

モノクローナル抗体の N-グリカン分析: サンプル前処理からデータ解析までの 包括的手法

著者

David L. Wong, Oscar Potter,
Jordy Hsiao, and Te-Wei Chu
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、バイオ医薬品分子の中でも特に重要であり、幅広いアプリケーションで利用されています。mAb は不均一な性質のために、包括的な特性解析が要求されます。こうした分析には、mAb やその変異体の完全なアミノ酸配列の決定、グリコシル化、酸化、脱アミド化などの翻訳後修飾 (PTM) の特性解析が含まれます。

グリコシル化は、多くの生物化学的プロセスで重要な役割を果たします。また、治療の効果、安定性、薬物動態、免疫原性にも影響を及ぼします¹。グリカンの特性解析には通常、NMR、HPLC、質量分析 (MS) などの手法が用いられます。グリカンは組成/構造が極めて多様で、エレクトロスプレーによってイオン化されにくいいため、グリカンを特性解析する MS による手法は困難な課題となっています。InstantPC は、ProZyme Inc. 社の新しい蛍光色素標識タグ (図 1) であり、イオン化効率と N-グリカン分子の感度の向上を目的に開発されました。

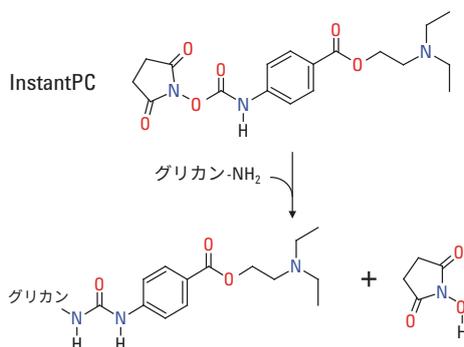


図 1. mAb から遊離され InstantPC で標識化された N-グリカンの構造式

グリカン分析の従来のメソッドは多大な労力を要するもので、PNGaseF を用いた酵素によるグリカンの遊離（一晚）から始まり、サンプルクリーンアップ、還元的アミノ化 (2-AB または InstantPC) を用いた蛍光色素標識タグによる標識化、最終的には LC-FLD または LC/MS 分析前の遊離した標識 N-グリカンのクリーンアップまで、数多くの手順が含まれます^{2, 3}。蛍光色素標識タグを使用し MS 感度が大幅に向上しているにもかかわらず、労働集約的な手作業でのサンプル前処理、低い再現性、サンプル処理のスケールアップに対する制限が、バイオ医薬品業界の大きな問題となっています。

この研究では、Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling Platform を用いて、グリカン特性解析ワークフローのサンプルスルーputを向上させる方法を紹介します。このソリューションは、Agilent 1290 Infinity II LC システム、Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラム、Agilent 高感度蛍光検出 (FLD)、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF で構成されています。Q-TOF データは Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアで自動的に解析されます (図 2)。このソリューションにより、簡便なサンプル前処理、効率的なデータ採取とデータ解析が可能になり、生産性が劇的に向上します。また、N-グリカンの質量データベースからの精密質量ピーク割り当てを用いた FLD または質量情報に基づいて、柔軟に定量を実行できます。

分析方法

サンプル前処理

この研究では、次に示す 4 種類のモノクローナル抗体 (mAb) サンプルを使用しました。

- モノクローナル抗体標準 RM 8671 は、米国国立標準技術研究所 (NIST) から入手したもので、NISTmAb とも呼ばれています。
- ハーセプチン製剤 (トラスツズマブ) は、Genentech (米国、カリフォルニア州、サウスサンフランシスコ) から調達しました。
- Sigma SiLu mAb は、Sigma-Aldrich から購入しました (SiLu Lite、P/N: MSQC4)。
- CHO mAb1 は Agilent R&D ラボで発現して精製しました。

すべての mAb サンプルは、AssayMAP Bravo 自動分注装置 (G5542A) と ProZyme Inc. 社の GlykoPrep-plus 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと InstantPC (96-ct) を使用してサンプル前処理を実行する前に、脱イオン水で 1.0 µg/µL に希釈しました。サンプル前処理の詳しい手順は、ProZyme のアプリケーションノート (製品コード: GPPNG-PC) に記載されています。最終のクリーンアップステップの後、溶出され、遊離され、標識化された N-グリカンは、最終容量の 50 µL となっていたため、前処理したサンプルの 1 µL には、1 µg の mAb からの N-グリカンが含まれていました。



