

モノクローナル抗体の化学的に誘導された 脱アミド化と酸化の定量

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF および
Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア

著者

Linfeng Wu
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

はじめに

アスパラギン (Asn) の脱アミド化、アスパラギン酸 (Asp) の異性化、メチオニン (Met) の酸化などの修飾は、遺伝子組み換え抗体の代表的な分解生成物です。過去の研究で、Asn、Asp、Met 残基の分解は、タンパク質の活性に影響を与える場合があることが示されています^{1~4}。このため、mAb などのタンパク質の新薬候補物質に見られるこれらの修飾は、重要品質特性 (CQA) であり、保管および製剤条件下で厳密にモニタリングされます。こうした修飾は多くの場合、薬剤開発中に実施されるストレスと強制分解の研究の中心となります。これらの CQA を評価するには、同定と定量を同時に実施する必要があります。

このアプリケーションノートでは、Agilent AssayMAP Bravo Platform、Agilent 1290 Infinity II LC、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアなどで構成される統合型ワークフロー (図 1) を用いたペプチドマッピングメソッドにより、遺伝子組み換え mAb の化学的に誘導された脱アミド化と酸化の同定と定量を同時に実施しました。



図 1. ペプチドマッピング用の統合ワークフロー

実験方法

材料

mAb1 サンプルは、サードパーティパートナーによって製造、精製された遺伝子組み換え CHO 培養 IgG1 mAb を用いました。NISTmAb は、米国国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。

装置構成

- Agilent AssayMAP Bravo システム (G5571AA)
- Agilent 1290 Infinity II LC システム (以下の機器で構成)
 - 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)、サンプル冷却システム (オプション #100) を搭載
 - Agilent 1290 Infinity II サーマスタット付カラムコンパートメント (G7116B)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6549A)
- Agilent Jet Stream デュアルエレクトロスプレーイオン (ESI) ソース (G1958-65268)

化学誘導とサンプル前処理

Asn の脱アミド化を有意なレベルに誘導するために、mAb1 サンプルをトリス-HCl バッファシステム (pH 8.7) 中に、高温 (37 °C) で 0 日、3 日、6 日、13 日間、暴露しました。Met の酸化を誘導するために、mAb1 および NISTmAb サンプルをさまざまな濃度の酸化剤 H₂O₂ (0 ~ 0.2 % v/v の範囲) を含むトリス-HCl バッファ中で一晩、室温でインキュベートしました。すべてのサンプルを、サンプル消化の前に、- 80 °C で凍結乾燥させて保管しました。

いずれのサンプルも AssayMAP Bravo Platform を用いて、還元、アルキル化、トリプシン消化、脱塩を行いました⁵。消化済みサンプルを LC/MS で分析しました。

LC/MS 分析

電荷表面を持つアジレントの逆相 C18 カラム (2.1 × 150 mm、2.7 μm) で、30 分のグラジエントを用いて LC 分離を実施しました (表

1)。6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF で生データを取り込みました (表 2)。

表 1. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

LC パラメータ	
分析カラム	電荷表面を持つアジレントの逆相 C18 カラム
移動相 A	H ₂ O、0.1 % 酢酸
移動相 B	90 % アセトニトリルおよび 0.1 % 酢酸水溶液
カラム温度	60 °C
流量	0.4 mL/min
グラジエント	0.0 分 - 3 %B 30.0 分 - 22 %B 32.0 分 - 90 %B 35.0 分 - 90 %B 37.0 分 - 3 %B
ストップタイム	40 分

表 2. MS パラメータ

パラメータ	設定値
機器	6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
ガス温度	325 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネブライザ	35 psig
ソースガス温度	275 °C
ソースガス流量	12 L/min
VCap	4,000 V
ノズル電圧	0 V
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	m/z 300 ~ 1,700
採取レート	8 スペクトル/秒
自動 MS/MS 範囲	m/z 50 ~ 1,700
最小 MS/MS 採取レート	3 スペクトル/秒
Isolation Width (選択幅)	ナロー (m/z 1.3)
プリカーサ/サイクル	上位 10
コリジョンエネルギー	荷電 2 の場合は 3.1*(m/z)/100+1 荷電 3 以上の場合は 3.6*(m/z)/100-4.8
MS/MS のスレッショールド	1,000 カウントと 0.001 %
ダイナミック排除オン	1 回繰り返して 0.2 分間排除
プリカーサアバウンダンススペースのスキャンスピード	あり
Target	25,000 カウント/スペクトル
MS/MS 累積時間制限を使用	あり
純度	100 % 厳重、30 % カットオフ
同位体モデル	ベプチド
プリカーサでのソート	荷電状態、アバウンダンスの順: +2、+3、>+3

