

バイオイナート仕様の流路における mAb の ネイティブ SEC/MS 分析

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと
Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm PEEK ライニング
カラムによる mAb 分析

著者

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

Sonja Schneider and
Udo Huber
Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
D-76337 Waldbronn
Germany

概要

モノクローナル抗体 (mAb) などの遺伝子組換え治療用タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、安全性や有効性に悪影響を及ぼすおそれのあるサイズ変異体の存在を検出するために不可欠な分析ツールです。SEC では通常、不揮発性のリン酸緩衝液を使用するため、分離に質量分析 (MS) を適用することはできません。このため、ピークの同定にはオンライン・オフラインを問わず脱塩のステップが必要とされます。

酢酸アンモニウムなどの揮発性の MS 対応緩衝液を従来のステンレス製機器/カラム構成で使用した場合、リン酸緩衝液と比較して、非特異的相互作用のために効果が大幅に低下することが示されています。この欠点は、生体適合性のある、つまりバイオイナート仕様の流路を使用することによって解消できます。本アプリケーションノートでは、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) ライニング Agilent AdvanceBio SEC カラムと Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる mAb のネイティブ SEC/MS 分析の性能について紹介します。

はじめに

タンパク質を流体力学半径（サイズ）に基づいて溶出させる SEC は、mAb に関連する凝集とフラグメンテーションの研究に広く使用されています。¹⁻⁴SEC では多くの場合、中性 pH および高イオン強度のリン酸緩衝液が使用され、非変性水性条件下でサイズ変異体の分離が可能となります。この手法は、固定相との相互作用に依存せず、移動相グラジエントの適用を必要としない唯一のクロマトグラフィー技術です。代わりに分子は、粒子の細孔へのアクセシビリティに依存した速度でカラムを通過します。非常に大きな分子は排除され最初に溶出する一方で、小さな分子はサイズに応じてさまざまな程度で細孔に浸透できます。また、不要な二次相互作用が固定相との間で発生して、ピークテーリングおよび回収率の低下、溶出時間のシフトを引き起こし、分離に大きな影響を与えることがあります。これらの相互作用は、一般に静電的または疎水的であり、移動相の組成を調整することで（塩、有機溶媒などの添加により）抑制できます。⁵しかし最近になって、一般的な移動相組成を使用しながら二次相互作用を制限または防止する新規でより不活性度の高い SEC 材料が使われるようになってきました。その強力な例が AdvanceBio SEC カラムであり、親水性ポリマーでコーティングされたシリカ粒子を使用することにより、最も困難で問題の多かったタンパク質バイオ医薬品の分析が可能となっています。この方法で、固定相で発生し得る活性点が保護されます。^{6,7}

SEC は、不揮発性の緩衝液と塩を使用するため、MS と互換性がありません。したがってピーク同定では、フラクションコレクションと脱塩によりエレクトロスプレーイオン化（ESI）をうまく行う必要があります。現在、これらのプロセスは一般的に、二次元 LC/MS（2D-LC/MS）を使用して自動的に実行されています。マルチハートカットバルブに取り付けられたループで一次元目の SEC ピークが収集された後、二次元目で逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）または SEC を使用してオンラインで脱塩されます。^{8,9}しかしここ数年、酢酸アンモニウムなどの揮発性移動相を使用して、SEC と MS を直接組み合わせるようになってきました。¹⁰興味深いことに、このような使用法により別の種類の非特異的相互作用が注目されるようになりました。LC システム、キャピラリーチューブ、およびカラムハードウェアに一般的に用いられているステンレス表面と mAb との相互作用です。^{11,12}この影響は多くの場合、高いイオン強度でリン酸緩衝液を使用するとマスクされます。

したがって、mAb のネイティブ SEC/MS 測定を成功させるには、1290 Infinity II Bio LC システムと PEEK ライニング AdvanceBio SEC カラムが提供する全体がバイオイナート仕様の流路が必要です。1290 Infinity II Bio LC システムは、鉄を含まない流路を用いて望ましくない相互作用のリスクを最小限に抑えたバイオイナート仕様の機器です。¹³クロマトグラフィーを非常に高い圧力で実施するために、ステンレスの代わりに金属合金 MP35N をシステム全体に使用しています。PEEK ライニング AdvanceBio SEC カラムのステンレス表面は、PEEK を使用してマスキングされています。このシステムとカラムの組み合わせにより、優れた生体適合性、化学耐性、機械的・熱的安定性が得られます。

このアプリケーションノートでは、mAb のネイティブ SEC/MS 分析において、1290 Infinity II Bio LC システムと PEEK ライニング AdvanceBio SEC カラムの性能を、対応するステンレス製カラムと比較します。

