

# HILICとワイドポアAmide固定相を用いた lgGサブユニットグライコフォームのマッピング

Matthew A. Lauber and Stephan M. Koza Waters Corporation, Milford, MA, USA

# アプリケーションのメリット

- IgG サブユニットグライコフォームの HILIC 分離向上
- MSに適合するHILICによりサンプル構成成分の詳細な研究が可能に
- 従来の逆相(RP)分離と直交する選択性により 親水性のタンパク質の修飾特性解析を改善
- *RapiFluor-MS 遊離 N* 結合型糖鎖分析による糖 鎖プロファイリングを補完するドメイン特有 の糖鎖情報
- Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm 固定相 は糖タンパク質分離により QC 試験を実施し、 一貫したバッチ間再現性を確保

# ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide、 300 Åカラム

Glycoprotein Performance Test Standard Glycoworks<sup>™</sup> RapiFluor-MS<sup>™</sup> N-glycan キット ACQUITY UPLC H-Class Bio システム Xevo<sup>®</sup> G2 QTof 質量分析計 SYNAPT<sup>®</sup> G2-S HDMS

# キーワード

ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、 BEH Amide 300 Å、糖鎖、糖タンパク質、 グリコシル化、HILIC、IdeS

### はじめに

治療への適用で最も成功したタンパク質はモノクローナル抗体(mAb)であるこ とは疑い無く、現在バイオ医薬品市場のほぼ半分を占めています<sup>1</sup>。mAb、特 に laG ベースの mAb の興味深い特性は、全く同じ 2 つの軽鎖と全く同じ 2 つ の重鎖がジスルフィド結合と非共有結合により結合することで形成されている という点です。さらに、mAbの構造は、機能的に重要なサブユニット、例えば、 結晶化可能なフラグメント(Fcドメイン)や2つの抗原結合フラグメント(Fab ドメイン)から構成されています。一般にミドルアップもしくはミドルダウン 分析と称される分析においては<sup>2-5</sup>、細胞ベースでの研究を実施し、特性解析を 促進する手段として、ネイティブな抗体はプロテアーゼにより Fc ドメインや Fab ドメイン、もしくは他の関連サブユニットに消化されます。mAb をサブユ ニットに消化するために使用が増えてきている方法の1つとして、IdeS プロテ アーゼ (Immunoglobulin Degrading Enzyme of S. pyogens) を用いた方法があります <sup>2,6</sup>。ldeS はヒト化 mAb をそれぞれのシークエンスモチーフを維持した状態でヒ ンジ領域において特異的に切断し、続けて還元することにより、質量分析に適 し治療用 mAbの様々な特性の特定に有用な3つの25 kDaの mAb フラグメント を正確に生成します(図1)<sup>3</sup>。異なる医薬品製品から ldeS により生成されるサ ブユニットはそれぞれ特徴的な逆相保持時間を示すため<sup>3</sup>、ldeSによる消化と 逆相クロマトグラフィーとの組み合わせは、実際に、mAb と融合タンパク質に 対してシンプルな同一性試験として提案されてきました。さらに、逆相の保持 はメチオニンなどタンパク質残基の酸化により大きく影響を受けるため、酸化 に関するドメイン特有の情報を分析して取得するために有用であることが示さ れています<sup>3</sup>。



図 1. lgG LC, Fd' および Fc /2 サブユニット調製のための ldeS 消化および還元のスキーム

#### 実験方法

#### サンプル詳細

## mAbのldeS 消化および還元:

トラスツズマブ製剤を 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) で 7 倍に 希釈して 3 mg/mL の濃度とし、トラスツズマブに対して 50:1 (w/w)の比率で IdeS (Promega、Madison、WI)を添加して 37℃ で 30 分インキュベートし、得られた IdeS 消化抗体に 1M TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine) および固体 GuHCl (グアニジ ン塩酸塩)を添加して変性、還元しました。変性 / 還元ステッ プの最終緩衝液組成は、約 6 M GuHCl、80 mM TCEP、10 mM リ ン酸緩衝液 (pH 7.1) です。IdeS 消化トラスツズマブ(1.5 mg/ mL) はこの緩衝液中で 37℃で1時間インキュベートしました。 NIST から候補標準物質 #8670 (Iot #3F 1b) として得た IgG1K mAb の IdeS 消化還元サンプルも同様に調製しました。