データ処理

LC/MS/MS 分析で取り込んだデータを、MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアによって処理しました。化学的に誘導された脱アミド化の分析では、検索パラメータをトリプシン消化として、セミトリプシンペプチドおよび最大 2 つの切断ミスに対応できるように設定し、システイン (C) のアルキル化および N-末端 pyroGlu (E/Q) を含む固定修飾、アスパラギン (N) やグルタミン (Q) の脱アミド化、メチオニン (M) の酸化を含む可逆修飾の分析を可能にしました。質量許容範囲は、MS1 では 10 ppm、MS2 では 20 ppm です。ペプチドの長さは 5 ~ 60 アミノ酸 (AA) に制限しました。ペプチドスペクトルマッチは、MS/MS 機能を用いて、0.1 % の偽発見率 (FDR) でフィルタリングしました。化学的に誘導された酸化の研究では、検索パラメータを脱アミド化の研究の場合と同じ設定にしました。ただし、トリプトファン (W) の酸化 (+4 Da、+16 Da、または +32 Da) を追加しました⁶。

結果と考察

脱アミド化ペプチドの分離と同定

Asn の脱アミド化は、タンパク質とペプチドで一般的に観察される修飾の 1 つです。これは、バイオ医薬品の製造で、製造方法や保存方法に問題が生じる主な原因です。Asn 残基の脱アミド化の原因には、加水分解による Asp の形成と、環状スクシンイミド中間体によるアスパラギン酸またはイソアスパラギン酸の形成があります。脱アミノ化ではシフトがわずかに 0.984 Da のため、異なる種類が共溶出する場合、脱アミノ化とアスパラギン酸の異性化の正確な同定と定量が、困難になることがあります。

定常 CH3 領域中の Asn の脱アミド化は、溶媒露出として同定され化学的劣化に大きく影響することが、これまでのレポート^{3, 4}で示されています。この領域 (重鎖のシーケンス位置 376-397、GFYPSDIAVEWESN₃₈₉GQPEN₃₉₄N₃₉₅YK) と一致する PENNY ペプチドは、3

個の Asn 残基があり、高 pH に暴露される条件下で脱アミド化に対してそれぞれ異なる反応性を持っています。このペプチドを用いて、アジレントのペプチドマッピングワークフローにより、Asn 脱アミド化および Asp 異性化の同定と定量を同時に実施しました。

図 2 に、30 分の LC グラジエントを用いたさまざまな翻訳後修飾 (PTM) 型の PENNY ペプチドについて抽出化合物クロマトグラム (ECC) を示します。未修飾の野生型 (WT) ペプチド、N₃₈₉ Asn 脱アミド化/Asp 異性化、2 か所の脱アミド化/Asp 異性体など、7 種類の異なる PENNY ペプチド型を示しています。この図から、すべての種類が 6 分間の時間枠内に分離されて存在し、修飾型と未修飾型が十分に分離されていることがわかります。

