

Altura サイズ排除 130 Å カラムによる幅広い pH 範囲での GLP-1 アナログの包括的な分析

著者

Daniel Meston,
Anne Blackwell, and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

グルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬 (GLP-1) は、化学的に関連のある不純物が多数含まれている新しいクラスの治療用ペプチドであり、分離がきわめて困難です。今後数年の間に、複数の GLP-1 に関する特許の存続期間が満了するため、バイオシミラーメーカーが医薬品の品質を確保できるようにサポートする、高性能の分離メソッドの存在が非常に重要になります。

帯電した表面へのペプチドの非特異的吸着は、大幅なピークテーリングを引き起こす可能性があります。シリカ担体では、表面に露出しているシラノール基が原因で、多くの場合、ピークテーリングが発生します。ステンレス製のコンポーネントを Agilent Altura ウルトライナートハードウェアに置き換えることにより、追加のメソッド開発なしに、GLP-1 の分離性能を大幅に向上させ、下流のワークフローにおける SEC の適用性を高めることができます。このアプリケーションノートでは、メソッド開発のワークフローをサポートするために、GLP-1 のクロマトグラフィー性能に対する pH および有機溶媒比率の影響に関する体系的な研究の概要について説明します。また、新しい Altura SEC 130 Å カラムへのアップグレードにより得られる、優れた分離性能についても調べています。

はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、タンパク質の凝集、構造の変化、重合など、生物製剤のサイズをモニタリングするための標準的なアプローチです。生体分子はカラム内を移動する際、分子が小さいほど粒子のポア内部に深く浸透するため、より長く保持されます。ただし、生体分子には、pKa 値の異なる多数の活性点が含まれているため、SEC では、帯電した表面との間で、大幅な非特異的相互作用が発生することがよくあります。これらの中で最も一般的なのは、露出したシラノール基やカラムハウジングの金属表面です。本研究では、シリカ表面への結合を最小限に抑えるために、Agilent AdvanceBio サイズ排除媒体を、化学的に不活性なポリマーでコーティングしました。さらに、Altura HPLC カラムは、金属結合を防止するウルトライナートテクノロジーを採用しており、従来のステンレス製カラムケーシングと比較して、ピークテーリングを最小限に抑えます。

ここでは、GLP-1 アナログの凝集およびピーク形状に対する pH および有機溶媒比率の影響に関する体系的な研究について報告します。これには、ステンレス製カラム内の同一の SEC 媒体と比較した際の、新しい Agilent Altura SEC 130 Å カラムの大きな利点などが含まれます。ステンレス製カラムと比較して、ほとんどの条件下におけるピークテーリングが、リラグルチドでは 60 % 超、エキセナチドでは 60 %、セマグルチドでは 30 % 低減しました。また、他社製イナートカラムと比較しても、場合によっては最大 75 % 低減しました。

実験方法

試薬および調製

超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで製造しました。すべての HPLC グレードの緩衝液塩、35 % アンモニウム溶液、および凍結乾燥状態のタンパク質は、Sigma-Aldrich から購入しました。セマグルチド (HY-114118CP) は、Medchem Express から購入しました。リラグルチド (SML3925-25MG) および酢酸エキセナチド (AT27767-25MG) は、Sigma-Aldrich から購入しました。

サンプル前処理

すべてのサンプルを、1x PBS pH 7.4 により、1 mg/mL に希釈しました。

移動相の調製

溶出液 C は、1 mL のトリフルオロ酢酸と 1.1 mL の 35 % v/v アンモニア溶液を混合して、水で 1 L まで希釈し、0.1 % トリフルオロ酢酸アンモニウム (pH 8.5) を調製しました。

使用機器

- Agilent Infinity III 1260 多波長検出器 (G7165A)
- Agilent Infinity III 1260 マルチカラムサーモスタット (G7116A)
- Agilent Infinity III 1260 Bio マルチサンブラ (G5668A)
- Agilent Infinity III 1260 バイオイナートポンプ (G5654A)

ソフトウェアおよびデータ処理

- Agilent OpenLab CDS Acquisition バージョン 2.8
- Agilent OpenLab CDS Analysis バージョン 2.8

