Agilent AdvanceBio SEC カラムによる PEG 化タンパク質の分析

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

M.Sundaram Palaniswamy

Agilent Technologies, Ltd

India

概要

治療用タンパク質を PEG 化することにより、溶解性の向上、免疫原性の低下、半減期の長期化、プロテアーゼからの保護効果など、薬剤の物理化学的性質や生物学的性質が改善され、治療用タンパク質の価値が大幅に高まります。PEG 化タンパク質より分子量の大きい不純物を検出するには、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が最適です。一方、PEG 化タンパク質の SEC では、PEG (ポリエチレングリコール) が介在してシリカ固定相との相互作用が生じ、回収率の低下やピーク形状の劣化、過度のテーリングにつながることが大きな課題となっています。このアプリケーションノートでは、シンプルで高感度の SEC メソッドを用いた、PEG 顆粒球コロニー刺激因子 (PEG GCSF) の純度の測定について取り上げます。PEG GCSF の分離と定量は、Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを使用して水性移動相で行いました。その結果、濃度範囲 12.5 ～ 2,000 µg/mL の検量線で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なことを示します。また、リテンションタイムとピーク面積の精度についても優れた結果が得られました。これは、このメソッドが PEG GCSF の分析に適していることを示します。さらに、AdvanceBio SEC カラムにより、強制的なストレス負荷で生成された凝集体を分離および定量することができました。

Agilent Technologies

はじめに

PEG ポリマー鎖を別の分子 (通常は薬剤や治療用タンパク質) に共有結合させることを PEG 化と言います。PEG 化タンパク質は、通常、PEG の反応性誘導体をターゲットの巨大分子と一緒にインキュベーションすることで得られます。PEG 部分がもたらすさまざまな利点により、タンパク質の安定性が高まり、体内での循環半減期が長くなります。PEG は、アメリカ食品医薬品局 (FDA) により、一般に安全と見なされている成分として承認されており [1]、FDA に承認されている PEG 化医薬品もあります。PEG 顆粒球コロニー刺激因子 (PEG GCSF) は、GCSF の N 末端メチオニン残基に 20 kDa の PEG 分子を共有結合させることで、遺伝子組み換え GCSF の作用時間を長くしたものです。GCSF は 175 個のアミノ酸から成るタンパク質で、分子量は 18,800 ダルトンです。一方、PEG GCSF の合計分子量は 39 kDa です。ドラフトモノグラフメソッドでは、純度および二量体以上の凝集体の測定に、SEC HPLC を使用することを推奨しています [2]。公開されている PEG GCSF の測定メソッドの多くでは、非特異的な相互作用を防ぎ、ピーク形状と分離能を高めるために、100 mM の NaCl、85 % のオルトリン酸、および最大 10 % のエタノールから成る水性移動相を使用しています [3]。ところが、水性移動相 を用いた SEC では、治療用タンパク質の非特異的吸着が問題となります。凝集体が、本来のタンパク質分子よりも固定相に結合しやすい傾向を示すことがあるからです。このような結合が優先的に生じると、SEC によって凝集体が正確に分析されないばかりか、検出されない可能性もあります。この問題を克服するために、有機溶媒を含む移動相や極端な pH の移動相が使用されてきました。実際、この方法によって分解能や回収率が高まることはわかっていますが、凝集体の可逆的な解離に加え、製剤緩衝液中で不可逆的な解離が生じる可能性もあります [4]。

このアプリケーションノートでは、SEC 分析に画期的な技術をもたらす Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムの利点を紹介します。このカラムは、革新的なシリカ粒子と独自の親水性結合相を採用することで、移動相に有機溶媒を添加することなく、多様なサンプルで優れた分離能とサイズ分離を実現します。

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モジュール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 (p/n G5611A)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート高性能オートサンプラ (p/n G5667A)
- Agilent 1200 Infinity シリーズサーモスタット (p/n 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 (p/n G1316C、オプション 19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL (p/n 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 粒子を充填 (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 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。

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:	150 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 6.8
カラム温度:	室温
注入量:	10 µL
流量:	0.8 mL/min
UV 検出:	214 および 280 nm

試薬とサンプル

市販の PEG GCSF 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。一塩基性および二塩基性のリン酸水素ナトリウムと塩酸を 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。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 PEG GCSF 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。