図 2. mAb グリカンの特性解析ワークフロー

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B) 付き 1290 Infinity II LC システムと、デュアル Agilent Jet Stream イオン源付き 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムを組み合わせ実施しました。検出器は、PMT ゲイン = 10 で、 $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 345 \text{ nm}$ に設定しました。グリカンは、Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラム (2.1 × 100 mm、1.8 μm) を使用して、クロマトグラフィー分離されました。表 1 と表 2 は使用した LC/MS 分析条件を示しています。約 1 ~ 2 μL の各 N-グリカンサンプルが LC/MS 分析用に注入されました。

データ処理

InstantPC-標識の遊離 N-グリカンは、MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアの遊離グリカンワークフローを使用して解析されました。この分析ワークフローでは、Agilent パーソナル化合物データベース (PCD) のグリカンデータベースを使用します。この PCD グリカンデータベースにより、グリカンの正確な同定と確認が可能になります。最後に、BioConfirm B.09.00 のレポートビルダープログラムを使用し、解析結果をまとめたレポートが PDF 形式で生成されました。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC システム	
カラム	Agilent AdvanceBio グリカンマッピング、 2.1 × 100 mm、1.8 μm
サーモスタット	4 °C
溶媒 A	水酸化アンモニウムで pH = 4.5 に調整された 50 mM 酢酸
溶媒 B	アセトニトリル
グラジエント	0–0.5 分、75–71 %B 0.5–16 分、71–67.5 %B 1–22 分、67.5–60 %B 22–22.5 分、60–40 %B 22.5–23.5 分、40 %B (0.7 mL/min) 23.5–24 分、40–75 %B (0.7 mL/min) 24–30 分、75 %B (0.9 mL/min)
カラム温度	40 °C
流量	0.4 mL/min
注入量	2.0 μL

Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B) を使用しました。検出器は、PMT ゲイン = 10 で、 $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 345 \text{ nm}$ に設定しました。

表 2. MS の採取パラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム	
ガス温度	150 °C
乾燥ガス	9 L/min
ネブライザ (psig)	35
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10 L/min
VCap	3,000 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ電圧	120 V
スキマ電圧	65 V
Quad AMU	95
取り込みモード	低質量範囲、HiRes (4 GHz)
質量範囲	m/z 300 ~ 1,700
採取レート	2 スペクトル/秒

結果と考察

遊離され標識化されたグリカンの LC-FLD 分析は、治療用タンパク質のグリコシル化を決定するために広く使用されている手法の 1 つです。アジレントはこれまでに公開したアプリケーションノートで、さまざまなカラム寸法および分析条件を使用した複数の mAb グリカンプロファイルの最適な分離について紹介してきました^{4,5}。本書に記載された分離メソッドは総合的に最高のパフォーマンスを示しており、この研究におけるさまざまな mAb N-グリカンサンプルで最大限のピーク分離と優れた堅牢性を得られました。

図 3 は、NISTmAb の N-グリカンの代表的なクロマトグラム (FLD および MS EIC) を示しています。FLD クロマトグラム (図 3 の上の図、拡大図) から、15 個のグリカンピークが検出されたことがわかります。G0F および G1F イソ型、G2F などの主要な存在量のグリカンのグリコシル化パターンは、蛍光データと MS データの間で比較することができました (図 7)。

