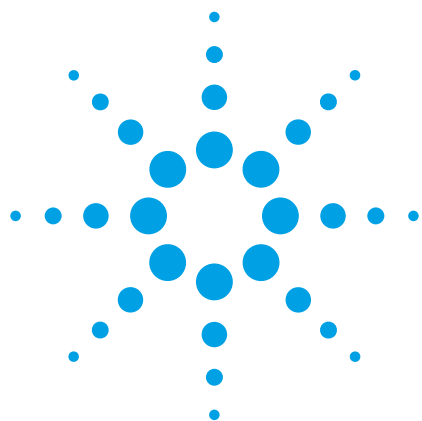




Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C3 カラムを用いた インタクトおよび還元型モノクローナル 抗体の超高速プロファイリングにおける 逆相最適化

アプリケーションノート

生物医薬品

著者

James Martosella、Phu Duong
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centreville Rd
Wilmington, DE
19808

概要

Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C3 カラムを用いて、インタクトおよび還元型モノクローナル抗体 (mAb) の高速逆相分離を最適化しました。StableBond C3 相と堅牢なサブ 2 μ m RRHD カラム技術により、モノクローナル抗体の構造を高分離能で分離でき、ハイスループット mAb 分析における有効性が示されました。異なる細胞株により発現したモノクローナル抗体を検証し、高速分析時に高分離能が得られるように最適化しました。連続分析シーケンスの際に、ZORBAX 300SB-C3 カラムの耐用期間における安定性と再現性を評価したところ、堅牢な分離性能が得られると同時に、高温と高圧に対する優れた耐性が実証されました。



Agilent Technologies

はじめに

生物医薬品開発は製薬業界で急速に成長していますが、この開発パイプラインにおいては、抗体医薬品のキャラクタライゼーションが重要な課題となります。抗体の分離にはさまざまなクロマトグラフィーテクニックを使用できますが、抗体を検出および測定するためには、複数の分離モードが必要となります。抗体のキャラクタライゼーションに用いられるアプローチの1つに、LC/MS 検出への適合性が高い逆相 (RP) メソッドがあります。しかし、モノクローナル抗体 (mAb) などの大型分子の RP 分離には、従来、ピークの幅の広さや拡散、分離能の低さといった問題点があるため、分析における使用には限界がありました。UHPLC と粒子径の小さいカラムの登場により、短い分析時間でも、分離能の高い RP 分析が実現できるようになりました。また、ODS とは異なる化学結合相の導入により、高いタンパク質感度で、従来とは異なる選択性が得られるようになっています。mAb の RP 分析におけるそうした代替手法については、生物医薬品分析を円滑化するものとして期待が高まっています。

この研究では、ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C3 カラムを用いて、高速分析においてインタクトおよび還元型抗体の超高分離能分離を実現しました。具体的には、インタクトおよび還元型の軽鎖および重鎖 mAb で超高効率分離が実現できるように、グラジエント条件を 75 °C で最適化しました。また、高温、高圧、低 pH 条件における ZORBAX 300SB-C3 カラムの耐久性と再現性も評価し、保持挙動、ピーク形状、効率に関するカラムの変動をモニタリングしました。この研究で得られたすべての結果は、このカラムは高速 mAb プロファイリングにおいて有効で、再現性の高い高分離能分離を実現できることを実証しています。

実験手法

材料

この研究では、2 つのヒト化モノクローナル抗体株を使用しました。1 つの株は CDH 培地 (p/n 010774) を用いてアジレントで発現したもので、もう 1 つの株は、Creative Biolab (ペンシルベニア州) から購入したチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞由来のモノクローナル抗体です。トリフルオロ酢酸を Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入し、イソプロパノール、n-プロパノール、アセトニトリルを Honeywell-Burdick & Jackson (マスキーゴン、ミシガン州) から入手しました。1-プロパノールを VWR (p/n BJ322-4) から購入しました。透析カセットは 3,500 MWCO のもので、Thermo Scientific (p/n 66330) から購入しました。

