[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ペプチドマッピングのための ACQUITY Arcの分析法移管およびその信頼性

Brooke M. Koshel and Sean M. McCarthy
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 分析法のパラメーターを変更することなく、Agilent 1100 シリーズ HPLC システムから ACQUITY® Arc™ システムへのペプチドマッピングのシームレスな移管が可能
- 異なる ACQUITY Arc システム間での再現性
- ルーチンワークフローに組み込まれた補完的質量検出データ

ウォーターズのソリューション

ACQUITY Arc システム

2489 UV/Vis 検出器

ACQUITY QDa® 検出器

XBridge® BEH C_{18} カラム

Empower® 3 ソフトウェア

キーワード

分析法移管、ACQUITY Arc、ACQUITY QDa、ペプチド

はじめに

ACQUITY Arc システムは、HPLC と UHPLC による分離をシングルプラットホームで稼働できるようにすることにより、HPLC と UPLC® 間のギャップを埋めることを目指した LC プラットホームとして開発されました。Arc Multi-flow path™ テクノロジーにより、パス 1 と パス 2 の間を簡単に切り換え、シームレスな分析法移管または既存の分析法の改善が可能となります。以前のアプリケーションノートで、モノクローナル抗体分析について SEC-HPLC[1] および CEX-HPLC[2] 各分析法の移管において ACQUITY Arc システムの使いやすさを紹介しました。両方のアプリケーションノートで HPLC 分離に対応するパス 1 を使用し、共にシステム間で同等の相対保持時間、ピーク面積百分率、および分離能を示しました。本アプリケーションノートの目的は、LC プラットホーム間で移管した場合のペプチドマッピングの分析方法の同等性を実証することです。

ペプチドマッピングはバイオ医薬品業界ではルーチン分析であり、プラットホームアッセイとして使用されています。ペプチドマッピングは、同一性を確認するためにタンパク質のアミノ酸配列と翻訳後修飾の特性解析に使用されています。製品の商品化が近づくと、ペプチドマッピングは通常、バッチリリースもしくは同一性確認後の遺伝的安定性の判定のために使用されています[3]。ペプチドマッピングは、一般的な分析法とはみなされず、むしろそれぞれ独自のタンパク質のために開発しなければならないアッセイとみなされています[4]。安定性、安全性、有効性などに関連する重要品質特性（CQA）および同一性の評価を可能にし、再現性のあるペプチドマッピングを作成するためには、各アッセイにおいて消化と分離の両方を考慮しなければなりません。

特定のタンパク質のペプチドマッピングを確立することは困難な場合があるため、本アプリケーションノートでは 60 分の一般的なプラットホームの分析法を使用して Agilent 1100 シリーズ HPLC システムから ACQUITY Arc システムへの分析法移管を評価しています。さらに同じ分析法を使用して、異なる 2 つの ACQUITY Arc システムから得られた結果を比較することにより、システム間のばらつきを評価しました。最後に、ACQUITY QDa 検出器を光学検出器とともに使用して、質量検出がどのように分析に組み込まれるかを紹介します。

実験方法

サンプル調製

10 mg/mL のインフリキシマブ 90 µL を DTT（ジチオスレイトール）により還元し、ヨードアセトアミドによりアルキル化しました。次にサンプルを 1:20 の酵素対基質比でトリプシンにより消化し、37 ℃で 18 時間インキュベーションしました。その後、TFA を添加してトリプシンを非活性化しました。消化済みサンプルの推定最終濃度は 0.4 mg/mL で、希釈せずに注入しました。

LC 条件

LC システム： 2489 UV/Vis 検出器および QDa 検出器を接続した ACQUITY Arc システム、パス 1

クオータナリーポンプおよび DAD 検出器を接続した Agilent 1100 シリーズ HPLC システム

延長ループ： 100 µL

測定波長： 214 nm

サンプリングレート：20 Hz

カラム： XBridge BEH C_{18} 130Å、3.5 µm、4.6 mm ×100 mm（P/N 186003033）

XBridge BEH C_{18} ***XP*** 130Å、2.5 µm、4.6 mm ×100 mm（P/N 186006039）

カラム温度： 40 ℃

移動相 A： 0.1%（v/v）TFA 水溶液

移動相 B： 0.1%（v/v）TFA 含有アセトニトリル

サンプル温度：4℃

注入量： 75 µL

グラジエント：

時間 (min)	流量 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
Initial	0.500	95	5	0	0
5.00	0.500	95	5	0	0
45.00	0.500	50	50	0	0
47.50	0.500	5	95	0	0
52.50	0.500	5	95	0	0
52.60	0.500	95	5	0	0
60.00	0.500	95	5	0	0