実験方法

試料調製

リン酸ナトリウム（ NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 ）と酢酸アンモニウムは Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から入手し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）は Thermo Fisher Scientific（ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）から入手しました。タイプ I の純水は、Sartorius（ゲッティンゲン、ドイツ）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。分子量マーカーのサイログロブリン（670,000 Da）、ガンマグロブリン（158,000 Da）、オボアルブミン（44,000 Da）、ミオグロビン（17,000 Da）、およびビタミン B12（1,350 Da）を含むゲルろ過標準は、Bio-Rad（ハーキュリーズ、カリフォルニア州、米国）から入手しました。トラスツマブと抗体薬複合体（ADC）プレントキシマブ ベドチンは、それぞれ Roche（バーゼル、スイス）と Seattle Genetics（ボセル、ワシントン州、米国）から提供されたものです。NISTmAb 参照物質（RM8671）は Agilent Technologies（サンタクララ、カリフォルニア州、米国）から購入しました。

サンプルおよび移動相の前処理

mAb は PBS で 1 mg/mL に希釈しました。両方の mAb にわずかなストレス（50 °C で 1 週間）を加え、高分子量（HMW）種および低分子量（LMW）種を増加させました。ゲルろ過標準を、メーカーの指示に従って水で希釈しました。移動相は新しく調製し、使用前に 0.2 μm のボルトトップフィルタでろ過しました。

装置構成

Agilent 1290 Infinity II LC (ステンレス [SST] LC) と Agilent 1290 Infinity II Bio LC (バイオイナート仕様) の 2 台のシステムを使用しました。いずれのシステムにも、ピークの広がりを抑えるために、内径 75 µm の超低分散 (ULD、SST またはバイオイナート仕様) キットを装着しました。

構成の詳細

	Agilent ステンレス LC システム	Agilent Bio LC システム
ポンプ	1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)	1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
オートサンブラ	1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、一体型サンプルサーモスタット付き	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
カラムコンパートメント	1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、ULD 熱交換器 (G7116-60021) 付き	1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、Bio ULD 熱交換器 (G7116-60091) 付き
検出器	1290 Infinity II DAD (G7117B)	1290 Infinity II DAD (G7117B)
フローセル	標準 InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (G4212-60008)	Max-Light カートリッジセル LSS、10 mm (G7117-60020)
超低拡散キット	1290 Infinity II LC 用超低拡散キット (5067-5963)	1290 Infinity II Bio LC 用超低拡散キット (5004-0007)
MS システム	6545 LC/Q-TOF (Agilent Jet Stream 技術を使用)	

メソッド

ステンレス (SST) 製および PEEK ライニングカラムの 2 種類の Agilent AdvanceBio SEC カラムを評価しました。SEC/UV のデータは、Agilent OpenLab CDS バージョン 2.6 で取り込んで処理しました。ネイティブ SEC/MS のデータは、Agilent MassHunter for Data Acquisition (B.09.00) で取り込み、Agilent MassHunter Qualitative Analysis BioConfirm アドオン (B.07.00) で解析しました。

SEC 条件

	ステンレス製カラム	PEEK ライニングカラム
カラム	Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 150 mm、1.9 µm (部品番号 PL1580-3201)	Agilent AdvanceBio SEC 200 Å, PEEK ライニング、2.1 × 150 mm、1.9 µm (部品番号 PL1980-3201PK)
流量	360 µL/min	75 µL/min
注入量/負荷 UV	19 µL/19 µg	4 µL/4 µg
注入量/負荷 MS		10 µL/50 µg
移動相	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7 100 mM 酢酸アンモニウム 50 mM 酢酸アンモニウム	
カラム温度	25 °C	
オートサンブラ温度	6 °C	
検出 UV	280/4 nm、リファレンス オフ、ピーク幅 >0.1 分	

ネイティブ MS パラメータ

パラメータ	設定値	
イオン化	エレクトロスプレーポジティブイオン化	
MS ダイバータバルブ	バイパス	
イオン源パラメータ	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	300 °C
	シースガス流量	8 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	350 V
取り込みパラメータ	スキマ電圧	220 V
	質量範囲	拡張された質量範囲 (2 GHz)
		500 ~ 10,000 m/z
	取り込みスピード	1 スペクトル/秒
	モード	高分離能モード
		プロフィール取り込み

結果と考察

図 1 は、1290 Infinity II Bio LC および AdvanceBio SEC 200 Å PEEK ライニングカラムで 150 mM リン酸ナトリウム（すなわち、SEC の最も典型的な移動相）および MS 対応の代替として 100 mM 酢酸アンモニウムを用いて得られたいくつかの mAb の SEC UV 280 nm クロマトグラムをゲルろ過標準と重ね表示したものです。後者の移動相を使用することで、

脱塩ステップを必要とせずに SEC と MS を直接組み合わせる可能性が示唆されました。AdvanceBio SEC 粒子の親水性ポリマーコーティングによって、ADC を含むすべての mAb が満足のいく性能で分離されていることがわかります。ADC に関連する疎水性に起因した固定相との二次相互作用により、初期世代の SEC 粒子では分析が困難でした。

