

Ein verbesserter Arbeitsablauf zur Profilerstellung und Quantifizierung von Sialinsäuren in Biotherapeutika

Autoren

Anna Fong, John Yan,
Ace G. Galermo, Tom Rice,
Aled Jones und Ted Haxo
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Diese Application Note befasst sich mit der Verwendung des Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilerstellung und -Quantifizierung (Best-Nr. GS24-SAP) zur Erstellung eines Profils der in biotherapeutischen Glycoproteinen sowie in NISTmAb vorhandenen Sialinsäuren und zu deren absoluter Quantifizierung. Dieses Kit verwendet einen neuen und verbesserten Hochdurchsatz-Arbeitsablauf für die Vorbereitung, Trennung und Detektion von 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol(DMB)-markierten Sialinsäuren mit hohem Durchsatz. Eine endständige Sialinsäure am nicht-reduzierenden Ende von N- oder O-Glykanen kann eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Wirksamkeit biotherapeutischer Glycoproteine spielen.¹

Bei dem hier beschriebenen Arbeitsablauf wird das AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilerstellung und -Quantifizierung für die Freisetzung endständiger Sialinsäure durch saure Hydrolyse mit anschließender DMB-Markierung und die qualitative und quantitative Analyse verwendet. DMB-markierte Sialinsäuren aus Proben und Standards werden durch Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (LC) getrennt und mithilfe von Fluoreszenzdetektion (FLD) quantifiziert. Anschließend wird ihre Struktur massenspektrometrisch (MS) bestätigt.

Einleitung

Die Zusammensetzung von Glykanen aus biotherapeutischen Glycoproteinen kann deren Immunogenität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflussen.² Glykane sind Kohlenhydrate, die aus Monosacchariden bestehen, welche je nach Zusammensetzung und Bindungsposition in vielen verschiedenen möglichen Oligosaccharidstrukturen angeordnet sind. Abhängig vom jeweiligen Molekül und dessen Anwendung kann endständige Sialinsäure die Clearance-Rate verringern, die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) reduzieren oder entzündungshemmend wirken.³⁻⁵ Zwei in Biotherapeutika häufig vorkommende Formen sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc). Neu5Ac ist für gewöhnlich die vorherrschende Spezies, während Neu5Gc im menschlichen Organismus nicht synthetisiert wird und ihr Vorhandensein in Biotherapeutika immunogen sein kann. Es ist daher äußerst wichtig, sowohl die absolute Menge an Sialinsäure als auch die Mengen der unterschiedlichen Sialinsäure-Spezies in therapeutischen Glycoproteinen zu überwachen.

Der hier beschriebene neue Hochdurchsatz-Arbeitsablauf beruht auf einem 96-Wellplate-Format zur Freisetzung, Markierung und Analyse von Sialinsäuren aus therapeutischen Glycoproteinen unter Verwendung von Rituximab, Etanercept, NISTmAb und Cetuximab. Sialinsäurereste werden freigesetzt und dann in einem zweistufigen Verfahren mit 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol (DMB) markiert. DMB-markierte Sialinsäuren werden anschließend getrennt und innerhalb von lediglich 10 Minuten schnell mithilfe einer Methode analysiert, die auf Umkehrphasen-Ultra-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (UHPLC) mit FLD-Detektion zur Quantifizierung und einer optionalen MS-Detektion zur Massenanalyse basiert. Es können sowohl eine qualitative Charakterisierung von Neu5Ac, Neu5Gc und anderen Sialinsäure-Spezies unter Verwendung eines Sialinsäure-Referenzpanels (SARP)

als auch eine absolute Quantifizierung mit Empfindlichkeit im Pikomolbereich unter Verwendung der enthaltenen quantitativen Neu5Ac- und Neu5Gc-Standards durchgeführt werden. Der Arbeitsablauf ermöglicht eine zuverlässige und reproduzierbare Hochdurchsatz-Probenvorbereitung für die Profilerstellung und Quantifizierung von Sialinsäuren. Dieses Kit verfügt über ein breites Detektionsspektrum und eine verbesserte Empfindlichkeit für Moleküle mit einem niedrigen Grad an Sialylierung.

