

Analisi degli n-glicani delle glicoproteine bioterapeutiche utilizzando la preparazione del campione con modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X e LC/FLD/MS

Analisi degli N-glicani semplificata e standardizzata

La posizione e la struttura dei glicani N-linked gioca un ruolo fondamentale nella farmacologia delle proteine terapeutiche, con possibili effetti sull'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica.

2-AB (2-amminobenzammide) è un marcatore ben affermato che è stato utilizzato per generare dati sugli N-glicani per oltre 20 anni. Il modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X di Agilent è una piattaforma¹ ad alte prestazioni per la preparazione del campione di N-glicani con un flusso di lavoro semplificato che utilizza una fase di deglicosilazione in soluzione di cinque minuti seguita da una marcatura 2-AB su una matrice allo stato solido. Il colorante in eccesso viene lavato via con acetonitrile prima di eluire i campioni marcati con acqua deionizzata senza richiedere l'essiccazione del campione. I campioni sono pronti per la UHPLC/FLD/MS in 2 ore o meno utilizzando la colonna HILIC ammide AdvanceBio per cromatografia liquida con interazione idrofila (HILIC) seguita da quantificazione relativa. Inoltre, è disponibile una vasta gamma di standard di N-glicani marcati con 2-AB per la calibrazione delle separazioni degli N-glicani e per contribuire all'identificazione delle specie di N-glicani.



Figura 1. Flusso di lavoro di analisi degli n-glicani rilasciati utilizzando la preparazione del campione Gly-X 2-AB Express con LC/FLD/MS.

Soluzione per il flusso di lavoro dell'analisi degli N-glicani end-to-end progettata e prodotta da Agilent

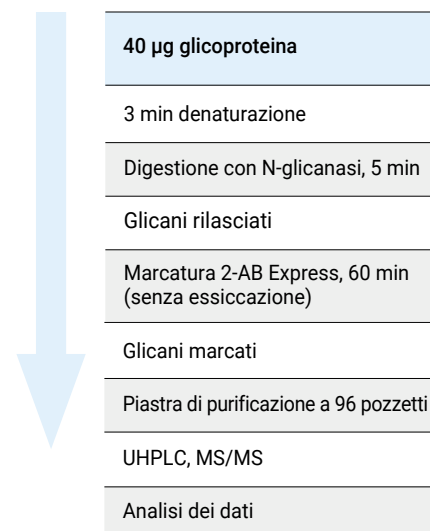
In questa guida, troverai le parti di consumo di cui necessiti per cominciare con la preparazione del campione e l'analisi degli N-glicani marcati con 2-AB. Molti di questi sono stati usati per analizzare gli N-glicani di rituximab (Rituxan, un anticorpo monoclonale o mAb) ed etanercept (Enbrel, una proteina di fusione Fc), a dimostrazione dell'intero flusso di lavoro incluse la preparazione del campione, la separazione e l'interpretazione dei dati.²

Questa guida al flusso di lavoro dell'analisi degli N-glicani con Gly-X 2-AB Express include le informazioni di ordinazione per:

- Il kit di preparazione del campione – con la tecnologia del modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X i campioni vengono preparati e sono pronti per l'analisi in 2 ore.
- Standard per gli N-glicani marcati con 2-AB – questi standard e librerie individuali ben caratterizzati sono essenziali quando si profilano le specie di N-glicani che possono influire sulla sicurezza e sull'efficacia di prodotti medicinali bioterapeutici.
- Colonna per cromatografia liquida per la separazione dei glicani tramite HILIC.
- Solventi e reagenti.
- Vial e tappi.
- Fase mobile concentrata pronta per la diluizione.

Passi che migliorano la produttività:

- Digestione a 50 °C mediante PNGase F in 5 minuti, con rilascio di N-glicani senza errori sistematici.
- La marcatura con 2-AB Express viene eseguita mentre i glicani sono immobilizzati sulla matrice di purificazione, eliminando l'essiccazione e riducendo il tempo totale di preparazione del campione.
- L'utilizzo di un colorante consolidato per la marcatura con 2-AB che garantisce la continuità dei dati per i progetti in corso.
- Un formato modulare del kit per un utilizzo flessibile.



