

Analyse des N-glycanes des glycoprotéines biothérapeutiques à l'aide de la préparation d'échantillons du module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X et de LC/FLD/MS

L'analyse des N-glycanes simplifiée et standardisée

La localisation et la structure des N-glycosylés jouent un rôle déterminant dans la pharmacologie des protéines thérapeutiques susceptible d'affecter l'immunogénicité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie.

Le 2-AB (2-aminobenzamide) est un marqueur bien établi qui est utilisé pour générer des données sur les N-glycanes depuis plus de 20 ans. Le module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X Agilent est une plateforme haute performance de préparation d'échantillons de N-glycanes¹ avec une procédure simplifiée, utilisant une étape de déglycosylation en solution de cinq minutes suivie d'un marquage 2-AB sur une matrice à l'état solide. L'excès de colorant est éliminé par lavage avec de l'acétonitrile avant d'éluer les échantillons marqués avec de l'eau déionisée sans nécessiter de séchage de l'échantillon. Les échantillons sont prêts pour la UHPLC/FLD/MS en un maximum de 2 heures grâce à la colonne AdvanceBio Amide HILIC de chromatographie en phase liquide d'interactions hydrophiles (HILIC) et à la quantification relative subséquente. En outre, une large gamme d'étalons de N-glycanes marqués au 2-AB est disponible pour étalonner les séparations de N-glycanes et aider à identifier les espèces de N-glycanes.

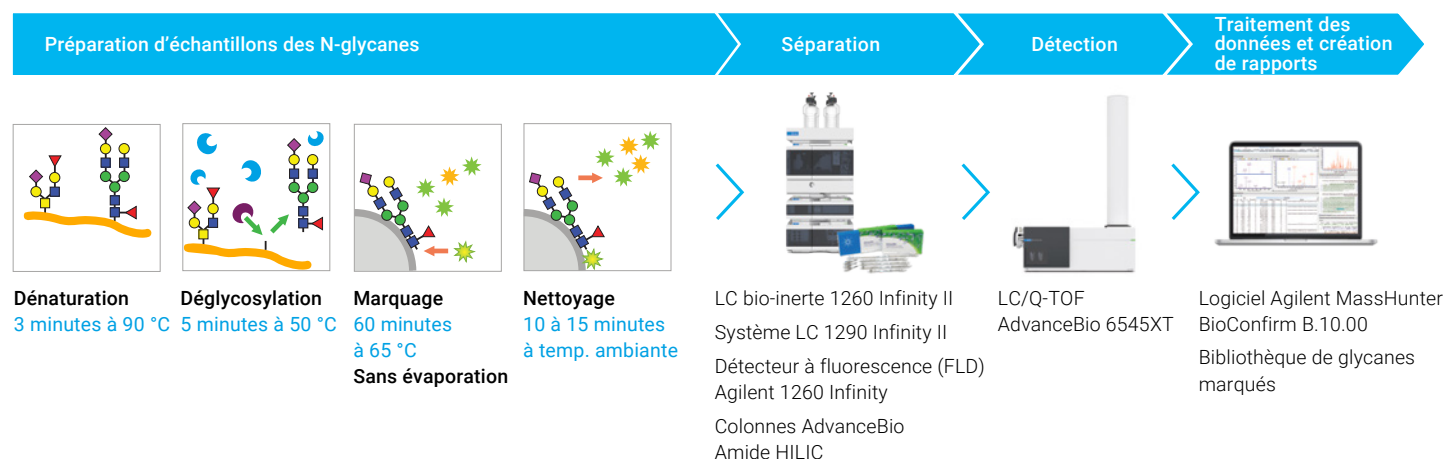


Figure 1. Procédure d'analyse des N-glycanes libérés utilisant la préparation d'échantillons Gly-X 2-AB Express avec LC/FLD/MS.

