

Análisis de N-glicanos: mejor juntos

Flujo de trabajo de preparación de muestras de Agilent y ProZyme





Haga avanzar su análisis de glicoproteínas a nuevos niveles de rendimiento

La estructura de los N-glicanos puede afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica de las proteínas terapéuticas, como los anticuerpos monoclonales (mAb) y las proteínas de fusión. Por este motivo, la caracterización de N-glicanos resulta esencial para el proceso de desarrollo bioterapéutico^{1,2}.

Un método habitual para la caracterización de N-glicanos implica el marcado de glicanos liberados enzimáticamente para permitir la detección de fluorescencia (FLD) y mejorar la ionización para la espectrometría de masas (MS). Estos glicanos marcados se separan mediante cromatografía de líquidos (LC) o electroforesis capilar (CE), habilitándose la cuantificación relativa mediante FLD y confirmándose la masa mediante detección por MS. La cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC) es la técnica de separación más popular para los N-glicanos marcados.

Flujos de trabajo integrales para la preparación y el análisis de muestras de N-glicanos

Con la integración de productos de glicanoanálisis ProZyme, Agilent ofrece ahora diversas opciones de preparación de muestras para N-glicanos para ayudarle en sus flujos de trabajo de LC/FLD/MS y CE (Figura 1):

- Gly-X, nuestro producto más reciente. Acortando el tiempo de preparación de las muestras a una hora, utiliza una digestión con PNGasa F e InstantPC (un tinte para el marcado de glicosilamina con una elevada señal de FLD y MS) en cinco minutos. También se puede marcar con 2-AB y APTS con un tiempo del flujo de trabajo de unas dos horas.
- GlykoPrep, un kit rotativo de una generación anterior. Está basado en los cartuchos AssayMAP introducidos en 2012 con un tiempo del flujo de trabajo de entre tres y cinco horas.
- Herramientas que permiten métodos más tradicionales.

Estos flujos de trabajo modulares están disponibles con diferentes etiquetas de glicanos y están asistidos por una amplia gama de patrones y bibliotecas de glicanos marcados y sin marcar.

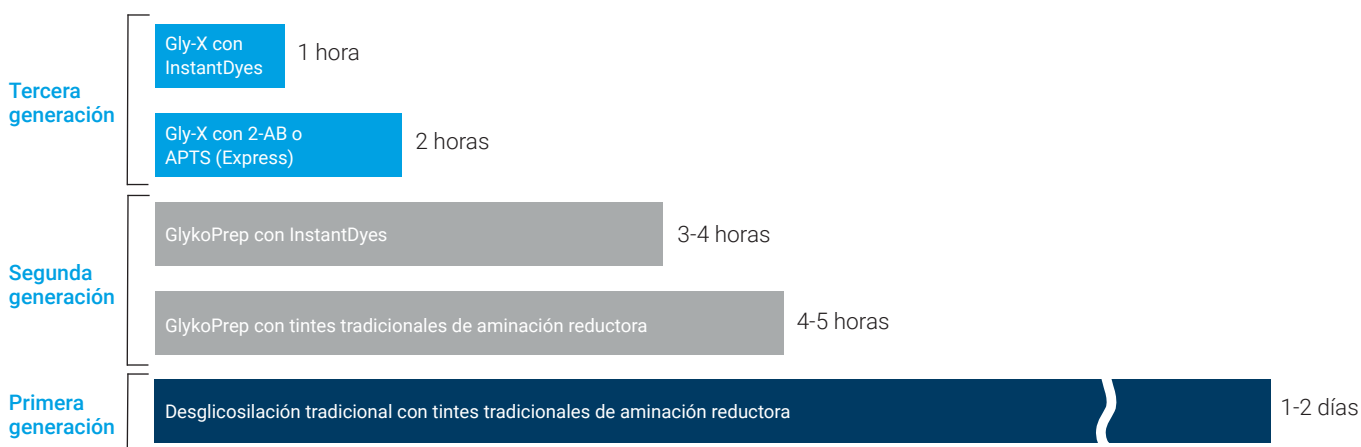


Figura 1. Evolución de la preparación de muestras de N-glicanos (los tiempos se muestran a la derecha).

Junto con las columnas HILIC para mapeo de glicanos AdvanceBio y los instrumentos para LC y MS, Agilent ahora ofrece soluciones para todo el flujo de trabajo de glicanos liberados.



Figura 2. Elementos del flujo de trabajo de N-glicanos liberados de Agilent.

Preparación de muestras de N-glicanos Gly-X

Gly-X es una plataforma de preparación de N-glicanos de nueva generación que proporciona un flujo de trabajo simplificado en solución. Utiliza una digestión en PNGasa F durante cinco minutos (en combinación con el tinte InstantPC y un eficiente paso de limpieza de placas de vacío) para eliminar el exceso de marcador y de desnaturalizante. De este modo, las muestras estarán listas para UHPLC con detección por FLD y/o MS de señal elevada en 60 minutos o incluso menos (Figura 3).

¿Desea continuar usando el marcado con 2-aminobenzamida (2-AB) para comparar con los datos históricos? La plataforma Gly-X admite el marcado con 2-AB mediante 2-AB Express, en el que los glicanos son inmovilizados en la matriz de limpieza antes del marcado, con lo que se elimina la necesidad de secado.

También se admiten las separaciones CE de los N-glicanos mediante el kit APTS (ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico) Express. El flujo de trabajo con 2-AB Express y APTS Express lleva unas dos horas, debido a la hora adicional necesaria para el marcado mediante la reacción de aminación reductora en caliente.

