

製品確認および製品品質特性のプロセスモニタリングのためのACQUITY QDa 検出器を用いた一回の分析によるマルチ特性モニタリング

Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

本アプリケーションノートでは、規制対応が可能なクロマトグラフィーデータソフトウェアであるEmpowerとACQUITY QDa 検出器を使用して、単一の試験で複数の製品特性を同定するための戦略概念を解説しています。

高分解能MS装置を使用して特性解析を行った後に、開発またはQCラボで重要な製品特性をモニターする場合、ACQUITY QDa 検出器は効率的で費用対効果の高いソリューションを提供します。このアプリケーションノートでは、CDRペプチド、酸化および脱アミド化ペプチド、および糖ペプチドを、EmpowerソフトウェアのUV、MS等の複数の検出器のチャンネルデータおよびチャンネル間の計算機能を使用した、一回の分析で取得されるデータからの同定、定量およびレポート作成までを解説しています。モニターされる特性のリストは、それぞれの抗体ごとに決定する必要がありますが、個々のユーザーのニーズにあわせて容易に拡張できます。

利点

- 製品の確認と翻訳後修飾の日常的なスクリーニングを可能にする一回のデータ取得によるマルチ特性モニタリング
- Empower ソフトウェアが実現する、複数の製品品質特性のデータ取得、解析、レポート作成のための自動化された規制準拠のワークフロー

はじめに

複数の製品品質特性（PQA）をモニターするために LC-MS ベースの分析法の活用が、バイオ医薬品業界で勢いを増し始めています。この概念の背景にあるアイデアは、分子レベルで製品特性を評価することができない複数の光学検出ベースのクロマトグラフ法を実施するのではなく、LC-MS 法を組み込んで、製品の重要な品質特性を同時に評価できることです。開発ラボや品質管理ラボに至るまでの質量分析（MS）の導入の動機は、特性解析のほか、低分子医薬品と比較してタンパク質ベースの治療薬が複雑であることが主な原因です¹。従来のクロマトグラフィー法を LC-MS 法に置き換えることは、薬事申請時の QbD（Quality by Design）をサポートする製品とプロセスに対するより大きな理解を最終的に提供します。製品開発において、QbD は体系的かつ積極的なアプローチであり、製品品質と患者の安全性を向上させる方法として規制当局によって奨励されています^{2,3}。

最近、モノクローナル抗体（mAb）の相補性決定領域（CDR）ペプチドをモニターする同定試験の手法が開発され、ACQUITY QDa 検出器を使用して検証されています⁴。本アプリケーションノートでは、一度の分析で製品確認および事前に特性解析を実施済みの複数の翻訳後修飾（PTM）のモニタリングを行う必要性について、質量データを取得する、費用対効果の高いソリューションである ACQUITY QDa 検出器を使用して検討しました。既に公表された研究結果と一致させるために、トラスツズマブおよび Waters インタクト mAb スタンダードのサンプルを参照用トラスツズマブ標準品の CDR ペプチドと比較して、保持時間および質量を確認することでこの方法の特異性を検証することができます。医薬品の CQA（Critical Quality Attributes: 重要品質特性）は独立して決定する必要があるため、本アプリケーションでは ACQUITY QDa 検出器と規制対応が可能なクロマトグラフデータソフトウェアである Empower を使用して単回の試験で複数の特性を識別するための戦略を提供するコンセプトの証明について検討しました。

実験方法

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
検出器:	ACQUITY UPLC TUV ACQUITY QDa 検出器 (Performance Model)
吸収波長:	215 nm

カラム:	ACQUITY UPLC Peptide CSH C ₁₈ 130 Å、1.7 μm、 2.1 mm x 100 mm
カラム温度:	65 °C
移動相 A:	0.1% ギ酸含有 水溶液 (v/v)
移動相 B:	0.1% ギ酸含有アセトニトリル (v/v)
サンプル温度:	10 °C
注入量:	10 μL

