

Cuantificación de ácidos siálicos totales en glicoproteínas bioterapéuticas



Análisis simplificado y estandarizado de ácidos siálicos

La composición de los glicanos que se encuentran en las glicoproteínas bioterapéuticas puede afectar a la inmunogenicidad, a la farmacocinética y a la farmacodinámica. Los glicanos y los carbohidratos se componen de monosacáridos con diferentes estructuras oligosacáridas en función de la composición y de la posición de los enlaces. En función de la molécula y de la aplicación, el ácido siálico terminal puede reducir el índice de aclaramiento, la actividad de citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) o puede tener un efecto antiinflamatorio. Dos de las formas que se encuentran habitualmente en los 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. Dada la importancia de los ácidos siálicos presentes en las glicoproteínas bioterapéuticas, es imprescindible monitorizar la cantidad absoluta de estos ácidos.

El kit AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales sirve para cuantificar de forma rápida los ácidos siálicos libres o los que se liberan a partir de glicoproteínas intactas y ofrece varias ventajas:

- Las muestras se preparan para su análisis en aproximadamente 1,5 horas y permite una cuantificación rápida y fiable de los ácidos siálicos totales liberados a partir de proteínas intactas mediante tratamiento con sialidasa A.
- Amplio intervalo analítico de concentraciones de ácidos siálicos.
- Compatible con lectores de placas que permiten el análisis mediante mediciones de la fluorescencia o la absorbancia.
- Degradación mínima (o nula) del ácido siálico gracias a la liberación mediante tratamiento enzimático.
- Formato de microplacas de 96 pocillos fácil de utilizar que permite analizar un número elevado de muestras, y generar 48 y 96 puntos de datos.
- Se puede automatizar.

Solución para la cuantificación de ácidos siálicos totales diseñada y fabricada por Agilent

Los kits AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales de Agilent (GS48-SAQ y GS96-SAQ) suministran todos los reactivos necesarios para preparar muestras de ácidos siálicos en aproximadamente 1,5 horas. El análisis es rápido y sencillo gracias al lector de microplacas estándar¹ con mediciones de la absorbancia o la fluorescencia.

En esta guía se indican los consumibles necesarios para comenzar a cuantificar el ácido siálico de las muestras. Los productos que aparecen sirven para evaluar los ácidos siálicos presentes en rituximab (Rituxan, un anticuerpo monoclonal o mAb), etanercept (Enbrel, una proteína de fusión Fc), cetuximab (Erbix, un anticuerpo monoclonal) y NISTmAb.² En el estudio se ha cuantificado el ácido siálico mediante el kit AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales y los ácidos siálicos se han caracterizado y cuantificado con el kit AdvanceBio de caracterización y cuantificación de ácidos siálicos (ref. GS24-SAP).^{3,4}

Productos químicos y flujo de trabajo del kit de determinación de ácidos siálicos totales^{4,5}:

El kit emplea reacciones enzimáticas en cadena, que transforman el ácido siálico liberado mediante tratamiento enzimático en peróxido de hidrógeno, que reacciona según una relación estequiométrica con un reactivo de tinción, lo que genera una respuesta intensa de fluorescencia o absorbancia. Este método permite que la liberación de ácidos siálicos, la conversión, la detección y la cuantificación puedan realizarse en un solo pocillo a fin de lograr un procesamiento rápido y sencillo.

Paso 1: Liberación de ácidos siálicos (30 minutos)

Glicoproteína + Sialidasa A \rightarrow Ácido siálico + Glicoproteína desializada (sin ácido siálico)

Paso 2: Detección del ácido siálico liberado (60 minutos)

Ácido siálico + ácido N-acetilneuramínico aldolasa \leftrightarrow Manosamina + Ácido pirúvico

Ácido pirúvico + Piruvato oxidasa \rightarrow Acetilfosfato + H₂O₂

Reactivo de tinción + H₂O₂ \rightarrow Reactivo de tinción indicador

A continuación se exponen ejemplos de los datos de linealidad y reproducibilidad del patrón cuantitativo de Neu5Ac que se suministra con los kits AdvanceBio de Agilent para la cuantificación de ácidos siálicos totales:

