

インタクトおよびサブユニットの モノクローナル抗体の統合ワークフロー による精密質量測定

アプリケーションノート

バイオ医薬品・バイオシミラー

著者

Shuai Wu and Maryann Shen
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Steve Murphy and

Zach Van Den Heuvel
Agilent Technologies, Inc.
Madison, WI, USA

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) ベースの物質は、急速に成長する生物製剤を代表するものであり、臨床試験とその後の発売の承認を得るために大規模な特性解析が必要になります。精密質量測定は、抗体の特性解析において難易度の高いステップです。抗体はサイズが大きく、またグリコシル化などの翻訳後修飾が存在するためです。このような特性は、修飾の位置の判別が複雑になる原因にもなっています。

抗体の質量測定に関連する課題を克服するために、多数の補足的なアプローチが一般に使用されています。抗体は、PNGase F によって処理して N グリカンを除去したり、IdeS などのプロテアーゼで分解して抗体フラグメントを生成したり、還元して質量測定の前に軽鎖および重鎖を生成したりすることができます。これらの手法をさまざまに組み合わせて使用できます。サンプル前処理は、煩雑であったり、時間がかかったり、再現性が限られていたりすることがあります。このアプリケーションノートでは、Agilent AssayMAP Bravo での自動化によってそれらのアプローチをどのように合理化して、ヒューマンエラーの可能性を減らし、再現性を高め、無人運転の時間を増やすかを示します (図 1 および 2)。

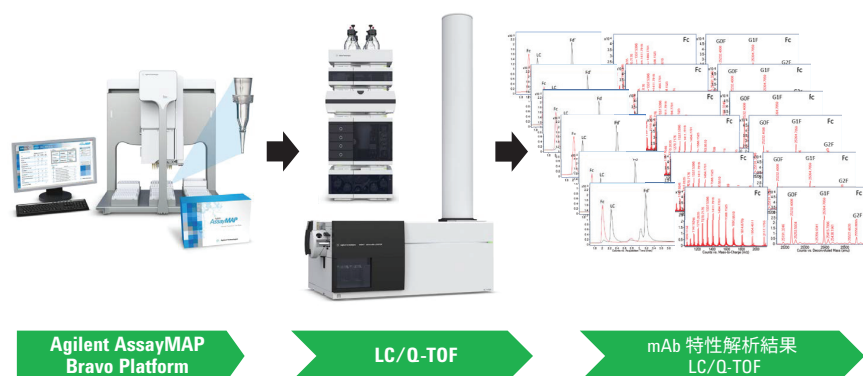


図 1. Agilent AssayMAP Bravo を用いた自動抗体特性解析の統合ワークフロー



Agilent Technologies

2種類の既知の抗体を用いるサンプル前処理、データ採取、データ解析を通じて、未処理サンプルからインタクト質量解析を行うための完全なソリューションを、アジレントがどのように提供しているかを説明します。AssayMAP ストレプトアビジン (SA-W) カートリッジに結合されたビオチン化 HER2 ECD (トラスツズマブ) またはビオチン化 L タンパク質 (NIST mAb) のいずれかを使用して、ハーセプチン (トラスツズマブ)、HER2 細胞外領域 (ECD) 特有のモノクローナル抗体、NIST モノクローナル抗体参照物質 8671 を細胞培地の上清から AssayMAP Bravo でアフィニティ精製しました。L タンパク質は、抗体の Kappa 軽鎖のアフィニティ試薬です。その後、アフィニティ精製したハーセプチンと NIST mAb の両方を、On-Column Reaction (カートリッジでの反応) アプリケーションを用いて AssayMAP カートリッジで固定化したまま、インタクトのままとしたか、PNGase F で脱グリコシル化したか、または IdeS で分解しました。PNGase F 反応および IdeS 反応からの水溶性反応生成物 (それぞれグリカンおよび Fc/2 重鎖フラグメント) が 1 つのプレートで採取されました。固定化されたインタクト mAb、脱グリコシル化された mAb、F(ab')₂ フラグメントの半分は、カートリッジから、還元バッファを含むウェルに溶出されました。それぞれのサンプルの残りの半分は、非還元バッファに溶出されました。AssayMAP Bravo ではこれらのステップがすべて自動化されました。質量精度の高いデータを取得するため、これらのステップから得られたタンパク質を UHPLC と Q-TOF 質量分析装置で分析しました。

分析方法

試薬

遺伝子組み換えヒト HER2 細胞外領域 (ECD) は ACRO Biosystems 社 (デラウェア州ニューアーク) から購入しました。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin キットおよび Pierce Biotin Quantitation Kit は Thermo Fisher Scientific 社 (ニューヨーク州グランドアイランド) から購入しました。Rapid PNGase F は New England Biolabs 社 (マサチューセッツ州イプスウィッチ) から入手しました。IdeS プロテアーゼは Promega 社 (ウィスコンシン州マディソン) から購入しました。ハーセプチン製剤 (トラスツズマブ) は Genentech 社 (カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) が製造したものです。モノクローナル抗体参照物質 8671 は米国国立標準技術研究所 (NIST) から購入しました。使用済み CHO 細胞培地は Aldevron 社 (ウィスコンシン州マディソン) から入手しました。AssayMAP ストレプトアビジンカートリッジ (SA-W) はアジレント・テクノロジー (カリフォルニア州サンタクララ) から入手しました。他のすべての化学物質は Sigma-Aldrich 社 (ミズーリ州セントルイス) から入手しました。

抗体アフィニティカートリッジの生成

ヒト上皮成長因子受容体 (HER2) ECD および L タンパク質を、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin キットを用いてビオチン化しました。HER2 ECD に対するビオチンのモル比は 9.5 と測定され、L タンパク質に対するビオチンのモル比は 5.3 と測定されました。これらの比率は、Pierce Biotin Quantitation Kit の指示に従って測定しました。