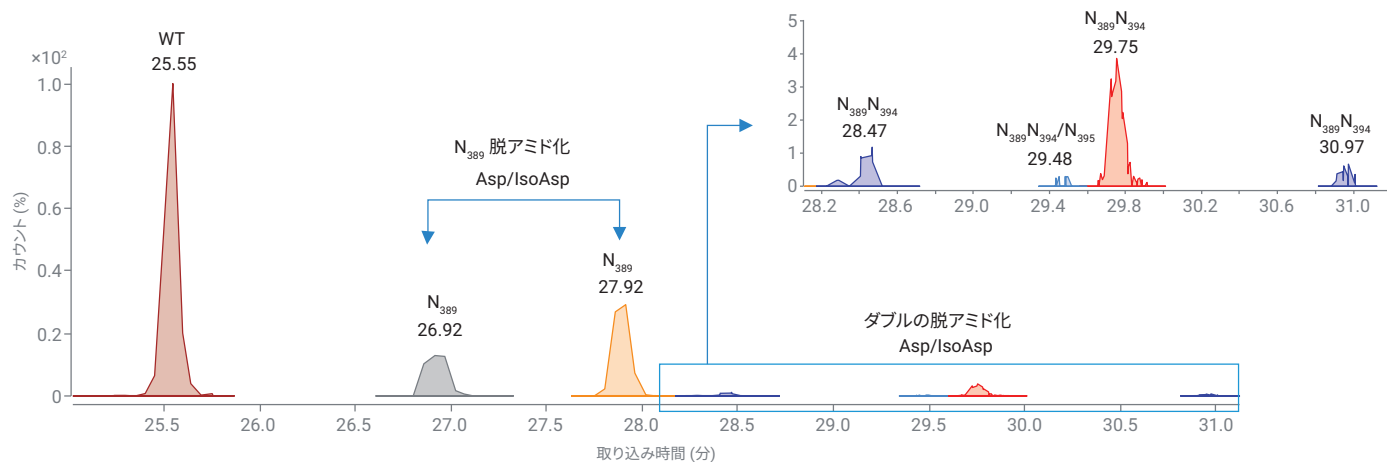


図 2. 電荷表面を持つ逆相 C18 カラムにおいて、30 分の LC グラジエントを用いた Asn 脱アミド化、Asp 異性化、野生型の GFYPSDIAVEWESN₃₈₉GQPEN₃₉₄N₃₉₅YK ペプチドの ECC

MassHunter BioConfirm ソフトウェアは、PTM 解析のための使いやすいインタフェースを備えています (図 3)。このソフトウェアの機能を使用して、生体分子テーブルから目的のペプチドをいくつか選択し、MS/MS スペクトルを並べて比較することができます。図 4 に、BioConfirm ソフトウェアを用い、PENNY ペプチドの野生型 (WT, RT = 25.55 分) と 2 か所の脱アミド化型 (N₃₈₉、N₃₉₄, RT = 30.97 分) の MS/MS スペクトルを比較して示します。フラグメントイオンを詳細に比較するために、ス

ペクトルを同期して拡大表示できます。y₃ プロダクトイオンは WT と脱アミド化型のいずれでも同じ m/z を示しており、N₃₉₅ での脱アミド化がないことが確認できます。脱アミド化ペプチドで y₆ プロダクトイオンは +1 Da の質量シフト、y₁₀ プロダクトイオンは +2 Da の質量シフトがあり、その 2 か所の脱アミド化位置は N₃₈₉ と N₃₉₄ であることがわかります。

図 2 で示したペプチド型のすべての MS/MS スペクトルを、脱アミド化の位置を検証するために確認しました。ほぼすべての脱アミド化型を、脱アミド化位置とともに明確に同定しました。例外は、リテンションタイムが 29.48 分の 2 か所の脱アミド化型 (N₃₈₉、N₃₉₄/N₃₉₅) で、N₃₉₄ または N₃₉₅ の両義に取れる Asn 脱アミド化位置となっていることです。

