

シンプルウェスタンを用いてハイスループットで糖鎖のキャラクタリゼーション

序論

治療用タンパク質の品質、有効性、および安全性を評価する上で、糖鎖（グリカン）の特性解析は非常に重要で、製品のライフサイクルを通してモニターされなければなりません。しかしながら、糖構造の複雑に加え、HPLCおよび質量分析などの通常行われる糖鎖分析手法は高度な専門知識を要するため、タンパク質のグリコシル化の分析は困難であることが少なくありません。その上、糖鎖を放出/解離または誘導体化するための酵素処理（消化）または化学処理によるタンパク質の改変は、最終分析時に考慮しなければならない要因であり、すべての糖鎖が放出または改変されていない場合には不完全な評価をもたらす可能性もあります。近年、レクチンマイクロアレイが、一連の治療用タンパク質の糖鎖プロファイルを作成するのに利用されています¹。これにより糖タンパク質の迅速なスクリーニングを行えますが、どの電荷アイソフォームがどの糖鎖構造を含むかに関する情報は得られません。ここでは、Peggy Sue[™]を使って糖鎖プロファイルと電荷もしくは分子量の違いによる不均一性を同時にスクリーニングする新たな全自動ハイスループットの方法について説明します(図1)。両方(電荷と分子量)の分析方法を一つの装置に組み合わせたことにより、治療用抗体などの糖タンパク質の重要な属性を簡単にスクリーニングすることができます。実際には電荷と分子量に基づいたシンプルウェスタンを行うだけです。また、Wes[™]を使って分子量でタンパク質を分離して糖鎖を

スクリーニングする方法もあわせて紹介します。

ワークフロー

材料

プロテインシンプル

- 測定装置: Peggy Sue と Wes
- XDR Charge Separation Master Kit for Peggy Sue (PN CBS2001)
- 12-230 kDa Wes Separation Module (PN SM-W004)
- Biotin Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue (PN DM-004)
- Anti-Human IgG Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue (PN DM-005)
- Premix G2, ampholyte-free separation gradient (PN 040-967)
- pI Standard Ladder 3 (PN 040-646)
- pI Standard, 9.7 (PN 040-790)
- cIEF 500 mM Arginine (PN 042-691)
- Wes Wash Buffer (PN 042-202)
- EZ Standard Pack 5 (PN PS-ST05EZ-8)
- Total Protein Detection Module for Wes, Peggy Sue or Sally Sue (DM-TP01)

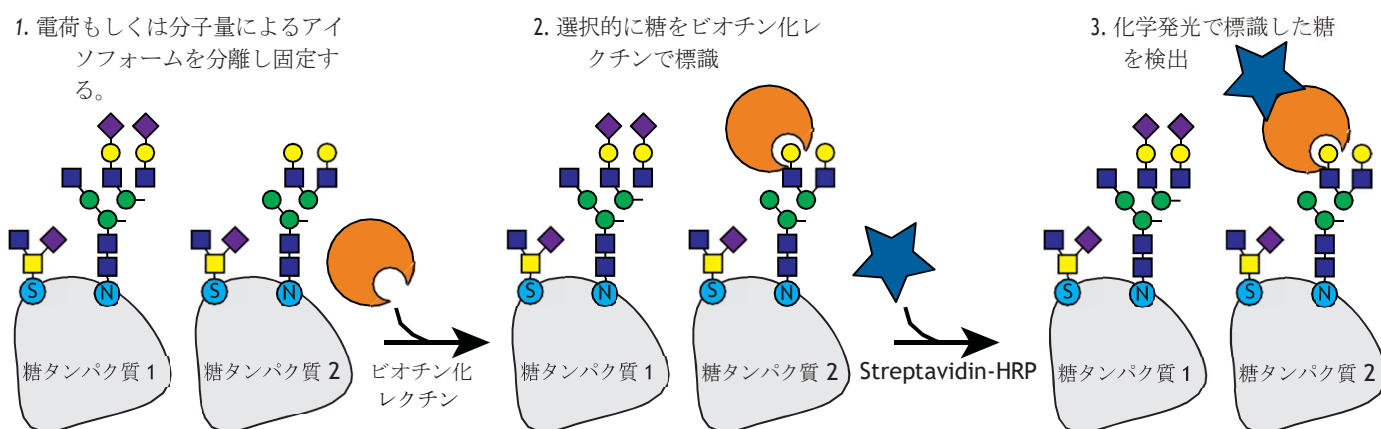


図1. ビオチン化レクチンとHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識ストレプトアビジンを用いるPeggy Sueでの糖タンパク質検出の模式図。タンパク質のアイソフォームを電荷または分子量の違いにより分離し、ビオチン化レクチンをタンパク質上の炭水化物に選択的に結合させます。最後に、結合したレクチンをHRP標識ストレプトアビジンで検出します。

