

# Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットによるモノクローナル 抗体 EG2-hFc およびリツキシマブの ハイスループット N-グリカンプロファイリング

## 著者

Yongjing Xie,  
Letícia Martins Mota, and  
Michael Butler  
National Institute for  
Bioprocessing Research  
& Training (NIBRT),  
Foster Avenue, Mount  
Merrion, Blackrock, Co.  
Dublin, Ireland

YashoNandini Singh and  
Aled Jones  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

タンパク質のグリコシル化は、治療用糖タンパク質の不均一性の主な原因の1つであり、安全性と効能に影響を与える可能性があるため、重要品質特性（CQA）と見なされています。望ましい製品品質を確保するには、治療薬のグリカンプロファイルの詳細な特性解析と定量を定期的に行う必要があります。しかし、グリコシル化によって治療薬が非常に複雑かつ不均一になるため、バイオ医薬品グリカンの特性解析と品質管理の進捗が大きく阻害される可能性があります。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットを用いた、ハイスループットかつ高感度のグリカンプロファイリングについて説明します。このキットを用いることで、さまざまな分子サイズの2種類のモノクローナル抗体（EG2-hFc とリツキシマブ）から InstantPC-ラベル化 N-グリカンの糖タンパク質の変性、脱グリコシル化、グリカン誘導体化、精製、検出を迅速に実行できます。グリカン前処理の手順全体を大幅に短縮して1時間未満で実行でき、蛍光検出の感度も向上します。したがって、このようなワークフローを使用すれば、サンプル前処理の信頼性と再現性が大幅に向上し、グリカンのプロファイリングと定量をハイスループットで実行できる可能性が非常に高くなります。また、ラボのあらゆる分析要件に容易に対応できます。

## はじめに

グリコシル化は、治療用タンパク質の最も一般的で複雑な翻訳後修飾の1つです。<sup>1-3</sup> バイオ医薬品のグリコシル化は、タンパク質の折り畳み、安定性、薬物動態、免疫原性、エフェクタ機能などの多くの特性を調節することで、これらの医薬品の安全性と効能において大きな役割を果たします。<sup>4,6</sup> このため、グリコシル化は治療用タンパク質のCQAと見なされることが多く<sup>7</sup>、一貫した望ましい製品品質を確保するには、治療薬のグリカンプロファイルの徹底的な特性解析と定量が必要です。しかし、哺乳類宿主の細胞株、細胞培地、バイオプロセス条件、ダウンストリーム精製戦略など、多くの要素がグリコシル化プロファイルに影響します。<sup>8-10</sup> その結果、グリコシル化によって医薬品が非常に複雑かつ不均一になり、単糖類の組成、グリコシド結合、グリカン分岐にばらつきが生じます。<sup>11</sup> このため、バイオ医薬品グリカンの特性解析と品質管理の進捗が大きく阻害されます。

グリカンのプロファイリングには、幅広い手法が開発されています。例えば高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、キャピラリー電気泳動 (CE)、質量分析 (MS)、核磁気共鳴 (NMR)、およびマイクロアレイに基づく技術などです。<sup>12</sup> ただし、親水性相互作用液体クロマトグラフィーと蛍光検出の組み合わせ (HILIC/FLD) は標準メソッド、すなわち 2-アミノベンズアミド (2-AB) による後誘導体化として使用されます。<sup>13</sup> グリカンプロファイリングの主な欠点は時間のかかるサンプル前処理です。これが再現性と感度の低下の原因となります。当社は以前に、ハイスループットで高感度なグリカンプロファイリング向けに、96ウェルプレートベースのプラットフォームを用いたワークフローを開発および効率化しました。このワークフローのアプリケーションとしては、バイオ医薬品の開発や疾病バイオマーカー探索などがあります。<sup>14</sup>

