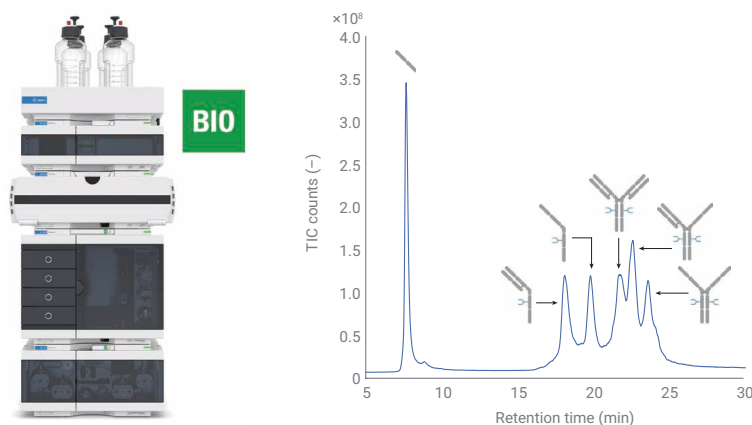


製品関連の mAb フラグメントのモニタリング

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを用いた
インタクトプロテイン分析による低分子量種の UV および
MS 検出



著者

André Feith
Agilent Technologies, Inc.

概要

低分子量 (LMW) 種や高分子量 (HMW) 種のような製品関連の不純物は、治療用モノクローナル抗体 (mAb) 製品の重要品質特性 (CQA) であると考えられており、医薬品の製造プロセス全体でモニタリングする必要があります。このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと PEEK ライナ付き Agilent PLRP-S カラムを組み合わせた優れた性能に基づく RPLC メソッドを開発しました。NISTmAb の還元した重鎖および軽鎖を分析することにより、グラジエント勾配がきわめて緩やかな場合でも、優れた相対リテンションタイムと面積偏向が得られました。メソッド開発後は、2つの重鎖 (H2) または 2つの重鎖と 1つの軽鎖 (H2L) のような関連するすべての LMW フラグメントを分離して検出できました。このメソッドは、UV および MS 検出器を連続して組み合わせているため、バイオ医薬品の製造チェーンの一部の領域で使用できます。さらに、このメソッドは SDS-PAGE/CE-SDS の代替でもあり、LMW 種と翻訳後修飾 (PTM) という 2つの CQA を 1回で分析できる可能性が示されました。

はじめに

mAb はバイオ医薬品の主要な製品クラスであり、さまざまな疾患を適切に処置してきました。¹これらの生体分子には保存されているヘテロ四量体構造が含まれており、これはジスルフィド結合で接続された 2 つの重鎖と 2 つの軽鎖で構成されています。製造時や不適切な保管状態において、LMW 種 (図 1 を参照) または HMW 種 (抗体ダイマーなど) のような製品関連の不純物が形成される場合があります。これらの不純物は多くの精製ステップの後でも存在する場合があります、医薬品ではこれらの不純物を CQA としてモニタリングすることが非常に重要になります。抗体ダイマー、三量体、高い凝集体のような HMW 種は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と UV 検出によりルーチン分析と分離が可能です。²SEC と MS 検出を組み合わせることで実施することにより、分子量と PTM に関連する不純物を詳細に特性解析できます。³重鎖 (H)、軽鎖 (L)、H2L フラグメントのような LMW 種は、キャピラリー電気泳動-ドデシル硫酸ナトリウム (CE-SDS) により分析できます。⁴ただし、CE-SDS は、SDS による高いイオン抑制が原因で MS 検出と組み合わせることができないため、多くの場合は経験的知識に基づいて LMW 種を同定します。このアプリケーションノートでは、1290 Infinity II Bio LC と PEEK ライナ付き PLRP-S カラムの優れた性能に基づいた、mAb の LMW 種の代替分析手法について説明します。ルーチン分析または詳細分析の場合、必要に応じて、NISTmAb の関連するすべての還元起因 LMW フラグメントを、UV および MS の逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) モードで検出できます。

