

N-Glykan-Analyse biotherapeutischer Glykoproteine mit der AdvanceBio Gly-X InstantPC-Probenvorbereitung und LC/FLD/MS

Vereinfachte und standardisierte Produktivität bei der N-Glykan-Analyse

Die Position und Struktur von N-verknüpften Glykanen therapeutischer Moleküle haben möglicherweise Auswirkungen auf die Immunogenität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und können so die pharmakologischen Eigenschaften entscheidend beeinflussen. Agilent AdvanceBio Gly-X ist eine moderne Plattform für die Vorbereitung von N-Glykan-Proben.¹ Diese Plattform sorgt für einen vereinfachten Arbeitsablauf in Lösung, bei dem der Farbstoff InstantPC für eine schnelle Markierung der Glykane und ein intensives Signal für die Fluoreszenzdetektion (FLD) sorgt und Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit einem effizienten Vakuumaufreinigungsschritt der Platten zur Entfernung von überschüssigem Marker und Denaturierungsmittel verwendet wird. Dank der AdvanceBio Amid HILIC-Säule für die hydrophile Interaktionschromatographie und anschließender relativer Quantifizierung sind markierte N-Glykan-Proben in unter 60 Minuten für die UHPLC/FLD/MS-Analyse bereit. Darüber hinaus steht eine Bandbreite InstantPC-markierter N-Glykan-Standards bereit, mit denen N-Glykan-Trennungen durchgeführt und N-Glykan-Spezies identifiziert werden können.

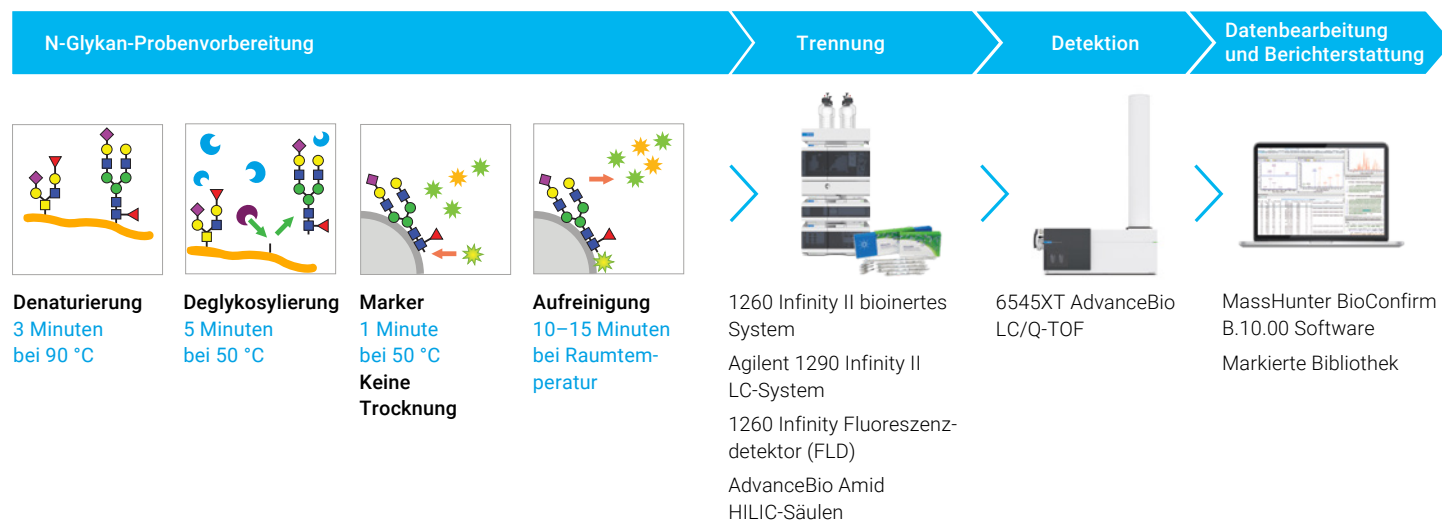


Abbildung 1: Arbeitsablauf bei der Analyse freigesetzter N-Glykane mit der Gly-X InstantPC-Probenvorbereitung und LC/FLD/MS.

