

Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC および 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の N-グリカン分析の効率的なワークフロー

著者

John Yan and Aled Jones
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、InstantPC および 2-アミノベンズアミド (2-AB) という 2 つのラベルを使用した、生物製剤の糖タンパク質の遊離 N-グリカンの前処理と分析について説明します。グリコシル化は最終医薬品の治療機能に影響を与えることがあるため、生物製剤の開発および製造において N-グリカン分析は必須です。ここで説明するワークフローでは、Agilent AdvanceBio Gly-X と InstantPC および Gly-X 2-AB Express キット (旧 ProZyme) を使用して PNGase F により N-グリカンを遊離した後、InstantPC による即時のグリコシルアミンラベリングまたは 2-AB Express による還元的アミノ化ラベリングをそれぞれ実施します。ラベル化 N-グリカンを親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) で分離し、蛍光と質量分析 (MS) を使用して検出します。Gly-X サンプル前処理で高レベルの再現性とスループットを達成することにより、前処理時間が InstantPC で 1 時間、2-AB Express で 2 時間になります。さらに、InstantPC ラベルにより、蛍光応答と MS イオン化効率を向上させます。

はじめに

N-結合型グリカンの構造がグリコシル化生物製剤の機能に影響を与える場合があり、多くの場合、グリコシル化は重要な品質特性 (CQA) になるため、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です。¹N-グリカン分析では多くの場合、タグにより遊離グリカンをラベリングして蛍光検出 (FLD) し、イオン化を向上させて質量分析 (MS) した後、N-グリカンを分離、検出、および相対定量します。2-AB² のような頻繁に使用される蛍光タグの多くは、InstantPC のような最近導入された色素と比較すると MS 感度に関して制限があり、既存の N-グリカンサンプル前処理のワークフローは時間がかかる場合があります。³ただし、2-AB は 20 年間以上にわたって使用されているため、文献や多くのラボでは十分に確立されています。

このアプリケーションノートでは、InstantPC および 2-AB ラベル化 N-グリカンの前処理と Agilent LC/FLD/MS 機器による分析のための効率的なワークフローについて説明します。InstantPC または 2-AB Express ラベリング用の Gly-X N-グリカンサンプル前処理キット (旧 ProZyme) には、図 1 に示すように、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といった N-グリカンサンプル前処理用の試薬がすべて付属しています。

実験方法

N-グリカンのサンプル前処理

Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理と InstantPC (p/n GX96-IPC) および Gly-X 2-AB Express (p/n GX96-2AB) キットを使用して、モノクローナル抗体のリツキシマブ (リツキサン、ロット番号 M190170) および Fc 融合タンパク質のエタネルセプト (エンプレル、ロット番号 1092537) のラベル化

N-グリカンを前処理しました。この際、前処理ごとに 40 µg のタンパク質を使用しました。各サンプルの 4 個の複製物を蛍光/MS 検出で分析し、相対 % グリカンピーク面積を計算しました。

InstantPC および 2-AB ラベル化サンプルを、標準の手動プロトコルで前処理しました。Gly-X 溶液内脱グリコシル化プロトコルでは、90 °C で 3 分の変性を使用して糖タン

パク質ターゲットを開放し、PNGase F による 50 °C で 5 分の脱グリコシル化反応を可能にします。溶液内脱グリコシル化に従って、InstantPC ラベル化サンプルを遊離 N-グリカンの 1 分のグリコシルアミンラベリングで前処理した後 (図 2)、HILIC 固相抽出 (SPE) を使用して遊離色素の減圧下でのクリーンアップを実施します。