還元とアルキル化

塩酸グアニジン (GuHCl) を用いた変性条件下で還元とアルキル化をおこない、遊離軽鎖および重鎖の試料を調製しました。抗体 0.5 mL (1.5 mg/mL) を水に対して透析し、保存料を除去しました。透析後、100 mM TRIS-HCl と 4M GuHCl (Mallinckrodt、フィリップスバーグ、ニュージャージー州) で 0.5 mL を希釈し、最終濃度を 0.75 mg/mL としました。溶液の pH を pH 8.0 に調整しました。0.5 M ジチオスレイトール (DTT、Sigma) 原液 10 μ L を加え、最終濃度を 5 mM としました。この混合液を 37 °C の水槽に保管し、30 分間インキュベーションしました。その後、抗体溶液を室温まで冷却し、0.5 M ヨードアセトアミド (IAM、Sigma) 原液 26 μ L を加え、最終濃度を 13 mM としました。このアルキル化した抗体溶液を、光の当たらない室温条件で 45 分放置しました。その後、溶液を 0.5 M DTT 20 μ L で急冷し、最終濃度を 10 mM としました。次に、還元およびアルキル化した抗体 1.0 mL を、4 mL、3.5 K MWCO コンセントレータ (p/n 5185-5991) により、水 (0.1 % TFA) を用いて 3800 RPM で 30 分間脱塩しました。濃縮プロセスを 2 回繰り返す、最終体積を 0.5 mL (1.5 mg/mL) としました。

UHPLC 条件

機器	Agilent 1290 LC Infinity システム、オートサンブラ (ALS)、バイナリポンプ、サーモスタットオープン (TLC)、ダイオードアレイ検出器 (DAD) 搭載
カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C3、1.8 μ m 2.1 x 100 mm (p/n 858750-909) 2.1 x 50 mm (p/n 857750-909)
移動相 (インタクト mAb)	A. 98/2 水/n-プロパノール (0.1 % TFA) B. 70/20/10 イソプロパノール/ACN/水 (0.1 % TFA)
移動相 (還元型 mAb)	A. H ₂ O + 0.1 % TFA (v/v) B. 80/10/10 n-プロパノール/ACN/水 (0.1 % TFA)
注入量	2 μ L
流速	0.5 mL/min 1.0 mL/min (インタクト) 1.25 mL/min (耐久性テスト)
グラジエント	マルチセグメント
温度	75 °C
検出	UV、280 nm

連続クロマトグラフィー分析の際には、2 分のポストランを追加し、カラムの再平衡化をおこないました。

結果

還元型およびアルキル型モノクローナル抗体の超高速分離におけるグラジエントの最適化

図 1 は、CHO 細胞由来の還元型およびアルキル型 mAb の高速分離結果を示しています。Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 100 mm カラムと 75 °C の温度条件、および最適化したグラジエントにより、軽鎖と 2 つの重鎖変異型を 4.5 分未満で高分離能で分離できました。2 つの重鎖ピーク 1 および 2 は、バンド幅が狭く、良好に分離されています。0.6 分の軽鎖ピークは、0.5 および 0.7 分の周囲の軽鎖フラグメントピークから良好に分離されています。この分離において最適化したグラジエントを表 1 に示しています。

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 100 mm、1.8 μm カラムを用いた還元型モノクローナル抗体の高速分離