Experimentelles

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte im 96-Wellplate-Format. Durch saure Hydrolyse wurden Sialinsäuren aus Rituximab (Rituxan, Chargennummer M190170), Etanercept (Enbrel, Chargennummer M190088), NISTmAb (Chargennummer 14HB-D-002) und Erbitux (Cetuximab, Chargennummer M160886) freigesetzt. Die Methode kommt ohne Trocknungsschritt aus, was den Zeitaufwand für die Probenvorbereitung insgesamt um 1 bis 2 Stunden verkürzt. Die Probenmenge beträgt typischerweise 200 µg bei Glycoproteinen mit niedrigem Sialylierungsgrad und 5 µg bei Glycoproteinen mit hohem Sialylierungsgrad. Mithilfe von Serienverdünnungen der Sialinsäure-Referenzstandards Neu5Ac und Neu5Gc wurde eine Standardkurve erstellt, um die Quantifizierungsgrenze (LOQ) und die Nachweisgrenze (LOD) der Analyse zu bestimmen. Die freigesetzten Sialinsäuren, das SARP und die Standards wurden dann nach dem in Abbildung 1 dargestellten Arbeitsablauf mit DMB derivatisiert. Die Freisetzungs- und Markierungsschritte wurden in einem Thermocycler durchgeführt.

LC/FLD/MS-Analyse DMB-markierter Sialinsäuren

DMB-markierte Sialinsäuren aus Rituxan, Enbrel, NISTmAb und Erbitux wurden mittels Umkehrphasen(RP)-Trennung auf einem Agilent 1290 Infinity II LC-System mit Fluoreszenzdetektion (FLD) zur Quantifizierung analysiert. Alle RP-

UHPLC-Trennungen wurden unter den in Tabelle 1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine weitere Inline-Analyse mit einem Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-Massenspektrometer (Tabelle 2) durchgeführt, um die Elutionsreihenfolge der DMB-markierten Sialinsäure-Spezies in dem SARP zu bestätigen. Nach dem Fluoreszenzdetektor wurde ein fest installierter Flussteiler verwendet, um ungefähr 50 % des Flusses dem Abfall zuzuführen und 50 % per MS zu analysieren. Die Datenanalyse erfolgte mit Agilent OpenLab CDS 2.3 und der MassHunter -Software zur qualitativen Analyse 10.0. Zur Quantifizierung von Neu5Gc und Neu5Ac wurden die Kalibrierungskurven herangezogen.

Material

Acetonitril (LC/MS-Reinheitsgrad, Honeywell Burdick & Jackson) stammte von VWR. Methanol (Optima LC/MS-Qualität) stammte von Fisher Scientific. Für alle Experimente wurde intern hergestelltes nanoreines Wasser verwendet.

Geräte

Die Trennung DMB-markierter Sialinsäure-Proben fand unter Verwendung einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule (2,1 × 75 mm, 2,7 µm; Best-Nr. 697775-902) nach den Methodendetails in Tabelle 1 auf einem Agilent LC/MS-System mit folgenden Komponenten statt:

- Agilent 1290 Infinity II Hochgeschwindigkeitspumpe (G7120A)
- Agilent Infinity Mehrfachprobengeber (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity Fluoreszenzdetektor (G1321B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (Parameter in Tabelle 2)

Software

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter zur qualitativen Analyse 10.0

