

당단백질의약품의 총 시알산 정량



시알산 분석 간소화 및 표준화

당단백질의약품에 존재하는 글리칸 조성은 면역원성, 약동학 및 약력학에 영향을 미칠 수 있습니다. 글리칸은 조성 및 결합 위치에 따라 여러 가지 가능한 올리고당 구조로 배열된 단당류로 구성된 탄수화물입니다. 분자 및 용도에 따라 말단 시알산은 제거율을 감소시키거나 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 활성도를 감소시키거나 항염증 작용을 나타낼 수 있습니다. 바이오의약품에서 일반적으로 발견되는 당단백질의 두 가지 형태는 N-acetylneuraminic acid(Neu5Ac) 및 N-glycolylneuraminic acid(Neu5Gc)입니다. 일반적으로 Neu5Ac가 우세한 것이며, Neu5Gc는 인체 내에서 합성이 안되지만 바이오의약품에 존재할 경우에는 면역원성이 될 수 있습니다. 당단백질의약품에서 시알산의 중요성을 감안할 때 시알산의 절대량을 모니터링하는 일은 필수적입니다.

Intact 당단백질에서 유리 또는 방출된 시알산의 빠른 정량에 사용되는 AdvanceBio 총 시알산 정량 키트는 다음과 같은 몇 가지 이점을 제공합니다.

- 약 1.5시간 내에 시료의 분석 준비가 끝나므로 Sialidase A를 이용해 원형(intact) 단백질에서 방출되는 총 시알산을 빠르고 신뢰할 수 있는 정량이 가능
- 넓은 측정 범위에서 시알산 농도 검출
- 형광 검출 또는 흡광도를 이용한 측정 기능을 제공하는 플레이트 리더와 호환
- 효소 방출에 따른 시알산의 분해 최소화(해당하는 경우)
- 사용자 친화적인 고처리량 96-well 마이크로플레이트 형식을 사용하여 48 및 96 데이터 포인트를 간편하게 생성
- 자동화가 쉬움

애질런트에서 설계 및 제조한 총 시알산 정량 솔루션

Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트(GS48-SAQ 및 GS96-SAQ)는 약 1.5시간 내에 시알산 시료를 준비하는 데 필요한 모든 시약을 제공합니다. 흡광도 또는 형광을 이용해 측정하는 표준 마이크로플레이트 리더¹를 사용하여 빠르고 쉽게 분석할 수 있습니다.

이 안내서에서는 시료의 시알산 정량을 시작하는 데 필요한 소모품 목록을 제공합니다. 나열된 제품들은 리툽시맵(Rituxan, 단일 클론 항체 또는 mAb), 에타너셉트(Enbrel, Fc 융합 단백질), 세톡시맵(Erbix, 단일 클론 항체) 및 NISTmAb에 존재하는 시알산을 평가하는데 사용되었습니다.² 이 연구에서는 AdvanceBio 총 시알산 정량 키트를 사용하여 시알산을 정량하고 AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(품번 GS24-SAP)를 사용하여 시알산을 프로파일링 및 정량했습니다.^{3,4}

총 시알산 분석 키트의 케미스트리와 워크플로^{4,5}

이 키트는 결합된 효소 반응을 사용하여 효소적으로 방출된 시알산을 과산화수소로 전환합니다. 이 과산화수소는 화학양론적으로 염료와 반응하여 강한 형광 또는 흡광도 신호를 생성합니다. 이 접근 방식을 사용하면 시알산의 효소적 방출, 전환, 검출 및 정량을 단일 웰에서 수행할 수 있어 빠르고 간단한 처리가 가능합니다.

1단계: 시알산의 방출(30분)

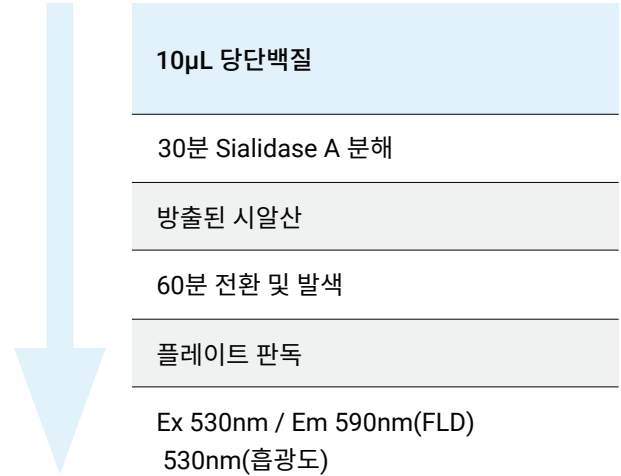
당단백질 + Sialidase A → 시알산 + 시알산화 당단백질(시알산이 없어짐)

