

mAb の凝集についての研究

多角度光散乱と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィーの使用

著者

Jasmin Preis* and
Miriam Lossa
*Agilent Technologies, Inc.

概要

UV、RI、静的光散乱などの検出器を搭載した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 (mAb) 凝集体およびフラグメントの含有量とサイズを測定するための優れた分析ツールです。分離範囲が最適化された最新の高分解能 SEC カラムは、このメソッドをフルに活用できます。

はじめに

さまざまな慢性自己免疫疾患や腫瘍性疾患の診断や治療に対し高い有効性や可能性を持つことから、mAb などのバイオ医薬品に対する関心が高まっています¹。

医薬品の効能の損失を回避し、免疫原性反応を防ぐには、mAb の重要な品質特性 (CQA) の制御が不可欠です。モニタリングが不可欠なパラメータの 1 つは凝集体 (ダイマー、三量体、およびそれ以上の凝集体) の内容です。凝集は製造プロセスや配送中に、または長期保管の結果として発生します。凝集のほか、完全長抗体の劣化により生じる抗体フラグメントのモニタリングも必要です。

凝集とフラグメンテーションのモニタリングメソッドには、GPC/SEC が最適です。UV や光散乱などの高分解能、高感度の検出手法で、ネイティブ抗体やその凝集体、フラグメントを同時に分析できる GPC/SEC メソッドが求められています。

実験方法

表 1 を参照してください。

結果と考察

複数の検出手法 (UV、RI、LS など) との GPC/SEC 接続は、抗体凝集体やフラグメントを同時測定できる優れた分析ツールです。このような検出方法の組み合わせは、相互に補完し合うという大きな強みがあります。UV と RI はどちらも濃度検出器で、一般にサンプルの純度を判断するために使われますが、屈折率増分 (dn/dc) と吸光係数 (ϵ) が等しいと仮定すれば、凝集体およびフラグメントの定量にも使用できます。

表 1. 機器パラメータ

	条件
ポンプ	イソクラテックポンプ 流量: 1.00 mL/min 移動相: 水性 34 mM リン酸緩衝液 pH 6.4、0.3 M NaCl
注入システム	オートサンブラ 注入量: 20 μ L
カラム	Agilent MAB 3 μ m プレカラム、8 \times 50 mm (p/n MAA080503) Agilent MAB 3 μ m、8 \times 300 mm (p/n MAA083003MC)
検出器	多波長 UV-Vis 検出器 (MWD) @ λ = 280 nm および/または λ = 214 nm 示差屈折率 (RI) 検出器 多角度光散乱検出器 (MALLS) @ λ = 633 nm
ソフトウェア	Agilent WinGPC UniChrom

しかし、既知の標準溶液を使ってキャリブレーションしなければ、モル質量を決定できないため、さらに光散乱検出器を接続することにより、光散乱検出器がモル質量選択検出器として、mAb とその凝集体の分析を補完します。光散乱には、巨大分子のモル質量を決定する絶対的な方法であり、高モル質量に対する感度が極めて高いという 2 つの大きなメリットがあります。したがって、分子量依存性により、MALLS 検出器は少量の mAb 関連物質や高次な凝集体にも高い感度を示します。

GPC/SEC 実験を成功させるには、検出のほか、良好に分離された、適合性の高いデータを得るための、分析対象物に適した分離範囲を持つカラムやカラムセットが必要です。MAB カラムの設計は、タンパク質および mAb アプリケーションに適しています。mAb モノマー、関連物質、凝集体、およびフラグメントのモニタリングに必要な分離範囲全体をカバーする MAB カラムは、mAb の CQA を測定するための長期性能と高分解能も提供します。

図 1 はネイティブ抗体 (ウサギ血清の IgG) と抗体凝集体の溶出図、また、図 2 はネイティブ mAb と抗体フラグメントの溶出図を重ね表示したものです。どちらのデータセットも、MAB 3 μ m カラム 1 本を使ったアプリケーションの結果です。

モノクローナル抗体を分析するための 3 つの検出器信号すべてを図 3 に示します。光散乱信号は、モル質量の大きな凝集体の感度向上を示します。後者は定量に光散乱が使用されているということではなく、CQA のモニタリングと mAb 凝集プロセスの調査が簡略化されることを意味します。

以下の情報はマルチ検出セットアップのデータから得られます。

- モノマー、ダイマー、三量体の絶対モル質量と回転半径 (Rg) (MALLS 検出器)
- 相対メソッドによるフラグメントのモル質量 (キャリブレーション、RI/UV 検出器)
- 純度: 高次な凝集体、関連物質、モノマー、フラグメントの量 (RI/UV 検出器)

