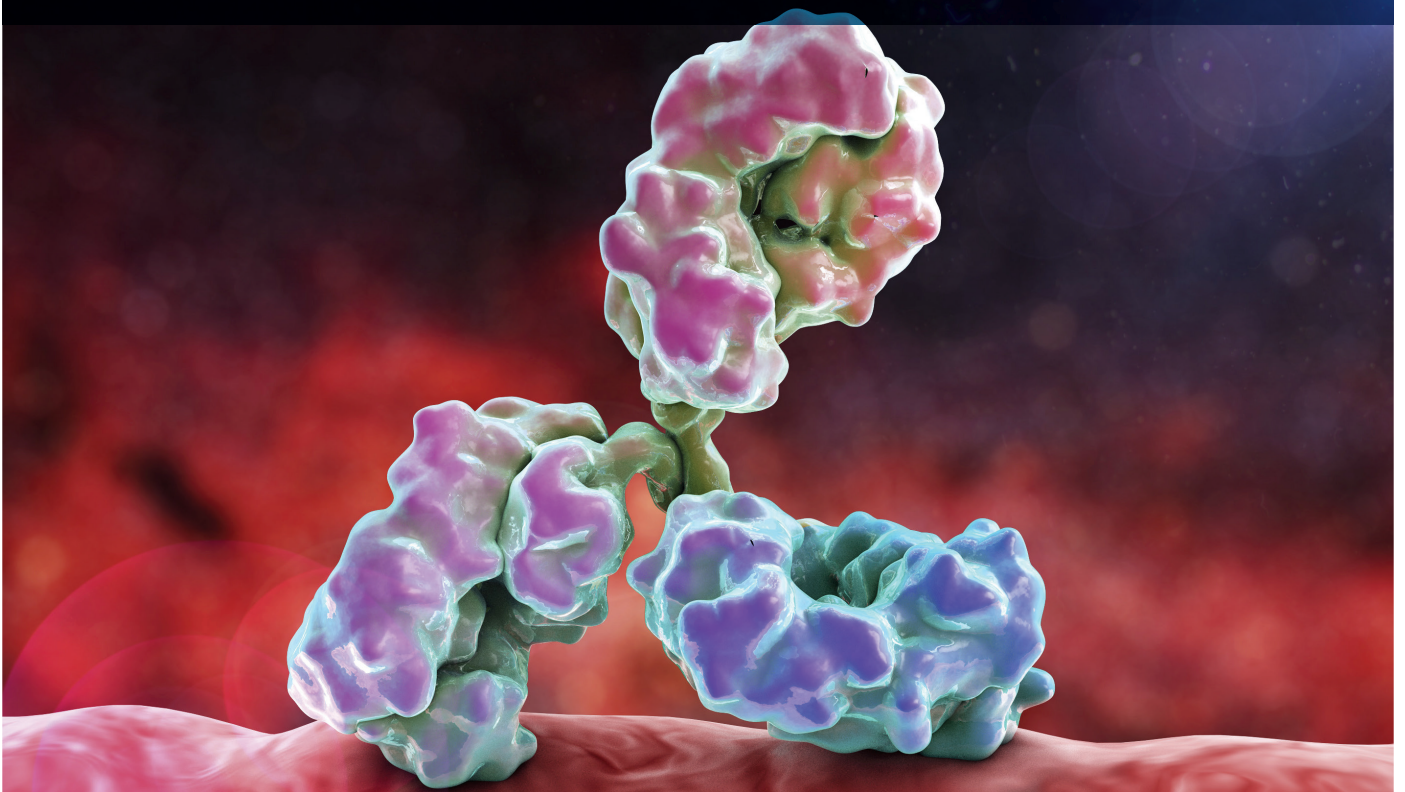


アジレントバイオカラム

バイオ医薬品の重要品質特性 CQA: Critical Quality Attributes

アプリケーション総覧



目次

はじめに

1 抗体価の測定

- 1.1 背景
- 1.2 概要
- 1.3 アフィニティークロマトグラフィーによる抗体価測定: 分析の手引き
- 1.4 関連するアプリケーションノート
- 1.5 バイオモノリスプロテイン A カラムと LC/MS を用いた
細胞クローン選択 - 5991-5124JAJP
- 1.6 mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column
- 5991-5135EN
- 1.7 その他のアプリケーションノート
- 1.8 追加情報

2 インタクトおよびサブユニットの純度

- 2.1 背景
- 2.2 概要
- 2.3 関連するアプリケーションノート
- 2.4 Fast and High Resolution Analysis of Intact and Reduced
Therapeutic Monoclonal Antibodies (mAbs) - 5991-6274EN
- 2.5 Disulfide Linkage Analysis of IgG1 using an Agilent 1260 Infinity
Bio-inert LC System with an Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl
sub-2 μm Column - 5991-1694EN
- 2.6 Determination of Drug-to-Antibody Distribution in Cysteine-Linked
ADCs - 5991-7192EN
- 2.7 その他のアプリケーションノート

3 ペプチドマッピング

- 3.1 背景
- 3.2 概要
- 3.3 ペプチドマッピング: 分析の手引き
- 3.4 関連するアプリケーションノート
- 3.5 High-Resolution Mapping of Drug Conjugated Peptides
in an ADC Digest- 5991-6191EN
- 3.6 Analysis of Tryptic Digests of a Monoclonal Antibody
and an Antibody-Drug Conjugate with the Agilent 1290 Infinity II
LC 5991-7374EN
- 3.7 その他のアプリケーションノート
- 3.8 追加情報

4 アミノ酸分析

- 4.1 背景
- 4.2 概要
- 4.3 アミノ酸分析ソリューション: 分析の手引き
- 4.4 関連するアプリケーションノート
- 4.5 Determination of Amino Acid Composition of Cell Culture Media and Protein Hydrolysate Standard - 5991-7922EN
- 4.5 Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いた自動アミノ酸分析 - 5991-5571JAJP

5 グリカン分析

- 5.1 背景
- 5.2 概要
- 5.3 グリカンマッピング: 分析の手引き
- 5.4 関連するアプリケーションノート
- 5.5 Fast and Efficient HILIC Methods for Improved Analysis of Complex Glycan Structures - 5991-4896EN
- 5.6 N-Glycan Analysis of mAbs and Other Glycoproteins with UHPLC and Fluorescence Detection - 5991-5253EN
- 5.7 Agilent Solutions for High-throughput N-linked Glycan Profiling from Biotherapeutics - 5991-6904EN
- 5.8 その他のアプリケーションノート
- 5.9 追加情報

6 凝集/フラグメントの分析

- 6.1 背景
- 6.2 概要
- 6.3 生体分子分析のためのサイズ排除クロマトグラフィー: 分析の手引き
- 6.4 関連するアプリケーションノート
- 6.5 Agilent AdvanceBio SEC カラムによるインスリンのバイオシミラーおよび先発薬のサイズ排除クロマトグラフィー - 5991-6872JAJP
- 6.6 タンパク質凝集体の評価方法を最適化し実行するための包括的なワークフロー - 5991-7476JAJP
- 6.7 Size Exclusion Chromatography in the Presence of an Anionic Surfactant 5991-7989EN
- 6.8 Calibrating your Agilent AdvanceBio SEC Columns - 5991-7799EN
- 6.9 その他のアプリケーションノート
- 6.10 追加情報

7 電荷変異体の分析

- 7.1 背景
- 7.2 概要
- 7.3 イオン交換クロマトグラフィーによる生体分子の分析: 分析の手引き
- 7.4 関連するアプリケーションノート
- 7.5 Charge Heterogeneity Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar mAbs - 5991-5557EN
- 7.6 Optimizing Protein Separations with Cation Exchange Chromatography Using Agilent Buffer Advisor - 5991-0565EN
- 7.7 Faster Separations Using Agilent Weak Cation Exchange Columns - 5990-9931EN
- 7.8 その他のアプリケーションノート

8 ベストプラクティスとトラブルシューティング

重要品質特性 アプリケーション総覧

序文

バイオ医薬品の将来は明るく、生活を変える治療薬になるとみられています。この分野は成長を続けており、がん治療や免疫疾患における斬新で画期的な治療法が原動力となっています。新しい生物製剤を臨床において安全に発展させていくには、製造と品質管理に関する信頼性の高いプロセスが必要です。生物製剤の複雑で不均一な性質のために、信頼できるクロマトグラフィー分離による正確で堅牢な分析試験方法が求められています。重要品質特性 (CQA) の特定は、バイオ医薬品の開発と製造のための クオリティ・バイ・デザイン (QbD) の導入において最も困難なステップです。製品ごとに特性を決定するのはきわめて難しく、このために製品品質の一貫性がさらに重要になります。Agilent CrossLab では、お客様のニーズに合った AdvanceBio カラムと消耗品を設計、製造してきました。このアプリケーション集では、HPLC-UV または光散乱検出器のいずれかをを用いた各 CQA の最先端のクロマトグラフィー分離について解説するアプリケーションをまとめました。また、アジレントのバイオカラム製品群の各種結合相を使用した CQA のさまざまなクロマトグラフィー分離技術の概要を示します。逆相、サイズ排除、イオン交換、疎水性相互作用による、治療用タンパク質、mAb、抗体薬物複合体のクロマトグラフィー分析の例を紹介します。アジレントは、お客様の生産性、メソッドの堅牢性、分析結果の信頼性の向上を支援し、より安全で効果的な生物製剤の開発に向け、お客様とともに歩んでいきます。

お客様の成功がわたしたちの成功です。



Padraig McDonnell

バイスプレジデント兼 Chemistries and Supplies 部門ゼネラルマネージャー
Agilent CrossLab グループ



Angelica Riemann

Chemistries and Supplies 部門マーケティングディレクター
Agilent CrossLab グループ

はじめに

生物製剤タンパク質は非常に複雑な分子であり、通常は遺伝子組み換え手法を利用した発酵によって製造されます。しかし、この製造プロセスにより、これらのタンパク質の多種多様な変異体が発生します。このような物質の品質を確保することが、きわめて重要です。品質の確保とは、製品が適切に製造されているか、すべての不純物を同定し定量したか、タンパク質の効能が特定されているかを確認することです。

したがって、インタクト、非変性の分子でテストを実行する必要があります。モノクローナル抗体ほどの大きさのものには、1,300 種類以上のアミノ酸が含まれ、質量が 145,000 ダルトンを超える場合があります。しかし、単一の微小な不純物の同定は困難です。例えば、アスパラギンの脱アミド化ではわずか 1 ダルトンの質量差が生じ、分子中の 20 以上のアスパラギンの部位のどこにでもこの質量差が生じる可能性があるためです。分子をフラグメント（軽鎖や重鎖など）に分解し、酵素処理によってさらに小さなペプチド鎖に分解することでようやく、こうしたわずかな差の一部を突き止められるようになっていきます。

多種多様な変異体が形成される場合もあり、これらは一般に翻訳後修飾 (PTM) と呼ばれます。PTM が生じるのはタンパク質の発現後で、考えられる要因としては、製造の条件や、変異を生じさせる条件への暴露があります。温度、pH、濃度、酵素に対する暴露の変動は、いずれも変異体の発生につながります。特にグリコシル化は非常に多様ですが、多くのタンパク質の有効性についての非常に重要な要素です。

さまざまな種類の不純物と、各不純物によって生じるリスクを理解することが、重要品質特性 (CQA) モニタリングの基礎となります。

本書の目的は、CQA モニタリングのさまざまな面に適した HPLC アプリケーションを紹介することです。また、必要となる各種の検出に合った液体クロマトグラフィーカラムの指針を示し、将来の検討において参考となる有用な情報を提供します。

 抗体価の測定 アフィニティクロマトグラフィー プロセス開発時の mAb 抗体価測定に最適	 グリカン分析 親水性相互作用クロマトグラフィー 高速、高分離能、再現性の高いグリカン分離	 電荷変異体の分析 イオン交換クロマトグラフィー 生体分子の特性解析の真度とスピードの向上
 アミノ酸および 細胞培地の分析 低分子クロマトグラフィー (<150 Å) 堅牢、高分離能分離を実現	 ペプチドマッピング 逆相クロマトグラフィー (<150 Å) 一次配列の確実な特性解析と PTM の検出	 凝集体/ フラグメントの分析 サイズ排除クロマトグラフィー 幅広い生体分子分離のための正確で 高精度な定量
 インタクトおよび サブユニットの純度 高分子クロマトグラフィー (>150 Å) 各分離ニーズに適した選択オプション		

CQA モニタリングにアジレント品質を

抗体価の測定

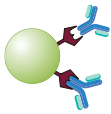
背景

生物製剤の製造において、抗体価の測定とは、発酵プロセス中のターゲットタンパク質の濃度を測定することです。正確な抗体価の測定が必要となる場合、注目すべき場面が2つあります。1つ目は、クローン選択プロセス時です。すべてのクローンで同等の効果が得られるわけではないため、十分な量のターゲットタンパク質を得られる遺伝子導入クローンのみを選択します。2つ目は、発酵プロセス中のスケールアップ時です。このプロセスでは、ターゲットタンパク質の濃度をモニタリングします。細胞培地条件を最適化し、最適な培養時間を決定するには、抗体価を正確に測定する必要があります。

モノクローナル抗体の場合、抗体価の測定の最も効果的な方法の1つはアフィニティークロマトグラフィーの使用です。プロテイン A またはプロテイン G アフィニティークロマトグラフィーカラムで IgG 分子を保持することによって、残りの不純物と発酵プロセスからの副生成物を取り除くことができます。精製済みモノクローナル抗体の溶出や、ピーク面積と検量線の比較による定量によって、タンパク質の濃度を高速測定できます。

モノリスカラムを採用すると、細胞培地の残渣による詰まりのリスクが軽減され、結果を短時間で (4 分以内) に得られるようになります。

これらのカラムは、別の補完的な技法 (凝集体分析や電荷変異体分析など) による後続の CQA 分析用に、十分な試料を精製することにも使用でき、2D ワークフローに容易に統合することが可能です。



抗体価の測定

アフィニティクロマトグラフィー

プロセス開発時の mAb 抗体価測定に最適

バイオモノリスプロテイン A およびバイオモノリスプロテイン G

天然プロテイン A またはプロテイン G

特長	利点
高速分離	メソッド開発時間の短縮
高い結合能力	アプリケーションの柔軟性の向上
最少限の詰まり	システムのダウンタイムの低減

モノクローナル抗体の場合、抗体価の測定の最も効果的な方法の 1 つはアフィニティクロマトグラフィーの使用です。プロテイン A またはプロテイン G アフィニティクロマトグラフィーカラムで IgG 分子を吸収することによって、残りの不純物と発酵プロセスからの副生成物を取り除くことができます。精製済みモノクローナル抗体の溶出や、ピーク面積と検量線の比較による定量によって、タンパク質の濃度を高速測定できます。

モノリスカラムを採用すると、細胞培地の残渣による詰まりのリスクが軽減され、結果を短時間で (4 分以内に) 得られるようになります。

これらのカラムは、別の補完的な技法 (凝集体分析や電荷変異体分析など) による後続の CQA 分析用に、十分な試料を精製することにも使用でき、2D ワークフローに容易に統合することが可能です。

概要

抗体価測定のためのアフィニティカラムの選択において最初に考慮すべき点は、精製または分析対象のターゲットタンパク質です。免疫グロブリンは、その種類 (IgG 1、2 など) や由来 (ヒト、マウスなど) によって、プロテイン A とプロテイン G との親和性が異なります。例えば、ヒト IgG3 はプロテイン G と緊密に結合しますが、プロテイン A とはまったく結合しません。プロテイン A カラムとプロテイン G カラムの選択に関するガイドライン、推奨される移動相、サンプルメソッドについては、次の「分析の手引き」で紹介します。アフィニティ実験において溶出バッファとなる移動相 B は、最適化可能な 1 つのメソッドパラメータです。HCl は、他の溶出液よりも屈折率が低く、ベースラインノイズが低下するという利点がありますが、クエン酸などの他の溶出液よりもカラム寿命が短くなる場合があります。

アフィニティクロマトグラフィーによる 抗体価測定: 分析の手引き

はじめに

アフィニティクロマトグラフィーは、特定のタンパク質間 (抗原/抗体など) でよく用いられる非常に特異的な分子相互作用を活用した強力な手法です。アジレントは、モノクローナル抗体 (mAb) の単離と定量のためのモノリスプロテイン A およびプロテイン G カラムなど、専門的なアフィニティ製品を提供しています。

近年、mAb はさまざまな疾患の治療に対応する主要な生物製剤製品の 1 つとなっています。これらの抗体は、病因物質を適切にターゲティングするために、特定の遺伝的体質に合わせて設計されています。抗体の開発では、高収率のクローンを選択するために、プロテイン A およびプロテイン G アフィニティ分析カラムを使用してさまざまな細胞培地上清から抗体価および濃度を測定します。

カラムの選択

プロテイン A および G カラムは、抗体に対して高い親和性を持つため、細胞培地上清中の抗体にのみ結合します。ただし、選択性はそれぞれ異なります。例えば、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムは、ヒトサブクラス IgG1 および IgG2 に対して高い親和性を示しますが、IgG3 に対して親和性はありません。一方、Agilent バイオモノリスプロテイン G カラムは、ヒトサブクラス IgG1、IgG2、および IgG3 に対して高い親和性を示します。また、プロテイン G カラムは、IgA や IgD などのヒトサブクラスモノクローナル抗体に対する親和性はありませんが、プロテイン A カラムはどちらの抗体にも結合します (表 1)。つまり、この 2 種類のカラムは相互に補完的に使用できます。プロテイン G カラムは、プロテイン A とは結合しない mAb に対する親和性があり、この逆も成り立ちます (図 1)。このため、現在開発中の生物製剤の多様な mAb サブクラスおよびフラグメントの抗体価測定が可能になります。

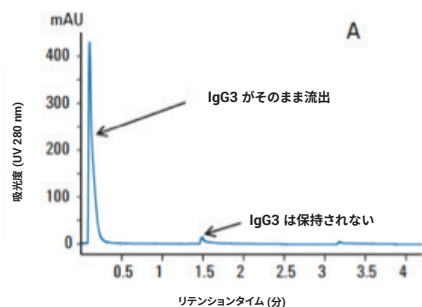
表 1. 異なるヒトおよびマウス IgG サブクラスに対するプロテイン A および G の結合親和性 [(1), (2)]

抗体	抗体	プロテイン A	プロテイン G
ヒト	ヒト IgG1	++++	++++
	ヒト IgG2	++++	++++
	ヒト IgG3	-	++++
	ヒト IgG4	++++	++++
	ヒト IgA	++	-
	ヒト IgD	++	-
	ヒト IgE	++	-
	ヒト IgM	++	-
	マウス	マウス IgG1	+
	マウス IgG2a	++++	++++
	マウス IgG2b	+++	+++
	マウス IgG3	++	+++
	マウス IgM	+/-	-
抗体フラグメント	プロテイン A	プロテイン G	
ヒト Fab	+	+	
ヒト F(ab') ₂	+	+	
ヒト scFv	+	-	
ヒト Fc	++	++	
ヒト K	-	-	
ヒト λ	-	-	

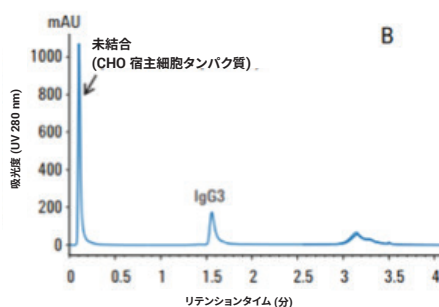
表中のキーコードは、それぞれの抗体に対するプロテイン A および G カラムの相対的な親和性を示します。

- ++++ = 強い親和性
- ++++ = 中位の親和性
- ++++ = 弱い親和性
- + = わずかな親和性
- = 親和性なし

バイオモノリスプロテイン A
IgG3 に対する選択性なし



バイオモノリスプロテイン G
IgG3 に対する選択性



バイオモノリスプロテイン A には IgG3 に対する親和性はありませんが、バイオモノリスプロテイン G にはあります。

図 1. アプリケーションノート 5991-6094JAJP, 5991-6087JAJP より転載

HPLC システムの留意点 - 分析中のタンパク質の保護

モノリスカラムは HPLC および UHPLC システムで使用できますが、このタイプの分析では Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC が最適です。1260 Infinity II バイオイナート LC は、pH 1 ~ pH 13 の極端な pH 値や高い塩濃度のバッファなど、困難な溶媒条件に容易に対応します。送液システムに耐腐食性の高いチタンを使用し、サンプル流路での金属接触を一切排除することで、堅牢性のきわめて高い機器を実現しています。

サンプル前処理

アフィニティークロマトグラフィーのサンプル前処理は、HPLC のタンパク質分析と同様です。カラム性能の最適化、カラム寿命の延長のために、注入前にいくつかの細かなサンプル前処理が必要です。

- カラムの詰まりを防ぐために、サンプルを遠心分離またはろ過して、宿主細胞の残渣や、上清または溶解液からの微粒子を除去します。
- 血清/血漿サンプルでは、サンプルから脂質を除去することも重要です。脂質はカラムに強力に結合して、カラムや機器の汚れの原因となります。

バイオモノリスプロテイン A のカラムには白いバンドが、バイオモノリスプロテイン G のカラムには黄色のバンドが、それぞれカラムの周囲に付いています。



分析条件

サンプル注入

1～5 mg/mL の mAb を含むサンプルの場合、1～5 μ L の注入量としてください。サンプルは H₂O または移動相 A で溶解できます。カラムには 1 回の注入で、最大 50 μ L または最大 400～500 mg の mAb を注入できます。

流量

高速の場合、カラムは 1.0～3.0 mL/min で機能します。ただし、1.0 mL/min の場合、ピークがシャープになり、S/N 比が改善します。

温度

良好な分離が得られる一般的な温度は 25 °C です。設定可能なカラム温度は、4～40 °C です。

検出

UV 280 nm での検出を推奨します。この波長は、芳香族の側鎖や、より複合化された側鎖を持つアミノ酸の吸収波長です。

移動相

移動相 A、結合および洗浄バッファ

移動相 A は結合バッファで、50 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4 です。

結合/洗浄バッファは使用直前に調製してください。さらに、カラム内部のフリットに蓄積するバッファの不純物を低減するために、0.22～0.45 μ m メンブレンによるバッファのろ過を推奨します。ろ過によりカラムの詰まりを防ぐことができます。

移動相 B、溶出バッファ

バイオモノリスプロテイン A および G カラムでは、mAb 溶出に使用される多くの低 pH バッファを使用できます。詳細については、表 2 を参照してください。クエン酸、グリシン、HCl、酢酸がよく使用されます。しかし、HCl の屈折率は、他の溶媒と比べて低い値です。このため、低濃度のサンプルを使用していて、ベースラインノイズや不自然なピークの問題がある場合は、HCl を溶媒として使用できます。

注: 通常、アフィニティカラム用の溶出バッファは、屈折率 (RI) が結合/洗浄バッファと大きく異なります。このため、溶出物が流れ始めたときに、ベースラインノイズや不自然なピークが生じます。このピークによって、低濃度サンプルの定量が妨げられる場合があります。この影響を最小限に抑えるために、高品質な化学薬品を使用することを推奨します。また、不自然なピークを立証するためにブランクランを含める必要があります。必要に応じて、ブランクランを使用してベースラインを差し引くことができます。

表 2. 使用可能な溶出バッファ

カラム	溶出バッファ	濃度	pH
バイオモノリス プロテイン A	クエン酸	0.1 M	2.5～3.0
	グリシン	0.1 M	2.5～3.0
	酢酸	5～20 %	
	HCl	12 mM～0.1 M	
バイオモノリス プロテイン G	クエン酸	0.1 M	2.5～3.0
	グリシン	0.1 M	2.5～3.0
	酢酸	5～20 %	
	HCl	12 mM～0.1 M	

高速分離プロトコル

バイオモノスプロテイン A およびプロテイン G カラムは高速分離が可能です。カラムの動作速度は、最大で 3 mL/min です。図 2 は、バイオモノスプロテイン G カラムを用いて、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min と、さまざまな流量で IgG₃ を分析した結果であり、mAb の高速回収と溶出の能力を示しています。表 3 は流量と動作グラジエントを示しています。溶出バッファ (移動相 B) を pH 2.5 ~ 3.0 に調整するだけで、バイオモノスプロテイン A でもこの条件を使用できます。

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	バイオモノスプロテイン G
注入量:	IgG ₃ (2 mg/mL)
移動相 A:	5 μ L
移動相 B:	50 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
温度:	0.1 M クエン酸、pH 2.0
HPLC:	25 °C
検出:	Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC

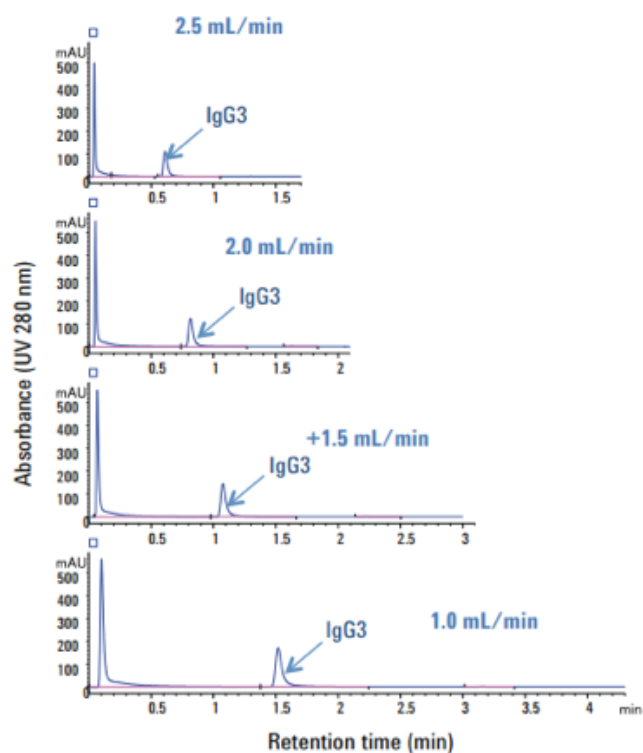


図 2. カラム: バイオモノスプロテイン G

カラム寿命の最大化

カラム再生

モノリスディスクの最大の利点は、ポアではなくチャンネルが存在することによって、細胞培地サンプル注入時にカラムの詰まりの可能性が低下することです。これにより堅牢性が向上し、クリーニングの労力が軽減されます。30 ~ 50 サンプルごとにブランクグラジエント注入を実行することで、カラム汚染を低減することができます。

カラムの劣化（ピークのテーリングや広がり）が観察された場合、次のクリーニング手順の実行を推奨します。カラム再生が最初のステップです。それでも性能が十分でない場合は、定置洗浄手順を使用できますが、利用可能なプロテイン A の量が減少します。

カラム再生

- 2 mL (20 カラム容量 (CV)) の 100 mM リン酸バッファと 1 M NaCl、pH 7 ~ 8 で、0.5 ~ 1.0 mL/min で洗浄します。
- 2 mL (20 CV) の低 pH 溶液 (溶液バッファなど) で洗浄します。
- 結合バッファで再平衡化します。

定置洗浄

- 1 ~ 2 mL (10 ~ 20 CV) の 0.1 M NaOH を使用して 0.2 ~ 0.5 mL/min で洗浄 (逆方向) します。
- 1 ~ 2 mL (10 ~ 20 CV) の脱イオン水を使用して 0.5 ~ 1.0 mL/min で洗浄します。
- 1 ~ 2 mL (10 ~ 20 CV) の濃縮されたバッファ (0.1 ~ 0.5 M) を使用して洗浄し、正常な pH (7.0 ~ 7.4) に戻します。
- 5 mL (50 CV) の結合バッファで再平衡化します。

不純物が高疎水性または脂質で、カラムから容易に除去できない場合は、2-プロパノール (最大 30 %)、または塩酸グアニジン (最大 3 M) を使用して不純物を除去できます。これらの代替クリーニング溶液の使用後に、手順 1 ~ 4 を実行します。

警告: クリーニング溶液でカラムを洗浄する場合、カラムの最大許容圧力を超える高圧が発生しないように、カラムでの流量を常時低くしてください。

表 3. IgG3 の高速分離が可能な流量と動作グラジエント

1.0 mL/min		
時間 (分)	% A	% B
0	100	0
0.4	100	0
0.5	0	100
2.0	0	100
2.1	100	0
4.2	100	0

1.5 mL/min		
時間 (分)	% A	% B
0	100	0
0.3	100	0
0.4	0	100
1.7	0	100
1.8	100	0
3.2	100	0

2.0 mL/min		
時間 (分)	% A	% B
0	100	0
0.2	100	0
0.3	0	100
1.2	0	100
1.3	100	0
2.2	100	0

2.5 mL/min		
時間 (分)	% A	% B
0	100	0
0.1	100	0
0.2	0	100
0.8	0	100
0.9	100	0
1.7	100	0

短期保管

一晩または数日の短期間保管の場合、結合バッファを用いてカラムをフラッシュし、機器から取り外し、ふたをして、4～8℃で保管します。短期保管後の最初の注入の前にカラムを平衡化してください。

長期保管

カラムを2日以上使用しない場合、1 mL (10 CV) 以上の脱イオン水で洗浄した後、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 でフラッシュしてください。その後、カラムエンドプラグで密閉し、4～8℃ (39～46°F) で保管してください。

参考文献

1. Richman, D. D., Cleveland, P. H., Oxman, M. N., and Johnson, K. M. 1982. "The binding of 1. *Staphylococci* protein A by the sera of different animal species." *J. Immunol.* 128: 2300–2305.
2. Frank, M. B. 1997. "Antibody Binding to Protein A and Protein G beads". In: Frank, M. B., ed. *Molecular Biology Protocols*. Oklahoma City.

製品情報

部品番号	製品
5069-3639	バイオモノリスプロテイン A、4.95 x 5.2 mm
5190-6900	バイオモノリスプロテイン G、4.95 x 5.2 mm

高速で一貫性の高い生体分子の特性評価 – Agilent AdvanceBio カラム

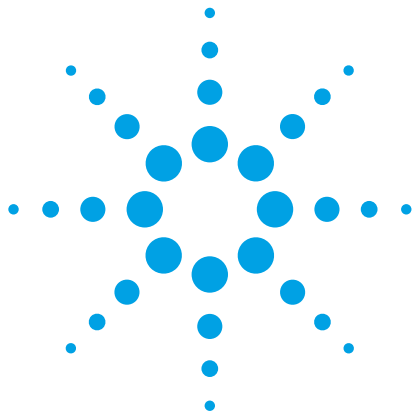
Agilent AdvanceBio カラムは、ペプチドやタンパク質の分離および特性評価において一貫した高品質の性能を提供します。これらの最先端カラムにより、精度と生産性を高め、分析の妨げとなり得る干渉を除去できます。厳しい試験が実施され、アジレントの60日間の保証も付いています。

詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

優れた結果を得るためのパートナー

増え続ける課題に対処するためには、的確な答えが必要です。アジレントのソリューションを使用することで、革新的な疾病研究、創薬の加速化、開発および製造の信頼性向上が可能になります。

アジレントのバイオ医薬品ソリューションの詳細
www.agilent.com/chem/jp



バイオモノリスプロテイン A カラムと LC/MS を用いた細胞クローン選択

アプリケーションノート

生物製剤・バイオシミラー

著者

Emmie Dumont, Isabel Vandenheede,
Pat Sandra, Koen Sandra
Research Institute for Chromatography
(RIC)
President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk
Belgium

James Martosella, Phu Duong,
Maureen Joseph
Agilent Technologies, Inc

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを用いて、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養上清の組み換えモノクローナル抗体価を測定する方法を説明します。また、このカラムを用いて μg レベルの抗体を濃縮し、質量分析によるさらなる構造分析を行う方法を説明します。このワークフローは、生物製剤およびバイオシミラー開発におけるクローン選択プロセスの指針となるものです。



Agilent Technologies

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、癌や自己免疫疾患といった命にかかわる疾患の治療に広く用いられています。現在、30 を超えるモノクローナル抗体が販売されており、2010 年には 9 種類が爆発的に売れました。また、2009 年の売り上げトップ 10 の生物製剤のうち、5 つが mAb でした [1]。mAb は現在、もっとも急成長しているタイプの治療薬と見なされています。売り上げ上位の mAb は今後数年で特許が失効することから、バイオシミラーに関する活動が活発化しています。モノクローナル抗体のバイオシミラーについては、最初の 2 種類が 2013 年に認可されました。いずれも活性成分としてインフリキシマブが含まれています [2]。

mAb に関しては、先発薬でもバイオシミラーでも、クローン選択が開発プロセス初期において重要となります。このアプリケーションノートでは、このプロセスで Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを使用した例を紹介し、この HPLC カラムは、ポリ (グリシジル メタクリレート-コ-エチレンジメタクリレート) 多孔質モノリス支持材を *Staphylococcus aureus* のプロテイン A でコーティングした構造になっています。高速高効率分離とキャリアオーバーが少ないというモノリスの利点と、免疫グロブリン G (IgG) の Fc 領域に対するプロテイン A レセプターの選択性を兼ね備えています。そのため、mAb 抗体価および細胞培養上清から直接採取したサンプルのハイスループット測定に理想的なカラムです。また、mAb を分析スケールで精製し、質量分析 (MS)、イオン交換 (IEX)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) などによるさらなる分析を行う場合にも適しています。

ここでは、バイオモノリスプロテイン A カラムを用いて、抗体価および構造特性をもとに、トラスツズマブのバイオシミラーを産生するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) クローンを選択する手法を説明しています。トラスツズマブは 1998 年からハーセプチンとして販売されています。現在でも、HER2 陽性乳癌の治療に広く用いられています [3]。主要な生物製剤であるトラスツズマブの特許は、欧州では 2014 年、米国では 2018 年に失効します。バイオシミラー mAb 抗体価をもとにクローンを選択するために、先発薬のハーセプチンにより作成した検量線を用いて絶対濃度を測定しました。構造特性を評価し、先発薬分子と比較するために、プロテイン A カラムを用いて mAb を分析スケールで濃縮したのち、質量分析を行いました。

実験方法

材料

アセトニトリル、水、イソプロパノールを Biosolve (ファルケンスワールト、オランダ) から入手しました。クエン酸、ギ酸、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩 (TCEP) を Sigma-Aldrich, Corp. (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。ヒト化モノクローナル抗体のトラスツズマブ (ハーセプチンとして販売) を Roche (バーゼル、スイス) から入手しました。トラスツズマブのバイオシミラー CHO 細胞培養上清については、地元のバイオテクノロジー企業から入手しました。

サンプル前処理

21 mg/mL のハーセプチン原液を移動相 A で希釈し、検量線を作成しました。細胞上清を 50 mM Na_2HPO_4 で 1:1 に希釈しました。上清を 5.000 g で 5 分間遠心分離してから注入しました。10 mM TCEP を添加し、採取したフラクションを室温で 1 時間還元しました。

使用機器

バイオモノリスプロテイン A 測定には、以下の機器を使用しました。

- Agilent 1100 シリーズクオートナリポンプ (G1311A)
- Agilent 1100 シリーズオートサンブラ (G1313A)
- Agilent 1100 シリーズダイオードアレイ検出器 (G1315A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズ分析スケールフラクションコレクタ (G1364C)

LC/MS 測定には、以下の機器を使用しました。

以下を搭載する Agilent 1290 Infinity バイナリ LC

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220B)
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B)
- Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF および Agilent Jet Stream LC/MS (G6540A)

ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation リビジョン C01.05 (35)
- Agilent MassHunter、機器コントロール用 (B05.01)
- Agilent MassHunter、データ解析用 (B06.00)
- Agilent BioConfirm ソフトウェア、MassHunter 用 (B06.00)

条件、バイオモノリスカラム

カラム:	Agilent バイオモノリスプロテイン A (p/n 5069-3639)
移動相:	A) 50 mM リン酸、pH 7.4 B) 100 mM クエン酸、pH 2.8
グラジエント:	時間 (分) %B 0~0.5 0 (結合) 0.6~1.7 100 (溶出) 1.8~3.5 0 (再生)
流量:	1 mL/min
注入量:	50 µL
検出:	UV、280 nm
フラクション コレクション:	時間ベース

条件、LC/MS

カートリッジ:	オンライン脱塩カートリッジ、 2.1 × 10 mm
移動相:	A) 0.1 % ギ酸を含む水 (v:v) B) 0.1 % ギ酸を含むアセトニトリル (v:v)
流量:	400 µL/min
注入量:	可変 (タンパク質量 1 µg に対応)
ニードル洗浄溶媒:	60 % アセトニトリル、35 % 水、 5 % イソプロパノール
オートサンブラ温度:	7 °C
グラジエント:	時間 (分) % B 0 5 0.5 5 2 80.0 3 80.0 3.10 5 5 5
Q-TOF ソース:	Agilent Jet Stream、 ポジティブイオン化モード
ドラインガス温度:	300 °C
乾燥ガス流量:	8 L/min
ネブライザ圧力:	35 psig
シースガス温度:	350 °C
シースガス流量:	11 L/min
ノズル電圧:	1,000 V
キャピラリ電圧:	3,500 V
フラグメンタ電圧:	200 V
Q-TOF 検出:	質量範囲 3,200 amu
データ取り込み範囲:	500~3,200 m/z 高分解能モード (4 GHz)
データ取り込みレート:	毎秒 1 スペクトル プロフィール取り込み
ダイバータバルブ:	時間 (分) 対象 0 廃液 1 MS 3.5 廃液

結果と考察

トラスツマブ抗体価測定によるクローン選択

図 1 では、特定のトラスツマブ産生クローン上清およびハーセプチン先発薬のプロテイン A クロマトグラムを重ねて表示しています。結合していない物質がフロースルーで溶出した一方で、mAb は pH が低くなった後にはじめて溶出しています。先発薬では、フロースルーで溶出した物質は観察されませんでした。このサンプルは販売されている製品であるため、この結果は当然といえます。上清のケースでは、結合していない物質に起因する大きなシグナルが見られます。

図 2 では、バイオシミラー開発プログラムの枠組みに沿って作成された 12 のトラスツマブ産生クローンのプロテイン A クロマトグラムを重ねて表示しています。これらのクロマトグラムから、低収率クローンと高収率クローンの違いがすでに生じていることがわかります。ハーセプチン先発薬を希釈して作成した外部検量線にピーク面積を関連付ければ、mAb の絶対濃度を測定することができます。

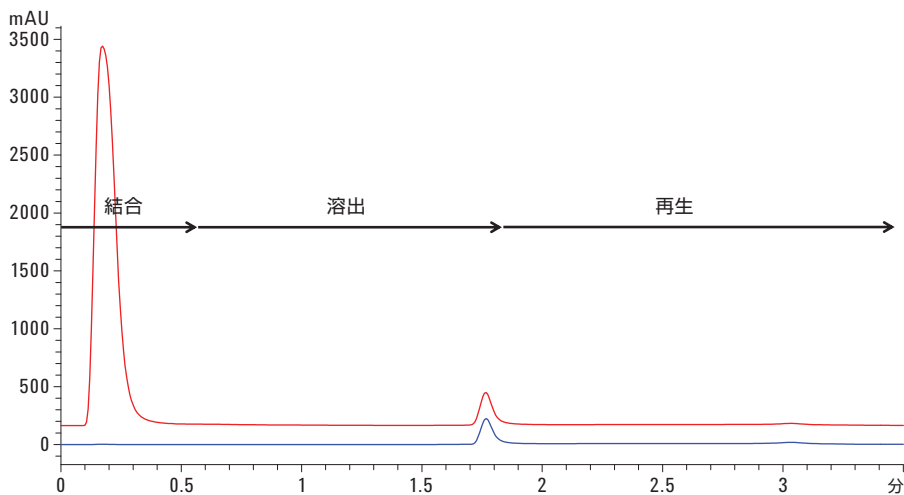


図 1. トラスツマブ産生 CHO クローン、クローン 9 (赤) と、50 mM Na-リン酸 pH 7.4 で 0.2 mg/mL に希釈したハーセプチン先発薬 (青) の UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラム。上清はリン酸緩衝液で 1:1 に希釈しました。

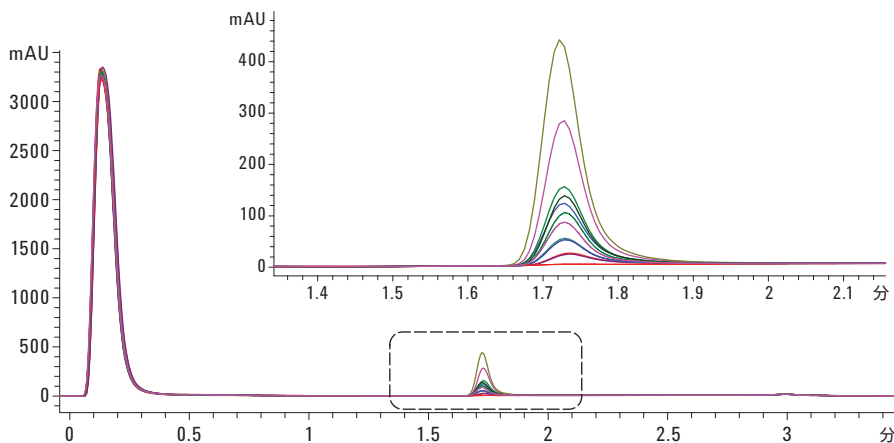


図 2. 12 のトラスツマブ産生 CHO クローンの UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラムの重ね表示

検量線と、それに対応するハーセプチンキャリブレーションポイントのクロマトグラムを、図 3 および 4 に示しています。0.02~2 mg/mL で良好な直線性が得られています。この値は、CHO 細胞における通常の mAb 抗体価範囲です。得られた mAb 抗体価を表 1 にまとめ、図 5 で図示しています。これらの知見から、さらなるバイオシミラー開発に関して明確な判断を下すことが可能

になります。具体的には、高収率クローン 9 および 10 を選択し、サブクローン段階へ進めるという判断が可能です。表 1 には、2 種類の細胞培地で CHO クローンを培養した場合に得られた抗体価も示しています。この結果から、どちらの培地が適しているかが明確にわかります。

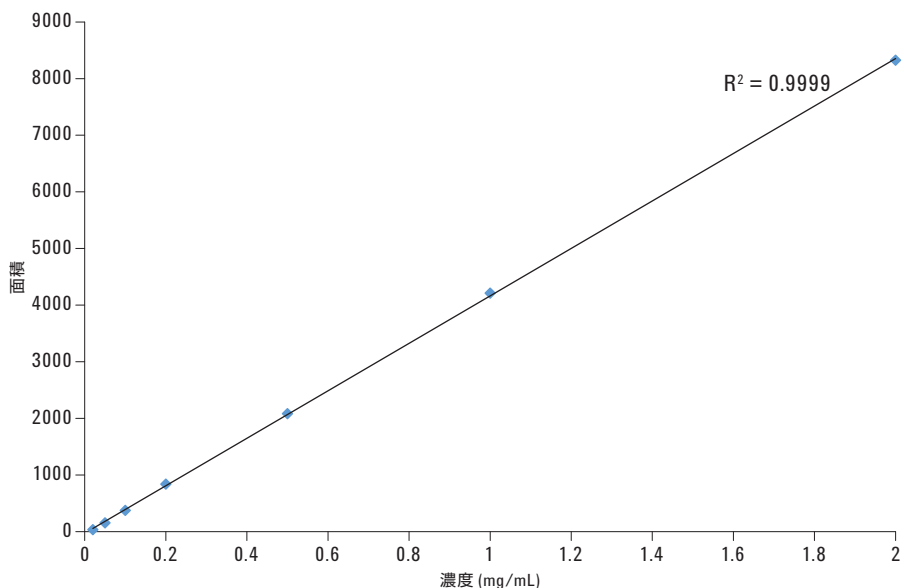


図 3. Agilent バイオモノリスプロテイン A を用いたハーセプチンの検量線、0.02~2 mg/mL

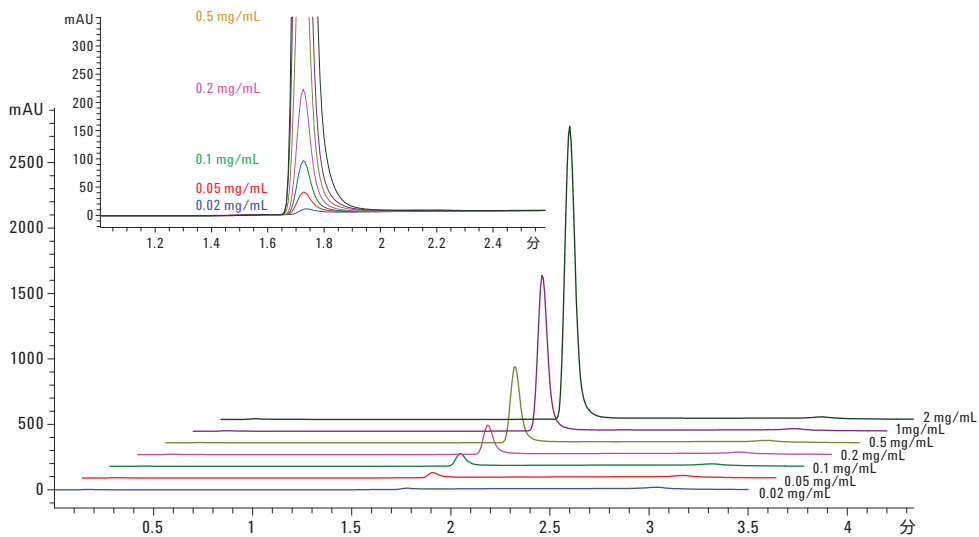


図 4. ハーセプチンキャリブレーションポイントの UV 280 nm Agilent バイオモノリスプロテイン A クロマトグラムの重ね表示

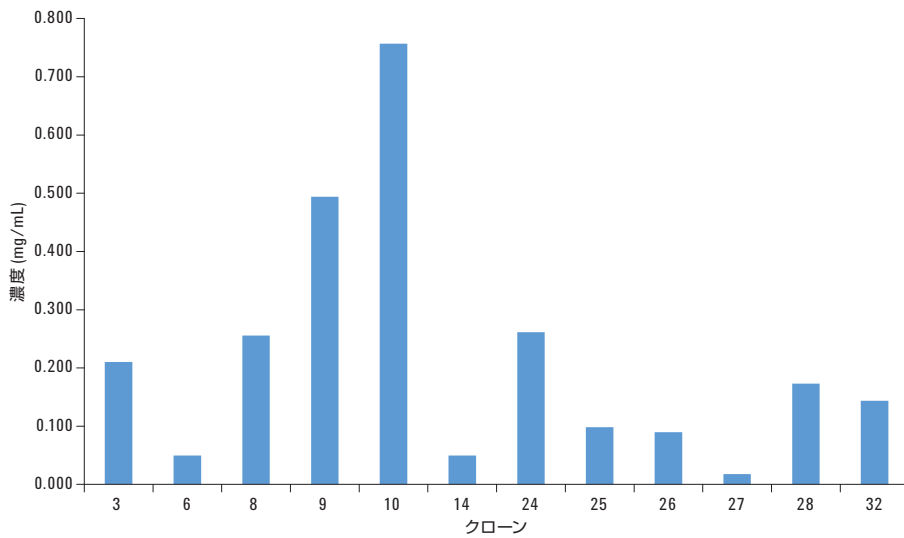


図 5. 各種トラスツマブ CHO クローンにおけるバイオシミラー mAb 抗体価 (mg/mL) を示すグラフ

表 1. 2 種類の培地で培養した各種の CHO クローンで測定されたトラスツマブバイオシミラー絶対濃度

CHO クローン 培地 A	濃度 (mg/mL)	CHO クローン 培地 B	濃度 (mg/mL)
3	0.156	3	0.210
6	0.048	6	0.050
8	0.155	8	0.256
9	0.215	9	0.494
10	0.311	10	0.757
14	0.038	14	0.050
24	0.082	24	0.262
25	0.049	25	0.098
26	0.037	26	0.090
27	–	27	0.018
28	0.117	28	0.173
32	0.156	32	0.144

構造特性の評価によるクローン選択

クローン選択において、mAb 抗体価の次に重要な基準は、構造特性にもとづく基準です。バイオシミラー開発の場合、構造は先発薬との類似性がきわめて高くなければならず、先発薬バッチ間の変動範囲内に収まることが求められます。そのため、プロテイン A フラクションを採取し、ジスルフィド結合還元による軽鎖および重鎖の生成後、高分解能質量分析により測定しました。この手法を用いれば、アミノ酸配列を確認し、グリコシル化パターンを解明することができます。

酸性緩衝液の入った捕集バイアル内で直接 mAb を還元するため、一般的な還元剤のジチオスレイトール (DTT) ではなく、TCEP を選択しました。TCEP を使えば、低 pH を含む広い pH 領域での還元が可能です。それに対して、DTT の場合は、還元効果は 7 以上の pH 値に限定されます。オンライン脱塩後、還元したフラクションを MS システムに注入しました。図 6 および 7 は、1 つのハーセプチン先発薬および 2 つの高収率トラスツマブバイオシミラー産生クローンについて、軽鎖および重鎖スペクトルをデコンボリューションしたものを示しています。

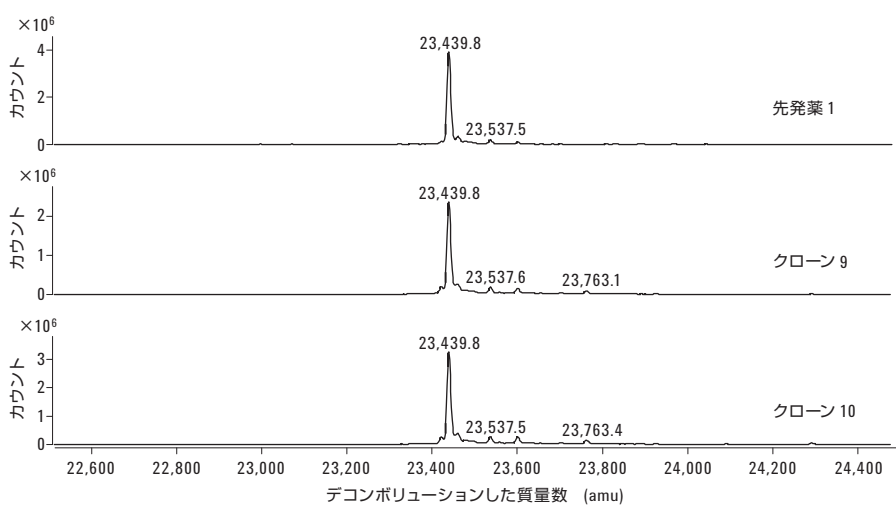


図 6. ハーセプチン先発薬および 2 つのトラスツマブ産生クローンのデコンボリューションした軽鎖スペクトル

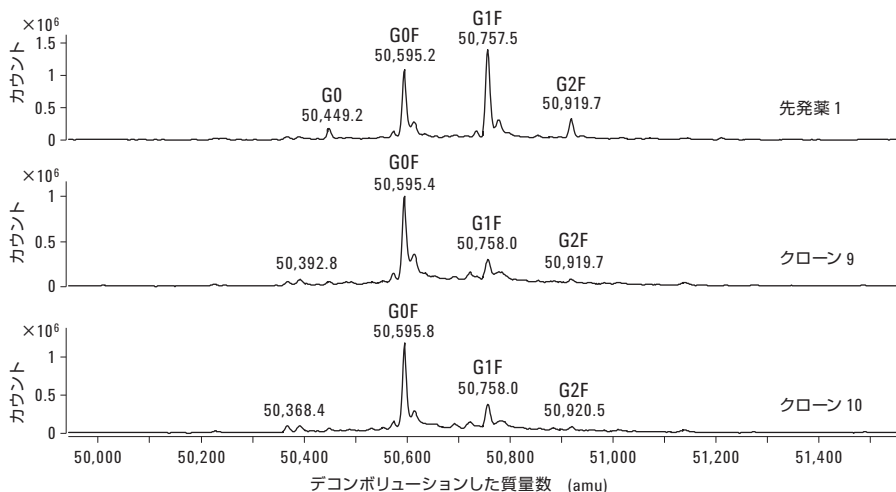


図 7. ハーセプチン先発薬および 2 つのトラスツマブ産生クローンのデコンボリューションした重鎖スペクトル。G0、G0F、G1、G2F の記号は、mAb 主鎖に結合する N-グリカンを示しています。

表 2 および 3 は、4 つの先発薬製造バッチおよび 12 のトラスツズマブクローンにおける MW 測定値と主要糖型の相対強度を示しています。これらの結果から、ハーセプチン先発薬およびクローンに由来するトラスツズマブは、同様の軽鎖および重鎖分子量値を示していると結論づけられます。

また、先発薬およびクローンに由来する mAbs の重鎖において、複雑なタイプである同じ N-グリカンも観察されました。これらの特性は、米国および欧州の規制当局の規定では、きわめて重

要な構造特性 (一次配列が同一で、グリコシル化が保存されていること) とされています。グリコシル化については、定性的観点からは同様でしたが、定量的には違いが見られました。別のアプリケーションノートでは、プロテイン A バイオモノリスを用いて培地を調整し、グリコシル化を先発薬仕様に適合させる方法について説明しています [4]。

表 2. 先発薬およびトラスツズマブクローンにおける軽鎖および重鎖 MW の測定値

MW (Da)	先発薬 1	先発薬 2	先発薬 3	先発薬 4	クローン 3	クローン 6
軽鎖	23,439.8	23,439.8	23,439.8	23,439.8	23,439.8	23,440.2
重鎖 *	49,149.9	49,150.2	49,150.1	49,150.1	49,150.5	49,151.0

MW (Da)	クローン 8	クローン 9	クローン 10	クローン 14	クローン 24	クローン 25
軽鎖	23,439.8	23,439.8	23,439.8	23,439.9	23,439.8	23,439.9
重鎖 *	49,150.6	49,150.1	49,150.5	49,150.2	49,150.6	49,151.1

MW (Da)	クローン 26	クローン 27	クローン 28	クローン 32
軽鎖	23,440.0	23,441.4	23,439.8	23,439.9
重鎖 *	49,150.9	49,151.9	49,150.7	49,150.9

*理論上脱グリコシル化した MW 値。

表 3. 4 つの先発薬製造バッチおよびトラスツズマブクローンにおける主要糖型の相対強度

糖型	先発薬 1	先発薬 2	先発薬 3	先発薬 4	クローン 3	クローン 6
% Man 5	1.6	1.6	1.3	1.1	2.7	1.6
% G0F-GlcNAc	1.5	2.7	3.3	2.4	3.2	3.2
% G0	5.7	5.9	5.0	4.9	2.8	3.3
% G0F	35.2	44.8	50.5	48.2	66.1	56.2
% G1F	45.2	38.4	34.0	36.8	20.6	27.7
% G2F	10.7	6.6	5.9	6.7	4.7	8.1

糖型	クローン 8	クローン 9	クローン 10	クローン 14	クローン 24	クローン 25
% Man 5	2.6	3.3	5.0	1.2	1.9	5.1
% G0F-GlcNAc	3.8	4.8	4.6	2.1	3.6	4.2
% G0	1.7	2.9	2.9	3.9	2.2	2.3
% G0F	69.9	66.1	64.1	64.6	68.6	60.7
% G1F	18.4	18.5	19.5	22.9	19.4	20.9
% G2F	3.6	4.3	3.8	5.3	4.3	6.7

糖型	クローン 26	クローン 27	クローン 28	クローン 32
% Man 5	5.4	0.0	1.5	3.1
% G0F-GlcNAc	5.8	0.0	2.9	4.3
% G0	1.8	0.0	1.2	2.7
% G0F	61.6	67.2	61.6	64.3
% G1F	19.5	32.8	26.3	20.3
% G2F	5.8	0.0	6.5	5.3

結論

先発薬との抗体価および構造類似性にもとづくトラスツズマブバイオシミラー産生クローンの選択において、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを問題なく適用することができました。このクローン選択プロセスは、先発薬およびバイオシミラー mAb の開発初期段階におけるきわめて重要なプロセスです。

参考文献

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra. *J. Chromatogr. A.*, **1335**, 81 (2014).
2. www.ema.europa.eu
3. www.gene.com
4. E. Dumont, *et al.*, Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5124EN (2014).

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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。

本資料に記載の情報、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. 2014

Printed in Japan

August 21, 2014

5991-5124JAJP



Agilent Technologies

mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column

Authors

Emmie Dumont, Isabel Vandenheede, Pat Sandra, and Koen Sandra

Research Institute for Chromatography (RIC)

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk, Belgium

James Martosella, Phu Duong
and Maureen Joseph
Agilent Technologies, Inc

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are becoming increasingly important in the treatment of various diseases. During development of recombinant mAbs, protein titer and yield from various cell culture supernatants must be monitored. This application note describes how the Agilent Bio-Monolith Protein A column was successfully applied in the determination of mAb concentrations.

Introduction

Protein A from *Staphylococcus aureus* has a very strong affinity for the Fc domain of immunoglobulins (IgG), allowing its capture from complex matrixes such as cell-culture supernatants. Affinity chromatography making use of Protein A is the gold standard in therapeutic monoclonal antibody (mAb) purification, and typically represents the first chromatographic step in downstream processing. Protein A chromatography finds applications beyond this large-scale purification. At the analytical scale, it is used early in the development of mAbs for the high-throughput determination of mAb titer and yield directly from cell culture supernatants, and to purify μg amounts of material for further measurements, for example, by mass spectrometry (MS), ion-exchange (IEX), size exclusion chromatography (SEC), or hydrophobic interaction chromatography (HIC).

This application note describes the use of the Agilent Bio-Monolith Protein A column in mAb titer analysis. This HPLC column (Figure 1) has a 5.2 mm id, a column length of 4.95 mm, and is composed of a highly cross-linked poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic disk coated with native Protein A from *S. aureus*. Its monolithic nature, characterized by well-defined channels of 1,200 to 1,500 nm, and by the absence of pores and voids, delivers fast and efficient separations with negligible carryover and excellent robustness. These are features typically expected from a column for mAb titer analysis, to successfully guide clone selection and cell-culture optimization. We present the best practice for use of the column in the determination of absolute mAb concentrations in Chinese hamster ovary (CHO) cell-culture supernatants. Data from a trastuzumab biosimilar project are used for illustration purposes. Trastuzumab, marketed as Herceptin since 1998, is used in the treatment of HER2 positive breast cancer, and comes out of patent in 2014 in Europe, and 2018 in the United States.

Experimental

Materials

Water was obtained from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Citric acid, acetic acid, NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 were purchased from Sigma-Aldrich, Corp. (St. Louis, MO, USA). Humanized monoclonal antibody trastuzumab, marketed as Herceptin, was obtained from Roche (Basel, Switzerland). Trastuzumab biosimilar CHO cell culture supernatants were obtained from a local biotechnology company.

Sample preparation

Herceptin stock solution present at 21 mg/mL was diluted in mobile phase A prior to injection. Cell supernatants were diluted 1:1 in 50 mM Na_2HPO_4 . Supernatants were centrifuged at 5,000 g for 5 minutes prior to injection.

Instrumentation

Agilent Bio-Monolith Protein A measurements were performed on:

- Agilent 1100 Series Quaternary Pump (G1311A)
- Agilent 1100 Series Autosampler (G1313A)
- Agilent 1100 Series Diode Array Detector (G1315A)

Software

- Agilent Technologies OpenLAB CDS ChemStation revision C01.05 (35)

Conditions, Bio-Monolith column

Parameter	Value	
Column:	Agilent Bio-Monolith Protein A (p/n5069-3639)	
Mobile phase:	A) 50 mM phosphate, pH 7.4 B) 100 mM citric acid, pH 2.8 mM acetic acid, pH 2.6	
Gradient:	Time (min)	% B
	0 to 0.5	0 (binding)
	0.6 to 1.7	100 (elution)
	1.8 to 3.5	0 (regeneration)
Flow rate:	1 mL/min	
Injection volume:	Variable (50 μL , optimized for CHO cell culture supernatants)	
Detection:	UV at 280 nm	

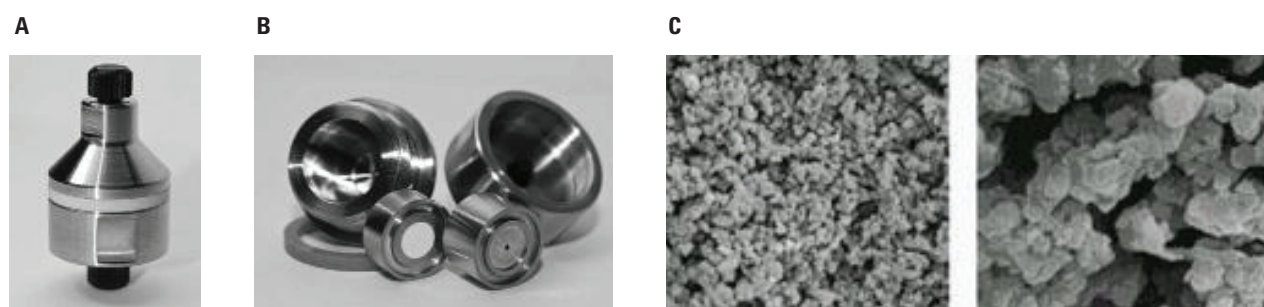


Figure 1. UV 280 nm Agilent Bio-Monolith Protein A chromatogram of a trastuzumab-producing CHO clone, clone 9 (red), and of a Herceptin originator diluted in 50 mM Na-phosphate pH 7.4 to 0.2 mg/mL (blue). Note that the supernatant was diluted 1:1 in phosphate buffer.

Results and Discussion

Buffer selection

Figure 2 shows a typical chromatogram from the Protein A column. The example chromatogram is one injection of the supernatant of a specific trastuzumab-producing CHO clone. The unbound material eluted in the flow-through while the mAb was retained at neutral pH (binding) and was only released (elution) after lowering the pH upon applying a step gradient. In this case, 50 mM Na-phosphate at pH 7.4 was used for binding/loading, and 100 mM citric acid at pH 2.8 for elution. This represents a good starting condition for any application.

When developing a new method for a Protein A column, both binding and elution buffers should be optimized. For binding buffers, 50 mM Na phosphate, pH 7.4, is a good starting point, and can be optimized between pH 7 and 8. For elution buffers, the 100 mM citric acid used here is a good starting point. Other possible elution buffers are 500 mM acetic acid, pH 2.6, 100 mM glycine HCl, pH 2.8, and 12 mM HCl, pH 1.9.

Figure 3 compares the elution of a Herceptin originator with acetic acid and citric acid. Very similar peak shape and area were observed, although peaks were slightly sharper using citric acid. In the case of this Herceptin originator, no material was seen in the flow-through, which was not surprising since this represented the marketed product and was devoid of host-cell proteins. In the chromatograms shown, the flow rate was set at 1 mL/min. The monolithic nature of the support, characterized by convective instead of diffusive mass transfer, allowed for near flow-rate independence and, hence, high-throughput separations. This is highly desirable in mAb titer determination, which typically requires the processing of a wide range of samples. The maximum flow rate that can be applied on the column is 2 mL/min, which allows fast, sub-2-minute separations.

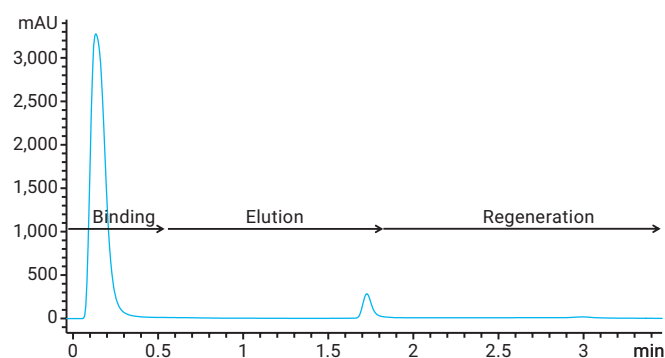


Figure 2. UV 280 nm Protein A chromatogram showing the supernatant of a trastuzumab-producing CHO clone. Injection volume was 50 μ L. Peak width at half height was 0.10 minutes for the unbound material and 0.06 minutes for the retained mAb.

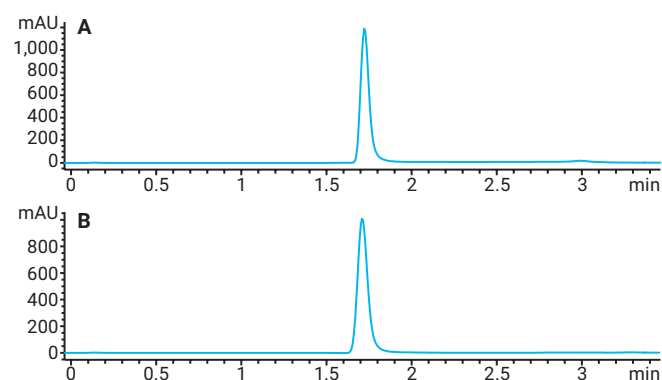


Figure 3. UV 280 nm Protein A chromatogram of Herceptin originator diluted in 50 mM Na-phosphate, pH 7.4, to 0.5 mg/mL (50- μ L injection, 25- μ g column load). Elution was achieved using citric acid (A) and acetic acid (B). Peak width at half height is 0.057 and 0.067 minutes for citric acid and acetic acid, respectively.

Precision, linearity, carryover, and injection size

Precision is critically important in the determination of the mAb titer. Table 1 shows the peak area and retention time repeatability that can typically be expected upon injecting a Herceptin originator 10 times. Chromatograms are shown in Figure 4. More than acceptable relative standard deviation (RSD) values were obtained for both citric acid and acetic acid as elution buffers. Carryover was simultaneously assessed by injecting a buffer blank after the mAb injection sequence (Figure 5). At a 10-fold column load of 5 µg, carryover appeared to be nonexistent, which can again be attributed to the use of a monolithic support. Carryover at 1% levels became apparent upon a single load of 500 µg of mAb onto the column. This represents the maximum column load and is one typically not encountered in real-life experiments. It is worth noting that carryover was eliminated after the injection of a second buffer blank.

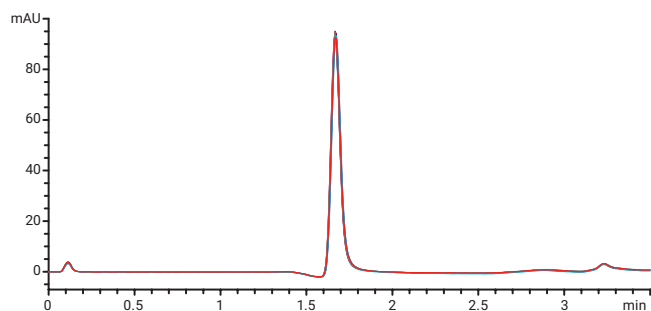


Figure 4. Replicate (n = 10) UV 280 nm Protein A chromatograms of a Herceptin originator diluted in 50 mM Na phosphate, pH 7.4, to 0.5 mg/mL (injection volume 5 µL). Elution was achieved using acetic acid.

Table 1. Retention time and peak area RSD values obtained for the 10-fold analysis of a Herceptin originator at 0.5 mg/mL (5 µL injection volume).

	Acetic acid		Citric acid	
	Peak area	RT (min)	Peak area	RT (min)
1	361	1.669	383	1.666
2	362	1.668	372	1.666
3	373	1.668	365	1.665
4	365	1.669	389	1.667
5	370	1.669	383	1.666
6	373	1.669	378	1.666
7	367	1.671	379	1.678
8	365	1.668	377	1.666
9	366	1.670	376	1.667
10	360	1.670	377	1.667
Mean	366	1.669	378	1.667
S	4.64	0.001	6.52	0.001
% RSD	1.27	0.06	1.73	0.06

The limit of detection (LOD) was around column loads of 0.5 µg. This put some demands on injection volume. If samples have low mAb levels, high volume injections are required. Figure 6 shows the linearity obtained when increasing the injection volume from 5 to 50 µL for a 1 mg/mL Herceptin originator. With the knowledge that 50 µL injections are perfectly feasible and that the lowest detectable amount on-column is 0.5 µg, samples with mAb concentrations at 10 µg/mL are within reach.

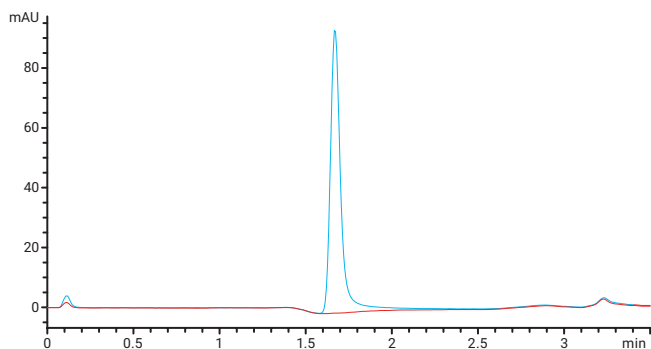


Figure 5. UV 280 nm Protein A chromatograms of a Herceptin originator diluted in 50 mM Na phosphate, pH 7.4, to 0.5 mg/mL, and a blank buffer analyzed after a sequence of 10 Herceptin injections. Elution was achieved using acetic acid, and injection volumes were 5 µL.

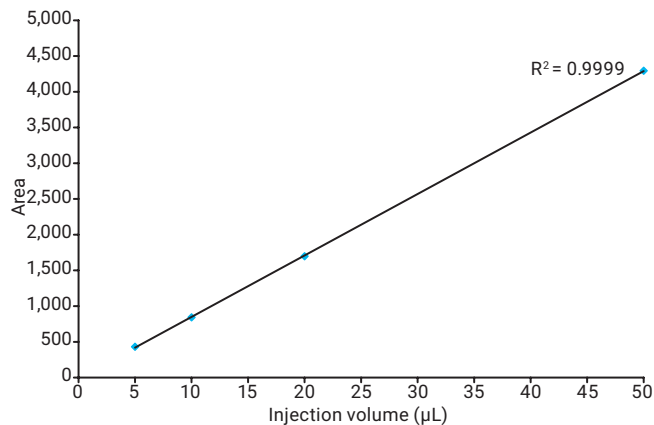


Figure 6. Linearity obtained by increasing the injection volume of a Herceptin originator (0.5 mg/mL) from 5 to 50 µL.

In mAb titer determination, it is important to be able to assess absolute mAb concentrations. These can be found by linking the peak areas measured in cell-culture supernatants to an external calibration curve constructed by diluting a mAb standard. For the Herceptin biosimilar project, this standard was found in the originator product, which was accurately formulated at 21 mg/mL. The calibration curves of a dilution series of Herceptin originators using citric acid and acetic acid as elution buffers are shown in Figure 7. The corresponding chromatograms are shown in Figure 8. In both cases, linearity was excellent, between 0.02 mg/mL and 2 mg/mL, which is the typical mAb titer range in CHO cells.

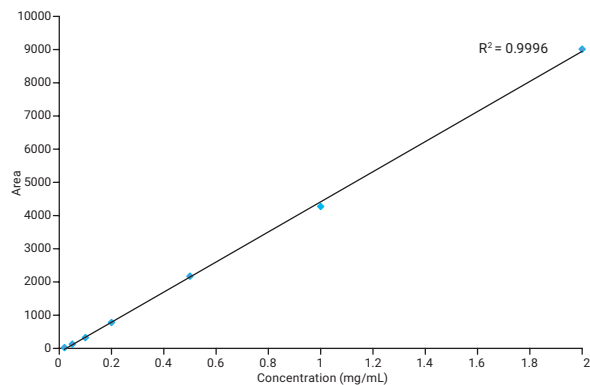
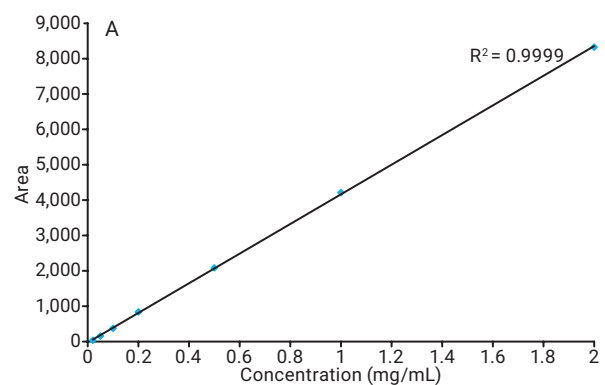


Figure 7. Herceptin Protein A calibration curve (0.02 to 2 mg/mL) using citric acid (A) and acetic acid (B) as elution buffer.

Application in mAb titer determination

The method possesses all the characteristics for the determination of mAb titer in cell-culture supernatants. It is fast, precise, and linear in the expected mAb concentration range and does not suffer from carryover. To illustrate this, nine trastuzumab-producing clones, generated in the framework of a Herceptin biosimilar development program, were analyzed using the Bio-Monolith Protein A column to determine absolute mAb concentrations. Chromatograms are displayed in Figure 9, and Table 2 reports the obtained mAb titers using both citric acid and acetic acid as elution buffers. Very consistent data were generated using both elution buffers. These results allow clear decisions to be made early in the development of mAbs. High-producing clones can be readily selected and subjected to further development.

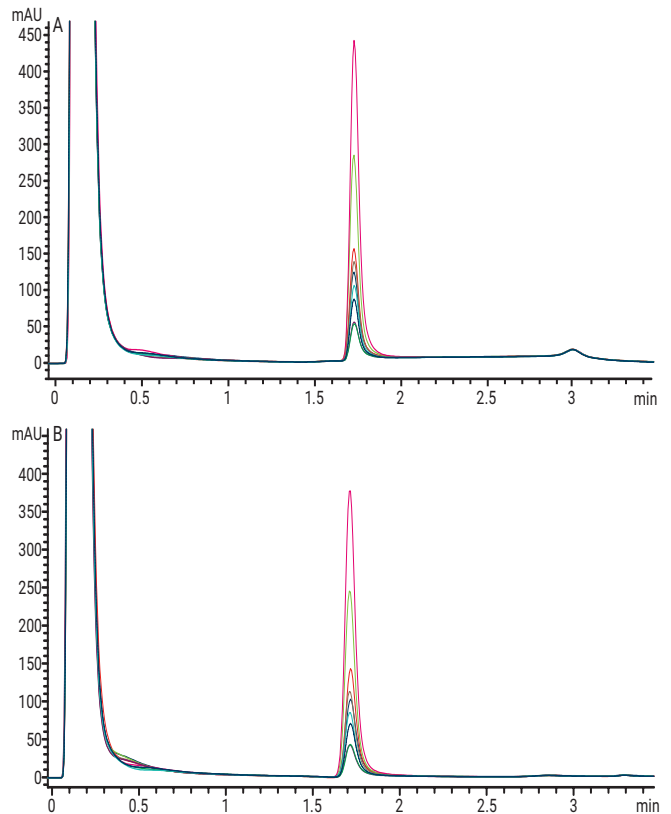


Figure 9. Overlaid UV 280 nm Protein A chromatograms of nine trastuzumab-producing CHO clones using citric acid (A) and acetic acid (B) as elution buffer.

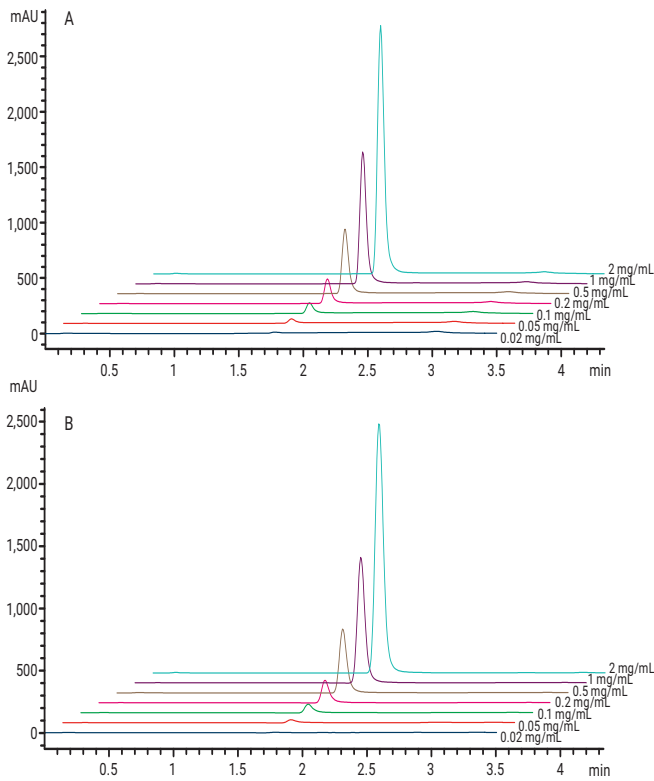


Figure 8. Overlaid UV 280 nm Protein A chromatograms of Herceptin calibration points using citric acid (A) and acetic acid (B) as elution buffer.

Maximizing column lifetime

Column regeneration

A major benefit of using a monolithic disk is that the presence of channels instead of pores decreases the likelihood of column clogging when injecting cell-culture samples. This increases robustness and reduces cleaning efforts. Column contamination can be reduced by running a blank gradient injection after every 30 to 50 samples. If column deterioration is observed (tailing or broad peaks), the following cleaning procedure is recommended. Column regeneration is the first step. If performance is still suboptimal, the clean-in-place procedure can be used, which will reduce the amount of Protein A available.

Column regeneration

1. Wash with 2 mL (20 column volumes (CV)) of 100 mM phosphate buffer + 1 M NaCl, pH 7 to 8, at 0.5 to 1.0 mL/min.
2. Wash with 2 mL (20 CV) of low-pH solution (such as elution buffer).
3. Re-equilibrate with binding buffer.

Clean-in-place

1. Wash with 1 to 2 mL (10 to 20 CV) of 0.1 M NaOH (reverse flow direction) at 0.2 to 0.5 mL/min.
2. Wash with 1 to 2 mL (10 to 20 CV) of DI water at 0.5 to 1.0 mL/min.
3. Wash with 1 to 2 mL (10 to 20 CV) of concentrated buffer (0.1 to 0.5 M) to restore normal pH (7.0 to 7.4).
4. Re-equilibrate with 5 mL (50 CV) of binding buffer.

Conclusions

The Agilent Bio-Monolith Protein A column was successfully applied in the selection of trastuzumab-biosimilar-producing clones based on both titer and structural similarity to the originator. This clone selection process is of utmost importance early in the development of innovator and biosimilar mAbs

For More Information

These data represent typical results.

For more information on our products and services, visit our Web site at www.agilent.com/chem.

その他のアプリケーションノート

AdvanceBio SEC

資料番号	タイトル
5991-2990JAJP	バイオモノリスプロテイン A による細胞培養のモノクローナル抗体力価のモニタリング
5991-4723EN	Reducing Cycle Time for Quantification of Human IgG Using the Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC Column
5991-5125EN	Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS
5991-6094JAJP	バイオモノリスプロテイン G カラム - mAb 抗体価測定用の優れたカラム

追加情報

Agilent バイオモノリスカラムはイオン交換方式でも使用できます。

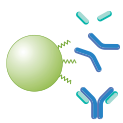
インタクトおよびサブユニットの純度

背景

逆相クロマトグラフィーは、各種のクロマトグラフィーの中で最も有用な手法の 1 つとして今も活用されています。よく知られた手法であり、分析対象物と固定相間の疎水性相互作用を活用します。インタクトタンパク質の場合、この手法では通常、イオンペア試薬とともに有機溶媒のグラジエントを移動相として使用します。これらの条件下では、分子が変性しやすくなります。サンプルをカラムで保持して濃縮するため、質量分析で役立つ高感度な技術です。このため、インタクトタンパク質の精密質量測定に最適です。

モノクローナル抗体などの大きなタンパク質の場合、IgG 分子の Fab および Fc 領域の重鎖や軽鎖などの小さなフラグメントであっても、ワイドポアアラムが適しています。アジレントは、300 および 450 Å 製品をさまざまな構成で提供しています。例えば、全多孔質、表面多孔質粒子を特長とする Poroshell 技術、厳選されたアルキル結合相などです。結合相は通常、より短い鎖長 (C8 または C4/C3) が独特のリガンドで、これには異なる選択性を提供する可能性があるジフェニルなどがあります。

逆相クロマトグラフィーの高い精度を活用すると、インタクトおよびフラグメント分析が可能となり、バイオシミラーと先発生物製剤を比較できます。ただし、必ず追加のテストを実行して、検出される可能性のあるさまざまな変異体の特定の部位を同定する必要があります。



インタクトおよびサブユニットの純度

高分子クロマトグラフィー (>150 Å)

各分離ニーズに適した選択オプション

AdvanceBio RP-mAb

モノクローナル抗体に最適

特長

450 Å ポア、表面多孔質粒子

長いカラム寿命

利点

高分離能 mAb 分離の実現に最適な設計

運用コストの低減

ZORBAX RRHD 300 Å 1.8 μm

UHPLC 分離

特長

最大圧力 1200 bar

1.8 μm 粒子

利点

UHPLC で使用可能

最大の分離能

PLRP-S

MS 検出での最適なギ酸性能

特長

シラノールの相互作用がないポリマー性粒子

耐久性が高く、堅牢な粒子

利点

より良好なピーク形状、より高い回収率、より少ないキャリーオーバー

長期にわたり再現性の高い結果を提供

概要

インタクトタンパク質分析用の逆相カラムを選択する際は、相互に関係する複数の要素を考慮しなければなりません。これには例えば、サンプルの分子量、最適な粒子のポアサイズ、カラムケミストリ、検出器の種類に特化して使用される機器、移動相の条件、速度やスループットなどがあります。

大きな分析対象物には大きなポアサイズが必要です。例外がいくつかあるものの、インタクトタンパク質分析のためのポアサイズは一般的に 300 ~ 500 Å です。概して、ポアサイズはタンパク質の流体力学半径の 3 倍以上とする必要があります。AdvanceBio RP-mAb カラムのポアサイズは 450 Å で、ZORBAX RRHD 300 Å、ZORBAX 300SB、Poroshell 300 のポアサイズはすべて 300 Å となっており、PLRP-S には多数のポアサイズが用意されています。インタクトタンパク質には、一般的に使用されるポアサイズよりも大きなものが使用され、1000 Å、5 μm PLRP-S カラムは、インタクトタンパク質およびタンパク質フラグメントで優れた分析結果を提供します。

逆相カラムの場合、カラムケミストリの選択のための一般的な指針は、より大きな分子量、より短いアルキル鎖です。このため、一般的に、ペプチドの分離には C18 カラムが、一方、インタクトタンパク質の分離には C8、C4、C3 カラムが使用されます。直線状のアルキル鎖に加え、AdvanceBio RP-mAb、ZORBAX RRHD 300、ZORBAX 300SB カラムではジフェニル相を使用できます。場合によっては、異なる選択性のジフェニル相によって、必要な分離を得られることがあります。PLRP-S カラムは、シリカベースの粒子ではなくポリマー性粒子を使用しています。一般的な逆相分離が可能ですが、選択性が多少異なり、pH 耐性が広いという利点があります。

使用可能な機器によって、達成可能な最大圧力が決まります。確かに、1200 bar の UHPLC では、最大圧力 600 bar のカラムを使用できません。しかし、カラムの早期故障を招く可能性があるため、カラムに圧力がかかり過ぎないように注意が必要です。アジレントの逆相カラム製品群の ZORBAX RRHD カラムは、最大背圧が 1200 bar で、高速な高圧力分離に使用できます。

機器と背圧の能力を考える際は、開発中のメソッドを最大背圧が異なる別の LC システムに移行する必要があるかどうかを考慮することが重要です。移行する場合、すべてのプラットフォームで動作できるメソッドの開発は、費用面と時間面で効果的です。

多くの場合、検出器の選択と移動相の条件は関連します。タンパク質の分離では、これは通常、UV 検出器と質量分析計 (MS) のどちらかを使用するかで決まります。従来より、UV 検出を用いた分離ではトリフルオロ酢酸 (TFA) をイオンペアリング剤として使用します。一方、MS 検出の場合はギ酸を使用します。TFA は、シリカベースのカラムで優れたピーク形状を得られるため、よく UV 検出に使用されますが、質量分析計ではイオン抑制を招きます。ギ酸は MS の感度を維持しますが、シリカベースのカラムでは理想的なピーク形状を得ることができません。このため、ギ酸の移動相にはポリマー性 PLRP-S カラムが推奨されています。このようなトレードオフを理解することで、ギ酸の移動相とシリカベースカラム、または TFA と質量分析計の組み合わせを使用できます。ギ酸や PLRP-S を UV 検出器と組み合わせて使用することにデメリットはありません。

水/アセトニトリルのグラジエントは通常、インタクトタンパク質およびモノクローナル抗体フラグメントの逆相分離で使用され、一般的にアジレントの逆相カラムに適しています。特定の分離においては、メタノールやイソプロパノールなどの異なる有機溶媒が、有用な選択性の変化をもたらす場合があります。AdvanceBio RP-mAb カラムで、イソプロパノール、アセトニトリル、水を含む有機移動相を用いると、最良の結果を得られます。アプリケーションノート 5991-6274EN には、このカラムと移動相のペアリングの詳細について記載されています。

AdvanceBio 脱塩 RP 製品なら、カートリッジ型の PLRP-S ベース手法をオンラインでの脱塩に使用できます。このカートリッジは、通常は質量分析の前に使用しますが、UV 検出器およびフラクションコレクションと組み合わせて使用して、次の分析の前のサンプルの脱塩に使用することも可能です。

Fast and High Resolution Analysis of Intact and Reduced Therapeutic Monoclonal Antibodies (mAbs)

The Agilent Bio-inert LC and AdvanceBio RP-mAb Columns

Authors

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, India

Abstract

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have become the most rapidly growing class of therapeutics in development for many diseases. Novel mAbs are entering clinical trials at a rate of 40 per year. There is also an urgent need for an analytical method that can be used for high-throughput analysis of large number of samples to support the growing biopharma development. This Application Note describes a fast and high-resolution method for the analysis of intact and reduced therapeutic Innovator and Biosimilar mAbs by reverse phase HPLC. Separation was achieved using an Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC system with Agilent AdvanceBio RP-mAb C4 and Diphenyl columns. RP-mAb columns give the advantage of superficially porous 3.5 μm particles with 450 \AA wide pores for improved accuracy and short analysis time compared to fully porous particles of the same size. The bio-inertness of the system, together with high resolution, and short and reproducible methods makes it highly suitable for biopharma QA/QC analysis.

Introduction

Evaluating the molecular similarity of a biosimilar to the reference or the innovator molecule is crucial during biosimilar development. A number of physicochemical methods are required by regulatory agencies involving a wide range of comparability programs. The authorities want to see comparability data on platforms that the previous company or the innovator submitted, primarily high-performance liquid chromatography (HPLC), TOF, Q-TOF mass spectrometry, and capillary electrophoresis. HPLC is a well-established technique for the determination of intact protein by size exclusion or ion exchange. However, technological developments in the field of reverse phase (RP) chromatographic stationary phases (a large pore size of 300 Å or fused core particles with short alkyl chains) have made them promising tools for analyzing intact proteins¹.

Historically, mAbs and their fragments are analyzed with limited success using widepore, totally porous particle RP HPLC. Due to their large size and limited diversity, analysis times are often unacceptably long, and mAb peaks can elute as broad bands, compromising resolution. In contrast, high efficiency superficially porous columns easily separate mAbs and their fragments in minutes with high efficiency.

In this work, we have demonstrated the suitability of the Agilent 1260 Bio-inert Quaternary LC system and Agilent AdvanceBio RP-mAb columns to achieve high resolution and rapid separation of intact and fragmented therapeutic innovator and biosimilar rituximab. The unique design of the AdvanceBio RP-mAb column offers unique selectivity due to its superficially porous particles (3.5 µm) with wide pores (450 Å). The column delivers a significant speed and resolution advantage while maintaining compatibility with all instruments.