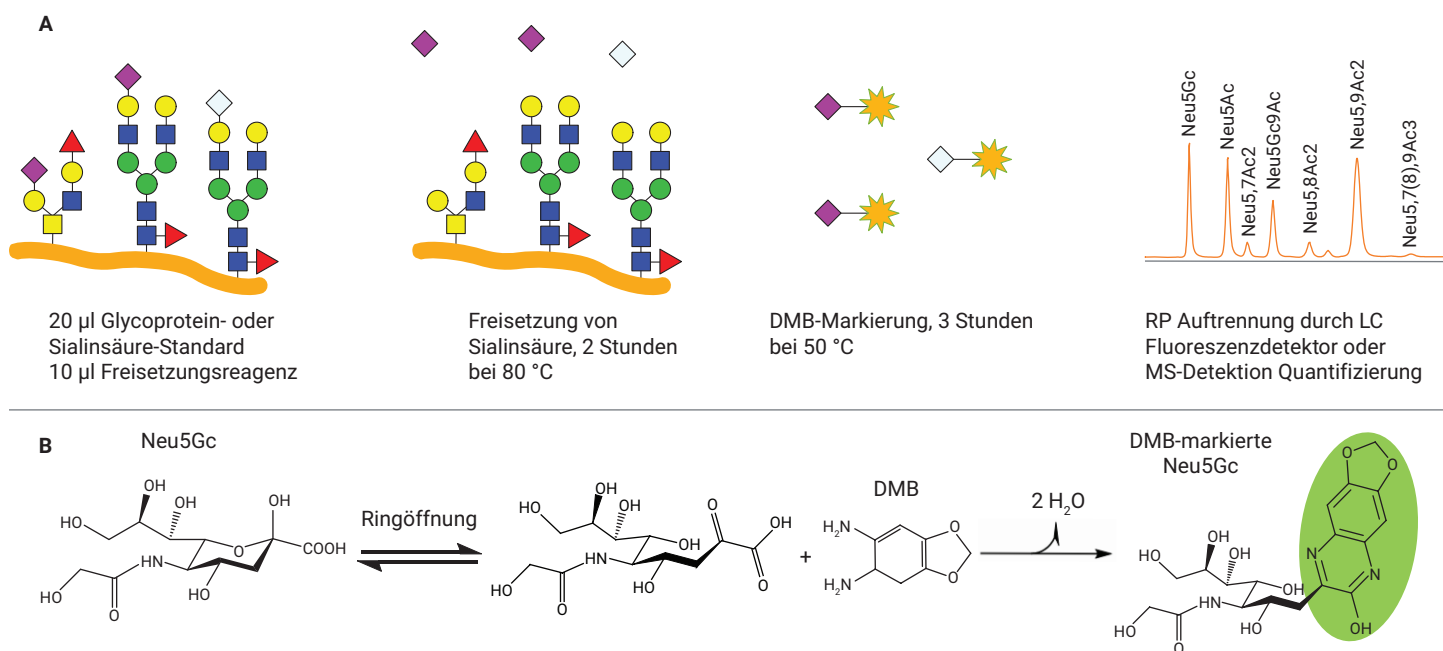


Abbildung 1. Arbeitsablauf der Sialinsäure-Freisetzung und DMB-Markierung (A) Überblick (B) Mechanismus der Markierung der Sialinsäure Neu5Gc mit DMB.

Tabelle 1. Bedingungen bei der Umkehrphasen-UHPLC.

Parameter	Wert				
Gerät	Agilent 1290 Infinity II LC-System				
Säule	Agilent InfinityLab PoroShell 120EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 µm (Best-Nr. 697775-902)				
Säulentemperatur	30 °C				
Mobile Phase	A) Methanol:Acetonitril:Wasser (4:8:88) B) Acetonitril				
Gradienten-Programm	Zeit (min)	% A	% B	Flussrate (ml/min)	Isokratische Elution
	0,00	100	0	0,4	
	6,00	100	0	0,4	
	6,25	20	80	0,4	Waschen Erneute Äquilibration
	7,30	20	80	0,4	
	7,50	100	0	0,4	
	10,00	100	0	0,4	
Injektionsvolumen	10 µl				
Detektion	Agilent 1260 Infinity II Fluoreszenzdetektor λ _{Ex} 373 nm, λ _{Em} 448 nm				

Tabelle 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-Parameter.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
Quelle	Duale AJS ESI
Gastemperatur	350 °C
Trocknungsgasstrom	11 l/min
Zerstäuber	15 psi
Sheathgas-Temperatur	400 °C
Sheathgas-Fluss	12 l/min
Vcap	1.400 V
Nozzle Voltage	1.800 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Massenbereich (MS)	m/z 400 bis 1.000
Massenbereich (MS/MS)	m/z 100 bis 550
Datenerfassungsmodus	Hochauflösung (4 GHz)

