

MARCH 2021

LC|GC's **CHROM**academy

powered by crawfordscientific



生体分子の分離、同定、 定量のための新しいソリューション

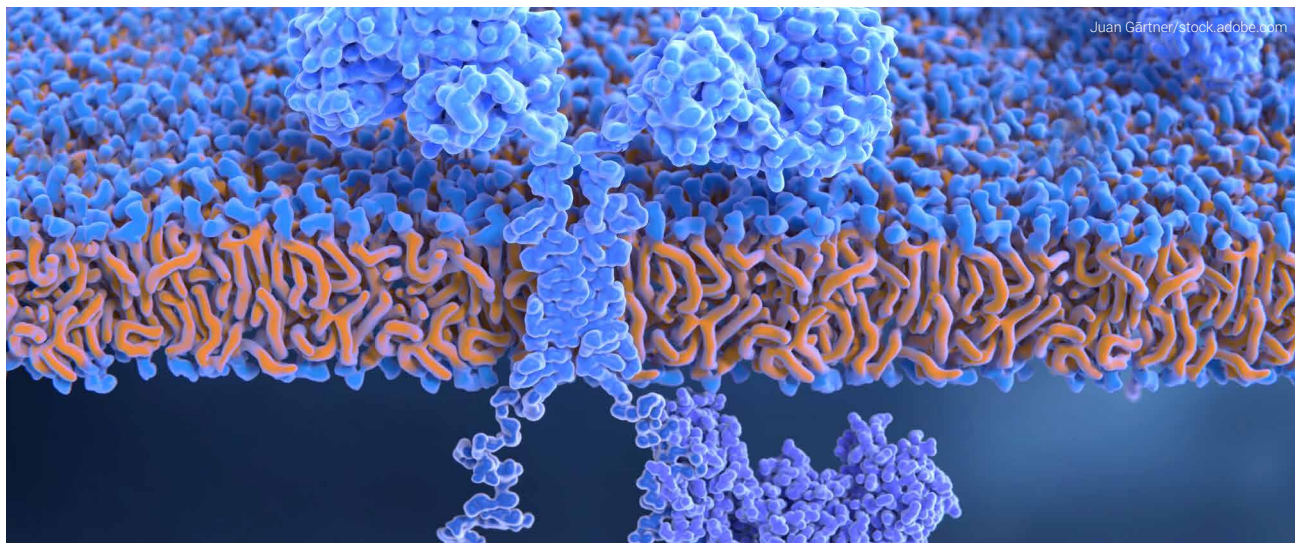
生物製剤の糖タンパク質の
グリコシル化および
シアル酸分析

生体分子分離のための
二次元液体クロマトグラフィー
入門

質量リテンションタイムフィンガー
プリンティングによる SARS-CoV-2
スパイク糖ペプチドの同定、
マッピング、および相対的な定量

本カスタム電子書籍は、アジレント後援のもと、CHROMAcademy との
パートナーシップで提供されています。





生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化 およびシアル酸分析

John Yan

**プレートベース
および LC/FLD/
MS 法を用いた、
異なるシアリル化 N-
グリカン種の同定、
および生物製剤の
糖タンパク質中の
シアル酸含有量の
定量分析**

はじめに

シアル酸は、組み換え治療用糖タンパク質の有効性を仲介する際に重要な役割を果たします。グリカンの非還元末端でのシアル酸の有無が、生物製剤タンパク質の薬物動態および潜在的な免疫原性に影響を与える場合があります。そのため、製造プロセス時にはシアリル化をモニタリングして管理する必要があります。本稿では、プレートベースおよび液体クロマトグラフィー（LC）と蛍光（FL）および質量分析（MS）検出法を用いた、異なるシアリル化 N-グリカン種の同定、および生物製剤の糖タンパク質中のシアル酸含有量の定量分析について説明します。また、N-グリカン分析用の蛍光色素の利点、シアル酸の定量の向上、分析ワークフロー、蛍光と質量分析（MS）検出の両方を利用するクロマトグラフィー分離オプションについても説明します。

生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアル酸分析

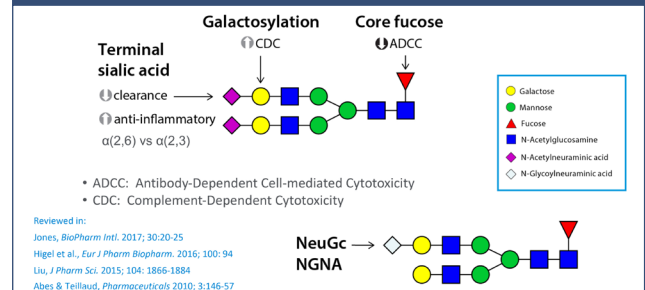
グリコシル化生物製剤

グライコミクスはゲノミクスやプロテオミクスほど注目されてはいませんが、SwissProtデータベースのすべてのタンパク質のうちの5分の1はグリコシル化されていることがわかっています。グリコシル化は、タンパク質の折り畳み、安定性、および機能に影響を与え、グリコシル化部位、グリカン組成、グリカン長、および構造の違いに応じて多様性を示す場合があります。市販されている生物製剤の60%以上はグリコシル化されています。グリコシル化は重要品質特性になる場合があります、製品の品質特性としてモニタリングする必要があります。グリコシル化の主な2つのタイプは、O-結合型グリカンの添加とN-結合型グリカンの添加ですが、N-結合型グリコシル化は生物製剤で最も一般的なグリコシル化タイプです。このグリコシル化では、規定されたコンセンサスシークオン内のアスパラギン残留物のアミド窒素にグリカンが結合します。

2010年、エポジェンは売り上げ上位10の医薬品の中でグリコシル化された唯一の生物製剤でした。2018年になると、売り上げ上位10の医薬品のうち7つの製品がグリコシル化生物製剤（売り上げ1位はヒュミラ）で、このことは医薬品業界がバイオ医薬品に向けて全体的に移行していることを示しています。

バイオ医薬品は分析特性解析の観点から見ると、低分子医薬品と比較して非常に複雑です。例えば、低分子医薬品のアスピリンは分子量が約180 Daです。一方、免疫グロブリンG (IgG) をベースにしているバイオ医薬品は分子量が約150,000 Daであり、医薬品の作用に影響を与える可能性のあるさまざまな翻訳後修飾（グリコシル化を含む）が存在し

図1: 生物製剤に対する N-グリカン構造の影響



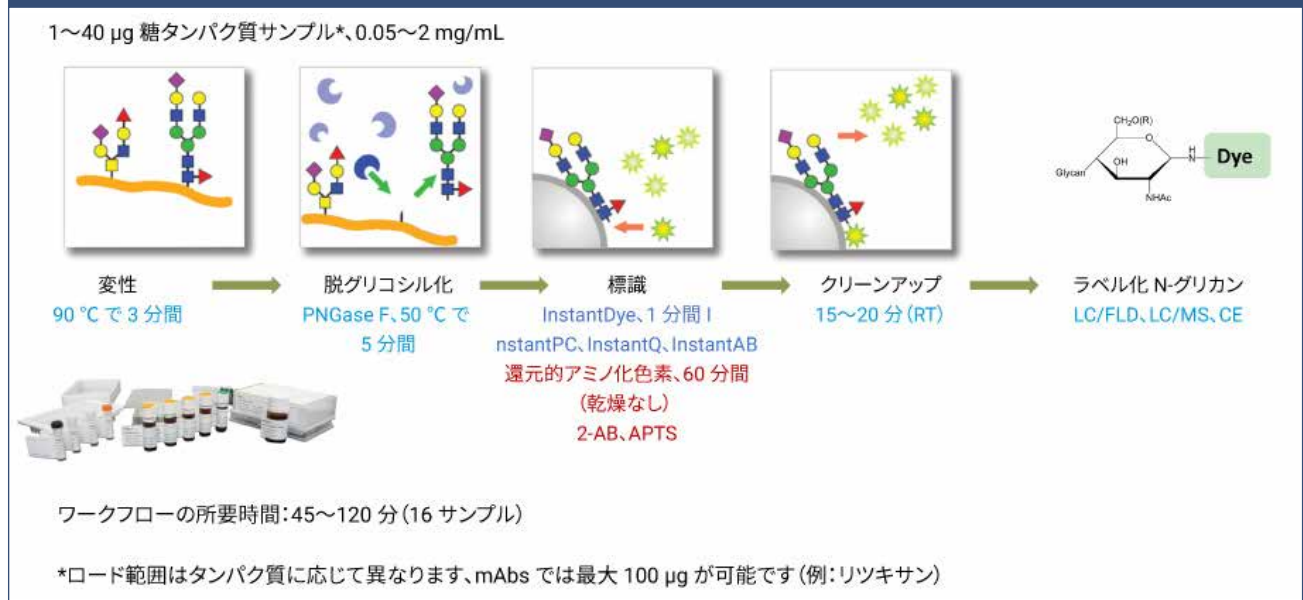
ます。図1に示すように、グリカンはフコース、マンノース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、およびさまざまなシアル酸のような複数の単糖単位で構成されています。コアフコースが存在するとがん治療において重要な抗体依存性細胞障害 (ADCC) が減少します。このため、生物製剤を開発している企業は、コアフコースの量を減らして ADCC 活性を最大化させることを試んでいます。また、文献には、ガラクトシル化が存在すると、補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性が増大する可能性がある一方で、末端シアル酸が存在すると、クリアランスの割合が低下する可能性があることにより、治療用タンパク質が体内に留まる時間が長くなることも示されています。

N-グリカン分析

N-グリカン分析には、多数の異なる手法が使用できます。インタクトタンパク質レベルでは、LC 分離と高分離能精密質量分析を組み合わせることで使用することにより、存在するグリカンのタイプに関する情報を取得できます。別の手法は、プロテアーゼを使用して糖タンパク質をペプチドに分解し、LC で分離してデータベース検索によるタンデム MS で分析することにより、部位特異的なグリコシル化情報を得ることです。また別の手法は、PNGase F のような

生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアル酸分析

図 2: Gly-X N-グリカンサンプル前処理技術



酵素を使用して糖タンパク質の N-グリカンの酵素遊離を分析することです。遊離グリカンはそのまま分析するか、または一般に蛍光タグで標識化することにより、LC またはキャピラリー電気泳動 (CE) による蛍光検出が可能になります。この場合、得られるデータは一般的に異なるグリカン種の相対 % 面積として表されます。

