes del marcado, como se hace en los flujos de trabajo convencionales con APTS. Después del marcado, el marcador APTS libre y otros componentes de la reacción se eliminan de los glucanos marcados con APTS unidos a la matriz, seguido de la elución de las muestras de N-glucanos marcados con APTS en agua. El flujo de trabajo con APTS se sustenta en una gama de patrones de migración marcados con APTS, N-glucanos individuales y bibliotecas de N-glucanos⁵, y exoglucosas.

Flujos de trabajo de preparación de muestras de N-glucanos con APTS

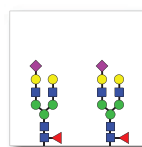
Agilent GlykoPrep con APTS
Tiempo total aprox. de 4–5 horas
 Desglucosilación en matriz
 Marcado en solución
 Limpieza en matriz
 Formato preparado para automatización



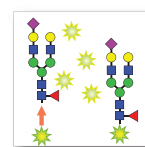
Desnaturalización
5 min



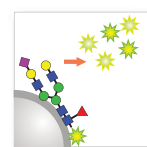
Desglucosilación
15 a 60 min



Secado
30 a 60 min

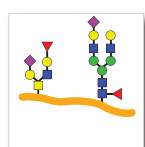


Marcado
60 min

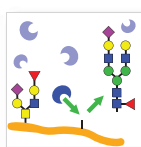


Limpieza
15 a 30 min

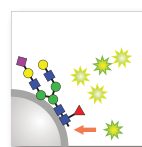
Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express
Tiempo total aprox. de 2,5 horas
 Desglucosilación en solución
 Marcado y limpieza en matriz
 Formato preparado para automatización



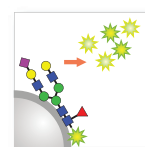
Desnaturalización
3 min



Desglucosilación
5 min



Marcado
60 min
Sin secado



Limpieza
15 a 30 min



• Fase sólida
• Por vacío

Figura 1. Flujos de trabajo de preparación de muestras de N-glucanos: Agilent GlykoPrep con APTS y Agilent AdvanceBio Gly-X de nueva generación con APTS Express.

Métodos y materiales

Preparación de muestras

Las muestras de N-glucanos de MabThera, lote núm. H0102B03 (rituximab) y Enbrel lote núm. R170724 (etanercept) se prepararon con el kit Agilent AdvanceBio Gly-X de preparación de N-glucanos con APTS Express (GX96-APTS) y el kit Agilent GlykoPrep de preparación rápida de N-glucanos con APTS (GP96NG-APTS), siguiendo los protocolos estándar recomendados, usando 40 µg de proteína por preparación con Gly-X, y 50 µg de proteína con GlykoPrep.

Separaciones por CE

Los N-glucanos marcados con APTS se separaron mediante:

- Sistema Agilent Gly-Q (anteriormente ProZyme) de análisis de glucanos con detección de fluorescencia inducida por LED (LEDIF), Ex/Em (nm) 310/>385 (código de producto GQ2100), con inyección electrocinética y separación de dos minutos.
- Sistema Sciex PA800-plus de CE con detección por fluorescencia inducida por láser (LIF), Ex/Em (nm) 488/520. Capilar N-CHO, longitud hasta la ventana: 50 cm; longitud total: 60 cm. Electrolito: Tampón de separación de carbohidratos. Presión de inyección de la muestra: 0,5 psi durante 10 segundos. Tensión y tiempo de separación: 30 kV durante 27 minutos, temperatura del cartucho: 20 °C.

UHPLC-HILIC

La separación por cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC) de glucanos marcados con APTS con detección de fluorescencia (FLD) se llevó a cabo en una columna Amide (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) a una temperatura de columna de 60 °C y un gradiente del 30 % al 60 % de formiato de amonio 50 mM con pH 4,4, entre 2 y 50 minutos a un flujo de 0,4 ml/min.

Los glucanos marcados se controlaron mediante FLD, Ex/Em (nm) 473/520.

Las asignaciones de glucanos se realizaron mediante comparación con los datos existentes de Agilent y los de la bibliografía⁶.

Tratamiento con sialidasa A de los glucanos marcados con APTS Express

En una placa para PCR, se añadió 1 µl de sialidasa A (GK80040) a 75 µl de glucanos marcados con APTS de Gly-X y se incubó a 50 °C durante 10 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se inyectaron en el sistema Gly-Q de CE.

