[TECHNOLOGY BRIEF]

ワイドポアAmide固定相を用いた高分子量 *N* 結合型糖鎖のHILIC分離におけるピークキャパシティ向上

Matthew A. Lauber and Stephan M. Koza

目的

*Rapi*Fluor-MS™ 標識高分子量 *N* 結合型糖鎖の分離に ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide 300 Åカラムを用いた分離向上を実証すること

背景

タンパク質のグリコシル化は、糖タンパク質から糖鎖を切り出し、一般的に蛍光および MS で検出可能な *Rapi*Fluor-MS 等で標識して分析されます [1]。これら遊離して標識した *N* 結合型糖鎖は、その用途のために設計された Glycan BEH Amide、130 Åカラムを用いて UPLC® HILIC 分離により高分離分析を達成できます [2]。興味深いことに、タンパク質のグリコシル化は非常に多様です。モノクローナル抗体は相対的に低分子量（1-3 kDa）の二分岐構造で修飾される傾向にあるのに対し、多くのバイオ医薬品タンパク質は比較的高分子量（3-6 kDa）の三分岐もしくは四分岐構造の糖鎖を発現します。このような分子量が大きく多分岐の糖鎖構造は、大きなストークス半径を示します。

ワイドポア Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラムは *Rapi*Fluor-MS 標識した三分岐および四分岐 *N* 結合型糖鎖の分離を向上

結果として、標準的な平均ポアサイズ（80-150 Å）のパーティクルを充填したクロマトグラフィーカラムの適用は、これら糖鎖種の分離において制限となります。そのため、大きな構造をもつ分析種が固定相のポアの大半にアクセスできる平均ポアサイズの大きな固定相を使用することは有用です。さらに、大きな構造の標識糖鎖は、ワイドポア固定相においてポアを移動する際に拡散を制限されにくい傾向にあります [3-4]。本テクノロジーブリーフでは、平均ポアサイズが 300 Å（Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm）のアミド固定相の有用性と、*Rapi*Fluor-MS 標識した組み換えヒト Factor Ⅸ由来の三分岐および四分岐 *N* 結合型糖鎖の分離向上について実証しました。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