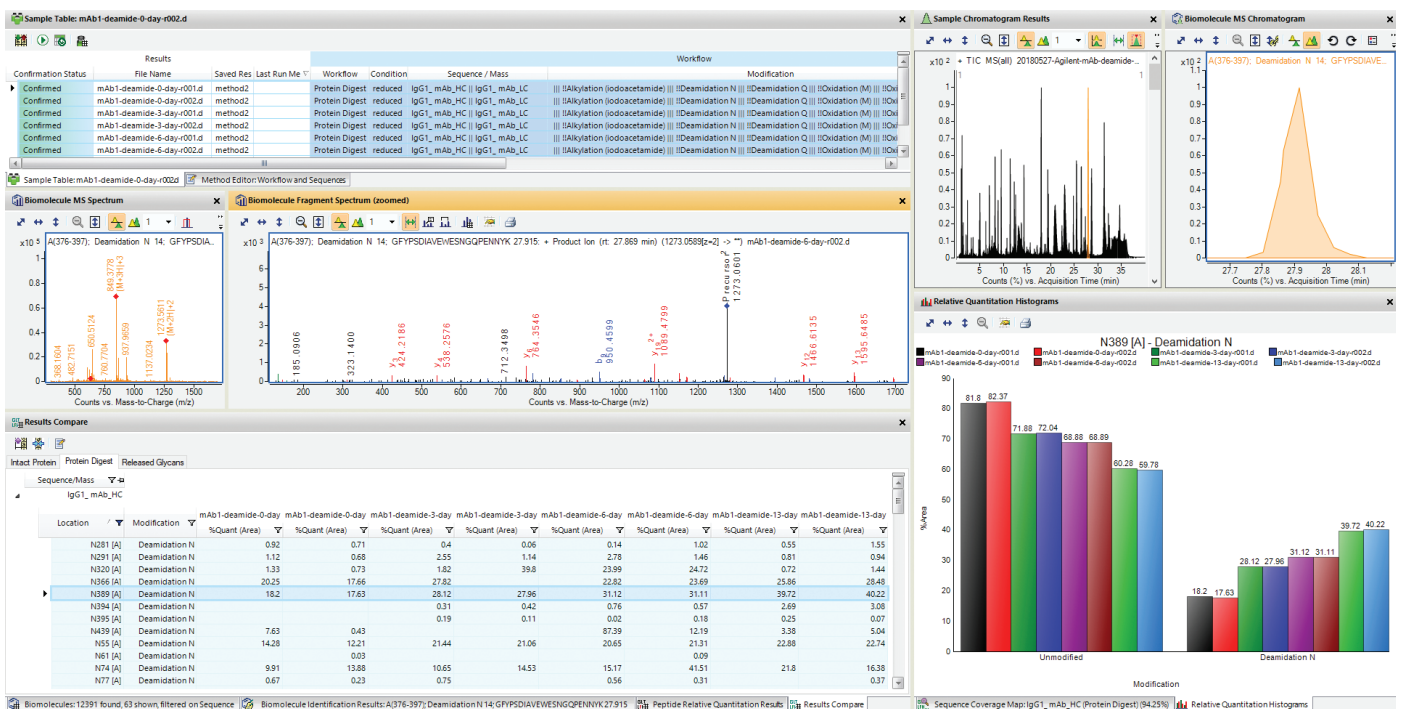


図 3. MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアによる PTM の同定および定量のスクリーンショット