QDa設定

サンプリングレート： 2 Hz

質量範囲： 350 ～ 1250 Da

コーン電圧： 10 V

キャピラリー電圧： 1.5 kV

プローブ温度： 500 ℃

データ管理

Empower 3 CDS ソフトウェア、SR2

結果および考察

HPLC ペプチドマップが示す Agilent 1100 シリーズ HPLC システムから ACQUITY Arc システムに移管された分析法の同等性

Agilent 1100 シリーズ HPLC システムから ACQUITY Arc システムへのペプチドマッピングの移管を評価するために、インフリキシマブのペプチドマップを、前述の分析法パラメーターを使用して作成しました。以前の評価に基づいて、アクティブプレヒーター（CH-30A）を ACQUITY Arc システムに配置し、2 つのシステム間で同等の温度制御を確保しました[5]。分離は最初に Agilent 1100 シリーズ HPLC システムで実施し、ベンチマーク結果を確定しました（図 1A）。その後、分析法パラメーターは変更せずに、分析法を ACQUITY Arc システムに移管しました。結果は、2 つのシステム間で 185 µL に等しいグラジエントオフセットを示しました。グラジエント SmartStart テクノロジー[6] を使用して、2 つのシステム間の Dwell Volume の差を補正し、注入後に適用しました。この機能により、グラジエントテーブルを一切変更することなく注入に関するグラジエントを調整できます。ACQUITY Arc システムにより得られたクロマトグラムを図 1B に示しました。2 つのシステムにより得られたクロマトグラムは、十分に一致しています。

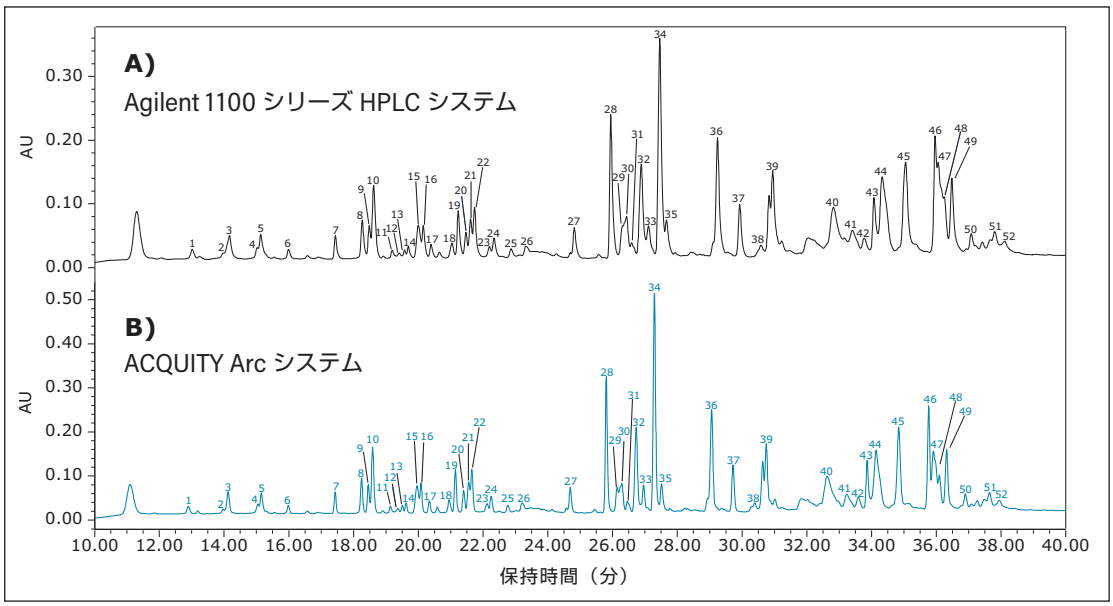

図 1. A）Agilent 1100 シリーズ HPLC システム および B）ACQUITY Arc システム（グラジエントオフセットを適用）により得られたインフリキシマブペプチドマップの比較。すべての標識ピークについての相対保持時間を求めました。ピークの選択は、溶出位置および強度により行いました。相対保持時間は、ピーク 1 に対して計算しました。

