

Un flusso di lavoro migliorato per la profilazione e la quantificazione degli acidi sialici nei prodotti bioterapeutici

Autori

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

Abstract

Questa nota applicativa descrive l'uso del kit di profilazione e quantificazione di acido sialico Agilent AdvanceBio (codice GS24-SAP) per eseguire la profilazione e la quantificazione totale degli acidi sialici presenti in glicoproteine bioterapeutiche come anche in NISTmAb. Questo kit utilizza un nuovo flusso di lavoro ad alta produttività migliorato per la preparazione, la separazione e la rivelazione di acidi sialici marcati con 1,2-diammino-4,5-metilenediossibenzene (DMB). Il capping con acido sialico in corrispondenza del terminale non riducente di N- oppure O-glicani può svolgere un ruolo fondamentale nel mediare l'efficacia delle glicoproteine bioterapeutiche.¹

Il flusso di lavoro qui descritto mostra il kit di profilazione e quantificazione di acido sialico AdvanceBio per il rilascio di acido sialico terminale mediante idrolisi dell'acido, seguito da marcatura con DMB e analisi sia qualitativa che quantitativa. Gli acidi sialici marcati con DMB provenienti da campioni e standard vengono separati mediante cromatografia liquida (LC) in fase inversa, quindi quantificati utilizzando la rivelazione a fluorescenza (FLD) e confermati dal punto di vista strutturale mediante spettrometria di massa (MS).

Introduzione

La composizione dei glicani presenti sulle glicoproteine bioterapeutiche può influenzare l'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica.² I glicani sono carboidrati composti da monosaccaridi disposti in molte possibili strutture oligosaccaridiche differenti a seconda della composizione e della posizione dei legami. A seconda della molecola e dell'applicazione, l'acido sialico terminale può ridurre il tasso di clearance, ridurre l'attività di citotossicità cellulare dipendente da anticorpi (ADCC) oppure essere anti-infiammatorio.³⁻⁵ Due forme tipicamente riscontrate nei prodotti bioterapeutici sono l'acido N-acetilneuramminico (Neu5Ac) e l'acido N-glicilneuramminico (Neu5Gc). Neu5Ac è generalmente la specie predominante, mentre Neu5Gc non viene sintetizzato dal corpo umano e la sua presenza nei prodotti bioterapeutici può essere immunogenica. È pertanto essenziale monitorare la quantità assoluta di acido sialico come anche i livelli di differenti specie di acido sialico presenti nelle glicoproteine terapeutiche.

Viene qui presentato un nuovo flusso di lavoro ad alta produttività basato su un formato di piastra a 96 pozzetti per il rilascio, la marcatura e l'analisi di acidi sialici provenienti da glicoproteine terapeutiche, usando rituximab, etanercept, NISTmAb e cetuximab come esempi. I residui di acido sialico vengono rilasciati e quindi marcati con 1,2-diammino-4,5-metilenediossibenzene (DMB) con una procedura in due fasi. Gli acidi sialici marcati con DMB vengono quindi separati e analizzati utilizzando un metodo rapido della durata di 10 minuti basato sulla cromatografia liquida a prestazioni ultra elevate (UHPLC) in fase inversa con la rivelazione FLD per la quantificazione e eventualmente la rivelazione MS per l'analisi in massa. Il flusso di lavoro offre sia la caratterizzazione qualitativa di Neu5Ac, Neu5Gc e altre specie di acidi sialici, utilizzando un pannello di riferimento di acidi sialici (SARP, sialic acid reference panel), che la quantificazione assoluta

con sensibilità a livello della picomole, utilizzando gli standard quantitativi di Neu5Ac e Neu5Gc inclusi. Il flusso di lavoro consente una preparazione del campione ad alta produttività affidabile e riproducibile per la profilazione e la quantificazione degli acidi sialici. Questo kit offre un ampio intervallo di rivelazione e una migliore sensibilità per molecole con bassi livelli di sialilazione.

