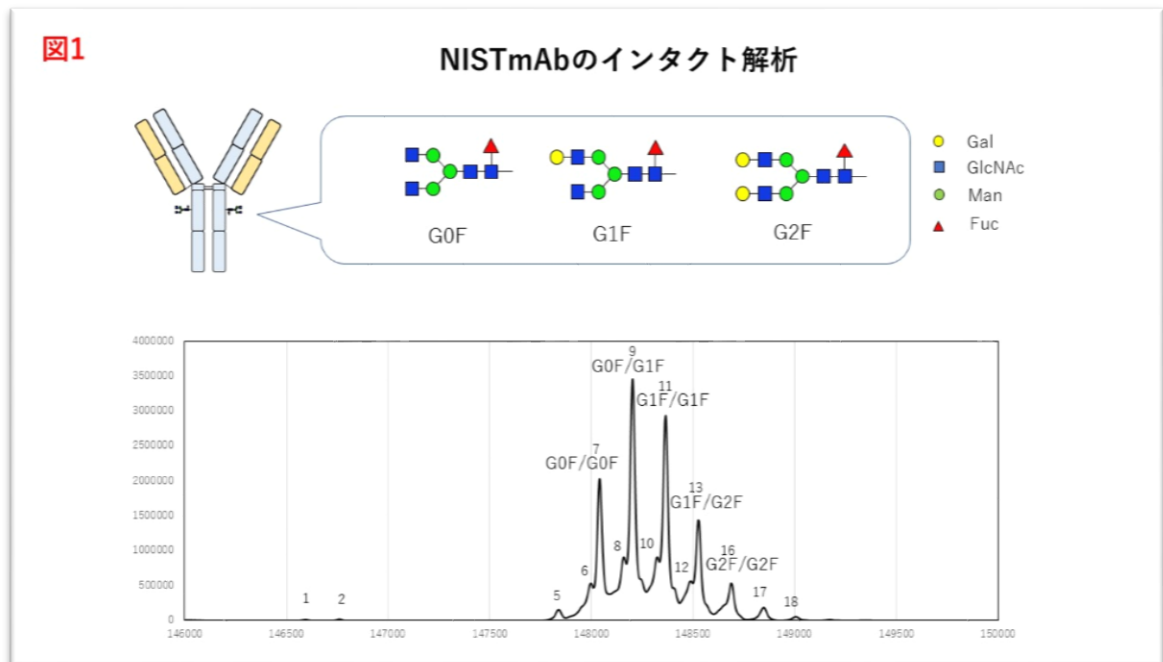


抗体のサブユニット解析編

抗体分子(IgG1)を約 150 kDa のまま測定するインタクト解析では、抗体分子に熱変性以外の処理を加えないため、測定における人為的な要因による影響をほとんど受けることなく、分子全体の質量分析が行える。これにより、糖鎖の不均一性を評価することができる(図1)。インタクト解析の方法については、カラムメーカー等が公表している手法で容易に測定可能なため、ここでのプロトコール化は省略する。分解能 70,000 の高分解能質量分析計で行うインタクト解析では、平均質量^{a)}で評価することになるのに対し、抗体分子を約 25 kDa まで限定分解して測定するサブユニット解析では、モノアイソトピック質量^{b)}での評価が可能となる。平均質量での評価の場合、最大 7 Da 程度の誤差を許容する必要があるのに対し、モノアイソトピック質量測定の精度は 0.1 Da 程度まで向上する。このことにより、ペプチドまで分解せずともサブユニットレベルにおいて、糖鎖やアミノ酸残基の不均一性評価がある程度可能となる。また、ペプチドマッピングの操作より簡便でかつ、前処理工程で生ずる人為的な Met の酸化や Asn の脱アミド化を最小限に抑えられることもメリットとなる。

我々のラボでは、Bruker 製 maXisII 質量分析計を用いて抗体の特性解析を行っているが、日常メンテナンスにおいて分解能約 60,000~70,000 を維持できている。今回我々が提示するプロトコールでは、標準抗体である NISTmAb RM8671 のサブユニット解析において、微量成分故に検出が難しい高マンノース型糖鎖やシアル酸含有糖鎖に相当する成分まで検出可能である。更に操作はシンプルであり、抗体医薬の特性解析に有益な方法である。



【材料】

分析カラム: Waters BioResolve RP mAb Polyphenyl, 450 Å, 2.7 μm, 1.0x100 mm

抗体医薬品: NISTmAb, Humanized IgG1k Monoclonal Antibody, Cat# RM8671, 10 mg/mL

ギ酸: 和光純薬 LC-MS 用, Cat# 067-04531

アセトニトリル: 関東化学 LC-MS 用

Tuning Mix (Calibrant): ESI-L Low Concentration Tuning Mix, アジレント, Cat# G1969-85000

カゼイン: 和光純薬 化学用

IdeS: FabRICATOR Enzyme (Genovis), Cat# A0-FR1-008, 8x100 U

EndoS: IgGZERO Enzyme (Genovis), Cat# A0-IZ1-010, 1000 U

8 M 塩酸 Guanidinium 溶液(8M Guanidinium HCl): 富士フイルム和光 生化学用, Cat# 071-02891

Bond-Breaker TCEP solution (0.5 M): 富士フイルム和光, Cat# 207-20151

1 M Tris-HCl (pH 8.0): NIPPON GENE, Cat# 312-90061

脱塩カラム: Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, Thermo Scientific, Cat# 89882

低吸着バイアル 0.6 mL: Maximum Recovery 0.6 mL Microtube, AXY, Cat# MCT-060-L-C

低吸着バイアル 1.5 mL: プロテオセーブ 1.5 mL マイクロチューブ, 住友ベークライト, Cat# MS-4125M

低吸着チップ 200 μL: Maximum Recovery 200 μL Tip, AXY, Cat# T-200-C-L

低吸着チップ 10 μL: Maximum Recovery 10 μL Tip, AXY, Cat# T-300-L

LC 用低吸着バイアル 0.3 mL: AMR, Cat# PSVial 100

リン酸緩衝生理食塩水(PBS): ナカライ, 細胞培養用, Cat# 14249-25

注意: 本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

0.45 μm 遠心フィルター: Ultrafree-MC-HV, Millipore, Cat# UFC30HNVB

<Tips>

カラムサイズは重要で、径 1 mm のカラムでは Fc サブユニットのテーリングが低減する。可能な限り高濃度で分析すること。

【装置】

高分解能質量分析計: Bruker maXisII

UHPLC: 島津 LC20A システム(バイオイナート仕様)

