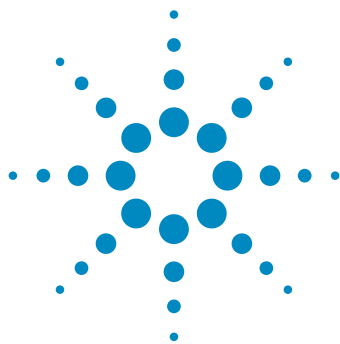




LC/Q-TOF によるサブナノグラムレベルの インタクトモノクローナル抗体の定量

アプリケーションノート

著者

Alex Zhu, David Wong, and Aaron Boice

はじめに

バイオ医薬品の定量には、酵素によって分解されたサンプルからの署名ペプチドに焦点を当てたターゲットマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 手法がよく使用されます。この手法は最高レベルの分析感度を提供しますが、一方で2つの重要な制限があります。予想されていない分子種の観測ができず、サンプルハンドリングによって不自然な結果が生じる可能性があります。インタクトタンパク質レベルの定量ではこれらの制限は問題になりませんが、分析感度と再現性に関しては分離の課題に直面します。この調査では、クロマトグラフィーにおける最新の進展と高性能 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を使用して、優れた直線ダイナミックレンジを拡張する高い感度と再現性での定量分析メソッドを確立します。



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



Agilent Technologies

分析条件

試薬および薬品

製剤化されたトラスツズマブモノクローナル抗体 (mAb) 標準は Genentech 社 (米国、カリフォルニア州、サウスサンフランシスコ) から調達しました。ウシ血清アルブミン (BSA) とギ酸 (FA) は Sigma-Aldrich 社から調達しました。

試料調製

グリコシル化トラスツズマブの濃度 24 µg/µL の原液を 0.01 % BSA (w/v) と 0.1 % FA を含む超純水で希釈し、0.01 ng/µL ~ 100 ng/µL の範囲をカバーしました。希釈比は 1:3.162、つまり 10 の平方根で一定で希釈レベルに応じて半分の次数になります。

装置とソフトウェア

分離には次の機器で構成される Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプラ (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II サーモスタット付カラムコンパートメント (G7116B)

UHPLC システムを、デュアル Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン源を搭載した Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF システムに接続しました。Agilent MassHunter Acquisition (B.08.01) ワークステーションソフトウェアの高分子 SWARM オートチューン機能を使用してデータを取り込みました。データ解析には、Agilent MassHunter BioConfirm (B.08.00) と Agilent MassHunter Quantitative Analysis (B.08.00) を使用しました。

メソッド

表 1 に Agilent 1290 Infinity II UHPLC の条件を示します。0.9 分のストップフロー期間を含むグラジエントメソッドを使用しました。表 2 に質量分析システムの条件を示します。SWARM オートチューンを使用して高分子の移送と検出を最適化しました。

表1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC の条件。

LC 条件		
カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl 1.8 µm、2.1 × 50 mm、857750-944	
カラム温度	80 ° C	
注入量	1 µL	
マルチサンプラ温度	4 °C	
マルチウォッシュ	30 秒の 90/10 ACN/H ₂ O、その後 10 秒のグラジエント開始溶媒	
移動相	A) H ₂ O、0.1 % ギ酸 B) 90/10 アセトニトリル/H ₂ O、0.1 % ギ酸	
流量	0.500 mL/min	
グラジエント	0.0 分	34.6 % B
	0.1 ~ 1.0 分	0.9 分間のフロー停止
	2.0 分	34.6 % B
	3 分	90 % B
ストップタイム	4 分	
ポストタイム	1.5 分	
分析時間	~ 6.5 分 (注入時間を含む)	

表2. Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF のメソッドパラメータ。

パラメータ	設定
イオンモード	AJS、ポジティブ
ガス温度	290 ° C
乾燥ガス流量	13 L/min
ネブライザガス	45 psi
シースガス温度	380 ° C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	5,500 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ	380 V
質量範囲	600 ~ 5,000
CE	0
Quad AMU	350
取り込みレート	2 spec/s

結果と考察

分析感度

このメソッドでは 0.0316 ng までの量のインタクト mAb オンカラムの注入を検出できました。各ピークについて $\pm 2 m/z$ のエクストラクションウィンドウを用いて 3 種類の価数、12 種類のグリコフォームのピークのトータルを合計した抽出イオンクロマトグラム (EIC) を生成しました。図 1 は各希釈レベルでの 6 回の繰り返し注入の抽出の重ね表示です。各レベルでのデコンボリュートしたスペクトルからスペクトル結果に一貫性があることが示されました。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の優れたインタクトタンパク質感度は、高分子用に最適化する SWARM オートチューン機能との組み合わせ時に十分に発揮される光学、真空、ヒータシステムのさまざまなデザイン性能により実現できます。ここでは示していませんが、この実験はイオンサンプリングを最大にするヘキサポアキャピラリデザインを特長とする Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システムでも実行しました。6545XT はシングルポアキャピラリデザインを採用していますが、6550 よりも 4 倍以上高い感度を達成できます。

