

Sialinsäure-Analyse biotherapeutischer Glycoproteine mithilfe des AdvanceBio Kits zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung und LC/FLD/MS



Einfache und standardisierte Sialinsäure-Analytik

Die Zusammensetzung von Glykanen aus biotherapeutischen Glycoproteinen kann deren Immunogenität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflussen.¹ Glykane sind Kohlenhydrate, die aus Monosacchariden bestehen, welche je nach Zusammensetzung und Bindungsposition in vielen verschiedenen möglichen Oligosaccharidstrukturen angeordnet sind. Je nach Molekül und Applikation kann die terminale Sialinsäure die Clearance-Rate herabsetzen, die Aktivität der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) reduzieren oder entzündungshemmend wirken. Zwei häufig in Biotherapeutika vorhandene Formen sind N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc). Neu5Ac ist für gewöhnlich die vorherrschende Spezies, während Neu5Gc im menschlichen Organismus nicht synthetisiert wird und ihr Vorhandensein in Biotherapeutika immunogen sein kann. Es ist daher äußerst wichtig, sowohl die absolute Menge an Sialinsäure als auch die Mengen der unterschiedlichen Sialinsäure-Spezies in therapeutischen Glycoproteinen zu überwachen.

Das Agilent AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung (Bestellnummer GS24-SAP) zeichnet sich durch höhere Empfindlichkeit für Proteine mit niedrigerem Sialyierungsgrad aus, wie es zum Beispiel bei monoklonalen Antikörpern mit einer einzigen N-Glykosylierungsstelle in der Fc-Region der Fall ist. Das Kit enthält alle notwendigen Reagenzien zur Vorbereitung fluoreszenzmarkierter Sialinsäure-Proben in etwa 5 Stunden. Kombiniert mit der Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule lassen sich sowohl die Profilerstellung als auch die Quantifizierung der Sialinsäuren schnell und einfach mittels LC/FLD oder LC/MS durchführen.

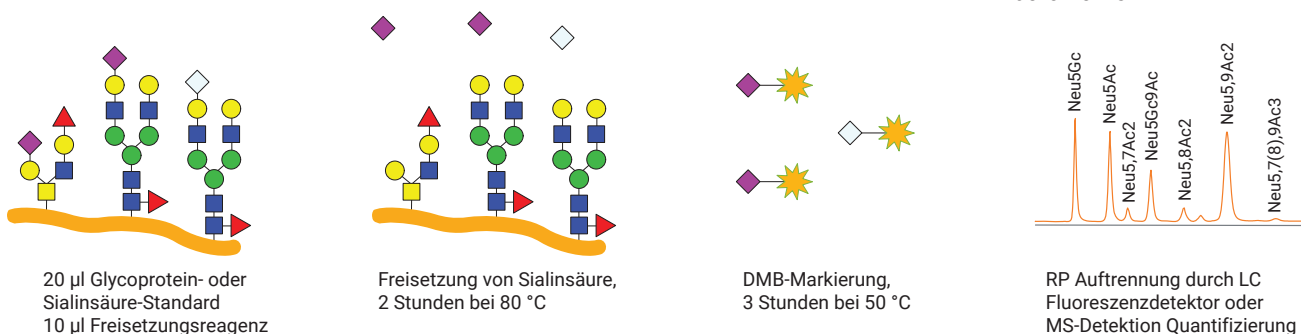


Abb. 1. Arbeitsablauf zur Freisetzung und DMB-Markierung von Sialinsäure mit anschließender Trennung und Detektion mittels FLD oder MS.

Von Agilent entwickelte und hergestellte End-to-End-Lösung zur Analyse von Sialinsäuren

Dieser Leitfaden enthält Angaben zu den Verbrauchsmaterialien, die für den Einstieg in die Sialinsäure-Analytik erforderlich sind. Viele dieser Verbrauchsmaterialien wurden verwendet, um die in Rituximab (Rituxan, ein monoklonaler Antikörper bzw. mAb), Etanercept (Enbrel, ein Fc-Fusionsprotein), Cetuximab (Erbix, ein monoklonaler Antikörper) und NISTmAb enthaltenen Sialinsäuren zu analysieren.² Der effiziente Arbeitsablauf ermöglicht die Bestimmung der absoluten und relativen Mengen von Neu5Ac und Neu5Gc und umfasst sowohl die Profilerstellung als auch die quantitative Analyse durch LC/FLD und LC/MS.

