

Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムによる脱アミド化ペプチドの分離

著者

Oscar Potter and Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

概要

グルタミンとアスパラギンの脱アミド化は、タンパク質に影響を与える最も一般的な分解の 1 つです。ただし、質量分析による脱アミド化の分析は、未修飾型に対するマスシフトが 1 Da 未満と小さいために困難です。部位特異的な脱アミド化の測定には、LC/MS 分析の前のプロテアーゼ消化がよく使用されますが、未修飾型と脱アミド化型がクロマトグラフィー分離されなければ、この方法も失敗する可能性があります。幸いなことに、電荷表面を持つ C18 カラムを使用すれば、脱アミド化ペプチドとその未修飾変異体の分離度が劇的に向上します。また移動相の最適化によって、これらの成分の分離度をさらに制御しやすくなる可能性があります。

はじめに

タンパク質の脱アミド化の分析は、バイオ医薬品の開発と生産における複数の段階で重要です。分析上の観点から言うと、脱アミド化によってアミド基がなくなり新たにカルボン酸性基が発生するため、IEX や等電点電気泳動などの電荷に基づくメソッドによって分析できる可能性があります¹。ただし、これらの手法によって必ずしも脱アミド化生成物が分離されるわけではないため、タンパク質内の特定の部位での脱アミド化を確認できない場合があります。このため、多くの分析者はサンプルのプロテアーゼ消化を実行し、生成されるペプチドを逆相 LC/MS で分析します。アスパラギンやグルタミンの脱アミド化は、未修飾型ペプチドに対する 0.9840 Da の質量増加によって同定されます。このような分解部位を含むペプチドは分離されやすく、それぞれのペプチドの相対信号強度に基づく相対定量を行うことができます²。ただし、アスパラギン/グルタミンが対応するカルボン酸性基に変換されても、低 pH では疎水性が大きく変化しないため、脱アミド化ペプチドが非脱アミド化型と共溶出する可能性があります³。このような共溶出により、図 1 に示すように、脱アミド化ペプチドの信号が未修飾型の大量の ¹³C 同位体と重なってしまいます。これが脱アミド化ペプチドの定量と検出を妨げたりする可能性があります。

このアプリケーションノートでは、電荷表面を持つ C18 カラムを使用すると、従来の C18 カラムよりも脱アミド化ペプチドと未修飾型ペプチドに対する選択性が大幅に向上することについて紹介します。選択性が向上すると、ペプチドレベルでの脱アミド化の検出および定量機能に対する信頼性が大幅に高まります。

Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムはアジレントの表面多孔質 Poroshell 技術に基づいており、ハイブリッドエンドキャップ処理された C18 固定相でポアサイズ 100 Å の 2.7 μm 粒子を修飾することにより、正電荷面を形成します。このため、従来の C18 カラムと異なる選択性を得られます。

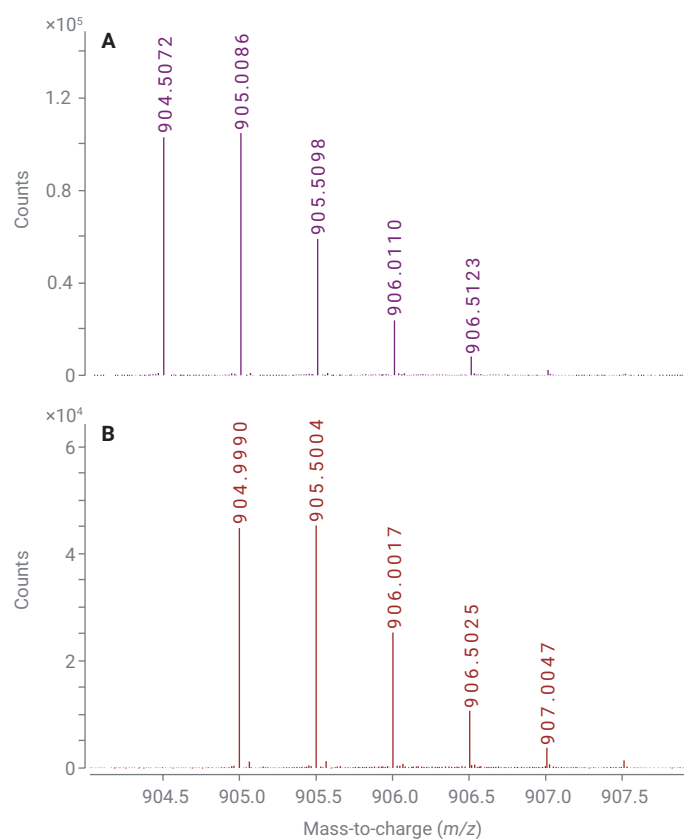


図 1. 未修飾型と脱アミド化ペプチドのマススペクトラムの比較。
VVSVLTVLHQDWLNGK (A) と同ペプチドの脱アミド化ペプチド (B)

