

インタクトおよび脱グリコシル化抗体薬物 複合体の薬物抗体比の効率的な 測定ワークフロー

Agilent AssayMAP Bravo および Agilent 6545XT
AdvanceBio 精密質量四重極飛行時間型 LC/MS システム

著者

Jerry Han, Zach Van Den
Heuvel, and Steve Murphy
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA 95052

はじめに

抗体薬物複合体 (ADC) は、急成長している生体分子医薬品であり、合成リンカーによって低分子医薬品に結合されたモノクローナル抗体 (mAb) で構成されています。結合された薬物と mAb の比 (薬物抗体比: DAR) は、効果と安全性に影響を与えるため、ADC 開発の重要な品質特性の 1 つです^{1,2}。生体内の DAR 分布の変化をモニタリングすることにより、ADC の生体内分解 (例えば薬物の脱結合) に対する重要な理解を得ることができます^{3,4}。しかし、LC/MS で繰り返し実行される平均 DAR や DAR 分布の測定では、複雑なマトリックス (例えば血清/血漿) からの ADC の親和性捕捉や精製済み抗体の脱グリコシル化など、煩雑でミスが起きやすいサンプル前処理手順が必要です。この複雑なサンプル前処理ワークフローの課題に対応するために (図 1)、本アプリケーションノートでは Agilent AssayMAP Bravo Platform におけるアフィニティ精製と脱グリコシル化の自動化について説明します^{5,6}。血清中にすべての DAR 種 (0 ~ N) のある ADC の単離を可能にするために、標的抗原を用いてアフィニティ精製を実行しました。脱グリコシル化によってさまざまなグリコフォームを除去することで、精製された抗体の質量スペクトルをシンプルなものにし、検出下限を向上させました。手作業の時間を最小に抑え、抗原の固定、アフィニティ精製、オンカートリッジ脱グリコシル化を含む自動処理全体を約 5 時間で完了することができました。

本アプリケーションノートでは、AssayMAP Bravo を Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、Agilent BioConfirm DAR Calculator ソフトウェアと組み合わせて使用する効率的な ADC DAR ワークフローを紹介します。このワークフローは導入が容易で再現性が高く、拡張性に優れ、手作業の時間を最小に短縮します。

実験方法

材料

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、HE2-H5225) から購入しました。トラスツマブエムタンシン (T-DM1) は Genentech 社が製造したものです。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチン、Pierce ビオチン定量キット、Zeba スピン脱塩カラム (7K MWCO、0.5 mL) は Thermo Fisher Scientific 社 (ニューヨーク州グランドアイランド、327、28005、89882) から入手しました。ラット血清は Sigma-Aldrich 社 (ミズーリ州セントルイス、R9759) から入手しました。Rapid PNGase F は New England Biolabs 社 (マサチューセッツ州イプスウィッチ、P0711) から入手しました。AssayMAP Streptavidin カートリッジは Agilent Technologies 社 (カリフォルニア州サンタクララ、SA-W、G5496-60010) から入手しました。10X HEPES バッファ、100 mM、1.5 M NaCl、pH 7.4 (HBS-N) は GE Healthcare Life Sciences 社 (マサチューセッツ州マルボロ、BR100670) から入手しました。5 M NaCl は Promega 社 (PAV4221) から入手しました。1 M Tris-HCl、pH 8.0 は Quality Biological 社 (351-007-101) 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。

HER2 ECD のビオチン化

最終濃度を 2 mg/mL にするために、1 mg の凍結乾燥済み遺伝子組み換え HER2 ECD を 500 μ L の Milli-Q 水で再溶解しました。メーカーの指示に従い、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-ビオチンを使用して、再溶解済みの HER2 ECD の半分 (250 μ L 中 0.5 mg) をビオチン化しました。ビオチンの過剰モル倍率は 250 で、室温で 1 時間インキュベーションしました。ラベリング後、Zeba スピン脱塩カラムを使用しゲルろ過することによって、余分な Sulfo-NHS-LC-ビオチンと Sulfo-NHS (副産物) を除去しました。メーカーの指示に従い、Pierce ビオチン定量キットを使用して、ラベリング済み HER2 ECD 中のビオチン化濃度を推定しました。

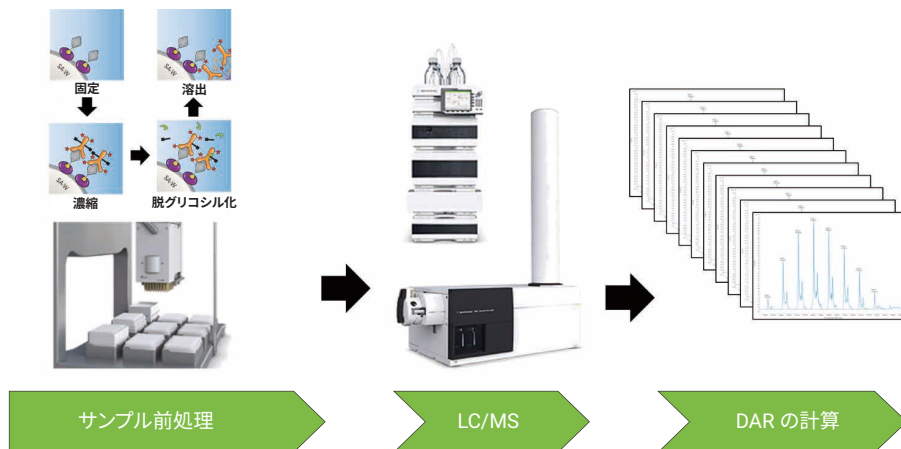


図 1. ADC DAR の特性解析のワークフロー

抗原固定、親和性捕捉、オンカートリッジ脱グリコシル化の自動化

自動化セットアップ: ビオチン化抗原の固定、ADC の精製、ADC の脱グリコシル化は、AssayMAP Bravo Platform で Immobilization (固定)、Affinity Purification (アフィニティ精製)、On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) アプリケーションを用いて実行しました。図 2 ~ 4 は、各手順で使用されるデッキレイアウトとラボウェアを示しています。表 1 に、サンプルと試薬の要約を示します。それぞれのアプリケーションに必要な溶液量は、対応する試薬容量カリキュレータを使用して算出しました。Immobilization (固定) アプリケーションのプラットフォームを準備するために、Cartridge Transfer (カートリッジ移動) v1.0 ユーティリティ (表 2B) を使用し、48 (6 カラム) のストレプトアビジン (SA-W) カートリッジをカートリッジラック (AssayMAP Bravo のデッキ 6) からカートリッジステーション (デッキ 2 上) に移動させました。