Procédure d'analyse des N-glycanes solution de bout en bout conçue et fabriquée par Agilent

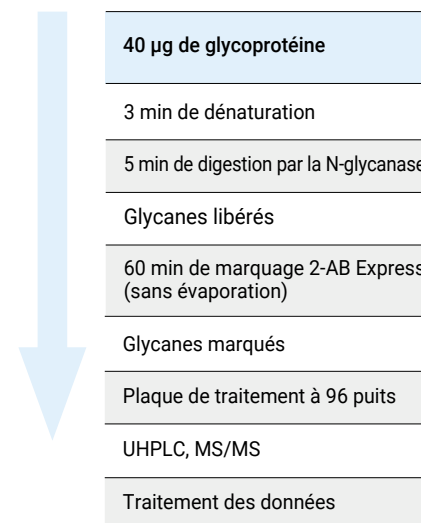
Dans ce guide, vous trouverez les consommables dont vous avez besoin pour commencer à préparer et à analyser des échantillons de N-glycanes 2-AB. Plusieurs d'entre eux ont été utilisés pour analyser les N-glycanes du rituximab (Rituxan, un anticorps monoclonal ou mAb) et de l'étanercept (Enbrel, une protéine de fusion Fc), démontrant ainsi l'ensemble de la procédure, y compris la préparation des échantillons, la séparation et l'interprétation des données.²

Ce guide de la procédure d'analyse des N-glycanes de Gly-X 2-AB Express comprend des informations pour commander :

- Le kit de préparation des échantillons – les échantillons sont préparés et prêts à être analysés en 2 heures grâce à la technologie du module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X;
- Des étalons de N-glycanes marqués au 2-AB – ces étalons et bibliothèques individuels bien caractérisés sont essentiels pour le profilage des espèces de N-glycanes qui peuvent avoir un impact sur la sécurité et l'efficacité des drogues biothérapeutiques;
- Des colonnes de chromatographie en phase liquide pour la séparation des glycanes par HILIC;
- Des solvants et des réactifs;
- Des flacons et des capsules.
- Une phase mobile concentrée prête pour la dilution.

Étapes qui améliorent la productivité :

- Digestion PNGase F de 5 minutes à 50 °C qui permet une libération non biaisée des N-glycanes.
- Le marquage express 2-AB est effectué pendant que les glycanes sont immobilisés sur la matrice de nettoyage, ce qui élimine le temps de séchage et réduit le temps total de préparation des échantillons.
- L'utilisation d'un colorant d'étiquetage 2-AB établi qui assure la continuité des données pour les projets en cours.
- Un format de kit modulaire pour une utilisation flexible.



