

# Agilent 1290 Infinity II LC システムによる ペプチドマッピングとグリカンマッピングの 自動切り替え

モノクローナル抗体の特性解析における  
生産性と柔軟性の向上

## 著者

Gerd Vanhoenacker, Aurélie  
Terrier, Gianni Vandenborre,  
Pat Sandra, and Koen Sandra  
RIC Biologics  
President Kennedypark 26  
B-8500 Kortrijk  
Belgium

Sonja Schipperges,  
Sonja Schneider, and  
Udo Huber  
Agilent Technologies  
Hewlett-Packard Strasse 8  
D-76337 Waldbronn  
Germany

## 概要

グリカンマッピングおよびペプチドマッピングは、モノクローナル抗体 (mAb) のような治療用タンパク質の構造を特性解析するための重要な分析手法です。このアプリケーションノートでは、mAb のグリカンマッピングとペプチドマッピングを、モード切り替え時に手動操作なしに同じシステムで実行する方法について説明します。分析は、カラムスイッチングバルブ、蛍光検出器 (FLD)、ダイオードアレイ検出器 (DAD)、および四重極 TOF 質量分析計 (Q-TOF MS) を搭載した Agilent 1290 Infinity II LC で実施しています。Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムとグリカンマッピングカラムを使用していますが、後者は高速でグリカンの遊離とラベル化を実行できる InstantPC キットと組み合わせています。さまざまな mAb サンプルで示されているように、単一の分析シーケンスでグリカンマッピングとペプチドマッピングを実行するよう機器を設定することにより、柔軟性と生産性が非常に高くなります。

## はじめに

mAb は、がん、自己免疫疾患、感染症などの命に関わる疾患を治療するための重要な治療用タンパク質として注目されています。治療用タンパク質として大きな可能性があると同時に、分析の要件が非常に厳しく構造的にかなり複雑です。グリカンマッピングおよびペプチドマッピングは、mAb に関連する構造的な複雑性を解明するための重要な分析ツールです。<sup>1~3</sup>

親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と FLD および 2-アミノベンズアミド (2-AB) によるラベル化を組み合わせた手法は、mAb 由来の N-グリカンの分析にきわめて有効であると考えられています。<sup>4</sup>このメソッドの基になっているのは、『高速・高分離能・高性能液体クロマトグラフィーメソッドによるグリカン混合物の分離およびオリゴ糖プロファイルの分析 (A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles)』という 25 年前の論文です。<sup>5</sup>分離は、アミド官能基を有する 5  $\mu\text{m}$  シリカベースの粒子が充填されたカラムで実施しました。当時、この手法は pH 4.4 のギ酸アンモニウムバッファを使用しているにもかかわらず、順相 HPLC メソッドであると考えられていました。現在では、この LC モードは HILIC と呼ばれています。最近アジレントは、AdvanceBio グリカンマッピングカラムを導入しました。これはアミドケミストリをベースにした専用のカラムで、1.8  $\mu\text{m}$  全多孔質および 2.7  $\mu\text{m}$  表面多孔質の両形式で使用でき、それぞれ UHPLC (120 MPa) および HPLC (60 MPa) に対応しています。その結果、元の論文で使用されている高速 (rapid) および高分離能 (high resolution) という用語は事実上再定義されています。実際、サブ 2  $\mu\text{m}$  全多孔質粒子およびサブ 3  $\mu\text{m}$  表面多孔質粒子で規定される短い拡散距離により、高速で優れた分離を実現しています。<sup>6</sup>

グリカンのラベル化を実行し、蛍光または質量分析 (MS) によるクロマトグラフィーの動作と検出を改善しています。多くのラボには 2-AB によるラベル化が適していますが、最近ではプロカインアミド (PC) のような高感度の MS 測定が可能な他のラベルも要求されています。従来は、分析プロセスではサンプル前処理がボトルネックになっており、脱グリコシル化、還元的アミノ化によるラベル化、クリーンアップのような手間を要するサンプル操作に数日を要していました。グリカングリコシルアミン型および簡素化された脱グリコシル化プロトコル (AdvanceBio Gly-X N-グリカン前処理) と反応する最新世代のグリカン試薬 (InstantPC) を使用することにより、処理時間を 1 時間未満まで削減できると同時に、スループットを大幅に向上できます。<sup>7</sup>

グリカンマッピングの次に mAb で実行する一般的で重要な作業は、LC/MS ベースのペプチドマッピングです。アミノ酸配列、N- および O-グリコシル化、糖化、N および C 末端処理、脱アミド化 (アスパラギン、グルタミン)、アスパラギン酸の異性化、酸化 (メチオニン、トリプトファン) のような重要で主な構造的特徴は、LC/MS データから簡単に抽出できます。<sup>1~3</sup> mAb のトリプシン消化に関連する複雑性には、十分な分離能力が必要です。疎水性、サイズ、電荷の点でさまざまな特性を持ち、広いダイナミック濃度範囲に存在する、非常に多くのペプチドを分解するのに適したメソッドは、逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) です。移動相添加物トリフルオロ酢酸 (TFA) は、塩基性溶質のピーク形状とクロマトグラフィー分離能を改善するのに有効であることが歴史的に実証されていますが、イオン化抑制により悪影響を受けるため、MS 感度が低下してしまいます。これをギ酸に置き換えることにより

MS 感度が大幅に向上しますが、従来の逆相カラムのクロマトグラフィー性能が低下してしまいます。最近導入された Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムは、表面が帯電状態でハイブリッドエンドキャップ処理された C18 固定相を備えたサブ 3  $\mu\text{m}$  表面多孔質粒子をベースとしており、移動相添加物として MS に適したギ酸を使用して優れたクロマトグラフィー性能を実現しています。<sup>8</sup>

一般的なバイオ医薬品特性解析のワークフローではグリカンマッピングとペプチドマッピングの両方を実行する必要があるため、同じ分析シーケンス内で同じ分析設定を使用してこの作業を実行することへの関心が高まっています。このアプリケーションノートでは、カラムスイッチングバルブ、FLD、DAD、および Q-TOF MS を搭載した Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用して、AdvanceBio グリカンマッピングカラムおよびペプチドプラスカラムで手動操作なしに、mAb のペプチドマッピングとグリカンマッピングを連続して実行する方法について説明します。

## 実験方法

### 装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC システムと、Agilent Jet Stream ESI イオン源を搭載した Agilent 6545 LC/Q-TOF を使用しました。LC システムを、次のモジュールとオプション、機器で構成しました。分析流路を図 1 に示します。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)
  - サンプルサーモスタット (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116B)
  - バルブドライブ (オプション #058)
  - Agilent InfinityLab クイックチェンジバルブ、2 ポジション/6 ポート、130 MPa (G4231C)

- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
  - Max-Light カートリッジ 10 mm、1  $\mu$ L (G4212-6008)
- Agilent 1260 Infinity II 蛍光検出器 (G1321A)
  - 標準フローセル、8  $\mu$ L (G1321-60005)

MCTに取り付けられているカラムスイッチングバルブを使用して、グリカンマッピングカラムまたはペプチドプラスカラムおよびそれぞれで分析を選択します。ペプチドマッピング溶出液は、分離せずにDADとMSに連続して流します。グリカンマッピング溶出液は、ZDV Tピース (Agilent) で分離してFLDとMSに流します。分離する必要があるのは、壊れやすいFLDフローセルを保護するためです。

### カラム

- Agilent AdvanceBio グリカンマッピング、2.1  $\times$  150 mm、2.7  $\mu$ m (p/n 683775-913)
- Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1  $\times$  150 mm、2.7  $\mu$ m (p/n 695775-949)

### ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーション (B09.00)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (B07.00)
- Agilent MassHunter BioConfirm (B07.00)

### 材料および試薬

アセトニトリル (HPLC-S)、純水 (ULC/MS)、およびギ酸 (ULC/MS) は、Biosolve から入手しました。ギ酸アンモニウム (LC/MS グレード)、グアニジン-HCl、DL-ジチオトレイトール (DTT)、および 2-ヨードアセトアミド (IAA) は Sigma から購入しました。トリス-HCl (1 M、pH 7.5) は Invitrogen から、トリプシン (シーケンスグレード) は Promega から入手しました。タイプ I の純水は、Sartorius の arium pro ラボ用超純水システムにより水道水から生成しました。Gly-X 脱グリコシル化モジュール、Gly-X InstantPC ラベル化モジュール、および Gly-X InstantPC クリーンアップモジュールで構成される、AdvanceBio Gly-X と InstantPC 色素キット (GX96-IPC) はアジレント・テクノロジーで用意しました。