SA-W カートリッジのコンディショニング: SA-W カートリッジは、流量 300 μ L/min、100 μ L の 1% ギ酸 (FA) でプライミングし、樹脂に取り込まれた空気を除去しました。この後、流量 5 μ L/min、100 μ L の 1% FA による平衡化ステップへと続きます。平衡化ステップでは、溶出ステップで共溶出すると後の分析へ干渉しうる、カートリッジ樹脂に弱く結

合されているすべてのストレプトアビジンを除去します。図 2A はこのステップでの設定を示しています。SA-W カートリッジのコンディショニングとビオチン化抗原の固定を同時に行うこともできますが (Wu 氏ほか⁷⁾、本アプリケーションノートではわかりやすいように分けて実行しました。

ビオチン化済み HER2 ECD の固定: アフィニティ精製のアフィニティ (ペイト) カートリッジを生成するために、Immobilization (固定) v1.0 アプリケーションを使用して 3 μ g のビオチン化済み HER2 ECD を 48 個のストレプトアビジンカートリッジ (SA-W) のそれぞれに固定しました。図 2B はこのアプリケーションの設定を示しています。10 ベッドボリュームの結合バッファ (50 μ L、10 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4) を 10 μ L/min で使用して、SA-W コンディショニングステップでプライミングされたカートリッジを平衡化しました。次に、100 μ L の結合バッファ中の 3 μ g のビオチン化済み HER2 ECD を、平衡化済みカートリッジそれぞれに流量 5 μ L/min でロードしました。ビオチン化済み HER2 ECD をロードした後、ベッドボリュームの 10 倍 (50 μ L) の結合バッファを 10 μ L/min で使用してカートリッジを洗浄しました。これで、アフィニティ精製ステップのためのカートリッジの準備が整いました。

A

Immobilization: Using AssayMAP v1.0

Application Settings

Number of Full Columns of Cartridges: 6

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input checked="" type="checkbox"/>			3
Prime	<input checked="" type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	100	5	1
Load Sample	<input type="checkbox"/>	100	5	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 1	<input type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 1	<input type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Load Blocking Reagent	<input type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 2	<input type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 2	<input type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Stringent Syringe Wash	<input type="checkbox"/>	50		1
Re-Equilibrate	<input type="checkbox"/>	50	10	1
Final Syringe Wash	<input type="checkbox"/>			3

Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Priming & Equilibration Buffer
4. Sample	5. Cartridge Wash Buffer 1	6. Cartridge Wash Buffer 2
7. Flow Through Collection	8. Stringent Syringe Wash Buffer	9. Blocking Reagent

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

B

Immobilization: Using AssayMAP v1.0

Application Settings

Number of Full Columns of Cartridges: 6

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input type="checkbox"/>			3
Prime	<input type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Load Sample	<input checked="" type="checkbox"/>	100	5	3
Collect Flow Through	<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"/>			
Load Blocking Reagent	<input type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Cup Wash 2	<input type="checkbox"/>	25		1
Internal Cartridge Wash 2	<input type="checkbox"/>	50	10	3
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Stringent Syringe Wash	<input type="checkbox"/>	50		1
Re-Equilibrate	<input type="checkbox"/>	50	10	1
Final Syringe Wash	<input type="checkbox"/>			3

Deck Layout

1. Wash Station	2. Cartridges	3. Priming & Equilibration Buffer
4. Sample	5. Cartridge Wash Buffer 1	6. Cartridge Wash Buffer 2
7. Flow Through Collection	8. Stringent Syringe Wash Buffer	9. Blocking Reagent

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 2. Immobilization (固定) アプリケーションの設定。A) SA-W カートリッジのコンディショニング、(B) ビオチン化済み HER2 ECD の SA-W カートリッジへの固定

Affinity Purification: Using AssayMAP v1.0

Application Settings

Number of Full Columns of Cartridges: 6

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input type="checkbox"/>			3
Prime	<input type="checkbox"/>	100	300	1
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Load Sample	<input checked="" type="checkbox"/>	100	2	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"/>	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 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 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 Skat, PolyPro
5	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
6	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
7	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skat, PolyPro
8	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
9	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skat, PolyPro

図 3. Affinity purification (アフィニティ精製) アプリケーションの設定

AssayMAP App: ON-CARTRIDGE REACTION v1.0

Select Method

Browse for a Method: C:\Works Workspace-Methods\AM OnCartridge Reaction ... Load

Application Settings

Number of Full Columns of Cartridges: 6

Step	Conduct Step?	Volume (µL)	Flow Rate (µL/min)	Wash Cycles
Initial Syringe Wash	<input type="checkbox"/>			3
Equilibrate	<input checked="" type="checkbox"/>	50	10	1
Collect Flow Through	<input type="checkbox"/>			
Reaction	<input checked="" type="checkbox"/>	6		3
Temperature		45	°C	
Duration		30	Minutes	
Reaction Chase	<input checked="" type="checkbox"/>	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	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
4	96 Red PCR Insert + Eppendorf 30129300, PCR, Full Skat
5	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
6	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
7	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skat, PolyPro
8	12 Column, Low Profile Reservoir, Natural PP
9	96 Eppendorf 30129300, PCR, Full Skat, PolyPro