Resultados y comentarios

Rendimiento del APTS Express

Con APTS Express la cantidad de muestra recomendada es de 10 a 40 µg. Se observaron perfiles de glucanos similares en el intervalo de 1 a 200 µg para MabThera y de 10 a 200 µg para Enbrel (datos no mostrados).

La limpieza para APTS Express elimina más del 99 % del reactivo de tinción libre (datos no mostrados) y minimiza el sesgo para glucanos individuales (Figura 2). La limpieza también preserva las formas de glucanos sialilados, como se muestra en la Figura 3.

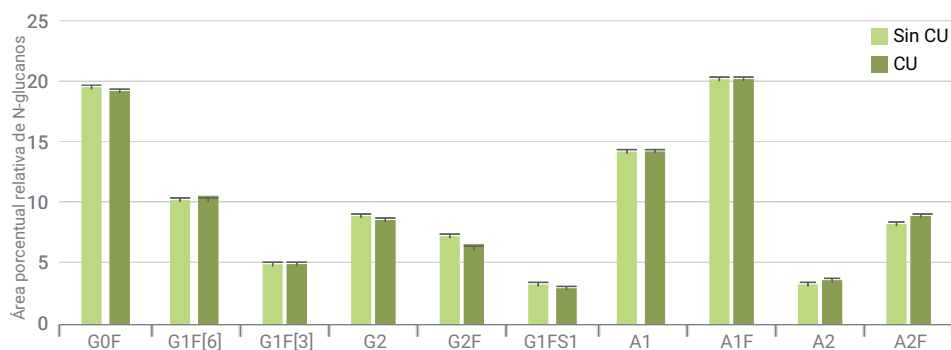


Figura 2. Flujos de trabajo de preparación de muestras de N-glucanos: Agilent GlykoPrep con APTS y Agilent AdvanceBio Gly-X de nueva generación con APTS Express.

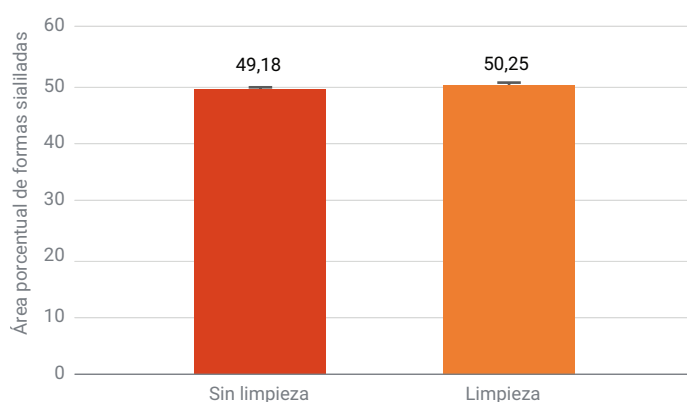


Figura 3. Conservación de las formas sialiladas. Los N-glucanos de Enbrel marcados con APTS se analizaron por UPLC, y se comparó el área porcentual relativa total de las formas sialiladas con y sin limpieza.

La reproducibilidad se evaluó preparando seis réplicas de MabThera y separando con el sistema Agilent Gly-Q (Figura 4). Para los principales picos de glucanos, el %CV fue inferior al 3 %.

Separaciones por CE

Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express es un kit de formato abierto que permite la separación en una variedad de sistemas de CE.

Los N-glucanos de Rituxan y Enbrel se separaron en el sistema Agilent Gly-Q de CE (Figuras 5A y 6A) y Sciex PA800 plus (Figuras 5B y 6B).

El módulo AdvanceBio Gly-X de eliminación del APTS elimina más del 99 % del reactivo de tinción libre, lo que permite una separación limpia en la primera parte del análisis.

