

UNIFI 科学情報システムによる 2D-LC/MS を用いたモノクローナル抗体の抗体価および一次構造特性の基準に準拠したモニタリング

Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

この研究では、2D-LC/MS を用いてモノクローナル抗体（mAb）の抗体価を評価し、生成物の質量とグリコシル化プロファイルの両方を確認しました。1D 力価測定と 2D プロダクトプロファイリング用に構成された、MS 検出器を備えた 1 つのプラットフォームでのデータ収集が簡便に行えることを実証しています。

アプリケーションのメリット

- 互換性のない分析法の 2D 結合により、質量検出機能を改善。
- 光学検出および/または MS 検出を備えた 1 つのプラットフォームで 1D および 2D 分析法を用いた分析の柔軟性を実証。
- コンプライアンス対応の UNIFI ソフトウェアによるデータ取り込みおよび解析の自動化。

はじめに

2 次元液体クロマトグラフィー（2D-LC）は、バイオ医薬品業界の多くのアプリケーションで使用されています。医薬

品がより複雑になり、新しい医薬品が模索される中で、情報に基づいた意思決定を下すために、高品質のデータが得られる高性能な分析法および装置に対する需要が高まっています。業界のイニシアチブにより、規制環境における分析法の堅牢性と、操作の改善に対する追加要件も推進されています。このような要求の進化に対処するために、コンプライアンス対応の UNIFI インフォマティクス内で作動する高分解能質量分析を備えた 2D-LC の性能が実証されています。単一のハートカットを用いたプロテイン A アフィニティー逆相クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせ（Pro A-RPLC-MS）により、抗体価と一次構造の特性を評価しました。実験は分かりやすく設計されており、Pro A を様々な 2 次元分析とうまく組み合わせた複数の文献報告をもとに開発されました^{1~3}。

光学検出を備えたプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーは、細胞培養基材から精製した Fc 含有分子の定量に、従来から使用されています。分析スケールでは、このアッセイがクローンの選択に重要です。ここでは最も高い産生能をもつ細胞株が最も望まれます。高力価が確認された後、製品品質特性を評価する追加のアッセイも行います。一般的なアプローチでは、分取スケールのクロマトグラフィーまたはプレートによる固相化処理、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、イオン交換クロマトグラフィー（IEX）などの 1 次元（1D）アッセイを使用して、治療用分子のサンプルを細胞培養から精製します。その後、その精製品を使用して、逆相インタクト質量分析を実行します。2 次元（2D）アプローチを使用することで、煩雑なサンプル処理や下流工程が不要になります。

この研究では、2D-LC/MS を用いてモノクローナル抗体（mAb）の抗体価を評価し、生成物の質量とグリコシル化プロファイルの両方を確認しました。1D 力価測定と 2D プロダクトプロファイリング用に構成された、MS 検出器を備えた 1 つのプラットフォームでのデータ収集が簡便に行えることを実証しています。

実験方法

サンプル調製

21 mg/mL のトラスツズマブ製剤を使用して、濃度 4 mg/mL のトラスツズマブ 0.1% ギ酸水溶液（v/v）のストック溶液を調製しました。1D Pro A 試験で、光学検出限界に達するまで、2 倍希釈系列を調製しました。

LC 条件

システム：	2D テクノロジー搭載 ACQUITY UPLC I-Class PLUS
	クォータナリーソルベントマネージャ（QSM）（1 次元目）
	バイナリーソルベントマネージャ（BSM）（2 次元目）

)

検出器:	ACQUITY UPLC TUV 検出器 (1 次元目)
波長:	280 nm
サンプル温度:	6 °C
注入量:	2 µL

プロテイン A (1 次元目)

カラム:	POROS A 20 µm カラム、2.1 × 30 mm
カラム温度:	25 °C
流量:	1.000 mL/min
移動相 A:	50 mM リン酸、150 mM NaCl、pH 7
移動相 B:	500 mM 酢酸

グラジエント:

時間 (分)	流速 (mL/分)	MPA (%)	MPB (%)	曲線
0.00	1.000	100.0	0.0	
1.50	1.000	100.0	0.0	6
1.51	1.000	0.0	100.0	6
4.50	1.000	0.0	100.0	6
4.51	1.000	100.0	0.0	6
9.00	1.000	100.0	0.0	6

逆相 (2 次元目)

カラム: XBridge Protein BEH C₄、300 Å、3.5 μm、4.6 × 50 mm (製品番号: 186004502)

カラム温度: 80 °C

流量: 0.500 mL/分 (待機中流量 0.100 mL/分)

移動相 A: 0.1% ギ酸水溶液 (v/v)

移動相 B: 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v)

グラジエント:

時間 (分)	流速 (mL/分)	MPA (%)	MPB (%)	曲線
0.00	0.500	95.0	5.0	
1.00	0.500	95.0	5.0	6
3.50	0.500	50.0	50.0	6
5.00	0.500	50.0	50.0	6
5.50	0.500	5.0	95.0	6
7.50	0.500	5.0	95.0	6
7.60	0.500	95.0	5.0	6
10.00	0.500	95.0	5.0	6

MS 条件

システム:	Vion IMS QTof
イオン化モード:	ESI+, 感度モード
質量範囲:	m/z 750~4,000
キャピラリー電圧:	2.75 kV
コーン電圧:	140 V
ソース温度:	150 °C
脱溶媒温度:	600 °C

脱溶媒ガス流量:

600 L/時間

ロックマス:

2.2 pmol/ μ L Glu フィブリノペプチド B、50/50 水/アセトニトリル、0.1% ギ酸 (v/v)

データ管理

UNIFI 科学情報システム v1.9.4

Vion IMS QToF ドライバーパック 2.2.0

結果および考察

モノクローナル抗体の 1D 定量

光学検出を搭載した Pro A は、mAb の抗体価を評価するための、スタンドアローンでハイスループットの分析法としてよく使用されています。従来の 1D 力価アッセイでは、精製した標準試料を用いて検量線を作成し、定量のために線形回帰計算を行いました。図 1 に示した検量線は、トラスツズマブの希釈系列 (0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mg/mL) から作成したものです。希釈系列による注入の重ね書きにより、保持時間に再現性があることがわかります。注入のピーク面積 (TUV @ 280 nm) 対濃度 (mg/mL) のプロットは高い相関性を示していますが、このアッセイにおいては典型的に見られるものです (挿入図)。