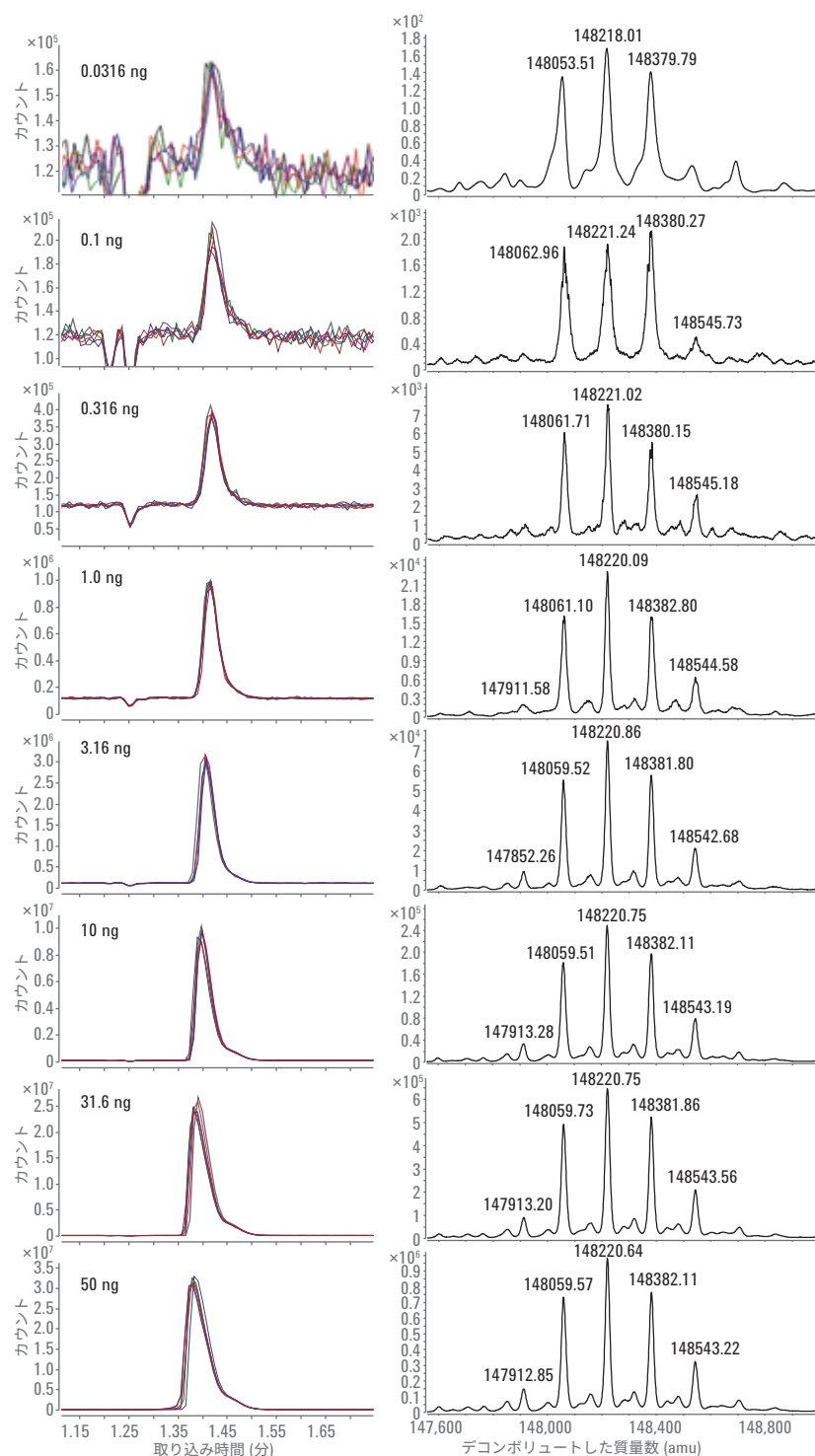


図 1. すべての希釈レベルでのクロマトグラフィーレスポンスの再現性。

再現性

ピークレスポンスの再現性も 10 ng の 100 回のオンカラム注入にわたって評価しました。図 2 は、この実験の進行全体で得られた EIC ピーク面積をプロットしたものです。記録された面積、今回の実験の低濃度オンカラムにおいても 1.5 % RSD の精度レベルを示しています。この実験はレスポンス補正用の内部標準を一切用いずに実施しましたが、1290 Infinity II UHPLC の安定性と LC/Q-TOF の検出の安定性を反映する結果を示しました。

質量精度

同定の確認のために、BioConfirm で最大エントロピーアルゴリズムを使用してスペクトルデータのデコンボリューションを実行しました。連続的に 10 ng を 100 回繰り返し注入して、中性電荷質量を割り当てて質量精度の再現性を調べました。図 3 は、上位 2 つの強度の強いグリコフォームが 100 回注入にわたって記録された質量誤差を示しています。各データポイントは 10 ppm 質量誤差内に収まり、強度が上位 2 つのグリコフォームの平均質量誤差はそれぞれ -1.78 ppm と -5.68 ppm でした。同様に、誤差の標準偏差も優れ 2.0 ppm 未満を示しました。ばらつきが小さいことから、大規模な実験の基礎を確立できます。