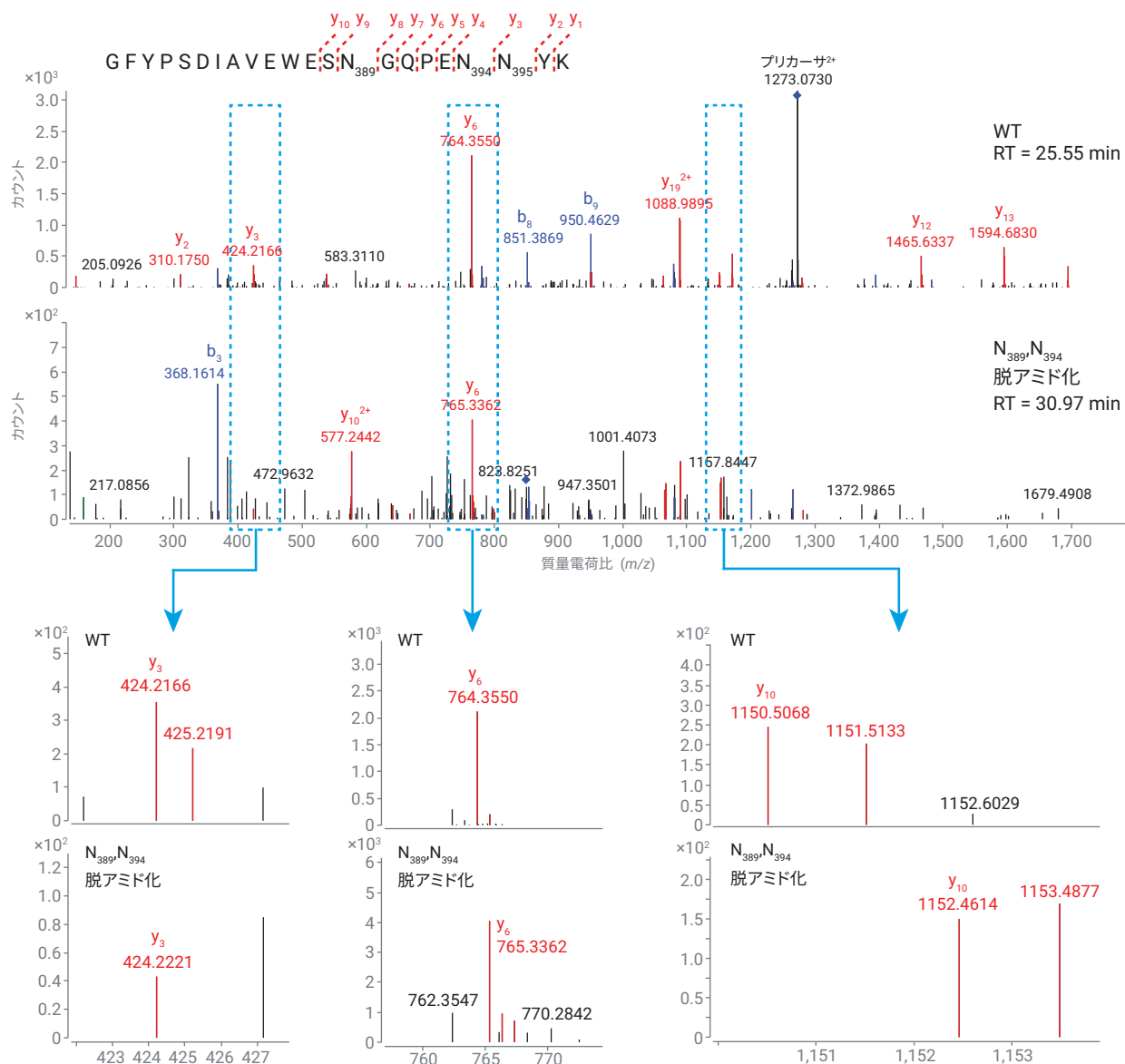


図 4. MassHunter BioConfirm ソフトウェアによるペプチド GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK の野生型と 2 か所の脱アミド化型 (N_{389}, N_{394} , RT = 30.97 分) の MS/MS スペクトルの比較。PTM 位置についてさまざまな特徴を持つフラグメントイオンを詳細に比較するための拡大図

脱アミド化の定量

MassHunter BioConfirm ソフトウェアでは、修飾を持つすべての残基の PTM の割合を、一連のサンプルにわたって定量できます。修飾型と未修飾型の和に対する修飾ペプチドの % ピーク面積 (またはオプションとして % ピーク高) が計算されます。また、比較結果の概要を表形式で表示できます (図 5)。この Results Compare テーブルから、全サンプルにおける修飾残基すべての PTM 定量結果の概要がわかります。BioConfirm では、Results Compare テーブルの表示に加え、ヒストグラムによる定量結果の視覚化も可能です。修飾済み残基のヒストグラムを表示するには、Results Compare テーブル中の目的の残基を含む行をクリックするだけです。

Sequence/Mass		mAb1-deamide-0-day-r001.d				mAb1-deamide-3-day-r001.d				mAb1-deamide-6-day-r001.d				mAb1-deamide-13-day-r001.d			
Location	Modification	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	%Quant (Area)	
Sequence/Mass																	
IgG1_mAb_HC																	
N104 [A]	Deamidation N	97.7		53.22				18.19							23.41		
N206 [A]	Deamidation N	7.25						2.84							0.28		
N208 [A]	Deamidation N	7.25		15				6.49							7.96		
N213 [A]	Deamidation N			0.37													
N281 [A]	Deamidation N	0.93		19.38				2.95							14.37		
N291 [A]	Deamidation N	1.13		2.57				2.81							0.82		
N320 [A]	Deamidation N	0.66		0.9				24.16							38.89		
N366 [A]	Deamidation N	20.25		27.82				22.82							25.86		
N389 [A]	Deamidation N	18.27		28.27				31.22							39.73		
N394 [A]	Deamidation N			0.32				0.77							2.69		
N395 [A]	Deamidation N			0.2				0.02							0.2		
N426 [A]	Deamidation N	78.89		79.32				5.09							91.17		
N439 [A]	Deamidation N	89.32		8.73				87.36							7.88		
N55 [A]	Deamidation N	14.31		21.51				20.65							22.88		
N74 [A]	Deamidation N	9.91		10.65				15.17							21.8		
N77 [A]	Deamidation N	0.67		0.75				0.56									
N84 [A]	Deamidation N	1.74		3.19				2.69							3.69		
Sequence/Mass																	
IgG1_mAb_LC																	
N142 [B]	Deamidation N	2.07		2.19				3.89							2.25		
N143 [B]	Deamidation N	0.19		1.69											0.46		
N157 [B]	Deamidation N	0.53															
N163 [B]	Deamidation N	0.21						0.44							0.16		
N215 [B]	Deamidation N							0.28									
N58 [B]	Deamidation N	0.12		0.71				0.29							0.58		

