

アプリケーションノート

Henry Shion, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

本実験では、waters_connect インフォマティクスによりコントロールされる BioAccord LC-MS システム^{1~10}を使用したハイスループットのインタクト質量確認ワークフローの開発について紹介します。より高速なグラジエント LC-MS 分析と強化されたインフォマティクス機能との組み合わせを、タンパク質のターゲット質量のマッチングに展開しました。さらに、色分けしたサンプルプレートを表示して、簡単なカスタム計算を用いた各サンプルの質量確認ステータスを表示できます。質量確認ワークフローを逆相およびネイティブ SEC LC-MS インタクト質量分析に適用し、1 分析あたりの LC の合計分析時間は 2.5 分でした。このワークフローにより、サンプルスループットが懸念事項であるバイオ医薬品の分析における、クロンのスクリーニング、プロセス開発、およびその他の機能のための、LC-MS インタクト質量分析の分析効率が向上するはずです。

アプリケーションのメリット

- 逆相およびネイティブ SEC LC-MS インタクト質量分析の両方に対する実証済みアプリケーション
- 色分けしたサンプルプレートによる各サンプルの質量確認ステータスの迅速な可視化
- コンプライアンス対応の waters_connect プラットホームでのハイスループット LC-MS ワークフローは、バイオ医薬品組織全体にわたって展開可能
- ターゲット分子量ベースのインタクト質量確認

はじめに

バイオ医薬品の開発全体にわたって、モノクローナル抗体（mAb）などのバイオ医薬品の特性解析のための分析支援が不可欠です。質量分析によるインタクト質量分析によって、分子量やサンプルの不均一性などの重要な情報が提供されます。大量のバイオ医薬品サンプル/候補が生成されるため、ハイスループット分析が可能な分析法を使用して、開発の初期段階で製品特性をスクリーニングし（クローンのスクリーニングなど）、プロセス開発にわたる強力な QbD イニシアチブをサポートすることができます。本実験では、waters_connect インフォマティクスによりコントロールされる BioAccord LC-MS システム¹⁻¹⁰を使用したハイスループットのインタクト質量確認ワークフローの開発について紹介します。より高速なグラジエント LC-MS 分析法を、強化されたインフォマティクス機能と組み合わせてハイスループットのインタクト質量確認分析のためのターゲット質量のマッチング用に展開しました。色分けしたサンプルプレート表示により、簡単なカスタム計算を用いた各サンプルの質量確認ステータスが、迅速に示されます。質量確認ワークフローを逆相およびネイティブの SEC LC-MS インタクト質量分析に適用し、1 分析あたりの LC の合計分析時間は 2.5 分でした。本実験では、6 つの市販のモノクローナル抗体とシステイン結合抗体薬物複合体サンプルを調べました。開発済みのワークフローは、サンプルスループットがきわめて重要な考慮事項であるバイオ医薬品開発の LC-MS インタクト質量分析分野の、分析効率を向上させるプラスの影響を与えるはずで



図 1. Waters BioAccord LC-MS システムおよび waters_connect インフォマティクスプラットフォーム

実験方法

逆相 LC-MS 分析法およびネイティブ SEC-MS 分析法はいずれも、よりハイスループットのインタクト質量確認スクリーニングのために開発されました。本実験では、6 種のモノクローナル抗体と 1 つのシステイン結合 ADC サンプルを調べて、質量確認ワークフローを実証しました。分析用に、繰り返しサンプルを 48 バイアルのサンプルプレートに配置しました。

サンプルの説明

NIST レファレンス mAb（米国国立標準技術研究所）、トラスツズマブ（Genentech、South San Francisco、CA）、インフリキシマブ（Janssen）、レツキシマブ（Biogen-Idex）、ベバシズマブ（Genentech）、アダリムマブ（Abbvie）はすべて、市販品をオリジナルの処方で入手しました。特許で保護されている ADC サンプルは、共同研究を通して入手しました。サンプルは、逆相 LC-MS 分析の前に 50 mM 酢酸アンモニウム（Sigma 431311）で 0.2 mg/mL に希釈し、ネイティブ SEC LC-MS 分析の場合は 50 mM 酢酸アンモニウム（pH ~7.0）で 2.5 mg/mL に希釈しました。LC-MS グレードの水とアセトニトリル（Fisher Scientific Optima）を使用して、移動相およびシステム溶液を調製しました。ギ酸（製品番号 = 85178）は Fisher Scientific から購入しました。

分析条件

LC 条件（逆相 LC-MS 分析）

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
検出:	ACQUITY RDa 質量検出器
バイアル:	Waters トータルリカバリーバイアル（製品番号 = 186000385C）
カラム:	BioResolve RP mAb Polyphenyl カラム、450 Å、2.7 μm、2.1 mm × 50 mm（製品番号 = 186008944）
カラム温度:	80 °C
サンプル温度:	6 °C
注入量:	4 μL
流速:	0.4 mL/分

LC 条件 (逆相 LC-MS 分析)

