



Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による インタクトモノクローナル抗体の 精密な特性評価

アプリケーションノート

著者

David L. Wong
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAbs) は、きわめて重要なクラスのバイオ医薬品分子です。このため、タンパク質医薬品では徹底的な mAb 特性解析が各製造ステップで必要です。インタクト mAb 解析により、mAb 製品の正確な分子量の測定、および翻訳後修飾 (PTM)、抗体薬の複合体 (ADC)、mAb 配列の多様性、分解生成物などの不均一性の程度の測定を迅速に評価できます。インタクトタンパク質や抗体の分析には、広い質量範囲で分解能が優れている四重極飛行時間型 (Q-TOF) LC/MS システムがよく使用されます¹⁻³。Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムは、30,000 m/z までの生体分子の測定が飛躍的に向上するハードウェアおよびソフトウェア機能を備えています。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム、6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、さまざまな mAb 製品を解析できる Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアによる自動データ処理を使用したシームレスなワークフローを説明しています。



図 1. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム。



Agilent Technologies

分析条件

サンプルおよび実験方法

モノクローナル抗体標準 RM 8671 は米国国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。ハーセプチン製剤 (トラスツズマブ) と ADC 製剤 (T-DM1) は Genentech 社 (カリフォルニア州サウスサンフランシスコ、米国) から購入しました。すべての mAb サンプルは脱イオン水で 1.0 µg/µL に希釈しました。

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムと、Agilent JetStream デュアルスプレーイオン源を搭載した Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムとを組み合わせ実行しました。LC 分離には Agilent PLRP-S 1000 Å カラム (2.1 × 50 mm, 5 µm) を使用しました。表 1 と表 2 は使用した LC/MS パラメータを示しています。約 0.5 µg の mAb サンプルを注入して各分析を実行しました。

データ処理

mAb のすべての MS データは、MassHunter BioConfirm B.08.00 ソフトウェアのタンパク質デコンボリューション機能を用いて解析しました。この機能では正確な分子質量計算のために最大エントロピーアルゴリズムを使用しています。質量デコンボリューションでは、2,000 ~ 5,000 *m/z* の質量範囲で高い方から 25 % 分のピーク高についての平均スペクトルを使用しました。デコンボリュートした質量範囲は 140,000 ~ 160,000 ダルトンに設定しました。

結果と考察

複数の mAb を分析すると同時に、試験したすべてのサンプルについて共通の手法により優れたデータ品質が得られました。図 2 は NIST mAb 標準のインタクトプロテイン分析を示しています。約 0.5 µg を (サンプルの脱塩前処理なしに) Agilent PLRP-S カラムに注入し、0.5 mL/min の流速で 4 分のグラジエントを使用しました。

インタクト mAb の高品質の MS スペクトルと多価イオンの分布が 2,000 ~ 5,000 *m/z* の質量範囲で得られました。拡大した各多価イオンのスペクトル (図 2 挿入図) は NIST mAb の 6 種類の主なグリコフォームを明らかに示しています。

BioConfirm B.08 のタンパク質デコンボリューション機能は、質量範囲の自動検出だけでなくゼロ荷電状態のスペクトルの正確な測定も提供して、優れた質量精度を提供します。図 3 は、インタクト NIST mAb の MS デコンボリューションの結果を示しています。低 ppm 誤差 (平均: < 0.5 ppm) と優れた MS 分解能を、NIST mAb の 6 種類の主なグリコフォームすべてに

ついて得ることができました。mAb の主要な特徴だけでなく、GlcNAc 残留物の損失などのグリコシル化の他の軽微な不均一性が容易に同定されました。LC/Q-TOF で収集される生データおよび最大エントロピーデコンボリューションアルゴリズムの最小限の処理により、ユーザーはインタクトタンパク質の組成についての詳細を検出して失わないようにすることができます。このことは、軽微な構造を不明確にする高いレベルのデータ処理や操作を採用するよりアグレッシブな分析手法と比較する場合は特に重要です。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ。

| Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム | |
|-------------------------------------|---|
| カラム | Agilent PLRP-S, 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm (p/n PL1912-1502) |
| サーモスタット | 4 °C |
| 溶媒 A | 0.1 % ギ酸水溶液 |
| 溶媒 B | 0.1 % ギ酸 100 % アセトニトリル溶液 |
| グラジエント | 0 ~ 1 分, 0 ~ 20 % B 1 ~ 3 分, 20 ~ 50 % B 3 ~ 4 分, 50 ~ 70 % B |
| カラム温度 | 60 °C |
| 流速 | 0.5 mL/min |
| 注入量 | 0.5 µL |