実験方法

試料調製

mAb サンプルはチャイニーズハムスターの卵巣細胞を用いて、発現および精製しました。このサンプルをトリプシンで分解し、試薬グレードの水酸化アンモニウム溶液 (Sigma-Aldrich) で約 pH 11 に調製し、60 °C で 4 時間恒温で保持し、脱アミド化を促進させました。LC/MS グレードのギ酸 (部品番号 533002) と アセトニトリル (部品番号 900667) も Sigma-Aldrich から購入しました。

装置構成

LC システム

次の構成の Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity II オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity II サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)

MS システム

Agilent 6546 LC/Q-TOF

データ処理

LC/MS データは、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェア (バージョン 10.0 SP1) と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア (バージョン 10.0) で処理しました。

結果と考察

表 1 のとおり、mAb 消化物から、部分的に脱アミド化している 5 種類のペプチド (A, B, C, D, E) が同定されました。これらのペプチドを用いて、未修飾のペプチドからその脱アミド化ペプチドを分離する際に、カラムと移動相の選択がどのように影響するかを調べました。

LC/MS 条件

パラメータ	Agilent 1290 Infinity II LC												
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドプラス、2.1 × 150 mm、(p/n 695775-949) Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、2.1 × 150 mm、(p/n 653750-902)												
カラム温度	60 °C												
移動相	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液												
流量	0.4 mL/min												
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>50.5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>53</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0	3	2	3	40	40	50.5	100	53	3
時間 (分)	% B												
0	3												
2	3												
40	40												
50.5	100												
53	3												
ポストタイム	7 分												
注入量	3 µL												

パラメータ	Agilent 6546 Q-TOF
イオン源	Agilent Jet Stream を使用
ガス温度	323 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネブライザガス	35 psi
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
フラグメンタ	125 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
質量範囲	m/z 300 ~ 1,700
MS スキャンレート (スペクトル/秒)	5
取り込みモード	ポジティブモード、拡張ダイナミックレンジ (2 GHz) セントロイドデータ形式

表 1.

ペプチド	シーケンス (非脱アミド化型)	[M+2H] ²⁺ の m/z
A	NQVSLTCLVK	581.8103
B	FNWYVDGVEVHNAK	839.4047
C	VVSVLTVLHQDWLNGK	904.5071
D	NTAYLQMNSLR	655.8300
E	GLEWVGYPSPNGETTYNQK	1136.0323

カラムタイプ

図 2 は、2 種類の C18 カラムを用いたペプチドとその脱アミド化ペプチドの分離を示したものです。ギ酸を加えた水/アセトニトリルグラジエントによる一般的な LC/MS 分析メソッドを使用しています。

AdvanceBio ペプチドマッピングカラムでは、2.7 μm の表面多孔質粒子に基づくエンドキャップ処理された C18 シリカ（ポアサイズ 120 \AA ）を使用しています。このカラムでは通常、脱アミド化ペプチドが未修飾型より少し遅れて溶出しました。いずれのケースでも、2 種類以上の脱アミド化ペプチドが検出されています。これはアスパラギンがアスパラギン酸とイソアスパラギン酸に変換された可能性が高いことを示しています。ただし、ペプチド D では 1 種類の脱アミド化変異体が未修飾型の前に溶出しており、ペプチド C および E では、脱アミド化ペプチドと未修飾型が共溶出しています。この結果から、標準的な C18 カラムでは、脱アミド化ペプチドが未修飾型から分離されない場合があります。

もう一方の AdvanceBio ペプチドプラスカラムは同じタイプの粒子に正電荷の表面を持ち、官能基 C18 とエンドキャップも同等です。このカラムでは、すべての脱アミド化変異体を未修飾型から確実に分離できました。また、全 5 種類のペプチドのすべての脱アミド化ペプチドが未修飾型より後に溶出しました。