移動相 A: 0.1 % ギ酸水溶液

移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0.00	0.40	95.0	5.0	6
1.00	0.40	15.0	85.0	6
1.20	0.40	5.0	95.0	6
1.50	0.40	95.0	5.0	6
2.50	0.40	95.0	5.0	6

MS 条件

MS システム: ACQUITY RDa 質量検出器、BioAccord システム

イオン化モード: ポジティブモード

取り込み範囲: $m/z = 400 \sim 7000$

スキャンレート: 2 Hz

キャピラリー電圧:	1.5 KV
脱溶媒温度:	550 °C
コーン電圧:	70 V
Intelligent data capture:	Off (オフ)

LC 条件 (ネイティブ SEC LC-MS 分析)

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
検出:	ACQUITY RDa 質量検出器
バイアル:	Waters トータルリカバリー (製品番号 = 186000385 C)
カラム:	ACQUITY UPLC Protein BEH SEC カラム、200 Å、1.7 μm、2.1 × 150 mm (製品番号 = 186008471)
カラム温度:	30 °C
サンプル温度:	6 °C
注入量:	10 μL
流速:	0.2 mL/分
移動相 A:	50 mM 酢酸アンモニウム

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	カーブ
0.00	0.20	100.0	0.0	6
2.50	0.20	100.0	0.0	6

データ管理

インフォーマティクス:

waters_connect

システムコントロールおよびデータ解析:

UNIFI (バージョン 1.9.4)

結果および考察

よりハイスループットの質量確認ワークフローを開発するために、高速 LC グラジエントを作成して実験の実行時間を短縮しました。逆相 LC-MS 分析では、2.5 分間のグラジエントを使用しました（標準分析法では 5 % B から 85 % B で合計実行時間が 7 分であったのが、ハイスループット分析法では 1.0 分間のグラジエントで 5 % B から 85 % B で合計実行時間が 2.5 分に短縮されました）。流速は 0.4 mL/分に維持しました。2 つのグラジエントメソッドの TIC（トータルイオンクロマトグラム）の比較が図 2 に示されています。

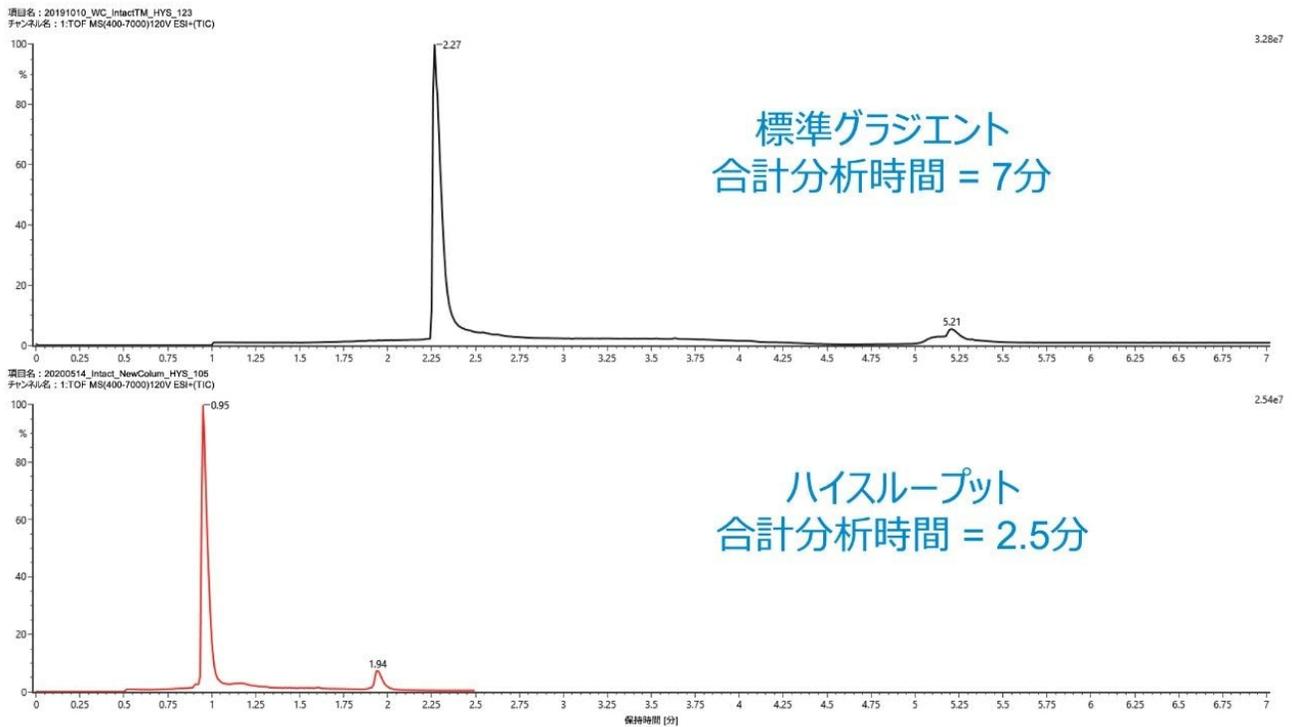


図 2. 標準逆相 LC-MS メソッド（上）とハイスループットの逆相 LC-MS メソッド（下）の TIC の比較。ハイスループット分析法の合計実行時間は 2.5 分に短縮されています。

