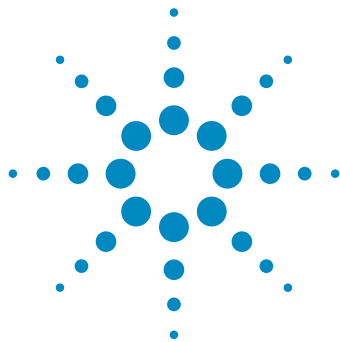




モノクローナル抗体のペプチドマッピングのための統合ワークフロー

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

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

Jing Chen
Agilent Technologies, Inc.
Madison, WI, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、製薬業界で最も急成長している医薬品の 1 つです。mAb はタンパク質医薬品の一種であり、その製造は、初期発現から製品化にいたる各段階で mAb の注意深い特性解析を必要とするきわめて複雑なプロセスです。mAb の特性解析には多数の分析法が用いられていますが、その中でもペプチドマッピングは、mAb の一次配列を確認し、脱アミド化、酸化、グリコシル化などの翻訳後修飾 (PTM) を同定および定量するために不可欠な手法となっています¹。

LC/MS/MS による mAb のペプチドマッピングでは、精製した mAb を酵素によりペプチドに切断した後、タンデム質量分析計で分析し、得られたデータを解析します。通常、サンプル前処理は、変性、還元、アルキル化、酵素分解など複数のステップからなり、それらを手作業で行うとなると、多大な手間がかかるだけでなく、調製可能なサンプル量が限られ、高い再現性も望めません。

このアプリケーションノートでは、サンプルの分解と精製を高い再現性で同時に行うことのできるハイスループットのワークフローについて取り上げます。このワークフローでは、Agilent AssayMAP Bravo 液体ハンドリングロボット、高感度・高精度のスペクトル採取が可能な Agilent 1290 Infinity II LC システムと Agilent 6550 Q-TOF、自動データ解析機能付きの Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを使用しました。



Agilent Technologies

実験方法

材料

モノクローナル抗体標準物質 RM 8671 は、米国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。質量分析グレードのトリプシン/Lys-C 酵素混合物は、Promega 社から入手しました。その他すべての試薬は、Sigma-Aldrich 社から購入しました。mAb の精製には、アジレント・テクノロジーズの AssayMAP C18 カートリッジを使用しました。

サンプル前処理

NIST の mAb 標準物質 RM 8671 の変性、還元、アルキル化、分解、および脱塩には、AssayMAP Bravo を使用しました。まず、サンプルを脱イオン (DI) 水で 10、5、1、および 0.5 µg/µL に希釈した後 (各濃度の調製を 8 回繰り返し)、各サンプル 10 µL を不透明の 96 ウェル U 底プレートに移しました。サンプル前処理は、タンパク質サンプル前処理ワークベンチソフトウェアで管理しました。また、サンプルの分解には、溶液内分解モジュールを使用しました。各サンプルに 30 µL の変性・還元剤 (8 M のグアニジン、13.3 mM の TCEP、pH 7.5) を加えました。プレートを密封し、37 °C で 1 時間オフデッキでインキュベーションしました。

プレートを開封した後、溶液内分解アプリケーションを使用して、アルキル化剤 (132 mM のヨードアセトアミド) 10 µL を不透明のふた付き 96 ウェル U 底プレートから各サンプルに移し、サンプルを混合しました。その後、サンプルプレートにふたをして室温の暗所で 30 分間インキュベーションしました。

次に、希釈液 (50 mM のトリス、pH 7.5) 210 µL をサンプルに加え、続いて 50 mM の酢酸で希釈したさまざまな濃度のトリプシン/Lys-C 混合液 (酵素:タンパク質は 1:40) 5 µL を加えました。

サンプルを密封し、37 °C で 2 時間オフデッキでインキュベーションしました。再びトリプシン/Lys-C 混合液 5 µL をサンプルに加え、37 °C でさらに 14 時間オフデッキでインキュベーションしました。翌日、AssayMAP 試薬移送ユーティリティを使用して 10 % の TFA 30 µL をサンプルプレートに移し、サンプルを酸化しました。その後、ペプチド精製アプリケーションを使用して、サンプルを C18 カートリッジで脱塩しました。このとき、まずカートリッジに 100 µL の 60 % アセトニトリル、0.1 % TFA を入れ、50 µL の 0.1 % TFA で平衡化しました。次に、分解したサンプルを流量 5 µL/min で投入し、50 µL の 0.1 % TFA で洗浄した後、15 µL の 60 % アセトニトリル、0.1 % TFA により流量 3 µL/min で 165 µL の 0.1 % FA に溶出してアセトニトリル濃度を 5 % にしました。その後、各サンプル 0.5 µg を LC/MS で分析しました。

LC/MS 分析

機器

LC システム

次のコンポーネントが装着された Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用しました。

- 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
- Agilent 1290 Infinity II サーモスタット カラムコンパートメント G7116B

MS システム

Agilent JetStream デュアルイオン源を搭載した Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システムを使用しました。

