

Sviluppo di un flusso di lavoro rapido per la preparazione di campioni con APTS per il rilascio e la marcatura di N-glicani

Autori

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

Aarti Jashnani
Bristol-Myers Squibb
Redwood City, CA

Abstract

I gruppi N-glicanici dei prodotti bioterapeutici possono influenzarne l'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica, rendendo la loro caratterizzazione una parte essenziale del processo di sviluppo. Un approccio comune consiste nel derivatizzare gli N-glicani rilasciati per via enzimatica con un colorante fluorescente per separare e rilevare la miscela di glicani e valutare la distribuzione relativa delle loro specie. Per la separazione mediante elettroforesi capillare (EC), il colorante carico negativamente 8-aminopirene-1,3,6-trisolfonato (APTS) viene usato frequentemente per permettere la migrazione di specie neutre di glicani. Usando i metodi tradizionali, spesso per essere completata la preparazione dei campioni di N-glicani marcati con APTS richiede diverse ore o persino giorni.

Presentiamo un flusso di lavoro con APTS come aggiunta alla piattaforma di preparazione degli N-glicani Agilent AdvanceBio Gly-X (precedentemente ProZyme) dove N-glicani marcati con APTS sono pronti per l'analisi mediante EC o UHPLC in ~2,5 ore. Le separazioni di glicani marcati con APTS da Rituxan ed Enbrel sono mostrate su due piattaforme EC e UHPLC-HILIC.

Introduzione

Oltre il 60% dei farmaci bioterapeutici è glicosilato¹, inclusi anticorpi monoclonali (mAb), proteine di fusione Fc, fattori della coagulazione e citochine come l'eritropoietina. La struttura dei glicani N-linked può giocare un ruolo fondamentale nella farmacologia delle proteine terapeutiche, con possibili effetti sull'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica^{2,3}. Questo rende la caratterizzazione degli N-glicani una parte essenziale del processo di sviluppo dei farmaci bioterapeutici. Gli N-glicani non contengono un cromoforo o fluoroforo adatto alla rilevazione in linea, per cui per la separazione mediante EC essi vengono generalmente derivatizzati con marcatori fluorescenti come l'APTS mediante amminazione riduttiva dopo rilascio enzimatico con PNGase F. I metodi tradizionali di marcatura con

APTS richiedono diversi passaggi, inclusa l'evaporazione dei glicani rilasciati prima della marcatura e la successiva purificazione dell'eccesso di marcatore APTS, che possono richiedere ore se non giorni per essere completati. La preparazione rapida di N-glicani GlykoPrep con marcatura APTS ha semplificato il processo di preparazione dei campioni riducendolo a 4-5 ore.⁴ La preparazione degli N-glicani Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express (precedentemente ProZyme) è un flusso di lavoro semplificato in cui i campioni sono generalmente pronti per l'analisi in 2,5 ore (Figura 1). Una deglicosilazione in soluzione di cinque minuti con PNGase F su una piastra per PCR a 96 pozzetti rilascia N-glicani ed è permessa da un reagente di denaturazione che migliora l'esposizione dei siti di N-glicosilazione per una rapida scissione enzimatica a temperatura elevata.

In seguito alla rapida conversione delle glicosilammine ($-NH_2$) alla loro forma con estremità riducente libera ($-OH$), gli N-glicani sono caricati su una matrice di purificazione in una piastra di filtrazione sotto vuoto a 96 pozzetti. La marcatura APTS Express degli N-glicani mediante amminazione riduttiva (un'ora) viene effettuata sulla matrice di purificazione, eliminando la necessità di essiccare i campioni di glicani prima della marcatura come si faceva nei flussi di lavoro tradizionali con APTS. Dopo la marcatura, il marcatore APTS libero e gli altri componenti della reazione vengono lavati via dai glicani marcati con APTS legati alla matrice; segue poi l'eluizione in acqua dei campioni di N-glicani marcati con APTS. Il flusso di lavoro con APTS è supportato da diversi standard di migrazione marcati con APTS, N-glicani singoli e librerie di N-glicani⁵ ed esoglicosidasi.

