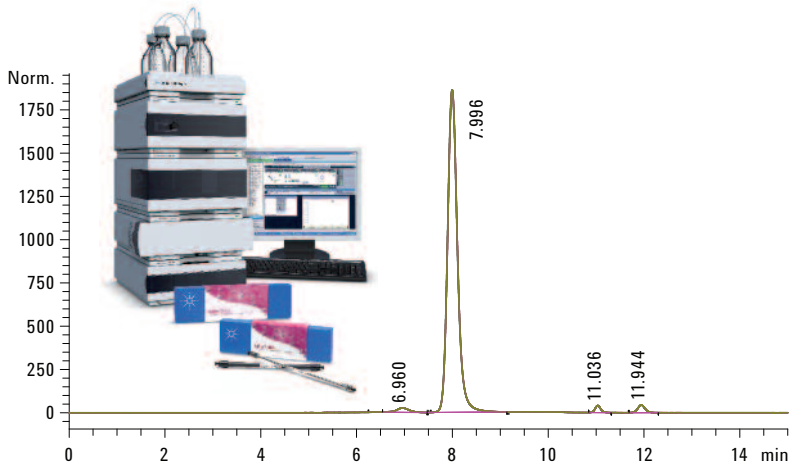
Agilent BioSEC カラムと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を用いたサイズ排除クロマトグラフィによるモノクローナル抗体の分析

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Srividya Kailasam、
Jochen Strassner、Faizy Ahmed、
Martin Vollmer
Agilent Technologies
Bangalore, India and
Waldbronn, Germany



概要

Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC システムと Agilent BioSEC カラムを用いて、Anti-FLAG と BL05 という 2 つのモノクローナル抗体 (mAb) の純度と安定性を分析しました。高感度の Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器を用いて、低濃度でこれらの抗体を分析しました。バイオイナート LC システムと BioSEC カラムを組み合わせれば、治療用 mAb やタンパク質のルーチンサイズ排除クロマトグラフィに対応する信頼性と堅牢性の高いメソッドを開発できます。どちらの mAb についても、他社製カラムで得られた結果よりも、抗体のメインピークから変異体を良好に分離できました。

Agilent Technologies

はじめに

調剤、保管、臨床使用時における組み換えタンパク質および mAb の純度のモニタリングには、高感度の分析テクニックが必要です。不適切な製造、調剤、保管、処理条件などによりサンプル中で形成される凝集体は、サイズの違いをもとに、医薬品主成分から分離し、検出することができます。一般に、サンプルの完全性をモニタリングするための凝集体や立体配座変異体の分析には、UV 検出と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) が用いられます。このアプリケーションノートでは、Agilent BioSEC カラムを用いた SEC による mAb の分離と完全性のモニタリングに関して、Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC システムの適合性を実証しています。この機器と小型粒子カラムを組み合わせれば、機器やカラム粒子表面での二次相互作用を最小限に抑えながら、未変性コンホメーションから変異体をきわめて効率的に分離することができます。

実験手法

システム

完全な生体適合性を備えた 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。最大圧力は 600 bar で、以下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 (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、バイオイナート加熱エレメントを搭載 (G1316C #19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器、Max-Light 60 mm、高感度フローセルを搭載 (G4212A #33)
- ChemStation B.04.02 ソフトウェア

革新的なキャピラリ技術を搭載したこのシステムでは、サンプルパスに金属コンポーネントが一切使われていないため、サンプルが金属表面に接触することはありません。溶媒送液でも、ステンレススチールや鉄のコンポーネントは使われていないので、腐食を防止できます。

化学物質と試薬

モノクローナル抗体 : 1. Anti-FLAG、3.8 mg/mL (Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス) および 2. BL05、0.76 mg/mL (Agilent、カリフォルニア州サンディエゴ)

SEC 標準ミックス : (チログロブリン、免疫グロブリン (IgA および IgG)、オボアルブミン、RNAse、シチジン)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムを Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から購入。

サイズ排除クロマトグラフィ

カラム

カラム 1 :	Agilent BioSEC 3、3 µm、300 Å、7.8 mm x 300 mm (p/n 5190-2511)
カラム 2 :	Agilent BioSEC 5、5 µm、300 Å、7.8 mm x 300 mm (p/n 5190-2526)
カラム 3 :	ブランド A、5 µm、250 Å、7.8 mm x 300 mm

