

Quantification des acides sialiques totaux des glycoprotéines utilisées en biothérapie



Analyse des acides sialiques simplifiée et normalisée

La composition des glycanes présents dans les glycoprotéines utilisées en biothérapie peut affecter l'immunogénicité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique. Les glycanes sont des glucides composés de monosaccharides qui peuvent être assemblés de nombreuses façons pour former diverses structures d'oligosaccharides, 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 types fréquemment présents dans les produits utilisés en biothérapie 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. Étant donné l'importance des acides sialiques sur les glycoprotéines utilisées en biothérapie, il est essentiel de surveiller la quantité absolue d'acide sialique.

Le kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio, utilisé pour la quantification rapide d'acide sialique libre ou libérée à partir de glycoprotéines intactes, offre de nombreux avantages :

- Les échantillons sont prêts à être analysés après 1,5 heure environ, ce qui permet une quantification rapide et fiable de l'acide sialique total libéré à partir des protéines intactes par la sialidase A.
- Large plage dynamique de détection des taux d'acides sialiques.
- Compatible avec les lecteurs de plaque permettant une mesure par détection de fluorescence ou absorbance.
- Dégradation minimale (le cas échéant) de l'acide sialique en raison d'une libération enzymatique.
- Format de microplaque à 96 puits conviviale et à haut rendement adapté pour la génération de 48 et 96 points de données.
- Compatible avec l'automatisation.

Solution de quantification des acides sialiques totaux conçue et fabriquée par Agilent

Les kits de quantification des acides sialiques totaux Agilent AdvanceBio (GS48-SAQ et GS96-SAQ) fournissent tous les réactifs nécessaires pour préparer des échantillons d'acide sialique en 1,5 heure environ. L'analyse est rapide et facile grâce à l'utilisation d'un lecteur de microplaque standard¹ permettant une mesure par absorbance ou fluorescence.

Dans ce guide, vous trouverez la liste des consommables nécessaires pour commencer la quantification de l'acide sialique dans votre échantillon. Les produits répertoriés ont été utilisés pour évaluer les acides sialiques présents dans le rituximab (Rituxan, un anticorps monoclonal ou mAb), l'étanercept (Enbrel, une protéine de fusion Fc), le cetuximab (Erbix, un anticorps monoclonal) et le NISTmAb.² L'étude visant à quantifier l'acide sialique grâce aux kits de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio, mais aussi à profiler et quantifier les acides sialiques grâce au kit de profilage et de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio (p/n GS24-SAP).^{3,4}

Chimie et flux de tâches du kit d'analyse des acides sialiques totaux^{4,5} :

Le kit utilise une réaction enzymatique couplée, convertissant par voie enzymatique l'acide sialique libéré en peroxyde d'hydrogène, qui réagit de manière stœchiométrique avec un colorant, produisant ainsi une réponse intense en fluorescence et en absorbance. Cette approche permet une libération enzymatique d'acide sialique. La conversion, la détection et la quantification peuvent se faire dans un même puits pour un traitement simple et rapide.

Étape 1 : libération de l'acide sialique (30 minutes)

Glycoprotéine + sialidase A \rightarrow acide sialique + glycoprotéine désialylée (sans acide sialique)

Étape 2 : Détection de l'acide sialique libéré (60 minutes)

Acide sialique + aldolase N-acétylneuraminique \leftrightarrow mannosamine + acide pyruvique

Acide pyruvique + pyruvate oxydase \rightarrow acétylphosphate + H₂O₂

Colorant + H₂O₂ \rightarrow colorant rapporteur

10 μ L de glycoprotéine

30 min de digestion par la sialidase A

Libération des acides sialiques

60 min de conversion et de développement

Lecture de la plaque

Ex 530 nm/Em 590 nm (FLD)

530 nm (absorbance)

Pour obtenir des informations sur la préparation et l'analyse d'échantillons de N-glycanes, consultez : Analyse des N-glycanes : Plus performants ensemble ([5994-1647FR](#)).