Flussi di lavoro per la preparazione di campione di N-glicani con APTS

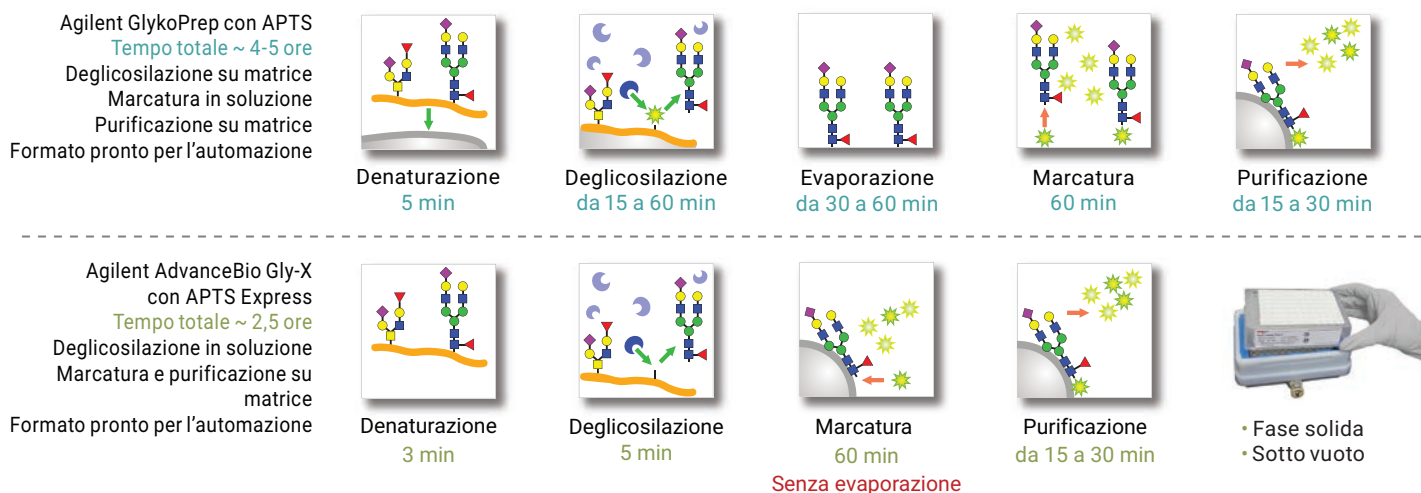


Figura 1. Flussi di lavoro per la preparazione dei campioni di N-glicani: Agilent GlykoPrep con APTS e Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express di nuova generazione.

Materiali e metodi

Preparazione del campione

I campioni di N-glicani ottenuti da MabThera, lotto n. H0102B03 (rituximab) ed Enbrel, lotto n. R170724 (etanercept) sono stati preparati con Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep con APTS Express (GX96-APTS) e Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep con APTS (GP96NG-APTS) seguendo i protocolli consigliati standard, usando 40 µg di proteine per la preparazione di Gly-X e 50 µg di proteine per Agilent GlykoPrep.

Separazioni EC

Gli N-glicani marcati con APTS sono stati separati mediante:

- Sistema di analisi dei glicani Agilent Gly-Q (precedentemente ProZyme) con rilevamento a fluorescenza indotta da LED (LEDIF), Ex/Em (nm) 310/>385 (codice prodotto GQ2100), con iniezione elettrocinetica e separazione in due minuti.
- Sistema EC Sciex PA800-plus con rilevamento a fluorescenza indotta da laser (LIF), Ex/Em (nm) 488/520. Capillare N-CHO, lunghezza alla finestra: 50 cm; lunghezza totale: 60 cm. Elettrolita: tampone di separazione dei carboidrati. Pressione di iniezione del campione: 0,5 psi per 10 secondi. Tensione e tempo di separazione: 30 kV per 27 minuti, temperatura della cartuccia: 20 °C.

UHPLC-HILIC

La separazione mediante cromatografia liquida ad interazione idrofila (HILIC) di glicani marcati con APTS con rivelazione a fluorescenza (FLD) è stata eseguita su una colonna ammidica (2,1 x 150 mm, 1,7 µm) usando una temperatura della colonna di 60 °C e un gradiente da 30 a 60% di formiato di ammonio 50 mM pH 4,4 tra 2 e 50 minuti a un flusso di 0,4 mL/min.

I glicani marcati sono stati monitorati mediante FLD, Ex/Em (nm) 473/520.

Le assegnazioni dei glicani sono state effettuate mediante confronto con i dati Agilent esistenti e con quelli in letteratura.⁶

Trattamento con sialidasi A di glicani APTS Express

In una piastra per PCR è stato aggiunto 1 µL di sialidasi A (GK80040) a 75 µL di glicani marcati con APTS Gly-X, poi incubati a 50 °C per 10 minuti. I campioni sono stati lasciati raffreddare e iniettati nel sistema EC Gly-Q.

