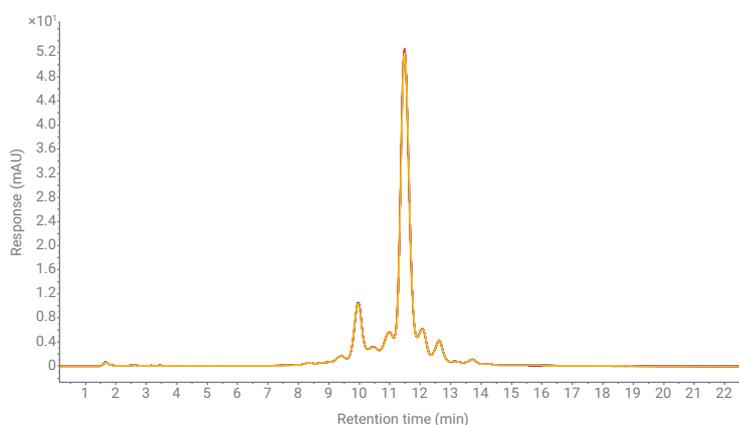


Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる mAb 電荷変異体分析のグラジエント勾配と 分離条件の最適化



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

電荷変異体分析は、液体クロマトグラフィーシステムにおいて要求の高い応用アプリケーションです。これは、分離を最適にするために、腐食性の高いバッファ塩を非常に緩やかなグラジエントと組み合わせて使用しているためです。Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムで、複数の塩グラジエントの分離能と再現性を評価して分析しました。

ハイスピードポンプを含む 1290 Infinity II Bio LC と完全に鉄分のない流路は、バイオクロマトグラフィーで使用される条件に最適であり、システムに損傷を与える可能性のある腐食を防止します。1290 Infinity II Bio LC は、非常に分析困難である緩やかなグラジエントの場合でも優れた再現性を実現しており、高い信頼性でデータを生成するアジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムであることが立証されました。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、サイズが約 150 kDa という高分子量の非常に不均一な巨大分子であり、通常は遺伝子組み換え型製造メソッドにより生成されます。また、多数の修飾が発生する可能性のある複雑な生体合成プロセスで生成され、何百種類もの異なる変異体を生成します。脱アミド化、酸化、ジスルフィドブリッジ、N-グリコシル化、N- および C-末端処理は、最も一般的な翻訳後修飾 (PTM) の一部です。これらの修飾はすべて生成時に発生する可能性があると同時に、製造および保管がこれらの巨大分子の複雑さに影響を与えます。PTM により、広範な分析とモニタリングが必要になる複雑なアイソフォームプロファイルが形成されます。これは、最終医薬品での修飾が生物活性の損失、半減期の変化、または免疫原性と関連付けられる場合があるためです。¹一部の PTM は分子の電荷変異体を生成し、これは通常、イオン交換クロマトグラフィー (IEX) を用いて分析します。²電荷変異体は最も重要な品質特性 (CQA) の 1 つと考えられているため、厳密な許容基準と品質管理について検討する必要があります。また、製品が正しく製造されていることを確認し、すべての不純物を同定して定量するために非常に重要です。

緩やかなグラジエント溶出は、タンパク質の IEX では非常に一般的です。タンパク質の溶出におけるイオン強度モードでの一般的な塩グラジエントは約 1 ~ 3 mM/min であり、pH 値は許容範囲 ± 0.02 pH 単位に設定されています。³

1290 Infinity II Bio LC には、高性能のハイスピードポンプが搭載されています。低圧混合ポンプ (クォータナリポンプなど) と比較した場合、バイナリポンプの主な利点は、溶媒成分の 1 つを低い割合で混合した場合に、溶媒混合の真度と精度が大幅に向上することです。この方法で混合すると、溶媒グラジエントの開始時と終了時の溶媒組成の精度が高まります。⁴これは、再現性が高く正確で緩やかなグラジエントの生成の基本です (各チャンネルで 1 %/min 未満)。

1290 Infinity II Bio LC は、アジレントの次世代ハイエンド液体クロマトグラフィーシステムであり、特に 2 M NaCl のような高塩濃度、最大 8 M の尿素、0.5 M NaOH や 0.5 M HCl のような高および低 pH 溶媒などのバイオクロマトグラフィーで使用される条件向けに設計されています。流路全体にステンレス (SST) と鉄分がまったく存在していません。マルチサンブラ、マルチカラムサーモスタット、検出器全体のキャピラリーとフィッティングはすべて、ニッケル-コバルトアロイの MP35N 製です。この材質を使用することにより、高塩含有バッファの腐食の可能性が低減され、鉄イオンの存在により引き起こされるタンパク質の修飾 (酸化、タンパク質複合体の形成など) を防止できます。

