

生物製剤の糖タンパク質の総シアル酸定量



シアル酸分析の簡素化と標準化

生物製剤の糖タンパク質に存在する糖鎖の組成は、免疫原性、薬物動態、薬力学に影響を与える可能性があります。糖鎖は、組成と結合位置に基づいて多種多様なオリゴ糖構造に配置された単糖で構成される炭水化物です。分子と用途に応じて、末端シアル酸がクリアランス速度を低下させたり、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を低下させたり、抗炎症作用を示したりすることがあります。生物製剤で一般的に見られる形態は、N-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）およびN-グリコシルノイラミン酸（Neu5Gc）の2つです。通常はNeu5Acが主要な成分ですが、ヒトによって合成されず、生物製剤におけるその存在は免疫原性である可能性があります。生物製剤用糖タンパク質におけるシアル酸の重要性を考えると、シアル酸の絶対量をモニタリングすることが不可欠です。

AdvanceBio 総シアル酸定量キットは、インтактな糖タンパク質から遊離シアル酸を迅速に定量するために用いるもので、次のような特長があります。

- サンプルの前処理が約 1.5 時間で完了するため、シアリダーゼ A によってインтактタンパク質から遊離された総シアル酸を迅速かつ高い信頼性で定量できます。
- 広いダイナミックレンジでシアル酸レベルの検出が可能です。
- 蛍光検出または吸光度による測定に用いられるプレートリーダーと互換性があります。
- 酵素遊離によるシアル酸の分解が（ある場合）最小限に抑えられます。
- 48 および 96 データポイントの生成に適した、ユーザーフレンドリーなハイスループット 96 ウェルマイクロプレートフォーマットです。
- 自動化に対応しています。

アジレントが設計・製造した 総シアル酸定量ソリューション

AdvanceBio 総シアル酸定量キット（GS48-SAQ および GS96-SAQ）には、シアル酸サンプルの調製に必要な試薬がすべて揃っており、約 1.5 時間で前処理が完了します。吸光度または蛍光による測定機能を備えた標準的なマイクロプレートリーダー¹を使用して、分析をすばやく簡単に行うことができます。

このガイドでは、サンプル中のシアル酸の定量を開始するために必要な消耗品のリストを紹介し、記載されている製品を用いて、リツキシマブ（Rituxan、モノクローナル抗体：mAb）、エタネルセプト（Enbrel、Fc 融合タンパク質）、セツキシマブ（Erbix、モノクローナル抗体）、および NISTmAb に存在するシアル酸を評価しました²。この検討では、AdvanceBio 総シアル酸定量キットを使用してシアル酸を定量し、AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット（部品番号 GS24-SAP）を用いてシアル酸のプロファイリングと定量を行いました。^{3,4}

総シアル酸分析キットの試薬とワークフロー^{4,5}:

このキットは、酵素によって遊離されるシアル酸を過酸化水素に変換する共役酵素反応を利用します。過酸化水素は、化学量論的に色素と反応し、強い蛍光または吸光度信号を生成します。このアプローチでは、シアル酸の酵素による遊離、変換、検出、定量が単一のウェルで実行されるため、迅速かつ簡便な処理が可能です。

ステップ1：シアル酸の遊離 (30分)

糖タンパク質 + シアリダーゼ A → シアル酸 + 脱シアル化糖タンパク質 (マイナス シアル酸)

ステップ2：遊離したシアル酸の検出 (60分)

シアル酸 + N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ ↔ マンノサミン + ビルビン酸ビルビン酸 + ビルビン酸オキシダーゼ → アセチルホスフェート + H₂O₂

