

III AUFTRAGSANALYTIK

Die süße Visitenkarte

Die Glykosylierung eines Antikörpers entscheidet häufig über dessen Wirksamkeit. Damit wird die Identifikation der Zuckermodifikationen von Antikörpern mittels MALDI TOF-MS zu einem wichtigen Analysetool.

Die Bedeutung von therapeutischen Antikörpern der IgG-Klasse hat in den letzten Jahren zugenommen und damit natürlich auch das Interesse an geeigneten Analysemethoden. Diese Antikörper sind Proteine, die eine Y-förmige Struktur besitzen und aus zwei identischen leichten und schweren Ketten von Aminosäuren bestehen. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft.

Analysen am Fc-Teil

Ein weiterer Bestandteil der Struktur ist eine Kohlenhydratkette am konstanten Fc-Teil der schweren Kette. Diese ist das Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen. Ihre Identifikation stellt einen wichtigen Bestandteil bei der Analyse von Antikörpern dar, um diese vollständig zu charakterisieren. Bedingt durch die überschaubare Variabilität dieser Kette sollte es möglich sein, über das mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Massenspektrometer) bestimmte Molekulargewicht auf die Struktur rückschließen zu können. Abbildung 1 zeigt die 12 zu erwartenden Kohlenhydratstrukturen mit Angabe der Molekulargewichte. Die Strukturen sind normalerweise aus fünf verschiedenen Sacchariden aufgebaut: Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Mannose (Man), N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc, Sialinsäure).

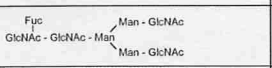
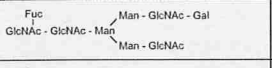
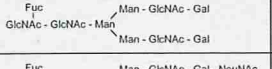
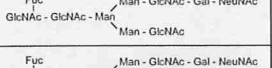
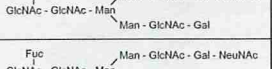
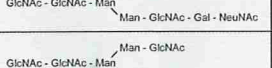
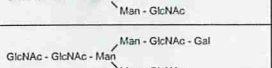

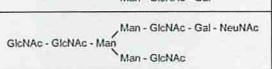
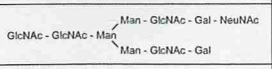
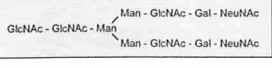

Kohlenhydratstruktur des Oligosaccharids	Molekulargewicht in Dalton	
	Oligosaccharid	Natriumaddukt
	1463,4	1486,4
	1625,5	1648,5
	1787,6	1810,6
	1916,8	1939,8
	2078,9	2101,9
	2370,2	2393,2
	1317,2	1340,2
	1479,4	1502,4
	1641,5	1664,5
	1770,6	1793,6
	1932,8	1955,8
	2224,0	2247,0

Abb.1: Mögliche Kohlenhydratstrukturen von Antikörpern

Der Autor



Stefan Künzig arbeitet seit 15 Jahren im Bereich Proteinanalytik und ist seit 2003 Leiter der Analytik bei der Biopharm GmbH. Er studierte von 1987 bis 1992 Biotechnologie an der Fachhochschule für Technik in Mannheim und schloss dort als Diplom-Ingenieur Biotechnologie ab. 1992 begann er bei der Biopharm GmbH als Projektleiter im Bereich analytische Dienstleistungen und wurde 2003 zum Leiter der Analytik des Unternehmens ernannt. Biopharm bietet seit 20 Jahren GMP/GLP-konforme Analytik-Dienstleistungen für die Pharma- und Biotech-Industrie an.

pern dar, um diese vollständig zu charakterisieren. Bedingt durch die überschaubare Variabilität dieser Kette sollte es möglich sein, über das mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Massenspektrometer) bestimmte Molekulargewicht auf die Struktur rückschließen zu können. Abbildung 1 zeigt die 12 zu erwartenden Kohlenhydratstrukturen mit Angabe der Molekulargewichte. Die Strukturen sind normalerweise aus fünf verschiedenen Sacchariden aufgebaut: Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Mannose (Man), N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc, Sialinsäure).

