

## リン酸化 N-グリカンの分析における 優れた回収率の達成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムおよび  
PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム

### 著者

Koen Sandra, Jonathan  
Vandenbussche,  
Gerd Vanhoenacker, and  
Pat Sandra  
Research Institute for  
Chromatography (RIC)  
President Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium  
Sonja Schneider, Sonja  
Krieger, Linda Lloyd, and Udo  
Huber  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

リン酸基は、ステンレス製部品と相互作用し、HPLC や LC/MS 分析において回収率の問題が生じることが知られています。これは、リソソームの酵素に結合したヌクレオチド、リン酸化ペプチド、リン酸化グリカンで見られる現象です。

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを用いた、治療用酵素から遊離したリン酸化 N-グリカンの分析について説明します。

## はじめに

タンパク質バイオ医薬品は、急速に成長している治療薬で、命にかかわるさまざまな疾患の治療に広く用いられています<sup>1,2</sup>。タンパク質バイオ医薬品の約 40 % がグリコシル化されており、グリカンの質量は、モノクローナル抗体 (mAb) での 2 ~ 3 % から、エリスロポエチン (EPO) での 50 % までの幅があります。グリコシル化は、医薬品の効能と安全性に影響を及ぼす可能性がある重要な品質特性です。次に例を示します。

- 複合型 N-グリカンの末端のシアル酸残基が、血流中の EPO の半減期を調節します。
- コアフコシル化は mAb のエフェクター機能に影響を与えます。
- マンノース-6-リン酸基は、治療用酵素をリソソームへ輸送するのに不可欠です。リソソームは、治療用酵素が触媒活性を示すのに必要な細胞小器官です<sup>1,2</sup>。

このように、グリカン構造の解析は必要不可欠です。

蛍光検出器 (FLD) 付の親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と 2-アミノベンズアミド (2-AB) によるラベル化が、バイオ医薬品から酵素により遊離した N-グリカンの分析にきわめて有効と考えられています<sup>1,2</sup>。この方法は、中性のシアル酸付加された N-グリカンにおいては実証済みですが、リン酸化 N-グリカンの分析では、回収率が低く、再現性のないデータとなることがよくあります。これは、リン酸基と流路のステンレス製部品の相互作用によるものです。この問題は、トリエチルアミンなどのイオンペアリング剤を含む移動相を用いることで、あるいは高性能イオン交換クロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリ検出 (HPAEC-PAD) によって高 pH (pH > 12) で分離することで、軽減される場合が多々あります。

このアプリケーションノートでは、サンプル流路全体が金属フリーの場合に、リン酸化グリカンを最適なメソッドで分析できることを実証します。そのために、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを用いました。

## 実験方法

### 材料

アセトニトリルと水は Biosolve (ファルケンズワールト、オランダ) から入手しました。ギ酸アンモニウムは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。2-AB ラベル化 RNase B と遺伝子組み換えヒト酸性アルファ-グルコシダーゼ N-グリカンは、地域のバイオテクノロジー企業から入手しました。

### 装置構成

HILIC-FLD 測定は、次の装置構成で実施しました。

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム:

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション 019) 付
- Agilent 1260 Infinity II 蛍光検出器 (G7121B)、バイオイナートフローセル (オプション 228) 付

HILIC-MS 測定は、次の装置構成で実施しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム:
  - Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
  - Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)
  - Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション 019) 付
- Agilent 6500 シリーズ Accurate-Mass 四重極飛行時間型 LC/MS システム (G6545A)、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン (ESI) 源付

### ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1
- Agilent MassHunter、機器コントロール用 (B06.01)
- Agilent MassHunter、データ解析用 (B07.00)

## 結果と考察

図 1 は、ステンレス製と PEEK ライナ付 AdvanceBio Glycan マッピングカラムを取り付けた Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを用いて、2-AB ラベル化した中性の高マンノース型 RNase B N-グリカン进行分析した結果を示しています。分析した中性のグリカンについて、両カラムで同様のクロマトグラムが得られました。2-AB ラベル化グリカンは重合度に基づいて溶出されます。すなわち、グリコシド結合の数が増えるにつれ、リテンションタイムが長くなります。同じ重合度の化合物を分離するための十分な選択性の違いがあります。これは M7 異性体で、グリカン分岐におけるマンノース残基の位置が異なります。

## メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、ステンレス製、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 683775-913) Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、PEEK ライナ、2.1 × 100 mm、2.7 μm (特注品)
移動相 A	100 mM NH <sub>4</sub> 酢酸、pH 4.5
移動相 B	アセトニトリル
グラジエント	0 ~ 38 分:80 ~ 60 %B
流量	0.4 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL
検出	励起 260 nm、発光 430 nm
<b>Q-TOF ソース</b>	
	Agilent Jet Stream ポジティブイオン化モード
ドライガス温度	300 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	35 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	8 L/min
ノズル電圧	1,000 V
キャピラリー電圧	3,500 V
フラグメンタ電圧	150 V
<b>Q-TOF 検出</b>	
質量範囲	3200 amu
取り込み範囲	500 ~ 3,200 m/z
	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
データ取り込みレート	毎秒 1 スペクトル

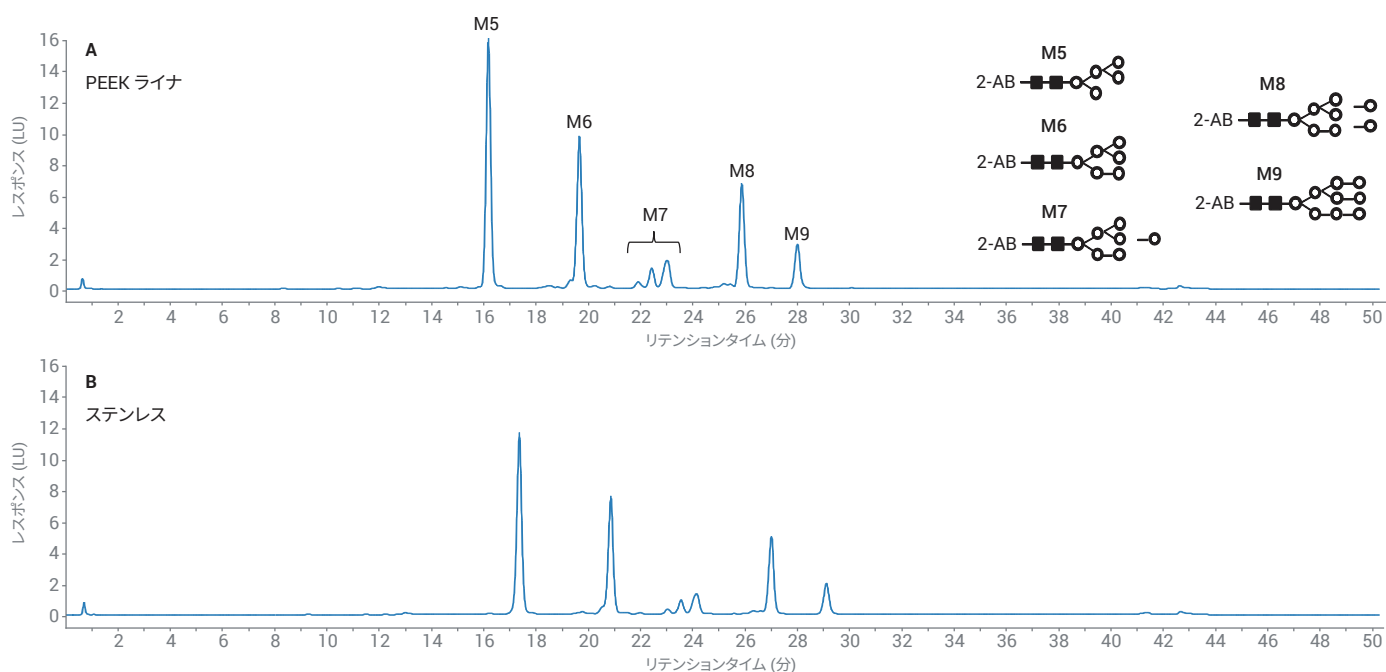


図 1. ステンレス製および PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを取り付けた Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを用いた、2-AB ラベル化 RNase B N-グリカンの HILIC-FLD クロマトグラム

酵母で発現させた遺伝子組み換えヒト酸性アルファ-グルコシダーゼ由来の 2-AB ラベル化した中性のリン酸化高マンノース N-グリカン を HILIC-FLD 分析および HILIC-ESI-MS 分析した結果を、図 2 および 3 に示します。ヒト酸性アルファ-グルコシダーゼは、細胞内のリソソーム区画でグリコーゲンからグルコースへの加水分解を触媒します。約 50,000 人がこの酵素が欠乏しており、リソソームでのグリコーゲン蓄積となり、筋肉の損傷を引き起こします。患者は通常、遺伝子組み換えヒト酸性アルファ-グルコシダーゼによる酵素補充治療を受けます。グリカンを含むマンノース-6-リン酸の存在は重要です。なぜなら、この官能基は、グリコーゲン分解の場であるリソソーム

