

N-グリカンの遊離およびラベリングのための 高速 2-AB サンプル前処理ワークフローの 開発

著者

Vaishali Sharma,
Andres Guerrero, John Yan,
Aled Jones, Michael Kimzey,
Emily Dale, Ted Haxo, and
Sergey Vlasenko
Agilent Technologies, Inc.

概要

N-グリカンの特性解析は、生物製剤の開発においてきわめて重要です。一般的に、酵素によって遊離された N-グリカンは、タグで誘導体化して HILIC/UHPLC-FLR および UHPLC/MS による蛍光 (FLR) 検出および質量分析 (MS) 検出を実行します。N-グリカンサンプル前処理は多くの場合、完了までに何時間または何日間を要します。Agilent InstantPC のような新しい蛍光タグでは高い FLR と MS 感度を実現できますが、2-AB (2-アミノベンズアミド) は 20 年以上にわたって N-グリカンデータの生成に使用されてきたタグであり、多くのラボで十分に確立されています。ここで示すのは、5 分の溶液内脱グリコシル化手順の後に乾燥手順が不要な直接オンマトリックス 2-AB ラベリングとクリーンアップを使用する高速 N-グリカンサンプル前処理ワークフローの開発とアプリケーションであり、分析までに約 2 時間でサンプルの準備が完了します。

また、アジレントが提供する次の 2 つの異なる N-グリカンのサンプル前処理ワークフローを使用して、2 つのモノクローナル抗体 (マブセラ、NISTmAb) と 1 つの Fc 融合タンパク質 (エンブレル) に関する比較実験を実施します。1) Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB、2) Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB Express (旧 ProZyme)。Agilent AdvanceBio Gly-X 技術と 2-AB Express ラベリングは、従来のサンプル前処理メソッドと比較して、結果が得られるまでの時間が大幅に短縮されています。

はじめに

N-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。¹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、標準の液体クロマトグラフィー (LC) 手法による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、一般的には PNGase F での酵素による遊離後の還元的アミノ化反応により (図 1)、2-AB のような蛍光タグで誘導体化します。この目的で最も一般的に使用されている還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムです。²従来の 2-AB 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色素ラベルのクリーンアップなど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なくても何時間を要する場合があります。³GlykoPrep と 2-AB のような従来の還元的アミノ化色素によりサンプル前

処理プロセスを効率化したため、プロセスを 4~5 時間で完了できます。Gly-X N-グリカン前処理と 2-AB Express はシンプルで高速なワークフローであり、溶液内脱グリコシル化により 5 分で N-グリカンを遊離して、ソリッドステートマトリックスで 2-AB ラベリングを実行

し、アセトニトリルにより余分な色素を洗浄してからラベル化サンプルを脱イオン水に溶出させます。通常、UHPLC 分析までに 2 時間でサンプルの準備が完了します (図 2)。

N-グリカンの 2-AB 還元的アミノ化

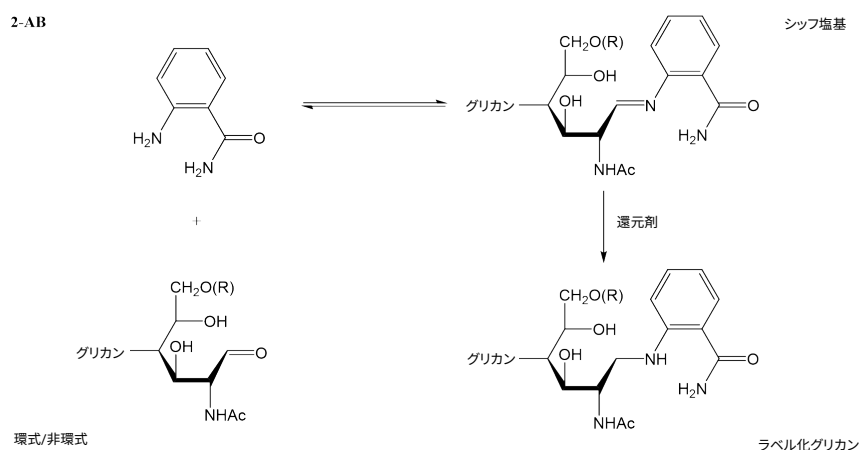


図 1. 酵素によって遊離された N-グリカンの 2-AB によるラベリング。色素の 1 級アミンは、非環式還元糖の γ カルボニル炭素を侵食して部分的なシッフ塩基を形成します。シッフ塩基のイミン基は、化学的に還元されてラベル化グリカンを生成します。

