Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

迅速な重要品質特性モニタリングのための ACQUITY QDa 検出器を用いたモノクローナル抗体サブユニットのプロセスモニタリング

Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, and Ying Qing Yu
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- MassLynx® ソフトウェアのMaxEnt™ デコンボリューションアルゴリズムを使用したサブユニット分析の補完的な質量データ
- サブユニットデータの日常的モニタリングによる製造工程のばらつきの適時検出とコスト削減への貢献
- バッチ間の一貫性を迅速にスクリーニングするためのサブユニットグリコフォームのプロファイリング

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY QDa® 検出器

ACQUITY UPLC 可変 UV（TUV）検出器

MassLynx® v. 4.1 ソフトウェア（MaxEnt1 付属）

ACQUITY UPLC Protein BEH カラム

キーワード

モノクローナル抗体、サブユニット分析、IdeS 消化、ACQUITY QDa 検出器

はじめに

タンパク質ベースのバイオ医薬品は成長を続ける医薬品を代表する存在となっています。これらの製造は複雑なプロセスであることから、品質と安全性を確保するために、開発および製造プロセス全体で重要品質特性（CQA; critical quality attributes）をモニタリングするさまざまな検査が必要となります。タンパク質のグリコシル化を研究することは重要品質特性の 1 つとなっています。なぜなら、グリコシル化は市販されている一部の組み換えモノクローナル抗体（mAb）の細胞毒性に関連しているからです[1]。分析法には、蛍光およびMSベースの遊離 - 標識法、すなわち個々の糖鎖や糖ペプチドをモニタリングする“ボトムアップ”アプローチがあります。これに代わり、モノクローナル抗体サブユニットの主要なグリコフォームを評価するために、“ミドルダウン”アプローチを適用することも可能です。後者は特に、製造環境では重要であり、グリコシル化パターンの変化を特定し、適時かつ費用対効果の高い方法でこれを報告し修正するために理想的と言えます。

ACQUITY QDa 検出器は費用対効果の高いツールとして確立されており、直交的な検出手法として使用した場合、既存の LC ワークフロー内でマススペクトルデータを入手できます。本アプリケーションノートではACQUITY QDa 検出器のサブユニット分析への適用性を評価することを対象にしています。IgG1 であるトラスツズマブを、ジチオスレイトール（DTT）を用いて部分的に還元し、約 25 kDa の軽鎖および約 50 kDa の重鎖の各フラグメントを生成しました（図 1A）。MassLynx ソフトウェアを使用してデータを取得することにより、MaxEnt1 デコンボリューションアルゴリズムを介して複雑なスペクトルを解釈し、各サブユニットの分子量を決定しました。さらにIdeS 消化および還元によってそれぞれが約25 kDaの 3 つのフラグメントが生成しました（図 1B）。IdeS 消化は抗体のヒンジ領域において単一部位を特異的かつ効率的に切断するため、治療用モノクローナル抗体に広く使用される特性解析ツールです。本事例では、主要なグリコフォームをモニタリングするための代替手段として使用しています。