Eine Lösung für den End-to-end-Arbeitsablauf der N-Glykan-Analyse, entwickelt und hergestellt von Agilent

In diesem Leitfaden sind die Verbrauchsmaterialien angegeben, die Sie für N-Glykan-Analysen mit InstantPC benötigen. Viele der Verbrauchsmaterialien wurden getestet, und die Testergebnisse in der Application Note [5994-1348DEE](#) beschrieben.² Im Rahmen dieser Studie wurden N-Glykane von Rituximab (Rituxan, ein monoklonaler Antikörper bzw. mAb) und Etanercept (Enbrel, ein Fc-Fusionsprotein) analysiert. Es wurde gezeigt, dass die N-Glykan-Analyse mit InstantPC-Markern im Vergleich zu 2-AB-Glykanen für ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal und eine bessere MS-Ionisierungseffizienz sorgt, was einen Nachweis von Glykanen mit niedriger Abundanz ermöglicht.

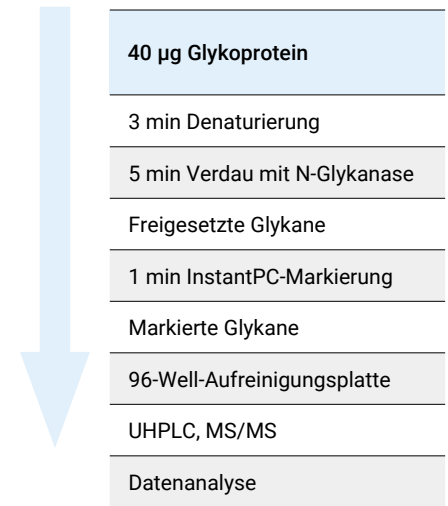
Dieser Leitfaden zum Arbeitsablauf der Gly-X InstantPC N-Glykan-Analyse enthält außerdem Bestellinformationen für:

- Kit für die Probenvorbereitung – Gly-X InstantPC-Technologie, speziell für hohe Fluoreszenzsignale in LC/FLD und verstärkte Ionisierung bei der MS-Analyse entwickelt und optimiert.
- InstantPC-markierte N-Glykan-Standards – diese gut charakterisierten Einzelstandards und -bibliotheken sind bei dem Profiling von N-Glykan-Spezies entscheidend wichtig, die die Sicherheit und Wirksamkeit von Biotherapeutika beeinträchtigen können.
- Flüssigchromatographie-Säulen für die Trennung von Glykanen durch HILIC.
- Lösemittel und Reagenzien.
- Konzentrierte mobile Phase, bereit zur Verdünnung.
- Probenflaschen und -verschlüsse.
- Datenanalyse und Berichterstellung.

So kurbeln Sie die Produktivität der N-Glykan-Analyse an

- Proben sind in weniger als 1 Stunde bereit für UHPLC/FLD oder LC/MS.
- Der 5-minütige Verdau mit PNGase F bewirkt die Freisetzung der N-Glykane ohne Bevorzugung einzelner Spezies.
- Farbstoff InstantPC für hohe UHPLC/FLD- und MS-Signale.
- Einfache, bei Umgebungsbedingungen stabile 96-Well-Aufreinigungsplatte.
- Unterstützt schnelle und hochauflösende Analysen.
- Das modulare Format ermöglicht einen flexiblen Probendurchsatz und verhindert Verschwendung.

In Abbildung 2 sind HILIC/FLD-Daten von aus Rituximab und Etanercept freigesetzten und mit Gly-X InstantPC vorbereiteten Glykanen beispielhaft dargestellt. Weiterführende Hinweise zu den MS-Daten für die N-Glykan-Strukturaufklärung finden Sie in der Application Note [5994-1348DEE](#).