Risultati e discussione

Prestazioni di APTS Express

In APTS Express è raccomandata l'introduzione di quantità di campioni comprese tra 10 e 40 µg. Profili di glicani simili sono stati osservati nell'intervallo 1-200 µg per MabThera e 10-200 µg per Enbrel (dati non mostrati).

La purificazione APTS Express rimuove >99% di colorante libero (dati non mostrati) e riduce al minimo la distorsione per i glicani singoli (Figura 2). Inoltre, la purificazione preserva le specie sialilate dei glicani, come evidenziato nella Figura 3.

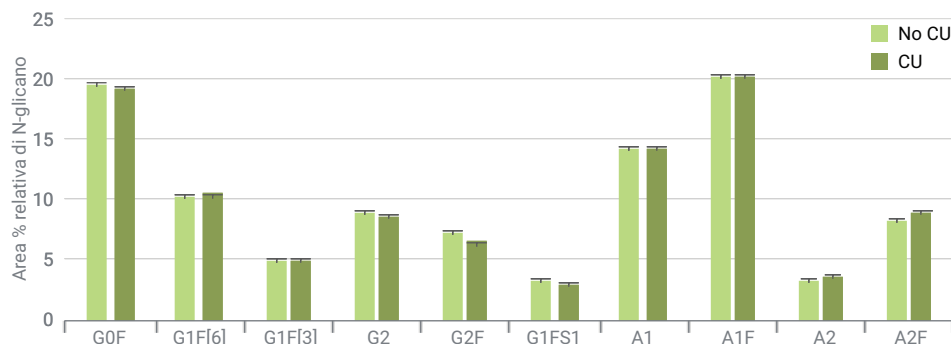


Figura 2. Flussi di lavoro per la preparazione dei campioni di N-glicani: Agilent GlykoPrep con APTS e Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express di nuova generazione.

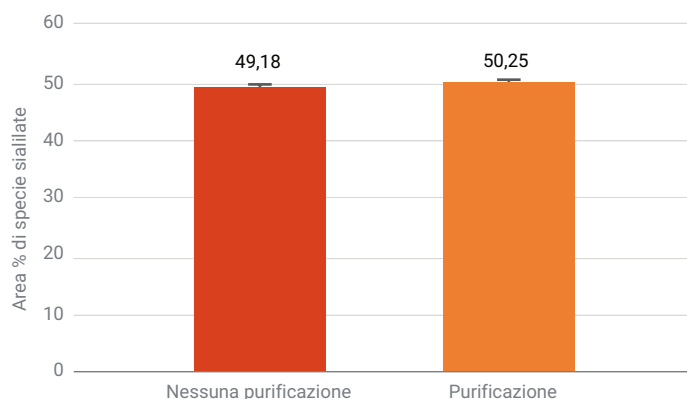


Figura 3. Mantenimento delle specie sialilate. Gli N-glicani APTS di Enbrel sono stati misurati mediante UPLC e l'area % relativa sommata delle specie sialilate è stata confrontata con e senza purificazione.

La riproducibilità è stata valutata preparando sei replicati di MabThera ed effettuando la separazione con il sistema Agilent Gly-Q (Figura 4). Per i picchi principali dei glicani, %CV era inferiore al 3%.

Separazioni EC

Agilent AdvanceBio Gly-X con APTS Express è un kit aperto che permette la separazione su svariati sistemi EC.

Gli N-glicani di Rituxan ed Enbrel sono stati separati sui sistemi EC Agilent Gly-Q (Figure 5A e 6A) e Sciex PA800 Plus (Figure 5B e 6B).

Il modulo di purificazione APTS AdvanceBio Gly-X rimuove >99% del colorante libero e permette una separazione pulita nella parte iniziale dell'analisi.

