[TECHNOLOGY BRIEF]

HILICおよび内部蛍光による検出を用いたインタクトmAbの糖鎖占有率測定

Authors: Matthew A. Lauber and Stephan M. Koza

目的

ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide 300 Å カラムと HILIC を用いたインタクト mAb の糖鎖占有率測定を実証すること

背景

モノクローナル抗体（mAb）は市場において最も重要な治療薬の 1 つです。治療用途として処方されるこれら mAb は、CHO などの真核細胞株で発現させることが最も多く、結果として、重鎖の Fc 領域のアスパラギン残基 2 か所のコンセンサス部位に *N*-グリコシル化が見られます。グリコシル化は薬効、安全性、製造条件の尺度として用いることができるため、mAb 製剤原料の *N* 結合型糖鎖プロファイルを特性解析しルーチンでモニターすることは、多くの場合重要です[1-2]。最近発売した GlycoWorks™ *Rapi*Fluor-MS™ *N*-Glycan Kit により、非常に詳細な HILIC ベースの遊離 *N* 結合型糖鎖分析を容易に行うことができるようになり、それに伴って *N* グリコシル化の不均一性の解析も容易に行えるようになりました[3-4]。一方で、特にグリコシル化が不完全であると mAb のエフェクター機能を大きく変化させるため[5]、アスパラギン結合部位がどれだけ *N* 結合型糖鎖で占有されているのかを測定することも重要です。従来、この評価は mAb の還元により得られる重鎖のキャピラリー SDS ゲル電気泳動法（CE-SDS）の分離により行われていました[6,7]。代わりにインタクト mAb の糖鎖占有率の変異体を直接評価するために、我々は HILIC に基づく LC 分析法を開発しました。このかつてない分離を達成するために、新規で本目的のために開発を行った HILIC カラムを採用しました。この新規カラム、ACQUITY

ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å 1.7 µm カラムを用いたインタクト mAb 糖鎖占有率変異体のかつて無い親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）分離

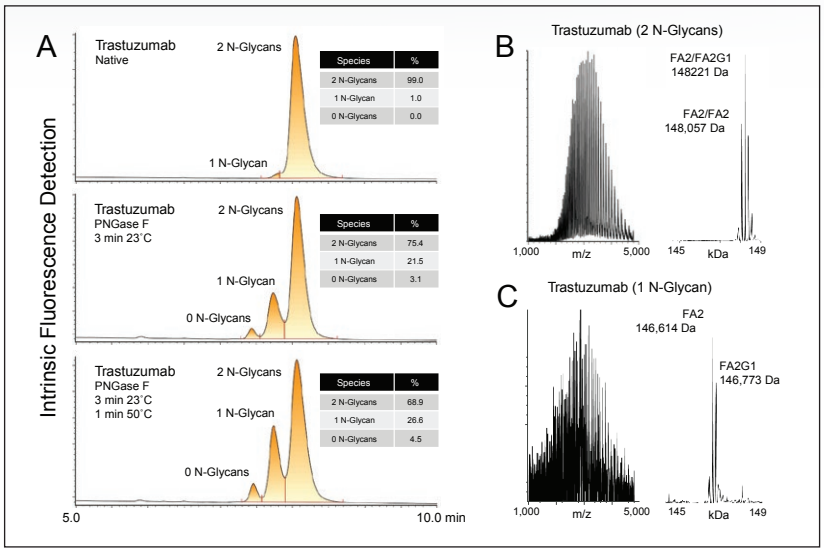

図 1. インタクトトラスツズマブの HILIC 分離。（A）未変性および一部脱グリコシル化したトラスツズマブの HILIC 蛍光クロマトグラム。（B）未変性トラスツズマブサンプルで分離した主要な分析種の未加工およびデコンボリューションした ESI MS スペクトル（C）未変性トラスツズマブサンプルで分離した少量分析種の未加工およびデコンボリューションした ESI MS スペクトル。ACQUITY UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å 1.7 µm カラムを 80℃で、5 mg/mL のトラスツズマブ 1 µL（水溶液）を注入して HILIC 分離を実施。0.1%（v/v）TFA と 0.3%（v/v）HFIP を含む水溶液（A）およびアセトニトリル溶液（B）を移動相として用いて、流速 0.4 mL/min でサンプルを分離。以下のグラジエント条件を使用：20%A; 0-0.5 分、20-25%A; 0.5-1.0 分、25-40%A; 1.0-10.0 分、40-100% A; 10.0-10.5 分、100% A; 10.5-11.0 分、100% -20% A; 11.0-11.5 分、20% A; 11.5-15.0 分（再平衡化）。溶出したタンパク質は内部蛍光（Ex 280 nm / Em 320 nm）で検出。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

UPLC Glycoprotein BEH Amide 300 Å、1.7 µm カラムは、mAb が固定相のポアの大半にアクセスでき、拡散の制限により大きく分離が損なわれることのないワイドポアアミド固定相が充填されています。