結果の類似性をさらに評価するために、保持時間について検証しました。保持時間のわずかの差が類似ピーク間に見られ、52 ピークについて表 1 に記載しました。相対保持時間を計算すると、類似ピーク間の差はごくわずかです。グラジエント SmartStart テクノロジーとパス 1 を併用することにより、分析法を一切変更することなく、HPLC の分析法を最新 LC プラットホームに移管することができました。

ピーク	Agilent 1100 シリーズ HPLC システム		ACQUITY Arc システム		Δ
	保持時間（分）	相対保持時間（RRT）	保持時間（分）	相対保持時間（RRT）	
1	13.01	1.00	12.89	1.00	0.000
2	13.96	1.07	13.97	1.08	0.010
3	14.16	1.09	14.12	1.10	0.007
4	15.02	1.15	15.04	1.17	0.012
5	15.12	1.16	15.15	1.18	0.013
6	15.98	1.23	15.99	1.24	0.011
7	17.43	1.34	17.43	1.35	0.012
8	18.26	1.40	18.25	1.41	0.012
9	18.48	1.42	18.46	1.43	0.011
10	18.61	1.43	18.59	1.44	0.011
11	19.19	1.47	19.14	1.48	0.010
12	19.40	1.49	19.37	1.50	0.011
13	19.57	1.50	19.51	1.51	0.009
14	19.68	1.51	19.62	1.52	0.009
15	19.99	1.54	19.96	1.55	0.011
16	20.15	1.55	20.08	1.56	0.009
17	20.39	1.57	20.34	1.58	0.010
18	21.03	1.62	20.95	1.62	0.008
19	21.23	1.63	21.15	1.64	0.008
20	21.46	1.65	21.40	1.66	0.010
21	21.61	1.66	21.56	1.67	0.011
22	21.73	1.67	21.65	1.68	0.009
23	22.19	1.71	22.12	1.72	0.010
24	22.33	1.72	22.25	1.73	0.009
25	22.86	1.76	22.76	1.77	0.008
26	23.31	1.79	23.20	1.80	0.007
27	24.81	1.91	24.69	1.91	0.008
28	25.94	1.99	25.80	2.00	0.008
29	26.30	2.02	26.14	2.03	0.006
30	26.42	2.03	26.29	2.04	0.007
31	26.58	2.04	26.46	2.05	0.009
32	26.88	2.07	26.73	2.07	0.007
33	27.10	2.08	26.96	2.09	0.007
34	27.45	2.11	27.29	2.12	0.006
35	27.66	2.13	27.51	2.13	0.008
36	29.23	2.25	29.06	2.25	0.007
37	29.92	2.30	29.72	2.30	0.005
38	30.58	2.35	30.39	2.36	0.006
39	30.94	2.38	30.75	2.38	0.006
40	32.81	2.52	32.63	2.53	0.008
41	33.40	2.57	33.23	2.58	0.010
42	33.77	2.60	33.59	2.61	0.009
43	34.07	2.62	33.86	2.63	0.008
44	34.32	2.64	34.14	2.65	0.009
45	35.04	2.69	34.84	2.70	0.008
46	35.96	2.76	35.77	2.77	0.010
47	36.05	2.77	35.91	2.78	0.014
48	36.24	2.79	36.10	2.80	0.014
49	36.47	2.80	36.32	2.82	0.013
50	37.07	2.85	36.90	2.86	0.012
51	37.80	2.91	37.65	2.92	0.014
52	38.10	2.93	37.95	2.94	0.014

表 1. Agilent 1100 シリーズ HPLC システムおよび ACQUITY Arc システムにおいて同定された図 1 に示す 52 ピークの保持時間の比較。グラジエント SmartStart テクノロジーを使用して、2 つのシステム間の Dwell Volume の差を調整しました。オフセットの結果として生じた両者の相対保持時間の差は、算出された Δ 値により示されているように、ほとんどありません。

