

# Agilent ZORBAX RRHD サブ 2 $\mu$ m 300 Diphenyl UHPLC カラムを使用した 還元型およびインタクトモノクローナル 抗体の超高速/高分離能の分離

## アプリケーションノート

### バイオ医薬品

#### 著者

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

#### 概要

Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition (RRHD) 300 Diphenyl 逆相カラムと最適化されたクロマトグラフィー条件を使用することにより、インタクトおよび還元型モノクローナル抗体 (mAbs) の迅速な分離を実現しました。独自のジフェニル相と堅牢なラピッドレゾリューション High Definition カラム技術を最適化されたグラジエント条件と組み合わせることで、超高速分離と優れたピーク形状を達成し、mAb の高スループット特性解析のための有効性を実証しました。短い分析時間で分離能と効率の高い分離を実現するために、チャイニーズハムスターの卵巣と CDH 培地細胞株の両方から発現したモノクローナル抗体を評価し、比較しました。さらに、高い動作圧力と動作温度でも ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムを評価しました。また、再現性と寿命を継続して調べたところ、高い動作耐久性が示されました。



Agilent Technologies

## はじめに

医薬品業界ではバイオセラピューティクス向けの薬剤開発が急速に広まり、信頼性の高い抗体薬物の特性解析が、この開発パイプラインの重要な課題となっています。抗体の特性解析は多くの分離技術を使用して行うことができますが、サブ 2  $\mu\text{m}$  カラムや新しい相の化学的特性により得られる効率的で好ましい材料の導入により、逆相クロマトグラフィーでの分離が急成長を続けています。

この実験では、インタクトおよび還元型モノクローナル抗体 (mAbs) の超高分離能の分離を短い分析時間で実現しました。また、mAb の特性解析では従来の C18、C8、および C3 とは異なる選択性を示しました。具体的には、温度を上げてグラジエント条件を体系的に最適化し、インタクト mAb と還元 mAb、軽鎖および重鎖 mAb 変異体を迅速に分離しました。この調査では、長い平衡化時間や大規模なポストラ洗浄が不要な、超高速の効率的な分析間メソッドの最適化を目標としました。ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムの寿命と再現性も評価しました。寿命を評価するために、タンパク質標準混合物を使用し、動作圧力 (> 900 bar) と温度 (75 °C) を上げ、低い pH と高い流量で 1000 回の注入を行うことによりカラムをテストしました。分析間再現性とリテンションの挙動は、mAb 標準を使用した 200 回の分析で確認しました。

## 実験方法

### 材料

この実験では、2 種類のヒト化モノクローナル抗体細胞株を使用しました。1 つの細胞株は CDH 培地 (p/n 010774) を使用し、もう一方の細胞株は、Creative Biolab (ペンシルバニア) から購入したチャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞由来のモノクローナル抗体を使用して発現させました。トリフルオロ酢酸は Sigma-Adrich (セントルイス、ミズーリ州) から、イソプロパノール、1-プロパノール、およびアセトニトリルは Honeywell-Burdick & Jackson (マスキーゴン、ミシガン州) から購入しました。1-プロパノールは VWR から (p/n BJ322-4)、透析カセットは MWCO が 3,500 のもので、Thermo Scientific から購入しました (p/n 66330)。

## 還元およびアルキル化

塩酸グアニジン (GuHCl) を使用した変性条件下で還元とアルキル化を行い、遊離軽鎖および重鎖を生成しました。0.5 mL (1.5 mg/mL) の抗体を、防腐剤を取り除くために水を使用して透析しました。透析後、0.5 mL のアリコート、100 mM TRIS-HCl と 4 M GuHCl (Mallinckrodt、フィリップスバーグ、ニュージャージー州、米国) を使用して最終濃度 0.75 mg/mL まで希釈しました。pH を 8.0 に調整し、10  $\mu\text{L}$  の 0.5 M ジチオトレイトール (DTT、Sigma) 原液を加えて、最終濃度を 5 mM としました。この混合液を 37 °C の恒温槽に入れ、30 分間インキュベートしました。抗体を室温まで短時間冷却し、26  $\mu\text{L}$  の 0.5 M ヨードアセトアミド (IAM、Sigma) 原液を加えて、最終濃度を 13 mM としました。アルキル化した抗体溶液を、光のあたらない場所に室温で 45 分間置きました。その後、回収した混合物を 20  $\mu\text{L}$  の 0.5 M DTT で最終濃度 10 mM までクエンチしました。次に、還元し、アルキル化した 1.0 mL の抗体を、水を使用し (0.1 % TFA)、4 mL の 3.5 K MWCO コンセントレータ (p/n 5185-5991) で脱塩しました (30 分間、3,800 RPM)。この濃縮プロセスを 2 回繰り返し、最終ボリウムを 0.5 mL (1.5 mg/mL) としました。