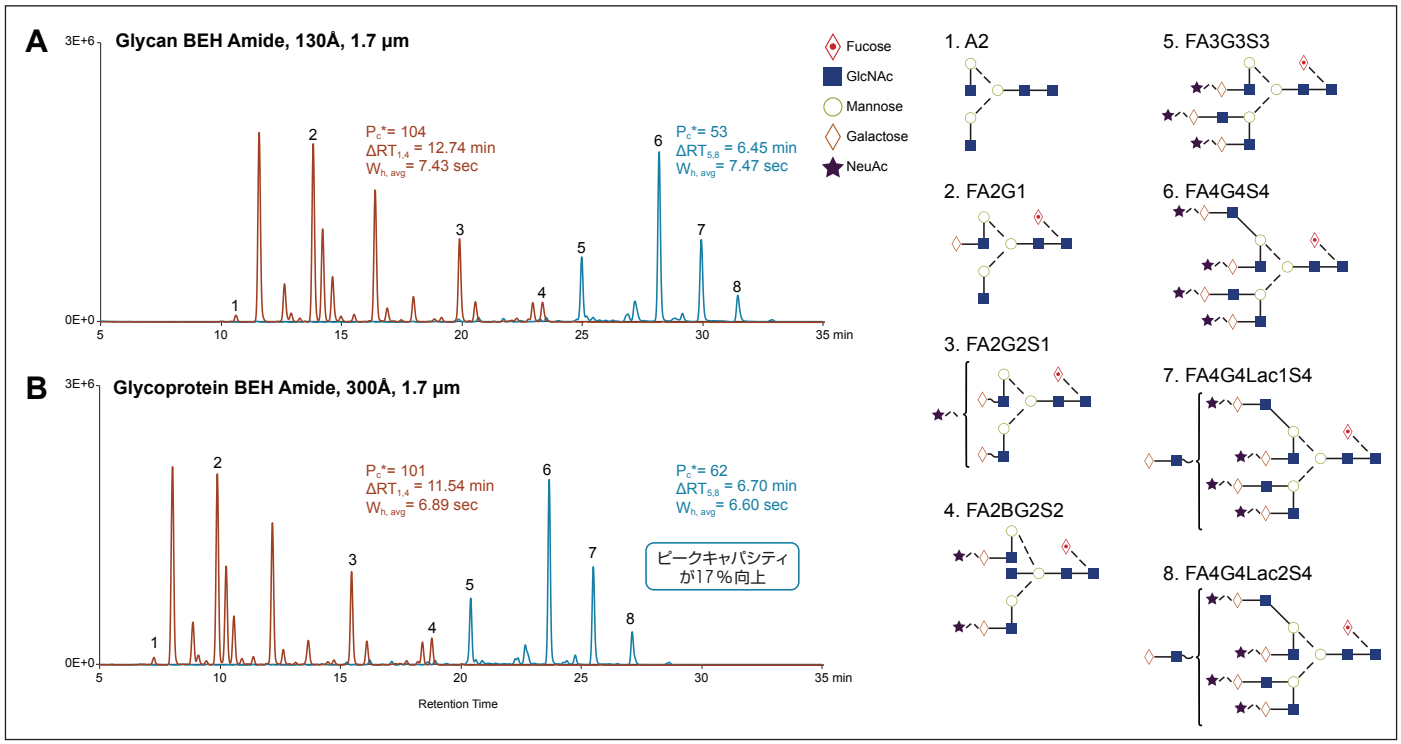

図 1. プールしたヒト IgG（オレンジ）および組み換え Factor Ⅸ（青）由来 N 結合型糖鎖の RapiFluor-MS 標識体 HILIC 蛍光クロマトグラム。（A）0.4 µg のタンパク質から得られた糖鎖の ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm カラムでのクロマトグラム。（B）0.4 µg のタンパク質から得られた糖鎖の ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å , 1.7 µm, 2.1 × 150 mm カラム分離クロマトグラム。GlycoWorks™ RapiFluor-MS Care & Use Manual（7150004793）の条件に従って分離を実施。ピークキャパシティは、表示したピークの半値幅および保持ウィンドウから計算。

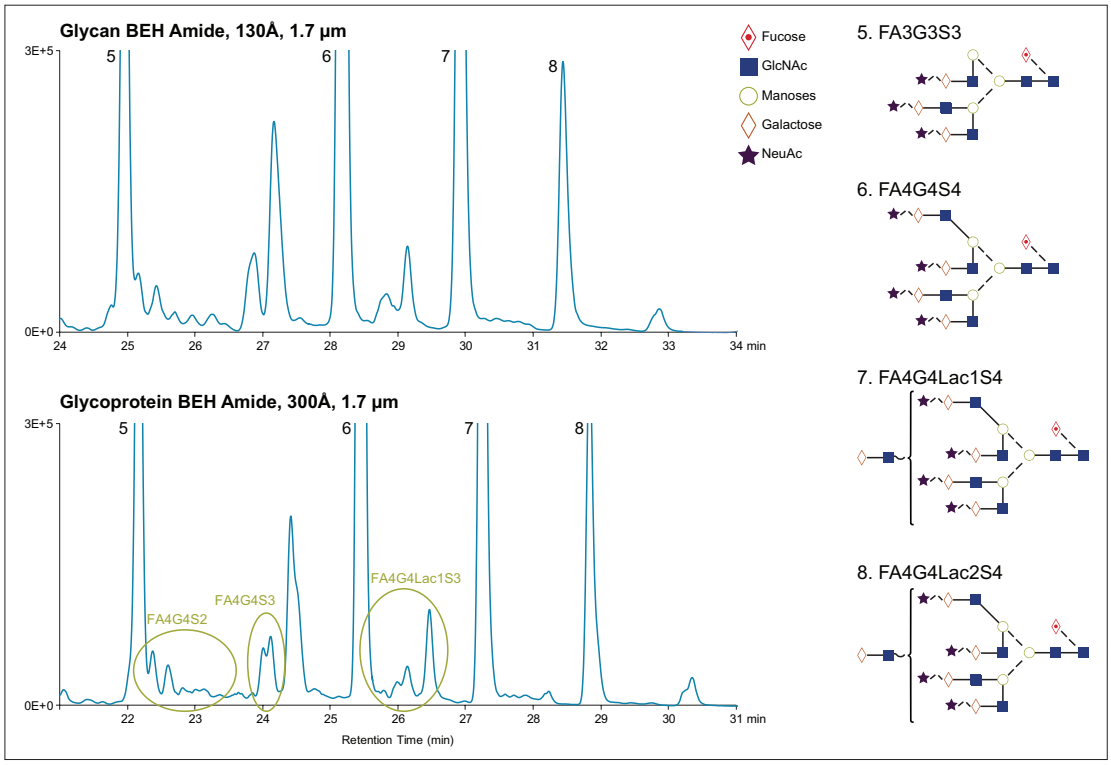

図 2. 複数のアミド結合固定相の 2.1 × 150mm カラムを用いた RapiFluor-MS 標識組み換え Factor Ⅸ由来 N 結合型糖鎖の HILIC 蛍光クロマトグラム。ピークキャパシティは、表示したピークの半値幅および保持ウィンドウから計算。

