

N-グリカンの遊離およびラベリングのための 高速 APTS サンプル前処理ワークフローの 開発

著者

Andres Guerrero, John Yan,
Ace G. Galermo, Tom Rice,
Jim Torrence, Justin Hyche,
Ted Haxo, Sergey Vlasenko,
and Aled Jones
Agilent Technologies, Inc.,
Hayward, CA

Aarti Jashnani
Bristol-Myers Squibb
Redwood City, CA

概要

生物製剤の N-グリカン部位は、免疫原性、薬物動態、薬力学に影響を与えることがあるため、N-グリカンの特性解析が開発プロセスの重要な部分になっています。一般的なアプローチは、蛍光色素により酵素的に遊離された N-グリカンを誘導体化することにより、グリカン混合物を分離して検出し、グリカン種の相対分布を評価することです。キャピラリー電気泳動 (CE) による分離の場合、中性グリカン種の泳動を可能にするために、負電荷の色素 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム塩 (APTS) が頻繁に使用されます。従来のメソッドを使用した APTS ラベル化 N-グリカンの前処理は多くの場合、完了までに何時間も、あるいは何日もかかります。

ここでは Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理プラットフォーム (旧 ProZyme) に追加する APTS ワークフローについて説明します。APTS ラベル化 N-グリカンの CE または UHPLC 分析用の前処理は、約 2.5 時間で完了します。2 つの CE プラットフォームと UHPLC-HILIC における、リツキサンおよびエンブレルの APTS ラベル化グリカンの分離について示します。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb)、Fc 融合タンパク質、凝固因子、およびエリスロポエチンのようなサイトカインなど、60 % を超える生物製剤がグリコシル化されています。¹N-結合型グリカンの構造は、治療用タンパク質の薬理学で重要な役割を果たし、免疫原性や薬物動態、薬力学に影響を与える可能性があります。^{2, 3}このことから、N-グリカンの特性解析は生物製剤の開発プロセスの重要な部分になっています。N-グリカンには、オンライン検出に適した発色団も蛍光色素分子も含まれていないため、CE による分離の場合、一般的には PNGase F による酵素的な遊離後の還元的アミノ化反応により、APTS のような蛍光タグで誘導体化します。従来の APTS ラベリングメソッドでは、ラベリング前の遊離グリカンの乾燥およびその後の余分な APTS ラベルの

クリーンアップを含む複数の手順が必要になるため、完了までに何日とまではいかなくても何時間を要する場合があります。GlykoPrep 高速 N-グリカン前処理と APTS により、サンプル前処理プロセスを 4 ~ 5 時間に効率化しました。⁴Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理と APTS Express (旧 ProZyme) はシンプルなワークフローであり、通常分析までのサンプルの準備が 2.5 時間で完了します (図 1)。96 ウェル PCR プレートフォーマットでの PNGase F による 5 分の溶液内脱グリコシル化により N-グリカンが遊離され、変性試薬により N-グリコシル化部位の曝露が増進され、高温での酵素による迅速な切断が実現します。

グリコシルアミン (-NH₂) から遊離還元末端型 (-OH) への高速変換に従って、96 ウェル吸引過プレートフォーマットのクリーンアップマトリックスに N-グリカンをロードします。クリーンアップマトリックスで還元的アミノ化による N-グリカンの APTS Express ラベリング (1 時間) を実行することにより、従来の APTS ワークフローで実施していた、ラベリング前のグリカンサンプルの乾燥が不要になります。ラベリング後、マトリックスに結合している APTS ラベル化グリカンから遊離 APTS ラベルとその他の反応成分を洗浄し、APTS ラベル化 N-グリカンサンプルを水中に溶出させます。APTS ワークフローは、幅広い APTS ラベル化泳動標準、個別の N-グリカンおよび N-グリカンライブラリ⁵、エキソグリコシダーゼによってサポートされています。

