

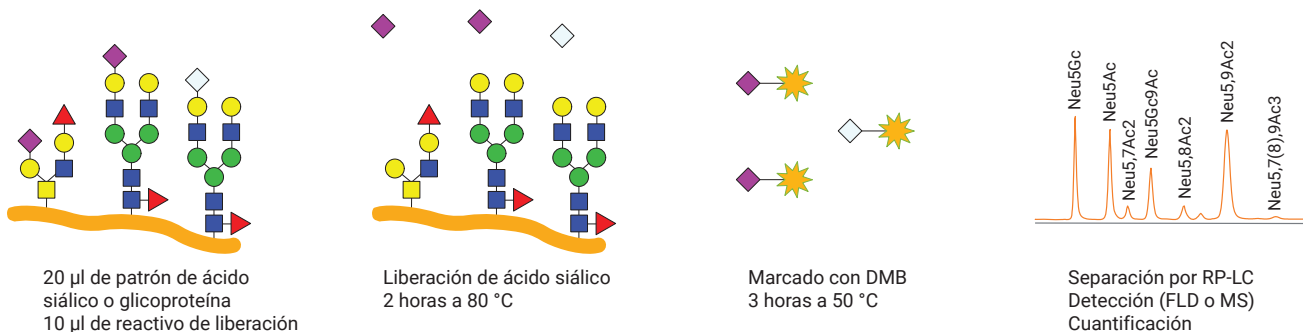
# Análisis de ácido siálico de glicoproteínas bioterapéuticas mediante el kit de determinación de perfiles y cuantificación de ácido siálico AdvanceBio y LC/FLD/MS



## Simplificación y estandarización del análisis de ácido siálico

La composición de los glicanos presentes en las glicoproteínas bioterapéuticas puede afectar a la inmunogenicidad, la farmacocinética y la farmacodinámica<sup>1</sup>. Los glicanos son carbohidratos formados por monosacáridos dispuestos en muchas posibles estructuras diferentes de oligosacáridos dependiendo de la composición y la posición de los enlaces. En función de la molécula y de la aplicación, el ácido siálico terminal puede reducir el índice de depuración, la actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) o puede tener un efecto antiinflamatorio. Las dos formas más habituales que se encuentran en productos bioterapéuticos son el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). El Neu5Ac suele ser la forma predominante, mientras que el Neu5Gc no se sintetiza en humanos y su presencia en los productos bioterapéuticos puede tener un efecto inmunogénico. Por tanto, es fundamental hacer un seguimiento de la cantidad absoluta de ácido siálico y de las concentraciones de las diferentes formas de ácido siálico presentes en las glicoproteínas terapéuticas.

El kit AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos (referencia GS24-SAP) ofrece mayor sensibilidad para la detección de proteínas con un bajo grado de sialilación, como los anticuerpos monoclonales con un único punto de N-glicosilación en la región de Fc. En el kit se incluyen todos los reactivos necesarios para la preparación de las muestras de ácido siálico marcado con fluorescencia en unas 5 horas. Junto con la columna Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, es posible lograr tanto la determinación de perfiles como la cuantificación de ácidos siálicos de forma sencilla y rápida mediante LC/FLD o LC/MS.



**Figura 1.** Flujo de trabajo de liberación de ácido siálico y marcado con DMB seguido por la separación y detección mediante fluorescencia o espectrometría de masas.

## Solución integral de análisis de ácido siálico diseñada y fabricada por Agilent

En esta guía se recogen los consumibles necesarios para iniciar el análisis de ácido siálico. Gran parte de estos consumibles sirve para evaluar los ácidos siálicos que se encuentran en rituximab (Rituxan, un anticuerpo monoclonal o mAb), etanercept (Enbrel, una proteína de fusión de Fc), cetuximab (Erbix, un anticuerpo monoclonal) y NISTmAb.<sup>2</sup> El flujo de trabajo optimizado proporciona un método para determinar las cantidades, tanto absolutas como relativas, de Neu5Ac y Neu5Gc, abarcando tanto la caracterización como el análisis cuantitativo por LC/FLD y LC/MS.