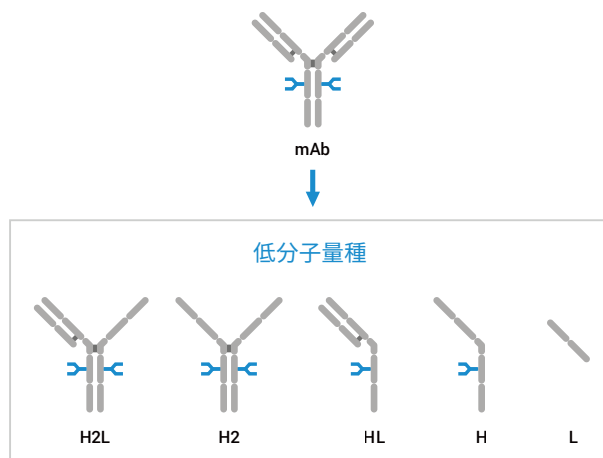


図 1. モノクローナル抗体 (mAb) の還元起因 LMW 種の概略図。

略称: H2L (2 つの重鎖と 1 つの軽鎖)、H2 (2 つの重鎖)、HL (1 つの重鎖と 1 つの軽鎖)、H (重鎖)、L (軽鎖)

実験方法

装置

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と組み合わせ、次のモジュールで構成しました。

- 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)、標準のフロークイック搭載
- Bio 熱交換器 (G7116-60071) と 2 つの Agilent 熱平衡化デバイス (G7116-60013) を接続
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (VWD) (G7114B)、バイオマイクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 搭載
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF (G6545XT)

ソフトウェア

- Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (B.09.00 以降)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis (10.0 以降)
- Agilent MassHunter BioConfirm (10.0 以降)

カラム

Agilent PLRP-S 5 μ m 1000 Å、2.1 \times 100 mm PEEK ライナ付き (p/n PL1912-2502PK)

試薬

Agilent InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル (p/n 5191-4496) および Agilent-NISTmAb (p/n 5191-5744) 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。DL-ジチオスレイトール (DTT) は Merck (ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

サンプル前処理

NISTmAb を部分的に還元するために、1290 Infinity II Bio マルチサンプルにおいて、茶色ガラスバイアルで 4 °C で、40 µg を 1 mM DTT とともに直接インキュベーションしました。40 µg の NISTmAb を 10 mM DTT とともに 60 °C で 30 分間インキュベーションして、重鎖 (H) および軽鎖 (L) に完全に還元しました。注入濃度は 1 mg/mL の NISTmAb または還元した NISTmAb でした。

表 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC を使用してインタクト NISTmAb および対応する LMW 種を分析するための LC メソッド

パラメータ	設定値
カラム	Agilent PLRP-S 5 µm 1,000 Å, 2.1 × 100 mm PEEK ライナ付き
溶媒	A) 水 + 0.1 % ギ酸 B) アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
グラジエント	0.00 分 - 25 % B 9.00 分 - 30 % B 34.00 分 - 38 % B 34.01 分 - 100 % B 36.00 分 - 100 % B 36.01 分 - 25 % B 40.00 分 - 25 % B
流量	0.400 mL/min
温度	60 °C、熱平衡化デバイス搭載
UV 検出器	VWD : 280 nm、10 Hz/MS : 表 2 を参照
注入	注入量 : 0.3 µL サンプル温度 : 4 °C 洗浄 : 水で 3 秒間 (フラッシュポート)

表 2. インタクト NISTmAb および対応する LMW 種を分析する際のイオン源および MS のパラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF
ガス温度	350 °C
ドライガス流量	12 L/min
ネブライザ	35 psig
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
VCap	4,000 V
ノズル電圧	2,000 V
フラグメンタ	180 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V
取り込みモード	ポジティブ、拡張 (m/z 10,000) 質量範囲
質量範囲	m/z 100 ~ 10,000
取り込みレート	1 スペクトル/秒
リファレンス質量	m/z 922.0098

結果と考察

製造から品質管理までの製造プロセス全体でバイオ医薬品を分析する場合、LC システムで分析可能な最高の性能が要求されます。mAb フラグメントの分析に関する 1290 Infinity II Bio LC の性能を評価するために、NISTmAb を DTT で完全に還元して H および L フラグメントを生成しました。図 2 に、7 回の連続注入における相対リテンションタイムと面積の相対標準偏差 (RSD) を示します。これにより、1290 Infinity II Bio LC と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF の組み合わせにおいて、リテンションタイムと面積精度が優れており、mAb フラグメントの緩やかなグラジエントでの分析に最適であることがわかります。LC メソッドが、勾配 0.32 および 0.55 % B/min の 2 つの直線グラジエントで構成されている場合でも、リテンションタイムの RSD 値は 0.190 % (L) および 0.056 % (H)、面積精度の RSD 値は 0.530 % (L) および 0.744 % (H) と低く抑えられています。