グラジエント

時間(分)	流量 (mL/分)	%A	%B	%C	%D
初期値	0.2	97	3	0	0
3	0.2	97	3	0	0
120	0.2	67	33	0	0
127	0.2	20	80	0	0
130	0.2	20	80	0	0
131	0.2	97	3	0	0
150	0.2	97	3	0	0

検出器設定

サンプリングレート:	2 Hz
質量範囲:	350~1250 Da
イオン化モード:	ESI+, セントロイド
コーン電圧:	10 V
キャピラリー電圧:	1.5 kV
プローブ温度:	500 °C

データ管理

Empower 3 CDS、SR2

結果および考察

抽出イオンクロマトグラムにより複数の特性をモニターすることによる同定確認

抗体の可変領域は、特異的抗体に特有の CDR ペプチドを含有し、これらのペプチドを同定に使用することが可能です。複数の特性を報告するための ACQUITY QDa 検出器を用いた評価法を確立するにあたり、まずトラスツズマブのペプチドマップデータを取得することから始めました。還元およびアルキル化したトラスツズマブのトリプシン消化物を調製し、さらに希釈することなく約 0.5 mg/mL の最終濃度で注入しました。上記のペプチドマッピング法を、抽出イオンクロマトグラム (XIC) を用いて目的の特性を同定するために使用できるように、フルスキャンデータを取得するように設定した ACQUITY QDa 検出器を用いて行いました。図 1 は、光学検出によるトレースと対応する質量データ間の強い相関を示しています。このデータは、ACQUITY QDa 検出器が LC-UV ベースのペプチドマップアッセイに効率的に質量測定値を追加情報として提供する手法であることを示唆しています。