また、直接または蛍光タグによる標識化後に酸加水分解して、グリカンを個別の単糖レベルでモニタリングすることもできます。

N-グリカンのサンプル前処理

従来の N-グリカンの前処理は非常に時間がかかるプロセスであり、一晩の脱グリコシル化と標識化のステップを使用して 1 日または数日を要する場合があります。数年前には、オールインワンソリューションワークフローを導入して、2-アミノベンズアミド (2-AB) やアミノピレントリルスルフォネートのような従来の還元的ア

ミノ化蛍光色素分子を使用することにより、サンプル前処理の時間を 5 時間に短縮することができました。高速グリコシルアミン反応性色素を使用してさらに改善した結果、前処理時間が 3~4 時間まで短縮されました。最近では、AdvanceBio Gly-X サンプル前処理プラットフォームが導入されました。この新しいプラットフォームにより、還元的アミノ化 (2-AB、APTS) で前処理時間が 2 時間、インスタントグリコシルアミン反応性色素 (InstantPC) を使用することにより 1 時間以内まで短縮されています。

AdvanceBio Gly-X N-グリカンサンプル前処理プラットフォームの概略を図 2 に示します。最初に、糖タンパク質を独自の試薬により 90 °C で 3 分間変性してタンパク質を開き、50 °C で 5 分間にわたって PNGase F による脱グリコシル化を行います。次に、グリコシルアミン反応性色素 InstantPC のような蛍光色素分子により約 1 分間、または 2-AB のような還

生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアル酸分析

元的アミノ化色素により 60 分間遊離グリカンを標識化します。標識化後、標識化グリカンをクリーンアップして過剰な色素を除去すると、分析の準備が完了します。

InstantPC 標識化 N-グリカンの分離

蛍光標識化グリカンの分離と分析に一般的に使用されているメソッドは、親水性相互作用 LC (HILIC) と蛍光検出です。また、異なるグリカン種の同定では、インライン MS 検出も用いられます。図 3 に、IgG 治療薬であるリツキシマブから InstantPC 標識化されたグリカンを分離して分析する 60 分間の HILIC グラジエントメソッドを示します。

この場合、MS による検出も行われています。図 4 に、エタネルセプトの標識化 N-グリカンのトータルイオンクロマトグラムを示します。InstantPC 標識化サンプルの MS トータルイオンクロマトグラムはほぼ蛍光レスポンスを反映しているため、低アバンドランスのグリカン種の同定に有用です。さらに、幅広い標識化 N-グリカン標準が使用できますが、これは MS が使用できない際の同定に有用です。この中には、チャイニーズハムスター卵巢細胞で発現される IgG 分子に存在する可能性のある一般的な 2 本鎖 N-グリカンのような個別のグリカン標準、およびヒト IgG のような事前標識化グリカンのライブラリ、さらにアルファ-(2,6) およびアルファ-(2,3)-シアリル化ライブラリが含まれています。

2-AB ワークフロー

2-AB は、遊離グリカン分析に由来から使用されている色素です。2-AB による従来のワークフローは時間がかかりますが、最新の効率的なワークフローを使用した場合、2-AB 標識化

は高速ワークフローに最適です。ただし、新規データを従来のデータに関連付けができる必要があります。AdvanceBio Gly-X 技術を使用した Express ワークフローを図 2 に示します。一般的な溶液内変性と脱グリコシル化のステップを、96 ウェルクリーンアッププレートのオンマトリックス還元的アミノ化とともに使用することにより、追加の乾燥ステップが必要なくなります。標識化後、グリカンをクリーンアップして過剰な色素を除去すると、分析の準備が完了します。前処理時間は約 2 時間です。以前のメソッドでは非常に時間がかかる場合がありました。図 5 に、リツキシマブからのグリカンの分離と分析の一例を示します。ここに示されているのは、すべての主要グリカン種の中で主に % CV が低い 2 本鎖中性 2-AB 標識化グリカン G0F、G1F、および G2F です。

シアル酸定量

シアル酸は、治療用糖タンパク質の有効性を仲介する際に重要な役割を果たします。N-または O-グリカンの非還元末端でのシアル酸の有無が、タンパク質の薬物動態および免疫原性に影響を与える場合があります。そのため、治療用タンパク質のシアル酸含有量を維持して管理することが重要です。AdvanceBio 総シアル酸定量キットは、総シアル酸の定量において高感度で高スループットのアプローチを提供します。96 ウェルプレートを用いた分析は、シアリダーゼ A により遊離されたシアル酸を過酸化水素に変換する酵素反応がベースになっており、蛍光色素と一対一に反応することにより、高強度の蛍光または吸光シグナルを生成します。別の糖タンパク質ではグリコシル化の量がばらつく場合があり、これはシアル化の量もばらつくことを意味します。そのた

生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアリル酸分析

図 3: リツキシマブ InstantPC グリカンの分析

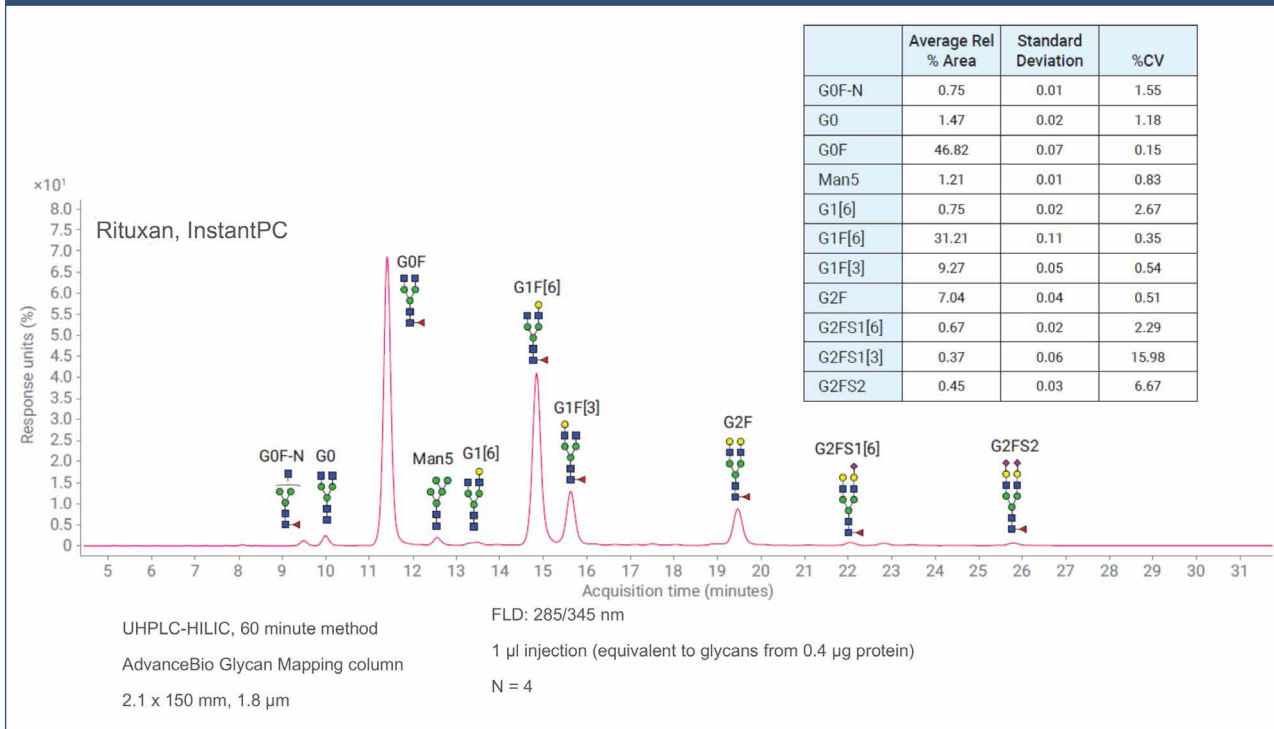
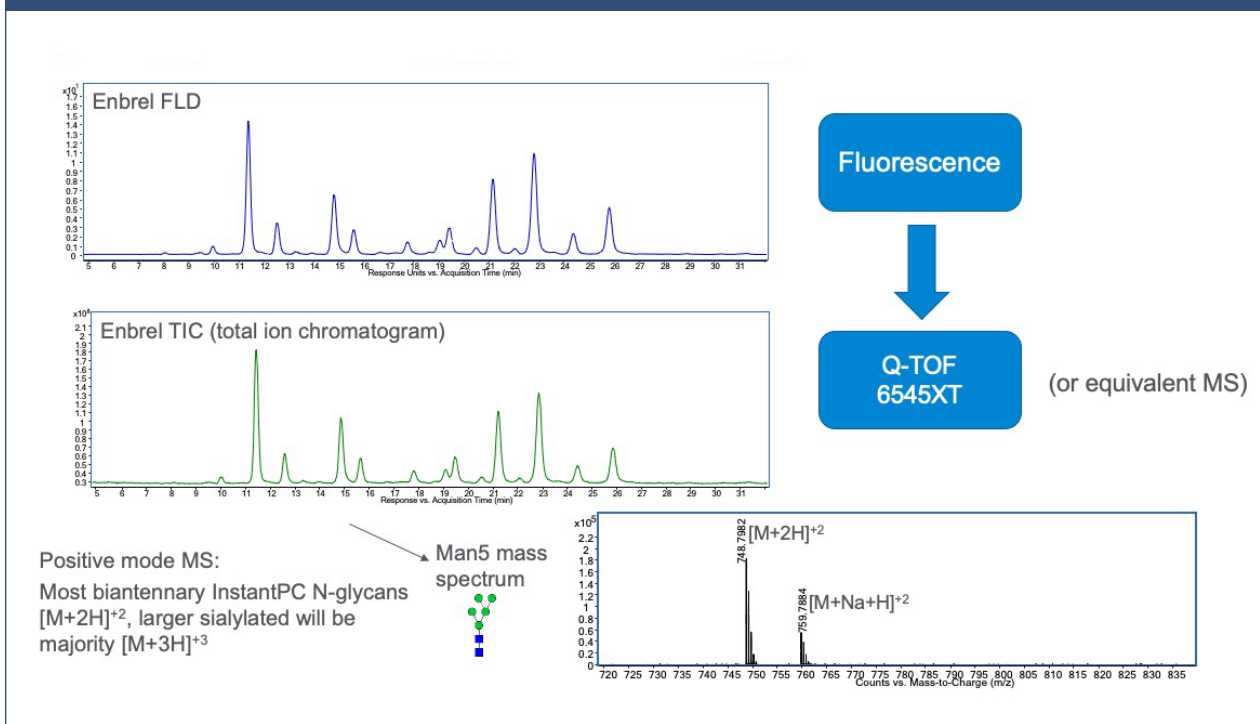


