

## 柔軟な LC プラットホーム Arc Premier システム（BSM-R）を用いたペプチドマッピングアッセイ

---

Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

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

ペプチドマッピングアッセイは、タンパク質の配列、翻訳後修飾、医薬品同定、不純物など、タンパク質ベースの医薬品に関連する特性を測定するために、バイオ医薬品ラボで一般的に展開されています。この状況において、一貫性の高い結果を出すことができ、組織全体にわたって展開できる LC プラットホームが強く望まれています。MaxPeak High Performance Surfaces テクノロジーを採用した Arc Premier システムは、バイオ医薬品の開発および製造に容易に展開できる柔軟な LC プラットホームとして設計されています。この試験では、開発環境および製造環境に代表的な 2 つの条件のセットをピーク保持時間およびテーリングについて評価することで、システム性能を再現性および金属に吸着しやすい分析種の吸着を軽減する性能について評価しました。得られた結果から、バイナリーソルベントマネージャ（BSM-R）を搭載した Arc Premier システムでは、様々な試験条件において再現性の高い結果が得られると同時に、金属に吸着しやすい分析種の分析種/表面間相互作用を最小限に抑えられることが分かりました。また、開発環境および製造環境に容易に展開できる柔軟な LC プラットホームとして適していると結論付けられました。

### アプリケーションのメリット

- バイナリーソルベントマネージャを搭載した Arc Premier システムでは、幅広い条件下で再現性の高い結果が得られる

- MaxPeak High Performance Surfaces テクノロジーにより、金属に吸着しやすいペプチドのテーリングが低減し、クロマトグラフィー性能が向上

---

## はじめに

ペプチドマッピングは、バイオ医薬品の特性解析および製造現場で一般的に展開されている分析法です。アッセイとして、ペプチドマッピングは、タンパク質ベースの医薬品に関連するタンパク質配列の決定、翻訳後修飾、医薬品同定、不純物などの測定に有用です。ペプチドマッピングは複雑であり、薬物候補の特性解析では特に、上流での活動のための低流速で緩やかなグラジエントにより高分離能のグラジエントを得るなど、しばしば厳しい条件が要求されます。一方、ペプチドマッピングアッセイの普遍的な性質およびこれが業界全体にわたって展開されていることから、ペプチドマッピングアッセイがラボ間および LC プラットホーム間で移管されることが珍しくありません。ラボ間で装置ラインナップおよび性能にばらつきがあると、これがアッセイ結果に影響を及ぼすため、移管が困難になります。最近ウォーターズでは、MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) テクノロジーを採用した Arc Premier LC 製品ラインを導入しました。Arc Premier システムは、クォータナリーソルベントマネージャまたはバイナリーソルベントマネージャと併用して、複数のラボにわたって容易に展開できる柔軟な LC プラットホームとして設計されており、金属に吸着しやすい分析種に対する性能向上により、開発および製造活動がサポートされています。バイナリーソルベントマネージャを搭載した Arc Premier システムが組織全体で展開できる適切な LC プラットホームであることを実証するため、開発環境および製造環境に代表的な条件下で、ペプチドマッピングアッセイを評価しました。ピーク保持時間およびテーリングについて評価することで、再現性および金属に吸着しやすい分析種の吸着を軽減する効果についてシステム性能を評価しました。

---

## 結果および考察

本研究では、バイオ医薬品の開発時および製造時にペプチドマッピングアッセイで遭遇する可能性のある条件を代表する 2 つの分析法を作成しました。1 つ目の分析法は、バイオ医薬品の特性解析および開発初期段階において上流の活動で通常展開される高分離能の分離を代表しています。この例では、0.250 mL/分という低流速で 0.3% B/分という緩やかなグラジエントを使用することにより、クリティカルペアの分離が向上していますが、繰り返し注入において同じグラジエント組成が得られる LC の性能向上が必要になります。2 つ目の分析法は、バイオプロセスが十分に制御され、重要な分子種が既知でありモニタリングが必要な開発後期または製造環境で遭遇する可能性のある条件を代表しています。この例では、0.500 mL/分という高流速でより急なグラジエント (0.6% B/分) を使用することにより、これらの