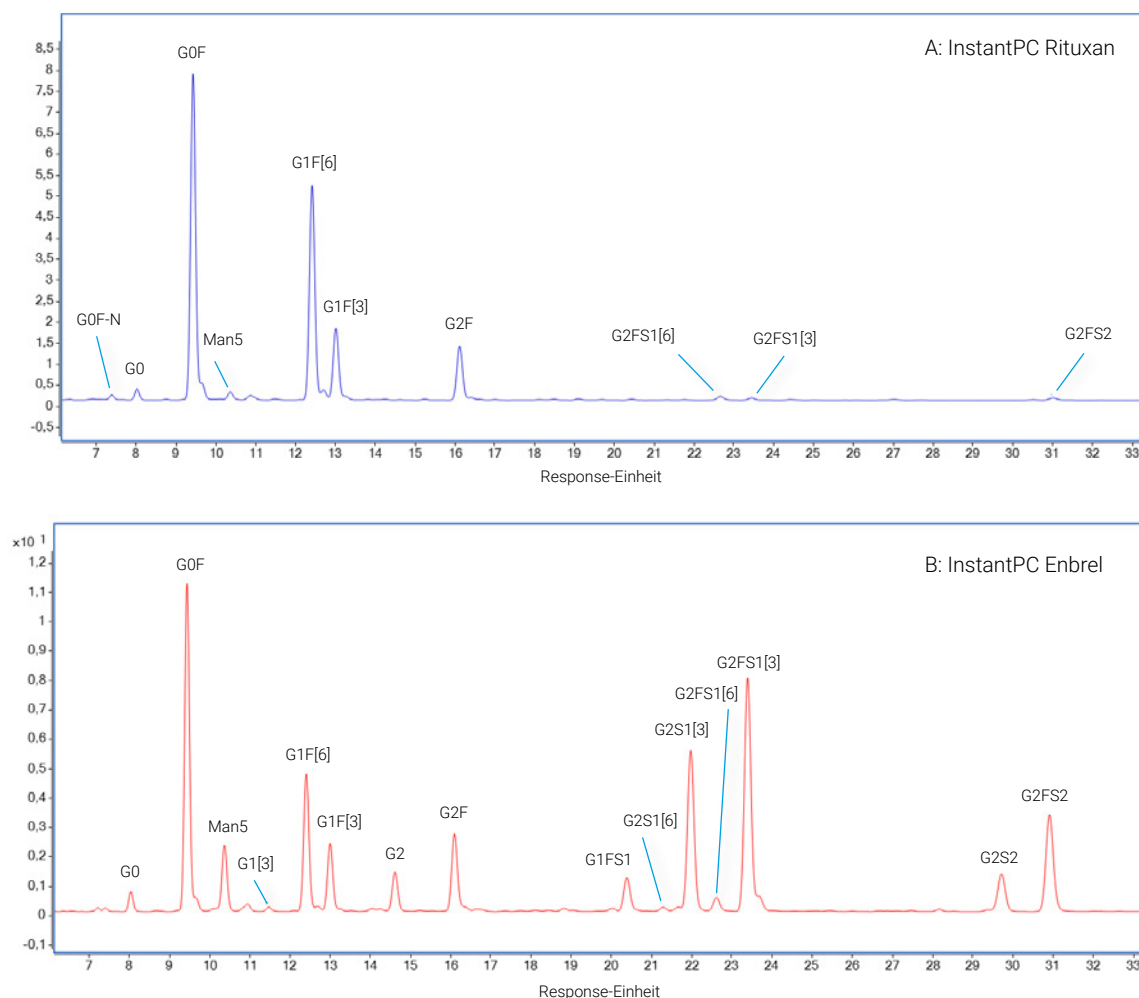


Abbildung 2: HILIC-UHPLC-Fluoreszenzprofil von InstantPC-markierten N-Glykanen aus A) Rituxan und B) Enbrel. Die relativen Prozentwerte der N-Glykan-Flächen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst (n = 4). UHPLC-Bedingungen und Quadrupol-Flugzeit-Parameter sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 1. Relative prozentuale Fläche, SD und % VK-Werte für InstantPC-markierte N-Glykane aus Enbrel, n = 4.