図 5. PTM 定量の Results Compare テーブル。指定の日数にわたり、高 pH 条件に暴露した mAb1 重鎖および軽鎖での Asn 脱アミド化の定量的比較を示しています。

図 6 は、BioConfirm による、高 pH 条件下で指定の日数の間暴露した mAb1 重鎖の 3 種類の Asn 脱アミド化 (N₃₈₉、N₃₉₄、N₃₉₅) の定量のヒストグラムを示します。日数別に、2 つのテクニカルレプリケートを実行しました。N₃₈₉ は用いた 3 種類の残基の中で脱アミド化レベルが最大です。他のグループにおいてもこれと同様の結果が得られており、Asn の C-末端の Gly では他の残基よりも脱アミド化率が高いことが分かります。また、C 末端の芳香族環を含む大きな疎水性残基は一般的に、きわめて低速の脱アミド化と相関付けられます^{7, 8}。N₃₉₄ または N₃₉₅ の脱アミド化位置が不明確な場合があるため、データ解析でこの 2 か所での脱アミド化の定量を組み合わせることを考慮する必要があります。

ペプチドマッピングワークフローでは、治療用タンパク質を最初に消化してペプチドフラグメントを生成しますが、これにより不完全な消化が生じる場合があります。サンプル消化は複雑なため、PTM 定量で使用されるペプチド型を検査する必要があります。BioConfirm ソフトウェアは、Peptide Relative Quantitation Results というタイトルの表を作成して、すべての修飾残基と対応するペプチドを各データファイルからリスト表示します (図 7)。図 7 に、8 つのデータファイルにある mAb 重鎖の N₃₈₉ の脱アミド化の定量を示します。データファイル内で同定される対応ペプチドすべてを表示するには、最新データファイルのサブテーブルを展開します。PTM 定量に用いられるペプチド型を自動的に決定するために、BioConfirm はタンパク質消化と PTM 分析に関連する一連のルールを適用します。また、**Use for %Quant** チェックボックスをクリックすることによって、ペプチド選択を調整できます。計算された %Quant、Results Compare テーブル、ヒストグラムは、更新された定量結果と即座に同期します。

