

Análisis de N-glicanos en glicoproteínas bioterapéuticas mediante la preparación de muestras con el kit AdvanceBio Gly-X 2-AB Express y LC/FLD/MS

Simplificación y estandarización del análisis de N-glicanos

La ubicación y estructura de los N-glicanos desempeña una función crítica en la farmacología de las proteínas terapéuticas, lo cual puede afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica.

La 2-AB (2-aminobenzamida) es un marcador consolidado que se lleva usando más de 20 años para generar datos sobre N-glicanos. El kit AdvanceBio Gly-X 2-AB Express de Agilent es un sistema de alto rendimiento para la preparación de muestras de N-glicanos¹ con un flujo de trabajo simplificado, que utiliza una etapa de desglucosilación en solución de cinco minutos, seguida del marcado con 2-AB en una matriz en estado sólido. El exceso de reactivo de tinción se elimina con acetonitrilo antes de eluir las muestras marcadas con agua desionizada (DI), sin necesidad de secarlas. Las muestras están listas para su análisis por UHPLC/FLD/MS en 2 horas o menos gracias a la columna AdvanceBio Amide para cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), seguida de una cuantificación relativa. Además, está disponible un amplio abanico de patrones de N-glicanos marcados con 2-AB para calibrar las separaciones de N-glicanos y ayudar a identificar los distintos N-glicanos.



Figura 1. Flujo de trabajo de análisis por LC/FLD/MS de N-glicanos liberados mediante el uso de la preparación de muestras con el kit Gly-X 2-AB Express.

Solución integral de flujo de trabajo para el análisis de N-glicanos diseñada y fabricada por Agilent

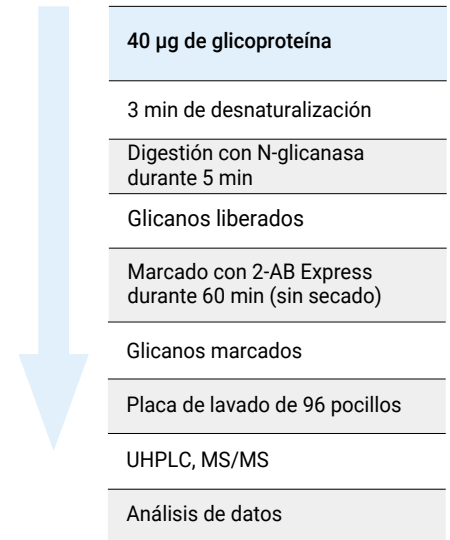
En esta guía, encontrará los consumibles que necesita para empezar con la preparación y el análisis de muestras de N-glicanos marcados con 2-AB. Muchos de ellos se utilizaron para analizar los N-glicanos de rituximab (Rituxan, un anticuerpo monoclonal o mAb) y de etanercept (Enbrel, una proteína de fusión o Fc), demostrándose todo el flujo de trabajo, que incluía la preparación de las muestras, la separación y la interpretación de los datos.²

Esta guía de flujo de trabajo para el análisis de N-glicanos con el kit Gly-X 2-AB Express incluye información de pedidos para:

- El kit de preparación de muestras: las muestras se preparan y están listas para su análisis en 2 horas mediante la tecnología AdvanceBio Gly-X 2-AB Express.
- Patrones de N-glicanos marcados con 2-AB: estos patrones individuales bien caracterizados y bibliotecas son esenciales a la hora de caracterizar las formas de N-glicanos que pueden afectar a la seguridad y eficacia de los fármacos bioterapéuticos.
- Columnas para cromatografía de líquidos para la separación de glicanos mediante HILIC.
- Disolventes y reactivos.
- Viales y tapones.
- Fase móvil concentrada lista para diluir.

Pasos que mejoran la productividad:

- La digestión con PNGasa F durante 5 minutos a 50 °C permite una liberación sin sesgo de los N-glicanos.
- El marcado con 2-AB Express se lleva a cabo mientras los glicanos están inmovilizados en la matriz de lavado, lo cual elimina el paso de secado y reduce el tiempo total de preparación de la muestra.
- El uso de un reactivo de tinción consolidado para marcado, como la 2-AB, garantiza la continuidad de los datos para los proyectos en curso.
- Un formato de kit modular para un uso flexible.