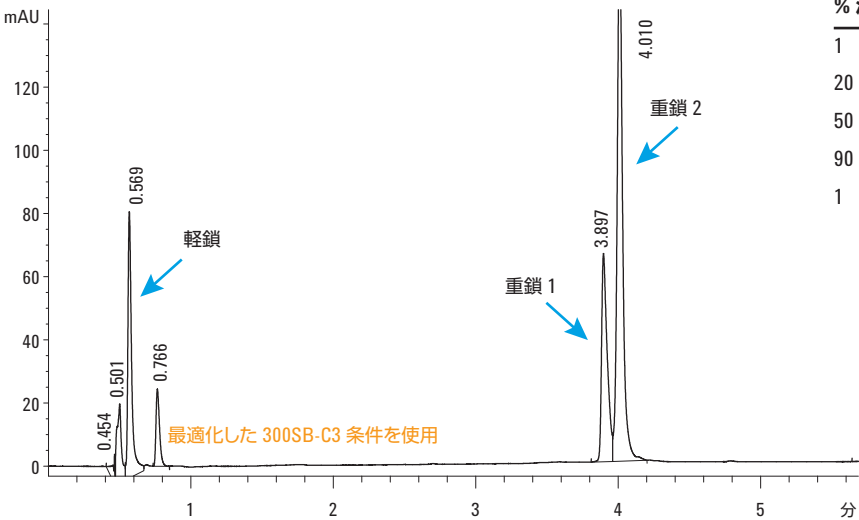


表 1. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C3 グラジエント条件

% 溶媒 B	時間 (分)
1	0
20	2
50	5
90	6
1	6.1

カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、2.1 x 100 mm、1.8 μm	温度	74 °C
サンプル	還元型 mAb (IgG1) (1.0 mg/ml) BioCreative IgG1	流速	0.5 mL/min
サンプル注入量	2 μL	検出	UV 280
移動相 A	0.1 % TFA を含む水		
移動相 B	80 % n-プロピルアルコール、 10 % ACN、9.9 % 水および 0.1 % TFA		

図 1. Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C3、2.1 x 100 mm、1.8 μm カラムにより実現した還元型モノクローナル抗体の高速分離。温度 75 °C、流速 0.5 mL/min、UV 280 で検出。グラジエント条件は表 1 に記載

還元型およびアルキル型モノクローナル抗体の超高異なる細胞株由来のインタクト mAb の高分離能高速分析における条件の最適化

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm、1.8-μm カラムを用いて、異なる細胞株由来のモノクローナル抗体を分離および最適化し、異なる mAb 発現に対する C3 の選択性を評価しました。体系的なグラジエントメソッドにもとづき、各 mAb について、最適な分離能で高速分離が実現するグラジエント条件を決定しました。図 2 の上図で示す分離は、CDH 培地から発現したアジレントの標準抗体について最適化したものです。グラジエント条件は表 2A のものを使用しました。分離は 4 分未満で完了し、インタクトピークがきわめて狭いバンド幅で良好に分離されています。これに対して、図 2 の下図は、CHO 細胞株から発現したヒト化 mAb について最適化した分離を示しています。グラジエント条件は表 2B のものを使用しました。この分離では、緩やかなグラジエント勾配によりグラジエント条件を最適化し、mAb 塩基ピークからフロントショルダーが分離しました。図 2 のどちらの分離も、ハイスループット連続 mAb 分析の効率が高くなるように開発されたものです。各分離の最後に、90 % イソプロパノールによる高速洗浄と再平衡化をおこない、繰り返し注入シーケンスに対応しました。

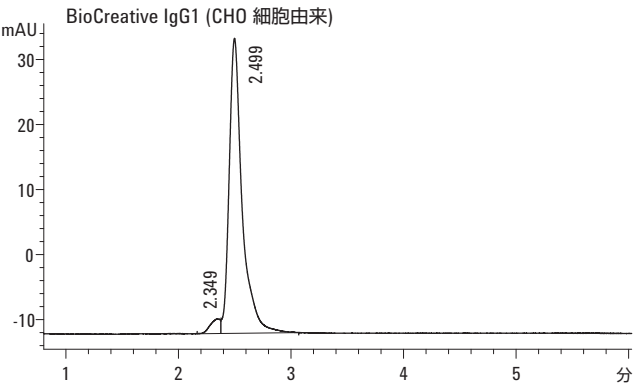
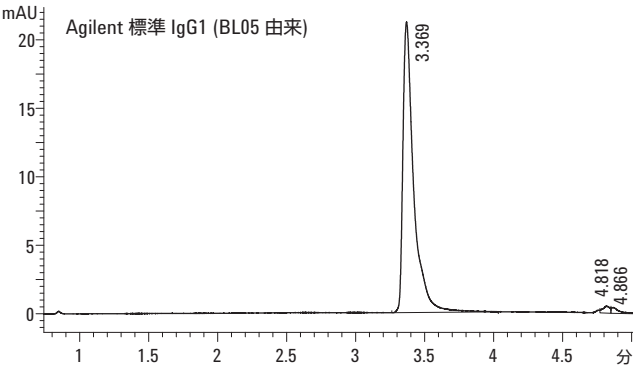
表 2A Agilent 標準 IgG1 のグラジエント

