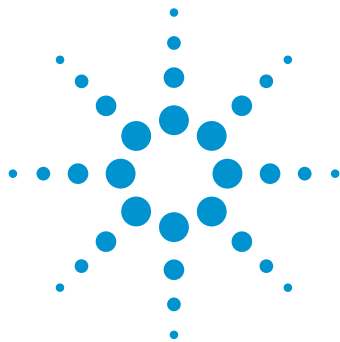




Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジを用いた 2D-LC/MS による mAb 分析でのオンライン脱塩

アプリケーションノート

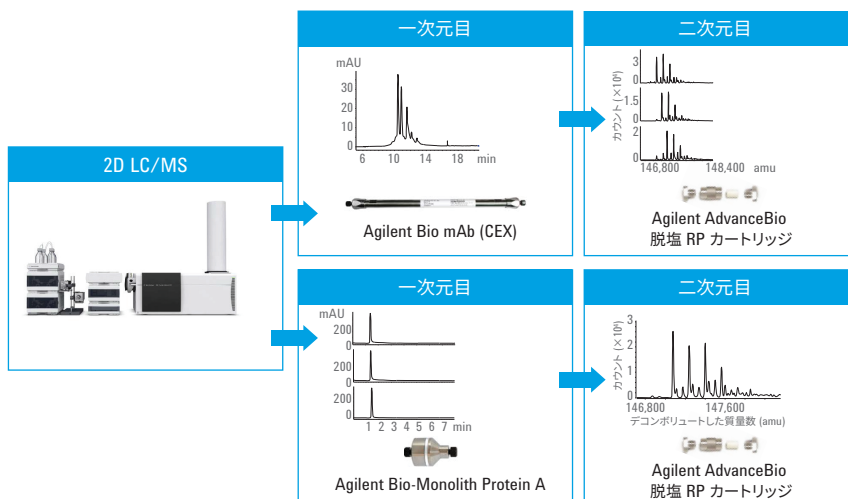
生物製剤

著者

Suresh Babu C.V. and Ravindra Gudihal
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、二次元目での脱塩カートリッジを用いた脱塩と 2D-LC/MS 構成を用いたモノクローナル抗体 (mAb) の評価について説明します。イオン交換 (IEX) とアフィニティクロマトグラフィーは主に塩ベースの溶出条件で使用され、今回の調査では一次元目の分離で使いました。二次元目では、MS 分析の前に、Agilent AdvanceBio 脱減 RP カートリッジを使用してフラクションの脱塩を行いました。分析結果では、高品質の MS データを提供することにより脱塩カートリッジの優れた性能を示しました。



モノクローナル抗体の特性解析に使用される 2D-LC/MS ワークフローの例



Agilent Technologies

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) 治療用タンパク質は、医薬品業界においてたえず成長を続ける分野です。mAb 分子は本質的に複雑で、開発プロセス中および mAb の寿命中にさまざまな酵素のおよび化学的修飾を受けます。これらの修飾は、フラグメンテーション、翻訳後修飾 (PTM)、分解、凝集、配列変異体を含め、不均一性をもたらします。したがって、医薬品の安全性、品質、効能を確実なものとするには、徹底した物理化学的な特性分析が必要です。二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) を質量分析 (MS) と組み合わせることにより、さまざまな mAb 変異体の特性分析に適した分析技法を実現できます。アフィニティ、イオン交換 (IEX) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などの技法を一次元目の分離で使用します。これらの LC 技法と組み合わせて使用する代表的な移動相は水性ベースで、MS 検出と互換性がない非揮発性塩を含んでいます。これらのクロマトグラフィーで分離された各ピークを MS で同定するために、二次元目でオンライン脱塩アプローチを使用しました。

このアプリケーションノートでは、mAb を分析するための、二次元目のオンライン脱塩カラムとしての AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジの使用を解説します。一次元目の LC では、IEX を使用して電荷変異体の特性分析を行い、さらに、プロテイン A カラムによるアフィニティキャプチャーを使用して先発品やバイオシミラーを含むさまざまな mAb サンプルを分析しました。この結果では、向上した MS データを提供することにより Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジの優れた性能を示しています。

