

細胞培地の上清からの モノクローナル抗体混合物の 多次元 HPLC 分離

治療用モノクローナル抗体 (mAb) は複雑な構造を有しており、分析が非常に困難です。システム上で複数の分析技法を組み合わせることにより、分子量 (MW)、アミノ酸配列、N-グリコシル化、N- および C-末端処理、脱アミド化、酸化、フラグメンテーション、凝集など、同時マルチ特性分析 (MAA) が可能になります。¹

自動 2D-LC/MS マルチ特性アナライザに、一次元目ではプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーを、二次元目ではマルチメソッドオプション (SEC、CEX、または HIC)、三次元目ではグリカン分析のための脱塩 SEC-MS を組み合わせます。²⁻⁶ この設定により、細胞培地の上清からの mAb の精製、および mAb 抗体価、サイズ/電荷/疎水性変異体、分子量、アミノ酸配列、翻訳後修飾の同定が可能です。この設定では、分離能に影響を及ぼすことなく、異なる 2D メソッドを自動で切り替えることができます。



2D-LC 初心者の場合	アジレントでは、新規ユーザーを対象に、2D-LC ProtA-SEC アプリケーションに関する 2 日間の対面式トレーニングを実施します。サービスパッケージ (部品番号 R3995C) の日本での販売についてはお問い合わせください。
2D-LC を自分で試してみたい場合	アジレントでは、カラム、標準のほか、アプリケーションノート、ワークフローガイド、メソッドファイル、レポートテンプレートを含むメディアキットで構成された InfinityLab 2D-LC ProtA-SEC キット (部品番号 G4245A) をご用意しています。詳細については、最寄りの販売店にお問い合わせください。

