Agilent AdvanceBio SEC カラムによる生物製剤のハイスループット・高感度なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、2.7 µm カラム

アプリケーションノート

バイオ医薬品

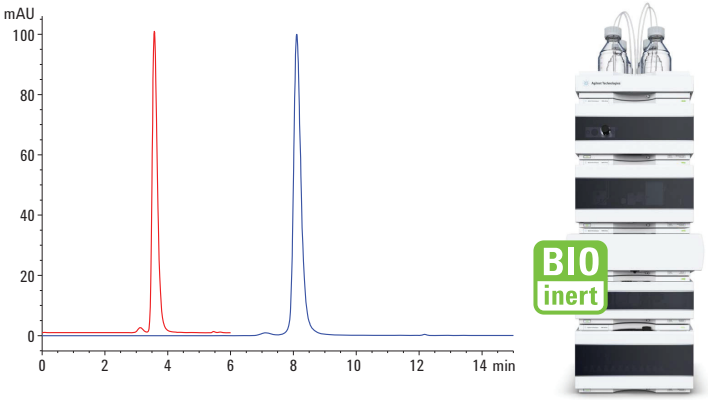
著者

M. Sundaram Palaniswamy

Agilent Technologies Inc.

概要

生物製剤の製造時には、細胞培養、回収、精製、保管、および充填の段階でのさまざまなメカニズムによりモノクローナル抗体 (mAb) の凝集が発生する可能性があります。mAb のサイズにもとづく分離には、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が標準的な手法となっています。SEC は、凝集体の定性的および定量的評価の基準となる有効な分析法と見なされています。ところが、製薬プロセスの過程で生じる複数のサンプルを SEC で分析するとなると、完了までに何時間もかかるうえ、その間にサンプルが不適切な環境に置かれることで凝集状態に重大な影響がおよぶ可能性もあります。今回の調査では、より短く細い Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用することで、mAb および抗体薬の複合体 (ADC) を優れた分離能、感度、および再現性で迅速に分離し、定量できることが実証されました。このメソッドにより、分離と定量をわずか 4 分未満で行えただけでなく、ストレスに起因する凝集体をモニタリングし、検出することができました。



Agilent Technologies

はじめに

タンパク質は、pH、温度、濃度の変化などのストレス条件下にさらされると、容易に凝集体を形成します。凝集は、医薬品の製造プロセスの上流または下流工程、さらに単なる保管時にも、さまざまな段階で発生する可能性があります。モノクローナル抗体 (mAb) および抗体薬の複合体 (ADC) の凝集体をモニタリングおよび特性解析する手段として、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が広く使用されています。ところが、SEC による分離は通常、大型のカラムを用いて比較的低流量で行われ、分析に長い時間がかかります。この課題の解決に向け、近年では粒子径 2 µm 以下のカラムを用いた超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) の導入が進み、分析時間は大幅に短縮されました。ただし、超微粒子と高い流量を使用することで生じる熱的力とせん断力が、温度や圧力に敏感なタンパク質にとって致命的となる可能性があります [1]。また、水系移動相を用いた ADC の SEC 分析では、良好なピーク形状が得られず、凝集体と単量体を明確に分離することができません。これらの問題は、疎水性の細胞傷害性薬剤と固定相との間に生じる非特異的な相互作用により説明できます。この相互作用を解決してピーク形状を改善するために、SEC の移動相にはさまざまな有機溶媒が添加されます。ところが、これらの有機溶媒は、タンパク質に損傷を与え、カラム寿命にも悪影響をおよぼす可能性があります。

アジレントは、SEC により得られる情報の品質を高めるために、SEC に数々の改善を行ってきました。その 1 つが、最適なポア体積とポアサイズを持ち、アジレント独自の親水性ポリマーコーティングを施した、より短く (150 mm) より細い (4.6 mm) カラムの開発です。これにより、水系移動相に有機溶媒を加えなくても、明確に分離したシャープなピークが得られるようになります。このアプリケーションノートでは、より短く細い Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いた mAb および ADC の高速でハイスループットの SEC 分析について取り上げます。mAb および ADC 分子の定量に対するこれらのカラムの適合性についても示します。

