

# モノクローナル抗体 (mAb) の 高速高効率ペプチドマッピング： 表面多孔性粒子カラムが実現する 低圧での高分離分析

## アプリケーションノート

生物医薬品・バイオシミラー

### 著者

James Martosella, Alex Zhu  
Agilent Technologies, Inc.  
Wilmington, DE 19808  
Ning Tang  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA 95052

### はじめに

逆相 (RP) クロマトグラフィーによるペプチドマッピングは、生物医薬品分析の主流テクニックで、生物医薬品の包括的な特徴分析が可能です。質量分析 (MS) と組み合わせれば、タンパク質やバリエーションの同定、翻訳後-修飾 (PTM) およびその位置の測定、タンパク質配列の確認が可能です。しかし、ペプチドマッピングには、タンパク質分解物が複雑であることから、クロマトグラフィー上の大きな難問が伴います。そのため、多くのユーザーは、堅牢で信頼性の高いペプチドマップメソッドの開発に苦労しています。一般に、ペプチドマップに関しては、感度の低さ、ピーク形状の悪さ、望みどおりの分離を達成するのに要する長い分離時間などの問題があります。

最近では、そうした問題を解消するために超高性能液体クロマトグラフィー (UHPLC) が導入されるようになり、従来の HPLC よりも優れた分離能や感度が得られているほか、分析時間も大幅に短くなっています。UHPLC 技術は、タンパク質製剤に関するより詳細な分析の基盤となります。速い流速、小さい粒子、短いカラムを利用して、大幅に短い時間で高い分離性能を得ることが可能です。しかし、そうした分析ではシステム圧力が高くなるため、従来型の HPLC 機器での対応が難しいことが多く、必ずしも汎用性の高いソリューションとは言えませんでした。



**Agilent Technologies**

こうした問題を解消するために、アジレントは粒子径 2.7  $\mu\text{m}$  の AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを発売しました。このカラムは生物医薬品分析におけるこれまでの HPLC の欠点を補い、従来の LC システムの圧力で高速かつ高効率のペプチドマッピングを実現するものです。表面多孔性充てん剤を用いた AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使えば、優れたピーク性能を維持しながら、きわめて短い時間かつ低システム圧でペプチドマッピング効率を大幅に向上させることが可能です。この研究では、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを用いて、短い分析時間でモノクローナル抗体 (mAb) トリプシン分解物の LC/MS ペプチドマッピング分析をおこないました。また、AdvanceBio カラムと他社製サブ 2  $\mu\text{m}$  UHPLC ペプチドマッピングの性能を比較しました。

## 材料とメソッド

### サンプル前処理

まず、mAb IgG1 (30 mg/mL) 水溶液 50  $\mu\text{L}$  と 100 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 8) 水溶液 75  $\mu\text{L}$  を混合しました。トリフルオロエタノール 75  $\mu\text{L}$  と 200 mM ジチオトレイトール (DTT) 水溶液 3  $\mu\text{L}$  をタンパク質サンプルに加え、60  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間加熱し、タンパク質を変性および還元させました。タンパク質を室温に冷ましたのち、200 mM ヨードアセトアミド (IAM) 12  $\mu\text{L}$  をサンプルに添加しました。サンプルを室温の暗所に 1 時間静置した後、DTT 水溶液 3  $\mu\text{L}$  をサンプルに加え、1 時間にわたって過剰な IAM と反応させました。水 900  $\mu\text{L}$  と 100 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 300  $\mu\text{L}$  でサンプルを希釈しました。トリプシン溶液 (75  $\mu\text{L}$ ) をサンプルに加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で 20 時間インキュベーションしました。一晩のインキュベーション後、純ギ酸 3  $\mu\text{L}$  を加え、分解を止めました。

## 条件

カラム:	AdvanceBio ペプチドマッピング 2.1 $\times$ 100 mm (p/n 655750-902)、AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 $\times$ 150 mm (p/n 653750-902)、他社製 UHPLC カラム、2.1 $\times$ 100 mm
溶媒:	A: $\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 % FA (v/v) B: 90 % ACN + 0.1 % FA (v/v)
注入量:	15 $\mu\text{L}$
流量:	ケースにより異なる
温度:	40 $^{\circ}\text{C}$
検出:	UV、215/220 nm
使用機器:	Agilent 1290 Infinity LC システム、Agilent 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 (Q-TOF) システム

## Q-TOF MS パラメータ

イオンモード:	ポジティブ
ソース:	Agilent Dual Jet Stream
ドライイングガス温度:	250 $^{\circ}\text{C}$
ドライイングガス流量:	10 L/min
シースガス温度:	250 $^{\circ}\text{C}$
シースガス流量:	12 L/min
ネブライザ:	35 psi
キャピラリー電圧:	3,500 V
フラグメンタ:	200 V
スキマ電圧:	65 V
Oct 1 RF:	750 V
ノズル電圧:	0 V
MS 範囲 ( $m/z$ ):	100~1600
MS/MS 範囲 ( $m/z$ ):	100~1600
MS スキャンレート (スペクトル/秒):	8
MS/MS スキャンレート (スペクトル/秒):	3

LC/MS 分析結果の解析には、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア B.06 と Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア B.06 を使用しました。

