

## 4D-LC/MS を用いた モノクローナル抗体のオンライン酵素消化と ペプチドマッピングの自動化



### 著者

林 明生  
内藤 厚子  
瀬崎 浩史

アジレント・テクノロジー  
株式会社

### 要旨

抗体医薬品はその高い選択性により、新たな医薬品モダリティとして注目されています。抗体の品質特性解析の一つに電荷変異体の分析がありますが、これはイオン交換クロマトグラフィーを使用するため、分取した画分に対して酵素消化を行い、ペプチドマッピングを実行するためにはバッファー置換などの煩雑な作業を必要とします。本アプリケーションノートでは、2次元 LC/MS (2D-LC/MS) を拡張したモノクローナル抗体の Multi Attribute Method (MAM) ソリューションを紹介します。1次元目 (1D) でイオン交換クロマトグラフィーによる抗体の Charge variants の分離、2次元目 (2D) で C18 カートリッジにより画分をトラップしてサンプル溶媒の脱塩と還元サブユニット化をし、3次元目 (3D) で酵素を固定化したカラムにより断片化を行い、4次元目 (4D) に逆相クロマトグラフィーによるペプチドマッピングと MS 検出を組み合わせました。

## システム

Agilent InfinityLab 2D-LC Solution

- 1260 フレックスポンプ (G7104C, 1D)
- 1290 フレックスポンプ (G7104A, 2D)
- 1260 アイソクラティックポンプ (G7110B, 3D)
- 1290 ハイスピードポンプ (G7120A, 4D)
- 1260 マルチサンブラ (G7167A)
- 1290 マルチカラムサーモスタット (G7116B)
  - + 2 ポジション/10 ポートバルブ
- 1290 ダイオードアレイ検出器 (G7117A)
- 1290 マルチカラムサーモスタット (G7116B)
  - + 2 ポジション/10 ポートバルブ
- バルブドライブ (G1170A) 3 個
  - + 2D-LC バルブ (G4236A)
  - + マルチハートカットバルブキット (G4242A)

Agilent 6546 Q-TOF MS

## 分析条件

### 試料調製

NIST mAb Standard (Agilent Parts No. 5191-5744) を超純水に溶解し、10 mg/mL の濃度の試料としました。

表 1. 測定条件

1D 測定条件 (図 2 灰色部分の測定条件)	
カラム	Bio MAb NP5, 2.1×250 mm (Agilent, Parts No. 5190-2411)
移動相	A : 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) B : 500 mM 塩化ナトリウム, 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8)
流速	0.2 mL/min
グラジエント	B : 8 % (0 min) →20 % (30 min) →100 % (31 min) →100 % (35 min)
カラム温度	30 °C
注入量	5 µL
検出	280 nm
2D 測定条件 (図 2 橙色部分の測定条件)	
カラム	ポリマー脱塩カートリッジ 2.1×100 mm (Agilent, Parts No. PL1612-1102 + 820999-901)
移動相	A : 0.1 % 酢酸 / 水 B : 0.1 % 酢酸 / アセトニトリル C : 20 mM ジチオトレイトール / 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
流速	0.2 ~ 0.015 mL/min
カラム温度	30 °C

3D 測定条件 (図 3 青色部分の測定条件)	
カラム	Lys-C, 2.1×33 mm (Parts No. 100-1021-LYSC, Perfinity)
カラム温度	37 °C
移動相	50 mM 重炭酸アンモニウム / 水
流速	0.135 ~ 0.06 mL/min
4D 測定条件 (図 2 緑色部分の測定条件)	
カラム	Poroshell 120 EC-C18, 3.0×100 mm, 2.7 µm (Agilent, Parts No. 695975-302)
移動相	A : 0.1 % 酢酸 / 水 B : 0.1 % 酢酸 / アセトニトリル
流速	0.5 mL/min
カラム温度	60 °C
MS 測定条件 (図 2 緑色部分の測定条件)	
イオン源	Dual AJS ESI
極性	Positive
乾燥ガス	300 °C, 8 L/min
シースガス	350 °C, 10 L/min
ネプライザー圧力	50 psi
キャピラリー電圧	3500 V
ノズル電圧	1000 V
フラグメンター	170 V
測定モード	Auto MS/MS
測定レンジ	m/z 300-3000 (MS1)
コリジョンエネルギー	Slope : 3.8 / 100 m/z, Offset : -2.1
リファレンスイオン	922.009798

データ採取には MassHunter (2D-LC アドオン) ソフトウェアを用いました。また、解析には BioConfirm 12.0 (Agilent), Byos (ProteinMetrics) を用いました。

