

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7664366号
(P7664366)

(45)発行日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(24)登録日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	1/16 (2006.01)	C 0 7 K	1/16
B 0 1 D	15/42 (2006.01)	B 0 1 D	15/42
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00
C 1 2 N	9/76 (2006.01)	C 1 2 N	9/76
請求項の数 16 (全28頁)			
(21)出願番号	特願2023-218716(P2023-218716)	(73)特許権者	597160510
(22)出願日	令和5年12月26日(2023.12.26)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(62)分割の表示	特願2021-500860(P2021-500860)の分割		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
原出願日	令和1年7月12日(2019.7.12)		アメリカ合衆国10591-6707ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番
(65)公開番号	特開2024-45122(P2024-45122A)		
(43)公開日	令和6年4月2日(2024.4.2)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和6年1月18日(2024.1.18)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/697,547	(74)代理人	100205707
(32)優先日	平成30年7月13日(2018.7.13)		弁理士 小寺 秀紀
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 グリコシル化ペプチドの検出及び定量

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つ以上の抗体を含む試料中の1つ以上の糖ペプチドを特徴付ける及び/または定量する方法であって、

(a) 前記1つ以上の抗体を含む試料を1つ以上のプロテアーゼと接触させ、1つ以上の糖ペプチドを生成させる工程；

(b) 糖ペプチドが親水性濃縮基材に結合することを可能にする条件下で、前記糖ペプチドを前記親水性濃縮基材に接触させる工程；

(c) 前記親水性濃縮基材を洗浄して、前記親水性濃縮基材から非糖ペプチド混入物質を除去する工程；

(d) ギ酸アンモニウム及びアセトニトリル(ACN)の水溶液を用いて前記親水性濃縮基材から前記糖ペプチドを溶出させて、濃縮糖ペプチド試料を作製する工程；

(e) 前記濃縮糖ペプチド試料を分離カラムに適用する工程；

(f) 前記分離カラムから前記糖ペプチドを溶出させ、それによって前記試料中の糖ペプチドを1つ以上の画分に分離する工程；ならびに

(g) 前記1つ以上の画分を質量分光分析に供し、前記1つ以上の画分における糖ペプチドを特徴付ける及び/または定量する工程を含む、前記方法。

【請求項2】

前記親水性濃縮基材が、固相抽出(SPE)クロマトグラフィー基材を含む、請求項1

に記載の方法。

【請求項 3】

前記親水性濃縮基材が、シリカベースのアミノプロピル吸着剤材料を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記質量分光分析が、液体クロマトグラフィーシステムと組み合わされた質量分析計を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記質量分光分析が、UV 検出器と組み合わされた質量分析計を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記ギ酸アンモニウム及び ACN の水溶液が、水中に約 100 ~ 約 400 mM のギ酸アンモニウム及び約 2 . 5 % ~ 約 10 % の ACN を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記親水性濃縮基材が、ギ酸及び ACN 洗浄溶液で洗浄され、前記溶液が、約 0 . 5 体積 % ~ 約 5 体積 % のギ酸及び約 85 体積 % ~ 約 95 体積 % の ACN を含み、残りの水が、非糖ペプチド混入物質を除去するためのものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記分離カラムが、親水性相互作用 (HILIC) カラムを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記糖ペプチドを 1 つ以上の画分に分離することが、分離カラムに移動相勾配を適用することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記移動相勾配が、約 10 mM のギ酸アンモニウム (pH 4 . 5) から約 90 % の ACN と 10 mM のギ酸アンモニウム (pH 4 . 5) までを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記移動相勾配が、H₂O 中の約 0 . 05 % TFA または ACN 中の約 0 . 045 % TFA を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の画分に存在する糖ペプチドに結合しているグリカン进行を同定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記 1 つ以上のプロテアーゼが、トリプシンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

溶出された糖ペプチドの糖ペプチドレベルでのグリコシル化プロファイリングをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記親水性濃縮基材をアセトニトリル (ACN) の水溶液で予備洗浄することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記親水性濃縮基材との接触の前に、ACN の水溶液中に糖ペプチドを含む試料を希釈することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、バイオ医薬品に関するものであり、治療用抗体及びそのフラグメントなどのタンパク質のインビボでの翻訳後グリコシル化の検出及び定量化に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

背景

治療用モノクローナル抗体 (m A b) は、翻訳後修飾 (P T M) から生じる変種を含む、多くの生成物の変種を有する哺乳動物細胞で産生される不均一な分子である。N - 結合型グリコシル化は、治療用抗体の主要な P T M である。医薬品の品質を定義し、ロット間の一貫性を示し、製造プロセスの制御を確実にするために、N 結合型グリカン構造の特徴付け及び個々のグリコフォームの定量化が、規制当局によって要求される。従来、抗体内の N 結合型グリカンは、抗体からグリカンを酵素的に遊離させてから蛍光試薬で標識することによって、定量化される。あるいは、グリコシル化は、抗体のトリプシン消化により生成された糖ペプチドを分析することによって、ペプチドレベルで特徴付けされ得る。ただし、不均一なグリコフォームを持つ糖ペプチドは、ペプチドマッピングに伝統的に使用されている逆相ベースの液体クロマトグラフィー (R P L C) では十分に分離されないことが多い。さらに、オンライン質量分析 (M S) によって誘発される糖ペプチドの糖鎖のインソースフラグメンテーションは、切断されたグリコフォームアーティファクトを生成し得、これによって M S を使用したさまざまなグリコフォームの相対存在量の正確な定量が損なわれる。

10

【 発明の概要 】

【 0 0 0 3 】

一態様では、本発明は、糖ペプチドを精製及び / または分離する方法であって、 (a) 糖ペプチドが親水性濃縮基材に結合することを可能にする条件下で、糖ペプチドを含む試料を親水性濃縮基材に接触させること ; (b) 当該親水性濃縮基材を洗浄して、当該親水性濃縮基材から非糖ペプチド混入物質を除去すること ; ならびに (c) ギ酸アンモニウム及びアセトニトリル (A C N) の水溶液を使用して、当該親水性濃縮基材から糖ペプチドを溶出させ、それによって濃縮糖ペプチド試料を作製すること、を含む方法を提供する。必要に応じて、この方法は、濃縮糖ペプチド試料を分離カラムに適用すること、及びこの分離カラムから糖ペプチドを溶出させることを含む。

20

【 0 0 0 4 】

いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、固相抽出 (S P E) クロマトグラフィー基材を含む。

【 0 0 0 5 】

いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、シリカベースのアミノプロピル吸着剤材料を含む。

30

【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態では、ギ酸アンモニウム及び A C N の水溶液は、水中に約 1 0 0 ~ 4 0 0 m M のギ酸アンモニウム及び約 2 . 5 % ~ 約 1 0 % の A C N を含む。

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態では、ギ酸アンモニウム A C N 溶液は、水中に 2 0 0 m M のギ酸アンモニウム及び 5 % の A C N を含む。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、ギ酸及び A C N 洗浄溶液で洗浄され、この溶液は、0 . 5 体積 % ~ 約 5 体積 % のギ酸及び約 8 5 体積 % ~ 約 9 5 体積 % の A C N を含み、残りの水は、非糖ペプチド混入物質を除去するためである。

40

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、ギ酸及び A C N 洗浄溶液は、1 体積 % のギ酸、9 体積 % の H₂O、9 0 体積 % の A C N を含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、分離カラムは、親水性相互作用 (H I L I C) カラムを含む。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、分離カラムから糖ペプチドを溶出させることは、糖ペプチドを 1 つ以上の画分に分離することをさらに含む。

50

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、糖ペプチドを 1 つ以上の画分に分離することは、分離カラムに移動相勾配を適用することを含む。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、移動相勾配は、10 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.5) から 90% ACN (10 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5) までである。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、移動相勾配は、H₂O 中の 0.05% TFA または ACN 中の 0.045% TFA である。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、この方法は、1 つ以上の画分に存在する糖ペプチドを同定することをさらに含む。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、この方法は、1 つ以上の画分に存在する糖ペプチドに結合しているグリカンと同定することをさらに含む。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、このグリカンは、N - グリカンを含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、この糖ペプチドは、モノクローナル抗体から得られる。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、アイソタイプ IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4、または混合アイソタイプのものである。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、この方法は、モノクローナル抗体をプロテアーゼで消化することをさらに含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、トリプシンを含む。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、この方法は、溶出された糖ペプチドに対して質量分光分析を実施することをさらに含む。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、この方法は、溶出された糖ペプチドの糖ペプチドレベルでのグリコシル化プロファイリングをさらに含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、この方法は、親水性濃縮基材をアセトニトリル (ACN) の水溶液で予備洗浄することをさらに含む。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、この方法は、親水性濃縮基材との接触の前に、ACN の水溶液中に糖ペプチドを含む試料を希釈することをさらに含む。

[本発明 1001]

糖ペプチドを分離する方法であって、

糖ペプチドが親水性濃縮基材に結合することを可能にする条件下で、前記糖ペプチドを含む試料を前記親水性濃縮基材に接触させる工程；

前記親水性濃縮基材を洗浄して、前記親水性濃縮基材から非糖ペプチド混入物質を除去する工程；

ギ酸アンモニウム及びアセトニトリル (ACN) の水溶液を用いて前記親水性濃縮基材から前記糖ペプチドを溶出させて、濃縮糖ペプチド試料を作製する工程；

前記濃縮糖ペプチド試料を分離カラムに適用する工程；ならびに

前記分離カラムから前記糖ペプチドを溶出させる工程であって、それによって前記試料中の糖ペプチドを分離する、溶出させる工程

10

20

30

40

50

を含む、前記方法。

[本発明 1 0 0 2]

前記親水性濃縮基材が固相抽出 (S P E) クロマトグラフィー基材を含む、本発明 1 0 0 1 の方法。

[本発明 1 0 0 3]

前記親水性濃縮基材がシリカベースのアミノプロピル吸着剤材料を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 0 2 の方法。

[本発明 1 0 0 4]

前記ギ酸アンモニウム及び A C N の水溶液が、水中に約 1 0 0 ~ 4 0 0 m M のギ酸アンモニウム及び約 2 . 5 % ~ 約 1 0 % の A C N を含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 0 3 のいずれかの方法。

10

[本発明 1 0 0 5]

前記ギ酸アンモニウム A C N 溶液が、水中に約 2 0 0 m M のギ酸アンモニウム及び約 5 % の A C N を含む、本発明 1 0 0 4 の方法。

[本発明 1 0 0 6]

前記親水性濃縮基材を、約 0 . 5 体積 % ~ 約 5 体積 % のギ酸、及び約 8 5 体積 % ~ 約 9 5 % の A C N 、残りは水を含む、ギ酸及び A C N の洗浄溶液で洗浄して、非糖ペプチド混入物質を除去する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 0 5 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 0 7]

前記ギ酸及び A C N の洗浄溶液が、約 1 体積 % のギ酸、約 9 % の H ₂ O 、及び約 9 0 体積 % の A C N を含む、本発明 1 0 0 6 の方法。