実験方法

サンプル

治療用モノクローナル抗体 mAb1 (先発品)、mAb2 (バイオシミラー)、mAb3 (先発品) は地元の薬局から購入し、メーカーの指示に従って保管しました。すべての溶媒は LC グレードのものでした。

使用機器

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションは、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 バイオイナートクォータリポンプ (G5611A)
- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- 1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付 Agilent 1290 Infinity オートサンプラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付 カラムコンパートメント (G1316C、2 台)
- 2 ポジション/4 ポート デュオバルブ (2D-LC バルブヘッド、G4236A) 付 Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)

- 40 μ L ループを装備したマルチハートカットバルブ (G4242-64000、2 個) 付 Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A、2 個)
- 10 mm フローセル搭載 Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G1315C、2 台)
- Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (G6530A)

図 1 は 2D-LC/MS の構成を示しています。

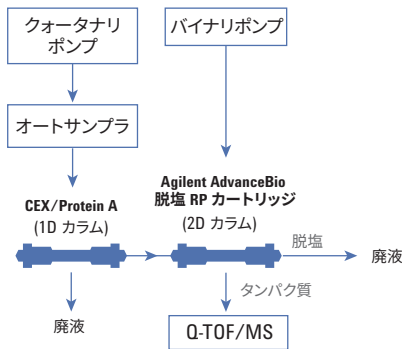


図 1. 2D-LC/MS 構成の概略図。

クロマトグラフィー条件

マルチハートカット 2D-LC/MS 分析 (IEX → 脱塩 RP、アフィニティ → 脱塩 RP)	
一次元目ポンプ (IEX)	
溶媒 A	水
溶媒 B	NaCl (850.0 mM)
溶媒 C	NaH ₂ PO ₄ (41.0 mM)
溶媒 D	NaH ₂ PO ₄ (55.0 mM)
流量	0.75 mL/min
グラジエント	Agilent Buffer Advisor で計算された塩グラジエント (緩衝液: 30 mM、pH: 6.3、NaCl: 0 ~ 161.5 mM) 0 分: 30.3 %A、0.0 %B、59.6 %C、10.1 %D 2 分: 26.0 %A、5.0 %B、56.9 %C、12.1 %D 8 分: 21.5 %A、10.0 %B、54.9 %C、13.6 %D 20 分: 13.3 %A、19.0 %B、51.9 %C、15.8 %D 35 分: 30.3 %A、0.0 %B、59.6 %C、10.1 %D
ポストタイム	10 分

クロマトグラフィー条件 (続き)

一次元目ポンプ (Protein A、アフィニティ)		
溶媒 A	20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4	
溶媒 B	0.5 M 酢酸	
流量	1 mL/min	
グラジエント	0 ～ 0.5 分: 0 %B (結合) 0.6 ～ 1.7 分: 100 %B (溶出) 1.8 ～ 3.5 分: 0 %B (再生)	
二次元目ポンプ (脱塩 RP)		
溶媒 A	0.1 % ギ酸	
溶媒 B	0.1 % ギ酸 ACN 溶液	
流量	0.4 mL/min	
グラジエント	0 分: 5 %B 0.5 分: 5 %B 3.0 分: 80 %B 4.0 分: 80 %B 4.1 分: 5 %B 6.0 分: 5 %B	
2D グラジエントストップ タイム	6.0	
2D サイクルタイム	6.1	
オートサンブラ		
注入量	5 µL	
サンプル温度	5 °C	
カラム (IEX → 脱塩 RP) (アフィニティ → 脱塩 RP)		
一次元目カラム	Agilent Bio MAb NP5、4.6 × 250 mm、5 µm PEEK (p/n 5190-2407) Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm、5 µm (p/n 5069–3639)	
二次元目カラム	Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ、2.1 × 12.5 mm、10 µm、1,000 Å (p/n PL1612-1102)	
カラムコンパートメント		
一次元目カラム	室温	
二次元目カラム	室温	
マルチハートカット		
動作モード	一次元目のリテンションタイムにもとづくハートカット (2D タイムセグメント) により時間ベースのマルチハートカットを実行。 不純物のハートカットをサンプリング時間 0.04 分で実施 (ループ充填 >200 %)。	
検出		
一次元目	波長 280 nm/4 nm	
DAD パラメータ	参照波長 360 nm/100 nm	
二次元目	ガス温度	350 °C
MS パラメータ	シースガス温度	400 °C
	ガス流量	8 L/min
	シースガス流量	11 L/min
	ネブライザ	35 psi
	Vcap	5,000 V
	ノズル電圧	1,000 V
	フラグメンタ	200 V
LC ストリームの タイミング	MS バルブ切り替え (廃液/MS) による時間セグメント	

ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition
ソフトウェア、バージョン C.01.07 [27] と
Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition ソフト
ウェア、バージョン A.01.02 [24]
- Agilent MassHunter ワークステーションソ
フトウェア、バージョン B.05.01、ビルド
4.0.479.0
- Agilent Buffer Advisor A.01.01 [009]

結果と考察

mAb の不均一性により、2D-LC と質量分析検
出との組み合わせは生物製剤の特性分析に
適したメソッドとなっています。IEX、SEC、アフィ
ニティクロマトグラフィーなどのクロマトグラ
フィー技法を使用して重要な品質特性を分析
します。今回の調査では、アフィニティ精製と
IEX の両方を一次元目の分離で選択しました。
続いて、オフラインでのフラクションの脱塩を
行うことなく、二次元目を RP 脱塩ステップとし
て mAb サンプルを分析しました。

IEX → 脱塩 RP

塩グラジエントを用いた弱カチオン交換クロマトグラフィー (WCX) は、mAb をその電荷の違いによって分離するために一般的に使用されています。これらの荷電変異体のピークの特異分析をさらに行うために、MS 分析の前に脱塩ステップが必要です。図 2 および 3 は、先発品およびバイオシミラー mAb の 2D-LC/MS による荷電変異体の分析結果を示しています。一次元目に、Agilent Bio MAb PEEK カラムを使用して荷電種を分離しました。その後、二次元目に、Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジを使用して脱塩を行いました。先発品 mAb は、メインピークとして 1 つの大きなピークと複数の低レベルの塩基性および酸性変異体ピークを示しました。早い溶出ピークと遅い溶出ピークは、それぞれ酸性変異体と塩基性変異体でした。バイオシミラー mAb のクロマトグラムは、異なる分離プロファイルを示し、先発品 mAb とは異なる大きさの塩基性および酸性変異体を示しました。マルチハートカットメソッドを使用して先発品およびバイオシミラー mAb のピークを選択して二次元目の脱塩カートリッジに移送し MS 分析しました。マルチハートカット 2D-LC メソッドの詳細については、参考文献 1 および 2 に記載されています。図 3 はこれらの荷電変異体ピークのデコンボリュートした MS の結果を示しています。WCX では、先発品およびバイオシミラー mAb のメインピークが同じリテンションタイムで溶出され、それぞれのデコンボリュートした質量測定によりこれらのピークが同一であることが確認されました。バイオシミラー mAb のピーク 2 および 3 の MS 分析により、ピーク 1、2、3 間の 128 Da のシフトが明らかになりました。このシフトは C 末端リジンランケーション (データは示していませんが、カルボキシペプチダーゼ B 消化を使用して確認済み) に相当しています。このデータセットは mAb 電荷変異体の同定のために AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジの使用が効果的なオンライン脱塩アプローチであることを実証しています。高分解能の mAb 分離では、Agilent AdvanceBio RP mAb カラムを二次元目で使用することができます³。

