

Développement d'un flux de travail rapide de préparation d'échantillons pour la libération et le marquage APTS de N-Glycanes

Auteurs

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

Aarti Jashnani
Bristol-Myers Squibb
Redwood City, CA

Résumé

Les groupements N-glycane des agents biothérapeutiques peuvent affecter leur immunogénicité, leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique si bien qu'il est essentiel de caractériser ces groupements dans le cadre du processus de développement. Une approche courante consiste à dériver par voie enzymatique les N-glycanes libérés avec un colorant fluorescent afin de séparer et de détecter le mélange de glycanes et d'évaluer ainsi leur distribution relative. Pour la séparation par électrophorèse capillaire (CE), le colorant à charge négative 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonate (APTS) est souvent utilisé afin de permettre la migration des espèces de glycanes neutres. Avec les méthodes traditionnelles, la préparation de N-glycanes marqués à l'APTS nécessite souvent un grand nombre d'heures, voire même plusieurs jours de travail.

Nous présentons ici un flux de travail avec APTS qui vient s'ajouter à la plateforme de préparation Agilent AdvanceBio des Gly-X N-Glycanes (antérieurement ProZyme), où les N-glycanes marqués à l'APTS sont prêts pour l'analyse CE ou UHPLC en ~2,5 heures. Les séparations de glycanes de Rituxan et d'Embril marqués à l'APTS sont montrées sur deux plateformes CE et UHPLC-HILIC.

Introduction

Plus de 60 % des agents biothérapeutiques sont glycosylés¹. C'est le cas notamment des anticorps monoclonaux (mAb), des protéines de fusion Fc, des facteurs de coagulation et de cytokines telles que l'érythropoïétine. La structure des N-glycosylés peut jouer un rôle déterminant dans la pharmacologie des protéines thérapeutiques susceptible d'affecter l'immunogénicité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie^{2,3}. Il est donc essentiel de caractériser les N-glycanes dans le cadre du processus de développement des agents biothérapeutiques. Les N-Glycanes ne contiennent pas de chromophore ou de fluorophore qui puisse être détecté en ligne. Par conséquent, pour la séparation par CE, ils sont couramment dérivatisés avec des marqueurs fluorescents tels que l'APTS par amination réductrice après libération enzymatique par

PNGase F. Les méthodes traditionnelles de marquage à l'APTS nécessitent plusieurs étapes dont une de séchage des glycanes libérés avant le marquage, suivi de l'élimination de l'excès d'APTS qui peut prendre des heures, voire même plusieurs jours. La préparation rapide des N-glycanes GlykoPrep avec APTS a simplifié le processus de préparation des échantillons en le ramenant à quatre ou cinq heures.⁴ La préparation de N-glycanes avec Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express (anciennement ProZyme) est un flux de travail simplifié où les échantillons sont typiquement prêts à être analysés en 2,5 heures (figure 1). Une déglycosylation de cinq minutes en solution avec PNGase F dans une plaque de PCR à 96 puits libère les N-glycanes grâce à un réactif de dénaturation qui améliore l'exposition des sites de N-glycosylation pour un clivage enzymatique rapide à une température élevée..

Suite à la conversion rapide des glycosylamines ($-NH_2$) en une forme comportant une extrémité réductrice libre ($-OH$), les N-glycanes sont chargés sur une matrice de purification dans un format de plaque de filtration sous vide à 96 puits. Le marquage Express à l'APTS des N-glycanes par amination réductrice (une heure) est réalisé sur la matrice de purification, éliminant ainsi le besoin de sécher les échantillons de glycanes avant le marquage, comme c'est le cas dans les flux de travail traditionnels avec l'APTS. Après le marquage, l'APTS libre et d'autres composants de la réaction sont éliminés par lavage des glycanes marqués à l'APTS liés à la matrice, et les échantillons de N-glycanes marqués à l'APTS sont élués avec de l'eau. Le flux de travail avec APTS utilise des étalons de migration marqués à l'APTS, des N-glycanes individuels et des banques de N-glycanes⁵ ainsi que des exoglycosidases.