直線性と範囲

検量線の作成には、濃度範囲 7.8 ～ 2,000 µg/mL の 9 種類の PEG GCSF 標準溶液を使用しました。

LOQ と LOD

S/N 比が 3 を超えた PEG GCSF 濃度を LOD とし、S/N 比が 10 を超えた濃度を LOQ としました。

PEG GCSF 凝集体の調製

PEG GCSF の凝集体は、ドラフトモノグラフに従い、約 2 mg/mL の医薬品をポリプロピレン製試料管に入れて 55 ° C で 60 分間、120 分間、および 180 分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は、凝集体の割合が 5 % を超えてはならないとしています。また、3 回の注入により得られた凝集体の面積パーセントの RSD % は、10 % 以下でなければなりません。さらに、3 回の注入により得られた PEG GCSF 単量体のピークの RT 変動は、0.2 分以下でなければなりません。

結果と考察

分離と検出

図 1 に示すように、このクロマトグラフィー条件で 5.989 分に単一の対照ピークが現れており、インタクト PEG GCSF が良好に分離しています。この図の拡大図から、この複合体には明らかに、二量体および三量体以上の凝集体も含まれています。ただし、遅く溶出しているピークがないことから、このサンプルには、遊離 GCSF は含まれていません。

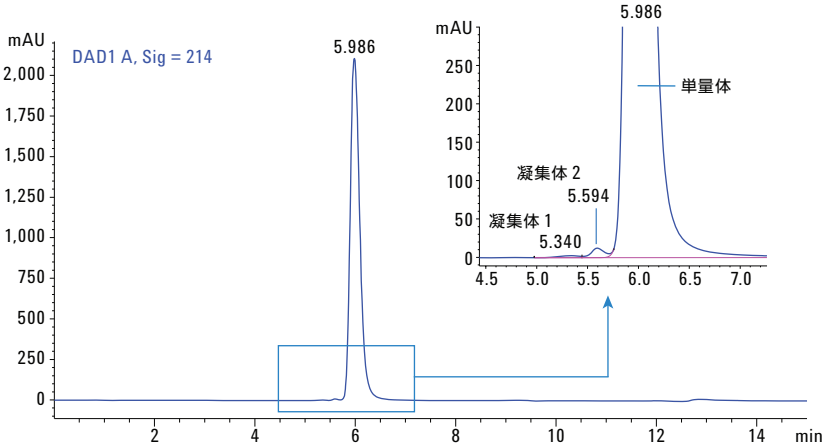


図 1. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムにより得られたインタクト治療用 PEG GCSF の SEC プロファイル

リテンションタイムと面積の精度

手順の精度は、一連の測定値がどの程度一致しているかによって表され、一般にその指標として相対標準偏差 (RSD) が用いられます。これらの測定値は、前述の条件で均一なサンプルを複数回分析することによって得られます。図 2 は、6 回の繰り返し分析の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、PEG GCSF の 6 回の繰り返し分析により得られた、単量体および凝集体の RT およびピーク面積の平均値と RSD を示します。メインピークの RT およびピーク面積の RSD は、それぞれ 0.023 % と 0.081 % でした。これは、この分析メソッドの再現性とシステムの精度がきわめて優れていることを示します。

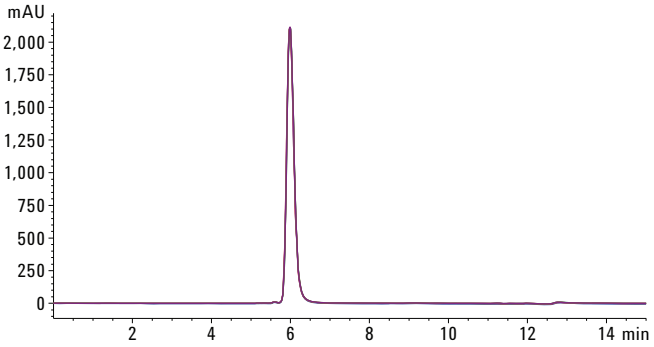


図 2. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを用いた PEG GCSF の 6 回の繰り返し分析により得られたクロマトグラムの重ね表示

表2. 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 (分)	RSD	平均 (mAU/分)	RSD
PEG GCSF	5.987	0.023	99.39	0.081
PEG GCSF の凝集体 1	5.594	0.01	0.413	4.91
PEG GCSF の凝集体 2	5.340	0	0.155	5.1

