[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

UPLC-FLR（蛍光）システム、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）による 2-AB 化糖鎖の分析法開発

Joomi Ahn, Ying Qing Yu, and Martin Gilar
Waters Corporation, Milford, U.S.

アプリケーションの利点

ACQUITY UPLC® システムとGlycan Separation Technology カラムが、糖鎖分析に高度な分離と分析時間の短縮をもたらします。バイオ医薬品開発におけるグリコシレーションのハイスループットモニタリング、プロファイリングに威力を発揮します。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC
ACQUITY UPLC FLR（蛍光）検出器
Glycan Separation Technology　カラム

キーワード

組み換えモノクローナル抗体
HILIC
グラジエント条件の最適化
流速
バッファー濃度
移動相pH
カラム温度

はじめに

ここ数年のバイオ医薬品業界において、最もホットな分野は抗体（mAb）医薬品開発であると言えるでしょう。組換え mAb 開発の重要な側面の一つは、グリコシレーション（グリコシル化）パターンのプロファイリングです。糖鎖は生物学的活性において重要な役割を演じており、タンパク質合成でのグリコシレーションの変化は薬効や消失速度など医薬品の特性に影響を与えます。数ある糖鎖分析手法の一つに、蛍光検出を利用した親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）があります。複雑な糖鎖の混合物を、高感度に再現よく分離する方法です。

ウォーターズの ACQUITY UPLC FLR（蛍光）システムと Glycan Separation Technology（GST）カラムとの融合により、従来の HPLC と比較し、飛躍的に分離を向上させます。この糖鎖分析カラムには、1.7 µm のアミド結合極微粒子が充填されており、HILIC モードで効率的に蛍光標識糖鎖を分離します。構造異性体や同時溶出するマイナーピークを含め、UPLC FLR システムで高度に糖鎖を分離することでより正確な測定が実現できます。

本アプリケーションノートでは、HILIC のグラジエント条件を検討する際の一般的なガイドラインを、2- アミノベンズアミド（2-AB）化ヒト IgG 由来 N 結合型糖鎖の分離の最適化を UPLC で実施した例を用いて示しています。従来の HPLC では分離できなかった構造異性体や同時溶出するマイナーピークの分離を含め、GST カラムの HILIC モードでの蛍光標識糖鎖の分離能力を実証します。

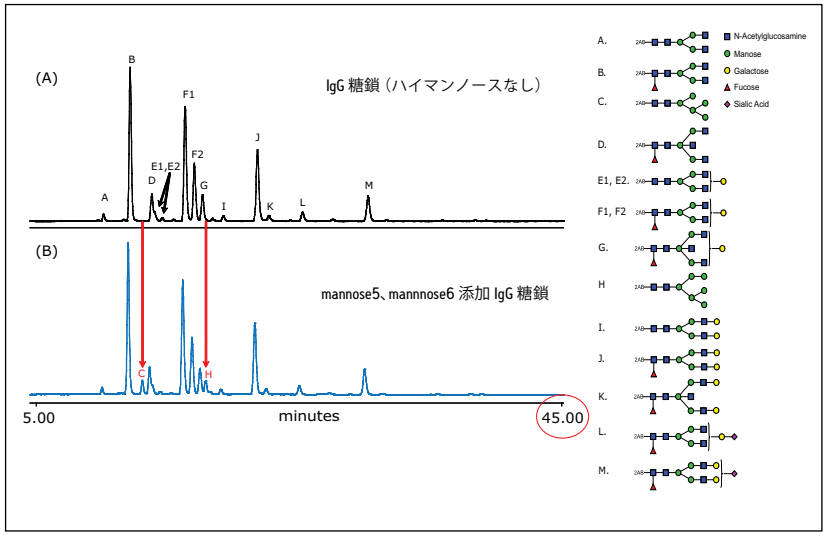


図 1.（A）ヒト IgG 由来 2-AB 化糖鎖　（B）IgG 糖鎖にハイマンノース型糖鎖 mannose5、mannose6 を添加

実験方法

LC 条件

LC システム :	Waters ACQUITY UPLC システム
カラム :	ACQUITY UPLC BEH Glycan カラム 2.1x150 mm, 1.7 µm
カラム温度 :	40℃ *
流速 :	400 µL/min*
移動相 A:	100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5*
移動相 B:	アセトニトリル
グラジエント :	72-62% B/45 分 *
弱洗浄溶媒 :	72% アセトニトリル
強洗浄溶媒 :	20% アセトニトリル
注入 :	1 µL（パーシャルループ）