Condizioni sperimentali

Preparazione del campione

I campioni sono stati preparati usando un formato in piastre a 96 pozzetti. Acidi sialici sono stati rilasciati da rituximab (Rituxan, numero di lotto M190170), etanercept (Enbrel, numero di lotto M190088), NISTmAb (numero di lotto 14HB-D-002) ed Erbitux (cetuximab, numero di lotto M160886) mediante una reazione di idrolisi dell'acido. Il metodo elimina la necessità di una fase di evaporazione, riducendo in tal modo il tempo complessivo di preparazione del campione di 1-2 ore. La quantità di campione è tipicamente di 200 µg di glicoproteina con basso livello di sialilazione e 5 µg di glicoproteina altamente sialilata. Diluizioni successive di standard di riferimento degli acidi sialici Neu5Ac e Neu5Gc sono state utilizzate per preparare una curva standard e per determinare il limite di quantificazione (LOQ, limit of quantitation) e il limite di rivelazione (LOD, limit of detection) per l'analisi. Acidi sialici rilasciati, SARP e standard sono stati quindi derivatizzati con DMB seguendo il flusso di lavoro illustrato nella Figura 1; le fasi di rilascio e marcatura sono state eseguite in un termociclatore.

Analisi LC/FLD/MS di acidi sialici marcati con DMB

Gli acidi sialici marcati con DMB provenienti da Rituxan, Enbrel, NISTmAb e Erbitux sono stati analizzati utilizzando la separazione in fase inversa (RP, reversed-phase) con un sistema LC Agilent 1290 Infinity II con rivelazione a fluorescenza (FLD) per la quantificazione. Tutte le separazioni RP-UHPLC sono state condotte nelle condizioni descritte

nella Tabella 1. È stata anche eseguita un'analisi aggiuntiva in linea utilizzando uno spettrometro di massa LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio Agilent (Tabella 2) per confermare l'ordine di eluizione delle specie di acido sialico marcato con DMB presenti nel SARP. Uno splitter di flusso fisso è stato utilizzato dopo il rivelatore FLD, deviando approssimativamente 50% del flusso verso lo scarico e 50% verso il sistema MS. I dati sono stati analizzati con il sistema di gestione dei dati cromatografici Agilent OpenLab CDS 2.3 e il software di analisi qualitativa MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Neu5Gc e Neu5Ac sono stati quantificati utilizzando le curve di calibrazione.

Materiali

L'acetoneitrile (di grado per LC/MS, Honeywell Burdick & Jackson) è stato acquistato presso VWR. Il metanolo (Optima, di grado per LC/MS) è stato acquistato presso Fisher Scientific. Acqua nanopura generata internamente è stata utilizzata per tutti gli esperimenti.

Strumentazione

I campioni di acido sialico marcati con DMB sono stati separati utilizzando una colonna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2,1 × 75 mm, 2,7 µm; codice 697775-902) secondo i dettagli del metodo riportati nella Tabella 1, con una configurazione per LC/MS Agilent composta da:

- Pompa High Speed Agilent 1290 Infinity II (G7120A)
- Multicampionatore Agilent Infinity (G7167B)
- Termostato multicolonna Agilent 1290 Infinity II (G7116B)
- Rivelatore a fluorescenza Agilent 1260 Infinity (G1321B)
- Sistema LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio (parametri nella Tabella 2)

