

Flujo de trabajo mejorado para la determinación de perfiles y la cuantificación de ácidos siálicos en productos bioterapéuticos

Autores

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

Resumen

Esta nota de aplicación describe el uso del kit Agilent AdvanceBio (ref. GS24-SAP) de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos para elaborar perfiles y llevar a cabo una cuantificación absoluta de los ácidos siálicos presentes en glicoproteínas bioterapéuticas y anticuerpos monoclonales del NIST (NISTmAb). Este kit utiliza un nuevo y mejorado flujo de trabajo de alta productividad para la preparación, separación y detección de ácidos siálicos marcados con 1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno (DMB). La desactivación de los ácidos siálicos en el extremo no reductor de los N- u O-glicanos desempeña un papel crucial en la eficacia de las glicoproteínas bioterapéuticas¹.

El flujo de trabajo aquí descrito aborda el uso del kit AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos para la liberación de ácido siálico terminal mediante hidrólisis ácida, seguida por el marcado con DMB y por análisis cualitativos y cuantitativos. Los ácidos siálicos marcados con DMB procedentes de muestras y patrones se separan mediante cromatografía de líquidos (LC) en fase inversa, se cuantifican mediante detección de fluorescencia (FLD) y su estructura se confirma por espectrometría de masas (MS).

Introducción

La composición de los glicanos presentes en las glicoproteínas bioterapéuticas puede afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica². Los glicanos son carbohidratos formados por monosacáridos dispuestos en muchas posibles estructuras diferentes de oligosacáridos dependiendo de la composición y la posición de los enlaces. En función de la molécula y de la aplicación, el ácido siálico terminal puede hacer disminuir la tasa de aclaramiento, reducir la citotoxicidad celular asociada a los anticuerpos (ADCC) o producir efectos antiinflamatorios³⁻⁵. Dos formas habitualmente presentes en los productos bioterapéuticos son el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). El Neu5Ac suele ser la forma predominante, mientras que el Neu5Gc no se sintetiza en humanos y su presencia en los productos bioterapéuticos puede tener un efecto inmunogénico. Por tanto, es fundamental hacer un seguimiento de la cantidad absoluta de ácido siálico y de las concentraciones de las diferentes formas de ácido siálico presentes en las glicoproteínas terapéuticas.

En este documento se presenta un nuevo flujo de trabajo de alta productividad basado en un formato con placas de 96 pocillos para la liberación, el marcado y el análisis de ácidos siálicos de glicoproteínas terapéuticas, usando el rituximab, el etanercept, los NISTmAb y el cetuximab como ejemplos. Los residuos de ácidos siálicos se liberan y, a continuación, se marcan con 1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno (DMB) en un procedimiento de dos pasos. Después, los ácidos siálicos marcados con DMB se separan y analizan mediante un método rápido de 10 minutos de cromatografía de líquidos de ultraalta presión (UHPLC) en fase inversa con detección por FLD para fines de cuantificación y detección opcional por MS para el análisis de masas. El flujo de trabajo permite la caracterización cualitativa de Neu5Ac, Neu5Gc y otras formas de ácidos siálicos

mediante un panel de referencia de ácidos siálicos (SARP), así como la cuantificación absoluta con una sensibilidad del orden de picomoles usando los patrones cuantitativos de Neu5Ac y Neu5Gc que se incluyen. El flujo de trabajo posibilita una preparación de muestras fiable, reproducible y de alta productividad para la determinación de perfiles y la cuantificación de ácidos siálicos. Este kit ofrece un amplio intervalo de detección y una mayor sensibilidad para la detección de moléculas con grados bajos de sialilación.

