[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

*Rapi*Fluor-MS および ACQUITY QDa 検出器を使用したプロセス開発時の遊離 *N*-型糖鎖プロファイルの迅速モニタリング

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

アプリケーションのメリット

- 製造中の糖鎖プロファイルの迅速なフィードバックによる製品品質の確保
- 遊離 *N* - 型糖鎖の前処理時間の短縮
- *N* - 型糖鎖分析のスループットの向上
- 質量検出との組合せによる *N* - 型糖鎖種の特異性確認

ウォーターズのソリューション

*Rapi*Fluor-MS™ Glycan Performance Test 標準液 (p/n 186007983)

ACQUITY® QDa® 検出器

ACQUITY UPLC® H-Class Bio システム (FTN)

ACQUITY UPLC 蛍光検出器 (FLR)

ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide カラム

Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア

Waters® フラクションマネージャ (WFM-A)

キーワード

糖鎖、質量検出、H-Class、ACQUITY、QDa、*Rapi*Fluor-MS、IgG

はじめに

糖鎖が付加したバイオ医薬品は開発パイプラインの中でも構造変動しているため、糖鎖プロファイルおよび *N*-型糖鎖の特性解析が行われます。さらに、新規のタンパク質治療薬の開発は進歩し続けているため、スケールアップ時には製造条件を慎重に研究・評価し、臨床試験および最終的な商品化に向けての準備では安定した安全性と有効性を確保する必要があります。

このプロセスの一環として重要品質特性について詳細なモニタリングを頻繁に行って、製造バッチが規定の合格基準内にあることを確認するとともに、クオリティ・バイ・デザイン (QbD) アプローチの一部ともなるこれらの重要なパラメーターを特定します。特に *N* - 型糖鎖プロファイルは、タンパク質バイオ医薬品の安全性および有効性に関して糖鎖が重要であるために、詳細にモニタリングされます。

遊離 *N*-型糖鎖プロファイルのモニタリングは、以前から労力がかかるサンプル前処理が重荷となっていて、数時間から数日を要することもあります。このため、製造条件が *N*-型糖鎖プロファイルに及ぼす影響のモニタリングは困難になっています。さらに遊離された標識 *N*-型糖鎖の分析には、往々にして長い分析時間を必要とします。特異的構造のモニタリングが要求される場合には、ユーザーはしばしば同定および定量のために光学的検出を用います。

本アプリケーションノートでは、遊離 *N*-型糖鎖を迅速に標識するための新規試薬である *Rapi*Fluor-MS の使用について紹介します。*Rapi*Fluor-MS により、遊離 *N*-型糖鎖サンプルの全ての前処理時間を 30 分までに短縮するとともに、従来の標識手法に比べて蛍光シグナルは最大 14 倍、MS 検出シグナルは最大 1000 倍向上します。サンプル前処理時間の短縮とともに、高分離クロマトグラフィー分析法の全サイクルタイムを 10 分まで規則的にスケール変更しました。そして、ACQUITY QDa 検出器を組み合わせることで、共溶出した場合でもモニタリング糖鎖種の選択手段となる選択イオンレコーディング (SIR) を使用することで、特異糖鎖のモニタリングを行うことができます。このアプリケーションノートでは、*Rapi*Fluor-MS と ACQUITY QDa 検出器を組み合わせることにより、重要なデータを迅速かつ効率的に取得するための強力なソリューションが得られることについて説明します。

実験方法

遊離 *N*- 型糖鎖は、*Rapi*Fluor-MS サンプル前処理キットのプロトコールに従って、市販のトラスツズマブから前処理しました。添加実験で使用したハイマンノース種を、*Rapi*Fluor-MS による遊離および標識の後に RNase-B から分離しました。マンノース (M5) 種をクロマトグラフィーで分離し、Waters フラクションマネージャ (WFM-A) を使用して回収しました。回収したサンプルは CentriVap を使用して乾燥し、水に再溶解しました。各分析におけるロード量は、遊離した標識 N- 型糖鎖としてオンカラムで約 32 pmol でした。LC-MS グレードのアセトニトリルおよび水は Pierce 社から購入しました。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 (P/N 186007081) を使用して、1 L の水に溶液全部を注いで調製し、混合しました。UPLC® システムは、質量検出器内の付加体形成の可能性を少なく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ものを使用しました。

LC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class Bio

検出器： ACQUITY UPLC FLR
ACQUITY QDa

カラム： 高分離法：
ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、
130Å、1.7 µm、2.1 mm × 150 mm
(P/N 186004742)