APTS を使用した N-グリカンのサンプル前処理ワークフロー

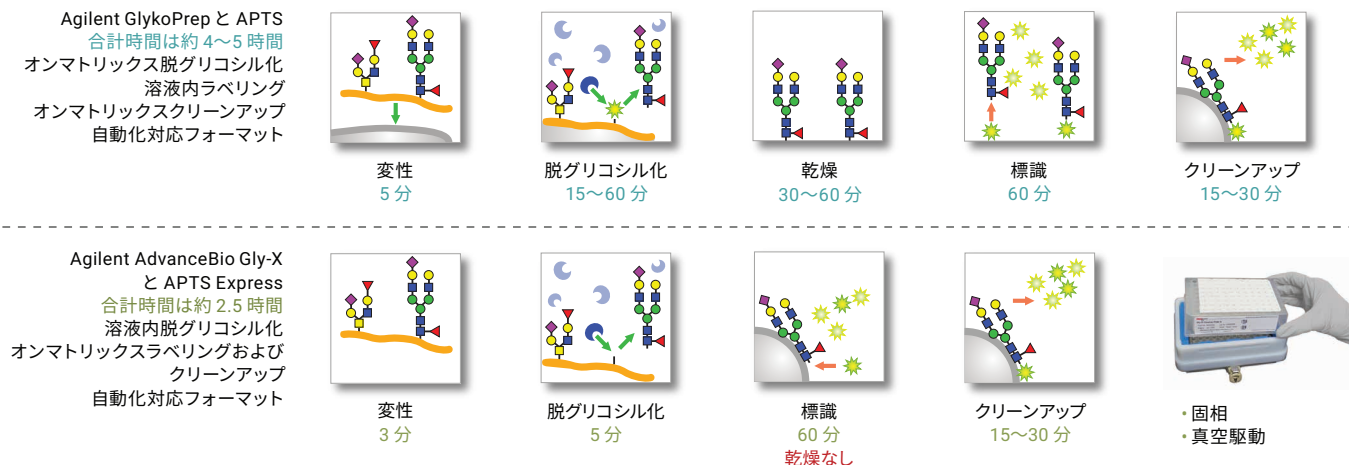


図 1. N-グリカンのサンプル前処理ワークフロー：Agilent GlykoPrep と APTS、および次世代 Agilent AdvanceBio Gly-X と APTS Express

方法および材料

サンプル前処理

マブセラ（ロット番号 H0102B03、リツキシマブ）およびエンブレル（ロット番号 R170724、エタネルセプト）の N-グリカンサンプルを、Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理と APTS Express キット（GX96-APTS）および Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカン前処理キットと APTS（GP96NG-APTS）により前処理しました。この際、標準の推奨プロトコルに従い、Gly-X 前処理では 40 µg のタンパク質、および Agilent GlykoPrep では 50 µg のタンパク質を使用しました。

CE 分離

APTS ラベル化 N-グリカンを次のシステムで分離しました。

- Agilent Gly-Q グリカン分析システム（旧 ProZyme）と LED 誘起蛍光検出（LEDIF）、Ex/Em (nm) 310/> 385（製品コード GQ2100）、電気的注入および 2 分の分離使用。
- Sciex PA800-plus CE システムとレーザー誘起蛍光（LIF）による検出、Ex/Em (nm) 488/520。N-CHO キャピラリー、窓までの長さ：50 cm、全長：60 cm、電解液：炭水化物分離バッファ。サンプル注入圧力：0.5 psi、10 秒間。分離電圧と時間：30 kV、27 分間、カートリッジ温度：20 °C。

UHPLC-HILIC

アミドカラム（2.1 x 150 mm、1.7 µm）で、蛍光検出（FLD）による APTS ラベル化グリカンの親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）分離を実施しました。この際、カラム温度 60 °C、グラジエント 30 ~ 60 % 50 mM ギ酸アンモニウム pH 4.4、2 ~ 50 分の間は流量 0.4 mL/min という条件を使用しました。

ラベル化グリカン を FLD、Ex/Em (nm) 473/520 でモニタリングしました。グリカン を、既存のアジレントのデータおよび文献内のデータ⁶と比較して割り当てました。

APTS Express グリカンのシアリダーゼ A による処理

PCR プレートで、1 µL のシアリダーゼ A（GK80040）を 75 µL の Gly-X APTS ラベル化グリカンに加え、50 °C で 10 分間インキュベーションしました。サンプルを冷却して Gly-Q CE システムに注入しました。

結果と考察

APTS Express の性能

APTS Express の推奨サンプル注入量は 10 ~ 40 µg です。マブセラでは 1 ~ 200 µg の範囲、エンブレルでは 10 ~ 200 µg の範囲において類似したグリカンプロファイルが観察されました（データは示していません）。