	Durchschnittl. rel. Fläche (%)	Standardabweichung	% VK
G0F-N	0,520	0,000	0,000
G0	1,288	0,005	0,388
G0F	42,965	0,031	0,072
Man5	1,003	0,010	0,955
G1F[6]	29,453	0,031	0,105
G1F[3]	10,203	0,030	0,293
G2F	7,858	0,013	0,160
G2FS1[6]	0,675	0,010	1,481
G2FS1[3]	0,378	0,015	3,974
G2FS2	0,455	0,010	2,198

Tabelle 2. Relative prozentuale Fläche, SD und % VK-Werte für InstantPC-markierte N-Glykane aus Rituxan, n = 4.

	Durchschnittl. rel. Fläche (%)	Standardabweichung	% VK
G0	1,138	0,005	0,440
G0F	20,340	0,055	0,269
Man5	4,073	0,015	0,368
G1[3]	0,320	0,008	2,552
G1F[6]	9,130	0,037	0,410
G1F[3]	4,523	0,013	0,278
G2	2,628	0,010	0,364
G2F	5,573	0,015	0,269
G1FS1	2,628	0,015	0,564
G2S1[6]	0,268	0,005	1,869
G2S1[3]	13,235	0,033	0,251
G2FS1[6]	1,148	0,005	0,436
G2FS1[3]	20,185	0,057	0,285
G2S2	3,478	0,005	0,144
G2FS2	9,143	0,030	0,327

Tabelle 3. Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD-Bedingungen für InstantPC-markierte N-Glykane.

Parameter	Wert		
Säule	Agilent AdvanceBio Amid HILIC, 2,1 × 150 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 859750-913)		
Säulentemp.	60 °C		
Mobile Phase	A) 50 mM Ammoniumformat, pH 4,4 B) Acetonitril		
Gradienten-Programm	Zeit (Minuten)	%B	Flussrate (ml/min)
	0	77	0,6
	45	59	0,6
	46	40	0,6
	47	40	0,6
	49	77	0,6
	60	77	0,6
Injektionsvolumen	1 µl		
Fluoreszenz-detektion	Agilent 1260 Infinity II Fluoreszenzdetektor InstantPC: λEx 285 nm, λEm 345 nm		

Tabelle 4. Agilent 6545XT Q-TOF-Parameter für InstantPC-markierte N-Glykane.

Agilent 6545XT Q-TOF	
Quelle	Duale AJS ESI
Gastemperatur	150 °C
Trocknungsgasstrom	9 l/min
Zerstäuber	35 psi
Sheathgas-Temperatur	300 °C
Sheathgas-Fluss	10 l/min
Vcap	2500 V
Nozzle Voltage	500 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Massenbereich	m/z 600 bis 3000
Scanrate	1 Spektrum/s
Datenerfassungsmodus	Erweiterter dynamischer Bereich (2 GHz)

Erste Schritte mit Gly-X InstantPC

Erwägungen bei der Vorbereitung von Glycoproteinproben

Glycoproteinproben sollten mit einer Konzentration von maximal 2 mg/ml in einem neutralen Puffer mit niedrigem Salzgehalt ohne Tenside und ohne nukleophile Substanzen (wie Amine) vorliegen. Höher konzentrierte Proben sollten mit Wasser oder 50 mM HEPES (pH 7,9) verdünnt werden.