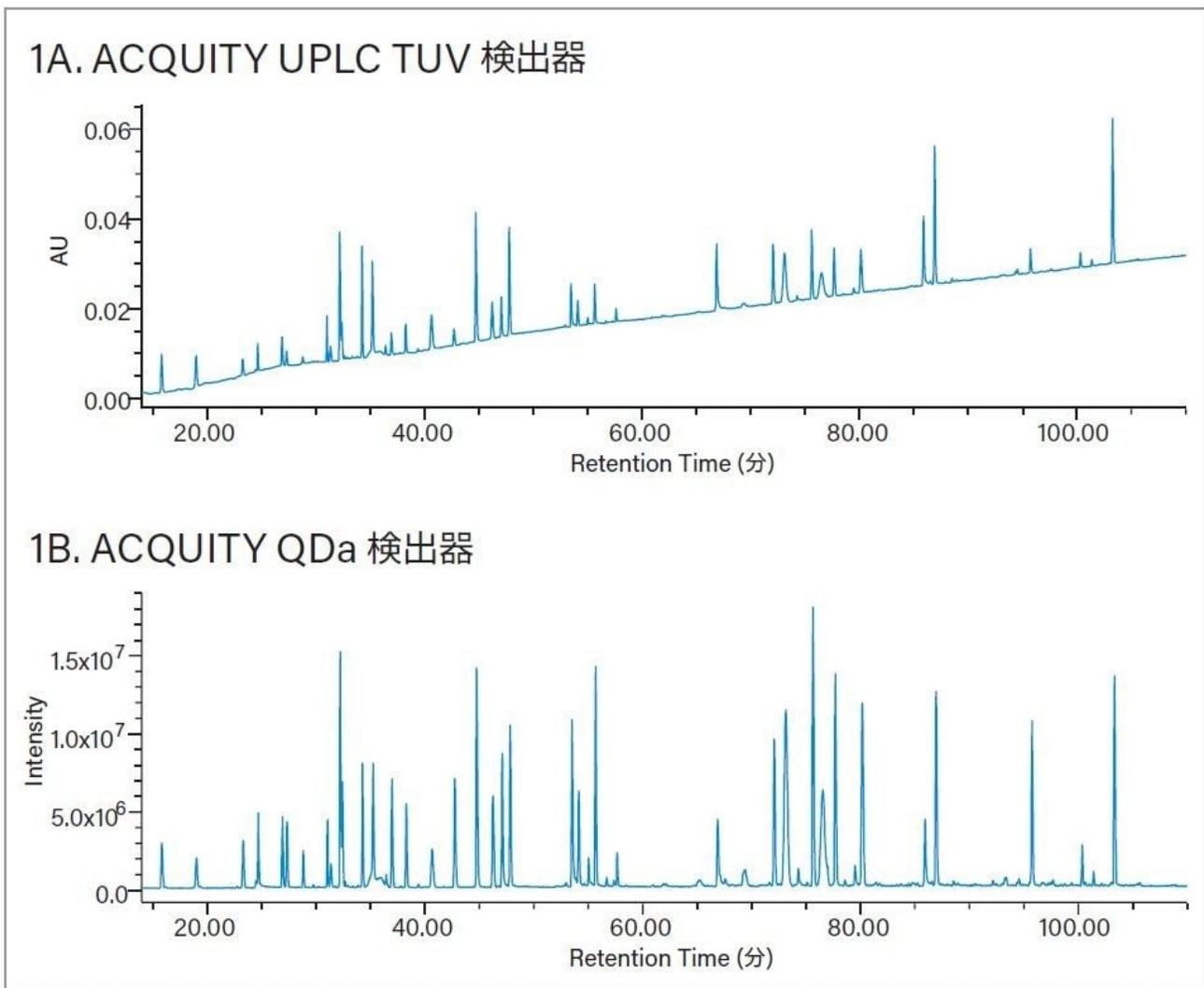


図 1.ペプチドマップ検出

1A) トラスツマブのトリプシン消化物の光学検出

1B) 対応する ACQUITY QDa データ

CDR ペプチドは、XIC で各 CDR ペプチドの m/z を抽出することにより、抗体の同定確認に用いることができます。マニュアル解析によりそれぞれの XIC チャンネルを抽出することを避けるために、チャンネル生成を実施することができます⁵。簡潔に言えば、メソッドセットに各 CDR ペプチドの m/z の生成チャンネルを設定することができます。この方法では、ターゲットペプチドのそれぞれの m/z を単一チャンネルとして抽出し、得られたチャンネルに各 CDR ペプチドの保持時間および成分ラベル情報を含んだ解析メソッドを設定することで、質量及び保持時間に従って同定された CDR ペプチドの単一チャンネル結果が得られます。図 2A は Empower の画面を示しており、メソッドセットで生成チ

チャンネルを用いて解析する方法を示しています。メソッドセットでは、目的の各属性に対して新規の生成チャンネルを作成できます。CDR ペプチドの場合、6つの CDR ペプチドの質量を、図 2B に示すように、生成チャンネルの式フィールドに入力することができます。この例では、CDR ペプチドの各々を同定するために単一の価数のイオンデータのみが使用されていますが、ユーザーは、異なる価数のイオンデータを合計することもできます。

るモニター対象の特性の質量情報も含まれています。得られたチャンネルから抽出したクロマトグラムを図 3A に示します。この図では、6 つの CDR ペプチドのそれぞれの XIC が明確に示され、これによりサンプルの同定も可能です。

