

モノクローナル抗体の N-結合型グリカンの 高速全自動分析を実現する Agilent mAb-Glyco chip キット

技術概要

Lukas Trojer
Kirill Gromadski
Stephan Buckenmaier
Agilent Technologies
Waldbronn, Germany

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、さまざまな新しい生物学的物質のなかでも重要な物質で、さまざまな疾患の治療に関して、およそ 30 の抗体医薬品が認可されています¹。これらの糖タンパク質薬剤は、構造のなかに複雑なオリゴ糖部分を含み、その存在の有無や種類は、薬効や薬物動態、免疫原性、折り畳み特性、安定性に大きな影響を与えることが知られています。グリコシル化は、mAb を発現する細胞株や、培地の pH や温度といった特定の発現条件など、多くの要因による影響を受けます。そのため、グリカンの分析は、治療用 mAb 開発のさまざまな段階できわめて重要となります。

従来の PNGase F ベースの N-グリカン分析には、脱グリコシル化、加水分解、グリカンの誘導体化、グリカン分析、データ解析といった手順が含まれ、完了までに通常 1 日半から 2 日の時間がかかります。それに対して、N-結合型グリカン分析用に設計された Agilent mAb-Glyco chip キット (G4240-64020) を使えば、自動ワークフローソリューションにより、10~30 分で結果を得られます。分析者がするべき作業は、mAb サンプルを希釈し、遠心分離にかけて Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムで分析するだけです。mAb の脱グリコシル化、グリカン分離、質量分析計へのサンプルの直接導入は、チップ上でおこなわれます。データ処理は包括的で、きわめて短い操作時間で実行できます。通常は、1 サンプルあたり 5 分未満で完了するので、分析結果を迅速に得ることができます。このように、Agilent mAb-Glyco chip は、生物学的医薬品の開発段階における大きな問題点を解消します。

この技術概要では、次のことを説明します。

- Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムの機器設定
- Agilent mAb-Glyco chip キットのデザイン
- 全自動 N-グリカン分析とデータ処理のワークフロー
- Agilent mAb-Glyco chip の安定性、再現性、耐久性に関するデータ



Agilent Technologies

機器設定

ここで説明するすべての分析は、Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムを用いておこなわれました。システム構成は、サンプルサーモスタット (G1330B) 搭載マイクロウェルプレートオートサンプラ (G1377A)、キャピラリーポンプ (G1376A)、ミクロデガッサ (G1379B) 搭載ナノフローポンプ (G2225A) とキャピラリーポンプ (G1376A)、LC モジュールと質量分析計をつなぐ Chip-Cube (G4240A) です。HPLC グレードの H₂O [0.1 % FA] と ACN [0.1 % FA] を、ナノフローポンプの移動相 A および B として使用しました。キャピラリーポンプ (サンプルローディング) については、チャンネル A に脱グリコシル化バッファ (G4240-64023) を用いてアイソクラティックモードで使用しました。質量分析計は、Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF (G6520B) を使用しました。内部質量較正には、API-TOF 参照質量ソリューションキット (G1969-85001) の m/z 922.0098 を使用しました。チップの堅牢性を確保し、寿命を長くするために、mAb-Glyco chip の使用に先立ち、mAb-Glyco chip 対応キット (G4240-64025) を設置する必要があります。データ採取および解析には、MassHunter Workstation を使用しました (LC/MS Data Acquisition (B 02.01) および Qualitative Analysis (B 03.01) ソフトウェア)。

Agilent mAb-Glyco chip キット

このキットは、mAb-Glyco chip、試薬パック、mAb-Glyco chip コンテンツディスク、クイックスタートガイドで構成されています。試薬パックには、チップの使用に必要なすべての試薬が含まれています。含まれる試薬は、フローパス不活性化およびキャリアオーバー防止用のシステム

コンディショニング試薬、クロマトグラフィ確認およびメソッド開発用のグリカン標準、機能確認およびトラブルシューティングのための標準抗体、サンプルの希釈およびチップの酵素リアクターへの mAb サンプルのローディングのための脱グリコシル化バッファです。コンテンツディスクには、グリカン精密質量および構造データベースなどの分析を簡単にするためのツールや、レポート作成テンプレートなど、HPLC-Chip/MS 分析およびデータ解析用に最適化されたメソッドが収録されています。詳細については、mAb-Glyco chip ユーザーガイドをご覧ください²。

Agilent mAb-Glyco chip レイアウト

図 1 は、mAb-Glyco chip の構造を示しています。チップには、次の要素が統合されています：(a) 固定化 PNGase F ビーズを充てんした 310-nL 酵素リアクター (ER)、(b) 160-nL 多孔性グラファイトカーボン濃縮カラム (PGC-EC)、(c) 43-mm PGC 分析カラム (PGC-SC)、分析対象物を質量分析計に直接送るためのナノエレクトロスプレーチップ (図には示さず)。mAb-Glyco chip では、Chip-Cube の同心ローターインローターバルブ設計が使われています³。これにより、酵素リアクターと PGC 濃縮カラムを個別に切り替え、キャピラリーポンプのフローパスにつなげたり切り離したりすることが可能になっています表 1 に可能なすべてのチップバルブポジションをまとめます。