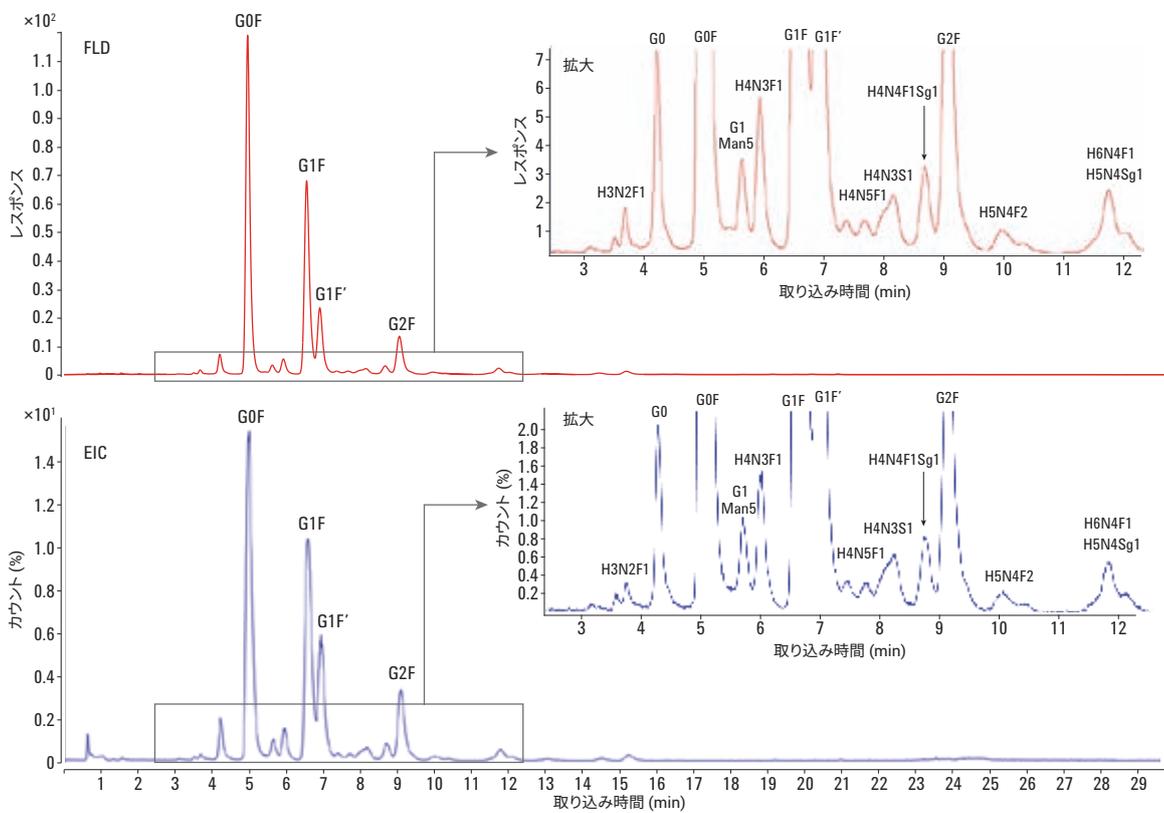


図 3. NISTmAb から InstantPC 標識化された N-グリカンの FLD クロマトグラムと質量スペクトル (EIC)

蛍光検出では構造を直接解明することはできませんが、mAb グリカンの MS 分析を使用するとグリカンの単糖類組成を特定できます。多くの mAb N-グリカンで、この組成により構造的課題を高い信頼性で解明できます。正電荷を持つ InstantPC タグと高感度 Agilent Jet Stream (AJS) エレクトロスプレーイオン (ESI) 源テクノロジーを組み合わせることで、N-グリカンに対する MS 検出感度が劇的に高まります。さらに、MS パラメータを最適化して InstantPC で標識化された N-グリカンの感度を最大に高めるとともに、壊れやすい分子のイオンソース内でのフラグメンテーションを最小に抑えました。最適化された条件によって MS スペクトル品質が大幅に向上し、正確な N-グリカンの同定および相対的定量

結果が導かれました。図 4 は、InstantPC で標識化された N-グリカン (G2F) の MS スペクトルを示しています。G2F のプロトン化された型の二価イオンの $[M+2H]^{2+}$ 、その付加体の $[M+H+Na]^{2+}$ と $[M+H+K]^{2+}$ のみが観察されました (注: InstantPC 標識が原因で、グリカンの遊離還元末端型と比べると質量が 261.1477 Da 増加しています)。