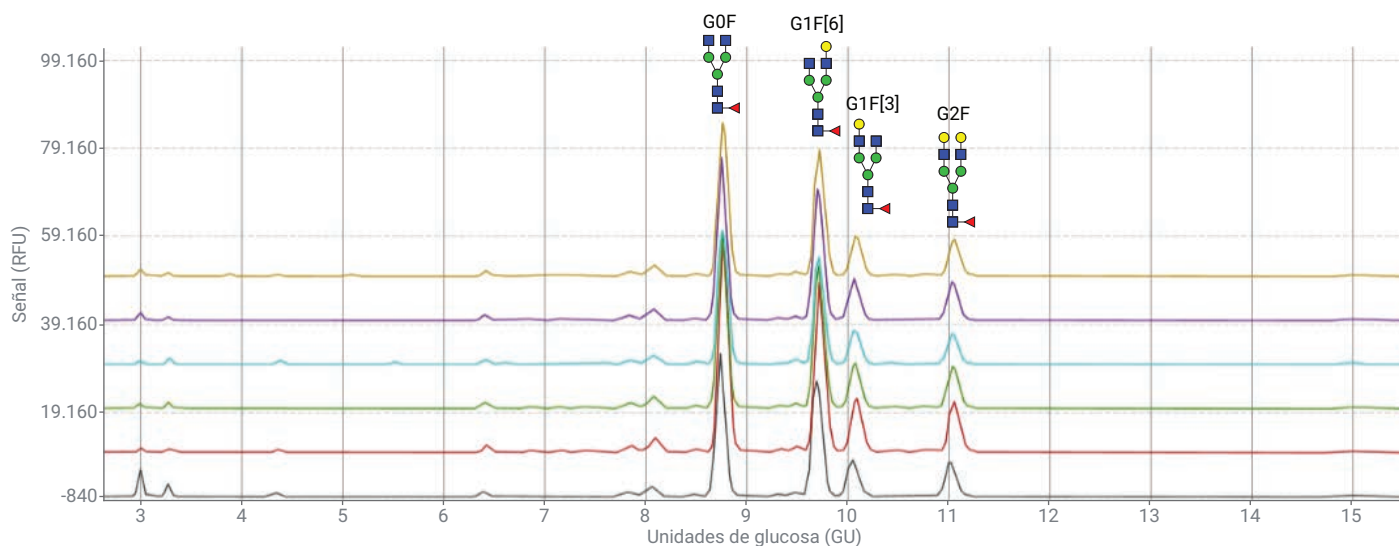


Figura 4. Reproducibilidad del kit Agilent Gly-X APTS Express. Se prepararon seis réplicas de MabThera y se separaron en el sistema Agilent Gly-Q de CE, mostrado en (A). El área porcentual relativa y el %CV de los principales picos de glucanos se muestran en (B).

