

完全自動化のキャピラリー等電点電気泳動と 質量分析計によるモノクローナル抗体の 電荷変異体の同定

著者

Tony Wang, James Xia, and
Rena Wang
CMP Scientific Corp,
Brooklyn, NY, USA

Jens Meixner
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

このアプリケーションノートでは、ダイレクト質量分析法 (MS) によるモノクローナル抗体 (mAb) の電荷変異体の測定について解説します。ワークフローでは、CMP Scientific 社の EMAS-II キャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS) イオン源を搭載した Agilent 7100A CE システムを使用しました。MS は、Agilent 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS または Agilent 6545 Q-TOF LC/MS のいずれかで実施しました。

はじめに

mAb 治療用タンパク質は、脱アミド化、C 末端リジン、グリコシル化、リジン糖化、N 末端ピログルタミン酸などの翻訳後修飾の結果として、電荷不均一性を示します。等電点ゲル電気泳動、キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF)、イメージキャピラリー等電点電気泳動は、バイオ医薬品の電荷変異体のルーチン定量分析に使用されてきました。しかし、各電荷変異体の潜在的な種の MS 同定は、困難な課題となっています。CMP Scientific 社の EMASS-II CE/MS イオン源を Agilent 7100A CE システムおよび TOF/Q-TOF システムで用いて、ダイレクト MS による治療用 mAb 電荷変異体の同定を行う方法を説明します。

実験方法

サンプルと試薬

キャリア両性電解質、pH 範囲 3.0 ~ 10.0 の Pharmalyte、mAb 標準、SiLu Lite SigmaMAb 汎用抗体標準ヒト (カタログ番号 MSQC4-1MG) は、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。SigmaMAb の原液は 50 % グリセロール中で 5 mg/mL に調製し、-20 °C で保管しました。水、ギ酸、水酸化アンモニウム、アセトニトリル、メタノールを含む LC/MS グレードの試薬も Millipore-Sigma (バリーントン、マサチューセッツ州) から入手しました。

オンライン CIEF-MS の構成と試薬調整
オンライン CIEF-MS は、EMASS-II CE/MS イオン源 (CMP Scientific Corp、ブルックリン、ニューヨーク州、米国) を使用し、7100A CE システム (Agilent Technologies、サンタクララ、カリフォルニア州、米国) と 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS または 6545 Q-TOF LC/MS を組み合わせて実施しました。オンライン CIEF-MS 分析用のエレクトロスプレーのエミッタ (外径 1.0 mm、内径 0.75 mm、チップサイズ 30 µm) と、分離用の中性コーティング PS1 キャピラリー (外径 360 µm および内径 50 µm) は、CMP Scientific か

ら購入しました。陰極液は、15 % グリセロール (v/v) 溶液中の 0.2 N 水酸化アンモニウムでした。陽極液は、15 % グリセロール (v/v) 溶液中の 1 % ギ酸でした。ポジティブエレクトロスプレーイオン化電圧 (2.2 ~ 2.4 kV) は、EMASS-II イオン源に付属する外部ベンチトップ高電圧電源から供給しました。シース液は、20 % 酢酸、25 % アセトニトリル (v/v) でした。6230 および 6545 のキャピラリー電圧 (Vcap) はゼロボルトに設定しました。シングルボアのインラインナノスプレーシールドを用いて、MS からのドライガスをそらし、EMASS-II イオン源からのナノスプレーの干渉を最小限に抑えました。顕微鏡カメラで測定し、エミッタチップから MS までの距離を 3 ~ 4 mm に調整しました。サンプル (0.1 ~ 0.5 mg/mL) を、5 mM 酢酸アンモニウム、1 ~ 1.5 % 両性電解質、15 % グリセロールで調製しました。

サンプルの注入と分離

75 cm 長のキャピラリー (内径 50 µm) を用いて 950 mbar で 10 秒間、陰極液を注入した後、サンプル溶液の注入時間を 75 秒に設定しました。次に、キャピラリー注入口の端に正の CE 分離電圧 (18.8 kV) を印加して電気泳動を開始しました。キャピラリー注入口の定圧 (5 ~ 10 mbar) 印加により、流体力学的流れが生じ、分析時間が短縮されました。

