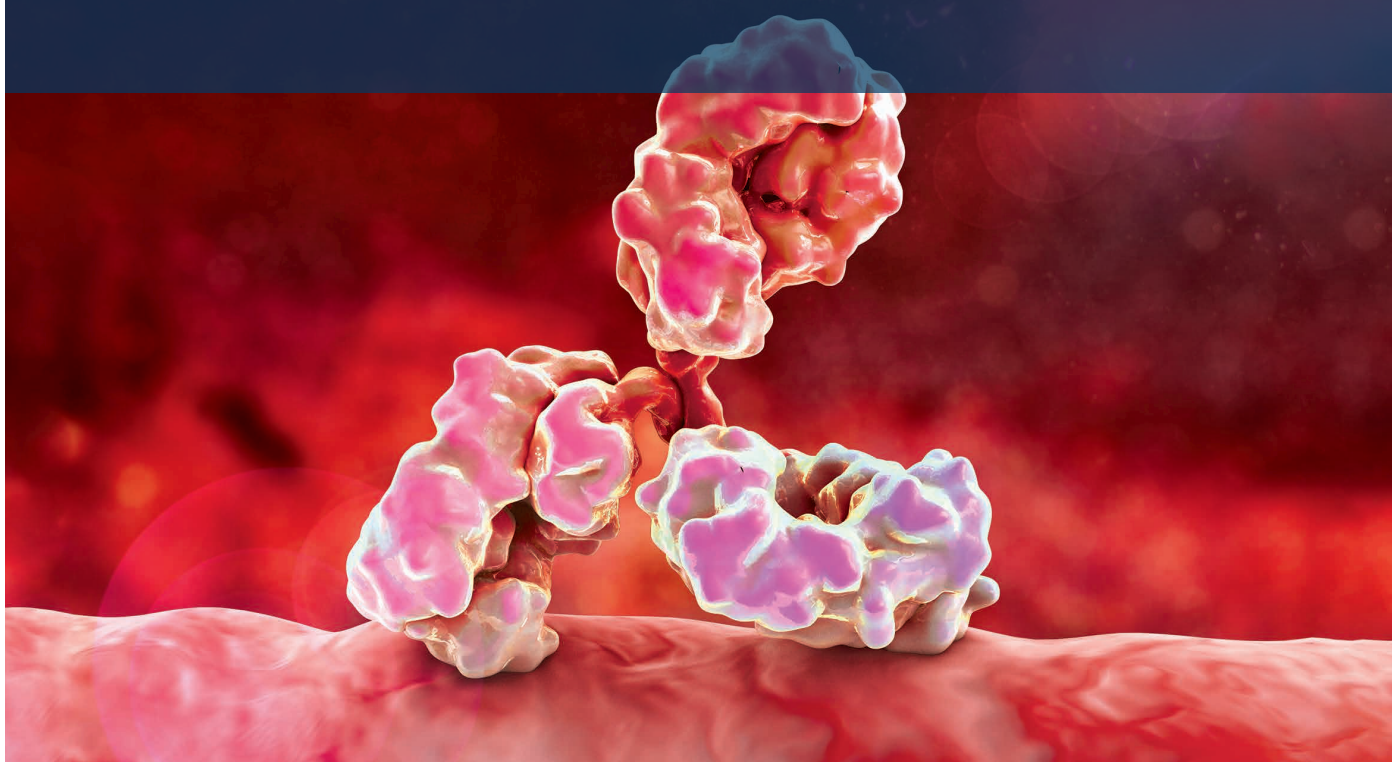


Agilent InfinityLab Bio LC ソリューション

バイオ医薬品分析

アプリケーション総覧





バイオ医薬品分析の 課題を克服

バイオ医薬品分析の複雑さが増すにつれ、バイオ医薬品ワークフロー全体にわたる優れた技術革新が求められています。

Agilent InfinityLab Bio LC ソリューションは、完全にイナート仕様の幅広いバイオイナート LC システムで構成されており、創薬、医薬品開発から QA/QC まで、堅牢で正確なバイオ分析を実現します。

InfinityLab Bio LC システムとバイオカラム、MS 検出器、ソフトウェア、サービスを組み合わせることにより、バイオ医薬品の課題に対応する包括的なソリューションを提供します。

このアプリケーション総覧には、バイオ分析における InfinityLab Bio LC ソリューションの優れた性能と汎用性を示す最新のアプリケーションが掲載されています。

BIO



目次

1	モノクローナル抗体 (mAb)	8
1.1	mAb 電荷変異体分析の改良	8
	– イオン交換クロマトグラフィー	
	– Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ	
	– Agilent Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、5 µm、PEEK	
1.2	高 mAb 凝集体分析	16
	– サイズ排除クロマトグラフィー	
	– Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ	
	– Agilent AdvanceBio SEC、200 Å、4.6 × 300 mm、1.9 µm	
1.3	製品関連の mAb フラグメントのモニタリング	24
	– 逆相クロマトグラフィー	
	– Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ	
	– Agilent PLRP-S、1,000 Å、2.1 × 100 mm、5 µm、PEEK ライナ付き	
1.4	カチオン交換分析の便利なカスタマイズ	30
	– イオン交換クロマトグラフィー	
	– Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC	
	– Agilent Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、5 µm、PEEK	
1.5	4D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体電荷変異体の完全自動化特性解析	38
	– イオン交換クロマトグラフィー	
	– 逆相クロマトグラフィー	
	– Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムと Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF	
	– Agilent Bio MAb、NP5、2.1 mm × 250 mm、5 µm、PEEK	
	– Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 150 mm、2.7 µm	
1.6	2-in-1 バイオプロセス分析	50
	– 親水性相互作用液体クロマトグラフィー	
	– アフィニティクロマトグラフィー	
	– Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC	
	– Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 µm	
	– Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm	
2	ペプチド	58
2.1	Agilent 1290 Infinity II Bio LC へのシームレスなメソッド移管	58
	– 逆相クロマトグラフィー	
	– Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ	
	– Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 µm	
	– Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guard、2.1 × 5 mm、1.8 µm	

2.2 堅牢で信頼性の高いペプチドマッピング	64
– 逆相クロマトグラフィー – Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ – Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 250 mm、2.7 μm – Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング Fast Guard、2.1 × 5 mm、2.7 μm – Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 μm – Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guard、2.1 × 5 mm、1.8 μm	
3 抗体薬物複合体 (ADC)	70
3.1 高塩条件下での抗体薬物複合体の分析	70
– 疎水性相互作用液体クロマトグラフィー – Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ – Agilent AdvanceBio HIC カラム、4.6 × 100 mm、3.5 μm	
3.2 利便性と信頼性の高い抗体薬物複合体の分析	76
– 疎水性相互作用液体クロマトグラフィー – Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC – Agilent AdvanceBio HIC カラム、4.6 × 100 mm、3.5 μm	
4 糖鎖	80
4.1 糖鎖の分離における分離能と速度	80
– 親水性相互作用液体クロマトグラフィー – Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ – Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、2.1 × 150 mm、1.8 μm – Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、2.1 × 100 mm、1.8 μm	
5 プリカーサオリゴヌクレオチド	88
5.1 オリゴヌクレオチド合成の原料の分析	88
– 逆相クロマトグラフィー – Agilent 1290 Infinity II Bio LC とフレキシブルポンプ – Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm	
6 漢方薬	94
6.1 LC メソッドの互換性を判別するための性能比較	94
– 逆相クロマトグラフィー – Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC – Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 150 mm、5 μm – Agilent InfinityLab Poroshell EC-C18、2.1 × 50 mm、2.7 μm – Agilent InfinityLab Poroshell SB-C18、2.1 × 150 mm、2.7 μm	

メソッドとシステムの概要

この表は、各アプリケーションの実験設定の
クイックガイドとしてお使いください。

	メソッド						1290 Bio			1260 Bio	
	IEX	SEC	逆相 LC	HILIC	HIC	AC	HSP	2D-LC	FP	Prime	Inert
モノクローナル抗体 (mAb)											
mAb 電荷変異体分析の改良	●						●				
高 mAb 凝集体分析		●					●				
製品関連の mAb フラグメントのモニタリング			●				●				
カチオン交換分析の便利なカスタマイズ	●									●	
4D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体電荷変異体の完全自動化特性解析	●		●					●			
2-in-1 バイオプロセス分析				●		●					●
ペプチド											
Agilent 1290 Infinity II Bio LC へのシームレスなメソッド移管			●				●				
堅牢で信頼性の高いペプチドマッピング			●				●				
抗体薬物複合体 (ADC)											
高塩条件下での抗体薬物複合体の分析					●		●				
利便性と信頼性に優れた抗体薬物複合体の分析					●					●	
糖鎖											
糖鎖の分離における分離能と速度				●			●				
プリカーサオリゴヌクレオチド											
オリゴヌクレオチド合成の原料の分析			●						●		
漢方薬											
性能比較による LC メソッドの互換性の判別			●							●	

HSP Agilent 1290 Infinity II Bio LC とハイスピードポンプ
2D-LC Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システムと Agilent 6545XT
AdvanceBio LC/Q-TOF

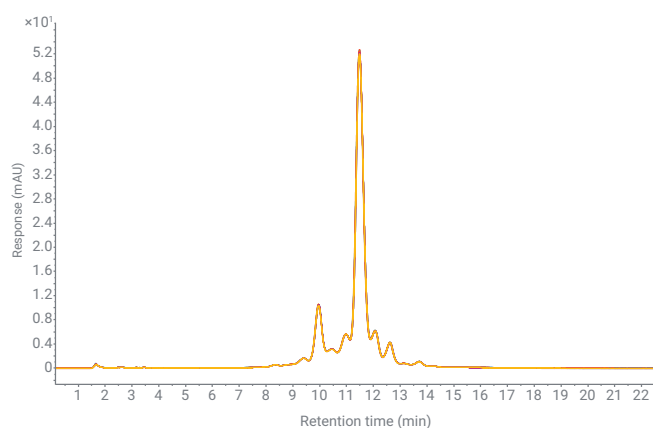
FP Agilent 1290 Infinity II Bio LC とフレキシブルポンプ
Prime Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC
Inert Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC

勾配を限界まで小さく：

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる
mAb 電荷変異体分析のグラジエント勾配と分離条件の最適化



BIO



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

電荷変異体分析は、液体クロマトグラフィーシステムにおいて要求の高い応用アプリケーションです。これは、分離を最適にするために、腐食性の高いバッファ塩を非常に緩やかなグラジエントと組み合わせて使用しているためです。Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムで、複数の塩グラジエントの分離能と再現性を評価して分析しました。

ハイスピードポンプを含む 1290 Infinity II Bio LC と完全に鉄分のない流路は、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に最適であり、システムに損傷を与える可能性のある腐食を防止します。1290 Infinity II Bio LC は、非常に分析困難である緩やかなグラジエントの場合でも優れた再現性を実現しており、高い信頼性でデータを生成するアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムであることが立証されました。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、サイズが約 150 kDa という高分子量の非常に不均一な巨大分子であり、通常は遺伝子組み換え型製造メソッドにより生成されます。また、多数の修飾が発生する可能性のある複雑な生体合成プロセスで生成され、何百種類もの異なる変異体を生成します。脱アミド化、酸化、ジスルフィドブリッジ、N-グリコシル化、N- および C-末端処理は、最も一般的な翻訳後修飾 (PTM) の一部です。これらの修飾はすべて生成時に発生する可能性があると同時に、製造および保管がこれらの巨大分子の複雑さに影響を与えます。PTM により、広範な分析とモニタリングが必要になる複雑なアイソフォームプロファイルが形成されます。これは、最終医薬品での修飾が生物活性の損失、半減期の変化、または免疫原性と関連付けられる場合があるためです。¹一部の PTM は分子の電荷変異体を生成し、これは通常、イオン交換クロマトグラフィー (IEX) を用いて分析します。²電荷変異体は最も重要な品質特性 (CQA) の 1 つと考えられているため、厳密な許容基準と品質管理について検討する必要があります。また、製品が正しく製造されていることを確認し、すべての不純物を同定して定量するために非常に重要です。

緩やかなグラジエント溶出は、タンパク質の IEX では非常に一般的です。タンパク質の溶出におけるイオン強度モードでの一般的な塩グラジエントは約 1 ~ 3 mM/min であり、pH 値は許容範囲 ±0.02 pH 単位に設定されています。³

1290 Infinity II Bio LC には、高性能のハイスピードポンプが搭載されています。低圧混合ポンプ (クォータリポンプなど) と比較した場合、バイナリポンプの主な利点は、溶媒成分の 1 つを低い割合で混合した場合に、溶媒混合の真度と精度が大幅に向上することです。この方法で混合すると、溶媒グラジエントの開始時と終了時の溶媒組成の精度が高まります。⁴これは、再現性が高く正確で緩やかなグラジエントの生成の基本です (各チャンネルで 1 %/min 未満)。

1290 Infinity II Bio LC は、アジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムであり、特に 2 M NaCl のような高塩濃度、最大 8 M の尿素、0.5 M NaOH や 0.5 M HCl のような高および低 pH 溶媒などのバイオクロマトグラフィーで使用される条件向けに設計されています。流路全体にステンレス (SST) と鉄分がまったく存在していません。マルチサンブラ、マルチカラムサーモスタット、検出器全体のキャピラリーとフィッティングはすべて、ニッケル-コバルトアロイの MP35N 製です。この材質を使用することにより、高塩含有バッファの腐食の可能性が低減され、鉄イオンの存在により引き起こされるタンパク質の修飾 (酸化、タンパク質複合体の形成など) を防止できます。

このアプリケーションノートでは、トラスツズマブおよび NISTmAb 参照標準の電荷変異体分析について説明します。複数の塩グラジエント勾配を試験して、分析可能で最適な分離能を見つけました。次に、最適なグラジエント勾配の再現性について評価しました。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様の標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 µL 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5

カラム

Bio MAb、NP5、2.1 × 250 mm、PEEK (p/n 5190-2411)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸水素二ナトリウム七水和物、塩化ナトリウム、塩酸、水酸化ナトリウム、トリス (ヒドロキシメチル)-アミノメタン、イミダゾール、およびピペラジン六水和物は、Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。

サンプル

- Agilent-NISTmAb (p/n 5191-5744)
- ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ（ハーセプチンとして販売）は Roche（バーゼル、スイス）から入手しました
- トラスツズマブは、30 mM リン酸バッファ、pH 6.8 に溶解しました

バッファの前処理

2 L の 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8 については、4.45 g のリン酸二水素ナトリウム水和物および 7.44 g のリン酸水素二ナトリウム七水和物を計量し、茶色の 2 L ボトルに加えて超純水を 2 L まで調製しました（& バッファ A）。29.22 g の塩化ナトリウムを総濃度が 500 mM になるように空の茶色 1 L ボトルに加え、前処理したリン酸バッファ A を 1 L まで調製しました（& バッファ B）。前処理した両方のバッファの pH 値を確認し、必要に応じて pH 6.8 に調整しました（大量の塩を加えると pH が変化する場合があります）。前処理した両方のバッファを 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過しました。

メソッド

表 1 参照

注：高濃度の塩溶液を溶出液として使用する際には、ポンプメソッドにおいて対応する溶媒タイプの設定を検討してください。例えば、500 mM の塩化ナトリウムが含まれている溶媒 B の場合、ポンプメソッドの溶媒選択フィールドで [Generic Aqueous（一般的な水）] や [Water（水）] ではなく、「Sodium Chloride 0.5 M（塩化ナトリウム 0.5 M）」を使用します。大量の塩を加えると溶媒の圧縮率が変化するため、あらかじめ設定された溶媒テーブルを使用することにより最高のポンプ性能を実現できます。

結果と考察

メソッド開発

目的の分離能を達成して最適な分離をするには、電荷変異体分析用の広範なメソッド開発が必要です。このために非常に重要になるのは、pH とグラジエント勾配という 2 つのパラメータに対して最適な値を見つけることです。両方の因子が分離に大きな影響を与える可能性があります。最初に、pH スカウティングを実行して、分離に最適な pH を見つけることを推奨します。以前の実験では、使用するバッファの pH を pH 6.4 ～ 7.4 まで分析して、トラスツズマブと NISTmAb 参照標準の両方のサンプルに対して最適な pH を 6.8 と決定しました（データは示していません）。次のステップは、最適なグラジエント勾配を決定して、効率的な分離を実行することです。

表 1. 塩グラジエントのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8、B) 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8、500 mM 塩化ナトリウム
グラジエント	30 分で 0 または 25 mM ～ 150 mM NaCl、メソッド開発で複数の緩やかなグラジエントを使用 0 mM（トラスツズマブ）および 25 mM（NIST）、30 分で 100 mM NaCl まで上昇させて再現性を評価 30 分で 25 ～ 50 mM NaCl まで上昇させて再現性を評価（非常に緩やかなグラジエント） 31 分後に 500 mM NaCl で洗浄 ストップタイム：35 分 ポストタイム：15 分
流量	0.200 mL/min
温度	30 °C
検出	280 nm 10 Hz
注入	注入量：3 μL（トラスツズマブの場合）、2 μL（NIST の場合） サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水で 3 秒間

図 1 は、1 % B/min (5 mM/min) ～ 0.33 % B/min (1.66 mM/min) の範囲の複数のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分析した結果を重ね表示したものです。グラジエントが緩やかになるほど、ポンプ性能への要件が高くなっています。グラジエント時に非常に正確な溶媒組成を実現するためには、少量の溶媒成分を混合する際にポンプを正確かつ高精度で動作させる必要があります。ただし、塩グラジエントの場合、グラジエントを非常に緩やかにしても分離能が高くなるとは限らず、単にピーク幅が広がるだけである（例えば、図 1 の 0.33 % B/min）ことを考慮する必要があります。したがって、再現性の実験で選択したグラジエント勾配は、試験したグラジエントの間中である 0.66 % B/min (3.3 mM/min) であることがわかり、さらに緩やかにするように検討する必要があります。

NISTmAb 参照標準の電荷変異体の分離の場合も、同様のメソッド開発手順を実行しました（図 2 を参照）。NIST の開始条件には、等電点 (pI) が～ 9 のトラスツズマブと比較してわずかに多い量の塩が含まれていました。この原因は NIST 抗体の pI が高かったためです (pI は～ 9.2)。NISTmAb 参照標準の電荷変異体をより効率的に分離するために、トラスツズマブと比較してグラジエントをわずかに緩やかにしました。その結果、最も緩やかなグラジエントは 0.17 % B/min (0.83 mM/min) で、ポンプにとっては困難な処理です。詳細な再現性の実験では、0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配を選択しました。

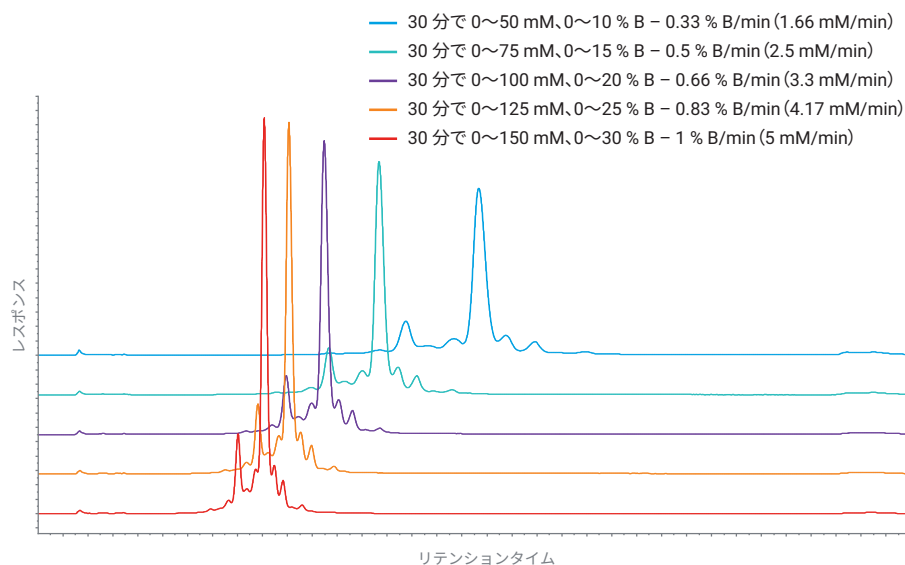


図 1. 複数の塩グラジエント勾配によるトラスツズマブ分離メソッド開発

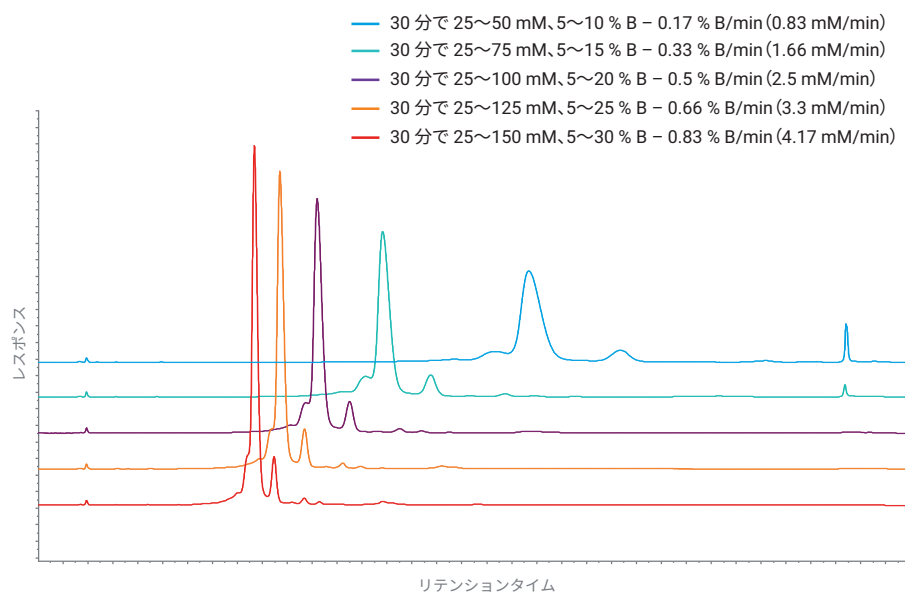


図 2. 複数の塩グラジエント勾配による NISTmAb 参照標準分離メソッド開発

トラスツズマブ電荷変異体の分離の再現性

図 3 は、0.66 % B/min (3.3 mM/min) のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果を示しています (A)。図 3B は、分離した変異体を見やすくするために表示を拡大したものです。A というマークが付けられた変異体は、メインピークの前に溶出した酸性変異体を表しているのに対して、塩基性変異体 B はメインピークの後に溶出しています。メインピークの前では 5 つの酸性変異体が分離されており、メインピークの後では 4 つの塩基性変異体が溶出していました。すべての変異体とメインピークに対して、リテンションタイム (RT) と面積の精度を評価しました。RT と面積の精度は両方ともに優れたものであり、RT については 0.052 % 相対標準偏差 (RSD) 未満の値で、面積については 0.82 % RSD 未満の値です。ただし、2 つの非常に小さな変異体ピーク A1 と B3 を除きます。

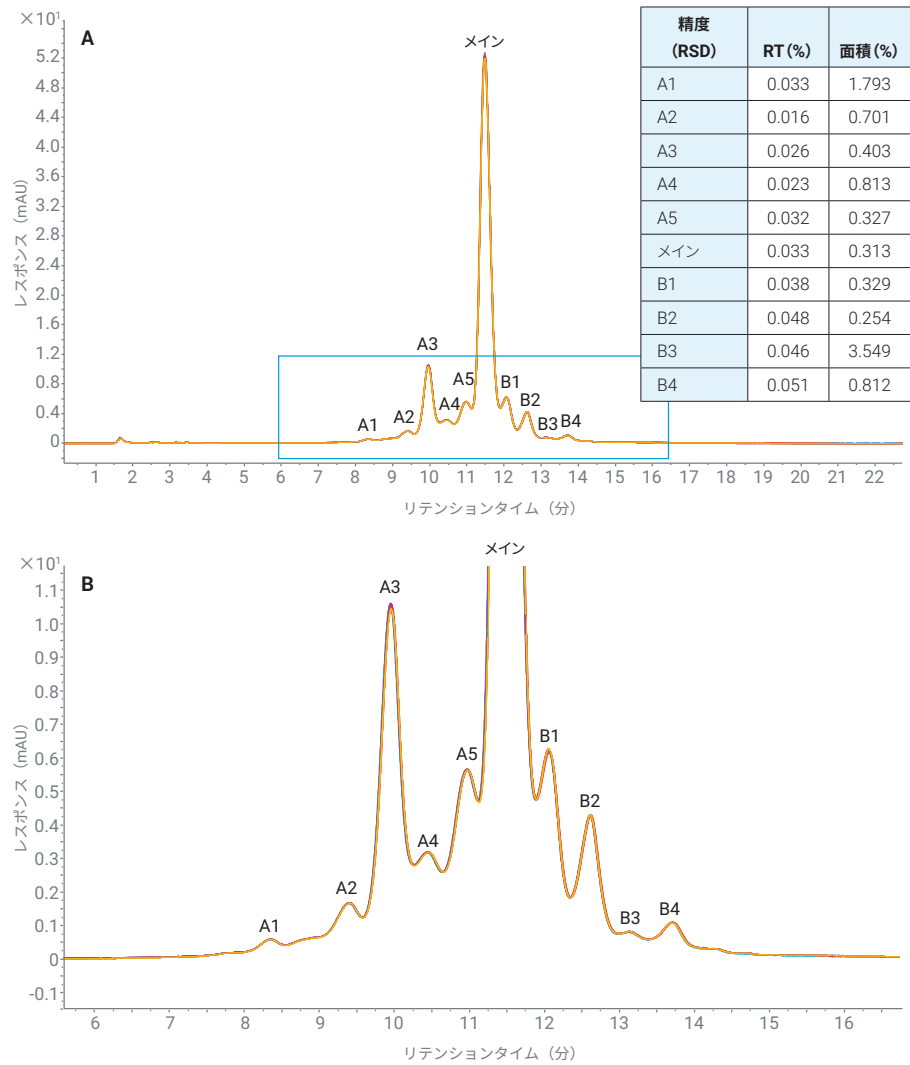


図 3. (A) 7 回の連続分析において 0.66 % B/min (3.3 mM/min) のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果。(B) 拡大表示

NISTmAb 電荷変異体の分離の再現性

図 4 は、0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果を示しています (A)。

図 4B は、2 つの酸性変異体と 4 つの塩基性変異体を拡大して表示したものです。今回も、すべての変異体とメインピークに対して、リテンションタイム (RT) と面積の精度を評価しました。RT と面積の精度は両方ともに優れたものであり、RT については 0.06 % RSD 未満の値で、面積については 0.55 % RSD 未満の値です。ただし、1 つの非常に小さな変異体ピーク B2 を除きます。

図 2 に示したように、最も緩やかなグラジエントの 0.17 % B/min (0.83 mM/min) の場合、0.5 % B/min (2.5 mM/min) (再現性の実験で使用したより緩やかな値) のようなグラジエントと比較して、分離能は良好ではありません。

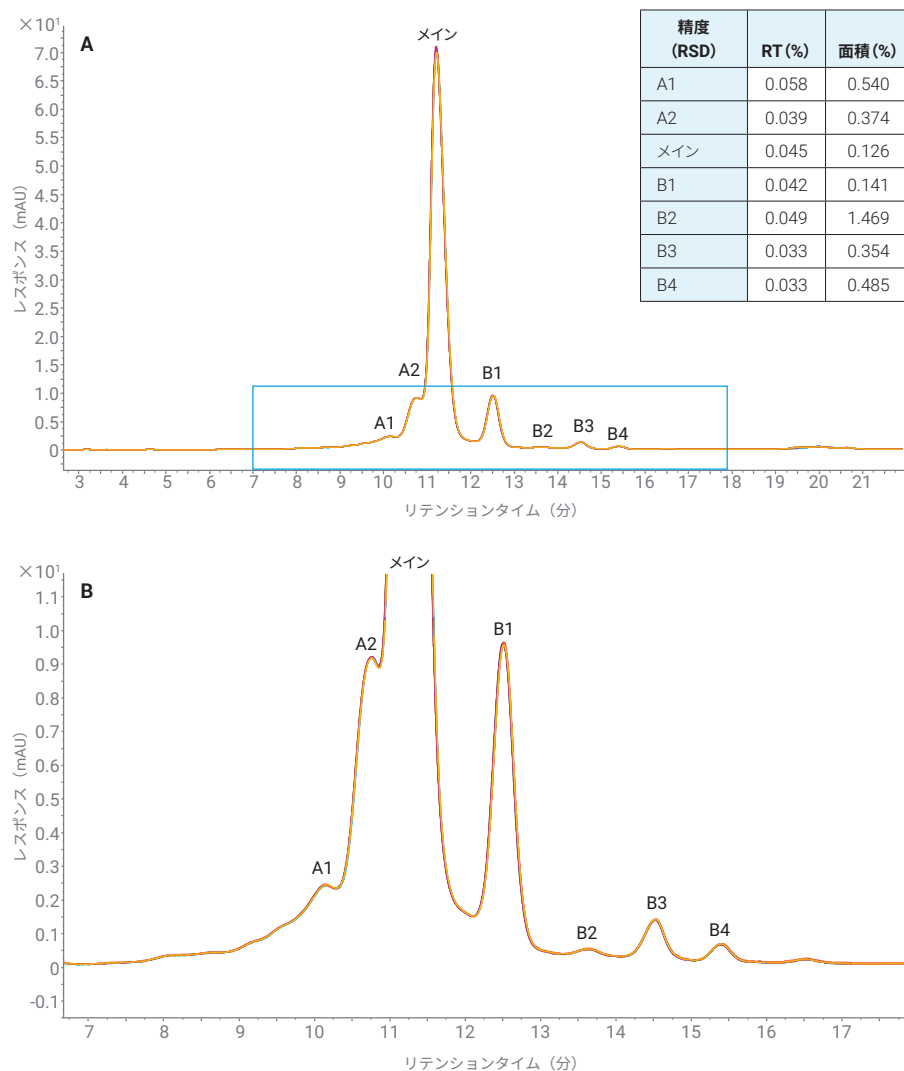


図 4. (A) 7 回の連続分析において 0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果。(B) 拡大表示

ただし、1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプは、分析困難なグラジエント勾配に対応しました。これを図 5 に示します。7 回の連続した分析での RT 精度は非常に良好でしたが (0.25 % RSD 未満)、使用したグラジエントではピーク幅が非常に広くなりました。ピーク幅が広がるとピーク高は低くなりますが、これは面積精度に悪影響を及ぼします。

結論

複数の塩グラジエント勾配に対して、1290 Infinity II Bio LC によりトラスツズマブと NISTmAb の電荷変異体の分離と再現性を評価しました。グラジエントが緩やかになると、分離能が向上しているように見えることがあります。しかし、両方の mAb に対して、評価した最も緩やかなグラジエントの場合でも、最高の分離を実現できず、勾配が緩やかになるにつれてピーク幅が広がり始めただけで、これ以上は分離が向上しないことがわかりました。高分離とシャープなピーク形状を最適に組み合わせたメソッドに対して、再現性を詳細に評価しました。グラジエント勾配が 3.3 mM/min (トラスツズマブ) および 2.5 mM/min (NISTmAb) の場合、RT と面積の両方で優れた再現性が実現しました。評価したすべてのピークに対して、RT 精度は 0.06 % RSD 未満でした。NISTmAb で試験した最も緩やかなグラジエントに対しても再現性を評価したところ、非常に緩やかなグラジエント勾配 0.83 mM/min の場合でも、非常に優れた RT 精度が実現しました (< 0.25 % RSD)。これらのデータは、完全に鉄分のない流路を備えた 1290 Infinity II Bio LC がバイオクロマトグラフィーで使用する条件に最適で、非常に再現性の高い結果が得られることを示しています。

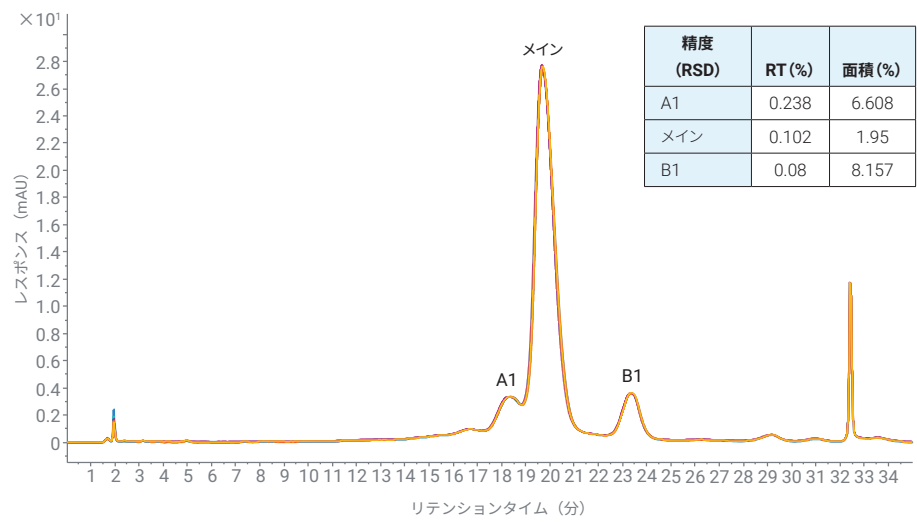


図 5. 7 回の連続分析において 0.17 % B/min (0.83 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果。

参考文献

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, publication number 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379.

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

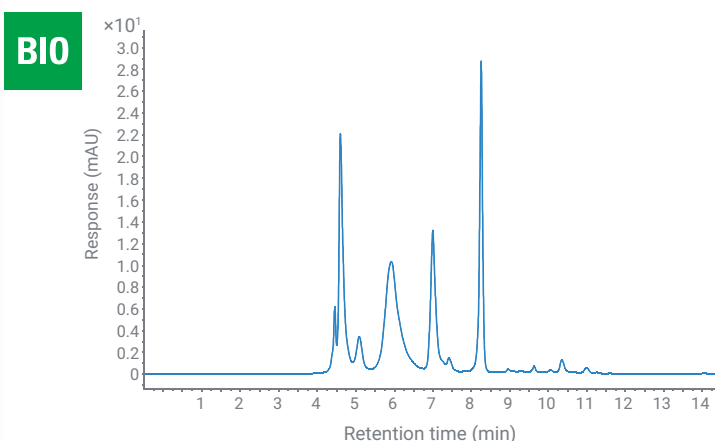
Printed in Japan, October 12, 2020

5994-2692JAJP

DE.964027778

mAb 凝集体分析の向上

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いた
高分離能 SEC



著者

Edgar Nägele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC カラムと超低分散キャピラリーを搭載した Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムにより、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) タンパク質分離における優れた分離能について示しています。イナート仕様の UHPLC システムでは、腐食性塩バッファを使用した分析が実施できるため、メンテナンスコストが削減されます。内径が異なる (0.17、0.12、0.07 mm) キャピラリーに対して、SEC 分析の分離能を比較しました。タンパク質標準混合物、および凝集体を含むモノクローナル抗体 (mAb) を分離して分離能を比較しました。さらに、分子量の測定は、Agilent OpenLab GPC/SEC アドオンソフトウェアで 1 つのソフトウェアソリューションにおいて、1 ステップのワークフローを実現しました。

はじめに

mAb のような現代のバイオ医薬品は、非常に不均一な化合物です。最も重要な品質特性 (CQA) の 1 つである凝集体モニタリングは通常、SEC で実施します。この手法では、標準のカラムキャリブレーション後に分子量を計算することにより、化合物を同定できます。さらに、二量体および三量体以上の凝集体のような不必要な高分子量化合物が存在することを示すことにより、純度を確認することができます。必要な分離能を得るためには、2 μ m 以下の粒子材料が充填された最新の SEC カラムが推奨されます。最適な性能を実現するには、2 μ m 以下のカラムとデッドボリウムが可能な限り小さい UHPLC システムを組み合わせる必要があります。デッドボリウムが大きい場合、分散効果によってカラムの分離能が低下します。さらに、完全なイナート仕様の 1290 Infinity II Bio LC は、SEC バッファでよく見られる高塩濃度に完全対応しており、最小限のメンテナンスコストで信頼性の高い結果が得られます。

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC での最新の 2 μ m 以下の SEC カラムを使用し、デッドボリウムが可能な限り少ないシステムを使用することのメリットについて示します。タンパク質および凝集体の分離に対するデッドボリウムの影響について実証するために、内径の異なるキャピラリーを使用しました。十分に特性解析された NISTmAb を使用して pH および熱的ストレスにより多数の凝集体を生成し、次に二量体、三量体、およびそれ以上の凝集体を分離します。

実験方法

機器

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、一体型サンプルサーモスタット付き (#101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 μ L 搭載

追加部品

Agilent 1290 Infinity II Bio 超低拡散キット (G7132A#006)

ソフトウェア

Agilent OpenLab バージョン 2.5 および GPC/SEC アドオンソフトウェア V. 1.2

LC メソッド

パラメータ	設定値
溶媒	リン酸緩衝液 (PBS)、pH 7.4
流量	0.35 mL/min
イソクラティック分離	
カラム温度	30 °C
サンプル温度	4 °C
ニードル洗浄	水で 3 秒間
注入量	5 μ L
検出 (VWD)	280 nm、データレート 20 Hz

カラム

Agilent AdvanceBio SEC、200 Å、4.6 $\times$ 300 mm、1.9 μ m (p/n PL1580-5201)

サンプル

- キャリブレーション用タンパク質混合物 (p/n 5190-9417)：サイログロブリン (670,000 Da)、 γ -グロブリン (150,000 Da)、オボアルブミン (45,000 Da)、ミオグロビン (17,000 Da)、アンギオテンシン II (1,000 Da)
- ヒト化モノクローナル抗体 (mAb) のトラスツマブ (ハーセプチンとして販売) は Roche (バーゼル、スイス) から入手しました。トラスツマブは、30 mM リン酸バッファ (pH 6.8) に溶解しました。
- Agilent NISTmAb、ヒト化 IgG1 κ mAb (p/n 5191-5745)

pH/温度ストレスを加えた NISTmAb 用のプロトコル

mAb を移動相で最終濃度 2 mg/mL に希釈しました。pH ストレスは、他の文献に記載されている方法にわずかな変更をして実施しました。¹ 1 M HCl をゆっくりとサンプル溶液に滴下して、pH を 6.0 から 1.0 にしました。その後、1 M NaOH を追加して pH を 10.0 に調整しました。最終的に、1 M HCl を追加して pH を再び調整して 6.0 に戻しました。pH が推移する間に約 1 分間の待ち時間を設定し、一定速度でわずかに攪拌しました。この溶液を 60 °C で 60 分間インキュベートしました。

溶媒と試薬

- PBS** : 1 錠を 200 mL の脱イオン水に溶解すると、25 °C で 0.01 M リン酸バッファ、0.0027 M 塩化カリウム、0.137 M 塩化ナトリウム、pH 7.4 の溶液が得られます。
- 試薬はドイツの VWR から購入しました。
- 超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

結果と考察

タンパク質の SEC 分離用の最新カラムには 2 μm 未満の粒子を含む材料が充填されており、最適な分離能を実現します。ただし、この場合には、デッドボリュームが低く最適化された機器が必要になります。これは、特に内径が大きいキャピラリーが、分離能を低下させる場合があるためです。3 種類の二量体を含む、5 種類のタンパク質混合物を 1290 Infinity II Bio LC を使用して分離した結果を図 1A に示します。デッドボリュームと分散効果を最小限に抑えるために、内径 0.07 mm のキャピラリーを使用して分離しました。サイログロブリンの溶出時間が早い (4.947 分) 二量体も部分的に分離されました。分子量測定のためのキャリブレーションを設定するために、この混合物中のすべてのタンパク質を使用して検量線を作成しました (図 1B)。曲線が最適に適合したのは 4 次の場合でした。

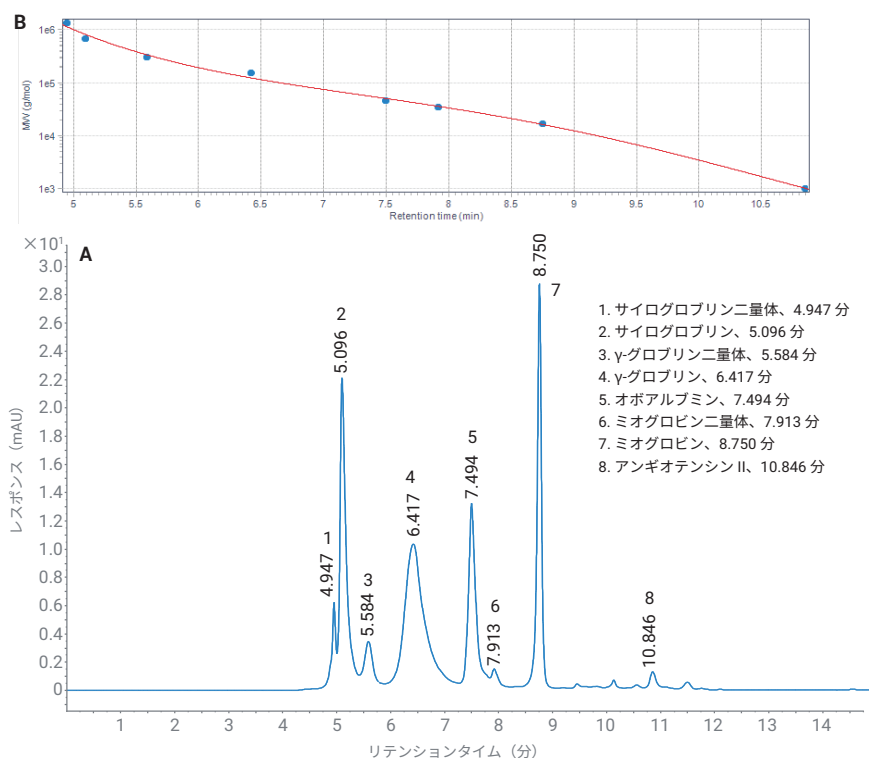


図 1. (A) Agilent AdvanceBio SEC、200 Å、4.6 × 300 mm、1.9 μm と、0.07 mm キャピラリーを含む Agilent 1290 Infinity II Bio 超低拡散キットを組み合わせ、3 種類の二量体を含む 5 種類のタンパク質混合物を分離した結果。(B) いくつかの二量体を含むタンパク質混合物を用いた、分子量測定の SEC 検量線

