

遊離 N-グリカンの LC/FLD/MS 分析のために改善された 親水性相互作用液体クロマトグラフィー

著者

Randall Robinson, Tom Rice,
Anne Blackwell, Aled Jones,
and Oscar Potter
Agilent Technologies, Inc.

概要

グリコシル化はタンパク質の機能に直接影響を及ぼすため、生物製剤の重要品質特性（critical quality attribute, CQA）または製品品質特性として頻繁にモニタリングされます。グリカンプロファイルの一貫性は、生物製剤タンパク質の安定性、安全性、血清半減期が制御されていることを確認するのに役立ちます。したがって、確実にこれらの治療薬を成功させるためには、グリカンのプロファイリングのための堅牢な分析ツールとメソッドの存在が非常に重要です。遊離 N-グリカンは多くの場合に、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）を使用して分離されます。このアプリケーションノートでは、高性能のグリカン分離のために特別に開発された、新しい Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラムにより、複数のモノクローナル抗体の N-グリカンをプロファイリングしました。このカラムは、異なる電荷のグリカンの選択性を向上させるように設計されており、複雑なサンプルにおけるグリカン共溶出の発生を低減します。この研究では、この新しいカラムが、一般的な抗体由来のグリカンを始めとする広範なグリカン構造に対して、優れたピーク形状と分離能を実現することを示します。また、このカラムは、シアル酸含有糖類を含む幅広いグリカン混合物を 1 時間以内で完全にプロファイリングでき、異なる電荷のグリカンの分離性能を向上させつつ、市販されている他の主要なカラムに劣らない性能を提供します。

はじめに

N-結合型グリカンの構造がタンパク質の機能に強く影響を及ぼす可能性があるため、グリコシル化は生物製剤タンパク質の開発のための CQA とされることがよくあります。¹ N-グリカンの特性解析は一般的に、誘導体化タグによる N-グリカンの酵素遊離とラベリングに続き、LC/MS データ取得と解釈を用いて実施されます。² HILIC は N-グリカン分析に使用される主要なクロマトグラフィー手法であり、通常は蛍光または質量分析 (MS) による検出を組み合わせます。

HILIC 分離は N-グリカン分析によく用いられていますが、複雑な N-グリカンのプロファイリングを行う場合は、重要なグリカンペアの共溶出など、技術的な課題があります。特に、蛍光検出器 (FLD) を使用している場合、グリカン共溶出はグリカンの相対的な定量を妨げます。これは HILIC グラジエント時間を大幅に長くすることでのみ対処することができます。

これらを始めとする N-グリカンの HILIC 分離に伴う一般的な問題に対処するために、アジレントは、優れた荷電基選択性を備えた新しい HILIC 固定相の AdvanceBio アミド HILIC カラムを開発しました。このカラムは、HILIC 保持と荷電基オーバーラップの両方を別々に調整できるようにすることにより、メソッド開発の柔軟性を向上させ、グリカンピークの共溶出の発生を低減できます。このカラムは新しい Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液と同時に発売されました。これは、簡単な希釈操作で、すぐに使用可能な HILIC 移動相緩衝液を調製できます。

実験方法

N-グリカンのサンプル前処理

グリカンは、糖タンパク質セツキシマブ (Erbix, ロット番号 M160886)、Agilent-NISTmAb 参照標準 (部品番号 5191-5745、ロット番号 0006732507)、およびリツキシマブ (Rituxan, ロット番号 M120333) から遊離して、Agilent InstantPC 色素でラベル付けし、Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理キットおよび InstantPC キット (部品番号 GX96-IPC) を使用して分析前にクリーンアップしました。

装置

次のコンポーネントで構成される Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用してサンプルを分析しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプル (G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1260 蛍光検出器 (G7121B) とバイオイナート FLD フローセル (部品番号 G5615-60005)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549A)

LC システムに Agilent バイオ超低拡散キット (部品番号 5004-0007) を組み合わせました。Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラム (2.1 × 150 mm、1.8 μm、部品番号 859750-913) で LC 分離を行いました。Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム HILIC 移動相濃縮液 (部品番号 G3912-00000) を使用して、1 L の MS グレードの水に 1 本のボトルの濃縮液 (10 mL) を加えて移動相緩衝液を調製しました。FLD セル背圧を低減するために、T スプリッタを使用して、セル (廃液/MS) のすぐ下流で LC フローを分割しました。その他の関連メソッドパラメータを表 1 および表 2 に示します。