MS パラメータ

Q-TOF キャピラリー電圧をゼロボルトに設定しました。ドライガスを 6 L/min、365 °C に、フラグメンタ電圧を 380 V に設定しました。Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (v B.09) を使用して、CE/MS メソッドの設定、データ取り込み、分析を実施しました。表 1 に、この CIEF-MS メソッドを示します。

表 1. CIEF-MS メソッドのパラメータ

パラメータ	設定値
キャピラリー電気泳動	7100A CE
質量分析計	6230 Accurate-Mss TOF LC/MS、6545 Q-TOF LC/MS
CE/MS 結合	CMP Scientific の EMASS-II CE/MS イオン源
分離キャピラリー	75 cm PS1 キャピラリー (CMP Scientific Corp)
陽極液	1 % ギ酸、15 % グリセロール
陰極液	0.2 N 水酸化アンモニウム、15 % グリセロール
シース液	20 % 酢酸、25 % アセトニトリル
サンプルバッファ	5 mM 酢酸アンモニウム、1 ~ 1.5 % Pharmalyte 3-10、15 % グリセロール
注入	フラッシュ、10 秒 (陰極液) フラッシュ、75 秒 (サンプル溶液)
分離	15.0 ~ 18.8 kV、5 ~ 10 mbar
エレクトロスプレーのエミッタ	30 µm チップサイズ (CMP Scientific Corp)
ESI 電圧	2.4 kV
エミッタから質量分析計までの距離	4 mm
キャピラリーの終端からエミッタチップまでの距離	0.8 mm
フラグメンタ電圧	380 V
Vcap	0 V
ドライガス流量	6 L/min
ドライガス温度	365 °C

結果と考察

完全自動化 CIEF-MS メソッドの原理

このオンライン CIEF-MS メソッドの詳細は、参考文献のセクションに挙げた資料に記載されています^{1~4}。簡単に説明すると、分離キャピラリー内に pH グラジエントを確立するために、最初に水酸化アンモニウムのスモールプラグをキャピラリー注入口から注入します (図 1、ステップ 1)。次に、両性電解質と混合したサンプルのロングプラグをキャピラリー注入口から注入します。サンプル溶液が水酸化アンモニウムプラグをキャピラリーの出口方向に押しやり、その後の等電点電気泳動のための陰極液の終端を形成します (図 1、ステップ 2)。pH グラジエントがキャピラリー内で形成される間、酸性のシース液が水酸化アンモニウムプラグを徐々に中和しました。モノクローナル抗体の場合、最適化された条件は 20 % 酢酸、25 % アセトニトリルです。陰極液が完全に消費されると、集束したタンパク質ゾーンがキャピラリーの出口に泳動し始めます。この泳動は、従来の 2 ステップ CIEF-MS メソッドの化学的移動と同じ原理に従っています (図 1、ステップ 3)。このため、集束 (キャピラリー内の水酸化アンモニウムによる) と移動 (酸性シース液によって完全に中和された水酸化アンモニウム) が連続的に起きます。これにより運用が大幅に簡素化され、電荷変異体の分析の成功率が最大に向上します。

塩基性タンパク質の混合物による Agilent-CMP CE/MS システムの性能の確認

少量のリゾチームとリボヌクレアーゼ A の混合物を注入することによって、Agilent-CMP CE/MS システムの性能を評価することを推奨します。サンプルを 0.1 mg/mL のリゾチームと 0.3 mg/mL のリボヌクレアーゼ A として 100 mM 酢酸アンモニウム、4 % 酢酸 (v/v) で調製します。バックグラウンド電解液は 10 % 酢酸 (v/v) です。シース液は、5 % 酢酸、10 % メタノール (v/v) です。サンプル注

入は 100 mbar、7 秒間です。分離電圧は 30 kV です。図 2 に、適切に稼働しているシステムにおいて、塩基性のタンパク質混合物のキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)-MS の結果を示します。両方のタンパク質ピークにおいて明らかなピークテーリングがないこと、リゾチームとリボヌクレアーゼ A の間の分離ウィンドウ