# セツキシマブのldeS/ カルボキシペプチダーゼB消化および還元:

ldeS 消化の前に<sup>10</sup>、セツキシマブは本抗体に典型的な C 末端 リジン残基を除去するためにカルボキシペプチダーゼ B で処 理しました<sup>4</sup>。セツキシマブ製剤はカルボキシペプチダーゼ B (223 µ/mg, Worthington, Lakewood, NJ)と 100:1 (w/w)で混合し、 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1)で希釈し、濃度 1.8 mg/mL のも のを 37℃で 2 時間インキュベートしました。カルボキシペプ チダーゼ B で処理したセツキシマブは 100 ユニットの ldeS を 添加し、37℃で 30 分インキュベートしました。得られた ldeS 消化物は 1M TCEP および固体 GuHCl を添加して変性、還元しま した。変性 / 還元ステップの最終緩衝液組成は、約 6 M GuHCl、 80 mM TCEP、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1)です。ldeS 消化トラ スツズマブ (0.9mg/mL) はこの緩衝液中にて 37℃で 1 時間イン キュベートしました。

## RapiFluor-MS標識したセツキシマブの N結合型糖鎖の調製:

RapiFluor-MS 標識 N 結合型糖鎖は、GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit(製品番号:176003606)を用いてCare & Useマニュアル (715004793)記載のガイドラインに従って調製しました。

#### 分析条件

(特に記載の無い限り同じ)

### カラムコンディショニング

ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラム (糖タンパク質分離に用いた他のアミドカラムも同様)は40 µg の Glycoprotein Performance Test Standard (製品番号 186008010、 0.1% トリフルオロ酢酸 [TFA]、80% アセトニトリル [ACN] に4 mg/mL で溶解して10 µL 注入)の2連続注入・分離で、もしく はカラムをマスクするのに必要なサンプルを同等量ロードして コンディショニングを実施します。下記分析法に示した分離は、 Glycoprotein Performance Test Standard を用いたコンディショニン グに使用できます。

## カラムコンディショニンググラジエント:

カラムサイズ	: 2.1	× 150 m	m	
移動相 A:	0.1	% (v/v) T	FA 水溶液	
移動相 B:	0.1	% (v/v) T	FA アセト	ニトリル溶液
時間 ( <u>min</u> )	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curve</u>	
0.0	15.0	85.0	6	
0.5	15.0	85.0	6	
1.0	33.0	67.0	6	
21.0	40.0	60.0	6	
22.0	100.0	0.0	6	
24.0	100.0	0.0	6	
25.0	15.0	85.0	6	
35.0	15.0	85.0	6	

#### lqGサブユニット分離に向けたLC条件

LC システム: ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

サンプル温度: 5℃

- 分析カラム温度:45℃(トラスツズマブおよび NIST IgG1K サブユ ニット HILIC 分離)
  - 60℃(セツキシマブサブユニット HILIC 分離)

- 80℃(トラスツズマブサブユニット逆相分離)
- 移動相 A: 0.1% (v/v) TFA 水溶液
- 移動相 B: 0.1% (v/v) TFA アセトニトリル溶液
- UV検出: 214 nm、10Hz

- 注入量: ≦ 1.2 μL (水系溶媒希釈)。注:室温ではタン パク質が析出する傾向にあるため、サンプルに よっては高有機溶媒比率の希釈液を避ける必要 があります。2.1 mm 内径カラムでは、クロマ トグラフィー性能に悪影響を及ぼさずに水系溶 媒希釈液を 1.2 μ 注入まで可能。
- ウォーターズカラム:ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、 300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm(<u>製品番号</u> <u>176003702</u>、Glycoprotein Performance Test Standard 添付して出荷);

ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 μm、 2.1 × 150 mm (製品番号 186004742) ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>4</sub>、300 Å、1.7 μm、 2.1 × 150 mm (製品番号 186004497)

- その他カラム: カラム A:2.6 µm、2.1 × 150 mm カラム B:1.8 µm、2.1 × 150 mm
- バイアル: ポリプロピレン 12 × 32 mm スクリューネックバイアル、300 µ (製品番号: 186002640)

トラスツズマブサブユニットの逆相分離に用いたグラジエント(図 2A):

時間 ( <u>min</u> )	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curve</u>
0.0	95.0	5.0	6
1.0	66.7	33.3	6
21.0	59.7	40.3	6
22.0	20.0	80.0	6
24.0	20.0	80.0	6
25.0	95.0	5.0	6
35.0	95.0	5.0	6

IgG サブユニットの HILIC 分離に用いたグラジエント(図 2-7)

时间 ( <u>min</u> )	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curve</u>
0.0	20.0	80.0	6
1	30.0	70.0	6
21	37.0	63.0	6
22	100.0	0.0	6
24	100.0	0.0	6
25	20.0	80.0	6
35	20.0	80.0	6

