

Analyse des acides sialiques des glycoprotéines biothérapeutiques à l'aide du kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio et de la LC/FLD/MS



Une analyse des acides sialiques simplifiée et standardisée

La composition des glycanes présents sur les glycoprotéines biothérapeutiques peut affecter leur immunogénicité, leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique.¹ Les glycanes sont des glucides composés de monosaccharides ayant différentes structures d'oligosaccharides possibles en fonction de leur composition et de la position des liaisons. Selon la molécule et l'application, un acide sialique en position terminale peut réduire la vitesse de clairance, diminuer l'activité ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps) ou conférer un effet anti-inflammatoire. Les deux formes fréquemment présentes dans les produits biothérapeutiques sont l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc). Le Neu5Ac est habituellement l'espèce chimique prédominante, car le Neu5Gc n'est pas synthétisé par l'homme et sa présence dans les produits biothérapeutiques peut s'avérer immunogène. Il est donc primordial de surveiller la quantité absolue d'acide sialique ainsi que la concentration de ses différents types dans les glycoprotéines thérapeutiques.

Le kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio (réf. GS24-SAP) offre une meilleure sensibilité pour les protéines à faible degré de sialylation telles que les anticorps monoclonaux qui ont un seul site de N-glycosylation dans la région Fc. Le kit comprend tous les réactifs nécessaires pour la préparation des échantillons d'acide sialique marqués par fluorescence en environ 5 heures. En conjonction avec la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, le profilage et la quantification des acides sialiques peuvent être réalisés rapidement et facilement par LC/FLD ou LC/MS.

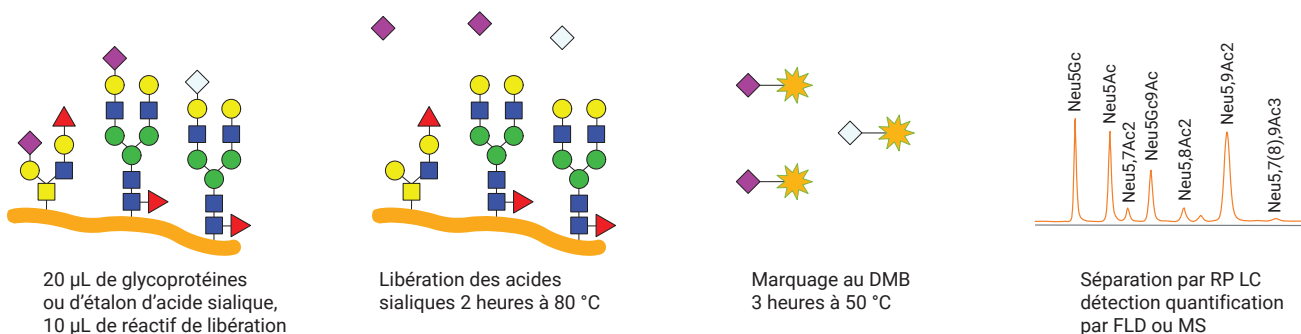


Figure 1. Méthode de libération des acides sialiques et de marquage au DMB suivi par une séparation et une détection à l'aide d'un détecteur à fluorescence ou de MS.

Une solution intégrale pour l'analyse d'acides sialiques conçue et fabriquée par Agilent

Dans ce guide, vous trouverez les consommables dont vous avez besoin pour commencer l'analyse d'acides sialiques. La plupart de ces consommables sont utilisés pour évaluer les acides sialiques présents dans le rituximab (Rituxan, un anticorps monoclonal ou mAb), dans l'étanercept (Enbrel, une protéine de fusion Fc), le cétuximab (Erbix, un anticorps monoclonal) et le NISTmAb.² Le flux de tâches optimisé offre une méthode pour déterminer les quantités relatives et absolues de Neu5Ac et Neu5Gc, couvrant le profilage et l'analyse quantitative par LC/FLD et par LC/MS.