メソッド条件

表 1. LC-UV 条件

パラメータ	値
カラム	- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、4.6 × 300 mm、2.7 µm (部品番号 PL1580-5350) - Agilent Altura SEC 130 Å、4.6 × 300 mm、2.7 µm、ウルトライナートテクノロジー仕様 (部品番号 PL1580-5350A) - Agilent Altura SEC 300 Å、4.6 × 300 mm、2.7 µm、ウルトライナートテクノロジー仕様 (部品番号 PL1580-5301A) - 他社製イナート SEC カラム、125 Å、4.6 × 300 mm、2.5 µm
移動相	溶離液 A : 1x PBS pH 7.4 溶出液 B : 25.65 酢酸 : 1 g/L アルギニン水溶液、pH 2 溶出液 C : 0.1 % アンモニウム TFA、pH 8.5 溶出液 D : ACN
流量	0.35 mL/min
A:B:C:D	表 2 を参照
カラム温度	25 °C
注入量	1 µL
合計分析時間	20 分
UV	220 nm
レスポンスタイム	10 Hz

表 2. pH/ACN 条件のメソッド条件

メソッド	溶出液 A %	溶離液 B %	溶出液 C %	溶出液 D %
1	90	0	0	10
2	80	0	0	20
3	50	0	0	50
4	0	90	0	10
5	0	80	0	20
6	0	50	0	50
7	0	0	90	10
8	0	0	80	20
9	0	0	50	50

結果と考察

Altura SEC 300 Å カラムによるスクリーニングにより、GLP 凝集が pH に大きく依存することを明確化

リラグルチド²、セマグルチド³、およびエキセナチド⁴（ただし、その程度は低い）などの GLP-1 アナログが、異なる pH 条件下で凝集する傾向があることは、多くの文献で報告されています。そこで、高次凝集体が完全に除外されてしまう可能性により、初期条件のスクリーニングが複雑化することを防止するために、新しい Altura SEC 300 Å カラムを使用しました。リラグルチドおよびセマグルチドのピーク形状を改善するには、有機溶媒を使用することがきわめて重要であることが明らかになりました。これは、リラグルチドおよびセマグルチドの Lys26 に、それぞれパルミチン酸またはステアリン二酸が結合しているためです。付加的な脂肪酸を持たないエキセナチドは、有機溶媒の影響を非常に受けにくくなります。リラグルチドでは、10 % ACN 条件でピークが後続の注入にまで持ち越されることが確認されるのに対して、セマグルチドでは、10 % できわめて幅広い

ピークを示しますが、悪影響はそれほど大きくありません。注目すべきは、低 ACN 比率で見られるこれらの幅広いピークが、pH に関係なく確認された点です。

pH の影響を調査したところ（図 2）、調査したすべての GLP-1 において、pH が 2 から 8.5 に増加すると溶出量が減少しました。これは、pH 6 ～ 9 の範囲において高次オリゴマーへの凝集が生じると示唆している、文献の内容と一致しています。リラグルチドとエキセナチドは同様の挙動を示しており、pH が 2 から 8.5 へと変化するとピーク幅は改善しましたが、セマグルチドは pH 2 および 7.4 において、それぞれピークフロンティングまたはピークテーリングが著しく増大しました。これは、ステアリン二酸のイオン化状態により引き起こされた可能性が高いと考えられます。