その他の材料

- SERVALYT™ pl 2-11 と pl 7-9 (SERVA Electrophoresis GmbH, PN 42907.02 と 42900.02)
- Biotinylated Lectin Kits I & II (Vector Laboratories, PN BK-1000 と BK-2100)
- Protein Deglycosylation Mix II (New England Biolabs, PN P6044)
- PNGase F (New England Biolabs, PN P0704)

サンプル

- アダリムマブ (Adalimumab:ADA、(ヒュミラ:Humira®))、トラスツズマブ (Trastuzumab (ハーセプチン:Herceptin®))、そして NIST モノクローナル抗体 (RM 8671) など全ての抗体は市販品。CandyCane™ Glycoprotein Molecular Weight Standardsは Thermo Fisher Scientific (C21852) から購入。

レクチンの糖鎖エピトープ

レクチン	糖鎖エピトープの選択性
Concanavalin A (Con A)	高マンノース、αMan、αGlc
Dolichos biflorus (DBA)	αGalNAc
Lens culinaris (LCA)	高マンノース、αMan、αGlc
Peanut (PNA)	GalB3GalNAc
Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin (PHA-E)	GalB4GlcNAcB2Manα6、ManB4
Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin (PHA-L)	GalB4GlcNAcB6、Manα3
Pisum sativum (PSA)	高マンノース、αMan、αGlc
Ricinus communis I (RCA I, RCA ₁₂₀)	Gal
Soybean (SBA)	αBGalNAc
Ulex europaeus I (UEA I)	αFuc
Wheat germ (WGA)	GlcNAc

表 1. このテクニカルノート上の全てのレクチンは、Biotinylated lectin kitに含まれています。糖の略語: Fuc (L-フコース)、Gal (D-ガラクトース)、GalNAc (N-アセチルガラクトサミン)、Glc (D-グルコース)、GlcNAc (N-アセチルグルコサミン)、Man (マンノース)。

方法

電荷および分子量の違いによるシンプルウェスタン・レクチンプロットは、Peggy SueおよびWesの製品添付文書に記載されている標準プロトコールに従って行い、ビオチン化レクチンを一次抗体の代わりに使用します。糖鎖に結合したビオチン化レクチンはStreptavidin-HRPで検出します。

方法1: シンプルウェスタン電荷レクチンプロット

- サンプル調製: 電荷の違いによるタンパク質の分離は、4% ServalYT™ (3% pl 7-9, 1% pl 2-11) と 40 mM Arginine を懸濁した G2 ampholyte free mixで行います。全てのモノクローナル抗体は1.0 μg/mLで測定しました。pl Standard Ladder 3 (4.9、6.0、6.4、7.0、7.3) と pl Standard 9.7を使用します。

例えば、タンパク質サンプルの保存濃度が100 μg/mLで、終サンプル容量を200 μLで調整する場合:

- 溶液1の準備: 150 μLのG2 ampholyte free mix、16 μLのArginine、2 μLの2-11 ServalYT と6 μLのpl 7-9 ServalYTを混合します。
- 溶液2の準備: 20 μLの脱イオン水、3 μLのpl standard ladder 3、1 μLのpl marker 9.7と2 μLのタンパク質を混合します。
- 溶液1と溶液2を混合します。
- 脱グリコシル化: 製品説明書に従って、濃度1 mg/mLのサンプルをProtein Deglycosylation Mix IIで37 °Cで16時間インキュベートし、サンプルを脱グリコシル化します。ネガティブコントロールとして、Protein Deglycosylation Mix IIの代わりにDeglycosylation Mix Buffer 1を加えて同一条件でサンプルを処理します。
- フォーカシング条件を50分21000 μWもしくは測定するタンパク質に最適な条件に設定します。
- 全てのレクチンをWes Wash Buffer (PN 042-202)で20 μg/mLに希釈し、120分間、1次抗体として使用します。
- 糖鎖検出に調製済みのStreptavidin-HRPを使用します。モノクローナル抗体検出に調製済みのAnti-Human IgG Secondary HRP antibodyを使用します。インキュベートする時間は60分です。
- タンパク質のキャピラリー内壁への固定、抗原抗体反応および検出はPeggy Sue製品インサートに記載されているデフォルト条件に従います。