Flujo de trabajo de preparación de muestras de N-glicanos Gly-X

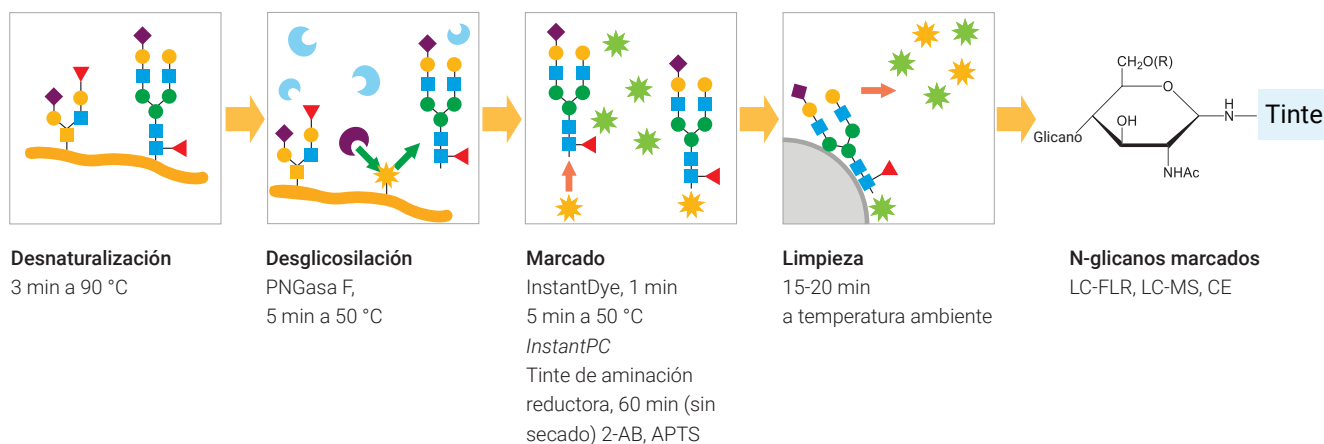


Figura 3. Flujo de trabajo de preparación de muestras de N-glicanos Gly-X. La cantidad de muestra inicial recomendada es de 1 a 40 µg, lo que supone una cantidad de muestra máxima superior a la de otros flujos de trabajo similares. Es posible que también se pueda usar más proteína, en función de la molécula. Para ver otras consideraciones sobre la muestra, consulte los manuales del producto Gly-X individual.

La preparación de muestras con Gly-X es robusta y reproducible

Se incluyen todos los reactivos, incluida la enzima N-glicanasa (PNGasa F), salvo los reactivos de uso frecuente tales como acetonitrilo, ácido fórmico y agua. Mediante el uso de un formato de 96 pocillos para la placa de limpieza por vacío, se pueden procesar de 1 a 96 muestras por ciclo. Los pocillos usados de la placa de limpieza se sellan antes de su almacenamiento a temperatura ambiente. Los reactivos usados parcialmente pueden devolverse a las condiciones de almacenamiento pertinentes para su reutilización (consulte más detalles en el manual de instrucciones). La separación de N-glicanos de rituximab marcados con InstantPC se muestra en la Figura 4, junto con datos del área porcentual relativa.

Valores de % área relativa, DE y % CV para N-glicanos de Rituxan marcados con InstantPC, n = 4.

	% área relativa media	Desviación estándar	% CV
G0F-N	0,75	0,01	1,55
G0	1,47	0,02	1,18
G0F	46,82	0,07	0,15
Man5	1,21	0,01	0,83
G1[6]	0,75	0,02	2,67
G1F[6]	31,21	0,11	0,35
G1F[3]	9,27	0,05	0,54
G2F	7,04	0,04	0,51
G2FS1[6]	0,67	0,02	2,29
G2FS1[3]	0,37	0,06	15,98
G2FS2	0,45	0,03	6,67

N-glicanos de rituximab, Gly-X InstantPC

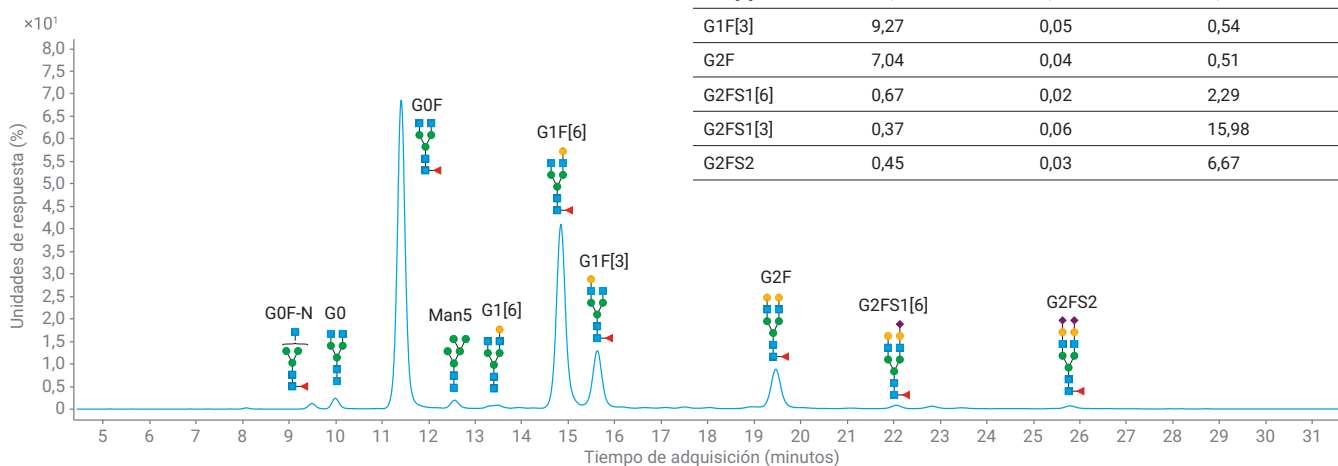


Figura 4. Perfil de fluorescencia HILIC-UHPLC de N-glicanos de Rituxan preparados con Gly-X InstantPC. Las áreas porcentuales relativas de N-glicanos se muestran en la tabla. Los datos proceden de la nota de aplicación [5994-1348EN](#).