Abspaltung der Kohlenhydratketten vor der Analyse

Die eindeutigen Unterschiede in den Molekulargewichten dieser 12 Strukturen kommen dem beschriebenen Analysenansatz natürlich sehr entgegen. Zum einen kann die Bestimmung mittels aktueller MALDI TOF-Massenspektrometer sehr genau erfolgen (Fehler i. d. R. $\leq 0,1\%$) und zum anderen werden nur die Massen der einzelnen Strukturen im Gesamten bestimmt. Um diese Massen bestimmen zu können, müssen die Kohlenhydratketten vom restlichen Antikörper abgespalten werden. Dies geschieht enzymatisch mit N-Glycosidase F (z. B. Deglycosylation Kit von Roche). Die

Probe wird mit dem Enzym über Nacht bei 37 °C inkubiert. Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist, dass die Probe in einem geeigneten Puffer zum Beispiel PBS (Phosphate Buffered Saline) vorliegt. Nach dem Abspalten der Kohlenhydrate werden diese aufkonzentriert und die Lösung entsalzt. Dies geschieht durch Zentrifugation durch eine Größenausschlussmembran (z. B. Microcon YM-3 von Millipore). Die auf



der Membranoberfläche verbliebene, die Kohlenhydrate enthaltende Restlösung von wenigen μl , wird direkt auf den Probenträger des MALDI TOF-MS aufgetragen. Bei Einsatz der Größenausschlussmembranen ist grundsätzlich darauf zu achten, dass die aufgetragenen Lösungen nicht bis zur vollständigen Trockne zentrifugiert werden. Vor Gebrauch werden die Membranen zweimal mit Wasser gewaschen.

Geeignete Matrix

Die Kalibrierung des Massenspektrometers kann mit einer Kohlenhydratstruktur wie NA2-Glycan (zum Beispiel von Calbiochem, Molekulargewicht = 1641,5 Da, 20 μg gelöst in 50 μl Wasser) erfolgen. Eine geeignete Matrix ist Alpha-cyano-p-Hydroxymethylsäure. Der Probenauftrag erfolgt in vier Schichten mit Zwischentrocknung: je 0,5 μl Matrix, Massenstandard, 5 mM Kaliumchloridlösung, Matrix. Hierdurch wird eine gute Kristallisation der Proben auf dem Träger erreicht. Der Standard wird als NA2-Glycan/ Kaliumaddukt gemessen (Molekulargewicht = 1680,6 Da).

Kalibrier-Kontrolle

Die Massen von Kalium und/oder der Matrix werden zusätzlich für eine externe Zwei- oder Dreipunkt-Massenkalibrierung des Gerätes verwendet. Eine Kontrolle der Kalibrierung erfolgt zum Beispiel durch Messung von NA2-Glycan/ Natriumaddukt (Molekulargewicht = 1664,5 Da). Hierzu werden je 0,5 μl Matrix, Massenstandard, 5 mM Natriumchloridlösung und erneut Matrix schichtweise aufgetragen. Die Proben werden analog mit 5 mM Natriumchlorid aufgetragen und als Kohlenhydrat/ Natriumaddukte (vgl. Abb.1) gemessen. Die Geräteparameter sind vom verwendeten Massenspektrometer abhängig. Die Ionen tragen eine positive Ladung.

Wohin mit dem Tween?

Polysorbate mit dem kommerziellen Namen Tween® werden als Emulgator und Lösungsvermittler in vielen Formulierungen von Antikörpern eingesetzt. Da sie im gleichen Molekulargewichtsbereich wie die für Antikörper relevanten Kohlenhydratstrukturen liegen, müssen sie in aller Regel vor der Analytik entfernt werden. Hierfür hat sich folgende Vorgehensweise als geeignet erwiesen. Durch Zentrifugation durch eine Größenausschlussmembran (zum Beispiel Microcon YM-30 von Millipore) wer-