モノクローナル抗体 (mAb) は糖タンパク質ベースの医薬品の主要カテゴリに位置付けられています。<sup>15</sup> このアプリケーションノートでは、EG2-hFc とリツキシマブの mAb を用いて、この革新的なワークフローの実行可能性を示します。EG2-hFc はヒト化ラクダ科タイプの抗体です。軽鎖の欠損があり、分子サイズが約 80 kDa と小さいのが特徴です。EG2-hFc のターゲットは、通常は非小細胞肺癌 (NSCLC) で過剰発現する上皮成長因子受容体 (EGFR) です。<sup>16</sup> リツキシマブは世界初の腫瘍学関連のモノクローナル抗体治療法です。遺伝子工学的に、マウスの軽鎖/重鎖可変領域シーケンスとヒトの定常領域シーケンスが含まれます。分子サイズは約 145 kDa です。リツキシマブは CD20 抗原をターゲットとして、これに結合します。CD20 抗原は主に、正常および悪性の免疫システム B 細胞の表面に見られます。リツキシマブは通常、成人の非ホジキンリンパ腫 (NHL) や慢性リンパ性白血病 (CLL) の治療に使用されます。<sup>17,18</sup> このワークフローの「迅速な」糖タンパク質の脱グリコシル化と蛍光の誘導体化により、グリカンの前処理時間が 10 分未満と大幅に短縮されるとともに、高感度の蛍光検出が可能になります。したがって、この開発した堅牢なワークフローを使用すれば、ハイスループットのグリカンプロファイリングおよび mAb 定量用のサンプル前処理を高い信頼性と再現性で実行できる可能性が非常に高くなります。またこのワークフローは最小限の変更で、その他の糖タンパク質ベースの治療薬にも応用できます。

## 実験方法

### 試料調製

AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット、96 サンプル (GX96-IPC) は、次の 3 つのモジュールで構成されています。

- Gly-X 脱グリコシル化モジュール (GX96-100)
- Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (GX96-101)
- Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール (GX96-102)

Agilent AdvanceBio InstantPC マルトデキストリンラダー (GKPC-503)

前述のとおり、EG2-hFc とリツキシマブのモノクローナル抗体はチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から作製し、AKTA Avant システム (GE Healthcare) を用いてプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーで精製しました。<sup>14</sup> HPLC-グレードのアセトニトリルは Sigma から購入し、すべての前処理で Milli-Q 水を使用しました。一般的な化学物質はすべて Sigma-Aldrich から購入しました。

### サンプル前処理

#### 脱グリコシル化

モノクローナル抗体 (EG2-hFc とリツキシマブ) の溶媒中の酵素の脱グリコシル化は、AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット (GX96-IPC) の手順に従って実行しました。

1. モノクローナル抗体 (EG2-hFc とリツキシマブ) (40 µg) を 50 mM の 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニルエタンスルホン酸 (HEPES) バッファ (pH 8.0) で希釈し、最終量を 20 µL にします。
2. 2 µL の Gly-X 変性剤を 20 µL の EG2-hFc とリツキシマブの溶液に添加し、十分に混ぜます。
3. 90 °C で 3 分間インキュベートし、室温で 2 分間置きます。

- 2  $\mu\text{L}$  の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を添加し、十分に混ぜます。
- 50  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間インキュベートします。

### InstantPC による蛍光誘導体化

- InstantPC 色素のバイアル 1 本を付属の 150  $\mu\text{L}$  の溶媒で溶解させて InstantPC 色素溶液を前処理し、十分に混ぜます。
- 5  $\mu\text{L}$  の InstantPC 色素溶液を上記の前処理済みサンプルに添加し、十分に混ぜます。
- 50  $^{\circ}\text{C}$  で 1 分間インキュベートします。

### InstantPC-ラベル化グリカン精製

- 150  $\mu\text{L}$  のロード/洗浄溶液 (2.5 % のギ酸/97.5 % のアセトニトリル) を各サンプルに添加します。
- 400  $\mu\text{L}$  のロード/洗浄溶液を含む Gly-X クリーンアッププレートの各ウェルに、サンプル全体 (179  $\mu\text{L}$ ) を移します。
- 真空圧を利用してクリーンアッププレートに溶液を通してから、600  $\mu\text{L}$  のロード/洗浄溶液でサンプルを 3 回洗浄します。