LC メソッド

注入量 :	1 µL
移動相 A :	150 mM リン酸バッファ (pH = 7.0)
移動相 B :	150 mM 塩化ナトリウムを含む 150 mM リン酸バッファ (pH = 7.0)
流速 :	1 mL/min UV
検出 :	220 nm/4 nm リファレンス : オフ

結果と考察

異なるバッファ条件での タンパク質標準の分析

バッファの最適化は、SEC による mAb 分析において、二次的な固定相の相互作用を最小限に抑え、最高の分離能を得るための重要な前提条件です。市販されている SEC カラムの多くでは、非特異的な結合やピーク拡散、ピークテーリングを抑えるために、腐食性の塩がしばしば用いられています。

この研究では、2 つの mAb の SEC 分析において、次の 2 つのバッファシステムを用いました。A) 150 mM リン酸バッファ (pH 7.0) および B) 150 mM 塩化ナトリウムを含む 150 mM リン酸バッファ (pH 7.0)。

mAb 注入前にカラムとシステムの性能を評価するために、塩化ナトリウムを含まない場合 (図 1) と 150 mM 塩化ナトリウムを含む場合 (図 2) の両バッファ条件において、既知分子量のサイジング用標準ミックスを分析しました。標準タンパク質の分離では、バッファ A で他社のブランド A カラムを用いた場合に、大幅なピーク拡散が見られました (図 1)。同じ移動相 A では、Agilent BioSEC 3 カラムで最高の分離効率が得られ、Agilent BioSEC 5 カラムよりも分離能が高くなりました。これらの結果は、小さい粒子径の効果を示しています。小さい粒子は、直径の大きい粒子を用いたカラムに比べて、タンパク質分離における物質移動が向上します (図 1)。Agilent BioSEC カラムの性能は、塩添加物がない場合でも低下していません。このことは、二次相互作用を抑えるために、高濃度の塩は必要ないことを示しています。

