VVOTERS

## ワイドポアAmide 固定相を用いた HILIC 糖ペプチドマッピング

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

- 従来の逆相分離と直交する選択性によりグ リコシル化などの親水性タンパク質修飾の 特性解析能を改善
- 修飾サイトの確認に向けた lgG 糖ペプチドの業界最高レベルの分離
- 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
- RapiFluor-MS 遊離 N 結合型糖鎖分析を補完す る糖鎖情報
- 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(特許申請中)

Glycoprotein Performance Test Standard

ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class Bio システム

SYNAPT® 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、mAb、糖ペプチド、 糖タンパク質

#### はじめに

バイオ医薬品のペプチドマッピングは、同一性試験やアミノ酸残基特異的な 修飾のモニターのツールとして長く使用されてきました<sup>1-2</sup>。従来の分析では、 トリプシンやLys-C などの忠実性の高いプロテアーゼの使用で得られるペプチド を、イオンペア試薬を用いて C<sub>18</sub> 結合固定相で逆相分離により非常に高いピーク キャパシティで分離します。これらの分離では、アスパラギンと、アスパラギン が脱アミドして生成する 2種、アスパラギン酸およびイソアスパラギン酸のよ うなアミノ酸残基が 1 つ異なるペプチドを分離することができます<sup>34</sup>。

しかしながら、全てのタンパク質修飾が逆相分離で容易に分離できる訳ではあり ません。比較すると、特に糖ペプチドのアイソフォームは通常、その糖鎖の質量 が約 10-2000 Da 異なっていると考えると、多くの場合、糖ペプチドは比較的低 い選択性で分離されます。そのため、逆相分離は一般的なペプチドマッピングに 有効ではありますが、親水性の修飾の分離においては制限されています。以前の 研究において、アミド結合固定相を用いた親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)による相補的かつ高分離な糖ペプチドの分離が示されています<sup>56</sup>。これ ら研究では、親水性と水素結合性の結果として高い保持が得られる<sup>7</sup>ことから、 アミド結合固定相がこれらの分離に特に効果的であることを実証しています。

このテクノロジーを拡張して、ポアサイズの大きいアミド結合固定相、いわゆ る"ワイドポア"充塡剤を開発し、アミドHILIC 分離がインタクトおよび消化 糖ペプチド両方のグライコフォームの分離に広く適用できるようになりました。 ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラムで使用しているこの 固定相により、そのサイズに関わらず糖ペプチドが充塡剤細孔内の大半にアクセ スでき、拡散が制限されにくくなります<sup>8-9</sup>。以前の研究において、インタクト モノクローナル抗体 (mAb)の糖鎖占有率の評価<sup>10</sup>、lgG サブユニットのドメイン 特有グリコシル化の解析<sup>11</sup>、および GlycoWorks™ *Rapi*Fluor-MS™ 標識した三分岐 および四分岐 N 結合型糖鎖の分離向上<sup>12</sup> に対するこの HILIC カラムの使用につ いて実証しました。ここでは、3 種類の異なるモノクローナル抗体 (トラスツズ マブ、セツキシマブ、NIST から入手した lgG1K 候補標準物質)の糖ペプチドにつ いて HILIC で高分離を得るために ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、 1.7 µm カラムの使用を検討しました。

### 実験方法

#### サンプル詳細

#### トラスツズマブおよびNIST候補標準物質のLys-C消化

以前に報告したシングルリアクションバイアルで一晩(16 時間以上)反応させる方法<sup>4</sup>を採用し、トラスツズマブおよび NIST から入手した IgG1K モノクローナル抗体の候補標準物質(#8670、lot #3F 1b)について非還元 Lys-C 消化物を調製しました。TFAで酵素を失活させた消化物は分析まで -80℃で保管しました。HILIC クロマトグラフィーに向けた調製として、水溶性消化物は容量比で4 倍のアセトニトリルと0.1 倍のジメチルスルホキシドで希釈し、不溶性成分を取り除くために 16×1000 g で 10 分間遠心分離し、遠心分離した消化物の上清を分析に供しました。