が 1 分以上であること、ピーク高が類似していること、ピーク幅が 30 秒未満であることなどの基準を調査する必要があります。

ステップ 1: NH₄OH プラグの注入



ステップ 2: タンパク質サンプルプラグ (両性電解質中) の注入



ステップ 3: 集束/移動



図 1. CIEF-MS メソッドの原理

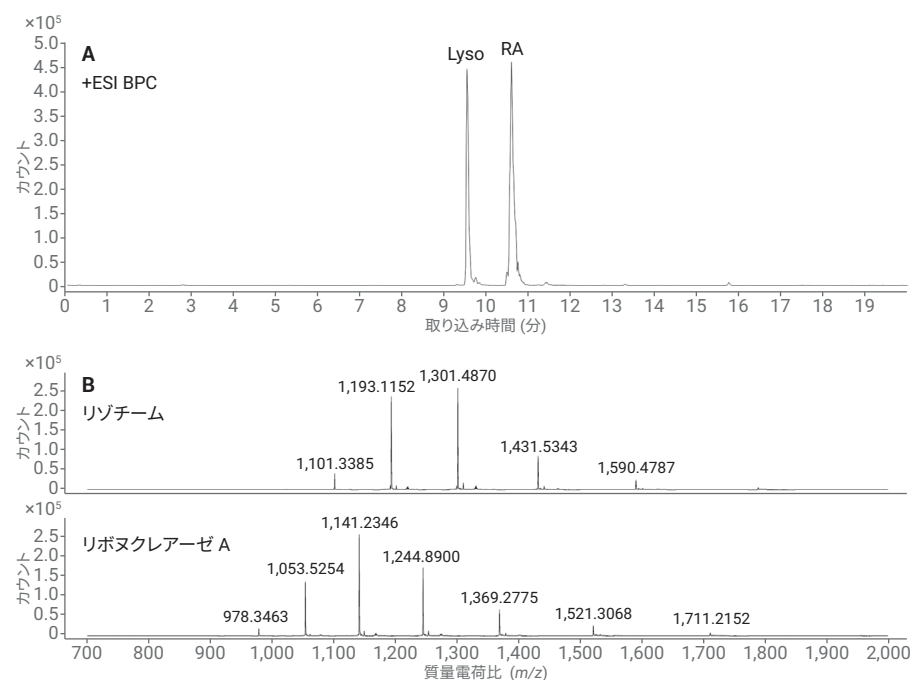


図 2. リゾチームとリボヌクレアーゼ A タンパク質の混合物による Agilent-CMP CE/MS システム性能の確認

モノクローナル抗体標準による Agilent-CMP CE/MS システムの性能評価

mAb 電荷変異体の分析のための CIEF-MS 実験を開始する前に、mAb サンプルの注入によってシステム性能をさらにテストすることをおすすめします。SigmaMAb を例にとると、IgG 分子は 20 分後に泳動することが予想されます (図 3)。この長い泳動時間は、最小の電気浸透流が PS1 キャピラリーに存在することを示しています。ピークテーリングが存在しないことは、キャピラリー壁へのタンパク質の吸着が最小であることを示唆しています。実験条件は以下のとおりです。

- **サンプル:** 100 mM 酢酸アンモニウム、4 % 酢酸 (v/v) 中の、0.2 mg/mL SigmaMAb
- **バックグラウンド電解液:** 30 % 酢酸 (v/v)
- **シース液:** 20 % 酢酸、25 % アセトニトリル
- **注入:** 950 mbar で 3 秒間サンプル注入後、950 mbar で 3 秒間バックグラウンド電解液注入
- **分離:** 30 kV

タンパク質標準による Agilent-CMP CIEF-MS システムの性能評価

CZE-MS の評価後に、シトクローム C (pI 値 10.3) とミオグロビン (pI 値 7.2 と 6.8) の混合物を使用し、CIEF-MS メソッドをテストすることができます。図 4 に、100 cm PS1 キャピラリーを用いた混合物サンプルの CIEF-MS 結果を示します。実験条件は以下のとおりです。

- **サンプル:** 1.2 % Pharmalyte 3-10、4 mM 酢酸アンモニウム、12 % グリセロール中の、0.1 mg/mL シトクローム C、0.08 mg/mL ミオグロビン