Para obtener más información sobre Gly-X, consulte estos recursos o visite nuestra [página web sobre Gly-X](#).

Publicación	Documento	Título
5994-1348EN	Nota de aplicación	Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics Using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with LC/FLD/MS
5994-0682EN	Nota de aplicación	Preparation of Released N-Glycan Samples from Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express for LC-Fluorescence Analysis
5994-0944EN	Nota de aplicación	Development of a Rapid APTS Sample Preparation Workflow for N-Glycan Release and Labeling
5994-1231EN	Manual del usuario	Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit (p/n GX24-IPC and GX96-IPC)
5994-1228EN	Manual del usuario	Agilent AdvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with 2-AB Express Kit (p/n GX24-2AB and GX96-2AB)
5994-1229EN	Manual del usuario	Agilent Gly-X N-Glycan Rapid Release and Labeling with APTS Express Kit (p/n GX96-APTS)

Preparación de muestras de N-glicanos GlykoPrep

Lanzados en 2012, los cartuchos de fase sólida ProZyme GlykoPrep fueron la primera plataforma en usar el marcado de glicanos “instantáneo” (Figura 5). Los cartuchos permiten agilizar y estandarizar la preparación de muestras de N-glicanos en los formatos tanto rotativo como de automatización (AssayMAP Bravo). La reproducibilidad se demostró en dos estudios interlaboratorio mediante el uso de LC³ y CE⁴. Aunque GlykoPrep ha sido sustituido por Gly-X, continuamos ofreciendo soporte a los clientes existentes de GlykoPrep.

Flujo de trabajo de preparación de muestras de N-glicanos GlykoPrep

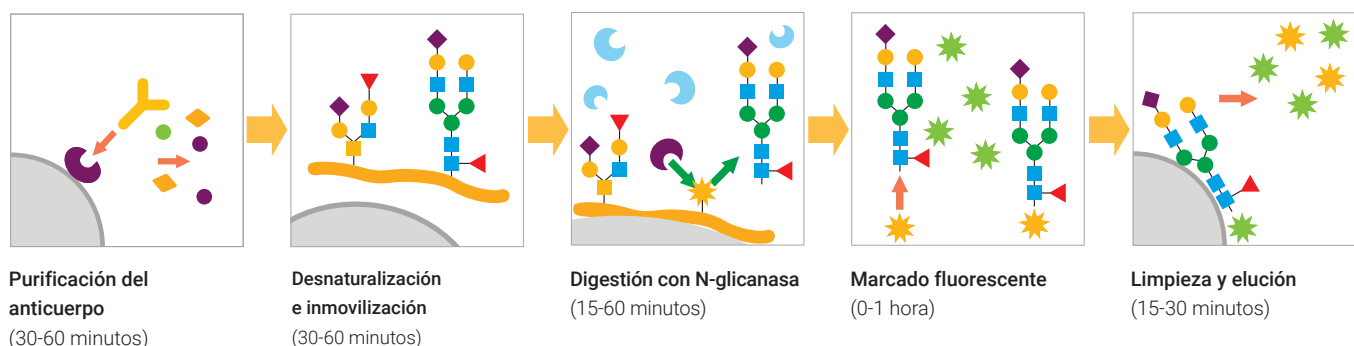


Figura 5. Flujo de trabajo de preparación de muestras de N-glicanos GlykoPrep. Están disponibles numerosas opciones de marcado, incluidos InstantPC, 2-AB e InstantAB, APTS.

Para obtener más información sobre GlykoPrep, consulte estos recursos o visite nuestra [página web sobre GlykoPrep](#).

Publicación	Documento	Título
5994-0942EN	Nota de aplicación	Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans
5991-8550EN	Nota de aplicación	A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis
5991-6958EN	Nota de aplicación	Comparison of Relative Quantification of Monoclonal Antibody N-Glycans Using Fluorescence and MS Detection
5991-0871EN	Nota de aplicación	Analysis of Monoclonal Antibody N-Glycans by Fluorescence Detection and Robust Mass Selective Detection Using the Agilent LC/MSD XT



Métodos tradicionales para la preparación de muestras de N-glicanos

Los antiguos flujos de trabajo de preparación de muestras de N-glicanos incluían la digestión nativa o mediante desnaturalizantes con PNGasa F, la purificación de los glicanos liberados, el marcado con un fluoróforo y la purificación de los glicanos marcados. Estos flujos de trabajo llevan de 1 a 2 días y no son adecuados para aplicaciones de alta productividad ni para la automatización.

Con la introducción de Gly-X, podemos ayudarle a pasar desde un flujo de trabajo con 2-AB hasta técnicas más rápidas de preparación de muestras con una mayor productividad. Sin embargo, continuamos ofreciendo soporte a los flujos de trabajo tradicionales con una amplia gama de herramientas de marcado y limpieza de glicanos.

Para obtener más información sobre nuestros productos para la preparación tradicional de glicanos, consulte estos recursos o visite nuestra [página web sobre preparación tradicional de glicanos](#).