色素 + H₂O₂ → レポーター色素

ここに示すのは、Agilent AdvanceBio 総シアル酸定量キットに付属の定量 Neu5Ac 標準の直線性と再現性データの例です。

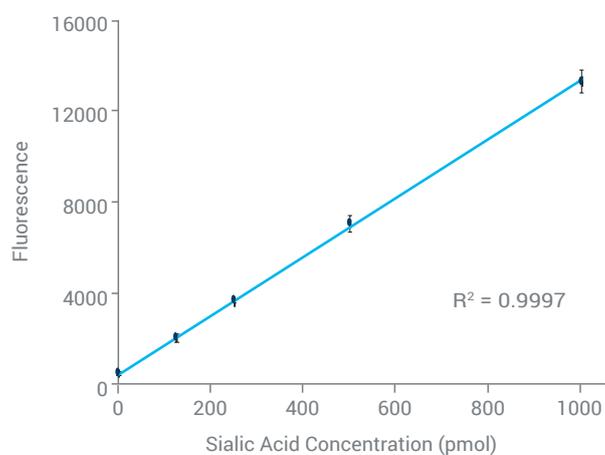
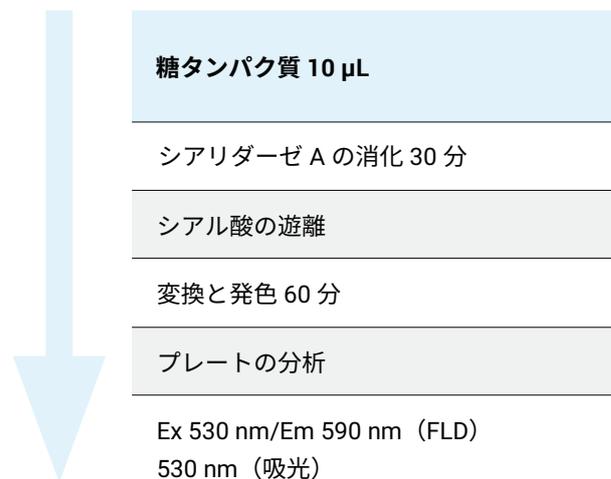


図 1. Agilent AdvanceBio 総シアル酸定量キットの検量線。0、125、250、500、1,000 pmol のシアル酸に対応する 5 点の検量線。R²=0.9997



