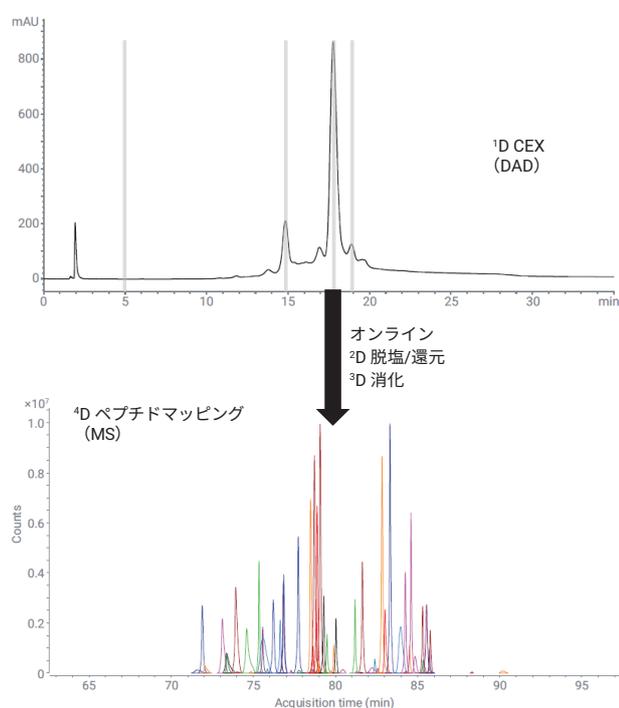


## 4D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体 電荷変異体の特性解析の完全自動化



### 著者

Liesa Verscheure,  
Gerd Vanhoenacker,  
Pat Sandra, and Koen Sandra  
RIC Biologics  
Belgium

Sonja Schipperges,  
Sonja Schneider, and  
Udo Huber  
Agilent Technologies, Inc.  
Germany

### 概要

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューション および Agilent 6545 LC/Q-TOF システムを用いた 4 次元液体クロマトグラフィー / 質量分析計 (4D-LC/MS) によるモノクローナル抗体 (mAb) 電荷変異体の完全に自動化された詳細な特性解析について説明します。カチオン交換クロマトグラフィー (CEX) によって分離された電荷変異体のピークを、マルチハートカットバルブに取り付けられたループで収集し、オンライン脱塩、変性、還元、およびトリプシン消化処理を連続的に行った後、LC/MS によるペプチドマッピングを行います。

## はじめに

タンパク質バイオ医薬品は、がん、心血管疾患、糖尿病、感染症、炎症性疾患、自己免疫疾患などのさまざまな疾患の治療のための重要な治療薬として活用され始めています。<sup>1~3</sup> タンパク質バイオ医薬品にはさまざまな種類があり、モノクローナル抗体 (mAb)、抗体薬物複合体 (ADC)、融合タンパク質、ホルモン、成長因子、サイトカイン、治療用酵素、血液因子、ワクチン、抗凝固剤などがあります。安全性と有効性の点で明らかな利点があるため、これらの品目は医薬品市場を大幅に再編し、現在では 350 を超える製品のヒットへの使用が米国および欧州連合で承認されています。<sup>1~3</sup> これは医薬品市場全体の約 4 分の 1 に相当し、その中でも mAb は最も急速に成長している医薬品の分類です。

これらの医薬品は、治療において大きな可能性がある一方で、構造が非常に複雑であるため、分析を行うことが困難です。<sup>1, 2</sup> 低分子医薬品とは対照的に、バイオ医薬品は分子量が大きく (mAb の分子量は約 150 kDa)、不均一です。バイオ医薬品は 1 つまたは 2 つの遺伝子の発現から生じる遺伝子産物です。ただし、翻訳後修飾 (PTM)、アミノ酸配列、高次構造などが異なる可能性のある数百の変異体が共存しており、これらすべてが製品のプロファイル、安全性、および有効性に関係します。<sup>1~3</sup> そのため、変異体の詳細な構造特性解析には、クロマトグラフィー (LC) と質量分析計 (MS) をはじめとする多くの分析ツールが用いられます。

アスパラギンの脱アミド化、C 末端のリジン切断、N 末端の環化 (ピログルタミン酸形成)、シアル化などの PTM から生じる可能性のある電荷変異体を分析するための重要技術として CEX があります。CEX は、固定相のアニオン基とタンパク質表面のカチオン基の間の静電相互作用が分離の基礎となっています。タンパク質が等電点 (pI) より低い移動相 pH でカラムにロードされ、塩または pH グラジエントにより溶出されます。CEX バッファは通常、不揮発性成分で構成されているため、これらのメソッドは MS と互換性がありません。ピーク同定は、MS 分析の前にピークの分取と脱塩を行う面倒な作業です。<sup>4</sup> 近年、堅牢な 2D-LC 機器が商業的に導入されたことにより、このような一連の作業は、オンラインで自動化されたメソッドで行われるようになりました。<sup>5~9</sup> CEX カラムから溶出するピークはループに貯留され、MS 測定の前に逆相 (RPLC) またはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いたオンライン脱塩にかけられます。2D-LC ではコンプリヘンシブ (LC×LC) と (マルチ) ハートカット 2D-LC (LC-LC) の両方が用いられています。<sup>5~9</sup> しかしながら、CEX ピークを明確に識別するには、ペプチドマッピングが必要です。タンパク質の測定では同定を行ったり、MS 装置の質量精度を超える質量差を伴う支配的な修飾を明らかにしたりすることはできませんが、通常アミノ酸配列情報は得られず、修飾部位の特定もできません。以前の研究<sup>10~12</sup> をうけて、このアプリケーションノートでは、一次元目 (<sup>1</sup>D) CEX、ピークの収集、<sup>2</sup>D 脱塩、変性、還元、<sup>3</sup>D トリプシン消化、<sup>4</sup>D RPLC/MS ベースのペプチドマッピングを組み込んだ、mAb 電荷変異体の詳細な特性解析の完全自動化を行うオンライン 4D-LC/MS セットアップについて解説します。