ネイティブ SEC LC-MS 分析では、LC の流速が 0.075 mL/分 から 0.2 mL/分 に増加され、ネイティブ SEC LC-MS 分析の合計実行時間が 7.0 分から 2.5 分に短縮されました。図 3 に、標準 SEC LC-MS 分析とハイスループット分析法の TUV の比較が示されています。

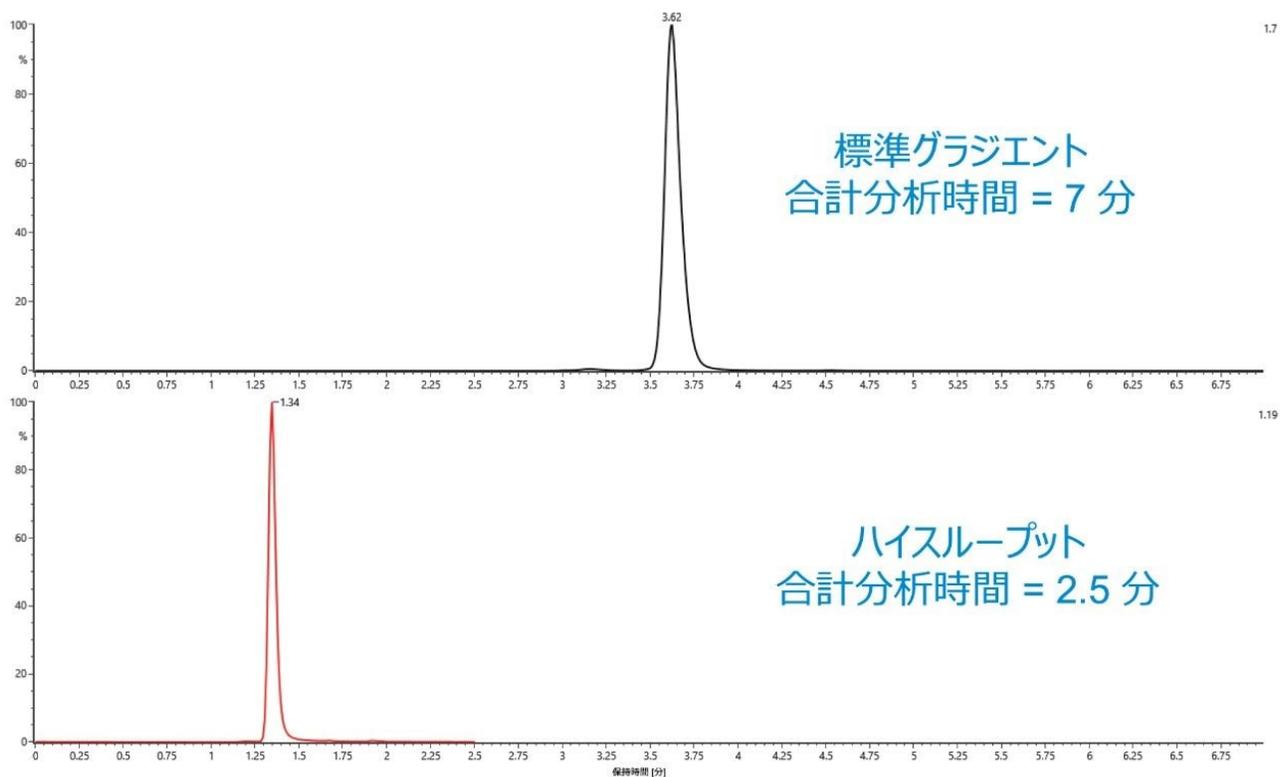


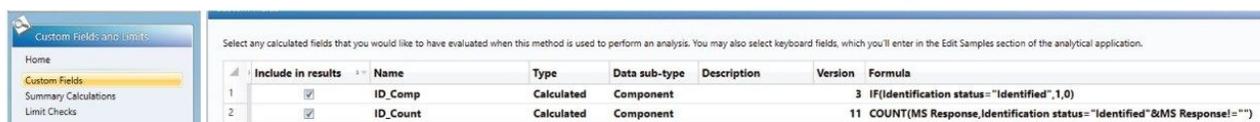
図 3. 標準の SEC LC-MS 分析法（上）とハイスループット SEC LC-MS（下）との TUV の比較。スループット分析法の合計実行時間が 2.5 分に短縮されています。

クローンのスクリーニングによるバイオ医薬品の探索では、非常に多くの場合、質量確認の課題に配列情報は必要ではありません。これは、サンプルが契約分析組織へのアウトソーシングであり、その組織が配列を独占的に維持したい場合にも、一般に見られます。waters_connect プラットホームはこの機能に対応して、データ解析時にターゲット質量を自動質量確認するために、分析メソッドに直接入力できます。図 4 に、逆相 LC-MS 分析実験の解析メソッドで入力された、6 つの抗体の質量が示されています。ソフトウェアライブラリーに存在するまたは追加された翻訳後修飾（PTM）をターゲット質量と組み合わせて、分析法での成分同定に使用できます。