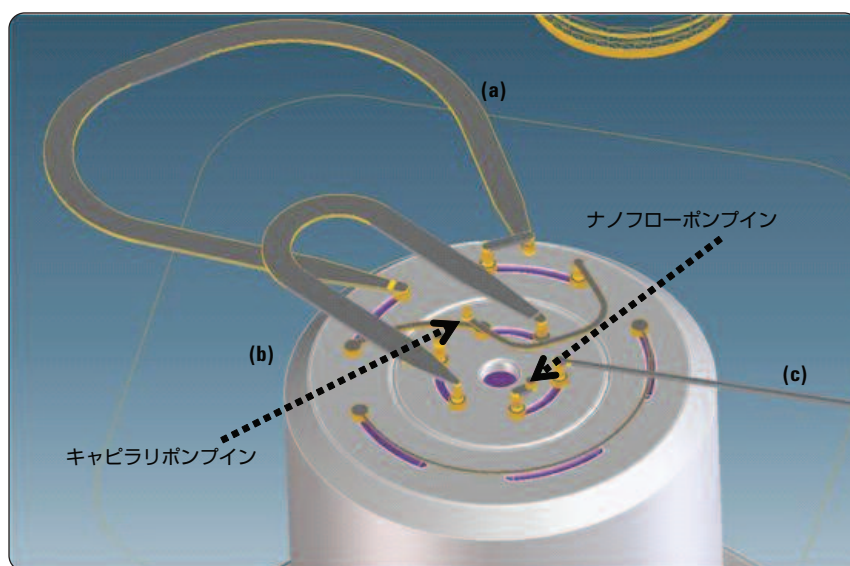


図 1 mAb-Glyco chip のローターインローターバルブとチップ設計：(a) 酵素リアクター (ER)、(b) グリカン濃縮カラム (PGC-EC)、(c) グリカン分析カラム (PGC-SC)

インナーローター (IR)	アウターローター (OR)	カラムナノフローポンプ	カラムキャピラリーポンプ
濃縮	インライン	PGC-SC	ER / PGC-EC
濃縮	バイパス	PGC-SC	PGC-EC
分析	インライン	PGC-EC / PGC-SC	ER
分析	バイパス	PGC-EC / PGC-SC	なし

表 1 Agilent mAb-Glyco chip で可能なローターバルブ切り替えポジション

オンチップワークフローの 説明

1) データ採取

図 2 は、5 つの自動ステップからなるオンチップワークフローを示しています。

1. **サンプル注入** (図 2A) : アウターローターはバイパスに、インナーローターは分析に設定されています。キャピラリーポンプにより、酵素リアクターボリュームのおよそ 10 倍の抗体サンプルを注入し、チップにロードします。図 2A では、フローパスにローディングされているカラムがない点に注目してください。サンプル注入は、この後の酵素リアクターへのサンプル導入に備えて、単にサンプルを適切な位置へ移動させるための手順です。

2. **酵素リアクターへのサンプル導入** (図 2B) : アウターローターが一定時間、インラインポジションに切り替わります。この時間の長さは、キャピラリーポンプ流速と酵素リアクターボリュームに応じています。この手順で、ループ注入によりサンプルがオンチップワークフローに導入されます。時間設定されたアウターローターバルブの切り替えにより、酵素リアクターが注入プラグの中心からサンプル断片を切り取ります。

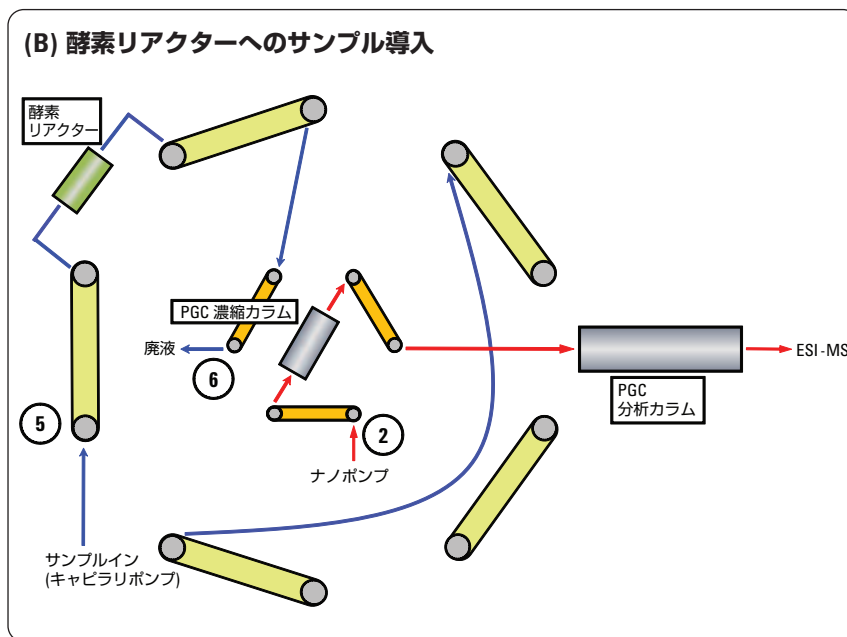
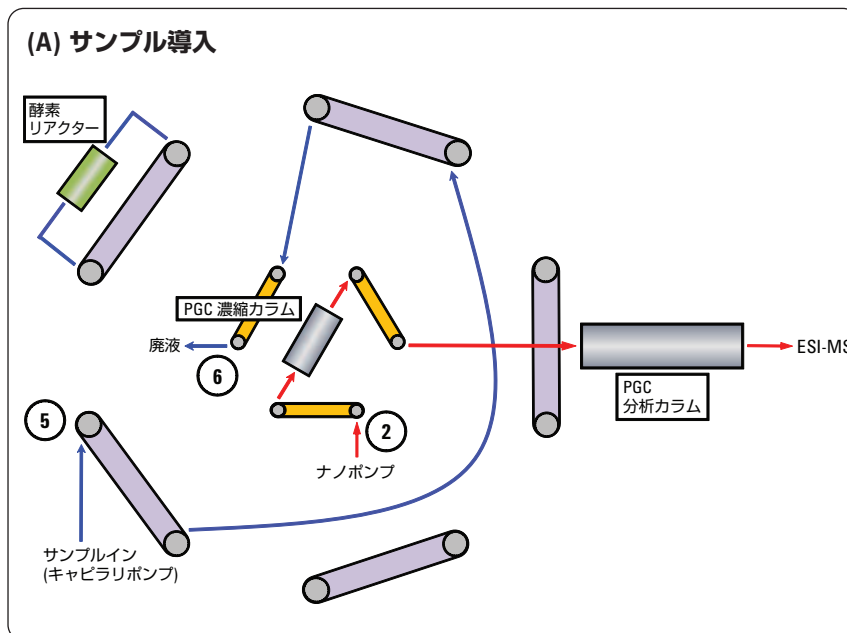