## 実験

### 試料調製

アセトニトリル (HPLC-S)、水 (ULC/MS)、およびギ酸 (ULC/MS) は、Biosolve (オランダ、ファルケンスワールト) から入手しました。NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、NaCl、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、トリス塩基、ジチオスレイトール (DTT) は Sigma (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。UltraPure Tris-HCl pH 7.5 は、ThermoFisher Scientific (米国マサチューセッツ州ウォルサム) から購入しました。超純水 (I 型水) は、Sartorius (ドイツ、ゲッティンゲン) 製の arium pro Ultrapure Lab Water System を用いて水道水から精製しました。ヒト化モノクローナル抗体のトラスツマブ (ハーセプチンとして販売) を Roche (スイス、バーゼル) から入手しました。

### サンプル調製

トラスツマブは、<sup>1</sup>D CEX 移動相 A (MPA : 10 mM リン酸ナトリウム pH 7.65) で 7 mg/mL に希釈しました。トラスツマブを 37 °C で 3 日間高 pH 条件 (100 mM Tris pH 9.0) でインキュベートし、続いて <sup>1</sup>D CEX 移動相 A で 7 mg/mL にバッファ交換することにより、脱アミド化を誘導しました。

### 装置

マルチハートカットオプションを備えた Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムに加えて、Agilent 1260 Infinity II フォータナリポンプ、Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ、2 個の 2 位置/6 ポートバルブ、およびゼロデッドボリュウム T ピースを使用しました。接続には内径 0.12 mm のステンレス配管を使用しました。図 1 に装置構成の概略 (このアプリケーションノートのサマリー) を示します。ダイオードアレイ検出 (DAD) を、1 次元目 (CEX) と 4 次元目 (RPLC) で使用しました。さらに、Jet Stream ESI ソースを備えた Agilent 6545 LC/Q-TOF を 4 次元目の検出で用いました。