（* その他の条件については図に示しました）

検出器 :	ACQUITY UPLC FLR（蛍光検出器）
励起波長 :	330 nm
蛍光波長 :	420 nm
データ取り込み :	5 ポイント /sec
PMT ゲイン :	1
タイムコンスタント :	標準

サンプル

ProZyme 社（San Leandro, CA, U.S.）製 2-AB 化ヒト IgG 由来 N 結合型糖鎖を使用。
クロマトグラフィー的に複雑なサンプルを調製するため、さらに 2-AB 化 mannose5、mannose6 を添加したサンプルも使用。

結論と考察

2-AB 化糖鎖の分離には HILIC の手法を用いました。分析法の最適化で、目的の糖鎖が近接して溶出する部分の分離には、緩いグラジエント勾配を使ったフォーカスグラジエントを利用しました。流速、バッファー条件、pH、カラム温度についても、糖鎖ピークが近接している部分の分離を改善するよう調整しました。図 1 で使用した HILIC の最適化条件は、図 2 から図 6 に示した様々な条件下での実験を元に確立しました。

IgG 由来の 2-AB 化糖鎖の複雑な混合物について、図 1 のように E1/E2、F1/F2 の異性体も含めすべての糖鎖を極めて良好に分離することができました。すべての図に示したグラジエントは 45 分で行い、全分析は 2.1x150 mm カラムを使用して 1 時間で完了しました。HILIC での糖鎖分離条件を、粒子径 3 µm のカラムを使用した HPLC 条件から、粒子径 1.7 µm のカラムと UPLC を使用した UPLC 条件に移管することで分離を改善することができ、さらに、分析時間の短縮も可能です。

図 1（B）で示したように、近くに溶出するピークがあるため分離が難しい mannose5（ピーク C）、mannose6（ピーク H）も分離することができました。

HILIC グラジエントにおける初期アセトニトリル濃度

グラジエント初期条件のアセトニトリル濃度の影響を図 2 に示しました。72% から 62% のグラジエント条件で最も良好な分離が得られました。拡大して示した部分は分離が改善または悪化した部分です。たとえば、（A）の拡大図から（B）の左側の拡大図では分離の改善が見られ、（B）の右側の拡大図から（C）の拡大図では分離が悪化しています。

グラジエント勾配の変化による影響を排除するため、図 2 のすべての実験で 45 分間でアセトニトリル濃度を 10% 変化させるよう設定しました。

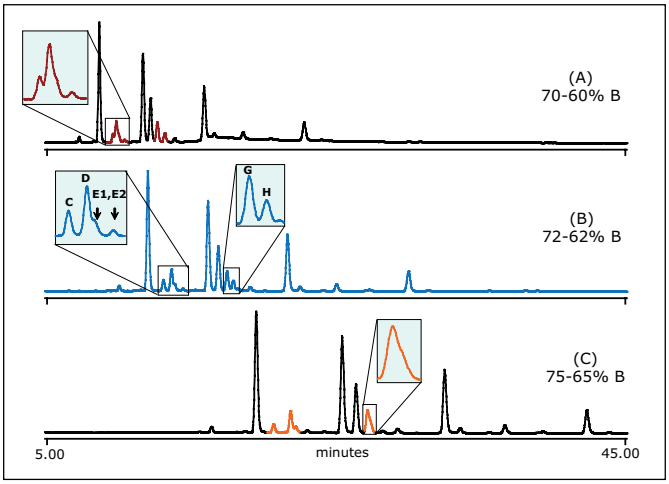


図 2. 2-AB 化糖鎖の分離におけるグラジエント初期有機溶媒濃度の影響
流速 0.4 mL/min、カラム温度 40℃で固定。移動相 A は 100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5、移動相 B はアセトニトリル。（ピーク名については図 1 を参照）

