

Altura ウルトライナー ト PLRP-S 1000 Å カラムを用いた逆相 HPLC によるインタクトタンパク質およびペプチドの分析性能の向上

著者

Andrew Coffey,
Anne Blackwell, and
Daniel Meston
Agilent Technologies, Inc.

概要

高分子量の生体分子を分離する場合、従来のステンレス製カラムハードウェアには、ピークが欠落したり、使用前に注入を繰り返してカラムを事前にコンディショニングする必要があるなど、共通の課題が伴います。また、化学的に複雑な生体分子（タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど）と、カラムハードウェアに含まれる金属イオンとの間に生じる望ましくない相互作用により、近接して溶出する成分間の分離が著しく妨げられる可能性があります。このアプリケーションノートでは、ウルトライナー トコーティングの Agilent Altura カラム技術にアップグレードすることにより、mAb および ADC 分析における LC/MS 性能を大幅に向上させる方法について取り上げます。

はじめに

逆相 HPLC (RP-LC) によるインタクトタンパク質の分析は、品質管理において、生物製剤タンパク質の純度を測定するうえで、また重要品質特性 (CQA) の同定および定量を改善するうえで、非常に重要な役割を果たします。RP-LC を質量分析検出器と組み合わせると、いくつかの利点をもたらされます。第一に正確な分子量を測定できること、第二に翻訳後修飾 (PTM) およびプロテオフォームを含む変異体を同定できること、第三に抗体薬物複合体 (ADC) における抗体薬物比がわかることです¹。

多くの RP カラムは、幅広い機能付与が可能なシリカベースの固定相を採用していますが、酸性の残留シラノール基がペプチド、タンパク質、およびその他の生体分子の塩基性残基と相互作用して著しいピークテーリングを引き起こし、クロマトグラフィー性能が大幅に損なわれる可能性があります。一方、ポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS/DVB) ベースの固定相には意図しない吸着部位がありません。また、ポアサイズが大きいため、RP による選択性を低下させるポアボリュームへの拡散制限やサイズ排除メカニズムの働きが抑えられ、優れたクロマトグラフィー効率を得られることがわかっています²。

PLRP-S 1000Å のようなワイドポアカラムは、特にギ酸など MS に対応した移動相条件と組み合わせることで、生体分子に対して卓越した性能を発揮します。

それでも、ステンレス製カラムハードウェアを使用すると、望ましくない相互作用が生じる場合があります。複数の負電荷を持つ分子（オリゴヌクレオチド、リン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質、一般に等電点が低いタンパク質など）が、ステンレス製カラムハードウェアの露出した金属イオンと相互作用するからです。このような相互作用を防ぐには、新しいカラムに「不活性化」が必要となり、そのために再現性の高い結果が得られるまでサンプルを何度も注入し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 Altura ウルトライナート PLRP-S 1000 Å カラムが、高分子量のインタクト生体分子の分析に有効な高性能の頼れるツールとして機能することを実証します。分離時の非特異的吸着を効果的に阻止するために開発されたウルトライナートテクノロジーにより、不活性化にかかる時間は 15 分の 1 に短縮されました。また、mAb および ADC の回収率は約 10 % 向上し、GLP-1 や小型の球状タンパク質など低分子量の生体分子にいたっては最大 2 倍になりました。

実験方法

試薬および調製

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) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。LC/MS グレードのアセトニトリル (ACN) は、アジレントから (部品番号 5191-5101-001)、また LC/MS グレードのギ酸は Sigma-Aldrich 社から購入しました。

mAb 製剤と ADC サシツズマブゴビテカン は、Evidentic 社から 10 mg/mL のものを購入しました。酢酸エキセナチド (AT27767-25MG) および凍結乾燥リゾチームは Sigma-Aldrich 社から購入しました。

使用装置

- Agilent 1290 マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Bio マルチサンブラ (G7137A)
- Agilent 1290 Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 6530 Q-TOF MS システム