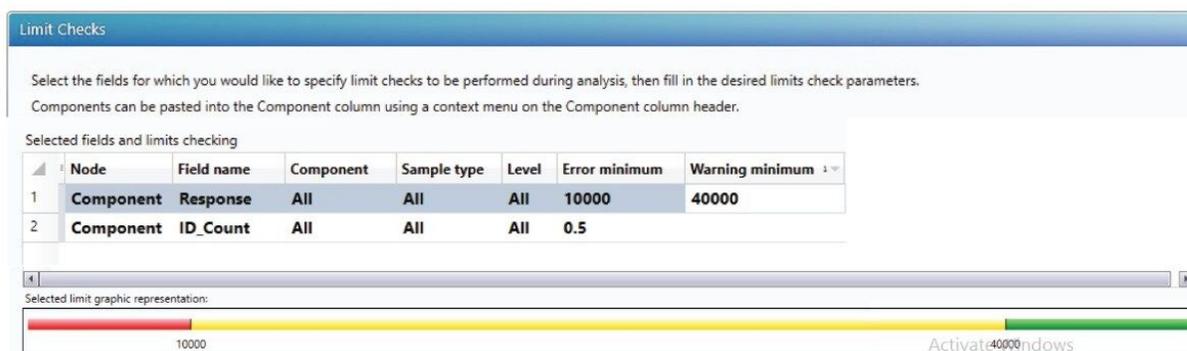
	Component n...	Expected RT (min)	Time window (min)	Expected mass (Da)	Description
1	mAb1	0.96	0.3	148037.0	mAb 1
2	mAb2	0.96	0.3	148058.0	mAb 2
3	mAb3	0.96	0.3	149199.0	mAb 3
4	mAb4	0.96	0.3	147078.0	mAb 4
5	mAb5	0.96	0.3	148078.0	mAb 5
6	mAb6	0.96	0.3	148512.0	mAb 6

図 4. データ解析時に、ターゲット質量が自動質量確認のための分析法の [予想質量 (Da)] フィールドに入力されま
す。

2つのカスタムフィールドが生成されて、サンプルプレートの各サンプルの質量確認ステータスが表示されました。カスタムフィールド ID_comp は、同定された (マッチした) 成分 (質量) のステータスを通信するために使用され、もう1つのカスタムフィールド ID_count は、同定ステータスを同定された成分 (質量) のシグナルレスポンスにリンクするために使用されます。これらのカスタムフィールドは、図 5A に示されているように、この分析法に含まれています。ID_count のレスポンスとカスタムフィールドは、分析メソッド「リミットチェック」(図 5B を参照) で設定され、サンプルプレートの質量確認のステータスが色付け表示されます。UNIFI/waters_connect のカスタムフィールドを使用したインタクト質量分析のデータ解析の詳細な説明は、この参考文献に記載されています¹¹。



A - 2つのカスタムフィールド



B - リミットチェックの色分け

図 5A. 分析法で 2 つのカスタムフィールドが作成されて選択され、リミットチェック（図 5B）セットアップと組み合わせ、分析法に質量確認ステータスが色付けで表示されます（確認済み：緑色、疑わしい：黄色、未確認：赤色）。

メソッドを確立することにより、統合し、自動化したデータ取り込みと解析を用いる合理化された実験を実行できます。図 6 に、BioAccord LC-MS システムでの逆相 LC-MS 実験の自動取り込み前後の、48 バイアルプレート上の各サンプル繰り返しの質量確認ステータスの例を示しています。

A - プレートレビューのビフォ・アフター



B - 48 (または 96) のサンプルキュー

#	Item name	Sample type	Sample position	Run time (min)	Injection volume (µL)	Replicates
1	WC_20200417HYS_202	Blank	1:A,1	2.50	10.00	1
2	WC_20200417HYS_203	Unknown	1:A,2	2.50	4.00	1
3	WC_20200417HYS_204	Unknown	1:A,3	2.50	4.00	1
4	WC_20200417HYS_205	Unknown	1:A,4	2.50	4.00	1
5	WC_20200417HYS_206	Unknown	1:A,5	2.50	4.00	1
6	WC_20200417HYS_207	Unknown	1:A,6	2.50	4.00	1
7	WC_20200417HYS_208	Unknown	1:A,7	2.50	4.00	1
8	WC_20200417HYS_209	Reference	1:A,8	2.50	4.00	1
9	WC_20200417HYS_210	Unknown	1:B,1	2.50	4.00	1
10	WC_20200417HYS_211	Unknown	1:B,2	2.50	4.00	1
11	WC_20200417HYS_212	Unknown	1:B,3	2.50	4.00	1
12	WC_20200417HYS_213	Unknown	1:B,4	2.50	4.00	1
13	WC_20200417HYS_214	Unknown	1:B,5	2.50	4.00	1
14	WC_20200417HYS_215	Unknown	1:B,6	2.50	4.00	1
15	WC_20200417HYS_216	Unknown	1:B,7	2.50	4.00	1
16	WC_20200417HYS_217	Unknown	1:B,8	2.50	4.00	1
17	WC_20200417HYS_218	Unknown	1:C,1	2.50	3.00	1
18	WC_20200417HYS_219	Unknown	1:C,2	2.50	3.00	1
19	WC_20200417HYS_220	Unknown	1:C,3	2.50	3.00	1
20	WC_20200417HYS_221	Unknown	1:C,4	2.50	3.00	1
21	WC_20200417HYS_222	Unknown	1:C,5	2.50	3.00	1
22	WC_20200417HYS_223	Unknown	1:C,6	2.50	3.00	1
23	WC_20200417HYS_224	Unknown	1:C,7	2.50	3.00	1
24	WC_20200417HYS_225	Unknown	1:C,8	2.50	3.00	1
25	WC_20200417HYS_226	Unknown	1:D,1	2.50	4.00	1
26	WC_20200417HYS_227	Unknown	1:D,2	2.50	4.00	1