- InstantPC-ラベル化 N-グリカンを、100  $\mu\text{L}$  の Gly-X InstantPC 溶出液 (160 mM のギ酸アンモニウム/10 % (v/v) のアセトニトリル、pH 4.4) で溶出させます。
- 収集した N-グリカン溶液を、処理せずすぐに分析します。または今後の分析用に -20  $^{\circ}\text{C}$  で保管します。

### InstantPC-ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD 分析

EG2-hFc とリツキシマブからの InstantPC-ラベル化 N-グリカンのプロファイルは、HILIC/FLD で測定しました。この測定には Agilent 1260 Infinity システムと Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (120  $\text{\AA}$ 、2.1  $\times$  150 mm、2.7  $\mu\text{m}$  (部品番号 683775-913))、および Agilent OpenLab ChemStation ソフトウェアを使用しました。システムはクォータナリ溶媒ポンプ、オートサンプラ、蛍光検出器で構成しました。検出器は InstantPC 向けに、励起波長 285 nm、発光波長 345 nm で設定しました。InstantPC-ラベル化グリカンサンプルは、1  $\mu\text{L}$  の量を注入前の追加処理なしで注入しました。N-グリカンは 50 mM のギ酸アンモニウム (pH 4.4) を溶媒 A として、アセトニトリル

を溶媒 B として用いて分離しました。HPLC システムは、溶媒 A と溶媒 B (27/73, v/v) を用いて 1.5 分間、0.5 mL/min の流量で平衡化しました。その後、73 ~ 62 % の溶媒 B (v/v) の直線グラジエントを用いて、分離を 30 分間実行しました。サンプルは注入前に 5  $^{\circ}\text{C}$  で保管し、カラム温度は 60  $^{\circ}\text{C}$  に設定しました。システムは AdvanceBio InstantPC マルトデキストリンラダー (GKPC-503) を用いてキャリブレーションしました。グルコース単位 (GU) の値とリテンションタイム T (分) のデータを位数 5 の多項式曲線に適合させて、検量線を取得しました。

## 結果と考察

### AdvanceBio Gly-X 技術による高速グリカン前処理

図 1 のとおり、この研究では AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットおよび InstantPC キットを使用することで、96 ウェルプレートフォーマットのワークフローで N-グリカンサンプルを効率的に前処理できました。このキットでは、糖タンパク質を 90  $^{\circ}\text{C}$  で 3 分間変性させた後に、50  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間脱グリコシル化させます。これで、ターゲット糖タンパク質