20

[本発明 1 0 0 8]

前記分離カラムが親水性相互作用 (H I L I C) カラムを含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 0 7 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 0 9]

前記分離カラムから前記糖ペプチドを溶出させる工程が、前記糖ペプチドを 1 つ以上の画分に分離することをさらに含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 0 8 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 1 0]

前記糖ペプチドを 1 つ以上の画分に分離することが、前記分離カラムに移動相勾配を適用することを含む、本発明 1 0 0 9 ~ 1 0 1 1 のいずれかの方法。

30

[本発明 1 0 1 1]

前記移動相勾配が、約 1 0 m M のギ酸アンモニウム (p H 4 . 5) から約 9 0 % の A C N と 1 0 m M のギ酸アンモニウム (p H 4 . 5) ままで含む、本発明 1 0 1 0 の方法。

[本発明 1 0 1 2]

前記移動相勾配が、H ₂ O 中の約 0 . 0 5 % の T F A または A C N 中の約 0 . 0 4 5 % の T F A を含む、本発明 1 0 1 0 の方法。

[本発明 1 0 1 3]

前記 1 つ以上の画分に存在する前記糖ペプチドを同定する工程をさらに含む、本発明 1 0 0 9 ~ 1 0 1 2 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 1 4]

40

前記 1 つ以上の画分に存在する前記糖ペプチドに結合しているグリカンと同定する工程をさらに含む、本発明 1 0 0 9 ~ 1 0 1 3 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 1 5]

前記グリカンが N - グリカンを含む、本発明 1 0 1 4 の方法。

[本発明 1 0 1 6]

前記糖ペプチドがモノクローナル抗体から得られる、本発明 1 0 0 9 ~ 1 0 1 5 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 1 7]

前記モノクローナル抗体が、アイソタイプ I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 、または混合アイソタイプである、本発明 1 0 1 6 の方法。

50

[本発明 1 0 1 8]

前記モノクローナル抗体をプロテアーゼで消化する工程をさらに含む、本発明 1 0 1 6 または 1 0 1 7 の方法。

[本発明 1 0 1 9]

前記プロテアーゼがトリプシンを含む、本発明 1 0 1 8 の方法。

[本発明 1 0 2 0]

溶出された前記糖ペプチドに対して質量分析を実施する工程をさらに含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 1 9 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 2 1]

溶出された前記糖ペプチドの糖ペプチドレベルでのグリコシル化プロファイリングをさらに含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 2 0 のいずれかの方法。

10

[本発明 1 0 2 2]

前記親水性濃縮基材をアセトニトリル (A C N) の水溶液で予備洗浄する工程をさらに含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 2 1 のいずれかの方法。

[本発明 1 0 2 3]

前記親水性濃縮基材との接触の前に、 A C N の水溶液中に糖ペプチドを含む前記試料を希釈する工程をさらに含む、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 2 2 のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】質量分析 (L C / M S) と組み合わせた液体クロマトグラフィーによる糖ペプチド定量の現在の標準的な方法を示す概略ワークフロー図を示している。

20

【図 2】遊離されたグリカンの定量と比較した、図 1 のワークフローに示される糖ペプチド定量の方法の結果を示す表を示す。すなわち、1 つは糖ペプチドの検出に基づいており、もう 1 つは遊離されたグリカンの検出に基づいている。

【図 3】糖ペプチドによるグリコフォーム定量化と遊離グリカン法との間の不一致 (図 2 を参照) が、糖ペプチド分析における M S による糖骨格のインソースフラグメンテーションに起因する可能性が高く、切断されたグリカンアーティファクト (すなわち、 G 0 F - G 1 c N A c 及び G 1 F - G 1 c N A c) の増加、ならびに主要なグリカン (すなわち、 G 0 F 及び G 1 F) の減少を引き起こすことを実証している質量スペクトルを示す。遊離グリカン法は、M S シグナルではなく、遊離されたグリカンに結合した標識の蛍光によってグリコフォームを定量化する。

30

【図 4】本明細書において開示される糖ペプチド定量化方法のワークフロー図を示す。

【図 5】2 つの異なる方法によってトリプシン消化物から得られた m A b 1 ペプチドの分離の結果を示している、m A b 1 ペプチドの一連の H I L I C - U V クロマトグラムを示す。

【図 6】図 5 に示されるトレースの糖ペプチド部分の拡大図を示しており、これによって、2 番の方法がより良好な分離、より鋭いピーク、及びより大きな S / N 比を有することが実証される。

【図 7】糖ペプチドにズームインする m A b 1 糖ペプチドの一連の H I L I C - T I C クロマトグラムを示す。示されているように、2 番の方法は、M S シグナルの S / N 比が大きかった。

40

【図 8 A】m A b 1 糖ペプチド (M ² + イオン) の M S 1 スペクトルを示す。

【図 8 B】m A b 1 糖ペプチド (M ² + イオン) の M S 1 スペクトルを示す。

【図 9】遊離グリカン分析を伴う H I L I C カラムでの糖ペプチド分離によるグリコフォーム定量の比較を示している、一連のトレース及び表を示す。

【図 1 0】ペプチド消化物の乾燥が、糖ペプチドの濃縮を助け得るが、グリカンの U V シグナル及び相対的な P A % に影響を及ぼさなかったことを実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 1 1】水及び A C N 中のそれぞれ 0 . 0 5 % 及び 0 . 0 4 5 % の T F A を使用することによって、移動相の調製を単純化し、ピーク統合を改善するために行われた変更を示す

50

一連のトレースを示す（R P - L C ペプチドマッピング移動相）。

【図 1 2 A】移動相変化が糖ペプチド（ M^2+ イオン）の M S シグナルに影響を及ぼさなかったことを実証している一連の質量スペクトルの結果を示す。

【図 1 2 B】移動相変化が糖ペプチド（ M^2+ イオン）の M S シグナルに影響を及ぼさなかったことを実証している一連の質量スペクトルの結果を示す。

【図 1 2 C】移動相変化が糖ペプチド（ M^2+ イオン）の M S シグナルに影響を及ぼさなかったことを実証している一連の質量スペクトルの結果を示す。

【図 1 2 D】移動相変化が糖ペプチド（ M^2+ イオン）の M S シグナルに影響を及ぼさなかったことを実証している一連の質量スペクトルの結果を示す。

【図 1 3】80% A C N に希釈された m A b 1 糖ペプチドの溶液安定性を実証している一連のトレースを示す。

10

【図 1 4】ミス切断された糖ペプチドを有するトリプシン消化物が U V による糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースを示す。

【図 1 5】オンライン M S データによって、E I C を使用して、グリコフォームの定量化に役立つ各ピークにおけるミス切断された糖ペプチドの割合（%）を見つけ得ることを実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 1 6】トリプシンによる m A b 2 の再消化が、ミス切断された糖ペプチドを除去してグリコフォームの定量化を助けたことを実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 1 7】ギ酸アンモニウムが H I L I C S P E からの糖ペプチドの溶出を有意に改善したことを実証している一連のトレースを示す。

20

【図 1 8】乾燥または S P E 精製 / 乾燥が m A b 1 糖ペプチドの定量に影響を及ぼさなかったことを実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 1 9】糖ペプチド及び遊離グリカン分析による同様の m A b 3 グリコフォーム定量化を実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 2 0 A】糖ペプチド及び遊離グリカン分析による還元及び非還元の m A b 3 トリプシン消化物を使用した、同様のグリコフォーム定量化を実証している一連のトレース及び表を示す。

【図 2 0 B】糖ペプチド及び遊離グリカン分析による還元及び非還元の m A b 3 トリプシン消化物を使用した、同様のグリコフォーム定量化を実証している一連のトレース及び表を示す。

30

【図 2 1】フコシル化を伴う場合と伴わない場合の、I g G 1 及び I g G 4 糖ペプチドの分離の比較を示している一連のトレースを示す。

【図 2 2】本明細書に開示される方法を含む糖ペプチド定量化の方法を示す概略ワークフロー図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明が記載される前に、本発明は、記載された特定の方法及び実験条件に限定されないことを理解されたい（そのような方法及び条件は変動し得るからである）。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図しないことも理解されたい。任意の実施形態または実施形態の特徴は、互いに組み合わせてもよく、そのような組み合わせは、本発明の範囲内に明示的に含まれる。

40

【0028】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の列挙された数値に関して使用される場合、その値が列挙された値から 1% 以下変化し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、「約 100」という表現は、99 及び 101、ならびにその間の全ての値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4 など）を含む。

50

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法及び材料を、本発明の実施または試験に使用してもよいが、好ましい方法及び材料をここで説明する。本明細書に記載されている全ての特許、出願、及び非特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 3 0 】

本明細書において使用される略語

P T M : 翻訳後修飾

R P - L C - M S / M S : 逆相液体クロマトグラフィータンデム質量分析法

m A b : モノクローナル抗体

I g G : 免疫グロブリン G

L C : 軽鎖

H C : 重鎖

M S : 質量分析法

S P E : 固相抽出

H I L I C : 親水性相互作用液体クロマトグラフィー

U V : 紫外線

T F A : トリフルオロ酢酸

A C N : アセトニトリル

【 0 0 3 1 】

定義

本明細書で使用される「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された、4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖からなる免疫グロブリン分子(すなわち、「完全な抗体分子」)、ならびにその多量体(例えば、I g M)またはその抗原結合フラグメントを指すものとする。各重鎖は、重鎖可変領域(「H C V R」または「V_H」)及び重鎖定常領域(ドメインC_H1、C_H2、及びC_H3で構成される)で構成されている。様々な実施形態では、重鎖は、I g Gアイソタイプであってもよい。場合によっては、重鎖はI g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4から選択される。いくつかの実施形態では、重鎖は、アイソタイプI g G 1またはI g G 4の重鎖であり、必要に応じて、アイソタイプI g G 1 / I g G 2またはI g G 4 / I g G 2のキメラヒンジ領域を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(「L C V R」または「V_L」)及び軽鎖定常領域(C_L)で構成されている。V_H及びV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が点在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化され得る。各V_H及びV_Lは、3つのCDR及び4つのFRで構成され、これはアミノ末端からカルボキシ末端に向かって、FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3、FR 4の順序で配置されている。「抗体」という用語は、任意のアイソタイプまたはサブクラスのグリコシル化及び非グリコシル化免疫グロブリンの両方への言及を含む。「抗体」という用語は、抗体を発現するようにトランスフェクトされた宿主細胞から単離された抗体などの組換え手段によって調製、発現、作製または単離された抗体分子を含む。抗体構造のレビューについては、L e f r a n c e t a l . , I M G T u n i q u e n u m b e r i n g f o r i m m u n o g l o b u l i n a n d T c e l l r e c e p t o r v a r i a b l e d o m a i n s a n d I g s u p e r f a m i l y V - l i k e d o m a i n s , 2 7 (1) D e v . C o m p . I m m u n o l . 5 5 - 7 7 (2 0 0 3) ; 及び M . P o t t e r , S t r u c t u r a l c o r r e l a t e s o f i m m u n o g l o b u l i n d i v e r s i t y , 2 (1) S u r v . I m m u n o l . R e s . 2 7 - 4 2 (1 9 8 3) を参照のこと。

