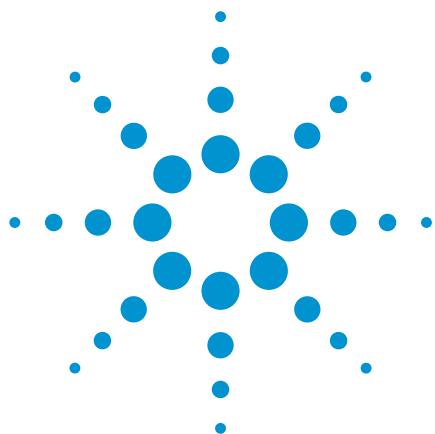




PLRP-S ポリマー逆相カラムを用いた mAb および ADC の LC/MS 分離

インタクトおよびフラグメント化した mAb および ADC の分析

アプリケーションノート

生物製剤

著者

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、モノクローナル抗体 (mAb) や抗体薬の複合体 (ADC) など、分子量の大きい生体分子の特性解析に使用する、ポリマーベースの逆相カラムのアプリケーションについて説明します。ポリマーカラムの性能について理解するために、mAb のインタクトおよびフラグメントの両方のレベルに関して研究を行いました。その結果、カラムの優れた分離性能、および mAb と ADC のルーチン LC/MS 分析への適合性が実証されています。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) および抗体薬の複合体 (ADC) は、自然界に不均一に存在する、治療用タンパク質分子です [1]。これらの分子は、安全性や効能を保证するための特性解析が必要な医薬品開発プロセス時に、さまざまな修飾を経ることがあります。逆相 LC と質量分析検出は、mAb および ADC の基本的な特性解析に最も広く用いられている手法です。再現性の高い高分離能分離および高品質の MS データを達成するためには、LC カラムとメソッドを正しく選択することが重要になります。通常、MS に適したイオンペアリング剤であるギ酸 (FA) を、移動相において従来のシリカベースの逆相カラムとともに使用すると、トータルイオンクロマトグラム (TIC) のピーク形状が劣化してしまいます。また LC/MS の結果にも影響を与えます (分離能、感度、MS 信号、正確な分子量情報など)。このため、生体分子の LC/MS 分析の精度を向上させるために、ギ酸条件に互換性のある LC カラムに関して重要な要件が存在します。



Agilent Technologies

この研究では、ポリマー逆相カラム (Agilent PLRP-S) を用いて、mAb および ADC の LC/MS 分析について実証しました。PLRP-S カラムには、ポリスチレンとジビニルベンゼンの硬質でマクロポーラスな球形粒子が含まれています。この粒子は、全 pH 領域に対して、物理的かつ化学的に安定しています。また、基材そのものに疎水性があるため、逆相系での分離には結合相、アルキル結合基は必要ありません。そのため、残存シラノールや残留重金属は存在しません。この研究では、LC/MS メソッドで PLRP-S カラムを用いて、ADC を含む複数の治療用タンパク質 mAb を分析しました。この手法では、LC/MS に関して良好な結果が得られ、インタクトおよびフラグメント化した mAb と ADC について、精密な質量測定を実施できました。

分析方法

サンプル

- 治療用タンパク質 mAb1、mAb2、および ADC (リジン複合化) 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。
- インタクト:** mAb1、mAb2、および ADC は、0.1% ギ酸含有 3% アセトニトリル (ACN) を用いて濃度 2 µg/µL まで希釈し、1 µL を注入しました。
- 還元:** 20 µL の mAb (2 µg/µL) サンプルを、5 µL ジチオスレイトール (DTT) (1 M) と混合した後、37 °C で 1 時間インキュベーションしました。
- パパイン消化:** 10 µL の mAb (2 µg/µL) サンプルを、5 µL 消化緩衝液 (システインを含む)、5 µL 活性化パパイン (Sigma) と混合しました。この混合溶液を 37 °C で 3 時間インキュベーションしました。
- IdeS タンパク分解:** 20 µL の mAb (2 µg/µL) サンプルを、0.5 µL FabRICATOR (30 単位) (Sigma) と混合し、その混合溶液を 37 °C で 1 時間インキュベーションしました。