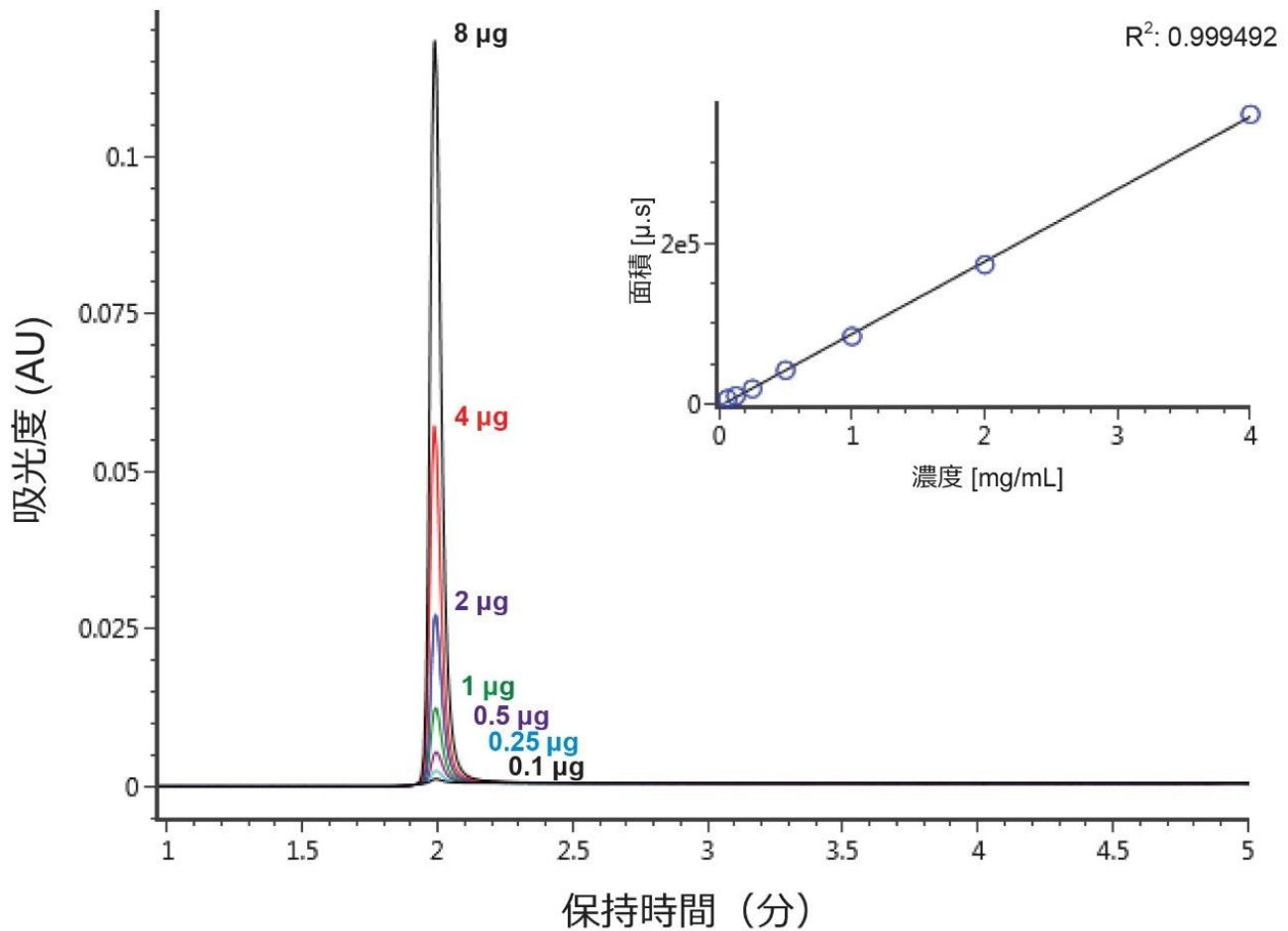


図 1. トラスツズマブ標準試料のプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー。段階希釈の重ね書きにはロード量
が示されています。サンプルは 0.05～4 mg/mL で調製しました。これは、0.1～8 µg（注入量 2 µL）のロード量に相当
します。検量線（挿入図）から、この範囲でピーク面積と濃度が直線的な関係にあることがわかります。

インタクト mAb の RPLC-MS 分析は、バイオ医薬品の質量確認および生成物グリコシル化のプロファイルを迅速に提供することができ、クローン選択、プロセス開発、プロセスモニタリングを支援します。Pro A バッファの成分は直接は質量分析に適合していませんが、2D テクノロジーを使用して、分析種を 1 次元目から 2 次元目カラムに選択的にハートカットすることで、MS に適した移動相で 2 次元目の分離を実行できます。

UNIFI 内での 2D システムの構成は分かりやすく、システムが作成された後は、ユーザーはシステムを従来の 1D アッセイと 2D ワークフローの間で容易に切り替えることができます。[管理] タブから [デバイス管理] にアクセスして、2D システムを設定できます（図 2）。1 次元目のコンポーネントを新しいシステムに追加し、次に 2 次元目のコンポーネントを追加する必要があります。その後は、UNIFI 内でこの順序で割り当てることで同定が容易になります。これ

は、分析法がより複雑になり、追加のポンプを組み込んだ場合や、複数のハートカット分析にトラップカラムを収容する 2 台目のカラムマネージャが必要な場合に特に有用です。