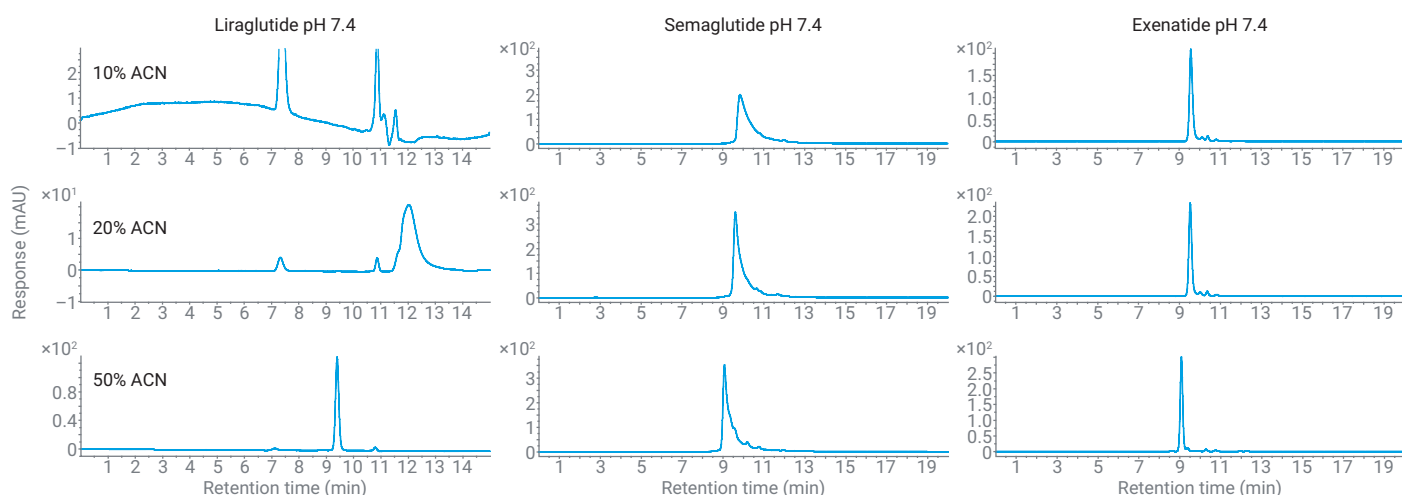


図 1. pH 7.4 における GLP-1 のピーク形状に対する ACN フラクションの影響

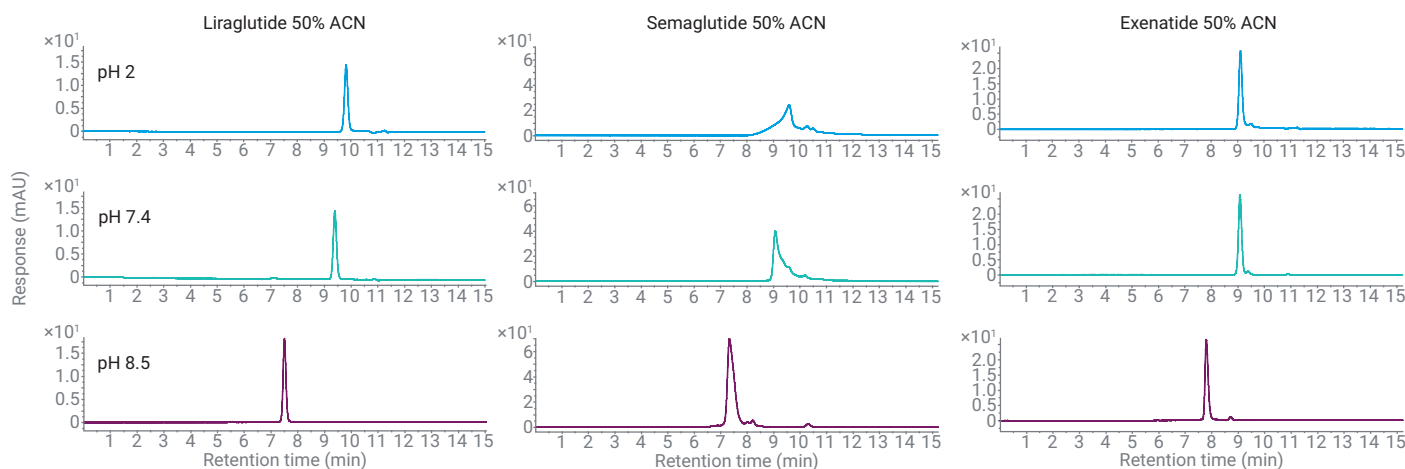


図 2. 50 % ACN 条件における GLP-1 のピーク形状および溶出量に対する pH の影響

GLP-1 のピーク形状および溶出量が条件変化に対して高い感受性を示すことを示しており、これは K26 側鎖の化学的性質に大きく関係していると考えられます。これは、この部位にさまざまな修飾が含まれている他の多くの GLP-1 において、最適なピーク形状を確保するために、メソッドのスクリーニングが必要になることを示唆しています。

Altura ウルトライナート SEC 130 Å カラムは、ステンレス製の同等のカラムや他社製イナートカラムと比較して、GLP-1 作動薬の優れた分離と回収を可能にします。