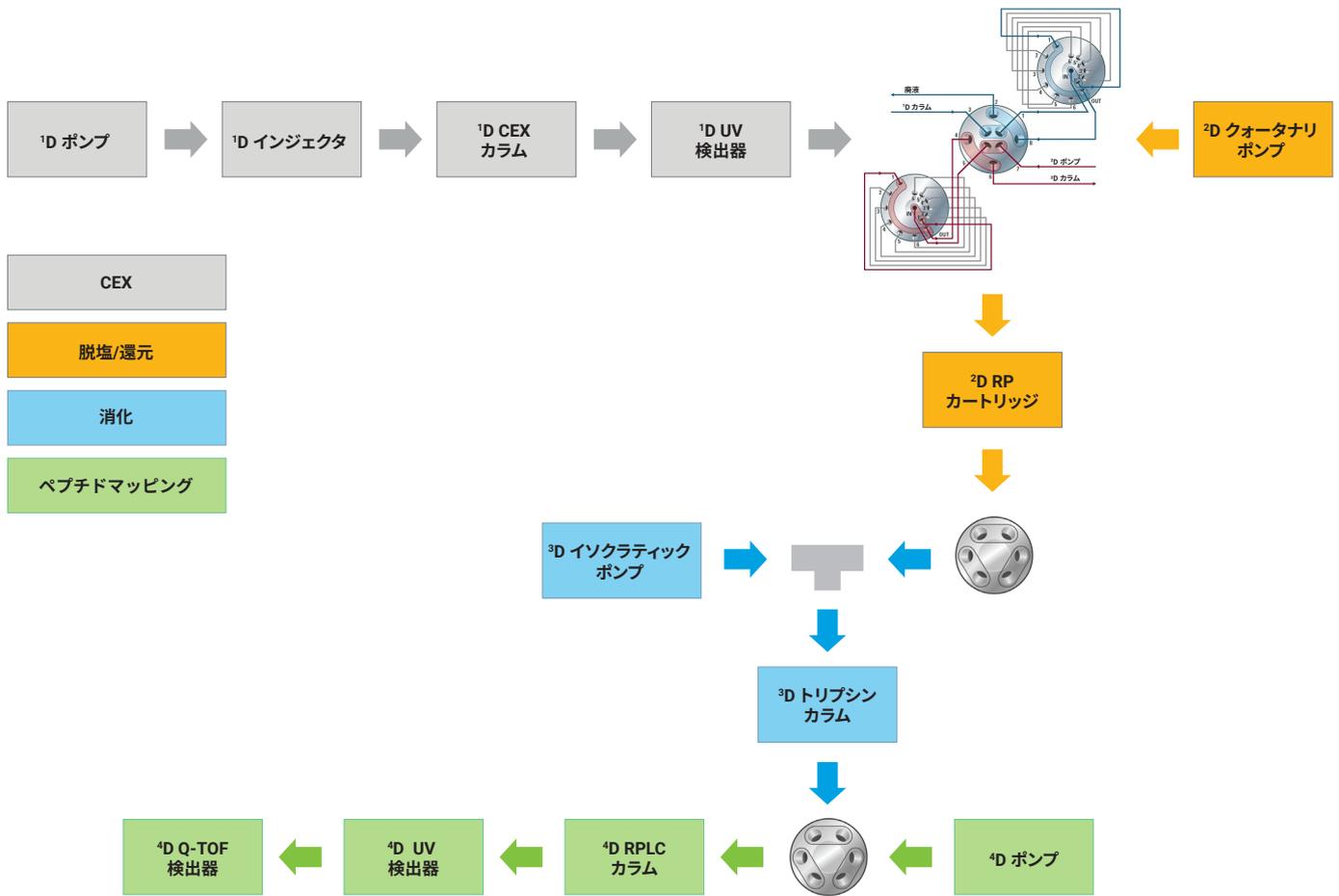


図 1. マルチハートカットを用いた <sup>1</sup>D CEX 分離と電荷変異体ピーク収集、<sup>2</sup>D RPLC ベースの脱塩、変性、還元、<sup>3</sup>D トリプシン消化、および <sup>4</sup>D RPLC-MS ベースのペプチドマッピングを組み込んだ 4D-LC/MS の構成

## 装置構成

### <sup>1</sup>D: カチオン交換クロマトグラフィー

- G7120A Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
- G7167B Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル、サンプルサーモスタット付き (オプション 101)
- G7116B Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT)、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 2 ポジション/6 ポートバルブを装着したバルブドライブ (オプション 058) 付き、1300 bar (G4231C)

- G7117B Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器、3.7 mm HDR InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G4212-60032) 付き

**注:** UV シグナルの飽和を防ぐために、光路長の短い検出器フローセル (光路長 3.7 mm) を取り付けシグナル強度を低減しました。

### マルチハートカット 2D-LC

- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2D-LC バルブ (G4236A) 付き
- 40 μL ループ付きマルチハートカットバルブ (G4242-64000) を搭載した 2 台の Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)

**<sup>2</sup>D:** 逆相クロマトグラフィーによる脱塩、変性、還元

G7111B Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ、アクティブインレットバルブ (AIM) (オプション 032) 付き

**<sup>3</sup>D:** トリプシン消化

- 0100-0969 ZDV T ピース
- G7110B Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ

#### <sup>4</sup>D: 逆相クロマトグラフィーによるペプチドマッピング

- G7120A Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 2 ポジション/6 ポートバルブを装着したバルブドライブ (オプション 058) 付き、1300 bar (G4231C)
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD、10 mm InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) 搭載
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF、Jet Stream ESI ソース搭載

**注:** Orachrom StyrosZyme TPCK-Trypsin および Agilent AdvanceBio peptide mapping カラムを、1 つのカラムコンパートメントの異なるゾーンに収納し、それぞれ 40 および 60 °C で温調しました。

#### ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS ChemStation リビジョン C.01.07 SR4 [505]
- 2D-LC アドオンソフトウェアリビジョン A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter Data Acquisition (B.09.00)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis, BioConfirm アドオン付き (B.07.00)

#### メソッド

<sup>1</sup>D と <sup>4</sup>D は 2D-LC ソフトウェアで構成し、<sup>2</sup>D と <sup>3</sup>D は通常の方法設定で制御し、繰り返しのイベントとしてプログラムしました。これらのイベントのサイクルタイムは 110 分で、2D-LC ソフトウェアでプログラムされた <sup>4</sup>D サイクルタイムと同じでした。MassHunter のデータ取り込みは、2D-LC システムからのリモートスタートによってトリガーしました。

CEX 分析全体で 4 つのハートカットを行いました。4.8 分における最初のハートカットはブランクカットです。これにより、対象の実際の CEX ハートカットを分析する前に、すべての次のプレコンディショニングが可能になります。

<sup>1</sup> D: カチオン交換クロマトグラフィー			
カラム	Agilent Bio mAb, nonporous (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部品番号 5190-2411)		
カラム温度	30 °C		
移動相 A	10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.65		
移動相 B	10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.65 + 100 mM NaCl		
流量	0.2 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	B (%)	CEX 分析
	0	5	
	36	70	
	36.5	100	
	46	100	
	46.5	5	
60	5		
注入量	100 μg		
検出	220 および 280 nm		
ピーク幅	> 0.025 分 (10 Hz)		

マルチハートカット <sup>1</sup> D > <sup>2</sup> D	
トラスツズマブのサンプリングタイムテーブル	
カット	時間 (分)
1 - ブランク	4.80
2 - プレピーク	14.93
3 - メインピーク	17.55
4 - ポストピーク	18.99

<sup>2</sup> D: 逆相クロマトグラフィーによる、脱塩、変性、還元 (手動入力の反復イベント)						
カラム	ポリマーベース脱塩カートリッジ、2.1 × 10 mm					
カラム温度	23 °C					
移動相 A	0.1 % (v/v) ギ酸水溶液					
移動相 B	0.1 % (v/v) ギ酸アセトニトリル溶液					
移動相 C	20 mM DTT in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5					
グラジエント	時間 (分)	A (%)	B (%)	C (%)	流量 (mL/min)	
	10	99	1	0	0.5	脱塩とフォーカシング (濃縮)
	10.01	0	0	100	0.2	還元
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	脱塩と溶出
	25	99	1	0	---	
	25.01	40	60	0	---	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	溶出と消化
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	---	
	95	99	1	0	---	
120	99	1	0	---		
バルブ	27 分: ポジション 1 → 2 (トリプシン消化開始) 67 分: ポジション 2 → 1 (ペプチドマッピング開始)					