Flux de travail de préparation des échantillons de N-Glycanes marqués à l'APTS

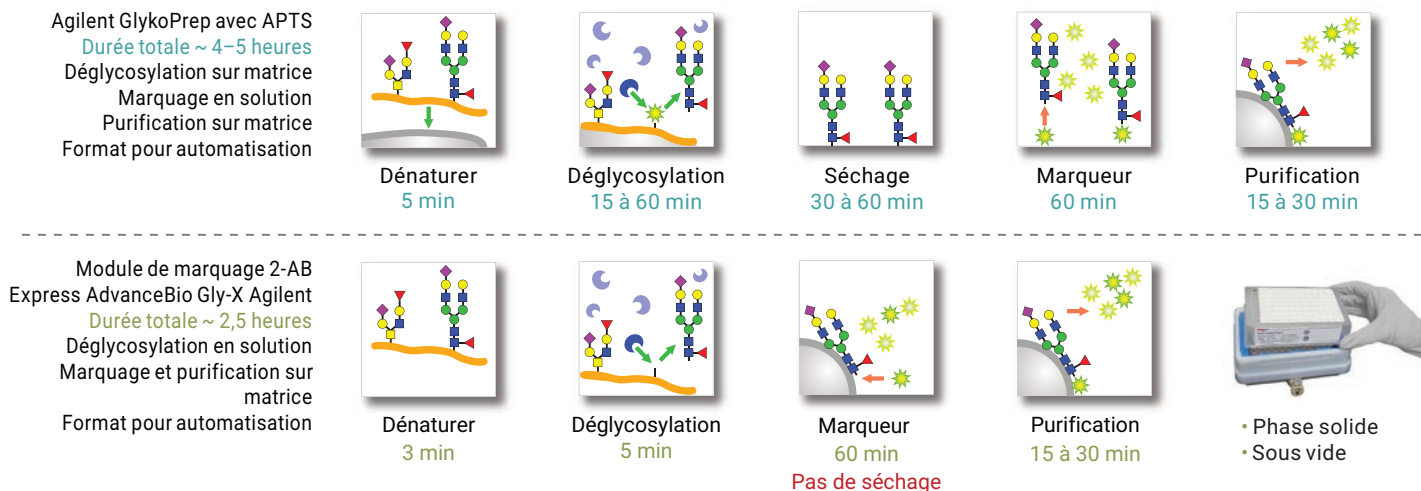


Figure 1. Flux de travail de préparation des échantillons de N-glycanes : Agilent GlykoPrep avec APTS, et le module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X Agilent nouvelle génération.

Méthodes et matériaux

Préparation des échantillons

Des échantillons de N-Glycanes de MabThera lot n° H0102B03 (rituximab) et d'Enbrel lot n° R170724 (étanercept) ont été préparés avec le kit Agilent de préparation de N-glycanes AdvanceBio Gly-X avec APTS Express (GX96-APTS) et la préparation rapide des N-glycanes GlykoPrep avec APTS Agilent (GP96NG-APTS) selon les protocoles standard recommandés, en utilisant 40 µg de protéines par préparation Gly-X et 50 µg de protéines pour Agilent GlykoPrep.

Séparations par CE

Les N-glycanes marqués à l'APTS ont été préparés par :

- Le système d'analyse des glycanes Agilent Gly-Q (anciennement ProZyme) avec détection par fluorescence induite par LED (LEDIF), Ex/Em (nm) 310/>385 (code produit GQ2100), avec injection électrocinétique et séparation de deux minutes.
- Système de CE Sciex PA800-plus avec détection par fluorescence induite par laser (LIF), Ex/Em (nm) 488/520. Capillaire N-CHO, longueur jusqu'à la fenêtre : 50 cm ; longueur totale : 60 cm. Électrolyte : Tampon de séparation à base de glucides. Pression d'injection des échantillons : 0,5 psi pendant 10 secondes. Tension de séparation et durée : 30 kV pendant 27 minutes, température de la cartouche : 20 °C.

UHPLC-HILIC

La séparation par chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) des glycanes marqués à l'APTS avec détection de fluorescence (FLD) a été réalisée sur une colonne amide (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) à une température de colonne de 60 °C avec un gradient de 30 à 60 % de formate d'ammonium 50 mM, pH 4,4, pendant 2 à 50 minutes à un débit de 0,4 mL/min.

Les glycanes marqués ont été contrôlés par FLD, Ex/Em (nm) 473/520.

Les glycanes ont été attribués par comparaison aux données existantes d'Agilent et de la littérature.⁶

Traitement par sialidase A de glycanes marqués à l'APTS Express

Sur une plaque PCR, 1 µL de sialidase A (GK80040) a été ajouté à 75 µL de glycanes Gly-X marqués à l'APTS et le tout incubé à 50 °C pendant 10 minutes. Une fois refroidis, les échantillons ont été injectés sur un système de CE Gly-Q.

