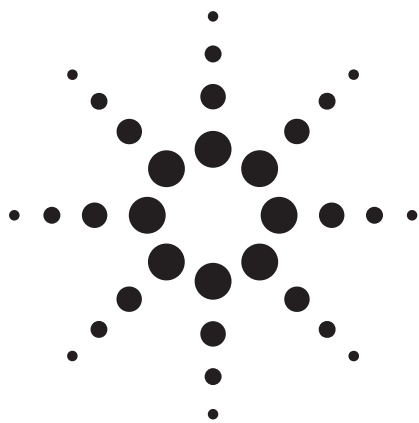




HPLC と LC/MS を用いた 抗体分離の選択性最適化のための ZORBAX StableBond 300 Å LC カラムの比較*

アプリケーション

医薬品

著者

Douglas S. Rehder
Amgen Inc.
1201 Amgen Court West
Seattle, WA 98119
USA

Thomas M. Dillon and Pavel V. Bondarenko
Amgen Inc.
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
USA

William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

要約

N-末端グルタミンやピログルタミン酸を含む軽鎖と重鎖の2つの変異型の効率的な分離を行う還元型抗体用の逆相 LC/MS メソッドを開発するために、結合相の異なる StableBond 300 Å ラピッドレゾリューション (3.5 µm) LC カラムを使用しました。0.1% トリフルオロ酢酸中のn-プロパノールとアセトニトリルの溶液の比率を上げ、ZORBAX 300 Å SB-CN LC カラムを用いて高分離が達成されました。

はじめに

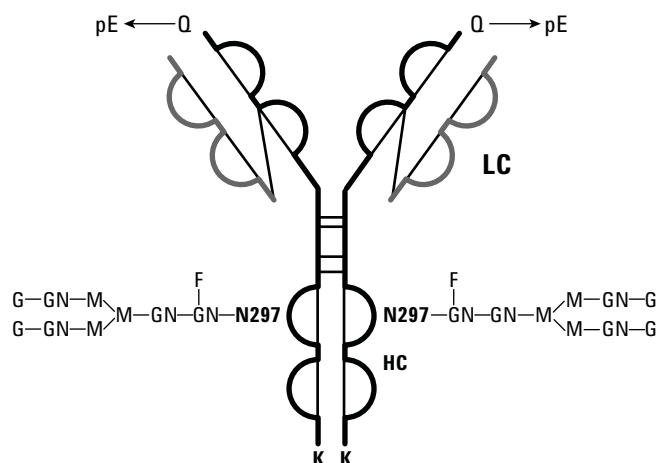
抗体の特徴付け (characterization) は、製薬会社にとって重要な課題です。多くの分離技術で特徴付けすることが可能ですが、逆相クロマトグラフ LC/MS では、カラムからの回収率が悪く、分離能が不十分で、カラム性能がすぐに低下する点に問題があったため、分析が困難でした。多くの場合、臨床的重要性の変更が同時に起こる可能性があるため、質量分光分析が理想的です。

インタクト抗体 [1 ~ 3] の他、還元型やアルキル型鎖 [4] の分離や精製にも、パーフュージョン (perfusion) クロマトグラフがよく使用されてきました。パーフュージョンクロマトグラフは効率的な分取技術ですが、分離には高流量が必要とされるため、変異型の分離が不十分なことと、質量分析計を連結することが困難なことが問題となります [2]。70 °C 以上のカラム温度と長鎖アルキル (C8 と C18) の固定相を用いたインタクトな抗体の逆相 LC/MS 分析用メソッドは参考文献 [5] で説明されており、プロパノールや高い溶出強度を持つ溶媒を採用することで、さらに最適化されました [6]。還元型抗体用のメソッド開発の開始点として、インタクトな抗体用に堅牢な StableBond カラムを用いた逆相 LC/MS メソッドについて説明します。

*この研究は、「医薬品中の還元型モノクローナル抗体の逆相液体クロマトグラフ/質量分光分析」、著者: Douglas S. Rehder, Thomas M. Dillon, Gary D. Pipes, Pavel V. Bondarenko, *Journal of Chromatography A*, **1102** (2006) 164 ~ 175 ページ、として発表されました。



