

Analisi degli acidi sialici delle glicoproteine bioterapeutiche usando il kit di profilazione e quantificazione acido sialico AdvanceBio e LC/FLD/MS



Analisi degli acidi sialici semplificata e standardizzata

La composizione dei glicani presenti sulle glicoproteine bioterapeutiche può influenzare l'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica.¹ I glicani sono carboidrati composti da monosaccaridi disposti in molte possibili strutture oligosaccaridiche differenti a seconda della composizione e della posizione dei legami. A seconda della molecola e dell'applicazione, l'acido sialico terminale può ridurre il tasso di clearance, ridurre l'attività di citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi (ADCC) oppure può avere effetto anti-infiammatorio. Due forme che si trovano tipicamente nei prodotti bioterapeutici sono l'acido N-acetilneuramminico (Neu5Ac) e l'acido N-glicolilneuramminico (Neu5Gc). Neu5Ac è generalmente la specie predominante, mentre Neu5Gc non viene sintetizzato dal corpo umano e la sua presenza nei prodotti bioterapeutici può essere immunogena. È pertanto essenziale monitorare la quantità assoluta di acido sialico come anche i livelli di differenti specie di acido sialico presenti nelle glicoproteine terapeutiche.

Il kit di profilazione e quantificazione acido sialico Agilent AdvanceBio (codice GS24-SAP) offre una migliore sensibilità per proteine con bassi livelli di sialilazione, come gli anticorpi monoclonali con un unico sito di N-glicosilazione nella regione Fc. Il kit include tutti i reagenti necessari per preparare in circa 5 ore campioni di acidi sialici marcati in fluorescenza. Abbinandolo con la colonna InfinityLab Poroshell 120 Agilent EC-C18, è possibile eseguire sia la profilazione che la quantificazione degli acidi sialici in modo rapido e semplice mediante LC/FLD o LC/MS.

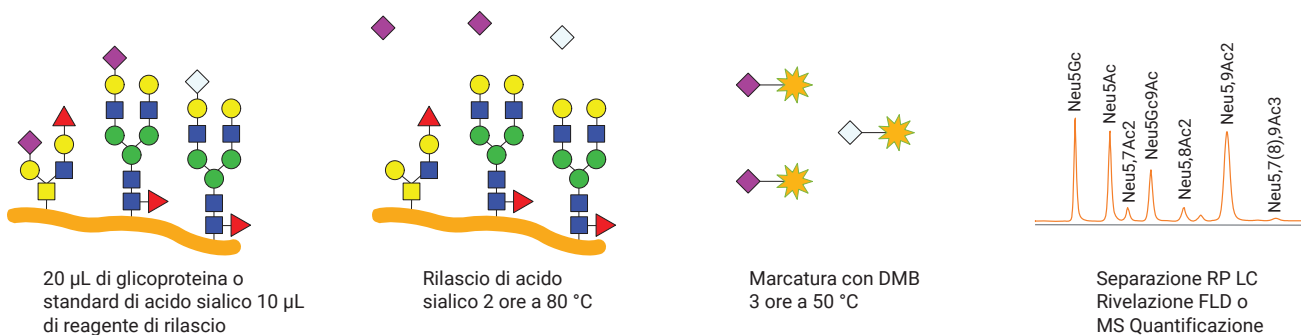


Figura 1. Flusso di lavoro di rilascio di acidi sialici e marcatura con DMB seguito da separazione e rivelazione mediante rivelatore a fluorescenza o MS.

Soluzione per l'intero processo di analisi degli acidi sialici progettata e realizzata da Agilent

In questa guida, troverai i prodotti di consumo necessari per avviare l'analisi degli acidi sialici. Molti di questi prodotti di consumo sono stati utilizzati per valutare gli acidi sialici presenti in rituximab (Rituxan, un anticorpo monoclonale o mAb), etanercept (Enbrel, una proteina di fusione Fc), cetuximab (Erbix, un anticorpo monoclonale) e NISTmAb.² Il flusso di lavoro semplificato fornisce un metodo per determinare sia le quantità assolute che le quantità relative di Neu5Ac e Neu5Gc, incluse l'analisi di profilazione e quella quantitativa mediante LC/FLD e LC/MS.