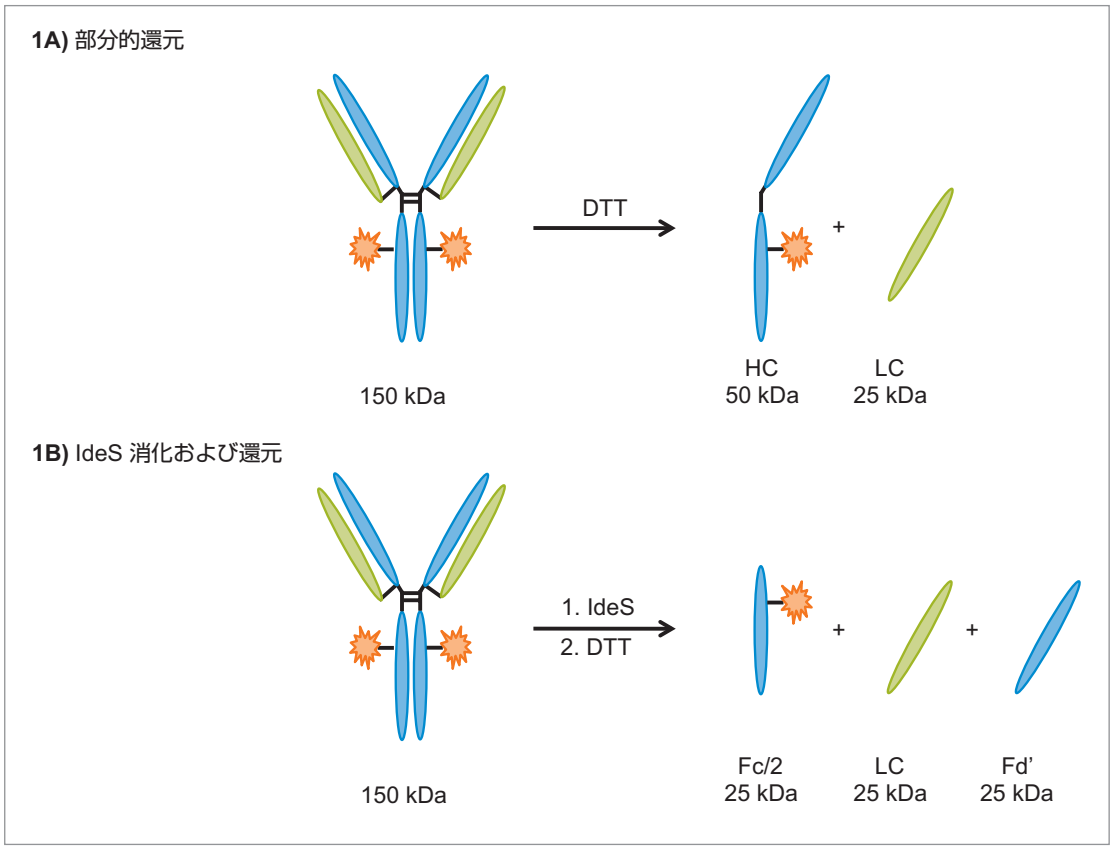

図 1. サブユニットの形成。1A）DTT を用いた部分的還元により重鎖（HC）および軽鎖（LC）間の結合を切断します。1B）IdeS 消化および還元により 3 つのフラグメントが生成します：Fc/2、LC および Fd'、それぞれの大きさは約 25 kDa です。Fc 領域にはグリコシル化部位が存在するため、重鎖または Fc/2 フラグメントの質量検出によってグリコシル化プロファイルをモニタリングすることが可能です。

実験方法

LC 条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class システム

測定波長：214 nm

サンプリングレート：5 Hz

カラム：ACQUITY UPLC Protein BEH C_4、1.7 µm、2.1 mm × 50 mm（P/N 186004495）

カラム温度：80℃

移動相 A：0.1%（v/v）ギ酸水溶液

移動相 B：0.1%（v/v）ギ酸含有アセトニトリル

サンプル温度：10℃

注入量：3 µL

グラジエント：

時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B	%C	%D
Initial	0.400	95	5	0	0
15.00	0.400	40	60	0	0
20.00	0.400	20	80	0	0
23.00	0.400	20	80	0	0
27.00	0.400	95	5	0	0
30.00	0.400	95	5	0	0

QDa 設定

サンプリングレート：5 Hz

質量範囲：350～1250 Da

イオン化モード：ESI+, continuum

コーン電圧：15 V

キャピラリー電圧：1.5 kV

プローブ温度：600℃

データ管理

MassLynx v. 4.1 ソフトウェア（MaxEnt1 付属）

トラスツズマブの部分的還元：

21 mg/mL トラスツズマブ 10 µL に 190 µL の 25 mM Tris-HCl（pH 7.5）を添加し、適切なタンパク質濃度である 1 mg/mL としました。濃縮 DTT をサンプルに添加し、最終 DTT 濃度が 1.0 mM の溶液としました。続けてサンプルを 37℃で 20 分間インキュベートしました。3% アセトニトリル、0.1% ギ酸水溶液を等量添加し、最終タンパク質濃度 0.5 mg/mL の溶液を調製しました。この調製では長期保存を想定していないため、サンプルは直接注入しました。

