

Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm PEEK ライナ付きカラムを用いた 抗体フラグメント薬物複合体の分析



Monoclonal antibody



Single-chain Fv (scFv)

著者

Benjamin Stenton
Antikor

Andrew Coffey and
Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

概要

抗体薬物複合体 (ADC) は通常、薬剤リンカー (約 2 kDa) を IgG 抗体全体 (約 150 kDa) に複合化して形成し、最大 8 の薬物抗体比 (DAR) で構成されます。こうして形成された抗体は約 10 % w/w に修飾されますが、抗体の主な特性の大部分は変更されずに維持されます。抗体の一本鎖 Fv (V_H および V_L) のような抗体フラグメントは、IgG (約 30 kDa) の約 5 分の 1 のサイズであり、DAR をさらに高くする (約 10) ように修飾できます。こうして形成された抗体フラグメント薬物複合体 (FDC) では、約 65 % w/w のタンパク質修飾を示します。このような極端な修飾により複合体の特性が大幅に変化する場合があり、分析に新たな課題が生じてしまいます。

はじめに

このアプリケーションノートで分析した FDC は等電点が非常に低く（リジン複合化が原因）、複合体の凝集が迅速であるため、逆相（RP）クロマトグラフィーの移動相ではギ酸を使用できません。エレクトロスプレーイオン化では、ギ酸に存在するデュアル機能のプロトン化成分により荷電種を生成し、ナトリウム付加物を最低限に抑えます。DAR が高いと FDC が凝集する傾向があるため、複合体の精製、製剤、分析間でのステップ数を最小にするには、インライン脱塩メソッドが適しています。このアプリケーションノートでは、pI が非常に低く分析困難な FDC の特性を解析するために、質量分析に対応する未変性モードのサイズ排除（SEC/MS）メソッドを開発しました。このメソッドは、適切なポアサイズにより対象分子を良好に分離し、ナトリウム付加物がほぼ存在しない優れた脱塩が実現できるため、FDC DAR 分析および反応混合物中の複合体のモニタリングに最適です。

実験方法

試薬および調製

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

サンプル前処理

scFv および FDC サンプルは Antikor が作製しました。

装置構成

HPLC 分析では、Agilent 1290 Infinity LC を次の構成で使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity オートサンプラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付 カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ 検出器 WR (DAD) (G7115A)
- Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF

データ処理

LC/MS データは、Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 および BioConfirm B.07 ソフトウェアで処理しました。

メソッド条件

| Agilent 1290 Infinity LC | | |
|--------------------------|--|--|
| HPLC 条件 | 逆相メソッド | 未変性 SEC メソッド |
| カラム | Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm (p/n PL1912-1502) | AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 2.1 × 150 mm PEEK ライナ付き (p/n PL1980-3250PK) |
| 移動相 | A = 20 mM NH ₄ OAc, pH 7.0 B = MeCN | 75 mM NH ₄ OAc, pH 7.0 |
| グラジエント | 0 分 10 % B 8.4 分 10 % B 14.4 分 90 % B 20.4 分 90 % B 21.6 分 10 % B 25.8 分 10 % B | |
| 流量 | 0.6 mL/min | 0.05 mL/min |
| カラム温度 | 70 °C | 30 °C |
| 注入量 | 2.2 μL | 5 μL |

| Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF | | |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| パラメータ | 逆相メソッド | 未変性 SEC メソッド |
| イオン源 | デュアル Agilent Jet Stream | デュアル Agilent Jet Stream |
| ガス温度 | 325 °C | 300 °C |
| ドライガス流量 | 11 L/min | 8 L/min |
| ネブライザガス | 40 psi | 40 psi |
| シースガス温度 | 400 °C | 300 °C |
| シースガス流量 | 12 L/min | 8 L/min |
| キャピラリー電圧 | 4,500 V | 3,000 V |
| ノズル電圧 | 300 V | 2,000 V |
| フラグメンタ | 275 V | 200 V |
| スキマ電圧 | 65 V | 65 V |
| Oct 1 RF Vpp | 750 V | 750 V |
| 質量範囲 | m/z 300 ~ 3,200 | m/z 900 ~ 10,000 |
| MS スキャンレート (スペクトル/秒) | 1 | 1 |
| 取り込みモード | ポジティブ、拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz) | ポジティブ、拡張ダイナミックレンジモード (2 GHz) |