このアプリケーションノートでは、トラスツズマブおよび NISTmAb 参照標準の電荷変異体分析について説明します。複数の塩グラジエント勾配を試験して、分析可能で最適な分離能を見つけました。次に、最適なグラジエント勾配の再現性について評価しました。

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムのモジュール構成は次のとおりです。

- Agilent 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、イナート仕様の標準フロー熱交換器付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、イナート仕様のマイクロフローセル、3 mm、2 μ L 搭載

ソフトウェア

Agilent OpenLab CDS バージョン 2.5

カラム

Bio MAb、NP5、2.1 \times 250 mm、PEEK (p/n 5190-2411)

試薬

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸水素二ナトリウム七水和物、および塩化ナトリウムは、Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。

サンプル

- Agilent-NISTmAb (p/n 5191-5744)
- ヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブ（ハーセプチンとして販売）は Roche（バーゼル、スイス）から入手しました
- トラスツズマブは、30 mM リン酸バッファ、pH 6.8 に溶解しました

バッファの前処理

2 L の 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8 については、4.45 g のリン酸二水素ナトリウム水和物および 7.44 g のリン酸水素二ナトリウム七水和物を計量し、茶色の 2 L ボトルに加えて超純水を 2 L まで調製しました（& バッファ A）。29.22 g の塩化ナトリウムを総濃度が 500 mM になるように空の茶色 1 L ボトルに加え、前処理したリン酸バッファ A を 1 L まで調製しました（& バッファ B）前処理した両方のバッファの pH 値を確認し、必要に応じて pH 6.8 に調整しました（大量の塩を加えると pH が変化する場合があります）。前処理した両方のバッファを 0.2 μm メンブレンフィルタでろ過しました。

メソッド

表 1 参照

注：高濃度の塩溶液を溶出液として使用する際には、ポンプメソッドにおいて対応する溶媒タイプの設定を検討してください。例えば、500 mM の塩化ナトリウムが含まれている溶媒 B の場合、ポンプメソッドの溶媒選択フィールドで [Generic Aqueous（一般的な水）] や [Water（水）] ではなく、「Sodium Chloride 0.5 M（塩化ナトリウム 0.5 M）」を使用します。大量の塩を加えると溶媒の圧縮率が変化するため、あらかじめ設定された溶媒テーブルを使用することにより最高のポンプ性能を実現できます。

結果と考察

メソッド開発

目的の分離能を達成して最適な分離をするには、電荷変異体分析用の広範なメソッド開発が必要です。このために非常に重要になるのは、pH とグラジエント勾配という 2 つのパラメータに対して最適な値を見つけることです。両方の因子が分離に大きな影響を与える可能性があります。最初に、pH スカウティングを実行して、分離に最適な pH を見つけることを推奨します。以前の実験では、使用するバッファの pH を pH 6.4～7.4 まで分析して、トラスツズマブと NISTmAb 参照標準の両方のサンプルに対して最適な pH を 6.8 と決定しました（データは示していません）。次のステップは、最適なグラジエント勾配を決定して、効率的な分離を実行することです。

表 1. 塩グラジエントのクロマトグラフィー条件

パラメータ	設定値
溶媒	A) 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8、B) 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8、500 mM 塩化ナトリウム
グラジエント	30 分で 0 または 25 mM ~ 150 mM NaCl、メソッド開発で複数の緩やかなグラジエントを使用 0 mM（トラスツズマブ）および 25 mM（NIST）、30 分で 100 mM NaCl まで上昇させて再現性を評価 30 分で 25 ~ 50 mM NaCl まで上昇させて再現性を評価（非常に緩やかなグラジエント） 31 分後に 500 mM NaCl で洗浄 ストップタイム：35 分 ポストタイム：15 分
流量	0.200 mL/min
温度	30 °C
検出	280 nm 10 Hz
注入	注入量：トラスツズマブでは 3 μL、NIST では 2 μL サンプル温度：10 °C ニードル洗浄：水で 3 秒間