方法2: シンプルウェスタン分子量レクチンプロット

- 終濃度40 μg/mLのCandyCane MW Standardsを準備します。製品説明書に従い濃度100 μg/mLのNISTモノクローナル抗体をPNGase Fで処理します。未処理のサンプルとして、PNGase Fの代わりに水を加えます。NISTモノクローナル抗体をCon Aで測定するのに、サンプルを0.1X Sample Bufferで1 μg/mLに調製します。全てのサンプルを95 °C、5分間熱変性します。
- レクチンをWes Wash Buffer (PN 042-202)で20 μg/mLに希釈し、一次抗体の代わりに使用します。
- 調製済みのStreptavidin-HRPを二次抗体として使用します。
- レクチンでプローブするサンプルでは、Antibody Diluent 2の代わりにWash Bufferでブロッキングし、その他、タンパク質のキャピラリー内壁への固定、抗原抗体反応および検出は、WesもしくはPeggy Sue製品インサートに記載されているデフォルト条件に従います。

結果

方法 1: シンプルウェスタン電荷レクチンプロット

上記のワークフローに従って、Peggy SueでNIST モノクローナル抗体の糖鎖プロファイルの特性分析を行いました。NISTモノクローナル抗体はマンノース、フコースおよびGalNAcで修飾されていることが知られています²。予想通り、これらの糖を選択的に結合するビオチン化レクチンの存在を検出する化学発光シグナルを検出しましたが、NISTモノクローナル抗体上に存在しない糖に特異的なシグナルは検出されませんでした(図2)。興味深いことに、NISTモノクローナル抗体のマンノースに結合するレクチン(ConA, PSA、およびLCA)での検出では、抗ヒトIgG抗体で検出した場合やMauriceでNISTモノクローナル抗体を泳動し、直接検出(A_{280nm})した際に作成したピークプロファイルと同様の分離プロファイルを示し(Data not shown)、マンノース基は、NISTモノクローナル抗体の全ての電荷アイソフォーム上に存在していることを示唆しました。表2では、各レクチンおよび抗ヒトIgG抗体で検出した相対ピーク面積の百分率を示しています。

次に、脱グリコシル化酵素で処理後、糖を検出できるかどうか

か検証しました。NISTモノクローナル抗体をProtein Deglycosylation Mix II (New England Biolabs)で処理し、次にPeggy Sueで分析しました。NISTモノクローナル抗体の抗ヒトIgG抗体による検出では、電荷の違いによる分離に有意な変化を引き起こし、これは、酵素反応による脱グリコシル化はその分子構造に有意に影響を及ぼし、電荷アイソフォームに変化を引き起こすことを示していました。マンノースに特異的に結合するレクチンで検出するとシグナルは検出されず、マンノースは完全に除去されたことを示唆していました(図3)。さらに、他の糖と結合するレクチンで検出すると、未処理のそれに比べてピークの減少や新たなピークも明らかになりました。これはおそらく不完全な脱グリコシル化のためと考えられます。コントロールとして、脱グリコシル化酵素非存在下で同様に処理したNISTモノクローナル抗体では、電荷の違いによる分離プロファイルに変化がほとんどもしくは全くな(図4)、これら電荷プロファイルの変化は主に糖鎖の酵素的除去によるもので、熱処理のためではないということを強く示していました。表3は、熱処理後の各レクチンおよび抗ヒトIgG抗体で検出した時のピーク面積の百分率の変化を示しています。