【調製液】

移動相 A 液: 0.1%ギ酸を含む超純水

移動相 B 液: 0.1%ギ酸を含むアセトニトリル

カゼイン溶液: カゼイン 4 mg/mL になるよう 0.1%ギ酸水に溶解後、遠心(14,000g, 5 min)した上清を 0.45 μm 遠心フィルターでろ過する。冷蔵保存して使用する(保存期間は未検討)。

IdeS 溶液: IdeS の粉末 100 U を 10 μL の超純水に溶解する。冷蔵で 1 カ月程度保存可。

EndoS 溶液: EndoS の粉末 1,000 U を 50 μL の超純水に溶解する。冷蔵で 1 カ月程度保存可。

<Tips>

【カラムのコンディショニング】(重要)

サブユニット Fc/2 の溶出ピークは極めてテーリングを起こしやすい。この対策として、分析カラムへの非特異的吸着を防ぐ目的で、あらかじめ分析カラムをタンパク質でブロッキングしておく必要がある。ブロッキング用タンパク質にはカゼインを用いる。ブロッキング処理しても長期間カラムを使用していると徐々にタンパク質が溶出し効果が低減してくる。このため、カラム保存後に改めて使用し始める際は、その都度ブロッキング処理をした方がベターと思われる。

• 分析前のコンディショニングランの例

カゼイン溶液 5 μL を 2 回注入 → ブランク液 5 μL を 2 回注入

(注: カゼイン溶液を注入するときは、質量分析計の汚染を防ぐため流路バルブを waste 側へ切り替え、質量分析計には導入しないこと)

【酵素処理によるサブユニットの調製】

IdeS は抗体分子をヒンジ領域で切断することにより 2 分割するプロテアーゼである。還元処理との組み合わせにより、25 kDa のサブユニットレベル(Fc/2, Fd, LC)まで分解できる。EndoS は特定の N 結合型糖鎖をトリミングできるエンドグリコシダーゼである。糖鎖の不均一性を低減することにより、微量成分を検出し易くするために併用する。

① 酵素処理(IdeS 単独の場合)

酵素処理、還元変性処理は **図 2** のフローチャートを参照。その後の脱塩処理は **図 3** のフローチャートを参照。

<Tips>

- 脱塩処理を行わないと、グアニジン付加体(+59 Da)⁹⁾が検出される。
- 脱塩操作は、できる限り 1 mg/mL に近い高い濃度で行う。0.2 mg/mL 以下の濃度では回収率が低下し希薄溶液となる。その結果、Fc/2 サブユニットのピークのテーリングが悪化する。

図 2**NISTmAb の[IdeS, Guanidine, 還元]処理のフローチャート**

NISTmAb (10 mg/mL)	2 μ L (20 μ g)
↓ PBS	4 μ L
↓ IdeS (10 units/ μ L)	2 μ L
↓ 37°C, 30 min	
↓ 8 M Guanidine HCl	14.5 μ L
↓ 0.5 M TCEP	2.5 μ L
↓ 37°C, 30 min	
↓ 100% ギ酸	1 μ L
↓ MilliQ water	4 μ L
液量 30 μ L (タンパク質濃度 0.67 μ g/ μ L)	

図3

NISTmAb の[IdeS, Guanidine, 還元]処理後の脱塩のフローチャート

Zeba Spin Desalting Column, 7K MWCO

(ブレンダーでよく攪拌後、先端を折り、蓋を緩めて廃液用PPチューブにセットする)

(蓋は以降の操作においても緩めた状態とする)

↓ 1500g, 1min

(遠心の方向を毎回同じにするため、ペンでしるしをつけておく)

↓ ろ液を捨てる

↓ 100 mM Tris(pH8) 300 μ L (Trisの代わりに100 mM 重炭酸アンモニウムでも可、以降同じ)

↓ 1500g, 1min

↓ ろ液を捨てる

↓ 100 mM Tris(pH8) 300 μ L

↓ 1500g, 1min

↓ ろ液を捨てる

↓ 新しい1.5 mlチューブにセットする

↓ 抗体溶液 30 μ L (IdeS, Guanidine, TCEP処理したもの) を注意深くのせる

(カラムベッドの中央に液滴を垂らす)

↓ 100 mM Tris(pH8) 15 μ L を注意深くのせる

↓ 1500g, 2min

ろ液約50 μ L

② 酵素処理(IdeS+EndoS の場合)

IdeS 単独処理①と同じ処理を行うが、酵素反応液には次の通り EndoS を追加し、それ以外は図 2 のフローチャートに従う。

酵素反応液:

NIST mAb (10 mg/mL)	2 μ L (20 μ g)
IdeS (10 units/ μ L)	2 μ L (final 1 unit / 1 μ g of IgG)
EndoS (20 units/ μ L)	1 μ L (final 1 unit / 1 μ g of IgG)
PBS	3 μ L

Total	8 μ L
-------	-----------

【LC-MS 条件】

流速:	0.1 mL/min
カラム温度:	80°C
分析時間:	20 min
NISTmAb 終濃度:	0.4 μ g/ μ L (回収率 100%の場合)
注入量:	4~20 μ L (回収率 100%の場合 1.6~8 μ g)

注意: 本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

<Tips>

タンパク注入量が少ない、またはタンパク濃度が低いと $F_c/2$ のテーリングが顕著になる。注入量が多過ぎるとメジャー成分の影響が大きくなり、微量成分の解析が妨害される場合もあるので、注入量が多ければ良いというものでもなさそうだ。