N-グリカンサンプル前処理のワークフロー

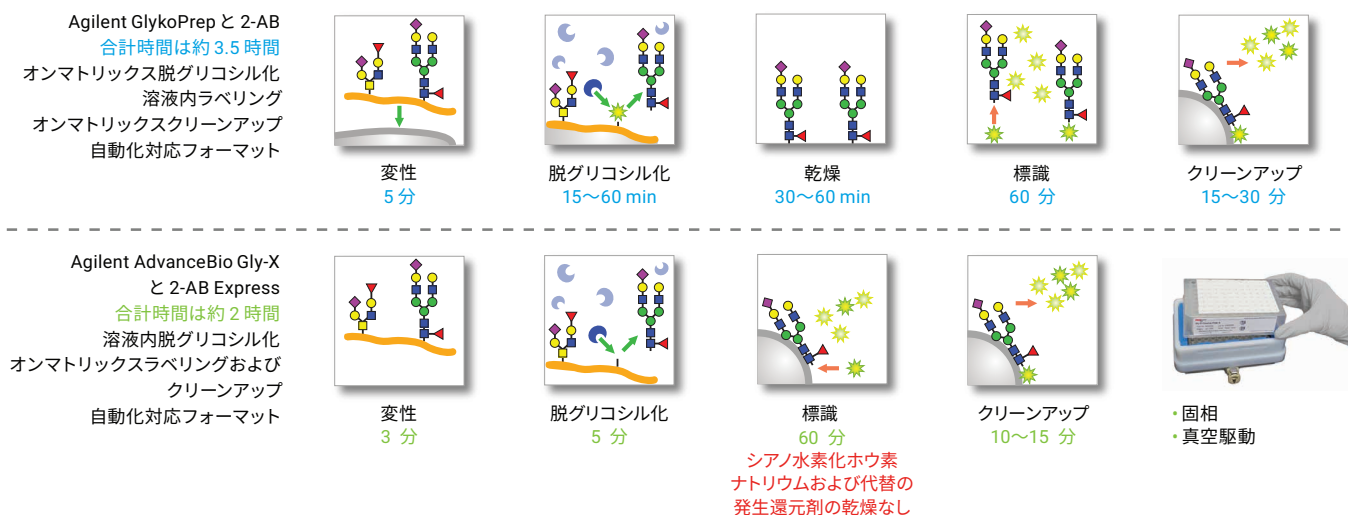


図 2. N-グリカンのサンプル前処理ワークフロー：Agilent GlykoPrep および Agilent AdvanceBio Gly-X と 2-AB Express

メソッド

サンプル前処理

マブセラ (ロット番号 H0102B03)、エンブレル (ロット番号 R170724)、および NIST モノクローナル抗体参照物質 8671 (NISTmAb) (ロット番号 14HB-D-002) の N-グリカンサンプルを、Agilent Glyko-Prep 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB (GP96NG-AB) および Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB Express (GX96-2AB) (旧 Prozyme) キットで前処理しました。この際、標準の推奨プロトコルに従い、前処理ごとに 50 µg のタンパク質を使用しました。すべてのサンプルは 3 つずつ前処理しました。

HILIC-UHPLC 分析

分析前に、溶出したサンプルを最終容量 100 µL に調整しました (1 µL 注入)。親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) でグリカンを分離しました。アミドカラム (2.1 × 150 mm、1.7 µm) で HILIC-UHPLC 分離を実施しました。この際、25 ~ 38 % 50 mM ギ酸アンモニウム pH 4.4、2.5 ~ 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蛍光検出 Ex/Em (nm) 360/428 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、LC/MS による質量決定^{4,5}、および公表データ (NISTmAb の場合) と比較して割り当てました。^{6,7}