Agilent Technologies



Code	Glycan structure	Mono mass	Average mass
G2	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{GN}-\text{GN}-\text{F}$	1768.6	1769.6
G1	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{GN}-\text{GN}-\text{F}$	1606.6	1607.5
G0	$\begin{array}{c} \text{GN}-\text{M} \\ \text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{GN}-\text{GN}-\text{F}$	1444.5	1445.4
MAN5	$\begin{array}{c} \text{M} \\ \text{M} \\ \text{M} \end{array} \text{M}-\text{GN}-\text{GN}-\text{F}$	1216.4	1217.2
F	Fucose	146.0579	146.1430
G	Galactose	162.0528	162.1424
M	Mannose	162.0528	162.1424
GN	N-acetylglucosamine	203.0794	203.1950

図 1. 本研究で使用する組み換えモノクローナル IgG 抗体の構造式。糖鎖付加形状には、不定数のガラクトース残留物を含む 2 つの二分岐のグリカンが含まれます (G)。最も一般的なアイソフォームは G0、G1、G2 です。重鎖 (HC) の N-末端グルタミン (Q) のピログルタミン酸 (pE) への転換も示されます。重鎖 C-末端リジン (K) は、酵素活性により抗体中に見つからないことがよくあります。ジスルフィド結合は黄色、重鎖は緑色、軽鎖 (LC) はピンク色で示されます。

ヒト免疫グロブリンガンマ (IgG) 抗体は、ジスルフィド結合で接続された軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) の 2 つの同一複製物を含む糖タンパク質です (図 1)。軽鎖はカッパー型かラムダ型のどちらかになり、重鎖はガンマ型になる可能性があります。免疫グロブリンガンマ重鎖の N-末端残留物は、一般的にグルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸のいずれかです。カッパー型軽鎖の N-末端残留物は、一般的にグルタミン酸かアスパラギン酸のいずれかである一方、ラムダ型軽鎖では、セリン、プロリン、グルタミンです [7] [8]。モノクローナル抗体の最も一般的な翻訳後修飾は、N-末端グルタミン (Q) のピログルタミン酸 (pE) への転換です。

Q からピログルタミン酸 (pE) の形成により N-末端アミンを排除し、環の残りのアミドは中性であるため、酸性変異型を生成します [2]。この一時的変異はアンモニアの放出に関連しており、質量は 17u 減少します (図 2)。

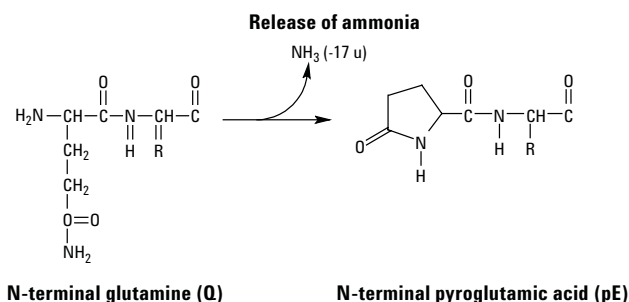


図 2. N-末端グルタミン (Q) からピログルタミン酸 (pE) 生成メカニズム

イオン交換クロマトグラフや等電電気泳動法がこれら変異型の分離に役立つことが分かりましたが、CEX や IEF は簡単には質量分析とハイフネートされません。ここで説明している逆相 LC/MS 技術には、アミド分解 (+1 u)、C-末端リジン (+128 u)、追加シアル酸 (+291 u)、部分展開 (0 u) などのその他の「荷電一時的変異」から、ピログルタミン酸 (-17 u) を区別する潜在能力があります。

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、脱塩サンプルの直接注入を用いた、還元/アルキル化や制限タンパク質分解の後、抗体の糖鎖付加形状を規定するために使用されてきました [9]。本資料では、逆相 HPLC 分離と接続された ESI-MS による糖鎖付加形状の同定に関して報告します。