- Maximale Konzentration: 2 mg/ml.
- Maximale Proteinmenge pro Reaktion: 40 µg (z. B. 2 µl jeder Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml). Für mAbs könnten größere Proteinmengen verwendet werden (bis 100 µg), die Datenlinearität muss dann jedoch geprüft werden.
- Puffer: Neutraler Puffer mit niedrigem Salzgehalt (~150 mM) ohne Tenside und ohne nukleophile Substanzen (wie Amine). Proben können mit Wasser oder 50 mM HEPES (pH 7,9) verdünnt werden.

Andere Erwägungen:

- Bei Proben in Aminpuffern (z. B. Tris, Arginin, Glycin, Histidin) sollte der Puffer vor der Deglykosylierung ausgetauscht werden. Es wird ein Zentrifugen-Filtereinsatz mit einem MWCO von 10 kDa empfohlen.
- Bei Vorbereitung der Proben mit Protein-A-Affinitätschromatographie sollte 0,1 %ige Ameisensäure als Eluent dienen.
- PBS wird nicht empfohlen.
- Weiterführende Hinweise finden Sie in der Gebrauchsanweisung für Gly-X InstantPC.⁵

Hardware für Inkubation und Aufreinigung

Im Rahmen der Probenvorbereitung mit Gly-X InstantPC werden die Proben während der Protein-Denaturierung auf 90 °C erhitzt und während des Verdaus mit PNGase F und der Markierung mit InstantPC auf 50 °C erhitzt. Zur Erhitzung der Proben in der bereitgestellten 96-Wellplate empfehlen wir einen Thermocycler oder ein Trockenheizblockgerät (siehe folgende Empfehlungen). Das Aufreinigungsverfahren erfolgt bei Unterdruck. Wenn Sie die empfohlene Millipore Vakuumkammer und Pumpe nicht verwenden wollen, wenden Sie sich bitte an Agilent.

Heiz- und Vakuumgeräte (Drittanbieter)	Best.-Nr.
96-Well-Thermocycler (Corning)	THERM-1001, 110 V THERM-1000, 230 V
Dry Block Heater, 4 Blöcke, HB4DG, US (Menge: 2 St.) (Troemner)	HB4DG
Modulare Heizblöcke (Menge: 2 St.) (VWR)	VWR 13259-260
Vakuumkammer (Millipore)	MSVMHTS00
Vakuumpumpe (Millipore)	WP6211560, 110 V WP6122050, 220 V

Beste Praktiken für HILIC-Trennungen

Für HILIC-Trennungen eignen sich markierte Glykane in kleinen Injektionsvolumen unter 1 µl am besten. Bei wässrigen Injektionsvolumen > 1 µl werden Peakform und -auflösung beeinträchtigt. Anweisungen zur Probenverdünnung mit organischen Lösemitteln auf Injektionsvolumen > 1 µl finden Sie im Benutzerhandbuch von Gly-X InstantPC, [5994-1231EN](#), Seite 14.

Die Anwender sollten das Totvolumen der HPLC-Systeme auf ein Minimum optimieren. Die Lebensdauer der Säulen ist bei 80 % des Maximaldrucks optimal.

Das Konzentrat Agilent AdvanceBio Ammonium Formate Mobile Phase (Best-Nr. G3912-00000) kann zur Herstellung von 1 l 50 mM Ammoniumformiat, pH 4,4, verwendet werden.

Die typische Betriebstemperatur liegt bei 60 °C. Höhere Temperaturen können verwendet werden, verkürzen jedoch die Lebensdauer der Säule.

Glykanstandards

Agilent bietet eine große Bandbreite an freigesetzten, mit InstantPC markierten N-Glykan-Standards und -Bibliotheken. Dies ermöglicht die Kalibrierung der LC/FLD/MS-Systeme, die für die Analyse der freigesetzten Glykane verwendet werden. Eine vollständige Liste der markierten N-Glykan-Standards finden Sie in der Broschüre zu Glykan-Standards [5994-2202DEE](#). Glykan-Standards sind zur Identifizierung von Glykanisomeren und koelutierenden Peaks wichtig. G0F/Man5, Man5/G1, G1FS1/G2F sind mögliche Koelutionen.

