

LC-蛍光分析用 Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express による モノクローナル抗体の遊離 N-グリカン サンプルの前処理

著者

John Yan and Aled Jones
ProZyme, Inc.
Hayward, CA, US

Oscar Potter and
Anne Blackwell
Agilent Technologies, Inc.



概要

このアプリケーションノートでは、遊離グリカン分析を目的としたバイオ医薬品糖タンパク質の N-グリカンの前処理について解説します。グリカンの組成は製品の安全性と効能に直接影響を与えるため、N-グリカン分析は治療用タンパク質の開発と製造において重要です。このプロトコルでは、Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キットを用いて、PNGase F によるグリカンの遊離、還元的アミノ化によるラベリング、遊離色素のクリーンアップを丸一日以上ではなく 2 時間以内に処理する方法を説明します。使用した 2-アミノベンズアミド (2-AB) ラベルは、十分に確立された使用方法や、これまでの大量のグリカン分析データとの一貫性が高く評価されています。

はじめに

グリコシル化は、多数のバイオ医薬品タンパク質に共通する特徴であり、薬物動態、薬力学、免疫原性¹に影響を与え、多くのケースで重要品質特性²となります。このため、バイオ医薬品のグリコシル化は、開発および製造プロセス全体にわたって注意深く特性解析し、モニタリングする必要があります。

グリカンは本質的に UV を吸収せず、また蛍光性がなく、MS 検出では十分にイオン化できないため、通常は分析前に誘導化します。数種類の蛍光ラベルが広く使用されており、これには遊離 N-グリカンを還元的アミノ化³によって修飾する 2-AB や 2-AA などがあります。近年では、蛍光性と MS 感度の両方が優れたラベルも登場しています⁴。

2-AB ラベリングを用いる以前のプロトコルは、長い時間がかかることが多く、複数回の長期間のインキュベーションがあります。こうしたプロトコルでは、ユーザーが長時間拘束されるだけでなく、結果を迅速に得ることも、結果を基に速やかに判断を下すこともできません。多くの場合、長期間のインキュベーションなしでは脱グリコシル化が不完全なものとなるため、一般的には一晩かけて分解を行っていました。還元的アミノ化によって 2-AB ラベルを付ける場合、ラベリングの前にグリカンを乾燥させるステップがあり、ラベリング反応のために何時間もかけてインキュベートすることも少なくありませんでした。さらに、LC 分析の前に過剰な 2-AB 試薬を除去しますが、古いクリーンアップカートリッジは取り扱いが煩雑で、高スループットや自動ワークフローには適していません。

一方、図 1 に示すように、Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キットのプロトコルは、N-グリカンのサンプル前処理の主なステップである変性、脱グリコシル化、ラベリング、サンプルクリーンアップをすべて網羅しています。

実験方法

材料

HPLC グレードのアセトニトリルは Sigma-Aldrich 社から購入しました。水は、Milli-Q A10 純水生成装置 (Millipore) を用いて精製しました。