図 2
自動オンチップ mAbs 脱グリコシル化と、その後のオンチップ濃縮、分離、N-グリカン断片の MS 検出における mAb-Glyco chip のバルブ切り替え図。mAb-Glyco chip をバックフラッシュモードで使用する必要がある点に注意してください (詳細は参考文献 2 を参照) (続く)

3. **脱グリコシル化** (図 2C): アウターローターがバイパスポジションに戻ります。ユーザーの定義した一定時間、酵素リアクター内のサンプルが PNGase F 酵素と反応します。その間、キャピラリポンプがシステムをフラッシングします。
4. **グリカン移動** (図 2D): インナーローターとアウターローターの両方が同時に切り替わり、酵素リアクターと PGC 濃縮カラムをキャピラリポンプフローパスにつなげます。N-グリカン断片が酵素リアクターから PGC 濃縮カラムへ移動し、そこで保持されます。

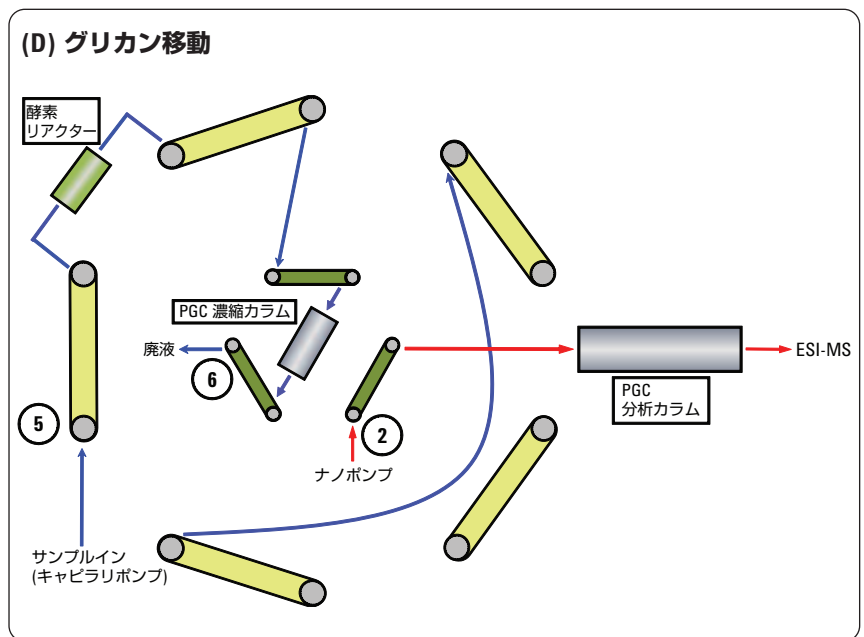
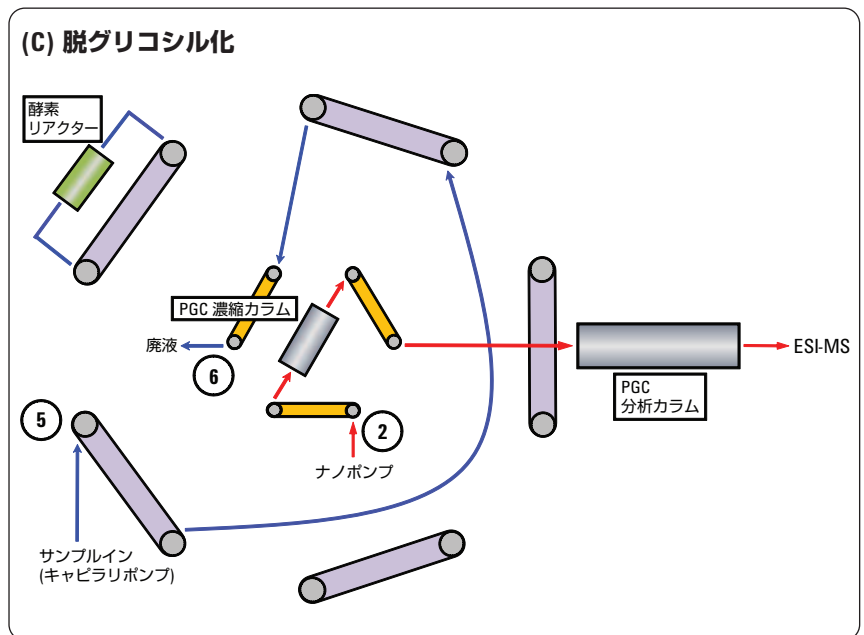


図 2
自動オンチップ mAbs 脱グリコシル化と、その後のオンチップ濃縮、分離、N-グリカン断片の MS 検出における mAb-Glyco chip のバルブ切り替え図。mAb-Glyco chip をバックフラッシュモードで使用する必要がある点に注意してください (詳細は参考文献 2 を参照) (続く)

5. **グリカン分離/検出** (図 2E) : インナーローターが分析ポジションに戻り、PGC濃縮カラムと PGC 分析カラムがナノポンプのフローパスに入ります。通常の逆相グラジエントにより保持された N-グリカンが PGC 分析カラムに溶出し、クロマトグラフィ分離を経て、分析対象物が質量分析計に移動します。分析のあいだ、アウターローターはインラインポジションにとどまり、脱グリコシル化バッファにより酵素リアクターを洗浄および再平衡化します。