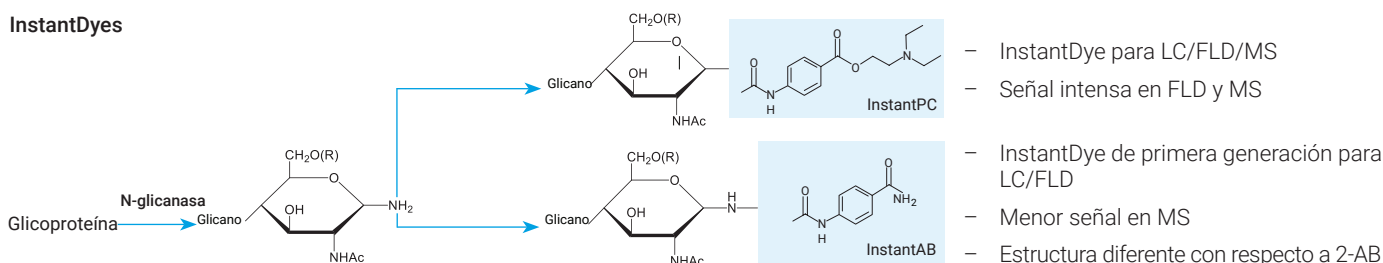
Publicación	Documento	Título
5994-1056EN	Ficha técnica	AdvanceBio N-Glycanase (PNGase F) ≥ 2.5 U/mL (ref. GKE-5006)
GKK-804	Guía de usuario	2-AB-plus Labeling Kit (ref. GKK-804)
GKI-4756	Guía de usuario	GlycoClean R Cartridges (ref. GKI-4756)
GKI-4025	Guía de usuario	GlycoClean H Cartridges (ref. GKI-4025)
GKI-4726	Guía de usuario	GlycoClean S Cartridges (ref. GKI-4726)
5991-9561	Guía de usuario	AdvanceBio N-Glycan Sample Preparation Kit (ref. 5190-8005)



Marcadores de glicanos

Puede marcar N-glicanos con InstantDyes tales como InstantPC, o bien con tintes tradicionales tales como 2-AB para HILIC, o APTS para CE, como se resume en la Figura 6. Recuerde que la aminación reductora precisa una reacción de marcado en caliente de una hora o más, por lo que la preparación de muestras llevará más tiempo. Los tintes para el marcado de glicanos tienen diferencias en el tiempo de retención y la selectividad UHPLC-HILIC, aunque el orden de retención permanece relativamente uniforme⁵.

InstantDyes



Aminación reductora

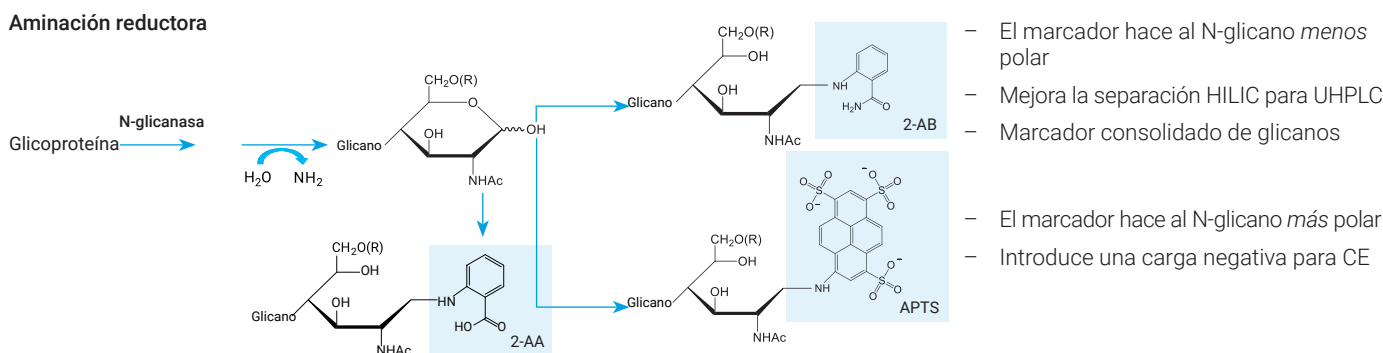


Figura 6. Opciones para el marcado de glicanos.

Además de una elevada señal FLD en LC, InstantPC contiene una amina terciaria que genera una elevada señal MS en modo positivo. Los glicanos sin marcar, así como las etiquetas tradicionales para el análisis de glicanos, tales como 2-AB y 2-AA, se ionizan mal en MS.

InstantPC contaba con la mayor señal de FLD de todos los marcadores de glicanos, como se muestra en la Figura 7. El segundo mejor marcador para fluorescencia fue la procainamida, que se añadía a los glicanos mediante aminación reductora, un flujo de trabajo que requiere mucho tiempo.

