

生物製剤中のシアル酸のプロファイリングと 定量のワークフローの改良

著者

Anna Fong, John Yan,
Ace G. Galermo, Tom Rice,
Aled Jones, and Ted Haxo
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット (p/n GS24-SAP) を用いて、生物製剤の糖タンパク質と NISTmAb 中に存在するシアル酸をプロファイリングして絶対定量する方法について説明します。このキットでは、新しく改良されたハイスループットワークフローを使用して、1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) でラベル化されたシアル酸を前処理、分離して検出します。N-グリカンまたは O-グリカンの非還元末端でキャッピングしているシアル酸は、生物製剤の糖タンパク質の効力の仲介において重要な役割を果たす場合があります。¹

ここで説明するワークフローでは、AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キットを使用して、酸加水分解により末端のシアル酸を遊離してから DMB ラベリングを実行し、定性分析と定量分析を実施します。サンプルと標準の DMB ラベル化シアル酸を逆相液体クロマトグラフィー (LC) で分離して、蛍光検出 (FLD) により定量し、質量分析 (MS) で構造を確認します。

はじめに

生物製剤の糖タンパク質に存在するグリカンの組成が、免疫原性、薬物動態、および薬力学に影響を与える場合があります。²グリカンは、組成と結合位置を基にして実現可能な多数の異なるオリゴ糖構造に配置された単糖類から構成される炭水化物です。末端のシアル酸は分子と用途に応じて、クリアランス率を減少させるか、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) の活動を抑制するか、または抗炎症性を示す場合があります。^{3~5}生物製剤中に一般的に存在する 2 つの形態は、N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) です。Neu5Ac は通常主な種であるのに対して、Neu5Gc はヒトでは合成されず、生物製剤に存在すると免疫原性を示す場合があります。したがって、シアル酸の絶対量、および治療用糖タンパク質中に存在するさまざまなシアル酸種の濃度をモニタリングすることが重要になります。

ここでは、96 ウェルプレートフォーマットに基づいた新しいハイスループットワークフローにより、具体例としてリツキシマブ、エタネルセプト、NISTmAb、セツキシマブを使用して、治療用糖タンパク質のシアル酸を遊離、ラベリングして分析します。シアル酸残留物の遊離と 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) によるラベル化を 2 段階手順で実行します。次に、逆相超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) と FLD 検出を基にした高速 10 分メソッドを使用して、DMB ラベル化シアル酸を分離して分析し、質量分析に向けた定量およびオプションの MS 検出を実行します。今回のワークフローでは、シアル酸リファレンスパネル (SARP) を使用した Neu5Ac、Neu5Gc、その他のシアル酸種の定性特性解析、および含まれている Neu5Ac と Neu5Gc 定量標準を使用したピコモルレベルの感度による絶対定量を実現しています。さらに、シ

アル酸のプロファイリングと定量に向けた信頼性と再現性の高いハイスループットのサンプル前処理が実行できます。このキットは、シアル化のレベルが低い分子に対して、幅広い検出範囲と高感度を実現しています。

実験方法

サンプル前処理

サンプルは 96 ウェルプレートフォーマットで前処理しました。酸加水分解反応により、リツキシマブ (リツキサン、ロット番号 M190170)、エタネルセプト (エンブレル、ロット番号 M190088)、NISTmAb (ロット番号 14HB-D-002)、およびアービタックス (セツキシマブ、ロット番号 MI60886) からシアル酸を遊離しました。このメソッドでは乾燥手順が必要ないため、サンプル前処理全体の時間を 1 ~ 2 時間短縮できます。サンプル量は通常、シアル化のレベルが低い糖タンパク質では 200 µg、シアル化のレベルが高い糖タンパク質では 5 µg です。シアル酸参照標準 Neu5Ac と Neu5Gc を段階希釈して検量線を作成し、分析で使用する定量下限 (LOQ) と検出下限 (LOD) を決定しました。次に、図 1 に示すワークフローに従って、遊離したシアル酸、SARP、および標準を DMB で誘導体化し、サーマルサイクラーで遊離とラベリング手順を実行しました。