## 結果・考察

1 次元 LC (1D-CEX) での分離において、いくつかの画分が観測されたので Pre, Main, Post の画分をそれぞれマルチハートカットバルブを用いてループに採取し、2 次元目以降の処理を順次行いました。(図 1)。

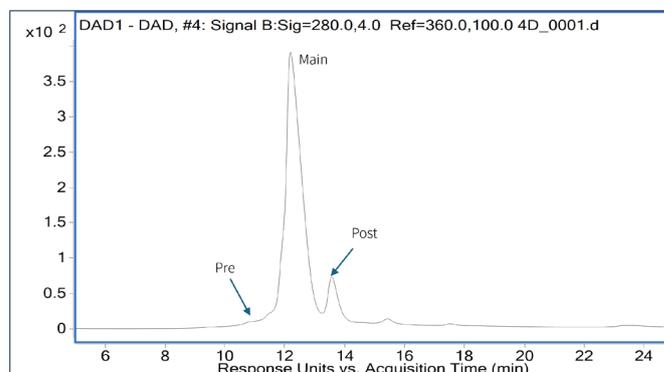


図 1. NIST mAb の 1D-CEX 分離

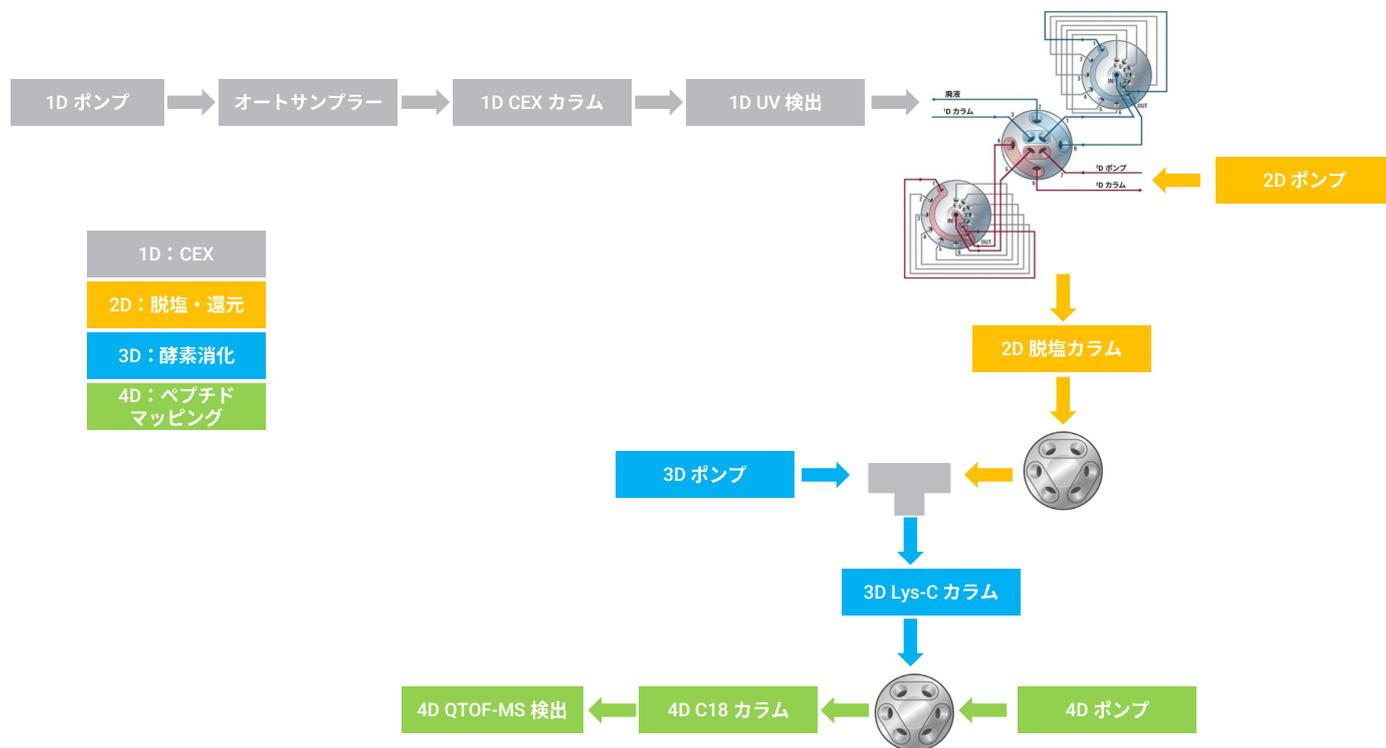


図 2. 4D-LC/MS システム構成の概要

図 3 に、BioConfirm ソフトウェアによって検出された NIST mAb の配列を表示します。実線は CID で乖離して MS2 にて同定されたもの、点線は最初のマスフィルター MS1 のみにて同定されたものを示します。