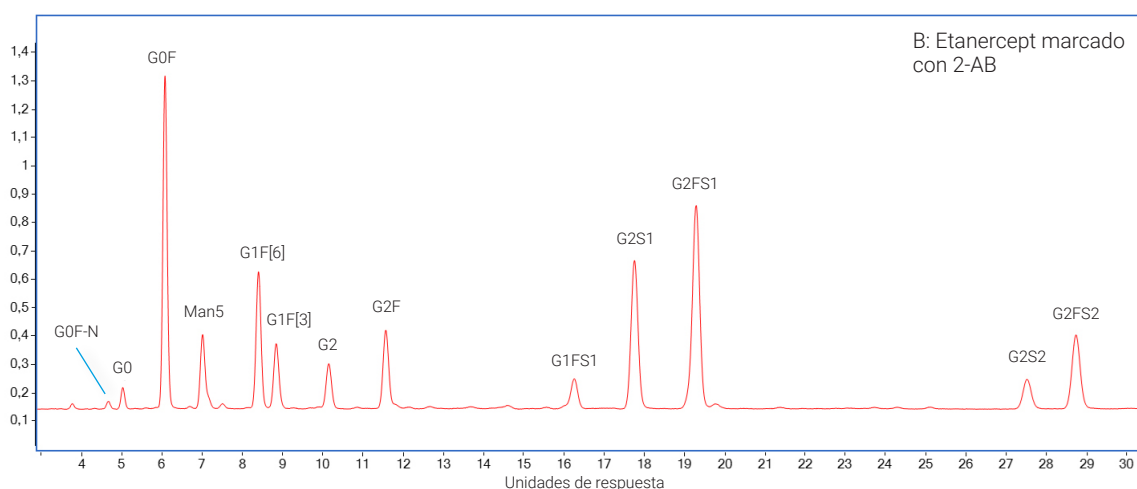
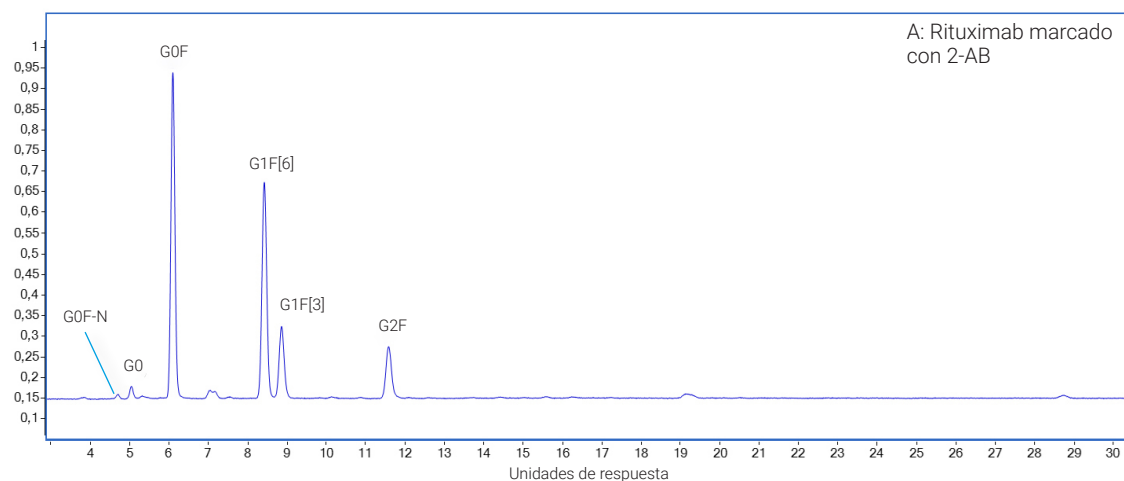


Figura 2. Perfil de fluorescencia en HILIC-UHPLC de N-glicanos de (A) Rituxan y (B) Enbrel marcados con 2-AB. Las áreas porcentuales relativas de los N-glicanos se muestran en las tablas 1 y 2, n = 4. Las condiciones de UHPLC y los parámetros de Q-TOF se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 1 Valores porcentuales de área relativa, SD y % CV para N-glicanos de rituximab marcados con 2-AB, n = 4.

	Área porcentual rel. promedio	Desviación estándar	% CV
G0F-N	0,523	0,030	5,715
G0	1,423	0,041	2,891
G0F	42,780	0,052	0,122
G1F[6]	33,760	0,077	0,229
G1F[3]	11,853	0,040	0,340
G2F	9,660	0,140	1,447

Tabla 2. Valores porcentuales de área relativa, SD y % CV para N-glicanos de Enbrel marcados con 2-AB, n = 4.