DMB ラベル化シアル酸の LC/FLD/MS 分析

リツキサン、エンブレル、NISTmAb、アービタックスの DMB ラベル化シアル酸を、逆相 (RP) 分離、Agilent 1290 Infinity II LC システム、および蛍光検出 (FLD) を使用して分析し、定量しました。RP-UHPLC 分離はすべて、表 1 に示す条件下で実施しました。Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 質量分析計 (表 2) を使用して追加のインライン分析を実施し、SARP 中に存在する DMB ラベル化

シアル酸種の溶出順序も確認しました。FLD 後に固定フロープリッタを使用して、流量の約 50 % を廃液に、50 % を MS に切り替えました。データは、Agilent OpenLab CDS 2.3 および MassHunter Qualitative Analysis 10.0 ソフトウェアにより解析しました。検量線を使用して、Neu5Gc と Neu5Ac を定量しました。

試料調製

アセトニトリル (LC/MS グレード、Honeywell Burdick & Jackson) は VWR から購入しました。メタノール (Optima LC/MS グレード) は Fisher Scientific から購入しました。すべての実験において、社内で生成したナノピュア水を使用しました。

装置構成

DMB ラベル化シアル酸サンプルを、表 1 で説明したメソッドにより Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラム (2.1 × 75 mm、2.7 µm、p/n 697775-902) 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 Infinity 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 のパラメータ使用)

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS 2.3
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0

