

HILIC カラムを用いた N-結合型グリカンの高速分析

アプリケーションノート

生物医薬品・バイオシミラー

著者

James Martosella, Oscar Potter,
Danny Mancheno, and Jia Liu
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

組み換えモノクローナル抗体 (mAb) 治療薬は、治療用タンパク質のなかでも最大のグループとなっています。この種の治療薬の効能は、mAb のグリコシル化パターンが適切かどうかによって大きく左右されます。また、これまでに認可されている治療用 mAb は、すべて免疫グロブリン G (IgG) です [1]。ヒト IgG には、各重鎖に 1 つの N-結合型グリコシル化部位があります [2]。N-結合型グリコシル化はきわめて重要かつ複雑な翻訳後修飾で、糖タンパク質薬剤の開発や処理、製造のあらゆる段階において、管理やモニタリング、および解析が求められます [3]。治療用タンパク質の安全性、効能、血中半減期などの特性は、グリコシル化パターンの違いによる影響を受けます。そのため、グリカンパターンの分析は、治療用糖タンパク質、とりわけ mAb の特性分析におけるきわめて重要な要素となります。

グリカン分析については、さまざまな手法が適用されています。しかし、大部分のメソッドは、酵素による mAb からのグリカンタンパク質遊離と、その後の 2-アミノベンズアミド (2-AB) などの標識試薬を用いた誘導体化をベースにしています [4]。グリカンには発色団がないため、2-AB (中性) タグで標識化すれば、蛍光検出が可能になります。標識化されたグリカンは親水性がきわめて高い構造で、分離テクニックとしては親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) が適しています。HILIC と蛍光検出を用いた分離は、グリカン分析に適した堅牢なメソッドです。また、HILIC/LC とマスマスペクトロメトリーを組み合わせれば、重要な質量情報や構造情報が得られます。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、ハイスループットグリコシル化分析に AdvanceBio グリカンマッピングカラムを導入しています。AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、新しい HILIC アミドケミストリを備えたサブ-2 μm HPLC カラムです。このカラムおよびメソッドを用いれば、グリカンの高分離能を得ると同時に、現在提供されている HPLC カラム技術よりも溶出時間を 40 % 短縮することができます。AdvanceBio グリカンマッピングカラムの有効性を示すために、2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンサンプルを分析しました。

材料とメソッド

条件、超高分離能

カラム: Agilent AdvanceBio グリカンマッピング、
2.1 \times 150 mm、1.8 μm (p/n 859700-913)
グリカンライブラリ: Agilent 2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカン、
200 pmol (p/n 5190-6996)
溶離液: A) 100 mM NH₄ 酢酸、pH 4.5
B) ACN
注入量: 70:30 ACN:水中で 2 μL
高速分離の評価にも同じ条件を使用しましたが、グラジエントは異なるものを使用しました。

ワークフローを図 1 に示しています。

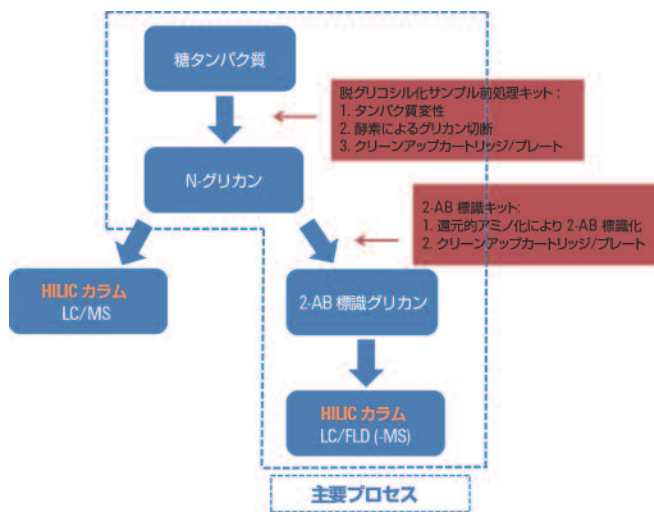


図 1. Agilent AdvanceBio グリカンマッピング HILIC カラムと蛍光検出を用いた 2-AB-標識ヒト IgG グリカン分析の全体のワークフローソリューション