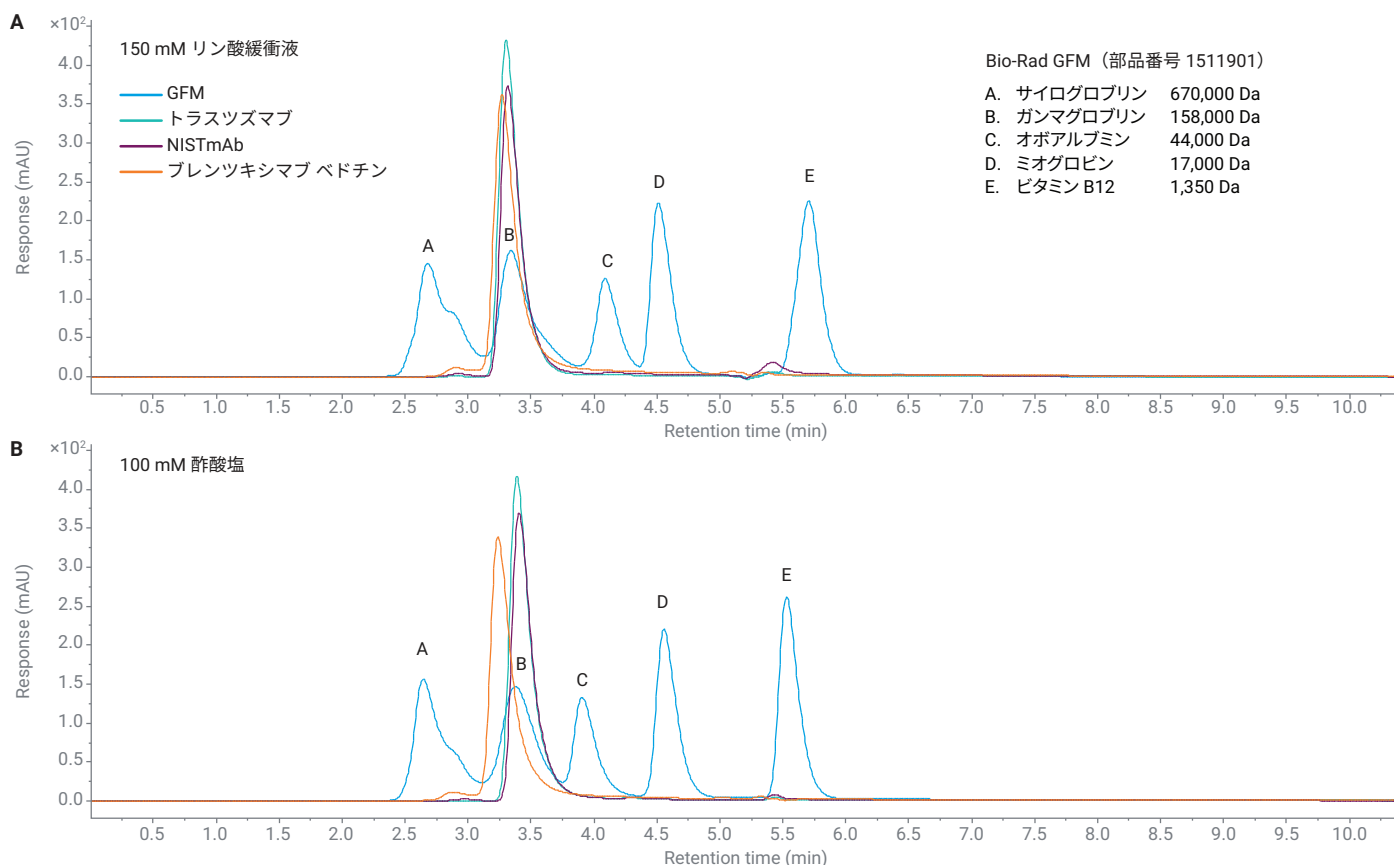


図 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC および Agilent AdvanceBio SEC 200 Å PEEK ライニングカラムで、移動相として (A) 150 mM リン酸ナトリウムおよび (B) 100 mM 酢酸アンモニウムを用いて得られたトラスツズマブ、NISTmAb、およびプレントキシマブ ベドテンと重ね表示したゲルろ過標準の UV 280 nm SEC クロマトグラム

SEC 流路内のステンレス製部品の有無による影響を評価するために、一部のシステムまたはカラムの組み合わせで mAb サンプルを分析しました。図 2 と 3 は、従来のステンレス製システムとカラム（左）、ステンレス製システムと PEEK ライニングカラム（中央）、およびバイオフィナート仕様の LC システムと PEEK ライニングカラム（右）におけるトラスツズマブと NISTmAb の分析した結果です。組み合わせはすべて、150 mM リン酸塩移動相と、MS 対応の代替として 50 および 100 mM 酢酸アンモニウム相を使用して評価しました。リン酸ナトリウムは、テストしたすべての組み合わせで満足のいく分離性能を示し、HMW 種の良好な回収率を示しています。リン酸ナトリウムを酢酸アンモニウムに置き換えて移動相のイオン強度を下げると、流路にステンレス製部品がある場合、分離の品質に悪影響が及んでいます。カラムハードウェアの影響により、酢酸アンモニウムを移動相としてステンレス製カラムを使用した場合、HMW 種は