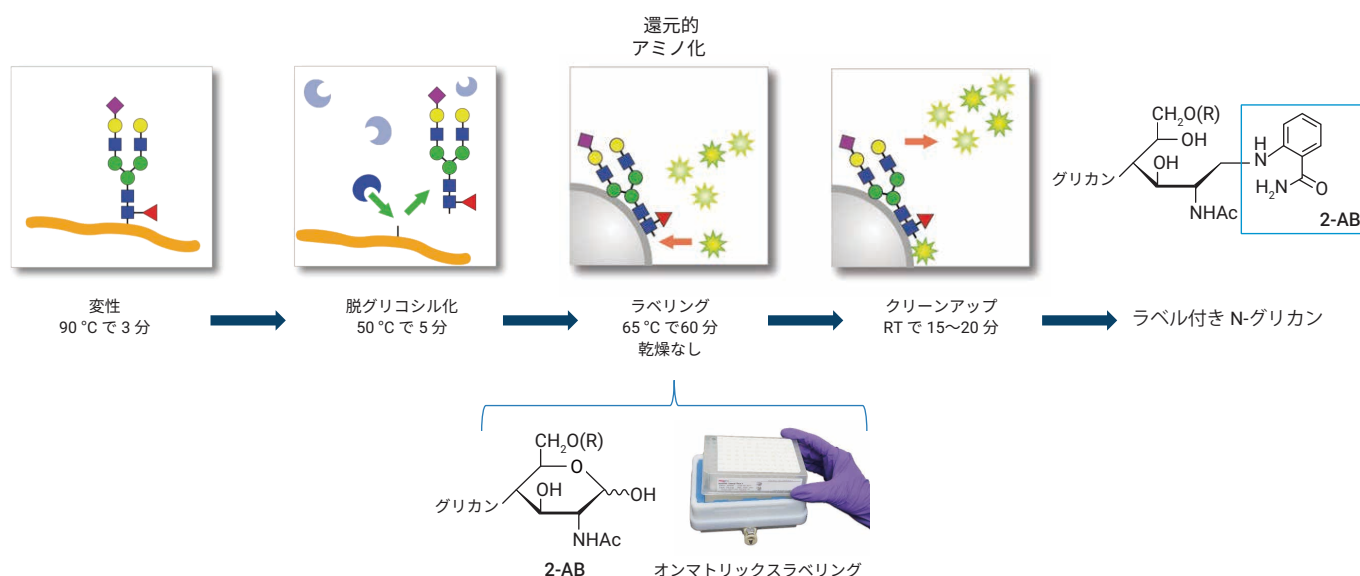


図 1. AdvanceBio Gly-X 2-AB Express による N-グリカンの遊離とラベリングのワークフロー

N-グリカンのサンプル前処理

ラベル付き N-グリカン サンプルは、AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キット (p/n GX96-2AB) を用いて前処理しました。図 2 に、キットコンポーネントを示します。

AdvanceBio Gly-X の N-グリカンサンプル前処理には、一連の酵素反応および化学反応ステップが含まれており、最初のステップはターゲットタンパク質の変性です (図 3)。変性試薬を加えて、サンプルを 3 分間 90 °C でインキュベートします。タンパク質の効果的なアンフォールディングにより、溶液中での PNGase F 酵素による N-グリカンの切断が、わずか 5 分以内に非常に効率的に完了します⁴。PNGase F は、N-結合型グリカンに特化したもので、N-グリカンのみをタンパク質から除去しつつ (図 4)、O-結合型糖鎖や非酵素的な糖化反応によるグリカンはタンパク質に付加したまま残ります。

ラベリングステップとクリーンアップステップは HILIC ベースの固相担体上で実行します。遊離 N-グリカンは、固定相へのローディング前に溶液中で -OH 形に変換され、その後に 2-AB ラベリング試薬を加えて、固相を 65 °C で 1 時間インキュベートします (図 5)。ラベリング完了後、過剰な試薬を一連のアセトニトリル洗浄で洗い落とし、その後ラベル付き N-グリカンを水で溶出します (図 6)。オンマトリックスラベリングでは、2-AB ラベリング前の遊離グリカンの乾燥は不要です。

装置構成

Agilent AdvanceBio Glycan Mapping カラムを次の製品で構成される Agilent LC で使用して、サンプルを分析しました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent Infinity マルチサンプルラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器 (G1321B)