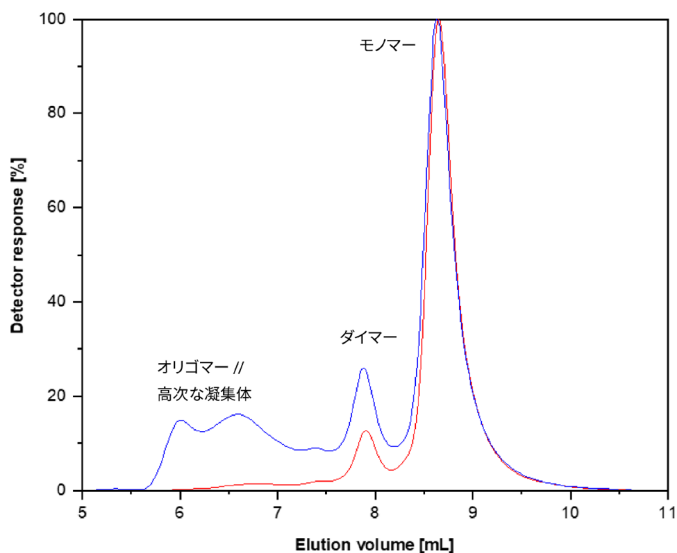


図 1. Agilent MAB 3 μ m カラムの分離範囲。赤色の曲線は、溶出量に対するネイティブ抗体とその関連物質の UV 信号をプロットしたものです。青色の曲線は凝集した抗体サンプルの溶出図です。

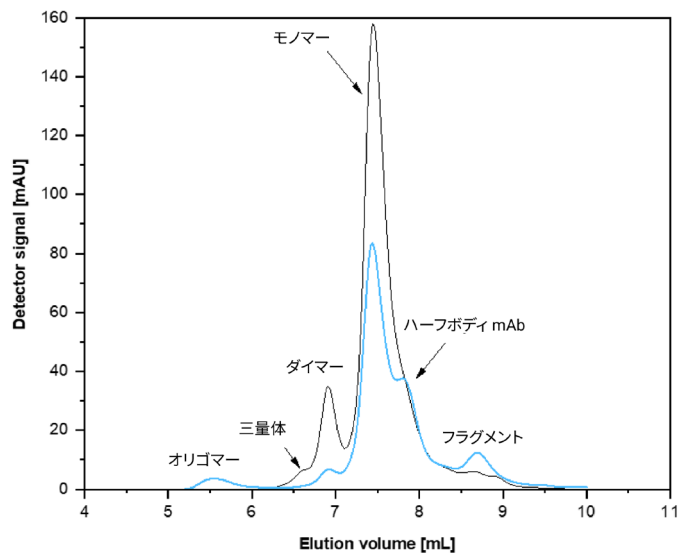


図 2. Agilent MAB 3 μ m カラムの分離範囲。黒色の曲線は、溶出量に対するネイティブ抗体とその関連物質の UV 信号をプロットしたものです。青色の曲線は還元により断片化された抗体サンプルの溶出図です。

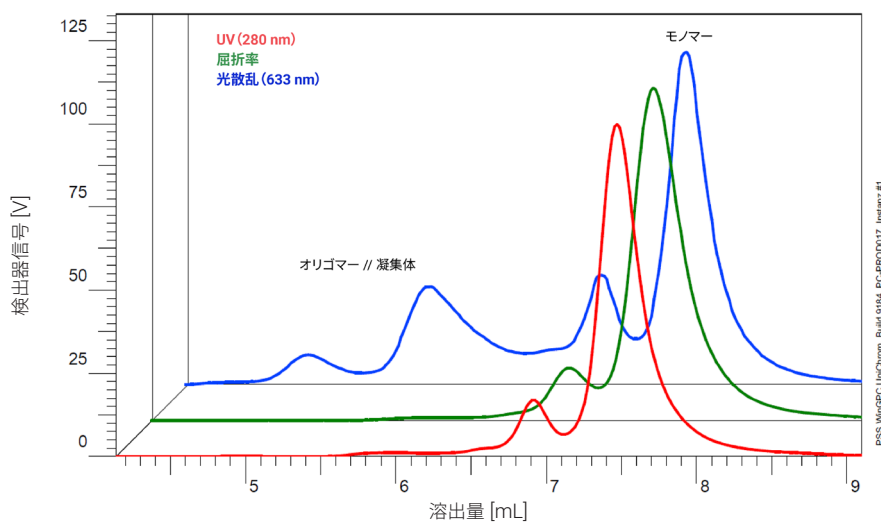


図 3. 抗体凝集体の高感度分析。抗体関連物質と高次の凝集体の光散乱信号は、モル質量に依存するため、モノマー信号と比べて比較的高く、高次の凝集体の検出感度を向上させます。

結論

MALLS 検出と組み合わせた GPC/SEC は、CQA の 1 つの側面である mAb の凝集を分析するための優れたツールとなります。このほか、前述のとおり測定をセットアップすれば、絶対モル質量や、回転半径 (Rg) などの寸法情報も測定可能です。また、Agilent MAB カラムは、光散乱検出器と接続するために、あらかじめ平衡化されています。分析中、ステンレスとの接触を回避するため、バイオイナートバージョンの GPC/SEC システム、MALLS 検出器、および MAB カラムも用意されています。

参考文献

1. Klein, C. Monoclonal Antibodies, MDPI books, **2018**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

RA44973.5708564815

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2020, 2023

Printed in Japan, March 2, 2023

5994-5721JAJP