この精度は、次のシステム適合性要件にも適合しています。

- 凝集体の割合が 5 % 以下である。
- 3 回の注入により得られた凝集体の面積パーセントの RSD が 10 % 以下である。
- 3 回の注入により得られた PEG GCSF 単量体のピークの RT 変動が 0.2 分以下である。

PEG 複合体に含まれる高分子量の凝集体の含有量は、0.6 % 以下でした。また、SEC HPLC により得られた PEG GCSF の純度は 99 % を超えていました。

LOD と LOQ

LOD および LOQ は、それぞれ 3.125 µg/mL と 12.5 µg/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 PEG GCSF の LOD と LOQ の値を表 3 に示します。図 3 は、LOD および LOQ 濃度の複合体のクロマトグラムとブランクのクロマトグラムを重ね合わせたものです。

表3. LOD、LOQ、S/N の結果 (n = 3)

濃度 (mg/mL)	S/N 比	平均面積
3.125 (LOD)	4.6	13.69
12.5 (LOQ)	17.7	27.16

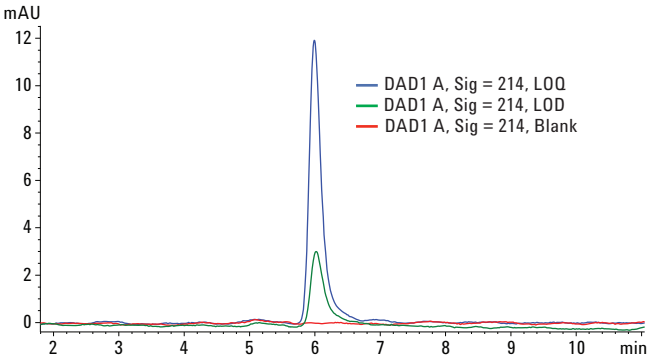


図 3. Agilent AdvanceBio SEC、130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによる LOD および LOQ 濃度の PEG GCSF とブランクのクロマトグラムの重ね表示

直線性

LOQ 濃度から、今回の調査で用いた最高濃度までの PEG GCSF 標準溶液を用いて、PEG GCSF の検量線を作成しました。図 4 に、濃度範囲 12.5 ～ 2,000 µg/mL の PEG GCSF の検量線と、各濃度における面積レスポンスを示します。

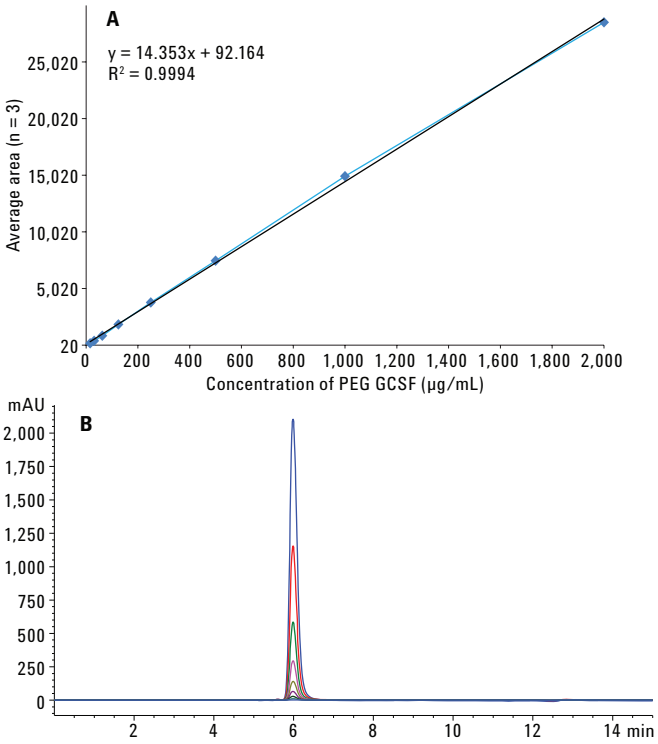


図 4. 濃度範囲 12.5 ～ 2,000 µg/mL の 8 種類の PEG GCSF 標準溶液を用いて作成した検量線 (A)。優れた相関係数値が得られています。直線範囲のクロマトグラムの重ね表示 (B) も示します。