Sont indiqués ici des exemples de données de linéarité et de reproductibilité pour l'étalon Neu5Ac quantitatif inclus fourni avec les kits de quantification des acides sialiques totaux Agilent AdvanceBio :

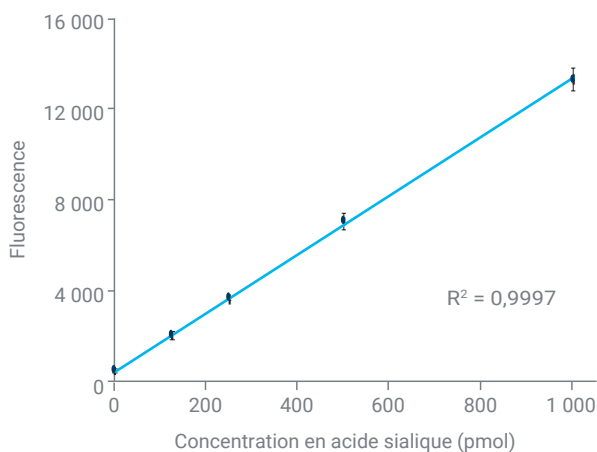


Figure 1. Courbe d'étalonnage du kit de quantification des acides sialiques totaux Agilent AdvanceBio. Courbe d'étalonnage à cinq points correspondant à 0, 125, 250, 500 et 1 000 pmol d'acide sialique avec un R² de 0,9997.

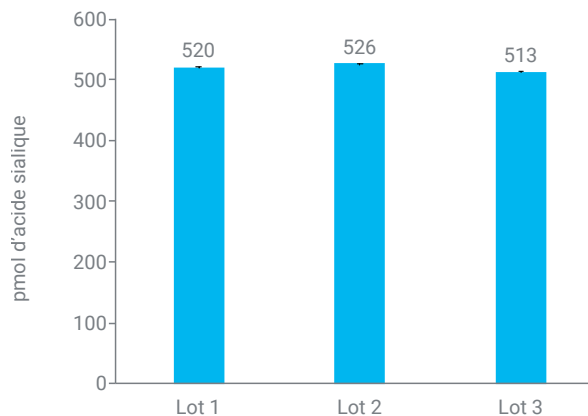


Figure 2. Comparaison entre lots de solutions étalons de l'acide sialique Neu5Ac. Mesure de 500 pmol d'acide sialique.

Prise en main des kits de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio

Considérations concernant les échantillons d'acide sialique

- Les échantillons pouvant être mesurés par le kit comprennent les glycoprotéines, les glycopeptides, les glycolipides, les acides polysialiques ou les cellules entières.
- La gamme dynamique de cette analyse se situe entre 40 et 1 000 pmol (détection de fluorescence) et entre 500 et 4 000 pmol (détection de l'absorbance). Il est possible de devoir ajuster la concentration des échantillons pour s'assurer que le signal se situe dans la gamme.
- Certains échantillons peuvent contenir de l'acide sialique libre. Un contrôle négatif (blanc d'échantillon) contenant un échantillon et tous les composants de réaction, hormis la sialidase A, doit être inclus dans chaque cycle pour tenir compte du signal d'acide sialique libre dans les échantillons.
- De faibles taux de fluorescence (ou absorbance) des glycoprotéines intrinsèques n'interféreront pas avec la quantification d'acide sialique, car le contrôle négatif sera soustrait avant de déterminer la teneur en acide sialique.
- Les échantillons doivent se trouver dans l'eau, dans une solution saline et tampons de phosphate ou dans un tampon semblable. Dans l'idéal, les échantillons ne doivent pas être dans un tampon présentant une molarité élevée pour garantir le bon pH de réaction.
- Parmi les facteurs pouvant entraîner une digestion incomplète par la sialidase figurent : un excès d'échantillon dans la réaction, un temps d'incubation ou une température insuffisants, ou des cas dans lesquels l'acide sialique est stériquement bloqué par la sialidase A.
- Certains acides sialiques O-acétylés peuvent s'avérer être des substrats inadaptés pour la N-acétylneuraminique aldolase et peuvent donner une valeur imprécise pour la teneur en acide sialique. La présence de groupes O-acétyles peut être confirmée par la dérivation de DMB, suivie d'une analyse par HPLC à l'aide du kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio (réf. GS24-SAP)^{3,4} Si la présence est avérée, la dé-O-acétylation de l'échantillon peut être effectuée par hydrolyse à l'aide d'une base douce avant de procéder au traitement avec les enzymes de conversion.