グラジエント

min	B%
0	22
14	45
14.3	80
15.3	80
15.6	22
20	22

➤0.1~0.3 min のタイミングでキャリブレーション液に切り替える。

Bruker TOF/MS (maXisII)の主要パラメータは次の通り(サブユニット抗体測定用)。

Polarity: positive

Mode: MS

Capillary: 4500 V

Nebrizer: 1.2

Dry Gas: 5.0

Dry temp: 180

Mass Range: 300 to 3,000 m/z

Spectra Rate: 1 Hz

【データ解析】

データ解析方法は、ソフトウェアによって異なるため詳述しない。現在、我々が使用しているマニュアル用解析ソフト(Bruker 製 DataAnalysis®)による解析処理の流れは次の通り。

1. 測定ごとのキャリブレーションデータを使って、測定データごとに再キャリブレーション。
2. トータルイオンクロマトで溶出ピークを確認。
3. 範囲を指定して Spectral deconvolution。
4. 検出された成分のモノアイソトピック質量の計算。
5. モノアイソトピック質量の値から成分を同定。

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

マニュアル解析用ソフトに加えて、自動解析ソフト(Bruker 製 BiopharmaCompass®)を使うことにより、ルーチンな解析が容易になる。この場合、あらかじめ登録しておいた Protein Reference List に対して検索を行うため、含有する可能性のある成分情報を集めて Protein Reference List を充実させることが必要である。我々は NISTmAb のサブユニット解析のために約 130 成分の Protein Reference List を作成した。IdeS 処理のみの全サブユニットにおける成分リストを表 1 に、IdeS と EndoS とを組み合わせたとき、トリミングされた糖鎖まで含めた Fc サブユニットの成分リストを表 2 に示した。

表1A

IdeS還元処理したNISTmAbのProtein Reference List

GROUP_ID	GROUP_PART	ANNOTATION	SUM_FORMULA	MASS
Fc/2	Hex(7)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man7	C1124H1744N2840367S7	25316.458
Fc/2	Hex(6)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man6	C1118H1734N2840362S7	25154.4052
Fc/2	Hex(5)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man5	C1112H1724N2840357S7	24992.3524
Fc/2	Hex(3)HexNAc(4)	Fc/2 G0	C1122H1742N2880358S7	25202.5005
Fc/2	Hex(3)HexNAc(3)	Fc/2 G0 -GlcNAc	C1114H1729N2870353S7	24999.4211
Fc/2	Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G0F	C1128H1752N2880362S7	25348.5584
Fc/2	Hex(4)HexNAc(4)	Fc/2 G1	C1128H1752N2880363S7	25364.5533
Fc/2	Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G1F	C1134H1762N2880367S7	25510.6112
Fc/2	Hex(5)HexNAc(4)	Fc/2 G2	C1134H1762N2880368S7	25526.6061
Fc/2	Hex(5)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G2F	C1140H1772N2880372S7	25672.664
Fc/2	Lys-loss	Fc/2 -Lys	C1066H1648N2820322S7	23775.9295
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F-GlcNAc	C1114H1727N2850356S7	25017.384
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)	Fc/2 -Lys G0	C1116H1730N2860357S7	25074.4055
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F	C1122H1740N2860361S7	25220.4634
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F GlcNAc	C1130H1753N2870366S7	25423.5428
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Gua	Fc/2 -Lys G0F Gua	C1123H1745N2890361S7	25279.51
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) TFA	Fc/2 -Lys G0F TFA	C1124H1741N2860363S7F3	25334.46
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G0F NANA	C1133H1757N2870369S7	25511.56
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G0F 2NANA	C1144H1774N2880377S7	25802.65
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation	Fc/2 -Lys G0F Ox	C1122H1740N2860362S7	25236.46
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Dea	C1122H1739N2850362S7	25221.45
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox	C1122H1740N2860363S7	25252.4532
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Dea	C1122H1738N2840363S7	25222.4314
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Ox Dea	C1122H1739N2850363S7	25237.4423
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Ox 2Dea	C1122H1738N2840364S7	25238.4263
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox Dea	C1122H1739N2850364S7	25253.4372
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox 2Dea	C1122H1738N2840365S7	25254.4213
Fc/2	Gly/Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys G0F	C1120H1737N2850360S7	25163.44
Fc/2	Gly/Lys-loss Amidation Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys Amid G0F	C1120H1738N2860359S7	25162.46
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F-GlcNAc	C1120H1737N2850361S7	25179.4369

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

表1B

Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)	Fc/2 -Lys G1	C1122H1740N2860362S7	25236.4583
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(5)	Fc/2 -Lys G1 +GlcNac	C1130H1753N2870367S7	25439.5377
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4) NANA	Fc/2 -Lys G1 NANA	C1133H1757N2870370S7	25527.5537
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F	C1128H1750N2860366S7	25382.5162
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) Gua	Fc/2 -Lys G1F Gua	C1129H1755N2890366S7	25441.56
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) TFA	Fc/2 -Lys G1F TFA	C1130H1751N2860368S7F3	25496.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G1F NANA	C1139H1767N2870374S7	25673.61
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G1F 2NANA	C1150H1784N2880382S7	25964.71
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) Oxidation	Fc/2 -Lys G1F Ox	C1128H1750N2860367S7	25398.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Dea	C1128H1749N2850367S7	25383.5
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) 2Oxidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox	C1128H1750N2860368S7	25414.5061
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Dea	C1128H1748N2840368S7	25384.4843
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Ox Dea	C1128H1749N2850368S7	25399.4952
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Ox 2Dea	C1128H1748N2840369S7	25400.4792
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) 2Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox Dea	C1128H1749N2850369S7	25415.4901
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1) 2Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox 2Dea	C1128H1748N2840370S7	25416.4741
Fc/2	Gly/Lys-loss Hex(4)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys G1F	C1126H1747N2850365S7	25325.49
Fc/2	Gly/Lys-loss Amidation Hex(4)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys Amid G1F	C1126H1748N2860364S7	25324.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNac(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F +GlcNac	C1136H1763N2870371S7	25585.5956
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(4)	Fc/2 -Lys G2	C1128H1750N2860367S7	25398.5111
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(5)	Fc/2 -Lys G2 +GlcNac	C1136H1763N2870372S7	25601.5905
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(4) NANA	Fc/2 -Lys G2 NANA	C1139H1767N2870375S7	25689.6066
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F	C1134H1760N2860371S7	25544.569
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F +GlcNac	C1142H1773N2870376S7	25747.6484
Fc/2	Lys-loss Hex(6)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F Hex	C1140H1770N2860376S7	25706.6219
Fc/2	Lys-loss Hex(7)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F 2Hex	C1146H1780N2860381S7	25868.6747
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G2F NANA	C1145H1777N2870379S7	25835.6645
Fc/2	Lys-loss Hex(7)HexNac(4)dHex(1) NGNA	Fc/2 -Lys G2F NGNA	C1145H1777N2870380S7	25851.6594
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G2F 2NANA	C1156H1794N2880387S7	26126.7599
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(5)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G2F +GlcNac NANA	C1153H1790N2880384S7	26038.7438
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNac(5)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G2F +GlcNac 2NANA	C1164H1807N2890392S7	26329.8393

