

Méthode améliorée pour le profilage et la quantification des acides sialiques en biothérapie

Auteurs

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

Résumé

Cette note d'application décrit comment utiliser le kit de profilage et de quantification de l'acide sialique Agilent AdvanceBio (réf. GS24-SAP) pour déterminer le profil et mesurer la quantité absolue d'acides sialiques présents dans les glycoprotéines biothérapeutiques ainsi que dans l'anticorps monoclonal NISTmAb. Ce kit utilise un nouveau flux de travail amélioré à haut débit pour la préparation, la séparation et la détection des acides sialiques marqués au 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB). Le blocage des acides sialiques au niveau de l'extrémité non réductrice des N-glycanes ou des O-glycanes peut jouer un rôle clé dans la médiation de l'efficacité des glycoprotéines biothérapeutiques.¹

Le présent flux de travail décrit le kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio qui permet la libération de l'acide sialique terminal par hydrolyse acide, suivie d'un marquage au DMB et d'une analyse qualitative et quantitative. Les acides sialiques issus d'échantillons et les étalons marqués au DMB sont séparés par chromatographie en phase liquide (LC) de phase inversée et quantifiés par détection de fluorescence (FLD), puis leur structure est confirmée par spectrométrie de masse (MS).

Introduction

La composition des glycanes présents sur les glycoprotéines biothérapeutiques peut affecter leur immunogénicité, leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique.² Les glycanes sont des glucides composés de monosaccharides ayant différentes structures d'oligosaccharides possibles en fonction de leur composition et de la position des liaisons. Selon la molécule et l'application, l'acide sialique terminal peut réduire le taux de clairance, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) ou peut s'avérer anti-inflammatoire.³⁻⁵ Deux formes couramment retrouvées dans les agents biothérapeutiques sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc). Le Neu5Ac est habituellement l'espèce chimique prédominante, car le Neu5Gc n'est pas synthétisé par l'homme et sa présence dans les produits biothérapeutiques peut s'avérer immunogène. Il est donc primordial de surveiller la quantité absolue d'acide sialique ainsi que la concentration de ses différents types dans les glycoprotéines thérapeutiques.

Il est présenté ici un nouveau flux de travail à haut débit utilisant des plaques à 96 puits pour la libération, le marquage et l'analyse d'acides sialiques de glycoprotéines thérapeutiques en utilisant comme exemples le rituximab, l'étanercept, le NISTmAb et le cétuximab. Les résidus d'acides sialiques sont libérés puis marqués au 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB) par une procédure à deux étapes. Les acides sialiques marqués au DMB sont ensuite séparés et analysés par une méthode rapide de 10 minutes basée sur la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) en phase inverse avec détection FLD pour la quantification et détection MS facultative pour l'analyse massique. Le flux de travail offre à la fois une caractérisation qualitative du Neu5Ac, du Neu5Gc et d'autres espèces d'acides sialiques à l'aide d'un panel de référence

d'acides sialiques (SARP), ainsi que leur quantification absolue à un niveau de sensibilité de l'ordre de la picomole en utilisant les étalons quantitatifs de Neu5Ac et de Neu5Gc inclus. Le flux de travail permet la préparation d'échantillons à haut débit de manière fiable et reproductible pour le profilage et la quantification des acides sialiques. Ce kit offre une large gamme de détection et une sensibilité accrue pour les molécules à faible degré de sialylation.

Méthode expérimentale

Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés sur des plaques à 96 puits. Les acides sialiques ont été libérés du rituximab (Rituxan, numéro de lot M190170), de l'étanercept (Enbrel, numéro de lot M190088), du NISTmAb (numéro de lot 14HB-D-002) et de l'erbitux (cétuximab, numéro de lot M160886) par une réaction d'hydrolyse acide. La méthode élimine la nécessité d'une étape de séchage, ce qui diminue le temps de préparation des échantillons de 1 à 2 heures. La quantité d'échantillon est typiquement de 200 µg de glycoprotéines à faible degré de sialylation et de 5 µg pour les glycoprotéines fortement sialylées. Des dilutions en série des étalons de référence des acides sialiques Neu5Ac et Neu5Gc ont été utilisées pour préparer une courbe d'étalonnage et établir la limite de quantification (LOQ) ainsi que la limite de détection (LOD) du test. Les acides sialiques libérés, SARP, et les étalons ont ensuite été marqués au DMB en suivant le flux de travail illustré dans la figure 1, les étapes de libération et de marquage étant réalisées dans un thermocycleur.