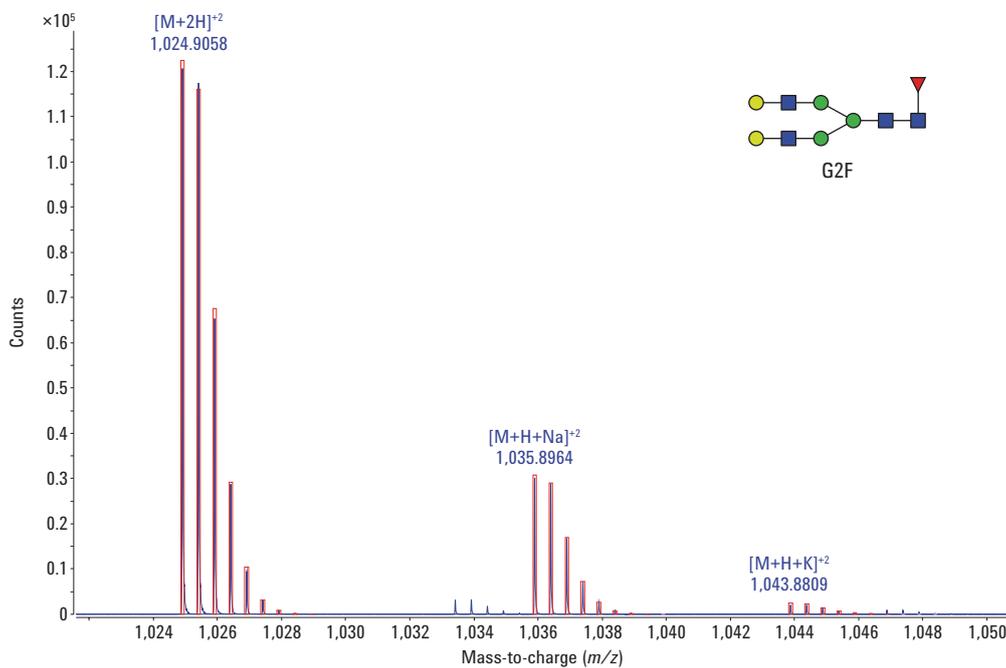


図 4. InstantPC で標識化された N-グリカン (G2F) の代表的なスペクトラム。InstantPC で標識化された G2F グリカンとその付加体の荷電状態の優れた同位体忠実度。赤色の枠は理論的同位体比、青色の線は実際の生 MS スペクトルを表しています。

MassHunter BioConfirm ソフトウェアによる遊離グリカンプロファイリングのワークフローを紹介してきました。このワークフローでは、サンプルバッチ分析を容易に設定できます。BioConfirm は、多数の商用またはカスタム仕様の蛍光色素識別タグに対応します。グリカンの精密質量情報および構造情報が含まれているパーソナル化合物データベース (PCD) を使用して、Agilent 独自の Find by Formula アルゴリズムによる同定が実行されます。続いて、まとめの分析レポートを、お客様が定義したレポートフォーマットで作成できます。図 5 は、同定されたグリカンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示しています。

BioConfirm での生体分子の結果テーブル (図 6) では、名前、質量、リテンションタイム、ピーク面積、組成、データベースマッチスコアを含むグリカンの詳細情報を即座に確認できます。複数の ID が、可能性のあるイソ型構造を持つグリカンと対応して表示されます。ユーザーはサンプルの TIC および個別のグリカン MS スペクトルを確認できます。さらに、複数

のファイルをバッチモードで処理して解析することが可能です。ユーザーは、相対定量分析のために、結果の表内で選択したグリカンのピーク面積を使用できます。

InstantPC 標識グリカンは、前に示したように、MS および FLD 分析において類似の相対的定量結果を示します⁴。Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアを使用し、CHO mAb1 サンプルの FLD クロマトグラムを積分しました。存在量が多い順に 7 番目までの N-グリカンの相対合計アブダンスを計算して、MS 解析で得られる同じデータと比較しました (図 7)。同等の結果を得るには、MS 検出器が飽和しないようにする必要があります。ワークフローに最適な分量にするには、約 0.5 µg の mAb から遊離された N-グリカンを注入します。