キャリブレーションを使用して、mAb トラスツマブおよび構成した二量体凝集体の分子量を測定しました（図 2）。抗体は 6.489 分に溶出し、対応する二量体凝集体は 5.673 分に溶出しています（図 2A）。トラスツマブと二量体の最大ピークで測定された分子量はそれぞれ、Mp 141,566 Da および Mp 321,609 Da でした。分子量分布を図 2B に、計算した分子量を下の表（2C）に示します。

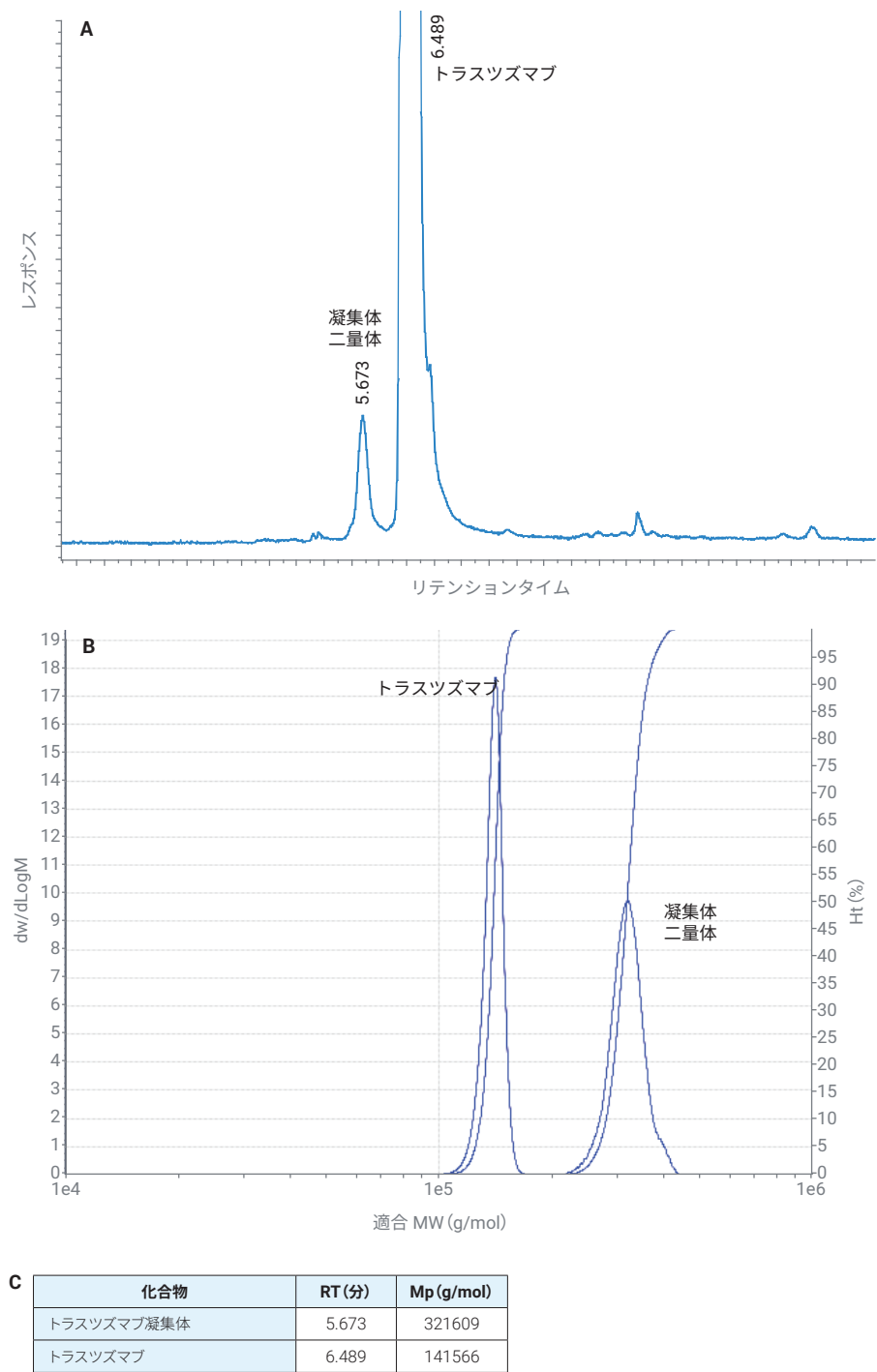


図 2. トラスツマブと二量体凝集体、分子量の測定。(A) 二量体凝集体からのトラスツマブ単量体の SEC 分離。(B) トラスツマブと二量体凝集体の分子量。(C) トラスツマブとその凝集体の分子量を示す表。
Mp：最大ピークでの分子量

使用したキャピラリーの内径の影響を、内径 0.07 (ULD)、0.12、0.17 mm のキャピラリーで比較して示します。影響を実証するために、タンパク質混合物 (図 1 参照) の 2 番目および 3 番目のピークの高さを測定しました (図 3)。ピーク 2 とピーク 3 の分離能の最高値は、内径 0.07 mm のキャピラリーで得られました (図 3 の表)。ピーク半値幅を測定するために、タンパク質混合物のピーク 2 を使用しました。測定した値から、内径が大きいキャピラリーを使用した際にピーク幅が増大することがわかりました。

トラスツズマブとその凝集体の分離に対するキャピラリーの影響を図 4 に示します。今回、別の低分子量化合物がメインピークの下に隠れていたことがわかっています。このピークは、0.17 mm キャピラリーではわずかなショルダーとしてのみ分離されていますが、0.07 mm キャピラリーではより明確に表示されています。

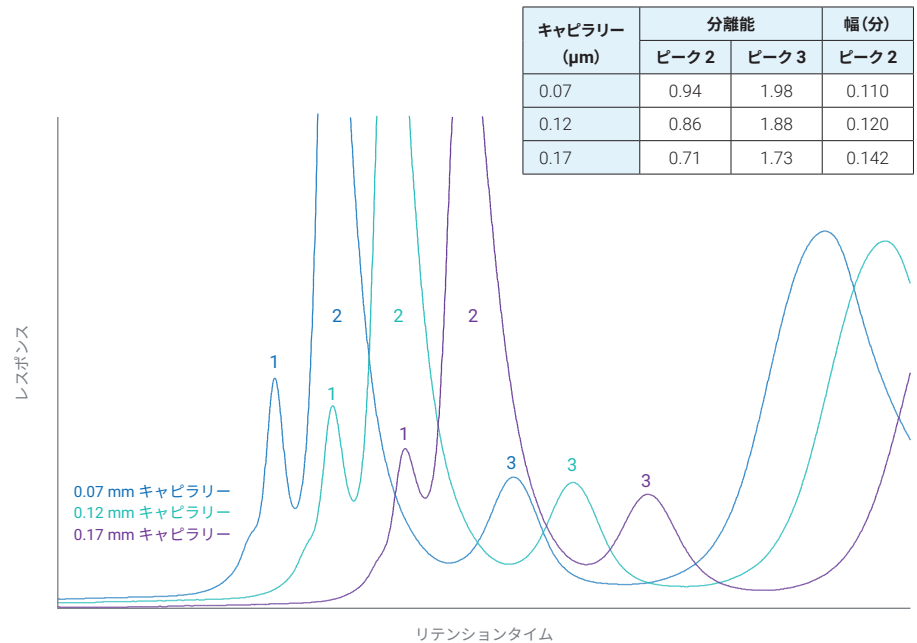


図 3. キャピラリーの内径を増大させた場合の分離能とピーク幅に与える影響の比較

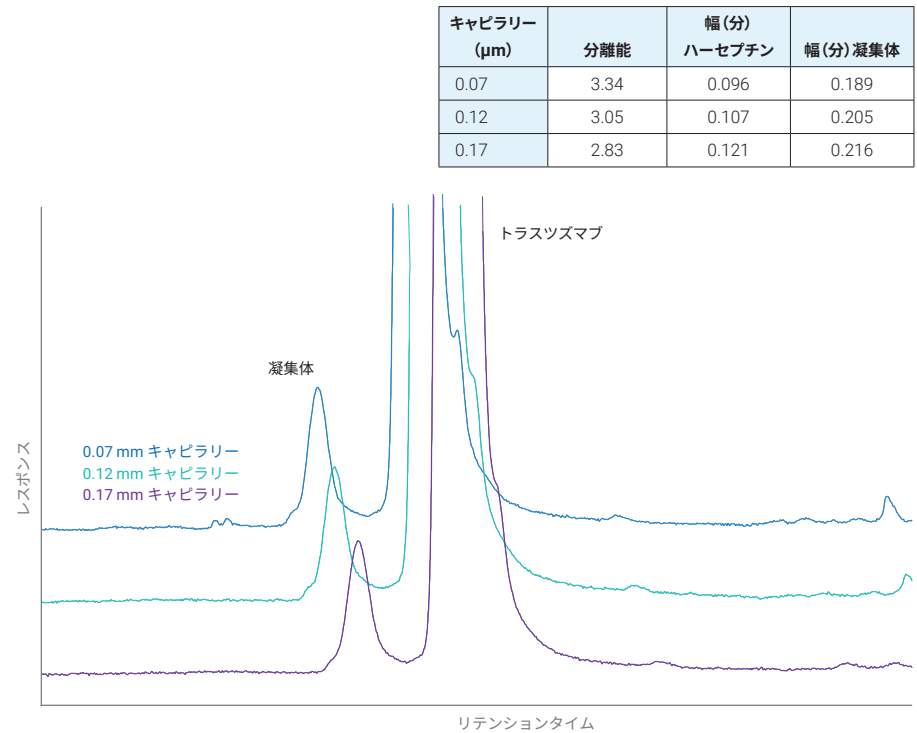


図 4. 使用したキャピラリーの内径に応じた、二量体凝集体からのトラスツズマブの分離能と二量体のピーク幅

リテンションタイムとピーク面積の RSD 値は、すべてのキャピラリーで優れています (表 1)。

別の例として、十分に特性解析された NISTmAb (ヒト化 IgG1κ mAb) を凝集体から分離し、分子量を測定しました (図 5)。

表 1. 使用したすべてのキャピラリーでのトラスツマブのリテンションタイムとピーク面積の RSD。リテンションタイムが増大しているのは、異なるセットのキャピラリーの容量が増大しているためです。

	0.07 mm キャピラリー		0.12 mm キャピラリー		0.17 mm キャピラリー	
	RT	面積	RT	面積	RT	面積
平均	6.464	1736.13	6.500	1727.05	6.554	1717.29
RSD (%)	0.02	0.10	0.01	0.28	0.01	0.25

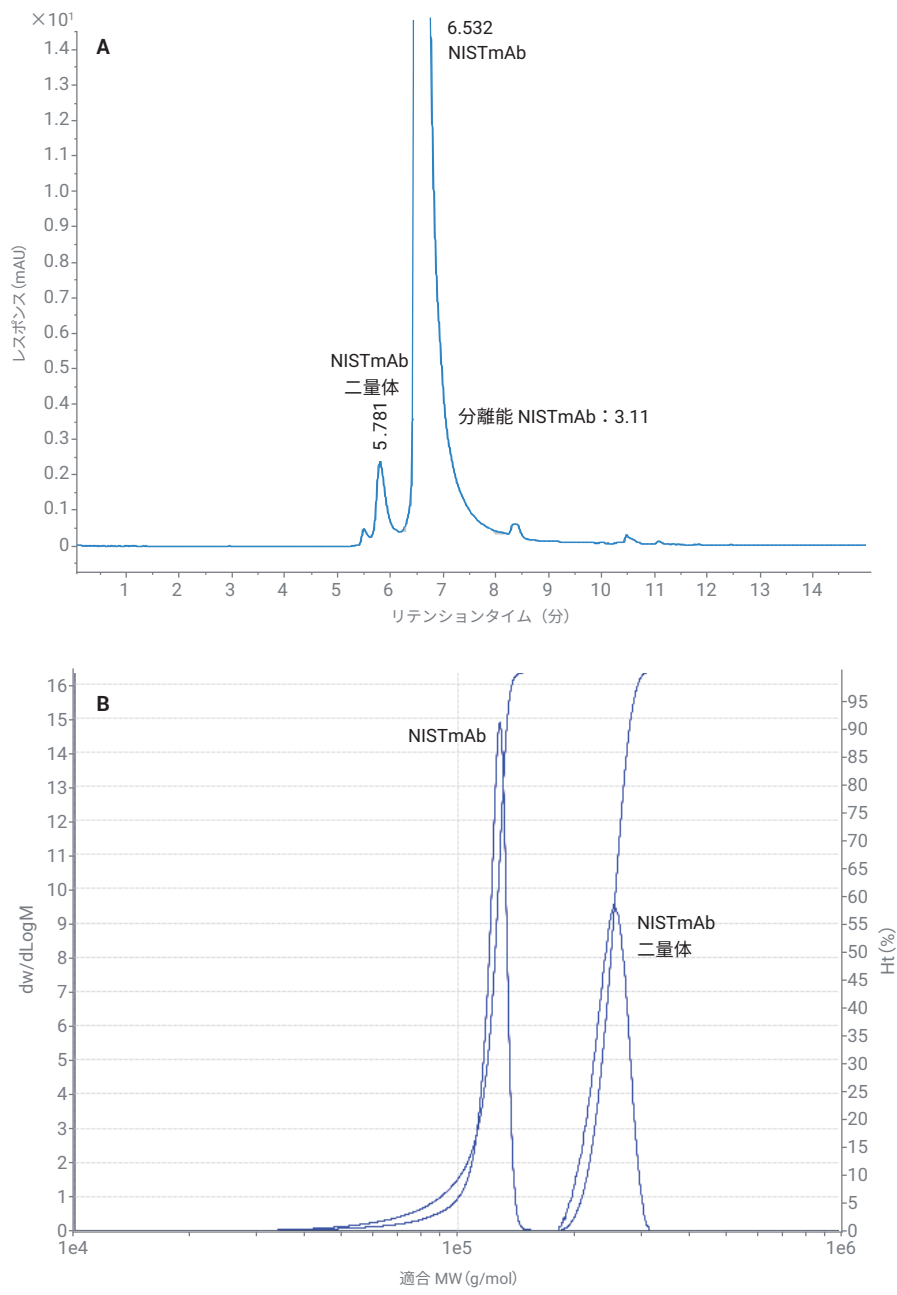


図 5. (A) 分離能 3.11 によるメイン二量体凝集体からの NISTmAb の分離。(B) NISTmAb とその凝集体の分子量。(C) NISTmAb とその凝集体の主なピーク特性解析の値を示す表。(D) NISTmAb とその凝集体の分子質量を示す表

pH ストレスおよび温度ストレス条件下では（「実験方法」のセクションを参照）、この mAb は高凝集体を形成する場合があります（図 6）。超低分散キャピラリーを使用すると、高凝集体を分離できます（図 6A）。ピーク特性解析による分子量分布と値を、図 6B と関連する表に示します。

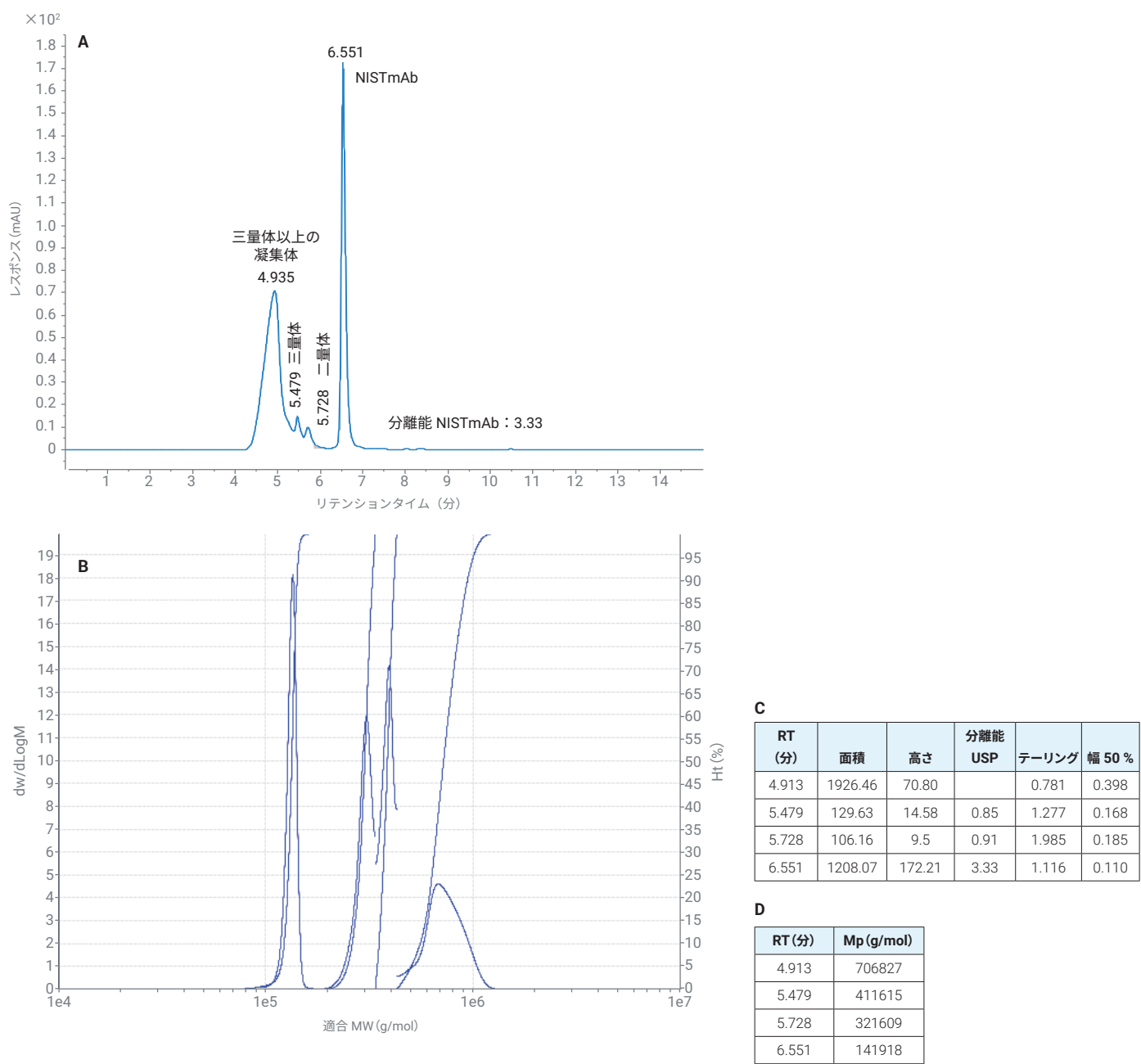


図 6. (A) pH ストレスを加えた NISTmAb からの凝集体の分離。(B) NISTmAb のストレス条件下で発生した凝集体の分子量分布。(C) NISTmAb とその凝集体の主なピーク特性解析の値を示す表。(D) NISTmAb とその凝集体の分子質量を示す表

結論

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC と AdvanceBio SEC カラムを組み合わせ、システムの最低のデッドボリュームと超低分散キャピラリーにより、最高の分離能でタンパク質とその凝集体を分離する能力について実証しました。1290 Infinity II Bio LC は、高塩バッファで動作できる完全にイナート仕様のシステムです。これにより、最高の分離能性能で最低のメンテナンスコストが実現します。

参考文献

1. Quantitation of mAb and ADC Aggregation Using SEC and an Aqueous Mobile Phase. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6303EN, **2016**.

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

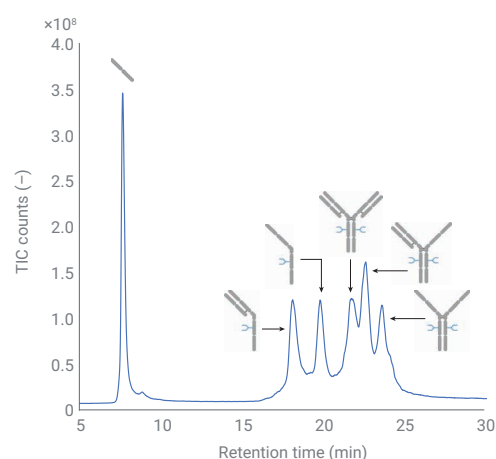
Printed in Japan, October 22, 2020

5994-2709JAJP

DE.1846180556

製品関連の mAb フラグメントのモニタリング

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いた
インタクトプロテイン分析による低分子量種の
UV および MS 検出



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

概要

低分子量 (LMW) 種や高分子量 (HMW) 種のような製品関連の不純物は、治療用モノクローナル抗体 (mAb) 製品の重要品質特性 (CQA) であると考えられており、医薬品の製造プロセス全体でモニタリングする必要があります。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと PEEK ライナ付き Agilent PLRP-S カラムを組み合わせた優れた性能に基づく RPLC メソッドを開発しました。NISTmAb の還元した重鎖および軽鎖を分析することにより、グラジエント勾配がきわめて緩やかな場合でも、優れた相対リテンションタイムと面積偏向が得られました。メソッド開発後は、2 つの重鎖 (H2) または 2 つの重鎖と 1 つの軽鎖 (H2L) のような関連するすべての LMW フラグメントを分離して検出できました。このメソッドは、UV および MS 検出器を連続して組み合わせているため、バイオ医薬品の製造チェーンの一部の領域で使用できます。さらに、このメソッドは SDS-PAGE/CE-SDS の代替でもあり、LMW 種と翻訳後修飾 (PTM) という 2 つの CQA を 1 回で分析できる可能性が示されました。

はじめに

mAb はバイオ医薬品の主要な製品クラスであり、さまざまな疾患を適切に処置してきました。¹これらの生体分子には保存されているヘテロ四量体構造が含まれており、これはジスルフィド結合で接続された 2 つの重鎖と 2 つの軽鎖で構成されています。製造時や不適切な保管状態において、LMW 種 (図 1 を参照) または HMW 種 (抗体ダイマーなど) のような製品関連の不純物が形成される場合があります。これらの不純物は多くの精製ステップの後でも存在する場合があります、医薬品ではこれらの不純物を CQA としてモニタリングすることが非常に重要になります。抗体ダイマー、三量体、高い凝集体のような HMW 種は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と UV 検出によりルーチン分析と分離が可能です。²SEC と MS 検出を組み合わせることで実施することにより、分子量と PTM に関連する不純物を詳細に特性解析できます。³重鎖 (H)、軽鎖 (L)、H2L フラグメントのような LMW 種は、キャピラリー電気泳動-ドデシル硫酸ナトリウム (CE-SDS) により分析できます。⁴ただし、CE-SDS は、SDS による高いイオン抑制が原因で MS 検出と組み合わせることができないため、多くの場合は経験的知識に基づいて LMW 種を同定します。このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC と PEEK ライナ付き PLRP-S カラムの優れた性能に基づいた、mAb の LMW 種の代替分析手法について説明します。ルーチン分析であれ詳細分析であれ必要に応じて、逆相液体クロマトグラフィー (RPCLC) モードを用いて、NISTmAb の関連する還元誘導された LMW フラグメントをすべて UV および MS で検出できます。

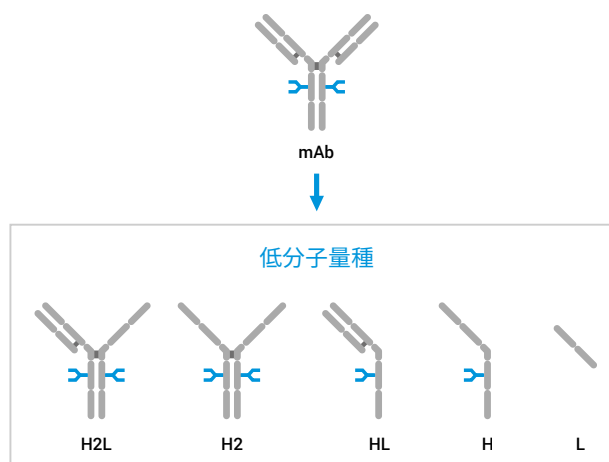


図 1. モノクローナル抗体 (mAb) の還元誘導 LMW 種の概略図。

略語: H2L (2 つの重鎖と 1 つの軽鎖)、H2 (2 つの重鎖)、HL (1 つの重鎖と 1 つの軽鎖)、H (重鎖)、L (軽鎖)

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせて、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプル (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、標準のフロークイック搭載
- Bio 熱交換器 (G7116-60071) と 2 つの Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) を接続
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B)、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (B.09.00 以降)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (10.0 以降)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 以降)

カラム

Agilent PLRP-S 5 μ m 1000 Å、2.1 $\times$ 100 mm PEEK ライナ付き (p/n PL1912-2502PK)

試薬

Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル (p/n 5191-4496) および Agilent-NISTmAb (p/n 5191-5744) を使用しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。DL-ジチオスレイトール (DTT) は Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

サンプル前処理

NISTmAb を部分的に還元するために、1290 Infinity II Bio マルチサンプルにおいて、茶色ガラスバイアルで 4 °C で、40 µg を 1 mM DTT とともに直接インキュベーションしました。40 µg の NISTmAb を 10 mM DTT とともに 60 °C で 30 分間インキュベーションして、重鎖 (H) および軽鎖 (L) に完全に還元しました。注入濃度は 1 mg/mL の NISTmAb または還元した NISTmAb でした。

表 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用してインタクト NISTmAb および対応する LMW 種を分析するための LC メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent PLRP-S 5 µm 1,000 Å, 2.1 × 100 mm PEEK ライニング
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 B) アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
グラジエント	0.00 分 – 25 % B 9.00 分 – 30 % B 34.00 分 – 38 % B 34.01 分 – 100 % B 36.00 分 – 100 % B 36.01 分 – 25 % B 40.00 分 – 25 % B
流量	0.400 mL/min
温度	60 °C、熱平衡化デバイス搭載
UV 検出器	VWD : 280 nm、10 Hz/MS : 表 2 を参照
注入	注入量 : 0.3 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : 水で 3 秒間 (フラッシュポート)

表 2. インタクト NISTmAb および対応する LMW 種を分析する際のイオン源および MS のパラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-ToF
ガス温度	350 °C
ドライガス流量	12 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
VCap	4,000 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ	180 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
取り込みモード	ポジティブ、拡張 (m/z 10,000) 質量範囲
質量範囲	m/z 100 ~ 10,000
取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	m/z 922.0098

結果と考察

製造から品質管理までの製造プロセス全体でバイオ医薬品を分析する場合、LC システムで分析可能な最高の性能が要求されます。mAb フラグメントの分析に関する 1290 Infinity II Bio LC の性能を評価するために、NISTmAb を DTT で完全に還元して H および L フラグメントを生成しました。図 2 に、7 回の連続注入における相対リテンションタイムと面積の相対標準偏差 (RSD) を示します。これにより、1290 Infinity II Bio LC と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の組み合わせにおいて、リテンションタイムと面積精度が優れており、mAb フラグメントの緩やかなグラジエントでの分析に最適であることがわかります。LC メソッドが、勾配 0.32 および 0.55 % B/min の 2 つの直線グラジエントで構成されている場合でも、リテンションタイムの RSD 値は 0.190 % (L) および 0.056 % (H)、面積精度の RSD 値は 0.530 % (L) および 0.744 % (H) と低く抑えられています。

LMW 種を RPLC で分析する際の主な課題の 1 つは、H2 や H2L のような抗体フラグメントを分離するには分解能が不十分であるということです。この原因は、実際の mAb と疎水性が類似しているためです。これらのフラグメントは、発酵プロセスまたは最終製品での部分的な還元により生成される場合があります。ただし、これらのフラグメントは、少量の DTT とともに温度を下げた状態で長時間にわたって部分的な還元を実施することにより、人工的に生成することもできます。この手法を使用して、PEEK ライナ付き PLRP-S と 1290 Infinity II Bio LC をベースにした RPLC メソッドを開発しました。

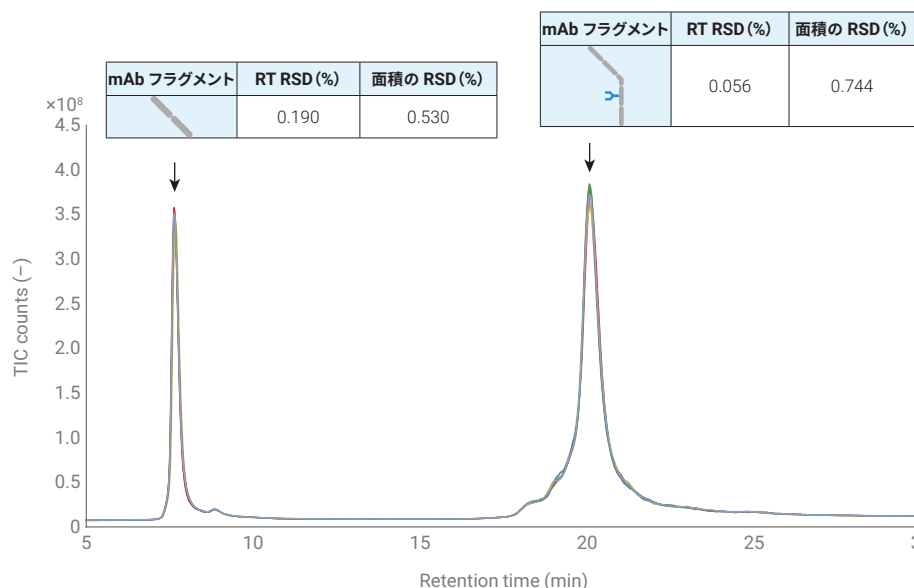


図 2. NISTmAb を還元することによって得られる重鎖および軽鎖フラグメントを分析した相対リテンションタイムと面積精度 (RSD, n = 7)

図 3 のクロマトグラムから、1290 Infinity II Bio マルチサンプルで NISTmAb が動的に還元されていることがわかります。図 1 に示されている関連する mAb フラグメントはすべて適切に分離されており、DTT の追加が原因で長時間にわたって変化しています。特に、H2、H2L フラグメント、NISTmAb は RPLC で非常に良好に分離されており、LMW の分析において PEEK ライナ付き PLRP-S カラムと 1290 Infinity II Bio LC を組み合わせたメソッドが適切であることを示しています。RPLC モードが存在するために、1290 Infinity II Bio LC システムを 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と簡単に組み合わせることができ、MS データを Agilent MassHunter BioConfirm で解析できます。図 3 のスペクトルは、デコンボリューション後のそれぞれのフラグメントの主なグリコフォームを示してい

ます。NISTmAb 固有のグリコシル化により、このメソッドで複数のフラグメントの PTM を簡単に分析できることがわかります。さらに、図 4B は、mAb ピーク周辺におけるフラグメントのクラスタリングに対する代表的なイオンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示しています。これらの EIC は、PEEK ライナ付き PLRP-S カラムの高い分解能の結果として、良好なピーク形状も実現しています。

1290 Infinity II 可変波長検出器と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を連続して組み合わせた機器設定により、1 回の分析でバンドをほぼ拡大せずに、プロセス開発から品質管理まで利便性の高いメソッドを移管しなくても、UV および MS 検出を実行できます (図 4A)。

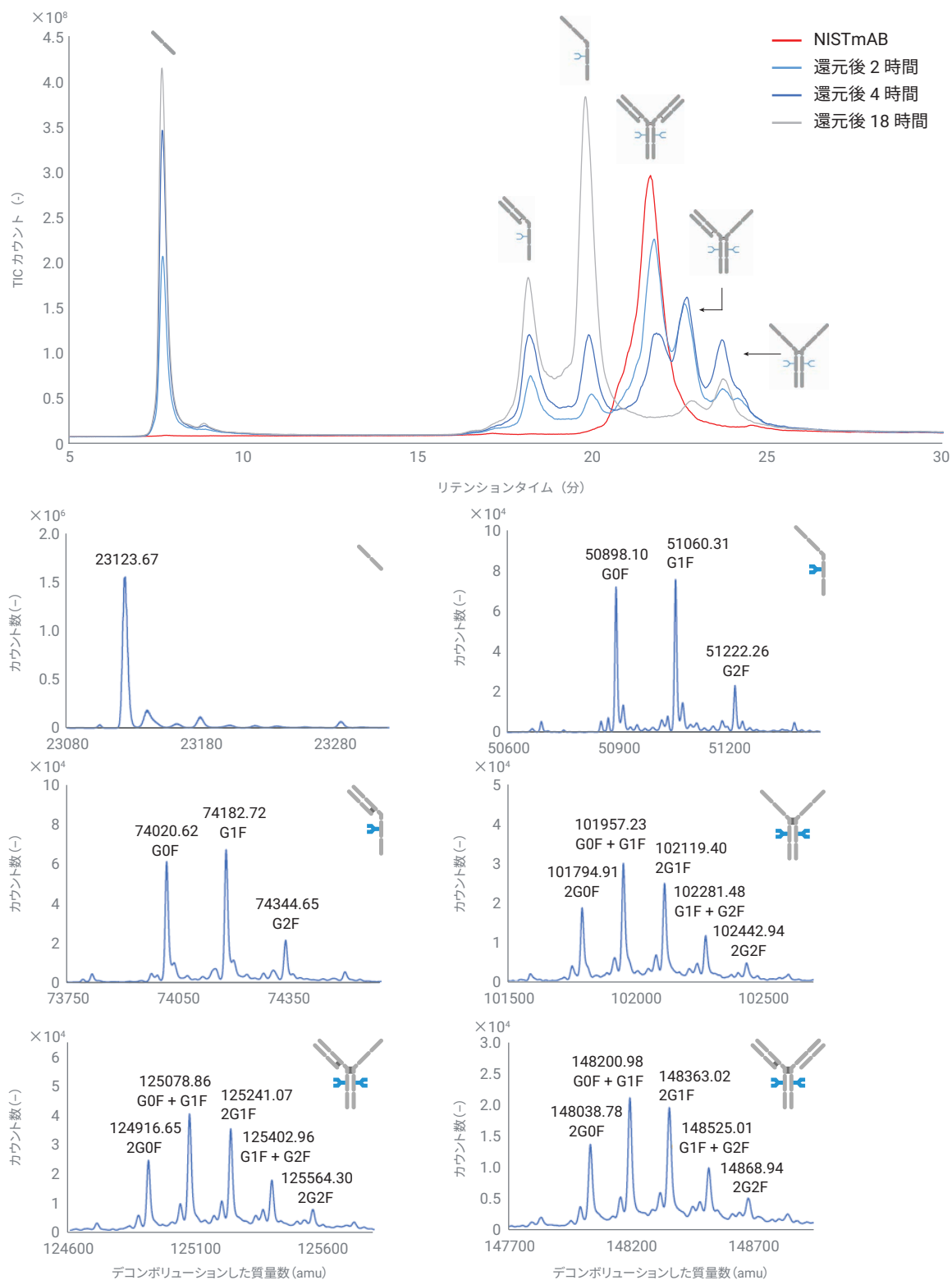


図 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC で分離され Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF で検出された NISTmAb の動的な部分的還元クロマトグラム。それぞれのフラグメントに対応する抽出スペクトルは、NISTmAb 固有のグリコシル化を示しています。

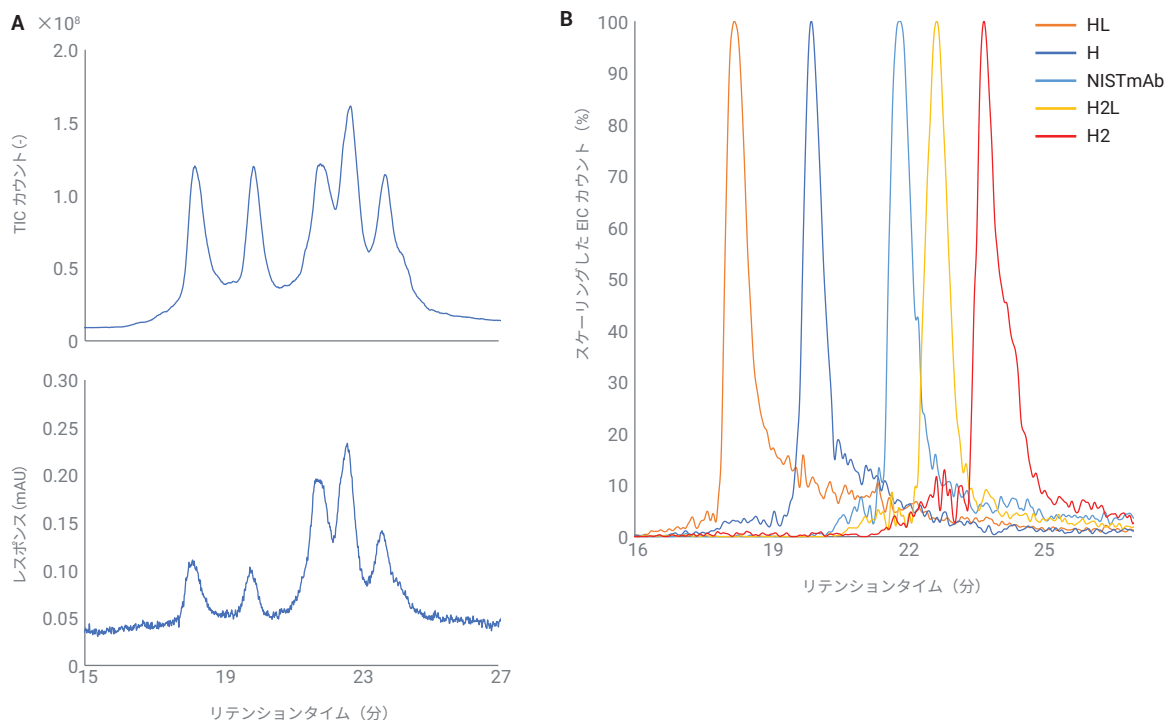


図 4. 1 回の分析で取得した NISTmAb 周辺のフラグメントクラスターリングの MS および UV クロマトグラム (A)。優れたピーク形状を示す NISTmAb フラグメントの抽出イオンクロマトグラム (B)

結論

LMW や HMW 種のような製品関連の不純物の分析においては、従来の SDS-PAGE と最新で同等の CE-SDS が広く使用されています。ただし、これらのメソッドで LMW 種の構造を同定することは困難であり、主に経験的知識に基づいていました。このアプリケーションノートでは、NISTmAb の関連するすべての還元起因 LMW 種を分離できる RPLC メソッドについて説明しました。1290 Infinity II

Bio LC は、重鎖および軽鎖フラグメントの分析を基にして、優れたリテンションタイムと面積精度値を実現できました。1290 Infinity II Bio マルチサンプリングでの NISTmAb の動的な還元とそれに続く 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による検出により、このメソッドが翻訳後修飾の分析に最適であることがわかりました。この能力をフラグメント分析と組み合わせることにより、バイオ医薬品開発を加速できます。これは、PEEK ライナ付き PLRP-S カラムと 1290 Infinity II Bio LC が、最終の品質管理までの製造プロセス全体にわたるバイオ医薬品の分析において将来的なニーズにも対応できる組み合わせであるためです。

参考文献

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000.
- Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2709EN, **2020**.
- Vandenhede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0303EN, **2018**.
- Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

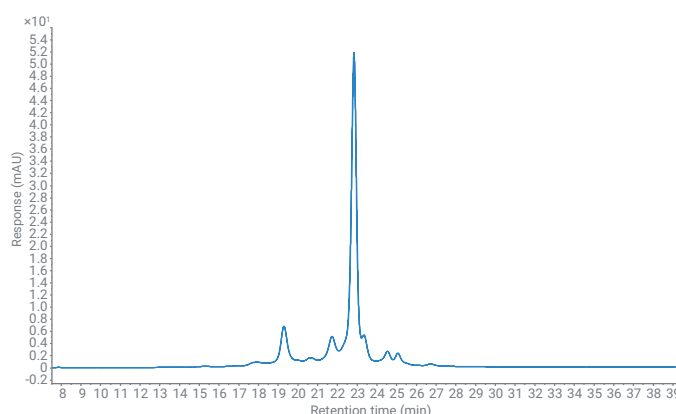
email_japan@agilent.com

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, January 29, 2021
5994-3021JAJP
DE44181.2356018519

カチオン交換分析の便利なカスタマイズ

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システム、
Agilent Buffer Advisor ソフトウェア、および pH グラジエントを
組み合わせた高分離能電荷変異体分析



