

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を 用いた 3 レベルでのモノクローナル抗体の グリコシル化のプロファイリング

著者

David L. Wong
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) とその誘導体は、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。近年の mAb 製品の承認件数と販売数の急激な増加に伴い、包括的な分析および特性解析機能のニーズが高まっています。mAb は本質的に不均一な分子で、さまざまなタイプの配列、修飾、構造変異体で構成されています。タンパク質のグリコシル化は、多くの生物学的プロセスで重要な役割を果たす mAb の主要な翻訳後修飾 (PTM) の 1 つです。mAb 分子へのグリカン結合の分布と組成は治療の効果や免疫原性に影響を与えることがあります。このため、一貫性のあるグリコシル化と関連する治療用 mAb の品質管理は、医薬品の生物学的処理において高い優先事項となっています¹。

四重極飛行時間型 (Q-TOF) 液体クロマトグラフィー / 質量分析計 (LC/MS) システムは、インタクト mAb および mAb サブユニットの分析に広く使用されています。これらの機器は広い質量レンジで優れた質量精度と分離能を備えており、mAb ペプチドシーケンスマッピングの実行、PTM の特性評価に有用です^{2~4}。

通常、グリカン/グリコフォームの特性解析には 4 つのレベルの LC/MS ワークフローがあります (図 1)。

- レベル 1 とレベル 2 は、インタクトおよび還元済みの mAb 分子のグリコフォームの分析に焦点を当てています。
- レベル 3 は、mAb のタンパク消化から生成されたグリコペプチドの分析で、一般的にペプチドシーケンスマッピングワークフローの一部です。
- レベル 4 は、酵素による切断などのメカニズムによって遊離されたグリカンの特性解析です。

以前のアプリケーションノートで IgG タンパク質のグリコペプチド分析 (レベル 3) については報告しているため⁵、今回の研究ではその他の 3 つの主な LC/MS ベースのワークフロー (レベル 1、2、4) を NISTmAb を使用して評価しました。3 つのワークフローのアプローチはすべて、所定のタンパク質についてグリコシル化の存在を定量的に理解することを目指しています。ワークフローでは次の機器を使用します。

- Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling Platform
- Agilent 1290 Infinity II LC システム
- Agilent PLRP-S カラムまたは AdvanceBio グリカンマッピングカラム
- 高感度な Agilent 蛍光検出器 (FLD)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム

データは 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF で取り込まれ、Agilent MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアで自動解析されます (図 2)。このソリューションにより、簡便なサンプル前処理と効率的なデータ採取が可能になり、生産性が劇的に向上するだけでなく、データ解析の精度も高まります。