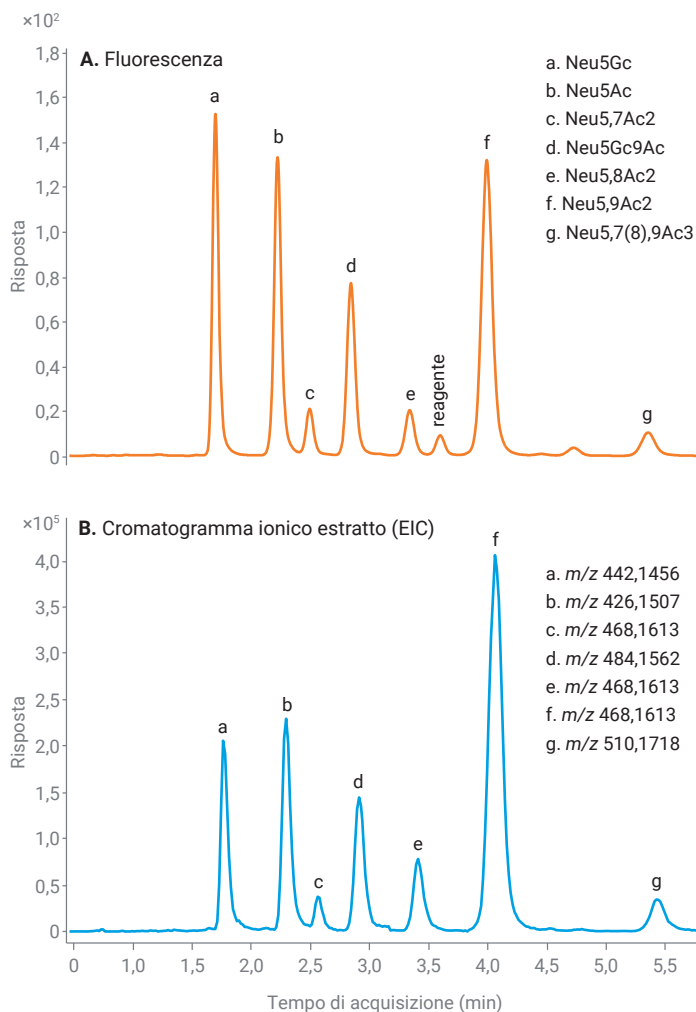
La guida sui flussi di lavoro dell'analisi degli acidi sialici AdvanceBio fornisce informazioni per gli ordini per:

- Kit di preparazione del campione per la profilazione e quantificazione acido sialico AdvanceBio. Questo kit contiene i reagenti necessari per il rilascio e la marcatura degli acidi sialici, oltre a un pannello di riferimento qualitativo degli acidi sialici e gli standard quantitativi di NANA e NGNA.
- Colonne per cromatografia liquida per la separazione dei glicani mediante cromatografia liquida in fase inversa (RPLC).
- Solventi e reagenti.
- Vial e tappi.

Potenzia la produttività dell'analisi degli acidi sialici con:

- Campioni pronti per l'analisi LC/FLD o LC/MS in circa 5 ore.
- Un formato per piastre a 96 pozzetti automatizzabile.
- Solo contenitori con tappi a vite, senza il bisogno di fiale in vetro.
- Senza alcuna necessità di eseguire l'evaporazione del campione prima del suo ingresso.
- Acidi sialici separati mediante RPLC in soli 10 minuti usando una colonna InfinityLab Poroshell 120 Agilent EC-C18.
- Un colorante DMB (1,2-diammino-4,5-metilenediossibenzene) molto noto.

Esempi di dati LC/FLD e LC/MS (EIC) per gli acidi sialici presenti nel pannello di riferimento di acidi sialici incluso. Per maggiori informazioni relative ai parametri LC e MS e esempi di analisi di acidi sialici in prodotti bioterapeutici, consultare il riferimento bibliografico 2.



	Area %	Media relativa	Deviazione standard	% 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: Cromatogramma UHPLC di SARP marcati con DMB.
(A) Fluorescenza (B) cromatogramma ionico estratto di specie di acido sialico marcate con DMB $[M+H]^+$.