表1C

Fc/2	native	Fc/2	C1072H1660N2840323S7	23904.0245
Fc/2 [274-449]	native	Fc/2 P[274-449]G	C898H1383N2410272S5	20055.04
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(3)HexNac(3)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G0F-GlcNac	C946H1462N2440306S5	21296.4945
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(3)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G0F	C954H1475N2450311S5	21499.5739
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(4)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G1F	C960H1485N2450316S5	21661.6267
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(5)HexNac(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G2F	C966H1495N2450321S5	21823.6795
Fd	Gln->pyro-Glu	Fd pyro-Glu	C1146H1784N2980352S10	25672.8066
Fd	Gln->pyro-Glu Gua	Fd pyro-Glu Gua	C1147H1789N3010352S10	25731.85
Fd	Gln->pyro-Glu TFA	Fd pyro-Glu TFA	C1148H1785N2980354S10F3	25786.8
Fd	Gln->pyro-Glu Deamidation	Fd pyro-Glu Dea	C1146H1783N2970353S10	25673.79
Fd	Gln->pyro-Glu Hex	Fd pyro-Glu Hex	C1152H1794N2980357S10	25834.8594
Fd	Gln->pyro-Glu Hex Dea	Fd pyro-Glu Hex Dea	C1152H1793N2970358S10	25835.8434
Fd	Gln->pyro-Glu 2Hex	Fd pyro-Glu 2Hex	C1158H1804N2980362S10	25996.9122
Fd	Gln->pyro-Glu 2Hex Dea	Fd pyro-Glu 2Hex Dea	C1158H1803N2970363S10	25997.8962
Fd	Gln->pyro-Glu 3Hex	Fd pyro-Glu 3Hex	C1164H1814N2980367S10	26158.965
Fd	Gln->pyro-Glu 3Hex Dea	Fd pyro-Glu 3Hex Dea	C1164H1813N2970368S10	26159.9491
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation	Fd pyro-Glu Ox	C1146H1784N2980353S10	25688.8015
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation Dea	Fd pyro-Glu Ox Dea	C1146H1783N2970354S10	25689.7855
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation 2Hex	Fd pyro-Glu Ox 2Hex	C1158H1804N2980363S10	26012.9071
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation 2Hex Dea	Fd pyro-Glu Ox 2Hex Dea	C1158H1803N2970364S10	26013.8911
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation 3Hex	Fd pyro-Glu Ox 3Hex	C1164H1814N2980368S10	26174.96
Fd	Gln->pyro-Glu Oxidation 3Hex Dea	Fd pyro-Glu Ox 3Hex Dea	C1164H1813N2970369S10	26175.944
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation	Fd pyro-Glu 2Ox	C1146H1784N2980354S10	25704.7964
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation Dea	Fd pyro-Glu 2Ox Dea	C1146H1783N2970355S10	25705.7804
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation Hex	Fd pyro-Glu 2Ox Hex	C1152H1793N2970360S10	25867.8332
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation Hex Dea	Fd pyro-Glu 2Ox Hex Dea	C1152H1792N2960361S10	25868.8173
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation 2Hex	Fd pyro-Glu 2Ox 2Hex	C1158H1804N2980364S10	26028.902
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation 2Hex Dea	Fd pyro-Glu 2Ox 2Hex Dea	C1158H1803N2970365S10	26029.8861
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation 3Hex	Fd pyro-Glu 2Ox 3Hex	C1164H1814N2980369S10	26190.9549
Fd	Gln->pyro-Glu 2Oxidation 3Hex Dea	Fd pyro-Glu 2Ox 3Hex Dea	C1164H1813N2970370S10	26191.9389

