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

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムと AdvanceBio SEC 300 Å、2.7 µm カラム

アプリケーションノート

生物製剤・バイオシミラー

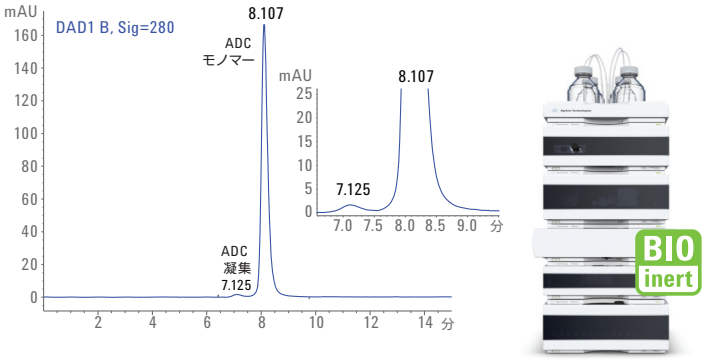
著者

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, India

概要

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、モノクローナル抗体およびその誘導体などの生物製剤のタンパク質サンプルに含まれる、モノマー、ダイマー、凝集体、潜在的分解物のモニタリングにとって重要なツールです。凝集体は品質に重要な影響を与えるため、定量が必要となります。

このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を使用した、生物製剤 mAb および抗体薬の複合体 (ADC) 中の凝集体の定量に必要なシンプルで高感度なメソッドについて解説します。このメソッドでは、有機修飾剤を使用せずに、mAb とその他の疎水性 ADC の分析に同一の水性移動相を使用します。この最適化されたメソッドでは、pH/温度のストレスによって作られた凝集体と分解物をモニタリングすることもできました。シンプルで再現性のあるこのメソッドは機器の腐食耐性と相まって、バイオ医薬品業界の mAb および ADC のルーチン QA/QC 分析に最適です。



Agilent Technologies

はじめに

治療用タンパク質は、開発のすべての段階、例えば、発現、リフォールディング、ダウンストリーム処理、製剤、滅菌、保管で凝集および分解を受けます。さらに、ADC を形成する疎水性ペイロードの付着は疎水性凝集も促進します。凝集体/分解物は低濃度で存在しますが、生物製剤の品質に大きな影響を与えることがあり、活性喪失、溶解性低減、免疫原性増大などを招きます。サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質の凝集体の分析に使用される標準メソッドです。ここでは、Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを治療用 mAb および ADC の分離、定量、そして完全性のモニタリングに使用した場合の利点を示します。AdvanceBio SEC カラムは SEC 分析にとっての画期的なテクノロジーです。アジレントは、有機溶媒を移動相に添加せずに、広い範囲のサンプルタイプに対して高い分離能とサイズ分離を実現するために、革新的なシリカ粒子とユニークな結合相を用いてカラムを設計し、製造しました。モノクローナル抗体およびより多くの疎水性 ADC の分析では同じ水性移動相を使用します。

測定条件

機器

完全なイナート仕様の、最大圧力が 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。構成モジュールは以下のとおりです。

- 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プラ (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity サーモスタットカラムコンパートメント (TCC)、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 DAD VL (G1315D とバイオイナート標準フローセル、10 mm)

ソフトウェア

Agilent ChemStation Rev. B.04.03 (あるいはこれ以上)

条件

カラム:	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm (p/n PL1180-5301)
移動相:	リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、150 mM 塩化ナトリムを含む 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4
TCC 温度:	室温
注入量:	10 µL
流量:	0.8 mL/min
検出:	UV、220 および 280 nm

試薬、サンプル、材料

トラスツズマブおよび抗体薬の複合体 (T-DM1) は、地元の薬局から購入し、メーカーの指示に従って保管しました。PBS、塩酸、水酸化ナトリウムは Sigma-Aldrich, Corp 社から購入しました。化学薬品および溶媒はすべて HPLC グレードで、Milli-Q 純水装置 (Millipore Elix 10、米国) から供給される高度精製水を使用しました。

直線性と範囲

検量線は、トラスツズマブおよび ADC の 15.625 ～ 2,000 µg/mL の 8 つの標準濃度を用いて描かれました。

定量下限 (LOQ) と検出下限 (LOD)

トラスツズマブおよび ADC (T-DM1) が LOD および LOQ 測定用に使用されました。生体分子濃度はS/N 比 (S/N) > 3 を LOD として S/N > 10 を LOQ としました。