Software

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0

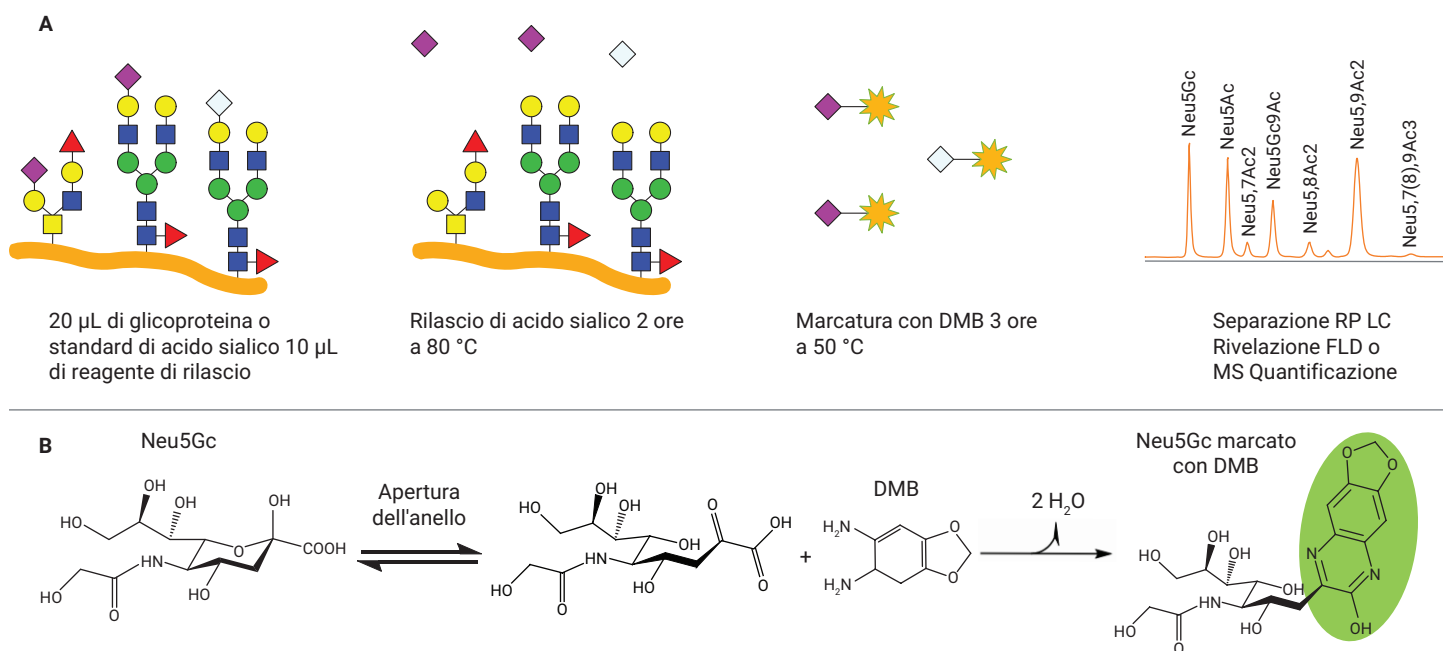


Figura 1. Flusso di lavoro di rilascio e marcatura con DMB di acido sialico. (A) Panoramica (B) Meccanismo di marcatura con DMB dell'acido sialico Neu5Gc.

Tabella 1. Condizioni di UHPLC in fase inversa.

Parametro	Valore																																
Strumento	Sistema LC Agilent 1290 Infinity II																																
Colonna	Agilent InfinityLab PoroShell 120EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 μm (codice 697775-902)																																
Temperatura della colonna	30 °C																																
Fase mobile	A) metanolo:acetonitrile:acqua (4:8:88) B) acetonitrile																																
Programma di gradiente	<table><tr><td>Tempo (min)</td><td>%A</td><td>%B</td><td>Flusso (mL/min)</td><td></td></tr><tr><td>0,00</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td><td rowspan="3">Isocratico eluizione</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>Lavaggio</td></tr><tr><td>7,50</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td><td rowspan="2">Riequilibrio</td></tr><tr><td>10,00</td><td>100</td><td>0</td><td>0,4</td></tr></table>	Tempo (min)	%A	%B	Flusso (mL/min)		0,00	100	0	0,4	Isocratico eluizione	6,00	100	0	0,4	6,25	20	80	0,4	7,30	20	80	0,4	Lavaggio	7,50	100	0	0,4	Riequilibrio	10,00	100	0	0,4
Tempo (min)	%A	%B	Flusso (mL/min)																														
0,00	100	0	0,4	Isocratico eluizione																													
6,00	100	0	0,4																														
6,25	20	80	0,4																														
7,30	20	80	0,4	Lavaggio																													
7,50	100	0	0,4	Riequilibrio																													
10,00	100	0	0,4																														
Volume di iniezione	10 μL																																
Rivelazione	FLD Agilent 1260 Infinity II λ _{Ecc} 373 nm, λ _{Em} 448 nm																																

Tabella 2. Parametri per il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio.

Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio	
Sorgente	AJS ESI doppia
Temperatura del gas	350 °C
Flusso del Drying Gas	11 L/min
Nebulizzatore	15 psi
Temperatura dello sheath gas	400 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
Vcap	1.400 V
Tensione ugello	1.800 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Intervallo di massa (MS)	m/z da 400 a 1.000
Intervallo di massa (MS/MS)	m/z da 100 a 550
Modalità di acquisizione	Alta risoluzione (4 GHz)

Risultati e discussione

Analisi LC/FLD/MS di acidi sialici marcati con DMB

L'analisi RP-UHPLC di SARP marcati con DMB dà come risultato la separazione e la rivelazione di sette acidi sialici derivati: Neu5Gc, Neu5Ac, Neu5,7Ac2, Neu5Gc,9Ac, Neu5,8Ac2, Neu5,9Ac2 e Neu5,7(8),9Ac3. Sebbene possano essere osservate differenze nei tempi di ritenzione con colonne, flussi, solventi o condizioni di laboratorio differenti, l'ordine di eluizione degli acidi sialici derivatizzati con DMB rimane invariato. Il pannello di riferimento viene utilizzato per valutare la risoluzione e l'accuratezza del sistema cromatografico all'inizio della sequenza di campioni. Un tipico cromatogramma FLD di un SARP marcato con DMB è mostrato nella Figura 2A. L'identificazione dei derivati DMB-acido sialico è stata confermata mediante spettrometria di massa (Figura 2B).

Analisi del contenuto di acido sialico di prodotti bioterapeutici e NISTmAb

Gli acidi sialici marcati con DMB identificati applicando il flusso di lavoro a Rituxan, Enbrel, NISTmAb ed Erbitux sono mostrati nella Figura 3. Sia Rituxan (Figura 3A) che Enbrel (Figura 3B) contengono principalmente Neu5Ac, mentre NISTmAb (Figura 3C) ed Erbitux (Figura 3D) contengono principalmente Neu5Gc. Gli spettri di massa dei picchi principali in campioni marcati con DMB provenienti da Enbrel ed Erbitux confermano le loro identità rispettivamente come Neu5Ac e Neu5Gc (Figura 4).

