

Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts von biotherapeutischen Glycoproteinen



Einfache und standardisierte Sialinsäure-Analyse

Die Zusammensetzung von Glykanen in biotherapeutischen Glycoproteinen kann die Immunogenität, Pharmakogenetik und Pharmakokinetik beeinflussen. Glykane sind Kohlenhydrate, die aus Monosacchariden bestehen und je nach Zusammensetzung und Bindungsposition zu vielen unterschiedlichen Oligosaccharidstrukturen angeordnet sein können. 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 anzutreffende 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. In Anbetracht der Bedeutung von Sialinsäuren für biotherapeutische Glykoproteine ist es wichtig, die absolute Sialinsäure-Menge zu überwachen.

Das AdvanceBio-Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts wird zur schnellen Quantifizierung von freier oder aus intakten Glykoproteinen freigesetzter Sialinsäure verwendet und bietet mehrere Vorteile:

- Die Proben sind in etwa 1,5 Stunden analysenfertig und ermöglichen eine schnelle und verlässliche Quantifizierung der aus intakten Proteinen mittels Sialidase A freigesetzten Sialinsäure-Gesamtmenge.
- Breiter dynamischer Nachweisbereich von Sialinsäurekonzentrationen.
- Kompatibel mit Plattenlesegeräten, die über Fluoreszenzdetektion oder Extinktion messen.
- Minimaler oder kein Abbau von Sialinsäure durch enzymatische Freisetzung.
- Benutzerfreundliches 96-Well-Mikroplattenformat mit hohem Durchsatz, geeignet für die Erzeugung von 48 und 96 Datenpunkten.
- Automatisierungsfreundlich.

Lösung zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts, entwickelt und hergestellt von Agilent

Die Agilent AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts (GS48-SAQ und GS96-SAQ) enthalten alle Reagenzien, die für die Vorbereitung von Sialinsäure-Proben benötigt werden. Die Probenvorbereitung dauert 1,5 Stunden. Für die schnelle und einfache Analyse kann ein Standard-Mikroplattenleser¹ mit Extinktions- oder Fluoreszenzmessung verwendet werden.

In dieser Anleitung finden Sie eine Liste der erforderlichen Verbrauchsmaterialien, um mit der Sialinsäure-Quantifizierung Ihrer Probe beginnen zu können. Die aufgelisteten Produkte wurden zur Bewertung der Sialinsäure in Rituximab (Rituxan, ein monoklonaler oder mAb), Etanercept (Enbrel, ein Fc-Fusionsprotein), Cetuximab (Erbix, ein monoklonaler Antikörper) und im NISTmAb verwendet.² In der Studie wurde Sialinsäure mithilfe von AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts quantifiziert und es erfolgte eine Profilerstellung und Quantifizierung mithilfe des Agilent AdvanceBio Kits zur Sialinsäure-Profilerstellung und -Quantifizierung (Best.-Nr. GS24-SAP).^{3,4}

Säulenchemie und Arbeitsablauf des Kits zur Analyse des Sialinsäure-Gesamtgehalts^{4,5}:

Im Kit werden gekoppelte Enzymreaktionen angewendet, bei denen enzymatisch freigesetzte Sialinsäure in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird, das stöchiometrisch mit einem Farbstoff reagiert und eine intensive Fluoreszenz- und Extinktions-Response erzeugt. Dieser Ansatz ermöglicht die enzymatische Freisetzung der Sialinsäure, Umwandlung, Detektion und Quantifizierung in einem einzigen Well, was für eine schnelle und einfache Verarbeitung sorgt.

Schritt 1: Freisetzung der Sialinsäure (30 Minuten)

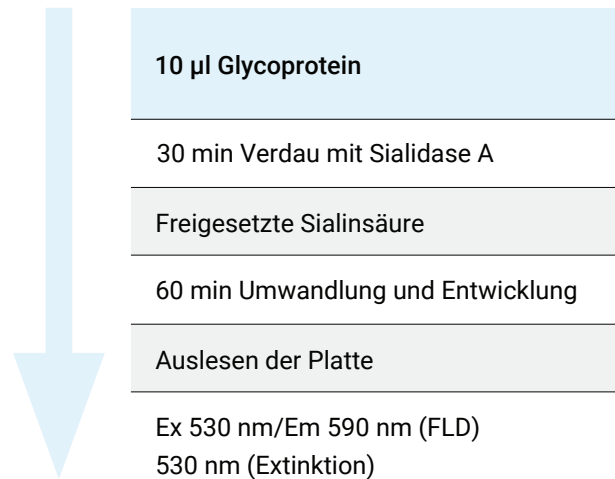
Glycoprotein + Sialidase A \rightarrow Sialinsäure + desialyliertes Glycoprotein (minus Sialinsäure)

Schritt 2: Detektion der freigesetzten Sialinsäure (60 Minuten)

Sialinsäure + N-Acetylneuraminsäurealdolase \leftrightarrow Mannosamin + Pyruvatsäure

Pyruvatsäure + Pyruvatoxidase \rightarrow Acetylphosphat + H₂O₂

Farbstoff + H₂O₂ \rightarrow Reporterfarbstoff



Weitere Informationen zur N-Glykan-Probenvorbereitung und -Analyse finden Sie unter: N-Glykan-Analytik: Zusammen besser ([5994-1647DEE](#)).