図 6. waters_connect での自動取り込みおよび解析の前後の、48 バイアルプレート上の各サンプルの質量確認ステータス

いくつかの質量確認サンプルの TIC とデコンボリューションされた質量スペクトルの例が図 7 に示されています。サンプルプレートの緑色のカラーコードは、そのサンプルの位置が、メソッドに含まれているターゲット質量の 1 つに対して質量確認されていることを示します。黄色のカラーコードは、分析法のターゲット質量の 1 つがマッチングされているが、シグナル強度が、リミットチェック設定の警告の最小レベルとフェイルの最小レベルの間にあることを示します。これが発生した場合は、データを手動でレビューすることを推奨します。赤色のカラーコードは、どのターゲット質量もマッチしなかったことを示します。図 7 の場合、このサンプルでは実際のシグナルは得られておらず、可能性のあるマッチはありません。

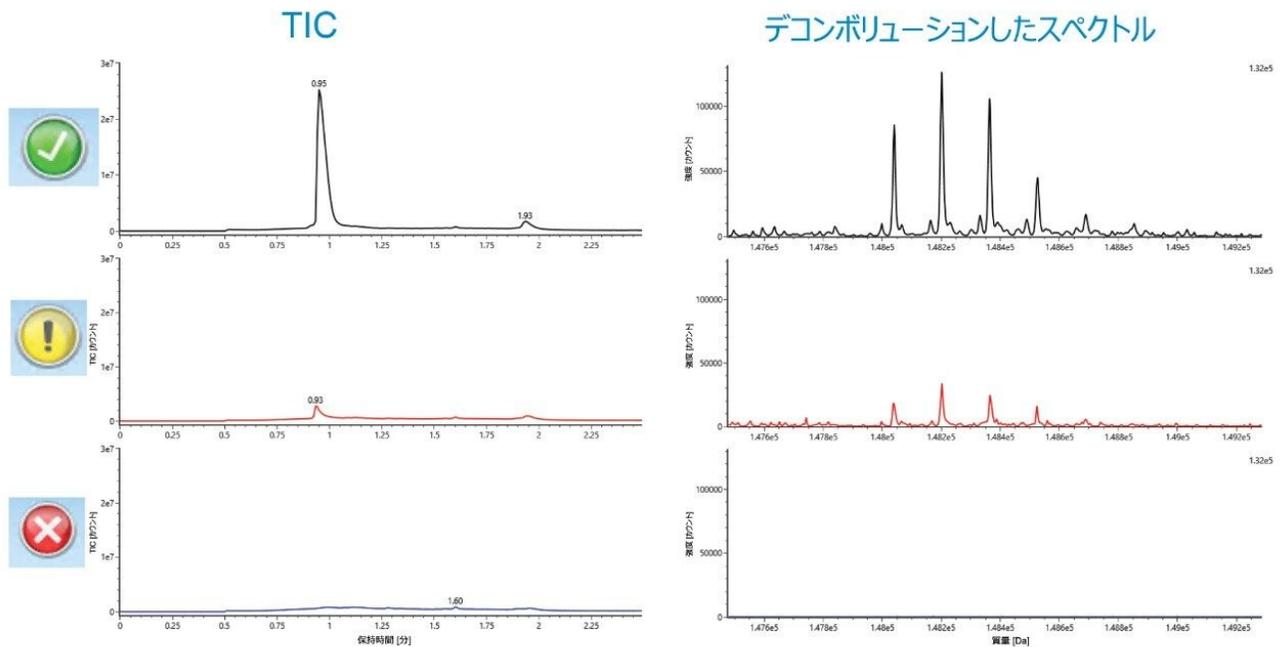


図 7. 逆相 LC-MS 実験で質量確認ステータスが異なる TIC デコンボリューションされたスペクトルの例。(上) 緑色：質量確認済み、(中央) 黄色：疑わしい-手動のレビューを示唆、(下) 赤色：質量未確認。

6 種の抗体サンプルの逆相 LC-MS 分析からの TIC およびデコンボリューションしたスペクトルが図 8 に示されています。高品質のデータが、6 種の抗体について通常 5 ~ 15 ppm の範囲の質量正確度で示されています。

