

電荷が異なるモノクローナル抗体の HPLC 分離 : Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムを用いた Agilent Bio MAb NP10 カラムと 他社カラムの比較

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Phu T Duong、Faizy Ahmed、
Taegen Clary
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA
Agilent Technologies, Santa Clara,
California
USA

概要

モノクローナル抗体 (mAb) 医薬品には、製造中の修飾により多様性が生じることが明らかになっています。多様性には、グリコシル化、脱アミド、酸化、不完全な C 末端処理、その他の翻訳後修飾などがあります。抗体医薬品に生じうるこうした多様性をモニタリングすることは、医薬品の安全性と治療効果を確保するうえで重要です。こうした安定性データは、FDA や EMA といった規制当局の要求項目です。ここで紹介するデータは、弱カチオン交換カラムを用いて、チャイニーズハムスター細胞 (CHO) 由来 mAb の製造中に生じる電荷が異なる抗体を分離したものです。Agilent Bio MAb NP10 (WCX、非多孔質、粒子径 10 μm) および他社製の 10 μm 粒子径 WCX カラムの分離性能を比較しました。Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を使用し分析を行いました。メソッドは緩衝液 pH、塩濃度、グラジエント、流速、分析時間を両方のカラムについて最適化しました。このアプリケーションにおける 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC の感度向上についても紹介します。



Agilent Technologies

はじめに

製造、精製、調剤、保管におけるモノクローナル抗体 (mAb) の純度と安定性のモニタリングには、高感度の分析テクニックが求められます。mAb と不純物の HPLC 分離には、イオン交換クロマトグラフィなどのさまざまな分析手法を用いることができます。ここで紹介するデータは、分析用の弱カチオン交換 (WCX) を用いて、チャイニーズハムスター細胞 (CHO) 由来 mAb の電荷が異なる抗体 (酸性および塩基性) を分離したものです。Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を用いて、Agilent Bio MAb NP10 (WCX、非多孔質、粒子径 10 µm) HPLC カラムおよび他社製の 10 µm 粒子径 WCX カラムでメソッドを開発しました。Agilent Bio MAb カラムに充てんされている非多孔質ポリスチレン-ジビニルベンゼン (PS-DVB) 粒子は、非特異的な吸着を抑制する親水性被膜に密度の高い WCX 層が結合しています。他社製のカラムには、親水性層および WCX 官能基でコーティングされた非多孔質 PS-DVB 粒子が使用されています。どちらのカラムも粒子径は 10 µm ですが、親水性被膜と WCX 官能基の密度が異なります。シグナル感度を Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC と Agilent 1100 LC を比較した結果も示しています。感度が向上した 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC により、低濃度の抗体の検出能力が高くなり、このアプリケーションにおける全体的な感度も向上します。

実験手法

HPLC システム

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、最大圧力 600 bar にまで対応しています。サンプルフローパスには、金属部品が使われていません。そのため、mAb サンプルが金属表面と接触することがなく、非特異的な吸着をできる限り抑えることができます。溶媒送液にもステンレススチール部品が使われていないため、腐食に起因する鉄の放出を抑えることができます。LC システムは、以下のモジュールで構成されています。

G5611A	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプ
G5667A	Agilent 1260 Infinity バイオイナート高性能オートサンブラ
G1330B	Agilent 1200 シリーズサーモスタット
G1316C #19	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を搭載
G4212A #33	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
ソフトウェア	ChemStation B.04.02

試料と試薬

CHO 細胞由来のヒト化モノクローナル抗体 – Creative Biolab (ペンシルヴェニア州ペンシルヴェニア)

塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムおよびリン酸水素二ナトリウム – Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス)

HPLC カラム

Agilent Bio MAb NP10、4.6 mm x 250 mm、PEEK (非多孔質、粒子径 10 µm)