に酵素を輸送するために必要だからです。

中性の RNase B N-グリカンでの結果とは対照的に、ステンレス製カラムあるいは PEEK ライナ付 AdvanceBio Glycan マッピングカラムを用いて 2-AB ラベル化グリカン进行分析した結果に大きな違いがあります。中性のグリカン M2 ~ 8 は、両カラムで同じ挙動であり、ステンレス製カラムでは金属イオンとリン酸基の相互作用のため、モノリン酸化したグリカン M2 ~ 8P はピークテーリングがあり、ジリン酸化グリカン M5 ~ 8P2 は回収されていません。同じ回収の問題はヌクレオチドにも当てはまることが知られています (AMP > ADP > ATP)。PEEK ライナ付カラムでは、モノリン酸化でもジリン酸化構造でも理想的なピーク形

状が得られました。このことから、流路から金属部品をすべて除去すること (機器とカラムの不活性化) が重要であることが分かります。グリカン分枝の  $\alpha$ 1-3 または  $\alpha$ 1-6 の異なる位置にリン酸基がある、異性体モノリン酸化グリカンでも同様に観察されました。このことは、図 4 に示した M6、M6P、M6P2 の抽出イオンクロマトグラムによってさらに裏付けられています。

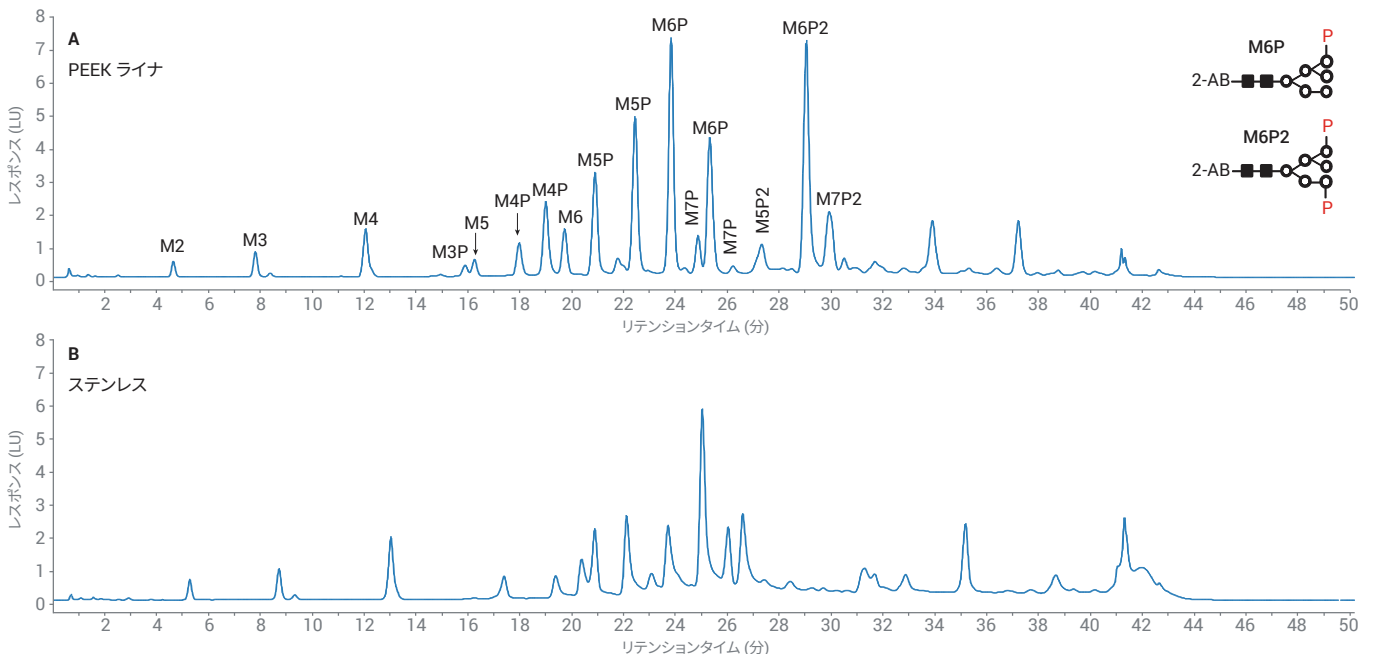


図 2. ステンレス製および PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを取り付けた Agilent 1260 Infinity II パイオインナート LC システムを用いた、ヒト酸性アルファ-グルコシダーゼ由来の 2-AB ラベル化した中性のリン酸化高マンノース型 N-グリカンの HILIC-FLD クロマトグラム