Experimental

Equipment

A completely biocompatible Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System with a maximum pressure of 600 bar consisting of the following modules was used:

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC Pump (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert High Performance Autosampler (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity Series Thermostat (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity Thermostatted Column Compartment containing bio-inert click-in heating elements (G1316C, option 19)
- Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector with 60 mm Max-Light high sensitivity flow cell (G4212B option 33)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (p/n 799775-944)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (p/n 799775-904)

The complete sample flow path is free of any metal components, therefore, the sample never contacts metal surfaces. Solvent delivery is free of any stainless steel or iron components.

Software

Agilent ChemStation B.04.03 (or higher)

Reversed-phase HPLC parameters

Chromatographic parameters for intact and reduced mAb analysis using AdvanceBio RP-mAb columns are shown in Table 1.

Table 1. Chromatographic parameters used for intact and reduced analysis.

Parameter	HPLC (intact and reduced mAbs)	
Mobile phase	A) Water + 0.1 % TFA B) IPA:ACN:Water (70:20:10) + 0.09 % TFA	
Columns	Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm	
Gradient	Time (min)	% B
	0	15
	0.5	25
	1.5	35
	1.51	35
	3.0	60
4.0	60	
Post time	2 minutes	
Injection volume	1 µL	
Flow rate	1.0 mL/min	
TCC	80 °C	
UV detection	220 and 280 nm	

Reagents, samples, and materials

Alnnovator and biosimilar rituximab were purchased from a local pharmacy and stored according to the manufacturer's instruction. PBS and tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals and solvents were HPLC grade, and highly purified water from a Milli-Q water purification system (Millipore Elix 10 model, USA) was used. Acetonitrile and 2-propanol were purchased from Lab-Scan (Bangkok, Thailand). For intact and reduced analysis, rituximab samples were diluted to 2 mg/mL using PBS.

Sample preparation

Reduction of mAbs

For the separation of the light and heavy chains, an aliquot of 0.5 MTCEP stock was added to the mAb samples to obtain a final concentration of 10 mM. The mixture was held at 60 °C for 30 minutes.

Results and Discussion

The AdvanceBio RP-mAb column with superficially porous particles and wide pores delivers higher resolution and faster run times to provide accurate, reproducible results when analyzing monoclonal antibodies for biopharma discovery, development, and QA/QC applications. Combined with the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System with a power range up to 600 bar, it can be used for mAb separation. The mobile phase was a combination of isopropanol (IPA), acetonitrile (ACN), water, and trifluoroacetic acid (TFA). Figures 1 and 2 depict the optimized RP HPLC elution profile of intact innovator and biosimilar rituximab on an AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm and AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm column, respectively, demonstrating excellent peak shape and fast separation in 4 minutes. Comparing Figures 1 and 2 demonstrates that different selectivity can be obtained through the use of different bonded phases using the same chromatographic conditions, with the diphenyl phase resolving in finer detail.

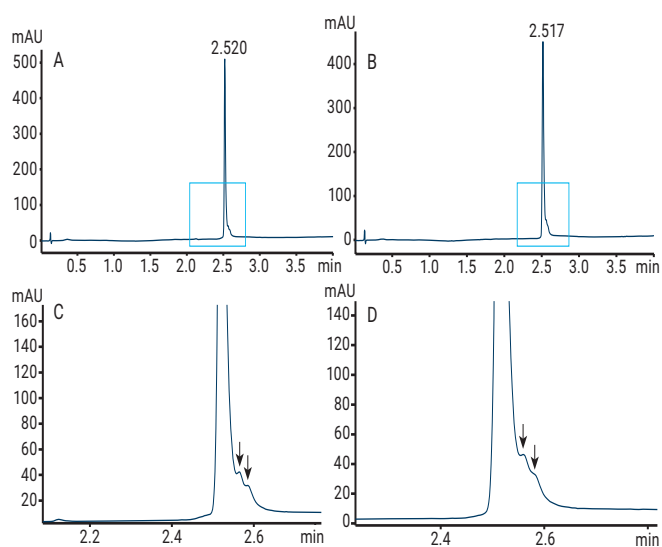


Figure 1. RP-HPLC analysis of innovator rituximab (A) and biosimilar rituximab (B) separated on an Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl 2.1 × 50 mm, 3.5 μm column. C and D show zooms.

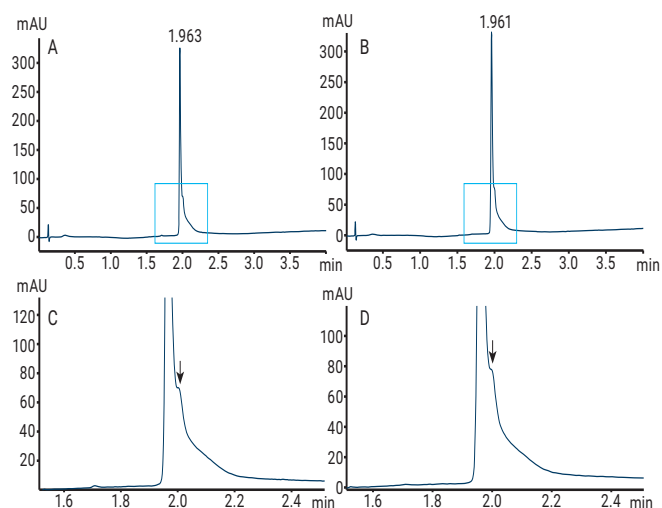


Figure 2. RP-HPLC profile of intact innovator rituximab (A) and biosimilar rituximab (B) on an Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm column. C and D show zooms.

Reduced mAb analysis

TCEP was used to separate free antibody light and heavy chains. AdvanceBio RP-mAb columns are very effective in providing fast and high-resolution separations of antibody fragments. The profiles in Figures 3 and 4 show a rapid reversed-phase analysis optimized for the separation of antibody fragments in approximately 4 minutes using C4 and diphenyl phases, respectively.

In both cases, due to reduction of the disulfide bonds, mAbs eluted as distinct light chain (LC) and heavy chain (HC) separations with high efficiency. The same gradient used for the intact analysis was able to resolve the LC and HC for the reduced samples. As we have seen with intact mAb analysis, the LC and HC show different selectivities with diphenyl and C4 columns. RP HPLC analysis of intact and reduced innovator and biosimilar using AdvanceBio RP-mAb diphenyl and C4 columns indicates that the mAb pair are highly similar.

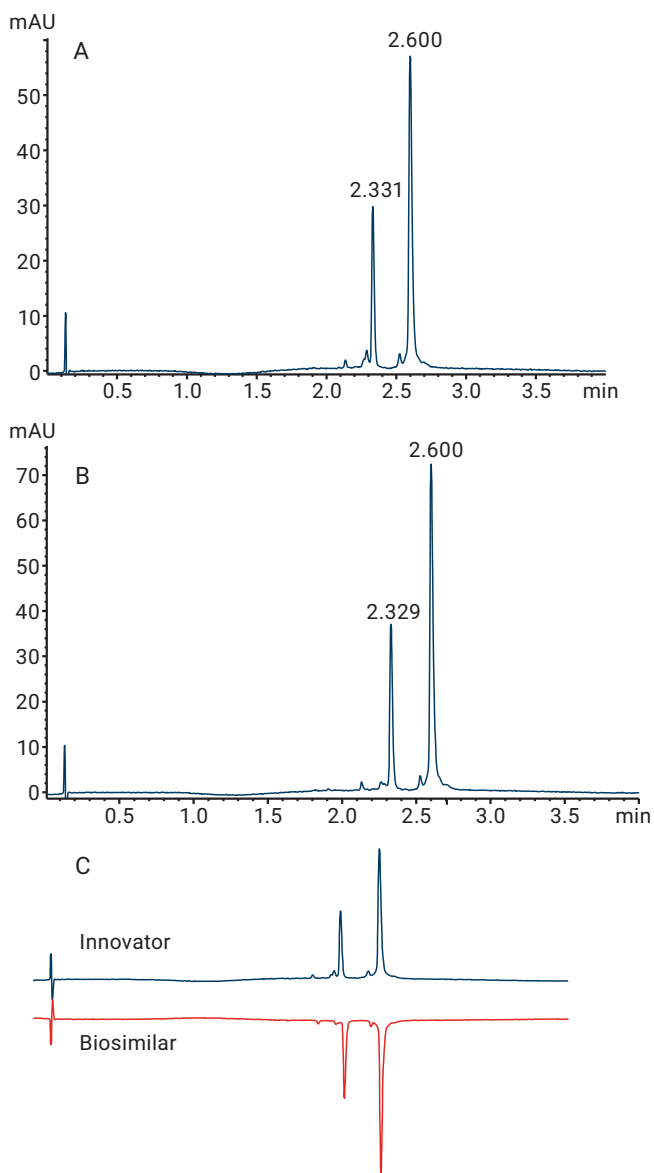


Figure 3. RP-HPLC profiles of innovator rituximab (A) and biosimilar rituximab (B) separated on an Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm column. Mirror plot image overlays (C).

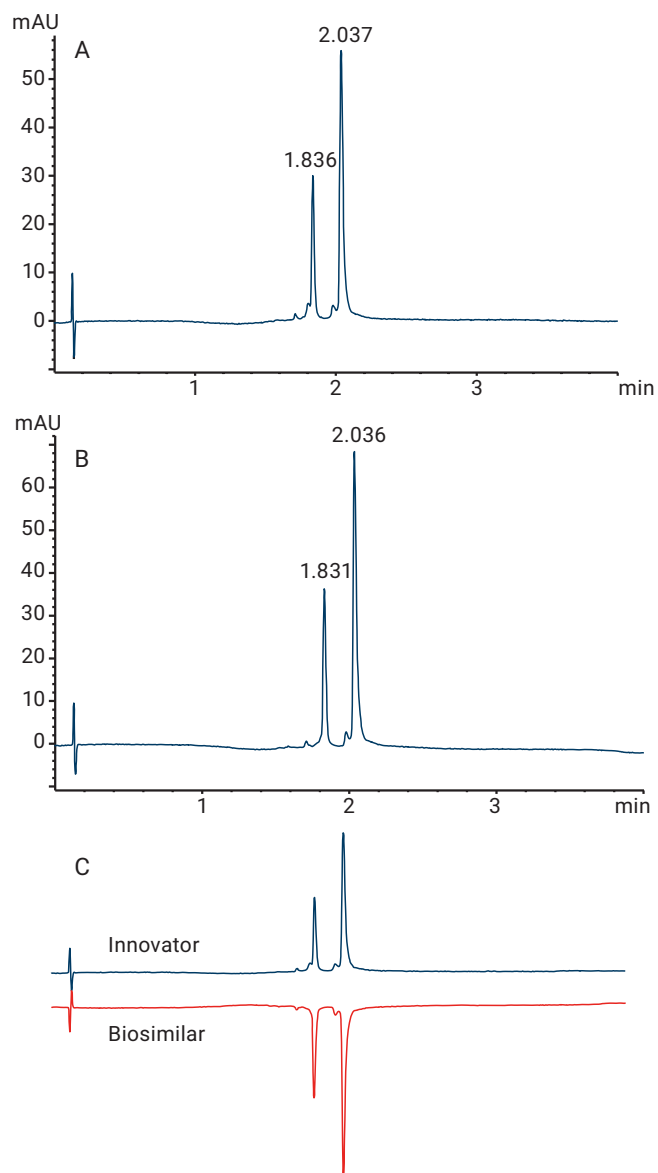


Figure 4. RP-HPLC profiles of innovator rituximab (A) and biosimilar rituximab (B) separated on an Agilent AdvanceBio RP-mAb C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm column. Mirror plot image overlays (C).

Precision of retention time and area

Tables 2 and 3 present the average retention times and area RSDs from six replicates of intact and TCEP reduced innovator, and biosimilar rituximab for the diphenyl and C4 phases. The results show that both columns provide precision of RT and area within the acceptable limit of $\pm 3\%$ and $\pm 5\%$, respectively.

Conclusion

In this application note, we have demonstrated a simple LC-UV-based approach to define the molecular similarity between a biosimilar and its innovator reference. We first used the Agilent 1260 Bio-inert Quaternary LC system with Agilent AdvanceBio RP-mAb Diphenyl and C4 columns to develop a high-resolution and rapid separation of intact mAbs. Using the same method, we were also able to show the separation of light chain and heavy chain after TCEP reduction. Area and RT precision of intact and reduced analysis using AdvanceBio RP-mAb columns were excellent, and show the reliability of the method. Such fast, simple, and reproducible methods for intact and reduced analysis of mAbs, coupled with bio-inertness of the system makes this solution suitable for the comparability analysis of mAbs for the biopharma industry.

Reference

1. Navas, N; *et al.*, Anal. Bioanal. Chem. 2013, 405, pp 9351-9363.

Table 2. Retention time and peak area RSD (%), n = 6 for intact analysis

Samples	Retention time		Peak area	
	Mean (min)	RSD	Mean (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb, C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
Innovator rituximab	1.96	0	71.61	1.98
Biosimilar rituximab	1.95	0.26	77.3	0.47
Agilent AdvanceBio RP-mAb, Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
Innovator rituximab	2.51	0.20	66.7	0.458
Biosimilar rituximab	2.51	0	73.3	1.86

Table 3. Retention time and peak area RSD (%), n = 6 for reduced analysis

Samples	Retention time		Peak area	
	Mean (min)	RSD	Mean (mAU/min)	RSD
Agilent AdvanceBio RP-mAb, Diphenyl, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
Innovator rituximab LC	2.32	0.60	19.71	4.24
Innovator rituximab HC	2.58	1.52	57.33	1.57
Biosimilar rituximab LC	2.32	0.07	23.56	3.25
Biosimilar rituximab HC	2.60	0.05	58.40	5.61
Agilent AdvanceBio RP-mAb, C4, 2.1 × 50 mm, 3.5 μm				
Innovator rituximab LC	1.83	0	21.5	1.4
Innovator rituximab HC	2.03	0.04	51.2	2.25
Biosimilar rituximab LC	1.83	0.03	24.47	3.84
Biosimilar rituximab HC	2.03	0.06	52.66	0.84

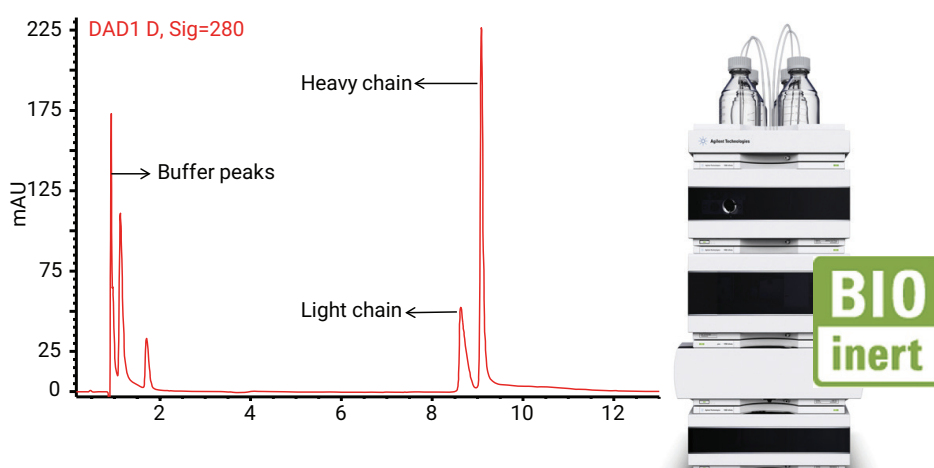
Disulfide Linkage Analysis of IgG1 using an Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System with an Agilent ZORBAX RRHD Diphenyl sub-2 μm Column

Authors

M. Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

Abstract

This Application Note describes a simple method for the analysis of disulfide linkages in monoclonal antibodies (mAbs) by reversed-phase HPLC. Separation was achieved using an Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System and an Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl sub-2 μm particle column. Diphenyl 1.8 μm columns deliver UHPLC performance for reversed-phase separations of intact proteins and peptide digests. Together with UHPLC instruments, these versatile columns enable higher order characterization with shorter analysis times. The 1260 Infinity Bio-inert LC System has a power range up to 600 bar and is capable of handling the higher pressures demanded by emerging column technologies with smaller particles down to 1.7 μm .



Introduction

Although recombinant mAb therapeutics have advanced enormously in recent years, little is known about their disulfide bond patterns. Complete disulfide bond assignment of IgG1 antibodies can be challenging due to their large size and substantial number of disulfide linkages. Disulphide bonding is critical to maintaining immunoglobulin (IgG) tertiary and quaternary structure for therapeutic monoclonal antibodies (mAb). Both inter- and intra-chain disulphide bonds are formed intracellularly in the expression host prior to secretion and purification during mAb production processes. Disulphide bond shuffling has previously been reported for IgG2 and disulphide-mediated arm-exchange for IgG4, reflecting innate behaviour of these IgG classes^{1, 2}. However, a typical and significant reduction in the number of disulphide bonds has been observed in IgG13 that present significant issues for manufacturing of therapeutic mAbs. This Application Note demonstrates the suitability of the 1260 Bio-inert Quaternary LC System for separating and analyzing the disulfide linkages of IgG1 by reversed-phase HPLC on ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm column. Ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) separation using sub-2 μm particles improves resolution per time and sensitivity, shortens run times, and thus enables the analysis of IgG1, reduced IgG1, and the peptides resulting from digestion of IgG1.

Equipment

Instrumentation

A completely biocompatible Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System with a maximum pressure of 600 bar consisting of the following modules was used:

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC Pump (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert High Performance Autosampler (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity Series Thermostat (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity Thermostatted Column Compartment containing bio-inert click-in heating elements (G1316C, option 19)
- Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector with 60 mm Max-Light high sensitivity flow cell (G4212B option 33)
- Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm column (p/n858750-944).

The complete sample flow path is free of any metal components such that the sample never gets in contact with metal surfaces. Solvent delivery is free of any stainless steel or iron components.

Software

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition for LC & LC MS Systems, Rev. C.01.04

HPLC analysis

Table 1 Chromatographic parameters used for RP HPLC.

Parameter	Conditions	
Mobile phase A	Water + 0.1% TFA	
Mobile phase B	Acetonitrile + 0.09% TFA	
Gradient	Time (min)	Mobile phase B (%)
	0 minutes	25
	3 minutes	35
	4 minutes	40
	5 minutes	40
	15 minutes	90
	16 minutes	25
	Post time	5 minutes
Injection volume	3 μL (Needle with wash, flush port active for 7 seconds)	
Flow rate	0.3 mL/min	
Data acquisition	214 and 280 nm	
Acquisition rate	20 Hz	
Flow cell	60 mm path	
Column oven	50 °C	
Sample thermostat	5 °C	

Reagents, Samples and Materials

The human monoclonal antibody IgG1 was a proprietary pharmaceutical molecule. DL-Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide, trizma base, and Endoproteinase Lys C were purchased from Sigma Aldrich. All chemicals and solvents used were HPLC grade and highly purified water from Milli Q water purification system (Millipore Elix 10 model, USA) was used. Acetonitrile was of gradient grade and purchased from Lab-Scan (Bangkok, Thailand).

Reduction and alkylation of Intact IgG1

IgG1 was diluted to 2 mg/mL using 100 mM Tris HCl and 4 M Gu HCl, pH 8.0. An aliquot of 10 μ L of 0.5 M DTT stock was added to obtain a final concentration of 5 mM. The mixture was held at 37 $^{\circ}$ C for 30 minutes. The reaction mixture was cooled briefly to room temperature (RT). An aliquot of 26 μ L of 0.5 M Iodoacetamide stock was added for a final concentration of 13 mM. It was allowed to stand for 45 minutes. Once removed, the solution was quenched with 20 μ L of DTT for a final concentration of 10 mM.

Lys C digestion of IgG1 and reduction

IgG1 was diluted to 1 mg/mL using 100 mM Tris HCl, pH 8.0. Endoproteinase Lys C in 100 mM Tris HCl, pH 8.0 was added at an enzyme protein ratio of 1:100 (w/w). The mixture was incubated overnight at 37 $^{\circ}$ C. The reaction was stopped by lowering the pH to 6.0 by adding 10 % TFA. Later, the reduction of Lys C digested IgG1 was carried out as described earlier in this Application Note.

Results and Discussion

Separation and Detection

A ZORBAX RRHD 300 Diphenyl 1.8 μ m column has the advantage of low pH and temperature stability, and, combined with the 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System with a power range up to 600 bar and capabilities of handling the higher pressures, can be used for protein separation. Figure 1 **A** depicts the optimized RP HPLC elution profile of intact IgG1 on a ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m column demonstrating excellent retention of IgG1 in 15 minutes. The reproducibility of analysis was tested with six replicates. Figure 1 **B** shows the overlay of six replicates.

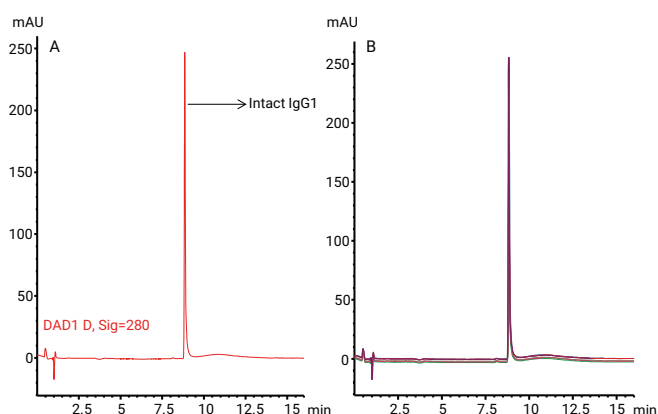


Figure 1. RP HPLC profile of intact IgG1 on an Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m column (A), and an overlay of six replicates (B).

Table 2 Retention time and area RSD (%), n = 6 for intact IgG1

Retention time		Peak area	
Mean (min)	RSD (limit: \pm 3.0 %)	Mean (mAU/min)	RSD (limit: \pm 5.0 %)
8.838	0.086	1,170	0.461

The effect of reduction and alkylation of the disulfide bonds in intact IgG1 was tested. Figure 2 shows the reversed-phase chromatogram of A reduced and alkylated IgG1 B overlay with reduction/alkylation buffer blank and C overlay of six replicates showing separation reproducibility. Due to the reduction of the disulfide bonds, the IgG1 is separated into its light and heavy chains. The IgG1 eluted as distinct light chain (LC) and heavy chain (HC) as indicated in Figure 2; however, this was not confirmed by mass spectral analysis.

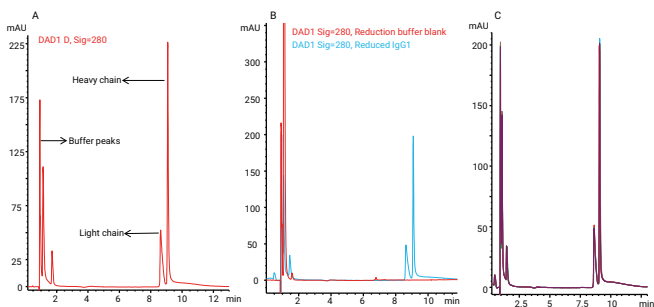


Figure 2. RP HPLC profile of (A) Reduced and alkylated IgG1, (B) overlaid with buffer blank, (C) overlay of six replicates.

Table 3. Retention time and area RSD (%), n = 6 for Light chain

Retention time		Peak area	
Mean (min)	RSD (limit: ± 3.0 %)	Mean (mAU/min)	RSD (limit: ± 5.0 %)
8.638	0.091	504.33	2.780

Table 4. Retention time and area RSD (%), n = 6 for Heavy chain

Retention time		Peak area	
Mean (min)	RSD (limit: ± 3.0 %)	Mean (mAU/min)	RSD (limit: ± 5.0 %)
9.084	0.152	1,520	0.390

Peptide maps resulting from Lys C digestion of intact IgG1 under nonreducing conditions resulted in a less intricate RP HPLC profile. A representative chromatogram of the IgG1 digest (Figure 3 A) displays the two (baseline separated) peaks that were selected for area and RT precision. The overlay results in sharp peaks with good resolution and excellent separation reproducibility (Figure 3 B).

Further, we wanted to compare the reversed-phase profile of IgG1 under nonreduced and reducing conditions to determine the peptides bound through disulfide linkages. The overlay of Lys C peptide maps of nonreduced IgG1 (red trace) and reduced IgG1 (blue trace) is depicted in Figure 4. The appearance of additional peaks (indicated by an asterix) after reduction of Lys C digested IgG1 confirms they are bound through disulfide linkages.

Precision of retention time and area

The precision of the retention time and area for intact IgG1, reduced IgG1 and endoproteinase Lys C digested IgG1 under nonreduced conditions are given in Tables 2, 3, and 4. The results show that the ZORBAX diphenyl sub-2 μm column shows precision of RT and area to be within 3% and 5 % respectively.

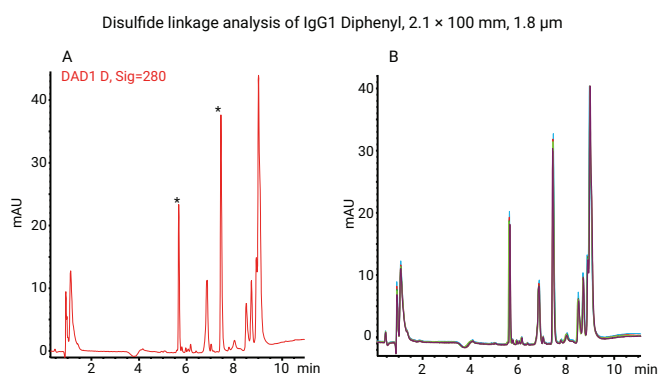


Figure 3. RP HPLC profile of (A) Lys C digested IgG1 and (B) overlay of six replicates. Peaks selected for RT and area RSDs are indicated by an asterix.

Table 5 Retention time and area RSD (%), n=6 for Lys C digested IgG1

	Retention time		Peak area	
	Mean (min)	RSD (limit: $\pm 3.0\%$)	Mean (mAU/min)	RSD (limit: $\pm 5.0\%$)
Peak 1	5.525	0.307	60	0.544
Peak 2	7.444	0.140	132.45	1.113

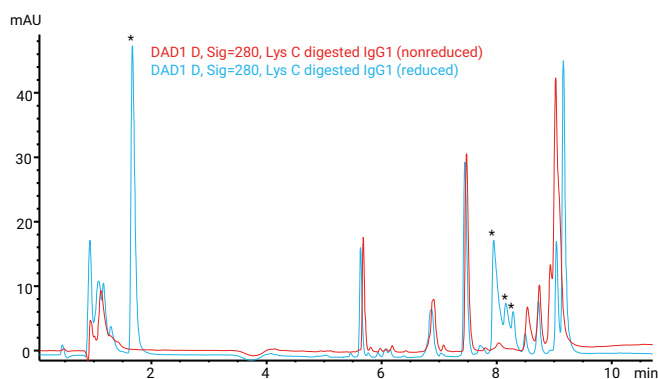


Figure 4. Comparison of peptide maps of Lys C digested IgG1 under nonreducing condition (red trace) followed by reduction (blue trace). Peptides bound through disulfide linkages are indicated by an asterix.

Conclusion

Disulfide linkage analysis is important to study some of the post-translational modifications of proteins for biopharma process development and monitoring. We have shown the combination of an Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quarternary LC System and an Agilent ZORBAX RRHD 300 Diphenyl, 2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m column to perform reproducible and high resolution analysis of disulfide linkage analysis of monoclonal antibodies for biopharma process development and monitoring. Area and RT precision of the method were excellent and proved reliability. Further, the 1260 Infinity Bio-inert LC has a power range up to 600 bar and is capable of handling the higher pressures demanded by emerging column technologies with smaller particles down to 1.7 μ m. The bio-inertness and corrosion resistance of the instrument coupled with a simple and reproducible method make this solution particularly suitable for the QA/QC analysis of monoclonal antibody for the biopharmaceutical industry.

References

1. R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng, Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 2503–2510.
2. T.-Y. Yen, H. Yan, B.A. Macher, Characterizing closely spaced, complex disulfide bond patterns in peptides and proteins by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 37 (2002) 15–30.
3. Mullan et al. *BMC Proceedings* 2011, 5 (Suppl 8):P110

Determination of Drug-to-Antibody Distribution in Cysteine-Linked ADCs.

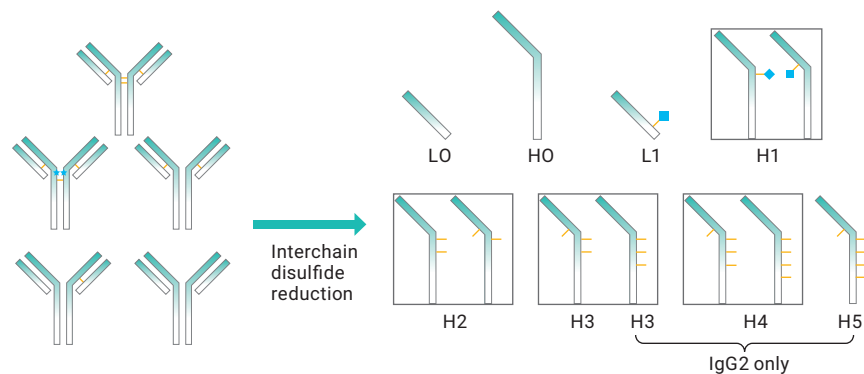
An Analysis of ADCs of IgG1 and IgG2 Subclasses

Authors

Lily Liu
Agensys, Inc.
Santa Monica, CA, US
Andy Coffey
Agilent Technologies, Inc

Abstract

This Application Note shows the advantages of using sub-2 μm reversed-phase columns to gain extra resolution and accuracy in the determination of drug-to-antibody ratios. These ratios were determined in antibody-drug conjugates derived from antibody intermediates of the IgG1 and IgG2 subclasses in this study.



Introduction

Antibody-drug conjugates (ADCs) represent a growing class of anticancer therapeutics that combine the specificity of an antibody with the potency of chemotherapeutic agents using covalent and chemically stable linkages. The ADC field is expanding with an increasing number of conjugation technologies being developed. One dominant class of ADCs includes conjugation to cysteine residues that are involved in the formation of interchain disulfide bonds through maleimide linkages. One of the principal critical quality attributes for ADCs that directly correlates with potency is the drug-to-antibody ratio (DAR). Up to eight or 12 drug-linkers may be conjugated per antibody, depending on the IgG antibody subclass¹.

Hydrophobic interaction chromatography (HIC) is a common approach for determining conjugate distribution, and calculating DAR for ADCs manufactured from IgG1 mAbs. However, monitoring conjugate distribution and DAR for ADCs manufactured from IgG2 mAbs by HIC is challenging, due to incomplete resolution between positional isomers and variably conjugated species. Reversed-phase (RP) chromatography can be used as an alternative or orthogonal technique for determining the DAR of ADCs following reduction of interchain disulfide bonds. Using this technique, the DAR may be calculated experimentally from the distribution of unconjugated and conjugated light and heavy chains. For ADCs manufactured from IgG2 antibodies, RP is a more suitable method. This is because elution between unconjugated and variably conjugated light and heavy chains is dictated by the number of conjugated drug-linkers, regardless of the site of conjugation.

A limited variety of suitable HIC and RP columns are available for these applications. This Application Note describes the use of the Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 column for characterizing the distribution of unconjugated and variably conjugated light and heavy chains, and for determining the average DAR. Here, we describe RP UHPLC methods suitable for ADCs manufactured from both IgG1 and IgG2 antibodies. Compared to methods using common HPLC columns, the ZORBAX RRHD SB300-C8 column offers improved peak resolution, and yields similar distributions of unconjugated and conjugated light and heavy chains and DARs.

Materials and Methods

Reagents, samples, and materials

ADCs manufactured from fully human IgG1 and IgG2 antibody intermediates are proprietary. DL-dithiothreitol (DTT) was purchased from Thermo Scientific (Pierce NoWeigh DTT). All solvents used were HPLC grade, and were purchased from either VWR or Fisher Scientific.

Samples in their respective formulation buffers (pH 5–6) were diluted to 5 mg/mL, and the pH was adjusted to approximately pH 8 with 1 M Tris pH 9. Partial reduction of the interchain disulfide bonds was achieved by incubation in 40 mM DTT at 37 °C for 15 minutes. After cooling to room temperature, reduced samples were diluted 1:1 with 2 % formic acid in 50 % acetonitrile to quench the reduction reaction.

UHPLC method

Parameter	Value
Column	Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8, 50 mm × 2.1, 1.8 μm
Other columns	Vydac 214MS, C4, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 300 Å Agilent PLRP-S, 2.1 × 50 mm, 5 μm, 1,000 Å
Mobile phases	A) 0.1 % TFA in H ₂ O B) 0.08 % TFA in 90 % ACN
Column temperature	80 °C (IgG1) 70 °C (IgG2)
Post-column cooler	35 °C
Injection volume	2 μL (IgG1) 3 μL (IgG2)
Flow rate	1 mL/min (IgG1) 0.8 mL/min (IgG2)
Detection	UV at 214 and 280 nm
Autosampler temperature	10 °C
IgG1 Gradient	Time (min) %B 0 34.5 3 38.0 5.5 38.5 25 55.0 25.1 75.0 26 75.0 26.1 34.5 Post time: 4 minutes
IgG2 Gradient	Time (min) %B 0 30.0 3 30.0 21 45.0 21.1 75.0 22 75.0 22.1 30.0 Post time: 2 minutes

Instruments

UHPLC with DAD detection system from an external vendor.

The equivalent Agilent instrument for UHPLC analysis is the Agilent 1290 Infinity II LC system, which is expected to deliver comparable, or better performance

Peak assignments

Peak identities were confirmed by coupling the UHPLC with in-line mass spectrometry (data not shown). The major peaks corresponded to unconjugated and variably conjugated light and heavy chains. Peaks eluting as trailing shoulders from the major peaks were identified as having one or more intrachain disulfide bonds reduced. Multiple peaks corresponding to conjugated heavy chains were observed having the same mass, and were identified as being positional isomers, where the drug-linker was conjugated at different cysteine residues.

DAR calculation

The DAR value was calculated from the analysis of the UV chromatogram, using Equation 1.

$$\text{DAR} = 2 \left(\sum_{n=0}^1 \frac{\text{LC peak area} \times n_{\text{drug}}}{\text{Total LC peak area}} + \sum_{n=0}^j \frac{\text{HC peak area} \times n_{\text{drug}}}{\text{Total HC peak area}} \right)$$

Figure 1.

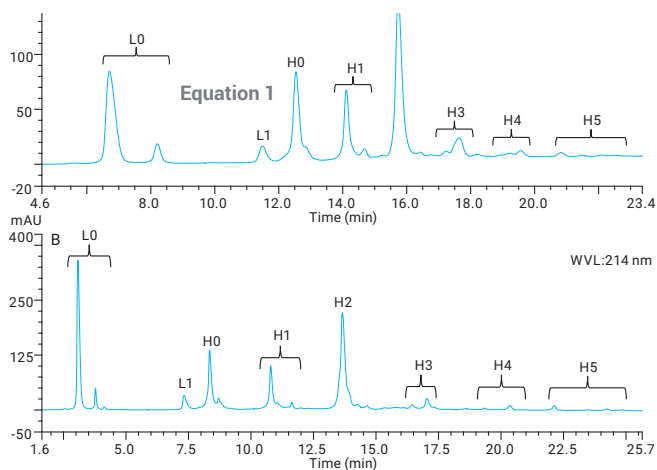


Figure 1. Comparison of reduced RP profiles obtained using a C4 HPLC column (A) and an Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 (B) for a cysteine-conjugated IgG2 ADC.

Results and Discussion

Figure 1 compares the reversed-phase chromatographic profiles of an ADC manufactured from an IgG2 mAb intermediate using a conventional C4 HPLC column and the ZORBAX RRHD SB300-C8 column. The peaks observed in the chromatogram corresponding to the UHPLC method using the ZORBAX RRHD SB300-C8 column are sharper, and show better resolution compared to the C4 HPLC column. Peak separation and resolution achieved using the ZORBAX RRHD SB300-C8 column enabled improved peak integration accuracy, and the DAR value was calculated to be 0.1 higher as a result. resolution achieved using the ZORBAX RRHD SB300-C8 column enabled improved peak integration accuracy, and the DAR value was calculated to be 0.1 higher as a result.

Figure 2 shows RP chromatograms of a reduced ADC manufactured from an IgG1 mAb resulting from analyses using both the Agilent PLRP-S column and the ZORBAX RRHD SB300-C8 column. Separation of the unconjugated and conjugated light and heavy chains on the ZORBAX RRHD 300SB-C8 column resulted in sharper peaks and improved resolution of the minor species in comparison to the PLRP-S HPLC column. The DAR value calculated from the results using the ZORBAX RRHD column was 0.1 higher than the result from the PLRP-S column. This difference can be attributed to more accurate peak integration.

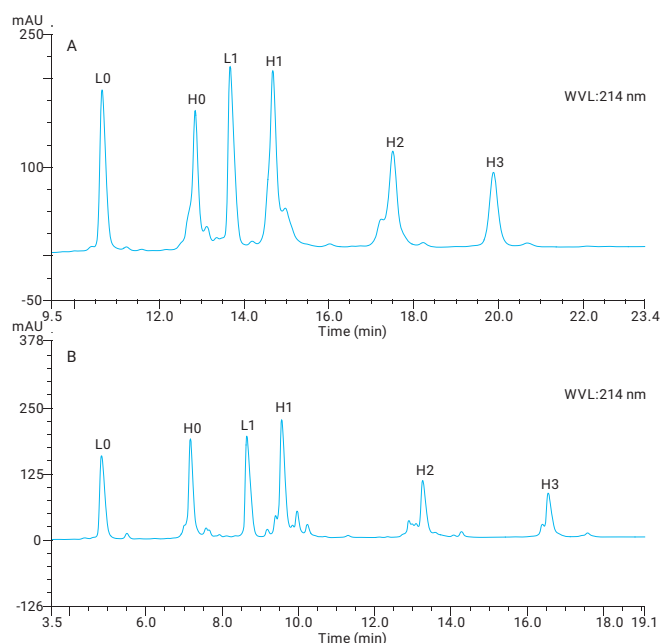


Figure 2. Comparison of PLRP-S HPLC (A) and Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8. 1.8 μm (bottom) profiles for a cysteine-conjugated IgG2 ADC.

Distributions and DAR value

Table 2 shows the distribution of unconjugated and conjugated light and heavy chains, and the calculated average DAR for the ZORBAX RRHD column and the two different HPLC columns. Relative peak areas and concomitant DAR values calculated using results obtained with the ZORBAX RRHD column are similar to those determined using the HPLC columns. The major advantage of using a sub-2 μm column is the improved peak resolution. This improved resolution results in better separation of minor species that were coeluting with the main peaks using the HPLC columns. The gradients presented in this Application Note can also be used to detect minor changes in sample stability and characterization of minor peaks by LC/MS. Also, the increased peak resolution and the higher pressure compatibility of the ZORBAX RRHD columns allow for development of shorter gradients for high-throughput testing.

Conclusion

Reversed-phase methods can determine the distribution of unconjugated and conjugated light and heavy chains and for calculation of the DAR for ADCs.

The Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 column has been shown to be suitable for these purposes to support characterization of ADCs derived from both IgG1 and IgG2 antibody intermediates. Peaks eluting from the ZORBAX RRHD SB300-C8 column were observed to be sharper and better resolved in comparison to the HPLC columns included in the comparison. This improvement enabled more accurate peak integrations and concomitant DAR values. The improvement in peak resolution from the ZORBAX RRHD SB300-C8 column also allowed detection of conjugation site positional isomers. RP methods using the ZORBAX RRHD SB300-C8 column have been shown to be suitable for characterizing the conjugate distribution of partially reduced ADCs in place of, or orthogonal to, hydrophobic interaction chromatography.

Reference

1. Wiggins, B.; *et al.* Characterization of Cysteine-Linked Conjugation Profiles of Immunoglobulin G1 and Immunoglobulin G2 Antibody–Drug Conjugates. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104(4), 1362-1372.

Table 2. Relative peak areas of each species and average DAR value using an Agilent ZORBAX RRHD SB300-C8 compared with HPLC columns.

Peak ID	IgG2 ADC		IgG1 ADC	
	% by HPLC (C4)	% by UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)	% by HPLC (PLRP-S)	% by UHPLC (Agilent ZORBAX RRHD)
L0	22.6	23.7	14.3	13.3
L1	2.3	3.4	15.6	17.7
H0	17.3	15.6	16.8	15.4
H1	12.5	13.1	26.2	27.8
H2	32.4	30.9	16.8	15.8
H3	7.4	8.1	10.5	10.0
H4	2.1	3.2	–	–
H5	3.3	2.2	–	–
DAR	3.5	3.6	3.6	3.7

その他のアプリケーションノート

AdvanceBio RP mAb

資料番号	タイトル
5991-6296EN	LC/MS Analysis of Intact Therapeutic Monoclonal Antibodies Using AdvanceBio RP-mAb
5991-4723EN	Reducing Cycle Time for Quantification of Human IgG Using the Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC Column
5991-5125EN	Cell Culture Optimization Using an Agilent Bio-Monolith Protein A Column and LC/MS
5991-6094JAJP	バイオモノリスプロテイン G カラム - mAb 抗体価測定用の優れたカラム

PLRP-S

資料番号	タイトル
5991-6263EN	Drug-to-Antibody Ratio (DAR) Calculation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Using Automated Sample Preparation and Novel DAR Calculator Software
5991-6559EN	Measuring Drug-to-Antibody Ratio (DAR) for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) with UHPLC/Q-TOF

ZORBAX RRHD 300SB

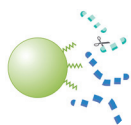
資料番号	タイトル
5990-9668JAJP	Agilent ZORBAX RRHD サブ 2 μm 300 Diphenyl UHPLC カラムを使用した還元型およびインタクトモノクローナル抗体の超高速/高分離能の分離
5990-7988EN	Analysis of Oxidized Insulin Chains using Reversed-Phase Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18
5990-7989JAJP	タンパク質分析用 Agilent ZORBAX 300-SBC18 1.8 μm ラピッドレゾリューション High Definition カラムの概要
5990-9248EN	Fast Separation of Recombinant Human Erythropoietin Using Reversed-Phased Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18, 1.8 μm
5990-9631JAJP	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
5990-9016EN	Reversed-phase Separation of Intact Monoclonal Antibodies Using Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition 300SB-C8 1.8 μm Column
5990-9667JAJP	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 カラムを用いたインタクトおよび還元型モノクローナル抗体の超高速プロファイリングにおける逆相最適化

ペプチドマッピング

背景

ペプチドマッピングはタンパク質の一次構造の包括的な同定に非常に適した手法です。また、タンパク質内の変異体の正確な位置の識別にも使用できます。遺伝子組み換えタンパク質の一次構造 (またはアミノ酸配列) はすでに判明しているため、トリプシンなどの酵素によってタンパク質が消化されるときに生成されるフラグメントを予測できます。トリプシンによって、リジンまたはアルギニンとその他のプロリン以外のアミノ酸の間の結合が加水分解され、タンパク質がフラグメントに切断されます。このアプローチによって、トラスツズマブが 62 のフラグメントに分解されます。これらのフラグメントを高分離能逆相分離することで、従来の「フィンガープリント」クロマトグラムに分離できます。分離と質量分析検出を組み合わせることで、ペプチドマッピングクロマトグラムで見られる実際のピークと予測されるフラグメントを、分析ソフトウェアによって関連付けることができます。

ペプチド「フィンガープリント」はタンパク質の種類によって異なり、さまざまなサイズ (個々のアミノ酸、ジペプチドから、はるかに大きいポリペプチドまで) や疎水性の違いがあります。このため、このタイプの分離には表面多孔質粒子または全多孔質粒子での C18 逆相を推奨します。



ペプチドマッピング

逆相クロマトグラフィー (<math><150 \text{ \AA}</math>)

一次配列の特性解析と PTM 検出での高い信頼性

AdvanceBio ペプチドマッピング

タンパク質同定と PTM 分析

特長	利点
エンドキャップされた C18 結合相	親水性ペプチドの優れたリテンション
表面多孔質粒子	小さい背圧で UHPLC 程度の効率を実現

概要

ペプチドマッピングではサンプル前処理が重要です。サンプル前処理は複数の手順を含む時間がかかるプロセスで、消化するタンパク質ごとに最適化が必要な場合があります。サンプル前処理の詳細手順については、後述の「ペプチドマッピングの基礎」を参照してください。大量のペプチドマッピングサンプルを分析する場合は、自動化によって速度と再現性を上げることができます。本章の最後で、AssayMAP Bravo (サンプル前処理自動化システム) の詳細について説明します。

トリフルオロ酢酸をイオンペア試薬として使用すると、最適なピーク形状を得ることができます。AdvanceBio ペプチドマッピングカラムはこの分離方法に適しています。このカラムには 120 Å ポアサイズの Poroshell 粒子が含まれており、UHPLC 機器を使用しなくても優れた分離能とピーク機能を得ることができます。MS 検出を使用するアプリケーションでは、イオンペア試薬としてギ酸がよく使用されます。

ペプチドマッピング: 分析の手引き

はじめに

ペプチドマッピングは生物薬剤研究における貴重なツールで、きわめて強力なメソッドとして、組み換えタンパク質をはじめとするタンパク質同定試験に広く用いられています。大抵の場合、タンパク質の酵素分解 (通常はトリプシンを使用) によりペプチド断片を生成したのち、再現性の高い方法でそのペプチド断片を分離および同定します。これにより、単一のアミノ酸変化、酸化、脱アミド化、その他の分解を検出およびモニタリングすることができます。また、N-末端環化、C-末端リシン処理、N-グリコシル化などの一般的なモノクローナル抗体バリエーションや、その他の翻訳後修飾を直接検出することも可能です。

ペプチドマップは、タンパク質や複数の処理で得られる最終生成物のフィンガープリントで、分析対象のタンパク質を包括的に理解することができます。ペプチドマッピングは、タンパク質の分離精製、ペプチド結合の選択的切断、ペプチドのクロマトグラフィー分離、有効な手法によるペプチドの分析という4つの主要手順で構成されます。

ペプチドマッピングは、タンパク質の一次構造を確認し、構造中の変化を検出するための比較手法と考えられています。また、処理の一貫性や遺伝的安定性を検証することもできます。ペプチドマップについては、タンパク質の確実な同定が可能で、完全なペプチド配列を最大限カバーし、非消化タンパク質の補足的情報や配列情報が得られることが求められます。

ペプチドを分離し、ペプチドマップを作成するためのクロマトグラフィーテクニックの選択は、分析対象タンパク質や実験の目的、予想される結果によって異なります。しかし、ペプチドマッピング分離の HPLC テクニックとしては、優れた分離能を備えた逆相クロマトグラフィーが広く用いられています。逆相クロマトグラフィーは、揮発性の移動相溶媒を使用できるため、分析的分離と分取的分離のいずれにも適しています。

ペプチドマッピング分離には低分子分離と同様のカラムが適しているものの、ほとんどのペプチドマッピング分離は低 pH および高温でおこなわれるため、優れた pH 安定性を備えたカラムが一般に使用されています。

ペプチドマップを適切に作成するためには、キャラクタライゼーションの方法全体を注意深く検証する必要があります。1つのプロフィールには、各ペプチドやその派生物を表す 100 以上のピークが含まれることもあります。そのため、サンプル前処理手法、強力な分離テクニック、有効性が実証されたプロトコルに関する知識が求められます。ペプチドマップを適切に作成するスキルと情報があれば、タンパク質分解物を最適に分離し、信頼性の高い確実なペプチド分析結果を得られます。

このペプチドマッピングの基礎では、逆相クロマトグラフィーによるペプチドマップ作成における重要点と、ペプチドマッピング手順に用いられる基本的なテクニックを紹介し、分離の最適化を行って、優れた結果を得るための方法を説明します。

タンパク質分解:

ペプチドマッピング分離を向上させるタンパク質の前処理

分析に先立つタンパク質分解のステップを十分に理解すれば、完全な分解を確実に起こない、分析の信頼性を高めることができます。多くの場合、必要条件を満たす安定した LC 注入用サンプルを得るためには、独自の開発プロトコルを備えた分解手法が求められます。分解の最適化にあたって考慮すべき選択肢は数多くありますが、従うべき一般的なアプローチがあります。タンパク質分解では、表 1 に示すように、(1) サンプル前処理、(2) 切断剤の選択、(3) 還元/アルキル化、(4) 分解プロセス、(5) 濃縮/精製という 5 つのステップが用いられます。

表 1. タンパク質分解の 5 ステップ

手順	結果	一般的な手法
1. サンプル前処理	分解するサンプルの前処理	除去、濃縮、透析、脱塩
2. 切断剤の選択	特定の切断要件	なし
3. 還元およびアルキル化	ジスルフィド結合を還元し アルキル化により SH 基にキャップ	還元: DTT、45 分、60 °C アルキル化: IAM、1 時間、暗所
4. 分解プロセス	タンパク質の切断	分解: pH 8、37 °C、一晩 クエンチ: TFA 添加
5. 濃縮/精製	LC または LC/MS 分析のためのサンプル前処理	C18 チップ、濃縮、透析、アフィニティカラム

ステップ 1:

サンプル前処理

タンパク質のサイズや構成によって、サンプル前処理のアプローチは異なります。特定の条件下では、サンプルの濃縮が必要となります。製品作成に用いた他の物質や安定剤についても、そうした物質がマッピング手順の妨げになる場合には、タンパク質と分離する必要があります。そうした手順を実施する手法は数多くあるほか、それぞれのタンパク質に適した精製手法やプロセスもあります。しかし、分解に先立つサンプル前処理に最も広く用いられているアプローチは、除去/濃縮、透析、ゲルろ過による脱塩です。

除去および濃縮は、高濃度のタンパク質の除去や、サンプル中のターゲットのタンパク質の分離を目的としています。除去は一般に、プロテオミクスアプリケーションにおいて、高濃度のアルブミンや免疫グロブリンが含まれる血清などの生物学サンプルの複雑さを低減するために用いられます。アジレントのマルチプルアフィニティ除去システム (MARS) HPLC カラムおよびスピナカートリッジを使えば、血清や血漿などの生体液中に大量に存在する低濃度タンパク質やバイオマーカーの同定とキャラクタライゼーションが可能です。MARS を用いた 14 種類の高濃度タンパク質の除去により、総タンパク質量の最大 94 % を除去できます。除去プロセスは堅牢かつ高効率で、自動化も容易です。



MARS は、さまざまな LC カラム寸法およびスピナカートリッジフォーマットで提供されています。除去されるタンパク質は、アルブミン、IgG、抗トリプシン、IgA、トランスフェリン、ハプトグロビン、フィブリノーゲン、アルファ 2-マクログロブリン、アルファ 1-酸性糖タンパク質、IgM、アポリポタンパク質 AI、アポリポタンパク質 AII、補体 C3、トランスサイレチンです。

除去では、イムノアフィニティ技術 (免疫沈降、共免疫沈降、イムノアフィニティクロマトグラフィーなど) が用いられます。また、濃縮テクニックでは、各物質に固有の生化学活性、翻訳後修飾 (PTM)、細胞内の空間的配置をもとに、細胞タンパク質のサブクラスが分離されます。翻訳後修飾 (リン酸化やグリコシル化など) は、イオン金属アフィニティクロマトグラフィー (IMAC) や固定化レクチンなどのアフィニティリガンドを用いて濃縮することができます。固有のタンパク質ケミストリを導入するためのその他のテクニックとしては、修飾アミノ酸や PTM の代謝的および酵素的導入などがあります。

シンプルなサンプルでも複雑なサンプルでも、分解に対応できるように最適化するために、透析または脱塩が必要となります。例えば、質量分析 (MS) では荷電イオンを測定することから、検出への干渉を最小限に抑えるためには、分析に先立ち塩 (特にナトリウム塩やリン酸塩) を除去する必要があります。透析および脱塩の生成物では、バッファ交換、脱塩、または低分子除去により、ダウンストリームプロセスの干渉を防止することが可能です。

透析は、サンプル中の塩濃度を下げる手法として確立されています。透析の際には、透析袋 (一定の孔隙率を持つ膜ケース) を満たし、袋を結んだのち、水またはバッファの入った水槽に袋を入れ、拡散により塩濃度を平衡化させます。袋を通過して拡散できない大きな分子は、袋の中に残ります。水槽内の液体が水の場合、袋内の低分子の濃度が徐々に低下し、やがて袋の外と中の濃度が同じになります。平衡が成立したら、袋を破り、液体を収集容器に注ぎます。透析は数リットルまでの体積に対応できますが、塩を除去するまでに数日を要するため、大容量のサンプルでの使用は現実的ではありません。

分解に先立つサンプルの脱塩については、ゲルろ過が最も現実的な手法です。この手法は、分子の大きさに基づいて分離する非吸着クロマトグラフィーテクニックです。脱塩は、サンプル中の塩などの低分子量成分を完全に除去または減少させるために用いられます。それに対して、バッファ交換はサンプルバッファを別のバッファに置換するものです。

ゲルろ過は、アイソクラティック溶出によりサンプルを処理するため、最も実施が容易なクロマトグラフィー手法です。ゲルろ過（サイズ排除クロマトグラフィーとも呼ばれます）を用いれば、分子量の差が2倍未満の分子（タンパク質など）を分離することができます。ペプチドマッピングアプリケーションでは、分離する物質間のサイズの違いはきわめて大きいのが普通です（タンパク質と塩など）。ゲルろ過メディアについては、大きい分子を完全に除去すると同時に、小さい分子を孔隙（ポア）へ自由に拡散できるものを選択します。バッファを用いてカラムを平衡化します。このバッファは、サンプルのバッファと同じものでも違うものでも使用できます。カラムへのサンプル導入後、さらにカラムバッファ（溶出バッファ）を加え、サンプル分子をカラム下流へ流します。メディアの孔隙を通過できない大きい分子が最初にカラムから溶出し、それに続いて小さい分子が溶出します。小さい分子は孔隙に拡散するため、大きい分子よりも溶出が遅くなります。溶出バッファがサンプルとは異なる場合、大きい分子は元々の塩から離れて新しいバッファに溶出し、元のサンプルバッファと完全に分離されます。



AdvanceBio SEC カラムを使えば、ペプチドマッピングアプリケーションに先立ち、タンパク質混合物を効率的に分離（サイズに基づく）および脱塩することができます。

Captiva 低タンパク除去フィルタ

どのようなサンプル前処理を行う場合でも、低タンパク質結合特性を備えたフィルタによるサンプルのろ過は効果があります。

アジレントの PES フィルタは、タンパク質に関連するろ過において、一貫性のある優れた低タンパク質結合特性を発揮します。PES フィルタメンブレンは、ほとんどの LC 分析で PVDF メンブレンよりも適切なオプションとなります。アジレントの PES は、一般的な LC 溶媒で PVDF と同様の適合性を持ち、タンパク質の結合とクリーンさについてはそれ以上に優れています。

詳しくは、<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=18908> をご覧ください。

Captiva PES フィルタ				
直径	ポアサイズ (um)	認定	ハウジング	部品番号
4	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5095
4	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5094
15	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5096
15	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5097
25	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5098
25	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5099



ステップ 2:

切断剤の選択

ペプチド結合の切断には、化学的切断と酵素的切断という 2 つの手法があります。化学的切断では、臭化シアン (CNBr) などの非酵素求核試薬を用いて、特定領域のペプチド結合を化学的に切断します。酵素的切断では、トリプシンなどのタンパク質分解酵素で、各種の部位特異的な切断を行います。切断手法および切断剤は、分析対象タンパク質や、分析において予想される結果によって異なります。また、選択の際には、ペプチドマッピングプロセス全体を慎重に検証し、関連する特性を考慮する必要があります。ペプチドマッピングに用いられる最も一般的な切断剤は、トリプシンです。これは、トリプシンの特性がきわめて明確に定義されているためです。トリプシンは、アルギニン (Arg) またはリシン (Lys) C 末端側のみ加水分解します。一般的な切断剤とその特異性を表 2 にまとめています。

表 2. ペプチド結合の切断方法

切断のタイプ	切断剤	特異性
酵素的切断	トリプシン	Arg および Lys の C-末端側
	ペプシン	非特異的
	キモトリプシン	疎水性残基の C-末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ	Glu および Asp の C-末端側
化学的切断	臭化シアン	Met の C-末端側
	希酸	Asp および Pro
	BNPS-スカトール	Trp

ステップ 3:

変性、還元、アルキル化

タンパク質分解酵素により効率的にペプチド鎖を切断するためには、ほとんどのサンプルで、さまざまな試薬を用いた変性、還元、アルキル化をおこなう必要があります。変性と還元は、1,4-ジチオスレイトール (DTT)、メルカプトエタノール、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンなどの試薬と加熱の組み合わせにより、しばしば同時におこなわれます。たいていは DTT が使用されます。この試薬は強力な還元剤で、ジスルフィド結合を切断し、タンパク質のシステイン間における分子間および分子内のジスルフィド形成を防ぎます。変性と還元を組み合わせることで、変性作用因として加熱のみを用いる場合に生じる、ジスルフィド結合の還元起因する再生という問題を避けることができます。再生の可能性をさらに低くするためには、タンパク質の変性と還元に続き、システインのアルキル化をおこなう必要があります。分解に先立つタンパク質サンプルのアルキル化に最も広く使用されている試薬は、ヨードアセトアミド (IAM) とヨード酢酸 (IAA) です。

図 1 は、分解に先立つモノクローナル抗体の還元およびアルキル化の完全性評価に用いられる逆相クロマトグラフィー分離メソッドの一例です。

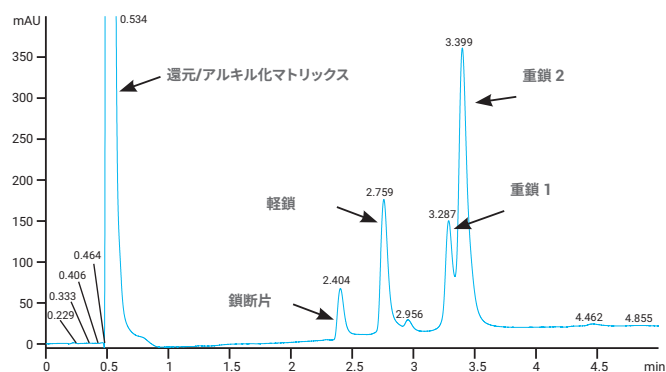


図 1. Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) 300SB-C8、2.1 x 50 mm カラム (部品番号 857750-906) を用いて、分解プロトコルに先立ち還元およびアルキル化したモノクローナル抗体の逆相分離。Agilent 1290 Infinity LC で水 (0.1 % TFA)/ACN (0.08 %) のマルチセグメント条件を用いて、0.5 mL/min および 75 °C で分離しました。

ステップ 4:

すでに述べたように、トリプシンは特異性が明確に定義されているため、分解に最も広く用いられるタンパク質分解酵素です。トリプシンはタンパク質であるため、自己消化と呼ばれる過程でみずからを分解することがあります。しかし、ほとんどのサンプルに天然で存在するカルシウムが、トリプシン中の Ca^2 結合ループで結合し、自己消化を防ぎます。現在ほとんどのラボで用いられている修飾トリプシンを使えば、自己消化をさらに防ぐことができるため、通常は大きな問題にはなりません。

トリプシン消化は、一般には 37°C で、 pH 7.5 ~ 8.5 の最適な pH 範囲で実行されます。酵素的切断に最も適した pH を得るために、トリプシンの添加に先立ち、バッファ (通常は 50 mM 重碳酸トリエチルアンモニウム (tABC) または 12.5 mM 重碳酸アンモニウム(ABC)) を添加します。この目的には、2-アミノ-2-ヒドロキシメチルプロパン-1,3-ジオール (トリス) バッファも用いられますが、トリスバッファは MALDI や ESI-MS などの MS 分析には適合せず、固相抽出 (SPE) や ZipTip により除去しなければならない点を考慮する必要があります。分解に十分な (ただし多すぎない) 量の酵素を加えるためには、適切な酵素/タンパク質比を保つことが不可欠です。

タンパク質は環境によって異なる挙動を示すことがあります。また、混合物中のモデルタンパク質を分解する場合には、個別に分解する場合に比べて、分解の効率が低くなる傾向があります。その理由の 1 つは、多くのタンパク質を同時に分解するほど、トリプシン切断部位の競合が激しくなることです。また、その他にも多くの要素やパラメータ条件がタンパク質分解の完全性と効率に影響を与え、予想される結果に変動を生じさせます。そうした要素をより慎重に把握および制御すれば、分解の効率が大幅に向上します。反応の pH 、分解時間および温度、使用する切断剤の量は、いずれも分解の効率に大きな影響を与えます。

- **分解物の pH :** 一般に、分解混合物の pH は、任意の切断剤の性能を最適化できるように、事前分析により決定されます。例えば、切断剤に臭化シアンを用いる場合、強酸環境 (pH 2、ギ酸など) が必要となります。しかし、切断剤にトリプシンを使用する場合は、弱アルカリ環境 (pH 8) が最適です。原則としては、分解中や断片化反応の途中で、反応環境の pH によりタンパク質の化学的完全性が変化しないようにします。
- **分解時間および温度:** 時間と温度は、最適な分解を実現するための重要な要素です。化学的反応を最小限に抑えるために、ほとんどのタンパク質分解では 25°C ~ 37°C が推奨されます (トリプシン消化は通常 37°C で実行されます)。しかし、反応温度が高くなるとタンパク質変性も大きくなるため、最終的にはタンパク質の種類とサイズにより反応温度が決定されます。反応時間も、分解プロトコルの最適化において考慮すべき要素です。サンプル量が十分にある場合、不完全な分解を避けて再現性の高いマップを得るために、事前分析により最適な時間を決定することを推奨します。分解時間は、サンプルのサイズや種類によって、2 時間 ~ 30 時間と大きく異なります。反応は酸の添加や凍結により停止しますが、これによりマップに影響が出ることはありません。
- **切断酵素の濃度:** 切断剤の濃度は、マップパターンへの影響を避けるために、最小限に抑える必要があります。切断剤の量を多くすると、通常はかなり短い時間 (6 ~ 20 時間など) で分解が完了します。しかし、量を増やす場合には、慎重に考慮する必要があります。タンパク質と酵素の比率は、通常は 10:1 ~ 200:1 程度です。切断を最適化するために、切断剤を 2 回以上にわけて段階的に添加することが推奨されます。たいていの標準的なトリプシン消化手順では、そうした方法でトリプシンが添加されます。しかし、最終的な反応量は、次のペプチドマッピング手順である分離が促進される程度の量にとどめる必要があります。分析対象タンパク質を除いて、すべての試薬で分解対照を用いたブランク測定を実施すれば、その後の分析に影響を与える可能性のある分解アーチファクトを見極めることができます。

図 2 - トリプシン消化手順

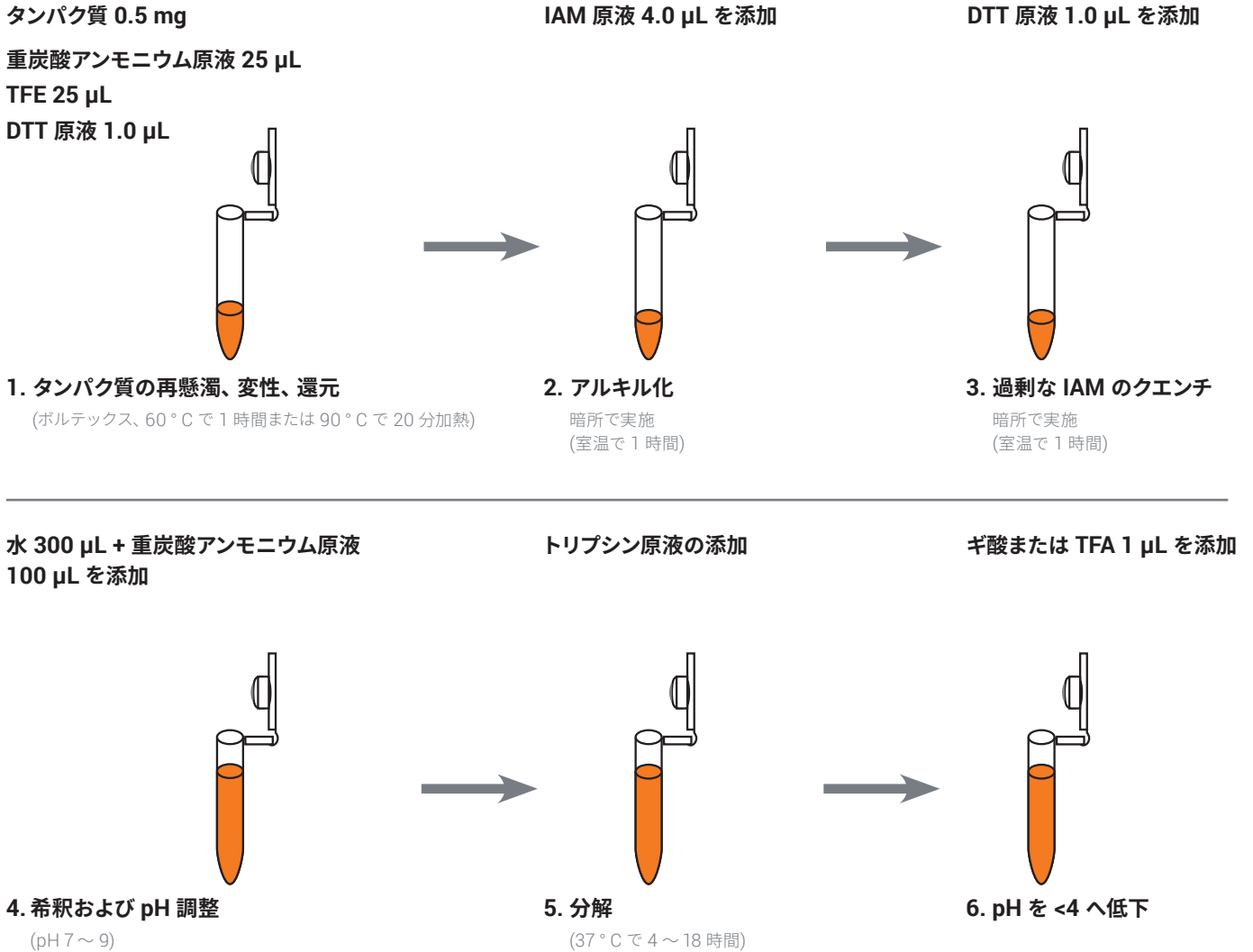


図 3 - 分解手順の所要時間

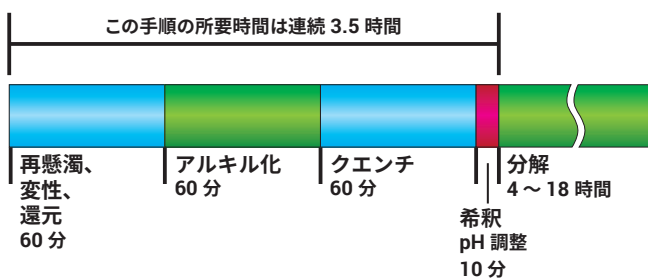


図 2 および 3 では、タンパク質 (0.5 mg) の還元、アルキル化、溶液内分解、精製に一般的に用いられているトリプシン消化手順をまとめています。この手順は、タンパク質の量が少ない場合にも対応できます。

還元、アルキル化、分解用溶液の前処理: まとめ

100 mM の重炭酸アンモニウム:

水 100 mL に重炭酸アンモニウム 0.7906 g を加え溶解します。4 °C の冷蔵庫で保管します。保管期間は最長 2 か月です。

トリプシン原液:

修飾トリプシンは、Agilent プロテオミクスグレードトリプシン (部品番号 204310、後述の「トリプシン消化プロトコルの「例」」を参照) として購入できます。このトリプシンは凍結乾燥されています。この状態のまま -20 °C で保管すれば、1 年以上にわたって、活性を大きく損なわずに保管することができます。必要に応じて、凍結乾燥されたトリプシンを 50 mM 酢酸 100 μ L に溶解してトリプシン原液を調製し、最終濃度が 1 μ g/mL となるようにします。凍結融解サイクルを最小限に抑え、保管の安定性を高めるためには、溶解したトリプシンをそれぞれ 10 μ L 程度チューブに 10 分割して入れてください。フロストフリーではない冷凍庫に入れ、-20 °C で各チューブを保管してください。この 1 μ g/ μ L の溶液を用いて、必要に応じてトリプシン中間溶液を作成します (以下を参照)。Agilent プロテオミクスグレードトリプシンには、トリプシン分解の代替プロトコルを紹介する技術文献が付属します。以下のメソッドにより、プロトコルの簡単さと信頼性が確認されています。

200 mM DTT:

1.5 mL エッペンドルフチューブ内で、水 1 mL に DTT 0.031 g を加え溶解します。ボルテックスします。DTT 溶液を適当な量 (100 μ L など) にわけ、遠心分離管に入れます。フロストフリーではない冷凍庫で、分割した各溶液を -20 °C で保管します。保管期間は最長 1 か月です。解凍したら再冷凍しないでください。

200 mM IAM

(使用直前に調製): 1.5 mL エッペンドルフチューブ内で、水 1 mL に IAM 0.037 g を加え溶解します。

トリプシン消化プロトコル

タンパク質の再懸濁、変性、還元	
1	総タンパク質量 0.5 mg を 0.5 mL エッペンドルフチューブに入れます。
2	重炭酸アンモニウム原液 25 μ L を加えます。
3	TFE 変性剤 25 μ L を加えます。
4	DTT 原液 1.0 μ L を加えます。
5	ボルテックスで混合します。
6	以下のいずれかの条件で加熱し、変性させます。 ✓ 60 °C で 45 分～1 時間 ✓ 90 °C で 20 分 (親水性タンパク質) ～1 時間 (疎水性タンパク質)
7	室温まで冷やします。
アルキル化	
1	IAM 原液 4.0 μ L を加えます。
2	短くボルテックスします。
3	室温の暗所 (ホイルで覆いをしたラックなど) で 1 時間、サンプルをインキュベーションします。
余分な IAM のクエンチ	
1	DTT 原液 1.0 μ L を加え、余分な IAM を分解します。
2	室温の暗所 (ホイルで覆いをしたラックなど) で 1 時間放置します。
希釈と pH 調整	
1	水 300 μ L を加えて変性剤を希釈します。
2	重炭酸アンモニウム原液 100 μ L を加えて pH を高くします。
3	必要に応じて、pH 試験紙に 0.5 ～ 1 μ L をたらし、pH を確認します。一般的な pH 値は 7.5 ～ 8.0 です。開始サンプルの pH が不明の場合は、pH の確認が特に重要です。
4	pH が 7 ～ 9 の範囲外の場合は、さらに塩基性物質 (重炭酸アンモニウム) を加えます。

分解	
1	トリプシン保管溶液中で、新しいトリプシン原液を作成します。15 分置いて、再懸濁を完了させます。
2	分解する総タンパク質量が 20 μ g 未満の場合は、超純水 45 μ L を加えて原液を 10 倍に希釈し、トリプシン中間溶液を作成します。この 100 ng/ μ L の溶液は、-20 °C で保管すれば、2 か月にわたって活性を大きく損なわずに保つことができます。 注意: IAM がクエンチされていないと、リシンが徐々にアルキル化されます。
3	酵素:基質 1:20 ～ 1:50 の質量でトリプシン原液を加えます。例えば、タンパク質 500 μ g の場合、トリプシン 10 ～ 25 μ g (トリプシン原液 10 ～ 25 μ L) を加えます。
4	短くボルテックスします。
5	チューブをヒーター内に置き、37 °C で 4 ～ 18 時間インキュベーションします。
6	溶液を冷やします。
pH 低下によるトリプシン活性の停止	
1	ギ酸または TFA 1 μ L を加えて pH を下げ、トリプシン活性を停止させます。脱塩する場合は、精製過程でペプチドが樹脂に吸着するのを防ぐため、TFA を使用してください。
2	短くボルテックスします。
3	元のサンプルの pH に心配がある場合は、pH を確認してください (通常は 3.0 ～ 3.3)。pH が 4 以上の場合は、さらに酸を加えます。
分解物の精製	
1	サンプルの由来によっては、MS 分析に先立ち、脱塩する必要があります。
2	脱塩の必要はないものの、サンプルが不透明な状態の場合は、MS 分析に先立ちサンプルをろ過します。Agilent スピンフィルタ、部品番号 5185-5990 を使用してください。そうした不透明な状態は、サンプル中の細胞残屑が原因となっている可能性があります。
3	必要に応じて、分析用のサンプルを希釈します。 タンパク質の分子量が 50 kDa で、分解が完了している場合は、溶液の濃度は約 20 pmol/ μ L になります。それほど複雑ではないサンプルの場合、希釈して 50 fmol/ μ L の溶液を作成します。

ステップ 5:

分解物の精製と濃縮

一般には、ペプチドマップ分析を成功させるためには、ペプチドマッピングに先立ち、精製または濃縮をおこなう必要があります。サンプルの種類や分析の目的に応じて、数多くの精製および濃縮手法があります。例えば、特定の PTM (リン酸化反応、ユビキチン化、グリコシル化など) の濃縮には、PTM 特異的抗体またはリガンドによる親和性精製が用いられます。ホスホペプチドの濃縮には、抗ホスホ特異的抗体による IP や、リン酸化セリン、チロシン、トレオニンと選択的に結合する TiO₂ によるプルダウンが用いられます。

ペプチド濃縮後には、グラファイトまたは C-18 チップまたはカラムを用いて、塩とバッファを除去することができます。また、界面活性剤については、アフィニティカラムや界面活性剤沈殿試薬により除去できます。希釈サンプルについても、さまざまな分子量カットオフ (MWCO) 範囲のコンセンレータを用いて濃縮することができます。精製が完了したら、MS 分析のための最終的な前処理をおこないます。この前処理は、分析の種類によって異なります。LC/MS または LC/MS/MS の場合、良好な LC 分離能および分析結果を得るためには、適切な移動相およびイオン対試薬が必要です。MALDI-MS の場合、ペプチドサンプルと特定のマトリックス (結晶性エネルギー吸収色素分子) を混合し、MALDI プレート上で乾燥させてから分析する必要があります。



トリプシン消化プロトコル

必要なアイテム	例
重炭酸アンモニウム、試薬グレード	Sigma カタログ #A-6141
ジチオスレイトール (DTT)、99 % 以上	Sigma カタログ #D-5545
ヨードアセトアミド (IAM)、97 %	Sigma-Aldrich カタログ #I-670-9
トリフルオロエタノール (TFE)、99 % 以上	Sigma-Aldrich カタログ #T63002-100G
修飾トリプシン	Agilent プロテオミクスグレードトリプシン (部品番号 204310)
水、18 メガオーム相当	部品番号 8500-2236
ギ酸、分析グレード、またはトリフルオロ酢酸、シーケンシンググレード	部品番号 G2453-85060
Eppendorf Safe-Lock 遠心分離管、ナチュラル、非シリコン処理	Eppendorf 部品番号 022363611 (0.5 mL、500 個ボックス)、または部品番号 022363204 (1.5 mL、500 個ボックス)
マイクロピペッタおよびチップ: 範囲 1 ~ 1000 µL	
チューブヒーター / シェーラー	Eppendorf サーモミキサー
pH 試験紙、pH 範囲 2.5 ~ 4.5 および 7.0 ~ 9.0	EM Science ColorpHast ストリップ、カタログ #700181-2
化学天秤	
Bond Elut OMIX チップ、10 µL (溶出量 2 ~ 10 µL)	1x96 チップ (部品番号 A5700310)、6x96 チップ (部品番号 A5700310K)
Bond Elut OMIX チップ、100 µL (溶出量 10 ~ 100 µL)	1x96 チップ (部品番号 A57003100)、6x96 チップ (部品番号 A57003100K)

少量のペプチド精製: Bond Elut OMIX チップ

ペプチド分解物精製のための Bond Elut OMIX (容量 10 µL) メソッド

必要なアイテム	例
サンプル	2.5 % TFA 溶液を用いて、サンプル中のトリフルオロ酢酸 (TFA) 濃度が 0.5 % ~ 1.0 % になるように調整します。
試料調製	50 % アセトニトリル (ACN):水 10 µL を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。
コンディショニングと平衡化	1.0 % TFA 溶液 10 µL を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。
サンプル導入	前処理したサンプル最大 10 µL を OMIX チップに吸引します。最大の効率を得るためには、サンプルを 3 ~ 5 サイクルにわたって吸引および注入します。最大 10 サイクルを使用して、結合を向上させることができます。
洗浄	0.1 % TFA バッファ 10 µL を吸引し、溶媒を捨てます。同じ手順を繰り返します。
溶出	LC/MS または LC/MS/MS 分析: 0.1 % ギ酸または 0.1 % 酢酸を含む 50 ~ 75 % アセトニトリルまたは 50 ~ 75 % メタノール溶液 2 ~ 10 µL を吸引し、オートサンプリャイアルまたはウェルプレートに注入します。

最良の結果を得るためには、平衡化、サンプル導入、洗浄ステップの際に、ピペッタをチップ容量 (10 µL) に合わせてください。
溶出の際には、正確な量の溶液を個別の容器に分け、ピペッタをチップ容量の 10 µL に合わせ、最大容量に保ってください。

ハイスループットペプチドアプリケーション: ペプチドマッピングのための自動サンプル前処理ソリューション

「きわめて一貫性の高い分解と、AssayMAP による
自動逆相精製を組み合わせることで、これまでは
考えられなかったスケールとスループットの
コラボレーション研究が可能になりました」

Jacob D. Jaffe 博士

アシスタント
ディレクター
プロテオミクス
プラットフォーム



ペプチドマッピング用の自動サンプル前処理の詳細については、**73 ページ**をご覧ください。

逆相クロマトグラフィー： ペプチドマッピングに適したテクニック

ペプチドマップを作成するためのカラムとメソッドは、最終的にはマッピングするタンパク質と分析の目標によって決まります。バイオフィーマ分野で最も広く用いられているペプチドマッピングカラムメソッドは、逆相クロマトグラフィー (RPC) です。このテクニックは分離能が高く、(質量分析と互換性のある) 揮発性移動相を使用できるため、ほとんどのペプチド分離の HPLC メソッドとして広く用いられています。RPC はスピードと効率という点で、他の HPLC 分離テクニックよりも優れています。図 4 では、ウシ血清アルブミンを用いた良好なペプチド分離例を示しています。この図から、ペプチドマッピングに RPC を用いれば、多くのペプチドピークフラグメントを分離できることがわかります。

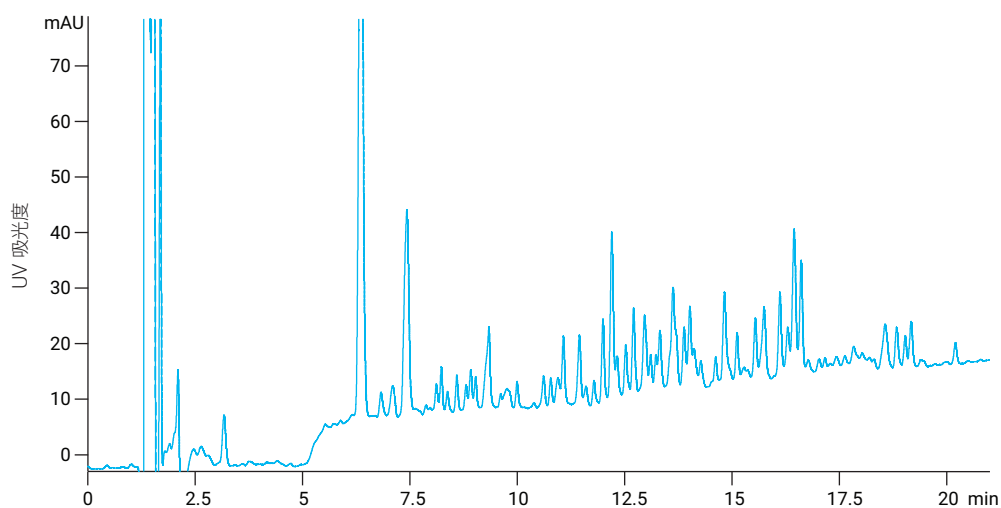
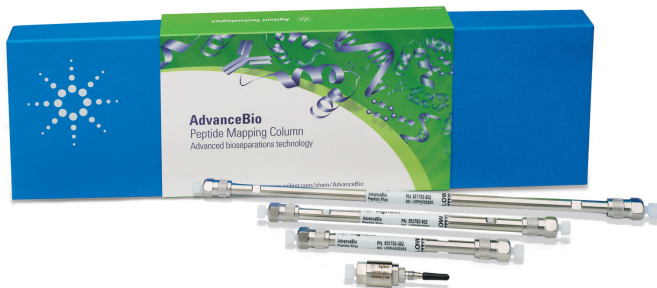


図 4. Agilent Polaris C18-A、2.0 x 150 mm カラム (部品番号 A2001150X020) を用いた BSA の逆相分離

ペプチドマッピング分離を成功させるための要件

一般に、ペプチドマッピングの実用的な RPC メソッドを開発するためには、当該ペプチドに関する具体的なカラム要件およびクロマトグラフィーメソッドの開発を十分に理解する必要があります。ペプチド分離には、多くの点で低分子分離と同じクロマトグラフィー原理が適用されますが、ペプチドメソッドを最適化し、再現性の高い確実な分離を実現するためには、多くの固有の条件を考慮する必要があります。カラム選択、カラム品質、移動相選択、検出などの要件は、いずれもペプチドマッピング分離に大きな影響を与える要素で、適切に決定すれば、ペプチドマップの品質を大きく向上させることができます。



カラムの選択

分離能の優れた信頼性の高いペプチドマッピング分離を実現するうえで最も重要な点は、適切なカラムを選択することです。カラムのポアサイズ、粒子のタイプおよびサイズ、結合相のケミストリ、安定性 (化学的安定性および充填ベッドの安定性) は、いずれもペプチドマッピング分離、分析の最適化、および分光分析を促進するうえで、重要な役割を果たしています。ペプチド分離に適したカラムのポアサイズは 100 Å ~ 120 Å で、一般的に最適な相は C18 です。一部の市販カラムでは、ペプチド分離用に 60 Å までのポアサイズが提供されていますが、これは通常、小さいペプチド断片の分離や標準試料分析に用いられます。同様に、短い結合相炭素鎖が用いられることもありますが、これは特定のメソッドで使用されるもので、特に疎水性が幅広い場合にはペプチドの保持に制約が出ます。

ペプチドの分離は、拡散係数が大きいと、段数が小さくなります。また、多くの場合、直径の小さい全多孔性カラムが低い流速で用いられます。そのため、より効率の良いペプチドマッピングを実現するために、サブ 2 μm 粒子が用いられることが多くなっています。しかし、最近では、生物薬剤分野を中心に、生物学的分離に表面多孔性カラムが使われることも増えています。これは、表面多孔性カラムでは、タンパク質やペプチドの質量拡散に伴う制約に対応できるためです。表面多孔性カラムでは、拡散経路が短くなるため、小さい粒子のカラムで生じがちなシステム背圧の上昇を引き起こさずに、大きな分子を高線速度で分離できます。図 5 に、表面多孔性カラムを用いたペプチドマップの高速高分離能分離の例を示します。

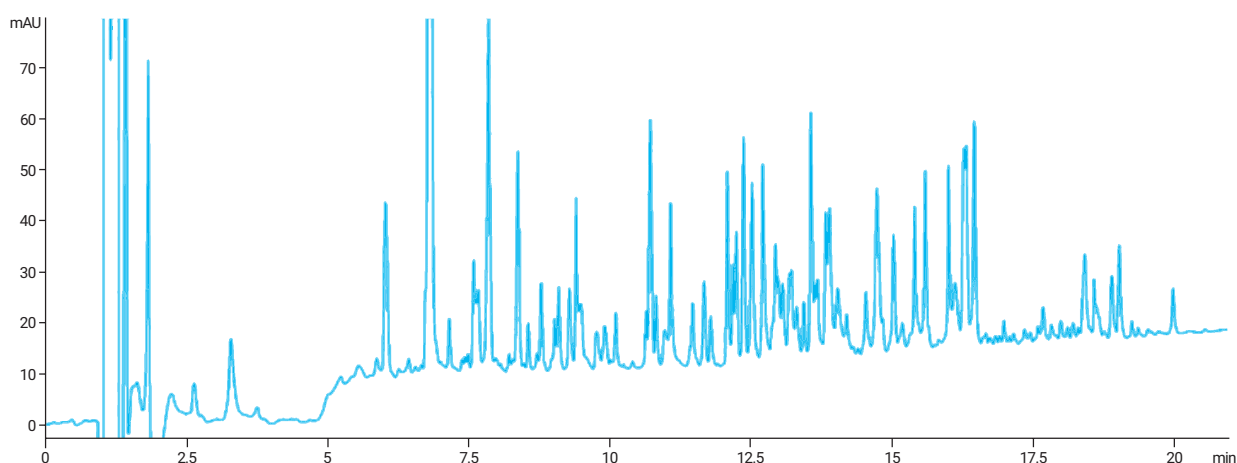


図 5. Agilent AdvanceBio ペプチドマッピング 2.1 x 150 mm カラム (部品番号 653750-902) を用いた BSA の逆相分離。
水 (0.1 % TFA)/ACN (0.08 %) 直線グラジエントを用いて、0.3 mL/min、40 °C でペプチドマッピング分離を実施。

カラム品質 (分析間再現性および安定性) は、重要ですが見過ごされることの多い要素です。再現性の高い堅牢なペプチドマッピング分離を実現するためには、カラム品質は非常に重要です。一般に、ペプチドの逆相分離は、低 pH (pH<3) および高温 (>40 °C) で実行されます。

正確なマッピングフィンガープリントと再現性の高いバリデーションプロトコルを実現するためには、再現性の高いカラムが重要となります。ペプチドマッピング用のカラムを選択する際には、カラム品質を最優先に考慮する必要があります。図 6 には、再現性の高いペプチドマップの例を示しています。この例では、低 pH および高温条件下で、モノクローナル抗体のトリプシン消化物を分離しています。

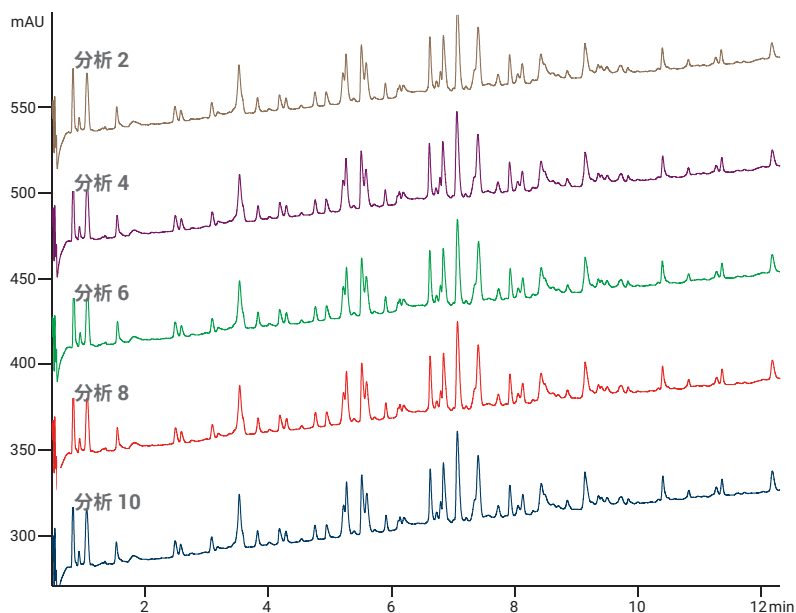


図 6. モノクローナル抗体のトリプシン消化物を 5 回繰り返し注入により分離。6520 Q-TOF に連結した Agilent 1200 LC システムで 3.0 x 150 mm Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を使用。水 (0.1 % FA)/ACN (0.1 % FA) グラジエントを用いて、0.3 mL/min、40 °C で分離を実施。

