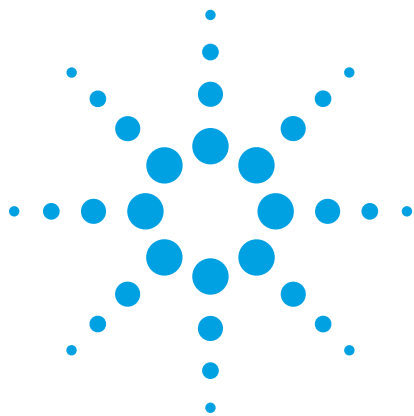




Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8 カラムを用いた還元モノクローナル抗体の高速 UHPLC 分析

アプリケーションノート

生物医薬品

著者

James Martosella、Phu Duong、
Susanne Moyer
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd,
Wilmington, DE, 19808
USA

概要

最適なクロマトグラフィー条件下で Agilent ZORBAX サブ 2 µm Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8 逆相カラムを用いて、還元およびアルキル化モノクローナル抗体の高分離能/超高速分離を実現しました。StableBond C8 相と RRHD カラム技術に、堅牢なグラジエント溶出条件を組み合わせれば、軽鎖および 2 つの重鎖のモノクローナル抗体変異型を高速かつ高効率で、4 分未満で分離できます。また、別の移動相組成を用いて、超高速 LC/MS 分析に対する分離の柔軟性を高めました。安定性の高い C8 相と堅牢なカラム充填技術により、動作圧力と温度を高くしても、再現性の高い分離とクロマトグラフィー結果が得られました。



Agilent Technologies

はじめに

生物医薬品開発は製薬業界で急速に成長していますが、この開発パイプラインにおいては、抗体医薬品のキャラクタライゼーションが重要な課題となります。抗体のキャラクタライゼーションには多くの分離テクニックを使用できますが、逆相クロマトグラフィーによる分離は、プロトコルの効率や分離能、総タンパク回収率の低さから、限定的にしか用いられていません。構造的に見ると、モノクローナル抗体は糖タンパク質の一種で、ジスルフィド架橋により結合するまったく同一の2つの重鎖(50 kDa)とまったく同一の2つの軽鎖(25 kDa)で構成されています。製造や処方、保管の際の純度と安定性の高スループットモニタリングを実現するためには、これらの鎖やイソ型を高速かつ高効率で分析する必要性や重要性が高くなります。

この研究では、Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8、1.8 μ m カラムと、還元モノクローナル抗体分析に最適なクロマトグラフィー条件を組み合わせ、超高速 mAb キャラクタライゼーションおよびスクリーニングにおける有用性を実証しました。ZORBAX StableBond C8 相と高温条件(75 °C)、および最適化したグラジエント条件により、軽鎖および重鎖 mAb の高分離能分離をきわめて短い溶出時間でおこなうことができました。我々の知る限りでは、この溶出時間はこれまでに報告されたことのない水準です。分離の際には、各種の LC/MS ユーザー条件に対する柔軟性を高めるために、各種の移動相組成と質量分析 (MS) に適したイオン対添加剤を使用しました。使用したカラムは、900 bar を超える背圧に対しても優れた耐性を示し、酸性移動相条件および高温条件下で再現性の高いカラム動作が得られました。また、250 回の分析でタンパク質回収率を繰り返し評価したところ、ゴーストピークや保持力の変動は見られませんでした。

実験手法

材料

この研究で用いたヒトモノクローナル抗体は、アジレントの CDH メディア (p/n 010774) を用いて作成し、10 mM リン酸バッファおよび 0.09 % (w/v) アジ化ナトリウム中で、pH 7.2 および 4 °C で保管しました。抗体の濃度は 10 mg/mL です。トリフルオロ酢酸は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から購入し、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) から入手しました。透析カセットは 3,500 MWCO のもので、Thermo Scientific (p/n 66330) から購入しました。