トラスツズマブの IdeS 消化および還元：

25 mM Tris 緩衝液中の 1 mg/mL トラスツズマブサンプルに IdeS プロテアーゼ（FabRICATORR；Genovis、Cambridge、MA）を混合し、37℃で 30 分間インキュベートしました。濃縮 DTT を IdeS 消化サンプルに添加し、最終 DTT 濃度 1.0 mM の溶液としました。得られたサンプルを 37℃で 20 分間インキュベートしました。注入前に 3% アセトニトリルと、0.1% ギ酸水溶液を等量で添加し、最終タンパク質濃度 0.5 mg/mL の溶液を調製しました。

結果および考察

トラスツズマブの軽鎖と重鎖のデータを得るために、前述したように抗体を部分的に還元しました。UV クロマトグラムを図 2A に示します。各フラグメントの質量を決定するために、MassLynx ソフトウェアオプションの MaxEnt1 アルゴリズムを使用してデコンボリューションを行い、ゼロ電荷状態の質量を計算しました。uniform Gaussian モデルを使用し、MaxEnt1 分解能を 0.5 Da/ チャンネル、ピーク幅を 0.7 Da に設定しました。スペクトルは対象ピークの中央からベースラインまでを積算しました。最大反復回数は 20 とし、データの重複処理を防止しました。図 2B、2C には、軽鎖、重鎖のサブユニットのデコンボリューションスペクトルがそれぞれ示されています。軽鎖のデコンボリューションが単一ピークに収束しているのに対し、重鎖のデコンボリューションでは 4 つの主要なグリコフォームを同定しました。