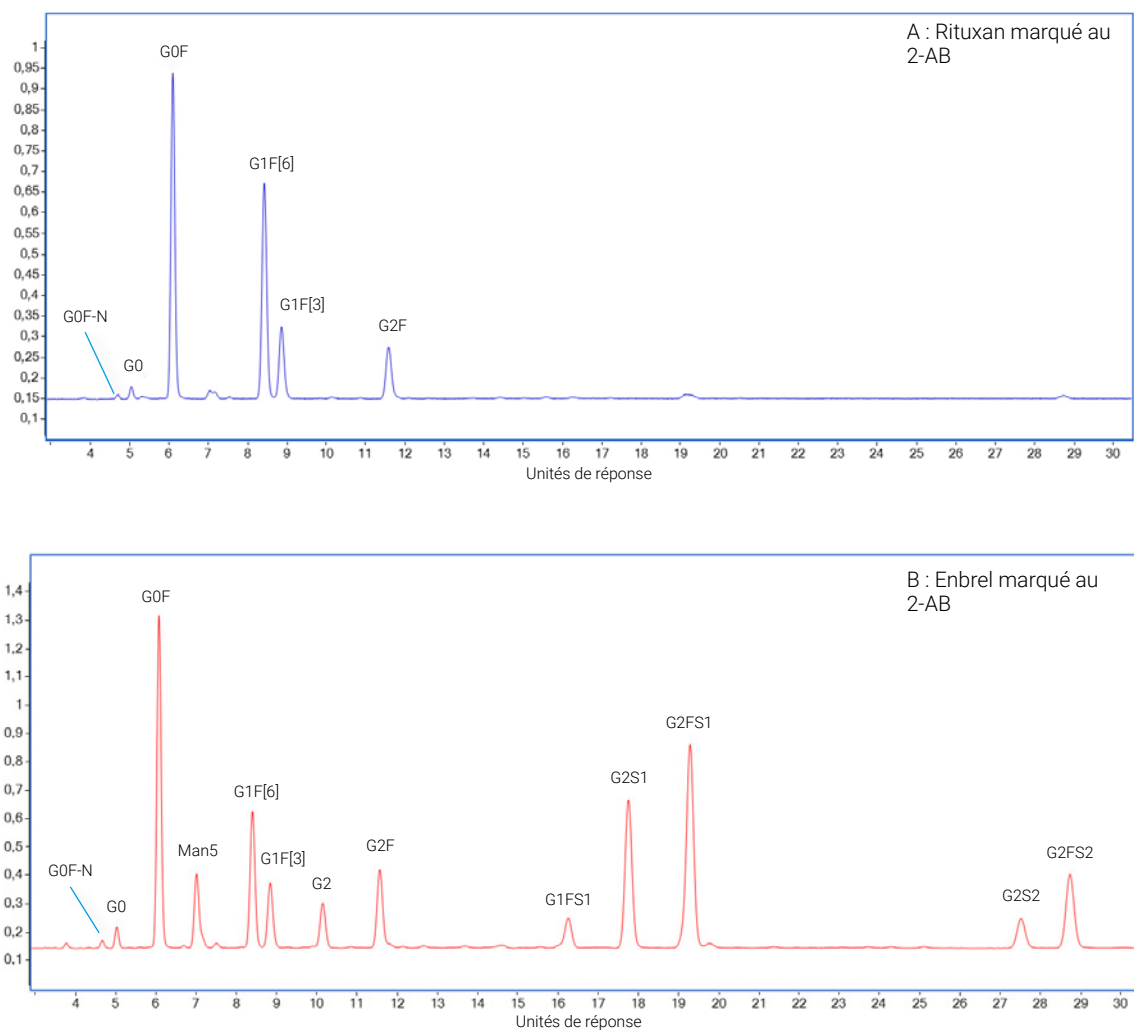


Figure 2. Profil de fluorescence HILIC-UHPLC des N-glycanes de (A) Rituxan et (B) Enbrel marqués avec 2-AB. Les zones de N-glycane en pourcentage relatif sont présentées dans les tableaux 1 et 2, n = 4. Les conditions d'UHPLC et les paramètres de Q-TOF sont indiqués dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 1. % relatifs d'aire de pic, écart-type et CV (%) pour les N-glycanes du Rituxan marqués avec le marqueur 2-AB, n=4.

	Aire rel. moyenne (%)	Écart-type	% 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

Tableau 2. % relatifs d'aire de pic, écart-type et CV (%) pour les N-glycanes de l'Enbrel marqués avec le marqueur 2-AB, n=4.

	Aire rel. moyenne (%)	Écart-type	% 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

Tableau 3. Conditions HILIC/FLD de l'Agilent 1290 Infinity II UHPLC pour les N-glycanes marqués avec le marqueur 2-AB.