実験方法

機器、カラム、標準物質

分析には、次のモジュールで構成される、イナート仕様の Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム (最大圧力 600 bar) を使用しました。

- 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 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搭載 (G1316C、オプション 19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器、最大光路長 60 mm の高感度フローセル搭載 (G4212B、オプション 33)
- Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、7.8 × 150 mm、粒子径 2.7 µm (p/n PL1180-3301)
- Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、4.6 × 150 mm、粒子径 2.7 µm (p/n PL1580-3301)
- AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準、凍結乾燥済み、1.5 mL (p/n 5190–9417)

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 システムによる SEC に用いたクロマトグラフィーパラメータを示します。

表1. SEC HPLC に用い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、pH 7.0 (移動相 A)
TCC 温度	室温
イソクラティック分離	移動相 A
注入量	5 µL (7.8 × 150 mm カラム)
	2 µL (4.6 × 150 mm カラム)
流量	1 mL/min (7.8 × 150 mm カラム)
	0.35 mL/min (4.6 × 150 mm カラム)
UV 検出	220 および 280 nm

試薬およびサンプル

リツキシマブの先発薬とバイオシミラー、ハーセプチン、および ADC 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リン酸水素ナトリウム、塩酸 (HCl)、および水酸化ナトリウム (NaOH) を Sigma-Aldrich 社から購入しました。化学物質および溶媒はすべて HPLC グレードのものを使用し、Milli-Q 純水製造システム (Millipore Elix 10 モデル、米国) で生成した超純水を使用しました。

Agilent AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーション

AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーションは、Agilent 300 Å タンパク質標準 (チログロブリン (670 kDa)、γ-グロブリン (158 kDa)、オブアルブミン (44 kDa)、ミオグロビン (17 kDa)、およびアンギオテンシン II (1,000 Da)) の溶出容積を測定することにより行いました。AdvanceBio SEC タンパク質標準の分子量の対数 (logMW) 値を溶出容積に対してプロットし、排除限界を求めました。

定量下限 (LOQ) と検出下限 (LOD)

LOD および LOQ の測定には、例としてハーセプチンと ADC を使用しました。S/N 比 が 3 を超えたタンパク質濃度を LOD とし、S/N 比が 10 を超えた濃度を LOQ としました。

手順

5 µL および 2 µL の移動相をブランクとして注入した後、インタクト mAb およびストレスを加えた mAb を 6 回繰り返し分析し、面積およびリテンションタイム (RT) の偏差を計算しました。

リツキシマブの凝集体の調製

凝集体の分析には、mAb および ADC の代表例としてリツキシマブ先発薬と ADC を使用しました。凝集体を誘発させるために、文献 [2] に記載の手順をわずかに変更して用いました。

1. サンプル溶液 (2 mg/mL) に 1 M の HCl をゆっくりと滴下し、pH を 6.0 から 1.0 に変化させました。
2. 1 M の NaOH を加えて pH を 10.0 に調整しました。
3. 1 M の HCl を再び加え、pH を 6.0 に戻しました。

pH 調整から次の pH 調整までに約 1 分間の待ち時間を設け、その間常に 500 rpm で撹拌しました。この溶液を 60 ° C で 60 分間放置しました。