デバイス管理 → 装置システム

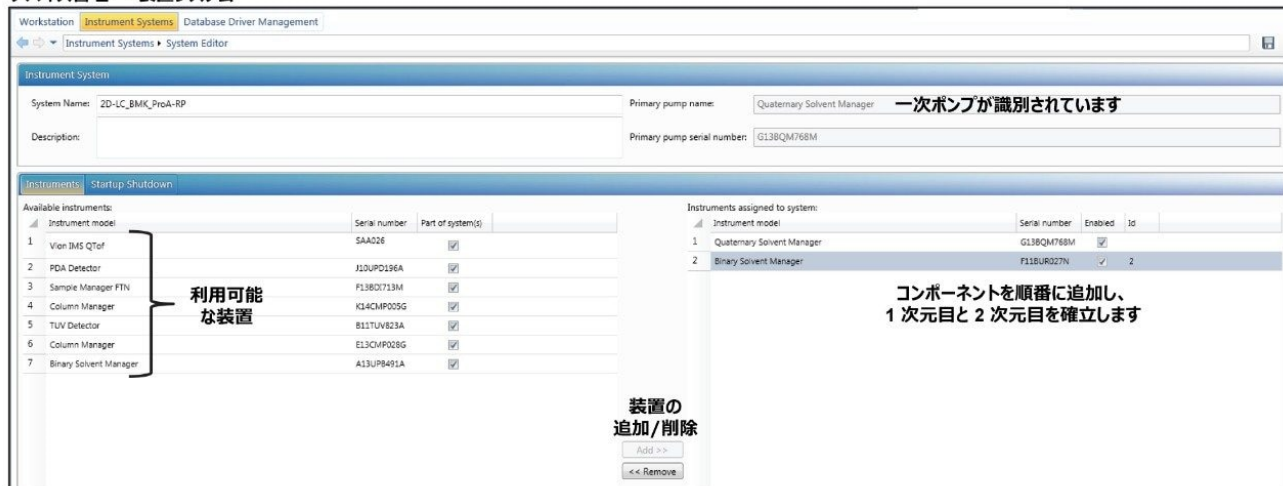


図 2.2D システムの構成。利用可能な装置コンポーネントをリストから簡単に追加または削除することで、クロマトグラフィーシステムを構成します。1 次元目および 2 次元目のモジュールを「順番に」追加することで、それぞれを区別することができます。1D および 2D ワークフロー用にそれぞれ独立したシステムを作成しておき、データの収集前にユーザーが選択することができます。

図 3 に示したシステム構成により、ユーザーは従来の 1D ワークフローで切り替えたり（図 3A）、既存のシステムを変更して、一連のバルブスイッチをプログラミングすることで（システムチューブ接続を変更せずに実行できる）、2D ワークフローに対応することができます。このように、1D 力価アッセイは、質量情報が不要な場合のハイスルーブットスクリーニングに大いに役立ちます。同定が必要な場合は、分析種の 2 回目の注入を行い、ハートカットを 2 次元目に変換することができます（図 3B）。ハートカットウィンドウが決定されると、1 次元目と 2 次元目の流路が At-Column Dilution (ACD) によって結合されます。バルブ位置を元の位置に戻すと、流路が再び分けられ、2 次元目の分離を実行できます（図 3C）。