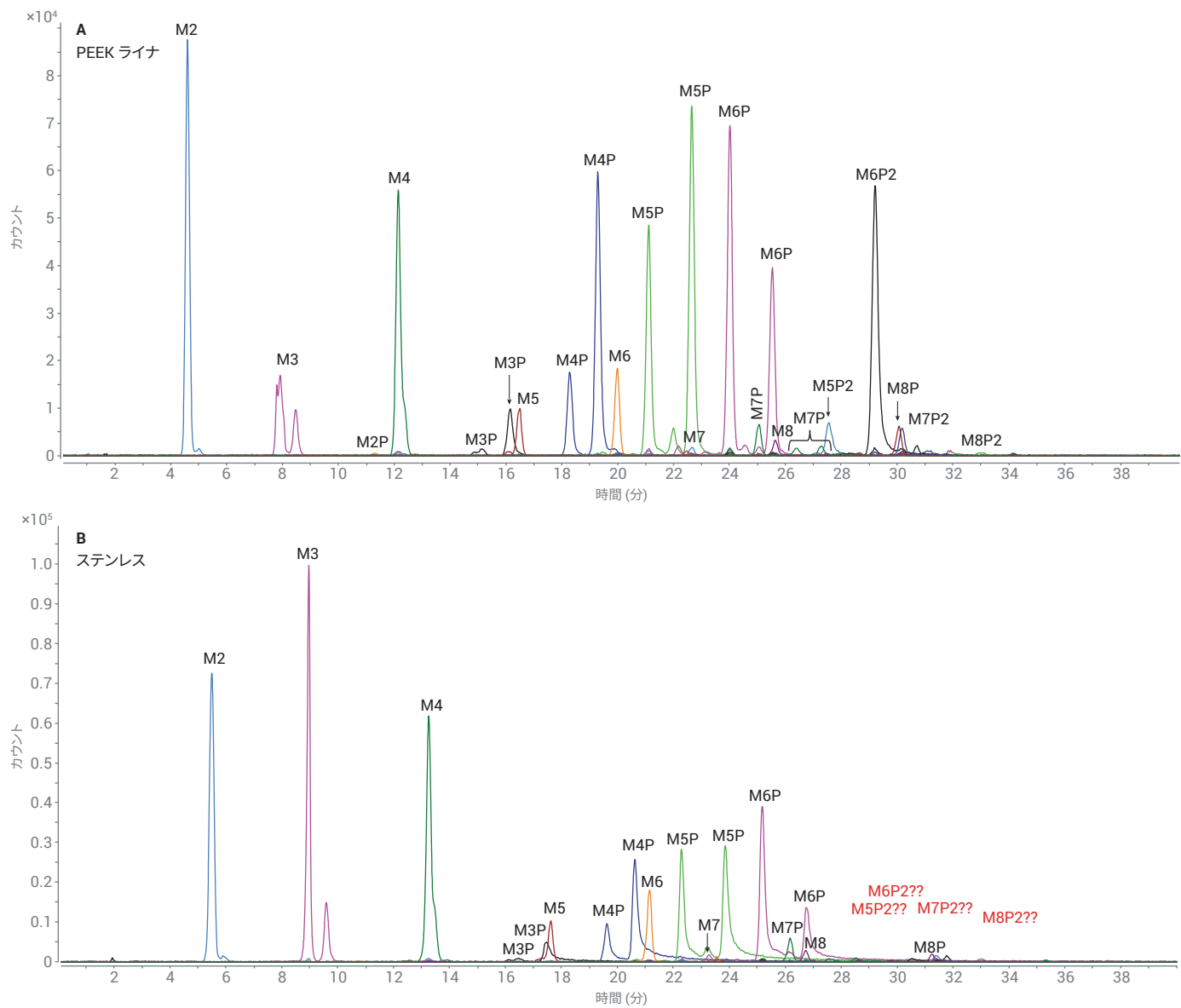


図 3. ステンレス製および PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを取り付けた Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを用いた、ヒト酸性アルファ-グルコシダーゼ由来の 2-AB ラベル化した中性のリン酸化高マンノース型 N-グリカンの HILIC-ESI-MS クロマトグラム。異なるグリカンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を重ね表示しています。

