

開発後期および QC 環境のための BioAccord システム性能評価 - ペプチドマッピング解析

Henry Shion, Nilini Ranbaduge, Jonathan Pugh, Robert Lewis, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

このアプリケーションブリーフでは、従来のバリデーション要件に従うことが求められる規制環境下のワークフローにおいて、ペプチドマッピング向けの BioAccord システムが十分な再現性を示すことを実証しています。

アプリケーションのメリット

BioAccord システムを使用したペプチドマッピングのワークフローのシステム内およびシステム間での比較。

はじめに

2017 年、FDA は『A Retrospective Evaluation of the Use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications』（FDA の生物製剤認可申請における質量分析の使用の遡及的評価）と題された白書を公表しました。ここでは、タンパク質ベースのバイオ医薬品の特性解析において、質量分析の使用がますます増加していることが強調されています。最近では、液体クロマトグラフィーおよび高分解能質量分析（LC-MS）の使用範囲を、特性解析以外にも広げていくための共同作業が製薬業界において進められており、特に、開発後期および QC 環境内での属性モニタリング

分析での使用が挙げられます。高度な技能を備える科学者がこのようなデータを生成および収集するニーズ、並びにプロセス開発および QC ラボで MS ベースのアッセイを開発するための LC-MS プラットホームの頑健性および変動性に対するニーズについては、数々の懸念が存在します。Waters BioAccord システムは、バイオ医薬品分析向けに、頑健でコンプライアンス対応しており、かつ簡単に展開できる高性能 LC-MS システムを求める業界のニーズに対応する目的に特化した初のプラットフォームとなります。多数のアプリケーションノートおよびテクニカルノートで紹介されているように¹⁻⁹、BioAccord システムは、これらの分野の運用上の要件を満たし、上回っています。この最新の試験では、以前のインタクト質量分析の作業（Waters アプリケーションノート、720006722）を補完する形で、ペプチドマッピングワークフローにおける BioAccord システムの再現性に焦点を当てています。

結果および考察

BioAccord システムは、ACQUITY UPLC I-Class PLUS システムに、光学検出器（TUV または FLR）と、インラインで ACQUITY RDa 質量検出器（小型の高性能 oa-TOF 質量検出器）を組み合わせで構成されています。このシステムは、waters_connect プラットホーム内で UNIFI 科学情報システムと併用することで、ペプチドマップ、インタクト質量、遊離糖鎖、オリゴヌクレオチドの分析における自動のデータ取り込み、解析、レポート作成用に簡素化されたワークフローが利用できます。このシステムは、バイオ医薬品ルーチン分析の目的に合わせて設計されており、規制環境下および規制対象外のラボのいずれにおいても展開可能です。

ペプチドマッピングは、治療用タンパク質の一次配列の確認、パターンの確立、プロダクトの修飾変異レベルの確認をルーチンで行うために使用します。低含量の変異体についての信頼性の高い分析は、サンプル処理および LC-MS 装置の性能の両方に、非常に敏感に影響されます。そのため、規制環境下でバリデーションされるペプチドマッピングのアッセイ開発においては、頑健で使いやすく、再現性の高い LC-MS システムおよびメソッドが必須となります。

この試験では、すべてのペプチドマッピングの実験に、Waters mAb トリプシン消化標準品（製品番号：186009126 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>>）を使用しました。200 μ L の水を（40 μ g のトリプシン消化 NISTmAb が入っている）サンプルバイアルに添加して、最終濃度が 0.2 μ g/ μ L になるようにしました。そして溶液 5 μ L を BioAccord システムに注入して分析しました（オンカラム注入 1 μ g）。Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 130 Å、1.7 μ m、2.1 mm $\times$ 100 mm カラム（製品番号：186002352 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>）をペプチド分離用に 65 °C まで加熱しました。移動相 A および B は、それぞれ 0.1% ギ酸 Milli-Q 水溶液と、0.1% ギ酸アセトニトリル溶液です。60 分間にわたる 99% A ~ 60% A の線形グラジエントを流量 0.2 mL/分で設定しました。合計分析時間は、カラム平衡化を含めて 75 分でした。RDa 検出器は ESI ポジティブフルスキャン、フラグメンテーションモード（2 Hz）で操作し、質量範囲 50~2,000 m/z でデータを取り込みました。コーン電圧は 30 V（フラグメンテーションコーン電圧は 60 V~130 V に上昇）、キャピラ