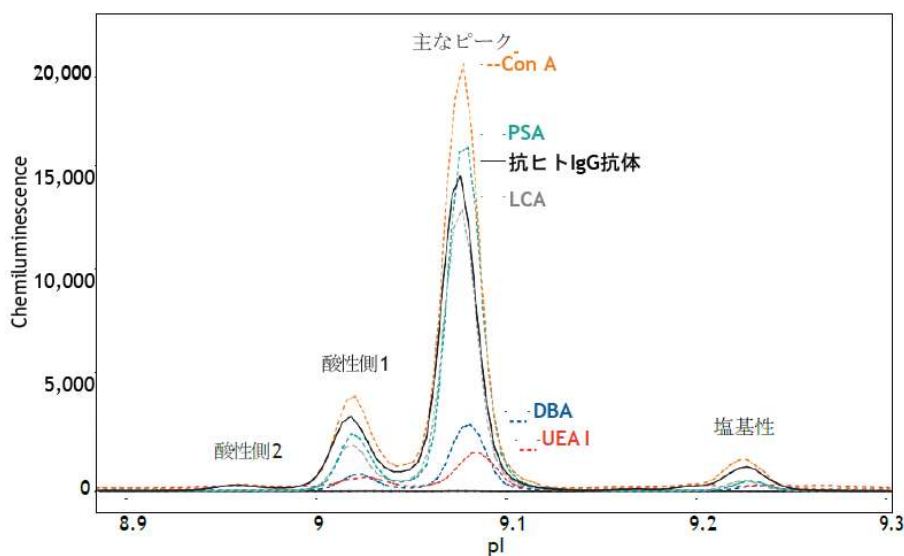


図2. NISTモノクローナル抗体のレクチンと抗ヒトIgG抗体によるピークプロファイル

検出方法	主なピーク (%)	酸性側 1 (%)	酸性側 2 (%)	塩基性側 (%)
抗ヒトIgG抗体	71.4	20.2	1.8	6.6
Con A	76.0	18.2	0.3	5.5
LCA	83.2	14.2	0	2.5
PSA	84.6	13.1	0	2.3
UEA I	80.6	19.4	ND	ND
DBA	77.0	17.9	0	5.1
WGA, PNA, SBA, PHA-L, PHA-E, RCA ₁₂₀	ND	ND	ND	ND