【 0 0 3 2 】

抗体という用語は、複数の異なるエピトープに結合し得るヘテロ四量体免疫グロブリンを含む「二重特異性抗体」も包含する。単一の重鎖及び単一の軽鎖及び6つのCDRを含む二重特異性抗体の半分は、1つの抗原またはエピトープに結合し、抗体の残りの半分は

10

20

30

40

50

異なる抗原またはエピトープに結合する。場合によっては、二重特異性抗体は、同じ抗原に、ただし異なるエピトープまたは重複しないエピトープに結合し得る。場合によっては、二重特異性抗体の両方の半分とも、二重特異性を保持しながら同一の軽鎖を有する。二重特異性抗体は、一般に、米国特許出願番号 2 0 1 0 / 0 3 3 1 5 2 7 (2 0 1 0 年 1 2 月 3 0 日) に記載されている。

【 0 0 3 3 】

抗体 (または「抗体フラグメント」) の「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の 1 つ以上のフラグメントを指す。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合フラグメントの例としては、(i) F a b フラグメント、V L、V H、C L 及び C H 1 ドメインからなる一価フラグメント; (i i) F (a b ') 2 フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b フラグメントを含む二価フラグメント; (i i i) V H 及び C H 1 ドメインからなる F d フラグメント; (i v) 抗体の単一アームの V L 及び V H ドメインからなる F v フラグメント、(v) V H ドメインからなる d A b フラグメント (W a r d e t a l . (1 9 8 9) N a t u r e 2 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6)、(v i) 単離された C D R、ならびに (v i i) F v フラグメントの 2 つのドメイン、V L 及び V H からなる s c F v であって、合成リンカーによって結合されて、V L 及び V H 領域が対になって一価分子を形成する単一のタンパク質鎖を形成する s c F v が挙げられる。ダイアボディなどの他の形態の一本鎖抗体も「抗体」という用語に含まれる (例えば、H o l l i g e r e t a l . (1 9 9 3) 9 0 P N A S U . S . A . 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ; 及び P o l j a k e t e t a l . (1 9 9 4) 2 S t r u c t u r e 1 1 2 1 - 1 1 2 3 を参照のこと) 。

【 0 0 3 4 】

さらに、抗体及びその抗原結合フラグメントは、当技術分野で一般に知られている標準的な組換え DNA 技術を使用して得てもよい (S a m b r o o k e t a l . , 1 9 8 9 を参照のこと) 。

【 0 0 3 5 】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変及び定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト m A b は、例えば、C D R、特に C D R 3 において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入される変異) を含む得る。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種 (例えば、マウス) の生殖系列に由来する C D R 配列がヒト F R 配列に移植された m A b を含むことは意図しない。この用語は、非ヒト哺乳動物で、または非ヒト哺乳動物の細胞で組換え的に産生された抗体を含む。この用語は、ヒト対象から単離されるか、またはヒト対象において生成された抗体を含むことは意図しない。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される用語「糖ペプチド / 糖タンパク質」は、共有結合した炭水化物またはグリカンを含む、それらの合成中または合成後に修飾されたペプチド / タンパク質である。特定の実施形態では、糖ペプチドは、モノクローナル抗体から、例えば、モノクローナル抗体のプロテアーゼ消化物から得られる。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用される用語「グリカン」とは、一般にグルコース (G l c)、ガラクトース (G a l)、マンノース (M a n)、フコース (F u c)、N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c)、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) 及び N - アセチルノイラミン酸 (N e u N A c) を含む 1 つ以上の糖単位を含む化合物である (F r a n k K j e l d s e n , e t a l . A n a l . C h e m . 2 0 0 3 , 7 5 , 2 3 5 5 - 2 3 6 1)。モノクローナル抗体などの糖タンパク質のグリカン部分は、その機能または細胞の位置を特定するための重要な特性である。例えば、特定のモノクローナル抗体は、特定のグリカン部分で修飾されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 8 】

「親水性相互作用クロマトグラフィー」またはH I L I Cという用語は、親水性化合物が疎水性化合物よりも長く保持される、親水性固定相及び疎水性有機移動相を使用するプロセスを含むことを意図している。特定の実施形態では、このプロセスは、水混和性溶媒移動相を利用する。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される「試料」という用語は、モノクローナル抗体から得られるような、少なくとも分析物分子、例えば、糖ペプチドを含む分子の混合物であって、例えば、分離、分析、抽出、濃縮、またはプロファイリングを含む、本発明の方法以下に従って操作される混合物を指す。

10

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される「分析」または「分析すること」という用語は、交換可能に使用され、目的の分子（例えば、糖タンパク質）を分離、検出、単離、精製、可溶化、検出及び/または特徴付ける任意の様々な方法を指す。例としては、限定するものではないが、固相抽出、固相マイクロ抽出、電気泳動、質量分析、例えば、S P E H I L I C、M A L L D I - M SまたはE S I、液体クロマトグラフィー、例えば、高性能、例えば、逆相、順相、またはサイズ排除、イオン対液体クロマトグラフィー、液-液抽出、例えば、加速流体抽出、超臨界流体抽出、マイクロ波支援抽出、膜抽出、ソックスレット抽出、沈殿、清澄化、電気化学的検出、染色、元素分析、エドモンド分解、核磁気共鳴、赤外線分析、フローインジェクション分析、キャピラリーエレクトロクロマトグラフィー、紫外線検出、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

20

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される「プロファイリング」という用語は、試料中の糖ペプチドの含有量、組成、または特徴的な比率を得るために組み合わせ使用される、任意の様々な分析方法を指す。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される「親水性濃縮基材」とは、結合を可能にする条件下、例えば、p H、イオン強度などの下で親水性材料に優先的に結合するクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、S P Eに使用される。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される「クロマトグラフィー表面」という用語は、試料または分析物に曝露される表面を含む。クロマトグラフィー表面は、化学的に修飾されてもよいし、官能化されてもよいし、もしくは活性化されてもよいし、または微細構造、例えば、細孔を有してもよい。特定の実施形態では、クロマトグラフィー表面は、疎水性であっても、親水性（極性）であっても、またはイオン性であってもよい。他の実施形態では、クロマトグラフィー表面は完全に多孔性、表面的に多孔性、または非多孔性である。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「クロマトグラフィーコア」という用語は、本発明の材料の内部を形成する粒子、モノリス、または別の適切な構造の形態のシリカなどの有機材料を含むがこれらに限定されないクロマトグラフィー材料を含む。特定の態様では、クロマトグラフィーコアの表面とは、本明細書で定義されるように、クロマトグラフィー表面を表すか、またはクロマトグラフィー表面によって包まれた材料を表す。クロマトグラフィー表面の材料は、離散遷移もしくは明確な遷移が識別できるように、クロマトグラフィーコア上に配置されてもよいし、または結合もしくはアニーリングされてもよく、あるいはクロマトグラフィーコアの表面と混ざり合って、材料の漸次的変化を生じ、内部コア表面の離別を生じないようにクロマトグラフィーコアに結合されてもよい。特定の態様では、クロマトグラフィー表面材料は、クロマトグラフィーコアの材料と同じであっても、または異なってもよく、細孔容積、表面積、平均細孔径、炭素含有量または加水分解p H安定性を含むがこれらに限定されない、クロマトグラフィーコアとは異なる物理的または物理化学的特性を示してもよい。

40

50

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「親水性」という用語は、水に対して親和性を有すること、水を引き寄せること、水を吸着すること、または水を吸収することを述べる。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される「疎水性」という用語は、水に対する親和性の欠如、水をはじくこと、または水を吸着もしくは吸収ができないことを述べる。

【 0 0 4 7 】

「固相抽出」または「S P E」とは、定量的化学分析、例えば、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）またはガスクロマトグラフィー（G C）と組み合わせて使用される場合が多いクロマトグラフィー技術である。S P Eの目標は、不要な混入物質を含む複雑な試料マトリックスから標的の分析物を分離することである。分離された標的の分析物は、定量分析と適合し得る溶液中に回収される。標的化合物を含むこの最終溶液は、分析に直接使用してもよいし、または蒸発させて、標的化合物をさらに濃縮し、検出及び測定をより容易にする目的で、より少ない容積の別の溶液中で再構成してもよい。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される「クロマトグラフィー」とは、混合物、例えば、糖ペプチドを含む混合物を分離するプロセスを指す。これは、混合物を固定相に通すことを含み、これにより、目的の分子が混合物中の他の分子から分離され、目的の1つ以上の分子を単離することが可能になる。クロマトグラフィー分離の方法の例としては、なかでも、キャピラリーアクションクロマトグラフィー、例えば、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（T L C）、カラムクロマトグラフィー、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（F P L C）、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（H I L I C）、及び逆相高速液体クロマトグラフィー（R P - H P L C）が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される「接触」とは、溶液または固相中の少なくとも2つの物質を一緒にすること、例えば、クロマトグラフィー材料の固定相を試料と接触させることを含む。

【 0 0 5 0 】

概要

モノクローナル抗体（M A b）は、標的抗原に対するこれらの薬物の特異性に起因して、例えば、免疫系を活性化して腫瘍細胞を殺すこと、腫瘍細胞が増殖するためのシグナル伝達を遮断すること、腫瘍細胞に薬物を運ぶことによって、または放射線標的として、がん及び他の慢性疾患に対する効果的な生物製剤として浮上している。免疫グロブリンのグリコシル化は、それらの物理化学的特性と、補体の結合及び活性化などのそれらの細胞媒介性エフェクター機能との両方に影響する。これらの生物学的機能は、N - 結合型オリゴ糖の有無だけでなく、オリゴ糖の特定の構造にも依存している場合がある。さらに、抗体のN - グリコシル化は、バイオ医薬品の製造において慣用的に特徴付けられている。特に、モノクローナル抗体のグリカンプロファイルは、有効性、免疫原性、及び製造条件の尺度となり得るので、重要な品質属性として定義されることもある。したがって、グリカン分析のアプローチは、詳細な特徴付けを容易にするために高感度を示すことが重要である。治療用モノクローナル抗体の製造では、部位特異的なN - グリコシル化及びN - グリカン部位の占有率の評価が重要である。したがって、モノクローナル抗体から得られた糖ペプチドを分離するための高効率 / 高分解能の方法が必要である。開示された本発明はその必要性を満たす。

【 0 0 5 1 】

本明細書に開示されるのは、固相抽出（S P E）を、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（H I L I C）カラムと組み合わせて、グリコシル化及び非グリコシル化トリプシンペプチドを分離する、糖ペプチド分析及び定量化のための新しい方法である。様々な実