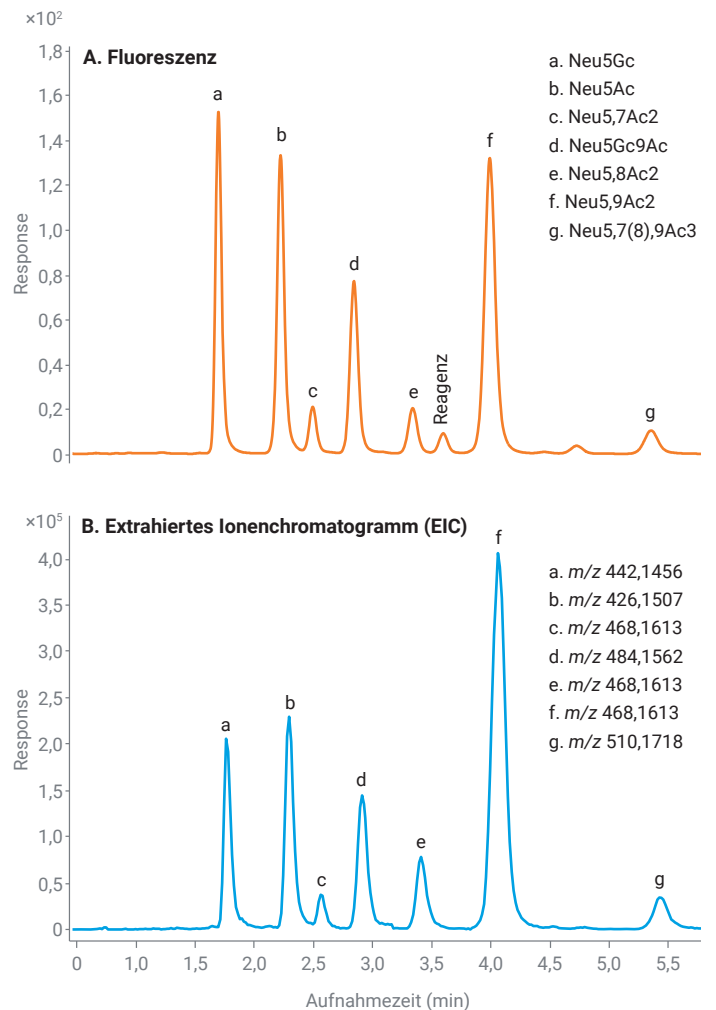
Die Anleitung für den Arbeitsablauf zur Sialinsäure-Analytik mit dem AdvanceBio Kit enthält Bestellinformationen für:

- Das AdvanceBio Probenvorbereitungskit für die Sialinsäure-Profilerstellung und -Quantifizierung. Dieses Kit enthält die erforderlichen Reagenzien zur Freisetzung und Markierung von Sialinsäuren sowie ein qualitatives Sialinsäure-Referenzpanel und quantitative NANA- und NGNA-Standards.
- Flüssigchromatographiesäulen zur Trennung von Glykanen durch Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RPLC).
- Lösemittel und Reagenzien.
- Probenflaschen und -verschlüsse.

Vorteile zur Steigerung der Produktivität bei der Sialinsäure-Analytik:

- Vorbereitung der Proben für die LC/FLD- oder LC/MS-Analyse in ungefähr 5 Stunden.
- Automatisierbares 96-Well-Plattenformat.
- Behältnisse mit Schraubverschluss anstelle von Glasampullen.
- Keine Probentrocknung vor dem Probeneintrag erforderlich.
- Sialinsäure-Trennung durch RPLC in nur 10 Minuten mit einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18-Säule.
- Verwendung des gut beschriebenen Farbstoffes DMB (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol).

Exemplarische LC/FLD- und LC/MS(EIC)-Daten für Sialinsäuren im mitgelieferten Sialinsäure-Referenzpanel. Für weitere Informationen, einschließlich LC- und MS-Parametern und exemplarischer Analysen von Sialinsäuren in Biotherapeutika siehe Literaturhinweis 2.



	Durchschnittl. rel. Fläche (%)	Standardabweichung	% VK
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

Abb. 2: UHPLC-Chromatogramm des DMB-markierten SARP. (A) Fluoreszenz (B) Extrahiertes Ionenchromatogramm von DMB-markierten Sialinsäure-Spezies $[M+H]^+$.

Tabelle 1: Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD-Bedingungen.