抽出イオンクロマトグラムを用いたプロセスモニタリングのためのマルチ特性モニタリング

同様のアプローチを用いて、脱アミド化または酸化などの化学修飾を定量することができます。製造または保存中のプロセス変化は、抗体の活性または抗原結合に影響を与える可能性のある修飾の比率に影響を与える可能性があります⁶。この例では、アスパラギンの脱アミドおよびメチオニンの酸化について検討します。これらの修飾は、高分解能 MS を用いた特性解析により重要な品質特性であると判断されていることを前提としています。酸化修飾の場合、質量の差が大きいため、この修飾は CDR ペプチドと同様の方法で生成したチャンネルでモニターすることができます。得られた XIC を図 3B に示します。一方、脱アミド化は、天然のペプチドと脱アミド化されたペプチドとの間の質量の差が非常に小さいので、各ペプチドの相対存在量を確実に決定するためにデータを異なる方法で解析しなければなりません。この場合、ピークがクロマトグラフィーで分離しているので、ユーザーによって設定された時間に 1 つの計算した質量から別の質量に切り替える生成チャンネルを使用することができます。この設定方法は、図 2B で詳しく紹介しています。Empower の画面に示していますが、モニターする質量は 19 分で $m/z = 543.1$ Da (天然ペプチド、 $z = 2$) から 543.6 Da (脱アミド化ペプチド、 $z = 2$) に切り替わります。2 番目のチャンネルを使用することにより、天然および脱アミド体からのシグナルの重複を回避します。天然及び脱アミド化ペプチドの XIC を図 3C に示します。

