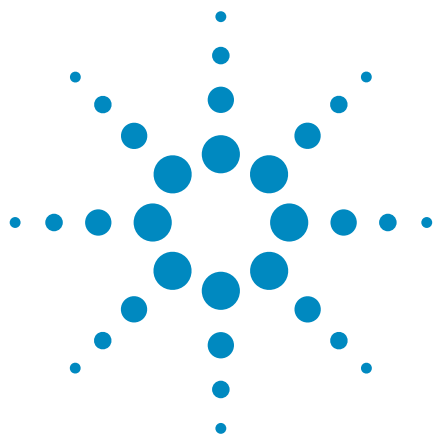
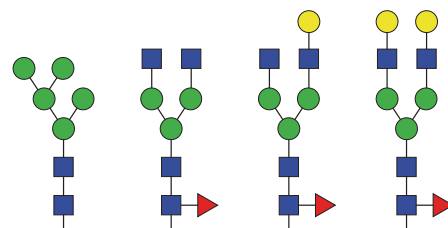




Agilent LC/MSD XT を用いた 蛍光検出および質量選択検出による モノクローナル抗体 N-グリカンの分析

アプリケーションノート

生物製剤



著者

Oscar Potter, Gregory Staples, Jordy Hsaio,
and Te-Wei Chu



Agilent LC/MSD XT

概要

治療用タンパク質の N-グリコシル化は製品開発、プロセス開発、および QC 時にモニタリングされます。分析者の多くは酵素による N-グリカンの遊離後、蛍光タグで標識化し、HILIC-FLD 分析を行います。Prozyme Inc. 製の InstantPC タグを使用すると、マニュアルサンプル前処理が 1 時間以内に完了するほか、Agilent AssayMap Bravo liquid handling platform を用いることで、ハイスループットな並行処理が可能になります。高分解能分離は Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムを用いて、短いサイクル時間で完了することができます (5991-4886JAJP 参照)。

蛍光検出はよく用いられる検出手法ですが、HILIC-FLD ワークフローを実行する分析者は、特に新しいサンプルの種類や予期しないピークの場合に、ピークの割り当ての曖昧さという困難な課題に直面することがあります。そのような場合、LC-Q-TOF や MALDI-TOF などの補完的な分析によるサンプル分析を試みる可能性がありますが、時間の浪費や費用増につながります。

アジレントは以前、HILIC-FLD システムをオンラインで高分解能 Q-TOF 質量分析装置に接続した高度なワークフローを実証しました (5991-6958EN 参照)。このアプローチには、蛍光ベースの堅牢な定量化と、質量分析の強力な構造解析能力という 2 つの利点があります。しかし、ルーチンのコスト効率の良いソリューションを求める分析者は、堅牢で占有スペースが小さく、シングル四重極技術を搭載した質量選択検出器 (MSD) の使用を選択する場合があります。そのため、HILIC-FLD システムに、堅牢性と高度に優れた積み重ね可能な Agilent LC/MSD XT シングル四重極を組み合わせるメソッドをご紹介します。MSD データから得られる質量情報により、ピークの割り当ての曖昧さを解決し、共溶出する構造を検出することができます。このメソッドは 60 MPa 未満で作動するため、既存のさまざまな LC システムとの互換性が保たれます。



Agilent Technologies



図 1. InstantPC で標識化された N-グリカンの同定および定量化に用いた、サンプル前処理、LC カラム、および機器のフローチャート

実験方法

サンプル前処理

モノクローナル抗体 (mAb) のサンプルは自社のラボで発現されたもの (CHO mAb 1) か、Sigma-Aldrich (SiLu Lite P/N MSQC4) および NIST (NIST mAb、参照物質 8671) から購入したものを用いました。サンプルはすべて 1 µg/µL に調整してから、Prozyme Inc. 製の GlykoPrep-plus 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと InstantPC (96-ct) (GPPNG-PC) によって前処理しました。サンプルのハンドリングは AssayMap Bravo Liquid Handling Platform (G5542A) により自動化しました。このプロトコルの最終ステップでは、50 µL 中に標識化されたグリカンを溶出することで、最終サンプル溶液の各 µL が 1 µg の mAb から遊離された N-グリカンを表すようにします。このワークフローには、遠心分離やドライダウンのステップが不要であるという利点があります。

