高分解能 SEC によるリツキシマブの凝集体およびフラグメントの分離と定量

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムと AdvanceBio SEC 300Å、2.7 µm カラム

アプリケーションノート

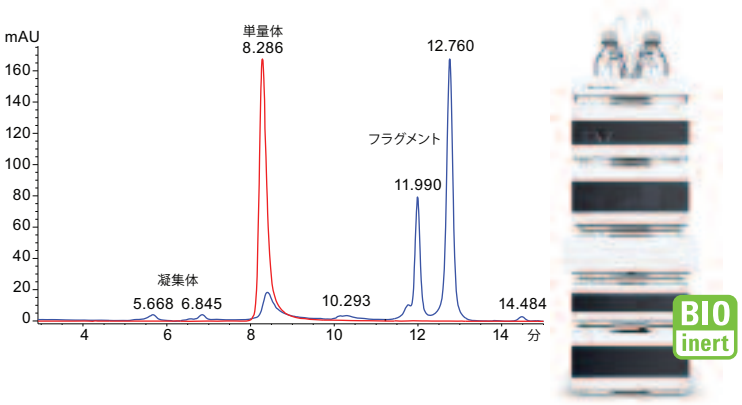
生物製剤・バイオシミラー

著者

M.Sundaram Palaniswamy
Agilent Technologies Pvt Ltd
Bangalore, India

概要

モノクローナル抗体 (mAb) の凝集は、医薬品自体の安定性や環境的な要因など、複数のメカニズムにより引き起こされます。モノクローナル抗体にもとづく治療薬の凝集およびフラグメントレベルの測定と定量には、標準メソッドとしてサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) が使用されています。このアプリケーションノートでは、リツキシマブバイオシミラーおよび先発薬のインタクト mAb と、強制的にストレスを加えることで生成された mAb 凝集体およびフラグメントの高分解能分離および定量について取り上げます。分離および定量には、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC と Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用しました。カラムのキャリブレーションには、分子量マーカーを使用しました。AdvanceBio SEC カラムは、凝集体/分解物のモニタリングにおいて、優れた感度と高分解能の分離能力を発揮しました。今回の実験を通じ、このカラムが、高分解能と高感度が求められるアプリケーションに最適であることが実証されました。



Agilent Technologies

はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、治療用 mAb に含まれる単量体や低分子量 (LMW) および高分子量 (HMW) 変異体の分離メソッドとして広く受け入れられています。未変性条件下での SEC 分析では、分子サイズによって充填剤ポアへの拡散が異なる性質を利用して単量体とその変異体を分離します。mAb にもとづく医薬品の開発を成功させるには、さらに物理的および化学的な分解経路で強制的に分解を促し、それによって起こる凝集や分解についての評価も必要になります。生物製剤の開発において分子サイズが問題となるのは、凝集体が免疫原性の増加に関与し、治療薬の安全性や効能に影響を与えるからです。そのため、こういった変異体を分離およびモニタリングできる SEC メソッドを確立することが重要な課題となっています。このアプリケーションノートでは、SEC 分析に画期的な技術をもたらす Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いた SEC メソッドの利点を紹介します。このカラムは、独自の 2.7 µm シリカ粒子と結合相を採用することで、mAb とその質量変異体を高分解能分離します。また、今回評価したメソッドでは、優れたリテンションタイムと面積精度が実現されました。これは、実験に用いたカラムとバイオイナート LC システムが mAb の分析に適していることを実証するものです。

分析方法

機器

分析には、以下のモジュールで構成される、完全なイナート仕様の Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを最大圧力 600 bar で使用しました。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプ (G5611A)
- 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 (TCC)、バイオイナートクリックイン加熱エレメントを搭載 (G1316C、オプション 19)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL (G1315D、バイオイナート標準フローセル (光路長 10 mm) を搭載)

ソフトウェア

Agilent ChemStation Rev. B.04.03 (またはそれ以上)

分析条件

カラム:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm (p/n PL1180-5301)
移動相:	リン酸緩衝食塩水 (PBS): 150 mM の塩化ナトリウムを含む 50 mM のリン酸ナトリウム溶液、pH 7.4
TCC 温度:	室温
注入量:	10 µL
流量:	0.8 mL/min
検出波長:	UV、220 および 280 nm

