

AdvanceBio シアル酸プロファイリング および定量キットと LC/FLD/MS を用いた 生物製剤糖タンパク質のシアル酸分析



シアル酸分析の簡素化と標準化

生物製剤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。¹グリカンは、組成と結合位置に基づいて、多数の異なるオリゴ糖の構造に配列されている単糖類で構成される炭水化物です。末端シアル酸は分子と用途に応じて、クリアランスの率を減少させたり、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を低下させたりする場合があります。また、抗炎症性を示す場合もあります。生物製剤の一般的な 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 は通常主な種ですが、Neu5Gc は人間によって合成されず、生物製剤に存在すると免疫原性を示す場合があります。そのため、重要になるのは、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です。

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) により、Fc 領域に単一の N-グリコシル化部位を含む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において感度が向上します。このキットには、約 5 時間で蛍光ラベル化シアル酸サンプルを前処理するのに必要なすべての試薬が含まれています。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムと組み合わせることにより、LC/FLD または LC/MS によるシアル酸のプロファイリングと定量を簡単に実行できます。

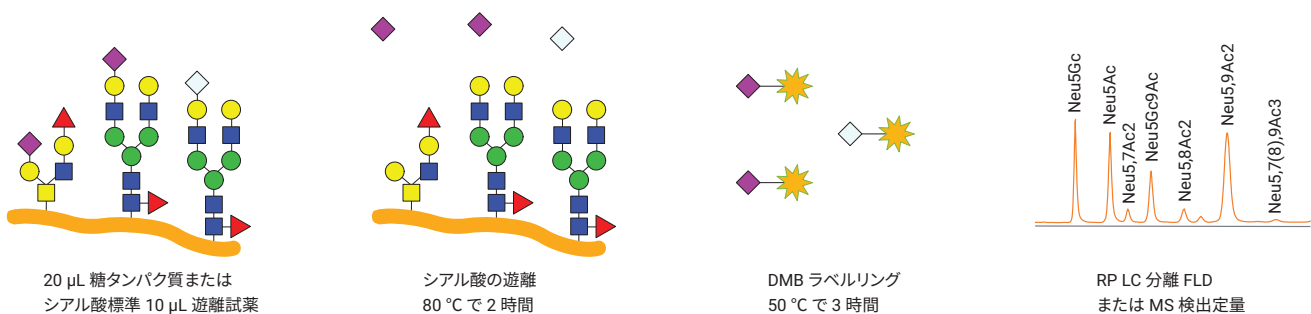


図 1. シアル酸遊離と DMB ラベリングワークフローに続いて、FLD または MS を使用して分離と検出を実行しました。

アジレントが設計・製造した包括的なシアル酸分析ソリューション

このガイドでは、シアル酸分析を始める際に必要になる消耗品について説明します。これら多くの消耗品を使用して、リツキシマブ（リツキサン、モノクローナル抗体、つまり mAb）、エタネルセプト（エンブレル、Fc 融合タンパク質）、セツキシマブ（アーピタックス、モノクローナル抗体）、および NISTmAb 中に存在するシアル酸を評価しました。²この効率的なワークフローによって開発したメソッドは、Neu5Ac と Neu5Gc の絶対量と相対量を測定でき、LC/FLD および LC/MS によるプロファイリングと定量分析の両方に対応しています。

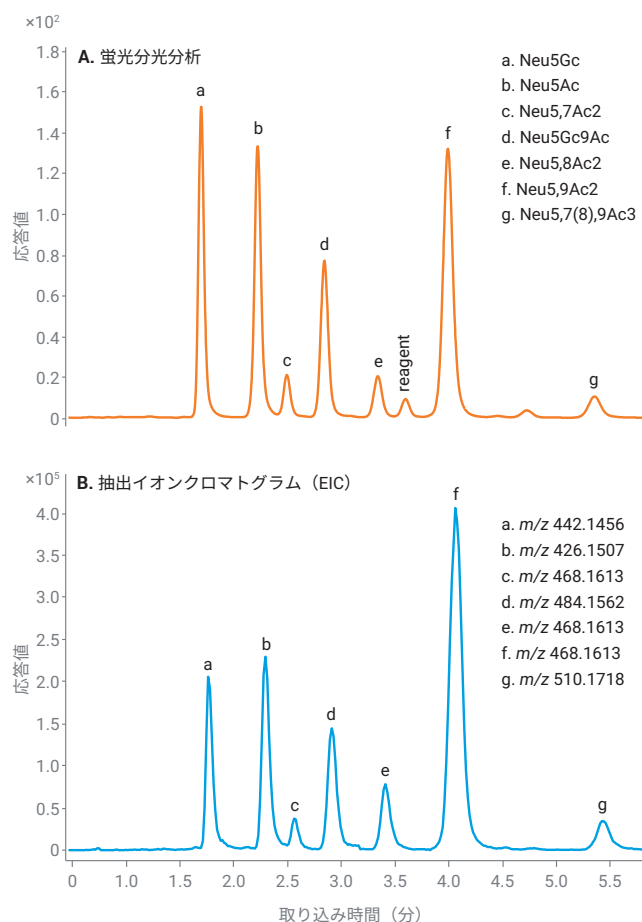
この AdvanceBio シアル酸分析ワークフローガイドでは、次の製品の情報について説明します。

- AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量サンプル前処理キット。このキットには、シアル酸を遊離してラベル化するために必要な試薬、定性シアル酸リファレンスパネルと定量 NANA および NGNA 標準が含まれています。
- 逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）によるグリカン分離用の LC カラム。
- 溶媒と試薬。
- バイアルとキャップ。