<sup>3</sup> D：トリプシン消化 (手動入力のリバースイベント)			
カラム	Orachrom StyrosZyme TPCK-Trypsin PEEK (2.1 × 150 mm)		
カラム温度	40 °C		
移動相	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8		
グラジエント	時間 (分)	流量 (mL/min)	
	25	0.06	
	25.01	0.135	消化
	67	0.135	
	67.01	0.06	
135	0.06		
バルブ	27分：ポジション1 → 2 (トリプシン消化開始) 67分：ポジション2 → 1 (ペプチドマッピング開始)		

## データ処理

測定されたデータを、MassHunter BioConfirm ソフトウェアのアルゴリズムを用いて、トラスツズマブの軽鎖および重鎖の配列と照合しました。実験データをシーケンスと照合する際の質量許容値は 8 ppm としました。20 ppm の質量精度で得られた抽出イオンクロマトグラム (EIC) を使用して、脱アミド化などの PTM をモニタリングしました。

## 結果と考察

CEX、ピーク収集、脱塩、変性、還元、トリプシン消化、およびペプチドマッピングを組み込んだ、完全に自動化されたオンライン 4D-LC/MS タンパク質測定系のスキームを図 1 に示します。CEX ピークは、マルチハートカットバルブに取り付けられた 40 μL のループで収集され、1 画分ごとに脱塩、変性、および還元が行われるポリマー RP カートリッジに移送されます。カートリッジにトラップされた還元 mAb は、その後、アセトニトリル濃度を上げることによってトリプシンカラムに溶出されます。T ピースを使用して、トリプシン消化バッファを逆相移動相と混合してアセトニトリル濃度を下げることにより、最適な消化条件にて消化されます。消化中、トリプシンカラムはペプチドマッピングカラムと直列に接続され、生成したペプチドは RPLC カラムの先端にロードされます。20 分後、バルブ切り替えを行い、消化物の MS への溶出を開始します。

<sup>4</sup> D：逆相クロマトグラフィーによるペプチドマッピング (2D-LC ソフトウェアによるリバースイベント)			
カラム	Agilent AdvanceBio peptide mapping (2.1 × 150 mm × 2.7 μm) (部品番号 651750-902)		
カラム温度	60 °C		
移動相 A	0.1 % (v/v) 胃酸水溶液		
移動相 B	0.1 % (v/v) 胃酸アセトニトリル溶液		
流量	0.4 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	B (%)	
	0	1	
	8.5	1	
	9	100	
	15	100	
	16	1	
	20	1	ペプチドマッピングカラムへ消化物をロード
	64	1	
	64	1	ペプチドマッピング
	97	45	
	98	100	
	103	100	
104	1		
110	1		
DAD 検出	214 および 280 nm		
ピーク幅	> 0.025 分 (10 Hz)		
MS 検出			
イオン源			
イオン化	ポジティブ		
ドライガス温度	300 °C		
ドライガス流量	8 L/min		
ネブライザ圧力	35 psi		
シースガス温度	350 °C		
シースガス流量	8 L/min		
キャピラリー電圧	3,500 V		
ノズル電圧	1,000 V		
フラグメンタ電圧	175 V		
データ取り込み			
モード	Extended dynamic range (2 GHz)		
データ取り込み範囲	m/z 100 ~ 3,200		
	1 スペクトラム/秒		
	セントロイド取り込み		
67分にダイバートバルブをMSに切り替え			

mAb トラスツズマブの CEX クロマトグラムを 図 2 に示します。ハーセプチンとして商品化されているトラスツズマブは、HER2 受容体に結合するヒト化 IgG1 であり、この性質を用いて HER2 陽性転移性乳がんの治療に使用されています。この mAb は pI が 8.45 で、CEX 移動相 pH では正に帯電しており、それによって負に帯電したクロマトグラフィー樹脂との相互作用が生じます。NaCl 塩グラジエントを使用して mAb を溶出させると、さまざまな電荷変異体ピークが検出され、それらのピークはその後オンラインペプチドマッピングにかけられました。図 3A は、図 2 に示した 3 つの CEX ピーク（プレピーク、メインピーク、およびポストピーク）と CEX ブランクを分析した 4D-LC/MS 測定を概略的に示したものです。図 3B は、メイン CEX ピークの脱塩、変性、還元、消化、およびペプチドマッピングといった 1 サイクルにおける、圧カプロファイルおよび DAD クロマトグラムを拡大して示したものです。90 % を超えるシーケンスカバレッジが得られました。同定されたペプチドを表 1 に示します。また、LC/MS 化合物クロマトグラムの重ね書き表示を図 4 に示します。同定されなかったペプチドは鎖長が短く親水性の成分が多く、消化中にペプチドマッピングカラムの先端に濃縮されないことがあります。このため、それらは廃液へ流されます。

シーケンス情報の他に、ペプチドマッピングは修飾と修飾部位も明らかにすることができます。図 5 は、CEX のプレピーク、メインピーク、ポストピークの測定で検出された、2 つのペプチドの EIC（すなわち、30 位に潜在的な脱アミド化部位を含む軽鎖 ペプチド ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25 ~ 42)、および 102 位に潜在的な異性化部位を含む重鎖ペプチド WGGDGFYAMDYWGQGLTVVSSASTK (HC 99 ~ 124)) のオンラインペプチドマッピングを示したものです。データから、プレピークは脱アミド化された変異体に対応し、アスパラギンは軽鎖のうちの 1 つの 30 位でアスパラギン酸に変換されていると推定できます。ポストピークが重鎖のうち 1 つの 102 位にイソアスパラギン酸を有することも示されました。これは、修飾された変異体および修飾されていない変異体に対応する 2 つのピークが検出されたことにより明らかとなりました。これらの結果は、ハーセプチンの酸性および塩基性変異体に対してオフライン分取およびペプチドマッピングを行った Harris らの報告結果と一致しています。<sup>4</sup>