Parameter	Wert				
Gerät	Agilent 1290 Infinity II LC-System				
Säule	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 75 mm, 2,7 µm (Best-Nr. 697775-902)				
Säulentemperatur	30 °C				
Mobile Phase	A) Methanol:Acetonitril:Wasser (4:8:88) B) Acetonitril				
Gradienten- Programm	Zeit (Min.)	%A	% B	Flussrate (ml/min)	
	0,00	100	0	0,4	isokratisch
	6,00	100	0	0,4	Elution
	6,25	20	80	0,4	
	7,30	20	80	0,4	Spülen
	7,50	100	0	0,4	Stabilisierung
10,00	100	0	0,4		
Injektionsvolumen	10 µl				
Detektion	Agilent 1250 Infinity II FLD λ_{EX} 373 nm λ_{EM} 448 nm				

Tabelle 2: Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF-Parameter.

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
Quelle	Duale AJS ESI
Gastemperatur	350 °C
Trocknungsgasstrom	11 l/min
Zerstäuber	15 psi
Sheathgas-Temperatur	400 °C
Sheathgas-Fluss	12 l/min
Vcap	1.400 V
Nozzle Voltage	1.800 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Massenbereich (MS)	m/z 400 bis 1.000
Massenbereich (MS/MS)	m/z 100 bis 500
Datenerfassungsmodus	Hochauflösung (4 GHz)

Erste Schritte bei der Verwendung des AdvanceBio Kits zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung³

Gesichtspunkte im Zusammenhang mit der Sialinsäure enthaltenden Probe

- Mit dem Kit können die folgenden Proben gemessen werden: Glycoproteine, Glykopeptide, Glykolipide, Polysialinsäuren, Serum, Plasma, Gewebe oder ganze Zellen.
- Der dynamische Bereich dieses Assays liegt im Bereich von 1 bis 2000 pmol Sialinsäure pro Well. Möglicherweise muss die Probenkonzentration angepasst werden, um sicherzustellen, dass das Signal im Messbereich liegt.
- Proben können durch Trocknen und Rekonstituieren in einem kleineren Volumen von deionisiertem Wasser vor der Verwendung aufkonzentriert werden. Die Probe kann direkt in den Analyse-Well getrocknet oder in einem separaten Röhrchen vorbereitet werden.

Gerätschaften für die Inkubation

Bei der Probenvorbereitung mit dem AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung (GS24-SAP) werden die Proben während des Säurefreisetzungsschritts auf 80 °C erhitzt und bei 50 °C mit DMB markiert. Zum Erwärmen der Proben in der im Lieferumfang enthaltenen 96-Well-Platte empfehlen wir die Verwendung eines Thermocyclers oder zweier unabhängiger Trockenheizblöcke. Nachstehend werden geeignete Produkte empfohlen.

Gerätschaften für die Inkubation (nicht von Agilent)	Best.-Nr.
96-Well-Thermocycler, der auf Sollwerte von 50 °C und 80 °C einstellbar ist	Verschiedene
Trockenheizblock, 4 Blöcke (2 St.) (Troemner)	HB4DG
Modulare Heizblöcke (2 St.) (VWR)	13259-260

Datenanalyse und Berichterstellung

Die Datenanalyse erfolgte mit Agilent OpenLab CDS 2.3 und der MassHunter-Software zur qualitativen Analyse 10.0. Zur Quantifizierung von Neu5Gc und Neu5Ac wurden die Kalibrierungskurven herangezogen.

Hinweis: Agilent bietet nun MassHunter 11 mit der OpenLab ECM XT Datenanalyse-Software (21 CFR Part 11 compliant) an.

Literaturhinweise

1. Antibody Glycosylation and its impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. J. Pharm. Sci. 2015, 104(6), 1866-1884.
2. Ein verbesserter Arbeitsablauf zur Profilierung und Quantifizierung von Sialinsäuren in Biotherapeutika 5994-2352DEE, 2020.
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, 5994-2800EN.

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zur Bestellung der in den folgenden Tabellen aufgeführten Artikel im Agilent Online Store fügen Sie Artikel Ihrer Favoritenliste hinzu, indem Sie auf den „Meine Liste“-Link in der Kopfzeile klicken. Geben Sie dann die Stückzahl der gewünschten Artikel ein, fügen Sie sie dem Warenkorb hinzu und gehen Sie zur Kasse. Ihre Liste bleibt für zukünftige Bestellungen in Ihren Favoriten gespeichert.