LC/MS/MS および LC/MS 分析は、Agilent 1290 Infinity II LC と、JetStream デュアル ESI ソースを搭載した Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS を組み合わせたシステムで実施しました。LC 分離には、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (2.1 × 150 mm、2.7 µm) を使用しました。表 1 および表 2 に、使用した LC/MS/MS パラメータをまとめます。LC/MS 分析には、同じ LC グラジエントとソースパラメータを使用しました。MS データは 5 スペクトル/秒で取り込みました。

データ解析

LC/MS/MS で取り込んだ生データの解析には、Agilent MassHunter BioConfirm B.08 ソフトウェアを使用しました。手順を簡単に説明すると、まず生データを Molecular Feature Extractor (MFE) で処理しました。ペプチド検出パラメータはデフォルト値に設定しました。ただし、*m/z* 範囲は制限なしに、またピークフィルタのピーク高は 500 カウント以上に設定しました。アルキル化 (C) を固定修飾、酸化 (M)、脱アミド化 (NQ)、ピログルタミン化 (Q)、および一般形態の多様なグリコシル化 (N) を可変修飾として、結果を NIST の mAb 配列で検索しました。このとき、MS 一致許容範囲を ±10 ppm、MS/MS 一致許容範囲を ±20 ppm に設定しました。また、酵素の切断ミスの許容値を 2 としました。同定されたすべてのペプチドは、少なくとも 1 つの MS/MS スペクトルに含まれていました。バイオスコアの低いペプチドについては、手動でその妥当性を確認しました。

表1. 液体クロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	値
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 150 mm、2.7 μm
サーモスタット	4 °C
溶媒 A	0.1 % ギ酸水溶液
溶媒 B	0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント	0 ~ 15分、B を 5 % から 40 % へ 15 ~ 18 分、B を 40 % から 90 % へ 18 ~ 20 分、B を 90 % で維持
カラム温度	60 °C
流量	0.4 mL/分

表2. 質量分析計パラメータ

パラメータ	値
ガス温度	290 °C
乾燥ガス	13 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	12 L/min
VCap	4,000 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ電圧	175 V
四重極 AMU	100
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジ (2 GHz)
質量範囲	m/z 100 ~ 1,700
採取レート	5 スペクトル/秒
自動 MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 1,700
最小 MS/MS 取り込みレート	3 スペクトル/秒
Isolation Width (選択幅)	中程度 (~ 4 m/z)
プリカーサ/サイクル	上位 10
コリジョンエネルギー	$3.6 \cdot (m/z) / 100 - 4.8$
MS/MS の閾値	1,000 カウントおよび 0.001 %
ダイナミック排除	オン、3 回繰り返し後に 0.2 秒間排除
プリカーサアバンドンスにもとづくスキンスピード	有効
ターゲット	25,000
MS/MS 蓄積時間制限の使用	有効
純度	厳密性 100 %、カットオフ 30 %
同位体モデル	ペプチド
プリカーサのソート	アバンドンスのみを基準; +2、+3、>+3

結果と考察

Agilent AssayMAP Bravo、Agilent 6550 Q-TOF LC/MS/MS、および Agilent BioConfirm B.08 による統合ワークフロー

バイオ医薬品 mAb の特性解析にはペプチドマッピングが日常的に用いられていますが、そのためのサンプル前処理は複雑です。サンプル前処理に用いる手法や実施する分析者、パートナーラボ相互のわずかな違いがデータのばらつきにつながり、分析結果の品質を大きく左右します。数か月または数年にまたがって異なるバッチを比較する必要がある場合は、

このばらつきが特に大きな障害になります。また、サンプル前処理を手作業で行う場合、クローン選択などのハイスループットアプリケーション用に規模を拡大するのは容易ではありません。

Agilent AssayMAP Bravo は、ペプチドマッピングのためのサンプル前処理に伴う物理的な作業を自動化します。サンプル前処理プロセスを加速させることができるうえ、再現性も高まります。AssayMAP ソフトウェアには、溶液内分解やペプチド精製など、幅広いタンパク質サンプル前処理ワークフローのための使いやすいアプリケーションが搭載されています。このソ

フトウェアはロボットに対し、サンプルの変性、還元、アルキル化、酵素分解、サンプルクリーンアップなど、LC/MS 分析のために不可欠なステップの実行を指示します。このオープンアクセスの自動化ソリューションは、特にタンパク質サンプル前処理用に設計されています。これらの機械的ステップが自動化されるため (図 1 および図 2)、サンプル前処理が実行されている間に他の作業を行うことができます。また、サンプル前処理メソッドは複数のラボの AssayMAP システム間で転送することも可能なため、その優れた再現性を組織全体で活かすことができます。



図 1. mAb のペプチドマッピングのための統合ワークフロー。Agilent AssayMAP Bravo Platform による自動サンプル前処理、Agilent 6550 Q-TOF LC/MS/MS による分析、および Agilent BioConfirm B.08 による解析で構成されています。



図 2. Agilent AssayMAP ペプチドサンプル前処理ワークフローでは、ペプチドマッピングなどのワークフローに応じてサンプルを分解、精製、分取することができます。

Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS/MS システムは、質量精度と感度に優れた MS 結果をもたらし、タンパク質の同定および詳細なペプチドマッピングに有効なことが実証されています²。また、BioConfirm ソフトウェアは、MFE、ペプチド配列の照合、およびタンパク質配列をカバーするマッピングのための自動データ解析機能を備えています。通常、LC/MS/MS で分析する分解 mAb サンプルは非常に複雑で、多数のペ

プチドが含まれるうえ、その多くに多様な PTM がなされている可能性があります。MS データの取り込み後、BioConfirm ペプチドマッピングワークフローを用いれば、MFE 処理を実行し、きわめて複雑なデータから化合物 (すなわちペプチド) のリストを生成することができます。その後、この化合物リストがユーザー指定の mAb 配列と照合され、配列カバーマップが生成されます。図 3 は、トリプシン/Lys-C 混合液

で分解した NIST mAb の抽出化合物クロマトグラム (ECC) です。同定されたすべてのペプチドに、NIST mAb の軽鎖および重鎖に対応する配列番号のラベルが付けられています。

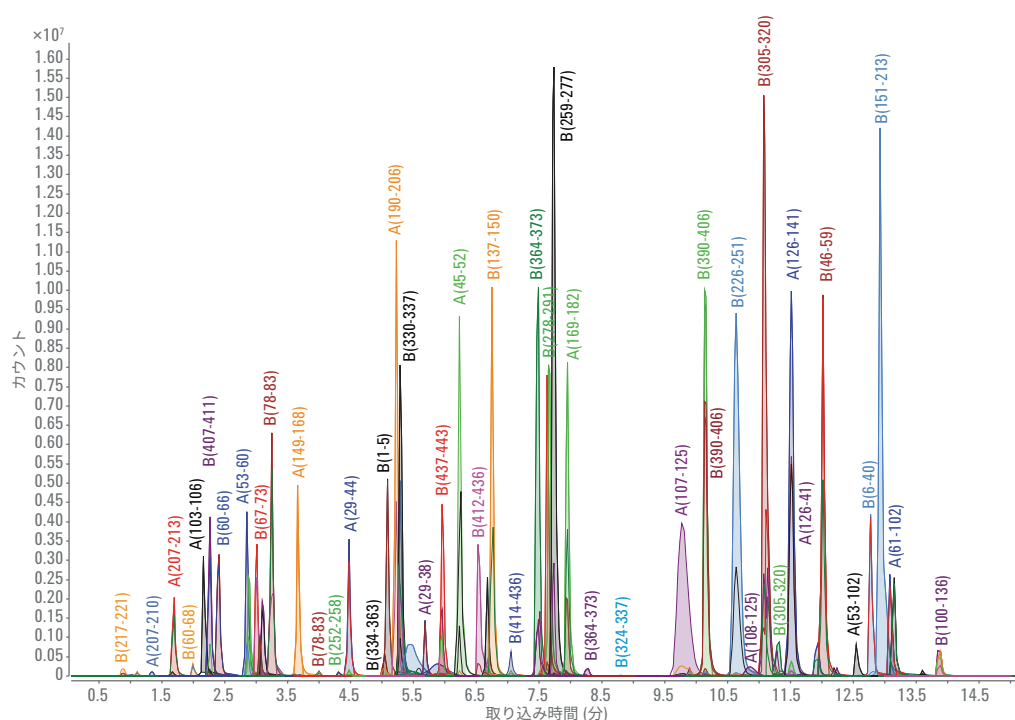


図 3. トリプシン/Lys-C で分解した NIST mAb 標準物質 RM 8671 を Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムで分離したペプチドの ECC。軽鎖および重鎖ペプチドにそれぞれ A および B のラベルが付けられています。

ペプチドを高い信頼性で同定するために、MS 質量誤差が 10 ppm 未満で、かつ存在を裏付ける MS/MS スペクトルが 1 つ以上あるペプチドのみを一致とみなしました。図 4 に、例として 2 種類の特 定ペプチドについて得られたフラグメントイオンの MS/MS スペクトルを示します。BioConfirm のスコアリングアルゴリズムでは、次のような要因が考慮されます。

- b および y フラグメントイオンの存在
- インモニウムイオン
- 質量精度
- MS/MS ピーク強度
- その他のパラメータ

高品質の MS データと MS/MS データを統合することにより、ペプチド照合の信頼性が向上し、ペプチドの修飾に関する豊富な情報が得られます (図 5 および図 6)。