ソリューション

プールしたヒト IgG および組み換えヒト Factor Ⅸ（分子量が大きく、高度にシアリル化された *N* 結合型糖鎖で修飾されていることが知られる糖タンパク質の 1 つ）から *N* 結合型糖鎖を調製しました [5]。具体的には、これらのサンプルは、GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS Care & Use Manual に記載の通り、迅速な脱グリコシル化、*Rapi*Fluor-MS 標識、µElution HILIC プレート精製により調製しました [1,6]。得られた *Rapi*Fluor-MS 標識 *N* 結合型糖鎖の糖鎖マッピングはまず、汎用の糖鎖分析と GlycoBase データベースサーチ [7] のために設計された、Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 µm カラムを用いて行いました。図 1A は、親水性の低い IgG *N* 結合型糖鎖（オレンジ）を含むサンプルと、その後ろに溶出するより親水性の高い Factor Ⅸ由来の *N* 結合型糖鎖（青）を含むサンプルを比較した HILIC ベースクロマトグラフィーの蛍光クロマトグラムを示しています。さらに、図 1A には、2 種類のサンプルの保持ウィンドウにおける有効ピークキャパシティを示しています。これらの結果は、300 Å ワイドポア固定相を充填した Glycoprotein BEH Amie カラムにより得られたクロマトグラムとピークキャパシティを示した図 1B と比較できます。ワイドポア Glycoprotein BEH Amide 300 Å、1.7 µm カラムを使用した場合、IgG *N* 結合型糖鎖の有効ピークキャパシティは同等であるのに対し、Factor Ⅸの *N* 結合型糖鎖の分離はピークキャパシティが約 17%と著しく向上しました。高分子 *N* 結合型糖鎖に対するワイドポア BEH Amide カラムの分離能力は顕著で、存在率の低い糖鎖種の分離が促進されます。図 2 には、FA4G4S2、FA4G4S3、FA4G4Lac1S3 *N* 結合型糖鎖の分離が向上している、クロマトグラムのピークの多い部分について抜粋して示しました。要約すると、より小さい二分岐の *N* 結合型糖鎖を分離する際には、表面積が大きく保持の強い Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 µm 固定相が最良の選択です。しかしながら、より大きい、三分岐および四分岐 *N* 結合型糖鎖の特性解析には、ワイドポアアミド固定相の使用が有用です。さらに、ワイドポアアミドカラムは特に大きい生体高分子の分離を目的としています。ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å、1.7 µm 固定相は、インタクトタンパク質レベルでのリボヌクレアーゼ B（RNase B）グライコフォームの分離（クロマトグラフィー分離例は参考文献 8 を参照）などの厳しい品質管理試験により一貫したバッチ間性能を確保しています。

まとめ

高分子量の三分岐および四分岐 *N* 結合型糖鎖は、高度に分岐した構造で比較的大きなストークス半径を持ちます。これら大きな構造について最適な HILIC 分離を達成するために、ワイドポアアミド結合固定相、Glycoprotein BEH Amide 300 Å、1.7 µm カラムを提案します。大きな分析種について、従来のポアサイズのカラムに対しこのカラムは約 17%ピークキャパシティが向上します。非常に複雑な糖鎖プロファイルという特徴を示すこの分離スペースにおいて分離能の向上は非常に有用です。中でも注目すべき点として、組み換え凝集素抗体 Factor Ⅸ、エリスロポエチン、ダルベポエチン等の非常に複雑な *N* 結合型糖鎖構造が発現する生体高分子の特性解析およびルーチンモニタリングにこの分離の向上が非常に有用です。

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., Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Novel Fluorescence and MS-Active Labeling Reagent. Waters Application Note 720005275EN 2015.
2. Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Gilar, M., UPLC-FLR Method Development of 2-AB Labeled Glycan Separation in Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). Waters Application Note 720003238EN 2010.
3. Gustavsson, P.-E.; Larsson, P.-O., Support Materials for Affinity Chromatography. In Handbook of Affinity Chromatography, Hage, D., Ed. Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2006; pp 15–33.
4. Renkin, E. M., *J. Gen. Physio.* 1954, (38), 225.
5. Yu, Y. Q., Analysis of N-Linked Glycans from Coagulation Factor IX, Recombinant and Plasma Derived, Using HILIC UPLC/FLR/QTof MS. Waters Application Note 720004019EN 2011.
6. GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS N-Glycan Kit Care and Use Manual 715004793EN.
7. Campbell, M. P.; Royle, L.; Radcliffe, C. M.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M., GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* 2008, 24 (9), 1214–6.
8. Lauber, M. A.; Koza, S. M., Developing High Resolution HILIC Separations of Intact Glycosylated Proteins using a Wide-Pore Amide-Bonded Stationary Phase Waters Application Note 720005380EN 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 UPLC、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。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年 8月 720005381JA PDF