Le guide du flux de tâches de l'analyse d'acides sialiques

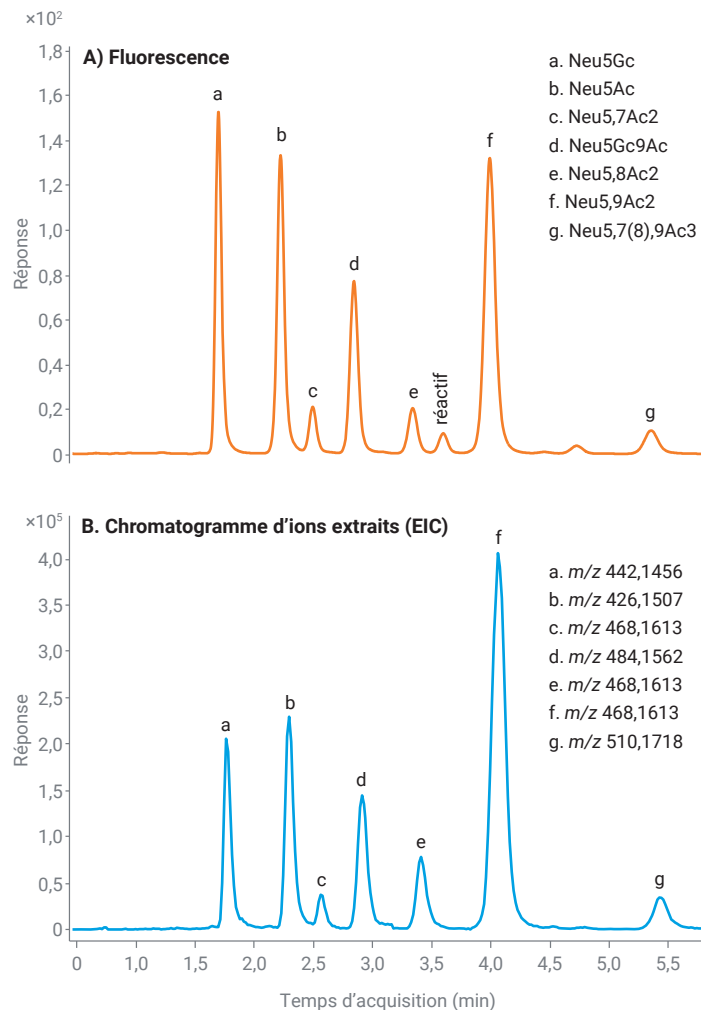
AdvanceBio offre des informations pour commander concernant :

- Le kit de préparation d'échantillons pour le profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio. Ce kit comprend les réactifs nécessaires pour la libération et le marquage des acides sialiques, ainsi qu'un ensemble de référence d'acides sialiques qualitatifs et les étalons NANA et NGNA quantitatifs.
- Les colonnes de chromatographie en phase liquide pour la séparation de glycanes par chromatographie liquide en phase inverse (RPLC).
- Les solvants et réactifs.
- Les flacons et capsules.

Augmentez votre productivité en analyse d'acides sialiques avec :

- Des échantillons prêts pour une analyse par LC/FLD ou LC/MS en environ 5 heures.
- Un format de plaque à 96 puits automatisable.
- Pas d'ampoules en verre, uniquement des contenants avec capsule à visser.
- Sans séchage d'échantillon avant l'injection d'échantillon.
- Les acides sialiques sont séparés par RPLC en seulement 10 minutes à l'aide de la colonne Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18.
- Un colorant DMB réputé (1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène).

Exemples de données LC/FLD et LC/MS (chromatogramme d'ions extraits) pour les acides sialiques présents dans l'ensemble de référence d'acides sialiques inclus. Pour de plus amples informations, y compris les paramètres LC et MS, ainsi que des analyses d'acides sialiques dans les produits biothérapeutiques, voir la référence 2.