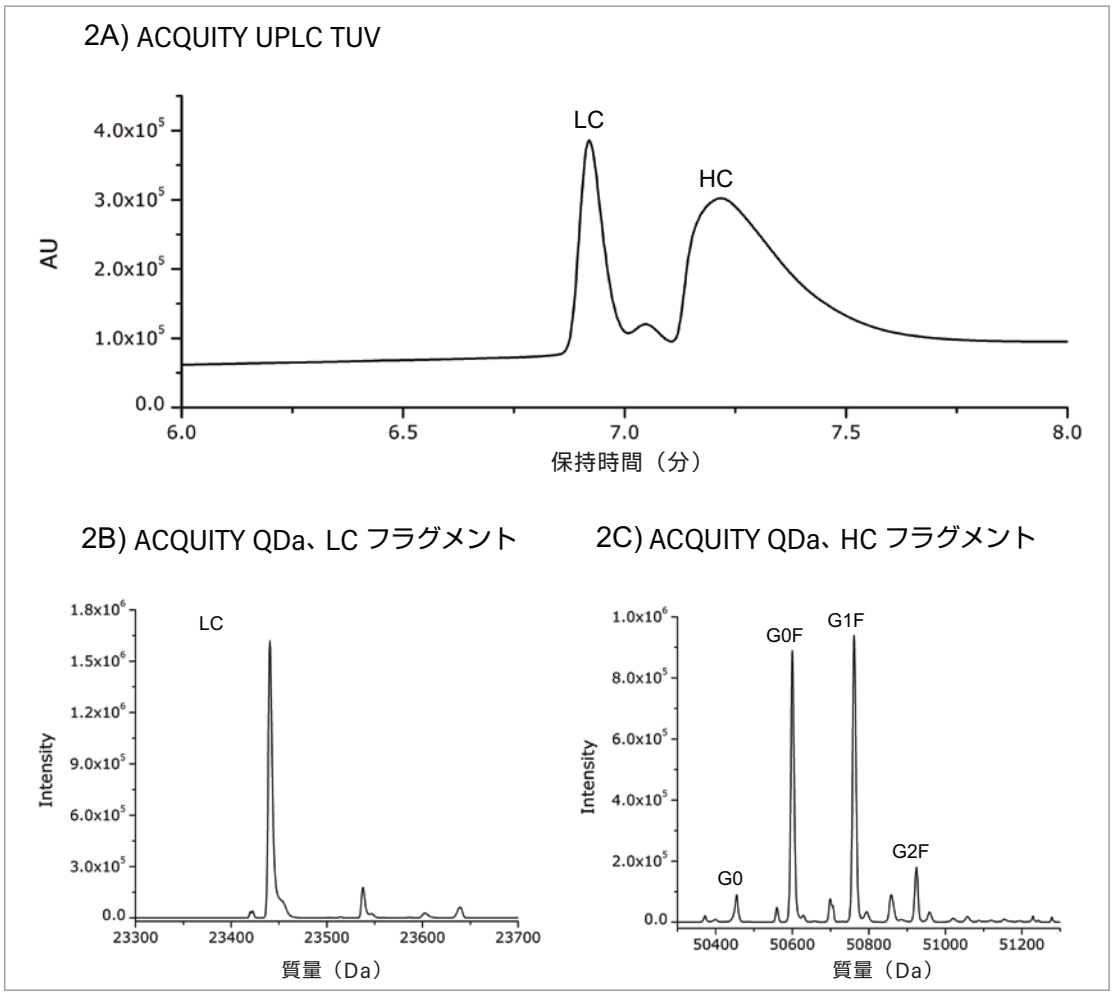

図 2. トラスツズマブの部分的還元。2A）軽鎖（LC）および重鎖（HC）フラグメントの分離を示す UV クロマトグラム。2B）および 2C）対応する ACQUITY QDa 検出器から取得した質量データ。MaxEnt1 アルゴリズムを軽鎖と重鎖のフラグメントのデコンボリューションのために使用しました。軽鎖は単一の電荷状態に収束していますが、重鎖には 4 つのグリコフォームが見られます。

ACQUITY QDa 検出器の質量範囲は *m/z* 30–1250 であるため、軽鎖と重鎖ともに価数の低いのものはこの検出ウィンドウから外れています。図 3 では、軽鎖の ACQUITY QDa データに広範なスキャン範囲をもつ高分解能 MS のシミュレーションデータを重ねています。重ね書きから、ACQUITY QDa データは高分解能装置で測定可能な電荷状態の一部分しか表していないことが分かります。このことが質量測定に及ぼす影響を評価するために、MaxEnt1 から計算された軽鎖と重鎖の結果を実測質量として表 1 に記載し、理論的な平均分子量と比較しました。

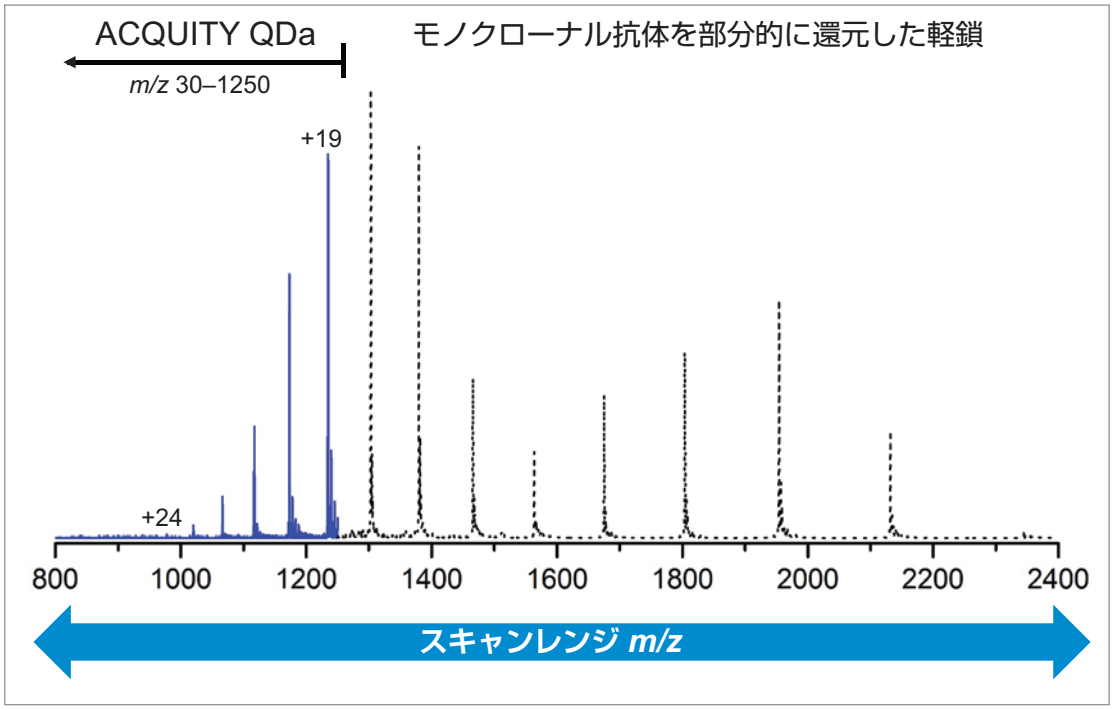

図 3. 軽鎖の電荷状態の重ね書き。ACQUITY QDa 検出器（青）が高分解能 MS（点線）で測定可能な電荷状態の一部分と重なっています。ACQUITY QDa データは +19 から +24 までの電荷状態を網羅しています。