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

モノクローナル抗体の電荷変異体の分離は、クロマトグラフィー技術者にとって困難な作業になる可能性があります。分析対象のモノクローナル抗体には微小不均一性があるため、最適な分離能を見つけるには、大がかりなメソッド開発が必要になることがあります。pH グラジエントの分離能は、従来の塩グラジエントより優れていることが多く、極めて効率的に電荷変異体を分離できます。このアプリケーションノートでは、異なるタイプの pH グラジエントを使用した、トラスツズマブと NIST mAb の 2 つのモノクローナル抗体の高分離能で再現性のある電荷変異体分析について説明します。

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは流路にまったく鉄を含まず、Agilent 1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプを備えており、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用して、わずか 4 つの原液から溶媒の動的混合をすることができます。

はじめに

治療用モノクローナル抗体（mAb）は非常に不均一な分子であり、多数の変異体で構成されています。多数の変異体の存在はこの種のバイオ医薬品では自然に起こることであり、必ずしも不純物とは見なされません。溶液中のタンパク質は多くの場合、水性媒体へのタンパク質界面に極性および荷電アミノ酸を持っていますが、疎水性残基は疎水性相互作用のために自己会合する傾向があります。周囲の液体と接触しているタンパク質の「外側」にあるこれらのアミノ酸は、修飾されやすくなっています。¹

変異体はタンパク質の微小不均一性とも呼ばれ、抗体産生中の翻訳後修飾に由来することがあります。さらに、精製プロセス・配合・および/または保管後に修飾されることもあります。² しかし、その変異体が医薬品タンパク質に存在する場合、生物学的活性が異なったり、免疫原性が強まる可能性があります。² したがってバイオ医薬品の安全性と有効性を確保するためには、mAb の微小不均一性は広範な特性解析の対象となります。

カチオン交換クロマトグラフィー（CEX）は、モノクローナル抗体の電荷変異体分析の標準分析法と見なされています。³ 従来の塩グラジエントは、メソッドが完全に最適化されていれば高い分離能を発揮します。ただし、タンパク質分離を目的とした高分離能イオン交換法を開発するのに必要な労力は、非常に大きくなる可能性があります。塩濃度、移動相の pH 値、および添加剤などは、最適化すべきパラメータのごく一部です。さらに、すべての分子、特に生体分子は異なる挙動を示す可能性があり、開発されたメソッドに対する要求は、実験パラメータの大きな変化、特に pH 値に関して厳しくなります。^{1, 4}

pH グラジエントベースの CEX は、クロマトフォーカシングとしても知られていますが、mAb 電荷変異体を分離するために高分離能で堅牢なメソッドを実現します。^{1, 4, 5} 通常のイオン交換クロマトグラフィー（IEX）では、バッファのイオン強度（おもに NaCl などの塩）を増加させることにより、分子をカラムから溶出させます。対照的に pH グラジエントでは、バッファの pH の変化に伴って、結合した分子が溶出します。これにより、正味の表面電荷が変化し、分子が電氣的に中性である等電点（pI）における結合分子の溶出が可能となります。

より一般的なワイド pH グラジエントメソッドでは、単一のバッファシステム内で異なる抗体から変異体を分離できます。¹ また、pH グラジエントベースメソッドのメソッド開発は、従来のイオン強度ベースの IEX と比較して、より簡単に大幅に短縮されます。

1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に特化して設計されたアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムです。また、サンプル流路全体にステンレス（SST）と鉄分がまったく存在していません。マルチサンブラ、マルチカラムサーモスタット、検出器全体のキャピラリーとフィッティングはすべて、ニッケル-コバルト合金の MP35N 製です。この材質を使用することにより、高塩含有バッファによる腐食の可能性が低減され、鉄イオンの存在により引き起こされるタンパク質の修飾（酸化、タンパク質複合体の形成など）を防止できます。

1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプはクォータナリポンプとして使用でき、Buffer Advisor ソフトウェアを用いれば 4 つの原液のみから溶媒の動的混合を容易に実現できます。その結果、バイオ分析ワークフローが簡素化され、バッファの準備に必要な時間が大幅に短縮されます。Buffer Advisor ソフトウェアを使用すると、IEX のポンプタイムテーブルを計算するだけで、4 液から成る塩グラジエントと pH グラジエントをすばやく簡単に生成できます。

このアプリケーションノートでは 2 つの異なる pH グラジエントを使用して、トラスツズマブと NIST mAb 参照標準の電荷変異体の分析について説明します。

実験方法

装置

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、次のモジュールで構成されます。

- Agilent 1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプ（G7131C）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ（G7137A）、サンプルサーモスタット付き（オプション #101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、標準フローバイオコンパチブル熱交換器搭載
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（G7114B）、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 μ L 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5 以降

カラム

Bio MAb、NP5、2.1 $\times$ 250 mm、PEEK（部品番号 5190-2411）

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸水素二ナトリウム七水和物、塩化ナトリウム、トリス（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）、イミダゾール、塩酸、およびピペラジン六水和物は、Sigma-Aldrich（ドイツ、シュタインハイム）から入手しました。

サンプル

- Agilent-NISTmAb
(部品番号 5191-5744)
- ヒト化モノクローナル抗体トラスツマブ
(ハーセプチンとして販売)。Roche (スイス、バーゼル) から入手しました。トラスツマブは 30 mM リン酸緩衝液、pH 6.8 に溶解しました。

バッファの前処理

バッファは、Buffer Advisor ソフトウェアの原液レシピに従って調製しました (図 1 を参照)。

四級リン酸塩ベースのバッファシステム：Buffer Advisor によって計算

- A：水
- B：1,700 mM 塩化ナトリウム
- C：44.5 mM リン酸二水素ナトリウム
- D：55 mM リン酸水素二ナトリウム

注：この設定は、塩および pH グラジエント溶出ともに使用できます。これにより、直接比較が可能になり、メソッド開発の可能性が高まります。

バイナリワイド pH グラジエントバッファシステム— Buffer Advisor によって計算

Buffer Advisor を使用すると、複合バッファとも呼ばれる広範囲の pH グラジエントを作成できます。これらの場合、グラジエントを作成するために C チャネルと D チャネルのみが使用されます。この実験では、Farnan と Moreno¹によって記述された pH グラジエントを使用し、Buffer Advisor の原液組成にユーザー混合物としてバッファ組成を挿入しました (2.4 mM トリス、1.5 mM イミダゾール、11.6 mM ピペラジン、pH 調整用の HCl

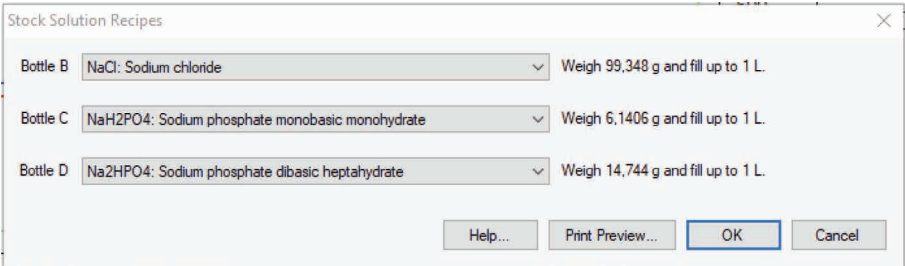


図 1. Agilent Buffer Advisor 原液レシピ：四級リン酸バッファシステム

pH 6 & C および 10.5 & D)。このオプションにより、ユーザーはバッファ組成物を自作して、目的の pH 範囲を実現できます。Buffer Advisor は、双方のバッファ混合物のイオン強度 (IS) とバッファキャパシティ (BC) を計算します。

- A：水
- B：n/a
- C：pH = 6、IS = 22.5 mM、BC = 6.19 mM
- D：pH = 10.5、IS = 0.717 mM、BC = 2.31 mM

メソッド

表 1. 四級リン酸塩ベースのバッファシステム：塩グラジエントクロマトグラフィーの条件

パラメータ	設定値
溶媒	A：水 B：1,700 mM 塩化ナトリウム C：44.5 mM リン酸二水素ナトリウム D：55 mM リン酸水素二ナトリウム
グラジエント	グラジエント 0 ～ 30 分：10 ～ 110 mM NaCl (30 mM リン酸バッファ、pH 6.8)。 30 ～ 31 分：洗浄ステップ 500 mM NaCl ストップタイム：31 分 ポストタイム：15 分
流量	0.200 mL/min
温度	30 °C
検出	280 nm 10 Hz
注入	注入量：4 µL サンプル温度：8 °C 水でのニードル洗浄：3 秒

表 2. 四級リン酸ベースのバッファシステム—pH グラジエントクロマトグラフィーの条件

パラメータ	設定値
溶媒	A：水 B：1,700 mM 塩化ナトリウム C：44.5 mM リン酸二水素ナトリウム D：55 mM リン酸水素二ナトリウム
グラジエント	グラジエント 0 ～ 30 分：pH 7 ～ 8.4 (30 mM リン酸バッファ、pH 6.8)。 30 ～ 31 分：洗浄ステップ 500 mM NaCl ストップタイム：31 分 ポストタイム：15 分
流量	0.200 mL/min
温度	30 °C
検出	280 nm 10 Hz
注入	注入量：4 µL サンプル温度：8 °C 水でのニードル洗浄：3 秒

注：高濃度の塩溶液を溶出液として使用する際には、ポンプメソッドにおいて対応する溶媒タイプの設定を検討してください。したがって例えば、1,700 mM NaCl を使用するリン酸バッファグラジエントの溶媒 B の場合、ポンプメソッドの溶媒選択フィールドで、[Generic Aqueous (一般的な水)] や [Water (水)] ではなく、「Sodium Chloride 1.5 M (塩化ナトリウム 1.5 M)」を使用します。大量の塩を加えると溶媒の圧縮率が変化するため、あらかじめ設定された溶媒テーブルを使用することによりポンプの性能を最大限に引き出すことができます。

結果と考察

Buffer Advisor を使用すると、塩と pH グラジエント勾配の両方が計算できます。このアプリケーションノートの実験方法のセクションで説明されている四級リン酸バッファを使用すると、トラスツズマブの電荷変異体を分離するために使用する両方のバージョンを計算できます。

図 2 は、2 つのクロマトグラムの重ね表示を示しています。トラスツズマブの電荷変異体を、フラットな塩グラジエント（青）と pH 7 ～ 8.4 のリン酸バッファ pH グラジエント（緑）で分離したものです。塩と pH グラジエントによる分離は同等ですが、pH グラジエントを使用すると分離能がわずかに向上します。

表 3. バイナリワイド pH グラジエントバッファシステム / Farnan pH グラジエント

パラメータ	設定値
溶媒	A : n/a B : n/a C : pH = 6、IS = 22,4 mM、BC = 6,14 mM (Farnan バッファ ¹⁾) D : pH = 10,5、IS = 0,717 mM、BC = 2,31 mM (Farnan バッファ ¹⁾)
グラジエント	トラスツズマブグラジエント : 0 ～ 50 分、pH 8.3 ～ 10、それに続く 51 ～ 55 分、pH 10.5 での「洗浄」ステップ ストップタイム : 55 分 ポストタイム : 20 分 NISTmAb グラジエント : 0 ～ 45 分、pH 8.9 ～ 10.5 ストップタイム : 50 分 ポストタイム : 20 分
流量	0.200 mL/min
温度	30 °C
検出	280 nm 10 Hz
注入	注入量 : 4 µL サンプル温度 : 8 °C 水でのニードル洗浄 : 3 秒

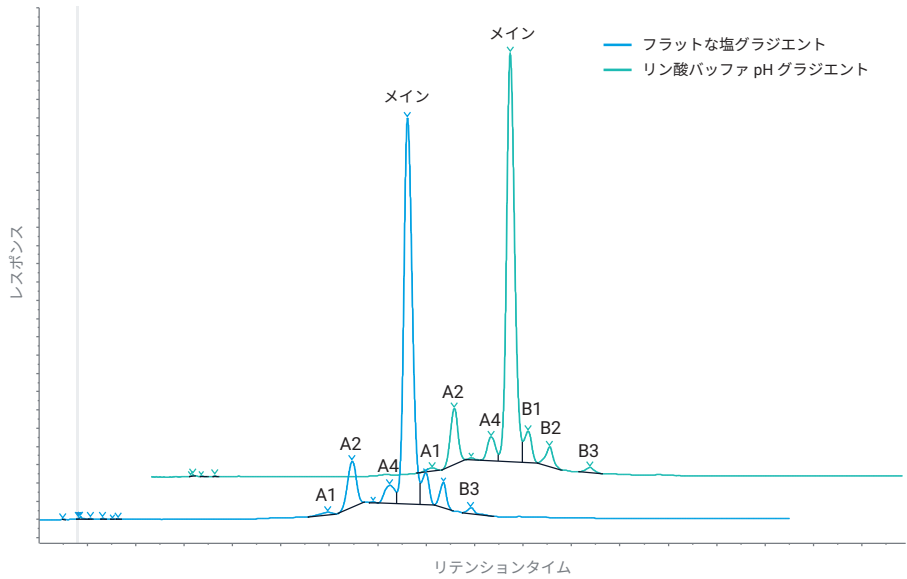


図 2. フラットな塩グラジエント（青）と pH 7 ～ 8.4 のリン酸バッファ pH グラジエント（緑）を使用して電荷変異体を分離した際の 2 つのクロマトグラムの重ね表示

Buffer Advisor ソフトウェアの機能の 1 つは、特定のグラジエント内に追加のグラジエントステップを追加して、直線グラジエント（塩および pH）の計算を改善することで目的の pH / プリセットした pH から大きく逸脱することなく完全な直線性を実現することです。この機能を有効にするには、Buffer Advisor ユーザーインターフェース (UI) の 4. Create % Timetable セクションの Optimize Gradient [グラジエントの最適化] ボックスをオンにしてください（図 3A および 3B の赤い円を参照）。

図 3A と B は、ボックスをチェックしない場合 (A) とチェックした場合 (B) のプリセット pH と実際の pH の違いを示しています。Buffer Advisor による追加の最適化を行わないと、実際の pH はプリセット pH から最大 0.4 単位ずれる可能性があり、ユーザーが実行中のグラジエント直線性を信頼することが難しくなります。**Optimize Gradient** [グラジエントの最適化] ボックス（図 3B）をオンにすると、元のグラジエントに追加のステップが挿入され、pH グラジエントの直線性が確保されます。左下の **Result Pump Gradient Timetable** [ポンプグラジエントタイムテーブルの結果] に、挿入された追加のステップが表示され、実際のグラジエントがプリセットグラジエントに可能な限り近くなります。このグラジエントタイムテーブルは、OpenLab のメソッドにエクスポートして、入力に必要な時間を省き簡単に転送できます。



図 3. Agilent Buffer Advisor ソフトウェアのグラジエント機能で最適化して、線形性に優れた pH グラジエントを実現。A は最適化なし、B は最適化されたグラジエントを示しています。

図 4 は、pH 7 から 8.4 までのリン酸バッファ pH グラジエントを使用したトラスツズマブの電荷変異体分析の 7 回の分析結果を重ね表示したものです。最初の 2 つのピークを除いて、リテンションタイム (RT) と面積の相対標準偏差 (RSD) が 0.085 %未満という優れた再現性が得られました。変異体 A3 および B3 は面積と高さが非常に小さいため、面積の再現性が 1 % より高くなっています。

リン酸バッファシステムでは、特に目的の分子の pI が pH 6 ～ 8 のバッファ範囲にない場合、メソッド開発は制限されます。分子の pI が高すぎる場合、このバッファシステムを使用して溶出させることはできません。例えば、pI が 9.18⁶ の NIST mAb は、CEX カラムからの溶出を可能にするために別のバッファシステムが必要になります。

より一般的なアプローチは、複数のバッファシステムで構成される広範囲の pH グラジエントを使用することです。この設定は、Composite Buffer (Wide Range pH Gradient) という名称で Buffer Advisor ソフトウェアにも組み込まれています。Farnan と Moreno (2009) ¹ の pH 範囲 6.0 ～ 10.5 の pH グラジエントは、モノクローナル抗体の電荷変異体を分析するのに適したバッファシステムです。このシステムをさらに使用し、このメソッドをトラスツズマブと NIST mAb 用に最適化しました。

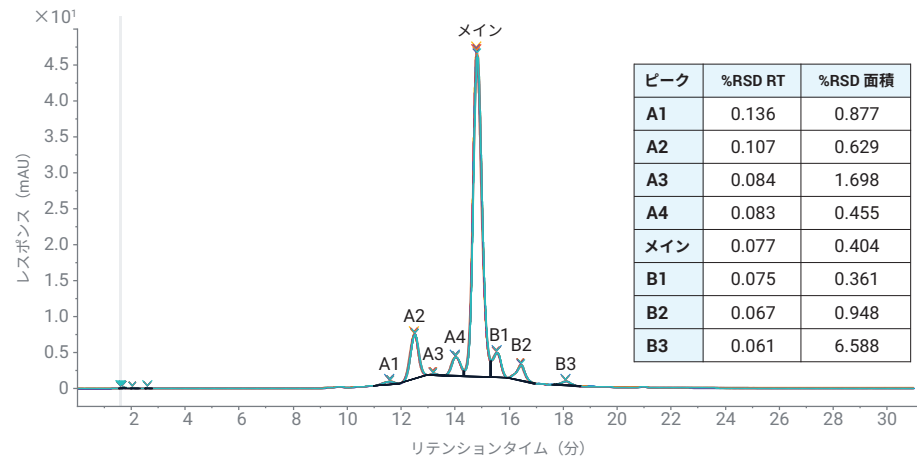


図 4. pH 7 ～ 8.4 のリン酸バッファ pH グラジエントで分析したトラスツズマブの 7 回連続測定を重ね表示 (リテンションタイム (RT) と面積の精度表を含む)

図 5 は、広範囲の pH グラジエントを、最適な分離能を実現するために pH 8.3 ~ 10 に狭めて使用した場合のトラスツズマブ電荷変異体の分離を示しています。リン酸バッファ pH グラジエントと比較して (図 2 を参照)、メインピークの前に溶出するさらに 2 つの酸性変異体 (A1 から A6) と、メインピークの後に溶出するもう 1 つの塩基性変異体を分離することができました。特に図 5B の拡大図は、メインピーク周辺のさまざまな電荷変異体の優れた分離を示しています。図 2 に示すならぬ塩と pH のグラジエントと比較して、ピークがシャープで分離能が向上しています。

判別したすべての変異体について、RT と面積の精度を評価しました (図 5 のピークテーブルを参照)。非常に小さなピークにおいても RT の精度は優れており、最初の変異体 A1 を除いて RSD は 0.06 % 未満の値でした。面積精度は、非常に小さいピークを除き、大半のピークで優れた値を示しました。

Farnan と Moreno¹ で使用された pH グラジエントも、NISTmAb の分析に最適であることがわかりました (図 6 を参照)。NISTmAb の場合、NISTmAb の pI が異なるため、pH グラジエントは異なる pH 範囲に変更しました。ここで開発した pH 8.9 ~ 10.5 までのならぬグラジエントを用いて、3 つの酸性変異体と 2 つの塩基性変異体を分離することができました。

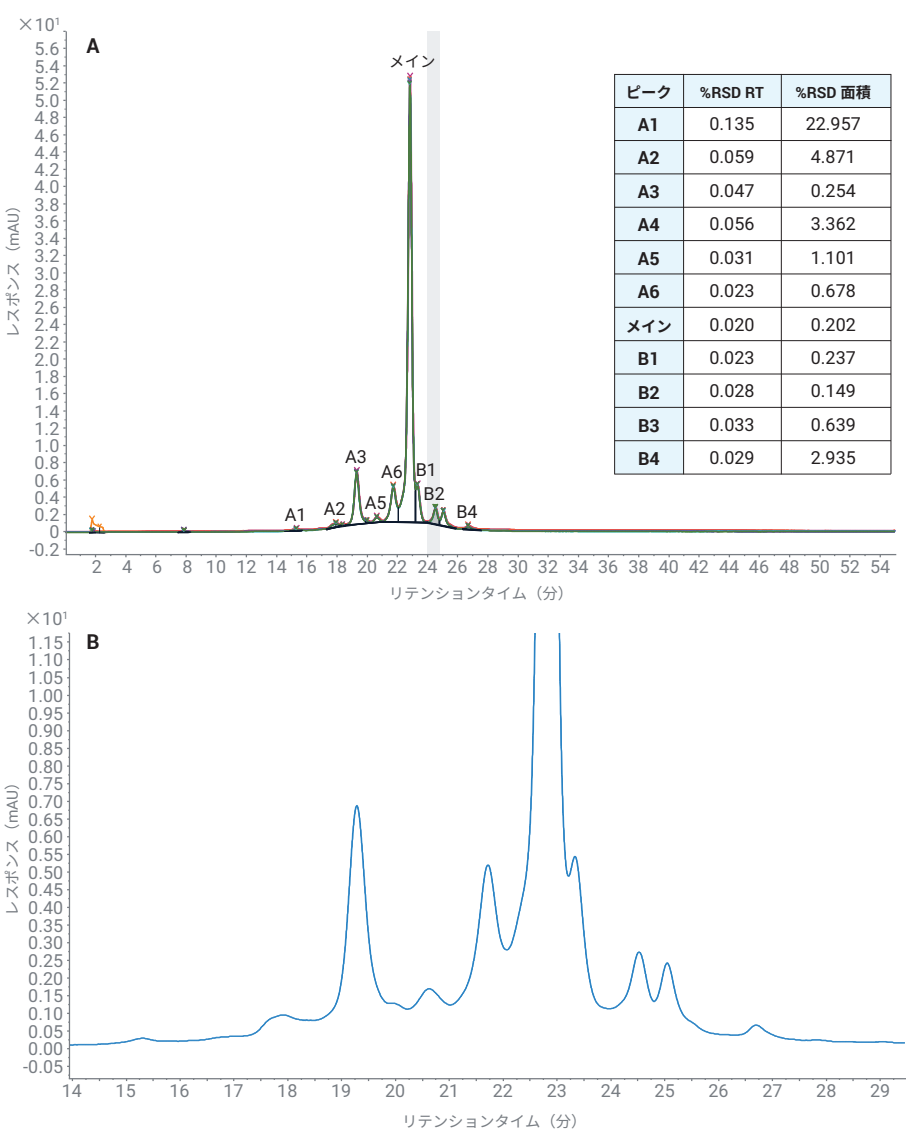


図 5. pH 8.3 ~ 10 のワイド pH グラジエントを用いて分析したトラスツズマブの 7 回連続測定を重ね表示 (リテンションタイム (RT) と面積 A の精度表を含む)。単回注入 B の拡大図

結論

モノクローナル抗体の分析において、塩グラジエントに対する pH グラジエントの優位性が実証されました。pH グラジエントはなだらかな塩グラジエントと比べても、メソッド開発を容易にし、さらには高分離能のクロマトグラフィーの結果が得られることが示されました。塩グラジエントメソッド開発の可能性はかなり限られていますが（グラジエントスロープの変更は、ピーク幅が広がるだけで、分離の変化は見られませんが⁶⁾）、pH グラジエントは分離能をさらに高め、シャープなピークが維持できる可能性を示しています。これは、トラスツマップと NIST mAb の分析で、特に Farnan と Moreno¹ に基づく広範囲の pH グラジエントの使用によって示されました。Buffer Advisor ソフトウェアによって、リン酸バッファシステム用の 4 つの原液の動的混合が容易になり、ラボでの時間のかかるバッファ液調製の作業時間を短縮できます。さらに、広範囲の pH グラジエントは、Buffer Advisor によって簡単に計算できます。したがって、Buffer Advisor ソフトウェアで開発され、サンプル流路に鉄をまったく含まない Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムとフレキシブルポンプで実行したすべてのメソッドで、信頼性と再現性の高い結果が得られました。

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, April 20, 2021
5994-3257JAJP
DE44286.1248842593

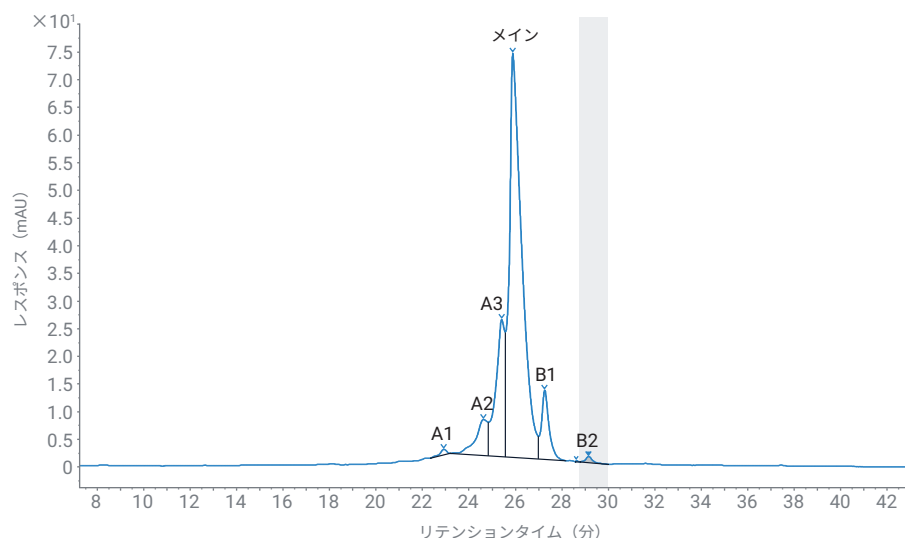
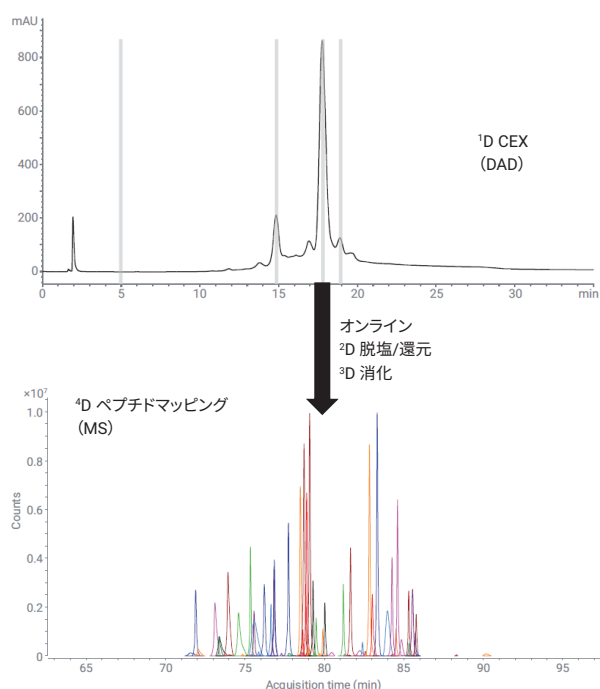


図 6. Farnan および Moreno¹ に従って pH 8.9 ~ 10.5 に変更した pH グラジエントを使用した NISTmAb の分離

参考文献

1. Farnan, D.; Moreno, G.T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
2. Liu, H. *et al.* Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 2426–2447.
3. Vlasak, J.; Ionescu, R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, 9, 468–481.
4. Rea, J. *et al.* Validation of a pH Gradient-Based Ion-Exchange Chromatography Method for High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 54, 317–323.
5. Lingg, N. *et al.* Highly Linear pH Gradients for Analyzing Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity in the Alkaline Range: Validation of the Method Parameters. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1373, 124–130.
6. Turner, A.; Schiel, J. E. Qualification of NISTmAb Charge Heterogeneity Control Assays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410(8), 2079–2093.
7. Schneider, S. How Shallow Can You Go? Refining Charge Variant Analysis of mAbs with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2692EN, **2020**.

4D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体電荷変異体の完全自動化特性解析



著者

Liesa Verscheure, Gerd
Vanhoenacker, Pat Sandra,
Koen Sandra
RIC Biologics
Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider, and
Udo Huber
Agilent Technologies, Inc.
Germany

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab 2D-LC ソリューション および Agilent 6545 LC/Q-TOF システムを用いた 4 次元液体クロマトグラフィー / 質量分析 (4D-LC/MS) によるモノクローナル抗体 (mAb) 電荷変異体の完全に自動化された詳細な特性解析について説明します。カチオン交換クロマトグラフィー (CEX) によって分離された電荷変異体は、マルチハートカットバルブに取り付けられたループで収集され、LC/MS ベースのペプチドマッピングの前に、オンライン脱塩、変性、還元、およびトリプシン消化に連続的にかけられます。

はじめに

タンパク質バイオ医薬品は、がん、心血管疾患、糖尿病、感染症、炎症性疾患、自己免疫疾患などのさまざまな疾患の治療のための重要な治療薬として活用され始めています。¹⁻³ タンパク質バイオ医薬品にはさまざまな種類があり、モノクローナル抗体 (mAbs)、抗体薬物複合体 (ADC)、融合タンパク質、ホルモン、成長因子、サイトカイン、治療用酵素、血液因子、ワクチン、抗凝固剤などがあります。安全性と有効性の点で明らかな利点があるため、これらの分子は医薬品市場を大幅に再編し、現在では 350 を超える製品のヒットへの使用が米国および欧州連合で承認されています。¹⁻³ これは医薬品市場全体の約 4 分の 1 に相当し、その中でも mAb は最も急速に成長している医薬品クラスです。

これらの分子は、治療の大きな可能性があると同時に、分析に関する要求が非常に厳しい巨大な構造の複雑さを有しています。^{1, 2} 小分子薬とは対照的に、バイオ医薬品は大きく (mAb の分子量は約 150 kDa)、不均一です。バイオ医薬品は 1 つまたは 2 つの遺伝子から生まれるものです。ただし、翻訳後修飾 (PTM)、アミノ酸配列、高次構造などが異なる可能性のある数百の変異体が共存しており、これらすべてが製品のプロファイル、安全性、および有効性に関係します。¹⁻³ そのため、変異体の詳細な構造特性評価には、クロマトグラフィー (LC) と質量分析 (MS) をはじめとする多くの分析ツールが用いられます。

アスパラギンの脱アミド化、C 末端のリジン切断、N 末端の環化 (ピログルタミン酸形成)、シアル化などの PTM から生じる可能性のある電荷変異体を研究するための重要技術として CEX があります。CEX では、固定相のアニオン基とタンパク質表面のカチオン基の間の静電相互作用が分離の基礎となっています。タンパク質が等電点 (pI) より低い移動相 pH でカラムにロードされ、塩または pH グラジエントを使用して溶出されます。CEX バッファは通常、不揮発性成分で構成されているため、これらのメソッドは MS と互換性がありません。ピーク同定は、MS 分析の前にピークの収集と脱塩を行う面倒な作業です。⁴ 近年、堅牢な 2D-LC 機器が商業的に導入されたことにより、このような一連の作業は、オンラインで自動化されたメソッドで行われるようになりました。⁵⁻⁹ CEX カラムから溶出するピークはループに保存され、MS 測定の前に逆相 (RPLC) またはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用してオンライン脱塩にかけられます。包括的な (LC×LC) と (複数の) ハートカット 2D-LC (LC-LC) の両方が使用されます。⁵⁻⁹ ただし、CEX ピークを明確に識別するには、ペプチドマッピングが必要です。タンパク質測定は同一性を示し、MS 機器の質量精度を超える質量差を伴う主要な修飾を強調しますが、通常、実際のアミノ酸配列を得ることはできず、修飾を特定することもできません。以前の研究¹⁰⁻¹² を受けて、このアプリケーションノートでは、一次元 (1D) CEX、ピーク収集、2D 脱塩、変性、還元、3D トリプシン消化、mAb 電荷変異体の詳細な特性解析のための 4D RPLC/MS ベースのペプチドマッピングを組み込んだ、完全自動化されたオンライン 4D-LC/MS セットアップについて説明します。

実験方法

試料調製

アセトニトリル (HPLC-S)、水 (ULC/MS)、およびギ酸 (ULC/MS) は、Biosolve (オランダ、ファルケンスワールト) から入手しました。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、NaCl、NH₄HCO₃、トリス塩基、およびジチオスレイトール (DTT) は、Sigma (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。UltraPure Tris-HCl pH 7.5 は、ThermoFisher Scientific (米国マサチューセッツ州ウォルサム) から購入しました。タイプ I の水は、Sartorius (ドイツ、ゲッティンゲン) 製の arium pro Ultrapure Lab Water System を用いて水道水から精製しました。ヒト化モノクローナル抗体のトラスツマブ (ハーセプチンとして販売) を Roche (スイス、バーゼル) から入手しました。

サンプル前処理

トラスツマブは、1D CEX 移動相 A (MPA : 10mM リン酸ナトリウム pH 7.65) で 7 mg/mL に希釈しました。トラスツマブを 37 °C で 3 日間高 pH 条件 (100 mM Tris pH 9.0) でインキュベートし、続いて 1D CEX 移動相 A で 7 mg/mL にバッファ交換することにより、脱アミド化を誘導しました。

装置構成

マルチハートカットオプションを備えた Agilent 1290 Infinity II 2D-LC システム、追加の Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプと Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ、追加で 2 個の 2 位置/6 ポートバルブ、およびゼロデッドボリューム T ピースを使用しました。内径 0.12 mm のステンレスチューブを使用しました。図 1 に構成を概略的に示します。また、このアプリケーションノートに要約します。ダイオードアレイ検出 (DAD) を、1 次元 (CEX) と 4 次元 (RPLC) で使用しました。さらに、Jet Stream ESI ソースを備えた Agilent 6545 LC/Q-TOF を使用して、4 番目で最後の次元の検出を行いました。

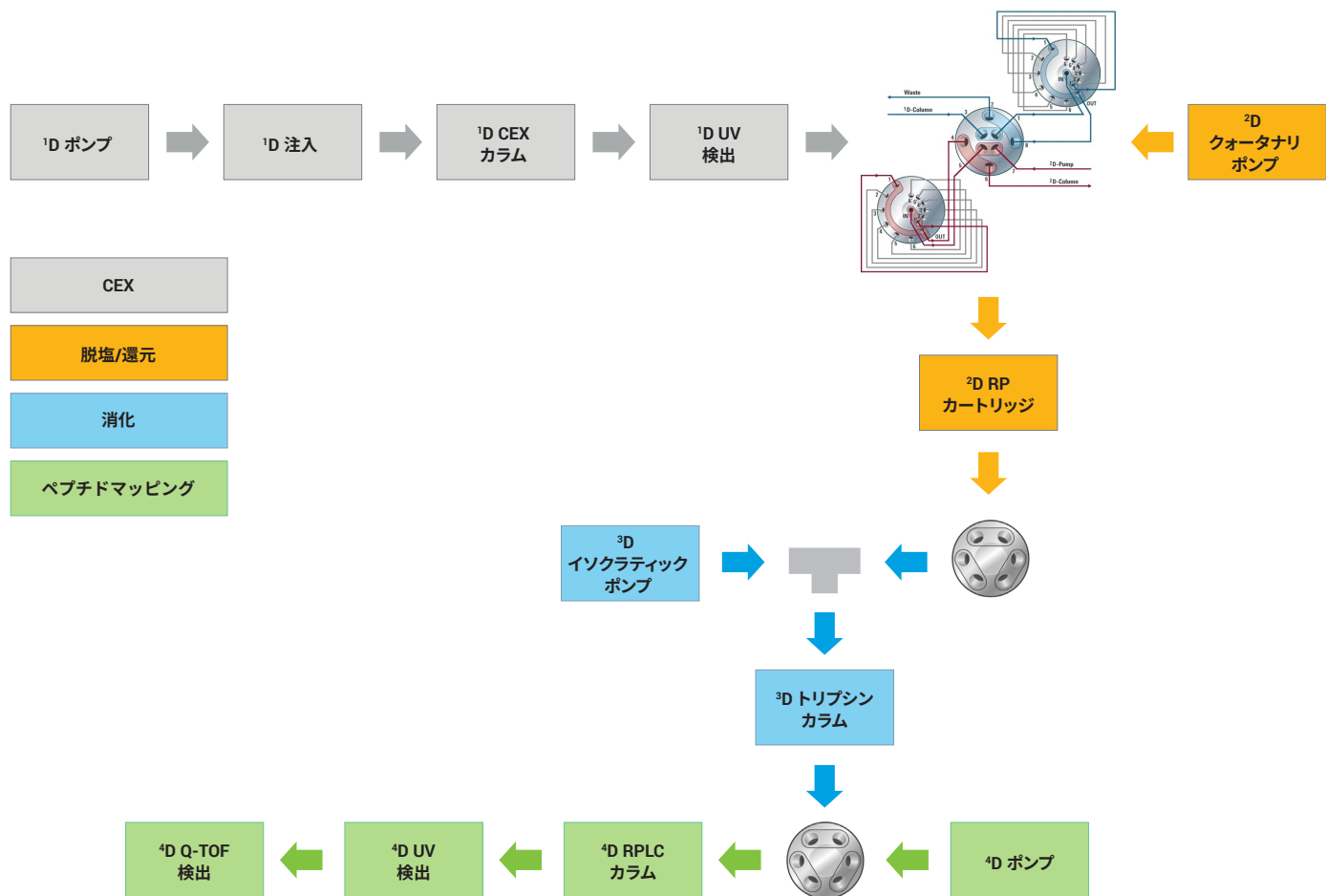


図 1. マルチハートカットを用いた ¹D CEX 分離と電荷変異体ピーク収集、²D RPLC ベースの脱塩、変性、還元、³D トリプシン消化、および ⁴D RPLC-MS ベースのペプチドマッピングを組み込んだ 4D-LC/MS の構成

構成

1D : カチオン交換クロマトグラフィー

- G7120A Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ
- G7167B Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル、サンプルサーモスタット付き (オプション 101)
- G7116B Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT)、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 2 ポジション/6 ポートバルブを装着したバルブドライブ (オプション 058) 付き、1300 bar (G4231C)

- G7117B Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器、3.7mm HDR InfinityLab Max-Light カートリッジセル (G4212-60032) 付き

注： シグナル強度を低減し、UV シグナルの飽和を防ぐために、短い 3.7mm の検出器フローセルを取り付けました。

マルチハートカット付き 2D-LC

- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2D-LC バルブ (G4236A) 付き
- 2 台の Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、40 μL ループ付き マルチハートカットバルブ (G4242-64000) を搭載

2D: 脱塩、変性、還元用逆相クロマトグラフィー
G7111B Agilent 1260 Infinity II クォータナリポンプ、アクティブインレットバルブ (AIV) (オプション 032) 付き

3D : トリプシン消化

- 0100-0969 ZDV T ピース
- G7110B Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ

⁴D：ペプチドマッピング用逆相クロマトグラフィ

- G7120A Agilent 1290 Infinity II
ハイスピードポンプ
- G7116B Agilent 1290 Infinity II MCT、
Agilent InfinityLab クイックチェンジ
2 ポジション/6 ポートバルブを装着した
バルブドライブ（オプション 058）付き、
1300 bar（G4231C）
- G7117B Agilent 1290 Infinity II DAD、
10 mm InfinityLab Max-Light カート
リッジセル（G4212-60008）搭載
- G6545A Agilent 6545 LC/Q-TOF、
Jet Stream ESI ソース搭載

注：Orachrom StyrosZyme TPCK- トリプシン
および Agilent AdvanceBio ペプチドマッ
ピングカラムはともに、1 つのカラムコンパー
トメントの異なるゾーンに収納され、それぞれ
40 および 60 °C に維持されます。

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS ChemStation
リビジョン C.01.07 SR4 [505]
- 2D-LC アドオンソフトウェアリビジョン
A.01.04 [017]
- Agilent MassHunter、機器コントロール
用（B.09.00）
- Agilent MassHunter、データ解析用
BioConfirm アドオン付き（B.07.00）

メソッド

¹D と ⁴D は 2D-LC ソフトウェアで構成し、²D
と ³D は通常のメソッド設定で制御し、繰り返
しイベントとしてプログラムしました。これら
のイベントのサイクルタイムは 110 分で、2D-
LC ソフトウェアでプログラムされた ⁴D サイク
ルタイムと同じでした。MassHunter のデー
タ取り込みは、2D-LC システムからのリモート
スタートによってトリガーしました。

CEX 分析全体で 4 つのハートカットが行われ
ました。4.8 分における最初のハートカットは
ブランクカットです。これにより、対象の実際
の CEX ハートカットを分析する前に、すべて
の次元のプレコンディショニングが可能になり
ます。

¹ D:カチオン交換クロマトグラフィー			
カラム	Agilent Bio MAb、非多孔質 (2.1 mm × 250 mm, 5 μm) (部品番号 5190-2411)		
温度	30 °C		
移動相 A	10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.65		
移動相 B	10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.65 + 100 mM NaCl		
流量	0.2 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	B (%)	
	0	5	CEX 分析
	36	70	
	36.5	100	
	46	100	
	46.5	5	
	60	5	
注入	100 μg		
検出	220 および 280 nm		
ピーク幅	> 0.025 分 (10 Hz)		

マルチハートカット ¹ D > ² D	
サンプリングタイムテーブル トラスツズマップ	
カット	時間 (分)
1 – ブランク	4.80
2 – プレピーク	14.93
3 – メインピーク	17.55
4 – ポストピーク	18.99