表 1. 2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンの高速分離で得られた分離性能結果

カラム	平均 RT (分)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (分)	Bp (bar)、 20 % B	ピーク キャパシティ
グリカンマッピングカラム	3.93	1.63	1.70	3.05	2.09	0.059	298	135

結果と考察

高速分離

1.8 μm 粒子の AdvanceBio グリカンマッピング HILIC カラムを使えば、10 分未満の超高速グリカン分析が実現します (図 2 および表 1)。表 2 に、ピーク番号と IgG の主要グリカン構造を示しています。

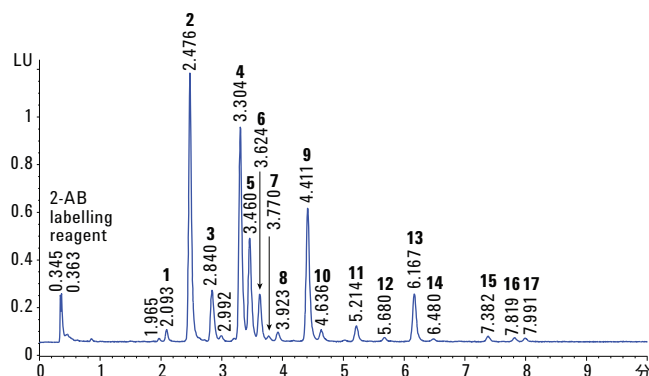


図 2. 条件

グラジエント:	時間 (分)	% B	流量 (mL/min)
	0	75	1.0
	12	60	1.0
	12.15	40	0.5
	12.5	40	0.5
	12.9	75	0.5
	13.05	75	1.0
	15	75	1.0

図 2. Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムを使えば、2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンの 10 分未満での高速分離が可能です。

表 2. ピーク番号と IgG の主要グリカン構造

ピーク	グリカン	構造	ピーク	グリカン	構造
1	G0		10	G2FB	
2	G0F		11	G1FS1	
3	G0FB		12	A1	
4	G1F		13	A1F	
5	G1F'		14	A1FB	
6	G1FB		15	A2	
7	G1FB Man6		16	A2F	
8	G2		17	A2FB	
9	G2F				

▲ フルクトース
● ガラクトース
● マンノース
■ N-アセチルグルコサミン
◆ N-アセチルノイラミン酸

超高分離能分離

1.8 μm 粒子の AdvanceBio グリカンマッピング HILIC カラムでは、高速分離の代わりに、わずかに長いランタイムでの超高分離能分離を行うことも可能です (図 3 および表 3)。この分離では、2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンがきわめて良好に分離され、きわめて高い感度が得られます。

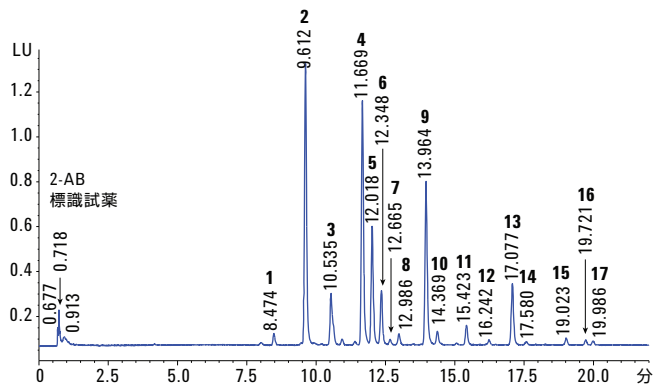


図 3. 条件

カラム温度: 55 °C
 グラジエント: 時間 (分) % B 流量 (mL/min)
 0 80 0.5
 25 60 0.5
 26 0 0.5
 27 80 0.5
 30 80 0.5
 検出: 蛍光、励起 260 nm、発光 430 nm
 使用機器: Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器

図 3. Agilent 1.8 μm AdvanceBio グリカンマッピング HILIC カラムを用いた超高分離能分離における 2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンの分離