結果と考察

2-AB ラベル化 N-グリカンの HILIC-UHPLC 分析では、2 つの異なるサンプル前処理メソッドである GlykoPrep と 2-AB および Gly-X と 2-AB Express の間で同等の結果を示しました。

- **マブセラ**: CHO 細胞で生成される大部分のモノクローナル抗体と同様に、マブセラのグリコシル化パターンは大部分が中性 2 本鎖グリカンで構成されており、G0F、G1F[6]/G1F[3]、および G2F が低濃度のシアル化種および高マンノース種で支配的 です (図 3)。

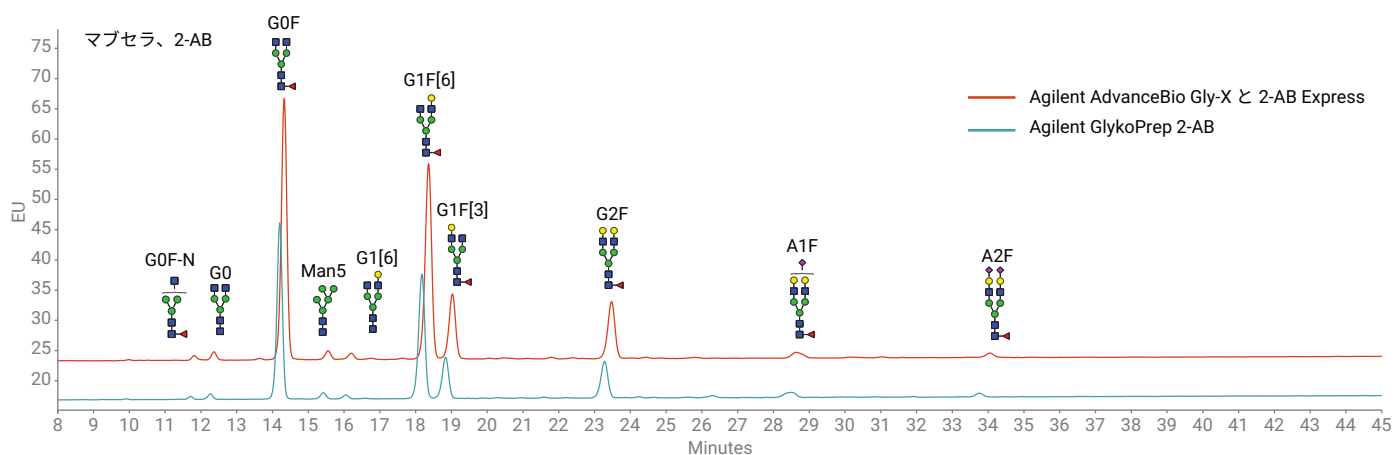


図 3. Agilent GlykoPrep と 2-AB および Agilent AdvanceBio Gly-X と 2-AB Express ラベリングで前処理された、マブセラの N-グリカンの 2-AB UHPLC 蛍光プロファイルの重ね表示

- エンブレル**：マブセラとは対照的に、エンブレルのグリコシル化プロフィールには、非常に高濃度のシアル化グリカンと A1F、A2F、A1、A2 のようなアフコシルグリカンが含まれています (図 4)。
- NISTmAb**：マブセラと同様に、NISTmAb は大部分が G0F、G1F[6]/[3]、および G2F で構成されています。ただし、NISTmAb には、中性種で公表データに示されているように 1 つおよび 2 つのガラクトース- $\alpha(1,3)$ -ガラクトースエピトープを持つグリカンも含まれています (図 5)。⁶