Analyse LC/FLD/MS des acides sialiques marqués au DMB

Les acides sialiques marqués au DMB de rituxan, d'enbrel, de NISTmAb et d'erbitux ont été analysés par une séparation en phase inverse (RP) sur un système de LC Agilent 1290 Infinity II avec détection de fluorescence (FLD) pour la quantification. Toutes les séparations par RP-UHPLC ont été réalisées dans les conditions

décrites dans le tableau 1. Une analyse en ligne supplémentaire sur spectromètre de masse LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT (tableau 2) a également été réalisée afin de confirmer l'ordre d'élution des espèces d'acides sialiques marquées au DMB présentes dans le SARP. Un diviseur de débit fixe a été utilisé après la FLD pour dériver environ 50 % du flux vers les déchets et les 50 % restants vers le MS. Les données ont été analysées à l'aide des logiciels Agilent OpenLab CDS 2.3 et MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Le Neu5Gc et le Neu5Ac ont été quantifiés à l'aide des courbes d'étalonnage.

Matériaux

L'acétonitrile (grade LC/MS, Honeywell Burdick & Jackson) a été acheté auprès de VWR. Le méthanol (grade Optima LC/MS) a été acheté auprès de Fisher Scientific. De l'eau nanopure générée en interne a été utilisée pour toutes les expériences.

Instruments

Les échantillons d'acides sialiques marqués au DMB ont été séparés sur une colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2,1 × 75 mm, 2,7 µm ; réf. 697775-902) par la méthode décrite dans le tableau 1, sur un système Agilent LC/MS composé de :

- Pompe à haut débit Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Multi-échantillonneur Agilent Infinity (G7167B)
- Thermostat multicolonne Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Détecteur à fluorescence Agilent 1260 Infinity (G1321B)
- LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (paramètres spécifiés dans le tableau 2)

