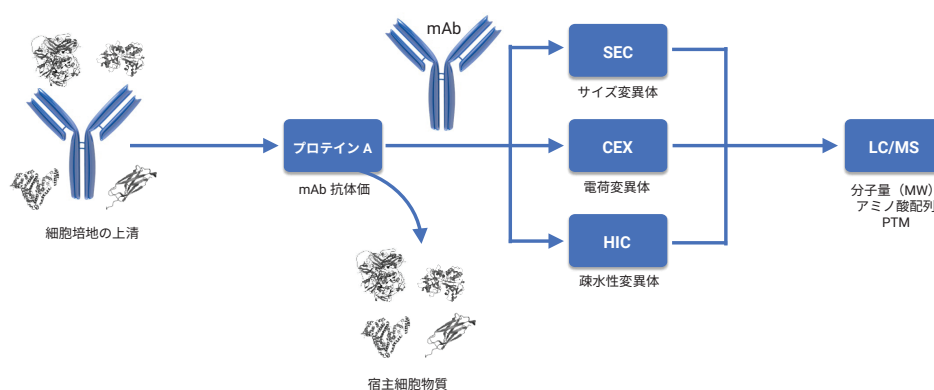


モノクローナル抗体のマルチ特性解析

3D-LC/MS と 2D マルチメソッドオプションによる同時および
並行マルチ特性解析



著者

Liesa Verscheure,
Gerd Vanhoenacker,
Pat Sandra, and Koen Sandra
RIC biologics
President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

Sonja Schipperges,
Sonja Schneider, and
Udo Huber
Agilent Technologies
Hewlett-Packard Strasse 8
D-76337 Waldbronn
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 6530 LC/Q-TOF システムを用いたモノクローナル抗体のマルチ特性解析について説明します。一次元目のプロテイン A アフィニティクロマトグラフィー、二次元目のマルチメソッドオプション (SEC、CEX、HIC から選択)、および三次元目の脱塩 SEC-MS を組み合わせて分析システムを構成しました。この画期的な 3D-LC/MS セットアップにより、細胞培地上清を直接システムに注入し、mAb の抗体価、サイズ/電荷/疎水性変異体、分子量、アミノ酸 (AA) 配列、および翻訳後修飾を、同時に並行して評価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) は複雑な構造を有しており、分析が非常に困難です。これらのバイオテクノロジー応用医薬品は、2つの軽鎖と2つの重鎖による150 kDa 四量体の状態で、およそ1,300個のアミノ酸で構成されています。アミノ酸はさらに翻訳同時修飾および翻訳後修飾されてさまざまな電荷変異体や疎水性変異体が生じる可能性があり、四量体は分解または凝集してサイズ変異体となります。最終的に、数百のmAb種によって、製品のプロファイル、安全性、効能が構成されます。この不均一性を解明するには、液体クロマトグラフィー (LC) および質量分析法 (MS) とともに、広い範囲の分析ツールおよび分析手法が必要です。^{1~3}

複数の技術を1つの分析システム内に結合することによって、分子量 (MW)、アミノ酸配列、N-グリコシル化、N および C 末端処理、脱アミド化、酸化、断片化、凝集などのさまざまな構造的な特性を同時評価できるのが、マルチ特性評価 (multi-attribute method, MAM) として知られる手法です。ハートカットまたはマルチハートカットモードで動作する二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) は、この点で非常に有用視されています。^{4~7} このコンセプトは近年、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 (SEC)、および LC/MS を、(マルチ) ハートカット三次元 (³D) セットアップで組み合わせることによって次のレベルへと向上しました。⁸

現行の研究ではこのコンセプトを基に、カチオン交換クロマトグラフィー (CEX) と疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) の2つのメソッドを二次元目にさらに追加し、カラムセレクトタによって²D (SEC、CEX、またはHIC) で使用するモードを選択して分析することができます。この²D マルチメソッドオプション付きの3D-LC/MS マルチ特性解析システムでは、細胞培地の上清から直接、mAb 抗体価、サイズ/電荷/疎水性変異体、分子量、アミノ酸配列、翻訳後修飾を同時並行して評価できます。

実験方法

材料

アセトニトリル (HPLC-S)、イソプロパノール (HPLC)、水 (ULC/MS)、およびギ酸 (ULC/MS) は、Biosolve (オランダ、ファルケンスワルト) から入手しました。NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaCl、NH₄HCO₂、(NH₄)₂SO₄、および酢酸は、Sigma-Aldrich (米国、ミズーリ州セントルイス) から購入しました。タイプ1の超純水は、Sartorius (ドイツ、ゲッティンゲン) 製のArium Pro ラボ用超純水システム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ズマブ (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。トラスツズマブのバイオシミラー、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞培養の上清は、地元のバイオテクノロジー企業から入手しました。

サンプル前処理

トラスツズマブ希釈系列 (0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、および2.0 mg/mL) は50 mM リン酸ナトリウム pH 7.45 (プロテイン A 移動相 A) で作成しました。トラスツズマブ産生 CHO クロンの細胞培養上清サンプルを、プロテイン A カラムにロードし、その後2分間1,000 g で遠心分離しました。

装置構成

マルチハートカットオプションを搭載した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、2個のAgilent 1290 Infinity バルブドライブ、Agilent 2D-LC アクティブ溶媒モジュレーション (ASM) バルブ、Agilent InfinityLab クイックチェンジ溶媒選択バルブ、Agilent InfinityLab クイックチェンジ4カラム選択バルブを使用しました。内径0.12 mm のステンレス配管を用いて、各モジュール間を接続しました。構成については、図1に概略を示し、以下に詳細を説明します。一次元目 (プロテイン A) および二次元目 (SEC/CEX/HIC) でダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用しました。さらに、三次元目 (SEC 脱塩) の後の検出には、Agilent Jet Stream ESI ソースを搭載したAgilent 6530 LC/Q-TOF を使用しました。

構成

¹D : プロテイン A クロマトグラフィー

- 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) 搭載 (G7111B、オプション032)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル、サンプルサーモスタット搭載 (G7167B、オプション101) および80 μLの拡張シートキャピラリー付き (G4226-87303)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT)、バルブドライブ搭載 (G7116B、オプション058)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、HDR 3.7 mm Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル付き (G4212-60032)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2D-LC ASM バルブ1300 bar (G4243A、部品番号5067-4266) を搭載、および次の機器
 - **デッキ A** : 80 μL ST 0.35 mm × 831 mm M/M キャピラリー (部品番号5067-6645)、0.12 mm × 170 mm M/M トランスファーキャピラリー (部品番号5500-1376) とZDV M/M ユニオン (部品番号5023-3150) を各2個接続
 - **デッキ B** : 0.12 mm × 150 mm M/M キャピラリー (部品番号5500-1204)
 - **ASM** : 0.12 mm × 85 mm M/M キャピラリー (部品番号5500-1300)