Paramètre	Valeur
Colonne	Agilent AdvanceBio Amide HILIC, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm, (réf. 859750-913)
Temp. de colonne	60 °C
Phase mobile	A) Formate d'ammonium 50 mM, pH 4,4 B) Acétonitrile
Programme de gradient	Temps (minutes) % de B Débit (mL/min)
	0 74 0,6 mL/min
	50 54 0,6 mL/min
	51 40 0,6 mL/min
	52 40 0,6 mL/min
	54 74 0,6 mL/min
	64 74 0,6 mL/min
Volume d'injection	1 µL
Détection de fluorescence	FLD Agilent 1260 Infinity II 2-AB : λexc 260 nm, λém 430 nm

Tableau 4. Paramètres Q-TOF de l'Agilent 6545XT pour les N-glycanes marqués avec le marqueur 2-AB.

Agilent 6545XT Q-TOF	
Source	Dual AJS ESI
Température du gaz	150 °C
Débit du gaz de séchage	9 L/min
Nébuliseur	35 psi
Température du gaz de gainage	300 °C
Débit de gaz de gainage	10 L/min
Vcap	2 500 V
Tension de la buse	500 V
Fragmenteur	120 V
Écrêteur	65 V
Gamme de masse	m/z 300 à 3 000
Taux de balayage	1 spectre/s
Mode d'acquisition	Plage dynamique étendue (2 GHz)

Commencer avec Gly-X 2-AB Express : Conseils pour des résultats optimaux

Considérations sur la préparation des échantillons de glycoprotéines

Les échantillons de glycoprotéines doivent être préparés à une concentration maximale de 2 mg/mL dans un tampon neutre à faible teneur en sel et exempt de détergents. Les échantillons de concentration plus élevée doivent être dilués dans de l'eau ou dans 50 mM HEPES, pH 7,9.

- Concentration maximale : 2 mg/mL.
- Quantité maximale de protéine par réaction : 40 µg (par exemple, 20 µL de chaque solution à 2 mg/mL). Des quantités plus importantes de protéine peuvent être utilisées pour les mAb (jusqu'à 100 µg), mais il faut évaluer la linéarité des données si l'on charge plus de 40 µg.
- Tampon : Tampon neutre à faible teneur en sel (~150 mM) sans détergent. L'échantillon peut être dilué avec de l'eau ou 50 mM HEPES, pH 7,9.
- Un filtre centrifuge à coupure de 10 kDa de masse moléculaire est recommandé lorsque la concentration en sel de l'échantillon est supérieure à 150 mM.

Matériel d'incubation et de nettoyage

Au cours de la procédure de préparation des échantillons Gly-X 2-AB Express, les échantillons sont chauffés à 90 °C pour la dénaturation des protéines, à 50 °C pour la digestion par la PNGase F et à 65 °C pour le marquage 2-AB. Nous vous recommandons d'utiliser un thermocycleur ou une unité chauffante à sec pour chauffer les échantillons dans la plaque à 96 puits fournie en suivant les suggestions ci-dessous.

La procédure utilise un nettoyage simple, par aspiration. Si vous souhaitez utiliser un réchauffeur, un module d'extraction sous vide ou une pompe équivalents autres que les modèles suggérés dans ce tableau, une validation peut être nécessaire. Contactez Agilent pour une assistance supplémentaire.

Matériel de chauffage et de vide (non-Agilent)	Réf.
Thermocycleur à 96 puits (Corning)	THERM-1001, 110 V THERM-1000, 230 V
Bloc chauffant à sec, 4 modules, HB4DG, US (qté : 2) (Troemner)	HB4DG
Blocs chauffants modulaires (qté : 2) (VWR)	VWR 13259-260
Bain sec numérique compact/bloc chauffant (Thermo Fisher Scientific)	88871001
Module d'extraction sous vide (Millipore)	MSVMHTS00
Pompe à vide (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220 V