### サンプルとサンプル前処理

合計 9 種類の mAb サンプル (先発薬とバイオシミラー) を設定に従って分析しました。以下に簡単に説明するように、それぞれの分析のためにこれらのサンプルを前処理しました。前処理したサンプルは、分析するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保管しました。グリカンマッピング用のコントロールサンプルとして、Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリ (GKPC-020) を使用しました。

### グリカンマッピング

ユーザーマニュアルで説明されているプロトコルに従って、サンプルを前処理しました。ここでは、40  $\mu$ g の mAb を  $90^{\circ}\text{C}$  で 3 分間変性させ、PNGase F を使用して  $50^{\circ}\text{C}$  で 5 分間脱グリコシル化しました。遊離したグリカンを、 $50^{\circ}\text{C}$  で 1 分間 InstantPC によりラベル化しました。次にラベル化した N-グリカンを、HILIC 固相抽出 (SPE) クリーンアップモジュールを使用して精製しました。

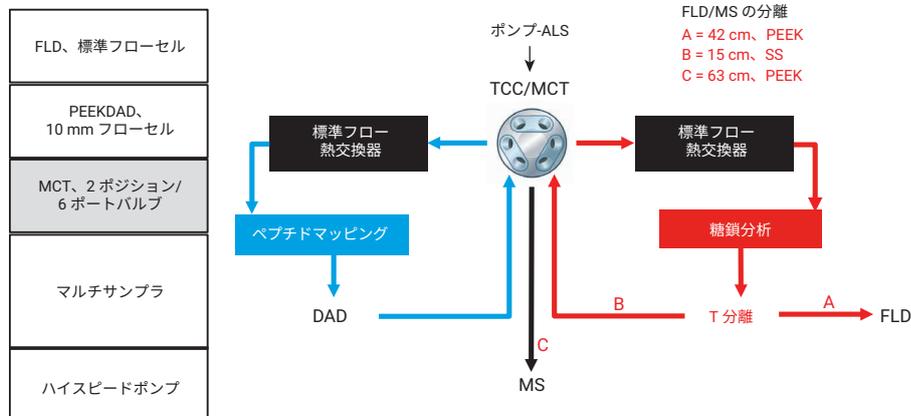


図 1. ペプチド分析およびグリカン分析の自動切り替えの分析流路

## メソッドパラメータ

糖鎖分析	
LC	
MCT バルブ	位置 1 (グリカンカラム方向、FLD-MS を分離)
カラム	Agilent AdvanceBio グリカンマッピング、2.1 × 150 mm、2.7 μm
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4 水中 B) アセトニトリル
流量	0.5 mL/min
グラジエント	グリカンマッピング
	切り替え後のグリカンの コンディショニング
	0 ~ 2 分 80 ~ 75 % B 2 ~ 38 分 75 ~ 65 % B 38 ~ 39 分 65 ~ 40 % B 39 ~ 41.5 分 40 ~ 80 % B 41.5 ~ 55 分 80 % B
	0 ~ 10 分 50 % B 10 ~ 12 分 50 ~ 80 % B 12 ~ 25 分 80 % B
温度	40 °C
注入	1 μL、5 °C でニードル洗浄：フラッシュポートにおいて水:アセトニトリル (50:50) で 5 秒
検出	
FLD	
波長	Ex 285 nm、Em 345 nm
ピーク幅	> 0.05 分 (1 秒のレスポンス時間、9.26 Hz)
PMT ゲイン	10
MS	
ダイバータバルブで MS に	5 ~ 39 分
イオン源	
ドライガス温度	150 °C
ドライガス流量	8 L/min
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	30 psi
キャピラリー電圧	2,500 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ	120 V
データ取り込み	
イオン極性	陽性
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	m/z 600 ~ 3,000
スキャン速度	1 スペクトラム/s
リファレンス質量	無効

ペプチドマッピング	
LC	
MCT バルブ	位置 2 (ペプチドカラムおよび DAD/MS 方向)
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm、2.7 μm
移動相	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液
流量	0.3 mL/min
グラジエント	ペプチドマッピング
	切り替え後のペプチドのコンディ ショニング
	0 ~ 1 分 2 % B 1 ~ 41 分 2 ~ 47 % B 41 ~ 42 分 47 ~ 95 % B 42 ~ 47 分 95 % B 47 ~ 48 分 95 ~ 2 % B 48 ~ 55 分 2 % B
	0 ~ 15 分 50 % B 15 ~ 16 分 50 ~ 95 % B 16 ~ 20 分 95 % B 20 ~ 21 分 95 ~ 2 % B 21 ~ 30 分 2 % B
温度	50 °C
注入	5 μL、5 °C でニードル洗浄：フラッシュポートにおいて水:アセトニトリル (50:50) で 5 秒
検出	
DAD	
波長	214/8 nm、220/8 nm、280/8 nm
ピーク幅	> 0.025 分 (0.5 秒のレスポンス時間、10 Hz)
MS	
ダイバータバルブで MS に	0 ~ 42 分
イオン源	
ドライガス温度	325 °C
ドライガス流量	12 L/min
シースガス温度	300 °C
シースガス流量	12 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ	175 V
データ取り込み	
イオン極性	陽性
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
リファレンス質量	無効
データ取り込み MS	
質量範囲	m/z 100 ~ 3,000
スキャン速度	2 スペクトル/秒
データ取り込み MS/MS	
自動 MS/MS 質量範囲	m/z 100 ~ 3,000
自動 MS/MS スキャンレート	4 スペクトル/秒
選択幅	中程度 (~ m/z 4)
荷電状態基本設定	2/3 / > 3/Unk
コリジョンエネルギー	すべて：4 (傾き) および -4.8 (オフセット)
最大プリカーサ数/サイクル	5
プリカーサスレッシュホールド 絶対/相対 %	1,000/0.010
同位体モデル	ペプチド
アクティブな排除	0.5 分の 2 種類のスペクトル後
プリカーサの順位	アバンドンスのみ
純度	ストリンジェンシー：100 %、カットオフ：30 %

## ペプチドマッピング

ここでは、100 µg の mAb を 3 M グアニジン-HCl を使用して 100 mM トリス-HCl pH 7.5 中で変性させ、5 mM DTT により 60 °C で 30 分間還元して、IAA により 37 °C で 1 時間アルキル化しました。次に、ゲルろ過によりサンプルを脱塩してから、酵素:タンパク質の比 1:25 による 37 °C で一晩のトリプシン消化を実施しました。

## メソッドを切り替える分析シーケンス

以下に説明する分析を、オペレータによる操作なしに単一の分析ステップで実施しました。この実験では、ペプチドマッピングからグリカンマッピングへの自動切り替えおよび逆の自動切り替えを複数回実行しました。あるメソッドから他のメソッドに切り替える際には中間のメソッドを実行し、次の分析に備えてシステムとカラムをコンディショニングしました。

ライン	サンプル	メソッド
1	ブランク	グリカン
2	グリカン CHO コントロール	グリカン
3	グリカン CHO コントロール	グリカン
4	グリカン CHO コントロール	グリカン
5	トラスツズマブ先発薬	グリカン
6	トラスツズマブバイオシミラー (コントロール)	グリカン
7	トラスツズマブバイオシミラー (4x)	グリカン
8	トラスツズマブバイオシミラー (8x)	グリカン
9	トラスツズマブバイオシミラー (16x)	グリカン
10	トラスツズマブバイオシミラー (24x)	グリカン
11	ブランク	グリカンからペプチドへ移行
12	ブランク	ペプチド
13	トラスツズマブ先発薬	ペプチド
14	トラスツズマブ先発薬	ペプチド
15	トラスツズマブ先発薬	ペプチド
16	トラスツズマブバイオシミラー (コントロール)	ペプチド
17	トラスツズマブバイオシミラー (4x)	ペプチド
18	トラスツズマブバイオシミラー (8x)	ペプチド
19	トラスツズマブバイオシミラー (16x)	ペプチド
20	トラスツズマブバイオシミラー (24x)	ペプチド
21	ブランク	ペプチドからグリカンへ移行
22	ブランク	グリカン
23	リツキシマブ先発薬	グリカン
24	リツキシマブバイオシミラー 1	グリカン
25	リツキシマブバイオシミラー 2	グリカン
26	ブランク	グリカンからペプチドへ移行
27	ブランク	ペプチド
28	リツキシマブ先発薬	ペプチド
29	リツキシマブバイオシミラー 1	ペプチド
30	リツキシマブバイオシミラー 2	ペプチド
	保管	