Résultats et discussion

Performance de l'APTS Express

L'apport d'échantillon recommandé pour l'APTS Express est de 10 à 40 µg. Des profils de glycanes similaires ont été observés dans la plage de 1 à 200 µg pour MabThera et de 10 à 200 µg pour Enbrel (données non présentées).

La purification de l'APTS Express élimine >99 % de colorant libre (données non présentées) et minimise le biais pour les glycanes individuels (figure 2). La purification préserve également les espèces de glycanes sialylées, comme le montre la figure 3.

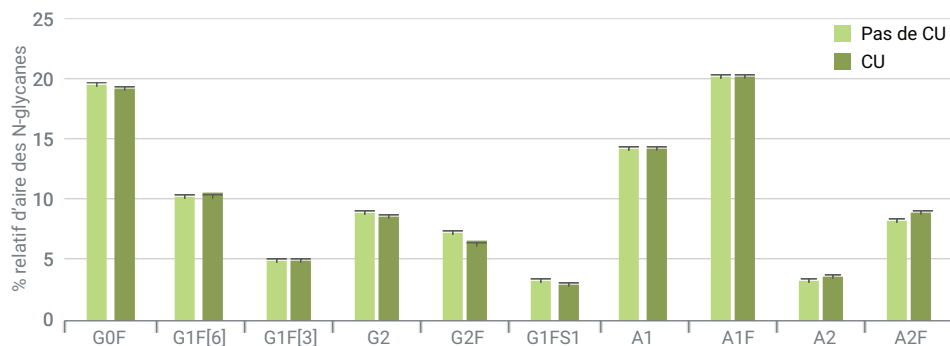


Figure 2. Flux de travail de préparation des échantillons de N-glycanes : Agilent GlykoPrep avec APTS, et le module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X Agilent nouvelle génération.

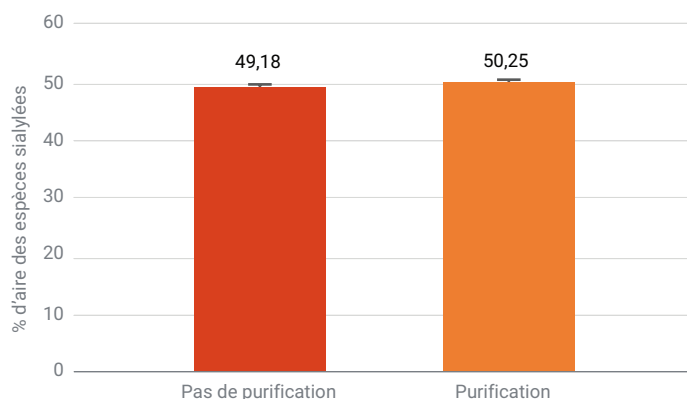


Figure 3. Préservation des espèces sialylées. Les N-glycanes d'Enbrel marqués à l'APTS ont été mesurés par UPLC, et la somme des % relatifs d'aire des espèces sialylées a été comparée avec et sans purification.

La reproductibilité a été évaluée en préparant six répliques de MabThera et en réalisant la séparation avec le système Agilent Gly-Q (figure 4). Pour les principaux pics de glycanes, le % de CV était inférieur à 3 %.

Séparations par CE

Agilent AdvanceBio Gly-X avec APTS Express est un kit à format ouvert qui permet la séparation sur différents systèmes de CE.

Les N-Glycanes de Rituxan et d'Enbrel ont été séparés sur les systèmes de CE Agilent Gly-Q (figures 5A et 6A) et Sciex PA800 plus (figures 5B et 6B).

Le module de traitement APTS AdvanceBio Gly-X élimine >99 % du colorant libre et permet une séparation propre en début d'analyse.