- **陽極液:** 1 % ギ酸、15 % グリセロール
- **陰極液:** 0.2 N 水酸化アンモニウム、15 % グリセロール
- **シース液:** 30 % 酢酸
- **注入:** 950 mbar で 25 秒間陰極液を注入した後、950 mbar で 110 秒間サンプルを注入
- **集束と移動:** 15 kV、10 mbar

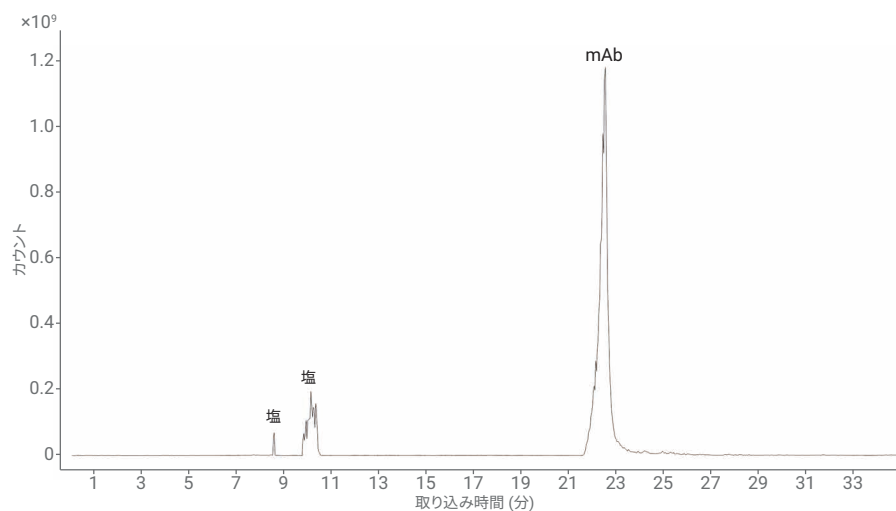


図 3. モノクローナル抗体標準による分離キャピラリー性能の確認

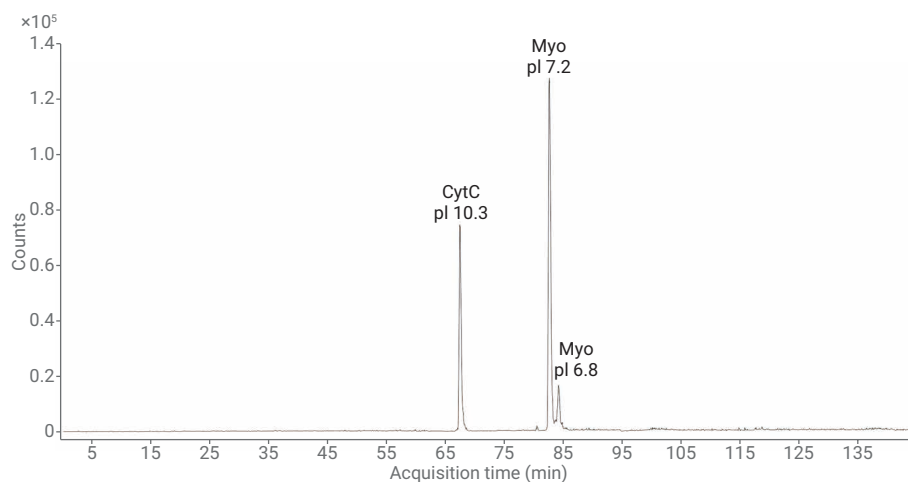


図 4. シトクローム C とミオグロビンの混合物による CIEF-MS システム性能の確認

ダラツムマブの CIEF-MS 分析

ダラツムマブは市販の治療用タンパク質 IgG1 モノクローナル抗体です。図 5 に、ダラツムマブサンプルの CIEF-MS 分析中の Agilent MassHunter ソフトウェアのスクリーンショットを示します。中段の左側のパネルの青のトレースはトータルイオンエレクトロフェログラム (TIE)、赤は CE 電流プロットです。シトクローム C がサンプルに添加され、TIE に最初のピークとして表れました。シトクローム C は pI 値が 10.3 であるため、pH 範囲 3 ～ 10 内の両性電解質のフロントマーカとして機能します。図 5 に示すように、ダラツムマブが表れた場所には、最小の両性電解質バックグラウンドしかなく、抗体分子に好ましいエレクト