	Aire rel. moyenne (%)	Écart-type	% 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

Figure 2 : Chromatogramme UHPLC de SARP marqué au DMB. (A) Fluorescence. (B) Chromatogramme d'ions extraits des types d'acide sialique marqués au DMB $[M+H]^+$.

Tableau 1 : Conditions pour Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD.

Paramètre	Valeur				
Instrument	LC Agilent 1290 Infinity II				
Colonne	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 75 mm, 2,7 µm (réf. 697775-902)				
Température de colonne	30 °C				
Phase mobile	A) Méthanol:acétonitrile:eau (4:8:88) B) acétonitrile				
Programme de gradient	Temps (min)	% A	% B	Débit (mL/min)	
	0,00	100	0	0,4	Isocratique
	6,00	100	0	0,4	Élution
	6,25	20	80	0,4	
	7,30	20	80	0,4	Lavage
	7,50	100	0	0,4	Stabilisation
10,00	100	0	0,4		
Volume d'injection	10 µL				
Détection	Agilent 1250 Infinity II FLD λ _{EX} 373 nm, λ _{EM} 448 nm				

Tableau 2 : Paramètres du système LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT.

LC/Q-TOF Agilent AdvanceBio 6545XT	
Source	Dual AJS ESI
Température du gaz	350 °C
Débit du gaz de séchage	11 L/min
Nébuliseur	15 psi
Température du gaz de gainage	400 °C
Débit de gaz de gainage	12 L/min
Vcap	1 400 V
Tension de la buse	1 800 V
Fragmenteur	120 V
Cône écreteur	65 V
Gamme de masse (MS)	m/z 400 à 1 000
Gamme de masse (MS/MS)	m/z 100 à 500
Mode d'acquisition	Résolution élevée (4 GHz)

Commencer à utiliser le kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio³

Informations concernant les échantillons d'acide sialique

- Les échantillons mesurés par ce kit comprennent les glycoprotéines, les glycopeptides les glycolipides, les acides polysialiques, le sérum, le plasma, les tissus ou les cellules entières.
- La gamme dynamique de cette analyse correspond à 1 à 2 000 pmol d'acide sialique par puits. Il peut être nécessaire d'ajuster la concentration des échantillons afin de s'assurer que le signal se situe dans la plage de la gamme.
- Les échantillons peuvent être concentrés par séchage et reconstitués dans un petit volume d'eau déionisée avant utilisation. Les échantillons peuvent être séchés directement dans les puits d'analyse ou préparés dans des tubes séparés.

Matériel d'incubation

Durant la préparation d'échantillons à l'aide du kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio (GS24-SAP), les échantillons sont chauffés à 80 °C durant l'étape de libération et marqués avec du DMB à 50 °C. Pour chauffer les échantillons dans la plaque à 96 puits fournie, nous recommandons d'utiliser le thermocycleur et deux unités indépendantes de chauffage à sec. Des suggestions sont fournies ci-dessous.

Matériel d'incubation (non Agilent)	Référence
Thermocycleur à 96 puits pouvant atteindre des consignes de 50 °C et 80 °C	Différents
Unité de chauffage à sec, 4 unités (Qté 2) (Troemner)	HB4DG
Unités de chauffage modulaires (Qté 2) (VWR)	13259-260

Traitement des données et reporting

Les données ont été analysées à l'aide des logiciels Agilent OpenLab CDS 2.3 et MassHunter Qualitative Analysis 10.0. Le Neu5Gc et le Neu5Ac ont été quantifiés à l'aide des courbes d'étalonnage.

Remarque : Agilent propose maintenant le MassHunter 11 avec le logiciel de traitement des données OpenLab ECM XT conforme à la réglementation 21 CFR Partie 11.

Références

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. Méthode améliorée pour le profilage et la quantification des acides sialiques en biothérapie 5994-2352FR, 2020.
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, 5994-2800EN.