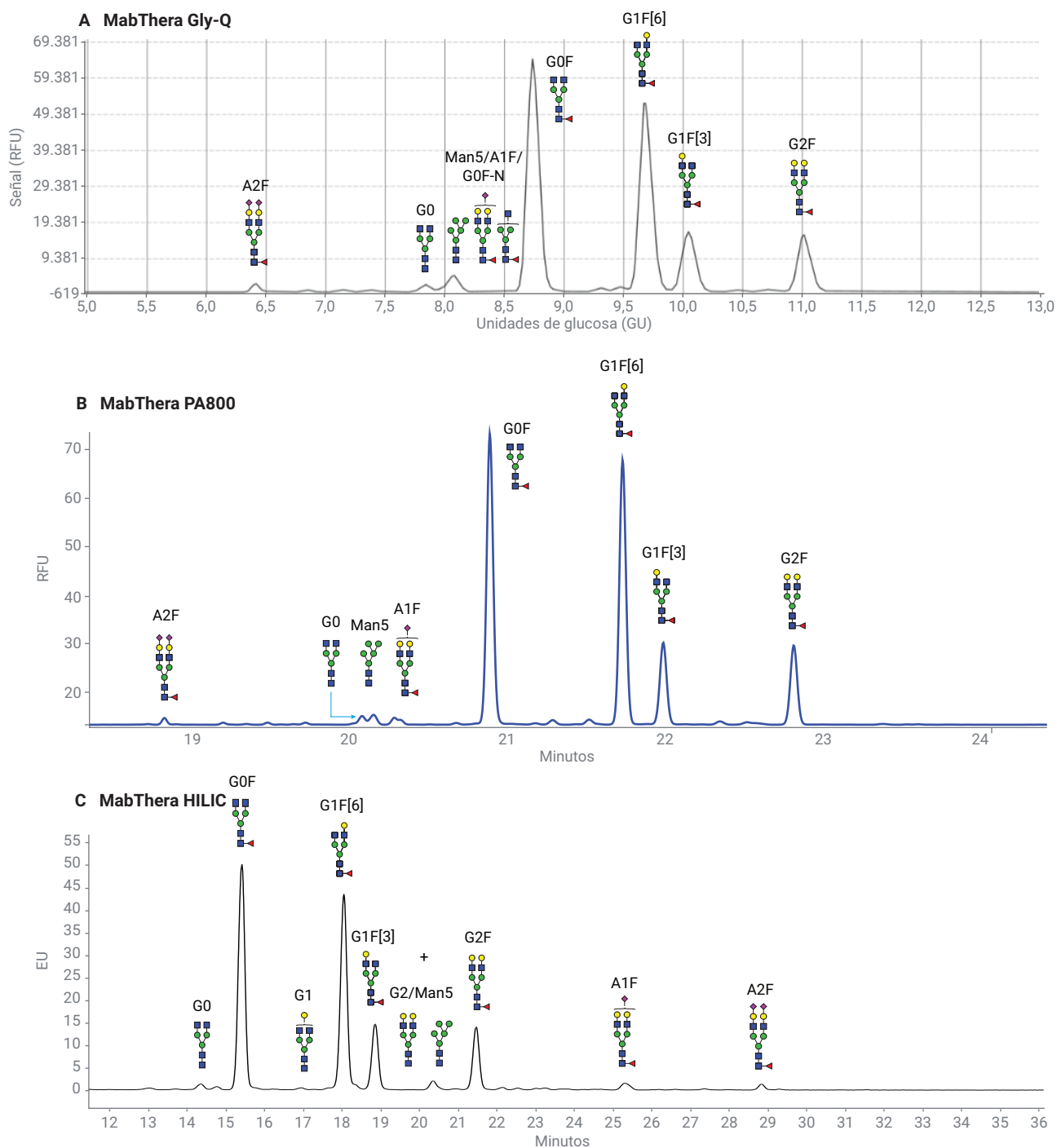


Figura 5. N-glucanos de MabThera preparados con Agilent Gly-X APTS Express, separados por: A) CE en un sistema Agilent Gly-Q, B) CE en un sistema PA800 plus y C) UHPLC-HILIC.