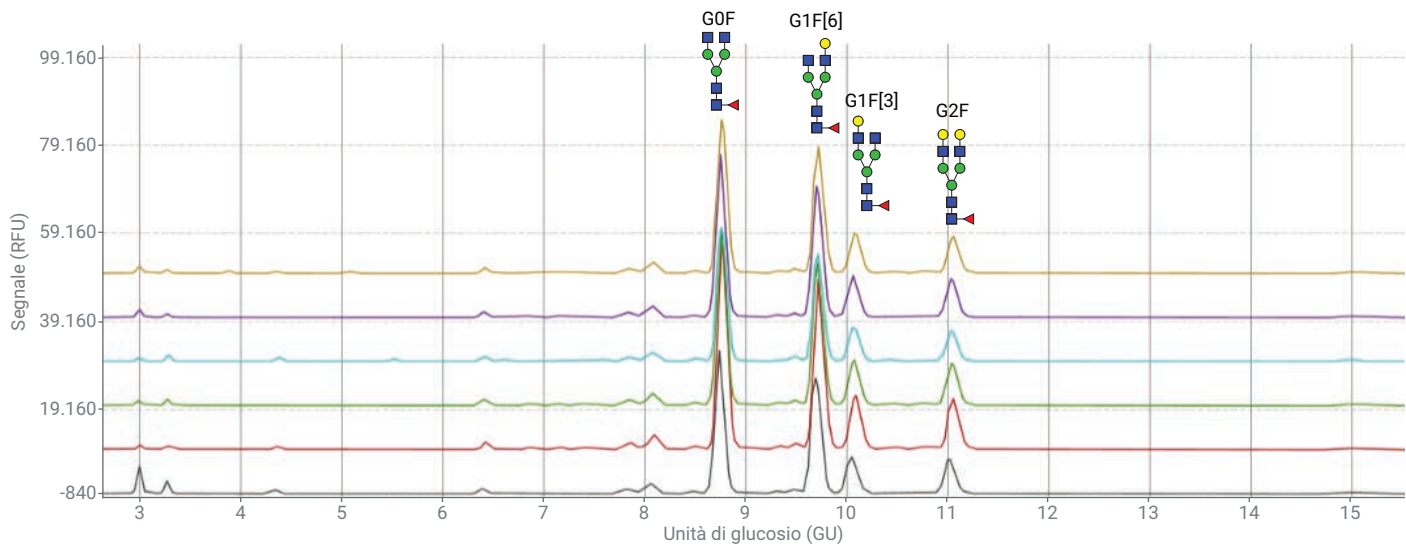


Figura 4. Riproducibilità di Agilent Gly-X APTS Express. Sono stati preparati sei replicati di MabThera, separati sul sistema EC Agilent Gly-Q, mostrati in (A). L'area % relativa e la CV % per i principali picchi di glicani sono mostrate in (B).