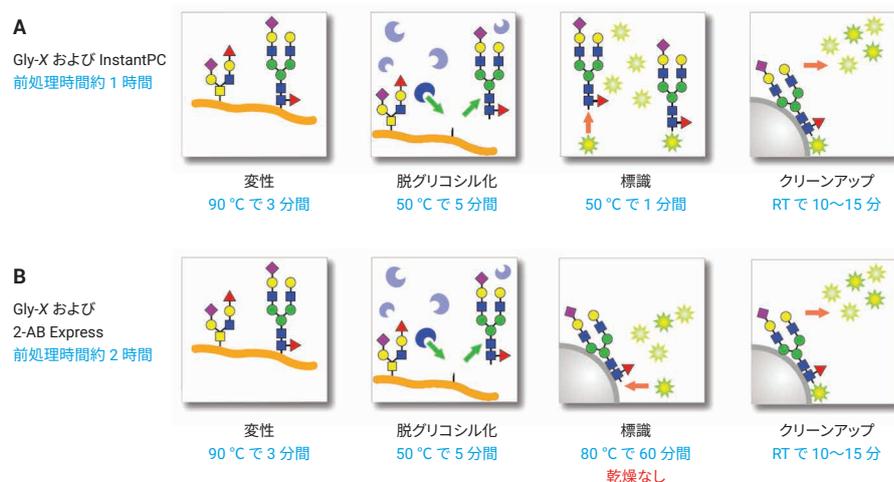


図 1. Gly-X N-グリカンサンプル前処理。A) 溶液内脱グリコシル化とラベリング後のオンマトリックススクリーンアップを使用した InstantPC ワークフロー、B) 溶液内脱グリコシル化後のオンマトリックスラベリングとスクリーンアップを使用した 2-AB ワークフロー

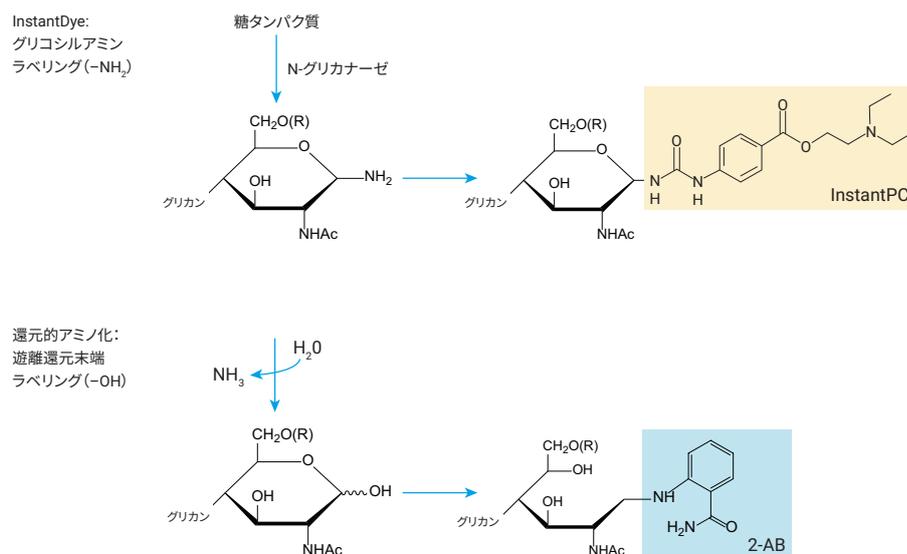


図 2. InstantPC グリコシルアミンラベリングと 2-AB による従来の還元的アミノ化の比較

2-AB でラベル化された N-グリカンサンプルを、標準の Gly-X 2-AB Express プロトコルと還元的アミノ化反応を使用して前処理しました。PNGase F による 5 分の Gly-X 脱グリコシル化に従って、遊離 N-グリカンをグリコシルアミン型 (-NH₂) から遊離還元末端型 (-OH) に変換し、還元的アミノ化による 2-AB ラベリングを実施します。次に、N-グリカンを吸引る過でソリッドステートマトリックスに脱溶媒化した後、オンマトリックス 2-AB ラベリング手順を実行します。このプロセスでは、2-AB ラベリング手順前のグリカン乾燥が不要なため、合計サンプル前処理時間を短縮できます。

N-グリカン分析

InstantPC および 2-AB ラベル化 N-グリカンを、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) で分離しました。この際、Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (2.1 × 150 mm, 1.8 μm, p/n 859700-913)、Agilent 1290 Infinity II LC システム、インライン蛍光検出 (表 1) を Agilent AdvanceBio 6545XT LC/Q-TOF と組み合わせて表 2 に示すパラメータを使用しました (同等の MS 機器をポジティブモードで使用する場合があります)。