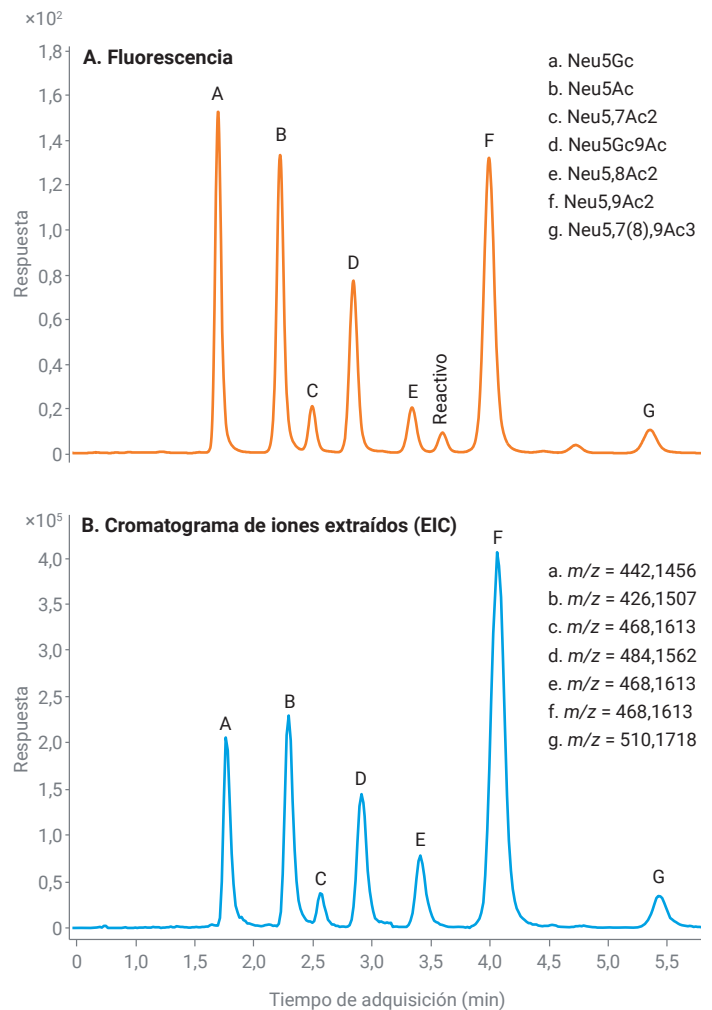
Esta guía del flujo de trabajo para el análisis de ácido siálico con el kit AdvanceBio ofrece información útil para los pedidos de:

- Kit de preparación de muestras Agilent AdvanceBio de determinación de perfiles y cuantificación de ácidos siálicos. Este kit suministra los reactivos necesarios para liberar y marcar los ácidos siálicos, así como un panel de referencia cualitativo de ácido siálico y los patrones cuantitativos de NANA y NGNA.
- Columnas para cromatografía de líquidos para la separación de los glicanos mediante cromatografía de líquidos en fase reversa (RPLC).
- Disolventes y reactivos.
- Viales y tapones.

### Aumente la productividad del análisis de ácidos siálicos con:

- Muestras listas para análisis mediante cromatografía de líquidos/detector de fluorescencia o cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en menos de 5 horas.
- Un formato automatizado en placa de 96 pocillos.
- Sin ampollas de vidrio, con todos los recipientes dotados de tapón de rosca.
- Sin necesidad de secado antes de la entrada de muestras.
- Ácidos siálicos separados mediante RPLC en tan solo 10 minutos con la columna EC-C18 InfinityLab Poroshell 120 de Agilent.
- Un reactivo de tinción muy conocido, el DMB (1,2-diamino-4,5-metilendioxibenceno).

Ejemplos de datos de LC/FLD y LC/MS (EIC) de ácidos siálicos presentes en el panel de referencia de ácidos siálicos. Para obtener más información sobre, entre otros, los parámetros de LC y MS y los análisis de ejemplo de los ácidos siálicos que contienen los productos bioterapéuticos, consulte la Referencia 2.