クロマトグラフィーの条件

ポンプ

Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)

移動相 A

水酸化アンモニウムで pH = 4.5 に調整された 50 mM ギ酸

移動相 B

アセトニトリル

サンブラ

Agilent 1260 Infinity II マルチサンブラ (G7167A)、11 °C に設定されたサーモスタット付

カラム

- AdvanceBio グリカンマッピングカラム
1.8 µm、2.1 × 100 mm (メソッド A で使用)
- AdvanceBio グリカンマッピングカラム
2.7 µm、2.1 × 150 mm (メソッド B で使用)
- AdvanceBio グリカンマッピングカラム
1.8 µm、2.1 × 150 mm (メソッド C で使用)

カラムヒーター

Agilent 1260 Infinity II G7116 サーマスタットカラムコンパートメント、40 °C に設定された G7116-60015 溶媒予備加熱器付

カラムは、8 µL フローセル (G1321-60005) 付きの Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B) に内径 100 µm SSTL チューブを用いて接続しました。検出器は PMT ゲイン = 10 で、λEx = 285 nm、λEm = 345 nm に設定しました。

LC/MSD XT パラメータ

パラメータ	設定値
イオン源	
使用製品	Agilent Jet Stream、ポジティブモード
シースガス	300 °C、10.0 L/分
ドライガス温度	150 °C、9.0 L/分
ネブライザ圧力	35 psig
VCap	2,500 V ノズル: 500 V
取り込み設定	
質量範囲	500-1,400 <i>m/z</i>
フラグメンタ	100 V
ゲイン EMV	1.0
ステップサイズ	0.10
ピーク幅	0.2

ソフトウェア

OpenLab CDS Chemstation Edition Rev C.01.07 SR3

試薬

試薬および溶媒はすべて、入手可能な最高純度のものを使用しました。

グラジエントの表

メソッド A (2.1 × 100 mm 1.8 µm カラム用)

タイムテーブル

時間 (分)	%A	%B	流量 (mL/min)
0.00	25.0	75.0	0.70
0.50	27.0	73.0	0.70
4.00	28.0	72.0	0.70
9.00	33.0	67.0	0.70
9.20	50.0	50.0	0.70
9.70	50.0	50.0	0.70
10.00	25.0	75.0	0.70
11.50	25.0	75.0	0.70
11.80	25.0	75.0	0.80
14.50	25.0	75.0	0.90
15.30	25.0	75.0	0.70

ストップタイム = 18 分

メソッド B (2.1 × 150 mm 2.7 µm カラム用)

タイムテーブル

時間 (分)	%A	%B	流量 (mL/min)
0.00	27.0	73.0	0.50
1.00	28.5	71.5	0.50
9.00	29.5	70.5	0.50
22.00	41.0	59.0	0.50
22.50	50.0	50.0	0.80
23.50	50.0	50.0	0.70
23.70	27.0	73.0	0.70
25.00	27.0	73.0	0.70
25.50	27.0	73.0	0.80
27.50	27.0	73.0	0.90
28.00	27.0	73.0	0.50

ストップタイム = 30 分

メソッド C (2.1 × 150 mm 1.8 µm カラム用)

時間 (分)	%A	%B	流量 (mL/min)
0.00	22.0	78.0	0.60
0.50	26.0	74.0	0.60
13.00	27.5	72.5	0.60
28.00	39.0	61.0	0.60
28.50	50.0	50.0	0.50
28.60	50.0	50.0	0.40
28.80	22.0	78.0	0.40
31.00	22.0	78.0	0.50
31.50	22.0	78.0	0.55
33.50	22.0	78.0	0.60