ソフトウェアおよびデータ処理

- Agilent MassHunter Workstation、バージョン 10.1
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、バージョン B.07
- Agilent DAR カリキュレータ、バージョン B01.01

サンプル前処理

すべてのサンプルは、1 mg/mL の濃度になるよう 0.1 % ギ酸溶液に溶解しました。

分析メソッド

表 1. LC の分析条件

イオンペア逆相 LC/MS			
カラム	- Agilent PLRP-S 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 μm (p/n PL1912-1502) - Agilent Altura PLRP-S 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 μm, ウルトライナートテクノロジー仕様 (p/n PL1912-1502A)		
移動相	溶出液 A) 0.1 % ギ酸 溶出液 B) ACN + 0.1 % ギ酸		
流量	0.21 mL/min		
カラム温度	65 °C		
注入量	1.0 μL		
合計分析時間	10 分		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	75	25
	5	75	25
	10	50	50
	10.01	1	99
	12	1	99
	12.01	75	25
	15	75	25

結果と考察

表 2. MS メソッド条件

Q-TOF パラメータ	
イオン化モード	ポジティブ
ガス温度	350 °C
乾燥ガス	12 L/min
ネブライザ圧力	60 psi
シースガス温度	400 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	5,500 V
ノズル	2,000 V
フラグメンタ電圧	270 V
スキマ電圧	140 V
Oct 1 RF Vpp	750 V

Altura PLRP-S 1000 Å による不活性化時間の最小化と幅広い生体分子の回収率の向上

タンパク質やペプチドは両性アミノ酸で構成されているため、正に帯電した部位と負に帯電した部位が両方あり、これらの部位が金属表面上の帯電部位と非特異的に相互作用する可能性があります。図 1 は、ADC サシツズマブゴビテカンの不活性化における Altura PLRP-S 1000 Å カラムハードウェアの優位性を示しています（図 1A）。この図から、3 回目の注入で分析対象物のシグナルが安定した状態に達していることがわかります。これに対し、ステンレス製ハードウェアは 3 回目の注入までシグナルが現れず、約 20 回の注入でようやく Altura カラムと同様のシグナル強度に達しています。また、質量負荷を大きくすることで回収率の違いを克服できるかどうかを確認するため、サシツズマブゴビテカンの注入量を増やしましたが、複数回の注入後に観察された回収率は、依然として Altura ハードウェアの方が約 8 % 高くなりました（図 1B）。