² D:脱塩、変性、還元用逆相クロマトグラフィー (手動入力の反復イベント)						
カラム	ポリマーベース脱塩カートリッジ、2.1 × 10 mm					
温度	23 °C					
移動相 A	0.1 % (v/v) ギ酸水溶液					
移動相 B	0.1 % (v/v) ギ酸アセトニトリル溶液					
移動相 C	100 mM トリス -HCl (pH 7.5) に 20 mM DTT					
グラジエント	時間 (分)	A (%)	B (%)	C (%)	流量 (mL/min)	
	10	99	1	0	0.5	脱塩とフォーカシング
	10.01	0	0	100	0.2	還元
	20	0	0	100	0.2	
	20.01	99	1	0	0.5	脱塩と溶出
	25	99	1	0	---	
	25.01	40	60	0	---	
	27	40	60	0	0.5	
	27.01	40	60	0	0.015	溶出と消化
	68	40	60	0	0.015	
	68.01	0	100	0	0.5	
	85	0	100	0	---	
	95	99	1	0	---	
	120	99	1	0	---	
バルブ	27 分:位置 1 → 位置 2 (トリプシン消化開始) 67 分:位置 2 → 位置 1 (ペプチドマッピング開始)					

3D:トリプシン消化 (手動入力のリバースイベント)			
カラム	Orachrom StyrosZyme TPCK-トリプシン PEEK (2.1 × 150 mm)		
温度	40 °C		
移動相	50 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 8		
グラジエント	時間 (分)	流量 (mL/min)	
	25	0.06	
	25.01	0.135	消化
	67	0.135	
	67.01	0.06	
	135	0.06	
バルブ	27 分: 位置 1 → 位置 2 (トリプシン消化開始) 67 分: 位置 2 → 位置 1 (ペプチドマッピング開始)		

データ処理

測定されたシグナルは、MassHunter ソフトウェアに組み込まれた BioConfirm アルゴリズムを用いて、トラスツズマブの軽鎖および重鎖の配列と照合しました。実験データをシーケンスと照合する際の質量許容値は 8 ppm としました。20 ppm の質量精度で得られた抽出イオンクロマトグラム (EIC) を使用して、脱アミド化などの PTM をモニタリングしました。

結果と考察

CEX、ピーク収集、脱塩、変性、還元、トリプシン消化、およびペプチドマッピングを組み込んだ、完全に自動化されたオンライン 4D-LC/MS タンパク質アナライザのスキームを図 1 に示します。CEX ピークは、マルチハートカットバルブに取り付けられた 40 µL のループで収集され、脱塩、変性、および還元が行われるポリマー RP カートリッジに 1 つずつ移されます。カートリッジにトラップされた還元 mAb は、その後、アセトニトリル濃度を上げることによってトリプシンカラムに溶出されます。T ピースを使用して、トリプシン消化バッファを逆相移動相と混合し、最適な消化条件を設定してアセトニトリル濃度を下げます。消化中、トリプシンカラムはペプチドマッピングカラムと一直線とし、生成されたペプチドを RPLC カラムの先頭に集めます。20 分後、バルブ切り替えを行い、MS への消化物の溶出を開始します。

*D:ペプチドマッピング用逆相クロマトグラフィー (2D-LC ソフトウェア制御による反復イベント)			
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング (2.1 × 150 mm×2.7 μm) (部品番号 651750-902)		
温度	60 °C		
移動相 A	0.1 % (v/v) ギ酸水溶液		
移動相 B	0.1 % (v/v) ギ酸アセトニトリル溶液		
流量	0.4 mL/min		
グラジエント	時間 (分)	B (%)	
	0	1	
	8.5	1	
	9	100	
	15	100	
	16	1	
	20	1	ペプチドマッピングカラムでのロード消化
	64	1	
	64	1	ペプチドマッピング
	97	45	
	98	100	
	103	100	
	104	1	
110	1		
DAD 検出器	214 および 280 nm		
ピーク幅	> 0.025 分 (10 Hz)		
MS 検出器			
イオン源			
ポジティブイオン化			
ドライガス温度	300 °C		
ドライガス流量	8 L/min		
ネブライザ圧力	35 psi		
シースガス温度	350 °C		
シースガス流量	8 L/min		
キャピラリ電圧	3,500 V		
ノズル電圧	1,000 V		
フラグメンタ	175 V		
データ取り込み			
モード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)		
データ取り込み範囲	m/z 100 ~ 3,200		
	1 スペクトラム/秒		
	セントロイド取り込み		
67 分後にダイバートバルブを MS に切り替え			

mAb トラスツズマブの CEX クロマトグラムを図 2 に示します。ハーセプチンとして商品化されているトラスツズマブは、HER2 受容体に結合するヒト化 IgG1 であり、この性質を用いて HER2 陽性転移性乳がんの治療に使用されています。pI が 8.45 の場合、mAb は CEX 移動相 pH では正に帯電しており、それによって負に帯電したクロマトグラフィー樹脂との相互作用が支配されます。NaCl 塩グラジエントを使用して mAb を溶出させると、さまざまな電荷変異体が明らかになり、その後オンラインペプチドマッピングにかけられました。図 3A は、図 2 に示した 3 つの CEX ピーク（プレピーク、メインピーク、およびポストピーク）と CEX ブランクの分析に関連した 4D-LC/MS 実験を概略的に示したものです。図 3B は、1 サイクルの圧力および DAD プロファイルを拡大し、メイン CEX ピークの脱塩、変性、還元、消化、およびペプチドマッピングを示したものです。90 % を超えるシーケンスカバレッジが得られました。同定されたペプチドを表 1 に示します。また、LC/MS 化合物クロマトグラムの重ね表示を図 4 に示します。カバーされていないペプチドは通常小さく、親水性のものが多く、消化中にペプチドマッピングカラムのヘッドに集まらないことがあります。このため、それらは廃液として流されます。

シーケンス情報の他に、ペプチドマッピングは修飾と修飾部位も明らかにします。図 5 は、CEX のプレピーク、メインピーク、ポストピーク、特に、2 つのペプチドの EIC（すなわち、30 位に潜在的な脱アミド化部位を含む軽鎖ペプチド ASQDVNTAVAWYQQKPGK（LC 25-42）、および 102 位に潜在的な異性化部位を含む重鎖ペプチド WGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTK（HC 99-124））のオンラインペプチドマッピングを示したものです。データから、プレピークは脱アミド化された変異体に対応し、アスパラギンは軽鎖のうちの 1 つの 30 位でアスパラギン酸に変換されていると推定できます。ポストピークが重鎖のうち 1 つの 102 位にイソアスパラギン酸を有することも実証されました。これは、修飾された変異体および修飾されていない変異体に対応するピークダブレットによって明確に視覚化されています。これらの結果は、ハーセプチンの酸性および塩基性変異体に対してオフライン画分収集およびペプチドマッピングを行った Harris らの報告結果⁴と一致しています。

同じ実験を、高 pH ストレスを受けたハーセプチンサンプルで実施しました（図 6）。このような条件は脱アミド化を誘発し、その結果 mAb をより酸性にすることが知られています。図 6 に示す CEX プロファイルは酸性シフトを示し、CEX ピーク 1 と 2 のペプチドマップデータは、両方の軽鎖が 30 位で脱アミド化された二重脱アミド化変異体を示しています。CEX ピーク 3 と 4 は、単一の脱アミド化事象に対応します。1 つの軽鎖が 30 位で脱アミド化されます。ピーク 1 と 2、および 3 と 4 の違いは、今回は重鎖の 387 位にある別の脱アミド化に起因します。この脱アミド化部位は、脱アミド化が存在する場合に明らかに異なって消化される 2 つのペプチド（1 つは完全切断、もう 1 つは誤切断）に現れます。

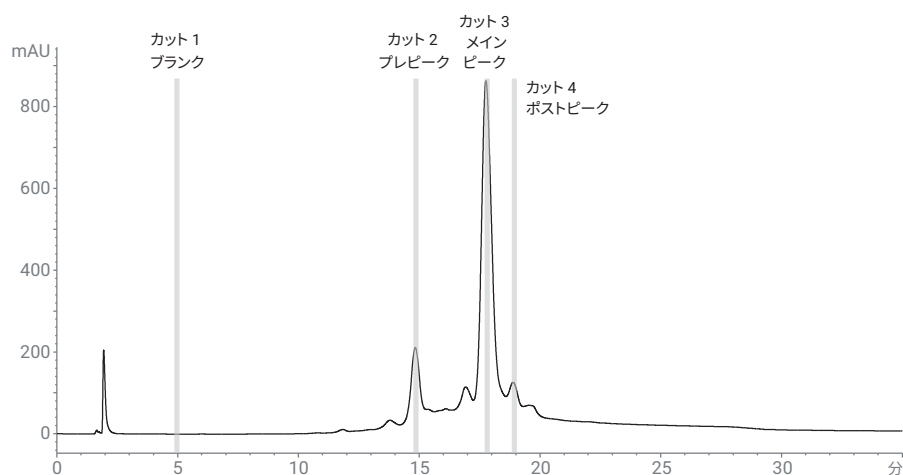


図 2. モノクローナル抗体トラスツズマブの CEX クロマトグラム。条件は参考文献 13 を参照。用いたハートカットは灰色で示されています。

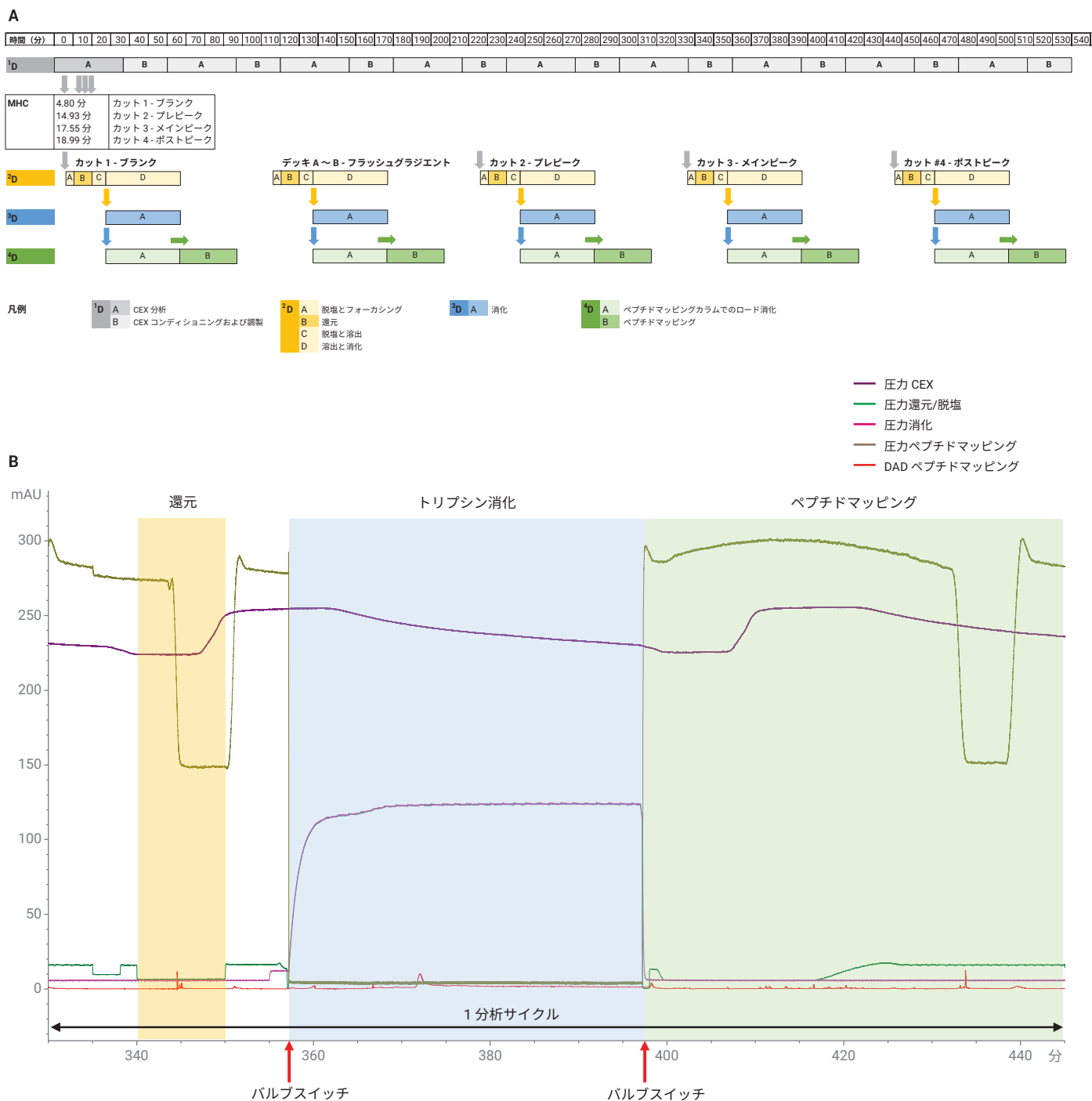


図 3. (A) 図 2 に示したように、プレピーク、メインピーク、ポストピーク、および CEX ブランク領域に焦点を当てた 4D-LC/MS 実験のさまざまなステージの概略図。
(B) メイン CEX ピークの脱塩、変性、還元、消化、およびペプチドマッピングの拡大図

表 1. オンライン RPLC/MS ベースのペプチドマッピング後に CEX メインピークで同定されたペプチド

RT	質量	容量	容量 %	シーケンス	Seq Loc.	Tgt. Seq. Mass	Diff. (ppm)	誤切断
79.1	1880.9972	66635668	6.61	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	HC (001-019)	1880.9956	0.8	0
76.8	1109.5539	25727274	2.55	LSCAASGFNIK	HC (020-030)	1109.5539	0.0	0
81.2	2180.0864	16055279	1.59	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	HC (020-038)	2180.0837	1.2	1
76.6	1088.5410	13618352	1.35	DTYIHWVR	HC (031-038)	1088.5403	0.6	0
76.2	829.4442	24354704	2.42	GLEWVAR	HC (044-050)	829.4446	-0.5	0
71.9	1083.5360	19879112	1.97	IYPTNGYTR	HC (051-059)	1083.5349	1.0	0
72.1	1181.6059	3708836	0.37	GRFTISADTSK	HC (066-076)	1181.6041	1.6	1
73.1	968.4819	26423682	2.62	FTISADTSK	HC (068-076)	968.4815	0.4	0
79.3	2260.1184	317550	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLR	HC (068-087)	2260.1158	1.1	1
81.3	3518.6474	320893	0.03	FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC (068-098)	3518.6446	0.8	2
76.8	1309.6451	24858112	2.47	NTAYLQMNSLR	HC (077-087)	1309.6449	0.1	0
79.9	2568.1769	5903991	0.59	NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR	HC (077-098)	2568.1737	1.2	1
71.6	1276.5392	2994056	0.30	AEDTAVYYCSR	HC (088-098)	1276.5394	-0.1	0
85.3	2783.2545	16863744	1.67	WGGDGFYAMDYWGQGLTVSSASTK	HC (099-124)	2783.2537	0.3	0
78.7	1185.6398	68405792	6.79	GPSVFPLAPSSK	HC (125-136)	1185.6394	0.4	0
77.7	1263.6494	36588096	3.63	STSGGTAALGCLVK	HC (137-150)	1263.6493	0.1	0
88.3	6655.2898	221285	0.02	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	HC (151-213)	6655.2857	0.6	0
79.8	1374.7171	214690	0.02	VDKKVEPKSCDK	HC (214-225)	1374.7177	-0.4	3
84.9	2729.4093	7103687	0.71	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	HC (226-251)	2729.4073	0.7	0
73.4	834.4277	13166738	1.31	DTLMISR	HC (252-258)	834.4269	1.0	0
82.0	2897.4175	220680	0.02	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC (252-277)	2897.4151	0.9	1
84.3	4556.2041	547132	0.05	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC (252-291)	4556.1992	1.1	2
79.3	2081.0013	17858876	1.77	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK	HC (259-277)	2080.9987	1.2	0
83.0	3739.7881	18901388	1.88	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	HC (259-291)	3739.7828	1.4	1
78.6	1676.7966	5991668	0.59	FNWYVDGVEVHNAK	HC (278-291)	1676.7947	1.1	0
84.6	1807.0008	38113724	3.78	VVSVLTVLHQDWLNGK	HC (305-320)	1806.9992	0.9	0
83.3	2227.2022	63210428	6.27	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	HC (305-323)	2227.2001	0.9	1
82.4	2458.3080	2959244	0.29	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	HC (305-325)	2458.3043	1.5	2
81.6	2886.5495	183447	0.02	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	HC (305-329)	2886.5426	2.4	3
73.9	837.4964	38694668	3.84	ALPAPIEK	HC (330-337)	837.4960	0.5	0
75.4	1285.6662	875645	0.09	EPQVYTLPPSR	HC (348-358)	1285.6667	-0.4	0
75.6	1903.9366	36378636	3.61	EPQVYTLPPSREEMTK	HC (348-363)	1903.9350	0.8	1
80.5	2989.5263	1849832	0.18	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	HC (348-373)	2989.5253	0.3	2
78.4	1721.8701	179925	0.02	EEMTKNQVSLTCLVK	HC (359-373)	1721.8692	0.6	1
78.9	1103.6013	45037560	4.47	NQVSLTCLVK	HC (364-373)	1103.6009	0.4	0
81.6	2543.1245	29221288	2.90	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	HC (374-395)	2543.1241	0.2	0
85.7	4398.0307	5032842	0.50	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK	HC (374-412)	4398.0281	0.6	1
85.9	4954.3531	225838	0.02	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC (374-417)	4954.3502	0.6	2
82.8	1872.9144	57538216	5.71	TTPPVLDSDGSFFLYSK	HC (396-412)	1872.9146	-0.1	0
82.6	2429.2370	970108	0.10	TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK	HC (396-417)	2429.2366	0.2	1
77.8	2986.3744	1042270	0.10	SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	HC (418-442)	2986.3715	1.0	1
78.5	2743.2427	46302832	4.60	WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	HC (420-442)	2743.2384	1.6	0
74.6	659.3487	26985572	2.68	SLSLSPG	HC (443-449)	659.3490	-0.5	0
76.7	1877.8787	2655889	0.26	DIQMTQSPSSLSASVGDTR	LC (001-018)	1877.8789	-0.1	0
79.5	2551.2398	9011163	0.89	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCR	LC (001-024)	2551.2371	1.1	1

RT	質量	容量	容量 %	シーケンス	Seq Loc.	Tgt. Seq. Mass	Diff. (ppm)	誤切断
75.6	1989.9932	10501849	1.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	LC (025-042)	1989.9908	1.2	0
74.8	2286.1771	370620	0.04	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	LC (025-045)	2286.1757	0.6	1
84.3	1771.9519	27274394	2.71	LLIYSASFLYSGVPSR	LC (046-061)	1771.9509	0.6	0
85.8	4129.8936	10160642	1.01	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGKTK	LC (067-103)	4129.8892	1.1	0
85.3	4599.1803	2980494	0.30	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGKTKVEIK	LC (067-107)	4599.1792	0.2	1
84.5	4755.2888	6157193	0.61	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGKTKVEIKR	LC (067-108)	4755.2803	1.8	2
82.2	2101.1217	3894068	0.39	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC (108-126)	2101.1208	0.4	1
84.0	1945.0220	32666390	3.24	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	LC (109-126)	1945.0197	1.2	0
90.2	3666.8789	1457746	0.14	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPR	LC (109-142)	3666.8756	0.9	1
85.5	1739.8676	23403588	2.32	SGTASVCLLNFFYPR	LC (127-142)	1739.8665	0.6	0
75.9	2676.2628	852142	0.08	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	LC (146-169)	2676.2627	0.0	1
80.0	4160.0087	11663837	1.16	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK	LC (146-183)	4160.0033	1.3	2
79.7	4766.2746	403170	0.04	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK	LC (146-188)	4766.2683	1.3	3
78.8	3618.7073	16391463	1.63	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK	LC (150-183)	3618.7021	1.5	1
78.6	4224.9705	725845	0.07	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK	LC (150-188)	4224.9670	0.8	2
77.3	4490.1265	478190	0.05	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK	LC (150-190)	4490.1209	1.3	3
78.9	6290.0188	328711	0.03	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (150-207)	6290.0085	1.6	4
79.0	1501.7515	2071466	0.21	DSTYSLSTLTLSK	LC (170-183)	1501.7512	0.2	0
74.0	2689.3218	547667	0.05	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (184-207)	2689.3170	1.8	2
73.4	2083.0562	6116953	0.61	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	LC (189-207)	2083.0521	2.0	1
75.3	1817.8988	25691042	2.55	VYACEVTHQGLSSPVTK	LC (191-207)	1817.8982	0.3	0

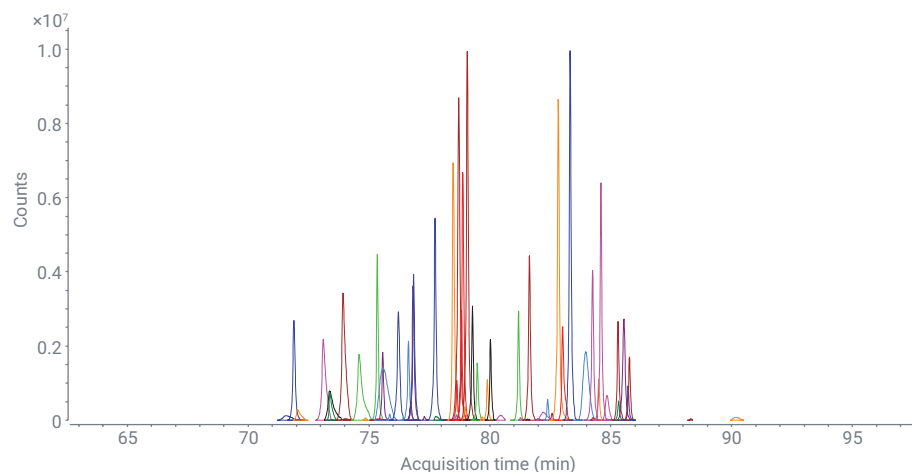


図 4. オンラインペプチドマッピング後の CEX メインピークで MS により同定されたペプチドの RPLC/MS 化合物クロマトグラムの重ね表示

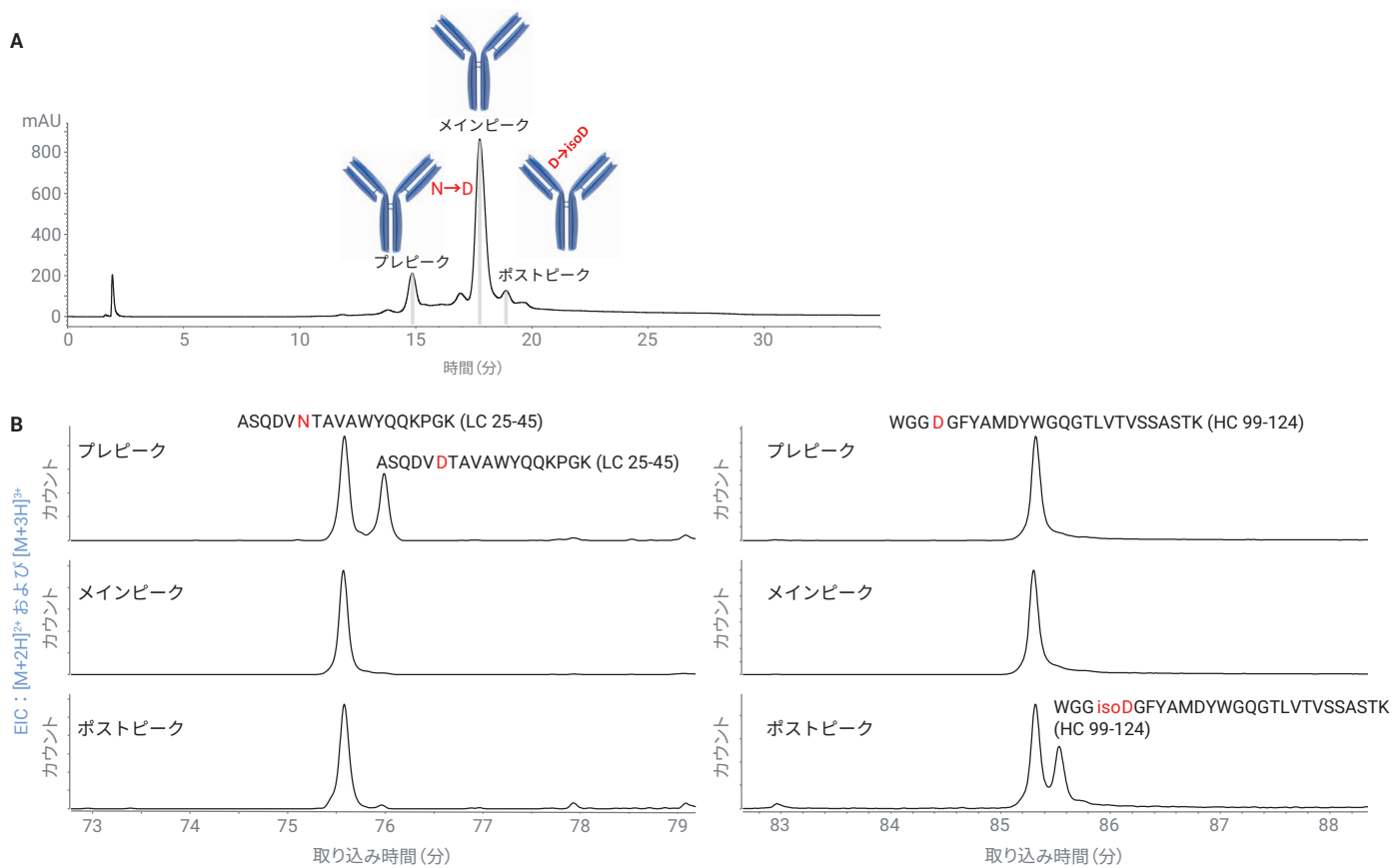


図 5. トラスツマブ CEX のプレピーク、メインピーク、およびポストピークのオンラインペプチドマッピング。(A) CEX のクロマトグラムおよび (B) 抽出イオンクロマトグラム—軽鎖ペプチド ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱アミド化軽鎖ペプチド ASQDVDTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重鎖ペプチド WGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124)、異性化重鎖ペプチド WGGisoDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTK (HC 99-124)

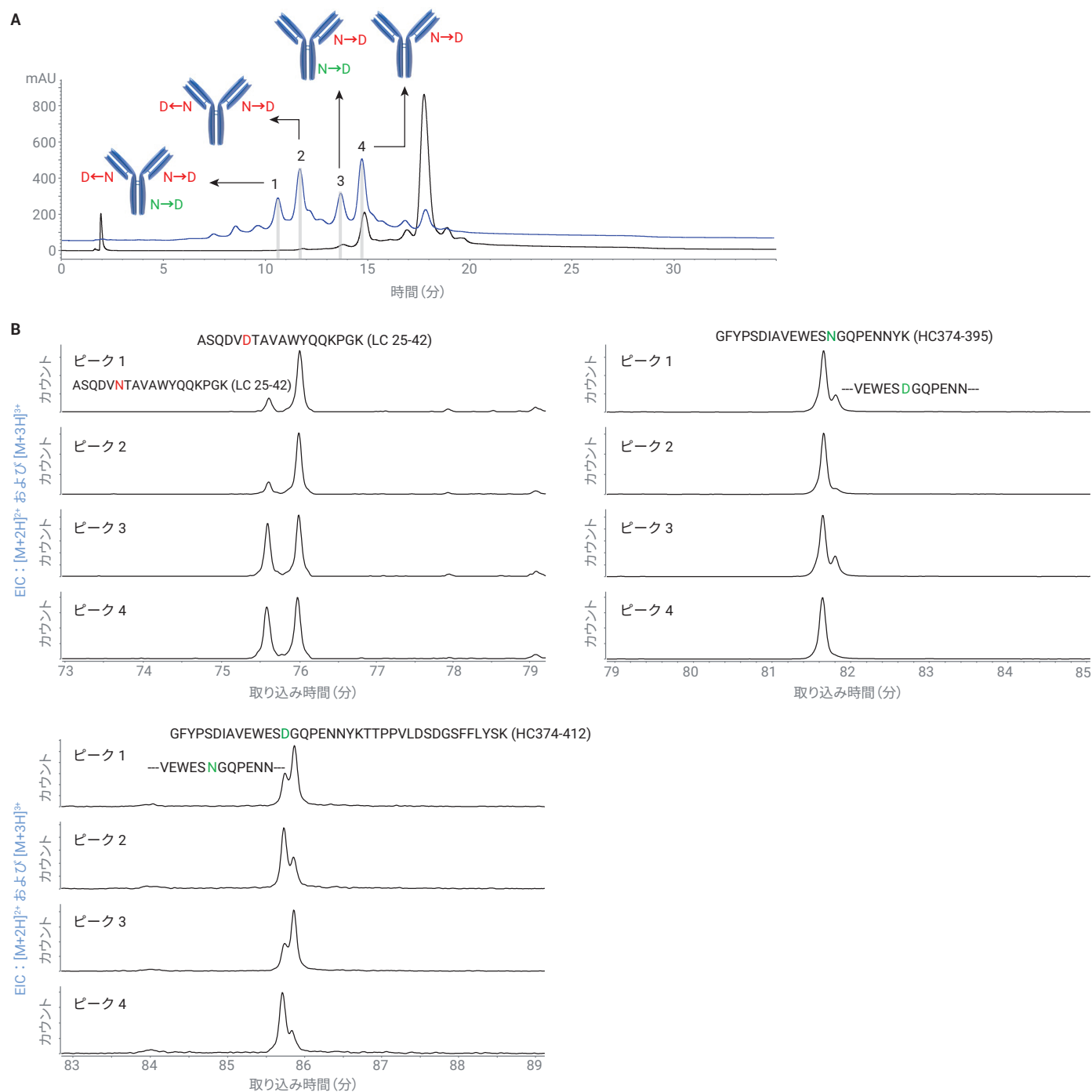


図 6. 高 pH ストレスを受けたトラスツマブ CEX ピーク 1、2、3、および 4 オンラインペプチドマッピング。(A) 非ストレスおよび高 pH ストレストラスツマブの CEX クロマトグラムの重ね図、(B) 抽出イオンクロマトグラム—軽鎖ペプチド ASQDVNTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、脱アミド化軽鎖ペプチド ASQDVDTAVAWYQQKPGK (LC 25-42)、重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (HC 374-395)、脱アミド化重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWESDGGQPENNYK (HC 374-395)、重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSK (HC374-412)、脱アミド化重鎖ペプチド GFYPSDIAVEWESDGGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSK (HC 374-412)

結論

マルチハートカット、²D RPLC ベースの脱塩、変性、還元、³D トリプシン消化、および ⁴D RPLC/MS ベースのペプチドマッピングを使用した ¹D CEX 分離と電荷変動ピーク収集を組み込んだ完全自動化 4D-LC/MS タンパク質アナライザについて説明し、ストレスを受けないトラスツズマブ、および高 pH ストレスを受けたトラスツズマブの CEX プロファイルで観察された酸性および塩基性変異体の特性解析に適用しました。このマルチディメンジョナルシステムは、InfinityLab 2D-LC ソリューションと 6545 LC/Q-TOF システムに基づいています。一次元の CEX をプロテイン A アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーなどに置き換えることで、この 4D-LC/MS 設計の変形型を簡単に構成することができます。

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, June 17, 2020
5994-2020JAJP
DE.5371643519

参考文献

1. Sandra, K. *et al.* Modern Chromatographic and Mass Spectrometric Techniques for Protein Biopharmaceutical Characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1335, 81–103.
2. Fekete, S. *et al.* Chromatographic, Electrophoretic and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507.
3. Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, 32, 992–1000.
4. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr. B* **2001**, 752, 233–245.
5. Stoll, D. *et al.* Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products by Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled with UV Absorbance and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 51–60.
6. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157.
7. Stoll, D. R. *et al.* Direct Identification of Rituximab Main Isoforms and Subunit Analysis by Online Selective Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 8307–8315.
8. Sandra, K. *et al.* Multiple Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry for the Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Ado-Trastuzumab Emtansine. *J. Chromatogr. B* **2016**, 1032, 119–130.
9. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.
10. Gstöttner, C. *et al.* Fast and Automated Characterization of Antibody Variants with 4D HPLC/MS. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2119–2125.
11. Goyon, A. *et al.* Streamlined Characterization of an Antibody-Drug Conjugate by Two-Dimensional and Four-Dimensional Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 14896–14903.
12. Goyon, A. *et al.* From Proof of Concept to the Routine Use of an Automated and Robust Multi-Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry Workflow Applied for the Charge Variant Characterization of Therapeutic Antibodies. *J. Chromatogr. A* **2020**, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460740.
13. Vandenheede, I. *et al.* Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-5273EN, **2014**.

2-in-1 バイオプロセス分析

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC および InfinityLab LC/MSD iQ を用いた内部バルブ切り替えによる mAb 抗体価測定と使用済みメディア分析の組み合わせ



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany
Natascha Verhagen,
Lena Gaugler,
Attila Teleki, and Ralf Takors
Institute of Biochemical
Engineering
University of Stuttgart,
Germany

概要

重要プロセスパラメータ（CPP）と重要品質特性（CQA）の分析は、バイオ医薬品の製造において最適なプロセス収率と製品品質を監視、保証する上で重要な役割を果たします。これらのパラメータの分析には、HPLC メソッドがよく使用されます。ただし、ツールを実装する上では、コスト、ラボスペース、およびワークロードが非常に重要となります。このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを自動カラム選択バルブを装備した Agilent InfinityLab LC/MSD iQ と組み合わせて用いて、使用済みメディア分析およびプロテイン A ベースの抗体価測定用に使用する方法を示します。スマート MS 検出器を備えた親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）を適用することにより、重要な細胞培養培地成分において優れた直線性、感度、および選択性が達成されました。1260 Infinity II バイオイナート LC システムではクォータリポンプが使用されているため、機器を手動で再構成することなく、モノクローナル抗体（mAb）製品のその後の分析を UV 検出器を用いて実施することができました。カラム切り替え、洗浄、平衡化などの必要なメンテナンス操作はすべて、Agilent OpenLab CDS 2 ソフトウェアを使用して実行できます。このソフトウェアは、21 CFR Part 11 への準拠に関する FDA の要件を満たすことが完全に認められています。

はじめに

mAb などのバイオ医薬品の生産は、主にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などの哺乳類細胞株のバイオリアクタ培養によって行われます。これらの生産宿主を最適に成長させ、最適な収率を得るには、糖、アミノ酸、ビタミン、成長因子などの多くの栄養素を必要とします。¹ プロセスと製品の分析は、クオリティ・バイ・デザイン (QbD) などの概念を通じて、医薬品規制調和国際会議 (ICH) によって奨励されています。QbD においては、最終製品の品質を検査によって保証するのではなく、品質を保証できるようなプロセスを作り上げることを目指しています。² さまざまな分析方法が、オンライン、アットライン、またはオフラインのツールとして、アップストリーム/ダウンストリームプロセスまたは品質管理に使用できます。モニタリングの重要なパラメータとしては、栄養素の消費、製品の生成、および製品の品質 (CQA) があります。¹ ラボのスペースは限られており、分析メソッドの準備や切り替えには時間がかかる可能性があるため、複数のパラメータを同時に分析する高度なメソッドが求められています。このアプリケーションノートでは、極性媒体化合物用の HILIC と、製品抗体価の測定用のプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーの 2 つの方法を紹介します。どちらのメソッドも、自動カラム選択バルブを備えた LC/MSD iQ に接続された単一の 1260 Infinity II バイオイナート LC システムで実行しました。

実験方法

装置

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを LC/MSD iQ と組み合わせ、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタット (G5668A#101) およびマルチウォッシュオプション (G5668A#112) 付き
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート 4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブ (G5639A) および広範囲温度ゾーンでの使用向けデバイダアセンブリ (G7116-60006) 付き
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、バイオイナート標準フローセル 10 mm (G4212-60007) 付き
- Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)
- Agilent InfinityLab フレックスベンチ MS (G6015B)

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.4

カラム

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 μm (部品番号 685775-601)
- Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm (部品番号 5069-3639)

バルブ構成

バイオイナート 4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブを図 1 に従って設置、構成し、分析ごとに再構成することなく、単一の LC システムで使用済みメディア分析と mAb 抗体価分析を実現しました。ポジション 3 に追加のバイパスキャピラリを使用することにより、カラム選択バルブの上流にある LC システムのフラッシングが可能になり、2 つのメソッドで使用する移動相間の接触や塩の沈殿の可能性が回避できます。

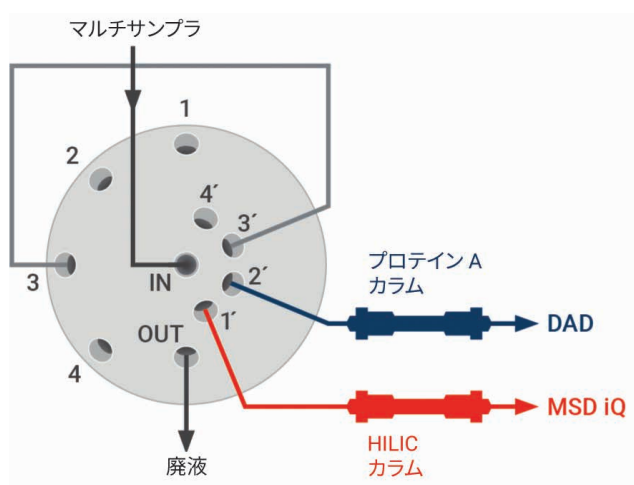


図 1. 構成されたバイオイナート 4 ポジション/10 ポートカラム選択バルブの概略図

試薬

LC グレードのアセトニトリルは Merck（ドイツ、ダルムシュタット）から購入しました。超純水は、0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。D-グルコース、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-乳酸、および L-アラニル-L-グルタミンは Sigma-Aldrich（ドイツ、シュタインハイム）から購入しました。さらに、プレミックスアミノ酸標準を使用しました（部品番号 5061-3330、1 nmol/μL）。ギ酸アンモニウムとギ酸は VWR（ドイツ、ダルムシュタット）から入手しました。

標準とサンプル前処理

すべての分析成分の原液は、混合参照標準として 10 mM の濃度で水中で調製しました。水性標準液または培養上清（シュトゥットガルト大学生物化学工学研究所提供）を、プロテイン A クロマトグラフィーによる抗体価分析用に遠心分離（12,100 × g、2 分）の直後に注入するか、水で 1:10 に希釈して遠心分離し、HILIC クロマトグラフィー用に 60 %（v/v）アセトニトリルと 30 mM ギ酸アンモニウム（pH 3.0）に調整しました。培地化合物のクロマトグラフィー性能を向上させる目的で、有機溶媒とバッファによるサンプルの前希釈が必要でした。

培養

CHO DP12 細胞株を産生する IgG₁ モノクローナル抗体（抗 IL-8）のバイオリアクタ培養は、開始容量 1.0 L でバッチモードで実施しました。メディアは化学的に定義されました（TC42、Xell AG、ドイツ）。L-グルタミン、L-アラニル-L-グルタミン、D-グルコース、成長因子、およびその他のさまざまなアミノ酸が含まれます。サンプルは毎日採取し、0.2 μm PES シリンジフィルタでろ過しました。得られた上清は分析まで -70 °C で保存しました。

表 1. 使用済みメディア分析の HILIC メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5、2.1 × 100 mm、2.7 μm
溶媒	A) 85 % アセトニトリル/5 % 2-プロパノール/10 % 水 + 30 mM ギ酸アンモニウム、pH 3 B) 10 % アセトニトリル/5 % 2-プロパノール/85 % 水 + 30 mM ギ酸アンモニウム、pH 3
グラジエント	0.00 分 – 100 % A/0 % B 1.00 分 – 100 % A/0 % B 11.00 分 – 90 % A/10 % B 12.00 分 – 0 % A/100 % B 12.01 分 – 100 % A/0 % B 20.00 分 – 100 % A/0 % B
流量	0.600 mL/min
温度	20 °C
MS 検出器	自動取り込みモード/SIM（表 3 を参照）
注入	注入量：1 μL サンプル温度：4 °C マルチ洗浄：5 秒、90 % アセトニトリル/10 % 水（S1、ニードル洗浄）

表 2. mAb 抗体価分析のためのプロテイン A メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm
溶媒	C) 50 mM リン酸ナトリウムバッファ pH 7.4 D) 500 mM 酢酸 pH 2.6
グラジエント	0.00 分 – 100 % C/0 % D 0.50 分 – 100 % C/0 % D 0.60 分 – 0 % C/100 % D 1.70 分 – 0 % C/100 % D 1.80 分 – 100 % C/0 % D 3.5 分 – 100 % C/0 % D
流量	1 mL/min
温度	30 °C
UV 検出器	280 nm/4 nm、リファレンス 360 nm/100 nm、20 Hz
注入	注入量：50 μL サンプル温度：4 °C マルチ洗浄：5 秒、100 % 水（S2、ニードル洗浄）

結果と考察

化学的に定義された、CHO 細胞を培養するための細胞培養メディアは、数種類の極性化学物質を含み、これらは HILIC カラムで事前に誘導体化せずに分析できます。これらの化合物の大部分は発色団を欠いているため、標準的な UV 検出は適していません。この場合、LC/MSD iQ によって提供される使いやすい質量検出を用いれば、特異性と選択性が向上します。自動取り込みモードを使用することにより、設定された LC 流量と化合物のイオン質量に基づいて、イオン源パラメータとフラグメンタ電圧が自動的に調整されます。適切な SIM チャンネルのみを手動で構成しました。分離には、InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 カラムを、低 pH のバッファとしてギ酸アンモニウムとともに使用しました（表 1）。さらに、5 % (v/v) 2-プロパノールを有機溶媒として移動相 A および B に添加し、HILIC 分離のピーク形状を最適化しました。図 2 は、有機酸、アミノ酸、およびジペプチドを含む細胞培地メディアに通常存在する 16 種類の極性化合物の分離を示しています。