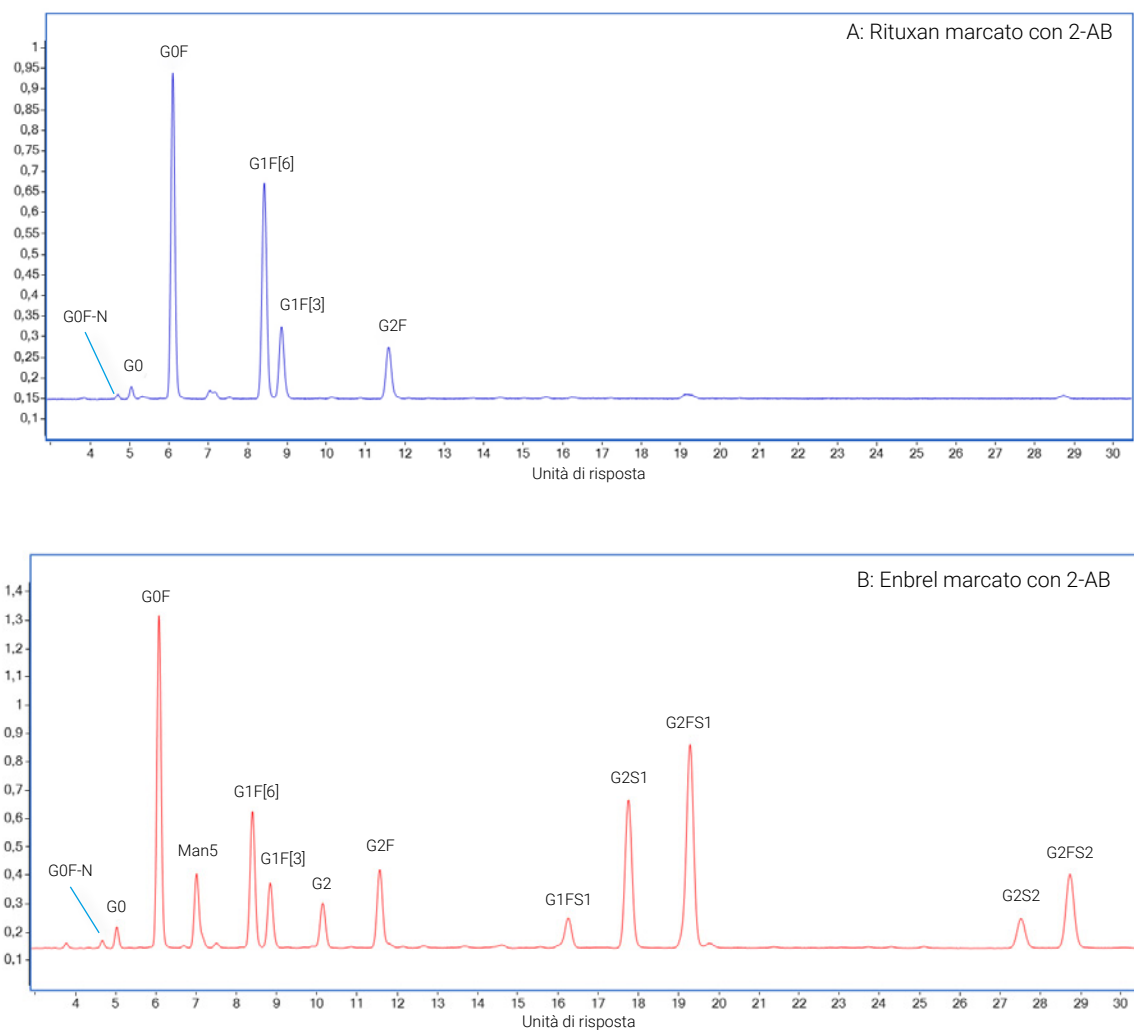


Figura 2. Profilo di fluorescenza HILIC-UHPLC degli N-glicani (A) Rituxan e (B) Enbrel marcati con 2-AB. Le aree percentuali relative di N-glicani sono riportate nelle Tabelle 1 e 2, n = 4. Le condizioni UHPLC e i parametri Q-TOF sono mostrati nelle tabelle 3 e 4.