これまでのデータは、K26 側鎖の修飾が、GLP-1 アナログのクロマトグラフィ特性に対して大きな影響を与えることを示唆しています。ただし、金属結合による非特異的相互作用に対する Altura ウルトライナートハードウェアの低減効果を評価するために、同一ロットの SEC 充填剤を、ステンレス製ハードウェアと Altura ハードウェアにそれぞれ充填しました。

図 3 は、Altura ウルトライナートハードウェアが、試験したほとんどの条件下において、ピーク対称性を大幅に改善することを明確に示しています。興味深いことに、pH 7.4 では、pH 2 や pH 8.5 といったより極端な pH 条件と比較して、金属との相互作用が低減する傾向があります。その結果、ウルトライナートハードウェアを使用することにより、メソッド開発時に適用できる pH 条件の範囲が広がります。これは、すべて K26 に対して修飾が施されている次世代の GLP-1 アナログにおいて、特に大きな利点になると考えられます。

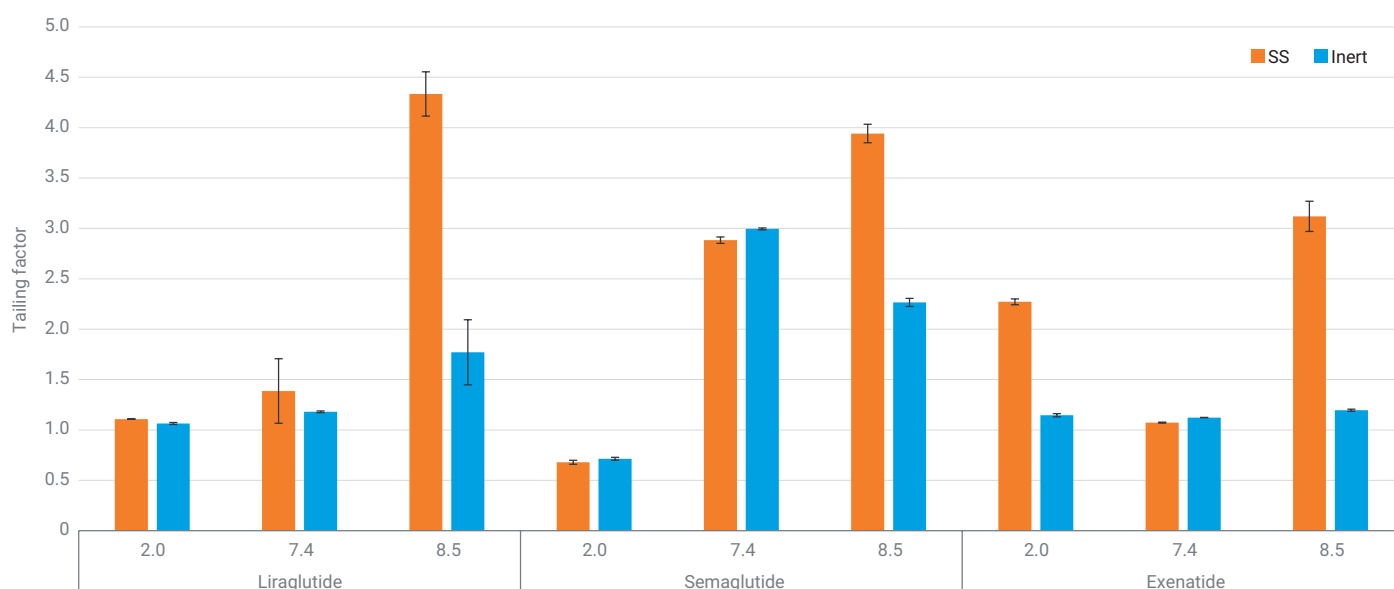


図 3. 50 % ACN における、異なる pH 条件下での GLP-1 アナログのピーク対称性に対する Agilent ウルトライナートハードウェアの影響

図 4 は、本研究で使用した 3 種類の GLP-1 アナログにおける、ピーク対称性の代表的な改善例を示しています。特に、高 pH の条件では、セマグルチドおよびリラグルチドにおいて、著しい非特異的吸着が生じましたが、エキセナチドでは、低 pH と高 pH のいずれの場合においても、ステンレスへの吸着が見られました。興味深いことに、セマグルチドの場合 (図 4B)、ピーク半値幅が同等であることからわかるように、カラム効率はほぼ変化しませんでした。テーリングによりフラグメント不純物に対する分離効率が低下し、凝集体ピークが消失しました。