APTS Express クリーンアップにより遊離色素の > 99 % を除去し（データは示していません）、個別のグリカンのバイアスを最小限に抑えています（図 2）。また、図 3 に示すように、クリーンアップではシアル酸付加されたグリカン種も保持されています。

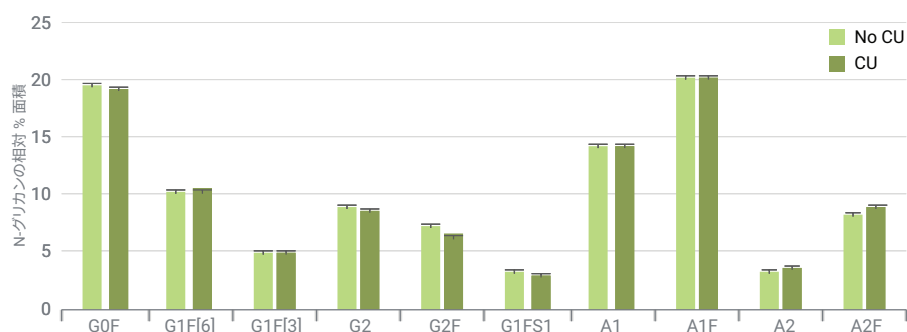


図 2. N-グリカンのサンプル前処理ワークフロー：Agilent GlykoPrep と APTS、および次世代 Agilent AdvanceBio Gly-X と APTS Express

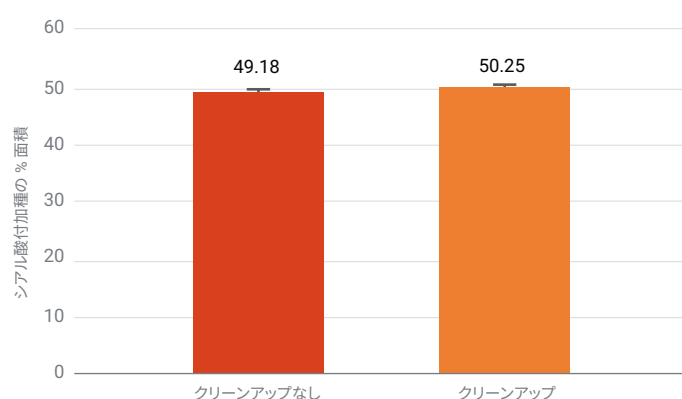


図 3. シアル酸付加種の保持。エンブレル APTS N-グリカン を UPLC で測定し、シアル酸付加種の合計相対 % 面積をクリーンアップありとなして比較しました。

マブセラの 6 個の複製物を前処理して Agilent Gly-Q システムで分離し、再現性を評価しました (図 4)。主要なグリカンのピークに対して、%CV は 3 % 未満でした。

CE 分離

Agilent AdvanceBio Gly-X と APTS Express は、さまざまな CE システムで分離を実行できるオープンフォーマットのキットです。

リツキサンおよびエンブレルの N-グリカンを、Agilent Gly-Q CE システム (図 5A と 6A) と Sciex PA800 plus (図 5B と 6B) で分離しました。

AdvanceBio Gly-X APTS クリーンアップモジュールにより > 99 % の遊離色素が除去されるため、分析の初期段階でクリーンな分離を実行できます。