## UHPLC の条件

機器	オートインジェクタ (ALS)、バイナリポンプ、サーモスタット付きオープン (TLC)、ダイオードアレイ検出器 (DAD) を備えた Agilent 1290 LC Infinity システム
カラム	Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition 300 Diphenyl、1.8 $\mu\text{m}$ 、2.1 x 100 mm (p/n 858750-944) 2.1 x 50 mm (p/n 857750-944)
移動相	(インタクト mAb) A. 98/2 水/イソプロパノール (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 <sub>2</sub> O + 0.1 % TFA (v/v) B. 80/10/10 1-プロパノール/ACN/水 (0.1 % TFA)
注入量	1~3 $\mu\text{L}$
流量	0.5 mL/min (還元型) 1.0 mL/min (インタクト) 1.25 mL/min (寿命テスト)
グラジエント	マルチセグメント化
温度	75 °C
検出	UV、280 nm

分析を連続して行うために、カラムの再平衡化用に 2 分間のポストラを追加しました。

## 結果

### 還元型モノクローナル抗体の超高速分析のためのグラジエントの最適化

図1のクロマトグラムの比較は、還元し、アルキル化したモノクローナル抗体の2つの最適化された高速分離を示したものです。ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 x 100 mm カラムとクロマトグラフィー条件により、還元型 mAb の軽鎖変異体と2つの重鎖変異体を十分な分離能で分離できました。図1の上部パネルのクロマトグラムは、表1Aに示すグラジエント条件を使用して得られた細いバンドによる分離と重鎖の高い分離能を詳細に示しています。これに対し、図1の下部パネルに示した分離は、

重鎖の分離能が上がるように最適化されていますが、ピーク幅がわずかに大きくなっています。この分離では、2つの重鎖がほぼベースライン分離になっています。この分離の最適化された条件を表1Bに示します。2つの分離を比較すると、ジフェニル相では、グラジエントの傾きをわずかに変えることで、2つの重鎖ピークの分離を大きく制御できました。さらに、同じサイズの C3 および C8 カラムをこれらと同一の条件下で使用しても、この分離能を向上させるジフェニルのように劇的な効果は見られませんでした。これは、ジフェニルが持つ、この特定の抗体に対する独自の選択性が従来の短鎖結合相の化学的特性よりも優れていることを示しています。