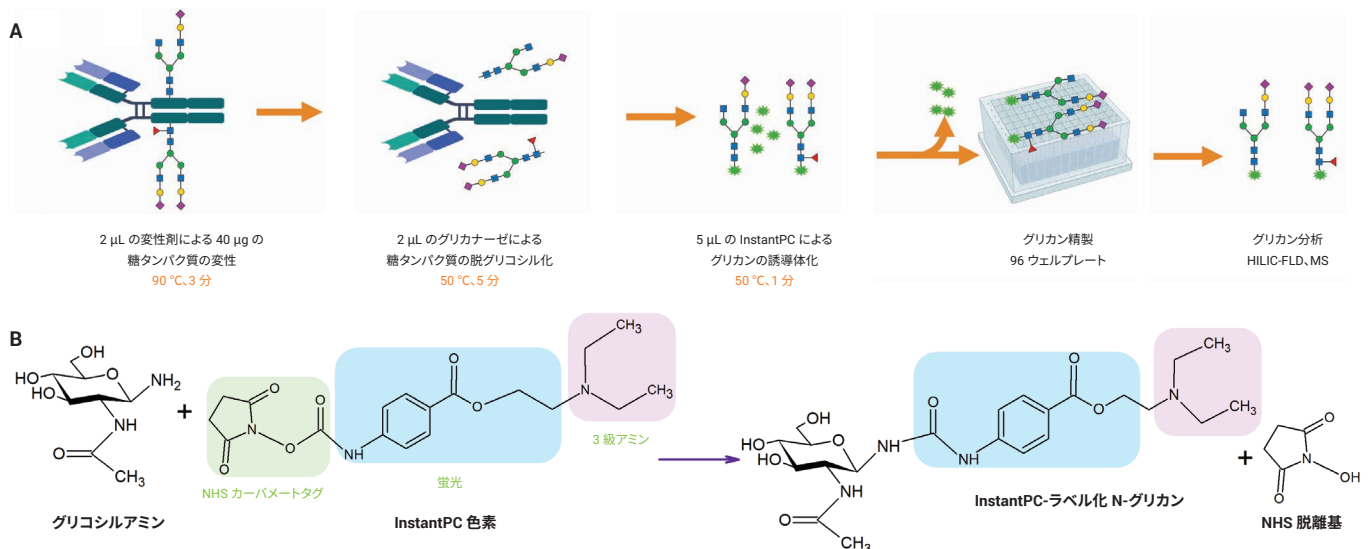


図 1. Agilent AdvanceBio Gly-X 技術によるグリコシルアミン遊離と InstantPC 誘導体化。(A) 溶液中の糖タンパク質の脱グリコシル化、InstantPC 誘導体化、オンマトリックスクリーンアップのワークフロー (B) 遊離グリコシルアミンの活性化カーバメートケミストリベースの InstantPC 誘導体化のための反応スキーム

からグリカン効率かつ完全に遊離できます。また、InstantPC 蛍光ラベルの導入により、活性化したプロカイン、遊離グリコシルアミンの中間体が、活性化したカーバメートケミストリを介して InstantPC と結合し、安定した尿素結合を形成します。この革新的なワークフローを利用することで、グリカンの前処理からプロファイリングまでをわずか 1 時間で完了し、グリカンの包括的な定性/定量分析を実行できます。

### HILIC/FLD によるモノクローナル抗体の InstantPC-ラベル化グリカンプロファイリング

モデル糖タンパク質として、EG2-hFc とリツキシマブのモノクローナル抗体を選択しました。これらの遊離グリコシルアミンの中間体を、HILIC/FLD による定性/定量分析用に InstantPC でラベル化しました。開発したクロマトグラフィー条件（表 1）において、EG2-hFc とリツキシマブからの InstantPC-ラベル化 N-グリカンはいずれも、すべての主要な N-グリカン種のピークが良好に分離されました（図 2 と図 3）。グリカンプロファイリング用に開発したこの HILIC/FLD メソッドは、再現性に優れています（データは示していません）。

図 2A のとおり、CHO 細胞から作製した mAb では、EG2-hFc のグリカンプロファイルが典型的です。これらのプロファイルは主に中性の二分岐の複雑な N-グリカンとコアフコシル化、および比較的低い割合のシアル化 N-グリカンで構成されており、GlcNAc-バイセクト型のグリカンは含まれません。図 2B と表 2 のとおり、グリカンを存在量が多い順に並べると、FA2G2 (33.138 %)、FA2G1 (27.200 %)、FA2G2S1 (14.324 %)、FA2 (9.878 %)、FA2G2S2 (9.249 %) となります。また図 3A では、リツキシマブも EG2-hFc と同様に、CHO 細胞から作製された mAb の一般的な N-グリカンプロファイルを持っています。ただし、各 N-グリカンピークの相対アブundanceには大きな差異が見られました。図 3B と表 2 のとおり、グリカンを存在量が多い順に並べると、FA2 (40.208 %)、FA2G1 (35.672 %)、FA2G2 (10.734 %) となります。低濃度