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

表1D

Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation	Fd pyro-Glu 3Ox	C1146H1784N298O355S10	25720.7913
Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation Deamidation	Fd pyro-Glu 3Ox Dea	C1146H1783N297O356S10	25721.7753
Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation 2Hex	Fd pyro-Glu 3Ox 2Hex	C1158H1804N298O365S10	26044.897
Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation 2Hex Dea	Fd pyro-Glu 3Ox 2Hex Dea	C1158H1803N297O366S10	26045.881
Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation 3Hex	Fd pyro-Glu 3Ox 3Hex	C1164H1814N298O370S10	26206.9498
Fd	Gln->pyro-Glu 3Oxidation 3Hex Dea	Fd pyro-Glu 3Ox 3Hex Dea	C1164H1813N297O371S10	26207.9338
Fd	Hex Hex	Fd 2Hex	C1158H1807N299O362S10	26013.9388
Fd	Hex	Fd Hex	C1152H1797N299O357S10	25851.8859
Fd	native	Fd	C1146H1787N299O352S10	25689.8331
Fd	Oxidation	Fd Ox	C1146H1787N299O353S10	25705.828
Fd	Oxidation Hex	Fd Ox Hex	C1152H1797N299O358S10	25867.8809
Fd	Oxidation Hex Hex	Fd Ox 2Hex	C1158H1807N299O363S10	26029.9337
Fd [1-88]	Gln->pyro-Glu	Fd [1-88] pyro-Glu	C441H699N117O131S3	9826.07938
Fd [1-88]	Gln->epyro-Glu Hex	Fd [1-88] pyro-Glu Hex	C447H709N117O136S3	9988.13221
Fd [1-88]	Hex	Fd [1-88] Hex	C447H712N118O136S3	10005.1588
Fd [1-88]	native	Fd [1-88]	C441H702N118O131S3	9843.10593
Fd [89-239]	Hex	Fd [89-239] Hex	C711H1097N181O227S7	16026.7906
Fd [89-239]	Hex Oxidation	Fd [89-239] Hex Ox	C711H1097N181O228S7	16042.7855
Fd [89-239]	native	Fd [89-239]	C705H1087N181O222S7	15864.7377
Fd [89-239]	Oxidation	Fd [89-239] Ox	C705H1087N181O223S7	15880.7327
LC	Hex	LC Hex	C1026H1588N270O335S7	23275.357
LC	native	LC	C1020H1578N270O330S7	23113.3042
LC	Gua	LC Gua	C1021H1583N273O330S7	23172.35
LC	TFA	LC TFA	C1022H1579N270O332S7F3	23227.3
LC	Hex Hex	LC Hex Hex	C1032H1598N270O340S7	23437.4099
LC	Oxidation	LC Ox	C1020H1578N270O331S7	23129.3
LC	2Oxidation	LC 2Ox	C1020H1578N270O332S7	23145.29
LC	Deamidation	LC Dea	C1020H1577N269O331S7	23114.29
LC	Oxidation Deamidation	LC Ox Dea	C1020H1577N269O332S7	23190.28
LC	2Oxidation Deamidation	LC 2Ox Dea	C1020H1577N269O333S7	23146.2781

表1E

LC	Hex Oxidation	LC Hex Ox	C1026H1588N270O336S7	23291.3519
LC	Hex 2Oxidation	LC Hex 2Ox	C1026H1588N270O337S7	23307.3469
LC	Hex Deamidation	LC Hex Dea	C1026H1587N269O336S7	23276.341
LC	Hex Oxidation Deamidation	LC Hex Ox Dea	C1026H1587N269O337S7	23292.336
LC	Hex 2Oxidation Deamidation	LC Hex 2Ox Dea	C1026H1587N269O338S7	23308.3309
LC	2Hex Oxidation	LC 2Hex Ox	C1032H1598N270O341S7	23453.4048
LC	2Hex 2Oxidation	LC 2Hex 2Ox	C1032H1598N270O342S7	23469.3997
LC	2Hex Deamidation	LC 2Hex Dea	C1032H1597N269O341S7	23438.3939
LC	2Hex Oxidation Deamidation	LC 2Hex Ox Dea	C1032H1597N269O342S7	23454.3888
LC	2Hex 2Oxidation Deamidation	LC 2Hex 2Ox Dea	C1032H1597N269O343S7	23470.3837
LC	3Hex	LC 3Hex	C1038H1608N270O345S7	23599.4627
LC	3Hex Oxidation	LC 3Hex Ox	C1038H1608N270O346S7	23615.4576
LC	3Hex 2Oxidation	LC 3Hex 2Ox	C1038H1608N270O347S7	23631.4525
LC	3Hex Deamidation	LC 3Hex Dea	C1038H1607N269O346S7	23600.4467
LC	3Hex Oxidation Deamidation	LC 3Hex Ox Dea	C1038H1607N269O347S7	23616.4416
LC	3Hex 2Oxidation Deamidation	LC 3Hex 2Ox Dea	C1038H1607N269O348S7	23632.4365

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

表2A

EndoS + IdeS還元処理したNISTmAb Fc/2サブユニットのProtein Reference List

GROUP_ID	GROUP_PART	ANNOTATION	SUM_FORMULA	MASS
Fc/2	Hex(7)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man7	C1124H1744N284O367S7	25316.46
Fc/2	Hex(6)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man6	C1118H1734N284O362S7	25154.41
Fc/2	Hex(5)HexNAc(2)	Fc/2-Lys Man5	C1112H1724N284O357S7	24992.35
Fc/2	Hex(3)HexNAc(4)	Fc/2 G0	C1122H1742N288O358S7	25202.5
Fc/2	Hex(3)HexNAc(3)	Fc/2 G0 -GlcNAc	C1114H1729N287O353S7	24999.42
Fc/2	Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G0F	C1128H1752N288O362S7	25348.56
Fc/2	Hex(4)HexNAc(4)	Fc/2 G1	C1128H1752N288O363S7	25364.55
Fc/2	Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G1F	C1134H1762N288O367S7	25510.61
Fc/2	Hex(5)HexNAc(4)	Fc/2 G2	C1134H1762N288O368S7	25526.61
Fc/2	Hex(5)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 G2F	C1140H1772N288O372S7	25672.66
Fc/2	Lys-loss	Fc/2 -Lys	C1066H1648N282O322S7	23775.93
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F-GlcNAc	C1114H1727N285O356S7	25017.38
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)	Fc/2 -Lys G0	C1116H1730N286O357S7	25074.41
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F	C1122H1740N286O361S7	25220.46
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G0F GlcNAc	C1130H1753N287O366S7	25423.54
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Gua	Fc/2 -Lys G0F Gua	C1123H1745N289O361S7	25279.51
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) TFA	Fc/2 -Lys G0F TFA	C1124H1741N286O363S7F3	25334.46
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G0F NANA	C1133H1757N287O369S7	25511.56
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G0F 2NANA	C1144H1774N288O377S7	25802.65
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation	Fc/2 -Lys G0F Ox	C1122H1740N286O362S7	25236.46
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Dea	C1122H1739N285O362S7	25221.45
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox	C1122H1740N286O363S7	25252.45
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Dea	C1122H1738N284O363S7	25222.43
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Ox Dea	C1122H1739N285O363S7	25237.44
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F Ox 2Dea	C1122H1738N284O364S7	25238.43
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox Dea	C1122H1739N285O364S7	25253.44
Fc/2	Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G0F 2Ox 2Dea	C1122H1738N284O365S7	25254.42
Fc/2	Gly/Lys-loss Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys G0F	C1120H1737N285O360S7	25163.44
Fc/2	Gly/Lys-loss Amidation Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys Amid G0F	C1120H1738N286O359S7	25162.46