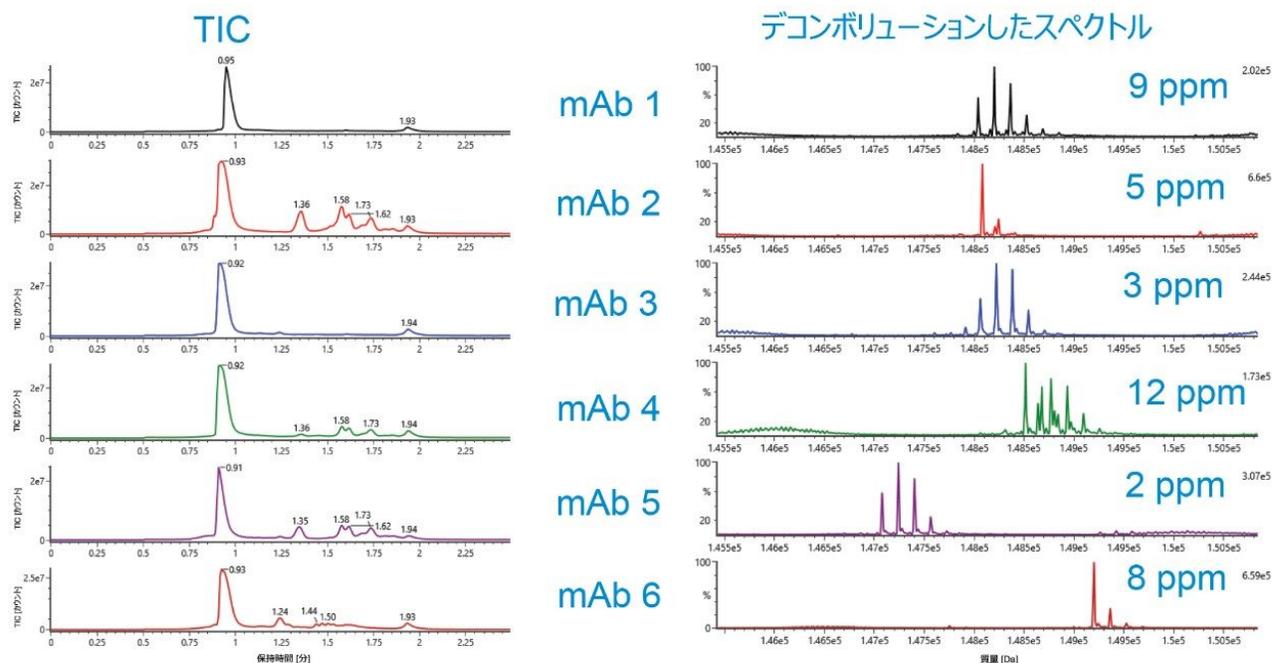


図 8. 逆相ハイスループット LC-MS 分析法で分析した 6 種の抗体サンプルの高品質 TIC およびデコンボリューションしたスペクトル

図 9 に、解析済み UV クロマトグラム、および 6 種の抗体サンプルのネイティブ SEC LC-MS 分析から得られた生スペクトルの組み合わせを示しています。多価抗体イオンの m/z エンベロープが（逆相分析法と比較して）高くなっていることが、生スペクトルの組み合わせで認められました。デコンボリューション後の 6 種の抗体すべてで 15 ppm 以内の質量正確度が得られました（図には示されていない）。