還元とアルキル化

塩酸グアニジンを用いた変性条件下で還元とアルキル化をおこない、逆相分析用の遊離軽鎖および重鎖を作成しました。抗体 0.5 mL (1.5 mg/mL) を水に対して透析し、保存料を除去しました。透析後、100 mM TRIS-HCl と 4M 塩酸グアニジン (Mallinckrodt、フィリップスバーグ、ニュージャージー州) で 0.5 mL を希釈し、最終濃度を 0.75 mg/mL としました。溶液の pH を pH 8.0 に調整しました。0.5 M ジチオスレイトール (DTT、Sigma) 原液 10 μ L を加え、最終濃度を 5 mM としました。この混合液を 37 °C の水槽に保管し、30 分間インキュベーションしました。その後、抗体溶液を室温まで冷却し、0.5 M ヨードアセトアミド (IAM、Sigma) 原液 26 μ L を加え、最終濃度を 13 mM としました。この抗体溶液を、光の当たらない室温条件で 45 分放置しました。その後、溶液を 0.5 M DTT 20 μ L で急冷し、最終濃度を 10 mM としました。次に、還元およびアルキル化した抗体 1.0 mL を、4 mL、3.5 K MWCO コンセントレータ (p/n 5185-5991) により、水 (0.1 % TFA) を用いて 3800 RPM で 30 分間脱塩しました。濃縮プロセスを 2 回繰り返し、最終体積を 0.5 mL (1.5 mg/mL) としました。

UHPLC 条件

機器	Agilent 1290 LC Infinity システム、オートサンブラ (ALS)、バイナリポンプ、サーモスタットオープン、ダイオードアレイ検出器 (DAD) 搭載
カラム	Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C8、2.1 x 100 mm、1.8 μ m (p/n 858750-906)
移動相	(各種) A. H ₂ O + 0.1 % TFA (v/v) B. 1-プロパノール : ACN:H ₂ O (80:10:10) + 0.1 % TFA (v/v) A. H ₂ O + 0.05 % TFA/0.5 % 酢酸 (v/v) B. 1-プロパノール : ACN:H ₂ O (80:10:10) + 0.05 % TFA/0.5 % 酢酸 (v/v) A. H ₂ O + 0.05 % TFA/0.05 % ギ酸 (v/v) B. ACN + 0.05 % TFA/0.05 % ギ酸 (v/v)
注入量	1~3 μ L
流速	0.5 mL/min
グラジエント	マルチセグメント
温度	75 °C
検出	UV、225 nm

連続クロマトグラフィー分析の際には、2 分のポストランを追加し、カラムの再平衡化をおこないました。

結果と考察

還元およびアルキル化モノクローナル抗体の超高速分析における分離の最適化

図 1A と 1B のクロマトグラムは、還元およびアルキル化モノクローナル抗体の超高速分離に最適化した 2 つのクロマトグラフィープロフィールを示しています。Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8、1.8 μm カラムと 75 °C の高温条件、および最適化した移動相組成により、分離能の高い 2 種類の高速度分離が可能になりました。上のクロマトグラム (1A) で示されている速度の速い分離プロフィールは、4 分未満で還元モノクローナル抗体の分離が完了したことを示しています。狭い軽鎖および重鎖バンドが高い効率で分離されています。それに対して、図 1B のクロマトグラムでは、高速という点は変わりませんが、分析時間は 1A より長くなっています。この分離では、軽鎖および重鎖

のバンドの幅がわずかに広がっていますが、2 つの重鎖ピーク 1 および 2 は完全に分離されています。どちらの分離についても、移動相 A は水 (0.1 % TFA)、移動相 B は 1-プロパノール、アセトニトリル、水 (0.1 % TFA) の 80/10/10 混合液です。移動相 B について、100 % アセトニトリルなどの異なる溶離液組成を試してみましたが、図 1 および 2 に示すような満足のいくピーク形状は得られませんでした。軽鎖および重鎖を 4 分未満で分離するためには、上図の分離で用いた最適なセグメントのグラジエント条件 (表 1A) が必要でした。それに対して、より緩やかなグラジエント条件 (表 1B) は、2 つの重鎖変異型をベースラインで分離できるように最適化したものです。どちらの分離についても、各グラジエントの最後に、高速カラム洗浄ステップによりカラムの平衡化を高速化しました。これにより、高スループット分析と連続分析が実現しました。