## 結果と考察

### グリカンマッピング

分析シーケンスを、一連のグリカンマッピング実験から開始しました。図 2 に、表面多孔質 2.7  $\mu\text{M}$  AdvanceBio グリカンマッピングカラムで得られた InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリの 3 回繰り返し HILIC 分析で同時に取り込んだ FLD および MS のトレースを示します。FLD および MS プロファイルの両方において、高分離能により N-グリコシル化の詳細が得られています。InstantPC ラベル化グリカンは重合度に基づいて溶出されます。すなわち、グリコシド結合の数が増えるにつれ、リテンションタイムが長くなります。G1F[3] や G1F[6] のような異性体化合物を含む、重合度が同じ化合物を分離するために十分な選択性の違いが存在します。これらの化合物は、複合型グリカンの  $\alpha$ 1-3 または  $\alpha$ 1-6 分岐のいずれかでガラクトース残基の位置が異なります。図 3 に、少量および多量の InstantPC ラベル化 N-グリカンの代表的な MS スペクトルを示します。明確で高強度のスペクトルが観察されており、これらは PC 塩基性テール (3 級アミン) のプロトン親和性が高いことで説明できます。表 1 と 2 はそれぞれ、InstantPC ラベル化 N-グリカンの 3 回繰り返し分析時に得られた、MS および FLD リテンションタイム、ピーク面積とピーク面積 % 精度を示しています。相対標準偏差 (RSD) 値が優れていることがわかります。MS および FLD 検出ではピーク面積 % が多少異なりますが、これは MS のイオン化の違いで説明できます。このように、MS トレースは主に同定の目的で使用され、FLD トレースは定量の目的で使用されます。

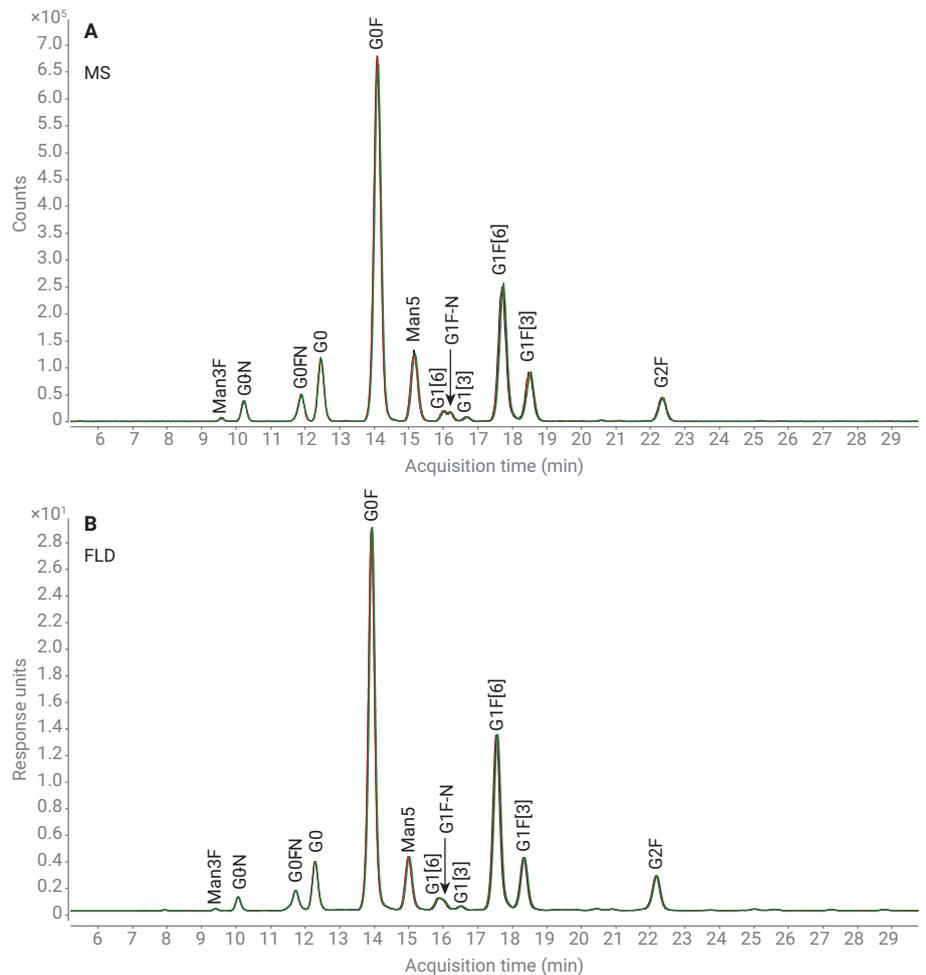


図 2. 表面多孔質 2.7  $\mu\text{M}$  Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムにおける Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリの 3 回繰り返し HILIC-MS (A) および HILIC-FLD (B) クロマトグラム。MS トレースについては、ベースピーククロマトグラム (BPC) を示しています。アジレント資料番号 5994-2202EN<sup>9</sup> に従ったグリカン用語

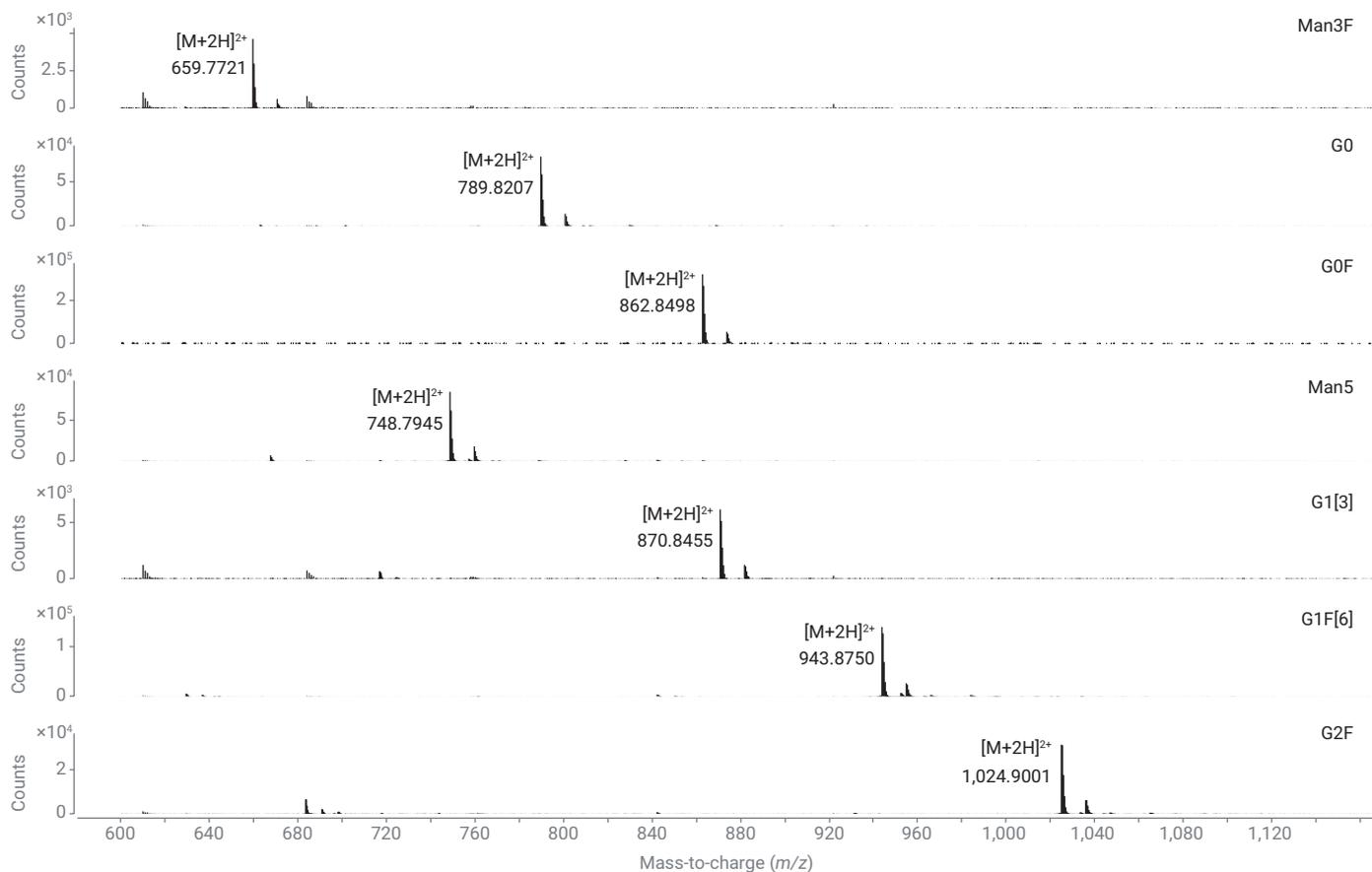


図 3. 図 2 に示されている Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリで観察された、少量および多量のグリカンピークに対応する MS スペクトル

表 1. Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリの 3 回繰り返し分析における MS リテンションタイム、ピーク面積、ピーク面積 % の RSD 値