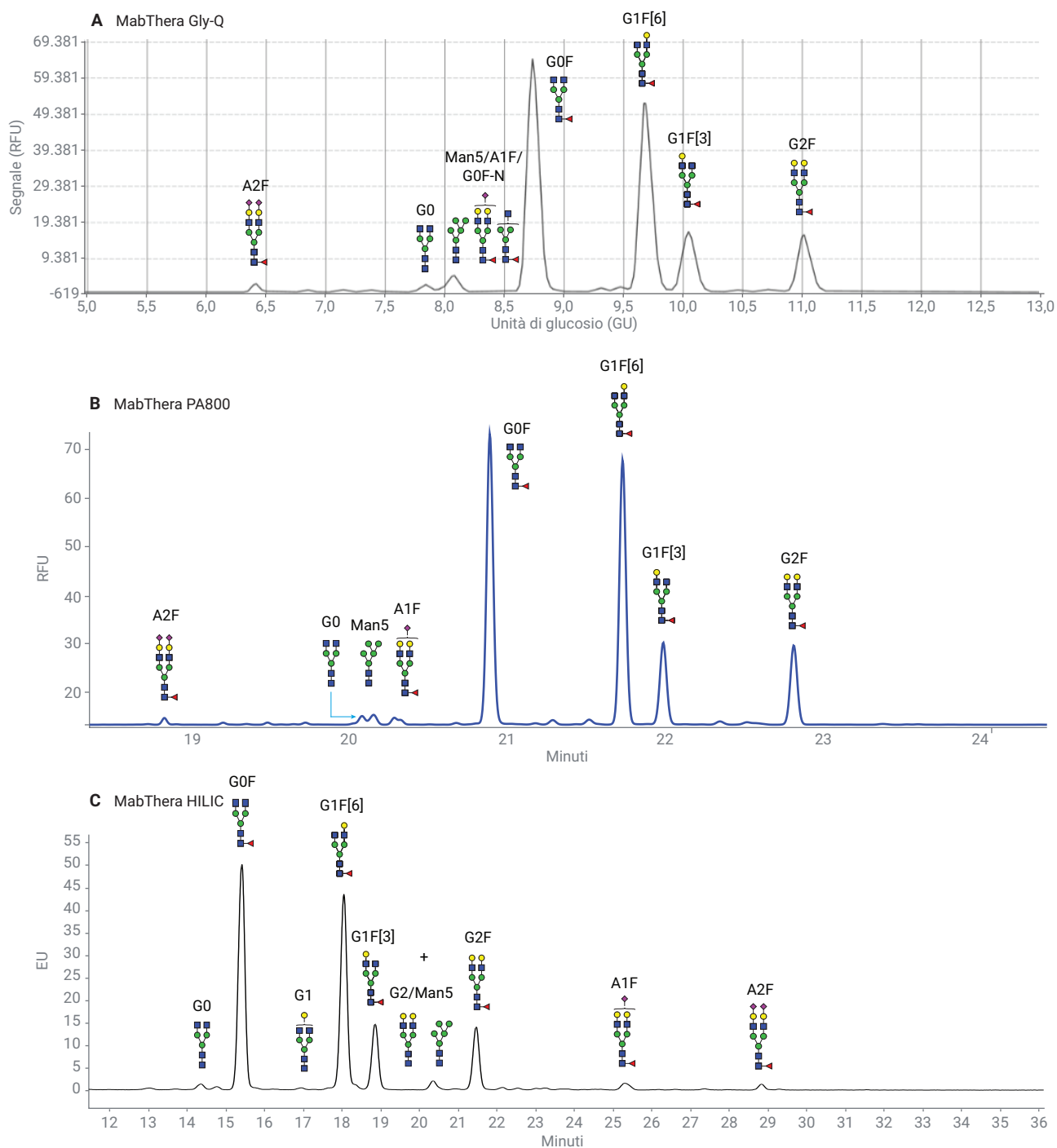


Figura 5. N-glicani di MabThera preparati con Agilent Gly-X APTS Express, separati mediante: A) EC su sistema Agilent Gly-Q, B) EC su PA800 plus e C) UHPLC-HILIC.