10

20

30

40

50

施形態では、これらの分離技術は、グリカン構造を解明するために、紫外線（UV）検出及びオンライン質量分析（MS）検出と組み合わせられる。一部の方法では、グリカンの特徴付けは、ペプチド鎖からグリカン遊離すること、次いで、ペプチドとは別にグリカン进行分析することに依存している（例えば、図1～3を参照）。グリカンはUV検出に適していないため、遊離されたグリカンは多くの場合、蛍光検出用のアントラニルアミド、アントラニル酸もしくは2-アミノピリジンなどのフルオロフォアタグ、または、MS検出を可能にするために有意な塩基性を有するプロカインアミドなどの分子で標識されている。ただし、グリカン分析へのこのアプローチでは、グリコシル化のグローバルな評価しか得られない。特に、このワークフローは遊離手順に依存しているので、グリカンに関する部位特異的な情報は失われる。対照的に、開示された方法では、単離された糖ペプチドは、同じクロマトグラフィー分離内のグリコフォーム構造の違いに基づいて分離される。さらに、HILICカラムを使用して達成された、異なるグリカン異性体を含む糖ペプチドの分離は、標準のRP-LC法を使用しても観察されなかった（例えば、図1～3を参照のこと）。希釈、真空乾燥、及び/または固相抽出（SPE）を含む、HILICの試料前処理条件を最適化することにより、さまざまなタイプのペプチドマッピング試料前処理からの糖ペプチドの分析を可能にするワークフローが開発された（例えば、図22を参照のこと）。本明細書に開示されるように、本発明者らは、方法及びワークフローが、オンラインMS検出と組み合わせたUV検出を使用して、ペプチドレベルでの抗体における個々のグリコフォームの相対レベルの同定及び定量化に適していることを実証した（例えば、図4及び22を参照のこと）。

10

20

【0052】

本明細書に開示される方法は、糖ペプチド、例えば、1つ以上のプロテアーゼで消化された抗体などのモノクローナル抗体から得られた糖ペプチドの精製及び/または分離及び/または分析を含む。開示された方法は、分離及び分析の改善された結果、ならびにグリカンがそれらの抗体フラグメントに共有結合しままである間に、グリカンを研究する能力を提供する。グリコフォームのこのペプチドレベルの分析は、単一の試料を逆相ペプチドマッピング、例えば、トリプシン消化、及びHILICベースの糖ペプチドマッピングに利用できるという点で、生物製剤の特徴付けにも利点をもたらす。さらに、グリカンとペプチド/タンパク質間の結合を維持することで、糖ペプチドのタンパク質成分に基づくUV及びMSの検出が容易になり、例えば、遊離したグリカンを標識する必要がなくなる。

30

【0053】

特定の実施形態では、この方法は、糖ペプチドを親水性濃縮基材に結合させることを可能にするか、及び/または引き起こす条件下で、糖ペプチドを含む試料を親水性濃縮基材と接触させることを含む。この試料を一旦、親水性濃縮基材にロードすると、一連の調整された洗浄及び溶出溶液を、親水性濃縮基材上に通して、糖ペプチドから混入物質を分離し、次いで、さらに分析するために糖ペプチドを収集してもよい。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材を洗浄して、試料から非糖ペプチド混入物質を除去する。したがって、有意な程度まで、糖ペプチドを、親水性濃縮基材のクロマトグラフィー表面などの親水性濃縮基材上で濃縮する。特定の実施形態では、親水性濃縮基材は、シリカベースのアミノプロピル吸着剤材料を含む。特定の実施形態では、親水性濃縮基材は、固相抽出（SPE）用に構成される。

40

【0054】

SPE用に設計されたデバイスは、典型的には、ユーザーが標的成分、この場合は糖ペプチドを優先的に保持することを可能にするクロマトグラフィー吸着剤（例えば、シリカベースのアミノプロピル吸着剤などの親水性濃縮基材）を含む。SPEデバイスは、通常、試料保持リザーバー、吸着剤を収容するための手段、及び流体導管、またはデバイスを出る流体を適切な収集容器に向けるための注ぎ口を備える。SPEデバイスは、少数の試料を調製するのに便利で費用効果の高いシングルウェルフォーマットであっても、または多数の試料を並行して調製するのに非常に適したマルチウェルフォーマットであってもよい。マルチウェルフォーマットは、ロボット流体分注システムで一般的に使用される。典

50

型的なマルチウェルフォーマットには、48ウェル、96ウェル、及び384ウェルの標準プレートフォーマットが含まれる。流体は通常、特別に設計された真空マニホールドを使用してデバイス全体に真空を引くことによって、または遠心力もしくは重力を使用することによって、SPEデバイスを通して収集コンテナに押し込まれる。遠心力は、SPEデバイスを適切な収集トレイと一緒に、意図された目的のために特別に設計された遠心分離機に配置することによって生成される。SPEデバイスは、幅広いクロマトグラフィー極性の標的化合物を保持する高い能力を有し、試料混入物質が洗浄されて廃棄されるときに標的化合物の保持を維持し得、次にその標的化合物を、可能な限り少ない溶出量で、溶出させる機能を提供し、それによって、SPE中に得られる標的化合物濃度の程度を最大化することが有利である。

10

【0055】

開示された方法に従って、様々な固相抽出デバイスを使用してもよい。一実施形態では、SPEデバイスは、マイクロ溶出プレート、クロマトグラフィーカラム、薄層プレート、試料精製デバイス、注入カートリッジ、マイクロタイタープレート、及びクロマトグラフィー調製デバイスからなる群より選択される。

【0056】

SPE材料を含むシリカベースのアミノプロピル吸着剤材料は、当技術分野で公知であり、例えば、GlycoWorks HILIC SPEプレートの形態などで、例えばWaters Corporationから商業的に入手し得る（例えば、米国特許第6,723,236号、同第7,052,611号、及び同第7,192,525号を参照のこと）。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、洗浄、例えば、予備洗浄ステップによる試料の添加のために調製される。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、糖ペプチド試料と接触する前に洗浄される。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、水（ H_2O ）及び/またはACN溶液（例えば、ACN水溶液）、例えば、約60体積%～約95体積%のACN溶液、例えば、約60体積%、65体積%、70体積%、75体積%、80体積%、85体積%、90体積%、または95体積%のACN溶液（残りは水）で洗浄される。

20

【0057】

様々な実施形態では、親水性濃縮基材は、濃縮のために糖ペプチドを含む試料と接触せられる。試料溶液に関しては、それは、糖ペプチドが可溶性であり、糖ペプチドが親水性濃縮基材に結合する、溶媒に溶解された糖ペプチドを含むであろう。好ましくは、結合は強く、糖ペプチドのかなりの部分の結合をもたらす。場合によっては、実質的に全ての糖ペプチドが結合する。様々な実施形態では、溶媒は水溶液であり、典型的には、糖ペプチドを可溶化及び安定化するための緩衝液、塩、及び/または界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、糖ペプチド試料は、約0.1体積%～約0.5体積%のTFAを含有する約60体積%～90体積%のACN及び10体積%～約40体積%の水の溶液であり、例えば、0.2%のTFAを含有する約80:20のACN:水（v/v）である。低pHを使用して、高度に有機的な溶媒、例えば、約6.5、6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5または3.0未満などの約6.5未満のpHを有する溶液へのペプチド溶解度を維持し得る。

30

40

【0058】

次に、親水性濃縮基材を洗浄して、親水性濃縮基材に有意に結合しない非グリコシル化ペプチドなどの混入物質を除去する。このような混入物質は、廃棄され得る。いくつかの実施形態では、親水性濃縮基材は、ギ酸及び/またはトリフルオロ酢酸（TFA）の水（ H_2O ）溶液及びアセトニトリル（ACN）などの酸及びアセトニトリル（ACN）の水（ H_2O ）溶液中で洗浄される。特定の実施形態では、ギ酸及びACNの水溶液は、体積で約0.5%～約5%のギ酸、及び体積で約85%～約95%のACN（残りは水）を含み、例えば、体積で約0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、または5.0%のギ酸、及び体積で約80%、85%、90%、または95%のACNを含む。特定の実施形態では、TFA及びACNの水溶液

50

は、体積で約 0.5% ~ 約 5% の T F A 及び体積で約 85% ~ 約 95% の A C N (残りは水) を含み、例えば、体積で約 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、または 5.0% の T F A、及び体積で約 80%、85%、90%、または 95% の A C N を含む。特定の例では、洗浄溶液は、体積で 1% ギ酸、9% H₂O、90% A C N 溶液である。特定の例では、洗浄溶液は、体積で 1% T F A、9% H₂O、90% A C N 溶液である。

【 0 0 5 9 】

混入物質が一旦、除去されたら、親水性濃縮基材を溶出溶液と接触させて、親水性濃縮基材から糖ペプチドを溶出させる。シリカベースのアミノプロピル吸着剤は、弱塩基性の表面及び陰イオン交換の可能性を有している。ただし、シリカベースのアミノプロピル吸着剤からの糖ペプチドの相対的及び全体的な回収率は、溶出条件に特に敏感である可能性がある。偏った回収またはスペシエーションは、試料調製手順にとって問題となる場合がある。試料に存在する種の正確な表現を提供しないことに加えて、堅調ではなく、特に最も回収率の低い種に関して、得られた相対存在量プロファイルを再現性よく決定できない方法を示している可能性がある。例えば、本開示の対象である糖ペプチドとは対照的に、誘導体化されたグリカンの回収のために、A C N 中の酢酸アンモニウムを溶出溶液として使用することが推奨される。ただし、糖ペプチドの場合、A C N 中の酢酸アンモニウムは良好な結果をもたらさない。したがって、特定の実施形態では、糖ペプチドは、ギ酸アンモニウム及び A C N の水溶液を用いてシリカベースのアミノプロピル吸着剤から溶出される。いくつかの実施形態では、ギ酸アンモニウム及び A C N の水溶液は、約 100 ~ 400 m M のギ酸アンモニウム及び約 2.5 ~ 約 10% の A C N、例えば、約 100 m M のギ酸アンモニウム、約 150 m M のギ酸アンモニウム、約 200 m M のギ酸アンモニウム、約 250 m M のギ酸アンモニウム、約 300 m M のギ酸アンモニウム、約 350 m M のギ酸アンモニウム、または約 400 m M のギ酸アンモニウム、及び約 2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、または 10.0% の A C N を含む。特定の実施例では、ギ酸アンモニウム及び A C N の水溶液は、約 200 m M のギ酸アンモニウム及び約 5% の A C N を含む。

【 0 0 6 0 】

糖ペプチドが一旦、親水性濃縮基材から溶出されると、得られた濃縮糖ペプチド試料は、さらなる分離及び分析、例えば、クロマトグラフィー及び / または質量分析に供され得る。実施形態では、濃縮糖ペプチド試料は、分離カラムに適用され、続いて、例えば、移動相勾配を使用して糖ペプチドの個々の種を分離するために、分離カラムから溶出される。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、溶媒勾配、ステップ溶出、及び / または多次元溶出を実施して、糖ペプチドを分離カラムから溶出及び / または分離する。勾配の使用は、クロマトグラフィーの分野で周知である。基本的な原理は、分析物を分離カラムに吸着させること、次いで、脱着溶媒勾配で溶出させることを含む。勾配とは、溶媒の少なくとも 1 つの特徴の変化、例えば、p H、イオン強度、極性、または結合相互作用の強度に影響を与えるある因子の濃度の変化を指す。