図 1 は、1 % B/min (5 mM/min) ~ 0.33 % B/min (1.66 mM/min) の範囲の複数のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分析した結果を重ね表示したものです。グラジエントが緩やかになるほど、ポンプ性能への要件が高くなっています。グラジエント時に非常に正確な溶媒組成を実現するためには、少量の溶媒成分を混合する際にポンプを正確かつ高精度で動作させる必要があります。ただし、塩グラジエントの場合、グラジエントを非常に緩やかにしても分離能が高くなるとは限らず、単にピーク幅が広がるだけである（例えば、図 1 の 0.33 % B/min）ことを考慮する必要があります。したがって、再現性の実験で選択したグラジエント勾配は、試験したグラジエントの間中である 0.66 % B/min (3.3 mM/min) であることがわかり、さらに緩やかにするように検討する必要があります。

NISTmAb 参照標準の電荷変異体の分離の場合も、同様のメソッド開発手順を実行しました（図 2 を参照）。NIST の開始条件には、等電点 (pI) が ~ 9 のトラスツズマブと比較してわずかに多い量の塩が含まれていました。この原因は NIST 抗体の pI が高かったためです (pI は ~ 9.2)。NISTmAb 参照標準の電荷変異体をより効率的に分離するために、トラスツズマブと比較してグラジエントをわずかに緩やかにしました。その結果、最も緩やかなグラジエントは 0.17 % B/min (0.83 mM/min) で、ポンプにとっては困難な処理です。詳細な再現性の実験では、0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配を選択しました。