HILIC 分離はすべて、表 1 に示す条件下で実施しました。FLD 後に固定フロースプリッタ (IDEX Health & Science、p/n UH-427) を使用して、流量の約 50 % を廃液に 50 % を MS に切り替えました。Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアとパーソナル化合物データベース (PCD) を使用して、データを処理しました。

表 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、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		
グラジエントプログラム	InstantPC および 2-AB ラベル化グリカン		
	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0	80	0.5
	2	75	0.5
	48	62	0.5
	49	40	0.5
	51.5	80	0.5
	52	80	0.5
60	80	0.5	
注入量	1 μL (0.4 μg タンパク質のグリカンと同等)		
検出	Agilent 1260 Infinity II FLD InstantPC : λ _{Ex} 285 nm、λ _{Em} 345 nm 2-AB : λ _{Ex} 260 nm、λ _{Em} 430 nm		

表 2. Agilent 6545XT Q-TOF パラメータ

Agilent 6545XT Q-TOF	
イオン源	デュアル AJS ESI
ガス温度	150 °C
ドライガス流量	9 L/min
ネプライザ	35 psi
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	120 V
スキマ電圧	65 V
質量範囲	m/z 600 ~ 3,000
スキャン速度	1 スペクトル/秒
取り込みモード	高分解能 (4 GHz)

試料調製

LC/MS グレードのアセトニトリルと水は Honeywell Research Chemicals から購入しました。

装置構成

ラベル化 N-グリカンサンプルを、Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (メソッドの詳細は表 1 を参照) を使用して、次の構成の Agilent LC/MS で分離しました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (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)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (表 2 のパラメータを使用、同等の機器を使用する場合もあります)

ソフトウェア

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

結果と考察

InstantPC および 2-AB N-グリカンの HILIC 分離

InstantPC または 2-AB でラベル化されたリツキサンおよびエンブレルのラベル化 N-グリカンの HILIC 分離では、60 分のメソッドを使用した際に主要なグリカン種に対して適切に分解されたピークが得られています (図 3 と 4)。IgG のリツキサン (図 3A は InstantPC の場合、図 4A は 2-AB の場合) は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で生成された Fc 領域に 1 つのグリコシル化部位を持つモノクローナル抗体特有の N-グリカンプロファイルを示しています。これには、主にコアフコースを持つ中性 2 本鎖の複雑な N-グリカン、多量の Man5、および比較的 low 比率のシアル化グリカンが含まれています。Fc 融合タンパク質のエンブレルの N-グリカンプロファイル (図 3B は InstantPC の場合、図 4B は 2-AB の場合) には、Fc 領域の単 N-グリカン部位に加えて、融合パートナーの 2 つの追加の N-グリコシル化部位が原因の高濃度のシアル化グリカン、TNF- α 受容体 (TNFR) 細胞外領域が含まれています。⁵

2-AB N-グリカンの HILIC リテンションタイムは、InstantPC N-グリカンの場合よりも短いものの、N-グリカン種の溶出順序は同じです。G0F/Man5 や Man5/G1 のような重要なペアは多くの場合、生物製剤の開発プロセス時にモニタリングされており、InstantPC および 2-AB ラベルの両方で適切に分離されるため、相対 % 組成を高い信頼性で決定できます。G1F 異性体の G1F[6] と G1F[3] も分離されています。相対 % 面積、標準偏差、および相対標準偏差を表 3 ~ 6 に示していますが、4 個のサンプル前処理複製物間で小さいばらつきが認められます。このばらつきの原因は、グリカンのアバンドランスが低いことです。

InstantPC の別のメリットは、前に説明したクロマトグラフィー条件を使用した 2-AB (図 4B) と比較して、エンブレルのアイソフォーム G2S1[6]/[3] および G2FS1[6] が分離されていることです (図 3B)。生物製剤リツキサンとエンブレルの InstantPC および 2-AB ラベル化 N-グリカンの蛍光検出を使用した分析では、主要なグリコフォーム G0F、G1F[6]/[3]、G2F、G2S2、および G2FS2 に対して同等の相対 % 面積が得られています。