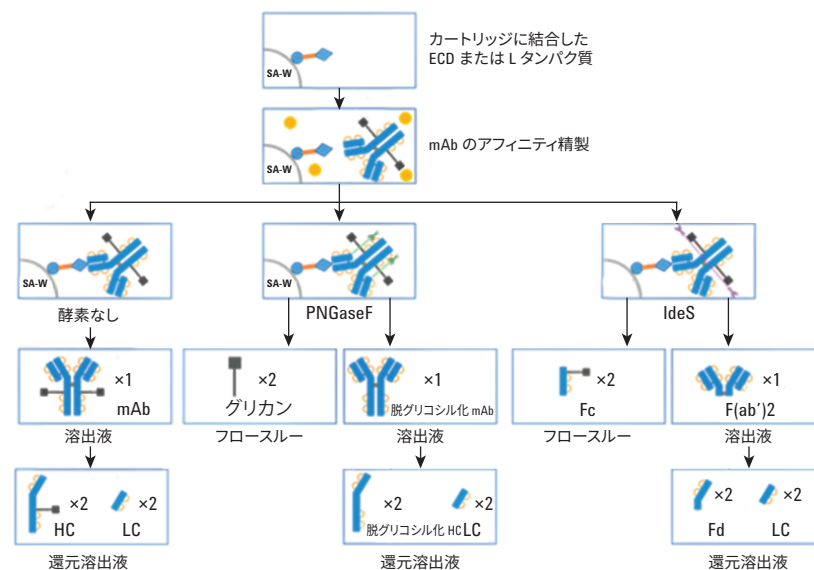


図 2. Agilent AssayMAP Bravo が実施する抗体サンプル前処理

次に AssayMAP Bravo を使用して、AssayMAP Bravo の Immobilization (固定化) アプリケーション (図 3) により、各ストレプトアビジン (SA-W) カートリッジで、2 µg のビオチン化 HER2 ECD (表 1 のカラム 1 および 2) と、2 µg のビオチン化 L タンパク質 (表 1 のカラム 3 および 4) を固定化しました。低い流速でターゲット分子を効率よく結合するために必要なビオチン化されたリガンドの最小質量は、経験的に判別され、ターゲットに対するビオチン化捕捉リガンドのモル比がおおよそ 5:1 であることが分かりました。短時間で、SA-W カートリッジを 1% のギ酸でプライミングおよび平衡化 (デッキロケーション 3、図 3) してから、**Internal Cartridge Wash 1 (内部カートリッジ洗浄 1)** ステップを使用して 50 µL の HEPES バッファで洗浄しました (10 mM の HEPES、150 mM の NaCl、pH 7.4) (デッキロケーション 5、洗浄 1)。1% のギ酸でのプライミングおよび平衡化は、カートリッジから混入空気を除去し、低 pH 条件で固体サポートから解離したストレプトアビジンモノマーを除去する厳密な洗浄として機能しました。次にカートリッジを HEPES バッファで再平衡化しました。これにより、カートリッジの樹脂充填剤に HEPES バッファが供給され、ビオチン化抗原を結合する準備ができました。次に、**Load Blocking Reagent (ブロッキング試薬のロード)** ステップを使用して、5 µL/min の流量で、100 µL の HEPES バッファ中の 2 µg のビオチン化 HER2 ECD または L タンパク質を SA-W カートリッジにロードしました (デッキロケーション 9)。アフィニティカートリッジの生成の最後のステップは、**Internal Cartridge Wash 2 (内部カートリッジ洗浄 2)** を使用した 50 µL の HEPES バッファでの 1 回の洗浄です。Immobilization (固定化) アプリケーション内の他のすべてのステップはオフにしたため、自動的にスキップされました。図 3 に、この分析の実行に使用された Immobilization (固定化) アプリケーションの設定のスクリーンショットを示します。

表 1. 実験計画および溶出プレート内の最終サンプル

ステップ 1		ECD、ビオチン (2 µg/100 µL)	L タンパク質、ビオチン (2 µg/100 µL)	
ステップ 2		ハーセプチン (2 µg/100 µL)	NIST mAb (2 µg/100 µL)	
	カラム 1 および 2	カラム 3 および 4	ステップ 3	
酵素なし	A	インタクトハーセプチン (グリカンあり)	インタクト NIST mAb (グリカンあり)	
	B	ハーセプチン LC/HC (グリカンあり)	NIST mAb LC/HC (グリカンあり)	← TCEP
PNGase F	C	ハーセプチン (グリカンなし)	NIST mAb (グリカンなし)	
	D	ハーセプチン LC/HC	NIST mAb LC/HC	← TCEP
IdeS	E	ハーセプチン F(ab') ₂	NIST F(ab') ₂	
	F	ハーセプチン Fd'、LC	NIST Fd'、LC	← TCEP
	G			
	H			

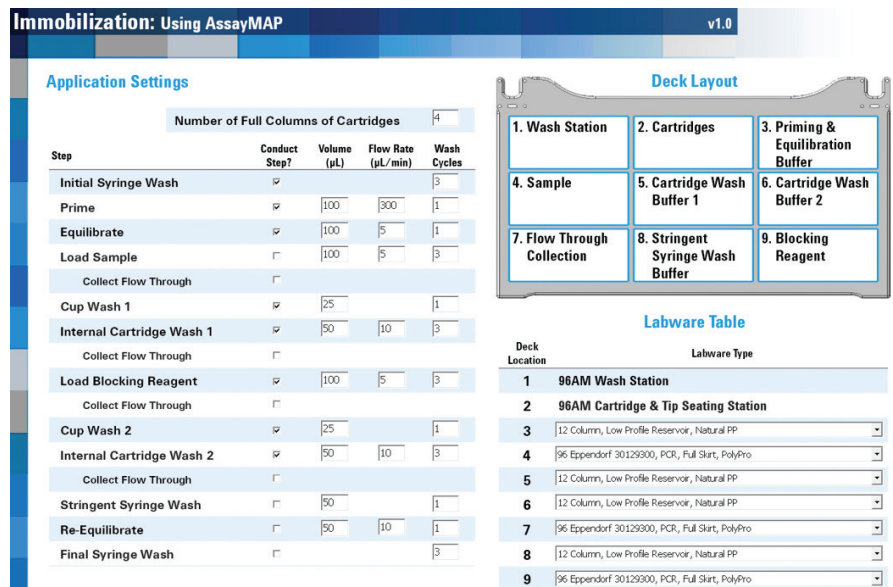


図 3. Agilent AssayMAP Bravo のユーザーインターフェース。抗体アフィニティカートリッジの生成に使用する AssayMAP Bravo 上の Immobilization (固定化) アプリケーションの設定画面を示します。

抗体精製

市販のハーセプチン (トラスツズマブ) および NIST mAb を、脱イオン水に再溶解して 20 mg/mL とし、分取し、 -80°C で保管しました。使用直前に、ハーセプチンと NIST mAb を水で $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に希釈しました。次に、両方の mAb を、濃度が $2\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ になるように使用済み CHO 細胞溶解液にスパイクしました。AssayMAP Bravo 上の Affinity Purification (アフィニティ精製) アプリケーションを使用して、細胞培地の上清から抗体を精製しました (図 4)。プライミングと平衡化のステップはオフにしました。これらのステップは Immobilization (固定化) プロトコル中に既に実行されたためです。次に、ハーセプチン mAb または NIST mAb のいずれかをスパイクした $100\ \mu\text{L}$ の CHO 細胞溶解液を、HER2 ECD および L タンパク質アフィニティカートリッジのそれぞれに $3\ \mu\text{L}/\text{min}$ でロードし、続いて $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ で $150\ \mu\text{L}$ HEPES バッファ洗浄を行いました (Internal Cartridge Wash 1、内部カートリッジ洗浄 1)。表 1 (ステップ 1) に、異なるサンプルに対してカートリッジをどのように使用したかを示します。A から F のコラム 1 および 2 (12 個のカートリッジ) に、ビオチン化 HER2 ECD をロードしました。A から F のコラム 3 および 4 (12 個のカートリッジ) に、ビオチン化 L タンパク質をロードしました。

カートリッジでの脱グリコシル化および IdeS 分解

ハーセプチンおよび NIST mAb のキャプチャの後に、On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) に備えて $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ の流量で $50\ \mu\text{L}$ の水コントロールまたは酵素バッファによりカートリッジを平衡化しました (図 5)。表 1 (ステップ 2) に以下の内容を示しています。

- A 行と B 行のカートリッジは水で平衡化
- C 行と D 行のカートリッジは脱グリコシル化バッファで平衡化 (20 mM のトリス、pH 8.0)
- E 行と F 行のカートリッジは IdeS タンパク質分解バッファで平衡化 (50 mM のトリス、150 mM の NaCl、pH 6.6)