同じ実験を、高 pH ストレスを受けたハーセプチンサンプルで実施しました（図 6）。高 pH ストレス条件下では脱アミド化が誘発され、その結果 mAb はより酸性となることが知られています。図 6 に示す CEX プロファイルは酸性シフトを示し、CEX ピーク 1 と 2 のペプチドマッピング結果は、両方の軽鎖が 30 位で脱アミド化された 2 つの脱アミド化変異体を示しています。CEX ピーク 3 と 4 は、1 つの脱アミド化変異体に対応します。1 つの軽鎖が 30 位で脱アミド化されます。ピーク 1 と 2、および 3 と 4 の違いは、今回は重鎖の 387 位にある別の脱アミド化に起因します。この脱アミド化部位は、脱アミド化が存在する場合に明らかに異なって消化される 2 つのペプチド（完全切断および miss cleavage）において検出されました。

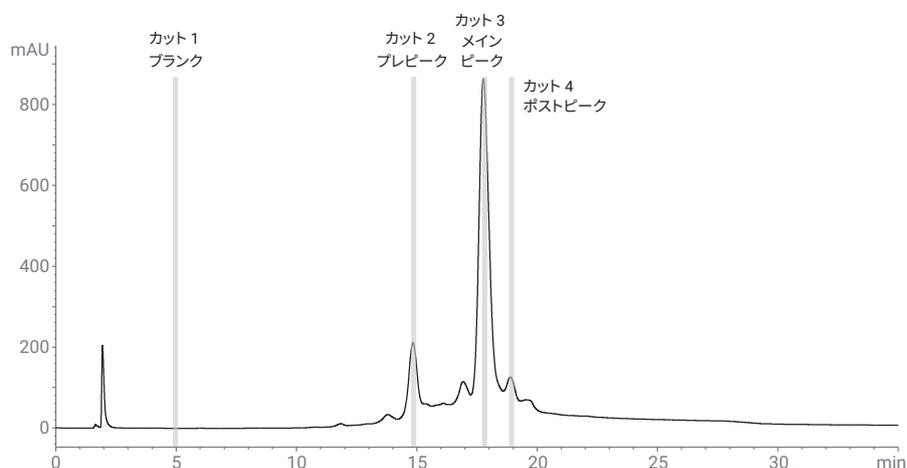


図 2. モノクローナル抗体トラスツズマブの CEX クロマトグラム。条件は参考文献 13 を参照。ハートカットした画分を灰色で示しています。

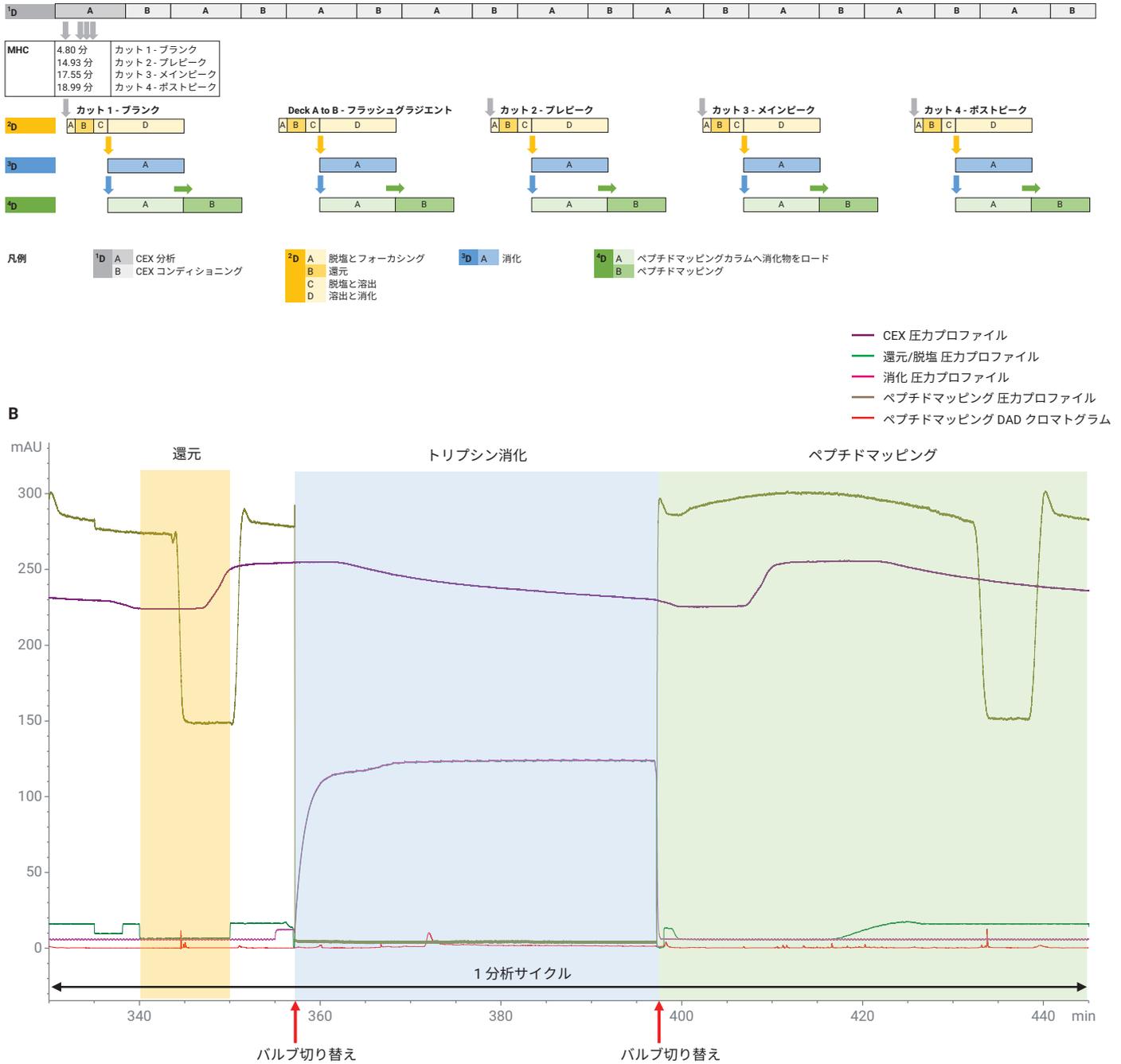


図 3. (A) 図 2 に示した、プレピーク、メインピーク、ポストピーク、および CEX ブランク画分の 4D-LC/MS 測定のさまざまなステージの概略図。  
 (B) メイン CEX ピークの脱塩、変性、還元、消化、およびペプチドマッピングの拡大図

表 1. RPLC/MS ベースのオンラインペプチドマッピング後に CEX メインピークで同定されたペプチド

RT	質量	容量	容量 %	シーケンス	Seq Loc.	ターゲット質量	誤差 (ppm)	Miss Cleavage
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC (001 ~ 019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC (020 ~ 030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	HC (020 ~ 038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHWVR	HC (031 ~ 038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC (044 ~ 050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC (051 ~ 059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC (066 ~ 076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC (068 ~ 076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC (068 ~ 087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC (068 ~ 098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC (077 ~ 087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC (077 ~ 098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDTAVYYCSR	HC (088 ~ 098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVVSSASTK	HC (099 ~ 124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC (125 ~ 136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC (137 ~ 150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC (151 ~ 213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKEVPEKSCDK	HC (214 ~ 225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC (226 ~ 251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC (252 ~ 258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK	HC (252 ~ 277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC (252 ~ 291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVDVSHEDPEVK	HC (259 ~ 277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC (259 ~ 291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC (278 ~ 291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC (305 ~ 320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC (305 ~ 323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYCK	HC (305 ~ 