図 4: エタネルセプトの InstantPC N-グリカンの MS トータルイオンクロマトグラム



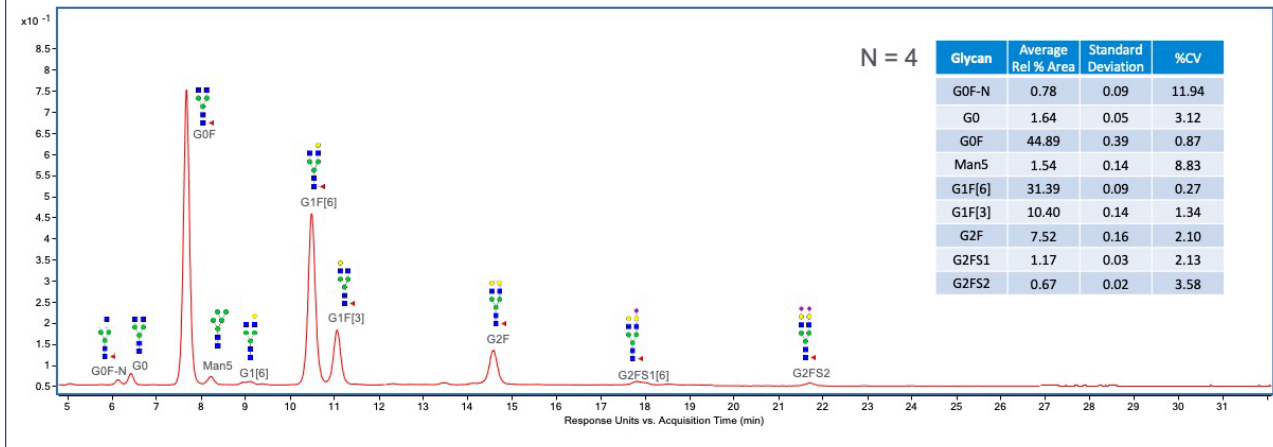
生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアル酸分析

図 5: リツキシマブ Gly-X 2-AB Express N-グリカンの分析

Analytical Method:

UHPLC-HILIC, 60 minute method, 1 µl injection (equivalent to glycans from 0.4 µg protein), FLD: 260/430 nm

AdvanceBio Glycan Mapping column, 2.1 x 150 mm, 1.8 µm



め、良好なシグナルを生成するタンパク質の量で開始することが重要です。例えば、マブセラはシアル酸の濃度が低いため、大量のタンパク質が必要になるのに対して、フェチュインまたはエタネルセプトはシアル酸含有量が高いため、必要になるタンパク質は少なくて済みます。

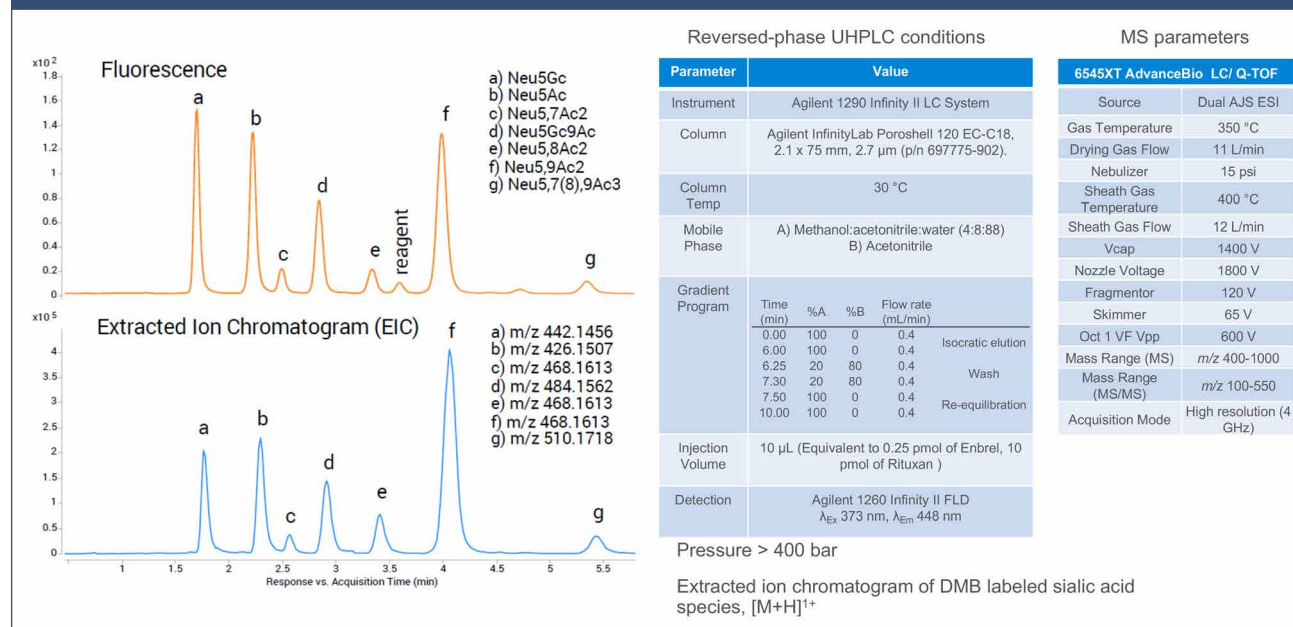
N-アセチルノイラミン酸 (NANA) および N-グリコリルノイラミン酸 (NGNA) は構造が類似したシアル酸のタイプであり、ヒドロキシル基 (NGNA) が添加されている点のみが異なります。このわずかな違いは、NGNA をヒトに対して潜在的に免疫原性がある状態にするには十分です。これら 2 つのタイプのシアル酸を区別するために一般的に使用されている 1 つのメソッドは、グリカンからシアル酸を遊離して色素 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン-2HCl (DMB) で標識化することです。これは、AdvanceBio シアル酸のプロファイリングおよび定量キットで使用されているプ

ロセスであり、このキットには定量 NANA および NGNA 標準も含まれています。標識化後に、LC 分離と蛍光または MS による検出を実施します。LC の後に蛍光と MS 検出の両方を使用して、DMB で標識化された異なるタイプのシアル酸の混合物であるシアル酸リファレンスパネルを分析した例を図 6 に示します。クロマトグラムの最初の 2 つのピークはそれぞれ NGNA と NANA であり、クロマトグラムの残りのピークは自然界で観察されるのとは異なるタイプのシアル酸です。

「N- または O- グリカンの非還元末端でのシアル酸の有無が、タンパク質の薬物動態および免疫原性に影響を与える場合があります。」

生物製剤の糖タンパク質のグリコシル化およびシアリル酸分析

図 6: DMB 標識化シアリル酸リファレンスパネル (SARP)



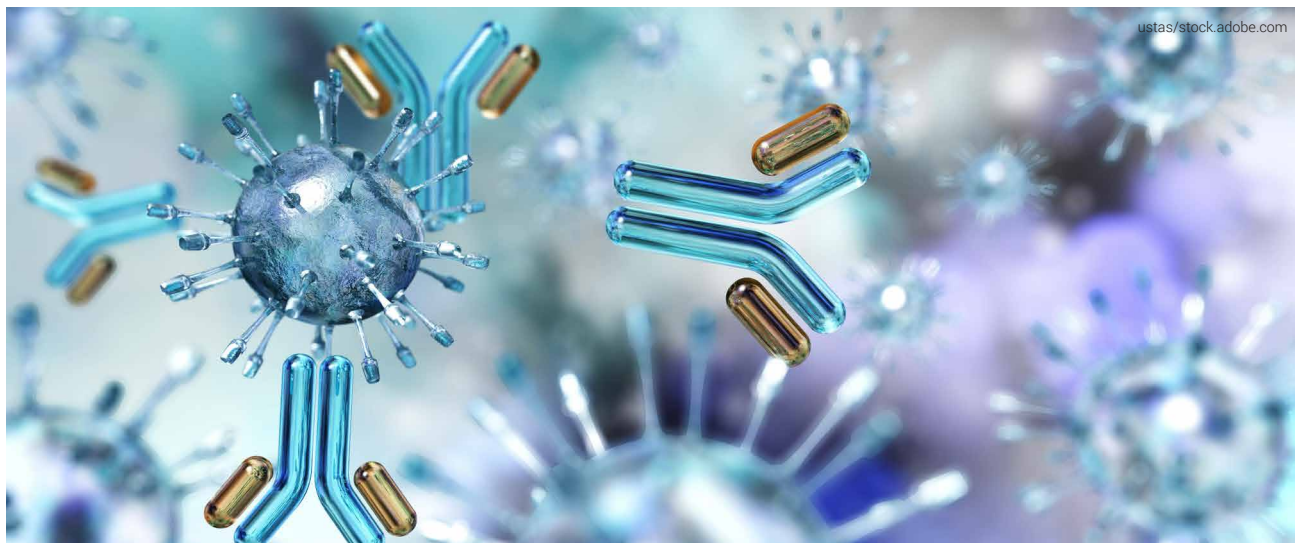
結論

代表的な生物製剤の糖タンパク質に存在する N-グリカンを前処理、分離、検出、同定するためのさまざまなツールが研究者に提供されています。AdvanceBio Gly-X サンプル前処理キットのような最新のワークフローでは、グリカンを迅速に遊離、標識化、および分離する技術を用いて、蛍光検出による定量を実施します。これらの新しく高速なサンプル前処理ワークフローの他に、InstantPC のような最新の色素を高いイオン化効率で使用して、MS による遊離グリカンの堅牢な特性解析をすることができます。これらの新しいワークフローは、2-AB のような従来のグリカン標識化色素でも使用できます。この場合、新規データと従来のデータを関連付けるための便利で高速なサンプル前処理オプションが提供されます。アジレントでは遊離グリカン分析に加えて、シアリル酸の定量およびプロファイリング向けの製品を提供しています。これにより、グリコシル化