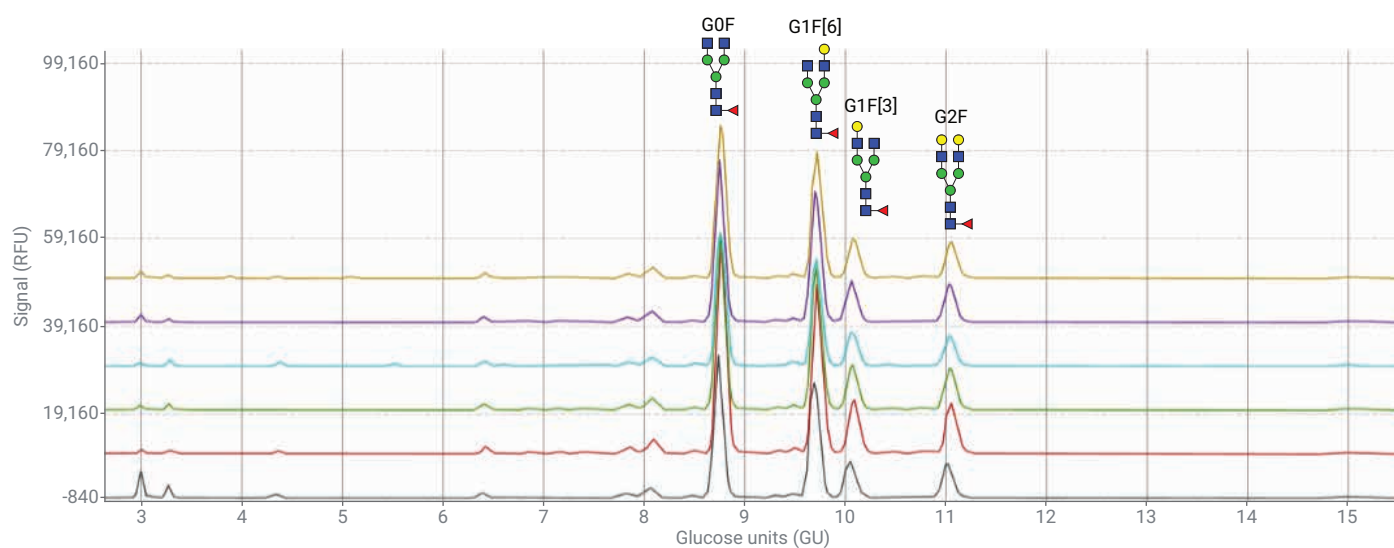


図 4. Agilent Gly-X APTS Express の再現性。マブセラの 6 個の複製物を前処理し、Agilent Gly-Q CE システムで分離した結果を (A) に示します。主要なグリカンピークの相対 % 面積と %CV を (B) に示します。