使用機器

- LC:** Agilent 1290 Infinity LC システム
- MS:** Agilent 6530 Accurate-Mass 四重極飛行時間型 (Q-TOF) システムと Agilent Jet Stream イオン源

条件

Agilent 1290 Infinity LC システム		
カラム:	Agilent PLRP-S、2.1 × 50 mm、5 μm、1,000 Å (p/n PL 1912-1502)	
注入量:	1 μL	
サンプル温度:	5 °C	
移動相 A:	0.1 % ギ酸水溶液	
移動相 B:	0.1 % ギ酸 ACN 溶液	
グラジエント:	インタクト	フラグメント
	0 分 → 20 % B	0 分 → 20 % B
	4 分 → 20 % B	10 分 → 50 % B
	5 分 → 40 % B	10.1 分 → 85 % B
	10 分 → 70 % B	11 分 → 85 % B
	11 分 → 90 % B	11.1 分 → 20 % B
	11.1 分 → 20 % B	
ストップタイム:	11.1 min	
ポストタイム:	4 分	
カラム温度:	80 °C	
流量:	0.6 mL/min	
Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS		
イオンモード:	ポジティブイオンモード、デュアル AJS ESI (プロファイル)	
乾燥ガス温度:	350 °C	
乾燥ガス流量:	8 L/min	
シースガス温度:	400 °C	
シースガス流量:	11 L/min	
ネブライザ:	35 psi	
キャピラリー電圧:	5,500 V	
フラグメンタ電圧:	380 V	
スキマー電圧:	65 V	
Oct RF Vpp:	750 V	
取り込みパラメータ	1 GHz でデータ取得、MS のみのモード、質量範囲	
MS モード:	600 ~ 4,000 m/z (フラグメント)、2,000 ~ 6,000 m/z (インタクト)	
データ分析:	LC/MS で取得したデータを、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアおよび Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを使用して分析 しました。抗体薬の複合体 (ADC) および mAb1/mAb2 の電荷 0 のスペクトルを取得するためにそれぞれ、 最大エントロピーアルゴリズムおよび pMod デコンボリューションアルゴリズムを使用しました。	

結果と考察

良好なクロマトグラフィー性能を達成するために、通常はトリフルオロ酢酸 (TFA) をイオンペアリング剤として移動相に追加して、シャープな分離ピークを得ます。ただし、TFA は信号の抑制効果があるため、MS 分析には適していません [2]。ギ酸は、生体分子アプリケーションにおいて、MS に適した望ましいイオンペアリング剤ですが、従来のシリカベースのカラムではピーク形状が劣化する場合があります。良好な分離ピーク形状と高 S/N 比 (S/N) m/z 質量スペクトルを両立させることは、mAb のような高分子量タンパク質を取り扱う際には困難になることがあります [3]。そのため、MS 互換性のある適切な LC カラムを選択して、mAb と ADC の分離精度を向上させることが重要になります。mAb 分離において、シリカベースのカラムを LC/MS で使用する際には、アジレントアプリケーションノート、5991-6296EN、5991-4266EN、5991-2116JAJP、および 5990-9631JAJP を参照してください [3 ~ 6]。

この研究では、ポリマーベースの PLRP-S カラムを用いて、mAb および ADC をインタクトとフラグメントの両方のレベルで分析しました。PLRP-S は堅牢で機械的にも安定しているため、分子量の大きい生体分子アプリケーションに適した、幅広いポアサイズと粒子サイズで使用できます。