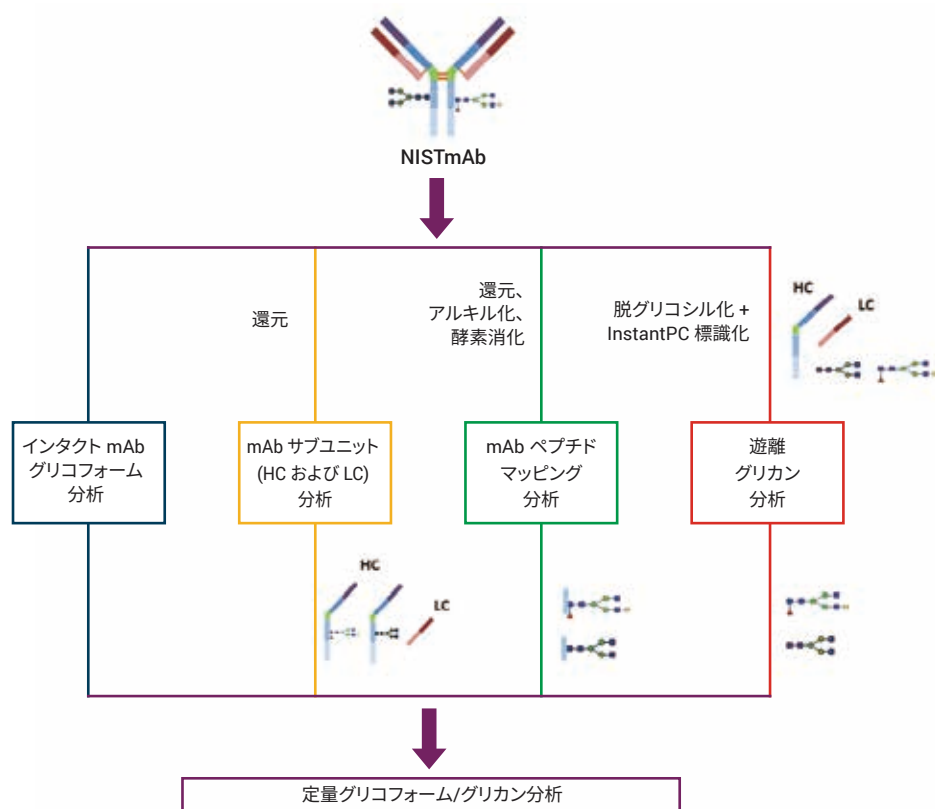


図 1. さまざまなグリコフォーム/グリカンの定量分析のワークフロー



図 2. mAb グリコフォーム/グリカンの特性解析ワークフローの分析コンポーネント

分析方法

材料と方法

NISTmAb と呼ばれている、モノクローナル抗体の標準品、RM 8671 は米国国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。2,2,2-トリフルオロエタノール (TFE)、DL-ジチオスレイトール (DTT)、tris(2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) は Sigma-Aldrich から入手しました。Rapid PNGase F は New England BioLabs から購入しました。GlykoPrep-plus 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと InstantPC (96-ct) は ProZyme, Inc. から購入しました。すべてのワークフローで使用した NISTmAb サンプルは 1.0 µg/µL になるように DI 水で希釈しました。

サンプル前処理

インタクト mAb グリコフォームの分析ワークフローではサンプル前処理が不要でした。NISTmAb サブユニット (重鎖) のグリコフォームを正確に定量分析するには、完全なタンパク質の還元が必要でした。このため、60 °C での 40 mM DTT による最初の還元反応を 30 分間実行した後、追加の 25 mM TCEP 反応 (室温で 30 分) を実行しました。最後に、

Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling システム (G5542A) を遊離グリカン定量ワークフローで使用しました。サンプル前処理の詳細な手順については、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。最後のクリーンアップステップ後、遊離され標識化された N-グリカン溶出の最終濃度は 1.0 µg/µL でした。

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で実施しました。インタクト NISTmAb および還元された NISTmAb の LC 分離は、Agilent PLRP-S カラム (2.1 × 50 mm、1,000 Å、5 µm) を使用して得られました。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。蛍光検出器は、PMT ゲイン = 10 で、 λ_{Ex} = 285 nm、 λ_{Em} = 345 nm に設定しました。表 1 と表 2 は使用した LC/MS 分析条件を示しています。インタクトおよびサブユニット分析では、約 0.5 µg のタンパク質を注入しました。N-グリカンの実験では、1

〜 2 µg のインタクトタンパク質から遊離したフリーなグリカンを注入しました。

データ処理

MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアには、主に 3 つのバイオ医薬品分析ワークフロー (インタクト mAb、ペプチドマッピング、遊離グリカンプロファイリング) の機能があり、今回の調査においてすべてのデータ処理に使用しました。この強力なソフトウェアプログラムにより下流のデータ解析が簡素化され、分析対象の生体分子の自動識別および相対的な定量が可能になります。遊離グリカンのワークフローでは、グリカンの正確な同定と確認が可能な Agilent パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) のグリカンデータベースを使用しました。

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			
サンプルタイプ	インタクト mAb	mAb サブユニット (HC および LC)	mAb 遊離グリカン
カラム	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 1,000 Å, 5 µm (p/n PL1912-1502)	Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 1,000 Å, 5 µm (p/n PL1912-1502)	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm (p/n 858700-913)
サーモスタット	4 °C	4 °C	4 °C
溶媒 A	0.1 % 胃酸水溶液	0.1 % 胃酸水溶液	水酸化アンモニウムで pH = 4.5 に調整された 50 mM 胃酸
溶媒 B	0.1 % 胃酸 100 % アセトニトリル溶液	0.1 % 胃酸 100 % アセトニトリル溶液	アセトニトリル
グラジエント	0–1 分、0–20 %B 1–3 分、20–50 %B 3–4 分、50–70 %B	0 分、25 %B 5 分、45 %B 6 分、60 %B 6–7 分、60 %B	0–0.5 分、75–71 %B 0.5–16 分、71–67.5 %B 16–22 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	60 °C	60 °C	40 °C
流量	0.5 mL/min	0.8 mL/min	0.4 mL/min
注入量	0.5 µL	1.0 µL	2.0 µL