### lgGサブユニット分離のためのMS条件

MS システム:	Xevo G2 QTof もしくは SYNAPT G2-S HDMS				
イオン化モード:	ESI+				
測定モード:	Resolution ( $\sim$ 20K)				
キャピラリー電圧:	3.0 kV				
コーン電圧:	45 V				
ソース温度:	150°C				
脱溶媒温度:	350℃				
脱溶媒ガス流速:	800 L/Hr				
キャリブレーション試薬:Nal(2 µg/µL、 <i>m/z</i> 500 - 5000)					
データ取込み: m/z 500-4000、スキャン時間 0.5 秒					
データ管理:	MassLynx <sup>®</sup> ソフトウェア (v4.1) / UNIFI <sup>®</sup> v1.7				

## RapiFluor-MS 標識遊離N結合型糖鎖の HILIC分離に向けたLC条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
サンプル温度:	10°C
分析カラム温度:	60°C
蛍光検出	Ex 265/Em 425 nm ( <i>Rapi</i> Fluor-MS) (データ取り込み 5 Hz [50 mm column]、Gain=1)
注入量	10 µL(DMF/ACN 希釈サンプル)
移動相A:	50 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH4.4 (100 倍濃縮液 [ 製品番号 186007081] から LC-MS グレードの水を用いて調製)
移動相 B:	アセトニトリル (LC-MS グレード)
カラム:	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、130 Å、1.7 μm、 2.1×50 mm(製品番号 186004740)
バイアル:	ポリプロピレン 12 × 32 mm、300 µL、スク リューネックバイアル (製品番号 186002640)

RapiFluor-MS 標識 N 結合型糖鎖 HILIC 分離に用いたグラジエント (図 7B):

時間 ( <u>min</u> )	流速 ( <u>mL/min</u> )	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curve</u>
0.0	0.4	25	75	6
11.7	0.4	46	54	6
12.2	0.2	100	0	6
13.2	0.2	100	0	6
14.4	0.2	25	75	6
15.9	0.4	25	75	6
18.3	0.4	25	75	6

#### RapiFluor-MS N結合型 HILIC 分離のためのMS条件

MS システム:	SYNAPT G2-S HDMS
イオン化モード:	ESI+
測定モード:	TOF MS. Resolution ( $\sim$ 20K)
キャピラリー電圧:	3.0 kV
コーン電圧:	80V
ソース温度:	120℃
脱溶媒温度:	350℃
脱溶媒ガス流速:	800 L/Hr
キャリブレーション	ν試薬:Nal(1 μg/μL、m/z 500 - 5000)
ロックスプレー	
(ASM B-side):	100 fmol/µL Human Glufibrinopeptide B in O
	(v/v) formic acid.
	70:30 water every seconds
データ取込み:	<i>m/z</i> 500-2500、1 Hz
データ管理:	MassLynx ソフトウェア (v4.1)

しかしながら、多くの lqG の修飾は、その水素結合能と共に mAbの親水性の変化をより強く引き起こすことに留意する必要 があります。この種の修飾として非常に明白な例がグリコシル 化です。mAb から切り出した糖鎖は、多くの場合、固定相とし てアミド結合相を使用した親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)で分析されますが、これはその親水性と水素結合性に よる高い保持のためです<sup>7</sup>。ここで、ウォーターズは、lqG サブ ユニットの分離にもアミド結合相を用いた HILIC を検討するこ とを提案します。lqG サブユニット分離のアプリケーションでは、 カラムで溶離される際に大きいサブユニット構造が充塡剤細孔 内の大半にアクセスでき、拡散を制限されないように、平均細 孔径の大きい固定相であることが重要です<sup>8-9</sup>。粒子径 2 µm 以下 のワイドポアアミド固定相の開発により、逆相ベースのサブユ ニット分析に対して相補的かつ新規のワークフローの検討を進 めてきました。このアプリケーションノートでは、Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 μm カラムを用いた lgG の N 結合型グリ コシル化に関するドメイン特有の情報を迅速にプロファイルで きる LC/MS および LC/UV 技術の開発について実証します。