ソフトウェア

この調査で使用したソフトウェアは以下のとおりです。

- Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェア、バージョン 11.0
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン 10.0

表 1. Agilent InstantPC 標識遊離グリカン分析のための LC/FLD 条件

パラメータ	値			
カラム	Agilent AdvanceBio アミド HILIC、2.1 × 150 mm、1.8 μm (部品番号 859750-913)		他社アミドカラム、2.1 × 150 mm、1.7 μm	
カラム温度	60 °C			
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4、Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム HILIC 移動相濃縮液 (部品番号 G3912-00000) から調製 B) アセトニトリル			
流量	0.6 mL/分			
グラジエントプログラム	時間 (分)	%B	時間 (分)	%B
	0	77	0	73
	45	56	45	60
	46	40	46	40
	47	40	47	40
	49	77	49	73
60	77	60	73	
注入量	1 μL			
検出	λ _{ex} 285 nm、λ _{em} 345 nm			

表 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF パラメータ

パラメータ	値
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化
ドライガス温度	150 °C
ドライガス流量	9 L/分
ネブライザ	35 psi
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10 L/分
キャピラリ電圧	2,500 V
ノズル電圧	500 V
データ取り込みモード	2 GHz (拡張ダイナミックレンジ) 標準質量範囲 (m/z 3,200)

結果と考察

NISTmAb (ヒト化 IgG1 κ モノクローナル抗体) およびリツキシマブ (図 1) 由来のあまり複雑ではないグリカン混合物のプロファイリングにより、新しい HILIC 固定相が、G0F、Man5、G1[6]F、G1[3]F、G2F などの治療用抗体にとって最も一般的な N-グリカンを良好に分離することが実証されました。これらの中性グリカンは優れたピーク形状と分離能で、約 15 分で分離されました。以下に説明するように、より複雑なグリカンプロファイルのサンプルを含む、幅広いサンプルタイプに適合するように、LC グラジエントを開発しました。ただし、それほど複雑ではないサンプルのみを分析する場合は、勾配の大きいグラジエントを使用して分析時間を短縮しつつ、主要グリカン種を分離できます。表 1 のグラジエントでは、マイナーな NISTmAb グリカン種 (G2FGa2 および H5N3S1) の間で 1 つの共溶出が生じることが示されています。これはグラジエントの勾配を大きくすることで分離できます。