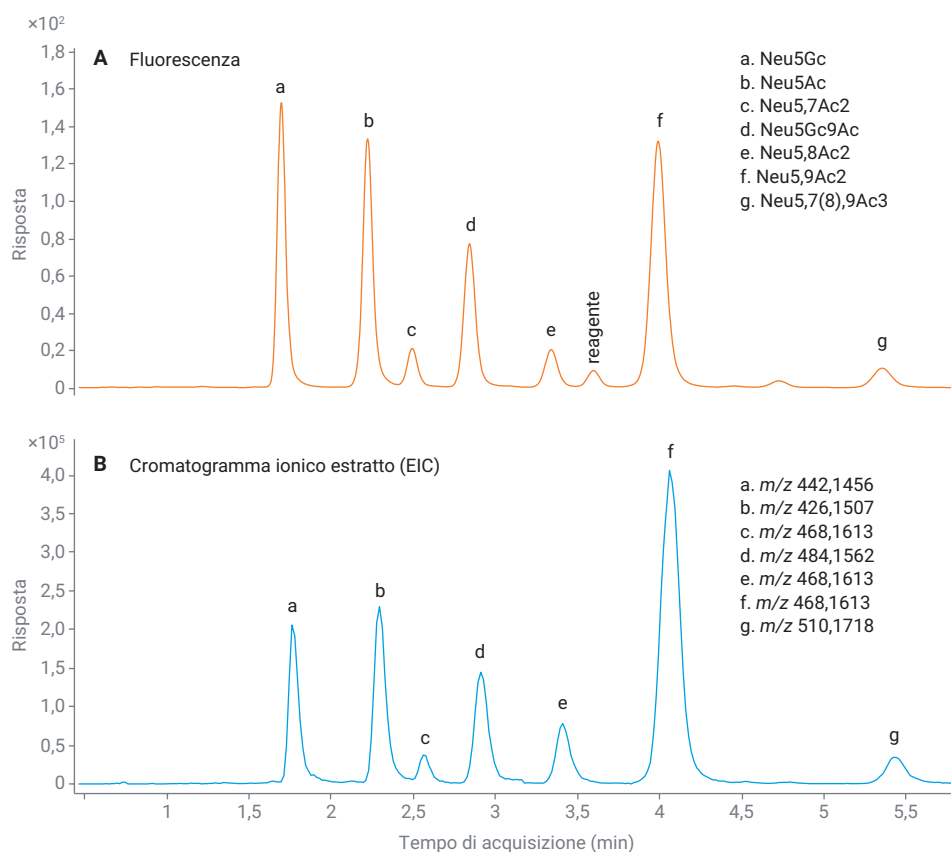


Figura 2. Cromatogramma UHPLC di SARP marcati con DMB. (A) Fluorescenza; (B) cromatogramma ionico estratto di specie di acido sialico marcate con DMB, $[M+H]^+$.

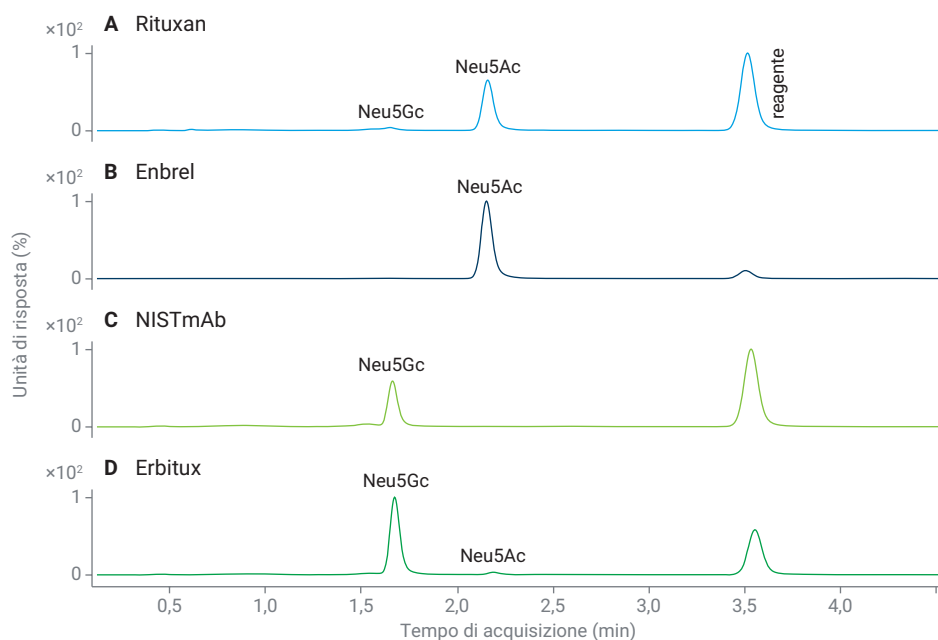


Figura 3. Profili di fluorescenza UHPLC di acidi sialici marcati con DMB provenienti da glicoproteine differenti (A) Rituxan; (B) Enbrel; (C) NISTmAb; (D) Erbitux.

Analisi quantitativa del contenuto di acido sialico

Una curva di calibrazione quantitativa è stata generata in base alla separazione cromatografica e alla risposta di fluorescenza di standard di Neu5Ac e Neu5Gc marcati con DMB (Figura 5). I valori di LOD e LOQ sono stati calcolati utilizzando il rumore determinato da OpenLab CDS 2.3 utilizzando il calcolo del rumore P2P. Le quantità in moli rilevabili di Neu5Gc e Neu5Ac provenienti da Rituxan, Enbrel, NISTmAb e Erbitux sono state determinate in base alle aree dei picchi integrate ed elencate nella Tabella 3. I risultati della quantificazione dell'acido sialico totale sono consistenti con quelli ottenuti dal kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio (codice GS48-SAQ) (Tabella 4). Il kit mostra inoltre migliori prestazioni rispetto a un flusso di lavoro di marcatura con DMB precedente (codice GKK-407) (Tabella 5) consentendo una maggiore concentrazione di glicoproteina per pozzetto di campione come una diminuzione della diluizione del campione prima dell'analisi, dando come risultato un aumento del segnale di fluorescenza per gli acidi sialici marcati con DMB.