カートリッジを通じて $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ で $4\ \mu\text{L}$ の熱水、Rapid PNGase F (1:12)、または IdeS 酵素 ($4\ \text{U}/\mu\text{L}$) を吸引することによって、On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) (図 5) を実施しました。次に、追加の $2\ \mu\text{L}$ の加熱した酵素

溶液または水を、各カートリッジを通じて 30 分にわたって吸引しました (使用した酵素の総体積は $6\ \mu\text{L}$ でした)。

Affinity Purification: Using AssayMAP v1.0

Application Settings

Step	Conduct Step?	Volume (μL)	Flow Rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3
Prime	<input type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate	<input type="checkbox"/>	50	10	1
Load Sample	<input checked="" type="checkbox"/>	100	3	3
Collect Flow Through	<input checked="" type="checkbox"/>			
Cup Wash 1	<input checked="" type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 1	<input checked="" type="checkbox"/>	150	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 2	<input type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 2	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Stringent Syringe Wash	<input type="checkbox"/>	50		1
Elute	<input type="checkbox"/>	25	5	1
Eluate Discard	<input type="checkbox"/>	0		
Add to Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Existing Collection Volume		0		
Final Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3

Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Prime & Equilibrate Buffer
4. Samples	5. Cartridge Wash Buffer 1	6. Cartridge Wash Buffer 2
7. Flow Through Collection	8. Elution & Syringe Wash Buffer	9. Eluate Collection

Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	96AM Wash Station
2	96AM Cartridge & Tip Seating Station
3	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
4	[96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro]
5	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
6	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
7	[96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro]
8	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
9	[96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro]

図 4. 細胞培地の上清から抗体を精製するために使用する Agilent AssayMAP Bravo 上の Affinity Purification (アフィニティ精製) アプリケーションの設定画面

AssayMAP App: ON-CARTRIDGE REACTION v1.0

Select Method

Browse for a Method [C:\Work\Workspace-Methods\OnCartridge Reaction v1.1] Load

Application Settings

Step	Conduct Step?	Volume (μL)	Flow Rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			2
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Reaction	<input checked="" type="checkbox"/>	5		3
Temperature		45	$^{\circ}\text{C}$	
Duration		30	Minutes	
Reaction Chase		25	5	
Combine With Eluate	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 1	<input checked="" type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 1	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 2	<input checked="" type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 2	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Stringent Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>	50		1
Elute	<input checked="" type="checkbox"/>	15	5	1
Eluate Discard	<input type="checkbox"/>	0		
Existing Collection Volume		15		
Final Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3

Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Equilibration & Chase Buffer
4. Reagent	5. Wash Buffer 1	6. Wash Buffer 2
7. Flow Through Collection	8. Elution & Syringe Wash Buffer	9. Eluate Collection

Labware Table

Deck Location	Labware Type
1	96AM Wash Station
2	96AM Cartridge Seating Station
3	[8 Row, Low Profile Reservoir, Natural PP]
4	[96 Red PCR, Insert + Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt]
5	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
6	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
7	[96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro]
8	[12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP]
9	[96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skirt, PolyPro]

図 5. On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) アプリケーションの設定画面。このケースでは、mAb の脱グリコシル化 (PNGase F) およびタンパク質分解 (IdeS) に使用されます。

両方の吸引ステップ中に、Bravo のデッキロケーション 4 でペルチェ装置を使用して 3 つの試薬を 37 °C まで加熱しました (図 5)。アプリケーションフォーム内で温度を 45 °C に設定しました。このようにすると、ヒーターからサンプルプレートを通じてカートリッジの樹脂充填剤に至る熱伝導におけるロスのため、カートリッジ内の反応温度が約 37 °C になるためです。Reaction Chase (反応追跡) において、分解の終わりにそれぞれの反応バッファまたは水コントロール (25 µL) を各カートリッジを通じて吸引し、放出されたグリカンまたは Fc を採取するために、カートリッジを通過した酵素溶液またはコントロールと結合させました。これらの放出された反応生成物を、デッキロケーション 7 のフロースルーコレクションプレートで採取しました。各カートリッジを、1 M NaCl を含む HEPES バッファ 50 µL により 10 µL/min で洗浄し (デッキロケーション 5、洗浄 1)、続いて 10 µL/min で 0.003 % のギ酸によって洗浄しました (デッキロケーション 6、洗浄 2) (図 5)。精製された mAb、脱グリコシル化された mAb、または F(ab')₂ フラグメントを、カートリッジごとに 15 µL の 1 % ギ酸によって溶出プレート内の既存の 15 µL の 0.5 % 水酸化アンモニウムへ溶出し (デッキロケーション 8)、溶離液を中性化しました。TCEP を溶離液に追加して最終濃度を 5 mM とし (表 1 のステップ 3、B、D、F の各行)、サンプルを室温で 30 分間還元しました。On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) アプリケーションの他のすべてのステップはオフになっています (図 5)。

LC/MS 分析

LC/MS 分析は、PLRP-S カラム (PL1912-1502) 付き Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムと、デュアル Agilent Jet Stream イオン源付き Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせて実施しました。表 2 と表 3 は使用した LC/MS 分析条件を示しています。すべてのインタクト mAb および脱グリコシル化 mAb サンプルを、5 分間のグラジエントによって分析しました。すべての IdeS フラグメントおよび還元した軽鎖と重鎖を、8.5 分間のグラジエントによって分析しました。

表 2. 液体クロマトグラフィーのパラメータ

Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム				
カラム	Agilent PLRP-S、1000 Å、2.1 × 50 mm、8 µm (p/n PL1912-1502)			
溶媒 A	0.1 % ギ酸水溶液			
溶媒 B	0.1 % ギ酸 ACN			
グラジエント	1. インタクト mAb		2. 還元 mAb	
	時間 (分)	B (%)	時間 (分)	B (%)
	0	5	0	25
	1	20	1	25
	3	50	6.5	60
	4	95	7.5	60
	4.1	5	7.6	25
	5	5	8.5	25
カラム温度	インタクト mAb と脱グリコシル化 mAb では 60 °C、他のサンプルでは 40 °C			
流量	インタクト mAb では 0.5 mL/min、サブユニットでは 0.8 mL/min			
注入量	1 µL			

表 3. 質量分析計のパラメータ

パラメータ	Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF		
	インタクト抗体	F(ab') ₂	サブユニット
イオン源	デュアル Agilent Jet Stream	デュアル Agilent Jet Stream	デュアル Agilent Jet Stream
ガス温度	350 °C	350 °C	350 °C
ガス流量	12 L/min	12 L/min	12 L/min
ネブライザ	60 psi	35 psi	35 psi
シースガス温度	400 °C	400 °C	400 °C
シースガス流量	11 L/min	11 L/min	11 L/min
VCap	5,500 V	4,000 V	4,000 V
ノズル電圧	2,000 V	2,000 V	2,000 V
フラグメンタ電圧	380 V	180 V	180 V
スキマ電圧	140 V	65 V	65 V
質量範囲	800-5,000 m/z	800-5,000 m/z	400-3,200 m/z
スキャン速度	1 スペクトル/秒	1 スペクトル/秒	1 スペクトル/秒
取り込みモード	高 (10,000 m/z)	高 (10,000 m/z)	標準 (3,200 m/z)
	質量範囲	質量範囲	質量範囲
	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)	高分解能 (4 GHz)

データ解析

トータルイオンクロマトグラム (TIC) のピークごとのスペクトルを抽出し、Agilent MassHunter BioConfirm の最大エントロピーアルゴリズムを用いてデコンボリュートしました。表 4 に、デコンボリューションのパラメータを示します。