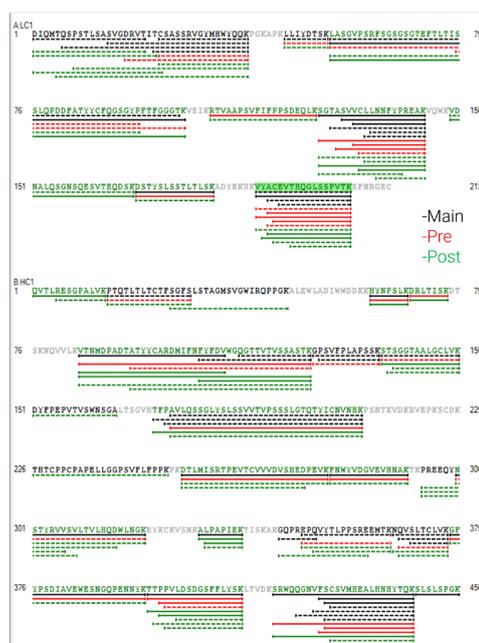


図 3. NIST mAb の配列カバレッジマップ

Lys-C による酵素消化はトリプシンによるものに比べ長い断片配列を生じますので、それによって CID MS/MS での配列確認が難しく、MS1 による検出が適している領域があることがうかがえます。

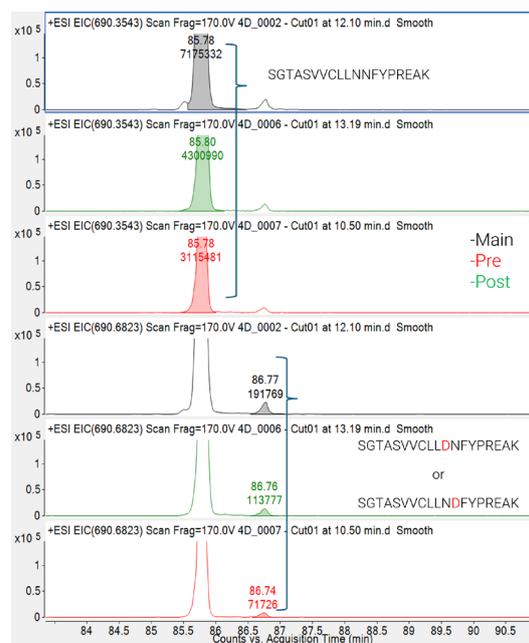


図 4. 各画分における脱アミド化ペプチドの EIC (抽出イオンクロマトグラム)

モノクローナル抗体をイオン交換クロマトグラフィーで分析して得られる情報は電荷変異体についての品質特性ですが、これは主にタンパク質配列中のアスパラギン側鎖が加水分解されてアスパラギン酸やイソアスパラギン酸を生じることを意味しています。Pre, Main, Post 各画分から生じる消化断片について解析を行ったところ、軽鎖<sup>126</sup>Ser-<sup>144</sup>Lys (SGTASVWCLNNFYPREAK) の配列中にある<sup>137</sup>Asn、もしくは<sup>138</sup>Asnに脱アミド化が起きていると示唆されました。(図4参照) イオン交換クロマトグラフィーは不揮発性の塩を含む移動相を使用するため、MS検出への接続は不可能ですが、4D-LC/MSでは電荷変異体の画分をオンラインで酵素消化し、MS検出に適した移動相に置換するため、電荷変異を起こしたアミノ酸残基の情報を得ることも可能です。

また、オンライン酵素消化ペプチドのマッピングはN-結合型糖鎖の組成についても情報が得られます。通常、モノクローナル抗体のグリコ

フォームを分析する場合は、 intactのまま逆相 LC/MS 分析を行ってデコンボリューションにより主要な糖鎖の組成比を求める方法と、PNGaseF 酵素により脱糖鎖を行ってから蛍光標識を行った後に HILIC で分析する方法に大別されます。今回の手法では糖鎖が付加した状態のまま Lys-C による酵素消化を行っていますので、糖ペプチドとして検出されてきます。Byos (Protein Metrics) を解析に用いたところ、図5に示すように重鎖<sup>292</sup>Thr-<sup>320</sup>Lys の配列中にある、<sup>300</sup>Asn に G1F や G0F が付加したシグナルが検出されました。