存在したとしてもほとんど検出されていません。PEEK ライニングカラムを用いて、100 mM 酢酸アンモニウムで分析を行うと、HMW 種が再び現れます。MS 感度の点で最も優れた 50 mM 酢酸アンモニウム移動相では、バイオフィナート仕様の LC システムと PEEK ライニングカラムの組み合わせ（右下のクロマトグラム）のみで、HMW 不純物の検出に關して有用な結果が得られています。

さらに、ピークの幅とテーリングに対する機器の影響を図 4 に示します。1290 Infinity II Bio LC でピーク幅は一貫して小さくなります。リン酸移動相を MS 対応の酢酸塩に置き換えても、ピークテーリングは長くなりません。一方ステンレス製 LC システムで移動相を変更すると、ピーク幅とテーリングの両方が大幅に悪化します。移動相のイオン強度を下げると、この影響が増幅されます。

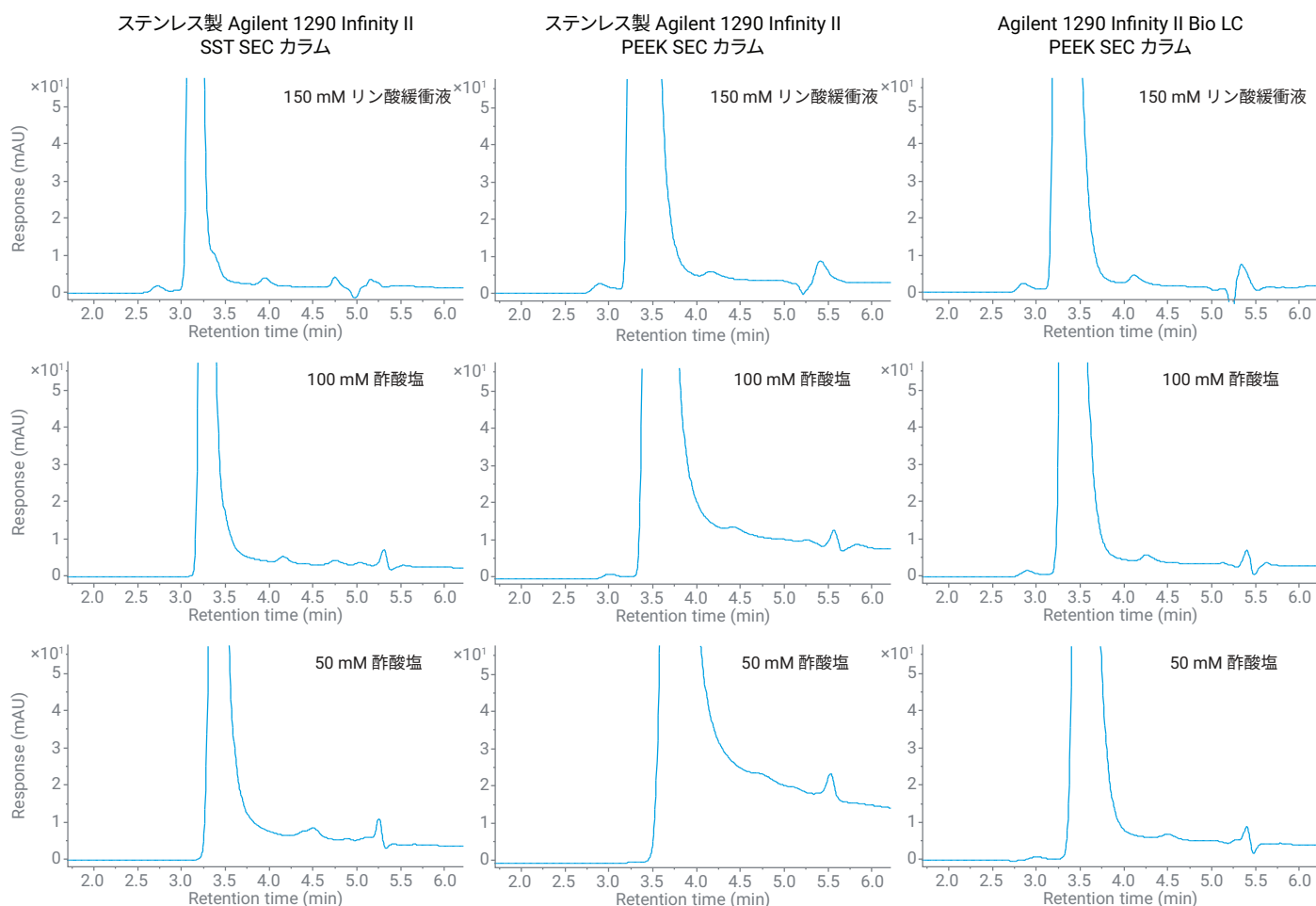