Ergebnisse und Diskussion

LC/FLD/MS-Analyse DMB-markierter Sialinsäuren

Die RP-UHPLC-Analyse des DMB-markierten SARP führt zur Trennung und Detektion von sieben Sialinsäurederivaten: Neu5Gc, Neu5Ac, Neu5,7Ac2, Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac2, Neu5,9Ac2 und Neu5,7(8),9Ac3. Zwar sind je nach Säule, Flussrate, Lösemittel oder Laborbedingungen Unterschiede in den Retentionszeiten festzustellen, aber die Elutionsreihenfolge der DMB-derivatisierten Sialinsäuren bleibt konsistent. Das Referenzpanel wird verwendet, um die Auflösung und Genauigkeit des chromatographischen Systems zu Beginn der Probensequenz zu beurteilen. Abbildung 2A zeigt ein typisches FLD-Chromatogramm eines DMB-markierten SARP. Die Identifizierung der DMB-Sialinsäurederivate wurde durch Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung 2B).

Analyse des Sialinsäure-Gehalts von Biotherapeutika und NISTmAb

Abbildung 3 zeigt DMB-markierte Sialinsäuren, die durch Anwendung des Arbeitsablaufs auf Rituxan, Enbrel, NISTmAb und Erbitux identifiziert wurden. Sowohl Rituxan (Abbildung 3A) als auch Enbrel (Abbildung 3B) enthalten hauptsächlich Neu5Ac, während NISTmAb (Abbildung 3C) und Erbitux (Abbildung 3D) hauptsächlich Neu5Gc enthalten. Die Massenspektren der Hauptpeaks in DMB-markierten Proben von Enbrel und Erbitux bestätigen, dass es sich um Neu5Ac bzw. Neu5Gc handelte (Abbildung 4).

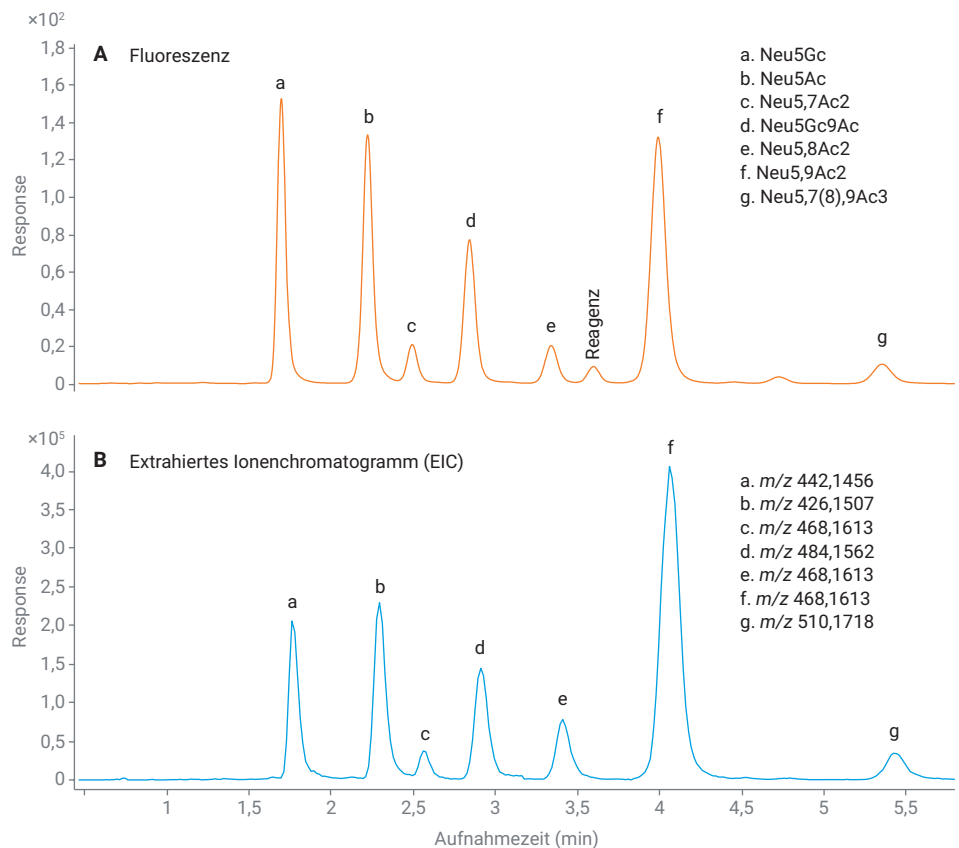


Abbildung 2. UHPLC-Chromatogramm des DMB-markierten SARP. (A) Fluoreszenz; (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm von DMB-markierten Sialinsäure-Spezies, $[M+H]^+$.

