



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ナリ 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的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 WWR 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 MΩ 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 μm 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ナリポンプ (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 μm カラム (p/n PL1180-3301) または
- Agilent AdvanceBio SEC、2.7 μm 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 μL (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。

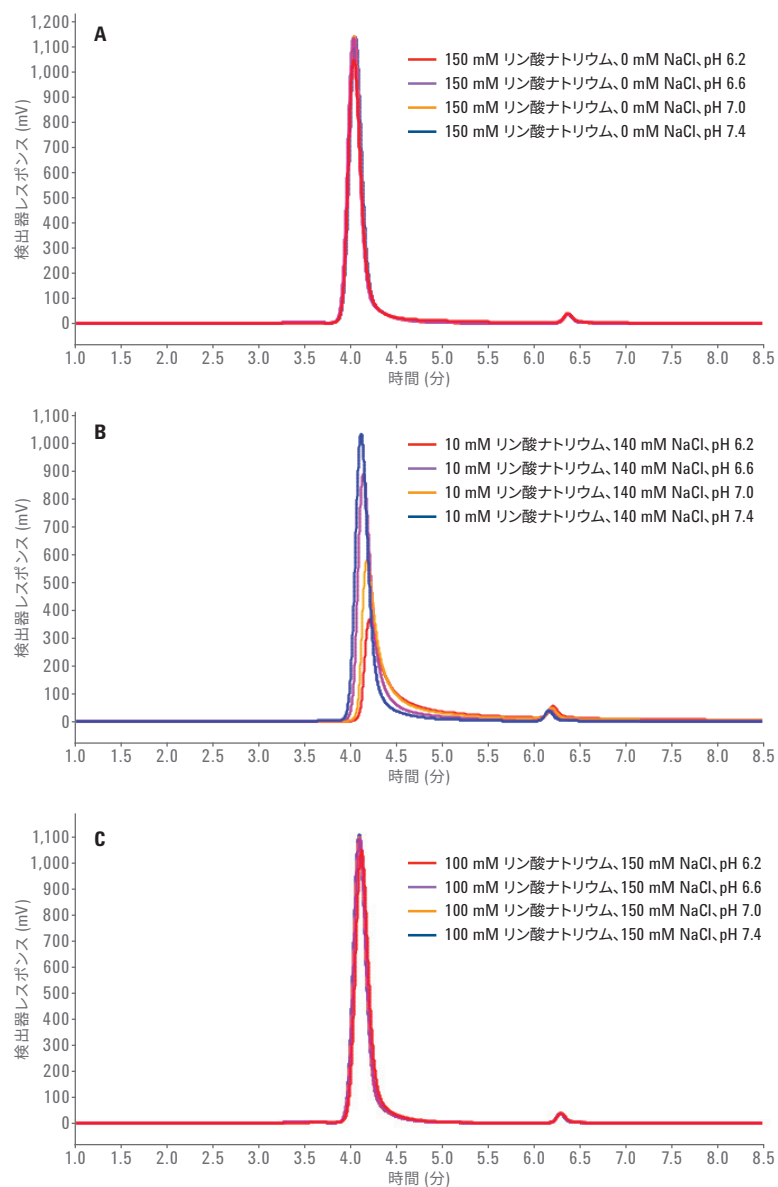


図 1. 12 種類の異なる移動相条件で連続して、リツキシマブ先発品 (1 μ L 注入) を分析 (表 1 の実験 1 ~ 12 を参照)。

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)。

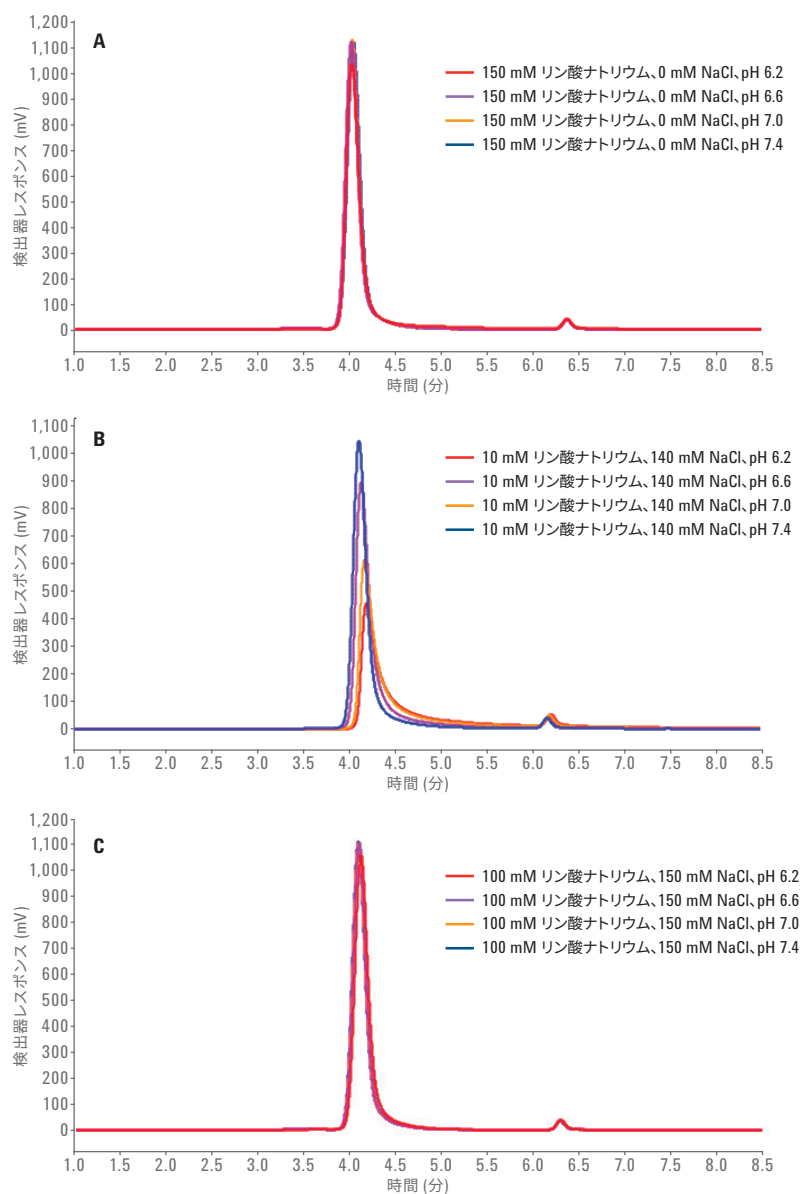


図 2.12 種類の異なる移動相条件で連続して、リツキシマブバイオシミラー (1 μ L 注入) を分析 (表 1 の実験 1 ~ 12 を参照)。

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。

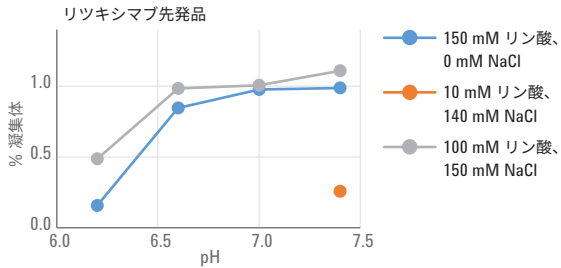


図 3A. リツキシマブ先発薬の凝集体含有量のピーク面積のパーセント率 (表 1 の実験 1 ～ 12 を参照)。凝集体が検出された実験のポイントが示されています。