移動相の選択

ペプチドマッピングで最も一般的に使用される溶媒は、0.1 % のトリフルオロ酢酸 (TFA) や、ギ酸 (FA) を添加した水、アセトニトリルです。特定の状況下では、プロピルアルコールまたはイソプロピルアルコールを加えて、分解物を溶出させることができます。ただし、添加により移動相の粘度が著しく上昇しないことが条件となります。リン酸塩を含むバッファ入り移動相を使えば、pH 条件の柔軟性が得られます。3.0 ~ 5.0 の範囲で pH を変動させると、酸性残基 (グルタミン酸やアスパラギン酸など) を含むペプチドの分離が向上します。pH 2 ~ 7 (ポリマーベース充填剤の場合はそれ以上) のリン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸も、アセトニトリルグラジエントで使用されます。トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルは、きわめて頻繁に使用されます。

タンパク質およびペプチドの分析において RPC で用いられる移動相には、イオン対試薬として機能する添加剤が含まれています。この成分により、ペプチドの荷電群との間でイオン対が形成され、ペプチドの疎水性が高くなります。

その結果、ペプチドと疎水性固定相の相互作用が可能になり、保持力が高くなって分離が向上します。トリフルオロ酢酸 (TFA)、ギ酸 (FA)、酢酸 (AcOH) などの一般的な添加剤は pH がきわめて低く、タンパク質のアンフォールディングと変性を促進します。そのため、ペプチドなどの分子が、よりシャープで左右対称なバンドで溶出します。TFA は荷電ペプチドへの親和性を備えていることから、ペプチドおよびタンパク質の分離のイオン対試薬として最も広く用いられています。

検出

ペプチドの検出は、一般に 210 nm ~ 220 nm または 280 nm で実行されます (図 7)。ペプチドマッピングでは多くの場合、280 nm での検出と 210 nm での検出が並行しておこなわれます。トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンは 280 nm で感度が高くなります。いっぽう、210 nm では、どちらかといえば非選択的に、サンプルマトリックス中の多くの生体物質が検出されます。しかし、210 nm および 220 nm での感度は、280 nm の 2 ~ 8 倍になります。また、ペプチドマップの検出プロフィールできわめて重要となるのが、0.1 % TFA 水 (溶媒 A) と 0.08 % TFA を含む ACN (溶媒 B) の混合です。これにより、溶出グラジエント過程での吸光度の変化に起因するベースラインドリフトを最小限に抑えることができます。図 7 では、220 nm ~ 280 nm の波長におけるペプチドマッピング分離を比較し、吸光度の感度および UV ピークプロフィールの違いを示しています。

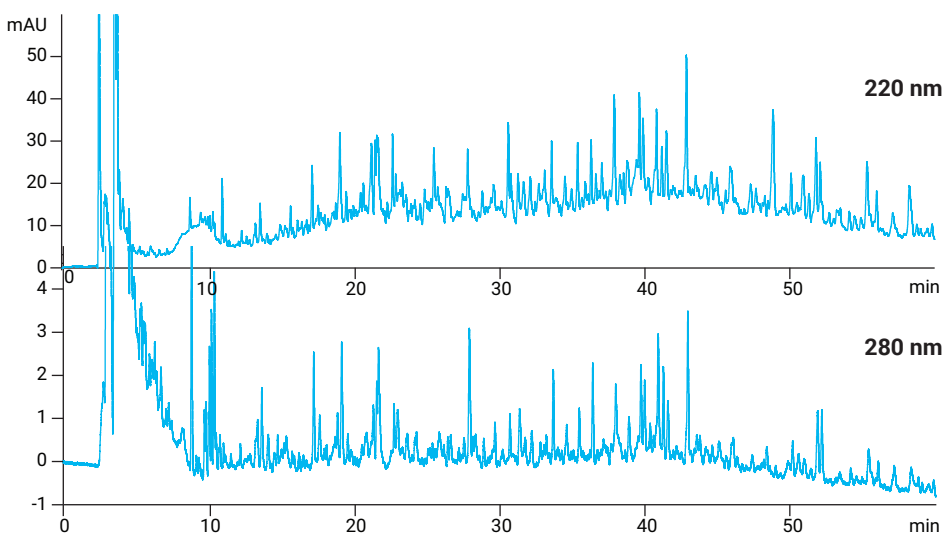


図 7. 220 nm (上) および 280 nm (下) における e.coli 分解物のプロファイリング。Agilent 1290 Infinity LC で AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 651750-902)、2.1 x 250 mm を使用。

効率的なペプチドマッピングメソッドの開発

ペプチドマッピング分離の RPC メソッドを開発するための一般的なアプローチは、通常の RP メソッド開発と同じですが、ペプチドマッピングメソッドの開発に固有の特別な要件もあります。このセクションでは、分離能の高いペプチドマップを作成するために推奨される基本アプローチを紹介します。具体的には、(1) 分析対象物を保持するためのグラジエント条件の最適化、(2) 選択性を変化させるための可変要素、(3) 分析時間と分離能を効率的に調整するためのさらなるカラム条件の最適化、の 3 点について説明します。このメソッド開発プロセスの各ステップにおいては、常にサンプルの種類やペプチドマッピング分析の目的などを十分に考慮する必要があります。

(1) グラジエント条件の最適化

ペプチド分離には、常に低 pH 緩衝液とアセトニトリル (ACN) とのグラジエントが推奨されます。その理由は、以下のとおりです。

- 幅広い種類および構造のペプチドの分離が促進されます
- シラノールのイオン化が抑制されます。シラノールがイオン化すると、分子中の塩基性アミノ側鎖との間で望ましくない相互作用が生じ、ピーク形状の悪化につながります
- ペプチド断片の変性が促進され、保持力と分離能が高まります
- 低 UV 検出 (<210 nm) に対応できるため、最大限の検出感度が得られます
- 移動相の粘度が低いため、幅の狭いバンドが得られます
- 遊離アミノ末端および塩基性アミノ酸とのイオン対形成により、保持力の低い小さいペプチドの保持力が向上します (バッファに TFA を使用した場合)

ACN の代わりにプロパノールまたはイソプロパノール (IPA) を有機溶媒として用いれば、疎水性ペプチドの回収率が高くなります。しかし、これらの溶媒は粘度が高いため、カラムの背圧が高くなり、場合によってはバンドの幅が広くなることがあります。また、検出に高い波長 (>220 nm) が必要で、検出感度が低下します。

ほとんどのペプチドは、ACN が 60 % 未満で溶出しますが、場合によってはより高い濃度が必要となることもあります。初期ペプチドマッピングメソッド開発の開始点としては、45 分で 0 ~ 60 % (2 %/min) のグラジエントが適しています。しかし多くの場合、望みの分離能を得るためには、最終的なメソッドでより緩やかなグラジエントにする必要が生じます。グラジエント勾配 (%B/min) は、サンプルがカラムを移動する際のサンプルバンドの平均保持力 (k') を決定する要素です。 k' 値は、カラム寸法、流速、サンプル重量、グラジエント勾配により変化します。

(2) ペプチドマップの選択性を変化させるための可変要素

一般に、生体試料のクロマトグラフィー分析では、カラム条件を変更する前に、まずバンド間隔を向上させます。温度やグラジエント勾配は変更が容易なので(移動相やカラムの変更が不要)、ペプチドマッピング分離を最適化する際には、まずバンド間隔の向上を試みるべきです。

温度の変更は、選択性を変化させるための強力な手段で、特定のペプチド残基の保持力を変化させることができます。ペプチドマッピング分離では、温度を高くすると、バンドの幅が狭くなり、システムの背圧が低くなるほか、選択性が変化します。推奨される初期温度は、30～50℃です。ただし、特定のマッピング分離に最も適した温度は、分解物の種類や組成などの多くの要因に左右されます。疎水性のきわめて高いペプチドの場合、最適な回収率を得るために、60～80℃の温度が必要となることがあります。いっぽう、多くのサンプルでは、30～60℃の範囲内の特定の温度で最適な選択性が得られます。

図 8 では、ミオグロビンのトリプシン消化物の同一グラジエント領域において、温度を 30℃(上図) から 60℃(下図) に変えた場合の 2 つの例を比較しています。温度を 60℃ に上げると、ピーク 1～7 で示されているように、分離プロファイルのバンド形状およびピーク位置が変化します。このクロマトグラム領域における顕著な変化として、ピーク 1、2、3 の分離が向上し、ピーク 4 および 5 のバンド位置(選択性)が変化していることが明らかにわかります。

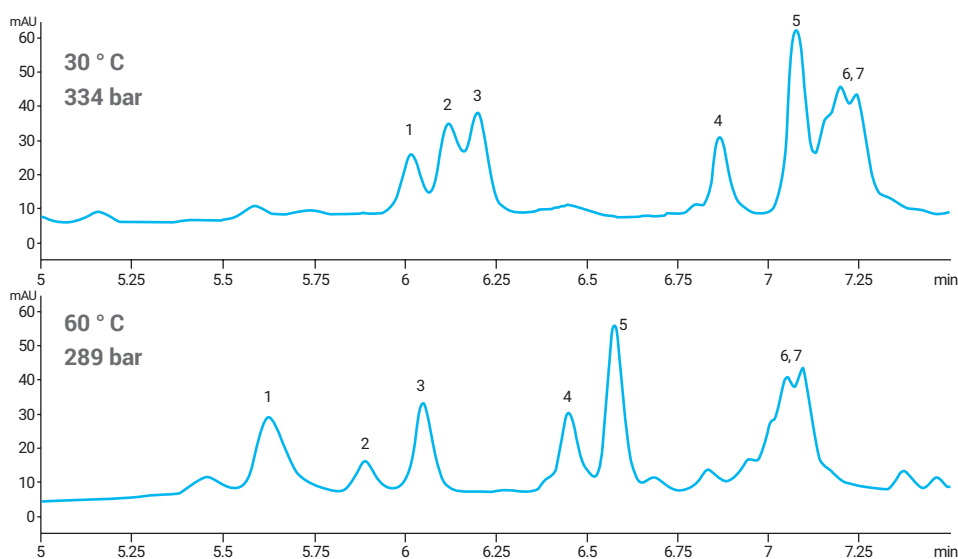


図 8. 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を用いた 20 分のグラジエントの 5.0～8.0 分におけるミオグロビントリプシン消化物のグラジエント分離。いずれの分離においても、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォーターナリ LC システムで、水 (1.0% TFA)/ACN (0.08% TFA) の直線グラジエント、流速 0.3 mL/min、215 nm を使用しました。上のクロマトグラムは温度 30℃、下のクロマトグラムは温度 60℃ で分離しました。



グラジエント勾配の変更により、ペプチドマッピング分離のバンド間隔を大幅に向上し、選択性を変化させることも可能です。グラジエント勾配を変化させる場合には、流速を一定に保って溶出時間を短く(勾配を急にする)または長く(勾配を緩やかにする)する方法か、分析時間を一定に保って流速を変化させる方法のいずれかを使用します。

図9では、グラジエント勾配の変更により生じる選択性の変化が示されています。ミオグロビンのトリプシン消化物を用いて、15分の急勾配グラジエント(上図)と勾配の緩い40分のグラジエント(下図)を比較しました。どちらの分離でも、流速0.6 mL/minを維持し、温度は50°Cとしました。2つのクロマトグラムを比較し、それぞれの分離における同一のピーク(*)を見てみると、バンド間隔、ピークカウント、ピーク形状が大きく変化していることがわかります。

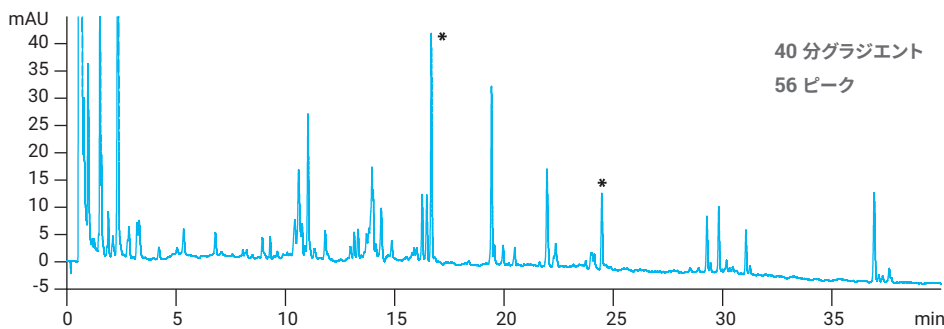
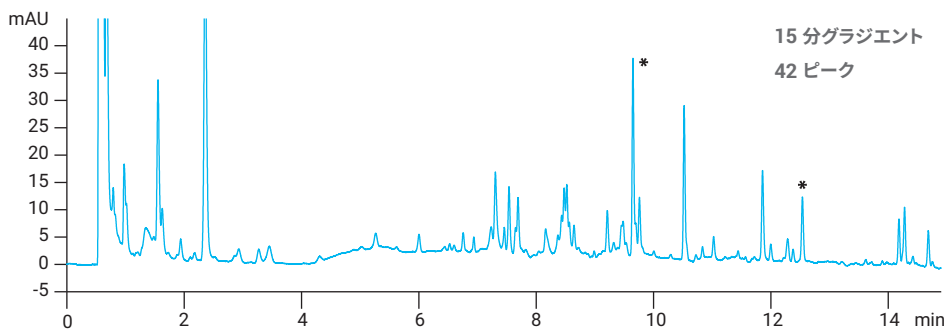


図9. Agilent 1260 Infinity バイオイナートフォータナリ LC システムで 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラム (部品番号 653950-302) を用いたミオグロビンのトリプシン消化物のグラジエント分離。水 (1.0% TFA)/ACN (0.08% TFA) 直線グラジエントを使用。流速 0.6 mL/min、温度 50°C。上のクロマトグラムは 15 分、下のクロマトグラムは 40 分で分離しました。各クロマトグラムの * は、同一のピークを示しています。

(3) カラム条件の調整による最適化

グラジエント条件の保持力 (k') と選択性 (α) を最適化したら、カラムの長さや流速の変更により、分離をさらに向上させることが可能です。グラジエント溶出を変化させるためのカラム条件の選択方法は、基本的なアイソクラティック分離の場合と同じです。どちらのケースでも、効率 (N) の値を大きくすれば、その代わりに分析時間が長くなります。分析時間が長くなってもそれほど問題のない場合は、流速を遅くすれば、手軽に分離能を向上させることができます。しかし、分離能を大幅に向上させる必要がある場合には、一般的にはカラムを長くする方法が適しています。選択性の最適化後、分離能が必要以上に高くなっている場合は、流速を速くする、または短いカラムの使用により分析時間を短縮することができます。図 10 では、カラムの長さを 150 mm から 250 mm にして、ミオグロビンのトリプシン消化物のマッピング分離能を向上させた例を示しています。この例では、条件とグラジエント時間を一定に保ち、カラムの長さだけを 150 mm から 250 mm と長くしました。各分離の同じ領域を赤で囲んでいます。この領域から、250 mm カラムによる分離能の向上と、単位時間あたりのピークキャパシティの向上がわかります。

(1)、(2)、(3) で述べたグラジエント溶出、選択性の最適化に関する可変要素、およびカラム条件の最適化は、ペプチドマッピングを含むあらゆる分離を向上させるアプローチとして確立されています。前述のメソッドを、以下のステップでわかりやすくまとめています。

ペプチドマッピングメソッド開発ステップ	
1	初期グラジエント条件の選択: カラム長さ、移動相組成、流速、温度、検出。この初期分離条件は、保持力 (k') に合わせて最適化されます。そのためには、グラジエントを急勾配にしすぎないことが求められます。
2	グラジエント範囲の調節。この手順により、クロマトグラムの始めと終わりにある無駄な時間を排除し、分析時間を短くします。
3	選択性の変更。バンドがオーバーラップしたり、分析時間が長すぎたりする場合は、前述した選択性の調節を試してみてください。
4	グラジエント形状の検討。分離能をさらに向上させる選択肢として、非直線グラジエント形状を用いれば、バンド間隔をさらに広げられる場合があります。
5	カラム条件の調整。バンド幅と選択性を最適化すると、分析時間またはカラムの長さの変更により、分離能または分析スピードを向上させることが可能です。

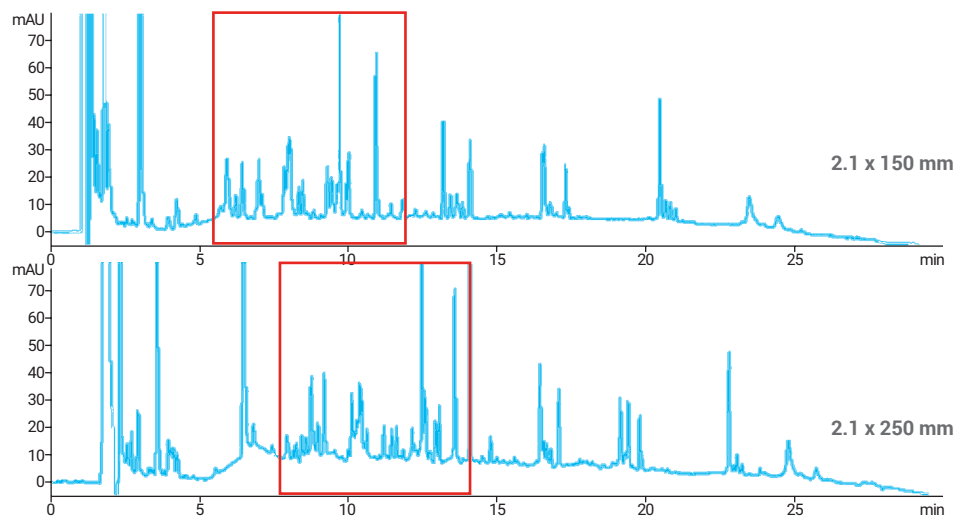


図 10. 分離能におけるカラムの長さの影響。ミオグロビンのトリプシン消化物 (部品番号 651750-902) を用いたペプチドマッピングの比較。分離能とピーク形状の違いを強調するために、各分離の同じ領域を赤で囲んでいます。分離にあたっては、Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォーターナリ LC システムで Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、2.1 x 150 mm (部品番号 651750-902) を使用しました。水 (1.0 % TFA)/ACN (0.08 % TFA) 直線グラジエント、30 分で 10 ~ 60 % B、0.3 mL/min、45 °C。

質量分析によるペプチドマッピングの キャラクタライゼーション

逆相クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせたテクニックは、ペプチドおよびペプチドマップのキャラクタライゼーションに広く用いられているメソッドです。例えば、生物薬剤分野では、ターゲットとなる治療用ペプチドの配列の特定およびモニタリングはきわめて重要です。また、タンパク質製剤の安定性は、酸化、還元、グリコシル化、切断などの修飾をモニタリングするうえで重要な要素となります。MS は、製剤のライフサイクル全体を通じた遺伝的安定性を確認するうえで、純度試験として使用できます。

ペプチドは分離ペプチドの直接導入（構造解析の場合はオンライン LC/MS を使用）により質量分析を用いて分析され、その結果がタンパク質のアミノ酸配列と関連付けられます。その後、同定されたペプチドにおいて、ペプチドマップのカバーする特定のアミノ酸配列が確認され、タンパク質が同定されます。質量分析によるペプチドマッピングは、以下に適用されます。

- 特定のタンパク質の同定の確認
- タンパク質の詳細なキャラクタライゼーション。N-末端および C-末端ペプチドの確認、広い範囲の配列をカバーするペプチドマップ、アミノ酸置換など
- 翻訳後修飾のスクリーニングおよび同定(グリコシル化、ジスルフィド結合、N-末端ピログルタミン酸、メチオニン、トリプトファン酸化など)

一般的な MS 分析としては、エレクトロスプレー、MALDI-TOF-MS、高速原子衝撃 (FAB) などがあります。修飾タンパク質の配列決定や、発生したアミノ酸修飾の種類の特定には、タンデム MS も使用されます。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) または MALDI-MS を用いれば、タンパク質分解ペプチドを intact 状態のままイオン化して気化させ、質量を正確に測定することができます。ほとんどのペプチド分離は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) LC/MS で実施されます。これは、LC の利便性に加えて、高品質のタンデム質量スペクトルにより、信頼性の高いタンパク質同定が可能になるためです。四重極飛行時間型 (QTOF) MS 機器では、分離能と質量精度が優れているため、特に大きなペプチドで高品質の構造情報が得られます。

MS 情報をもとにすれば、タンパク質を容易に同定することが可能です。その際には、intact プロテインから派生すると予想される値やタンパク質データベースに照らして、測定した質量を比較し、質量および配列情報を導き出します。ペプチドマッピングによるタンパク質のキャラクタライゼーションの目的は、理論上のタンパク質構造組成の 95 % 以上の配列と一致させ、解明することにあります。図 11 に、ESI-MS を用いて高度に最適化したエリスロポエチンタンパク質 (EPO) 分解物のペプチドマップ例を示しています。最適化したクロマトグラフィー条件と MS パラメータにより、100 % の配列をカバーできました。この例は、ペプチドマッピング分離が良好にキャラクタライゼーションされたことを示しています。

アプリケーションで最高のシステム動作性能を
実現するには、Agilent ペプチドマッピング標準試料を
ご使用ください。



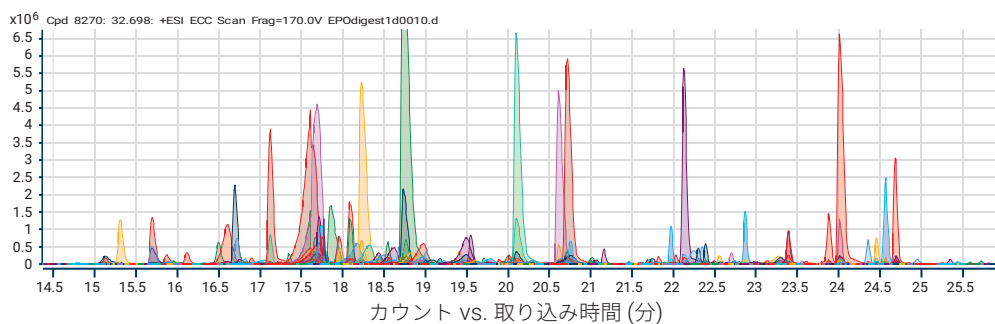
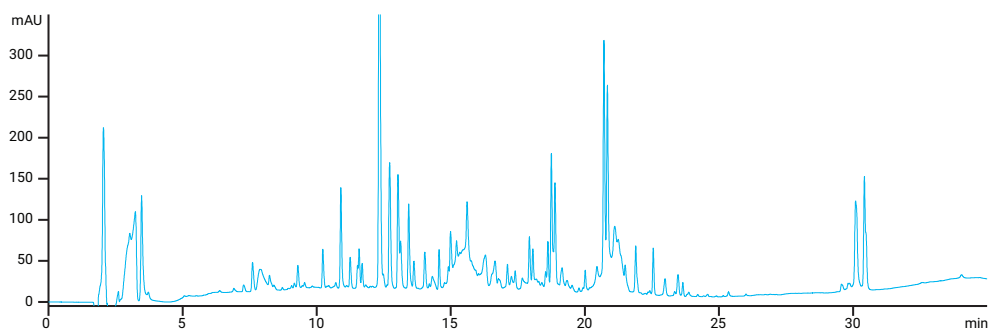


図 11. 上のクロマトグラムは、完全に最適化した EPO 分解物のペプチドマッピング分離を示しています。分離には 2.1 x 150 mm AdvanceBio ペプチドマッピングカラムを使用しました。下のクロマトグラムは、Agilent Q-TOF で得られた配列範囲の定性分析結果 (Molecular Feature Extractor を使用) を示しています。

製品情報

アジレントでは、ペプチドマッピング分析に以下の製品を推奨しています。

AdvanceBio ペプチドマッピングカラム – ほとんどのアプリケーションに対応

品名	部品番号	Fast Guard 部品番号
4.6 x 150 mm, 2.7 µm	653950-902	850750-911
3.0 x 150 mm, 2.7 µm	653950-302	853750-911
2.1 x 250 mm, 2.7 µm	651750-902	851725-911
2.1 x 150 mm, 2.7 µm	653750-902	
2.1 x 100 mm, 2.7 µm	655750-902	

*Fast Guard カラムを使えば、分離スピードや分離能を損なわずに、カラム寿命を長くすることができます。

ペプチド品質管理用標準試料

品名	部品番号
ペプチド品質管理用標準試料、71 µg, 2 mL バイアル中	85190-0583
HSA ペプチド標準混合物	G2455-85001



ペプチドサンプル前処理の自動化

手作業によるペプチドサンプルの前処理には時間がかかります。MS でペプチドマッピングアプリケーションを実行する場合、自動化によりスループットを向上することができます。再現性の高いワークフローにより、分析結果の一貫性を確保することが可能です。AssayMAP は分解、精製、断片化といったワークフローに変革をもたらし、かつてない精度とスループットを実現します。

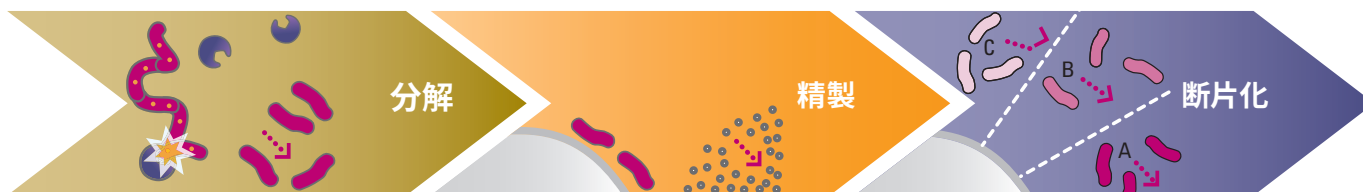
- 人的ミスの減少 (<5% CV) による再現性の向上
- スループットの向上 - 1日あたり最大 384 サンプルに対応
- 操作時間の大幅な短縮 - 分析に費やせる時間が増加
- メソッド開発の迅速化 - 自動プラットフォームにより、迅速なメソッドの最適化が可能



AssayMAP Peptide Sample Prep ソリューションは、小型の充填ベッククロマトグラフィー、最先端の Bravo Liquid Handling Platform、アプリケーションベースのシンプルなユーザーインターフェースを組み合わせています。サンプル前処理の自動化を簡単に実現できます。

AssayMAP ペプチドサンプル前処理ソリューション

質量分析用



分解:

- ユーザーの提供する試薬を用いた溶液内分解
- 96-ウェルプレート最大 4 枚を並行処理
- 手作業のピペッティング手順は 1 回のみ

利点:

- ユーザーによるばらつきを低減
- スループットと再現性が向上

精製:

- 逆相カートリッジを用いた定量的分離メソッド
- 96-ウェルプレート 1 枚を並行処理

利点:

- 10 μ L 溶出により乾燥時間を短縮、または「希釈注入」メソッドに対応
- プロセス管理 - あらゆるサンプルを同じように処理

断片化:

- 強カチオン交換 (SCX) カートリッジにより最大 6 フラクシオンを生成し、pH または塩による段階的溶出を用いてサンプルを単純化
- 96-ウェルプレート 1 枚を並行処理

利点:

- オフラインで断片化することにより LC/MS スループットが向上し、LC グラジエント時間が短縮
- 強力な濃縮ツールにより、サンプルを単純化し、分析に先立ちターゲットペプチドを分離

ワークフロー全体の利点:

- ワークフローのユーザーインターフェースの標準化により、使いやすさが向上し、リンクによるワークフロー統合が実現
- サンプル再分析の必要性が低下し、再分析に必要なサンプル量が減少

Agilent AssayMAP ソリューションにより、 サンプル前処理のワークフロー再現性が向上

AssayMAP Peptide Sample Prep ソリューションを用いて、2 種類のサンプル（尿素およびグアニジン塩酸中 BSA）を 64 回繰り返して分解しました。サンプル精製には AssayMAP 逆相カートリッジ、サンプル分析には Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、Agilent 1290 Infinity LC、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 質量分析計を使用しました。2 日目に実験を繰り返し、再現性を評価しました。表 1 に示すように、各サンプル中の 25 のペプチドについて、%CV を測定しました。各 %CV 範囲を表示し、トータルの平均 %CV における影響を示しています。再現性をさらに示すため、代表的なペプチドのピーク面積を図 12 に示しています。

AssayMAP によるサンプル前処理の所要時間は、1 日あたり 4 時間で、このうち手作業による操作時間は 1 日あたりわずか 2 時間です。AssayMAP を使用しない場合、同じワークフローに 1 日あたり 8 時間を要します。このうち手作業による操作時間は 1 日あたり 4 時間です。

トータルのワークフロー CV は <4 % でした。ワークフローには、AssayMAP Peptide Sample Prep システム、Agilent AdvanceBio ペプチドマッピングカラム、1290 Infinity LC システム、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 質量分析計を使用しました。

このアプリケーションの詳細については、アジレント文献 5991-2474EN (英文) をご覧ください。

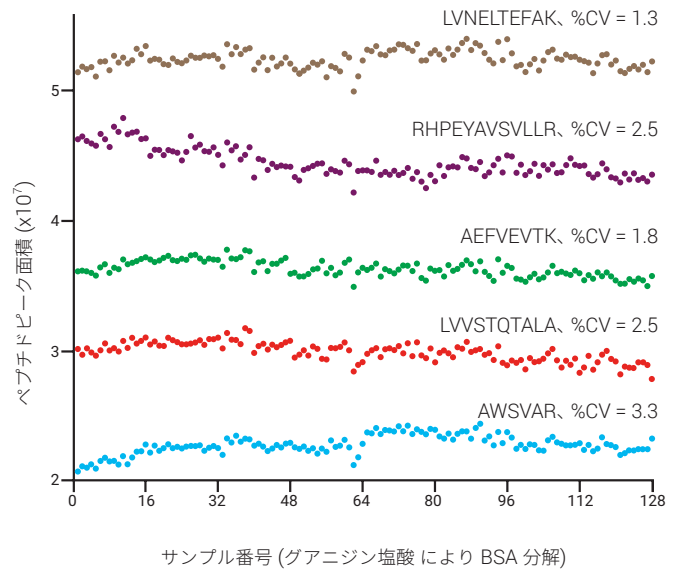


図 12. 2 日間における 4 つのペプチドのピーク面積を示す散布図

表 1.- 各 %CV 範囲における日ごとの %CV

25 ペプチド	尿素 (n=64, 62)		グアニジン塩酸 (n = 64, 64)	
	1 日目	2 日目	1 日目	2 日目
平均ピーク面積 %CV	3.3	3.7	2.3	2.6
%CV<5 のペプチド	23	21	25	23
5>%CV<10 のペプチド	2	3		1
%CV>10 のペプチド		1		1

優れた結果を得るためのパートナー

増え続ける課題に対処するためには、的確な答えが必要です。アジレントのソリューションを使用することで、革新的な疾病研究、創薬の加速化、開発および製造の信頼性向上が可能になります。ゲノミクス研究、自動化、分離、および検出のためのアジレントのソリューションは、ワークフローに応じたソフトウェアソリューションとともに、有効な治療法を市場に提供するために必要な答えをお届けします。

アジレントのバイオ医薬品ソリューションの詳細については、[agilent.com/chem/jp](https://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。



最適なカラム選択のために

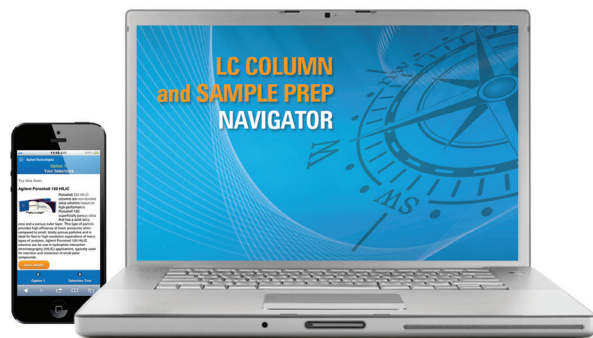
[agilent.com/chem/navigator](https://www.agilent.com/chem/navigator)

幅広いバイオカラムや低分子用カラムを提供しているアジレントは、アプリケーションに最適なカラムを選択しやすくするために、LC カラムおよびサンプル前処理ナビゲータを作成しました。

このナビゲータでは、次の 4 つの条件から検索が可能です。

- 部品番号: LC カラムおよびサンプル前処理製品のクロスリファレンスにより、最適なアジレント交換用部品が見つかります。
- カラム: メソッドに基づいて推奨カラムを提供します。
- 化合物: ドロップダウンリスト
- USP メソッド

また、このツールでは、クロマトグラフィーを最適化するためのカラム、サンプル前処理製品に関する推奨事項、技術サポートのリソースやその他のツールへのクイックアクセスも提供しています。



High-Resolution Mapping of Drug Conjugated Peptides in an ADC Digest

Peptide map comparison of mAb and drug conjugated mAb

Authors

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies Inc.

Introduction

Currently, antibody drug conjugates (ADCs) are prime protein drugs for biotherapeutic use. When a cytotoxic drug is conjugated to a biotherapeutic monoclonal antibody (mAb), there are several options for the conjugation site. As part of the characterization of ADCs, it is important to be able to identify these conjugation sites. This can be done using peptide mapping. The specificity of the enzyme to cleave the mAb into peptide fragments results in different cleavage patterns, and, hence, peptide fragments, around the conjugation site. High-resolution peptide mapping can be used to identify peptides that are produced as a result of conjugation of the cytotoxic drug. This Application Note demonstrates the use of the Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Column and an Agilent 1290 Infinity LC system for ADC peptide mapping analysis. For analysis using UV, it is important to have high resolution to identify the individual peptides, therefore, the method was developed with an optimized flow rate and gradient time for increased peak capacity. Comparison of a peptide map of Trastuzumab biotherapeutic mAb and its cytotoxic drug conjugate, ADC, revealed the peptide map differences corresponded to drug-conjugated peptides. These hydrophobic peptides were resolved on the AdvanceBio Peptide Mapping Column.

Materials and Methods

Therapeutic proteins, ADC, and Trastuzumab were purchased from a local pharmacy. All chemicals and solvents were HPLC grade. Tryptic digestion of mAbs was carried out as described elsewhere¹. Before the digestion of the mAbs with trypsin, the disulfides were reduced and alkylated under denaturing conditions.

An Agilent 1290 Infinity LC system with the following configuration was used for the study:

- Agilent 1290 Infinity Binary Pump with integrated vacuum degasser (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (DAD) (G4212A) with 10 mm Max-Light flow cell (G4212-60008)
- AdvanceBio Peptide Mapping Column (p/n 651750-902)

Conditions

Parameter	Value
Column	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 250 mm, 2.7 μm (p/n 651750-902)
Mobile phase	A) 0.1 % TFA in water B) 0.08 % TFA in 90 % ACN
Gradient	Time (min) %B 0 3 60 50 65 90 66 90 70 3
Injection volume	5 μL (10 μg/μL)
Flow rate	0.5 mL/min
Data acquisition	210 nm/4 nm, 252 nm/4 nm
Thermostatted column compartment	60 °C
Sample thermostat	5 °C
Postrun time	10 minutes

Results and Discussion

Peak capacity is often used as an evaluation criterion to measure the performance of a column under given chromatographic conditions. mAb digestion produces many peptides for analysis. Therefore, it is necessary to develop a method that can increase peak capacity. Also, peak capacity is essential in a peptide mapping study so small impurity peaks or sample heterogeneity can be addressed. Due to the heterogeneous nature of ADC with glycosylation and cytotoxic drug conjugates, tryptic-digested ADC will generate more complex peptides than unconjugated mAb. To monitor the tryptic-digested ADC peptide mixture, optimization of gradient time and flow rates is critical to achieve high peak capacity.

The peak capacity values were calculated by dividing the gradient time by the average peak width of five peptide peaks at baseline (5σ). Figure 1 depicts the effect of gradient time and flow rate on peak capacity. The results suggested that a 0.5 mL/min flow rate and 60 minutes gradient time gave the highest peak capacity values for the 2.1 × 250 mm, 2.7 μm column. These would, therefore, be the optimum conditions for identifying the peptides that have cytotoxic drug conjugation with high resolution.

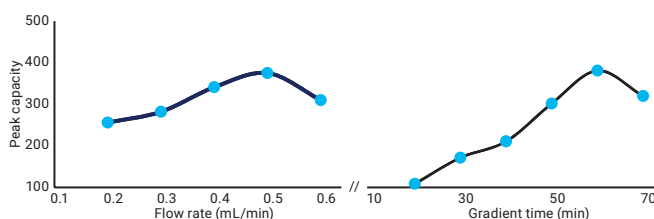


Figure 1. Effect of flow rate and gradient time on peak capacity.

Figure 2 shows the peptide map of the tryptic digested ADC. The peptide map shows excellent performance with baseline separation and resolution across the entire gradient profile. There was a significant improvement in separation time with the 250 mm column (60 minutes) compared to a 150 mm column (220 minutes) as previously reported in the literature for peptide mapping of ADC2. A peak capacity value of 354 was obtained and the RSD values demonstrate the excellent reproducibility of retention time and peak area and, thus, the precision of the system (Table1).

To identify peptides that have the cytotoxic drug attached, the peptide digests of the mAb and its conjugate, ADC, were analyzed by monitoring the UV trace at 252 nm (Figure 3). Peptide maps of ADC are different from those of Trastuzumab. It is clearly evident that the more hydrophobic drug-bonded peptides in ADC are eluted later (~ 40 to 60 minutes). Comparing the two peptide maps shows a group of later-eluting peptides identified in the ADC digest that are not present in the digest of the mAb. These hydrophobic peptides are the ones with the cytotoxic drug conjugation.

Table 1. RSD of retention time and area (n = 5) of peaks shown in Figure 2.

	Mean RT (min)	RSD RT (%)	Mean area (mAU/min)	RSD Area (%)
Peak 1	5.37	0.13	369.2	0.76
Peak 2	14.27	0.06	106.1	1.66
Peak 3	28.84	0.02	202.61	0.09
Peak 4	35.86	0.02	193.83	0.58

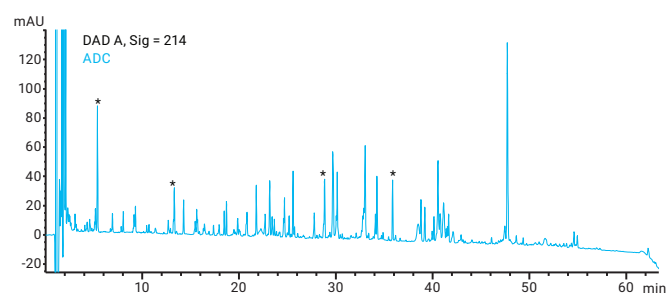


Figure 2. Peptide map of tryptic-digested ADC separated on an Agilent AdvancedBio Peptide Mapping column (*peaks selected for RSD calculations).

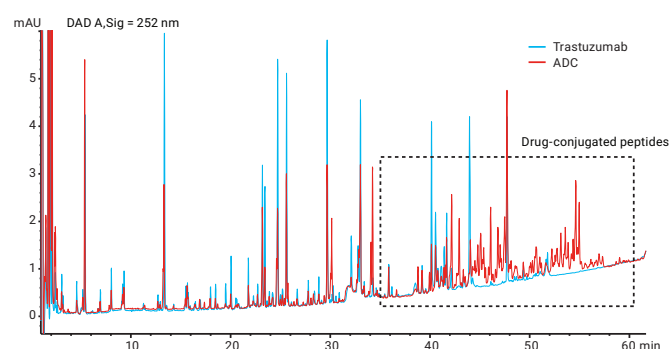


Figure 3. Overlay of peptide map of tryptic-digested ADC and Trastuzumab separated on an Agilent AdvancedBio Peptide Mapping Column.

Conclusions

High-resolution peptide maps are obtained when the 250 mm Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Column is used with an Agilent 1290 Infinity LC System. By comparing the peptide maps of the mAb and its conjugate, ADC, it is possible to identify the peptides conjugated with a cytotoxic drug in the ADC digest. Additionally, we demonstrated that the AdvanceBio Peptide Mapping Column provided resolution across the range of peptide types. Good peak shapes and reproducibility were obtained for the analysis of the more hydrophobic conjugated peptides, enabling identification and quantitation.

References

1. Gudihal, R.; Waddell, K. Identification of Oxidation Sites on a Monoclonal Antibody Using an Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS System Coupled to an Accurate-Mass 6520 Q-TOF LC/MS; *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-8768EN, **2011**.
2. Kim, M. T.; *et al.* Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, pp 1223-1232.

Analysis of Tryptic Digests of a Monoclonal Antibody and an Antibody-Drug Conjugate with the Agilent 1290 Infinity II LC

Authors

Gerd Vanhoenacker,
Mieke Steenbeke,
Isabel Vandenheede,
Pat Sandra, and Koen Sandra

Research Institute for
Chromatography

President Kennedypark 26
B-8500 Kortrijk Belgium

Udo Huber and
Sonja Schneider

Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany.

Abstract

An Agilent 1290 Infinity II LC in combination with an Agilent AdvanceBio Peptide Mapping column was used to analyze tryptic digests of the monoclonal antibody (mAb) trastuzumab, or trade name Herceptin, and the antibody-drug conjugate (ADC) ado-trastuzumab emtansine, or trade name Kadcyla. The use of the highly efficient Agilent V380 Jet Weaver mobile phase mixer reduced the baseline noise caused by the trifluoroacetic acid (TFA) modifier significantly, enabling detection of low abundant peptides by UV at 214 nm. By modifying the gradient steepness, peak capacities of approximately 300, 450, and 900 could be obtained for total analysis times of 25, 45, and 205 minutes, respectively.

Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) have emerged as important therapeutics for the treatment of cancer and autoimmune diseases, among others^{1,2}. The successes of mAbs have triggered the development of various next-generation formats including antibody-drug conjugates (ADCs), which combine a specific mAb and a cytotoxic drug by a stable linker^{1,2}. The promise of ADCs is that highly toxic drugs can selectively be delivered to tumor cells, thereby substantially lowering side effects typically experienced with classical chemotherapy. Peptide mapping is an important methodology in the analysis and characterization of these molecules. Hundreds of peptides with varying physicochemical properties present in a wide dynamic concentration range exist in mAb and ADC tryptic digests, demanding the best in terms of separating power. This Application Note describes how an Agilent 1290 Infinity II LC in combination with an Agilent AdvanceBio Peptide Map column is successfully applied to tackle these challenging separations.

Experimental

Instrumentation

An Agilent 1290 Infinity II LC was used, comprising:

- Agilent 1290 Infinity II High Speed Pump (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector (G7117B) equipped with a 10 mm flow cell

An Agilent 1290 Infinity II LC was used, comprising:

- Agilent Jet Weaver mixer, both 35 and 100 μ L configurations were tested (G4220-60006)
- Agilent High-Performance Jet Weaver mixer, 380 μ L (G4220-60012)

Samples and sample preparation

Trastuzumab (Herceptin) and ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla) were obtained from Roche (Basel, Switzerland).

A 100 μ g amount of protein, diluted in 0.05 % Rapigest/100 mM Tris-HCl, pH 8, was reduced at 60 °C for 30 minutes by the addition of 5 mM dithiothreitol, and alkylated at 37 °C for 1 hour by adding 10 mM iodoacetamide. Trypsin was subsequently added at an enzyme-to-substrate ratio of 1:25 (w:w). Digestion proceeded for 16 hours at 37 °C. The final concentration was 0.5 μ g/ μ L.

Method parameters

Parameter	Value
Column	Agilent AdvanceBio Peptide Mapping column, 2.1 \times 250 mm, 2.7 μ m (p/n 651750-902)
Mobile phase	A) 0.05 % TFA in water/acetonitrile 99:1 (v:v) B) 0.045 % TFA in acetonitrile
Flow rate	0.35 mL/min
Gradient	0 to 60 %B in various gradient slopes (see peak capacity) 60 to 90 %B in 0.5 minutes and hold for 4.5 minutes 7 minutes post time at 0 %B Example for 40 minutes gradient: 0 to 40 minutes – 0 to 60 %B 40 to 40.5 minutes – 60 to 90 %B 40.5 to 45 minutes – 90 %B
Temperature	60 °C
Injection	5 μ L Needle wash flush port, 5 seconds, 0.05 % TFA in water/acetonitrile 20:80 (v:v)
Detection	Signal 214/4 nm, Reference 360/60 nm Signal 252/4 nm, Reference 360/60 nm (for ADC) >0.025 minutes (0.5 seconds response time) (10 Hz)

Results and Discussion

Agilent AdvanceBio Peptide Mapping column

The Agilent AdvanceBio Peptide Mapping column is packed with 2.7 μm superficially porous C18 particles with 120 \AA pore size. It is a state-of-the-art column for peptide mapping, enabling high-resolution separations in short analysis times. Figure 1 shows the results for a fast analysis (25 minutes total analysis time) of a tryptic digest of Herceptin.

Agilent Jet Weaver mixers

For comprehensive peptide mapping, the system should be able to detect high as well as low abundant peptides. Peptide mapping is generally carried out with UV detection at 214 nm and a water/acetonitrile mobile phase containing trifluoroacetic acid (TFA) because of its beneficial effects on peptide retention and peak shape. It is known that these conditions contribute to increased baseline noise due to the UV absorption of the TFA modifier³. The noise will depend on column dimensions and flow, gradient slope, and system gradient formation.

When mobile phase mixing is inadequate, small variations present in the mobile phase composition may persist after passage through the column, and reach the detector. In the case of TFA, which has significant UV absorbance at low wavelengths (for example, 214 nm), small fluctuations in TFA concentration and water/acetonitrile ratio will be visible with UV or DAD. Excessive noise can be tackled by increasing the mobile phase mixing performance to stabilize solvent composition as much as possible.

The impact of mixing has been tested with the selected column and samples by comparison of three state-of-the-art Jet Weaver mobile phase mixers.

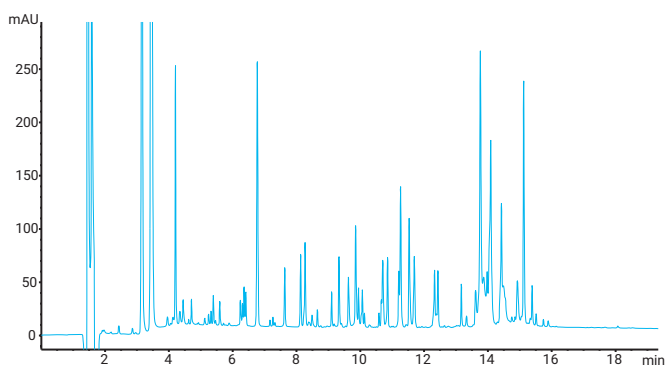


Figure 1. Analysis of a Herceptin tryptic digest, 20-minute gradient, UV detection at 214 nm.

- Agilent V35 Jet Weaver: internal volume of 35 μL , most commonly used because of the small impact on delay volume
- Agilent V100 Jet Weaver: internal volume of 100 μL , used for applications that require higher mixing performance and low delay volume
- Agilent V380 High-Performance Jet Weaver: internal volume of 380 μL , used for applications that need best mixing

Figure 2 shows the results of a blank (mobile phase A) injection with a 40-minute gradient carried out with the various Jet Weaver mixers. It is clear that despite the excellent behavior of the V35 Jet Weaver for most analyses, its performance for the detection of low-level compounds under these particular conditions is poor. Increasing the mixing volume to 100 μL significantly improves baseline stability, and by installing the 380 μL mixer, the noise caused by TFA is nearly eliminated. It is striking how the small system peaks present in the blank analysis (retention time 23 to 27 minutes) are not detectable with the V35 Jet Weaver whereas they are easily visible with the V380 mixer. Therefore, the V380 High-Performance Jet Weaver was selected for further analyses.

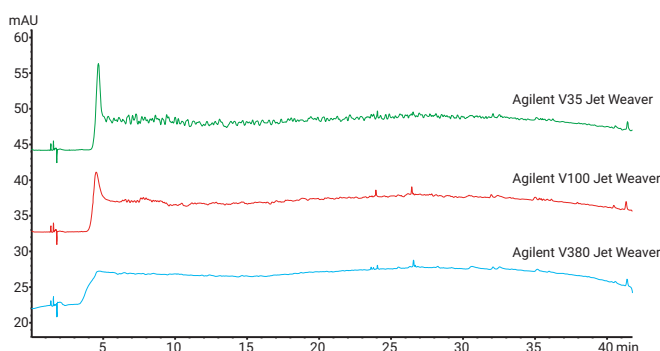


Figure 2. Analysis of a blank solution with an Agilent V35 (green), Agilent V100 (red), and Agilent V380 (blue) Jet Weaver mixer, 40-minute gradient, UV detection at 214 nm.

Switching between a low-volume and high-volume mixer will change the delay volume of the setup, and will affect retention times and potentially selectivity. To maintain the separation, some delay time should be added to the gradient to correct for this. This time shift for the gradient enabled nearly identical retention times and selectivity to be obtained with all three mixers (Figure 3).

Considerations on peak capacity

As shown in Figure 3, the tryptic digests are complex samples, and high peak capacity is mandatory for adequately characterizing mAbs and ADCs. With the current system and column configuration, the peak capacity can be adjusted according to the desired performance by changing only the gradient steepness and gradient time⁴.

As illustrated, the Kadcylya tryptic digest was analyzed with 12 different gradient times between 5 and 200 minutes. Four peptides were selected to calculate the peak capacity at 4 sigma (= 13.4 %) peak height. Figure 4 and Table 1 show the results. Short gradients with peak capacity below 250 can be used for fast (high productivity) analyses, whereas long gradients will result in peak capacities close to 900. The Herceptin tryptic digest was injected with some selected gradient conditions as a control, and peak capacities were in accordance to expectations. Figure 5 shows the results for these analyses. Note that the slope of the curve flattens strongly from 120 minutes onward, and that, in fact, working at slower slopes is pointless.

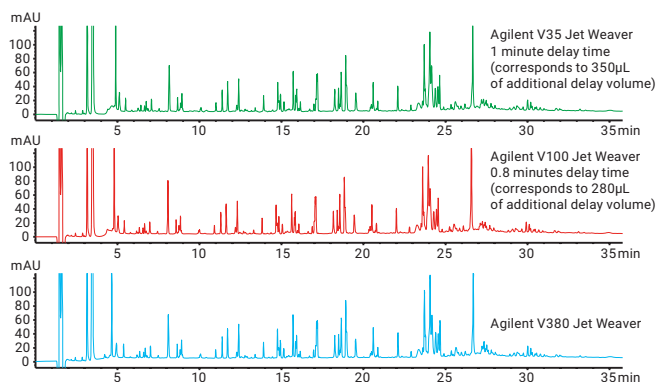


Figure 3. Analysis of Kadcylya tryptic digest with an Agilent V35 (green), Agilent V100 (red), and Agilent V380 (blue) Jet Weaver mixer, 40-minute gradient, UV detection at 214 nm.

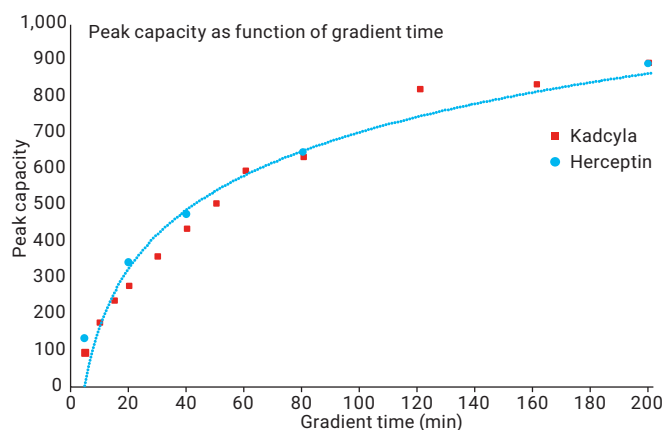


Figure 4. Peak capacity as a function of gradient time. UV detection at 214 nm (detector set at 40 Hz to ensure sufficient data points in fast analyses).

Table 1. Peak capacity according to gradient for Kadcylya and Herceptin.

Gradient time (min)	Peak capacity	
	Kadcylya	Herceptin
5	95	134
10	177	
15	238	
20	280	342
30	359	
40	438	475
50	506	
60	596	
80	635	646
120	822	
160	836	
200	893	891

Further comments on the analysis of the Herceptin and Kadcylla digests

A 40-minute gradient resulted in a peak capacity of approximately 450, and these conditions, a good compromise between analysis time and separation performance, were used to highlight the difference between the mAb and the ADC. The protein sequence of Kadcylla is identical to Herceptin; the difference is in the conjugation of the cytotoxic agent emtansine to lysine residues. Figure 6 shows an overlay of both samples, with detection at 214 nm and 252 nm. Overall, the chromatograms are similar except for the cluster of peaks eluting late in the gradient (between 25 and 35 minutes). These are peptide-drug conjugates all containing emtansine. The complexity stems from the fact that a high number of lysine residues are available for conjugation. Figure 7 shows a detail of the chromatograms recorded at 252 nm. The addition of the drug to the peptide increases hydrophobicity and, therefore, retention. Since this cytotoxic agent has a UV absorbance at 252 nm, the conjugates are better observed with the detector set at this wavelength. The repeatability of the developed method was evaluated by five replicate injections of the Kadcylla tryptic digest. The overlay in Figure 8 shows that the injection and retention time precision are excellent.

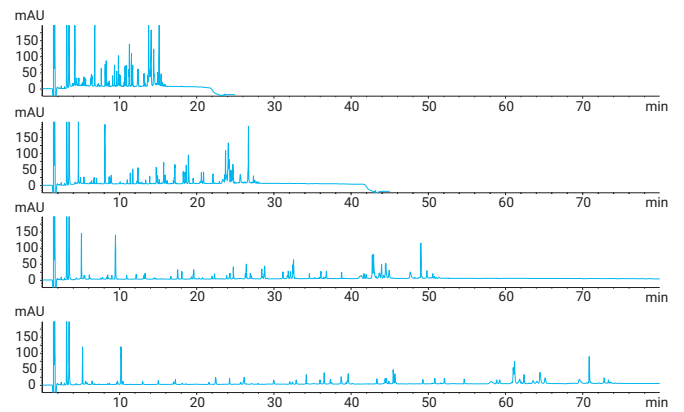


Figure 5. Analysis of a Herceptin tryptic digest with a 20, 40, 80, and 120-minute gradient, UV detection at 214 nm. Note, for comparison, that the y-scale was increased with the Δ -gradient factor.

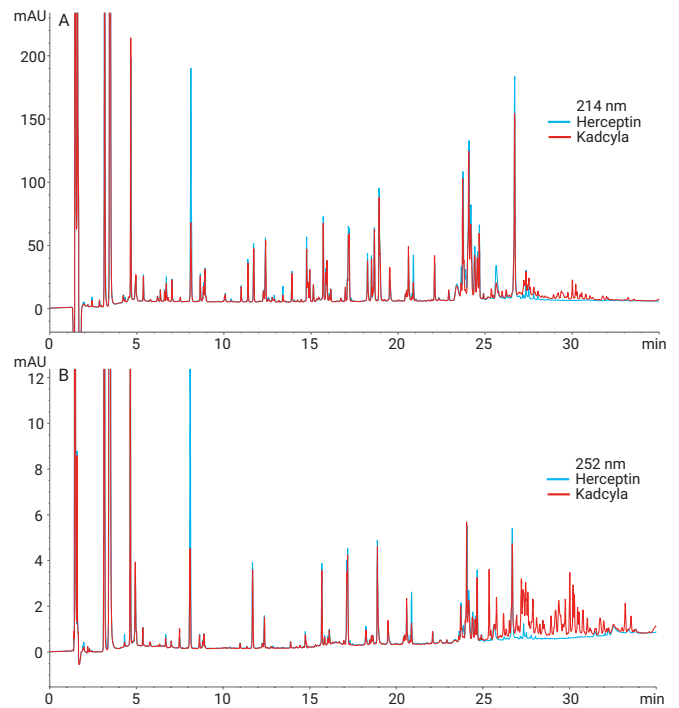


Figure 6. Comparison of analysis of a Herceptin (blue) and Kadcylla (red) tryptic digest with a 40-minute gradient, UV detection 214 nm and 252 nm.

Conclusions

High peak capacities can be achieved for the analysis of tryptic digests of mAbs and ADCs with an Agilent 1290 Infinity II LC in combination with an Agilent AdvanceBio Peptide Map column. The Agilent V380 Jet Weaver mobile phase mixer is effective in reducing the noise caused by the TFA modifier. This opens opportunities to quantify low abundant species in complex mixtures. The excellent precision obtained with the current setup suggests that this is a valuable tool for detailed analysis of protein biopharmaceuticals such as mAbs and ADCs. A next level of detail can be obtained when analyzing these digests on an LC×LC setup as described recently^{5,6}.

References

1. Sandra, K.; Vandenhede, I.; Sandra, P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1335*, 81–103.
2. Fekete, S.; *et al.* Chromatographic, electrophoretic, and mass spectrometric methods for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 480–507.
3. Huesgen, A. G. Performance of the Agilent 1290 Infinity Quaternary Pump using Trifluoroacetic Acid (TFA) as the mobile phase modifier, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5990-4031EN, **2009**.
4. Vanhoenacker, G.; *et al.* Tryptic digest analysis using the Agilent 1290 Infinity LC System, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-4031EN, **2009**.
5. Vanhoenacker, G.; *et al.* Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of therapeutic monoclonal antibody digests, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 355-366.
6. Sandra, K.; *et al.* Multiple heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry for the characterization of the antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine, *J. Chromatogr. B*, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.04.040.

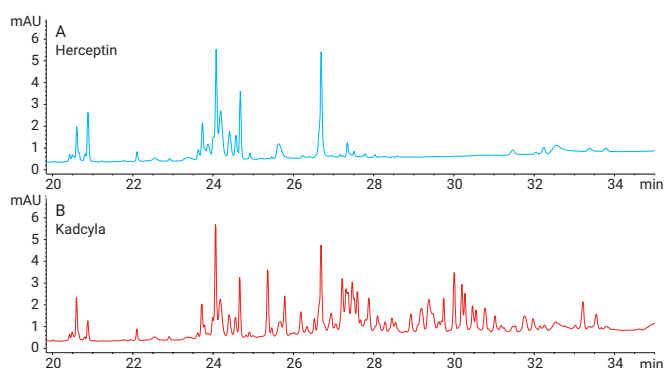


Figure 7. Detail of the comparison of an analysis of a Herceptin and Kadcyra tryptic digest with a 40-minute gradient, UV detection at 252 nm.

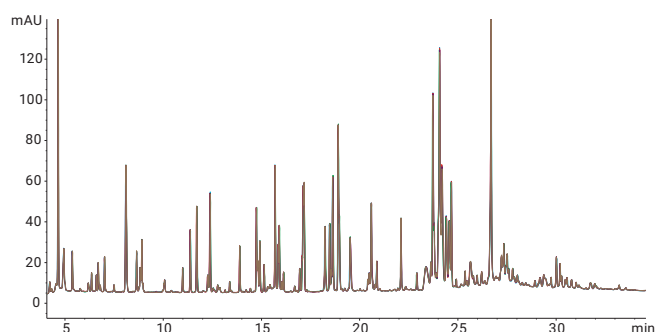


Figure 8. Overlay of five replicate injections of a Kadcyra tryptic digest with a 40-minute gradient, UV detection at 214 nm.

その他のアプリケーションノート

資料番号	タイトル
5991-1813EN	High Resolution Glycopeptide Mapping of EPO Using an Agilent AdvanceBio Peptide Mapping Column
5991-2085EN	Peptide Mapping of Glycoprotein Erythroprotein by HILIC LC/MS and RP-LC/MS
5991-3585JAJP	モノクローナル抗体 (mAb) の高速高効率ペプチドマッピング
5991-4920EN	Comparison of Biosimilar and Innovator Monoclonal Antibody Rituximab Using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System and Agilent OpenLAB Match Compare Software
5991-6338EN	Peptide Mapping: A Quality by Design (QbD) Approach

追加情報

AssayMAP Bravo システムにより、ペプチドマッピングのハイスループットタンパク質消化のサンプル前処理を自動化できます。詳細については、www.agilent.com/chem/jp および次の文書を参照してください。

資料番号	タイトル
5991-6273JAJP	Agilent AssayMAP Bravo Platform: タンパク質およびペプチド分析のための自動サンプル前処理システム
5991-6478EN	Rapid Antibody Digestion Enabled by Automated Reversed-Phase Desalting on the Agilent AssayMAP Bravo Platform

ペプチド標準試料はメソッド開発とシステムチェックに使用できます。

部品番号	品名
5190-0583	10 ペプチド標準
G2455-85001	HSA ペプチド標準
G1990-85000	トリプシン消化メチル化 BSA 標準

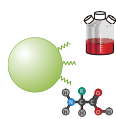
アミノ酸分析

背景

タンパク質のアミノ酸組成の同定方法は十分に確立されており、他の手法と組み合わせることで正しい構造を確認できます。分析前にタンパク質を構成アミノ酸に加水分解するには、一般的に酸加水分解が用いられます。またアミノ酸は、遺伝子組み換えタンパク質の調製に使用される細胞培地の主要成分でもあります。発酵反応中の個々のアミノ酸消費をモニタリングし、同じクロマトグラフィー方法を使用できることが望ましい場合があります。

アミノ酸は本来両性イオンで、中性基、疎水性基、親水性基、酸性基、塩基性基などのさまざまな側鎖があります。また適切な UV 発色団もないため、20 種類のアミノ酸や天然由来アミノ酸の分離と検出は困難です。アジレントは、マルチサンプルによる自動プレカラム誘導体化反応と、すべての一般的なアミノ酸がベースライン分離可能な逆相クロマトグラフィーを組み合わせた独自のアミノ酸分析メソッドを開発しました。

プレカラム誘導体化を実行するには、まず高 pH のホウ酸塩緩衝液でサンプルを中性化し、各アミノ酸のアミノ末端を中性化する必要があります。その後、1 級アミノ酸が オルトフタルアルデヒド (OPA) と、2 級アミノ酸 (プロリン、ヒドロキシプロリンなど) がクロロギ酸 9-フルオレニルメチル (FMOC-Cl) と反応します。これにより、逆相によってその後の分離を実行できます。ただし、ベースライン分離には高 pH 条件が必要であるため、カラム寿命を延ばし安定した結果を得るために、高 pH 移動相に対して耐久性のあるカラムを使います。



アミノ酸および 細胞培地の分析

低分子クロマトグラフィー (<math>< 150 \text{ \AA}</math>)

堅牢な高分離能分離

AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)

LC/UV または LC/FLD (サンプル誘導体化あり)

特長	利点
非常に高い分離能	より信頼性の高い結果
pH 耐性の高い C18 固定相	長いカラム寿命
HPLC と UHPLC に対応	柔軟性の向上

AdvanceBio MS スペントメディア

LC/MS (サンプル誘導体化なし)

特長	利点
HILIC LC 分離/ MS 検出	複数の代謝物種に 1 つのメソッド
サンプル誘導体化 が不要	あらゆる LC/MS システムに使用可能
ステンレス製 PEEK ライニ ングカラムハードウェア	優れたピーク形状と 回収率

概要

AdvanceBio アミノ酸分析キットは、分析に必要なあらゆる試薬と標準溶液を 1 つの部品番号 (5190-9426) で提供します。各部品は必要に応じて個別に注文できます。この後の「分析の手引き」では、移動相の前処理、オートサンブラでの自動オンラインアミノ酸誘導体化の設定、および LC メソッドの詳細手順を説明します。

AdvanceBio アミノ酸分析カラムには、高 pH 移動相に対して耐久性を持たせるために独自の処理を施した C18 シリカ粒子が、充填されています。アミノ酸は高 pH 条件で最も効率的に分離されます。この点が以前のアミノ酸分析ソリューションから改善されているため、これらの移動相条件ではカラム寿命が大幅に長くなります。この利点を最大限に生かすため、カラムは移動相 A を使用したまま保管しないでください。短期間の保管には移動相 B を、長期間の保管には 50 % のアセトニトリルを使用してください。このカラムはグラジエント中に塩基性 pH に短時間曝露されるのは問題ありませんが、高 pH に長時間曝露されるとカラム寿命が短くなります。

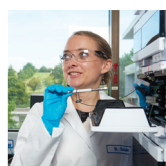
アミノ酸分析ソリューション: 分析の手引き

アミノ酸分析の信頼性と効率を高めるトータルソリューション

Agilent AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) は、Agilent InfinityLab LC シリーズの機器およびカラム技術のメリットと実績あるプレカラム誘導体化試薬を組み合わせ、ワークフローの効率を最大限に高めるトータルソリューションです。定評ある AdvanceBio ファミリーの製品として、タンパク質、抗体、複合体、新規生物物質、バイオ医薬品の徹底的な特性解析に必要な一貫性と卓越した性能を提供します。

AdvanceBio AAA は、試薬/標準溶液、カラム、およびアプリケーションサポートを含む総合的なソリューションです。InfinityLab LC シリーズの最新機器とカラム技術を活用し、高速・高感度の自動アミノ酸分析を実現します。アミノ酸の誘導体化は、Agilent 1260 Infinity II オートサンプラによりオンラインで自動化されます。手間のかかる手作業が不要になり、反応結果の再現性も高まります。AdvanceBio AAA カラムは、サブ 2 μm カラム (内径 2 μm 以下のカラム) に匹敵する分析スピードと分離能を実現します。しかも背圧が半分に抑えられるため、カラムが目詰まりしにくくなります。

AdvanceBio AAA ソリューションは、実績あるアジレントのオルトフタルアルデヒド/9-フルオレニル-メチルクロロギ酸エステル (OPA/FMOC) 試薬によるアミノ酸誘導体化をベースとしています。これらの試薬を AdvanceBio AAA カラムおよび標準溶液と組み合わせることで、スピードと感度を兼ね備えた最適な定量および定性アミノ酸分析が実現します。このガイドでは、AdvanceBio AAA ソリューションを使用したタンパク質/ペプチド加水分解物中の一般的なアミノ酸の分離プロトコルをご紹介します。



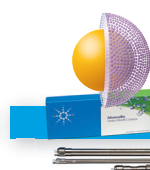
エキスパートによる
アプリケーション
およびテクニカルサポート



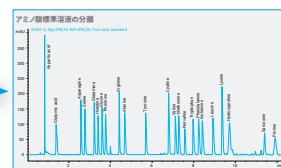
調製済みの
AdvanceBio AAA
試薬および標準溶液



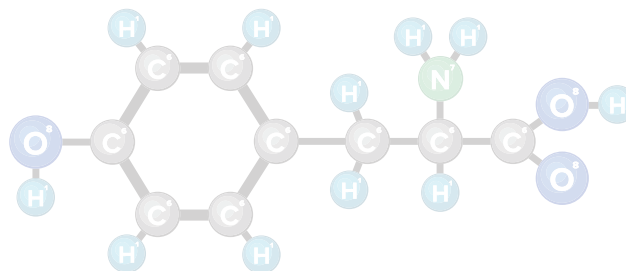
LC 分析の効率を高める
アジレントの LC システム



AdvanceBio AAA カラム
高速で確実なアミノ酸分離



信頼性の高いデータを
高速分析

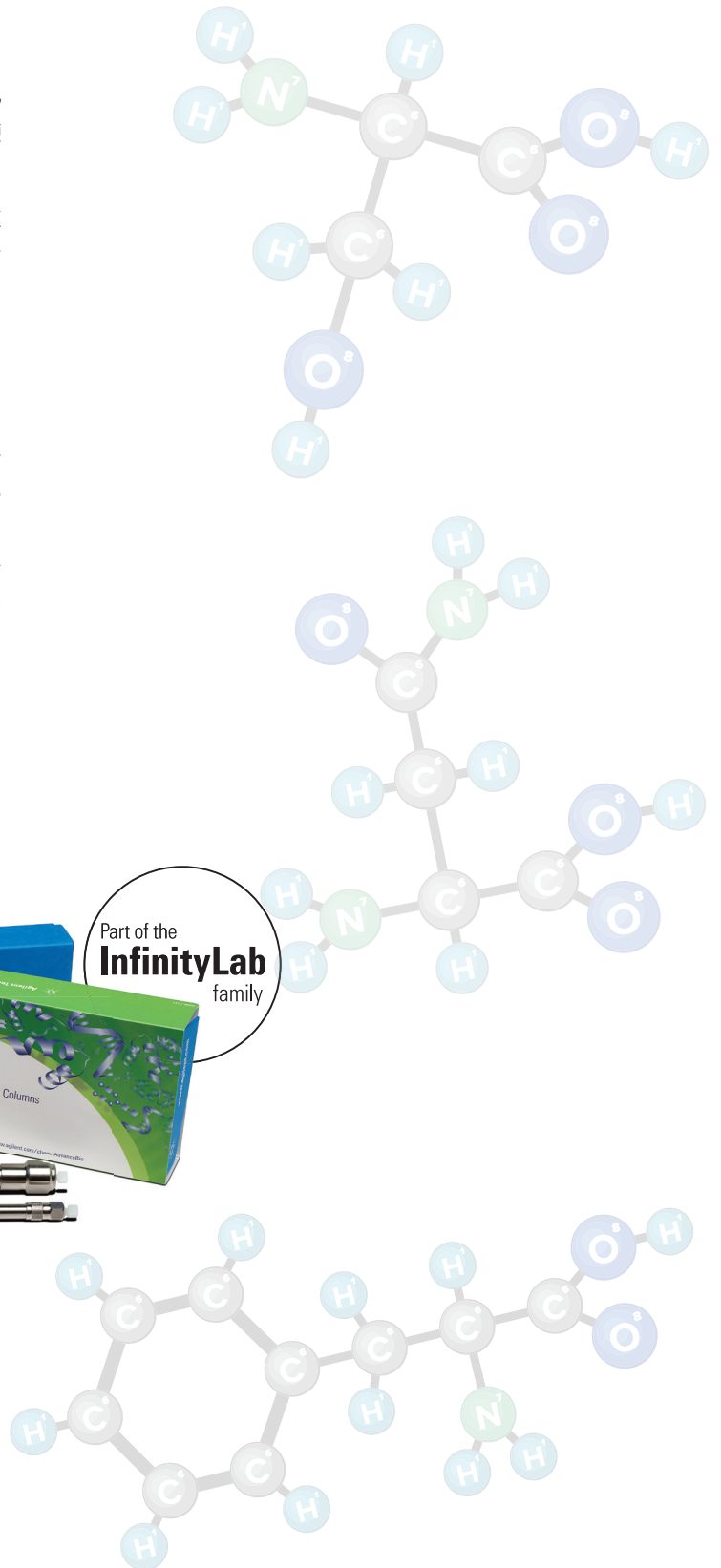


AdvanceBio AAA カラム: 表面多孔質粒子 (SPP) 技術

AdvanceBio AAA カラムには、アジレントの革新的な 2.7 μm 表面多孔質粒子 (SPP) Poroshell 技術が採用されています。粒子は 1.7 μm の硬質コアと 0.5 μm の多孔性層で構成されています。

この 2.7 μm の SPP は、サブ 2 μm 全多孔質粒子の 50 ~ 60 % の背圧で 80 ~ 90 % の分離効率を実現します。全多孔質粒子よりも粒径分布が狭いため、カラムベッドの均一性が高く、カラム内での分散が低減します。また、多孔性層が薄いため、物質移動抵抗は低くなります。さらに、カラムに組み込まれた 2 μm のフリットにより、目詰まりが 3.5 μm および 5 μm カラムと同程度に抑えられます。

最近まで、すべてのシリカベースの SPP 材料は、高 pH のバッファにおいては寿命が限られていました。寿命を延ばすためには、表面修飾や特殊な結合修飾によってベースとなる粒子を保護する必要があります。AdvanceBio AAA カラムは、アジレント独自のプロセスにより粒子表面が化学修飾され、高 pH 条件下でのシリカの溶出を防ぐ有機層が形成されています。



AdvanceBio AAA カラム: 表面多孔質粒子 (SPP) 技術

AdvanceBio AAA カラムは、アミノ酸分析に最適な選択性を備えています。

高速で確実なアミノ酸分離

- サブ 2 μm カラムと同等のスピードと分離能を半分の背圧で実現
- 2 μm フリットにより汚れたサンプルにも対応
- 高 pH における安定性とカラム寿命を高める独自の化学修飾
- カラム寿命をさらに延ばして運用コストを削減するガードカラム

信頼性をもたらすコンスタントな効率

- 最大 60 MPa、5 mL/min のパワーレンジによるスピードと分離能の向上
- インジェクタプログラミングによる自動オンライン誘導体化
- ダイオードアレイ技術に基づく多波長同時検出の感度向上
- フルスペクトル検出による同定およびピーク純度分析
- あらゆる HPLC および UHPLC アプリケーションに 100 % 対応

アジレントの検出器 - 多様なニーズに柔軟に対応

多波長検出器:

妥協のない高感度で多波長同時検出

ダイオードアレイ検出器 - スペクトルデータを高速採取:

選択性を高めながらマトリックス効果を抑制し、正確な同定とピーク純度分析を実現

蛍光検出器:

マルチシグナルモードで高感度を実現



圧倒的な信頼性: Agilent AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)

優れた感度と再現性で生体サンプル中のアミノ酸を高速分離できます。

AAA 分析のステップ

1. HPLC 移動相の調製
2. アミノ酸標準溶液の調製
3. 内部標準 (ISTD) 原液の調製
4. オンライン誘導体化の実施
5. 検出パラメータの設定
6. ハイスループットのルーチン分析の実行
7. 欧州薬局方 (EP) に準拠したシステム適合性の保証
8. 細胞培地およびタンパク質加水分解物標準溶液への適用



ステップ 1:

HPLC 移動相の調製

移動相 A:

10 mM Na₂HPO₄ および 10 mM Na₂B₄O₇ pH 8.2

1 L の移動相を調製するには、1.4 g の無水 Na₂HPO₄ および 3.8 g の Na₂B₄O₇・10H₂O を計量し、全量を 1 L にします。1.2 mL の濃塩酸で約 pH 8.4 に調整してから、濃塩酸をさらに数滴加えて最終 pH を 8.2 に調整します。pH の調整前に、ホウ酸ナトリウムを完全に溶解します。0.45 μm の再生セルロース膜 (p/n 3150-0576) でろ過します。

移動相 B:

アセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10、v:v:v)

すべての移動相溶媒には、HPLC グレードを使用します。

移動相 A は移動相 B よりも消費量が多いため、移動相 B 1 L に対して移動相 A を 2 L 調製することをおすすめします。

注入希釈液

注入希釈液は、100 mL の移動相 A と 0.4 mL の濃リン酸の混合液です。この溶液は 4 °C で保管してください。

0.1 N 塩酸

拡張アミノ酸および内部標準原液は、0.1 N 塩酸溶液で調製します。0.1 N 塩酸を前処理するために、少し水を入れた 500 mL メスフラスコに 4.2 mL 塩酸 (36 %) を加えます。混合してメスアップします。4 °C で保存します。

誘導体化試薬

誘導体化試薬 (ホウ酸バッファ、OPA、および FMOC) は、アジレントから提供されている調製済みの溶液です。容器からそのままバイアルに移して使用できます。以下の点にご注意ください。

- OPA は酸化を防ぐため、不活性化ガスをアンブルに封入して出荷されています。OPA は、開封後約 7 ~ 10 日間使用可能です。OPA は 100 μL ずつマイクロバイアルインサートに移し、冷蔵庫で保管することをおすすめします。OPA のマイクロバイアルは毎日交換してください。
- FMOC は乾いた空気中では安定した状態ですが、水分に触れると劣化します。FMOC も 100 μL ずつマイクロバイアルインサートに移し、冷蔵庫で保管してください。OPA と同様に、FMOC アンブルの使用期限は 7 ~ 10 日です。
- ホウ酸バッファは、1.5 mL オートサンプリングバイアルに直接移して使用できます。バイアルインサートは不要です。3 日ごとに交換してください。

ステップ 2:

アミノ酸標準溶液の調製

アジレントでは、検量線の作成用に、アミノ酸 (AA) 17 種の溶液を 5 種類の濃度 (10 pmol/μL ~ 1 nmol/μL) でご用意しています。標準溶液は 4 °C で保管してください。

拡張アミノ酸 (EAA) を調製するには、以下のアミノ酸を計量します。

- アスパラギン 59.45 mg
- ヒドロキシプロリン 59.00 mg
- グルタミン 65.77 mg
- トリプトファン 91.95 mg

計量したアミノ酸を 25 mL メスフラスコに入れ、半量まで 0.1 N 塩酸を加え、溶解するまで振とうするか超音波処理します。次に、標準まで水を加え、各アミノ酸の総濃度を 18 nmol/μL にします。

高感度 EAA 原液を調製する場合は、この標準感度溶液 5 mL を水 45 mL で希釈します (1.8 nmol/μL)。拡張アミノ酸を含む溶液は、室温では不安定な状態です。この溶液は冷凍保存しておき、感度が低下する兆候が見られたら廃棄してください。



ステップ 3:

内部標準 (ISTD) 原液の調製

一級アミノ酸 ISTD 原液を調製する場合は、ノルバリン 58.58 mg を計量して 50 mL メスフラスコに入れます。二級アミノ酸 ISTD 原液を調製する場合は、サルコシン 44.54 mg を計量して同じ 50 mL メスフラスコに入れます。半量まで 0.1 N 塩酸を加え、溶解するまで振とうするか超音波処理します。標準まで水を加え、各アミノ酸の最終濃度を 10 nmol/μL にします (標準感度)。高感度 ISTD 原液を調製する場合は、この標準感度溶液 5 mL を水 45 mL で希釈します。高感度 ISTD の各アミノ酸の最終濃度は 1 nmol/μL です。4 °C で保存します。

検量線の作成には、実験のニーズに応じて 2 ~ 5 種類の濃度の標準溶液を使用します。「標準感度」分析用の 3 点検量線を作成する場合は、100 pmol/μL、250 pmol/μL、および 1 nmol/μL の標準溶液を使用するのが一般的です。

内部標準またはその他のアミノ酸 (拡張アミノ酸など) を加える場合は、以下の表に従ってください。表 1 は、UV 分析で一般的に使用される「標準感度」の濃度です。表 2 は、「高感度」の蛍光分析に使用される一般的な濃度です。

表 1. 標準感度用標準溶液

	最終的な AA 溶液の濃度 (pmol/μL)		
	900	225	90
5 mL の 18 nmol EAA を水で希釈	5 mL	5 mL	5 mL
	-	15 mL	45 mL
希釈済み EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
5 mL の希釈済み EAA 混合液を分取	5 mL	5 mL	5 mL
10 nmol ISTD 溶液を追加	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
100 μL の EAA-ISTD 混合液を分取	100 μL	100 μL	100 μL
1 nmol AA に追加	900 μL	-	-
250 pmol AA に追加	-	900 μL	-
100 pmol AA に追加	-	-	900 μL
EAA と 500 pmol/μL ISTD を含む最終的な AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

表 2. 高感度用標準溶液

	最終的な AA 溶液の濃度 (pmol/μL)		
	90	22.5	9
5 mL の 1.8 nmol EAA を水で希釈	5 mL -	5 mL 15 mL	5 mL 45 mL
希釈済み EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
5 mL の希釈済み EAA 混合液を分取	5 mL	5 mL	5 mL
1 nmol ISTD 溶液を追加	5 mL	5 mL	5 mL
高感度 EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
100 μL の EAA-ISTD 混合液を分取	100 μL	100 μL	100 μL
100 nmol AA に追加	900 μL	-	-
25 pmol AA に追加	-	900 μL	-
10 pmol AA に追加	-	-	900 μL
EAA と 50 pmol/μL ISTD を含む最終的な AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL



ステップ 4:

オンライン誘導体化の実施

オンライン誘導体化の自動化プログラムは、オートサンプラのモデルに応じて多少異なります。Agilent G7129A バイアルサンプラでインジェクタプログラムを使用する場合は、以下の手順に従います。

1. ホウ酸塩バッファバイアル (p/n 5061-3339) から 2.5 μL 吸引します。
2. サンプルバイアルから 1.0 μL 吸引します。
3. 3.5 μL をエアーステアで 5 回混合します。
4. 0.2 分間待ちます。
5. OPA バイアル (p/n 5061-3335) から 0.5 μL 吸引します。
6. 4.0 μL をエアーステアで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
7. FMOC バイアル (p/n 5061-3337) から 0.4 μL 吸引します。
8. 4.4 μL をエアーステアで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
9. 注入希釈液バイアルから 32 μL 吸引します。
10. 20 μL をエアーステアで 8 回混合します。
11. 注入

*注: 他のオートサンプラモデルの場合は、装着されているサンプルループの容量が異なる可能性があるため、容量の調整が必要です。

誘導体化試薬とサンプルの位置は、使用する ALS トレイ構成に合わせて
 ます。G7129A と 2 × 66 バイアルトレイを使用する場合の位置は、以下
 のとおりです。

- バイアル P1-A1: ホウ酸バッファ
- バイアル P1-A2: OPA
- バイアル P1-A3: FMOC
- バイアル P1-A4: 注入希釈液
- P1-B1: サンプル

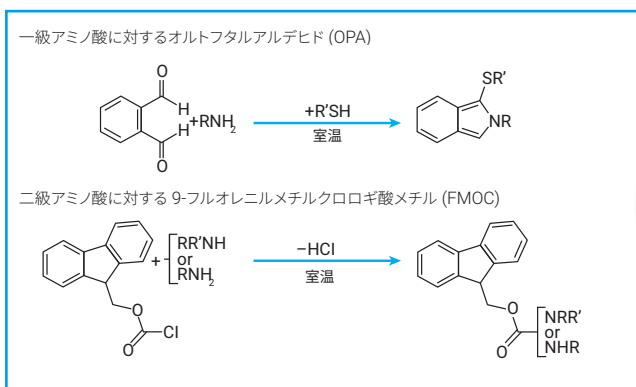
注: 適切なバイアル、キャップ、およびポンプパラメータを使用してください。

使用量の少ない OPA および FMOC 試薬はバイアルインサートに入れて
 セットする必要があります。このインサートは、広口スクリューバイアルま
 たはクリンプバイアルに対応しています。FMOC は揮発性が高く、OPA
 は酸素の存在下でゆっくり分解するため、この手順では、どちらの試薬に
 も気密シールが必要です。スナップバイアルは使用しないでください。ま
 た、オートサンプラの破損を防ぐため、他の機器用に設計されたバイアル
 やキャップは使用しないでください。



図 1. Agilent のインサート、バイアル、およびキャップ:
 A) コニカルインサート (p/n 5181-1270)、B) 広口バイアル、
 茶色 (p/n 5182-0716)、C) スクリューキャップ (p/n 5182-0721)

オートサンプラによる精度向上



試薬の自動添加

精度が向上
 手作業による誘導体化が不要



図 2. OPA および FMOC によるオンライン誘導体化: 逆相カラムでの極性アミノ
 酸の分離と UV および蛍光による検出

ステップ 5:

検出パラメータの設定

カラムコンパートメント (TCC)

左右の温度ゾーンを 40 °C に設定します。分析中、温度を ± 0.8 °C に維持できます。

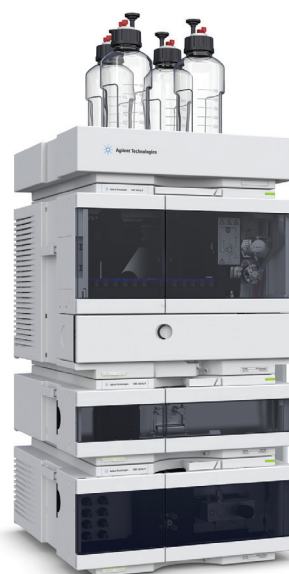
ダイオードアレイ検出器 (DAD)

シグナル A: 338 nm	バンド幅 10 nm	リファレンス波長 390 nm	バンド幅 20 nm
シグナル B: 262 nm	バンド幅 16 nm	リファレンス波長 324 nm	バンド幅 8 nm
シグナル C*: 338 nm	バンド幅 10 nm	リファレンス波長 390 nm	バンド幅 20 nm

*以下の手順に従う場合、シグナル C は必要ありません。

OPA 誘導体化アミノ酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出するには、最後の OPA 誘導体化アミノ酸 (リジン、標準溶液のピーク 20) が溶出してから最初の FMOC 誘導体化アミノ酸 (ヒドロキシプロリン、標準溶液のピーク 21) が溶出するまでの間に、検出器の波長を切り替える必要があります。

分析中に DAD で波長を切り替える最適なポイントは、最初に 2 つのチャンネル (シグナル A 338 nm で OPA 誘導体化アミノ酸を検出し、シグナル B 262 nm で FMOC 誘導体化アミノ酸を検出) でデータを採取することにより特定できます。以降の分析は、波長が適切なタイミングで 338 nm から 262 nm に切り替わるように検出器のタイムテーブル機能をプログラムすることにより、1 つのチャンネルで行えます。すなわち、OPA-リジンと FMOC-ヒドロキシプロリンが溶出するまでの間に波長を切り替えることで、OPA 誘導体化アミノ酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出できます。



蛍光検出器 (FLD)

FLD は必ず、システムの最下流に接続にします。これは耐圧 2 MPa のフローセルの破損を避けるためです。

ピーク幅 0.01 分、ストップタイム 18 分 (必要に応じて調整)

励起 340 nm、蛍光 450 nm、フィルタ 390 nm (デフォルトフィルタ)

シグナルタイムテーブル:

0.00 分: 励起 340 nm、蛍光、450 nm、ゲイン (必要な場合)

5.53 分: 励起 260 nm、蛍光 325 nm、

PMT ゲイン 10 (必要な場合。リジンとヒドロキシプロリンの間で切り替え)

蛍光検出器 (FLD) で波長を切り替えるポイントを特定するには、分析を 2 回実行する必要があります。まず、励起波長 340 nm、蛍光波長 450 nm で OPA 誘導体化アミノ酸を検出します。次に、励起波長 260 nm、蛍光波長 325 nm で FMOC 誘導体化アミノ酸を検出します。そのデータをもとに検出器のタイムテーブル機能を設定することで、OPA 誘導体化アミノ酸と FMOC 誘導体化アミノ酸の両方を 1 つのクロマトグラムで検出できます。この機能では、最後の OPA 誘導体化アミノ酸 (リジン) が溶出してから最初の FMOC 誘導体化アミノ酸 (ヒドロキシプロリン) が溶出するまでの適切なポイントで波長が切り替わるようにプログラムします。