表2B

Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F-GlcNAc	C1120H1737N285O361S7	25179.44
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)	Fc/2 -Lys G1	C1122H1740N286O362S7	25236.46
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(5)	Fc/2 -Lys G1 +GlcNAc	C1130H1753N287O367S7	25439.54
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4) NANA	Fc/2 -Lys G1 NANA	C1133H1757N287O370S7	25527.55
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F	C1128H1750N286O366S7	25382.52
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) Gua	Fc/2 -Lys G1F Gua	C1129H1755N289O366S7	25441.56
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) TFA	Fc/2 -Lys G1F TFA	C1130H1751N286O368S7F3	25496.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G1F NANA	C1139H1767N287O374S7	25673.61
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G1F 2NANA	C1150H1784N288O382S7	25964.71
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation	Fc/2 -Lys G1F Ox	C1128H1750N286O367S7	25398.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Dea	C1128H1749N285O367S7	25383.5
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox	C1128H1750N286O368S7	25414.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Dea	C1128H1748N284O368S7	25384.48
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Ox Dea	C1128H1749N285O368S7	25399.5
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F Ox 2Dea	C1128H1748N284O369S7	25400.48
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox Dea	C1128H1749N285O369S7	25415.49
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) 2Oxidation 2Deamidation	Fc/2 -Lys G1F 2Ox 2Dea	C1128H1748N284O370S7	25416.47
Fc/2	Gly/Lys-loss Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys G1F	C1126H1747N285O365S7	25325.49
Fc/2	Gly/Lys-loss Amidation Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Gly/Lys Amid G1F	C1126H1748N286O364S7	25324.51
Fc/2	Lys-loss Hex(4)HexNAc(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G1F+GlcNAc	C1136H1763N287O371S7	25585.6
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(4)	Fc/2 -Lys G2	C1128H1750N286O367S7	25398.51
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(5)	Fc/2 -Lys G2 +GlcNAc	C1136H1763N287O372S7	25601.59
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(4) NANA	Fc/2 -Lys G2 NANA	C1139H1767N287O375S7	25689.61
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F	C1134H1760N286O371S7	25544.57
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F -GlcNAc	C1126H1747N285O366S7	25341.49
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(5)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F+GlcNAc	C1142H1773N287O376S7	25747.65
Fc/2	Lys-loss Hex(6)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F Hex	C1140H1770N286O376S7	25706.62
Fc/2	Lys-loss Hex(7)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 -Lys G2F 2Hex	C1146H1780N286O381S7	25868.67
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(4)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G2F NANA	C1145H1777N287O379S7	25835.66
Fc/2	Lys-loss Hex(7)HexNAc(4)dHex(1) NGNA	Fc/2 -Lys G2F NGNA	C1145H1777N287O380S7	25851.66
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(4)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G2F 2NANA	C1156H1794N288O387S7	26126.76

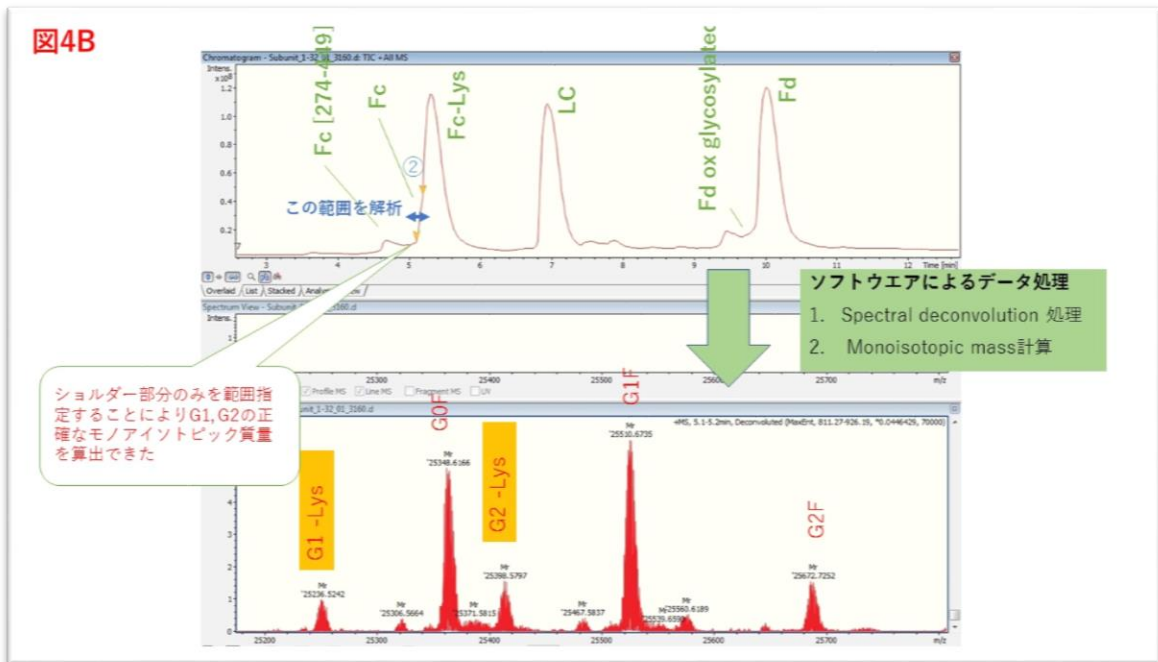
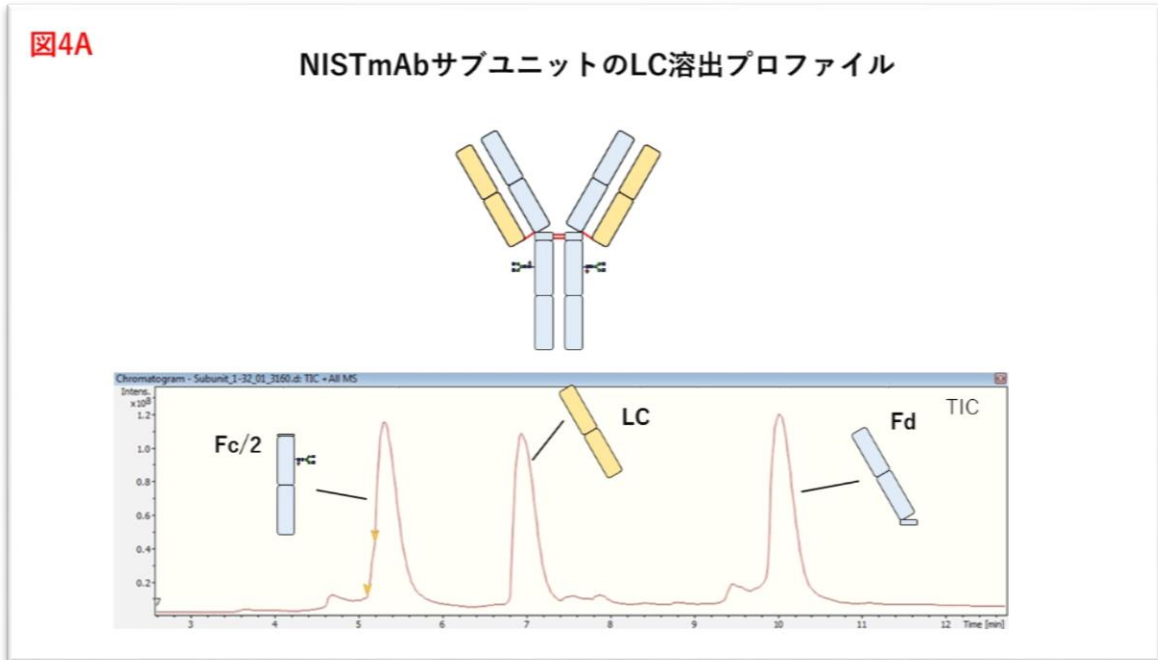
注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