Experimento

Preparación de muestras

Las muestras se prepararon usando un formato de placas de 96 pocillos. Los ácidos siálicos se liberaron a partir de rituximab (Rituxan; número de lote M190170), etanercept (Enbrel; número de lote M190088), NISTmAb (número de lote 14HB-D-002) y cetuximab (Erbix; número de lote MI60886) mediante hidrólisis ácida. El método evita tener que incluir un paso de desecación, lo que reduce la duración total de la preparación de muestras entre 1 y 2 horas. La cantidad de muestra suele ser de 200 µg de glicoproteína con un bajo grado de sialilación y 5 µg de glicoproteína con un alto grado de sialilación. Se emplearon diluciones en serie de patrones de referencia de ácidos siálicos (Neu5Ac y Neu5Gc) para elaborar una curva de calibración y determinar el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD) del ensayo. Después, los ácidos siálicos liberados, el SARP y los patrones se derivatizaron con DMB conforme al flujo de trabajo que se muestra en la Figura 1; los pasos de liberación y marcado se llevaron a cabo en un termociclador.

Análisis por LC/FLD/MS de ácidos siálicos marcados con DMB

Los ácidos siálicos marcados con DMB y procedentes de Rituxan, Enbrel, NISTmAb y Erbix se analizaron mediante cromatografía en fase inversa (RP) con un sistema de LC Agilent 1290 Infinity II y detección de fluorescencia (FLD) para

la cuantificación. Todas las separaciones por RP-UHPLC se llevaron a cabo en las condiciones descritas en la Tabla 1. Asimismo, se llevó a cabo un análisis adicional en línea usando un sistema de LC/MS Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (Tabla 2) para confirmar el orden de elución de las formas de ácido siálico marcadas con DMB presentes en el SARP. Se situó un divisor de flujo fijo después del detector FLD, que desvió aproximadamente un 50 % del flujo al contenedor de residuos y un 50 % hacia el instrumento MS. Los datos se analizaron con el software Agilent OpenLab CDS 2.3 y MassHunter Qualitative Analysis 10.0. La cuantificación de Neu5Gc y Neu5Ac se hizo mediante las curvas de calibración.

Materiales

El acetonitrilo (Honeywell Burdick & Jackson; calidad para LC/MS) se adquirió a VWR. El metanol (Optima; calidad para LC/MS) se adquirió a Fisher Scientific. Para todos los experimentos se utilizó agua Nanopure producida en las propias instalaciones.

Instrumentos

Las muestras de ácidos siálicos marcados con DMB se separaron usando una columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2,1 × 75 mm, 2,7 µm; ref. 697775-902) mediante el método cuyos detalles se especifican en la Tabla 1, utilizando para ello una configuración de LC/MS de Agilent con los instrumentos siguientes:

- Bomba de alta velocidad Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Muestreador múltiple Agilent Infinity (G7167B)
- Termostato multicolumna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity (G1321B)
- Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (parámetros en la Tabla 2)