図 4. On-cartridge reaction (オンカートリッジ反応) アプリケーションの設定

ADC アフィニティ精製: 20 ~ 0.3125 µg/mL の異なる T-DM1 濃度の血清と、T-DM1 なしのコントロールを作成するために (表 2A)、さまざまな量の T-DM1 (トラスツズマブエムタンシン、HER2 ECD を標的とする ADC) を精製済みラット血清にスパイクしました。LC/MS への直接注入のために水で希釈したセットも準備しました。アフィニティによる捕捉のために、血清サンプルをビオチン化済み HER2 ECD-SA-W カートリッジにロードする直前に、結合バッファ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) を用いてさらに 1:1 で希釈しました。アフィニティ精製には、Affinity Purification (アフィニティ精製) v1.0 アプリケーションを使用しました。図 3 はこのアプリケーションの設定を示しています。簡単に説明すると、T-DM1 を含む 100 µL の希釈済みラット血清を、流量 2 µL/min でアフィニティカートリッジに通過させました。カートリッジの列 (n = 6) ごとに異なる濃度の T-DM1 をロードしました (プレートのレイアウトは表 2B を参照)。サンプルのロード後、流量 10 µL/min で、ベッドボリュームの 10 倍 (50 µL) の高塩 HEPES バッファ (50 µL, 10 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.4)、次いで ベッドボリュームの 10 倍 (50 µL) の結合バッファによって、連続的にカートリッジを洗浄しました。これで、脱グリコシル化のためのカートリッジの準備が整いました。

脱グリコシル化: グリカンが存在する場合と存在しない場合の DAR 分析を比較するために、精製済み T-DM1 のカートリッジの半分は PNGase F (カラム 1 ~ 3) でインキュベーションし、カートリッジの残りの半分 (カラム 4 ~ 6) は PNGase F を含まない脱グリコシル化用バッファ (脱グリコシル化コントロール無し) でインキュベーションしました (表 2B)。

表 1. サンプルと試薬

サンプルと試薬	
洗浄ステーション	Milli-Q 水、すべてのプロトコル用
Immobilization v1.0	
SA-W カートリッジのコンディショニング	
カートリッジ	SA-W (G5496-60010)
プライム	1 % 酢酸
平衡化	1 % 酢酸
ビオチン化済み HER2 ECD の固定:	
カートリッジ	コンディショニングされた SA-W
平衡化およびカートリッジ洗浄バッファ	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4
サンプル	ビオチン化 HER2 ECD
Affinity Purification v1.0	
カートリッジ	ビオチン化 HER2 ECD-SA-W
サンプル	さまざまな濃度の ADC がスパイクされたラット血清
カートリッジ洗浄 1	10 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.4
カートリッジ洗浄 2	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4
On-Cartridge Reaction v1.0	
カートリッジ	ADC-結合されたビオチン化済み HER2 ECD-SA-W
平衡化および chase バッファ	20 mM トリス, pH 8.0
脱グリコシル化酵素	PNGase F
カートリッジ洗浄 1	10 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.4
カートリッジ洗浄 2	0.003 % 酢酸
溶出バッファ	1 % 酢酸
中和溶液	0.5 % 水酸化アンモニウム

表 2. 実験計画。(A) 段階希釈およびロード量と (B) アフィニティ精製および脱グリコシル化のためのプレートレイアウト

A

段階希釈およびロード量			
ラット血清中の ADC 濃度 (µg/mL)	血清の使用量 (µL)	カートリッジにロードした質量 (ng)	LC カラムにロードした質量 (ng)
20	50	1000	200
10	50	500	100
5	50	250	50
2.5	50	125	25
1.25	50	62.5	12.5
0.625	50	31.25	6.25
0.3125	50	15.625	3.125
0	50	0	0

B

アフィニティ精製および脱グリコシル化のためのプレートレイアウト (ラット血清中の ADC 濃度 (µg/mL))						
	1	2	3	4	5	6
A	20	20	20	20	20	20
B	10	10	10	10	10	10
C	5	5	5	5	5	5
D	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
E	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
F	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625
G	0.3125	0.3125	0.3125	0.3125	0.3125	0.3125
H	0	0	0	0	0	0

脱グリコシル化

脱グリコシル化なし

オンカートリッジ脱グリコシル化には、On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) v1.0 アプリケーションを使用しました。図 4 はこのアプリケーションの設定を示しています。簡単に説明すると、T-DM1-結合カートリッジを、流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で ベッドボリュームの 10 倍 (50 μL) の脱グリコシル化バッファ (20 mM Tris、pH 8.0) により平衡化しました。反応ステップでは、4 μL の加熱された PNGase F (カラム 1 ~ 3) または脱グリコシル化用バッファ (カラム 4 ~ 6) を、デッキ位置 4 (ペルチェヒーター / クーラー) から各 T-DM1-結合カートリッジに吸引しました。反応ステップの後に、2 μL の低速吸引が 30 分以上続きます。このソフトウェアでは必ず、反応量の最初の 4 μL を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ でロードした後、残りの量 (今回の例では 2 μL) をフォームで設定した継続時間の間ロードします。反応の間、カートリッジチップをウェル内の溶液と接触させ、コンダクタンスによってカートリッジ内部の上昇した温度を保持しました。カートリッジ内を約 37 °C にするために (反応温度)、ペルチェ温度を 45 °C に設定しました。6 μL の溶液のみがカートリッジを通過して吸引されますが、1:12 に希釈した 12 μL の PNGase F (カラム 1 ~ 3) と脱グリコシル化用バッファのみ (カラム 4 ~ 6) が、反応の開始時に位置 4 の PCR プレートに分取されました。蒸発によるボリューム損失があるほか、ウェルの底部とカートリッジのチップの間の接触を維持して熱が伝わるように、反応が終わるまでの間ウェルごとに少なくとも 3 μL が必要となるため、カートリッジを通過して吸引されるよりも多くの量が必要となります。必要となる超過量は温度設定や反応時間により異なります。反応後のカートリッジ内に残留する遊離グリカンを集めるために、流量 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 25 μL の脱グリコシル化用バッファ (“reaction chase” バッファ) を各カートリッジに通過させて、シリンジブローブに吸引しました。シリンジに集められたフロースルー (“reaction chase” バッファ、遊離 N-グ

リカン、酵素溶液の混合溶液) を空のフロースルーコレクションプレートに分注しました。流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で、ベッドボリュームの 10 倍 (50 μL) の高塩 HEPES バッファ (50 μL 、10 mM HEPES、1 M NaCl、pH 7.4) を用いて、カートリッジを洗浄しました。この後に、同じ流量で、10 ベッドボリュームの 0.003 % FA を用いて低ストリンジェンシー洗浄を行い、高塩 HEPES バッファ (MS では使用不可) といくつかの非特異的結合エンティティを除去しました。カートリッジに固定された脱グリコシル化 T-DM1 (カラム 1 ~ 3) またはインタクト T-DM1 (カラム 4-6) を、流量 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、15 μL の 1 % FA を用いて、ウェルごとに 15 μL の 0.5 % 水酸化アンモニウム (存在する採取量) を含んだ溶出プレートに溶出し、即座にサンプルを中和しました。各サンプルの最終量