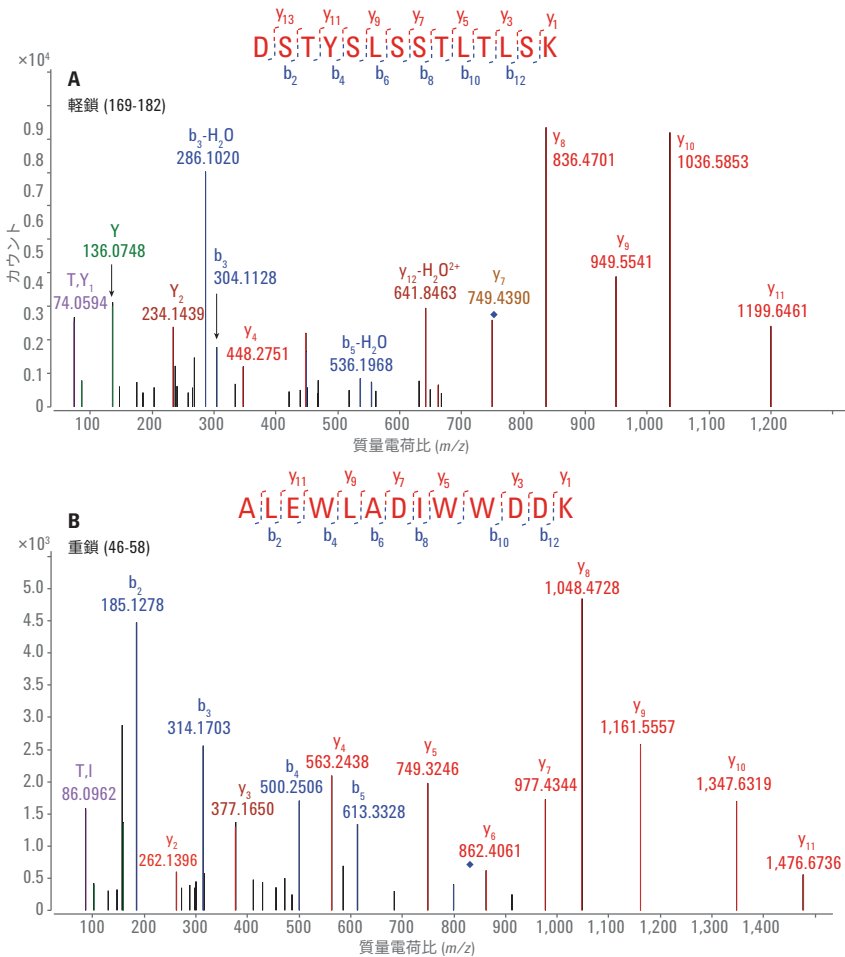


図 4. 分解 NIST mAb で得られたペプチドの代表的な MS/MS スペクトル。A) 軽鎖ペプチド、B) 重鎖ペプチド。

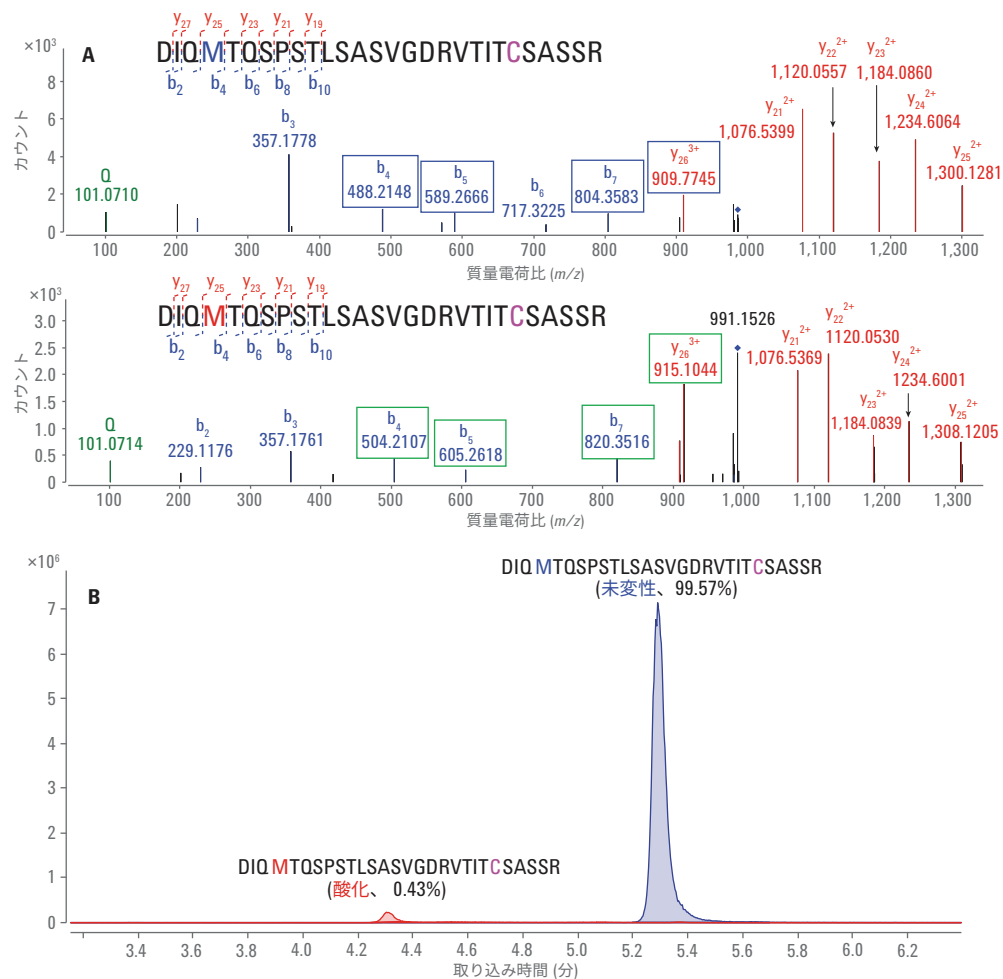


図 5. A) 翻訳後修飾 (メチオニン酸化) の解析。未変性ペプチドと Met 酸化ペプチドの MS/MS スペクトル (軽鎖ペプチド 1-28)。上段: 未変性ペプチド、下段: Met 4 位置で酸化 (緑のボックス)。B) 未変性ペプチド (青) および酸化ペプチド (赤) の ECC の重ね表示と相対定量分析 (軽鎖ペプチド 1-28)。

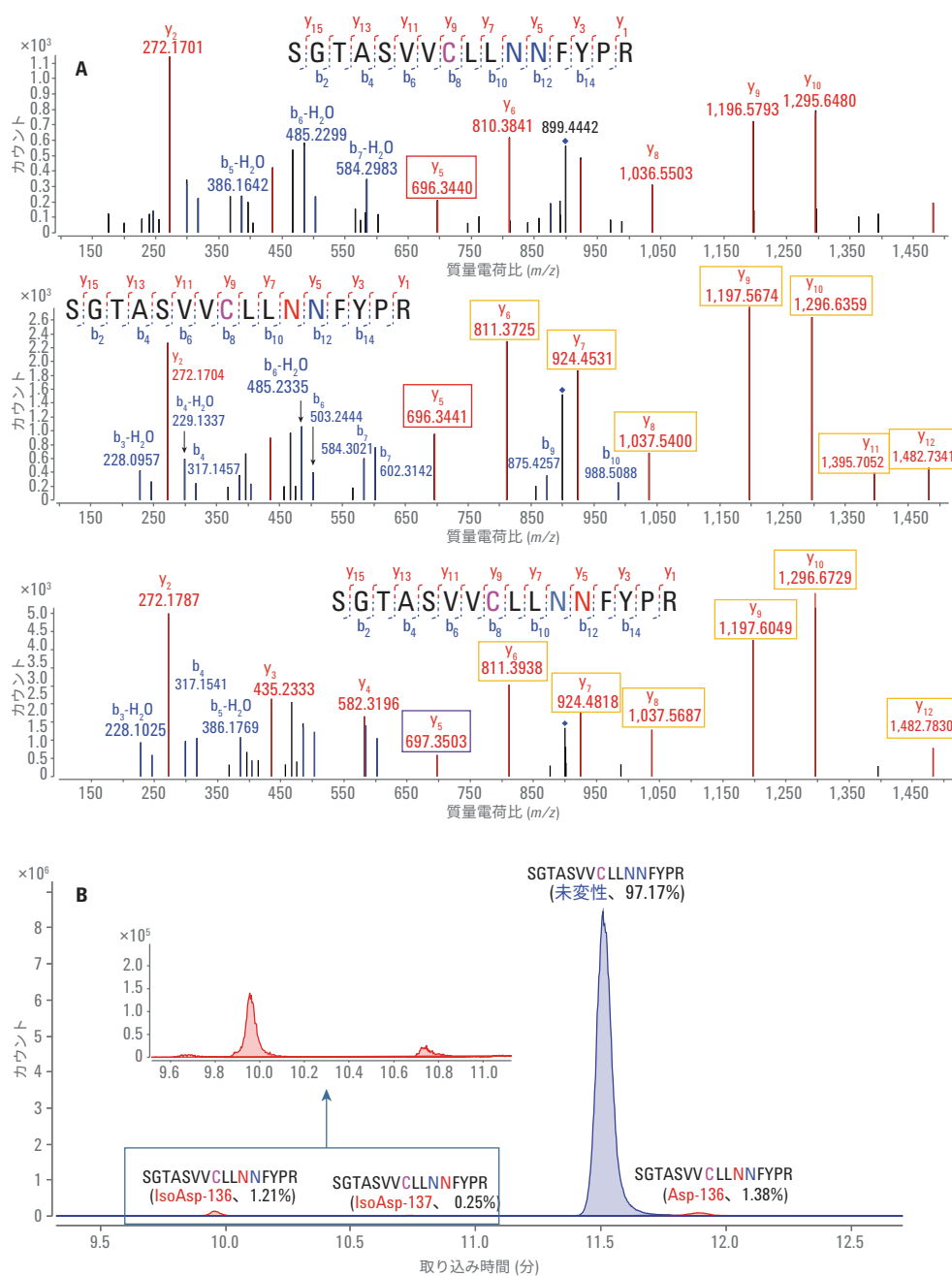


図 6. A) 翻訳後修飾 (脱アミド化) の解析。未変性ペプチドと脱アミド化ペプチドの MS/MS スペクトル (軽鎖: 126-141)。上段: 未変性ペプチド、中段: Asn 136 位置で脱アミド化、下段: Asn 137 位置でアミド化。B) 未変性ペプチドおよび脱アミド化ペプチドの ECC の重ね表示と相対定量分析 (軽鎖: 126-141)。差し込み図: IsoAsp-136 および IsoAsp-137 の拡大図。

mAb のタンパク質配列カバー率と分解したサンプル量の関係も調査しました。表 3 に、さまざまなサンプル濃度で調製した NIST mAb のタンパク質配列カバー率をまとめます。全体として、タンパク質のサンプル量にかかわらず、分析した (n = 8) どの NIST mAb 分解物についても 95 % 以上のタンパク質配列カバー率が得られました。図 7 は、代表的なペプチドマッピング結果とタンパク質配列カバー率を示す BioConfirm B.08 ソフトウェアの画面です。