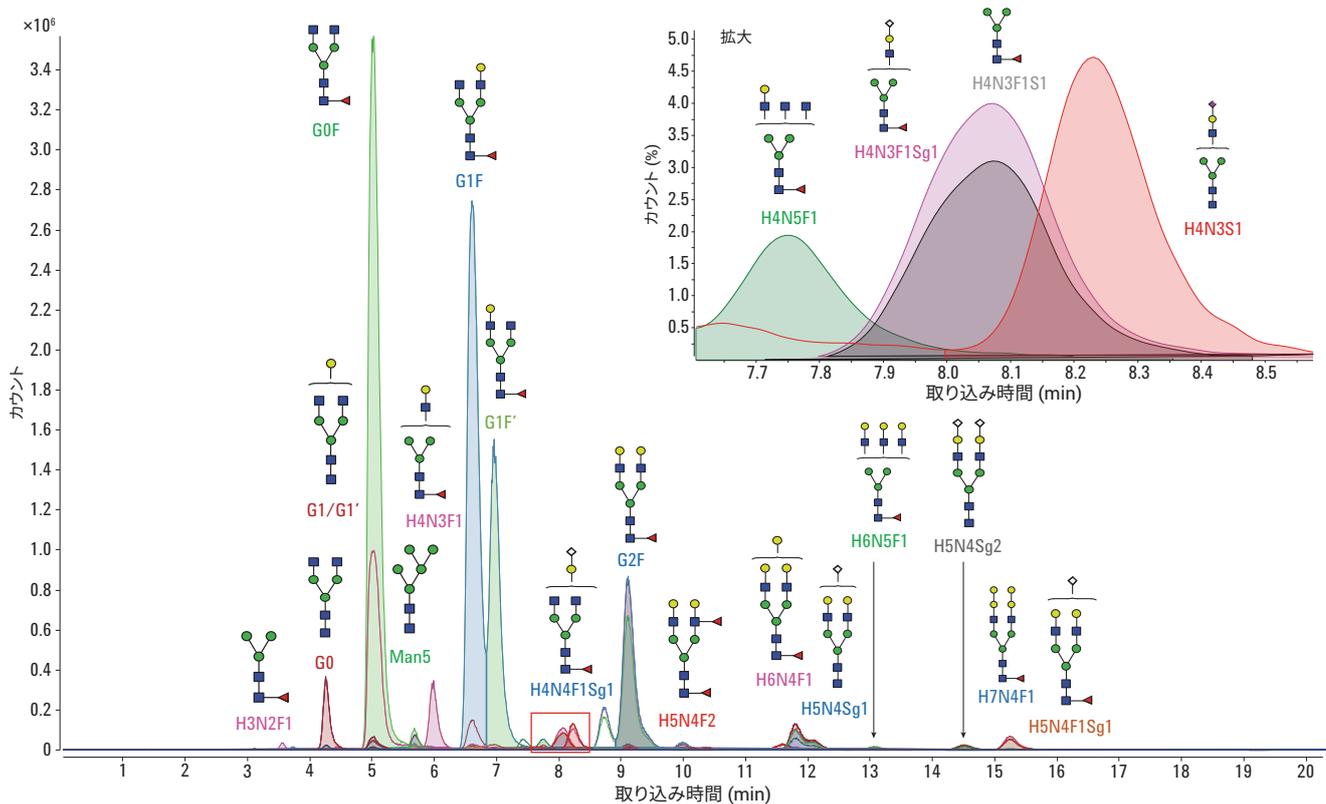


図 5. NISTmAb からの同定されたグリカンの抽出イオンクロマトグラム。挿入図: 7.6 ~ 8.6 分のリテンションタイムの範囲に溶出され、同定されたグリカンの EIC の拡大図