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zur Bestellung der in den folgenden Tabellen zusammengefassten Artikel im Agilent Store legen Sie die gewünschten Artikel in die Liste *Produktfavoriten*, dazu klicken Sie auf die MeineListe-#-Links in den Überschriften. Dann geben Sie die gewünschte Menge ein, wählen die Option „In den Warenkorb“ und gehen zur Kasse. Ihre Liste unter *Produktfavoriten* bleibt erhalten und kann bei zukünftigen Bestellungen genutzt werden.

Wenn Sie *Produktfavoriten* zum ersten Mal benutzen, werden Sie zur Eingabe Ihrer E-Mail-Adresse aufgefordert, um das Kundenkonto zu bestätigen. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Wenn Sie noch kein Agilent Konto eingerichtet haben, müssen Sie sich für eines registrieren. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch über die üblichen Verkaufs- und Vertriebskanäle bestellt werden.

MeineListe 1 N-Glykan-Probenvorbereitung mit Gly-X InstantPC, AdvanceBio Amid HILIC-Säulen, Lösemittel und Probenbehälter.

Beschreibung	Best.-Nr.
Probenvorbereitung	
AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit InstantPC-Kit, 96 St.	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit InstantPC-Kit, 24 St.*	GX24-IPC*
Gly-X Abstandshalter für Vakuumkammer	GX100
HILIC-Säule	
AdvanceBio Amid HILIC 300 Å, 2,1 x 150 mm, 1,8 µm	859750-913
Reagenzien	
InfinityLab Ultrarein LC/MS-Acetonitril (1 l)	5191-4496
MS-Lösung, Ameisensäure, 10 ml	US-700002341
Agilent AdvanceBio Ammonium Formate Mobile Phase, Konzentrat, 10 ml	G3912-00000
InfinityLab Ultrarein LC/MS-Standard, Wasser	5191-4498
Probenflaschen und Verschlüsse**	
Schraubverschluss-Probenflaschen, 250 µl, 100 St.	5190-2242
Schnappverschluss, blau, Septen aus PTFE/Silikon, 100 St. Deckelgröße: 11 mm	5182-0541

* Kit, 24 St. (GX24-IPC) enthält eine 96-Well-Aufreinigungsplatte. Bewahren Sie die Aufreinigungsplatte bei Raumtemperatur auf und bestellen Sie 24 Gly-X InstantPC Deglykosylierungs- und Markierungs-Modul-Nachfüllungen (GX24-201PC).

** InstantPC-markierte Glykane werden in eine 96-Wellplate eluiert. Die Anwender können die Proben direkt von der Platte in die LC injizieren oder zuerst zu Probenflaschen überführen.

MeineListe 2 Zusätzliche Konfigurationen der Gly-X InstantPC-Kits und -Module für die Vorbereitung von N-Glykan-Proben.

Beschreibung	Best.-Nr.
AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit InstantPC-Kit, 96 St.	GX96-IPC
AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit InstantPC-Kit, 24 St.	GX24-IPC
AdvanceBio Gly-X Deglykosylierungsmodul, 24 St.	GX24-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC Markierungsmodul, 24 St.	GX24-101
AdvanceBio Gly-X Deglykosylierungsmodul, 96 St.	GX96-100
AdvanceBio Gly-X InstantPC Markierungsmodul, 96 St.	GX96-101
AdvanceBio Gly-X InstantPC Aufreinigungsmodul, 96 St.	GX96-102
AdvanceBio Gly-X Modulsatz zur Deglykosylierung und InstantPC-Markierung, 24 St.	GX24-201PC
AdvanceBio Gly-X Modulsatz zur Deglykosylierung und InstantPC-Markierung, 96 St.	GX96-201PC
Gly-X Abstandshalter für Vakuumkammer	GX100

Glykanstandards

Eine vollständige Liste der markierten N-Glykan-Standards von Agilent finden Sie in der Broschüre zu Glykan-Standards 5994-2202DEE.