#### 結果および考察

1%

#### 直交的かつ相補的なlgGサブユニット分離

lqG サブユニットマッピングに対する従来のアプローチを示すた めに、まず、還元 /ldeS 消化した lqG1 mAb をワイドポア C4 結 合固定相 (Protein BEH C<sub>4</sub>、300 Å、1.7 μm) を用いて逆相クロマト グラフィーで分離しました。この研究に用いた lqG1 mAb はトラ スツズマブですが、これは第一世代の mAb 医薬品製品として有 名であり、バイオシミラーの開発ターゲットとなるものです<sup>11</sup>。 図 2A は、還元 /ldeS 消化トラスツズマブの典型的な UPLC<sup>®</sup> クロ マトグラムを示していますが、ここでは3つのピークが、それ ぞれ Fc/2、LC、Fd' サブユニットの順番で、ほぼ等間隔で溶出し ています。この高分離を得るための条件には、イオンペアとし て TFA の使用が必要です。興味深いことに、同じ移動相がタン パク質の HILIC には最適であることが証明されていますが、こ れは疎水性イオンペアによりタンパク質残基の親水性をマスク することで低減するためです。これは、親水性修飾の選択性向 上に繋がります<sup>12</sup>。すなわち、グラジエントを逆にして新規開 発ワイドポアアミド結合固定相 (Glycoprotein BEH Amide、300 Å、 1.7 µm)を用いるだけで HILIC により逆相分離と直交する分析法 を実現することができます。

このワイドポアアミド結合固定相を充塡したカラ ムにより得られたクロマトグラムの例を図 2B に示 しました。ここでは先ほどと同じ還元 / IdeS 消化ト ラスツズマブが約10本のピークに分離しています。 最初に溶出する 2 つのピークは Fd' および LC サブユ ニットで、残りのより強く保持するピークは糖鎖を 持つ Fc/2 サブユニットです。より強く保持するピー クに焦点を当て、グリコシル化の不均一性に関する 情報を解析できます(図 3A)。揮発性移動相を用い た分析法であるため、グライコフォームのピークは すぐに ESI-MS で情報を得ることができます。 グラ イコフォームプロファイルの分析種に対応したデコ ンボリューション MS スペクトルと分子量を図 3B と 図 3C に示しました。図 3 では、対応する MS スペク トルと同じ色でクロマトグラフィーピークに表示し ました。この HILIC 分離では、近い分子量の分析種 間で夾雑が少ない(例えば、Fc/2 + A2G1 と Fc/2+FA2、 オレンジと青のスペクトル)ため、各グライコフォー ムのデコンボリューション MS スペクトルを容易に 生成できることに留意下さい。一次試験として実施 する分析で、相対存在率が2%以上として知られて いるトラスツズマブの全ての糖鎖は容易に検出でき ます<sup>13</sup>。注目すべきは、Fc/2+M5(Man5)などの存在 率の低い分析種も検出でき、抽出イオンクロマトグ ラム(XIC)により観測できる点です。これは、特定 の低存在量の分析種をモニターする必要がある場合 には、選択反応モニタリング(SRM) MS 分析を実施 できる可能性を示唆しています。この条件では分離 できませんが、M5 Fc/2 グライコフォームは異なる 分離条件(図7A参照)で分離できます。



図 2. トラスツズマブサブユニット分離 (A) 還元 //deS 消化サンプル 1 µg を ACQUITY UPLC Protein BEH C4、300 Å、1.7 µm カラムで分離(水系溶媒希釈 0.7 µL 注入)。(B) 還元 //deS 消化 サンプル 1 µg を ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å、1.7 µm カラムで分離(水系溶媒 希釈 0.7 µL 注入)。



図 3. トラスツズマブ Fc/2 サブユニットグライコフォームのプロファイリング (A) 図 2B のグラ イコフォームの分離に相当する保持ウィンドウ。(B) HLLC クロマトグラフィーピークのデコン ボリューション ESI MS スペクトル。クロマトグラフィーピークは対応する MS スペクトルと同じ 色で表示。(C) 観測されたトラスツズマブサブユニットの分子量

# トラスツズマブFc/2グリコシル化の HILIC-UVプロファイリングによるバッチ間分析

サブユニットレベルの HLIC-MS により得られる データは情報が豊富であることは明らかです。光 学検出に基づくサブユニット HILIC 分離も同様に 有益です。この目的のため、トラスツズマブ Fc/2 グリコシル化のバッチ間分析の実施に HILIC-UV 分 析法を適用し、図4にその例を示しました。2種 類の異なるロットのトラスツズマブから得られた Fc/2 グライコフォームの HILIC クロマトグラムを 図 4A に示しました。これらロットに関する以前 からの試験法は、遊離糖鎖レベルでグリコシル化 の違いを示していました<sup>14</sup>。ここでは、プロファ イル間に渡るピークの積分により、トラスツズマ ブのこの2ロットは、遊離糖鎖分析の結果と同様 に、Fc ドメインのグリコシル化プロファイルに関 して実際に異なることを確認しました。特に、FA2、 FA2G1、FA2G2 Fc/2 サブユニットの存在量から推 測されるように、これら2ロットのトラスツズマ ブは末端のグリコシル化の程度に関して異なって います(図 4B)。グリコシル化の程度は補体依存性 細胞障害(CDC)に影響するため、これは有益な観 測です<sup>15</sup>。