## セツキシマブのLys-C/トリプシン消化

還元・アルキル化したセツキシマブは Achromobacter プロテアー ゼI(Lys-C)とトリプシンを組み合わせて消化を実施しました。 処方されたセツキシマブは 10 mg/mL の濃度で、10 kDa MWCO 遠心 フィルター (Millipore、Bullerica、MA) でバッファー交換して 6 M 塩酸グアニジン、50 mM DTT、0.2M リン酸緩衝液 (pH8.1)の溶液 にして、37℃で2時間インキュベートしました。その後、サン プルをヨードアセトアミドの溶液で希釈し、抗体の濃度が8mg/mL、 バッファーの組成が 4.8 M GuHCl、40 mM DTT、50 mM ヨードアセト アミド、0.17 M リン酸緩衝液(pH8.1)となるようにしました。ヨー ドアセトアミドによるアルキル化は、この条件で暗所にて 37℃ で10分処理し、その後システインにより反応を止めて、尿素含 有バッファーで希釈し、Achromobacter プロテアーゼ I (Lys-C)と 4:1 (w/w)の比率で混合しました。0.8 mg/mLのセツキシマブ、 0.5 M 塩酸グアニジン、3 M 尿素、40 mM アンモニア、4 mM DTT、 5 mM ヨードアセトアミド、6 mM システイン、0.1 M リン酸緩衝 液 (pH ~ 7.1) で構成された消化物の溶液は 37℃でインキュベー トしました。2時間インキュベートした後、水とトリプシン溶液 (Sigma T6567) で2倍に希釈し、タンパク質とトリプシンの比率 が 4:1 (w/w)になるようにしました。37℃でさらに 2 時間インキュ ベートした後、消化溶液は再度水および新しいトリプシン溶液で 2倍に希釈しました。トータルのタンパク質とトリプシンの比率 は 2:1 (w/w) で、37℃でさらに 16 時間インキュベートしました。 その後、TFA により酸性にして反応を止め、分析まで-80℃で保 管しました。HILIC クロマトグラフィーに向けた調製として、水 溶性消化物は容量比で4倍のアセトニトリルと0.1倍のジメチル スルホキシドで希釈し、不溶性成分を取り除くために 16×1000 g で10分間遠心分離しました。遠心分離した消化物の上清を分析 に供しました。

#### 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 タンパク質もしくは糖ペプチド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 mm		
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	トリル溶液
<u>時間</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	Curve	
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	

### mAb糖ペプチドLC-UV-MSのためのLC条件(図1-6):

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

サンプル温度: 10℃

分析カラム温度: 30℃(トラスツズマブLys-C消化物のHLIC分離)

60℃(セツキシマブ Lys-C/トリプシン消化物 HILIC 分離)

60℃(トラスツズマブ Lys-C 消化物の逆相分離)

- 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
- HILIC 注入量: 100-250 μL (HILIC に適合するように水溶性消化 物は容量比で4倍のアセトニトリルと0.1倍のジメ チルスルホキシドで希釈)
- 逆相注入量: 24.2 µL(水溶性消化物)
- カラム: ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、 1.7 µm、2.1×150 mm(製品番号 176003702、 Glycoprotein Performance Test Standard 添付して出荷); ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>18</sub>、300 Å、1.7 µm、 2.1×150 mm(製品番号 186003687)
- 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 µL (製品番号 186002640)

## トラスツズマブLys-C消化物の逆相分離に用いた グラジエント(図1A):

<u>時間</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	<u>Curv</u>
0.0	98.0	2.0	6
96.0	50.0	50.0	6
99.0	20.0	80.0	6
101.0	20.0	80.0	6
102.0	98.0	2.0	6
113.0	98.0	2.0	6

## トラスツズマブLys-C消化物および Lys-C/トリプシン消化物の HILIC分離に用いたグラジエント (図1B-6):

<u>時間</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>	Curv
0.0	20.0	80.0	6
60.0	50.0	50.0	6
61.0	80.0	20.0	6
63.0	80.0	20.0	6
64.0	20.0	80.0	6
75.0	20.0	80.0	6