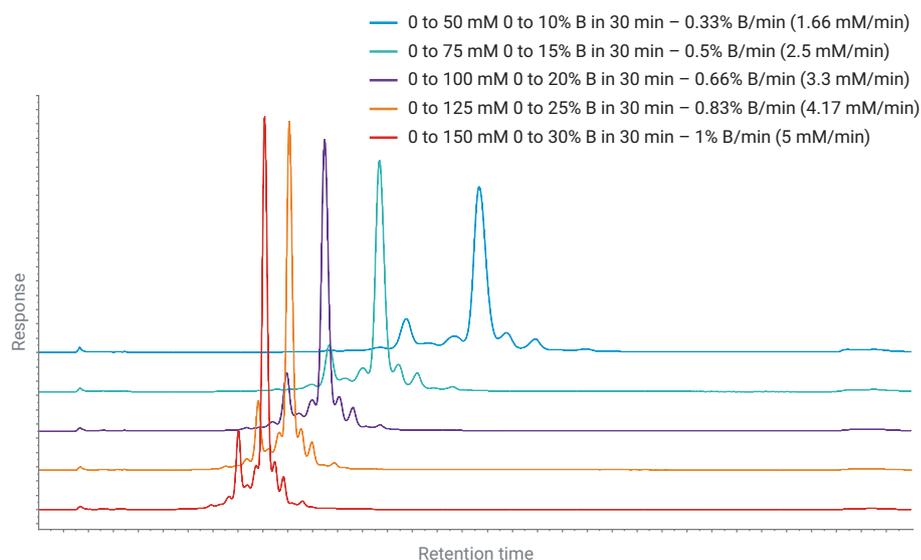


図 1. 複数の塩グラジエント勾配によるトラスツズマブ分離メソッド開発

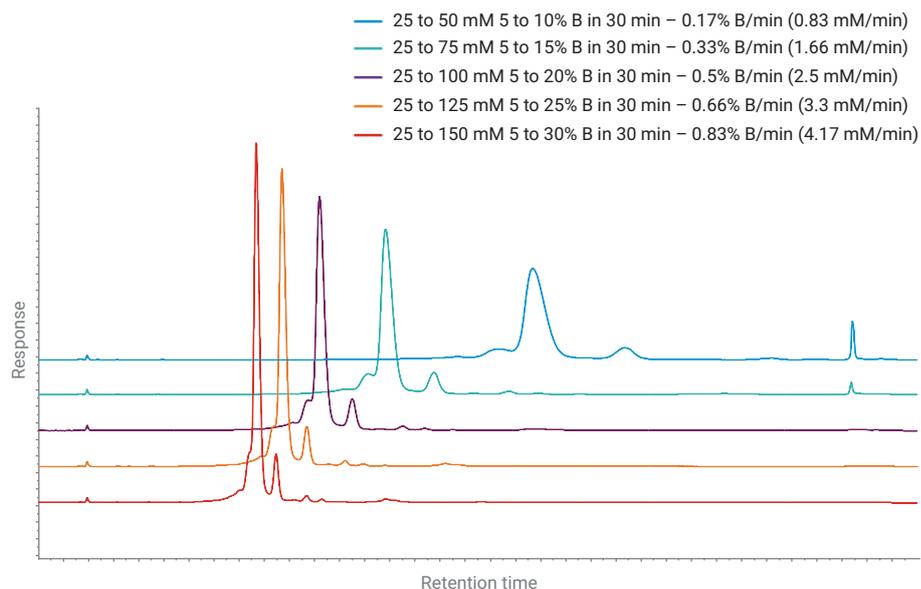


図 2. 複数の塩グラジエント勾配による NISTmAb 参照標準分離メソッド開発

トラスツズマブ電荷変異体の分離の再現性

図 3 は、0.66 % B/min (3.3 mM/min) のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果を示しています (A)。図 3B は、分離した変異体を見やすくするために表示を拡大したものです。A というマークが付けられた変異体は、メインピークの前に溶出した酸性変異体を表しているのに対して、塩基性変異体 B はメインピークの後に溶出しています。メインピークの前では 5 つの酸性変異体が分離されており、メインピークの後は 4 つの塩基性変異体が溶出していました。すべての変異体とメインピークに対して、リテンションタイム (RT) と面積の精度を評価しました。RT と面積の精度は両方ともに優れたものであり、RT については 0.052 % 相対標準偏差 (RSD) 未満の値で、面積については 0.82 % RSD 未満の値です。ただし、2 つの非常に小さな変異体ピーク A1 と B3 を除きます。

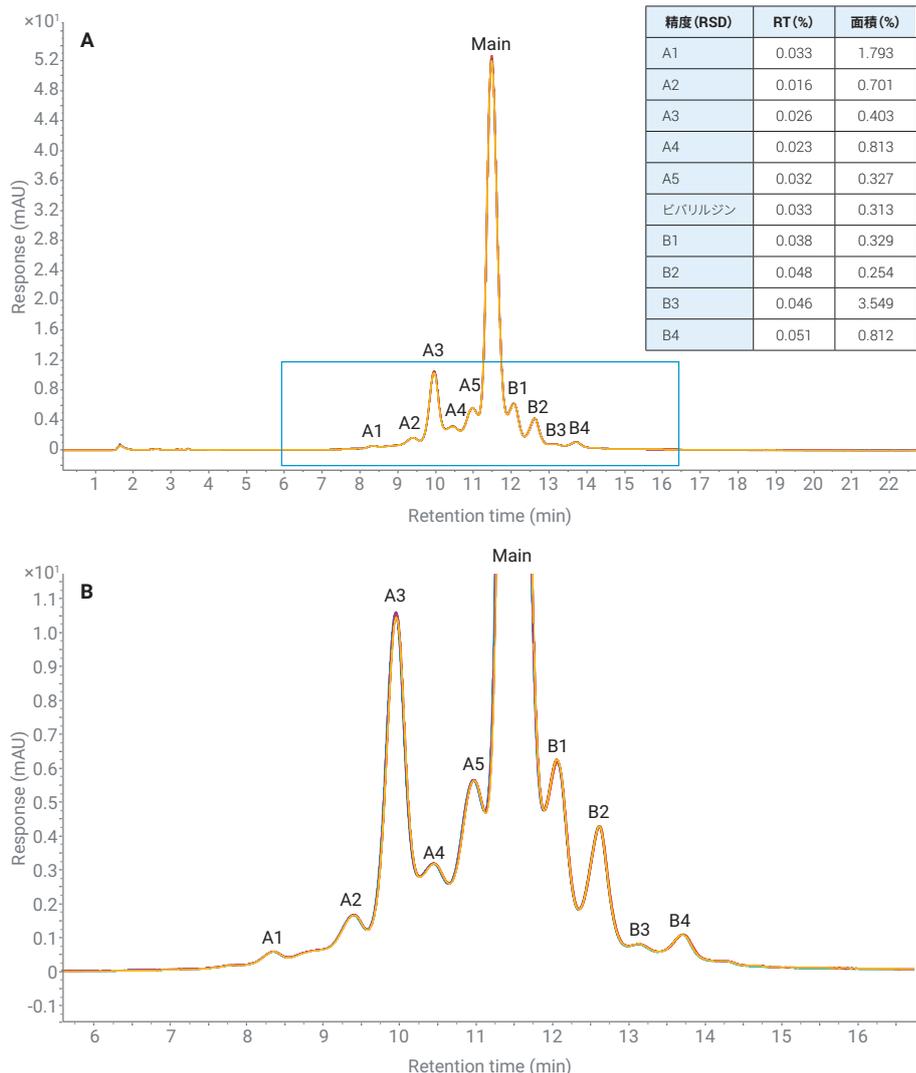


図 3. (A) 7 回の連続分析において 0.66 % B/min (3.3 mM/min) のグラジエント勾配でトラスツズマブの電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果。(B) 拡大表示