	Área porcentual rel. promedio	Desviación estándar	% CV
G0F-N	0,428	0,005	1,170
G0	1,155	0,006	0,500
G0F	19,783	0,026	0,133
Man5	5,225	0,034	0,654
G1F[6]	9,468	0,029	0,303
G1F[3]	4,663	0,056	1,193
G2	3,280	0,008	0,249
G2F	6,223	0,019	0,304
G1FS1	3,083	0,039	1,253
G2S1	14,400	0,029	0,204
G2FS1	20,523	0,039	0,188
G2S2	3,415	0,053	1,540
G2FS2	8,350	0,014	0,169

Tabla 3 Condiciones del sistema de UHPLC HILIC/FLD 1290 Infinity II de Agilent para N-glicanos marcados con 2-AB.

Parámetro	Valor																					
Columna	Columna de HILIC AdvanceBio Amide de Agilent, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm (ref. 859750-913)																					
Temp. de la columna	60 °C																					
Fase móvil	A) formiato de amonio 50 mM, pH = 4,4 B) acetonitrilo																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (minutos)</th> <th>% B</th> <th>Flujo (ml/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>74</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>54</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>51</td> <td>40</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>40</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>54</td> <td>74</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>64</td> <td>74</td> <td>0,6</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (minutos)	% B	Flujo (ml/min)	0	74	0,6	50	54	0,6	51	40	0,6	52	40	0,6	54	74	0,6	64	74	0,6
Tiempo (minutos)	% B	Flujo (ml/min)																				
0	74	0,6																				
50	54	0,6																				
51	40	0,6																				
52	40	0,6																				
54	74	0,6																				
64	74	0,6																				
Volumen de inyección	1 µl																					
Detección de fluorescencia	Sistema de FLD Agilent 1260 Infinity II 2-AB: λEx 260 nm, λEm 430 nm																					

Cómo empezar con Gly-X 2-AB Express: Consejos para obtener resultados óptimos

Consideraciones sobre la preparación de muestras de glicoproteínas

Las muestras de glicoproteínas deben prepararse a una concentración máxima de 2 mg/ml en un tampón neutro de baja salinidad y sin detergentes. Las muestras de mayor concentración deben diluirse en agua o en HEPES 50 mM, a pH 7,9.

- Concentración máxima: 2 mg/ml.
- Cantidad máxima de proteína por reacción: 40 µg (por ejemplo, 20 µl de cada solución de 2 mg/ml). Podrían utilizarse cantidades más elevadas de proteínas para los mAb (hasta 100 µg), aunque debe evaluarse la linealidad de los datos cuando se carguen más de 40 µg.
- Tampón: Tampón neutro de baja salinidad (~150 mM) sin detergentes. Las muestras pueden diluirse en agua o en HEPES 50 mM, a pH 7,9.
- Se recomienda un filtro de centrifuga con valor de corte de peso molecular de 10 kDa si la concentración salina de la muestra es superior a 150 mM.

Tabla 4. Parámetros del Q-TOF Agilent 6545XT para N-glicanos marcados con 2-AB.

Q-TOF Agilent 6545XT	
Fuente	AJS ESI dual
Temperatura del gas	150 °C
Flujo de gas de secado	9 l/min
Nebulizador	35 psi
Temperatura del gas de focalización	300 °C
Flujo de gas de focalización	10 l/min
Vcap	2.500 V
Tensión de la boquilla	500 V
Fragmentador	120 V
Skimmer	65 V
Intervalo de masas	m/z de 300 a 3.000
Velocidad de barrido	1 espectro/s
Modo de adquisición	Intervalo dinámico ampliado (2 GHz)

Instrumentos de incubación y lavado

Durante el flujo de trabajo de preparación de muestras con el kit Gly-X 2-AB Express, las muestras se calientan a 90 °C para la desnaturalización de proteínas, a 50 °C para la digestión con PNGasa F y a 65 °C para el marcado con 2-AB. Le recomendamos que utilice un termociclador o un termobloque seco para calentar las muestras en la placa de 96 pocillos suministrada mediante las siguientes indicaciones.

El flujo de trabajo utiliza un sencillo lavado por aspiración. Si desea utilizar un calentador, un colector de vacío o una bomba equivalentes, pero distintos de los modelos indicados en esta tabla, es posible que sea necesario realizar una validación. Contacte con Agilent para una asistencia técnica más detallada.