表3. さまざまなサンプル量の酵素分解 NIST mAb の配列カバー率のまとめ

分解した サンプル量 (μg)	NIST mAb 分解物 (繰り返し回数)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	平均
100	96 %	96 %	96 %	95 %	96 %	96 %	95 %	97 %	96 %
50	96 %	96 %	97 %	96 %	96 %	97 %	96 %	96 %	96 %
10	97 %	97 %	97 %	97 %	97 %	97 %	98 %	98 %	97 %
05	97 %	93 %	97 %	97 %	94 %	94 %	97 %	94 %	95 %

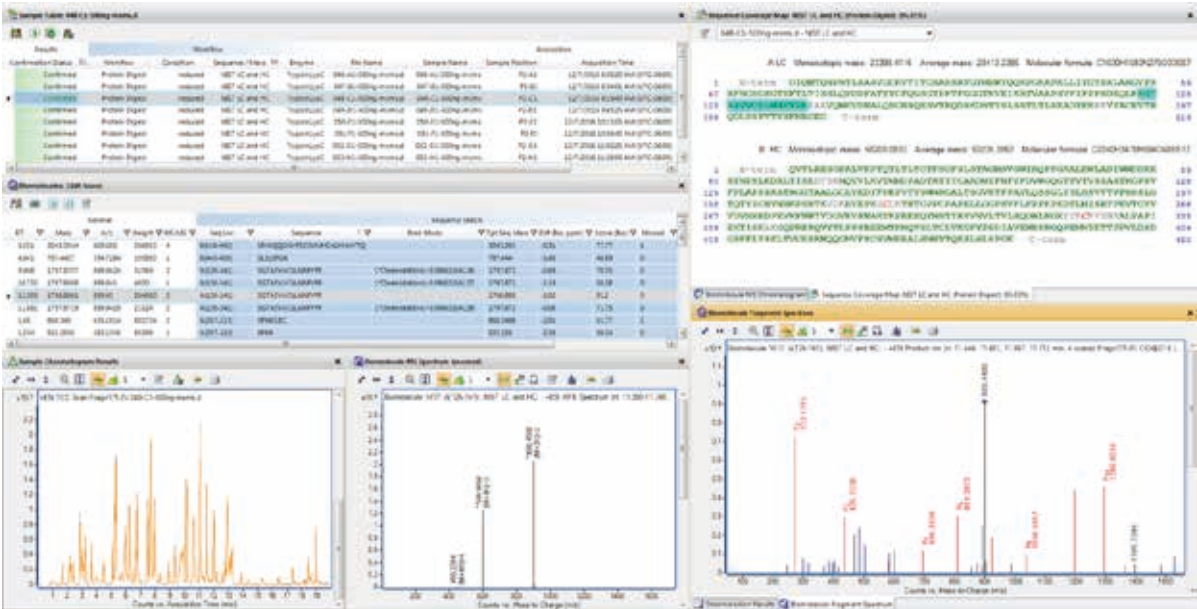


図 7. 代表的なペプチドマッピング結果とタンパク質配列カバー率を示す Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアのスクリーンショット

翻訳後修飾の解析

タンパク質のメチオニン酸化とアスパラギン脱アミド化は、最も頻繁に生じる、生物学的に重要な PTM です。メチオニン (Met) は硫黄を含むアミノ酸で、特に活性酸素種によって酸化されやすい性質を持っています。一般に、Met 酸化の特性解析は、mAb にもとづく治療薬の開発においてきわめて重要になります。

今回の調査で得られたペプチドマッピングの結果では、Met 4 を含む NIST mAb 軽鎖ペプチド 1-28 が部分的に酸化されていることが確認されました。図 5A は、未変性 (プリカーサ m/z 985.8097、+3) と Met 酸化ペプチド (プリカーサ m/z 991.1414、+3) の MS/MS スペクトルを比較したものです。 $b_4 \sim b_7$ のフラグメントイオン (緑のボックス) に大きな差 (+16 Da) が現れていることから、未変性種と修飾形態を明確に区別することができます。これは、修飾が生じている具体的な位置を示します。また、MS データは各ペプチド種の相対量を示し、酸化形態はペプチドの約 0.43 %、未変性形態は約 99.57 % であることがわかります (図 5B)。

もう 1 つの一般的 PTM である脱アミド化では、酵素によらない自発的な反応によってアミド基の除去とカルボキシル基への置換が起こることでアスパラギンまたはグルタミンが修飾