外部定量に関する LC/MSD iQ の能力を実証するために、1、2、5、10、20、50、75、100、150、200 μM のレベルで、すべての化合物について 10 ポイント検量線を作成しました。さらに、検出限界（LOD、S/N = 3）を、OpenLab CDS の自動シグナル/ノイズ比（S/N）計算（P2P）を使用して、すべての化合物に関して 3 つの最低レベルの平均により決定しました。表 3 は、大半の分析成分に対して、良好な直線性（R² > 0.99）と 1 pmol 未満の LOD が得られたことを示しています。これは、LC/MSD iQ が省スペースで設置可能でユーザーフレンドリーな定量に最適であることを示しています。³

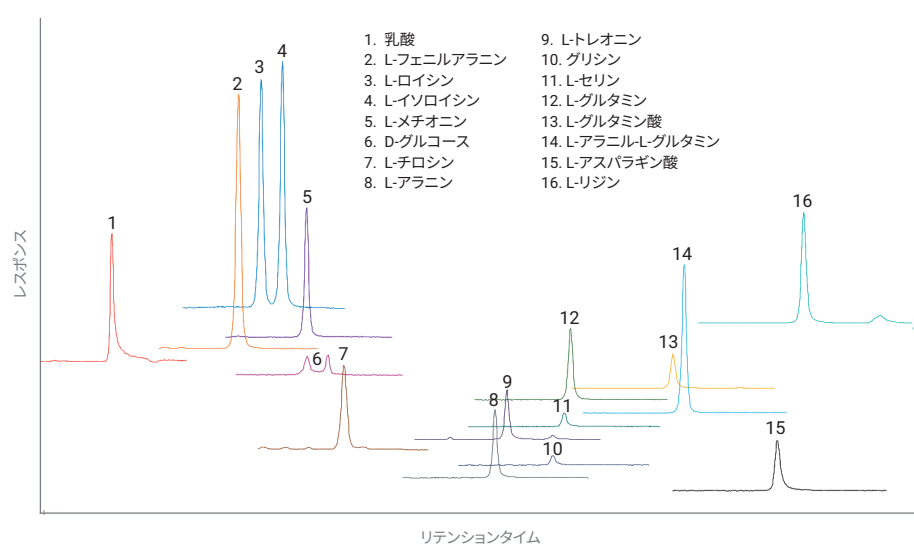


図 2. HILIC メソッドと Agilent InfinityLab LC/MSD iQ を検出器として使用し、標準（200 μM）として分析された細胞培地メディア化合物のクロマトグラム

表 3. HILIC 使用済みメディア分析で分析された各化合物標準の MS および定量パラメータ

化合物	SIM () / 極性	フラグメンタ (V)	リテンション タイム (分)	キャリブレーション範囲 (μM)	R ²	LOD (pmol オンカラム)
乳酸	89 / -	90	1.734	1 ~ 200	0.9979	0.63
L-フェニルアラニン	166 / +	100	3.611	1 ~ 200	0.9956	0.41
L-ロイシン	132 / +	90	3.951	1 ~ 200	0.9964	0.86
L-イソロイシン	132 / +	90	4.274	1 ~ 200	0.9964	0.67
L-メチオニン	150 / +	100	4.615	1 ~ 200	0.9966	0.23
D-グルコース	179 / -	100	4.917	20 ~ 200	0.9934	12.24
L-チロシン	182 / +	100	5.134	2 ~ 200	0.9997	1.09
L-アラニン	90 / +	90	7.358	1 ~ 200	0.9980	0.88
L-トレオニン	120 / +	90	7.534	1 ~ 200	0.9984	0.90
グリシン	76 / +	90	8.218	5 ~ 200	0.9991	3.72
L-セリン	106 / +	90	8.387	5 ~ 200	0.9982	2.80
L-グルタミン	147 / +	90	8.512	2 ~ 200	0.9989	1.72
L-グルタミン酸	148 / +	90	10.100	2 ~ 200	0.9996	1.46
L-アラニル-L-グルタミン	218 / +	100	10.158	1 ~ 200	0.9952	0.54
L-アスパラギン酸	132 / -	90	11.537	2 ~ 200	0.9958	1.19
L-リジン	147 / +	90	11.969	1 ~ 150	0.9901	0.29

2 つの CHO 細胞培養 (A + B) を実施し、バイオリアクタを毎日サンプリングして、使用済みメディア分析に対する後者の HILIC メソッドの適用性を示しました。栄養素の動的プロファイルを図 3 に示します。左側に描かれている化合物はすべて、培養中に濃度が低下するものです。濃度が増加する化合物は右側の図に示されています。全体として、メディア成分は

典型的な挙動を示しています。例えば、D-グルコース (炭素源) と L-グルタミン/L-アラニル-L-グルタミン (窒素源) の消費、またはオーバーフロー代謝の副産物としての乳酸の形成などです。化合物の生成または消費速度のわずかな違いは、CHO 細胞培養の異なる性能を示しています (A と B の比較)。培養中にこの HILIC 法を適用することにより、プロセス

を管理し、培養終了時の製品収量を最適化するためのインプロセス制御を講じることができます。

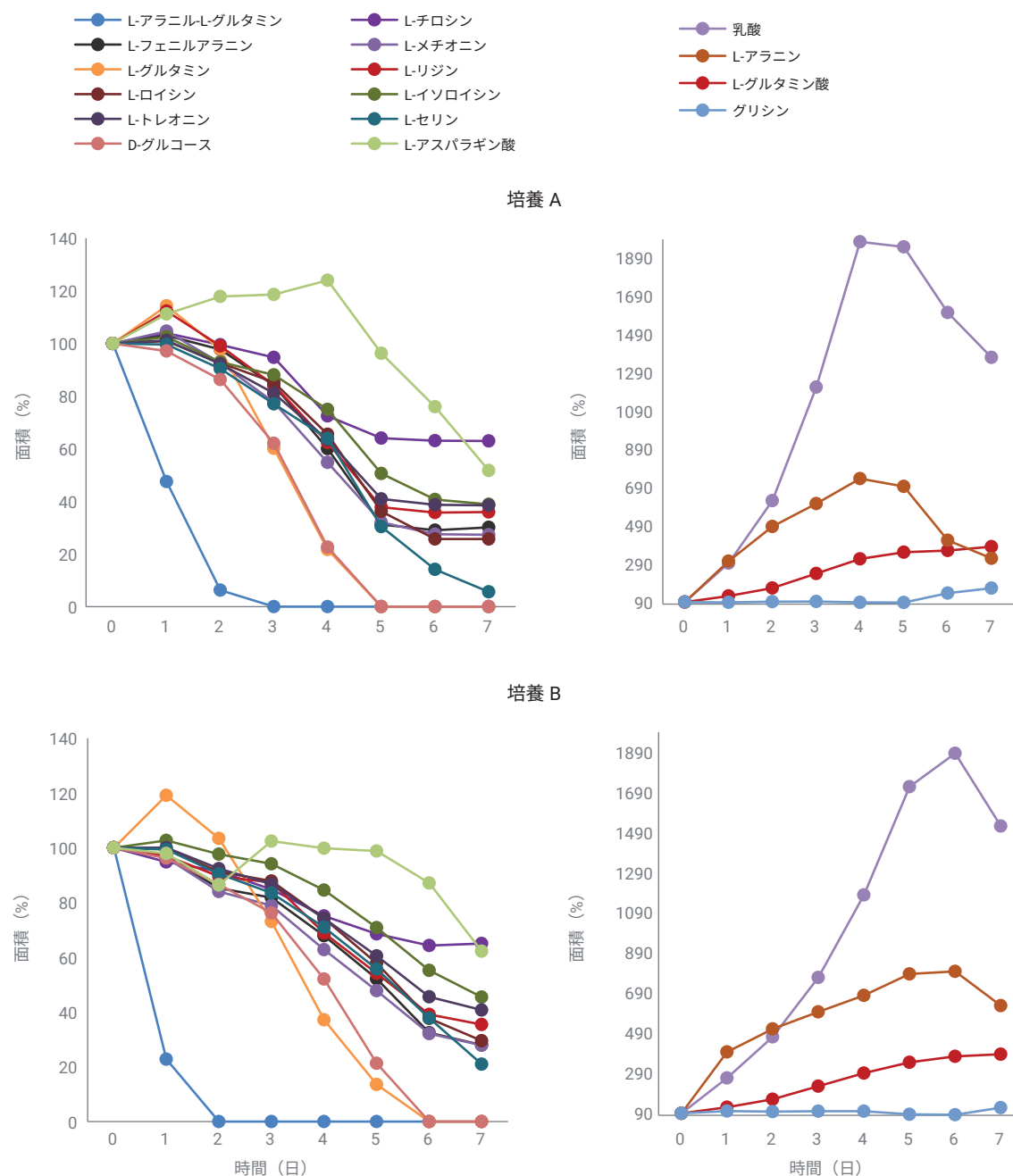


図 3. 細胞培地培養中の HILIC 分析メディア化合物のプロファイル

プロセス変数をさらに監視するために、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを続けて同じ 1260 Infinity II バイオイナート LC システムで実施しました。このシステムは、特に粘性のある生体分子や代謝物に適した、完全なバイオイナート流路を備えています。4 つの利用可能な溶媒チャンネルすべて（HILIC の場合は A + B、プロテイン A の場合は C + D）を使用して、両方のメソッドが手動で溶媒を切り替えることなく実行できます。さらに、両方のカラムを同時に設置し、異なる温度で制御し、内部のカラム選択バルブで切り替えられるため、手動操作がさらに削減されます。開発および最適化したプロテイン A メソッドを表 2 に示します。図 4 は、6 日間の培養期間における培地 A のプロテイン A メソッドの UV クロマトグラムを示したものです。mAb の抗体価は 6 日目に最大に達し、その後減少しました。これはおそらく、プロテイン A に結合する mAb の Fc 領域の熱的または酵素的分解によるものだと考えられます。

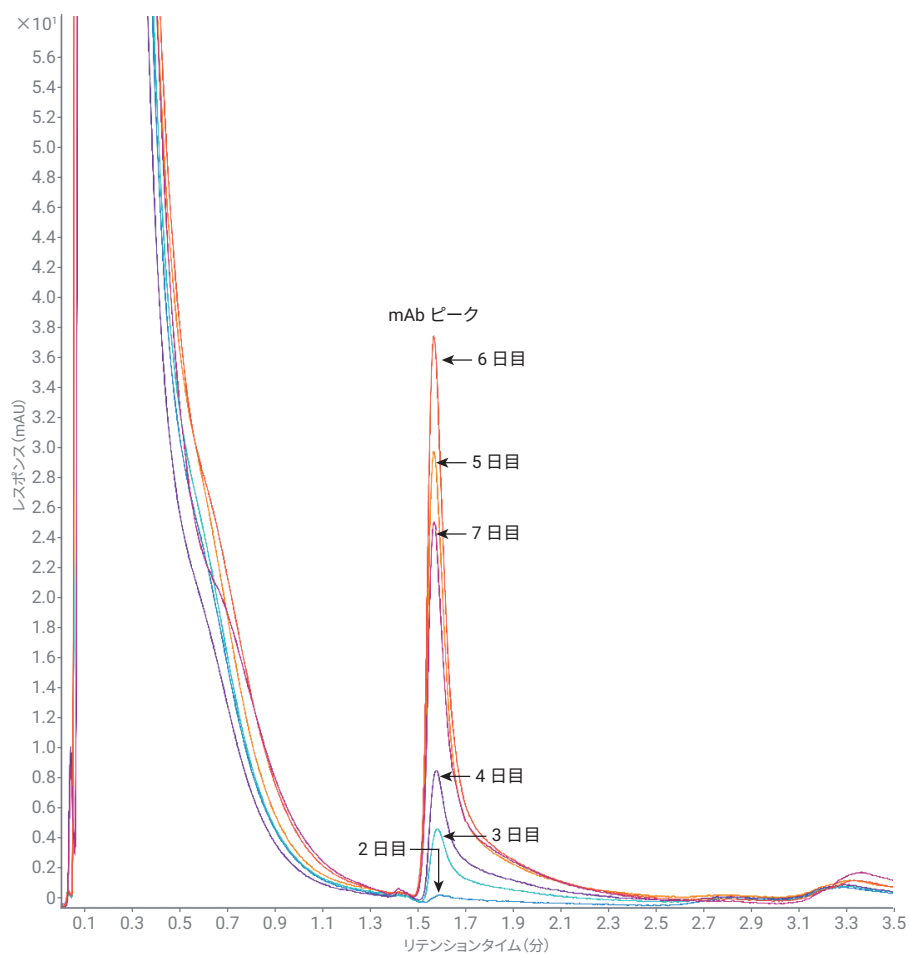


図 4. 6 日間の発酵における培養 A の上清サンプルのクロマトグラム。Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器（280 nm）と組み合わせたプロテイン A メソッドによって分析

mAb ピークの積分後、OpenLab によってピークエクスプローラと呼ばれる機能が提供されます。図 5A は、ピークエクスプローラビューのスナップショットです。ここで、Y 軸はさまざまな注入を示し、X 軸は対応するリテンションタイムを示しています。積分された mAb ピークの面積が円で表され、円の直径は mAb の量に比例します。このピークエクスプローラビューは、mAb の動的な産生を定性的にわかりやすく示します。培養 A および B の動的な mAb 蓄積量を比較すると、mAb の増加の有意差が明らかになり（図 5B）、これもインプロセス制御の目安にできる可能性があります。両方のメソッドを組み合わせると、製造環境またはプロセス開発環境でアットラインプロセス分析を採用するための優れたツールボックスとして活用できます。

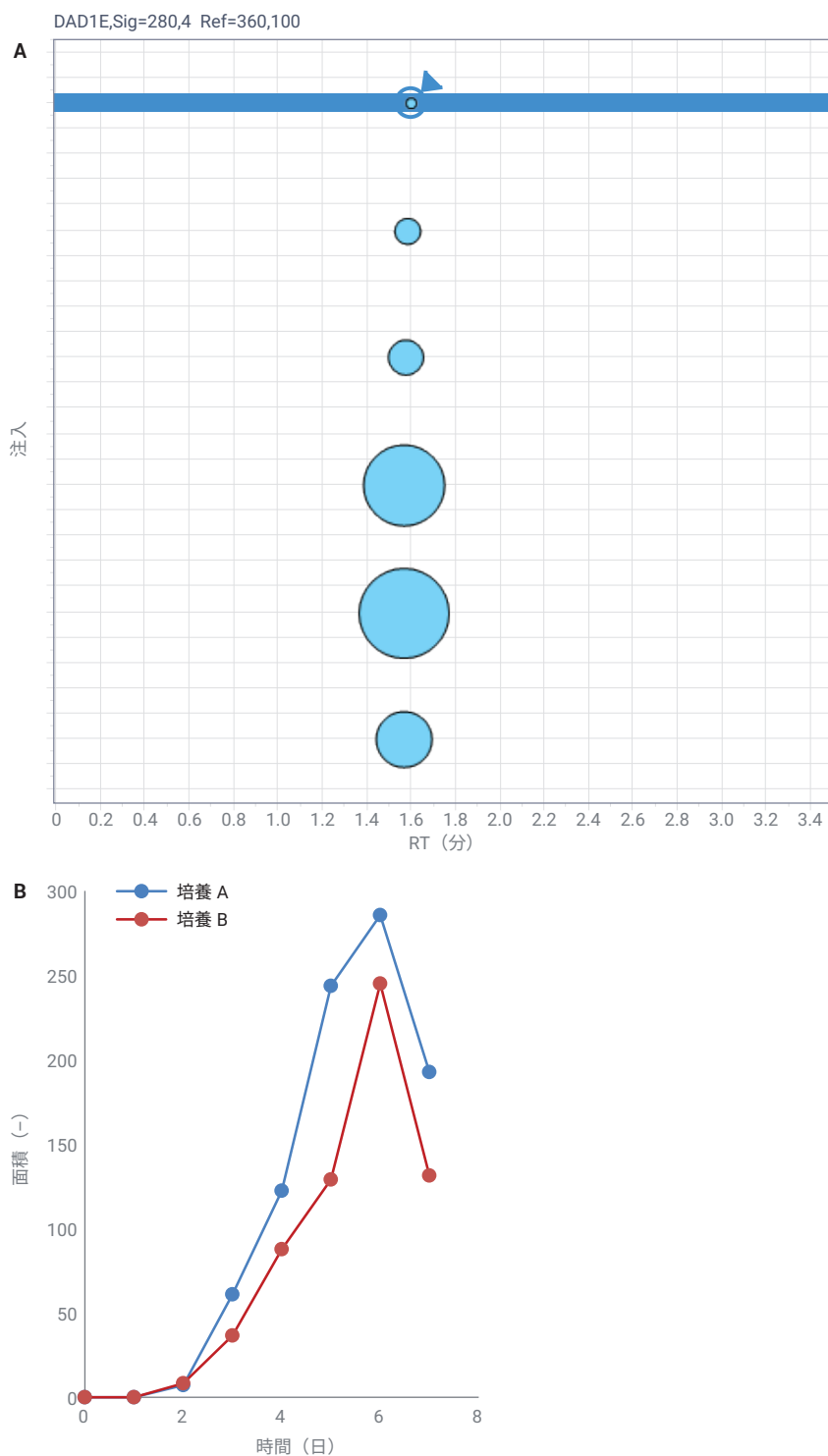


図 5. Agilent OpenLab CDS における培養 A のピークエクスプローラビューのスナップショット (A) と培養期間中の mAb 産生 (B)

結論

プロセス分析技術 (PAT) は、製造プロセス中の成長速度、製品収量、製品品質などのバイオプロセスパラメータを制御、改善するための強力なツールです。このアプリケーションノートでは、その前提条件として、プロセス制御の手段としての HPLC 測定の応用について示しました。検出器として LC/MSD iQ を使用する HILIC 分析について、使いやすい自動取得モードで、主要な細胞培養栄養素の優れた直線性、感度、および選択性が得られることを示しました。自動カラム切り替え機能を備えた LC/MSD iQ に 1260 Infinity II パイオイナート LC を結合させて用いて、使用済みメディア分析とプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーを組み合わせることにより、手動操作が大幅に削減されました。OpenLab CDS 2 ソフトウェアは、完全な適格性評価を受けており、21 CFR Part 11 に関する FDA 要件への準拠に必要なサービスがすべて利用可能で、このアットライン HPLC ソリューションと同時に使用すれば、最新の QbD 環境の一部として最適に機能します。

参考文献

1. Tripathi, N. K.; Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7.
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2). **2009**. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf. (Accessed: 20th April 2020)
3. Feith, A. *et al.* HILIC-Enabled ¹³C Metabolomics Strategies: Comparing Quantitative Precision and Spectral Accuracy of QTOF High- and QQQ Low-Resolution Mass Spectrometry. *Metabolites* **2019**, 9, 63.

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。

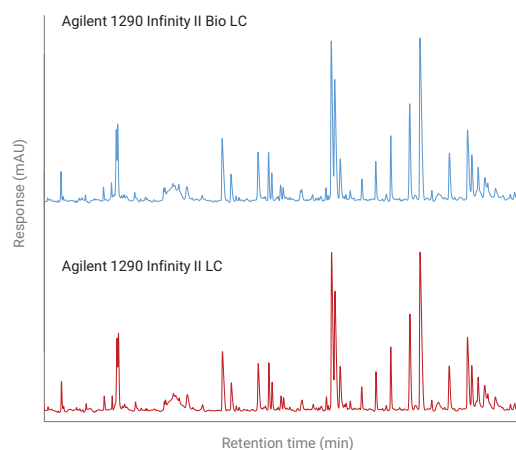
アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, July 16, 2020
5994-2082JAJP
DE.028912037

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムへの シームレスなメソッド移管

ペプチドマッピング分析における優れた性能と
Agilent 1290 Infinity II LC システムを上回るメソッド互換性



BIO



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

概要

ペプチドマッピングには、バイオ医薬品の一次構造と翻訳後修飾（PTM）を解析するための高精度で信頼性が高く堅牢なメソッドが必要です。しかし、バリデーション済みのメソッドについては、メソッド移管と互換性が問題になる可能性があります。このアプリケーションノートでは、新しい Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いて、メソッド移管を簡便に行えることを示します。対象とした 12 種類のペプチドの平均相対リテンションタイムの偏差が 0.039 % であるという優れた結果に基づくと、1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 1290 Infinity II LC システムの間でリテンションタイムが 0.17 % しかずれないことがわかりました。ピークアバンドンスをさらに比較統計解析すると、LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせることにより、両方のシステム間に有意差がないことが明らかになりました。その結果、新しい 1290 Infinity II Bio LC が UV または MS ベースのペプチドマッピングワークフローの最適な選択肢となることがわかりました。

はじめに

ある機器から別の機器へのメソッド移管と互換性は、さまざまな業界のラボにとって重要です。¹ 特にバイオ医薬品業界では、機器間のメソッド移管は、バリデーション済みのメソッドに関して非常に重要です。1290 Infinity II LC から 1290 Infinity II Bio LC へのシームレスなメソッド移管を実証するために、ICH ガイドライン Q6B² に記載されているように、バイオ医薬品の評価にかなりの影響を及ぼすペプチドマッピングワークフローを選択しました。このアプリケーションノートでは、NISTmAb のトリプシン消化を取り上げ、1290 Infinity II Bio LC によるメソッド移管が簡単にできることを示します。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 1290 Infinity II LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせて、次のモジュールで構成しました。

Agilent 1290 Infinity II Bio LC :

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプル (G7137A) とサンプルサーモスタット (オプション 101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、標準フロー・クイックコネクタ Bio 熱交換器 (G7116-60071) および Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) 2 台搭載

- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B)、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

Agilent 1290 Infinity II LC :

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167A)、サンプルサーモスタット (オプション #101) 搭載
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、標準フロー・クイックコネクタ熱交換器 (G7116-60015) および Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) 2 台搭載
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B) とマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションデータ取り込み (B.09.00)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (B.10.00)
- Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00)

カラム

- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 $\times$ 150 mm、1.8 μ m (部品番号 959759-902)
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guard、2.1 $\times$ 5 mm、1.8 μ m (部品番号 821725-901)

試薬

LC グレードのアセトニトリル、炭酸水素アンモニウム、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン、および 2-ヨードアセトアミドは、Merck (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ装着の Milli-Q Integral システム (Millipak、Merck-Millipore、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) で精製しました。ギ酸は VWR (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。トリプシン (ブタ、質量分析グレード) は、G-Biosciences (米国、セントルイス) から入手しました。

サンプル前処理

100 μ L の炭酸水素アンモニウム (100 mM) 中の 0.8 mg の Agilent-NISTmAb (部品番号 5191-5744) を、2 μ L のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP、200 mM) を添加して変性および還元し、60 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートしました。4 μ L の 2-ヨードアセトアミド (IAM、200 mM) でアルキル化した後 (RT で 1 時間)、2 μ L の TCEP で過剰な IAM をクエンチし (RT で 1 時間)、続いて 0.8 mL の 25 mM 炭酸水素アンモニウムで希釈し、酵素トリプシンを加えました (NISTmAb 対トリプシン 20:1 w/w)。37 $^{\circ}$ C で一晩消化させた後、2 μ L のギ酸を添加して、得られた懸濁液の pH を pH 4 未満に下げました。

結果と考察

1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC の間の優れたパフォーマンスとメソッド移管を示すために、NISTmAb のトリプシン消化物を UV および MS 検出により分析しました。どちらのシステムにも、同じ長さで直径のキャピラリーが装備されており、追加のカラム容量は同じです。ただし、1290 Infinity II Bio LC は、粘着性の生体分子に特に適した鉄をまったく含まない流路を有するという特徴があります。両方の分析で、同じ ZORBAX RRHD Eclipse Plus カラムおよびメソッドパラメータを使用しました (表 1)。図 1 は、両方のシステムで取得したペプチドマップのクロマトグラムです。ペプチドパターンの類似性は極めて優れたもので、見分けがほとんどつきません。

表 1. Agilent 1290 Infinity II LC および BioLC のペプチドマッピングメソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 μm + Fast Guard 2.1 x 5 mm
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 B) アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
グラジエント	0.00 分 – 2 % B 44.00 分 – 45 % B 44.01 分 – 97 % B 50.00 分 – 97 % B 50.01 分 – 2 % B 60.00 分 – 2 % B
流量	0.300 mL/min
温度	40 °C、熱平衡化デバイスを利用
UV 検出	VWD : 214 nm、10 Hz/MS : 表 2 を参照
注入	注入量 : 15 μL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : 水で 3 秒間 (フラッシュポート)

表 2. ペプチドの All Ions MS/MS 分析のソースおよび MS パラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
ガス温度	300 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネブライザ	40 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
Vcap	4,000 V
ノズル電圧	500 V
フラグメンタ	175 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
取り込みモード	ポジティブ、拡張ダイナミックレンジ (2 GHz)
質量範囲	m/z 100 ~ 1,700
取り込みレート	6 スペクトル/秒
コリジョンエネルギー	All Ions MS/MS – 0 V、10 V、25 V

より詳しく評価するため、一般的な分離能 (R_s) 値を両方の分離について 3 つ計算し (図 1)、極めてよく一致することが示されました。リテンションタイム精度に関する 1290 Infinity II Bio LC および 1290 Infinity II LC の性能を解析するために、12 個のペプチドを選択し、対応するリテンションタイムの相対標準偏差 (RSD) を 10 回の連続注入に基づいて計算しました。図 2 は、すべての RSD 値がシステムに関係なく 0.1 % 未満であることを示しており、Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプと 1290 Infinity II ハイスピードポンプの優れた性能が示されました。12 個のペプチドの平均 RSD 値は 1290 Infinity II Bio LC では 0.039 % という極めて小さい値となっており、このシステムは堅牢で信頼性の高いペプチドマッピングに最適であることがわかります。ただし多くのラボにとっては、性能が高いだけでなく、異なる LC システム間のメソッドの互換性も非常に重要です。

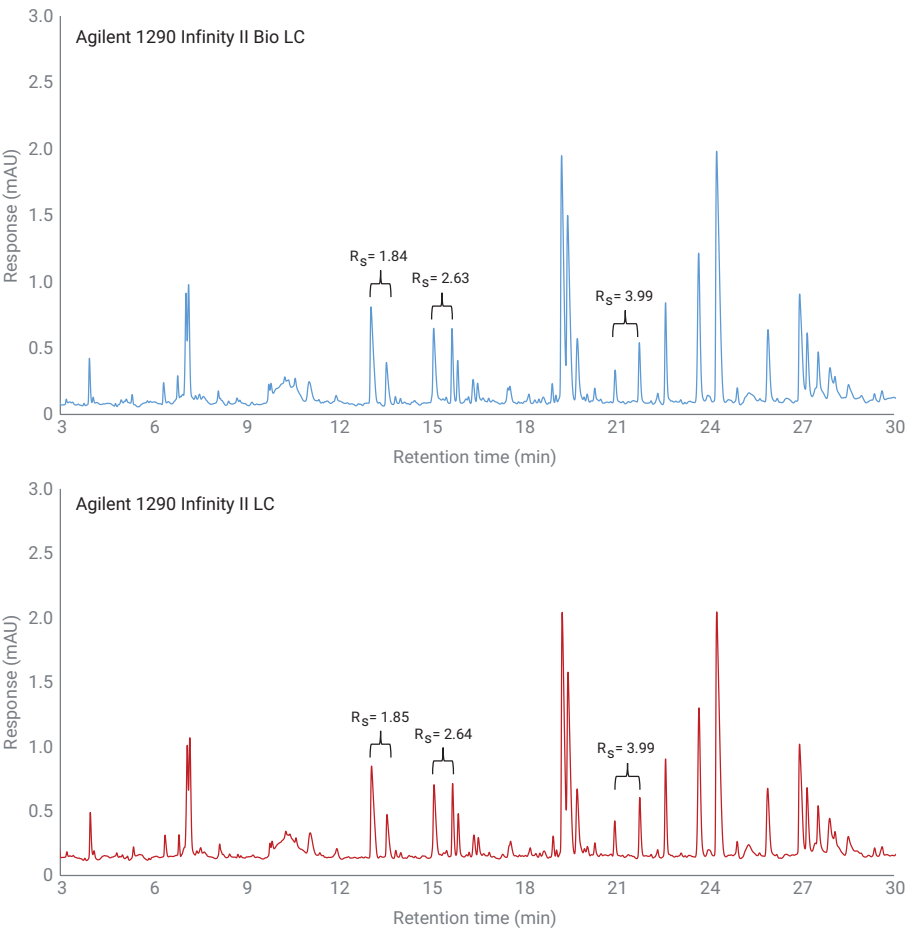


図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC と Agilent 1290 Infinity II LC による、同じメソッド (表 1) を用いて分離された NISTmAb のトリプシン消化物のクロマトグラム

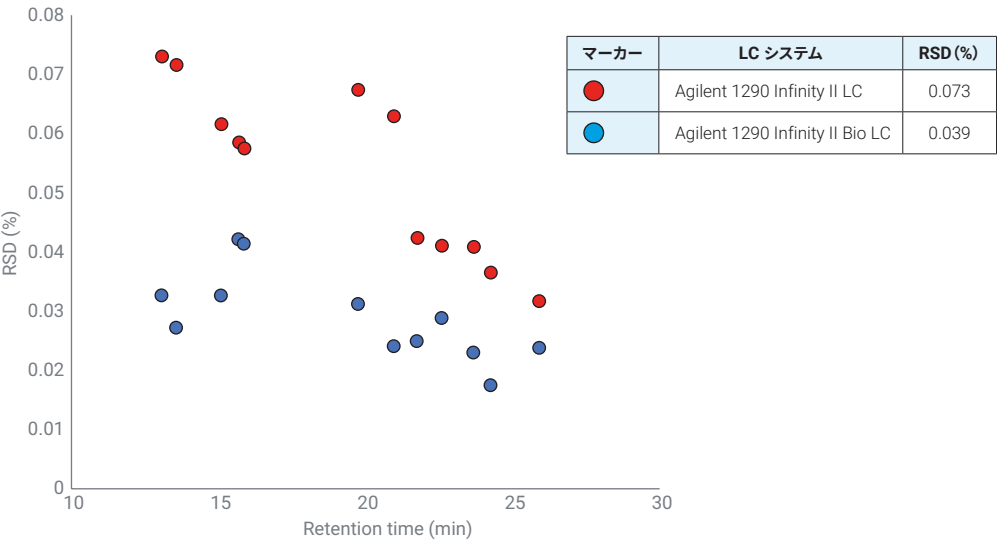


図 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent 1290 Infinity II LC の相対リテンションタイム精度 (RSD) 値

バリデーション済みまたはコンプライアンス環境で分析成分を特定するには、特定のウィンドウ内に絶対リテンションタイムを設定する必要があります。両方の LC システムの 12 個のペプチドの平均リテンションタイムを求め、1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC の間のリテンションタイムの偏差を計算することにより、性能を評価しました。平均ペプチドリテンションタイムを図 3 の表に示します。また、対応する偏差を棒グラフにしました。LC システム間の偏差は最大でもわずか 0.17 % という計算結果が得られ、1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC 間のシームレスなメソッド移管が示されました。

メソッドの互換性をさらに調査するために、両方のシステムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC / Q-TOF と接続しました。ノンターゲットアプローチでは、MS 検出器を All Ion モードで使用し (表 2)、コリジョンセル内のすべてのプリカーサーイオンを周期的にフラグメント化しました。次に、これらの情報が豊富なデータセットを両方の LC システムの Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) ソフトウェアで評価し、同定されたピークが存在量の違いを全体的に把握しました。両方の LC システムで NISTmAb のトリプシン消化物を 10 回連続注入して得たデータをもとに、統計解析を行いました。250 の最もアバンダンスが高いピークを相関解析によって評価し、対応する対数倍率変化を図 4A に示します。両方のシステムでピークの違いが見られない場合、ピークは図 4A の 1x ラインの周りに集まり、ピーク面積に有意差がないことが示されます。しかし、一方のシステムに 2 倍のアバンダンスのピークがある場合、そのピークは 2 x ラインの周りに配置されます。グラフィカルデータの結果を見ると、ほとんどのピークに大きな差はないことがわかります。ピークの最大 75 % で、アバンダンスの違いが 10 % 以下でした。さらに驚くべきことに、10 回の注入を超えるアバンダンスの RSD は、1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC でほぼ同じでした (図 4B)。ペプチドピークの 90 % 以上で、面積 RSD 値が 4 % 以下でした。

LC システム	平均ペプチドリテンションタイム (分)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Agilent 1290 Infinity II LC	13.082	13.577	15.104	15.704	15.887	19.751	20.968	21.769	22.599	23.684	24.261	25.907
Agilent 1290 Infinity II Bio LC	13.062	13.559	15.084	15.677	15.860	19.743	20.961	21.742	22.585	23.663	24.249	25.907

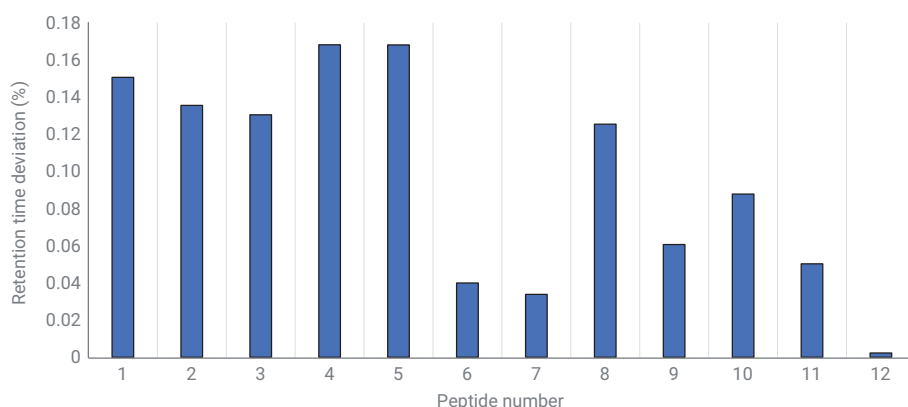


図 3. 選択した 12 種類のペプチドの平均リテンションタイムと、2 つの LC システムにおける偏差

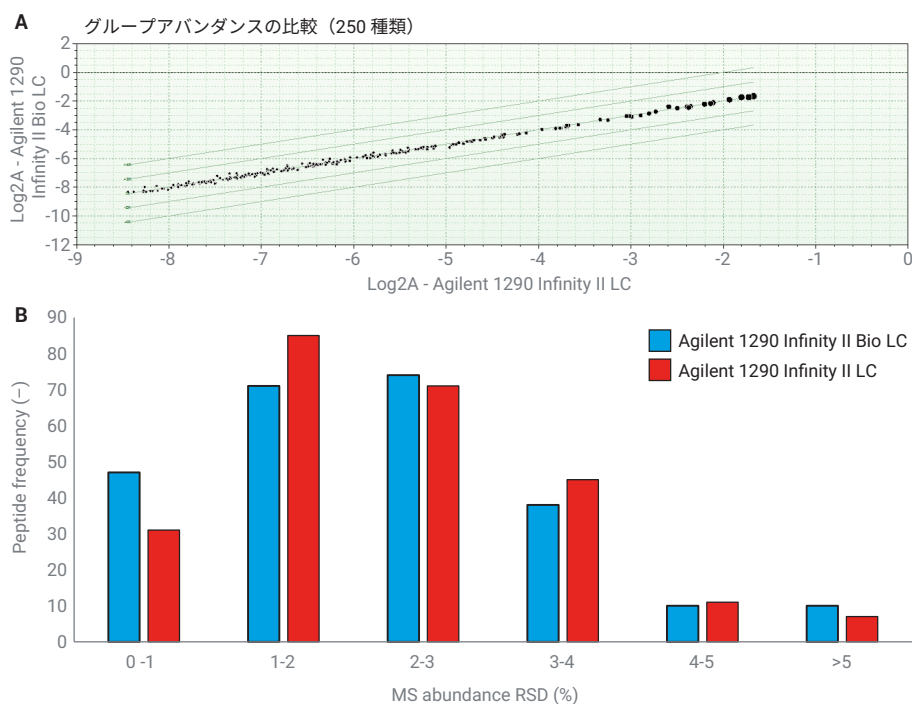


図 4. (A) 10 回の連続注入に基づく統計的相関解析。対数倍率値は、Agilent MassHunter Mass Profiler (B.10.00) によって識別された 250 の最高アバンダンスピークの黒い点として示されています。(B) Agilent 1290 Infinity II Bio LC および 1290 Infinity II LC のペプチドアバンダンスの RSD 値のヒストグラム。

結論

メソッド移管は、新しい LC システムを構成しインストールする際に、多くのラボにとって面倒で困難なプロセスになることがあります。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC ではそのような懸念がないことを示しました。1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC で、同じ NISTmAb ペプチドマッピングメソッドを実行した結果、最大 0.17 % のリテンションタイム偏差でシステム間のメソッド移管がシームレスに行えることがわかりました。1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプのおかげで、10 回の注入後の平均相対リテンションタイム偏差も 0.039 % という優れた値を示しました。両方のシステムを 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせ、ピークアバンドランスの包括的な統計解析を行った結果、両者に有意な差はなく、2.8 % という優れた平均 RSD が示されました。これらの検討結果を組み合わせると、1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC の間で効率的かつ便利なメソッド移管が簡単に実現できることは明らかです。したがって、1290 Infinity II Bio LC は、流路に鉄を含まないという利点を備えた、検出メソッドに左右されないペプチドマッピングワークフローに最適な選択肢です。

参考文献

1. Agilent 1290 Infinity with ISET. *Agilent Technologies user manual*, publication number G4220-90314, **2015**.
2. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B, **1999**. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

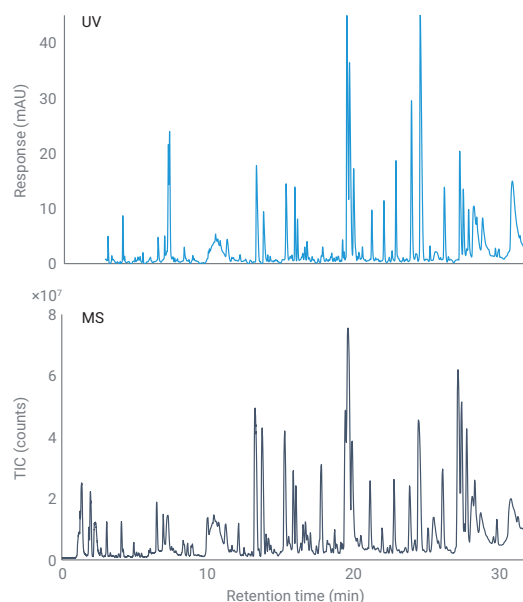
Printed in Japan, November 19, 2020

5994-2836JAJP

DE.44140.1323148148

堅牢で信頼性の高いペプチドマッピング

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム：
mAb の一次構造および PTM 分析用の UV および MS ベースの
新たなプラットフォーム



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

概要

ペプチドマッピングは、モノクローナル抗体（mAbs）の一次構造を解明するための標準分析法です。ただし、ペプチドマッピングを成功させるには、高品質のペプチド分離のための堅牢で信頼性の高い LC システムを用いることが鍵となります。このアプリケーションノートでは、ペプチドマッピングに最適なシステムとして Agilent 1290 Infinity II Bio LC を紹介します。公開されている NISTmAb の包括的なペプチドマッピングメソッドを再現したところ、非常になだらかなグラジエントでも、0.1 % 未満の極めて優れた相対リテンションタイム偏差が得られました。さらにメソッド開発を進め、優れた相対標準偏差とピークキャパシティ値を維持しながら、合計分析時間を 60 % 削減しました。さらに、メソッド開発セットアップの例として、1290 Infinity II Bio LC を Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF に直接接続し、バイオ医薬品の製造チェーン全体でのメソッド移管を容易にしました。

はじめに

ペプチドマッピングは、今日の産業バイオテクノロジーにおけるバイオ医薬品の一次構造と翻訳後修飾（PTM）を分析するために広く使用されている手法です。通常、mAb の変性、アルキル化、および消化では、ボトムアップアプローチが使用されます。続いて、得られたペプチドは、逆相または、場合によっては親水性相互作用液体クロマトグラフィーを使用して HPLC または UHPLC によって分離されます。検出は、質量分析（MS）を使用して原薬を同定するか、あるいは品質管理（QC）環境で紫外線（UV）吸光度を使用してクロマトグラフィープロファイルのリファレンスマップと比較することにより実施されます。ペプチドマッピングは、ICH ガイドライン Q6B.¹ に記載されている生物学的製剤の評価の許容基準の一部として使用できます。LC/MS または UV を使用することにより、ペプチドマッピングの変化、例えば酸化または脱アミド化の増加²、新しい配列変異体の出現³、またはグリカン組成の変化⁴、を評価することができます。したがって、安全で強力なバイオ医薬品をリリースおよび開発するためには、特に UV 検出器を使用する場合、精度と堅牢性が最も重要です。