ソリューション

インタクトの mAb に対して 2.1 × 150 mm ワイドポア BEH Amide カラム（流速：0.4 mL/min、カラム温度：80℃）を用いたハイスループット高分離 HILIC 分離を確立しました。さらに、HILIC グラジエント初期組成に用いられる高い有機溶媒比率における mAb の溶解性を向上するために、2 種類の移動相添加剤、0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）および 0.3% ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）を用いました。この LC 分析法の感度を向上させるために、インタクトタンパク質はその内部蛍光を用いて検出を行いました。ピーク積算に望ましい最適なシグナルノイズ比と一貫してフラットなクロマトグラフィーベースラインが得られる励起および蛍光波長はそれぞれ 280 nm、320 nm でした。この 15 分の LC 分析法から得られた代表的なクロマトグラムを 1A に示しました。3 種類のクロマトグラムを示しています。1 番上のクロマトグラムは製剤を希釈して注入したトラスツズマブの結果を示していますが、他の 2 つのクロマトグラムは PNGase F で一部脱グリコシル化した後のトラスツズマブサンプルの結果を示しています。脱グリコシル化したトラスツズマブサンプルは、mAb の糖鎖占有率変異体が分離していると予想される通り、HILIC プロファイルに特徴的な 3 つのピークをはっきりと示しています。純粋なトラスツズマブのサンプルには、オンライン MS 分析の結果で確認した通り、全て占有された形態および 1 つ占有された形態（1%）のみが測定可能なレベルで含まれていました。主要な LC ピークに対応するデコンボリューションした MS スペクトルは、148,057 Da および 148,221 Da など、トラスツズマブの主要なグライコフォームの理論分子量の 2 Da 以内の質量が示されました（図 1B）[9]。一方で、分子量が少し小さい保持の弱いピークのデコンボリューションした MS スペクトルは不均一性が低減し、約 1000 から 2000 Da 小さい質量を示しており、糖鎖が 1 か所占有した形態と一致していました（図 1C）。このサンプルでは、完全に脱グリコシル化した形態は検出されませんでした。このデータは、同じ速度でどちらの部位も脱グリコシル化されるとした場合に予測されるよりも完全に脱グリコシル化した形態の量は少ないという興味深い結果を示しています。この例では、完全に脱グリコシル化した形態の観測されたレベルは、予測されるよりも約 1/3 少ないという結果でした。これは、一方の *N* 結合型糖鎖の消化脱離速度がもう一方よりも遅い、もしくは最初の *N* 結合型糖鎖の脱離により、残りの *N* 結合型糖鎖の消化脱離速度が低減する可能性を示唆しています。

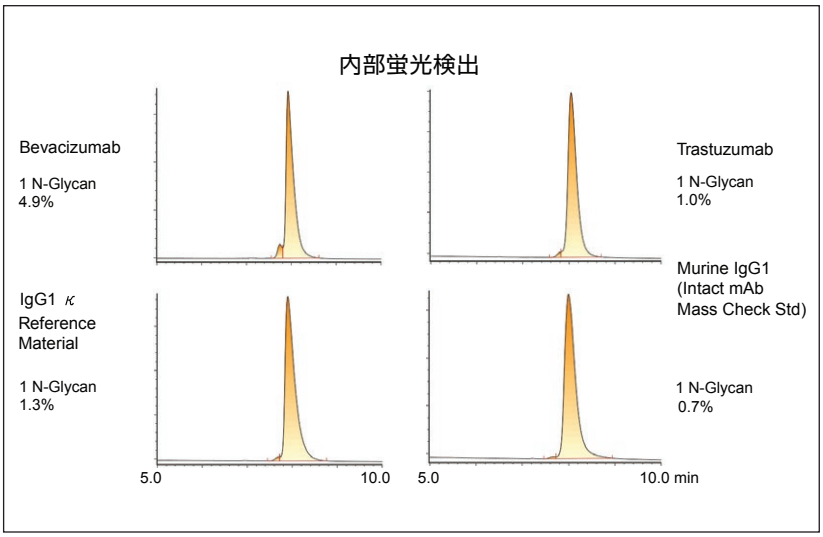

図 2．4 種類のインタクト mAb の HILIC 分析。ベバシズマブ、候補標準物質 NIST IgG 1K、トラスツズマブは、前処理無しに各製剤から 5 mg/mL に希釈して分析。Intact mAb Mass Check Standard（1mg）は HILIC 分析の前に、6M 塩酸グアニジン 500 µL に溶解し、100kDa MWCO ポリエーテルスルホン膜（GE Healthcare Life Sciences, Vivaspin 500）を 3 回通してフィルターろ過し、5mg/mL に濃縮