されます。通常、アスパラギンはアスパラギン酸 (Asp) またはイソアスパラギン酸 (IsoAsp) に変換されます。脱アミド化の速度は、一次配列およびタンパク質構造の他、pH、温度、イオン強度など溶液の特性に左右されます³。

今回実施した分析では、MS/MS スペクトルにより、NIST mAb の軽鎖ペプチド 126-141 について 3 種類の脱アミド化形態がそれぞれ異なるリテンションタイムで検出されました。図 6A は、未変性ペプチドと脱アミド化ペプチドの MS/MS スペクトルです。より高い質量範囲では y 系列のフラグメントが支配的イオンとなり、より低い質量範囲では b 系列のフラグメントが支配的イオンとなっています。 $y_6 \sim y_{12}$ のどのフラグメントイオン (オレンジのボックス) でも、0.98 Da という特徴的なマスシフトが生じています。これは、ペプチドのこの領域で脱アミド化が起きていることを明確に示しています。また、中段パネルの y_6 イオン (赤のボックス) が未変性形態 (上段パネル) と同じであることから、このペプチドに対する脱アミド化が Asn 137 ではなく Asn 136 で起きていることがわかります。これに対し、下段パネルの y_6 イオン (紫のボックス) は、質量が未変性配列より 0.98 Da だけ高くなっていることから、このペプチド群では Asn 137 位置で脱アミド化が起きていることを確認できます。

MS データの定量分析により、この軽鎖 126-141 ペプチドの脱アミド化動態について非常に多くの情報が明らかになりました。今回の調査では、未変性の未修飾形態のペプチドがサンプルの 97.17 % を占め、3 種類の脱アミド化変異体がそれぞれ異なる割合 (IsoAsp-136 が 1.21 %、IsoAsp-137 が 0.25 %、Asp-136 が 1.38 %) で観察されました。これらの結果を図 6B にまとめます。注目すべきは、このような位置特異的な PTM の情報と各修飾の相対的な定量が治療薬 (mAb) の開発においてきわめて重要になる点です。この統合ワークフローを用いることで、これらの情報が容易に得られます。ペプチドマッピングのワークフローは非常に複雑です。LC/MS で測定するサンプルを精密に還元、アルキル化、分解、脱塩するためには多数のサンプル前処理ステップを踏まなければなりません。そのため、この種の定量分析には、ロボットによる再現性の高いサンプル前処理がきわめて有効です。それを容易に自動化できるのが AssayMAP 液体ハンドリングシステムです。

自動ペプチドマッピングワークフローが 結果の再現性を向上

この自動ワークフローソリューションでは、実験規模を容易に拡大・縮小し、あらゆるサンプル数に対応することができます。今回の調査では、このシステムの精度と再現性を評価するために、2つのレベルで繰り返し分析を実施しました。まず、同一の分解 mAb サンプルを同じウェルから8回注入し、LC/MS システムの定量再現性を評価しました。次に、別々のウェルで変性、分解、精製した8回の繰り返し mAb サンプルを個別に注入して分析しまし

た。この実験では、すべての定量測定に 6550 Q-TOF LC/MS/MS 機器の MS のみモードを用い、5 µg の mAb から調製したサンプルについて、切断ミスのない 28 種類のペプチドを EIC により定量しました。同一サンプルの LC/MS 注入の繰り返し (図 8A および図 8B) およびサンプル前処理の繰り返し (図 8C および図 8D) から得られた代表的な ペプチド 2 種類の EIC の重ね表示を示します。定量したペプチド 28 種類のうち、17 種類は変動係数 (CV) が 10 % 未満 (平均 6 %)、7 種類は 10 ~ 20 % (平均 15 %)、4 種類は 20 % を超えました (図 8E)。こ

れらの結果は、AssayMAP によるペプチドマッピングの調査で報告されている他の結果⁴と一致しています。

今回の調査では取り上げていませんが、AssayMAP アフィニティ精製アプリケーションと Protein A、Protein G、またはストレプトアビジン アフィニティカートリッジを用いてこのワークフローを拡張し、増殖培地、血漿、その他複雑なマトリックス中に懸濁したサンプルに対応することも可能です。