他社製 WCX、粒子径 10 µm、4 mm x 250 mm、PEEK

LC メソッド

注入量:	5 µL (1 mg/mL アフィニティ精製モノクローナル抗体)
移動相 A:	0.025 M、0.05 M のリン酸二水素ナトリウムおよびリン酸水素二ナトリウム、pH 5.5、6.0、6.5、7.0
移動相 B:	移動相 A に 0.4 M 塩化ナトリウムを添加
流速:	0.8 mL/min、室温
検出:	214 nm、220 nm、280 nm で検出
参照:	360 nm

結果

緩衝液 pH 選択性 – モノクローナル抗体の分離

緩衝液の最適化は、カチオン交換クロマトグラフィによる mAb 分析における重要なステップです。カラムの mAb 吸着および溶出能力を最大化するためには、緩衝液 pH を慎重に最適化する必要があります。一般には、リン酸ナトリウムと塩化ナトリウムを使用します。最初に同じ緩衝液条件でカラムを使用すれば、性能の理解や比較が容易になります。その後、各カラムについて、最適な分離条件を得られるようにメソッドを変更しました。mAb の pI は未知ですが、5~7 と推定されるため、pH 5.5、6.0、6.5 の緩衝液を使用しました。リン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウムを混合し、適切な pH で濃度 0.025 M および 0.05 M の緩衝液を作成し、移動相 A としました。移動相 B は、移動相 A に 0.4 M NaCl を添加しました。mAb 5 µg (5 µL) をカラムに注入し、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を用いて、波長 214、220、280 nm で分析しました。はじめの分析時間は 60 分で、流速は 0.8 mL/min としました。室温で 0~60 分において移動相 B を 0%~100% とする直線グラジエントを使用しました。図 1 は、どちらのカラムにおいても、緩衝液 pH が小さくなるとピーク保持時間が長くなることを示しています (図 1 のパネル A~C の比較)。mAb メインピークの保持時間は、pH 5.5 では 15 分ですが、pH 6.0 (9.7 分) および 6.5 (8.1 分) では、

主要 mAb ピークの溶出が早くなっています。この緩衝液スカウティングにより、これらのカラムでは、pH 5.5 の緩衝液において吸着能力が最高でした。pH 6.0 および pH 6.5 では、ピーク分解能は良好のようには見えますが、多くの物質がカラムに吸着されず、サンプルがフロースルーとして溶出し、ボイドボリュームに近づきすぎています (図 1、パネル A および B)。pH 5.5 では、カラム

のサンプル保持時間が長くなりますが、ピーク分解能はどちらのカラムでも低下しています。pH 5.5 では、保持時間が最適化されます。この初期のメソッド最適化をもとに比較すると、3つの緩衝液条件すべてにおいて、Agilent Bio MAb カラムで他社製 WCX カラムよりも優れた分離とピーク分解能が得られました。

