

Native SEC-MS を使用した モノクローナル抗体 (mAbs) と mAb 由来治療の分析

凝集体の定量は、効能と免疫原性に対する影響の可能性を考慮すると、タンパク質ベースの治療において特に懸念されます。UV 検出と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、治療用タンパク質中に存在する凝集体量を測定するための標準的分析法です。ただし研究者の間では、精密な質量測定のために、SEC に高分解能 MS 手法であるネイティブ質量分析 (ネイティブ MS) を組み合わせることが増えています。¹ 一部の実験目標に対しては、MS は UV 以上に適切な検出技術となります。分子量の確認以外にも、ネイティブ MS 検出ではさらに、抗体薬複合体 (ADC) の薬物抗体比 (DAR) を測定し、翻訳後修飾 (PTM) の情報を提供します。

一般的に MS には逆相分離を組み合わせますが、mAbs の分析の場合には制限があります。逆相クロマトグラフィーで使用される低 pH と有機溶媒により mAbs が変性し、システインまたはリジン結合 ADC に見られるような、不安定な非共有結合や、酸に不安定な構造が解離します。SEC は、逆相技術に独自のメリットをもたらします。中性 pH の緩衝液入り移動相に使用すると、インタクトタンパク質の構造と不安定な共有結合または非共有結合が維持され、未変性状態での mAb の質量測定を行うことができます。SEC では特に不安定なシステイン結合 ADC 構造も維持されるため、MS データから DAR の計算が可能です。^{2,3}



SEC-MS に関連の課題：

- 高分子量 (HMW) および低分子量 (LMW) 不純物から、mAb モノマーの高分解能 SEC 分離を実現します。
- MS 検出に対応の SEC カラムおよび条件を確認します。そのため、次のような利点があります。
 - 固定相表面の結合が安定し、カラムブリードが発生しません。
 - MS での効率的な成分の脱溶媒をサポートする流量により、サンプルの凝集が発生しません。
 - 移動相が十分な揮発性を有し、低い塩濃度が高精度の質量測定を実現します。

SEC-MS 分析に Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用する理由

- 粒子径とポア特性は、ピーク形状、ピーク感度、分解能を向上させる重要な要素です。1.9 μm 粒子の AdvanceBio SEC カラムは、高分解能分離に最適なポアサイズと容量を備えています。
- SEC 樹脂の表面との二次相互作用は、分子によるポアの自由な通過や、サイズに基づく分離を妨害する可能性があります。独自の親水性相が実現する不活性な表面により、ADC や mAb との二次的疎水性相互作用を最小限に抑えられます。
- AdvanceBio SEC ハイブリッド粒子は最高性能のシリカとポリマー技術を採用しており、ブリードを防止するクラス最高レベルの機械的な堅牢性を備えているため、MS 検出器での使用に最適です。
- AdvanceBio 1.9 μm SEC カラムは、変性移動相条件（アセトニトリル/水/TFA など）と、MS 対応ネイティブ条件（80 mM 酢酸アンモニウム）の両方に対応しており、インタクトタンパク質 (>2,000 m/z) に非常に適した選択肢です。
- 小内径の 2.1 mm および 4.6 mm カラムは、成分の効率的な脱溶媒/イオン化に必要な低流量に対応しています。これは、精密質量測定を妨げる付加体の生成を最低限に抑制するために必要です。
- PEEK ライナ付き SS カラムハードウェアはサンプル流路からの金属を排除します。これにより、高精度の質量測定を妨げる付加体の生成を低減させる、低濃度の移動相緩衝液をより簡単に使用できます。

カラム選択の条件

SEC 実験における適切なポアサイズの選択は、分析対象物のサイズと実験目標によって異なります。ポアサイズの選択はタンパク質の分子量に基づき、より大きな分子量のタンパク質にはより大きなポアサイズが必要になります（図1）。AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムには 2 つのポアサイズがあります。低分子またはバッファ成分からタンパク質を分離することが目的の脱塩実験を実施する場合は、より小さなポアサイズで最大限の分離を得られます。この場合、タンパク質の分子量がカラムのサイズ上限よりも大きいカラムを選択すると、タンパク質の除外に有用です。

SEC-MS 実験目標の達成に役立ち、サンプルの制約に対応できる寸法の SEC カラムを選択します。

- シンプルな脱塩実験には 30 mm または 50 mm の短いカラムで十分である場合もあります。¹
- 長いカラムはより高い分解能を実現し、ダイマーからモノマー、またはフラグメントからモノマーを分離できます。
- 内径の小さいカラムでは必要な注入量がより少なく、サンプル量が限られている場合に有用です。
- 内径の小さいカラムでは最適な SEC 分離のために流量を低くする必要があり、ネイティブ MS における効率的な脱溶媒とイオン化に最適な流量と MS イオン源条件に対しより良好に対応します。
- PEEK ライナ付きカラムは、金属表面へのサンプルの接触を低減します。それにより、二次的反応が最小限に抑制されてピーク形状が向上し、比較的低濃度の揮発性移動相が可能です。²