これらの GLP-1 アナログの凝集挙動に対する pH の影響は、最適なクロマトグラフィーを実現するうえで極めて重要になります。特にセマグルチドは、ポアサイズの小さいカラムを用いて高 pH で分析した場合、多数の共溶成分を示すように見えます。興味深いことに、Altura SEC 300 Å カラムで分析すると、ピーク形状が大幅に改善され (図 5)、フラグメントの分離も非常に良好になります。これは、排除効果による予期しない影響が生じていないことを確認するため、pH と並行してカラムのポアサイズもスクリーニングする必要があることを示唆しています。

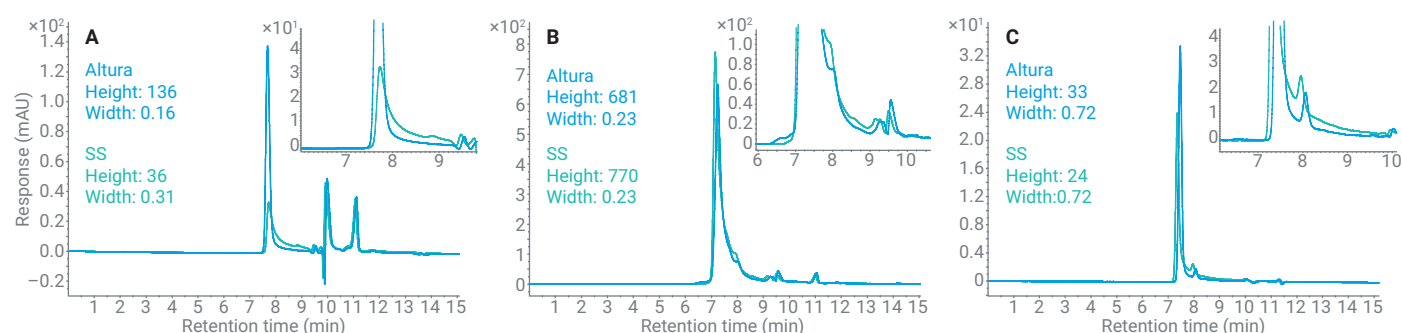


図 4. pH 8.5 (A, B) および pH 2 (C) と 50 % ACN 下でのリラグルチド (A)、セマグルチド (B)、エキセナチド (C) に対して、Agilent Altura SEC 130 Å カラム (青色のクロマトグラム) とステンレス製カラム (緑色のクロマトグラム) を用いた際の性能向上を示す代表的なクロマトグラム。ピーク幅は、FWHM で示されています。