この 2 種類のカラム間で挙動が異なる理由として、一般的に正電荷を持つ C18 固定相は標準的な C18 固定相よりもペプチドの保持力が低いことが考えられます。保持力低下の原因は、ペプチドとのイオン性相互作用である可能性があります。ペプチドは通常、0.1% のギ酸があればプラスに帯電するからです⁴。このような保持力低下効果は強塩基性ペプチドでは強くなり、ペプチドに含まれる酸性アミノ酸が多くなるほど弱くなります。脱アミド化によって酸性基が増えるため、脱アミド化ペプチドの塩基性が未修飾型より低くなり、正電荷面を持つカラムでの保持力が増大します。

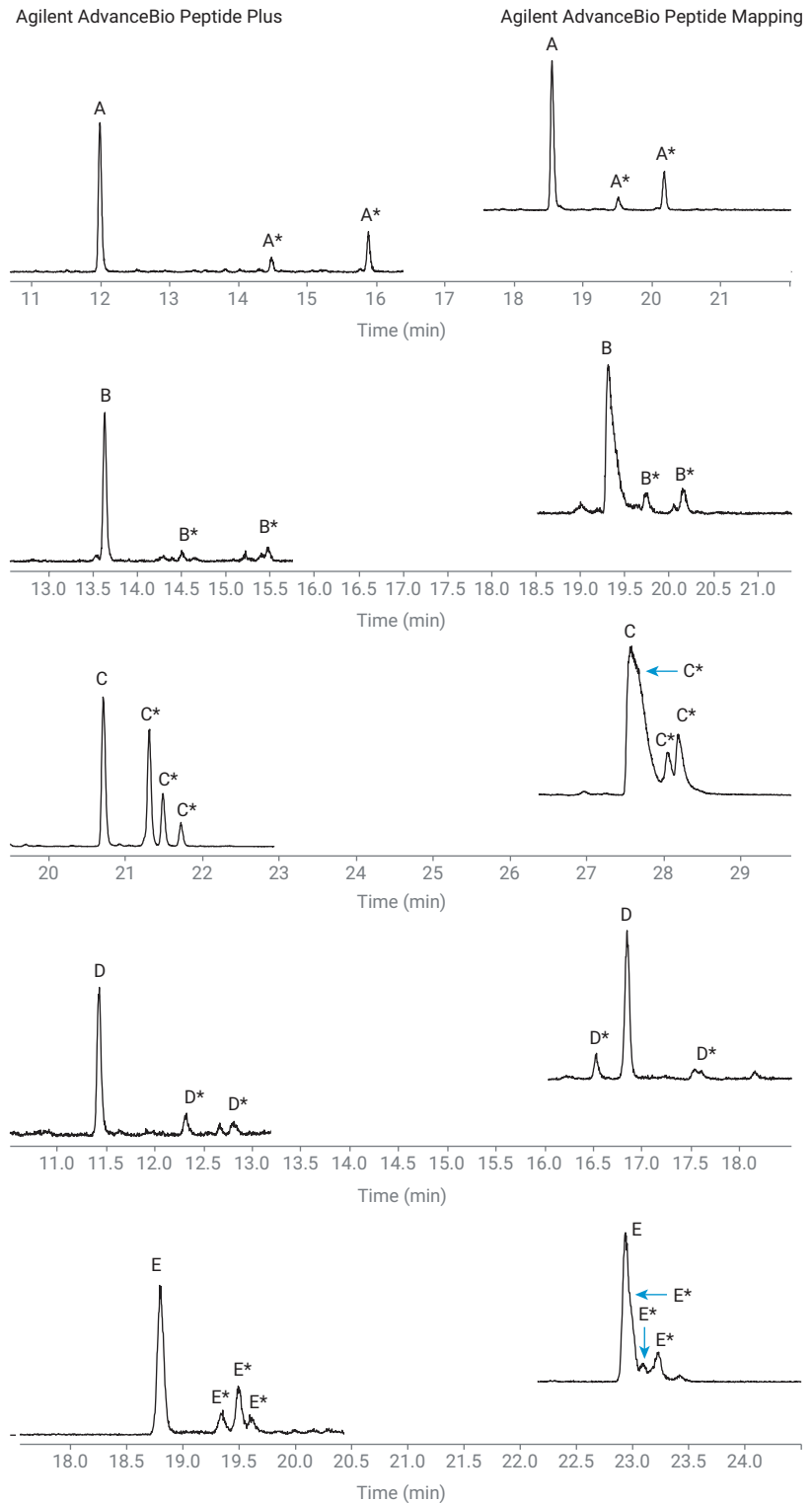


図 2. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラムと Agilent AdvanceBio ペプチドプラスカラムの比較。未修飾ペプチド（各ペプチドは、表 1 のアルファベットを表記）とその脱アミド化ペプチド（表 1 のアルファベットに * を示す）を同条件（0.1% のギ酸による移動相調整）で分離した。