	リテンションタイム (分)				面積				面積 %			
	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%
Man3F	9.57	9.57	9.61	0.24	63,179	60,303	57,197	4.97	0.29	0.29	0.27	3.77
G0-N	10.22	10.23	10.23	0.06	438,962	407,010	425,035	3.78	2.04	1.93	2.03	3.12
G0F-N	11.89	11.89	11.89	0.00	677,744	650,350	641,947	2.85	3.15	3.08	3.06	1.58
G0	12.45	12.45	12.47	0.09	1,482,185	1,491,906	1,493,663	0.42	6.90	7.07	7.12	1.67
G0F	14.09	14.09	14.11	0.08	10,089,817	9,847,418	9,847,909	1.41	46.96	46.64	46.97	0.40
Man5	15.15	15.15	15.18	0.11	1,879,904	1,847,418	1,829,999	1.37	8.75	8.75	8.73	0.14
G1[6]	15.99	16.01	16.04	0.16	225,860	242,203	235,501	3.50	1.05	1.15	1.12	4.51
G1F-N	16.18	16.19	16.21	0.09	201,264	181,045	186,695	5.50	0.94	0.86	0.89	4.45
G1[3]	16.67	16.69	16.71	0.12	121,670	113,030	110,855	4.97	0.57	0.54	0.53	3.69
G1F[6]	17.70	17.73	17.75	0.14	4,091,308	4,068,838	4,015,420	0.96	19.04	19.27	19.15	0.60
G1F[3]	18.49	18.51	18.53	0.11	1,486,906	1,477,715	1,412,363	2.79	6.92	7.00	6.74	1.96
G2F	22.33	22.35	22.37	0.09	727,378	726,061	710,476	1.30	3.39	3.44	3.39	0.88

表 2. Agilent AdvanceBio InstantPC CHO mAb N-グリカンライブラリの 3 回繰り返し分析における FLD リテンションタイム、ピーク面積、ピーク面積 % の RSD 値

	リテンションタイム (分)				面積				面積 %			
	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%
Man3F	9.39	9.40	9.41	0.11	1.67	1.71	1.71	1.36	0.20	0.20	0.20	1.55
G0-N	10.05	10.06	10.06	0.06	11.23	11.31	11.37	0.62	1.33	1.34	1.35	0.80
G0F-N	11.72	11.72	11.73	0.05	22.13	22.16	22.29	0.38	2.62	2.63	2.64	0.53
G0	12.28	12.28	12.29	0.05	46.05	45.94	45.91	0.16	5.44	5.45	5.45	0.04
G0F	13.92	13.92	13.94	0.08	386.64	386.37	385.08	0.22	45.71	45.82	45.67	0.16
Man5	14.98	14.99	15.02	0.14	54.34	54.46	54.69	0.33	6.42	6.46	6.49	0.49
G1[6] + G1F-N	15.86	15.88	15.90	0.13	17.82	18.10	18.49	1.86	2.11	2.15	2.19	2.02
G1[3]	16.50	16.52	16.53	0.09	4.47	4.41	4.44	0.68	0.53	0.52	0.53	0.53
G1F[6]	17.53	17.56	17.58	0.14	198.71	196.70	196.76	0.58	23.49	23.33	23.34	0.39
G1F[3]	18.33	18.34	18.36	0.08	57.76	57.38	57.61	0.33	6.83	6.80	6.83	0.23
G2F	22.17	22.18	22.19	0.05	45.09	44.74	44.74	0.45	5.33	5.31	5.31	0.26

図 4 に、2.7  $\mu\text{m}$  AdvanceBio グリカンマッピンググラムにおける開発時におけるトラスツズマブ先発薬（ハーセプチン）とバイオシミラーの HILIC-FLD N-グリカンプロファイルを示します。バイオシミラーは、以前のアプリケーションノート<sup>10, 11</sup>で説明したように、Bio-Monolith Protein A カラムを使用して CHO 細胞培地から採取しました。先発薬とバイオシミラー候補の両方で同じ型の複合 N-グリカンが観察されましたが、バイオシミラーでは G0F 種が過剰発現しており、定量的な差があることがわかっています。グリコシル化は重要な品質特性であるため、このガラクトシル化の不足により、製品はハーセプチンバイオシミラーとして規制機関が認めるのに十分なほどには類似していません。

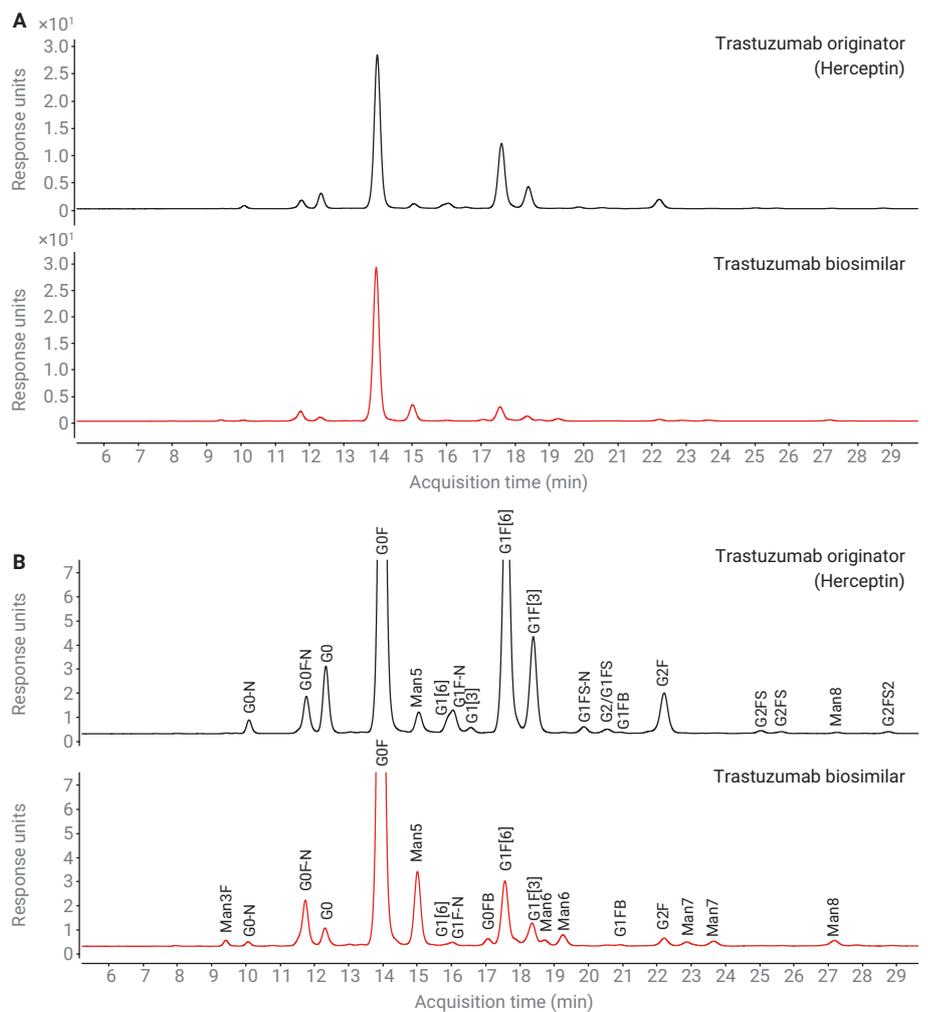


図 4. トラスツズマブ先発薬およびプロテイン A 精製バイオシミラー候補から酵素で遊離された InstantPC ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD クロマトグラム (拡大なしと拡大あり)。アジレント資料番号 5994-2202EN<sup>9</sup> に従ったグリカン用語

図 5 に、異なる濃度のガラクトース、ウリジン、塩化マンガン (4x、8x、16x、および 24x) において CHO クローンを生成するバイオシミラーを培養して取得した N-グリカンプロファイルを示します。<sup>12</sup>これらは、G0F および G1F

受容体に対してガラクトース残基を供与する役割を持つガラクトシルトランスフェラーゼの基質および活性化剤です。別のサンプル中の N-グリカンの相対強度を図 6 に示します。ガラクトース、ウリジン、塩化マンガンの濃度が増加

すると、G1F/G0F 比が増加していることがわかります。これらの結果から、先発薬の仕様内でバイオシミラーのグリコシル化に適合できる条件が存在すると結論づけられます。