試薬とサンプル

リツキシマブの先発薬とバイオシミラー、セツキシマブ、トラスツズマブ、および ADC (抗体薬物複合体) は、地域の薬局で購入し、製造元の指示に従って保管しました。PBS、塩酸、および水酸化ナトリウムは、Sigma-Aldrich 社から購入しました。化学薬品および溶媒はすべて HPLC グレードです。超純水は、Milli-Q 純水生成装置 (Millipore Elix 10 モデル、米国) で生成しました。

AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーション

AdvanceBio SEC カラムのキャリブレーションは、複数の標準物質 (タンパク質凝集体、チログロブリン (670 kDa)、g-グロブリン (158 kDa)、オブアルブミン (44 kDa)、ミオグロビン (17 kDa)、およびビタミン B12 (1.35 kDa)) の溶出容積を測定することにより行いました。標準物質の分子量値の対数を溶出容積に対してプロットし、このプロットをもとにサンプルの相当分子量を判断しました。

手順

移動相 (10 µL) をブランクとして注入した後、インタクト mAb およびストレスを加えた mAb を 6 回繰り返して注入し、面積とリテンションタイム (RT) の偏差を計算しました。

リツキシマブの凝集体の調製

mAb の凝集体は、最終濃度が 2 mg/mL になるようモノクローナル抗体を移動相で希釈して調製しました。また、文献 [1] に記載の手順をわずかに変更して pH ストレス試験を実施しました。この手順を簡単に説明すると次のとおりです。まず、サンプル溶液の pH が 6.0 から 1.0 に変化するまで、1 M の HCl を 1 滴ずつゆっくり加えました。次に、1 M の NaOH を加えて pH を 10.0 に調整しました。最後に、再び 1 M の HCl を加えて pH を 6.0 に戻しました。pH 調整から次の pH 調整まで 1 分間待ち、その間常に 500 rpm で撹拌しました。この溶液を 60 °C で 60 分間放置しました。

結果と考察

分離と検出

既知分子量の一連の標準タンパク質を使用して、AdvanceBio SEC 300Å カラムのキャリブレーションを行いました (図 1)。タンパク質マーカーに含まれる標準タンパク質凝集体のピーク (ボイドピーク) から、ボイドボリュームを求めました。これは、カラムから 5.748 分に溶出したピークにあたり、その溶出容積は V_0 = 4.59 (mL) です。カラムで分離したタンパク質の検量線は直線関係を示しています。この検量線により、分析したタンパク質範囲 (1.3～670 kDa) の排除限界 (670 k Da) が定義されます (図 2)。未知タンパク質の分子量は、このプロットをもとにその溶出容積から判断することができます。

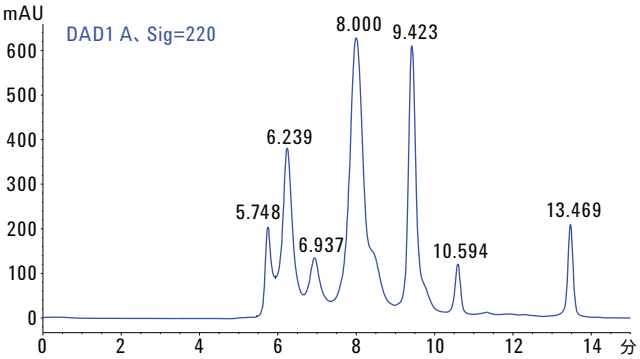


図 1. Agilent AdvanceBio SEC、300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによるタンパク質標準物質の分離

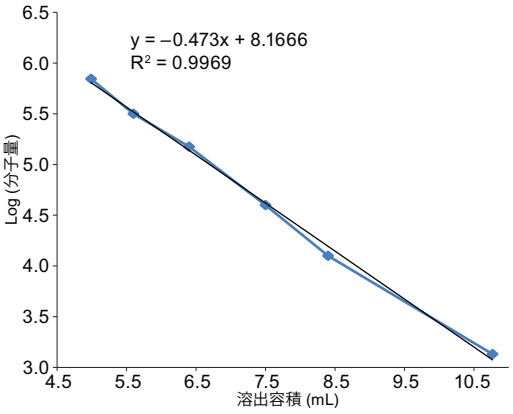


図 2. Agilent AdvanceBio SEC-3、300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによる標準物質の検量線