Tabella 1. Area % relativa, SD e valori di CV % per gli N-glicani in Rituxan marcati con 2-AB, n = 4.

	Area % Media relativa	Deviazione standard	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

Tabella 2. Area % relativa, SD e valori di CV % per gli N-glicani in Enbrel marcati con 2-AB, n = 4.

	Area % Media relativa	Deviazione standard	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

Tabella 3. Agilent 1290 Infinity II UHPLC condizioni HILIC/FLD per gli N-glicani marcati 2-AB.

Parametro	Valore
Colonna	HILIC ammido Agilent AdvanceBio, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm (codice 859750-913)
Temp. della colonna	60 °C
Fase mobile	A) formiato di ammonio 50 mM, pH 4,4 B) acetonitrile
Programma gradiente	Tempo (minuti) %B Flusso (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
Volume di iniezione	1 µL
Rivelazione a fluorescenza	FLD Agilent 1260 Infinity II 2-AB: λEx 260 nm, λEm 430 nm

Tabella 4. Agilent 6545XT parametri Q-TOF per gli N-glicani marcati con 2-AB.

Agilent 6545XT Q-TOF	
Sorgente	Dual AJS ESI
Temperatura del gas	150 °C
Flusso del drying gas	9 L/min
Nebulizzatore	35 psi
Temperatura dello sheath gas	300 °C
Flusso dello sheath gas	10 L/min
Vcap	2.500 V
Tensione ugello	500 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Intervallo di massa	m/z tra 300 e 3.000
Velocità di scansione	1 spettro/secondo
Modalità di acquisizione	Intervallo dinamico esteso (2 GHz)

Introduzione a Gly-X 2-AB Express: suggerimenti per risultati ottimali

Considerazioni sulla preparazione dei campioni di glicoproteine

I campioni di glicoproteine devono essere preparati a una concentrazione massima di 2 mg/mL in un tampone neutro a basso contenuto salino, privo di detergenti. I campioni con concentrazioni superiori devono essere diluiti in acqua o in HEPES 50 mM, pH 7,9.

- Concentrazione massima: 2 mg/mL.
- Quantità massima di proteine per reazione: 40 µg (ad esempio, 20 µL di ciascuna soluzione da 2 mg/mL). Per gli mAbs possono essere utilizzate quantità di proteine superiori (fino a 100 µg) ma in caso di caricamento di più di 40 µg è necessario valutare la linearità dei dati.
- Tampone: Tampone neutro a basso contenuto salino (~150 mM) senza detergenti. Il campione può essere diluito con acqua o HEPES 50 mM, pH 7,9.
- Quando la concentrazione salina del campione è superiore a 150 mM, si raccomanda un filtro centrifuga con cut-off del peso molecolare a 10 kDa.

Apparecchiatura di incubazione e purificazione

Durante il flusso di lavoro di preparazione del campione con Gly-X 2-AB Express, i campioni vengono riscaldati a 90 °C per la denaturazione della proteina, 50 °C per la digestione mediante PNGase F e a 65 °C per la marcatura con 2-AB. Si raccomanda di utilizzare un termociclatore o un riscaldatore a blocchi a secco quando si riscaldano i campioni nella piastra a 96 pozzetti fornita attenendosi ai suggerimenti seguenti.

Il flusso di lavoro utilizza una procedura semplice, a depressione. Se si desidera utilizzare un riscaldatore equivalente, un vacuum manifold o una pompa diversa dai modelli suggeriti in questa tabella, può essere necessaria la validazione. Contattare Agilent per ulteriore assistenza.

Apparecchiatura di riscaldamento e vuoto (non Agilent)	Codice
Termociclatore a 96 pozzetti (Corning)	THERM-1001, 110 V THERM-1000, 230 V
Riscaldatore a secco a blocchi, 4 blocchi, HB4DG, US (qtà: 2) (Troemner)	HB4DG
Blocchi di riscaldamento modulari (qtà: 2) (VWR)	VWR 13259-260
Bagno a secco digitale compatto/Riscaldatore a blocchi (Thermo Fisher Scientific)	88871001
Vacuum manifold (Millipore)	MSVMHTS00
Pompa per vuoto (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220 V