## トラスツズマブLys-C消化物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: Resolution (~20K)
- キャピラリー電圧: 3.0 kV
- コーン電圧: 25 V

ノース温度:	120℃			
兑溶媒温度:	350℃			
兑溶媒ガス流	速:800 L/H	r		
キャリブレーシ	ョン試薬:Nal	(1 μg/μL、	<i>m/z</i> 100	- 2000)
コックスプレ-	- : 300 fmol	/µL Human	Glufibring	peptide

- ロックスプレー: 300 fmol/µL Human Glufibrinopeptide B in 0.1% (v/v) formic acid、70:30 water (90 秒間隔)
- データ取込み: m/z 500-2500、スキャン時間 0.1 秒
- データ管理: MassLynx<sup>®</sup> ソフトウェア(v4.1) / UNIFI<sup>®</sup> v1.7

# 蛍光検出によるlgG1K糖ペプチドマッピングのためのLC条件(図7):

- LC システム: ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
- サンプル温度: 10℃
- 分析カラム温度: 45℃

## 蛍光検出: Ex 280/Em 320 nm (10 Hz scan rate、Gain =1)

- 注入量: 100 µL(DMF/ACN 希釈サンプル)
- 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
- カラム: ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、 1.7 µm、2.1×150 mm(製品番号 176003702、 Glycoprotein Performance Test Standard 添付して出荷)
- 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 μL(製品番号 186002640)

## グラジエント(図7):

<u>時間</u>			
( <u>min</u> )	<u>%A</u>	<u>%B</u>	Curve
0.0	15.0	85.0	6
0.5	15.0	85.0	6
1.0	30.0	70.0	6
21.0	37.0	63.0	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
データ管	FE · IIN	JIFL v1 7	

### 結果および考察

#### 直交的かつ相補的な糖ペプチドマッピング分離

ペプチドマッピングに向けた従来のアプローチを示すために、まずワイドポア C<sub>18</sub> 固定相 (ペプチド分析用 BEH C<sub>18</sub> 300 Å 1.7 µm)を用いた逆相クロマトグラフィーを用いて mAb の Lys-C 消化物の LC-UV-MS 分析を実施しました。第一世代 mAb 医薬品製品として有名でありバイオシミラー開発のターゲットとなることから<sup>13</sup>、 本研究にはトラスツズマブを選択しました。図 1A にはトラスツズマブの Lys-C 消化物に典型的な UPLC クロ マトグラムを示しましたが、ここでは、1 分あたり 0.5% アセトニトリルを変更するグラジエント全域に渡っ てペプチドは幅広く分離しました。消化物のグリコシル化していないペプチドはクロマトグラム全域に渡っ て広く分離しているのに対し、糖ペプチドは約 60 分の保持時間でおおよそ 1 分の幅の領域に溶出しました。 この高分離を生成する条件にはトリフルオロ酢酸 (TFA)を添加した移動相を用いておりますが、同じ移動相 はタンパク質分析の HILIC 分析にも最適であることが分かっています<sup>10-11</sup>。

結果的に、グラジエントを逆にして新規に開発したワイドポアアミド結合相(Glycoprotein BEH Amide、300Å) を用いた HILIC により、逆相分離と直交する分析法が実現します。この新規ワイドポアアミド固定相を充塡 したカラムと1分あたり0.5%アセトニトリル濃度を上昇させるグラジエント勾配を用いて得られたクロマ トグラムの例は図1に示しました。ここでは、トラスツズマブのLys-C消化ペプチドは前半と後半に溶出す る種に大きく分かれましたが、これらはそれぞれグリコシル化していない種とグリコシル化している種に相 当します。TFA イオンペアの使用によりペプチド残基の親水性がマスクされ糖鎖による親水性修飾の選択性 が向上するため、この分離が促進されます。また、アミドカラムにより糖ペプチドはクラスで分離されるだ けでなく、ペプチドグライコフォームの選択性も逆相分離に比べて顕著に向上したことも注目してください。