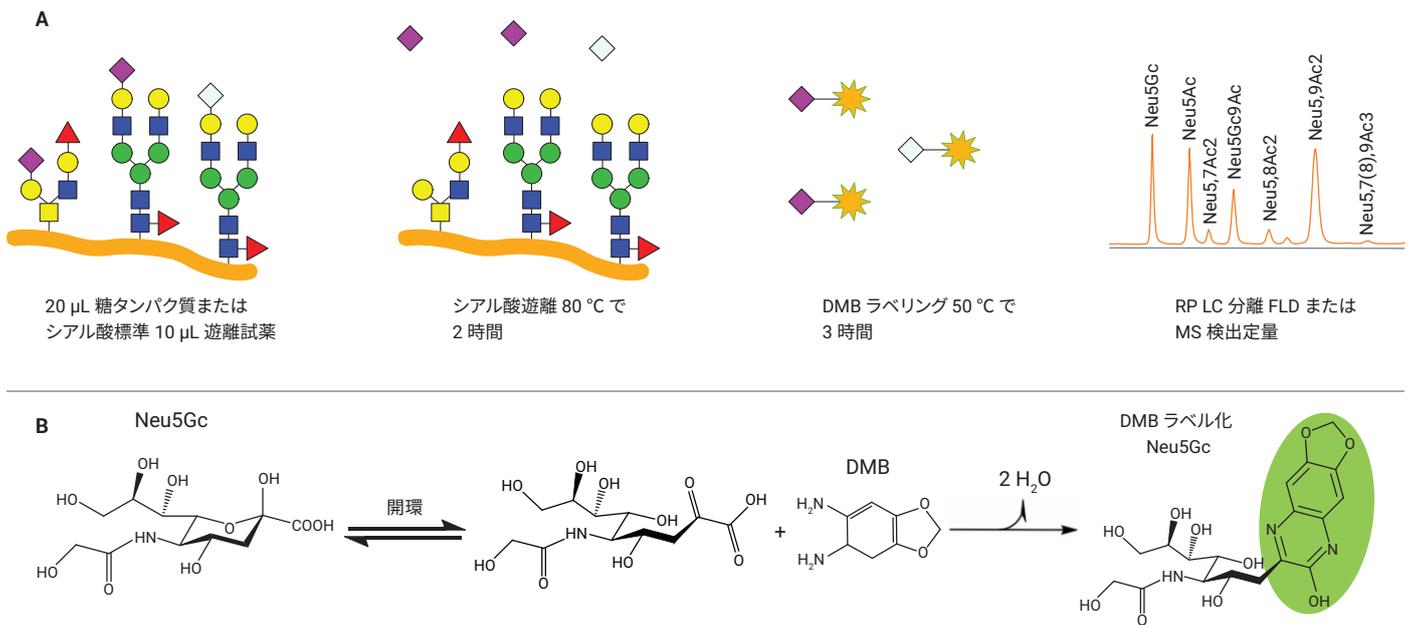


図 1. シアル酸遊離と DMB ラベリングワークフローの (A) 概要、および (B) シアル酸 Neu5Gc の DMB ラベリングのメカニズム

表 1. 逆相 UHPLC 条件

パラメータ	設定値																																			
機器	Agilent 1290 Infinity II LC システム																																			
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 75 mm, 2.7 µm (p/n 697775-902)																																			
カラム温度	30 °C																																			
移動相	A) メタノール:アセトニトリル:水 (4:8:88) B) アセトニトリル																																			
グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> <th>流量 (mL/min)</th> <th>操作</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0.4</td> <td>イソクラティック</td> </tr> <tr> <td>6.00</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0.4</td> <td>溶出</td> </tr> <tr> <td>6.25</td> <td>20</td> <td>80</td> <td>0.4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7.30</td> <td>20</td> <td>80</td> <td>0.4</td> <td>洗浄</td> </tr> <tr> <td>7.50</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0.4</td> <td>再平衡</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0.4</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%A	%B	流量 (mL/min)	操作	0.00	100	0	0.4	イソクラティック	6.00	100	0	0.4	溶出	6.25	20	80	0.4		7.30	20	80	0.4	洗浄	7.50	100	0	0.4	再平衡	10.00	100	0	0.4	
時間 (分)	%A	%B	流量 (mL/min)	操作																																
0.00	100	0	0.4	イソクラティック																																
6.00	100	0	0.4	溶出																																
6.25	20	80	0.4																																	
7.30	20	80	0.4	洗浄																																
7.50	100	0	0.4	再平衡																																
10.00	100	0	0.4																																	
注入量	10 µL																																			
検出	Agilent 1260 Infinity II FLD λ_{Ex} 373 nm, λ_{Em} 448 nm																																			

表 2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF パラメータ

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
イオン源	デュアル AJS ESI
ガス温度	350 °C
ドライガス流量	11 L/min
ネブライザ	15 psi
ソースガス温度	400 °C
ソースガス流量	12 L/min
Vcap	1,400 V
ノズル電圧	1,800 V
フラグメンタ	120 V
スキマ電圧	65 V
質量範囲 (MS)	m/z 400 ~ 1,000
質量範囲 (MS/MS)	m/z 100 ~ 550
取り込みモード	高分解能 (4 GHz)

結果と考察

DMB ラベル化シアル酸の LC/FLD/MS 分析

DMB ラベル化 SARP の RP-UHPLC 分析により、次の 7 種類のシアル酸誘導体を分離して検出します。Neu5Gc、Neu5Ac、Neu5,7Ac2、Neu5Gc,9Ac、Neu5,8Ac2、Neu5,9Ac2、および Neu5,7(8),9Ac3。異なるカラム、流量、溶媒、またはラボ条件においてリテンションタイムに差が認められることもあります。DMB 誘導体化シアル酸の溶出順序に変化はありません。サンプルシーケンスの開始時にリファレンスパネルを使用して、クロマトグラフィーシステムの分解能と精度を評価しています。DMB ラベル化 SARP の代表的な FLD クロマトグラムを図 2A に示します。質量分析により、DMB シアル酸誘導体の同定を確認しました (図 2B)。

生物製剤と NISTmAb のシアル酸含有量の分析

リツキサン、エンブレル、NISTmAb、およびアービタックスに今回のワークフローを適用して同定した DMB ラベル化シアル酸を図 3 に示します。リツキサン (図 3A) とエンブレル (図 3B) には主に Neu5Ac が含まれていますが、NISTmAb (図 3C) とアービタックス (図 3D) には主に Neu5Gc が含まれています。エンブレルおよびアービタックスの DMB ラベル化サンプル中の主要ピークの質量スペクトルにより、同定物質がそれぞれ Neu5Ac および Neu5Gc として確認されています (図 4)。