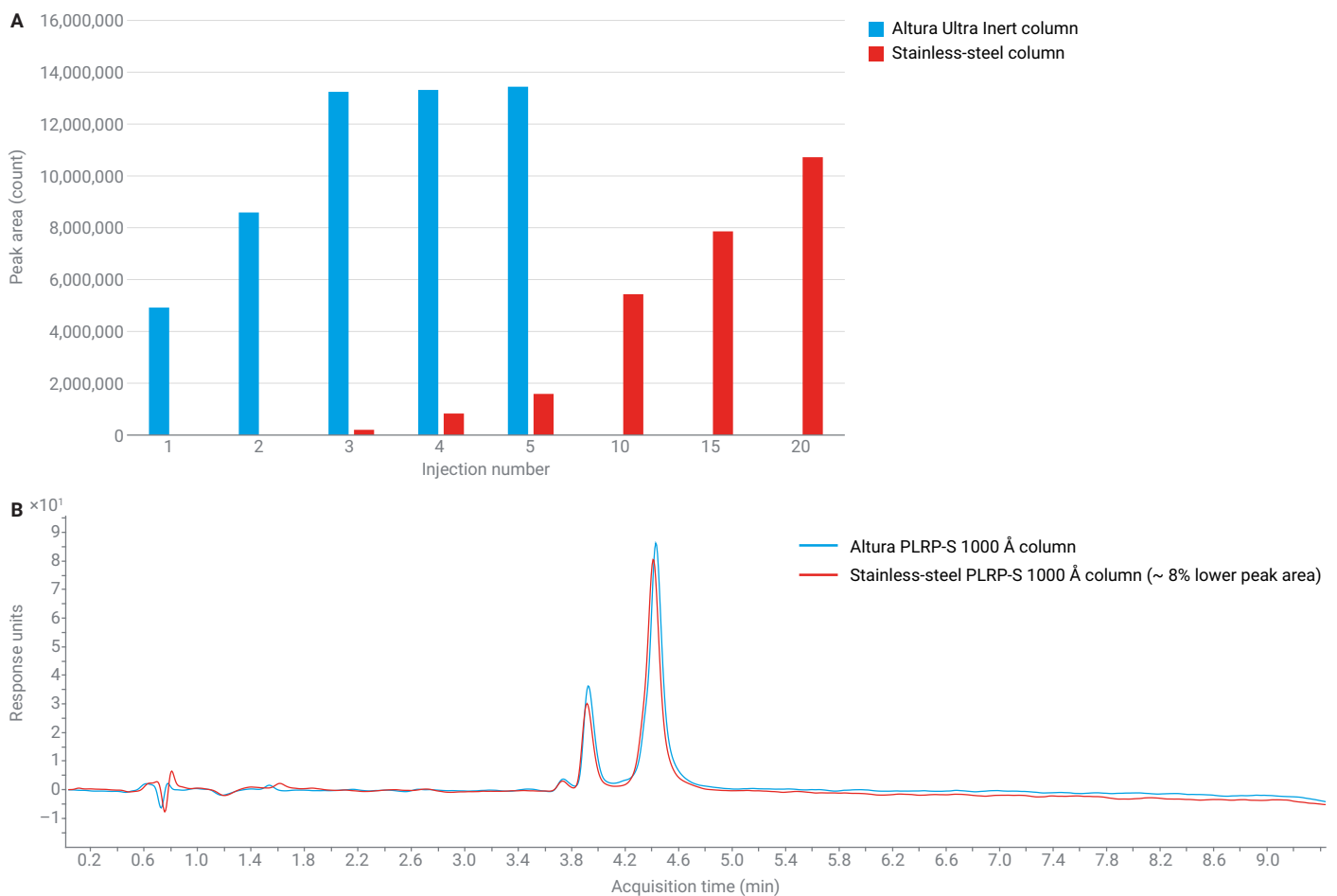


図 1. (A) 1 μ L の 0.05 mg/mL サンプルの注入による Altura PLRP-S 1000 Å カラム（青）およびステンレス製 PLRP-S 1000 Å カラム（赤）の不活性化。(B) 1 μ L の 0.1 mg/mL サシツズマブゴビテカンを注入した場合の Altura PLRP-S 1000 Å カラム（青）とステンレス製カラム（赤）によるピーク回収率の違い

さらに、インタクトのアグリコシル化 mAb アテゾリズマブの回収率についても、Altura PLRP-S 1000 Å カラムの方が 5 % 高い結果となりました (図 2A)。これにより、デコンボリュートした MS スペクトルの品質が向上し (図 2B)、2 つ (−256 Da) または 1 つ (−128 Da) のリシン残基の欠失を同定できました。

回収率の向上は、低 pH 条件下でのインタクト mAb についてはそれほど大きくありませんでしたが、GLP-1 エキセナチドなど低分子量の生物製剤では、Altura カラムを使用することで、回収率が大幅に向上し、ほぼ 2 倍になりました (図 3A)。リゾチームなどの低分子量の球状タンパク質については、ステンレス製カラムでの回収率は Altura カラムの約 85 % でした (図 3B)。この結果は、Altura PLRP-S 1000 Å カラムが多様な生物製剤分子に対し、現行のステンレス製カラムと比較して、最大限の感度を確保できる適切な選択肢であることを示唆しています。