Buone pratiche per HILIC

- Piccoli volumi di iniezione di 1 µL (acquosa) di glicani marcati sono i più pratici per le separazioni HILIC. Volumi di iniezione acquosa > 1 µL compromettono la forma dei picchi e la risoluzione. Per istruzioni sulla diluizione del campione con un solvente organico per volumi di iniezione > 1 µL, consultare il manuale dell'utente di Gly-X 2-AB.²
- Con la fase mobile concentrata a base di formiato di ammonio Agilent AdvanceBio (codice G3912-00000) è possibile preparare 1 L di formiato di ammonio 50 mM, pH 4,4.
- Per minimizzare il volume morto, gli utilizzatori devono provvedere a ottimizzare i propri sistemi HPLC. La durata ottimale della colonna viene ottenuta operando solo fino all'80% della pressione massima.
- La temperatura di funzionamento tipica è 60 °C. Temperature superiori possono essere utilizzate ma abbreviano la durata della vita della colonna.

Standard di glicani

Agilent offre un'ampia gamma di librerie e standard di N-glicani rilasciati marcati con 2-AB per calibrare i sistemi LC/FLD/MS utilizzati per l'analisi dei glicani rilasciati.³ Gli standard dei glicani sono fondamentali per contribuire a identificare gli isomeri e i picchi coeluiti. Tra i potenziali co-eluenti vi sono G0F/Man5, Man5/G1, G1FS1/G2F.

Analisi dei dati e refertazione

I dati sono stati analizzati utilizzando il software per l'analisi qualitativa Agilent MassHunter BioConfirm con PCD.

Nota: Agilent ora offre MassHunter 11 con il software di analisi dei dati OpenLab ECM XT conforme alla norma 21 CFR Parte 11.

Semplicità di scelta e informazioni per gli ordini

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle seguenti dall'Agilent online store, aggiungere gli articoli al proprio elenco di prodotti preferiti facendo clic sul collegamento Il mio elenco nell'intestazione. Dopodiché sarà possibile immettere le quantità dei prodotti necessarie, aggiungere i prodotti al carrello e procedere al pagamento. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che sia possibile disporne per ordini futuri.

Se questa è la prima volta che usi i Prodotti preferiti, ti verrà chiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Se ancora non disponi di un account Agilent registrato, dovrai crearne uno. Questa funzione è disponibile soltanto nelle regioni in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono essere ordinati online facendo clic sui codici individuali o tramite i canali ordinari di vendita e distribuzione.

Il mio elenco 1 preparazione del campione di N-glicani con Gly-X 2-AB Express, colonne HILIC ammidate AdvanceBio, solventi e contenitori per campioni.

Descrizione	Codice
Preparazione del campione di N-glicani	
Kit del modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96 pz	GX96-2AB
Kit del modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24 pz	GX24-2AB*
Confezione di avvio del modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X	GX400
Set per modulo di deglicosilazione e marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24 pz	GX24-401AB*
Colonne, raccordi e connettori	
HILIC ammidate AdvanceBio, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm	859750-913
Raccordo Quick Connect Agilent InfinityLab (iniettore colonna)	5067-5965
Raccordo Quick Turn InfinityLab Agilent (uscita colonna)	5067-5966
Solventi e reagenti	
Acetonitrile ultra puro per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4496
Standard per LC/MS ultrapuro InfinityLab, acqua, 1 L	5191-4498
Fase mobile a base di formiato di ammonio concentrata AdvanceBio, 10 mL	G3912-00000
Soluzione MS, acido formico, 10 mL	US-700002341
Forniture per la filtrazione di solventi**	
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab	5191-6776
Matraccio di filtrazione del solvente InfinityLab, vetro, 2 L	5191-6781
Membrana del filtro, nylon 47 mm, 0,2 µm, 100/conf.	5191-4341
Filtro a membrana, cellulosa rigenerata, 47 mm, 0,2 µm, 100/conf.	5191-4340
Filtro in vetro per bottiglie di solvente, ingresso solvente, 20 µm	5041-2168
Prodotti di consumo per la gestione dei solventi	
Kit di avvio tappo InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Bottiglia di solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia di solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia di solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia di solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Bottiglia di purging Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Contenitore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L, con tappo Stay Safe [§]	5043-1221
Filtro al carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g [§]	5043-1193
Vial e tappi[†]	
Vial, a vite, 2 mL, polipropilene, 100/conf. [‡]	5191-8150
Inserto per vial, 300 µL, polipropilene, supporto polimerico, 100/conf. [‡]	5182-0549
Tappo a vite in polipropilene trasparente da 9 mm, 100/conf.	5191-8151