脱アミド化ペプチドと未修飾型に対する選択性が向上すれば、正電荷面を持つカラムでこれらの成分が共溶出する可能性が大幅に低くなるため、質量スペクトルの重なりによる問題を解消できます。

移動相

AdvanceBio ペプチドプラスカラムで 0.1 % のギ酸を使用することで、5 種類のペプチドの脱アミド化ペプチドと未修飾型を確実に分離できましたが、移動相の選択も分離に大きな影響を与えます。

図 3 上側は、水性移動相と有機移動相にそれぞれ 0.05 %、0.1 %、0.3 % のギ酸を加えた場合のペプチド C とその脱アミノ化型 (C*) の分離を示したものです。ギ酸の濃度を 0.05 % に下げると選択性と分離度が向上し、0.3 % に上げると分離度が若干低下します。ペプチド E でも同様のパターンが見られます。

ギ酸は LC/MS ペプチド分離の移動相調整剤としてよく使用されますが、ピーク形状の改善のためにトリフルオロ酢酸 (TFA) が使用される場合もあります (ただし TFA を使用すると ESI-MS 感度に悪影響を及ぼす可能性があります)⁵。TFA を使用するとギ酸より移動相の pH が下がるため、脱アミド化によるカルボン酸のイオン化が抑制されます。また、TFA はギ酸より強力なイオンペア試薬として作用するため、イオン性相互作用の影響を軽減できることが報告されています。AdvanceBio ペプチドプラスカラムでは、このような作用が脱アミド化ペプチドとその未修飾型の分離度に影響する可能性があります。