表2. NISTモノクローナル抗体をレクチンと抗ヒトIgG抗体で検出した時のピーク面積の相対的な分布(%). ND = 検出限界以下。

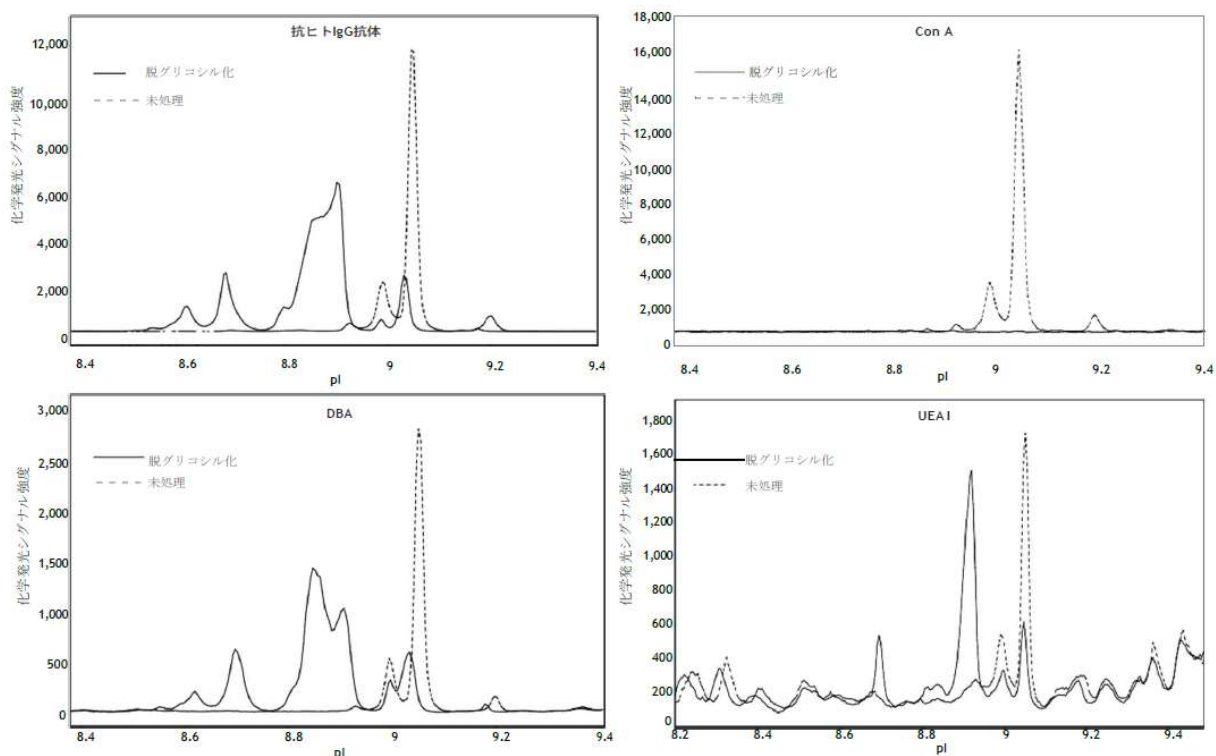


図3.脱グリコシル化後(実線)と未処理(点線)のNISTモノクローナル抗体を比較すると、マンノース、Con A、PSAとLCA (PSA/LCA data not shown)に結合するレクチンに依存するシグナルは減少しており、マンノース基が完全に除去されたことを示唆しています。不完全な脱グリコシル化のために、抗ヒトIgG抗体、DBAおよびUEA Iでの検出プロファイルに新たなピークが現れたものと考えられます。

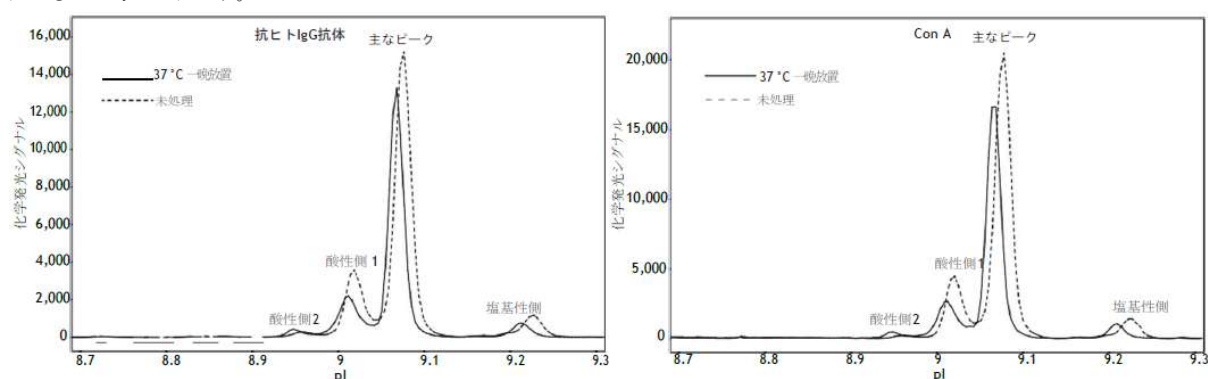


図4 37°CでNISTモノクローナル抗体をインキュベートしても、電荷分離またはレクチン結合プロファイルに有意な変化をもたらさないことを示しています。37°Cで一晩インキュベートした後(実線)と未処理コントロール(点線)のNISTモノクローナル抗体のピークパターンを比較しています。NISTモノクローナル抗体は抗ヒトIgG抗体(左パネル)とConA(右パネル)で検出しました。NISTモノクローナル抗体のピーク分布は、他のレクチンで検出した場合とほとんど変わりはありませんでした(表3)。

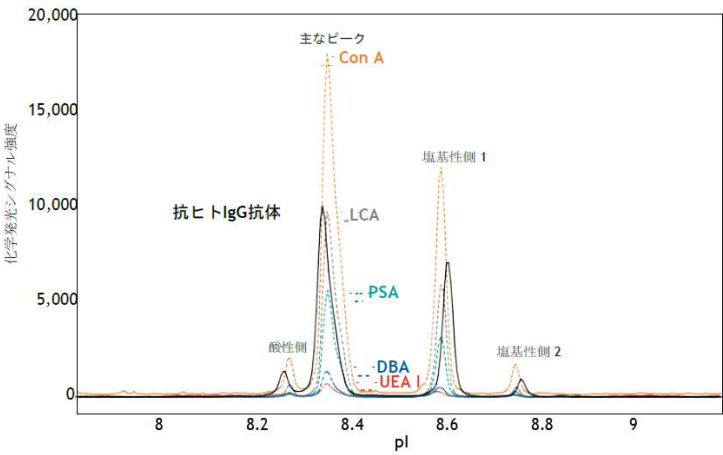
検出方法	主なピーク (% 変化)	酸性側 1 (% 変化)	酸性側 2 (% 変化)	塩基性側 (% 変化)
抗ヒトIgG抗体	2.3	-1.5	0.8	-1.5
Con A	0.5	-0.4	0.8	-0.9
LCA	2.3	-2.4	0	0.2
PSA	2.8	-2.4	0	-0.5
UEA I	-7.2	7.2	ND	ND
DBA	-0.4	1.6	0	-1.2