# lgGサブユニットグライコフォームの プロファイリングに向けた Glycoprotein BEH Amide、300Å、 1.7 μmカラムのライフタイム試験

上述の分離に対する BEH Amide、300 Å、1.7 µm カ ラムの経時的な頑健性を示すために、還元・ldeS 消 化トラスツズマブサンプルを1本のカラムで 300 回連続注入など一連の試験を実施しました。還元・ ldeS 消化 mAb サンプルには高濃度のグアニジン変性 剤と TCEP 還元剤が含まれるため、これはカラムに 対し非常に負荷が大きい条件です。この試験におけ る 20 回目、180 回目、300 回目の注入のトータル イオンクロマトグラムを図 5A に示しました。この 分析では、Fc /2+A2 および Fc /2+FA2 の半値幅の分 離度に特に注目して、20 回注入毎に抽出イオンク ロマトグラム(XIC)により評価しました。



図4.トラスツズマブFc/2のバッチ間プロファイリング。(A) 医薬品製品 2 ロットのトラスツズ マブFc/2 サブユニットグライコフォームの HLLC クロマトグラム(B) 主要サンプル成分の相対存 在量。ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm カラムを用いて 3 回 分析を実施。



図 5. 還元・IdeS 消化トラスツズマブの繰り返し注入による ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300 Å、1.7 μm、2.1 × 150 mm カラムのライフタイム試験。(A) 20 回目、180 回目、300 回 目の注入によるトータルイオンクロマトグラム(TIC)。分離度測定のために用いた Fc/2+A2 およ び Fc/2+FA2 の抽出イオンクロマトグラム(XIC)の例。(B) 300 回注入のカラム寿命試験に渡るク ロマトグラフィーパラメーター。各パネルは 20 回毎の注入について、繰り返しグラジエントと XIC で測定した FA2 グライコフォームの保持時間(RT)、A2 と FA2 グライコフォーム間の分離度、 分析時の最大圧および%キャリーオーバについての結果を表示。

この試験では、Fc/2+FA2の保持時間、分析時における最大システム圧、最も存在量の多いグライコフォーム (Fc/2+FA2)のキャリーオーバの割合(%)などのクロマトグラフィーパラメーターについてもモニターしまし た(図 5B)。これらパラメーターのプロットはカラムのライフタイムに渡るサブユニット分離の一貫性を明確 に示しています。卓越した一貫性により、このカラムでは相対的に安定した保持時間、A2 および FA2 グライ コフォームの一貫した分離度(Rs=2)、一貫して 6 Kpsi 以下と低いシステム最大背圧と 0.1 - 0.2%の特筆す べき低いキャリーオーバが得られます。この分析法のキャリーオーバは、同様の分析を C4 ベースの逆相分析 法で行った場合に比べて約 1 桁低いため、この HILIC 分離における後者の特徴は特に注目に値します。

#### Glycoprotein BEH Amide、300Å、1.7 µmカラムの性能の評価

この新規ワイドポアカラムテクノロジーの性能を、ポアサイズのみが異なる同じケミストリーだけでな く、市販の近い用途のカラムと比較しました。図6にはNISTから入手した lgG 1K mAb の還元 ldeS 消化サ ンプルについて異なるカラムテクノロジーを用いて得られたクロマトグラムを示しました。目視の比較で も、Glycoprotein BEH Amide 300 Åカラムは他の3種類のカラムに比べて優れた結果を示しました。この評 価を定量化するため、FA2G1 グライコフォームからの FA2 グライコフォームの分離についてピークバレー 比を計算しました。Glycoprotein BEH Amide 300 Åカラムでは、130 Å glycan BEH Amide カラム、その他2種 類の市販アミドカラムに対してそれぞれ 48 %、152 %、261 % 向上が見られました。この mAb サンプルは、 免疫原性のα-1,3-ガラクトースを含む糖鎖 (FA2G2Ga1 構造) がかなり高い相対存在比で存在するという 非常に興味深い特徴を有しています<sup>16-17</sup>。図6に示すように、この Fc/2+FA2G2Ga1 の分析種はワイドポア Amide カラムで容易に可視化できます。これは、この新たなアプリケーションにおいて高分子 HLIC 分離の ピークキャパシティが大きく向上したことを示しています。