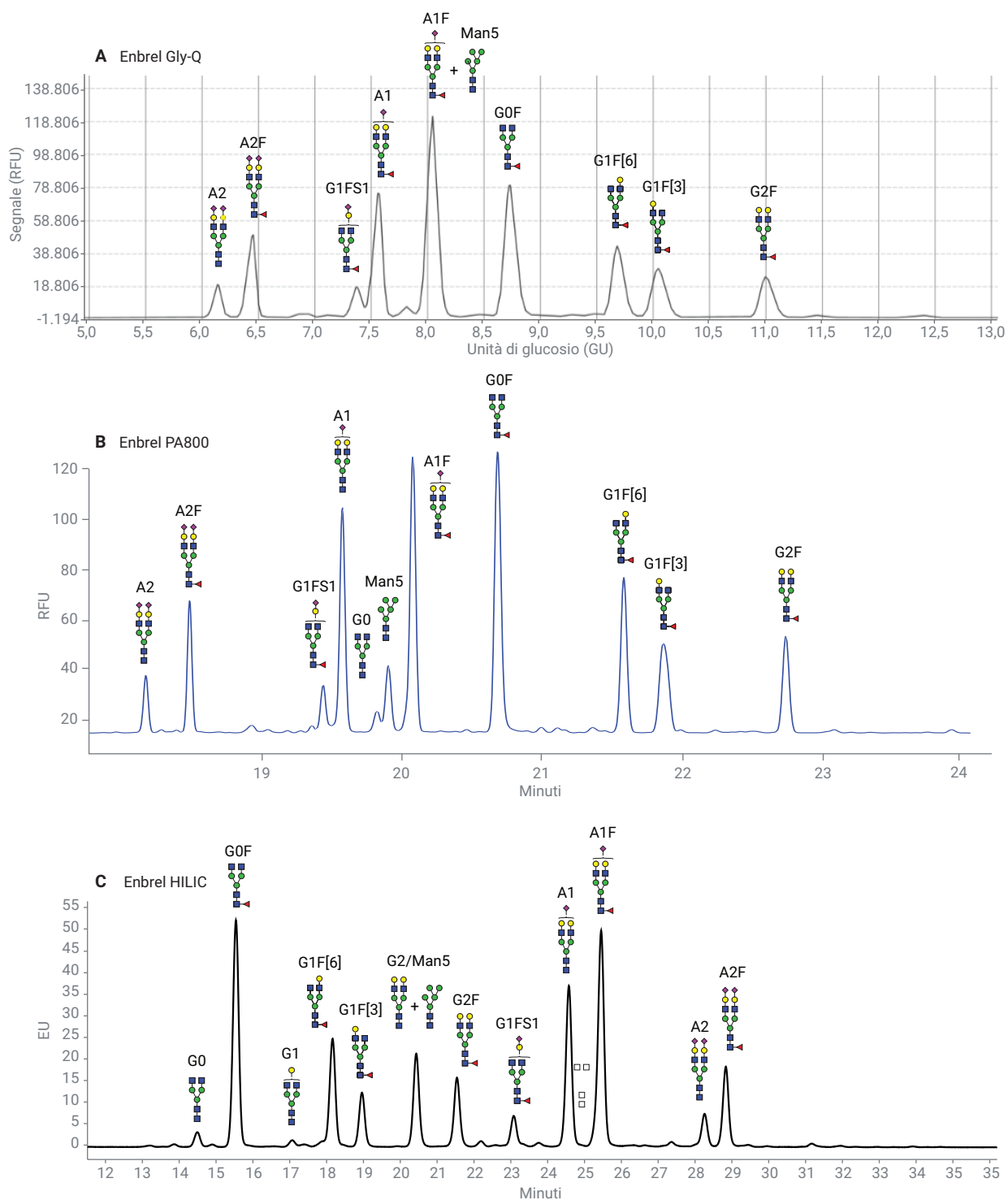


Figura 6. N-glicani di Rituxan preparati con Agilent Gly-X APTS Express, separati mediante: A) EC su sistema Agilent Gly-Q, B) EC su PA800 plus e C) UHPLC-HILIC.

Separazione UHPLC-HILIC

Esempi di N-glicani da MabThera ed Enbrel marcati usando AdvanceBio APTS Express e separati mediante HILIC sono mostrati rispettivamente nelle Figure 5C e 6C.

I glicani marcati con APTS possono essere separati mediante HILIC su strumenti UHPLC o HPLC. I picchi dei glicani APTS, però, sono più larghi che con altri coloranti per N-glicani usati abitualmente per l'HILIC (ad esempio InstantPC e 2-AB). Può essere necessario un gradiente HILIC che inizia con una bassa percentuale di composti organici in quanto i glicani APTS sono più polari e quindi più trattenuti con una HILIC rispetto ai glicani marcati con 2-AB e ai glicani marcati con altri coloranti.

Trattamento con sialidasi A di glicani APTS Express

La sialidasi A (GK80040) rilascia acido sialico $\alpha(2,3)$ -, $\alpha(2,6)$ -, $\alpha(2,8)$ - e $\alpha(2,9)$ -legato dai glicani marcati con APTS e può facilitare l'assegnazione dei picchi.

Il trattamento di 10 minuti con sialidasi A degli N-glicani di Enbrel causa lo spostamento dei picchi sialilati sull'elettroferogramma Gly-Q in posizione neutra (Figura 8). Ad esempio, A2F si sposta in G2F e A1F si sposta in G1F.