表 1. InstantPC ラベル化 N-グリカンのプロファイリング用の HILIC/FLD 条件

パラメータ	設定値																																
機器	Agilent 1260 Infinity II LC システム																																
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム、120 Å、2.1 × 150 mm、2.7 μm (p/n 683775-913)																																
カラム温度	60 °C																																
移動相	A) 50 mM のギ酸アンモニウム (pH 4.4) B) アセトニトリル																																
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> <th>流量 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>27</td> <td>73</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>1.5</td> <td>27</td> <td>73</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>31.5</td> <td>38</td> <td>62</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>70</td> <td>30</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>34</td> <td>27</td> <td>73</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>27</td> <td>73</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>27</td> <td>73</td> <td>0.5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A (%)	B (%)	流量 (mL/min)	0	27	73	0.5	1.5	27	73	0.5	31.5	38	62	0.5	33	70	30	0.4	34	27	73	0.25	35	27	73	0.5	50	27	73	0.5
時間 (分)	A (%)	B (%)	流量 (mL/min)																														
0	27	73	0.5																														
1.5	27	73	0.5																														
31.5	38	62	0.5																														
33	70	30	0.4																														
34	27	73	0.25																														
35	27	73	0.5																														
50	27	73	0.5																														
注入量	1 μL (0.4 μg の糖タンパク質からのグリカンと同等)																																
検出	Agilent 1260 Infinity II LC システム FLD λ <sub>ex</sub> 285 nm および λ <sub>em</sub> 345 nm																																