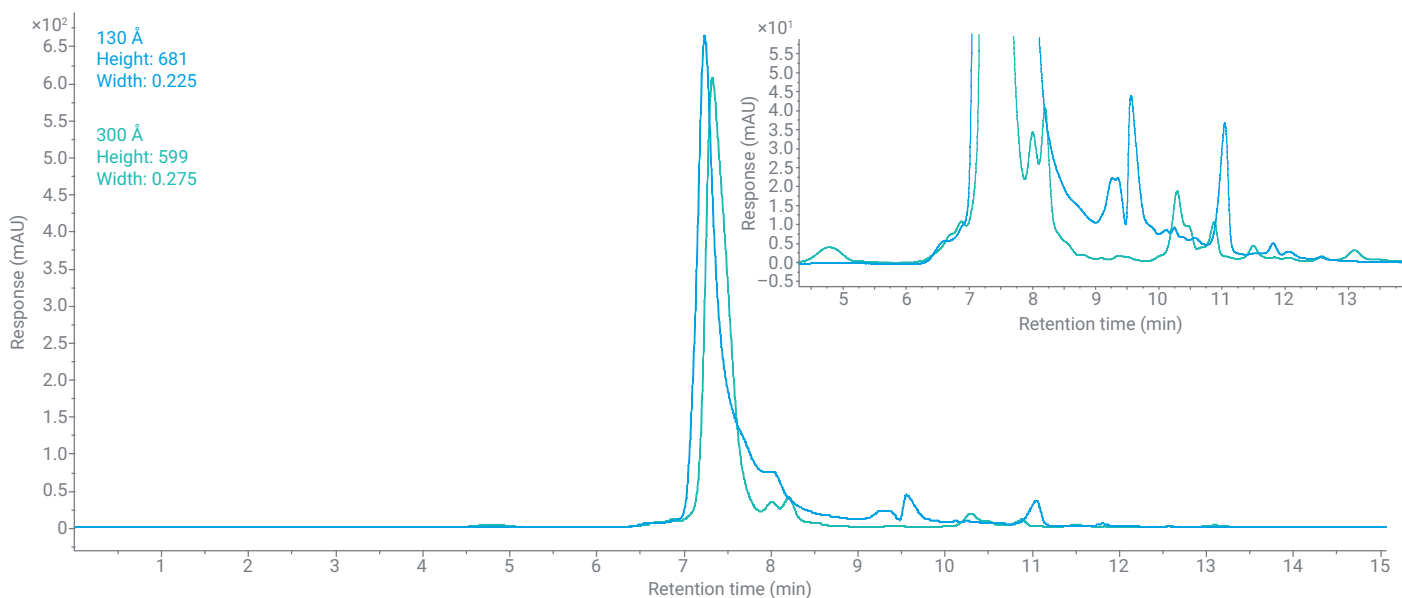


図 5. pH 8.5 と 50 % ACN において、130 Å および 300 Å の Agilent Altura SEC でセマグルチドを分析した際の、ピーク形状および分解能の違いを示す代表的なクロマトグラム。ピーク幅は、FWHM で示されています。

ウルトライナートカラムを他社製イナートカラムと比較したところ（図 6）、Altura SEC 130 Å は、pH の極端な範囲において再度大幅な性能向上を示しており、Altura ウルトライナートテクノロジーにより、適用できる条件の範囲が拡大したことをさらに実証しました。3 種類の GLP-1 アナログすべての代表的なクロマトグラム（図 7）を見てみると、他社製

カラムではピークテーリングを示しており、再現性が低いことが実証されました。エキセナチド（図 7C）の場合、Altura SEC で分析すると、メインピークのテール領域にあるフラグメントピークの分解能が向上しました（Rs 2.42 対 1.88）。