ロスプレーイオン化条件であることが示されました。多くの mAb 治療用タンパク質で、20 % 酢酸と 25 % アセトニトリルがシース液として適切に機能することが分かっています²。実験条件は以下のとおりです。

- **サンプル:** 5 mM AA、1 % Pharmalyte 3-10、15 % グリセロール中の、0.33 mg/mL ダラツムマブ、0.11 mg/mL シトクローム C
- **陰極液:** 0.2 N 水酸化アンモニウム、15 % グリセロール

- **陽極液:** 1 % ギ酸、15 % グリセロール
- **シース液:** 20 % 酢酸、25 % アセトニトリル
- **注入:** 950 mbar で 10 秒間陽極液を注入した後、950 mbar で 75 秒間サンプルを注入
- **集束と移動:** 18.8 kV、5 mbar

75 cm PS1 キャピラリーでこれらの条件の下、通常、シトクローム C のピークが 40 分後に出現します。その後、ダラツムマブのピークが 5 分以内に出現します。

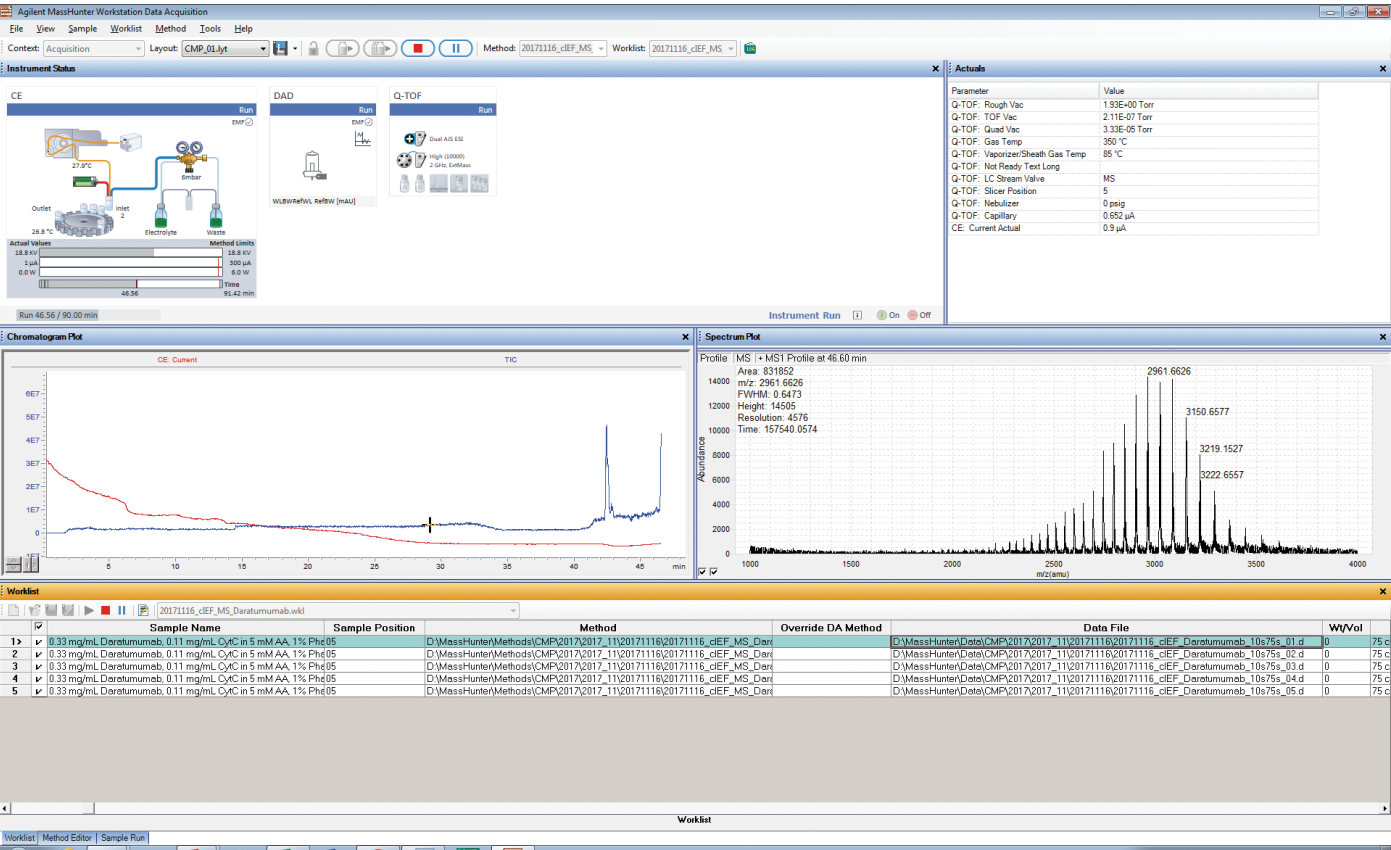


図 5. ダラツムマブサンプルの CIEF-MS 分析中の MassHunter ソフトウェアのスクリーンショット

CIEF-MS 分析で同定される ダラツムマブの電荷変異体

図 6 に、同定されたダラツムマブの電荷変異体を示します。1 つの塩基性変異体と、2 つの酸性変異体があります。MassHunter BioConfirm ソフトウェアによるデコンボ

リューションの後、電荷変異体のピークとメインピークのインタクト質量の違いを基に、電荷変異体が N 末端ピログルタミン酸 (塩基性変異体、ピーク B1)、脱アミド化 (酸性変異体、ピーク A1)、リジン糖化 (酸性変異体、ピーク A2) として同定されました。