図 2. AdvanceBio Gly-X 2-AB Express N-グリカンサンプル前処理キットのコンポーネント

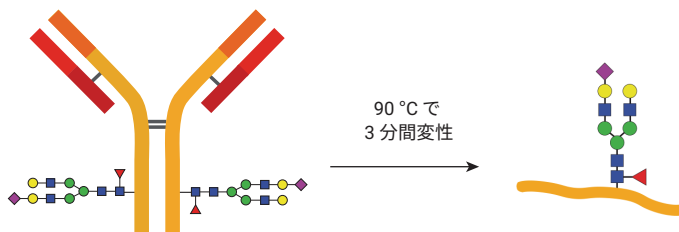


図 3. まずサンプルタンパク質を変性し、次のステップで効率的に脱グリコシル化します。

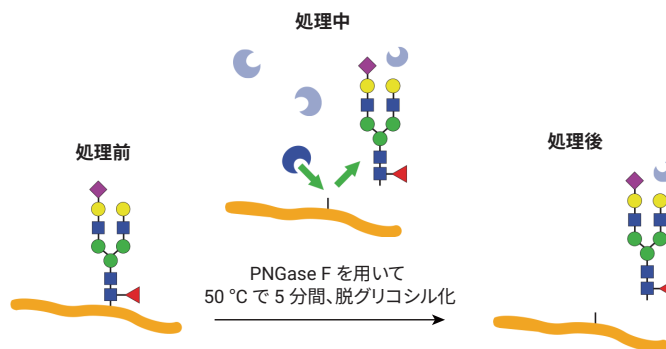


図 4. PNGase F を使用して N-グリカンをタンパク質から迅速に切断します。

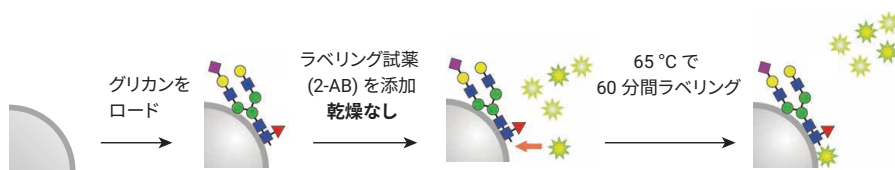


図 5. サンプルを真空式のクリーンアッププレート上の HILIC ベースの固相担体にロードします。次に 2-AB ラベリング試薬を固相担体に加えて、1 時間インキュベートします。乾燥ステップは不要です。

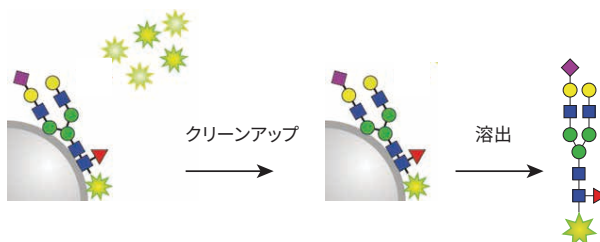


図 6. 過剰なラベリング試薬を洗い落とし、固体固定相からラベル付きグリカンを溶出します。

ソフトウェア

- Agilent MassHunter Acquisition
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア

結果と考察

MabThera および Enbrel の 2-AB N-グリカンサンプルを LC/FLD で分析しました。図 7 に代表的なクロマトグラムを示します。MabThera はよりシンプルなグリコシル化パターンを示し、Enbrel ではシアル酸付加されたグリカンが相対的に高いレベルを示しています。サンプル前処理の再現性はきわめて重要であるため、サンプルは製造ロット間で比較します。測定されるばらつきは、サンプルハンドリングや分析の人為的結果ではなく、真にサンプル中の変化に起因するものでなければなりません。

表 1. LC メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping、2.1 × 150 mm、1.8 μm (p/n 859700-913)
カラム温度	40 °C
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5 B) アセトニトリル
流量	0.5 mL/min
グラジエントプログラム	時間 (分) % B 流量 (mL/min)
	0.0 82 0.4
	2.0 82 0.4
	2.5 77 0.4
	48.0 62 0.4
	49.0 40 0.4
	51.5 40 0.4
	52.0 82 0.4
	54.0 82 0.6
	58.0 82 0.6
	58.5 82 0.4
注入量	1 μL (0.4 μg のタンパク質からのグリカンと同等)
検出	Agilent 1290 Infinity II FLD 励起 260 nm エミッション 430 nm