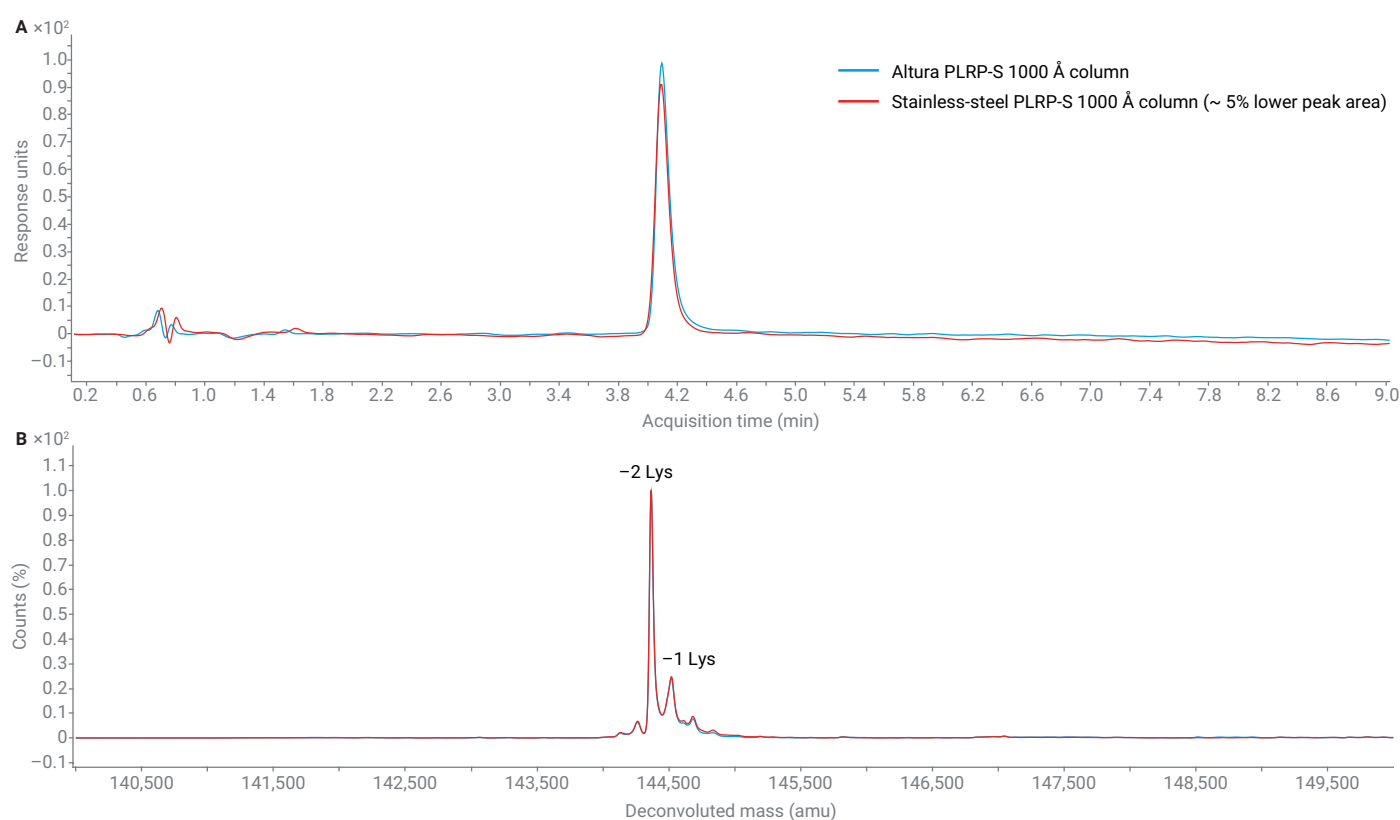


図 2. (A) 1 μ L の 0.1 mg/mL アテゾリズマブを注入した場合の Altura PLRP-S 1000 Å カラム (青) とステンレス製カラム (赤) によるピーク回収率の違い。(B) アテゾリズマブのデコンボリュートしたスペクトル

