[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

*Rapi*Fluor-MS標識、ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムおよび蛍光/ACQUITY QDa MS検出器による遊離*N*型糖鎖モニタリングの新機能

Eoin F.J. Cosgrave, Matthew A. Lauber, Robert Birdsall, and Sean M. McCarthy
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 遊離*N*型糖鎖分析のサンプル前処理の時間短縮
- 日常的にすべてのピークの質量情報と蛍光情報を得ることで糖鎖モニタリングの信頼性向上

ウォーターズのソリューション

*Rapi*Fluor-MS™ Glycan Performance Test スタンダード

GlycoWorks™ *Rapi*Fluor-MS *N*-Glycan キット

ACQUITY® QDa® MS 検出器

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システム

ACQUITY UPLC FTN

ACQUITY UPLC 蛍光検出器（FLR）

ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide カラム

Empower® 3 CDS ソフトウェア

キーワード

糖鎖、グリコフォーム、標識糖鎖、ピークモニタリング、質量検出、蛍光検出、IgG

はじめに

バイオ医薬品の開発において、安全性、有効性、薬効に影響を及ぼす製品の重要品質特性（CQA; critical quality attributes）に関与する特性解析と糖鎖プロファイリングのモニタリングは重要です。グリコフォームの構造の特性解析が必要であることは広く認知されており、質量分析計（MS）は糖鎖の同定に重要な役割を果たしています。

プロファイルが確立されると多くの場合、蛍光検出を組み込んだ分析法は下流へと移管されます。多くの場合、特性解析後に検出されたそれぞれのピークの質量情報を取得したいという要望があります。しかし、質量情報の取得は、コストがかかるために質量分析計が不足することや、有意義で有用なデータを得るためには MS 専門の分析者が必要なことなどの多くの理由から困難でした。

本アプリケーションノートでは、*Rapi*Fluor-MS 標識試薬、ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、蛍光 /ACQUITY QDa MS 検出器による IgG の遊離 *N* 型糖鎖プロファイルのモニタリングを紹介します。この新しいワークフローでは、30 分以内で糖タンパクから迅速に分析用サンプルを前処理することが可能です。

さらに、*Rapi*Fluor-MS 標識は前例のない MS 応答[1]を実現するため、ACQUITY QDa を用いた質量検出が可能となります。本アプリケーションノートでは *Rapi*Fluor-MS によってもたらされる感度の向上と荷電状態プロファイルや、その蛍光と検量検出に対する一般的な有用性と、様々な IgG の糖鎖構造に対して得られる ACQUITY QDa MS 検出器のマススペクトルの品質について議論します。

実験条件

LC条件

LC システム：　ACQUITY UPLC H-Class Bio

検出器：　ACQUITY UPLC 蛍光検出器、ACQUITY QDa MS 検出器

カラム：　ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、130Å、1.7 µm、2.1×150 mm（製品番号 186004742）

カラム温度：　60 ℃

サンプル温度：　10 ℃

注入量：　2 µL

蛍光検出器設定

サンプリングレート：5 points/sec

励起波長：　265 nm

蛍光波長：　425 nm

ACQUITY QDa MS 検出器設定

サンプリングレート：5 points/sec

質量範囲：　500 - 1250 Da

コーン電圧：　15 V

キャピラリー電圧：　1.5 kV

プローブ温度：　500 ℃

イオン化法：　ESI+

移動相 A：　アセトニトリル（Pierce、LC/MS グレード）

移動相 B：　50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4、（LC/MS グレード、ウォーターズ ギ酸アンモニウム緩衝液）

移動相 C：　アセトニトリル（LC/MS グレード）

移動相 D：　アセトニトリル（LC/MS グレード）

時間	流量 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
Initial	0.400	75	25	0	0
35.0	0.400	54	46	0	0
36.5	0.200	0	100	0	0
39.5	0.200	0	100	0	0
42.5	0.200	75	25	0	0
47.4	0.400	75	25	0	0
55.0	0.400	75	25	0	0