	Área porcentual rel. promedio	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

**Figura 2:** Cromatograma de UHPLC de un SARP marcado con DMB. (A) Fluorescencia (B) Cromatograma de iones extraídos de formas de ácido siálico marcadas con DMB  $[M+H]^+$ .

**Tabla 1:** Condiciones para un sistema de UHPLC HILIC/FLD 1290 Infinity II de Agilent.

Parámetro	Valor	
Instrumento	Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II	
Columna	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 µm (ref. 697775-902)	
Temperatura de la columna	30 °C	
Fase móvil	A) Metanol:acetonitrilo:agua (4:8:88) B) acetonitrilo	
Programa de gradiente	Tiempo (min) % A % B Flujo (ml/min)	
	0,00 100 0 0,4	Isocrática
	6,00 100 0 0,4	Elución
	6,25 20 80 0,4	
	7,30 20 80 0,4	Lavado
	7,50 100 0 0,4	Reequilibrio
10,00 100 0 0,4		
Volumen de inyección	10 µl	
Detección	FLD Agilent 1250 Infinity II; λ <sub>EX</sub> 373 nm; λ <sub>EM</sub> 448 nm	

**Tabla 2:** Parámetros del sistema de LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio de Agilent.

Sistema de LC/Q-TOF Agilent 6545XT AdvanceBio	
Fuente	ESI AJS dual
Temperatura del gas	350 °C
Flujo de gas de secado	11 l/min
Nebulizador	15 psi
Temperatura del gas de focalización	400 °C
Flujo de gas de focalización	12 l/min
Vcap	1.400 V
Tensión en la boquilla	1.800 V
Fragmentador	120 V
Skimmer	65 V
Rango de masas (MS)	m/z de 400 a 1000
Rango de masas (MS/MS)	m/z de 100 a 500
Modo de adquisición	Alta resolución (4 GHz)

## Iniciación con el kit de determinación de perfiles y cuantificación de ácido siálico AdvanceBio<sup>3</sup>

### Factores relativos a la muestra de ácido siálico que es necesario tener en cuenta

- Entre las muestras que se pueden analizar con el kit se encuentran las glicoproteínas, los glicopéptidos, los glicolípidos, los ácidos polisíálicos, el suero, el plasma, el tejido o las células enteras.
- El rango dinámico del ensayo es de 1 a 2.000 pmol de ácido siálico por pocillo. Es posible que sea necesario ajustar la concentración de muestras para garantizar que la señal se encuentra dentro del rango correspondiente.
- La concentración de muestras se puede llevar a cabo mediante el secado y la reconstitución en un volumen más reducido de agua desionizada (DI) antes de su uso. La muestra se puede secar directamente en los pocillos del análisis o se puede preparar en un tubo diferente.

### Material de incubación

Durante la preparación de muestras con el kit de determinación de perfiles y cuantificación de ácido siálico AdvanceBio (GS24-SAP), las muestras se calientan a 80 °C en el paso de liberación del ácido y se marcan con DMB a 50 °C. Para calentar las muestras en la placa de 96 pocillos que se suministra, se recomienda el uso de un termociclador o dos calentadores de bloque seco diferentes. Se proporcionan algunas sugerencias a continuación.

Material de incubación (de marcas distintas a Agilent)	Referencia
Termociclador de 96 pocillos con capacidad para valores programados de 50 °C y 80 °C	Variable
Calentador de bloque seco, cuatro bloques (cantidad: 2) (Troemner)	HB4DG
Bloques calentadores modulares (cantidad: 2) (VWR)	13259-260

### Análisis de datos y generación de informes

Los datos se analizaron con el software Agilent OpenLab CDS 2.3 y MassHunter Qualitative Analysis 10.0. La cuantificación de Neu5Gc y Neu5Ac se hizo mediante las curvas de calibración.

**Nota:** Agilent ofrece actualmente MassHunter 11 con el software de análisis de datos OpenLab ECM XT, que cumple los requisitos de la norma 21 del CFR, parte 11.

### Referencias

- 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.
- Flujo de trabajo mejorado para la determinación de perfiles y la cuantificación de ácidos siálicos en productos bioterapéuticos 5994-2352ES, 2020.
- Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, 5994-2800EN.