325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK	HC (305 ~ 329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAPIEK	HC (330 ~ 337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC (348 ~ 358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC (348 ~ 363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC (348 ~ 373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC (359 ~ 373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC (364 ~ 373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC (374 ~ 395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSK	HC (374 ~ 412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDK	HC (374 ~ 417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TTPVLDSGGSFFLYSK	HC (396 ~ 412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TTPVLDSGGSFFLYSKLTVDK	HC (396 ~ 417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	HC (418 ~ 442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	HC (420 ~ 442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC (443 ~ 449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDR	LC (001 ~ 018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCR	LC (001 ~ 024)	2551.2371	1.1	1

RT	質量	容量	容量 %	シーケンス	Seq Loc.	ターゲット質量	誤差 (ppm)	Miss Cleavage
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC (025 ~ 042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC (025 ~ 045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC (046 ~ 061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTK	LC (067 ~ 103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKVEIK	LC (067 ~ 107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTPPTFGQGTKVEIKR	LC (067 ~ 108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC (108 ~ 126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC (109 ~ 126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPR	LC (109 ~ 142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVCLLNFFYPR	LC (127 ~ 142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC (146 ~ 169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK	LC (146 ~ 183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYK	LC (146 ~ 188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK	LC (150 ~ 183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYK	LC (150 ~ 188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHK	LC (150 ~ 190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (150 ~ 207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYLSSTLTLTK	LC (170 ~ 183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (184 ~ 207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (189 ~ 207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC (191 ~ 207)	1817.8982	0.3	0