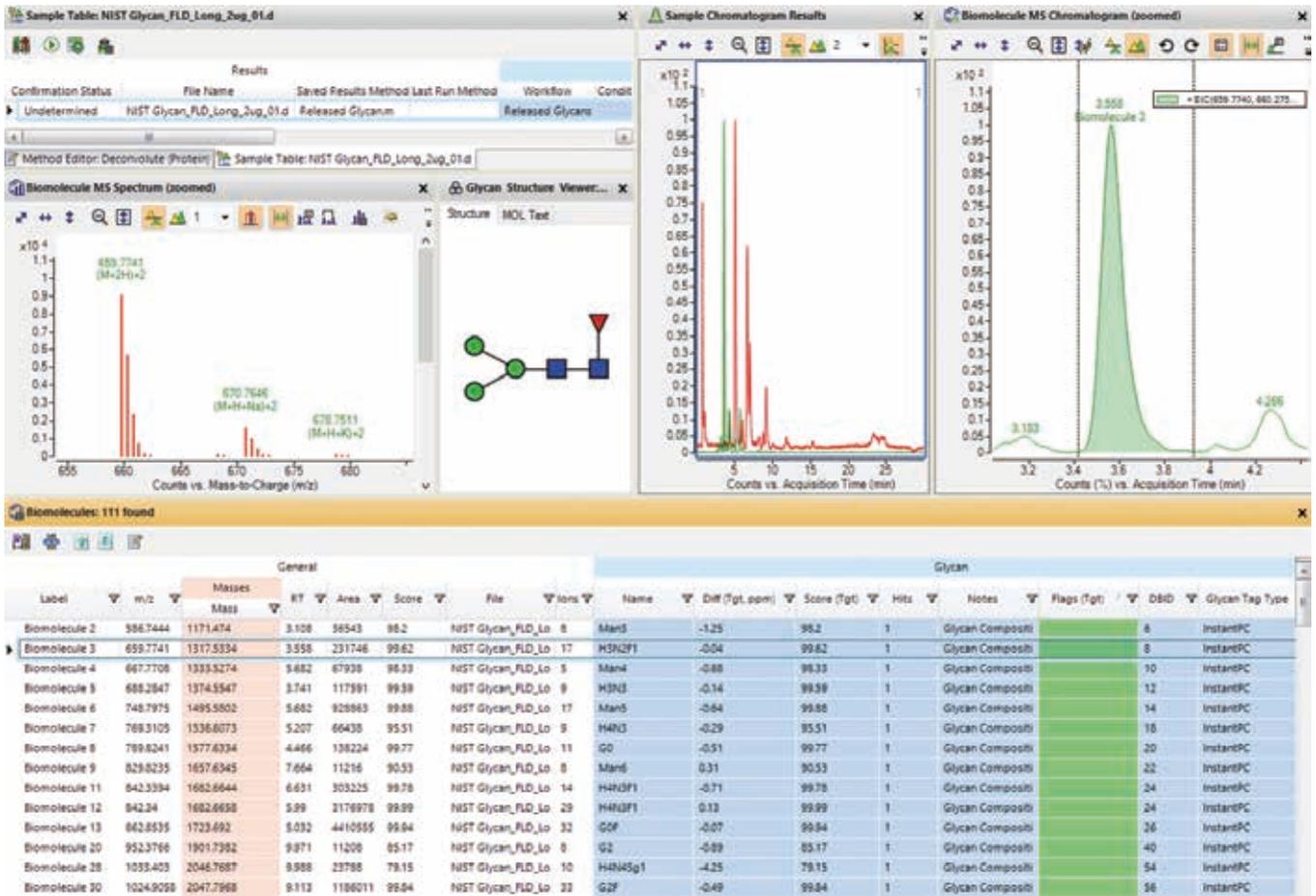


図 6. 代表的なグリカンプロファイリング結果を表示する Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアのスクリーンショット

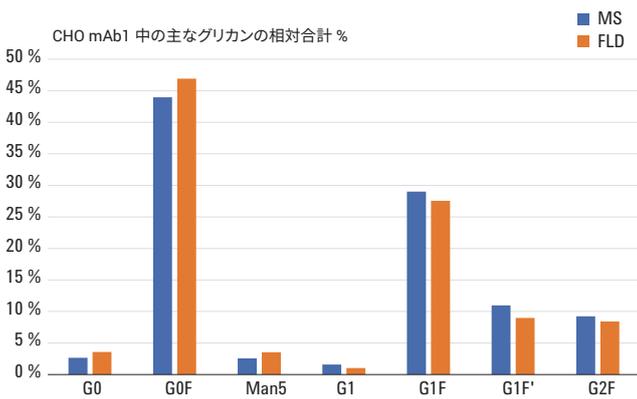


図 7. CHO mAb1 (0.5 µg) 中の主要な N-グリカンの相対合計 % を MS ベースの定量 (青色) と FLD ベースの定量 (オレンジ色) の結果で比較

MSの結果をまとめ比較するために、各 mAb サンプルについて存在量が多い順に 5 番目までの N-グリカンを使用して相対合計 % を計算しました。図 8 はこのデータを示しています。