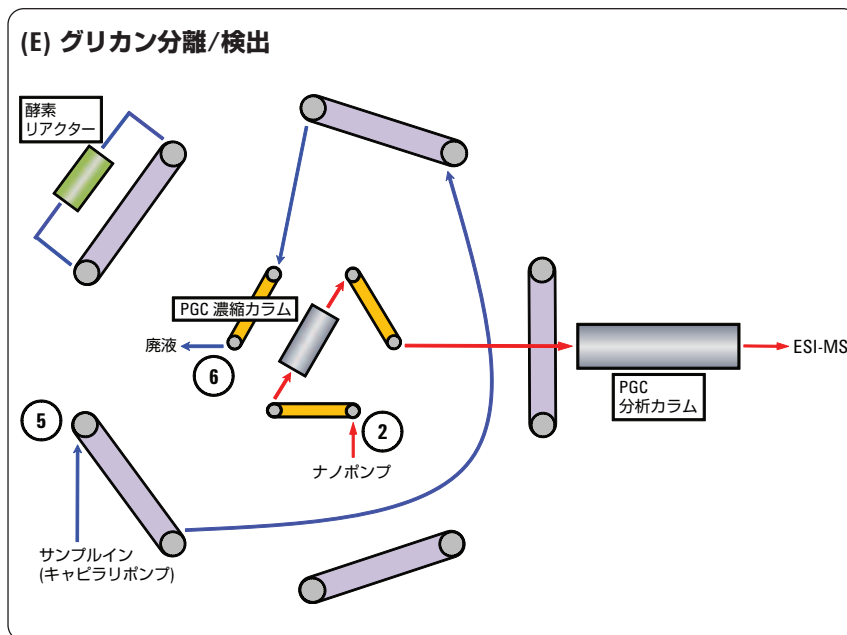


図 2
自動オンチップ mAbs 脱グリコシル化と、その後のオンチップ濃縮、分離、N-グリカン断片の MS 検出における mAb-Glyco chip のバルブ切り替え図。mAb-Glyco chip をバックフラッシュモードで使用する必要がある点に注意してください (詳細は参考文献 2 を参照)

図3は、メソッド「Antibody_75µmSeat Capillary.m;」を用いて標準抗体を分析した結果を示しています。このメソッドは、mAb-Glyco chip キットに含まれています。上図は、ワークフローの時間区分、キャピラリー圧力図、ナノポンプグラジエントを示しています。3 µL/min のキャピラリーポンプフロー流速では、サンプル注入(区分 A)の所要時間は1分、酵素リアクターへのサンプル導入(B)時間は6秒です。反応時間(C)は4分で、通常はこの時間内に抗体の脱グリコシル化が完了します。酵素リアクターから PGC 濃縮カラムへの N-グリカン断片の移動(D)は1分、カラムフラッシング手順と再平衡化を含む PGC 分析カラムでの濃縮グリカンの分離(E)は6分でした。すべて合わせたワークフロー所要時間は12分です。従来、このワークフローには、1日半から数日の時間がかかっていました。

下図は、対応するクロマトグラムを示しています。赤いピークは mAb 脱グリコシル化で得られたグリカン、黒いピークは抗体標準に添加した内部標準です。内部標準は遊離還元末端グリカンで、HPLC-Chip/MS システムの機能確認として機能します。たとえば、インタクトな mAb-Glyco chip の場合、もっとも多量の抗体グリカンと内部標準の比率が、図3で示すものと同じになります。