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

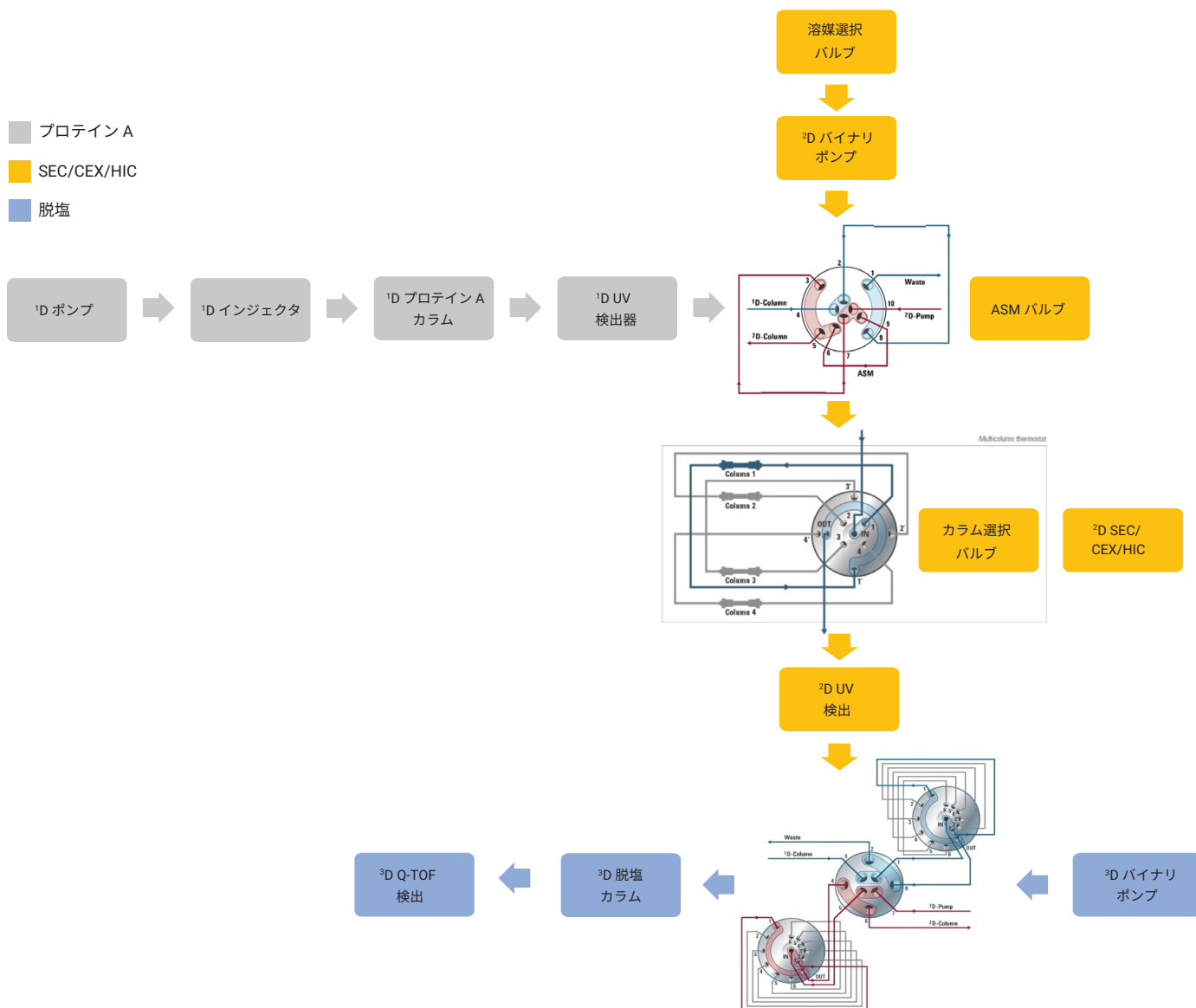


図 1. 1D プロテイン A 分離、2D SEC/CEX/HIC、および 3D SEC-MS ベースの脱塩を組み込んだ 3D-LC/MS 構成

²D : SEC、CEX、HIC の選択

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)、Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) に取り付けられた Agilent InfinityLab クイックチェンジ 12 ポジション/13 ポート溶媒セレクタ、200 bar バルブヘッド (G4235A、部品番号 5067-4159) をポンプクラスタとしてプログラムしました
- バルブドライブ搭載 Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT) (G7116B、オプション 058)、Agilent InfinityLab クイックチェンジ 4 カラムセレクタバルブ 800 bar (G4237A、部品番号 5067-4279)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル 10 mm (G4212-60008)

マルチハートカット

- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) と 2D-LC バルブ (G4236A)
- 2 個の 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)

³D : 脱塩 SEC-MS

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (MCT)、バルブドライブ搭載 (G7116B、オプション 058)
- Agilent 6530 LC/Q-TOF、Jet Stream ESI ソース (G6530A)

注: プロテイン A カラムおよび脱塩用 SEC カラムは同一のカラムコンパートメント内の異なるゾーンに配置しました。

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 Acquisition (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

²D と ³D は 2D-LC ソフトウェアで構成しますが、¹D の設定は通常の方法で制御されます。MassHunter Acquisition 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。SEC、CEX、または HIC 分析でさまざまなハートカットを実行しました。どの分析でも、最初のハートカットはブランクカットで、分析対象のハートカットの前にすべての次元のプレコンディショニングを行いました。二次元目で、異なるクロマトグラフィーモードへ切り替えるには、次のモードへ切り替える前に移動相と流量に関してシステムをプレコンディショニングする必要があります。

¹ D プロテイン A クロマトグラフィー		
カラム	Agilent Bio-Monolith Protein A カラム、5.2 × 5 mm (p/n 5069-3639)	
温度	25 °C	
移動相 A	50 mM リン酸ナトリウム pH 7.45	
移動相 B	500 mM 酢酸、pH 2.5	
流量	0.75 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0.0	0
	0.2	0
	0.3	100
	1.4	100
	2.0	0
4.0	0	
注入量	0.4 ~ 40 µg (検量線 プロテイン A) 40 µg (CEX およびメイン SEC) 100 µg (HIC) 500 µg (HMW SEC)	
DAD 検出	280 nm	
ピーク幅	> 0.05 分 (5 Hz)	
ASM	²D CEX および HIC	²D SEC
	0 分: ポジション 2 (ポート 1 & 8 ASM) 1.7 分: ポジション 4 (ポート 1 & 3 ASM)	0 分: ポジション 1 (ポート 1 & 8) 1.7 分: ポジション 5 (ポート 1 & 3)
	¹ D プロテイン A クロマトグラフィーによる目的ピークを、ASM バルブに取り付けられた 80 µL ループで収集し、 ² D クロマトグラフィーモードに移送しました。	

² D サイズ排除クロマトグラフィー		
カラム	Agilent AdvanceBio SEC 300A、7.8 × 300 mm、2.7 µm (p/n PL1180-5301)	
温度	25 °C	
移動相	150 mM リン酸ナトリウム pH 7.0	
流量	0.7 mL/min	
分析時間	30 分	
DAD 検出	214 および 280 nm	
ピーク幅	> 0.05 分 (5 Hz)	
カラム選択バルブ	ポジション 2 (ポート 2 → 2')	
MHC	先発薬	クローン
	ブランク: 4.94 分	ブランク: 4.94 分
	HMW: 9.62 分	HMW: 9.36 分
	メイン: 10.8 分	メイン: 10.8 分
	² D SEC における目的ピークを、マルチハートカットバルブに取り付けられた 40 µL ループで収集し、 ³ D 脱塩 SEC-MS に移送しました。	