パネル A – pH 6.5

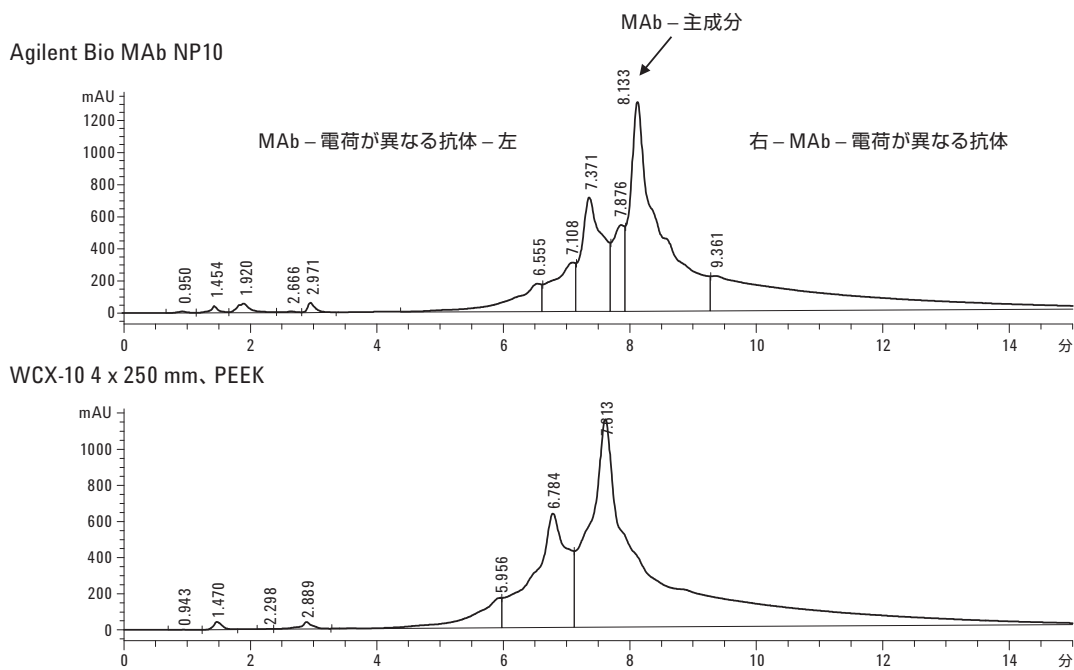
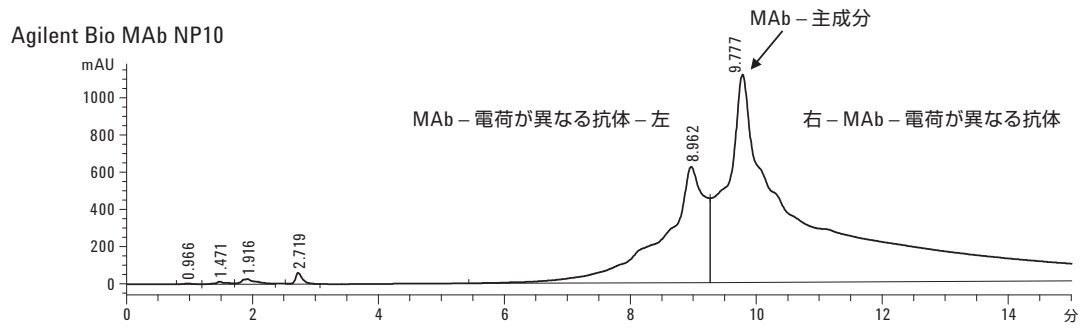
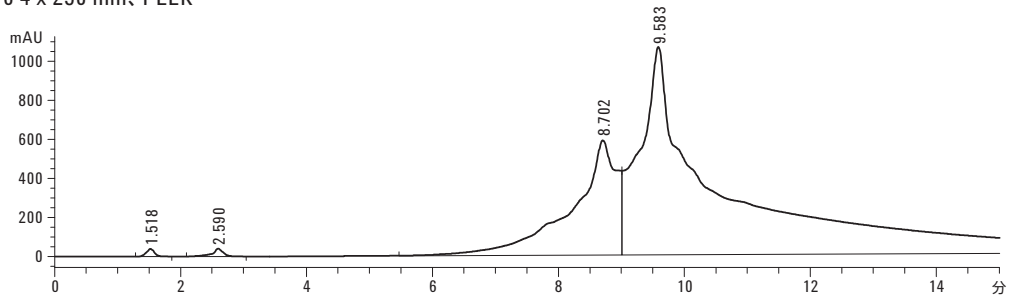


図 1. 緩衝液 pH の選択性 – Agilent Bio MAb NP10 および WCX-10 4 x 250 mm、PEEK カラムを用いた mAb 分離 (続く)