2단계: 방출된 시알산 검출(60분)

시알산 + N-Acetylneuraminic aldolase ↔ Mannosamine + 피루브산

피루브산 + Pyruvate oxidase → Acetylphosphate + H₂O₂

염료 + H₂O₂ → 리포터 염료



N-글리칸 시료 전처리 및 분석에 대한 정보는 다음을 참조하세요.
N-글리칸 분석: 함께하면 더 커지는 힘(5994-1647KO)

다음은 Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트와 함께 제공된 정량 Neu5Ac 표준물질의 직선성과 재현성 데이터를 보여주는 예입니다.

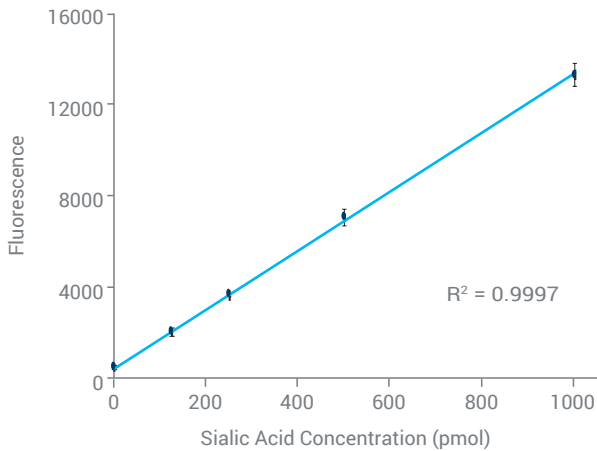


그림 1. Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트 표준 곡선. 시알산에 해당하는 5-포인트 표준 곡선 각각 0, 125, 250, 500 및 1,000pmol, R²의 값 0.9997.

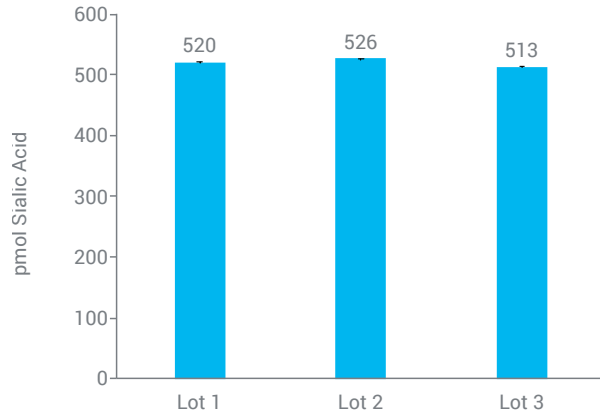


그림 2. Neu5Ac 시알산 표준 용액 로트 간 비교. 500pmol 시알산 측정.

AdvanceBio 총 시알산 정량 키트 시작하기

시알산 시료에 대한 고려사항

- 이 키트로 측정할 수 있는 시료에는 당단백질, 당펩타이드, 당지질, 폴리시알산 또는 전체 세포가 포함됩니다
- 이 분석의 측정 범위는 40~1,000pmol(형광 검출) 및 500~4,000pmol(흡광도 검출)입니다. 신호가 범위 내에 들어오도록 시료 농도를 조정해야 할 수도 있습니다
- 일부 시료에는 유리 시알산이 포함될 수 있습니다. 시료, 그리고 Sialidase A를 제외한 모든 반응 성분을 포함하는 음성 대조군(시료 블랭크)은 시료의 유리 시알산 신호를 고려하기 위해 각 실행에 포함되어야 합니다
- 낮은 수준의 고유 당단백질 형광(또는 흡광도)은 시알산의 정량과 간섭을 일으키지 않는데, 시알산의 양을 결정하기 전에 음성 대조군을 감산하기 때문입니다
- 시료는 물, PBS 또는 유사한 완충액에 존재해야 합니다. 정확한 반응 pH를 보장하기 위해 시료가 높은 물 농도의 완충액에 존재하지 않는 것이 이상적입니다
- 불완전한 시알리다아제 분해를 초래할 수 있는 요인에는 다음이 포함됩니다: 반응에 시료가 너무 많음, 불충분한 배양 시간 또는 온도, 또는 시알산이 시알리다아제 A로부터 입체적 방해 받는 상황
- 일부 O-아세틸화 시알산은 N-acetylneuraminic aldolase의 열악한 기질이 될 수 있으며 시알산 함량에 대한 정확한 값을 제공하지 않을 수 있습니다. DMB 유도체화 후 AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트(품번 GS24-SAP)를 사용한 HPLC 분석으로 O-아세틸 그룹의 존재를 확인할 수 있습니다.^{3,4} 전환 효소로 처리하기 전에 약염기 가수분해를 통해 시료의 탈 O-아세틸화를 수행할 수 있습니다