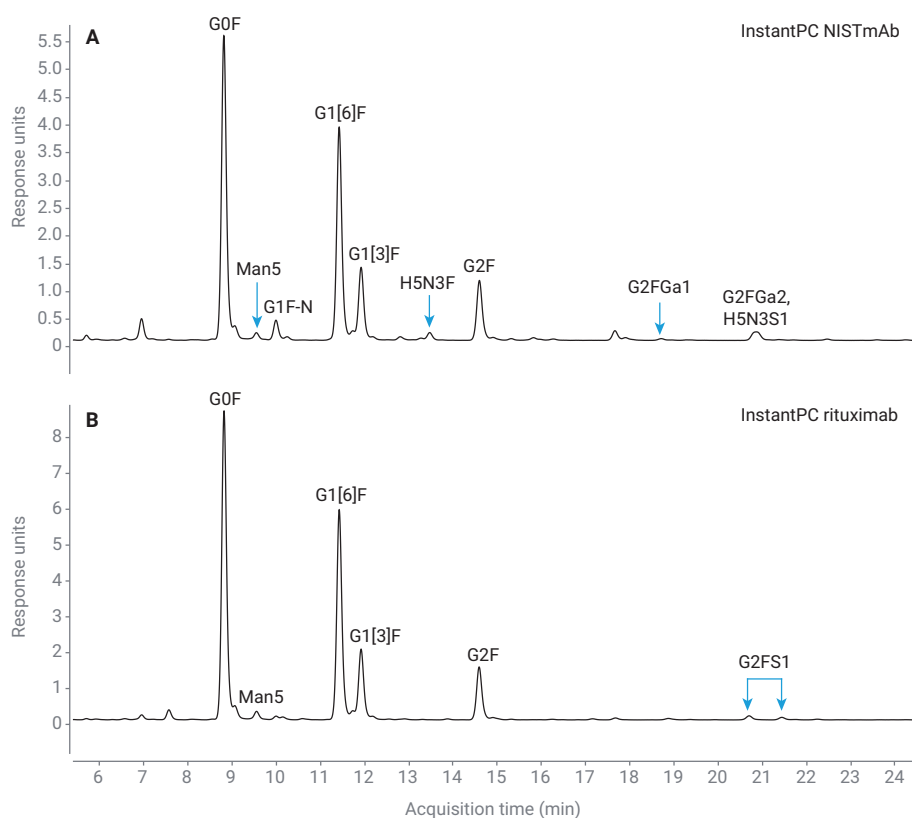


図 1. NISTmAb およびリツキシマブの InstantPC 標識 N-グリカンの LC/FLD クロマトグラム

複雑なグリカン混合物のプロファイリングでは、特に MS データがない場合に、近接して溶出するグリカンペアを一貫性して完全に分離することは困難な場合が多くなります。AdvanceBio アミド HILIC カラムは、異なる電荷をもつグリカンの中で優れた選択性を示し、これらの重要なグリカンペアを簡単に分離できます。さらに、従来の Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムライン（データは示していません）と比較し、ピーク形状とキャパシティが大幅に向上しています。図 2 に InstantPC 標識セツキシマブのクロマトグラフィープロファイルを示します。この抗体は、Fc および Fab 領域の両方に存在する

グリコシル化のために、N-グリコリルノイミン酸含有シアル酸含有糖類 (NeuGc または NGNA) や α 1,3 結合ガラクトース残留物含有二分岐および三分岐グリカンなど、多様なグリカンプロファイルを有しています。サンプルの複雑さに関わらず、蛍光検出のみで、40 分のリテンションタイムウィンドウ以内に、セツキシマブの包括的なグリカンプロファイルを取得できました (図 2A)。蛍光トレースには、慎重なモニタリングが必要とされることが多い非ヒト Gal α 1-3Gal および NeuGc エピトープを含むグリカンで、明確に分離された多数のピークが示されています。MS データを収集した場合、低アブダンスのグリカンのピー

ク領域は、抽出化合物のクロマトグラムにより計算できます (図 2B)。さらに、タンデム MS データにより、一般的でない/新しいグリカンピークの特徴解析に役立つ詳細な構造情報を取得できます。例えば、図 3 に示したグリカン FA2G2Ga2 の y_4 および $y_4\alpha$ フラグメントは、反対の/非断片化アンテナにおける Gal-Gal-GlcNAc 配列の説得力のある証拠を提供します。