手順

移動相 (10 µL) をブランクとして注入後、各直線性レベルを 3 回繰り返しました。各レベルの面積とリテンションタイム (RT) を使用して標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (RSD %) の値を計算しました。低い方の直線性レベルにおける注入から LOD と LOQ を求めました。各直線性レベルでの平均面積を分析対象物の濃度に対してプロットし、モノマーの検量線を作成しました。

トラスツズマブおよび ADC 凝集体の準備

トラスツズマブおよび ADC 凝集体は、モノクローナル抗体を移動相で最終濃度 2 mg/mL に希釈して調合しました。多数の論文に記載されている方法でわずかに修飾されるように pH ストレスをかけました [1]。つまり、1 M HCl を液滴でゆっくりとサンプル溶液に加えて pH を 6.0 から 1.0 にしました。その後、1 M NaOH を追加して pH を 10.0 に調整しました。最終的に、1 M HCl を追加して pH を再び調整して 6.0 に戻しました。pH が推移する間に約 1 分間の待ち時間を設定し、500 rpm の一定速度でかき混ぜました。溶液は 60 °C で 60 分間恒温放置しました。

結果と考察

分離と検出

凝集体、モノマー、ダイマー、より高次な凝集体の SEC 定量では、移動相はサンプル組成に影響を与えないことがきわめて重要です。環境条件によって凝集体のレベルが変化するので、SEC 分離は水性移動相で中性 pH で低レベルの塩分によって実行できることが重要です。図 1 は、AdvanceBio SEC カラムをタンパク質で頻繁に使用されるクロマトグラフィー条件、つまり、pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水を用いた、インタクト治療用トラスツズマブ mAb の 15 分間での優れた分離を示しています。ピークは対称形で mAb の分子量と一致するリテンションタイムで溶出し、分子サイズを基にした分離で二次的な相互作用がないことが示されています。また、図 1 の拡大図は、少量の凝集体の存在を明らかにしています。早くあるいは遅れて溶出するピークが存在しないことは、市販の mAb 調合液は均一で、高次な凝集体や分解物がないことがわかります。

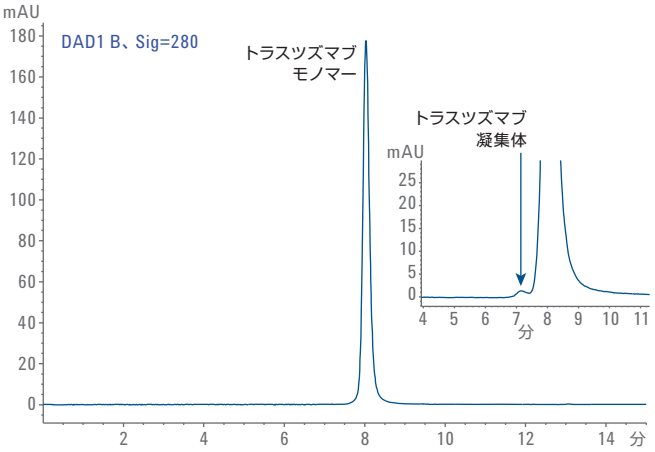


図 1. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムでの (A) インタクトトラスツズマブと (B) トラスツズマブ凝集体を示すその拡大領域の SEC プロファイル

ADC の SEC

水性相を用いて市販の SEC カラムで実施される ADC の SEC 分析に最もよく用いられているメソッドでは、ピーク形状が悪く、単量の複合体と凝集体の分離が不完全です。これは、疎水性ペイロードと固定相との非特異性の相互作用が原因でした。15 % の 2-プロパノールの追加がこの効果を克服することが示されました [2]。AdvanceBio SEC カラムを水性移動相で使用して ADC T-DM1 を分析した場合、PBS は対称的なピークおよびモノマーと凝集体のより良好な分離を導き、試料と固定相との非特異性の相互作用がないことを示しました (図 2)。

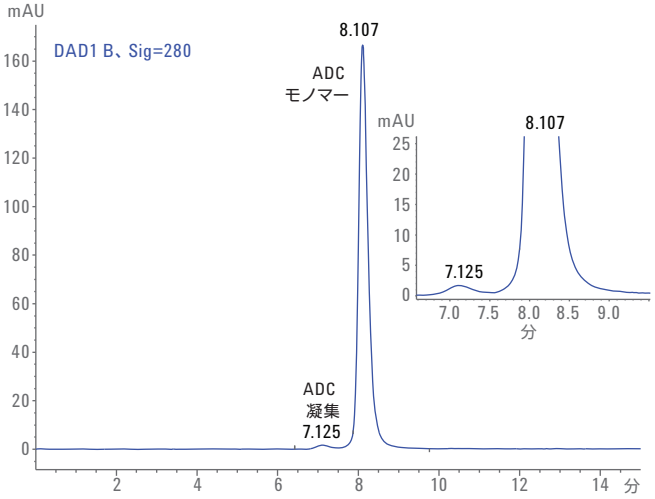


図 2. PBS、pH 7.4 を移動相として使用した Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムでのインタクト T-DM1 (ADC) の SEC プロファイル