【 0 0 6 2 】

使用される勾配は、漸進的であってもよいし、または段階的に加えられてもよい。一実施形態では、1 つ以上の次元で変化する脱着溶媒の 2 つ以上のボラスを使用する。例えば、2 つ以上のボラスは、p H、イオン強度、疎水性などにおいて変化し得る。洗浄溶液を使用する場合は、結合した糖ペプチドへの損失または損傷を最小限に抑えて、望ましくない混入物質を除去するように選択し得る。洗浄溶液の特性は、試料と脱着溶液の特性の中間であってもよい。例えば溶出勾配の溶媒は、糖ペプチド及び最終的な検出方法と互換性があるように選択される。一般的に、使用される溶媒は、既知の従来の溶媒である。様々な実施形態では、適切な溶媒を選択し得る溶媒としては、水酸化アンモニウム、トリエチルアミン、リン酸二アンモニウム、塩化メチレン、アセトニトリル (少量の塩基性ま

たは酸性修飾剤を含むまたは含まない)、メタノール(より多くの修飾剤、例えば酢酸もしくはトリエチルアミン、または水とメタノールもしくはアセトニトリルのいずれかとの混合物を含む)、酢酸エチル、クロロホルム、ヘキサン、イソプロパノール、アセトン、アルカリ緩衝液、高イオン強度緩衝液、酸性緩衝液、強酸、強塩基、酸/塩基との有機混合物、酸性または塩基性メタノール、テトラヒドロフラン及び水が挙げられる。

【0063】

HPLCを含む液体クロマトグラフィーを、糖ペプチドなどの構造を分析するために使用してもよい。陰イオン交換クロマトグラフィー、逆相HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、高速陰イオン交換クロマトグラフィー、及び順相(NP)クロマトグラフィー、例としては、NP-HPLCを含む、さまざまな形態の液体クロマトグラフィーを使用してこれらの構造を研究し得る(例えば、Alpert et al., J. Chromatogr. A 676:191-202(1994)を参照のこと)。親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)は、部分的に水性の移動相で実行され得るNP-HPLCの変法であり、ペプチド、炭水化物、核酸、及び多くのタンパク質の順相分離を可能にする。HILICの溶出順序は、逆相HPLCの場合とは逆に、最低の極性から最高の極性である。HPLCは、例えば、WatersのHPLCシステム(例えば、Waters 2695 Alliance HPLCシステム)、Agilent, Perkin Elmer, Gilsonなどで実施し得る。

10

【0064】

NP-HPLC、好ましくはHILICは、本明細書に記載の方法で使用され得るHPLCの特に有用な形態である。NP-HPLCは、分析物と固定相(例えば、基材)との間の極性相互作用に基づいて分析物を分離する。極性分析物は、極性固定相と会合し、極性固定相によって保持される。吸着強度は、分析物の極性の増大とともに増大し、極性分析物と極性固定相(移動相と比較して)との間の相互作用によって溶出時間が増大する。移動相でより極性の高い溶媒を使用すると、分析物の保持時間が短縮されるが、溶媒の疎水性が高いほど保持時間が長くなる傾向がある。

20

【0065】

シリカ、アミノ、アミド、セルロース、シクロデキストリン及びポリスチレン基材を含む、様々なタイプの基材を、例えば、カラムクロマトグラフィーのために、NP-HPLCと共に使用してもよい。カラムクロマトグラフィーで使用できる有用な基材の例としては、ポリスルホエチルアスパルタミド(poly Sulf ethyl Aspartamide)(例えば、Poly LCから)、スルホベタイン基材、例えば、ZIC(登録商標)-HILIC(例えば、SeQuantから)、POROS(登録商標)HS(例えば、Applied Biosystemsから)、POROS(登録商標)S(例えば、Applied Biosystemsから)、ポリヒドロエチルアスパルタミド(Poly Hydro ethyl Aspartamide)(例えば、Poly LCから)、Zorbax 300 SCX(例えば、Agilentから)、Poly GLYCOPLEX(登録商標)(例えば、Poly LCから)、Amide-80(例えば、Tosoh aasから)、TSK GEL(登録商標)Amide-80(例えば、Tosoh aasから)、Poly hydroxy ethyl A(例えば、Poly LCから)、Glyco-Sep-N(例えば、Oxford Glyco Sciencesから)、及びAtlantis HILIC(例えば、Watersから)が挙げられる。開示された方法で使用され得るカラムとしては、以下の官能基の1つ以上を利用するカラムが挙げられる:カルバモイル基、スルホプロピル基、スルホエチル基(例えば、ポリ(2-スルホエチルアスパルタミド))、ヒドロキシエチル基(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルアスパルタミド))及び芳香族スルホン酸基。

30

40

【0066】

使用される移動相は、イオン対剤、例えば、アセトニトリル及び水の有無がある緩衝液を含んでもよい。イオン対剤としては、ギ酸塩、酢酸塩、TFA、及び塩が挙げられる。緩衝液の勾配を使用してもよく、例えば、2つの緩衝液を使用する場合、第1の緩衝液の

50

濃度またはパーセンテージは減少し得、一方で、第2の緩衝液の濃度またはパーセンテージはクロマトグラフィーの実行の経過にわたって増加する。例えば、第1の緩衝液のパーセンテージは、クロマトグラフィーの実行の経過にわたって約100%、約99%、約95%、約90%、約85%、約80%、約75%、約70%、約65%、約60%、約50%、約45%、または約40%～約0%、約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、または約40%減少し得る。別の例として、第2の緩衝液のパーセンテージは、同じ実行の経過にまたがって、約0%、約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、または約40%～約100%、約99%、約95%、約90%、約85%、約80%、約75%、約70%、約65%、約60%、約50%、約45%、または約40%増大し得る。必要に応じて、第1及び第2の緩衝液の濃度またはパーセンテージは、クロマトグラフィーの実行の終了時に開始値に戻り得る。例として、第1の緩衝液のパーセンテージは、85%～63%～59%～10%～85%まで5段階で変更し得るが、同じステップの第2の緩衝液のパーセンテージは、15%～37%～41%～90%～15%に変化する。このパーセンテージは、線形勾配として、または非線形（例えば、段階的）様式で徐々に変化し得る。例えば、この勾配は、多相性、例えば、二相性、三相性などであってもよい。好ましい実施形態では、本明細書に記載の方法は、イオン対形成剤を使用せずに、移動相の極性の増大に対応する、漸減するアセトニトリル緩衝液勾配を使用する。

10

【0067】

カラム温度は、例えば、市販のカラムヒーターを使用して、クロマトグラフィーの実行全体を通して一定の温度に維持され得る。いくつかの実施形態では、カラムは、約18～約70、例えば、約30～約60、約40～約50、例えば、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、または約70の温度に維持される。好ましい温度は約45である。

20

【0068】

移動相の流速は、約0～約100ml/分であり得る。分析の提案の場合の流速は通常0～10ml/分の範囲であり、分取用HPLCの場合は100ml/分以上の流速を使用してもよい。例えば、流速は、約0.5、約1、約1.5、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、または約5ml/分であってもよい。同じパッキング、同じ長さ、ただし直径が小さいカラムに置き換えるには、より広い直径のカラムで見られるのと同じピークの保持時間及び分離能を維持するために、流速を下げる必要がある。好ましくは、4.6×100mm、5μmカラムにおいて約1ml/分に相当する流速を使用する。

30

【0069】

この実行時間は、約15～約240分、例えば、約20～約70分、約30～約60分、約40～約90分、約50分～約100分、約60～約120分、約50～約80分であってもよい。

【0070】

NP-HPLCは、例えば、内径が約75μmのカラムを使用して、ナノスケールで実施されるように調整してもよい（例えば、Wuhrer et al., Anal. Chem. 76: 833-838 (2004); Wuhrer et al., Internat. J. Mass. Spec. 232: 51-57 (2004)を参照のこと）。

40

【0071】

特定の実施形態では、分離カラムは、親水性相互作用（HILIC）分離カラムであり、その後、糖ペプチドは、例えば、移動相勾配を使用して、HILIC分離カラムから溶出されて糖ペプチドの個々の種を分離し、それにより、試料中の糖ペプチドを精製及び/または分離する。特定の例では、HILICから溶出された糖ペプチドは1つ以上の画分に分離される。このような画分は、MS分析などの後続の分析に使用され得る。特定の実施形態では、この方法は、1つ以上の画分に存在する糖ペプチド及び/またはグリカンと同定することを含む。特定の実施形態では、グリカンは、N-グリカンである。特定の実施形態では、移動相勾配は、10mMのギ酸アンモニウム（pH 4.5）から90%AC

50

N (1 0 m M ギ酸アンモニウム、p H 4 . 5) までである。特定の実施形態では、移動相勾配は、H₂O中の0 . 1 % T F Aであり、A C N中の0 . 1 % T F Aになる。

【 0 0 7 2 】

糖ペプチドは、モノクローナル抗体などのグリコシル化タンパク質から得られる。グリコシル化モノクローナル抗体は、還元、酵素消化、変性、断片化、化学的切断、及びそれらの組み合わせによって調製され得る。本明細書に開示される方法は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、または混合アイソタイプなどの任意の抗体アイソタイプに適用可能である。

【 0 0 7 3 】

還元とは、モノクローナル抗体などの3次元タンパク質においてジスルフィド結合を2つのチオールに還元することである。還元は、還元剤、例えば、T C E P - H C l の存在下で、熱変性、界面活性剤の添加、または変性剤、例えば、グアニジンH C l (6 M) の添加によって実施し得る。酵素分解とは、タンパク質をプロテアーゼ、例えば、トリプシンまたはアクロモバクター (A c h r o m o b a c t e r) プロテアーゼI (L y s - C) で消化することである。さらに、糖タンパク質は、熱または化学物質、あるいはそれらの組み合わせによって変性され得る。断片化には、モノクローナル抗体などの単一またはマルチサブユニットのタンパク質のタンパク質部分を、物理的、生物学的、または化学的方法で切断することが含まれる。例えば、S . p y o g e n e s (I d e S) の免疫グロブリン分解酵素は、抗体サブユニットの断片化に一般的に使用される。