Software

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0

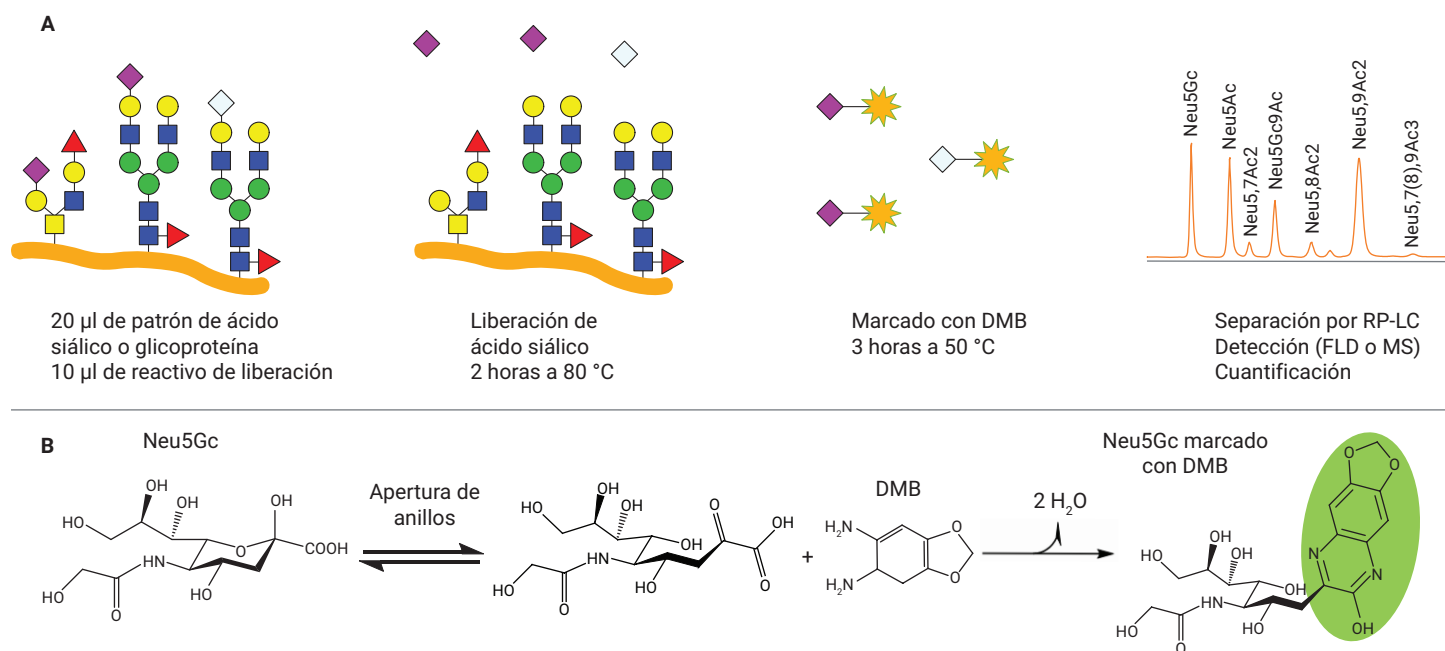


Figura 1. Flujo de trabajo de liberación de ácidos siálicos y marcado con DMB. A) Descripción general. B) Mecanismo del marcado con DMB del ácido siálico Neu5Gc.

Tabla 1. Condiciones de la UHPLC en fase inversa.

Parámetro	Valor																																
Instrumento	Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II																																
Columna	Agilent InfinityLab PoroShell 120 EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 μm (ref. 697775-902)																																
Temperatura de la columna	30 °C																																
Fase móvil	A) Metanol, acetonitrilo y agua (4:8:88) B) Acetonitrilo																																
Programa de gradiente	<table><tr><td>Tiempo (min)</td><td>% A</td><td>% B</td><td>Flujo (ml/min)</td><td></td></tr><tr><td>0,00</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td><td rowspan="3">Elución isocrática</td></tr><tr><td>6,00</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td></tr><tr><td>6,25</td><td>20</td><td>80</td><td>0,4</td></tr><tr><td>7,30</td><td>20</td><td>80</td><td>0,4</td><td>Lavado</td></tr><tr><td>7,50</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td><td rowspan="2">Estabilización</td></tr><tr><td>10,00</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td></tr></table>	Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)		0,00	100	0	0,4	Elución isocrática	6,00	100	0	0,4	6,25	20	80	0,4	7,30	20	80	0,4	Lavado	7,50	100	0	0,4	Estabilización	10,00	100	0	0,4
Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)																														
0,00	100	0	0,4	Elución isocrática																													
6,00	100	0	0,4																														
6,25	20	80	0,4																														
7,30	20	80	0,4	Lavado																													
7,50	100	0	0,4	Estabilización																													
10,00	100	0	0,4																														
Volumen de inyección	10 μl																																
Detección	FLD Agilent 1260 Infinity II; λ _{Ex} = 373 nm; λ _{Em} = 448 nm																																

Tabla 2. Parámetros del sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio.

Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio	
Fuente	ESI AJS dual
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas de secado	11 l/min
Nebulizador	15 psi
Temperatura del gas de focalización	400 °C
Flujo de gas de focalización	12 l/min
Vcap	1.400 V
Tensión en la boquilla	1.800 V
Fragmentador	120 V
Skimmer	65 V
Rango de masas (MS)	m/z = 400-1.000
Rango de masas (MS/MS)	m/z = 100-550
Modo de adquisición	Alta resolución (4 GHz)

Resultados y comentarios

Análisis por LC/FLD/MS de ácidos siálicos marcados con DMB

El análisis por RP-UHPLC del SARP marcado con DMB dio lugar a la separación y la detección de siete derivados de ácidos siálicos: Neu5Gc, Neu5Ac, Neu5,7Ac2, Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac2, Neu5,9Ac2 y Neu5,7(8),9Ac3. Aunque pudieran observarse diferencias en los tiempos de retención con diferentes columnas, flujos, disolventes o condiciones del laboratorio, el orden de elución de los ácidos siálicos derivatizados con DMB no varió. El panel de referencia se utilizó para evaluar la resolución y la exactitud del sistema cromatográfico al inicio de la secuencia de muestras. En la Figura 2A se muestra un cromatograma típico de un SARP marcado con DMB detectado mediante FLD. La identificación de los derivados de ácidos siálicos marcados con DMB se confirmó mediante espectrometría de masas (Figura 2B).

Análisis del contenido de ácidos siálicos en productos bioterapéuticos y NISTmAb

Los ácidos siálicos marcados con DMB e identificados mediante la aplicación del flujo de trabajo a Rituxan, Enbrel, NISTmAb y Erbitux se muestran en la Figura 3. Tanto el Rituxan (Figura 3A) como el Enbrel (Figura 3B) contienen principalmente Neu5Ac, mientras que los NISTmAb (Figura 3C) y el Erbitux (Figura 3D) contienen principalmente Neu5Gc. Los espectros de masas de los picos principales de las muestras de Enbrel y Erbitux marcadas con DMB confirmaron la identificación como Neu5Ac y Neu5Gc, respectivamente (Figura 4).