図 2. 異なる移動相組成と異なるハードウェア不活性度の組み合わせによるトラスツズマブの UV 280 nm SEC クロマトグラム

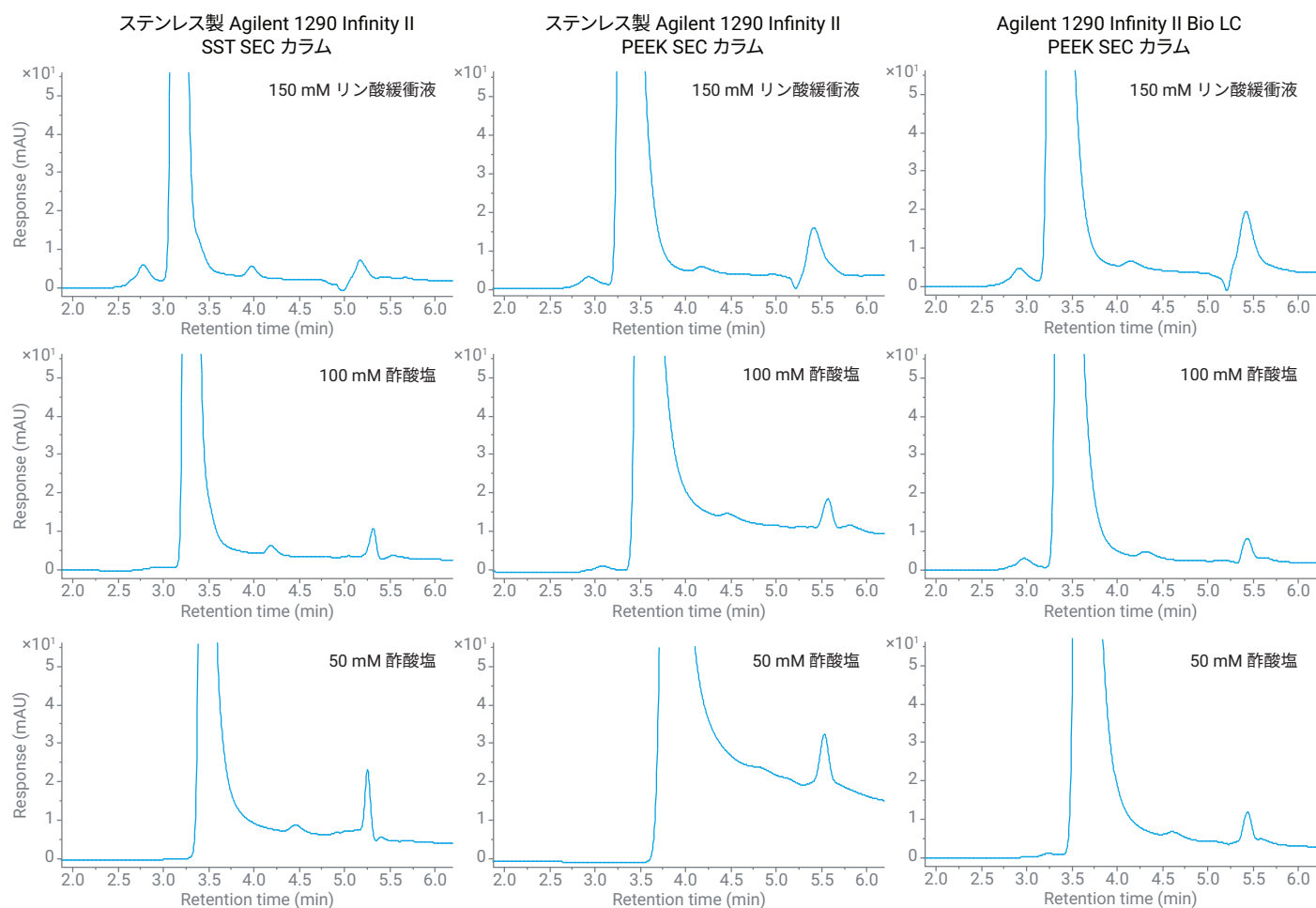


図 3. 異なる移動相組成と異なるハードウェア不活性度の組み合わせによる NISTmAb の UV 280 nm SEC クロマトグラム

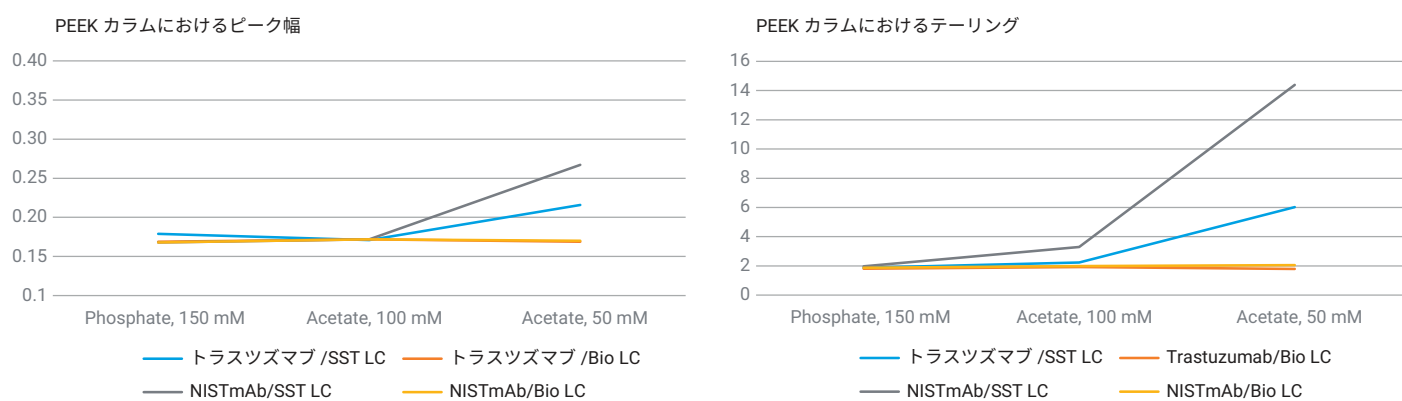


図 4. Agilent 1290 Infinity II LC (SST LC) と Agilent 1290 Infinity II Bio LC および異なる移動相組成を使用して得られたトラスツズマブと NISTmAb の UV 280 nm SEC クロマトグラムで観察されたピーク幅とテーリング

1290 Infinity II Bio LC システムを PEEK ライニング AdvanceBio SEC カラム（酢酸アンモニウムを使用）と組み合わせて得られる優れた性能により、SEC をネイティブ MS に直接接続して mAb の特性解析をサポートできる可能性があります。概念実証として、このハードウェアと Agilent 6545 LC/Q-ToF を使用して mAb を分析しました。クロマトグラフ性能と MS 感度の妥協点として、100 mM 酢酸アンモニウム移動相を選択しました。

NISTmAb の SEC/UV/MS 分析結果を図 5 に示します。UV 280 nm のクロマトグラムは、デコンボリュートした MS スペクトルに基づいて、それぞれ mAb 二量体および Fab フラグメントとして識別可能な HMW および LMW バリエーションを示しています。メインピークに関連するスペクトルは、2 分岐複合体 N- 結合型糖鎖 G0、G0F、G1F、および G2F で修飾されたいくつかのグリコフォームの存在をはっきりと示しています。スペクトルからはまた、C 末端リジンを持つ mAb バリエーションの存在も分かります。