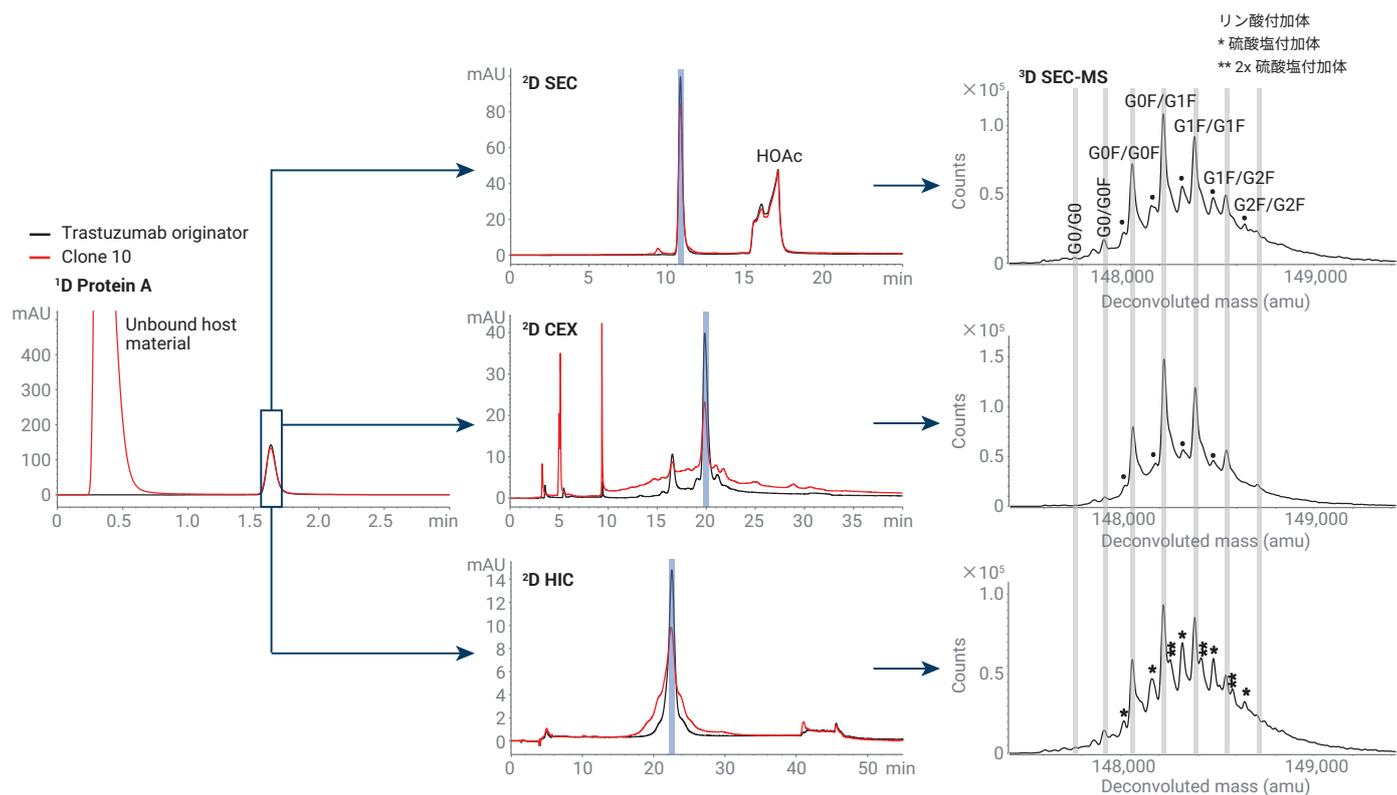


図 1. (A) トラスツズマブ先発薬および CHO クローン 10 の上清の 1D プロテイン A クロマトグラム。(B) 1.6 分におけるプロテイン A ピークの 2D SEC、CEX、HIC クロマトグラム。(C) トラスツズマブ先発薬のメイン 2D SEC、CEX、HIC ピークのデコンボリュートした 3D SEC-MS スペクトル。採取された 2D ハートカットは青で示されています。(詳細は、アプリケーションノート 5994-3521EN をご覧ください)

2D および 3D 分離を最適化するためのヒント

- モノクローナル抗体サンプルには、250 μ L インサート (部品番号 5182-0549) 付きのアジレントのポリプロピレン (PP) バイアル (部品番号 5191-8150)、または 400 μ L インサート (部品番号 5183-2086) 付き不活性化ガラスバイアル (部品番号 5182-0714) を使用します。生物学的化合物または医薬品化合物には不活性化ガラスバイアルを、ガラスバイアルが適切でない場合は PP バイアルの使用を推奨します。
- 必ず HPLC グレード、ACS グレード、または試薬グレードの高品質の化学物質を使用します。

- 必ず 0.22 μ m または 0.45 μ m メンブレンフィルタでバッファ移動相をろ過します。0.22 μ m メンブレンは主に溶液の滅菌に使用し、0.45 μ m メンブレンは通常、粒子の除去や一般的なろ過に使用します。ナイロンメンブレンは親水性で、広範な有機溶媒に対し耐性があり、高 pH サンプルの使用に最適です。酸性溶液には適していません。再生セルロースメンブレンは、水溶性および有機サンプルに適した広範な溶媒に対して耐性があります。
- pH 計をチェックしてキャリブレーションし、バッファを測定する前に pH 精度を確保します。必要に応じて再キャリブレーションします。

サンプル調製

- サンプルは溶出液に溶解させる必要があります。できれば移動相そのものに溶解させるのが理想的です。
- カラムを損傷から保護するために、Captiva プレミアム PES シリンジフィルタを使用してサンプルをろ過することを推奨します。

カラム

プロテイン A カラムの保管⁷⁻⁸：

- 短期（終夜または 2 日間以内）：
 - 結合バッファを使用してカラムをフラッシングします（移動相 A）。
 - 機器からカラムを取り外します。
 - 4～8℃で保管する前にカラムにキャップを取り付けます。短期保管後に初めて注入を行う前に、カラムを平衡化する必要があります。
- 長期（2 日間以上）
 - 1 mL（カラム容量（CV）の 10 倍）以上の脱イオン水を使用してカラムをフラッシングします。
 - 後で、2 mL（20 CV）以上の 20 % エタノール溶液と 20 mM トリスバッファ、pH 7.4、流量 0.2～0.5 mL/min でフラッシングします。
 - 4～8℃で保管する前にカラムにキャップを取り付けます。

SEC カラムの保管：

- 短期保管（1 週間以内）
 - 両端にキャップを取り付けた状態で、移動相でカラムを保管します。
- 長期保管（1 週間以上）
 - ろ過された 100 mM リン酸ナトリウム、pH ≤ 7 で、0.02 % NaN₃ を使用または使用せずに保管するか、または 20 % メタノール水溶液で保管します。
 - カラム容量の 10 倍以上でカラムをフラッシングします。
 - 20 % メタノールとの間で切り替えるには、高い粘度によるカラムへの過剰な圧力を防ぐために、カラムのフラッシングは低流量で行う必要があります。
 - 低流量から開始し、4.6 mm カラムの場合は 0.1 mL/min 以下、7.8 mm カラムの場合は 0.2 mL/min でフラッシングし、圧力を 200 bar 未満に維持します。

Bio MAb カラムの保管：

- 短期保管（1 週間以内）20 mM リン酸バッファ、pH 6.0。
- 長期保管：20 mM リン酸バッファ（出荷時の溶媒）と 0.1 % NaN₃（アジ化ナトリウム）を用いて、pH 6.0 でフラッシングします。カラム容量の 15 倍以上でフラッシングします。