Logiciels

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0

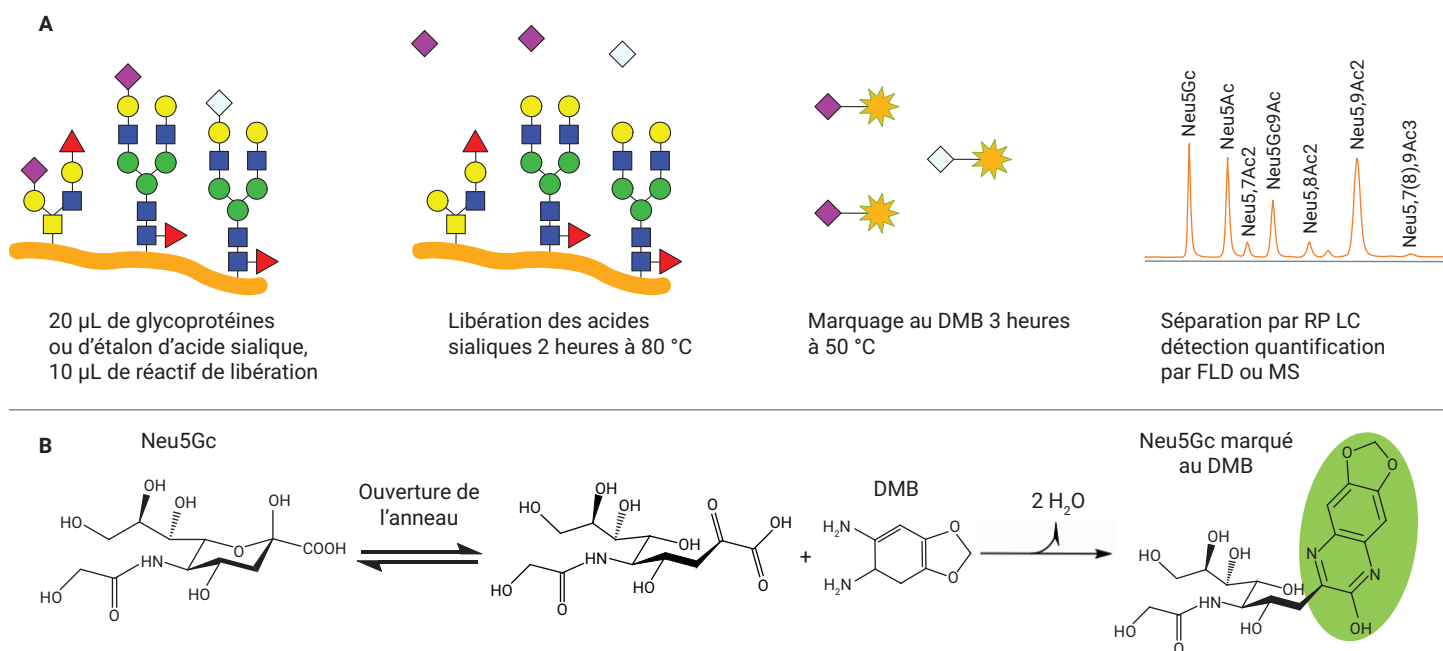


Figure 1. Méthode de libération des acides sialiques et de marquage au DMB. (A) Principe. (B) Mécanisme de marquage au DMB de l'acide sialique Neu5Gc.

Tableau 1. Condition d'UHPLC en phase inverse

Paramètre	Valeur				
Instrument	LC Agilent 1290 Infinity II				
Colonne	Agilent InfinityLab PoroShell 120EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 μm (réf. 697775-902)				
Température de colonne	30 °C				
Phase mobile	A) méthanol:acétonitrile:eau (4:8:88) B) acétonitrile				
Programme de gradient	Temps (min)	% A	% B	Débit (mL/min)	
	0,00	100	0	0,4	Élution isocratique
	6,00	100	0	0,4	
	6,25	20	80	0,4	
	7,30	20	80	0,4	Lavage
	7,50	100	0	0,4	Stabilisation
	10,00	100	0	0,4	
Volume d'injection	10 μL				
Détection	Agilent 1260 Infinity II FLD λ _{ex} 373 nm, λ _{em} 448 nm				

Tableau 2. Paramètres du système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT.

LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT	
Source	Dual AJS ESI
Température du gaz	350 °C
Débit du gaz de séchage	11 L/min
Nébuliseur	15 psi
Température du gaz de gainage	400 °C
Débit du gaz de gainage	12 L/min
Vcap	1 400 V
Tension de la buse	1 800 V
Fragmenteur	120 V
Cône d'échantillonnage	65 V
Gamme de masse (MS)	m/z 400 à 1 000
Gamme de masse (MS/MS)	m/z 100 à 550
Mode d'acquisition	Haute résolution (4 GHz)

Résultats et discussion

Analyse LC/FLD/MS des acides sialiques marqués au DMB

Analyse RP-UHPLC des résultats de SARP marqués au DMB pour la séparation et la détection de sept dérivés d'acides sialiques : Neu5Gc, Neu5Ac, Neu5,7Ac2, Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac2, Neu5,9Ac2 et Neu5,7(8),9Ac3. Bien que des différences de temps de rétention soient observées avec différentes colonnes et conditions de laboratoire ainsi que différents débits et solvants, l'ordre d'élution des acides sialiques marqués au DMB reste le même. Le panel de référence est utilisé pour évaluer la résolution et l'exactitude du système de chromatographie au début de la séquence d'échantillons. Un chromatogramme FLD type de SARP marqué au DMB est montré sur la figure 2A. L'identification des dérivés d'acides sialiques marqués au DMB a été confirmée par spectrométrie de masse (figure 2B).

Analyse de la teneur des agents biothérapeutiques et de NISTmAb en acides sialiques

Les acides sialiques marqués au DMB identifiés en appliquant le flux de travail au rituxan, à l'enbrel, au NISTmAb, et à l'erbitux sont présentés sur la figure 3. Le rituxan (figure 3A) et l'enbrel (figure 3B) contiennent principalement du Neu5Ac alors que le NISTmAb (figure 3C) et l'erbitux (figure 3D) contiennent essentiellement du Neu5Gc. Les spectres massiques des principaux pics d'échantillons marqués au DMB d'enbrel et d'erbitux confirment qu'il s'agit bien de Neu5Ac et Neu5Gc, respectivement (figure 4).