結果と考察

2 種のモノクローナル抗体について未加工サンプルからデータ解析までの統合された精密質量測定ワークフローのパフォーマンスを示します。ハーセプチンの例では、固有の抗体抗原相互作用をどのように使用すると、複雑なマトリックスから特定の抗体を精製して、その後の質量の特性解析に利用できるかを示します。NIST mAb は、幅広い抗体に結合する汎用性の高いアフィニティリガンド (抗体の Kappa

表 4. 最大エントロピーデコンボリューションのパラメータ

パラメータ	最大エントロピーデコンボリューションの設定			
	インタクト mAb	F(ab') ₂	LCHC	サブユニット
質量範囲 (Da)	140-160 K	90-110 K	20-60 K	21-28 K
質量ステップ (Da)	1	1	1	1
限られた m/z 範囲の使用	2,000~4,500	1,800~3,000	900~2,600	1,000~2,600
ベースライン係数	3.5	6.0	6.0	6.0
付加物	プロトン	プロトン	プロトン	プロトン
同位体幅	自動	自動	自動	自動

軽鎖の L タンパク質アフィニティ) も精製ツールとして使用でき、その際に抗体固有の試薬を生成する必要がないことを示しています。ハーセプチン (トラスツズマブ) および NIST mAb 標準品を、アフィニティ精製するか、脱グリコシル化するか、または IdeS で分解し、その後

AssayMAP Bravo プラットフォームを用いて還元しました (表 1 および図 2)。次に、LC/MS 分析を実施しました。その結果を図 6 から図 11 に示します。

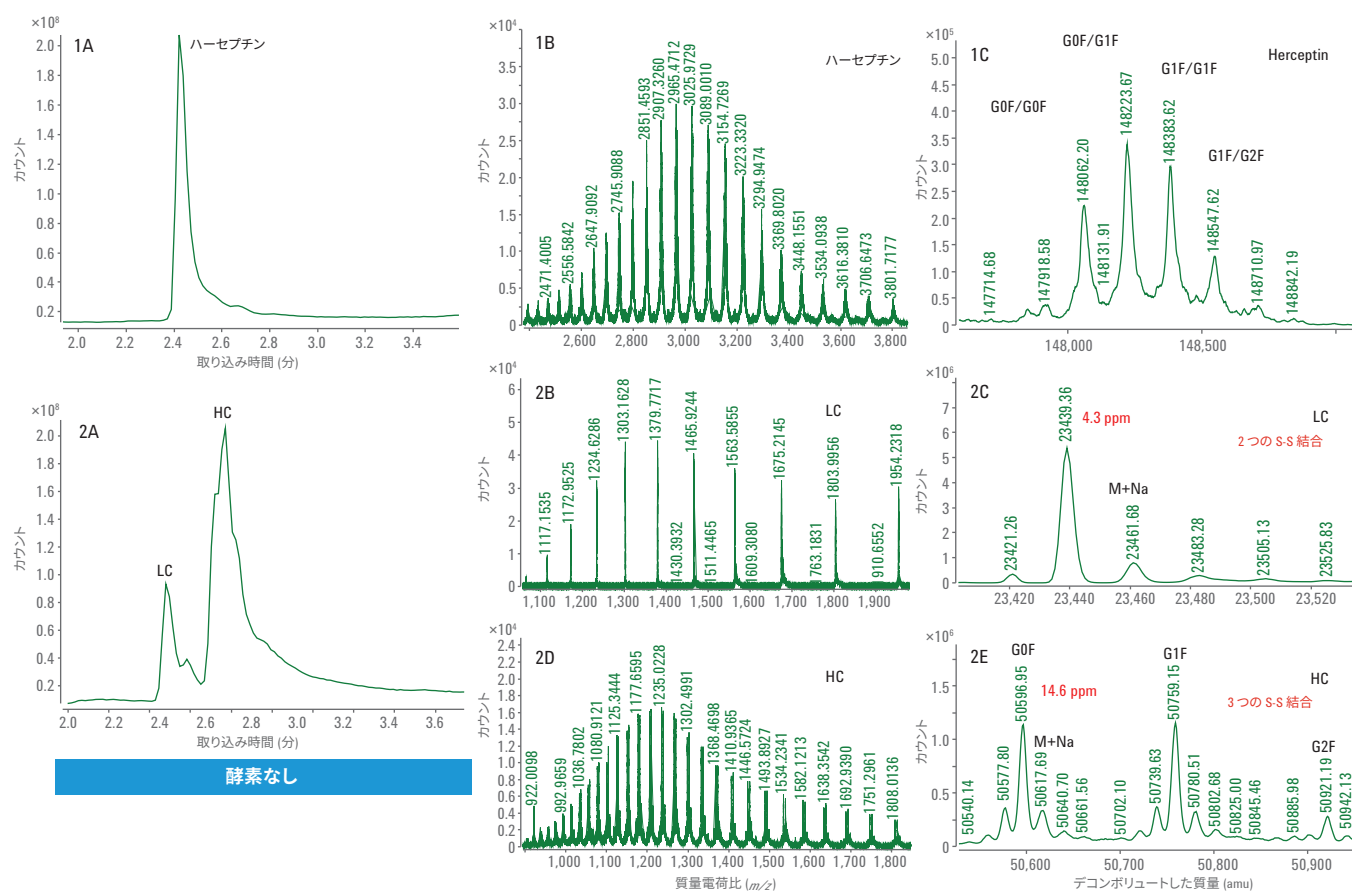


図 6. 1A、2A) ECD で精製されたインタクトハーセプチンおよび還元ハーセプチンの TIC。1B、2B、2D) インタクトハーセプチンおよび還元ハーセプチンの質量スペクトル。1C、2C、2E) インタクトハーセプチンおよび還元ハーセプチンのデコンボリュートしたスペクトル。LC = 軽鎖、HC = 重鎖

精製されたインタクトハーセプチン (図 6-1) および NIST mAb (図 9-1) を、LC/Q-TOF によって分析しました。いずれも UHPLC 分離後に示したピークは 1 つのみでした。このことは、AssayMAP Bravo でアフィニティ精製を実施すると、高度に精製された mAb が得られることを示します。図 6-1C および図 9-1C のデコンボリュートした Q-TOF MS スペクトルから、インタクトハーセプチンでは中性分子質量が 148,062.20、インタクト NIST mAb では 148,040.02 (4.02 ppm) であることがわかります。精製されたハーセプチンの質量は、理論値 148,058.83 を数ダルトン超えていました。この非特異的な付加体は、イオン源で完全に脱溶媒化されずに、インタクト質量レベルで部分的に分離される可能性があります。しかし、NIST mAb は精製後に良好な質量精度を示し、Affinity Purification (アフィニティ精製) アプリケーションが有用であることを実証しました。

TCEP を用いて精製インタクト mAb を室温で還元した後に、8.5 分のグラジエントで UHPLC により軽鎖と重鎖を分離しました (表 2 のグラジエント 2 で mAb を還元)。デコンボリュートした軽鎖質量はどちらも、ハーセプチン軽鎖の場合には 23,439.36 で 4.3 ppm (図 6-2C)、NIST mAb の場合には 23,124.00 で 2.39 ppm という良好な質量精度を示しました (図 9-2C)。この結果では、TCEP が、両方の軽鎖で 2 つの鎖内ジスルフィド結合を保持しながら、軽鎖と重鎖の間の鎖間ジスルフィド結合のみを還元したことも示しました。重鎖質量を調査したときに、両方の抗体における重鎖で鎖内ジスルフィド結合が還元されました。その際、中性分子質量がハーセプチンでは 50,596.95 (14.6 ppm) (図 6-2E)、NIST mAb では 50,901.81 (0.18 ppm) (図 9-2E) でした。インタクトハーセプチンの理論上の質量と測定された質量の間に観測され