LMW 種を RPLC で分析する際の主な課題の 1 つは、H2 や H2L のような抗体フラグメントを分離するには分解能が不十分であるということです。この原因は、実際の mAb と疎水性が類似しているためです。これらのフラグメントは、発酵プロセスまたは最終製品での部分的な還元により生成される場合があります。ただし、これらのフラグメントは、少量の DTT とともに温度を下げた状態で長時間にわたって部分的な還元を実施することにより、人工的に生成することもできます。この手法を使用して、PEEK ライナ付き PLRP-S と 1290 Infinity II Bio LC をベースにした RPLC メソッドを開発しました。

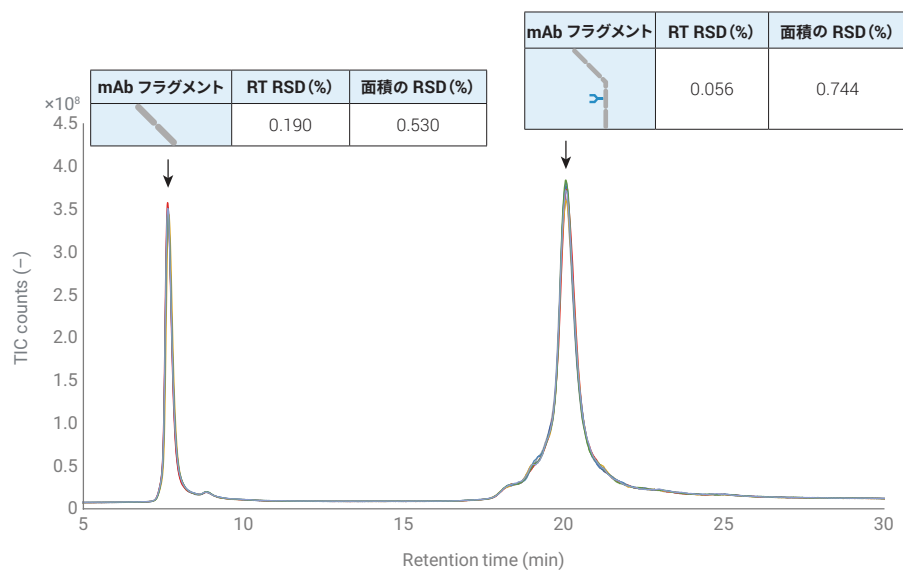


図 2. NISTmAb を還元することによって得られる重鎖および軽鎖フラグメントを分析した相対リテンションタイムと面積精度 (RSD, n = 7)

図 3 のクロマトグラムから、1290 Infinity II Bio マルチサンプラで NISTmAb が動的に還元されていることがわかります。図 1 に示されている関連する mAb フラグメントはすべて適切に分離されており、DTT の追加が原因で長時間にわたって変化しています。特に、H2、H2L フラグメント、NISTmAb は RPLC で非常に良好に分離されており、LMW の分析において PEEK ライナ付き PLRP-S カラムと 1290 Infinity II Bio LC を組み合わせたメソッドが適切であることを示しています。RPLC モードが存在するために、1290 Infinity II Bio LC システムを 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF と簡単に組み合わせることができ、MS データを Agilent MassHunter BioConfirm で解析できます。図 3 のスペクトルは、デコンボリューション後のそれぞれのフラグメントの主なグリコフォームを示しています。NISTmAb 固有のグリコシル化により、

このメソッドで複数のフラグメントの PTM を簡単に分析できることがわかります。さらに、図 4B は、mAb ピーク周辺におけるフラグメントのクラスタリングに対する代表的なイオンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示しています。これらの EIC は、PEEK ライナ付き PLRP-S カラムの高い分解能の結果として、良好なピーク形状も実現しています。

1290 Infinity II 可変波長検出器と 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF を連続して組み合わせた機器設定により、1 回の分析でバンドをほぼ拡大せずに、プロセス開発から品質管理まで利便性の高いメソッドを移管しなくても、UV および MS 検出を実行できます (図 4A)。