ハイスループット法：
ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、
130Å、1.7 µm、2.1 mm × 50 mm
(P/N 186004740)

カラム温度： 60 ℃

サンプル温度： 10℃

FLR 設定

サンプリングレート： 5 points/ 秒

励起波長： 265 nm

蛍光波長： 425 nm

QDa設定

サンプリングレート：5 points/ 秒

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： 400℃

モード： 正イオン

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、ギ酸アンモニウム濃縮液)

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)

グラジエントテーブル 高分離法：

時間	流量 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
初期値	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

グラジエントテーブル ハイスループット法：

時間	流量 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
初期値	0.800	75	25	0	0
5.8	0.800	54	46	0	0
6.1	0.400	0	100	0	0
6.6	0.400	0	100	0	0
7.1	0.400	75	25	0	0
8.0	0.800	75	25	0	0
10.0	0.800	75	25	0	0

データ管理

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア (CDS)

結果および考察

遊離 *N*-型糖鎖の特性解析において、高分離法はサンプルに存在する分析種の正確な同定および定量のためによく使用されます。これらの方法は効果的にスケール変更できますが、同じクロマトグラフおよび粒子径カラムを使用する場合には、全分析時間が減少するにつれて、対応する分離能の損失が生じます。往々にして、速度のメリットが実現される場合には一部の分離能の損失は許容されますが、重要な構造は明確に同定できる分離能は維持されなければなりません。図 1 に示されているように、高分離の 55 分の分析法から 10 分のハイスループット分析法へ移管することにより、*N*-型糖鎖種間の分離能の多くは維持されますが、短時間の分析法へ移行した場合には、図中に示されたピーク間の分離能の損失が生じます。この分離能の損失により、2 種間の識別ができないため、光学的検出による正確なモニタリングが困難になります。

MS の感度向上により、他の検出器に追加する形態で ACQUITY QDa 検出器を導入し、サンプル内に存在するそれぞれの分析種の選択的モニタリング（SIR）を行いました。ACQUITY QDa 検出器の SIR 機能を使用することにより、各成分の独立したクロマトグラムを取得でき、光学的検出のみ使用することの困難を克服できました。図 2 に示されているように、SIR を使用することにより、さまざまなグリコフォーム間の明確な識別ができました。それぞれの分析種について、対応するピークまたは分離された位置異性体を有する複数の糖鎖種の複数のピークを明確に識別し、定量化のためのデータ解析ができました。

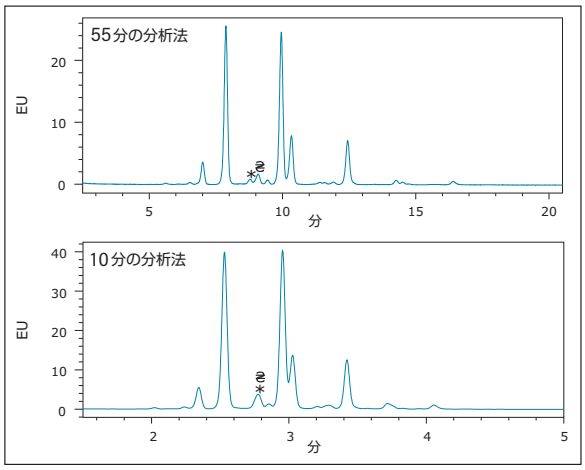

図 1. 高分離法（上のクロマトグラム）は、グラジエントを規則的にハイスループット法に合わせてスケール変更し、カラム長および流量を減少させました。分離能は低下していますが、選択性は一定のままです。