SYNAPT® G2-S は *Rapi*Fluor-MS と 2-AB 標識 *N* 型糖鎖の価電状態の評価に使用しました。実験条件の詳細は参考文献 1 を参照してください。

*Rapi*Fluor-MS Glycan Performance Test スタンダード（製品番号 186007983）は DMF / アセトニトリル / 水 = 22.5%:55.5%:22% 混合液 25 µL に希釈し、そのまま使用しました。それぞれの分析ではオンカラムで遊離標識 *N* 型糖鎖 32 pmol に相当する 2 µL を注入しました。LC /MS グレードのアセトニトリルと水は Pierce から購入しました。ギ酸アンモニウムはウォーターズ ギ酸アンモニウム緩衝液 - Glycan Analysis（製品番号 186007081）を 1 L の水にすべての溶液を加えることで調製しました。UPLC® システムは、質量検出器における付加イオンを低減するために、不揮発性塩を必要としないアプリケーション専用の装置を使用しました。

結果および考察

既存の分析ワークフローに質量検出を加えることで糖鎖の迅速かつ明確な同定が可能になります。従来は意味のある質量情報を取得するためには、適切な感度の高分解能の装置を必要とし、困難な作業でした。この問題を克服するために、新規標識試薬 *Rapi*Fluor-MS を使用することができます。*Rapi*Fluor-MS は劇的に *N* 型糖鎖の MS 感度と荷電状態の両方を向上させます。

これを実証するために、*Rapi*Fluor-MS 標識糖鎖のマススペクトルを従来の蛍光標識試薬である 2-AB で標識された糖鎖のマススペクトルと比較しました。この分析は、特徴的に非常に広い質量範囲を有する飛行時間型質量分析を用いて行われました。異なる標識技術の荷電状態の特性をより客観的に観察しました。

図 1 に示すように、*Rapi*Fluor-MS を使用した場合、シグナル強度が飛躍的に向上しました。同様に興味深い事として *Rapi*Fluor-MS 標識の使用により検出された糖鎖イオンの荷電状態のシフトです。図に示されるように、*Rapi*Fluor-MS 標識 FA2 はほとんどすべてが $[M+2H]^{2+}$ の荷電状態を取っており、より複雑な構造ではより高い $[M+3H]^{3+}$ の荷電状態を取り始めています。それぞれの場合で少なくともひとつはより高い荷電状態を取っているため、*m/z* が ACQUITY QDa MS 検出器の質量範囲に入ります。したがって、*Rapi*Fluor-MS により、費用効果が高くユーザーフレンドリーな ACQUITY QDa MS 検出器を利用した *N* 型糖鎖モニタリング実験が可能になります。