## 結果と考察

### 高速ペプチドマッピングの最適化

存在する可能性のある数百のピークを分離および分析するためには、ペプチドマッピングメソッドの最適化が重要です。短い分析時間での高分離能を実現する最適化の実施はしばしばきわめて難しく、時間もかかることがあります。そのため、mAb トリプシンペプチドマッピングにおいて望みどおりの分離能を得るためには、120 分かそれ以上という長いグラジエント条件が必要になることがあります。mAb のような大型のタンパク質では時間は特に長くなります。迅速にマッピングできればそれに越したことはありませんが、分離能を犠牲にするわけにはいきません。また、最終的に、長いグラジエント条件で得られる分離と同レベルの分析結果が得られなくてはなりません。

分離性能を損なわずに分析スピードを上げられる AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの柔軟性を実証するために、図 1 で 2 件の UV 分離を比較しています。この比較では、 $2.1 \times 150$  mm

AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (上のクロマトグラム) を用いて、75 分で mAb トリプシンペプチドマッピングメソッドを最適化しました。グラジエントプロファイル全体で、ベースラインで効率的に分離されたピークが得られています。この 75 分の分離は、同じ寸法の一般的なカラムを用いたペプチドマッピング時間よりも短い時間で同等の分離が得られることを明確に示しています。

一方、図 1 の下の 14 分のクロマトグラムでは、カラム流量が 0.2 から 0.6 mL/min に上がり、カラムの長さは 150 から 100 mm と短くなっています。この変更の際には、同じ選択性を確保するために体積流量を慎重に維持し、カラムボリュームあたりのグラジエント変化が等しくなるよう設定しました。14 分のペプチドマッピングメソッドからは、優れた分離性能が見てとれます。ベースライン分離と感度が維持され、分離能にも変化はありません。この 14 分の分離は、従来型の 600 bar HPLC 機器でも UHPLC 並みのスピードと性能が得られることを実証しています。

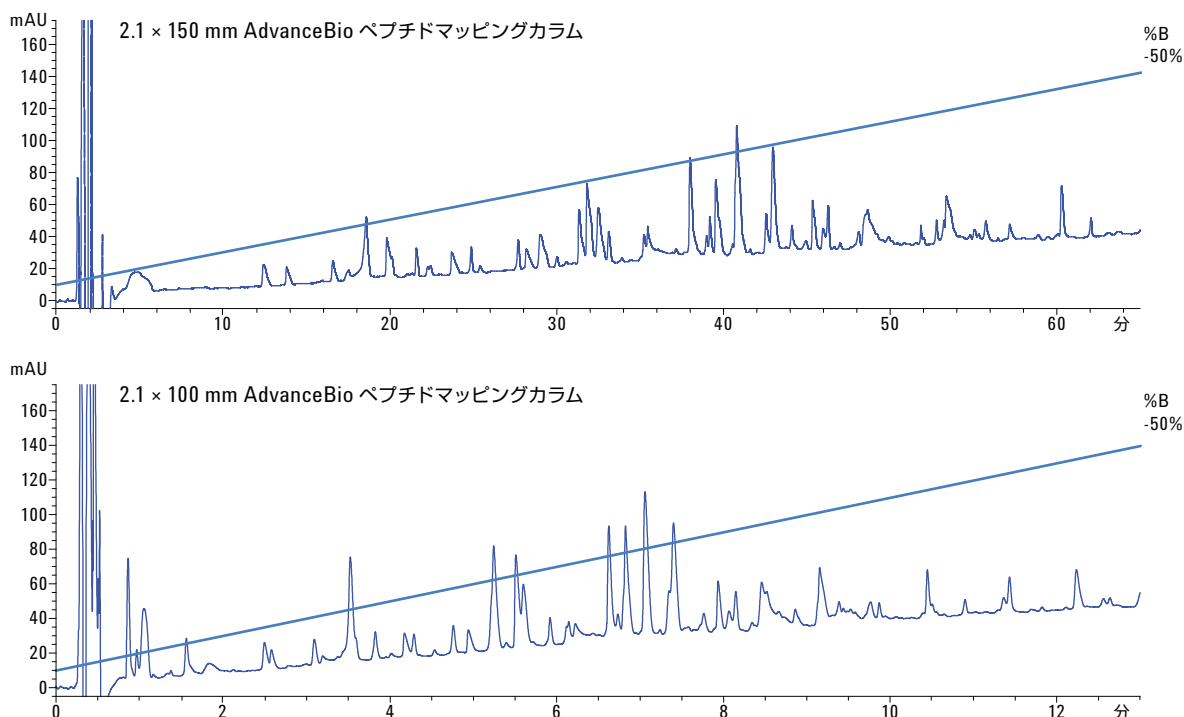


図 1. AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの最適化による高速ペプチドマッピング分析の実現。グラジエント 10~40 % B、DAD : 215 nm、40 °C。上図、 $2.1 \times 150$  mm カラムを用いた 75 分の分離により 59 ペプチドピークを生成 (流量 0.2 mL/min、211 bar)。下図、 $2.1 \times 100$  mm カラムを用いて最適化した 14 分の分離により 57 ペプチドピークを生成 (流量 0.6 mL/min、433 bar)。

