

# Quantificazione dell'acido sialico totale di glicoproteine bioterapeutiche



## Analisi dell'acido sialico semplificata e standardizzata

La composizione dei glicani presenti sulle glicoproteine bioterapeutiche può influenzare l'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica. I glicani sono carboidrati composti da monosaccaridi disposti in molte possibili strutture di oligosaccaridi in base alla composizione e alla 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 comunemente 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 immunogenica. Vista l'importanza degli acidi sialici presenti sulle glicoproteine bioterapeutiche, è fondamentale monitorare la quantità assoluta di acido sialico.

Il kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio, usato per la quantificazione rapida dell'acido sialico libero o rilasciato da glicoproteine intatte, offre diversi vantaggi:

- I campioni pronti per l'analisi in circa 1,5 ore permettono una quantificazione rapida e affidabile dell'acido sialico totale rilasciato da proteine intatte da parte della sialidasi A.
- Ampio range dinamico di rivelazione dei livelli di acido sialico.
- Compatibile con lettori di piastre che effettuano le misure mediante rivelazione a fluorescenza o assorbanza.
- Degradazione minima (o assente) dell'acido sialico dovuta al rilascio enzimatico.
- Formato a micropiastre da 96 pozzetti facile da usare e ad alta produttività, adatto per generare 48 e 96 punti dati.
- Compatibile con l'automazione.

## Soluzione per la quantificazione dell'acido sialico totale progettata e prodotta da Agilent

I kit di quantificazione dell'acido sialico totale Agilent AdvanceBio (GS48-SAQ e GS96-SAQ) includono tutti i reagenti necessari per preparare i campioni di acido sialico in circa 1,5 ore. L'analisi è rapida e semplice grazie all'uso di un lettore di micropiastre standard<sup>1</sup> che utilizza assorbanza o fluorescenza per la misura.

In questa guida, troverai l'elenco delle parti di consumo necessarie per iniziare la quantificazione dell'acido sialico nei tuoi campioni. I prodotti elencati sono stati usati 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.<sup>2</sup> Nello studio l'acido sialico è stato quantificato usando i kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio e gli acidi sialici sono stati quantificati e ne è stato determinato il profilo usando il kit di profilazione e quantificazione dell'acido sialico AdvanceBio (codice GS24-SAP).<sup>3,4</sup>

## Composizione chimica e flusso di lavoro del kit di analisi dell'acido sialico totale<sup>4,5</sup>:

Il kit usa una reazione enzimatica accoppiata che converte l'acido sialico rilasciato enzimaticamente in perossido di idrogeno, che reagisce stechiometricamente con un colorante generando un intenso segnale di fluorescenza o assorbanza. Questo approccio permette il rilascio enzimatico dell'acido sialico e la conversione, la rivelazione e la quantificazione in un unico pozzetto per un trattamento semplice e rapido.

### Fase 1: rilascio dell'acido sialico (30 minuti)

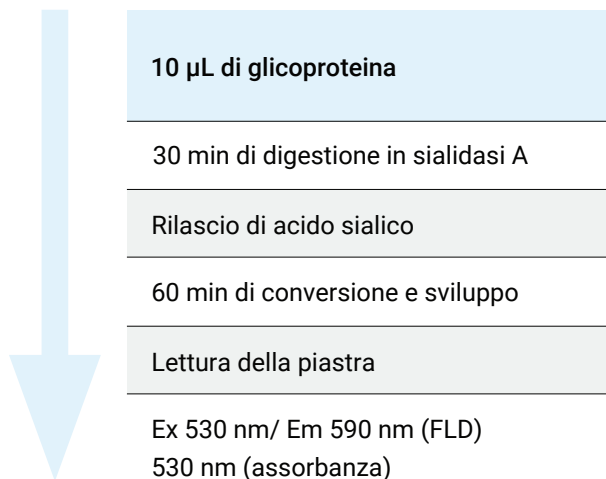
glicoproteina + sialidasi A  $\rightarrow$  acido sialico + glicoproteina desialilata (senza acido sialico)

### Fase 2: rivelazione dell'acido sialico rilasciato (60 minuti)

acido sialico + N-acetilneuramminico aldolasi  $\leftrightarrow$  mannosamina + acido piruvico