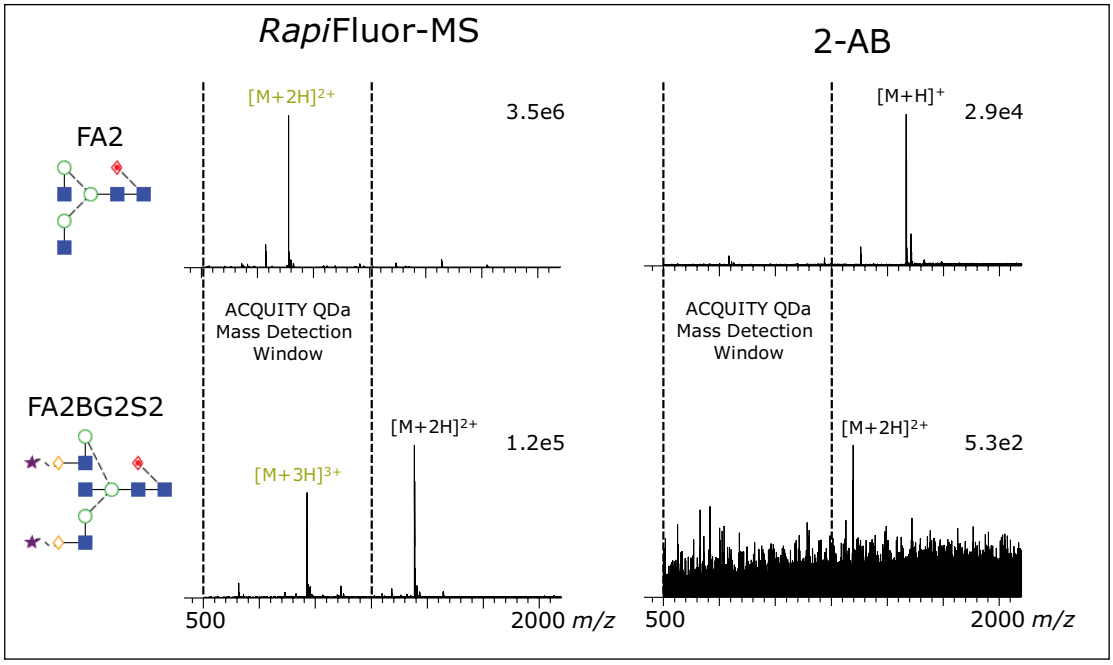

図 1. RapiFluor-MS 標識 N 型糖鎖の荷電状態。2 種類の N 型糖鎖標識試薬 RapiFluor-MS と 2-AB の飛行時間型 ESI+ マススペクトル。ACQUITY QDa MS 検出器 取得ウインドウ範囲内で検出されたプロトン化イオンを緑で表示。ACQUITY QDa MS 検出器の質量範囲をそれぞれのスペクトルの破線で表示。

上述のように、ACQUITY QDa MS 検出器の *N* 型糖鎖の日常的な検出は *Rapi*Fluor-MS 標識で可能です。重要なことは、ACQUITY QDa MS 検出器は、ピークの均質性および質量情報のデータを裏付けるとともに、光学系の定量を促進するために蛍光検出と組み合わせることができるということです。日常的にこれらのデータが収集できるように、ACQUITY QDa MS 検出器は豊富な質量分析のトレーニング経験がないユーザーが簡単に意味のある質量情報を得ることができるように設計されています。

これを実証するために、IgG の *Rapi*Fluor-MS 標識遊離 *N* 型糖鎖サンプルを分離し、溶出する糖鎖を蛍光と ACQUITY QDa MS 検出器の両者でモニターしました。図 2 に示すように、同定に利用される蛍光と、それぞれの糖鎖のピークの割り当てを容易に確認できる ACQUITY QDa MS 検出器データの両方の検出器チャンネルで高品質のデータが得られました。Empower ソフトウェアでは図 2 に示すように、成分および質量情報を簡単にデータを見直すためのピークの注釈として付けることが可能です。