た質量差は、軽鎖でも重鎖でも観測されませんでした。代わりに、ハーセプチン軽鎖のナトリウム付加体では中性分子質量が 23,461.68 (図 6-2C)、ハーセプチン重鎖のナトリウム付加体では 50,617.69 (図 6-2E) であることを明確に確認できました。

C 行および D 行 (表 1) で、精製されたインタクト mAb サンプルにカートリッジでの脱グリコシル化が実施され、サンプルの半分は TCEP によって還元されました (表 1 の B、D、F の各行)。脱グリコシル化ハーセプチンと脱グリコシル化 NIST mAb のどちらも、デコンボリュートしたスペクトルで、グリカンなしの 1 つの大きなピークを示しました (図 7-1C および 10-1C)。

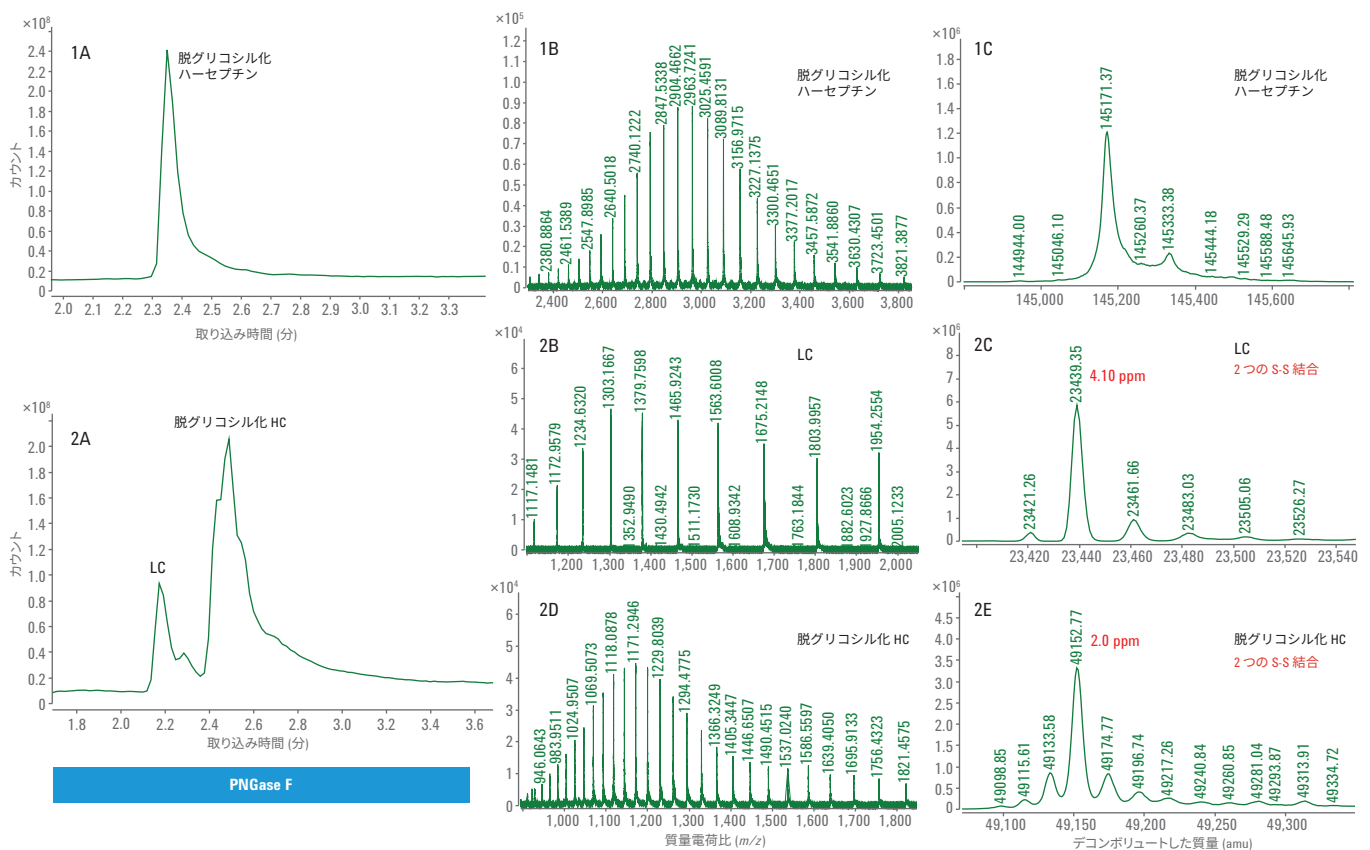


図 7. 1A、2A) PNGase F を用いたカートリッジでの脱グリコシル化後の、ECD で精製されたインタクトハーセプチンおよび還元ハーセプチンの TIC。1B、2B、2D) 脱グリコシル化ハーセプチン、LC、および HC の質量スペクトル。1C、2C、2E) 脱グリコシル化ハーセプチン、LC、および HC のデコンボリュートしたスペクトル。LC = 軽鎖、HC = 重鎖