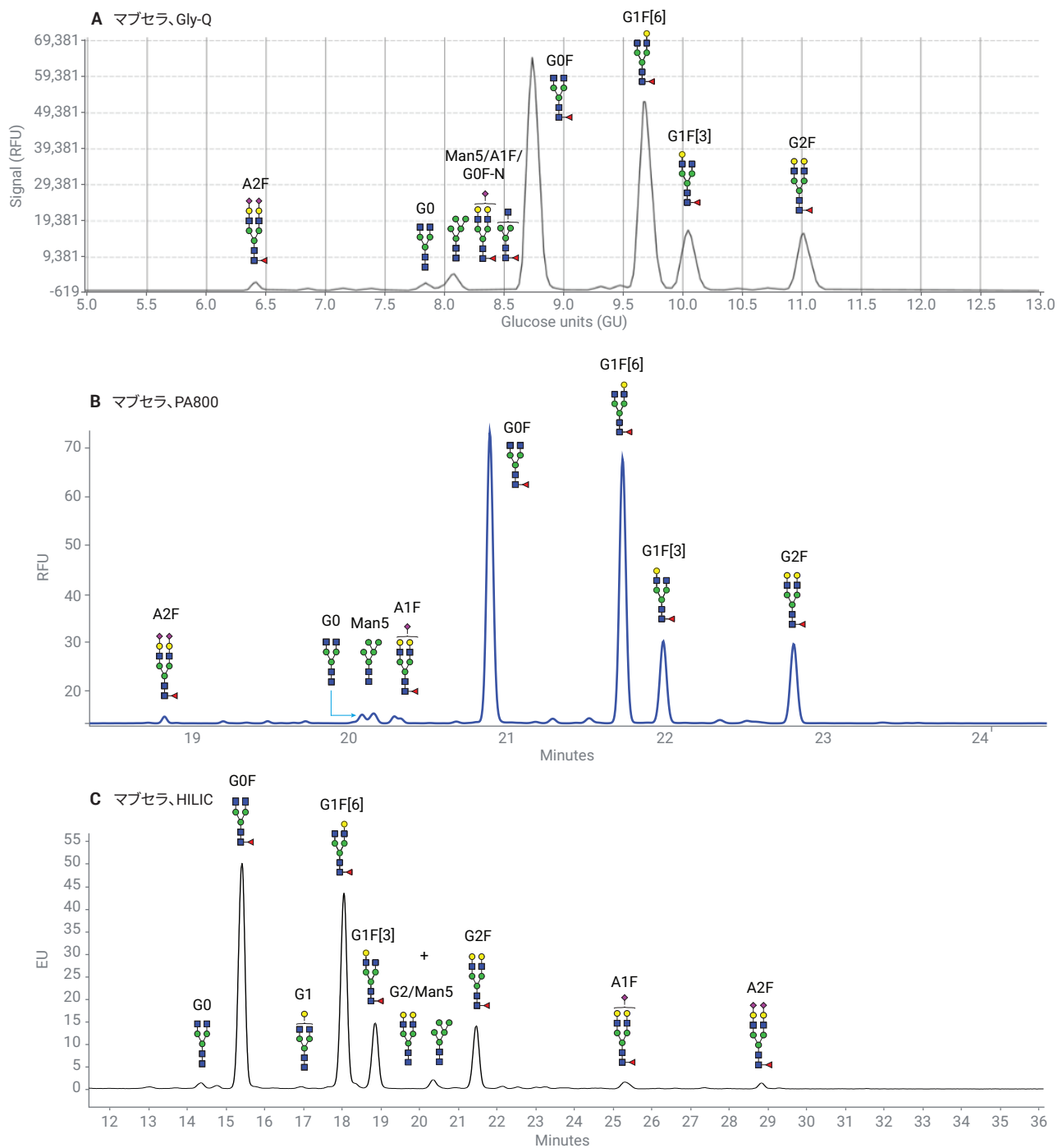


図 5. Agilent Gly-X APTS Express で前処理したマブセラの N-グリカン。次のシステムで分離しました。A) Agilent Gly-Q システムの CE、B) PA800 plus の CE、C) UHPLC-HILIC