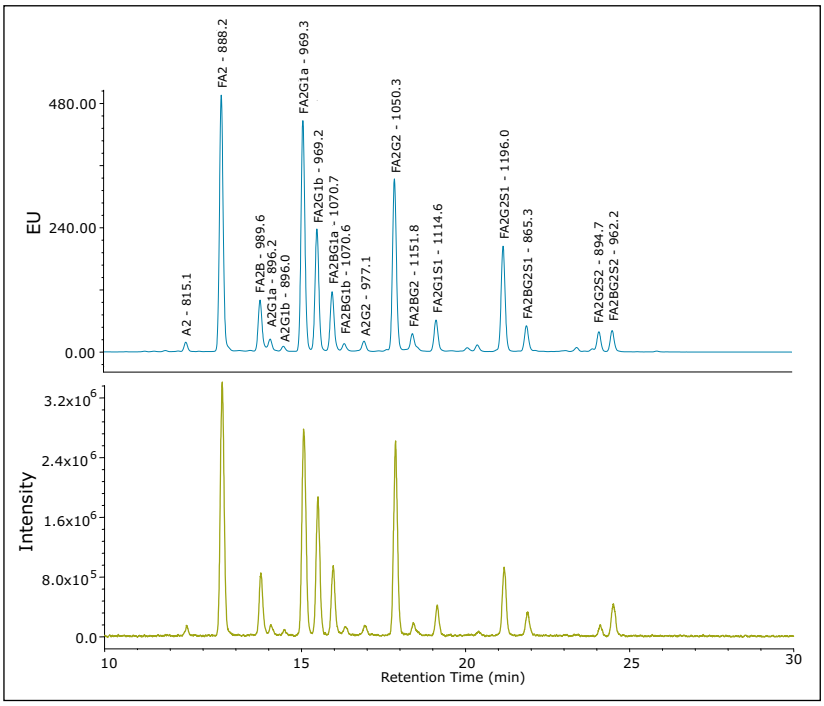

図 2. IgG 糖鎖の蛍光（上）と 5 点平均でスムージングした TIC クロマトグラム（下）。それぞれのピークには、Empower のデータ管理ソフトウェアで成分名とベースピーク質量の注釈が付けられています。

ACQUITY QDa で *N* 型糖鎖構造を検出する能力は重要ですが、特に詳細にデータを解析する必要がある場合、*N* 型糖鎖モニタリングのスペクトル品質がさらに重要となります。したがって、前述したクロマトグラムで検出されたピークに関連付けられた MS データの品質を検討しました。図 2 で割り当てられたそれぞれのピークのスペクトルを図 3 に表示します。ACQUITY QDa MS 検出器では糖鎖の相対存在量、分子量またはシアル酸含量に関わらず、クリーンで簡単に解釈できる *Rapi*Fluor-MS 標識糖鎖のマススペクトルが取得できます。明らかに、*Rapi*Fluor-MS と ACQUITY QDa MS 検出器を一緒に用いることで、*N* 型糖鎖の日常的なモニタリングにおける割り当ての信頼性を高めるために非常に有益なデータを提供することができます。