【 0 0 7 4 】

様々な実施形態では、試料中の抗体は、親水性濃縮基材と接触する前に、還元、酵素分解、変性または断片化によって処理及び調製され得る。この方法は、フラグメントによるモノクローナル抗体 (m A b) 治療薬などのタンパク質のグリコシル化を特徴付ける新規のクロマトグラフィー方法、及びペプチドレベルのH I L I C - U V - M S分析を提供する。特定の実施形態では、試料は、任意の介在するステップで、濃縮、脱塩などされ得る。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、この方法は、例えば、糖ペプチドのペプチド部分からのU V シグナルを使用して、糖ペプチドを検出することをさらに含む。これは、試料の画分に対して実行され得、質量分析法 (M S) 分析などのさらなる分析のために特定の画分を選択することが可能になる。したがって、さらなる実施形態では、検出ステップは、質量分析法または液体クロマトグラフィー - 質量分析法 (L C - M S) を含む。生体分子の分析のための質量分析の適用では、分子は、液相または固相から気相及び真空相に移される。多くの生体分子は大きくて壊れやすいので (タンパク質が代表的な例である)、真空相に移行するための最も効果的な方法の2つは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (M A L D I) またはエレクトロスプレーイオン化 (E S I) である。これらの方法の使用の態様、及び試料調製要件は、当業者に公知である。一般に、E S I はより感度が高く、一方でM A L D I はより高速である。重要なことに、一部のペプチドはE S I よりもM A L D I モードでイオン化が良好であり、その逆も同様である (G e n o m e T e c h n o l o g y , J u n e 2 2 0 , p 5 2) 。本発明の抽出チャネル方法及びデバイスは、M S 分析のための試料、特に糖ペプチドなどの生体分子試料を調製するのに特に適している。本発明の重要な利点は、濃縮または脱塩などの介入プロセスステップを必要とせずに、直接分析され得る濃縮試料の調製を可能にすることである。

【 0 0 7 6 】

E S I は、試料を揮発性酸及び有機溶媒と混合し、高電圧で充電された導電性針を通してそれを注入することによって実行される。針の端から噴霧 (または排出) された帯電液滴は質量分析計に送られ、それが飛んでくるにつれて熱及び真空によって乾燥される。液滴が乾燥した後、残りの帯電分子は電磁レンズによって質量検出器に向けられて、質量分析される。一実施形態では、溶出された試料は、キャピラリーからエレクトロスプレーノズルに直接沈着され、例えば、キャピラリーは、試料ローダーとして機能する。別の実施形態では、キャピラリー自体が、抽出デバイス及びエレクトロスプレーノズルの両方とし

10

20

30

40

50

て機能する。

【 0 0 7 7 】

MALDI の場合、分析物分子（例えば、タンパク質）は、金属標の上に沈着され、有機マトリックスと共結晶化される。試料は乾燥され、質量分析計に挿入され、通常、飛行時間（TOF）検出によって分析される。一実施形態では、溶出された試料は、キャピラリーから金属標の上に直接沈着され、例えば、キャピラリー自体が試料ローダーとして機能する。一実施形態では、抽出された分析物は、MALDI 標の上に沈着され、MALDI イオン化マトリックスが追加され、試料は、例えば、TOF 検出によってイオン化及び分析される。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、他のイオン化モード、例えば、ESI - MS、ターボスプレーイオン化質量分析、ナノスプレーイオン化質量分析、サーモスプレーイオン化質量分析、ソニックスプレーイオン化質量分析、SELDI - MS 及び MALDI - MS が使用される。一般に、これらの方法の利点は、試料の「ジャストインタイム」精製及びイオン化環境への直接導入が可能になることである。さまざまなイオン化及び検出モードにより、使用する脱着溶液の性質に独自の制約が生じることに注意することが重要であり、脱着溶液が両方と適合性があることが重要である。例えば、多くのアプリケーションの試料マトリックスは、イオン強度が低い、特定の pH 範囲内にある必要があるなど。ESI では、試料中の塩がイオン化を低下させることによって、または、ノズルを詰まらせることによって、検出を妨げ得る。この問題は、分析物を低塩で提示することによって、及び / または揮発性塩を使用することによって対処される。MALDI の場合、分析物は、標的へのスポッティング及び使用するイオン化マトリックスと適合性のある溶媒に含まれている必要がある。

【実施例】

【 0 0 7 9 】

以下の実施例は、当業者に本発明の方法を作製及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示するものであり、発明者がその発明と見なす範囲を制限することを意図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力が払われているが、ある程度の実験誤差と偏差を考慮すべきである。特に明記されていない限り、部品は重量部、分子量は平均分子量、温度は摂氏温度、室温は約 25 、圧力は大気圧またはそれに近い圧である。

【 0 0 8 0 】

実施例 1：糖ペプチド及び遊離されたグリカンの RPLC - UV - MS に基づく以前の方法の比較。

図 1 は、糖ペプチド定量の現在の方法を図示する概略ワークフロー図である。治療用抗体は、変性、還元、及びアルキル化された後、トリプシンで消化された。相対的な定量は、糖ペプチドの質量ピークのピーク強度（高さ）によって行われた。遊離グリカン法は、MS シグナルではなく、遊離グリカンに結合した標識の蛍光によってグリコフォームを定量化する。図 2 は、遊離されたグリカン（蛍光試薬、Waters の RapiFluor - MS で標識）及び糖ペプチドによって定量化された各糖鎖の相対定量の比較を示す表である。方法間の定量の主な違いを 3、5、7、及び 8 行目に示す。図 3 は、糖ペプチドによるグリコフォームの定量と遊離グリカン方法との間の不一致が、糖ペプチド分析において MS による糖骨格のインソースフラグメンテーションによる可能性が高く、切断されたグリカンアーティファクト（すなわち、G0F - GlcNAc 及び G1F - GlcNAc）が増加し、主なグリカン（すなわち、G0F 及び G1F）が減少することを実証している質量スペクトルである。この結果は、ペプチドレベルでのグリカン分析には、新しくかつ改良された方法が必要であることを実証している。

【 0 0 8 1 】

実施例 2：HILIC - UV - MS を使用した糖ペプチド分析の新しい方法。

治療用抗体由来のペプチドは、日常的に実施される還元または非還元ペプチドマッピング

10

20

30

40

50

グ法のいずれかによって調製された。次に、HILIC-UV-MS分析の前に、消化物を最終80%ACN(v/v)に希釈した。

LCシステム：PDA(UV)検出器を備えたWaters ACQUITY I-Class UPLC(登録商標)System

MSシステム：Waters XEVO G2-S QToFまたはThermo Scientific Q Exactive Plus

カラム：Waters ACQUITY UPLC(登録商標)Glycan BEH Amide HILIC Column

【0082】

図5は、2つの異なる方法によってトリプシン消化物から得られたmAb1ペプチドの分離の結果を示す、mAb1ペプチドの一連のHILIC-UVクロマトグラムである。

1番の方法は、ギ酸アンモニウムを使用し、一方で2番の方法はTFAを使用する。さまざまなグリコフォームの相対レベルは、オンラインMS検出を備えたPDA検出器を使用してUVによって定量化された。図6は、図5に示したトレースの糖ペプチド部分の拡大図であり、2番の方法の分離が優れており、ピークがシャープで、S/N比が高いことを実証している。

図7は、糖ペプチド部分を拡大したmAb1糖ペプチドの一連のHILIC-TICクロマトグラムである。示されているように、2番の方法は、MSシグナルのS/N比が大きかった。

図8A及び図8Bは、mAb1糖ペプチド(M^2+ イオン)のMS1スペクトルである。グリカンのMSインソースフラグメンテーションは、UVによるグリコフォーム定量の要因ではなかった。

図9は、HILICカラムでの糖ペプチド分離と遊離グリカン分析の比較を示している一連のトレース及び表である。糖ペプチド及び遊離グリカン分析による同様のグリコフォームの定量化を、mAb1で観察した。重要なことに、2つの方法間でグリコフォームの定量に大きな違いは観察されず、HILICカラム分離がグリコペプチド分析で実行可能であることが実証されている。

さらに、総フコシル化及びガラクトシル化レベルは、2つの分析間で一貫していた。切断されたグリカンアーティファクトは、HILIC-UVによる糖ペプチドの定量に影響を与えない。これは、以前のRPLC分析で観察されたアーティファクトが、MSによって誘導されたグリカンのインソースフラグメンテーションに起因したことを示唆している。

【0083】

薄い消化物は乾燥により濃縮され得る：消化物の濃度が0.5mg/mL未満の場合、試料を、真空乾燥、及び乾燥ペプチドを、0.2%TFAを含む80:20のACN:水(v/v)に再懸濁することによって、0.5mg/mL以上まで濃縮してもよい。有機溶媒へのペプチドの溶解性を高く維持するには、低いpHが必要である。図10は、ペプチドの乾燥がペプチドの濃縮に役立ち、異なる試料量(例えば、5~20µg、左上)を使用しても一貫しているが、グリカンのUVシグナル(左下)及び相対PA%(右の表)には影響しなかったことを実証している、一連のトレース及び表である。図11は、移動相の準備を簡素化し、ピーク積分を改善するために行われた変更を示している一連のトレースである。移動相は、水/ACN中の0.1%TFAから、ペプチドマッピングに使用したのと同じ移動相緩衝液(水及びACN中のTFAは、それぞれ0.05%及び0.045%)に変化した。図12A、12B、12C、及び12Dは、移動相変化が糖ペプチド(M^2+ イオン)のMSシグナルに影響を与えなかったことを示している一連の質量スペクトルの結果である。図13は、80%ACNに希釈されたmAb1糖ペプチドの溶液安定性を実証している一連のトレースである。

【0084】

薄い消化物は乾燥により濃縮され得る：消化物の濃度が0.5mg/mL未満の場合、試料を、真空乾燥、及び乾燥ペプチドを、0.2%TFAを含む80:20のACN:水(v/v)に再懸濁することによって、0.5mg/mL以上まで濃縮してもよい。有機溶媒へのペプチドの溶解性を高く維持するには、低いpHが必要である。図10は、ペプチドの乾燥がペプチドの濃縮に役立ち、異なる試料量(例えば、5~20µg、左上)を使用しても一貫しているが、グリカンのUVシグナル(左下)及び相対PA%(右の表)には影響しなかったことを実証している、一連のトレース及び表である。図11は、移動相の準備を簡素化し、ピーク積分を改善するために行われた変更を示している一連のトレースである。移動相は、水/ACN中の0.1%TFAから、ペプチドマッピングに使用したのと同じ移動相緩衝液(水及びACN中のTFAは、それぞれ0.05%及び0.045%)に変化した。図12A、12B、12C、及び12Dは、移動相変化が糖ペプチド(M^2+ イオン)のMSシグナルに影響を与えなかったことを示している一連の質量スペクトルの結果である。図13は、80%ACNに希釈されたmAb1糖ペプチドの溶液安定性を実証している一連のトレースである。

図14は、ミス切断された糖ペプチドの同定：図14は、ミス切断された糖ペプチドを有する消化物がUVによる糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図15は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図16は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図17は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図18は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図19は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図20は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図21は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図22は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図23は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図24は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図25は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図26は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図27は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図28は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図29は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図30は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図31は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図32は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図33は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図34は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図35は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

図36は、糖ペプチドの定量を複雑にすることを実証している一連のトレースである。図37は、オンラインMSデータによれば、抽出イオンクロマトグラフィー(EIC)を使用して、各ピークのミス切断された糖ペプチドの割合(%)を見出し得ることを実証している、一連のトレース及び表である。オンラインMS検出からのEICを使用して、各共溶出ピークでのミス切断されたペプチド(複数可)と通常のトリプシン消化された糖