生物製剤の分析用の堅牢なツールキット製品がすべて揃います。

John Yan

John Yan 博士は、アジレントのアプリケーションケミストです。



生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

Dwight R. Stoll

バイオ分析における二次元液体クロマトグラフィーの基礎と最新アプリケーション

はじめに

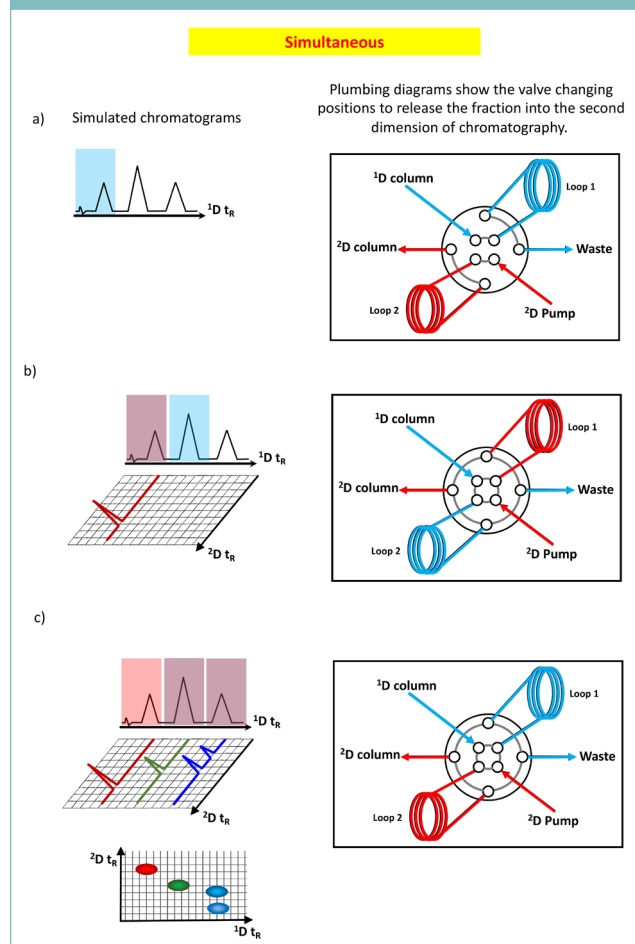
バイオ分析では依然として従来の一次元液体クロマトグラフィー（1D-LC）が貴重なツールですが、クロマトグラフィー分離にもう一次元追加することが有益になる場合があります。2本のカラムをタンデムで使用する二次元液体クロマトグラフィー（2D-LC）では、分離時間を大幅に延長をしなくても分析対象物の分離能を明らかに向上させることができます。分離パラメータを特定の混合条件およびターゲット化合物に合わせることで、2D-LCの分析収率を最大化します。この概要は、二次元液体クロマトグラフィー分離の概念に関する入門書としての役割を果たし、2D-LCのいくつかの主要なモードと動作原理について取り上げるとともに、生体分析の課題を解決するために2D-LCが明らかに優れていることを示す適切な例についても説明します。

2D-LC 分離の基本

生体分子の分析では、一見シンプルに見えるサンプルでも、クロマトグラフィー分離で分離されないピークが生じるほど複雑な場合があります。

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

図 1: 二次元液体クロマトグラフィーの概略



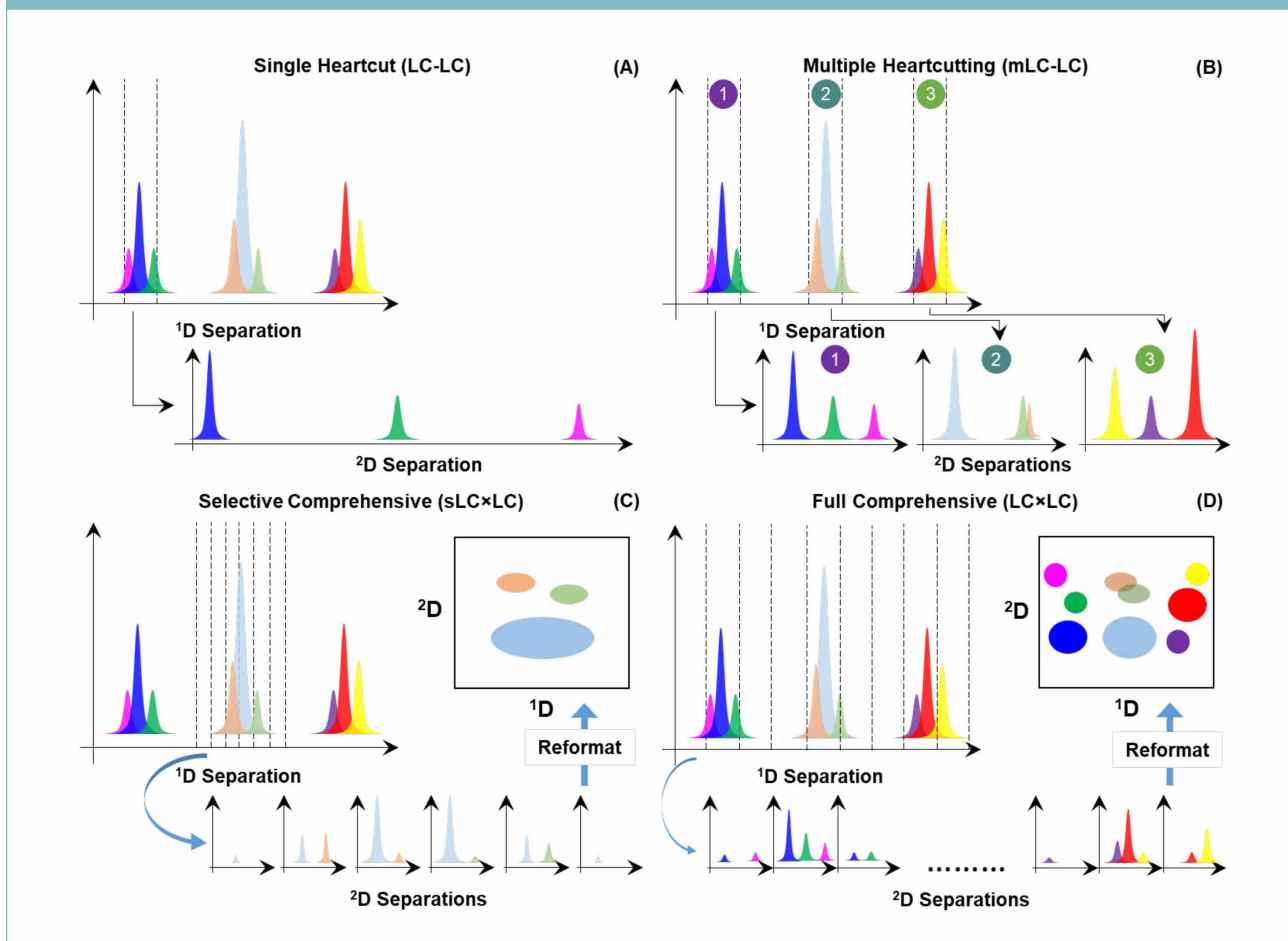
す。結果として、特に異性体混合物と同様な構造に密接に関連している場合がある成分、または成分の同定が必要な未知の種に対して混合物中の種を分離するためには、単一ステージの液体クロマトグラフィーが適切ではない場合があります。図 1A に理想的な例を示しますが、示されているクロマトグラムから、二次元 LC を使用することに価値がある理由を明確にすることができます。サイズや電荷などの単一の特性だけで分析対象物が十分に分離されていない場合、両方の特性で成分を分離することで対象成分を完全に分離できます。

2D-LC で観察される分離の向上を定量する方法として、一般的に使用されているピークキャパシティの基準に従うと、単に 1D-LC のカラムを長くするよりも、LC の二次元目が分析的にどれくらい価値があるのかを数値的に説明できます。クロマトグラフィーの各次元について、分離の有効性と機器レスポンスのデューティサイクルに従い、分析測定を本質的に範囲にグループ化します。これにより、長期間にわたる機器レスポンスの一次セットの範囲を作成します。二次元目を追加することにより、ピークキャパシティを増大させて 2D セットの測定範囲を生成します。補完的なカラムと分離条件を適切に選択することにより、この分離空間を使用して、これまで分離困難であった分析対象成分を識別することが可能になります。さらに、二次元目を指定した分析に必要なものとして追加できます。2D-LC 動作モードにより、二次元目 (2D) の分離ステージのターゲットアプリケーションを使用可能にします。

1D-LC の場合と同様に、2D-LC に必要な機器としてスイッチングバルブを使用しますが、サンプル注入のタイミング用にいくつかのコンポーネントが追加されています。バルブ切り替えのタイミングと 2 つのサンプルループのロードを適切に設定することにより、両方のカラムで同時に分離プロセスを実行することが可能になります (図 1B)。1D カラムからの流出物の一部を既知の容量のサンプルループに迂回させて充填すると、サンプルループ内の溶液が 2D カラムに注入されます。その結果、一次元目 (1D) からの分離セグメントが、二次元目のカラムに注入される前に効果的にプールされます。2D-LC のクロマトグラフィーデータにより、各 1D ピークの成分が 2D 条件に従ってさらに分離される状況が明確に示されます。

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

図 2: 2D 分離のモード (6)