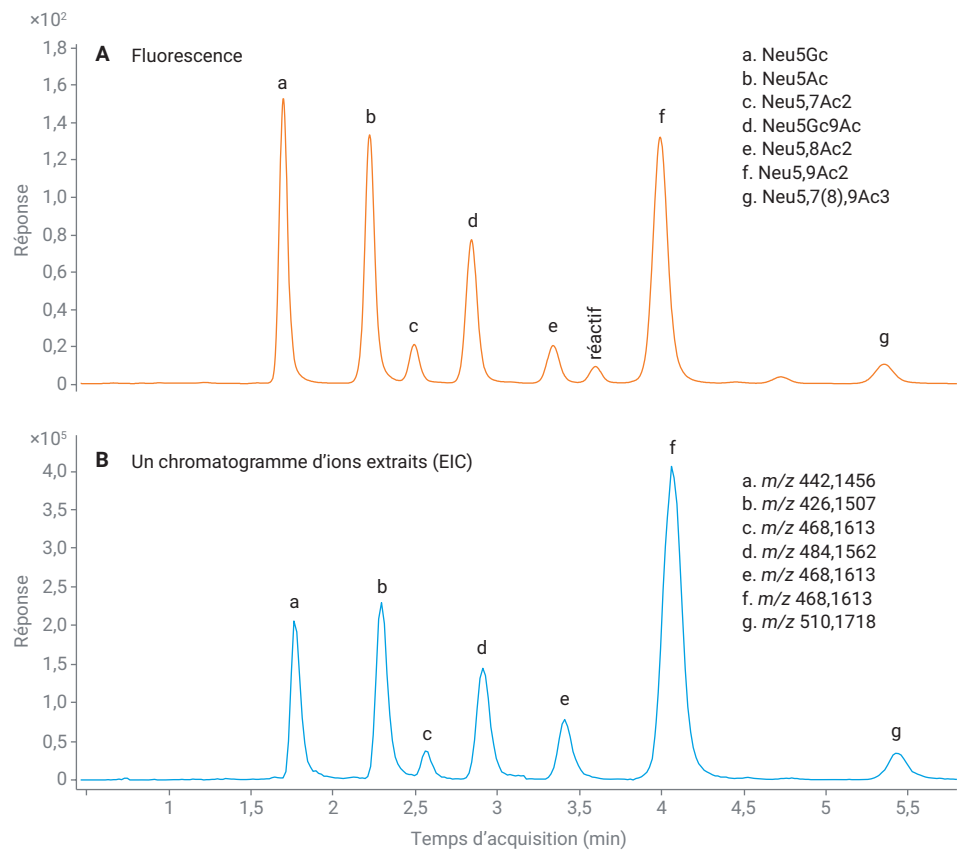


Figure 2. Chromatogramme UHPLC de SARP marqué au DMB. (A) Fluorescence ; (B) Chromatogramme d'ions extraits d'espèces d'acide sialique marquées au DMB, $[M+H]^+$.

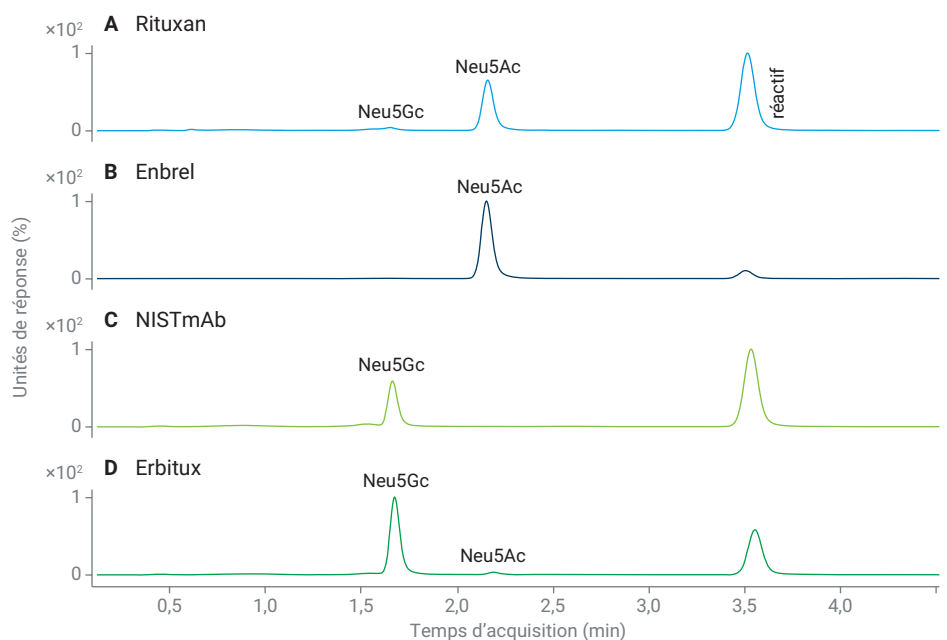


Figure 3. Profils de fluorescence UHPLC d'acides sialiques marqués au DMB de différentes glycoprotéines (A) Rituxan ; (B) Enbrel ; (C) NISTmAb et (D) Erbitux.