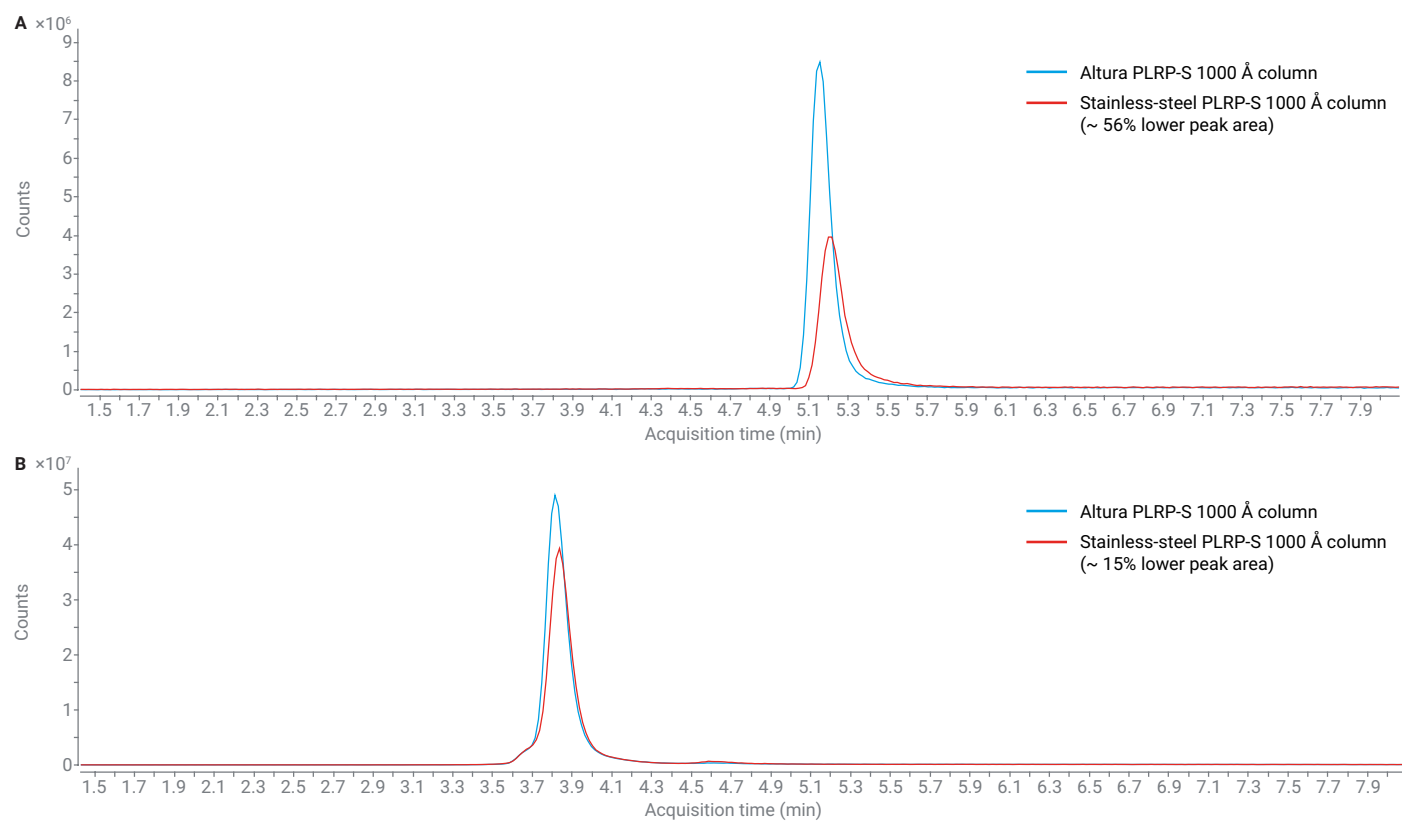


図 3. 1 μL の 0.1 mg/mL エキセナチドを注入した場合 (A) と 1 μL の 0.1 mg/mL リゾチームを注入した場合 (B) の Altura PLRP-S 1000 Å カラム (青) とステンレス製カラム (赤) によるピーク回収率の違い