結果と考察

分離と検出

既知分子量の一連の Agilent 300 Å タンパク質標準を使用して AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーションを行いました。タンパク質マーカーに含まれるチログロブリン凝集体のピーク (ボイドピーク) をもとにボイドボリュームを求めました。この凝集体は、AdvanceBio SEC、7.8 × 150 mm カラムでは 2.56 分、4.6 × 150 mm カラムでは 2.35 分で溶出し、ボイドボリューム (V_0) がそれぞれ 2.56 mL と 0.805 mL であることがわかりました。また、AdvanceBio SEC カラムで分離したタンパク質の検量線は直線相関性を示しました。この検量線から、分析したタンパク質範囲の排除限界 (670 kDa) と浸透限界 (1,000 Da) が明らかになりました。このプロット (図 1) を使用することで、未知タンパク質の分子量をその溶出容積から判断することができます。

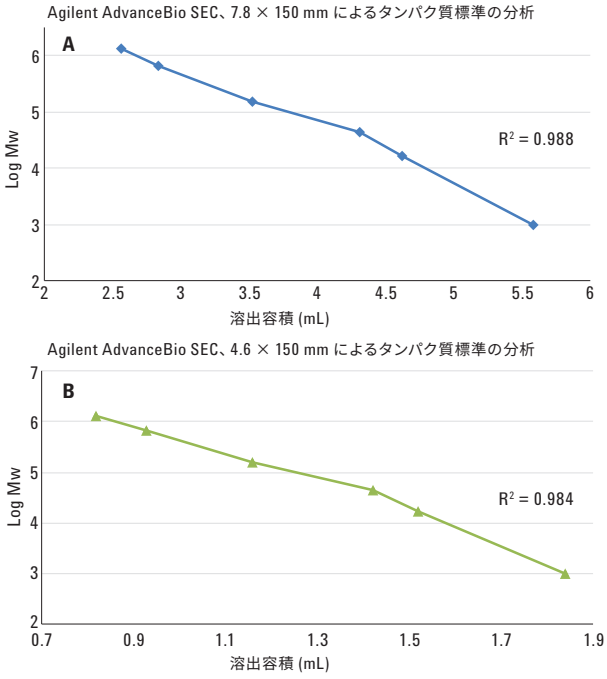


図 1. 7.8 × 300 mm (A) および 4.6 × 150 mm (B) の Agilent AdvanceBio SEC 300 Å カラムで得られたタンパク質標準の検量線。

今回の調査では、分析時間を短縮することにより分析スループットを高めることを目的としました。SEC では、カラム寸法が同じであれば、流量によって分析時間が決まります。ただし、流量を上げると、分離能が犠牲になる可能性があります。分析時間を短縮するためには、流量に対するカラムのボイドボリュームの比率を低減する必要があります。すなわち、単純な方法として、カラム長を短くして流量を上げれば、SEC を高速化できるということです [2、3]。図 2 は、リツキシマブのバイオシミラーと先発薬、ハーセプチン、および ADC を AdvanceBio SEC、7.8 × 150 mm カラムで SEC 分析したクロマトグラフィープロファイルです。これらのクロマトグラムから、クロマトグラフィー条件下で単量体が 4 分未満で良好に分離していることがわかります。

次に、感度を高めるために、AdvanceBio SEC、4.6 × 150 mm カラムで分離を行いました。図 3 に示す結果から、優れた分離性能が得られたことがわかります。どちらの場合も、単量体のピークの前後に凝集体や分解物を示す溶出ピークがないことから、使用した市販の mAb 調製物が均一だったと考えられます。これらのカラムを使用して水系移動相で疎水性 ADC を分析したところ、対称のピークが得られました。これは、疎水性ペイロードと固定相との間で二次的な相互作用が起きなかったことを示します。より短い AdvanceBio SEC カラムでは、ADC 凝集体を分離することができました。これは、このカラムが ADC の特性解析に適しており、開発、ロット管理、および安定性の研究に役立つ十分な情報が得られることを示しています。