図 6. 各種 2.1×150mm カラム (ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラム、ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide、 130 Å、1.7 µm カラム、他社カラム A:2.6 µm、2.1×150 mm、他社カラム B:1.8 µm、2.1×150 mm) で得られた IgG1K のサ ブユニットグライコフォームのプロファイル。Fc/2+FA2 と FA2G1 グライコフォームのピークバレー (p/v) 比を記載。α-gal 含有 Fc/2+FA2G2Ga1 は Glycoprotein BEH Amide 300 Åカラムで容易に可視化。

## mAbグリコシル化に関するドメイン特有の情報で RapiFluor-MS N結合型糖鎖分析を補完

HILIC により IqG サブユニットのプロファイリングを行う主要な 利点の1つは、グリコシル化に関するドメイン特有の情報を解 析できることです。laGの構造では、一貫して重鎖の Asn297 に N結合型糖鎖を有しています。結果として、ほとんどの lqG は Fc サブユニットの CH2 ドメイン (重鎖定常領域第2ドメイン)が2 つの糖鎖で修飾されます。ただし、ヒト lgG の 20% は CH1 ドメ インも修飾されていると推定されますが、このドメインは Fab サ ブユニット、より具体的には IdeS で生成される Fd' サブユニット に存在します<sup>18-19</sup>。例えば、セツキシマブ(マウス細胞株から発 現させたキメラ mAb) は CH1 および CH2 ドメインどちらもグリ コシル化されています<sup>20</sup>。そのため、このmAbの特性解析は、我々 の新規開発技術のアプリケーションに対し興味深い事例である ことが分かります。カルボキシペプチダーゼBで処理したセツ キシマブの還元 IdeS 消化サンプルの HILIC 分離は、弱く保持した サブユニット1つだけを示し、オンライン ESI-MS により LC サブ ユニットであることが容易に帰属できます(データは記載無し)。 さらに、図 7A に示すように、セツキシマブのグライコフォーム 保持ウィンドウには、トラスツズマブとそのグリコシル化 Fc/2 サブユニットで見られたよりも2倍のピークが見られます。こ

•

- (0

れら HILIC-MS 分離からデコンボリューションした ESI-MS データ は、最初のグループのピーク (グレーで表示) が、Fc/2 グライコ フォームや FA2、FA2G1、M5、FA2G2 などの典型的な mAb 糖鎖 に相当することを裏付けています。一方で、2 番目のグループの ピークは、独自の質量を示す Fd' サブユニットのグライコフォー ムに特徴的に関連することが分かります。興味深いことに、帰属 した Fd' グライコフォーム (赤で表示) それぞれは免疫原性を持ち、 非ヒトα-1,3- ガラクトースもしくは非ヒト N-グリコリルノイラ ミン酸エピトープを含有しています<sup>21</sup>。

これら糖鎖の帰属は遊離 N 結合型糖鎖の分析により確認しました。 新規開発 GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS *N*-Glycan キット<sup>22</sup> を用いて、セ ツキシマブ N 結合型糖鎖を迅速に調製し、新規蛍光および MS 標 識試薬の *Rapi*Fluor-MS で標識しました。得られた標識 N 結合型糖 鎖は、glycan BEH Amide 130 Å、1.7  $\mu$ m カラムを用いて分離し、 図 7B に示すように蛍光およびポジティブイオンモード ESI-MS で 検出しました。*Rapi*Fluor-MS 標識で得られる感度向上により遊離 N 結合型糖鎖の信頼性の高い帰属が容易に行えました。サブユ ニット HILIC-UV-MS 分析法および遊離糖鎖分析の結果から帰属し た種は、セツキシマブのグリコシル化に関する以前の報告により 裏付けられました<sup>6,20</sup>。