MeineListe 3 Mit InstantPC markierte N-Glykan-Standards, die in Rituximab vorkommen.² Diese Standards können als Kontrollen und zur Unterscheidung von koeluiierenden Peaks bei der N-Glykan-Trennung dienen.

MeineListe 3 (ermittelte N-Glykane in Rituxan)

Beschreibung	CFG-Struktur	Best.-Nr.
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

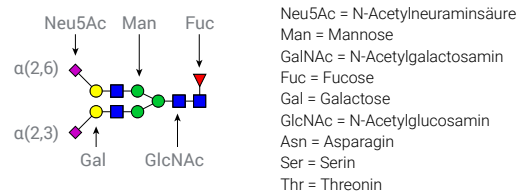


Abbildung 3: Die Glykan-Symboldarstellungen folgen den Empfehlungen des Consortium for Functional Glycomics⁶ (CFG) und wurden mit GlycoWorkbench 2.14.10 erstellt.

MeineListe 4 Mit InstantPC markierte N-Glykan-Standards, die in Etanercept vorkommen.² Diese Standards können als Kontrollen und zur Unterscheidung von koeluiierenden Peaks bei der N-Glykan-Trennung dienen.

MeineListe 4 (ermittelte N-Glykane in Enbrel)

Beschreibung	CFG-Struktur	Best.-Nr.
G0F-N / FA1		GKPC-402
G0 / A2		GKPC-301
G0F / FA2		GKPC-302
Man5 / M5		GKPC-103
G1 / A2G1		GKPC-317
G1F / FA2G1		GKPC-316
G2 / A2G2		GKPC-304
G1FS1 α(2,3) / FA2G1S(3)1		GKPC-330
G2F / FA2G2		GKPC-305
G2S1 α(2,3) / A2G2S(3)1		GKPC-321
G2FS1 α(2,3) / FA2G2S(3)1		GKPC-325
G2S2 α(2,3) / A2G2S(3)2		GKPC-322
G2FS2 α(2,3) / FA2G2S(3)2		GKPC-323

MeineListe 5 AdvanceBio InstantPC-markierte High-Mannose-N-Glykan-Standards.

Beschreibung	CFG-Struktur	Best.-Nr.
Man5 / M5		GKPC-103
Man6 / M6		GKPC-104
Man7 / M7		GKPC-105
Man8 / M8		GKPC-106
Man9 / M9		GKPC-107

MeineListe 6 Bibliotheken aus InstantPC-markierten, tri- oder tetraantennären N-Glykanen zur Untersuchung von sialylierten Glykoproteinen. Die Glykanstrukturen sind auf den Analysenzertifikaten dargestellt.

Beschreibung	Best.-Nr.
Bibliothek aus InstantPC-markierten, α (2,3)-sialylierten triantennären N-Glykanen	GKPC-233
Bibliothek aus InstantPC-markierten, α (2,6)-sialylierten triantennären N-Glykanen	GKPC-263
Bibliothek aus α (2,3)-sialylierten tetraantennären N-Glykanen	GKPC-234
Bibliothek aus α (2,6)-sialylierten tetraantennären N-Glykanen	GKPC-264

MeineListe 7 N-Glykan-Bibliotheken und Kontroll-Glykoproteine. Die Glykanstrukturen sind auf den Analysenzertifikaten dargestellt.