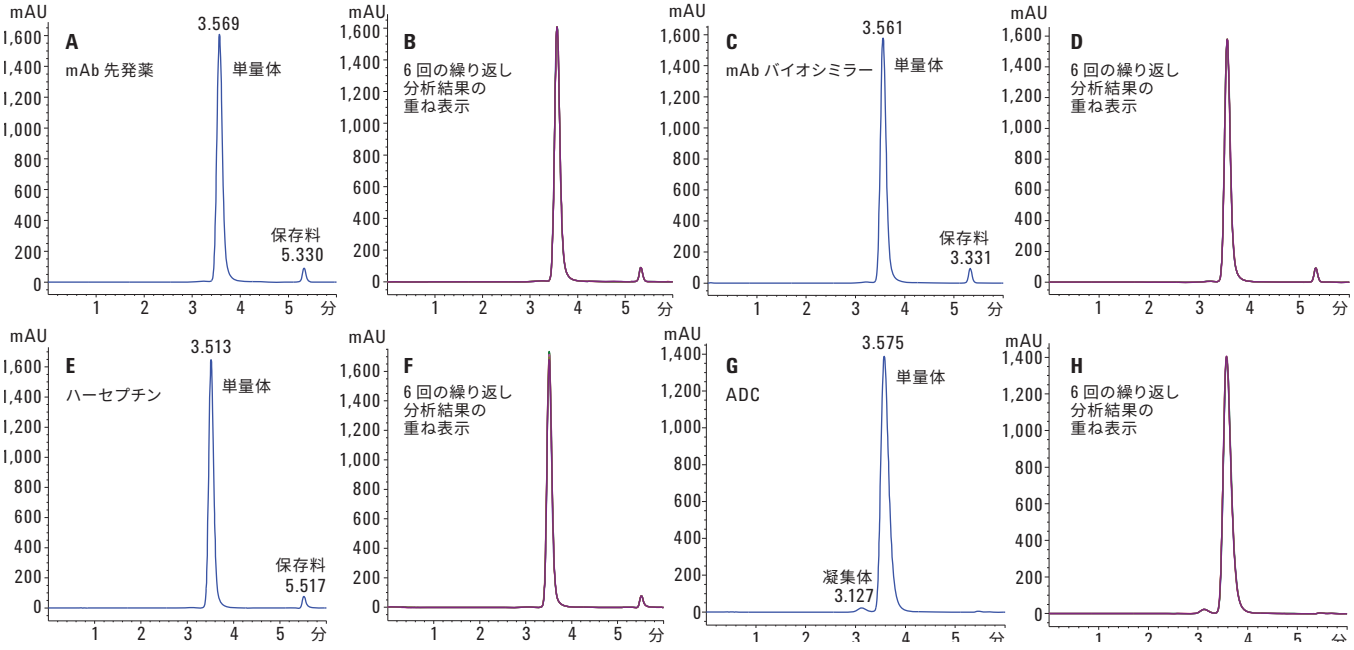


図 2. Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、7.8 × 150 mm、2.7 µm カラムで得られた未変性のリツキシマブ先発薬とバイオシミラー、ハーセプチン、および ADC の SEC クロマトグラフィープロファイル。