注: アミノ酸の濃度が 100 pmol 未満の場合は、蛍光検出器を使用することをおすすめします。

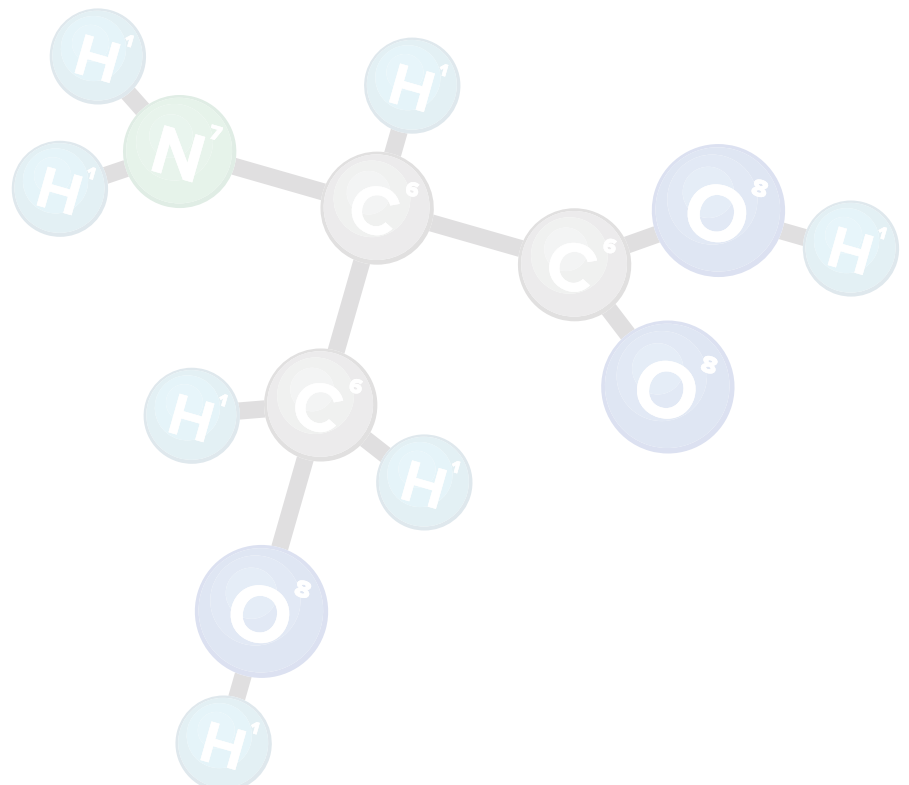


グラジエントプログラム

時間 (分)	% B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	終了

流量: 内径 4.6 mm カラムの場合は 1.5 mL/min、
内径 3 mm カラムの場合は 0.62 mL/min

注入量: 1 μ L



代表的な分離例

AdvanceBio AAA カラムによる一級アミノ酸 20 種の分離結果を図 3 に示します。

以下の点にご注意ください。

- 移動相にアジ化ナトリウムを添加しても無添加でも、アミノ酸の溶出プロファイルには影響しません。
- NaN_3 は、細菌/真菌の繁殖を抑制するための防腐剤として使用します。
- 移動相を 0.45 μm フィルタでろ過することを強くおすすめします。
注: アミノ酸の濃度が 100 pmol 未満の場合は、蛍光検出器を使用することをおすすめします。

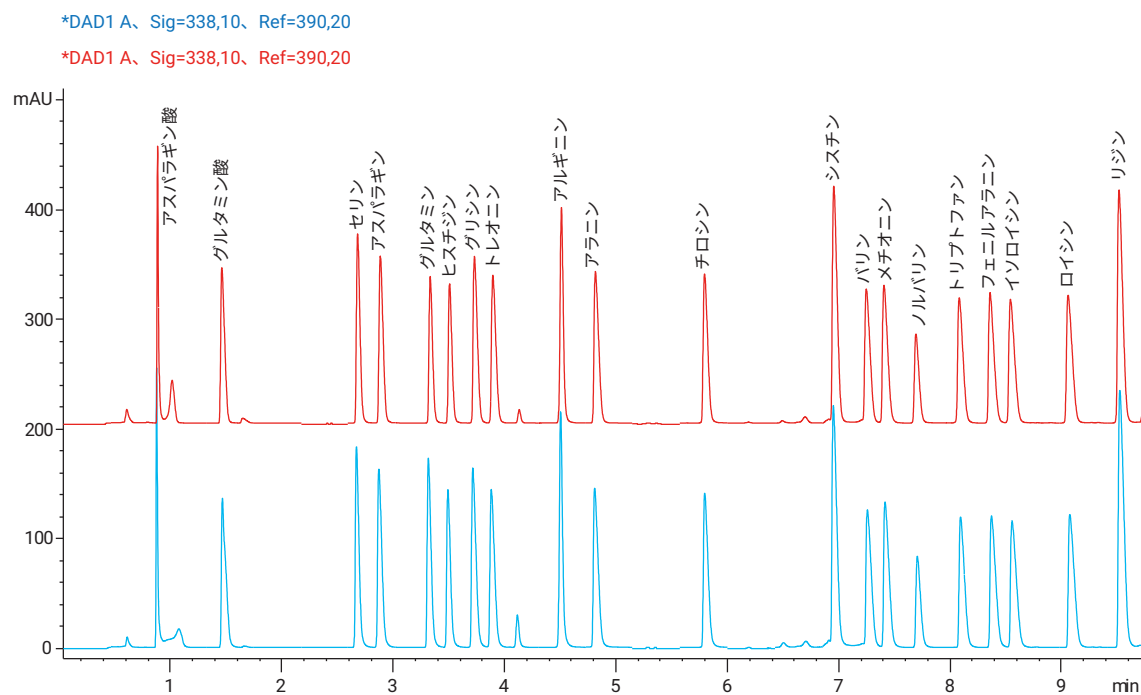


図 3. Agilent AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm カラムによるアミノ酸 20 種の標準溶液の分離結果: 移動相に 5 mM アジ化ナトリウムを添加した場合と無添加の場合の比較

注: 移動相 A への 5 mM アジ化ナトリウム (NaN_3) の添加は、微生物の繁殖抑制と緩衝液の消費期限延長を目的とし、必須ではありません。

ステップ 6:

アミノ酸のハイスループット分析

図 4 のクロマトグラムは、ハイスループットの一般的なルーチン分析において Agilent AdvanceBio AAA カラムにより得られる標準的な感度を示しています。これらの分離結果は、内径の異なる AdvanceBio AAA、100 mm、2.7 μ m カラムを装着した Agilent 1260 Infinity II HPLC バイナリシステムと DAD 検出器により得られたものです。1 回の分析が再平衡も含めて 20 分未満で完了し、十分な分離能が得られています。一級アミノ酸 (OPA 誘導体化) は 338 nm で、また二級アミノ酸 (FMOC 誘導体化) は 262 nm でモニタリングしました。

図 4 で、最初に溶出している 20 種類のアミノ酸は一級アミノ酸で、OPA により誘導体化されています。最後に溶出している 3 種類のアミノ酸 (ヒドロキシプロリン、サルコシン、プロリン) は、FMOC で誘導体化されています。リジンが溶出してからヒドロキシプロリンが溶出するまでに間に、プログラムにより波長が 338 nm から 262 nm に切り替えられています。

- メソッドは異なるカラム寸法に容易にスケールアップできます。
- この分析では、カラム径に応じてメソッドの流量のみを変更しました。
- カラム外容積を最小化するために、低容量熱交換器と内径 0.12 mm キャピラリー配管を使用しました。

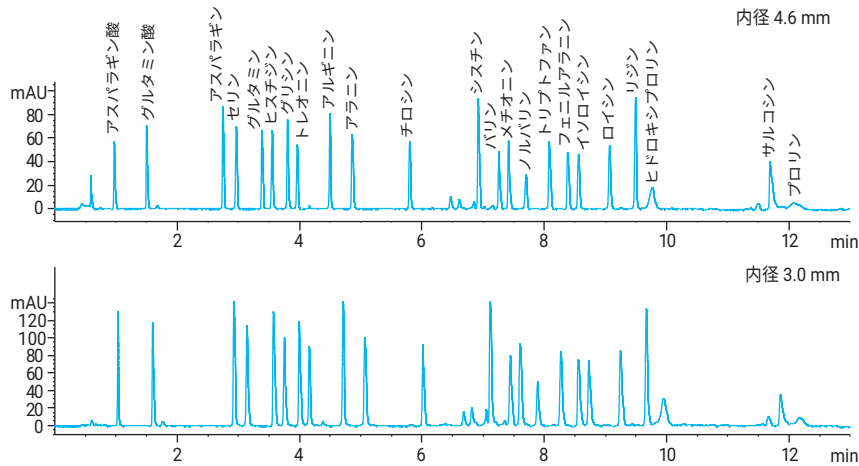


図 4. アミノ酸メソッドを用いて内径の異なる AdvanceBio AAA カラムで分析した AA 標準溶液の分離結果



100 pmol および 1000 pmol の分析における リテンションタイムと面積の精度 (n=6)

表 3. AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm カラムで分離したアミノ酸 (100 pmol) のリテンションタイムと面積の精度 (6 回の繰り返し分析)

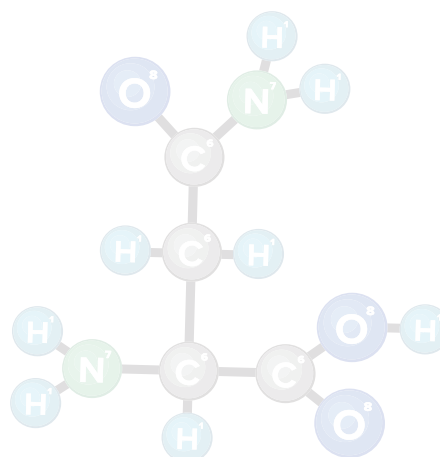
アミノ酸	平均 RT	RT RSD (%)	面積の RSD (%)
1. アスパラギン酸	0.851	1.270	1.066
2. グルタミン酸	1.428	0.973	1.850
3. アスパラギン	2.639	0.605	1.790
4. セリン	2.835	0.629	1.820
5. グルタミン	3.285	0.470	1.560
6. ヒスチジン	3.465	0.430	1.220
7. グリシン	3.681	0.477	1.920
8. トレオニン	3.837	0.440	1.950
9. アルギニン	4.458	0.251	2.150
10. アラニン	4.764	0.280	3.060
11. チロシン	5.762	0.128	1.650
12. システイン	6.870	0.067	1.900

アミノ酸	平均 RT	RT RSD (%)	面積の RSD (%)
13. バリン	7.201	0.084	2.47
14. メチオニン	7.363	0.073	1.82
15. ノルバリン	7.602	0.073	1.72
16. トリプトファン	8.055	0.054	1.57
17. フェニルアラニン	8.341	0.051	1.66
18. イソロイシン	8.503	0.047	1.72
19. ロイシン	9.000	0.030	1.70
20. リジン	9.428	0.028	1.66
21. ヒドロキシプロリン	9.747	0.021	4.13
22. サルコシン	10.980	0.026	1.15
23. プロリン	11.620	0.021	4.36

表 4. AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm カラムで分離したアミノ酸 (1000 pmol) のリテンションタイムと面積の精度 (6 回の繰り返し分析)

アミノ酸	平均 RT	RT RSD (%)	面積の RSD (%)
1. アスパラギン酸	0.837	0.151	2.60
2. グルタミン酸	1.400	0.512	2.19
3. アスパラギン	2.583	0.124	2.13
4. セリン	2.772	0.114	1.74
5. グルタミン	3.220	0.092	1.80
6. ヒスチジン	3.405	0.077	1.39
7. グリシン	3.598	0.068	1.48
8. トレオニン	3.766	0.059	2.26
9. アルギニン	4.422	0.027	1.66
10. アラニン	4.685	0.031	1.87
11. チロシン	5.695	0.034	2.04
12. システイン	6.794	0.030	2.22

アミノ酸	平均 RT	RT RSD (%)	面積の RSD (%)
13. バリン	7.118	0.025	2.40
14. メチオニン	7.281	0.025	1.78
15. ノルバリン	7.573	0.019	1.77
16. トリプトファン	7.970	0.024	2.03
17. フェニルアラニン	8.238	0.027	1.98
18. イソロイシン	8.413	0.025	2.17
19. ロイシン	8.925	0.020	1.81
20. リジン	9.357	0.022	2.00
21. ヒドロキシプロリン	9.718	0.014	3.14
22. サルコシン	10.961	0.015	5.91
23. プロリン	11.911	0.011	2.58



ステップ 7:

欧州薬局方 (EP) に準拠したシステム適合性の保証

欧州薬局方 (EP) では、アミノ酸およびアミノ酸混合物の定性的・定量的組成の要件が規定されています。また、許容される不純物の要件も定められています。アミノ酸メーカーには、欧州市場への製品流通前に、各社のアミノ酸がこれらの仕様に適合していることを証明することが法的に義務付けられています。

ロイシン (Leu) は、分岐鎖 α -アミノ酸の 1 種で、発酵プロセスにより製造されます。このプロセスでは、イソロイシンが副生成物として生成されることがあります。欧州薬局方の規定では、ロイシンとイソロイシンの分離度が 1.5 以上であることが求められます [1]。

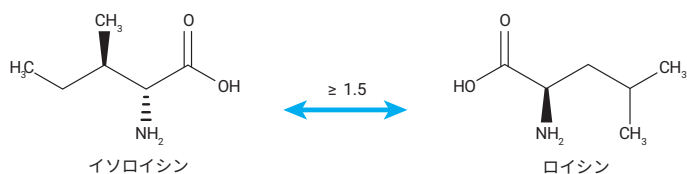


表 5. Agilent AdvanceBio AAA カラムと AA 標準溶液を用いたシステム適合性試験

システム適合性	AdvanceBio AAA、C18、4.6 × 100 mm、2.7 μ m	AdvanceBio AAA、C18、3.0 × 100 mm、2.7 μ m
ロイシンとイソロイシンの分離度 (1.5 以上)	4.5	4.6

参考資料:

1. European pharmacopoeia 9.0 (2.2.56)
Amino Acid Analysis

ステップ 8:

細胞培地およびタンパク質加水分解物標準溶液の最適化

細胞培地は、バイオ医薬品やその他の生物活性化合物の製造に広く利用されています。細胞培地の組成は、目的とする製品の収率や構造を左右することから、その最適化に細心の注意を払う必要があります。一般的な細胞培地は、アミノ酸、ビタミン、炭水化物、無機塩の他、ペプチドやタンパク質などの多様な化合物で構成されます。細胞は、成長の際に栄養素を消費し、目的のバイオ医薬品と老廃物を放出します。アミノ酸は、タンパク質の構成要素であり、多くの代謝経路の中間生成物でもあります。このことから、細胞に必要な栄養素を供給するために、通常、細胞培地にはアミノ酸が追加されています。

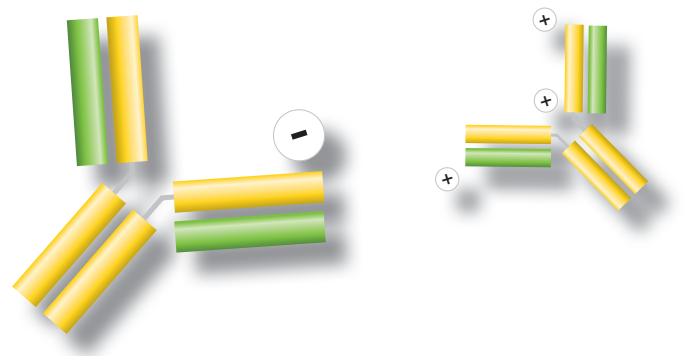
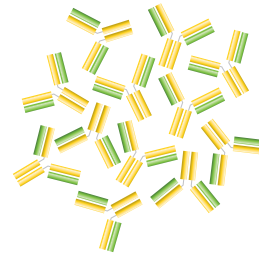
培養細胞中のアミノ酸フラックスの測定は、細胞の代謝率や状態の重要な指標になります。また、利用可能な残余炭素や窒素源の指標としても役立ちます。これは、多様な糖新生、尿素産生、およびタンパク質合成のために他の細胞種よりも大量にアミノ酸を消費する肝細胞や肝癌細胞株において、特に大きな意味を持ちます。

アミノ酸分析には、プレカラム誘導体化を使用した HPLC が標準的手法として用いられています。HPLC 分離と UV または蛍光検出のための溶液中の遊離アミノ酸のプレカラム誘導体化は、手作業によりオフラインで行われることもあります。ただし、オフラインでの誘導体化には、オペレータの技能不足やラボの技術不足がエラー原因になり、必要なサンプル操作や処理時間が増え、汚染のリスクが高まるという、直接的なデメリットがあります。一方、自動オンライン誘導体化では、これらのエラー原因が大幅に解消され、精度が即座に高まり、時間の短縮にもつながります。すなわち、オンライン誘導体化が組み込まれた堅牢な高分離能 HPLC メソッドなら、オフラインメソッドよりも格段に高い生産性が望めます。

一般的な細胞培地とタンパク質加水分解物のアミノ酸組成分析の結果を図 5～8 に示します。この分析により、細胞培地のアミノ酸組成が理論的組成と正確に一致していることが立証されました。このようなアプリケーションは、アミノ酸組成のモニタリングや調整に有効です。また、製造プロセスを最適化し、最終的なバイオ医薬品の品質を高め、最適な収率を確保するうえでも不可欠なステップです。

アミノ酸メソッドを使用した AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm カラムによる組成分析 (図 5～8) には、以下の細胞培地を使用しています。

1. イーグル最小必須培地 (MEM) M4655: L-アルギニン、L-シスチン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン
2. 細胞培地添加用非必須アミノ酸 (NEAA) M7145: L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-プロリン、L-セリン
3. RPMI 1640 R0083: L-アルギニン、L-アスパラギン、L-シスチン、グリシン、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン



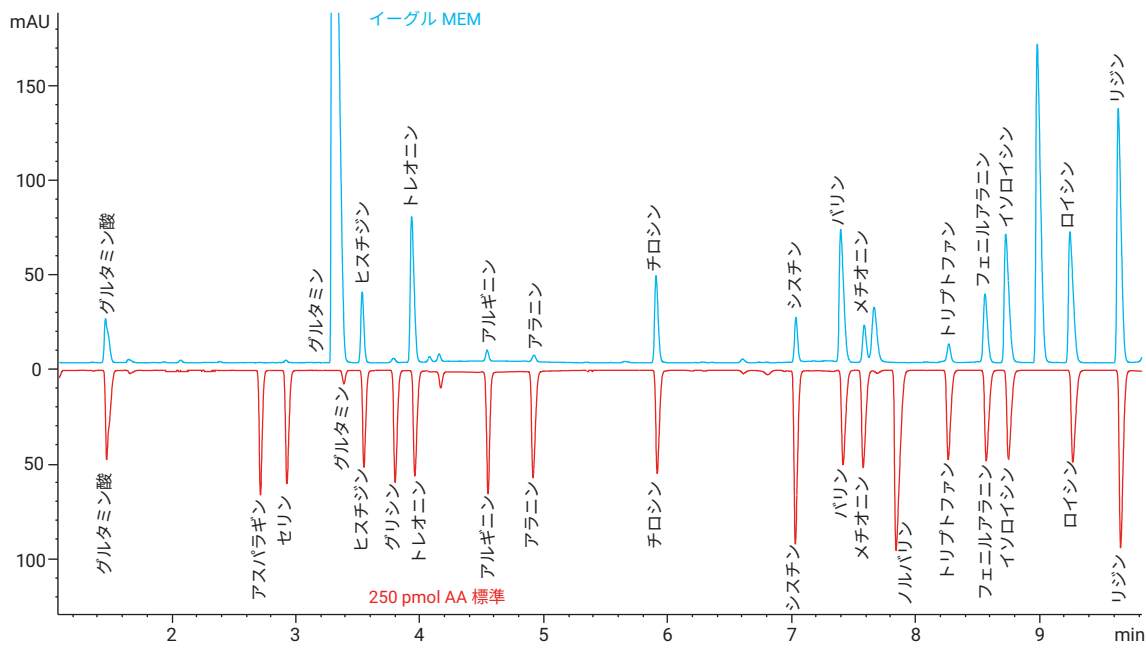


図 5. イーグル MEM 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

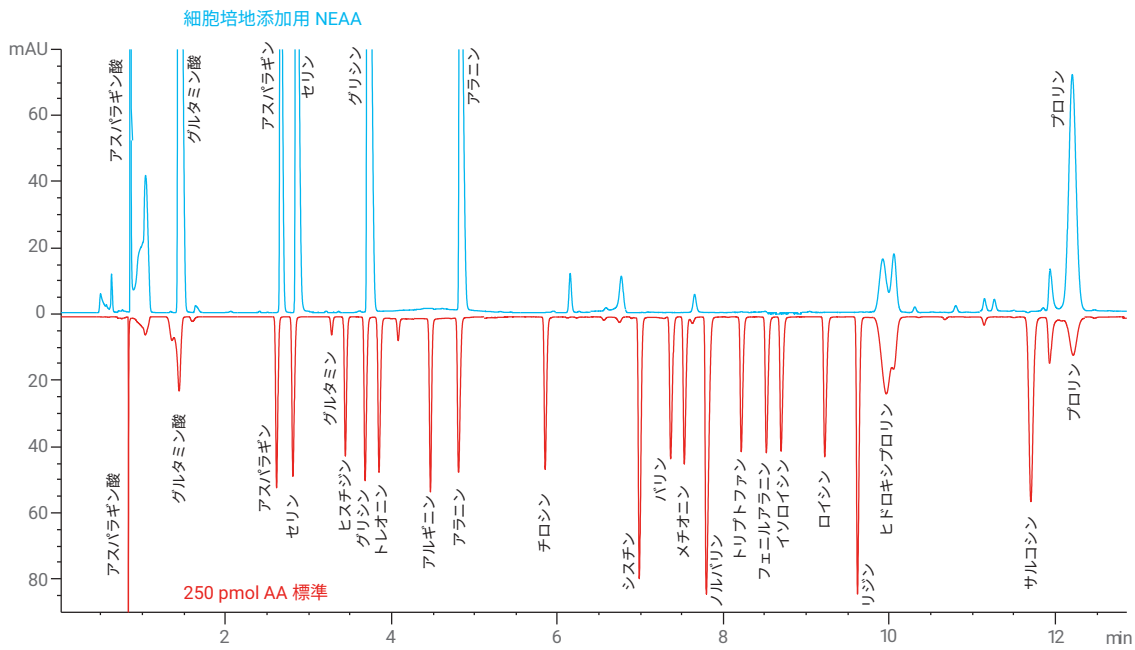


図 6. 非必須アミノ酸 (NEAA) 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

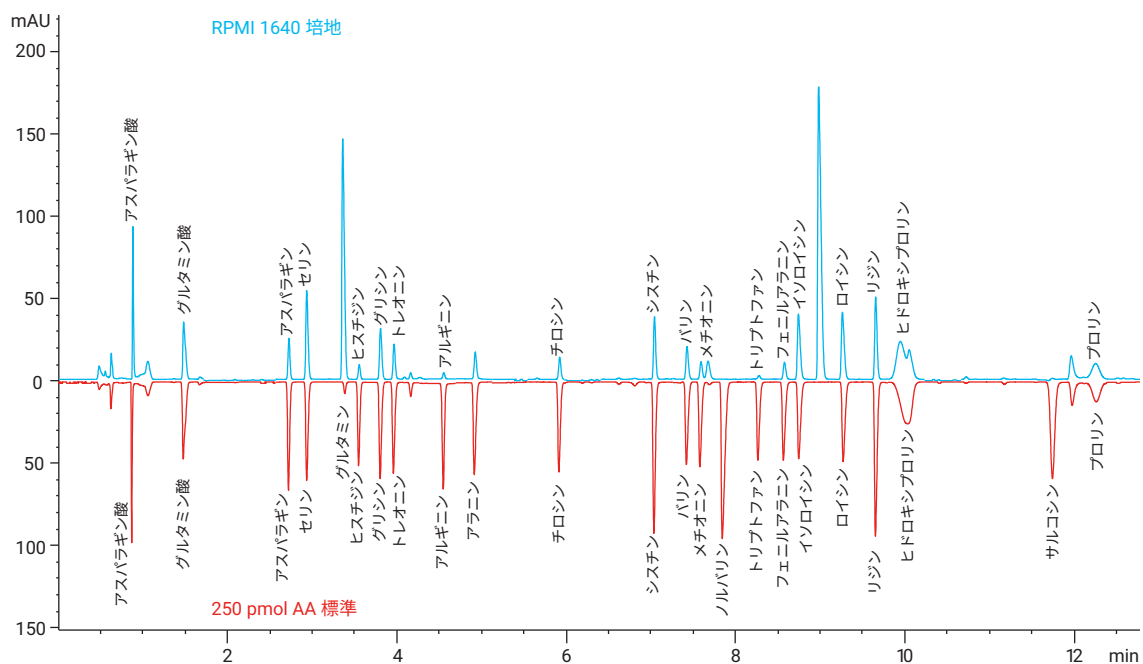


図 7. RPMI 1650 培地のアミノ酸分析結果 (青)。対比のため、Agilent AdvanceBio AAA 溶液を使用したアミノ酸標準溶液の結果 (赤) も示しています。

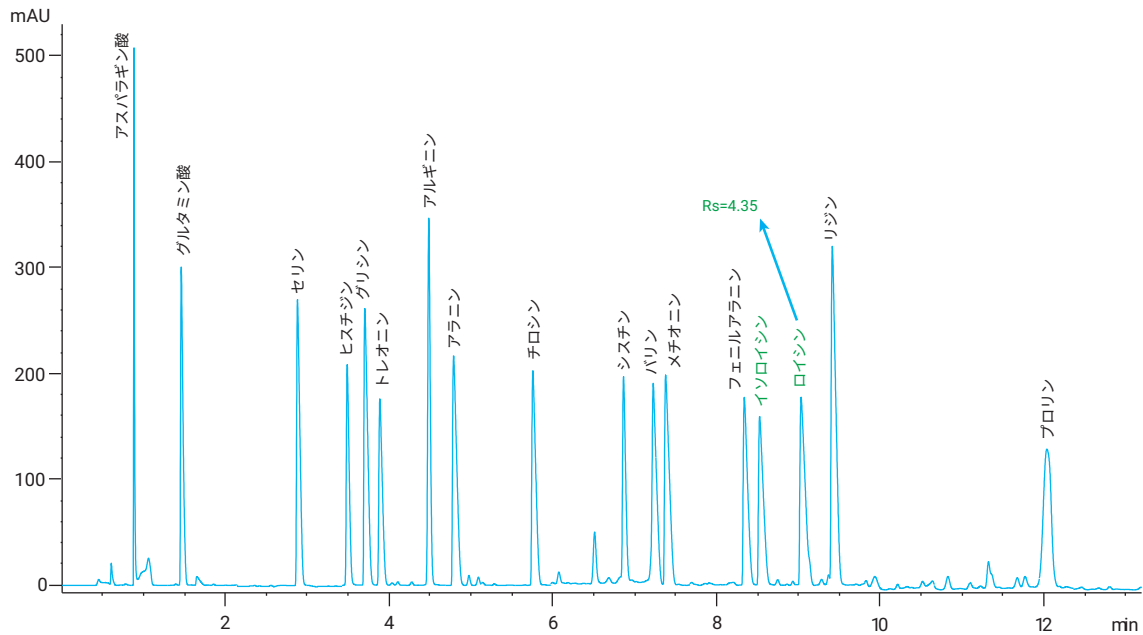


図 8. タンパク質加水分解物のアミノ酸分析結果。AdvanceBio AAA、4.6 x 100 mm、2.7 μ m カラムで得られたロイシンとイソロイシンの分離度は、システム適合性要件として公表されている値を優に上回っています。

メンテナンスとトラブルシューティング

Agilent AdvanceBio AAA ソリューションには、テクニカルサポートとアプリケーションサポートも含まれています。お客様の InfinityLab LC シリーズ機器システムをトラブルなく継続的にご使用いただくために、以下に従ってメンテナンスおよびトラブルシューティングを行うことをおすすめします。

日常的なメンテナンス:

- オートサンプラトレイにセットされている誘導体化試薬、ホウ酸塩緩衝液、アミノ酸標準溶液、および洗浄水を交換してください。
- リテンションタイムとレスポンスファクタの再キャリブレーションを実施してください。
- システム適合性レポートでカラムとガードカラムの性能を確認してください。
- 1日おきに、移動相 A および B を新しく調製したものに交換してください。

トラブルシューティング:

クロマトグラフィー分離能が低い

- ガードカラムの劣化
- 分析カラムの損傷
- ポストカラムの過剰に長い接続によるバンドの広がり
- カラム外容積を最小限にするために、必ず、低容量熱交換器で短い赤色チューブを使用してください。

クロマトグラムのシグナル強度が低い

- OPA 試薬の劣化
- FMOC 試薬の劣化



製品情報

カラム、消耗品、試薬	サイズ	部品番号
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) LC カラム	4.6 x 100 mm, 2.7 µm	655950-802
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) ガードカラム	4.6 x 5 mm, 2.7 µm, 3 個	820750-931
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) LC カラム	3.0 x 100 mm, 2.7 µm	695975-322
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) ガードカラム	3.0 x 5 mm, 2.7 µm, 3 個	823750-946
ホウ酸バッファ	0.4 M 水溶液, pH 10.2, 100 mL	5061-3339
FMOC 試薬	2.5 mg/mL アセトニトリル溶液, 1 mL アンプル x 10 本	5061-3337
OPA 試薬	10 mg/mL, 0.4 M ホウ酸ナトリウムバッファおよび3-メルカプトプロピオン酸に溶解, 1 mL アンプル x 6 本	5061-3335
インサート、樹脂脚付き	250 µL, 100 個	5181-1270
スクリューバイアル、茶色、ラベル付き	2 mL, 認証済み, 100 個	5182-0716
キャップ、スクリュー、緑、PTFE/白シリコンセプタム	100 個	5182-0721
スクリューバイアル、透明、平底	LC 用, 6 mL, 認証済み, 100 個	9301-1377
キャップ、スクリュー	6 mL バイアル用, 100 個	9301-1379
セプタム	6 mL バイアル用, 100 個	9301-1378
アミノ酸標準溶液	1 nmol/µL, 1 mL x 10 本	5061-3330
アミノ酸標準溶液	250 pmol, 10 本	5061-3331
アミノ酸標準溶液	100 pmol/µL, 1 mL x 10 本	5061-3332
アミノ酸標準溶液	25 pmol/µL, 1 mL x 10 本	5061-3333
アミノ酸標準溶液	10 pmol/µL, 1 mL x 10 本	5061-3334
アミノ酸消耗品キット		5062-2478

生体分子の特性解析のために開発された革新的な
Agilent AdvanceBio ファミリーの詳細については、
 ホームページをご覧ください。



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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おりません。
 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. 2018
 Printed in Japan, March 1, 2018
 5991-7694JAJP

 **Agilent**
 Trusted Answers

Determination of Amino Acid Composition of Cell Culture Media and Protein Hydrolysate Standard

The Agilent AdvanceBio Amino Acid Solution

Authors

M. Sundaram Palaniswam
Agilent Technologies, Ltd

Abstract

This study presents a method for analyzing primary amino acids in cell culture media using the Agilent AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA) solution with absorbance detection. Derivatization using an online injector program with OPA and FMOC decreases sample preparation time, and increases reproducibility over traditional offline methods. The effectiveness of this solution for routine analysis was confirmed using a system suitability test and retention time and area precision studies. The AdvanceBio AAA solution provides sensitive and high-resolution separation of all amino acids in cell culture media. The limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and linearity for selected amino acids for qualitative assays are also reported.

Introduction

Amino acids are the basic building blocks of proteins. They constitute all proteinaceous material of the cell including the cytoskeleton and the protein component of enzymes, receptors, and signaling molecules. In addition, amino acids are used for the growth and maintenance of cells. Cell culture media plays a key role in the biopharma industry. A large proportion of the amino acids supplied from cell culture media are diverted to pathways that could influence the fate of the cells in a culture. The identification of the optimal concentration of amino acids is important in fed batch and perfusion culture. Therefore, the design of an amino acid supplementation strategy might be streamlined by identifying the amino acid demands of a cell culture due to host cell growth and product production.

HPLC with precolumn derivatization is commonly used for the analysis of amino acids. Precolumn derivatization of free amino acids in solution for HPLC separations with UV or fluorescence detection is sometimes done manually, offline. Some immediate drawbacks to offline derivatization are sources of error due to operator skill, competence, and laboratory technique. Other drawbacks include extra sample manipulation, extra time required, and increased risk of contamination. Automated online derivatization minimizes these error sources, immediately improves precision, and saves time. Thus, a rugged high-resolution HPLC method including online derivatization, can increase productivity compared to offline methods. Consistent automated OPA derivatization, using the injector programming of the HPLC's autosampler and highly efficient Agilent AdvanceBio AAA columns, generate a rapid-reproducible amino acid method ideal for cell culture media. This method is convenient because the cell media samples are simply transferred to autosampler vials and analyzed. The selectivity of the AdvanceBio AAA column and the mobile phase gradient provides high resolution of 23 amino acids.

Materials and Methods

Instrumentation

Analyses were performed using an Agilent 1290 Infinity LC, which was equipped with an Agilent 1290 Infinity binary pump delivery system (G4220A), Agilent 1290 Infinity autosampler (G4226A), Agilent 1290 Infinity thermostatted column compartment (G1316C), and Agilent 1290 Infinity DAD (G4212A).

Reagents, samples, and materials

Cell culture media for compositional analysis, Minimum Essential Medium Eagle (M4655), Non-Essential Amino Acid (M7145), RPMI 1640 (R0083), Na₂HPO₄, and Na₂B₄O₇·10H₂O, were bought from Sigma-Aldrich. Protein hydrolysate was obtained from Fisher Scientific. Acetonitrile and methanol used were bought from Lab-Scan (Bangkok, Thailand). HPLC grade and highly purified water from a Milli-Q water purification system (Millipore Elix 10 model, USA) was used.

Column

Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (p/n 655950-802)

Preparation of HPLC mobile phase

Mobile phase A contained 10 mM Na₂HPO₄ and 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2. Mobile phase B contained acetonitrile, methanol, and water (45:45:10, v:v:v). Since mobile phase A is consumed at a faster rate than B, it is convenient to make 2 L of A for every 1 L of B produced.

Injection diluent

The injection diluent was 100 mL mobile phase A, plus 0.4 mL concentrated H₃PO₄ in a 100 mL bottle, stored at 4 °C. To prepare 0.1 N HCl, 4.2 mL concentrated HCl (36%) was added to a 500 mL volumetric flask that was partially filled with water, mixed, then filled to the mark with water. This solution was then used for making extended amino acid and internal standard stock solutions. It was stored at 4 °C.

Agilent AdvanceBio AAA standards and reagents kit, p/n 5190-9426, includes:

Part number	Component
5061-3339	Borate buffer: 0.4 M in water, pH 10.2, 100 mL
5061-3337	FMOC reagent, 2.5 mg/mL in ACN, 10 × 1 mL ampules
5061-3335	OPA reagent, 10 mg/mL in 0.4 M borate buffer and 3-mercaptopropionic acid, 6 × 1 mL ampules
5062-2479	Dithiodipropionic acid (DTDPA) reagent, 5 g
5061-3330	AA standard, 1 nmol/μL, 10 × 1 mL
5061-3331	AA standard 250 pmol, 10/pk
5061-3332	AA standard, 100 pmol/μL, 10 × 1 mL
5061-3333	AA standard, 25 pmol/μL, 10 × 1 mL
5061-3334	AA standard, 10 pmol/μL, 10 × 1 mL
5062-2478	Amino acids supplement kit, 1 g each

Derivatization reagents

Derivatization reagents (borate buffers, OPA, and FMOC) are ready-made solutions supplied by Agilent, and were transferred from their containers to autosampler vials. Precautions included:

- OPA is shipped in ampules under inert gas to prevent oxidation. Once opened, the OPA is potent for approximately 7 to 10 days. Therefore, 100 μL aliquots of OPA were transferred in microvial inserts and refrigerated. The OPA autosampler microvial was then replaced daily. Each ampule lasted 10 days (one vial/day).
- FMOC is stable in dry air, but deteriorates in moisture. Therefore, FMOC was transferred in 100 μL aliquots to microvial inserts and refrigerated. An open FMOC ampule transferred to 10 microvial inserts should last 10 days.
- Borate buffer was transferred to a 1.5 mL autosampler vial without a vial insert, and replaced every 3 days.

Preparation of amino acid standards

- Solutions of 17 amino acids in five concentrations are available from Agilent (10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ to 1 $\text{nmol}/\mu\text{L}$) for calibration curves. Each 1 mL ampule of standards was divided into 100 μL portions in conical vial inserts, and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$.
- The extended amino acid (EAA) stock solution was produced by weighing 59.45 mg asparagine, 59.00 mg hydroxyproline, 65.77 mg glutamine, and 91.95 mg tryptophan into a 25 mL volumetric flask. This flask was filled halfway with 0.1 N HCL, and shaken or sonicated until the amino acids were dissolved. It was then filled to mark with water to produce a total concentration of 18 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ of each amino acid.
- For the high-sensitivity EAA stock solution, 5 mL of this standard-sensitivity solution was diluted with 45 mL water (1.8 $\text{nmol}/\mu\text{L}$). Solutions containing extended standards were unstable at room temperature, and were kept frozen, and discarded at the first signs of reduced intensity.

Internal Standard (ISTD) stock solution

For primary amino acid ISTD stock solutions, 58.58 mg norvaline was weighed into a 50 mL volumetric flask. For secondary amino acids, 44.54 mg sarcosine was weighed into the same 50 mL flask. This flask was filled halfway with 0.1 N HCL, and shaken or sonicated until dissolved, then filled to mark with water for a final concentration of 10 nmol each amino acid/ μL (standard sensitivity). For high-sensitivity ISTD stock solution, 5 mL of standard-sensitivity solution was diluted with 45 mL of water, and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$.

Calibration curves may be made using two to five standards, depending on experimental need. Typically, 100 $\text{pmol}/\mu\text{L}$, 250 $\text{pmol}/\mu\text{L}$, and 1 $\text{nmol}/\mu\text{L}$ are used in a three-point calibration curve for standard analytical sensitivity analysis. The following tables should be followed if an internal standard or other amino acids (for example, the extended amino acids) are added. Table 1 describes standard analytical sensitivity concentrations typically used in UV analysis.

Table 1. Chromatographic parameters used for intact and reduced analysis.

	Concentration of Final AA solution ($\text{pmol}/\mu\text{L}$)		
	900	225	90
Take 5 mL of 18 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
Dilute with water	–	15 mL	45 mL
Diluted EAA mix	5 mL	20 mL	50 mL
Take 5 mL of diluted EAA mix	5 mL	5 mL	5 mL
Add 10 nmol ISTD solution	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD mix	10 mL	10 mL	10 mL
Take 100 μL of EAA-ISTD mix	100 μL	100 μL	100 μL
For 1 nmol AA, add:	900 μL	–	–
For 250 pmol AA, add:	900 μL	–	–
For 100 pmol AA, add:	–	–	900 μL
Final AA solution with EAA and 500 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ ISTD	1 mL	1 mL	1 mL

Online derivatization

Depending on the autosampler model, the automated online derivatization program differs slightly. For the Agilent G4226A well plate automatic liquid sampler (WPALS), the injection program was:

1. Draw 2.5 μL from borate vial (p/n 5061-3339).
2. Draw 1.0 μL from sample vial.
3. Mix 3.5 μL in wash port five times.
4. Wait 0.2 minutes.
5. Draw 0.5 μL from OPA vial (p/n 5061-3335).
6. Mix 4.0 μL in wash port 10 times default speed.
7. Draw 0.4 μL from FMOC vial (p/n 5061-3337).
8. Mix 4.4 μL in wash port 10 times default speed.
9. Draw 32 μL from injection diluent vial.
10. Mix 20 μL in wash port eight times.
11. Inject.
12. Wait 0.1 minutes.
13. Valve bypass.

The location of the derivatization reagents and samples is up to the analyst and the ALS tray configuration. Using the G1367C with a 2 \times 56-well plate tray (p/n G2258-44502), the locations were:

- Vial 1: Borate buffer
- Vial 2: OPA
- Vial 3: FMOC
- Vial 4: Injection diluent
- P1-A-1: Sample

Thermostatted column compartment (TCC)

Left and right temperatures were set to 40 $^{\circ}\text{C}$. Analysis was enabled when the temperature was within ± 0.8 $^{\circ}\text{C}$.

Diode array detector (DAD)

Signal A: 338 nm, 10 nm bandwidth, reference wavelength 390 nm, 20 nm bandwidth.

Signal B: 262 nm, 16 nm bandwidth, reference wavelength 324 nm, 8 nm bandwidth.

Signal C: 338 nm, 10 nm bandwidth, reference wavelength 390 nm, 20 nm bandwidth.

To detect both OPA and FMOC derivatized amino acids in a single chromatogram, it was necessary to switch detector wavelengths. This switch took place between the last eluting OPA derivatized amino acid, lysine (peak 20 in the standard), and the first eluting FMOC derivatized amino acid, hydroxyproline (peak 21 in the standard).

With the DAD, determining the appropriate transition point was possible by initially collecting two channels. Signal A, 338 nm, detected OPA derivatized amino acids, and signal B, 262 nm, detected FMOC derivatized amino acids. From this analysis, the ideal point at which to switch wavelength during the run was determined. Subsequent runs were then made using a single channel, with the detector timetable function used to program a wavelength switch from 338 to 262 nm at the appropriate time between the elution of OPA-lysine and FMOC-hydroxyproline. This switch allowed both OPA and FMOC-derivatized amino acids to be detected in a single chromatogram. Peak width settings of >0.01 minutes were used for all columns.:

Linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) determination

As an example extended amino acid (EAA) stock solution, asparagine (59.45 mg), glutamine (65.77 mg), and tryptophan (91.95 mg) were used for linearity, LOD, and LOQ determination. These standards were weighed into a 25 mL volumetric flask, which was filled halfway with 0.1 N HCl, and mixed or sonicated until they dissolved. The flask was then filled to mark with water for a total concentration of 18 nmol/ μL of each amino acid.

Linearity was studied in the range of 0.9–1,000 pmol/ μL of these standard amino acids. Appropriate AA standard solutions were prepared in triplicate and injected into the chromatograph. The LOD and LOQ were estimated from the calibration function. LOD and LOQ were calculated as $3 (SD(a)/b)$ and $10 (SD(a)/b)$, respectively, where $SD(a)$ is the standard deviation of the intercept, and b is the slope of the calibration function.

Gradient program	
Time (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	end

Flow rate: 1.5 mL/min for 4.6 mm id

Table 3. Retention time and area RSD precision for amino acids (1,000 pmol) separated on an Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, column (n = 6).

Amino acid	RT RSD (%)	Area RSD (%)	Amino acid	RT RSD (%)	Area RSD (%)
1. Aspartic acid	0.151	2.60	13. Valine	0.025	2.4
2. Glutamic acid	0.512	2.19	14. Methionine	0.025	1.78
3. Asparagine	0.124	2.13	15. Norvaline	0.019	1.77
4. Serine	0.114	1.74	16. Tryptophan	0.024	2.03
5. Glutamine	0.092	1.8	17. Phenylalanine	0.027	1.98
6. Histidine	0.077	1.39	18. Isoleucine	0.025	2.17
7. Glycine	0.068	1.48	19. Leucine	0.020	1.81
8. Threonine	0.059	2.26	20. Lysine	0.022	2
9. Arginine	0.027	1.66	21. Hydroxyproline	0.014	3.14
10. Alanine	0.031	1.87	22. Sarcosine	0.015	5.01
11. Tyrosine	0.034	2.04	23. Proline	0.011	2.58
12. Cysteine	0.030	2.22			

System suitability as per the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)

The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) defines requirements for the qualitative and quantitative composition of amino acids and mixtures of amino acids. The requirements for allowed impurities are also defined. Manufacturers of amino acids are legally bound to prove that their amino acids meet these specifications before they can distribute their products in Europe. Leucine (Leu) is a branched-chain α -amino acid that is produced by a fermentation process (Figure 2). During this process, isoleucine can be produced as a by-product. The Ph. Eur. states that leucine and isoleucine should have a resolution of not less than 1.5 [1].

Ten concentration points for three amino acids were assayed in triplicate. The three standard amino acids showed good linearity in the tested range. The area response obeyed the equation $y = mx + C$, where the intercept C was zero within 95 % confidence limits, and the square correlation coefficient (R^2) was always greater than 0.99. Figure 3 shows the linearity curve for asparagine, glutamine, and tryptophan in the concentration range evaluated.

The LOD and LOQ were approximately 0.9 pmol and 3.8 pmol, respectively, using UV detection, indicating that the method was sensitive. Table 5 shows the observed LOD and LOQ values of asparagine, glutamine, and tryptophan.

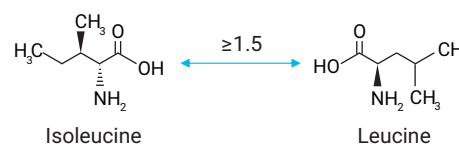


Figure 2. Isoleucine and leucine chemical relationship.

Table 4. System suitability testing using AdvanceBio AAA columns and AA standards.

System suitability	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μ m	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 3 × 100 mm, 2.7 μ m
Resolution between leucine and isoleucine (≥ 1.5)	4.5	4.6

Table 5. LODs and LOQs for three amino acids.

Asparagine		Glutamine		Tryptophan	
Concentration (pmol)	S/N ratio	Concentration (pmol)	S/N ratio	Concentration (pmol)	S/N ratio
0.9 (LOD)	5.3	0.9 (LOD)	3.0	0.9 (LOD)	4.5
1.9 (LOQ)	10.8	3.8 (LOQ)	13.8	3.8 (LOQ)	20.5

Results and Discussion

High-throughput routine analysis

The chromatogram in Figure 1 illustrates the standard analytical sensitivity achieved in high-throughput separations of amino acids. This chromatogram was obtained using an Agilent 1290 Infinity LC with an Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm column using the amino acid method with DAD detection. A single run was completed in 18 minutes (including re-equilibration) with adequate resolution. The primary amino acids (1-20, OPA-derivatized), shown in Figure 1, were monitored at 338 nm, while the secondary amino acids (21-23, Fmoc-derivatized) were monitored at 262 nm.

Precision of retention time and area (n = 6)

Tables 2 and 3 summarize the average retention times and area RSDs for all the amino acids for the 100 and 1,000 pmol from six replicates of an amino acid method. The retention time RSDs for all amino acid peaks, including the early eluting peak 1 were less than 1.2%, demonstrating excellent gradient reproducibility. Peak area RSDs were less than 5 %, indicating precise sample injection. The RSD values demonstrate the robustness and precision of the amino acid method.

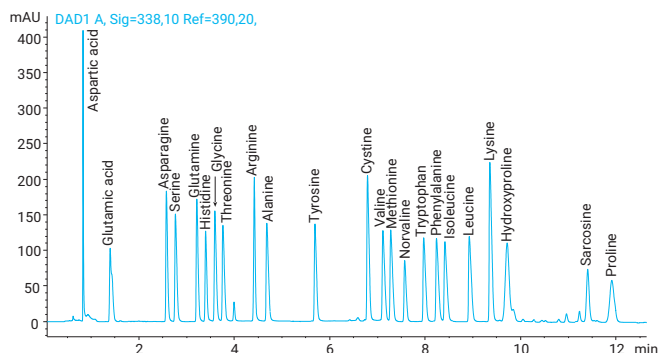


Figure 1. Separation of amino acid standard (1 nmol) on an Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm, 2.7 μm column, using the amino acid method.

Table 2. Retention time and area RSD precision for amino acids (100 pmol) separated on an Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, column (n = 6).

Amino acid	RT RSD (%)	Area RSD (%)	Amino acid	RT RSD (%)	Area RSD (%)
1. Aspartic acid	1.270	1.066	13. Valine	0.084	2.47
2. Glutamic acid	0.973	1.85	14. Methionine	0.073	1.82
3. Asparagine	0.605	1.79	15. Norvaline	0.073	1.72
4. Serine	0.629	1.82	16. Tryptophan	0.054	1.57
5. Glutamine	0.470	1.56	17. Phenylalanine	0.051	1.66
6. Histidine	0.430	1.22	18. Isoleucine	0.047	1.72
7. Glycine	0.477	1.92	19. Leucine	0.03	1.7
8. Threonine	0.440	1.95	20. Lysine	0.028	1.66
9. Arginine	0.251	2.15	21. Hydroxyproline	0.021	4.13
10. Alanine	0.280	3.06	22. Sarcosine	0.026	1.15
11. Tyrosine	0.128	1.65	23. Proline	0.021	4.36
12. Cysteine	0.067	1.9			

Amino acid analysis of cell culture media and protein hydrolysate standard

We analyzed the amino acid composition of commonly used cell culture supplements. These standards included: Minimum Essential Medium Eagle (MEM), Non-Essential Amino Acid (NEAA), RPMI 1640 R0083, and protein hydrolysate standard. The results were then compared with the amino acid standards. Figures 4 to 7 show the overlays of amino acid composition of the media and the amino acid standards.

It is evident that the amino acid composition of cell culture supplements, as determined by this method, matches accurately with their theoretical composition. In addition, baseline resolution of isoleucine and leucine was observed with a resolution factor of 4.35 for the protein hydrolysate standard, meeting the regulatory requirements for these components significantly better than competitive columns. Such applications are useful in monitoring and adjusting amino acid composition, which is an essential part of optimizing the manufacturing process to ensure high quality and optimum yield of the final biopharmaceutical product.

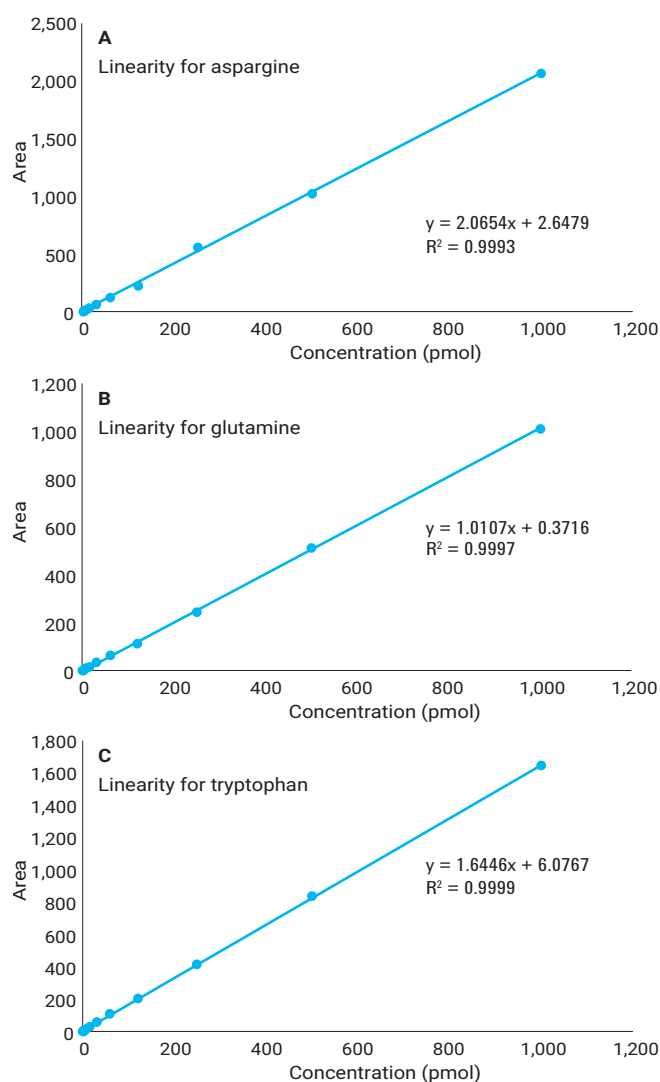


Figure 3. Linearity curve with 10 standard concentrations of asparagine, glutamine, and tryptophan ranging from 0.9 to 1,000 pmol, showing excellent coefficient values.

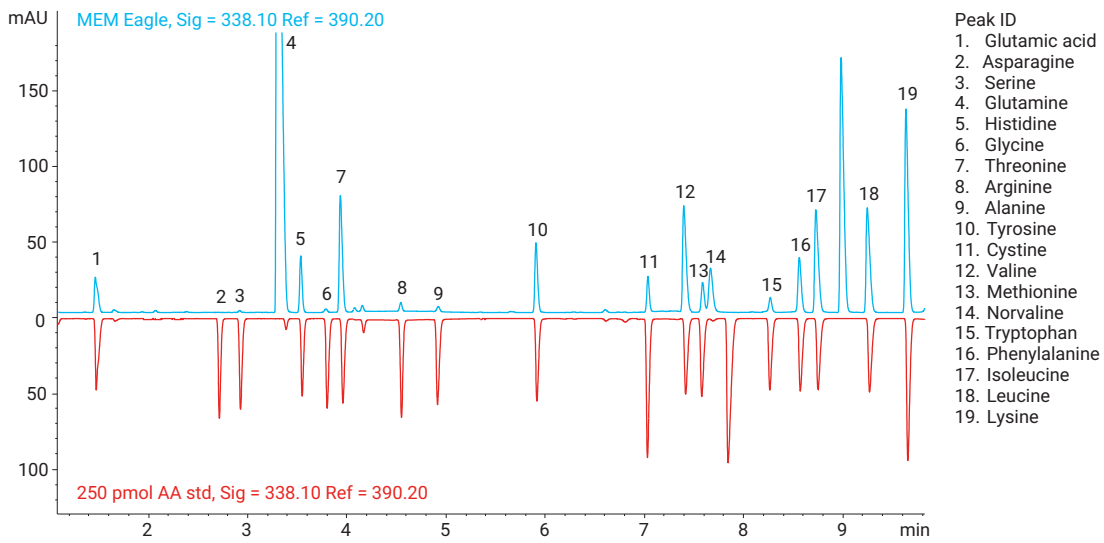


Figure 4. Amino acid analysis of MEM media (blue trace) mirrored with AA standards (red trace).

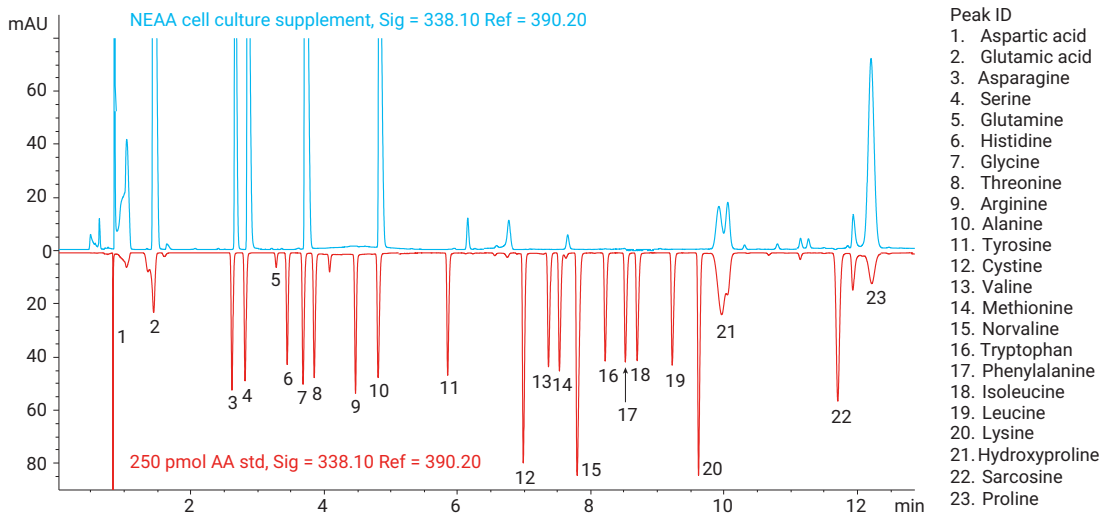


Figure 5. Amino acid analysis of NEAA media (blue trace) and comparison with AA standards (red trace).

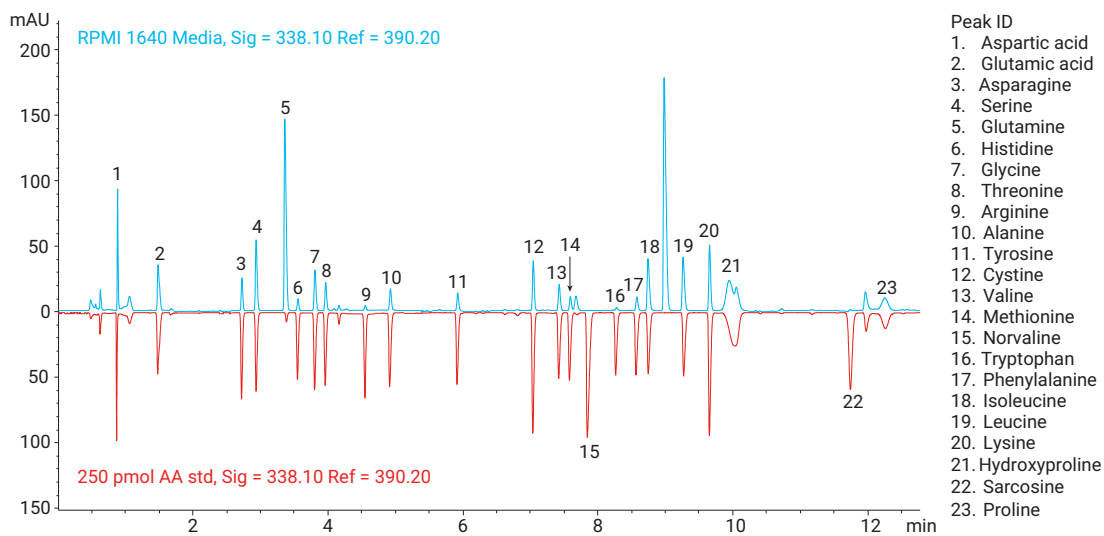


Figure 6. Amino acid analysis of RPMI 1650 media (blue trace) and comparison with AA standards (red trace).

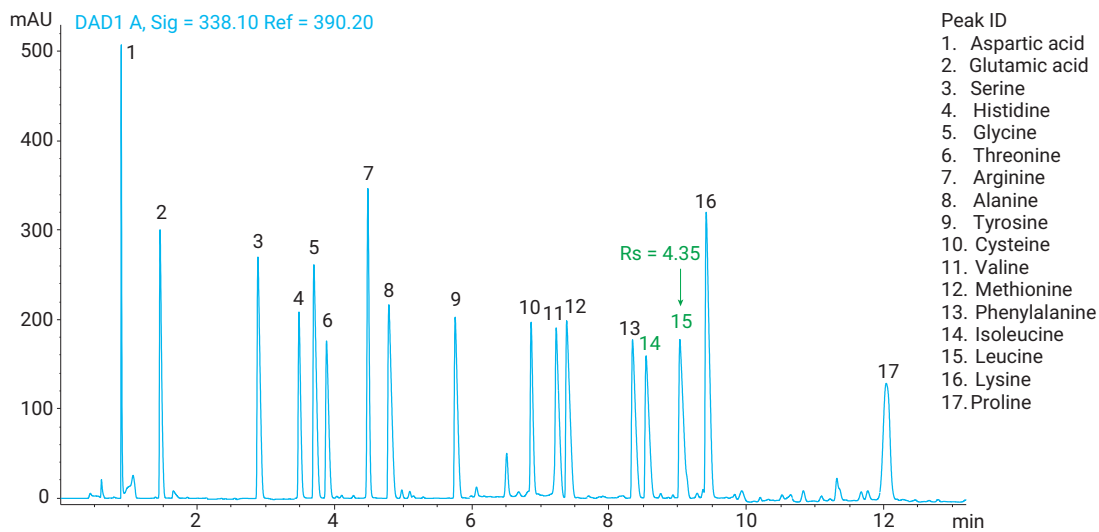


Figure 7. Amino acid analysis of protein hydrolysate standard. The resolution between leucine and isoleucine with the Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm column is much higher than the reported value for system suitability requirement for this pair.

Conclusion

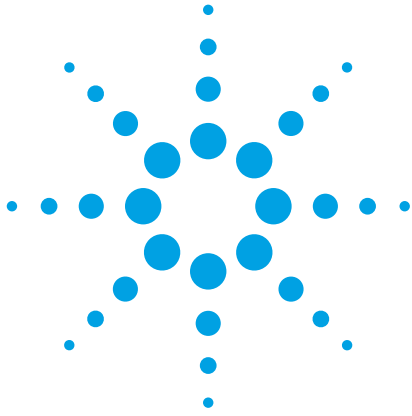
Amino acid analysis is an important approach for the characterization of protein and peptide-based products. Studying the roles of amino acids during bioprocesses leads to better understanding the feeding strategy, and to improving the yield and quality of the product. In addition, the determined amino acid composition can confirm sample identity, and give a measure of sample purity. This Application Note demonstrates several Agilent tools for the analysis of amino acids. We first used the Agilent 1290 Infinity LC and the Agilent AdvanceBio AAA kit for the automated online derivatization of amino acids using OPA/FMOC chemistries. The derivitized amino acids were then separated on an AdvanceBio AAA LC column to achieve a fast, sensitive, and reproducible separation of amino acids. Area and RT precision of the method were excellent, and met the system suitability requirement. Linearity curves with 10 standard concentrations of three amino acids, ranging from 0.9 pmol to 1 nmol, had excellent coefficient of linearity values, indicating that the method was quantitative and accurate. The LOD and LOQ for the amino acids were 0.9 pmol and 3.8 pmol, respectively, indicating that the method was sensitive. In addition, this method was able to separate and detect amino acids from cell culture media and protein hydrolysate standard. The amino acid composition determined using this method correlated well with their theoretical compositions..

Reference

1. European Pharmacopoeia 9.0 (2.2.56) *Amino Acid Analysis*

For More Information

These data represent typical results. For more information on our products and services, visit www.agilent.com/chem.



Agilent Poroshell HPH-C18 カラムを用いた 自動アミノ酸分析

アプリケーションノート

食品検査、農業、医薬品

著者

William Long
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、3.5 および 1.8 μm の Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムに関して以前に開発された自動プレカラム OPA/FMOC アミノ酸メソッドを、2.7 μm の Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔質カラムも対象に含めて実施しています。この分析において、このカラムの寿命が長いこと、および異なるカラム寸法への変換が容易できることが示されています。さらに、発酵生成物に対するカラムのアプリケーションについても説明します。



Agilent Technologies

はじめに

表面多孔質粒子 (SPP) の技術は、硬質なコアと表面が多孔性の外殻を持つ粒子をベースとしています。これらの粒子は、1.7 μm の硬質コアと 0.5 μm の多孔性外殻で構成されています。全体として 1 個の粒子サイズは約 2.7 μm です。2.7 μm の表面多孔質粒子では、サブ 2 μm の全多孔質粒子よりも背圧は 40 ~ 50 % 低く、効率はサブ 2 μm の全多孔質粒子の 80 ~ 90 % です。表面多孔質粒子は全多孔質粒子よりも、狭い粒子サイズの分布を示します。この結果、より均一性が高いカラムベッドとなり、カラムの分散が低減します。また、多孔性外殻が薄いため、物質移動抵抗は低くなります。これにより、高流量での効率の損失が最低限に抑えられます [1]。また、カラムには 2 μm のフリットが組み込まれているため、詰まりに対しては、3.5 μm および 5 μm のカラムと同程度の耐性があります。最近まで、すべてのシリカベースの SPP 材料は、リン酸バッファなどの高 pH のバッファにおいては寿命が限られていました。寿命を延ばすためには、表面修飾または特殊な結合修飾によってベースの粒子を保護する必要があります。Agilent Poroshell HPH-C18 粒子の表面は、独自プロセスにより有機層を形成するように化学的に修飾されており、高 pH 条件でのシリカ溶出に対して耐性があります。

HPLC カラムと機器は絶えず改良されているため、それに応じて HPLC メソッドも随時改善されています。HP 1090 シリーズ時代に HPLC システムでオルトフタルアルデヒド/9-フルオレニルメチルクロロギ酸エステル (OPA/FMOC) により誘導体化したアミノ酸を対象として開発された実績のあるメソッドは、後に Agilent 1100 シリーズ用にアップデートされました。現在では Agilent 1260 Infinity バイナリ LC および Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔質カラムを利用するように改良されています [2 ~ 8]。

実験方法

HPLC 移動相の前処理

移動相 A には、10 mM Na_2HPO_4 、10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 8.2)、および 5 mM NaN_3 が含まれています。1 L の水に、1.4 g 無水 Na_2HPO_4 、3.8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、および 32 mg NaN_3 を計量して加えます。1.2 mL HCl で約 pH 8.4 に調整してから、塩酸を数滴加えて pH 8.2 にします。pH の調整前に、ホウ酸ナトリウム結晶が完全に溶出するよう攪拌時間を設定します。0.45 μm 再生セルロース膜 (p/n 3150-0576) を通してろ過します。移動相 B には、アセトニトリル:メタノール:水 (45:45:10、v:v) が含まれています。すべての移動相溶媒には、HPLC グレードのものを使用しました。移動相 A は B よりも高い反応性で消費されるため、1 L の B ごとに 2 L の A を使用するのが最適です。

注入希釈液は 100 mL 移動相 A で、100 mL ボトル内に 0.4 mL H_3PO_4 を加えて 4 °C で保存しました。

0.1 N HCl を前処理するために、少し水を入れた 500 mL 計量フラスコに 4.2 mL HCl (36 %) を加えます。混合して、印の部分まで水を充填します。この溶液は、拡張アミノ酸および内部標準原液を作成するためのものです。4 °C で保存します。

誘導体化試薬 (ホウ酸ナトリウムバッファ、OPA、および FMOC) は、アジレントから提供されている既製の溶液です。この試薬は、容器からオートサンパライアルに移すだけです。次のような注意事項があります。

- OPA は酸化を防ぐため、不活性化ガスをアンブルに封入して出荷されています。OPA は、開封後約 7 ~ 10 日間使用可能です。100 μL 量の OPA をマイクロバイアルインサートに移すことを推奨します。名前と日付が記載されたラベルを貼り、ふたをして冷蔵保存します。OPA オートサンパライアルは毎日交換してください。
- FMOC は乾いた空気中では安定した状態ですが、水分に触れると劣化します。これも 100 μL 量をマイクロバイアルインサートに移すことを推奨します。名前と日付が記載されたラベルを貼り、しっかりとふたをして冷蔵保存します。FMOC アンブルは OPA と同様に、開封後 10 個のマイクロバイアルインサートに移して使用する場合の使用期限は 10 日です (1 日あたり 1 個のバイアルを使用)。
- ホウ酸ナトリウムバッファは、バイアルインサートを用いなくても 1.5-mL オートサンパライアルに移すことが可能です。3 日ごとに交換してください。

アミノ酸標準の前処理

検量線用として、アジレントの 5 種類の濃度 (10 pmol/ μL ~ 1 nmol/ μL) による 17 種類のアミノ酸溶液が使用できます。1 mL アンブルの各標準 (p/n 5061-3330 ~ 5061-3334) を 100 μL ずつコニカルバイアルインサートに分割します。ふたをして 4 °C で冷蔵保存します。

拡張アミノ酸 (EAA) 原液を作成するために、59.45 mg アスパラギン、59.00 mg ヒドロキシプロリン、65.77 mg グルタミン、および 91.95 mg トリプトファンを計量して 25 mL 計量フラスコに入れます。0.1 N HCl を半分まで充填し、溶解するまで振るか、または超音波洗浄器にかけます。印の部分まで水を充填し、総濃度 18 nmol/ μL のアミノ酸を作成します。

高感度 EAA 原液を作成する場合は、この標準感度溶液を 5 mL 取り出し、45 mL の水で希釈します (1.8 nmol/ μL)。拡張標準を含む溶液は、室温では不安定な状態です。この溶液は冷凍保存しておき、強度が低下する兆候が見られたら廃棄してください。

一級アミノ酸 ISTD 原液を作成する場合は、58.58 mg ノルバリンを計量して 50 mL 計量フラスコに入れます。二級アミノ酸を作成する場合は、44.54 mg サルコシンを計量して同じ 50 mL フラスコに入れます。0.1 N HCL を半分まで充填し、溶解するまで振るか、または超音波洗浄器にかけたあと、印の部分まで水を充填し、最終濃度 10 nmol/μL のアミノ酸を作成します (標準感度)。高感度 ISTD 原液を作成する場合は、この標準感度溶液を 5 mL 取り出し、45 mL の水で希釈します。4 °C で保存します。

実験での必要性に応じて、2~5 種類の標準で検量線を作成します。通常、標準感度分析の 3 点検量線の場合は、100 pmol/μL、250 pmol/μL、および 1 nmol/μL を使用します。

ポンプパラメータ

すべてのメソッドに対するポンプパラメータとして、圧縮率 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 35、B: 80 が指定されており、最小ストローク A、B は 20 μL です。

オンライン誘導体化

オンライン誘導体化の自動化プログラムは、オートサンブラのモデルに応じて多少異なります。Agilent G1376C ウェルプレート自動液体サンブラ (WPALS) の場合、次の注入プログラムを使用します。

1. ホウ酸ナトリウムバイアル (p/n 5061-3339) から 2.5 μL 吸引します。
2. サンプルバイアルから 1.0 μL 吸引します。
3. 3.5 μL を洗浄ポートで 5 回混合します。
4. 0.2 分間待ちます。
5. OPA バイアル (p/n 5061-3335) から 0.5 μL 吸引します。
6. 4.0 μL を洗浄ポートで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
7. FMOC バイアル (p/n 5061-3337) から 0.4 μL 吸引します。
8. 4.4 μL を洗浄ポートで 10 回、デフォルトスピードで混合します。
9. 注入希釈液バイアルから 32 μL 吸引します。
10. 20 μL を洗浄ポートで 8 回混合します。
11. 注入します。
12. 0.1 分間待ちます。
13. バルブをバイパスします。

誘導体化試薬とサンプルの位置は、分析者と ALS トレイ構成に合わせます。G1367C と 2×56 ウェルプレートトレイ (p/n G2258-44502) を用いた場合の位置は、次のとおりでした。

- バイアル 1: ホウ酸ナトリウムバッファ
- バイアル 2: OPA
- バイアル 3: FMOC
- バイアル 4: 注入希釈液
- P1-A-1: サンプル

カラムコンパートメント (TCC)

左側および右側の温度を 40 °C に設定しました。温度が ± 0.8 °C 以内に収まっている場合は、分析が実施できます。

ダイオードアレイ検出器 (DAD)

シグナル A: 338 nm、10 nm バンド幅、および参照波長 390 nm、20 nm バンド幅。

シグナル B: 262 nm、16 nm バンド幅、および参照波長 324 nm、8 nm バンド幅。

シグナル C: 338 nm、10 nm バンド幅、および参照波長 390 nm、20 nm バンド幅。

DAD は、リジン溶出後とヒドロキシプロリン溶出前に 262 nm、16 nm バンド幅、参照波長 324 nm、8 nm バンド幅に切り替わるようにプログラミングしました。シグナル C は、ピーク 20 と 21 の間でシグナル A と B の時間枠を調査した後、波長を切り替える最適なポイントを選択して決定しました。切り替え時間を決定してメソッドにプログラミングした後、シグナル A と B は省略可能になりました。

すべてのカラムに対して、ピーク幅 > 0.01 分に設定しました。

結果と考察

図 1 からわかるように、同じクロマトグラフィー条件を用いた場合、分離状態は非常によく似ていました。両方のカラムにおける混合物の溶出順序は同じであり、また図 2 に示すように、Eclipse Plus C18 と Poroshell HPH-C18 の間のアミノ酸サンプルのリテンションタイムには高い相関性があり、相関係数は 0.997 でした。クロマトグラムからわかるように、Poroshell HPH-C18 カラムでのリテンションタイム

が多少短くなっていました。一部のクロマトグラフィーでは違いが顕著に現れています。ここに示す例では、Poroshell HPH-C18 の方がロイシンおよびリジンの分離は良好であるようですが、リジンとヒドロキシプロリンおよびサルコシン/プロリンのペアの間の分離は劣っているように見えます。以前のアプリケーションノートで説明されているように、望ましいピークペアの分離能を向上させるために分離を最適化することができます。

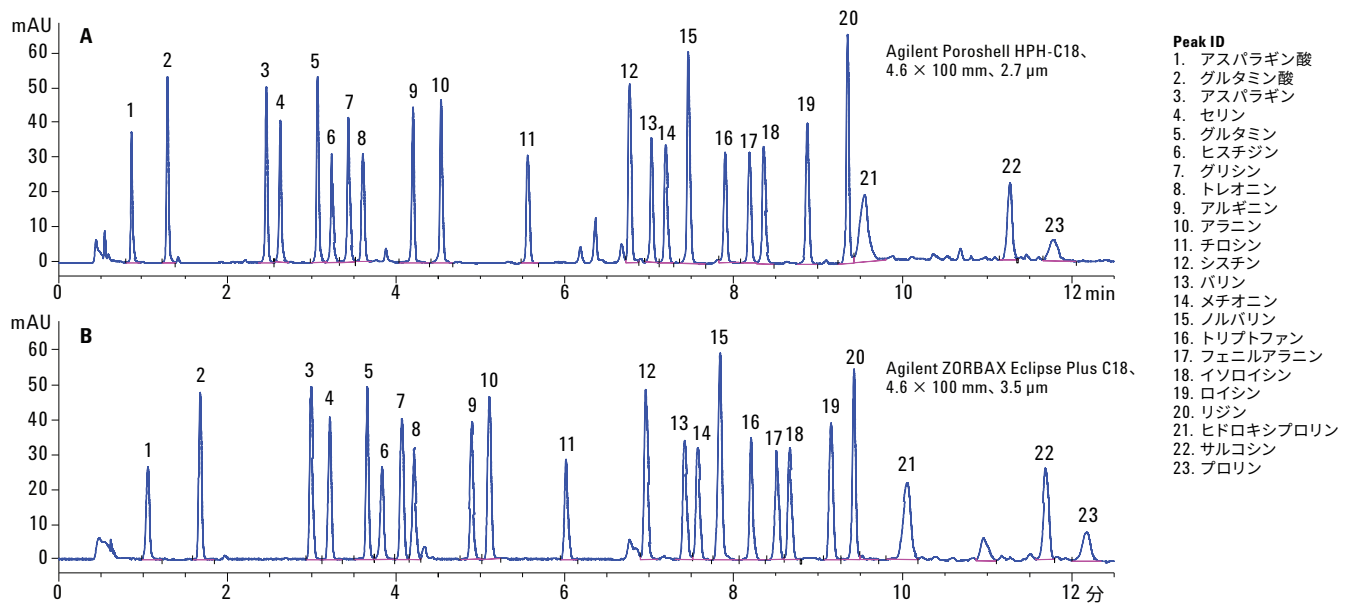


図 1. アミノ酸メソッドを用いた Agilent Poroshell HPH C18 と Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムの比較

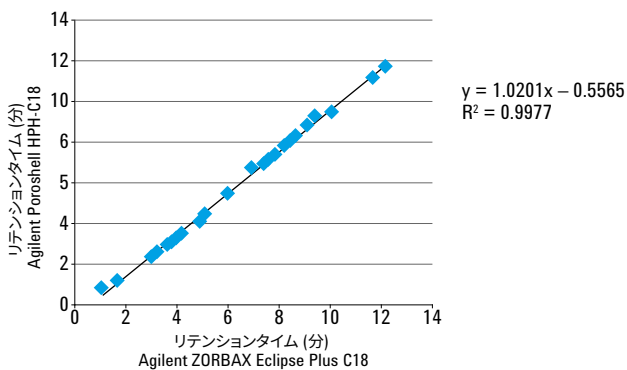


図 2. Agilent Poroshell HPH-C18 および Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用したリテンションタイムの相関性

表 1. 図 1. の条件

カラム:	Agilent Poroshell HPH C18、4.6 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-702) または Agilent Eclipse Plus C18、4.6 × 100 mm、3.5 μm (p/n 959961-902)
流量:	1.5 mL/min
グラジエント:	時間 (分) %B
	0 2
	0.35 2
	13.4 57
	13.5 100
	15.7 100
	15.8 2
	18 end

カラム寸法

メソッドは異なるカラム寸法に容易にスケールリングできます。この研究では、3種類のカラム寸法について調査しました。図3に示すように、すべてのカラムは長さ100 mmで、内径4.6、3.0、または2.1 mmでした。ここでメソッドへの唯一の変更点として、流量を変更しました。表1に、全体を通して使用したグラジエントプログラムを示します。流量は、カラム径によって幾何学的に変わります。4.6×100 mmカラムで使用した流量は1.5 mL/minでした。3および2.1 mmカラムで使用した流量は、それぞれ0.62 および 0.21 mL/min でした。いずれのケースでも、余分なカラム容量を最小限にするため、低容量熱交換器が短い赤色キャピラリーと共に使用されました。Agilent 1260 Infinity バイナリ LC に低拡散熱交換器およびキャピラリーを組み合わせて使用したところ、カラム圧力はおよそ175 bar でした。

カラム内径を大きいものから小さいものに変えると、すべての成分のリテンションタイムが多少増大することがわかりました（選択性は変わりません）。この原因は、グラジエント遅延時間が増大したためです。流量はスケールリングされた結果、カラム内径が大きいものから小さいものになると低減しますが、グラジエントディレイボリュームは一定に維持されるため、カラムに到達するまでのグラジエントに要する時間が増大します。さまざまなカラム内径間でのリテンションの差は、LCシステムでのグラジエントディレイボリュームをスケールリングする（ポンプとカラム注入口間のキャピラリーの長さ/直径/容量を増大または低減させる）ことにより、低減または除去される可能性があります。

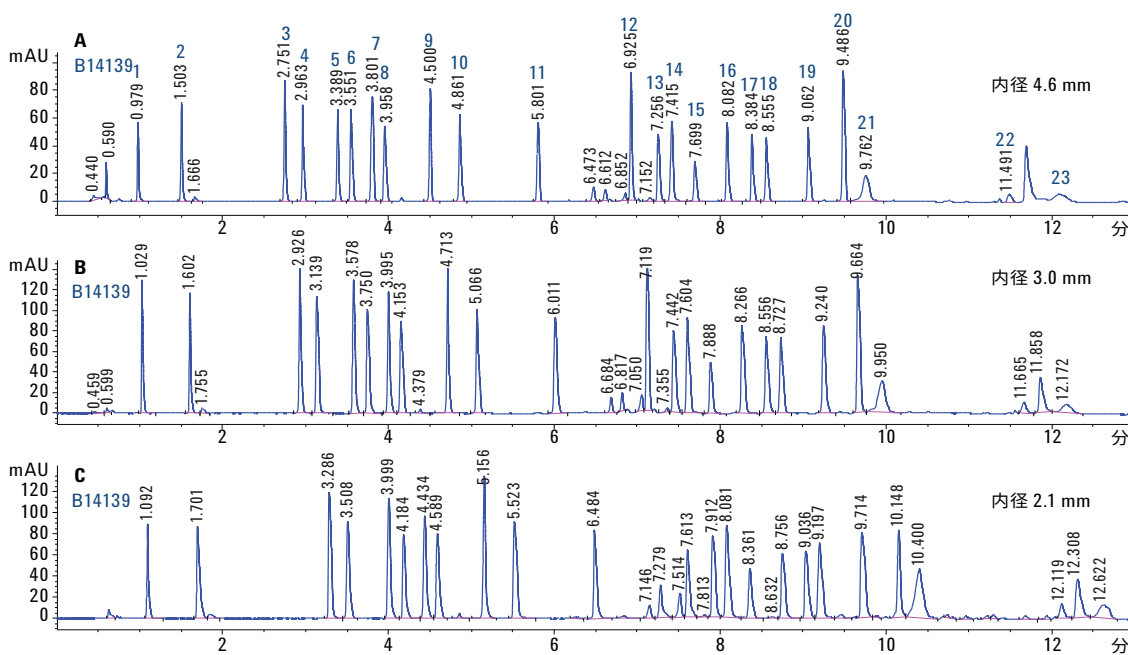


図3. アミノ酸メソッドを用いた異なる内径の Agilent Poroshell HPH-C18 100 mm カラム

ロット間のばらつき

メソッド開発では、バッチ間またはロット間の再現性も重要な要因になります。メソッドを採用する前に最初に実施するバリデーション手順の1つとして、異なるロットから作成された最低3つのカラムに対して、メソッドの性能を調査することを推奨します。

適切なバリデーション手法に従い、4.6、3.0、および2.1×100 mm カラムに対して、異なる生産バッチから粒子をロードした3つのカラムについて調査しました。これら3つの結果を重ね合わせたものを、図4A～Cに示します。図4Aからわかるように、4.6×100 mm カ

ラムでのアミノ酸分離では、すべての化合物に対して良好なピークおよびベースライン分離形状を示しました。溶出順序に変化は認められず、ロット間の再現性は良好でした。図4Aによると、 k' 値は一定のままですが、リテンションタイムが多少変化していることがわかります。ただし、ロイシンとヒドロキシプロリンの溶出時間と関係があるため、波長切り替え時間に多少の変更が必要です。また、図4Bと4Cからわかるように、内径が小さいカラムの場合も、明らかに同様の再現性が達成されています。

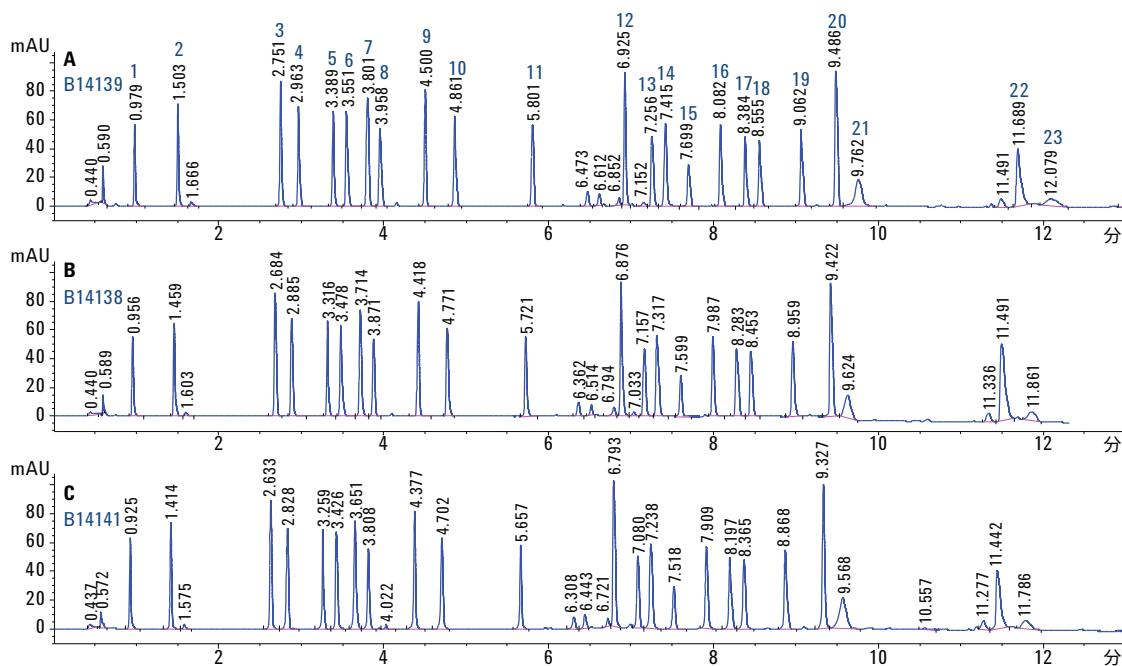


図4A. 3つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、4.6×100 mm、2.7 μm (p/n 695975-702) に関するアミノ酸と内部標準の分離

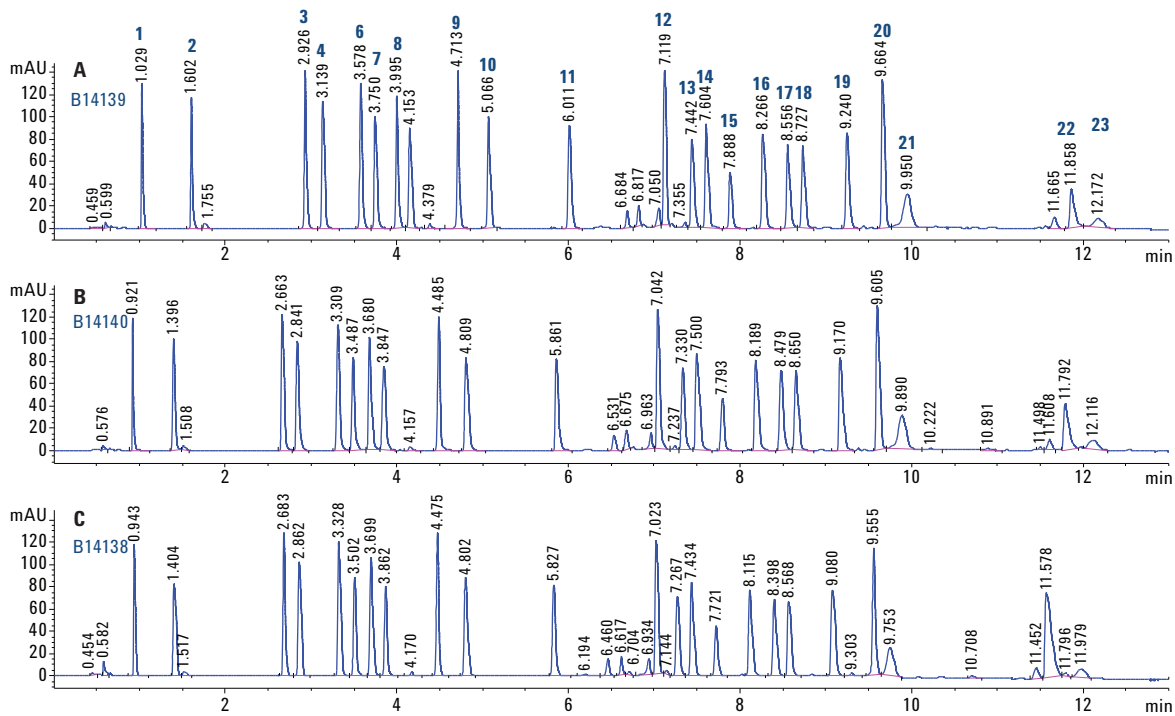


図 4B. 3 つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、3 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-502) に関するアミノ酸と内部標準の分離

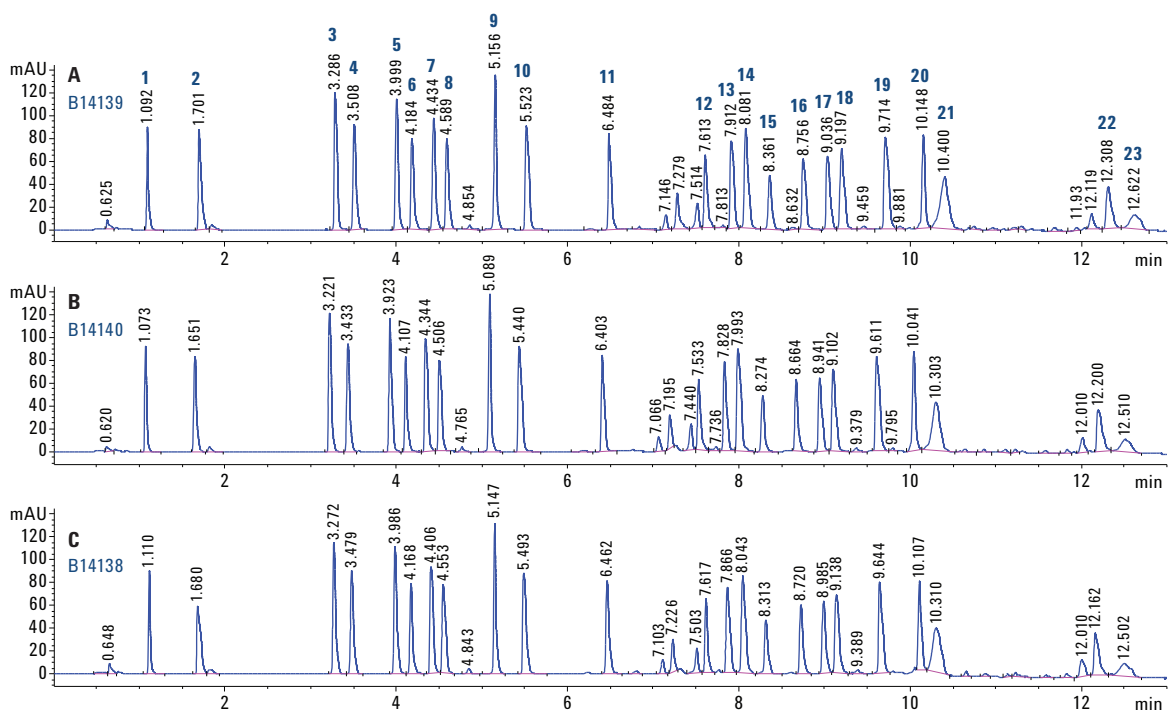


図 4C. 3 つのロットの Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695775-702) に関するアミノ酸と内部標準の分離

寿命

カラム寿命は、アミノ酸サンプルを分析する研究者にとって、考慮すべき重要な事項です。ほとんどのシリカカラムは、これらの条件に長く曝された後には効率が低下します。Kirkland ほか [9] および Tindall and Perry [10] では、リン酸バッファ中のシリカカラムの寿命が短くなる理由について考察していますが、両論文ともにカラムの寿命はそれほど長くないという点で一致しています。

シリカ HPLC カラムで高 pH での安定性を達成するには、2つの方法があります。1つは、Agilent ZORBAX Extend C18 カラムのように、特殊な結合相を採用する方法です。このカラムは、高 pH でのシリカの溶解を防ぐために二座型結合相を使用しています。高 pH での安定性を実現するもう1つの方法は、シリカ自体を修飾し、溶解しにくくする方法です。Poroshell HPH 粒子の表面は、独自プロセスにより有機層を形成するように化学的に修飾されており、高 pH 条件でのシリカ溶出に対して耐性があります [11]。

図5は、4つのクロマトグラムの重ね表示です。移動相AとBをそれぞれ1つの4Lボトルで前処理しました。1つの2.1×100 mm カラムを使用し、4週間にわたって500回の分析を行う寿命検査を実施しました。この一連の検査では、週ごとにおよそ102回の注入が、開封した直後のアミノ酸標準混合液および試薬を使用して行われました。シーケンスの最後に、カラムを100% Bの移動相によって40分間洗浄し、機器をシャットダウンしました。このようにしてメソッドは3.5日間実行され、その後カラムは3.5日間分析を行わずに保管されました。ここでは、サンプルを長時間分析してからカラムを洗浄して保管するという標準的なラボの慣行をシミュレートしました。元のアミノ定量メソッドでは、カラムを100%の移動相Bに保管することが推奨されていました。頻繁にアミノ酸を分析し、成果を上げている多くのラボでは、これが一般的な方法となっています。現実に沿った寿命検査を実施したところ、1か月間の500回にわたる標準注入での使用において、カラムは優れた寿命を示しました。なお、この検査では、シーケンスが終了するごとにシャットダウンして保管しました。図5からわかるように、17種類のアミノ酸サンプルに対して分離能が低下することはなく、リテンションタイムに多少のシフトが観察されただけです。

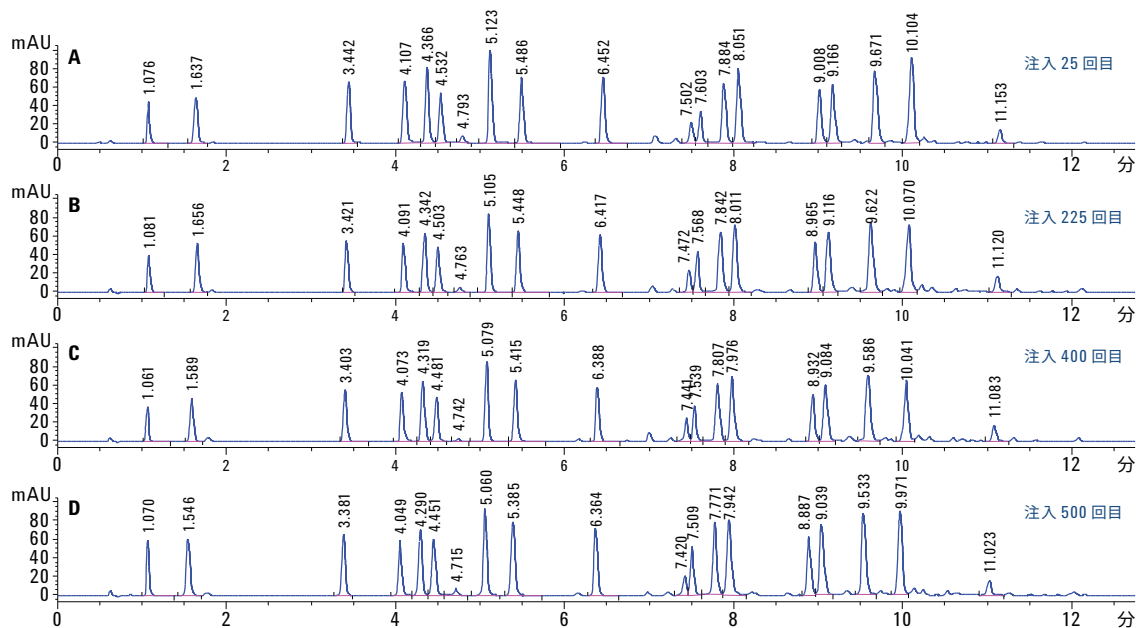


図5. Agilent Poroshell HPH-C18、2.1 x 100 mm のカラムを使用してアミノ酸メソッドを実行したカラム寿命の検査

結論

Agilent Poroshell HPH-C18 には、全多孔質 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 に類似した選択性があります。そのため、アミノ酸メソッドなどの既存のメソッドを容易に移管できます。この研究では、クロマトグラフィ条件には変更を加えませんでした。グラジエントに変更を加えて、選択されたアミノ酸に対する分離能を向上させることは可能です。大部分のケースにおいて、Poroshell HPH-C18 は、全多孔質 Eclipse Plus C18 よりも保持力が多少低くなっていました。メソッドは、4.6、3.0、および 2.1 mm × 100 mm カラムを用いて調査しました。低容量カラムヒーターを使用することを推奨します。全体で 4 つの粒子ロットを調査しましたが、波長切り替え時間に多少の変更が必要なだけでした。現実に沿った寿命検査を実施したところ、1 か月間の 500 回にわたる標準注入での使用において、カラムは優れた寿命を示しました。なお、この検査では、シーケンスが終了するごとにシャットダウンして保管しました。

参考文献

1. Wang, X.; Barber, W. E.; Long, W. J. Applications of superficially porous particles: High Speed, high efficiency or both? *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1228, 72-88.
2. Schuster, R.; Apfel, A. A new technique for the analysis of primary and secondary amino acids; Application note, Hewlett-Packard Publication number 5954-6257, **1986**.
3. Schuster, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **1988**, 431, 271-284.
4. Henderson, Jr., J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C. Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5980-1193E, **2000**.
5. Woodward, C.; Henderson, Jr., J. W.; Todd Wielgos, T. High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on Sub-Two Micron Reversed-phase (RP) Columns; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5989-6297EN, **2007**.
6. Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5968-5658EN, **1999**.
7. Greene, J.; Henderson, Jr., J. W.; Wikswo, J. P. Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-3283EN, **2009**.
8. Henderson, Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-4547EN, **2010**.
9. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 797, 111-120.
10. Tindall, G. W.; Perry, R. L. Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 988, 309-312.
11. Anon. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5022EN, **2014**.