は 30 μL でした。最後に、水中の希釈された未処理の T-DM1 サンプルと処理済みのサンプルを空のウェルに移し、Agilent PlateLoc プレートシーラーを用いてプレートをシールしました。これで、LC/MS 分析用のサンプルの準備が完了しました。

LC/MS 分析

準備したサンプルを、Agilent 6545XT AdvanceBio 精密質量四重極飛行時間 LC/MS システムと Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムを組み合わせて分析しました。LC/MS パラメータは、表 3A と 3B に示されているとおりに設定しました。サンプルごとに、30 μL のうち 6 μL (20 %) を分析用に注入しました。

表 3. LC および MS パラメータ。A) ADC 分離に使用した LC パラメータ。
B) インタクト ADC の MS データを取り込むために使用した MS パラメータ

パラメータ	設定値
A	
Agilent 1290 Infinity II UHPLC システム	
カラム	Agilent PLRP-S 1000Å 8 μm 150 \times 2.1 mm (PL1912-3802)
サンプルサーモスタット	5 °C
移動相 A	0.1 % FA 水溶液
移動相 B	0.1 % FA アセトニトリル溶液
グラジエント (セグメント化)	時間 (分) %B
	0-1 25-25
	1-2 25-37
	2-4 37-37
	4-4.5 37-50
	4.5-5.5 50-50
	5.5-6 50-25
6-8.5 25-25	
ストップタイム	8.5 分
カラム温度	60 °C
流量	0.4 mL/min
B	
Agilent 6545XT AdvanceBio 精密質量四重極飛行時間型 MS システム	
イオンモード	ポジティブイオンモード
イオン源	Agilent Dual Jet Stream
ドライガス温度	350 °C
ドライガス流量	12 L/min
ソースガス温度	400 °C
ソースガス流量	11 L/min
ネブライザ	60 psi
キャピラリー電圧	5,500 V
ノズル	2,000 V
フラグメンタ電圧	380 V
スキマ電圧	140 V
Oct RF Vpp	750 V
取り込みパラメータ	高 (30,000 m/z) 質量範囲
MS モード	拡張質量範囲 (2 GHz)
	MS のみのモード
	質量範囲 1,000-5,000 m/z

MS データ解析

生データは、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアで解析しました。3.05 分から 3.85 分間のリテンションタイムの平均スペクトルをトータルイオンクロマトグラム (TIC) から抽出し、デコンボリュートしました。表 4 に、デコンボリュートのパラメータを示します。DAR 解析では、デコンボリュートしたスペクトルをエクスポートし、Agilent MassHunter DAR カリキュレータを用いて解析しました。最大 DAR ピーク数を 7 に設定した以外は、DAR カリキュレータのデフォルトパラメータを使用して、インタクト (非還元)、リジンの結合した ADC の DAR 値を求めました。定量分析の再現性と性能を評価するために、Agilent MassHunter Qualitative Analysis を使用して m/z が 2,000 ~ 4,000 の範囲の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を抽出し積分しました。

結果と考察

ADC DAR の特性解析

Agilent AssayMAP Bravo Platform を使用して、血清中の ADC DAR 特性解析における複雑なサンプル前処理の問題に対処するために、包括的なワークフローを開発しました。自動化されたサンプル前処理のワークフローには次の作業ステップが含まれます。

- ビオチン化済み標的抗原の AssayMAP ストレプトアビジンカートリッジ (SA-W) への固定
- 複雑なマトリックスからの ADC の精製
- 精製済み ADC のオンカートリッジでの脱グリコシル化

次の 2 つの結果プレートが生成されました。

- 可溶性の反応生成物、この場合は N-グリカンを含むフロースループレート (今回は N-グリカンの分析は実施しませんでした)。
- 精製および脱塩済みのインタクトおよび脱グリコシル化された ADC を含む溶出プレート (ADC は LC/MS で分析しました)。

表 4. デコンボリュート用の Agilent MassHunter BioConfirm のパラメータ

パラメータ	Agilent MassHunter BioConfirm Deconvolute (MS): タンパク質
デコンボリュートアルゴリズム	最大エントロピー
デコンボリュートの設定	質量範囲: 140–160 KDa 質量ステップ: 1.0 Da
限られた m/z 範囲の使用	2,400–3,600 m/z
ベースライン	ベースライン減算 ベースライン係数: 7.00
付加体	プロトン
同位体幅	自動

Protein Sample Prep WorkBench では、Immobilization (固定) v1.0、Affinity Purification (アフィニティ精製) v1.0、On-Cartridge Reaction (カートリッジでの反応) v1.0 の 3 つのアプリケーションプロトコルを順に使用しました。今回の研究でのアプリケーションの設定 (図 2 ~ 4) を使用した場合、機器が要したおよその時間は、固定に 1 時間、アフィニティ精製に 1.2 時間、オンカートリッジ脱グリコシル化に 1.3 時間でした。自動化サンプルプロセス全体は約 4.5 時間で完了しました。AssayMAP により、最大 96 のサンプルの前処理を同時に完了でき、手作業の時間を最小に抑えて LC/MS 分析を 1 日で開始できました。

ビオチン化済み抗原と抗原結合カートリッジの前処理

遺伝子組み換えヒト HER2 ECD (アクセッション番号 AAA75493、細胞外領域: アミノ酸 Thr23–Thr652) は、T-DM1 への標的結合部位を含み、アフィニティ精製のペイトとして使用しました。非特異的な内在性抗体の捕捉を回避するために、ビオチン化済み抗原のアフィニティ精製手法ではプロテイン A/G カートリッジではなくストレプトアビジンカートリッジを使用しました。すべての DAR 種 (0 ~ N) を抗原精製によって単離することができました。抗原を AssayMAP ストレプトアビジンカートリッジに結合する最初のステップとして、第一級アミンにより HER2 ECD を Sulfo-NHS-LC-Biotin でラベリングしました。HER2 ECD には、15 のリジン残基とプロテイン N-末端の 16 の第一級アミンのラベリング部位が可能性として存在します。250 倍の過剰モルにより、室温で 1 時間の間に HER2