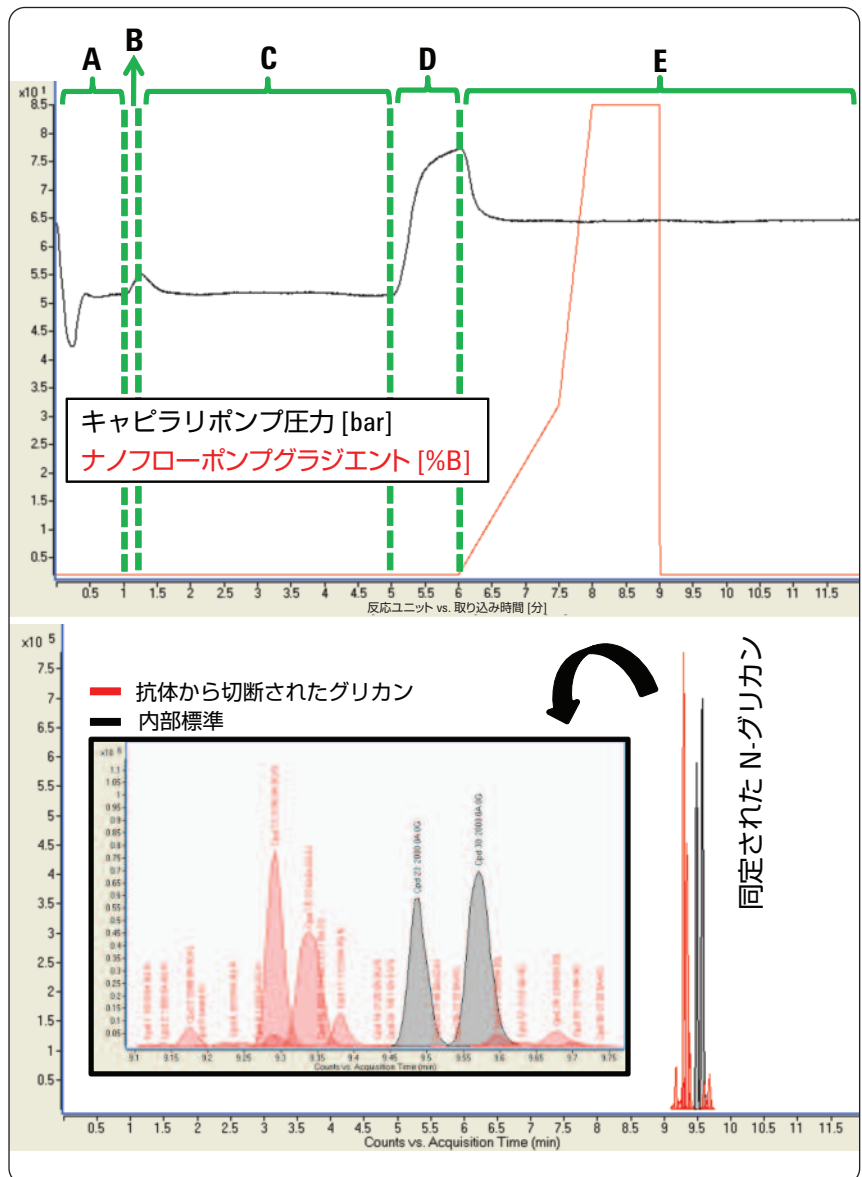


図3 mAb-Glyco chip の分析スピード。サンプル注入 (A)、酵素リアクターへのサンプル導入 (B)、脱グリコシル化 (C)、グリカン移動 (D)、グリカン分離/検出 (E) からなるワークフローの総時間は、12分です。サンプル：mAb-Glyco chip 試薬バックの標準抗体、オンカラム 75 ng

標準抗体のグリカンクロマトグラムをさらに詳しく見てみます。図4では、このクロマトグラムと、構造の割り当てを示しています*。同じグリカン構造が3つのピークに割り当てられているのはなぜでしょうか? 図4は、PNGase F 酵素による脱グリコシル化の際に、抗体のポリペプチド骨格からグリコシルアミンが放出されていることを示しています。これらは反応中間体で、酸性条件で加水分解され、

遊離還元末端グリカンになります⁴。還元末端の炭素でアノマー平衡化が生じるため、各グリコシルアミンは対応する2つの遊離グリカン構造を持ちます。右のクロマトグラムからは、PGC 分析カラムでこれらのジアステレオマー種が分離されるため、N-グリカン断片が3つのピークになることがわかります。mAb-Glyco chip のワークフローはきわめて短い時間 (分単位) で実行されるため、グリコシルアミン

がおもな化合物種として検出されます。しかし、酸性のナノフローポンプグラジエント (0.1 % FA) に曝露すると、グリコシルアミンの一部は遊離還元末端グリカンに変換されます (5 %~10 %)。特定された存在量の少ないグリコシルアミン構造 (オレンジのピーク) では、遊離還元末端グリカンは検出下限を下回っています。

*わかりやすくするために、内部標準のピークを消去しています。

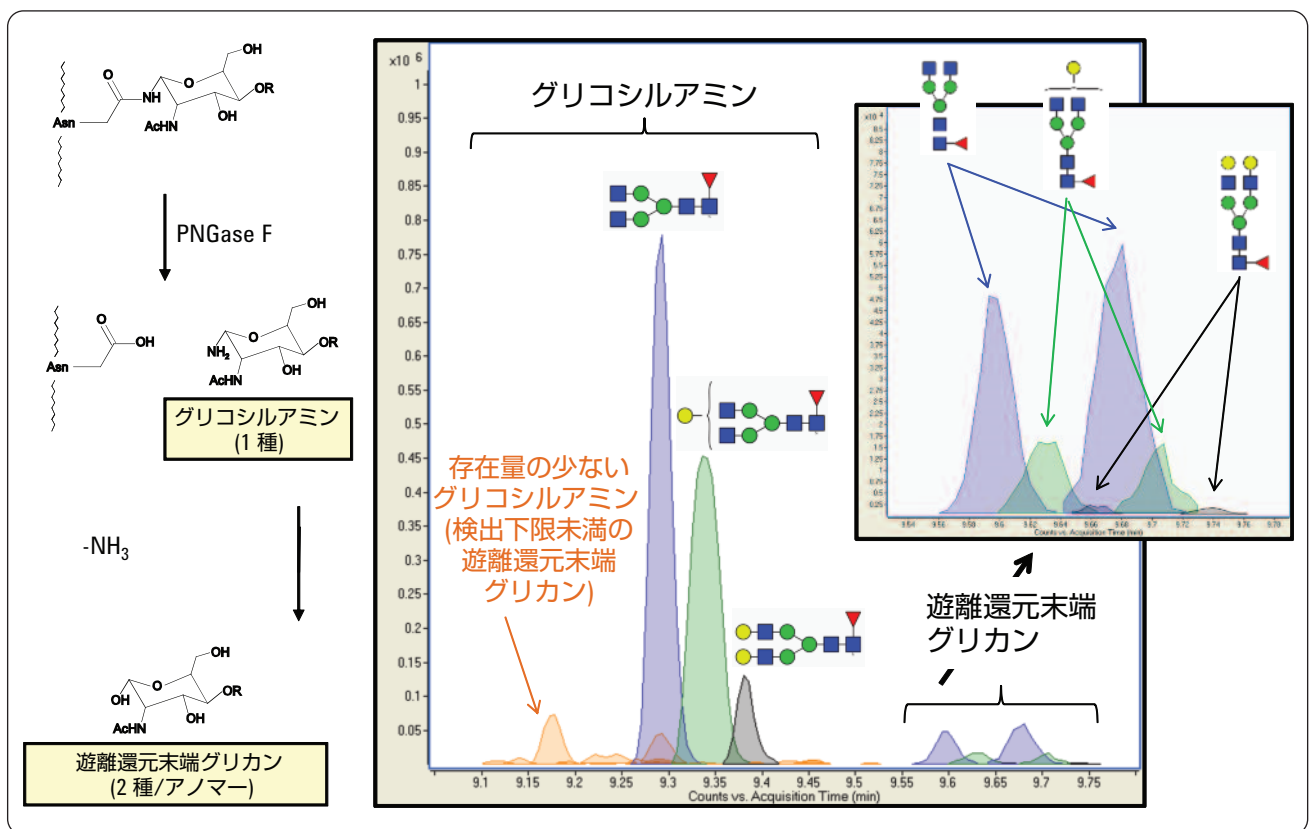


図4
左: PNGase F によりポリペプチド骨格から酵素切断された N-結合型グリカンの化学構造。グリコシルアミン中間体は、加水分解により2つのアノマー遊離還元末端グリカン種になります。右: mAb-Glyco chip の高速ワークフローにより、グリコシルアミンがおもに検出されます。サンプル: mAb-Glyco chip 試薬パックの標準抗体、オンカラム 75 ng (わかりやすくするために、内部標準は抽出していません)