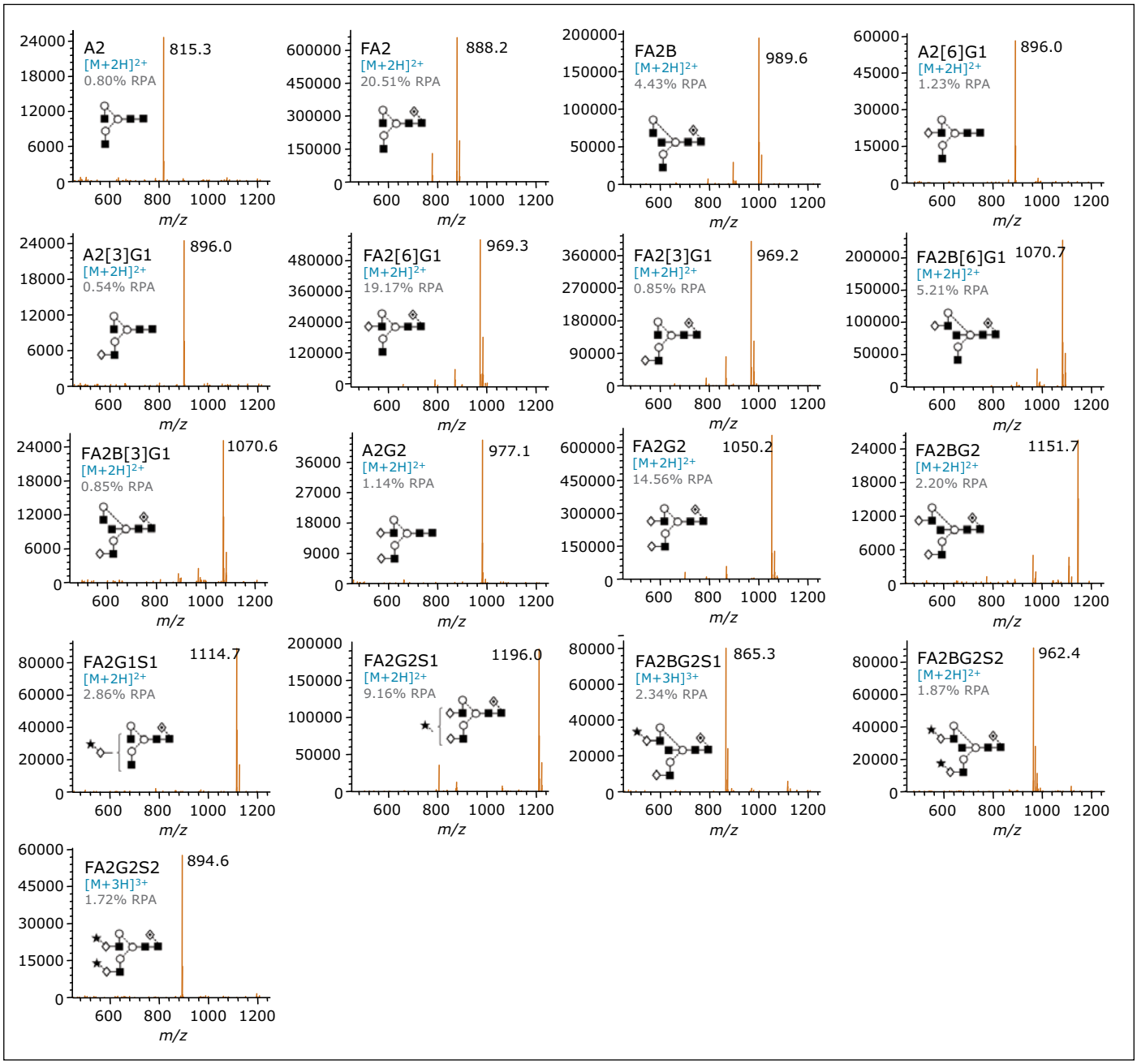

図 3. 図 2 に示すクロマトグラムで同定されたそれぞれの糖鎖構造の積算スペクトル。同定された構造は A2 のようなシンプルな構造から、FA2G2S2 のような IgG サンプル中に存在するより複雑な構造までにまたがっています。RPA（Relative Peak Area）= 蛍光検出に基づく相対ピーク面積

結論

グリコシル化（糖鎖付加）はほとんどのタンパク質医薬品において複雑かつ重要な特徴で、十分に特性解析され、開発から商業化にわたる製品のライフサイクル全体にわたってモニターされる必要があります。本アプリケーションノートで示したように、*Rapi*Fluor-MS は、試料調製時間と複雑さを大幅に低減し、蛍光感度を向上し、さらに劇的に MS 感度を向上します。糖鎖の MS 感度を向上することで *Rapi*Fluor-MS 標識は ACQUITY QDa での質量検出を可能とし、これにより、バイオ医薬品の開発中に検出された構造のピークモニタリングで高い信頼性が得られます。

*Rapi*Fluor-MS 標識および ACQUITY UPLC H-Class Bio システムと ACQUITY QDa MS 検出器による HILIC-FLR-MS は、バイオ医薬品の *N* 型糖鎖プロファイルをモニターするための比類のないソリューションを提供します。

参考文献

1. Lauber, M. A.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Guthrie, E.; Magnelli, P.; Taron, C. H.; Fountain, K. J., HILIC 分析のための新規蛍光・MS検出標識試薬による遊離 *N* 型糖鎖の迅速サンプル調製法 Waters Application Note 720005275JA 2015.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、QDa、ACQUITY UPLC、Empower、SYNAPT、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
GlycoWorks および *Rapi*Fluor-MS 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。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年6月 720005352JA PDF