2D カチオン交換クロマトグラフィー		
カラム	Agilent Bio MAb NP5 PK、2.1 × 250 mm、5 μm (p/n 5190-2411)	
温度	25 °C	
移動相 A	25 mM リン酸ナトリウム pH 7.0	
移動相 B	25 mM リン酸ナトリウム pH 7.0 + 100 mM NaCl	
流量	0.2 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0.0	5
	3.0	5
	43.0	65
	44.0	95
	49.0	95
	50.0	5
	65.0	5
DAD 検出	280 nm	
ピーク幅	> 0.05 分 (5 Hz)	
カラム選択バルブ	ポジション 1 (ポート 1 → 1')	
MHC	先発薬	クローン
	ブランク : 4.8 分	ブランク : 4.8 分
	プレ 1 : 13.35 分	プレ 3 : 16.29 分
	プレ 2 : 15.60 分	メイン : 19.45 分
	プレ 3 : 16.66 分	ポスト 1 : 20.83 分
	メイン : 19.89 分	ポスト 2 : 21.61 分
	ポスト 1 : 21.7 分	ポスト 3' : 24.96 分
	ポスト 2 : 22.85 分	
	ポスト 3 : 24.01 分	
	2D CEX における目的ピークを、マルチハートカットバルブに取り付けられた 40 μL ループで収集し、3D 脱塩 SEC-MS に移送しました。	

2D プレコンディショニング実行		
移動相	初期条件 2D クロマトグラフィーモード	
グラジエント	時間 (分)	流量
	0.0	0
	0.1	0
	1.0	1.0
	11.0	1.0
	11.01	0.1
	11.5	0.1
	12.5	流量初期条件 2D モード
15.0	流量初期条件 2D モード	
ASM	2D SEC コンディショニング : 初期条件でのコンディショニング実行および ASM 機能を無効にする前に、ASM キャピラリーをフラッシュするため、H ₂ O を用いて 1 回コンディショニングを実行	
	2D CEX および HIC コンディショニング : 開始移動相組成で 1 回コンディショニングを実行	
	2D SEC	ポジション 2 (ポート 1 → 8 ASM) - H ₂ O でフラッシュ ポジション 1 (ポート 1 → 8) - SEC コンディショニング
	2D CEX	ポジション 2 (ポート 1 → 8 ASM)
	2D HIC	ポジション 2 (ポート 1 → 8 ASM)
カラム選択バルブ	時間 (分)	流量
	0.00	現在位置を使用
	0.05	ポジション 4 (ポート 4 → 4')
	11.25	2D モード初期条件のバルブポジション
コンディショニングの実行中、1D および 3D の初期条件が適用されます。		

2D 疎水性相互作用クロマトグラフィー		
カラム	Agilent AdvanceBio HIC、4.6 × 100 mm、3.5 μm (p/n 685975-908)	
温度	25 °C	
移動相 A	1.5 M 硫酸アンモニウム、50 mM リン酸ナトリウム pH 7.0	
移動相 B	50 mM リン酸ナトリウム pH 7.0/IPA (80/20) (v/v)	
流量	0.5 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0.0	0
	2.0	0
	8.0	30
	38.0	45
	39.0	100
	43.0	100
	44.0	0
50.0	0	
DAD 検出	280 nm	
ピーク幅	> 0.05 分 (5 Hz)	
カラム選択バルブ	ポジション 3 (ポート 3 → 3')	
MHC	先発薬	クローン
	ブランク : 9.92 分	ブランク : 9.92 分
	プレ : 20.54 分	プレ : 20.54 分
	メイン : 22.42 分	メイン : 22.42 分
	ポスト : 24.26 分	ポスト : 24.26 分
2D HIC における目的ピークを、マルチハートカットバルブに取り付けられた 40 μL ループで収集し、3D 脱塩 SEC-MS に移送しました。		

MS データ処理

MassHunter ソフトウェアに統合されている BioConfirm Maximum Entropy デコンボリューションアルゴリズムを使用して、測定されたシグナルのデコンボリューション処理を行いました。

結果と考察

図 1 に、¹D でのプロテイン A クロマトグラフィー、²D での SEC、CEX、HIC、および ³D での SEC-MS ベースの脱塩化を統合した、3D-LC/MS マルチ特性解析システムの概略を示します。

はじめに、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーを用いた、細胞培地上清からの mAb の精製および mAb 抗体価測定を行います。黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A は、IgG の Fc 領域に対して強い親和性があるため、細胞培地上清中にあるマトリックス成分から mAb を分離することが可能です。中性 pH で mAb をプロテイン A 担体に結合させた後に、酸性移動相へのワンステップグラジエントを用いて mAb を溶出します。mAb の定量（抗体価の測定）は、UV 280 nm での溶出ピーク面積によって求められます。

その後、プロテイン A による分離ピークは ASM バルブに取り付けられた 80 μL ループで収集され、事前に定義された時間にバルブスイッチによって二次元目へ移送されます（2D-LC ソフトウェアによって制御されませんが、一般的なメソッド設定でプログラムされません）。二次元目で使用されるクロマトグラフィーモード（SEC、CEX、または HIC）はカラム選択バルブによって決定されます。CEX または HIC を選択すると、ASM 機能が作動して、¹D の溶出液の組成を ²D に対応させることができます。ASM に固有の希釈効果によりピークのブロードニングが生じるため、ASM 機能は SEC では無効にします。²D カラムからのピークの溶出は二次元目の DAD で検出され、酸性および塩基性変異体（CEX）、高分子量（HMW）および低分子量（LMW）変異体（SEC）、または疎水性変異体（HIC）を測定できます。

³ D サイズ排除クロマトグラフィー		
カラム	Agilent AdvanceBio SEC 300A, 4.6 × 50 mm, 2.7 μm (p/n PL1580-1301)	
温度	25 °C	
移動相 A	0.1 % 酢酸, 500 mM 酢酸アンモニウム	
移動相 B	0.1 % 酢酸, 20 % アセトニトリル (v/v)	
流量	0.4 mL/min (² D HIC の後は 0.8 mL/min)	
グラジエント	時間 (分)	%B
	0.0	100
	3.0	100
	3.01	0
	8.0 (² D HIC の後は 15.0)	0
	8.01 (² D HIC の後は 15.01)	100
	20.0 (² D HIC の後は 30.0)	100
MS 検出		
ダイバートバルブ	² D SEC および CEX	² D HIC
	0 分: MS へ 1.55 分: 廃液へ	0 分: MS へ 0.75 分: 廃液へ
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	
ネプライザ圧力	35 psi	
ソースガス温度	350 °C	
ソースガス流量	11 L/min	
キャピラリー電圧	3,500 V	
ノズル電圧	1,000 V	
フラグメンタ電圧	350 V	
データ取り込み		
モード	High mass range (1 GHz)	
データ取り込み範囲	m/z 500 ~ 10000	
	1 スペクトラム/秒	
	プロファイル取り込み	