A		Fc/2	FC/2					
	0.06	+FA2	Glycosylated	Domain-Specific Glycan Information	Species	MW <sub>Avg</sub> <sup>Theoretical</sup> (Da)	MW <sub>Avg</sub> Observed (Da)	Mass Error (Da)
	0.05 -		970)	as in	LC	23427.0	23427.1	0.1
		F	-c/2	A A A A	Fc/2-K + FA2	25236.3	25237.4	1.1
		+	Fd' pE	m the	Fc/2-K + M5	25008.1	25008.8	0.7
	0.04 -	Fc/2	+ (FA2G2Ga2)	Fd'	Fc/2-K + FA2G1	25398.5	25399.8	1.3
And	5-1-2-	+M5	+ (FA)	2G2Ga1Sg1) Glycosylated N-term pE	Fc/2-K + FA2G2	25560.6	25562.0	1.4
	0.03 -	1h	+ (FA2G2Sg1)		Fd' pE + FA2G2Ga1	27385.5	27386.8	1.3
		V		Fd' pE + (Hex9HexNAc5DHex1)	Fd' pE + FA2G2Sg1	27530.6	27531.8	1.2
	0.02		+FA2G2		Fd' pE + FA2G2Ga2	27547.6	27548.2	0.6
	0.02	N	When h	$\sim$	Fd' pE + FA2G2Ga1Sg1	27692.7	27693.1	0.4
	-	`	Fd' pE + (FA2G2Ga1)		Fd' pE + Hex9HexNAc5DHex1	28075.1	28075.3	0.2
	0.01	9	10 11 12 13 14 Time (min)	15 16 17 18				
В	4E+6 -	E.	FA2 FA2G2Ga2	High Resolution High Sensitivity	Species	MW <sub>Mono</sub> <sup>Theoretical</sup> (Da)	MW <sub>Mono</sub> Observed (Da)	Mass Error (ppm)
			51301	Released	FA2	1545.6080	1545.6136	3.6
			FAZGI	N-Glycan Profile	M5	1773.7190	1773.7242	2.9
					FA2G1	1935.7719	1935.7834	5.9
	∍		FA2G	2Ga1Sg1	FA2G2	2097.8247	2097.8136	-5.3
	ш		м5		FA2G2Ga1	2259.8775	2259.8860	3.8
			FA2G2Sg1		FA2G2Sg1	2404.9150	2404.9150	0.0
			A FA2G2Ga1	Hex9HexNAc5DHex1	FA2G2Ga2	2421.9303	2421.9320	0.7
					FA2G2Ga1Sg1	2566.9678	2566.9792	4.4
	0E+0 -	1 5	6 7 8 9	10 11 12	Hex9HexNAc5DHex1	2949.1154	2949.1424	9.2
			Time (min)					

図7. セツキシマブグリコシル化の HILIC によるプロファイリング。(A) 還元 IdeS/カルボキシペプチダーゼB 消化セツキシマブの ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm カラムを用いた HLIC-UVクロマトグラム。Fc/2 およびFd' サブユニットはそれぞれ、グレーと赤 で表示。デコンボリューションした MS スペクトルに基づくサブユニット 糖鎖の帰属も記載。(B) ACQUITY UPLC glycan BEH Amide 130 Å . 1.7 μm. 2.1× 50 mm カラムを用いたセツキシマブの RapiFluor-MS 標識 N 結合型糖鎖の HLIC-蛍光クロマトグラム。RapiFluor-MS 標 識 N 結合型糖鎖の帰属を裏付ける MS スペクトルデータを記載。

標識糖鎖とサブユニット由来の糖鎖の情報を組み合わせることで、セツキシマ ブのグリコシル化について、重要な詳細まで特性解析しました。*Rapi*Fluor-MS 標識遊離糖鎖分析により、糖鎖の詳細な MS/MS 分析も可能な LC/MS 適合分析条 件で、高分離分析を達成できます。同様に MS 適合のサブユニット HILIC 分離に より、ドメイン特有の糖鎖情報を最小限のサンプル調製で容易に得ることがで きます。結果として、各分析法により mAb グリコシル化の相補的な情報が得 られます。とはいえ、ワイドポア Amide HILIC 分析法は、マルチドメインのグ リコシル化について mAb を迅速にスクリーニングするための有用な技術とし て卓越しています。

#### 結論

mAb のサブユニット分析は、ドメイン特有の修飾について迅速に調査する有用 なストラテジーとなります。正確性の高い IdeS タンパク質消化と高分離 LC-UV-MS の組み合わせは、mAb の同一性試験および酸化の測定に対して、新たなア プローチとして提案されました<sup>3</sup>。現在のサブユニットマッピングストラテジー は逆相クロマトグラフィーにのみ依存しています。しかしながら、IgG タンパ ク質の N 結合型グリコシル化は、親水性および水素結合性に劇的な変化を生じ るため、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)による分離がこのアプリ ケーションに効果的に、また同じ移動相を用いて逆相と相補的な分析法として 用いることができます。このため、我々は、高分子分離に最適化した Amide 固 定相 (ワイドポア Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm 固定相) と HILIC の 使用を提案しました。*Rapi*Fluor-MS<sup>22</sup> により実現する遊離 N 結合型糖鎖分析にお ける新規展開と併せて、Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラムは、ド メイン特有糖鎖情報の解析など、mAb グリコシル化のルーチンモニタリングお よび詳細な特性解析に対し新たな可能性を実現します。