結果と考察

中性緩衝液で RP クロマトグラフィーを使用して scFv をインラインで脱塩した結果、約 12.7 分で scFv ピークが溶出しました (図 1)。図 2 に、scFv ピークの質量スペクトルを示します。デコンボリュート時に多数のナトリウム付加物が観察されており (図 3)、分析はかなり複雑になります。

RP 分析では高いイオン源温度によりリンカーが分解される場合があるため、代替のアプローチを探しました。

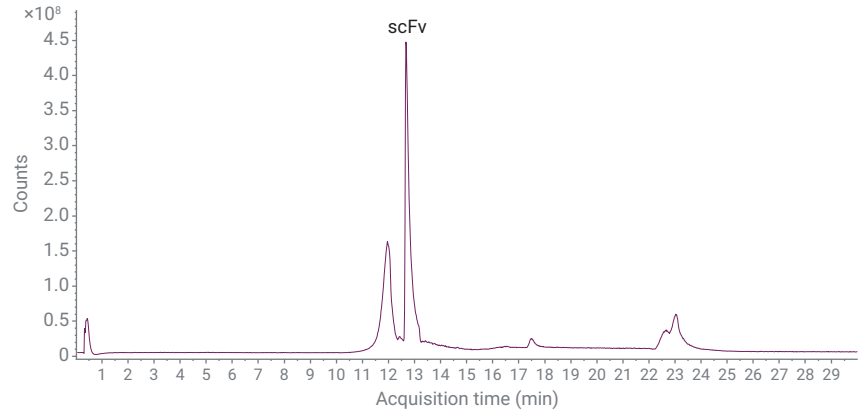


図 1. scFv の逆相 TIC

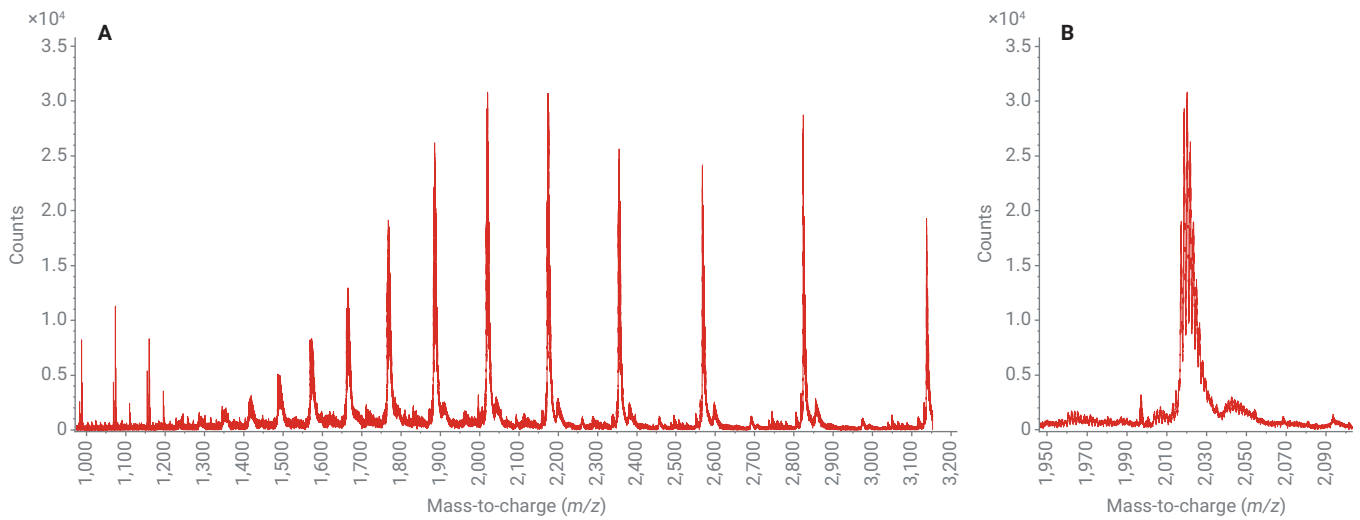


図 2. (A) scFv ピークの質量スペクトル。(B) 拡大表示

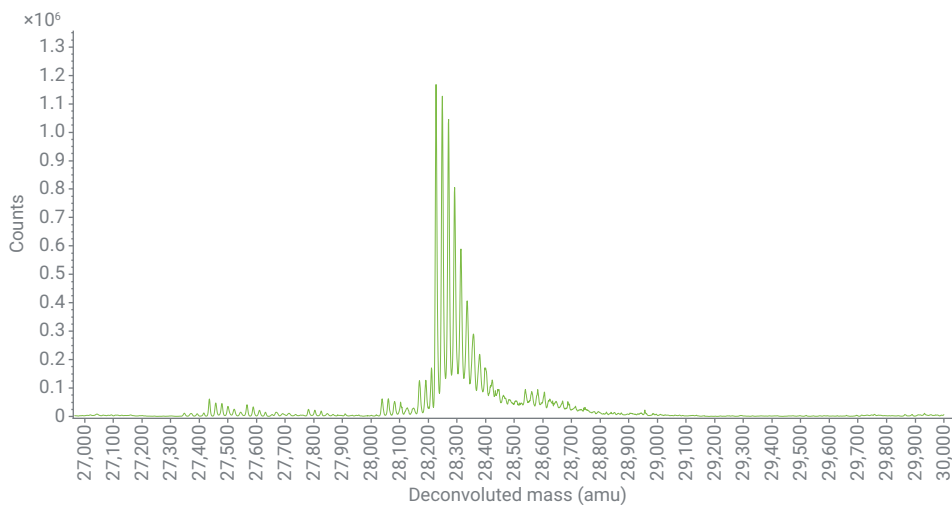


図 3. 複数のナトリウム付加物を示すデコンボリュートしたスペクトル

揮発性移動相緩衝液を使用した SEC を実行できますが、二次的反応を低減した固定相を使用する必要があります。一部の分子では、ステンレスではなく、バイオイナート (PEEK ライナ付き) SEC カラムを使用して、ピーク形状をさらに改善することもできます。

また、内径 2.1 mm のカラムを使用して、流量を 0.05 mL/min まで下げることにより、低い脱溶媒ガス流量と低い温度が使用できます。流量を低くすることで、タンパク質がナトリウムイオンからクロマトグラフィー分離されると、平衡化するまでの時間が長くなり、ナトリウム付加物が減少します (図 4 および 5)。図 4 から、scFv と薬物複合化された FDC の両方が薬剤リンカー (約 2 kDa) と塩から適切に分離されていることもわかります。このため、今回のメソッドは、反応時の FDC と薬剤リンカーのモニタリングにも簡単に適用できます。個々の DAR 種の分布は、デコンボリュートしたスペクトルから決定できます (図 6)。また図 6 では、主要な DAR ピーク間にいくつかの小さいピークも存在しますが、これは C 末端にアミノ酸が存在しない溶液内でのペプチドのフラグメンテーションの結果です。