表3. NISTモノクローナル抗体を37°Cでインキュベートしても、相対的なピーク面積の百分率はほとんど変わらず、熱処理はNISTモノクローナル抗体のレクチン結合プロファイルに影響を与えないことを示しています。ND =検出限界以下。熱処理をしなくても、UREA Iでは酸性側ピーク2と塩基性のピークは検出されませんでした(表2)。

市販の治療用モノクローナル抗体に関する糖鎖・電荷プロファイリングにこのアッセイを使用できるかどうかを検証するために、ヒュミラ(Humira®)およびハーセプチン(Herceptin®)を上記と同じ方法を用いて分析しました。

布は、以前の研究結果と一致する結果を示しました^{3, 4}。表4および5に各レクチンおよび抗ヒトIgG抗体で検出した相対ピーク面積の百分率の要約を示します。

図5. ヒュミラのレクチン結合プロファイル。高マンノース (Con A, LCA, PSA) およびフコース (UEA I) による検出シグナルの分布は、抗ヒトIgG抗体による検出ピークプロファイルと異なるピーク分布を示しています。表4は、ヒュミラを各レクチンで検出した時のピーク面積の相対分布 (%) を示しています。ヒュミラはAbbVieの登録商標です。



検出方法	主なピーク (%)	酸性側 (%)	塩基性側 1 (%)	塩基性側 2 (%)
抗ヒトIgG抗体	60	6	31	3
Con A	60.6	4.3	32.3	2.8
LCA	65.8	2.3	30.4	1.5
PSA	66.8	1.6	30.3	1.3
UEA I	55.5	14.2	24.2	6.0
DBA	68.5	5.2	23.2	3.1

表4. ヒュミラを各レクチンで検出した時のピーク面積の相対分布 (%) を示しています。

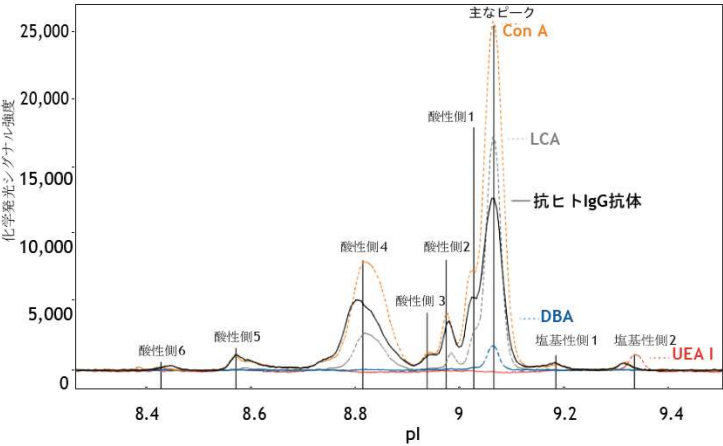


図6. ハーセプチンのレクチン結合プロファイル。ハーセプチンはGenentechの登録商標です。表5は、ハーセプチンを各レクチンで検出した時のピーク面積の相対分布 (%) を示しています。

検出方法	主なピーク (%)	酸性側 1 (%)	酸性側 2 (%)	酸性側 3 (%)	酸性側 4 (%)	酸性側 5 (%)	酸性側 6 (%)	塩基性側 1 (%)	塩基性側 2 (%)
抗ヒトIgG抗体	42.7	9.8	6.9	3.6	29.6	3.5	0.9	1.7	1.2
Con A	53.3	9.1	5.4	2.1	26.3	1.8	0.3	0.7	0.8
LCA	72.6	7.4	3.5	0	16.1	0.3	0	0	0
UEA I	54.6	7.4	5.2	6.8	2.6	13.1	9.8	0.4	0
DBA	91.6	8.4	0	0	0	0	0	0	0