結果と考察

炭水化物の組成、構造、相対量レベルは、治療用タンパク質の安全性および効能に関する重要な要素です。グリカンの構造の詳細な研究は、新薬の発見や開発に役立つ可能性もあります。

インタクトタンパク質レベルでの mAb グリコフォームの特性解析は、医薬品のバイオプロセス処理中に mAb グリコシル化を短時間で評価およびモニタリングするためのメソッドとして普及しています。

インタクト NISTmAb サンプルは、1290 Infinity II LC システムと 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 質量分析計とを組み合わせ使用し、Agilent PLRP-S カラムで分析しました。図 3 に示すように、MassHunter BioConfirm B.09.00 ソフトウェアの最大エントロピーアルゴリズムを使用して質量スペクトルのデコンボリューションを実行しました。

表 2. MS の測定パラメータ

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム			
サンプルタイプ	インタクト mAb	mAb サブユニット (HC および LC)	mAb 遊離グリカン
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream	デュアル Agilent Jet Stream	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	350 °C	350 °C	150 °C
ガス流量	12 L/min	12 L/min	9 L/min
ネブライザ	60 psig	35 psig	35 psig
シースガス温度	400 °C	350 °C	300 °C
シースガス流量	11 L/min	11 L/min	10 L/min
VCap	5,500 V	4,000 V	3,000 V
ノズル電圧	2,000 V	500 V	500 V
フラグメンタ電圧	380 V	180 V	120 V
スキマ電圧	140 V	65 V	65 V
Quad AMU	500 m/z	300 m/z	95 m/z
質量範囲	100-10,000 m/z	100-3,200 m/z	300-1,700 m/z
採取レート	1.0 スペクトル/秒	1.0 スペクトル/秒	2.0 スペクトル/秒
参照質量	922.0098	922.0098	922.0098
取り込みモード	ポジティブ、拡張 (10,000 m/z) 質量範囲	ポジティブ、標準 (3,200 m/z) 質量範囲、HiRes (4 Gz)	ポジティブ、低質量範囲、HiRes (4 Gz)