NISTmAb 電荷変異体の分離の再現性

図 4 は、0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果を示しています (A)。

図 4B は、2 つの酸性変異体と 4 つの塩基性変異体を拡大して表示したものです。今回も、すべての変異体とメインピークに対して、リテンションタイム (RT) と面積の精度を評価しました。RT と面積の精度は両方ともに優れたものであり、RT については 0.06 % RSD 未満の値で、面積については 0.55 % RSD 未満の値です。ただし、1 つの非常に小さな変異体ピーク B2 を除きます。

図 2 に示したように、最も緩やかなグラジエントの 0.17 % B/min (0.83 mM/min) の場合、0.5 % B/min (2.5 mM/min) (再現性の実験で使用したより緩やかな値) のようなグラジエントと比較して、分離能は良好ではありません。

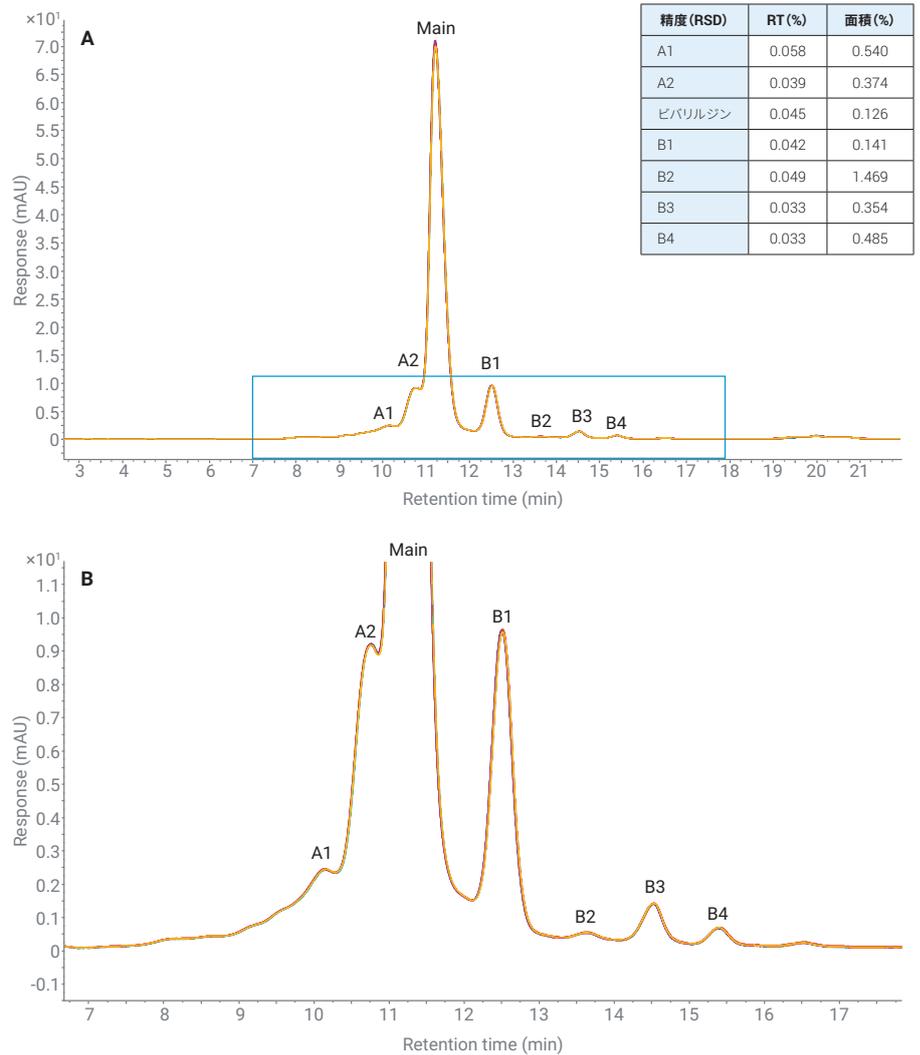


図 4. (A) 7 回の連続分析において 0.5 % B/min (2.5 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果。(B) 拡大表示