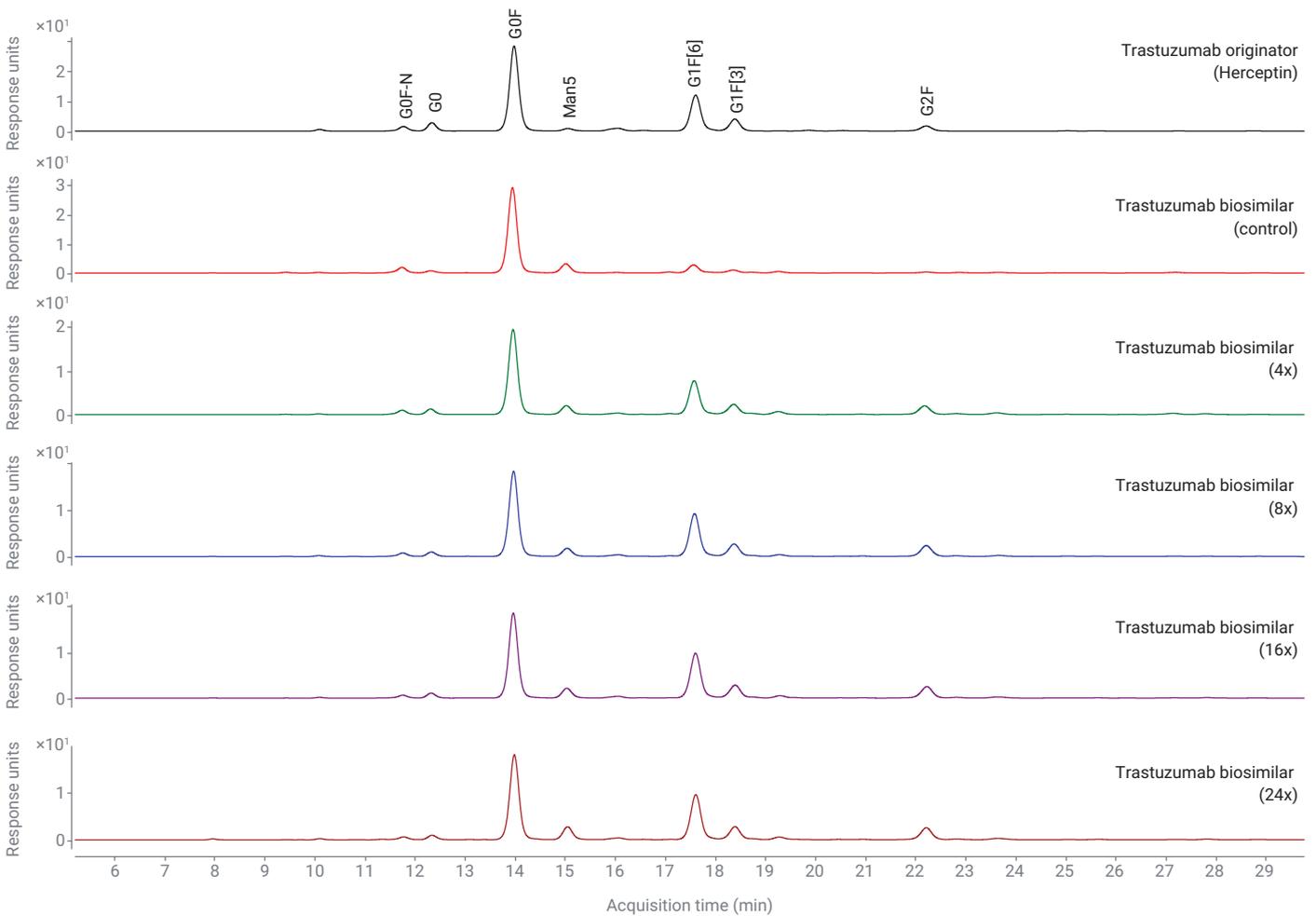


図 5. トラスツズマブ先発薬、および異なる濃度のガラクトース、ウリジン、塩化マンガンで CHO クローンを培養して採取したバイオシミラー候補の HILIC-FLD N-グリカンプロファイル

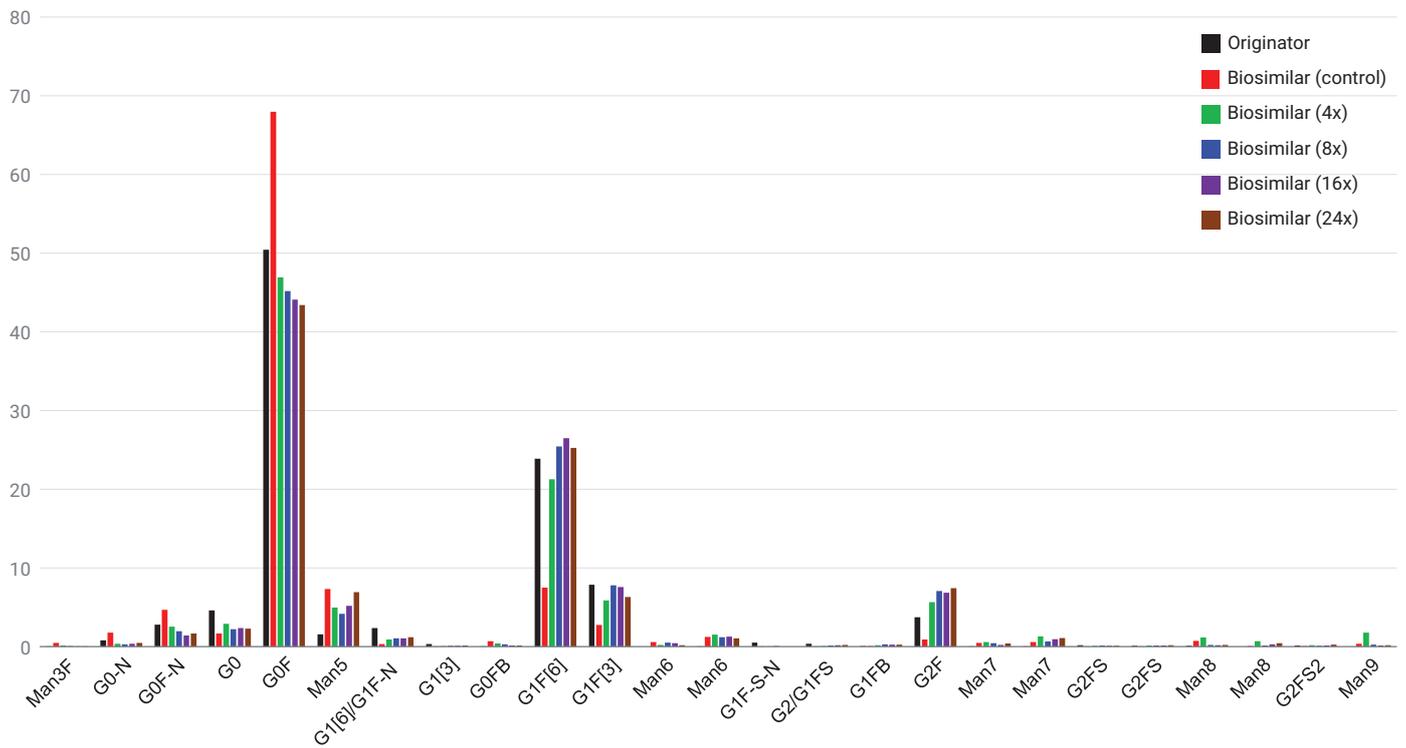


図 6. トラスツズマブ先発薬、および異なる濃度のガラクトース、ウリジン、塩化マンガンで CHO クローンを培養して採取したバイオンミラー中のグリカンの相対強度

図7に、一連のペプチドマッピング実験の設定で分析した、リツキシマブ先発薬（マブセラ）および2種類の認可バイオシミラーの HILIC-FLD N-グリカンプロファイルを示します。高品質のデータが得られており、さまざまな複合型および高マンノース型 N-グリカンが存在することがわかります。観察された N-グリカンは、図8に示すように、サンプル間で定性的な観点からは類似していますが、定量的な観点からは多少の違いが認められます。