凝集体/分解物の分析と定量

熱ストレスを加えた PEG GCSF の SEC プロファイルを図 5 に示します。この図から、AdvanceBio SEC カラムにより凝集体の分離および検出が可能なことがわかります。このクロマトグラムでは、インタクト PEG GCSF および二量体以上の PEG GCSF 凝集体が相互に明確に分離しています。表 4 に、面積パーセントにもとづく PEG GCSF の単量体および凝集体の相対的な定量結果をまとめます。

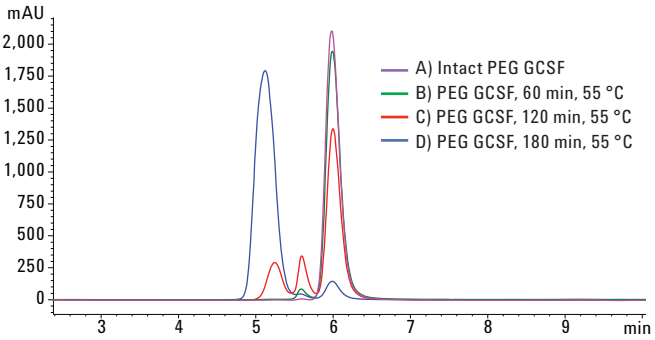


図 5. Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いて SEC HPLC で測定した PEG GCSF の凝集動態。(A) インタクト PEG GCSF、(B) 55 ° C で 60 分間加熱、(C) 55 ° C で 120 分間加熱、(D) 55 ° C で 180 分間加熱。

このデータから、55 ° C での熱ストレスにより、凝集体の濃度が高くなっていることは明らかです。それに伴い、単量体の含有量はそれぞれ 96 %、70 %、および 6.44 % に減少しています。

表4. ピーク面積にもとづく単量体と凝集体の相対定量結果

ストレスを加えた PEG GCSF (60 分間)		ストレスを加えた PEG GCSF (120 分間)		ストレスを加えた PEG GCSF (180 分間)	
時間	面積 %	時間	面積 %	時間	面積 %
5.59	2.85	5.24	16.01	5.12	91.89
5.99 (単量体)	96	5.59	12.74	5.57	1.14
		5.99 (単量体)	70.29	5.98 (単量体)	6.44

結論

このアプリケーションノートでは、モデルタンパク質として PEG GCSF を用い、PEG 化タンパク質の分析に有効なソリューションをいくつか紹介しました。ここでは、Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いて、PEG GCSF の純度をモニタリングするための単純な SEC HPLC メソッドを開発しました。移動相で有機溶媒は使用しませんでした。このメソッドによる繰り返し分析では、優れた RT と RSD が得られました。その結果は、PEG GCSF のシステム適合性要件に適合していました。PEG GCSF の LOD と LOQ は、それぞれ 3.125 µg/mL と 12.5 µg/mL でした。これは、この分析メソッドが高感度であることを示しています。また、濃度範囲 12.5 ～ 2,000 µg/mL の 8 種類の複合体標準溶液をもとに作成した検量線は、優れた直線性を示しました。これは、このメソッドにより正確な定量が可能なことを表しています。さらに、治療用 PEG 化タンパク質のストレス調査から、AdvanceBio SEC カラムにより、凝集体の分離および検出と、面積パーセントにもとづく定量が可能なことが実証されました。このような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、バイオ医薬品研究における PEG 化タンパク質の QC に適した、信頼性の高いソリューションを実現することができます。

参考文献

1. Gaberc-Porekar, V.; Zore, I.; Podobnik, B.; Menart, V. Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2008**, *11*, 242–250.
2. ipc.nic.in/writereaddata/monoprepimages/Pefilgrastim-2961377726.pdf
3. Ratto, J. J.; O' Conner, S. R.; Distler, A. R.; Wu, G. M.; Hummel, D.; Treuheit M. J.; Herman, A. C.; Davis, J. M. Ethanol-sodium chloride-phosphate mobile phase for size-exclusion chromatography of poly (ethylene glycol) modified proteins. *J. of Chromatog. A* **1997**, *763*, 337–344.
4. Tsutomu Arakawa; et al. The Critical Role of Mobile Phase Composition in Size Exclusion Chromatography of Protein Pharmaceuticals. *J. of Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 1674–1692.

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。

www.agilent.com/chem/jp

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。診断目的では使用できません。

本資料に記載の情報は、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
March 23, 2016
5991-6791JAJP

Agilent Technologies