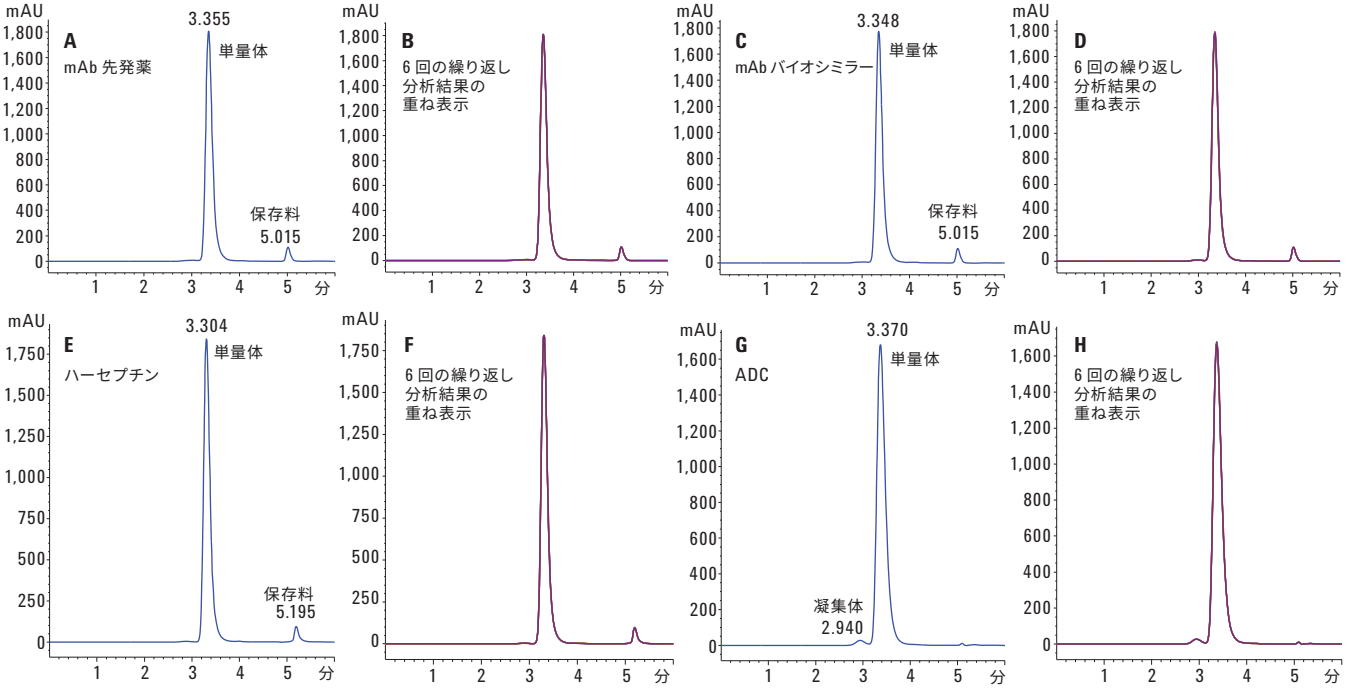


図 3. Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm カラムで得られた未変性のリツキシマブ先発薬とバイオシミラー、ハーセプチン、および ADC の SEC クロマトグラフィープロファイル。

リテンションタイム (RT) および面積の精度

このメソッドの精度を確かめるために、7.8 × 150 mm カラムではオンカラム濃度 10 µg、4.6 × 150 mm カラムでは 4 µg で 4 種類の生物製剤すべてについてリテンションタイム (RT) および面積の相対標準偏差 (RSD) 値を求めました。表 2 は、サンプルを 6 回繰り返し分析することにより得られた RT および面積の RSD の平均値です。RSD の最大値は、面積については 0.21 %、RT については 0.02 % でした。この結果は、このメソッドの優れた再現性、すなわちシステムの高い精度を示しています。

表2. サンプルの RT およびピーク面積の精度 (n = 6)。

	Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、7.8 × 150 mm、2.7 µm		Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm	
サンプル	RT RSD (%)	ピーク面積 RSD (%)	RT RSD (%)	ピーク面積 RSD (%)
リツキシマブ先発品	0	0.15	0.02	0.02
リツキシマブバイオシミラー	0	0.04	0.01	0.01
ハーセプチン	0	0.21	0.01	0.02
ADC	0	0.01	0	0.02

より短く細い Agilent AdvanceBio SEC カラムによるハーセプチンおよび ADC の定量

LOD と LOQ

表 3 に、7.8 × 150 mm および 4.6 × 150 mm カラムによるハーセプチンおよび ADC のオンカラム LOD および LOQ をまとめます。また、図 4 に、ハーセプチンおよび ADC サンプルの LOD および LOQ とブランクのクロマトグラムの重ね表示を示します。細い 4.6 × 150 mm カラムでは、生物製剤が高感度で分析されています。