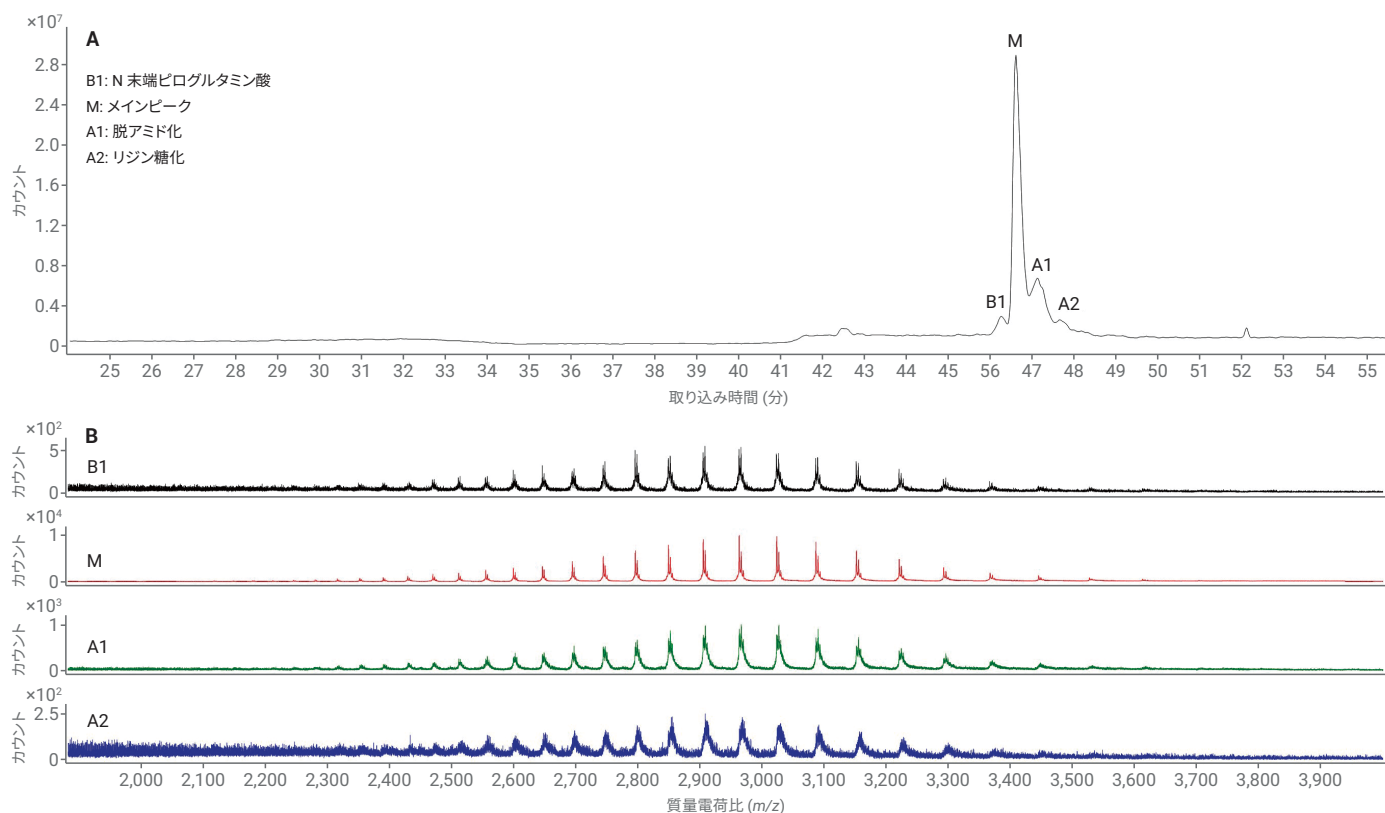


図 6. 完全に自動化された CIEF-MS メソッドによるダラツムマブの電荷変異体の分析

ダラツツムマブの繰り返し CIEF-MS 注入

図 7 に、ダラツツムマブサンプルの 5 晩にわたる CIEF-MS 注入の結果を示します。水酸化アンモニウムをキャピラリー内で長時間保持すると、キャピラリーの中性コーティングが損なわれる可能性があります。このため、陰極液およびサンプル注入に高圧 (950 mbar) を用いて、水酸化アンモニウムプラグがキャピラリー注入口から出口までを高速に泳動するようにしました。この高速の陰極液およびサンプル注入は層流を生成し、水酸化アンモニウム液によるサンプルプラグの混合を生じさせる可能性があります。結果として、有効な水酸化アンモニウムおよびサンプルゾーンの長さが注入に

よってわずかに変化します。これにより、ピークの泳動時間が変化することがあります。シトクローム C のピークをフロントマーカとして使用することで、ダラツツムマブのメインピークの相対泳動時間がかなり安定します。相対泳動時間の RSD を計算すると 5.8 % でした。

結論

このアプリケーションノートでは、7100 CE システムと TOF/Q-TOF 質量分析計で分析した完全自動化オンライン CIEF-MS メソッドを紹介しました。この CIEF-MS ワークフローは、動電的に流れるシース液のナノスプレー CE/MS 結合技術によって実現しています。塩基性タンパク質、モノクローナル抗体の CZE-

MS、電荷変異体の分析のためのダラツツムマブの CIEF-MS により、アジレントシステムにおける EMAS-II CE/MS イオン源の優れた性能が実証されました。また、キャピラリーの性能の評価やシステム性能の検査を含め、この CIEF-MS メソッドの詳細を紹介しています。Agilent-CMP CIEF-MS ワークフローにより、キャピラリー等電点電気泳動で分離されたインタクト mAb 電荷変異体のダイレクト質量分析法による同定が可能になります。