インタクト分析

図 1 に、PLRP-S、 2.1×50 mm、 $5 \mu\text{m}$ 、 $1,000 \text{ \AA}$ カラムを用いた、インタクト mAb および ADC の LC/MS 分析の結果を示します。このカラムでは、 ≤ 0.1 分間の半値全幅 (FWHM) mAb および 0.25 分間の FWHM ADC において、優れた TIC ピーク形状が得られました。また、標準 RP 移動相システム (ACN + FA) を用いて、狭い TIC ピーク幅が得られました。2 つの mAb で同様のピーク幅が得られましたが、これはさまざまな mAb サンプルに対して、このメソッドに適合性があることを示しています。ADC サンプルでも狭いピーク幅が得られましたが、かなり不均一になっています。同じメソッド条件とカラムに対して、UV 検出でも試験を実施しており、その結果は良好な同一のリテンションタイムプロファイルを示しました (データは図示していません)。

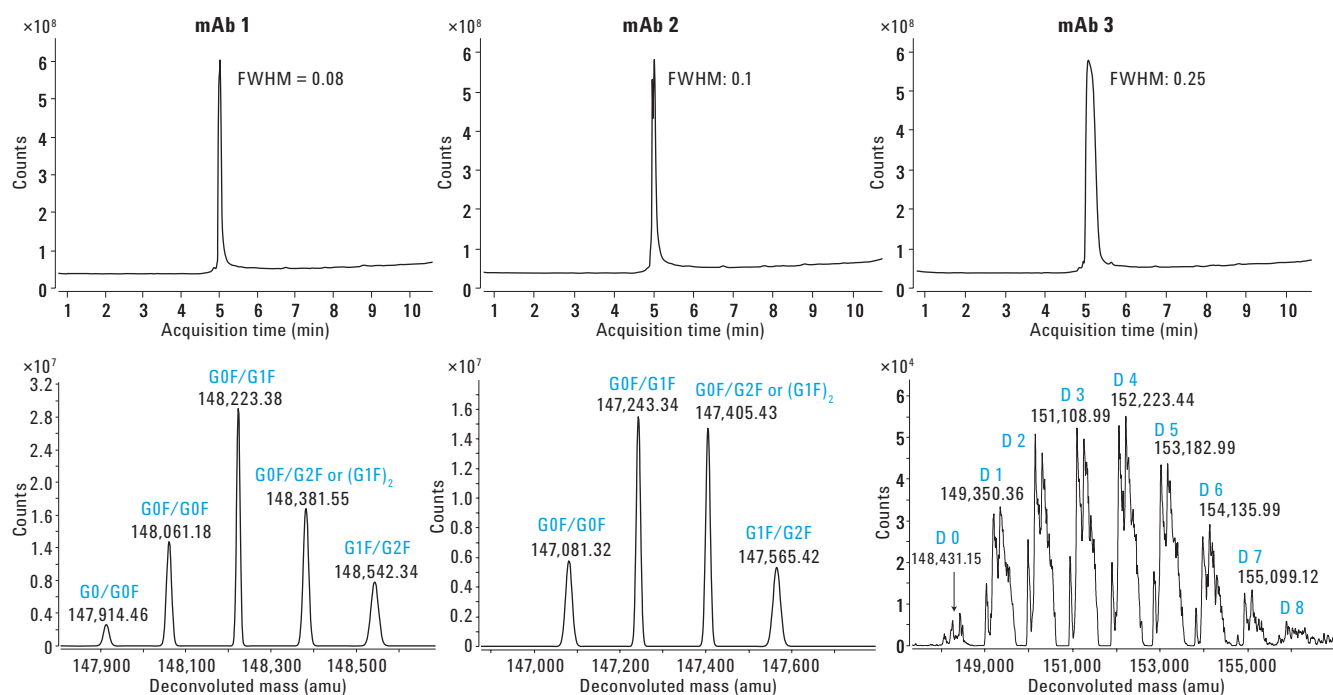


図 1. Agilent PLRP-S、 2.1×50 mm、 $5 \mu\text{m}$ 、 $1,000 \text{ \AA}$ カラムでのインタクト mAb/ADC LC/MS 分析。上: トータルイオンクロマトグラム、下: デコンボリュートしたスペクトル。FWHM: 半値全幅。