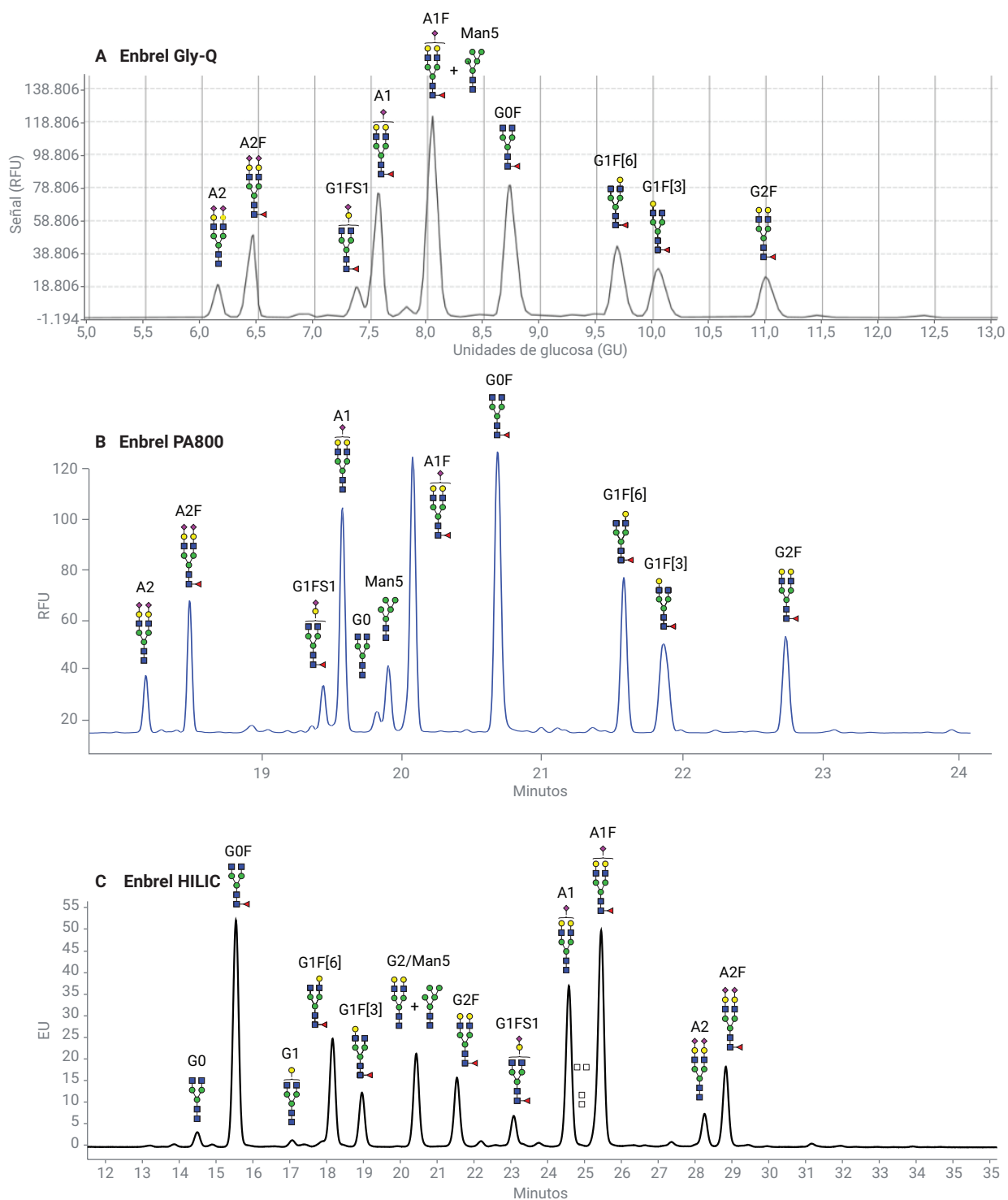


Figura 6. N-glucanos de Rituxan preparados con Agilent Gly-X APTS Express, separados por: A) CE en un sistema Agilent Gly-Q, B) CE en un sistema PA800 plus y C) UHPLC-HILIC.

Separación por UHPLC-HILIC

En las Figuras 5C y 6C se muestran, respectivamente, ejemplos de N-glucanos de MabThera y Enbrel marcados con AdvanceBio APTS Express y separados por HILIC.

Los glucanos marcados con APTS pueden separarse por HILIC en instrumentos de UHPLC o HPLC. Sin embargo, los picos de los glucanos marcados con APTS son más amplios que con otros reactivos de tinción de N-glucanos que se utilizan más regularmente para HILIC (por ejemplo, InstantPC y 2-AB). Puede ser necesario un gradiente en HILIC que comience con un porcentaje más bajo de disolvente orgánico, ya que los glucanos marcados con APTS son más polares y, por lo tanto, se retienen más durante la HILIC que los glucanos marcados con 2-AB y glucanos marcados con otros reactivos de tinción.

Tratamiento con sialidasa A de los glucanos marcados con APTS Express

La sialidasa A (GK80040) libera el ácido siálico enlazado a través de $\alpha(2,3)$, $\alpha(2,6)$, $\alpha(2,8)$ y $\alpha(2,9)$ de los glucanos marcados con APTS, y puede ayudar en la asignación de los picos.

Un tratamiento con sialidasa A de 10 minutos de los N-glucanos de Enbrel hace que los picos de las formas sialiladas en el electroferograma de Gly-Q se muevan a una posición neutra (Figura 8). Por ejemplo, A2F se desplaza a G2F, y A1F se desplaza a G1F.