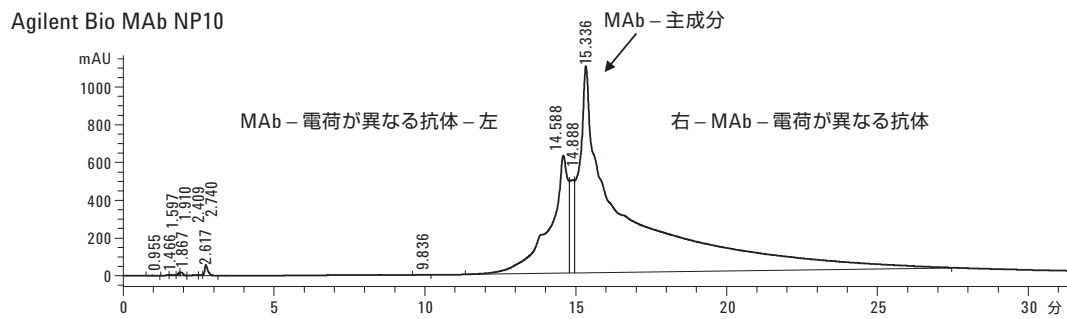
パネル B – pH 6



WCX-10 4 x 250 mm, PEEK



パネル C – pH 5.5



WCX-10 4 x 250 mm, PEEK

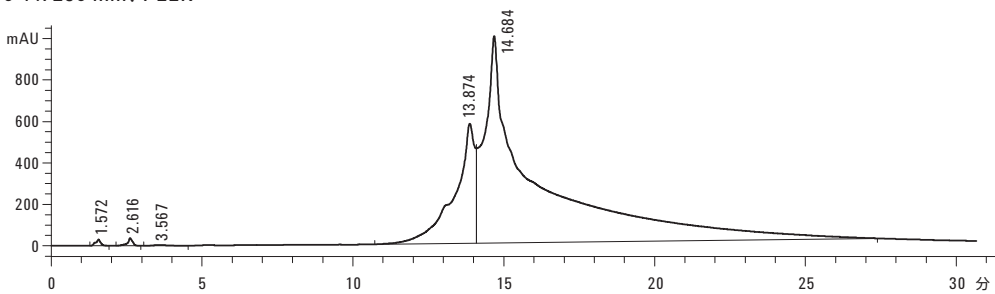


図 1. 緩衝液 pH の選択性 – Agilent Bio MAb NP10 および WCX-10 4 x 250 mm, PEEK カラムを用いた mAb 分離