リー電圧は 1.5 V に設定し、脱溶媒温度は 500 °C に維持しました。インテリジェントデータキャプチャーを有効にして、ペプチド割り当ての質量許容値を 10 ppm に設定し、割り当てミスを最小限にするため、追加のフィルターとしての確認用フラグメントイオンの最小値を >3 としました。UNIFI アプリ内の waters_connect の分析の種類 [Tof 2D クロマトグラフィーの定量アッセイ] を使用して、修飾ペプチドの相対量を定量しました。

図 1 は、BioAccord システムで 22 時間の分析時間にわたって行われた 18 のペプチド注入のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の重ね書きを示しています。表 1 にも示しているように、18 のペプチドマップのクロマトグラムの重ね書きから、モニタリングを行ったペプチドすべてについて、保持時間の標準偏差が 0.09 分未満と高い再現性が得られていることがわかります。

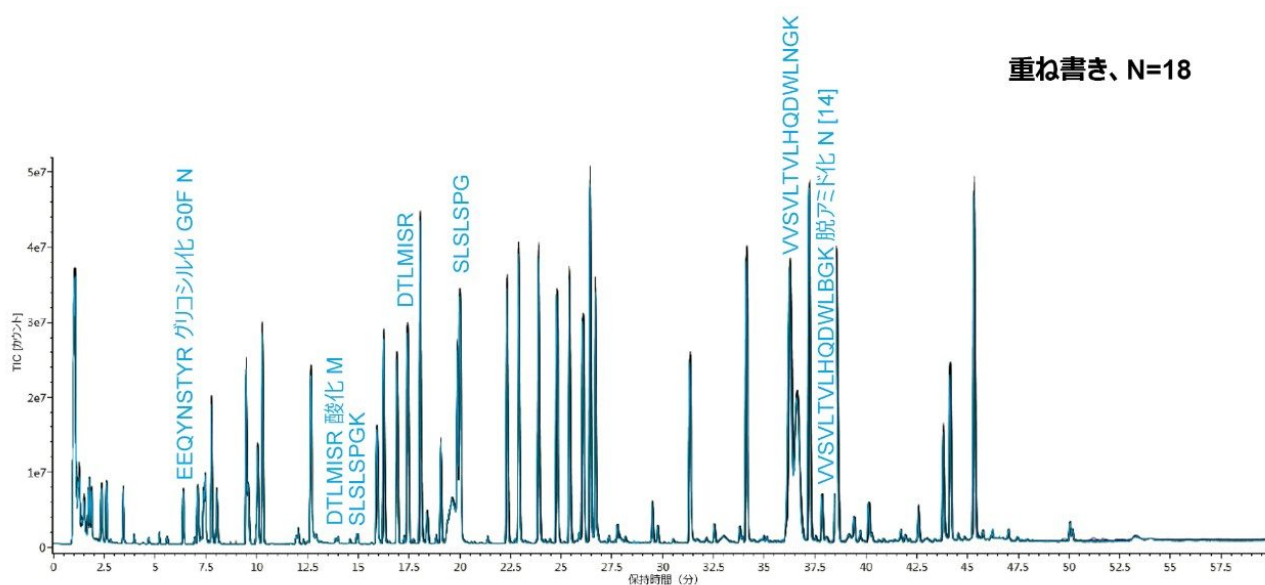


図 1. Waters mAb トリプシン消化標準品 (NISTmAb トリプシン消化) の 18 回の注入のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の重ね書き。ACQUITY UPLC I-Class PLUS システムおよび BioAccord システムを前面で使用することで、緩やかなグラジエントのメソッドを使用して、再現性の高いペプチドのクロマトグラフィー分離が得られました。一部のペプチドおよびそれらの PTM 対応物に名前が付けられています。