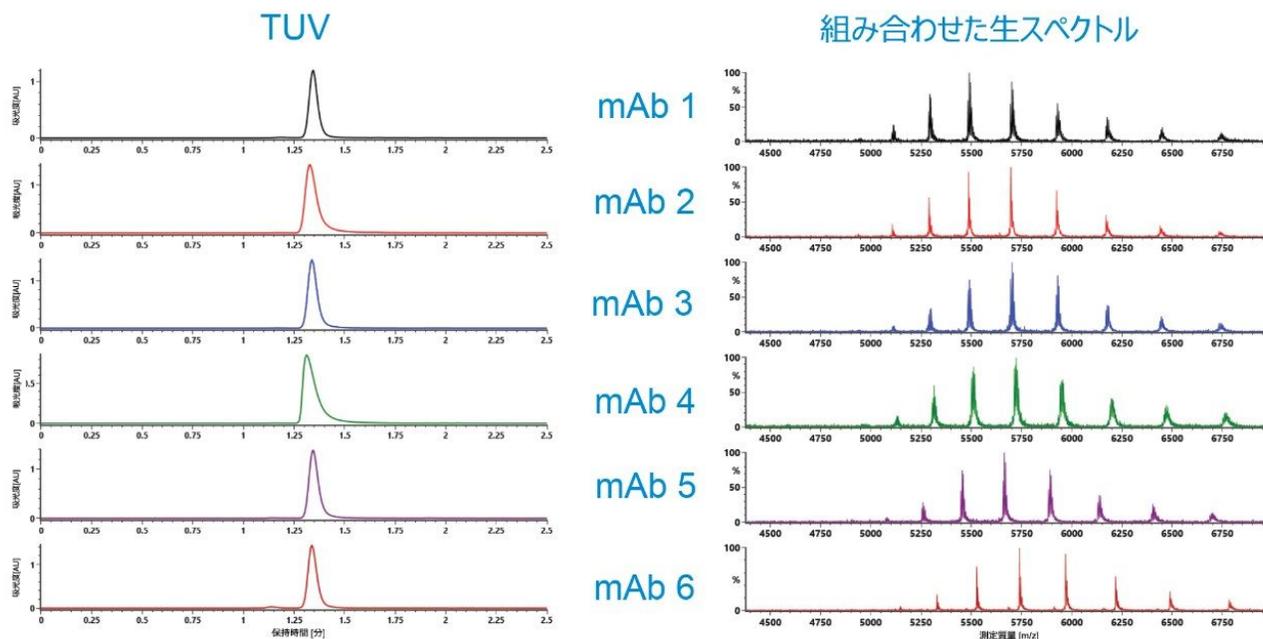


図 9. 6 種のモノクローナル抗体、TUV、TIC のネイティブ SEC LC-MS HTP スクリーニング

分子の複合質量を測定するには、複雑な生体サンプル内の非共有相互作用を維持するために、ネイティブ MS は不可欠です。6 種の抗体サンプルに加えて、システイン結合 ADC サンプルについて、逆相（データは示されていない）とネイティブ SEC LC-MS 分析法（図 10）の両方を使用して、比較実験を行いました。予想どおり、軽鎖と重鎖の間、および ADC 分子をまとめる 2 つの重鎖の間の非共有相互作用が維持されたのは、ネイティブアプローチのみでした。これにより、追加のカスタム計算を使用して、インタクト質量レベルで薬物-抗体比（DAR）を正常に測定できます^{6,11}。