2つのACQUITY Arc システム間における再現性

新しい装置プラットホームをラボ間または追加の場所に設置した場合、結果の一貫性が保たれることが重要です。異なる ACQUITY Arc システムの結果を比較するために上記分析法の条件を使用し、同じコア構成の異なる 2 つの ACQUITY Arc システムによりデータを収集しました。両システムとも 30-cm CH パッシブプレヒーターが配置されています。移動相およびサンプルは、多数の分析者がさまざまなラボでサンプルを分析しているこの分野の分析環境のシミュレーションを行うために、各システムについて個別に前処理を行いました。図 2 から、それぞれのシステムにおけるインフリキシマブのペプチドマップは一致しています。2 つのシステム間の相対保持時間の差を評価すると、表 2 に記載されているように差は 0.006 以下です。同じプラットホームの 2 つの異なる装置でほぼ同じ結果が得られることにより、結果の信頼性が増します。

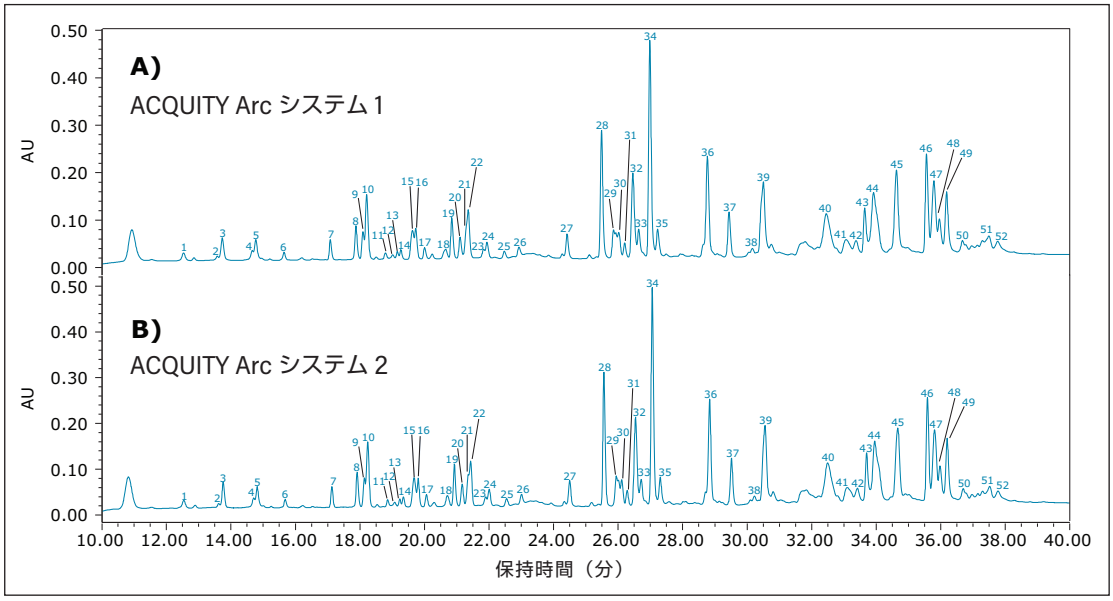

図 2. 異なる 2 つの ACQUITY Arc システムで得られたインフリキシマブのペプチドマップの比較 : A）ACQUITY Arc システム 1 および B）ACQUITY Arc システム 2 すべての標識ピークについての相対保持時間を求めました。ピークの選択は、溶出位置および強度により行いました。相対保持時間は、ピーク 1 に対して計算しました。

UHPLC ペプチドマップデータが示す分離能、質量検出の改善

ルーチンのペプチドモニタリングでは、相対保持時間およびサンプルのピーク面積を求め、さかのぼって標準試料と適合性基準を満たしているかを判定するのに、光学検出のみが多く使用されています。直交的検出方法として ACQUITY QDa 検出器を導入することにより、製品の一貫性を決定する場合に、結果として得られる質量情報の信頼性を増すことができます。上記のペプチドマップ法についての質量データを得るために、ACQUITY QDa 検出器を光学検出器の後に連続して接続しました。この際に、より小さい粒子が充填されたカラムを使用し、ACQUITY Arc システムの機能を利用して、HPLC および UHPLC 分離の両方を実施しました。この例では、3.5 µm カラムを 2.5 µm カラムで置き換えました。粒子径の変更の影響を調べるために、分析法を短い分析時間にスケール変更する代わりに、小さい粒子径へ移行することによって得られる分離能およびピーク容量の改善を利用するために同じ分析時間の 60 分で実行しました。