表2C

Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(5)dHex(1) NANA	Fc/2 -Lys G2F +GlcNAc NANA	C1153H1790N2880384S7	26038.74
Fc/2	Lys-loss Hex(5)HexNAc(5)dHex(1) 2NANA	Fc/2 -Lys G2F +GlcNAc 2NANA	C1164H1807N2890392S7	26329.84
Fc/2	native	Fc/2	C1072H1660N2840323S7	23904.02
Fc/2 [274-449]	native	Fc/2 P[274-449]G	C898H1383N2410272S5	20055.04
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(3)HexNAc(3)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G0F-GlcNAc	C946H1462N2440306S5	21296.49
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G0F	C954H1475N2450311S5	21499.57
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G1F	C960H1485N2450316S5	21661.63
Fc/2 [274-449]	P[274-449]G Hex(5)HexNAc(4)dHex(1)	Fc/2 P[274-449]G G2F	C966H1495N2450321S5	21823.68

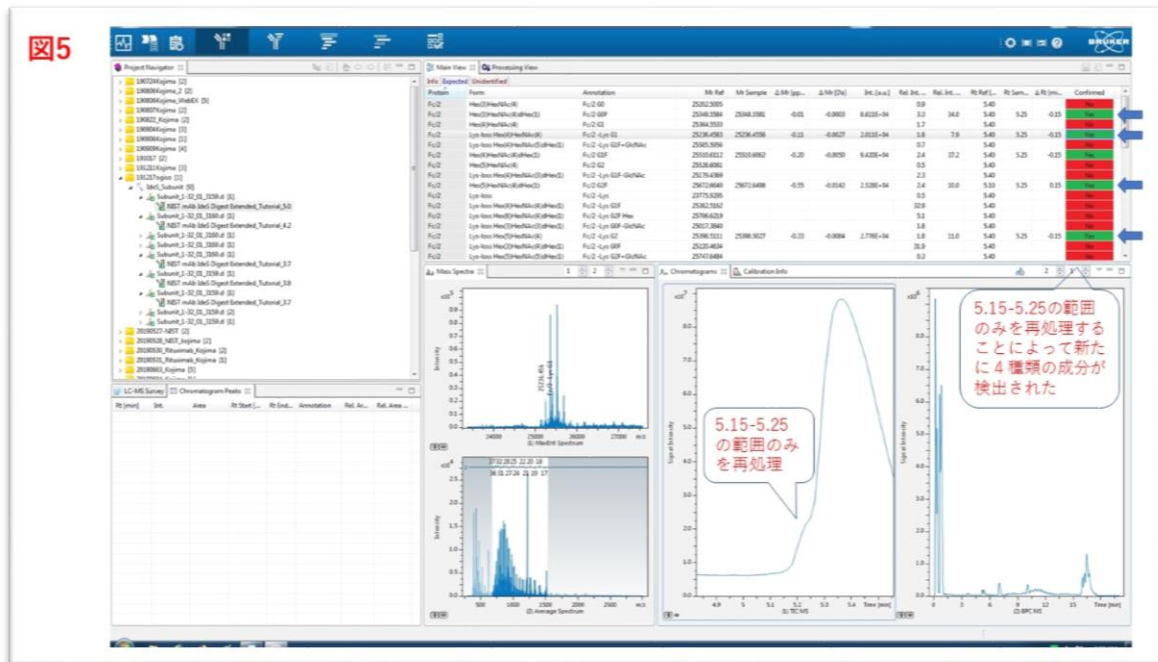
【結果】

マニュアル解析ソフト DataAnalysis[®]での解析結果の一例を図4に示した。データ解析は溶出ピークごとに分けて処理する。Protein Reference List に対して検索することにより、溶出順に Fc/2、LC、Fd の各サブユニットについて主要成分を検出することができた。一方、各ピークのテーリング部分や微小ピークを解析することにより微量成分を同定することができた。例えば、溶出時間 5.1 min~5.3 min のショルダーピークについては、微量成分である G1 糖鎖付加 Fc サブユニット(Lys 脱離体)、G2 糖鎖付加 Fc サブユニット(Lys 脱離体)を 0.1 Da 以下の誤差で検出することができた。