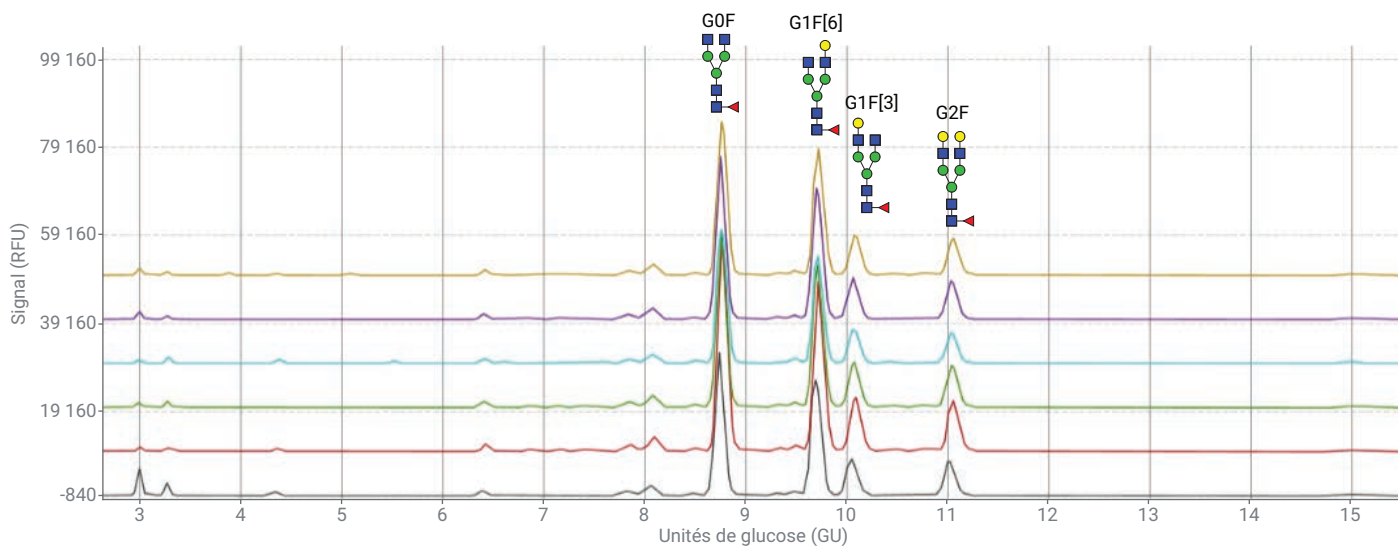


Figure 4. Reproductibilité d'Agilent Gly-X APTS Express. Six répliques de MabThera ont été préparées et séparées sur un système Agilent Gly-Q CE, comme indiqué en (A). Le % relatif d'aire et le % de CV des principaux pics de glycanes sont présentés en (B).