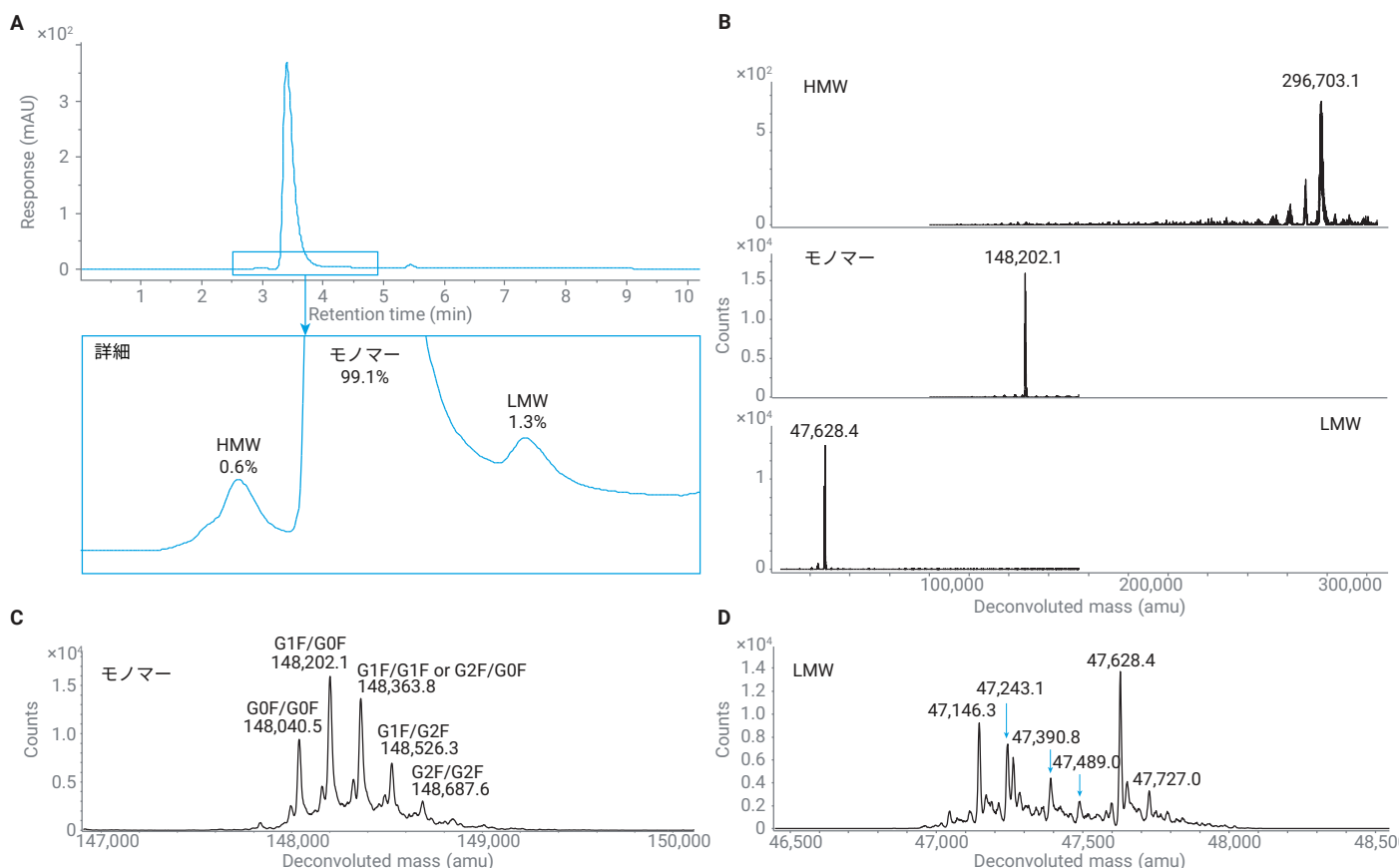


図 5. 50 °C で 1 週間ストレスをかけた NISTmAb の SEC/UV/MS。 (A) UV 280 nm クロマトグラム、 (B) HMW、モノマー、および LMW として注釈が付けられたピークに関連付けられたデコンボリュートしたネイティブ MS スペクトル、 (C) モノマーのデコンボリュートしたネイティブ MS スペクトルの拡大図、 (D) LMW のデコンボリュートしたネイティブ MS スペクトルの拡大図

図 6 は、鎖間システイン結合 ADC であるブレンツキシマブ ベドチンの SEC/UV/MS 分析結果を示したものです。軽鎖と重鎖は非共有相互作用によってのみ維持されるため、この ADC の測定は非変性 SEC および MS 条件の恩恵を明らかに受けています。この状態は、鎖間ジスルフィド結合還元とそれに続く遊離スルフヒドリル基の結合に起因します。メイン

ピークに関連付けられたデコンボリュートしたスペクトルは、ADC の重要品質特性（CQA）である薬物分布と薬物抗体比（DAR）を明確に示しています。さらに、グリコシル化パターンおよび、細胞傷害性薬剤を含まないリンカーを持つ DAR 種の亜集団が明らかになっています。