Analyse quantitative de la teneur en acides sialiques

Une courbe d'étalonnage quantitative a été générée à partir de la séparation chromatographique et la réponse de fluorescence des étalons de Neu5Ac et Neu5Gc marqués au DMB (figure 5). La LOD et la LOQ ont été calculées à partir du bruit mesuré avec OpenLab CDS 2.3 en calculant le bruit P2P. Les quantités molaires détectables de Neu5Gc et de Neu5Ac pour le rituxan, l'enbrel, le NISTmAb et l'erbitux ont été mesurées en intégrant les surfaces de pic et sont indiquées dans le tableau 3. Les résultats de quantification des acides sialiques totaux sont cohérents avec ceux obtenus avec le kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio (réf. GS48-SAQ) (tableau 4). Le kit présente également des performances améliorées par rapport à un flux de travail de marquage DMB plus ancien (réf. GKK-407) (tableau 5) en permettant de réduire la dilution de l'échantillon avant l'analyse et donc d'augmenter la concentration de glycoprotéines par puits d'échantillon, ce qui augmente le signal de fluorescence des acides sialiques marqués au DMB.

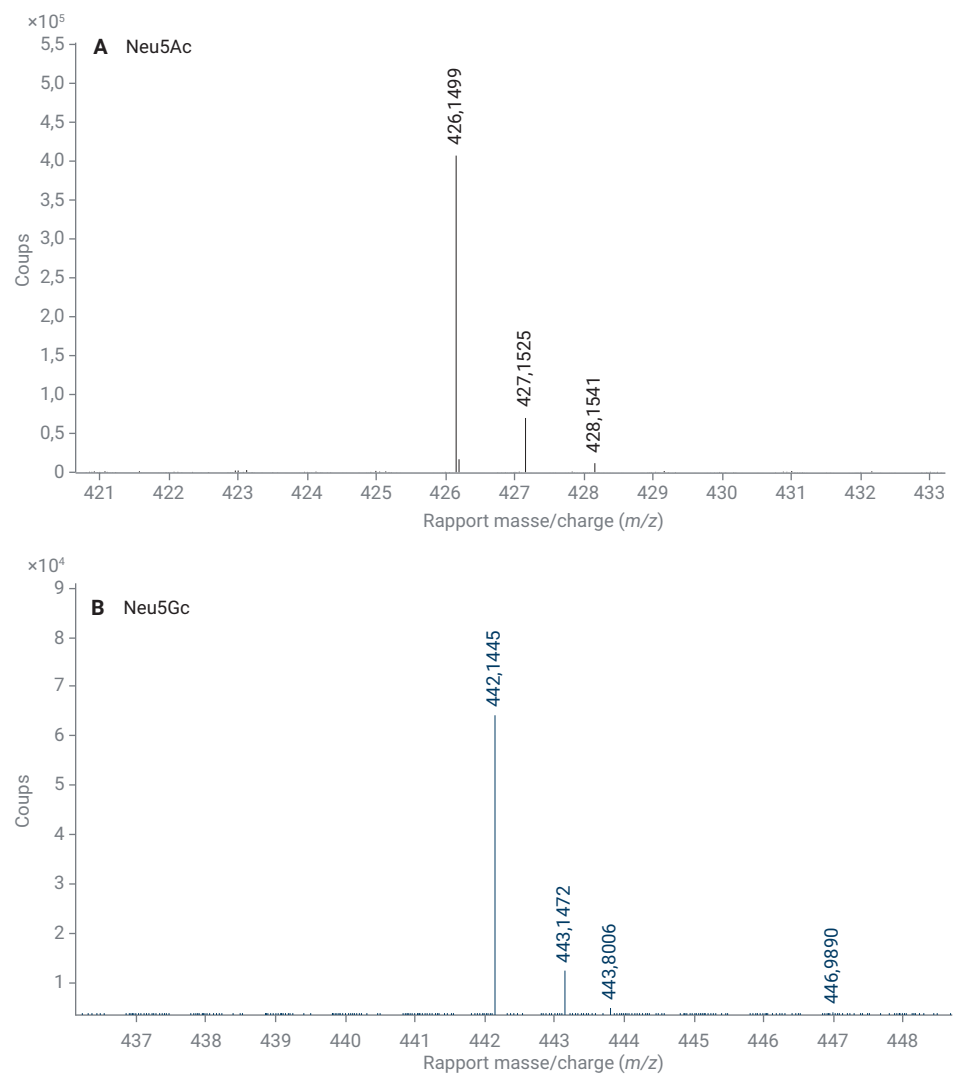


Figure 4. Spectre de masse d'acide sialique marqué au DMB (A) Neu5Ac d'Enbrel et (B) Neu5Gc d'Erbitux.

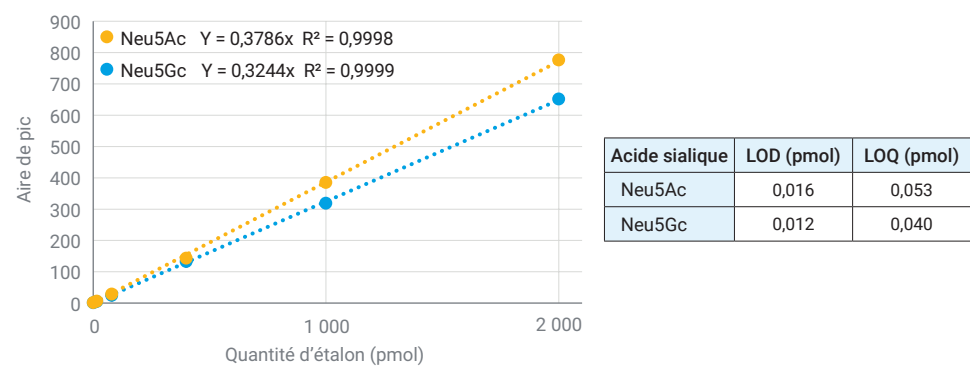


Figure 5. Courbes d'étalonnage de Neu5Ac et Neu5Gc, n = 2. Le tableau montre la LOD et la LOQ pour le Neu5Ac et le Neu5Gc.

Tableau 3. Le tableau indique la valeur moyenne (en pmol/μg) de Neu5Ac et de Neu5Gc pour chaque glycoprotéine, n = 3. ND = non détecté.

	Concentration (mg/ml)	Masse d'échantillon (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 %

Tableau 4. Acides sialiques totaux (Neu5Ac et Neu5Gc) mesurés avec le kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio (réf. GS24-SAP), comparativement aux valeurs obtenues avec le kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio (réf. GS48-SAQ), n = 3.

	Kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio		Kit de quantification des acides sialiques totaux Agilent AdvanceBio	
	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 %
Fétiune	226	4,45 %	232	7,39 %

Tableau 5. Quantification de Neu5Ac et Neu5Gc (pmol/μg) à l'aide du kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio (réf. GS24-SAP) comparativement aux valeurs obtenues avec le kit de marquage des acides sialiques au DMB Signal (réf. GKK-407), n = 3. ND = non détecté.

		GKK-407		Kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio	
Glycoprotéine	Acide sialique	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 %
Fétiune	Neu5Gc	ND	-	4,78	4,90 %
	Neu5Ac	201	1,47 %	222	4,44 %

Conclusion

Le kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio offre une meilleure sensibilité pour les protéines à faible degré de sialylation telles que les anticorps monoclonaux qui ont un seul site de N-glycosylation dans la région Fc. Le nouveau flux de travail de marquage au DMB élimine l'étape de séchage des échantillons, réduisant ainsi le temps de préparation d'échantillons.

Ce flux de travail offre une méthode permettant de mesurer les quantités absolues et relatives de Neu5Ac et Neu5Gc présents dans les agents thérapeutiques. La préparation des échantillons sur des plaques à 96 puits

permet une préparation haut débit et une haute reproductibilité. Les données quantitatives sont comparables à de précédents flux de travail de marquage au DMB (GKK-407) et aux résultats obtenus avec le kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio (GS48-SAQ).

Références

- 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.
- Scallion, 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

DE.7541782407

Ces informations peuvent être soumises à des modifications sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Imprimé aux États-Unis, le 23 mars 2021
5994-2352FR