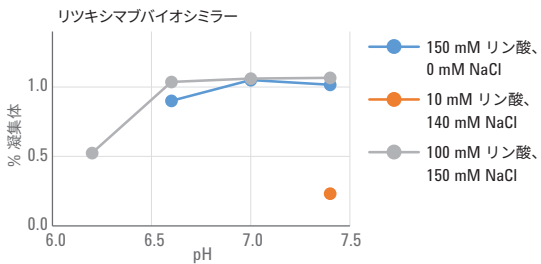


図 3B. リツキシマブバイオシミラーの凝集体含有量のピーク面積のパーセント率 (表 1 の実験 1 ～ 12 を参照)。凝集体が検出された実験のポイントが示されています。

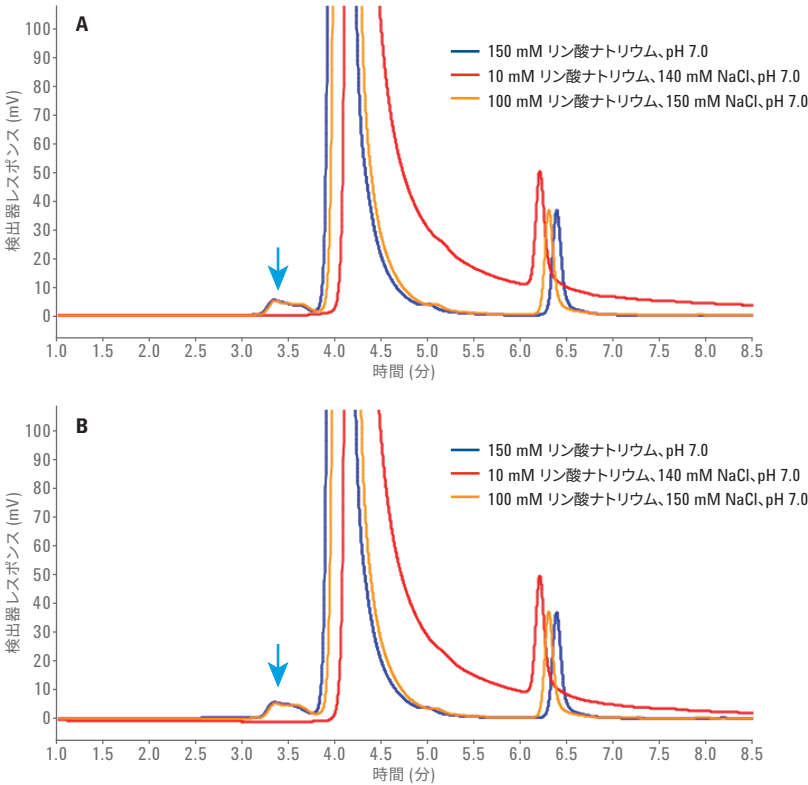


図 4. 最適化された pH 7.0 で異なる緩衝液塩濃度を用いたリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) 分析の UV 220 nm 信号のベースラインの拡大図 (表 1 の実験 3、6、11 を参照)。