表3. サンプルの LOD および LOQ 値。

	Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、7.8 × 150 mm、2.7 µm		Agilent AdvanceBio SEC、300 Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm	
サンプル	**LOD**	**LOQ**	**LOD**	**LOQ**
ハーセプチン	78 ng	156 ng	31.2 ng	62.4 ng
ADC	78 ng	156 ng	31.2 ng	62.4 ng

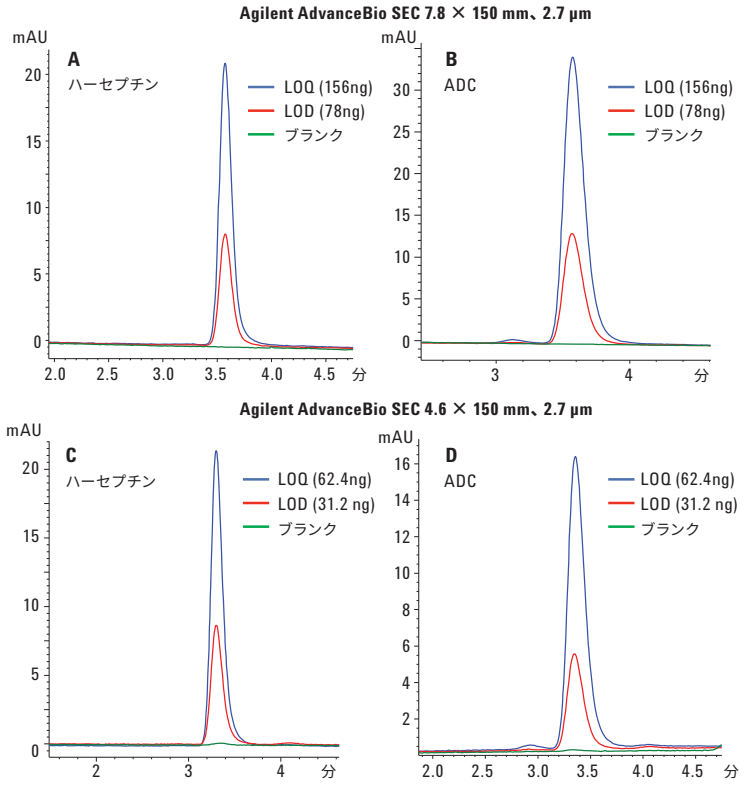


図 4. 7.8 × 150 mm および 4.6 × 150 mm の Agilent AdvanceBio SEC 300 Å カラムによるハーセプチンおよび ADC の LOD および LOQ とブランクの SEC クロマトグラムの重ね表示。

直線性

今回の調査では、ハーセプチンと ADC について、ハーセプチン/ADC の面積値と濃度を用いた検量線を LOQ レベルから最高濃度までの範囲で作成しました。図 5 に、両方のカラムで得られた濃度範囲 15.6 ～ 2,000 µg/mL のハーセプチンおよび ADC の検量線を示します。検量線から求めた mAb および ADC の回帰係数 (R^2) から、分析した範囲において、このメソッドが優れた定量性を有していることがわかりました。