図 1. トラスツズマブのLys-C 糖ペプチドマッピング。(A) ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>18</sub>、300 Å、 1.7 µm、2.1 × 150 mm カラムを用いたLys-C 消化物の従来の逆相分離(B) ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm、2.1 × 150 mm カラムを用いたLys-C 消化物のHLLC 分離。 各分析では、9.2 µg のLys-C 消化物を同じグラジエント勾配と、約0.2% TFA in 80:20 アセトニト リル/水(HLLC) もしくは 100% 水(逆相) からなる希釈液を用いてサンプル注入。

強く保持するピークに焦点を当てることで、トラスツズマブ分子のグリコシル化について検討を開始できます。 特に、オンライン MS 検出により得られた MS データとトータルイオンクロマトグラム (TIC) は、図 2B に示 すようにペプチド種とそのグライコフォームの同定に適用できます。Lys-C 糖ペプチドマップには、トラスツ ズマブの Fc ドメイン由来のアミノ酸残基 29 のペプチド(K16) が存在します。MS データの解析から、mAb で 一般的に見られる多くの二分岐構造が比較的多く容易に同定できました。例えば、図 3B はそれぞれ約 34.7 分 および 36.4 分の保持時間にモノシアリル化およびジシアリル化したグライコフォームを同定した MS データを 示しています。これらの同定は、以前に報告されているトラスツズマブの遊離 N 結合型糖鎖プロファイル<sup>14-15</sup> と非常によく相関しています。



図 2. HILIC と ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、 300 Å、1.7 µm カラムによるトラスツズマブのLys-C 糖ペプチドマッピング。(A)Lys-C糖ペプチド保持ウィ ンドウのUV クロマトグラム。(B) 同じ保持ウィンド ウのトータルイオンクロマトグラム(TIC)。

						_	
Species	Modification	Calculated Mass (Da)	RT (Min)	Intensity	Error (ppm)	В	
HC:K16	A1	4555.1865	26.4	15461	-1.0		
HC:K16	A2	4758.2656	27.7	219414	-1.1		
HC:K16	FA1	4701.2441	27.7	17931	-3.3		
HC:K16	FA2	4904.3237	28.8	1502968	-1.7		138
HC:K16	M5	4676.2129	29.3	51057	-0.7		L
HC:K16	A2G1	4920.3188	29.7	89714	-0.9		
HC:K16	A2G1	4920.3188	30.3	33516	-1.9		
HC:K16	FA1G1	4863.2974	30.4	17005	-1.1		~
HC:K16	FA2G1	5066.3765	30.8	1156785	-0.7		
HC:K16	FA2G1'	5066.3765	31.4	312270	-1.0		
HC:K16	FA2G2	5228.4292	33.2	226743	-2.0		_



図3.トラスツズマブLys-C糖ペプチド同定に用いた MSスペクトルデータ。(A)図2で標識した帰属の保 持時間、MS強度、質量エラー。(B)存在量の少ない モノおよびジシアリル化N結合型糖鎖で修飾された Lys-C糖ペプチドの同定に用いたMSスペクトル。

### トラスツズマブグリコシル化のHILIC-UV糖ペプチドマッピングによるロット間分析

HILIC-MS ベースの糖ペプチドマッピングにより情報豊富なデータが得られることは明らかです。しかしながら、 これら HILIC 糖ペプチドマッピング分離は光学検出のみに基づく分析法にも役立ちます。例えば、2 種類の 医薬品サンプルについてトラスツズマブのグリコシル化のロット間分析を実施するのに HILIC-UV 分析法を適 用しました。2 種類の異なるロットのトラスツズマブから得られた糖ペプチド K16 の代表的なクロマトグラム を図 4A に示しました。これらロットに関する以前の遊離糖鎖分析から、グリコシル化に違いがあることが 分かっています<sup>14</sup>。糖ペプチドプロファイルに渡るピーク面積の比較により、トラスツズマブのこの 2 ロット がグリコシル化に関して実際に異なっていることを確認しました。特に、トラスツズマブのこれらロットは、 FA2、FA2G1、FA2G2 グライコフォームの存在量が異なっていることからも明らかなように、末端のグリコシ ル化の程度が異なっていると考えられます (図 4B)。この結果はトラスツズマブサブユニットについて以前に 行われた HILIC ベースのプロファイリングおよび遊離糖鎖分析により得られた結果と一致していました<sup>11</sup>。