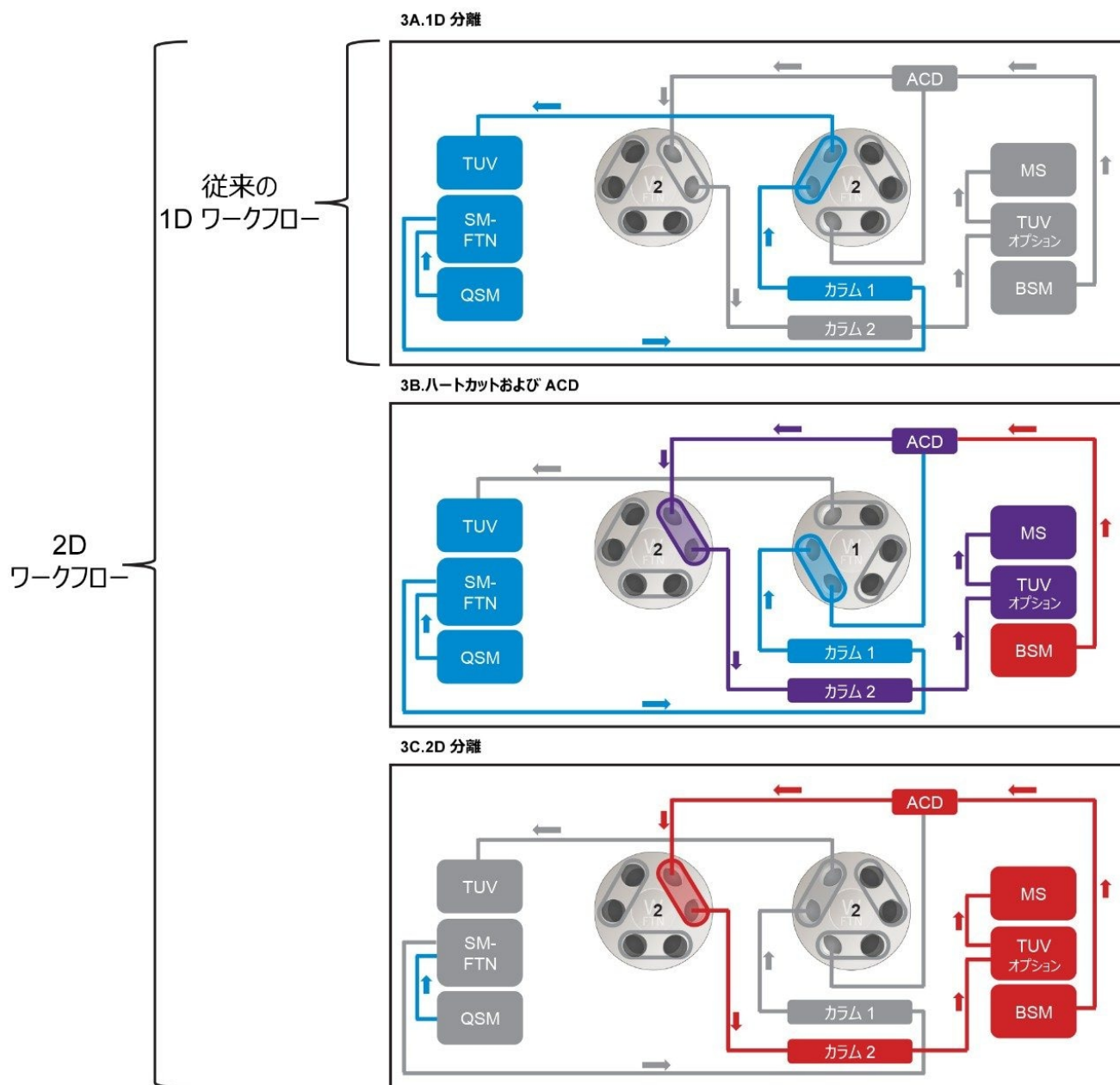


図 3.1D および 2D ワークフローのシステム構成。流路は、従来の 1D アッセイの光学検出器に向けられます（3A）。2D ワークフローでの保持時間の再現性モニタリングにもこれと同一の構成が使用されます。目的の分析種が 1 次元目のカラムから溶出するタイミングが決定されると、流路は 2 次元目（3B）に再度向けられます。ACD が動作し、MS に適した移動相でサンプルを洗浄します。その後、流路が再び分けられ、2 次ポンプを使用して 2 次元目の分離が行われます（3C）。2 次元目の分析では、追加の TUV 検出器をインライン配置できます。これは、分析法開発時のトラブルシューティングに役立ちます。カラム 2 からの移動相を、光学検出器をバイパスして直接 MS に流すこともできます。

UNIFI で 2D システムを構成した後、独立した 1D および 2D メソッドを作成できます。[分析メソッド] で、[取り込みメソッド名] フィールドがサンプルリストの設定に追加され、データの取り込みに適切なメソッドを選択できるようになります (図 4A)。複数のハートカットを用いた分析での脱塩または独立分析のために、追加のメソッドを作成することもできますが、Pro A-RPLC-MS 分析ではこれらの追加のステップは必要ありません。個々のメソッドを作成したら、サンプルセットを作成して (図 4B)、分析内のすべてのメソッドの実行を自動化することができます。