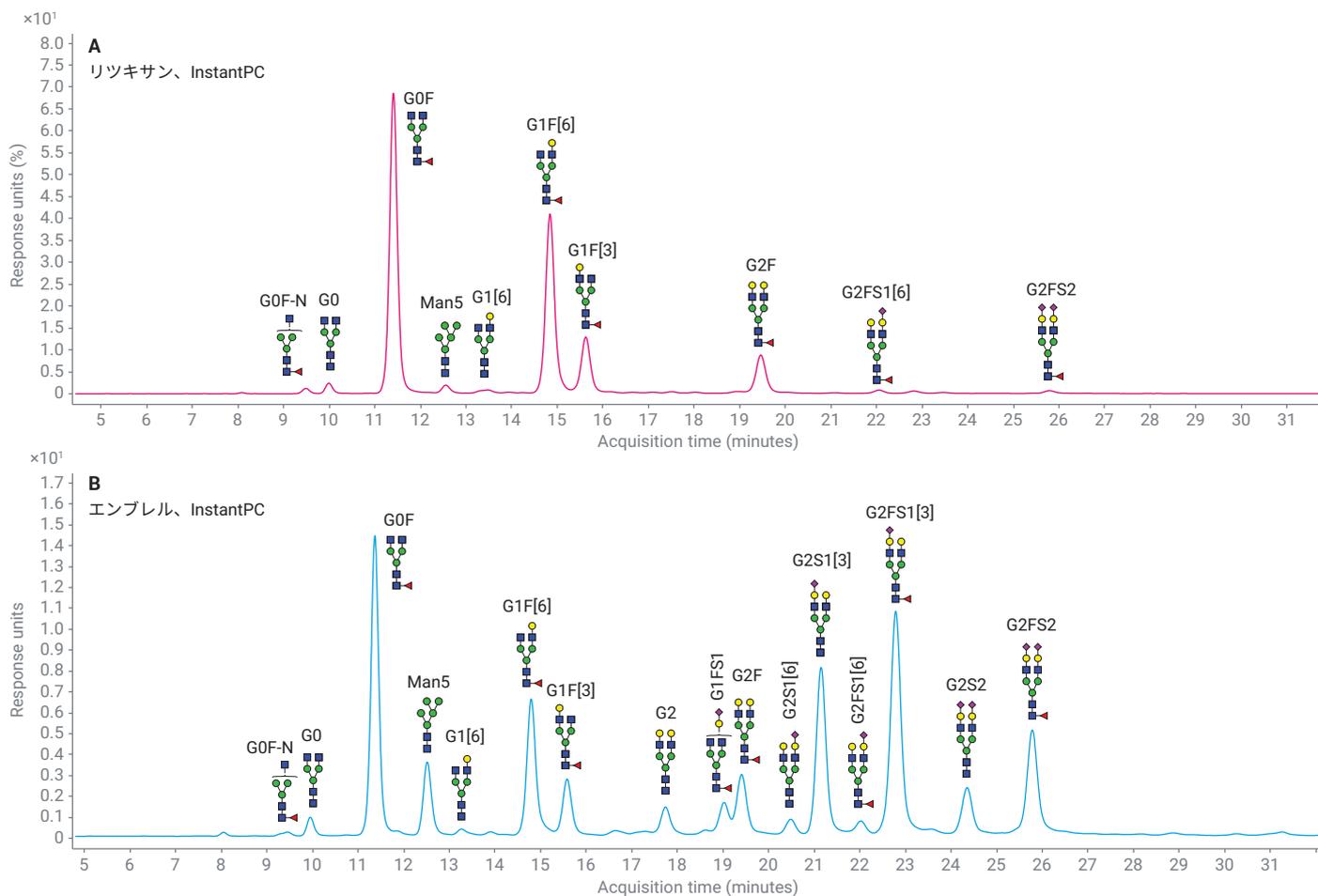


図 3. InstantPC でラベル化された A) リツキサンおよび B) エンブレル N-グリカンの HILIC-UHPLC 蛍光プロファイル。N-グリカンの相対 % 面積を表 3 と表 4 に示します (n = 4)。

表 3. 図 3A の InstantPC でラベル化された リツキサン N-グリカンの相対 % 面積、SD、および %CV の値 (n = 4)