ストップタイム = 37 分

結果と考察

分離

3 種類のカラムで一般的な治療用 mAb グリカンのプロファイルの分離を最適化し、ターゲットは種々のサイクル時間としました。各メソッドは、大半の治療用 mAb サンプルに発現する共通の中性グリカンの分解能を最大化する緩やかなグラジエントから始めます。グラジエント勾配を分析の途中で増加させ、より大きな構造を持つ酸性のグリカンを効率的に溶出させました。これらのメソッドはすべて、60 MPb を維持できるように設計されており、堅牢性を最大化しつつ、さまざまな LC 機器との互換性を維持することができます。図 2 に 3 種の分離法すべてを示していますが、メソッド C をその後の実験に使用することにしました。対象の mAb N-グリカンサンプル 3 種において総合的に最高の性能を得られることが分かったためです。

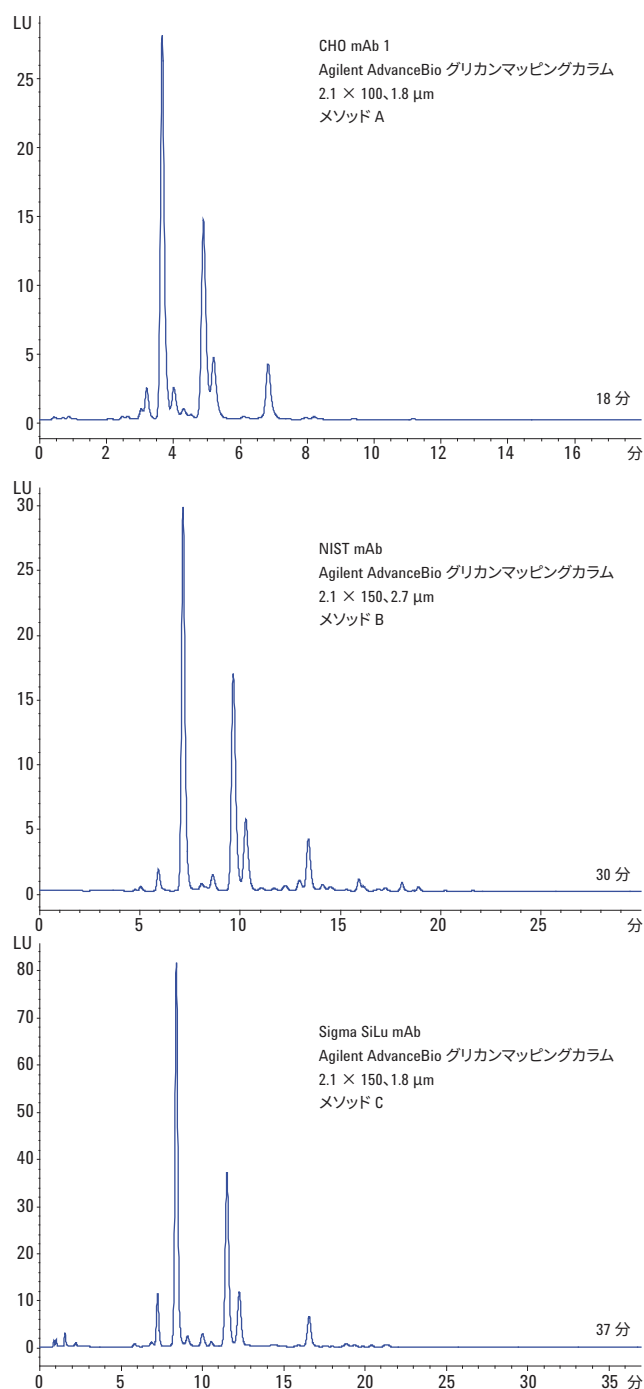


図 2. mAb サンプル 3 種に異なるカラムフォーマットを用いる 3 つの分離メソッド

LC/MSD XT の感度

分析者は従来、感度を懸念して、N-グリカンの LC/MS 分析にはシングル四重極質量分析装置の使用を避けてきました。しかし、2 つの技術革新によって、N-グリカンの検出下限が大幅に改善されました。