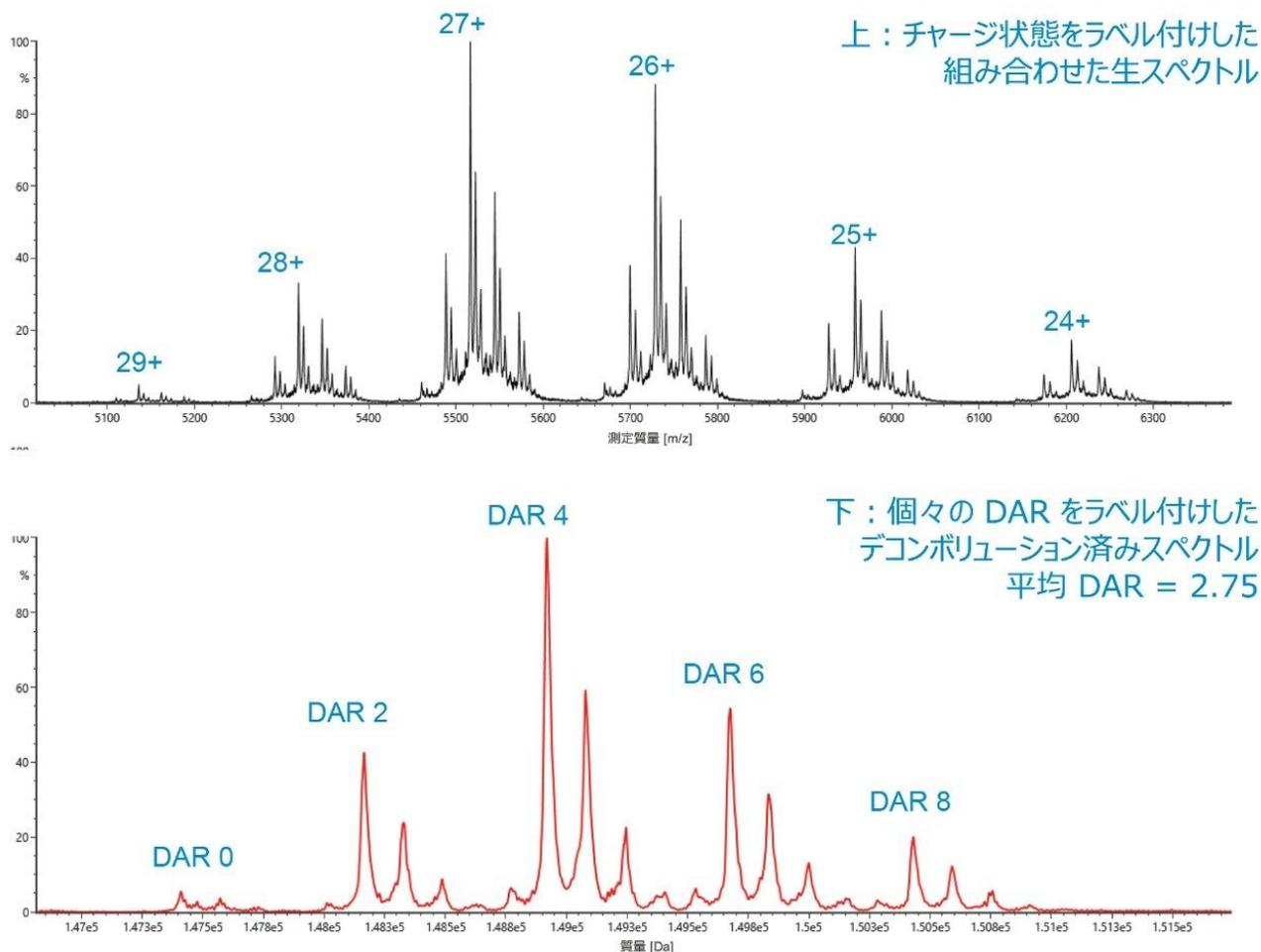


図 10. チャージ状態をラベル付けした組み合わせ生スペクトル（上）および *MaxEnt1* でデコンボリューションしたスペクトル（個々の *DAR* と合計平均 *DAR* でラベル付け）（下）。逆相 LC-MS 分析により、抗体の重鎖と軽鎖間および重鎖間の非共有結合が解離されます。ネイティブアプローチのみで、ADC 分子を保持する非共有相互作用が維持されていました。

結論

本実験では、waters_connect インフォマティクスプラットフォームでコントロールされる BioAccord LC-MS システムを使用して、ハイスループットのインタクト質量確認ワークフローの開発に成功しました。逆相 LC-MS およびネイティブ SEC LC-MS インタクト質量確認分析を使用して本ワークフローが実証され、どちらも 1 分析あたりの LC の合計

分析時間はわずか 2.5 分でした。色分けしたサンプルウェルディスプレイは、分析結果の迅速な視覚的スナップショットを提供することを示していました。全体として、このより迅速な方法により、バイオ製薬業界内でのよりハイスループットのインタクト質量分析を任務とする分析組織のラボの効率が改善するはずです。

参考文献

1. Shion, H.; *et al.* Enabling Routine and Reproducible Intact Analysis When Data Integrity Matters. Waters Application Note. 2019. 720006472EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html>> .
2. Ranbaduge, N.; *et al.* Routine Peptide Mapping Analysis using the BioAccord System. Waters Technology Brief. 2019. 720006466EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/routine-peptide-mapping-analysis-using-bioaccord.html>>
3. Zhang, X.; *et al.* Released N-linked Glycan Analysis using the BioAccord System. Waters Technology Brief. 2019. 720006474EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/released-n-linked-glycan-analysis-using-bioaccord.html>>
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 Technology Brief. 2019. 720006529EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/platform-method-molecular-mass-analysis-light-heavy-chains-monoclonal-antibodies-bioaccord-system.html>>
5. Zhang, X.; *et al.* Increasing Productivity and Confidence for N-linked Glycan Analysis of Biosimilars using the BioAccord System. Waters Technology Brief. 2019. 720006545EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/increasing-productivity-and-confidence-for-n-linked-glycan-analysis-of-biosimilars-using-the-bioaccord-system.html>>
6. Shion, H.; *et al.* Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Spectrometry on the BioAccord System. Waters Technology Brief. 2019. 720006570EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/analysis-of-antibody-drug-conjugates-adcs-by-native-mass-spectrometry-on-the-bioaccord-system.html>>
7. Ranbaduge, N.; *et al.* Establishing an Integrated Peptide Attribute Profiling and Monitoring Workflow for Improved Productivity and Confidence. Waters Application Note. 2019. 720006602EN <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/integrated-peptide-attribute-profiling-monitoring-workflow-for-improved-productivity-confidence.html> .

8. Ippoliti, S.; *et al.* Online IEX-MS of mAb Charge Variants using a BioResolve SCX mAb Column, IonHance CS-MS pH Concentrates, and BioAccord System. Waters Application Note. 2019. 720006672EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/online-iex-ms-mab-charge-variants-bioresolve-scx-mab-column-ionhance-cx-ms-ph-concentrates-and-bioaccord-system.html>> .
9. Shion, H.; *et al.* Evaluating BioAccord LC-MS System Performance for Deployment of Compact SmartMS Enabled Biopharma Solution in Late Stage Development and QC Environment – Intact Mass Analysis. Waters Application Note. 2020. 720006722EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/bioaccord-lc-ms-system-performance-smartms-enabled-biopharma-solution-development-qc-intact-mass-analysis.html>> .
10. Shion, H.; *et al.* Evaluating BioAccord System performance for deployment of compact smart MS system in late stage development and QC environment – peptide mapping analysis. Waters Application Note. 2020. 720006831EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/evaluating-bioaccord-system-performance-in-late-stage-development-and-qc-environment-peptide-mapping-analysis.html>> .
11. Shion H, Birdsall R, Cubbedge S, and Chen W. Development of Integrated Informatics Workflows for the Automated Assessment of Comparability for Antibody Drug Conjugates (ADCs) Using LC-UV and LC-UV/MS. Waters Application Note. 2015 May. 720005306EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/routine-ms-detection-for-usp-chromatographic-methods.html>> .

謝辞

著者らは、本試験での2つのカスタムフィールドの作成について、Steve Cubbedge に感謝の意を表します。

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>>

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>>

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

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/en_IN/Waters-Connect-Hub/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/en_IN/Waters-Connect-Hub/nav.htm?cid=135040165)

720007027JA、2020年11月改訂

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)