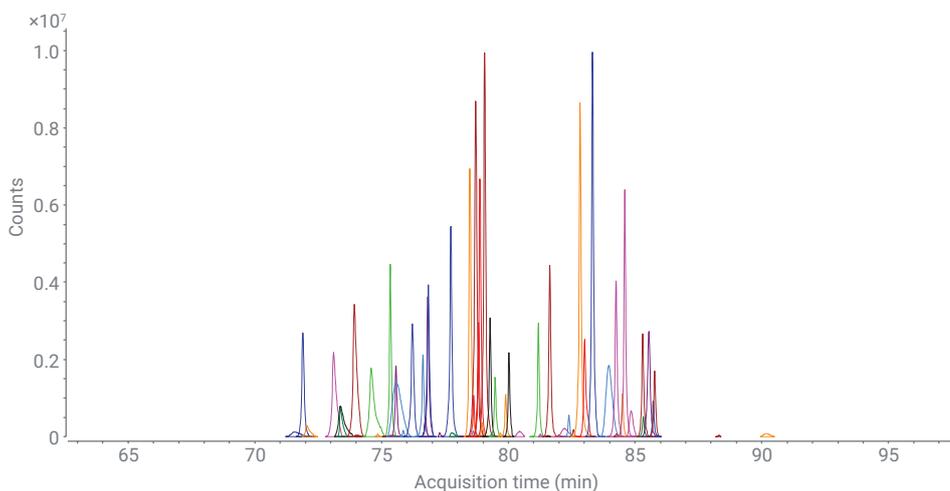


図 4. CEX メインピークのオンラインペプチドマッピングにより MS 同定されたペプチドの化合物クロマトグラム重ね書き表示

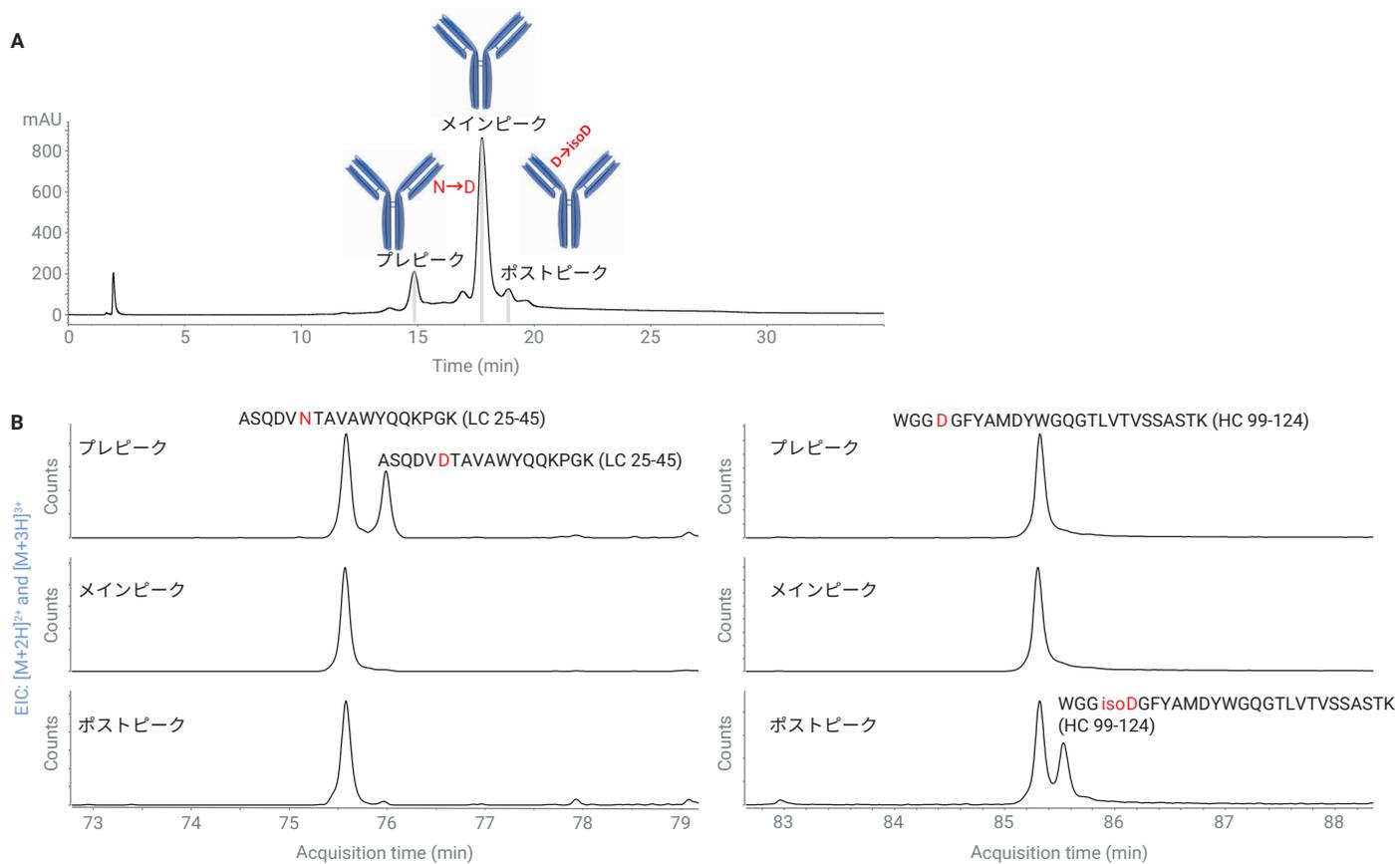


図 5. トラスツマブ CEX のプレピーク、メインピーク、およびポストピークのオンラインペプチドマッピング。  
 (A) CEX のクロマトグラム (B) 抽出イオンクロマトグラム - 軽鎖ペプチド ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25 ~ 42)、脱アミド化軽鎖ペプチド ASQDVDTAVAWYQQKPGK (LC 25 ~ 42)、重鎖ペプチド WGGDGFYAMDYWGQGLTVSSASTK (HC 99 ~ 124)、異性化重鎖ペプチド WGGisoDGFYAMDYWGQGLTVSSASTK (HC 99 ~ 124)