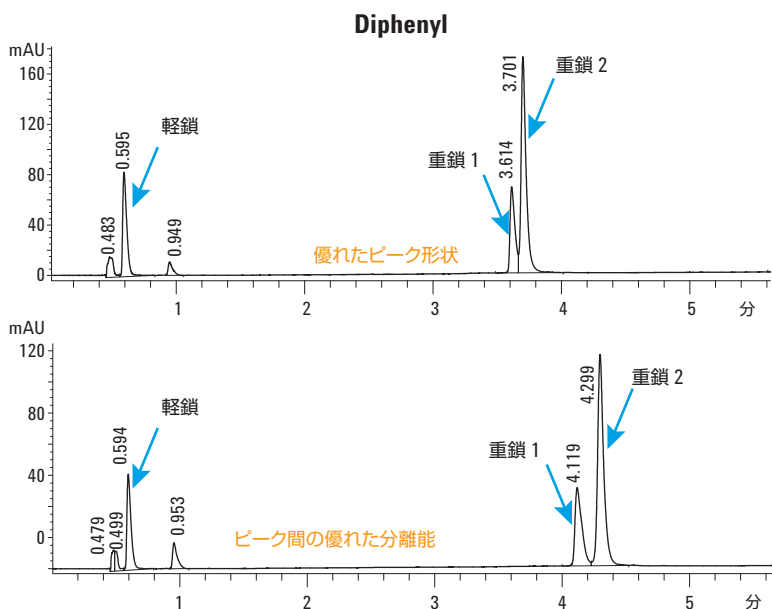


表1A グラジエントA

% 溶媒 B	時間 (分)
1	0
20	2
70	5
90	5.1
1	7

表1B グラジエントB

% 溶媒 B	時間 (分)
1	0
20	2
50	5
90	5.1
1	7

カラム Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm  
 サンプル 還元型モノクローナル抗体 (IgG1) (1.0 mg/ml) -BioCreative IgG1  
 サンプル注入量 2 μL  
 移動相 A 0.1 % TFA 水溶液  
 移動相 B 80 % 1-プロパノール、10 % ACN、9.9 % 水および 0.1 % TFA  
 グラジエント 最初の条件 : 0 分 - 1 % B、2 分 - 20 % B、5 分 - 70 % B  
 2 番目の条件 : 0 分 - 1 % B、2 分 - 20 % B、5 分 - 50 % B  
 流量 0.5 mL/min  
 温度 74 °C  
 検出 UV 280

図1. 異なる最適化グラジエント条件の下、Agilent ZORBAX ラピッドレゾリューション High Definition 300 Diphenyl (2.1 x 100 mm) で得られた、還元型モノクローナル抗体の2つの超高速分離の比較。上部パネルの分離は、狭いピーク幅と短いリテンションタイムを示しています。下部パネルの分離は、2つの重鎖ピークの分離能が高いにもかかわらず、効率が低いことを示しています

## インタクト mAb の超高分離能/高速分析の条件の最適化

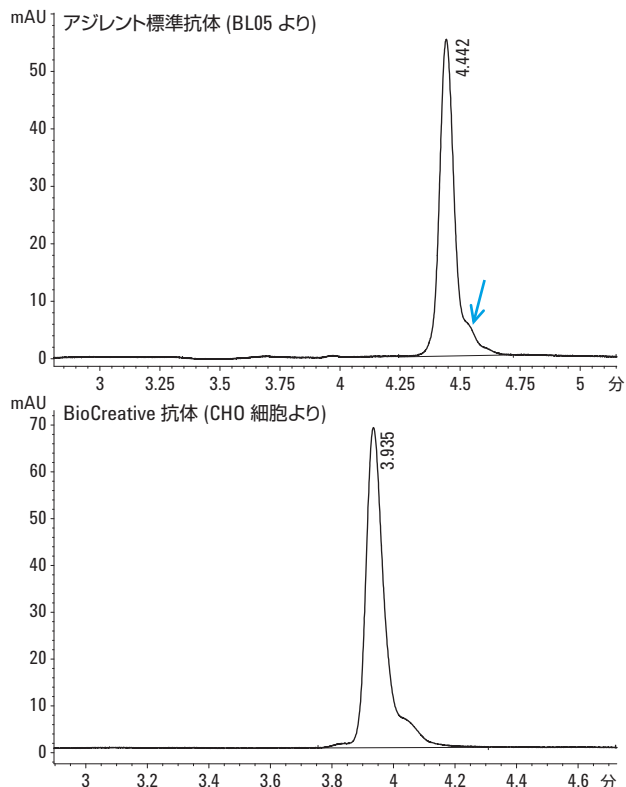
ZORBAX 300 Diphenyl (2.1 x 50 mm) でのインタクトモノクローナル抗体の分離性能を比較するために、2種類の mAb を選択し、それぞれを速度と分離能をもとに最適化しました。グラジエントの体系的な調査により、ジフェニルの分離能力をインタクト mAb の高速分離に活用できる、各 mAb の最適なグラジエントを特定しました。図 2 の上部パネルの分離は、表 2A に示すグラジエント条件を使用して CDH 培地から発現したアジレント標準抗体に合わせて最適化したものです。分離は 5 分未満で完了しました。インタクトピークについて優れた分離能を示し、4.5 分 (矢印) にショルダピークが見られます。これに対し、図 2 の下部パネルのクロマトグラムは、表 2B に示すグラジエント条件を使用して CHO 細胞株から発現した mAb に合わせて最適化したものです。この分離では、わずかに修正したグラジエント曲線を使用してグラジエントを最適化し、インタクト mAb のピーク前後の分離能を強化しました。高分離能/高速分析を達成するだけでなく、いずれの分離も、分析間の mAb プロファイリングを容易にするように開発されたものです。各分離は、高スループットの注入シーケンスを繰り返し実行するための 90 % イソプロパノールによる高速洗浄と迅速な再平衡化で完了します。