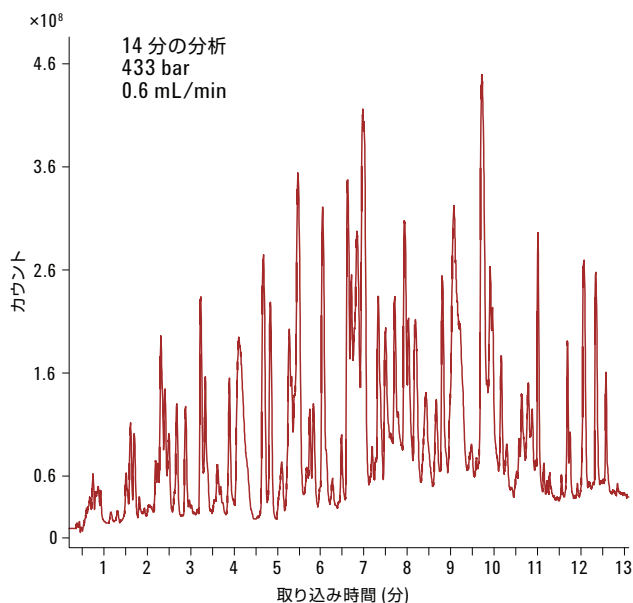
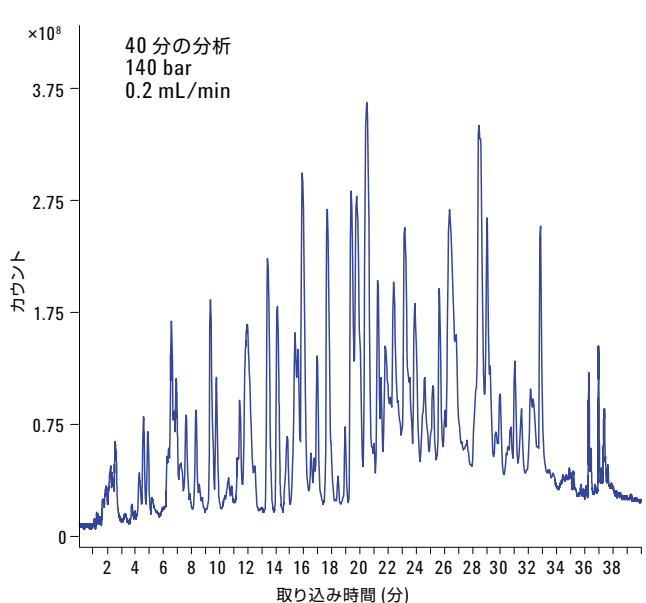
## AdvanceBio ペプチドマッピングカラムによる LC/MS ペプチドマッピング：短いグラジエントと長いグラジエントの比較

一般的な生物医薬品ペプチドマッピングワークフローでは、逆相 LC と質量分析検出の組み合わせが用いられます。UV 検出のみの従来のアプローチと比べると、RP LC/MS では、ペプチドマッピング実験から得られる情報量が大幅に増加します。RP LC/MS で測定すれば、共溶出するペプチドを区別し、ペプチド修飾の位置を特定および同定し、配列カバー率を算出することが可能です。配列カバー率が高いほど、トリプシン分解物が高い効率で分離できていることとなります。

RP LC/MS の際には、分解物プロファイル全体で修飾ペプチド (翻訳後修飾: PTM) を非修飾 (ネイティブ) 型や共溶出するペプチドと区別して検出するために、長いグラジエントを用いて分離能を高めるのが一般的です。分析時間を短縮するために勾配の急なグラジエントが用いられるケースもありますが、これは通常、

分離能や全体的なマッピング品質が犠牲になります。そのため、分析時間を短縮する際には、分離品質や質量スペクトルデータを損なわないようにすることが重要です。

図 2 では、40 分および 14 分のグラジエント時間において、AdvancedBio ペプチドマッピングカラムで得られたペプチドマップのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を比較しています。この比較では、カラム寸法を一定に保ったうえで、クロマトグラフィー上の選択性を同じにするために、カラム間のグラジエント変化/カラムボリュームが等しくなるようにグラジエント勾配を調節しました。この TIC の比較により、時間を短縮した 14 分の分析でも、分離能、選択性、分離性能が犠牲になっていないことがわかります。高流量条件での圧力の上昇は、600 bar 以上に対応する UHPLC 機器を必要としない範囲内に収まっています。



グラジエント、40 分		グラジエント、14 分	
時間 (分)	%B	時間 (分)	%B
0	3	0	3
35	35	10	35
37	90	12	90
40	90	14	90

図 2. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムのトータルイオンクロマトグラム (TIC) の比較。40 分および 14 分の分析における mAb トリプシン分解物のペプチドマッピング性能を比較しています。左図、40 分の分析で得られた TIC (流量 0.2 mL/min、140 bar)。右図、14 分の分析で得られた TIC (流量 0.6 mL/min、433 bar)。

また、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの Molecular Feature Extractor (MFE) を用いて、40 分および 14 分の分析における配列カバー率も検証しました。MFE は、ペプチドマップなどの複雑な分離データから化合物リストを検出および抽出するためのアルゴリズムです。その後、化合物リストが mAb タンパク質配列と照らし合わせられ、配列カバー率が算出されます。図 3 に、一致したペプチドの抽出化合物クロマトグラム (ECC) と配列カバー率を示しています。一致したペプチドはすべて、確認のために少なくとも 1 つの MS/MS スペクトルを用いて採取しました。