表 2. MS 取り込みパラメータ

| Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システム。 | |
|--|------------------------------------|
| イオン源 | デュアル Agilent Jet Stream |
| ガス温度 | 350 °C |
| ガス流量 | 12 L/min |
| ネブライザ | 60 psig |
| シースガス温度 | 400 °C |
| シースガス流量 | 11 L/min |
| キャピラリー電圧 | 5,500 V |
| ノズル電圧 | 2,000 V |
| フラグメンタ電圧 | 380 V |
| スキマ電圧 | 140 V |
| Quad AMU | 500 <i>m/z</i> |
| 質量範囲 | 100 ~ 10,000 <i>m/z</i> |
| 採取レート | 1.0 スペクトル/秒 |
| 参照質量 | 922.0098 |
| 取り込みモード | ポジティブ、拡張 (10,000 <i>m/z</i>) 質量範囲 |

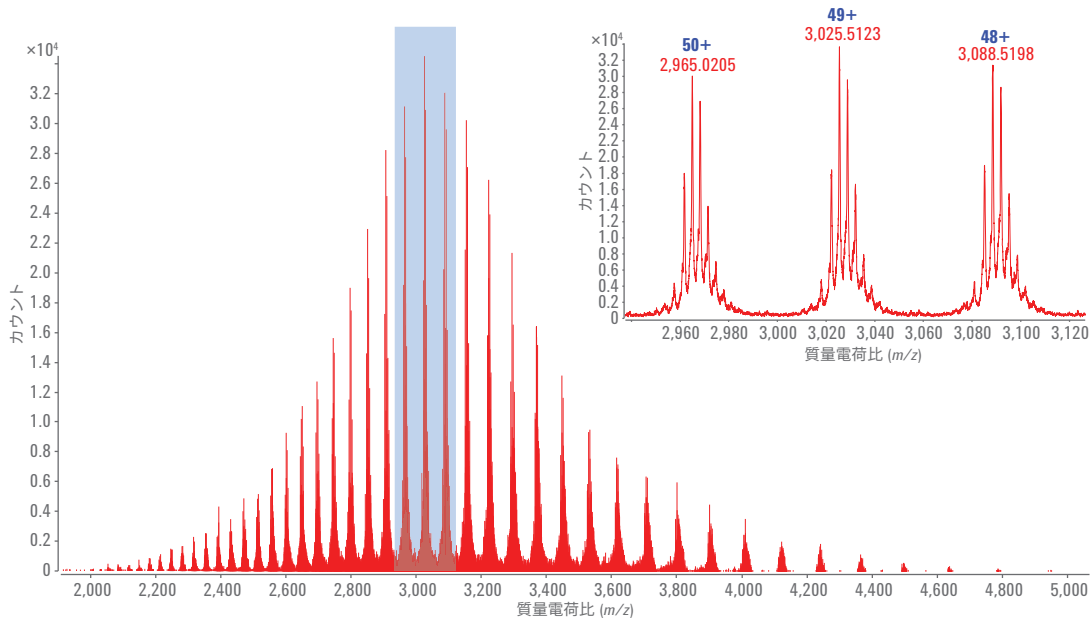


図 2. インタクト NIST mAb 分析 (0.5 μ g 注入)。

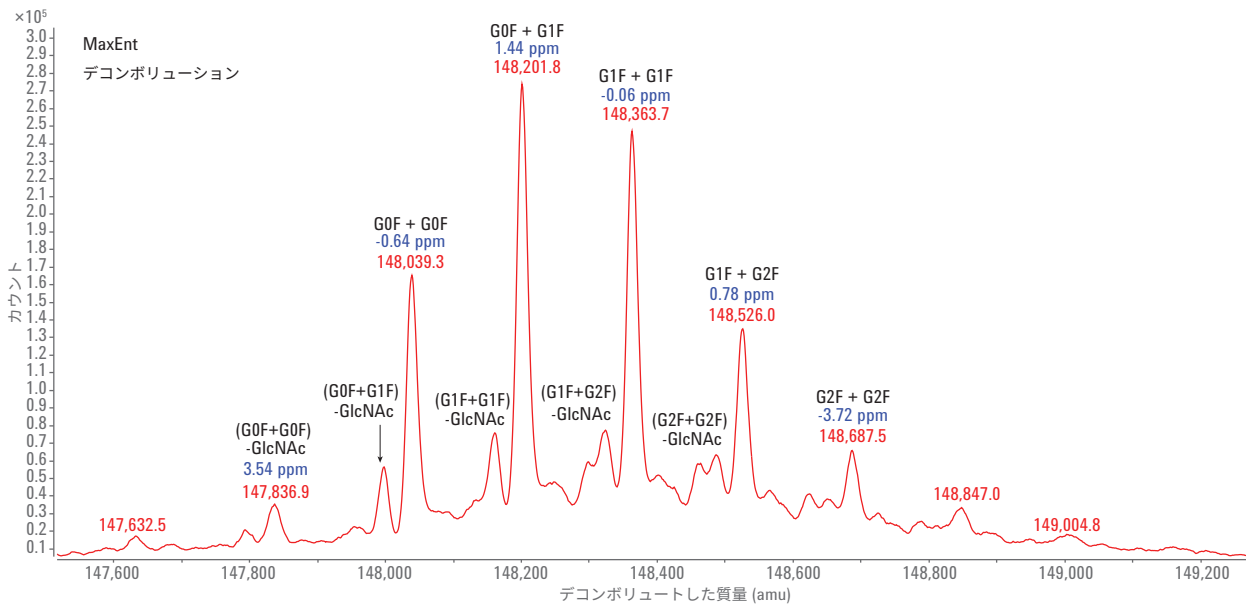


図 3. インタクト NIST mAb (0.5 μ g 注入) の MS デコンボリユーション。

mAb 分析における 6545XT システムの質量精度の再現性を確認するために、同じ量のサンプル注入と HPLC 条件を用いて複数の mAb も分析しました。表 3 は NIST mAb とハーセプチンの上位 6 種類のグリコフォームのデコンボリュートした質量結果を示しています。優れた低 ppm 質量誤差とすべてのグリコフォームが明確に一貫して示されました。