Beschreibung	Best.-Nr.
Die Bibliothek mit Human-IgG-N-Glykanen besteht aus komplexen biantennären Oligosacchariden. Diese entsprechen normalem Human-IgG, einschließlich einiger GlcNAc-N-Glykane des Bisecting-Typs, und sind mit InstantPC markiert.	GKPC-005
Die CHO mAb N-Glykan-Bibliothek enthält neutrale, fucosylierte, komplexe, biantennäre N-Glykane sowie das High-Mannose-N-Glykan Man5, die in vielen monoklonalen Antikörpern (mAbs) aus CHO vorhanden und mit InstantPC markiert sind.	GKPC-020
CHO mAb N-Glykan-Bibliothek plus CHO mAb-Glycoprotein besteht aus komplexen, biantennären sowie High-Mannose-N-Glykanen, die in vielen therapeutischen Glycoproteinen aus CHO vorhanden sind. Das Ausgangsglycoprotein für die Bibliothek ist auch in der Lieferung vorhanden, um es als Kontrolle bei der Probenvorbereitung nutzen zu können.	GKPC-020-P
AdvanceBio InstantPC Maltodextrin-Leiter. Kann als Standardleiter zur Erstellung von Glucoseeinheitswerten (GU) dienen ⁷	GKPC-503
Agilent NIST-mAb, 25 μ l	5191-5744
Agilent NIST-mAb, 4 x 25 μ l	5191-5745

MeineListe 8 AdvanceBio Amid HILIC-Säulen für Methoden der hydrophilen Interaktionsflüssigkeitschromatographie (HILIC). Weiterführende Hinweise siehe unsere [Website](#).

Beschreibung	Best.-Nr.
1,8 μm, 1200 bar max. Druck, 80 °C max. Temperatur	
AdvanceBio Amid HILIC, 2,1 x 150 mm, 1,8 μ m	859750-913
AdvanceBio Amid HILIC, 2,1 x 100 mm, 1,8 μ m	858750-913

Literaturverweise

1. N-Glykan-Analytik: Zusammen besser. Agilent Broschüre [5994-1647DEE](#), 2020.
2. Improved Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for LC/FLD/MS Analysis of Released N-Glycans. Application Note von Agilent. [5994-6916EN](#), 2023.
3. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan-Prep mit InstantPC-Kit. Vereinfachter Arbeitsablauf für eine schnelle FLD/MS-Glykan-Analyse, Agilent Broschüre [5994-0918DEE](#), 2019.
4. Technischer Flyer zu Glykan-Standards, [5994-2202DEE](#), 2020.
5. Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glykan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme). Benutzerhandbuch [5994-1231EN](#).
6. Y Xie, et al. High-throughput and high-sensitivity N-Glycan profiling: A platform for biopharmaceutical development and disease biomarker discovery. Analytical Biochemistry, Volume 623, 15 June 2021, 114205.
7. Varki A, et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. Glycobiology. 2015 Dec; 25(12): 1323-1324.

Agilent CrossLab: Wir unterstützen Ihren Erfolg

Agilent CrossLab ist ein Leistungsangebot von Agilent, das Services und Verbrauchsmaterialien integriert, um den Erfolg von Arbeitsabläufen zu unterstützen, die Produktivität zu verbessern und die Betriebseffizienz zu steigern. In jeder Interaktion sind wir bestrebt, Erkenntnisse zu bieten, mit welchen Sie Ihre Ziele schneller und besser erreichen. Wir bieten eine breite Palette an Produkten und Services an, von Methodenoptimierung und Schulung bis zum Umzug gesamter Labore und zur Analytik von Betriebsdaten, die Sie dabei unterstützen, Ihre Geräte und Ihr Labor so zu verwalten, dass sie bestmögliche Leistung erbringen.

Mehr Infos über Agilent CrossLab unter
www.agilent.com/crosslab

Weitere Informationen:

www.agilent.com/chem/glycoscience

Online-Store:

www.agilent.com/chem/store

Hier finden Sie ein Agilent Kundendienstzentrum in Ihrem Land:

www.agilent.com/chem/contactus

Deutschland

0800-603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien und Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

DE44396.4422106482

Änderungen dieser Informationen ohne vorherige Ankündigung vorbehalten.