* Il kit da 24 pezzi (GX24-2AB) contiene una piastra di purificazione a 96 pozzetti e un modulo di marcatura 2-AB da 24 pezzi. Conservare il modulo di purificazione a temperatura ambiente e ordinare ricariche da 24 pezzi di deglicosilazione Gly-X 2-AB Express e set del modulo di marcatura (GX24-401AB).

** Utilizzare il gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab prima dell'analisi se si utilizzano solventi diversi da quelli elencati in questa tabella.

† I glicani marcati con 2-AB vengono eluiti in una piastra a 96 pozzetti. Gli utenti possono iniettare in LC direttamente i campioni dalla piastra o trasferirli in vial per campioni.

‡ Agilent raccomanda di utilizzare un inserto per vial da 250 µL con il vial in polipropilene da 2 mL per ridurre al minimo il volume morto.

§ Il filtro a carbone non è incluso nel contenitore di scarico, ordinare gli articoli 5043-1221 e 5043-1193 insieme.

Il mio elenco 2 Configurazioni aggiuntive dei moduli e dei kit di preparazione del campione di N-glicani Gly-X 2-AB Express.

Descrizione	Codice
Modulo di deglicosilazione AdvanceBio Gly-X, 96 pz	GX96-100
Modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96 pz	GX96-401
Modulo di purificazione 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96 pz	GB96-402
Modulo di deglicosilazione AdvanceBio Gly-X, 24 pz	GX24-100
Modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 24 pz	GX24-401
Set per modulo di deglicosilazione e marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X, 96 pz	GX96-401AB

Standard di glicani

Per un elenco completo degli standard di N-glicani marcati Agilent, vedere la nostra brochure tecnica sugli standard dei glicani.³

Il mio elenco 3 standard di N-glicani marcati con 2-AB per glicani che compaiono in rituximab ed etanercept.² Questi standard possono essere utilizzati come controlli nella separazione degli N-glicani e per differenziare i picchi coeluiti.

Descrizione	Struttura CFG	Codice
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*

* GKSB-304 standard di N-glicani marcati con 2AB solo per Etanercept. Non compare in rituximab.

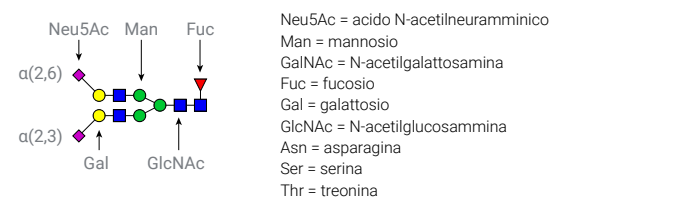


Figura 3. Le confezioni dei glicani seguono le raccomandazioni del Consorzio per la glicomica funzionale (Consortium for Functional Glycomics⁵, CFG) e sono stati disegnati usando GlycoWorkbench 2.14.10.

Il mio elenco 4 Ulteriori standard di N-glicani nativi di tipo complesso marcati con 2-AB.

Descrizione	Struttura CFG	Codice
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 w/2 α-gal		GKSB-318
A3		GKSB-307
G3		GKSB-308
G3S3 α(2,6)		GKSB-314
A4		GKSB-309
G4		GKSB-310

Il mio elenco 5 Standard di N-glicani ad alto contenuto di mannosio marcati con il modulo di marcatura 2-AB Express AdvanceBio Gly-X.

Descrizione	Struttura CFG	Codice
Man5 / M5		GKSB-103
Man6 / M6		GKSB-104
Man7 / M7		GKSB-105
Man8 / M8		GKSB-106
Man9 / M9		GKSB-107

Il mio elenco 6 N-glicani core e ibridi nativi marcati con 2-AB.