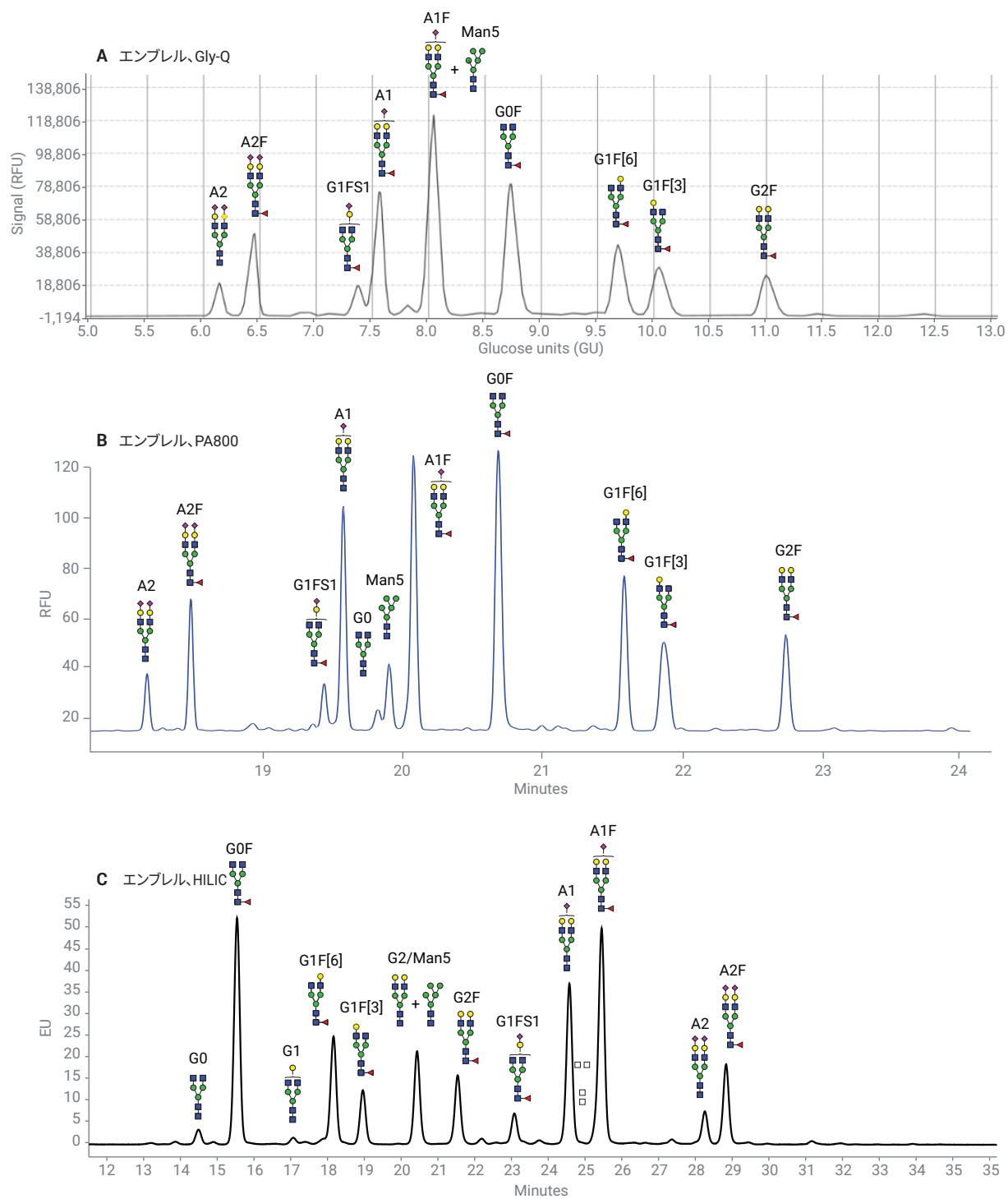


図 6. Agilent Gly-X APTS Express で前処理したリッソキサンの N-グリカン。次のシステムで分離しました。A) Agilent Gly-Q システムの CE、B) PA800 plus の CE、C) UHPLC-HILIC

UHPLC-HILIC 分離

AdvanceBio APTS Express でラベル化し、HILIC により分離されたマブセラとエンブレルの N-グリカンの例を、それぞれ 図 5C と 6C に示します。

APTS ラベル化グリカンは、UHPLC または HPLC 機器の HILIC により分離できます。ただし、APTS グリカンのピークは、HILIC で通常使用されているその他の N-グリカン色素 (InstantPC、2-AB など) を使用した場合よりも幅が広がります。APTS グリカンは、2-AB やその他のグリカンよりも HILIC 時に高極性で多数が保持されるため、HILIC グラジエントを低有機パーセントで開始することが必要になる場合があります。

APTS Express グリカンのシアリダーゼ A による処理

シアリダーゼ A (GK80040) により、APTS ラベル化グリカンの $\alpha(2,3)$ -、 $\alpha(2,6)$ -、 $\alpha(2,8)$ - および $\alpha(2,9)$ -結合型シアル酸を遊離することにより、ピークの割り当てを支援できます。

エンブレルの N-グリカンに対して 10 分のシアリダーゼ A による処理を実行すると、Gly-Q エレクトロフェログラムでピークがシアル酸付加されて、中性の位置に移動します (図 8)。例えば、A2F が G2F に移動し、A1F が G1F に移動します。