リテンションタイムと面積の精度

表 1 は、トラスツズマブ mAb および ADC 分析の 6 回繰り返し注入により得られた平均リテンションタイムと面積の RSD を示しています。リテンションタイムおよびピーク面積の RSD はそれぞれ 0.04 % および 1 % 未満で、メソッドの優れた再現性、すなわちシステムが高精度であることが示されました。

表 1. リテンションタイムとピーク面積の精度 (n=6)

	リテンションタイム		ピーク面積	
サンプル	平均 (min)	RSD	平均 (mAU/min)	RSD
トラスツズマブ イノベーター	8.034	0	100	0
ADC	8.106	0.005	98.91	0.33

検出下限と定量下限

トラスツズマブおよび ADC の LOD および LOQ はそれぞれ 15 µg/mL および 31 µg/mL でこのメソッドが高感度であることが示されました。トラスツズマブおよび ADC の測定された LOD および LOQ の値を表 2 に示し、LOD および LOQ のサンプルクロマトグラムとブランクを重ね合わせたものを図 3 に示しています。

表 2. LOD、LOQ、S/N の結果 (n = 3)

濃度 (mg/mL)	S/N	平均面積
トラスツズマブ		
15.625 (LOD)	7.8	12.62
31.25 (LOQ)	21.4	29.16
62.5	32.7	60.74
ADC		
15.625 (LOD)	10.5	15.20
31.25 (LOQ)	15.5	37.89
62.5	37.9	80.24

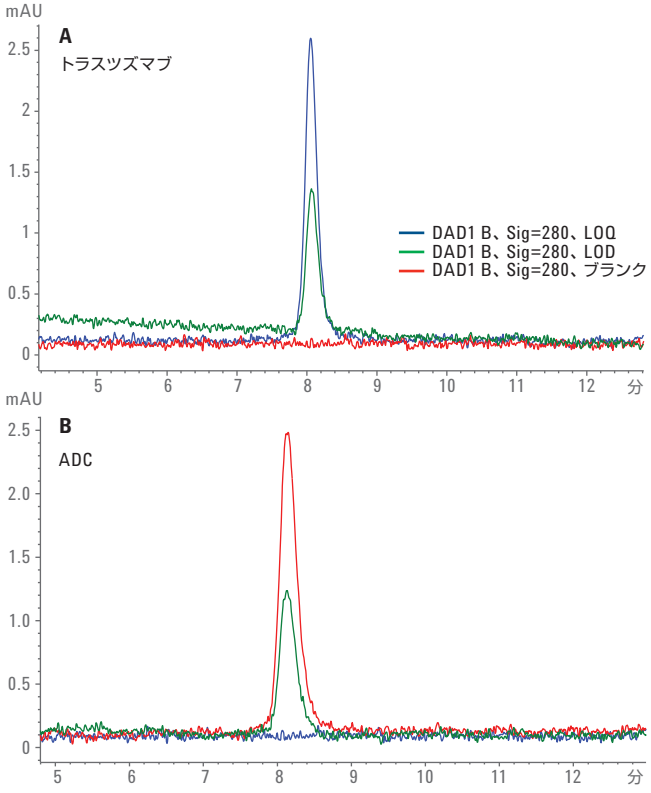


図 3. トラスツズマブおよび ADC の LOD および LOQ のクロマトグラムとブランクのクロマトグラムとの重ね合わせ

直線性

この実験ではトラスツズマブ/ADC の面積値と濃度を使用してトラスツズマブおよび ADC の検量線を LOQ レベルから最高の濃度レベルまで作成しました。真度結果を表 3 に示します。濃度範囲 12.5 ～ 2,000 µg の トラスツズマブ/ADC の検量線を図 4 に示しています。

表 3. トラスツズマブおよび ADC の直線範囲のまとめ (n = 3)