Wenn Sie die Produktfavoriten zum ersten Mal verwenden, werden Sie aufgefordert, zur Kontobestätigung Ihre E-Mail-Adresse einzugeben. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Andernfalls müssen Sie sich registrieren, damit ein Konto angelegt werden kann. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch online per Klick auf die einzelnen Bestellnummern oder über Ihre regulären Vertriebskanäle bestellt werden.

Meine Liste der AdvanceBio Verbrauchsmaterialien für die Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung

Beschreibung	Best.-Nr.
Probenvorbereitung	
AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung, 24 St.	GS24-SAP
Säulen	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 75 mm, 2,7 µm, Narrow-Bore	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, Vorsäule, 3 Stück	821725-911
Standards	
Bovines Fetuin, wärmebehandelt (0,4 mg) ^{†*}	WS0021
Agilent NISTmAb, 1 x 25 µl	5191-5744
Agilent NISTmAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Probenflaschen, Verschlüsse und Reagenzien	
Probenflasche, Schraubtyp, 2 ml, Polypropylen, zertifiziert für die Verwendung bei PFAS-Anwendungen, 100 St. [‡]	5191-8150
Probenflascheneinsatz, 300 µl, Polypropylen, mit Polymerfüßen, 100 St. [‡]	5182-0549
Polypropylen-Schraubverschluss, 9 mm, transparent, 100 St. [‡]	5191-8151
InfinityLab ultrareines LC/MS-Acetonitril (1 l)	5191-4496
InfinityLab Reinstwasser für LC/MS (1 l)	5191-4498
InfinityLab ultrareines LC/MS-Methanol (1 l)	5190-6896

Weiteres Zubehör

Beschreibung	Best.-Nr.
Meine Liste optionaler Artikel für Mikroplattenversiegler[*]	
Abziehbare Aluminiumplattenversiegelung	24210-001
Filter-Mikroplatte, 96 Well, Polypropylen mit 0,45 µm Polyvinylidenfluoridmembran, 300 µl/Well, 50 St.	200981-100
Meine Liste von Säulenanschlussfittings und -anschlüssen	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting (für den Anschluss am Säuleneinlass)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect-Kapillare MP35N 0,12 x 105 mm (für Quick Connect-Fitting)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (für den Anschluss am Säuleneinlass)	5067-5966
Quick Turn Kapillare MP35N 0,12 x 280 mm (für Quick Turn Fitting)	5500-1596
Montagewerkzeug für Quick Turn Fittings	5043-0915
Meine Liste von Zubehör für die Lösemittelfiltration^{**}	
InfinityLab Lösemittelfiltereinheit	5191-6776
InfinityLab Lösemittelfilterflasche, Glas, 2 l	5191-6781
Filtermembran, Nylon 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4341
Filtermembran, regenerierte Cellulose, 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4340
Glasfilter für Lösemittelflasche, Lösemittelleinlass, 20 µm	5041-2168
Meine Liste von Zubehör für die Arbeit mit Lösemitteln	
InfinityLab Stay Safe Verschlusskappe, Starter-Kit	5043-1222
InfinityLab Lösemittelflasche, klar, 1 Liter	9301-6524
InfinityLab Lösemittelflasche, braun, 1 Liter	9301-6526
Lösemittelflasche, klar, 2 Liter	9301-6342
Lösemittelflasche, braun, 2 Liter	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Spülflasche	5043-1339
InfinityLab Abfallbehälter, GL45, 6 l mit Stay-Safe-Verschluss (Aktivkohlefilter 5043-1193 nicht inkl.)	5043-1221
InfinityLab Aktivkohlefilter mit Zeitstreifen, 58 g (zur Verwendung mit 5043-1221)	5043-1193

[†] Nicht zum Kauf über das Internet erhältlich. Wenden Sie sich für Bestellinformationen an Ihren Agilent Vertreter.

^{*} [Klicken Sie hier](#) für weitere Informationen über den Agilent PlateLoc Mikroplatten-Thermo-Mikroplattenversiegler.

^{**} Für andere als die in dieser Tabelle aufgeführten Lösemittel verwenden Sie vor der Analyse die InfinityLab Lösemittelfiltereinheit.

[‡] Agilent empfiehlt, für die 2-ml-Probenflasche aus Polypropylen einen 250-µl-Fläscheneinsatz zu verwenden, um das Totvolumen zu minimieren.

DE44509.431087963

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Gedruckt in den USA, 4. Dezember 2021
5994-4201DEE