인큐베이션 하드웨어

AdvanceBio 총 시알산 정량 시료 전처리 동안, 시료는 37°C에서 30분 내에 효소적으로 방출됩니다. 37°C에서 60분간 배양하는 동안 전환 및 발색이 진행됩니다. 제공된 96-well plate에서 시료를 가열하려면 37°C 배양이 가능한 실험실 오븐이나 블록 히터를 사용하는 것이 좋습니다. 96-well 스커트 플레이트를 수용할 수 있는 평평한 표면의 히트 블록(예: 타이터 플레이트용 VWR 13259-295 모듈식 가열 블록)도 필요합니다. 또는 37°C 온도 제어 기능이 있는 플레이트 리더를 사용할 수 있습니다(히터 및 블록이 필요 없음).

인큐베이션 하드웨어(타사 제품)	부품 번호
드라이 블록 히터, 4 블록(2개)(Troemner)	HB4DG
타이터 플레이트용 모듈식 가열 블록(VWR)	13259-295

간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 품목을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 그 후 필요한 제품의 수량을 기입하고 장바구니에 추가한 후 결제를 진행하세요. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 각각의 부품 번호를 클릭하거나 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 온라인으로 주문할 수도 있습니다.

AdvanceBio 총 시알산 정량 소모품의 MyList 1

설명	부품 번호
시료 전처리	
AdvanceBio 총 시알산 정량 키트, 48-ct	GS48-SAQ
AdvanceBio 총 시알산 정량 키트, 96-ct	GS96-SAQ
표준 용액	
Bovine Fetuin, heat-treated(0.4mg)*	WS0021
Agilent-NISTmAb, 1 x 25µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb, 4 x 25µL	5191-5745
Agilent PlateLoc Thermal Microplate Sealer용 옵션 품목*	
Peelable aluminum plate seal	24210-001

* 온라인 판매용이 아닙니다. 주문 정보는 애질런트 담당자에게 문의해 주세요.

† Agilent PlateLoc 마이크로플레이트 열 밀봉 장치에 대해 자세히 알아보세요.

참고 문헌

1. Agilent BioTek 플레이트 리더:
 - a. Synergy H1 하이브리드 멀티모드 리더
 - b. Synergy Neo2 하이브리드 멀티모드 리더
 - c. Synergy LX 멀티모드 리더
2. 바이오의약품 중 시알산 프로파일링 및 정량을 위한 향상된 워크플로(5994-2352KO).
3. AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트 및 LC/FLD/MS를 이용한 당단백질 바이오의약품의 시알산 분석(5994-4201KO).
4. Agilent AdvanceBio 시알산 프로파일링 및 정량 키트 안내지(5994-2788KO).
5. Agilent AdvanceBio 총 시알산 정량 키트(5994-1227EN).

Agilent CrossLab: 성공 지원

CrossLab은 서비스와 소모품을 통합하여 워크플로 성공을 지원하고 생산성을 개선하며 운영 효율성을 향상시키는 애질런트 솔루션입니다. 애질런트는 모든 작업에 가치있는 정보를 제공하여 고객의 목표 달성을 지원합니다. 애질런트는 분석법 최적화와 교육부터 전체 실험실 재배치 및 운영 분석에 이르기까지 다양한 제품과 서비스를 제공하여 기기 및 실험실 관리에서 고객이 최상의 성과를 얻도록 도와줍니다.

www.agilent.com/crosslab에서 CrossLab에 대해 자세히 알아보세요.

자세한 내용:

www.agilent.com/chem/glycananalysis

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

국가별 애질런트 고객 센터 찾기:

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE91950304

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 1월 6일, 한국에서 인쇄
5994-4383KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com