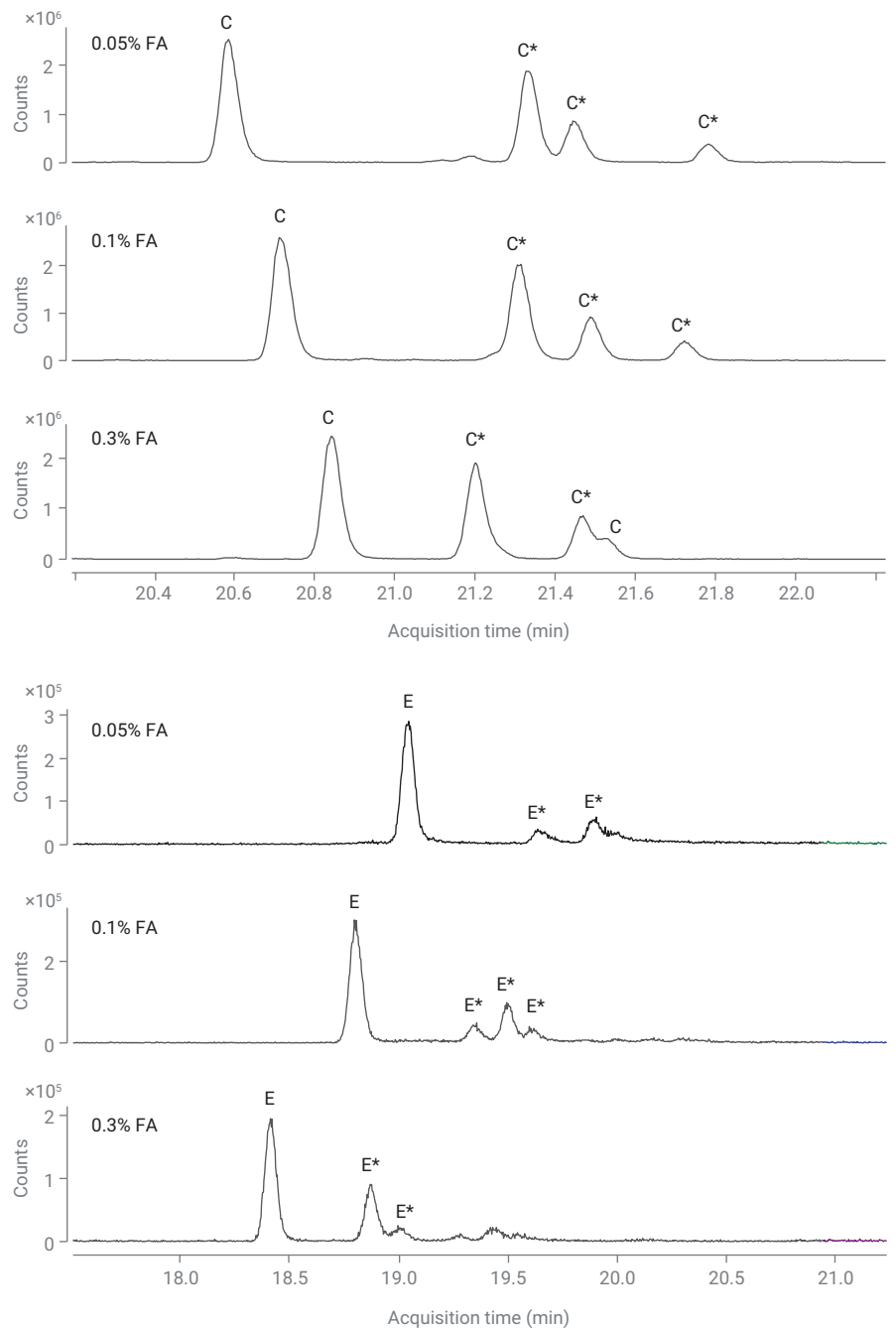


図 3. Agilent AdvanceBio ペプチドプラスで移動相調整剤であるギ酸 (FA) の濃度を上げた場合のペプチドの分離。各ペプチドは、表 1 のアルファベットを表記し、脱アミノ化ペプチドは、* を示す。

図4では0.1% TFAと0.1%ギ酸を比較しました。0.1%のTFA条件では、未修飾型に対する脱アミド化ペプチドの選択性が大幅に低下しました。ペプチドAでは、未修飾型と脱アミド化ペプチド間のベースラインが縮小しただけでした。一方、ペプチドCでは、脱アミド化ペプチドの1つが未修飾型より早く溶出しました。また、ペプチドEでは、1つの脱アミド化ペプチドにおいて未修飾型との間の分離が失われました。

全体的に、AdvanceBio Peptide Plusでは、脱アミド化ペプチドが未修飾型より後に溶出するという一般的なパターンが0.1%のTFA条件でも維持されました。ただし、AdvanceBio Peptide PlusでTFAを使用すると、ギ酸と比べて共溶出の可能性が大幅に高くなることを認識しておく必要があります。

結論

AdvanceBio ペプチドプラスカラムは、LC/MS分析に適した0.1%ギ酸を利用した条件で標準的なC18カラムと比べて、未修飾型に対する脱アミド化ペプチドの選択性が向上します。このため質量スペクトル重なりの問題が解消され、マニュアルまたは自動分析ソフトウェアで脱アミド化型ペプチドの検出と定量の信頼性が大幅に向上します。選択性は、移動相調整剤であるギ酸の濃度の増減によって変わる可能性があります。これらの結果は、LC/MSを用いたタンパク質の脱アミド化の分析に役立つ可能性があります。詳細については、アプリケーションノート「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」を参照してください²。