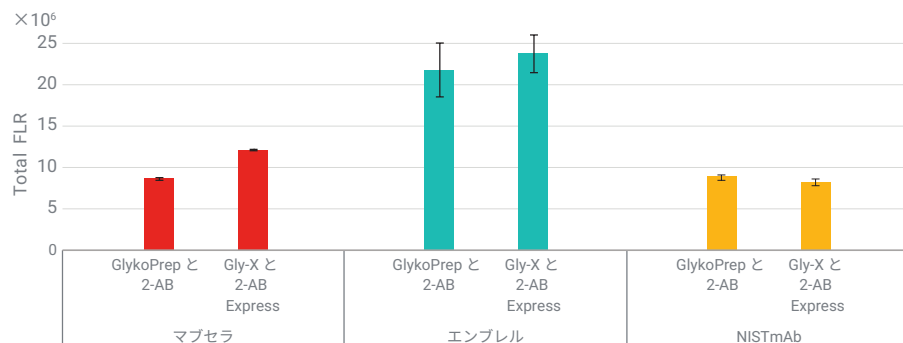


図 6. 2-AB 合計蛍光応答の比較。同等量の糖タンパク質 (マブセラ、エンブレル、NISTmAb) のグリカンを、Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB Express および Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB で前処理しました。UHPLC – FLR 分析の前に、溶出したすべてのサンプルを最終容量 100 μ L に調整しました (1 μ L 注入)。

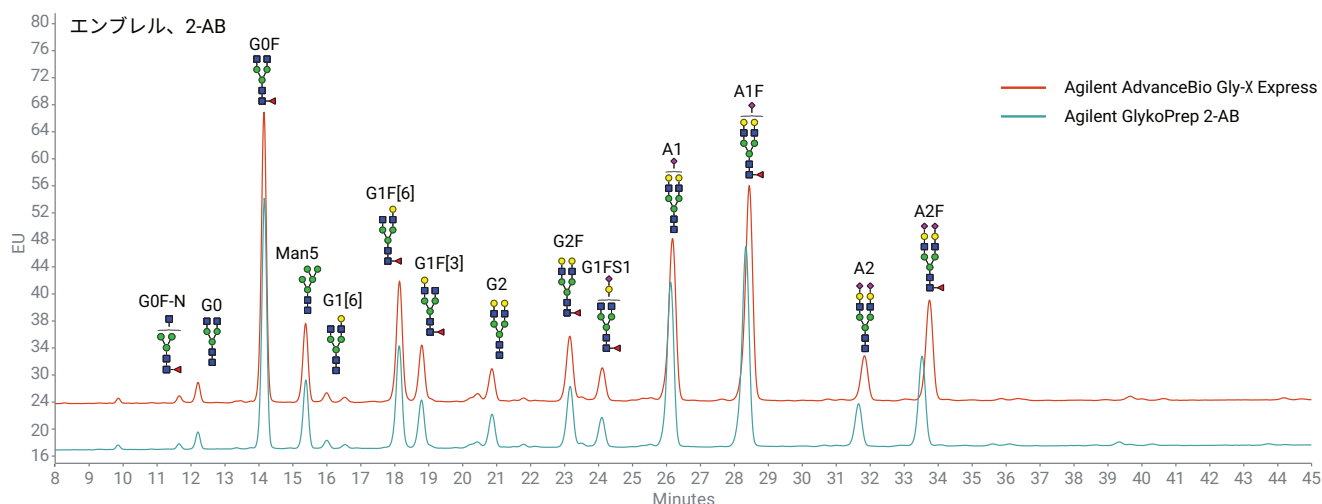


図 4. Agilent AdvanceBio Gly-X と 2-AB Express ラベリングおよび Agilent GlykoPrep と 2-AB で前処理された、エンブレルの N-グリカンの Agilent 2-AB UHPLC (旧 ProZyme) 蛍光プロフィールの重ね表示