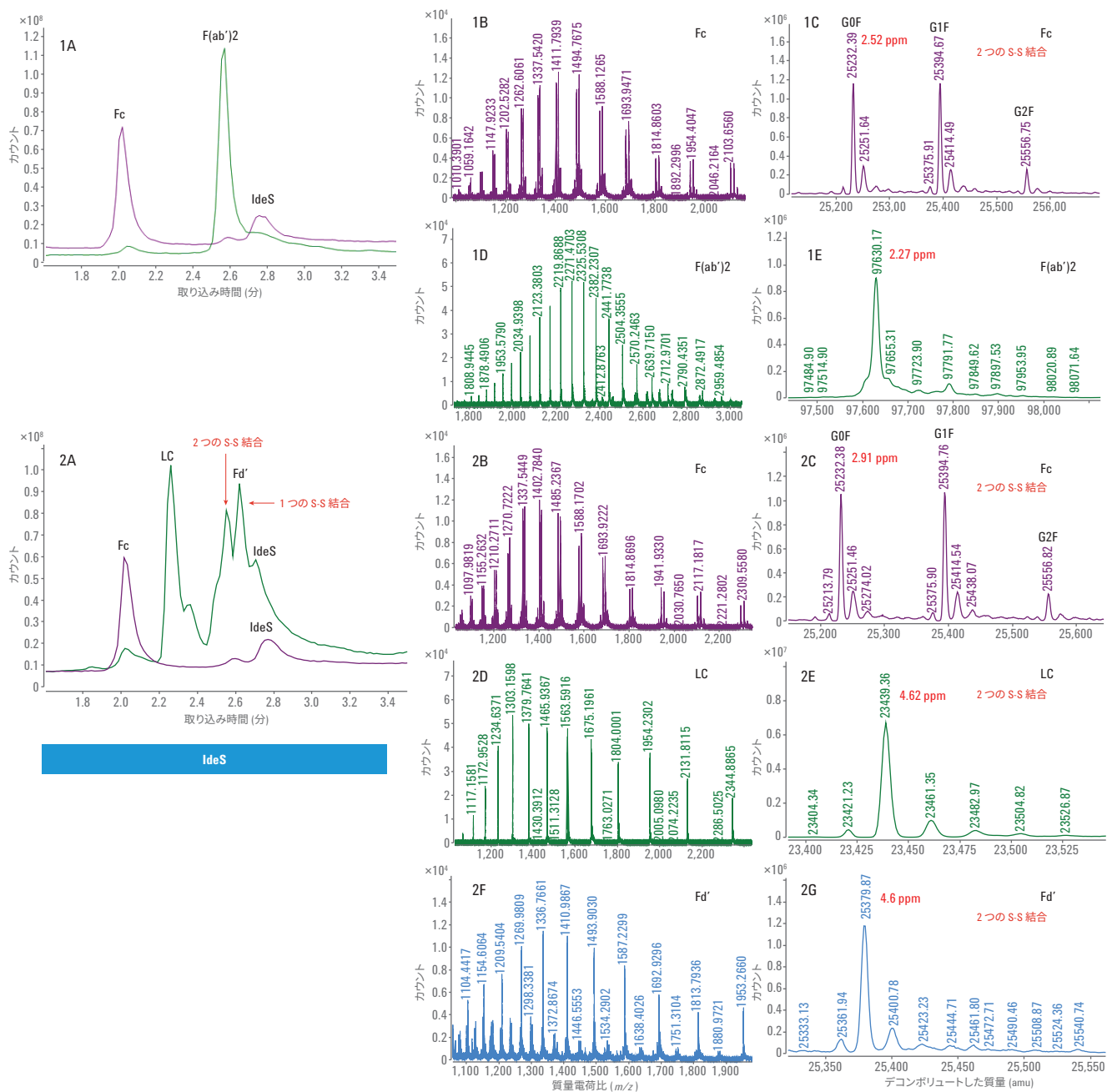


図 8. 1A、2A) カートリッジでの IdeS 反応および還元後の、ECD で精製されたハーセチンからのサブユニットの TIC。
 1B、1D、2B、2D、2F) ハーセチンサブユニットの質量スペクトル。1C、1E、2C、2E、2G) ハーセチンサブユニットのデコンボリュートしたスペクトル

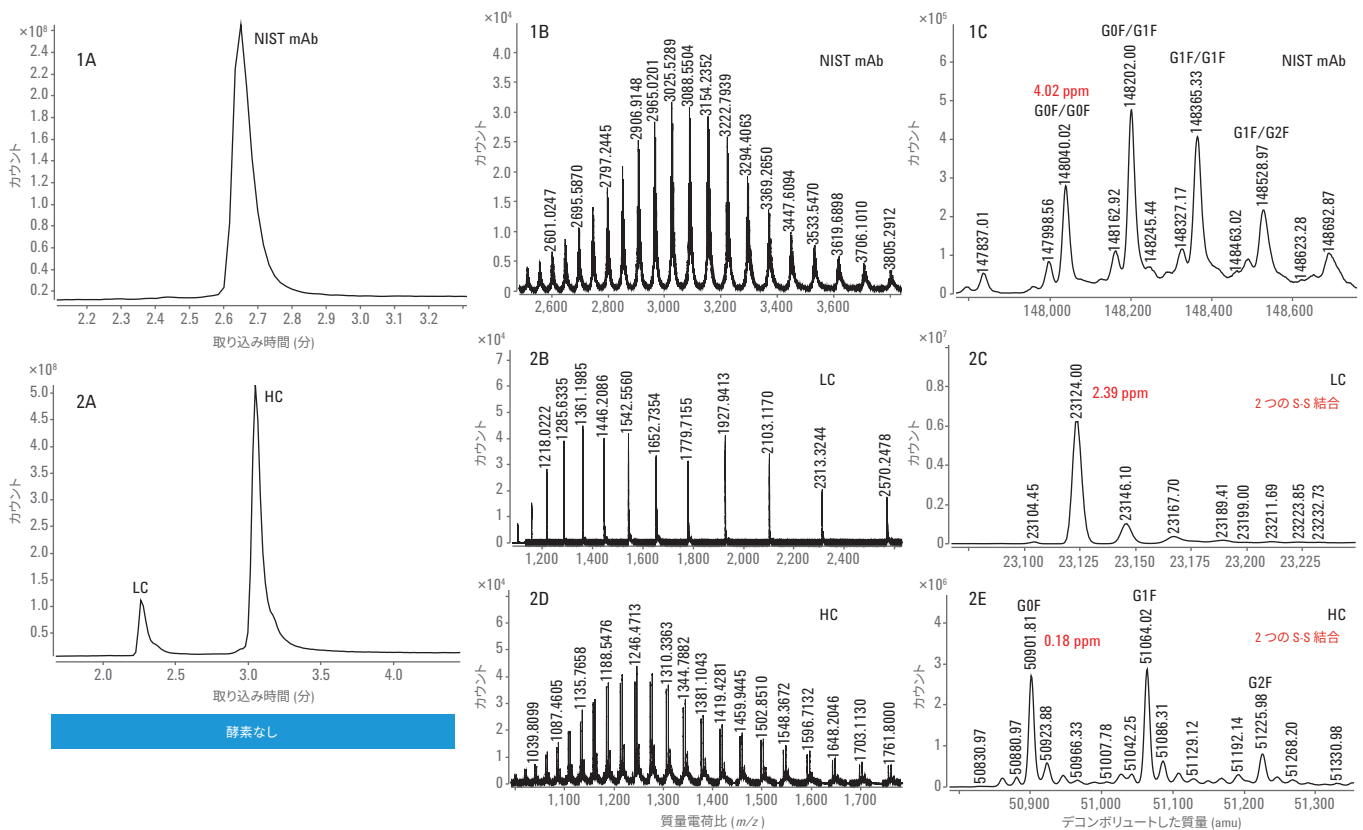


図 9. 1A、2A) L タンパク質で精製されたインタクト NIST mAb および還元 NIST mAb の TIC。1B、2B、2D) インタクト NIST mAb および還元 NIST mAb の質量スペクトル。1C、2C、2E) インタクト NIST mAb および還元 NIST mAb のデコンボリュートしたスペクトル。LC = 軽鎖、HC = 重鎖

両方の脱グリコシル化した mAb で、デコンボリュートした質量は、理論値よりもおよそ 3 Da 大きく、マスシフトは約 20 ppm です。これは、イオン源で完全に脱溶媒化されずに、インタクト質量レベルで部分的に分離された非特異的な付加体である可能性があります。軽鎖と重鎖のデコンボリュートした質量により、mAb がより明確になりました。還元されたサンプルを、8.5 分間のグラジエントで分析しました (表 2)。図 7-2C および図 10-2C のデコンボリュートしたスペクトルは、中性分子質量がハーセプチン軽鎖では 23,439.35 (4.1 ppm) で、NIST mAb 軽鎖では 23,124.12 (7.7 ppm) であったことを示しています。この結果は、図 6-2C および図 9-2C の結果と一致しています。図 7-2E および図 10-2E のデコンボリュートしたスペクトルは、中性分子質量がハーセプチン重鎖では 49,152.77 (2 ppm) で、NIST mAb 重鎖では 49,457.87 (12.16 ppm) であったことを示してい