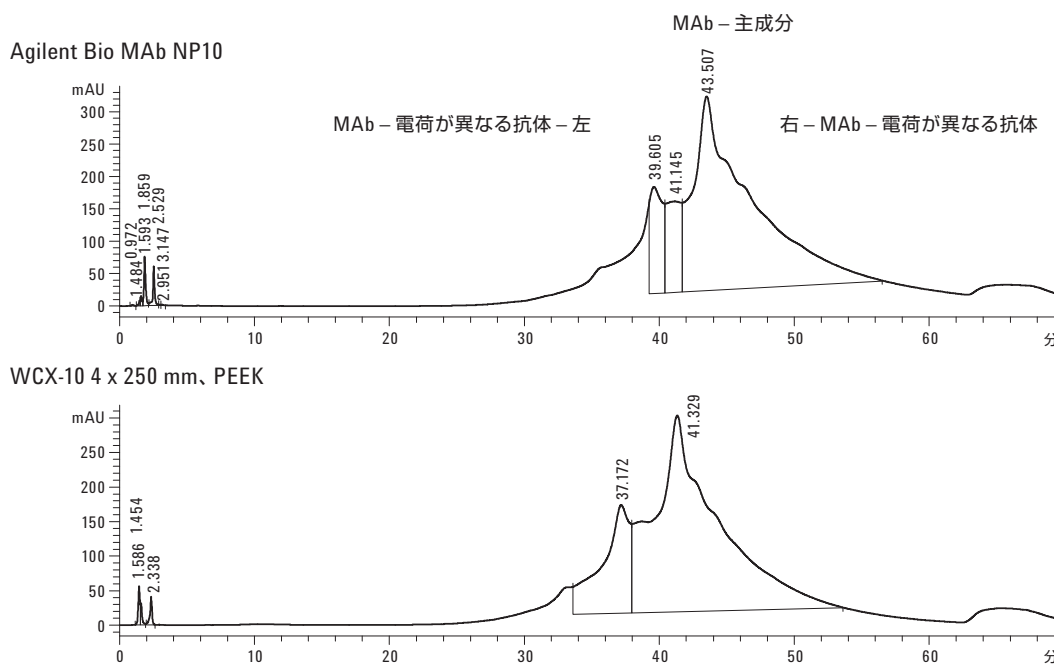
グラジエントの最適化 –

分析時間 60 分のモノクローナル抗体分離

両方のカラムにおいて、60 分で移動相 B を 10~35 % および 15~35 % とする条件で分析を行いました。どちらのグラジエントでも、pH 5.5 の 0.025 M および 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液を使用しました。緩衝液条件は pH 5.5 に維持しました（詳細なメソッドは図 2 の脚注を参照）。図 2 のパネル A は、0.025 M リン酸ナトリウム緩衝液を用いた 10%~35% B の直線グラジエントで得られた結果を示しています。どちらのカラムでも、ほぼ同じデータが得られています。メインの mAb ピークは、電荷が異なる抗体（酸性および塩基性）から良好に分離されています。Agilent Bio MAb NP10 カラムのほうが、わずかに保持時間が長く

なるため、ピークの変離とキャパシティが向上しています。15%~35% B の直線グラジエントでも、10%~35% B の直線グラジエントと同様の結果が得られました。ただし、15%~35% B では、電荷が異なる抗体（酸性および塩基性）両方について、カラムの分解能が向上しています（図 2 パネル A とパネル B の比較）。わずかに高い塩濃度から開始すると、グラジエントの勾配が緩くなり、一部の電荷が異なる抗体ピークの変離が向上します。2 つのカラムを比較すると、どちらのグラジエントでも、Agilent Bio MAb NP10 カラムのほうが他社製 WCX カラムよりもピーク分解能が大幅に高くなるのがわかります。また、Agilent Bio MAb NP10 カラムでは、mAb メインピークのテーリングが小さくなるため、塩基性の電荷が異なる抗体の変離が向上します。