Altura PLRP-S 1000 Å による PTM 同定の改善と ADC の DAR の正確な測定

Altura PLRP-S 1000 Å カラムでのピーク回収率の向上により、より高品質の MS スペクトルが得られました。これは、精密質量の分析に有益です。サシツズマブゴビテカン[®]はシステイン結合型 ADC で、逆相条件下での分離中に重鎖と軽鎖に解離しますが、その両方を定量するには高い分離能力が必要です (図 4)。興味深いことに、重鎖および軽鎖のいずれの質量スペクトルでも 418 Da の質量減少が認められました。これは、薬物ペイロードである SN-38 が ADC から脱落したことを示します。その原因は、サンプルを長時間にわたって室温に放置したと考えられます。

RP-LC によるインタクト分子の質量分析において最も重要な要素の 1 つは、mAb に低分子薬物が適切に結合しているかどうかを判断するため、薬物抗体比 (DAR) を正確に定量することです。サシツズマブゴビテカン[®]の場合、バリテーション済みの DAR 値は 7.6 です³。Altura PLRP-S 1000 Å カラムは、重鎖および軽鎖の両方に対して十分な分離能力、回収率、スペクトル品質を発揮し、DAR を正確に定量することができました (図 5)。

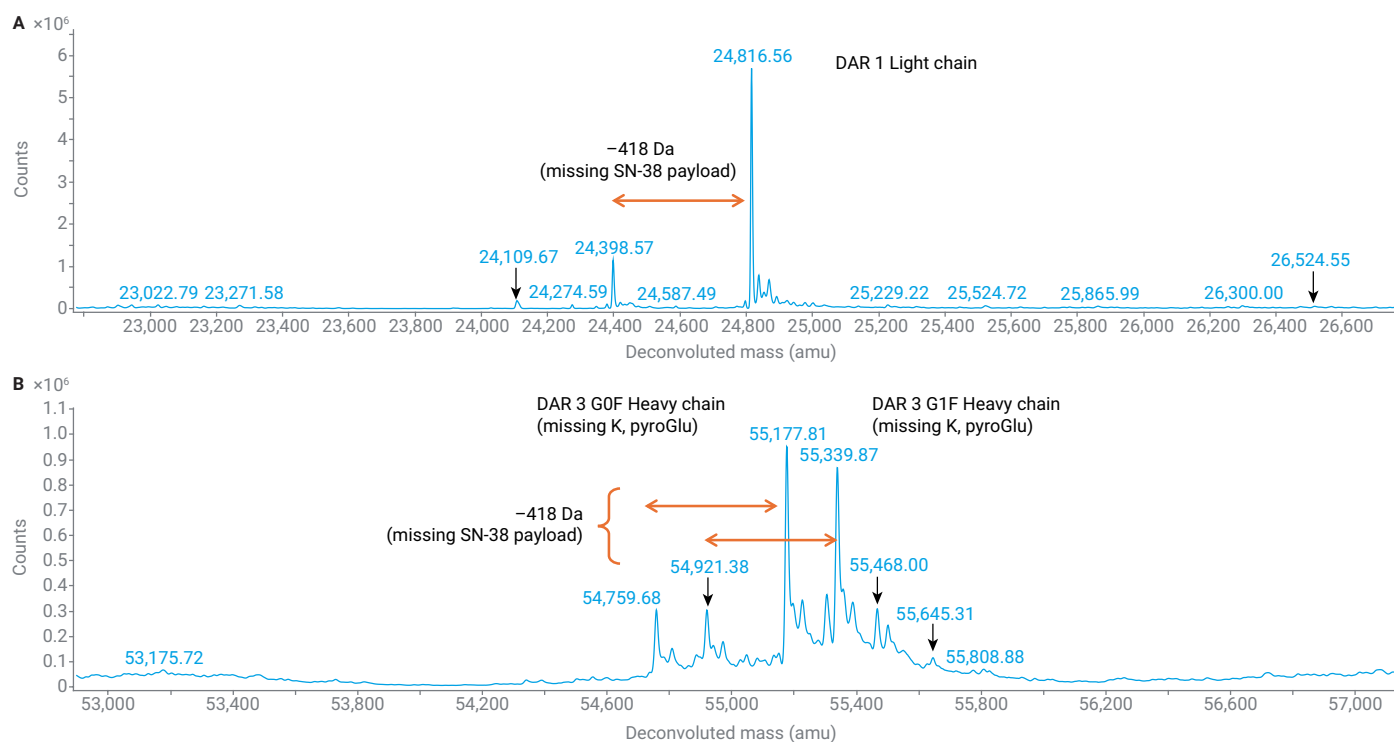


図 4. SN-38 ペイロードの脱落 (-418 Da) および両方の鎖のグリコシル化パターンを示す、サシツズマブゴビテカンの軽鎖および重鎖のデコンボリュート質量スペクトル (両鎖とも質量精度 28 ppm)。

DAR Deconvoluted Spectrum

Heavy Chain DAR 0: 50976.48 Da | Light Chain DAR 0: 23319.15 Da | Drug/Linker: 1496.7 Da | Combined DAR: 7.6