	部分的還元					IdeS 消化および還元			
	軽鎖	重鎖				Fc/2			
		G0	G0F	G1F	G2F	G0	G0F	G1F	G2F
平均質量 (Da)	23439.1	50447.7	50593.8	50756.0	50918.1	25090.2	25236.3	25398.4	25560.6
実測質量 (Da)	23440.5	50454.5	50600.0	50761.5	50925.0	25090.0	25235.0	25397.5	25560.0
質量誤差 (Da)	1.4	6.8	6.2	5.5	6.9	-0.2	-1.3	-0.9	-0.6
質量精度 (ppm)	60	135	123	108	136	-8	-52	-35	-23

*表 1. トラスツズマブの部分的還元、およびトラスツズマブの IdeS 消化および還元に関する、平均分子量と MaxEnt1 を用いたデコンボリューションで決定した実験的質量との比較。質量精度は （質量誤差/平均質量） * 10^6 で計算されます。*

装置の質量誤差の影響は電荷状態に比例しており、高い電荷状態ほど誤差が大きくなります。例えば、+19 から +50 までの電荷状態で検討してみます。これは、ACQUITY QDa 検出器によって取得した軽鎖および重鎖の両方で検出された電荷状態を網羅しています。このような電荷状態に関連した装置の質量誤差は±3.8 Da から ±10 Da（±0.2 x 電荷状態）までの範囲でした。トラスツズマブの軽鎖、つまり電荷状態が +19 から +24 までを検討した場合は、質量精度の予測値は 150 ppm から 200 ppm までの範囲でした。報告された軽鎖の実測質量精度は 60 ppm であること（表 1）から、この値は装置の予測範囲内に問題なく収まっていることになります。同様に、重鎖の質量精度は 150 から 200 ppm までの範囲内に収まると考えられ、すべてのフラグメントが同様の基準を満たしています（表 1）。

ACQUITY QDa 検出器のサブユニット分析への適用性をさらに評価するために、一般的に使われている IdeS 酵素を使用してサブユニットフラグメントを生成する第 2 の方法を試みました。IdeS 消化および還元を行うことで Fc/2、LC、Fd' からなる 3 つの約 25 kDa のフラグメントが生成しました。図 4A は、IdeS で消化し還元したトラスツズマブのクロマトグラムで、3 つのフラグメントが明確に分離されています。図 4B は、グリコシル化部位を含む Fc/2 フラグメントのデコンボリューション質量データで、重鎖データからこれまでに同定された 4 つの主要なグリコフォームが同様に示されています。表 1 は Fc/2 フラグメントのグリコフォームの質量精度を記載しており、これらも装置の予測質量精度範囲内に入っています。部分的還元と同じように、IdeS 消化および還元でも製造工程のばらつきを容易に判断することが可能です。