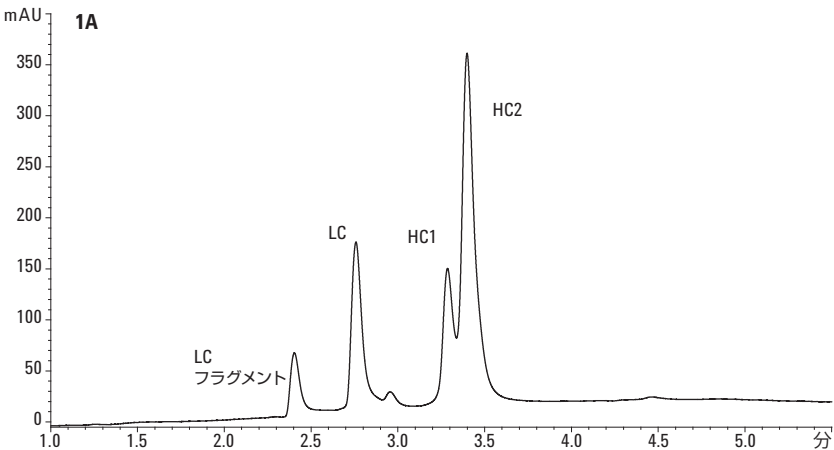


表 1A. スピードを最適化

グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	20	0
	35	3
	40	4
	40	5
	90	5.1
	90	5.5
	25	6

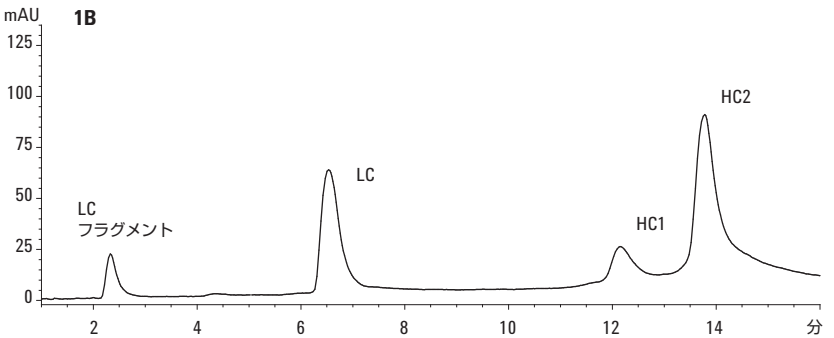


表 1B. 分離能を最適化

グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	25	0
	32	15
	32	16
	90	17
	90	17.5
	25	18

図 1. Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C8、1.8 μm カラム、2.1 x 100 mm を用いた還元およびアルキル化モノクローナル抗体の超高速分離に最適化した 2 つのグラジエントの比較。上図では、軽鎖および重鎖変異型を 4 分未満という短時間で分離しています。下図では、より緩やかなグラジエントプロフィールを用いた長い分析時間で、2 つの重鎖変異型をベースラインで完全に分離しています。どちらの分離も 75 °C でおこない、最後に 90 % 1-プロパノールによる高速洗浄手順を実施しました (UV は示さず)

高速拡張型 LC/MS 分析の移動相組成

ポジティブイオンモードの MS エレクトロスプレーイオン化では、シグナル抑制に大きな影響を与えるトリフルオロ酢酸 (TFA) の量を減らす必要があります。また、MS 分析では、シグナル強度を高める揮発性移動相添加剤による利点が得られます。したがって、MS 検出と組み合わせた逆相クロマトグラフィーのイオン対試薬としては、ギ酸 (FA) や酢酸 (AcOH) といった少量の有機酸が適しています。この研究では、LC/MS 分析でより高いシグナル強度が得られるように、従来の ACN/TFA のみのシステムに代わる選択肢として、有機移動相 B と各種のイオン対添加剤についていくつかの組み合わせを評価しました。イオン対試薬の濃度は 0.5 %~5 % の範囲で調整しました。移動相 B には、ACN、1-プロパノール、iso-プロパノール、もしくはそれらの組み合わせが含まれます。図 2A と 2B は、この研究で得られた上位 2 つの分離結果を示しています。既定のグラジエント条件 (表 2A および 2B) 下で、各分離が 5 分未満で完了する高速