ます。脱グリコシル化の後に、TCEP は 2 つの重鎖内で 2 つの鎖内ジスルフィド結合を還元できたと思われます。その原因は、脱グリコシル化によって重鎖のフォールディング全体が変わり、TCEP 還元においてより多くのスペースが開いたためであると考えられます。これは、1 つのジスルフィド結合のみが還元された、グリコシル化重鎖のデコンボリュートした質量から得られた結果 (図 6-2E および図 9-2E) とは異なります。

カートリッジでの IdeS 反応により、30 分以内に、両方の mAb の Fc および F(ab')₂ フラグメントが生成されました。AssayMAP Bravo アプリケーションでは、フロースルーで Fc を採取するか、**combine with elute (溶出液と結合)** の機能を用いて溶出液プレートでそれを F(ab')₂ に結合させることができました (図 5)。この実験では、フロースルーで Fc を採取し、溶出プレー

トで F(ab')₂ フラグメントを採取することを選択しました。図 8-1A および図 11-1A は、両方の mAb からの Fc および F(ab')₂ のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の重なりを示します。デコンボリュートしたスペクトルは、ハーセプチン Fc (GOF) では中性分子質量が 25,232.39 (2.52 ppm) で、NIST mAb Fc (GOF) では 25,232.41 (2 ppm) であったことを示しました。2 つの mAb は実際に Fc 領域で同一のアミノ酸配列を持っています。このことが実験結果によってさらに確認されました。デコンボリュートしたスペクトルは、ハーセプチン F(ab')₂ の中性分子質量が 97,630.17 (2.27 ppm) であることを示しました (図 8-1E)。理論値は 97,629.95 です。デコンボリュートした NIST F(ab')₂ (図 11-1E) は、中性分子質量が 97,610.84 (2.97 ppm) であることを示しました。理論値は 97,610.55 です。

F(ab')₂ サンプルの還元により、両方の mAb から軽鎖と Fd' フラグメントが良好な質量精度で生成されました。デコンボリュートしたスペクトル (図 8-2E) は、ハーセプチン軽鎖の中性分子質量が 23,439.36 (4.62 ppm)であることを示しました。これは図 6-2C および図 7-2C と一致しています。デコンボリュートしたスペクトル (図 11-2E) は、NIST mAb 軽鎖の中性分子質量が 23,124.02 (3.24 ppm) であることを示

しました。これは図 9-2C および図 10-2C と一致しています。ハーセプチン Fd' の TIC は、Fd' の 2 つのジスルフィド結合部位に対応するリテンションタイム 2.55 分および 2.62 分でピークの割れを示しました (図 8-2A)。リテンションタイム 2.55 分でのピークは、中性分子質量が 25,379.87 (4.6 ppm) であることを示しました。理論値は 25,379.75 です。このピークは、2 つの鎖内ジスルフィド結合がある Fd' でした (図

8-2G)。リテンションタイム 2.62 分でのピークは、1 つの鎖内ジスルフィド結合がある Fd' であり、中性分子質量は 25,381.61 (6.3 ppm) です (スペクトルは示されていません)。デコンボリュートした質量が 25,685.34 (0.9 ppm) であった NIST mAb Fd' (図 11-2A) には、2 つの鎖内ジスルフィド結合が含まれています (図 11-2G)。

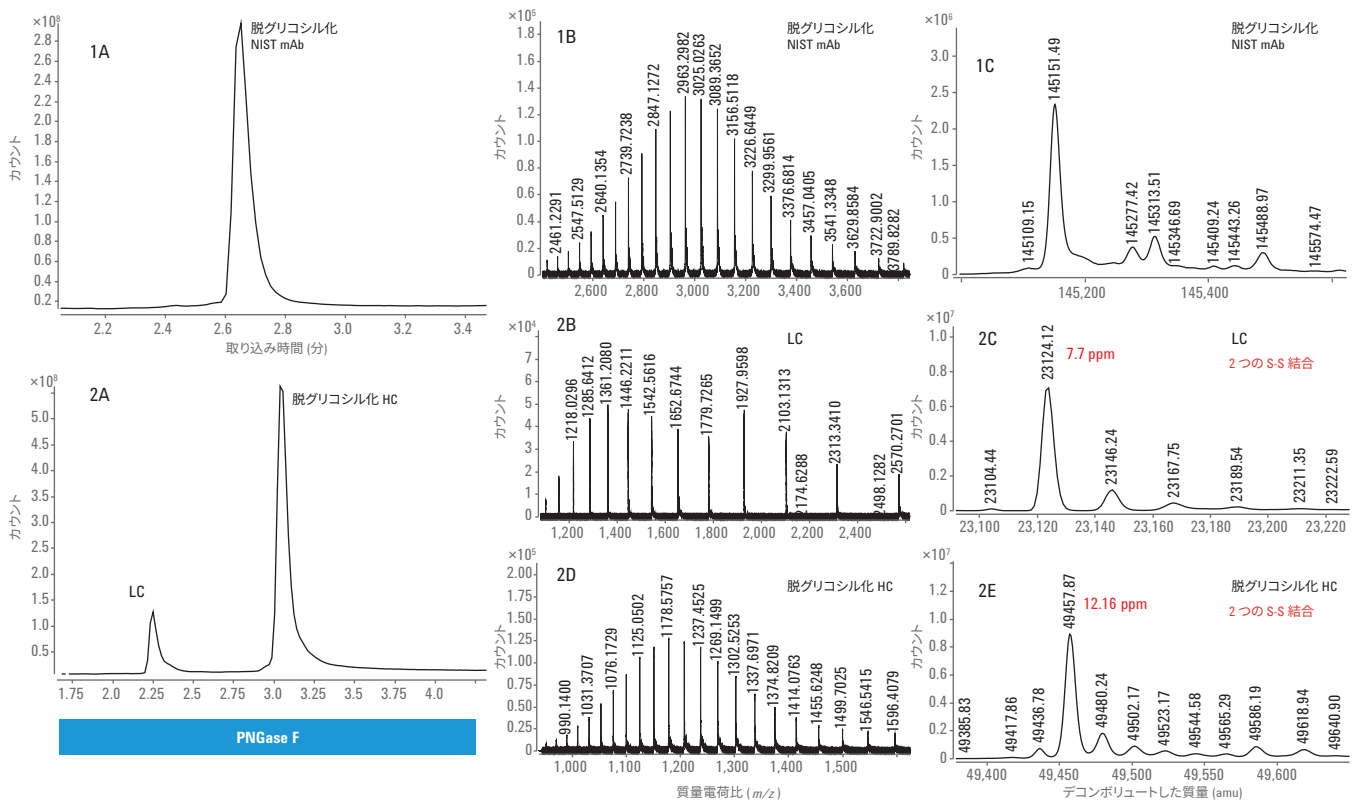


図 10. 1A、2A) PNGase F を用いたカートリッジでの脱グリコシル化後の、L タンパク質で精製されたインタクト NIST mAb および還元 NIST mAb の TIC。
1B、2B、2D) 脱グリコシル化 NIST mAb、LC、および HC の質量スペクトル。1C、2C、2E) 脱グリコシル化 NIST mAb、LC、および HC のデコンボリュートしたスペクトル。
LC = 軽鎖、HC = 重鎖