表 3. 2-AB 標識ヒト IgG N-結合型グリカンの高分離能分離結果

カラム	平均 RT (分)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (分)	Bp (bar)、ピークキャパシティ	20 % B
グリカンマッピングカラム	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221

性能比較

AdvanceBio グリカンマッピングカラムでは、2.1 × 150 mm 構成の他社製カラムに比べて、同じクロマトグラフィー条件で優れた分離能と狭帯域が得られます。また、ピークキャパシティも向上し、分離時間は 40 % 短くなります (図 4 および表 4)。

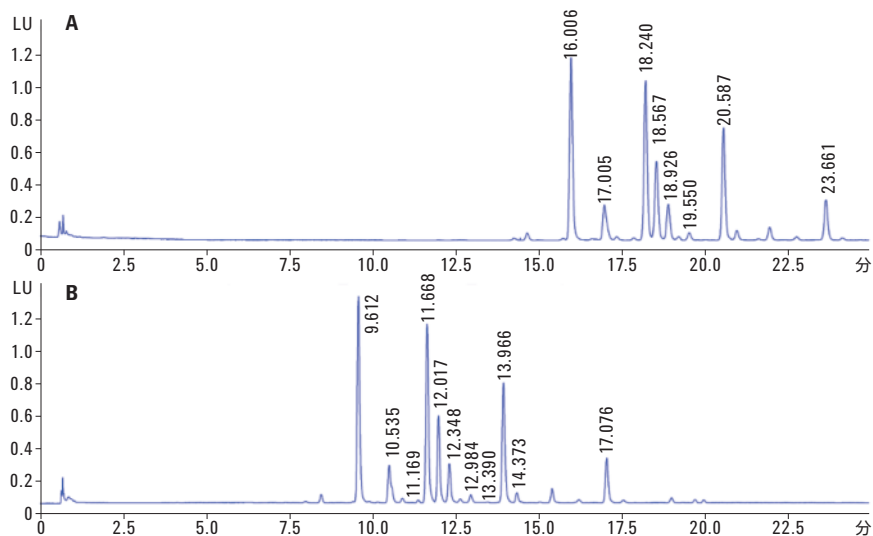


図 4. Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラム (B) では、同じ寸法および同じ分離条件の他社製カラムに比べて、優れた分離能、狭いピーク幅、高いピークキャパシティが得られ、分離時間が 40 % 短くなります。

表 4. スピード面の利点を示す Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムと他社製カラムとの比較

カラム	平均 RT (分)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (分)	Bp (bar)、 20 % B	ピーク キャパシティ
他社製グリカンカラム (A)	20.2	1.77	1.94	3.39	2.10	0.1085	349	214
Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラム (B)	12.7	2.60	2.90	5.43	2.81	0.0741	298	221

別の比較では、両方のカラムに超高速分離を適用しました。使用した条件 (5 % B によりグラジエントオフセットを調整) はどちらのカラムも同じです。AdvanceBioグリカンマッピングカラムでは、2.1 × 150 mm 構成の他社製カラムに比べて、優れた分離能、狭帯域、高いピークキャパシティが得られました (図 5 および表 5)。