詳細情報

本文書のデータは代表的な結果を記載したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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おりません。
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. 2016

Printed in Japan, July 7, 2016

5991-5571JAJP



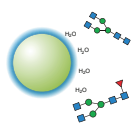
Agilent Technologies

グリカン分析

背景

グリコシル化は重要な翻訳後修飾です。これらの糖分子はタンパク質の認識と生物製剤の効能において重要な役目を果たすためです。ヒトのグリコシル化プロファイルは一般的なアンテナ状のパターンに従っており、遺伝子組み換えタンパク質のメーカーは細胞培地を使ってそのプロファイルを複製しようとしています。哺乳類細胞株が必要ですが、グリコシル化のパスウェイは複雑で、必要なグリカンプロファイルを生成しないクローンもあります。規制機関はこれを重要な課題と認識しており、グリカンフィンガープリントの測定手順を提供しています。具体的には、特定の酵素 (PNGase F) を使用して N-結合型グリカンを切断し、これらをラベリングして検出感度を上げ、HILIC クロマトグラフィーカラムで分離します (蛍光検出器との組み合わせがよく使用されますが、質量分析計も使用できます)。

アジレントは、2-アミノ安息香酸 (2AB) を用いた手動による脱グリコシル化とラベリング反応に必要なすべての成分が含まれるキットを提供しています。または、完全自動 AssayMAP プラットフォームを使用すると、短時間でより多くのサンプルを処理でき、スループットが大幅に向上します。この方法については、159 ページのアプリケーションノートを参照してください。



グリカン分析

親水性相互作用液体クロマトグラフィー

高速、高分離能で再現性の高いグリカン分離

AdvanceBio グリカンマッピング

アミド HILIC カラム

特長	利点
2.7 μm の表面多孔質粒子	低背圧で高分離能
1.8 μm の全多孔質粒子	最大限の分離能
蛍光および MS に対応	簡単なメソッド変換

概要

親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) では、逆相タイプの溶出液を、有機溶媒含有量の高いグラジエントから使用します。この成分と固定相の相互作用メカニズムによって、高有機溶出液から固定相の表面に存在する水層に分配されます。水も強力な溶出溶媒です。このため、サンプルマトリックスに存在する水の量を最小限に減らし、各グラジエントの最後にカラムの再平衡と安定化の時間を十分に取ることが重要です。サンプル前処理キットに含まれるプロトコルに従うことで、2AB ラベル化 N-型グリカンの分析準備ができます。AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、すべての HPLC 機器で使用可能な 2.7 μm の表面多孔質カラム、または UHPLC 機器用に最適化された 1.8 μm の全多孔質カラムで使用できます。密接に関連したグリカン構造で最適な分離能を達成するためのメソッド条件については、このセクションのワークフローの「分析の手引き」を参照してください。

グリカンマッピング: 分析の手引き

はじめに

グリコシル化などの一次アミノ酸配列に対する翻訳後修飾には機能的結果があり、バイオ医薬品の効能と免疫原性に影響を与える可能性があります。またグリカンの構造は、プラズマ中のタンパク質の半減期と、効能に必要な免疫反応を起こさせるモノクローナル抗体の機能に影響します。規制機関は、グリコシル化が生体分子の重要な品質特性の 1 つであると考えています。このため、糖タンパク質の先発品、バイオシミラー、バイオベター医薬品の開発プロセスの一部として、グリコシル化を適切な所定の範囲で特性解析および定量する必要があります。

Agilent AdvanceBio グリカンマッピングソリューションは、2-アミノベンズアミド (2AB) ラベル化グリカンの分析において、高い再現性を持ち、最適化されたワークフローを提供し、正確な同定および定量を実現します。

サンプル前処理 - AdvanceBio N-グリカンサンプル前処理キット

糖タンパク質の N-結合型グリカン成分 (モノクローナル抗体など) をマッピングするには、PNGase F を用いて、タンパク質アミノ酸バックボーンから N-型グリカンを酵素によって切断する必要があります。切断した N-型グリカンは、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) と MS 検出で分析できます。または、N-型グリカンを蛍光色素分子と 2-アミノベンズアミド (2AB) でラベル化し、HILIC クロマトグラフィーの後に蛍光検出または MS 検出を用いて分析することもできます。

AdvanceBio グリカンサンプル前処理キットには、サンプル前処理に必要なすべての試薬が含まれます。このキットは、N-型グリカンの遊離、N-型グリカンの精製、2-アミノベンズアミドによるラベリング、ラベル化グリカンのクリーンアップの手順を実行するための 4 つの試薬・消耗品で構成されます。また、ワークフローの各手順に対応したキットには個別の部品番号があり、単品での注文が可能です。ワークフローでは、液体クロマトグラフィー (通常は親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC)) によって分析に適したサンプルを作ることができます。

カラムの選択

Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、高速、高分離、かつ再現性の高い HILIC クロマトグラフィーによるグリカン同定を実施できるように設計および製造されています。AdvanceBio グリカンマッピングカラムでは、MS および蛍光検出の測定結果を最適化するための技術が応用されています。次の 2 種類のカラムから選択できます。高い分離能と低い背圧を実現する 2.7 μm 表面多孔質カラムが最高の分離能を実現する粒子径 1.8 μm カラムの 2 種類から選択できます。

AdvanceBio グリカンマッピング	アミド結合相により、グリカンが迅速に平衡化され選択性が向上
1.8 μm	全多孔質粒子を使用しており、高速分離および高スループットアプリケーションに適しています。Agilent 1290 Infinity II LC で使用すると最大 1200 bar で分析ができます。
2.7 μm	Poroshell 技術の表面多孔質粒子を使用することで拡散距離が短くなり、低背圧での高分離能分離が可能です。また長いカラムを使用できるため、分離効率が向上します。

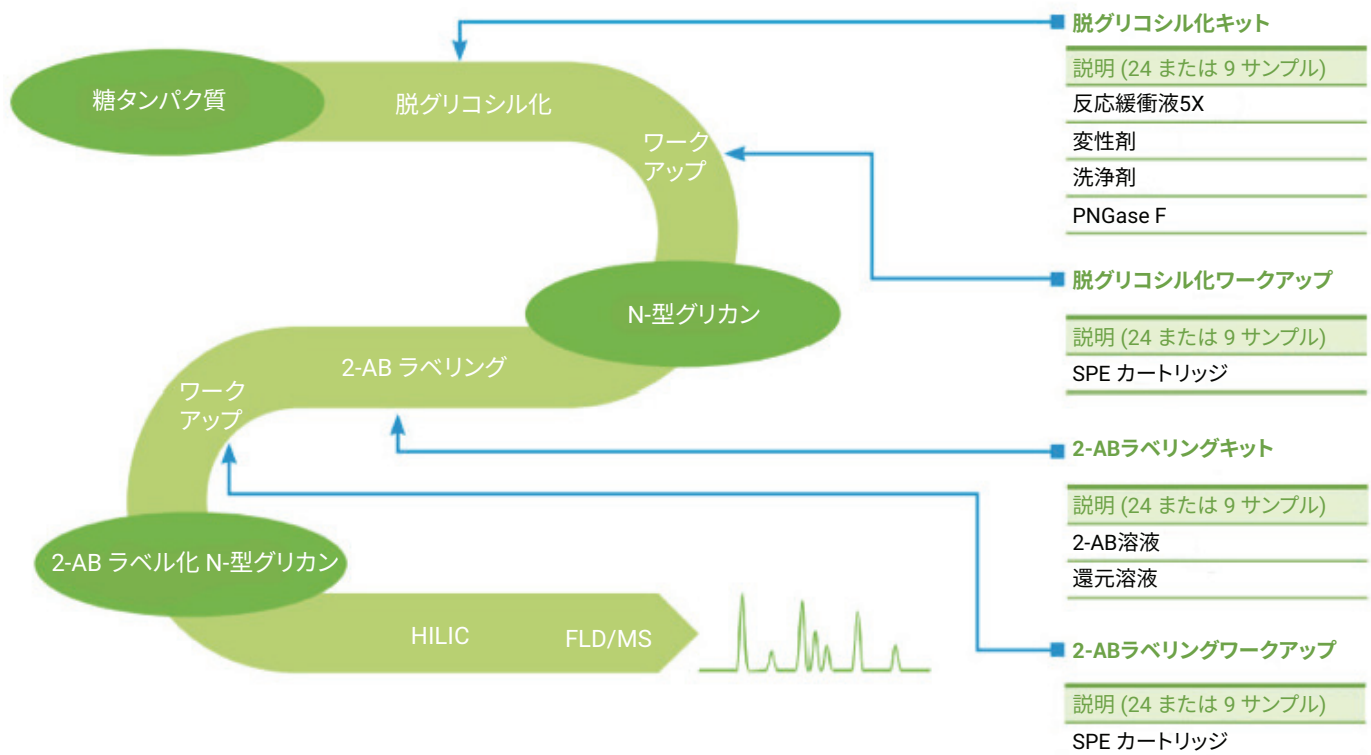


図 1.グリカンマッピングのサンプル前処理ワークフロー

分析スピード

AdvanceBio グリカンマッピングの 1.8 μm カラムでは、ハイスループットの N-型グリカン分析が可能です。このため、サンプル数が多く迅速なデータ採取が求められる同分野での使用に適しています。これらのカラムを使用すると、優れた分析結果を得られ、他社製のカラムと比べて分析時間を 40 % 短縮できます。

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A	AdvanceBio グリカンマッピング、 2.1 × 150 mm、1.8 μm
カラム B	他社製サブ 2 μm グリカンカラム
機器	Agilent 1290 Infinity LC と 1260 Infinity 蛍光検出器
カラム温度	55 °C
サンプル温度	10 °C
移動相	A: 100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5 B: ACN
FLD	励起波長 = 260 蛍光波長 = 430
注入量	2 μL in ACN/100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5 (7:3)
サンプル	Agilent 2-AB ラベル化 N-結合ヒト IgG グリカンライブラリ (p/n 5190-6996)

分離能

AdvanceBio グリカンマッピングの 2.7 μm メディアを長い 250 mm カラムで使用すると、高分離能分離を実現できます。分離能が向上すると、ターゲットグリカンを正確に定量でき、発現中に発生する可能性があるタンパク質のグリコシル化プロファイルを変えることができます。

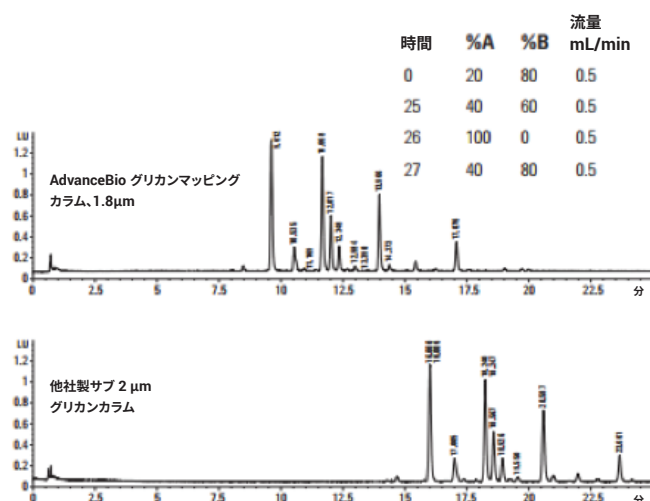


図 2. Agilent AdvanceBio グリカンマッピングカラムでは、2.1 × 150 mm の他社製サブ 2 μm のカラムよりも優れた分離能、幅の狭いバンド、高いピークキャパシティが得られます。

性能試験とリテンションマッピング用のグリカン標準試料により、分析結果の一貫性を確保

開発の初期段階で情報を逃したことが、後で大きな妨げとなることがあります。さらに、生産プロセスに一貫性がないと、グリコシル化に変化が生じ、免疫原性や効能に悪影響が出る可能性があります。アジレントの標準試料は、重要なデータが取り込まれ、すべてのワークフロー成分が最適に機能していることを確かめるのに役立ちます。2種類から選択可能です。

- デキストランラダー標準試料。データ解析とレポート作成が容易になります
- IgG N-結合型グリカン標準試料。ワークフロー効率を確認できます

これら2種類の標準試料は、2AB ラベル付きおよび2AB なし (サンプル前処理参照物質として使用) で提供されます。

2-AB ラベル化デキストランラダーの分離

分析条件

パラメータ	設定値
カラム	AdvanceBio グリカンマッピング, 859700-913 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
移動相	A: 100 mM ギ酸アンモニウム pH 4.5 B: ACN
FLD	励起波長 = 260 蛍光波長 = 430
注入量	2 μL (総量 10 pmol のグリカン/1 μL 75:25 ACN:水)
サンプル	Agilent 2-AB ラベル化デキストランラダー (p/n 5190-6998)

柔軟で高性能な LC 機器

堅牢で優れた操作性:

100% 生体不活性の Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC は、低い表面活性、耐食性、アクティブシール洗浄、四液混合などにより、優れた分析結果を提供します。

効率の新たなベンチマーク:

Agilent 1290 Infinity II LC は次世代 UHPLC です。最高 1300 bar の圧力と最高 5 mL/min の流量により、分析、機器、ラボの効率が最大限に向上します。

高効率で信頼性の高い分析結果: Agilent バイオイナート LC 消耗品により、よりシャープなピークと高い再現性が実現し、クロマトグラフィーの信頼性が向上します。

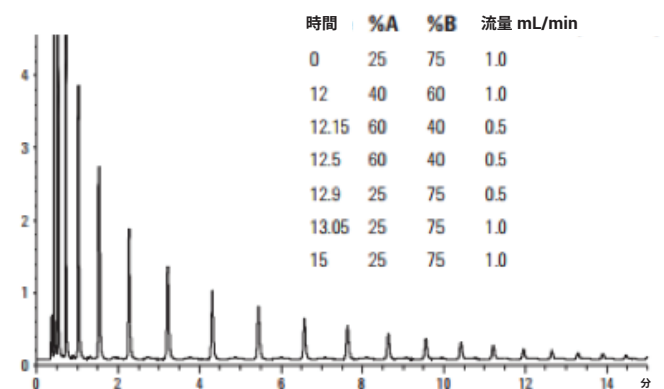


図 3. この分析では Agilent デキストランラダー標準試料を AdvanceBio グリカンマッピングカラムとともに用いて、未知のグリカンのリテンションタイムの関連付けを行います。5990-9384EN の掲載データです。

分析条件

移動相

AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、カラム内液がアセトニトリル:水となっており、すぐに HILIC 分離に使用できる状態で出荷されます。HILIC カラムは、最も汎用的なグリカン分析用の緩衝液とアセトニトリルに対応しています。グリカン分析用の一般的な移動相は次のとおりです。

バッファ A: 100 mM ギ酸アンモニウム水溶液、pH 4.5

バッファ B: アセトニトリル (質量分析用)

AdvanceBio グリカンマッピングカラムの適用可能 pH 範囲は pH 2 ~ 7 です。AdvanceBio グリカンマッピングカラムは HILIC アミド結合相のシリカベースカラムです。すべてのシリカは pH>6 の水系移動相で溶解するため、pH 7 を超える移動相を使用するとカラム寿命が短くなります。

サンプル注入量

分離能を最大化するには、1 ~ 2 μL のサンプルを注入します。サンプルは、まず H_2O で溶解し、アセトニトリル:水 = 70:30 となるように調製します。オートサンプラには冷却器が必要です。また、サンプルはカラムに注入する前にろ過してください。カラム注入口フリット径は、AdvanceBio グリカンマッピングの 1.8 μm カラムで 0.5 μm 、AdvanceBio グリカンマッピングの 2.7 μm カラムで 2 μm です。このため、サンプルは 0.2 μm のフィルタでろ過する必要があります。

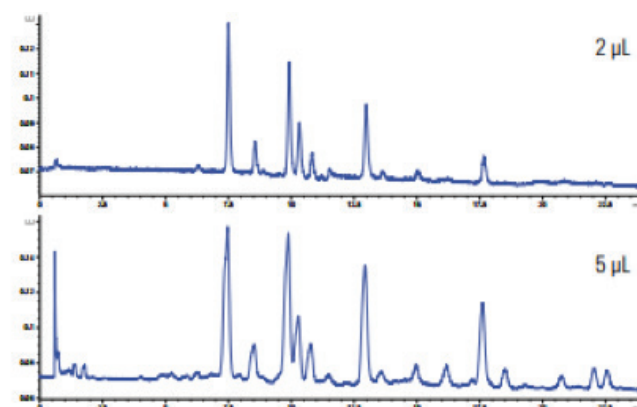


図 4. AdvanceBio グリカンマッピングの 1.8 μm 、2.1 x 150 mm のカラムで 5 μL (下のクロマトグラム) を注入した結果です。2 μL を注入した場合 (上のクロマトグラム) と比べてピーク幅が広く、分離能が失われています。5991-6183EN の掲載データです。

流量

高分離能分離の場合、0.5 mL/min の流量を使用してください。高速分離の場合は、最大 1.0 mL/min を使用できます。水の割合が高い移動相で洗浄する場合、流量は抑えてください。

最大動作圧は 1.8 μm カラムで 1200 bar、2.7 μm カラムで 600 bar です。最大動作圧の 80 % 以下で使用すると、より長寿命でカラムを使うことができます。

AdvanceBio グリカンマッピングの 2.7 μm カラムの推奨グラジエント

分離能重視の推奨グラジエント

時間	移動相 A	移動相 B	流量
0	20 %	80 %	0.5 mL/min
32	40 %	60 %	0.5 mL/min
33	80 %	20 %	0.5 mL/min
35	80 %	20 %	0.5 mL/min
36	20 %	80 %	0.5 mL/min
45	20 %	80 %	0.5 mL/min

分析速度重視の推奨グラジエント

時間	移動相 A	移動相 B	流量
0	20 %	80 %	0.7 mL/min
12	40 %	60 %	0.7 mL/min
12.5	80 %	20 %	0.5 mL/min
13.5	80 %	20 %	0.5 mL/min
16	20 %	80 %	0.5 mL/min
17	20 %	80 %	0.7 mL/min
18	20 %	80 %	0.7 mL/min

さまざまな種類のグリカンを含むサンプルで最高の分離能を実現するには、開始点と終了点の調整が必要な場合があります。例えばグリカン構造が大きい場合、最適な結果を出すには、75 ~ 55 % のアセトニトリルグラジエントが必要な場合があります。

温度

シャープなピークを形成するための一般的な操作温度は 60 °C です。これより高い温度も使用できますが、カラム寿命が短くなります。カラム寿命を延ばすには、40 °C を推奨します。選択性と分離能は、温度によって変化する可能性があります。

検出

N-型グリカンの検出には、質量分析計も使用できます。ただし、Agilent 1260 Infinity 蛍光検出器で 2AB ラベル化 N-型グリカンを検出するには、8 μL セルで 260 nm の励起波長と 430 nm の蛍光波長を使用することを推奨します。

AdvanceBio グリカンマッピングの 1.8 μm カラムの推奨グラジエント

分離能重視の推奨グラジエント

時間	移動相 A	移動相 B	流量
0	20 %	80 %	0.5 mL/min
32	40 %	60 %	0.5 mL/min
33	80 %	20 %	0.5 mL/min
35	80 %	20 %	0.5 mL/min
36	20 %	80 %	0.5 mL/min
45	20 %	80 %	0.5 mL/min

分析速度重視の推奨グラジエント

時間	移動相 A	移動相 B	流量
0	25 %	75 %	1.0 mL/min
12	40 %	60 %	1.0 mL/min
12.5	80 %	20 %	0.5 mL/min
13.5	80 %	20 %	0.5 mL/min
14	25 %	75 %	0.5 mL/min
15	25 %	75 %	1.0 mL/min
20	25 %	75 %	1.0 mL/min

カラムの寿命と性能の最大化

カラムのコンディショニング

AdvanceBio グリカンマッピングカラムは、糖タンパク質と糖ペプチドから切断された N-結合型グリカンの分離に適した設計となっています。HILIC メカニズムが有効に機能するには、使用前にカラムを十分に平衡化する必要があります。

- カラム容量の 10 倍以上、100 % のアセトニトリルでカラムをフラッシュします
- カラム容量の 10 倍、15 % のアセトニトリルを含む水でフラッシュします
- 最後に、分析開始時に使用するカラム容量の 20 倍の移動相でカラムをフラッシュします

カラムが十分に平衡化されたことを確認するには、分析を 2~3 回実行して再現性を確認します。

カラムのクリーニング

溶媒フローが制限されているように見える (カラム圧が異常に高い) 場合、カラム注入口までの溶媒フローに詰まりがないことをまず確認してください。カラムの前で詰まりが生じている場合は、配管またはフィルタの詰まっている部品を交換します。カラムが詰まっている場合は、バックフラッシュはせずに、カラムを交換してください。

カラムの保管

長期保管用溶媒には、アセトニトリル:水 (95:5) を推奨します。保管用溶媒に切り替える前に、60 % のアセトニトリル: 40 % の水でカラムをフラッシュし、緩衝液を除去することが必要な場合があります。カラムの保管の前に、充填剤の乾燥を避けるため、エンドフィッティングに終端プラグをしっかりとめ込む必要があります。

短期間であれば、カラムは移動相で保管しても差し支えありません。ただし、機器を保護するため、緩衝液を含まない同じ移動相でカラムをパージして、機器とカラムから塩を除去することをお勧めします例えば、90:10 のアセトニトリル:0.01 M ギ酸緩衝液入り移動相を除去するには、90:10 の ACN:H₂O を使用します。

短期間の保管の場合、カラムを 80 % のアセトニトリル:20 % の 5 mM ギ酸アンモニウムで保管すると迅速に再平衡化できます。カラム平衡化を確認するには、数回 (3 ~ 6 回) 注入してください。

製品情報

AdvanceBio グリカンマッピングカラム

1.8 µm, 1200 bar まで安定

説明	部品番号
2.1 x 100 mm	858700-913
2.1 x 150 mm*	859700-913
Fast Guard, 2.1 mm, 1.8 µm	651750-913

* カラムの推奨初期サイズ

2.7 µm の表面多孔質、600 bar まで安定

説明	部品番号
2.1 x 100 mm	685775-913
2.1 x 150 mm*	683775-913
2.1 x 250 mm	651750-913
Fast Guard, 2.1 mm, 2.7 µm	821725-906
4.6 x 100 mm	685975-913
4.6 x 150 mm	683975-913
4.6 x 250 mm	680975-913

* カラムの推奨初期サイズ

グリカン標準試料

説明	部品番号
デキストランラダー標準試料, 10 µg, 0.5 mL	5190-6997
2AB ラベル化デキストランラダー標準試料, 200 pmol	5190-6998
IgG N-結合型 グリカンライブラリ, 20 µg, 0.5 mL	5190-6995
2AB ラベル化 IgG N-結合型 グリカンライブラリ, 200 pmol	5190-6996

グリカン標準試料

説明	部品番号
AdvanceBio N-グリカンサンプル前処理キット (24 サンプル)	5190-8000
AdvanceBio N-グリカン脱グリコシル化キット (24 サンプル)	5190-8001
AdvanceBio N-グリカン脱グリコシル化クリーンアップカートリッジ (24 サンプル)	5190-8002
AdvanceBio 2AB グリカンラベリングキット (24 サンプル)	5190-8003
AdvanceBio 2AB グリカンラベリングクリーンアップカートリッジ (24 サンプル)	5190-8004
AdvanceBio N-グリカンサンプル前処理キット (96 サンプル)	5190-8005
AdvanceBio N-グリカン脱グリコシル化キット (96 サンプル)	5190-8006
AdvanceBio N-グリカン脱グリコシル化クリーンアップカートリッジ (96 サンプル)	5190-8007
AdvanceBio 2AB グリカンラベリングキット (96 サンプル)	5190-8008
AdvanceBio 2AB グリカンラベリングクリーンアップカートリッジ (96 サンプル)	5190-8009
脱グリコシル化およびラベリング用 96 ウェルプレート	5190-8010

Fast and Efficient HILIC Methods for Improved Analysis of Complex Glycan Structures

Authors

James Martosella,
Oscar Potter,
Danny Mancheno,
and Jia Liu
Agilent Technologies, Inc

Introduction

N-linked glycosylation is a critically important and very complex post-translational modification. It therefore needs to be controlled and monitored throughout development, processing, and manufacture of drug glycoproteins. Therapeutic protein characteristics, including safety, efficacy, and serum half-life, can be affected by differences in their glycosylation pattern, and so the analysis of these patterns is an important part of the characterization of therapeutic glycoproteins, particularly mAbs. Separation using HILIC with fluorescence detection is a robust method for glycan analysis, whereas HILIC/LC can also be coupled to mass spectrometry to obtain important mass and structure information.

One of the growing challenges in HILIC/LC, however, is achieving high-resolution separations with fast analysis times. With ever-increasing demands placed on biocharacterization for higher throughput, researchers are looking for improved separation (HILIC) methods, but not at the cost of lost separation performance. Since glycans include many closely related structures, it is critical to achieve the highest resolution possible, and preferably during a fast analysis time.

In this work, we used a sub-2 μm UHPLC HILIC column with amide chemistry for high-throughput glycosylation profiling. Specifically, we profiled 2-AB labeled human IgG and bovine fetuin N-linked glycans using a 1.8 μm , 2.1 \times 150 mm column with fluorescence detection. Rapid, sensitive and selective separations were achieved to provide ultra-high resolution of these complex glycans in run times as short as 9 minutes. In a run time comparison to a currently available UHPLC glycan column, we observed a 40 % reduction in analysis speed for human IgG N-linked glycans under identical conditions.

Materials and Methods

Conditions, recombinant human IgG1

Parameter	Value
Sample:	Agilent 2-AB labelled IgG N-linked glycan library, 200 pmol (p/n5190-6996)
Column:	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (p/n859700-913)
Mobile phase:	A, 100 mM NH ₄ formate, pH 4.5; B, ACN
Inj vol:	2 μL in 70/30 ACN:water
Column temp:	55 °C
Sample thermostat:	10 °C
Detection:	Fluorescence, excitation 260 nm, emission 430 nm
Instrument:	Agilent 1290 Infinity LC with 1260 Fluorescence Detector

Conditions, bovine fetuin

Parameter	Value
Sample:	ProZyme Glyko 2-AB bovine fetuinN-linked library
Column:	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (p/n859700-913)
Mobile phase:	A, 100 mM NH ₄ formate, pH 4.5; B, ACN
Inj vol:	5 μL (20 pmol) in 70/30 ACN:water
Column temp:	55 °C
Other conditions as above	

Conditions, dextran ladder

Parameter	Value
Sample:	Agilent 2-AB labelled dextran ladder standard (p/n5190-6998)
Column:	Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm (p/n859700-913)
Mobile phase:	A, 100 mM NH ₄ formate, pH 4.5; B, ACN
Inj vol:	2 L 75:25 ACN:water (10 pmol total glycan)
Other conditions as above	

Conditions, mass spectrometry, recombinant human IgG1

Parameter	Value
Instrument:	Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS
Source:	Agilent Dual JetStream
Drying gas temp:	200 °C
Drying gas flow:	12 L/min
Sheath gas temp:	250 °C
Sheath gas flow:	12 L/min
Nebulizer pressure:	25 psi
Capillary voltage:	3,500 V
Nozzle voltage:	500 V
Fragmentor voltage:	250 V
Skimmer voltage:	45 V
Octupole RF Vpp:	550 V
MS range:	100 to 1,700 m/z
MS scan rate:	2 spectra/s

The workflow is shown in Figure 1.

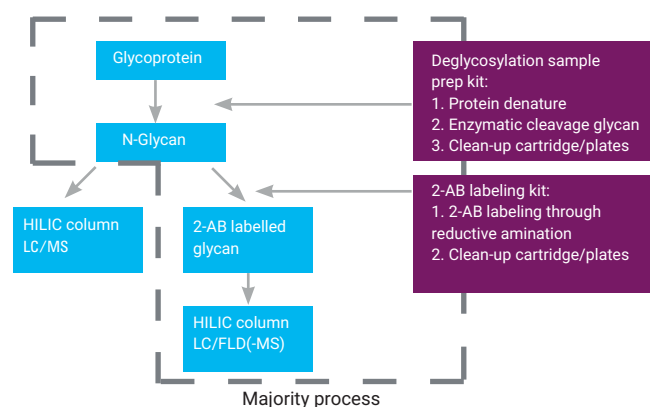


Figure 1. Amino acid analysis of protein hydrolysate. The resolution between leucine and Isoleucine with the AdvanceBio AAA, 4.6 x 100 mm, 2.7 μm column is much higher than the reported value for system suitability requirement.

Results and Discussion

Dextran ladder

Figure 2 shows the separation of a 2-AB labeled dextran ladder. In this separation, a homopolymeric series of 20 glucose oligomers were efficiently baseline resolved in less than 15 minutes.

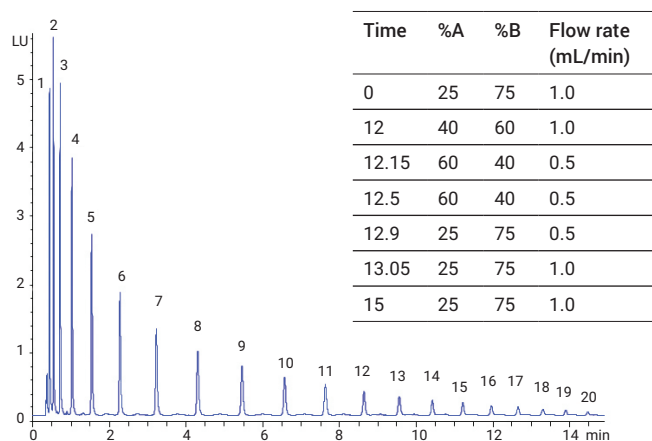


Figure 2. The Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column separates a 2-AB labeled dextran ladder to baseline in less than 15 minutes

Human IgG glycans

Figure 3 demonstrates an ultra-high resolution separation of 2-AB labeled N-linked human IgG glycans.

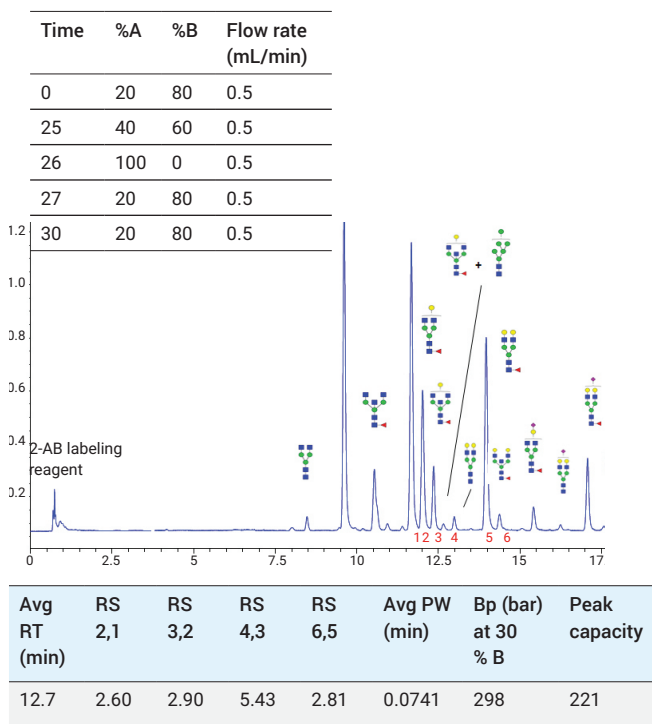


Figure 3. Very high resolution of 2-AB labeled N-linked human IgG glycans on the Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column.

Fast separation in less than 10 minutes was also achieved, as shown in Figure 4.

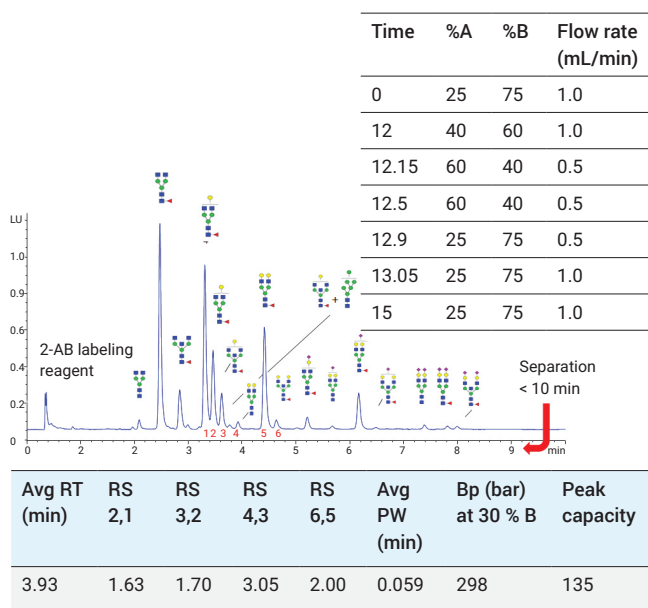


Figure 4. The Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column separates 2-AB labeled N-linked human IgG glycans in less than 10 minutes.

MS N-linked glycans

Figure 5 shows eight representative mass spectra from the ultra-high resolution separation of human IgG glycans. The spectra were generated by Q-TOF analysis (experimental). All spectra matched theoretical masses to within 6 ppm.

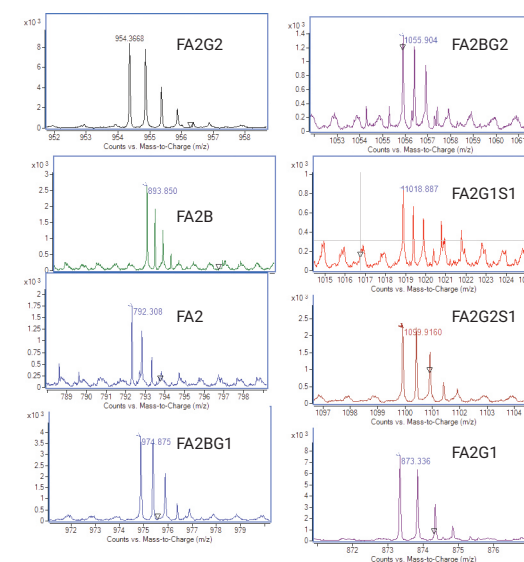


Figure 5. Eight representative mass spectra from the ultra-high resolution separation of human IgG glycans (fluorescence detector separations are displayed on the panel to the left).

Sub-2 µm HILIC comparison

Figure 6 shows the results of a comparison of glycan amide columns. Using the same chromatographic conditions, the AdvanceBio Glycan Mapping column delivered better resolution and narrower bands, with higher peak capacity, at a 40 % faster separation time than another brand of sub-2 µm HILIC column in a 2.1 × 150 mm configuration.

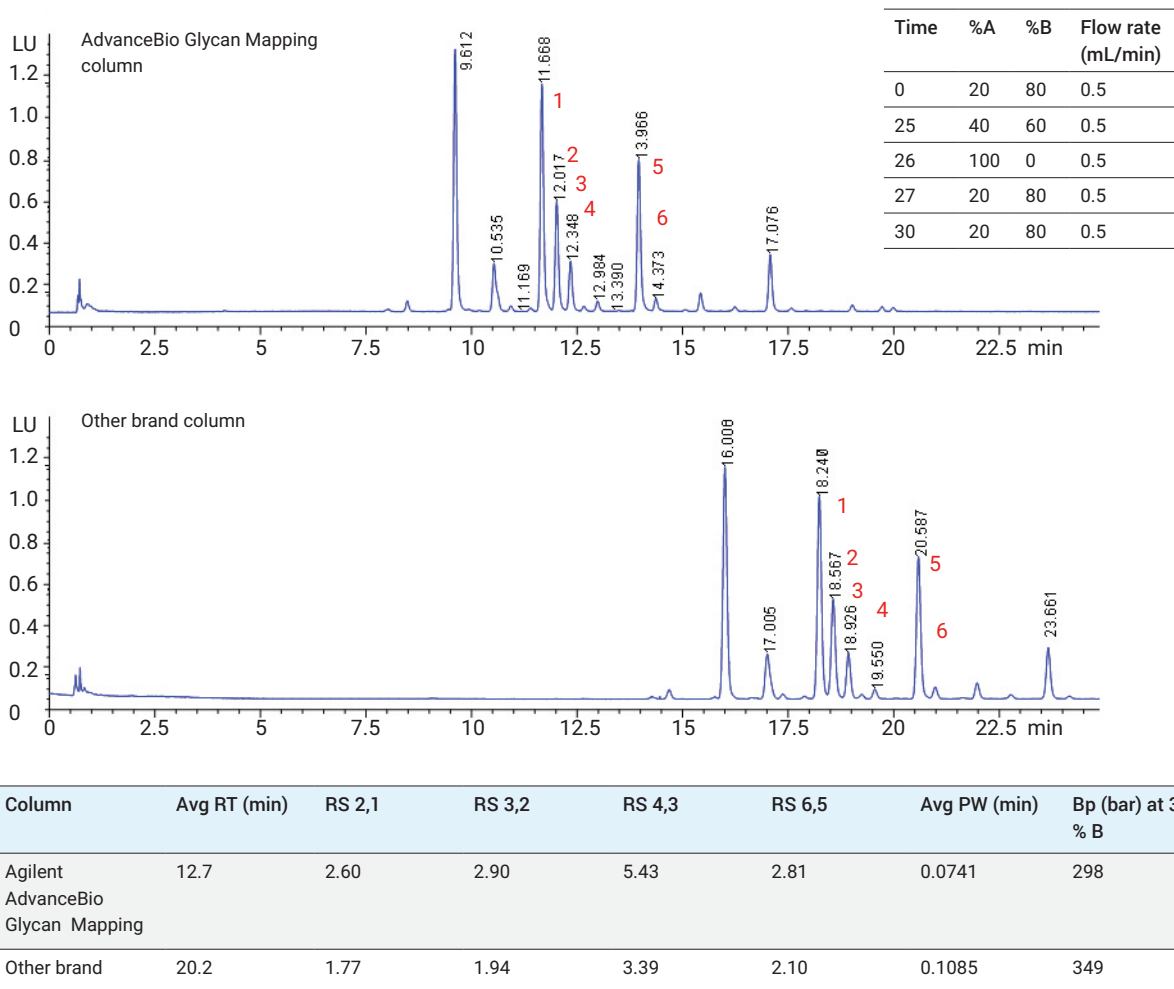


Figure 6. The AdvanceBio Glycan Mapping column delivers better resolution and narrower bands, with higher peak capacity at a 40 % faster separation time.

Fetuin glycans

Finally, we revealed the fast and highly efficient performance of the AdvanceBio Glycan Mapping column in a separation of 2-AB labeled bovine fetuin N-linked glycans (Figure 7).

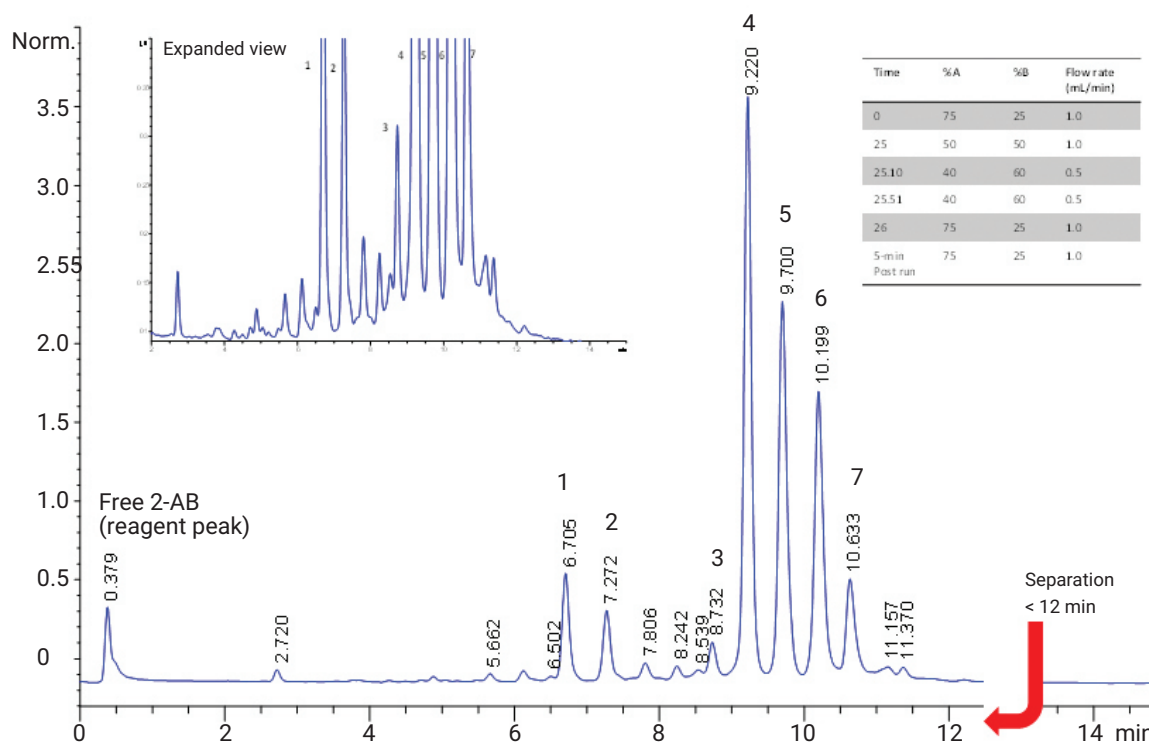
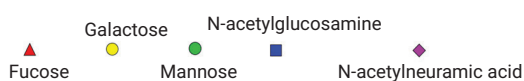


Figure 7. Fast and highly efficient separation of 2-AB labeled bovine fetuin N-linked glycans, 2.1 × 150 mm 1.8 µm AdvanceBio Glycan Mapping column.

Table 1. Glycan nomenclature and structure assignments for the optimized rapid separation of bovine fetuin 2-AB labeled N-linked glycans displayed in top chromatogram of Figure 7.

Peak	Retention	GU value	Glycan structure	Structures
1	6.70	9.4	A2G2S2	
2	7.27	9.8	A2G2S2	
3	8.73	10.8	A3G3S3, A3G3S2 (trace)	
4	9.22	11.2	A3G3S3, A3G3S2 (trace)	
5	9.70	11.6	A3G3S3, A3G3S4 (trace)	
6	10.20	12	A3G3S4, A3G3S3	
7	10.63	12.4	A3G3S4	



Conclusions

The Agilent 1.8 µm HILIC amide AdvanceBio Glycan Mapping column provided separation of N-linked glycans with high speed, excellent resolution and increased efficiency. In a 2.1 × 150 mm configuration and under identical chromatographic conditions, the column enabled a well-resolved separation of 2-AB labeled IgG N-linked glycans, with a 40 % reduction in elution time compared to another brand of sub-2 µm HILIC column. A separation of 2-AB labeled bovine fetuin N-linked glycans demonstrated the column's excellent analytical selectivity and resolving power for separating these complex biantennary and triantennary glycans.

Acknowledgement

This work was presented in a poster session at the 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 15–19 June, 2014, Baltimore.

N-Glycan Analysis of mAbs and Other Glycoproteins with UHPLC and Fluorescence Detection

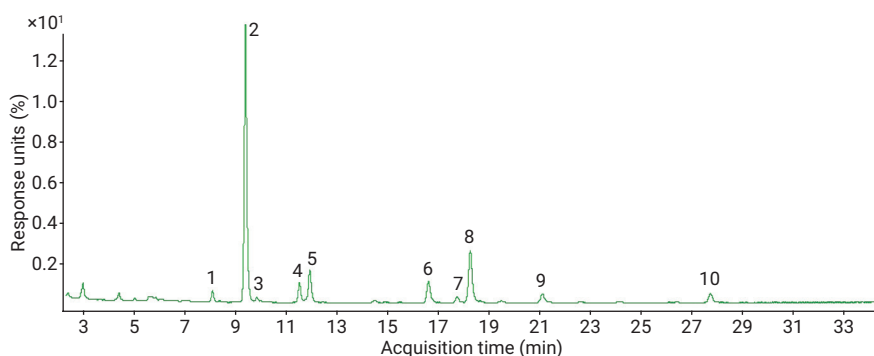
The Agilent 1290 Infinity Binary LC System with the Agilent AdvanceBio Glycan Mapping Column

Authors

Sonja Schneider and
Oscar Potter
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Abstract

This Application Note describes the analysis of N-linked glycans with hydrophilic interaction chromatography (HILIC) using the Agilent 1290 Infinity Binary LC together with the Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector and the Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS. Enzymatic glycan release with PNGase F followed by derivatization with 2-aminobenzamide (2-AB) was conducted on monoclonal antibodies (mAbs) and two other glycoproteins, fetuin and ovalbumin. The excellent resolution provided by the Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column allowed detection and identification of all major N-glycans in the mAb sample. Furthermore, the highly complex N-glycans released from fetuin and ovalbumin were well resolved.



Introduction

Glycosylation is one of the most frequently observed post translational modifications. Mammalian glycoproteins contain three major types of glycans: N-linked, O-linked, and glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchors, which consist of one or more monosaccharide units. A single glycosylation site can generate considerable heterogeneity of the mass and charge of glycoproteins. These oligosaccharides are involved in many biological regulation and recognition processes, for example, protein sorting, immune and receptor recognition, inflammation, pathogenicity, metastasis, and other cellular processes^{1,2}. In addition, properties such as safety, efficacy, and the serum half-life of therapeutic proteins can be affected by their glycosylation pattern.

Recombinant monoclonal antibody therapeutics (mAbs) represent the largest group of therapeutic proteins. The efficacy of these therapeutics is highly dependent on the correct glycosylation pattern of the mAbs and, so far, all licensed therapeutic mAbs are immunoglobulins G (IgGs)³. Human IgG has a single conserved N-linked glycosylation site located on the Fc region of each heavy chain at Asn297 (Figure 1), resulting in the presence of two N-glycans per IgG. This typically consists of a handful of major structures and numerous minor structures⁵. The combination of glycans at each of the two glycosylation sites on the Fc region leads to large numbers of different glycoforms in each batch of mAb production.

The glycan structure plays a critical role in complement activation and receptor affinity⁶, which affect the efficacy of therapeutic mAbs. Moreover, non-human glycans are a safety issue due to induced immune responses. Therefore, analysis of the glycan pattern is an important part of the characterization of therapeutic glycoproteins, especially mAbs.

This Application Note uses symbolic glycan structures according to the Consortium for Functional Glycomics (CFG), as shown in Figure 2. Assigned glycans are also described by the Oxford glycan nomenclature and by another style of nomenclature, which is popular for mAb glycans, shown here in italics.

Figure 2A shows the general nomenclature used to describe sugar residues of different glycan structures on proteins. Figure 2B shows some predominant glycan structures present on the Asn-297 site in human IgG. In general, N-glycans have a core structure, containing two b-D-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and three mannose (Man) units. IgG Fc N-glycans are predominantly biantennary complex-type structures, partially core-fucosylated (for example, FA2 or G0F).

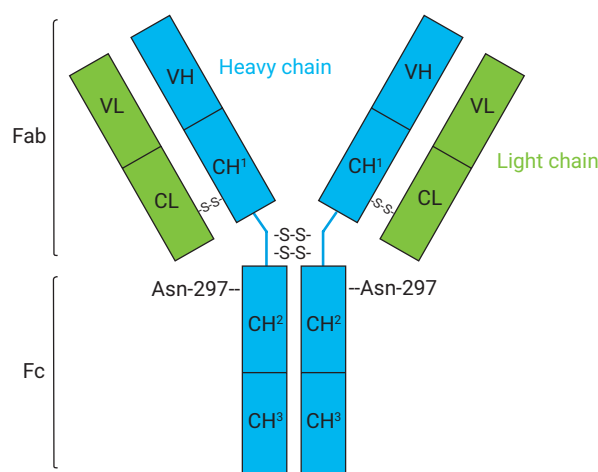


Figure 1. IgG antibody structure.

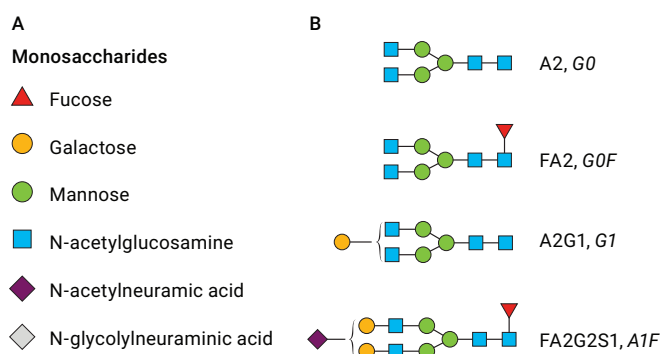


Figure 2. Glycan structure and isoforms. A) Monosaccharide description after the Consortium for Functional Glycomics, B) predominant glycan structures of human IgGs.

Different strategies for the analysis of N-glycans have been described. Many methods are based on enzymatic release of N-glycans from the protein by PNGase F. Due to the lack of intrinsic chromophores, it is also common to derivatize the glycans with a fluorescent label prior to analysis⁷. Each N-glycan contains a single reducing end site that can be reacted with an excess of fluorescent label, such that each N-glycan will be attached to one fluorophore. The processed sample is, therefore, appropriate for relative quantification by separation with fluorescence detection without the need for any quantitation standards or calibration. 2-AB is a stable, neutral label that is popular for N-glycan analysis^{7,8,9}. Figure 3 illustrates 2-AB labeling by reductive amination (Schiff's base intermediate not shown).

Subsequent purification using hydrophilic interaction chromatography/solid phase extraction (HILIC/SPE) is performed to remove the large excess of 2-AB so that it does not interfere with the HILIC/FLD analysis.

Here, we show enzymatic release of N-glycans using PNGase F with subsequent derivatization with 2-AB prior to separation by HILIC UHPLC, with fluorescence detection and identification by on-line quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF/MS).

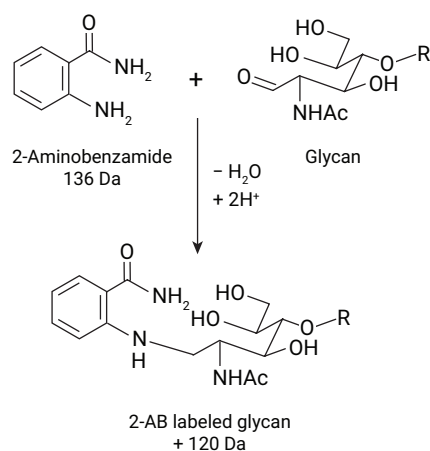


Figure 3. Labeling of a glycan with 2-aminobenzamide (2-AB).

Experimental

Reagents, samples, and materials

The Agilent 1290 Infinity Binary LC System consisted of the following modules:

- Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A) with 35 μ L Jet Weaver
- Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity Thermostat (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment (G1316C)

- Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector (G1321B) with standard flow cell

Reagents, samples, and materials

Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

Column

Agilent AdvanceBio Glycan Mapping, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (p/n 859700-913)

Software

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS Systems Rev. C.01.05 [38] and Agilent MassHunter Workstation Software, Version B.05.01, Build 4.0.479.0. Glycan structures were created with GlycoWorkbench, Version 2.1, stable (146).

Sample preparations

Deglycosylation procedure:

N-glycans were released from a monoclonal antibody, fetuin, and ovalbumin using PNGase F. This enzyme cleaves asparagine-linked high mannose as well as hybrid and complex oligosaccharides from the glycoproteins and leaves the glycans intact. Fetuin has three N-glycosylation sites (Asn-81, Asn-138, and Asn-158) and four O-linked sites (Ser-253, Thr-262, Ser-264, and Ser-323)¹¹. Ovalbumin has only one glycosylation site, whereas the mAb contains two glycosylation sites. The amount of PNGase F was adjusted to the amount of N-glycosylation sites. The proteins were deglycosylated according to instructions for 3 hours at 37 °C. The reaction was then stopped, and the sample was vacuum-dried for further processing.

2-AB-labeling for fluorescence detection and sample cleanup

The dried glycan samples were labeled with 2-aminobenzamide according to the protocol for 3 hours at 65 °C. After the labeling procedure, the samples were purified using the HILIC cleanup cartridges according to the instruction manual. After the cleanup procedure, the samples were vacuum-dried and reconstituted in ultrapure water:acetonitrile 30:70 (v/v) for analysis.

Solvents and samples

Buffer A was 100 mM ammonium formate in water, pH 4.5 and buffer B was acetonitrile. All solvents were LC grade. Fresh ultrapure water was obtained from a Milli-Q Integral system equipped with a 0.22 μ m membrane point-of-use cartridge (Millipak). The monoclonal antibody was RAT Anti-DYKDDDDK Tag Antibody. Ammonium formate, fetuin and ovalbumin, PNGase F from Elizabethkingia miricola, GlycoProfil 2-AB Labeling Kit, and GlycoProfil Glycan Cleanup Cartridges were purchased from Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA.

Instrumental conditions

	Antibody standard gradient	Fetuin gradient	Ovalbumin gradient
Starting flow rate	0.5 mL/min	0.5 mL/min	0.5 mL/min
Gradient	0 minutes 85 % B 5 minutes 75 % B 35 minutes 64 % B 40 minutes 50 % B 42 minutes, flow 0.5 mL/min 42.01 minutes, flow 0.25 mL/min 43 minutes 0 % B 48 minutes 0 % B 50 minutes 85 % B 50.01 minutes, flow 0.25 mL/min 51 minutes, flow 0.5 mL/min	0 minutes 75 % B 45 minutes 50 % B 47 minutes 40 % B, flow 0.5 mL/min 47.01 minutes, flow 0.25 mL/min 49 minutes 0 % B 51 minutes 0 % B 51.01 minutes 75 % B, flow 0.25 mL/min 52.00 minutes, flow 0.5 mL/min	0 to 6 minutes 85 % B 10 minutes 80 % B 60 minutes 70 % B 65 minutes 50 % B, flow 0.5 mL/min 65.01 minutes, flow 0.25 mL/min 68 minutes 0 % B 73 minutes 0 % B 74 minutes 85 % B, flow 0.25 mL/min 75.00 minutes, flow 0.5 mL/min
Stop time	51 minutes	52 minutes	75 minutes
Post time	20 minutes	20 minutes	20 minutes
Injection volume	5 µL	1 µL	1 µL
Thermostat autosampler	5 °C		
Column temperature	60 °C		
FLD	Ex. 260 nm, em. 430 nm		
Peak width	> 0.013 minutes (0.25 seconds resp. time) (37.04 Hz)		

MS parameters	
Gas temperature	250 °C
Sheath gas temperature	250 °C
Gas flow	8 L/min
Sheath gas flow	8 L/min
Nebulizer	25 psi
Vcap	3,500 V
Nozzle	1,000 V
Fragmentor	200 V
Skimmer	45 V
Oct 1 RF Vpp	550
Collision energies	15 and 30 V
Mode	MS and targeted MS/MS

Results and Discussion

Analysis of N-glycans from monoclonal antibodies

Figure 4 shows the separation of the mAb N-glycans. The mAb glycan pattern was optimally resolved, allowing separation and integration of all major N-glycans. Relative quantification was made based on the calculation of the peak area percentage. High intensity of the labeled glycans was achieved by setting the optimal wavelengths for glycan detection on the Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector, using 260 nm as excitation wavelength and 430 nm as emission wavelength¹⁰.

The resulting HILIC glycan profile was assigned to the corresponding glycan structures based on the parent ion mass observed and the related MS/MS spectra. The parent masses were entered into the GlycoMod tool from ExPASy to find related glycan structures.

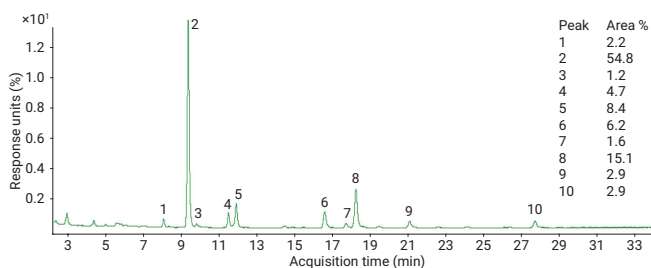


Figure 4. Separation of mAb N-glycans with fluorescence detection with 260 nm as the excitation wavelength.

GlycoMod predicts possible glycan structures (labeled or unlabeled) from the experimentally determined masses (<http://web.expasy.org/glycomod/>). Another helpful tool for glycan assignment and glycan structure design is GlycoWorkbench15, which was used in this work to prepare glycan structure cartoons.

As an example of the workflow, the N-glycan FA2G1Sg1 with a parent mass of 1026.88 [z = 2] (peak 7 and 8) was chosen. The glycan databases revealed the two most likely glycan structures for this mass (Figure 5).

MS/MS data was then used to distinguish between these two potential structures. Figure 6 shows the collision-induced dissociation (CID) MS/MS spectrum of the N-glycan FA2G1Sg1. The MS/MS data confirm the presence of a type of sialic acid, N-glycolylneuraminic acid (NeuGc), which results in strong signals for fragment ions at m/z 308 (NeuGc) and m/z 673 (NeuGc attached to galactose and N-acetylglucosamine). Meanwhile, there are no signals at m/z 292 or m/z 657, which would have indicated the presence of N-acetylneuraminic acid (NeuAc). Therefore, these results provided strong evidence that the structure was FA2G1Sg1 (containing NeuGc) rather than A2G2S1 (which contains NeuAc). The decision to assign a structure with a core fucose was also supported by the MS/MS data, based on the lack of strong fragment ion signals at m/z 512 or m/z 350, which would have been present if the fucose had instead been attached in the outer arm region.

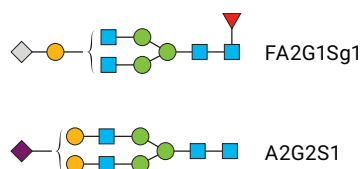


Figure 5. Two most likely glycan structures for the parent mass of 1,026.88 [z = 2], FA2G1Sg1 and A2G2S1.

All other peaks were similarly assigned using their MS and MS/MS spectra. The assigned structures are given in Table 1. The results show that the mAb mainly contains core fucosylated complex glycans, including several structures with NeuGc. These findings are typical for an IgG antibody produced by rat cells. NeuGc does not normally occur in human glycoproteins and is undesirable in therapeutic proteins¹². The sialic acids occurring in human glycoproteins are typically N-acetylneuraminic acids.

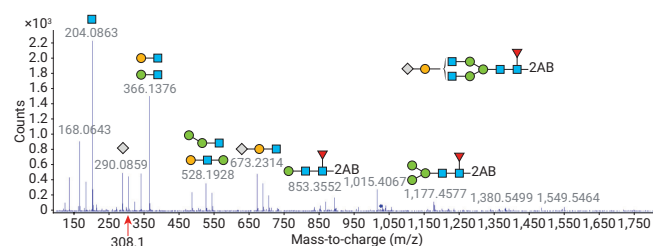


Figure 6. MS/MS spectra of FA2G1Sg1 - 1026.88 [z = 2] - 1931.6876 Da.

Table 1. Overview of masses and assigned 2AB- glycan structures of rat monoclonal antibody.

Peak	Oxford	Biopharma mAb style	Mass detector (Da)	Structure
1	FA1	G0-GlcNAc	A2G2S2	
2	FA2	G0F	792.3130 [z = 2]	
3	M5	Man5	1,355.5 [z = 1]	
4,5	FA2G1	G1F	873.34 [z = 2]	
6	FA1G1Sg1	G1FSg1-GlcNAc	925.34 [z = 2]	
7,8	FA2G1Sg1	G1FSg1	1,026.88 [z = 2]	
9	FA2G2Sg1	Ag1F	1,107.9135 [z = 2]	
10	FA2G2Sg2	Ag2F	1,261.446 [z = 2]	

Analysis of antibodies from fetuin and ovalbumin

N-glycans from two more proteins, fetuin and ovalbumin, were released by PNGase F, derivatized with 2-AB and analyzed using HILIC/UHPLC with online MS. Figure 7 shows the separation of bovine fetuin N-glycans. This glycosylation profile was dominated by complex non-fucosylated biantennary and triantennary glycans containing NeuAc. Nine major peaks could be assigned using Q-TOF/MS detection. Table 2 shows the assigned glycan structures.

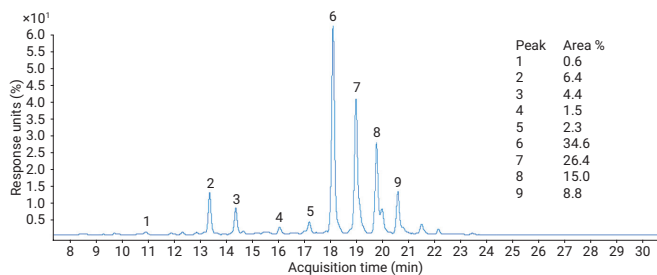


Figure 7. Separation of 2-AB-labeled fetuin.

Table 2. Detailed information of N-glycan ovalbumins.

Peak	Oxford	Structure
1	A2G2S1	
2,3	A2G2S2	
4	A3G3S2	
5	A3G3S3, A3G3S2 (trace)	
6	A3G3S3, A3G3S2 (trace)	
7	A3G3S3, A3G3S4 (trace)	
8	FA3G3S4, A3G3S3	
9	A3G3S4	

GlycoMod Figure 8 shows the separation of ovalbumin glycans. Ovalbumin is N-glycosylated only at one site (Asn292), but a complex glycosylation pattern can be associated to this site¹³. Due to the complexity of the glycan profile, the gradient had to be adjusted to a longer separation time to achieve higher resolution. The high performance of the AdvanceBio Glycan Mapping column allowed resolution of over 50 peaks with a good signal-to-noise (S/N) ratio. Twenty major peaks were assigned based on the parent ion-mass data (Table 3). Detailed structural conclusions were not achievable due to the high chance of isobaric structures occurring, several of which cannot necessarily be distinguished from the MS/MS data. Instead, the N-glycans are described in terms of their monosaccharide composition.

Compared to the relatively simple glycan pattern of the mAb, the two other glycoproteins had a greater variety of glycan structures. No fucosylated glycans were detected in ovalbumin in contrast to the mAb glycans, which matches previously reported findings that avian egg glycoproteins are non-fucosylated¹⁴.

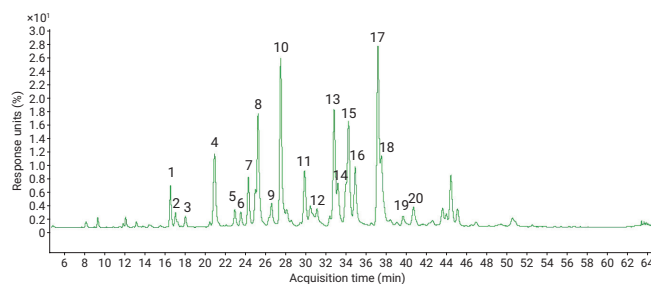


Figure 8. Separation of N-glycans released from ovalbumin.

Table 3. Assigned masses and monosaccharide composition of ovalbumin N-glycans; H = hexoses, i.e. galactose or mannose; N = N-acetylglucosamine.

Peak	Mass + 2AB (Da)	Calculated mass (Da)	PComposition (short form)	PComposition (long form)
1,2	1,234.48 [M]	1,114.48	H3N3	(HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
3	1,193.45 [M]	1,073.45	H4N2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂
4	1,437.56 [M]	1,317.56	H3N4	(HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
5	1,396.53 [M]	1,276.53	H4N3	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
6, 7	1,640.64 [M]	1,520.64	H3N5	(HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
8	1,355.506 [M]	1,235.51	H3N5	(Hex) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
9	1,599.61 [M]	1,479.61	H4N4	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
10	1,843.73 [M]	1,723.73	H3N6	(HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
11	1,802.74 [M]	1,682.74	H4N5	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
12, 14	2,046.884 [M]	1,926.88	H3N7	(HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
13	1,517.56 [M]	1,397.56	H6N2	(Hex) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
15	1,761.6574 [M]	1,641.66	H5N4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
16	2,005.8098 [M]	1,885.81	H4N6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
17	2,249.9728 [M]	2,129.97	H3N8	(HexNAc) ₆ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
18	1,964.82 [M]	1,844.82	H5N5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
19, 20	2,208.87 [M]	2,088.87	H4N7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

Conclusions

The Agilent 1290 Infinity Binary LC System, together with the Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector and Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF/MS, was an ideal combination for the analysis of released N-glycans that were derivatized with 2-aminobenzamide. Sample preparation using PNGase F for the release of N-linked glycans followed by 2-AB derivatization with subsequent HILIC sample cleanup was demonstrated for one monoclonal antibody and two other glycoproteins.

The Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column demonstrated excellent resolving power, allowing separation and identification of all major N-glycans in a rat mAb sample. Complex biantennary and triantennary N-glycans from fetuin and ovalbumin were also analyzed with very high resolution. Optimized fluorescence excitation and emission wavelengths of 260 and 430 nm provided better S/N ratios. Electrospray ionization Q-TOF MS analysis allowed assignment of different glycan structures or monosaccharide compositions, depending on the complexity of the sample.

References

1. Rademacher, T. W; Williams, P; DwekMark, R. A. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *P. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, pp 6123-6127.
2. Peracaula, R; *et al.* Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology* **2003**, 13, pp 227-244.
3. Jefferis, R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Progr.* 2005, 21, pp 11-16. 4. Arnold, J. N; *et al.* Human immunoglobulin glycosylation and the lectin pathway of complement activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2005**, 564, pp 27-43.
4. Fernandes, D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing. *Euro. Biopharm. Re.* **2005**, Summer, pp 106-110.
5. Abès, R; Teillaud, J. L. Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, pp 146-157.
6. Ruhaak, L. R; *et al.* Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 397, pp 3457-3481.
7. Royle, L; *et al.* HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal. Biochem.* **2008**, 376, pp 1-12.
8. Huhn, C; *et al.* IgG glycosylation analysis. *Proteomics* **2009**, 9, pp 882-913.
9. Melmer, M; *et al.* HILIC analysis of fluorescence-labeled N-glycans from recombinant biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, pp 905-914.
10. Ding, W; *et al.* Identification and Quantification of Glycoproteins Using Ion-Pairing Normal-phase Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteom.* **2009**, 8, pp 2170-2185.
11. Leibiger, H; *et al.* Variable domain-linked oligosaccharides of a human monoclonal IgG: structure and influence on antigen binding. *Biochem. J.* **1999**, 338, pp 529-538.
12. Anumula, K. R. Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal. Biochem.* **2006**, 350, pp 1-23.
13. Montreuil, J; Vliegthart, J. F. G; Schachter, H., Eds.; Glycoproteins II. Elsevier B. V., Amsterdam, **1997**.
14. Ceroni, A; *et al.* GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, 7, pp 1650-1659.

Agilent Solutions for High-throughput N-linked Glycan Profiling from Biotherapeutics

Authors

Arunkumar Padmanaban,
Sreelakshmy Menon, and
Suresh Babu CV

Agilent Technologies India Pvt
Ltd Bangalore India

Abstract

This Application Note presents an automated high-throughput sample preparation for 2-AB labeled N-linked glycans from innovator and biosimilar monoclonal antibody (mAb) followed by liquid chromatography (LC) analysis.

Agilent AssayMAP Bravo liquid handling platform was used for the automated sample preparation involving glycan cleavage and release from mAb, 2-AB labeling, and purification. The downstream ready samples were then analyzed using an Agilent 1290 Infinity LC system with Agilent AdvanceBio Glycan Mapping columns. The glycan distribution and heterogeneity between the samples were deduced by comparing the chromatogram from both innovator and biosimilar mAb.

The study highlights the high-throughput application of the AssayMAP Bravo platform for automated and reproducible sample preparation for glycan profiling, followed by fast chromatographic separation using a 1290 Infinity LC system.



Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are leading the race in biotherapeutics, and have revolutionized the way diseases are treated and intervened. Patents for most of the 20 clinically approved¹ first-generation mAbs have either expired, or are about to expire. This has increased the opportunity for generating generic versions, referred to as biosimilars. Regulatory bodies such as the United States Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) have published guidelines for the characterization of biosimilar protein therapeutics including post-translation modifications². Glycosylation modification results in structural heterogeneity that changes an mAb's target binding capacity, stability, charge, and mass³. During the course of developing the antibodies from the cell line, the glycans are monitored for cell line alteration and culture optimization. This requires a high-throughput sample preparation to screen several cell culture conditions in parallel. The Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform is a precise liquid-handling system designed for high-throughput applications like glycan profiling. Agilent Bravo with Agilent AssayMAP technology combines the automation with miniature 5 μ L pack bed cartridges for sample preparations, enabling high-throughput chromatography and sample preparations in a shorter time⁴.

This Application Note presents a workflow solution for profiling N-glycans from mAb using an Agilent AssayMAP Bravo platform. The system automates the N-glycan purification and derivatization using 2-aminobenzamide (2-AB) dye, which is then followed by Agilent HPLC analysis using Agilent Glycan Mapping columns. We showcase the ease-of-use of an AssayMAP Bravo for the automated sample preparation required for high-throughput profiling studies.

Experimental

Materials

ProZyme's GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with 2-AB kit, and 2-AB labeled Oligomannose 5 and 6 were purchased from ProZyme. An Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (p/n 859700-913), and Agilent 2-AB labeled human IgG N-linked glycans standards (p/n 5190-6996) were purchased from Agilent Technologies. Innovator rituximab and biosimilar product were purchased commercially from a local pharmacy. All other chemicals were procured as HPLC grade from Sigma.

Sample preparation

Reagents from a ProZyme GlykoPrep plus kit with an AssayMAP protocol were used for the sample preparation. An innovator and biosimilar sample was diluted to 1 mg/mL, then loaded onto three columns of the 96-well plate (24 replicates each). After placing the sample plates and reagents plates as specified in the guideline⁵, the samples were processed by launching the N-Glycan Sample Prep: RX digestion & 2-AB labeling module from Agilent VWorks software. The protocol consists of five modules that are performed in sequential order to immobilize the samples, digest the glycans, elute, label with 2-AB, and complete a final cleanup to remove the excess dyes. The final purified labeled glycan from each well were then transferred to HPLC vials and analyzed immediately, or stored at -80°C .

Figure 1 presents a schematic diagram of the complete workflow.

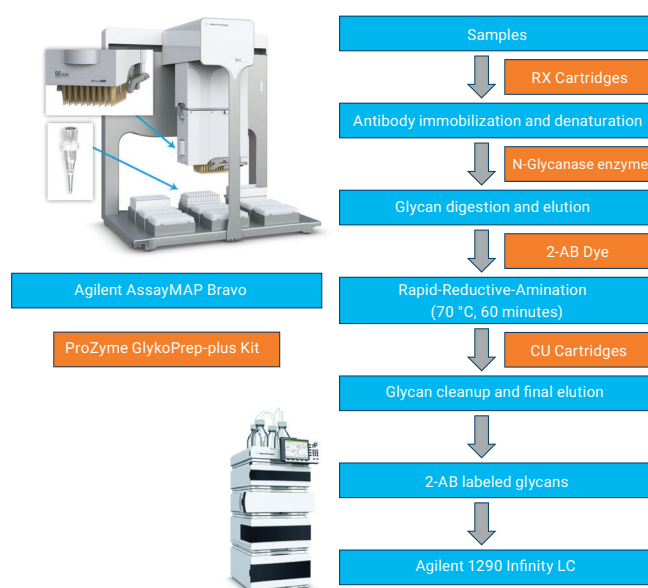


Figure 1. Schematic workflow for the glycan isolation, labelling, purification followed by LC analysis using Agilent solutions. Components of the Agilent AssayMAP steps are shown in blue; the ProZyme kits are shown in orange.

Instrumentation

Agilent 1290 Infinity LC System including:

- Agilent 1290 Infinity Binary Pump G4220A
- Agilent 1290 Infinity Autosampler G4226A
- Agilent 1290 Infinity TCC G1316 C
- Agilent 1260 Fluorescence Detector G1321 B

The LC method described earlier was adopted for this study⁶. Every sample was analyzed in quadruplet injections, followed by a blank injection.

Software

- Agilent VWorks Automation Control 11.4.0.1233
- Agilent AssayMAP Launch Pad 3.0
- Agilent N-Glycan Sample Prep: RX digestion & 2-AB labeling protocols 1.0
- Agilent ChemStation C.01.06

Results and Discussion

Agilent AssayMAP sample preparation

The samples were processed following a protocol consisting of five modules, as presented in Figure 2. The software suite consists of a deck layout, labware table, and application settings tab for each module to be performed (Figure 3). The user was prompted to place the appropriate consumables and reagents listed in the labware table in the specified deck positions. After setting up all labware, the protocol was executed, and AssayMAP Bravo completed the protocol, and a confirmation message was displayed to proceed to the next module.

The final Cleanup Protocol module eluted the labeled and purified glycans in an aqueous buffer into a clean 96-well plate. The samples were then analyzed in quadruplets, along with blanks, using the Agilent AdvanceBio Glycan Mapping column for the downstream LC analysis.

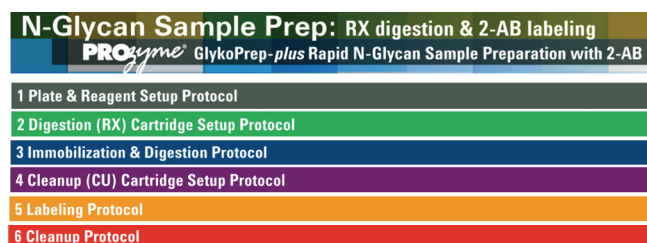


Figure 2. Agilent VWorks modules of an Agilent AssayMAP N-Glycan Sample Preparation.

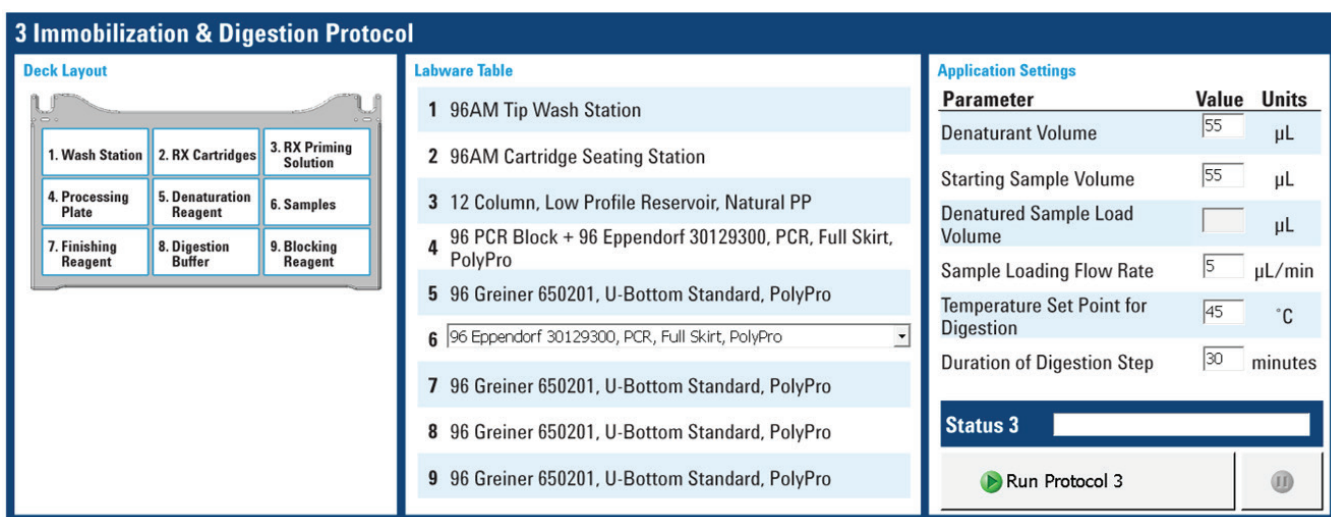


Figure 3. The deck layout, labware table, and application settings of the Immobilization and Digestion Protocol, one of the five sample preparation modules in Agilent VWorks software.

HPLC Analysis

The N-glycan profiles were compared between the innovator and biosimilar mAbs using a fast analysis method with the Agilent 1290 Infinity system. The Agilent 2-AB labeled IgG N-linked glycan library was used as the standard to assess the column performance, and to annotate the peaks in mAb samples. The 1290 Infinity system with high backpressure enabled the analysis of the samples in less than 6 minutes, saving analysis time per sample, and increasing sample throughput.

Each sample was HPLC analyzed in replicates of four. Figure 4 presents the peak area of four major glycans species from 96 replicates, demonstrating the excellent column-to-column reproducibility of the AssayMAP micro chromatography pipette tips. The Reproducibility Standard Deviation (RSD) calculated for peak area and peak height showed a coefficient of variation (CV) of less than 6 % for all glycan species. This demonstrates the very robust and reproducible sample preparation capability of the AssayMAP Bravo system.

Glycan profiling and comparison of innovator and biosimilar rituximab

The chromatograms of the innovator and biosimilar rituximab were compared with the standard N-linked IgG glycan library, and the peaks corresponding to glycans were annotated. Separate standards comprising 2-AB labeled oligomannose 5 and 6 were also used to annotate additional peaks. The glycosylation pattern of the major abundant glycans, such as the G0F, G1F isoforms, and G2F was comparable between the innovator and biosimilar product (Figure 5). Small differences in the low abundant glycans were observed; the biosimilar sample contained lower amounts of mannose (Man5), as shown in the zoomed view of Figure 6. Despite minor differences in some low abundant glycans, the glycan profile of the innovator and biosimilar rituximab can be concluded to be comparable.

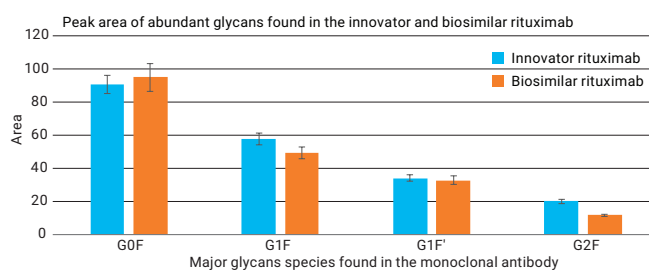


Figure 4. Peak area of major glycan species from 96 replicates for each innovator and biosimilar sample.

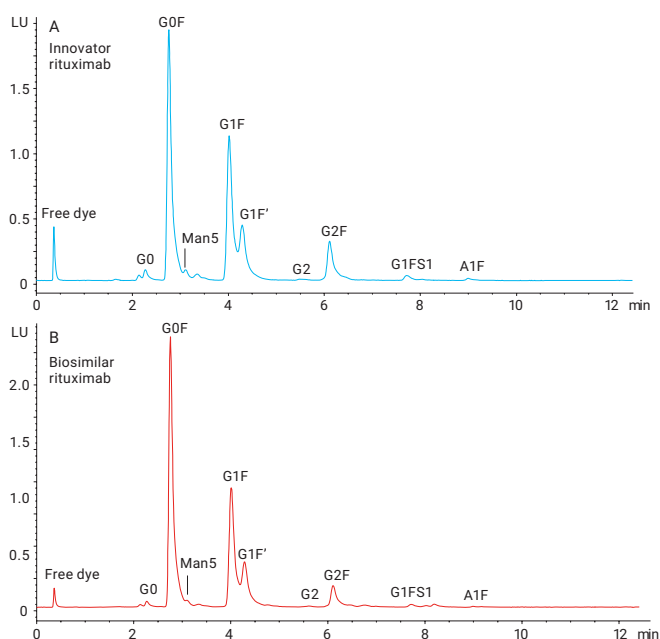


Figure 5. Glycosylation pattern of innovator and biosimilar rituximab.

The area percentage for each N-glycan core was calculated and compared between both samples. Table 1 shows the ratio of N-glycans between the innovator and biosimilar rituximab. The table shows a similar N-glycan fingerprint profile for both innovator and biosimilar.

Both samples showed a similar trend in the distribution of N-glycans, with G0F as the major glycoform followed by G1F, G1F', and G2F. Apart from the annotated glycans, there were a few unknown glycan forms that may be assigned with an orthogonal detection system. A correlation graph (Figure 7) plotted for the area percentage of both samples shows high similarity, with an R2 of 0.973.

Table 1. Glycan area percentage between innovator and biosimilar mAbs.

Percentage of N-glycans		
N-glycans	Innovator	Biosimilar
G0	1.5	0.8
G0F	42.2	50.5
Man5	1.7	1.2
G1F	28.6	26.7
G1F'	13.0	11.6
G2	0.3	0.2
G2F	8.7	5.5
G1FS1	0.9	0.6
A1F	0.2	0.5

Conclusions

This study highlights the versatility of the Agilent AssayMAP Bravo system for a high-throughput sample preparation.