## Selección sencilla e información para pedidos

Para hacer el pedido de los artículos que se enumeran en las tablas que aparecen a continuación en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a su lista de Productos favoritos haciendo clic en el enlace MiLista del encabezado. A continuación, introduzca las cantidades de los productos que necesite, añádalos a la cesta y continúe con el pago. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla para futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza la lista de Productos favoritos, se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. Si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también en línea haciendo clic en las diferentes referencias o a través de los canales habituales de ventas y distribución.

## Mi Lista de consumibles AdvanceBio para la determinación de perfiles y cuantificación de ácido siálico

Descripción	Referencia
<b>Preparación de muestras</b>	
Kit de determinación de perfiles y cuantificación de ácido siálico AdvanceBio, 24 ct	GS24-SAP
<b>Columnas</b>	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 75 mm, 2,7 µm, columna de diámetro estrecho	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, precolumna, 3/paq.	821725-911
<b>Patrones</b>	
Bovine Fetuin, con tratamiento de calor (0,4 mg) <sup>†*</sup>	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25 µl	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µl	5191-5745
<b>Viales, tapones y reactivos</b>	
Vial, de rosca, 2 ml, polipropileno, certificado para su uso en aplicaciones relacionadas con PFAS, 100/paq. <sup>‡</sup>	5191-8150
Inserto de vial, 300 µl, polipropileno, con pies poliméricos, 100/paq. <sup>‡</sup>	5182-0549
9 mm, tapón de polipropileno transparente con rosca, 100/paq. <sup>‡</sup>	5191-8151
Acetonitrilo ultrapuro para LC/MS InfinityLab (1 l)	5191-4496
Agua ultrapura para LC/MS InfinityLab (1 l)	5191-4498
Metanol ultrapuro para LC/MS InfinityLab (1 l)	5190-6896

## Suministros adicionales

Descripción	Referencia
<b>Mi Lista de artículos opcionales para sellador de microplacas<sup>†*</sup></b>	
Sello de placa de aluminio extraíble	24210-001
Microplaca de filtro, 96 pocillos, polipropileno con membrana de fluoruro de polivinilideno de 0,45 µm, 300 µl/pocillo, 50/paq.	200981-100
<b>Mi Lista de conectores de columna y conectores</b>	
Conexión de columna Agilent InfinityLab Quick Connect (para conexión en el inyector de columna)	5067-5965
Capilar Agilent InfinityLab Quick Connect MP35N 0,12 x 105 mm (para conector Quick Connect)	5500-1578
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para conexión en la salida de la columna)	5067-5966
Capilar de giro rápido MP35N 0,12 x 280 mm (para conector de giro rápido)	5500-1596
Herramienta de montaje para conectores de giro rápido	5043-0915
<b>Mi Lista de suministros de filtración de disolventes<sup>**</sup></b>	
Conjunto de filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, 47 mm, de nylon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, 47 mm, de celulosa regenerada, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4340
Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm	5041-2168
<b>Mi Lista de suministros de manipulación de disolventes</b>	
Kit de inicio de tapones InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l	9301-6524
Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l	9301-6526
Botella de disolvente, transparente, 2 l	9301-6342
Botella de disolvente, ámbar, 2 l	9301-6341
Botella de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l, con tapón Stay Safe (filtro de carbón 5043-1193 no incluido)	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g (para su uso con 5043-1221)	5043-1193

<sup>†</sup> No disponible para su venta en la tienda en línea. Póngase en contacto con su representante de Agilent para obtener más información sobre cómo hacer el pedido.

<sup>\*</sup> Haga clic aquí para obtener más información sobre el sellador térmico de microplacas Agilent PlateLoc.

<sup>\*\*</sup> Si se van a utilizar disolventes que no se encuentren enumerados en la tabla, recurra al conjunto de filtración de disolventes InfinityLab antes del análisis.

<sup>‡</sup> Agilent recomienda el uso de un inserto de vial de 250 µl con el vial de polipropileno de 2 ml para minimizar el volumen muerto.

DE44509.431087963

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021  
Impreso en EE. UU., 4 de diciembre de 2021  
5994-4201ES