環境に伴うハイスルーブットに対応しています。

Arc Premier システム用に推奨される XSelect Premier カラム (2.5  $\mu$ m、4.6  $\times$  150 mm、製品番号: [186009874 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009874-xselect-premier-csh-c18-column-130a-25--m--46-x-150-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009874-xselect-premier-csh-c18-column-130a-25--m--46-x-150-mm-1-pk.html)) を使用して、ペプチドマッピングのアッセイを、両方の条件下で Waters トリプシン消化標準品 (製品番号: [186009126 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009874-xselect-premier-csh-c18-column-130a-25--m--46-x-150-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009874-xselect-premier-csh-c18-column-130a-25--m--46-x-150-mm-1-pk.html)) を 3 回繰り返し注入して行いました。図 1 に示すように、ピークプロファイルは異なる条件で極めて同等で、繰り返し注入の重ね描きにより、システムの再現性が明らかになりました。Arc Premier システムで一貫性の高い結果が得られるかどうかを更に調べるため、9 本のピークを選択して、保持時間に関する性能を比較しました。図 1 中の表に示すように、低流速/緩やかなグラジエントまたは高流速/急なグラジエントを使用した場合に、計算した平均保持時間の標準偏差 (SD) はそれぞれ 0.02 分 (1.2 秒) および 0.01 分 (0.5 秒) で、それぞれの %RSD はいずれも 0.1% 未満でした。このデータは、バイナリーソルベントマネージャーを搭載した Arc Premier システムが、2 つの条件のいずれにおいてもペプチドマッピングアッセイに適しており、バイオ医薬品に関連する開発および製造活動をサポートする柔軟性が得られることを実証しています。

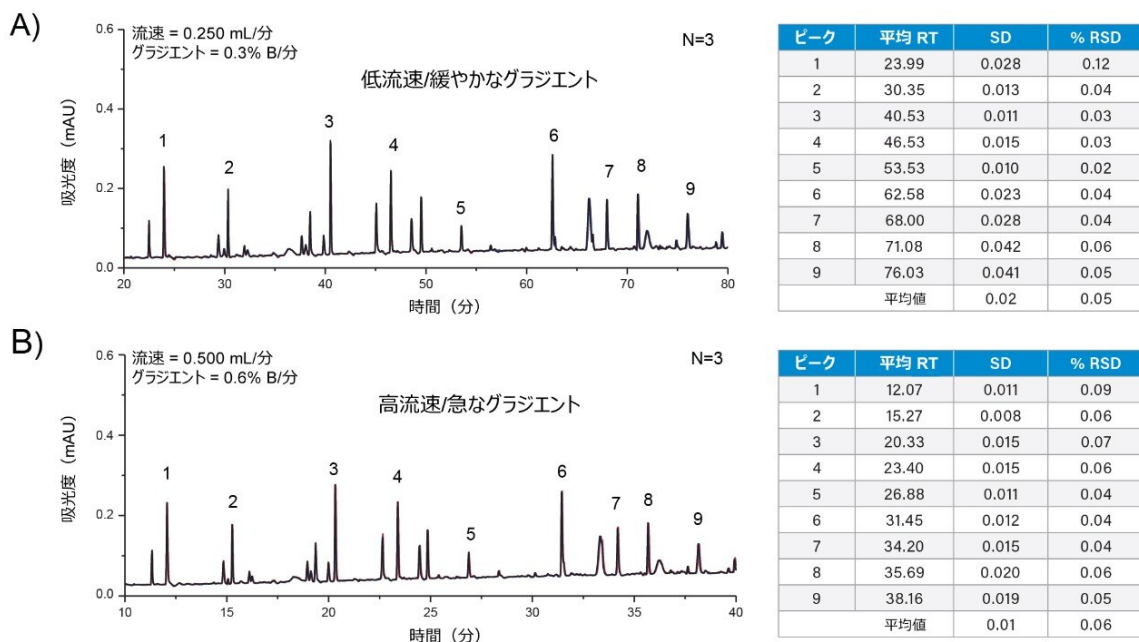


図 1. XSelect Premier カラムを使用して分離した 9 種のペプチドについての、ペプチドマッピングプロファイルおよび関連する保持時間の再現性。Arc Premier (BSM-R) システムでの A) 低流速/緩やかなグラジエントを用いた RPLC 分析法、および B) 高流速/急なグラジエントを用いた RPLC 分析法。