- The Agilent VWorks Automation Control software suite simplifies the sample preparation with ready-to-go protocols, resulting in downstream-compatible samples with minimal hands-on operation.
- Monoclonal antibody samples from a 96-well plate were processed, in parallel, for enzymatic glycan cleavage, separation, derivatization with 2-AB, and purification.
- The AssayMAP demonstrated excellent reproducibility in the glycan purification, and performed robustly.
- The purified samples were then analyzed using an Agilent 1290 Infinity LC system with the Glycan Mapping column.
- The glycan species were well-resolved in a shorter time, and were annotated using standards.
- The distribution of the glycan species between the innovator and biosimilar were assessed, and the data suggest comparable glycan profiles for the innovator and biosimilar rituximab used in this study.

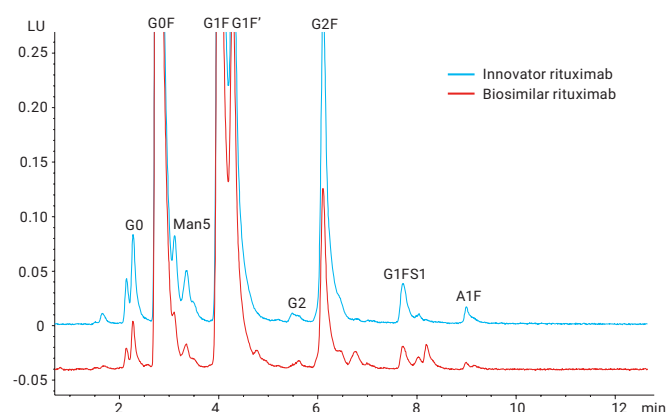


Figure 6. Zoomed view of Figure 5: the glycosylation pattern of innovator and biosimilar rituximab, showing minor differences in the low abundant glycans.

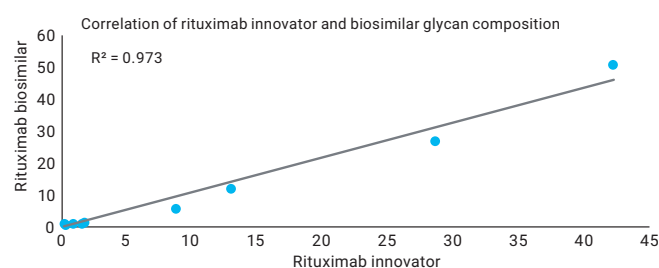


Figure 7. Linear graph showing the comparison of the area % of glycans released from innovator and biosimilar rituximab.

References

1. Chames, P.; Baty, D. Bispecific antibodies for cancer therapy. *mAbs* **2009**, 1:6, 539–547.
2. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). April 2015. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>
3. Zhang, Q.; et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research* **2009**, 8(2), 754–769.
4. Agilent AssayMAP Cartridges Automated Sample Preparation, Agilent Technologies Data Sheet, publication number 5991-1774EN, **2013**.
5. AssayMAP with ProZyme GlykoPrep-plus Rapid N-Glycan Sample Preparation with 2-AB Protocol Guide, Agilent Technologies Manual, publication number G5409-90012EN, Rev May **2013**.
6. Martosella, J.; et al. A Novel HILIC Column for High Speed N-linked Glycan Analysis, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-4886EN, **2014**.

その他のアプリケーションノート

資料番号	タイトル
5991-4801EN	Sensitive and Reproducible Glycan Analysis of Human Immunoglobulin G
5991-4886JAJP	HILIC カラムを用いた N-結合型グリカンの高速分析
5991-7024EN	Analysis of N-Linked Glycans from Antibody-Drug Conjugate (ADC) Using the Agilent AssayMAP Automated Sample Preparation and Agilent 1290 Infinity LC System

追加情報

脱グリコシル化、グリカンラベリング、サンプルクリーンアップ用の消耗品と試薬を含むグリカンサンプル前処理キットをご用意しています。プロトコルの詳細は、次のユーザーガイドを参照してください。

資料番号	タイトル
5991-9561EN	AdvanceBio N-Glycan Sample Preparation Kit User Guide (96 Samples) p/n 5190-8005
5991-9560EN	AdvanceBio N-Glycan Sample Preparation Kit User Guide (24 Samples) p/n 5190-8000

メソッド開発、データ解析、システムチェック用のグリカン標準試料をご用意しています。

部品番号	品名
5190-6997	Dextran ladder standard
5190-6998	Dextran ladder standard, 2-AB labeled
5190-6995	IgG N-linked glycan library
5190-6996	IgG N-linked glycan library, 2-AB labeled

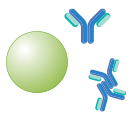
サンプル前処理を含む AdvanceBio グリカンマッピングワークフローのビデオの概要は、オンラインでご覧いただけます。

凝集/フラグメントの分析

背景

タンパク質をストレス条件にさらすと凝集しやすくなり、ダイマーやより大きいオリゴマー、または高次構造が形成されることがあります。これは生物製剤タンパク質の製造において特に問題です。ターゲットタンパク質は凝集を誘発するさまざまな条件の影響を受ける可能性があるためです。これらの条件には、発酵中の温度や濃度の変化、ダウンストリーム処理中の pH や濃度の変化などが含まれます。(インペラブレード、スターラ、その他のエンジニアリングプラント機器などによる)せん断力によって、ストレス関連の凝集が発生する場合があります。凝集体、特に非常に大きい(ただし肉眼では見えない粒子サイズの)多量体は、健康に悪影響を与える可能性があります。このため、凝集体のレベルを定量および測定し、その制限値を定めておく必要があります。

サイズ排除クロマトグラフィーは、高次凝集体とモノマーピークを分離する最適な手法の 1 つです。UV または DAD 定量などの適切な濃度検出器は比較的シンプルです。抗体薬物複合体や ADC などの複雑な分子は、分析が難しい可能性があります。多くのサイズ排除クロマトグラフィーカラムで吸着を引き起こす疎水性の薬剤が存在する可能性があるためです。この問題を解決するため、アジレントは二次的相互作用のリスクを大幅に軽減する新しい固定相を開発しました。この新しい AdvanceBio SEC カラムは、凝集体の高速分離および定量に最適です。



凝集/フラグメントの分析

サイズ排除クロマトグラフィー

幅広い生体分子分離の正確かつ精密な定量

AdvanceBio SEC

ルーチンアプリケーションや分析困難なアプリケーションなどに幅広く利用可能

特長	利点
親水性ポリマー被膜	二次的相互作用の防止
分析速度の向上	重要な納期の遵守
再現性の向上	再分析の減少
感度の向上	低レベルでも凝集の定量が可能

Bio SEC-3 と Bio SEC-5

超ワイドポアおよびスケールアップオプション

特長	利点
ほとんどの水溶性緩衝液に対応	メソッドの柔軟性
1000 Å と 2000 Å を含む幅広いポアサイズオプション	ペプチドから VLP (ウイルス様粒子) まで幅広く対応できるオプション
分析およびセミ分取寸法	スケールアップ/ダウンが容易

概要

タンパク質の凝集体は外的要因によって発生する可能性があるため、凝集分析で最も重要な手順の 1 つはサンプル前処理です。タンパク質が移動相で完全に溶解し、凝集レベルを変える可能性がある要素 (超音波、温度、pH、高すぎる濃度など) の影響を受けないようにする必要があります。サイズ排除クロマトグラフィーは、イソクラティック溶出を用いた比較的シンプルな手法です。移動相の条件としては、タンパク質とカラム固定相の間の二次的相互作用がないようにする必要があります。通常は、中性領域の 150 mM リン酸ナトリウムやリン酸緩衝液 (PBS) などの水溶性緩衝液を使用します。このような移動相溶液は、細菌の繁殖にも最適です。このため、定期的に新しい緩衝液を調製し、使用前に 0.2 μm のフィルタでろ過することが重要です。いかなる環境でも、未使用の緩衝液を機器内に長期間残さないでください。

アジ化ナトリウムなどの保存料を移動相に添加しないようにすれば、(210 ~ 220 nm の) 低波長を使用できるため、この手法の感度が大幅に向上します。カラムの保管には、20 % のエタノールなどの保存料を推奨します。ただし、有機溶媒を含む移動相の粘度は非常に高く、カラムを傷める可能性があるため、注意が必要です。

生体分子分析のための サイズ排除クロマトグラフィー: 分析の手引き

サイズ排除クロマトグラフィーの概要

生体分子を溶液中での分子サイズに基づいてクロマトグラフィーにより分離する分析手法を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と言います。他の分離モードとは異なり、SEC では、分析対象成分とカラムに充填された固定相との間で相互作用が生じないことが前提となります。そうした特徴から、凝集体、賦形剤、細胞残屑、その他の分解から生じる不純物などを含む汚染物質からインタクトタンパク質を分離し、分析するためには理想的なソリューションといえます。そのため、開発や製造において、バイオ医薬品用分子の特性分析に広く用いられています。

このガイドでは、SEC の分離原理、溶質のサイズと分子量の影響、カラムの選択、移動相に関する考慮事項、SEC 使用に関する一般的ルールなどを解説します。



分離の原理はいたってシンプル

SECでは、分子は、溶液中での分子サイズに比例して、大きいものから順に分離されます。きわめて大きい分子は充填ベッドから排除され、ポイドボリュームで最初に溶出します。それよりも小さな分子は、そのサイズに応じてさまざまな程度でポアに浸透することができます(図1)。最も小さい分子は、ポア構造の奥まで拡散し、最後に溶出します。

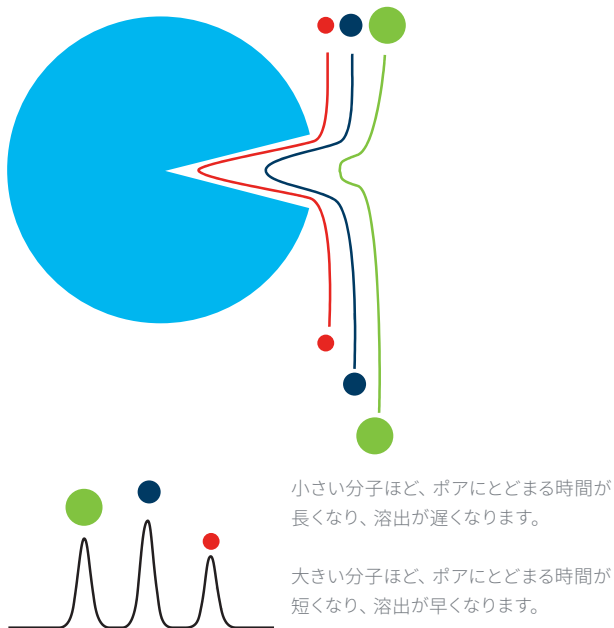


図1. 分子はそのサイズに応じて、さまざまな程度で固定相のポアに浸透します。

サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質混合物の分離および定量に適しています。遺伝子組み換えタンパク質製造の品質管理においては、凝集体(二量体、三量体、四量体など)を測定したり、分子量の大きいタンパク質から低分子量の賦形剤や不純物を分離したりするための重要な手段として用いられています(図2)。

治療用タンパク質では、凝集体の把握およびコントロールが不可欠になります。これは、凝集体が効能や使用期限に影響を与え、場合によっては深刻な免疫原性反応につながる可能性があるからです。ICH(Q6B)などの規則では、目的とする製品から凝集体を分離し、定量することが義務付けられています。

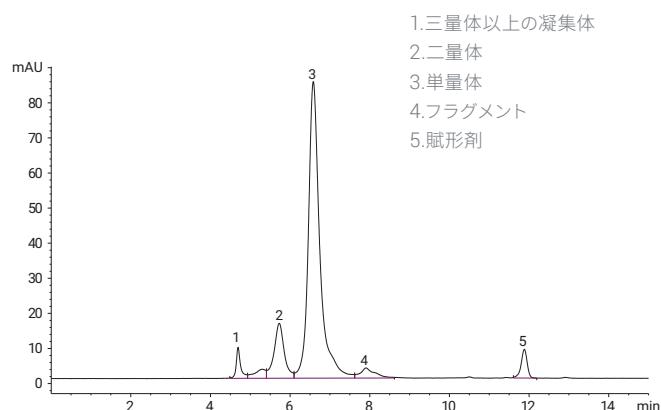


図2. IgGの凝集体と賦形剤の分離

条件、インタクト IgG の単量体と二量体の分離

パラメータ	設定値
サンプル:	ポリクローナル IgG
サンプル濃度:	150 mM リン酸ナトリウム緩衝液
カラム:	Agilent AdvanceBio SEC, 300 Å 7.8 x 300 mm,
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
流量:	1.0 mL/min
温度:	室温
検出器:	UV, 220 nm
注入量:	5 µL

通常、分子は分子量の順に溶出し、分子量の最も大きいものが最初に溶出します。しかし、実際には、SEC メカニズムは、溶液中での分子サイズにもとづいて機能します。ほとんどのタンパク質は密集した構造ですが、一部のタンパク質分子は円筒状を呈しているため、溶液中の流体力学半径が大きくなり、予想よりも早く溶出することがあります(図3)。また、移動相が異なると、溶液中のサイズ(流体力学半径または回転半径)が変化するため、溶出順序に影響が出ることもあります。

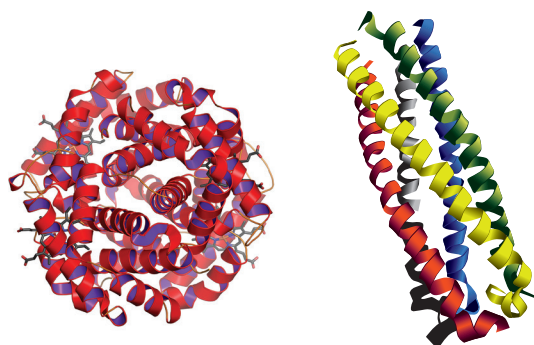


図3. 密集した球状のタンパク質と円筒状のタンパク質の比較

SEC-UV/DAD メソッド開発ガイド

生体分子、凝集分析 (ペプチド、ポリペプチド、タンパク質) のサイズにもとづく分離のための初期カラムおよび初期条件の選択

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、
mAbs MW >0.1~1,250 kDa

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、
mAbs MW >0.1~10,000 kDa

分子量範囲とポアサイズにもとづくカラムの選択

AdvanceBio SEC (2.7 μm)

ポアサイズ	MW 範囲 (kDa)
130 Å	0.1~100
300 Å	5~1,250

Agilent Bio SEC-5 (5 μm)

ポアサイズ	MW 範囲 (kDa)
100 Å	0.1~100
150 Å	0.5~150
300 Å	5~1,250
500 Å	15~5,000
1000 Å	50~7,500
2000 Å	> 10,000

推奨する初期分離条件

カラム: AdvanceBio SEC または Agilent Bio SEC-5
 移動相: 150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0*
 グラジエント: 10~30 分間のアイソクラティック
 温度: 推奨: 10~30 °C、最高温度: 80 °C

流量: 内径 4.6 mm カラムの場合は 0.1~0.4 mL/min
 内径 7.8 mm カラムの場合は 0.1~1.25 mL/min
 サンプル量: 総カラム容量の 5% 以下
 * 高および低塩濃度のさまざまな水溶性緩衝液を使用可能

詳細については、次のアプリケーションノートをご覧ください。Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins (効率的なタンパク質サイズ分離のための最適なパラメータの決定) (資料番号 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/jp

最初の分離後、分離のさらなる向上、タンパク質溶解度の維持、サンプルとクロマトグラフィー充填剤との相互作用の軽減のために、さらに変更が必要になることがあります。例えば、最適な分離を得るために、移動相のイオン強度を調整することができます。また、pH も一般に ± 0.2 単位で調整可能です。さらに最適化が必要な場合は、範囲を拡張する必要があります。温度の変更や、有機溶媒を追加することも検討します。

その他の塩が必要なプロトコルでは、次の緩衝液が一般的です。

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の塩化ナトリウム
 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の硫酸ナトリウム
 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 50 ~ 100 mM の尿素。その他の類似した塩 (KCl など) や塩酸グアニジンも使用できます。

pH 範囲: 2.0 ~ 8.5

添加可能な有機溶媒:

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 ~ 10% のエタノール (または、メタノール、アセトニトリルなどその他の類似した溶媒)。50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5% の DMSO。粘度の高い移動相を使用する場合は、最大使用圧力を超えないようにするために、流量の低減が必要になることがあります。

温度:

一般に、SEC による分離は 10 ~ 30 °C で行います。タンパク質やペプチドの分離では、タンパク質や疎水ペプチドの分離能と回収率を高めるために、それよりも高い温度が必要になることがあります。また、温度の影響を受けやすいタンパク質の生物活性を最大状態で保つために、SEC を低温室で行うこともあります。Agilent Bio SEC カラムの最高使用温度は 80 °C です。これより高い温度で使用すると、タンパク質が変性することがあります。

機器選定における検討事項

SEC 分離メカニズムでは、ピーク容積またはリテンションタイムが分析においてきわめて重要となります。したがって、高い精度と再現性を確保するためには、高性能の機器が求められます。アイソクラティックポンプまたはアイソクラティックモードで動作するグラジエントポンプが適しているため、示差屈折率 (RI) 検出器のほか、一般的な UV または DAD 検出器も使用できます。特に RI 検出器を使用する場合は、ベースライン安定性を確保するために、移動相のオンラインデガッサーやカラムコンパートメントを使用することを強くおすすめします。高温で分離を行うと、拡散係数が上昇し、分離能と再現性が向上するほか、カラムに対する負荷が軽減します。そのため、高性能システムにはカラムコンパートメントが不可欠です。

困難な溶媒条件でも高い堅牢性と信頼性を実現

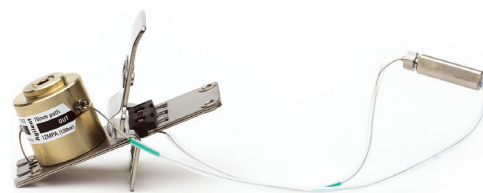
生体分子の分析では、2 M NaCl や 8 M 尿素など塩濃度の高い緩衝液や、pH が 1 ~ 13 までの範囲で極端に高い (または低い) 緩衝液が一般に使われます。これは、LC 機器にとってきわめて厳しい条件です。厳密に設計された 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、こうした困難な移動相条件にも簡単に対応することができます。送液システムに耐腐食性の高いチタンを採用し、サンプル流路での金属接触を一切排除することで、堅牢性のきわめて高い機器を実現しています。サンプルだけでなく、機器への投資も保護されます。検出器についても、生体分子の分離用に設計されているため、タンパク質の分析結果やピーク形状、回収率に影響をおよぼすことはありません。

タンパク質の変性を防止

タンパク質は熱により変性することがあります。サンプルの完全性を維持するためには、LC 流路全体でサンプルの温度を一定に保つことが重要です。不活性サンプルループとセラミックニードルを採用した Agilent バイオイナートオートサンブラなら、サーモスタットを追加することによりサンプルを冷却できます。カラムコンパートメント用のバイオイナート熱交換器が、温度を一定に保ちます。アジレントは、さまざまな条件でタンパク質を確実に分析していただけるよう、幅広いバイオイナートフローセルを用意しています。アジレントのフローセルの詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム



RFID タグ付きのバイオイナートフローセル、10 mm、13 μ L (p/n G5615-60022)

新たな知見を引き出すソフトウェアソリューション

サイズ排除クロマトグラフィーを用いた分析には、次のソフトウェアを役立てることができます。

- HPLC ソフトウェア: Agilent OpenLAB CDS ChemStation ソフトウェアは、クロマトグラフィーデータの採取、検証、および整理や、定量分析に役立ちます。
- GPC/SEC ソフトウェア: Agilent GPC/SEC システムに付属しています。分子量からさらに多くの情報を引き出すことができます。
- Buffer Advisor ソフトウェア: 塩および pH グラジエントをすばやく簡単に作成できます。メソッド開発に伴う緩衝液の調製、緩衝液の混合、pH スカウティングといった煩雑で誤差を生じやすい手順を排除します。



包括的な分子特性分析

SEC では、天然由来の分子 (多糖、デンプンなど) や合成ポリマー (ポリエチレングリコールやポリエチレンオキシド) など、高分子の分析対象成分の平均分子量を測定できます (図 4)。タンパク質や、ワクチンなど複雑なサンプルの場合は、通常、専用ソフトウェアを用いたより高度なデータ解析が必要になります。SEC に適切な検出器を使用すれば、サンプルの構造に関する有益な情報が得られます。検出器の選択肢の詳細については、176 ページをご覧ください。

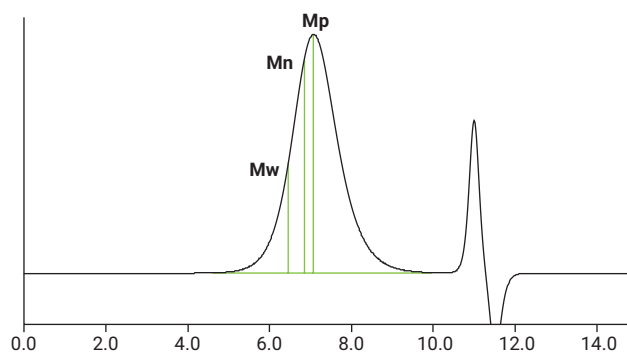


図 4. SEC による多糖の分離と Mw、Mn、および Mp

サイズ排除クロマトグラフィーにおける検討事項

サンプル前処理

サイズ排除クロマトグラフィーのサンプル前処理は、HPLC メソッドのタンパク質分析と同様です。最も重要な点は、サンプルを移動相に溶解させる必要がある点です。できれば移動相そのものに溶解させるのが理想的です。他の HPLC モードに比べて、カラムサイズが大きいほか、比較的流量が低いために線速度が低くなることから（後述の「カラムのサイズ」参照）、サンプル濃度および注入量を通常よりも高く（多く）する必要があります。カラムの損傷を防ぐため、使用前にサンプルをろ過するか遠心分離し、微粒子を除去することをおすすめします。ただし、ろ過ではサンプルの溶解性の低さを解消することはできません。溶解性が低い場合は、別の移動相を使用する必要があるでしょう。

サンプル前処理を効率化するためには、サンプルの溶解にあたって、サンプルそのものの性質が変わらない手法を用いることも重要です。タンパク質によっては、凍結融解サイクル、極端な温度、超音波処理、濃度などのストレス条件下で、凝集（二量体やさらに分子量の大きい多量体の形成）や解離（より小さい分子量のサブユニットの形成）が生じます。詳細については、164 ページのメソッド開発ガイドを参照してください。

Captiva 低タンパク質結合フィルタ

どのようなサンプル前処理を行う場合でも、低タンパク質結合特性を備えたフィルタによるサンプルのろ過は効果があります。

アジレントの PES フィルタは、タンパク質に関連するろ過において、一貫性のある優れた低タンパク質結合特性を発揮します。一般に、LC 分析には、PVDF メンブレンより PES フィルタメンブレンの方が適しています。アジレントの PES フィルタは、一般的な LC 溶媒で PVDF と同様に使用でき、タンパク質との結合の低さとろ過効果についてはそれ以上に優れています。詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Captiva PES フィルタ

直径 (mm)	ポアサイズ (mm)	認証	ハウジング	部品番号
4	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5095
4	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5094
15	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5096
15	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5097
25	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5098
25	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5099



カラムの選択

カラムのサイズ

SEC カラムは通常、他のクロマトグラフィーに用いられるものよりも大幅に長くなります。また、比較的低い流量（低い線速度）で使用されます。標準的な SEC カラムのサイズは 7.8 x 300 mm、標準的な流量は 1.0 mL/min です。これに対して、逆相カラムのサイズは 2.1 または 4.6 x 150 mm、線速度は SEC の 2～3 倍です。その理由は、カラムサイズの効果ではなく、SEC の分離メカニズムにあります。

SEC では、他のクロマトグラフィーテクニックで一般に見られるような、固定相への吸着や相互作用に起因するサンプル濃度の上昇は生じません。そのため、SEC で分析するサンプルは注入量が多く（5～20 μ L）、注入するサンプル濃度も一般に高くなります（1～4 mg/mL）。ランタイムは通常、1 カラムあたり 10～12 分（一般的な 7.8 x 300 mm カラム、流量 1.0 mL/min を想定）で、ピーク幅は一般に太くなります。そのため、高いデータ採取レートは必要ありません。タンパク質凝集の比較や定量では、HPLC ソフトウェアを使用します。多分散ポリマーの分子量分布情報を得るためには、専用の SEC ソフトウェアを使用します。

通常のキャリブレーションにより、選択したカラムの特性を理解することがきわめて重要です。その際に、どのポアにも浸透できない十分に大きな分子を標準液に含めることにより、そのカラムの排除限界を測定することができます。同様に、ポア構造の奥まで浸透する十分に小さな分子を使用することで、カラムの浸透限界を測定できます。実施する予定の分離がこれら 2 つの限界の間に収まるようにする必要があります。サンプルのクロマトグラムに、排除された物質や浸透限界点で溶出する物質のピークが現れた場合は、異なるポアサイズのカラムを使用することを検討してください。

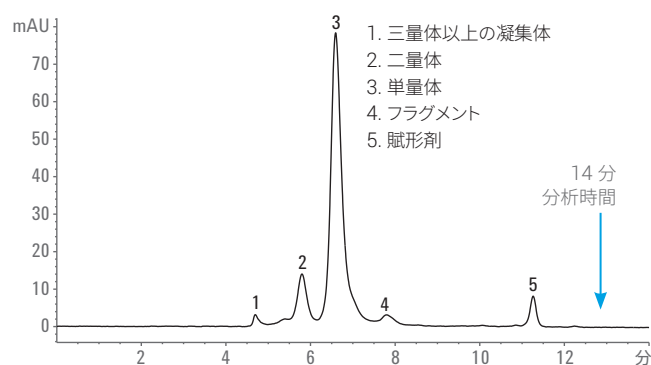
短いカラムによる分析の高速化

分析に求められる分離能を得るためには、通常は長さ 300 mm のカラムを使う必要があります。しかし、分離スピードを上げたい場合は、それよりも短いカラムの使用を検討することも可能です。長さ 150 mm のカラムを使えば、分離の所要時間は半分になりますが、分離能は低下します。ハイスループットが求められる場合は、背圧の限界に達するリスクを冒さない範囲の高流量で短いカラムを使用すれば、分析時間をさらに短縮することができます。図 5 を参照してください。

カラム: **AdvanceBio SEC, 7.8 x 300 mm**

流量: 1.0 mL/min

サンプル: ポリクローナル IgG



カラム: **AdvanceBio SEC, 7.8 x 150 mm**

流量: 2.0 mL/min

サンプル: ポリクローナル IgG

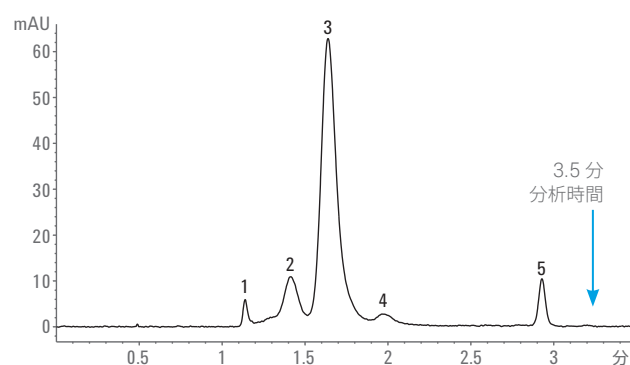


図 5: 300 mm カラムと 150 mm カラムを用いた分析結果の比較による時間短縮効果の実証



カラムメディアの選択

サンプルと分離に用いる移動相（水、緩衝液、有機溶媒）の溶解性を測定したら、分子タイプおよびサイズに適したサイズ排除カラムを選択します。ヘパリン、デンプン、セルロースなどの分子量分布の広い高分子では、ポリマーベースの充填剤を用いたカラムがしばしば使われます。特定の分子量を持つタンパク質や分子には、シリカベースの固定相が最適です（表 1）。

タンパク質凝集体など生体分子の分離に適した Agilent Bio SEC カラムと、多糖の分子量測定など天然ポリマーの分析に適した PL Aquagel-OH カラム。覚えておくべき重要な点は、タンパク質には多くのアミノ酸が含まれ、その側鎖官能基が酸性、塩基性、疎水性、中性/親水性など、さまざまに異なることです。シリカカラムとの相互作用を防ぐためには、移動相に緩衝液を用いる必要があります。

アジレントでは、各アジレント製カラムに適した分子量範囲を提案しています。分析対象成分の分子量がその範囲の中間あたりに収まるカラムを選択することをおすすめします。



タンパク質凝集体などの生体分子分離に適した Agilent Bio SEC カラムと、多糖分子量測定などの中性ポリマー分析に適した PL Aquagel-OH カラム

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

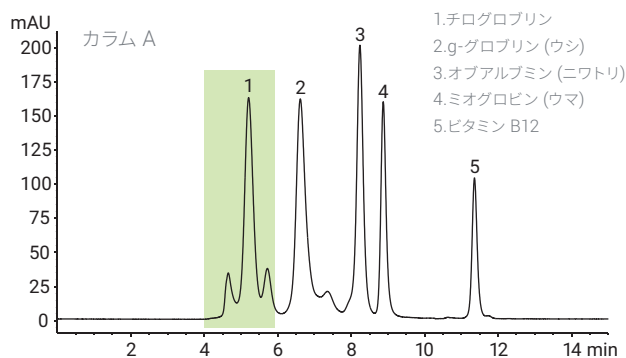
表 1. アプリケーションおよびサンプルサイズに応じたカラムの選択

アプリケーション	アジレントのカラム	特徴
タンパク質		
SEC-UV/DAD または LS による mAb、タンパク質、およびペプチドの分析	Agilent AdvantBio SEC	サンプルの再分析が不要な優れた分離能と、分析時間を短縮するスピードを実現する最新の革新技術を搭載。ラボの生産性を高めます。
SEC-MS による mAb、タンパク質、およびペプチドの分析	Agilent Bio SEC-3	MS 検出に適した安定したベースラインを実現します。
生体高分子や、複数の分子量の成分が含まれるサンプル	Agilent Bio SEC-5	幅広い分析に対応する多くのポアサイズオプション (100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å、2000 Å)。
球状タンパク質、抗体	ProSEC 300S	高塩濃度条件下でのタンパク質分析のためのシングルカラムオプション。
タンパク質、球状タンパク質	ZORBAX GF-250/450	従来型製品。使用の際は、USP L35 にもとづくプロトコルを使用する必要があります。
水溶性分析対象成分		
低分子量ポリマーおよびオリゴマー、オリゴ糖、PEG、リグニンスルホン酸	2 本または 3 本の PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 μm ✓ PL aquagel-OH 20 5 μm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 μm	PL aquagel-OH 分析シリーズは、pH 範囲 2 ~ 10 に対応し、有機溶媒 (最大 50 % のメタノール) を使用できます。また、最大 140 bar (2030 psi) の機械的安定性を持ち、カラム使用圧力は低めです。
多分散生体高分子、多糖、セルロース誘導体	2 本または 3 本の PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 μm	
超高分子量ポリマー、ヒアルロン酸、デンプン、ゴム	PL aquagel-OH 60/50/40 15 μm を連結	

ポアサイズ

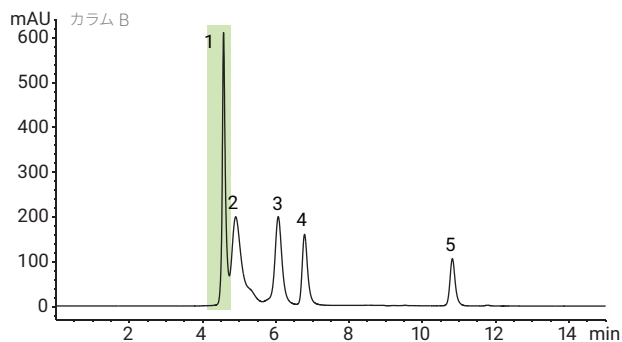
タンパク質は、他の生体高分子に比べて小型で密集した構造を持っているため、最初に選択するカラムとしては、ポアサイズが 300 Å のものが適しています。図 6 では、ポアサイズの異なるカラムについて、5 種類のタンパク質の混合参照標準とポリクローナル IgG サンプルの分離能を比較しています。ポアサイズによる分離能への影響は明らかです。

BioRad ゲルろ過標準混合物



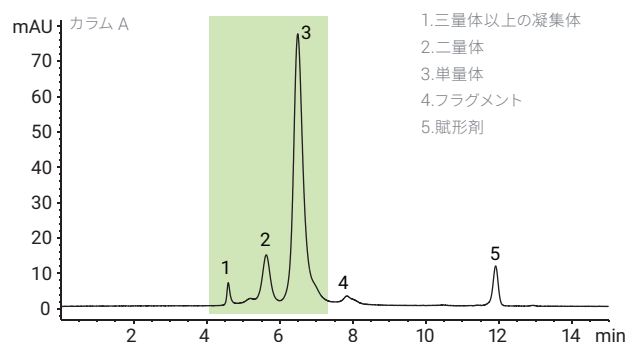
分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 x 300 mm、 2.7 μm (p/n PL1580-5301)
カラム B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 x 300 mm、 2.7 μm (p/n PL1580-5350)
サンプル:	BioRad ゲルろ過標準混合物
機器:	Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
流量:	0.35 mL/min
検出器:	UV、220 nm



ポアサイズ 300 Å では、最も大きいタンパク質であるチログロブリンおよび IgG 二量体が分離されています。一方、小さいポアサイズでは、最も大きいタンパク質は排除され、分離されていません。

ポリクローナル IgG の分離



分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	AdvanceBio SEC 300 Å 4.6 x 300 mm、 2.7 μm (p/n PL1580-5301)
カラム B:	AdvanceBio SEC 130 Å 4.6 x 300 mm、 2.7 μm (p/n PL1580-5350)
サンプル:	ポリクローナル IgG
機器:	Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
流量:	0.35 mL/min
検出器:	UV、220 nm

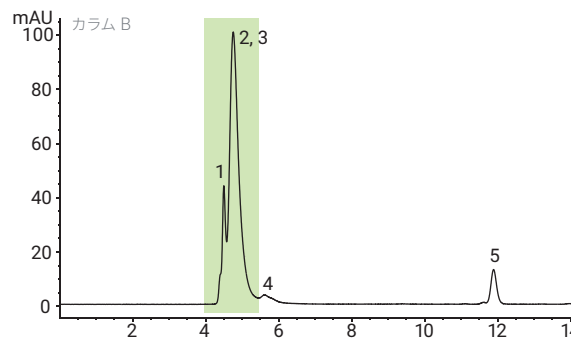


図 6: BioRad ゲルろ過標準およびポリクローナル IgG の分離における各種ポアサイズの比較。緑色の枠内は、2 種類のポアサイズによる分離能の違いを示しています。分子量の大きいタンパク質の分析には、より大きいポアサイズが必要です。

SEC 浸透範囲の検証

SEC によるタンパク質の分離メカニズムでは、溶質の分子量ではなく、溶液中での分子サイズにもとづいて分離が行われる点を理解しておくことが重要です。タンパク質/ペプチドの検量線とプルラン/多糖および PEG/PEO の検量線と比較すると (図 7)、このことがよくわかります。キャリブラントがプルラン/多糖および PEG/PEO の検量線は非常によく似ていますが、タンパク質/ペプチドの検量線は、位置と形状が異なっています。タンパク質は、3 次元構造を有する複雑なペプチド鎖で構成されています。この構造は、pH やイオン強度など、周囲の環境の影響を受けます。ペプチド鎖は、周囲の環境に最も適した形状に変化するため、それに伴って構造やサイズが変化することがあります。

溶出時間が分子量ではなく分子サイズによって決まることは、図 8 を見ればわかります。各キャリブラントの分子量はどれも 50,000 前後ですが、リテンションタイムは大きく異なっています。PEG は 7 分直後に、また多糖は 7.5 分直後に溶出していますが、タンパク質は約 9.5 分で溶出しています。

この結果は、SEC 分離メカニズムが分子量ではなく実際のサイズにもとづいていることを明らかに示しています。そのため、検量線を使用する際には、使用したキャリブラントを明確にすることが重要です。例えば、「分析対象サンプルは分子量 50,000 に相当するプルラン/多糖」のように記述するとよいでしょう。この相対的な影響を解消する高度な検出器については、176 ページを参照してください。

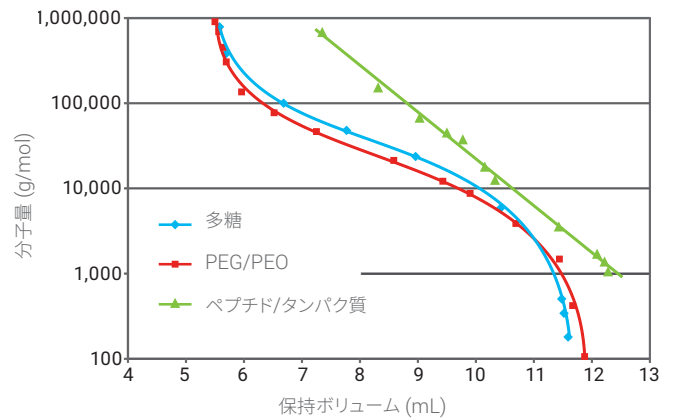


図 7: 3 種類のキャリブラントで作成した検量線の比較

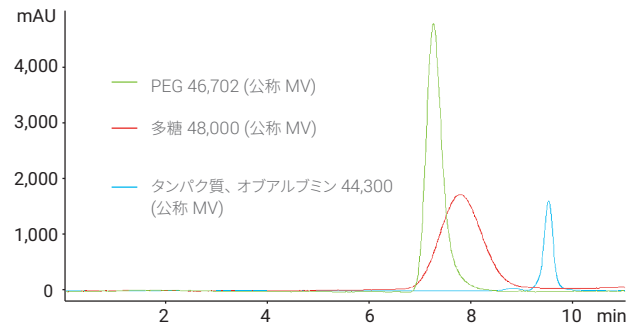


図 8: 同様の分子量を持つキャリブラントのクロマトグラムの重ね表示

130 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準

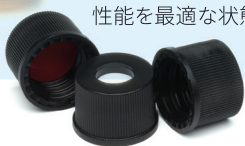
(p/n 5190-9416、130 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準、2 mL バイアル入り)

厳選された 5 種類のタンパク質・ペプチド (オブアルブミン、ミオグロビン、アプロチニン、ニューロテンシン、アンジオテンシン II) からなるキャリブラントです。130 Å の Agilent AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。

300 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準

(p/n 5190-9417、300 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準、2 mL バイアル入り)

厳選された 5 種類のタンパク質・ペプチド (チログロブリン、g-グロブリン、オブアルブミン、ミオグロビン、アンジオテンシン II) からなるキャリブラントです。300 Å の Agilent AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。



粒子径

粒子径もカラム選択における重要な考慮事項です。粒子径が小さいほど分離効率は高くなりますが、タンパク質が分解 (切断/変形) されるおそれがあります。図 9 は、3 μm の Agilent Bio SEC-3 カラムと 5 μm の Agilent Bio SEC-5 カラムの比較です。サンプルと移動相を注意深く前処理しないと、背圧の上昇やカラムの詰まりといったリスクが高くなります。ろ過により、不溶性物質や残屑を除去することを推奨します。また、ガードカラムやインラインフィルタを使用すれば、カラム寿命を延ばすことができます。

Agilent Bio SEC-3 と Agilent Bio SEC-5 の比較

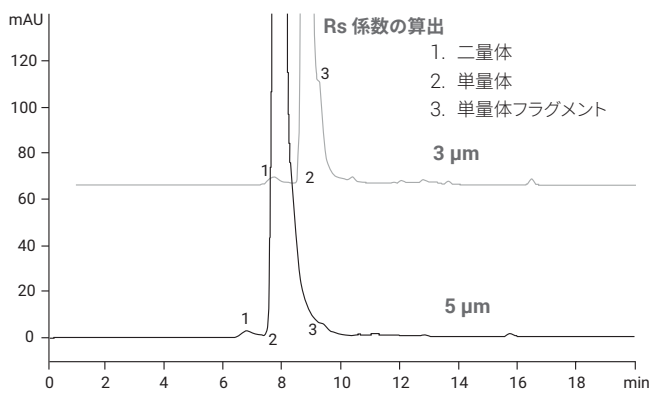


図 9: Agilent Bio SEC-3 カラムと Agilent Bio SEC-5 カラムの比較。
3 μm カラムの方が優れた分離能を示します。

カラム内径

カラム内径も重要な要素で、分析するサンプルの量に応じて決める必要があります。限られた量のサンプルしか使用できない場合は、内径 4.6 mm のカラム (流量 0.35 mL/min) が適しています。ただし、内径の小さいカラムを使用する場合は、過剰な分散や分離能の低下を避けるために、システムボリュームを最小限にすることが重要となります。水溶性移動相を使用する場合、SEC は非変性テクニックと見なされます。そのため、その後の分析に備えた複雑なサンプルの分離やサンプル成分の単離にきわめて有効です。21.2 mm 径の Agilent SEC-3 や SEC-5 製品のように内径の大きなカラムを使用すれば、HPLC 分析システムを用いたラボでの分取精製が可能です。

条件、モノクローナル抗体の分析

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio SEC-3、300 Å 7.8 x 300 mm、3 μm (p/n 5190-2511)
カラム B:	Bio SEC-5、300 Å 7.8 x 300 mm、5 μm (p/n 5190-2526)
サンプル:	ヒト化モノクローナル抗体
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7
流量:	1 mL/min
検出器:	UV、220 nm



Agilent AdvanceBio SEC カラム 7.8 x 300 mm および 4.6 x 300 mm

メソッドパラメータ

流量

一部のアプリケーションでは、分析のスピードが重要となります。一般的な 300 mm カラムの代わりに 150 mm などの短いカラムを使用したり流量を高くしたりすれば、分析時間を短縮できます。ただし、その場合は分離能に悪影響がおよぶことがあります。SEC では、ポアを出入りする拡散を利用して、カラムを通過する間に異なる長さの流路を作り出しているためです。このようなリスクはありますが、図 10 に示すように、150 mm カラムを流量 2 mL/min で使用することにより、4 分未満で IgG の二量体と単量体の定量に十分な分離能が得られます。

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 150 mm, 2.7 µm (p/n PL1180-3301)
サンプル:	IgG (2 mg/mL)
移動相:	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
流量:	0.5、1.0、1.5 mL/min (52、102、152 bar)
検出器:	UV, 220 nm
注入量:	5 µL

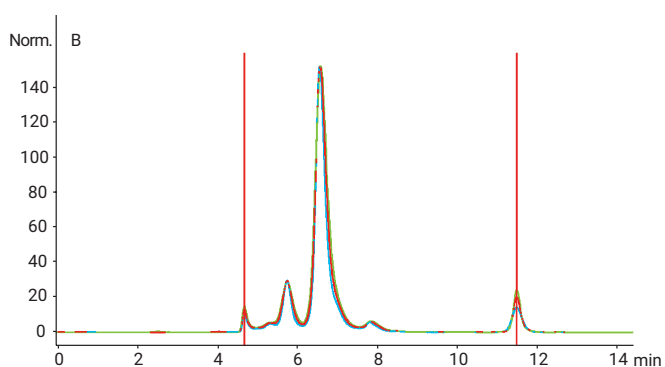
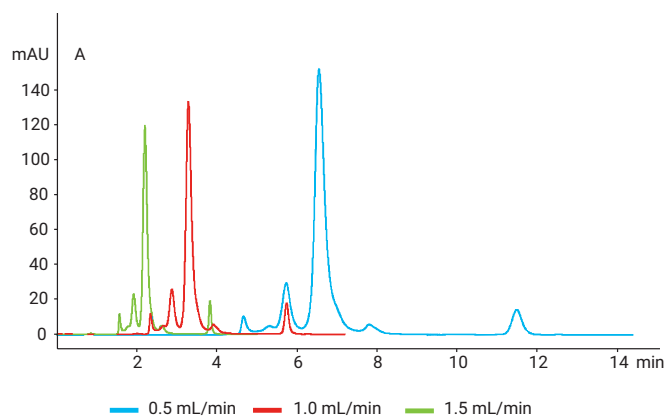


図 10: 流量を高くすることにより、分析時間が 12 分から 4 分に短縮されています (A)。リテンションタイムを正規化してクロマトグラムを重ね合わせると (B)、分離能はわずかに低下していますが、リテンションタイムは変わらないことがわかります。

SEC メソッドのトラブルシューティング

問題点	原因	解決策
回収率が予想よりも低い、またはピーク幅の広がり	親水性物質	少量 (10 ~ 20 %) の有機溶媒 (アセトニトリルまたはメタノール) を移動相に添加する。
分子量にそぐわないタイミングでピークが現れる、またはピークテールが生じる	イオン性相互作用または塩基性タンパク質	イオン強度 (塩濃度) を 50 ~ 100 mM 間隔で上昇させる。リン酸緩衝液を追加する。
ピーク形状が悪い	非特異的な吸着	塩濃度を高くするか、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを使用する。
分析対象成分の保持力/分離能が低い	分子サイズに適さないポアサイズ	ポアサイズを確認する。詳細については、170 ページを参照。

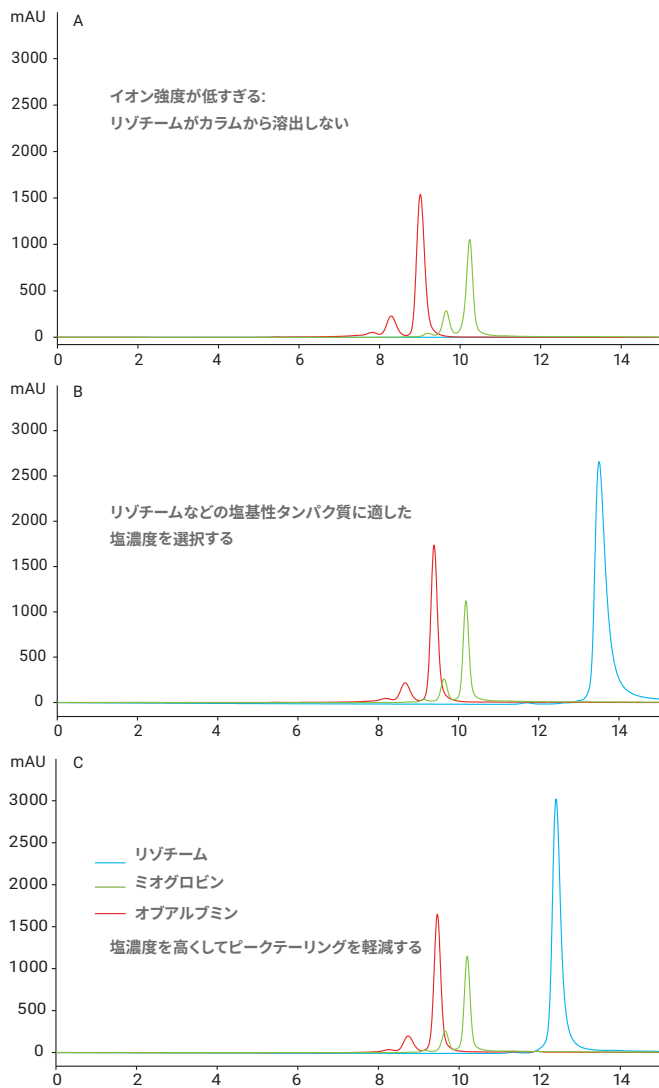
移動相の選択

二次的な相互作用から生じる問題

望ましくない二次的な相互作用を避けるために、メソッドの最適化が必要となることがあります。そうした相互作用が生じると、分析対象成分の溶出が予想よりも遅くなったり、実際よりも低い分子量が測定されたりする可能性があります。このような問題は、移動相の組成 (pH、イオン強度、有機溶媒) をわずかに調整すれば解決することができます (図 11)。また、望ましい分離を実現するためには、ポアサイズの見直し、複数のカラムの連結、分析流量の低下、温度の変更などが必要となることもあります。

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	Agilent Bio SEC-3 300 Å 4.6 mm x 300 mm, 3 μm (p/n 5190-2513)
サンプル:	タンパク質 (1 mg/mL 20 mM リン酸緩衝液、pH 7)
機器:	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
流量:	0.35 mL/min
検出器:	UV、220 nm A: 移動相 20 mM リン酸緩衝液、pH 7 + 50 mM NaCl B: 移動相 20 mM リン酸緩衝液、pH 7 + 100 mM NaCl C: 移動相 20 mM リン酸緩衝液、pH 7 + 400 mM NaCl
注入量:	5 μL



20 mM 緩衝液中で 50 mM NaCl



20 mM 緩衝液中で 400 mM NaCl

図 11: 目的とする分離に不適切なイオン強度の影響

キャリブレーション

カラムを選択したら、分子量のわかっている標準品を用いてキャリブレーションを行う必要があります。キャリブレーションは、カラムや移動相を変更するたびにやり直す必要があります。検量線は、分子量に対してリテンションタイムをプロットして作成します (図 12)。分析対象となる分子に適した標準品を選ぶことがきわめて重要です。タンパク質分離の場合、タンパク質分子量標準品を使用します。多糖分離については、ブルラン分子量標準品を使用する必要があります。

タンパク質	MW	保持ボリューム				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
チログロブリン	670,000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-グロブリン	158,000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67,000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
オパールブミン	45,000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
ミオグロビン	17,000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
リボヌクレアーゼ A	12,700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
ビタミン B12	1,350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
ウラシル	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

可能であれば、標準品は移動相に溶解してください。また、サンプルが完全に溶解するように注意を払う必要があります。溶液が濁っているように見える場合は、さらなる措置が必要です。注入前に、遠心分離やろ過により不溶物を除去してください。ただし、物理プロセスにより分子量組成が変化する可能性があるため、サンプルの溶解性を向上させる別の移動相条件を検討する必要がある場合もあります。

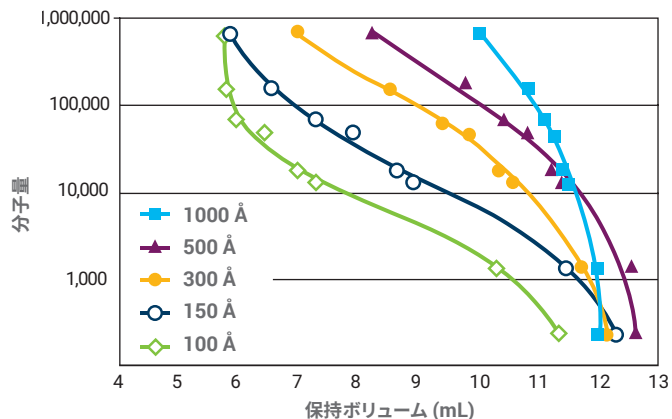
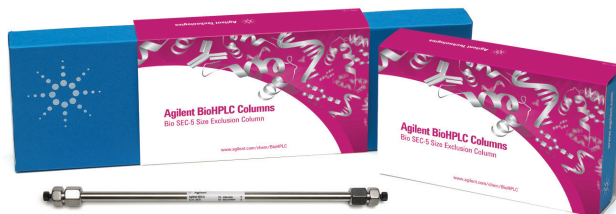


図 12: 分子量に対してリテンションタイムをプロットして得られた検量線

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	Agilent Bio SEC-5 7.8 x 300 mm, 5 μm (p/n 5190-2521)
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
流量:	1.0 mL/min
検出器:	UV



高度な検出テクニック

そのほかの SEC に関する考慮事項としては、検出器の選択があります。タンパク質の分離には、UV またはダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いるのが一般的です。ペプチドおよびタンパク質の場合、最善の結果 (最高の感度) は通常、220 nm で得られます。ただし、一部の緩衝液や有機溶媒については、低波長ではバックグラウンド吸光度が高くなる場合があります。その場合には、254 nm または 280 nm の波長が必要となるケースもあります。UV 検出の難点は、一部の分子が発色団を持たないことです。ただし、分析対象成分はアイソクラティック方式で溶出するため、代わりに RI 検出器を使用することができます。高度な光散乱検出を追加すれば、SEC の性能が大幅に向上します。静的光散乱では、カラムのキャリブレーションや不要な相互作用に左右されずに、精密な分子量を測定することができます。分子サイズを測定する動的光散乱により、それをさらに補完することが可能です。光散乱では、大きい分子に対する感度が向上するため、非常に低濃度の凝集体を検出することもできます (図 13)。クロマトグラフィー性能を低下させることなくこのような追加情報を得るには、デッドボリュームの小さい検出器を選ぶことが重要です。

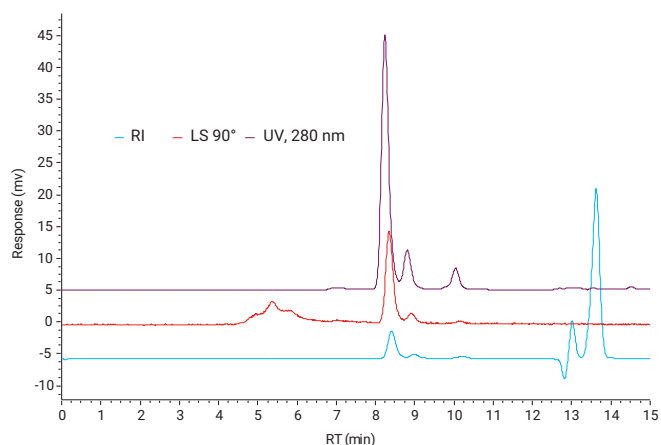


図 13: タンパク質分離において各種の検出器を用いた分析結果

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	Agilent AdvanceBio 300 Å, 7.8 x 300 mm, 2.7 μm
サンプル:	モノクローナル抗体分解物
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートオータナリ LC システムと Agilent 1260 Infinity マルチ検出器 GPC/SEC
移動相:	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
流量:	0.8 mL/min
温度:	30 °C
検出器:	UV, 280 nm + RI + LS 90 °
注入量:	5 μL

複合タンパク質

治療用タンパク質は、発現、リフォールディング、ダウンストリーム処理、調合、滅菌、保管など、開発のあらゆる段階で凝集したり分解したりする可能性があります。凝集体/分解物は非常に低濃度ですが、バイオ医薬品の品質への影響は大きく、効能の損失、溶解性の低下、および免疫原性の増加につながる可能性があります。サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質凝集体の特性解析の標準メソッドとして使用されており、規制機関への届け出や承認も必要となります。

該当部位への送達量を増加させ、半減期を延ばし、効能を高めるために、モノクローナル抗体などのタンパク質を複合化することができます。ポリエチレングリコールなどの水溶性ポリマーをタンパク質と結合させると、薬理活性が高まり、血流中での半減期が延び、免疫原性が減少します。近年、薬物送達の標的化と治療効果の向上のためにモノクローナル抗体と細胞毒性剤を複合化した抗体薬物複合体 (ADC) への関心が高まっています。複合化後も、バイオ医薬品と同じ凝集調査が必要になりますが、サンプルの特性が変化するため、SEC による分離が困難になる可能性があります。水系移動相を用いて抗体と ADC の両方を分析するには、AdvanceBio SEC のように非特異的な結合がほとんど生じないカラムが必要です。図 14 を参照してください。

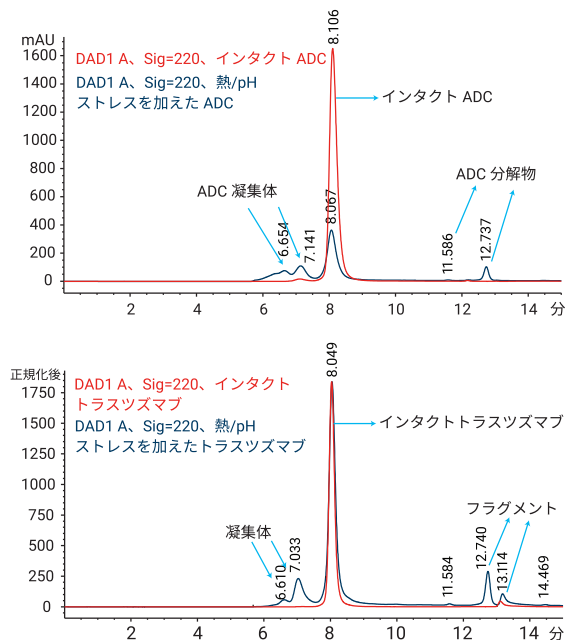


図 14: 同じ水系移動相を用いて mAb とより疎水性の高い ADC を分析した結果

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	AdvanceBio SEC 300 Å 7.8 x 300 mm, 2.7 µm
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	PBS, 150 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム, pH 7.4
カラム温度:	室温
注入量:	10 µL
流量:	0.8 mL/min
検出器:	UV, 220 nm

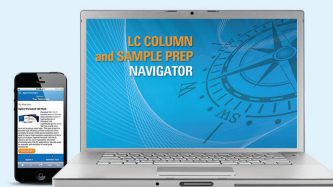
優れた結果を導き出すためのツール

www.agilent.com/chem/navigator

アジレントの LC カラムおよびサンプル前処理ナビゲータでは、アジレントの幅広いバイオカラムや低分子用カラムから、アプリケーションに最適なカラムを簡単にお選びいただけます。

このナビゲータでは、次の 4 つの条件から検索が可能です。

- 部品番号で: LC カラムおよびサンプル前処理製品のクロスリファレンスにより、最適なアジレント交換用部品が見つかります。



- 化合物で: ドロップダウンリストから選択します。
- USP メソッドで
- カラムで: メソッドにもとづいておすすめのカラムを提示します。

サンプル前処理

- できる限り、サンプルは移動相に溶解させてください
- サンプルが濁っている場合は、移動相の条件を変更する必要があります
- ろ過や遠心分離によりサンプルの濁りを解消することができますが、このプロセスによってサンプルの分子量組成が変化することがあります
- サンプルを溶解させるために、緩やかな加熱、攪拌、超音波処理などを使用することもあります。分子量組成が変化する可能性があるため注意が必要です
- 保管中にサンプルが変化しないように注意してください
- サンプルは用時調製し、できる限りすぐに分析してください
- 緩衝液中で細菌が急速に繁殖することがあります
- 高濃度で調製したサンプルは、経時的に変化し、凝集や沈殿が生じることがあります

カラムの選択

- サンプルの完全性を確保するために、SEC は長いカラムを用いてゆっくりと実施します
- カラムの長さは、通常 250 または 300 mm です
- 標準的な流量は、内径 7.5 または 7.8 mm カラムの場合は 1.0 mL/min、内径 4.6 mm カラムの場合は 0.35 mL/min です
- 生体高分子アプリケーションでは、分離能を高めるために、しばしば複数のカラムを連結して使用します
- 小さい粒子径を使用すれば、タンパク質アプリケーションの分離能が高まります
- 粒子径の小さい 150 nm カラムで分離すると、分析時間を短縮できます

カラムメディアの選択

- 分析対象成分との間で非特異的な相互作用が起きないカラムメディアを選択する必要があります
- ペプチドおよびタンパク質の分析には、シリカベースの充填材を使用します
- 多糖類など、分子量分布の広いサンプルの分析には、ポリマーベースの充填材を使用します

カラムのパラメータ

- ポアサイズ - サンプルの分子量範囲に応じて決定します。サンプル成分が排除されるものは避け、必要な分離領域で最大限のボリュームが得られるものを選択します
- 粒子径 - 粒子径が小さいほど分離能が高まります (ただし、背圧も高くなります)
- カラムの長さ - 分離能と分析時間を考慮し、両者の間の妥協点を探ります
- カラム内径 - カラムの内径が小さいほど、溶媒消費量と注入量が少なくなります



移動相

- イオン性の相互作用を防ぐために、移動相に緩衝液/塩を加える必要がありますが、多く加えすぎると、疎水性相互作用が生じる可能性があります
- 分解/凝集などを避けるために、分析対象成分を変化させないようにしてください
- 移動相は用時調製し、すぐに使用してください。低濃度の緩衝液を室温で保管すると、細菌が急速に繁殖します
- 緩衝液の消費期限は、非冷凍状態で7日未満です
- 使用前にろ過し、水(可能性低)や緩衝液塩(可能性高)中の微粒子を除去してください
- シリカカラムで高 pH のリン酸緩衝液(特に高温の場合)を使用すると、カラム寿命が大幅に短くなることがあります

アジレントの SEC 用バイオカラムの詳細については、

www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



Agilent AdvanceBio SEC カラムによる インスリンのバイオシミラーおよび 先発薬のサイズ排除クロマトグラフィー

アプリケーションノート

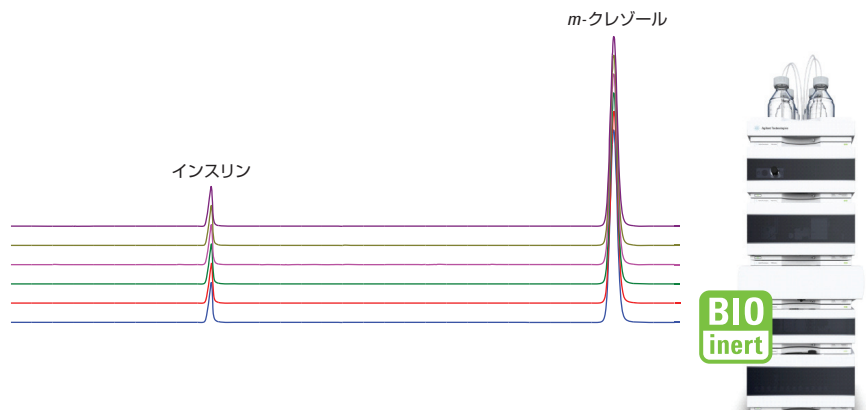
バイオ医薬品

著者

M. Sundaram Palaniswamy and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

インスリンは血糖の恒常性を調節する小さいポリペプチドホルモンです。製薬会社は、遺伝子工学的手法を用いて、作用が長時間持続する多様なインスリン類似体を開発してきました。ところが、薬局方では、このようなインスリン類似体の分析に利用できるメソッドが定められていません。そこで、欧州薬局方 (EP) のドラフトメソッドに従い、インスリン類似体の先発薬とバイオシミラーを同定するためのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) メソッドを、Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムを用いて開発しました。ルーチン分析におけるこのメソッドの有効性を、参照物質としてインスリン先発薬を使用したシステム適合性試験とリテンションタイム (RT) およびピーク面積の精度の評価により確認しました。このアプリケーションノートでは、メソッドの定量性能を評価するために、このカラムを用いてインスリンより分子量の大きい不純物を検出した結果も示します。



Agilent Technologies

はじめに

最新のインスリン類似体はヒトインスリン製剤の代替薬であり、ヒトインスリンと同等、またはそれ以上の有効性転帰を持つことが臨床試験によって確認されています。インスリン類似体は、2000年4月にアメリカ食品医薬品局 (USFDA) に承認され、作用が長時間持続する基礎ヒトインスリンとして市販されています。低分子製剤とは異なり、生物製剤は、生物学的プロセスにより製造されます。各製薬会社は、社内で開発されたプロセスに従って原薬および医薬品を製造していますが、その過程で、凝集体や分解生成物など、原薬由来の不純物が生じることがあります。抗糖尿病薬の需要の高まりを背景に、現代の製薬会社は、不純物のない医薬品を製造し、副作用のない安全な治療薬を提供するという、困難でありながらきわめて重要な役割を担っています。生物製剤業界では、原薬出荷試験や特性解析のための汎用ツールとして、LCとUV検出が使用されています¹。SECは、医薬品の純度および凝集体の分析に最適な分析法です。このアプリケーションノートでは、SECとUVを組み合わせたメソッドを用いて、インスリンバイオシミラーと先発薬 (参照物質) の分子類似性を測定し、システム適合性およびメソッドの精度を評価した結果を紹介します²。これらの調査から、このメソッドにより、許容可能な真度と精度の結果が得られることを確認できました。評価では、重要なクロマトグラフィーパラメータを基準として用い、メソッドの評価実験から得られた各パラメータの変動が許容限度内にあるかどうかにもとづいて判断しました。濃度範囲 10.6 ~ 3,400 µg/mL のインスリンの検量線では、良好な相関係数が得られました。これは、このメソッドによる定量が可能であることを示します。また、強制的なストレス負荷試験において、Agilent AdvanceBio SEC カラムにより、製剤より分子質量の大きい不純物をモニタリングおよび分離した結果も示します。

実験方法

機器

分析には、完全なイナート仕様の、最大圧力 600 bar の Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを使用しました。このシステムは、次のコンポーネントで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート高性能オートサンブラ (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント、バイオイナートクリックイン加熱エレメントを搭載 (G1316C、オプション 19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL (G1315D、バイオイナート標準フローセル (光路長 10 mm) を搭載)
- Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm (p/n PL1180-5350)

ソフトウェア

Agilent ChemStation B.04.03 (またはそれ以上)

SEC パラメータ

表 1 に、Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムで用いた SEC のクロマトグラフィーパラメータを示します。

試薬とサンプル

市販のインスリンの先発薬とバイオシミラーを地域の薬局で購入し、製造元の指示に従って保管しました。酢酸およびアンモニアは、Sigma-Aldrich 社から購入しました。すべての試薬および溶媒は、HPLC グレードのものを使用しました。また、Milli Q 純水装置 (Millipore Elix 10 モデル、米国) で製造した超純水を使用しました。

手順

移動相 10 µL をブランクとして注入後、各濃度の標準溶液を 3 回ずつ注入しました。各濃度のピーク面積とリテンションタイム (RT) をもとに、標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD %) の値を計算しました。低濃度の標準溶液の測定結果から、検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) を確立しました。各濃度の標準溶液で得られた平均ピーク面積をインスリンの濃度に対してプロットし、単量体の検量線を作成しました。

表1. SEC HPLC で使用したクロマトグラフィーパラメータ

パラメータ	条件
移動相	無水酢酸 200 mL、アセトニトリル 300 mL、および水 400 mL の混合液を濃アンモニアで pH 3.0 に調整し、水で 1,000.0 mL に希釈
カラム温度	室温
注入量	10 µL
流量	0.5 mL/min
UV 検出	276 nm

直線性と範囲

検量線の作成には、濃度範囲 10.6 ~ 3,400 $\mu\text{g/mL}$ の 9 種類のインスリン先発薬標準溶液を使用しました。

LOQ と LOD

S/N 比が 3 を超えたインスリン濃度を LOD とし、S/N 比が 10 を超えた濃度を LOQ としました。

インスリン凝集体の調製

インスリンの凝集体は、約 3.4 mg/mL の製剤をポリプロピレン製試験管に入れ、60 °C で 6 時間インキュベーションして調製しました。その後、サンプルを室温まで冷却し、すぐに分析しました。

システム適合性

ドラフトモノグラフで規定されているシステム適合性要件は次のとおりです。

- **シンメトリ係数:** インスリン類似体のピークについて 2.0 以下
- **p/v:** 2 以上
- **インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量:** インスリンのピークより RT の長いピークを除いたピーク総面積の 0.3 % 以下

結果と考察

分離と検出

インスリンバイオシミラーを、参照標準として先発薬を用いて比較しました。最適化された SEC HPLC メソッドにより、インタクトインスリンのバイオシミラーおよび先発薬を AdvanceBio

SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムできわめて明確に分離することができました。凝集体の兆候のない均一なプロファイルが、合計分析時間 55 分以内に得られました。約 49 分で溶出した保存剤の *m*-クレゾールのピークも観察されました (図 1)。

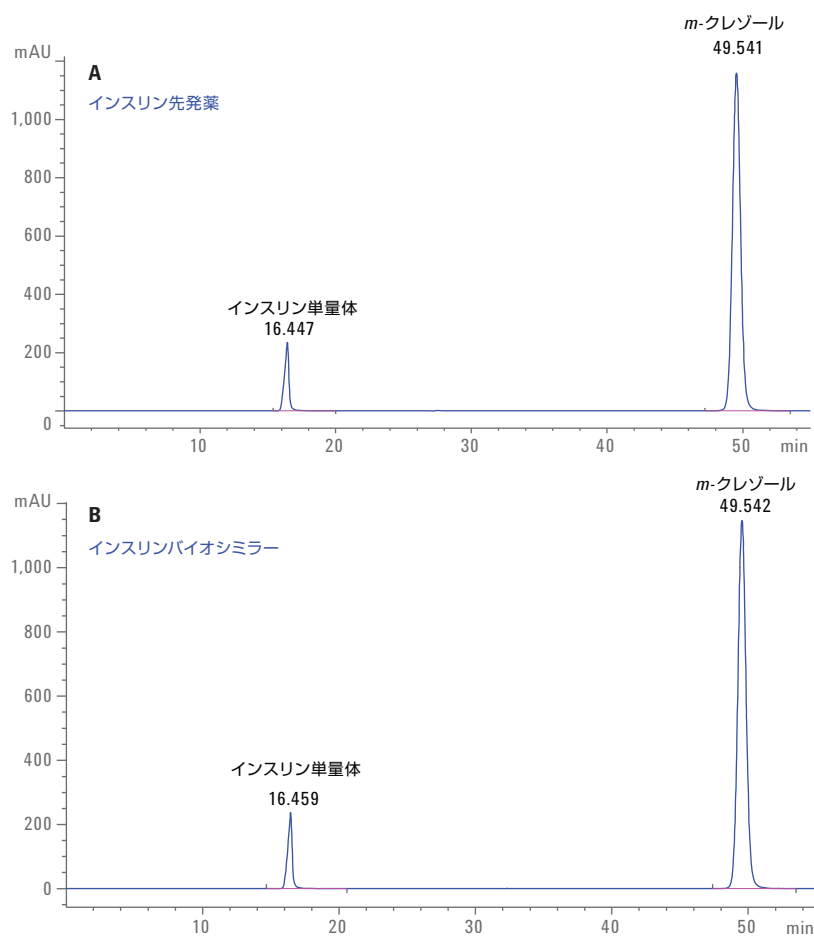


図 1. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムによるインスリンの先発薬およびバイオシミラーの SEC HPLC プロファイル

リテンションタイムとピーク面積の精度

図2は、インスリンの先発薬とバイオシミラーを6回繰り返し分析した結果を重ね合わせたものです。この図から、優れた分離再現性が得られていることがわかります。表2に、6回の繰り返し分析により得られたインスリン単量体のRTおよびピーク面積の平均値とRSDを示します。インスリン単量体のRTとピーク面積のRSDは、それぞれの許容限度 $\pm 3\%$ および $\pm 5\%$ に収まっていた。これは、この分析メソッドの再現性と精度がきわめて優れていることを示します。

システム適合性

表3に、インスリン類似体のシステム適合性試験の許容基準を示します。また、表4に、インスリンの先発薬およびバイオシミラーのシステム適合性試験の結果をまとめます。

これらの結果から、Agilent バイオイナート LC および AdvanceBio SEC カラムを用いたメソッドが、インスリンの QA/QC 分析に求められる厳しい性能要件を満たしていることがわかります。

LOD と LOQ

インスリン先発薬の LOD および LOQ の調査から、それぞれの値が $11.3 \mu\text{g/mL}$ と $28 \mu\text{g/mL}$ であることがわかりました。これは、このメソッドが高感度であることを示しています。測定により求めたインスリン先発薬の LOD と LOQ の値を表5に示します。

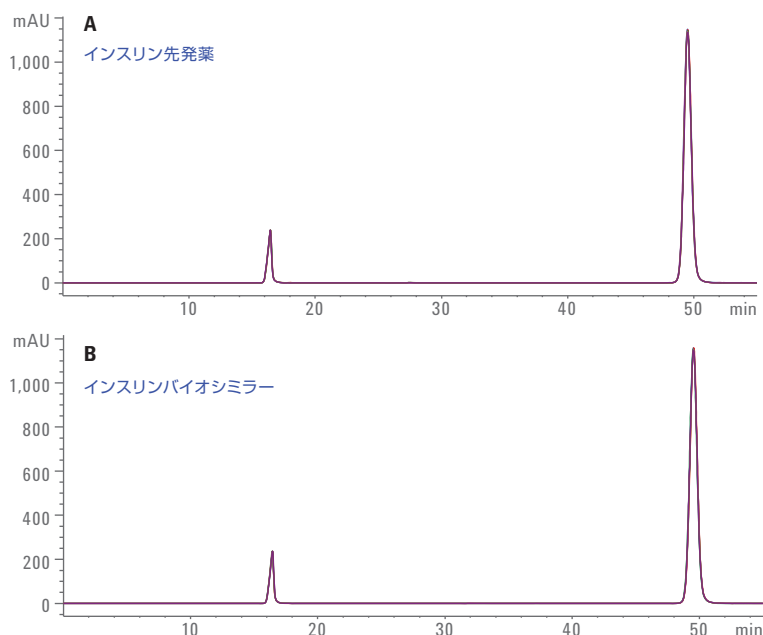


図2. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムを用いたインスリンの先発薬およびバイオシミラーの6回の繰り返し分析により得られたクロマトグラムの重ね表示

表2. RTとピーク面積の精度 (n = 6)

サンプル	RT		ピーク面積	
	平均 (分)	RSD	平均 (mAU/分)	RSD
インスリン先発薬	16.450	0.057	5,544.91	0.285
インスリンバイオシミラー	16.460	0.044	5,459.55	0.662

表3. 許容基準

パラメータ	限度
シンメトリ係数	インスリン類似体のピークについて 2.0 以下
p/v	2 以上
インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量	ピーク総面積の 0.3 % 以下

表4. システム適合性試験結果のまとめ

サンプル	Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムによる結果			合否 (合格/ 不合格)
	シンメトリ係数	p/v	インスリン類似体より RT の短い全不純物の総量	
インスリン先発薬	1.71	-	0.167	合格
インスリン バイオシミラー	1.72	-	0	合格

表5. インスリン先発薬の LOD、LOQ、S/N 比の結果 (n = 3)

濃度 (mg/mL)	S/N 比	平均面積
10.6 (LOD)	11.9	12.8
31.8 (LOQ)	34.7	37.4

直線性

L00 濃度からラベル表示濃度 (3.4 mg/mL) までの標準溶液を用い、各インスリン濃度に対して面積レスポンスをプロットし、インスリン先発薬の検量線を作成しました。図 3 に、濃度範囲 10.6 ~ 3,400 µg/mL のインスリンの検量線を示します。この検量線の R² 値は 0.99 を超えていました。これは、インスリンのピーク面積と濃度の間に、良好な投与量依存的相関性があることを示唆しています。

凝集体/分解物の分析と定量

生物製剤の不純物プロファイルは、製剤の安全性を確保するうえでますます重要になっています。凝集体は、ごく低濃度であっても、製剤の品質に大きな影響を与える可能性があるからです。AdvanceBio SEC カラムは、生体分子との相互作用を最小限に抑えるよう設計されているため、インスリン凝集体を明確にベースライン分離することが可能です。図 4 に示すように、これらのインスリン凝集体は、AdvanceBio SEC カラムからそれぞれ 11.181 分と 13.884 分で溶出しています。

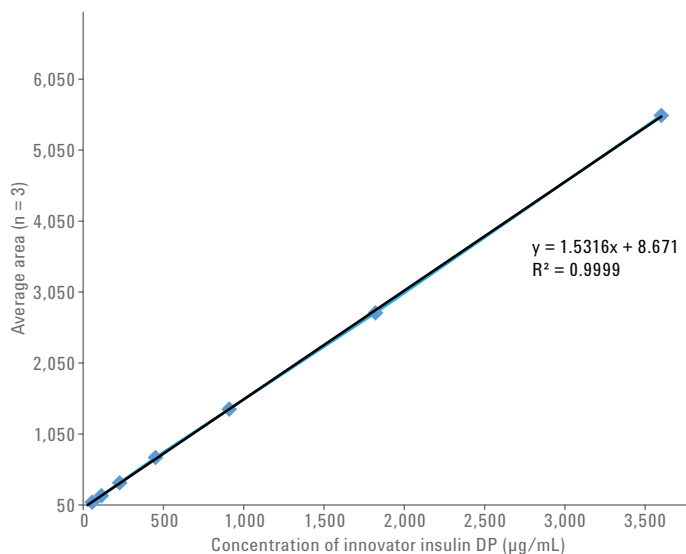


図 3. 濃度範囲 10.6 ~ 3,400 µg/mL のインスリン標準液を用いて作成した検量線。優れた相関性が得られています。

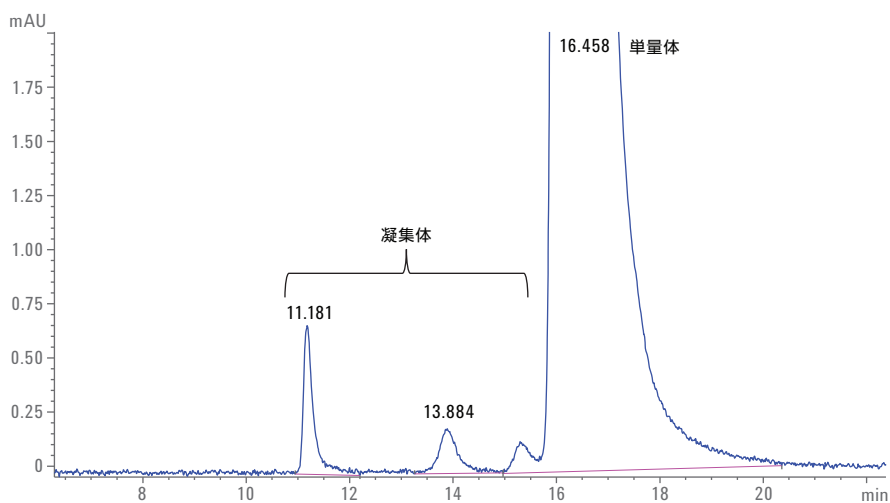


図 4. 熱ストレスを加えたインスリンの Agilent AdvanceBio SEC プロファイル。インスリン類似体がベースライン分離しています。

カラムの経済的価値と寿命の評価

特に AdvanceBio SEC カラムと他の種類のカラムを比較する際に、ラボ責任者やグループリーダーが主に重視するのはコストでしょう。SEC 分離では、人件費や機器の費用を除けば、カラム自体が最も高価なコンポーネントだからです。カラムの寿命が十分でなかったり、カラム間の再現性に問題がある場合、複数のカラムのスクリーニングが必要になる可能性があります。バッチ間の再現性を確保するためには、生産プロセス全体を厳密にコントロールすることが不可欠です。図 5 は、4 つのバッチの AdvanceBio SEC 130 Å カラムで AdvanceBio 130 Å タンパク質マーカを分離した結果です。アジレントでは、このような試験により、生産プロセス全体が厳密にコントロールされています。

また、お客様が開発プロセスの最初から最後まで利用できる長いカラム寿命を確保することもアジレントの目標の 1 つです。カラム寿命が長くなれば、ダウンタイムが大幅に削減され、さらに多くの利点をもたらされます。図 6 は、3 mg/mL のインスリン原薬を 50 回ずつ、合計 250 回注入して得られた 6 個のクロマトグラムを重ね合わせたものです。また、表 6 に、特定の分析で得られた RT、ピーク面積、テーリングファクター、および理論段数を示します。

この結果から、250 回の注入に渡って RT、ピーク面積、およびテーリングファクターに実質的な変化がないことは明らかです。カラムの効率の指標となる理論段数についても、顕著な変化はありません。

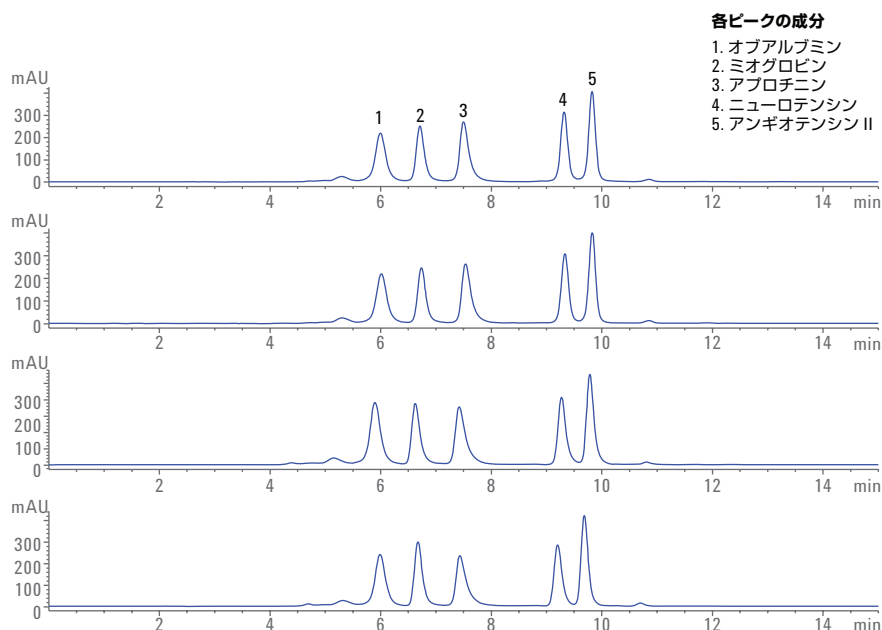


図 5. 4 つのバッチの Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムによる Agilent AdvanceBio 130 Å タンパク質標準の分離

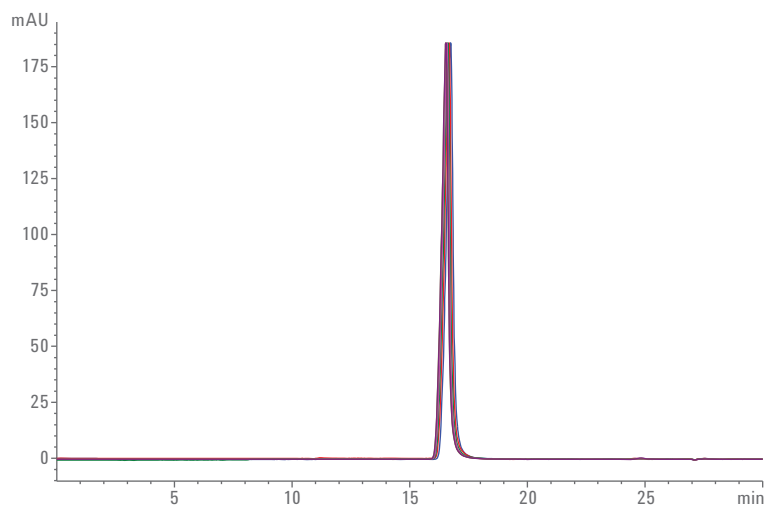


図 6. インスリン原薬を 50 回ずつ、合計 250 回注入して得られた 6 個のクロマトグラムの重ね表示

結論

サイズ排除クロマトグラフィーは、バイオ医薬品の凝集体および単量体の検出とモニタリングにおいて大きな役割を果たします。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC 130 Å カラムがインスリン類似体の試験に最適であることを実証しました。ここでは、薬局方のドラフトメソッドに従い、インスリン製剤のバイオシミラーと先発薬の分子類似性を明らかにするシンプルな UV ベースのメソッドを、AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムを用いて開発しました。このメソッドにより、きわめて優れた RT およびピーク面積の精度が得られ、その結果はシステム適合性要件に適合していました。8 種類の濃度のインスリン製剤標準溶液をもとに各濃度に対してピーク面積をプロットした検量線は、直線の相関性を表すとともに、卓越した直線性も示しました。また、測定により得られた LOD および LOQ は、それぞれ 10.6 μg/mL と 31.8 μg/mL でした。これは、メソッドの感度の高さを表しています。さらに、強制的なストレス負荷試験では、AdvanceBio SEC カラムにより、凝集体を分離およびモニタリングすることができました。AdvanceBio SEC カラムは製造上のロット間のばらつきが低減し、カラム寿命も長く、このカラムを使用して分析することで、再現性と堅牢性に優れた結果が得られるなど、多くの経済的利点をもたらされることも示しました。今回の調査で用いたシンプルで再現性の高いメソッドと、バイオ不活性で耐腐食性の機器を組み合わせることで、バイオ医薬品の開発プロセスに渡るインスリンの日常的な品質検査に適した、信頼性の高いソリューションを実現できるものと考えられます。

表6. インスリン原薬の 250 回の注入により得られた RT、ピーク面積、テーリングファクター、および理論段数

注入回数	RT (分)	ピーク面積	テーリングファクター	理論段数
1	16.657	3944	0.899	16,001
50	16.671	3966	0.890	15,849
100	16.681	3968	0.898	15,982
150	16.622	3942	0.893	15,942
200	16.634	3953	0.895	15,919
250	16.634	3963	0.890	15,944

参考文献

1. Kannan V; Narayanaswamy P; Gadamsetty D; Hazra P; Khedkar A; Iyer, H. A tandem mass spectrometric approach to the identification of O-glycosylated glargine glycoforms in active pharmaceutical ingredient expressed in *Pichia pastoris*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23(7), 1035-42.
2. Pharmeuropa, Vol. 23, No. 2, April **2011**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 1, 2016

5991-6872JAJP



Agilent Technologies



タンパク質凝集体の評価方法を最適化し 実行するための包括的なワークフロー

サイズ排除クロマトグラフィーと光散乱検出を組み合わせた
メソッド開発

アプリケーションノート

生物医薬品・バイオシミラー

著者

Andy Coffey and Matthew Rain
Agilent Technologies, Inc

概要

このアプリケーションノートでは、包括的な凝集体分析のワークフローについて次の点を解説します。

- モノクローナル抗体の高性能なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) における移動相条件の最適化
- 単量体、二量体、より高次の凝集体を含む凝集プロファイルの特性分析

今回の調査では、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用して、1260 Infinity II バイオイナート LC システムのバイオイナートクォータリポンプの機能をフル活用し、一連の高速 LC 分析中にリアルタイムでさまざまな緩衝液の組成を自動的に調製し、複雑な SEC の最適化実験を自動化しました。Agilent 1260 Infinity Bio-MDS マルチ検出器スイートはダイナミック光散乱検出機能を備え、高次のタンパク質凝集体を突き止め、分子量の絶対値を測定し、UV 検出システムによる定量測定を向上させます。



Agilent Technologies

はじめに

モノクローナル抗体 (mAbs) およびタンパク質の中には溶液中で自然に凝集するものがあります^{1,2}。多くのバイオ医薬品アプリケーションでは、凝集の程度をさまざまな条件下で高い精度で定性し定量する必要があります。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、タンパク質凝集体の特性分析および定量のための優れた手法ですが、正確に測定するには天然のタンパク質構造に対応する条件下での優れたクロマトグラフィーが必要です。特定のタンパク質の分離ピークの形状を改善し分離能を高めるために、さまざまな移動相の条件を評価することが多くの場合に必要となります。

緩衝液の条件の最適化の有用性は SEC 手法で見落とされることがあります。従来より、緩衝液の条件を最適化して固定相の材質との望ましくない非特異的相互作用を克服していましたが、カラムに適した条件でないと、測定対象とする凝集体そのものを攪乱するリスクを招くことがあります。しかし、Agilent AdvanceBio SEC カラムの不活性表面コーティングは、さまざまな緩衝液条件の二次的反応を抑制し、タンパク質の構造およびクロマトグラフィー分離能が得られるように緩衝液の化学的性質を最適化する優れた柔軟性を提供します。凝集分析のための SEC 緩衝液条件をルーチンで最適化するうえでのもう一つの障害に、パラメータスカウティング実験の多大な複雑さがあります。最適化実験では移動相の可能性に関して複雑な表の設計が必要となり、多数の異なる溶液を手作業で作成し、塩、緩衝液、pH の変化の組み合わせについて実験して評価しなければなりません。しかし、最先端のツールにより、SEC 条件を最適化するためのワークフローを大幅に合理化して、凝集体の特性分析および定量分析を実行し、日常的に使用できる最適化された手法を開発することができました。