40 分および 14 分の分析では、カバー率はおおむね同じに保たれました。14 分の LC/MS 分析における mAb の配列カバー率は 99.63 %、40 分の分析では 99.84 % でした。この比較により、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを用いてペプチドマッピング分析の時間を短縮しても、データ品質は犠牲にならないことがさらに実証されました。

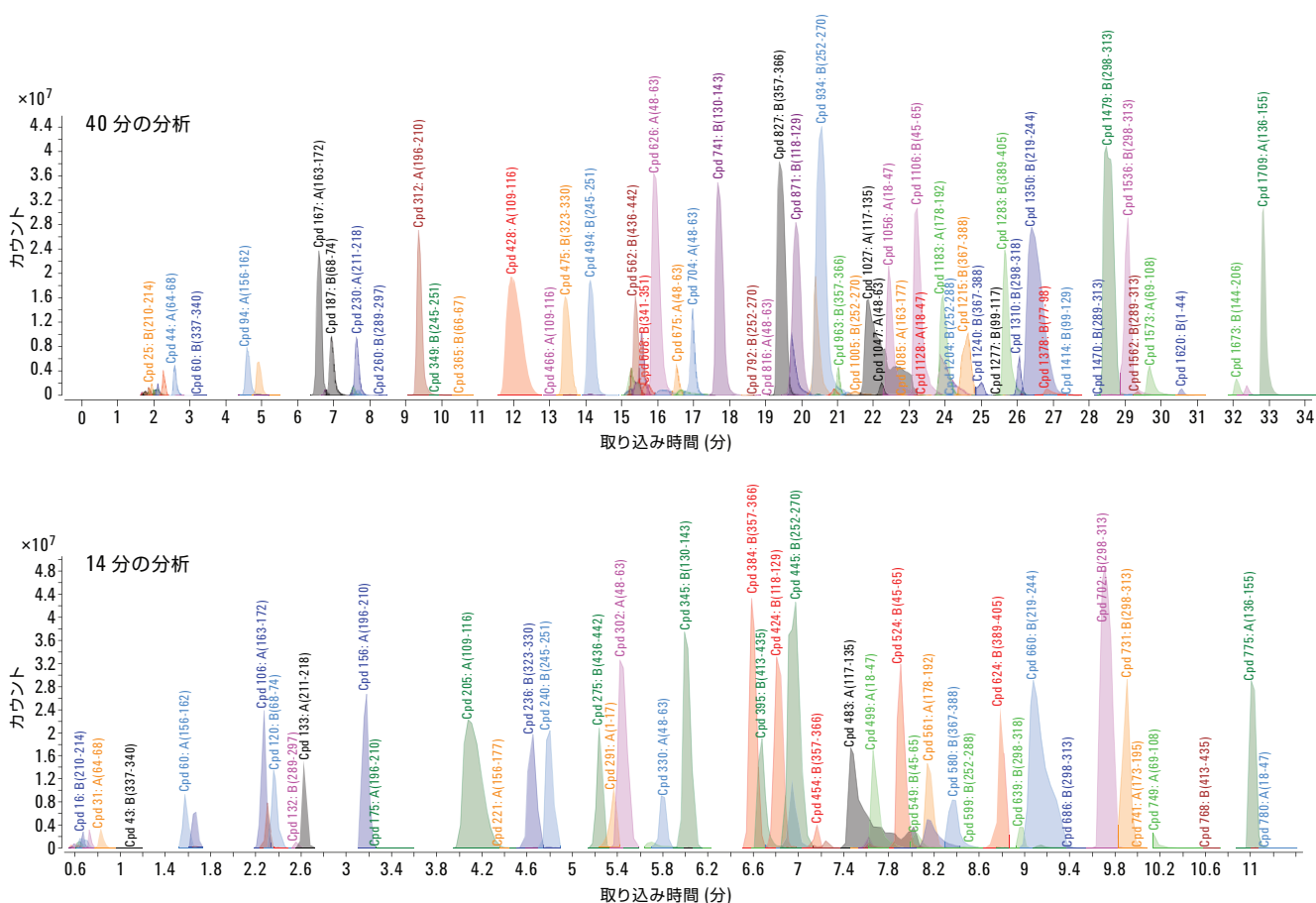


図 3. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの抽出化合物クロマトグラム (ECC) による mAb トリプシン分解物の分析結果の比較。上図では、40 分の分析で同定されたペプチドの ECC を示しています。mAb の配列カバー率は 99.84 % です。下図では、14 分の分析で同定されたペプチドの ECC を示しています。mAb の配列カバー率は 99.63 % です。

## 高速 PTM プロファイリング

構造や機能の変化を引き起こす可能性のある脱アミド化は、mAb 探索、開発、製造の際にモニタリングすべき重要な翻訳後修飾です。図 4 では、ペプチドの脱アミド化のピーク形状と相補性について、14 分の高速分析と 40 分の長い分析を比較しています。いずれのペプチドマッピング分離でも、Asn 357 を含む重鎖ペプチド 357-366 が同定されました。上段と中段の ECC 図では、ネイティブペプチドのピークが 2 つの脱アミド型と完全に分離され、ECC の重ね表示では全部で 3 種類のピークが示されています。40 分の分析 (上) と比較すると、14 分の分析 (下) においても、ネイティブおよび脱アミド型が十分に分離され、QTOF 分析により高い信頼性で同定されています。