この後、1D の範囲を超えて 2D で成分を分離した結果は、2D クロマトグラムに追加のピークとして示されます。

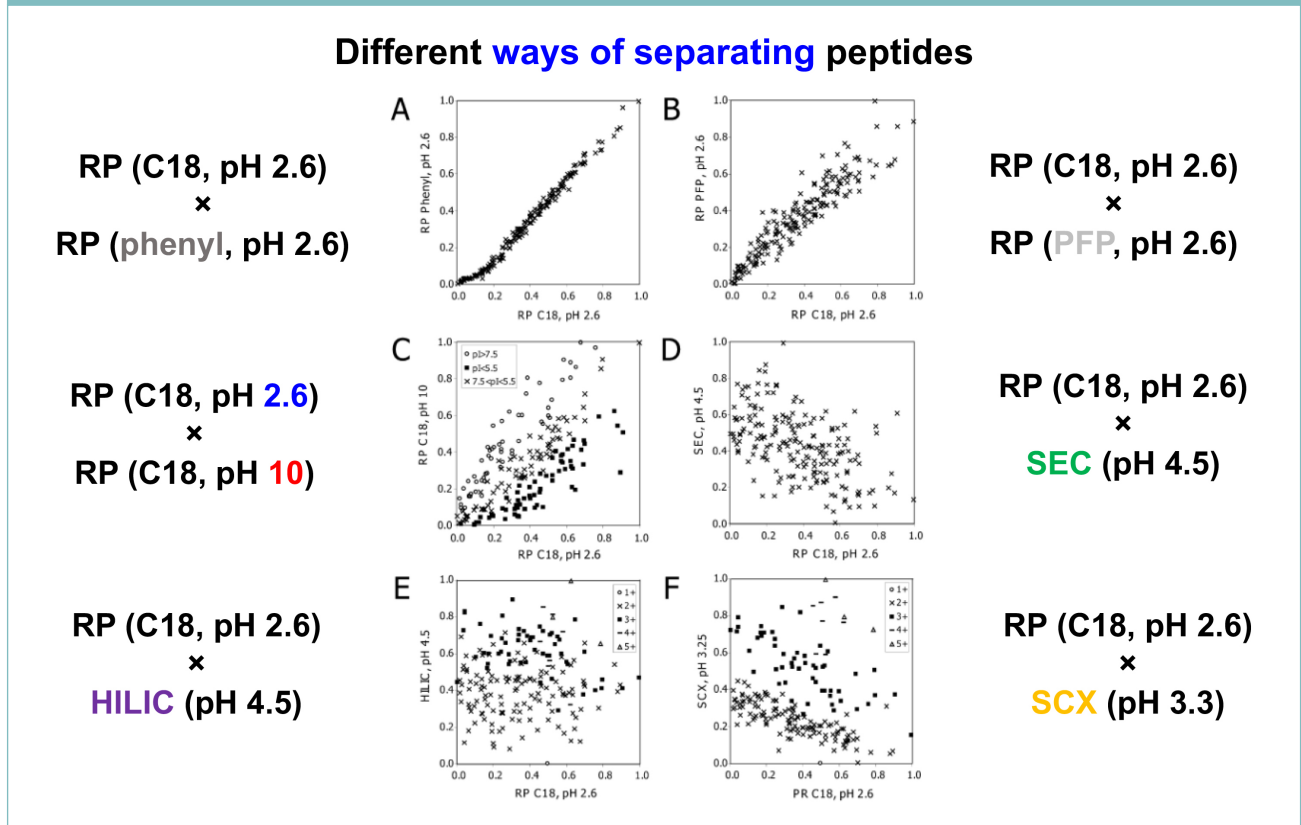
アプリケーションごとの 2D-LC 動作モードのターゲット

2D-LC の範囲内では、2 つの主要な動作モードの他に、この主要な動作モードの実質的なハイブリッドである 2 つのモードが存在します。これら 4 つのすべてのモードを図 2 に示します。

主要な動作モードの 1 つ目はシングルハートカットと呼ばれ、略称は LC-LC です (図 2A)。シングルハートカット 2D-LC のアプローチでは、単一のピークやピークのクラスタのような 1D クロマトグラムの単一の時間セグメントから流出物を取り出して、流出物の一部分を 2D カラムで分離します。LC-LC は、1D で同定された単一の対象領域を追加で特性解析する際に最も効果的です。

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

図 3: 2D 分離空間の使用の最適化 (10)



2D-LC の 2 つ目の主要な動作モードでは、1D からのすべての溶出液をフラクションで 2D に移動させ、完全に包括的な 2D-LC (略称は LCxLC) で分離します (図 2d)。LCxLC では、ターゲット混合物中の成分に関する最も完全なデータセットが得られます。このモードは、複数の分離困難でオーバーラップしている可能性のある種の非常に複雑なサンプル、または未知の混合物の完全な評価に最適です。

2D-LC の 2 つの主要な動作モードの他に使用できる 2 つのハイブリッドモードとして、マルチハートカット (mLC-LC) と選択的包括モード (sLCxLC) があります。マルチハートカットでは、シングルハートカットと類似した動作原理を適用します。ここでは、1D からの特定の

セクションの溶液を注入して 2D で分離しますが、クロマトグラフィー分析ごとに複数のハートカットサンプルを取得します (図 2B)。mLC-LC 手法は、クロマトグラムの複数の領域を拡張して特性解析する必要がある環境では有用ですが、LCxLC ほどではありません。選択的包括モードについては、特定の時間ウィンドウにわたって複数の時間セグメントをサンプリングするという LCxLC の概念が適用されますが、分析の期間全体を対象にしているわけではありません (図 2C)。sLCxLC 動作モードは、タンパク質の詳細な特性解析のような、特定のターゲット種を完全に評価する際に最適です。ここでは、クロマトグラフィー分析の一部だけをより精密に分析的調査をする必要があります。

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

「従来の 1D-LC の場合と同様に、2D-LC を実行する際には、使用する検出器の感度に応じて分離条件を注意深く調整する必要があります。」

カラム直交性による最適な分離能の実現

2D-LC の結果としてピークキャパシティがかなり向上します。この場合 1D および 2D カラムで補完的、つまり直交型の固定相を適切に使用することが非常に重要になります。固定相および移動相条件が本質的に同じである 2 本のカラムにより 2D-LC 分離を試みた場合でも、二次元目を追加した結果として分離の生産性が改善される保証はありません。代わりに、2D 空間にわたって分離を強化するために、次元間で何らかの形で差別化を図る必要があります。図 3a の例の場合、C18 およびフェニル固定相を pH が同じ移動相と組み合わせたとしても、カラム間の分析対象物の溶出において、ほぼ 1:1 の相関線の外側の分離空間領域に対して分析対象物のピークは本質的には広がりません。しかし、2D カラムをフッ素化フェニル固定相に置き換えるだけで (図 3B)、各分離ステージで分析対象物の識別がより明確になりました。1D および 2D の両方で同じタイプのカラムを使用している場合でも (図 3C)、次元間で移動相の pH を変えることにより分離条件で十分な差異が生じるため、分析空間でのピーク分離能が顕著に向上しています。同様に図 3D ~ F に示すように、次元間

でカラムが明らかに異なる場合でも分離能を向上できます。

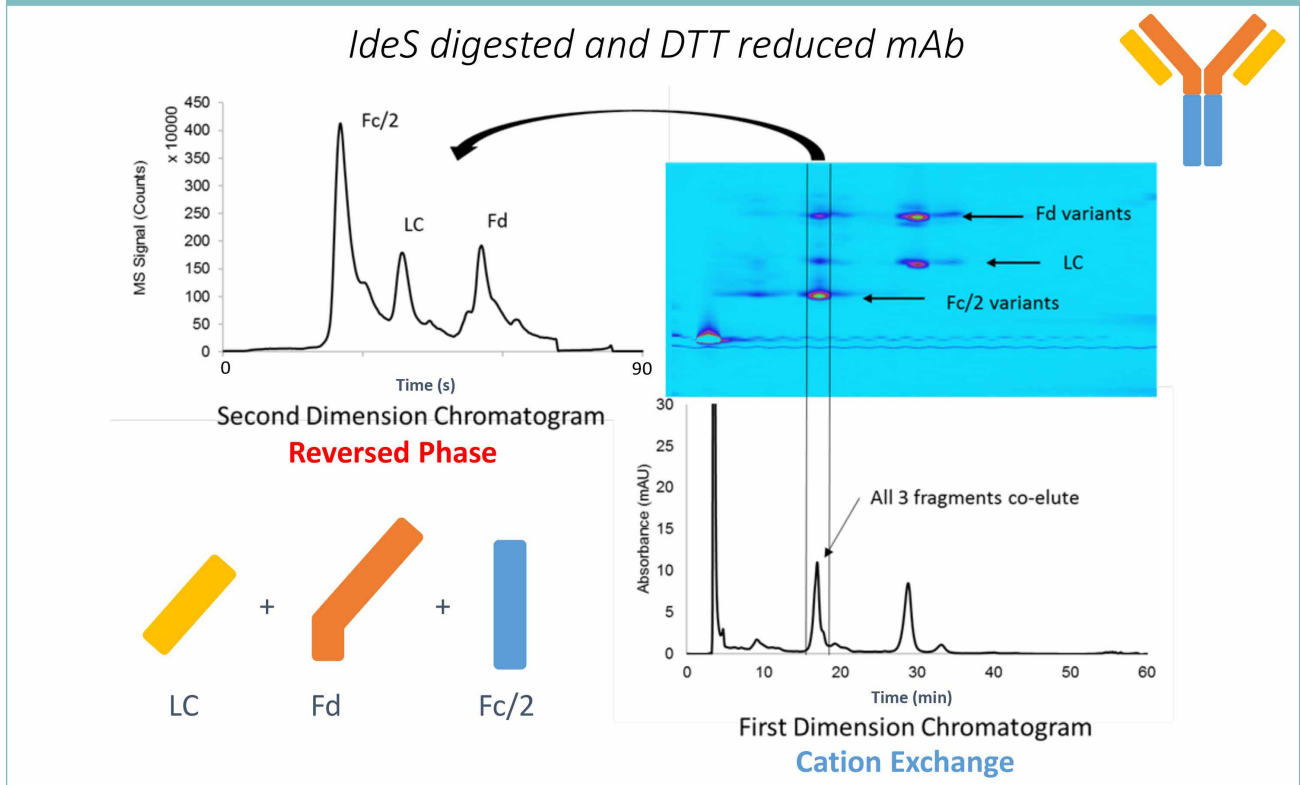
アンダーサンプリングを回避するための 2D サンプルング速度の最適化

2D-LC 分離タイミングで特に重要になるのは、2D 分離で 1D カラムからの流出物をアンダーサンプリングするのを回避することです。これは、アンダーサンプリングまたは再混合の問題として知られています。1D ピークで取得するサンプル数を少なくすることにより、本質的に 1D で分離されたすべての種の平均化つまり再混合になるため、最初の分離ステージの価値が低下します。Murphy-Schure-Foley 理論 (1) に従って、アンダーサンプリングの影響を最小限に抑えるために、分離ピークの領域間で 1D から取得するサンプル数を少なくとも 4 にする必要があります。さらに、1D および 2D の両方の速度を均衡させ、システム全体で実際のピークキャパシティが最適になるように、サンプリング速度を最適化する必要があります。

従来の 1D-LC の場合と同様に、2D-LC を実行する際には、使用する検出器の感度に応じて分離条件を注意深く調整する必要があります。クロマトグラフィー (1D および 2D) の各ステージでは、溶出液中の分析対象物の濃度が、各カラムへの初期注入時より低くなります。その結果、十分な分析対象物が存在していることを確認するための注入量とサンプリング時間が最小になります。

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

図 4: LCxLC による mAbs のサブユニットレベルの 2D-LC-MS のようす (7)



次元間での移動相不適合の回避

アンダーサンプリングを考慮するだけでなく、2D-LC で考慮すべき重要な側面は、カラム間の移動相の不適合による悪影響を防止することです。この問題は、1D の分析対象物とともに溶出する移動相が、2D に対して実質的な注入溶媒となるため、対応できる移動相が必要になることに起因します。ここでは、カラムと移動相の特定の組み合わせで影響を最小にできますが、その他の場合は非常に重要な問題です。一例として、イオン交換分離の移動相の組成には通常一定量の水分が含まれているため、一般に逆相分離の開始時には主として水性移動相に対応していることが挙げられます。一方、順相クロマトグラフィーで使用される高有機移動相では、順相 1D と逆相 (RP) 2D