表5. ハーセプチンを各レクチンで検出した時のピーク面積の相対分布 (%) を示しています。

方法 2: シンプルウェスタン分子量レクチンプロット

これまでの結果では、等電点電気泳動で電荷アイソフォームを分離し、どのようにシンプルウェスタンで糖鎖のプロファイリングをできるかを示しました。分子量で分離するレクチンアッセイの有用性を実証するために、**Wes**で市販のグリコシル化したタンパク質およびグリコシル化していないタンパク質の混合物を分析しました。**CandyCane MW Standards** (Thermo Fisher Scientific) の8種類のタンパク質のうち4種類には高マンノースが含まれています。**Wes**を使用しビオチン化**ConA**で**CandyCane**の高マンノースを分析したところ、マンノース含有タンパク質である、 $\alpha 2$ -Macroglobulin、Glucose oxidase、 $\alpha 1$ -Acid glycoproteinおよびAvidinに相当する分子量の違う4つのピークを観察しました(図7A)。**CandyCane**の製品インサートとの比較により、分子量で分離するシンプルウェスタン分子量レクチンプロットが従来のレクチンプロットと同等であることを確認しました(図7B)。

上で述べたように、治療用抗体の電荷アイソフォームに結合する糖鎖を同定するシンプルウェスタン電荷レクチンプロットと同様に、シンプルウェスタン分子量レクチンプロットを用いることによって、還元条件下で重鎖および軽鎖を含めて、抗体の分子量変異体に結合した糖鎖の同定が可能になります。例えば、**NIST**モノクローナル抗体の分析では、**Con A**と**WGA**は重鎖を認識し、比較的程度は低いものの軽鎖も認識するので、これらの糖鎖は抗体の重鎖に優先的に結合することを示唆しています(図8)。コントロールとして、試料中の全てのタンパク質を**Total Protein Kit**で検出しました。予想通り、**NIST**モノクローナル抗体を**PNGase F**で処理すると、**Con A**や**WGA**の結合はなくなりました。これらの結果から、シンプルウェスタンは、複雑で費用や時間のかかる様々な技術を必要とせず、グリコシル化のパターンを簡単にモニターする方法であることがわかります²。

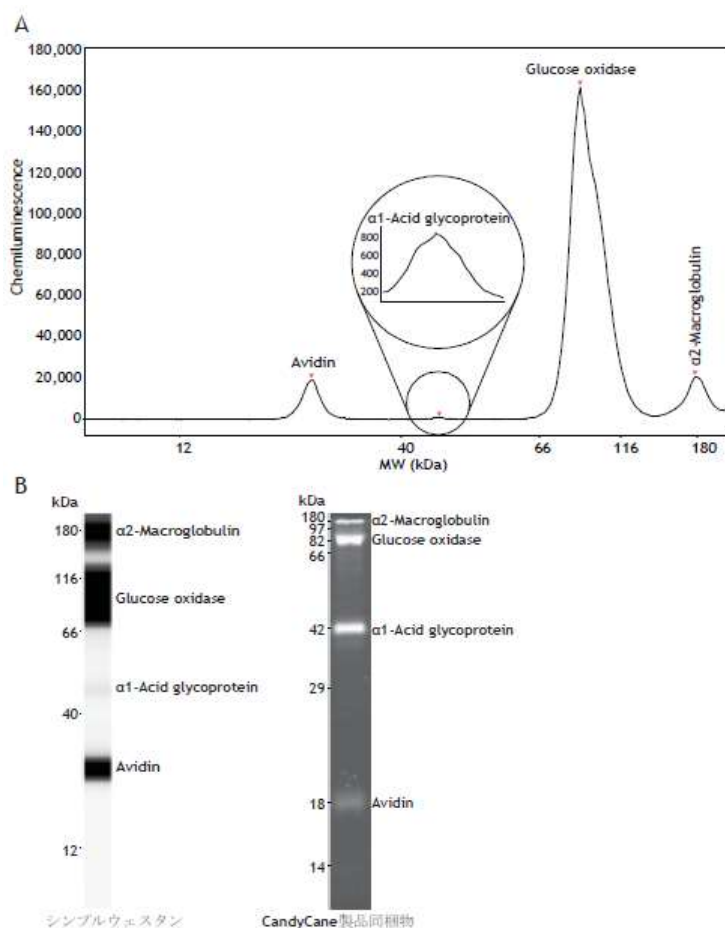


図7. (A) マンノースを含んだCandyCane glycoprotein standardsの**Con A**結合プロファイル。(B) WesのデータとCandyCaneの製品インサートの比較。シンプルウェスタンをつかって**Con A**で検出した4つの糖タンパク質(左)とglycoprotein stain(右)によって検出した4つの糖タンパク質を示しています。