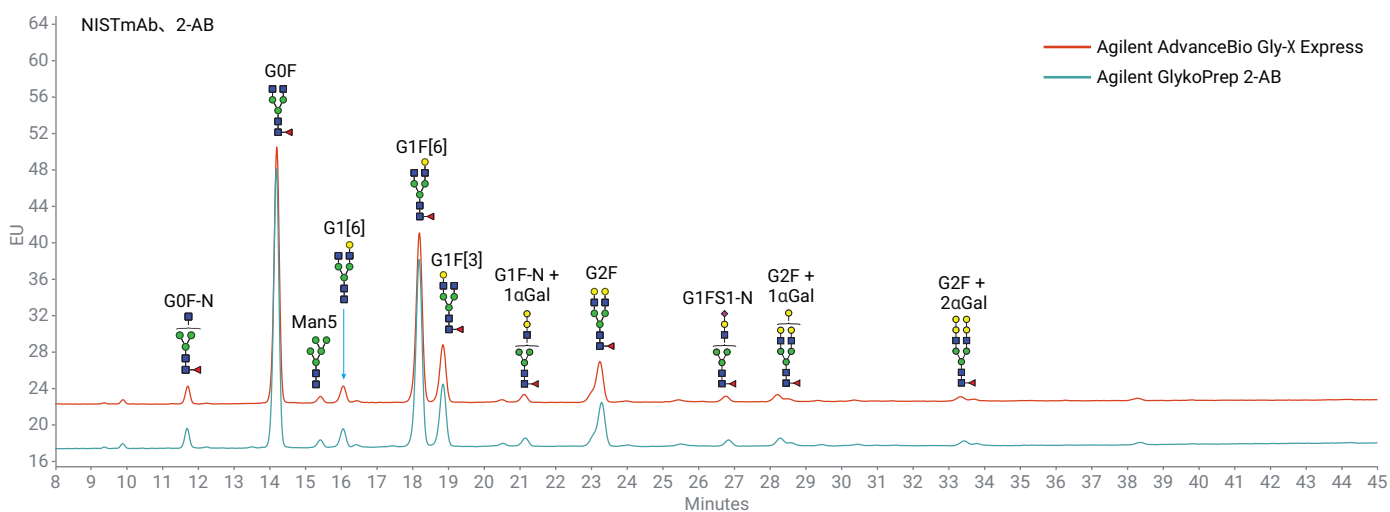


図 5. Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB Express および Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB で前処理された、NISTmAb の N-グリカンの 2-AB UHPLC 蛍光プロフィールの重ね表示

- 分子マブセラとエンブレルでは、GlykoPrep よりも Gly-X サンプル前処理の方で高い合計蛍光信号が観察されました。NISTmAb の合計蛍光は、Gly-X と GlykoPrep において同等でした。
- 2つのサンプル前処理メソッドでは、試験した3つの分子に対して同等の相対%面積が報告されました(図7)。