Sélection facile et informations pour commander

Pour commander les produits énumérés dans les tableaux ci-dessous dans la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez-les sur votre liste de Produits favoris en cliquant sur l'onglet MaListe dans l'en-tête. Puis entrez les quantités de produits dont vous avez besoin, ajoutez-les au panier et passez à la validation.

Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique Produits favoris pour faciliter vos futures commandes.

Si vous utilisez la rubrique Produits favoris pour la première fois, vous serez invité à entrer votre adresse e-mail pour vérifier votre compte. Si vous possédez déjà un compte Agilent, vous pourrez vous y connecter. Dans le cas contraire, vous devrez vous inscrire pour en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les produits peuvent également être commandés en ligne en cliquant sur chaque référence ou par vos canaux de distribution habituels.

MaListe de consommables de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio

Description	Référence
Préparation d'échantillons	
Kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio, 24 ct	GS24-SAP
Colonnes	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 75 mm, 2,7 µm, petit diamètre	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, colonne de garde, 3/pqt	821725-911
Étalons	
Fétuine bovine, traitée thermiquement (0,4 mg) [†] *	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Flacons, capsules, et réactifs	
Flacon à vis, 2 mL, en polypropylène, certifié pour une utilisation dans les applications liées au PFAS, 100/pqt [‡]	5191-8150
Insert de flacon, 300 µL, en polypropylène, pieds en polymère, 100/pqt [‡]	5182-0549
Bouchons 9 mm en polypropylène pour flacon à visser, 100/pqt [‡]	5191-8151
Acétonitrile ultrapur pour LC/MS InfinityLab (1 L)	5191-4496
Eau ultrapure pour LC/MS InfinityLab (1 L)	5191-4498
Méthanol ultrapur pour LC/MS InfinityLab(1 L)	5190-6896

Consommables supplémentaires

Description	Référence
MaListe d'articles optionnels pour scelleuse de microplaques[†]*	
Film pelable pour plaque en aluminium	24210-001
Microplaque de filtration, 96 puits, en polypropylène, avec membrane en fluorure de polyvinylidène de 0,45 µm, 300 µL/puits, 50/pqt	200981-100
MaListe de raccords et de connecteurs de colonne	
Raccord rapide Quick Connect InfinityLab Agilent (à raccorder à l'entrée de colonne)	5067-5965
Capillaire Quick Connect Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 105 mm (pour raccords Quick Connect)	5500-1578
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (à raccorder à la sortie de colonne)	5067-5966
Capillaire Quick Turn MP35N 0,12 x 280 mm (pour raccord Quick Turn)	5500-1596
Outil de montage pour raccords rapides Quick Turn	5043-0915
MaListe de consommables pour la filtration de solvants^{**}	
Ensemble de filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Flacon de filtration de solvants InfinityLab, en verre, 2 L	5191-6781
Filtre-membrane, en nylon, 47 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane des filtres, en cellulose régénérée 47 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre pour flacon de solvant, entrée de solvant, 20 µm	5041-2168
MaListe de consommables pour la manipulation de solvants	
Kit de démarrage, bouchons Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Flacon pour solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon pour solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon pour solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon pour solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Bidon de collecte de déchets InfinityLab, GL45, 6 L avec bouchon de sécurité Stay Safe (Filtre à charbon 5043-1193 non compris)	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g (à utiliser avec la réf. 5043-1221)	5043-1193

[†] Non disponible à la vente en ligne. Contactez votre représentant Agilent pour obtenir les informations pour commander.

^{*} Cliquez ici pour de plus amples informations sur la thermoscelleuse de microplaques Agilent PlateLoc.

^{**} Si vous utilisez des solvants autres que ceux indiqués dans ce tableau, utilisez l'ensemble de filtration de solvants InfinityLab avant l'analyse.

[‡] Agilent recommande d'utiliser les inserts de flacon de 250 µL avec les flacons en polypropylène de 2 mL pour réduire le volume mort.

DE44509.431087963

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Imprimé aux États-Unis, le 4 décembre 2021
5994-4201FR