トラスツズマブ		ADC	
濃度 (µg/mL)	平均面積	濃度 (µg/mL)	平均面積
15.625	16.4	15.625	22.6
31.25	30.6	31.25	37.9
62.5	64.4	62.5	91.2
125	140.7	125	178.8
250	277	250	348.4
500	538.2	500	704.7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

凝集体/分解物の分析

凝集体と分解物をモニタリングするために、未変性およびストレスを受けたトラスツズマブと ADC を SEC で比較しました。クロマトグラフィーで単量体のピークの前に溶出するすべてのピークを凝集体、後に溶出するすべてのピークを分解物とそれぞれ考えました [3]。

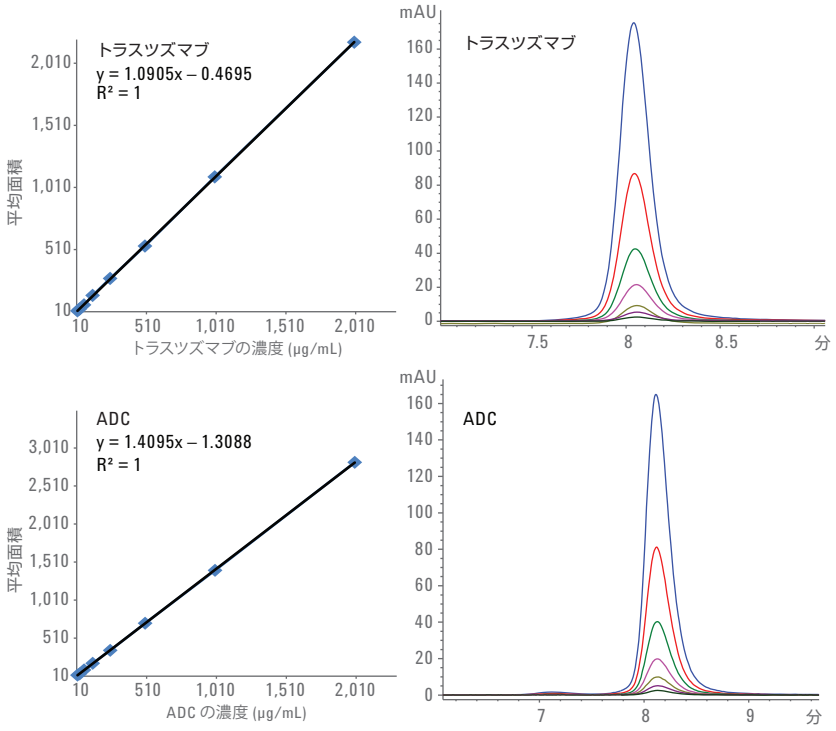


図 4. 濃度範囲が 15.62 ～ 2,000 µg/mL のトラスツズマブと ADC の 8 つの標準濃度による検量線は優れた相関係数を示しています。また、直線性の範囲のクロマトグラムを重ね合わせたものを示しています。

図 5 および 6 に示された pH/熱に起因する凝集のクロマトグラムから、AdvanceBio SEC カラムを使用すると凝集および分解されたトラスツズマブおよび ADC を分離して検出できることが分かります。インタクト、凝集体、分解物は、それぞれ良好に分離されました。

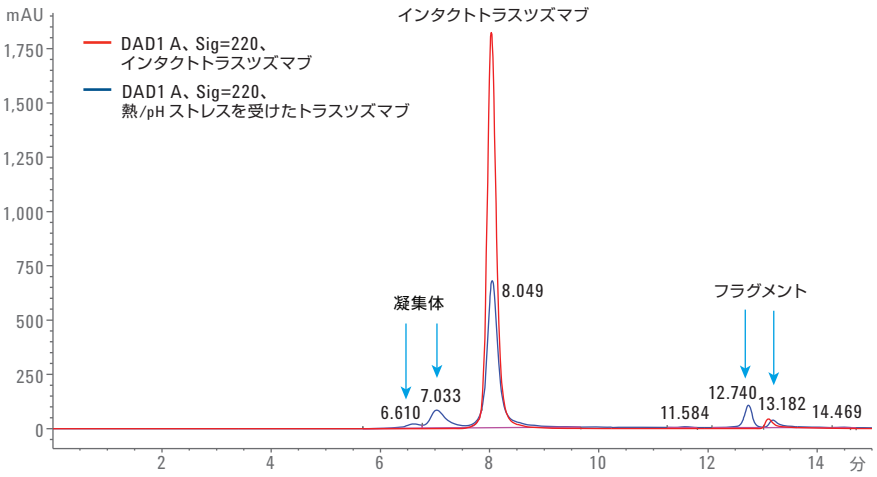


図 5. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを使用した、未変性 (コントロール、赤のトレース) トラスツズマブと pH/熱ストレスを受けた 2 mg/mL のトラスツズマブのクロマトグラムと重ね合わせました。