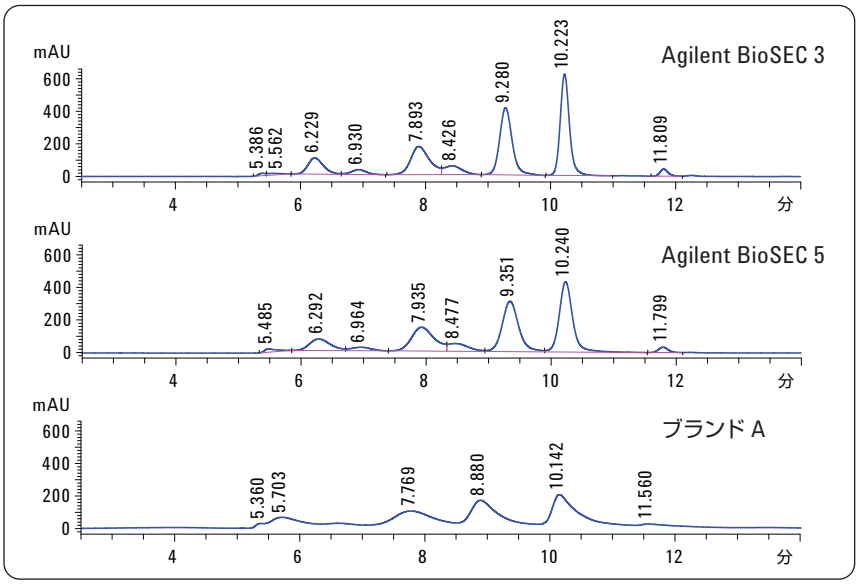


図 1
移動相 A を用いて 3 つのカラムで得られた標準ミックス 1 µL の SEC 分析結果

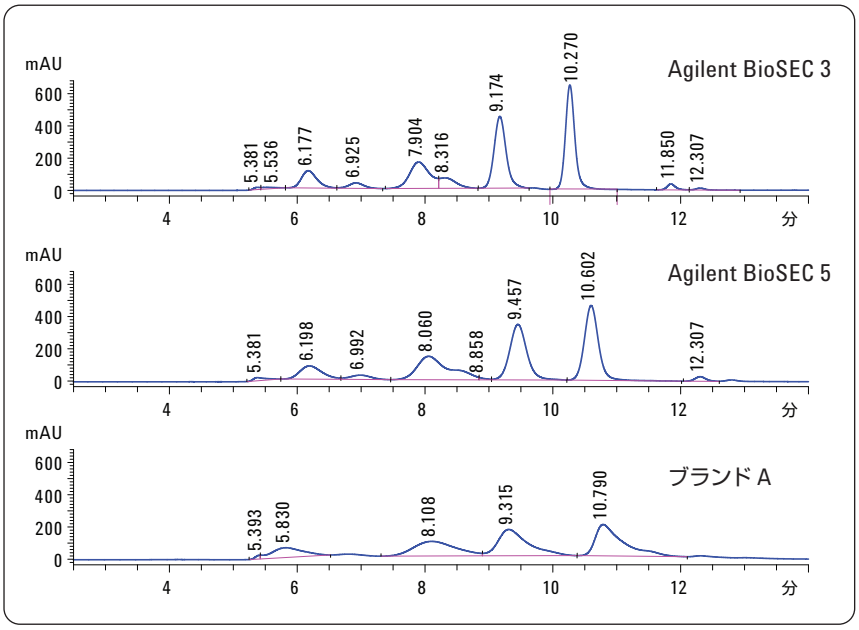


図 2
移動相 B を用いて 3 つのカラムで得られた標準ミックス 1 µL の SEC 分析結果

モノクローナル抗体の分離

mAb 分離 (Anti-FLAG オンカラム 0.76 µg) をおこない、Agilent バイオイナートソリューションの性能をさらに評価しました。同じカラム寸法で粒子径 5 µm、ポアサイズ 250Å の市販カラム (ブランド A) と比較して、Agilent BioSEC 3 と Agilent BioSEC 5 を評価しました。この分析結果は、タンパク質標準ミックスの分析で得られた結果と一致しています。ブランド A カラム (塩添加なし) では、抗体ピークで大きなテーリングが見られているのに対し、Agilent BioSEC カラムでは、高濃度の腐食性塩を用いなくても、左右対称のピークと優れた分離能が得られ、感度も向上しています (図 3)。

メソッド堅牢性の指標となる再現性は、QA/QC 分析ではとりわけ重要となります。図 4 では、Agilent BioSEC 3 µm カラムを用いて、非希釈 Anti-FLAG mAb を 5 回繰り返して分析したクロマトグラムを重ねて表示しています。完全に重なり合ったクロマトグラムは、このメソッドの再現性の高さや機器の安定性、カラムの性能を明らかに表しています。