Matériel d'incubation

Pendant la préparation d'échantillons pour la quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio, les échantillons sont libérés de manière enzymatique en 30 minutes à 37 °C. La conversion et le développement de couleurs surviennent lors de l'incubation durant 60 minutes à 37 °C. Pour le chauffage des échantillons dans la plaque à 96 puits fournie, nous recommandons l'utilisation d'une étuve de laboratoire ou d'une unité chauffante permettant une incubation à 37 °C. Une unité chauffante dotée d'une surface plane pour accepter une plaque à 96 puits à jupe (par exemple, une unité chauffante modulaire pour la plaque de titrage VWR 13259-295) est également requise. Une autre méthode consiste à utiliser un lecteur de plaque muni d'une régulation de température à 37 °C (l'unité chauffante est inutile ici).

Matériel d'incubation (non Agilent)	Référence
Bloc de chauffage à sec, 4 blocs (Qté : 2) (Troemner)	HB4DG
Bloc de chauffage modulaire pour plaque de titrage (VWR)	13259-295

Sélection simple et informations pour commander

Pour commander des articles répertoriés dans les tableaux ci-après sur la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez les articles dans votre liste des Produits favoris en cliquant sur le lien MaListe dans l'en-tête. Puis, saisissez les quantités de produits nécessaires, cliquez sur Ajouter au panier, et commencer la validation. Votre liste 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 saisir votre adresse e-mail pour vérifier votre compte. Si vous possédez déjà un compte Agilent, vous pourrez vous y connecter. Toutefois, si vous n'en avez pas, 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 articles peuvent également être commandés en ligne en cliquant sur les références individuelles ou par l'intermédiaire de vos canaux de distribution et de vente habituels.

MaListe 1 de consommables de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio.

Description	Référence
Préparation d'échantillons	
Kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio, 48-ct	GS48-SAQ
Kit de quantification des acides sialiques totaux AdvanceBio, 96-ct	GS96-SAQ
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
Articles en option pour la thermoscelleuse de microplaques Agilent PlateLoc[†]	
Joint de plaque en aluminium pelable	24210-001

* Non disponible à la vente en ligne. Contactez votre représentant Agilent pour obtenir des informations pour commander.

[†] Apprenez-en plus sur la thermoscelleuse de microplaques Agilent PlateLoc.

Références

1. Lecteurs de plaques Agilent BioTek :
 - a. Lecteur multimode hybride Synergy H1
 - b. Lecteur multimode hybride Synergy Neo2
 - c. Lecteur multimode Synergy LX
2. Méthode améliorée pour le profilage et la quantification des acides sialiques en biothérapie (5994-2352FR).
3. Analyse des acides sialiques des glycoprotéines utilisées en biothérapie grâce au kit de profilage et de quantification des acides sialiques AdvanceBio et de LC/FLD/MS, (5994-4201FR).
4. Brochure du kit de profilage et de quantification des acides sialiques Agilent AdvanceBio (5994-2788FR).
5. Kit de quantification des acides sialiques totaux Agilent AdvanceBio (5994-1227FR).

Agilent CrossLab : compagnon de votre succès

CrossLab est une offre d'Agilent qui associe des services et des consommables permettant d'améliorer les méthodes de travail, la productivité et l'efficacité opérationnelle. À chacune de nos interactions, nous vous apportons des conseils pour atteindre vos objectifs. Nous offrons une large gamme de produits et services, de l'optimisation de méthodes à la formation et à l'analyse opérationnelle, en passant par la réorganisation intégrale de laboratoires, afin de vous aider à obtenir les meilleures performances techniques et organisationnelles au sein de votre laboratoire.

Pour en savoir plus sur Agilent CrossLab : www.agilent.com/crosslab

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/glycananalysis

Pour acheter en ligne :

www.agilent.com/chem/store

Trouvez un centre d'assistance clientèle Agilent dans votre pays sur

www.agilent.com/chem/contactus

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

Etats-Unis et Canada

+1 800 227 9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

DE91950304

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.