還元型抗体用のこの RPLC/MS メソッドにより、軽鎖と重鎖、重鎖の Q と pE 変異型、その他の可能性のある抗体鎖の一時的変異を明確に分離します。

実験

材料

本研究で分析した組み換えヒトモノクローナル IgG 抗体は、Amgen (米国ワシントン州シアトル) で発現され、標準製造手順を用いて精製しました。抗体サンプルは、29 °C の pH 5.8 の緩衝液中で 3 ヶ月間保存され (T = 3 m 29 °C)、-80 °C で冷凍貯蔵したコントロールサンプルと比較しました (T0)。

サンプル前処理

還元とアルキル化

さらなる特徴付けのための自由重鎖と軽鎖を生成するために、変性状態の IgG を用いて、還元とアルキル化を行いました。抗体は 7.5 M 塩酸グアニジン (Mallinckrodt 製、米国ニュージャージー州フィリップスバーグ)、0.1 M トリス塩酸 (Sigma 製、米国ミズーリ州セントルイス)、1 mM エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA、Sigma 製) を含む緩衝液を用いて、pH 7.5、容量 0.5 mL、2 mg/mL に希釈しました。0.5 M ジチオトレイトル (DTT、Sigma 製) 原液の 5 μ L アリコートを、5 mM DTT 濃度を得るために加え、反応混合物は 37 °C で 30 分間保持しました。次に、タンパク質溶液を室温に冷却し、0.5 M ヨードアセトアミド (IAM、Sigma 製) 原液の 13 μ L アリコートを、13 mM IAM に到達するように加えました。光から保護しながら、室温で 40 分間アルキル化を行いました。還元型とアルキル型タンパク質の緩衝液 0.5 mL が、pH 5.0 の 10 mM 酢酸ナトリウム (J.T.Baker 製、米国ニュージャージー州フィリップスバーグ) 溶液 1 mL により、最終濃度 1 mg/mL のタンパク質と交換されます。緩衝液の交換は、以下のメーカー推奨事項に従い、Sephadex G-26 充てん材 (Amersham Pharmacia Biotech 製、フランス、オルセー) で充てんされた NAP-5 ゲルろ過カラムを用いて行いました。

還元型とアルキル型 IgG の逆相 LC

還元型とアルキル型 IgG の逆相 LC/MS は、UV 検出器、オートサンプラ、ナノフローセル、冷却機能付カラム恒温槽を搭載した Agilent 1100 キャピラリー HPLC システムで行いました。移動相には、溶媒 A に水、溶媒 B に 80% n-プロパノール、10% アセトニトリル、9.9% 水を用意し、両移動相に 0.1% トリフルオロ酢酸を添加しました。粒径 3.5 μ m、ポアサイズ 300 Å、1 mm x 50 mm の Agilent ZORBAX StableBond SB-300 Å カラム (C3、C8、C18、CN 固定相を含む) を用いて、75 °C、流量 50 μ L/min で LC/MS 分析を行いました。カラム溶出液は UV 検出器で分析し、その後、接続された質量分析計で測定しました。UV 検出のみの分析は、4.6 mm x 150 mm の同じ種類の ZORBAX StableBond 300 Å カラムを用いて、流量 1 mL/min で行いました。

還元型およびアルキル型抗体分析用の異なる StableBond ワイドポア逆相カラムの比較

図 3 には、ZORBAX SB-300 Å カラムで得られた還元型およびアルキル型 IgG の逆相クロマトグラムを示します。同じリニアグラジエント (B:23%→35%) を用いて、分離が達成されました。C3、C8、C18、CN 材質で充てんされた Agilent ZORBAX StableBond 300 Å カラムは、軽鎖や重鎖の他、重鎖の Q や pE に対しても、高い