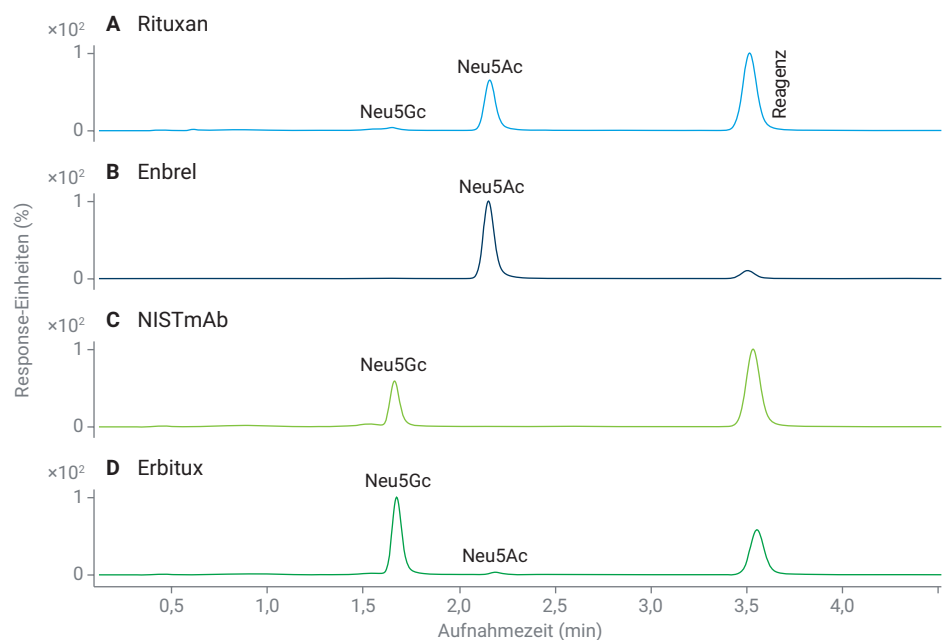


Abbildung 3. UHPLC-Fluoreszenzprofile DMB-markierter Sialinsäuren aus verschiedenen Glycoproteinen (A) Rituxan; (B) Enbrel; (C) NISTmAb und (D) Erbitux.

Quantitative Analyse
des Sialinsäure-Gehalts

Basierend auf der chromatographischen Trennung und der Fluoreszenz-Response DMB-markierter Neu5Ac- und Neu5Gc-Standards wurde eine quantitative Kalibrierungskurve erstellt (Abbildung 5). Die Berechnung der LOD und LOQ erfolgte unter Berücksichtigung des mittels OpenLab CDS 2.3 berechneten P2P-Rauschens. Die detektierbaren Molmengen von Neu5Gc und Neu5Ac aus Rituxan, Enbrel, NISTmAb und Erbitux wurden basierend auf integrierten Peakflächen bestimmt und sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierung des Gesamtgehalts an Sialinsäuren entsprechen den mithilfe des AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts (Best.-Nr. GS48-SAQ) erzielten Ergebnissen (Tabelle 4). Das Kit erwies sich außerdem als leistungsfähiger im Vergleich zu einem älteren Arbeitsablauf mit DMB-Labeling (Best.-Nr. GKK-407) (Tabelle 5), weil es eine höhere Glycoprotein-Konzentration je Probenwell und eine geringere Verdünnung von Proben vor der Analyse ermöglicht, was zu einer Verstärkung des Fluoreszenzsignals DMB-markierter Sialinsäuren führt.