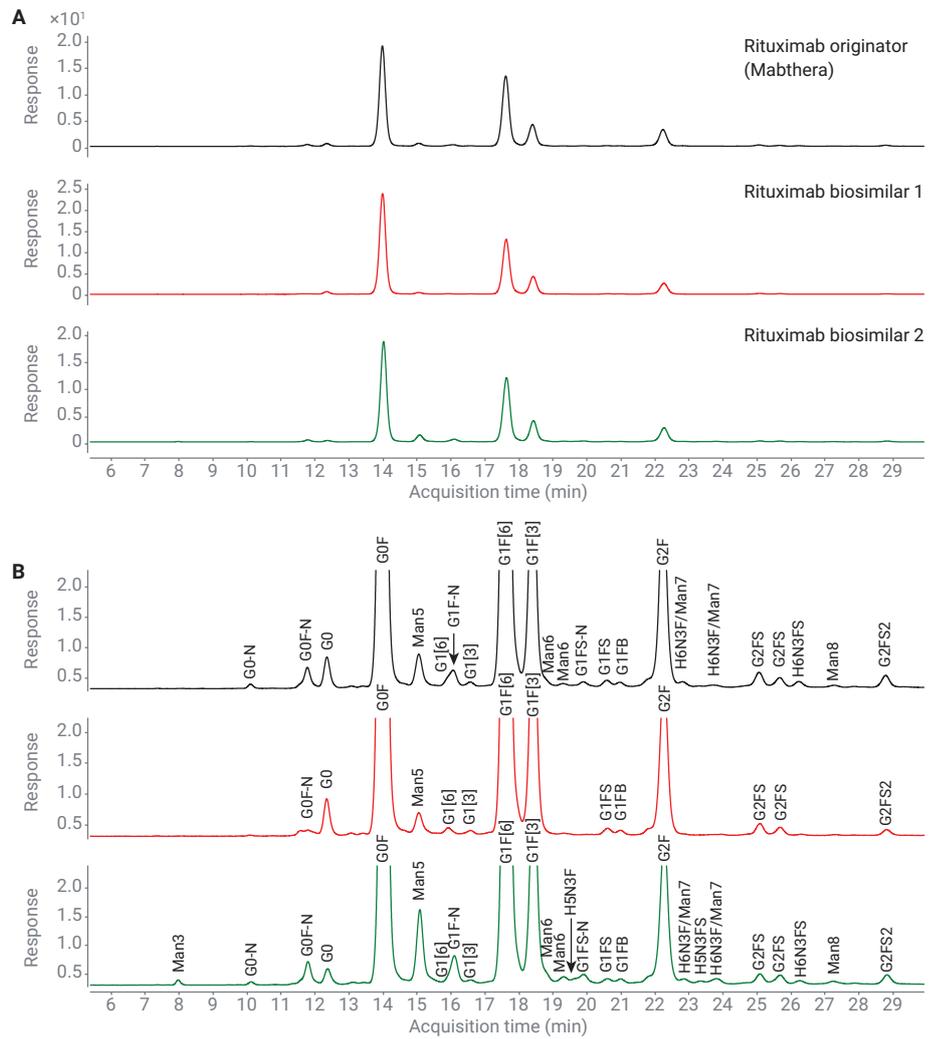


図7. リツキシマブ先発薬（マブセラ）および認可バイオシミラーから酵素で遊離した InstantPC ラベル化 N-グリカンの HILIC-FLD クロマトグラム。アジレント資料番号 5994-2202EN<sup>9</sup> に従ったグリカン用語。H、N、F、S はそれぞれ、ヘキソース、N-アセチルグルコサミン、フコース、N-アセチルノイラミン酸に対応しています。

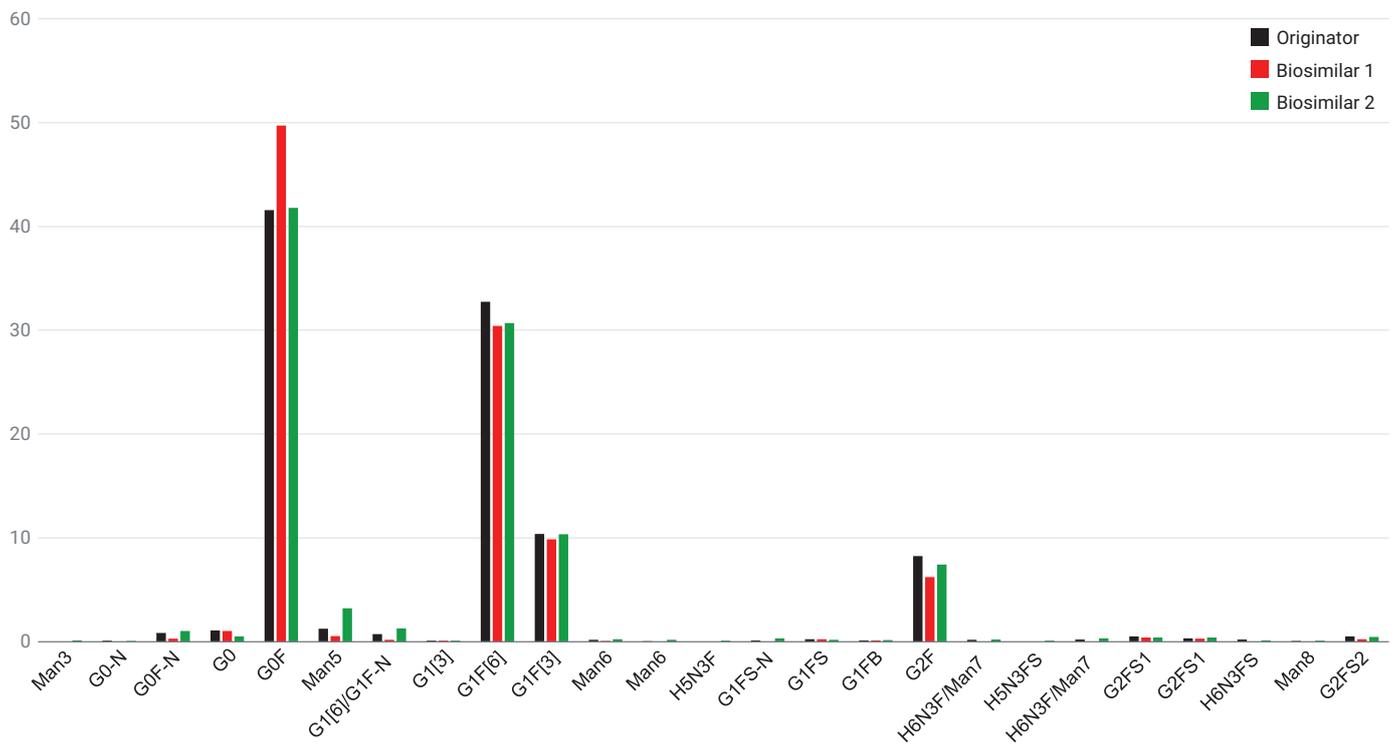


図 8. リツキシマブ先発薬（マブセラ）および認可バイオシミラー中のグリカンの相対強度

### ペプチドマッピング

トラスツズマブ先発薬とバイオシミラー候補サンプルのグリカンマッピング実験に続いて、設定をコンディショニングしてペプチドマッピングを実施しました。図 9 に、表面多孔質 2.7  $\mu\text{m}$  AdvanceBio ペプチドプラスカラムにおける、

トラスツズマブ先発薬トリプシン消化物の繰り返し LC/MS 分析の結果を示します。一貫して 98.5 % を超えるシーケンスカバレッジが得られており、グリコシル化、酸化、脱アミド化、N 末端環化、C 末端リジン切断などの翻訳後