このアプリケーションノートでは、ペプチドマッピングの新しいプラットフォームとして、新しい 1290 Infinity II Bio LC を紹介します。高精度のバイナリ Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプと生体適合性のある鉄を含まない流路を活用したこのシステムは、ペプチド、タンパク質、代謝物などの生体分子に特に適しています。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせて、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ（G7132A）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ（G7137A）、サンプルサーモスタット付き（オプション #101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、標準フロークイックコネクト Bio 熱交換器（G7116-60071）および Agilent 熱平衡化デバイス（G7116-60013）2 台搭載
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（VWD）（G7114B）、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（G6545XT）

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションデータ取り込み（B.09.00）
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis（B.10.00）
- Agilent MassHunter BioConfirm（B.10.00）

カラム

- Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 $\times$ 250 mm、2.7 μ m（部品番号 651750-902）
- Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング Fast Guards、2.1 $\times$ 5 mm、2.7 μ m（部品番号 851725-911）
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 $\times$ 150 mm、1.8 μ m（部品番号 959759-902）
- Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 Fast Guards、2.1 $\times$ 5 mm、1.8 μ m（部品番号 821725-901）

試薬

LC グレードのアセトニトリル、炭酸水素アンモニウム、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン、および2-ヨードアセトアミドは、Merck（ドイツ、ダルムシュタット）から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ装着の Milli-Q Integral システム（Millipak、Merck-Millipore、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ）で精製しました。ギ酸は VWR（ドイツ、ダルムシュタット）から購入しました。トリプシン（ブタ、質量分析グレード）は、G-Biosciences（米国、セントルイス）から入手しました。

サンプル前処理

100 μ L 炭酸水素アンモニウム（100 mM）中の 0.8 mg の Agilent-NISTmAb（部品番号 5191-5744）を、2 μ L のトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP、200 mM）を添加して変性および還元し、60 °C で 1 時間インキュベートしました。4 μ L の 2-ヨードアセトアミド（IAM、200 mM）でアルキル化した後（RT で 1 時間）、2 μ L の TCEP で過剰な IAM をクエンチし（RT で 1 時間）、続いて 0.8 mL の 25 mM 炭酸水素アンモニウムで希釈し、酵素トリプシンを加えました（NISTmAb 対トリプシン 20:1 w/w）。37 °C で一晩消化させた後、2 μ L のギ酸を添加することにより、得られた懸濁液の pH を pH 4 未満に下げました。

表 1. メソッド A :Mouchahoir & Schiel, 2018⁵ から採用した包括的な NISTmAb ペプチドマッピングメソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング、2.1 × 250 mm、2.7 µm + Fast Guard 2.1 × 5 mm
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 B) アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
グラジエント	0.00 分 – 2 % B 110.00 分 – 45 % B 110.01 分 – 97 % B 125.00 分 – 97 % B 125.01 分 – 2 % B 150.00 分 – 2 % B
流量	0.200 mL/min
温度	40 °C、熱平衡化デバイスを利用
検出	VWD : 214 nm、10 Hz/MS : 表 3 を参照
注入	注入量 : 15 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : 水で 3 秒間 (フラッシュポート)

表 2. メソッド B :最適化および短縮されたペプチドマッピングメソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 µm + Fast Guard 2.1 × 5 mm
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 B) アセトニトリル + 0.1 % 酢酸
グラジエント	0.00 分 – 2 % B 44.00 分 – 45 % B 44.01 分 – 97 % B 50.00 分 – 97 % B 50.01 分 – 2 % B 60.00 分 – 2 % B
流量	0.300 mL/min
温度	40 °C、熱平衡化デバイスを利用
UV 検出	VWD : 214 nm、10 Hz/MS:表 3 を参照
注入	注入量 : 15 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : 水で 3 秒間 (フラッシュポート)

表 3. ペプチドの繰り返し MS/MS 分析のソースおよび MS パラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
ガス温度	325 °C
ドライガス流量	13 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガス温度	275 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	4,000 V
ノズル電圧	0 V
取り込みモード	拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz)
質量範囲	<i>m/z</i> 100 ~ 1,700
取り込みレート	8 スペクトル/秒
自動 MS/MS 範囲	<i>m/z</i> 50 ~ 1,700
選択幅	ナロー (~ <i>m/z</i> 1.3)
プリカーサ/サイクル	10
コリジョンエネルギー	チャージ 2 : 3.1 (スロープ) および 1 (オフセット) チャージ 3 および >3 : 3.6 (スロープ) および -4.8 (オフセット)
プリカーサの閾値	1,000 カウントおよび 0.001 %
アクティブな排除	1 スペクトル後 0.2 分間
プリカーサの強度に基づくスキャン速度	あり、25,000 カウント/スペクトル
MS/MS 累積時間制限	あり
純度	ストリンジェンシー : 100 %/カットオフ : 30 %
同位体モデル	ペプチド
プリカーサの順位	荷電状態からアバンドランス

結果と考察

mAb などのタンパク質バイオ医薬品のトリプシン消化物は、多数のペプチドからなる非常に複雑な混合物です。これらのバイオ医薬品の一次構造を決定および分析するために、非常に長くなだらかなグラジエントが展開され、分析時間が最大数時間に及ぶこともあり、機器に対する要求が厳しくなります。この難易度の高い分析に 1290 Infinity II Bio LC が適合していることを示すために、NISTmAb のトリプシン消化について米国国立標準技術研究所 (NIST) によって以前に公開された LC/UV および MS メソッド⁵ を再現することにしました。この目的で、長さ 250 mm の AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使用しました。メソッドの合計分析時間は 2.5 時間でした (メソッド A、表 1)。さらに、分析時間を短縮するために、ZORBAX RRHD Eclipse Plus カラムのサブ 2 μm 粒子を活用して別の LC メソッドを開発しました (メソッド B、表 2)。図 1 は、Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) で検出された両メソッドのクロマトグラムです。

同様のペプチドパターンが、両方のクロマトグラムで観察できます。ただし、大半の成分が溶出したのは、最初に公開された NIST メソッド A では 80 分後であったのに対して、メソッド B では 30 分後とすることができました。その結果、合計分析時間が 60 % 短縮されました。1290 Infinity II Bio LC の精度と堅牢性を体系的に評価するために、両方のメソッドで 8 つのピークを選択しました。続いて、10 回の連続注入に基づいてリテンションタイムの標準偏差を計算しました (図 2)。

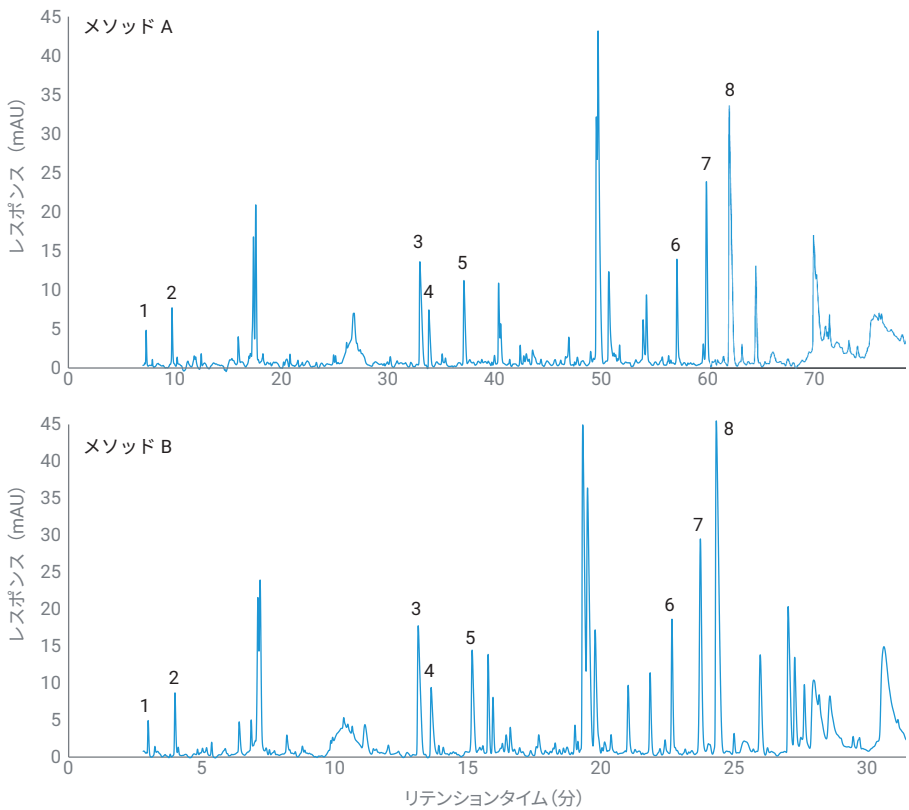
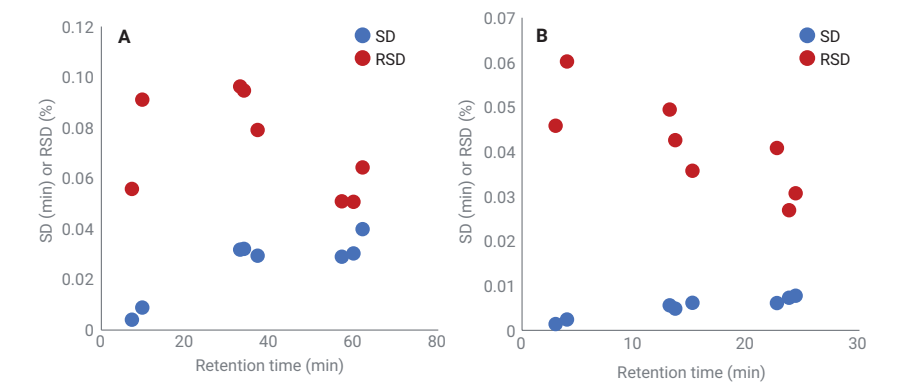


図 1.メソッド A および B を使用し、Agilent 1290 Infinity II Bio LC で分離された NISTmAb のトリプシン消化物のクロマトグラム。リテンションタイムの精度とピークキャパシティの計算のために、8 つのピークを選択しました。



	グラジエント勾配(%B/分)	Ø SD (分)	Ø RSD (%)	P _{C,4σ} (-)
メソッド A	0.39	0.026	0.073	428
メソッド B	0.98	0.005	0.039	348

図 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC で取得したメソッド A および B の絶対 (SD) および相対 (RSD) リテンションタイム精度値。グラジエント勾配とピークキャパシティを表に示します。

メソッド A と B はどちらも、0.1 % 未満の相対リテンションタイム偏差を示し、それぞれ 0.39 および 0.98 % B/分の非常になだらかなグラジエント勾配でも 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプの並外れた性能を示しています。LC メソッドの包括的な分離特性を評価するために、分離の品質の尺度として 4 σ のピークキャパシティを計算しました。メソッド A の分析時間が延長されたため、対応するピーク容量値は 428 で最も高くなりました。しかし、0.039 % という卓越した平均 RSD と 348 という高いピークキャパシティを組み合わせると、メソッド B は十分に代替手段となり得るもので、NIST が公開しているペプチドマッピングメソッドと比較して分析時間が大幅に短縮されます。

バイオテクノロジー環境におけるペプチドマッピングの一般的なワークフローでは、UV および MS 検出器を順に使用します。この設定では両方の検出器でメソッド開発を行うことができ、ペプチドの同定には MS を使用します。メソッドを確立した後、分析は QC 環境でのハイスループット分析用に UV 検出器に簡単に移管できます。このケースを実証するために、1290 Infinity II Bio LC を 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF に直接接続し、NISTmAb のトリプシン消化をメソッド B で再分析しました。MS 検出は、表 3 に示すように反復 MS/MS モードで実行しました。得られたクロマトグラムを図 3 に示します。

ピークの広がりに対して特別な対策は講じませんでしたが、信頼性の高い MS 検出には十分な分離能のままでした。mAb の一次構造の同定と確認は、Agilent MassHunter BioConfirm ソフトウェアを使用して簡単に実行できます。MS または MS/MS レベルで同定されたペプチドを、選択したバイオ医薬品の参照配列と比較することで、PTM を相対的に分析・定量化できます。このアプローチでは、いわゆる PENNY ペプチド (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) ⁶ および対応する脱アミド化アイソフォームを同定できました。PENNY ペプチドは、ほぼすべての

ヒトまたはヒト化 mAb が共有する保存領域 (Fc) の一部であり、誘導された脱アミド化の適切な指標として使用可能です。これらのペプチドの拡大図を図 4 に示します。

ペプチドの同定後、最適化されたペプチドマッピングメソッド B の優れた分離能力と、1290 Infinity II Bio LC の優れたリテンションタイム精度により、この場合は UV 検出によって相対定量を行うこともできます。

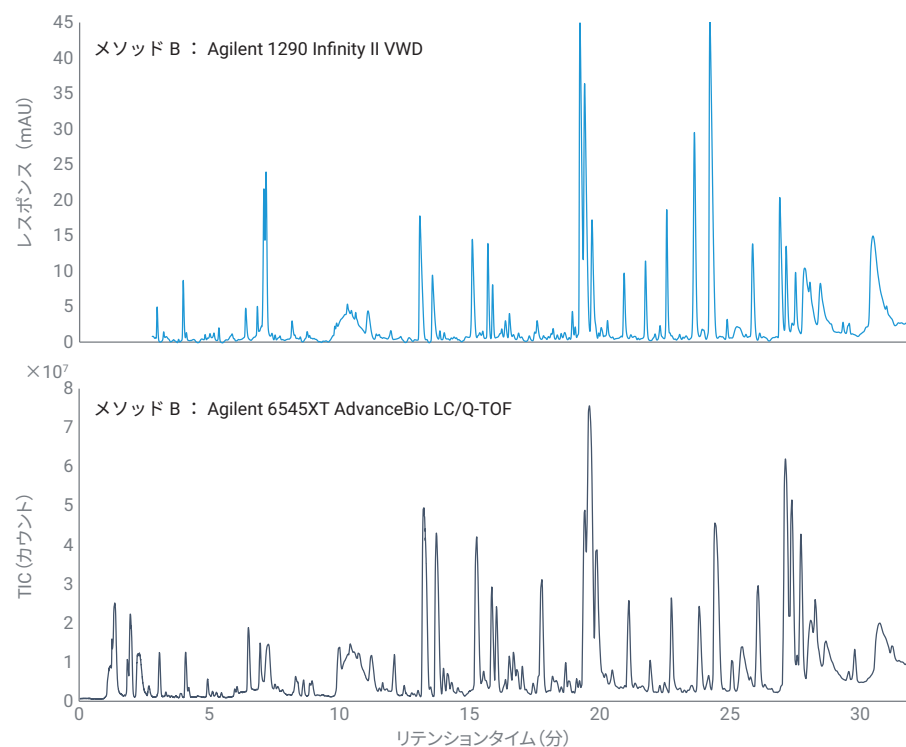


図 3. 生体適合性マイクロフローセルを備えた Agilent 1290 Infinity II VWD (上) と Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (下) で連続して検出された NISTmAb のトリプシン消化物のクロマトグラム

結論

配列またはグリコシル化変異体、酸化、脱アミド化などの重要品質属性 (CQA) は、ペプチドマッピングによって分析できます。ただし、可能な限り最高の結果を得るには、使用するメソッドと機器が堅牢で信頼性が高くなければなりません。このアプリケーションノートでは、新しい 1290 Infinity II Bio LC がこれらの高い期待に応えられることを示しました。0.1 % 未満のリテンションタイム精度の偏差が、NISTmAb の包括的な公開ペプチドマッピングメソッドを再作成することで常に実現できました。このメソッドを最適化し、1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプを用いることで、優れた精度と分離品質を損なうことなく合計分析時間を 60 % 短縮することができました。メソッド開発環境での使いやすさの例として、1290 Infinity II Bio LC を 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF に直接接続する機能により、ハイスループット QC 環境への簡単なメソッド移管が可能になることを実証しました。以上のことから、1290 Infinity II Bio LC は、mAb の UV および MS ベースの一次構造および PTM 分析のための新しいプラットフォームとして用いることができます。

参考文献

1. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q6B.(1999).Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.
2. Li, X. et al. High Throughput Peptide Mapping Method for Analysis of Site Specific Monoclonal Antibody Oxidation. *J. Chromatogr.A* **2016**, 1460, 51-60.
3. Li, Y. et al. Characterization of Alanine to Valine Sequence Variants in the Fc Region of Nivolumab Biosimilar Produced in Chinese Hamster Ovary Cells. *MAbs* **2016**, 8, 951-960.
4. Wang, T. et al. Application of a Quantitative LC-MS Multiattribute Method for Monitoring Site-Specific Glycan Heterogeneity on a Monoclonal Antibody Containing Two N-Linked Glycosylation Sites. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 3562-3567.
5. Mouchahoir, T.; Schiel, J. E. Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NISTmAb. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 2111-2126.
6. Chelius, D.; Rehder, D. S.; Bondarenko, P. V. Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6004-6011.

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, October 12, 2020
5994-2718JAJP
DE.1797222222

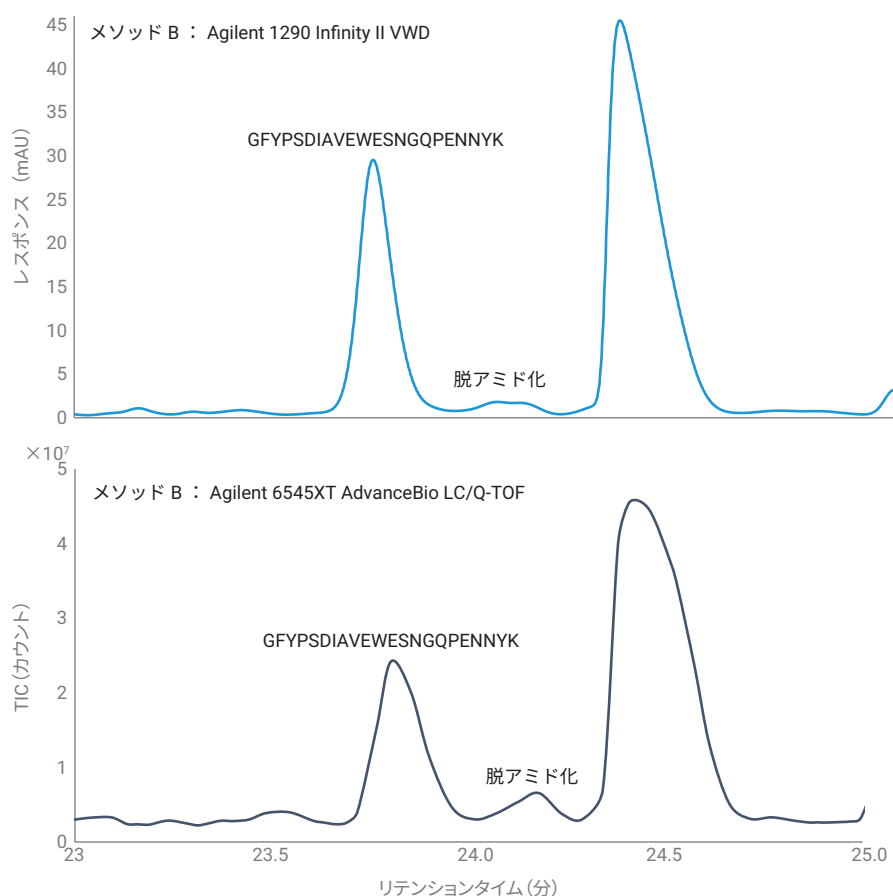
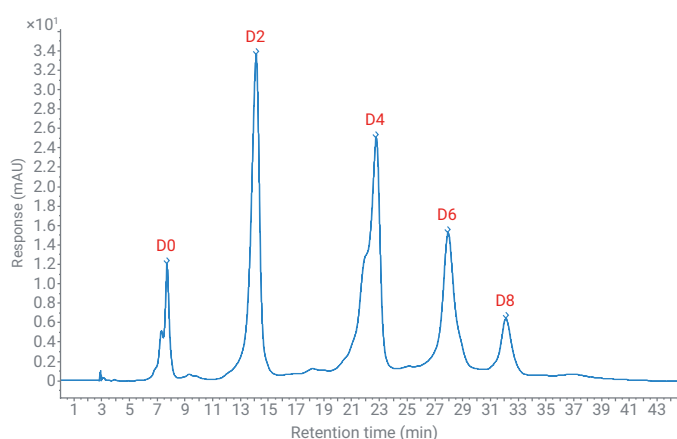


図 4. PENNY ペプチド (GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK) と対応する脱アミド化アイソフォームの分離を強調する図 3 のクロマトグラムの拡大図

高塩条件下での高い再現性

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いた
疎水性相互作用クロマトグラフィーによる抗体薬複合体の分析



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

薬物抗体比 (DAR) の決定は通常、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) を使用して行われます。この穏やかな非変性分析メソッドの溶出液には、液体クロマトグラフィー (LC) システムでは扱いづらい高濃度の腐食性のある塩が含まれています。

鉄をまったく含まない流路を備えた高速ポンプを装備した Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムは、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に最適であり、システムに損傷を与える可能性のある腐食を防止します。このアプリケーションノートでは、HIC を使用したブレンツキシマブ ベドチンの DAR 測定について述べます。DAR は、抗体あたり 3.7 薬物分子と計算されました。優れた再現性が得られ、1290 Infinity II Bio LC は、生成されたデータに最高の信頼性を与えるアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムの一翼を担うことが実証されました。Agilent OpenLab CDS のソフトウェア機能として「ブランク減算」を用いると、純度の低い硫酸アンモニウムによるベースラインのドリフトを除去し、スムーズな積分が実行できます。

はじめに

抗体薬物複合体 (ADC) は、細胞傷害性低分子医薬品が化学的に結合したモノクローナル抗体 (mAb) です。¹ 対応する抗体と比較して、構造はより複雑で不均一です。

システイン結合 ADC² (プレントキシマブ ベドチン、武田薬品のアドセトリスなど) では、部分的に還元された mAb の遊離チオール基に低分子が結合しています。遊離スルフヒドリル基の数は、複合化する薬物の定義位置の数が制限され、抗体あたり 0、2、4、6、および 8 つの薬物の混合物となります。mAb に結合した薬物の平均数は、安全性と有効性に直接影響を与える可能性があるため、ADC の最も重要な品質特性の 1 つです。DAR は、目的の組織に到達できるペイロードの量を決定します。⁵

HIC は、抗体ごとに異なる数の薬物がロードされたシステイン結合 ADC 分子を分離するための参照メソッドです。⁶ mAb に結合した低分子は比較的疎水性であることが多いため、ADC の薬物ロードが増すと、相対疎水性が増加します。したがって、HIC は DAR のモニタリングに最適です。

HIC は、天然のタンパク質構造を維持する非変性分析テクニックです。これは通常、中性 pH で実施されますが、高塩濃度から低塩濃度へのグラジエントでタンパク質を分離します。分離の原理は、タンパク質の塩析実験で見られるものと同じです。⁶ 移動相 A で使用される高濃度の塩バッファ液では、タンパク質は水和シェルを失い、固定相の疎水性表面に保持されます。移動相 B は通常、塩を添加しない同じバッファ (主にリン酸塩) です。グラジエント内の移動相 B の量が増えると、タンパク質は水和シェルを再構築し、カラムから溶出します。イソプロピルアルコールなどの有機溶媒を少量添加することでも、カラムからタンパク質を溶出させることができます。

1290 Infinity II Bio LC は、アジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムであり、バイオクロマトグラフィーで使用される条件 (2 M NaCl⁷、8 M までの尿素などの高塩濃度、0.5 M NaOH または 0.5M HCl など) の高 pH および低 pH 溶媒) にあわせて特別に設計されています。サンプル流路全体にステンレス (SST) と鉄分がまったく存在していません。マルチサンブラ、マルチカラムサーモスタット、検出器全体のキャピラリとフィッティングはすべて、ニッケル-コバルトアロイの MP35N 製です。この材質を使用することにより、高塩含有バッファの腐食の可能性が低減され、鉄イオンの存在に起因するタンパク質の修飾 (酸化、タンパク質複合体の形成など) を防止できます。

このアプリケーションノートでは、プレントキシマブ ベドチンを HIC で分析して DAR を測定し、リテンションタイムと面積の精度を評価します。さらに、OpenLab 2 の処理メソッドのソフトウェア機能「ブランク減算」をベースラインのドリフトのフィルタリングに適用し、その利点を示します。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様の標準フロー熱交換器搭載
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 μ L 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5

カラム

Agilent AdvanceBio HIC、3.5 μ m、4.6 $\times$ 100 mm (部品番号 685975-908)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。イソプロパノールは Merck (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ装着の Milli-Q Integral システム (Millipak、Merck-Millipore、米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) で精製しました。リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸水素二ナトリウム七水和物、および硫酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich (ドイツ、シュタインハイム) から入手しました。

サンプル

プレントキシマブ ベドチン (商品名アドセトリス、武田薬品工業、日本、東京) を水 50、溶媒 A (下記参照) 50 の溶液 100 mg/mL に溶解しました。

注：アドセトリスには数多くのアジュバントが含まれているため、ここで言及されている濃度はタンパク質濃度だけでなく、薬剤を構成するすべての成分の総濃度です。

バッファの前処理

A：pH 7 の 50mM リン酸バッファ液を溶媒とする 1.5M 硫酸アンモニウム

B：pH 7 の 50mM リン酸バッファ液 + 20 % イソプロパノール

2 L の 50mM リン酸バッファ、pH 7 については、5.84 g のリン酸二水素ナトリウム一水和物、および 15.47 g のリン酸水素二ナトリウム七水和物を 2L の茶色瓶に加え、超純水を使用して 2 L まで充填しました。pH 値をチェックして、必要であれば pH 7 に調整しました。次に、198.21 g の合計 1.5M の硫酸アンモニウムを空の 1L 茶色瓶に加え、調製したリン酸バッファ (→バッファ A) を使用して 1L まで充填しました。pH 値を確認し、必要に応じて pH 7 に戻しました (大量の塩を加えると pH が変化する可能性があります)。イソプ

ロパノール 200 mL と調製した 50m M リン酸緩衝液 (pH 7) 800 mL を混合し、空の 1L 茶色瓶琥 (→バッファ B) に加えました。調製した両方のバッファは、0.2 μm メンブレンフィルタを使用してろ過しました。

注：mAb と複合体を形成した低分子の疎水性医薬品の存在は、全体的な疎水性を大幅に増加させます。したがって、移動相にある程度の有機溶媒を含める必要があります (ここでは、20 % イソプロパノール)。

メソッド

表 1. 塩グラジエントのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) pH 7 の 50 mM リン酸バッファを溶媒とする 1.5M 硫酸アンモニウム B) pH 7 の 50mM リン酸バッファ + 20 % イソプロパノール
グラジエント	0 分 30 % B, 30 分 100 % B ストップタイム: 45 分 ポストタイム: 10 分
流量	0.400 mL/min
温度	25 °C
検出	280 nm, 10 Hz
注入	注入量: 15 μL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: 水で 3 秒間

注：HIC で高濃度の塩を使用するには、堅牢な LC システムが必要です。1290 Infinity II Bio LC の完全にステンレス (SST) または鉄を含まない流路は、高塩含有バッファによる腐食の可能性を無くします。さらに、シール洗浄やニードル洗浄などの洗浄機能は、塩の析出の問題の回避に役立ちます。しかし、短時間でも LC システムやカラムが高濃度の塩溶液に触れるのを避けることが重要です。

注：高濃度の塩溶液を溶出液として使用する際には、ポンプメソッドにおいて対応する溶媒タイプの設定を検討してください。例えば、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む溶媒 A の場合、ポンプメソッドの溶媒選択フィールドで、[Generic Aqueous (一般的な水)] や [Water (水)] ではなく「ammonium sulfate 1.5 M (硫酸アンモニウム 1.5 M)」を使用します。大量の塩を加えると溶媒の圧縮率が変化するため、あらかじめ設定された溶媒テーブルを使用することによりポンプ性能を最大限に引き出すことができます。

結果と考察

図 1 は、ブレンツキシマブ ベドチンの分析結果を示したものです。それぞれ 0、2、4、6、および 8 つの低分子医薬品を含む mAb に対応する 5 つの主要なピークが存在するのがわかります。HIC 分析により、薬物結合種の分布の特性解析および DAR の決定が可能になりました。

鎖間ジスルフィドブリッジは破壊され、結合薬物によって占有されますが、抗体鎖間の共有結合と非共有力の組み合わせは、分析中に mAb を無傷の形で維持するのに十分です。これは、HIC の穏やかな非変性条件によるものであり、システイン結合 ADC の分析には理想的です。図 1 の各ピークは、インタクト mAb 種に異なる数の薬物分子が結合したもので、薬物分子の数の順に対応しています (0 から 8 個の結合分子、D0 ~ D8)。ピークは、ブレンツキシマブ ベドチンの文献⁶ に見られるクロマトグラムと HIC クロマトグラムとを比較することによって特定しました。

各ピークのピーク面積およびそれぞれの薬物負荷を積分することにより、全体の DAR が計算できます (式 1)。

式 1.

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ ピーク面積} \times n_{drug}}{\text{総 LC ピーク面積}}$$

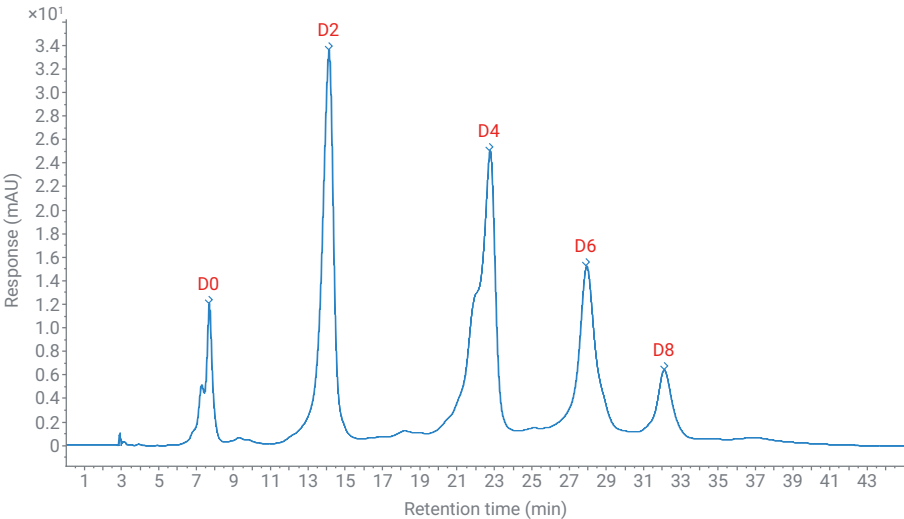


図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC によるブレンツキシマブ ベドチンの分析。D0 ~ D8 は、異なる DAR 種に対応します。

観測された 5 つのピークを積分し、面積パーセント率を計算すると、DAR が約 3.7 であることがわかりました（表 2 を参照）。この値は文献⁸と一致しています。

この分析のリテンションタイム（RT）と面積の精度についても評価しました（図 2）。その後 7 回の連続分析を行った結果、相対標準偏差（RSD）が 0.081 % 未満の優れた RT 精度であることがわかりました。面積精度も優れており、RSD は 0.282 % 未満でした（図 2 の表を参照）。

硫酸アンモニウムは HIC 分析で、非常に一般的に使用されるカオトロピック塩です。使用される濃度は通常、1 ～ 2 M の塩の範囲であり、これはかなりの量です。分析に純度の低い塩を使用すると（純度の低さは塩の結晶の色でもわかることがあります）、クロマトグラムのベースラインが大幅にドリフトし、積分誤差が発生する可能性があります。この問題に対処するには、「ブランク減算」と呼ばれるソフトウェア機能が適用できます。ブランク注入を使用してベースラインドリフトをフィルタで除去できます。この機能は、OpenLab 2 の処理メソッドにあります（図 3 を参照）。図 4 は、この機能を適用する前後でベースライン動作が異なるクロマトグラムを示しています。

表 2. DAR 種の結果

DAR 種	RT (分)	面積	面積 %	DAR の計算結果
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			DAR	3.733

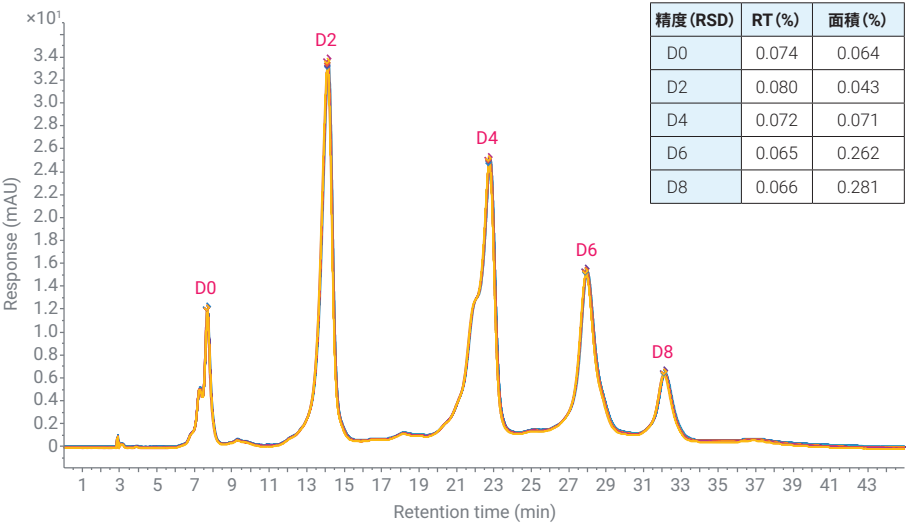


図 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC でのブレンツキシマブ ベドチンの分離 (7 回の連続分析の重ね表示)

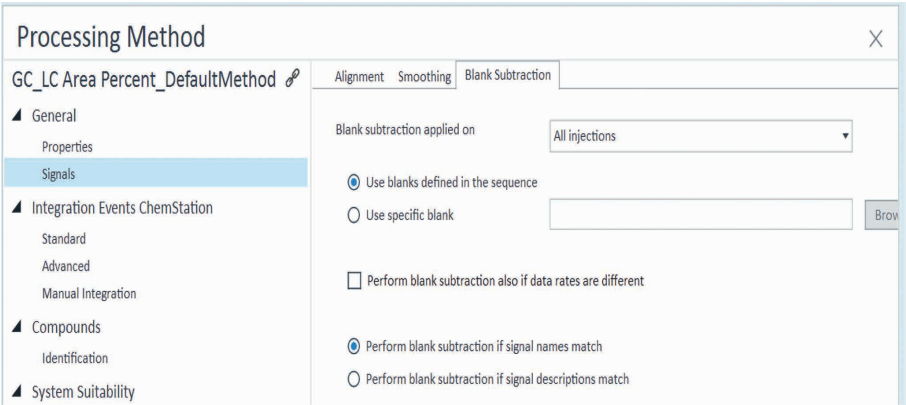


図 3. Agilent OpenLab CDS 2 の処理メソッド中の「ブランク減算」機能のスクリーンショット

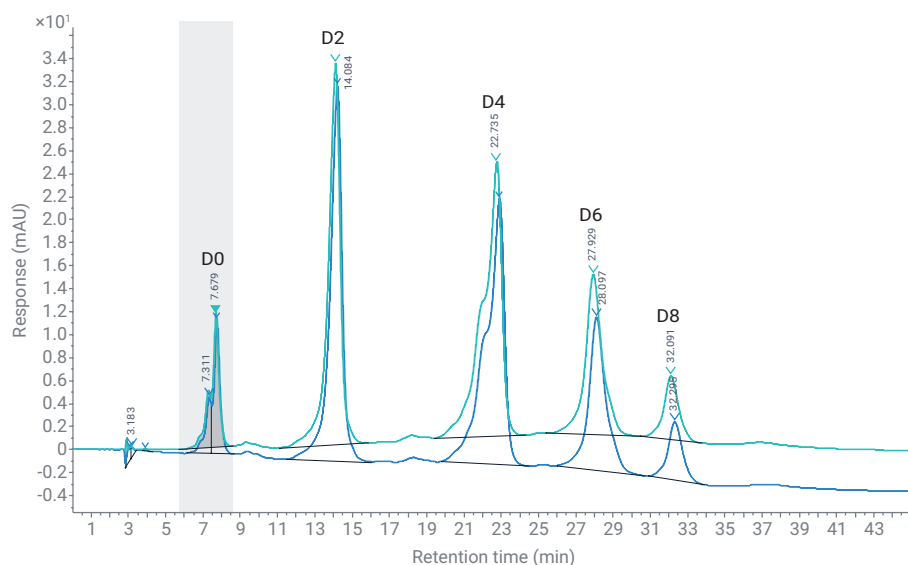


図 4. ブランク減算前(青)と後(緑)の HIC クロマトグラムの比較

結論

ブレンツキシマブ ペドチンの分析を、Infinity II 1290 Bio LC 上で HIC を使用して実施しました。予想された 5 つの DAR 種がすべて、それぞれ 0、2、4、6、および 8 つの低分子医薬品を含む mAb に対応して十分に分離されました。HIC 分析により、薬物関連種の分布の特性解析および DAR の決定（抗体あたり 3.7 薬物分子と計算されました）が可能となりました。7 回の連続分析の精度解析により、RT と面積の再現性が極めて優れていることが明らかになりました。HIC で使用する溶出液には、LC システムでは扱いが難しい高濃度の腐食性のある塩が含まれます。1290 Infinity II Bio LC は、鉄をまったく含まないサンプル流路で構成されているため、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に最適であり、システムが腐食で損傷する可能性を避けられます。

OpenLab 2 のソフトウェア機能であるブランク減算により、ユーザーは、結果に悪影響を与えることなく、さらに純度の低い硫酸アンモニウムを分析に使用できます。ブランクランをフィルタで除去するだけで、ベースラインを修正してスムーズな積分計算が可能になります。

1290 Infinity II Bio LC の生体適合性ハードウェアと OpenLab 2 の新しいソフトウェア機能との組み合わせにより、生成されたデータの信頼性が極めて高くなります。

参考文献

1. McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51.
2. Marcoux, J. *et al.* Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, 24, 1210-1223.
3. Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, 363(19), 1812-1821.
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8493EN, **2017**.
5. Wakankar, A. *et al.* Analytical Methods for Physicochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, 3(2), 161–172.
6. Rodriguez-Aller, M. *et al.* Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393-403.
7. High Stakes. High Performance. High Confidence: Agilent 1290 Infinity II Bio LC. *Agilent Technologies brochure*, publication number 5994-2376DE, **2020**.
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, 4(4), 458–465.