ペプチド	同定/修飾	平均質量(Da)	電荷	理論 (m/z)
L3	CDR	1991.17	$[M+3H]^{+3}$	664.7
L5	CDR	1773.04	$[M+3H]^{+3}$	592.0
L7	CDR	4190.48	$[M+4H]^{+4}$	1048.6
H3	CDR	1089.21	$[M+3H]^{+3}$	364.1
H6	CDR	1084.18	$[M+2H]^{+2}$	543.1
H6	Deamidation	1085.17	$[M+2H]^{+2}$	543.6
H12	CDR	2785.01	$[M+3H]^{+3}$	929.3
H21	Native	834.43	$[M+2H]^{+2}$	418.2
H21	Oxidation	850.42	$[M+2H]^{+2}$	426.2
H25	G0F	2634.53	$[M+3H]^{+3}$	879.2
H25	G1F	2796.67	$[M+3H]^{+3}$	933.2
H25	G2F	2958.81	$[M+3H]^{+3}$	987.3
H25	G0	2488.39	$[M+3H]^{+3}$	830.5
H25	G1	2650.53	$[M+3H]^{+3}$	884.5
H25	Man5	2406.28	$[M+3H]^{+3}$	803.1

表 1. 特性がレポートされるペプチド情報

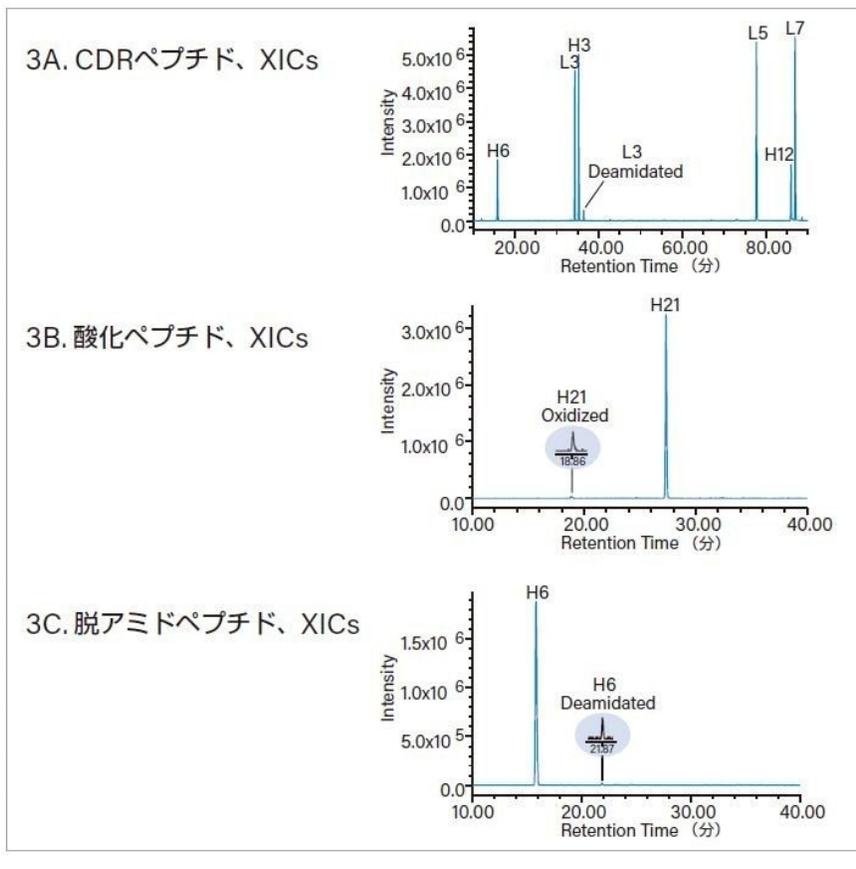


図 3.興味ある特性を識別するために使用する XICピーク標識「H」および「L」はそれぞれ、重鎖および軽鎖ペプチドを示します。

3A) トラスツズマブに特有の CDR ペプチド。

3B) 天然ペプチドおよびその酸化体。

3C) 天然ペプチドおよびその脱アミド化体。

天然のペプチド H6 も CDR ペプチドであることに留意してください。このペプチドは、同一性の確認に利用できますが、CDR チャンネルデータとは無関係にその脱アミド化体の修飾率定量に使用することもできます。3B および 3C の青色表示の XIC は、酸化されたペプチドおよび脱アミド化されたペプチドの 10 倍拡大 XIC を示しています。シグナル/ノイズ比は、これらの低レベルの修飾を確実に定量するための最小限の要件をはるかに上回っています。

選択イオンレコーディング (SIR) を用いたプロセスモニタリングのためのマルチ特性モニタリング

ピークモニタリングにさらなる特異性と感度が必要な場合は、選択イオンレコーディング（SIR）を使用することができます。SIRで単一の m/z を選択し、検出器において検出します。SIRの有用性を実証するために、5つの最も豊富な糖ペプチド（G0F、G1F、G2F、G0およびMan5）のメジャーな価数を予め決定しました。図4は、5つのSIRチャンネルデータの重ね書きクロマトグラムを示しています。

糖ペプチドのモニタリングには、正確な定量のためにSIRによる高い感度が必要となります。各SIRは別々のチャンネルデータとして取得され、各糖ペプチドの相対存在量を自動計算するためにはカスタムフィールドを用いた計算機能を使用することができます。