% 溶媒 B	時間 (分)
10	0
25	2.5
35	4.5
90	4.56
90	5.0
10	6

表 2B BioCreative IgG1 のグラジエント

% 溶媒 B	時間 (分)
5	0
25	5
25	7
90	8
5	9

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、2.1 x 50 mm、1.8 μm カラムを用いたインタクト IgG1 と分解生成物の高速分離



カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、 2.1 x 100 mm、1.8 μm
サンプル	モノクローナル抗体 (IgG1) 1.0 mg/mL Agilent 標準 IgG1 (上) BioCreative IgG1 (下)
サンプル注入量	2 μL
移動相 A	0.1 % TFA を含む水
移動相 B	70 % イソプロピルアルコール、 20 % ACN、10 % 水および 0.1 % TFA
温度	74 °C
流速	0.5 mL/min
検出	UV 280

図 2. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm カラムを用いて 2 つのモノクローナル抗体に最適化した UHPLC 分離。イソプロパノール/アセトニトリル/水を用いて、1.0 mL/min および 75 °C で分離。図 2 の上図は CDH 培地から発現した mAb について最適化し、下図は CHO 細胞株により発現したヒト化 mAb について最適化したものです。各分離後に 2 分間の高速平衡化ポストラン時間を設定しました

カラムの耐久性

900 bar での繰り返し注入シーケンスにおいて、低 pH 条件での Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 カラムの耐久性を評価しました。カラム充填ベッドの安定性、相安定性、注入口フリットの性能は、繰り返し mAb 分析における高温および高圧条件下での継続動作の性能を示す指標となります。この性能を評価するために、1.25 mL/min の流速を用いて、リボヌクレアーゼ A、シトクロム C、リゾチームを 2.1 x 50 mm カラムに 1000 回繰り返し注入しました。この分離のクロマトグラムを図 3 に示しています。各耐久性テストにおいて、分析対象タンパク質のグラジエ

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm、 1.8 µm カラムを用いた標準タンパク質と分解生成物の高速分離

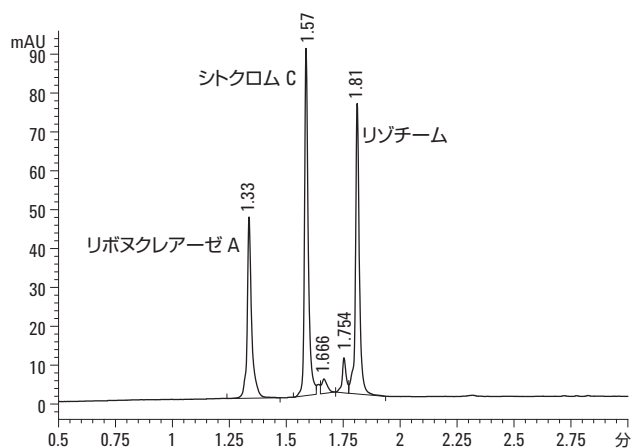


図 3. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm カラムの耐久性モニタリングにおけるリボヌクレアーゼ A、シトクロム C、リゾチームの高速分離。クロマトグラフィー条件は表 2 に記載

カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm、 1.8 µm (p/n 857750-909)	
サンプル	リボヌクレアーゼ A、シトクロム C、 リゾチーム (3 mg/mL)	
サンプル注入量	1 µL	
HPLC 機器	Agilent 1290 Infinity シリーズ	
検出	UV 280	
移動相 A	H ₂ O + 0.1 % TFA (v/v)	
移動相 B	ACN + 0.1 % TFA (v/v)	
流速	1.25 mL/min	
注入量	1 µL (1 mg/mL)	
温度	周囲温度	
グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	10	0
	70	2.5
	90	2.6
	90	3.0
	10	5.0

ントピーク幅を記録し、背圧を綿密にモニタリングしました。図 4A に示すように、注入 100 回ごとに、全部で 10 回分のピーク幅性能をプロットしました。1000 回注入シーケンス全体をつうじて、ピーク幅性能の安定性が保たれ、カラム背圧 (図 4B) も 900 bar から変化しませんでした。ピーク幅の再現性と効率が維持され、カラムの背圧増加が限られた範囲であったことは、分析に用いたカラムベッドが、高流速、低 pH、繰り返しの高圧動作に対する優れた耐久性を備えた最適な充填カラムベッドであることを示しています。また、耐久性テスト全体をつうじて優れたフロー動力特性が維持されたことは、タンパク質やシステム由来の微粒子によるつまりに対する注入口フリットの耐久性の高さを示しています。