²D 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 ループで収集され、1 つずつ ³D SEC-MS に移送されます。³D SEC カラムは、溶出バッファ（SEC/CEX/HIC）で使用されている非揮発性塩からタンパク質を分離するための脱塩ツールとして機能します。これは後続の MS 測定で必要となる機能です。バッファ中の塩がカラムに浸透する一方で、mAb 関連成分は最初に MS システムに溶出します。MS のダイバートバルブの動作はバッファ中の塩の溶出前に廃液に切り替えられる反復イベントとして MassHunter ソフトウェア内でプログラムします。

この 3D-LC マルチ特性アナライザの性能は、市販のトラスツズマブ（ハーセプチン）とバリオシミラー開発の際のトラスツズマブ産生 CHO クローンを用いて評価しました。トラスツズマブは、HER2 受容体に結合するヒト化 IgG1 で、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。

図 2 に、トラスツズマブ先発薬および CHO クローン 10 で得られたクロマトグラムとスペクトルを示します。高品質かつ有益な ¹D のプロテイン A および ²D の SEC、CEX、および HIC クロマトグラムが、CHO クローン 10 由来のトラスツズマブと比べて、トラスツズマブ

先発薬では全体的により高い純度で得られました。各クロマトグラフィーモードでのトラスツズマブ先発薬のメインピークの MS 測定（青で表示）は、比較可能なデコンボリュートされた MS スペクトルおよび糖鎖分布を示しています。しかし、かなりの量の硫酸付加体が

HIC 分析で観察されます。これは、過剰な量の硫酸アンモニウムが移動相に存在することが原因です。

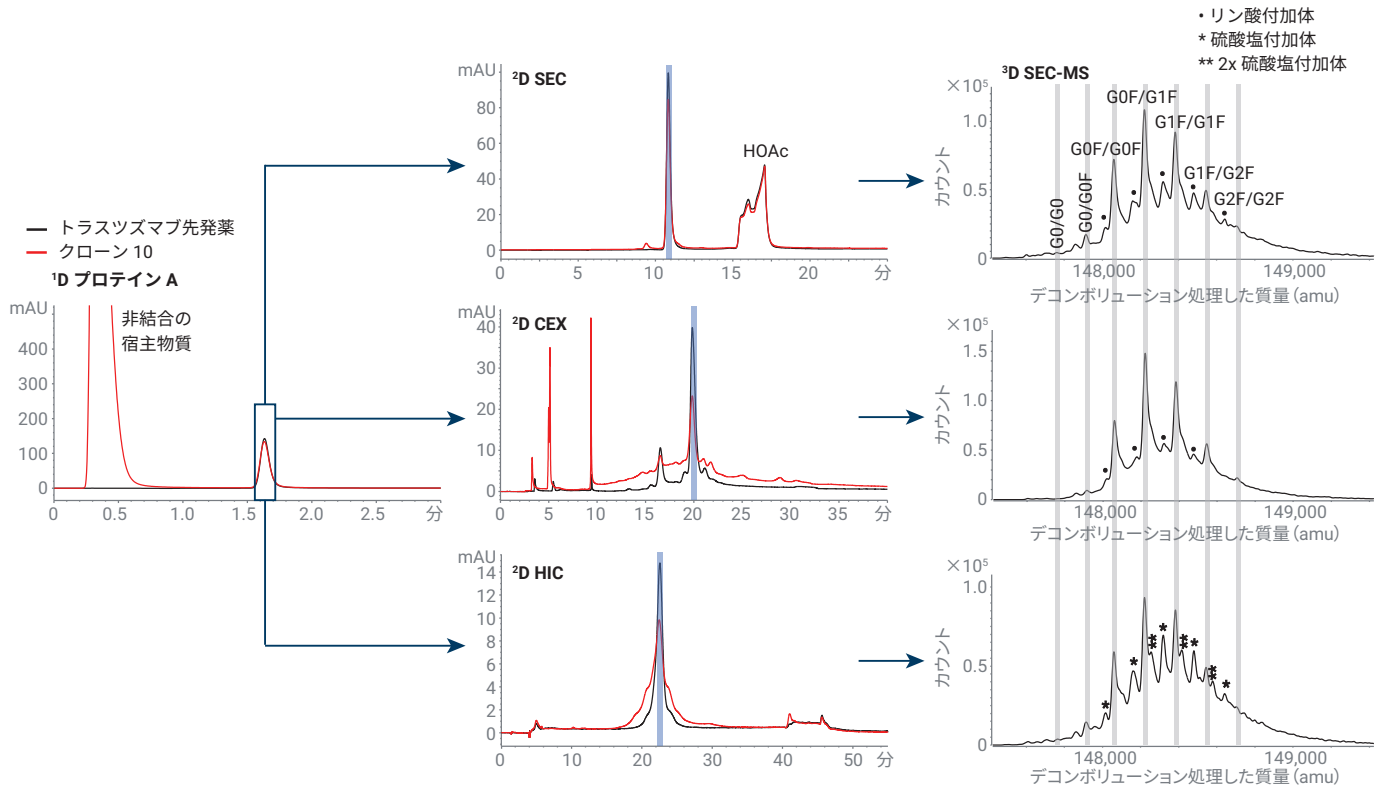


図 2. (A) トラスツズマブ先発薬および CHO クローン 10 の上澄みの ¹D プロテイン A クロマトグラム。(B) 1.6 分におけるプロテイン A ピークの ²D SEC、CEX、HIC クロマトグラム。(C) トラスツズマブ先発薬のメイン ²D SEC、CEX、HIC ピークのデコンボリュート処理した ³D SEC-MS スペクトル。採取された ²D ハートカットは青で示されています。

¹Dでのプロテイン A の抗体価測定

検量線は、0.02 ~ 2.0 µg/µL のさまざまな濃度の市販のトラスツマブを 20 µL 注入して作成しました。その後、20 µL の CHO クロンの上清を注入し、この検量線を使用して抗体価を測定しました。図 3 (A、B、および C) に、プロテイン A クロマトグラムと検量線を示します。宿主物質がフロースルーで溶出し、強度の高いシグナルが検出されます。一方で mAb はプロテイン A カラムに保持され、pH が低下した後にのみ溶出します (図 3B)。

先発薬は高度に精製された市販製品であるため、このフロースルーシグナルが先発薬に存在しないことは当然のことです。プロテイン A クロマトグラムから、そのピーク面積とトラスツマブの希釈系列から作成された外部検量線とをリンクすることによって、mAb の絶対濃度を決定することができます (図 3C)。クローン 3、6、8、9、および 10 に対してそれぞれ 0.40、0.09、0.57、0.74、および 1.0 µg/µL の抗体価が得られました。この結果から、低収率クローンと高収率クローンを区別するこ

とができます。その後、プロテイン A のピークが収集され、²D の SEC、CEX、HIC に移送され、図 3 (D、E、および F) に示されるようなクロマトグラムが得られました。