表 2A グラジエント

% 溶媒 B	時間 (分)
15	0
25	2.5
35	4.5
35	4.9
90	5.0
90	5.5
15	6.0

表 2B 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	6.0

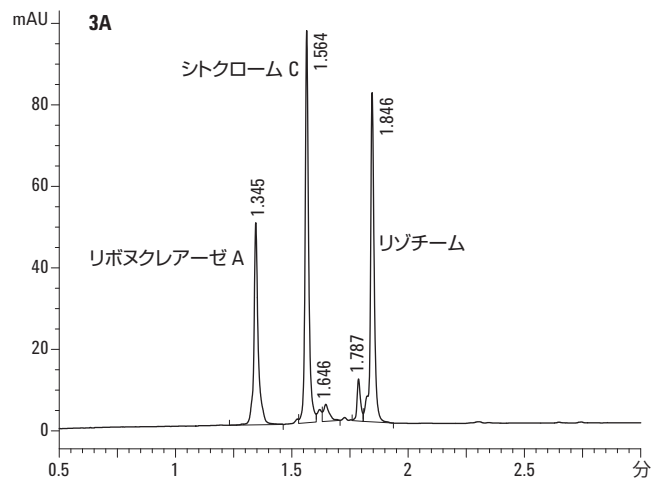


カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl、 2.1 x 100 mm、1.8 μm
サンプル	モノクローナル抗体 (1.0 mg/mL) - BioCreative およびアジレント標準 IgG1
サンプル注入量	2 μL
移動相 A	98/2 水/イソプロパノール (0.1 % TFA)
移動相 B	70/20/10 イソプロパノール/ACN/水 (0.1 % TFA)
流量	1.0 mL/min
温度	74 °C
検出	UV 280

図 2. 2 つのモノクローナル抗体の由来源に合わせて最適化した 2.1 x 50 mm Agilent ZORBAX RRHD 300SB Diphenyl カラムでの UHPLC による分離。分離は、1.0 mL/min で、70/20/10 イソプロパノール/アセトニトリル/水 (0.1 % TFA) の %B 組成を使用して 75 °C で行いました。図 2 の上部パネルは CDH 培地から発現した mAb に合せて、下部パネルは CHO 細胞株から発現したヒト化 mAb に合せて最適化したものです。各分離は、2 分間の高速の平衡化ポストランタイムで完了しました。

## カラム寿命

カラム充填相の安定性とインレットフリットの性能は、mAbの繰り返し分析で温度と圧力を上げて連続操作するためには非常に重要です。表3に示す条件を使用した900 barでの繰り返し注入シーケンスで、ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムの堅牢性についての寿命を低 pH で評価しました。リボヌクレアーゼ A、シトクローム C、およびリゾチームで構成されるタンパク質標準混合物の繰り返し注入を、2.1 x 50 mm のカラムを使用し、



サンプル	Diphenyl の RT (分)	ジフェニル「プレート」
リボヌクレアーゼ A	1.35	50816
シトクローム C	1.56	63533
リゾチーム	1.85	92272

図 3A. 2.1 x 50 mm ZORBAX RRHD 300 Diphenyl を使用した寿命安定性モニタリングのためのリボヌクレアーゼ A、シトクローム C、およびリゾチームの高速分離。表 3 で分離条件を説明します

表 3

カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300, 2.1 x 50 mm, 1.8 μm
サンプル	リボヌクレアーゼ A、シトクローム C、リゾチーム (3 mg/mL)
移動相 A	H <sub>2</sub> O + 0.1 % TFA (v/v)
移動相 B	ACN + 0.1 % TFA (v/v)
流量	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

HPLC 機器	Agilent 1290 Infinity シリーズ
検出	UV 280

流量 1.25 mL/min で合計 1,000 回行いました。この分離のクロマトグラムを図 3A に示し、寿命分析を容易にする 2 分間の高速分析時間の詳細を説明します。各分析では、背圧を厳密に監視しながら、各タンパク質のグラジエントピーク幅を記録しました。図 3B に示すように、10 回のピーク幅性能の分析を 60 回目の注入ごとにプロットしました。カラム背圧を 900 bar で一定に維持すると、ピーク幅性能は 1000 回の注入シーケンスを通じて安定していました。一定のピーク幅効率と安定した圧力曲線は、高流量 (内径 2.1 mm のカラムに対し)、低 pH、および高圧における連続操作に対する優れた回復性を持つようにパックドカラム床が最適化されていることを示します。さらに、大量のタンパク質注入の後、ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムは、タンパク質やシステム内のマイクロ粒子が原因で生じるインレットの目詰まりに対する高い耐性を持ち、優れたフリット流量を維持していました。