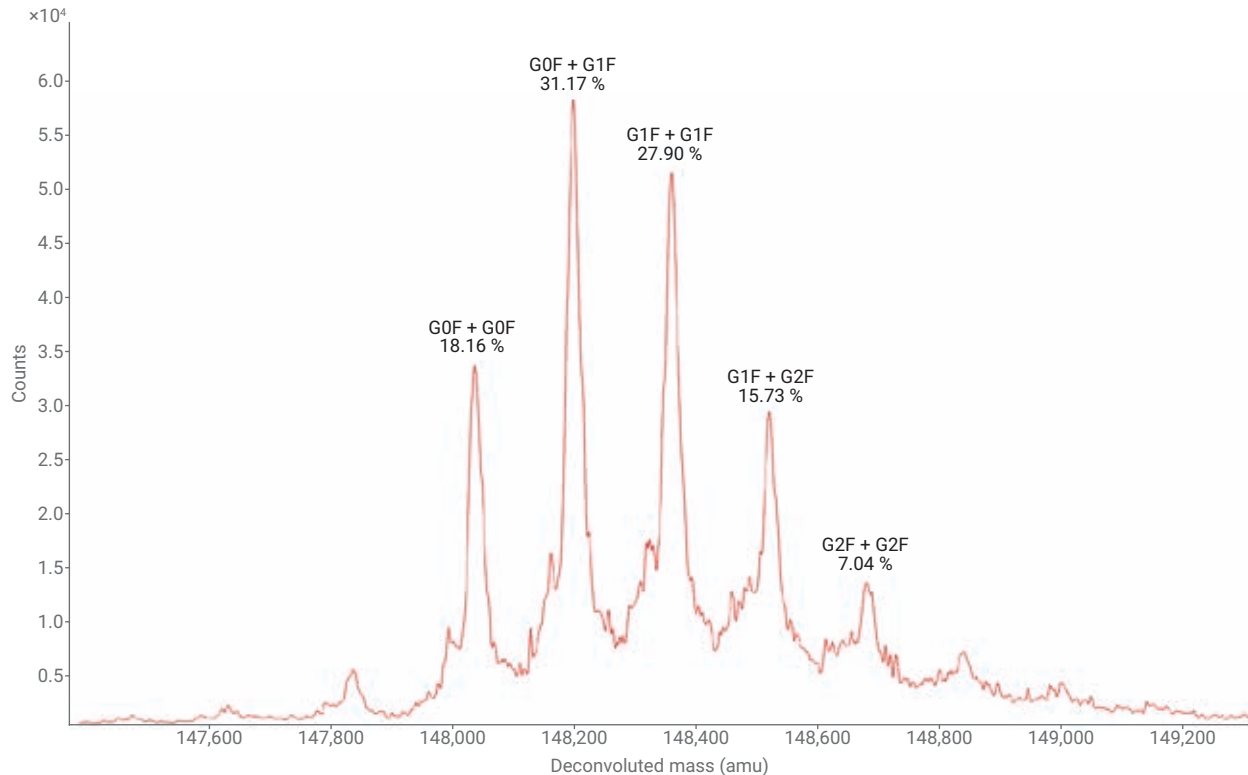


図 3. インタクト NISTmAb 標準の MS デコンボリュートしたスペクトル (最大エントロピー) および 5 種類の主要なグリコフォームと相対量の表示

通常、MS の未加工データを取り込むと、自動モードで BioConfirm インタクトタンパク質ワークフローが使用されます。これにより、スペクトルが任意の分離ピークにわたって合計された後、mAb のインタクト質量としてデコンボリューションされます。次に、測定した質量を、タンパク質データの既知の mAb 配列に基づいた理論上の質量と照合することによって、生体分子の各ピークが確認されました。識別されたすべてのグリコフォームの相対量も、デコンボリューションされた質量スペクトルのピークの高さまたはピーク面積を使用して自動的に計算されました。BioConfirm では、リストから削除またはリストに追加できる任意のグリコフォームの相対量率の再計算が可能です。

図 4 は、0.5 µg オンカラムでサンプルを 10 回繰り返し注入して得られた NISTmAb の 5 つの主要なグリコフォームの相対量と再現性をまとめたものです。ピーク高の分析から得られた定量的結果は、ピーク面積の計算から得た結果と類似しましたが、ピーク高の解析結果では精度がすべてのグリコフォームの平均標準偏差 (SD) で 1 % 未満となり、一方、ピーク面積の結果の平均 SD は約 1.62 % でした。

BioConfirm B.09.00 ソフトウェアの 1 つの機能として、異なるサンプルの中からグリコフォームを選択して、相対量を比較できる機能があります。図 5 は、2 つの NISTmAb サンプル (1 と 2) のデコンボリュートしたスペクトルのミラープロットイメージを示しています。詳細な解析には、G1F + G1F グリコフォーム (ハイライト) を選択しました。図 5 の表は、ピーク高およびピーク面積データのどちらを使用しても、両方のサンプルがきわめて類似した定量的結果になることを示します。