研究の種類	保持時間の標準偏差	相対含有量 % RSD
保持時間	0.09 分以内	–
モニタリングを行った ペプチドの相対含有量	–	8.12% 以内

表 1. ペプチドの保持時間の実験結果と、BioAccord システム 3 台のデータを使用して測定した相対 % 修飾レベル

BioAccord システムの性能により信頼性の高いペプチド修飾レベルの検出ができることを実証するため、天然のペプチドのセットおよびそれらの修飾ペプチドを、分析内相対的定量の対象にしました。

これらのペプチドには、図 1 でラベル付けされているように、糖ペプチド（EEQYNSTYR、G0F、G1F、および G2F、DTLMISR（酸化 M）、および VVSVLTVLHQDWLNGK（脱アミド化 N）が含まれています。

同様の LC-MS 分析を更に 2 台の BioAccord システム（18 注入）で実施したところ、3 台のシステムで同等のペプチド保持時間になりました。モニタリングを行ったペプチドすべてについて、3 台のシステム間での保持時間の標準偏差は 0.09 分（5.4 秒）未満であることが分かりました。

3 台のシステムで生成されたデータを使用して、同じペプチドのセットの相対含有量をプロットすると（図 2）、一部の糖ペプチドの相対含有量について、システム間でわずかなばらつきがあることがわかりました。ただし、モニタリングを行ったペプチドすべての %RSD の計算値は、MS レスポンスが顕著に異なるペプチド間でも 8.12% 未満に収まっていた。



図 2.3 台の BioAccord システムから生成されたデータを使用したペプチド（天然型、修飾型）の相対含有量のプロット。計算の結果、平均 %RSD は 8.12% で、自動分析での LC 保持時間の再現性は十分であり、異なるプラットフォームにわたってペプチド修飾レベルの決定を行うための MS レスポンスが得られることが示されました。

結論

システム内およびシステム間の試験により、システム 3 台のそれぞれで 18 回ずつ行った注入から得られたデータに基づいて、規制環境下で、BioAccord システムがペプチドマッピング分析の目的に適合していることが示されました。モニタリングを行ったペプチドすべてについて、保持時間の標準偏差は 0.09 分未満であり、モニタリングを行ったペプチド修飾すべての相対含有量は、様々なペプチド強度レベルにわたって平均 %RSD が 8.12% 未満でした。

BioAccord システムで生成されたペプチドマッピングのデータは、当社で以前に行ったシステム内およびシステム間のインタクト質量分析の性能試験⁹と一貫性があり、開発後期および QC 組織において、信頼性の高い MS ベースのアクセシビリティの展開ができることを裏付けています。

参考文献

1. Shion, H. *et al.* Enabling Routine and Reproducible Intact Mass Analysis When Data Integrity Matters. Waters Application Note, [720006472](#), 2019.
2. Ranbaduge, N. *et al.* Routine Peptide Mapping Analysis using the BioAccord System. Waters Tech Brief, [720006466](#), 2019.
3. Zhang, X. *et al.* Released N-linked Glycan Analysis Using the BioAccord System. Waters Tech Brief, [720006474](#), 2019.
4. Shion, H. *et al.* A Platform Method for the Molecular Mass Analysis of the Light Chains and Heavy Chains of Monoclonal Antibodies using the BioAccord System. Waters Tech Brief, [720006529](#), 2019.
5. Zhang, X. *et al.* Increasing Productivity and Confidence for N-linked Glycan Analysis of Biosimilars Using the BioAccord System. Waters Tech Brief, [720006545](#), 2019.
6. Shion, H. *et al.* Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Mass Spectrometry on the BioAccord System. Waters Tech Brief, [720006570](#), 2019.
7. Ranbaduge, N. *et al.* Establishing an Integrated Peptide Attribute Profiling and Monitoring Workflow for Improved Productivity and Confidence. Waters Application Note, [720006602](#), 2019.
8. Ippoliti, S. *et al.* Online IEX-MS of mAb Charge Variants Using a BioResolve SCX mAb Column, IonHance CX-MS pH Concentrates, and BioAccord System. Waters Application Note, [720006672](#), 2019.
9. Shion, H. *et al.* Evaluating BioAccord LC-MS System Performance for Deployment of a Compact, SmartMS-Enabled Biopharma Solution in Late Stage Development and QC Environment – Intact Mass Analysis. Waters Tech Brief, [720006722](#), 2020.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

720006831JA、2020 年 4 月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)