2) 自動データ解析

mAb から切断された N-グリカン分析により得られたデータは、複雑なものになることがあります (各種について、グリカン、グリコシルアミン、対応する遊離還元末端グリカンが幅広く分布 (図 3))。そこで、データ解析を円滑化するために、包括的な自動データ解析およびレポート作成手順を開発しました。図 5 は、未処理データファイル (TIC) を、構造や保持時間、容積、質量エラー、相対アバンダンスに関する情報を記載した同定グリカンのレポートに変換する手順の概要を示しています。

抽出 : Molecular Feature Extractor (MFE) を用いて、Q-TOF データファイルを解析します。MFE は、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアに含まれています。MFE では、LC 保持時間と精密質量をもとに、TIC データセットから固有の化合物を抽出するアルゴリズムが用いられています。また、検出された化合物の質量と、精密質量 mAb-Glyco データベースに保存された質量が比較されます。

同定 (オプション) : mAb-Glyco データベースで抽出されたグリカンシグナルを検出して、構造を結びつけます。図 6 は、標準抗体から得られた MassHunter Qual の結果を示しています。同定されたグリカンのヒットが [Data Navigator] パネルにリスト表示され、対応するピークが [Chromatogram Results] パネルで重ねあわされています (抽出化合物クロマトグラム (ECC) の重ね表示)。[Structure Viewer] パネルには、選択したピークのグリカン構造が表示されます。選択したグリカンのヒットの m/z 値、電荷状態、同位体は、[MS Spectrum Results] および [MS Spectrum Peak List] パネルに表示されます。