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0F-N	0.75	0.01	1.55
G0	1.47	0.02	1.18
G0F	46.82	0.07	0.15
Man5	1.21	0.01	0.83
G1[6]	0.75	0.02	2.67
G1F[6]	31.21	0.11	0.35
G1F[3]	9.27	0.05	0.54
G2F	7.04	0.04	0.51
G2FS1[6]	0.67	0.02	2.29
G2FS1[3]	0.37	0.06	15.98
G2FS2	0.45	0.03	6.67

表 4. 図 3B の InstantPC でラベル化された エンブレル N-グリカンの相対 % 面積、SD、および %CV の値 (n = 4)

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0	1.10	0.02	2.09
G0F	19.36	0.16	0.84
Man5	5.08	0.03	0.52
G1[6]	0.48	0.00	0.00
G1F[6]	10.48	0.04	0.39
G1F[3]	3.97	0.01	0.25
G2	2.08	0.01	0.55
G1FS1	1.84	0.05	2.49
G2F	4.26	0.09	1.99
G2S1[6]	1.18	0.01	0.49
G2S1[3]	13.91	0.04	0.31
G2FS1[6]	0.89	0.00	0.00
G2FS1[3]	20.54	0.08	0.37
G2S2	4.26	0.01	0.14
G2FS2	10.54	0.08	0.78