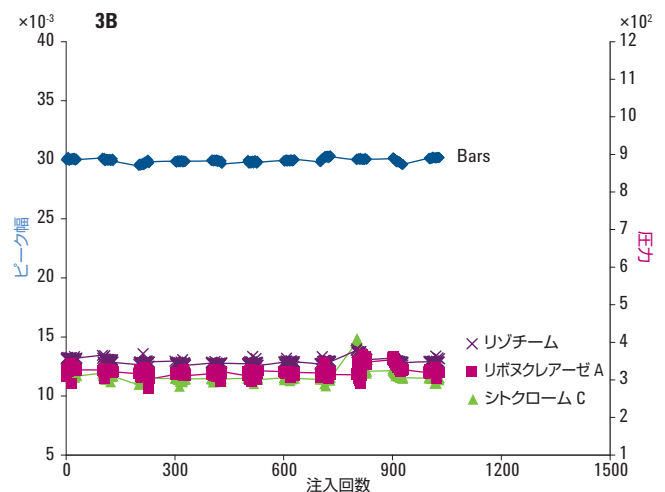
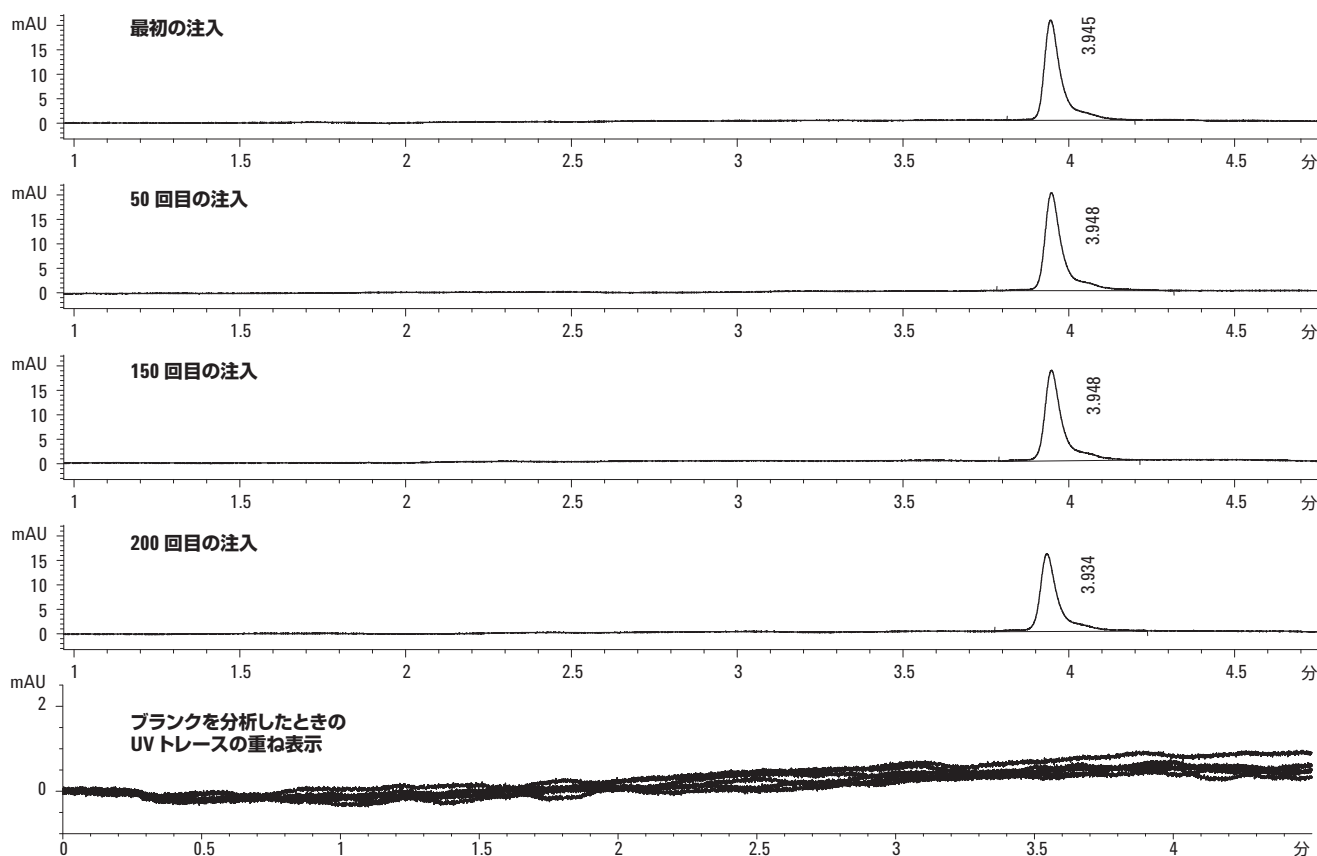