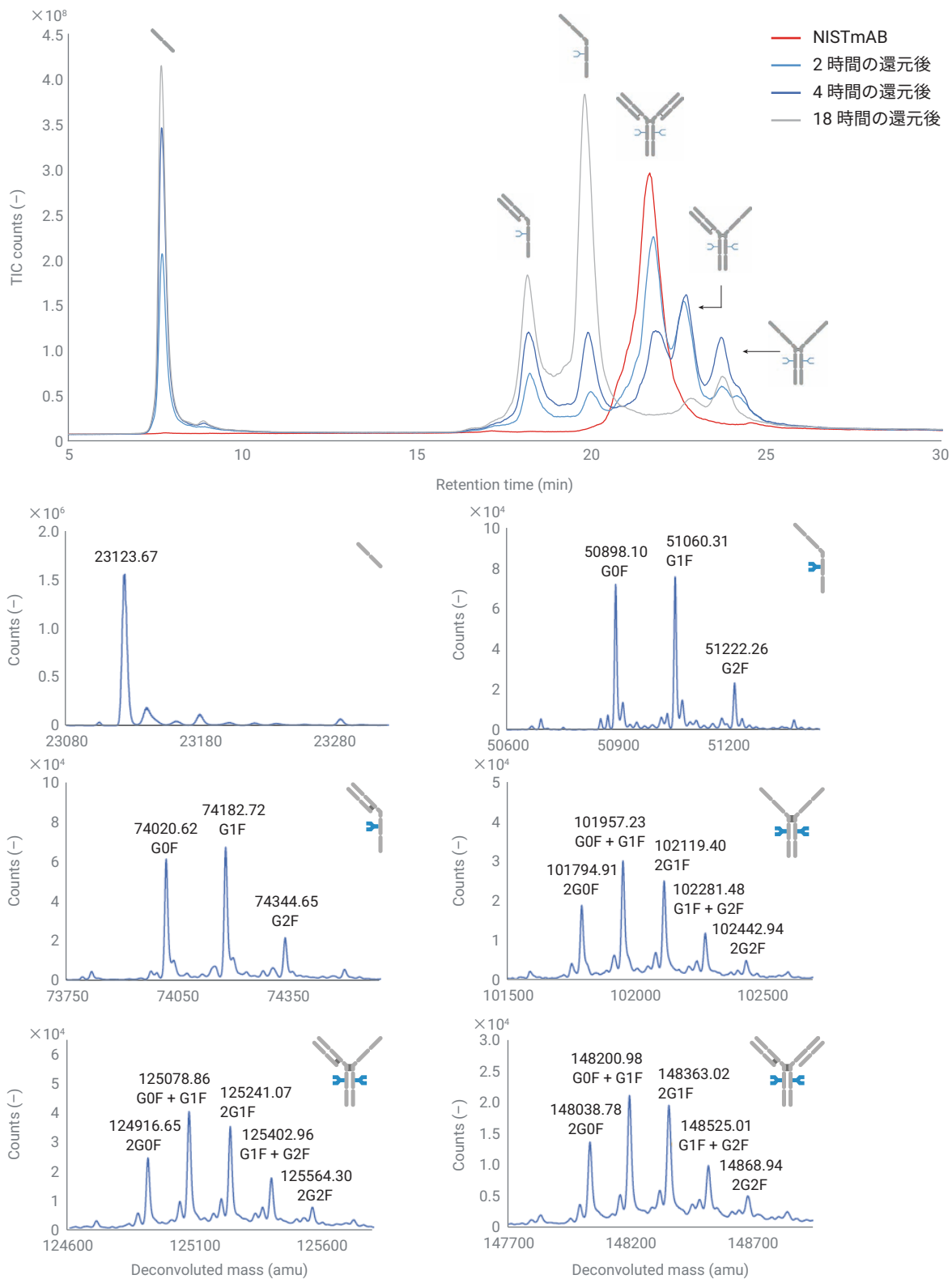


図 3. Agilent 1290 Infinity II Bio LC で分離され Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF で検出された NISTmAb の動的な部分的還元クロマトグラム。それぞれのフラグメントに対応する抽出スペクトルは、NISTmAb 固有のグリコシル化を示しています。