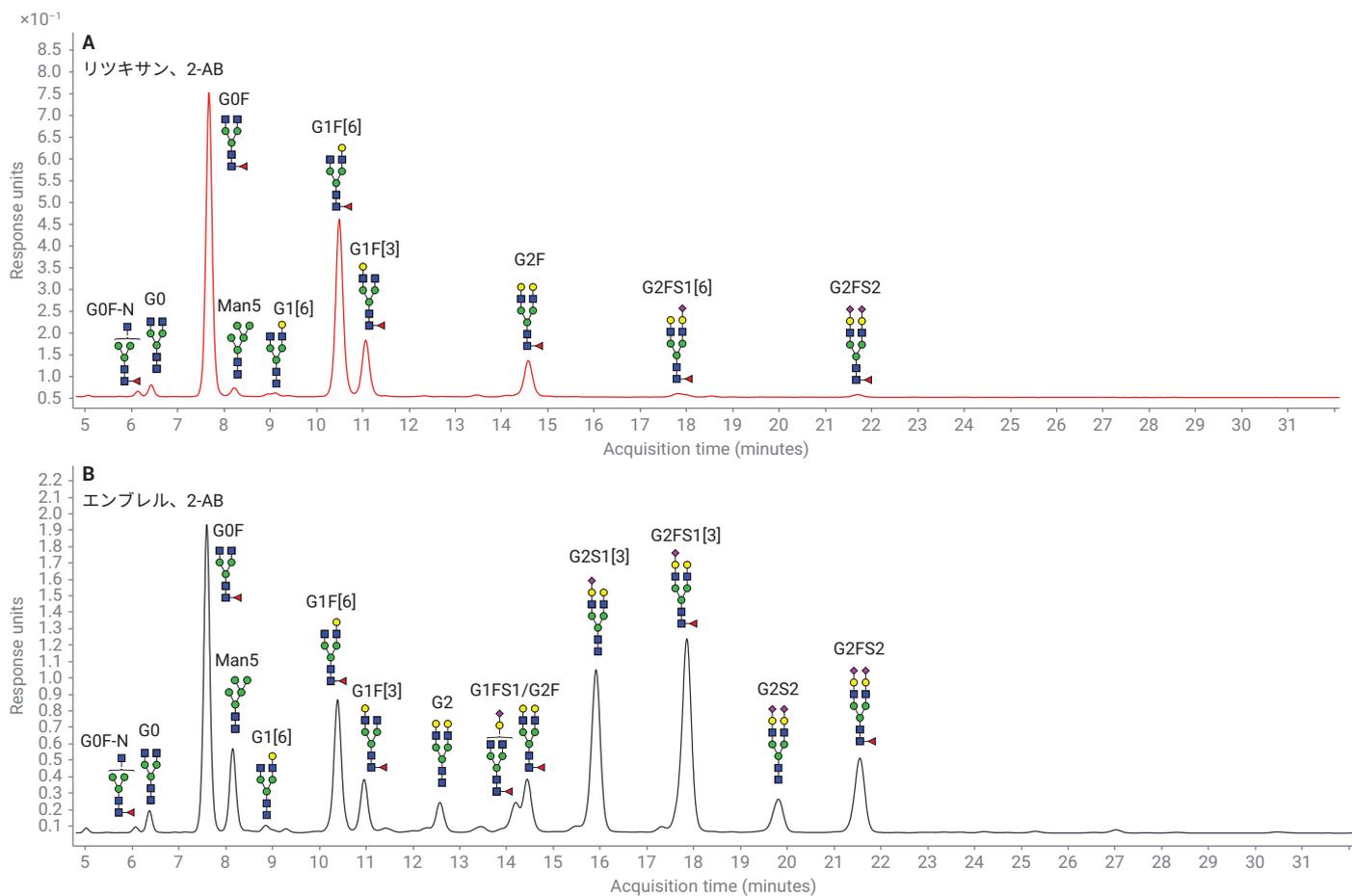


図 4. 2-AB でラベル化された A) リツキサンおよび B) エンブレル N-グリカンの HILIC-UHPLC 蛍光プロファイル。N-グリカンの相対 % 面積を表 5 と表 6 に示します (n = 4)。

表 5. 図 4A の 2-AB でラベル化されたリツキサン N-グリカンの相対 % 面積、SD、および %CV の値 (n = 4)

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0F-N	0.78	0.09	11.94
G0	1.64	0.05	3.12
G0F	44.89	0.39	0.87
Man5	1.54	0.14	8.83
G1F[6]	31.39	0.09	0.27
G1F[3]	10.40	0.14	1.34
G2F	7.52	0.16	2.10
G2FS1	1.17	0.03	2.13
G2FS2	0.67	0.02	3.58

表 6. 図 4B の 2-AB でラベル化されたリツキサン N-グリカンの相対 % 面積、SD、および %CV の値 (n = 4)

	平均相対 % 面積	標準偏差	%CV
G0F-N	0.32	0.02	7.44
G0	1.27	0.07	5.34
G0F	20.18	0.45	2.22
Man5	5.50	0.34	6.17
G1[6]	0.45	0.02	3.89
G1F[6]	10.35	0.33	3.18
G1F[3]	3.92	0.17	4.39
G2	2.21	0.15	6.78
G2F/G1FS1	7.00	0.25	3.63
G2S1	15.19	0.17	1.09
G2FS1	20.10	0.32	1.59
G2S2	4.19	0.25	5.95
G2SF2	9.35	0.74	7.93

InstantPC および 2-AB N-グリカンの FLD および MS 検出

同じ量の糖タンパク質原材料 (40 μg) を使用し、同じ相対量を注入して HILIC 分離を実施した場合 (100 μL キット溶出液の 1 μL)、InstantPC は 2-AB と比較して高い蛍光および MS 信号を示しています (図 5)。InstantPC および 2-AB ラベル化 Man5 の個別のスペクトルは、InstantPC で高い MS 信号を示しています (図 6)。