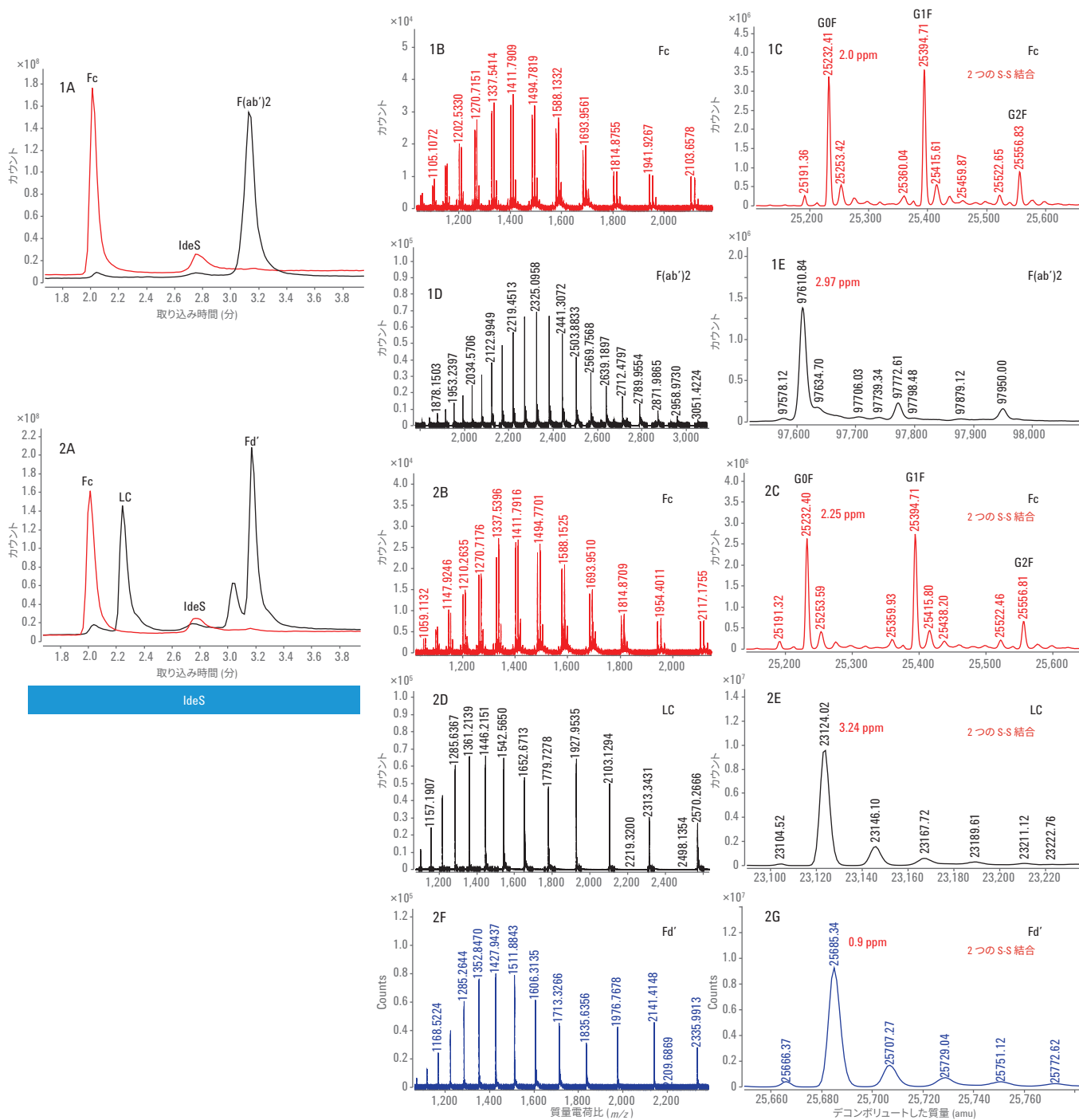


図 11. 1A、2A) Lタンパク質で精製された NIST mAb からのサブユニットの TIC。1B、1D、2B、2D、2F) NIST mAb サブユニットの質量スペクトル。

1C、1E、2C、2E、2G) NIST mAb サブユニットのデコンボリュートしたスペクトル

結論

Agilent AssayMAP Bravo Platform は、モノクローナル抗体の特性解析の統合ワークフローの主要な構成要素であり、広範なインタクト mAb 質量測定が含まれています。サンプル前処理の自動化、ヒューマンエラーの低減、再現性の確保が可能になり、分析者がその場を離れて他の作業を実行できるようになります (図 1 および 2)。現在の分析で、AssayMAP Bravo を使用してサンプル前処理の 4 つのカラムを完了するのに全体で 5.5 時間必要でした。同じ数のサンプルを手動で前処理すると、少なくとも 1 日かかります。サンプル前処理の 12 個のカラムのすべて (プレート全体) が必要な場合でも、AssayMAP Bravo で必要な処理時間はおよそ 5 ~ 6 時間のままです。しかし、プレート全体を手動でサンプル前処理すると、1 日を超えるコンスタントなベンチワーク時間が必要になります。AssayMAP Bravo は、ワークフロー全体を自動化し、結果を得るまでの時間を短縮する、使いやすいプラットフォームを提供します。AssayMAP Bravo は、マイクロクロマトグラフィーカートリッジを用いたタンパク質とペプチドのサンプル前処理、シンプルで信頼性の高い自動処理、アプリケーションベースのユーザーインターフェースに特化して設計されています。アジレントは、AssayMAP Bravo での自動化されたアフィニティ精製と酵素分解を、UHPLC、Agilent AdvanceBio Q-TOF、使いやすい Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアと統合することによって、抗体特性解析のための包括的なソリューションを提供します。

また、このワークフローは汎用性が高く、インタクト抗体とサブユニットタンパク質の両方の質量解析を実施できます。広範な特性解析研究のニーズに対応できるよう、カートリッジでの脱グリコシル化、IdeS プロテアーゼによるタンパク質分解、またはサブユニットを遊離するための還元処理を実行したり、3 つのすべてのステップを一緒に実行したりする柔軟性も備えています。ECD と L タンパク質の両方が、使用済み CHO セルメディアから高い純度で mAb を精製できます。

この統合的なアプローチにより、抗体前処理をバッチ間で比較するための高スループット解析も可能になります。クロマトグラフィー分離能が優れているため、インタクト抗体とそれらの軽鎖および重鎖サブユニット (さまざまなジスルフィド形態を含む) を高速かつ効率的に分離できます。Agilent AdvanceBio Q-TOF は、高分解能スペクトルを生成して、タンパク質質量解析で高い質量精度を達成します。MassHunter BioConfirm データ分析ソフトウェアは、自動化されたデータ抽出、デコンボリューション、配列マッチングを含む、包括的なタンパク質分析ワークフローを実現します。

謝辞

このプロジェクトに尽力いただいた元共同研究者の Jing Chen 氏に感謝いたします。

参考文献

1. Chames, P.; Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *mAbs* **2009**, *1*(6), 539-547.
2. Wang, D. L.; *et al.* Precise Characterization of Intact Monoclonal Antibodies by the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF. *Agilent Technologies*, publication number 5991-7813EN.
3. Beck, A.; Wagner-Rousset, E. Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.* **2013**, *85*(2), 715-736.
4. Zhang, Q.; Bateman, K. P. Automated DBS microsampling, microscale automation and microflow LC-MS for therapeutic protein PK. *Bioanalysis* **2016**, *8*(7), 649-659.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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, November 15, 2017

5991-8445JAJP



Agilent Technologies