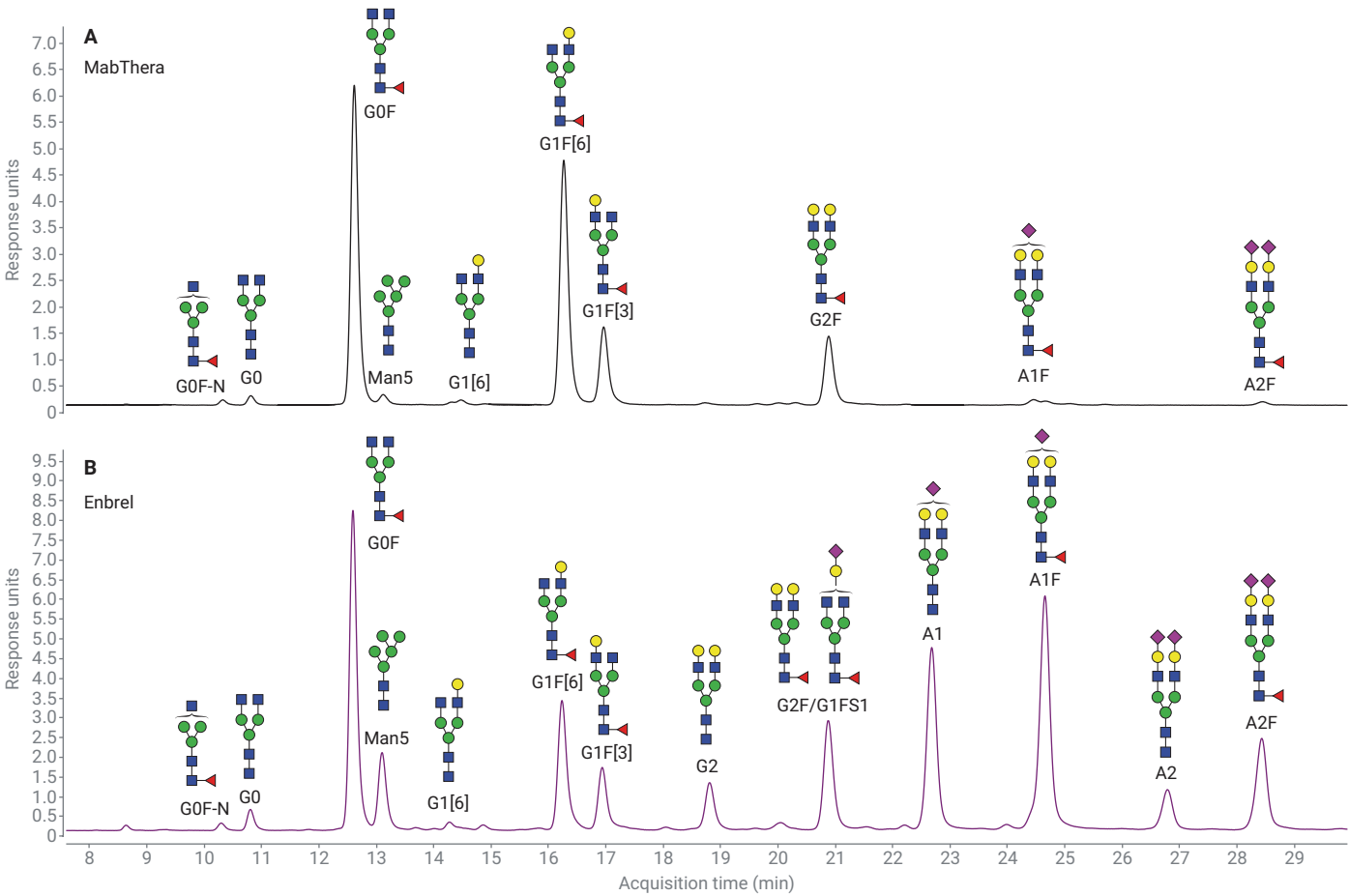


図 7. A) MabThera と B) Enbrel からの 2-AB ラベル付き N-グリカンの分離を示す代表的なクロマトグラム

表 2 は、MabThera サンプルの 3 回の前処理で検出された主な N-グリカン種の相対パーセント面積を示しています。平均パーセント面積、標準偏差、相対標準偏差 (% CV) がレポートされています。アバンドランスが最も低いグリカン以外では、サンプル前処理のばらつきはきわめて小さいものです。検出限界近くでは精度が課題となるため、これらのピークはばらつきが大きくなることが予想されます。

サンプル前処理メソッドの変更を検討している研究者としては、得られるデータが前のメソッドと同等か、いくらか優れた結果でなければなりません。他のラベリングケミストリが提供されている中で、引き続き 2-AB を用いる主な理由は、結果を他の 2-AB ラベリングプロトコルで得られた古いデータと比較できるためです。図 8 は、Enbrel の 3 回の前処理で検出された N-グリカンの相対パーセント面積を示しています。AdvanceBio Gly-X 2-AB Express と、ProZyme GlykoPrep 2-AB (ProZyme が提供する旧世代の 2-AB サンプル前処理) で前処理したサンプルの相対アバンドランスは、非常に類似しています。