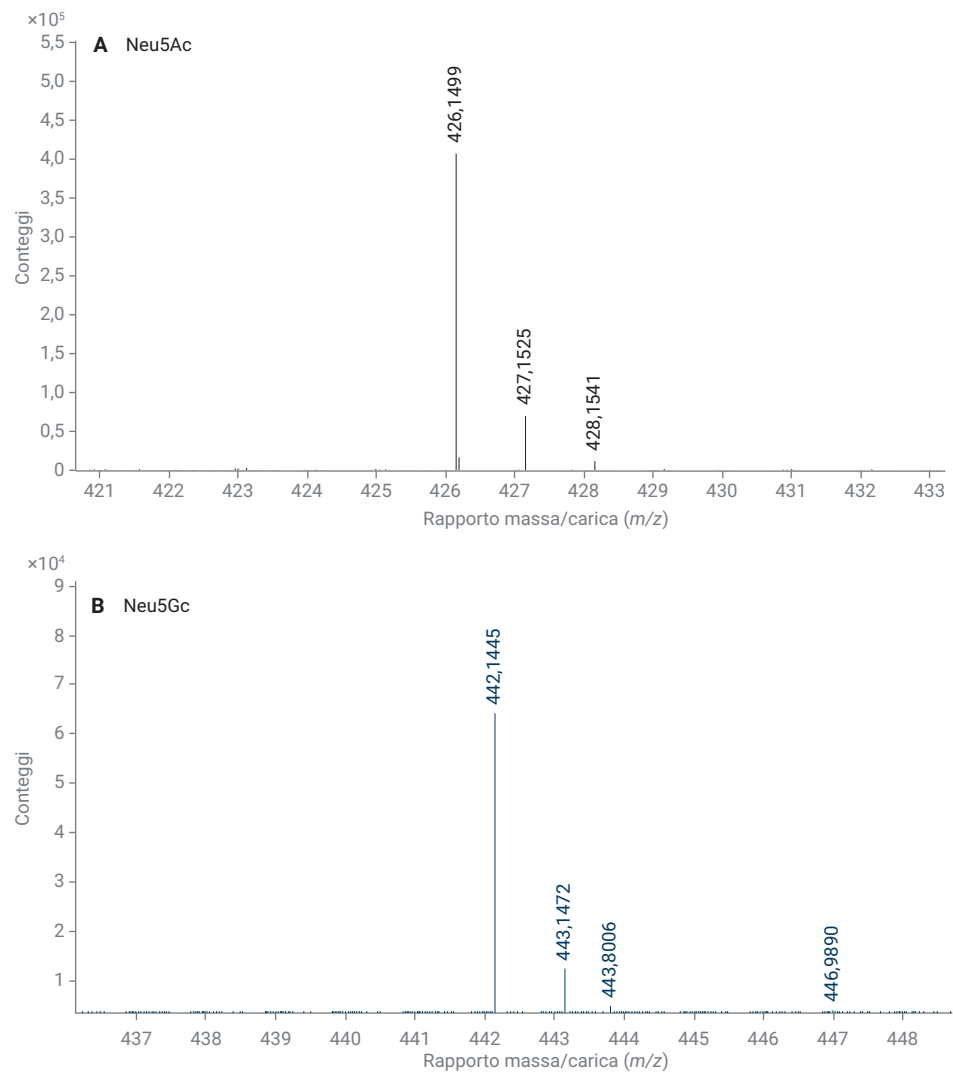


Figura 4. Spettro di massa di acido sialico marcato con DMB. (A) Neu5Ac proveniente da Enbrel; (B) Neu5Gc proveniente da Erbitux.