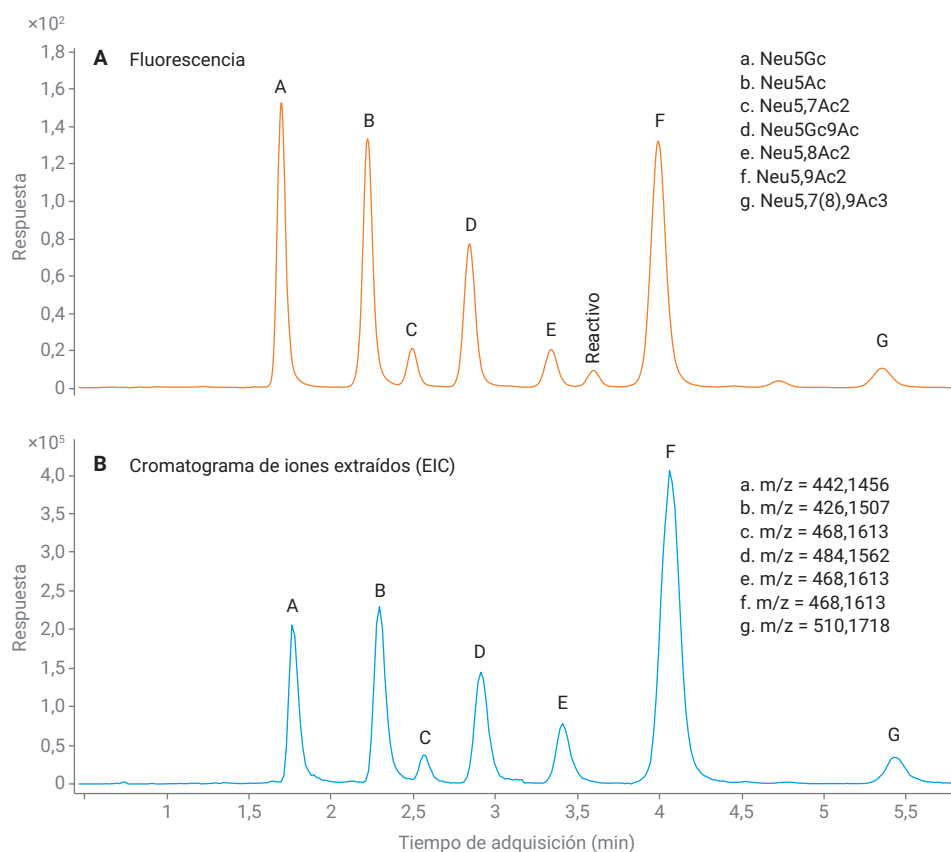


Figura 2. Cromatograma de UHPLC de un SARP marcado con DMB. A) Fluorescencia. B) Cromatograma de iones extraídos de formas de ácido siálico marcadas con DMB, $[M+H]^+$.

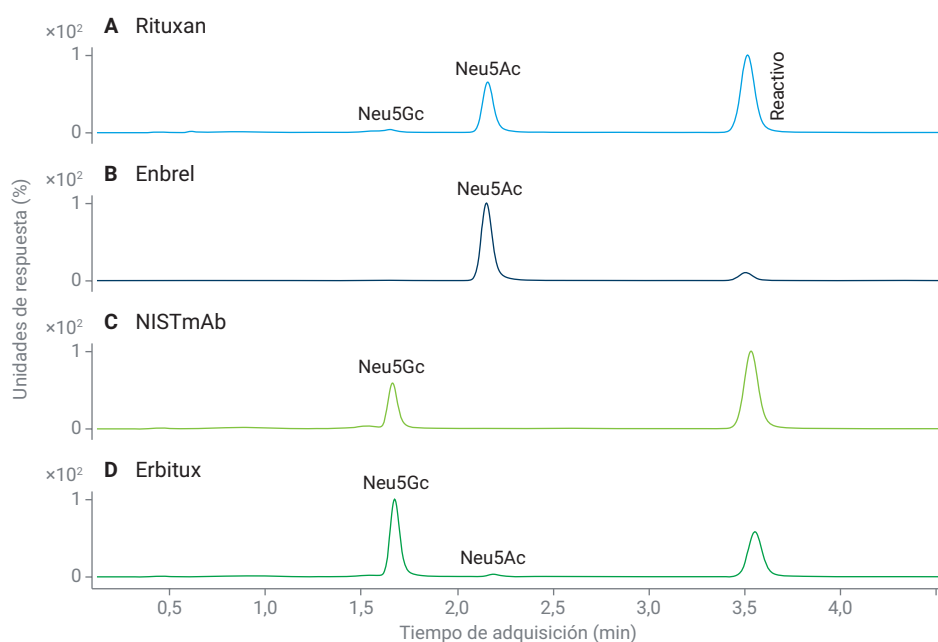


Figura 3. Perfiles de fluorescencia por UHPLC de ácidos siálicos marcados con DMB procedentes de diferentes glicoproteínas: (A) Rituxan; (B) Enbrel; (C) NISTmAb; y (D) Erbitux.

Análisis cuantitativo del contenido de ácidos siálicos

A partir de la separación cromatográfica y la respuesta de fluorescencia de los patrones de Neu5Ac y Neu5Gc marcados con DMB, se generó una curva de calibración para la cuantificación (Figura 5). El LOD y el LOQ se calcularon a partir del ruido, determinado mediante la función de cálculo de ruido P2P de OpenLab CDS 2.3. Las cantidades detectables en moles de Neu5Gc y Neu5Ac procedentes de Rituxan, Enbrel, NISTmAb y Erbitux se determinaron a partir de las áreas de pico integradas y se indican en la Tabla 3. Los resultados de cuantificación de ácido siálico total son coherentes con los obtenidos con el kit AdvanceBio (ref. GS48-SAQ) de cuantificación de ácido siálico total (Tabla 4). El kit también ofrece mayor rendimiento en comparación con un flujo de trabajo de marcado con DMB más antiguo (ref. GKK-407) (Tabla 5), ya que permite una concentración mayor de glicoproteína por pocillo de muestra y reduce la dilución de las muestras antes del análisis; todo ello consigue incrementar la señal de fluorescencia de los ácidos siálicos marcados con DMB.