図 4. トラスツズマブ Lys-C ペプチドグライコフォームのロット間プロファイリング。(A) 異なる 2 ロットの医薬品製品から得られたトラスツズマブ Lys-C 糖ペプチドの HILIC クロマトグラム。(B) 主要なサンブル成分の相対存在量。分析は ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7  $\mu$ m カラムを用いて 3 回実施。

## mAbグリコシル化に関するドメインおよびペプチド特有の情報による GlycoWorks RapiFluor-MS N 結合型糖鎖分析の補完

糖ペプチドマッピングの魅力的な特徴は、ドメインやペプチド特有の情報の特性解析に適用できる点です。 推論解析もしくは ETD フラグメンテーション分析、または両方によって糖ペプチドマッピングは、グリコシル 化の正確な部位について詳細を確認するのにも用いることができます<sup>16</sup>。以前言及したように<sup>11</sup>、lgG は重鎖 の Asn297 に一貫して N 結合型糖鎖を有しており、これは Fc サブユニットが 2 つの糖鎖で修飾されることを 意味しています。さらに、lgG と mAb lgG 治療薬には、マルチドメインでのグリコシル化を示すものもあり ます<sup>16</sup>。例えば、セツキシマブは、Fc および Fab ドメイン両方がグリコシル化されており、本研究において 非常に興味深いケースとなります。 セツキシマブのLys-C/トリプシン消化物の HILIC 糖ペプチドマップにより、この分子の複雑な糖鎖プロファ イルが明確に示されます(図 5)。表示したクロマトグラムでは、約 30 のクロマトグラフィーピークが見ら れました。さらに MS データの大まかな解析により、少なくとも 25 のグライコフォーム種が、1-2 %以上 の高い相対存在量で存在することが確認されました。図 6 はこれらの帰属を示す MS データを示しています。 図から分かるように、9 個のグライコフォームは Fcドメインのトリプシン消化ペプチド T22 と帰属され、一方、 他の 16 個のグライコフォームは Fab ドメインのトリプシン消化ペプチド T8 と帰属されました。Fab ドメイン (T8) 糖鎖の多くは、非ヒト $\alpha$  -1,3-ガラクトースもしくは非ヒトN グリコシルノイラミン酸部分 <sup>18</sup> のような 免疫原性エピトープを含むことは興味深い点です。以前の研究において、これら糖鎖種は、相補的なサブユ ニットマッピングと *Rapi*Fluor-MS 標識糖鎖分析により同定しました <sup>11</sup>。今回の糖ペプチドマッピングの結果 により、タンパク質グリコシル化を評価する更なる相補的な技術を示しています。



図 5. Lys-C/トリブシンを組み合わせた消化によるセツキシマブの N 結合型糖鎖部位およびその微小不均一性の評価。セツキシマブFc ドメインのペプチド T22 のグライコフォーム帰属はダークグレーで示し、Fab ドメインのペプチド T8 のグライコフォーム帰属は赤で示しました。分析は ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7  $\mu$ m、2.1×150 mm カラムと約 0.2 %TFA 含有80:20 アセトニトリル / 水のサンプル希釈液を用いて、9.2  $\mu$ g の Lys-C/トリプシン消化物について実施。