修飾が高精度で分析されています。表 3 に、修飾および非修飾ペプチドの精度データを示します。

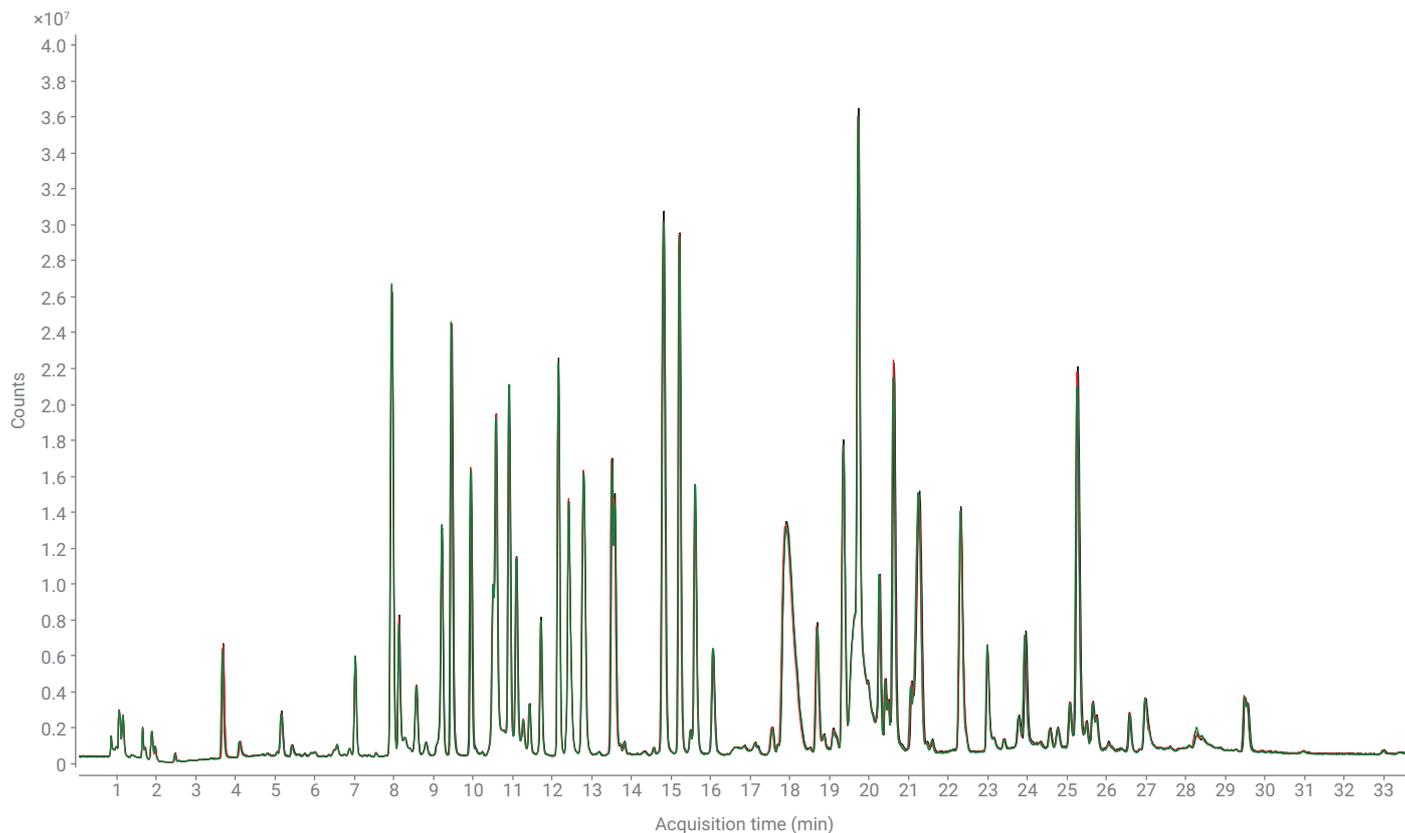


図 9. 表面多孔質 2.7  $\mu\text{m}$  Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムで 3 回繰り返し分析されたトラスツズマブ先発薬トリプシン消化物の LC/MS TIC トレース

表 3. トラスツズマブ先発薬ペプチドの LC/MS リテンションタイムおよびピーク面積精度データ (n = 3)

ペプチド	修飾	場所	リテンションタイム (分)				面積			
			注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%	注入 1 回目	注入 2 回目	注入 3 回目	RSD%
EVQLVESGGGLVQPGGSLR		Hc (001 ~ 019)	15.22	15.20	15.21	0.07	21,543,578	21,568,171	21,271,169	0.77
EVQLVESGGGLVQPGGSLR	ピログルタミン酸 (E1)	Hc (001 ~ 019)	19.73	19.73	19.73	0.00	227,186	225,778	230,268	1.01
QAPGK		Hc (039 ~ 043)	1.07	1.07	1.07	0.00	1,270,928	1,265,079	1,224,080	2.04
IYPTNGYTR		Hc (051 ~ 059)	7.03	7.02	7.02	0.08	5,876,176	5,956,977	5,921,920	0.68
IYPTNGYTR	脱アミド化 (N55)	Hc (051 ~ 059)	7.82	7.82	7.81	0.07	75,634	77,128	78,682	1.98
IYPTNGYTR	脱アミド化 (N55)	Hc (051 ~ 059)	8.28	8.27	8.28	0.07	1,929,925	1,908,310	1,914,802	0.58
IYPTNGYTR	脱アミド化 (N55)	Hc (051 ~ 059)	9.12	9.12	9.12	0.00	312,718	311,721	316,366	0.78
VEPK		Hc (218 ~ 221)	1.07	1.07	1.07	0.00	323,901	330,331	316,162	2.19
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK		Hc (226 ~ 251)	17.92	17.89	17.91	0.09	17,363,016	17,015,571	16,981,394	1.23
DTLMISR	酸化 (N255)	Hc (252 ~ 258)	7.55	7.55	7.56	0.08	255,300	259,876	251,521	1.64
DTLMISR		Hc (252 ~ 258)	9.22	9.21	9.21	0.06	11,595,004	11,749,527	11,800,546	0.91
TPEVTCVVDVSHEDPEVK		Hc (259 ~ 277)	14.82	14.80	14.81	0.07	37,674,640	37,729,504	37,213,192	0.76
EEQYNSTYR		Hc (296 ~ 304)	4.90	4.90	4.88	0.24	16,934	16,324	17,492	3.45
EEQYNSTYR	G0F (N300)	Hc (296 ~ 304)	5.17	5.16	5.16	0.11	110,472	105,261	107,652	2.42
VSNK		Hc (326 ~ 329)	1.07	1.07	1.07	0.00	356,697	359,808	350,322	1.36
EPQVYTLPPSR		Hc (348 ~ 358)	10.55	10.55	10.60	0.27	10,424,387	10,429,544	10,360,028	0.37
NQVSLTCLVK		Hc (364 ~ 373)	12.16	12.15	12.16	0.05	33,731,609	33,604,345	33,486,848	0.36
NQVSLTCLVK	脱アミド化 (N364)	Hc (364 ~ 373)	14.37	14.35	14.37	0.08	182,196	185,270	186,655	1.24
NQVSLTCLVK	脱アミド化 (N364)	Hc (364 ~ 373)	15.65	15.64	15.64	0.04	812,465	809,927	811,612	0.16
TTPPVLDSDGSFFLYSK		Hc (396 ~ 412)	19.36	19.35	19.36	0.03	17,785,338	17,610,740	17,615,308	0.56
SLSLSPG	K 切断 (K450)	Hc (443 ~ 449)	10.51	10.50	10.50	0.05	15,601,783	15,393,916	15,630,806	0.83
SLSLSPGK		Hc (443 ~ 450)	6.49	6.49	6.49	0.00	118,037	112,418	112,434	2.83
SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK		Lc (067 ~ 103)	22.33	22.33	22.31	0.05	2,007,854	1,993,328	2,014,568	0.54
VEIK		Lc (104 ~ 107)	1.65	1.65	1.65	0.00	1,635,756	1,644,870	1,694,386	1.90
TVAAPSVFIFPPSDEQLK		Lc (109 ~ 126)	19.65	19.64	19.64	0.03	10,494,089	10,075,113	10,090,599	2.32
VDNALQSGNSQESVTEQDSK		Lc (150 ~ 169)	8.14	8.13	8.13	0.07	3,067,119	2,974,891	2,835,943	3.93
VYACEVTHQLSSPVTK		Lc (191 ~ 207)	9.47	9.45	9.45	0.12	23,190,381	23,107,936	22,919,049	0.60

リツキシマブ先発薬および認可バイオシミラーのトリプシン消化物に関連する LC/MS TIC を図 10 に示します。修飾および非修飾ペプチドの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を図 11 に示します。サンプル間で、軽鎖および

重鎖 N 末端環化、重鎖 C 末端リジン切断、プロリンアミド化、および N-グリコシル化部位占有に違いが見られます。後半の測定では、AdvanceBio ペプチドプラスカラムで興味深い選択性が得られています。つまり、

高マンノース型および複合型 N-グリカンで修飾されている糖ペプチド間で、非グリコシル化ペプチド (EEQYNSTYR) が溶出しています。これらの測定は、リツキシマブサンプルのグリカンマッピングに続いて実施しました。