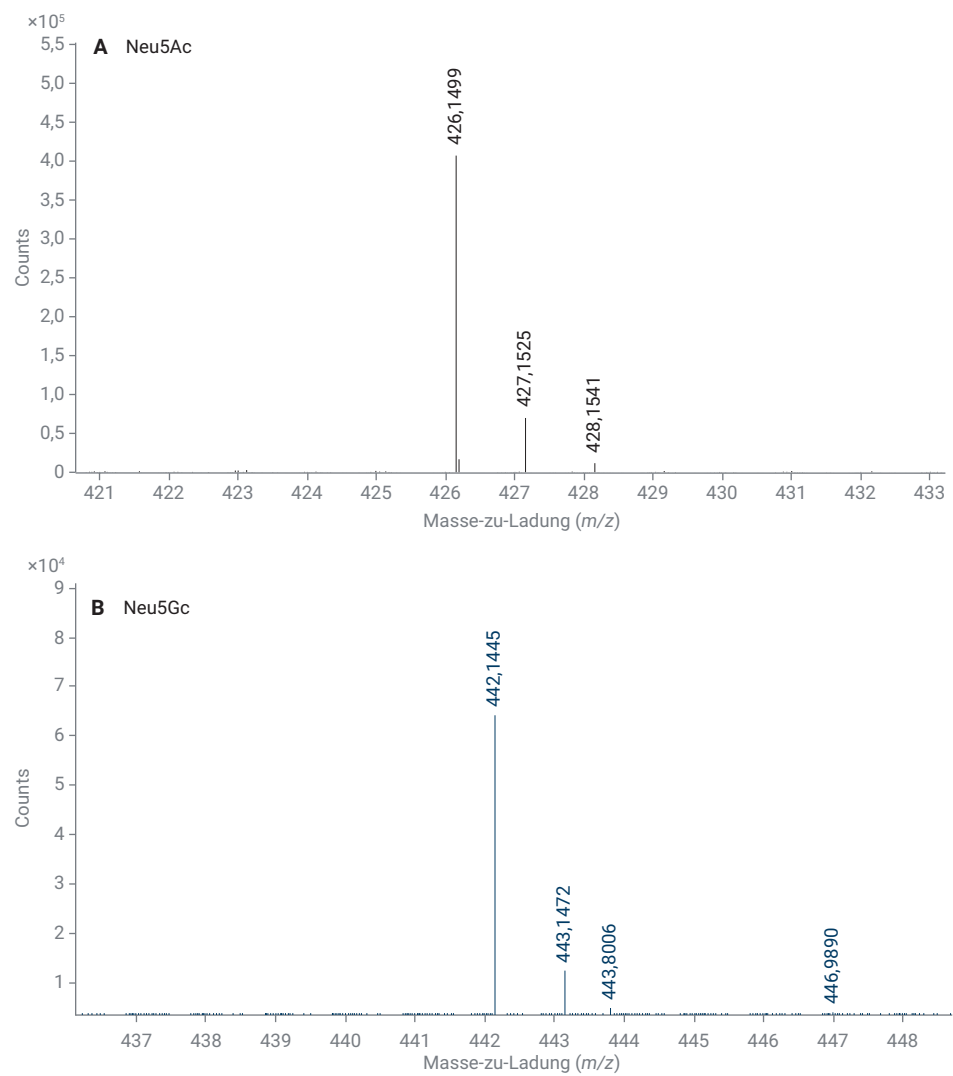


Abbildung 4. Massenspektrum von DMB-markierter Sialinsäure (A) Neu5Ac aus Enbrel und (B) Neu5Gc aus Erbitux.

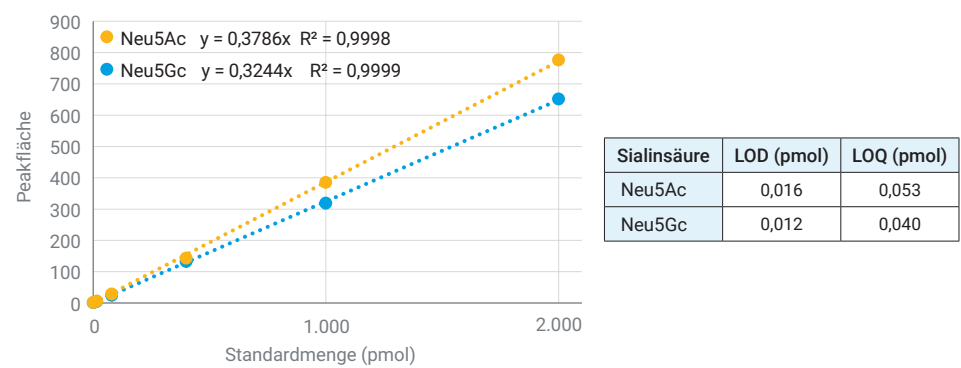


Abbildung 5. Kalibrierungskurven für Neu5Ac und Neu5Gc, n = 2. Die Nachweisgrenze und die Quantifizierungsgrenze für Neu5Ac und Neu5Gc sind in der Tabelle angegeben.