1 つ目は、高感度のイオン源である Agilent Jet Stream が利用可能になったことです。エレクトロスプレーの周囲の高温加熱されたシースガス流によりイオン化を大きく改善できます。2 つ目の技術革新は、Prozyme Inc. 製の InstantPC タグが利用可能になったことです。従来の蛍光標識に比べてイオン化効率を大幅に向上させることができます。

感度最大化のために MSD パラメータを最適化しました。InstantPC で標識化した N-グリカンの大半は、 $[M+2H]^{2+}$ や一部に $[M+NH_4+H]^{2+}$ 、および $[M+H+Na]^{2+}$ という二価イオンの形で観察されました。ドライガス温度またはフラグメンタ電圧を上昇させると、N-グリカンの衝突誘起解離を起こすことができ、Q-TOF の場合と同様に強力な構造解析が行えます (5991-5253EN を参照)。

診断シグナルは、プロファイルのわずか 0.1 % を占めるグリカンのものが得られました。この感度を他のワークフローと比較する際には、サンプル前処理ワークフローの最後に予備濃縮ステップを追加せずに得られた結果であるため、相当な時間が節約されていることにご留意ください。サンプルを乾燥し、より低容量のサンプルマトリックス内で再溶解すれば、感度をさらに高められる可能性があります。