ただし、1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプは、分析困難なグラジエント勾配に対応しました。これを図 5 に示します。7 回の連続した分析での RT 精度は非常に良好でしたが (0.25 % RSD 未満)、使用したグラジエントではピーク幅が非常に広くなりました。ピーク幅が広がるとピーク高は低くなりますが、これは面積精度に悪影響を及ぼします。

結論

複数の塩グラジエント勾配に対して、1290 Infinity II Bio LC によりトラスツマブと NISTmAb の電荷変異体の分離と再現性を評価しました。グラジエントが緩やかになると、分離能が向上しているように見えることがあります。しかし、両方の mAb に対して、評価した最も緩やかなグラジエントの場合でも、最高の分離を実現できず、勾配が緩やかになるにつれてピーク幅が広がり始めただけで、これ以上は分離が向上しないことがわかりました。高分離とシャープなピーク形状を最適に組み合わせたメソッドに対して、再現性を詳細に評価しました。グラジエント勾配が 3.3 mM/min (トラスツマブ) および 2.5 mM/min (NISTmAb) の場合、RT と面積の両方で優れた再現性が実現しました。評価したすべてのピークに対して、RT 精度は 0.06 % RSD 未満でした。NISTmAb で試験した最も緩やかなグラジエントに対しても再現性を評価したところ、非常に緩やかなグラジエント勾配 0.83 mM/min の場合でも、非常に優れた RT 精度が実現しました (< 0.25 % RSD)。これらのデータは、完全に鉄分のない流路を備えた 1290 Infinity II Bio LC がバイオクロマトグラフィーで使用する条件に最適で、非常に再現性の高い結果が得られることを示しています。

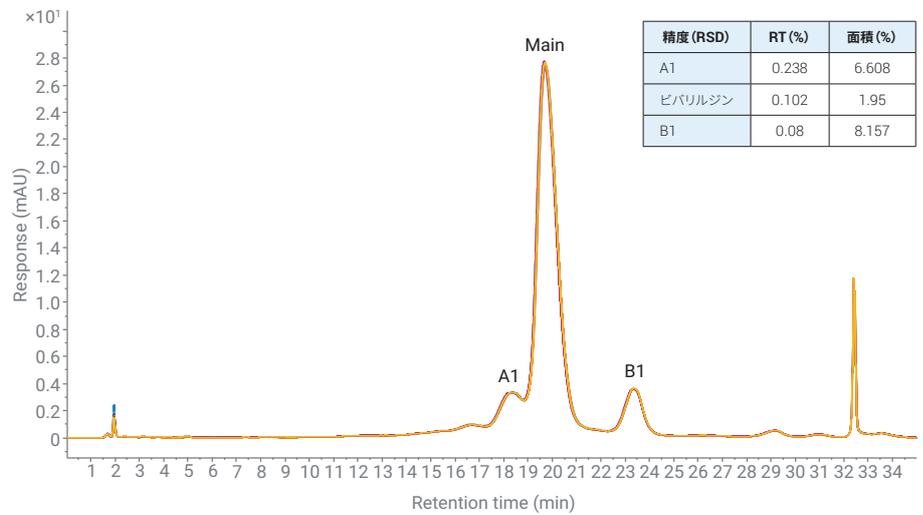


図 5. 7 回の連続分析において 0.17 % B/min (0.83 mM/min) のグラジエント勾配で NISTmAb 参照標準の電荷変異体を分離した際の再現性の実験結果

参考文献

1. Dick Jr., L. W. *et al.* Identification and Measurement of Isoaspartic Acid Formation in the Complementarity Determining Region of a Fully Human Monoclonal Antibody. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877(30), 3841–3849.
2. Zhang, L. *et al.* Improving pH Gradient Cation-Exchange Chromatography of Monoclonal Antibodies by Controlling Ionic Strength. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1272, 56–64.
3. Farnan, D.; Moreno, G. T. Multiproduct High-Resolution Monoclonal Antibody Charge Variant Separations by pH Gradient Ion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.* **2009**, 81(21), 8846–8857.
4. The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. *Agilent Technologies*, publication number 5990-7595EN, **2016**.
5. Goyon, A. *et al.* Determination of Isoelectric Points and Relative Charge Variants of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, 1065–1066, 119–128.
6. Xie, L. *et al.* Demonstrating Analytical Similarity of Trastuzumab Biosimilar HLX02 to Herceptin with a Panel of Sensitive and Orthogonal Methods Including a Novel FcγRIIIa Affinity Chromatography Technology. *BioDrugs* **2020**, 34(3), 363–379.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, January 5, 2021
5994-2692JAJP
DE.964027778