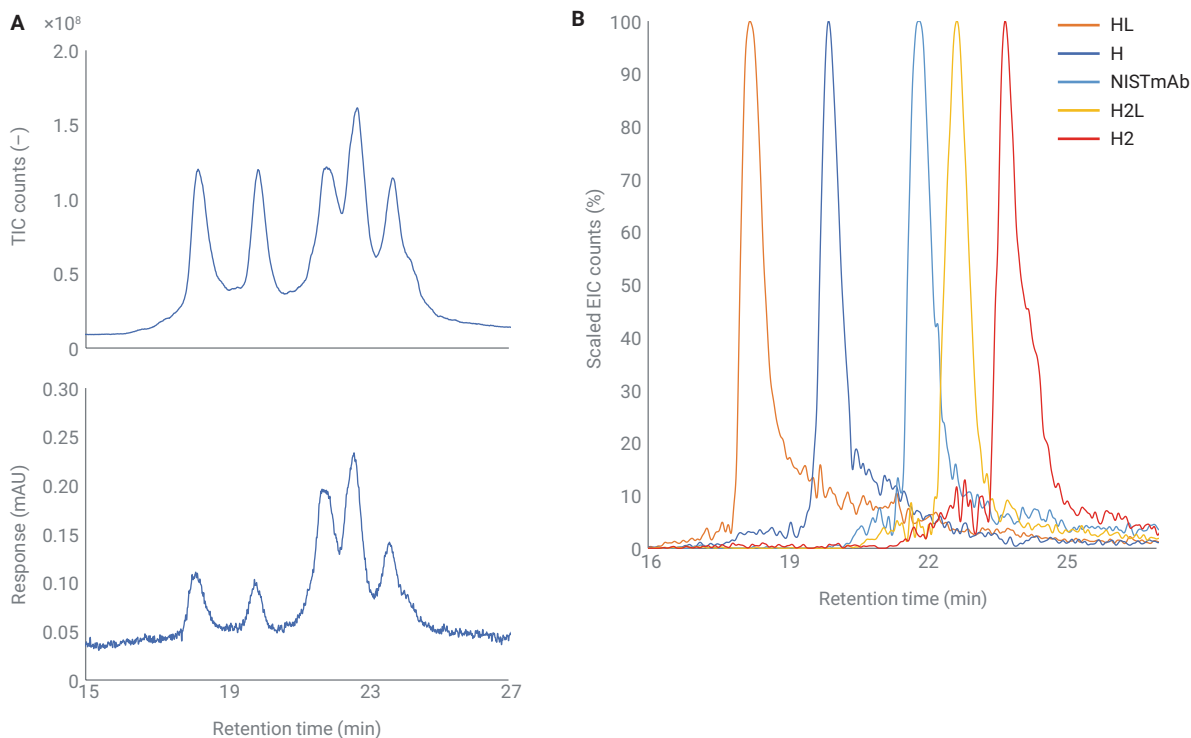


図 4. 1 回の分析で取得した NISTmAb 周辺のフラグメントクラスタリングの MS および UV クロマトグラム (A)。優れたピーク形状を示す NISTmAb フラグメントの抽出イオンクロマトグラム (B)

結論

LMW や HMW 種のような製品関連の不純物の分析においては、従来の SDS-PAGE と最新で同等の CE-SDS が広く使用されています。ただし、これらのメソッドで LMW 種の構造を同定することは困難であり、主に経験的知識に基づいていました。このアプリケーションノートでは、NISTmAb の関連するすべての還元起因 LMW 種を分離できる RPLC メソッドについて説明しました。1290 Infinity II Bio LC は、重鎖および軽鎖フラグメントの分析を基にして、優れたリテンションタイムと面積精度値を実現できました。1290 Infinity II Bio マル

チサンプルでの NISTmAb の動的な還元とそれに続く 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF による検出により、このメソッドが翻訳後修飾の分析に最適であることがわかりました。この能力をフラグメント分析と組み合わせることにより、バイオ医薬品開発を加速できます。これは、PEEK ライナ付き PLRP-S カラムと 1290 Infinity II Bio LC が、最終の品質管理までの製造プロセス全体にわたるバイオ医薬品の分析において将来的なニーズにも対応できる組み合わせであるためです。

参考文献

- Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 992–1000.
- Nägele, E. Elevate Your mAb Aggregate Analysis: High-resolution SEC with the Agilent 1290 Infinity II Bio LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2709EN, **2020**.
- Vandenhede, I. *et al.* SEC Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Detailed Characterization of mAbs and ADCs. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0303EN, **2018**.
- Rustandi, R. R.; Washabaugh, M. W.; Wang, Y. Applications of CE SDS Gel in Development of Biopharmaceutical Antibody-Based Products. *Electrophoresis* **2008**, 29, 3612–3620.

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 29, 2021
5994-3021JAJP
DE44181.2356018519