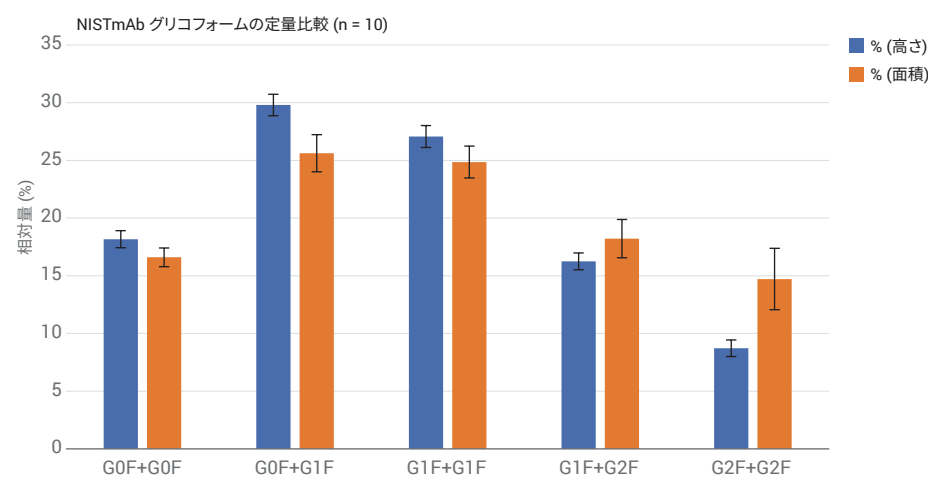
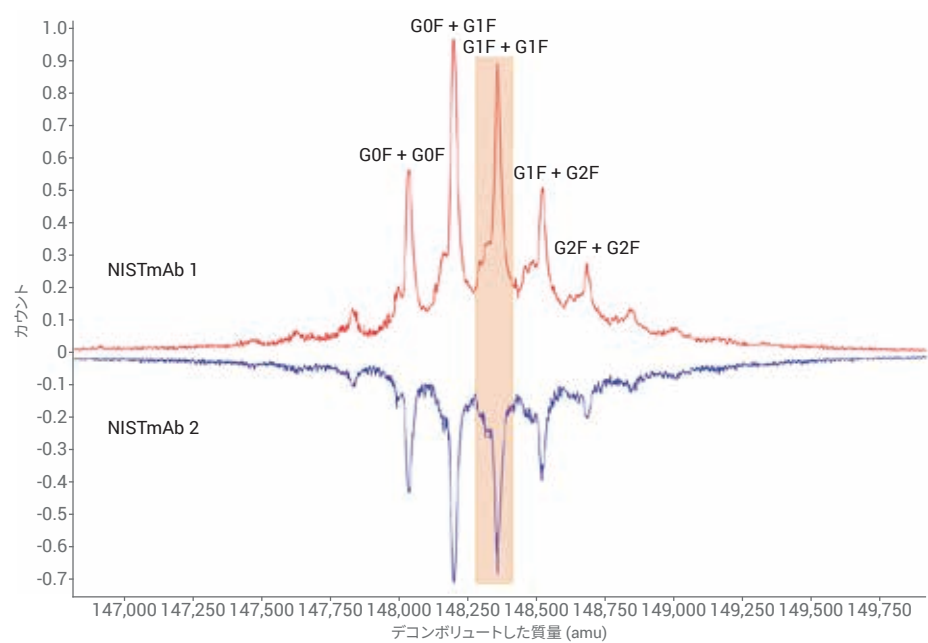


図 4. インタクト NISTmAb グリコフォーム分析で得られた定量的結果 (10 回繰り返し分析)



General			% Quantitation					Sequence match
Mass	RT	File	Use for % quant	Height (MS)	% Quant (height)	Area (MS)	% Quant (area)	Pred mods
148,363.0381	2.229	NIST mab_1.d	☒	8,387	28.43	6,527,163	27.71	2*G1F(1607.5013)
148,362.5884	2.261	NIST mab_2.d	☒	6,268	29.5	4,936,695	28	2*G1F(1607.5013)

図 5. 2 つの NISTmAb サンプル間のグリコフォーム (G1F+G1F) の定量的結果の比較

NISTmAb サンプルは、mAb サブユニットの分析にも使用しました (レベル 2)。NISTmAb の重鎖に付加したグリコフォームの正確な定量結果を得るには、NISTmAb の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) の均一なフォームを生成することが重要です。このため、すべての分子内および分子間のジスルフィド結合による架橋を完全に還元するために、DTT および TECP 反応との組み合わせによるタンパク質全体の還元が実行されました。図 6A は、2 個の主要なサブユニットが

分離した、還元された NISTmAb のトータルイオンクロマトグラムを示しています。きわめて短い HPLC グラジエントを使用し、液体クロマトグラフィーでの LC と HC との優れた分離が実現できました。図 6B は NISTmAb 重鎖 (図 6A の薄緑の影) のデコンボリューションしたスペクトルを示しています。3 つの主要なグリコフォーム (G0F、G1F、G2F) が観察され、相対アバundanceが計算されました。