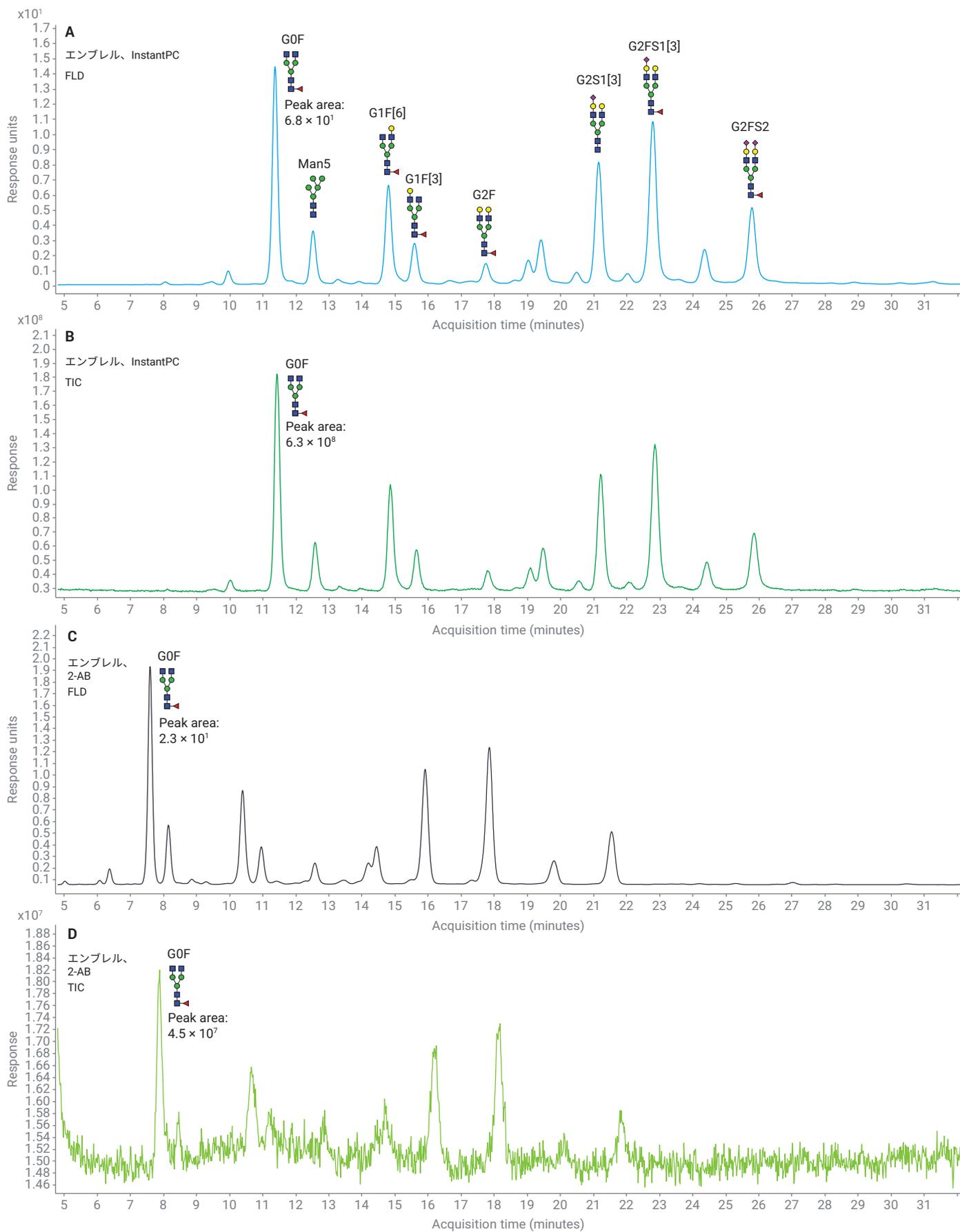


図 5. エンブレルの InstantPC および 2-AB ラベル化 N-グリカンの FLD と MS。A) InstantPC FLD、B) InstantPC TIC (トータルイオンクロマトグラム)、C) 2-AB FLD、D) 2-AB TIC