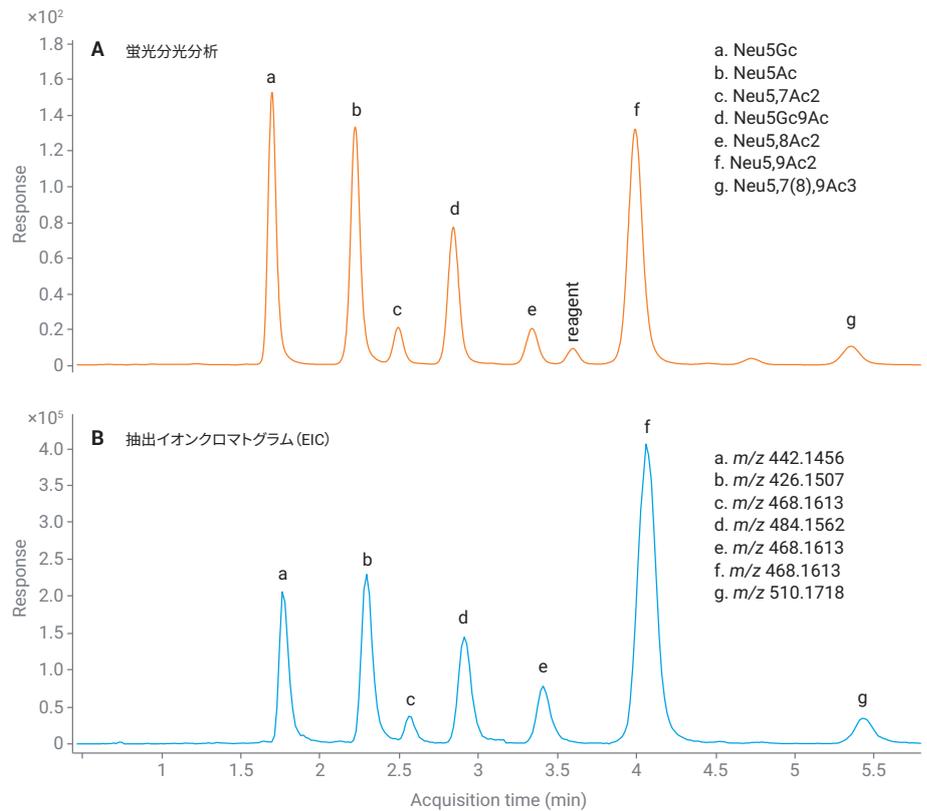


図 2. DMB ラベル化 SARP の UHPLC クロマトグラム。(A) 蛍光、(B) DMB ラベル化シアル酸種 $[M+H]^+$ の抽出イオンクロマトグラム

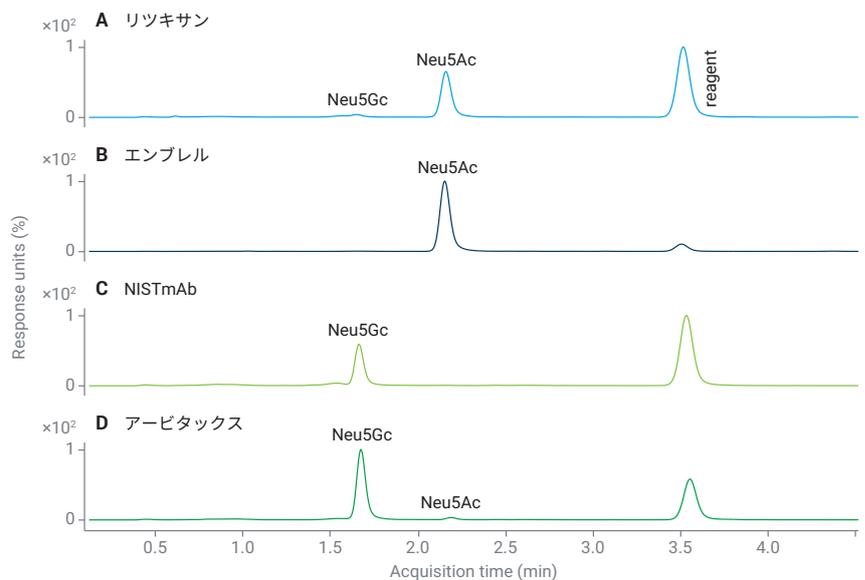


図 3. 異なる糖タンパク質 (A) リツキサン、(B) エンブレル、(C) NISTmAb、および (D) アービタックスの DMB ラベル化シアル酸の UHPLC 蛍光プロファイル