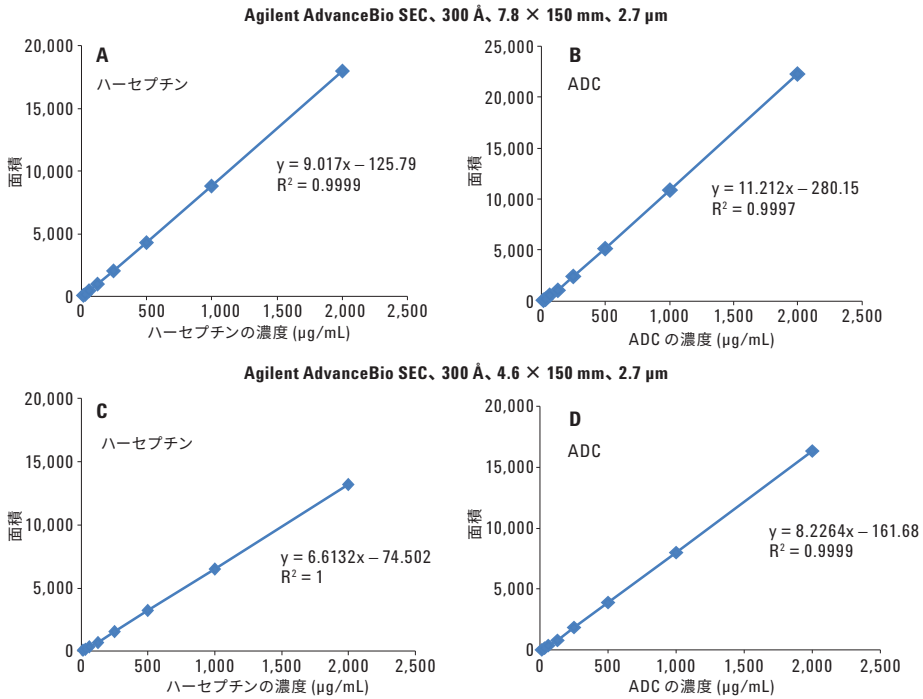


図 5. 濃度範囲 15.6 ～ 2,000 µg/mL の 8 種類のハーセプチンおよび ADC 標準溶液により作成した検量線。優れた相関係数を示しています。

凝集体/分解物の分析

タンパク質医薬品では、精製、製剤、および製造の段階でタンパク質の凝集を抑えることが常に課題となります。今回の調査では、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加えたハーセプチンと ADC を 2 種類の AdvanceBio SEC カラムで分析し、比較しました。このクロマトグラフィー分析では、単量体より先に溶出したピークを凝集体、後に溶出したピークをフラグメント/分解物と見なしました。

pH/熱に起因する凝集体のピークがクロマトグラムに現れたことから、これらの AdvanceBio SEC カラムによって凝集体およびフラグメントを分離、検出できることがわかりました。図 6 および図 7 に示すように、単量体、凝集体、および分解物が相互に明確かつ良好に分離されました。また、ストレスの結果、単量体のピーク高さが大幅に低下していました (データは示されていません)。

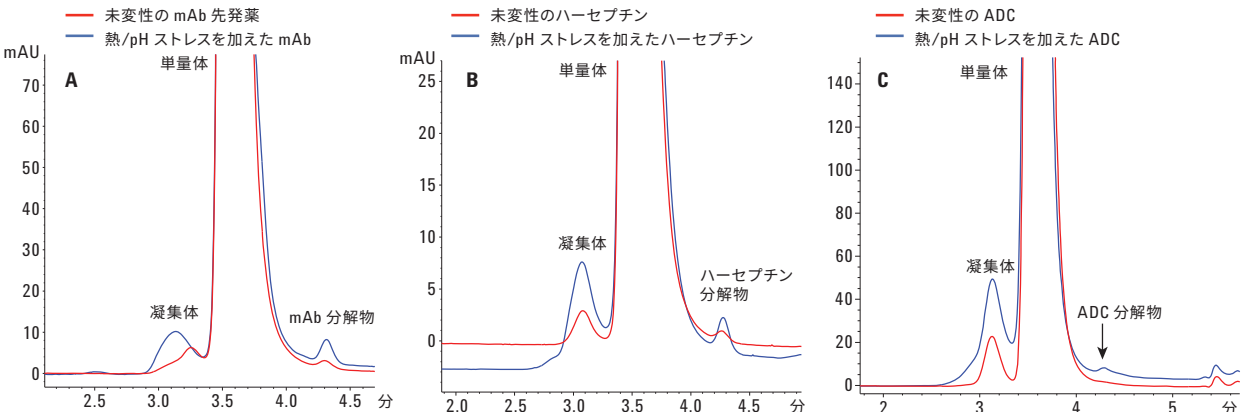


図 6. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 150 mm、2.7 µm カラムによる未変性 (コントロール、赤のトレース) および熱/pH ストレスを加えた (青) mAb 先発薬、ハーセプチン、および ADC のクロマトグラムの重ね表示。