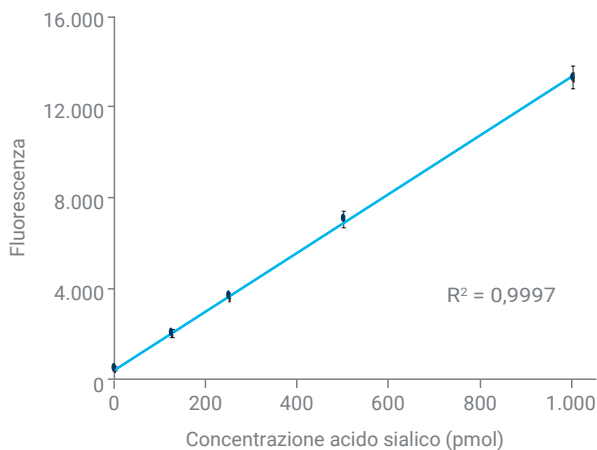
acido piruvico + piruvato ossidasi  $\rightarrow$  acetilfosfato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

colorante + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  colorante reporter

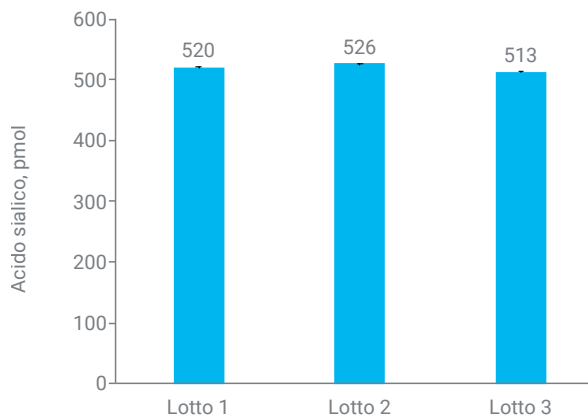


Per informazioni sulla preparazione e l'analisi dei campioni di N-glicani, vedere: N-Glycan Analysis: Better Together (5994-1647EN)

Sono qui illustrati esempi di dati di linearità e riproducibilità per lo standard quantitativo di Neu5Ac incluso, fornito con i kit di quantificazione dell'acido sialico totale Agilent AdvanceBio:



**Figura 1.** Curva standard del kit di quantificazione dell'acido sialico totale Agilent AdvanceBio. Curva standard a cinque punti corrispondente a 0, 125, 250, 500 e 1.000 pmol di acido sialico con un valore R<sup>2</sup> di 0,9997.



**Figura 2.** Confronto tra lotti di soluzione standard di acido sialico Neu5Ac. Misurazione di 500 pmol di acido sialico.

## Guida introduttiva ai kit di quantificazione dell'acido sialico totale Agilent AdvanceBio

### Considerazioni sui campioni di acido sialico

- I campioni che possono essere misurati dal kit includono glicoproteine, glicopeptidi, glicolipidi, acidi polisialici o cellule intere.
- Il range dinamico di questa analisi è compreso tra 40 e 1.000 pmol (rivelazione a fluorescenza) e tra 500 e 4.000 pmol (rivelazione ad assorbanza). La concentrazione del campione potrebbe dover essere regolata affinché il segnale rientri nel range.
- Alcuni campioni potrebbero contenere acido sialico libero. In ogni analisi deve essere incluso un controllo negativo (bianco del campione) contenente il campione e tutti i componenti della reazione tranne la sialidasi A per tenere conto del segnale dell'acido sialico libero nei campioni.
- Bassi livelli di fluorescenza (o assorbanza) intrinseca delle glicoproteine non interferiscono con la quantificazione dell'acido sialico in quanto il controllo negativo sarà sottratto prima di determinare la quantità di acido sialico.
- I campioni devono essere in acqua, PBS o un tampone simile. Idealmente, i campioni non devono essere in un tampone ad alta molarità per garantire il corretto pH di reazione.
- I fattori che possono determinare una digestione incompleta della sialidasi includono: quantità eccessiva di campione nella reazione, tempo o temperatura di incubazione insufficienti, o situazioni in cui l'acido sialico è stericamente ostacolato rispetto alla sialidasi A.
- Alcuni acidi sialici O-acetilati possono essere substrati inadatti per la N-acetilneuramminico aldolasi e potrebbero non fornire un valore accurato per il contenuto di acido sialico. La presenza di gruppi O-acetile può essere confermata mediante derivatizzazione con DMB, seguita da analisi HPLC usando il kit di profilazione e quantificazione dell'acido sialico AdvanceBio (codice GS24-SAP)<sup>3,4</sup>. Se presente, la de-O-acetilazione del campione può essere condotta mediante idrolisi con una base debole prima del trattamento con gli enzimi di conversione.