ペプチド（複数可）との比率を計算し、グリコフォーム定量のミス切断に起因するUVシグナルをフィルターで除去した。あるいは、その消化物をトリプシンで再消化して、ミス切断された糖ペプチドを通常のトリプシン消化された糖ペプチドに変換してもよい。

【0085】

再消化のために、以下のプロトコルを使用した：3 M トリス塩基で消化物のpHを約8.0に上げる。E：S比（w/w）が1：5のトリプシンを追加し、50℃で1時間インキュベートする。HILIC分析のために0.2% TFA（最終）を追加し、80% ACN（最終）に希釈する。図16は、トリプシンによるmAb2の再消化により、グリコフォーム定量のためのミス切断された糖ペプチドの干渉が除去されたことを実証している一連のトレース及び表である。

10

【0086】

試薬が混入した消化物は、固相抽出で精製され、乾燥によって濃縮され得る：消化物の濃度が0.5 mg/mL未満の場合、真空乾燥すること、及び乾燥ペプチドを、0.2% TFAを含む80：20のACN：水（v/v）に再懸濁することによって0.5 mg/mL以上まで濃縮してもよい。有機溶媒へのペプチドの溶解性を高く維持するには、低pHが必要である。

【0087】

消化物は、固相抽出（SPE）によって塩、試薬、または界面活性剤から浄化され、次いで真空乾燥されてもよい。

【0088】

Waters GlycoWorks HILIC μ Elution Plate（部品番号186002780）：水で洗浄し、次に80：15のACN：水（v/v）で洗浄する。ペプチド消化物（80% ACN（v/v）に希釈されている）を追加する。1：9：90のギ酸水：ACN（v/v）で2回洗浄する。200 mMのギ酸アンモニウム、5% ACNで溶出させる。溶出した糖ペプチドを真空乾燥させて、0.5 mg/mLになるように、0.2% TFAを含む80：20のACN：水（v/v）で再懸濁させる。

20

【0089】

図17は、ギ酸アンモニウムがHILIC SPEからの糖ペプチドの溶出を有意に改善することを実証している一連のトレースである。

【0090】

図18は、乾燥またはSPE精製/乾燥が、mAb1糖ペプチドの定量に影響を及ぼさないことを実証している一連のトレース及び表である。

30

【0091】

図19は、糖ペプチド及び遊離グリカン分析による同様のmAb3グリコフォーム定量化を実証している一連のトレース及び表である。

【0092】

図20A及び20Bは、糖ペプチド及び遊離グリカン分析による還元及び非還元mAb3トリプシン消化物を使用した、同様のグリコフォーム定量化を実証している一連のトレース及び表である。

【0093】

図21は、フコシル化を伴う場合と伴わない場合の、IgG1及びIgG4糖ペプチドの分離の比較を示している一連のトレースである。

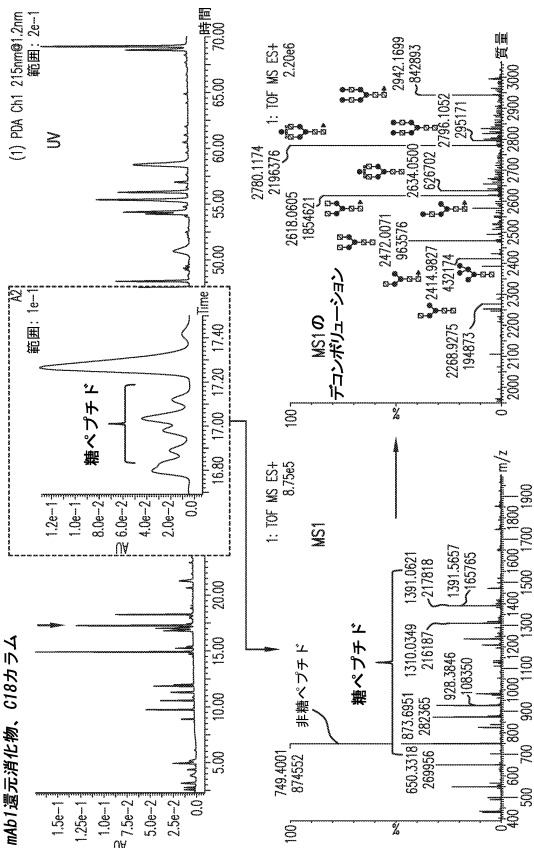
40

【0094】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて本発明の様々な改変が、前述の説明及び添付の図から当業者に明らかになるであろう。このような改変は、添付の特許請求の範囲内に含まれるものとする。

50

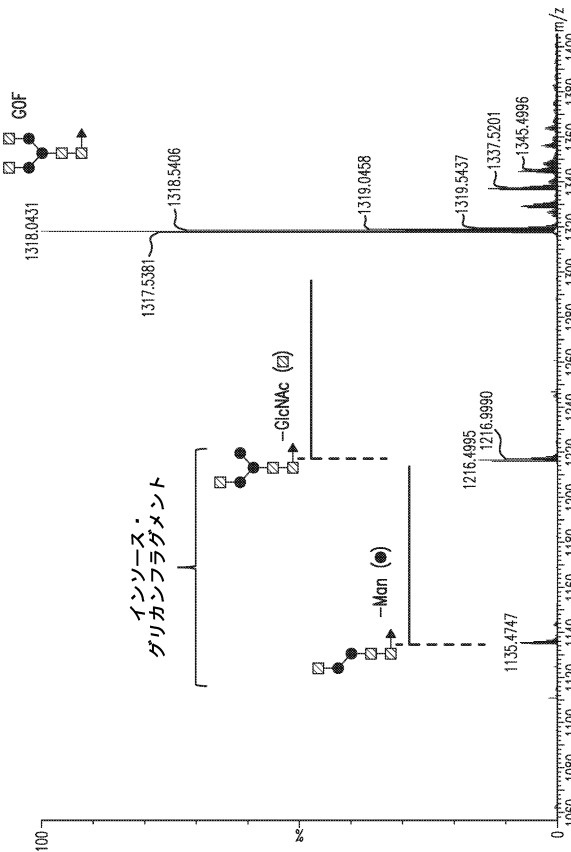
【図面】
【図 1】



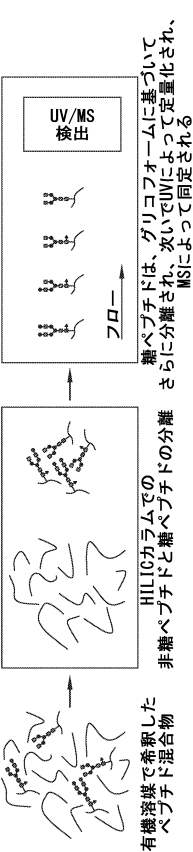
【図 2】

グリカン	全グリコフォームに対する%	
	糖ペプチド	遊離グリカン
	0.51	0.10
	0.44	ND
	2.50	0.26
	2.46	1.60
	5.43	0.30
	12.25	13.09
	3.75	ND
	23.57	34.12
	7.66	2.41 (1-6) 3.30 (1-3)
	28.12	14.01 (1-6) 16.16 (1-3)
	2.67	1.14
	10.65	11.21