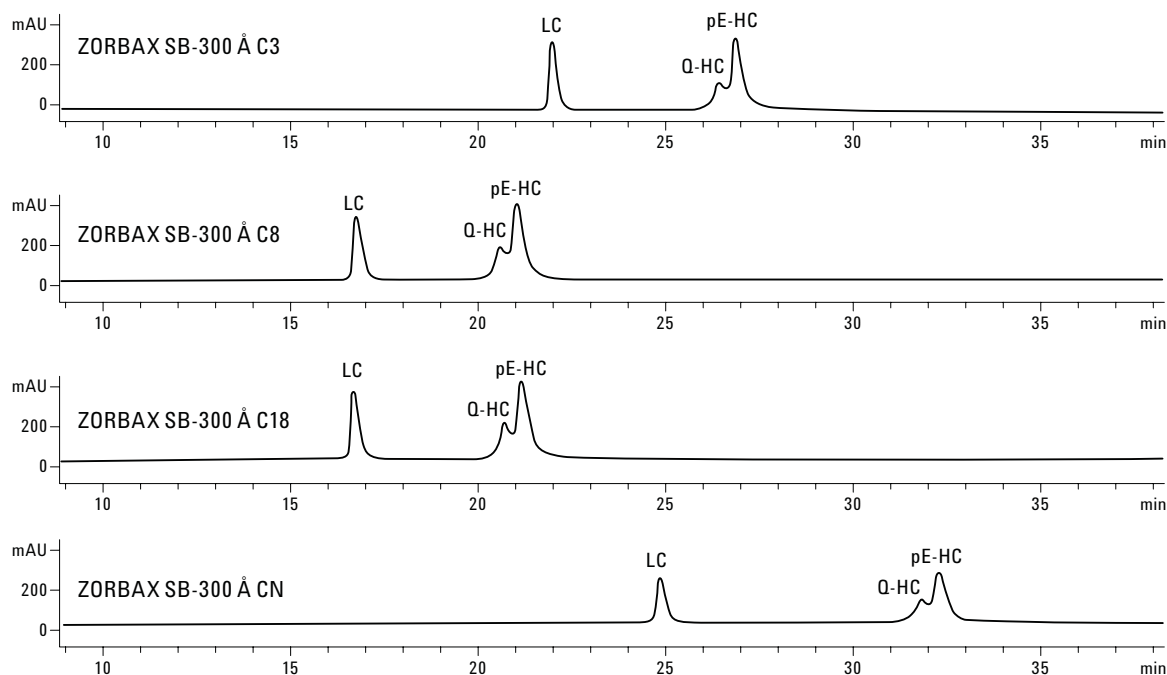


図 3. ZORBAX StableBond SB-300 Å カラム (4.6 mm x 150 mm、3.5 μ m、ポアサイズ 300 Å、C3、C8、C18、CN) と Varian Diphenyl カラム (150 mm x 4.6 mm) による、還元型とアルキル型 IgG の逆相クロマトグラム。23% から 35% の同じリニアグラジエント (23%(B)→35%(B)) を用いて、分離が達成されました。

表 1. 重鎖と軽鎖のリテンションタイムとピーク幅を用いて、図 2 の各分離に対して計算された分離度、選択性、理論段数

カラム	選択性	分離度	重鎖の理論段数
ZORBAX 300 Å SB-C3	1.24	18	130000
ZORBAX 300 Å SB-C8	1.28	16	80000
ZORBAX 300 Å SB-C18	1.29	17	81000
ZORBAX 300 Å SB-CN	1.31	25	155000

分離と感度を示すことが分かりました。分離度、選択性、理論段数を計算し、重鎖と軽鎖については、各々の分離を図 3 に要約して示しました。計算値は表 1 のとおりです。ZORBAX StableBond 300 Å CN が最高の選択性と分離を示しました。さらに、サンプルが分解されることで、分裂生成物と変異型の分離を行ったクロマトグラム上の軽鎖と重鎖の間に大きな空間が示されました。

LC/MS による重鎖と軽鎖の変異型のモニタリング

還元型とアルキル型 IgG のクロマトグラム (図 4) は、75 °Cでのグラジエント溶出で ZORBAX 300 Å SB-CN カラムを用いて、重鎖の pE 変異型 (pE-HC) から重鎖の Q 変異型 (Q-HC) を分離する能力を実証します。移動相には、セクション 2 で指定されたように、0.1% TFA とともに n-プロパノール、アセトニトリル、水が含まれています。0.1% TFA とともにアセトニトリルと水だけを含んだ従来の移動相は、分離不足、サンプル回収率の低下、大幅な残留を示しました (図 3b)。-80 °C (T0) で 3 ヶ月間冷凍保存されたサンプルと、29 °Cで pH 5.8 の緩衝液中で 3 ヶ月間保存されたサンプル ($T = 3 \text{ m } 29^\circ\text{C}$) を、図 4 で比較しています。pH 5.8 の緩衝液中の 29 °C で保管後、pE-HC のピーク面積が増加し、数週間後にはほぼ完全に転換しました (図 4B)。このメソッドにより、安定性研究や長期保存中の、Q-HC から pE-HC への転換のモニタリングが可能になりました。