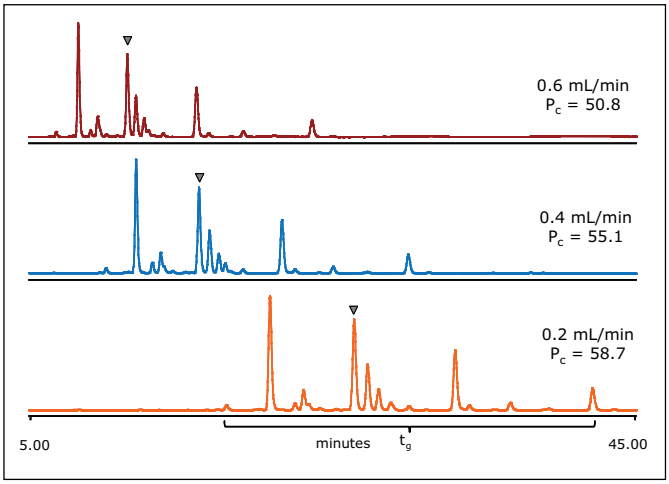
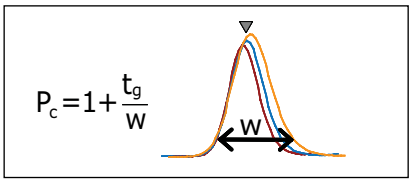


図 3. 流速の影響
40℃、45 分で移動相 B 濃度を 72% から 62% のグラジエント。移動相 A は 100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5、移動相 B はアセトニトリル。

流速

流速による影響を図 3 に示しました。流速の変化は、グラジエント勾配の変化に関与するため、分離と同様ピークキャパシティーにも影響します。流速を 0.2 から 0.6 mL/min に増加させると、ピーク幅 (w) は狭くなります。しかし、同時に effective separation window (tg)（実際に分離に使われている区間。最初のピークの溶出時間から最後のピークの溶出時間までの区間）は減少します（図 3 参照）。ですから流速がピークキャパシティー（Pc=1+tg/w と定義）に与える影響はあまり大きくないといえます。



今回は、わずかに分離に改善が見られたため 0.4 mL/min の流速条件を選択しました。次の項で説明するさらなる分離検討にはこれらのグラジエント条件を用いました。

バッファー濃度

図 4 に示したように、バッファー濃度は分離や選択性に影響を及ぼします。ギ酸アンモニウムの濃度の増加に伴い、中性糖鎖に比べ、電荷をもつシアル化糖鎖の保持時間が顕著に変化します。250 mM ギ酸アンモニウムでは、他の条件の変更では分離が難しい E1 と D が完全に分離しています。

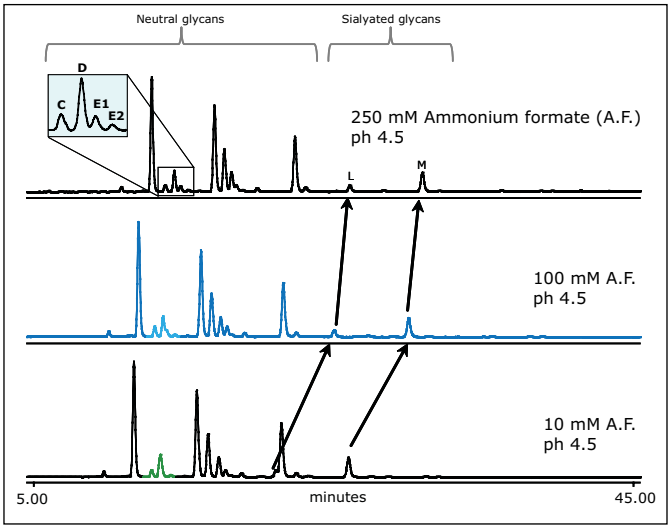


図 4. シアル化糖鎖へのバッファー濃度の影響
流速 0.4 mL/min、45 分で移動相 B 濃度を 72% から 62% のグラジエント。カラム温度 40℃。