Instrumentos de calefacción y vacío (de un fabricante distinto de Agilent)	Referencia
Termociclador de 96 pocillos (Corning)	THERM-1001, 110V THERM-1000, 230V
Termobloque seco, 4 bloques, HB4DG, EE. UU. (cant.: 2) (Troemner)	HB4DG
Bloques calentadores modulares (Cant.: 2) (VWR)	VWR 13259-260
Termobloque/baño seco digital compacto (Thermo Fisher Scientific)	88871001
Colector de vacío (Millipore)	MSVMHTS00
Bomba de vacío (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220V

Buenas prácticas de HILIC

- Los volúmenes de inyección pequeños de 1 µl (solución acuosa) de glicanos marcados son los más adecuados para las separaciones por HILIC. Los volúmenes de inyección de solución acuosa > 1 µl afectarán a la forma y resolución de los picos. Para obtener instrucciones sobre la dilución de la muestra con disolventes orgánicos para volúmenes de inyección > 1 µl, consulte el manual del usuario de Gly-X 2-AB.²
- Con el concentrado de fase móvil de formiato de amonio Agilent AdvanceBio (ref. G3912-00000) se puede preparar 1 l de formiato de amonio 50 mM, pH 4,4.
- Los usuarios deben optimizar sus sistemas de HPLC para minimizar el volumen muerto. La vida útil óptima de la columna se consigue operando sólo hasta el 80 % de la presión máxima.
- La temperatura típica de funcionamiento es de 60 °C. Se pueden utilizar temperaturas más altas, pero reducirán la vida útil de la columna.

Patrones de glicanos

Agilent ofrece un amplio abanico de patrones y bibliotecas de N-glicanos liberados marcados con 2-AB para calibrar los sistemas de LC/FLD/MS utilizados para el análisis de glicanos liberados.³ Los patrones de glicanos son fundamentales para ayudar a identificar isómeros de glicanos y picos que se solapan. Entre los posibles coeluyentes se encuentran G0F/Man5, Man5/G1, G1FS1/G2F.

Análisis de datos y generación de informes

Los datos se analizaron mediante el software de análisis cualitativo MassHunter BioConfirm de Agilent con la base de datos personal de compuestos.

Nota: En la actualidad Agilent ofrece el sistema MassHunter 11 con el software de análisis de datos OpenLab ECM XT que cumple con la norma 21 CFR Parte 11.

Selección e información para pedidos sencillas

Para pedir los artículos que aparecen en las siguientes tablas en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a su lista de productos favoritos haciendo clic en el enlace MiLista del encabezado. A continuación, puede introducir las cantidades de los productos que necesita, añadir los productos a la cesta y proceder a la compra. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla en futuros pedidos.

Si es la primera vez que emplea la opción Productos favoritos, se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. Si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos pueden pedirse on-line haciendo clic en las referencias individuales o a través de sus canales de venta y distribución habituales.

MiLista 1 Preparación de muestras de N-glicanos Gly-X 2-AB Express, columnas de HILIC AdvanceBio Amide, disolventes y recipiente para muestras.

Descripción	Referencia
Preparación de muestras de N-glicanos	
Kit AdvanceBio Gly-X 2-AB Express, 96-ct	GX96-2AB
Kit AdvanceBio Gly-X 2-AB Express, 24-ct	GX24-2AB*
Kit de inicio AdvanceBio Gly-X 2-AB Express	GX400
Conjunto de módulos de desglucosilación AdvanceBio Gly-X y marcado con 2-AB Express, 24-ct	GX24-401AB*
Columnas, accesorios y conectores	
AdvanceBio Amide de HILIC, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm	859750-913
Conectores de conexión rápida Agilent InfinityLab (inyector de columna)	5067-5965
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (salida de columna)	5067-5966
Disolventes y reactivos	
Acetonitrilo ultrapuro para LC/MS InfinityLab, 1 l	5191-4496
Patrón ultrapuro para LC/MS InfinityLab, agua, 1 l	5191-4498
Concentrado de fase móvil de formiato de amonio AdvanceBio, 10 ml	G3912-00000
Disolución para MS, ácido fórmico, 10 ml	US-700002341
Consumibles para el filtrado de disolventes**	
Conjunto para la filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, nylon de 47 mm, 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, de celulosa regenerada de 47 mm, 0,2 µm, 100/paq.	5191-4340
Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm	5041-2168
Consumibles para la manipulación de disolventes	
Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l	9301-6524
Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l	9301-6526
Botella de disolvente, transparente, 2 l	9301-6342
Botella de disolvente, ámbar, 2 l	9301-6341
Botella de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l con tapa Stay Safe [§]	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g [§]	5043-1193
Viales y tapones[†]	
Vial, tipo rosca, 2 ml, polipropileno, 100/paq. [‡]	5191-8150
Inserto de vial, 300 µl, polipropileno, pies de polímero, 100/paq. [‡]	5182-0549
Tapón de polipropileno transparente de 9 mm, tipo rosca, 100/paq.	5191-8151