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm、 1.8 µm の耐久性テスト

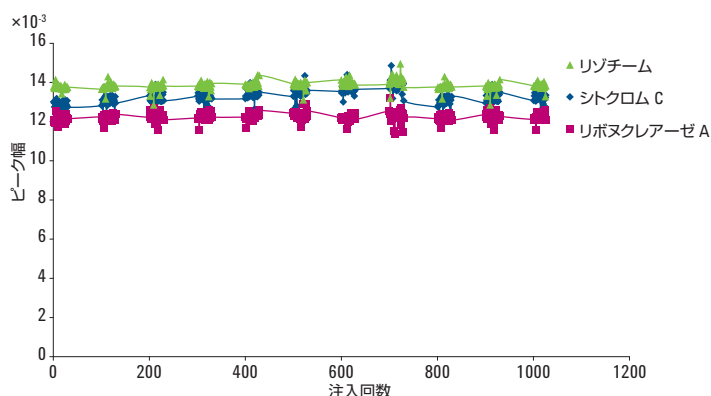


図 4A. 背圧 900 bar および高流速 (1.25 mL/min) における Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm の耐久性プロット。1000 回の注入シリーズにおいて、100 回ごとにリボヌクレアーゼ A、シトクロム C、リゾチームのピーク幅を継続的にプロットした結果を示しています

ZORBAX RRHD 300SB-C3、1.8 µm の耐久性テスト 圧力 vs. 注入回数

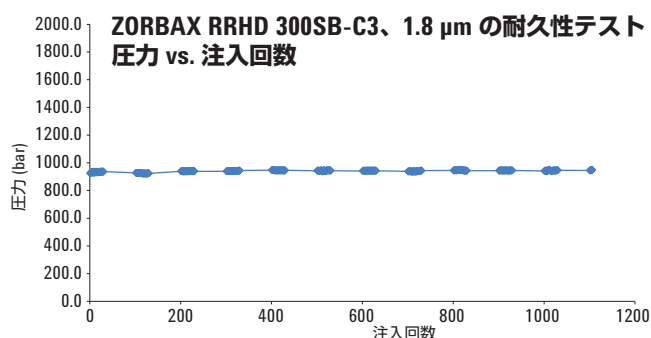
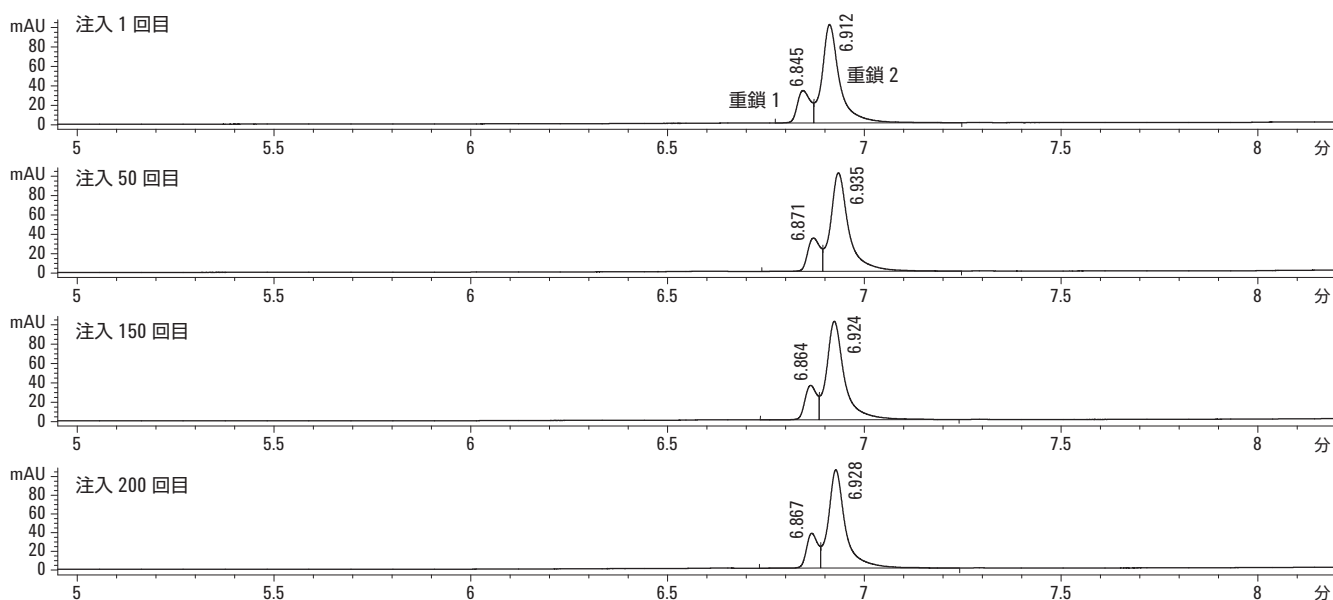