下段の図では、ネイティブペプチド ( $m/z = 581.32$  のプレカーサ) および 2 つの脱アミド型 ( $m/z = 581.81$  のプレカーサ) の MS/MS を示しています。このスペクトルでは、主たるイオンは  $\gamma$  および b-シリーズのフラグメントで、3 つのペプチドすべてで同じ  $y_4 \sim y_8$  イオンが観察されていますが、b2 および b3 イオン (丸で囲んだもの) については、ピーク 2 および 3 のほうが 0.98 Da ほど高くなっています。このことは、ネイティブ型と修飾型が厳密に区別されていることを示しています。

MFE の自動化合物抽出では、当該ペプチドに属するすべてのイオン強度 (同位体、電荷、付加物など) も得られます。そうした情報はペプチド表 1 の「Volume (体積)」タブに記載されます。その後、修飾ペプチドの比較パーセンテージを、表 1 の 2 つのデータセットから容易に導出することができます。全体としては、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムで得られた 14 分の高速ペプチドマップでは、時間の長い分析と比べて、PTM (脱アミド化) データや配列カバー率に悪影響が出ることはありませんでした。以上の結果から、流量を高めて勾配の急なグラジエントを用いても、優れた分離性能が維持され、ペプチドマッピング分析全体において高い信頼性が得られることが実証されました。

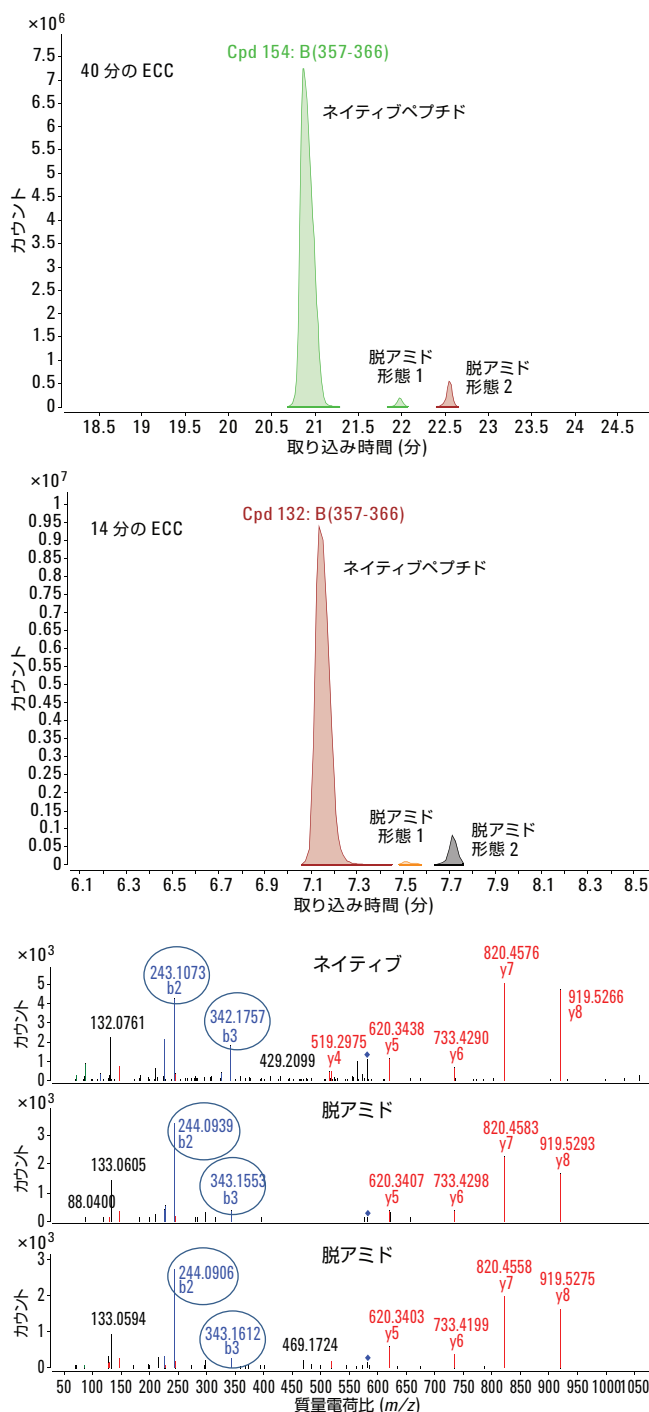


図 4. ネイティブペプチドおよび脱アミド型の抽出化合物クロマトグラム (ECC) の重ね表示と MS/MS スペクトル (下段)。上段の図は、40 分の分析の結果を示しています。中段の図は、14 分の分析の結果を示しています。下段の図は、上で示したネイティブ型および 2 つの脱アミド型の MS/MS スペクトルを示しています。

表 1. ネイティブペプチド HC (357-366) および 2 つの脱アミド型を示す抽出化合物リスト。配列、修飾、リテンションタイム、質量、Vol (体積) について、40 分の分析 (上) と 14 分の分析 (下) が比較されています。