また、モノクローナル抗体の N-末端に存在するグルタミン残基側鎖は自発的に縮合してピログルタミン酸になることが知られていますが、Pre, Main, Post の各画分から重鎖 N-末端について解析すると、図6に示すようにすべての画分で N-末端のグルタミン (Q) 残基が 100 % ピログルタミル化されているという結果を得ました。

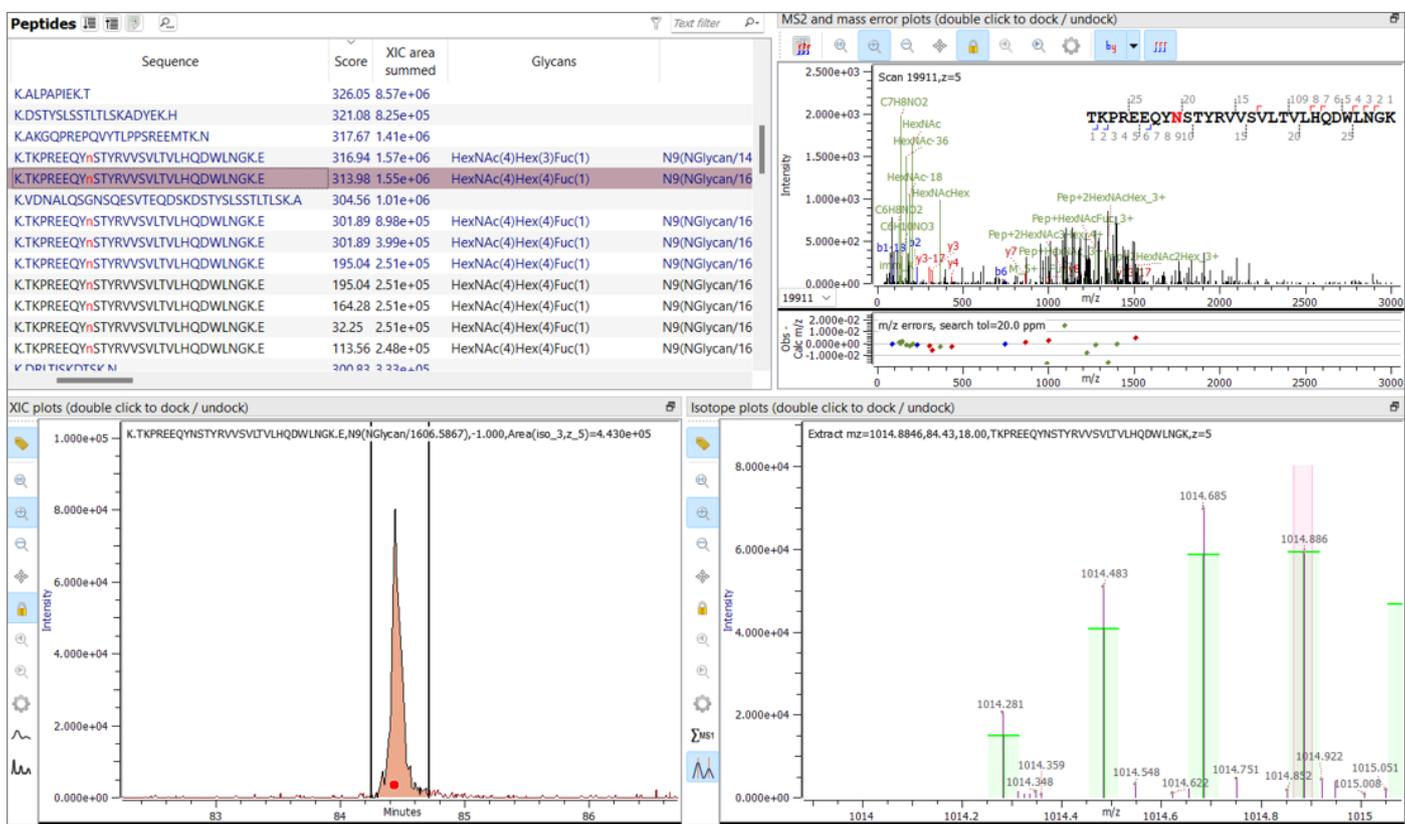


図5. MS/MS 同定された G1F ペプチドの結果

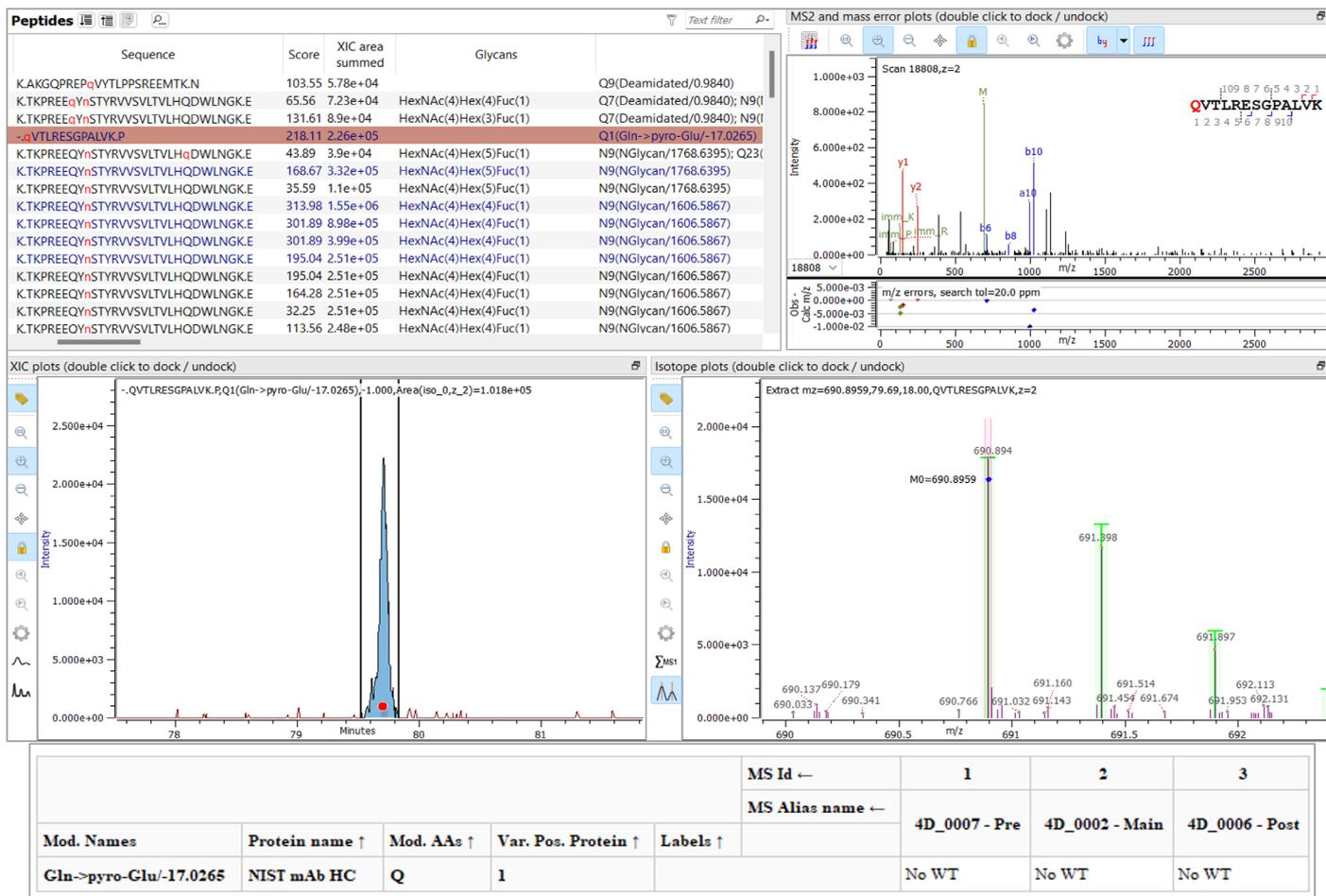


図 6. 重鎖 N-末端の pyro-Glu 化の MS/MS 検出

## まとめ

モノクローナル抗体の MAM ソリューションの一つとして、イオン交換クロマトグラフィーとオンライン酵素消化および逆相クロマトグラフィー・MS 検出を組み合わせた 4D-LC/MS について紹介しました。イオン交換分離画分の分取や脱塩、酵素消化などをマニュアルで行うことは可能ですが、オペレーターによる再現性のばらつきが大きく、オートメーション化もされていません。本アプリケーションノートで紹介した手法は 1 画分当たり約 2 時間で MS 検出までの処理が行われます。工程はすべて自動化されており、メソッド設定はループに画分採取するために 1D クロマトグラムの保持時間を入力するだけですむため、脱アミド化やグライコフォームなど複数の試験法に分かれていた分析を 1 回にまとめることが可能です。

## 参考文献

- 1) 4D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体電荷変異体の特性解析の完全自動化, アジレントアプリケーションノート 5994-2020JAJP

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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いません。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。

DE-001775

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, November 6, 2024

5994-7901JAJP