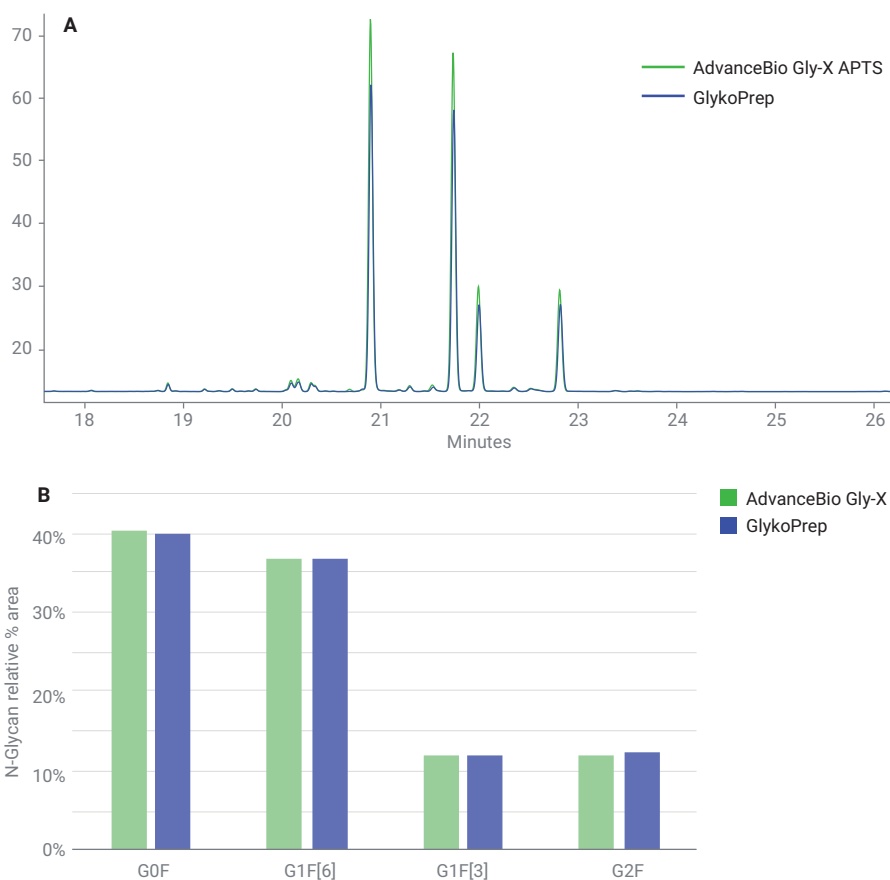


図 7. Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express および Agilent GlykoPrep APTS ラベル化 N-グリカンの比較。マブセラのラベル化 N-グリカンを、PA800 plus で前処理して分離しました。

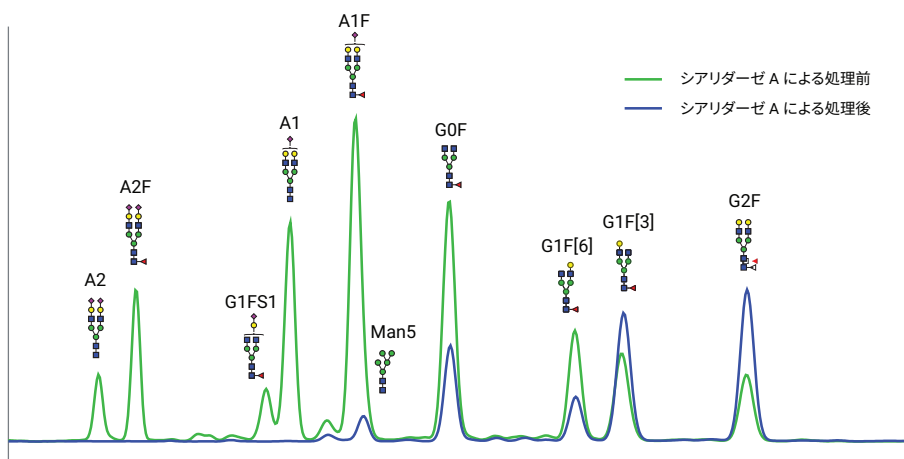


図 8. 10 分のシアリダーゼ A による分解前後のエンブレルの APTS ラベル化 N-グリカンの Agilent Gly-Q 分離

結論

遊離 N-グリカンの Agilent AdvanceBio Gly-X APTS Express ラベリングにより、例えば、Agilent GlykoPrep と APTS の過去のデータと直接比較できる、再現性と信頼性の高い結果が得られます。確立された APTS ラベルを用いることで、進行中の複数のプロジェクトでデータの継続性を確保できます。

AdvanceBio Gly-X と APTS Express により、非常に長い乾燥手順が不要になり、従来の APTS ラベリングによる高速なワークフロー（約 2.5 時間）が実現するため、結果が得られるまでの時間が短縮されます。AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理と APTS Express によるデータは、Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカン前処理キットと APTS によるデータと同等です。オープンフォーマットの CE キットにより、他の CE 機器で次世代 AdvanceBio Gly-X APTS Express ラベリングソリューションを実行し、UHPLC-HILIC で分離することが可能になります。

参考文献

1. Planinc, A.; *et al.* Glycan Characterization of Biopharmaceuticals: Up-Dates and Perspectives. *Anal. Chim. Acta.* **2016**, May 19, 921, 13–27.
2. Liu, L. Antibody Glycosylation and its Impact on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-fusion Proteins. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(6), 1866–1884.
3. Jones, A. N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins. *BioPharm International* **2017**, 30(6), 20–25.
4. Szekrényes, A.; *et al.* Multi-Site N-glycan Mapping Study 1: Capillary Electrophoresis – Laser Induced Fluorescence. *MAbs* **2016**, 8(1), 56–64.
5. www.prozyme.com/pages/n-glycan-standards
6. Reusch, D.; *et al.* High-throughput Glycosylation Analysis of Therapeutic Immunoglobulin G by Capillary Gel Electrophoresis Using a DNA Analyzer. *MAbs* **2014**, 6(1), 185–196.

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. 2019, 2020

Printed in Japan, May 18, 2020

5994-0944JAP

TN 4011

Rev. B

DE.5904166667