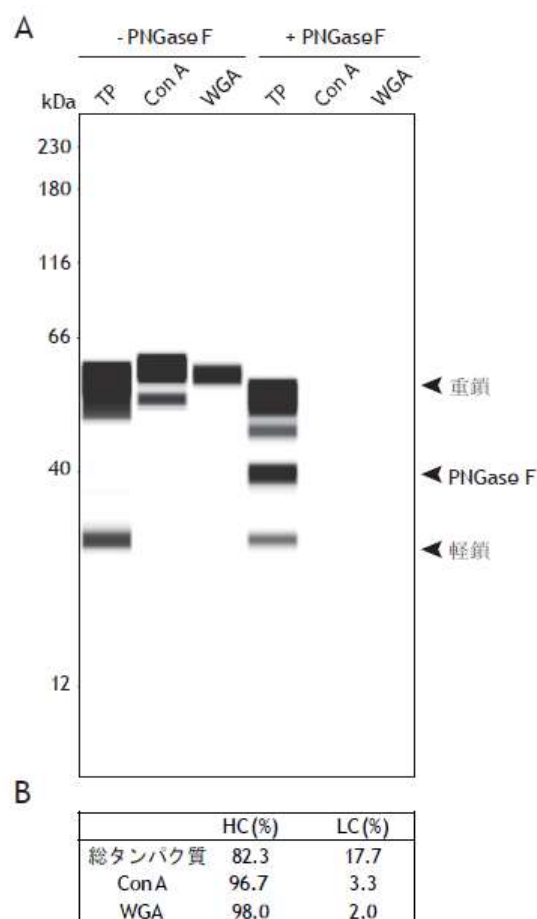


図8. 還元条件下での**NIST**モノクローナル抗体のレクチン・糖鎖および総タンパク質(TP)アッセイによるキャラクタリゼーション。(A) レーン表示。230 kDaでStreptavidin-HRPの交差反応を避けるためEZ Standard Pack 5を使用しました。(B) グリコシル化した**NIST**モノクローナル抗体の重鎖(HC)と軽鎖(LC)のピーク面積の百分率。

まとめ

糖鎖のプロファイリングは、治療用抗体の特性分析に不可欠です。しかしながら、使用されている標準的な方法は複雑で、分析する抗体を修飾操作する必要があります。ここでは、シンプルウェスタンを用いて、電荷または分子量の違いで抗体と糖タンパク質の糖鎖プロファイルを迅速に分析する方法を紹介し、またそれらの結果は、既知のグリコシル化特性と一致することも示しました。すなわちシンプルウェスタンの電荷もしくは分子量の両方で糖鎖プロファイルを詳細に分析することが可能であることを実証しています。Peggy Sueではネイティブ構造のままの抗体でレクチンプロット分析が可能で、そのハイスループット処理能力により、一度のシンプルウェスタン電荷アッセイで電荷不均一性プロファイルを比較することができます。さらに、Wesを用いたシンプルウェスタンでは、分子量の違いでタンパク質の糖鎖アイソフォームを分析することができます。従ってシンプルウェスタンのレクチンプロットは、抗体開発における迅速なスクリーニング方法として、もしくは糖鎖分析の従来法を補完するツールとして使用することができます。

参考文献

1. The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins, L Zhang, S Luo and B Zhang, *mAbs*, 2016; 8(3):524-35.
2. Orthogonal technologies for NISTmAb N-glycan structure elucidation and quantitation, J Prien, H Stöckmann, S Albrecht, S Martin, M Varatta, M Furtado, S Hosselet, M Wang, T Formolo, P Rudd and J Schiel, *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study*, 2015; 1201:185-235.
3. Assessing analytical similarity of proposed Amgen biosimilar ABP 501 to adalimumab, J Liu, T Eric, C Li, S Cao and S Kuhns, *BioDrugs*, 2016; 30(4):321-38.
4. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs, P Zhang, S Woen, T Wang, B Liau, S Zhao, C Chen, Y Yang, Z Song, M Wormald, C Yu and P Rudd, *Drug Discovery Today*, 2016; 21(5):740-65.



Toll-free: (888) 607-9692
Tel: (408) 510-5500
info@proteinsimple.com

proteinsimple.com

© 2018 ProteinSimple. ProteinSimple, Simple Western, Peggy Sue, Wes, Maurice and the ProteinSimple logo are trademarks and/or registered trademarks of ProteinSimple.