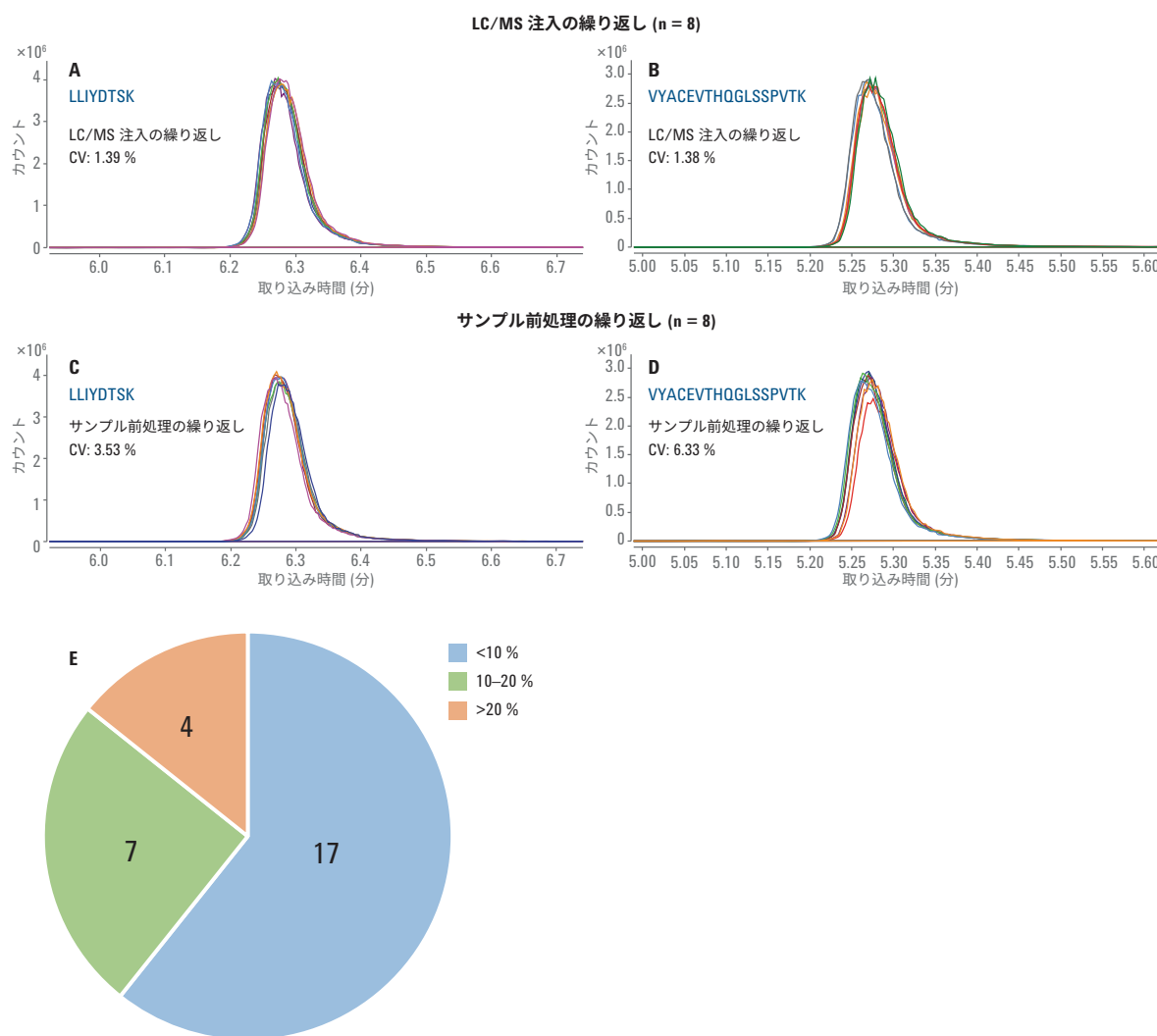


図 8. NIST mAb 5 µg から分解した代表的なペプチドの EIC。A、B) 同一サンプルの LC/MS 注入の繰り返し (n = 8)。C、D) サンプル前処理の全ステップの繰り返し (n = 8)。E) CV が 10 % 未満、10 ~ 20 %、20 % を超えたペプチドの数を表す円グラフ。

結論

アジレントのペプチドマッピングワークフローソリューションに統合されている最新の液体ハンドリングロボティクス、高性能のクロマトグラフィー技術、精密質量 Q-TOF LC/MS、およびパワフルなソフトウェアにより、mAb 生物製剤の開発においてきわめて重要となる複雑なプロセスを自動化し、効率化することができます。このワークフローでは次の製品を使用しています。

- Agilent AssayMAP Bravo システム。酵素分解およびサンプル精製を優れた再現性で自動化することができます。
- 卓越した LC 分離能を備えた Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム。高速分離を実現し、ラボの分析効率を高めます。
- 精度および感度に優れた Agilent 6550 Q-TOF LC/MS/MS システム。偏りのないペプチドマッピングデータが得られ、モノクローナル抗体のタンパク質配列を包括的にカバーすることができます。
- Agilent MassHunter BioConfirm データ解析ソフトウェア。自動でデータの抽出、配列の照合、PTM の同定、および配列カバー率の計算を実行します。

参考文献

1. Greer, F. M. MS Analysis of BioPharmaceutical Products. *Innovation in Pharmaceutical Technology* **2001**, 83-90.
2. High Resolution and Rapid Peptide Mapping of Monoclonal Antibody Using an Agilent 1290 Infinity UHPLC and an Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS System, *Agilent Technologies*, publication number 5991-3600EN.
3. Robinson, N. E. Protein Deamidation. *PNAS* **2002**, 99(8), 5283-5288.
4. Automation for LC/MS Sample Preparation: High Throughput In-Solution Digestion and Peptide Cleanup Enabled by the Agilent AssayMAP Bravo Platform, *Agilent Technologies*, publication number 5991-2957EN.

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 8, 2017
5991-7811JAJP



Agilent Technologies