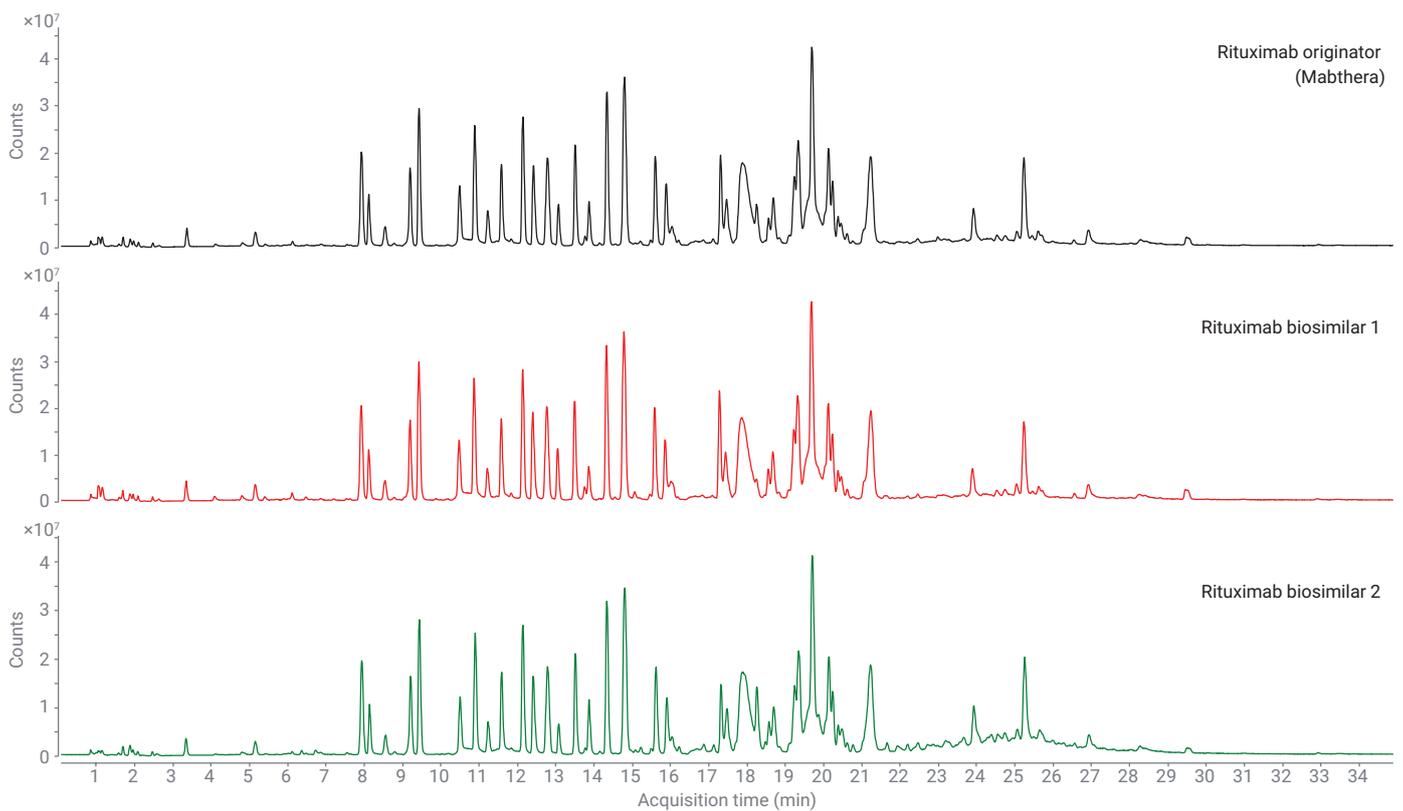


図 10. リツキシマブ先発薬 (マブセラ) および認可バイオシミラーの LC/MS ペプチドマップ (TIC)

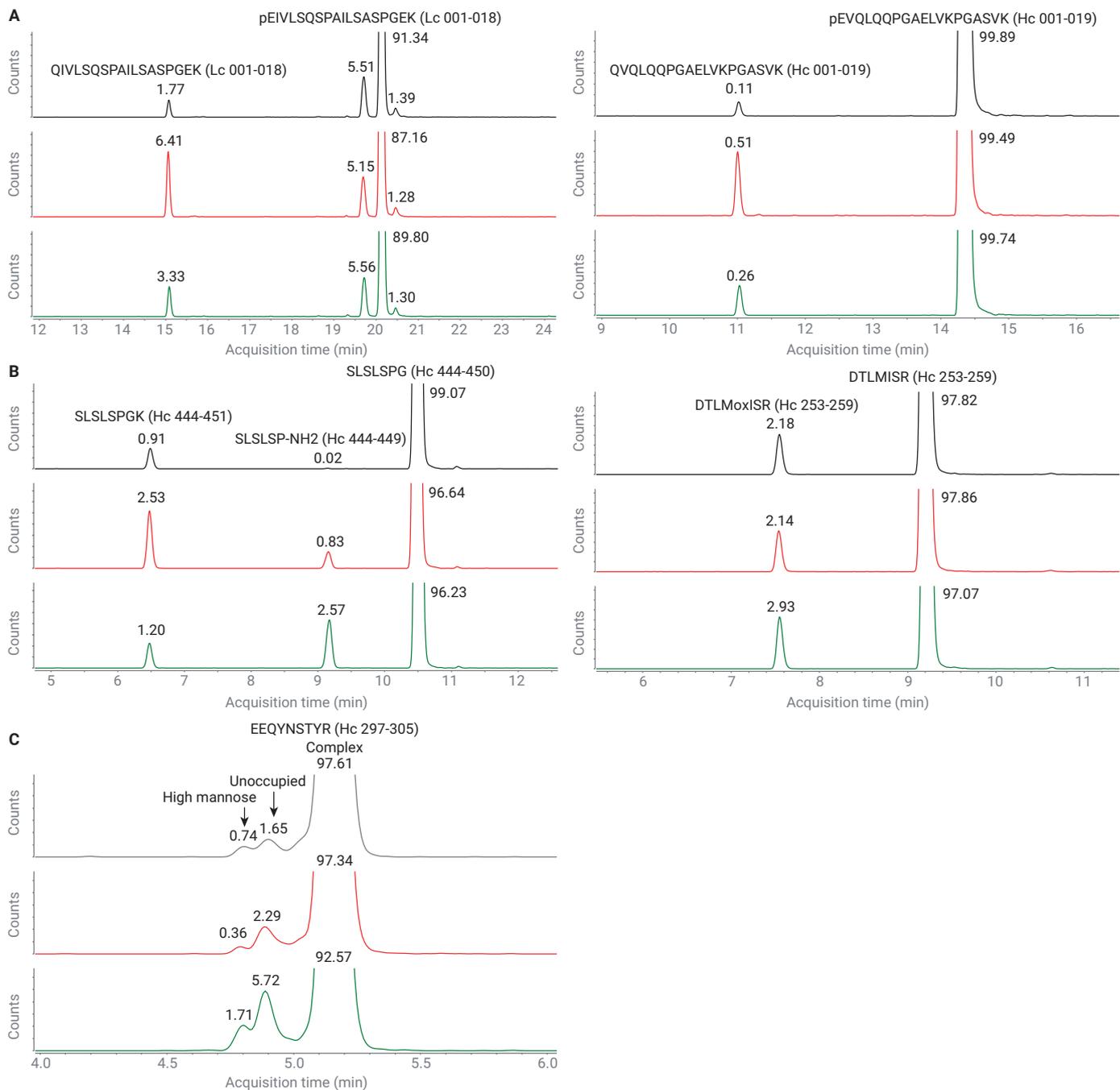


図 11. リツキシマブ先発薬 (マブセラ) (A)、認可バイオシミラー 1 (B)、バイオシミラー 2 (C) で観察された修飾および非修飾ペプチドの EIC。EIC は、質量精度 10 ppm で抽出しました。ピークのアノテーションは合計面積 % を示しています。

## 結論

カラムスイッチングバルブ、蛍光検出器 (FLD)、ダイオードアレイ検出器 (DAD)、および四重極 TOF 質量分析計 (Q-TOF MS) を搭載した Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用して、手動操作なしに mAb のペプチドマッピングとグリカンマッピングを連続して分析しました。Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムおよびグリカンマッピングカラムを使用し、後者をグリカンの高速な遊離とラベル化が可能な InstantPC キットと組み合わせることで、情報が豊富な高精度のデータを得られます。これらの製品により、バイオ医薬品の特性解析のツールがさらに拡充されます。

## 参考文献

1. Sandra, K.; Vandenneede, I.; Sandra, P. 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(1), 480–507.
3. Beck, A. et al. Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* **2013**, 85(2), 715–736.
4. D' Atri, V. et al. Hydrophilic Interaction Chromatography for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies at Protein, Peptide, and Glycan Levels. *LC-GC Europe* **2017**, 30(8), 424–434.
5. Guile, G. R. et al. A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Method for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles. *Anal. Biochem.* **1996**, 240(2), 210–226.
6. Martosella, J. et al. A Novel HILIC Column for High Speed N-linked Glycan Analysis. Agilent Technologies application note, publication number 5991-4886EN, **2017**.
7. Yan, J.; Jones, A. Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC および 2-AB Express サンプル前処理と LC/FLD/MS を用いた生物製剤の N-グリカン分析の効率的なワークフロー。Agilent Technologies application note, publication number 5994-1348JAJ, **2019**.
8. Potter, O.; Qin, V. Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムによる脱アミド化ペプチドの分離。Agilent Technologies application note, publication number 5994-2971JAJ, **2021**.
9. AdvanceBio Glycan Standards InstantPC, 2-AB, 2-AA, APTS, InstantAB, InstantQ, Unlabeled. Agilent Technologies flyer, publication number 5994-2202EN, **2019**.
10. Dumont, E. et al. バイオモノリスプロテインA カラムと LC/MS を用いた細胞クローン選択。Agilent Technologies application note, publication number 5991-5124JAJ, **2014**.
11. Dumont, E. et al. Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS. Agilent Technologies application note, publication number 5991-5125EN, **2014**.
12. Gramer, M. J. et al. Modulation of Antibody Galactosylation Through Feeding of Uridine, Manganese Chloride, and Galactose. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108(7), 1591–1602.

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おりません。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。

DE44487.2770486111

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, November 23, 2021

5994-4339JAJ