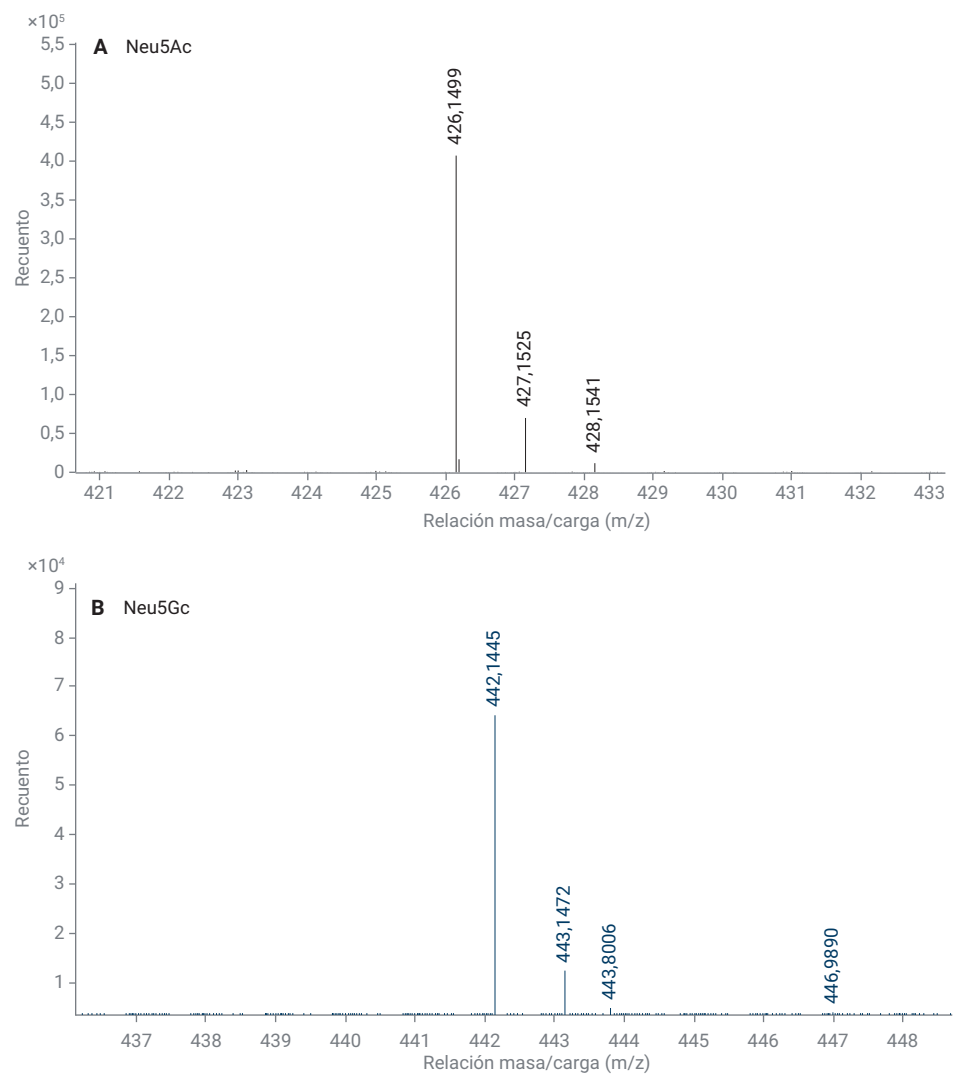


Figura 4. Espectro de masas de ácidos siálicos marcados con DMB: (A) Neu5Ac, a partir de Enbrel; y (B) Neu5Gc, a partir de Erbitux.