Descrizione	Struttura CFG	Codice
Ibrido		GKSB-111
NN		GKSB-100
Man3		GKSB-101
Man3F		GKSB-102

Il mio elenco 7 Librerie di N-glicani bi-, tri- e tetra-antennari marcati con 2-AB per lo studio delle glicoproteine sialilate. Le strutture dei glicani sono riportate sui Certificati di analisi.

Descrizione	Codice
Libreria partizionata di N-glicani biantennari e ad alto contenuto di mannosio con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-520
Libreria di N-glicani bi-antennari sialilati $\alpha(2,3)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-232
Libreria di N-glicani bi-antennari sialilati $\alpha(2,6)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-262
Libreria di N-glicani tri-antennari sialilati $\alpha(2,3)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-233
Libreria di N-glicani tri-antennari sialilati $\alpha(2,6)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-263
Libreria di N-glicani tetra-antennari sialilati $\alpha(2,3)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-234
Libreria di N-glicani tetra-antennari sialilati $\alpha(2,6)$ con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-264

Il mio elenco 8 Librerie di N-glicani marcati con 2-AB e glicoproteine di controllo. Le strutture dei glicani sono riportate sui Certificati di analisi.

Descrizione	Codice
La libreria di N-glicani di IgG umana con marcatura 2-AB AdvanceBio è costituita da oligosaccaridi biantennari complessi coerenti con N-glicani su IgG umana normale	GKSB-005
Libreria di N-glicani di glicoproteina α-1-acida umana con marcatura 2-AB AdvanceBio – è costituita da una miscela eterogenea di glicani bi-, tri e tetra-antennari core non-fucosilati con vari gradi di sialilazione (NeuAc) e alcuni con residui di fucosio sul braccio esterno e ripetizioni di lattosammina, coerenti con N-glicani precedentemente segnalati per la glicoproteina α 1-acida umana	GKSB-001
Libreria di N-glicani di fetuina bovina con marcatura 2-AB AdvanceBio – Libreria composta da una miscela di glicani N-legati sialilati (core non fucosilato), coerenti con N-glicani precedentemente segnalati per la fetuina bovina	GKSB-002
Standard di glucosio omopolimero con marcatura 2-AB AdvanceBio	GKSB-503
Agilent-NISTmAb*, 25 μ L	5191-5744
Agilent-NISTmAb*, 4 x 25 μ L	5191-5745

Il mio elenco 9 Colonne HILIC ammidate AdvanceBio.

Descrizione	Codice
1,8 μ m, pressione massima 1.200 bar, temperatura massima 80 °C	
HILIC ammidate AdvanceBio 300 Å, 2,1 x 150 mm, 1,8 μ m	859750-913
HILIC ammidate AdvanceBio 300 Å, 2,1 x 100 mm, 1,8 μ m	858750-913

Bibliografia

1. Analisi degli n-glicani: Insieme è meglio. Brochure Agilent [5994-1647ITE](#).
2. Analysis of labeled Glycans User Manual [5994-1231EN](#), pg 14.
3. Standard di glicani AdvanceBio InstantPC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, non marcati [5994-2202ITE](#).
4. Varki A, et al. [Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans](#). Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.
5. Sviluppo di un flusso di lavoro rapido per la preparazione del campione con 2-AB per il rilascio e la marcatura di N-glicani [5994-0945ITE](#).

Agilent CrossLab: A supporto del tuo successo

CrossLab è una funzionalità Agilent che integra servizi e prodotti di consumo per favorire l'efficacia del flusso di lavoro, migliorare la produttività e potenziare l'efficienza operativa. In ogni interazione, cerchiamo di offrire una visione generale che possa essere di aiuto per raggiungere i tuoi obiettivi. Offriamo un'ampia gamma di prodotti e servizi, dall'ottimizzazione del metodo e la formazione alla rilocalizzazione di interi laboratori e all'analisi delle operazioni, per aiutarti a gestire i tuoi strumenti e il tuo laboratorio e ottenere prestazioni migliori.

Per maggiori informazioni su CrossLab, visita www.agilent.com/crosslab

Per maggiori informazioni:

www.agilent.com/chem/glycoscience

Acquista online:

www.agilent.com/chem/store

Trova un centro assistenza clienti Agilent locale nel tuo Paese:

www.agilent.com/chem/contactus

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com