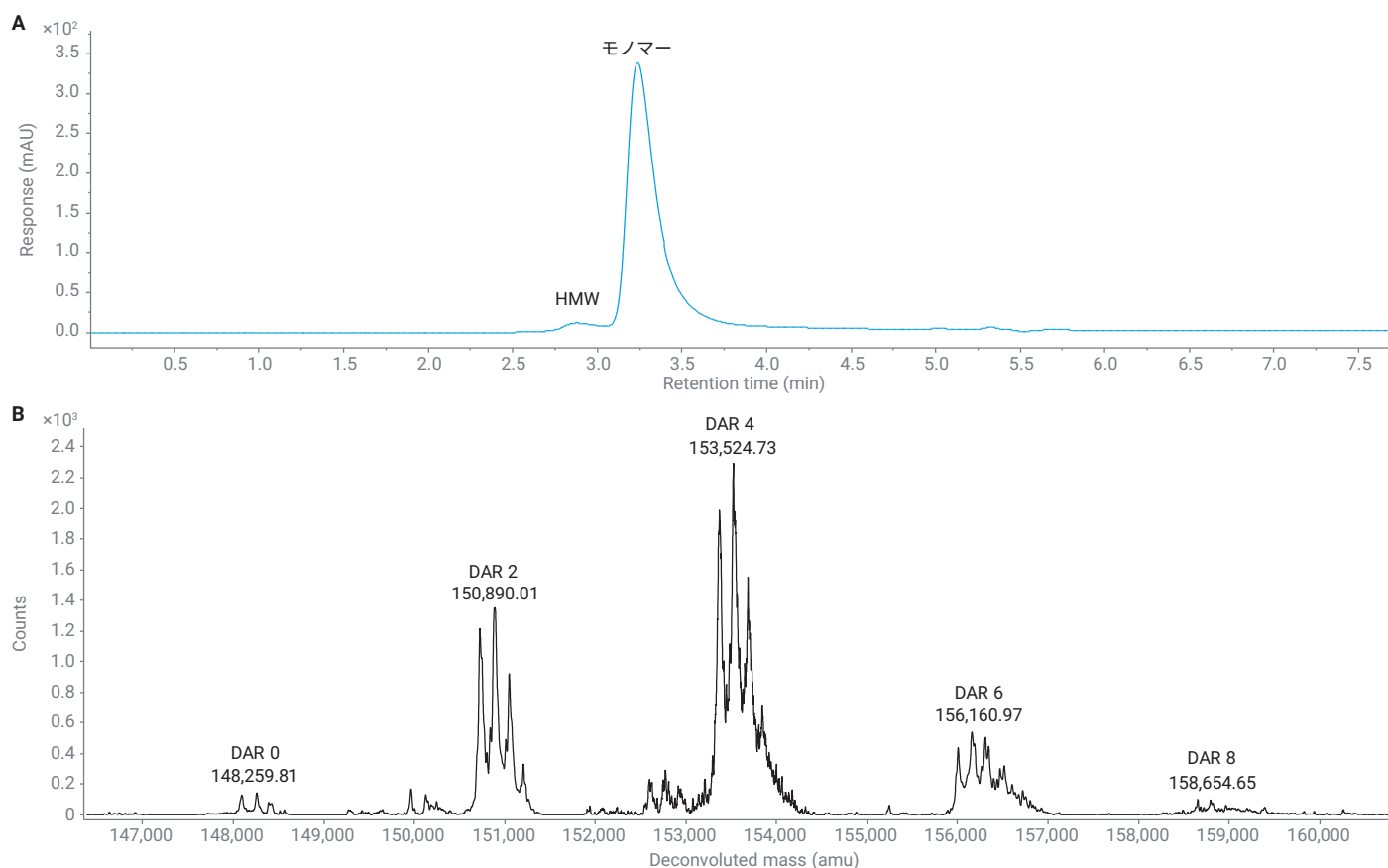


図 6. ADC ブレンツキシマブ ベドチンの SEC/UV/MS。(A) UV 280 nm のクロマトグラム、および (B) デコンボリュートしたモノマーピークに関連するネイティブ MS スペクトル。薬物分布が 0 ～ 8 で、DAR が 4 であることがわかります。

結論

ネイティブ SEC/MS により mAb を分析する場合、LC 機器とカラムの不活性度の重要性を過小評価することはできません。十分なクロマトグラフィ性能と HMW 種の回収を保証するためには、流路内のステンレス製部品との非特異的相互作用を低減することが最も重要です。PEEK ライニング Agilent AdvanceBio SEC カラムを備えた Agilent Infinity II Bio LC システムは、その点で非常に魅力的で有用です。このアプリケーションノートでは、分離性能への影響を抑えながら、従来のリン酸塩移動相を MS 対応の酢酸アンモニウムとうまく交換することが可能で、優れたネイティブ MS 測定が得られることを示しました。

参考文献

1. Sandra, K.; Vandenheede, 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. Theory and Practice of Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Aggregates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 101, 161–173.
3. Fekete, S. et al. Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 480–507.
4. Goyon, A. et al. Unravelling the Mysteries of Modern Size Exclusion Chromatography – the Way to Achieve Confident Characterization of Therapeutic Proteins. *J. Chromatogr. B* **2018**, 1092, 368–378.
5. Arakawa, T. et al. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 1674–1692.
6. Goyon, A. et al. Evaluation of Size Exclusion Chromatography Columns Packed with Sub-3 μm Particles for the Analysis of Biopharmaceutical Proteins. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1498, 80–89.
7. Schneider, S.; Jegle, U.; Dickhut, C. Size Exclusion Chromatography Analysis of Antibody Drug Conjugates. Agilent Technologies application note, 5991-8244EN, **2017**.
8. Sandra, K. et al. Characterizing Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC-MS. *LCGC Europe* **2017**, 30, 149–157.
9. Vanhoenacker, G.; Sandra, P.; Sandra, K. Minimizing the Risk of Missing Critical Sample Information by Using 2D-LC. *LCGC Europe* **2022**, 35, 348–353.
10. Vandenheede, I.; Sandra, P.; Sandra, K. Denaturing and Native Size-Exclusion Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of Monoclonal Antibodies and Antibody–Drug Conjugates. *LCGC Europe* **2019**, 32, 304–311.
11. Goyon, A. et al. Characterization of 30 Therapeutic Antibodies and Related Products by Size Exclusion Chromatography: Feasibility Assessment for Future Mass Spectrometry Hyphenation. *J. Chromatogr. B* **2017**, 1065–1066, 35–43.
12. Murisier, M. et al. The Importance of Being Metal-Free: The Critical Choice of Column Hardware for Size Exclusion Chromatography Coupled to High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1183, 338987.
13. Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis. Agilent Technologies application note, 5994-2709EN, **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。

DE22982808

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, January 27, 2023

5994-5674JAJP