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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020

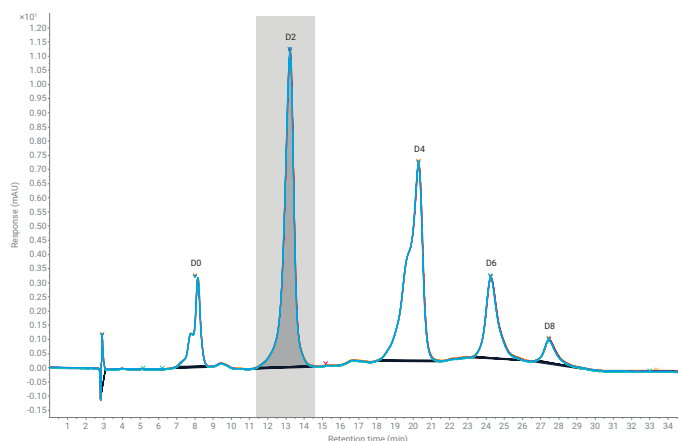
Printed in Japan, October 12, 2020

5994-2691JAJP

DE.9605902778

利便性と信頼性に優れた抗体薬物複合体の分析

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC を用いた
3 成分グラジエントによる薬物抗体比の測定



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）においてイソプロパノールなどの有機溶媒の添加は、疎水性抗体薬物複合体（ADC）の保持力を低下し、選択性を調整するための重要なパラメータになることがあります。このアプリケーションノートでは、3 番目のチャンネルの有機溶媒としてイソプロパノールを使用した 3 成分グラジエントによるブレンツキシマブ ベドチンの薬物抗体比（DAR）の測定について説明します。高塩含有バッファと有機溶媒という困難な組み合わせで優れた再現性が実現できる Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC は、生成されたデータの信頼性を最大限に高めるアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムと言えます。

はじめに

ADC は、細胞傷害性低分子医薬品が化学的に結合しているモノクローナル抗体（mAb）です。¹ 対応する抗体と比較して、構造はより複雑で不均一です。

ブレンツキシマブ ベドチンなどのシステイン結合 ADC は、鎖間ジスルフィドの還元後に生成され、特定のマレイミドリンカーと複合化が可能な遊離スルフヒドリル基となります。遊離スルフヒドリル基の数は、複合化する薬物の定義位置の数を制限し、抗体あたり 0（D0）、2（D2）、4（D4）、6（D6）、および 8 つ（D8）の薬物の混合物となります。

特に高 DAR 種は疎水性であるため、イソプロパノールなどの有機溶媒の添加は、HIC カラムから完全に溶出させるのに有用です。2 成分グラジエントでは通常、修飾剤は溶出に使用される移動相に添加されます（通常、塩をほぼ含まないバッファ）。Agilent1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプでは、クォータナリポンプとして 3 番目のチャネルを使用して有機溶媒を追加できます。2 つの溶媒がポンプ内で混合すると塩の結晶が形成される可能性があるため、高塩含有バッファと有機移動相は、その組み合わせが重要になる場合があります。

1260 Infinity II Prime Bio LC は、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に合わせて特別に設計されたアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムです。サンプルの流路には、ステンレス（SST）または鉄がまったく含まれていません。マルチサンブラ、マルチカラムサーモスタット、および検出器全体のすべてのキャピラリーやフィッティングは、ニッケルコバルト合金である MP35N で作られています。このため、1260 Infinity II Prime Bio LC は、腐食によるシステムへの損傷を回避することができ、HIC で通常使用される高濃度の腐食性のある塩での分析など、バイオクロマトグラフィーで使用される条件で最適に利用できます。

実験方法

装置

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、次のモジュールで構成されます。

- Agilent 1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプ（G7131C）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ（G7137A）、サンプルサーモスタット付き（オプション #101）
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、イナート仕様の標準フロー熱交換器搭載
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器（G7114B）、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 µL 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5 以降

カラム

Agilent AdvanceBio HIC カラム 3.5 µm、4.6 × 100 mm（部品番号 685975-908）

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。イソプロパノールは Merck（ドイツ、ダルムシュタット）から購入しました。超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸水素二ナトリウム七水和物、および硫酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich（ドイツ、シュタインハイム）から入手しました。

サンプル

ブレンツキシマブ ベドチン（商品名アドセトリス、武田薬品工業、日本、東京）を 50 % の水に溶解：100 mg/mL の 50 % 溶媒 A（以下を参照）。

注：アドセトリスには数多くのアジュバントが含まれているため、ここで言及されている濃度はタンパク質濃度だけではなく、薬物のすべての成分の総濃度です。

バッファの前処理

A) pH 7 の 50 mM リン酸バッファを溶媒とする 1.5 M 硫酸アンモニウム

B) 50 mM リン酸バッファ、pH 7

C) イソプロパノール

2 L の 50mM リン酸バッファ、pH 7 については、5.84 g のリン酸二水素ナトリウム一水和物、および 15.47 g のリン酸水素二ナトリウム七水和物を 2L の茶色瓶に加え、超純水を使用して 2 L まで充填しました。pH 値を確認し、必要に応じて pH 7 に調整しました（バッファ B）。合計 1.5M の 198.21g の硫酸アンモニウムを空の 1L 茶色瓶に加え、調製したリン酸バッファ（→バッファ A）を使用して 1 L まで充填しました。pH 値を確認し、必要に応じて pH 7 にしました（大量の塩を加えると pH が変化する可能性があります）。前処理した両方のバッファを 0.2 µm メンブレンフィルタでろ過しました。

メソッド

クロマトグラフィー条件	
パラメータ	設定値
溶媒	A) pH 7 の 50 mM リン酸バッファ液を溶媒とする1.5M硫酸アンモニウム B) 50 mM リン酸バッファ、pH 7 C) イソプロパノール
グラジエント	グラジエント：0 分 55 % A、40 % B、5 % C 25 分 0 % A、75 % B、25 % C ストップタイム：35 分 ポストタイム：10 分
流量	0.400 mL/min
温度	25 °C
検出	280 nm、10 Hz
注入	注入量：15 µL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水で 3 秒間

注：HIC で高濃度の塩を使用するには、堅牢な LC システムが必要です。1260 Infinity II Prime Bio LC の完全にステンレス（SST）または鉄を含まない流路は、高塩含有バッファによる腐食の可能性を無くします。さらに、シール洗浄やニードル洗浄などの洗浄機能は、塩の析出の問題の回避に役立ちます。しかし、短時間でも LC システムやカラムが高濃度の塩溶液に触れるのを避けることが重要です。

注：高濃度の塩溶液を溶出液として使用する際には、ポンプメソッドにおいて対応する溶媒タイプの設定を検討してください。例えば、1.5 M 硫酸アンモニウムの入った溶媒 A の場合、ポンプメソッドの溶媒選択フィールドで、[Generic Aqueous (一般的な水)] や [Water (水)] ではなく、「ammonium sulfate 1.5 M (硫酸アンモニウム 1.5 M)」を使用します。

大量の塩を加えると溶媒の圧縮率が変化するため、あらかじめ設定された溶媒テーブルを使用することによりポンプの性能を最大限に引き出します。

結果と考察

図 1 は、プレントキシマブ ベドチンの分析結果を示したもので、それぞれ 0、2、4、6、および 8 つの低分子医薬品を含む mAb に対応する 5 つの主要なピークが存在します。図 1 の各ピークは、インタクト mAb 種に異なる数の薬物分子が結合したもので、薬物分子の数の順に対応しています（0 から 8 個の結合分子、D0 ～ D8）。ピークは、プレントキシマブ ベドチンの文献²に見られるクロマトグラムと HIC クロマトグラムとを比較することによって特定しました。

この分析について、リテンションタイム（RT）と面積の精度から評価しました。その後 7 回の連続分析を行い、相対標準偏差（RSD）が 0.055 % 未満の優れた RT 精度であることがわかりました。これは、高塩含有バッファ（ここで使用されている 1.5 M 硫酸アンモニウムバッファなど）と有機溶媒としてイソプロパノールという非常に難しい組み合わせでも、クォータリポンプのすばらしい性能によって 3 成分グラジエントが実行できることを証明しています。面積精度も優れており、最後のピークを除いて RSD は 0.46 % 未満でした（図 1 の表を参照）。

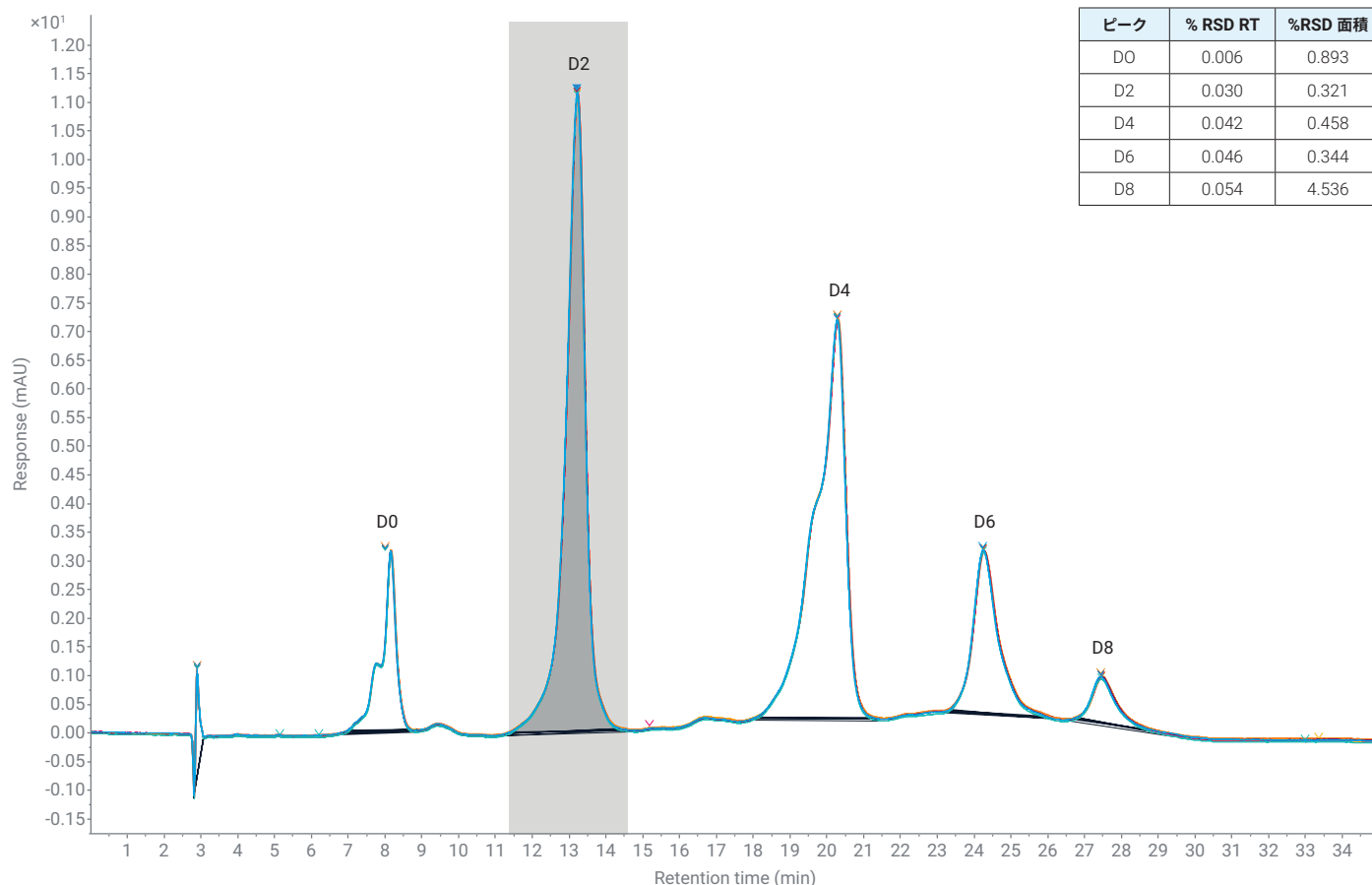


図 1. Agilent 1260 Infinity II Bio LC によるプレントキシマブ ベドチンの分離。D0 ～ D8 は、異なる DAR 種に対応します。7 回の連続分析の重ね図が表示されます。同じシーケンスで実行されるブランク注入を使用して、バッファ A の硫酸アンモニウム塩によって引き起こされるベースラインドリフトを、ブランク減算を適用しフィルタで除去しました。

HIC 分析により、薬物結合種の分布の特性解析および DAR の決定が可能になりました。各ピークのピーク面積およびそれぞれの薬物負荷を積分することにより、全体の DAR が計算できます（式 1）。

$$DAR = \sum_{n=0}^8 \frac{LC \text{ ピーク面積} \times n_{drug}}{\text{総 LC ピーク面積}}$$

式 1.

観測された 5 つのピークを積分し、面積パーセント率を計算すると、DAR が～ 3.3 であることがわかりました（表 1 を参照）。

表 1. DAR 種の結果

DAR 種	RT(分)	面積	面積 %	DAR の 計算結果
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
DAR				3.3

結論

3 番目のチャンネルに有機溶媒としてイソプロパノールを用いた 3 成分グラジエントで HIC により、プレントキシマブ ベドチンを分析しました。予想された 5 つの ADC 種がすべて、それぞれ 0、2、4、6、および 8 つの低分子医薬品を含む mAb に対応してきれいに分離されました。HIC 分析により、薬物関連種の分布の特性解析および DAR の決定（抗体あたり 3.3 薬物分子と計算されました）が可能となりました。難しい溶媒の組み合わせであっても、Agilent 1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプを備えた Agilent1260 Infinity II Prime Bio LC によって見事に処理できました。リテンションタイムの再現性は、相対標準偏差は 0.055 % 未満と非常に優れており、生成されたデータの信頼性を最大限に高めるために 2 成分系と同等の性能が実現されました。

参考文献

- McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339-51.
- Rodriguez-Aller, M. *et al.* Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393-403.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

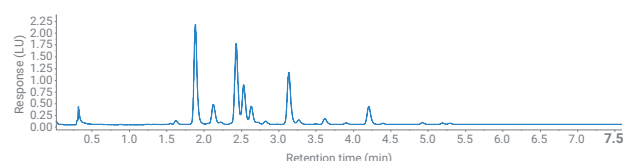
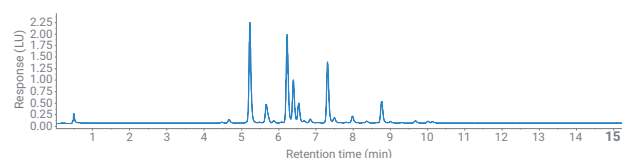
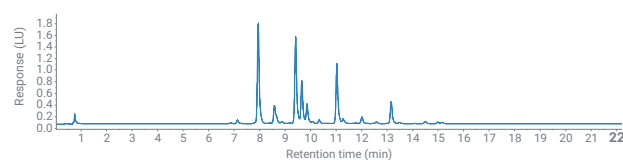
0120-477-111

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, May 7, 2021
5994-3522JAJP
DE44308.2358796296

糖鎖の分離における分離能と速度



著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、分離能と速度が最適化された条件における Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いた 2-AB 標識グリカンと InstantPC 標識グリカンの信頼性の高い分離について説明します。その信頼性は、リテンションタイム精度、面積精度、分離度などのパフォーマンス値を計算すると、いずれも優れた結果を示すことができます。検出には、Agilent 1260 Infinity II 蛍光検出器 (FLD) とバイオフィナートフローセルを使用しました。1290 Infinity II Bio LC システムは内部容量が小さく、バイナリポンプの溶媒組成と流量の精度が高いため、高分離能メソッドから速度を最適化したメソッドにメソッド移管しても、同等の結果を得ることができます。

はじめに

現在、モノクローナル抗体（mAb）は、現代の生物製剤化合物の非常に重要なクラスです。すべての治療用 mAb は、免疫グロブリン G（IgG）のクラスに属します。¹IgG の表面の各重鎖には N-結合型グリコシル化部位があり、最大 30 のグリコフォームの混合物となっています。²グリコシル化パターンは mAb の治療効果にとって重要であるため、その分析は QA/QC プロセスの重要な部分です。またグリコシル化は、mAb の最も重要な重要品質特性（critical quality attribute：CQA）です。

サンプル処理量を増やすには、高速なサンプル前処理メソッドだけでなく、複雑な混合物を十分に分離できる高速な分析メソッドも必要です。通常、糖鎖は蛍光化合物で標識化され、クロマトグラフィー分離の後に FLD を用いて検出されます。標識化メソッドは、InstantPC などの最新の標識化合物によって高速化しました。この標識は特に、従来の標識と比べて蛍光感度が高くイオン化しやすいため、質量分析検出に適しています。³その後のクロマトグラフィー分離は HILIC カラムで実行しました。これは最近の糖鎖分離の標準メソッドです。⁴

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC と Agilent AdvanceBio Glycan マッピング HILIC カラムを用いた、蛍光標識グリカンラダーと蛍光標識ヒト IgG N-グリカンライブラリの高分離能分離と高速分離について説明します。面積とリテンションタイムの RSD、分離度などの一般的な性能パラメータは、150 mm カラムと 100 mm カラムで示します。蛍光標識として、従来の 2-AB 標識と最新の InstantPC 標識を IgG ライブラリと比較し、高分離能メソッドと高速メソッドで同じ溶出パターンを取得できることを示します。

実験方法

機器

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ（G7132A）
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ（G7137A）、一体型サンプルサーモスタット付き（#101）
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116B）、イナート仕様の熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 蛍光検出器（FLD）（G7162B）、バイオイナート標準 FLD フローセル（G5615-60005）付き

カラム

1. Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、2.1 × 150 mm、1.8 μm（859700-913）
2. Agilent AdvanceBio Glycan マッピング、2.1 × 100 mm、1.8 μm（858700-913）

ソフトウェア

Agilent OpenLab バージョン 2.5 および GPC/SEC アドオンソフトウェア V. 1.2

サンプル

- AdvanceBio 2-AB ヒト IgG N-グリカンライブラリ（p/n GKSB-005）
- AdvanceBio InstantPC ヒト IgG N-グリカンライブラリ（p/n GKPC-005）
- AdvanceBio 2-AB グルコースホモポリマー標準（p/n GKSB-503）

試薬

- アセトニトリル、HPLC グラジエントグレード
- アンモニウムギ酸

試薬はドイツの VWR 社から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak 社）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

一般的なメソッド設定

パラメータ	設定値
バイナリポンプ	
溶媒	A) 水 + 100 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.5 B) ACN
MCT	
カラム温度	60 °C
FLD	
波長 (2AB)	Ex. 260 nm、Em. 430 nm
波長 (InstantPC)	Ex. 285 nm、Em. 345 nm
データレート	18.75 Hz (高分離能メソッド)
データレート	39.75 Hz (高速分離メソッド)
サンブラ	
注入	1 µL
ニードル洗浄	水/ACN 30/70 で 3 秒
高分離能メソッド、150 mm カラム	
バイナリポンプ	
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 分 - 80 % B、22 分 - 55 % B、22.25 分 - 40 % B、24.25 分 - 40 % B、24.5 分 - 80 % B、 ストップタイム: 24.5 分、ポストタイム: 7 分
MCT	
	カラム 1
高分離能メソッド、100 mm カラム	
バイナリポンプ	
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 分 - 80 % B、15 分 - 55 % B、15.25 分 - 40 % B、16.75 分 - 40 % B、17.0 分 - 80 % B、 ストップタイム: 17.0 分、ポストタイム: 5 分
MCT	
	カラム 2
高速メソッド、100 mm カラム	
バイナリポンプ	
流量	0.75 mL/min
グラジエント	0 分 - 75 % B、7.5 分 - 65 % B、7.75 分 - 40 % B、8.75 分 - 40 % B、9.0 分 - 75 % B、 ストップタイム: 9.0 分、ポストタイム: 3 分
MCT	
	カラム 2

結果と考察

150 mm の AdvanceBio Glycan マッピングカラムでの高分離能メソッドの初期開発では、グルコースベースのグリカンラダーと 2-AB 蛍光標識を使用しました。初期の溶媒比率、エンドポイント溶媒比率、および分析時間は、残留 2-AB 標識 (0.735 分) とグルコース単位 1 (GU1、0.934 分) 間の良好な分離に基づいて決定しました (図 1)。グルコースホモポリマーは、GU18 まで分離および検出しました。

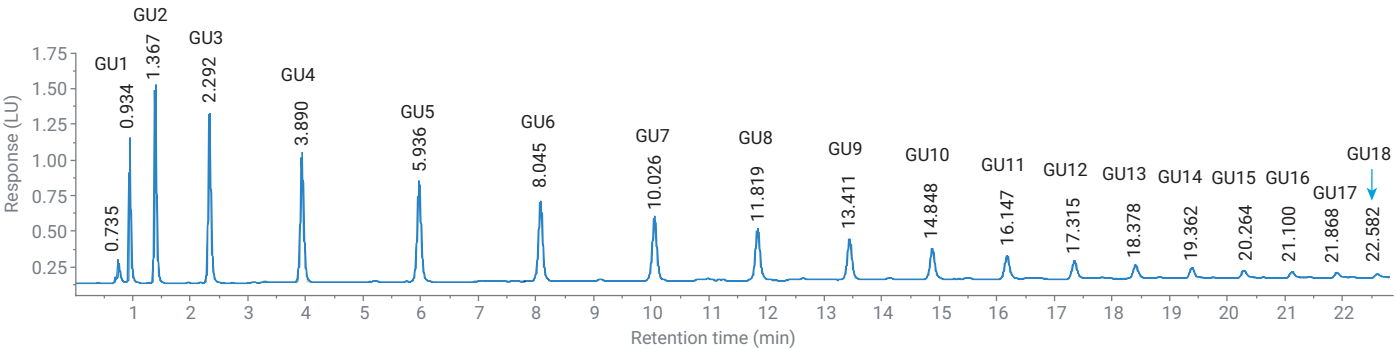


図 1. 150 mm カラムでのグリカンラダーの高分離能分離。一般的な直線グラジエントを用いて、最初に残留 2-AB と GU1 のベースライン分離用に調整しています。

残留 2-AB と GU1 の初期分離度は 4.23 で、明らかにベースライン分離です。分離度は 8.045 分間で GU6 に向上しています。溶出が遅いグルコースホモポリマーの場合は、ピーク幅が広がると分離度が低下します。面積 RSD は GU5 までは 0.65 % 未満、GU13 までは 1.17 % ～ 3.4 % です。溶出が遅いホモポリマーでは面積 RSD が高くなりますが、それに応じてピーク面積が小さくなります。リテンションタイム RSD は通常、すべての化合物で 0.08 % 未満です (表 1)。

初期の高分離能メソッドは、分離グラジエントを適切に 15 分まで短縮することで、150 mm カラムから 100 mm カラムにまで適合させました。洗浄時間と再生時間は、よりカラム容量が少ない 100 mm カラムに適合させました。得られた分離では、残留 2-AB が GU1 から分離され、18 種類のグルコースホモポリマーがグラジエント実行時間でベースライン分離されています (図 2)。

表 1. 150 mm カラムでのグリカンラダー分離の性能結果

GU	面積の RSD (%)	RT (分)	RT RSD (%)	分離度 USP	幅 50 % (分)
1	0.59	0.934	0.06	4.23	0.028
2	0.47	1.367	0.08	8.29	0.034
3	0.64	2.292	0.09	14.03	0.044
4	0.33	3.890	0.08	18.27	0.057
5	0.61	5.936	0.06	18.59	0.069
6	1.23	8.045	0.09	16.89	0.075
7	1.20	10.026	0.08	14.81	0.079
8	1.17	11.819	0.05	12.85	0.082
9	1.50	13.411	0.06	11.17	0.082
10	1.77	14.848	0.05	9.92	0.084
11	2.65	16.147	0.05	8.84	0.085
12	3.40	17.315	0.05	7.92	0.085
13	2.79	18.378	0.05	7.15	0.085
14	6.65	19.362	0.04	6.53	0.089
15	6.44	20.264	0.04	5.99	0.090
16	6.76	21.100	0.03	5.39	0.094
17	6.77	21.868	0.04	4.77	0.093
18	5.57	22.582	0.04	4.52	0.093

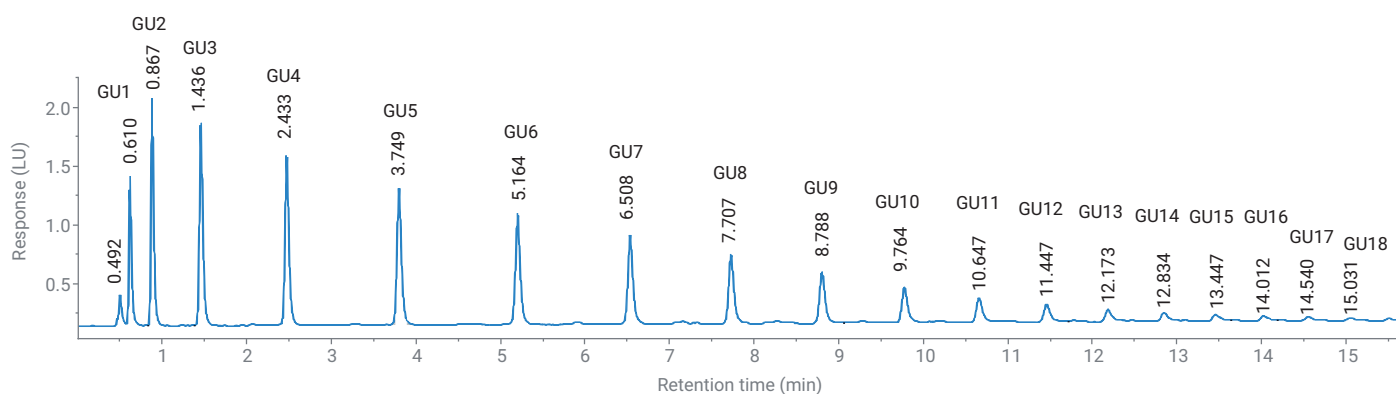


図 2. 100 mm カラムでのグリカンラダーの高分離能分離。グラジエントを短いカラム用に調整して 150 mm カラムから移管しました。残留 2AB と GU1 は、引き続き良好に分離されています。

残留 2-AB と GU1 の分離度は 2.16 でした。3.749 分に溶出しており、分離度は GU5 に向上しています。GU4 までは面積の RSD が 1.00 % 未満、GU14 までは 1.09 % ～ 3.5 % です。溶出が遅いホモポリマーでは面積の RSD が高くなりますが、それに応じてピーク面積が小さくなります。リテンションタイム RSD は通常、すべての化合物で 0.09 % 未満です (表 2)。

表 1 と表 2 を比較すると、150 mm カラムと 100 mm カラムで取得した面積の RSD とリテンションタイムの RSD の順序は同じでした。短い 100 mm カラムを使用すると分離度が低下しますが、すべてのピークのベースライン分離には十分です。

100 mm の AdvanceBio Glycan マッピングカラムと 150 mm の AdvanceBio Glycan マッピングカラム用に開発された高分離能メソッドを、いずれもグリカンサンプル (ヒト IgG の蛍光標識 N-グリカンライブラリ) の分離に適用しました (図 3 と図 4)。2-AB 標識 IgG N-グリカンライブラリ (図 3A および 3B) と InstantPC 標識 IgG N-グリカンライブラリ (図 4A および 4B) を用いて分離しました。2-AB 標識グリカンライブラリの分離では、100 mm カラムと 150 mm カラムで同様

表 2. 100 mm カラムでのグリカンラダー分離の性能結果

GU	面積の RSD (%)	RT (分)	RT RSD (%)	分離度 USP	幅 50 % (分)
1	0.86	0.610	0.13	2.16	0.031
2	0.82	0.867	0.18	4.87	0.032
3	0.95	1.436	0.19	9.23	0.040
4	0.97	2.433	0.09	13.35	0.048
5	1.09	3.749	0.06	15.02	0.054
6	1.13	5.164	0.03	14.41	0.058
7	1.41	6.508	0.08	12.94	0.061
8	1.24	7.707	0.08	11.11	0.063
9	1.57	8.788	0.05	9.59	0.066
10	2.30	9.764	0.04	8.33	0.069
11	3.46	10.647	0.03	7.28	0.071
12	1.82	11.447	0.02	6.32	0.074
13	1.50	12.173	0.03	5.50	0.078
14	3.25	12.834	0.02	4.87	0.079
15	5.92	13.447	0.03	4.25	0.087
16	3.75	14.012	0.03	3.64	0.097
17	5.38	14.540	0.02	3.06	0.105
18	6.17	15.031	0.04	2.82	0.106

の溶出パターンを示しています (図 3A と図 3B)。グラジエント実行時間については、100 mm カラムが 150 mm カラムの約 3 分の 1 となっています。いずれのケースでも同じ低アバンダンスのピークが見られ、パターンの中で溶出する 3 つのピークは、高い分離度で

分離されました。例えば 150 mm カラムの場合、9.408 分でのピーク溶出からの 9.651 分でのピーク溶出の分離度値は 1.94 でした。100 mm カラムでは、このピークは 6.391 分で溶出し、分離度は 1.68 です。

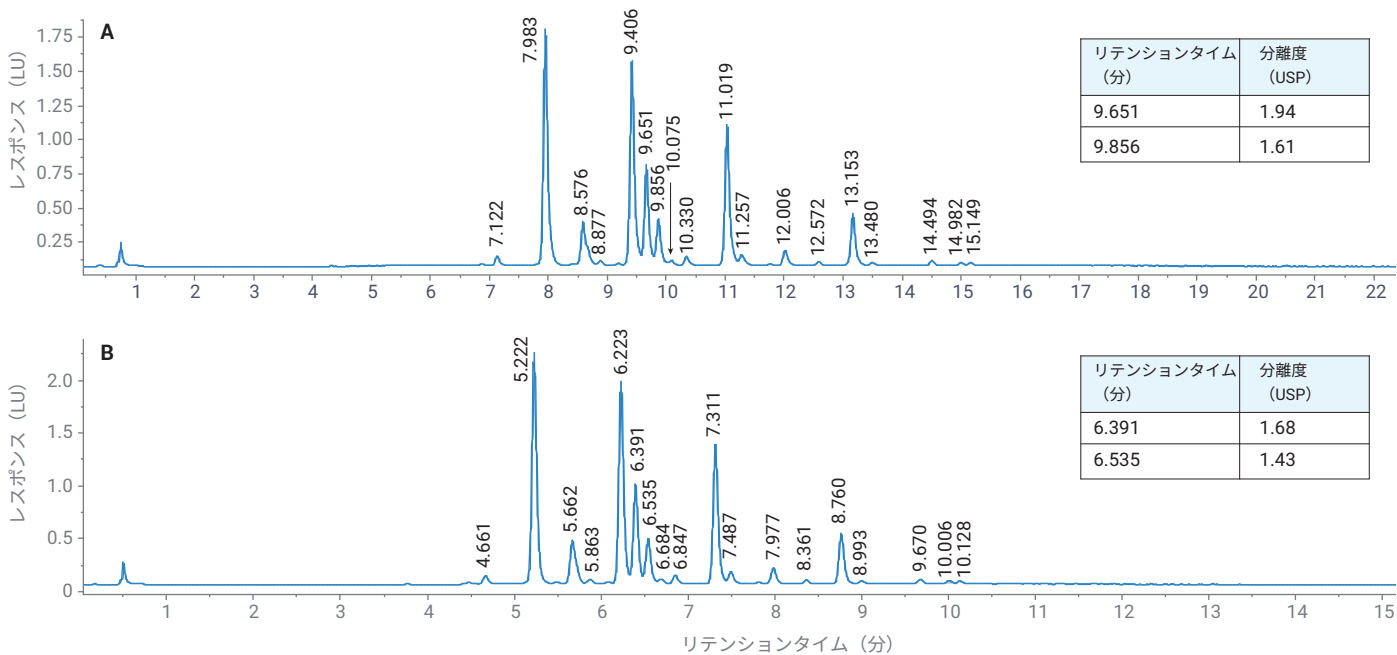


図 3. 150 mm の Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (A) と 100 mm の AdvanceBio Glycan マッピングカラム (B) での、2-AB 標識 IgG N-グリカンライブラリの高分離能分離

蛍光標識 InstantPC は最近開発されたもので、高い蛍光感度とイオン化能力を質量分析検出に活かしています。³150 mm カラムと 100 mm カラムから得られる溶出パターンは同等でした (図 4A および 4B)。低濃度グリカンに関する情報は同じであり、ピーク
の分離度も同等でした。100 mm カラムの場合、グラジエント実行時間が約 3 分の 1 に短縮されました。分析時間の中間のピークパ

ターンでは、150 mm カラムから 10.702 分で溶出したピークは、10.438 分のピークから分離度である 2.09 を示しました (図 4A)。100 mm カラムでは、同じピークが 7.186 分で溶出し、分離度は 1.74 でした (図 4B)。同じ挙動が、150 mm カラムと 100 mm カラムからの溶出ピーク (それぞれ 10.837 分と 7.237 分、および 15.456 分と 10.424 分) で見られました。

適用された両標識を比較すると、グリカンライブラリの InstantPC 標識の分離はより低いアバンドンスピークを示しました。これは、標識 2 より蛍光感度が高いためです。

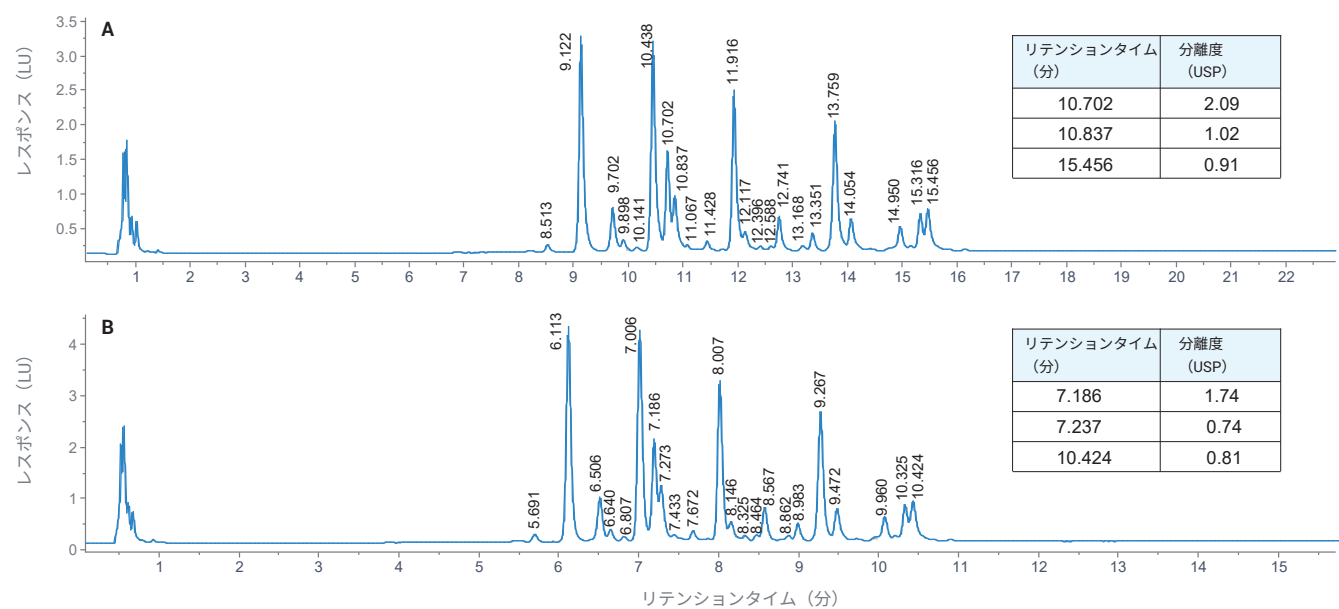


図 4. 150 mm の Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (A) と 100 mm の AdvanceBio Glycan マッピングカラム (B) での、InstantPC 標識 IgG N-グリカンライブラリの高分離能分離

サンプル前処理の改善によってその時間が大幅に短縮され、スループットも向上したため、高速な分析メソッドが必要となりました。^{3, 4}高速糖鎖分離メソッドを開発する場合は、100 mm カラム用に開発した高分離能メソッドをベースにしました。十分な分離度を持つ既知の溶出パターンを維持しながら分析時間を短縮するため、流量を段階的に増やし、それに合わせてグラジエント時間を短縮しました。この結果、流量を 50 % 増やした場合のグラジエント実行時間が半分になりました。このメソッドを用いて、2-AB 標識と InstantPC 標識

の IgG N-グリカンライブラリとの分離を比較しました (図 5 と図 6)。

2-AB 標識グリカンの高速分離 (図 5) と高分離能メソッドでの分離 (図 3B) は、溶出パターンが同じです。パターンの中で溶出する糖鎖の分離度でも、その識別と定量には十分です。2.527 分で溶出するピークの、前の溶出ピークから分離度は 1.24 と十分なものです。また高分離能メソッドの分離度は 1.68 でした。

また、InstantPC 標識グリカン (図 6) の高速分離と高分離能分離 (図 4B) の溶出パターンも同等です。3.063 分で溶出するピークは分離度は 1.48、高分離能メソッドの分離度は 1.74 でした。また図 5 と図 6 を比較すると、InstantPC 標識サンプルから取得できる低アバンドスグリカンに関する情報が、高分離能分離の情報より詳しいことがわかります。クロマトグラフィー挙動の違いにより、InstantPC 標識化合物の分離度は、2-AB 標識グリカンより低くなる場合があります。

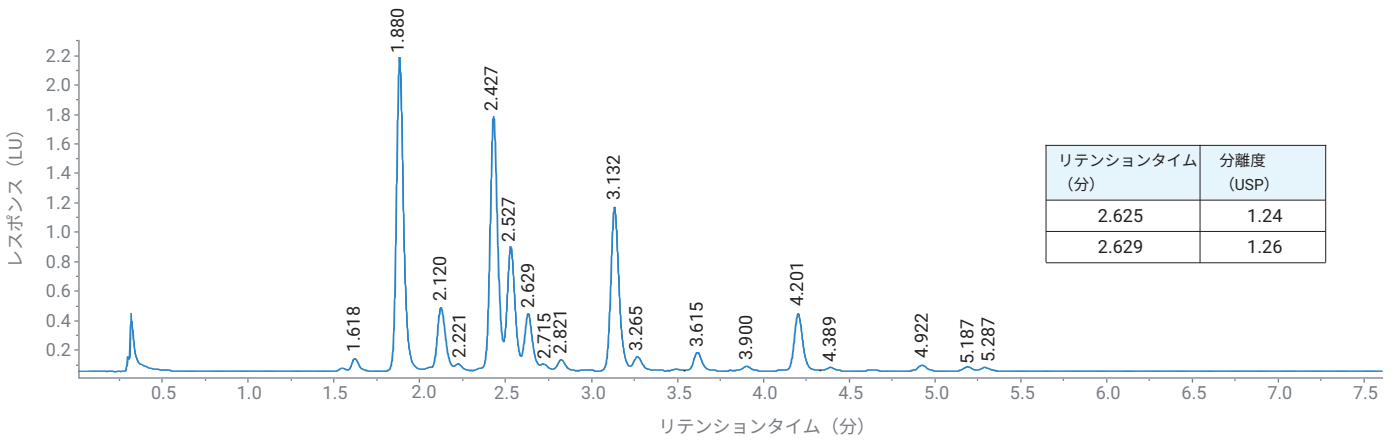


図 5. 100 mm の Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムでの、開発された高速分離メソッドによる 2-AB 標識 IgG N-グリカンライブラリとの分離

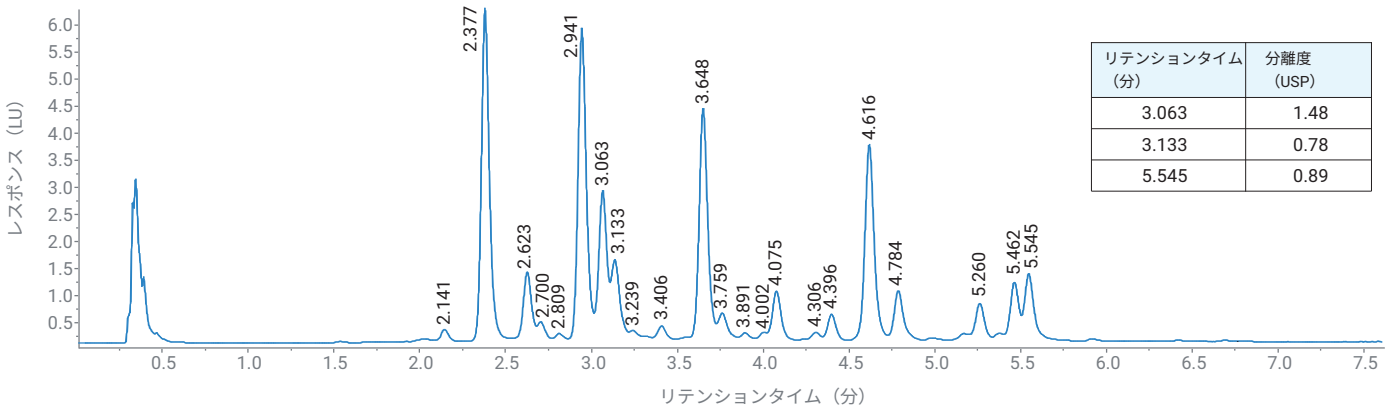


図 6. 100 mm の Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラムでの、開発された高速分離メソッドによる InstantPC 標識 IgG N-グリカンライブラリとの分離

結論

このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC を用いた蛍光標識グリカンの分離について説明しました。イナート仕様のUHPLC システムでは、糖鎖のような非常に複雑な生体化合物を分析でき、システムの活性表面での非特異的な吸着による低分子化合物の損失の心配もありません。

高分離能メソッドから速度を最適化したメソッドにメソッド移管しても、同等の結果を得ることができます。これは、1290 Infinity II Bio LC システム内部のディレイボリウムが小さく、1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプの溶媒混合と流量の精度が高いためです。リテンションタイム精度、面積精度、分離度などの性能値のすべての計算結果が、優れた値を示しました。

参考文献

1. Jefferis, R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21(1), 11–16.
2. Arnold, J. N. *et al.* Human Immunoglobulin glycosylation and the Lectin Pathway of Complement Activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, 564, 27–43.
3. Yan, J.; Jones, A. Streamlined Workflows for N-Glycan Analysis of Biotherapeutics using Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC and 2-AB Express Sample Preparation with FLD/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1348EN, **2019**.
4. Marosella, J. *et al.* A Novel HILIC Column for High Speed N-linked Glycan Analysis. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-4886EN, **2017**.