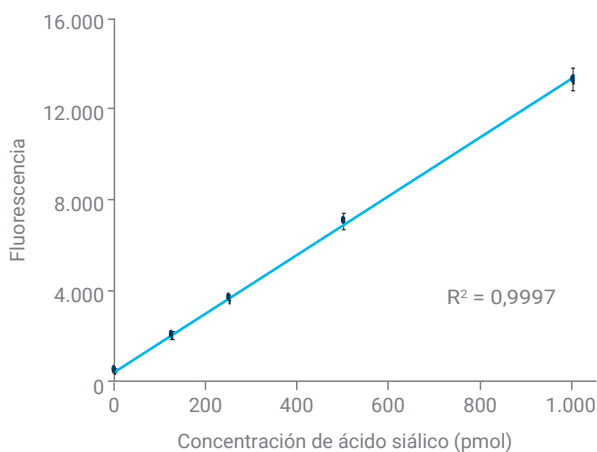
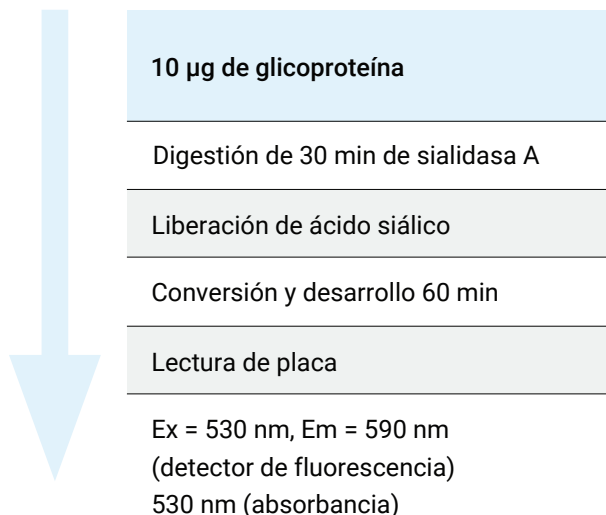


Figura 1. Curva de calibración del kit AdvanceBio de Agilent para la cuantificación de ácidos siálicos totales. Una curva de calibración de cinco puntos que corresponden a concentraciones de 0, 125, 250, 500 y 1000 pmol de ácido siálico con un valor de R² de 0,9997.



Para obtener más información sobre la preparación de muestras y análisis de N-glicanos, consulte: N-Glycan Analysis: Better Together ([5994-1647EN](#)).

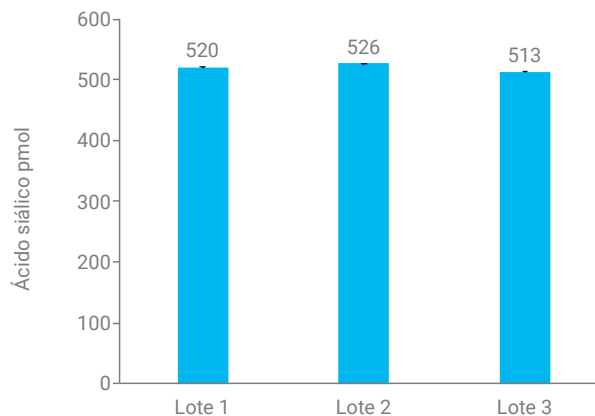


Figura 2. Comparación entre lotes de la solución de patrón de ácido siálico Neu5Ac. Medida de 500 pmol de ácido siálico.

Cómo comenzar a utilizar el kit AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales

Aspectos que se deben tener en cuenta relativos a la muestra de ácidos siálicos

- Entre las muestras que se pueden analizar con el kit figuran las glicoproteínas, los glicopéptidos, los glicolípidos, los ácidos polisíálicos o las células enteras.
- El intervalo analítico de este método es de 40 a 1.000 pmol (detección de fluorescencia) y de 500 a 4.000 pmol (detección de absorbancia). La concentración en la muestra debe adaptarse para garantizar que la señal se encuentre dentro del intervalo analítico.
- Algunas muestras pueden contener ácidos siálicos libres. Es preciso incluir un control negativo (blanco de la muestra) y todos los componentes de la reacción, salvo la Sialidasa A, en todos los análisis para determinar la señal correspondiente a los ácidos siálicos libres en las muestras.
- Los niveles bajos de fluorescencia (o absorbancia) intrínsecos de la glicoproteína no deberían interferir con la cuantificación de ácidos siálicos, ya que el control negativo se sustrae antes de la determinación de ácidos siálicos.
- Las muestras deben encontrarse en agua, PBS o un tampón equivalente. Lo idóneo es que las muestras no se encuentren en un tampón de molaridad elevada para garantizar que el pH de la reacción sea correcto.
- Entre los factores que pueden provocar una digestión incompleta con sialidasa se encuentran: una cantidad excesiva de muestra en la reacción, un tiempo o temperatura de incubación insuficientes o unas condiciones en las que haya un impedimento estérico entre el ácido siálico y la sialidasa A.
- Ciertos ácidos siálicos acetilados en el oxígeno tienen una escasa afinidad por la ácido N-acetilneuramínico aldolasa, lo que podría dar lugar a una falta de exactitud en la determinación del contenido de ácidos siálicos. La presencia de grupos acetilo en el oxígeno se puede confirmar mediante derivatización con DMB seguida de análisis por HPLC con el kit AdvanceBio de caracterización y cuantificación de ácidos siálicos (ref. GS24-SAP)^{3,4}. Si los hay, la desacetilación en el oxígeno se puede llevar a cabo mediante hidrólisis con una base suave antes del tratamiento con enzimas convertidoras.