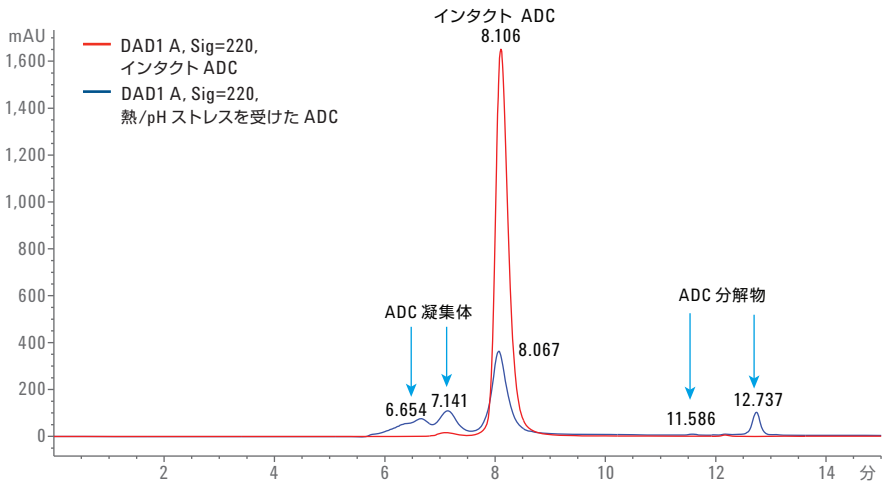


図 6. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを使用した未変性 (コントロール、赤のトレース) ADC のクロマトグラムを pH/熱ストレスを受けた 2 mg/mL の ADC と重ね合わせました。

トラスツズマブおよび ADC の凝集体と分解物の定量

トラスツズマブと ADC 中の凝集体と分解物の相対的な定量を、面積パーセントを基に、表 4 にまとめました。

トラスツズマブと ADC の凝集体と分解物のレベルが大幅に増加し、単量体型はそれぞれ 71 % と 54 % に相対的に減少したことが明らかにわかります。これらは評価できる結果ですが、凝集/分解と有効性の損失との関係を知るためには生物学的活性データによるサポートが必要です。

表 4. トラスツズマブと ADC モノマー、凝集体、フラグメントのリテンションタイムとピーク面積

インタクトトラスツズマブ		**ストレスを受けたトラスツズマブ**	
リテンションタイム (分)	**面積 %**	**リテンションタイム (分)**	**面積 %**
7.14	0.140	6.61	2.8
		7.033	13.26
13.10	3.0		
		12.74	7.65
		13.18	4.0
インタクト ADC		**ストレスを受けた ADC**	
7.115	2	6.654	19
		7.141	17.8
		11.58	0.2
		12.73	7.5
		14.46	0.2

結論

治療用 mAb のトラスツズマブ/ADC T-DM1 のメソッド開発および純度と安定性のモニタリングに使用できる複数の優れたツールを紹介しました。最初に、シンプルで高分離能の mAb の分離に対して Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用した方法を示しました。特に、AdvanceBio SEC カラムでは、移動相で有機溶媒を使用することなく、疎水性 ADC の優れた分離能を実現できることを明らかにしました。メソッドの面積およびリテンションタイム精度は優れており、メソッドの信頼性を立証しました。15 ～ 2,000 µg/mL の範囲の 8 つの標準濃度の mAb および ADC の検量線は優れた直線性で、メソッドが定量的で高精度であったことが示されました。mAb と ADC の LOD と LOQ がそれぞれ 15 µg/mL と 25 µg/mL で、メソッドが高感度であったことが示されました。さらに、mAb と ADC のストレスの実験から、AdvanceBio SEC カラムが面積パーセントをベースとして凝集体および分解物を分離し検出して定量できることが示されました。このようなシンプルで再現性のあるメソッドと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC のバイオ不活性と腐食耐性を組み合わせたこのソリューションは、バイオ医薬品業界におけるモノクローナル抗体/ADC の QA/QC 分析に最適なものとなっています。

参考文献

1. Başak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res*. **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* **2011**, *3:2*, 161-172.
3. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

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、アジレントのウェブサイト (www.aglient.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. 2015
Printed in Japan
October 16, 2015
5991-6303JAJP

Agilent Technologies