ECD 分子ごとに約 9 種類のビオチングループがラベリングされたものと結論づけられました。今回の研究では、各カートリッジの固定に 3 μg のペイト抗原 (捕捉する ADC の最大量の約 6 倍の過剰モル) を使用しました。このアフィニティ精製リガンドの質量は、SA-W カートリッジの結合容量をはるかに下回っていましたが、アフィニティリガンドの消費を最小に抑えつつ高いレベルのターゲット回収を可能にするために選択しました。

血清からの ADC のアフィニティ精製

ADC 開発中に何度も分析される生体内の ADC サンプルを再現するために、一連の希釈した T-DM1 をラット血清にスパイクして 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2A) の最終濃度とします。ロードステップでの効率的な結合を実現する重要なパラメータは、標的に対するアフィニティリガンドの過剰モルと、結合のための滞留時間です。滞留時間はロードの流量によってコントロールされます。この両方のパラメータを最適化し、最小のアフィニティリガンドの過剰モルを使用してコストを最小に抑え、一方で実行時間が最短となる最大の流量を使用しました。さまざまな条件を考慮して、過剰モルを約 6 倍とし、ロード流量を 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ としました。これらの変数は、他の結合パートナーに合わせて最適化する必要があります。

オンカートリッジ脱グリコシル化

ADC DAR の特性解析では、複数のグリコフォームにより MS スペクトルが複雑なものになり、DAR 計算の精度が低下します。このため、一般的に脱グリコシル化ステップを実施して LC/MS 分析前にグリコタンパクを除去します。今回の研究では、新たに開発されたオンカートリッジ反応手法を用いてカートリッジでのアフィニティ精製後に ADC を脱グリコシル化しました。従来の溶液中での脱グリコシル化反応と比べると、オンカートリッジ脱グリコシル化によってタンパク質精製、脱グリコシル化、バッファ交換のプロセス全体を効率化できます。このプロセス中に ADC から PNGase F を分離したため、LC/MS 分析でのイオン抑制を回避できました⁸。脱グリコシル化を 37 °C で実行し、ADC の完全性を維持して蒸発を最小に抑え、同時に完全な脱グリコシル化を 30

分以内に完了しました。必要な場合は、N-グリコタンパクをラベリングのために使用できます。

LC/MS によるサンプル前処理性能の評価

上述の方法で Agilent AssayMAP Bravo Platform を用いて準備した T-DM1 サンプルと未処理の T-DM1 コントロールを、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムで PLRP-S カラムにより分離して、Agilent 6545XT AdvanceBio 精密質量四重極飛行時間 MS システムで分析しました。TIC、EIC、抽出スペクトル、デコンボリュートしたスペクトル、DAR 値を、MassHunter ソフトウェアスイートを使用して生データから生成しました(詳細については MS データ解析を参照)。図 5 は、200 ng のコントロールおよび精製済み T-DM1 の LC/MS データを示しています(サンプル前処理中にオンカラムで 100 % 回収があったものと仮定)。

TIC は、血清にスパイクされたサンプルの最高レベルの純度、およびコントロール T-DM1 との比較での良好な回収率を示しました(図 5A-C)。コントロール、アフィニティ精製、アフィニティ精製と脱グリコシル化の T-DM1 サンプルの抽出スペクトルとデコンボリュートしたスペクトルは、ADC のアフィニティ精製による偏りが生じなかったことを示しています。また、オンカートリッジ脱グリコシル化によって、大部分のグリコフォームを除去することで、デコンボリュートしたスペクトルの簡素化と信号強度の向上が予想どおりに実現したことが示されました(図 5D-I)。