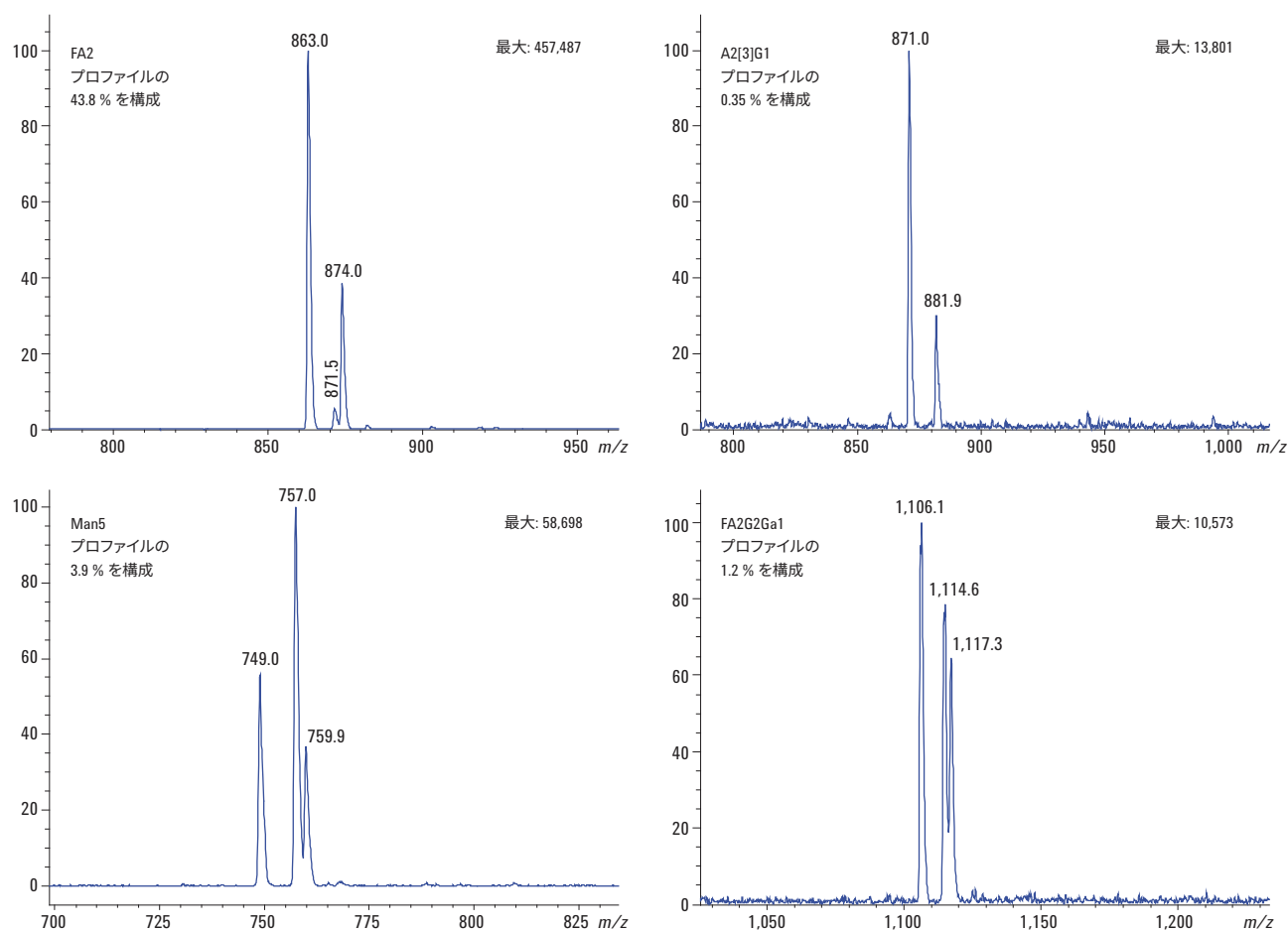


図 3. 3 μ g の mAb 由来の代表的なグリカン 4 種類の質量スペクトルを相対強度で示します。

A2[3]G1 のシグナルは、グリカンプロファイルのわずか 0.35 % を占めるものであり、高 S/N 比で明確に測定可能です。

ピークの割り当て

3 サンプルすべて (メソッド C を使用) のデータを統合し、アプリケーションノート 5991-5253EN と同様のアプローチを用いてグリカン組成にピークを割り当てました。

注意: InstantPC による標識化により、グリカンの遊離還元末端型と比べると質量が 261.1477 m/z 増加しています。

表 1 はサンプル 3 種で検出されたグリカンの組成を示したものです。グリカンの組成は次の形式で示されます。HxNxFxSgx + コア (H = ガラクトースまたはマンノース、N = N- アセチルグルコサミン、F = フコース、Sg = N- グリコリルノイラミン酸、およびコア = トリマンノシル、全 N-グリカンに共通のコア)。多くの場合、これらの組成により、治療用 mAb のグリコシル化パターンおよび HILIC 溶出順序に関する基礎知識を補足すれば、グリカン構造を提示することが可能になりました。治療用 mAb の大半には、類似した一定数の共通 N-グリカン構造があるため、表 1 はこのワークフローで N-グリカン割り当ての際に役立ちます。