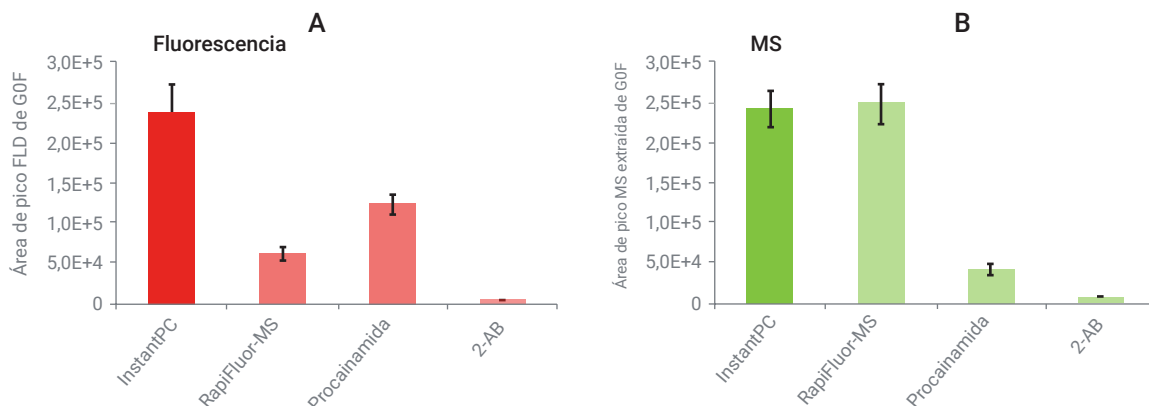


Figura 7. Comparación de la respuesta en FLD (A) y en MS (B) de los marcadores de glicanos. Los glicanos de muestras con cantidades iguales de glicoproteínas se marcaron con InstantPC, RapiFluor-MS, procainamida y 2-AB siguiendo las instrucciones del fabricante y se midieron mediante UHPLC. Las barras representan el área de pico de las especies de N-glicanos GOF.



Patrones de N-glicanos

Ofrecemos patrones de glicanos purificados en las formas tanto marcadas como sin marcar. Los marcadores admitidos son InstantPC, 2-AB, 2-AA y APTS. Todos ellos se pueden usar como patrones cualitativos en procedimientos tales como LC/FLD, LC/MS, CE/LIF y CE/MS.

Quedan cubiertos numerosos tipos de glicanos que aparecen en procedimientos bioterapéuticos, incluidos sialilados y neutros biantenarios complejos, de manosa alta y alfa gal. También puede elegir de entre diversas bibliotecas de glicanos para glicoproteínas, como:

- IgG humana
- Ribonucleasa B bovina
- Fetuina bovina
- Glicoproteína ácida (AGP) α 1 humana
- IgG monoclonal recombinante (mAb) fabricada en células de ovario de hámster chino (CHO)
- Bibliotecas de N-glicanos sialilados tri- y tetraantenarios

Además, ofrecemos la sialilación tanto α (2,3) como α (2,6) dentro de estos patrones.

- El enlace del ácido siálico α (2,3) se encuentra en glicoproteínas producidas en células CHO⁶. Los glicanos con sialilación α (2,3) presentan tiempos de retención HILIC más cortos que los N-glicanos isoméricos con enlaces de ácido siálico α (2,6)⁷.
- El enlace del ácido siálico α (2,6) se encuentra en glicoproteínas tales como la inmunoglobulina intravenosa humana (IVIG)⁸.



Para ver una lista de patrones de N-glicanos individuales, bibliotecas y escaleras de unidades de glucosa (GU), junto con estructuras y nomenclaturas alternativas, consulte la publicación [5994-0999EN](#).

Para conocer nuestra gama completa de patrones de N-glicanos, visite la [página web de Agilent](#).



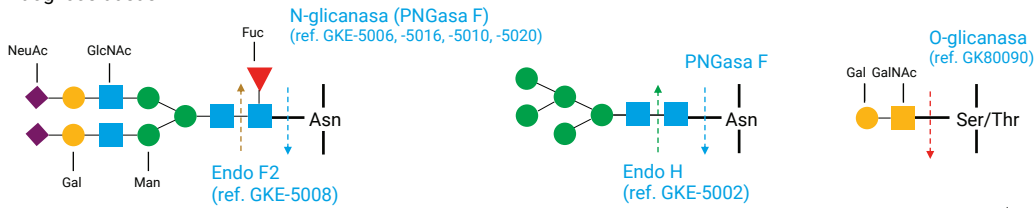
Glicoenzimas

Agilent ofrece ahora gran diversidad de glicoenzimas para prestar soporte a sus flujos de trabajo de glicanos liberados y analíticos de otro tipo. En la Figura 8 se muestra una selección de nuestras enzimas. Visite la [página web de Agilent](#) para conocer nuestra gama completa.

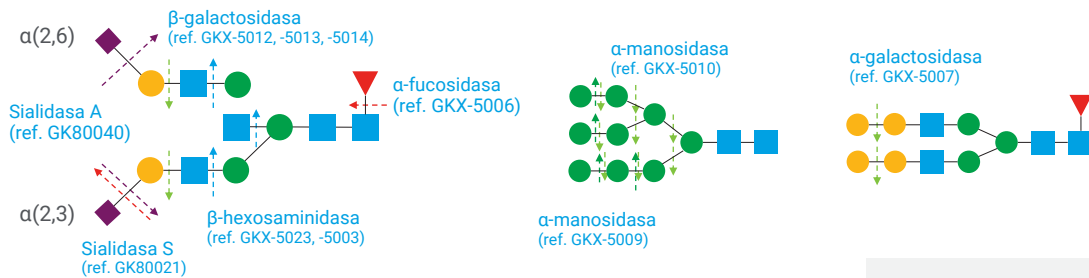
- Las endoglicosidasas escinden dentro de una estructura de glicano. La N-glicanasa (PNGasa F, técnicamente una asparagina amidasa) se utiliza frecuentemente para estudiar los glicanos liberados y para generar la proteína des-N-glicosilada, pues es la que más N-glicanos intactos libera.
- Las exoglicosidasas escinden residuos de monosacáridos expuestos o “terminales” de los glicanos. Entre las exoglicosidasas más usadas se encuentran la galactosidasa para la desgalactosilación y la sialidasa (neuraminidasa) para la desialilación de glicanos liberados, glicoproteínas o células.
- Las glicosiltransferasas catalizan la adición de un monosacárido específico a una estructura de glicano existente, bien libre o bien unida a una proteína, azúcar o lípido. Cada tipo de enzima añade un monosacárido específico. Entre las aplicaciones se incluye la modificación de glicanos en una proteína de glicoproteína in vitro para “glicodiseñar” un perfil de glicano deseado. Nuestras sialiltransferasas y galactosiltransferasas también incluyen los sustratos donantes de galactosa o ácido siálico adecuados.