自動解析ソフト BiophramaCompass®での解析結果の一例を図5に示した。同様に5.15 min~5.25 minのショルダーピークのみをデータ処理することにより、G1やG2糖鎖が付加した微量成分の検出が可能であった。

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません



本プロトコルによるサブユニット解析で検出された糖鎖のバリエーション、アミノ酸残基のバリエーションを図6にまとめた。IdeS 処理のみの試料からは、シアル酸含有糖鎖に相当する微量成分が検出されており、他方で、IdeS と EndoS を組み合わせることにより、それまで検出できなかった高マンノース型の糖鎖修飾に相当する成分も検出可能であった。

図6A サブユニット解析で検出された修飾糖のバリエーション

サブユニット	簡易表記	生物製剤	Oxford表記	構成糖	IdeS	IdeS+EndoS
Fc/2	Man5	Man5	M5	Hex(5)HexNAc(2)		
Fc/2	G0	G0	A2	Hex(3)HexNAc(4)		
Fc/2	G0F	G0F	FA2	Hex(3)HexNAc(4)dHex(1)		
Fc/2	G1	G1	A2G1	Hex(4)HexNAc(4)		
Fc/2	G1F	G1F	FA2G1	Hex(4)HexNAc(4)dHex(1)		
Fc/2	G2	G2	A2G2	Hex(5)HexNAc(4)		
Fc/2	G2F	G2F	FA2G2	Hex(5)HexNAc(4)dHex(1)		
Fc/2	G0F -GlcNAc	G0F -GlcNAc	FA1	Hex(3)HexNAc(3)dHex(1)		
Fc/2	G0F +GlcNAc	G0FB	FA2B	Hex(3)HexNAc(5)dHex(1)		
Fc/2	G1 +GlcNAc	G1B	A2BG1	Hex(4)HexNAc(5)		
Fc/2	G1 NANA	G1S1	A2G1S1	Hex(4)HexNAc(4) NANA		
Fc/2	G1F NANA	G1FS1	FA2G1S1	Hex(4)HexNAc(4)dHex(1) NANA		
Fc/2	G1F -GlcNAc	G1F -GlcNAc	FA1G1	Hex(4)HexNAc(3)dHex(1)		
Fc/2	G1F+GlcNAc	G1FB	FA2BG1	Hex(4)HexNAc(5)dHex(1)		
Fc/2	G2 +GlcNAc	G2B	A2BG2	Hex(5)HexNAc(5)		
Fc/2	G2 NANA	G2S1	A2G2S1	Hex(5)HexNAc(4) NANA		
Fc/2	G2F -GlcNAc	G2F -GlcNAc	FA1G2	Hex(5)HexNAc(3)dHex(1)		
Fc/2	G2F+GlcNAc	G2FB	FA2BG2	Hex(5)HexNAc(5)dHex(1)		
Fc/2	G2F Hex			Hex(6)HexNAc(4)dHex(1)		
Fc/2	G2F 2Hex			Hex(7)HexNAc(4)dHex(1)		
Fc/2	G2F NGNA		FA2G2Sg1	Hex(7)HexNAc(4)dHex(1) NGNA		
Fd	Hex			Hex		
Fd	2Hex			2Hex		
Fd	3Hex			3Hex		
LC	Hex			Hex		
LC	2Hex			2Hex		
LC	3Hex			3Hex		

自動解析で検出された構造

注意：本実験マニュアルは研究用であり、公的な試験方法を示すものではありません

図6B

サブユニット解析で検出されたアミノ酸修飾のバリエーション

サブユニット	アミノ酸変化	簡易表記	IdeS	IdeS+EndoS
Fc/2	Lys-loss	-K		
Fc/2	Oxidation	Ox		
Fc/2	Deamidation	Dea		
Fc/2	2Oxidation	2Ox		
Fc/2	2Deamidation	2Dea		
Fc/2	Oxidation Deamidation	Ox Dea		
Fc/2	Oxidation 2Deamidation	Ox 2Dea		
Fc/2	2Oxidation Deamidation	2Ox Dea		
Fc/2	2Oxidation 2Deamidation	2Ox 2Dea		
Fd	Gln->pyro-Glu	pQ		
Fd	Deamidation	Dea		
Fd	Oxidation	Ox		
Fd	Oxidation Deamidation	Ox Dea		
Fd	2Oxidation	2Ox		
Fd	2Oxidation Deamidation	2Ox Dea		
Fd	3Oxidation	3Ox		
Fd	3Oxidation Deamidation	3Ox Dea		
LC	Oxidation	Ox		
LC	2Oxidation	2Ox		
LC	Deamidation	Dea		
LC	Oxidation Deamidation	Ox Dea		
LC	2Oxidation Deamidation	2Ox Dea		

16

【考察】

本プロトコルを用いることにより、ペプチドマッピングや遊離糖鎖解析まで行わなくても、図6に示したように糖鎖の不均一性について解析できることがわかった。この簡便なサブユニット解析により得られる各成分の検出量を比較することによって、複数ロット間での一次的な品質評価が可能となる。しかしながら、サブユニット解析のみではアミノ酸残基の微小な変化(脱アミド化等)を検出するには不十分であるため、可能な限り詳細な品質評価を行うためには、ペプチドマッピングや遊離糖鎖解析のデータも併せて評価する必要がある。

*用語説明

- 平均分子量: 通常分子量
- モノアイソトピック質量: 天然存在比が最も多い¹²C, ¹H, ¹⁴N, ¹⁶Oから構成される質量
- IdeS: 抗体分子をおよそ半分に切断できる極めて特異性の高い酵素。認識部位は、N末・・・XXXXX | GPSVFLFPXXX・・・C末、至適pHは6.5~7、分子量は37 kDa。
- 付加イオン: 通常はプロトンが付加(+1 Da)して1価の陽イオンとして検出されるが、Naが付加(+23 Da)、Kが付加(+40 Da)、グアニジンが付加(+59 Da)、トリフルオロ酢酸が付加(+114 Da)したイオンが検出されることがある。