* El kit 24-ct (GX24-2AB) contiene una placa de lavado de 96 pocillos y un módulo de marcado con 2-AB de 24-ct. Guarde el módulo de lavado a temperatura ambiente y pida los recambios de 24-ct del conjunto de módulos del kit Gly-X Express de desglucosilación y marcado con 2-AB (GX24-401AB).

** Utilice el conjunto de filtración de disolventes InfinityLab antes del análisis si se utilizan disolventes distintos a los indicados en esta tabla.

† Los glicanos marcados con 2-AB se eluyen en una placa de 96 pocillos. Los usuarios pueden inyectar las muestras de la placa en el sistema de LC directamente o transferirlas a los viales de la muestra.

‡ Agilent recomienda utilizar un inserto de vial de 250 µl con el vial de polipropileno de 2 ml para minimizar el volumen muerto.

§ El filtro de carbón no se incluye con el depósito de residuos, pida el 5043-1221 y el 5043-1193 juntos.

MiLista 2 Configuraciones adicionales de los kits y módulos Gly-X 2-AB Express para la preparación de muestras de N-glicanos.

Descripción	Referencia
Módulo de desglucosilación AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GX96-100
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X 2-AB Express, 96-ct	GX96-401
Módulo de lavado AdvanceBio Gly-X 2-AB Express, 96-ct	GB96-402
Módulo de desglucosilación AdvanceBio Gly-X, 24-ct	GX24-100
Módulo de marcado AdvanceBio Gly-X 2-AB Express, 24-ct	GX24-401
Conjunto de módulos de desglucosilación AdvanceBio Gly-X y marcado con 2-AB Express, 96-ct	GX96-401AB

Patrones de glicanos

Para obtener una lista completa de los patrones de N-glicanos marcados de Agilent, consulte nuestro folleto técnico de patrones de glicanos.³

MiLista 3 Patrones de N-glicanos marcados con 2-AB para los glicanos que aparecen en rituximab y etanercept.² Estos patrones pueden utilizarse como controles en la separación de N-glicanos y para diferenciar los picos que se solapan.

Descripción	Estructura del CFG	Referencia
G0F-N / F(6)A1		GKSB-402
G0 / A2		GKSB-301
G0F / FA2		GKSB-302
Man5 / M5		GKSB-103
G1 / A2G1		GKSB-317
G1F / FA2G1		GKSB-316
G2F / FA2G2		GKSB-305
G2 / A2G2		GKSB-304*

* Patrón GKSB-304 de N-glicanos marcados con 2-AB solo para etanercept. No se produce en rituximab.

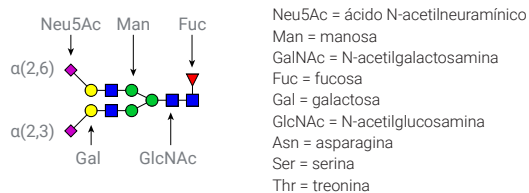


Figura 3. Los dibujos de los glicanos siguen las recomendaciones del Consortium for Functional Glycomics⁵ (CFG) y se han realizado mediante GlycoWorkbench 2.14.10.





MiLista 4 Patrones adicionales de N-glicanos naturales marcados con 2-AB.

Descripción	Estructura del CFG	Referencia
G0-N		GKSB-401
G0FB		GKSB-303
G2FB		GKSB-306
G2S1 $\alpha(2,6)$		GKSB-311
G2FS1 $\alpha(2,6)$		GKSB-315
G2S2 $\alpha(2,6)$		GKSB-312
G2FS2 $\alpha(2,6)$		GKSB-313
G2F con 2 α -gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 $\alpha(2,6)$		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

MiLista 5 Patrones de N-glicanos con un contenido elevado en manosa marcados con el módulo de marcado AdvanceBio Gly-X 2-AB Express.