この技術の他の mAb に対する適用性を評価するために、3 種類のさらなる mAb サンプルを分析しました。トラスツズマブ、ベバシズマブ、候補標準物質 IgG1K、マウス IgG1（Intact mAb Mass Check Standard、製品番号 :186006552）の結果を図 2 に示しました。HILIC 蛍光クロマトグラムの積算により、これらサンプルは相対存在比 0.7-4.9%の範囲で 1*N*-糖鎖（不完全なグリコシル化）変異体を含むことが示されました。これらの結果は、この HILIC 分析法が mAb の不完全なグリコシル化に関して 1% のレベルまでの 1*N*-糖鎖形態を評価できる魅力的な技術となることを示唆しています。0*N*- 糖鎖の形態に関する検出限界はさらに低い可能性があります。これらのサンプルの中で、ベバシズマブは 0*N*- 糖鎖形態の存在比が最も高い可能性が予測されます。実際、ベバシズマブのプロファイルでは、非常に小さく全体のプロファイルの中で 0.05%のレベルではありますが、0*N*- 糖鎖種と一致した保持時間にピークが存在します。これらの結果は、0*N*- 糖鎖種のレベルは統計的な予測よりも低いことを示唆しています。しかしながら、実際に統計的な予測よりも低いのかどうかを確認するには、この分析の定量限界の厳密な決定および推定される 0*N*- 糖鎖種ピークの同定について評価する必要があります。

mAb 糖鎖占有率を測定するこのストラテジーは、必要であったとしても最小限のサンプル調製で良いというのが最も魅力的な点です。部分的に断片化や還元さ

れた mAb 種により、夾雑が見られるケースはありました。その場合は、Intact mAb Mass Check Standard のように、100 kDa MWCO ポリエーテルスルホン膜による遠心ろ過のクリーンアップといったシンプルな手段で、夾雑を十分に最小限に抑えられます。HILIC 分離の独自の選択性を考えると、オフラインもしくはオンラインの 2D-LC を実施し、サイズ排除もしくは逆相分離とワイドポア Amide HILIC 分離を組み合わせることでも、夾雑成分に対応できます。今後は、（シアリダーセもしくは他のエキソグリコシダーゼを用いて）糖鎖不均一性を低減し、mAb 糖鎖占有変異体をよりきっちりと分離する、また、この分離を Fc サブユニットを生成する酵素と組み合わせて使用するなど検討を行います。

まとめ

グリコシル化の不均一性のプロファイルに加えて、糖鎖占有率の測定も重要です。ここでは、高分子 HILIC 分離のために設計された Glycoprotein BEH Amide カラムが、インタクト mAb サンプル中の不完全な N- 結合型糖鎖占有率の直接的な定量に使用できることを示しました。還元 mAb の従来からの CE-SDS 分離とは異なり、この技術ではインタクト mAb の糖鎖の占有率に関する性質（例えば 1*N*-糖鎖種 vs. 0*N*-糖鎖種など）について、非推定の評価が行えます。ここで紹介した HILIC の方法は MS にも適合するため、得られたピークの帰属を容易に確認できます。

参考文献

1. Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Ayoub, D.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianferani, S., Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 2013, 85 (2), 715–36.
2. Dalziel, M.; Crispin, M.; Scanlan, C. N.; Zitzmann, N.; Dwek, R. A., Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 2014, 343 (6166), 1235681.
3. Lauber, M. A.; Yu, Y. Q.; Brousmiche, D. W.; Hua, Z.; Koza, S. M.; Magnelli, P.; Guthrie, E.; Taron, C. H.; Fountain, K. J., Rapid Preparation of Released N-Glycans for HILIC Analysis Using a Labeling Reagent that Facilitates Sensitive Fluorescence and ESI-MS Detection. *Anal Chem* 2015, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00758.
4. 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.
5. Beck, A.; Wagner-Rousset, E.; Ayoub, D.; Van Dorsselar, A.; Sanglier-Cianferani, S., Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Analytical Chemistry* 2013, (85), 715–736.
6. Chen, G.; Ha, S.; Rustandi, R. R., Characterization of glycoprotein biopharmaceutical products by Caliper LC90 CE-SDS gel technology. *Methods Mol Biol* 2013, 988, 199–209.
7. Lacher, N. A.; Roberts, R. K.; He, Y.; Cargill, H.; Kearns, K. M.; Holovics, H.; Ruesch, M. N., Development, validation, and implementation of capillary gel electrophoresis as a replacement for SDS-PAGE for purity analysis of IgG2 mAbs. *Journal of Separation Science* 2010, 33 (2), 218–227.
8. Renkin, E. M., J. *Gen. Physio.* 1954, (38), 225.
9. Damen, C. W.; Chen, W.; Chakraborty, A. B.; van Oosterhout, M.; Mazzeo, J. R.; Gebler, J. C.; Schellens, J. H.; Rosing, H.; Beijnen, J. H., Electrospray ionization quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry as a tool to distinguish the lot-to-lot heterogeneity in N-glycosylation profile of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20 (11), 2021-33.

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 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 720005435JA PDF