#### 40 分の分析

Show/Hide	File	Seq Loc	Sequence	Pred Mods	RT	Tgt Seq Mass	Vol	Score (Bio)
<input checked="" type="checkbox"/>	igg036-Agilent long run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK		20.891	1160.6223	73748928	81.19
<input checked="" type="checkbox"/>	igg036-Agilent long run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK	1*Deamidation(+0.984016)B357	21.98	1161.6064	1009838	59.65
<input checked="" type="checkbox"/>	igg036-Agilent long run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK	1*Deamidation(+0.984016)B357	22.554	1161.6064	2747294	54.14

#### 14 分の分析

Show/Hide	File	Seq Loc	Sequence	Pred Mods	RT	Tgt Seq Mass	Vol	Score (Bio)
<input checked="" type="checkbox"/>	igg035-Agilent short run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK		7.145	1160.6223	41819052	73.17
<input checked="" type="checkbox"/>	igg035-Agilent short run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK	1*Deamidation(+0.984016)B357	7.515	1161.6064	276957	70.69
<input checked="" type="checkbox"/>	igg035-Agilent short run-peptides in -20.d	B(357-366)	NQVSLTCLVK	1*Deamidation(+0.984016)B357	7.717	1161.6064	2147009	71.81

### 急勾配グラジエントによるペプチドマッピング: HPLC (AdvanceBio ペプチドカラム) と UHPLC (他社製 UHPLC ペプチドカラム) の比較

UHPLC ペプチドマッピングの進歩により、分離性能が大幅に向上し、分析時間が短縮されました。サブ 2  $\mu\text{m}$  粒子技術のおかげで、短い時間でもペプチドの分離能を大幅に高めることが可能になっています。時間短縮が可能なのは、小さい粒子では拡散距離が短くなるためです。この分離能と感度の向上は、ペプチドマッピング、特に修飾ペプチドの検出ではきわめて大きな意味があります。薄い多孔性外層と硬質の内部コアで構成される 2.7  $\mu\text{m}$  の表面多孔性粒子なら、サブ 2  $\mu\text{m}$  カラムの性能と直接比較しても優れた分離能が得られます。また、カラム流量の上昇に伴うシステム圧力の制約が少なくなります。こうした圧力およびスピード面の利点が得られるため、高速高効率ペプチドマッピング分析において、600 bar 以上に対応できる UHPLC 機器を使う必要がなくなります。

図 5 では、IgG トリプシン分解物の UV クロマトグラムを比較しています。この図では、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムのスピードと分離能を、業界最高性能の UHPLC ペプチドマッピングカラムと直接比較しています。上のクロマトグラムでは、2.1  $\times$  100 mm のカラム寸法を用いて、高速高効率分析に対応できるように AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを最適化しています。この分離では、グラジエントプロファイル全体でペプチドピークが良好に分離され、433 bar の圧力で 56 ピークが得られました。下のクロマトグラムでは、同じクロマトグラフィー条件およびカラム寸法を用いて、2.1  $\times$  100 mm UHPLC ペプチドマッピングカラムを比較しています。これらの結果で重要な点は、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの低圧条件でも、同等の分離結果 (ピーク数) が得られていることです。しかしながら、UHPLC ペプチドマッピングカラムでは背圧が 700 bar に達するため、UHPLC 機器を使う必要があります。この点は、広い適用を妨げる制約となります。

mAb マッピングのための LC/MS 分析を迅速かつ日常的、包括的に実施することができれば、医薬品開発のあらゆるプロセスを加速させるのに役立ちます。しかし通常、そうした分離メソッドでは、効率を最大限に高めて時間を短縮するために UHPLC 性能が要求されます。表面多孔性カラムを用いた分離なら、UHPLC/MS 機器と同等の性能を HPLC/MS 機器に与えることが可能となります。サブ 2  $\mu\text{m}$  の UHPLC カラムと表面多孔性 HPLC ペプチドマッピングカラムの LC/MS ペプチドマッピング性能と圧力要件を比較するために、2.1  $\times$  100 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラムと同じ寸法他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラムを直接比較しました。図 6 に、2 つのカラムの RP LC/MS TIC および ECC 性能結果を示しています。ここでも、一致したペプチドはすべて、確認のために少なくとも 1 つの MS/MS スペクトルを用いて採取しました。

TIC および ECC の比較から、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムによる LC/MS 分析では、他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラムと比べても優れた分離能と配列カバー率が得られることがわかりました。AdvanceBio ペプチドマッピングカラムの配列カバー率は 99.63 % で、UHPLC カラムのカバー率 99.0 % に匹敵しました。どちらのカラムでも、全部で 76 のトリプシンペプチドが同定されました。しかし、UHPLC 分析では背圧が 700 bar になったのに対し、AdvanceBio 分離では 500 bar でした。UHPLC と同様の結果を得られる AdvanceBio ペプチドマッピングカラムは、従来の HPLC 機器を用いて高速高効率ペプチドマッピングを実現できる柔軟性を備えた魅力的なカラムといえます。