Agilent AdvanceBio SEC カラムの使用：最高の性能と分離を実現するためのヒント

カラムの性能と洗浄

- カラム内径に流量を合わせます⁴ - より内径の小さいカラムは、最適な SEC 分離のために流量を低くし、カラムに過剰な圧力がかかるのを回避する必要があります。より内径の小さい 2.1 mm および 4.6 mm カラムは、効率的なサンプルの脱溶媒/イオン化が必要とされるネイティブ MS に最適です。
 - 使用流量⁵：
 - 4.6 \times 150 mm, 0.1 ~ 0.7 mL/min
 - 4.6 \times 300 mm, 0.1 ~ 0.5 mL/min
 - 内径 2.1 mm カラム, 0.05 ~ 0.10 mL/min
- フローランプ速度をデフォルト値から 1 mL/min² 以下に下げます。流量を徐々に上げることで、カラム寿命が延びます。アジレントのソフトウェアで、この設定は、LC ポンプコントロールの詳細設定セクションにあります。
- カラムに適合するように、LC メソッドの最大圧力上限を設定します（AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムには 620 bar）。これは、LC の最大圧力機能がカラムの圧力上限を超える場合に重要です。
- カラムをバックフラッシュしないでください。必ず矢印の方向にカラムをフラッシュし、圧力が 400 bar 未満になるように流量を調整します。

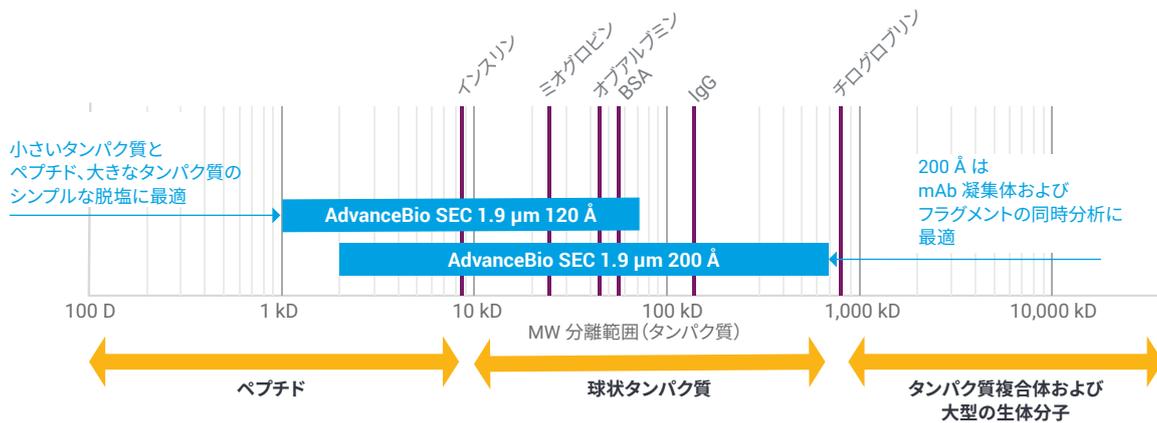


図1.分析対象物のサイズにより、使用する SEC ポアサイズが決まります。タンパク質が大きくなるほど、より大きなポアが必要です。

- カラム容量の最低 20 倍の洗浄液でフラッシュを行う前と行った後に、カラム容量の 5 倍以上の超純水ですすぎます。
- 適切な SEC 標準で定期的にシステム性能を検証してください。

クロマトグラフィー最適化

- サンプルをろ過し、微粒子を除去します。
- 特に複雑なサンプルや、「汚れた」サンプルを処理する場合は、カラム寿命を延ばすためにガードカラムやインラインフィルタを使用します。
- カラム接続が確実で、リークがないことを確認します。
- システムのデッドボリュームを最小化することで、サブ 2 μm SEC 粒子の分解能が最大限に向上します。1290 モデル LC に超低分散キットを設置することで、システムボリュームをさらに低減し、バンド幅の拡大を回避できます。⁶
- サンプル注入量を最小化することにより、クロマトグラフィー分離能が最大化します。カラム容量の 1 % の最大注入量で、1 ~ 5 μL のサンプル注入量が推奨されます。

MS メンテナンスと最適化

- 特に MS イオン源をクリーンに保つために大量の塩が溶出する可能性がある浸透限界点の周囲では、対象のリテンションタイム以外は LC の流路を廃液に切り替えます。
- HPLC グレード以上の溶媒を使用します。

- 酢酸アンモニウムなどの揮発性緩衝液を使用し、クロマトグラフィー分離能を維持してタンパク質構造を保つ最低の緩衝液濃度に SEC 移動相を最適化します。これにより MS イオン源がクリーンに保たれ、質量測定を妨げる付加体が最小限に抑えられます。
- 可能な場合は毎日、リントフリー布で MS イオン源をきれいに拭きま。必ずイオン源が高温でないことを確認してください。