ピーク	Agilent 1100 シリーズ HPLC システム		ACQUITY Arc システム		Δ
	保持時間（分）	相対保持時間（RRT）	保持時間（分）	相対保持時間（RRT）	
1	12.53	1.00	12.54	1.00	0.000
2	13.58	1.08	13.62	1.09	0.003
3	13.73	1.10	13.76	1.10	0.002
4	14.66	1.17	14.71	1.17	0.003
5	14.77	1.18	14.81	1.18	0.003
6	15.65	1.25	15.68	1.25	0.002
7	17.08	1.36	17.13	1.37	0.003
8	17.87	1.43	17.91	1.43	0.002
9	18.09	1.44	18.14	1.45	0.003
10	18.21	1.45	18.24	1.45	0.002
11	18.79	1.50	18.86	1.50	0.005
12	19.01	1.52	19.08	1.52	0.004
13	19.16	1.53	19.23	1.53	0.005
14	19.27	1.54	19.35	1.54	0.005
15	19.63	1.57	19.68	1.57	0.003
16	19.73	1.57	19.81	1.58	0.005
17	20.00	1.60	20.06	1.60	0.004
18	20.66	1.65	20.71	1.65	0.003
19	20.85	1.66	20.93	1.67	0.005
20	21.10	1.68	21.17	1.69	0.004
21	21.31	1.70	21.36	1.70	0.003
22	21.36	1.70	21.43	1.71	0.005
23	21.83	1.74	21.90	1.75	0.004
24	21.94	1.75	22.01	1.75	0.004
25	22.48	1.79	22.54	1.80	0.004
26	22.93	1.83	23.01	1.83	0.005
27	24.42	1.95	24.50	1.95	0.005
28	25.49	2.03	25.56	2.04	0.005
29	25.86	2.06	25.94	2.07	0.005
30	26.02	2.08	26.11	2.08	0.006
31	26.20	2.09	26.28	2.10	0.005
32	26.46	2.11	26.54	2.12	0.005
33	26.64	2.13	26.72	2.13	0.004
34	26.98	2.15	27.06	2.16	0.005
35	27.23	2.17	27.31	2.18	0.005
36	28.77	2.30	28.84	2.30	0.004
37	29.44	2.35	29.52	2.35	0.005
38	30.16	2.41	30.22	2.41	0.003
39	30.50	2.43	30.56	2.44	0.003
40	32.45	2.59	32.50	2.59	0.002
41	33.07	2.64	33.10	2.64	0.001
42	33.37	2.66	33.42	2.67	0.002
43	33.64	2.68	33.70	2.69	0.003
44	33.92	2.71	33.95	2.71	0.001
45	34.63	2.76	34.67	2.76	0.002
46	35.56	2.84	35.59	2.84	0.001
47	35.79	2.86	35.81	2.86	0.000
48	35.96	2.87	35.98	2.87	0.000
49	36.18	2.89	36.20	2.89	0.000
50	36.68	2.93	36.70	2.93	0.000
51	37.50	2.99	37.52	2.99	0.000
52	37.77	3.01	37.78	3.01	-0.001

表 2. 異なる 2 つの ACQUITY Arc システムにおいて同定された、図 2 に示す 52 ピークの保持時間の比較。システム間の保持時間のばらつきはほとんどありません。算出されたΔ値から、相対保持時間はほぼ同等です。

図 3A では、3.5 µm カラムの Agilent 1100 シリーズ HPLC システムで得られたクロマトグラムを比較目的で示しています（図 1A も参照ください。）図 3B に 2.5 µm カラムを使用した ACQUITY Arc システムの結果を、図 3C に対応する質量応答を示しています。粒子径を 3.5 µm から 2.5 µm に変更する際に、分離能にわずかな差が観察されます。UV/Vis データと対応する質量データ間に高い相関が存在し、ACQUITY QDa 検出器がルーチン分析に使用できることが示唆されます。