このアプリケーションノートでは、凝集体の調査における完全なワークフローソリューションの有用性を次の点について説明します。

- Agilent Buffer Advisor ソフトウェアと高分解能バイオイナートクォータリ LC ポンプを用いた、4 種類のシンプルな原液からの指定したリストの LC 緩衝液の自動混合と pH および緩衝液濃度のリアルタイム調整
- ダイナミック光散乱検出による高次タンパク質凝集体の測定、広い質量範囲にわたり感度を高めるための UV 検出での補完
- 光散乱検出による、凝集されたタンパク質および単量体のタンパク質の分子量と流体力学半径の絶対値の特性分析

今回の分析では、Agilent AdvanceBio SEC 15 cm カラムを使用して高速スクリーニングのための高速分離を実現しました。AdvanceBio SEC カラムには、より長いものやより短いものなどさまざまな長さのカラムが用意されているため、追加の分離能が必要な場合には、30 cm のカラム、あるいは複数のカラムを組み合わせる使用する場合にも容易にメソッドを適用できることが重要です。今回の調査で使用したモノクローナル抗体サンプルには、市販のリツキシマブおよびリツキシマブバイオシミラーが含まれています。

実験方法

試薬、サンプル、材料

一塩基性および二塩基性のリン酸水素ナトリウムと塩化ナトリウムは VWR から購入しました。化学物質および溶媒はすべて 99.7 % 以上の純度のものを使用しました。18 M Ω 未満の水は、Milli-Q A10 純水生成装置 (Millipore、米国) で生成しました。溶液は毎日調整し、使用前に 0.22 μ m メンブランフィルタでろ過しました。

機器

凝集体分析には、次のモジュールで構成される Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートクォータリポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ、サンプル冷却器およびマルチウォッシュ搭載 (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット、バイオイナート熱交換器搭載 (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR、バイオイナート標準フローセル搭載 (G7115A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-SEC マルチ検出器システム (G7805AA)
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 150 mm、2.7 μ m カラム (p/n PL1180-3301) または
- Agilent AdvanceBio SEC、2.7 μ m 300Å 7.8 × 300 mm カラム (p/n PL1180-5301)

機器条件

パラメータ	値
移動相	表 1 参照
流量	0.8 mL/min
温度	25 °C
注入量	1 ~ 25 μ L (サンプル濃度に依存)
検出	220 nm、280 nm、LS 90°、DLS
サンプル	リツキシマブ先発薬、 リツキシマブバイオシミラー、BSA

結果と考察

各サンプル混合物についての最適な移動相の組成を特定するために、4つのpHレベルの3種類の移動相、つまり12の実験条件のマトリックスを作成し評価しました。緩衝液の組成は次のとおりです。

- 150 mM リン酸ナトリウム
- 10 mM リン酸ナトリウム + 140 mM NaCl (さまざまなpH値でのPBSのエミュレーション)
- 100 mM リン酸ナトリウム + 150 mM NaCl

各移動相を、pH 6.2、6.6、7.0、7.4 でテストしました。

各実験を行うために、Agilent Buffer Advisor で各処理についての緩衝液の組成とpHを指定しました。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアにより、A～D原液の適切な混合物を自動計算し、LCパラメータスカウティング分析中に望ましい移動相をリアルタイムで調製しました。表1に12の実験条件を示します。

これらの条件を使用してリツキシマブの市販のサンプル、リツキシマブバイオシミラーのサンプル、市販のBSAタンパク質標準混合物(機器キャリブレーション用の10 mg/mL溶液)を分析しました。

Agilent AdvanceBio SEC 300Å 150 × 7.8 mm カラムを使用することによって、1サンプルあたり10分以内でスクリーニングできました。

表1. 実験の条件と対応する移動相の組成

実験方法	ユーザーが指定したパラメータ			ソフトウェアが計算したパラメータ				
	pH	緩衝液 (mM)	NaCl (mM)	合計濃度 (mM)	% A	% B	% C	% D
1	6.2	150	0	150	25.0	0.0	57.0	18.0
2	6.6	150	0	150	25.0	0.0	42.3	32.7
3	7.0	150	0	150	25.0	0.0	26.3	48.7
4	7.4	150	0	150	25.0	0.0	13.8	61.2
5	7.4	10	140	150	67.0	28.0	0.9	4.1
6	7.0	10	140	150	67.0	28.0	1.8	3.2
7	6.6	10	140	150	67.0	28.0	2.9	2.1
8	6.2	10	140	150	67.0	28.0	3.9	1.1
9	6.2	100	150	250	20.0	30.0	36.3	13.7
10	6.6	100	150	250	20.0	30.0	26.1	23.9
11	7.0	100	150	250	20.0	30.0	15.6	34.4
12	7.4	100	150	250	20.0	30.0	7.8	42.2

A = 水
 B = 500 mM NaCl
 C = 200 mM NaH₂PO₄
 D = 200 mM Na₂HPO₄

図1と図2に示すように、クロマトグラフィーデータの最初のレビューから、実験中の移動相の条件がリツキシマブ先発薬とリツキシマブバイオシミラーのピークの形状に影響を与えることが明らかになりました。2種類の分子は似たプロファイルを示し、10 mM リン酸ナトリウムと140 mM NaClの移動相組成では同様の異常な挙動を示しています。この移動相の組成は、ピーク高が低くなるとピークテールリングが著しく増大しました。このタイプの挙動は他のタンパク質でも観察され、メソッド開発とメソッド堅牢性の両方を実現するために移動相組成の影響を注意して評価する必要性を示しています。

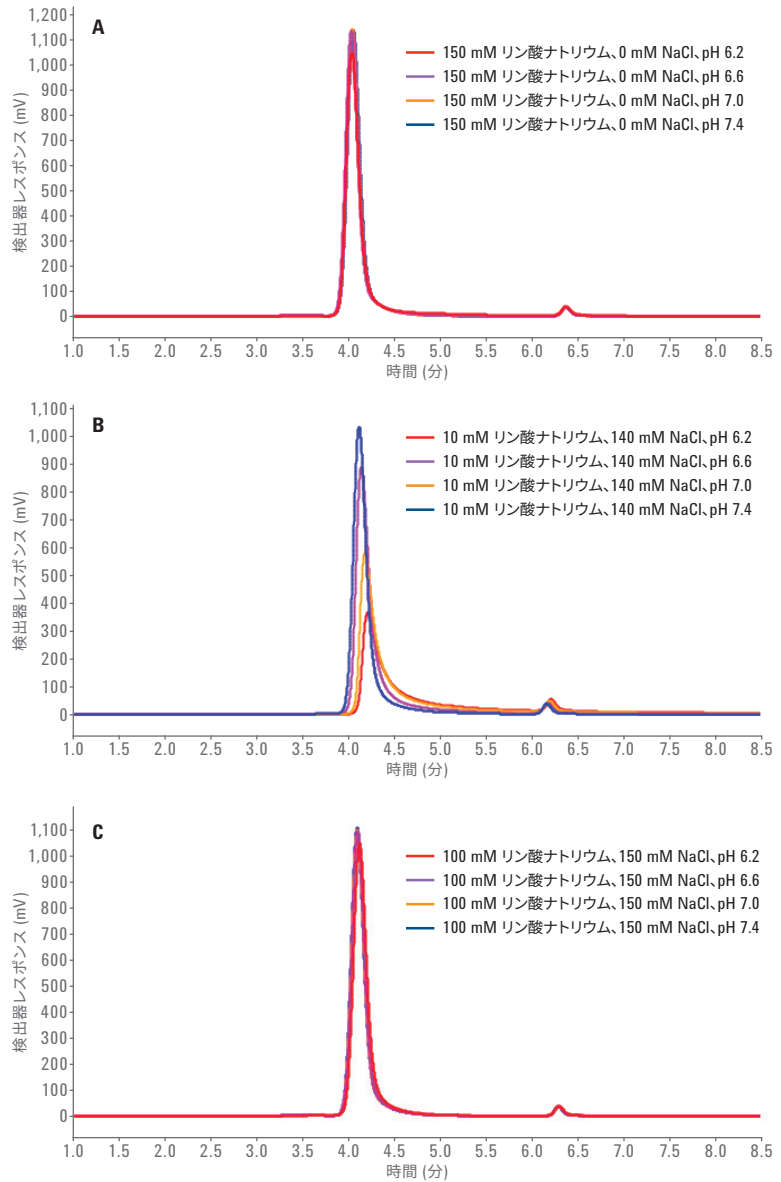


図1. 12種類の異なる移動相条件で連続して、リツキシマブ先発品 (1 µL 注入) を分析 (表1の実験1～12を参照)。

凝集体の含有量の定量には、UV 検出器を使用する必要があります。単量体のピークと凝集体のピーク (検出された場所) を積分して、ピーク面積の凝集体のパーセント率を求めることができます。リツキシマブ先発薬の結果を図 3A に、リツキシマブバイオシミラーの結果を図 3B に示しています。150 mM リン酸ナトリウムまたは 100 mM リン酸ナトリウムと 150 mM NaCl を用い pH 7.0 で、最も一貫性のある結果が得られました (実験 3 と 11)。

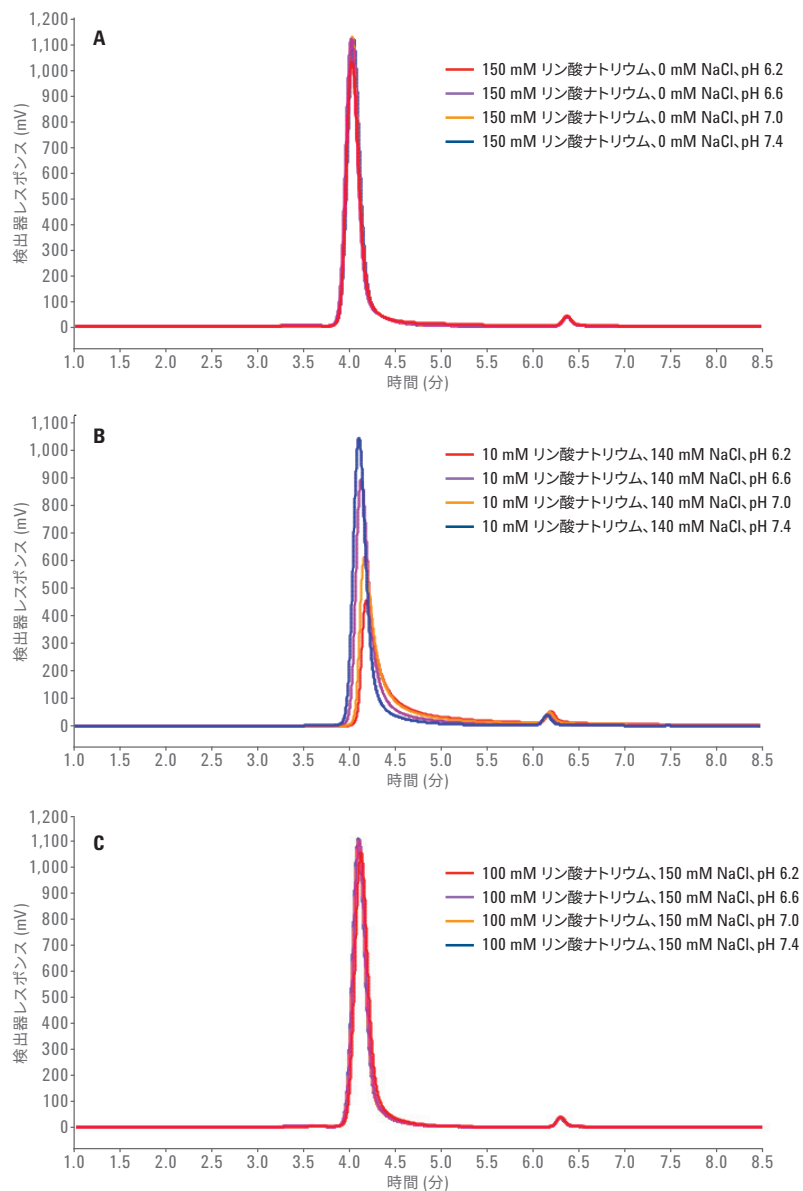


図 2.12 種類の異なる移動相条件で連続して、リツキシマブバイオシミラー (1 μ l 注入) を分析 (表 1 の実験 1 ~ 12 を参照)。

図4は、組成が異なる3種類の緩衝液でpH 7.0で得られるクロマトグラムです。この分子の分析に移動相として10 mM リン酸ナトリウムと140 mM NaClを使用した場合には、凝集体(矢印部分)が検出されなかったことを明確に示しています。

オプションで光散乱検出器を凝集体分析ワークフローに追加すると、タンパク質凝集体についてより有益な情報が明らかになります。このBSAの場合、明確に定義された分子を1回注入してシンプルな機器キャリブレーションを実行した後、検出器間の遅延と機器定数を迅速に求めることができます。Agilent Bio-SECソフトウェアを用いると、同じ条件のカラムと流量で得られた個別の任意クロマトグラムから個々のピークについて分子量情報のレポートを作成できます。

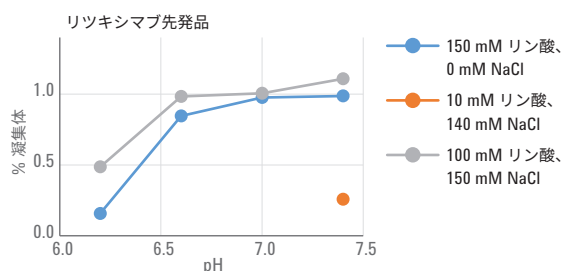


図 3A. リツキシマブ先発薬の凝集体含有量のピーク面積のパーセント率 (表 1 の実験 1 ~ 12 を参照)。凝集体が検出された実験のポイントが示されています。

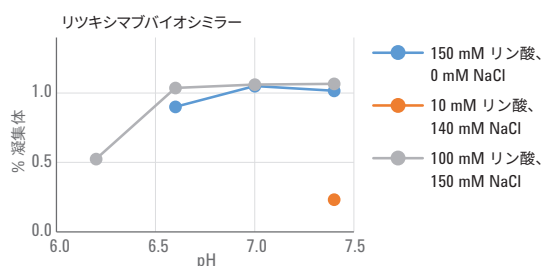


図 3B. リツキシマブバイオシミラーの凝集体含有量のピーク面積のパーセント率 (表 1 の実験 1 ~ 12 を参照)。凝集体が検出された実験のポイントが示されています。

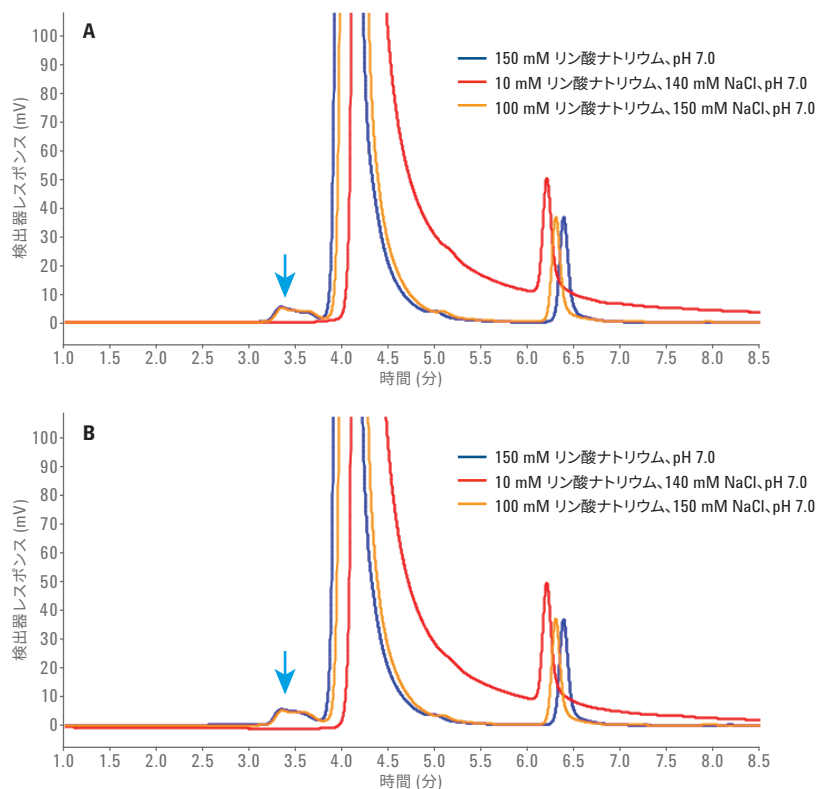


図 4. 最適化された pH 7.0 で異なる緩衝液塩濃度を用いたリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) 分析の UV 220 nm 信号のベースラインの拡大図 (表 1 の実験 3, 6, 11 を参照)。

図 5 は、実験 11 の高塩濃度条件下でのリツキシマブ先発薬とリツキシマブバイオシミラーの光散乱分析の結果を示しています。単量体のピークのための分析に焦点を当てると、光散乱分析により以前のアプリケーションノート¹に記載されている精密質量値に近い分子量が報告されました。バイオシミラー分子は、先発薬分子でははっきりと見られない C 末端リジン変異体が存在しているため、質量がわずかに大きくなることが予想されます。

より大きな凝集体と肉眼では見えない粒子の形成は、バイオ医薬品アプリケーションで特に懸念していることです。高度に凝集されたサンプルに対する光散乱検出の感度は、UV 検出から得られた濃度データを補完します。

UV 検出による単量体と二量体の分析結果はきわめて類似しています。しかし、図 6 が示すように、特定の移動相の条件下では光散乱検出器はより高次の凝集体により大きく反応することが立証され、リツキシマブ先発薬とバイオシミラーのより広い範囲の凝集体ではいくつかの相違点があることが明らかになりました。

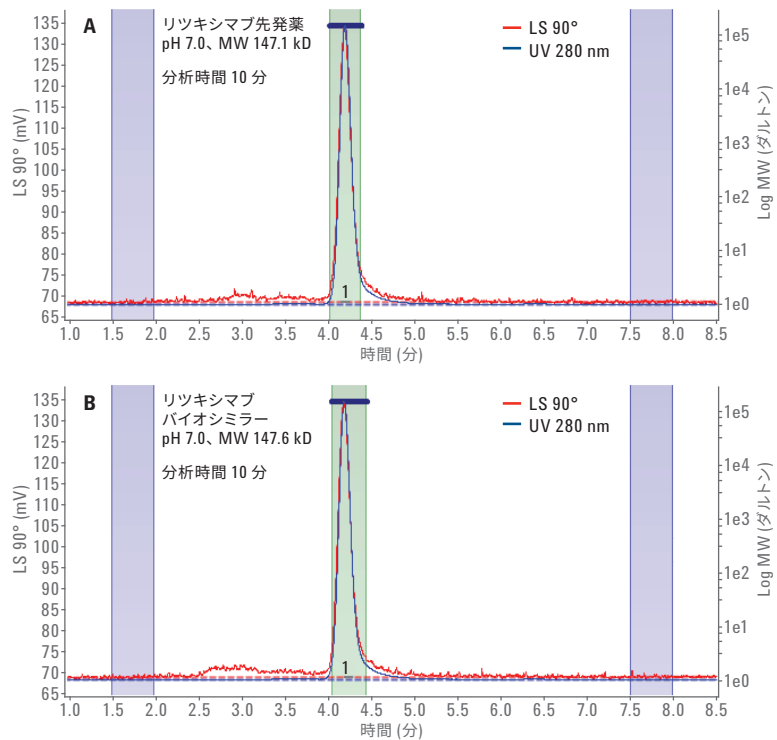


図 5. 100 mM リン酸ナトリウムと 150 mM NaCl, pH 7.0 でのリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) の LS 分析の比較 (表 1 の実験 11)。

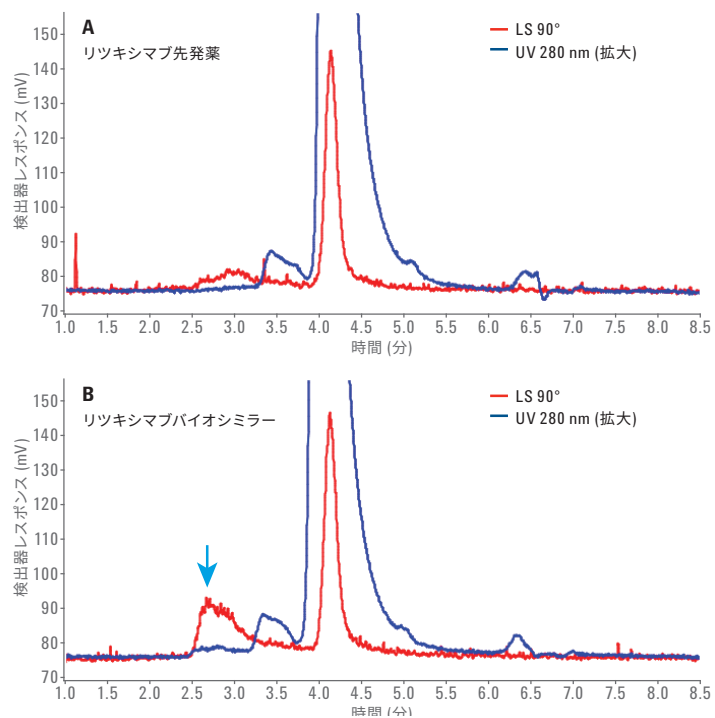


図 6. 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 でのリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) の LS 分析の比較 (表 1 の実験 3)。

DLS 機能の追加は得られる情報の内容をさらに詳細にして、流体力学半径の測定を可能にします (図 7)。

結論

完全にバイオイナートな流路の Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC システムと Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを組み合わせると、タンパク質凝集体の定量のためのサイズ排除クロマトグラフィーに適したメソッドの最適化を簡単に実現できます。より短い Agilent AdvanceBio SEC 300Å 15 cm カラムは分離を高速化し、スループットを大幅に高め広い範囲の分析条件のスクリーニングに必要な時間を短縮します。分離能と真度を高めるには、より長い 30 cm カラムを使用します。AdvanceBio SEC カラムには、非特異的な結合がほとんど生じないなどの利点があります。Bio-MDS マルチ検出器スイートと Bio-SEC ソフトウェアを使用すれば、他のどの手段でも検出が困難な低濃度の高分子量凝集体を突き止めることができます。最終的に、Bio-MDS を使用して、タンパク質分子量を測定したり、DLS 検出と組み合わせると流体力学半径情報を求めることができます。いくつかの技術の組み合わせにより包括的なワークフローソリューションを構成して、SEC 条件を短時間で最適化し、適切な緩衝液条件で凝集体を分子量範囲全体で正確に定量し、モノクローナル抗体の凝集動態の特性評価を行うことができます。

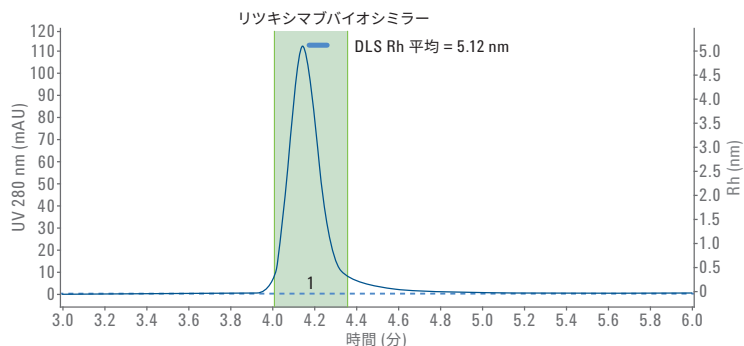


図 7. LS 検出器による流体力学半径の結果を示すリツキシマブバイオシミラー DLS 分析。

参考文献

1. Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), **2014**.
2. Mahler, H-C.; et al. Protein Aggregation: Pathways, Induction Factors and Analysis, *J. Pharm. Sci.* 2008, *98*(9).
3. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography, *Agilent Technologies Application Note* publication number 5991-6673EN **2016**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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おりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2017

Printed in Japan, January 5, 2017

5991-7476JAJP



Agilent Technologies

Size Exclusion Chromatography in the Presence of an Anionic Surfactant

Intact Protein Profiling

Authors

Andy Coffey
Agilent Technologies, Inc

Abstract

Sodium dodecyl sulfate (SDS, or SLS) is a well known anionic detergent, frequently used to denature proteins. It is commonly used in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), where a remarkably consistent level of binding across a wide range of proteins imparts a reliable charge-to-mass ratio. This allows separation of denatured proteins based on relative size due to their relative ion mobility. Conversely, size exclusion chromatography (SEC) for size-based separation of proteins is normally performed under nondenaturing conditions using predominantly aqueous buffers as mobile phase.

This Application Note used SEC with light scattering detection to investigate the impact of varying SDS concentration on the protein molecule. This was achieved by studying the changes in RT, apparent molecular weight, and hydrodynamic radius.

Introduction

To denature proteins, sodium dodecyl sulfate (SDS) is used above its critical micelle concentration (CMC). The CMC of SDS in pure water is 8.2 mM (approximately 0.2 % w/v). However, the presence of buffer salts or changes in pH and temperature may reduce the CMC significantly. CMC values of around 1.0 mM (approximately 0.04 % w/v) are observed in phosphate buffered saline (PBS), for example. A micelle forms when approximately 62 SDS molecules coalesce into a spherical shape with a hydrophobic core surrounded by an anionic surface, as depicted in Figure 1. Typically, SDS is used at significantly higher concentrations of 2 % w/v for sample preparation for SDS-PAGE, but also with a reducing agent to cleave disulfide bonds within the protein molecule. The resulting saturated SDS-protein complex has, on average, 1.4 g SDS per gram of protein [1]. Such denatured proteins are considered to adopt a rigid cylindrical shape resulting in the observation that ion mobility in gel electrophoresis is proportional to molecular weight. By omitting the reduction of disulfide bonds, it has been observed that the ratio of SDS to protein decreases significantly and the time to reach equilibrium may be doubled [2].

In contrast, adding SDS (approximately 10:1 mol ratio) has been found to arrest heat denaturation of BSA solution, which otherwise leads to creation of high molecular weight oligomers [3], or reduces the level of noncovalent aggregation. Historically, it was recommended to use 0.1 % w/v SDS in the mobile phase to reduce retention time (RT), and improve peak shape in protein size exclusion chromatography (SEC) [4].

The mechanism by which SDS denatures a protein is not fully understood. Since both the detergent molecule and the protein possess complementary ionic and hydrophobic regions, it is clear that a combination of mechanisms may be involved. Thermodynamic studies have suggested that interactions are not ionic alone. It is conceivable that SDS first begins to bind through an ionic interaction with positively charged amino acids side chains (Lys and Arg) on the surface of the protein. Increasing SDS concentration leads to higher levels of incorporation, and it is postulated that ultimately, the flexible protein chain is decorated with SDS micelles rather than the rigid cylinder model originally proposed [5].

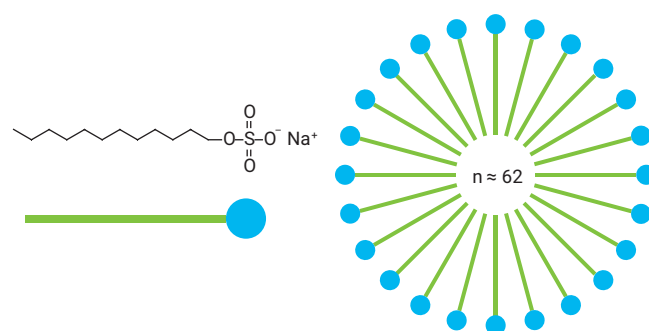


Figure 1. Cartoon depicting SDS micelle formed at concentrations above CMC (aggregation number ~ 62).

Bovine serum albumin (BSA) is a well studied protein due to its capability of acting as a carrier of smaller molecules between tissues and cells. The structure and size (hydrodynamic radius) of the BSA monomer has been determined using multiple analytical techniques. Its primary structure is 583 amino acids with a molecular weight of 66,463 Da, Figure 2. Commercial samples frequently contain varying amounts of dimer and higher-order aggregates, and different isolation techniques may result in varying amounts of these oligomers. Since BSA contains 35 cysteine residues, there are 17 disulfide bridges and one free thiol group. It is believed that BSA oligomers are predominantly covalently linked through disulfide bonds involving the extra thiol group. Therefore, in the absence of reducing agents, denaturation with SDS will not result in such covalently linked dimers and higher aggregates reverting to a monomeric form.

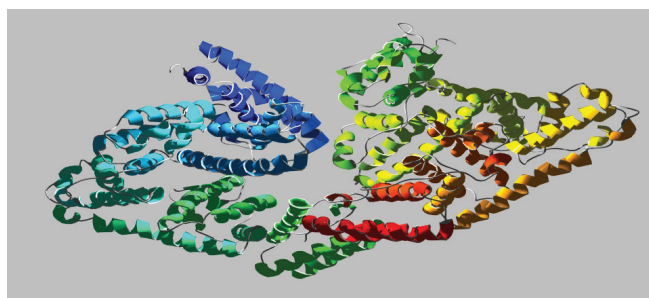


Figure 2. Native heart-shaped conformation of bovine serum albumin.

To explore the effect of SDS denaturation on the characteristics of BSA, a series of experiments were performed. Using SEC of the nonreduced BSA protein, the amount of dimer and higher-order aggregates could be determined. The addition of a light scattering detector with dynamic light scattering (DLS) capability allowed the measurement of both molecular weight and hydrodynamic radius (Rh). The eluent chosen for this series of experiments was phosphate buffered saline (PBS), containing 10 mM phosphate buffer, and 140 mM NaCl, pH 7.4 (Eluent A). A second mobile phase was prepared in an identical manner, but with the addition of 2 % w/v SDS (Eluent B). The HPLC instrument was then run with increasing levels of SDS incorporated in the mobile phase by varying the proportions of Eluent A and Eluent B. Throughout the experiment, the same BSA sample was used, prepared at a concentration of 10 mg/mL in PBS alone.

The experiment was designed to determine:

- If SDS can denature BSA oligomers
- What effect is observed on the molecular weight measured using inline light scattering detection
- What change in hydrodynamic radius is observed

Conditions

Parameter	Value
Column:	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm (p/n PL1180-5301)
Samples:	BSA (Sigma-Aldrich) Sample prepared 10 mg/mL in Eluent A
Eluent A:	PBS, pH 7.4 (10 mM phosphate, 140 mM NaCl)
Eluent B:	PBS, pH 7.4 (10 mM phosphate, 140 mM NaCl) + 2.0 % w/v SDS
Gradient:	Isocratic elution at 0 % B; 10 % B; 20 % B; 30 % B; 40 % B; 50 % B; 60 % B; 70 % B
Flow rate:	0.8 mL/min
Detector:	UV, 280 nm; LS 15°, LS 90°
Instrument:	Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC with Agilent 1260 Infinity Bio-SEC multidetector system.

Results and Discussion

Following two blank injections to allow for the column to become conditioned in the mobile phase, duplicate injections of BSA 10 mg/mL were made.

Figure 3 shows overlaid chromatograms (UV 280 nm signal) of four individual experiments at different mobile phase compositions. Table 1 contains RT information relating to the entire experimental series.

From Table 1, it is apparent that there is little change in total peak area for different runs. This indicates that increasing SDS concentration does not result in the absorption of the protein, or loss of protein through induced aggregation. RTs become shorter but stabilize from 0.6 to 1.4 % SDS (w/v), as seen in Figure 4. This shortening of RT also results in lower resolution between the peaks, so it proved difficult to accurately determine how much dimer and higher-order aggregates became denatured. It is clear that these multimer peaks are still abundant and must, therefore, be predominantly covalently linked.

Table 1. RT and total peak area.

% SDS in mobile phase	RT (min)			Total peak area
	Higher-order aggregates	Dimer	Monomer	
0.0 %	6.00	6.46	7.29	3,632
0.2 %	5.22	5.59	6.45	3,633
0.4 %	4.96	5.23	5.96	3,668
0.6 %	4.89	5.15	5.83	3,588
0.8 %	4.89	5.13	5.80	3,571
1.0 %	4.89	5.11	5.77	3,572
1.2 %	4.88	5.11	5.76	3,536
1.4 %	4.90	5.10	5.75	3,566

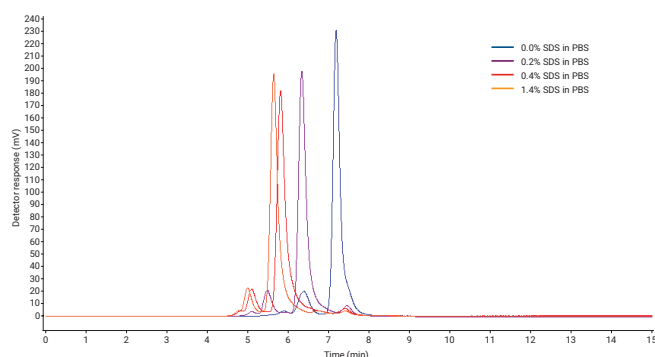


Figure 3. SEC chromatograms of BSA with increasing SDS concentration in mobile phase.

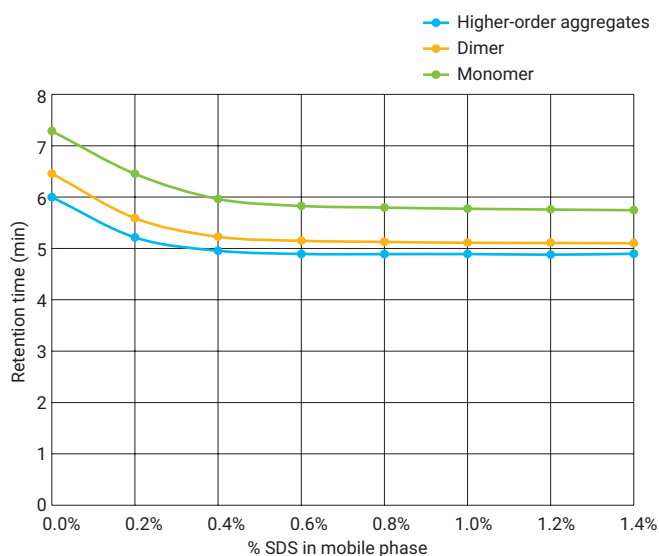


Figure 4. Effect of % SDS in mobile phase on RT.

In SEC, shorter RT is indicative of an increase in the size of a molecule in solution, but does not necessarily infer an increase in molecular weight. To ascertain the molecular weight of the three major peaks of the chromatogram, the BioSEC software was used to calculate the molecular weight using the relationship described in the following formulae [6]:

Where:

(LS) = Light scattering detector signal

K_{LS} = LS detector constant

dn/dc = Specific refractive index increment*

(UV) = UV detector signal (280 nm)

ϵ = Extinction coefficient

* Using the approximation of $dn/dc \approx 0.186$ mL/g for nonglycosylated proteins

Figure 5 shows the regions of each peak chosen to perform the light scattering molecular weight determination to try to minimize interference due to anticipated peak overlap. Table 2 shows the results for the molecular weight measurements. This table includes columns where the relative number of monomer units has been calculated. It is important to recognize that the molecular weight of the higher-order aggregates peak is nearly always three times larger than the molecular weight of the monomer peak, indicating it is a trimer. The molecular weight of the dimer peak is two times larger than the molecular weight of the monomer peak, as expected. In addition, the molecular weight of each of the peaks increases with increasing SDS concentration until a plateau is reached at 0.6% w/v SDS, in agreement with the stabilization of RTs at this point.

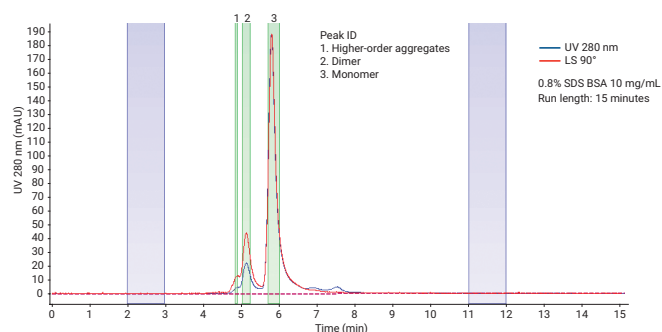


Figure 5. Molecular weight calculation regions for (1) higher-order aggregates, (2) dimer, and (3) monomer peaks of BSA.

Table 2. Molecular weight analysis results from light scattering detection.

SDS w/v%	Mass gain			SDS:BSA (g/g)		
	Higher-order aggregates	Dimer	Monomer	Higher-order aggregates	Dimer	Monomer
0.0	202,197	136,383	67,838	3.0	2.0	1.0
0.2	242,541	194,876	107,905	2.2	1.8	1.0
0.4	560,154	359,239	203,737	2.7	1.8	1.0
0.6	667,318	423,418	212,596	3.1	2.0	1.0
0.8	615,726	404,898	207,028	3.0	2.0	1.0
1.0	624,648	404,634	205,868	3.0	2.0	1.0
1.2	617,385	405,618	206,376	3.0	2.0	1.0
1.4	612,031	406,699	206,614	3.0	2.0	1.0

Table 3. Mass gain for BSA with increasing surfactant concentration, showing steady state at concentrations >0.6%.

SDS w/v%	Mass gain			SDS:BSA (g/g)		
	Higher-order aggregates	Dimer	Monomer	Higher-order aggregates	Dimer	Monomer
0.0	0	0	0	0.0	0.0	0.0
0.2	40,344	58,493	40,067	0.2	0.4	0.6
0.4	357,957	222,856	135,899	1.8	1.6	2.0
0.6	465,121	287,035	144,758	2.3	2.1	2.1
0.8	413,529	268,515	139,190	2.0	2.0	2.1
1.0	422,451	268,251	138,030	2.1	2.0	2.0
1.2	415,188	269,235	138,538	2.1	2.0	2.0
1.4	409,834	270,316	138,776	2.0	2.0	2.0

Since the observed molecular weight increases in line with the concentration of SDS present in the mobile phase, it may be inferred that each molecular species is actually gaining mass through accumulation of associated SDS. However, the observed mass gain is considerable and higher than expected, particularly since this BSA sample has not been reduced (Table 3). The steady state mass gain under the analysis conditions is 2 g SDS per 1 g protein, suggesting that SDS micelles may be accumulating along the protein molecule regardless of the number of oligomers it contains.

Closer inspection of the concentration-dependant UV trace of the chromatograms obtained at 0.0 % SDS and 1.4 % SDS shows further differences. There is clearly a reduction in resolution for the higher molecular weight species, however some smaller peaks eluting after the monomer peak have become evident in the 1.4 % SDS mobile phase composition (Figure 6). It was not possible to identify these lower molecular weight species.

Figure 7A shows the signals from the LS 90° detector for BSA at 0.0 % SDS and 1.4 % SDS concentrations. Since the light scattering detector is mass sensitive rather than concentration-dependant, it is not surprising that the signal obtained under the higher surfactant concentration conditions is much larger than the signal under native conditions.

In addition to the increased response seen in Figure 7A at the highest SDS concentration, there is also a vertical offset. The reason for this becomes apparent when the DLS data are analyzed to determine the Rh. Not only do we see an increase in the Rh of the monomer peak (from around 3.8 to 5.7 nm, close to literature values) [7,8,9], there is a continual background of particles detected of approximately 2.4–2.8 nm in size, almost certainly due to SDS micelles in solution.

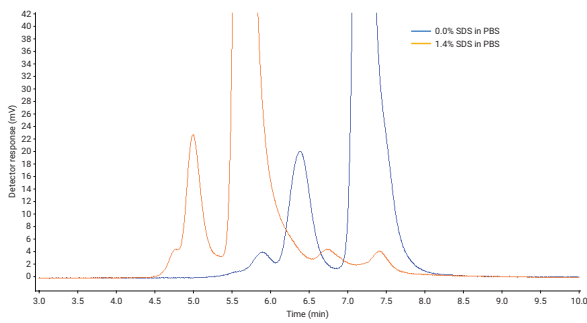


Figure 6. Close up of the UV 280 nm signal of BSA in PBS mobile phase containing 0.0 % SDS and 1.4 % SDS.

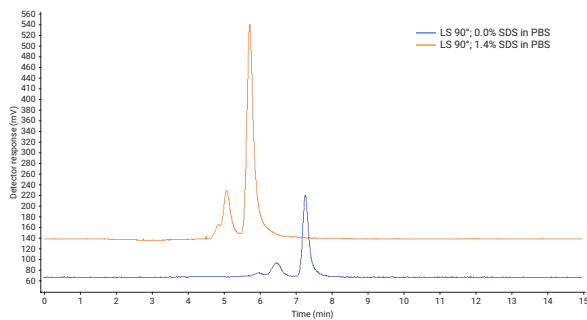


Figure 7A. Overview of the LS 90° signal of BSA in PBS mobile phase containing 0.0 % SDS and 1.4 % SDS.

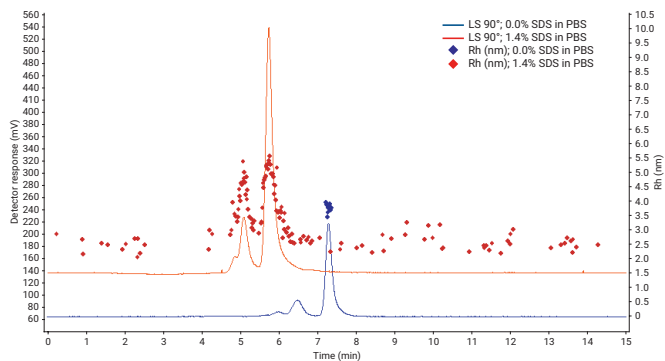


Figure 7B. Overview of the LS 90° signal of BSA in PBS mobile phase containing 0.0 % SDS and 1.4 % SDS with hydrodynamic radius (Rh) data added.

Conclusions

At the outset, this experiment was designed to determine if SDS can denature BSA oligomers using SEC with light scattering detection. It was found that accurate quantification of oligomer content was not possible through loss in resolution as the individual peaks corresponding to monomer, dimer, and higher-order aggregates eluted closer together. However, it is apparent the three individual species remain intact and become saturated with SDS to the same extent.

Simply denaturing the protein, making the molecule unfold, would be expected to give a larger structure in solution, leading to a shorter RT in SEC. However, as the SDS concentration was increased from 0.0 to 0.4 % w/v, the molecular weight of the monomer, dimer, and higher-order aggregates increased proportionally. At higher SDS concentrations (0.6–1.4 % w/v) the RTs (and, therefore, size in solution) and the molecular weight determined by light scattering stabilized as the molecular species were saturated by SDS.

Using DLS capability to determine hydrodynamic radius shows an increase in size comparable to literature values for a reduced BSA sample. The size increase does not reflect a change in conformation of the BSA sample run under nonreducing conditions, but replicates the observed increase in molecular weight as the molecule complexes with and becomes saturated by SDS micelles.

It is clear that, although the Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column is able to tolerate SDS in the mobile phase, as seen by the good peak shape and reproducible recovery, the SEC separation is badly affected by the dramatic increases in size and molecular weight of the protein species being analyzed. The use of surfactants in the mobile phase for SEC should be avoided wherever possible.

References

1. Reynolds, J. A.; Tanford, C. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*(19), 5161-5165.
2. Pitt-Rivers, R.; Impiombato, F. S. A. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *The Biochemical Journal* **1968**, *109*, 825-830.
3. Aoki, K.; Hiramatsu, K.; Kimura, K.; Kaneshina, S.; Nakamura, Y.; Sato, K. Heat Denaturation of Bovine Serum Albumin. I : Analysis by Acrylamide-gel Electrophoresis. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University* **1969**, *47*(4), 274-282
4. Hagarová, D.; Horváthová, M.; Žúbor, V.; Breier, A. Optimization of conditions for size-exclusion chromatography of proteins. *Chemical Papers* **1991**, *45*(3), 341-348.
5. Shirahama, K.; Tsujii, K.; Takagi, T. Free-boundary electrophoresis of sodium dodecyl sulfate-protein polypeptide complexes with special reference to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* **1974**, *75*, 309-319.
6. Wen, J.; Arakawa, T.; Philo, J. S. Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 155-166.
7. Lorber, B.; Fischer, F.; Bailly, M.; Roy, H.; Kern, D. Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students. *Biochem. and Mol. Biol. Ed.* **2012**, *40*(6), 372-382.
8. Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W. The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering. *Langmuir* **2000**, *16*(3), 922-927.
9. Tanner, R. E.; Herpigny, B.; Chen, S.-H.; Rha, C. K. Conformational change of protein sodium dodecylsulfate complexes in solution: A study of dynamic light scattering. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*(8), 3866-3872.

Calibrating your Agilent AdvanceBio SEC Columns

Technical Overview

Authors

Andy Coffey
Agilent Technologies, Inc

Introduction

Agilent AdvanceBio SEC columns are specifically designed for aqueous size exclusion chromatography (SEC) of biomolecules. The particles have been manufactured using proprietary technology to combine optimum pore size and pore volume for separating molecules such as proteins, polysaccharides, or aqueous soluble polymers.

Even if the intention is to use the AdvanceBio SEC column for quantification of monomer and dimer content, it is still good practice to regularly perform a calibration using appropriate molecular weight standards. Regular calibration ensures better reproducibility, leading to improved accuracy, and enables earlier detection of potential problems, reducing system downtime and troubleshooting.

For protein separations, the standards should be a range of well characterized proteins covering the entire operating range of the column. For polysaccharide analysis, pullulan polysaccharide molecular weight standards should be used, and for synthetic polyethylene glycol or polyethylene oxide, PEG/PEO standards are suitable.

SEC is a relatively straightforward technique. It relies on simple diffusion into the pore structure of the stationary phase; larger molecules cannot permeate the particles, and elute first, while smaller molecules diffuse readily into the pores, and elute later. This provides two key aspects for the successful use of SEC:

- There should be no secondary interactions between the analyte and the stationary phase
- The pore size should be chosen to match the size of molecules being analyzed

Proteins are complex molecules containing numerous side chain functionalities: acid, basic, neutral, and hydrophobic. Finding the optimum conditions to avoid secondary interactions can be challenging, however the AdvanceBio SEC product range has a polymeric surface coating applied to the silica particle that overcomes many of these issues.

The mechanism of separation relies on differences in size of molecules in solution. Protein structures are often compact and globular in nature, and proteins often aggregate under stress conditions such as extremes of temperature, pH, or salt composition and for dimers and larger units [1]. This is a particular issue for molecules such as monoclonal antibodies, where the presence of aggregated proteins can lead to adverse effects if administered. SEC provides the ideal tool for quantifying and monitoring protein aggregation. In comparison, polysaccharides and synthetic polymers such as polyethylene oxide do not possess a wide range of functional groups, but are often made up of a series of closely related oligomers. In this case, SEC can provide the analysis of molecular weight, molecular weight distribution, and branching information [2].

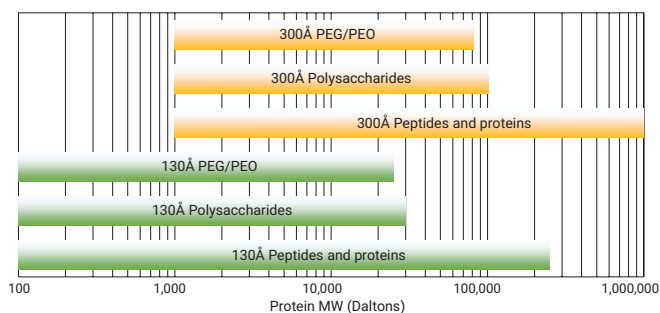


Figure 1. Resolving ranges for Agilent AdvanceBio SEC columns.

Calibrating your Agilent AdvanceBio SEC column

Choose the eluent for analysis. The samples need to be soluble in the mobile phase, and there should be no secondary interactions that lead to molecules eluting earlier or later than expected. For proteins, we recommend 150 mM sodium phosphate, pH 7.0 as this eliminates sodium chloride, which may lead to corrosion, from your HPLC system. However, other mobile phases including phosphate buffered saline (PBS), or high ionic strength mobile phases such as 0.1 M sodium phosphate/0.1 M sodium sulphate may still be used (see Pages 10–11).

Dissolve the standards in the mobile phase. Ensure that the solution is clear and there is no insoluble material present. If necessary, filter the sample. Consider changing the mobile phase to ensure that the samples fully dissolve.

Record the chromatogram for each of the standards, and plot the retention time (x-axis) versus the molecular weight (y-axis) to create the calibration curve. Notice that the y-axis is plotted on a logarithmic scale.

Conditions

Parameter	Value
Column:	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm (p/nPL1180-5350) Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 µm, 7.8 × 300 mm (p/nPL1180-5301)
Samples:	Agilent polyethylene glycol calibration kit, PEG-10, 10 × 0.2 g (p/nPL2070-0100) Agilent polyethylene oxide calibration kit, PEO-10, 10 × 0.2 g (p/nPL2080-0101) AdvanceBio SEC 130 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL (p/n5190-9416) AdvanceBio SEC 300 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL (p/n5190-9417) Protein standards (Sigma-Aldrich) Samples prepare at 0.5 – 1.0 mg/mL in mobile phase
Eluent A:	150 mM Sodium phosphate buffer, pH 7.0, PBS, pH 7.4 (10 mM phosphate, 140 mM NaCl) or 100 mM Sodium phosphate + 100 mM sodium sulfate, pH 7.0
Flow rate:	1.0 mL/min
Detector:	RI for polysaccharides and PEG / PEO standards UV, 220 nm for peptides and proteins
System:	Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC (with additional refractive index detector)

Peptide and Protein Calibration

Proteins and peptides are generally very compact molecules containing multiple hydrogen bonds, electrostatic interactions, or covalent bonds such as disulphide bridges. Choosing a range of standards covering the operating range of the column for calibration is preferred. It is also possible to use prepared standard mixtures, as peaks are likely to be clearly defined and well resolved (Figures 3A and 3B).

The presence of a diverse range of side chain functionality from different amino acids may mean undesirable secondary interactions can occur, and so different mobile phase compositions may need to be tested.

The peaks shown are generally very sharp and well defined since they represent a single molecular species. It is quite common for proteins to contain aggregates, and these too are typically well resolved – evident as an earlier eluting peak or series of peaks.

Protein/Peptide	MW	Retention time (min)	
		130 Å	300 Å
Thyroglobulin	670,000	4.60	5.14
γ-Globulin	150,000	4.90	6.53
BSA	66,000	5.53	7.57
Ovalbumin	44,300	6.04	8.13
Myoglobin	17,600	6.77	8.79
Cytochrome C	12,327	6.95	8.92
Aprotinin	6,511	7.56	9.38
Neurotensin	1,672	9.42	10.54
Angiotensin-II	1,040	9.94	10.82

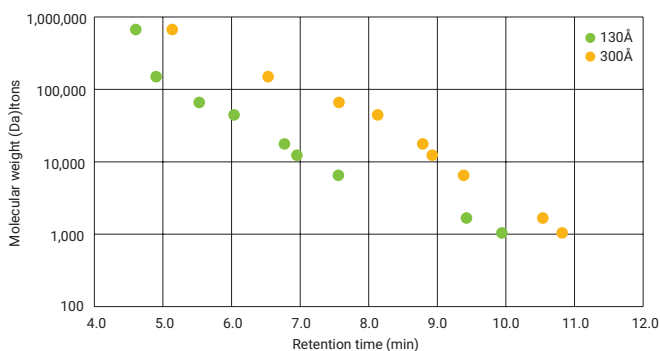


Figure 2. Peptide and protein calibration on Agilent AdvanceBio SEC columns.

Representative chromatograms for protein and peptide standards

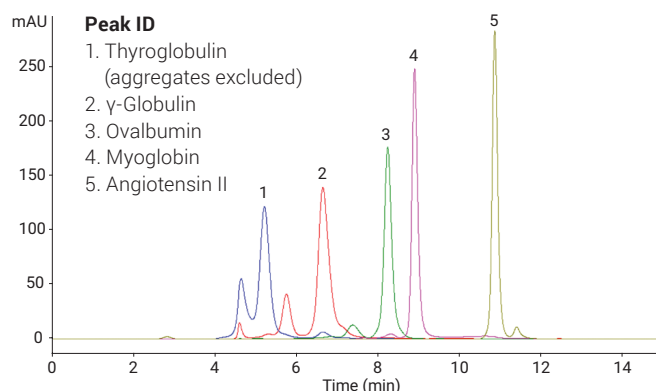


Figure 3A. Individual peptide and proteins contained in Agilent AdvanceBio SEC 300 Å Protein Standard (p/n5190–9417) on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column.

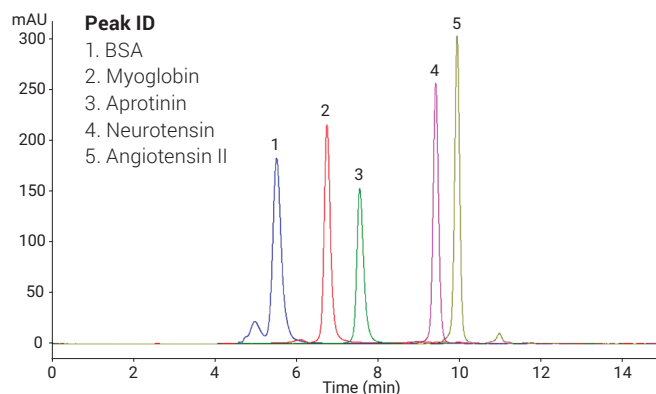


Figure 3B. Individual peptides and proteins contained in Agilent AdvanceBio SEC 130 Å Protein Standard (p/n5190–9416) on an Agilent AdvanceBio SEC 130 Å column.

Polysaccharide Calibration

Calibration with polysaccharide standards should be used when your analyte is also a polysaccharide, for example starch or cellulose. There are many types of polysaccharide, including linear, branched, or sulfated molecules. Unlike peptides or proteins, they comprise of a range of chain lengths and can extend to very large sizes. Therefore, it is important to ensure that the column you are using is capable of resolving the molecular weight range of polysaccharide you are investigating.

The mass difference of 162 for each additional hexose means that separating individual oligomers is very difficult unless the sample is sufficiently small (Figure 5C), achieved using two columns in series for additional resolution.

The combination of two columns run in series can increase resolution to the extent that individual oligomers are becoming visible in the 5,800 Da polysaccharide sample.

This sample contains oligomers of approximately 30–40 units, with a mass difference of 162 Da each.

Polysaccharide	MW	Retention time (min)	
		130 Å	300 Å
788K	788,000	4.48	4.74
380K	380,000	4.58	4.84
100K	100,000	4.73	5.33
48K	48,000	4.89	6.19
23.7K	23,700	5.39	7.42
5.8K	5,800	7.16	9.22
Maltotriose	504	9.46	10.72
Maltose	342	9.73	10.82
Glucose	180	10.01	11.09

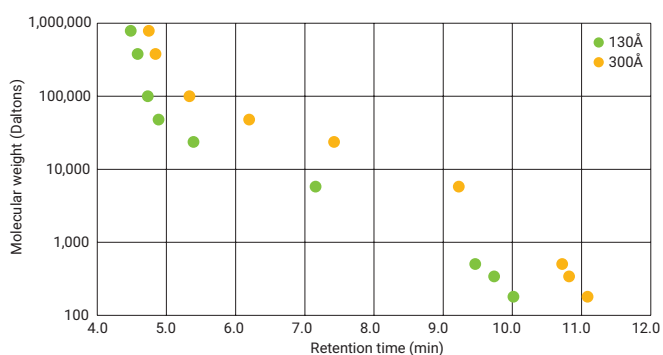


Figure 4. Polysaccharide calibration on Agilent AdvanceBio SEC columns.

Representative chromatograms for polysaccharide standards

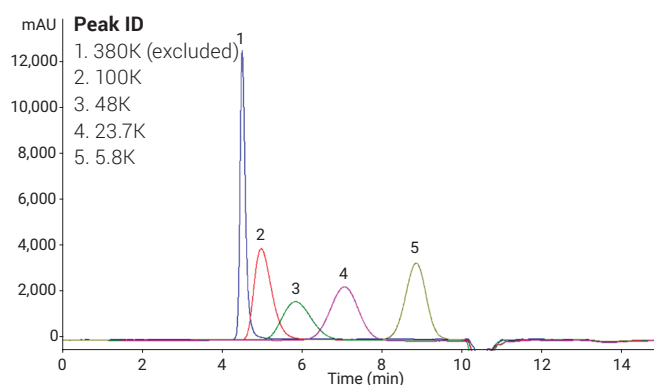


Figure 5A. Polysaccharide standards on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column.

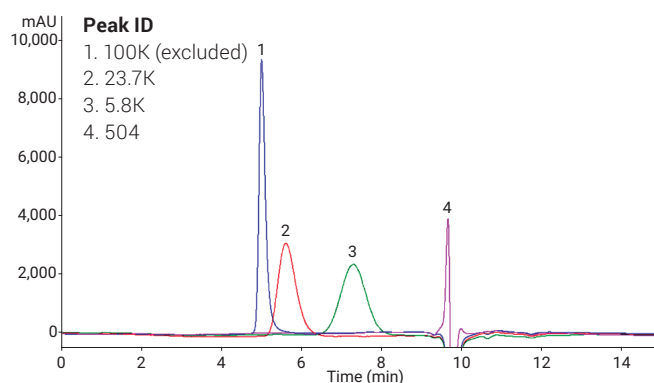


Figure 5B. Polysaccharide standards on an Agilent AdvanceBio SEC 130 Å column.

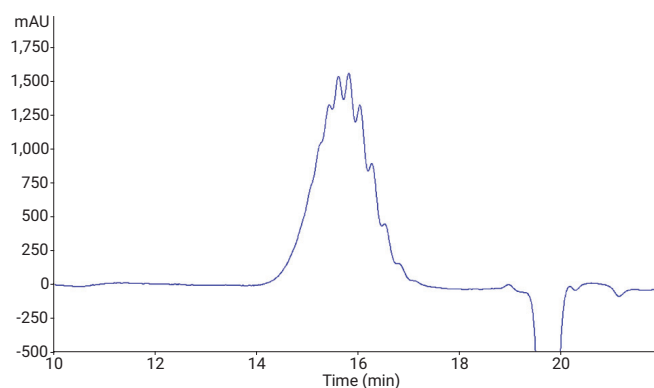


Figure 5C. Polysaccharide 5.8K run on Agilent AdvanceBio SEC columns 300 Å + 130 Å in series.

PEG/PEO Calibration

Polyethylene glycol (PEG) and polyethylene oxide (PEO) are synthetic polyethers, available in a range of sizes covering a diverse molecular weight range. Similar to polysaccharides, they comprise of a range of chain lengths, however the mass difference is just 44 Da.

PEG/PEO	MW	Retention time (min)	
		130 Å	300 Å
905K	905,000	4.41	4.73
692K	692,000	4.41	4.73
498.6K	498,600	4.58	4.83
305.5K	305,500	4.55	4.85
135.8K	135,800	4.65	4.93
77.35K	77,350	4.71	5.20
46.47K	46,470	4.77	5.67
21.3K	21,300	5.11	6.81
12.14K	12,140	5.65	7.74
8.73K	8,730	6.10	8.28
3.87K	3,870	7.26	9.32
1.48K	1,480	8.59	10.26
420	420	9.79	11.03
106	106	10.64	11.44

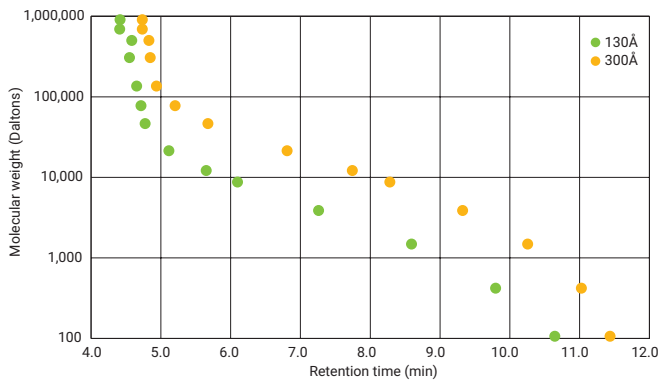


Figure 6. PEG/PEO Calibration on Agilent AdvanceBio SEC columns.

Representative chromatograms for PEG/PEO standards

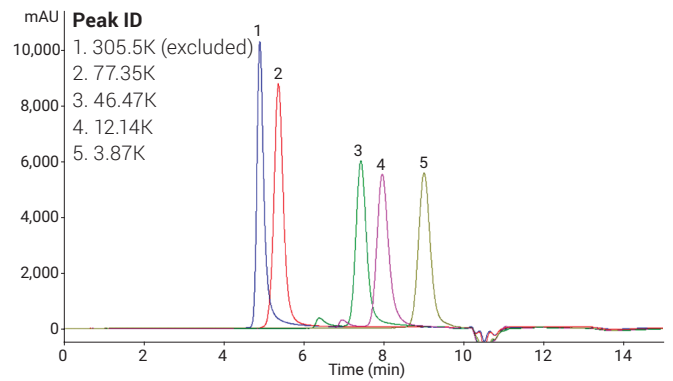


Figure 7A. PEG/PEO standards on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column.

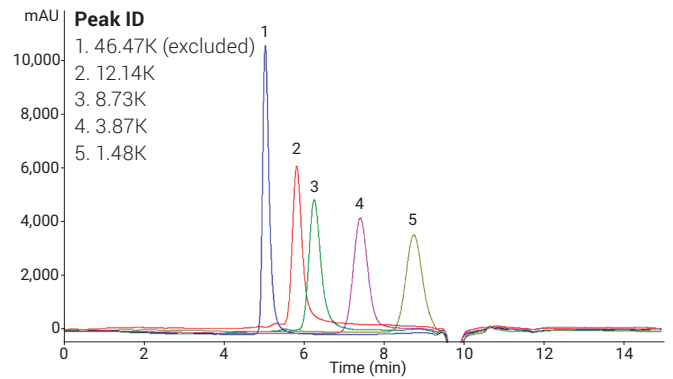


Figure 7B. PEG/PEO standards on an Agilent AdvanceBio SEC 130 Å column.

Effect of Mobile Phase Composition

The impact of mobile phase on the size of the molecule in solution, or in overcoming secondary interactions needs to be taken into consideration, as this will influence the retention time and alter the shape of the calibration curve. This is clearly visible in the comparison of three different mobile phases: 150 mM sodium phosphate, pH 7.0; PBS, pH 7.4 (approximately 10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl); 0.1 M sodium phosphate + 0.1 M sodium sulfate, pH 7.0 (Figure 8).

For molecules that do not present secondary interactions, such as polysaccharides, the effect of mobile phase composition is minimal (Figure 9).

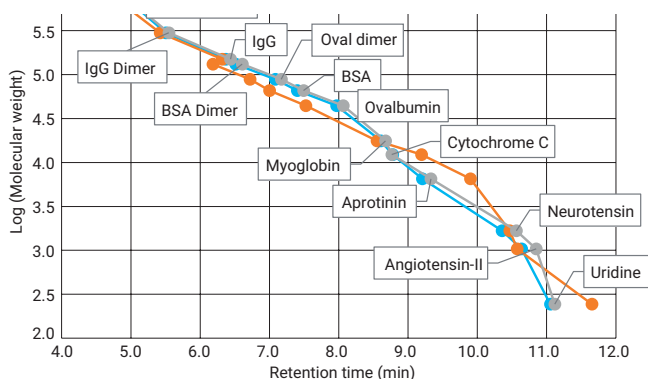


Figure 8. Effect of mobile phase composition on column calibration with protein standards.

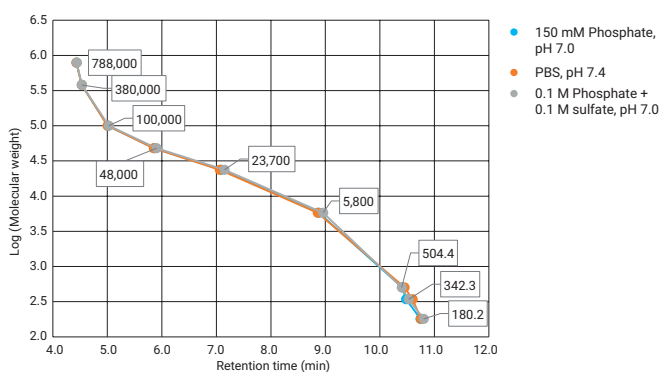


Figure 9. Effect of mobile phase composition on column calibration with polysaccharide standards.

When choosing a mobile phase for peptide or protein analysis by SEC, it is important to determine the effect that differences in pH or ionic strength may have on the sample of interest. Figures 10A, 10B, and 10C show a noticeable shift in the retention time of BSA under different mobile phase conditions. Resolution factors between dimer and monomer peaks may also be affected, so method optimization and method robustness should be fully explored.

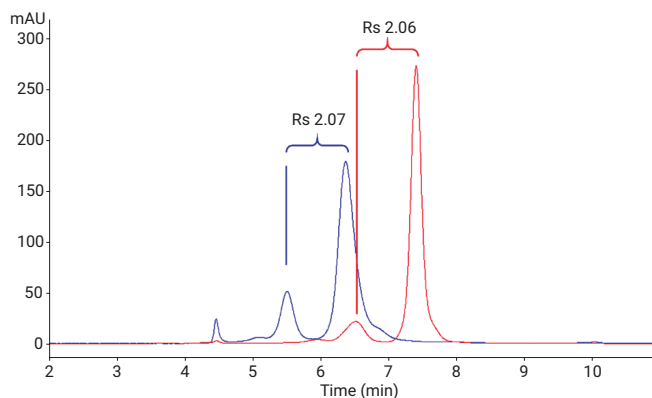


Figure 10A. γ -Globulin and BSA on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column using 150 mM sodium phosphate, pH 7.0.

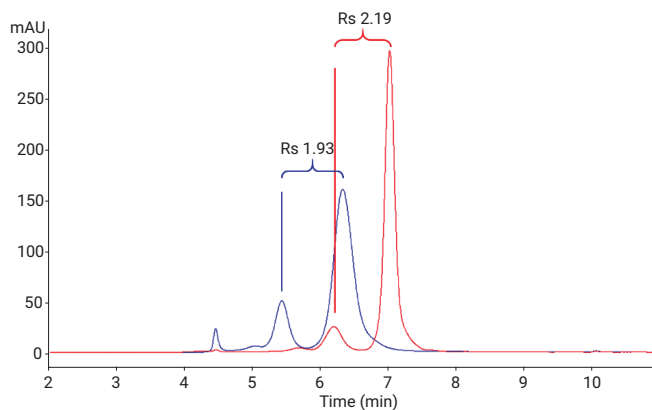


Figure 10B. γ -Globulin and BSA on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column using PBS, pH 7.4.

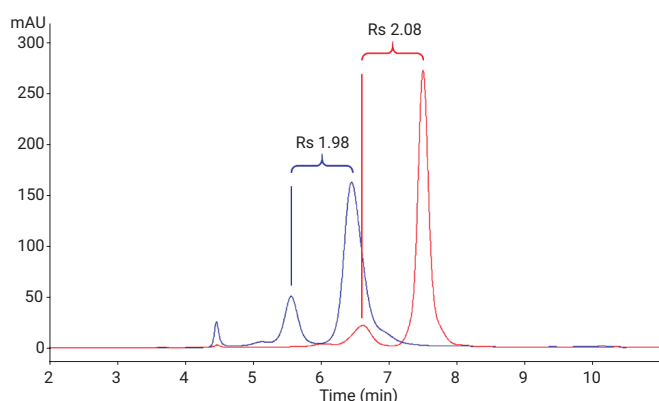


Figure 10C. γ -Globulin and BSA on an Agilent AdvanceBio SEC 300 Å column using 100 mM sodium phosphate + 100 mM sodium sulfate, pH 7.0.

Conclusion

Calibrating your Agilent AdvanceBio SEC size exclusion column with appropriate standards ensures you understand the correct working range, and can allow you to use calibration curves to estimate the molecular size of unknown molecules. However, regular calibration with a selection of standards is beneficial, and can be used to monitor column performance over a period of time, allowing early detection of potential problems. In turn, corrective action can be taken, ultimately reducing system downtime and improving productivity.

Agilent offers a range of column dimensions and different pore sizes suitable for differently sized molecules. Together with the extensive range of Agilent LC instrumentation, consumables, and technical support, we can provide the ultimate workflow solution for your needs.

Ordering Information

Part Number	Description
PL1180-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm guard
PL1580-5301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1301	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm guard
5190-9417	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL
PL1180-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 300 mm
PL1180-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 150 mm
PL1180-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 7.8 \times 50 mm guard
PL1580-5350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 300 mm
PL1580-3350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 150 mm
PL1580-1350	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å, 2.7 μ m, 4.6 \times 50 mm guard
5190-9416	Agilent AdvanceBio SEC 130 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL

See Also

1. Size exclusion chromatography for Biomolecule analysis: A "How-To" Guide; 5991-3651EN.
2. GPC/SEC standards: Product guide; 5990-7996EN.
3. Calibrating GPC columns: A Guide to Best Practice; 5991-2720EN.

References

1. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **1993**, *10(4)*, 307-377.

www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Conventional_GPC_-_Polymers_ans_Molecular_Weight.pdf

その他のアプリケーションノート

AdvanceBio SEC

資料番号	タイトル
5991-6791.JAJP	Agilent AdvanceBio SEC カラムによる PEG 化タンパク質の分析
5991-7165.JAJP	Agilent AdvanceBio SEC カラムによる生物製剤のハイスルーブット・高感度なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)
5991-6458.JAJP	生物製剤に含まれる凝集体の高速高分離サイズ排除クロマトグラフィー
5991-6304.JAJP	高分離能 SEC によるリソキシマブの凝集体およびフラグメントの分離と定量
5991-6303.JAJP	サイズ排除クロマトグラフィーと水性移動相を用いた mAb および ADC 凝集体の定量
5991-6302.JAJP	凝集分析向けの Agilent AdvanceBio SEC カラム: 機器の互換性
5991-6474.JAJP	バイオ医薬品分析における Agilent AdvanceBio SEC カラムの優位性

Bio SEC-3

資料番号	タイトル
5991-2463EN	Choosing the Right Calibration for the Agilent Bio SEC-3
5991-3954EN	Detailed Aggregation Characterization of Monoclonal Antibodies Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection
5991-3955EN	Determination of Protein Molecular Weight and Size Using the Agilent 1260 Infinity Multi-Detector Bio-SEC Solution with Advanced Light Scattering Detection
5990-9894EN	Optimum Pore Size for Characterizing Biomolecules with Agilent Bio SEC Columns
5991-0835EN	Development and partial validation of a SEC method for high-resolution separation and quantification of monoclonal antibodies

追加情報

メソッド開発、分子量推定、システム QC テスト用のさまざまな標準試料をご用意しています。

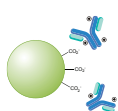
部品番号	品名
5190-9416	AdvanceBio SEC 130 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL
5190-9417	AdvanceBio SEC 300 Å Protein Standard, lyophilized, 1.5 mL
PL2070-0100	Polyethylene glycol calibration kit, PEG-10, 10 x 0.5 g
PL2080-0101	Polyethylene oxide calibration kit, PEO-10, 10 x 0.2 g
PL2090-0101	Pullulan Polysaccharide calibration kit

電荷変異体の分析

背景

正電荷および負電荷を持つアミノ酸と負電荷を持つグリカン（シアル酸）の存在は、高分子量のタンパク質が多重電種として存在し、複数の副反応によって正味電荷が変化する可能性があることを意味します。バイオ医薬品分野においては、医薬品の高分子タンパク質に含まれるアミノ酸やグリカンの種類およびその明確な位置を把握することがきわめて重要になります。抗体の抗原結合領域内の変異体が効能に深刻な影響をもたらす傾向があるからです。

イオン交換クロマトグラフィーでは、一部の電荷変異体、具体的には（構造内部ではなく）タンパク質の表面に位置するものを分離することが可能です。とはいえ、例えば正味電荷が +50 の分子を +49 または +51 の変異体から分離するのはかなり困難です。非多孔質粒子を使用して、ポア構造およびポア拡散を排除することで、ピーク形状と結果的な分離能はある程度改善できます。ただし、特定の分子に最適な分析条件を見極めるためには、一般的な弱カチオン交換カラムに戻し、広範なメソッド最適化を行う必要があります。



電荷変異体の分析

イオン交換クロマトグラフィー

生体分子の特性解析の精度とスピードの向上

Bio MAb

モノクローナル抗体に最適

特長	利点
硬質の非多孔質粒子	優れた分離効率
親水性 ポリマー層	非特異的な結合を排除
高密度の WCX 結合相	MAb に最適な高いイオン 交換容量

Bio IEX

タンパク質およびペプチドに最適

特長	利点
親水性コーティング層を 持つ硬質粒子	非特異的な結合を 排除
強/弱アニオン、 カチオン結合相	あらゆる分離に 対応

概要

ほとんどのタンパク質には酸性アミノ酸よりも塩基性アミノ酸の方が多く含まれているため、多くの場合、電荷変異体の分離にはカチオン交換が必要になります。ただし、タンパク質はそれぞれ異なり、必要最大限の分離能が得られる分析条件の特定には、相当な最適化作業が伴います。一般に、強カチオン交換カラムは扱いが容易ですが、モノクローナル抗体については、目的とする分離能を達成可能な唯一の手段が弱カチオン交換カラムである場合もあります。

メソッド開発を始める前に、ターゲットタンパク質の等電点 pI を特定することがきわめて重要です。初期移動相の pH がタンパク質の pI に近すぎると、タンパク質がカラムに保持されないからです。pH は、電荷変異体の pI にどの程度の幅があるかに応じて、主要種の等電点から 0.5 ~ 2 pH ユニット以上離す必要があります。タンパク質の溶出には、塩グラジエント (高いイオン強度によりカラムへのタンパク質の吸着を解離) または pH グラジエント (pI に等しい pH でタンパク質が溶出) のいずれかを使用できます。

メソッド開発時に複数の種類のカラムをスクリーニングできる機器を検討するのも良いでしょう。イオン強度および pH はどちらもタンパク質の正味電荷に影響し、弱イオン交換カラムの場合は、その影響がカラムの正味電荷にもおよびます。そのため、こういったメソッド条件のわずかな変化がどのような結果につながるのかが容易には予測できません。ここで推奨されるのが、厳密な「クオリティ・バイ・デザイン」アプローチです。そのために、マトリックス手法または体系的な実験計画法の開発用ソフトウェアを使用することをおすすめします。Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC のクォータナリ HPLC ポンプ機能との連携が可能な Buffer Advisor ソフトウェアを使用すれば、メソッド開発時間を大幅に短縮できます。「分析の手引き」や注目のアプリケーションノートなど、このセクションで紹介するアプリケーションノートでも、Buffer Advisor を使用した幅広い移動相条件のテスト方法を解説しています。最適な分離条件において、バッファ範囲の極限の pH レベルでイオン強度の非常に低いバッファを使用する必要がある場合は、PEEK カラムを使用することをおすすめします。

サイズ排除クロマトグラフィーと同様に、通常、イオン交換の分析条件下では変性が起こらないため、天然のインタクトタンパク質の分離も行えます。これは、2D-LC 構成の一次元目として組み合わせる場合を除き、このメソッドが MS に対応していないことを意味します。ただし、UV 検出による定量は可能です。

イオン交換クロマトグラフィーによる生体分子の分析: 分析の手引き

はじめに

タンパク質は多数のアミノ酸が鎖状に結合した分子で、その一部のアミノ酸は酸性または塩基性の側鎖官能基を持っています。そのため、周囲の溶液の pH を調整することで、タンパク質表面の総電荷をコントロールすることが可能です。タンパク質の正味電荷が中性になる (正電荷の数と負電荷の数が等しくなる) pH を等電点 pI と言います。この値を下回る pH では、タンパク質は全体として正電荷を帯びるため、負電荷のカチオン交換充填剤に保持できます。一方、 pI を超える pH では、タンパク質が全体として負電荷を帯びるため、アニオン交換充填剤に保持することができます。

この「分析の手引き」では、イオン交換 (IEX) クロマトグラフィー、カラムの選択肢、移動相に関する重要な考慮事項、IEX の使用に関する経験則、機器に関する考慮事項などを取り上げます。

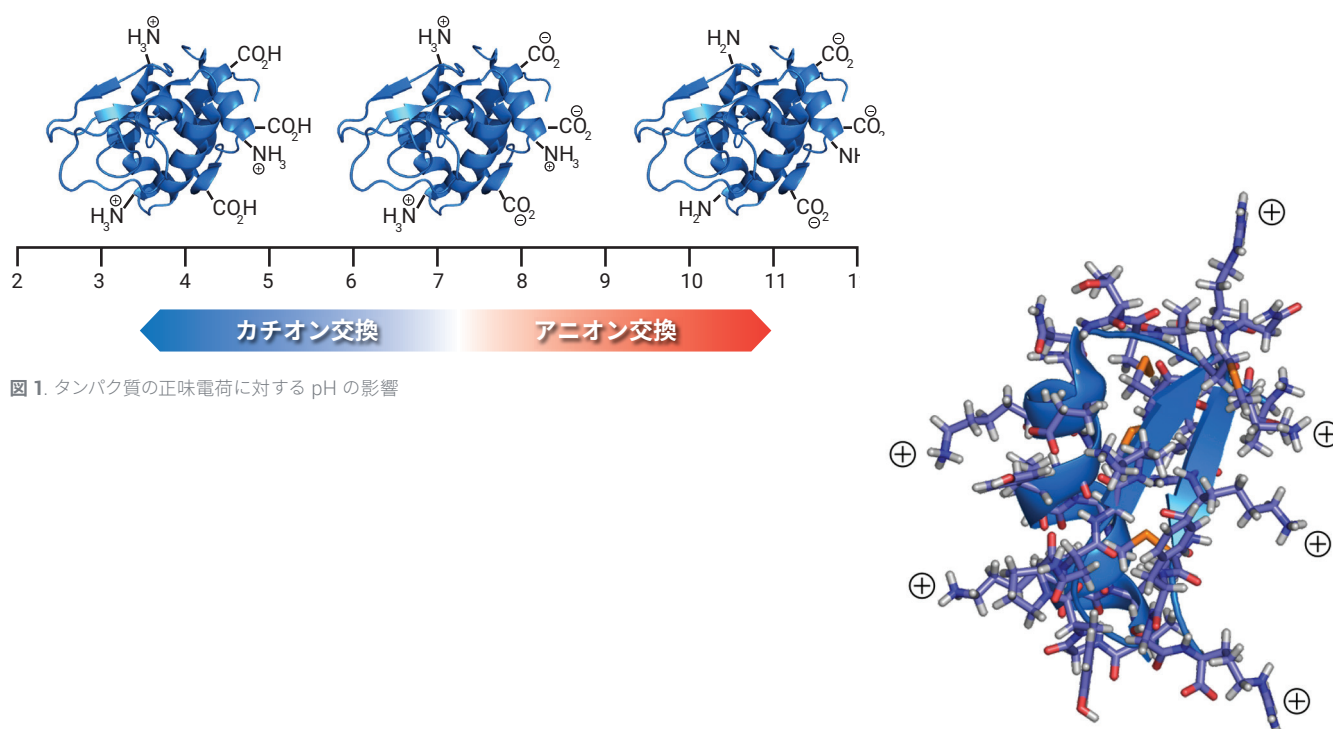


図 1. タンパク質の正味電荷に対する pH の影響

非変性条件下での一般的な分離手法としてのイオン交換

イオン交換クロマトグラフィーは、イオン電荷の違いを利用した生体分子の分離法として広く使用されています。穏やかな非変性的テクニックであり、有機溶媒を必要としないため、天然型または活性型タンパク質の特性解析や精製にも多用されています。

タンパク質は多様な官能基を持ち、これによって電荷に違いが生じます。酸性基には C 末端カルボン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸の酸性側鎖、グリコシル化タンパク質のシアル酸から生じる酸性基などがあります。また、塩基性基には N 末端アミンや、アルギニン、リジン、およびヒスチジンの塩基性側鎖などがあります。これらの官能基により、分子の総電荷は周囲の溶液の pH に左右され、その相互作用に応じて使用可能なイオン交換メソッドも変わってきます。移動相では、分離が終了するまでの間、コントロールされた pH を維持する必要があるため、溶出液には水溶性緩衝液が使用されます。

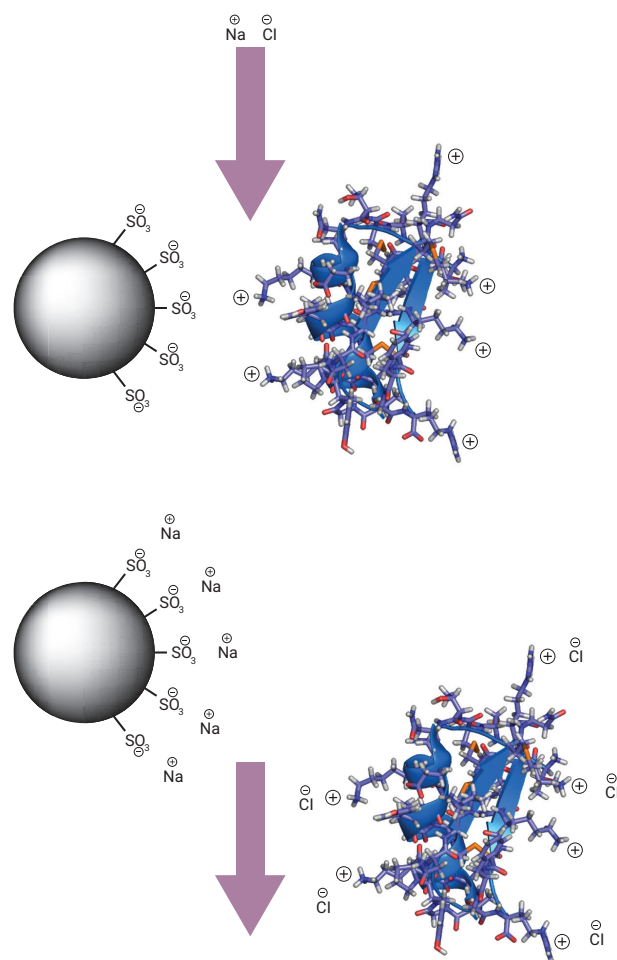


図 2. イオン交換による分離メカニズム

このように、イオン交換は、等電点の異なるタンパク質の分離に適しています。また、単一タンパク質の電荷アイソフォームの分離においても威力を発揮します。ますます重要性の高まるバイオ医薬品分野では、タンパク質がバイオエンジニアリングにより製造され、発酵反応から単離されています。これらのプロセスでは、タンパク質の一次構造の違いを示す電荷アイソフォームを同定することが重要になります。一次構造の違いは、グリコシル化、または C 末端残基の欠失やアミド化/脱アミド化などの分解経路が変化した可能性を示唆します。また、この変化が安定性や活性を変化させ、免疫学的副作用につながる可能性もあります。イオン交換は、創薬プロセスにおいて電荷変異体の分離および定量に使用されているほか、バイオ医薬品の製造段階での品質管理および品質保証にも活用されています。モノクローナル抗体 (mAb) などの高分子を対象とする場合、クロマトグラフィーにおける相互作用が表面電荷との相互作用に限定されことを踏まえ、分子のサイズや構造 (標準的な mAb は 150 kD) を考慮することも重要です。

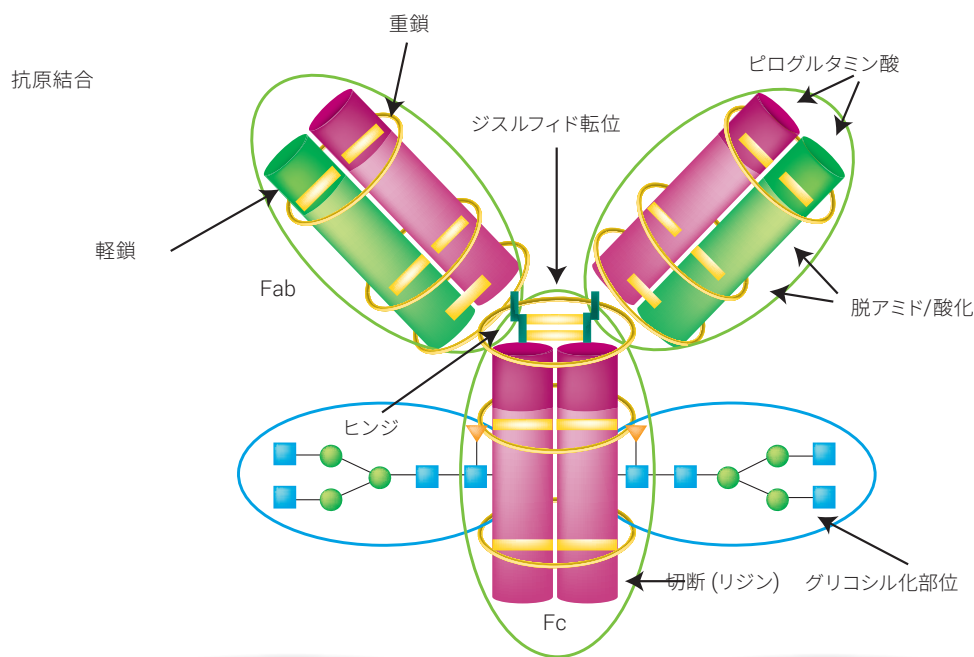
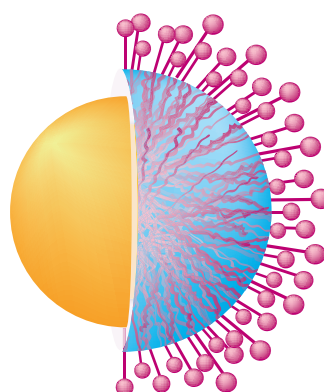


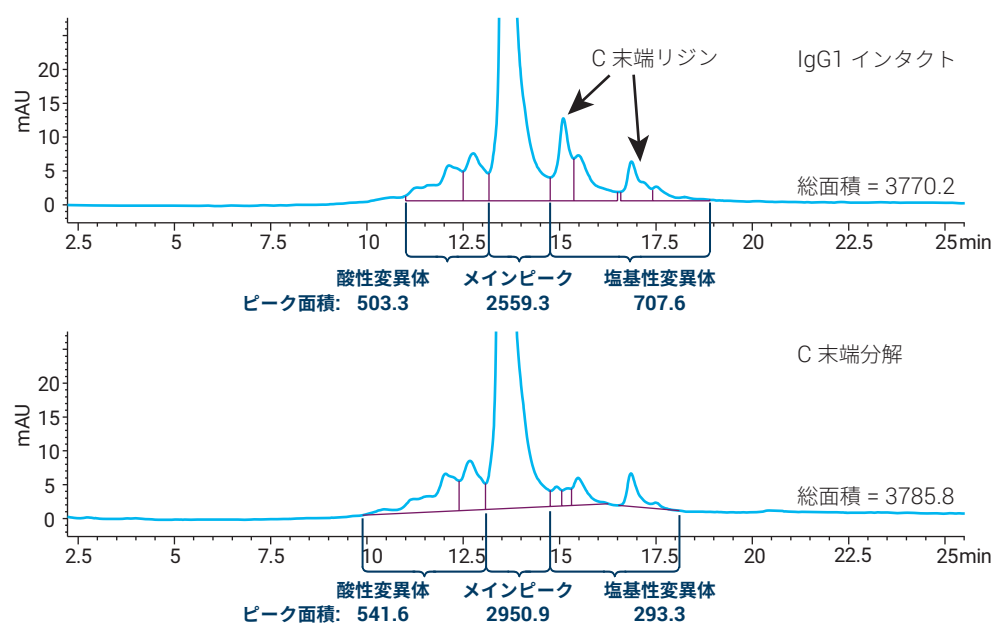
図 3. モノクローナル抗体の電荷変異体は、さまざまなレベルのアミノ酸のグリコシル化、脱アミド化、酸化や、重鎖のリジン切断により生じます。

Agilent Bio MAb HPLC カラム: あらゆる面で卓越した性能を実現

- 耐高圧性に優れた粒子、コーティング層、および結合相により、分離能および分離スピードを向上
- 親水性コーティング層により非特異的な相互作用をほぼ排除
- 親水性ポリマーコーティング層に弱カチオン交換基 (WCX) を高密度で均一に化学結合