シアル酸含有量の定量分析

DMB ラベル化 Neu5Ac および Neu5Gc 標準のクロマトグラフィーによる分離と蛍光応答に基づいて、定量検量線を作成しました (図 5)。OpenLab CDS 2.3 の P2P ノイズ計算で決定されたノイズを使用して、LOD と LOQ を計算しました。リツキサン、エンブレル、NISTmAb、およびアービタックスの Neu5Gc と Neu5Ac の検出可能モル量を、積分ピーク面積に基づいて決定しました (表 3)。総シアル酸定量の結果は、AdvanceBio 総シアル酸定量キット (p/n GS48-SAQ) で得られた結果と一致しています (表 4)。このキットは、以前の DMB ラベリングワークフロー (p/n GKK-407) と比較して性能が向上しています (表 5)。これは、サンプルウェルあたりの糖タンパク質の濃度の増加が、分析前のサンプル希釈中の減少として示されていることによるものであり、DMB ラベル化シアル酸の蛍光信号が増大しています。

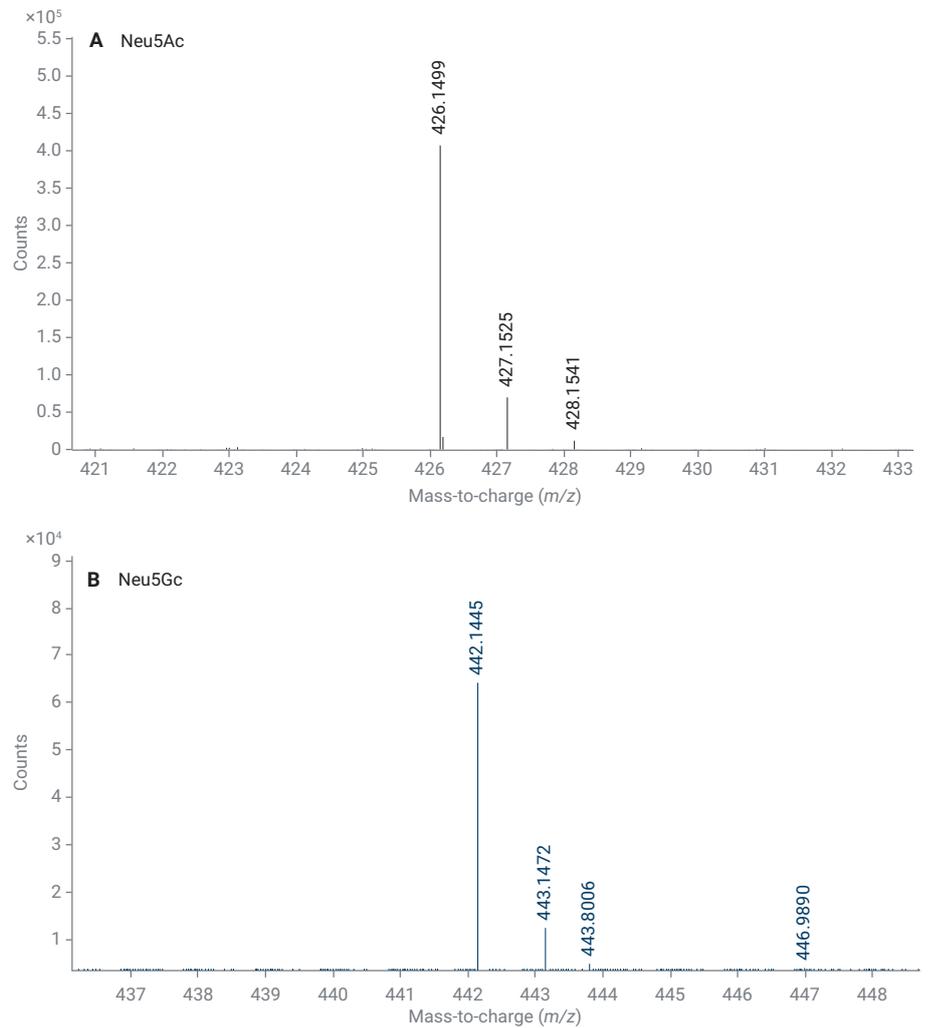


図 4. DMB ラベル化シアル酸 (A) エンブレルの Neu5Ac、(B) アービタックスの Neu5Gc の質量スペクトル

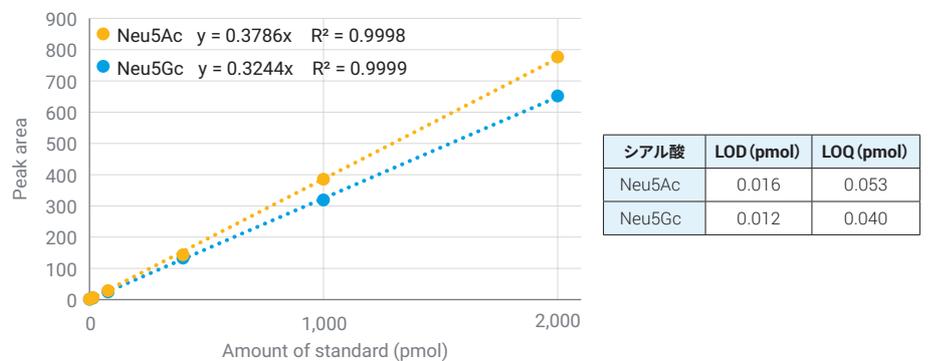


図 5. Neu5Ac および Neu5Gc の検量線 (n = 2)。Neu5Ac と Neu5Gc の LOD および LOQ を表に示します。

表3. 各糖タンパク質の Neu5Ac および Neu5Gc の平均 pmol/μg を表に示します (n = 3)。ND = 不検出

	濃度 (mg/mL)	サンプル質量 (μg)	Neu5Ac (pmol/μg)	%CV	Neu5Gc (pmol/μg)	%CV
リツキサン	10	200	0.60	4.2 %	0.02	1.8 %
エンブレル	0.25	5	228	6.9 %	ND	-
NIST mAb	10	200	ND	-	0.36	1.8 %
アービタックス	2	40	0.12	10.9 %	3.72	7.1 %

表4. Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット (p/n GS24-SAP) による総シアル酸 (Neu5Ac および Neu5Gc)。Agilent AdvanceBio 総シアル酸定量キット (p/n GS48-SAQ) で得られた値と比較 (n = 3)

	Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング および定量キット		Agilent AdvanceBio 総シアル酸定量キット	
	pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
リツキサン	0.62	4.17 %	0.47	5.04 %
エンブレル	220	1.65 %	210	12.34 %
アービタックス	3.80	7.26 %	3.49	0.69 %
フェチュイン	226	4.45 %	232	7.39 %

表5. Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット (p/n GS24-SAP) による Neu5Ac および Neu5Gc の定量 (pmol/μg)。SIGNAL DMB シアル酸ラベリングキット (p/n GKK-407) で得られた値と比較 (n = 3)。ND = 不検出