Descripción	Estructura del CFG	Referencia
Man5 / M5		GKSB-103
Man6 / M6		GKSB-104
Man7 / M7		GKSB-105
Man8 / M8		GKSB-106
Man9 / M9		GKSB-107

MiLista 6 Híbrido y núcleo de N-glicano natural marcado con 2-AB.

Descripción	Estructura del CFG	Referencia
Híbrido		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

MiLista 7 Bibliotecas de N-glicanos bi-, tri- y tetraantenarios marcados con 2-AB para el estudio de las glicoproteínas sialiladas. Las estructuras de los glicanos se muestran en los certificados de análisis.

Descripción	Referencia
Biblioteca particionada de biantenarios y manosa alta AdvanceBio 2-AB	GKSB-520
biblioteca de N-glicanos biantenarios sialilados $\alpha(2,3)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-232
biblioteca de N-glicanos biantenarios sialilados $\alpha(2,6)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-262
biblioteca de N-glicanos triantenarios sialilados $\alpha(2,3)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-233
Biblioteca de N-glicanos triantenarios sialilados $\alpha(2,6)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-263
biblioteca de N-glicanos tetraantenarios sialilados $\alpha(2,3)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-234
biblioteca de N-glicanos tetraantenarios sialilados $\alpha(2,6)$ AdvanceBio 2-AB	GKSB-264

MiLista 8 Bibliotecas de N-glicanos marcados con 2-AB y glicoproteínas de control. Las estructuras de los glicanos se muestran en los certificados de análisis.

Descripción	Referencia
La biblioteca de N-glicanos IgG humanos AdvanceBio 2-AB consta de oligosacáridos biantenarios complejos compatibles con los N-glicanos de IgG humanas normales	GKSB-005
La biblioteca de N-glicanos humanos con glicoproteína α-1-ácida AdvanceBio 2-AB consta de una mezcla heterogénea de glicanos bi-, tri- y tetraantenarios de núcleo no fucosilado con varios grados de sialilación (NeuAc) y algunos con restos de fucosa en el brazo exterior y restos repetidos de lactosamina, compatibles con los N-glicanos notificados anteriormente para la glicoproteína α -1 ácido humana	GKSB-001
La biblioteca de N-glicanos de fetuina bovina AdvanceBio 2-AB se compone de una mezcla de N-glicanos sialilados (núcleo no fucosilado), compatibles con los N-glicanos previamente registrados para la fetuina bovina	GKSB-002
Patrón homopolimérico de glucosa AdvanceBio marcado con 2-AB	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*, 25 μ l	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 x 25 μ l	5191-5745

MiLista 9 Columnas de HILIC AdvanceBio Amide.

Descripción	Referencia
1,8 μ m, 1.200 bar de presión máxima, 80 °C de temperatura máxima	
AdvanceBio Amide de HILIC, 300 Å, 2,1 x 150 mm, 1,8 μ m	859750-913
AdvanceBio Amide de HILIC, 300 Å, 2,1 x 100 mm, 1,8 μ m	858750-913

Referencias

1. Análisis de N-glicanos: mejor juntos. Folleto de Agilent [5994-1647ES](#).
2. Analysis of labeled Glycans User Manual [5994-1231EN](#), pág. 14.
3. Patrones de glicanos AdvanceBio: InstantPC, 2-AB, 2- AA, APTS, InstantAB, InstantQ, sin marcar [5994-2202ES](#).
4. Varki A, et al. [Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans](#). Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. Desarrollo de un flujo de trabajo rápido de preparación de muestras con 2-AB para la liberación y el marcado de N-glicanos [5994-0945ES](#).

Agilent CrossLab: le ayuda a tener éxito

CrossLab es una herramienta de Agilent que integra servicios y consumibles para respaldar el éxito del flujo de trabajo y mejorar la productividad y la eficiencia operativa. En todas las interacciones, nos esforzamos en poner a su disposición nuestros conocimientos para ayudarle a conseguir sus objetivos. Disponemos de una gran variedad de productos y servicios, desde optimización de métodos y formación hasta traslados de todo el laboratorio y analítica de operaciones, para ayudarle a gestionar sus instrumentos y su laboratorio con el fin de conseguir el máximo rendimiento.

Puede obtener más información acerca de CrossLab en www.agilent.com/crosslab

Obtenga más información:

www.agilent.com/chem/glycoscience

Tienda en línea:

www.agilent.com/chem/store

Encuentre un centro de atención al cliente de Agilent en su país:

www.agilent.com/chem/contactus

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com