Species	Modification	Calculated Mass (Da)	RT (Min)	Intensity	Error (ppm)	
HC:T22	FA1	2429.9592	32.2	9047	1.5	
HC:T22	FA2	2633.0386	33.6	263523	1.4	
HC:T22	M5	2404.9275	35.2	78988	0.0	
HC:T22	FA2G1	2795.0913	36.1	186156	1.2	
HC:T22	FA2G1'	2795.0913	36.7	57185	0.7	
HC:T22	[Hex5HexNAc3DHex1]	2754.0647	37.8	7783	1.0	
HC:T22	M6	2566.9805	38.1	5432	-1.8	
HC:T22	FA2G2	2957.1443	38.9	38257	1.1	
HC:T22	[Hex6HexNAc3DHex1]	2916.1177	40.5	12246	-1.3	
HC:T8	FA2	3350.3689	29.4	5688	4.9	
HC:T8	M5	3122.2578	30.4	6437	2.7	
HC:T8	FA2G1	3512.4216	31.7	8925	3.2	
HC:T8	FA2G2	3674.4746	34.1	11695	8.2	
HC:T8	FA2G2Ga1	3836.5273	36.7	9657	-0.6	
HC:T8	FA2G2Ga1'	3836.5273	37.0	15605	0.3	
HC:T8	FA2G2Sg1	3981.5649	37.5	25532	1.9	
HC:T8	FA2G2Ga2	3998.5801	39.1	212644	-0.7	
HC:T8	A2G2	3471.3950	39.1	21542	2.0	
HC:T8	[Hex7HexNAc5DHex1]	4144.6377	39.2	6944	-10.8	
HC:T8	FA2G2Ga1Sg1	4143.6177	39.6	90905	-0.7	
HC:T8	FA2G2Sg2	4288.6553	40.2	7428	-2.5	
HC:T8	[Hex8HexNAc5DHex1]	4363.7124	41.8	5280	1.7	
HC:T8	[Hex7HexNAc5DHex1NGNA1]	4508.7498	42.4	7114	-3.6	
HC:T8	[Hex9HexNAc5DHex1]	4525.7651	43.8	20104	4.3	
HC:T8 [Hex8HexNAc5DHex1NGNA1] 4670.8027 44.2 7640 1.2						

図 6. Lys-C/トリブシン消化セツキシマブのHILIC-UV-MS 分析の糖ペプチド帰属に用いた MS スペクト ルデータ。MS データの大まかな解析により、Fc ド メインに 9種のグライコフォームを、Fabドメインに 16種のグライコフォームを帰属できました。

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

この糖ペプチド分離例で得られたピークキャパシ ティは、他の市販カラムテクノロジーと比較して みると特に注目すべき値です。Glycoprotein BEH Amide 300 Å 1.7 μm カラムの性能を評価するため に、NIST 候補標準物質、IgG1K mAb の Lys-C 消化 物を分析しました。本試験では、フォーカスグラ ジエントと共に、低波長 UV 検出の代わりにペプチ ドの内部蛍光を用いることで、得られたクロマト グラムにおいて高い SN を達成することができまし た。mAbのFcドメイン由来の糖ペプチドはLys-C断 片にトリプトファンを含み、大部分はこのことによ りこの検出メカニズムが実現可能となります。NIST lqG1KのLus-C糖ペプチドについて得られた3つの蛍 光クロマトグラムを図7に示しました。これら3つの クロトマトグラムは、ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カラムとその他代替と なる市販カラム(カラム A および B) を用いて得ら れました。両端の糖ペプチドの保持時間(\*)で区切 られた保持ウィンドウと、K16+FA2、K16+FA2G1、 K16+FA2G1'、K16+FA2G2、K16+FA2G2Ga1 のピー クの半値幅を用いて、各カラムのピークキャパシ ティを測定しました。この分析は、これらカラムの 分離能力が大きく異なっていることを示しています。 Glucoprotein BEH Amide カラムは、有効ピークキャ パシティが 72.8 と卓越したピークキャパシティを 示し、他のアミドカラムテクノロジーに比べて 40 もしくは 96% 性能が向上していました。



図 7. 蛍光検出とアミド固定相を充填した各種 2.1×150 mm カラムを用いた lgGIK の Lys-C 糖ペプチドマッピング。競合カラム A: 150 Å 2.6  $\mu$ m、2.1×150 mm (上)、競合 カラム B: 1.8  $\mu$ m、2.1×150 mm (中) ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、 1.7  $\mu$ m カラム (下)。ピークキャパシティは標識した糖ペプチドの半値幅およびアスタリ スク(\*) で印をつけた最初と最後に溶出する糖ペプチド種により設定した保持ウィンド ウに基づいて計算しました。本比較試験結果は全てのアプリケーションを代表するもの とは限りません。