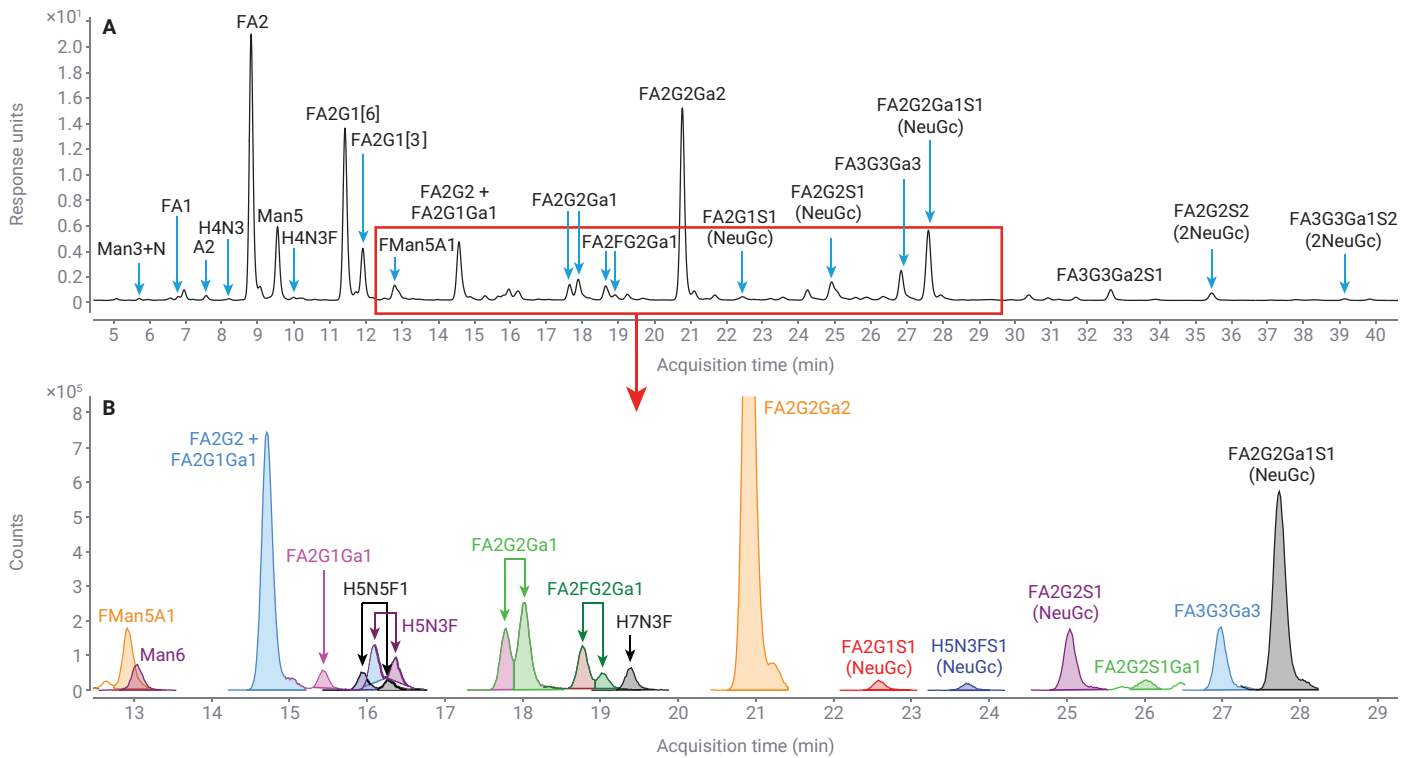


図 2. InstantPC 標識セツキシマブ N-グリカンの LC/FLD クロマトグラム (A)。MS データから生成された抽出化合物のクロマトグラムは、蛍光トレースに追加のグリカンピークが確認されないことを示しています (B)。