糖タンパク質	シアル酸	GKK-407		Agilent AdvanceBio シアル酸プロファイリング および定量キット	
		pmol/μg	%CV	pmol/μg	%CV
リツキサン	Neu5Gc	ND	-	0.02	1.76 %
	Neu5Ac	0.58	1.12 %	0.60	4.25 %
エンブレル	Neu5Ac	226	3.57 %	223	2.92 %
アービタックス	Neu5Gc	ND	-	3.68	1.02 %
	Neu5Ac	ND	-	0.12	4.46 %
フェチュイン	Neu5Gc	ND	-	4.78	4.90 %
	Neu5Ac	201	1.47 %	222	4.44 %

結論

AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キットにより、Fc 領域の単 N-グリコシル化部位を持つモノクローナル抗体のような、シアル化のレベルが低いタンパク質の感度が向上しています。改良した DMB ラベリングワークフローにより、サンプルの乾燥手順が不要になったため、サンプル前処理の時間が短縮されています。

このワークフローは、生物製剤中に存在する Neu5Ac と Neu5Gc の絶対量と相対量を決定するメソッドを提供します。サンプル前処理では、96 ウェルプレートフォーマットを使用してハイスループットのサンプル前処理を実現し

ており、再現性も高くなっています。定量データは、以前の DMB ラベリングワークフロー (GKK-407) および AdvanceBio 総シアル酸定量キット (GS48-SAQ) の結果と同等です。

参考文献

- Varki, A. Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, 14(8), 351–360.
- 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.
- Li, Y. *et al.* Sialylation on O-glycans Protects Platelets from Clearance by Liver Kupffer Cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **2017**, 114(31), 8360–8365.
- Scallon, B. J. *et al.* Higher Levels of Sialylated Fc Glycans in Immunoglobulin G Molecules can Adversely Impact Functionality. *Mol. Immunol.* **2007**, 44(7), 1524–1534.
- Kaneko, Y. *et al.* Anti-inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* **2006**, 313, 670–673.

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. 2020, 2021
Printed in Japan, March 23, 2021
5994-2352JAJP
DE.7541782407