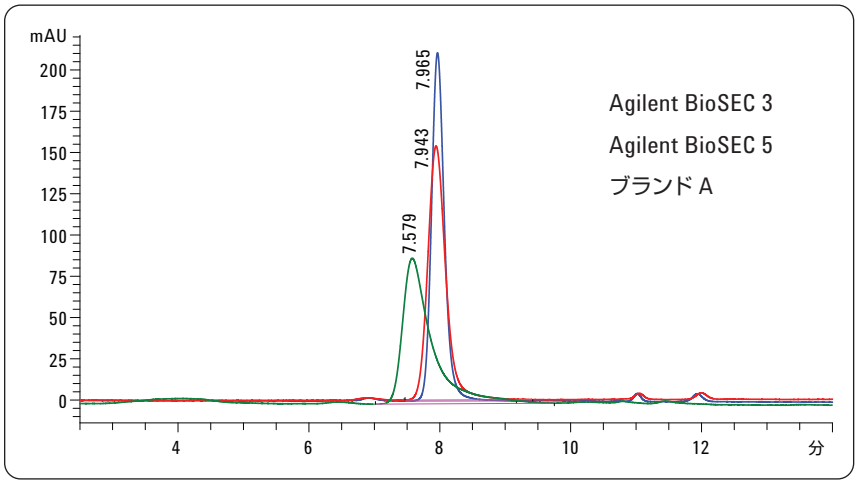


図 3
移動相 A を用いて 3 つのカラムで得られた Anti-FLAG mAb (5 倍に希釈) 1 µL の SEC 分析結果

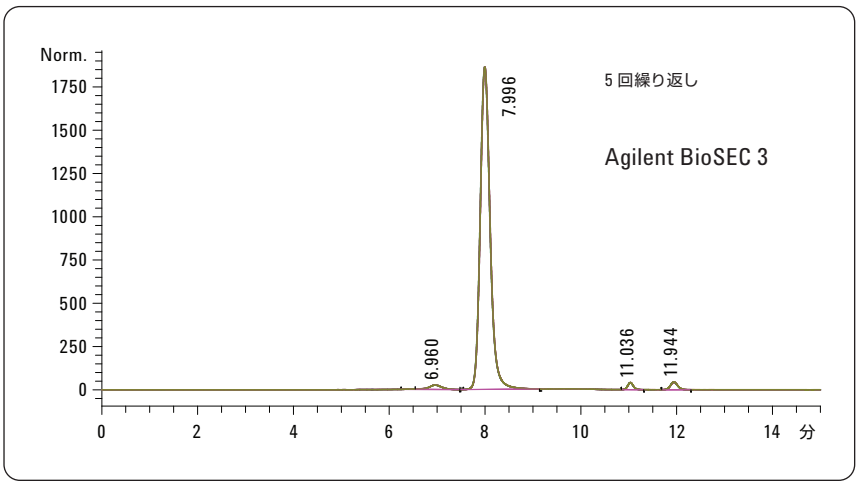


図 4
Agilent SEC 3 で分析した非希釈 Anti-FLAG mAb (1 µL) ; 移動相 A

熱ストレスによる mAb の物理化学特性変化の誘導

製造および調剤中の治療用タンパク質の凝集は、重要な特性と見なされます。そのため、薬効の喪失や免疫原性への悪影響を防ぐためには、厳密なモニタリングが求められます。SEC は、サイズにもとづく分離が可能で、生体分子と相互作用しない粒子が用いられることから、凝集のモニタリングに広く使用されています。

物理化学特性の変化 (凝集と変性) を促進するために、抗体 BL05 の適量に熱ストレスを加え、60 °C で 5、10、30、60 分加熱しました。異なるインキュベーション時間でサンプルを分析すると、TBL05 mAb コンホメーションの経時変化がはっきりと見てとれます。8 分における単量体ピークの高さは、時間とともに低くなりますが、リテンションタイム 5.5 分のピークの高さは、明らかに高くなっています (図 5)。Agilent BioSEC カラムとブランド A カラムを比較すると、クロマトグラフィ性能の違いが明らかにわかります。図 5C (ブランド A) のクロマトグラムでは、分離効率が大きく低下し、ピークテーリングが生じているため、定量がより困難になることが考えられます。それに対して、Agilent BioSEC (図 5A および 5B) を用いた分離では、優れた分離能が得られています。分離効率は、Agilent BioSEC 3 使用時にさらに高くなっています (図 5B)。