Especificidades para algunas endoglicosidasas (A), exoglicosidasas (B) y glicosiltransferasas (C)

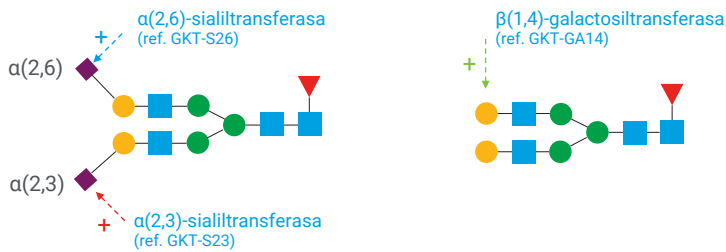
A. Endoglicosidasas



B. Exoglicosidasas



C. Glicosiltransferasas



Clave de la estructura de los glicanos

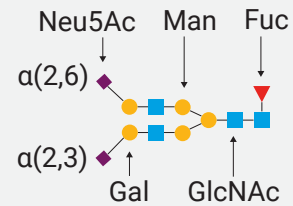


Figura 8. Especificidades para algunas A) endoglicosidasas; B) exoglicosidasas; y C) glicosiltransferasas.

Los dibujos de los glicanos siguen las recomendaciones del Consortium for Functional Glycomics⁹ (CFG) y se han realizado mediante GlycoWorkbench 2.14¹⁰.

Neu5Ac = ácido N-acetilneuramínico

GalNAc = N-acetilgalactosamina

Gal = galactosa

Asn = asparagina

Man = manosa

Ser = serina

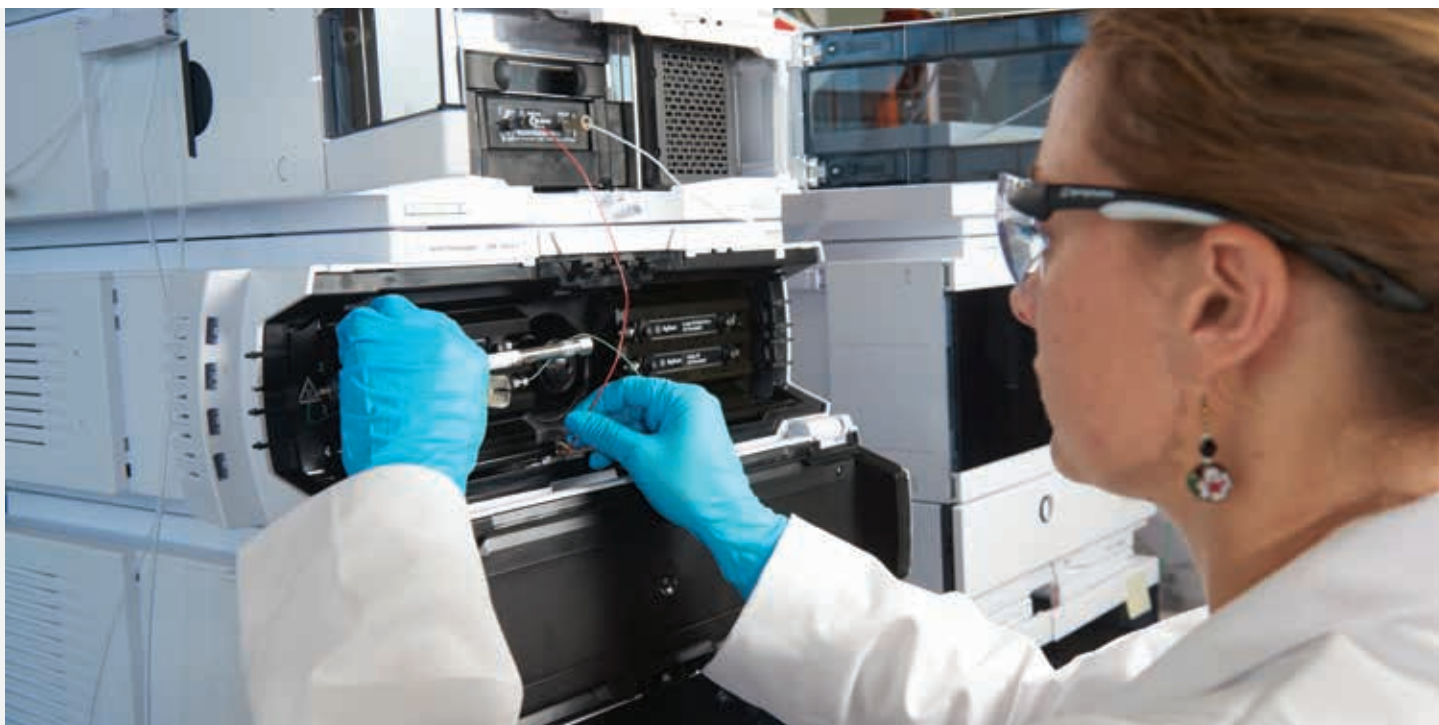
GlcNAc = N-acetilglucosamina

Thr = treonina

Fuc = fucosa

Para obtener más información sobre las glicoenzimas, consulte estos recursos o visite nuestra [página web sobre enzimas de glicobiología](#).