処理済み T-DM1

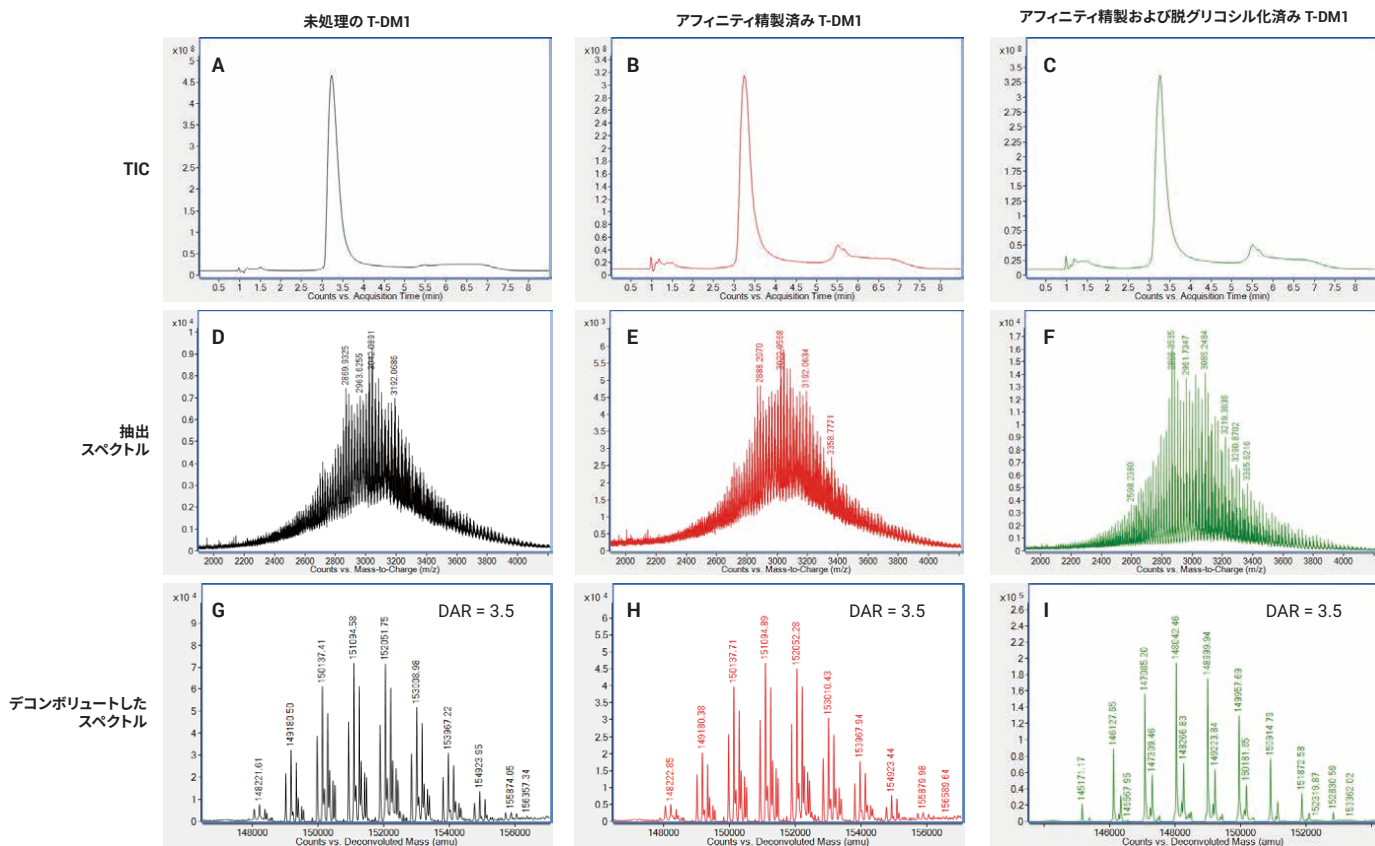


図 5. サンプル前処理の前後の 200 ng の T-DM1 から得られた代表的な TIC、抽出スペクトル、デコンボリュートしたスペクトル。未処理の T-DM1 (A)、アフィニティ精製済みのインタクト T-DM1 (B)、アフィニティ精製および脱グリコシル化済みの T-DM1 (C) の TIC。未処理の T-DM1 (D)、アフィニティ精製済みのインタクト T-DM1 (E)、アフィニティ精製および脱グリコシル化済みの T-DM1 (F) の抽出スペクトル。未処理の T-DM1 (G)、アフィニティ精製済みのインタクト T-DM1 (H)、アフィニティ精製および脱グリコシル化済みの T-DM1 (I) のデコンボリュートしたスペクトル

このワークフローの再現性を評価するために、前述のさまざまな濃度の T-DM1 をスパイクしたラット血清から精製した T-DM1 と、精製/脱グリコシル化した T-DM1 の両方について、EIC ベースの定量を実行しました。2,000 ~ 4,000 m/z の範囲にわたって EIC を抽出、積分しました。曲線下面積 (AUC) を相対定量に使用しました。図 6 は繰り返しテスト ($n = 3$) での EIC の重ね表示と %CV を示しています。3.125 ng のグリコシル化 T-DM1 サンプル (CV % = 14.50) を除くすべての %CV 値が 10 未満でした (図 6)。全体的に CV 値が低く、EIC が密接して重なっていることから、このワークフローの再現性が優れていることがわかります。

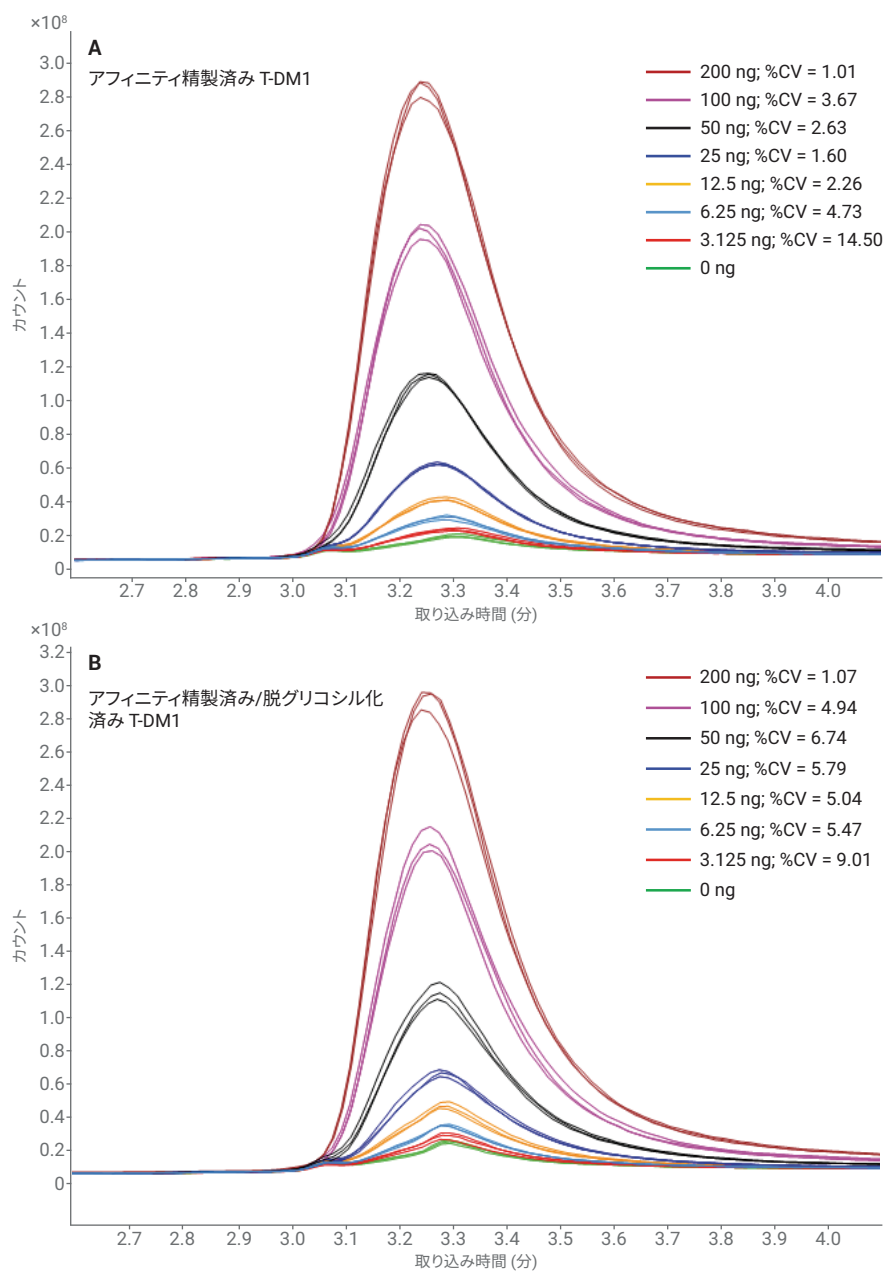


図 6. アフィニティ精製済み T-DM1 の EIC によって評価されたワークフローの再現性。ADC T-DM1 をラット血清に 20 ~ 0.3125 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でスパイクして、脱グリコシル化を伴うアフィニティ精製と伴わないアフィニティ精製によって回収し、その後にインタクト LC/MS 分析を実行しました。最初のサンプル入力に基づく、T-DM1 のカラムローディング質量を示しています (表 2A を参照)。この繰り返しトレースを同じ色で重ね表示して示しています。繰り返しテスト間の %CV は、積分された AUC に基づいて計算しました ($n = 3$)。