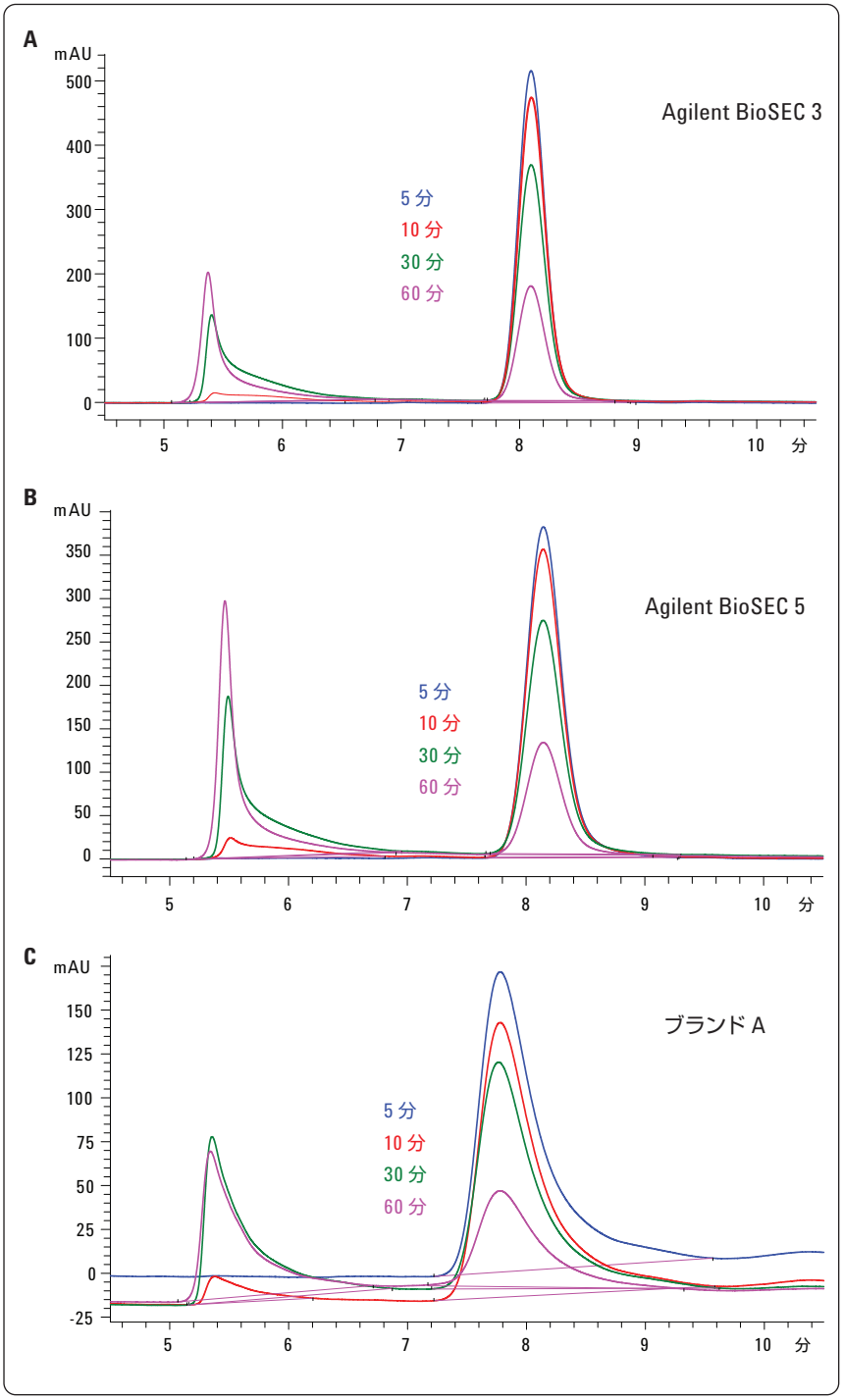


図 5A、5B、5C
BL05 における熱ストレス (60 °C) の影響、移動相 A

第 2 の異なるサンプルを用いて、この結果を確認しました。この例では、Anti-Flag mAb をサンプルとして、60 °C で 30 分間インキュベーションをおこなったあとに分析しました (図 6)。どちらの Agilent BioSEC カラムでも、高い効率と左右対称性が得られているのに対し、ブランド A では、感度や分離能が低下しています。

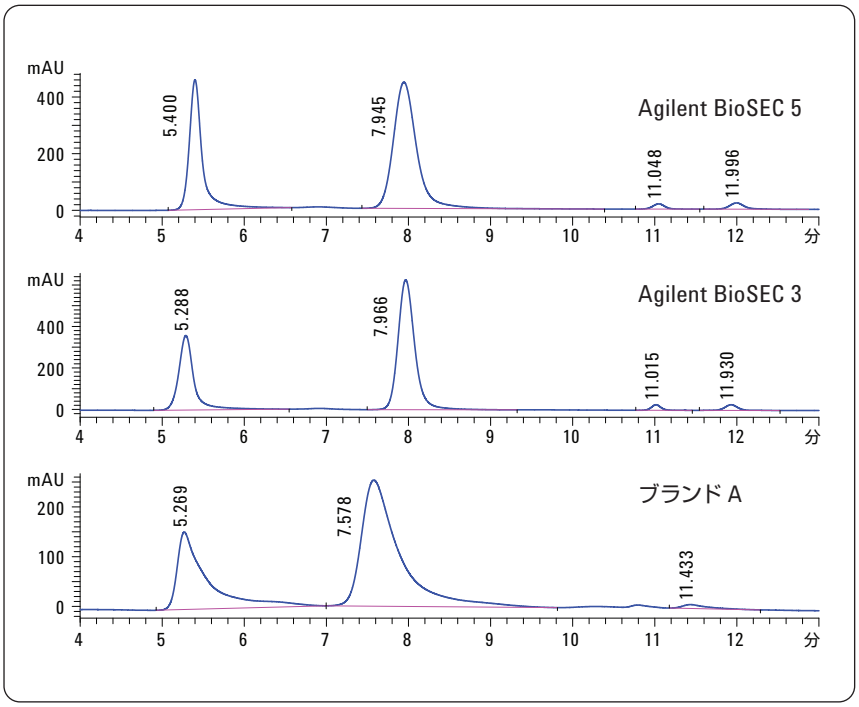


図 6
非希釈 Anti-FLAG (1 µL、オンカラム 3.8 µg) における熱ストレス (60 °C、30 分) の影響、移動相 A

結論

この研究では、Agilent 1260 Infinity バイオイナート HPLC と Agilent BioSEC カラムを組み合わせれば、mAb の物理化学特性分析において優れた性能が得られることが実証されています。内径の小さいカラムでは、より高い分離効率が得られます。このソリューションは、治療用モノクローナル抗体のメソッド開発や純度および安定性のモニタリングに対応する、優れた手法となります。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
February 1, 2011
5990-6414JAJP

Agilent Technologies