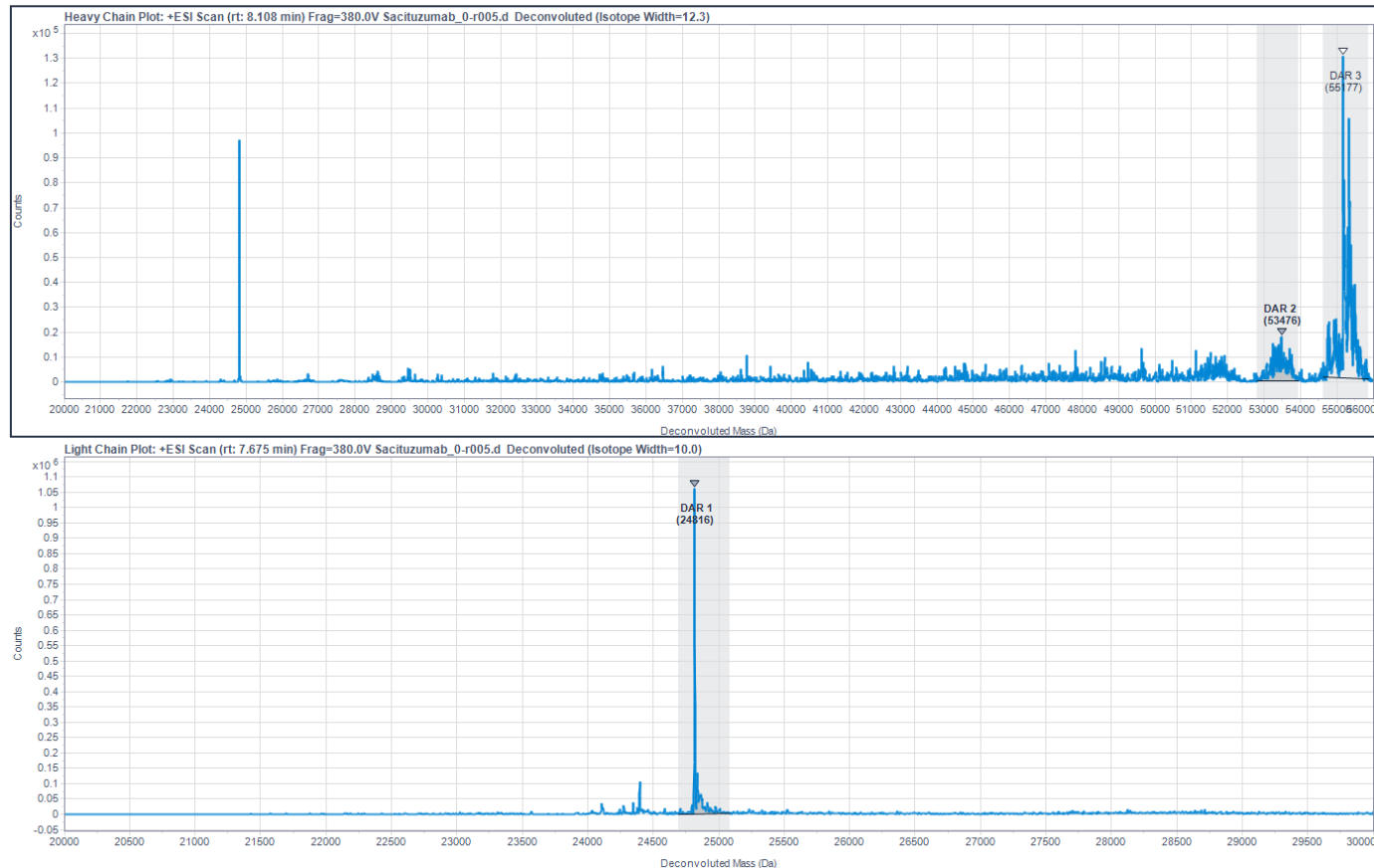


図 5. Agilent DAR カリキュレータソフトウェアを使用した ADC サシツズマブゴビテカン の DAR の定量結果

結論

インタクト分子の質量分析は、生物製剤の純度を測定するうえで極めて重要な手法です。ただし、これらの成分は化学的に複雑なため、シリカ固定相と金属製カラムハウジングの両方による非特異的な吸着が分離性能を著しく低下させる可能性があります。

Agilent Altura PLRP-S 1000 Å は、化学的に不活性なポリスチレン/ジビニルベンゼン固定相と、きわめて優れた不活性性能を持つ Altura ハードウェアを組み合わせた非常に堅牢なソリューションであり、分離性能に悪影響を及ぼすピークテーリングを大幅に低減し、生物製剤の回収率を高めます。今回の研究から、Altura PLRP-S カラムを使用することにより、mAb、ADC、GLP-1、および球状タンパク質の分析対象物の回収率がステンレス製カラムより向上すること、また薬物ペイロードの脱落など品質上きわめて重要となる PTM のモニタリングや ADC の DAR の正確な定量が可能になったことが確認されました。

参考文献

1. Donnelly, D. P.; et al. Best Practices and Benchmarks for Intact Protein Analysis for Top-Down Mass Spectrometry. *Nature Methods* **2019**, 16(7), 587–594. doi:10.1038/s41592-019-0457-0.
2. McCalley, D. V.; Guilleme, D. Evaluation of Additives on Reversed-Phase Chromatography of Monoclonal Antibodies Using a 1000 Å Stationary Phase. *J. Chromatog.A* **2020**, 1610, 460562. doi:10.1016/j.chroma.2019.460562.
3. Kopp, A.; et al. Antibody–Drug Conjugate Sacituzumab Govitecan Drives Efficient Tissue Penetration and Rapid Intracellular Drug Release. *Mol. Cancer Ther.* **2022**, 22(1), 102–111. doi:10.1158/1535-7163.mct-22-0375.

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。

DE-015845

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2026

Printed in Japan, July 24, 2026

5994-9322JAJP