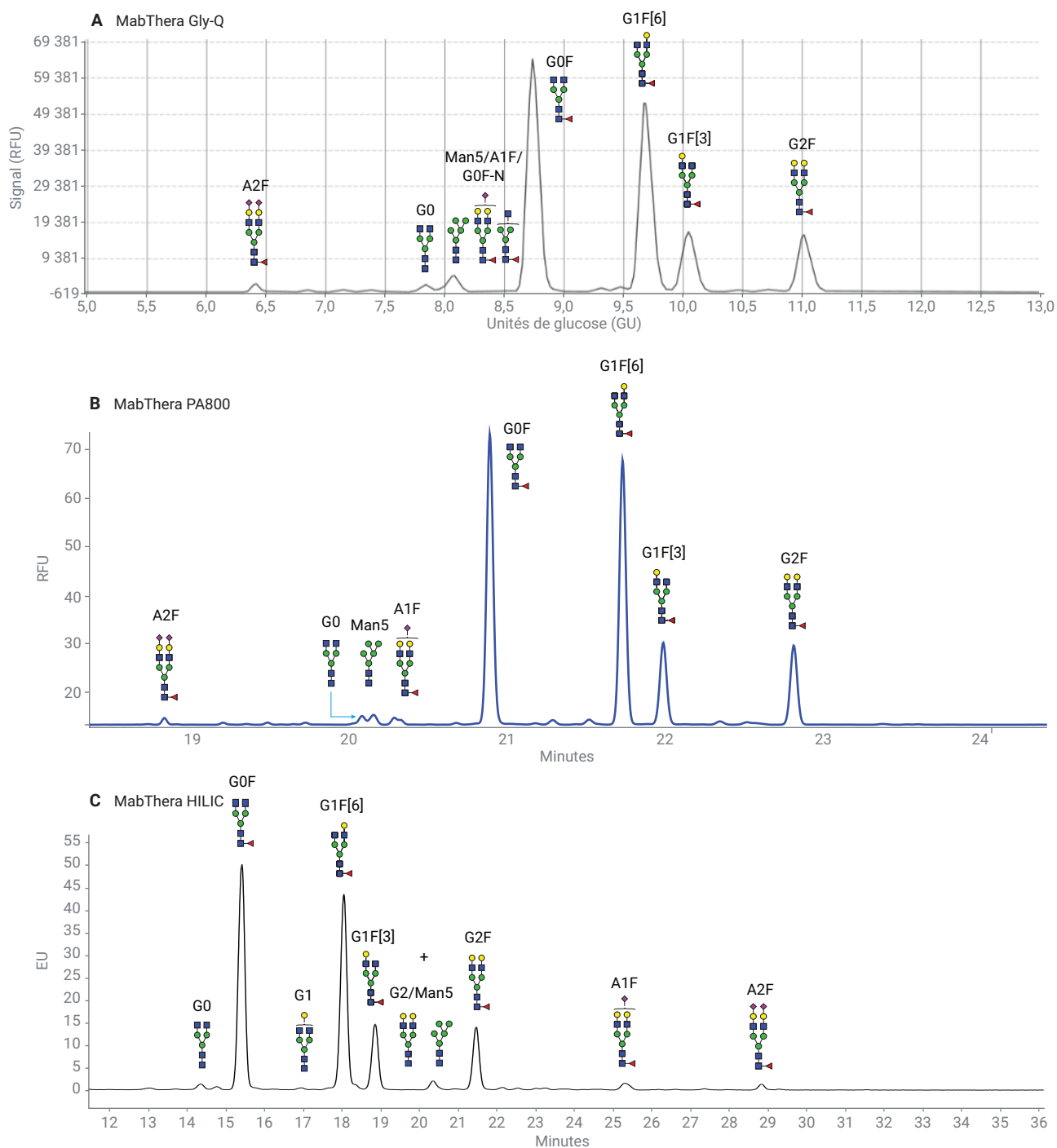


Figure 5. N-glycans de MabThera préparés avec Agilent Gly-X APTS Express, séparés par : A) CE sur un système Agilent Gly-Q, B) CE sur un système PA800 plus et C) sur UHPLC-HILIC.