カラムの保管

- 短期保管 (2 週間未満) - カラムは分析に使用した移動相で保管します。
- 長期保管 (2 週間以上) - ろ過された 100 mM リン酸ナトリウム (pH \leq 7.0、0.02 % NaN の有無は任意)、または 20 % メタノール水溶液でカラムを保管します。最低カラム容量の 10 倍以上でカラムをフラッシュします。メタノールまたはエタノールを導入する前に、必ず水でフラッシュすることを推奨します。20 % メタノールとの間で切り替える場合は、高い粘度によりカラムに過度な圧力がかかるのを防ぐために、低流量でフラッシュする必要があります。低流量から開始し、4.6 mm カラムには 0.1 mL/min 以下、2.1 mm カラムには 0.05 mL/min 以下でフラッシュします。必ず圧力を 400 bar 未満に維持します。カラムは室温で保管します。

参考文献

1. Sensitive Native Mass Spectrometry of Macromolecules using Standard Flow LC/MS (agilent.com) - [5994-1739EN](#)
2. 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 - [5994-3045JAJP](#)
3. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q TOF - [5994-2155EN](#)
4. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm Column User Guide - [5994-0739EN](#)
5. Analysis of Nanobodies Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm and AdvanceBio HIC Columns - [5994-1869EN](#)
6. Elevate Your mAb Aggregate Analysis - [5994-2709EN](#)

標準品、カラム、消耗品などの情報

Agilent オンラインストアで以下の表に記載の製品を注文するには、ヘッダーの MyList をクリックしてお気に入りの製品リストに製品を追加します。次に、必要な製品の数量を入力し、カートに追加してチェックアウトに進みます。今後のご注文のために、リストはお気に入りの製品の下に残ったままとなります。

お気に入りの製品を初めてご使用になる場合は、アカウント確認のために電子メールアドレスの入力が求められます。すでにアジレントのアカウントをお持ちの場合はログインできます。ただし、アジレントのアカウントをお持ちでない場合は、登録する必要があります。この機能は、e-コマースが有効である地域でのみご利用いただけます。すべての商品は、個々の製品番号をクリックするか、通常のアジレント営業所や販売店から注文できます。

説明	部品番号
サンプル前処理	
Captiva ディスポーザブルシリンジ、5 mL、100 個	9301-6476
Captiva プレミアムシリンジフィルタ、PES、15 mm、0.2 µm、100 個	5190-5096
標準	
Agilent NIST mAb、25 µL	5191-5744
Agilent NISTmAb、4 x 25 µL	5191-5745
300 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準	5190-9417
AdvanceBio SEC カラム	
120 Å カラム	
AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 µm、2.1 x 150 mm、PEEK ライナ付きステンレス製ハードウェア (推奨)	PL1980-3250PK
AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 µm、2.1 x 50 mm、ガード、PEEK ライナ付きステンレス製ハードウェア (推奨)	PL1980-1250PK
AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 µm、4.6 x 300 mm	PL1580-5250
AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 µm、4.6 x 150 mm	PL1580-3250
AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 µm ガード、4.6 x 30 mm	PL1580-1250
200 Å カラム	
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 µm ガード、2.1 x 50 mm、PEEK ライナ付き SS (推奨)	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 µm、2.1 x 150 mm、PEEK ライナ付き SS (推奨)	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 µm ガード、4.6 x 30 mm	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 µm、4.6 x 300 mm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 µm、4.6 x 150 mm	PL1580-3201
カラムフィッティングとコネクタ	
Agilent InfinityLab クイックコネクタフィッティング (カラム入口接続用)	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックコネクタキャピラリー MP35N 0.12 x 105 mm (クイックコネクタフィッティング用)	5500-1578

説明	部品番号
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム接続用、入口と出口の2個必要)	5067-5966
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用)	5500-1596
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
キャピラリー MP35N 0.17 x 100 mm SL/SL ps/ps (ガードおよびカラム接続用)	5500-1278
超低分散キット	
超低分散チューブキット、Agilent 1290 Infinity II LC 用	5067-5963
超低分散チューブキット、Agilent 1290 Infinity II Bio 用*	5004-0007
サンプル容器	
A-Line スクリューバイアル、2 mL、12 x 32 mm (12 mm キャップ) 茶色、ラベル付、100 個	5190-9590
スクリューキャップ、12 mm、圧着、青色、PTFE/白色シリコンセパタム、100 個	5190-7021
バイアルインサート、250 µL、5.6 x 30 mm、不活性化ガラス、樹脂足付、100 個	5181-8872
InfinityLab ウェルプレート 96/0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab マイクロプレートウェルプレート用クロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒と添加物	
InfinityLab Ultrapure LC/MS 純水、1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS MeOH、1L (カラム保管用)	5191-4497
ギ酸、5 mL	G2453-85060
溶媒ろ過消耗品 †	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
溶媒処理用消耗品	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティバージボトル、1 L	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 なし)	5043-1221
InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g (5043-1221 に使用)	5043-1193

* 1290 Infinity II Bio システムに推奨。

† この表に記載されていない溶媒を使用する場合は、分析の前に InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリを使用してください。

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, October 12, 2021
5994-4200JAJP
DE44462.6107060185