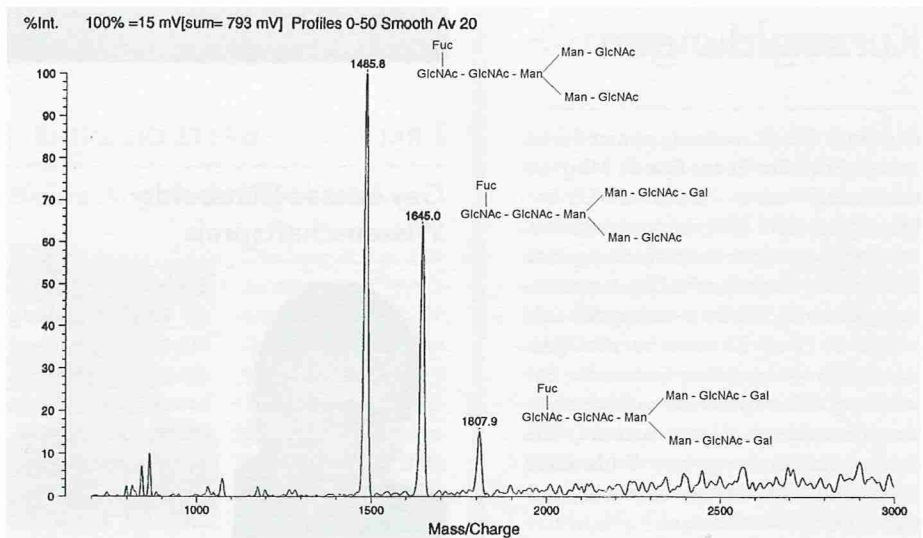


Abb. 2: Beispiel für die Identifikation einer Probe

den die auf der Membran verbleibenden Antikörper umgepuffert in PBS (50 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH = 7,5). Nach Zentrifugation der Probe und zweimaligem Waschen mit PBS werden die Rückstände in PBS aufgenommen.

Das nun noch in der Probe vorhandene Tween wird über eine spezielle Säule (zum Beispiel Extracti-Gel® D Detergent Removing Gel von PIERCE) entfernt. Nach dem Waschen der zuerst leergetropften Tween-Extraktionssäule mit 1 ml PBS wird die Probe aufgetragen und der heraustropfende Durchlauf gesammelt. Die Konzentration des Antikörpers in der tweenfreien Lösung sollte bei ca. 1 mg/ml liegen. Kontrolliert werden kann dies photometrisch durch Absorptionsmessung bei 280 nm in einem

UV-Spektrometer und bekanntem Extinktionskoeffizienten. Die Methode hierfür ist in der Regel etabliert. Anschließend kann die Probenvorbereitung direkt mit dem bereits zuvor beschriebenen enzymatischen Verdau mit N-Glycosidase F fortgesetzt werden.

Überschaubarer Aufwand

Mit der vorliegenden Methode ist es möglich, mit einem überschaubaren Aufwand eine Information über die an einem Antikörper vorhandenen Kohlenhydratstrukturen zu bekommen. Diese Prüfung kann neben anderen Methoden zur Identitätsbestimmung eingesetzt werden. ■

More Mileage

Get more mileage out of your microplate washer with the new AquaMax® series of microplate washers from MDS Analytical Technologies. With a unique modular design, the AquaMax systems configure easily to meet your current application requirements, and provide affordable upgrade options when your lab requirements change. The AquaMax 96- and 384-well wash heads are interchangeable and extend the capabilities of your washer within a single instrument platform.

More Flexibility

- ⊕ Configurable for 96- and 384-well microplate formats
- ⊕ Up to 4 fluid inlets for buffers and solutions allow multiple users without bottle changing
- ⊕ Automate microplate handling with Molecular Devices StakMax® or by integrating into a robotic workstation

More Reliability

- ⊕ Comprehensive, single-button, automated cleaning utilities
- ⊕ Washes all plate wells simultaneously
- ⊕ Stores up to 99 user-defined programs

Take the affordable, flexible path for your current and future microplate washing requirements with the new AquaMax series.

 **Molecular Devices**

tel. +44-118-944-8000 | www.moleculardevices.com

See us at
Analytica 2008
April 1-4, Hall 2, Stand 534,
Munich Germany

 **MDS**
Analytical Technologies