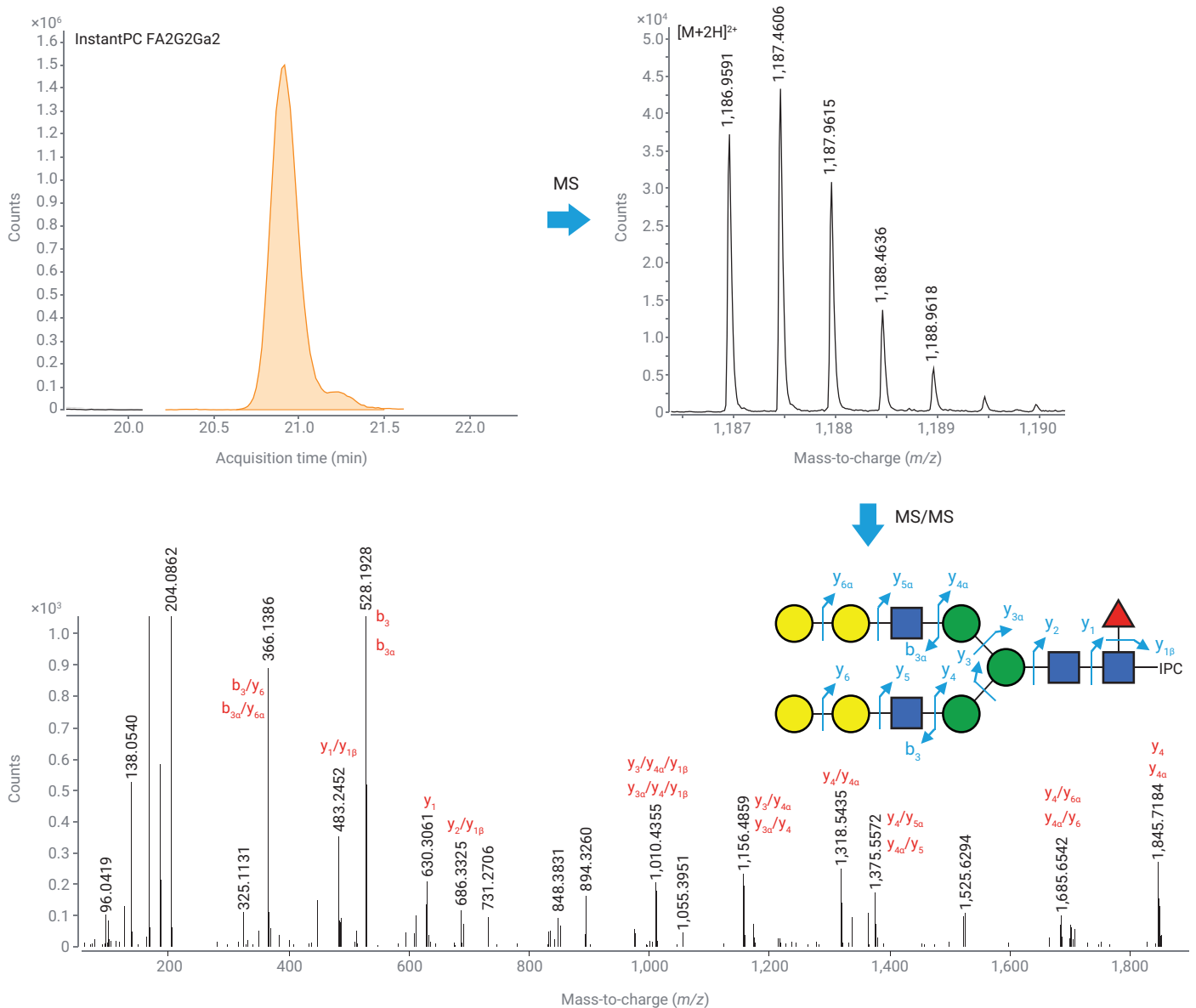


図 3. InstantPC FA2G2Ga2 の抽出化合物クロマトグラム、MS スキャン、MS/MS スキャン

異なる電荷のグリカンを分離する AdvanceBio アミド HILIC カラムの優れた性能の利点は、セツキシマブのクロマトグラフィープロファイルの直接比較において明確に示されています。図 4 の場合、グラジエントは、AdvanceBio アミド HILIC カラムで使用されるリテンションタイムウィンドウに厳密に適合する、他社アミドカラム (2.1 × 150 mm、1.7 μm) で開発しました。どちらのカ

ラムも同様の分離を示していますが、他社カラムでは中性および一価シアル酸含有糖類の間で 2 つのオーバーラップが生じています。MS 由来のクロマトグラムを使用している場合でも、FA2G2S1 (NeuGc) /FA2G2Ga2 ペアを区別するのは困難となる可能性があります。FA2G2S1 の $[M+H+NH_4]^{2+}$ イオンが FA2G2Ga2 の二重プロトン化付加体と 5 ppm しか異ならないからです。アンモニウム

付加体は一般的に主要種ではないものの、複数の荷電状態の付加体を対象とする自動化検索アルゴリズムによりグリカンが特定される場合に、このような類似性によってピーク領域の計算が複雑になる可能性があります。