Publicación	Documento	Título
5994-1225EN	Ficha técnica	Sialidase A (ref. GK80040)
GKT-S23	Ficha técnica	$\alpha(2,3)$ -Sialyltransferase (ref. GKT-S23)
GKT-S26	Ficha técnica	$\alpha(2,6)$ -Sialyltransferase (ref. GKT-S26)
GKT-GA14	Ficha técnica	$\beta(1,4)$ -Galactosyltransferase (ref. GKT-GA14)



Las columnas para mapeo de glicanos AdvanceBio aportan alta velocidad y resolución

En la carrera por descubrir y desarrollar nuevas aplicaciones bioterapéuticas prometedoras o por desarrollar un producto biosimilar comparable, no se puede comprometer la precisión y la eficiencia analítica. La reducción del tiempo de desarrollo de procesos, la realización de cambios en los procesos y el control de los costes son tan solo algunos de los retos que hay que afrontar a diario.

Una vez generadas las muestras de N-glicanos marcados mediante el uso de la preparación de muestras Gly-X, utilice columnas para mapeo de glicanos AdvanceBio de Agilent para la separación HILIC de N-glicanos marcados. Estas columnas con base amídica cuentan con un enlace hidrófilo exclusivo y están disponibles en dos configuraciones:

- 1,8 μm , completamente porosas, para velocidad y rendimiento (1200 bar)
- 2,7 μm , superficialmente porosas, para resolución a menores presiones (600 bar)

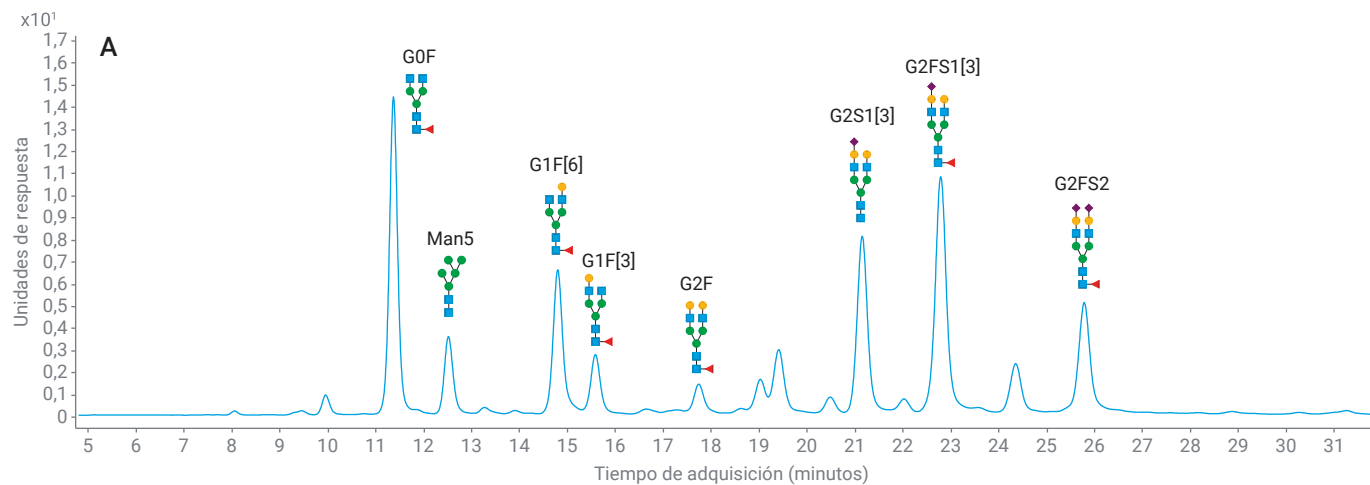
Los métodos HILIC para la separación de N-glicanos utilizando las columnas para mapeo de glicanos AdvanceBio están dentro de la literatura en las Tablas 1 y 2, y la separación de N-glicanos marcados con InstantPC de Enbrel en una columna de 2,1 \times 150 mm, 1,8 μm (ref. 859700-913) utilizando un método de 60 minutos se muestra en la Figura 9.



Las columnas para mapeo de glicanos AdvanceBio ofrecen un rendimiento excepcional y uniforme para la separación y la caracterización de péptidos, proteínas, anticuerpos, conjugados, nuevas entidades biológicas y productos biofarmacéuticos. Hay numerosas longitudes de columna disponibles.

Las columnas HILIC para mapeo de glicanos AdvanceBio le ayudan a superar importantes desafíos en el análisis de glicanos