Les meilleures pratiques de HILIC

- Les petits volumes d'injection de 1 µL (aqueux) de glycanes marqués sont les plus pratiques pour les séparations HILIC. Des volumes d'injection aqueux > 1 µL compromettent la forme et la résolution des pics. Pour les instructions relatives à la dilution de l'échantillon avec un solvant organique pour des volumes d'injection > 1 µL, consultez le manuel d'utilisation du Gly-X 2-AB².
- Le concentré de formate d'ammonium Agilent AdvanceBio pour phase mobile (réf. G3912-00000) peut être utilisé pour préparer 1 L de formate d'ammonium 50 mM, pH 4,4.
- Les utilisateurs doivent optimiser leurs systèmes de HPLC pour minimiser le volume mort. La durée de vie de la colonne est optimale si la pression utilisée est inférieure à 80 % de la pression maximale.
- La température de fonctionnement est généralement de 60 °C. Des températures plus élevées peuvent être utilisées, mais réduisent la durée de vie de la colonne.

Étalons de glycanes

Agilent propose une large gamme d'étalons et de bibliothèques de N-glycanes libérés marqués au 2-AB pour étalonner les systèmes LC/FLD/MS utilisés pour l'analyse des glycanes libérés.³ Les étalons de glycanes sont essentiels pour aider à identifier les isomères de glycanes et les pics coélus. Les coélueurs potentiels comprennent G0F/Man5, Man5/G1, G1FS1/G2F.

Traitement des données et création de rapports

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse qualitative Agilent MassHunter BioConfirm avec la base de données de composés personnelle.

Remarque : Agilent propose désormais MassHunter 11 avec le logiciel de traitement de données OpenLab ECM XT qui sont conformes à la norme 21 CFR Part 11.

Sélection simplifiée et informations pour commander

Pour commander les articles présentés dans les tableaux suivants à partir de la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez les articles à votre liste de produits favoris en cliquant sur le lien MaListe dans l'en-tête. Vous pouvez ensuite saisir les quantités des produits dont vous avez besoin, ajouter les produits à votre panier et procéder au paiement. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique Produits favoris pour faciliter vos futures commandes.

Si c'est la première fois que vous utilisez les Produits favoris, il vous sera demandé d'entrer votre adresse e-mail pour la vérification de votre compte. Si vous possédez un compte Agilent, vous pourrez vous connecter. Toutefois, si vous n'avez pas de compte Agilent enregistré, vous devrez en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les articles peuvent être commandés en ligne en cliquant sur les références individuelles ou par le biais de vos canaux de vente et de distribution habituels.

MaListe 1 Préparation d'échantillons de N-glycane Gly-X 2-AB Express, colonnes AdvanceBio Amide HILIC, solvants et contenants.

Description	Réf.
Préparation d'échantillons des N-glycanes	
Kit module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GX96-2AB
Kit module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24-ct	GX24-2AB*
Pack de base 2-AB Express AdvanceBio Gly-X	GX400
Ensemble de module de déglycosylation et de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24-ct	GX24-401AB*
Colonnes, raccords et connecteurs	
AdvanceBio amide HILIC, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm	859750-913
Raccord rapide Quick Connect Agilent InfinityLab (tête de colonne)	5067-5965
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (sortie de colonne)	5067-5966
Solvants et réactifs	
Acétonitrile ultrapur pour LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4496
Étalon ultrapur pour LC/MS InfinityLab, eau, 1 L	5191-4498
Concentré de formate d'ammonium AdvanceBio pour phase mobile, 10 mL	G3912-00000
Solution pour MS, acide formique, 10 mL	US-700002341
Fournitures pour la filtration des solvants**	
Ensemble de filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Fiole de filtration de solvant InfinityLab, verre, 2 L	5191-6781
Membrane des filtres, nylon, 47 mm, 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane des filtres, cellulose régénérée, 47 mm, 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre de flacon pour solvant, entrée de solvant, 20 µm	5041-2168
Consommables pour la manipulation de solvants	
Kit de démarrage bouchons Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Flacon pour solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon pour solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon pour solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon pour solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Bidon de collecte de déchets InfinityLab, GL45, 6 L avec bouchon Stay Safe [§]	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g [§]	5043-1193
Capsules et flacons[†]	
Flacon à vis, 2 mL, polypropylène, 100/pqt [†]	5191-8150
Insert de flacon, 300 µL, polypropylène, pieds en polymère, 100/pqt [‡]	5182-0549
9 mm, capsule à vis en polypropylène transparent, 100/pqt	5191-8151