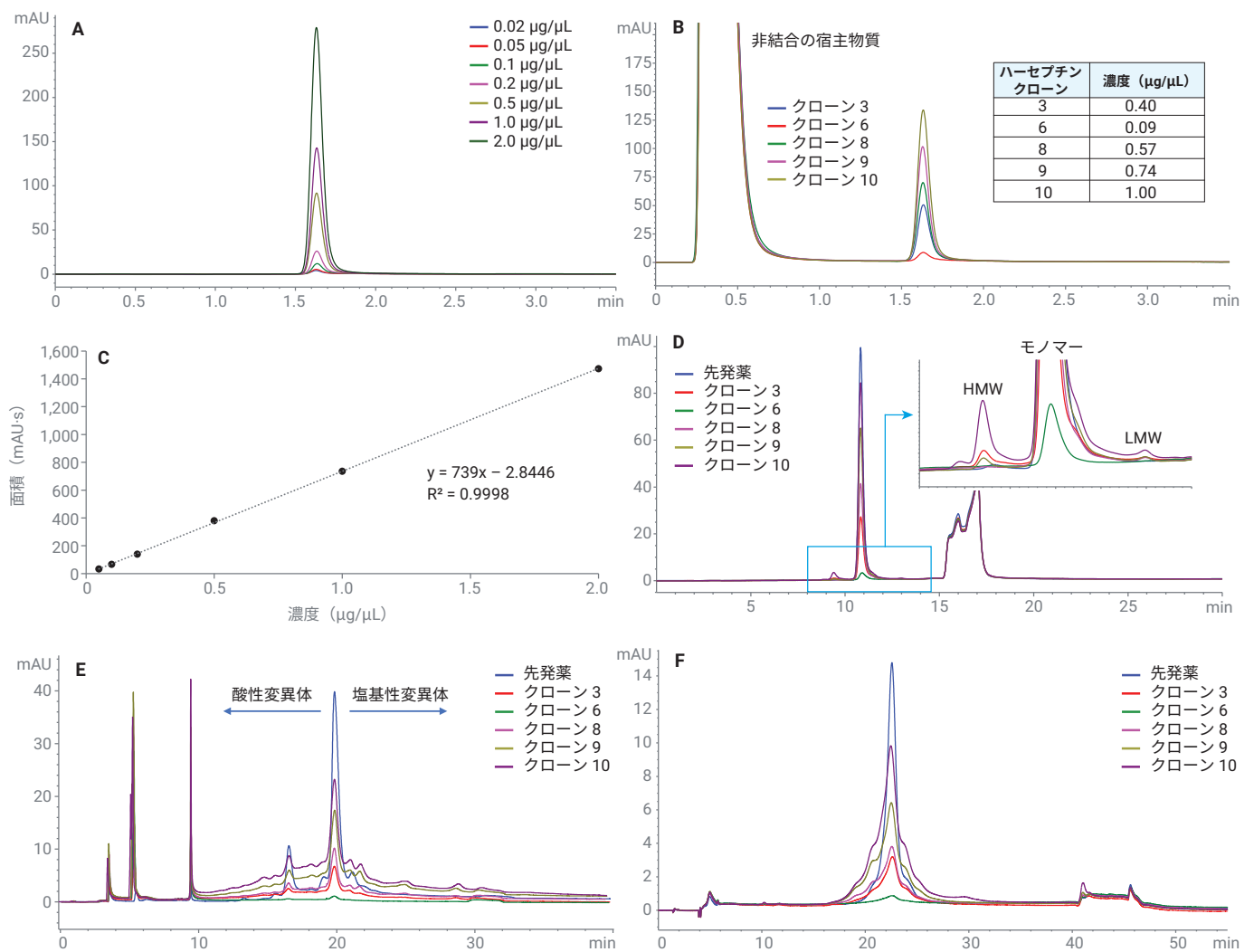


図 3. トラスツマブ先発薬およびトラスツマブ産生 CHO クロンのハートカットプロテイン A-SEC/CEX/HIC 分析。(A) トラスツマブ先発薬の希釈系列 (0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 µg/µL) の UV 280 nm での ¹D プロテイン A クロマトグラム。(B) 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの UV 280 nm での ¹D プロテイン A クロマトグラム。(C) ¹D UV 280 nm ピーク面積により作成した検量線。(D) トラスツマブ先発薬および 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの UV 280 nm での ²D SEC クロマトグラムおよび HMW および LMW 変異体の検出を示す拡大表示。(E) トラスツマブ先発薬および 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの UV 280 nm での ²D CEX クロマトグラム。(F) トラスツマブ先発薬および 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの UV 280 nm での ²D HIC クロマトグラム

それぞれの CHO クローンは主に、溶出する変異体の強度が異なり、これは抗体価と直接関連付けられます。

3D-LC/MSと²D SEC オプション

プロテイン A ピークを²D の SEC に移送することによって、高分子量および低分子量 (HMW および LMW) 変異体の観点で純度を評価できます。図 4A および 4B に、トラスツマブ先発薬と 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの SEC クロマトグラムを示します。

異なるサンプル間で HMW と LMW 変異体で相違が観察されます。CHO クロンは、トラスツマブ先発薬で観察されるよりも多くの

HMW および LMW の種を含んでいます。さらに、CHO クロンの HMW 変異体は、先発薬で観察される HMW 変異体よりも早く溶出し、HMW の性質に差があることが分かります。²D SEC クロマトグラムでは、プロテイン A 溶出バッファ (酢酸、HOAc) に相当する非常にブロードなピークが 15 分付近に観察されることに注意します。さらに、酢酸プラグ中のプロテイン A により精製された mAb を注入するため、中性 pH のバッファ中のサンプルの一次元 SEC 分析と比較して、メインピークでのテーリングファクターが増大します。

図 4C ~ 4F に、トラスツマブ先発薬と CHO クロンの³D SEC-MS のマススペクトルおよびデコンボリューション処理したスペクトルを示します。²D SEC ピークの一部のみが収集されて³D 脱塩 SEC-MS に移送されるので、低アバンドンスのピークの MS スペクトルの強度が低くなることに注意します。結果的に、¹D プロテイン A のロード量を 500 µg に増量して HMW ピークの特性分析データを得ました。代わりに、マルチハートカッター容量を大きくすることもできますが、この場合は SEC 分離が低下します。