Enbrel, InstantPC, FLD



Enbrel, InstantPC, cromatograma de iones totales

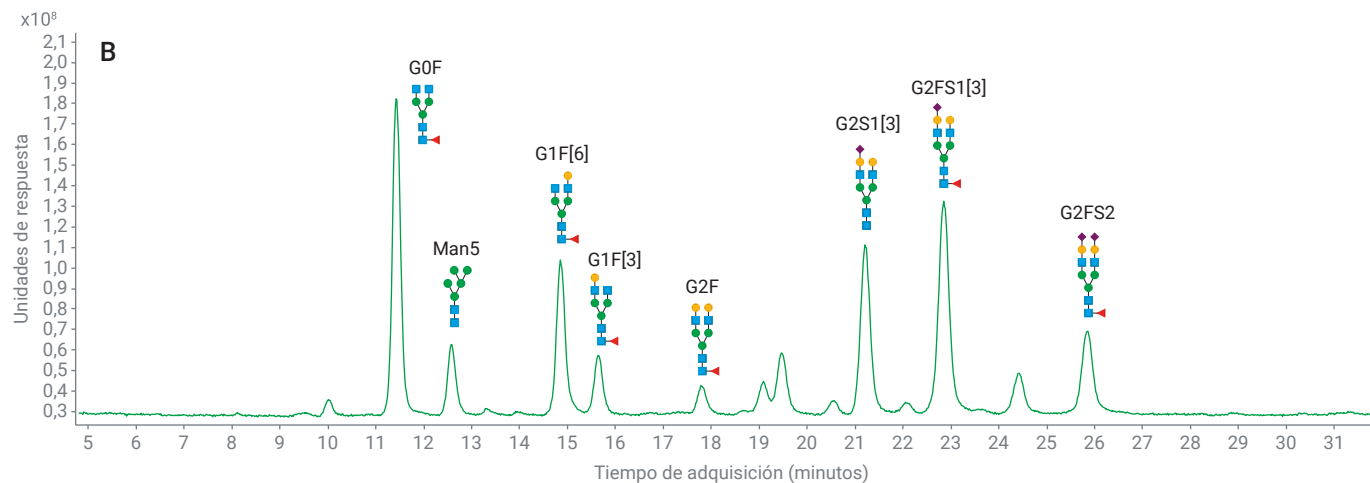


Figura 9. Separación de N-glicanos InstantPC procedentes de Enbrel (etanercept) en una columna de 2,1 × 150 mm, 1,8 μm (ref. 859700-913) empleando un método de 60 minutos. A) Detección de fluorescencia, B) Detección por MS.

Para obtener más información sobre las columnas para mapeo de glicanos AdvanceBio, consulte estos recursos o visite nuestra [página web sobre columnas para mapeo de glicanos](#).

Publicación	Documento	Título
5994-1469EN	Nota de aplicación	Separation of a Critical Pair of N-Glycans Using a Quality by Design (QbD) Approach
5994-0372EN	Nota de aplicación	Glycopeptide Characterization for Various Monoclonal Antibodies Using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
5991-8796EN	Nota de aplicación	Profiling Glycosylation of Monoclonal Antibodies at Three Levels Using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
5991-8550EN	Nota de aplicación	A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis



Servicios analíticos para prestar soporte a su análisis de N-glicanos

Los conocimientos de los expertos pueden ayudar a garantizar el éxito de su programa de desarrollo de fármacos. Agilent ofrece servicios para el análisis de glicanos liberados con opciones de creación de informes, como:

- LC/FLD para área porcentual relativa
- LC/MS para n.º de pico de glicano
- uso de patrones y exoglicosidasas para confirmar la asignación de picos de glicanos
- generación de glicovariantes utilizando exoglicosidasas y glicosiltransferasas para adaptarse a las necesidades de su estudio

Si tiene instrumentos o personal limitados, o si tiene problemas de tiempo, no hay problema. Podemos ayudarle a desarrollar e implementar un método de análisis de glicanos con un reducido tiempo de obtención de resultados. Además, realizamos muchos de nuestros servicios analíticos con productos disponibles comercialmente, lo que facilita la transferencia de métodos si decide traer el análisis a nuestro laboratorio.

Para estudiar las necesidades individuales de su proyecto, puede contactarnos en advancebio.glycan@agilent.com.



Referencias

1. Jones, A. *N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins*. BioPharm International. 2017, 30(6), 20–25.
2. Planinc, A. et al. *Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives*. Anal Chim Acta. 2016, 921, 13–27.
3. Szekrényes, Á. et al. *Multi-site N-Glycan Mapping study 2: UHPLC*. Electrophoresis. 2018, 39(7), 998–1005.
4. Szekrényes, Á. et al. *Multi-site N-Glycan Mapping study 1: Capillary electrophoresis - laser induced fluorescence*. MAbs. 2016, 8(1), 56-64.
5. Yan, J. et al. *Comparison of Common Fluorescent Labels for LC/MS Analysis of Released N-Linked Glycans*. Nota de aplicación de Agilent Technologies, número de publicación [5994-0942EN](#), 2019.
6. Lee, E.U. et al. *Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase*. J Biol Chem. 1989, 264(23), 13848-55.
7. Anthony, R.M. et al. *Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc*. Science. 2008, 320(5874), 373-6.
8. Raymond C. et al. *Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells*. MAbs. 2015, 7(3), 571-83.
9. Varki, A. et al. *Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans*. Glycobiology. 2015, 25(12), 1323-4.
10. Ceroni, A. et al. *GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans*. J Proteome Res. 2008, 7(4), 1650-9.

Servicios Agilent CrossLab

CrossLab es una herramienta de Agilent que integra servicios y consumibles con el fin de contribuir al éxito del flujo de trabajo y a obtener resultados importantes, como la mejora de la productividad y la eficiencia operativa. Por medio de CrossLab, Agilent se esfuerza por aportar información en cada interacción para ayudarle a alcanzar sus objetivos. CrossLab ofrece servicios de optimización de métodos, planes de servicios flexibles y formación en todos los niveles de competencia. Tenemos muchos otros productos y servicios para ayudarle a gestionar sus instrumentos y su laboratorio con el fin de obtener el mejor rendimiento.

Obtenga más información sobre Agilent CrossLab y vea ejemplos de soluciones que conducen a grandes resultados, en www.agilent.com/crosslab

Más información:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Compre on-line:

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

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.
DE.9254398148

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
Publicado en EE. UU., 21 de mayo de 2020
5994-1647ES