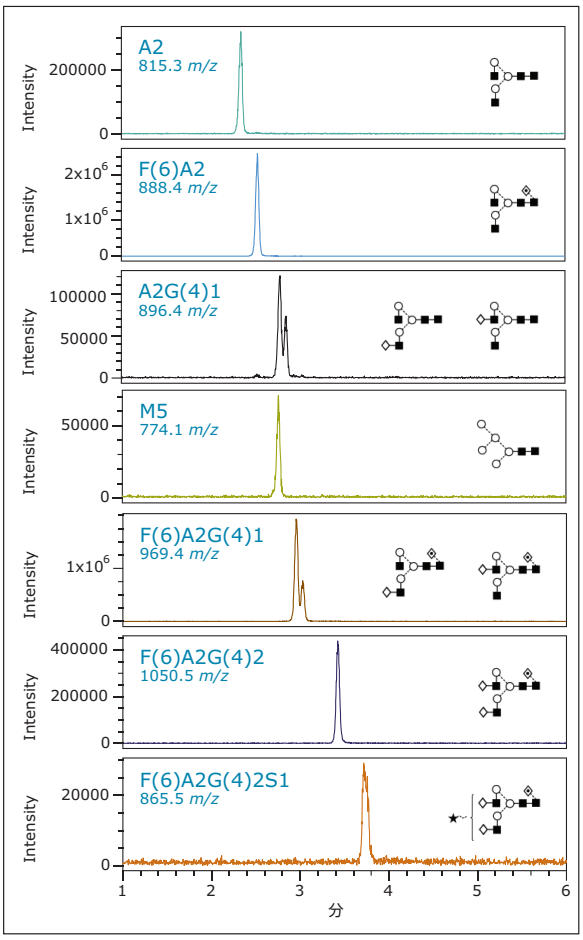

図 2. ハイスループット法を使用して分離された N- 型糖鎖種の選択イオンクロマトグラム。共溶出している M5 と A2G（4）1 は、質量検出により容易に識別できます。

開発したハイスループット法および質量検出により特定種を選択的にモニタリングできる能力により、目的の *N*-型糖鎖種のマンノース 5（M5）の直線性を調べました。実験方法のセクションで説明したとおり、*Rapi*Fluor-MS により標識された M5 種を、RNAse-B の標識 *N*-型糖鎖プールから分離しました。回収後、回収した物質を乾燥し、水に再溶解しました。再溶解したサンプルを、さまざまな濃度のトラスツズマブの *Rapi*Fluor-MS 標識遊離 *N*-型糖鎖サンプルに添加しました。サンプルに添加した量に関して M5 のピーク面積を選択的にモニタリングすることにより直線性を調べました。図 3 に示されているように、クロマトグラフィー再現性はきわめて良好でした。さらに、添加したそれぞれの量についてのピーク面積の直線性は非常に良好で（図 4）、質量検出器が定量に適したレスポンスを示していることを強く示唆しています。

添加した M5 種の直線性を測定した後に、M5 の相対量が増加しているバイオリアクタープロセスのシミュレーションを行いました。この研究については、相対定量化のための標準として A2G1 種を選択し、量が増加している M5 に添加しました。図 5 に示されているように、A2G1（右列）の量はこの実験の間中ほぼ一定のままでしたが、M5 種（中央列）は添加量の増加とともに予想されたとおり増加しました。さらに、蛍光クロマトグラム（左列）によりこれら 2 つの種（標識ピーク）のピーク面積の増加が示されていますが、質量情報がなければ、この増加の正確な原因は判断できません。

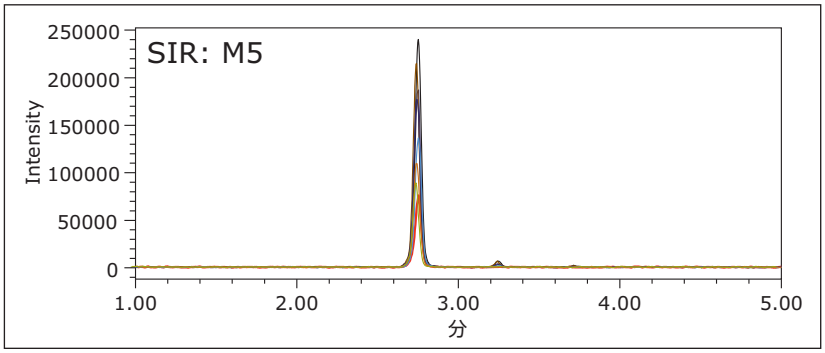

図 3. M5 スパイクレベル（spike level）の範囲でのクロマトグラムの重ね書き。再溶解した M5 1～6 µL の範囲での添加量。絶対濃度は求められませんでした。