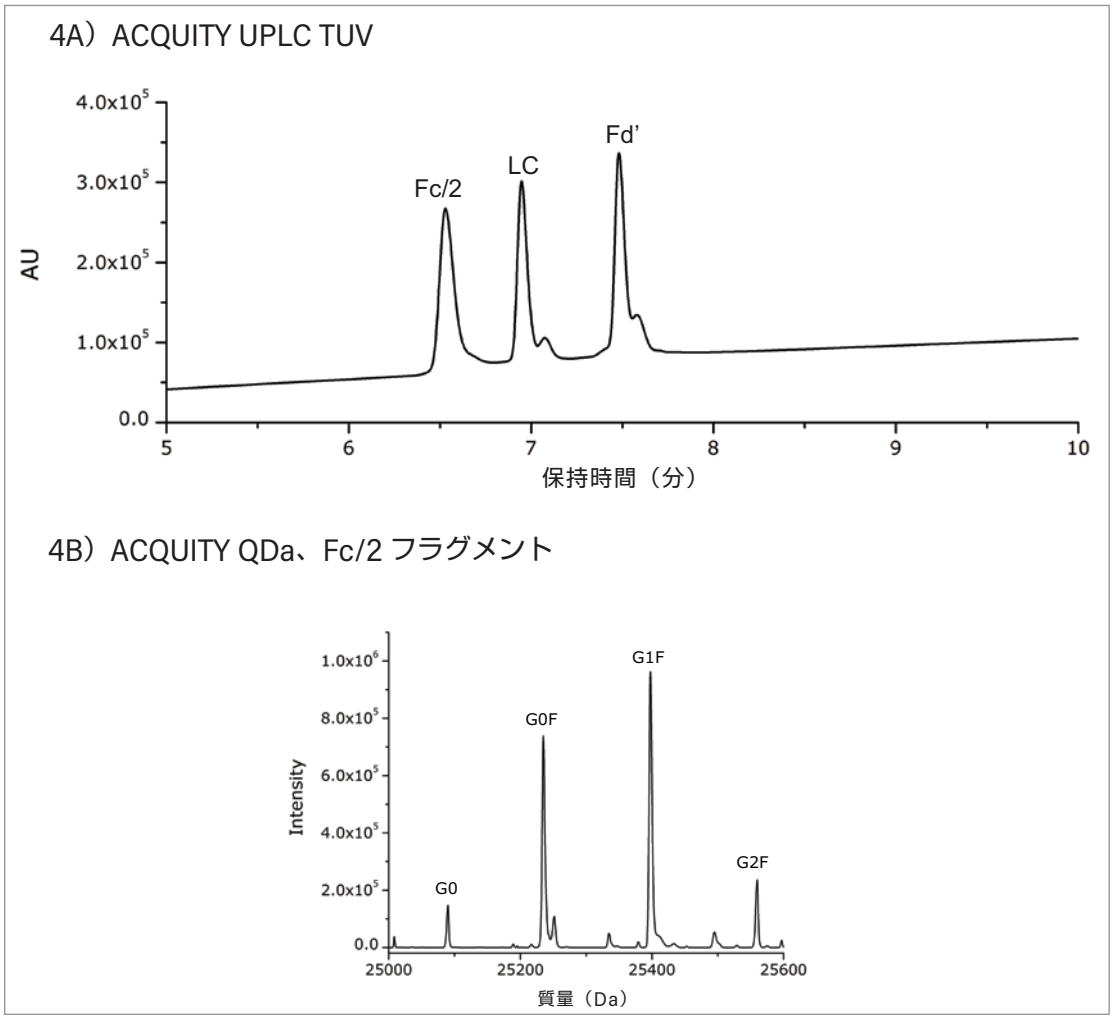

図 4. トラスツズマブの IdeS 消化および還元。4A）Fc/2、LC および Fd' フラグメントの分離を示した UV クロマトグラム。4B）ACQUITY QDa 検出器から取得した質量データ。デコンボリューションによって 4 つの Fc/2 グリコフォームが同定されました。

結論

本実験により、ACQUITY QDa 検出器が、2 つの異なる方法でサブユニットレベルで信頼できる質量決定に使用可能であることが実証されました。トラスツズマブを部分的に還元し、装置で予測される質量精度限度内に十分に収まる分子量である軽鎖と重鎖の各フラグメントを取得しました。IdeS 消化および還元を、抗体のより価数の低く分子量の小さなサブユニットフラグメントを取得するために使用しました。IdeS 消化および還元から得た約 50 kDa の重鎖フラグメントおよび約 25 kDa の Fc/2 フラグメント上の主要なグリコフォームをモニタリングすることにより、得られた結果を2 つの方法間で比較しました。どちらの方法でも ACQUITY QDa 検出器を有効に利用することで、サブユニットデータの迅速かつ効果的な収集を実現しており、最終的に製品の一貫性と同一性を検証するスクリーニングプロトコール中で使用可能であることが示されました。

参考文献

1. Raju T.S. and Jordan R.E. Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies. *mAbs*. 2012. 4(3):385–391.

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、MassLynx、ACQUITY UPLC、QDa および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
MaxEnt 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 720005707JA PDF