## 結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムと PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを用いた、治療用酵素から遊離したリン酸化 N-グリカンの分析を紹介しました。金属部品のない流路の使用、すなわち機器とカラムの不活性化によって、分析が困難な構造の化合物であっても分析が可能になることが実証されました。

## 参考文献

1. Sandra, K.; Vandenheede, I.; Sandra, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. *J. Chrom. A* **2014**, 1335, 81-103.
2. Fekete, S.; et al. Chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 480-507.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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, March 1, 2018  
5991-9019JAJP

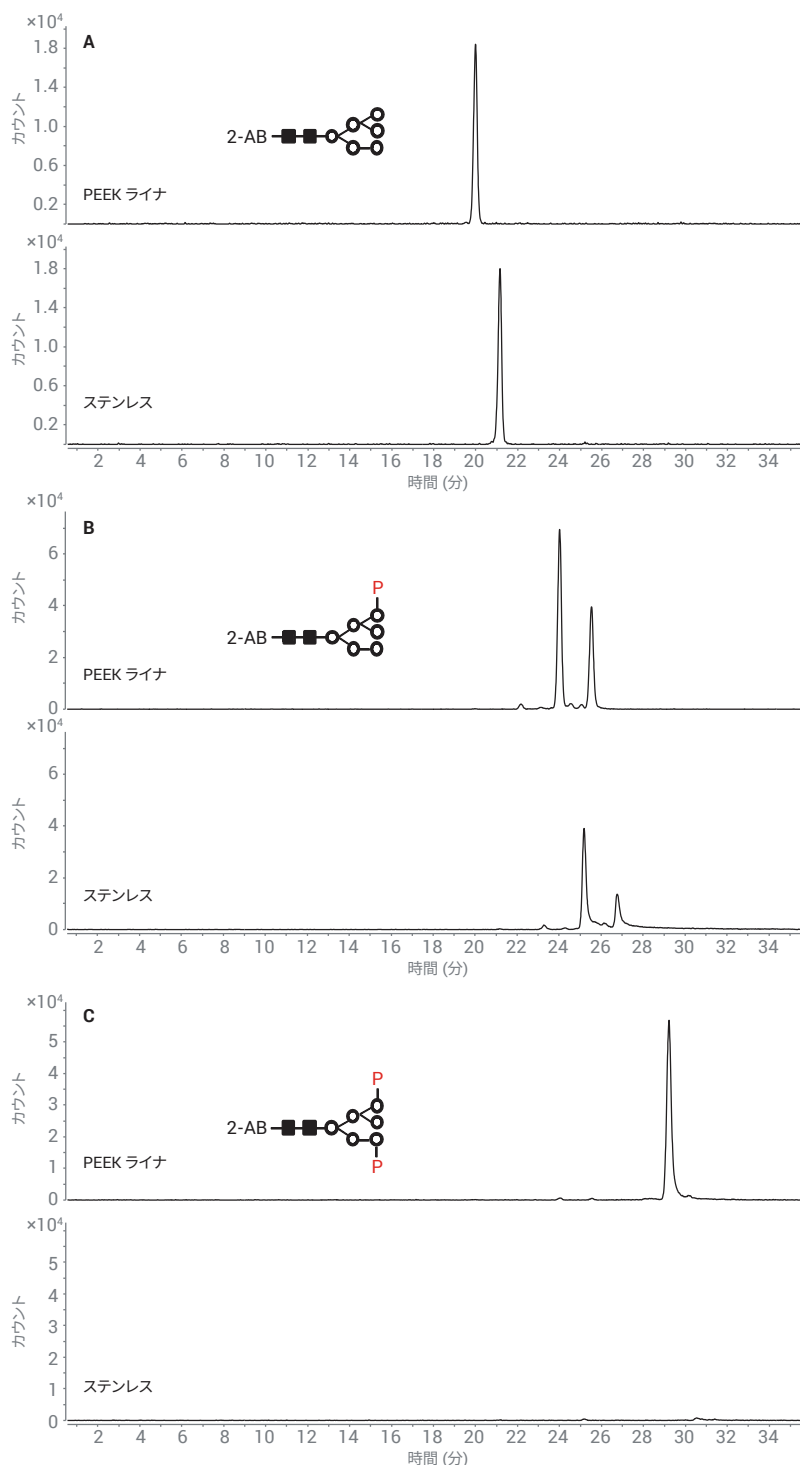


図 4. ステンレス製および PEEK ライナ付 Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムを取り付けた Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを用いた、2-AB ラベル化した M6、M6P、M6P2 N-グリカンの抽出イオンクロマトグラム (EIC)