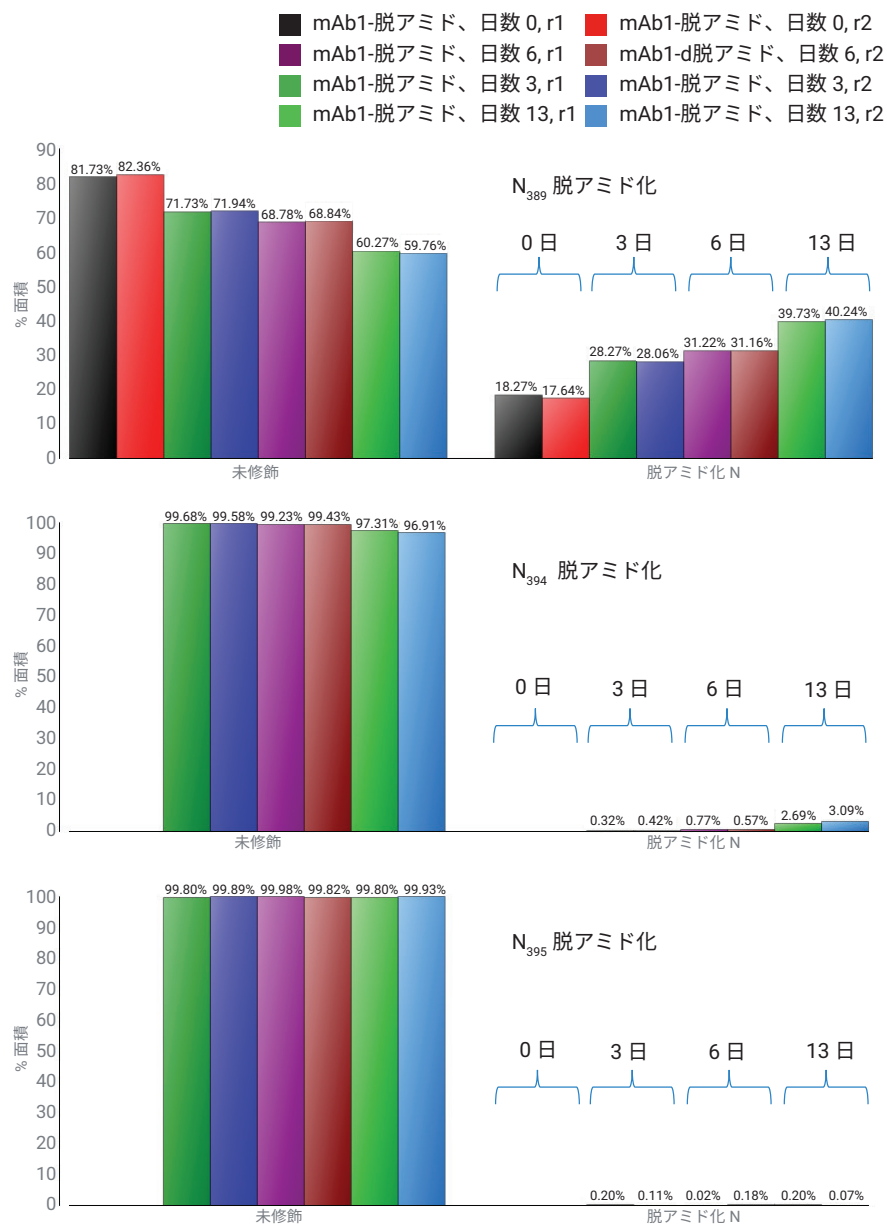


図 6. MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いた、指定の日数の間、高 pH 条件に暴露した mAb1 重鎖での 3 種類の Asn 脱アミド化 (N₃₈₉、N₃₉₄、N₃₉₅) の定量のヒストグラム。日数別に、2 つのテクニカルレプリケートを実行しました。

Seq Name	Location	Pred Mods	File	%Quant (Area)
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-0-day-r001.d	18.27
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-0-day-r002.d	17.64
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-3-day-r001.d	28.27
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-3-day-r002.d	28.06
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-6-day-r001.d	31.22
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-6-day-r002.d	31.16
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-13-day-r001.d	39.73
IgG1_mAb_HC	N389 [A]	Deamidation N	mAb1-deamide-13-day-r002.d	40.24

Sequence	Seq Loc	Pred Mods	RT	Use for %Quant	Area	Description
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)		25.546	<input checked="" type="checkbox"/>	2009991	Complete digest
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14	26.916	<input checked="" type="checkbox"/>	467513	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14	27.914	<input checked="" type="checkbox"/>	780187	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	28.467	<input checked="" type="checkbox"/>	21433	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 20	29.483	<input checked="" type="checkbox"/>	2197	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	29.753	<input checked="" type="checkbox"/>	73117	Complete digest, Predicted modifications
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	A(376-397)	Deamidation N 14, Deamidation N 19	30.973	<input checked="" type="checkbox"/>	9252	Complete digest, Predicted modifications

図 7. MassHunter BioConfirm での Peptide Relative Quantitation Results テーブルの一部のスクリーンショット

酸化の定量

2 つの mAbs (mAb1 と NISTmAb) 中の Met 酸化の度合いも、加速された酸化条件下で評価しました。例えば図 8 は、BioConfirm ソフトウェアを用いて、H₂O₂ 暴露の加速に対する mAb1 と NISTmAb の軽鎖 Met 4 (M4) の酸化の定量ヒストグラムを示しています。予想どおり、H₂O₂ 暴露の加速を受けて、両方の mAb の M4 での酸化の度合いが異なる酸化率で増大しました。