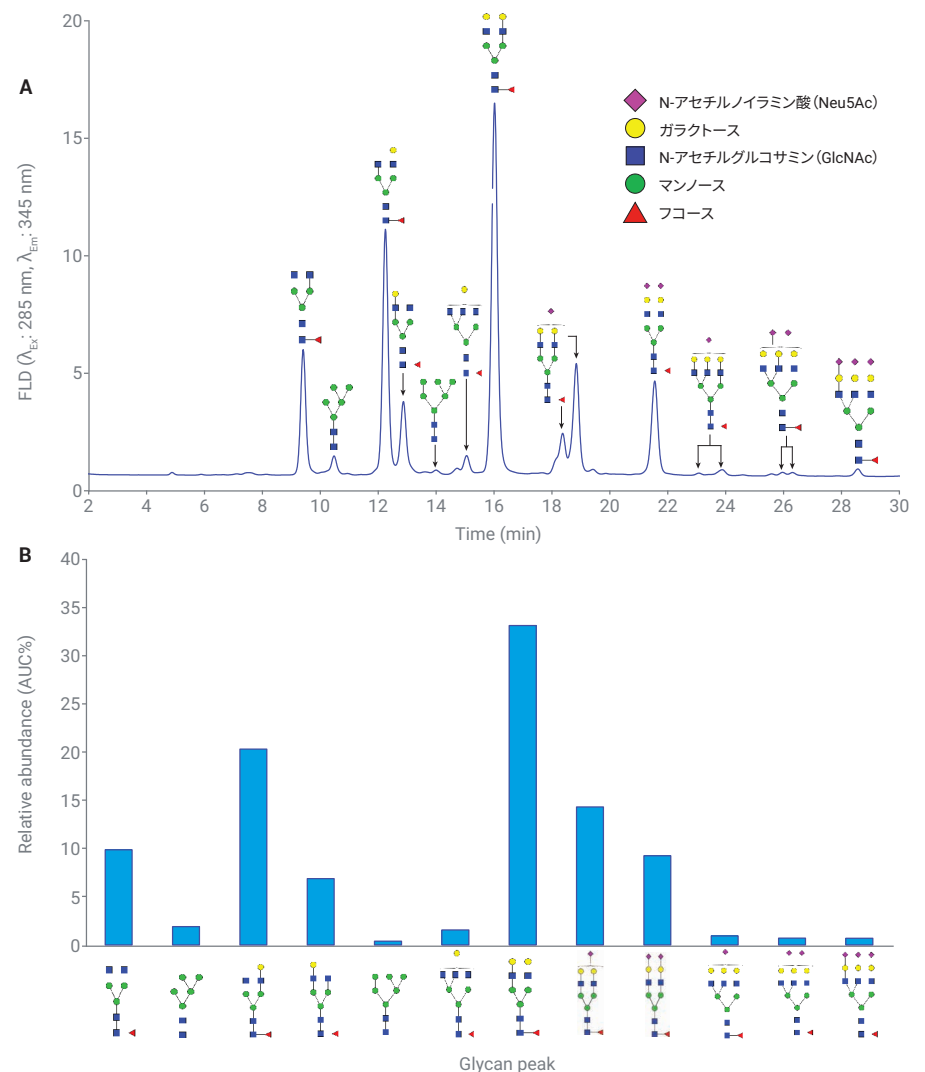


図 2. (A) EG2-hFc からの InstantPC-ラベル化 N-グリカンの HILIC/FLD クロマトグラム。  
(B) 各 N-グリカン種の相対アブundance

の高マンノースグリカン種も検出されました。内訳は M5 (6.173 %)、M6 (0.941 %)、M7 (0.440 %) です。シアル化グリカン種については相対アブundanceはごくわずかであり、FA2G2S1 (1.757 %)、FA2G2S2 (0.828 %)、FA1G1S1 (0.431 %) という結果でした。検量線下の平均面積 (%AUC) 値は、InstantPC でラベル化し、Agilent LC/FLD/MS 機器で分析したリツキシマブの N-グリカンで取得した値と一致しました。<sup>19</sup> ただし、M5 種のアブundanceは通常より大きくなりました。これは内製の CHO 細胞でのリツキシマブの発現が原因であった可能性があります。この結果、低アブundanceで存在するグリカン種の間で、バッチ間の差異が見られました。<sup>20</sup>

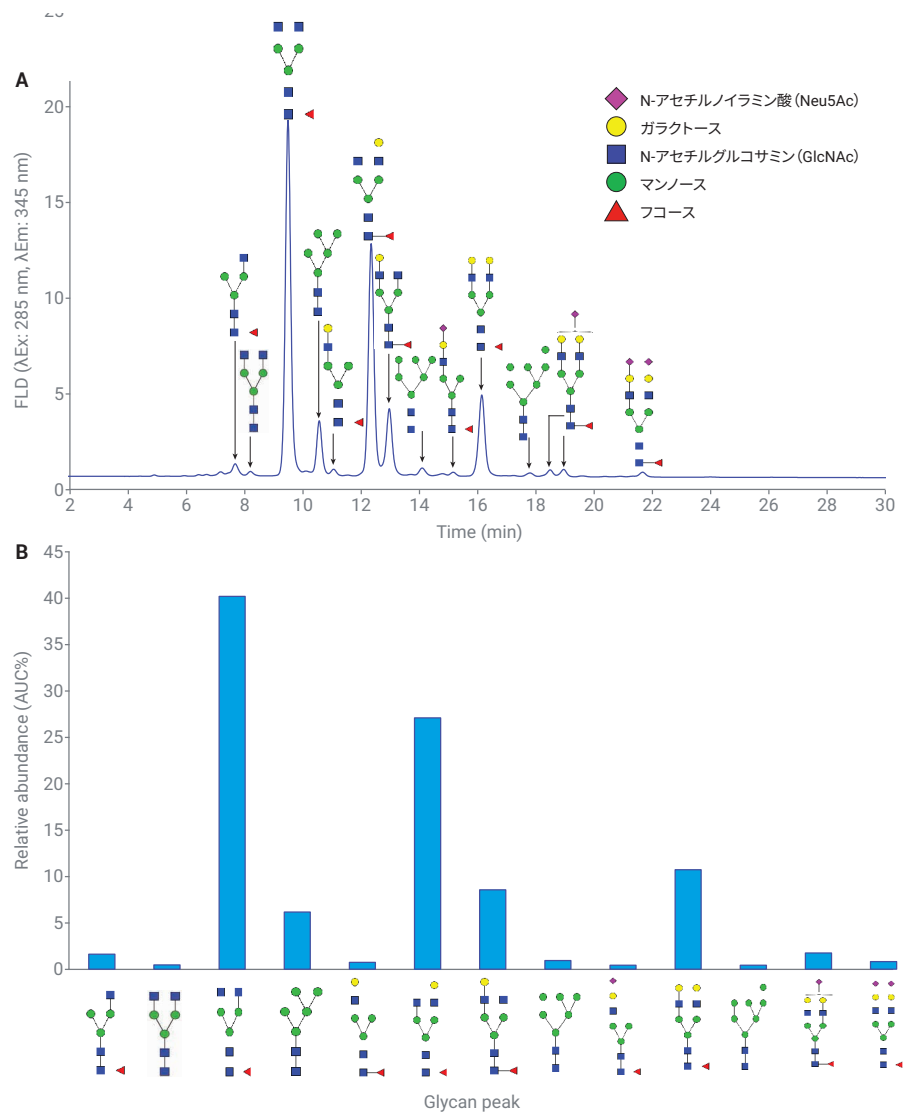
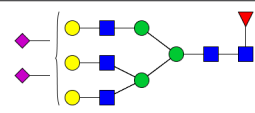
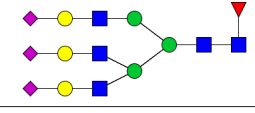