Hier sehen Sie Beispiele von Linearitäts- und Reproduzierbarkeitsdaten für den quantitativen Neu5Ac-Standard, der mit den Agilent AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts geliefert wird:

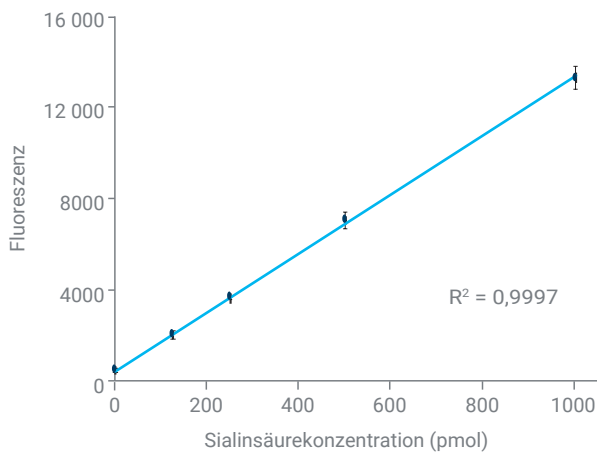


Abbildung 1. Standardkurve für das Agilent AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts. Eine Fünf-Punkt-Standardkurve wurde mit 0, 125, 250, 500 und 1000 pmol Sialinsäure aufgenommen und erzielte einen R^2 -Wert von 0,9997.

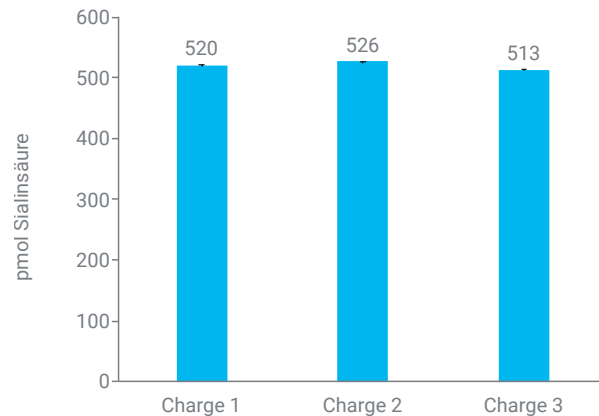


Abbildung 2. Vergleich von Chargen der Neu5Ac-Sialinsäure-Standardlösung. Messung von 500 pmol Sialinsäure.

Erste Schritte mit den AdvanceBio Kits zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts

Überlegungen zur Sialinsäure-Probe

- Zu den durch das Kit messbaren Proben zählen Glycoproteine, Glycopeptide, Glycolipide, Polysialinsäuren oder Gesamtzellen.
- Der dynamische Bereich dieses Assays liegt im Bereich von 40 bis 1000 pmol (Fluoreszenzdetektion) und 500 bis 4000 pmol (Extinktionsdetektion). Die Probenkonzentration muss möglicherweise angepasst werden, damit das Signal in diesen Bereich fällt.
- Einige Proben können freie Sialinsäure enthalten. Eine Negativkontrolle (Leerprobe) mit Probe und allen Reaktionskomponenten außer Sialidase A sollte bei jeder Messung mitlaufen, um das freie Sialinsäure-Signal der Proben zu berücksichtigen.
- Eine geringe intrinsische Glycoproteinfluoreszenz (oder -extinktion) stört die Sialinsäure-Quantifizierung nicht, da die Negativkontrolle vor Bestimmung der Sialinsäure-Menge abgezogen wird.
- Die Proben sollten sich in Wasser, PBS oder einem ähnlichen Puffer befinden. Idealerweise befinden sich die Proben nicht in einem Puffer mit hoher Molarität, damit ein korrekter pH-Wert der Reaktion gewährleistet ist.
- Zu den Faktoren, die zu einem unvollständigen Sialidase-Verdau führen können, zählen: zu viel Probe in der Reaktion, unzureichende Inkubationszeit oder -temperatur oder Situationen, in denen die Sialinsäure sterisch von Sialidase A behindert wird.
- Einige O-acetylierte Sialinsäuren sind möglicherweise schlechte Substrate für N-Acetylneuraminsäurealdolase und ergeben möglicherweise keinen präzisen Wert für den Sialinsäuregehalt. Die Anwesenheit von O-Acetylgruppen kann durch die DMB-Derivatisierung bestätigt werden, gefolgt von einer HPLC-Analyse mit dem AdvanceBio Kit zur Sialinsäure-Profilierung und -Quantifizierung (Best.-Nr. GS24-SAP)^{3,4}. Falls vorhanden, kann vor der Behandlung mit den Konvertierungsenzymen eine O-Deacetylierung der Probe durch eine milde Basenhydrolyse durchgeführt werden.