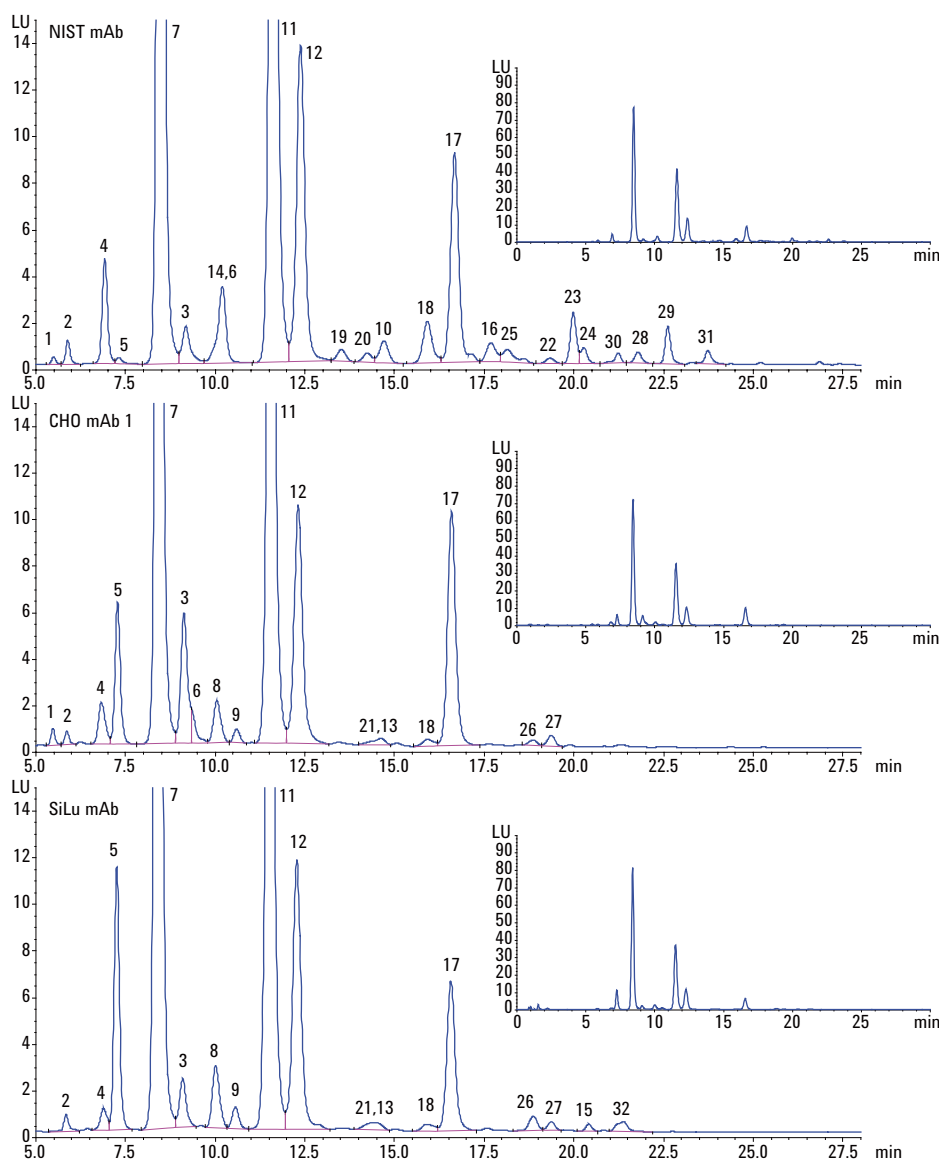


図 4. メソッド C による 3 種類の mAb 由来の主要および微量の N-グリカンの拡大 FLD クロマトグラム。

挿入図に縮小データを示します。アノテーションについては、表 1 を参照してください。

表 1.