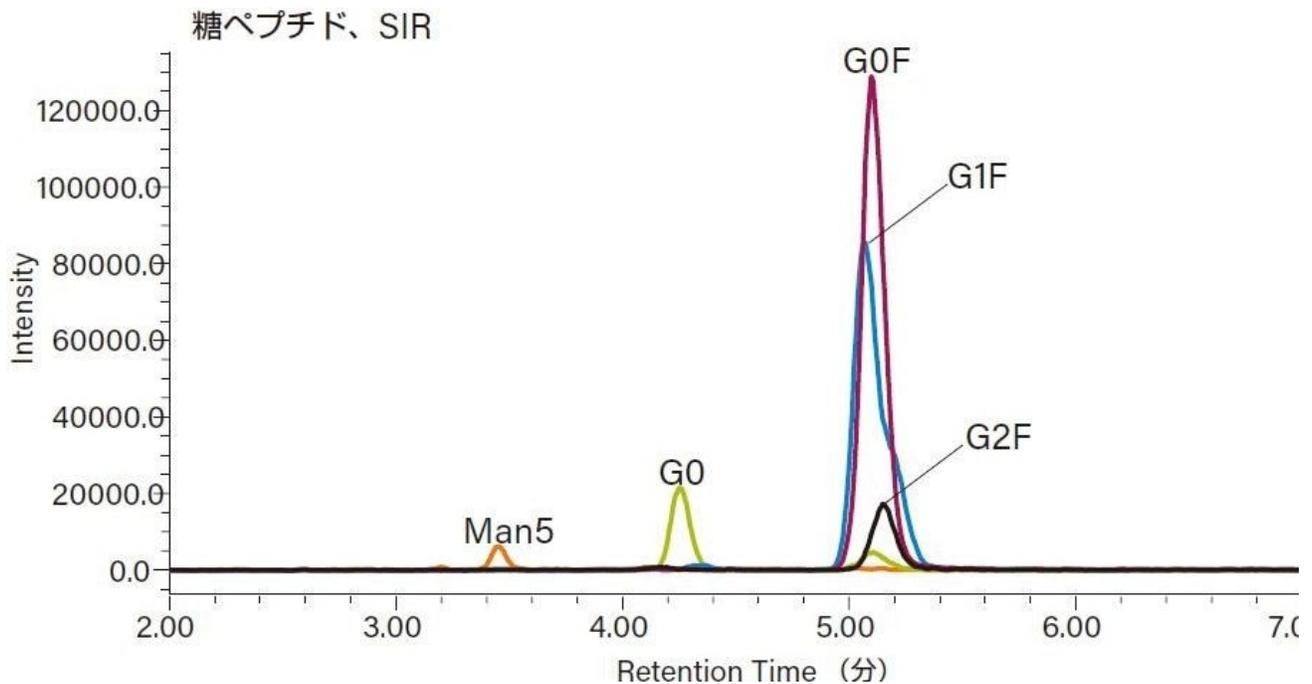
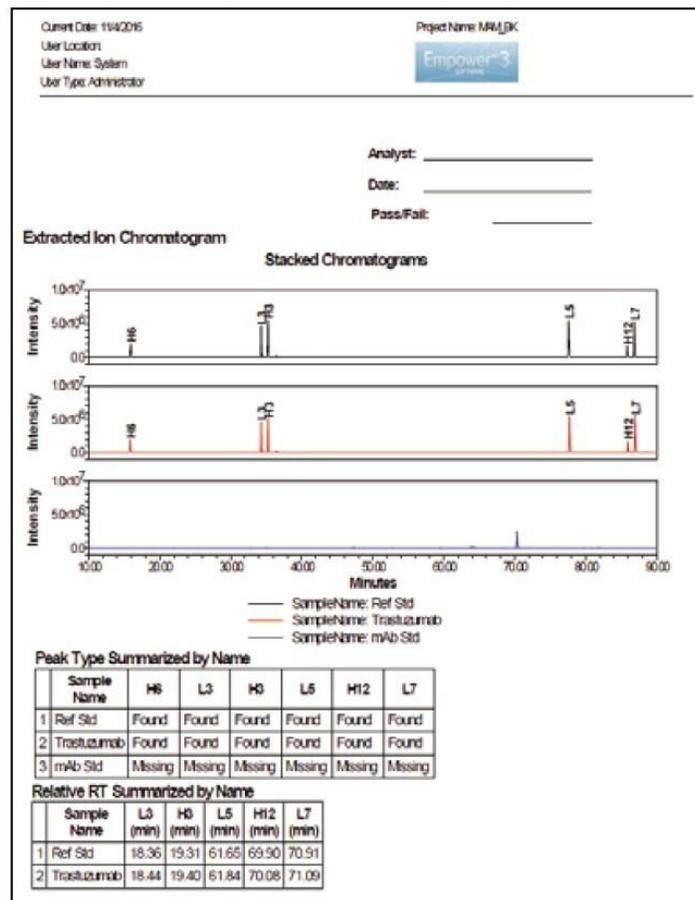


図 4.5つの糖ペプチドの相対存在量を決定するための、5つのSIRチャンネルの重ね書きクロマトグラム。各SIRは個々のチャンネルデータとして取得されるので、各糖ペプチドの相対存在量を決定するプロセスを自動化するためにカスタムフィールドの計算機能を使用します。

Empowerソフトウェアによるマルチ特性自動レポート

興味ある特性をモニターするために使用する生成チャンネルを含むメソッドセットの設定方法を示しました。それぞれのメソッドでは、独立した解析メソッドを設定することができます。この同じメソッドセットを使用して、特性ごとに独立したレポートメソッドを設定することができ、モニタリングプロセスをさらに自動化できます。Empowerはすべての結果を1つのレポートに出力する機能も有します。図5は、前述の各特性をモニターするために作成したEmpowerレポート画面を示しています。