パネル A : 直線グラジエント 10%~35% B



パネル B : 直線グラジエント 15%~35% B

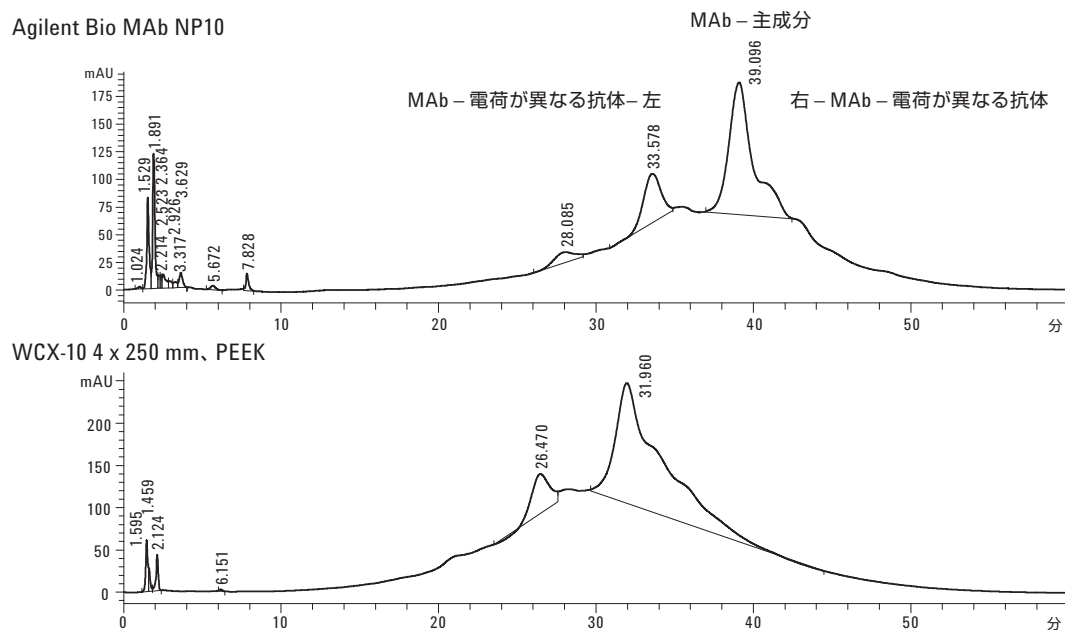


図 2. 直線グラジエントの最適化。パネル A : 10%~35% B。パネル B : 15%~35% B。0~60 分で 15%~35% B。60.1~70 分で 100% B。
5 µg mAb/run、0.8 mL/min、室温、波長 220 nm で検出

グラジエントの最適化 – 分析時間 30 分のモノクローナル抗体分析

一般に、イオン交換メソッドでは、長いサイクル時間と平衡化時間が必要となります。分析時間を短縮すると、分解能が低下することがあるため、こうしたメソッドの高速化は困難です。前述の 60 分のメソッドを 30 分に短縮しました。各カラムについてメソッドを再び最適化しました。他社製 WCX カラムについては 5~30% B、Bio MAb NP10 カラムについては 15%~30% B の直線グラジエントを行いました (詳細なメソッドは図 3 脚注を参照)。このメソッド最適化の目的は、分離プロファイルと分解能を維持することです。図 3 は、分析時間を 30 分に最適化したグラジエントのクロマトグラムを示しています。分析時間 60 分のクロマトグラムとほぼ同じであることがわかります。同

じピークが観察され、分解能も良好に保たれています。Bio MAb カラムでは、塩基性化合物の分解能がわずかに低下していますが、これらのピークにおける分解能の低下は、他社製 WCX カラムでより顕著となっています。これらのメソッドの大きな違いは、ピーク保持時間です。30 分メソッドでは、ピークの溶出が早くなります (図 2 と図 3 の比較)。2 つのカラムについて、異なるグラジエントを選択しましたが、他社製 WCX カラムでは、より勾配の緩いグラジエントが必要でした。ピーク保持時間は、急勾配のグラジエントを用いた Agilent Bio MAb NP10 カラムよりも長くなりました。この比較では、ランタイム 30 分での mAb 分離において、Agilent Bio MAb NP10 カラムのほうが優れた分解能が得られることが示されています。Agilent Bio MAb NP10 カラムは、ベースラインもより安定しています (図 3)。