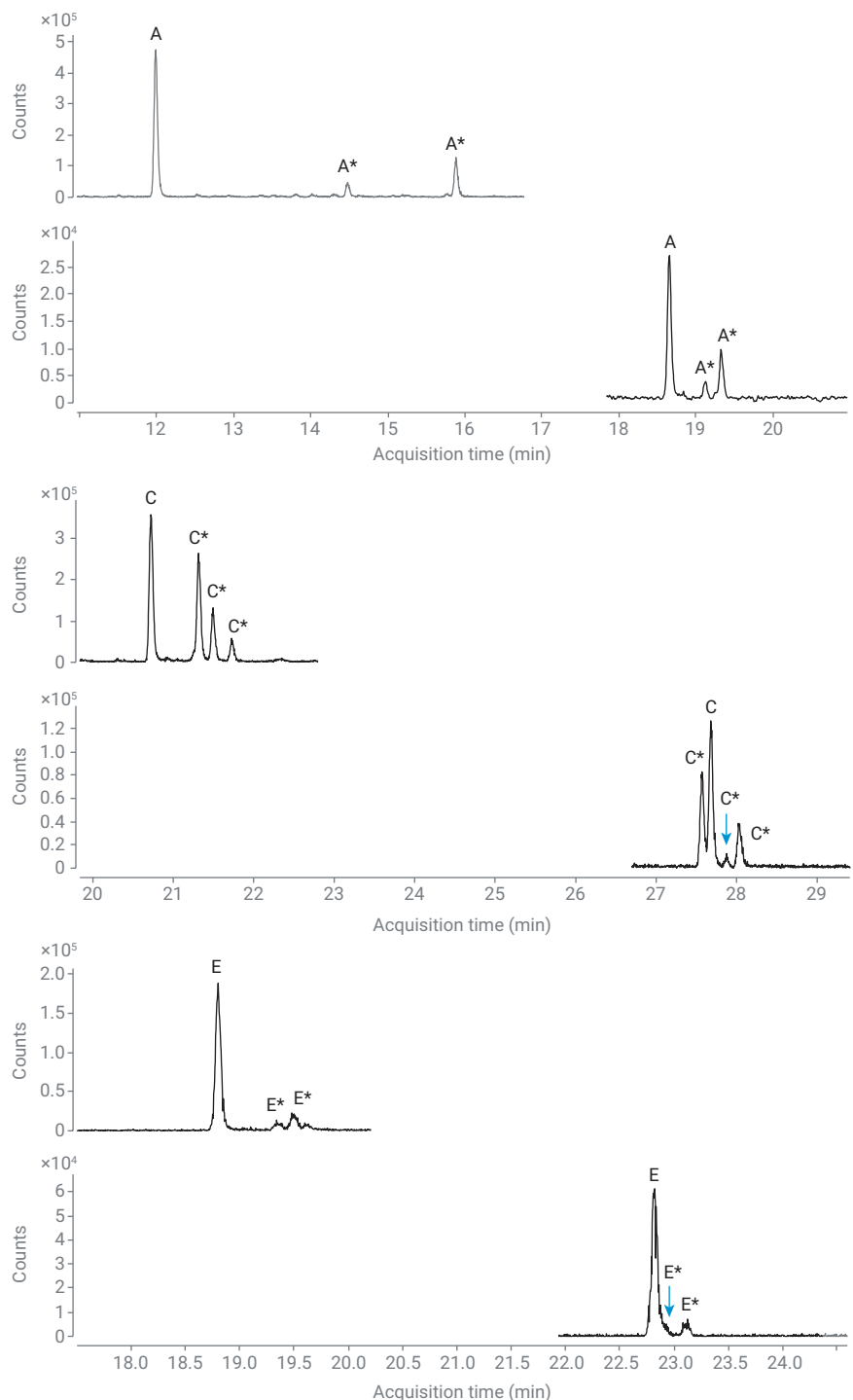


図4. Agilent AdvanceBio ペプチドプラスの移動相の比較。図左側(溶出が早い条件)は0.1%ギ酸、図右側(溶出が遅い条件)は0.1%TFAを移動相に利用した分析。各ペプチドは、表1のアルファベットを表記し、脱アミノ化ペプチドは*を示す。

参考文献

1. Gervais, D. Protein Deamidation in Biopharmaceutical Manufacture: Understanding, Control and Impact. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2015**, 91, 569–575.
2. Linfeng, Wu. Quantitation of Chemical Induced Deamidation and Oxidation on Monoclonal Antibodies. *Agilent Technologies*, **2018**.
3. Wang, W. *et al.* Quantification and Characterization of Antibody Deamidation by Peptide Mapping with Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 312, 107–113.
4. Nogueira, R.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W. Alternative High-Performance Liquid Chromatographic Peptide Separation and Purification Concept Using a New Mixed-Mode Reversed-Phase/Weak Anion-Exchange Type Stationary Phase. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1089, 158–169.
5. Apffel, A. *et al.* Enhanced Sensitivity for Peptide Mapping with Electrospray Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Presence of Signal Suppression Due to Trifluoroacetic Acid-Containing Mobile Phase. *Journal of Chromatography A* **1995**, 712, 177–1190.

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. 2021
Printed in Japan, January 27, 2021
5994-2971JAJP
RA44203.5978472222