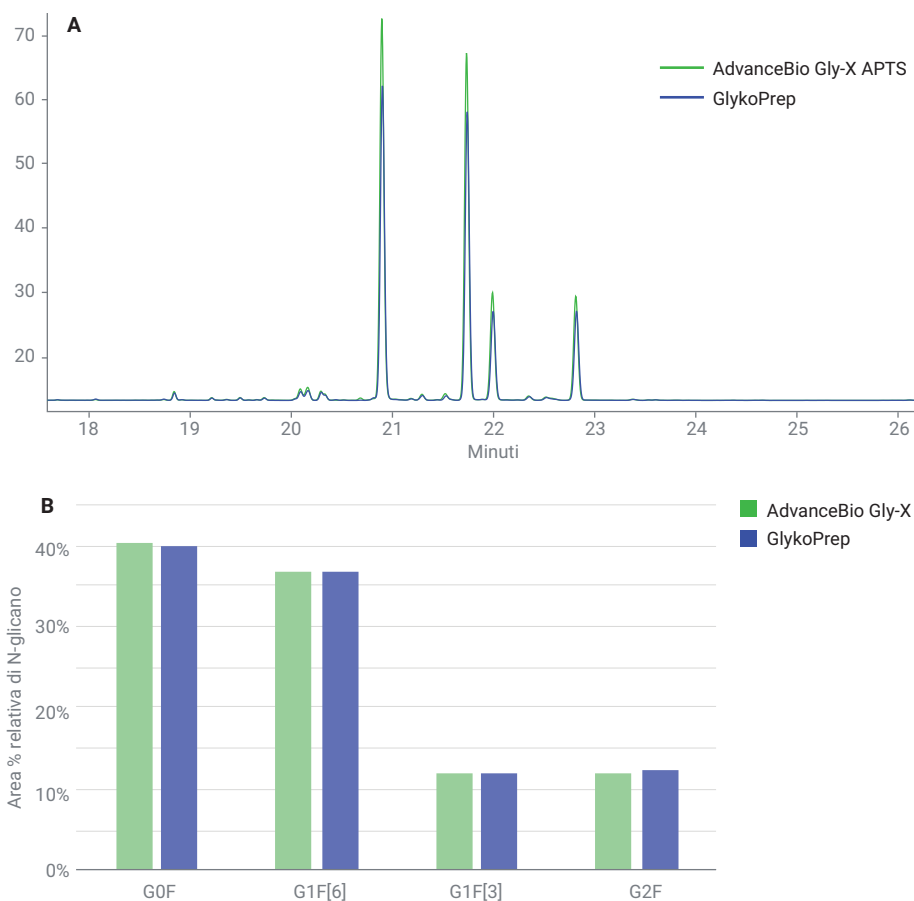


Figura 7. Confronto tra gli N-glicani marcati con Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express e Agilent GlykoPrep APTS. Gli N-glicani marcati di MabThera sono stati preparati e separati su PA800 plus.

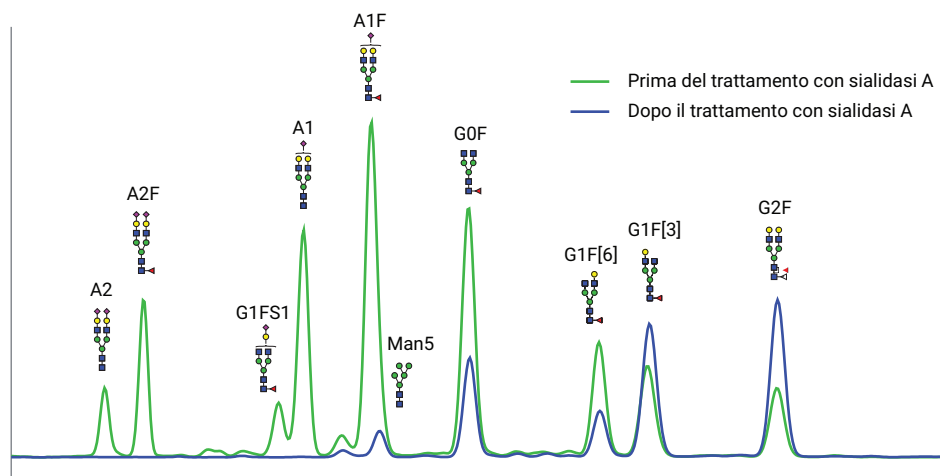


Figura 8. Separazione con Agilent Gly-Q di N-glicani marcati con APTS di Enbrel prima e dopo digestione di 10 minuti con sialidasi A.

Conclusione

La marcatura con Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express di N-glicani rilasciati offre risultati riproducibili e affidabili che possono essere confrontati direttamente ai dati storici, ad esempio Agilent GlykoPrep con APTS. L'utilizzo dei tradizionali marcatori APTS garantisce la continuità dei dati nei progetti in corso.

Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express offre un flusso di lavoro rapido (~2,5 ore) con marcatura APTS tradizionale senza dover ricorrere a lunghi passaggi di evaporazione, abbreviando il tempo necessario per ottenere i risultati. I dati ottenuti da AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep con APTS Express sono comparabili con quelli di Agilent GlykoPrep Rapid N-Glycan Prep con APTS. Il kit EC aperto permette di usare la soluzione di marcatura AdvanceBio Gly-X APTS Express di nuova generazione su altri strumenti EC e la separazione mediante UHPLC-HILIC.

Bibliografia

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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.