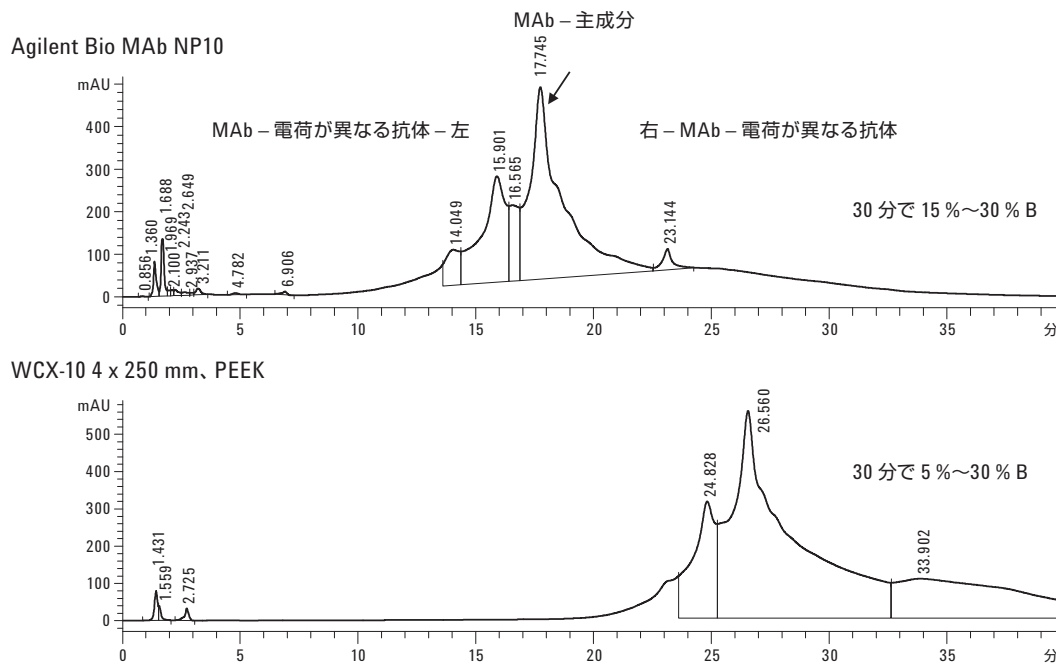


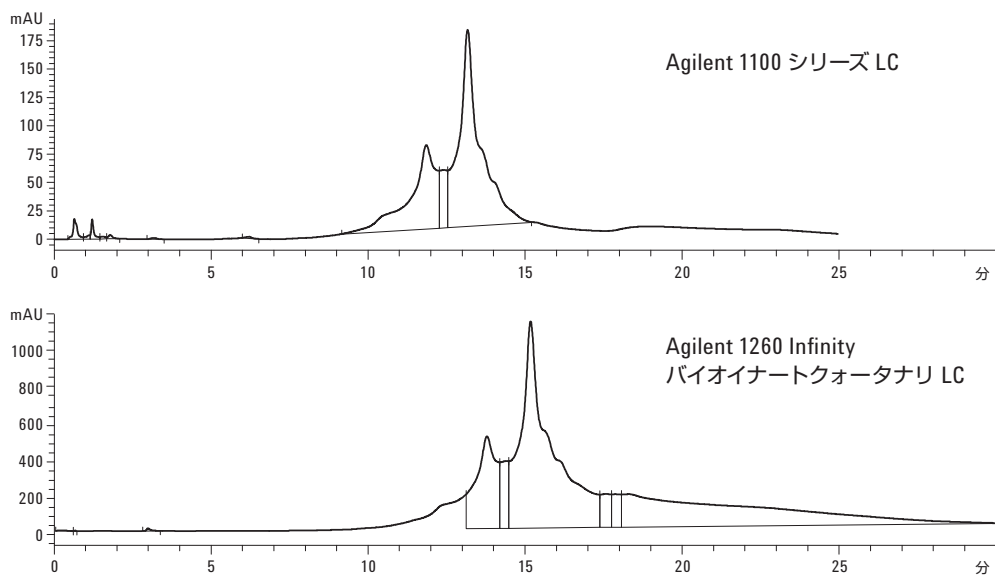
図 3. 分析時間 30 分のモノクローナル抗体分離。0~30 分で 5%~30% B および 15%~30% B のグラジエント。30.1~40 分で 100% B。
5 µg mAb/run、0.8mL/min、室温、波長 220 nm で検出

Agilent 1100 シリーズ LC と Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC の比較

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC では、高感度 DAD が使われています。また、このシステムは、生体試料が金属表面と接触しないように設計されています。少量の注入量と最高の感度で、モノクローナル抗体などの生体物質を分離できます。この新しい LC システムの優れた性能を、汎用システムの Agilent 1100 シリーズ LC と比較しました。いずれの LC システムでも、Agilent Bio MAb NP10 カラムを用いて、前述した実験と同様に mAb を分離しました (図 2、パネル B)。同じメソッド、注入量、サンプル濃度を使用しました。Agilent 1260 Infinity バイ