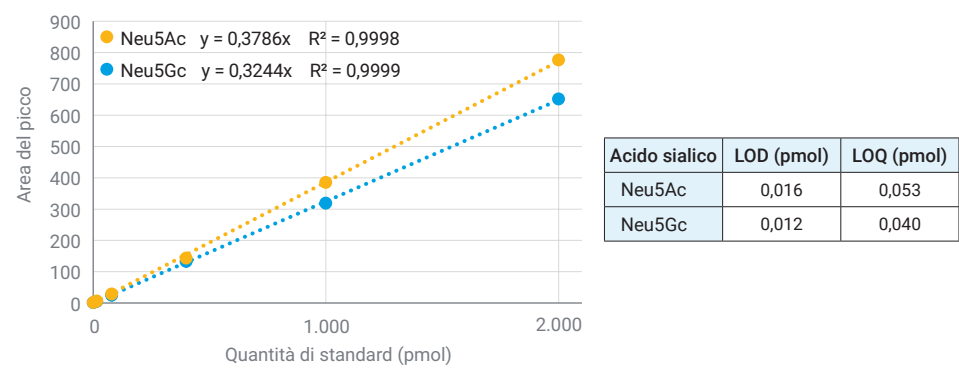


Figura 5. Curve di calibrazione per Neu5Ac e Neu5Gc, n = 2. I valori di LOD e LOQ per Neu5Ac e Neu5Gc sono mostrati nella tabella.

Tabella 3. Il valore medio di pmol/μg di Neu5Ac e Neu5Gc per ciascuna glicoproteina è mostrato nella tabella, n = 3. ND = non rilevato.

	Concentrazione (mg/mL)	Massa del campione (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	-
NIST mAb	10	200	ND	-	0,36	1,8%
Erbix	2	40	0,12	10,9%	3,72	7,1%

Tabella 4. Acido sialico totale (Neu5Ac e Neu5Gc) con il kit di profilazione e quantificazione di acido sialico Agilent AdvanceBio (codice GS24-SAP) in confronto con i valori ottenuti con il kit di quantificazione dell'acido sialico totale Agilent AdvanceBio (codice GS48-SAQ), n = 3.

	Kit di profilazione e quantificazione di acido sialico Agilent AdvanceBio		Kit di quantificazione dell'acido sialico totale 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%
Fetuina	226	4,45%	232	7,39%

Tabella 5. Quantificazione di Neu5Ac e Neu5Gc (pmol/μg) utilizzando il kit di profilazione e quantificazione di acido sialico Agilent AdvanceBio (codice GS24-SAP) in confronto con i valori ottenuti con il kit di marcatura con DMB di acido sialico Signal DMB (codice GKK-407), n=3. ND = non rilevato.

		GKK-407		Kit di profilazione e quantificazione di acido sialico Agilent AdvanceBio	
Glicoproteina	Acido sialico	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%

Conclusioni

Il kit di profilazione e quantificazione di acido sialico AdvanceBio offre una migliore sensibilità per proteine con bassi livelli di sialilazione come gli anticorpi monoclonali con un unico sito di N-glicosilazione nella regione Fc. Il flusso di lavoro di marcatura con DMB aggiornato elimina la fase di asciugatura dei campioni, riducendo il tempo di preparazione del campione.

Questo flusso di lavoro fornisce un metodo per determinare sia le quantità assolute che le quantità relative di Neu5Ac e Neu5Gc presenti in prodotti bioterapeutici. La preparazione del

campione utilizza un formato a 96 pozzetti per la preparazione ad alta produttività del campione ed è altamente riproducibile. I dati quantitativi sono confrontabili con i risultati di flussi di lavoro di marcatura con DMB precedenti (GKK-407) e con quelli del kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio (GS48-SAQ).

Bibliografia

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. USA.* **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

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2021
Stampato negli Stati Uniti, 23 marzo 2021
5994-2352ITE