ACQUITY QDa 検出器の追加の有用性が示される例として、ピークの特性解析がなされ、追加の質量データがバッチリリースまたはロット間比較のための同定に役立ったといったケースがあります。たとえば以下の配列のペプチドを考えてみてください：**ASQFVGSS**IHWYQQR の太字部分は相補性決定領域（CDR）の配列を表しています。ペプチドの平均質量 1794.0 Da を使用すると、電荷状態 $[M+1H]^{+1}$、$[M+2H]^{+2}$、および $[M+3H]^{+3}$ はそれぞれ 1795.0 Da、898.0 Da、および 599.0 Da と計算できます。図 4A の光学的トレースの積分ピークを、図 4B のピークの頂点に対応する質量データとして示しています。ACQUITY QDa 検出器は、*m/z* 350 から最大取り込み範囲である *m/z* 1250 までスキャンするように設定しました。図 4B の質量データから、このスキャン範囲に入る電荷状態がわかります。特性解析がすでに行われていることが想定されるラボ環境では、追加の質量データは、目的の製品の確認に役立ちます。

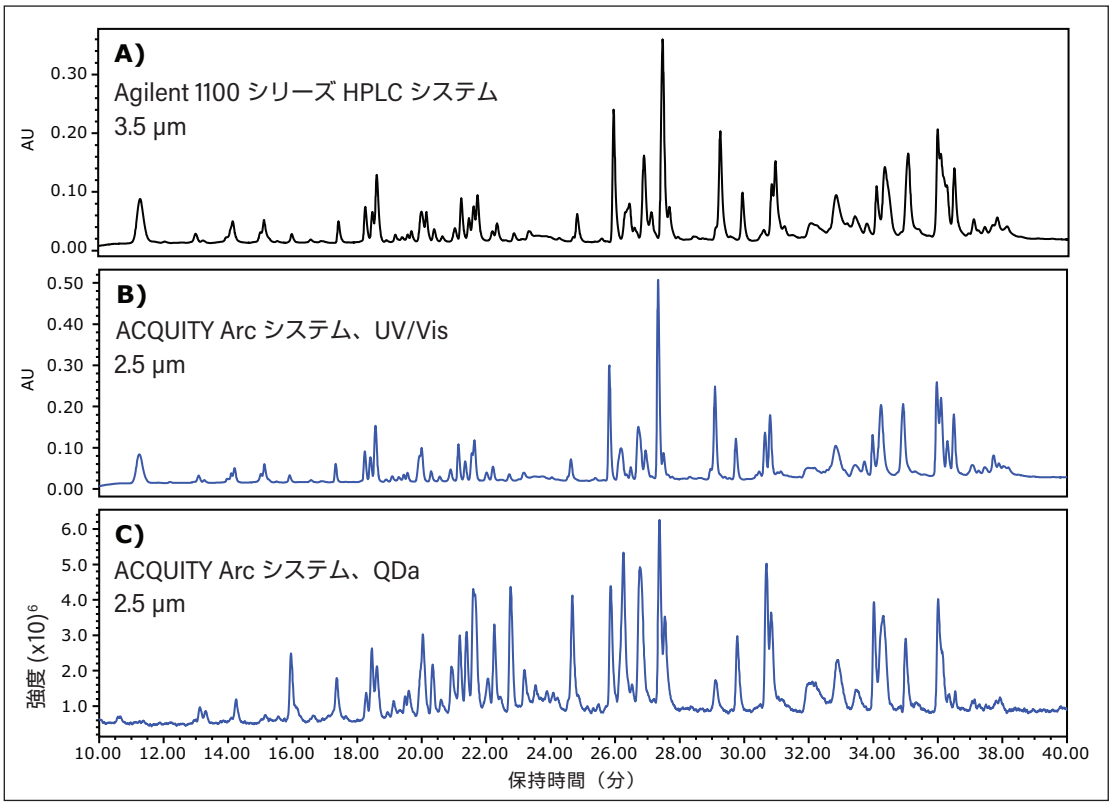

図 3. A）Agilent 1100 シリーズ HPLC システム および B）ACQUITY Arc システムにより得られたインフリキシマブペプチドマップと C）ACQUITY QDa 検出器により得られた対応する質量データとの比較。Agilent 1100 シリーズ HPLC システムにより収集されたデータは、3.5 µm 粒子が充填された XBridge BEH C_{18} 130 A、4.6 mm × 100 mm カラムを使用し、ACQUITY Arc システムにより収集されたデータは、2.5 µm 粒子が充填された XBridge BEH C_{18} 130 A、4.6 mm × 100 mm カラムを使用しました。
対応する質量データは、光学的データと高い相関を示しました。