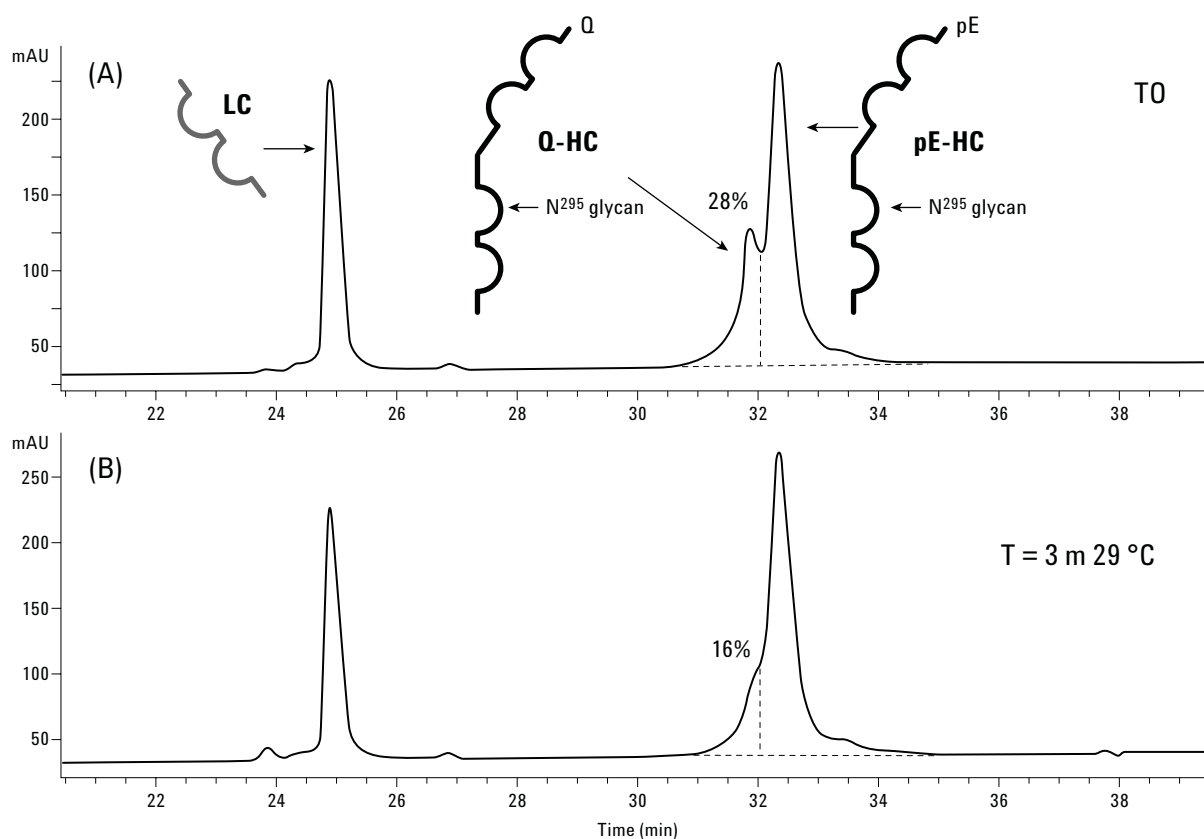


図 4. Agilent ZORBAX StableBond SB-300 CN カラム (粒径 3.5 μm 、ポアサイズ 300 Å、150 mm x 4.6 mm) で分析された還元型とアルキル型 IgG 抗体の逆相クロマトグラム。コントロールサンプルは、-80 °Cで 3 ヶ月間冷凍保存され、T0 (A)、29 °Cの pH 5.8 の緩衝液中で 3 ヶ月間保存された分解サンプルと比較しました (B)。ピークは、軽鎖 (LC)、N-末端 Q を持つ重鎖 (Q-HC)、N-末端 pE を持つ重鎖 (pE-HC) です。