さらに、10 回の繰り返し測定からの 3 つのグリコフォームの平均の相対量の値もそれぞれ 39.14 %、47.68 %、13.18 % と計算されました。これらの結果の平均 SD は 0.24 % 未満でした (図 7)。

遊離グリカンの分析 (レベル 4) のために、UHPLC、Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling Platform、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、自動データ処理用の MassHunter BioConfirm ソフトウェアを統合してワークフローソリューションを開発しました⁴。簡単に

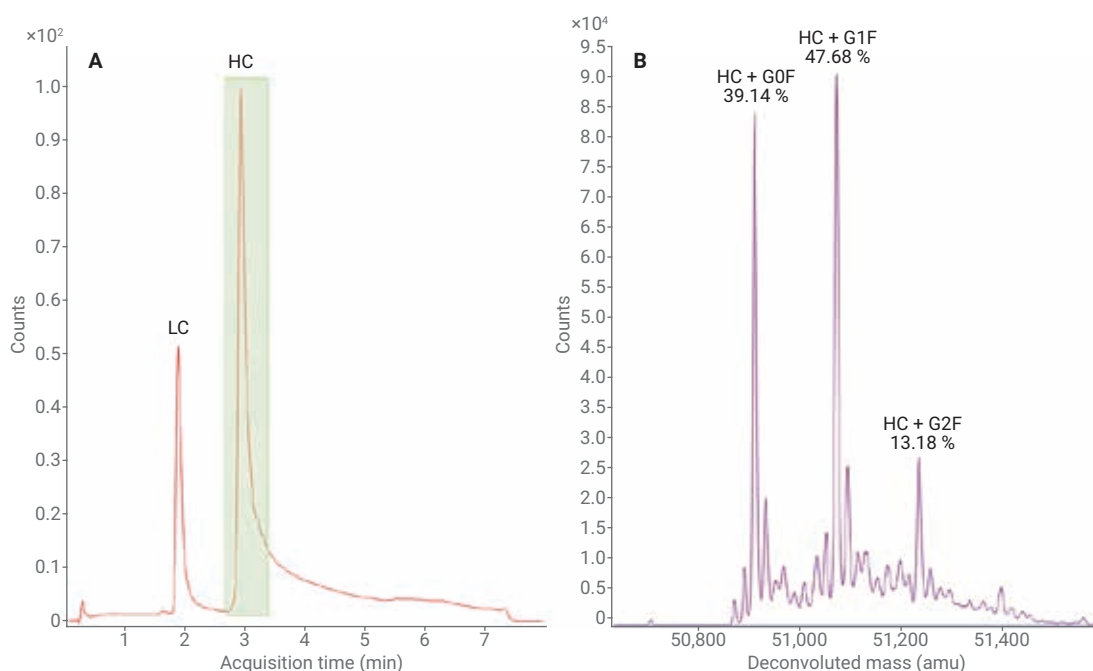


図 6. トータルイオンクロマトグラム (A)、および NISTmAb サブユニットの MS デコンボリューション (B)

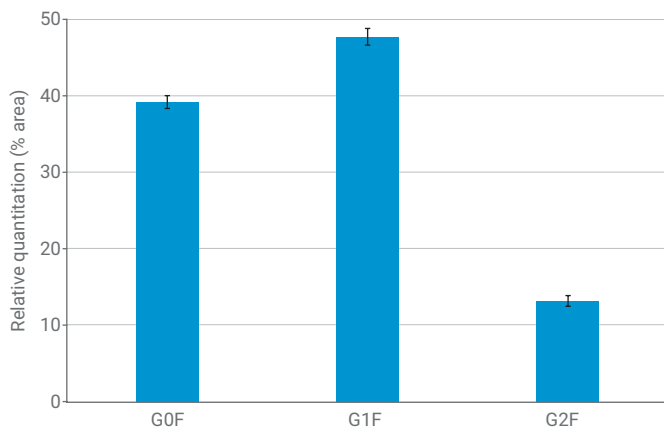


図 7. NISTmAb サブユニットワークフローからの定量結果

説明すると、PNGaseF によって NISTmAb の N-グリカンを経路により遊離した後、蛍光タグ (InstantPC) で標識化し、LC-FLD と LC/MS で分析しました。AssayMAP Bravo Liquid Handling システム (G5542A) をハイスループット方式で使用して、すべてのサンプル前処理が実行されました。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した。