Dispositivos de incubación

Durante la preparación de muestras para la cuantificación de ácidos siálicos totales con el kit AdvanceBio, con el tratamiento enzimático de las muestras los ácidos siálicos se liberan en 30 minutos a 37 °C. La conversión y el desarrollo del color durante una incubación tienen lugar durante 60 minutos a 37 °C. Para calentar las muestras en la placa de 96 pocillos que se suministra, se recomienda el uso de una estufa de laboratorio o un termobloque con capacidad de alcanzar los 37 °C. También es necesario contar con un termobloque de superficie plana compatible con placas de 96 pocillos con

faldón (por ejemplo, el termobloque modular VWR 13259-295 para placas de titulación). Como otra posibilidad, se puede emplear un lector de placas con control de temperatura a 37 °C (no son necesarios ni el calentador ni el bloque).

| Dispositivos de incubación (de un fabricante distinto de Agilent) | Referencia |
|---|------------|
| Termobloque seco, 4 bloques (cantidad: 2) (Troemner) | HB4DG |
| Termobloque modular para placas de titulación (VWR) | 13259-295 |

Selección sencilla e información para pedidos

Para pedir los artículos que aparecen en las siguientes tablas 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 la cantidad de los productos que necesita, añádalos al carrito y proceda a la compra. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla en futuros pedidos.

Si es la primera vez que emplea la opción Productos favoritos, se le solicitará que introduzca la dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. En cambio, 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 también pueden pedirse on-line haciendo clic en las referencias individuales o a través de sus canales de venta y distribución habituales.

MiLista 1 de consumibles AdvanceBio para la cuantificación de ácidos siálicos totales.

| Descripción | Referencia |
|--|------------|
| Preparación de muestras | |
| Kit AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales, 48-ct | GS48-SAQ |
| Kit AdvanceBio de cuantificación de ácidos siálicos totales, 96-ct | GS96-SAQ |
| Patrones | |
| Fetuina bovina, con tratamiento térmico (0,4 mg)* | WS0021 |
| Agilent-NISTmAb, 1 x 25 µl | 5191-5744 |
| Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µl | 5191-5745 |
| Artículos adicionales para el sellador térmico de microplacas Agilent PlateLoc† | |
| Sello de aluminio extraíble para placas | 24210-001 |

* No se encuentra disponible para la venta en línea. Póngase en contacto con su representante de Agilent para obtener más información sobre la realización de pedidos.

† Obtenga más información sobre el sellador térmico de microplacas Agilent PlateLoc.

Referencias

1. Lectores de placas Agilent BioTek:
 - a. Lector multimodo híbrido Synergy H1
 - b. Lector multimodo híbrido Synergy Neo2
 - c. Lector multimodo Synergy LX
2. Flujo de trabajo mejorado para la caracterización y la cuantificación de ácidos siálicos en productos bioterapéuticos (5994-2352ES).
3. Análisis de ácidos siálicos de glicoproteínas bioterapéuticas mediante el kit AdvanceBio de caracterización y cuantificación de ácidos siálicos y LC/FLD/MS, (5994-4201ES).
4. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit Flyer (5994-2788EN).
5. Agilent AdvanceBio Total Sialic Acid Quantitation Kit (5994-1227EN).

Agilent CrossLab: respaldamos su éxito

CrossLab es una herramienta de Agilent que integra servicios y consumibles para respaldar el éxito del flujo de trabajo, mejorar la productividad y mejorar la eficiencia operativa. En cada interacción, nos esforzamos por poner a su disposición nuestros conocimientos para ayudarle a conseguir sus objetivos. Ofrecemos una amplia gama de productos y servicios, desde la optimización de métodos y la formación hasta la reubicación de laboratorios completos y el análisis de operaciones, para ayudarle a gestionar sus instrumentos y su laboratorio con el fin de obtener el mejor rendimiento.

Puede obtener más información acerca de CrossLab en www.agilent.com/crosslab

Para obtener más información:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Tienda on-line:

www.agilent.com/chem/store

Encuentre un centro de atención al cliente de Agilent en su país:

www.agilent.com/chem/contactus

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

DE91950304

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.