ADC はターゲットに特化した新しい世代の効果的な生物製剤を代表します。正確な薬物抗体比 (DAR) を得ることは、効能を最適化し、ADC の毒性を最小限に抑える上で非常に重要です。しかし、DAR の獲得は、さまざまなレベルの薬物の複合体がもたらす複雑化のために、さらなる問題を提供します。図 4 はインタクトグリコシル化 ADC のデコンボリュートしたスペクトルを示しています。ADC の D0 ~ D8 と整合する質量で 9 つの質量クラスタを観察しました。各クラスタグループの 3 つの主要なピークは G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F グリコフォームに対応しています。特に重要なことは、BioConfirm DAR カリキュレータを使用して求めた平均 DAR 値が 3.5 で、他の分析メソッドで求めたデータを使用して事前に報告されていたインタクト ADC の DAR の値と一致することです。

表 3. インタクト mAb 分析のサマリ。

| グリコフォーム | NIST mAb | | ハーセプチン | |
|----------------------|--------------|------------|--------------|------------|
| | Cal. MW (Da) | 質量誤差 (ppm) | Cal. MW (Da) | 質量誤差 (ppm) |
| G0 + G0F | | | 147,912.6887 | 0.76 |
| (G0F + G0F) - GlcNAc | 147,836.3503 | 3.54 | | |
| G0F + G0F | 148,039.4297 | -0.64 | 148,058.8326 | 4.76 |
| G0F + G1F | 148,201.5729 | 1.44 | 148,220.9758 | 0.16 |
| G1F + G1F | 148,363.7162 | -0.06 | 148,383.1191 | -5.07 |
| G1F + G2F | 148,525.8595 | 0.78 | 148,545.2623 | -6.74 |
| G2F + G2F | 148,688.0027 | -3.72 | 148,707.4056 | -13.23 |