未加工の質量スペクトルを、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを用いて、電荷 0 の質量スペクトルに変換しました。図 1 に、デコンボリュートしたスペクトルを示しています。mAb1 をデコンボリュートしたスペクトルでは、5 つの主なグリコフォームが観察されていると同時に、mAb2 のスペクトルでは、4 つの主なグリコフォームが明確に観察されています。ADC をデコンボリュートした質量スペクトルは、1 つの薬物負荷と 8 つの主な薬物抱合 (D0 ~ D8) のそれぞれにおいて、ペイロードの傾向が増大していることを示しています。

フラグメント分析

生成されたフラグメントを分析するために、サンプルに対して化学反応と酵素反応を与えました。図 2 に、PLRP-S、 2.1×50 mm、 $5 \mu\text{m}$ 、 $1,000 \text{ \AA}$ カラムを用いた、還元 IdeS パパイン消化 mAb および ADC の LC/MS 分離の結果を示します。フラグメントピーク (LC、HC、ScFc、 $F(ab')_2$ 、Fc、 $2 * Fab_2$ 、および複数の薬物複合体種を含む ADC フラグメント) は、標準移動相システム (ACN + FA) を用いて、PLRP-S カラムで適切に分離されていることがわかります。2 つの mAb サンプルは、予想していたとおり、2 つの主な消化後フラグメントを示しました。