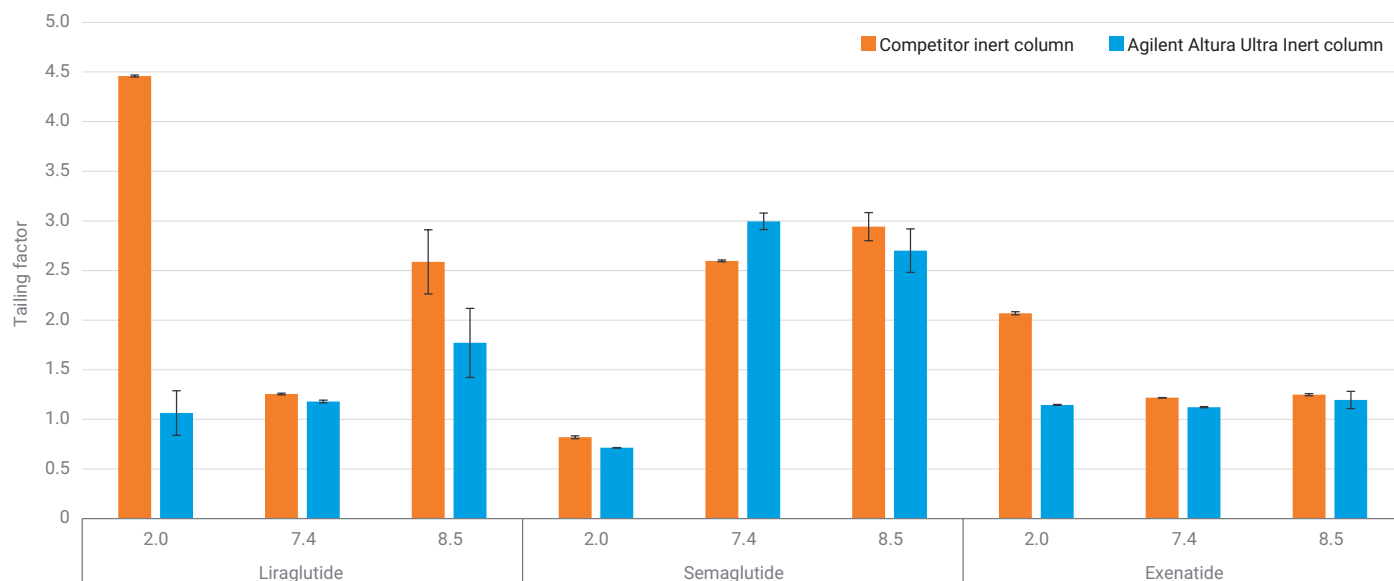


図 6. 他社製イナートカラムおよび Agilent Altura ウルトライナートカラムを用いた、50 % ACN における異なる pH 条件下での GLP-1 アナログのピーク対称性の比較

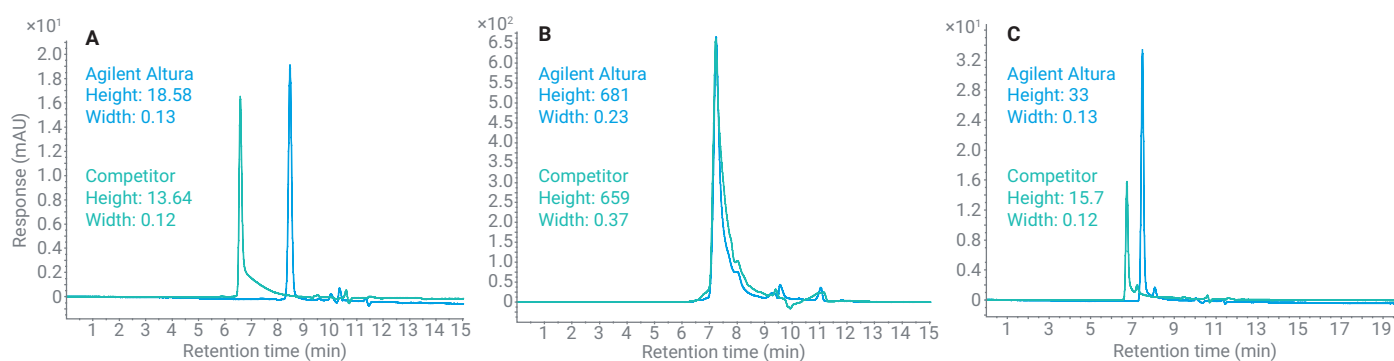


図 7. pH 2 (A, C) および pH 8.5 (B) と 50 % ACN 下でのリラグルトイド (A)、セマグルチド (B)、エキセナチド (C) に対して、Agilent Altura SEC 130 Å カラム（青色のクロマトグラム）と他社製イナートカラム（緑色のクロマトグラム）を用いた際の性能向上を示す代表的なクロマトグラム。ピーク幅は、FWHM で示されています。

結論

GLP-1 アナログは、従来の分析条件下で凝集する傾向があるため、分析上の大きな課題となっています。さらに、ペプチドの半減期を延長するために K26 にさまざまなスパーサや脂肪酸鎖を結合させることで、疎水性が大幅に増大し、結果としてピークテーリングが生じます。Agilent Altura SEC 130 Å および SEC 300 Å は、幅広い範囲の pH 値において優れたピーク対称性を示しており、ステンレス製カラムや他社製イナートカラムと比較して、メソッド設計の自由度が向上すると同時に、最適な分離性能を得るための pH 値のスクリーニングをより効果的に実施することができます。

参考文献

1. Giannetti, M.; et al. A Spectroscopic and Molecular Dynamics Study on the Aggregation Properties of a Lipopeptide Analogue of Liraglutide, a Therapeutic Peptide Against Diabetes Type 2, *Molecules* **2023**, 28(22), 7536. doi:10.3390/molecules28227536.
2. Castelletto, V.; et al. Fibrillar and Micellar Aggregation of Semaglutide and Formation of a Chiral-Imprinted Glass, *Biomacromolecules* **2026**, 27(4), 2818–2827. doi:10.1021/acs.biomac.5c02669.
3. Benet, A.; et al. The Effects of pH and Excipients on Exenatide Stability in Solution, *Pharmaceutics* **2021**, 13(8), 1263. doi:10.3390/pharmaceutics13081263.

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。

DE-015799

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2026
Printed in Japan, June 24, 2026
5994-9315JAJP