#### 結論

糖タンパク質の糖ペプチドマッピングは、ドメインおよびペプチド特有のグリコ シル化の両方を解析するのに用いることができる非常に有効な技術です。本研究 では、逆相分離によって得られるクロマトグラフィーの情報を補完する、糖ペプ チドの HILIC 分離への ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide、300 Å、1.7 µm カ ラムの使用について実証しました。さらに、本研究の結果は、この HILIC 分離に より他の市販アミドカラムテクノロジーと比較して良好なピークキャパシティが 得られることを示していました。HILIC 分離は MS に適合するため、糖ペプチドマッ プを特性解析するための情報豊富なデータを容易に得ることができます。例え ば、本研究では、セツキシマブのFc および Fab ドメイングリコシル化など、マ ルチドメインのタンパク質グリコシル化特性解析が比較的簡潔にできることを示 しています。HILIC サブユニットマッピングや GlycoWorks *Rapi*Fluor-MS 標識 N 結 合型糖鎖分析など最近開発されたストラテジーと組み合わせることで、ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide を用いた糖ペプチドマッピングは、今までにない レベルの詳細までタンパク質のグリコシル化特性解析を促進することが非常に 期待されます。

### 参考文献

- Xie, H.; Gilar, M.; Gebler, J. C., Characterization of protein impurities and site-specific modifications using peptide mapping with liquid chromatography and data independent acquisition mass spectrometry. *Anal Chem* 2009, 81 (14), 5699–708.
- Witze, E. S.; Old, W. M.; Resing, K. A.; Ahn, N. G., Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods* 2007, 4 (10), 798–806.
- Huang, H. Z.; Nichols, A.; Liu, D., Direct identification and quantification of aspartyl succinimide in an IgG2 mAb by *Rapi*Gest assisted digestion. *Anal Chem* 2009, 81 (4), 1686–92.
- Lauber, M. A.; Koza, S. M.; McCall, S. A.; Alden, B. A.; Iraneta, P. C.; Fountain, K. J., High-Resolution Peptide Mapping Separations with MS-Friendly Mobile Phases and Charge-Surface-Modified C<sub>18</sub>. *Anal Chem* 2013, 85 (14), 6936–44.
- Gilar, M.; Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Xie, H.; Han, H.; Ying, W.; Qian, X., Characterization of glycoprotein digests with hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry. *Anal Biochem* 2011, 417 (1), 80–8.
- Martin Gilar; Ying-Qing Yu; Joomi Ahn; Xie, H., Analysis of Glycopeptide Glycoforms in Monoclonal Antibody Tryptic Digest using a UPLC HILIC Column. Waters Application Note 720003363en 2010.
- 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.
- 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.
- Lauber, M. A.; Koza, S. M., Mapping IgG Subunit Glycoforms using HILIC and a Wide-Pore Amide Stationary Phase Waters Application Note 720005385en 2015.
- 12. Lauber, M. A.; Koza, S. M., Enhancing the Peak Capacity of High Molecular Weight N-Glycan HILIC Separations with a Wide-Pore Amide Bonded Stationary Phase. Waters Tech Brief 720005381en 2015.
- 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.
- Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Gilar, M., Trastuzumab Glycan Batch-to-Batch Profiling using a UPLC/FLR/MS Mass Spectrometry Platform. Waters Appication Note 720003576en 2010.
- 15. 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).
- 16. Houel, S.; Hilliard, M.; Yu, Y. Q.; McLoughlin, N.; Martin, S. M.; Rudd, P. M.; Williams, J. P.; Chen, W., N- and O-glycosylation analysis of etanercept using liquid chromatography and quadrupole time-of-flight mass spectrometry equipped with electron-transfer dissociation functionality. *Anal Chem* 2014, 86 (1), 576–84.
- 17. 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.



#### 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、SYNAPT、MassLynx 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9月 720005409JA PDF