インタクトタンパク質レベルでのアフィニティ精製 T-DM1 の定量についてのワークフローの性能を、分析の直線ダイナミックレンジを基にさらに評価しました。精製済み T-DM1 と精製済み/脱グリコシル化済み T-DM1 の AUC をプロットしました (図 7)。回帰分析では、0.3125 ~ 10 µg/mL の T-DM1 (初期スパイク量に基づいた 3.125 ~ 100 ng のカラムロード量) の血清サンプルについて、精製済み T-DM1 ($R^2 = 0.9987$) と精製済み/脱グリコシル化済み T-DM1 ($R^2 = 0.9996$) の両方で優れた直線レスポンスが示されました。この分析で溶出物の 20 % のみを注入したことに注目してください。以上の結果によって、AssayMAP Bravo Platform を用いて複雑なマトリックスから ADC を単離し、定量分析することの実現可能性が実証されました。

DAR 値を算出するために、前述 (表 2A) のコントロール、精製済み、精製済み/脱グリコシル化済み T-DM1 サンプルから得られたデコンボリュートしたスペクトルを Agilent DAR カリキュレータによって解析しました。DAR 0 ~ 7 を使用して平均 DAR を求めました。3 回の繰り返しテストから計算された平均 DAR 値は、すべてのサンプルで約 3.5 ± 0.1 (図 8) でした。これは、報告されている DAR 値と一致しています⁹。コントロール T-DM1 の結果に基づく、DAR 測定の下限値はオンカラム T-DM1 で 3.125 ng です。AssayMAP プラットフォームでのアフィニティ精製の後に高い信頼性で測定できる T-DM1 の最小の血清濃度は 0.3125 µg/mL でしたが、このレベルのスペクトルはノイズが多いものでした。精製済み T-DM1 サンプルの脱グリコシル化により、質量スペクトルがシンプルになり、0.3125 µg/mL の血清濃度で信頼性のより高い DAR 測定が可能になりました (図 8)。

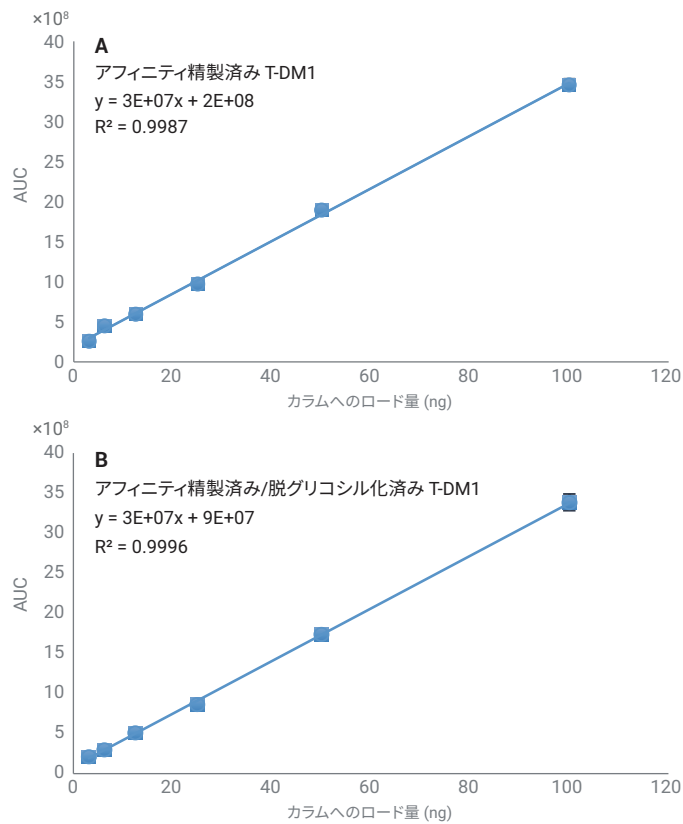


図 7. 血清サンプルのアフィニティ精製済みおよびアフィニティ精製済み/脱グリコシル化済み T-DM1 の直線ダイナミックレンジ解析。T-DM1 をラット血清にスパイクして、最終濃度を 0.3125 ~ 10 ng/µL としました。これらのサンプルの T-DM1 を、脱グリコシル化ありまたはなしでアフィニティ精製し、インタクト LC/MS 分析を実施しました。2,000 ~ 4,000 m/z の範囲の EIC が抽出され積分されました。AUC は、バックグラウンドを除去した後、これらのサンプルのオンカラム T-DM1 ロード量に対してプロットされました (表 2A)。直線性を評価するために、線形回帰分析を行いました。