図 3B. 高圧および高流量 (1.25 mL/min) におけるカラム寿命の安定性曲線を詳細に示す Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl 2.1 x 50 mm の寿命プロット。リボヌクレアーゼ A、シトクローム C、リゾチームの 10 個の連続したタンパク質ピーク幅を、1,000 回の注入の 60 回目ごとにプロットしました。この期間のカラム背圧を記録し、ここに示した注入回数に対してプロットしました

## カラムの再現性

200 回分析を行い、インタクトヒト化 mAb を繰り返し注入することでカラムの再現性を測定しました。新しい 2.1 × 50 mm ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムを使用し、表 2A で説明したグラジエント組成と条件の下で分析間再現性を確認しました。カラムの再現性とポストランリカバリを評価するために、20 回の分析ごとに収集したカラムブランクを使用して、200 回の連続

した注入を行い、複数のタンパク質注入のキャリーオーバーの効果を監視しました。定義された分離条件により、高圧 (>700 bar) のカラム操作が繰り返され、カラムは 75 °C の動作温度と低い pH に曝されました。図 4 に詳細を示すように、インタクト mAb の繰り返しの分離では、リテンションタイムとピーク形状が維持され、高い再現性を示しました。さらに、ポストランブランクでは、分析間の mAb のキャリーオーバーがないことがわかりました (図 4 の最下部パネル)。



カラム	Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 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) - BioCreative IgG1 およびアジレント標準 IgG1
サンプル注入量	1 μL
移動相 A	0.1 % TFA 水溶液
移動相 B	80 % 1-プロパノール、10 % ACN、9.9 % 水および 0.1 % TFA
流量	1.0 mL/min
温度	74 °C
検出	UV 280

図 4. Agilent ZORBAX RRHD 2.1 × 50 mm 300 Diphenyl カラムを 75 °C で使用した 200 回の繰り返し注入で得られたインタクト mAb のプロファイリングの詳細。ここに示すインタクト mAb の分離は、1、50、150、および 200 回目の分析で収集したものです。最下部のパネルは、カラム評価時に 20 回目ごとに収集した 5 UV のブランク分析トレースを重ね表示したものです (注: 重ね表示したトレースは 2 mAu に拡大したもの)。分離のグラジエント条件を表 2B に示します

## 結論

Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl、1.8  $\mu\text{m}$  カラムは、インタクトおよび還元型モノクローナル抗体 (mAb) のきわめて高速で効率的な分離を実現し、mAb の高スループットスクリーニングに有効であることがわかりました。抗体のタイプに合わせて調整したグラジエント条件を体系的に最適化することにより、インタクトおよび還元型 mAb アイソフォームの高分離能の分離を 5 分未満で実行できました。独自のジフェニル相と RRHD カラム技術によって、堅牢で繰り返し性の高い分離が可能になると同時に優れたピーク形状が得られ、従来の C3 および C8 相と比較して、グラジエント分離に独自の選択性という利点をもたらしました。

注入分析の繰り返しにより、ZORBAX RRHD 300 Diphenyl カラムの安定性 (寿命) と再現性も証明されました。900 bar および低 pH における 1,000 回の注入の間、カラムの効率性能は安定しており、カラム床の不安定性やフリットの目詰まりによる背圧の上昇に対する高い耐久性を示しました。さらに、700 bar における 200 回の繰り返し分析では、分離のピーク形状、分離能、および保持位置が維持され、カラムブランク分析では、ピークのキャリーオーバーや UV トレースのゴーストは見られませんでした。

[www.agilent.com/chem/jp](http://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 7, 2012

5990-9668JAJP



**Agilent Technologies**