5A. CDRペプチドのレポート



5B. 追加のレポート

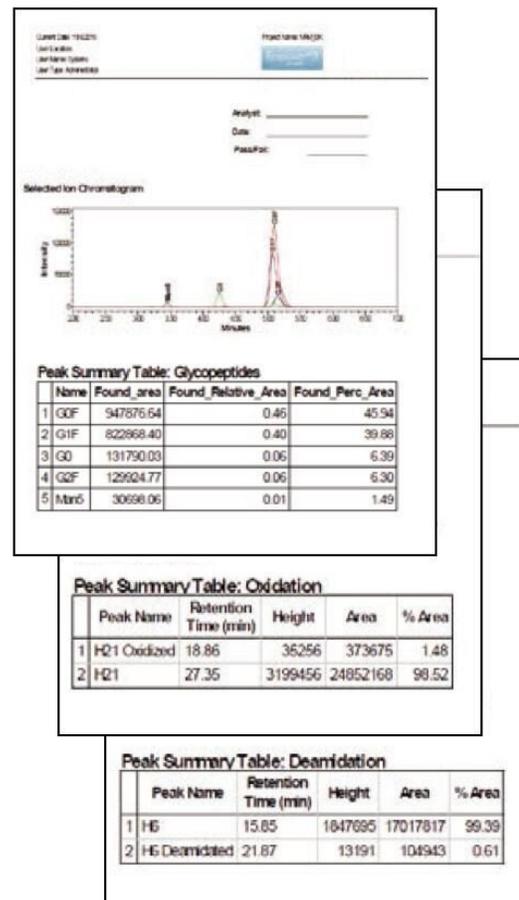


図 5. Empower のレポート

5A) 参照標準、トラスツズマブのサンプル、およびインタクト mAb 標準（ネガティブコントロール）の比較。ピークテーブルに、目的のピークが検出されたかどうか、および各 CDR ペプチドの相対保持時間をまとめています。相対保持時間の計算には、内部標準の代わりに H6 を使用しました。

5B) トラスツズマブサンプルの追加レポート。各項目は、その特定の特性の解析方法と生成チャンネルを設定した結果です。糖ペプチドの相対存在量のレポート中の、Found_area、Found_Relative_Area および Found_Perc_Area フィールドは、Empower のカスタム計算機能を使用して設定しました。これらのフィールドは、個々のチャンネルからのピーク面積をチャンネル間でレポートできるように設定しています。

結論

高分解能 MS 装置を使用して特性解析を行った後に、開発または QC ラボで重要な製品特性をモニターする場合、ACQUITY QDa 検出器は効率的で費用対効果の高いソリューションを提供します。このアプリケーションノートでは、Empower ソフトウェアの生成チャンネルおよびチャンネル間の計算機能を使用した、CDR ペプチド、酸化および脱アミド化ペプチド、および糖ペプチドの、単一のデータ取得から同定、定量およびレポート作成までを解説しています。モニターされる特性のリストは、それぞれの抗体ごとに決定する必要がありますが、個々のユーザーのニーズを満たすように容易に拡張できます。

参考文献

1. Arnaud, C. H. Mass Spec Weighs in on Protein Therapeutics. *C&EN*. 2016; 94(22): 30–34.
2. FDA, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015
3. ICH, Q8-Q12. (accessed November 2016).
4. Zhang, J. et al. Development and Validation of a Peptide Mapping Method for the Characterization of Adalimumab with QDa Detector. *Chromatographia*. 2016; 79(7): 395–403.
5. Birdsall, R. E., McCarthy, S. M. Increasing Specificity and Sensitivity in Routine Peptide Analyses Using Mass Detection with the ACQUITY QDa Detector. 2015; [720005377](#).
6. Habegger, M. et al. Assessment of Chemical Modifications of Sites in the CDRs of Recombinant Antibodies: Susceptibility vs. Functionality of Critical Quality Attributes. *mAbs*. 2014; 6(2):327–339.

ソリューション提供製品

720005919JA、2016年2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](#)