図 4B. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、2.1 x 50mm の圧力プロット。注入 100 回ごとにカラムの背圧を継続的に記録し、プロットしました

カラムの再現性

還元型 mAb サンプルを 200 回繰り返し注入し、Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 カラムの再現性を評価しました。2.1 x 50 mm カラムを用いて 2 つの還元型重鎖変異型を分離し、リテンションタイムと分離能を評価しました。図 5 に示すように、75 °C の高温と低 pH に継続的にさらされていても、優れた分析間のカラム再現性が得られました。1 回目、50 回目、150 回目、200 回目の mAb 重鎖 1 および 2 のピークでは、リテンションタイムとピーク形状が保たれており、一貫した分離性能が得られます。ピークの悪化や効率の低下の徴候は一切見られません。

カラムの再現性 - Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、2.1 x 100 mm、1.8 µm カラムを用いた還元型モノクローナル抗体の 200 回注入



カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3、2.1 x 100 mm、1.8 µm	グラジエント	0 分–1 % B、2 分–20 % B、5 分–50 % B、7 分–50 % B、
サンプル	還元型モノクローナル抗体 (IgG1) (1.0 mg/ml) Agilent BL05 IgG1		8.0 分–90 % B、8.3 分–1 % B、2 分維持
サンプル注入量	2 µL	温度	74 °C
移動相 A	0.1 % TFAを含む水	流速	0.4 mL/min
移動相 B	80 % n-プロピルアルコール、10 % CAN、 9.9 % 水および 0.1 % TFA	検出	UV 280

図 5. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 x 50 mm カラムを用いた 200 回繰り返し注入時の還元型およびアルキル型 mAb プロファイリング。
温度 75 °C。連続分析 1、50、150、200 回目の結果を表示。移動相：A：水 (0.1 % TFA)、B：80/10/10 n-プロパノール/ACN/水 (0.1 % TFA)。
グラジエント：0 分–1 % B、2 分–20 % B、5 分–50 % B、7 分–50 % B、8.0 分–90 % B、8.3 分–1 % B、2 分維持

結論

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8、1.8 μ m カラムを使えば、モノクローナル抗体の超高速および高効率分離が可能です。最適化したクロマトグラフィー条件と ZORBAX RRHD 300 カラム技術を組み合わせることで、由来の異なるインタクトおよび還元型 mAb を高速かつ高分離能で分離できました。グラジエント条件と組成を体系的に最適化することで、抗体の完全な分離、洗浄、再平衡化を短い分析時間でおこなうことが可能になり、ハイスループット mAb 分析における有効性が実証されました。

繰り返し注入分析により、ZORBAX RRHD 300SB-C3 カラムの安定性 (耐久性) および再現性が実証されました。900 bar および低 pH での 1000 回の注入全体をつうじてカラム効率が一定に保たれ、ベッドの不安定化やフリットのつまりによる背圧の増加に対する優れた耐久性も確認されました。また、2 つの重鎖 mAb 変異型の 200 回連続分析では、一貫したピーク形状と分離能が示され、リテンションタイムも維持されました。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

February 13, 2012

5990-9667JAJP



Agilent Technologies