ID	観察された [M+2H] ²⁺	提示された 組成	理論的な [M+2H] ²⁺	提示された構造	
				Oxford	代替
1	659.9	F1 + コア	659.774	F1M3	G0F-2GlcNAc
2	688.4	N1 + コア	688.284	A1	G1-GlcNAc
3	748.9	H2 + Core	748.798	M5	Man5
4	761.5	N1F1 + コア	761.313	FA1	G0F-GlcNAc
5	790.0	N2 + コア	789.824	A2	G0
6	842.4	H1N1F1 + コア	842.340	FA1G1	G1F-GlcNAc
7	863.0	N2F1 + コア	862.853	FA2	G0F
8	871.0	H1N2 + コア	870.851	A2[6]G1	G1
9	871.0	H1N2 + コア	870.851	A2[3]G1	G1'
10	923.6	H2N1F1 + コア	923.366	-	-
11	944.0	H1N2F1 + コア	943.879	FA2[6]G1	G1F
12	944.0	H1N2F1 + コア	943.879	FA2[3]G1	G1F'
13	952.0	H2N2 + コア	951.877	A2G2	G2
14	964.7	N3F1 + コア	964.393	FA2B	G0FB
15	991.9	H5 + コア	991.877	M8	Man8
16	996.1	H1N1Sg1F1 + コア	995.885	FA1G1Sg1	G1Sg1F-GlcNAc
17	1025.1	H2N2F1 + コア	1024.906	FA2G2	G2F
18	1025.1	H2N2F1 + コア	1024.906	FA2G1Ga1	G1F+αGal
19	1045.6	H1N3F1 + コア	1045.419	FA2[6]B1G1	G1FB
20	1045.7	H1N3F1 + コア	1045.419	FA2[3]B1G1	G1FB'
21	1089.5	H1N1F1S1 + コア	1089.427	FA1G1S1	G1S1F-GlcNAc
22	1097.7	H1N2F1Sg1 + コア	1097.425	FA2G1Sg1	G1Sg1F
23	1106.1	H3N2F1 + コア	1105.932	FA2G2Ga1	G2F+αGal
24	1106.1	H3N2F1 + コア	1105.932	FA2G2Ga1 イソ型	G2F+αGal'
25	1126.5	H2N3F1 + コア	1126.446	FA2BG2	G2FB
26	1170.4	H2N2F1S1 + コア	1170.454	FA2G2S1	A1F
27	1170.4	H2N2F1S1 + コア	1170.454	FA2G2S1 イソ型	A1F イソ型
28	1178.7	H2N2F1Sg1 + コア	1178.451	FA2G2Sg1	Ag1F
29	1187.1	H4N2F1 + コア	1186.959	FA2G2Ga2	G2F+(αGal)2
30	1207.7	H3N3F1 + コア	1207.472	FA2BG2Ga1	G2FB+αGal
31	1259.4	H3N2F1Sg1 + コア	1259.477	FA2G2Sg1Gal1	Ag1F+αGal
32	1316.2	H2N2F1S2 + コア	1316.001	FA2G2S2	A2F

結果の表

FLD クロマトグラム中のピークは総グリカンプロファイルの相対的な合計 % として報告されたものです。図 5 に結果を示します。

このプロファイルの一部には共溶出グリカン構造を表すピークが含まれていました。これらの共溶出には微量グリカンが含まれ、FLD のみに基づく定量化では、2 つの構造が組み合わせられたピーク面積が報告されます。