分析をおこなえるように、軽鎖および 2 つの重鎖変異型の分離を完全に最適化しました。上図の分離は、図 1A および 1B と同じ移動相組成を用いて最適化していますが、TFA を 1.0 % から 0.05 % に減らし、0.5 % AcOH を加えています。この分離のグラジエントを表 2A に示しています。下図 (図 2B) は、より一般的な水/ACN グラジエントを用いていますが、TFA を 0.05 % に減らし、0.05 % FA を加えています。この分離では、2 つの重鎖変異型の選択性が 2A の分離と異なっています。1-プロパノールを用いた 2A の分離では、HC1 と HC2 のポジションが逆になっています。また、2B で同じグラジエント勾配と移動相組成を用いて、FA を省いた場合では、HC1 と HC2 が十分に分離されませんでした。mAb の超高速分析においては、FA を減らし、FA または AcOH を用いる各分離の条件を自由に修正することが可能です。このことは、LC/MS 分析のプロファイリングの代替策としての可能性を示しています。

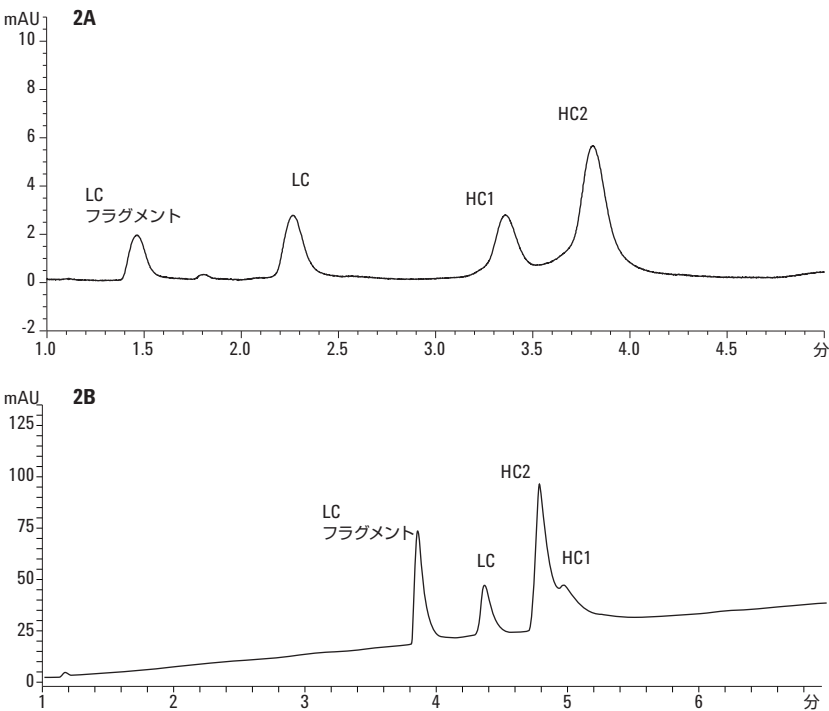


図 2. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8、2.1 x 100 mm カラムを用いた還元およびアルキル化抗体の超高速 LC/MS 分析における MS に適した移動相組成。上図 (2A) の分離では、図 1A および 1B と同じ移動相組成を用いていますが、MS 強度を高めるために酢酸を加えています。下図 (2B) では、より一般的な水/アセトニトリル移動相を用いていますが、シグナル抑制を抑えるために、TFA の量を減らし、ギ酸を加えています

表 2A. A: H₂O + 0.5 % AcOH/0.05 % TFA (v/v)
B: 1-プロパノール : ACN:H₂O (80:10:10) + 0.5 % AcOH/0.05 % TFA (v/v)

グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	25	0
	35	10
	35	12
	90	14
	25	18

表 2B. A: H₂O + 0.05 % FA/0.05 % TFA (v/v)
B: 1-プロパノール : ACN:H₂O (80:10:10) + 0.05 % FA/0.05 % TFA (v/v)

グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	25	0
	50	7
	90	8
	25	9

繰り返し mAB 分析の再現性と回収率

新しい ZORBAX RRHD SB C8、2.1 x 100 mm、1.8 μm カラムを用いて、表 3 のグラジエント組成および条件下で、還元モノクローナル抗体の分析間再現性と回収率を検証しました。カラム再現性と回収率を評価するために、250 回の連続カラム分析を実施し、注入 20 回ごとにポストランブランクとカラム背圧を検証しました。このライフタイムシーケンスのあいだ、カラムは繰り返し高压 (>700 bar) および高温 (75 °C) にさらされました。

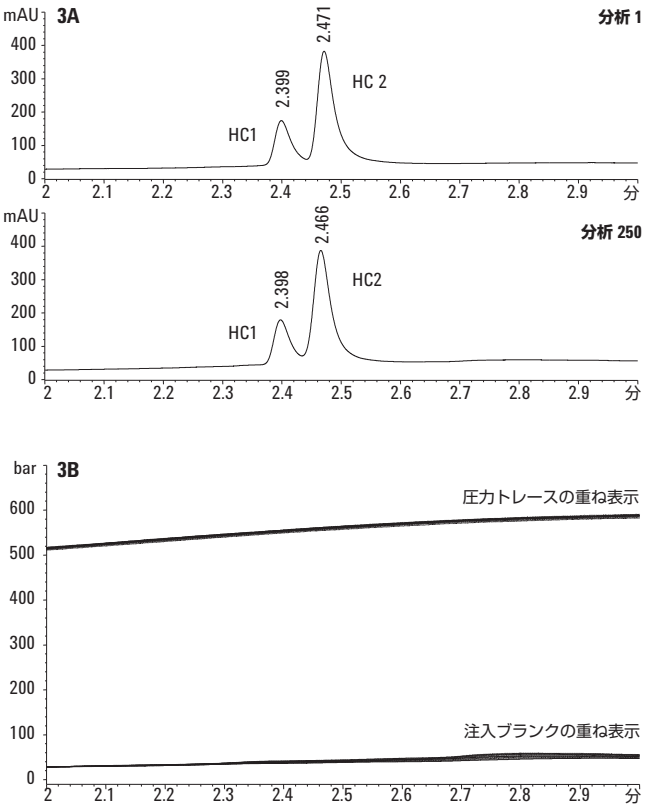


図 3A. 重鎖 1 と重鎖 2 のピーク形状およびリテンションタイムの再現性に関する分析 1 (上) と分析 250 (下) の比較

図 3B. 250 回繰り返し注入におけるブランク注入の UV および圧カトレースの 13 回重ね表示の比較。ブランクトレースはライフタイムシーケンスの注入 20 回ごとに採取

図 3A に示すように、重鎖変異型 1 および 2 の繰り返し分離では、優れた再現性が得られ、リテンションタイムやピーク形状に変化は見られませんでした。図 3B の下のクロマトグラムで示しているブランク分析の UV トレースの重ね表示からは、連続分析において残留 mAb のキャリーオーバーが生じていないことがわかります。また、3B 上図の圧カトレースの重ね表示では、繰り返し分析においてカラムの堅牢性が長期間保たれており、カラム内部の汚染やフリットのつまりに対する耐性が高いことが示されています。

表 3. mAb 繰り返し分析で用いた移動相とグラジエント

移動相	A. H ₂ O + 0.1 % TFA (v/v)	
	B. 1-プロパノール : ACN:H ₂ O (80:10:10) + 0.1 % TFA (v/v)	
グラジエント	% 溶媒 B	時間 (分)
	25	0
	35	10
	35	12
	90	14
	25	18

結論

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8、1.8 μm カラムを使えば、還元およびアルキル化モノクローナル抗体の超高速および高効率分離が可能です。最適化したグラジエント条件と高温の動作温度 (75 °C) に、堅牢な ZORBAX C8 コーティングケミストリを組み合わせることで、抗体の軽鎖および 2 つの重鎖変異型を高分離能かつ 4 分未満で分離できました。抗体の完全な分離、洗浄、再平衡化が可能になるように、グラジエント条件と組成を体系的に最適化し、分析時間を大幅に短縮しました。また、別の移動相添加剤 (ギ酸や酢酸など) を用いて超高速分析の分離を最適化することで、MS 感度を高めるための別の選択肢が得られました。

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

January 16, 2012

5990-9631JAJP



Agilent Technologies