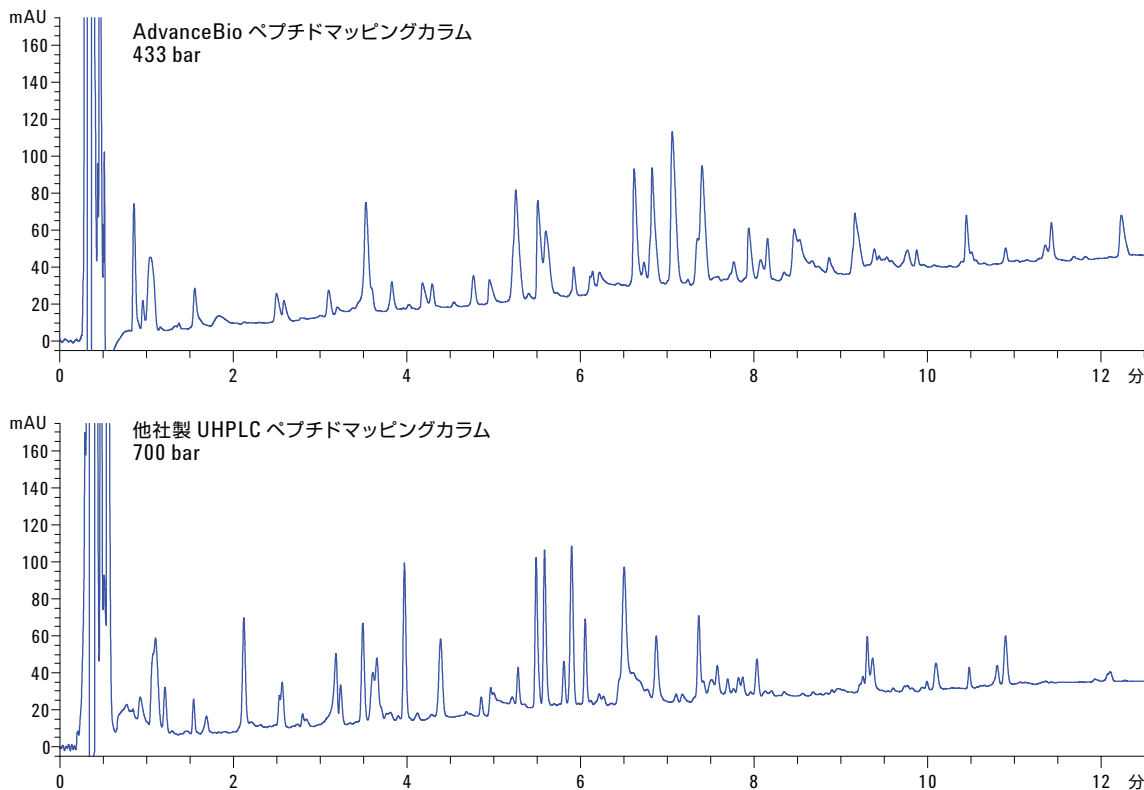


図 5. 2.1  $\times$  100 mm Agilent および他社製 UHPLC カラムを用いた mAb トリプシン分解物のペプチドマップ。グラジエント：10~40 % B、0.6 mL/min、DAD:215 nm、温度：40  $^{\circ}\text{C}$ 、流量:0.6 mL/min上、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムによる HPLC 分離。433 bar で 56 のピークが得られています。下、他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラムによる UHPLC 分離。700 bar で 52 のピークが得られています。



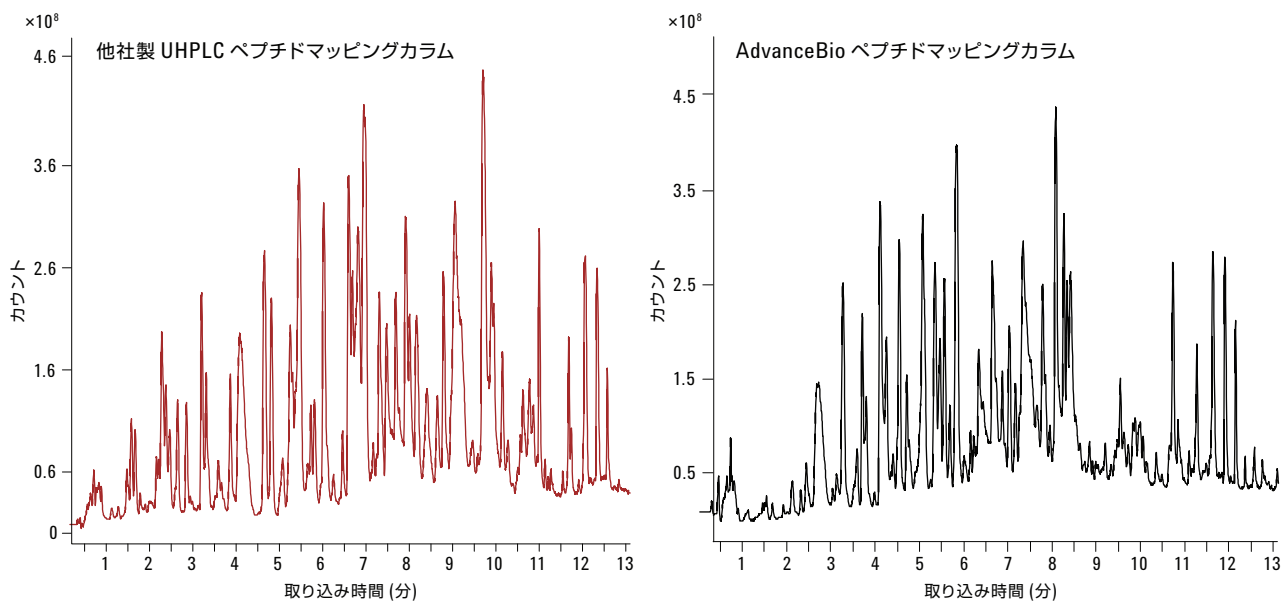


図 6A. 2.1 × 100 mm Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、433 bar (左図) と 2.1 × 100 mm 他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラム、700 bar (右図) を用いた mAb トリプシン分解物のトータルイオンクロマトグラム (TIC)。クロマトグラフィー条件は図 5 と同じ