図 6 には、還元型とアルキル型 IgG サンプルのクロマトグラムと、13 と 33 分に溶出する (アスタリスクで表示) 2 つの小さな断片のデコンボリューションされた ESI マススペクトルを示します。分析した IgG コントロールサンプル (T0) には、大きなアバンダンスの Q-HC が含まれます (図 5A と同じ)。材料を pH 5.8、29 °C で 3 ヶ月間保管した後 ($T = 3 \text{ m } 29^\circ\text{C}$)、同じ 2 つの小さなピークが存在するため、メソッドが影響している可能性を示唆します。グラジエント溶出前に 30 分間、カラム上でサンプルを保持した後、ピーク強度が増加するため (データ表示なし)、カラム内での低 pH および高温環境による酸加水分解された生成物として、これらのピーク

を同定します。2 つの小さな断片ピークの質量 (水 18 u を引く) はインタクトな重鎖の質量になるため、これらの種は重鎖の分裂生成物であることが確認できます。これらのピークのデコンボリューションされた ESI マススペクトル (図 6B と C) により、これらは、アスパラギン酸とプロリン残留物の酸加水分解生成物として同定されました。[10] 図 6B のマススペクトルは、糖鎖付加変異型、G0、G1、G2、MAN5 を持つ重鎖の C-末端断片を示します。図 5C は、Q-HC 変異型の質量 29,208 の小さなピークと質量を持つ大きなピークを含む重鎖の補完的な N-末端断片です。