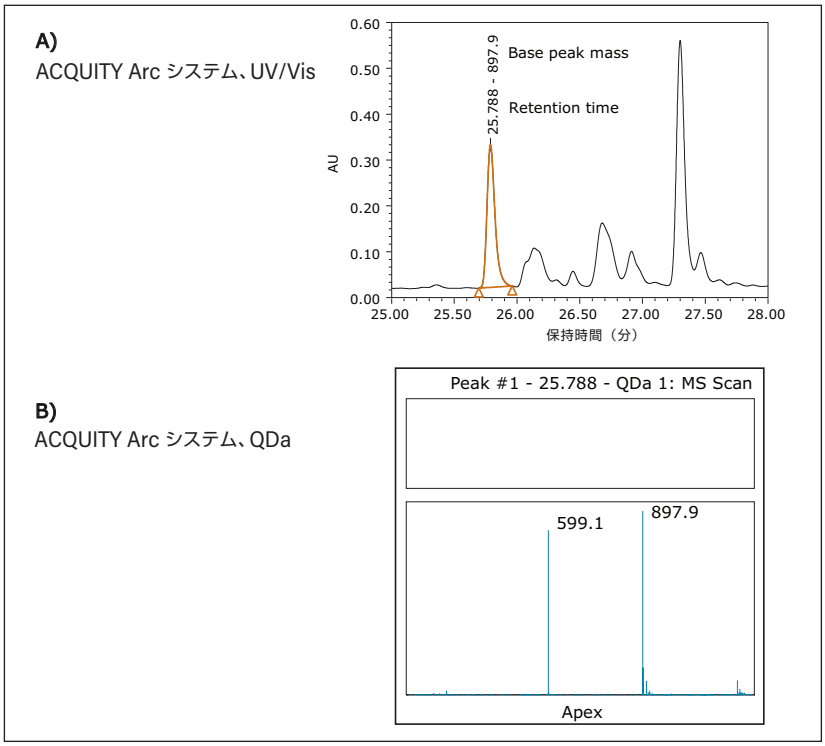

図 4. A）光学的データおよび B）光学的トレースの積分ピークの対応質量データを示す ACQUITY Arc システムによるインフリキシマブのペプチドマップ領域の拡大図。
*データ取得時、2.5 µm 粒子が充填された XBridge BEH C_{18} 130 A、4.6 mm × 100 mm カラムを使用しました。B）に示されている電荷状態は、以下の配列のペプチドについて計算された値 $[M+2H]^{2+}$ および $[M+3H]^{3+}$ と一致しました：**ASQFVGSS**IHWYQQR の太字部分は CDR 配列を表しています。*

結論

バイオ医薬品業界は、ACQUITY Arc システムなどの最新 LC プラットホームをラボに取り入れることにより、新しい技術および分析法を採用する必要性を認めています。組織全体または受託期間への分析法の移行は日常的になっているため、同一および異なる装置プラットホーム間において結果の一致性が示される必要があります。ACQUITY Arc システムには、従来の HPLC に匹敵する能力がありますが、Arc Multi-flow path™ テクノロジーを使用することにより HPLC 分析法を UHPLC 分析法にアップデートすることもできます。HPLC 分析法を UHPLC 分析法にアップデートし、ACQUITY QDa 検出器を分析に組み込むことにより、日常の質量検出を結果の確認に役立てることができます。

参考文献

1. Koshel, B. M., McCarthy, S. M. Transfer of an SEC Method for Monoclonal Antibody Analysis from HPLC to UHPLC using the ACQUITY Arc System. 2015; 720005510en.
2. Koshel, B. M., McCarthy, S. M. IEX Method Transfer: Replicating a Method for Monoclonal Antibody Analysis on an ACQUITY Arc System. 2015; 720005529en.
3. Luo, Y. et al. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. In Separation Science and Technology; Ahuja, S.; Scypinski, S., Ed.; Academic Press: Burlington, MA, 2010; Vol. 10; pp 283–359.
4. U.S. Pharmacopeial Convention, General Chapter <1055> Biotechnology-Derived Articles- Peptide Mapping, USP38-NF33, Official from August 1, 2015.
5. Hong, P., McConville, P. R. Method Transfer from Agilent 1100 Series LC System to the ACQUITY UPLC H-Class System: The Effect of Temperature. 2015; 720005204en.
6. ACQUITY Arc System Brochure. Waters Brochure. 2015; 720005393en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、QDa、XBridge、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
Arc および Multi-flow path は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年12月 720005588JA PDF