AdvanceBio HIC カラムの保管：

- 短期保管（終夜）：塩含有バッファでカラムをフラッシングします。
- 長期保管：カラムから塩含有移動相をフラッシングし、カラムを 100 % のアセトニトリルに移します。

カラム、消耗品などの情報

このガイドには、適切に設定されたシステムによる 2D-LC 分析に必要なカラムと消耗品がすべて記載されています。¹

すべての商品は、通常のアジレント営業所や販売店から注文できます。

アプリケーションノートで使用されているクロマトグラフィーカラム (5994-3521EN)

説明	部品番号
バイオモノリスプロテイン A、4.95 x 5.2 mm	5069-3639*
バイオモノリス遺伝子組み換えプロテイン A、4.95 x 5.2 mm	5190-6903**
Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 x 300 mm、2.7 μm	PL1180-5301
Agilent Bio MAb NP5 PK、2.1 x 250 mm、5 μm	5190-2411
Agilent AdvanceBio HIC、4.6 x 100 mm、3.5 μm	685975-908

*このカタログのデータ取得に利用したカラム

**バイオモノリスプロテイン A カラムと同等の性能を示すカラム詳細は、アプリケーションノート「Agilent Bio-Monolith rProtein A カラムによる 60 秒での mAb 抗体価測定⁷」をご覧ください。

標準およびコントロール

説明	部品番号
130 Å AdvanceBio SEC 標準溶液	5190-9416
300 Å AdvanceBio SEC 標準溶液	5190-9417
Agilent-NISTmAb、4 x 25 µL	5191-5745

サンプル調製およびラボの消耗品、試薬、溶媒

説明	部品番号
サンプルろ過	
Captiva ディスポーザブルシリンジ、5 mL、100 個	9301-6476
Captiva シリンジフィルタ、ポリエーテルスルホン (PES) メンブレン、4 mm、0.45 µm、LC/MS 認定、100 個	5190-5095
Captiva シリンジフィルタ、ポリエーテルスルホン (PES) メンブレン、4 mm、0.2 µm、LC/MS 認定、100 個	5190-5094
溶媒および試薬	
InfinityLab Ultrapure LC/MS アセトニトリル、1 L	5191-4496
InfinityLab UltraPure LC/MS 標準、水、1 L	5191-4498
MS ソリューション、ギ酸、10 mL	US-700002341
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
フィルタメンブレン、ナイロン 47 mm、0.45 µm、100 個	5191-4338
フィルタメンブレン、ナイロン 47 mm、0.2 µm、100 個	5191-4341
フィルタメンブレン、再生セルロース 47 mm、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

説明	部品番号
溶媒取り扱い消耗品	
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	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き**	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab チャコールフィルタ、58 g**	5043-1193
バイアルおよびキャップ†	
バイアル、スクリユー、2 mL、ポリプロピレン、認定、100 個	5191-8150
9 mm スクリュー型透明ポリプロピレンキャップ、100 個	5191-8151
250 µL インサート、ポリプロピレン、100 個	5182-0549
不活性化ガラスバイアルインサート、400 µL、不活性化ガラス、平底、500 個	5183-2086
キャップ、スクリユー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個	5182-0717
不活性化ガラスバイアル、スクリユートップ、透明、認定、2 mL、100 個	5182-0714

* 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。

** 廃液ボトルには活性炭フィルタが含まれていません。5043-1221 と 5043-1193 を一緒にご注文ください。

† デッドボリュームを最小限に抑制するために、アジレントでは 2 mL ポリプロピレンバイアル (部品番号 5191-8150) に 250 µL バイアルインサート (部品番号 5182-0549) を使用することを推奨しています。

関連情報

- Two-Dimensional Liquid Chromatography Principles, Practical Implementation and Applications authored by Peter W. Carr and Dwight R. Stoll ([5991-2359EN](#))
- Determination of Multiple Attributes of Monoclonal Antibodies ([5994-3521EN](#))
- Automated Monoclonal Antibody Subunit Analysis by Online Reduction Using 2D-LC/MS ([5994-4309EN](#))
- Multiple Heart-Cutting 2D-LC Analysis of Innovator versus Biosimilar Monoclonal Antibodies ([5991-6673EN](#))
- Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution user guide ([G2198-90001](#))
- [Agilent Heart-cutting 2D-LC Software Tutorial](#)
- Agilent Bio-Monolith rProtein A カラムによる 60 秒での mAb 抗体価測定 ([5994-3969JAJP](#))
- Agilent Bio-Monolith Protein A and G Columns Data Sheet ([5991-6040EN](#))

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。

DE25871361

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, January 21, 2022

5994-4351JAJP