Tabelle 3. Der durchschnittliche Neu5Ac- und Neu5Gc-Gehalt in pmol/µg für jedes Glycoprotein ist in der Tabelle angegeben, n = 3. ND = Nicht nachgewiesen.

	Konzentration (mg/ml)	Probenmenge (µg)	Neu5Ac (pmol/µg)	% VK	Neu5Gc (pmol/µg)	% VK
Rituxan	10	200	0,60	4,2 %	0,02	1,8 %
Enbrel	0,25	5	228	6,9 %	ND	-
NISTmAb	10	200	ND	-	0,36	1,8 %
Erbix	2	40	0,12	10,9 %	3,72	7,1 %

Tabelle 4. Gesamtmenge an Sialinsäuren (Neu5Ac und Neu5Gc) mit dem Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung (Best.-Nr. GS24-SAP) im Vergleich zu Werten, die mit dem Agilent AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts (Best.-Nr. GS48-SAQ) erhalten wurden, n = 3.

	Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung		Agilent AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts	
	pmol/µg	% VK	pmol/µg	% VK
Rituxan	0,62	4,17 %	0,47	5,04 %
Enbrel	220	1,65 %	210	12,34 %
Erbix	3,80	7,26 %	3,49	0,69 %
Fetuin	226	4,45 %	232	7,39 %

Tabelle 5. Quantifizierung von Neu5Ac und Neu5Gc (pmol/µg) mit dem Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung (Best.-Nr. GS24-SAP) im Vergleich zu den mit dem Signal DMB Sialinsäuren-Markierungskit (Best.-Nr. GKK-407) erhaltenen Werten, n = 3. ND = Nicht nachgewiesen.

		GKK-407		Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung	
Glycoprotein	Sialinsäure	pmol/µg	% VK	pmol/µg	% VK
Rituxan	Neu5Gc	ND	-	0,02	1,76 %
	Neu5Ac	0,58	1,12 %	0,60	4,25 %
Enbrel	Neu5Ac	226	3,57 %	223	2,92 %
Erbix	Neu5Gc	ND	-	3,68	1,02 %
	Neu5Ac	ND	-	0,12	4,46 %
Fetuin	Neu5Gc	ND	-	4,78	4,90 %
	Neu5Ac	201	1,47 %	222	4,44 %

Schlussfolgerungen

Das AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung zeichnet sich durch höhere Empfindlichkeit für Proteine mit niedrigem Sialyierungsgrad aus, wie es zum Beispiel bei monoklonalen Antikörpern mit einer einzigen N-Glykosylierungsstelle in der Fc-Region der Fall ist. Der aktualisierte Arbeitsablauf für die DMB-Markierung verzichtet auf einen Trocknungsschritt der Proben und verkürzt dadurch die Probenvorbereitung.

Dieser Arbeitsablauf stellt eine Methode zur Bestimmung sowohl der absoluten

als auch der relativen Mengen von Neu5Ac und Neu5Gc in Biotherapeutika dar. Die Probenvorbereitung wird in einem 96-Wellplate-Format für Probenvorbereitung mit hohem Durchsatz durchgeführt und ist hoch reproduzierbar. Die quantitativen Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei Anwendung älterer Arbeitsabläufe für die DMB-Markierung (GKK-407) und des AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts (GS48-SAQ).

Quellenangaben

- Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(8), 351–360.

- 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.
- Li, Y. et al. Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2017**, 114(31), 8360–8365.
- Scallon, B. J. et al. Higher Levels of Sialylated Fc Glycans in Immunoglobulin G Molecules can Adversely Impact Functionality. *Mol. Immunol.* **2007**, 44(7), 1524–1534.
- Kaneko, Y. et al. Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, 313, 670–673.

www.agilent.com/chem

DEE.7541782407

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Gedruckt in den USA, 23. März 2021
5994-2352DEE