* Le kit de 24-ct (GX24-2AB) contient une plaque de nettoyage à 96 puits et un module de marquage 2-AB 24-ct. Conservez le module de nettoyage à température ambiante et commandez 24 pièces de recharge du jeu de modules de déglycosylation et de marquage Gly-X 2-AB Express (GX24-401AB).

** Utilisez l'ensemble de filtration de solvant InfinityLab avant l'analyse si vous utilisez des solvants autres que ceux listés dans ce tableau.

† Les glycanes marqués avec le marqueur 2-AB sont élués dans une plaque à 96 puits. Les utilisateurs peuvent soit injecter les échantillons de la plaque directement sur le LC, soit les transférer dans des flacons pour échantillons.

‡ Agilent recommande d'utiliser un insert de flacon de 250 µl avec le flacon de 2 mL en polypropylène pour minimiser le volume mort.

§ Le filtre à charbon n'est pas inclus avec le bidon de collecte de déchets ; commandez 5043-1221 et 5043-1193 ensemble.

MaListe 2 Configurations supplémentaires des kits et modules de préparation d'échantillons de N-glycanes Gly-X 2-AB Express.

Description	Réf.
Module de déglycosylation AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GX96-100
Module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GX96-401
Module de traitement 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GB96-402
Module de déglycosylation AdvanceBio Gly-X, 24-ct	GX24-100
Module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24-ct	GX24-401
Ensemble de module de déglycosylation et de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96-ct	GX96-401AB

Étalons de glycanes

Pour une liste complète des étalons de N-glycanes marqués par Agilent, consultez notre dépliant technique sur les étalons de glycanes.³

MaListe 3 Étalons de N-glycane marqués au 2-AB pour les glycanes qui apparaissent dans le rituximab et l'étanercept.² Ces étalons peuvent être utilisés comme contrôles dans la séparation des N-glycanes et pour différencier les pics coélusés.

Description	Structure CFG	Réf.
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*

* Étalon de N-glycane marqué au GKSB-304 2AB pour l'étanercept uniquement. Ne se produit pas avec le rituximab.

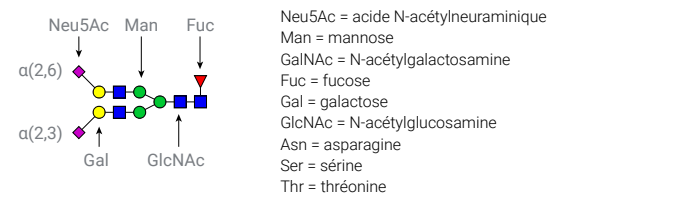


Figure 3. Les représentations schématiques des glycanes ont été réalisées conformément aux recommandations du Consortium for Functional Glycomics⁵ (CFG) avec GlycoWorkbench 2.14.10.

MaListe 4 Étalons supplémentaires de N-glycane natif de type complexe marqués au 2-AB.

Description	Structure CFG	Réf.
G0-N		GKSB-401
G0FB		GKSB-303
G2FB		GKSB-306
G2S1 α(2,6)		GKSB-311
G2FS1 α(2,6)		GKSB-315
G2S2 α(2,6)		GKSB-312
G2FS2 α(2,6)		GKSB-313
G2F avec 2 α-gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 α(2,6)		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

MaListe 5 Étalons de N-glycanes marqués par module de marquage 2-AB Express AdvanceBio Gly-X.

Description	Structure CFG	Réf.
Man5/M5		GKSB-103
Man6/M6		GKSB-104
Man7/M7		GKSB-105
Man8/M8		GKSB-106
Man9/M9		GKSB-107

MaListe 6 Noyau et hybride de N-glycane natif marqué au 2-AB.