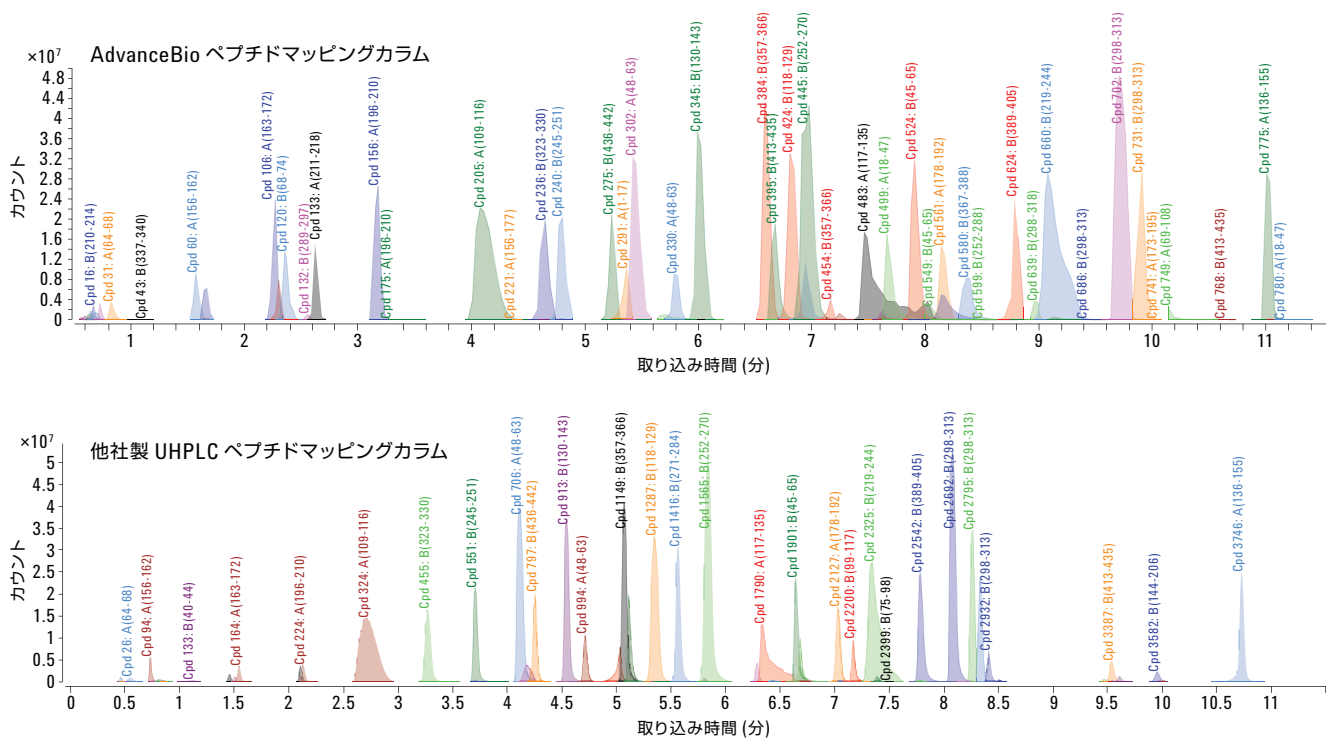


図 6B. mAb トリプシン分解物の抽出化合物クロマトグラム (ECC)。上図、2.1 × 100 mm Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、433 bar。配列カバー率は 99.63 % で、76 のトリプシンペプチドが同定されています。下図、他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラム、700 bar。配列カバー率は 99.0 % で、76 のトリプシンペプチドが同定されています。

## 結論

AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使えば、RP LC/MS ペプチドマッピングの分析時間を大幅に短縮し、短い時間で優れた分離能を得ることができます。最適化したグラジエント条件と組み合わせたこのアプリケーションでは、低い LC 動作圧力 (< 450 bar) を用いて 14 分でモノクローナル抗体のトリプシン分解物を分離する、高効率のペプチドマッピング分析が実現しています。他社製 UHPLC ペプチドマッピングカラムおよび高速分析条件との比較でも、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムにより、短い時間でグラジエントプロファイル全体においてペプチドピークが良好に分離され、高い mAb の配列カバー率が得られました。特に重要なのは、AdvanceBio ペプチドマッピングカラムによる分離は比較的低いシステム圧力で実施できる点です。このことは、従来型の HPLC 機器でも UHPLC 機器と同等の分離を実施できる可能性を示しています。

## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

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

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

December 6, 2013

5991-3585JAJP



**Agilent Technologies**