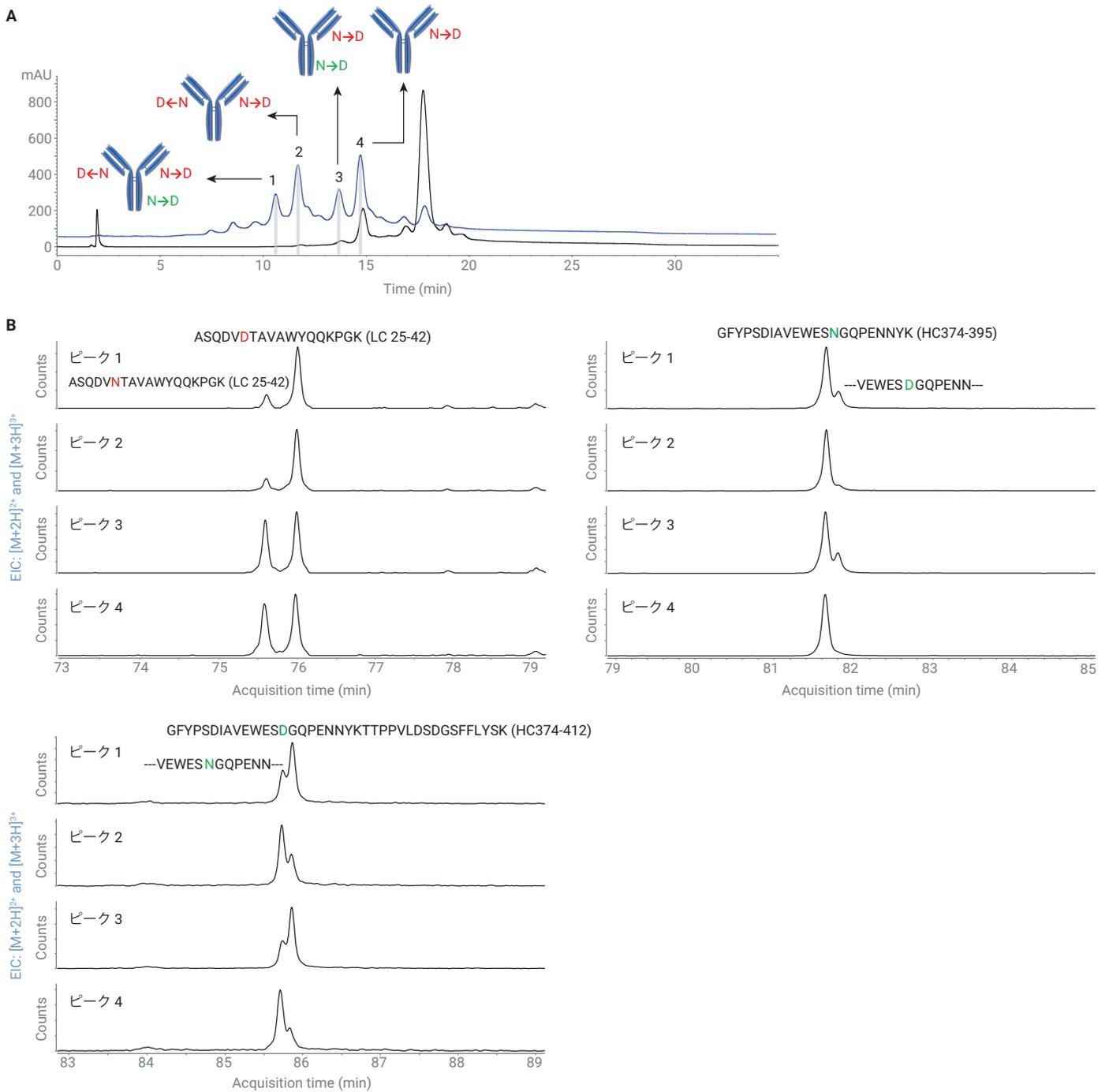


図 6. 高 pH ストレスを受けたトラストズマブ CEX ピーク 1、2、3、および 4 オンラインペプチドマッピング。

(A) 非ストレスおよび高 pH ストレストラストズマブの CEX クロマトグラムの重ね書き図 (B) 抽出イオンクロマトグラム - 軽鎖ペプチド ASQD**V**TAVAWYQQKPGK (LC 25 ~ 42)、脱アミド化軽鎖ペプチド ASQD**V**DTAVAWYQQKPGK (LC 25 ~ 42)、重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWES**N**GQPENNYK (HC 374 ~ 395)、脱アミド化重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYK (HC 374 ~ 395)、重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWES**N**GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSK (HC374 ~ 412)、脱アミド化重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWES**D**GQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSK (HC 374 ~ 412)

## 結論

<sup>1</sup>D CEX 分離、マルチハートカットによる電荷変異体ピークの収集、<sup>2</sup>D RPLC ベースの脱塩、変性、還元、<sup>3</sup>D トリプシン消化、および <sup>4</sup>D RPLC/MS ベースのペプチドマッピングを用いた完全自動化 4D-LC/MS タンパク質測定系を構築し、非ストレス下でのトラスツズマップ、および高 pH ストレスを受けたトラスツズマップの CEX プロファイルで観察された酸性および塩基性変異体の特性解析に適用しました。この多次元システムは、InfinityLab 2D-LC ソリューションと 6545 LC/Q-TOF システムをベースに構築されています。一次元目の CEX をプロテイン A アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーなどに置き換えることで、この 4D-LC/MS システムの変形型を簡単に構成することができます。

## 参考文献

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr.A* **2014**, 1335, 81-103.
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480-507.
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992-1000.
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr.B* **2001**, 752, 233-245.
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51-60.
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149-157.
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307-8315.
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr.B* **2016**, 1032, 119-130.
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119-2125.
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896-14903.
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr.A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460740.
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-5273EN, **2014**.



ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

DE.5371643519

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Printed in Japan, June 17, 2020  
5994-2020JAJP