シアル酸分析の生産性を向上させます。

- LC/FLD または LC/MS 分析用サンプルを約 5 時間で前処理。
- 自動化可能な 96 ウェルプレート形式。
- ガラス製アンブルなし、すべてスクリュウキャップの容器。
- サンプルインプット前のサンプルの乾燥不要。
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラムを使用して、RPLC によりシアル酸をわずか 10 分間で分離。
- 代表的な DMB (1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン) 色素。

含まれているシアル酸リファレンスパネル中に存在するシアル酸の LC/FLD および LC/MS (EIC) データの例です。LC および MS パラメータと生物製剤中のシアル酸の分析例などの詳細については、参考文献 2 をご覧ください。



	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

図 2 : DMB ラベル化 SARP の UHPLC クロマトグラム。
DMB ラベル化シアル酸種 [M+H]¹⁺ の (A) 蛍光 (B) 抽出イオンクロマトグラム

表 1 : Agilent 1290 Infinity II UHPLC HILIC/FLD 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	時間 (分) %A %B 流量 (mL/min)
	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 1250 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 ~ 500
取り込みモード	高分解能 (4 GHz)

AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キットの利用方法³

シアル酸サンプルに関する考慮事項

- キットで測定するサンプルは、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、ポリシアル酸、血清、血漿、組織、または細胞全体です。
- このアッセイのダイナミックレンジは、ウェルあたりシアル酸 1 ~ 2,000 pmol です。シグナルが範囲内に収まるように、サンプル濃度を調整することが必要になる場合があります。
- サンプルは、使用する前に乾燥させて少量の脱イオン水に再溶解させることにより濃縮できます。サンプルは、分析ウェル内で直接乾燥させるか、または別のチューブ内で前処理できます。

インキュベーションハードウェア

AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット (GS24-SAP) を使用したサンプル前処理時には、酸の遊離ステップ時にサンプルを 80 °C まで加熱し、DMB により 50 °C でラベル化します。指定した 96 ウェルプレートでサンプルを加熱する際には、サーマルサイクラーまたは 2 つの独立した乾燥ブロックヒーターを使用することを推奨します。提案例を下に示します。

インキュベーションハードウェア (他社製)	部品番号
50 °C および 80 °C の設定値に対応可能な 96 ウェルサーマルサイクラー	条件により異なる
乾燥ブロックヒーター、4 ブロック (2 個) (Troemner)	HB4DG
モジュール型加熱ブロック (2 個) (VWR)	13259-260

データ解析とレポート作成

データは、Agilent OpenLab CDS 2.3 および MassHunter Qualitative Analysis 10.0 ソフトウェアで解析しました。検量線を使用して、Neu5Gc と Neu5Ac を定量しました。

注：現在アジレントでは、21 CFR Part 11 に準拠した MassHunter 11 と OpenLab ECM XT データ解析ソフトウェアを提供しています。

参考文献

1. 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. An Improved Workflow for Profiling and Quantitation of Sialic Acids in Biotherapeutics 5994-2352EN, 2020.
3. Agilent AdvanceBio Sialic Acid Profiling and Quantitation Kit, User Manual, 5994-2800EN.

AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量消耗品

説明	部品番号
サンプル前処理	
AdvanceBio シアル酸プロファイリングおよび定量キット、24 ct	GS24-SAP
カラム	
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 75 mm、2.7 µm、ナローポア	697775-902
InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 5 mm、2.7 µm、ガードカラム、3 個	821725-911
標準液	
ウシフェチュイン、加熱処理済み (0.4 mg)	WS0021
Agilent-NISTmAb、1 x 25 µL	5191-5744
Agilent-NISTmAb、4 x 25 µL	5191-5745
バイアル、キャップ、試薬	
バイアル、スクリュー、2 mL、ポリプロピレン、PFAS 関連用途での使用を認証済、100 個 [†]	5191-8150
バイアルインサート、300 µL、ポリプロピレン、樹脂脚、100 個 [†]	5182-0549
9 mm、スクリュー、透明ポリプロピレンキャップ、100 個 [†]	5191-8151
InfinityLab UltraPure LC/MS アセトニトリル (1 L)	5191-4496
InfinityLab UltraPure LC/MS 純水 (1 L)	5191-4498
InfinityLab UltraPure LC/MS メタノール (1 L)	5190-6896

その他の消耗品

説明	部品番号
マイクロプレートシーラー用のオプション商品	
Peelable Aluminum プレートシーラー	24210-001
フィルタマイクロプレート、96 ウェル、ポリプロピレン、0.45 µm のポリフッ化ビニリデン膜付き、300 µL/ウェル、50 個	200981-100
カラムフィッティングとコネクタ	
Agilent InfinityLab クイックコネクタフィッティング (カラム注入口での接続用)	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックコネクタキャピラリー MP35N 0.12 x 105 mm (クイックコネクタフィッティング用)	5500-1578
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口での接続用)	5067-5966
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用)	5500-1596
クイックターンフィッティングの取り付けツール	5043-0915
溶媒ろ過消耗品**	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
溶媒ボトル関連消耗品	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティページボトル	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 は別途注文)	5043-1221
InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g (5043-1221 で使用)	5043-1193

** この表に記載されている以外の溶媒を使用する場合は、分析の前に InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリを使用してください。

[†] アジレントでは、250 µL バイアルインサートと 2 mL ポリプロピレンバイアルを使用して、デッドボリュームを最小限に抑えることを推奨しています。

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いません。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。

DE44509.431087963

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, November 12, 2021

5994-4201JAJP