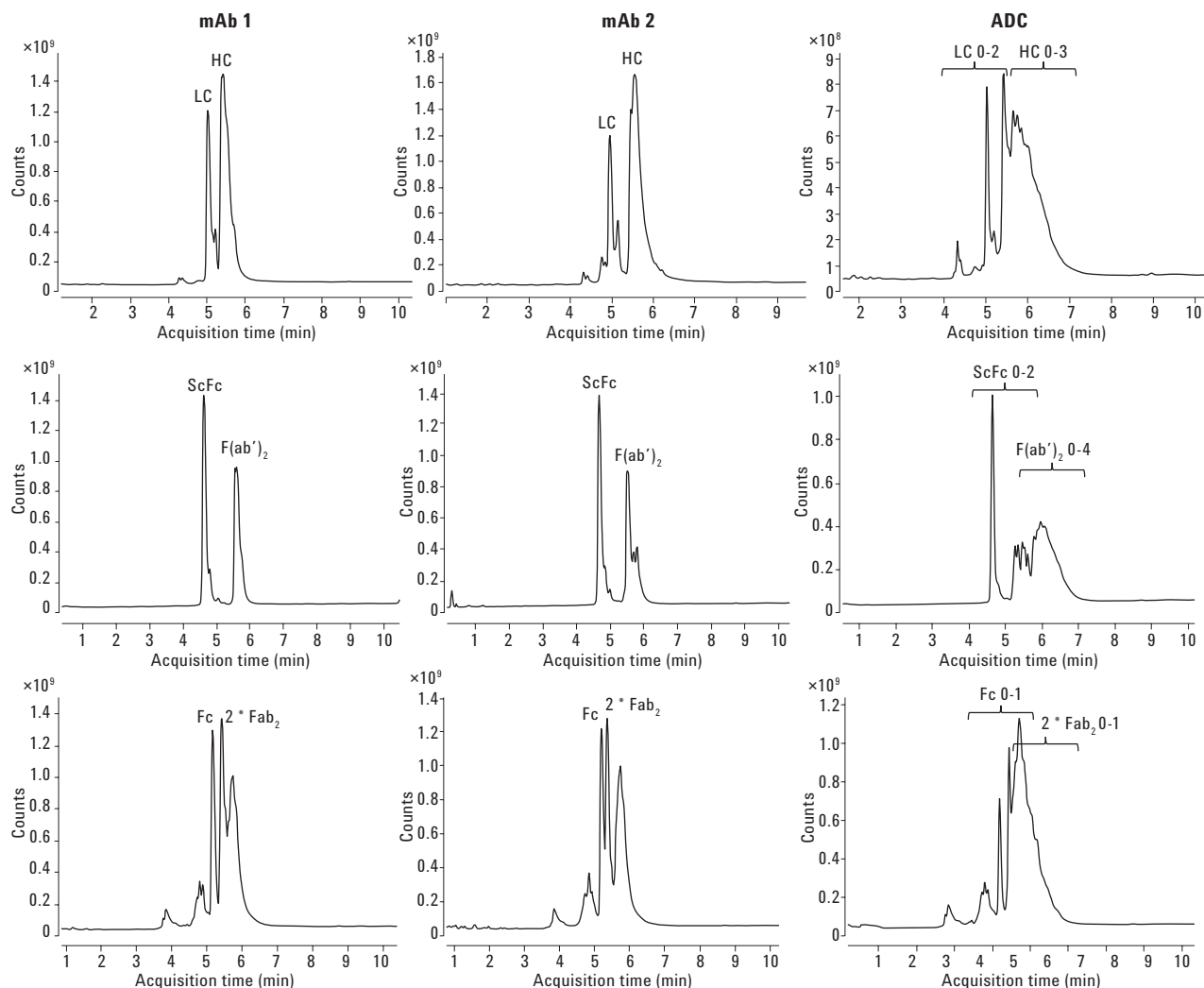


図 2. Agilent PLRP-S、 2.1×50 mm、 $5 \mu\text{m}$ 、 $1,000 \text{ \AA}$ カラムでの mAb フラグメント LC/MS 分析。上: 還元、中: IdeS 消化、下: パパイン消化。

これらの主なフラグメントピークを分離した結果は、良好な MS 感度と正確な分子量測定を達成するのに十分なものでした (図 3)。ADC サンプルでは、使用できるさまざまなリジン残留物が複合化することにより、高度な不均一性が生じるため、フラグメント種の分離は非常に困難な作業です。図 2 は、PLRP-S カラムでのグリコシル化 ADC フラグメントの分離を示しています。明らかに、複数の薬物複合体種は、今回の LC/MS 条件の下で適切に分離されており、PLRP-S カラムの高い分離性能を実証しています。図 3 に、mAb および ADC フラグメントの代表的なデコンボリュートしたスペクトルを示します。

結論

- Agilent PLRP-S カラムは、mAb および ADC のインタクトとフラグメントの両方のレベルにおける分析で、優れた分離性能を示しました。
- Agilent PLRP-S は、ギ酸含有の移動相において、良好なクロマトグラフィ性能と高品質な MS 応答を達成しました。
- この研究では、Agilent PLRP-S カラムを Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムと組み合わせて使用した、mAb および ADC の分析について説明しました。