図 8 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 8 の上の図、拡大図) から、15 個以上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多いグリカンのグリコシル化パターンは、蛍光データと MS データの間で類似しました。

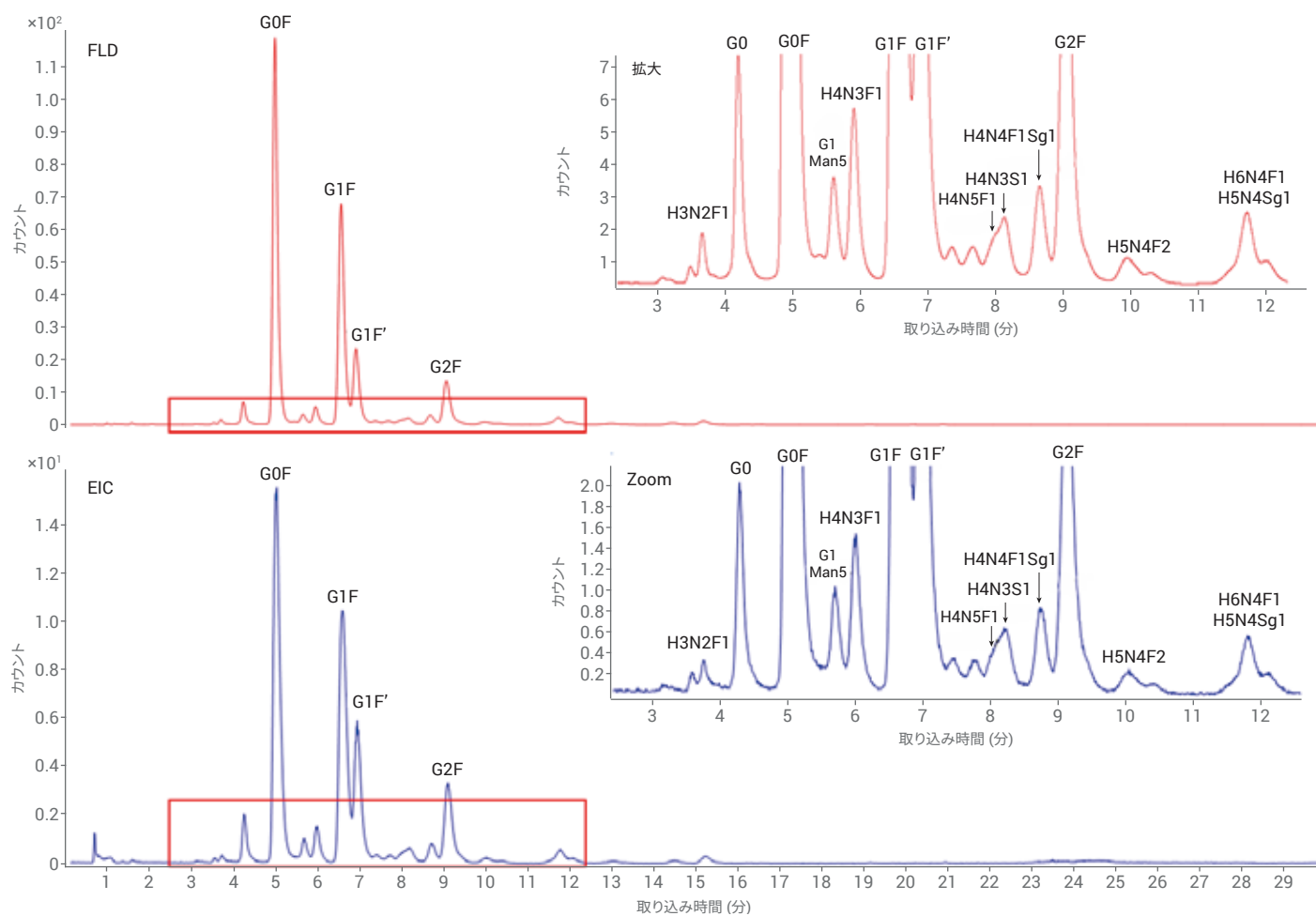


図 8. NISTmAb から InstantPC 標識化された N-グリカンの FLD クロマトグラムと質量スペクトル (EIC)