Tabella 1: Condizioni UHPLC HILIC/FLD per il sistema Agilent 1290 Infinity II.

Parametro	Valore				
Strumento	Sistema LC Agilent 1290 Infinity II				
Colonna	InfinityLab Poroshell Agilent 120 EC-C18 2,1 x 75 mm, 2,7 µm (codice 697775-902)				
Temperatura della colonna	30 °C				
Fase mobile	A) metanolo:acetonitrile:acqua (4:8:88) B) Acetonitrile				
Programma gradiente	Tempo (min)	%A	%B	Flusso (mL/min)	
	0,00	100	0	0,4	Condizioni isocratiche
	6,00	100	0	0,4	Eluizione
	6,25	20	80	0,4	
	7,30	20	80	0,4	Lavaggio
	7,50	100	0	0,4	Stabilizzazione
	10,00	100	0	0,4	
Volume di iniezione	10 µL				
Rivelazione	FLD Agilent 1250 Infinity II λ_{Ecc} 373 nm λ_{Em} 448 nm				

Tabella 2: Parametri per il sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio.

Sistema LC/Q-TOF 6545XT AdvanceBio	
Sorgente	AJS ESI doppia
Temperatura del gas	350 °C
Flusso del Drying Gas	11 L/min
Nebulizzatore	15 psi
Temperatura dello sheath gas	400 °C
Flusso dello sheath gas	12 L/min
Vcap	1.400 V
Tensione ugello	1.800 V
Fragmentor	120 V
Skimmer	65 V
Intervallo di massa (MS)	<i>m/z</i> tra 400 e 1.000
Intervallo di massa (MS/MS)	<i>m/z</i> tra 100 e 500
Modalità di acquisizione	Alta risoluzione (4 GHz)

Acquisire familiarità con il kit di profilazione e quantificazione acido sialico Agilent AdvanceBio³

Considerazioni sui campioni di acido sialico

- Tra i campioni misurati con il kit sono inclusi glicoproteine, glicopeptidi, glicolipidi, acidi polisialici, siero, plasma, tessuto o cellule intere.
- Il range dinamico di questa analisi è di 1 a 2.000 pmol di acido sialico per pozzetto. Potrebbe essere necessario regolare la concentrazione dei campioni per assicurarsi che il segnale rientri nel range.
- Per ottenere campioni concentrati è possibile procedere mediante evaporazione e ricostituzione in un volume minore di acqua deionizzata prima dell'uso. Il campione può venire evaporato direttamente nei pozzetti d'analisi o preparato in una provetta separata.

Hardware per incubazione

Durante la preparazione dei campioni usando il kit di profilazione e quantificazione acido sialico AdvanceBio (GS24-SAP), i campioni vengono riscaldati a 80 °C durante la fase di rilascio e marcati con DMB a 50 °C. Per riscaldare i campioni nella piastra a 96 pozzetti fornita, si raccomanda l'utilizzo di un termociclatore o di due riscaldatori a secco separati. Suggerimenti forniti di seguito.

Hardware per incubazione (non Agilent)	Codice
Termociclatore a 96 pozzetti con impostazione a 50 °C e 80 °C	Variabile
Riscaldatore a secco, 4 blocchi (quantità 2) (Troemner)	HB4DG
Blocchi di riscaldamento modulari (quantità 2) (VWR)	13259-260

Analisi dei dati e refertazione

I dati sono stati analizzati con il sistema di gestione dei dati cromatografici Agilent OpenLab CDS 2.3 e il software di analisi qualitativa MassHunter 10.0. Neu5Gc e Neu5Ac sono stati quantificati utilizzando le curve di calibrazione.

Nota: Agilent offre MassHunter 11 con software per l'analisi dei dati OpenLab ECM XT, in conformità alla normativa CFR 21 Parte 11.

Bibliografia

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. Un flusso di lavoro migliorato per la profilazione e la quantificazione degli acidi sialici nei prodotti bioterapeutici [5994-2352ITE](#), 2020.
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, [5994-2800EN](#).