Bio MAb による重鎖の C 末端切断の同定



分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	Bio MAb、PEEK、4.6 x 250 mm、5 μm (P/N 5190-2407)
サンプル:	5 μL の 1 mg/mL インタクトまたは C 末端分解 IgG1
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC
移動相:	A: 10 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 5.5 B: A + 0.5 M NaCl
流量:	0.85 mL/min
グラジエント:	0 ~ 25 分で 10 ~ 35 % B
検出器:	UV、225 nm
注入量:	5 μL

図 4. Agilent Bio MAb 5 μm カラムを装着した Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC による C 末端分解 IgG1 の計算。このカラムの優れた分離能により、良好なピーク同定と正確な定量が実現されています

信頼性の高いイオン交換分離を達成するために

ステップ 1:

サンプル前処理

イオン交換クロマトグラフィーのサンプル前処理は、他のタンパク質分析の場合とほとんど変わりません。最も重要な点は、サンプルを溶出液に溶解させる必要がある点です。できれば移動相そのものに溶解させるのが理想的です。カラムの損傷を防ぐために、使用前にサンプルをろ過して粒子を除去することをおすすめします。ただし、溶けきらなかったサンプルを除去する目的でろ過を使用しないでください。完全に溶解しない場合は、別の溶出液を検討してください。



Captiva 低タンパク除去フィルタ

Agilent Captiva プレミアム PES シリンジフィルタは、一貫性のある優れた低タンパク質結合特性を備え、タンパク質関連のろ過に最適です。一般に、LC 分析には、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンよりもポリエーテルスルホン (PES) フィルタメンブレンの方が適しています。アジレントの PES は、一般的な LC 溶媒で PVDF と同様の適合性を持ち、タンパク質の結合とクリーンさについてはそれ以上に優れています。詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



Captiva プレミアム PES シリンジフィルタ

直径 (mm)	ポア サイズ (μm)	適合性	ハウジング	部品番号
4	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5094
4	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5095
15	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5096
15	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5097
25	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5098
25	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5099



タンパク質およびペプチド分析のための AssayMAP 自動サンプル前処理システム

AssayMAP サンプル前処理システムは、タンパク質の精製および分解、ペプチドの精製および分注を自動化します。手作業による操作が最小限で済み、ワークフローの再現性と効率が最大限に高まります。標準化されたユーザーインターフェースにより、重要な分析パラメータを柔軟にコントロールしながら、シンプルなワークフローを実現できます。AssayMAP 技術によりもたらされる優れたデータ品質と幅広い機能により、創薬からバリデーションおよび生産まで多様なスケールに対応できるのも、AssayMAP ならではの特長です。

- 再現性の高い結果
- 手作業による操作を削減
- シンプルでカスタマイズ可能なプロトコル
- 1日あたりのスループットを8サンプルから384サンプルに向上
- 容易なメソッド移管

AssayMAP 技術の詳細については、以下の Web サイトをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

このガイドで取り上げているようなインタクトタンパク質の分析ワークフローでは、AssayMAP プラットフォームでプロテイン A またはプロテイン G マイクロクロマトグラフィーカートリッジを使用してターゲットタンパク質を定量的に精製し、HPLC カラムに導入することで、インタクトタンパク質の電荷変異体を分離、検出することができます。

サンプル前処理を効果的に行うためには、サンプルを溶解する際に、サンプルそのものの性質が変わらない手法を用いることも重要です。



ステップ 2:

カラムの選択 - イオン交換

アプリケーション	アジレントのカラム	特徴
モノクローナル抗体	Bio MAb	モノクローナル抗体を徹底的に特性解析するためには、酸性および塩基性アイソフォームを同定し、モニタリングする必要があります。Agilent Bio MAb HPLC カラムには、電荷の違いをもとにモノクローナル抗体を高分離能分離するために設計された独自の樹脂が充填されています。
ペプチドおよびタンパク質	Bio IEX	Agilent Bio IEX カラムには、非多孔質のイオン交換ポリマー粒子が充填されています。高分離能、高回収率、高効率の分離を実現するように設計されています。
タンパク質、ペプチド、および脱保護合成オリゴヌクレオチド	PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å	化学的安定性の高い全多孔質ポリマーに共有結合した強アニオン交換基により、広い動作 pH 範囲を実現します。アニオン交換容量が pH に左右されることもありません。合成オリゴヌクレオチドの場合は、温度、有機溶媒、高 pH の変性条件を使用した分離にも対応できます。5 µm メディアでは高分離能での分離が可能です。30 µm メディアは中圧での液体クロマトグラフィーに適しています。
球状タンパク質およびペプチド 非常に分子量の大きい生体分子	PL-SAX 1000 Å PL-SAX 4000 Å	
小さなペプチドから高分子量のタンパク質	PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å	PL-SCX は、マクロポラス型のスチレンジビニルベンゼンポリマーに親水性コーティングと強カチオン交換基を化学結合させた、ポリマー系の陽イオン交換 HPLC カラムです。このプロセスでは、幅広い生体分子の分析、分離、および精製に最適な密度で強カチオン交換基が結合されるようにコントロールされています。5 µm メディアでは高分離能での分離が可能です。30 µm メディアは中圧での液体クロマトグラフィーに適しています。
球状タンパク質 非常に分子量の大きい生体分子	PL-SCX 1000 Å PL-SCX 4000 Å	
抗体 (IgG、IgM)、 プラスミド DNA、ウイルス、 ファージ、その他のマクロ生体分子	バイオモノリス QA バイオモノリス DEAE バイオモノリス SO ₃	強カチオン交換相、強および弱アニオン交換相。 バイオモノリス HPLC カラムは、Agilent 1100 および 1200 Infinity シリーズをはじめとする LC システムに対応しています。
ウイルス、DNA、高分子量のタンパク質 プラスミド DNS、バクテリオファージ タンパク質、抗体	バイオモノリス QA バイオモノリス DEAE バイオモノリス SO ₃	

カラムメディアの選択

多くのクロマトグラフィーテクニックと同様に、イオン交換カラムにも幅広い選択肢があります。イオン交換の場合、まず考えなければならないのは「アニオン交換か、カチオン交換か」ということです。強イオン交換または弱イオン交換のいずれかを選択する必要もあります。通常は、強イオン交換カラムからスタートするのが良いでしょう。その後、異なる選択性を得るために、必要に応じて弱イオン交換カラムを使用することもできます。

強カチオン交換カラムの官能基はスルホン酸のため、酸性度のきわめて高い移動相以外では固定相が負に帯電します。逆に、強アニオン交換カラムの官能基は4級アミン基のため、塩基性度のきわめて高い移動相以外では正に帯電します。強イオン交換カラムの動作範囲が非常に幅広いのは、そのためです。これに対し、弱イオン交換充填剤(弱カチオンイオン交換カラムではカルボン酸、弱アニオン交換カラムではアミン)には、移動相の条件がより強く影響します。これらの官能基はタンパク質自体の荷電基に近い性質を持ち、イオン強度や移動相のpHによって荷電の程度が左右される可能性があります。

これによって分離能が変化する可能性があります。使用条件を慎重に選んでも、コントロールし、最適化できる範囲は限られます。そのため、弱イオン交換カラムは、強イオン交換カラムでは満たせない選択性が場合によっては得られる、付加的な手段として位置付けられます。

ポアサイズ

容量よりも分離能が重視される状況では、Agilent Bio IEX シリーズのような(適切な表面官能基を持つ)硬質の球状非多孔質粒子が有効です。分子量の大きい生体分子を分析する場合、または最大限のスピードが求められる場合は、Agilent バイオモノリスカラムが最適です。PL-SCX や PL-SAX 充填剤など一部の固定相は、ポア径が 1000 Å または 4000 Å の全多孔質粒子です。タンパク質が妨げられることなく構造内に完全に浸透することのできるポアサイズを選ぶことが重要です。

卓越した分離能力

親水性ポリマー層と高密度のイオン交換基により、幅広い等電点 (pI) のタンパク質混合物に対して非常にシャープなピーク形状と高い分離能が得られています。

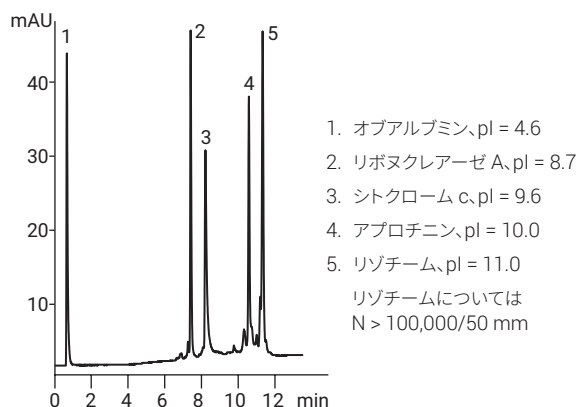


図 5. Agilent Bio SCX の卓越した分離能力

分析条件

パラメータ	設定値
カラム:	Bio SCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2423)
バッファ: A:	10 mM リン酸バッファ、pH 6.0
流量:	0.5 mL/min
グラジエント:	0 ~ 1.0 M NaCl、15分
検出器:	280 nm

粒子径

粒子径はカラムを選択するうえで重要な要素です。粒子径が小さいほど分離効率は高まりますが、動作圧力が高くなります。生体分子は比較的大きく、拡散が遅いため、小さな粒子径のカラムを使用しても、必ずしも低分子と同じように分離能が向上するわけではありません。また、水溶性緩衝液からなる移動相は比較的粘度が高いため、背圧が過剰にかからないように注意する必要があります。

カラムハードウェア

カラムは、目的に応じた粒子サイズを詰めたステンレスあるいは PEEK 管から選択できます。生体高分子のイオン交換分離には、必ずしも 25 cm のカラムは必要ではありません。しかしながら、カラムを長くすることで分離を改善できることもあります。カラムの長さを長くする場合、カラム背圧は長さに応じて高くなるので、粒子径を大きくすることが必要になります。分析時間を短くしスループットを向上させる場合、より小さな粒子を用いた短いカラムを使用すると、分離を向上させつつ分析時間を 5 倍程度まで早くすることができます。

アジレントの 3 μm イオン交換カラムを使用したカチオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質標準の分離

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio SCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2423)
カラム B:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2443)
カラム C:	Bio MAb、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2403)
サンプル:	リボヌクレアーゼ A、シトクローム c、リゾチーム、タンパク質混合物
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC
移動相:	A: 10 mM リン酸ナトリウム、pH 5.7 B: A + 1 M NaCl
流量:	0.5 mL/min
グラジエント:	0 分 - 100 % A : 0 % B 25 分 - 0 % A : 100 % B
温度:	室温
検出器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC に搭載のダイオードアレイ検出器、220 nm

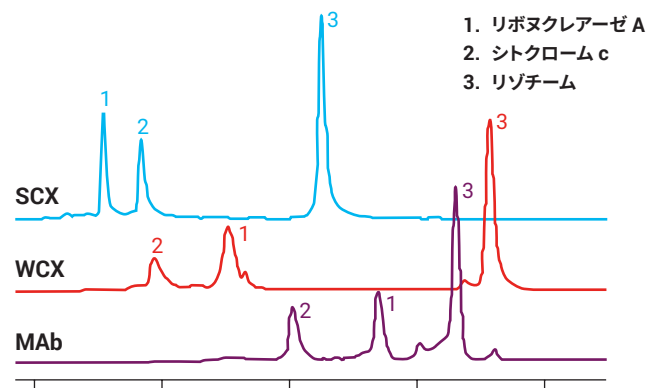


図 6. アジレントの 3 μm イオン交換カラムを使用したカチオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質標準の分離

小さな粒子と短いカラムによる分析の高速化 – 分離時間を 30 % 短縮

この実験ではステンレス製カラムを使用していますが、塩グラジエントは金属を侵しやすく、カラム壁と接触した状態が続くと腐食が生じることがわかっています。PEEK カラムではこのような問題が起こらないため、金属と反応しやすい分子を扱う場合に役立ちます。ただし、使用時には背圧を抑える必要があります。メタルフリーのサンプル流路を構成するには、PEEK カラムを、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC など生体不活性な機器と組み合わせて使用します。

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 250 mm、5 μm (P/N 5190-2445)
カラム B:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2443)
サンプル:	0.5 mg/mL
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC
移動相:	A: 20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.5 B: A + 1.6 M NaCl グラジエント: 0 分 - 100 % A : 0 % B
グラジエント:	0 ~ 50 % B
温度:	室温
注入量:	10 μL
検出器:	UV、220 nm

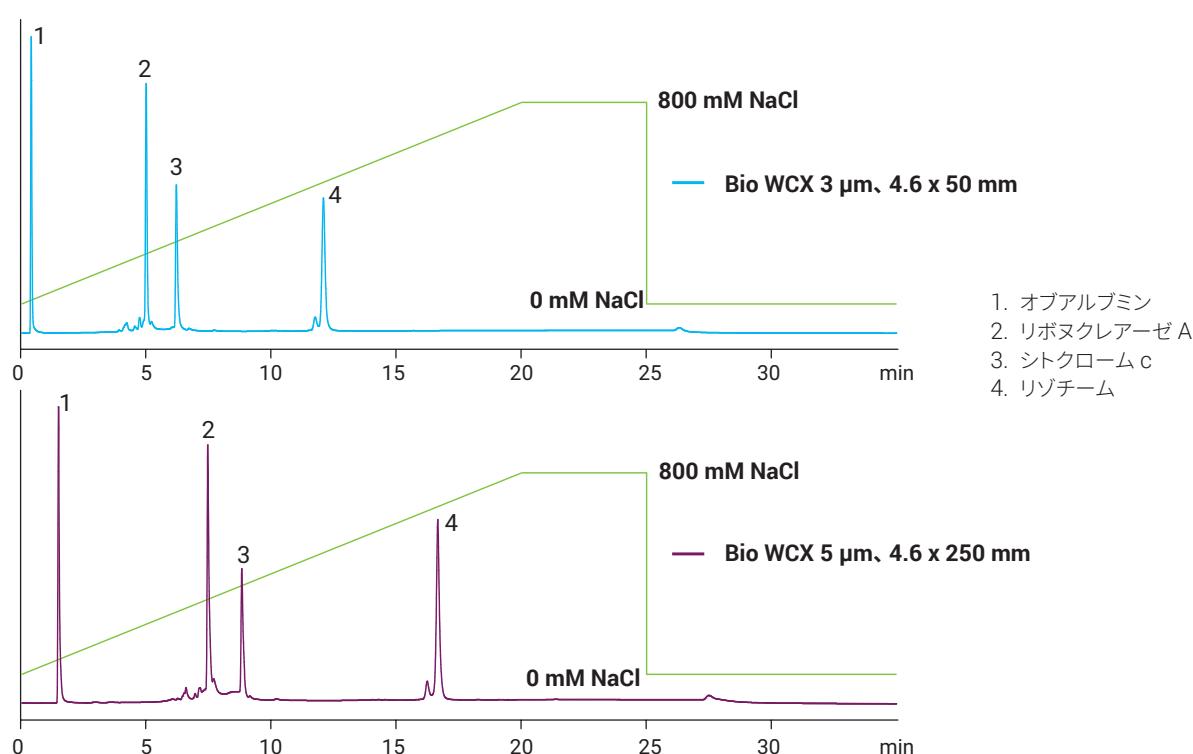


図 7. Agilent Bio WCX カラム (4.6 x 50 mm、3 μm および 4.6 x 250 mm、5 μm) による流量 1 mL/min でのタンパク質の分離。小さな粒子と短いカラムを使用することで分析時間が短縮されています。サンプル溶出時間は、長いカラムで 17 分だったのに対し、短いカラムではわずか 12 分です。

カラム径

カラム径も重要な要素であり、分析するサンプルの量に応じて選択する必要があります。限られた量のサンプルしか使用できない場合は、内径 2.1 mm のカラム (流量 0.35 mL/min) が適しています。ただし、内径の小さなカラムを使用する場合は、過剰な分散や分離能の低下を避けるため、カラムから検出器までのシステムボリュームを最小化することが重要です。

ステップ 3:

HPLC システムに関する考慮事項

このタイプの分析には、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC が最適です。この機器なら、pH 1 ~ pH 13 の極端な pH 値や高い塩濃度のバッファなど困難な溶媒条件に容易に対応します。

溶媒送液システムに耐腐食性に優れたチタンを、またサンプル流路にメタルフリーの材質を採用し、きわめて堅牢な機器となっています。

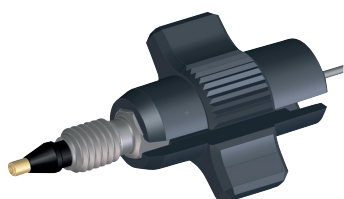
検出

複数のアミノ酸がアミド結合により結合したタンパク質などの生体分子の場合、波長 210 nm または 220 nm での UV 検出により、最善の信号強度と感度が得られます。ただし、イオン交換に広く使用されている溶出液には、低波長で高いバックグラウンド吸光度を示すものもあります。この場合は、代わりに 254 nm または 280 nm を使用する必要があります。ところが、これらの波長で検出されるのは、芳香族またはそれより大きな共役側鎖を持つアミノ酸のみのため、感度が大幅に低下します。

相互作用のないクロマトグラフィーの最適化

Agilent バイオイナート LC 用消耗品を使用することで、不要な相互作用が完全に排除された確かな結果が得られ、システム効率が向上します。また、ピーク形状および再現性が改善され、さらに信頼性の高いクロマトグラフィーが実現します。

詳しくはこちら: www.agilent.com/chem/biosupplies



Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、イオン交換クロマトグラフィーに最適な HPLC システムです

ステップ 4:

流量

内径 4.6 mm のカラムの標準的な流量は 0.5 ~ 1.0 mL/min です。一部のアプリケーションでは、分析のスピードが重要となります。分析時間は、短いカラム (従来の 150 mm または 250 mm カラムに代わって 50 mm カラムなど) を使用することで短縮できます。また、流量を上げたり、短いカラムと高流量を併用する方法も効果的です (カラムの圧力上限を超えないように注意してください)。

小さい粒子サイズにより分離能が向上

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μ m (P/N 5190-2443)
カラム B:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、1.7 μ m (P/N 5190-2441)
サンプル:	0.5 mg/mL
機器:	Agilent 1260 Infinity パイオイナートクォータナリ LC
移動相:	A: 20 mM リン酸ナトリウム、pH 6.5 B: A + 1.6 M NaCl
グラジエント:	0 ~ 50 % B
温度:	室温
注入量:	10 μ L
検出器:	UV、220 nm

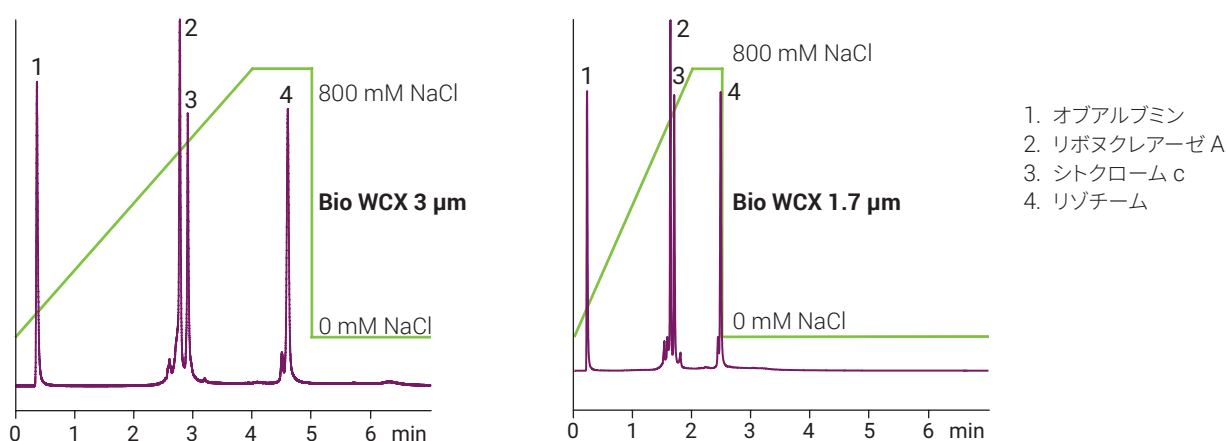


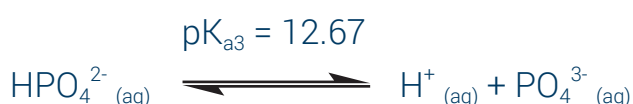
図 8. 流量を上げることで分析時間が短縮されています。ピーク形状や分離能の低下は認められません

移動相の選択

ステップ 5:

初期移動相は、タンパク質の pI と分析メソッド (カチオン交換か、アニオン交換か) にもとづいて選択します。図 10 に、一般的に使用されているバッファを示します。

バッファは、分離が終了するまで pH の変化をコントロールし、分析対象化合物の電荷を一定に保つ役割を担います。バッファがこの役割を十分に果たすことができるのは、その解離定数 pKa から 1 pH ユニットの範囲内のみであることに注意してください。リン酸またはリン酸塩の解離定数は以下の 3 つです。



すなわち、pH 範囲 6 ~ 7 のリン酸バッファはカチオン交換クロマトグラフィーに適しており、通常は 20 ~ 30 mM の濃度で使用します。このバッファには、210 nm でのバックグラウンド吸光度が低いという利点があります。バッファは、一定の手順に従って正確に調製することが重要です。イオン強度や pH のわずかな違いが、タンパク質のリテンションタイムにさまざまな影響をおよぼし、分離能の低下やクロマトグラフィープロファイルのばらつきを招く可能性があるからです。

標準的な使用条件下で完全にイオン化される強イオン交換カラムとは異なり、弱イオン交換カラムの場合は、バッファの pH やイオン強度がカラムのイオン化の程度に影響する可能性があることを認識しておいてください。弱イオン交換カラムは、目的とする分離を達成するために選択性を変える手段として利用できる方法の 1 つです。

ただし、カラムから生体分子を溶出させるには、競合イオンの導入が必要になります。通常、これは塩化ナトリウムによる直線グラジエントで行います。溶出液 A には、適切な pH に調整したバッファを使用します。溶出液 B には、同じ濃度のバッファで塩化ナトリウム濃度を高くし (0.5 M 程度)、pH を同じ値に調整したものを使用します。



分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio MAb、PEEK、4.6 x 250 mm、5 μm (P/N 5190-2407)
サンプル:	PBS (リン酸バッファ生理食塩水) に溶解したタンパク質 3 種の混合液、 pH 7.4、リボヌクレアーゼ A: 13,700 Da、pI 9.6、シトクローム c: 12,384 Da、 pI 10 ~ 10.5、リゾチーム: 14,307 Da、pI 11.35
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
移動相:	A: 水 B: 1.5 M NaCl C: 40 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40 mM Na ₂ HPO ₄ Buffer Advisor ソフトウェアにより事前に決定した割合で C と D を混合することにより、目的とする pH 範囲とイオン強度のバッファを調製
流量:	1 mL/min

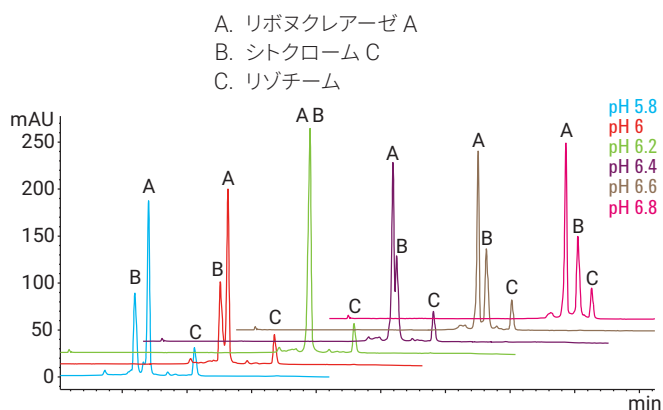


図 9. 3 種のタンパク質からなる混合液の分離を目的とした、動的に混合される 4 成分グラジエントを用いた pH スカウティング

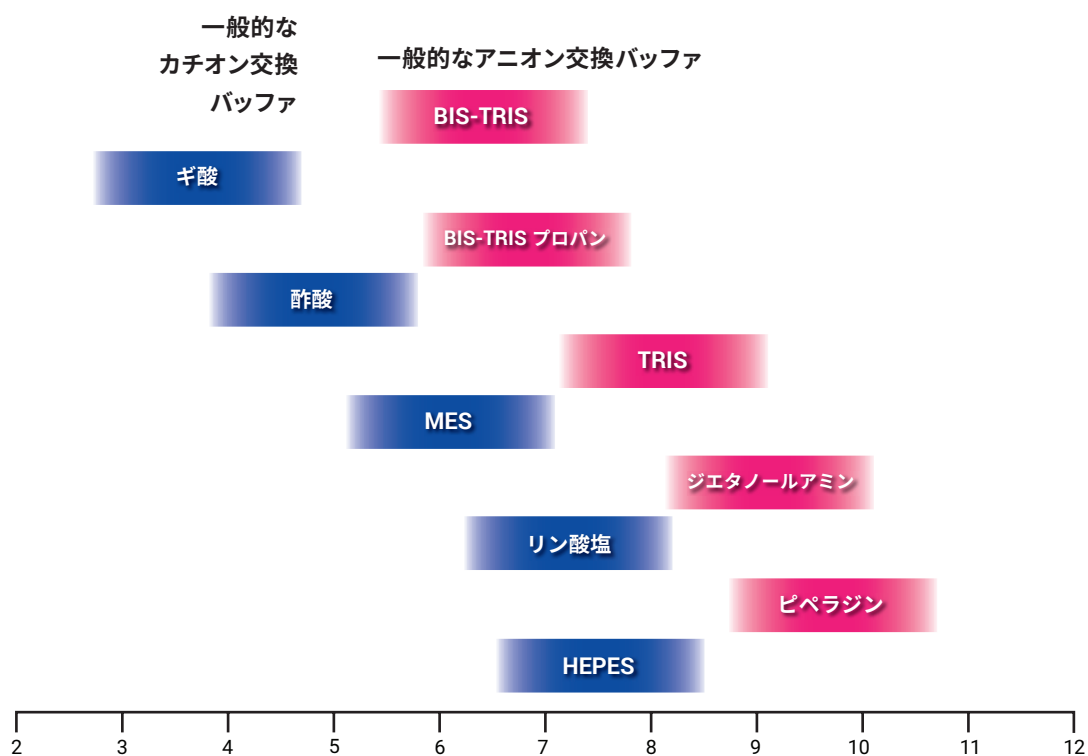


図 10. 一般的なイオン交換バッファ

効果的なイオン交換メソッドの開発

メソッド開発にあたって留意しなければならないのは、モノクローナル抗体などの生体分子がきわめて複雑だということです。一般的な mAb は、1300 種類以上のアミノ酸で構成されています。そのうち、おそらく 130 種類ほどには酸性残基があり、180 種類ほどには塩基性残基があります。モノクローナル抗体は中性 pH 領域で正味の正電荷を持つ可能性が高いため、分離にはカチオン交換カラムを使用する必要があります。しかし、そうした分子の実際の等電点 (pI) を予測するのは困難であるため、メソッドの開発または最適化が必要となることが予想されます。

サンプル前処理

- サンプルは、移動相 (溶出液 A) に最適な状態で溶解されている必要があります
- サンプルが濁っている場合は、移動相条件を変更してください
- ろ過や遠心分離によりサンプルの濁りを解消することもできますが、このプロセスによってサンプルの組成が変化する可能性もあります
- サンプルは使用時に調製し、すぐに分析してください
冷蔵することにより、サンプルの「消費期限」を延ばすことができます
- バッファ内で細菌が急速に繁殖することがあります

カラムメディアの選択

- アニオンおよびカチオン交換のいずれを選択するかは、分析対象タンパク質の等電点により異なります
- 強イオン交換カラムからスタートするのが良いでしょう。弱イオン交換カラムは、異なる選択性を得るために必要に応じて使用します

カラムの選択

- ポアサイズ: 分析対象のタンパク質は、妨げられることなく粒子内に浸透できなければなりません。カラムの保持容量がそれほど重視されない状況では、球状非多孔質粒子を使用することで最大限の分離能が得られます
- 粒子径: 粒子が小さいほど、分離能は高まります (この場合、背圧が高くなります)
- カラム長: 短い 50 mm カラムを使用することで、分離スピードを上げることができます。その効果は、粒子が小さいほど高まります。高い分離能が必要な場合は、長い 250 mm カラムを使用します
- カラム内径: カラムの内径が小さいほど、溶媒消費量と注入量が少なくなります (使用できるサンプルが限られている場合に役立ちます)



移動相

- 目的とする動作 pH を保つため、移動相にはバッファを混合する必要があります (通常は 20 mM)。弱イオン交換カラムを使用する場合は、バッファの pH とイオン強度が分離能に影響を与える可能性があるため、最適な条件を実験によって求めることが必要です
- 移動相に塩化ナトリウムを添加すると pH が変化します。添加後は、必要に応じて pH を再調整してください
- 移動相は使用時に調製し、すぐに使用してください。低濃度のバッファを室温で保管すると、細菌が急速に繁殖します
- バッファの消費期限は、非冷蔵状態で 7 日未満です
- 使用前にろ過し、水 (可能性低) や緩衝液塩 (可能性高) 中の微粒子を除去してください



カラムのコンディショニングと平衡化

イオン交換分離の再現性を確保するためには、グラジエントにカラムの平衡化およびクリーンアップステップを設けることが不可欠です。イオン強度を高めるか、溶媒の pH を変化させるか、あるいはその両方の手段を用いれば、タンパク質を溶出させることができます。そのため、各分析の最後に、カラムを平衡化して、イオン強度や pH を最初の条件に戻す必要があります。これを行わないと、次の分析時にタンパク質とカラムの相互作用が変化し、同じプロファイルが得られなくなります。

ソフトウェア

シンプルなワークフローの実現に役立つもう 1 つの手段が、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアです。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使えば、塩グラジエント (図 11) や pH グラジエント (図 12) をすばやく簡単に作成できます。バッファの調製、バッファの混合、pH スカウティングといった煩雑でエラーの起こりやすいメソッド開発ステップは不要になります。Buffer Advisor ソフトウェアは、1260 Infinity バイオイナートクォータリポンプの混合原理にもとづき、わずか 4 種類の原液から溶媒を動的に調製できます。これにより、バイオ分析のワークフローが簡略化され、バッファの調製にかかる時間が大幅に短縮されます。また、バッファがより正確に調製されるため、他のラボへのメソッド移管の頑健性も高まります。

塩グラジエントの作成では、チャンネル D の塩溶媒の量を徐々に増やししながら、チャンネル A および B の酸性および塩基性バッファ成分、チャンネル C の希釈用の水と混合します。



迅速なバッファスカウティングを実現する Agilent Buffer Advisor ソフトウェアビデオを見る: agilent.com/chem/bufferadvisor-video

20の実験の初期スクリーニングでは、通常なら40種類の溶液が必要となるところ、わずか4つの移動相原液だけで完了することができました。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアにより、目的とする pH とイオン強度になるようにバッファが自動的に混合されます。それをもとに、グラジエントのタイムテーブルをクォータナリポンプでプログラミングすることができます (図 13)。

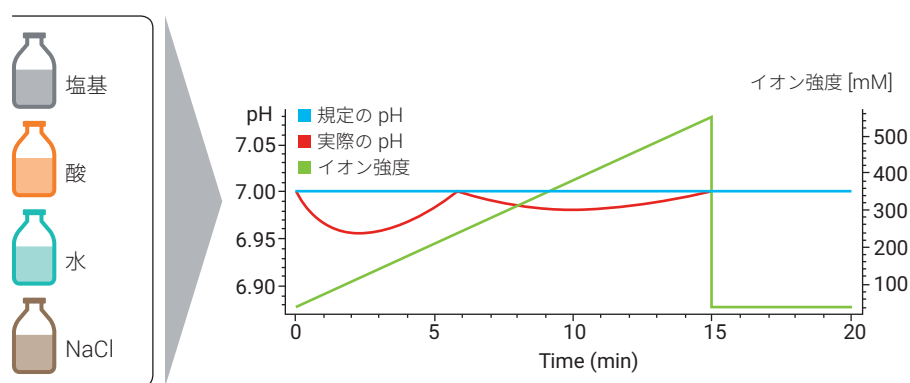


図 11. Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用することで、原液から塩グラジエントを簡単に作成できます

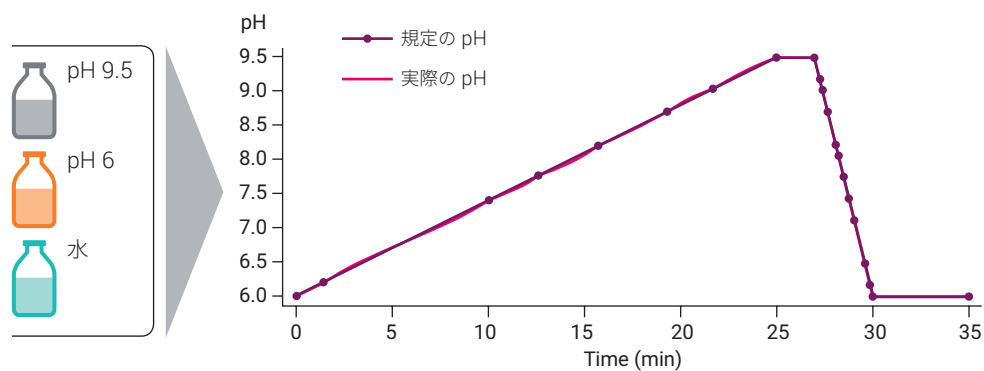


図 12. モノクローナル抗体分離のためのバッファ強度の最適化 - 原液から pH グラジエントを簡単に作成できます

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio WCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2443)
カラム B:	Bio SCX、ステンレス、4.6 x 50 mm、3 μm (P/N 5190-2423)
サンプル:	IgG モノクローナル抗体
サンプル濃度:	2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウムバッファ中、pH 6.0)
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC
移動相:	A: 水 B: 1.5 M NaCl C: 40 mM NaH ₂ PO ₄ D: 40 mM Na ₂ HPO ₄ Buffer Advisor ソフトウェアにより事前に決定した割合で C と D を混合することにより、目的とする pH 範囲とイオン強度のバッファを調製
流量:	1.0 mL/min
グラジエント:	提示したクロマトグラムの条件: pH 5.0 ~ 7.0、バッファ強度 10 ~ 25 mM、0 ~ 500 mM NaCl、0 ~ 15 分、500 mM NaCl、15 ~ 20 分 DOE 実験: pH 5.0 ~ 7.0 0 ~ 200 mM、0 ~ 250 mM、0 ~ 300 mM
温度:	室温
注入量:	5 μL
検出器:	UV、220 nm

自動メソッド開発により、最適なアイソフォーム分離を実現

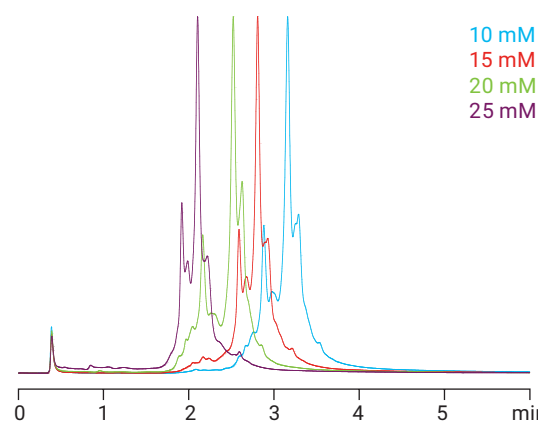


図 13. モノクローナル IgG 分離クロマトグラムのスクリーニングによる pH 6.5 におけるバッファの最適化

分析条件

パラメータ	設定値
カラム A:	Bio MAb、PEEK、4.6 x 250 mm、5 μm (P/N 5190-2407)
サンプル:	IgG モノクローナル抗体
サーモスタット	
移動相:	A: 10 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 6.0 B: 10 mM 重炭酸ナトリウムバッファ、pH 9.5
流量:	1.0 mL/min
グラジエント:	時間 (分) 移動相 (% B) 0 0 25 100 27 100 30 0
ポストタイム:	5 分
温度:	30 °C
データ	214 および 280 nm
取り込み:	
採取レート:	20 Hz
フローセル:	60 mm パス
注入量:	10 μL (ニードル洗浄、フラッシュポートを 7 秒間作動)
検出器:	

Bio MAb カラムによる高精度の定量と堅牢なメソッドの実現

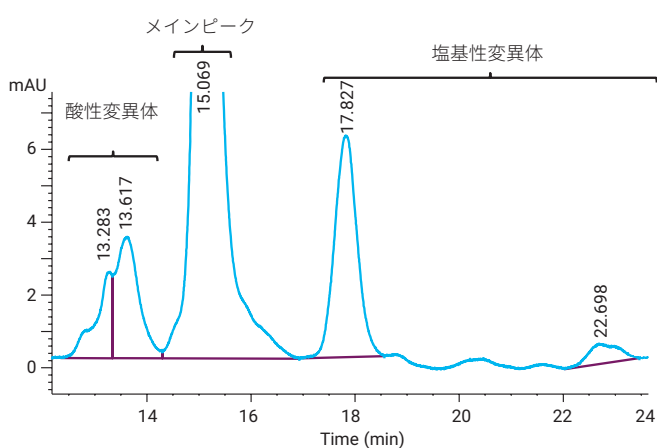


図 14. Agilent Bio MAb PEEK、4.6 x 250mm、5 μm カラムを使用して pH グラジエントによるカチオン交換で分離した IgG1 のクロマトグラム

Charge Heterogeneity Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar mAbs

Authors

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies India Pvt.
Ltd,
Bangalore, India

Abstract

This Application Note describes the high-resolution separation of charge variants of innovator and biosimilar rituximab using an Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC, biocolumns, and an Agilent OpenLAB ChemStation Software tool. An Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK ion exchange column features a unique resin designed for the charge-based separation of monoclonal antibodies (mAbs). The optimized salt-gradient showed the differences in acidic and basic charge variant profiles between innovator and biosimilar rituximab. Precision of retention time, height, and area of charge isoforms were well within the acceptable range. C-terminal digestion by Carboxypeptidase B (CPB) revealed the major lysine variant peaks in biosimilar rituximab.

Introduction

Recombinant monoclonal antibodies (mAbs) are important biotherapeutics with a wide range of diagnostic and clinical applications. Recently, biosimilar products are increasing in popularity in biopharmaceuticals. mAbs can undergo various post-translational modifications (PTMs) including lysine truncation, deamidation, oxidation, glycosylation, and so forth, becoming heterogeneous in their biochemical and biophysical properties. Due to these modifications, charge variants can affect the efficacy, activity, and stability of mAbs as biotherapeutics. Hence, it is very important to characterize the charge heterogeneity in drug development that will serve as a quality control (QC) step in the biopharmaceutical industry. In addition, precise bioanalytical methods are necessary to demonstrate the similarity between a biosimilar and the innovator product.

Cation exchange chromatography (CEX) is the gold standard for charge-sensitive antibody analysis. In CEX, method parameters often need to be optimized for each protein, as ion exchange depends upon the reversible adsorption of charged protein molecules to immobilized ion exchange groups. This Application Note describes the salt-gradient method for separating the charge variants of innovator and biosimilar rituximab using an Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC and an Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK ion exchange column. The method compares the CEX profiles of innovator and a rituximab biosimilar. Precision of retention time, height, area, and quantification of acidic, basic, and main forms was determined. Carboxypeptidase B (CPB) digestion was performed to study the contribution of C-terminal lysine variants.

Experimental

Instrumentation

An Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC, operating to a maximum pressure of 600 bar, was used for the experiments. The entire sample flow path was free of any metal components so that the sample did not come in contact with metal surfaces. Solvent delivery was free of any stainless steel or iron components.

Systems

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC Pump (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert High Performance Autosampler (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity Series Thermostat (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity Thermostatted Column Compartment (TCC) containing bio-inert click-in heating elements (G1316C option 19)
- Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector with with 10 mm bio-inert standard flow cell (G1315D)
- Agilent Bio MAb NP5, 4.6 × 250 mm, PEEK (p/n5190-2407)

Software

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, revision C.01.062
- Agilent Buffer Advisor, Rev. A.01.01

Table 1. Chromatographic parameters used for IEX chromatography.

Parameter	Conditions				
Mobile phase A	Water				
Mobile phase B	NaCl (850.0 mM)				
Mobile phase C	NaH ₂ PO ₄ (41.0 mM)				
Mobile phase D	Na ₂ HPO ₄ (55.0 mM)				
Gradient	Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Mobile phase C (%)	Mobile phase D (%)
	0	30.3	0	59.6	10.1
	2	26.0	5.0	56.9	12.1
	8	21.5	10.0	54.9	13.6
	20	13.3	19.0	51.9	15.8
	21	30.3	0	59.6	10.1
Injection volume	5 µL				
Flow rate	0.75 mL/min				
Data acquisition	280 nm/4 nm, Ref.: 360 nm/100 nm				
Acquisition rate	5 Hz				
TCC	Room temperature				
Sample thermostat	5 °C				
Post run time	10 minutes				

Reagents, samples, and procedure

Innovator and biosimilar rituximab were purchased from a local pharmacy and stored according to the manufacturer's instructions. Sodium phosphate dibasic, sodium phosphate monobasic, sodium chloride, hydrochloric acid (HCl), and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich. All the chemicals and solvents were HPLC grade, and highly purified water was from a Milli Q water purification system (Millipore Elix 10 model, USA). Carboxypeptidase B (C9584) was purchased from Sigma-Aldrich.

Ion exchange chromatography parameters

Table 1 shows the chromatographic parameters for ion exchange chromatography using a 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC. Rituximab (innovator and biosimilar) were diluted to 1 mg/mL in water, and the elution was monitored at 280 nm. Retention time (RT), area, and percent area were used to calculate standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD %) values. Relative percent area was used to quantify the charge variants of mAbs.

Carboxypeptidase B digestion

Biosimilar and innovator rituximab were diluted to 1 mg/mL using 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. To these, 0.25 units of CPB was added and incubated at 37 °C. At various time points, the reaction mixture was aliquoted and quenched with acetic acid before analysis.

Results and Discussion

The Agilent Buffer Advisor Software is an ideal tool to generate pH or ionic strength gradients for protein charge variant separation. It reduces the time required for method development. In this study, a series of method development scouting runs were carried out using the Buffer Advisor Software for optimal mAb charge variant separation. Figure 1 shows the charge variant profiles of innovator and biosimilar rituximab on a Bio MAb PEEK column, demonstrating high-resolution separation of charge variants in 20 minutes with three distinct peaks in biosimilar (Buffer: 30 mM, pH: 6.3, and NaCl: 0–161.5 mM). The Agilent Bio MAb columns contained a highly uniform, densely packed, weak cation exchange resin. Early and late-eluting peaks were called acidic and basic variants, respectively. The peak at 11.4 minutes was designated as the main peak. The overlay of five replicates of innovator and biosimilar rituximab shows excellent separation reproducibility (Figure 2). The average RTs and area RSDs for main peak are shown in the figure. The RSDs are within the acceptable range, which demonstrates the precision of the system.

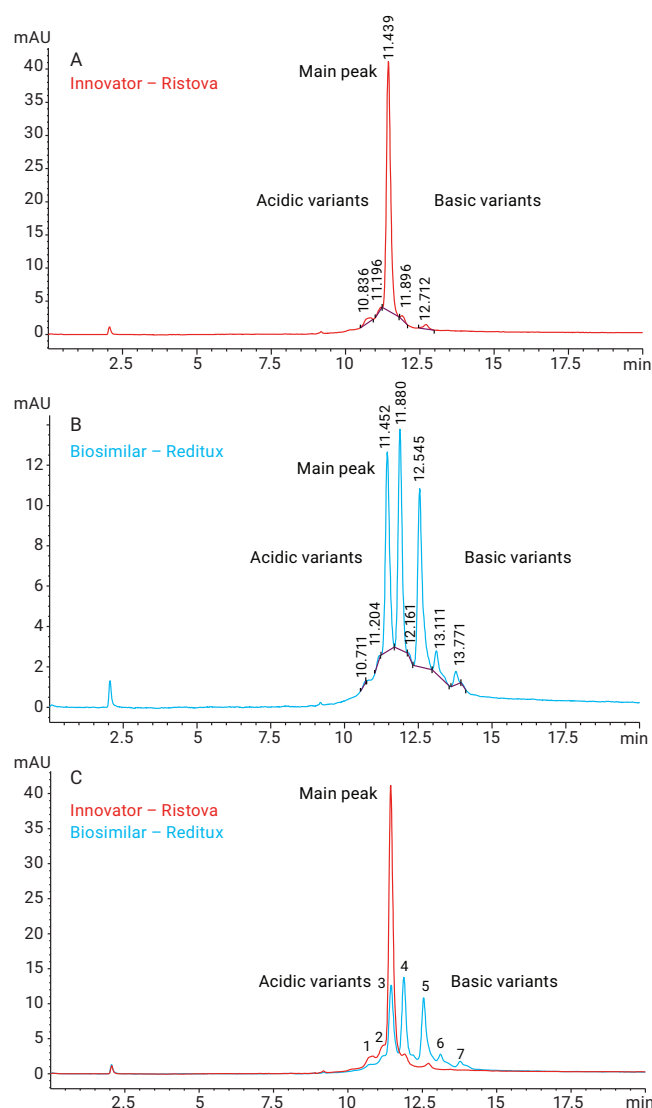


Figure 1. Charge variant profiles of innovator (A) and biosimilar (B) rituximab using an Agilent Bio MAb 5 μ m column. C) Overlay of innovator and biosimilar rituximab. Peaks 1 and 2: acidic variants; 3: main form; 4, 5, 6 and 7: basic variants.

The high-resolution separation of mAbs facilitated the quantification of charge variants using peak areas. Table 2 summarizes the area percent of charge variants of five consecutive analyses. There was a significant difference in the area percent of the charge variants between two mAbs. The main form in the innovator rituximab was found to be 93.21 % and 29.78 % in biosimilar rituximab. The major charge variant in biosimilar rituximab was 69.46 % basic variants as compared to the innovator product (3.22 %).

Table 2. Charge variants quantification by area %, n = 5.

Innovator – Ristova	RT (min)	Area %
Acidic variant	10.84, 11.21	3.56
Main peak	11.44	93.21
Basic variant	11.9, 12.7	3.22
Biosimilar – Ristova	RT (min)	Area %
Acidic variant	10.73, 11.22	0.76
Main peak	11.45	29.78
Basic variant	11.87, 12.15, 12.59, 13.1, and 13.77	69.46

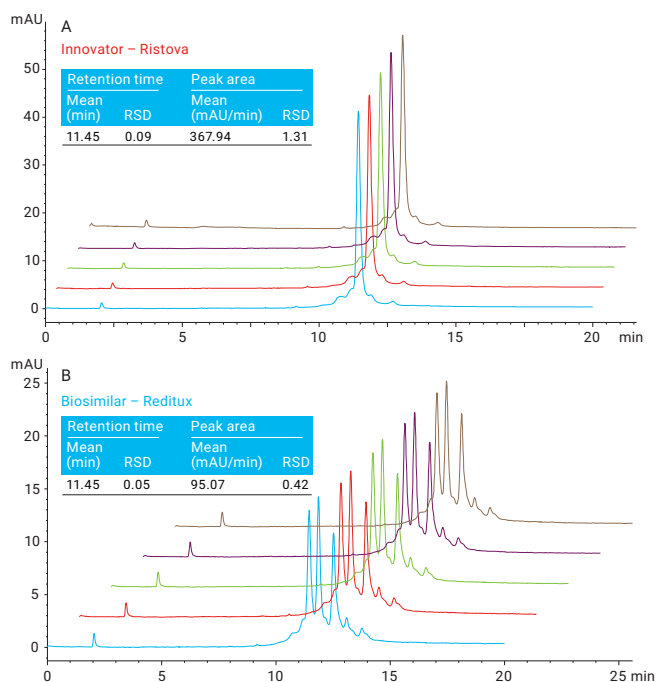


Figure 2. Overlay of five replicates of innovator (A) and biosimilar (B) rituximab on an Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC using an Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK column. Insert table shows the precision of retention time and area for main peak, n = 5.

To further characterize the basic variant mAU peaks, both mAbs were subjected to carboxypeptidase B digestion. Figures 3A and 3B show the overlay 50 of the IEX profiles before and after C-terminal cleavage of innovator and biosimilar rituximab, respectively. The disappearance of basic variant peaks after carboxypeptidase B treatment confirmed that the peaks correspond to lysine 20 variants. Figure 4 shows the overlay of the IEX profiles of biosimilar rituximab after CPB treatment and innovator rituximab without CPB treatment, revealing the charge variant similarity between the mAbs.

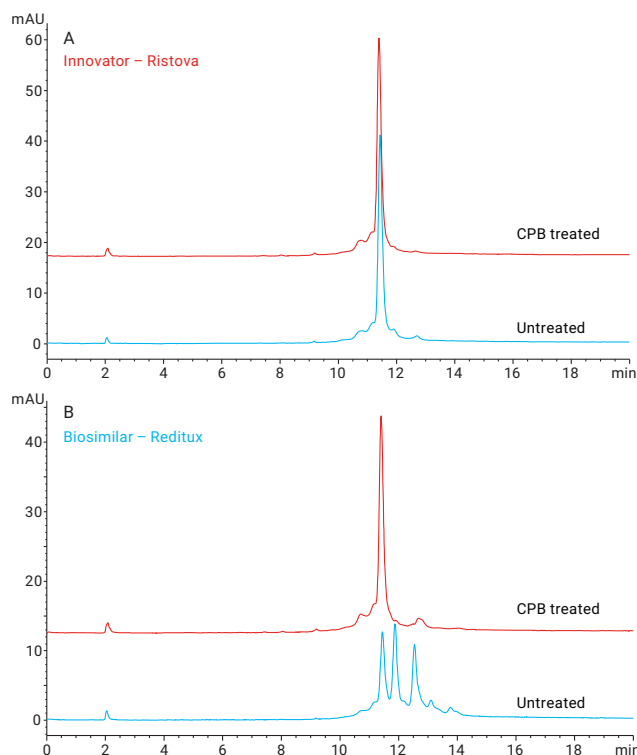


Figure 3. Characterization of basic charge variants. Separation of CPB treated (overnight) and untreated of innovator (A) and biosimilar (B) rituximab on an Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC using an Agilent Bio Mab, 4.6 × 250 mm, 5 μm, PEEK column.

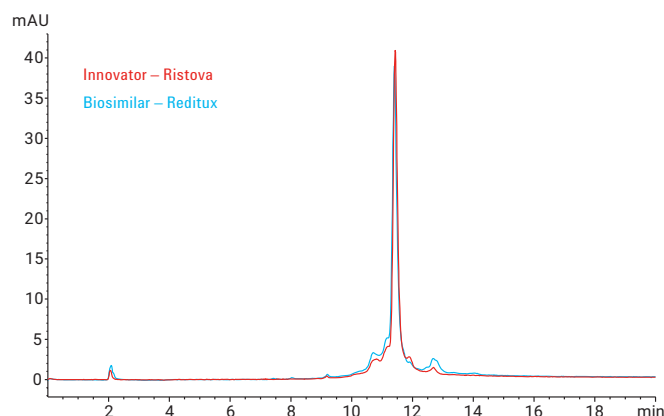


Figure 4. Overlay of innovator rituximab without CPB treatment (red) and biosimilar rituximab after CPB treatment (blue).

Conclusion

The salt-gradient method described in this Application Note demonstrates the high-resolution separation of charge variant profiles of mAbs on an Agilent Bio MAb, 4.6 × 250 mm, 5 μm PEEK column. The innovator and biosimilar rituximab had different separation profiles with different degrees of acidic and basic variants. Carboxypeptidase B digestion confirmed that the major basic variant peaks in biosimilar correspond to lysine variants. The Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC with Bio MAb PEEK columns and reproducible method make this solution particularly suitable for the QA/QC analysis of mAbs for the biopharmaceutical industry.

References

Yan, He; et al. *J. Sep. Sci.* **2011**, 34, 548–555

Agilent publication number 5991-0895EN

Agilent publication number 5990-6844EN

Agilent publication number 5991-0565EN

Optimizing Protein Separations with Cation Exchange Chromatography Using Agilent Buffer Advisor

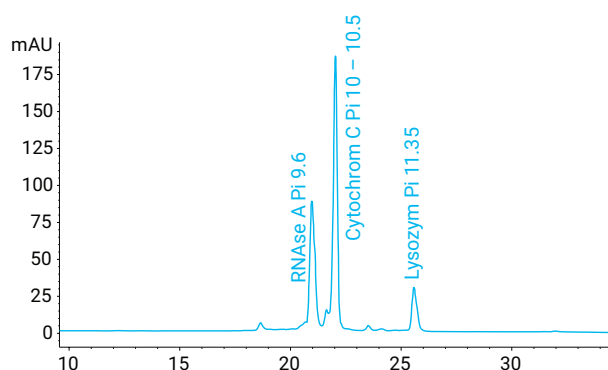
Protein separation with the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System

Authors

Sonja Schneider
Jochen Strassner
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Abstract

This Application Note shows that the Agilent Buffer Advisor software in combination with the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System is an ideal solution for automated protein separation by ionic strength gradients. Usually, pH scouting using premixed two-component gradients is time-consuming and work-intensive. Dynamically mixed four-component gradients calculated by the Buffer Advisor software shorten and simplify the workflow for pH scouting. In addition, excellent retention time precision and pH consistency were gained using the gradients calculated by the Buffer Advisor software.



Introduction

Proteins consist of many different amino acids comprising weak acidic (carboxylic) and basic (amine) groups. Therefore, proteins are amphoteric molecules that exist mostly as zwitterions in a certain pH range. The pH where the protein has no net charge and does not interact with a charged medium is the isoelectric point (pI). In ion exchange chromatography (IEX), the unique relationship between net surface and pH can be used for optimal protein separation. The pH defines the number of charges on the protein and also helps to stabilize the native structure of the protein in the buffer used during analysis.

To ensure optimal binding and elution characteristics of proteins of interest to the IEX column, pH and ionic strength of the deployed buffer are important factors. Even small changes in these two parameters can affect the separation. As a consequence, pH scouting is an important method to find the optimal separating conditions when working with ionic strength gradients. In contrast to pH-gradients, the pH is kept constant in ionic strength gradients. By increasing the ionic strength (salt concentration) of the mobile phase, the less strongly bound proteins are eluted earlier than the stronger bound proteins.

In general, a premixed two-component gradient is prepared for analysis with a starting buffer of low ionic strength and an elution buffer containing high ionic strength. This includes the following preparation steps:

- Dissolving the appropriate buffering compounds at defined concentration
- Titrating the pH with acid/base to the desired pH of the mobile phase
- Splitting the buffer and adding salt to one portion (elution buffer)
- Titrating the pH of the elution buffer with acid/base to the desired pH, if necessary

To perform pH scouting using premixed two-component gradients, prepare different bottles of buffer. To test, for example, six different pH values, it is necessary to prepare 12 bottles of premixed buffer. In contrast, with dynamically mixed four-component gradients, it is necessary to prepare only four bottles to generate various pH values. Further, dynamical mixing of a buffer eliminates the necessity to titrate the buffer solutions manually, which is typically time-consuming and errors prone. The application of dynamically mixed four-component gradients simplifies method development and reduces the time needed for buffer preparation to a large extent by just providing four bottles with stock solutions:

- Line A: Water
- Line B: Salt solution
- Line C: Acidic buffer component
- Line D: Basic buffer component

Using the four stock solutions, different buffers at different pH and salt concentration can be prepared. The Buffer Advisor software is a helpful tool to calculate the percentages of the stock solutions in order to achieve the desired pH, buffer concentration, and ionic strength (Figure 1).

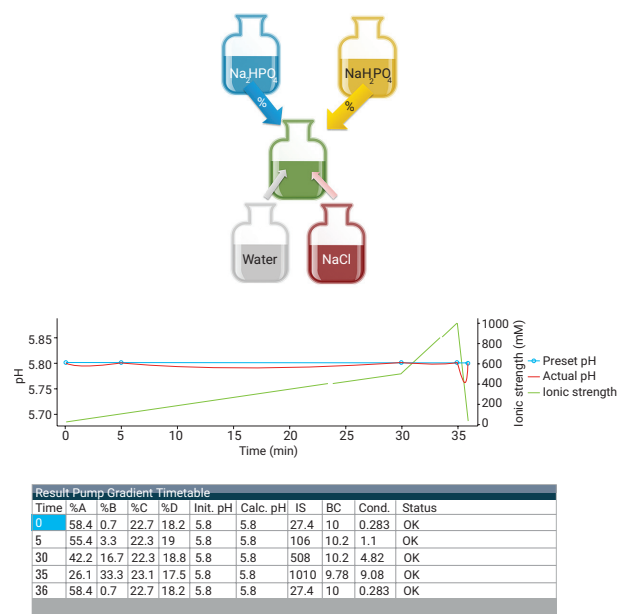


Figure 1. Quaternary mixing to create a salt gradient with constant pH.

The Buffer Advisor software generates a timetable, which can be imported into the method of the 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC Pump using the Import Solvent Blending File function of the Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Figure 2).

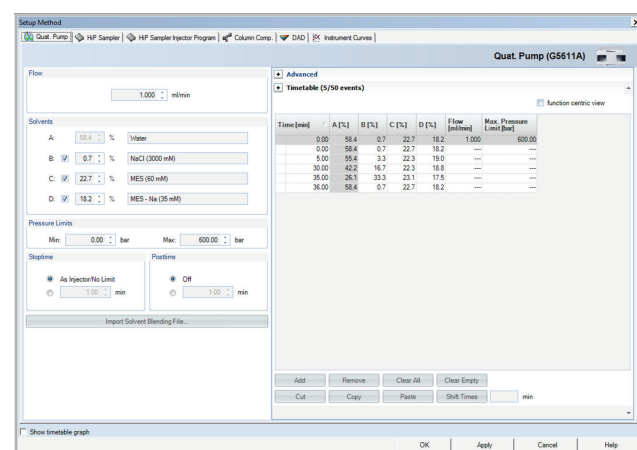


Figure 2. The generated Timetable can be imported into the method of the Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC System through the Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition software.

The Buffer Advisor software can be applied for ionic strength or pH gradients in anion or cation exchange chromatography. The software provides a wide choice of different selectable buffers for single buffer (ionic strength gradients) or for composite buffer (pH gradients) applications. Depending on the proteins of interest and the used columns, the user can select buffers either for anion or cation exchange (Figure 3). To ensure optimal buffering capacity, recommended pH ranges and concentrations in which the buffers should be used are displayed.

A common issue in ion exchange chromatography with ionic strength gradients is the decrease in pH as an effect of added neutral salt like NaCl^{1,2}. The Buffer Advisor software counteracts this issue by recalculation of the overall mobile phase composition considering the concentration of acidic and basic buffer (Line C and D) to maintain the desired constant pH. In addition, if the pH deviation gets too large, the Buffer Advisor software automatically inserts additional time points into the pump timetable.

1. Select Buffer & Gradient Mode		2. Define Gradient Table				3. Compose Stock Solution	
<input type="radio"/> Single Buffer (pH / Salt Gradient) <input type="radio"/> Composite Buffer (Wide Range pH Gradient) <input checked="" type="radio"/> Cation Exchange <input type="radio"/> Anion Exchange		Time	Salt	pH	Buffer	A: Water B: NaCl C: MES D: MES - Na	
MES/Na (MES+MES/Na)		0	20	5.8	20		
		5	100	5.8	20		
		30	500	5.8	20		
		35	1000	5.8	20		
		36	20	5.8	20		
Sodium Citrate (Citric + NaOH)		pH 2.9-3.7, 3.7-6.2		7.5-15 mM			
Formic/Na (acid + Na salt)		pH 3.2-4.4		7.5-125 mM			
Formic/Na (acid + NaOH)		pH 3.3-4.6		10-50 mM			
Lactic/Na (acid + Na salt)		pH 3.2-4.5		7.5-125 mM			
Lactic/Na (acid + NaOH)		pH 3.4-4.7		7.5-50 mM			
Acetic/Na (Acetic+Acetate/Na)		pH 3.9-5.4		7.5-125 mM			
Acetic/Na (Acetic+NaOH)		pH 4.1-5.6		7.5-50 mM			
Succinic/Na (acid + Na salt)		pH 3.6-5.6		7.5-125 mM			
Succinic/Na (acid + NaOH)		pH 3.9-6.3		10-20 mM			
Malonic/Na (acid + Na salt)		pH 2.8-5.5		7.5-125 mM			
Malonic/Na (acid + NaOH)		pH 2.9-5.5		7.5-25 mM			
MES/Na (MES+NaOH)		pH 5.5-7.3		7.5-125 mM			
Maleic/Na (acid + Na salt)		pH 2.6-3.5, 5.0-6.2		7.5-125 mM			
Maleic/Na (acid + NaOH)		pH 2.6-3.6, 4.9-6.7		10-20 mM			
ACES/Na (acid + NaOH)		pH 6.1-7.7		7.5-40 mM			
MOPS/Na (acid + Na salt)		pH 6.2-8.1		7.5-125 mM			
MOPS/Na (acid + NaOH)		pH 6.5-8.3		7.5-40 mM			
HEPES/Na (HEPES + salt)		pH 6.6-8.5		7.5-125 mM			
HEPES/Na (HEPES + NaOH)		pH 6.9-8.7		7.5-40 mM			
BICINE/Na (BICINE + Na salt)		pH 7.3-9.1		7.5-125 mM			
BICINE/Na (BICINE + NaOH)		pH 7.6-9.3		7.5-50 mM			
TAPS (acid + Na salt)		pH 7.6-9.4		7.5-125 mM			
TAPS (acid + NaOH)		pH 7.9-9.8		7.5-40 mM			
Sodium borate (H3BO3 + Tetraborate)		pH 8.1-8.9		7.5-125 mM			
Sodium borate (Tetraborate+NaOH)		pH 9.4-10.6		7.5-70 mM			
Sodium borate (H3BO3 + NaOH)		pH 8.4-9.5		7.5-50 mM			
Bicarbonate (NaHCO3+Na2CO3)		pH 9.3-10.2		7.5-125 mM			

Figure 3. Buffer list for cation exchange chromatography, sorted by recommended pH range.

Experimental

Instrumentation

The Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System consisted of the following modules:

- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary Pump (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity High performance Bio-inert Autosampler (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity Thermostat (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment (G1316C) with bio-inert solvent heat exchangers
- Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector VL (G1315D) with bio-inert standard flow cell, 10 mm)
- Agilent 1260 Infinity Bio-inert Analytical-scale Fraction Collector (G5664A)

Column

- Agilent Bio MAb Column, PEEK, 4.6 × 250 mm, 5 μm

Software

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition for LC and LC/MS Systems, Rev. C.01.03 [32]
- Agilent Buffer Advisor, Rev. A.01.01

Solvents

Buffer A: H₂O

Buffer B: NaCl 3 M

Buffer C: MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid monohydrate) 60 mM

Buffer D: MES-Na (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt) 35 mM

Sample

Mix of three proteins, solved in PBS (phosphate buffered saline), pH 7.4

Ribonuclease A: 13,700 Da pI 9.6

Cytochrom C: 1 2,384 Da pI 10–10.5

Lysozyme: 14,307 Da pI 11.35

All solvents used were LC grade. Fresh ultrapure water was obtained from a Milli-Q Integral system equipped with a 0.22 μm membrane point-of-use cartridge (Millipak). MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid monohydrate) and MES-Na (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid sodium salt) were purchased from Merck, Darmstadt, Germany. NaCl was purchased from VWR, Radnor, PA, USA.

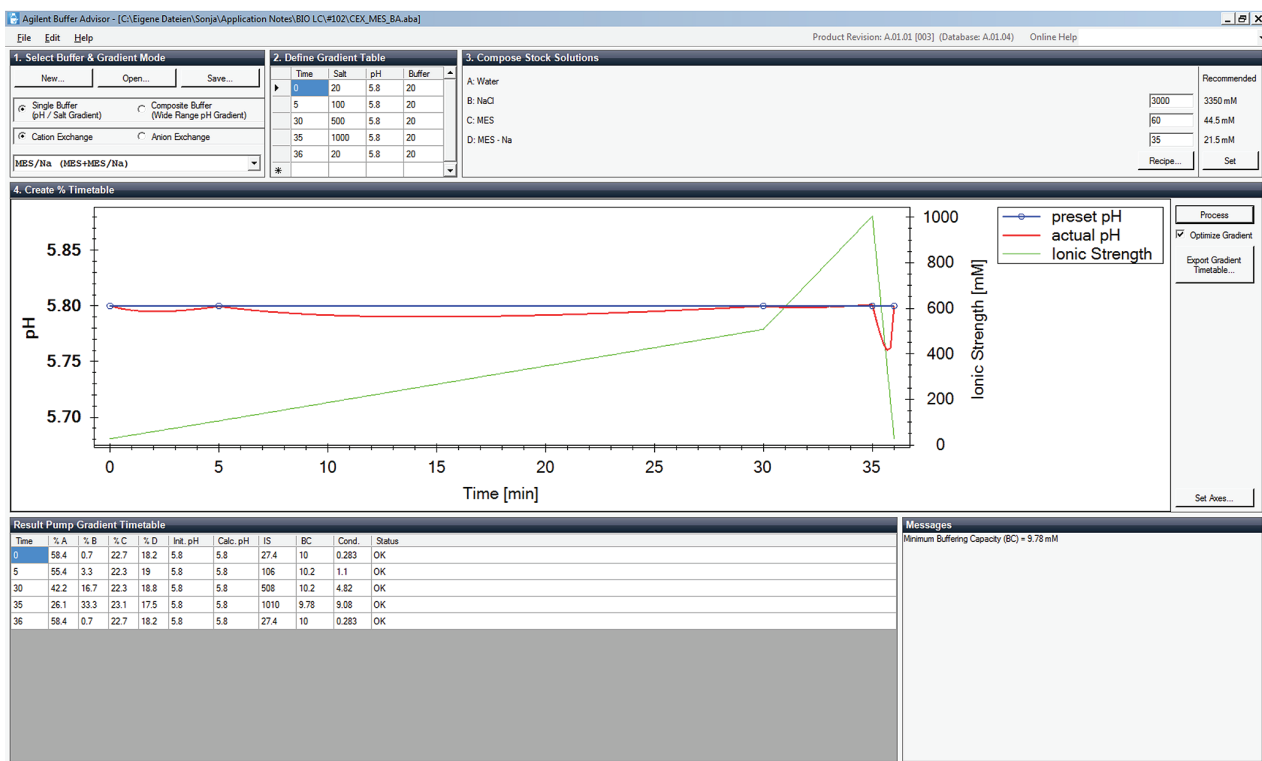


Figure 4. Agilent Buffer Advisor software, showing the steps described in "Results and discussion".

Conditions

Parameter	Value
Flow rate:	1 mL/min
Gradient:	0 min – 20 mM NaCl 5 min – 20 mM NaCl 30 min – 500 mM NaCl 35 min – 1000 mM NaCl 36 min – 20 mM NaCl
Injection volume:	10 µL
Thermostat:	4 °C
Temperature TCC:	25 °C
DAD:	280 nm/4 nm
Ref.:	Off
Peak width:	> 0.05 min (1.0 s response time)(5 Hz)

Stock Solution Recipes	
Bottle B	NaCl: Sodium chloride Weight 175.32 g and fill up to 1 L.
Bottle C	MES: MES Weight 11.714 g and fill up to 1 L.
Bottle D	MES - Na: MES sodium salt Weight 7.6027 g and fill up to 1 L.

Figure 5. Stock solution recipes

Results and discussion

pH scouting was performed using calculations from the Agilent Buffer Advisor software for pH values from 5.8 to 6.8. A mix of three proteins (ribonuclease A, cytochrome C and lysozyme) was separated using a four-component salt gradient at six different pH values. Dynamically mixed four-component gradients were generated using the calculations from the software. The Buffer Advisor software simplifies the generation of different four-component gradients by calculating the percentage of the individual stock solutions in the mobile phase at defined time points (Figure 4).

1. After definition of the gradient parameters, such as time, maximum salt concentration, pH, and buffer concentration
2. The Buffer Advisor software calculates the needed stock concentrations. The Recipe button displays the absolute amount of needed chemicals for the preparation of the stock solutions (Figure 5). These proposed stock concentrations can be adjusted by the user.
3. Select the Process tab.
4. The Buffer Advisor software calculates the needed amount of each channel to maintain the correct pH during the complete chromatographic run. Furthermore, it calculates whether the pH, salt concentration and buffer concentration entered is suitable for the buffer system that was selected. The timetable displays also additional data, such as buffering capacity of the mobile phase.

The pH scouting for the three-protein mix of ribonuclease A (A), cytochrome C (B) and lysozyme (C) demonstrates the benefits of the Agilent Buffer Advisor software (Figure 6). Even small pH changes of 0.2 have a strong influence on the retention of the proteins on the weak cation exchange (WCX) column. Changes in the elution order become obvious when the pH is changed from 5.8 to 6.8.

Manual preparation of corresponding buffers for premixed two-component gradients includes several steps. For each pH and for each prepared bottle (one with low and one with high ionic strength), a manual titration of the buffers is necessary. pH scouting for six different pH values in order to achieve the optimal resolution results in preparation of 12 solvent bottles (including weighing chemicals, pH adjustment). This is a very time-consuming procedure and highly prone to error and variation.

In contrast, the Buffer Advisor software is capable of automatically and reproducibly mixing all six separation conditions out of four stock solutions without any manual interference. The optimal resolution was achieved at pH 5.8 (Figure 6).

Based on the results, the user has various options on how to proceed:

1. Fine-tuning of the resulting pH values and gradients
2. Transfer of the dynamically mixed four-component gradient to other instruments through the OpenLAB CDS ChemStation timetable
3. Implementation of pH scouting results into two-component gradients using premixed buffers

In the last case, however, deviations from correct pH are expected, due to the pH optimization procedure of the Buffer Advisor software.

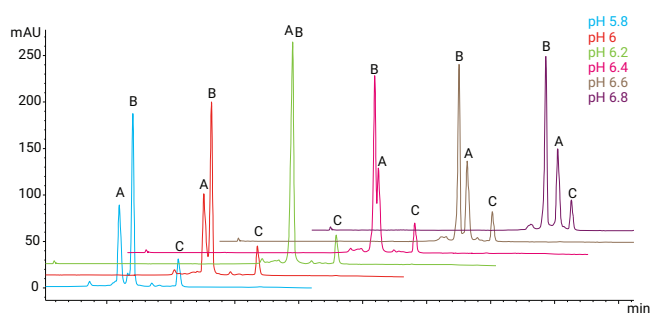


Figure 6. pH scouting for the separation of a three-protein mix using dynamically mixed quaternary gradients.

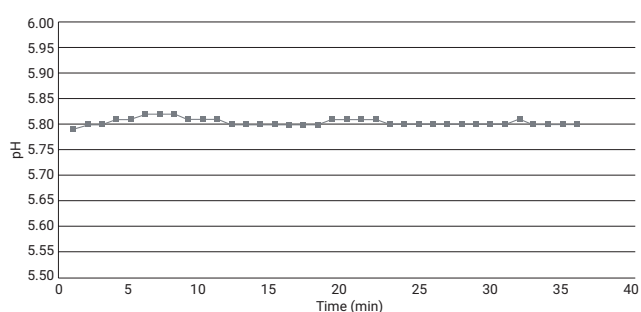


Figure 7. Off line pH measurement

Conclusions

Using dynamically mixed four-component gradients, calculated by the Buffer Advisor software, shortens and simplifies the workflow for pH scouting. The employment of dynamically mixed gradients calculated with the Buffer Advisor software results in a significant decrease in buffer preparation time, particularly when compared to manual preparation of buffers for premixed two-component gradients. The Buffer Advisor software provides a wide range of prevalidated, user-selectable buffer systems for anion and cation exchange chromatography and delivers recipes for preparation of the most suitable stock solutions. Due to pH optimization of the software, resulting pH values are more accurate and precise than those resulting from premixed gradients formed out of manually prepared buffer solutions. The Buffer Advisor software counteracts this issue by the recalculation of the four-component gradient regarding the concentration of acidic and basic buffer to maintain the desired constant pH.

The Buffer Advisor software in combination with the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System is excellent for generating four-component gradients. The calculations of Buffer Advisor software lead to exact and reproducible protein analysis while providing an excellent tool for automated pH scouting and accurate ion exchange chromatography. The Buffer Advisor software is, therefore, an ideal tool for automatic development of analytical methods in ion-exchange chromatography, which can be seamlessly transferred to the corresponding QA/QC departments.

References

1. R. J. C. Brown & M. J. T. Milton. Observation of a combined dilution and salting effect in buffers under conditions of high dilution and high ionic strength, *Accred Qual Assur* 8(11): 505-510, **2003**.
2. A. E. Voinescu et al. Similarity of Salt Influences on the pH of Buffers, Polyelectrolytes, and Proteins, *J. Phys. Chem. B* 110: 8870-8876, **2006**.

Faster Separations Using Agilent Weak Cation Exchange Columns

Authors

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Ion exchange is a commonly used technique for the separation of complex protein mixtures. Traditionally, such separations are performed using shallow gradients of increasing salt concentration with long column lengths providing the necessary resolution. The columns have often been packed using large diameter particles to minimize backpressure. This Application Note demonstrates how analysis times can be significantly reduced, increasing throughput without compromising analytical performance, by exploiting the benefits of small particle size, non-porous ion exchange sorbents.

Introduction

Proteins, polypeptides and oligonucleotides are often analyzed by ion exchange chromatography because they are complex molecules with multiple charges on their surfaces. The technique is ideally suited to the separation of charged biomolecules as it is non-denaturing and can provide good performance and resolution.

Traditionally, this has meant using highly porous particles to enable such large molecules to permeate the particles. In turn, columns of 15 cm or 25 cm in length, packed with 5 μm or 10 μm particles are commonly used.

The advent of non-porous sorbents such as Agilent's Bio IEX range, comprising a rigid polymeric core particle with a grafted hydrophilic layer containing the ion-exchange functionality, can improve resolution. This is because the diffusion-limited band broadening associated with a molecule penetrating the core of a large particle is eliminated. In turn, this means smaller particles and shorter column lengths can be used to significantly improve throughput, greatly reducing analysis times. The benefits for improved productivity for tasks such as fraction analysis are immediately evident.

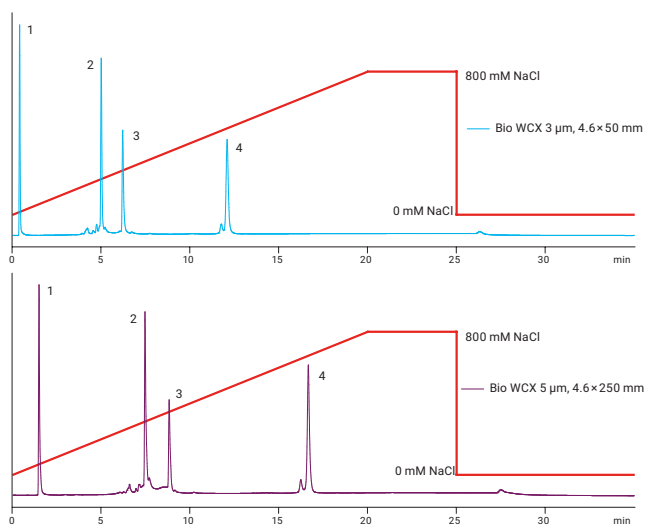


Figure 1. Protein separation on Agilent Bio WCX 5 μm 4.6 \times 250 mm versus Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm (flow rate 1.0 mL/min).

Materials and methods

Agilent Bio IEX columns are packed with rigid polymeric, nonporous particles grafted with a functionalized hydrophilic polymer layer. The resultant 1.7, 3, and 5 μm rigid particles provide high resolution and high separation efficiency by reducing the band broadening effects resulting from diffusion limitations with totally porous particles. The chemically bonded hydrophilic coating significantly reduces the effects of nonspecific binding and results in greater levels of recovery.

Conditions, Bio-Monolith column

Parameter	Value
Columns:	Agilent Bio WCX 5 μm , 4.6 \times 250 mm SS (p/n5190-2445) Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm SS (p/n5190-2443) Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm SS (p/n5190-2441)
Sample:	Ovalbumin (1), Ribonuclease A (2), Cytochrome c (3), Lysozyme (4)
Instrument:	Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC
Mobile Phase:	A: 20 mM sodium phosphate, pH 6.5 B: A + 1.6 M NaCl
Gradient:	0 to 50 % B
Temp.:	Ambient
Injection volume:	10 μL
Conc.:	0.5 mg/mL
Detection:	UV, 220 nm

Results and Discussion

The performance of a column, as measured by plate count, is dependent on particle size and column length. From this it may be inferred that a shorter column packed with smaller particles can be used to achieve the same level of performance when compared to a longer column packed with larger particles (Figure 1). This is commonly found in practice. However, for gradient elution, further modifications to the method need to be employed to provide the additional benefits of shorter run times and greater productivity.

Converting gradient times into column volumes is a useful way of calculating the shorter gradient program and can provide the desired outcome in terms of higher speed separations (Table 1). However, smaller particle sizes may require higher flow rates to attain maximum performance. This is illustrated by the van Deemter curves shown in Figure 2.

To maximize the separation efficiency using the Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm column, the 4 minute gradient separation was carried out at 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mL/min (Figure 3). As expected, the higher linear velocity created from higher flow rates improved the peak shape.

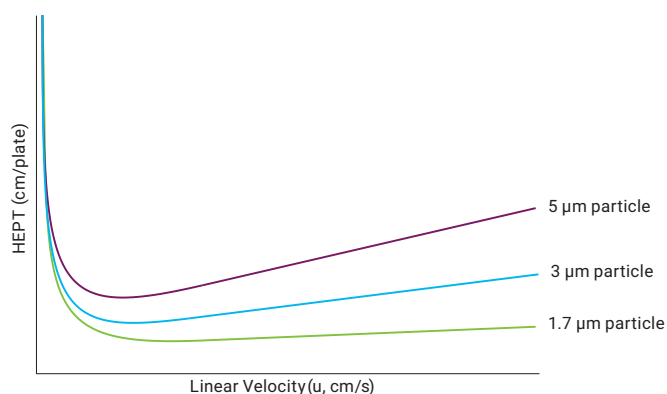


Figure 2. Typical van Deemter curves.

Table 1. Gradient Time to Column Volume Conversion

Time (minutes)	mM NaC	#CV
0	0	0.0
20	800	4.8
25	800	6.0
25.01	0	6.0
35	0	8.4

#CV = number of column volumes at 1.0 mL/min (4.6 \AA ~ 250 mm column)

Time (minutes)	mM NaCl	#CV
0	0	0.0
4	800	4.8
5	800	6.0
5.01	0	6.0
7	0	8.4

#CV = number of column volumes at 1.0 mL/min (4.6 \AA ~ 50 mm column)

In comparison, the Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm column provided sharper peaks under identical conditions (Figure 4).

Increasing the flow rate should mean that it is possible to further reduce the gradient time. This was investigated using the Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm column. The 0 to 800 mM NaCl gradient was reduced from 4 to 2 minutes.

It was found that at a flow rate of 1.7 mL/min the backpressure remained below 400 bar and still provided exceptional peak shape and resolution (Figure 5).

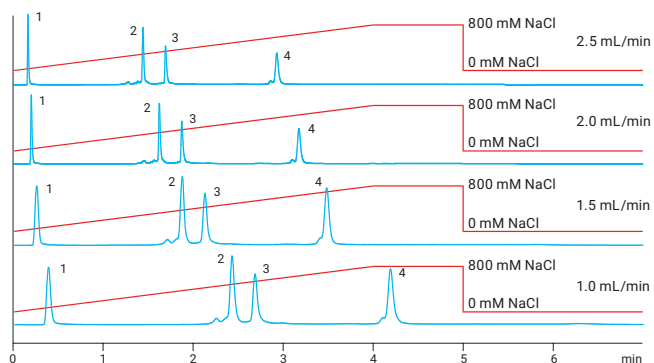


Figure 3. Effect of flow rate on chromatographic performance (Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm).

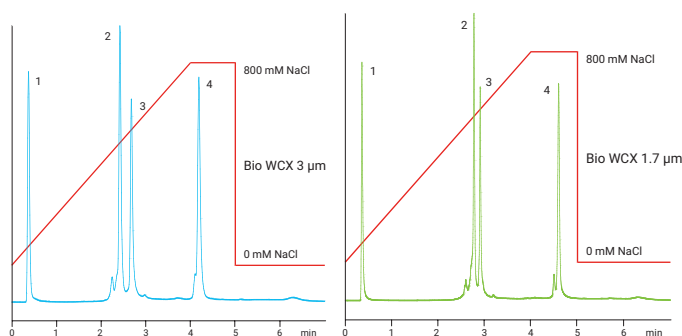


Figure 4. Comparison of Agilent Bio WCX 3 μm , 4.6 \times 50 mm versus Agilent Bio WCX 1.7 μm

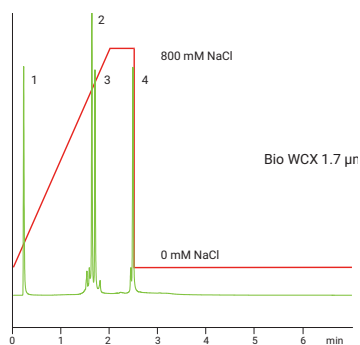


Figure 5. Agilent Bio WCX 1.7 μm , 4.6 \times 50 mm for protein separations under 3 minutes (flow rate 1.7 mL/min)

Conclusions

We have shown that by using shorter 5 cm columns packed with smaller particle size (3 μm and 1.7 μm), Agilent Bio WCX products can lead to significant reductions in run times from 20 or 30 minutes down to less than 3 minutes, and still retain excellent peak resolution. This enables much higher throughput in time-critical applications.

The backpressure of 400 bar shows that, by reducing the analysis time dramatically from over 30 minutes to less than four minutes for the entire gradient, a 600 bar system such as the Agilent 1260 Infinity Bio-inert LC is still sufficient.

For More Information

These data represent typical results. For more information on our products and services, visit our Web site at www.agilent.com/chem.

その他のアプリケーションノート

資料番号	タイトル
5991-7442JAJP	Agilent1260 Infinity バイオイナート LC からAgilent1260 Infinity II バイオイナート LC へのシームレスなメソッド移管
5991-5273EN	Characterize mAb Charged Variants by Cation-exchange Chromatography
5991-5274EN	Characterize Fab and Fc Fragments by Cation-exchange Chromatography
5991-0895EN	Analysis of Intact and C-terminal Digested IgG1 on an Agilent Bio MAb 5 µm Column
5990-9629JAJP	pH グラジエント溶出によるモノクローナル抗体電荷変異体の分離の向上
5991-1407EN	High-resolution Analysis of Charge Heterogeneity in Monoclonal Antibodies Using pH-gradient Cation Exchange Chromatography
5991-1408EN	Protein Separation with pH Gradients Using Composite Buffer Systems Calculated by the Agilent Buffer Advisor Software
5991-4722EN	Reducing Cycle Time for Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies
5991-3365EN	Simple Method Optimization in mAb Charge Variant Analysis using pH Gradients Generated from Buffer Advisor with Online pH and Conductivity Monitoring
5990-9270EN	Separation of Protein Standards on Agilent 3 µm Ion-Exchange Columns by Cation Exchange Chromatography
5990-9614EN	Analysis of proteins by anion exchange chromatography
5991-5221EN	Charge Profiling of 2AB-labelled N-linked Glycans

ベストプラクティスと トラブルシューティング

どんな問題もその原因を迅速に突き止めるためには、体系的にトラブルシューティングに取り組む必要があります。クロマトグラフィーによる分離には、サンプル前処理、移動相、メソッドの条件、機器のコンポーネント、およびカラムのすべてが関与するため、原因の特定は容易ではありません。

一般的な問題の防止や、発生した問題の認識および診断に役立つ小さなステップがいくつかあります。本書のさまざまなセクションに示したガイドラインでは、その例をいくつか紹介しています。その他にも、例えば以下のような措置を取ることができます。

- 可能な限り、定期的に適切な参照標準を使用して性能を測定し、記録に残してください。この記録を問題の特定に役立てることで、不備のある機器のまま無駄に測定を続けることがなくなります。また、観察された変化の性質も、問題を正確に特定するうえで役立ちます。
- LC システム、カラム、およびガードカラム (使用している場合) によってかかる一般的な背圧を把握しておいてください。圧力にばらつきが認められた場合に、その変化の原因、すなわちどのコンポーネントを交換またはクリーニングすべきかが容易にわかるようになります。

カラムに直接関連するベストプラクティスもいくつかあります。

- 移動相を流し始めるときは、低流量 (0.1 mL/min など) から開始し、数分間かけて流量を徐々に上げてください。メソッドの流量によってかかる背圧から圧力限度までに余裕がある場合でも、流し始めに圧力がゼロから急上昇すると、カラムが損傷する可能性があります。
- グラジエントメソッドを使用する場合は、メソッドの一部としてクリーニングステップを設け、その後には再平衡化を行ってから次のサンプルを注入してください。逆相メソッドの場合は、数分間に渡ってカラムを高有機状態に保つことでクリーニングを行います。イオン交換による電荷変異体分析のような水性メソッドの場合は、高塩濃度の移動相を数分間流すことによってクリーニングを行えます。一般に、このステップには 100 % の移動相 B が適しています。
- メソッドの開発時には、推奨される温度、圧力、pH の最小および最大条件を把握しておいてください。推奨範囲の限度付近で使用すると、より控えめな条件で使用した場合よりもカラム寿命が短くなります。

最適な性能を得るためには、高品質の移動相溶媒および添加物を使用することも重要ですが、カラムの一般の問題の防止に効果的な以下のパラメータについても考慮してください。

- 溶媒の混和性および添加物の溶解性に留意してください。移動相 A と移動相 B は完全に混和する必要がありますが、サンプル溶液も初期移動相状態で混和できなければなりません。また、カラムをクリーニングまたは保管するために移動相系を変更するときは、まず相溶性に配慮してください。また、混合することで背圧が上昇する可能性があるため、流量を下げてください。
- 適切な保管用溶媒については、カラムの使用ガイドを参照してください。
- 水性クロマトグラフィーの場合、移動相の「清浄さ」がきわめて重要になります。水性移動相、特に塩を含む中性 pH 領域の移動相では、微生物が急速に繁殖します。一般に、水性移動相を 0.2 μm フィルタでろ過し、冷蔵保存し、頻りに調製し直すことで、目詰まりにつながる微生物の繁殖を最小限に抑制できます。

以下のリソースでは、LC カラムに対する最善のケアおよび発生した問題のトラブルシューティングに関する情報をご覧ください。

- 「LC ハンドブック: LC カラムの選択方法とメソッド開発のガイド」には、メソッド開発に関連する豊富な情報と、観察された徴候にもとづくトラブルシューティングのアドバイスが記載されています。
www.chem-agilent.com/pdf/5990-7595JAJP.pdf
- 各カラムに付属のカラムユーザーガイドには、適切な温度、圧力、および pH 範囲のほか、使用可能な移動相、カラムのクリーニングおよび保管手順が詳しく記載されています。すべてのカラムユーザーガイドは www.agilent.com/chem/biolc-columns-user-guides でもご覧いただけます。紛失した場合にご利用ください。
- カスタマーサポートをご希望の場合はカスタムコンタクトセンター 0120-477-111 までお問い合わせください。

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おりません。
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. 2018

Printed in Japan, March 01, 2018

5991-9072JAJP