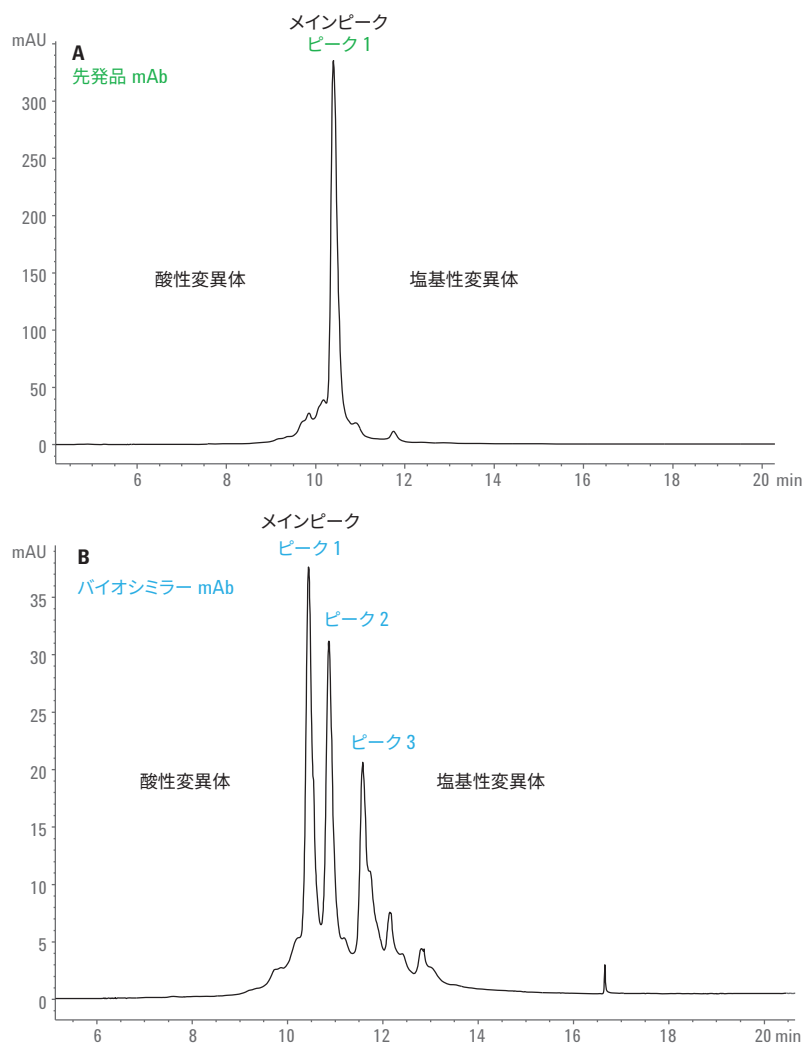


図 2. Agilent Bio MAb 5 μ m カラムを使用した先発品およびバイオシミラー mAb の一次元目の電荷変異体プロファイル。割り当てられた 1、2、3 のピークを二次元目 (Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジ) に移送して MS 分析を行いました。