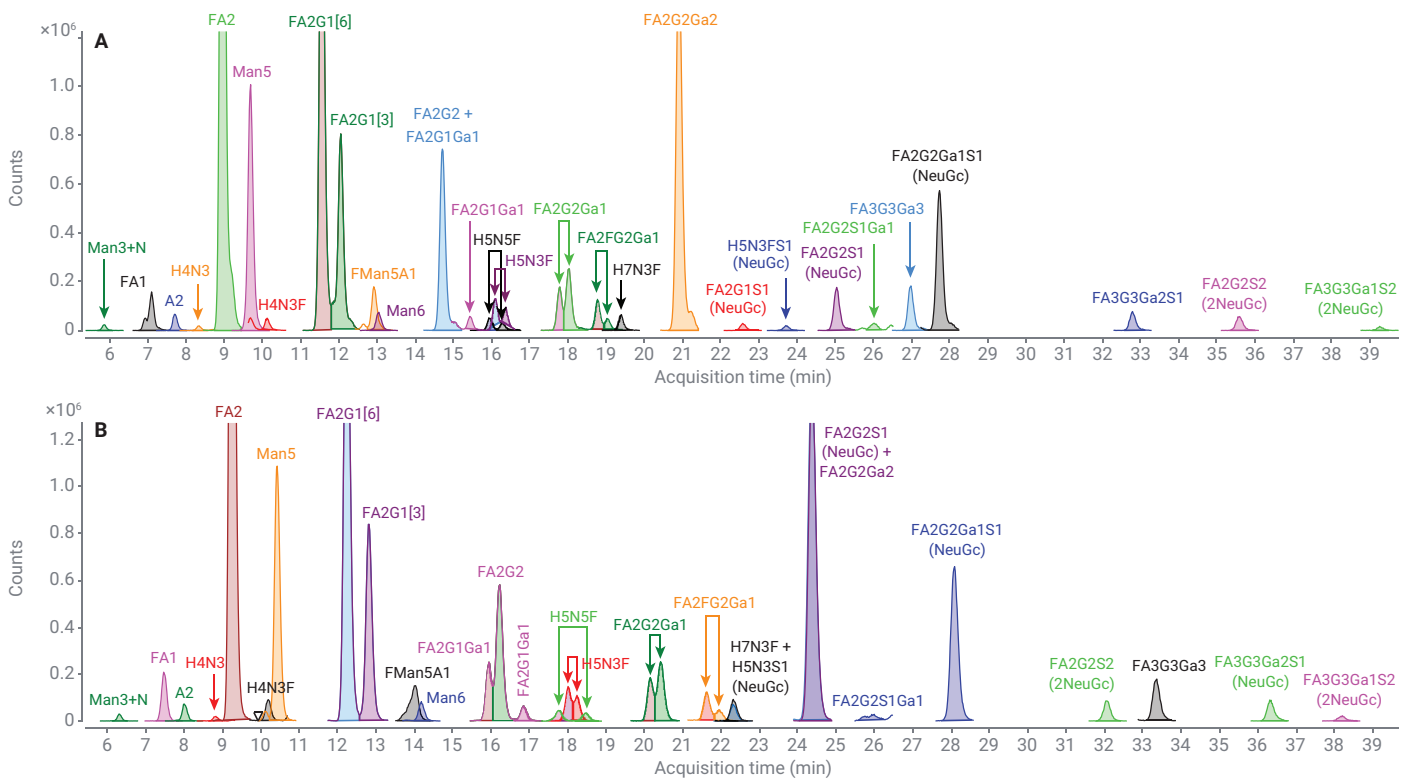


図 4. Agilent AdvanceBio アミド HILIC (A) および他社アミドカラム (B) での InstantPC セツキシマブの分離

結論

本アプリケーションノートで紹介した Agilent AdvanceBio アミド HILIC カラムは、シンプルな N-グリカンと複雑な N-グリカンの両方のプロファイルで高品質のグリカンデータを生成するパワフルなツールです。優れた荷電基選択性により、標識 N-グリカンの HILIC 分離によく見られる、最も厄介な共溶出を解消するこ

とが可能で、優れた温度安定性、耐久性、ピーク形状、再現性は、このカラムが、広範な生物製剤糖タンパク質サンプルからの N-グリカンの分離に取り組むユーザーにとって、有効な選択肢であることを示しています。Agilent AdvanceBio ギ酸アンモニウム移動相濃縮液を使用することにより、ばらつきが低減され、LC 分離のための前処理時間が短縮されます。

参考文献

1. Delobel, A. Glycosylation of Therapeutic Proteins: A Critical Quality Attribute BT - Mass Spectrometry of Glycoproteins: Methods and Protocols; Delobel, A., Ed.; Springer US: New York, NY, **2021**; pp 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_1.
2. Zhang, X.; Vimalraj, V.; Patel, M. Routine Analysis of N-Glycans Using Liquid Chromatography Coupled to Routine Mass Detection BT - Mass Spectrometry of Glycoproteins: Methods and Protocols; Delobel, A., Ed.; Springer US: New York, NY, **2021**; pp 205–219. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1241-5_15.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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おりません。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。

DE94744933

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, November 13, 2023

5994-6916JAJP