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。

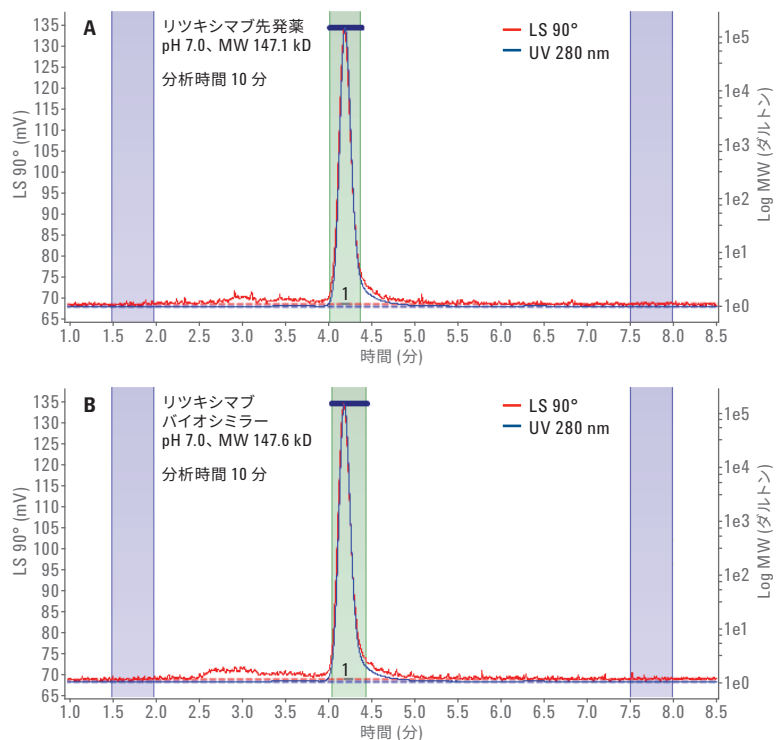


図 5. 100 mM リン酸ナトリウムと 150 mM NaCl, pH 7.0 でのリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) の LS 分析の比較 (表 1 の実験 11)。

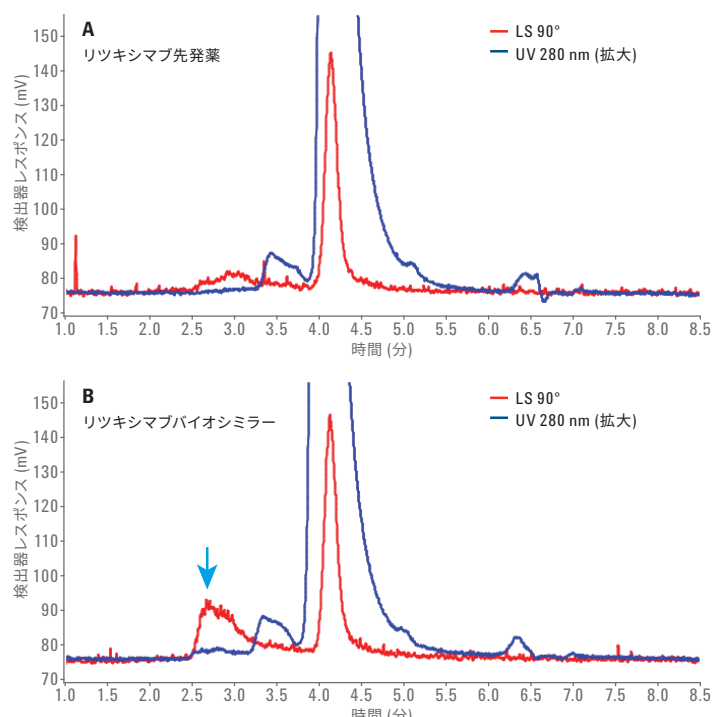


図 6. 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 でのリツキシマブ先発薬 (A) とリツキシマブバイオシミラー (B) の LS 分析の比較 (表 1 の実験 3)。

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。

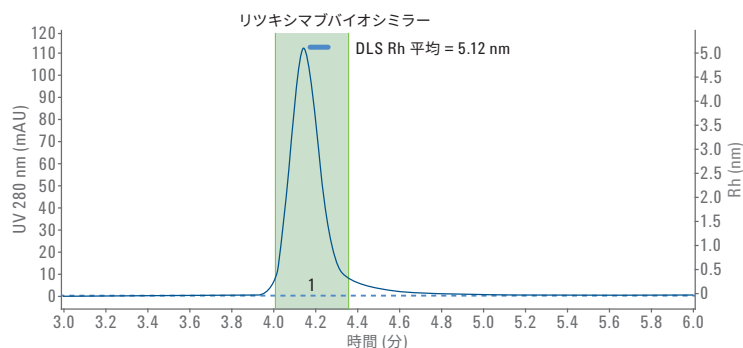


図 7. LS 検出器による流体力学半径の結果を示すリツキシマブバイオシミラー DLS 分析。

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