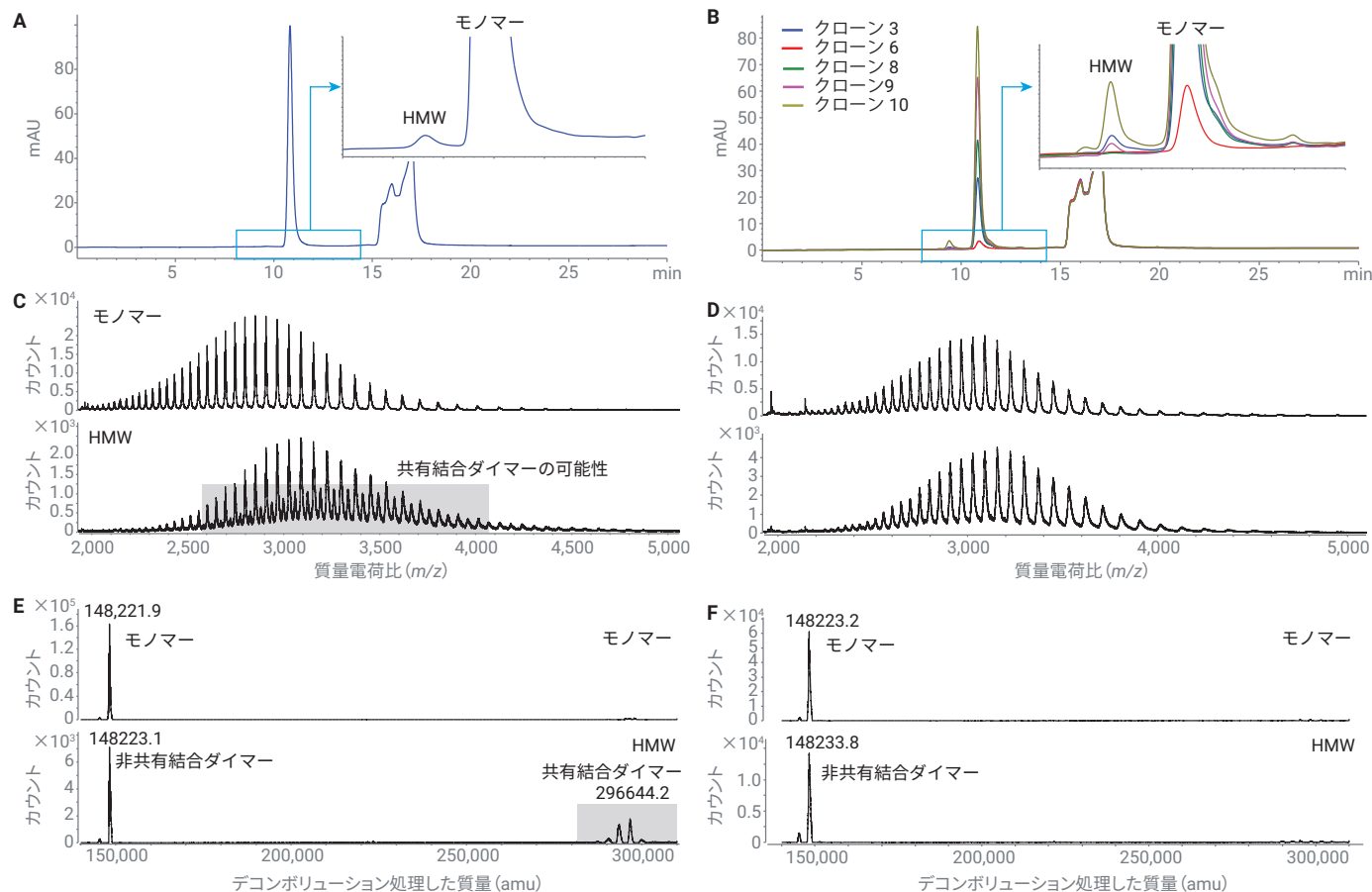


図 4. トラスツマブ先発薬および 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの²D SEC オプションを用いた 3D-LC/MS 分析。(A) トラスツマブ先発薬の UV 280 nm での²D SEC クロマトグラム。(B) 5 種類のトラスツマブ産生 CHO クロンの UV 280 nm での²D SEC クロマトグラム。(C) トラスツマブ先発薬のメインおよび HMW ピークの³D SEC-MS スペクトル。(D) CHO クロンの 10 のメインおよび HMW ピークの³D SEC-MS スペクトル。(E) トラスツマブ先発薬のメインおよび HMW ピークのデコンボリューション処理した³D SEC-MS スペクトル。(F) CHO クロンの 10 のメインおよび HMW ピークのデコンボリューション処理した³D SEC-MS スペクトル。

生のモノマースペクトルは類似する一方で、生の HMW スペクトルはトラスツズマブ先発薬と CHO クローン 10 との間で異なります。電荷を帯びたエンベロープ全体のより高い m/z 値へのシフトおよび低アバンダンスの中間 m/z スペクトルの存在は、トラスツズマブ先発薬での共有結合性と非共有結合性のダイマーの混合物を示唆します。トラスツズマブ産生 CHO クローン 10 では、電荷を帯びたエンベロープのシフトのみが観察され、非共有結合性のダイマーの存在を示唆します。後者のダイマーは変性する ^3D SEC-MS 条件では残存できず、このために崩壊してモノマーになります。実際、データをデコンボリューションすると、ダイマー相当の MW はトラスツズマブ先発薬の HMW ピークでのみ観察されます。CHO クローン 10 HMW の場合、使用される変性条件のために同じ MW がモノマーとして得られ、非共有結合が切断されます。

3D-LC/MS と ^2D CEX オプション

CEX は、脱アミド化、リジン切断、および N 末端環化などの修飾から生じる可能性のある電荷変異体をハイライトする優れたツールです。図 5A および 5B に、トラスツズマブ先発薬と 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの ^2D CEX クロマトグラムを示します。全体として、CHO クローンの純度は ^2D CEX クロマトグラムは、トラスツズマブ先発薬の分析で明らかにされた高い純度と同等でした。各 CHO クローンのクロマトグラムでは、プロテイン A の溶出条件に由来する酸性プラグが原因と考えられる強度の高いピークが、3、5、10 分付近に観察されました。

図 5C に、トラスツズマブ先発薬と CHO クローン 10 から選んだ電荷変異体でのデコンボリューション処理した ^3D SEC-MS スペクトルを示します。特に注意することは、より強い MS スペクトルを得るために、アバンダンスが低いピーク（ピーク 1 と 5）ではロード量を 100 μg に増やしたことです。トラスツズマブ先発薬と CHO クローン 10 は、メイン ^2D CEX ピーク（ピーク 3 と 6）で、MW 値およびグリコシル化パターンが同等でした。 ^2D CEX ピーク 1、2、および 4 は、メインピーク（機器の質量精度範囲内）と類似する MW 値を持ち、脱アミド化または異性化の傾向を示しています。Harris ら⁹ および Verscheure ら¹⁰ は、CEX フラクションコレクションおよびペプチドマッピングをそれぞれ、オフラインおよびオンライン手法で実行し、ピーク 1 は 2 か所の脱アミド化変異体に、ピーク 2 は 1 か所の脱アミド化変異体に、ピーク 4 はイソアスパラギン