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

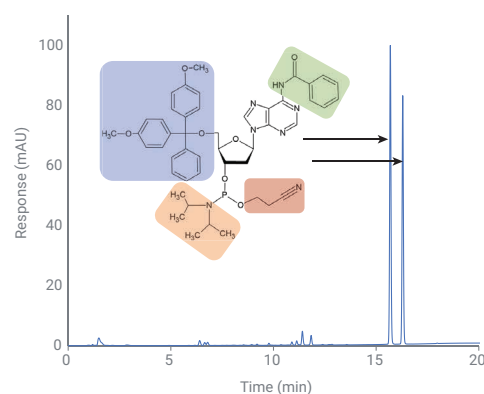
email_japan@agilent.com

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, May 11, 2021
5994-3130JAJP
DE44251.1113541667

オリゴヌクレオチド合成の原料の分析

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる
ヌクレオシドホスホロアミダイト分析のための柔軟かつ堅牢な
メソッド開発



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

概要

最高品質のバイオ医薬品を生み出すには、製造プロセスの最初のステップとして、合成用の原料を徹底的に分析する必要があります。オリゴヌクレオチドの場合、このような原料はヌクレオシドホスホロアミダイトと呼ばれており、その後の DNA 合成の構成要素として機能します。このアプリケーションノートでは、イナート仕様の Agilent 1290 Infinity II Bio LC を用いて LC メソッドを開発しました。LC と Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を組み合わせることで、複数の不純物を正確な質量で同定できました。また 4 チャンネルの Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプにより、メソッド開発を容易に行い、優れたリテンションタイムと面積精度を実現できました。この結果に基づき、さらにメソッド開発を実行して、優れた性能を維持しながら LC 分析時間を 66 % 短縮しました。またメソッド互換性の実験により、従来の Agilent 1290 Infinity II LC からのシームレスなメソッド移管が可能であることを確認しました。これらの結果から、1290 Infinity II Bio LC が、オリゴヌクレオチド合成の原材料の堅牢かつ多用途の分析に最適であることがわかります。

はじめに

DNA オリゴヌクレオチドの化学合成は、現代の分子生物学を生み出した技術の 1 つです。¹最近、いくつかのオリゴヌクレオチドベースのバイオ医薬品が承認されたこともあり²、オリゴヌクレオチドの製造および生産チェーンにおいて、信頼性と堅牢性の高い分析メソッドのニーズが高まっています。ヌクレオシドホスホロアミダイトは、DNA 合成技術に最適な標準構成要素であるとみなされています。関連する保護基を迅速かつ簡単に除去できるためです。³天然ヌクレオシドは、ヒドロキシル (-OH) 基やアミノ (-NH₂) 基などの活性点に多く存在します。このような官能基は、ホスホロアミダイトの構成要素で修飾されます。図 1 に、5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイト分子の構造式を示します。この分子には、デオキシリボースの 5'-ヒドロキシル基を保護するジメトキシトリチル (DMT) 基 (青色)、ホスホロアミダイト部分を修飾するジイソプロピルアミン (オレンジ色) および 2-シアノエチル (赤色) 基、アデニン塩基のアミノ基を保護するベンゾイル (緑色) 基の 4 つの特徴的な修飾が含まれます。修飾の後に、対応する DNA ヌクレオシド (デオキシアデノシン (dA)、デオキシグアノシン (dG)、デオキシシチジン (dC)、デオキシチミジン (dT) など) のホスホロアミダイトが、その後のオリゴヌクレオチドの自動合成の原料として働きます。この合成には脱保護、結合、酸化、キャッピングの各ステップで構成される複数の合成サイクルが含まれます。¹ただし、配列の不純物を最小限に減らして結合効率を上げるには、原料の純度と不純物を慎重にモニタリングおよび同定する必要があります。

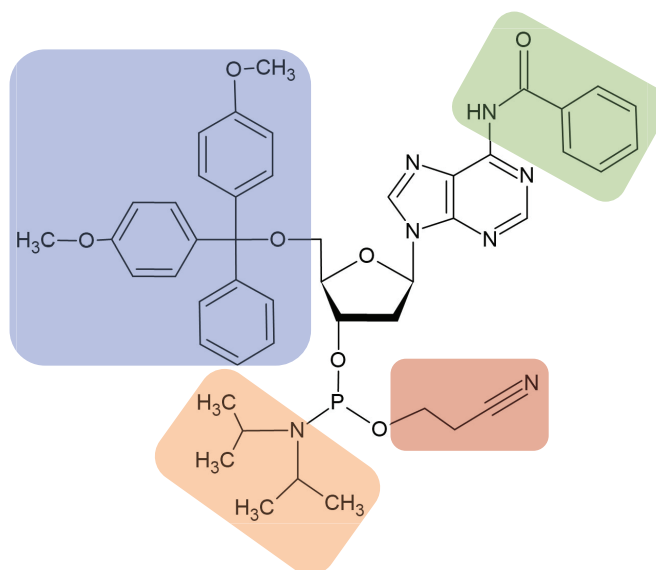


図 1. 5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイト分子の修飾基の概略図。
青色：ジメトキシトリチル (DMT) 基。緑色：ベンゾイル基。オレンジ色：ジイソプロピルアミン基。
赤色：2-シアノエチル基

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせて、次のモジュールで構成しました。

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム：

- Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプ (G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A) とサンプルサーモスタット (オプション 101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) と標準フローquickコネク Bio 熱交換器 (G7116-60071) および 2 台の Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B)、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity II LC システム：

Agilent 1290 Infinity II LC：

- Agilent 1290 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167A) とサンプルサーモスタット (オプション 101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) と標準フローquickコネク熱交換器 (G7116-60015) および 2 台の Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013)
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B) とマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (B.09.00 以降)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (10.0 以降)

カラム

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、
95 Å、2.1 × 100 mm、1.8 µm
(p/n 959758-902)

試薬

InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル
(p/n 5191-4496) と InfinityLab Ultrapure
LC/MS 純水 (p/n 5191-4498) を使用しま
した。酢酸アンモニウムと酢酸は VWR 社 (ダ
ルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

サンプル前処理

オリゴヌクレオチドの合成用の真正な
5'-O-DMT 2' デオキシアデノシンホスホロ
アミダイト (dA) の原料は、アジレントの核
酸ソリューション部門から入手しました。1
mg/mL のホスホロアミダイトを含むアセト
ニトリル溶液を注入しました。

表 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC による
5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイトの
原料の不純物分析用のイオン源および MS
パラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
ガス温度	320 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ	35 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
VCap	3,500 V
ノズル電圧	1,000 V
フラグメンタ	140 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
取り込みモード	ポジティブ、拡張 (m/z 10,000) 質量範囲
質量範囲	m/z 25~10,000
取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	m/z 121.050873、m/z 922.0098

表 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC による 5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミ
ダイトの原料の不純物分析用のメソッド A

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、95 Å、2.1 × 100 mm、1.8 µm
溶媒	A) アセトニトリル B) 水 C) 500 mM 酢酸アンモニウム、pH 5.5
グラジエント	時間 (分) A (%) B (%) C (%) 0.00 50 48 2 1.00 50 48 2 15.00 90 8 2 15.01 90 8 2 18.00 90 8 2 18.01 50 48 2 25.00 50 48 2
流量	0.200 mL/min
温度	20 °C、熱平衡化デバイス搭載
UV 検出器	VWD : 236 nm、10 Hz/MS : 表 2 を参照
注入	注入量 : 2 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : アセトニトリル 90 %/水 10 % で 3 秒 (フラッシュポート)

表 2. Agilent 1290 Infinity II Bio LC による 5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイトの
原料の不純物分析用の、分析時間を最適化したメソッド B

パラメータ	設定値
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、95 Å、2.1 × 100 mm、1.8 µm
溶媒	A) アセトニトリル B) 水 C) 500 mM 酢酸アンモニウム、pH 5.5
グラジエント	時間 (分) A (%) B (%) C (%) 0.00 50 48 2 0.33 50 48 2 5.00 90 8 2 5.01 90 8 2 6.00 90 8 2 6.01 50 48 2 8.33 50 48 2
流量	0.600 mL/min
カラム温度	20 °C、熱平衡化デバイス搭載
UV 検出器	VWD : 236 nm、10 Hz
注入	注入量 : 2 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : アセトニトリル 90 %/水 10 % で 3 秒 (フラッシュポート)

結果と考察

HPLC のメソッド開発と他の部門（初期プロセス開発や品質管理など）へのメソッド移管は、煩雑で手間がかかる場合があります。しかし 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプは 1290 Infinity II Bio LC システムでさまざまな用途に使用できるため、メソッド開発の簡便性と堅牢性が向上します。これを証明するため、4 チャンネルの Infinity II Bio フレキシブルポンプで 3 成分グラジエントを採用し、5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイトの原料の不純物分析 LC メソッドを開発しました。1290 Infinity II Bio LC の流路は耐腐食性が高いため、500 mM の酢酸アンモニウム（pH 5.5）のような高濃度バッファをメソッド開発に定常的に使用できます。このため、分析中にグラジエントミキシングしながら、さまざまな量と種類のバッファを高速でスクリーニングできます（表 1、メソッド A）。1290 Infinity II Bio LC と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を連結することで、化合物の UV 分析と MS 分析を同時に実行でき、製品と 3 種類の不純物（表 4）を精密質量で同定できました。ホスホロアミダイトのリン原子のキラル中心でのエピマー化により、製品、不純物 2、不純物 3 で 2 つのピーク（A と B）が見られました。

図 2 に、VWD と Bio マイクロフローセルで検出された原料の分離のクロマトグラムを示します。下のクロマトグラムは、対象ピーク間で良好な分離能を示す不純物を拡大表示したものです。3'-DMT-デオキシアデノシン 5'-ホスホロアミダイト（不純物 2A/2B）の分析は特に重要です。いわゆる「リバースアミダイト」によって、その後の DNA 合成でエラーが発生する可能性があるためです。

表 4. 5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイトの原料で同定された製品と不純物

名前	種	リテンションタイム(分)
5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイト	製品 A	15.69
	製品 B	16.29
5'-DMT-デオキシアデノシン	不純物 1	6.40
3'-DMT-デオキシアデノシン 5'-ホスホロアミダイト (リバースアミダイト)	不純物 2A	10.89
	不純物 2B	11.13
5'-DMT-デオキシアデノシンホスホロアミダイト	不純物 3A	11.41
	不純物 3B	11.83

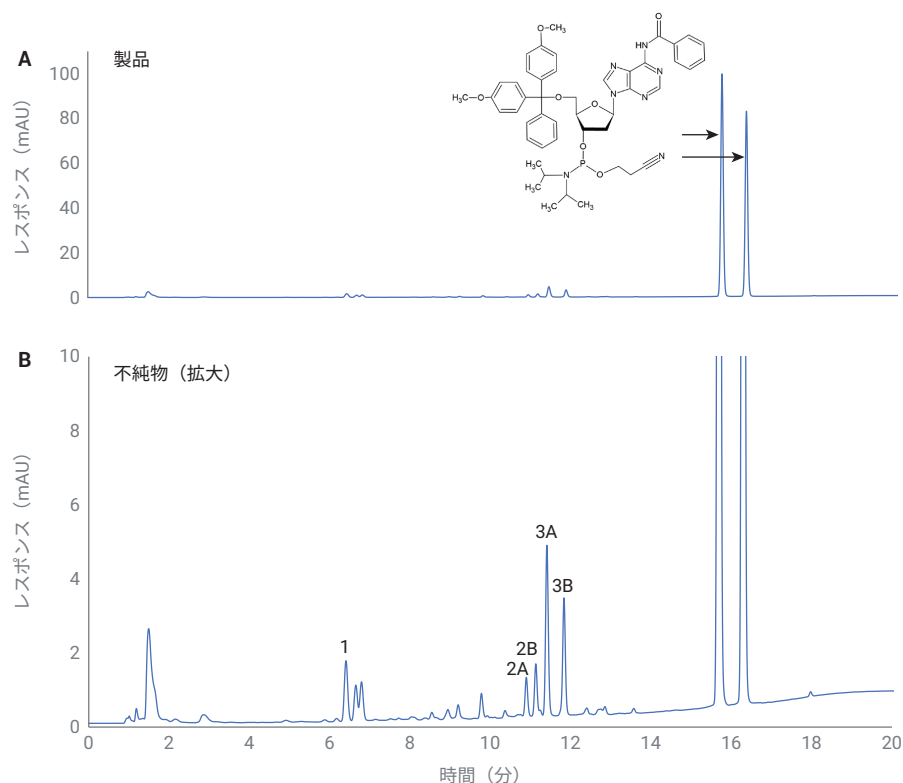


図 2. A: Agilent 1290 Infinity II Bio LC による原料の LC 分離 (メソッド A) のクロマトグラム (製品を強調表示)。B: 不純物を見やすくした同じクロマトグラムの拡大表示

10 回の連続注入を分析して 1290 Infinity II Bio LC の性能をさらに調査し、リテンションタイムと面積精度の値を計算しました（表 5）。製品と不純物で測定したリテンションタイムの RSD 値は 0.015 % ～ 0.050 % と非常に優れていました。これは、困難な 3 成分グラジエント分離において 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプが優れた性能を発揮できることを示しています。また 1290 Infinity II Bio LC は面積精度についての性能も優れており、平均相対標準偏差は 0.269 % でした。1290 Infinity II Bio LC と 1290 Infinity II LC のメソッド互換性をさらに評価するため、後で前の実験も実行しました。表 5 に、両方の LC システムの絶対リテンションタイムを示します。偏差は平均でたったの 0.686 % です。これは 1290 Infinity II LC からスムーズなメソッド移管ができることを示しています。

現代のラボにおいて、特にバイオ医薬品とその原料の品質管理におけるルーチン分析では時間は非常に重要な資源です。このため、さらにメソッド開発を使用して、LC 分析の時間を短縮しました。1290 Infinity II Bio LC システムの圧力定格は最高 130 MPa と高いため、高流量と微粒子を用いることで性能と分析時間を最適化できます。流量を 0.6 mL/min にまで上げ、グラジエントボリュームを一定に保つことで、LC メソッドの分析時間をわずか 8.33 分に短縮できました。これは 66 % 減に相当します（表 2、メソッド B）。分析時間は短くなっても、リテンションタイムと面積精度の優れた性能は維持されました（図 3 と表 6）。つまり 1290 Infinity II Bio LC は、オリゴヌクレオチドの製造チェーンの多用途で堅牢な分析メソッド開発に最適であるということです。

表 5. メソッド A で分析した化合物のリテンションタイムと面積精度の値、およびリテンションタイムの絶対偏差を Agilent 1290 Infinity II Bio LC と Agilent 1290 Infinity II LC で比較

種	リテンションタイム RSD (%)	面積の RSD (%)	リテンションタイムの偏差 1290 Bio LC と 1290 LC (%)
製品 A	0.017	0.113	0.07
製品 B	0.015	0.118	0.19
不純物 1	0.050	0.211	1.53
不純物 2A	0.026	0.314	0.85
不純物 2B	0.020	0.539	0.76
不純物 3A	0.022	0.209	0.73
不純物 3B	0.021	0.378	0.67

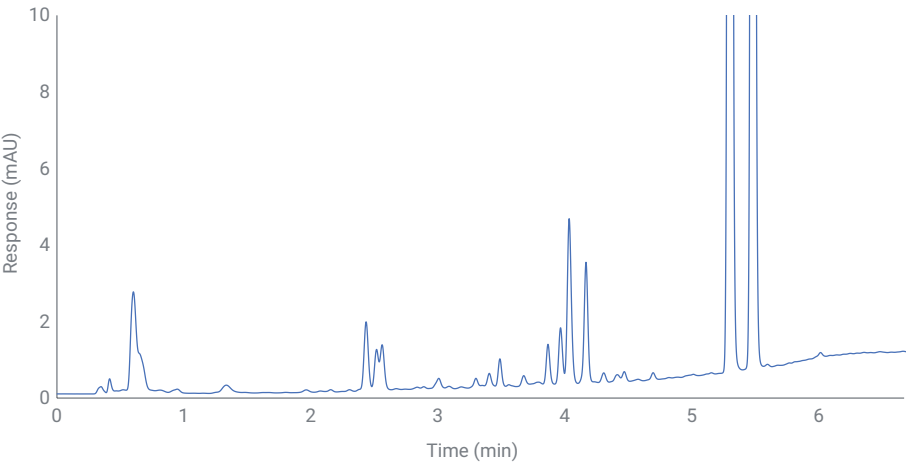


図 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC による、短い分析時間（メソッド B）での原料の LC 分離の拡大表示

表 6. メソッド B で分析した化合物のリテンションタイムと面積精度

種	リテンションタイム (分)	リテンションタイム RSD (%)	面積の RSD (%)
製品 A	5.30	0.042	0.180
製品 B	5.48	0.40	0.185
不純物 1	2.43	0.115	0.214
不純物 2A	3.86	0.079	0.557
不純物 2B	3.96	0.066	0.986
不純物 3A	4.03	0.065	0.355
不純物 3B	4.16	0.059	0.301

結論

ホスホロアミダイトに基づく DNA 合成技術は 1980 年代から活用されていますが、分析に関連する課題の効率化は今でも重要な課題です。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC とフレキシブルポンプを用いることで、プロセス開発および品質管理環境において、5'-DMT-デオキシアデノシン 3'-ホスホロアミダイト構成要素の真正な原料の不純物を確実に分析できることを示しました。Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプの汎用性と高性能に、1290 Infinity II Bio LC システム全般のイナート仕様の流路を組み合わせることで、優れたリテンションタイムと面積精度を達成し、シームレスなメソッド互換性を確認できました。この結果より、1290 Infinity II Bio LC システムは、困難な生体分子の分析に将来性のある選択肢であることがわかりました。

参考文献

1. Hughes, R. A.; Ellington, A. D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, 9, a023812.
2. Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 19, 673–694.
3. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites—A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.

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

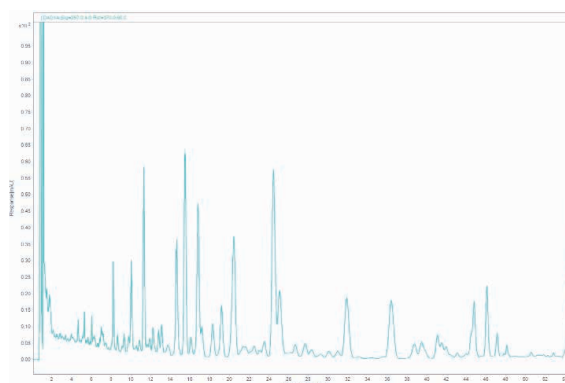
email_japan@agilent.com

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, May 10, 2021
5994-3498JAJP
DE44302.1218287037

性能比較による LC メソッドの互換性の判別

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムの比較検討



著者

Jochen Strassner
Agilent Technologies, Inc.

概要

新しい Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、クォータリポンプと 80 MPa の圧力定格を備えており、多くのアプリケーションに対応しています。適合するアプリケーション範囲は、低分子を利用した逆相 LC と、天然タンパク質および核酸アプリケーションを含む生体分子です。Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC は、鉄をまったく含まない堅牢性と多用途性に優れた液体クロマトグラフィーシステムであり、同等のステンレスベースの Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと同様の性能を発揮します。

イソクラティック、高速グラジエント、緩やかなグラジエントアプリケーションを使用して、ポンプの混合精度とメソッドの互換性に関する性能比較を行いました。どちらのシステムでも、すべてのアプリケーションで高い再現性が見られました。イソクラティックアプリケーションと高速グラジエントアプリケーションでは優れたメソッドの互換性が見られました。一方、緩やかなグラジエントメソッドでは、ある程度の調整が必要です。これは、移動相の組成の小さい変化が、サンプル成分のリテンションタイム (RT) に大きく影響するためです。

はじめに

(U) HPLCでタンパク質や核酸などの生体分子をサンプルとして使用するアプリケーションの数は増え続けています。これに伴い、LCハードウェアの利便性と堅牢性に関する懸念も高まっています。特に移動相として使用される高塩濃度バッファや、塩酸、水酸化ナトリウム、尿素などの強い定置洗浄溶媒については、この傾向が顕著です。このためバイオアプリケーションでも標準的な逆相アプリケーションでも、このような分析条件と洗浄条件に耐えられ、最大限の性能を実現する堅牢で信頼性の高い機器が求められています。

1260 Infinity II Prime Bio LC システムは、主要な溶媒送液モジュールである 80 MPa のクォータリポンプで構成される汎用システムファミリの 1 つです。標準的な逆相アプリケーションの分野でこれに相当するのが、1260 Infinity II Prime LC システムです。どちらのシステムも性能仕様は同じです。

メソッドの互換性は、旧バージョンの Agilent LC システムの代わりとして LC 機器の新規購入を検討しているお客様にとって、重要な判断材料となります。両方の 1260 Infinity II Prime システムの性能仕様は同じであるため、通常はメソッドの互換性があります。

この技術概要では、鉄を含まないイナート仕様の 1260 Infinity II Prime Bio LC システムと、ステンレス (SST) ベースの 1260 Infinity II Prime LC システムのポンプ性能を、さまざまなアプリケーション (イソクラティック、高速グラジエント、緩やかなグラジエントモードなど) で比較しています。

実験方法

装置

次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システム：

- Agilent 1260 Infinity II Bio フレキシブルポンプ (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンプルラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様の標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)、イナート仕様の InfinityLab Max-Light カートリッジセル付き、10 mm

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムには次のモジュールが含まれます。

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプルラ (G7167B) とサンプルサーモスタット (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5 以降

カラム

- **イソクラティックメソッド：**
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 4.6×150 mm、 $5 \mu\text{m}$ (p/n 959993-902)
- **高速グラジエントメソッド：** Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1×50 mm、 $2.7 \mu\text{m}$ (p/n 699775-902)
- **緩やかなグラジエントメソッド：**
Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、 2.1×150 mm、 $2.7 \mu\text{m}$ (p/n 683775-902)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、 $0.22 \mu\text{m}$ メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak, Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。アセトニトリル、Lichrosolv およびメタノール、Lichrosolv は VWR International 社 (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

サンプル

- Agilent イソクラティックサンプル (p/n 01080-68704)
- Agilent RRLC 混合物 (p/n 5188-6529)
- 霊芝子実体の乾燥抽出物 (USP 標準物質、カタログ番号 1288372) 霊芝子実体の乾燥抽出物 15.5 mg を 7.75 mL の MeOH で溶解し、ボルテックスしてから超音波処理しました。真空濃縮器で約 4 倍に濃縮した後に、 $0.22 \mu\text{m}$ のシリンジフィルタで遠心分離およびろ過し、最終サンプル溶液を作りました。

メソッド

イソクラティックメソッド

表 1. イソクラティックメソッドの条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) 水 B) アセトニトリル (ACN) C) ACN D) 水
グラジエント	イソクラティック、65 % B (チャンネル A/B) または 65 % C (チャンネル C/D) ストップタイム: 20 分 ポストタイム: オフ
ポンプ設定	最小ストローク: 自動 圧縮率: 60×10^{-6} /bar 第 1 チャンネル: 自動
流量	1.000 mL/min
温度	40 °C
検出	254 nm 10 Hz
注入	注入量: 5 µL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: ACN/水 (50/50) で 3 秒

高速グラジエントメソッド

表 2. 高速グラジエントメソッド条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) 水 B) ACN
グラジエント	0 分 20 % B 5 分 90 % B ストップタイム: 6 分 ポストタイム: 3 分
ポンプ設定	最小ストローク: 自動 圧縮率: 55×10^{-6} /bar 第 1 チャンネル: 自動
流量	1.000 mL/min
温度	40 °C
検出	245 nm 40 Hz
注入	注入量: 5 µL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: ACN/水 (50/50) で 3 秒

緩やかなグラジエントメソッド

表 3. 緩やかなグラジエントメソッド条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) 0.075 % リン酸水溶液 B) ACN
グラジエント	0 分 20 % B 3 分 26.5 % B 34 分 26.5 % B 52 分 38.5 % B 54 分 100 % B ストップタイム: 55 分 ポストタイム: 15 分
ポンプ設定	最小ストローク: 自動 圧縮率: 50×10^{-6} /bar 第 1 チャンネル: 自動
流量	0.400 mL/min
温度	30 °C
検出	257 nm 20 Hz
注入	注入量: 5 µL サンプル温度: 10 °C ニードル洗浄: ACN/水 (50/50) で 3 秒

結果と考察

イソクラティックメソッド

このアプリケーションでは、移動相を混合して正確、安定的、かつ精密にイソクラティックサンプルの成分を分離するためのポンプの機能を調査しました。イソクラティックサンプルを10回注入し、再現性とメソッドの互換性をテストしました。最初のシーケンスは溶媒チャンネル A/B、2 番目のシーケンスは C/D で実行しました。これらの溶媒チャンネルは移動相の混合用の溶媒ラインとして使用しました。各シーケンスからの最後の 7 回の連続クロマトグラムを評価に使用しました (図 1)。

同じメソッドを、両方のシステムで実行しました。対応するクロマトグラムを重ねて表示すると、両方のシステムのどちらのチャンネルの組み合わせでも、ピークリテンションタイムの再現性が非常に高いことがわかります。ピーク形状のわずかな違いは、機器の小さな差異によるものです。

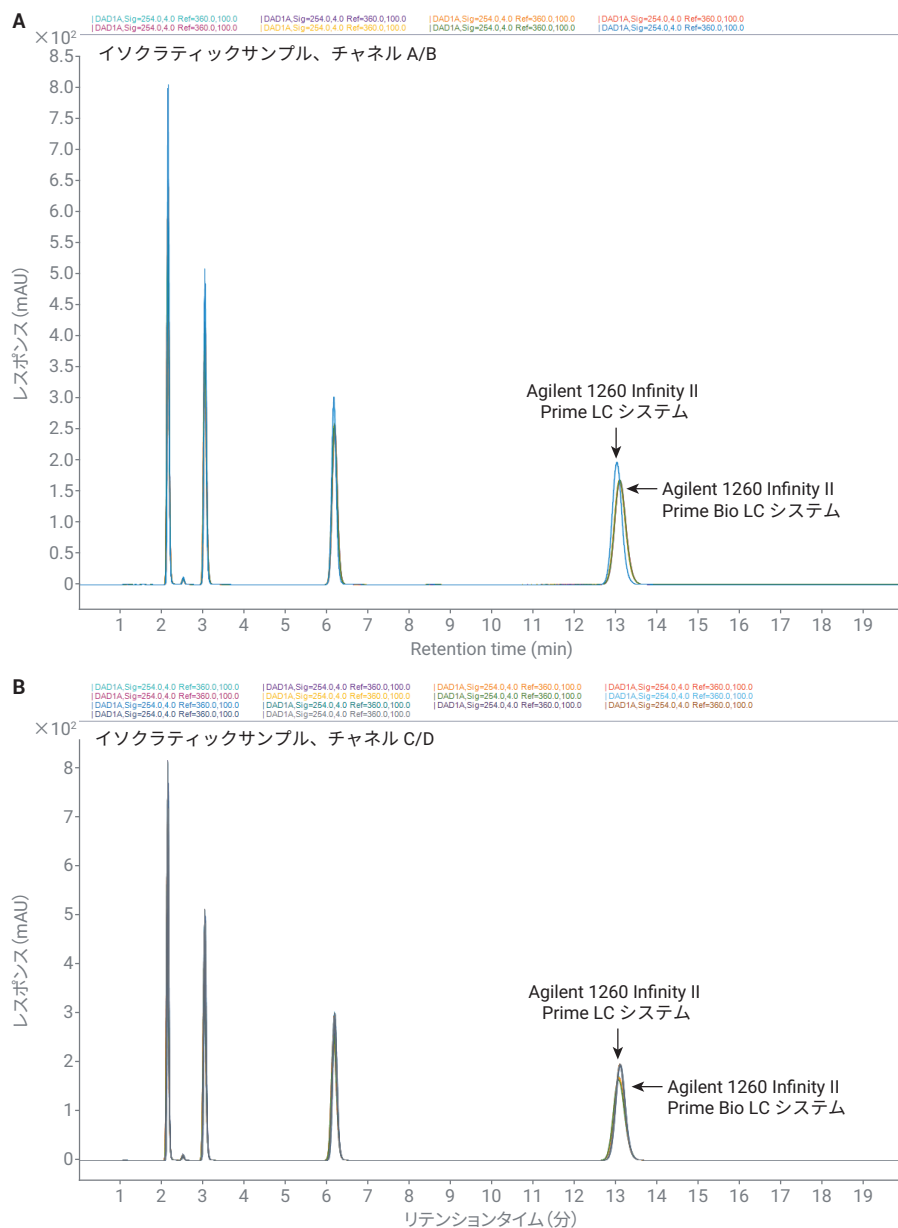


図 1. Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムでの、イソクラティックサンプルの各シーケンス最後 7 回のクロマトグラフィー分析の重ね表示。
(A) チャンネル A/B のデータ、(B) チャンネル C/D のデータ

いずれのシステムでも、溶媒組成の精度仕様は RSD が <0.15 %、または SD が 0.02 分の（いずれか大きい方）と定義されています。表 4 に、イソクラティックサンプルの成分の所定のリテンションタイムにおける組成精度の RSD 値を示します。どのような溶媒チャンネルの組み合わせを使用しても、高いポンプ性能を確認できました。メソッドの互換性が非常に優れており、RT 偏差は ±1 % 範囲を大幅に下回りました。これは、2 つの機器の性能が同程度であることを示しています。

高速グラジエントメソッド

UHPLC メソッドの一般的な特長は、高背圧で動作する微粒子カラムを用いた、高速で勾配の大きい溶媒組成グラジエントです。この場合は、20 % B ～ 90 % B の範囲の 5 分間のグラジエントと、6 分間の分析時間を適用しました。両システムで生成された 7 つの UV トレースを重ねて表示すると、ポンプの混合精度の再現性が非常に高いことがわかります（図 2、表 5）。

溶出時間が遅いピークでは特に、2 つのシステム間のリテンションタイムが異なることがわかります。ただし、2 つの機器間の溶出サンプル成分のリテンションタイムの相対偏差 (%RT) は 2 % を大きく下回っており、メソッドの互換性が高いことがわかります。

表 4. 両方の溶媒チャンネルのメソッドの互換性とリテンションタイム (RT) の精度の評価。両方の LC システムで 7 回のサンプル注入を実行し、その RT 平均値を使用しました。メソッドの互換性については、Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムの値をリファレンスとして使用しました。

溶媒チャンネル	リテンションタイム 1260 Agilent Infinity II Prime LC システム (分)	RT % RSD	リテンションタイム 1260 Agilent Infinity II Prime Bio LC システム (分)	RT % RSD	RT 偏差 (分)	RT 偏差 (%)
A/B	2.1533	0.0408	2.1487	0.0164	0.0046	-0.2134
A/B	3.0430	0.0361	3.0431	0.0771	0.0000	0.0012
A/B	6.1627	0.0226	6.1780	0.0417	-0.0153	0.2478
A/B	13.0088	0.0236	13.0808	0.0235	-0.0720	0.5537
C/D	2.1579	0.0536	2.1494	0.0385	0.0085	-0.3920
C/D	3.0534	0.0632	3.0435	0.0523	0.0099	-0.3244
C/D	6.1957	0.0349	6.1791	0.0380	0.0165	-0.2668
C/D	13.1101	0.0190	13.0814	0.0232	0.0287	-0.2191

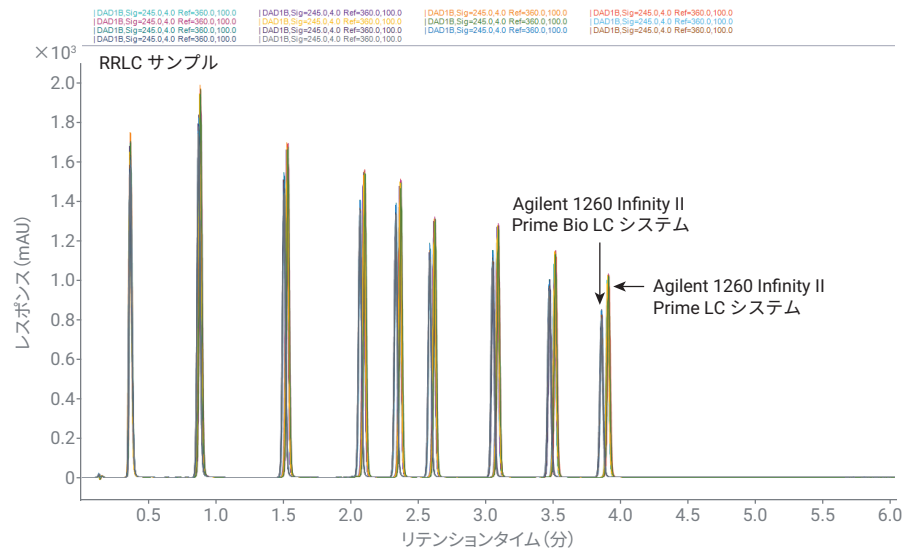


図 2. Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムでの、RRLLC サンプルの 7 回のクロマトグラフィー分析の重ね表示

表 5. RRLLC サンプルによるメソッドの互換性とリテンションタイム (RT) の精度の評価。両方の LC システムで 7 回のサンプル注入を実行し、その RT 平均値を使用しました。メソッドの互換性の推定値の場合は、Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムの値をリファレンスとして使用しました。

化合物 ID RRLLC サンプル	リテンションタイム Agilent 1260 Infinity II Prime LC システム (分)	RT %RSD	リテンションタイム Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システム (分)	RT %RSD	RT 偏差 (分)	RT 偏差 (%)
1	0.3604	0.5275	0.3593	0.0766	0.0012	-0.3233
2	0.8738	0.3954	0.8625	0.0578	0.0113	-1.2879
3	1.5150	0.3013	1.4900	0.0514	0.0250	-1.6513
4	2.0798	0.2418	2.0486	0.0252	0.0312	-1.5021
5	2.3447	0.1989	2.3117	0.0327	0.0331	-1.4106
6	2.5960	0.1765	2.5610	0.0238	0.0350	-1.3463
7	3.0619	0.1427	3.0236	0.0617	0.0384	-1.2531
8	3.4828	0.1268	3.4395	0.0684	0.0434	-1.2448
9	3.8720	0.1170	3.8227	0.0369	0.0492	-1.2719

緩やかなグラジエントメソッド

3 回目のアプリケーションでは、分離にかなり緩やかなグラジエントを必要とする複雑なサンプルを分析しました。霊芝子実体の抽出物は、USP (USP、ロックビル、メリーランド州、米国) が標準試薬として提供しているトリテルペノイドが豊富な抽出物です。分離メソッドは USP が公開しているクロマトグラフィーメソッドに基づいており¹、取得したピークの割り当ては、霊芝子実体の乾燥抽出物のロット証明書 F012B0 (USP カタログ番号 1288372) に従って実行しました。²図 3 のとおり、両方のシステムで、移動相の高い組成精度と、サンプルの溶出パターン的一致が見られました。

ただし、特にメソッド中のイソクラティックホールドステップでは、リテンションタイムのシフトが見られました (図 3)。この詳細は表 6 を参照してください。いくつかのピークのリテンションタイムの偏差が 5 % を超えています。つまり、この特定のメソッドでは、前の 2 つのアプリケーションよりもメソッドの互換性が低いということです。

RT 偏差が大きくなる根本原因をさらに評価するため、メソッドを少し変更し、B のイソクラティックホールドステップが元のメソッドの $\pm 0.2\%$ になるように調整しました。これで、2 つのポンプ間のわずかな組成精度の違いによる、分離化合物のリテンションタイムの変化をシミュレーションしました。その結果は規定の性能範囲内 ($\pm 0.4\%$) に収まっていました。図 4 のとおり、非常に小さな組成の変化によって、溶出ピークのリテンションタイムシフトが大きくなります。つまり、メソッドは組成の変化に対する感度が非常に高いため、2 つのポンプ間の組成精度の違いが結果に大きく影響するということです。メソッドの互換性の試験においては、通常、この効果を考慮する必要があります。

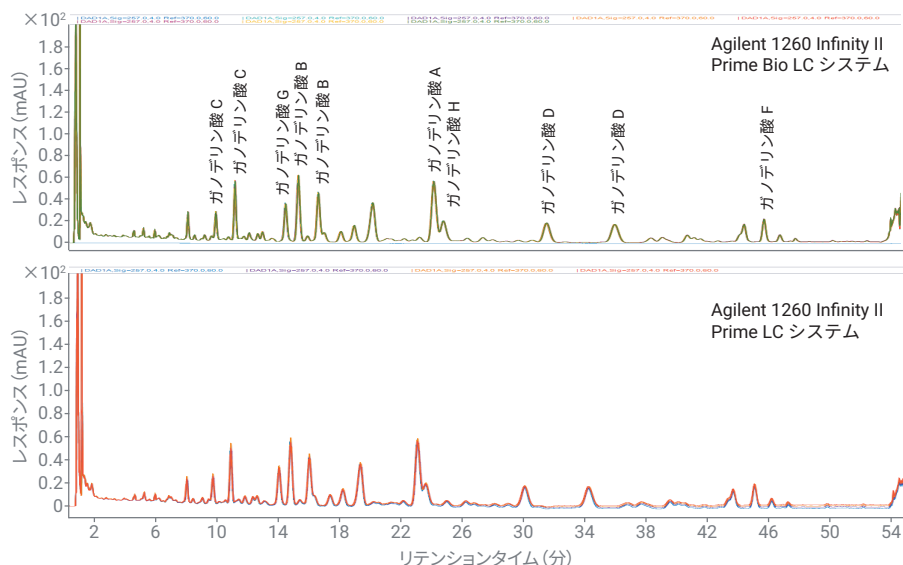


図 3. Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムにおける、霊芝子実体の抽出物の分離の 7 回のクロマトグラフィー分析の重ね表示。ピークの割り当ては前述のとおりです。

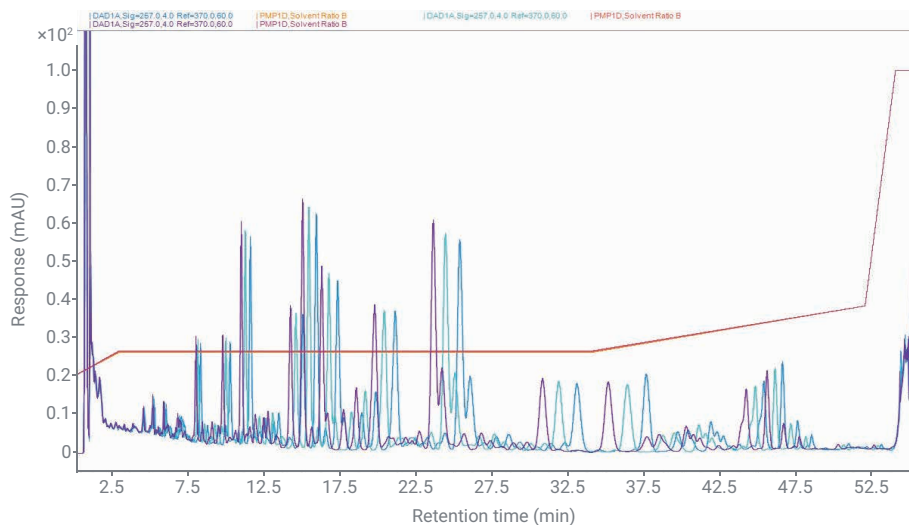


図 4. イソクラティックホールドステップの小さな変化がリテンションタイムに与える影響。イソクラティックホールドステップは $\pm 0.2\%$ B で修飾しました。Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムの結果を示します。緑色:26.5 % B イソクラティックホールドステップ (元)、青色:26.3 % B、マゼンタ:26.7 % B

表 6. Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムと Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムの間のリテンションタイムの偏差の計算。1260 Infinity II Prime LC システムのリテンションタイムは、偏差の計算のリファレンスとして使用できます。各機器の RT 精度はこれに従って表示されます。RT と RT %RSD の各値は、7 回の測定の前平均です。

化合物 ID 霊芝の抽出物	リテンションタイム Agilent 1260 Infinity II Prime LC システム (分)	RT %RSD	リテンションタイム Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システム (分)	RT %RSD2	RT 偏差 (分)	RT 偏差 (%)
1. ガノデリン酸 C	9.6596	0.1357	9.9924	0.0111	-0.3327	3.4446
2. ガノデリン酸 C	10.8330	0.1216	11.2505	0.0112	-0.4176	3.8546
3. ガノデリン酸 G	13.9869	0.0977	14.5709	0.0123	-0.5839	4.1749
4. ガノデリン酸 B	14.7444	0.0811	15.4070	0.0138	-0.6627	4.4943
5. ガノデリン酸 B	15.9688	0.0868	16.7174	0.0136	-0.7486	4.6878
6. ガノデリン酸 A	23.0435	0.1056	24.2967	0.0136	-1.2532	5.4386
7. ガノデリン酸 H	23.5823	0.1021	24.9284	0.0082	-1.3461	5.7080
8. ガノデリン酸 D	30.0558	0.0992	31.7005	0.0223	-1.6447	5.4721
9. ガノデリン酸 D	34.2341	0.1031	36.1752	0.0187	-1.9411	5.6700
10. ガノデリン酸 F	45.1035	0.0405	45.9687	0.0108	-0.8652	1.9182

結論

この技術概要では、3 種類のアプリケーションを実行して、新しい Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC システムと標準のステンレスベースの Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムの性能を比較しました。3 つのアプリケーションすべてにおいて各システムの再現性が優れており、イソクラティックメソッドと高速グラジエントメソッドの互換性が高いことがわかりました。リテンションタイムの偏差は、対応する溶出化合物のリテンションタイムに対して ±2 % 未満でした。

(長時間のイソクラティックホールドステップを含む) 緩やかなグラジエントで構成される 3 つ目のアプリケーションでは、溶出化合物数の RT 偏差が大きくなりました。この結果、システム間の移動相組成のわずかな違いが、大

きな偏差につながりうることがわかりました。組成精度の仕様内の性能を持つポンプでも、RT シフトが 5 % を超える場合があります。これは、メソッドの互換性を評価するためには、適切なメソッドを使用することが重要であることを示しています。

参考文献

1. Ganoderma lucidum Fruiting Body Monograph, Source URL: <https://hmc.usp.org/monographs/ganoderma-lucidum-fruited-body-1-0>, The United States Pharmacopeial Convention, **2015**.
2. Ganoderma lucidum Fruiting Body Dry Extract Lot Certificate F012B0, USP Catalog No. 1288372, The United States Pharmacopeial Convention, **2014**.

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いません。
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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, May 20, 2021
5994-3533JAJP
DE44314.0505092593

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・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, June 1, 2021
5994-2900JAJP
DE44348.2760069444