図 3. (A) リツキシマブからの InstantPC-ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD クロマトグラム。  
(B) 各 N-グリカン種の相対アブundance

表 2. InstantPC でラベル化した EG2-hFc とリツキシマブの N-グリカンプロファイリングのモノクローナル抗体

オックスフォード 表記法名	N-グリカン構造	GU	EG2-hFc		リツキシマブ	
			AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
FA1[6]		5.202	-	-	9.848	1.616
A2		5.425	-	-	2.839	0.465
FA2		5.922	71.368	9.878	244.882	40.208
M5		6.320	13.735	1.901	37.594	6.173
FA1[3]G1		6.515	-	-	4.487	0.737
FA2[6]G1		6.942	146.760	20.313	165.128	27.113
FA2[3]G1		7.152	49.752	6.886	52.128	8.559
M6		7.526	2.885	0.399	5.730	0.941
FA3G1		7.859	11.298	1.563	-	-
FA1[3]G1S1		7.891	-	-	2.625	0.431
FA2G2		8.194	239.420	33.138	65.368	10.734
M7		8.754	-	-	2.679	0.440
FA2G2S1		8.968 9.124	103.495	14.324	10.699	1.757
FA2G2S2		10.048	66.820	9.249	5.042	0.828
FA3G3S1		10.564 10.846	6.799	0.941	-	-

オックスフォード 表記法名	N-グリカン構造	GU	EG2-hFc		リツキシマブ	
			AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
FA3G3S2		11.594 11.720	5.124	0.709	-	-
FA3G3S3		12.553	5.045	0.698	-	-

- InstantPC-ラベル化マルトデキストリンラダーの検量線：  

$$GU = 0.007522 + 1.037T - 0.06697T^2 + 0.003039T^3 - 0.00006653T^4 + 0.0000005791T^5$$
- 各 N-グリカンの相対アバンドスは、次の式で計算：  

$$FLR\ AUC(\%) = FLR\ AUC_{グリカン} / \sum(FLR\ AUC_{グリカン}) \times 100$$
- グルコース単位 (GU)、検量線下の面積 (AUC)、相対アバンドス (AUC%) は、各種測定を平均化して計算
- 「-」は非検出

## 結論

タンパク質のグリコシル化は、治療用糖タンパク質の安全性と効能において非常に重要な役割を果たしており、重要品質特性と見なされています。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットを用いることで、生物製剤グリカンプロファイリング用のグリカン前処理をハイスループットで実行でき、プロセス全体を 1 時間以内に完了できることを示しました。InstantPC は、グリコシルアミンの中間体を「迅速 (instant) に」高い FLD 感度でラベル化できる革新的な蛍光色素です。また、開発した HILIC/FLD メソッドでは、モノクローナル抗体 (EG2-hFc およびリツキシマブ) からの InstantPC-ラベル化 N-グリカンを明確なピークに分離できました。さらに、効率的な 96 ウェルプレートフォーマットでグリカンサンプルを前処理することで、高い信頼性、堅牢性、再現性を得られます。