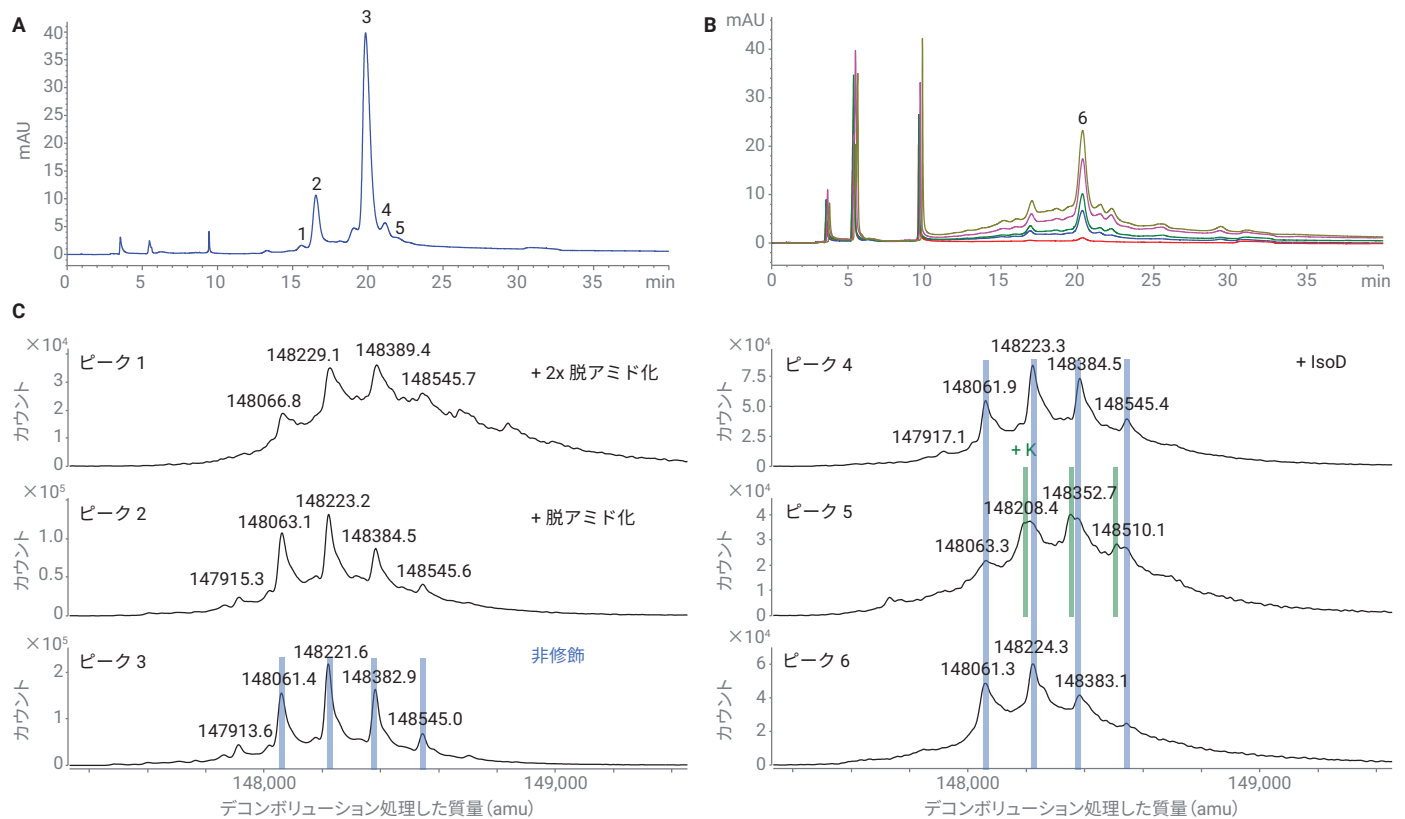


図 5. トラスツズマブ先発薬および 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの ^2D CEX オプションを用いた 3D-LC/MS 分析。(A) トラスツズマブ先発薬の UV 280 nm での ^2D CEX クロマトグラム。(B) 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの UV 280 nm での ^2D CEX クロマトグラム。(C) トラスツズマブ先発薬と CHO クローン 10 で収集されたピークのデコンボリューション処理した ^3D SEC-MS スペクトル。

酸含有変異体に相当することを確認しました。²D CEX ピーク 5 で、C 末端リジンに相当する、約 128 Da の質量増大のある変異体が観察されました。

3D-LC/MS と ²D HIC オプション

HIC は、タンパク質バイオ医薬品のダウンストリーム精製で主力となる手法で、分析ツールとしても価値があります。分離メカニズムは、高塩濃度における弱い疎水性固定相へのタンパク質の吸着に基づいています。塩濃度を下げることによって、疎水性が増加する順にタンパク質が脱着し、酸化、脱アミド化、異性化、

C 末端リジン、N 末端環化、およびクリッピングなどの抗体の不均一性をハイライトすることができます。

図 6A および 6B に、トラスツズマブ先発薬と 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの HIC クロマトグラムを示します。図 6C および 6D にそれぞれ、トラスツズマブ先発薬とトラスツズマブ産生 CHO クローンの 10 のメインピークをデコンボリューション処理した MS スペクトルを示します。定性可能なマスペクトルを得るために、ロード量を 100 µg まで増やしました。³D SEC による脱塩を行ったにもかかわらず、実質的に感度の低下をまねく付

加体が生成し、複雑なスペクトルが得られました。硫酸/リン酸アンモニウムバッファに代わる適切なバッファを見つけるための、さらなるメソッド開発が必要です。

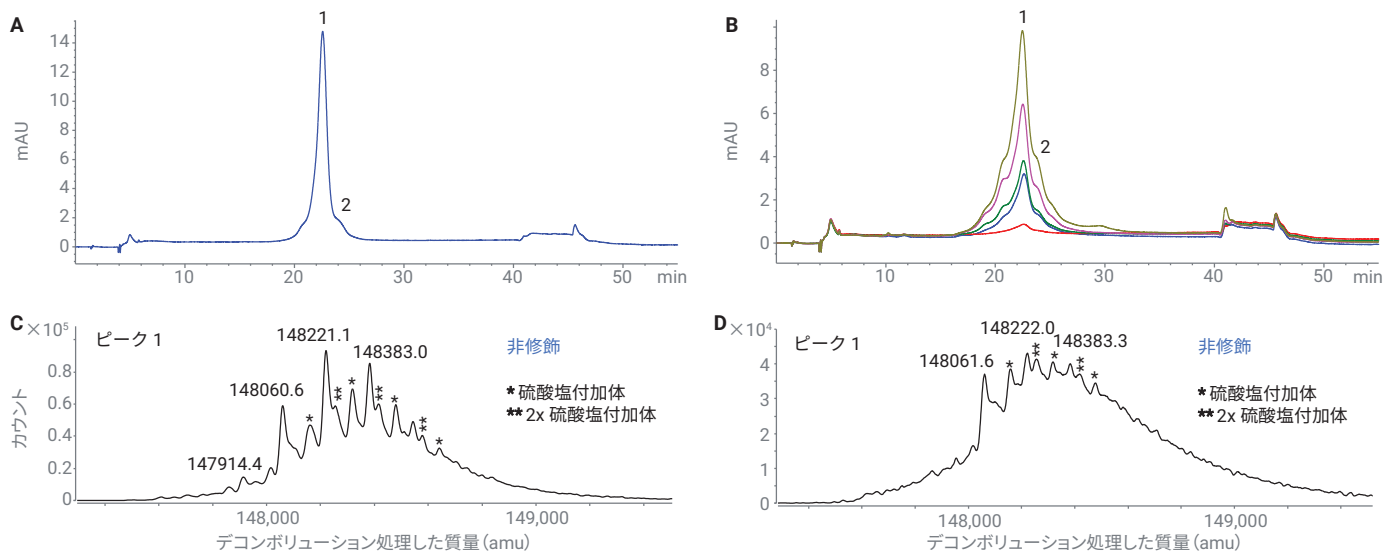


図 6. トラスツズマブ先発薬および 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの ²D HIC オプションを用いた 3D-LC/MS 分析。(A) トラスツズマブ先発薬の UV 280 nm での ²D HIC クロマトグラム。(B) 5 種類のトラスツズマブ産生 CHO クローンの UV 280 nm での ²D HIC クロマトグラム。(C) トラスツズマブ先発薬で収集されたピークのデコンボリューション処理した ³D SEC-MS スペクトル。(D) CHO クローン 10 で収集されたピークのデコンボリューション処理した ³D SEC-MS スペクトル