を結合するという課題が生じ、分析対象物の分離のフロンティングまたはその他の損失が発生する場合があります。

ただし、アクティブ溶媒モジュレーション (ASM) 技術により、移動相の非適合性は克服できます。アジレントとともに開発された ASM による 2D-LC システムは、2D カラムに注入されるサンプルの溶媒組成を調整するように機能して互換性を向上させます。サンプルが 2D カラムに到達する前に、一次元で収集した流出物を希釈する並行サンプルループを導入することにより、2D 注入溶媒の強度が低減されます。ASM では、サンプルを希釈しているにもかかわらず 2D 分離能が向上します。これは、溶媒強度を低くすることにより、分離の開始時に移動相中の分析対象物の溶解性

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

が不適切に高いために生じる分析対象物のブレイクスルーが防止されるためです。

2D-LC を利用した 1 回で 2 回分の結果が得られる分析

2D-LC が理想的なアプローチになる 1 つのカテゴリは、1 回の 2D-LC 分析で得られる結果を達成するために 2 回以上の別の実験が必要になる場合です。これは、質量分析 (MS) に対応していない条件下でクロマトグラム中の未知ピークを特性解析する際のよい例になります。このことは、Luo ら (2) によって調査されました。Luo らは MS 対応の分離条件下で別の分離を開発するのではなく、LC の最初のステージに MS 対応の二次元目を追加することにより、未知ピークの簡単な同定を可能にしました。Karongo et al. は、治療用ペプチド中の不純物の特性解析に使用された sLCxLC により、対象のペプチドと共溶出して 1D-LC では取り込まれなかった 3 種類の不純物が存在することを明らかにしました (3)。Woiwode らは、1D でのアキラル RP カラムと 2D でのキラル WAX カラムを組み合わせることにより、sLCxLC では 1 回の分析ですべてのアミノ酸をエナンチオ選択的に分離可能であることを実証しました (4)。茶やワインからの抽出物のような植物由来の抽出物を特性解析する際には、Muller らによるフェノール種の同定において LCxLC がきわめて重要な役割を果たしました (5)。

タンパク質の詳細な特性解析用のメソッド

2D-LC が特に有用な洞察を与える別のタイプの分析は、タンパク質の詳細な特性解析に関するものです。二次元分離をバックエンドの質量分析と組み合わせることにより、サンプル同定プロセスを大幅に効率化できます。モノクローナル抗体の構造と組成を完全に評価する際には、適切なサンプル処理と 2D-LC の後に MS 検出を実施します。抗体サブユニット、軽鎖と重鎖、結合グリカン、および構成ペプチドは、このタイプの多次元アプローチを通して同定可能であることが実証されています (6)。さらに、Sorensen らが報告している結果は、LC の一次元目のみを使用している場合は分解された抗体フラグメントが共溶出するため、LC 分離が 2 ステージ必要であることを実証しています (図 4) (7)。

自動化 2D-LC 分析の開発

2D-LC が解決できるバイオ分析の課題の 1 つは、時間がかかるサンプル前処理と詳細な分析が必要なピークの手動選択の問題です。トリプシン消化やジチオスレイトール (DTT) 還元のような各サンプル処理をオフラインで実行するのではなく、これらのステップを自動化 2D-LC に統合できます。Gstöttner らによる抗体分離に関する具体的な例には、最初にサンプルをイオン交換カラムで分離して、オンラインでフラクションを収集してから、還元リアクタカラムを通して移送した後、2D-RP 分離と MS 検出を実行するというワークフローがあります (8)。同様に、Camperi らは、モノクローナル抗体のグリコシル化変異体を特性解析する手順を開発しました。この手順では、質量分析による検出の前に RP カラムでサンプル

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

図 5: 最新アプリケーション - mAbs の自動化特性解析システム (9)

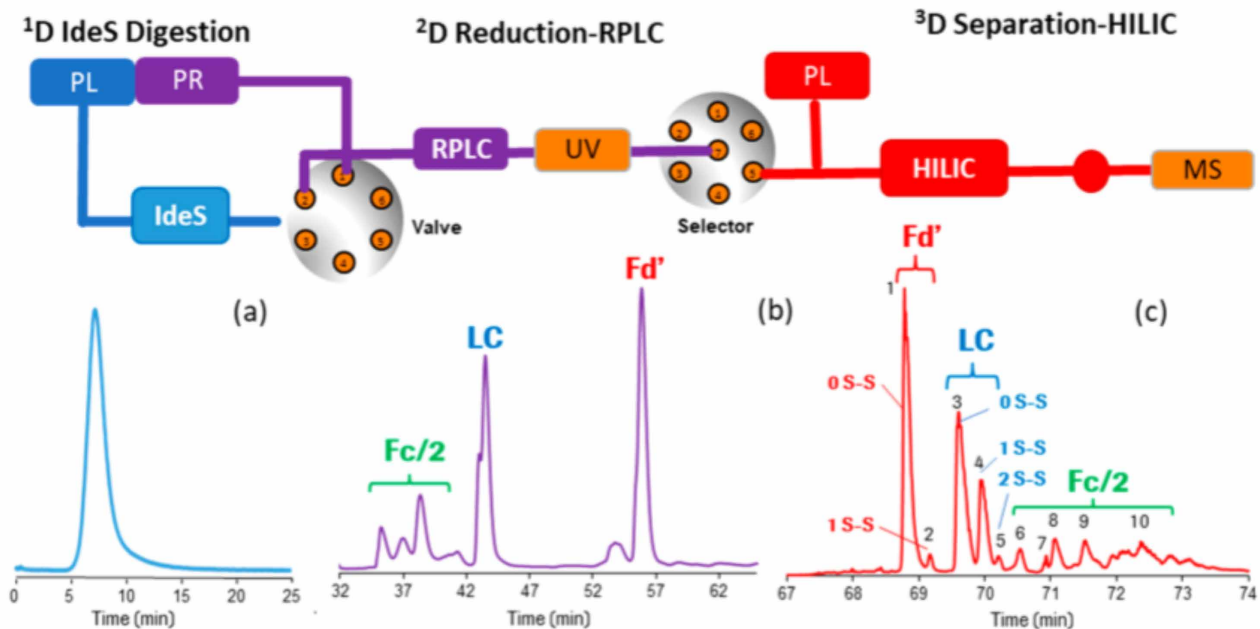


Figure 2. Schematic representation of the online 3D-LC workflow for automated middle-up analysis of mAbs using an online IdeS digestion with enzyme-immobilized column (¹D), followed by on-column reduction by RP-HPLC (²D) and HILIC (³D)/MS analysis of the proteolytic fragments Fd', LC, and Fc/2. (a) IdeS digestion of mAb-A (offline, detection UV at 280 nm), (b) RPLC (²D), and (c) HILIC (³D) chromatograms showing the three subunits (Fd', LC, and Fc/2). See Table S2 for retention times and mass assignments.

を IdeS 消化、還元、および分離して、親水性相互作用 LC (HILIC) 分離をしています (図 5) (9)。Camperi らによる自動化メソッドは、概念実証実験でのオフラインサンプル処理と比較して、大きな違いはないことがわかりました。

結論

多次元分離は、1D-LC 以上に十分な分析情報が取得でき、追加の作業がほぼ必要ないという点で、急速に知られるようになっていきます。ただし、この技術では最適な結果を得るためには、従来の原理を基礎とする化学分析を今までどおり考慮する必要があります。その他の分析機器の場合と同様に、2D-LC のメソッド開発では、使用する動作モード (LC-LC、mLC-LC、sLCxLC、または LCxLC) を、サンプルタイプおよび分析に必要な種類の情報に

合わせる必要があります。動作モードの機能を明らかにした後に重要になるのは、十分に直交している分離条件を使用することです。2D 空間での分離能が最高になるのは、補完的固定相だけではなく、分析対象物のクラスに応じた pH のような移動相条件のためでもあるため、分子特性を考慮することが重要になります。さらに、1D ステージをアンダーサンプリングすることは、一次元目で実現される分離の向上を無効にする可能性があるため、発生しないように注意する必要があります。ただし、ここでは検出器の感度とバランスを取る必要があります。2D で分離したフラクションの量はあまり少なくするべきではありません。その結果として分析対象物が少なくなり見逃されてしまいます。さらに、次元間の移動相の互換性を検討して、可能な限り不適合を回避す