4A. 分析メソッド → サンプルリスト

4B. サンプルセット → 取り込み

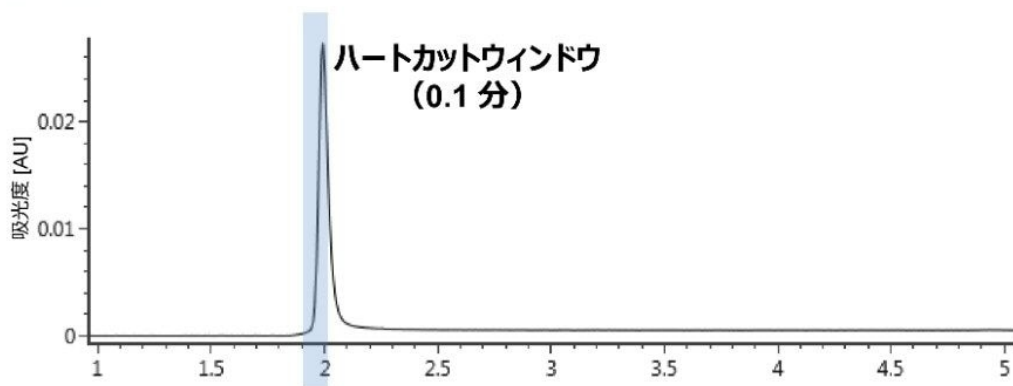
図 4.2D データ収集用のメソッドの作成。独立した 1D および 2D 分析メソッドを作成できるように、分析メソッドに [取り込みメソッド名] フィールドを組み込む必要があります。このフィールドがプロモーションパラメーターとして選択されると、ユーザーは個々の取り込みメソッドをキューに入れることができます。示されているメソッドは、1D Pro A、1D Pro A ハートカット、および 2D RPLC-MS 用です。

Pro A-RPLC/MS ワークフロー

図 4 に詳細に示されているメソッドを使用し、Pro A 1D 法を使用して mAb の力価を決定しました (図 5A)。光学検出によるトレースのピーク面積を使用して、図 1 に示した検量線からサンプル濃度を計算しました。この例では、サンプル濃度は約 1 mg/mL と決定されました。同様の光学検出によるトレースを使用して、LC-MS 分析のために分析種を 2 次元目に移動するためのハートカットウィンドウも決定しました。2 回目の注入では、0.1 分間のハートカットウィンドウ (1.9~2.0 分) を選択して、インラインの 2 次元目のカラムに分析種を移しました。サンプルセットの 3 番目の列では、流路が再び分けられ、2 次元目のカラムのヘッドに吸着している分析種を洗浄するために 10 分間のアイソクラティック保持が組み込まれ、プロテイン A バッファの混入物が除去されます。洗浄ステップの後、10 分間の

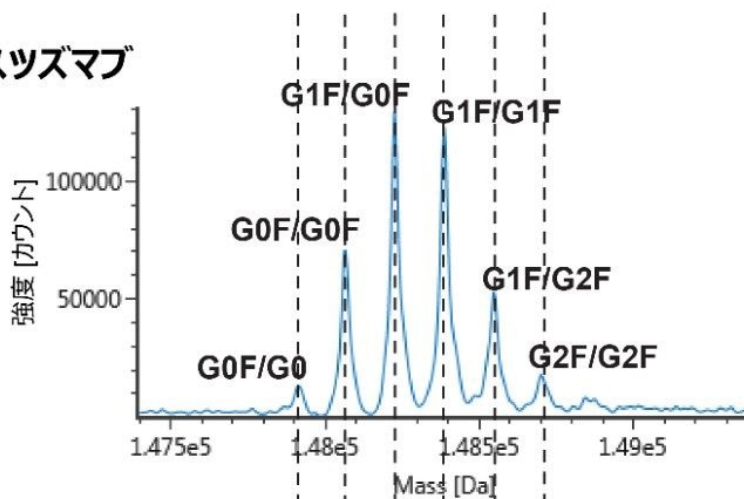
RPLC-MS グラジエントメソッドを実行しました。図 5B は、トラスツズマブの標識グリコフォームのデコンボリューションデータです。この質量データは、レファレンス標準試料から計算された予測質量と比較することで、サンプルの同定に使用できます。グリコシル化パターンのモニタリングは、バイオシミラー候補物質のスクリーニングの最適化、プロセス開発の意思決定のガイドとして、あるいは製造ラインにおける分析にデータを提供する目的でルーチンに使用できます。