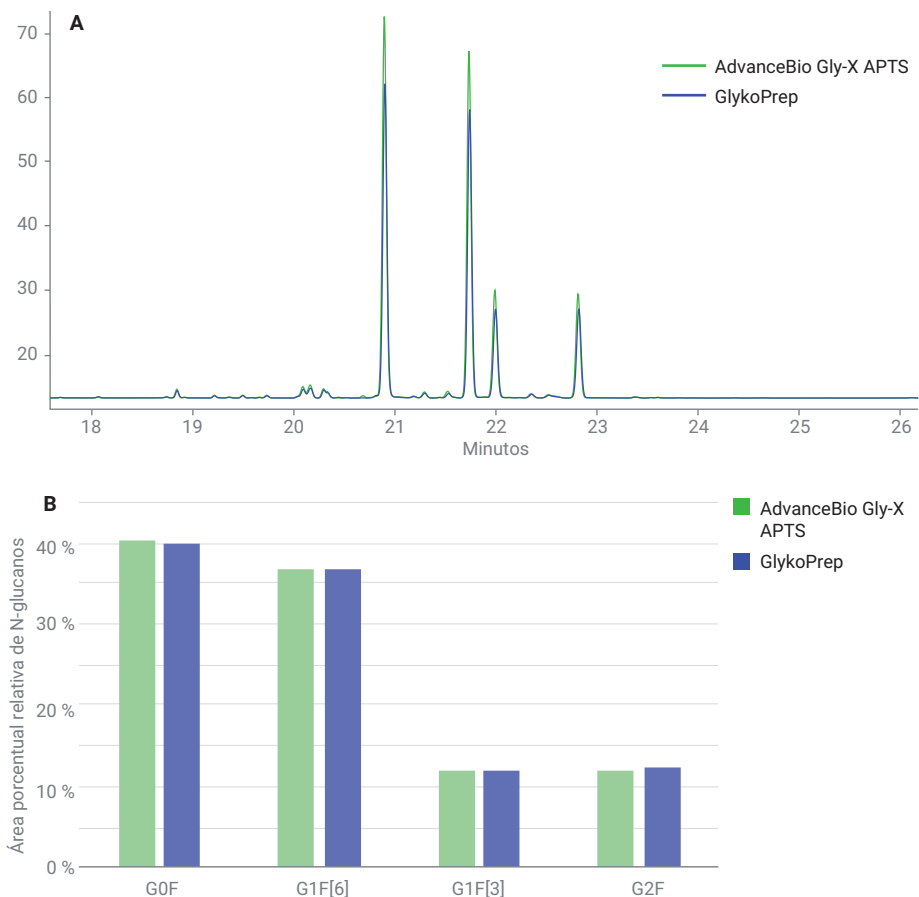


Figura 7. Comparación de los N-glucanos marcados con Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express y Agilent GlykoPrep APTS. Los N-glucanos marcados de MabThera fueron preparados y separados en un sistema PA800 plus.

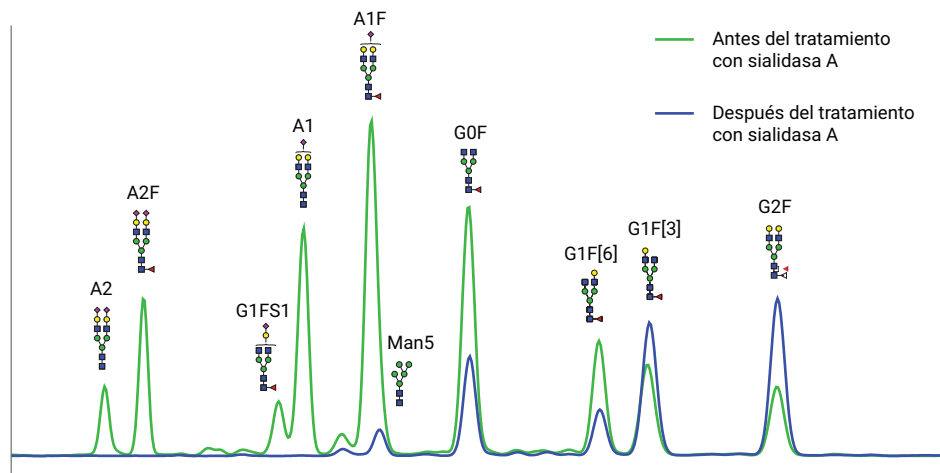


Figura 8. Separación en Agilent Gly-Q de N-glucanos marcados con APTS de Enbrel antes y después de la digestión con sialidasa A durante 10 minutos.

Conclusión

El kit Agilent AdvanceBio Gly-X para el marcado con APTS Express de N-glucanos liberados ofrece resultados reproducibles y fiables que pueden compararse directamente con datos históricos, por ejemplo, Agilent GlykoPrep con APTS. El uso del marcador APTS establecido garantiza la continuidad de los datos para los proyectos en curso.

AdvanceBio Gly-X con APTS Express ofrece un flujo de trabajo rápido (aproximadamente 2,5 horas) con el marcador APTS convencional sin necesidad de largos pasos de secado, lo que acelera la obtención de resultados. Los datos obtenidos con el kit AdvanceBio Gly-X para la preparación de N-glucanos con APTS Express son comparables a los obtenidos con el kit GlykoPrep de preparación rápida de N-glucanos con APTS. El kit de CE de formato abierto permite la solución AdvanceBio Gly-X de marcado con APTS Express de próxima generación en otros instrumentos de CE, y para la separación por UHPLC-HILIC.

Referencias

1. Planinc, A.; *et al.* Glycan Characterization of Biopharmaceuticals: Up-Dates and Perspectives. *Anal. Chim. Acta.* **2016**, 19 de mayo, 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
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

DE.5904166667

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.