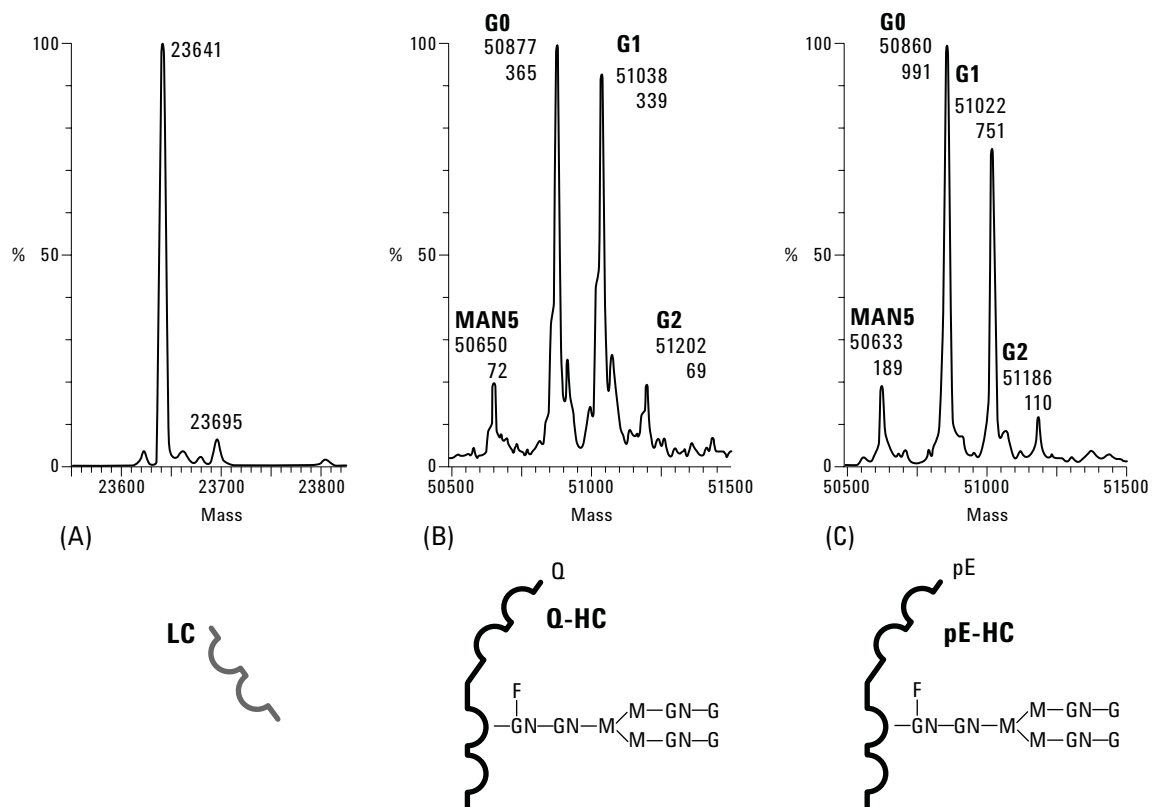


図 5. 図 4A のクロマトグラムで分離された還元型とアルキル型 IgG 抗体鎖のデコンボリューションされた ESI マススペクトル: (A) 軽鎖、LC、(B) N-末端 Q を持つ 50,877 u 重鎖変異型、Q-HC、(C) N-末端 pE を持つ 50,860 u 重鎖変異型、pE-HC。デコンボリューションされたマススペクトルは、G0、G1、G2、MAN5 の糖鎖付加形状を含む、Q-HC と pE-HC の糖鎖付加形状を示します。