MaxPeak HPS テクノロジーの性能を調査するため、低流速/緩やかなグラジエントの条件を使用し、XSelect CSH カラ

ム (2.5  $\mu$ m、4.6  $\times$  150 mm、製品番号: 186006729 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186006729-xselect-csh-c18-xp-column-130a-25--m-46-mm-x-150-mm-1-pk.html>>) を用いてペプチドマッピングアッセイを実施し、MaxPeak Premier ブランドのカラムを使用して取り込んだ以前のデータと比較しました。比較しやすくするため、いずれの分離においても ACQUITY QDa 質量検出器を使用して質量データを取り込みました。図 2 に、MaxPeak HPS テクノロジーを使用した際に、以前にピークテーリングの差が観察された 8 種のペプチドの抽出イオンクロマトグラム (XIC) を示します<sup>1</sup>。目視で調べたところ、MaxPeak HPS テクノロジーを採用した MaxPeak Premier カラムを使用した場合に、ピーク 1、5、7 (挿入図) で最も顕著なピークテーリングの低減が観察されました。この観察結果は定量的にも確認され、表 1 に示すように、ピーク 1、5、7 のピークテーリングで最大の差があると算出されました。残りのピークではテーリングはそれほど顕著ではありませんでしたが、それでもピークテーリングの低減が観察されました。ピーク 2 ではピークテーリングにわずかな変化しか見られませんでした。ピーク 2 は「塩基性」ペプチド ( $pI > 7.0$ ) と考えられ、ピークテーリングの面では MaxPeak HPS テクノロジーは性能に影響を及ぼさないと考えられることから、このことは予想内のことでした。これらの結果は、MaxPeak HPS テクノロジーにより、金属に吸着しやすい分析種の分析種/表面間相互作用を最小限に抑えることで、クロマトグラフィー性能が改善することを実証しています。