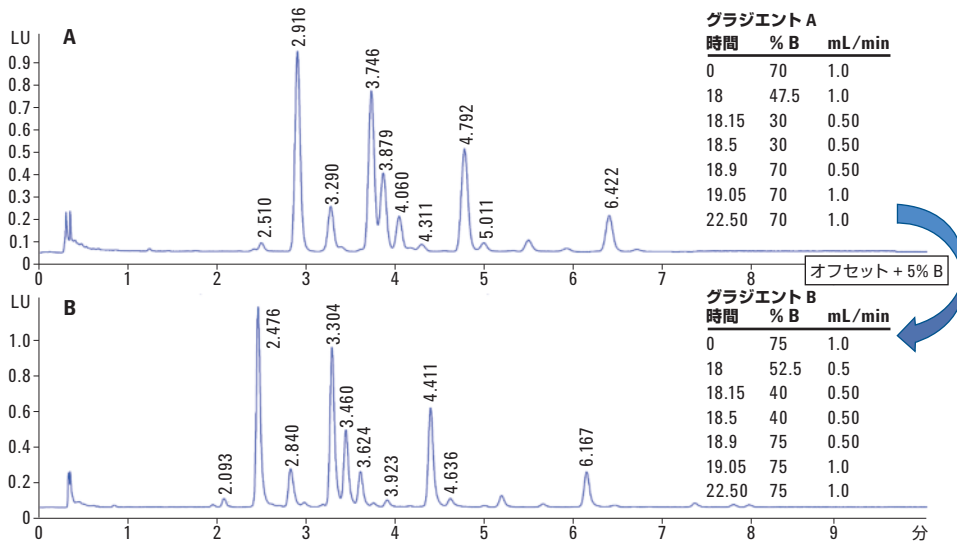


図 5. 超高速分離の比較: 同じ分離時間を用いる場合、AdvanceBio グリカンマッピングカラム (B) では、同じ構成の他社製カラムに比べて優れた分離能、狭帯域、高いピークキャパシティが得られます。

表 5. 分離能における利点を示す Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムと他社製カラムとの比較

カラム	平均 RT (分)	RS 2,1	RS 3,2	RS 4,3	RS 6,5	平均 PW (分)	Bp (bar)、20 % B	ピークキャパシティ
他社製グリカンカラム (A)	4.32	1.02	1.39	1.92	1.59	0.078	375	101
Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラム (B)	3.93	1.63	1.70	3.05	2.09	0.059	298	135

化学的安定性

AdvanceBio グリカンマッピングカラムでは、高温条件での優れた寿命安定性も示されています。図 6 は、60 °C で 5000 回注入したあとの安定した分離性能を示しています。この比較では、繰り返し注入後にもピーク形状、保持力、感度が維持されています。

結論

HILIC ベースの Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムを使えば、他の HPLC カラムよりも優れた分離能および効率でグリカンを分離することができます。溶出時間も 40 % 短縮されます。また、5000 回以上の注入後にも優れた化学的安定性が保たれます。

謝辞

この研究は、第 41 回高性能液相分離および関連技術に関する国際シンポジウム (HPLC 2014) のポスターセッションで発表されたものです(2014 年 5 月 11–15 日、ニューオーリンズ)。

参考文献

1. R. Jefferis, *Biotechnol.Prog.* **21**, 11 (2005).
2. J. N. Arnold, L. Royle, R. A. Dwek, P. M. Rudd, R. B. Sim, *Adv.Exp.Med.Biol.* **564**, 27 (2005).
3. R. Abès, J. L. Teillaud, *Pharmaceut.* **3**, 146 (2010).
4. L. R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A. M. Deelder, M. Wuhrer, *Anal.Bioanal.Chem.* **397**, 3457 (2009).

詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

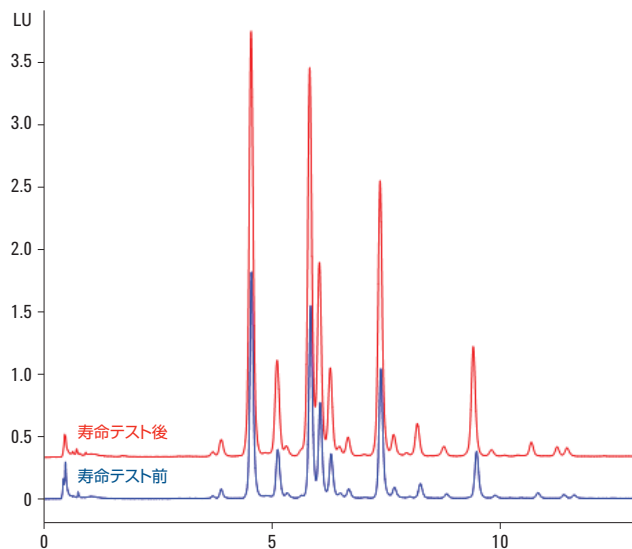


図 6. Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムの寿命テスト前後のグリカン分離結果の重ね表示 (HILIC QC 条件: 10:90 100 mM pH 4.4 ギ酸アンモニウム: ACN、0.2 mL/min、4 分、60 °C、シトシン)

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2014

Printed in Japan

June 30, 2014

5991-4886JAJP



Agilent Technologies