Description	Structure CFG	Réf.
Hybride		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

MaListe 7 Bibliothèques de N-glycanes bi-, tri- et tétra-antennés marqués au 2-AB pour l'étude des glycoprotéines sialylées. Les structures des glycanes sont indiquées sur les certificats d'analyse.

Description	Réf.
Bibliothèque partitionnée de biantennés et forte teneur en mannose 2-AB AdvanceBio	GKSB-520
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,3)$ biantennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-232
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,6)$ biantennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-262
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,3)$ triantennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-233
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,6)$ tri-antennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-263
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,3)$ tétraantennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-234
Bibliothèque de N-glycanes $\alpha(2,6)$ tétraantennés sialylés 2-AB AdvanceBio	GKSB-264

MaListe 8 Bibliothèques de N-glycanes marqués au 2-AB et glycoprotéines de contrôle. Les structures des glycanes sont indiquées sur les certificats d'analyse.

Description	Réf.
Bibliothèque de N-glycanes d'IgG humaine AdvanceBio 2-AB – constituée d'oligosaccharides biantennés complexes correspondant aux N-glycanes d'IgG humaines normales	GKSB-005
La bibliothèque de N-glycanes α-1-acide glycoprotéinique humain 2-AB AdvanceBio se compose d'un mélange hétérogène de glycanes bi, tri et tétra-antennés au noyau non fucosylé avec divers degrés de sialylation (NeuAc), et certains comprennent des résidus de fucose et des répétitions de lactosamine sur le bras externe, conformes aux N-glycanes précédemment signalés pour la glycoprotéine acide α 1 humaine	GKSB-001
La bibliothèque de N-glycanes fœtuines bovines 2-AB AdvanceBio se compose d'un mélange de N-glycosylés sialylés (noyau non fucosylé) conformes aux N-glycanes précédemment rapportés pour les fœtuines bovines	GKSB-002
Étalon d'homopolymère de glucose 2-AB AdvanceBio	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*, 25 μ L	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 x 25 μ L	5191-5745

MaListe 9 Colonnes AdvanceBio Amide HILIC.

Description	Réf.
1,8 μ m, pression maximale de 1 200 bar, température maximale de 80 °C	
AdvanceBio Amide HILIC 300 Å, 2,1 x 150 mm, 1,8 μ m	859750-913
AdvanceBio Amide HILIC 300 Å, 2,1 x 100 mm, 1,8 μ m	858750-913

Références

1. Analyse des N-glycanes : Plus performants ensemble. Brochure Agilent [5994-1647FR](#).
2. Analysis of labeled Glycans User Manual [5994-1231EN](#), pg 14.
3. AdvanceBio Glycan Standards Instant PC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, Unlabeled [5994-2202FR](#).
4. Varki A, et al. [Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans](#). Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. Développement d'un flux de travail rapide de préparation d'échantillons pour la libération et le marquage 2-AB de N-Glycanes [5994-0945FR](#).

Agilent CrossLab : Accompagner votre réussite

CrossLab est une solution Agilent qui intègre les services et les consommables pour favoriser la réussite des flux de travail, améliorer la productivité et renforcer l'efficacité opérationnelle. Dans chaque interaction, nous nous efforçons d'apporter notre expertise afin de vous aider à atteindre vos objectifs. Nous proposons une large gamme de produits et de services, depuis l'optimisation de méthode et la formation, jusqu'au service déménagement de laboratoire et l'analyse de fonctionnement, afin de vous aider à gérer vos instruments et votre laboratoire pour une meilleure performance.

Pour en savoir plus sur CrossLab, consultez www.agilent.com/crosslab

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/glycoscience

Pour acheter en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Pour contacter le centre d'assistance à la clientèle d'Agilent de votre pays : www.agilent.com/chem/contactus

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États-Unis et Canada

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com