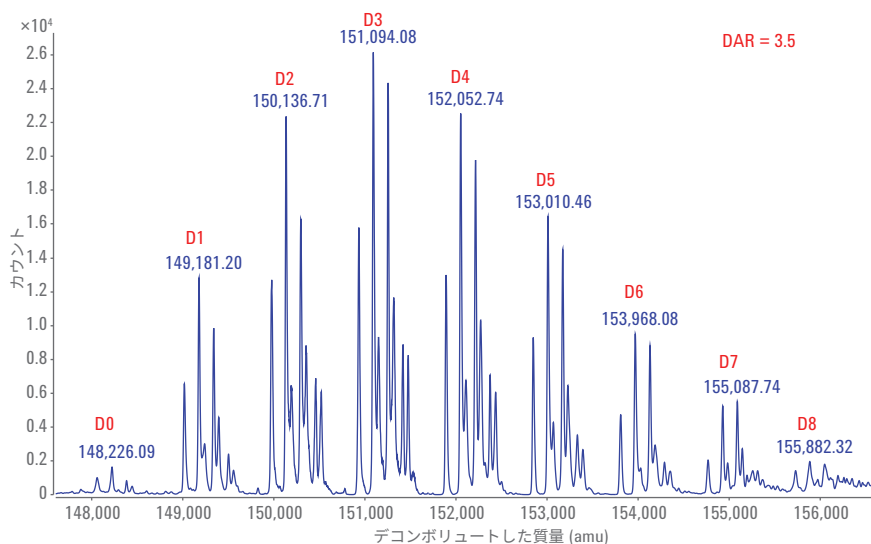


図 4. インタクト T-DM1 分析 (0.5 µg 注入)。

6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF が提供する高レベルの詳細情報は、バイオシミュラー治療薬の開発および分析時に直接的な利点を持ちます。BioConfirm ではデコンボリュートしたスペクトルのミラープロットが可能のため (図 5) タンパク質サンプル間の違いを即座に視覚化できます。この例では 2 つのサンプルは本質的にきわめて類似しています。しかし、タンパク質配列 (変異)、グリコシル化、タンパク質切断などの医薬品の品質を変え得る違いがある場合には、その違いを即座に見つけることができます。

結論

モノクローナル抗体には付随する高いレベルの複雑性があるため、高い信頼性で特性分析を実行するには高い分解能、精度、ダイナミックレンジが必要です。このアプリケーションノートでは、高性能クロマトグラフィーテクノロジーと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と自動データ処理用 Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを統合した高スループットのインタクト mAb 分析ワークフローソリューションを示しました。

- このワークフローではインタクト mAb 質量解析中に測定されるグリコフォームについて 1 ppt レベルまでの優れた質量精度を実現します。
- mAb タンパク質の不均一組成についての詳細な情報を得ることができました。主要なグリコフォームに加え、低強度の微量な成分や類似の分子量を明確に分離しました。GlcNAc 糖残基の損失があるすべての主要なグリコフォームおよび重鎖の C 末端リジンを持つ完全な長さのタンパク質配列などの多様性を容易に区別できました。

このメソッドに必要な全分析時間は非常に短いため、大きなサンプルセットにも対応可能です。わずか 4 分の LC グラジエントと、Agilent BioConfirm 自動データ処理により、全 96 ウェルプレートを 8 時間で完了できます。

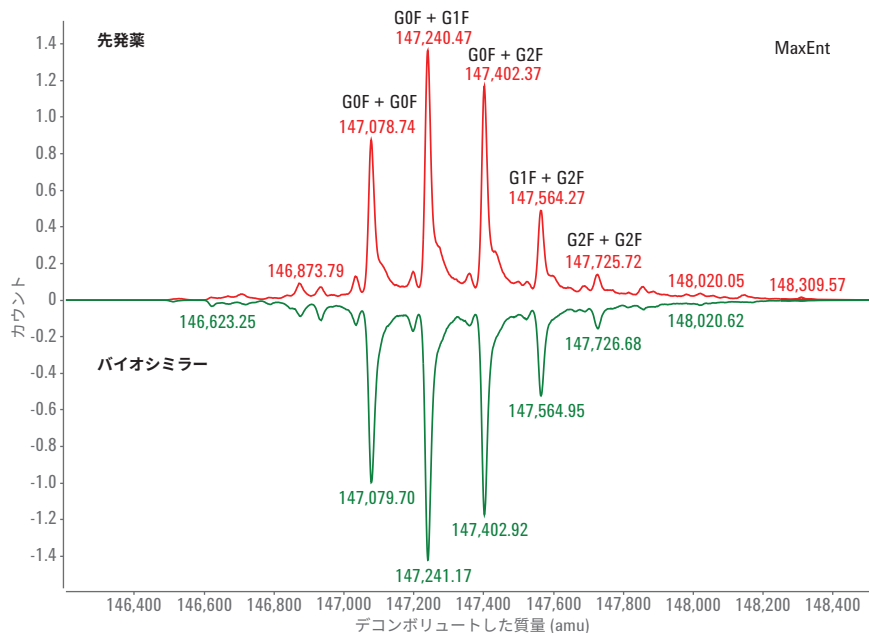


図 5. インタクトリツキシマブの分析 (先発薬対バイオシミュラー) (0.5 µg)。

参考文献

1. Intact Protein Analysis Using an Agilent 6550 Q-TOF Mass Spectrometer, *Agilent Technologies*, publication number 5991-2116EN.
2. Analysis of Monoclonal Antibody (mAb) Using Agilent 1290 Infinity LC System Coupled to Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF), *Agilent Technologies*, publication number 5991-4266EN.
3. An Integrated Workflow for Automated Calculation of Antibody-Drug Conjugate (ADC) Drug-to-Antibody Ratio (DAR), *Agilent Technologies*, publication number 5991-7366EN.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, February 24, 2017

5991-7813JAJP



Agilent Technologies