結論

Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express により、N-Glycan サンプルの分析の前処理が 2 時間以内に完了しました。古いメソッドでは、一晩のインキュベーションやラベリング前の乾燥を含めて丸一日かかっていた処理です。さまざまな糖タンパク質について得られるデータは、再現性が非常に高く、古い 2-AB サンプル前処理メソッドで得られたデータとも一貫性があります。

表 2. MabThera サンプルの 3 回の前処理での主な N-グリカン種の相対 % 面積

グリカン	RT	相対 % 面積					
		1	2	3	平均	標準偏差	% CV
G0F-N	10.32	0.56	0.57	0.57	0.57	0.01	1.02
G0	10.81	1.09	1.01	0.98	1.03	0.06	5.54
G0F	12.62	39.85	39.31	39.33	39.50	0.31	0.78
Man5	13.12	0.74	0.62	0.69	0.68	0.06	8.82
G1[6]	14.47	0.66	0.6	0.62	0.63	0.03	4.88
G1F[6]	16.27	34.65	34.81	34.67	34.71	0.09	0.25
G1F[3]	16.96	10.65	10.47	10.6	10.57	0.09	0.88
G2F	20.89	10.15	10.78	10.83	10.59	0.38	3.58
A1F	24.45	1.13	1.26	1.17	1.19	0.07	5.61
A2F	28.44	0.52	0.57	0.54	0.54	0.03	4.63

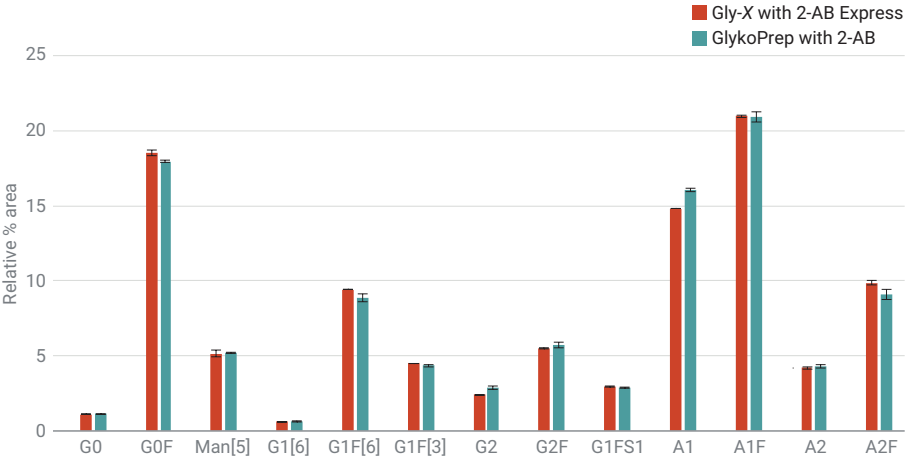


図 8. AdvanceBio Gly-X 2-AB Express キットを使用して前処理したサンプルから、ProZyme GlykoPrep 2-AB などの古いメソッドを使用して前処理したサンプルと同等のデータを得られます。この図は、Enbrel からの N-グリカンを示しています。すべてのデータについて n = 3 です。

参考文献

1. Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *J. Pharma. Sci.* **2015**, 104(6), 1866–1884.
2. Reusch, D.; Tejada, M. L. Fc Glycans of Therapeutic Antibodies as Critical Quality Attributes. *Glycobiology* **2015**, 25(12), 1325–1334.
3. Ruhaak, L. R.; *et al.* Glycan Labeling Strategies and Their Use in Identification and Quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397(8), 3457–3481.
4. Kimzey, M.; *et al.* Development of a 5-Minute Deglycosylation Method for High Throughput N-Glycan Analysis by Mass Spectrometry. *ProZyme Technical Note*, Bulletin 4001, Rev E.

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. 2019
Printed in Japan, March 7, 2019
5994-0682JAJP