N-グリカンサンプルの調製と分析については『N-Glycan Analysis: Better Together』(5994-1647EN) を参照ください。

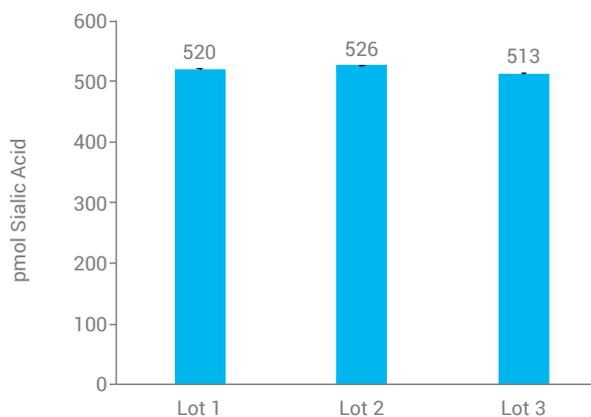


図 2. Neu5Ac シアル酸標準溶液のロット間の比較。500 pmol のシアル酸測定

AdvanceBio 総シアル酸定量キットの使用法

シアル酸サンプルに関する考慮事項

- キットで測定できるサンプルには、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、ポリシアル酸、または全細胞が含まれます。
- このアッセイのダイナミックレンジは、40 ~ 1,000 pmol (蛍光検出) および 500 ~ 4,000 pmol (吸光度検出) です。場合によっては、信号が範囲内に収まるように、サンプル濃度を調整する必要があります。
- 一部のサンプルには、遊離シアル酸が含まれていることがあります。サンプル中の遊離シアル酸シグナルを考慮するために、サンプルと、シアリダーゼ A 以外のすべての反応成分とを含むネガティブコントロール (サンプルブランク) を各分析に含める必要があります。
- 低レベルの内因性糖タンパク質の蛍光 (または吸光度) は、シアル酸の量を決定する前にネガティブコントロールが差し引かれるため、シアル酸の定量に干渉しません。
- サンプルは、水、PBS、または類似のバッファに入れる必要があります。正しい反応 pH を得られるように、サンプルを高モル濃度のバッファに入れないのが理想です。
- 不完全なシアリダーゼ消化につながる可能性のある要因には、反応中のサンプルが多すぎる、インキュベーション時間または温度が不十分である、またはシアル酸がシアリダーゼ A から立体的に妨げられている状況などがあります。
- 一部の O- アセチル化シアル酸は、N- アセチルノイラミン酸アルドラーゼの基質としては不十分であり、シアル酸含有量の正確な値を示さない場合があります。O- アセチル基の存在は、DMB 誘導体化を行い、AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット (部品番号 GS24-SAP) を使用した HPLC 分析を行うことによって確認できます³⁴。O- アセチル化シアル酸がサンプルに存在する場合は、サンプルの脱 O- アセチル化を穏やかな塩基加水分解によって実行します。

インキュベーションハードウェア

AdvanceBio 総シアル酸定量サンプルの前処理中に、サンプルは 37 °C、30 分で、酵素により遊離されます。変換と発色は、37 °C、60 分間のインキュベーション中に発生します。付属の 96 ウェルプレートでサンプルを加熱するには、37 °C のインキュベーションが可能なラボオープンまたはブロックヒーターを使用することを推奨します。96 ウェルスカート付プレートを受けるための平らな表面のヒートブロック (例えば、VWR 13259-295 タイタープレート用モジュラーヒーティングブロック) も必要です。あるいは、37 °C の温度制御が可能なプレートリーダーを使用することもできます (ヒーターとブロックは必要ありません)。

インキュベーションハードウェア (他社製)	部品番号
ドライブロックヒーター、4 ブロック (2 個) (Troemner)	HB4DG
タイタープレート用モジュラーヒーティングブロック (VWR)	13259-295

標準品、カラム、消耗品などの情報

すべてのアイテムは、アジレント営業所や販売店から注文することもできます。

AdvanceBio 総シアル酸定量消耗品

説明	部品番号
サンプル前処理	
AdvanceBio 総シアル酸定量キット、48-ct	GS48-SAQ
AdvanceBio 総シアル酸定量キット、96-ct	GS96-SAQ
標準	
ウシフェチニン、熱処理済 (0.4 mg) *	WS0021
Agilent-NISTmAb、1 x 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb、4 x 25 µL	5191-5745
Agilent PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラー用のオプションアイテム†	
Peelable Aluminum プレートシール	24210-001

* 注文方法については、担当営業までお問い合わせください。

† Agilent PlateLoc サーマルマイクロプレートシーラーの詳細をご覧ください。

参考文献

- Agilent BioTek マイクロプレートリーダー:
 - Synergy H1 マルチモードリーダー
 - Synergy Neo2 ハイブリッドマルチモードリーダー
 - Synergy LX マルチモードリーダー
- 生物製剤中のシアル酸のプロファイリングと定量のワークフローの改良 (5994-2352JAJP).
- AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キットと LC/FLD/MS を用いた生物製剤糖タンパク質のシアル酸分析, (5994-4201JAJP).
- Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング/定量キット (5994-2788JAJP).
- Agilent AdvanceBio Total Sialic Acid Quantitation Kit (5994-1227EN).

Agilent CrossLab：お客様の成功をサポート

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合し、お客様のワークフローのサポート、生産性の向上や運用効率の向上を実現するためのお手伝いをさせていただきます。すべてのやり取りにおいて、お客様が目標を達成するのに役立つ見えない価値を提供させていただきます。メソッドの最適化とトレーニングからラボ全体の移設と運用分析までの幅広い製品とサービスを提供することにより、お客様が機器とラボを管理して最高の性能を実現できるようお手伝いをさせていただきます。

CrossLab の詳細については、[ホームページ](#)をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE91950304

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, January 6, 2022
5994-4383JAJP