生体分子分離のための二次元液体クロマトグラフィー入門

る必要があります。移動相の不適合が回避できない場合は、適切な解決策メソッドと ASM 技術を使用する必要があります。

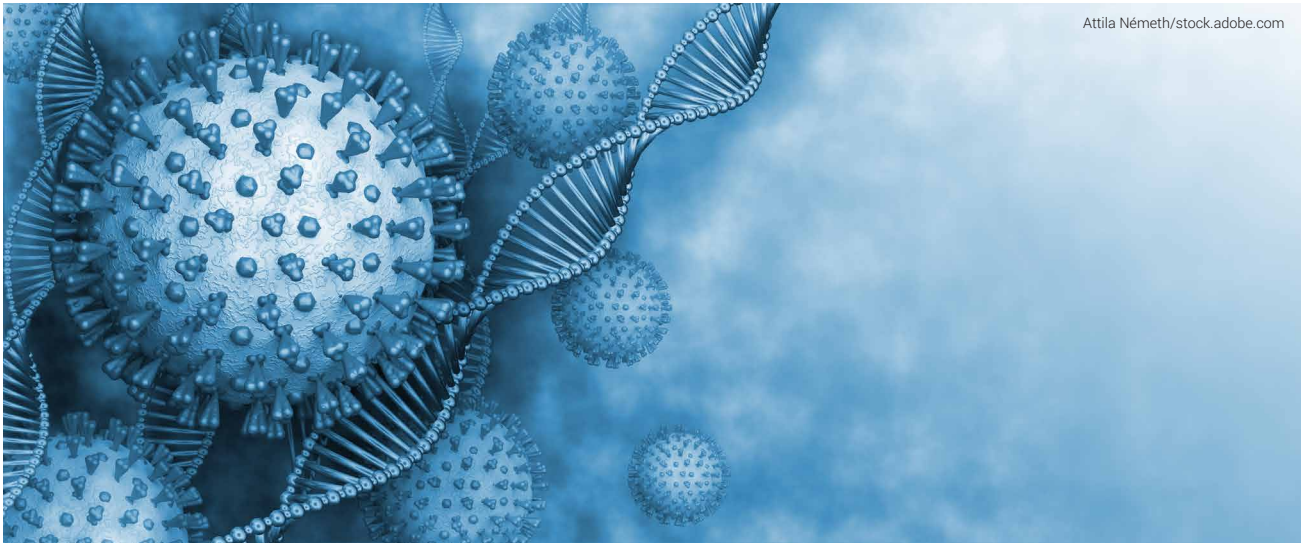
参考文献

1. R. E. Murphy, et al., *Anal.Chem.* **70**(8), 1585-1594 (1998).DOI: 10.1021/ac971184b
2. H. Luo, et al., *J. Pharm.Biomed.Anal.* **137**, 139-145 (2017).DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.012
3. R. Karongo, et al., *J. Chrom.A*, **1627**, 461430 (2020).DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461430
4. U. Woiwode, et al., *J. Chrom.A*, **1562**, 69-77 (2018).DOI: 10.1016/j.chroma.2018.05.062
5. M. Muller, et al., *Chromatographia*, **82**, 181-196 (2019).DOI: 10.1007/s10337-018-3662-6
6. D. R. Stoll, et al., in *Advances in Chromatography*, (CRC Press: Boca Raton, FL, 2018).
7. M. Sorensen, et al., *mAbs*, **8**(7), 1224-1234 (2016).DOI: 10.1080/19420862.2016.1203497
8. C. Gstöttner et al., *Anal.Chem.* **90**(3), 2119-2125 (2017).DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04372
9. J. Camperi et al., *Anal.Chem.* **92**(6), 4357-4363 (2020).DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05193
10. M. Gilar, et al., *Anal.Chem.* **77**(19), 6426-6434 (2005).DOI: 10.1021/ac050923i

Dwight R. Stoll, PhD

グスタフ・アドルフス大学教授





Attila Németh/stock.adobe.com

質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-CoV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、 および相対的な定量

Rod Chalk

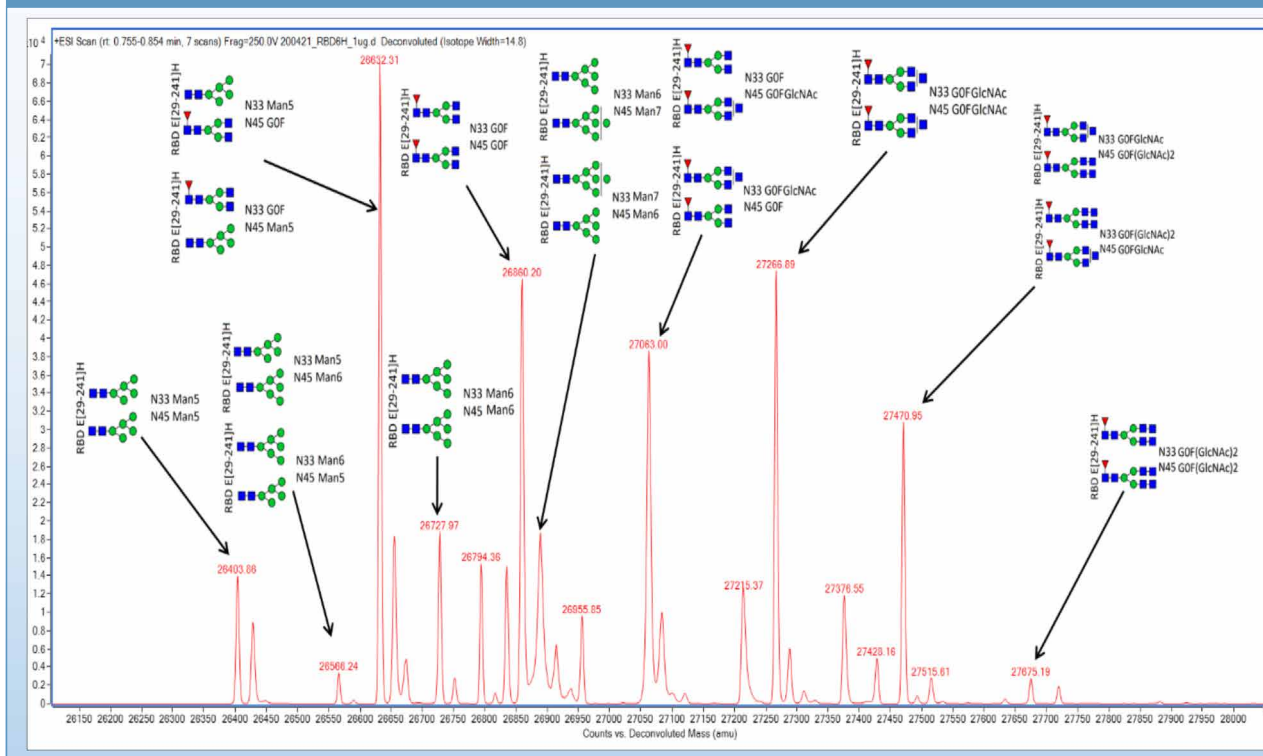
スパイクタンパク質の糖ペプチドのフィンガープリンティングとマッピング用のマスターデータベースは、複雑で時間のかかるプロセスが大幅に簡略化されます。

はじめに

SARS-CoV-2 ウイルスのスパイクタンパク質中に存在する複雑なグリコシル化は、免疫回避に関係があると考えられており、病原性を高める可能性があります。多くのラボでは研究目的でスパイクタンパク質を発現させていますが、完全に特性解析するには信頼性の高い分析ワークフローが必要です。これが重要であるのは、グリコシル化のパターンは、使用されている宿主細胞の発現システムと成長条件によって決定されるためです。これらの条件を正確に制御することは困難であり、生成されるスパイクタンパク質にバッチ間でばらつきが生じる場合があります。このグリコシル化の複雑性は、タンパク質の完全な特性解析において多数の技術的な障害を引き起こします。逆相液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC-MS) によるインタクト質量解析はおそらく実行できません。これは、22 の各グリコシル化部位に存在する可能性のある多数のグリカンにより、例外的に高い多分散が発生し、その結果としてシグナルの希釈が引き起こされるためです。実行可能であるとしても、グリカンの目的の位置情報は生成できません。遊離グリカン分析は実施できますが、この場合も位置情報は提供されません。

質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-CoV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量

図 1 : SARS-CoV2 のスパイク受容体結合ドメインには 2 つのグリコシル化部位 (N343、N331) があります。いくつかのグリカンは、これらの部位に関連付けることができます。



本稿では、最初のステップとして、LC-Q-TOF MSMS を使用した糖ペプチド質量およびリテンションタイムデータベースの作成を含む新しいアプローチについて説明します。このデータベースは、本質的に各糖ペプチドの精密質量リテンションタイムフィンガープリントの集まりであり、シンプル、強力、高速で堅牢な特性解析ワークフローに組み込むことができます。

スパイクタンパク質がもたらす課題

全長スパイクタンパク質は三量体として存在します。スパイク単量体の受容体結合ドメイン (RBD) 部には 2 つのグリコシル化部位 (N343 と N331) が存在しますが、それぞれにいくつかのグリカンは存在する可能性があります。RBD のグリコシル化部位は少数であるにもかかわらず、そのグリコシル化プロファイ

ルは複雑で、インタクト質量スペクトル (図 1) が示すように、サンプル間でばらつきがあります。2 つの部位が存在するため、場合によっては、指定した質量に対して 2 つの構造が存在する可能性があります。したがって、これらの構造のどちらが正しいのかを判別することができず、完全な同定ができません。

全長スパイクタンパク質の場合、状況はさらに複雑になります。ここでは 22 のグリコシル化部位がありますが、部位ごとにわずか 6 のグリカンは存在すると仮定した場合でも、存在する可能性のあるグリコフォームの総数は約 1300 億になり、スパイクタンパク質のインタクト質量分析は不可能です。さらに、このような分析でも位置情報は提供されません。

質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-COV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量

図 2: 逆相 HPLC による糖ペプチドの分離



代替になるのは糖ペプチド分析です。この場合、ペプチドごとに1つのグリコシル化部位を生成して、各部位を最終的にマッピングする必要があります。RBD内の2つのグリコシル化部位にはトリプシン切断部位がないため、トリプシン単独では使用できません。さらに、プリカーサ質量が不明であるため、プリカーサデータベースとの照合は使用できず、MS/MSが必要になります。ただし、考慮する必要がある問題がいくつかあります。つまり、糖ペプチド分子はペプチドバックボーンとグリカン構造で構成される混成物であり、それぞれに最適なフラグメンテーション条件が異なります。グリカンの最適なフラグメンテーションは、ペプチドをフラグメント化しないままにすることです。一方、最適なペプチドフラグメンテーションとは、グリカン情報が失われていることを意味します。

分離と検出機能の向上

複数の酵素を使用すると複雑さが増すため、オックスフォード大学新薬発見センターの研究者は単一酵素のエラスターゼを選択することに決定しました。この酵素はトリプシンと比較して頻繁に切断を実施して、短いペプチドを生成します。さらに重要なことは、エラスターゼはグリコシル化部位ごとに単一のペプチドを生成することであり、これは明確なマッピングにとって重要です。大部分のグリカンには極性があるため、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を使用すると適切に分離する一方、ペプチドは比較的無極性であるため、逆相 (RP) -HPLC で最適に分離します。短いペプチドは MS でのトータルイオンクロマトグラム (TIC) シグナルを増大させるため、RP-HPLC で容易に分離されます。ペプチドの分離は優れた分離能を示していますが、個別のグリカンは分離できず、共溶出して (図 2) 複数のピークが重なっています。

質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-COV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量