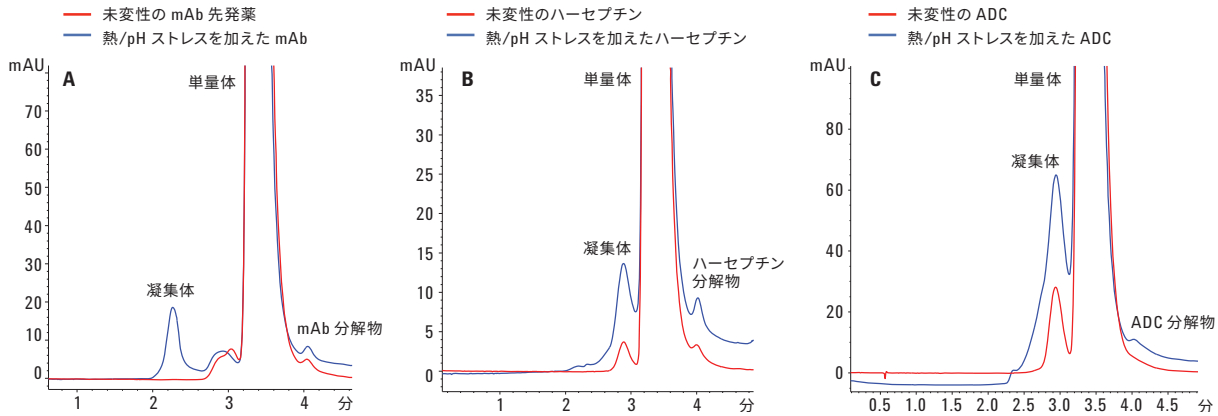


図 7. Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm カラムによる未変性 (コントロール、赤) および熱/pH ストレスを加えた (青) mAb 先発薬、ハーセプチン、および ADC のクロマトグラムの重ね表示。

結論

SEC は、タンパク質凝集体の特性解析に広く使用されています。凝集体は免疫原性になり得ることから、遺伝子組み換えタンパク質の製造時には、凝集レベルを徹底的に抑制することが求められます。今回の調査により、粒子径 2.7 µm の、より短く細い Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いることで、単量体、凝集体、およびフラグメントを 4 分未満でハイスループット分離できることがわかりました。AdvanceBio SEC カラムでは、移動相に有機溶媒を添加しなくても、疎水性 ADC をきわめて良好なピーク形状で分離できました。また、優れた面積および RT 精度が得られました。これは、ルーチン分析におけるこのメソッドの高い信頼性を示しています。さらに、評価した濃度範囲で直線性の高い検量線が得られたことから、優れた定量性を備えた正確なメソッドがであることがわかりました。最後に、より短く細い AdvanceBio SEC カラムでは、強制的にストレスを与えた調査において凝集体およびフラグメントを確実にモニタリングすることができました。以上の結果から、これらのカラムが、高いスループットと感度を必要とするアプリケーションに適していることが実証されました。

参考文献

1. Fekete, S.; Beck, A.; Veuthey, J-L.; Guillarme, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates.*J. Pharm. and Biomed.Anal.***2014**, *101*, 161–173.
2. 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. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 2197–2204.
3. Coffey, A. *Fast, High-Resolution Size Exclusion Chromatography of Aggregates in Biotherapeutics*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6458EN, **2015**.

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

カスト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, August 1, 2016
5991-7165JAJP

Agilent Technologies