Hardware für die Inkubation

Während der Probenvorbereitung für das AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts werden die Proben über 30 Minuten bei 37 °C enzymatisch freigesetzt. Die Umwandlung und Farbentwicklung geschieht während einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C. Wir empfehlen, zum Aufheizen der Proben in der mitgelieferten 96-Wellplate einen Laborofen oder Blockheizer zu verwenden, der über eine Inkubationsfunktion bei 37 °C verfügt. Ebenso erforderlich ist ein Heizblock mit flacher Oberfläche, der eine umrandete 96-Wellplate aufnehmen kann (z. B. VWR 13259-295 Modularer Heizblock für Titerplatten). Alternativ kann auch ein Plattenlesegerät mit 37 °C Temperaturregelung verwendet werden (kein Heizer und Block nötig).

Hardware für die Inkubation (nicht von Agilent)	Best.-Nr.
Trockenblockheizer, 4 Block (2 Stück) (Troemner)	HB4DG
Modularer Heizblock für Titerplatte (VWR)	13259-295

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Um die in den untenstehenden Tabellen aufgelisteten Produkte im Agilent Online Store zu bestellen, fügen Sie die Produkte zu Ihrer Liste „Produktfavoriten“ hinzu, indem Sie auf den Link „MyList“ in der Kopfzeile klicken. Geben Sie dann die Menge der benötigten Produkte ein, fügen Sie diese Ihrem Warenkorb hinzu und gehen Sie zur Kasse. Ihre Liste bleibt unter „Produktfavoriten“ für Sie zur Verwendung bei künftigen Bestellungen erhalten.

Wenn Sie „Produktfavoriten“ zum ersten Mal benutzen, werden Sie zur Eingabe Ihrer E-Mail-Adresse aufgefordert, um das Kundenkonto zu bestätigen. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Wenn Sie noch kein Agilent Konto eingerichtet haben, müssen Sie sich für eines registrieren. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch online durch Klicken auf die jeweiligen Bestellnummern oder über die normalen Verkaufs- und Vertriebswege bestellt werden.

MyList 1 von Verbrauchsmaterialien für das AdvanceBio Kit zur Quantifizierung der Gesamt-Sialinsäure.

Beschreibung	Best.-Nr.
Probenvorbereitung	
AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts, 48 St.	GS48-SAQ
AdvanceBio Kit zur Quantifizierung des Sialinsäure-Gesamtgehalts, 96 St.	GS96-SAQ
Standards	
Bovines Fetuin, hitzebehandelt (0,4 mg)*	WS0021
Agilent NIST-mAb, 1 x 25 µl	5191-5744
Agilent NIST-mAb, 4 x 25 µl	5191-5745
Optionale Produkte für Agilent PlateLoc Thermo-Mikroplattenversiegler†	
Abziehbarer Aluminium-Plattenverschluss	24210-001

* Nicht im Online-Handel erhältlich. Bestell-Informationen erfahren Sie von Ihrem Agilent Vertreter.
† Erfahren Sie mehr über den Agilent PlateLoc Thermo-Mikroplattenversiegler.

Literaturhinweise

- Agilent BioTek Plattenleser:
 - Synergy H1 Multi-Detektions-Reader mit Hybrid-Technologie
 - Synergy Neo2 Multi-Detektions-Reader mit Hybrid-Technologie
 - Synergy LX Multi-Detektions-Reader
- An Improved Workflow for Profiling and Quantitation of Sialic Acids in Biotherapeutics (5994-2352EN).
- Sialic Acid Analysis of Biotherapeutic Glycoproteins using AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit and LC/FLD/MS, (5994-4201EN).
- Agilent AdvanceBio Kit zur Charakterisierung und Quantifizierung von Sialinsäuren – Flyer (5994-2788DEE).
- Agilent AdvanceBio Total Sialic Acid Quantitation Kit (5994-1227EN).

Agilent CrossLab: wir unterstützen Ihren Erfolg

Agilent CrossLab ist ein Leistungsangebot von Agilent, das Services und Verbrauchsmaterialien integriert, um den Erfolg von Arbeitsabläufen zu unterstützen, die Produktivität zu verbessern und die Betriebseffizienz zu steigern. Wir sind bestrebt, mit jeder Interaktion Erkenntnisse zu bieten, mit welchen Sie Ihre Ziele schneller und besser erreichen. Wir bieten eine große Bandbreite an Produkten und Dienstleistungen an – von der Methodenoptimierung und Schulung bis zu kompletten Laborumzügen und Betriebsanalytik – und unterstützen Sie bei der Verwaltung Ihrer Geräte und Ihres Labors, um eine optimale Leistung zu erzielen.

Mehr Infos über Agilent CrossLab unter www.agilent.com/crosslab

Mehr Infos:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Online-Store:

www.agilent.com/chem/store

Hier finden Sie ein Agilent Kundendienstzentrum in Ihrem Land:

www.agilent.com/chem/contactus

Deutschland

0800 603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien und Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

DE91950304

Änderungen vorbehalten.