図 9 は、NISTmAb サンプルの N-グリカンの相対合計 % を存在量が多い順に 4 番目まで示しています。また、これらのグリコフォームの相対量 (%) の結果と NISTmAb サブユニットワークフロー (レベル 2) の結果は類似しました。レベル 2 と 4 での結果のわずかな違いは、定量分析で使用したレベル 2 サンプルで、小さなグリコフォームのピークを除外したことが原因であると考えられます。しかし、AdvanceBio Glycan Mapping カラムを使用したことで、G1F アイソフォームの優れたクロマトグラフィーによる分離と正確な定量が得られました。全体として、このアプローチにより、不完全な mAb 還元を原因とするサンプルの不均質性のために生じるグリカンピークの割り当てとピーク定量についての不確実性を解消することもできます。

結論

Agilent AssayMAP Bravo Liquid Handling Platform、UHPLC テクノロジー、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを統合することによって、抗体のグリコフォームを特性評価するための包括的なワークフローソリューションを開発しました。このアプローチで得られる柔軟なワークフローにより、次の 4 つの異なる分析レベルでグリカンの相対的な定量を求めることができます。

- インタクト mAb ワークフローでは、インタクト mAb の主要なグリコフォームを短時間で評価できました。同じサンプルのさまざまなタイムポイントから、または異なるバッチサンプルから得られた同じグリコフォームを、簡単にモニタリングし比較できます。

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. 2018
Printed in Japan, January 2, 2018
5991-8796JAJP

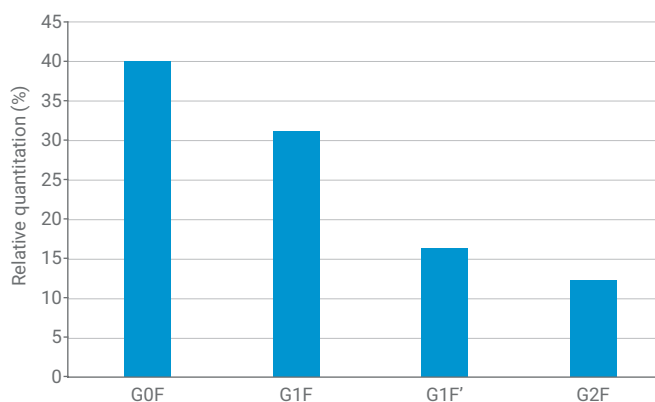


図 9. NISTmAb の遊離されたグリカンワークフローからの定量結果

- mAb のサブユニットのワークフローでは、G0F、G1F、G2F などの個々のグリカンについて詳細な定量情報を得られます。このワークフローは全体的にスループットが高いため、二重特異性 mAb を含む大部分の mAb とその変異体の精密質量測定に最適なメソッドです。
- ペプチドマッピングワークフローによるグリコペプチド分析では、グリカンの相対的な定量だけでなく、N-グリコシル化の部位の情報も得られました。Agilent AdvanceBio Glycan Mapping (HILIC) カラムは、親水性のグリコペプチドにおける強力なリテンションと向上した分離能を示しました。
- 遊離グリカンのワークフローは、蛍光検出と質量分析検出の両方を使用し、グリカン分析のための高い分析感度と最適な定量を提供しました。グリカン (G1F アイソフォーム) の優れた分離と BioConfirm B.09.00 で提供されるグリカンのデータベースの使用により、同定と相対定量において正確なグリカンプロファイリングが可能になりました。

参考文献

1. Rademacher, T. W.; Williams, P.; Dwek, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 6123-6127.
2. Precise Characterization of Intact Monoclonal Antibodies by the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, Agilent Technologies, publication number 5991-7813EN.
3. Making Peptide Mapping Routine with the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF, Agilent Technologies, publication number 5991-7815EN.
4. A Comprehensive Approach for Monoclonal Antibody N-linked Glycan Analysis from Sample Preparation to Data Analysis, Agilent Technologies, publication number 5991-8550EN.
5. Separation of IgG Glycopeptides using HILIC-LC-MS in Comparison to RP-LC-MS, Agilent Technologies, publication number 5991-4903EN.