## 参考文献

- Bairoch, A.; Apweiler, R. The SWISS-PROT Protein Sequence Database and Its Supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 45–8.
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the Frequency of Protein Glycosylation, as Deduced from Analysis of the SWISS-PROT Database. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4–8.
- Khoury, G.A.; Baliban, R.C.; Floudas, C.A. Proteome-Wide Post-Translational Modification Statistics: Frequency Analysis and Curation of the Swiss-Prot Database. *Sci. Rep.* **2011**, *1*.
- Zhou, Q.; Qiu, H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *J. Pharma. Sci.* **2019**, *108*, 1366–1377.
- Wada, R.; Matsui, M.; Kawasaki, N. Influence of N-Glycosylation on Effector Functions and Thermal Stability of Glycoengineered IgG1 Monoclonal Antibody with Homogeneous Glycoforms. *MAbs* **2019**, *11*, 350–372.
- Higel, F. *et al.* N-glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc Fusion Proteins. *Eur. J. Pharma. Biopharm.* **2016**, *100*, 94–100.
- Delobel, A. Glycosylation of Therapeutic Proteins: A Critical Quality Attribute. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2271*, 1–21.
- Goh, J.B.; Ng, S.K. Impact of Host Cell Line Choice on Glycan Profile. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, *38*, 851–867.
- Hossler, P.; Khattak, S.F.; Li, Z.J. Optimal and Consistent Protein Glycosylation in Mammalian Cell Culture. *Glycobiology* **2009**, *19*, 936–49.

10. Zhang, P. *et al.* Challenges of Glycosylation Analysis and Control: an Integrated Approach to Producing Optimal and Consistent Therapeutic Drugs. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 740–65.
11. Seeberger, P. H. Monosaccharide Diversity. in *Essentials of Glycobiology* (eds. rd *et al.*) 19–30 (Cold Spring Harbor (NY), 2015).
12. Everest-Dass, A. V. *et al.* Human Disease Glycomics: Technology Advances Enabling Protein Glycosylation Analysis - Part 1. *Expert Rev. Proteomics* **2018**, *15*, 165–182.
13. Melmer, M. *et al.* HILIC Analysis of Fluorescence-Labeled N-Glycans From Recombinant Biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 905–14.
14. Xie, Y. *et al.* High-throughput and High-Sensitivity N-Glycan Profiling: a Platform for Biopharmaceutical Development and Disease Biomarker Discovery. *Anal. Biochem.* **2021**, *623*, 114205.
15. Castelli, M. S.; McGonigle, P.; Hornby, P. J. The Pharmacology and Therapeutic Applications of Monoclonal Antibodies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00535.
16. Bell, A. *et al.* Differential Tumor-Targeting Abilities of Three Single-Domain Antibody Formats. *Cancer Lett.* **2010**, *289*, 81–90.
17. Pierpont, T. M.; Limper, C. B.; Richards, K. L. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 163.
18. Smith, M. R. Rituximab (Monoclonal Anti-CD20 Antibody): Mechanisms of Action and Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7359–68.
19. Yan, J. *et al.* Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPCおよび 2-AB Express サンプル前処理とLC/FLD/MS を用いた生物製剤のN-グリカン分析の効率的なワークフロー . *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348JAJ, **2019**.
20. Liao, B. A Comparative Study of the Intact Mass, Subunit Mass, and Released Glycans of Two Rituximab Biosimilars Using High-Resolution LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1653EN, **2020**.

ホームページ

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

カスタマコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

RA44495.5528240741

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, January 24, 2022

5994-4350JAJ