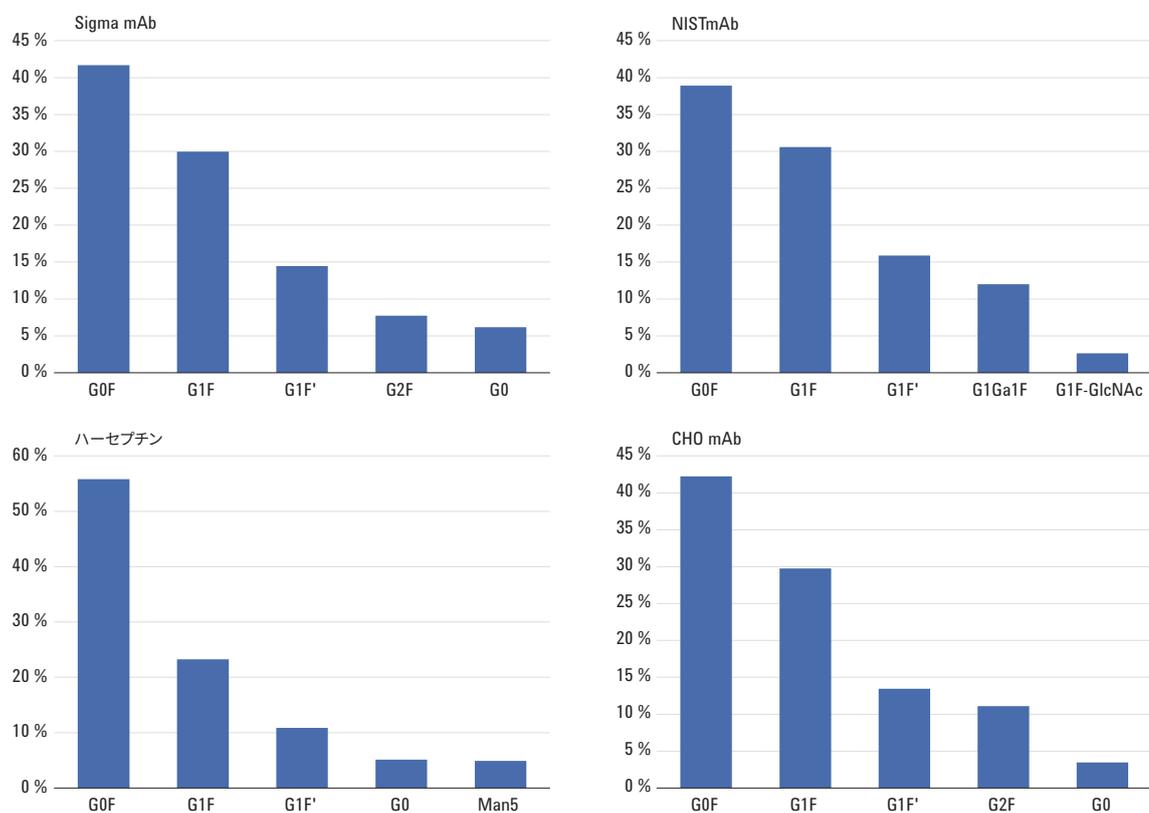


図 8. 4 種類の mAb サンプルそれぞれで存在量の多い順に 5 番目までの N-グリカンの相対合計 %。

注: NISTmAb には追加のアルファ-1,3-ガラクトースを持つ G1F であることが推測される構造が含まれ、これには G1Ga1F のラベルが付けられました。

BioConfirm B.09.00 ソフトウェアを使用することで、レポートビルダープログラムで独自のグリカンプロファイルレポートを作成できます。図 9 は、遊離グリカンのレポートの例を示しています。レポートビルダーにより、サンプル情報、サンプルクロマトグラム、生体分子のサマリ、生体分子の詳細などの情報を用いて各レポートセクションをカスタマイズすることができます。対応するグリカン構造が、同定されたグリカンとともに表示されます。