### 参考文献

- Aggarwal, R. S., What's fueling the biotech engine 2012 to 2013. Nat Biotechnol 2014, 32 (1), 32–9.
- Wang, B.; Gucinski, A. C.; Keire, D. A.; Buhse, L. F.; Boyne, M. T., 2nd, Structural comparison of two anti-CD20 monoclonal antibody drug products using middle-down mass spectrometry. *Analyst* 2013, 138 (10), 3058–65.
- Gucinski, A. C., Rapid Characterization and Comparison of Stressed anti-CD20 Drugs using Middle Down Mass Spectrometry. In 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis, MN, 2013.
- Ayoub, D.; Jabs, W.; Resemann, A.; Evers, W.; Evans, C.; Main, L.; Baessmann, C.; Wagner-Rousset, E.; Suckau, D.; Beck, A., Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques. *MAbs* 2013, 5 (5), 699–710.
- Alain Beck; Hélène Diemer; Daniel Ayoub; François Debaene; Elsa Wagner-Rousset; Christine Carapito; Alain Van Dorsselaer; Sanglier-Cianférani, S., Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *Trends in Analytical Chemistry* 2013, 48, 81–95.
- Janin-Bussat, M. C.; Tonini, L.; Huillet, C.; Colas, O.; Klinguer-Hamour, C.; Corvaia, N.; Beck, A., Cetuximab Fab and Fc N-glycan fast characterization using IdeS digestion and liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2013, 988, 93–113.
- Ahn, J.; Bones, J.; Yu, Y. Q.; Rudd, P. M.; Gilar, M., Separation of 2-aminobenzamide labeled glycans using hydrophilic interaction chromatography columns packed with 1.7 microm sorbent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010, 878 (3–4), 403–8.
- 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.
- 9. Renkin, E. M., J. Gen. Physio. 1954, (38), 225.
- Tetaz, T.; Detzner, S.; Friedlein, A.; Molitor, B.; Mary, J. L., Hydrophilic interaction chromatography of intact, soluble proteins. *J Chromatogr A* 2011, 1218 (35), 5892–6.
- Beck, A.; Sanglier-Cianferani, S.; Van Dorsselaer, A., Biosimilar, biobetter, and next generation antibody characterization by mass spectrometry. *Anal Chem* 2012, 84 (11), 4637–46.

- 12. Lauber, M. A.; McCall, S. A.; Alden, B. A.; Iraneta, P. C.; and Koza, S. M.; Developing High Resolution HILIC Separations of Intact Glycosylated Proteins Using a Wide-Pore Amide-Bonded Stationary Phase. Waters Application Note 720005380EN.
- Xie, H.; Chakraborty, A.; Ahn, J.; Yu, Y. Q.; Dakshinamoorthy, D. P.; Gilar, M.; Chen, W.; Skilton, S. J.; Mazzeo, J. R., Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. *MAbs* 2010, 2 (4).
- Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Gilar, M., Trastuzumab Glycan Batch-to-Batch Profiling using a UPLC/FLR/MS Mass Spectrometry Platform. Waters Application Note <u>720003576EN</u>.
- Raju, T. S.; Jordan, R. E., Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies. *MAbs* 2012, 4 (3), 385–91.
- 16. Schiel, J.; Wang, M.; Formolo, T.; Kilpatrick, L.; Lowenthal, M.; Stockmann, H.; Phinney, K.; Prien, J. M.; Davis, D.; Borisov, O. In Biopharmaceutical Characterization: Evaluation of the NIST Monoclonal Antibody Reference Material, 62nd Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Baltimore, MD, Baltimore, MD, 2014.
- Bosques, C. J.; Collins, B. E.; Meador, J. W., 3rd; Sarvaiya, H.; Murphy, J. L.; Dellorusso, G.; Bulik, D. A.; Hsu, I. H.; Washburn, N.; Sipsey, S. F.; Myette, J. R.; Raman, R.; Shriver, Z.; Sasisekharan, R.; Venkataraman, G., Chinese hamster ovary cells can produce galactose-alpha-1,3-galactose antigens on proteins. *Nat Biotechnol* 2010, 28 (11), 1153–6.
- Jefferis, R., Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. Biotechnol Prog 2005, (21), 11–16.
- Huang, L.; Biolsi, S.; Bales, K. R.; Kuchibhotla, U., Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization. *Anal Biochem* 2006, 349 (2), 197–207.
- 20. Qian, J.; Liu, T.; Yang, L.; Daus, A.; Crowley, R.; Zhou, Q., Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion. *Anal Biochem* 2007, 364 (1), 8–18.
- Arnold, D. F.; Misbah, S. A., Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008, 358 (25), 2735; author reply 2735–6.
- 22. 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 <u>720005275EN</u>.



#### 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、UPLC、ACQUITY UPLC、Oasis、UNIFI、MassLynx、SYNAPT、Xevo および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。 GlycoWorks および RapiFlour-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 720005385JA PDF