直線ダイナミックレンジ

今回の調査の最終段階は、このメソッドによって可能になる、3.2 桁以上にわたって直線的レスポンスを示す直線ダイナミックレンジの確立です。LC/MS によるインタクトプロテイン分析の直線的レスポンスでは従来の低分子分析よりも制限があることが報告されています¹。このメソッドでは、直線的レスポンスは 0.0316 ng オンカラムから 50 ng オンカラムまで維持されていました。これは 3.2 桁の直線ダイナミックレンジを示し、現在発表されているどれよりも優れています。図 4 は、MassHunter Quantitative Analysis で作成された検量線を各レベルで取り込まれた繰り返し分析の統計値とともに示しています。

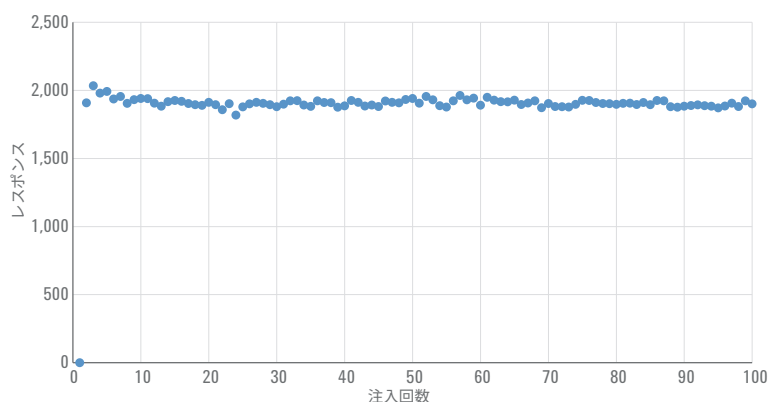


図 2. 10 ng オンカラムの 100 回注入にわたっての強度の再現性。

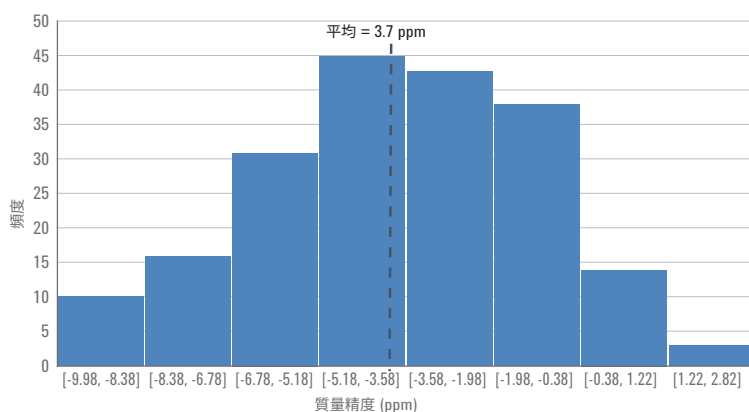


図 3. 上位 2 つのグリコフォームの 100 回の注入中で質量精度測定の結果のヒストグラム。

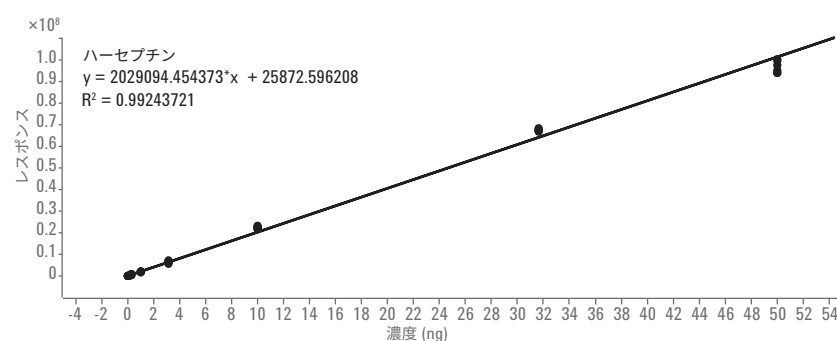


図 4. インタクトグリコシル化 mAb 分析で 3.2 桁の直線的レスポンスを示す検量線。

結論

このメソッドは、インタクトグリコシル化モノクローナル抗体の信頼性のある定量に必要となる、優れた分析感度と再現性と真度の組み合わせを示しています。SWARM オートチューンによる高分子分析のための Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の自動最適化により、検出限界とダイナミックレンジが Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システムよりも飛躍的に向上します。この再現性も、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムから得られる性能レベルに由来しています。数百回のサンプル注入を行い高精度な結果を得てインタクト mAb や他の分子量の大きい生体分子の大規模な定量分析のための基礎を築くことができます。

参考文献

1. van den Broek, I.; van Dongen, W. D. LC-MS-based quantification of intact proteins: perspective for clinical and bioanalytical applications. *Bioanalysis* **2015**, 7.15, 1943-1958.

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

5991-7814JAJP



Agilent Technologies