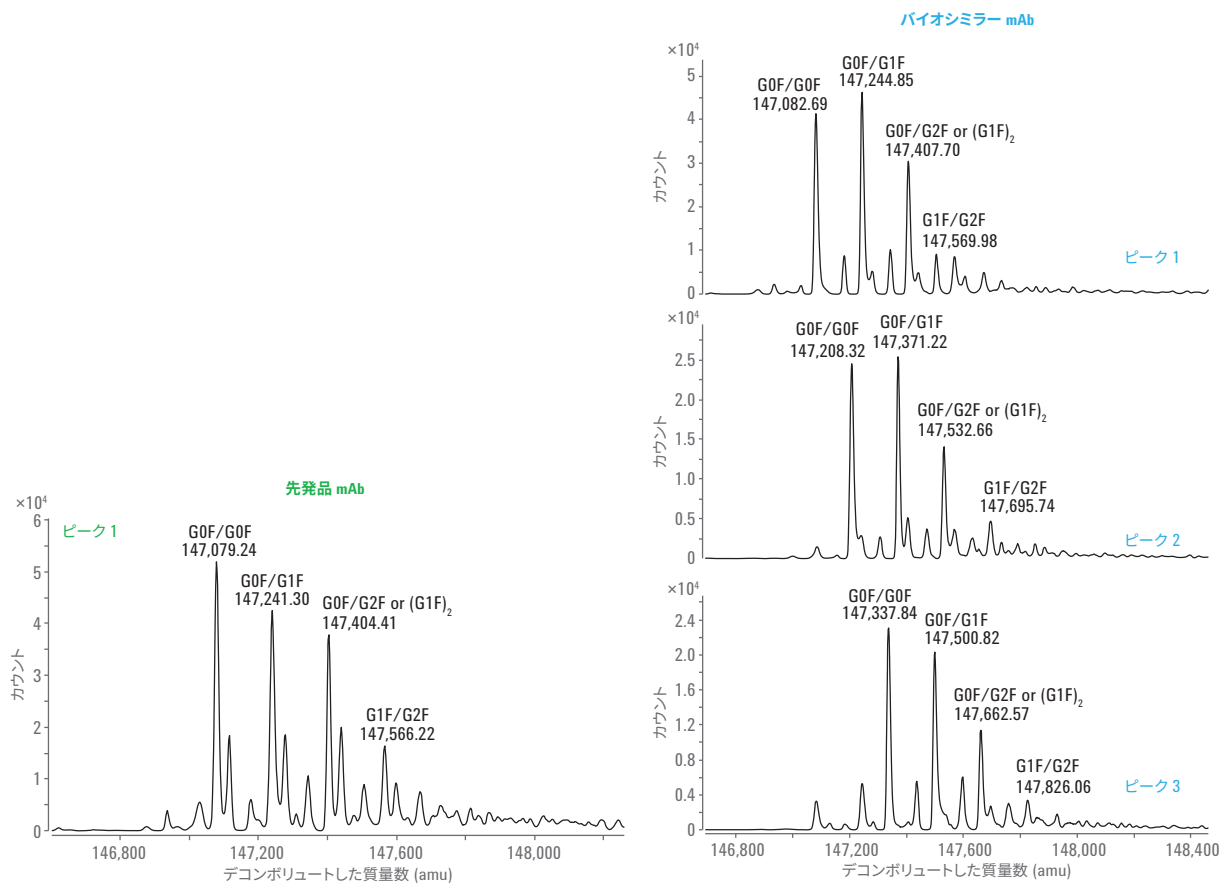


図 3. 図 2 のピーク 1、2、3 をそれぞれデコンボリュートした質量スペクトル

アフィニティ → 脱塩 RP

mAb の製造および精製中、高発現で適切な製品候補物質を生成する正しいクローンを確実に選択することが重要です。一般的に、mAb を精製したり細胞培地で mAb 濃度を測定したりするにはプロテイン A およびプロテイン G カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーを適用します。さらに、MS 分析を使用し、製品ピークの同定を確認することができます。今回の調査では、2D-LC/MS ハートカットメソッド

を使用して 3 種類の医薬品 mAb を分析しました。一次元目に、Agilent Bio-Monolith Protein A カラムを使用して mAb をキャプチャーして濃縮しました。二次元目に、Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジを使用して脱塩を行った後に質量分析を行いました。Protein A カラムからのアフィニティによって精製されたピーク (図 4) を、ハートカットメソッドを使用して MS 分析のために二次元目の脱塩カートリッジに移送しました。図 4 は 3 種類の mAb サンプル

についてそれぞれデコンボリュートした質量スペクトルを示しています。質量測定の実績により、それぞれの mAb の正しい品質が確認されます。このデータセットは、AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジによる迅速なオンライン脱塩アプローチを実証しています。