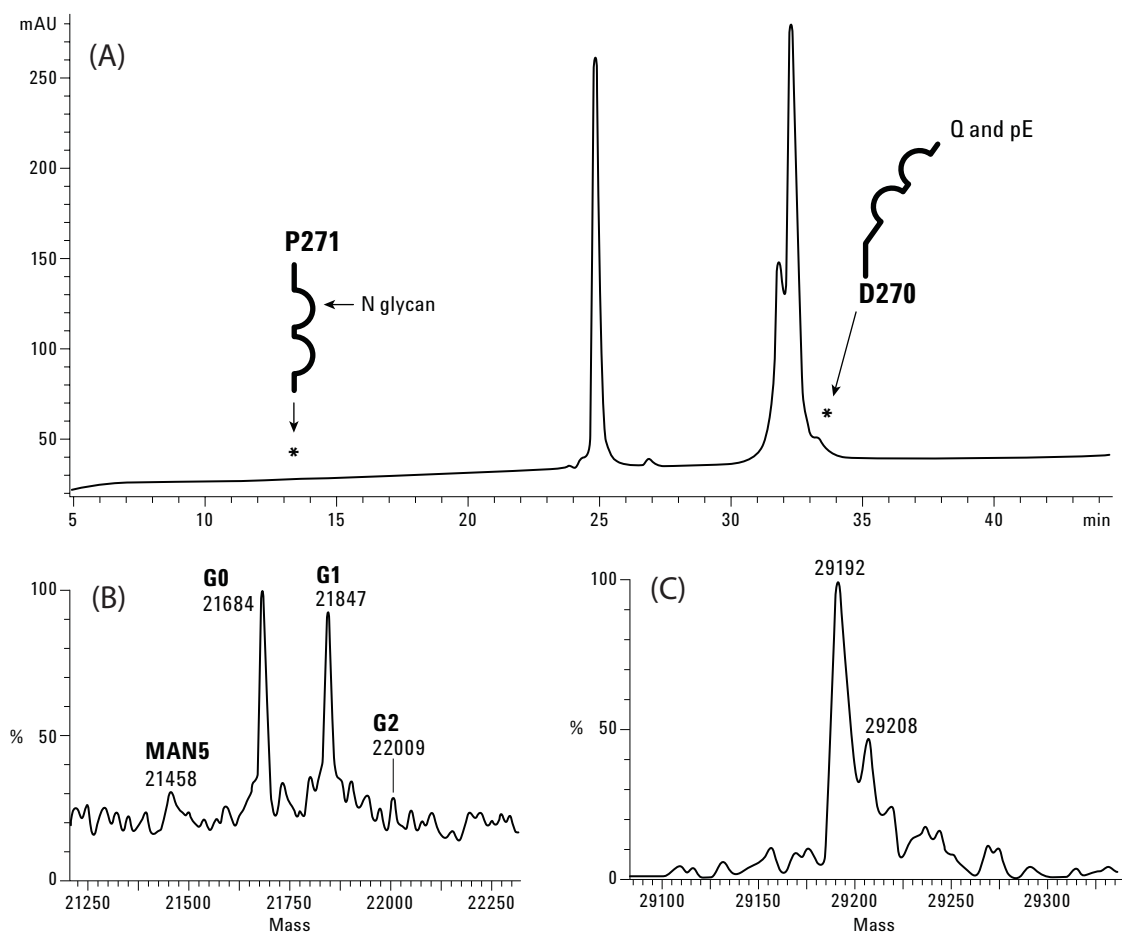


図 6. (A) -80 °Cで3ヶ月間凍結保存された還元型とアルキル型 IgG コントロールサンプルの RP クロマトグラム。(B と C) アスパラギン酸 270 とプロリン 271 (D270/P271) のカラム内での酸加水分解により生成された、2つの重鎖断片のデコンボリューションされた ESI マススペクトル (アスタリスクで表示)。(B) N-糖鎖付加による糖鎖付加形状を含む、重鎖の C-末端断片のデコンボリューションされた ESI マススペクトル。(C) D/P 分裂後に生成される重鎖の補完的な N-末端断片のデコンボリューションされた ESI マススペクトル。

結論

還元型モノクローナル抗体の2つの一般的な一時的変異の特徴付けと定量、N-末端ピログルタミン酸 (pE) や異種糖鎖付加形状の生成のために、逆相LC/UV/MS メソッドを開発しました。軽鎖と重鎖がクロマトグラムで明確に分離されました。N-末端グルタミンを含む重鎖変異型 (Q-HC) は、pE-HC 変異型から定量的に分離されました。最適なクロマトグラフ分離は、高いカラム温度 (75 °C)、移動相に強い溶離溶媒 (*n*-プロパノール)、長鎖アルキル (C8、C18) と CN 官能性を持つ ZORBAX LC カラムを用いて達成されました。最適なクロマトグラフ分離のために、移動相に TFA (0.1%) を使用しました。TFA はエレクトロスプレーイオン化の抑制の原因となると報告されていますが、プロパノールを用いた我々のメソッドでは、高いイオン強度と精密質量測定が得られます。N-末端グルタミンの状態を評価するのに、ペプチドマッピングを使用することが可能ですが、時間がかかり、消化中の環化のリスクも伴います。本書で説明した IgG 抗体の軽鎖と重鎖の RPLC/MS 分析は、サンプル前処理作業が短いため、一時的変異の傾向は低くなります。

参考文献

1. N. B. Afeyan, N. F. Gordon, I. Mazsaroff, L. Varady, S. P. Fulton, Y. B. Yang, and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* **519** (1990), p 1.
2. J. E. Battersby, B. Snedecor, C. Chen, K. M. Champion, L. Riddle, and M. Vanderlaan, *J. Chromatogr. A* **927** (2001), p 61.
3. M. J. Rosok, D. E. Yelton, L. J. Harris, J. Bajorath, K. E. Hellstrom, I. Hellstrom, G. A. Cruz, K. Kristensson, H. Lin, W. D. Huse, and S. M. Glaser, *J. Biol. Chem.* **271** (1996), p 22611.
4. J. Bongers, J. J. Cummings, M. B. Ebert, M. M. Federici, L. Gledhill, D. Gulati, G. M. Hilliard, B. H. Jones, K. R. Lee, J. Mozdzanowski, M. Naimoli, and S. Burman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21** (2000), p. 1099.
5. T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, and M. Speed Ricci, *J. Chromatogr. A* **1053** (2004), p 299.
6. T. M. Dillon, P. B. Bondarenko, D. S. Rehder, G. D. Pipes, G. R. Kleemann, and M. S. Ricci, *J. Chromatogr. A* (special issue dedicated to 2005 HPLC), submitted for publication.
7. E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, and S. Foeller, fifth ed., NIH Publication No. 91-3242, 1991.
8. A. Honegger and A. Pluckthun, *J. Mol. Biol.* **309** (2001), p 657.
9. K. Masuda, Y. Yamaguchi, K. Kato, N. Takahashi, I. Shimada, Y. Arata, *FEBS Letter*, **473** (2000) p 349.
10. G. M. Edelman, B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser, and M. J. Waxdal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **63** (1969), p 78.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
June 27, 2007
5989-6840JAJP



Agilent Technologies