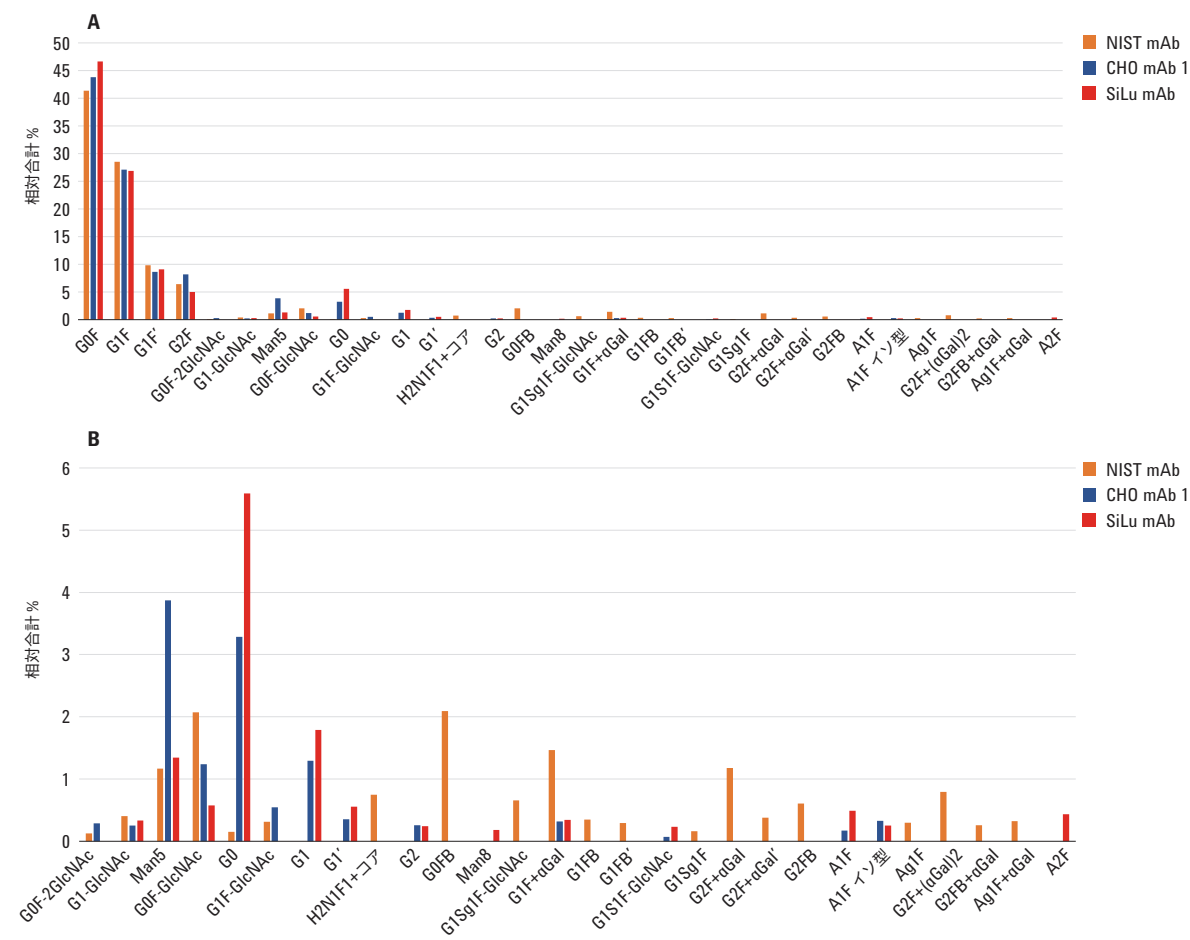


図 5. A) 3 種の mAb 由来の N-グリカンの相対アブundance。B) 微量成分のみを示す拡大図。微量成分とは 1 % 未満で容易に検出されたものです。

これらの低アバンダンスの共溶出構造の正確な定量化が必要な場合には、FLD を補足するために LC/MSD XT データを用いることを推奨します。質量スペクトルは共溶出 FLD ピークに相当する時間に統合することができます。FLD の面積とこのスペクトル中の二価の N-グリカンイオンの相対強度を組み合わせ、さまざまな構造に割り当てることができます。InstantPC 標識の MS シグナルは、蛍光強度で定められる真のアバンダンスに近似することをこれまでに示しています (5991-6958EN 参照)。

結論

シングル四重極テクノロジーを搭載した Agilent LC/MSD XT は、一般的な UHPLC HILIC-FLD システムにオンラインで接続し、あらゆるサンプルのあらゆるピークに対応可能な質量分析ベースの同定オプションを提供することができます。Agilent Jet Stream イオン源を InstantPC グリカントグと共に用いることで、十分な感度を得られ、サンプルを濃縮しなくても、通常の抗体サンプル中の大小両方のピークの MS シグナルを検出することができます。通常のモノクローナル抗体サンプルの場合は、確実にグリカン構造を割り当てることができます。本アプリケーションノートでは、堅牢な蛍光検出での相対定量に基づく従来型アプローチを用いましたが、MS データを用いて共溶出ピークの場合の定量化に役立てることもできます。

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。
アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト
www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, May 22, 2017

5991-8071JAJP



Agilent Technologies