オイナートクォータナリ LC のクロマトグラムでは、Agilent 1100 シリーズ LC に比べて全体的に感度が高くなり (図 4、パネル B)、mAb 分解能が大きく向上しています (図 4、パネル A)。同じサンプル濃度と注入量の場合、Agilent 1100 シリーズ LC のシグナルはわずか 175 mAU ですが、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC のシグナルは 1000 mAU を上回っています。また、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC では、塩基性ピーク (メイン mAb ピークの右側) の分離も向上しています。これらの結果は、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC が生体試料の分離に非常に適していることを示しています。

パネル A : Agilent Bio MAb NP10 4.6 mm x 250 mm カラムを用いた 2 つの LC システムの異なるスケールでの比較



パネル B : Agilent Bio MAb NP10 4.6 mm x 250 mm カラムを用いた 2 つの LC システムの同じスケールでの比較

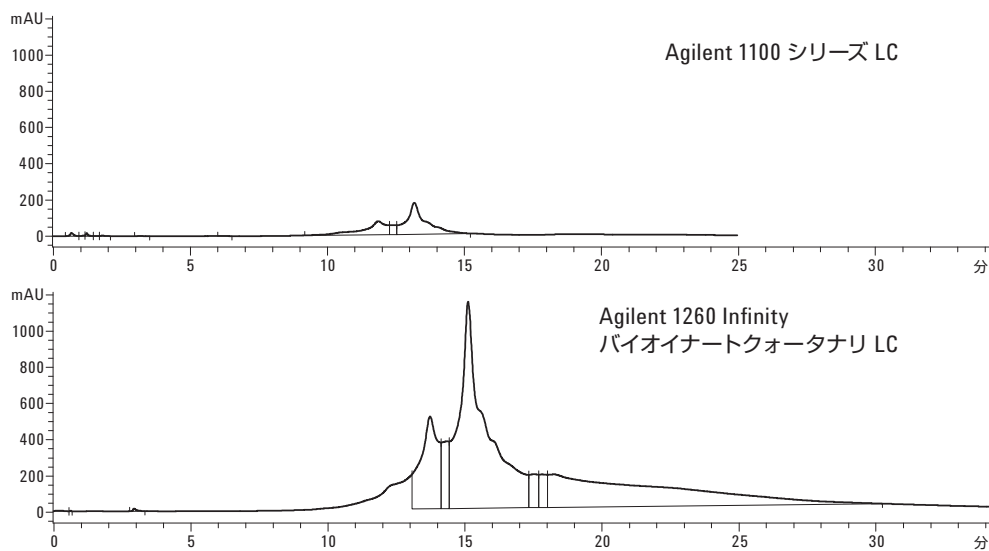


図 4. 同じ分離メソッドを用いた同じスケールおよび異なるスケールにおける Agilent 1100 シリーズ LC と Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC の比較

結論

モノクローナル抗体医薬品の市場が拡大するにつれて、その安定性や純度をモニタリングする高分解能の手法の重要性は、今後とも高まることが予想されます。分解能の高い安定したメソッドを実現するためには、最高のカラムと適切なメソッド条件の選択が欠かせません。ここで紹介するデータは、Agilent Bio MAb NP 10 カラムが mAb と電荷が異なる抗体の分離にきわめて適していることを示しています。このカラムは、幅広い緩衝液 pH (5.5~6.5) や塩濃度 (0.025 M および 0.05 M、0.05 M のデータは示さず) に対応します。Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC の優れた性能、高感度 DAD、耐圧 600 bar の組み合わせにより、この研究で用いた mAb の電荷が異なる抗体を Bio MAb カラムで分離することが可能になります。この高感度機器と Bio MAb カラムを組み合わせれば、治療用モノクローナル抗体の純度と安定性をモニタリングするためのイオン交換メソッドの開発に対応する、優れたソリューションが実現します。

詳細情報

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。

www.agilent.com/chem/jp

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。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2010

Printed in Japan

November 23, 2010

5990-6844.JAJP



Agilent Technologies