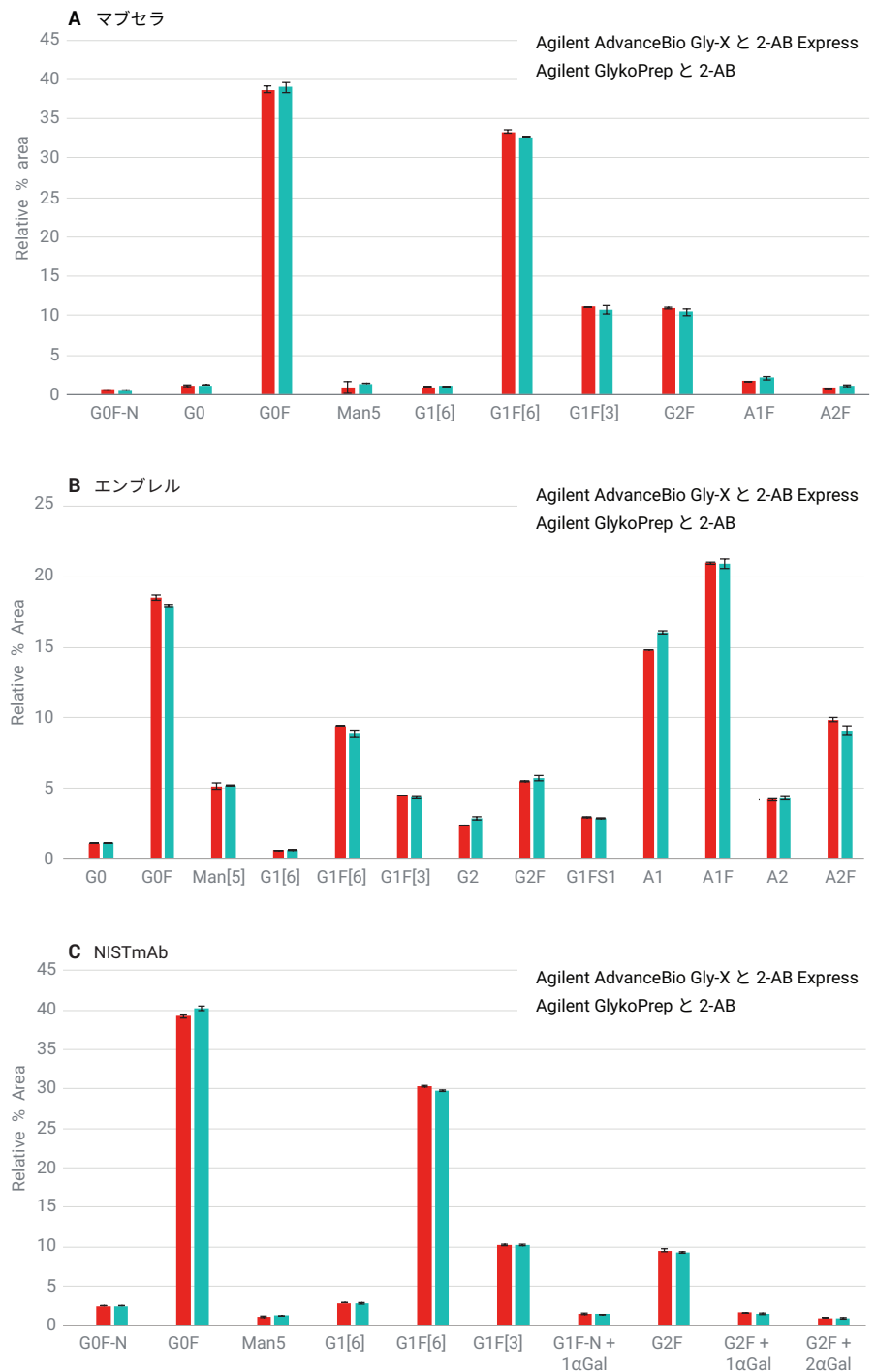


図7. Agilent GlykoPrep と 2-AB および Agilent AdvanceBio Gly-X と 2-AB Express で前処理された N-グリカンの相対%面積の比較。(A) マブセラ、(B) エンブレル、(C) NISTmAb。マブセラ/エンブレルで報告されたグリカンの場合は > 0.5% の相対%面積、また NISTmAb の場合は > 1.0%

結論

- Agilent GlykoPrep 高速 N-グリカンサンプル前処理キットと遊離 N-グリカンの 2-AB ラベリングでは、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した。
- Agilent AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理キットと 2-AB Express では、従来の 2-AB ラベリングで、非常に長い乾燥手順が不要な高速ワークフローを実現しており、結果が得られるまでの時間が短縮されました。
- GlykoPrep および Gly-X によるマブセラ、エンブレル、および NISTmAb の 2-AB ラベル化 N-グリカンの前処理では、合計蛍光信号と報告されている相対%面積の点から見て同等の結果が得られています。
- NISTmAb N-グリカンプロファイルは公表データと一致しています。

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. Ruhaak, R.; *et al.* Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem.* **2010**, *397*(8), 3457–3481.
3. Aich, U.; *et al.* State-of-the-art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of N-glycans from antibodies. *Electrophoresis* **2016**, *37*(11), 1468-88.
4. Kimzey; *et al.* Development of an instant glycan labeling dye for high throughput analysis by mass spectrometry. *Agilent poster, ASMS 2015*.
5. Yan; *et al.* Comparison of common fluorescent labels for liquid chromatography analysis of released N-linked glycans. *Agilent poster, ASMS 2017*.
6. De Leoz, M.L.A.; *et al.* NISTIR 8186: NIST Interlaboratory Study on the Glycosylation of NISTmAb, a Monoclonal Antibody Reference Material, June 2015 to February 2016. **2017**, <http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/ir/2017/NIST.IR.8186.pdf>
7. Hilliard, M.; *et al.* Glycan characterization of the NIST RM monoclonal antibody using a total analytical solution: From sample preparation to data analysis. *MAbs* **2017**, Sep 12:1-11. doi: 10.1080/19420862.2017.1377381. [Epub ahead of print].

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, 2020
Printed in Japan, May 21, 2020
5994-0945JAJP
TN 4012
Rev B
DE.6002662037