Semplicità di scelta grazie alle informazioni per gli ordini

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle riportate di seguito da Agilent Online Store, aggiungi gli articoli all'elenco Prodotti preferiti facendo clic sui collegamenti delle intestazioni Il mio elenco. Inserisci, quindi, le quantità dei prodotti richieste, aggiungi al carrello e procedi al pagamento. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che tu possa disporre per gli ordini futuri.

Se è la prima volta che utilizzi Prodotti preferiti, ti verrà richiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Se invece non disponi di un account Agilent registrato, dovrai registrarne uno. Questa funzione è disponibile soltanto nelle regioni in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono essere ordinati anche online facendo clic sui singoli codici oppure attraverso i normali canali di vendita e distribuzione.

Il mio elenco dei materiali di consumo per profilazione e quantificazione degli acidi sialici AdvanceBio

Descrizione	Codice
Preparazione del campione	
Kit di profilazione e quantificazione acido sialico AdvanceBio, kit da 24 pz.	GS24-SAP
Colonne	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 75 mm, 2,7 µm, piccolo diametro	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 5 mm, 2,7 µm, precolonna, 3/conf.	821725-911
Standard	
Fetuina bovina, trattata termicamente (0,4 mg)*	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
Vial, tappi e reagenti	
Vial, tipo a vite, 2 mL, polipropilene, certificato per l'uso in applicazioni connesse con gli PFAS, 100/conf.‡	5191-8150
Inserito per vial, 300 µL, polipropilene, supporto polimerico, 100/conf.‡	5182-0549
9 mm, tappo a vite in polipropilene trasparente, 100/conf.‡	5191-8151
Acetonitrile ultra puro per LC/MS InfinityLab (1 L)	5191-4496
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab (1 L)	5191-4498
Metanolo ultra puro per LC/MS InfinityLab (1 L)	5190-6896

Prodotti di consumo aggiuntivi

Descrizione	Codice
Il mio elenco di articoli facoltativi per la sigillatrice per micropiastre*	
Guarnizione per piastre in alluminio, rimovibile	24210-001
Micropiastra a filtro, 96 pozzetti, polipropilene, con membrana in fluoruro di polivinilidene da 0,45 µm, 300 µL/pozzetto, 50/conf.	200981-100
Il mio elenco di raccordi e connettori per colonne	
Raccordo Quick Connect Agilent InfinityLab (per connessione sull'iniettore della colonna)	5067-5965
Capillare Quick Connect Agilent MP35N InfinityLab, 0,12 x 105 mm (per raccordo Quick Connect)	5500-1578
Raccordo Quick Turn Agilent InfinityLab (per connessione all'uscita della colonna)	5067-5966
Capillare Quick Connect MP35N, 0,12 x 280 mm (per raccordo Quick Turn)	5500-1596
Utensile di montaggio per raccordi Quick Turn	5043-0915
Il mio elenco di prodotti di consumo per filtrazione**	
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab	5191-6776
Matraccio di filtrazione del solvente InfinityLab, vetro, 2 L	5191-6781
Membrana del filtro, nylon 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4341
Membrana del filtro, cellulosa rigenerata 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4340
Filtro in vetro per bottiglia di solvente, ingresso del solvente, 20 µm	5041-2168
Il mio elenco di prodotti di consumo per la manipolazione dei solventi	
Kit di avvio tappo Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Bottiglia di solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia di solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia di solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia di solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Bottiglia di spurgo Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Contenitore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L con tappo Stay Safe (Filtro al carbone 5043-1193 non incluso)	5043-1221
Filtro al carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g (utilizzare con 5043-1221)	5043-1193

* Non sono disponibili per la vendita online. Per maggiori informazioni sugli ordini, contattare il rappresentante locale Agilent.

* Fare clic qui per maggiori informazioni sulla termosigillatrice per micropiastre Agilent PlateLoc.

** Se si utilizzano solventi diversi da quelli elencati in questa tabella, usare il gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab prima dell'analisi.

‡ Agilent consiglia di utilizzare un inserto per vial da 250 µL con il vial in polipropilene da 2 mL per minimizzare il volume morto.

DE44509.431087963

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
Stampato negli Stati Uniti, 4 dicembre 2021
5994-4201ITE