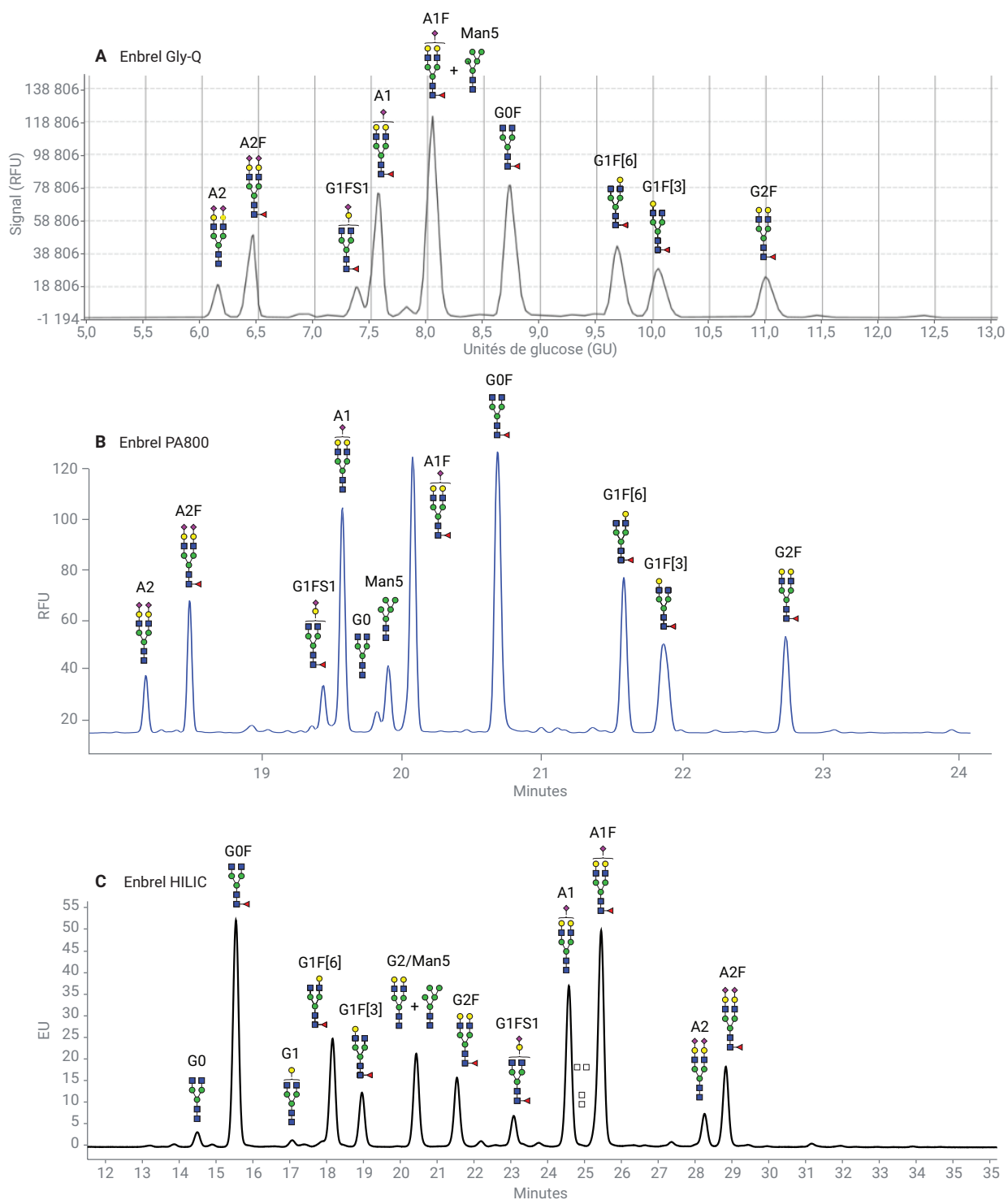


Figure 6. N-glycane de Rituxan préparés avec Agilent Gly-X APTS Express, séparés par : A) CE sur un système Agilent Gly-Q, B) CE sur un système PA800 plus et C) sur UHPLC-HILIC.

Séparation par UHPLC-HILIC

Des exemples de N-glycanes de MabThera et d'Enbrel marqués avec AdvanceBio APTS Express et séparés par HILIC sont présentés dans les figures 5C et 6C, respectivement.

Les glycanes marqués à l'APTS peuvent être séparés par HILIC sur des instruments UHPLC ou HPLC. Cependant, les pics de glycanes marqués à l'APTS sont plus larges qu'avec d'autres colorants de N-glycanes plus couramment utilisés pour la HILIC (par exemple, InstantPC, et 2-AB). Un gradient de HILIC commençant à un pourcentage organique plus faible peut être nécessaire car les glycanes marqués à l'APTS sont plus polaires, et donc retenus plus longtemps pendant la HILIC que 2-AB et les glycanes marqués avec d'autres colorants.

Traitement par sialidase A de glycanes marqués à l'APTS Express

La sialidase A (GK80040) libère l'acide sialique lié à $\alpha(2,3)$ -, $\alpha(2,6)$ -, $\alpha(2,8)$ - et $\alpha(2,9)$ des glycanes marqués à l'APTS et peut faciliter l'attribution des pics.

Un traitement de sialidase A de 10 minutes des N-glycanes d'Enbrel provoque la migration des pics sialylés vers une position neutre sur l'électrophérogramme Gly-Q (figure 8). Par exemple, A2F migre à G2F, et A1F migre à G1F.