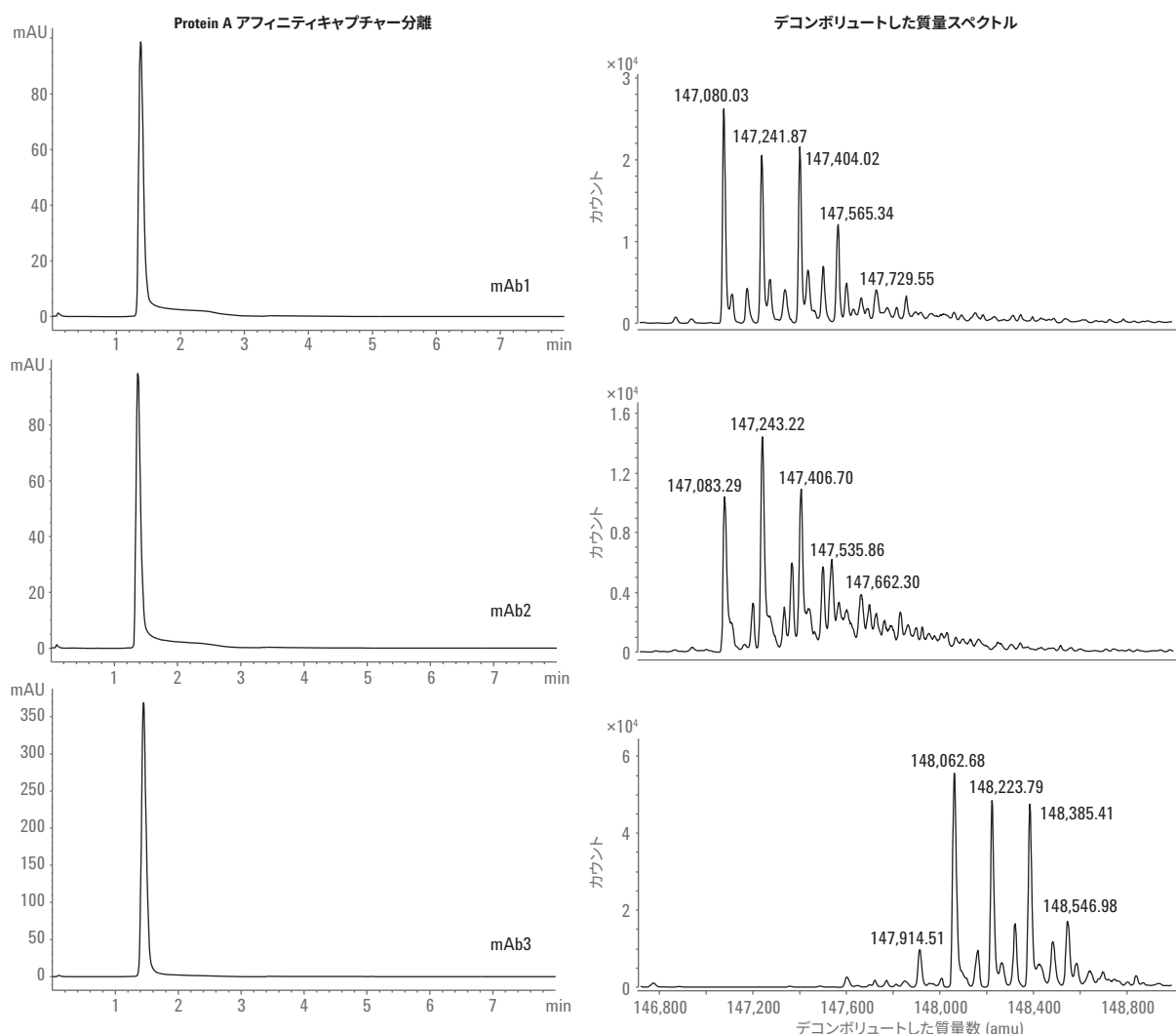


図 4. Protein A を一次元目のカラムとして、脱塩カートリッジを二次元目のカラムとして使用した 2D-LC/MS の mAb プロファイル。一次元目のクロマトグラムから選択したメインピークを捕捉して Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジへ移送することにより、塩が効果的に除去され、高品質の MS 結果が得られました。

結論

今回の調査は、Agilent 2D-LC システムとアジレント製バイオカラムとを組み合わせ使用した mAb 特性分析のワークフローソリューションを実証しています。これは、一次元目分離での電荷変異体またはタンパク質アフィニティキャプチャー、続く二次元目での Agilent AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジによる脱塩、その後の MS 分析で実現されました。この結果、AdvanceBio 脱塩 RP カートリッジを使用した効果的なオンライン脱塩が実証されます。

参考文献

1. Buckenmaier, S. Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for Multiple Heart-Cutting, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5615EN, **2015**.
2. Krieger, S. Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in Method Development for Impurity Analysis – The Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5643EN, **2015**.
3. Sandra, K.; Vanhoenacker, G.; Vandenheede, I.; Steenbeke, M.; Joseph, M.; Sandra, P. Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine. *Journal of Chromatography B* **2016**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.040>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、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。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, September 1, 2016

5991-7066JAJP



Agilent Technologies