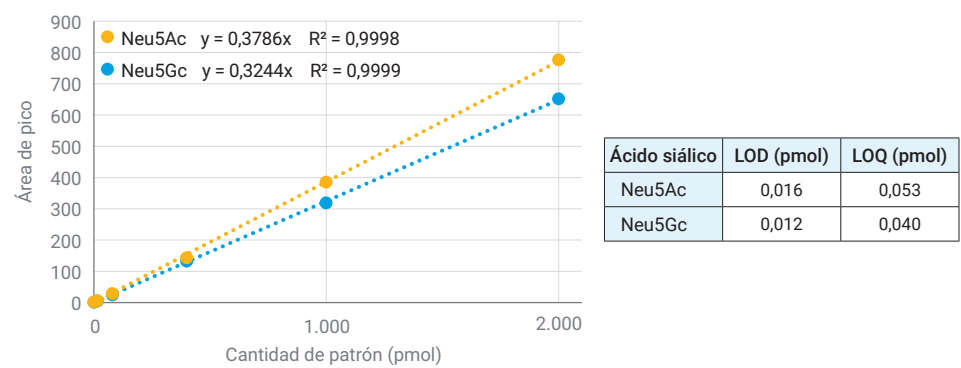


Figura 5. Curvas de calibración de Neu5Gc y Neu5Ac (n = 2). El LOD y el LOQ de Neu5Ac y Neu5Gc se indican en la tabla.

Tabla 3. La concentración media (pmol/μg) de Neu5Ac y Neu5Gc para cada glicoproteína se muestra en la tabla (n = 3). ND = no detectado.

	Concentración (mg/ml)	Masa de muestra (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	% CV	Neu5Gc (pmol/μg)	% CV
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 %

Tabla 4. Ácido siálico total (Neu5Ac y Neu5Gc) con el kit Agilent AdvanceBio (ref. GS24-SAP) de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos en comparación con los valores obtenidos mediante el kit Agilent AdvanceBio (ref. GS48-SAQ) de cuantificación de ácido siálico total (n = 3).

	Kit Agilent AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos		Kit Agilent AdvanceBio de cuantificación de ácido siálico total	
	pmol/μg	% CV	pmol/μg	% CV
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 %
Fetuina	226	4,45 %	232	7,39 %

Tabla 5. Cuantificación de Neu5Ac y Neu5Gc (pmol/μg) mediante el kit Agilent AdvanceBio (ref. GS24-SAP) de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos en comparación con los valores obtenidos mediante el kit DMB Signal (ref. GKK-407) de marcado de ácido siálico (n = 3). ND = no detectado.

		GKK-407		Kit Agilent AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos	
Glicoproteína	Ácido siálico	pmol/μg	% CV	pmol/μg	% CV
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 %
Fetuina	Neu5Gc	ND	-	4,78	4,90 %
	Neu5Ac	201	1,47 %	222	4,44 %

Conclusión

El kit AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos ofrece mayor sensibilidad para la detección de proteínas con un bajo grado de sialilación, como los anticuerpos monoclonales con un único punto de N-glicosilación en la región de Fc. El nuevo flujo de trabajo de marcado con DMB elimina el paso de desecación de las muestras, lo que reduce el tiempo de preparación de muestras.

Este flujo de trabajo proporciona un método para determinar las cantidades absolutas y relativas de Neu5Ac y Neu5Gc presentes en productos

bioterapéuticos. La preparación de muestras se lleva a cabo mediante un formato de placa de 96 pocillos que permite una alta productividad y es enormemente reproducible. Los datos cuantitativos son similares a los resultados obtenidos con los flujos de trabajo de marcado con DMB más antiguos (GKK-407) y con el kit AdvanceBio (GS48-SAQ) de cuantificación de ácido siálico total.

Referencias

1. Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(8), 351-360.
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. Li, Y. et al. Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* **2017**, 114(31), 8360-8365.
4. 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.
5. Kaneko, Y. et al. Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, 313, 670-673.

www.agilent.com/chem

DE.7541782407

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020 y 2021
Impreso en EE. UU., 23 de marzo de 2021
5994-2352ES