図 3: 糖ペプチド探索のワークフロー

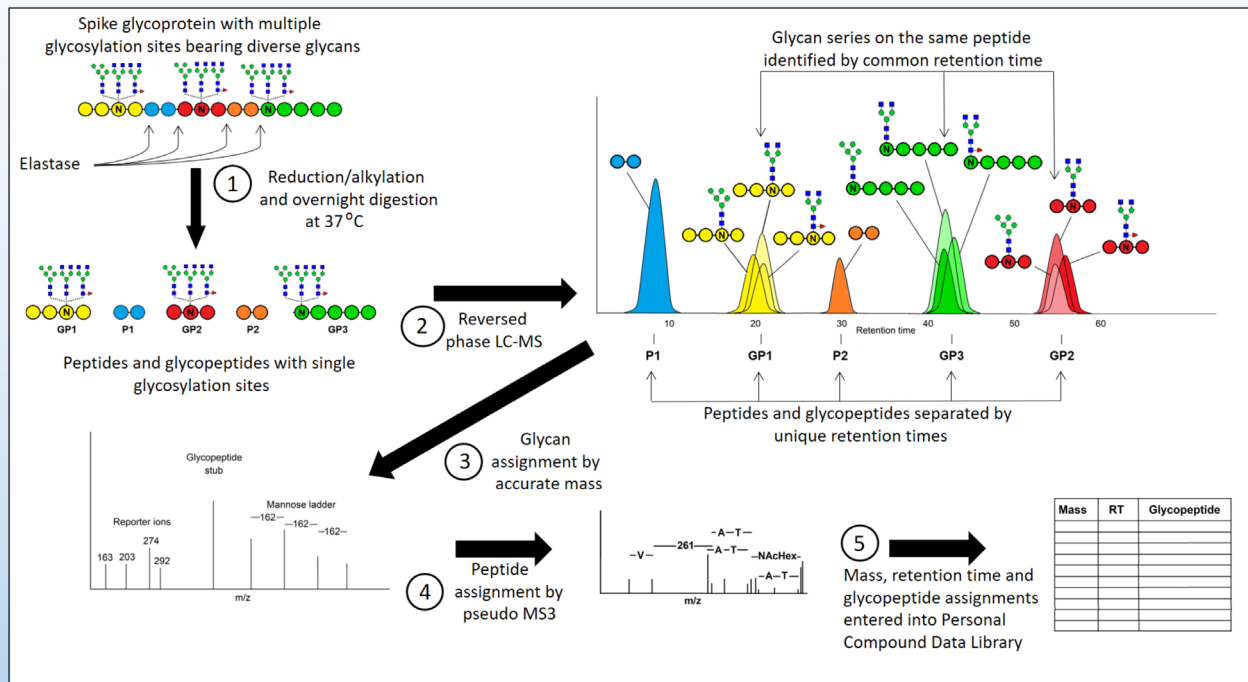
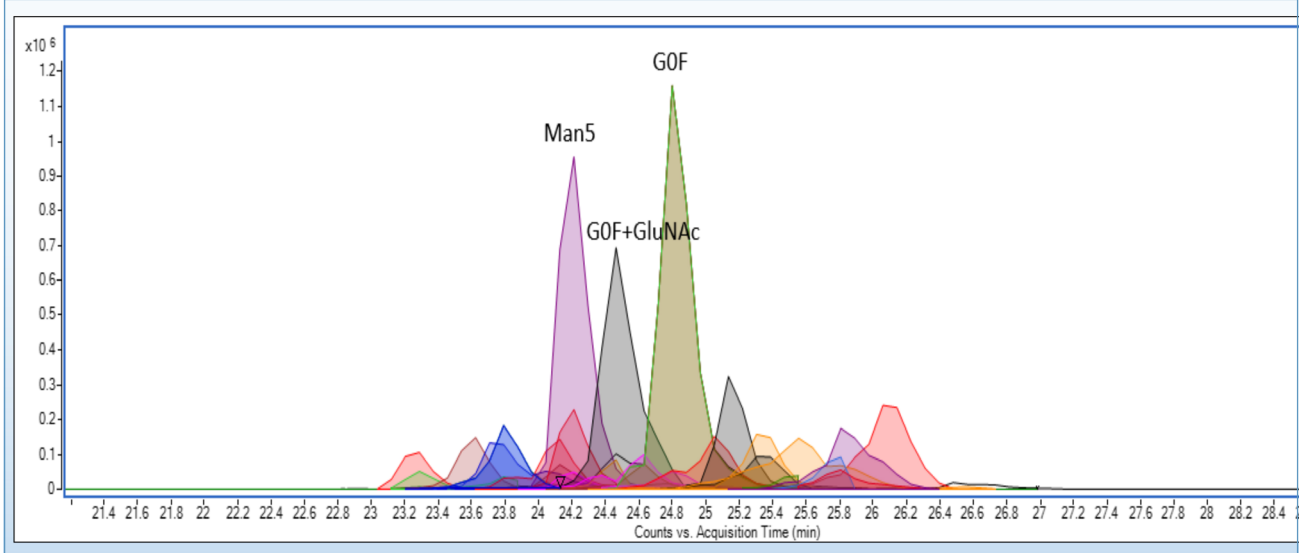
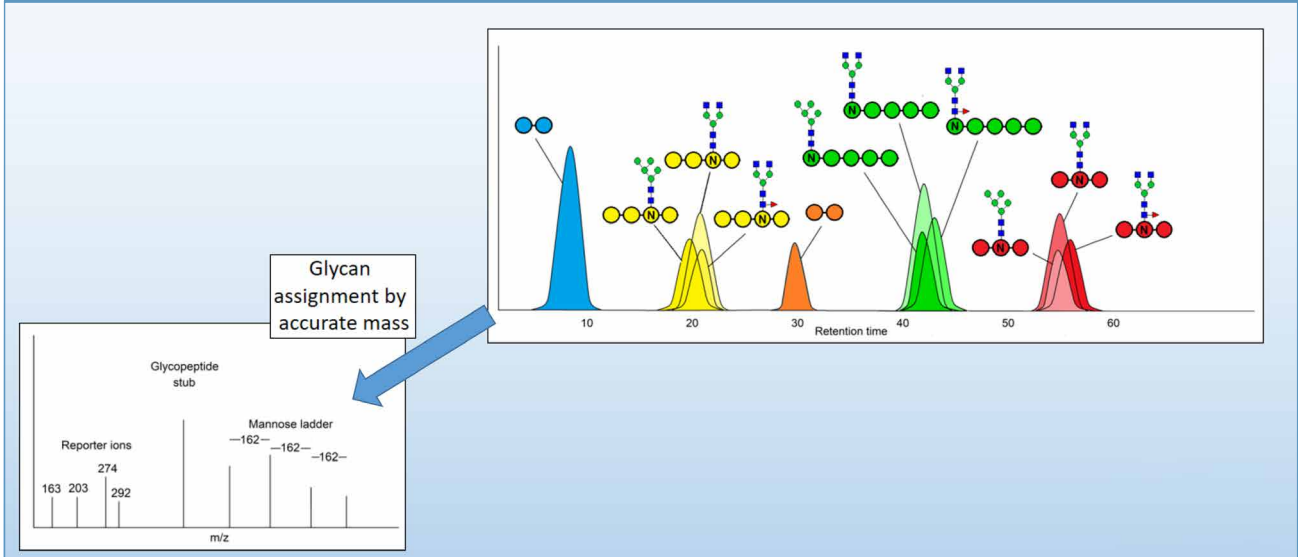


図 4: 27 の GEVFNAT-Man5 糖ペプチドはすべて、 ± 2 分のリテンションタイムウィンドウ内で溶出しています。



質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-COV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量

図 5: マンノースラダーは、マンノース含有グリカンの構造的長特です。



これは問題として捉えられる場合もありますが、研究者はこの特長を利用して新しいメソッドを開発し、これらの糖ペプチドを同定してマッピングしました。チームは、アジレントの AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使用してペプチドを分離し、グリカンが異なる同じペプチドが同じ時間に溶出していることを見出しました。このように、リテンションタイムが同じグリカンは同じペプチドにマッピングできます。ペプチドが同じグリカンはリテンションタイムが同じであり、精密質量が既知であるため、精密質量とリテンションタイムを組み合わせることにより、完全な糖ペプチド同定が可能なフィンガープリントが提供されます。

データベースの構築

図 3 に糖ペプチド探索のワークフローを示します。このワークフローは、一晚のエラスターゼ消化から開始して、ペプチドと糖ペプチドの混合物を生成します。次に RP-HPLC を行います。ここではペプチドが同じグリカンが共溶出し、リテンションタイムにより同定できます。例えば、ペプチド GEVFNAT- には 27 の異なるグリコフォームがあり、図 4 の拡大したイオ

ンクロマトグラムは、これらすべてが 4 分のリテンションタイムウィンドウ内で溶出していることを示しています。次のステップは、精密質量を使用してグリカンを同定することです。LC-MS/MS 分析は多数の種を対象とします。遊離糖類、ペプチドスタブ、および図に示されている (図 5) マンノースラダー (マンノース含有グリカンの構造的長特) を表す特異的レポーターイオンにより、糖ペプチドを特性解析しています。デコンボリュートした質量スペクトルは、個別の糖を持つグリカンの完全な配列を明らかにしており、質量精度は 10 ppm 以内です。

ワークフローの 2 番目のフェーズはペプチドの同定です。これは疑似 MS3 により実行していますが、この手順では MS 機器で高フラグメント電圧を使用して糖ペプチドのインソースフラグメンテーションを実行し、グリカンを損失させます。四重極でのターゲット質量としてペプチドスタブを選択して、衝突誘導解離を実行すると、ペプチド配列が生成されます。

このワークフローの主な長特は、観察されたすべてのスパイクタンパク質糖ペプチドに対

質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-CoV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量

度で糖ペプチド構造を割り当てることができるためです。この作業は、Agilent MassHunter Qualitative Analysis バージョン B.07 とモレキュラーフィーチャー抽出ツールを使用して自動的に実行できます (図 6)。このワークフローのさらなる利点は、グリカン分析に関する専門知識を必要としないことです。

結論

詳細なペプチド発見分析から生成された質量リテンションタイムデータベースにより、SARS-CoV-2 スパイク糖ペプチドのマッピングが大幅に簡略化されており、複雑な MS/MS 分析も必要ありません。これにより、LC リテンションタイムと精密質量のみを使用して糖ペプチドの構造を同定できます。このシンプルなワークフローは、さまざまな HPLC-MS 機器および構成に転送可能です。詳細なメソッドは自由に入手可能で (Chalk, R., Greenland, W. et al. 『Identification, Mapping and Relative Quantitation of SARS-CoV-2 Spike Glycopeptides by Mass-Retention Time Fingerprinting (質量リテンションタイムフィンガープリンティングによる SARS-CoV-2 スパイク糖ペプチドの同定、マッピング、および相対的な定量)』 (印刷中))、データベースはオンラインで入手可能です (Chalk, R., Greenland, W. et al., (2020)。『SARS-CoV2 Spike Glycopeptide Mass-Retention Time PCDL database (Version 1) (SARS-CoV2 スパイク糖ペプチド質量リテンションタイム PCDL データベース (バージョン 1))』 [データセット]。Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.3958218>)。

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。アジレント製品を COVID-19 の検査、診断、治療、緩和の用途で使用することは承認されていません。アジレントでは、製品による新型コロナウイルスの検出について検証を行っていません。

Rod Chalk, Ph.D.

オックスフォード大学新薬発見センター、
質量分析責任者