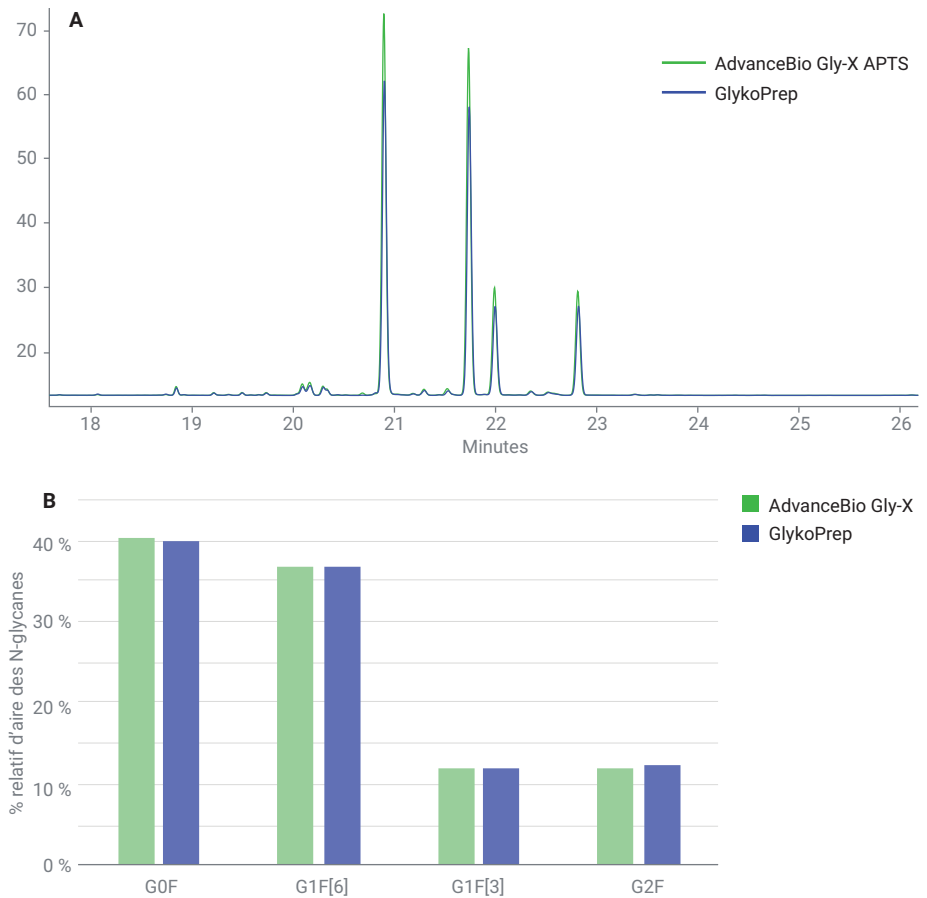


Figure 7. Comparaison de N-glycanes marqués avec le module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X Agilent et avec Agilent GlykoPrep APTS. Les N-glycanes de MabThera marqués ont été préparés et séparés sur un système PA800 plus.

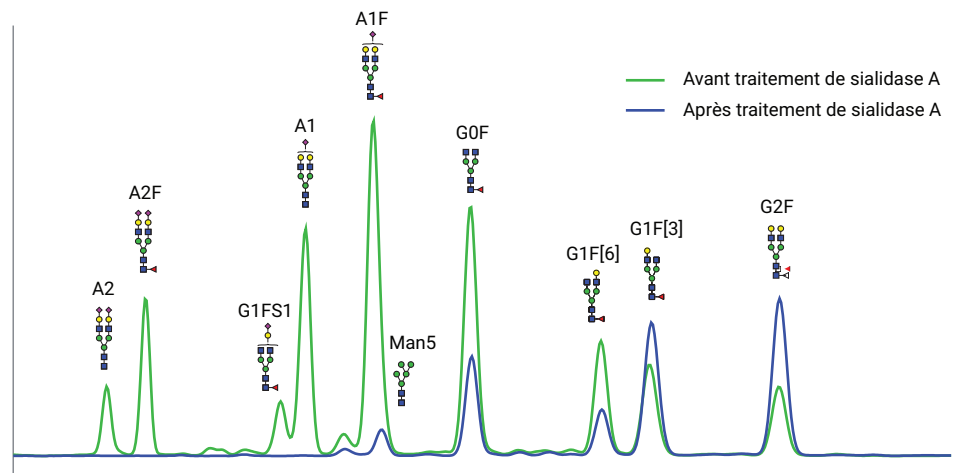


Figure 8. Séparation Agilent Gly-Q de N-glycanes d'Enbrel marqués à l'APTS avant et après 10 minutes de digestion par sialidase A.

Conclusion

Le marquage de N-glycanes libérés avec Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express donne des résultats reproductibles et fiables pouvant être directement comparés aux données historiques, par exemple, d'Agilent GlykoPrep avec APTS. L'utilisation d'un marqueur APTS établi assure la cohérence des données pour les projets en cours.

Le module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X Agilent offre un flux de travail rapide (~2,5 heures) avec un marquage traditionnel à l'APTS sans la nécessité d'une longue étape de séchage, ce qui permet de réduire le délai d'obtention des résultats. Les données de la préparation de N-glycanes AdvanceBio Gly-X avec APTS Express sont comparables à celles de la préparation rapide des N-glycanes GlykoPrep avec APTS Agilent. Le kit de CE à format ouvert permet un marquage nouvelle génération avec la solution de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X sur d'autres instrument de CE et une séparation par UHPLC-HILIC.

Références

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
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

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.