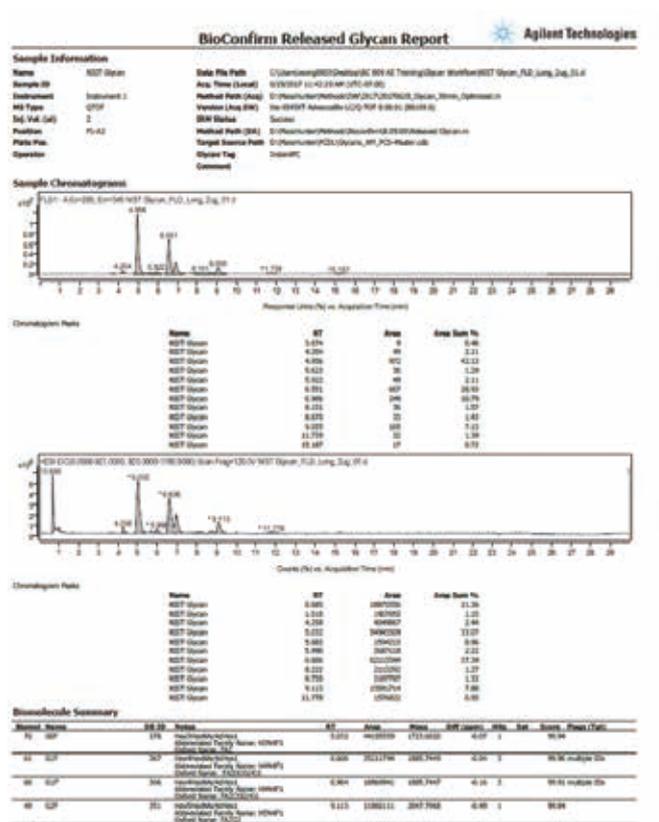
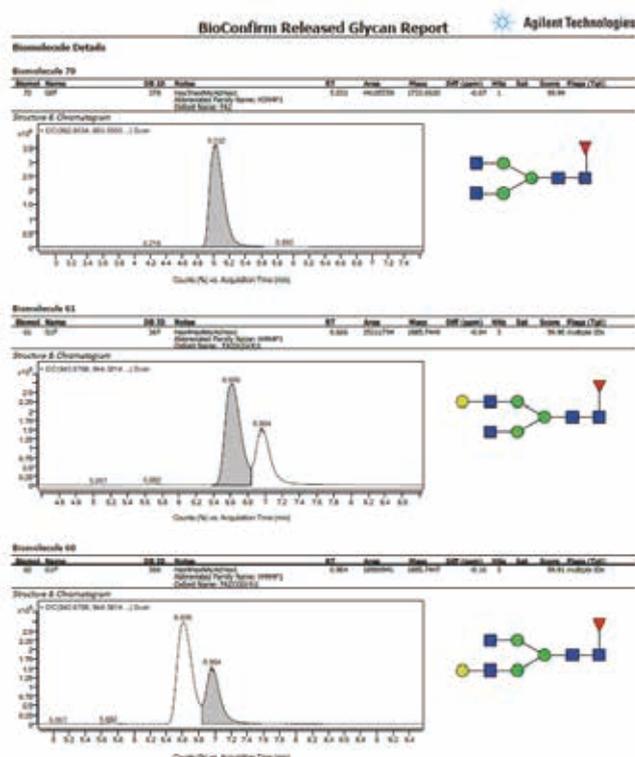


図 9. Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェア: 遊離グリカンのレポート



結論

この研究では、Agilent AssayMap Bravo、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、MassHunter BioConfirm ソフトウェアを、遊離グリカン分析用の統合ソリューションとして使用した場合の性能が示されました。

- ワークフローでは、高スループットのサンプル前処理を、Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムによる優れたクロマトグラフィー分離と組み合わせました。
- 容易な設定と BioConfirm B.09.00 に付属するグリカンのデータベースを使用することで、正確なプロファイリングと同定が可能になり、相対定量を実行できました。
- 6545XT-ベースのグリカン分析で得られた定量結果は、蛍光分析の定量結果と類似しており、さまざまな mAb サンプルにわたって異なる N-グリカンと比較できます。
- BioConfirm B.09.00 のレポートビルダー機能では、カスタムレポートを作成できます。

以上から、アジレントのソリューションはサンプル前処理から高精度なデータ解析までの N-結合グリカン分析のプロセス全体を自動化できることがわかりました。この手法は、蛍光分析を使用したグリカン分析と質量分析検出による追加の同定において、高感度と最高の定量を達成しました。

参考文献

- Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. "Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic" P. Natl. Acad.Sci.**1994**, 91, 6123-6127.
- Anumula, K. R. "Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates" Anal.Biochem.**2006**, 350, 1-23.
- N-Glycan Analysis of mAbs and Other Glycoproteins with UHPLC and Fluorescence Detection, Agilent Technologies, publication number 5991-5253EN.
- Comparison of Relative Quantification of Monoclonal Antibody N-glycans Using Fluorescence and MS Detection, Agilent Technologies, publication number 5991-6958EN.
- Analysis of Monoclonal Antibody N-glycans by Fluorescence Detection and Robust Mass Selective Detection Using the Agilent LC/MSD XT, Agilent Technologies, publication number 5991-8071EN.

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

カスタマコンタクトセンタ

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, October 11, 2017

5991-8550JAJP