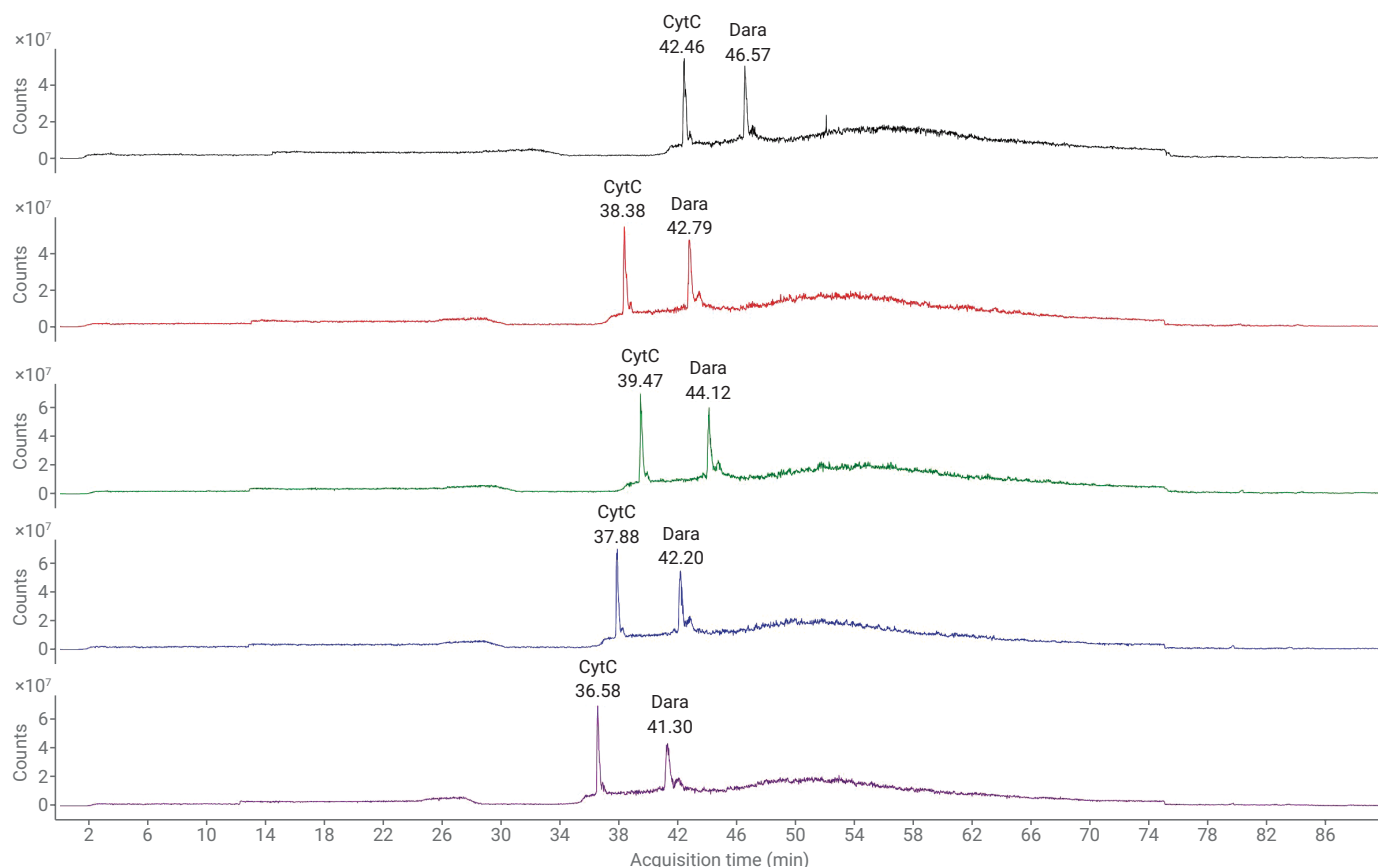


図 7. ダラツツムマブの 5 回の CIEF-MS 注入の再現性

参考文献

1. Zhu, G.; Sun, L.; Dovichi, N. J. Simplified Capillary Isoelectric Focusing with Chemical Mobilization for Intact Protein Analysis. *J. Sep. Sci.* **2017**, 40(4), 948-953.
2. Dai, J.; et al. Capillary Isoelectric Focusing-Mass Spectrometry Method for the Separation and Online Characterization of Intact Monoclonal Antibody Charge Variants. *Anal. Chem.* **2018**, 90(3).
3. Dai, J.; Zhang, Y. A Middle-Up Approach with Online Capillary Isoelectric Focusing/Mass Spectrometry for In-Depth Characterization of Cetuximab Charge Heterogeneity. *Anal. Chem.* **2018**, 90(24), 14527-14534.
4. Ouyang, Y.; et al. Negative-Ion Mode Capillary Isoelectric Focusing Mass Spectrometry for Charge-Based Separation of Acidic Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2019**, 91(1), 846-853.

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. 2019
Printed in Japan, February 1, 2019
5994-0672JAJP