【図 3】



【図 4】



10

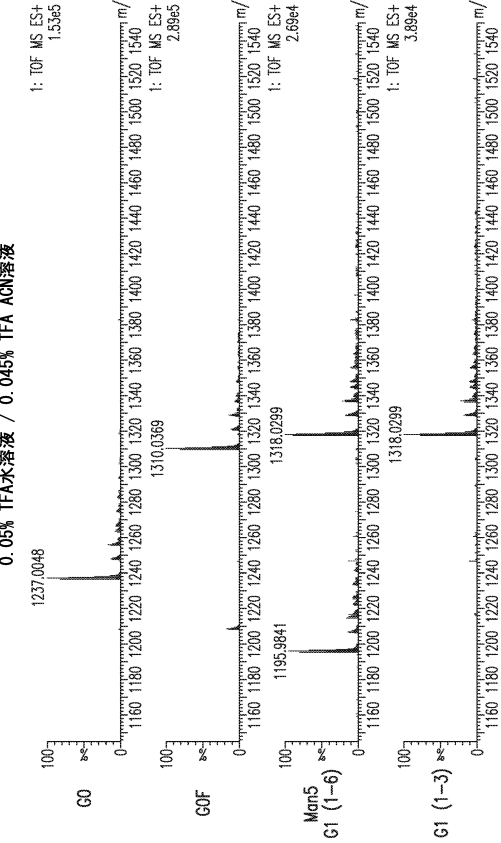
20

30

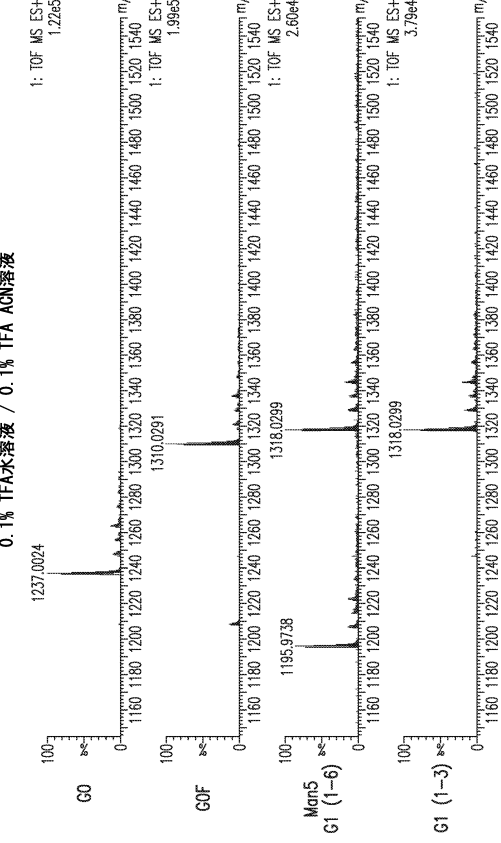
40

50

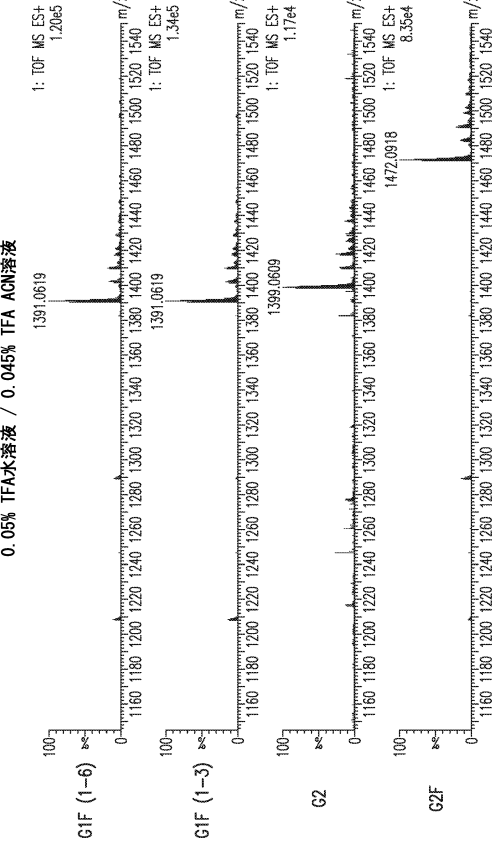
【 1 2 C 】



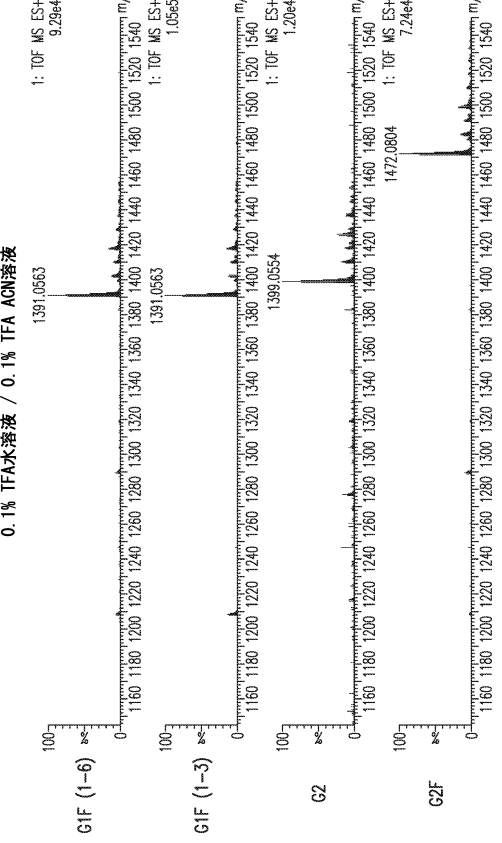
【 1 2 A 】



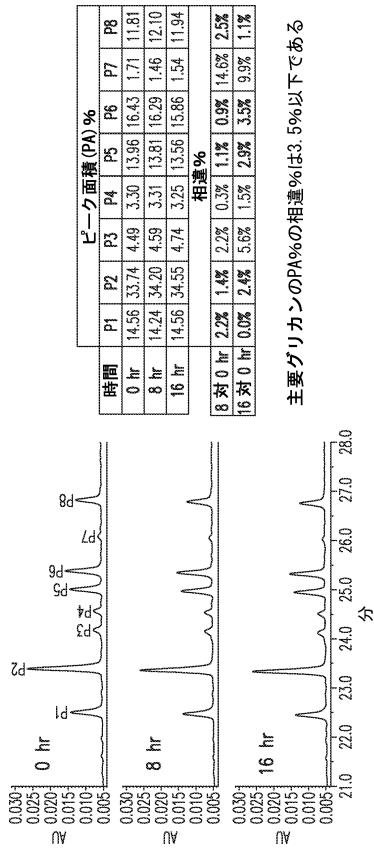
【 1 2 D 】



【 1 2 B 】

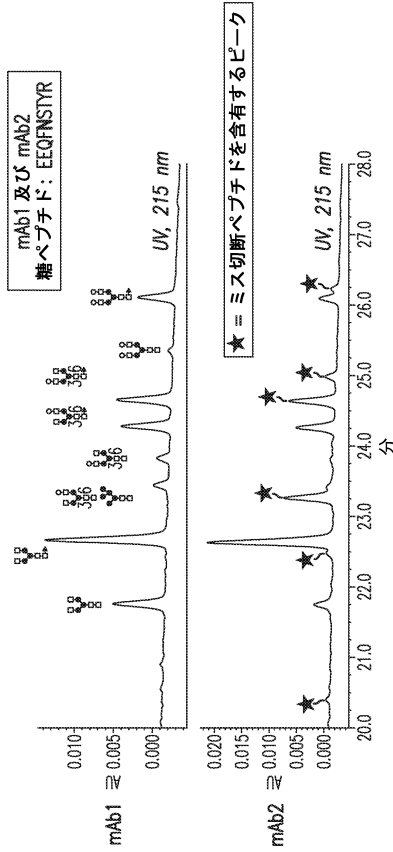


【図 1 3】

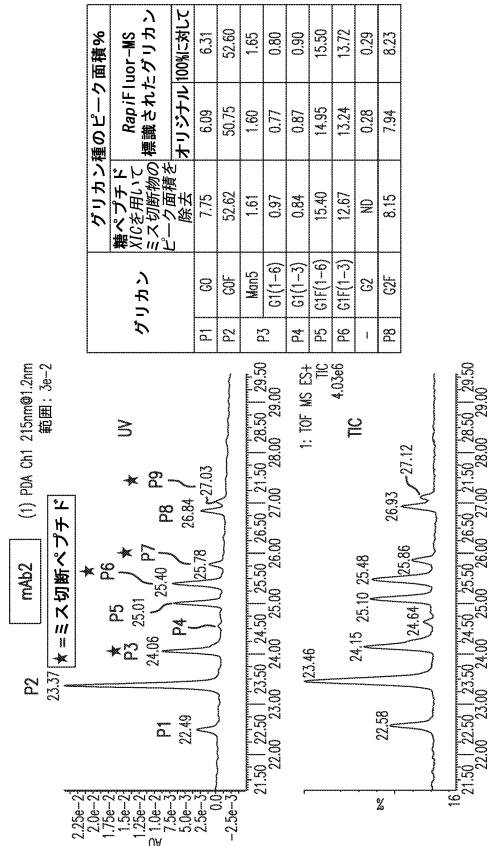


主要グリカンのPA%の相違%は3.5%以下である

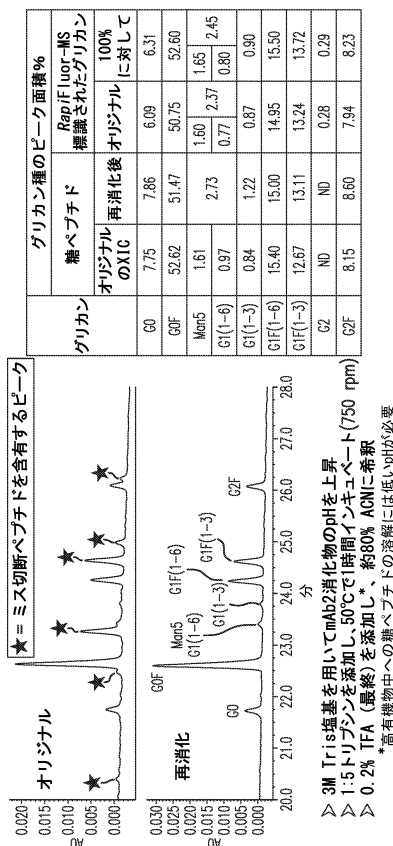
【図 1 4】



【図 1 5】



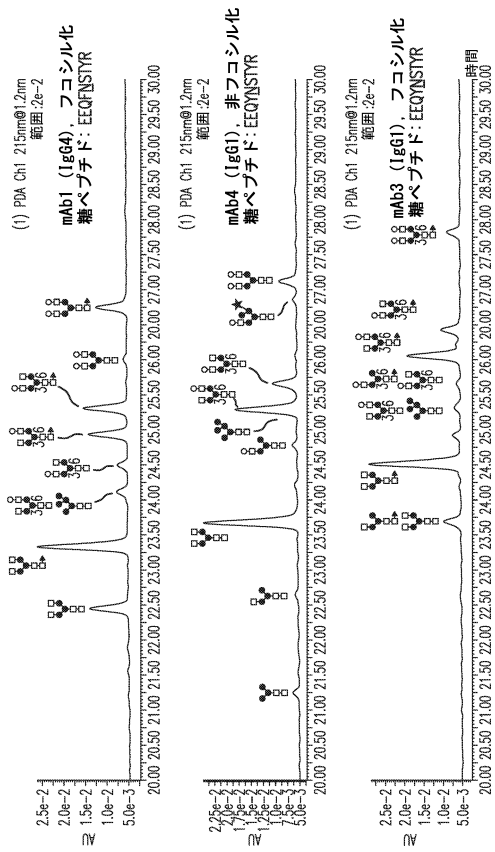
【図 1 6】



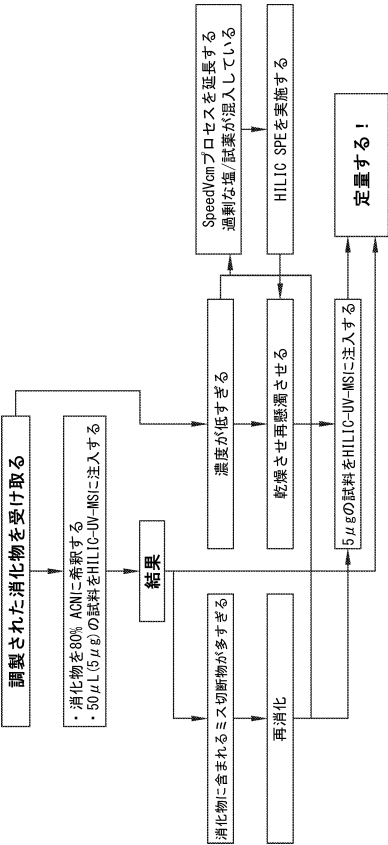
【図 2 0 B】

グリカン	グリカン種のピーク面積%			
	糖ペプチド		RapiFluor-MS 標識されたグリカン	
	還元 乾燥	非還元 再消化 SPE/乾燥	オリジナル	100%に対して
G0F-GlcNAc	1.24	0.98	1.31	1.34
G0	8.36	8.25	7.42	7.59
G0F	44.16	46.33	45.07	46.09
Man5	1.67	1.73	1.24	1.27
G1F (1-3)-GlcNAc	0.83	0.93	0.84	0.86
G1 (1-6)	1.95	2.33	1.7	1.74
G1 (1-3)	1.27	0.96	0.83	0.85
G1F (1-6)	24.92	24.96	24.25	24.80
G1F (1-3)	8.8	8.44	8.57	8.76
G2	ND	ND	0.41	0.42
G2F	6.8	5.09	6.14	6.28
フコシル化%	86.8	86.7	86.2	88.1
ガラクトシル化%	25.7	23.9	24.6	25.2

【図 2 1】



【図 2 2】



フロントページの続き

- 弁理士 刑部 俊
(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ローゼンバーグ アブラハム ゼッド .
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード 7
7 7 リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 シェン ビャオ
アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード 7
7 7 リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
審査官 福間 信子
(56)参考文献 特開 2 0 1 5 - 1 2 1 5 3 9 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 2 9 4 3 6 2 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 0 3 7 8 2 9 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 8 9 3 5 7 (W O , A 2)
KONDO A. et al. , Characterization of sialyated and fucosylated glycopeptides of beta 2-glyc
oprotein I by a combination of HILIC LC and MALDI MS/MS , J. Sep. Sci. , 2010年 , vol. 33
, pp. 891-902
(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 K
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)