5A. 1D TUV



5B.²D デコンボリューション

トラスツズマブ



NIST mAb

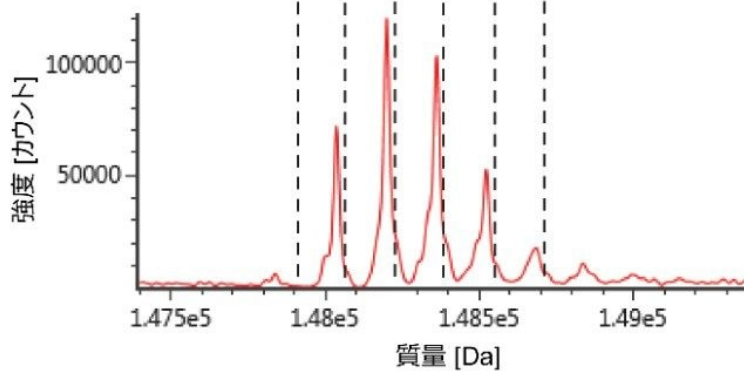


図 5. Pro A-RPLC-MS ワークフロー。プロテイン A を用いて、図 1 に示した検量線にピーク面積を関連付けることで、

mAb の力価を決定できます。次に、0.1 分間のハートカットウィンドウを使用して、MS データを収集するために 2 次元目に分析種を移しました。結果として得られたデコンボリューションされたスペクトルは、同定されたグリコフォームとともに示されています。トラスツズマブと *NIST mAb* を比較することで、質量および相対存在量の変化が認められます。

結論

この研究では、一般的な装置プラットフォームを使用し、従来の 1D アッセイを拡張して 2D 機能を組み込む方法を示します。UNIFI 科学情報システムでは、システムの構成を最初に完了した後、装置を物理的に変更することなく、必要に応じて 1D と 2D のワークフローを自動的に切り替えることができます。Pro A-RPLC-MS アッセイを使用し、2D ハートカットアプローチにより、MS に適合しないマトリックスから MS に適した移動相へ分析種を移して、1 回の自動分析で質量情報も取り込めるようにすることができました。

参考文献

1. Prentice, K. M.; Wallace, A.; Eakin, C. M. Inline Protein A Mass Spectrometry for Characterization of Monoclonal Antibodies. *Anal. Chem.* 2015, 87, 2023–2028.
2. Williams, A.; Read, E. K.; Agarabi, C. D.; Lute, S.; Brorson, K. A. Automated 2D-HPLC Method for Characterization of Protein Aggregation with In-Line Fraction Collection Device. *J. Chromatogr. B* 2017, 1046, 122–130.
3. Sandra, K.; Steenbeke, M.; Vandenheede, I.; Vanhoenacker, G.; Sandra, P. The Versatility of Heart-Cutting and Comprehensive Two- Dimensional Liquid Chromatography in Monoclonal Antibody Clone Selection. *J. Chromatogr. A* 2017, 1523, 283–292.

ソリューション提供製品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[Vion IMS QToF イオンモビリティ四重極飛行時間型質量分析計 <https://www.waters.com/134845751>](https://www.waters.com/134845751)

[UNIFI 科学情報システム <https://www.waters.com/134801359>](https://www.waters.com/134801359)

[ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

720006691JA、2019 年 10 月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)