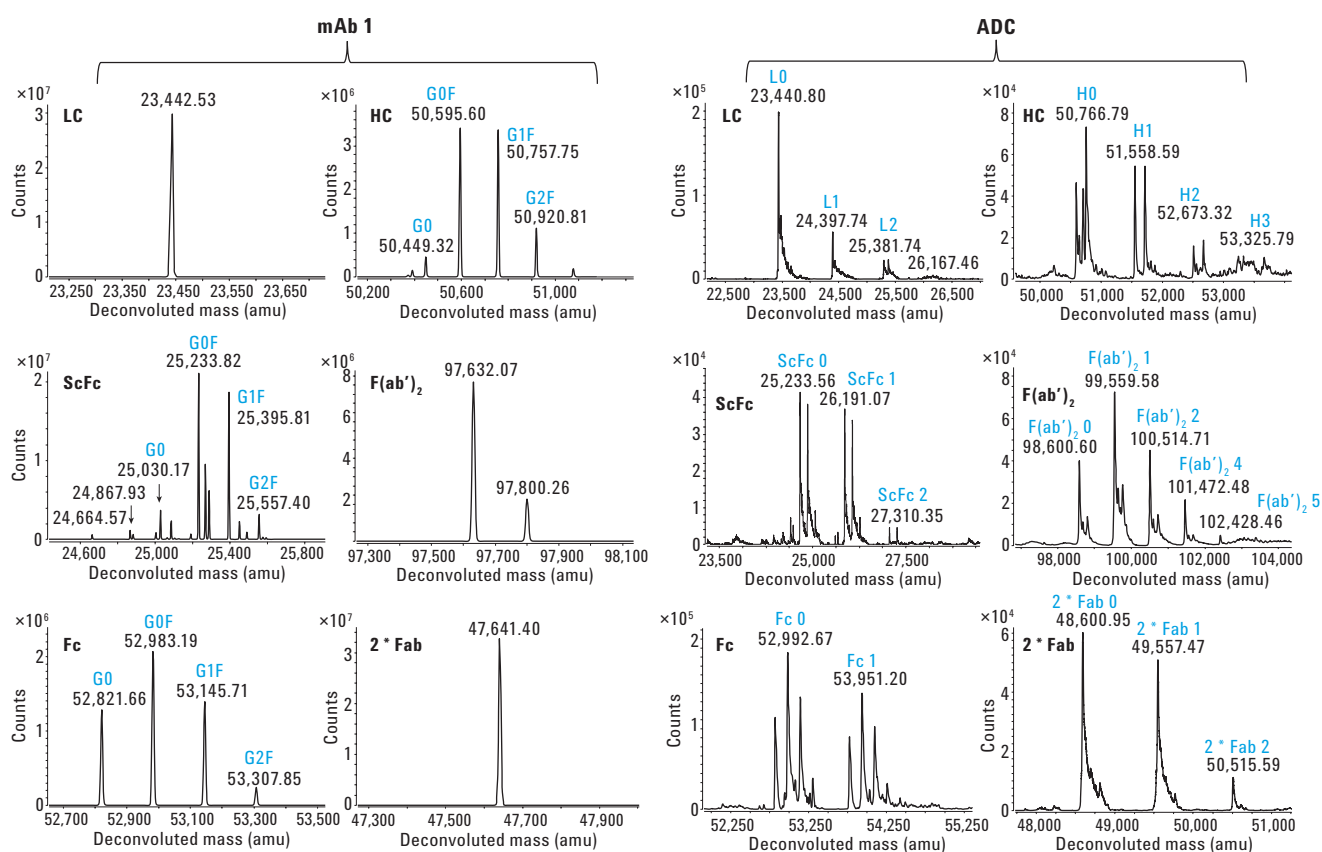


図 3. 代表的なデコンボリュートした質量スペクトル。上: 還元、中: Idea 消化、下: パパイン消化。

参考文献

1. Beck, A.; Reichert, J. M. Antibody-drug conjugates. *mAbs* **2014**, *6*, 1, 15-17.
2. McCalley, D. V. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1038*, 77–84.
3. Gudihal, R.; Suresh Babu C. V.; Tang, N. *Analysis of Monoclonal Antibody (mAb) Using Agilent 1290 InfinityLC System Coupled to Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF)*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-4266EN, **2014**.
4. Suresh Babu, C. V. *LC/MS of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Agilent AdvanceBio RP-mAb*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6296EN, **2015**.
5. Gudihal, R.; Suresh Babu, C. V.; Tang, N.; Madhavi H. N.; Uma, M. *Intact Protein Analysis using an Agilent 6550 Q-TOF Mass Spectrometer*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-2116EN, **2013**.
6. Martosella, J.; Duong, P.; Moyer, S. *Rapid UHPLC Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies using an Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8 Column*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-9631EN, **2012**.

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。

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。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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, August 1, 2016

5991-7163JAJP



Agilent Technologies