レポート作成 : 同じ質量を持つグリコシルアミンの量が合計されます。同じことが、遊離還元末端グリカン異性体についてもおこなわれます。後者にはイオン化

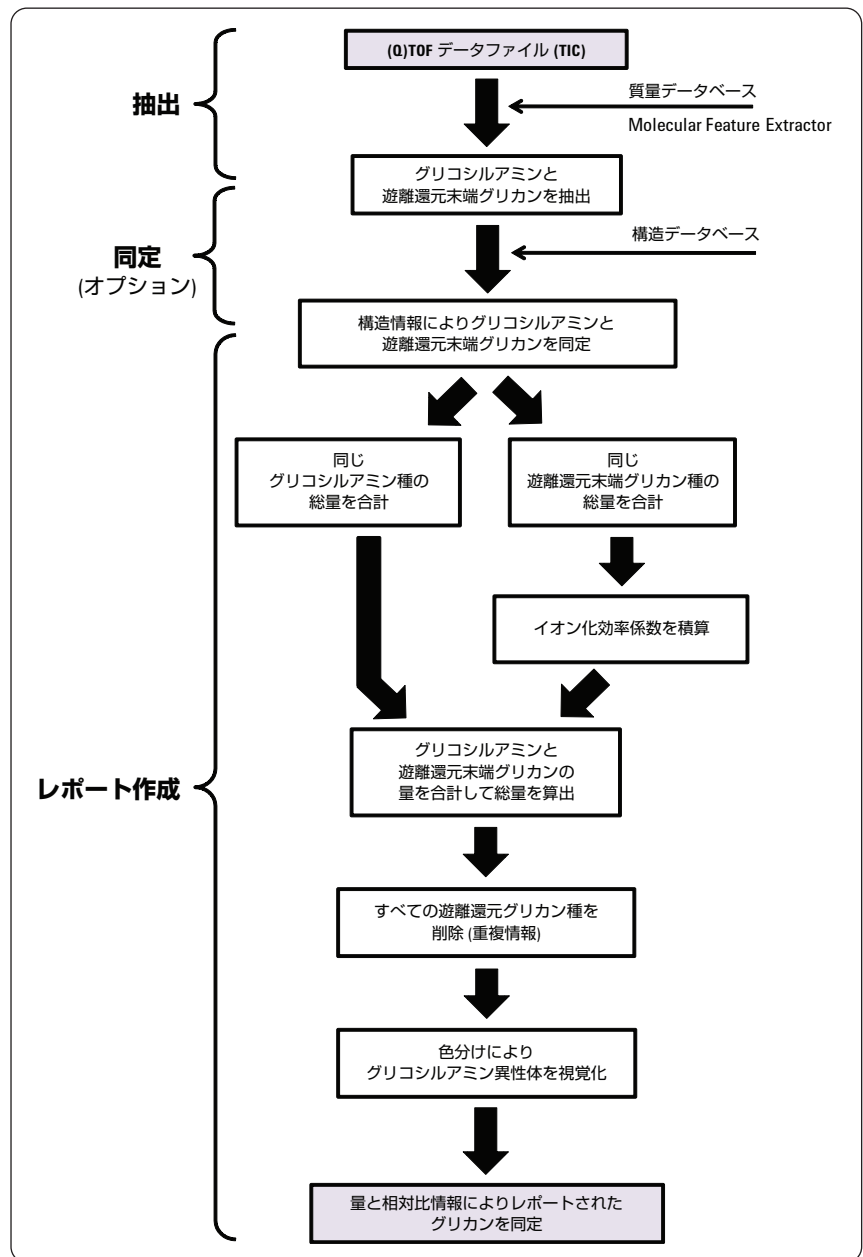


図 5
グリカン抽出、同定、クラスター化、レポート作成の自動手順の概要

係数が積算され、グリコシルアミンと遊離還元末端グリカンのイオン化効率の違いが補正されます。対応するグリコシルアミンと遊離グリカンがクラスター化さ

れ、総量がレポートされます。遊離還元末端グリカンの量は、重複情報として削除されます。最後に、グリコシルアミン異性体が色分けして表示されます。

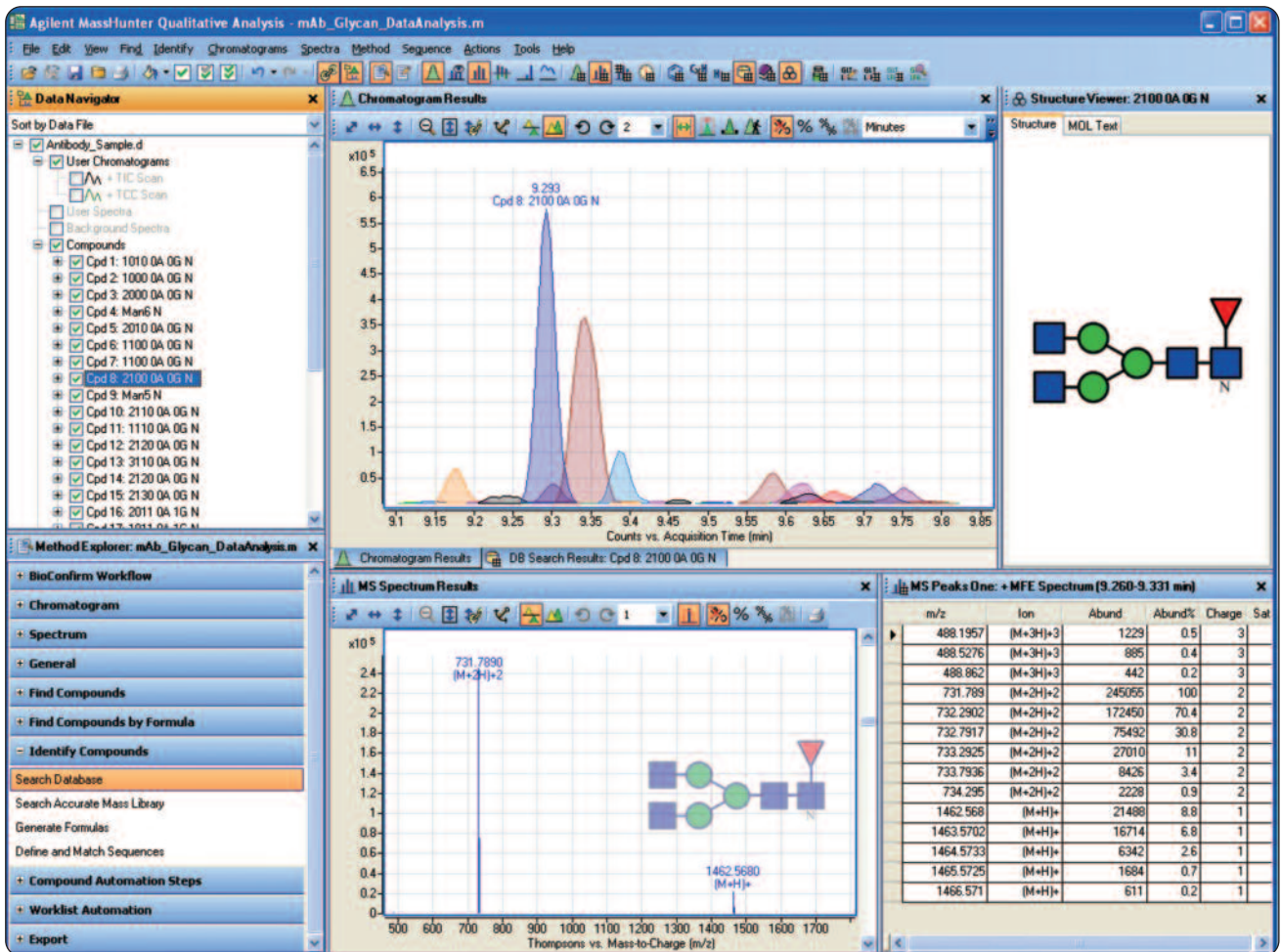


図 6 MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの抽出 (MFE) および同定 (データベース検索) 手順のグリカン解析結果表示。サンプル : mAb-Glyco chip 試薬バックの標準抗体、オンカラム 75 ng

チップの安定性、再現性、寿命

表 2 に、mAb-Glyco chip の特性をまとめています。200 回以上の注入における保持時間の安定性は、0.3 %~0.5 % RSD の範囲内 (4 つのチップを評価) で、相対アバンダンスの再現性は、相対比 1 % を超えるグリカンで 5 % RSD を上回りました。スプレー安定性は、標準的な HPLC chip に匹敵します。一般的な寿命は注入回数 200~300 回でした (10 個のチップを評価)。適切な条件で保管した場合 (-20 °C、酵素リアクターを湿らせた状態)、3 か月後でも、固定化 PNGase F は当初の活性の 90 % を維持しました。複数回の冷凍/解凍サイクルを繰り返しても、固定化後の PNGase F 活性に深刻な影響は出ませんでした。

図 7 (A) : 1~200 回の注入で得られたグリカンのクロマトグラム。同定されたグリカンパターンの保持時間、相対グリカン分布、絶対シグナル強度が良好に保たれ、