自動化された²Dモード切り替え

前述の 3D-LC/MS マルチ特性解析システムは、カラムセレクトバルブを搭載することによって、二次元目で3つの異なるクロマトグラフィーモード（SEC、CEX、または HIC）から選択できるオプションを提供します。すべてのクロマトグラフィーモードで適切な移動相組成が異なり、互換性はないため、²Dモード間の自動切り替えの評価が必要です。カラムに適切でない移動相が流入するのを防ぐために、システムではカラム選択バルブのバイパス位置を使用し、次に予定するクロマトグラフィーモードの移動相組成を用いてフラッシュするこ

とによって事前にコンディショニングしました。その後、サンプルの注入前にカラムを十分にコンディショニングするブランクランを実行しました。

各クロマトグラフィーモードを順次に実行するシーケンスを実行し評価を行いました。例えば、²D SEC を1回ランした後、システムは CEX 条件に合わせてプレコンディショニングされ、ブランクランの後にトラスツマブが注入されました。このクロマトグラムの²D CEX ランと²D HIC ランの後に得たクロマトグラムとの比較を、図7の最初の列に示しました。全体的に見て、同等のクロマトグラムがすべ

てのクロマトグラフィーモードで得られました。したがって、クロマトグラフィー品質を損なうことなく、異なる²Dモードを単一シーケンスで実行でき、このセットアップの最終目標にかなっていることが分かります。

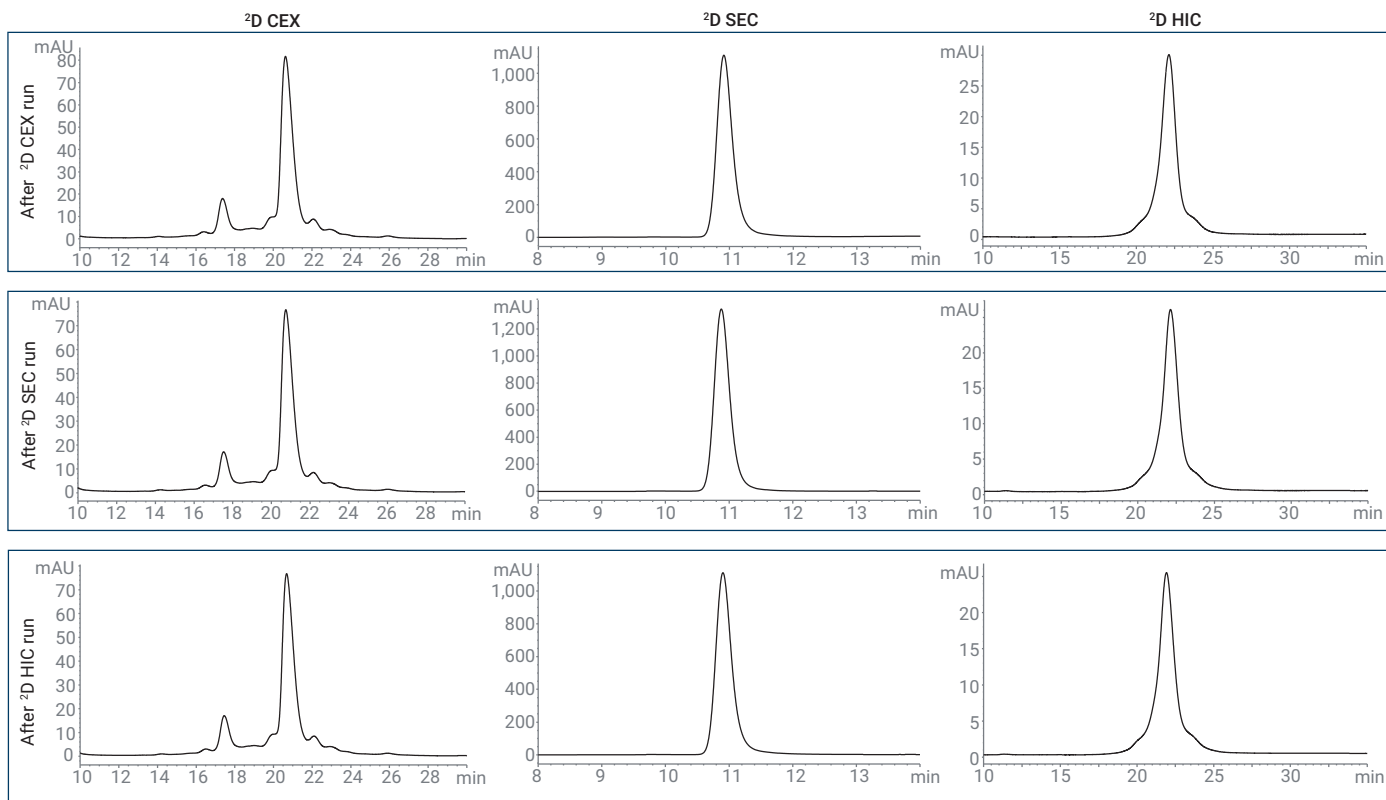


図7. SEC、CEX、および HIC 間で切り替わる²Dモードの評価中に得られた²D UV 280 nm クロマトグラム

結論

一次元目のプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーと、二次元目のマルチメソッドオプション (SEC、CEX、HIC から選択) と、三次元目の脱塩 SEC-MS を組み合わせた完全に自動化された 3D-LC/MS マルチ特性解析システムについて解説しました。このセットアップでは、mAb を細胞培地の上清から精製し、mAb 抗体価、サイズ/電荷/疎水性変異体、分子量、アミノ酸配列、翻訳後修飾を測定できます。また、分離能に影響を及ぼすことなく、異なる 2D メソッド間を自動で切り替えることができます。

参考文献

1. Sandra, K.; Vandenneede, I.; Sandra, P. 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. 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.
5. Sandra, K. *et al.* Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149-157.
6. 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.
7. Sandra, K. *et al.* The Versatility of Heart-Cutting and Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography in Monoclonal Antibody Clone Selection. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1523, 283–292.
8. Vanhoenacker, G. *et al.* Multi-Attribute Analysis of Monoclonal Antibodies Using the Agilent InfinityLab 2D-LC Solution and Q-TOF MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0947EN, **2020**.
9. Harris, R. J. *et al.* Identification of Multiple Sources of Charge Heterogeneity in a Recombinant Antibody. *J. Chromatogr.B* **2001**, 752, 233–245.
10. Verscheure, L. *et al.* Fully Automated Characterization of Monoclonal Antibody Charge Variants Using 4D-LC/MS. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2020EN, **2020**.

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。

DE44308.1141550926

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

5994-3521JAJP