移動相pH

図5に示したように、移動相A（100 mMギ酸アンモニウム）pH 4.5とpH 7.5では、分離に大きな変化は見られません。移動相のpHはギ酸でアンモニアを滴定して調整しました。図は示しませんが、低いpHではシアル化糖鎖の保持の変化が見られました。

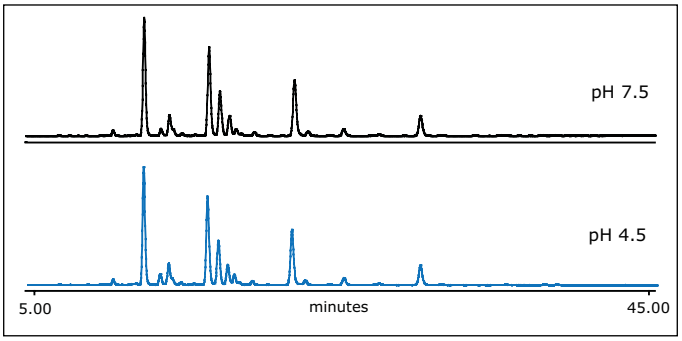


図 5. 移動相 pH の影響
100 mM ギ酸アンモニウムでの 2 条件の pH では保持に大きな変化は見られない。流速 0.4 mL/min、45 分で移動相 B 濃度を 72% から 62% のグラジエント。カラム温度 40℃。

カラム温度

カラム温度は物質の保持時間に影響します。カラム温度の上昇に伴い、クロマトグラフィーの理論から予測された通り、すべての糖鎖の保持時間が早まりました。図6に赤と紫で示した部分の変化は、カラム温度による影響によるものと考えられます。今回の複雑な糖鎖混合物の分析では分離が重要ですが、カラム温度は分離自体にはさほど大きな影響を与えないと考えられました。

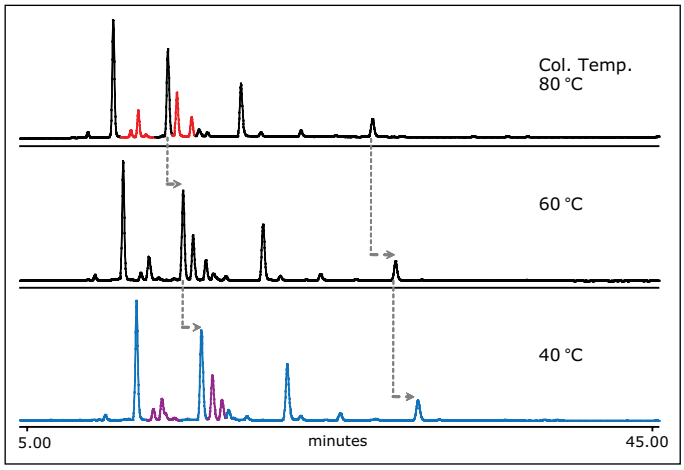


Figure 6. The retention shift due to the column temperature change.

結論

- Glycan Separation Technology カラムの高い分離、選択性を 2-AB 化 IgG 由来糖鎖を用いて実証しました。糖鎖分離におけるクロマトグラフィー条件の影響を、HILIC での分析法最適化のガイドラインとして解説しました。このガイドラインを利用することで、信頼性の高い糖鎖の同定、定量を行うための分析法開発をより短時間に、手間をかけずに行っていただけます。
- ACQUITY UPLC システムにより分析時間は大幅に短縮されました。一般的に 2-AB 化 IgG 糖鎖を十分に分離するためには、HPLC で 2-3 時間のグラジエントを要します。このアプリケーションで分析法最適化に用いた UPLC での分析では、複雑な糖鎖構造を分離するのに 1 時間あれば十分でした。
- UPLC と GST カラムを合わせて使用することで、より短時間でより良好な糖鎖の分離を実現できます。

このスピードと優れた分離は、バイオ医薬品開発において糖鎖のモニタリングやプロファイリングをハイスループットで実施することでますます利用価値が高まります。

参考文献

- Waters Glycan Column Brochure. 2009; 720002981en.
- Ahn J, Bones J, Yu YQ, Rudd PM, Gilar M. J Chromatogr B. 2010; 878: 403-408.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC は Waters Corporation の登録商標です。
The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012 年 06 月 720003238JA PDF