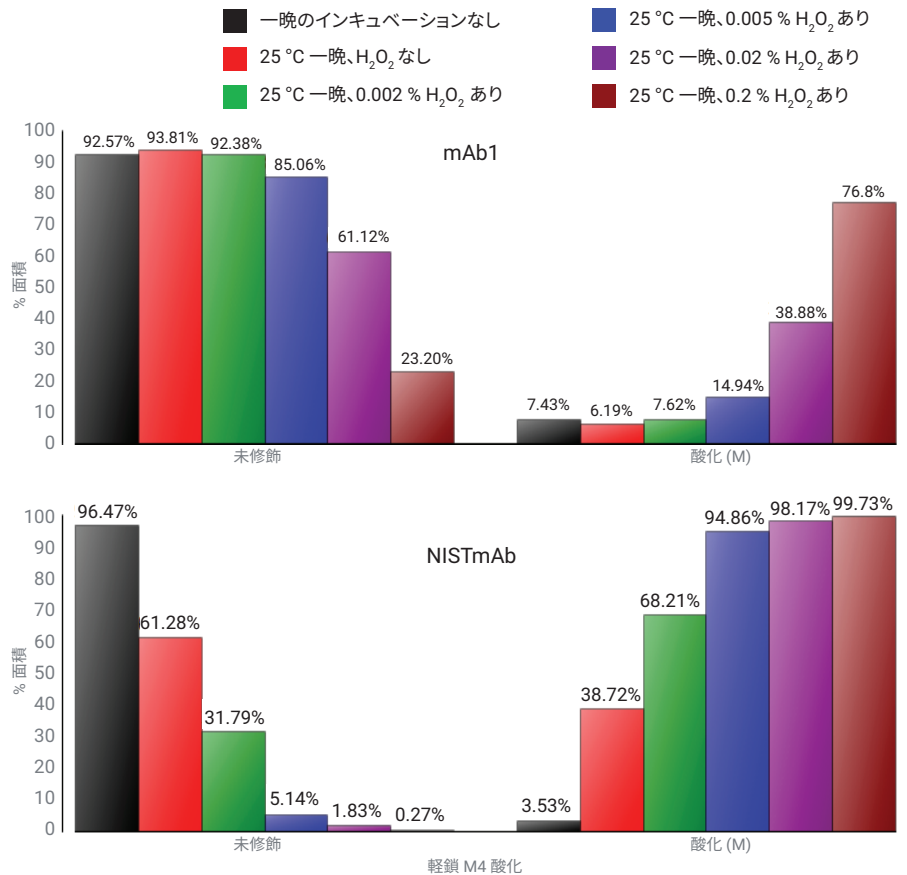


図 8. MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いた、加速された酸化条件下での mAb1 と NISTmAb の軽鎖の M4 酸化の定量のヒストグラム

結論

Agilent AssayMAP Bravo Platform による自動前処理、1290 Infinity II LC による LC 分離、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を用いたデータ取り込み、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いたデータ解析を含む統合型ワークフローを紹介しました。これにより、mAb での化学的に誘導される脱アミド化および酸化の同定と定量を同時に実施できます。MassHunter BioConfirm 10.0 ソフトウェアには次の機能があります。

- データのバッチ処理の自動化
- 統計スコアおよび FDR によるペプチドスペクトルの照合
- 結果のテーブルから質量スペクトルとクロマトグラムまでが連動したナビゲーション
- PTM の定量解析

上記の機能を組み合わせることにより、タンパク質バイオ医薬品の開発と製造におけるペプチドマッピングおよび PTM 定量のワークフローを強化することが可能です。

参考文献

1. Huang, L.; *et al.* In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. *Anal. Chem.* **2005**, *77*(5), 1432-1439.
2. Vlasak, J.; *et al.* Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody. *Anal. Biochem.* **2009**, *392*(2), 145-154.
3. Diepold, K.; *et al.* Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS following Incubation at Elevated Temperatures. *PLoS One* **2012**, *7*(1):e30295.
4. Habegger, M.; *et al.* Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies: Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. *MAbs.* **2014**, *6*(2), 327-339.
5. Automation of Sample Preparation for Accurate and Scalable Quantification and Characterization of Biotherapeutic Proteins Using the Agilent AssayMAP Bravo Platform. *Agilent Technologies*, publication number 5991-4872EN.
6. Folzer, E.; *et al.* Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule. *J. Pharma.Sci.* **2015**, *104*(9), 2824-2831.
7. Robinson, N. E.; Robinson, A. B.; Merrifield, R. B. Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides as primary structure models for peptide and protein deamidation. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*(6), 483-493.
8. Robinson, N. E.; Robinson, A. B. Prediction of primary structure deamidation rates of asparaginyl and glutaminyl peptides through steric and catalytic effects. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*(5), 437-448.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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. 2018

Printed in Japan, November 15, 2018

5994-0406JAJP