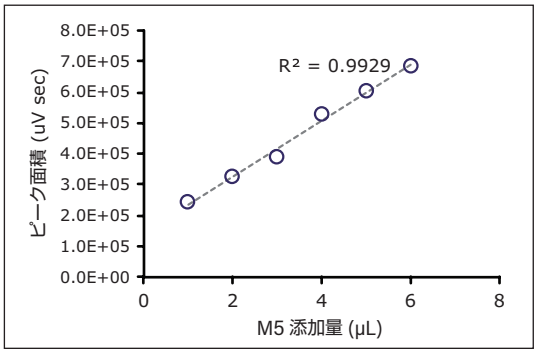

図 4.M5 スパイクサンプルにおける M5 添加量とピーク面積（図 3 に示されているデータ）のプロット。

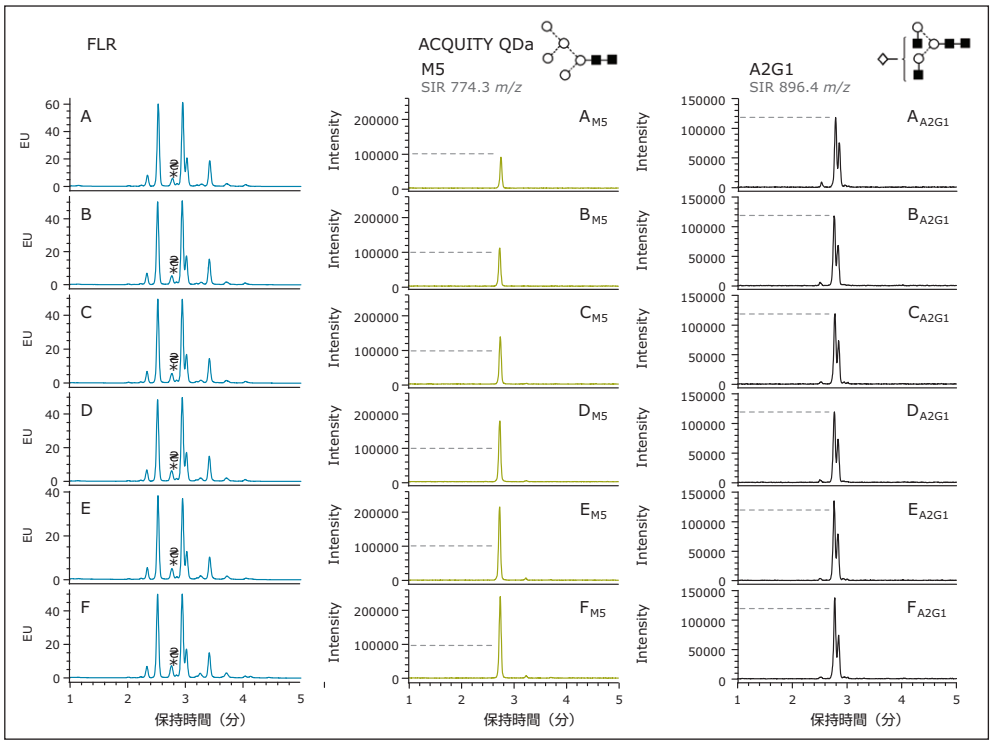

図 5. 共溶出している糖鎖構造の SIR 。

左：トラスツズマブ N-型糖鎖の蛍光プロファイルと M5 の増加（A - F）。図中のインディケーターは、共溶出する糖鎖 M5 および A2G1 の保持時間を示します。

中央：糖鎖サンプル A ～ F それぞれについての M5 の SIR 。

右：共溶出している構造、A2G1 についての SIR 。ACQUITY QDa SIR を使用することにより、蛍光プロファイルにおけるピーク面積の変化の原因である糖鎖構造の判定を迅速に行うことができます。

結論

ACQUITY UPLC H-Class Bio システムおよび ACQUITY QDa 検出器と *Rapi*Fluor-MS を併用することにより、日常的なハイスループット分析において、まったく新しいアプローチによる遊離 *N*-型糖鎖の正確なモニタリングが実現します。ACQUITY UPLC および ACQUITY QDa と併用することにより、サンプル前処理の時間が短縮するだけでなく、MS の感度も大幅に向上することで、従来は不可能であった遊離 *N*-型糖鎖プロファイルのさらに詳細なモニタリングが可能になります。ここでの例では蛍光検出器（FLR）を使用しましたが、相対的定量化のみを必要とするハイスループット法では、それぞれの糖鎖種は ACQUITY QDa 検出器によりモニタリングできるため FLR は必要ない可能性があります。ここで説明する手法のサンプル前処理と分析は 40 分で行うことができます。再現性のあるサンプル前処理に加えて、分離および定量分析は再現性と定量性を備えており、研究者が重要な決定を迅速に行うことを可能とします。

参考文献

1. Lauber MA, Brousmiche DW, Hua Z, Koza SM, Guthrie E, Magnelli P, Taron CH, and Fountain KJ. Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Novel Fluorescence and MS-Active Labeling Reagent. 2015, Waters Application Note P/N 720005275EN.

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、UPLC、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
*Rapi*Fluor-MS および Multi-flow path 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12月 720005438JA PDF