### Hardware di incubazione

Durante la preparazione del campione per la quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio, i campioni vengono rilasciati enzimaticamente in 30 minuti a 37 °C. La conversione e lo sviluppo del colore hanno luogo durante un'incubazione di 60 minuti a 37 °C. Per il riscaldamento dei campioni nella piastra a 96 pozzetti fornita, raccomandiamo l'uso di un forno da laboratorio o di un blocco riscaldante in grado di incubare a 37 °C. È necessario anche un blocco riscaldante con superficie piana che accolga una piastra con bordo a 96 pozzetti (ad esempio, blocco riscaldante modulare VWR 13259-295 per piastra di titolazione). In alternativa, può essere usato un lettore di piastre con controllo della temperatura a 37 °C (non sono necessari riscaldatore e blocco).

Hardware di incubazione (non Agilent)	Codice
Blocco riscaldante a secco, 4 blocchi (qtà 2) (Troemner)	HB4DG
Blocco riscaldante modulare per piastra di titolazione (VWR)	13259-295

### Semplicità di scelta e informazioni per gli ordini

Per ordinare articoli elencati nelle tabelle seguenti dall'Agilent Online Store, aggiungi gli articoli all'elenco dei Prodotti preferiti facendo clic sul collegamento "Il mio elenco" nell'interfaccia. Inserisci quindi le quantità dei prodotti di cui hai bisogno, Aggiungi al carrello, e procedi all'ordine. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che tu possa disporne per gli ordini futuri.

Se è la prima volta che usi Prodotti preferiti, ti verrà chiesto 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 ancora 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 anche essere ordinati online facendo clic sui singoli codici o attraverso i canali di vendita e distribuzione abituali.

**Il mio elenco 1** di parti di consumo per la quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio

Descrizione	Codice
<b>Preparazione del campione</b>	
Kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio, 48 pz	GS48-SAQ
Kit di quantificazione dell'acido sialico totale AdvanceBio, 96 pz	GS96-SAQ
<b>Standard</b>	
Fetaina bovina, trattata termicamente (0,4 mg)*	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25 µL	5191-5745
<b>Articoli opzionali per la termosigillatrice per micropiastre Agilent PlateLoc<sup>†</sup></b>	
Sigillatura delle piastre in alluminio rimovibile	24210-001

\* Non disponibile per la vendita online. Per informazioni sugli ordini, contatta il rappresentante locale Agilent.

<sup>†</sup> Maggiori informazioni sulla termosigillatrice per micropiastre Agilent PlateLoc.

### Bibliografia

1. Lettori di piastre Agilent BioTek:
  - a. Lettore multimodale ibrido Synergy H1
  - b. Lettore multimodale ibrido Synergy Neo2
  - c. Lettore multimodale Synergy LX
2. An Improved Workflow for Profiling and Quantitation of Sialic Acids in Biotherapeutics (5994-2352EN).
3. Sialic Acid Analysis of Biotherapeutic Glycoproteins using AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit and LC/FLD/MS, (5994-4201EN).
4. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit Flyer (5994-2788EN).
5. Agilent AdvanceBio Total Sialic Acid Quantitation Kit (5994-1227EN).

## Agilent CrossLab: a supporto del tuo successo

CrossLab è una funzione Agilent che integra servizi e prodotti di consumo per favorire l'efficacia del flusso di lavoro, migliorare la produttività e potenziare l'efficienza operativa. In ogni interazione, cerchiamo di offrire una visione generale che possa essere di aiuto per raggiungere i tuoi obiettivi. Offriamo un'ampia gamma di prodotti e servizi, dall'ottimizzazione del metodo e la formazione alla rilocalizzazione di interi laboratori e all'analisi delle operazioni, per aiutarti a gestire i tuoi strumenti e il tuo laboratorio e ottenere prestazioni migliori.

Per maggiori informazioni su CrossLab, visita [www.agilent.com/crosslab](http://www.agilent.com/crosslab)

Maggiori informazioni su:

[www.agilent.com/chem/glycananalysis](http://www.agilent.com/chem/glycananalysis)

Per acquistare online:

[www.agilent.com/chem/store](http://www.agilent.com/chem/store)

Trova un centro assistenza clienti Agilent locale nel tuo Paese:

[www.agilent.com/chem/contactus](http://www.agilent.com/chem/contactus)

Stati Uniti e Canada

**+1 800 227 9770**

[agilent\\_inquiries@agilent.com](mailto:agilent_inquiries@agilent.com)

Europa

[info\\_agilent@agilent.com](mailto:info_agilent@agilent.com)

Asia Pacifico

[inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:inquiry_lsca@agilent.com)

DE91950304

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.