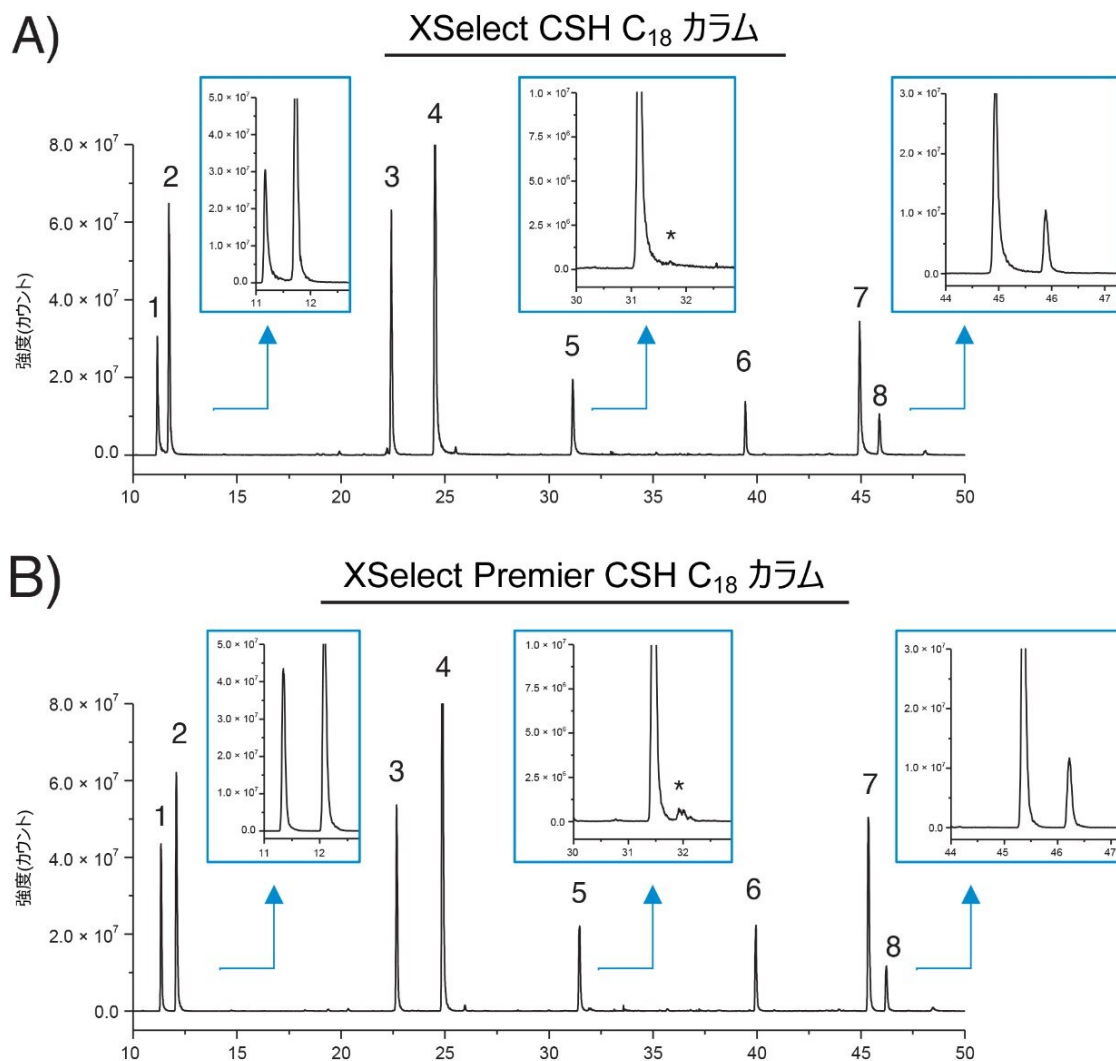


図 2. Arc Premier (BSM-R) システムにおいて、高流速/急なグラジエント RPLC 分析法で A) XSelect CSH C<sub>18</sub> カラム、および B) XSelect Premier CSH C<sub>18</sub> カラムを使用して分離された 8 種のペプチドの抽出イオンクロマトグラム。ピークテーリングを評価するため、挿入図に選択したピークを拡大表示しています。ACQUITY QDa の設定：モード：ポジティブ、スキャン範囲： $m/z$  350 ~ 1250、サンプルレート：5 Hz、プローブ温度：600 °C、キャピラリー電圧：1.5 kV、コーン電圧：15 V。

ピーク	配列	pI	CSH (Tf <sub>5%</sub> )	Premier (Tf <sub>5%</sub> )	変化率 (%)
1	VDNALQSGNSQESVTEQDSK	3.92	2.51	1.40	-44.19
2	VGVMHWYQQKPGK	9.50	1.47	1.46	-0.98
3	DIQMTQSPSTLSASVGDR	4.21	1.45	1.26	-12.68
4	TPEVTC*VVVDVSHEDPEVK	4.17	1.75	1.44	-17.73
5	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	4.00	1.65	1.33	-19.14
6	ALEWLADIWWDDKK	4.23	1.37	1.30	-5.12
7	ALEWLADIWWDDK	3.84	1.95	1.37	-29.36
8	FSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC*FQGSGYPFTFGGGTK	4.03	1.48	1.35	-8.60

注：アスタリスク（\*）が付いている配列の残基は、隣接するシステイン残基のカルバミドメチル修飾が検出されたことを示します。

表 1. XSelect CSH C18 カラム（CSH）および XSelect Premier CSH C18 カラム（Premier）を使用して、Arc Premier（BSM-R）システムで RPLC ベースの分析法により 8 種の対象ペプチドを分離し、ピークテーリングを計算して比較しました

## 結論

この試験では、MaxPeak HPS テクノロジーを採用した Arc Premier システム（BSM-R バリエーション）で卓越したクロマトグラフィー性能が得られ、様々な試験条件において再現性の高い結果が得られると同時に、金属に吸着しやすい分析種の分析種/表面間相互作用を最小限に抑えられることを実証しました。Arc Premier システムは、複数のラボにわたって容易に展開できる柔軟な LC プラットホームとして理想的であり、バイオ医薬品の開発および製造活動が円滑になります。

## 参考文献

1. Birdsall *et al.* Reducing Metal-Ion Mediated Adsorption of Acidic Peptides in RPLC-Based Assays Using Hybrid Silica Chromatographic Surfaces. *Journal Chromatography. B.* Vol 1179, 2021.

---

## ソリューション提供製品

Arc Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <<https://www.waters.com/10190669>>

720007464JA、2022 年 1 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.