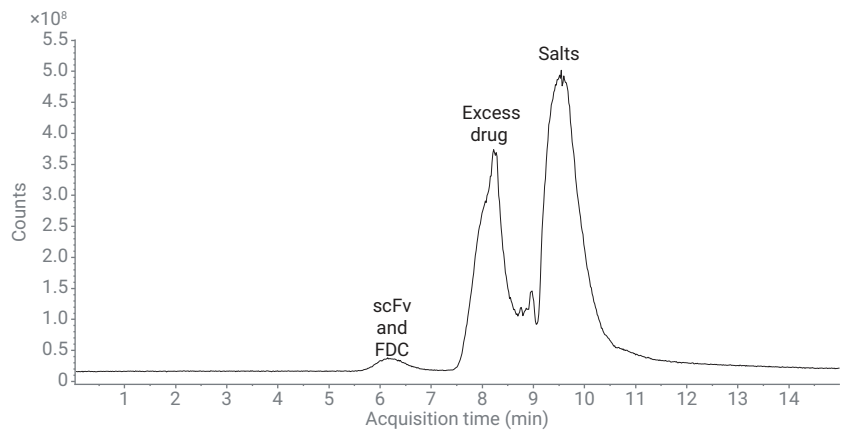


図 4. 未精製反応混合物の未変性モード SEC TIC

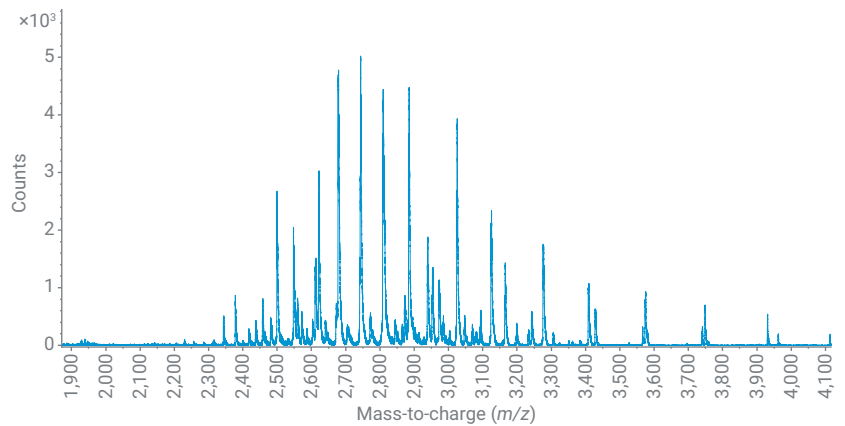


図 5. scFv と FDC の質量スペクトル

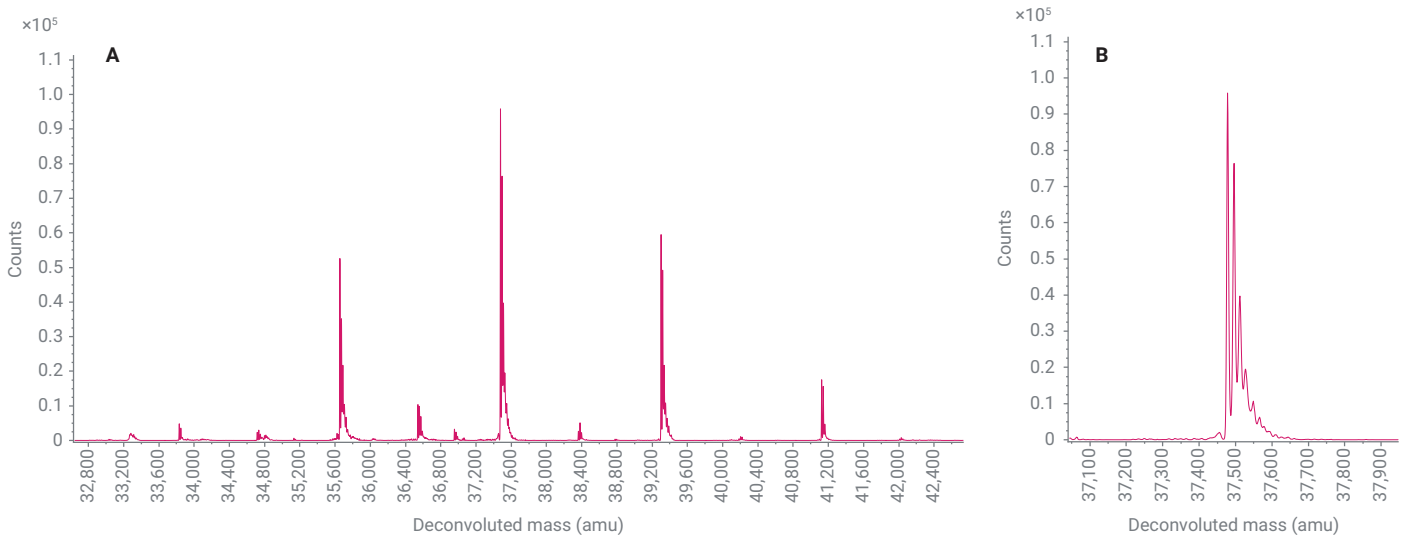


図 6. (A) DAR 種を示す scFv と FDC のデコンボリュートした質量スペクトル。(B) 拡大表示

結論

この研究では、未変性 SEC/MS により、逆相アプローチと比較してナトリウム付加物が少ない優れた脱塩が実現されており、分析時には中性の pH により FDC が安定した状態を維持します。PEEK ライナ付き SEC カラムおよびポアサイズ 120 Å の親水性固定相により、比較的低濃度の揮発性移動相を使用したこのタイプのサンプル分離で、二次的反応が最小限に抑えられます。この新しいメソッドは、FDC DAR 分析および反応混合物中の複合体のモニタリングに使用できます。

参考文献

1. Richards, D. A. Exploring Alternative Antibody Scaffolds: Antibody Fragments and Antibody Mimics for Targeted Drug Delivery. *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, 30, 35–46.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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いません。
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, February 9, 2021
5994-3045JAJP
DE44222.4859027778