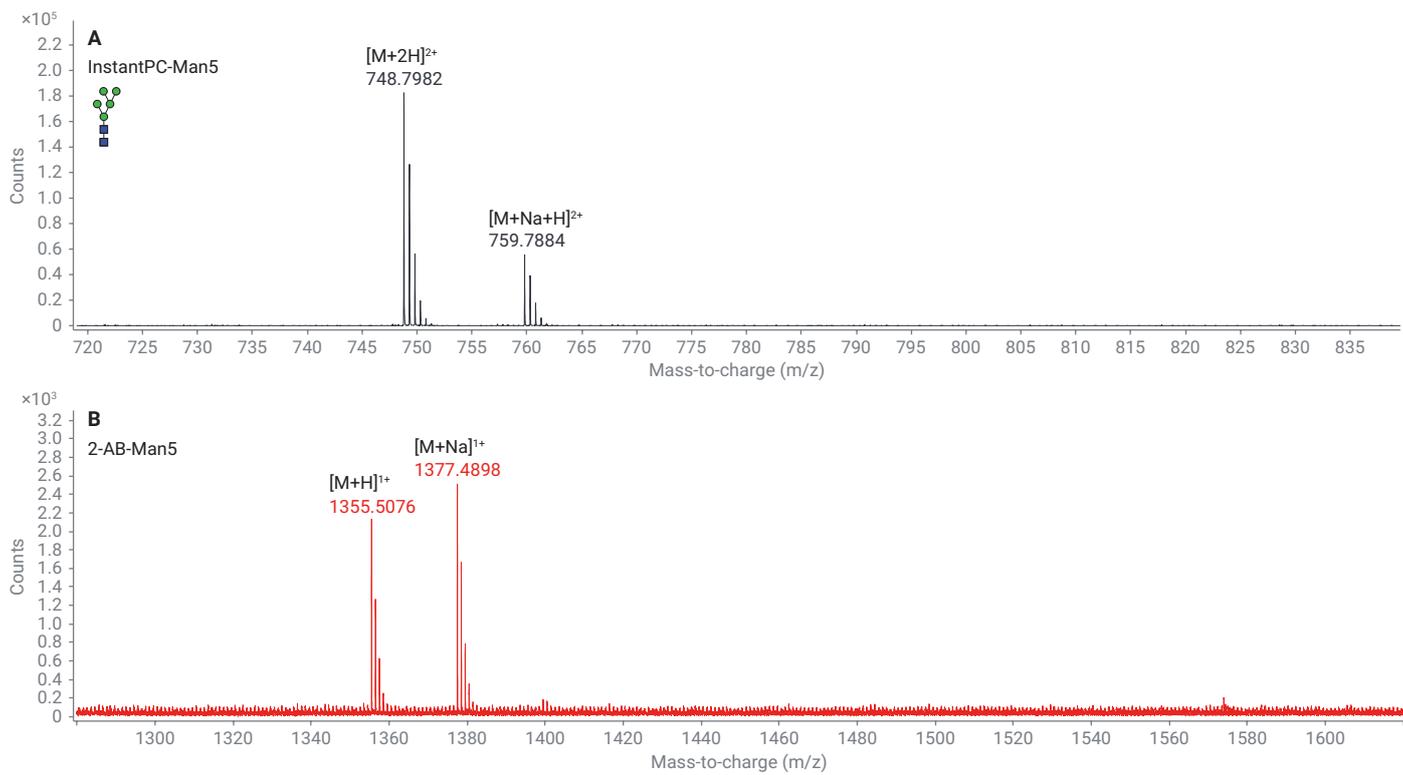


図 6. エンブレルの Man5 の質量スペクトルの比較、A) InstantPC でラベル化、B) 2-AB でラベル化

結論

グリコシル化は多くの生物製剤タンパク質の 1 つの特徴であり、多くの場合にモニタリングする必要がある CQA です。治療用タンパク質の開発と製造では、N-グリカン分析が重要になります。Gly-X N-グリカンサンプル前処理のワークフローでは、InstantPC によるグリコシルアミンラベリングと 2-AB による還元的アミノ化反応によるラベリングに最適な、N-結合型グリカンの 5 分の遊離が実行できます。これらのワークフローでは、InstantPC による即時のグリコシルアミンラベリング、または 2-AB による乾燥不要のオンマトリックス還元的アミノ化ラベリングが実行できます。グリカン種を、高分解能質量分析で確認した相対蛍光ピーク面積 % とピークの割り当てによりプロファイリングしました。InstantPC ラベル化グリカンは 2-AB の場合と比較して、ポジティブモードで高い FLD 信号と高い MS イオン化効率を示しており、低アバンドランスのグリカン種を高い信頼性で検出できています。InstantPC には明確な性能メリットがありますが、2-AB は長年使用されてきた N-グリカンラベルです。したがって、高速 2-AB ワークフローは、従来の 2-AB N-グリカンデータセットとの継続性を保持できます。

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. Anumula, K. R. Advances in Fluorescence Derivatization Methods for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Glycoprotein Carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, 1–23.
3. 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.
4. Yan, J. *et al.* Preparation of Released N-Glycan Samples from Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio Gly-X 2-AB Express for LC-Fluorescence Analysis. Agilent Technologies Application Note, publication number 5994-0682EN, **2019**.
5. Houel, S.; *et al.* N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 576–584.

ホームページ

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

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, November 12, 2019

5994-1348JAJP