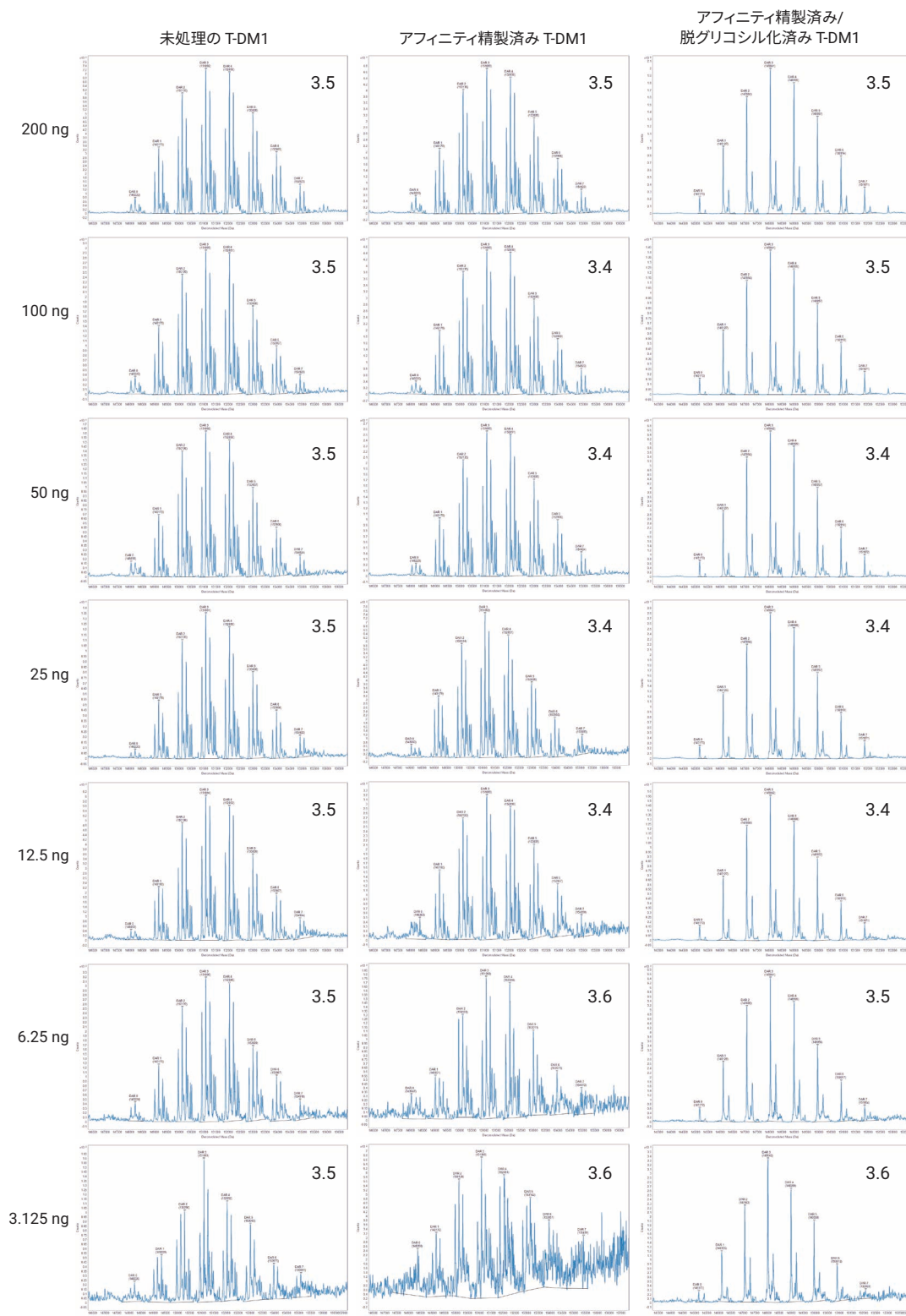


図 8. 未処理、アフィニティ精製済み、アフィニティ精製/脱グリコシル化済み T-DM1 のデコンボリュートした代表的なスペクトルと平均 DAR 値。T-DM1 を 0.3125 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の異なる濃度でラット血清にスパイクし、脱グリコシル化を伴う場合と伴わない場合のアフィニティ精製により回収しました。その後、 intact LC/MS 分析を実施しました。DAR 値は Agilent DAR カリキュレータを使用してデコンボリュートしたスペクトルから求めました。初期入力に基づくオンカラムローディング質量を左側に示します (表 2A を参照)。繰り返しテストから求めた平均 DAR 値を各スペクトルの右上に示しています ($n = 3$)。

結論

生体内の ADC DAR 解析の課題に対応する包括的なソリューションが提供されました。LC/MS 分析前に血清から ADC を回収して脱グリコシル化する一般的なワークフローが、Agilent AssayMAP Bravo Platform による自動化された手順によって実証されました。自動化された抗原固定、アフィニティ精製、オンカートリッジ脱グリコシル化は、約 4.5 時間で完了し、再現性が高く、手作業時間は最小限で、必要に応じて拡張が可能です。このようにして前処理されたサンプルを、高性能な Agilent 6545XT AdvanceBio 精密質量四重極飛行時間型 LC/MS システムによってシーMLS に分析することで、定性と定量の両方の研究に対応する高品質データを得られます。

謝辞

ここで紹介したワークフローの開発と最適化に大いに尽力いただいた Jing Chen 氏に、そして本アプリケーションノートへのアドバイズおよびクリティカルリーディングにご協力くださった Bill Rust 氏、Maryann Shen 氏、Shuai Wu 氏に感謝の意をお伝えいたします。

参考文献

1. Peters, C.; Brown, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep.* **2015** Jun 12, 35(4).
2. Beck, A.; *et al.* Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017** May, 16(5), 315-337.
3. Xu, K; *et al.* Characterization of intact antibody-drug conjugates from plasma/serum *in vivo* by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **2011** May 1, 412(1), 56-66.
4. Wei, C; *et al.* Where Did the Linker-Payload Go? A Quantitative Investigation on the Destination of the Released Linker-Payload from an Antibody-Drug Conjugate with a Maleimide Linker in Plasma. *Anal. Chem.* **2016** May 3, 88(9), 4979-86.
5. Agilent AssayMAP Bravo Platform. https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-6273EN_AssayMAP_Brochure_Fnl_HR.pdf.
6. Agilent AssayMAP Bravo Cartridges for Automated Protein Sample Preparation Workflows. <https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5991-4863EN.pdf>
7. Wu, S.; Shen, M. An Integrated Workflow for Intact and Subunits of Monoclonal Antibody Accurate Mass Measurements. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8445EN.pdf>.
8. Huang, R. Y.-C.; *et al.* Utility of Ion Mobility Mass Spectrometry for Drug-to-Antibody Ratio Measurements in Antibody-Drug Conjugates. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015** Oct, 26(10), 1791-4.
9. Krop, I. E.; *et al.* Phase I study of trastuzumab-DM1, an HER2 antibody-drug conjugate, given every 3 weeks to patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010** Jun 1, 28(16), 2698-704.

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, February 21, 2018

5991-9010JAJP