評価アイテム	分析したチップの数	結果
200 回注入における保持時間の安定性	4	0.3 %~0.5 % RSD
グリカン相対比の日内再現性	2	平均 5 % RSD (グリカン相対比 > 1 %)
グリカン相対比の日間再現性	2	平均 7 % RSD (グリカン相対比 > 1 %)
スプレー安定性	1	200 時間以上
チップ寿命	10	注入 200~300 回 (各回でウシ血清 (シグマ) IgG オンカラム 75 ng を注入)
PNGase F 活性 // 長期保管	1	-20 °C で保管した場合、 3 か月後も活性の 90 % を維持
PNGase F 活性 // 冷凍/解凍サイクル	2	74 回の冷凍/解凍サイクル後も 活性の 83 % を維持

表 2
mAb-Glyco chip の特性の概要

200 回注入後でも PNGase F リアクターの触媒活性が完全に保たれることが示されています。

図 7 (B) : 1.6 %~3.9 % の範囲における相対グリカン比率の %RSD 値は、この高速オンチップ脱グリコシル化ワークフローの堅牢性と安定性を示しています。

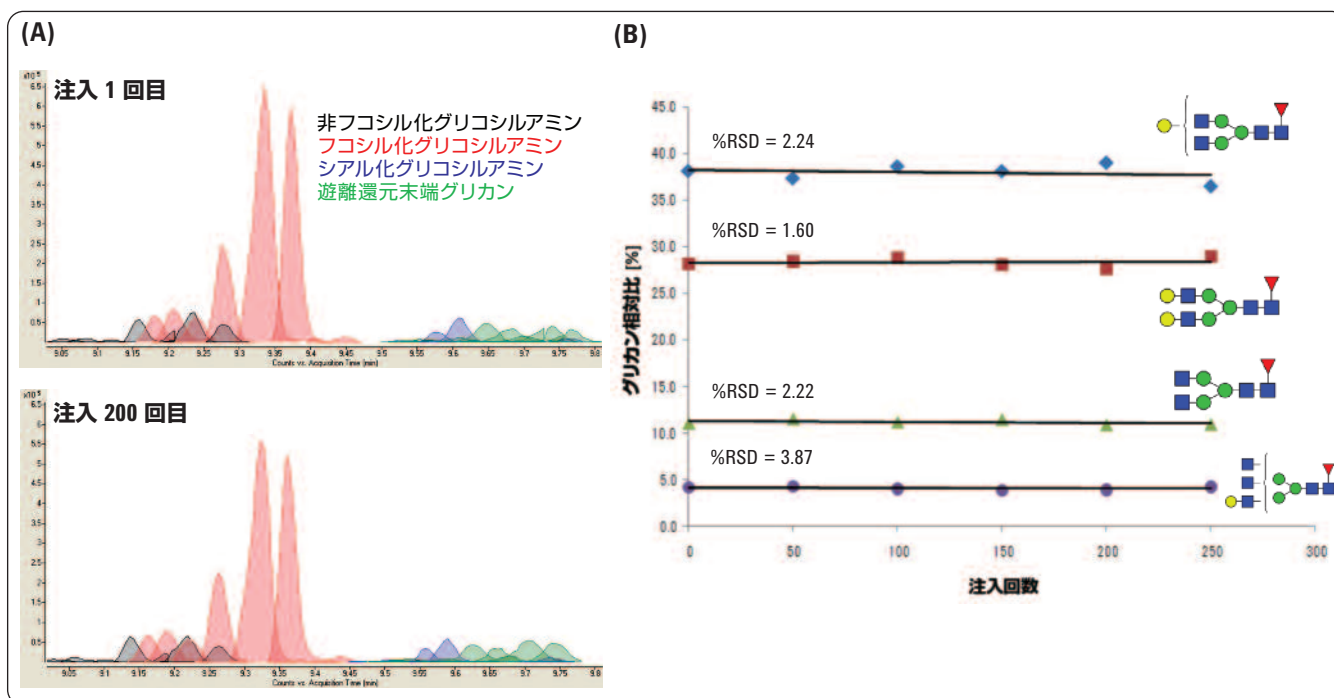


図 7
mAb-Glyco chip の長期的安定性と堅牢性 : (A) 注入 1 回目と 200 回目における分析対象抗体のグリカン抽出パターン ; (B) 注入回数に対するグリカン相対比 (強度の高い 4 つの N-グリカンのみを評価)。サンプル : ウシ血清 IgG (シグマ)、オンカラム 75 ng

結論

この技術概要では、新しい mAb-Glyco chip キットの技術面を説明しています。このチップキットは、Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS システムを用いたモノクローナル抗体 (mAb) の N-グリカンの高速自動分析用に設計されています。mAb のオンチップ脱グリコシル化、濃縮、クロマトグラフィ分離、切断グリカンの Q-TOF 分析、データ解析を含めた全ワークフローが、およそ 15 分で完了できることが実証されています。また、mAb-Glyco chip の安定性、再現性、寿命に関する詳細なデータも紹介しています。mAb-Glyco chip キットを使えば、堅牢で使いやすいソリューションにより、mAb ベースの生物医薬品の開発段階におけるおもな問題点を解消し、より迅速に分析結果を得ることができます。

参考文献

1.

R. Jefferis, "Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics" *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 226-234 (March 2009).

2

mAb-Glyco Chip User's Guide (G4240-90020); provided with mAb-Glyco Chip Enablement Kit (softcopy on mAb-Glyco Chip Content Disk).

3

"Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS system," Agilent Technologies publication 5989-3627EN.

4

J. R. Rasmussen, J. Davis, J. M. Risley, R. L. Van Etten, "Identification and derivatization of (oligosaccharyl)amines obtained by treatment of asparagines-linked glycopeptides with N-Glycanase enzyme," *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 1124-1126.

www.agilent.com/chem/jp

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。
本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
January 1, 2011
5990-6924JAJP



Agilent Technologies