図 3 から、AdvanceBio SEC 300Å により、インタクト mAb が 8 分後に良好に分離しているのがわかります。その前後に凝集体や分解物を示す溶出ピークがないことから、市販の mAb 調製物が均質な状態にあったと考えられます。

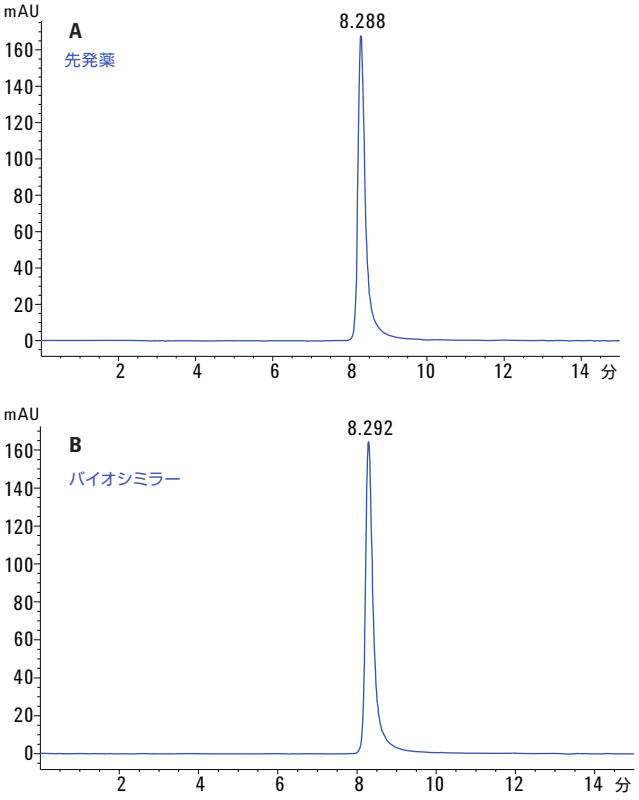


図 3. Agilent AdvanceBio SEC、300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによるリツキシマブのインタクト mAb の SEC プロファイル:
(A) リツキシマブ先発薬、(B) リツキシマブバイオシミラー

図 4 は、リツキシマブバイオシミラーおよび先発薬のクロマトグラムを重ね合わせたものです。非特異的な相互作用のないシャープな対称ピークが現れています。表 1 は、インタクト mAb を 6 回繰り返し注入することにより得られたリテンションタイムおよびピーク面積の平均値と RSD (相対標準偏差) です。リテンションタイムの RSD は 0.04 % 以下、ピーク面積の RSD は 1 % 以下です。これは、このメソッドの優れた再現性、すなわちシステムの優れた精度を示します。バイオシミラーと先発薬の RT は同等でした。また、ピーク面積率から求めた純度は、先発薬およびバイオシミラーのどちらについても 99 % を上回っていました。これは、両者の類似性が非常に高いことを示しています。

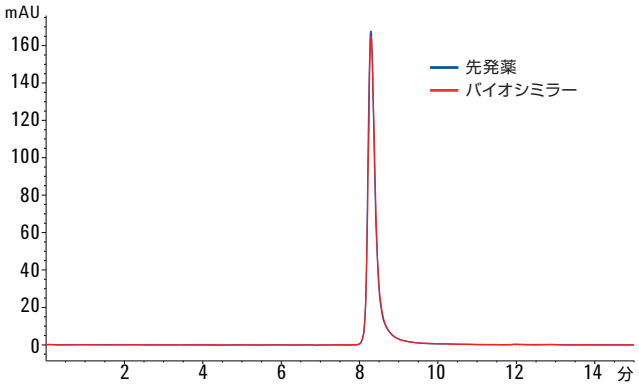


図 4. Agilent AdvanceBio SEC、300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムによるリツキシマブ先発薬およびバイオシミラーのクロマトグラムの重ね合わせ表示

表 1. リツキシマブのリテンションタイムとピーク面積の精度 (n=6)

	リテンションタイム		ピーク面積	
サンプル	平均 (分)	RSD	平均 (mAU/分)	RSD
リツキシマブ先発薬	8.28	0.04	99.33	1.21
リツキシマブ バイオシミラー	8.29	0	100	0

凝集体/分解物の分析と定量

凝集体と分解物をモニタリングするために、SEC を使用して、バイオシミラーおよび先発薬のインタクト mAb とストレスを加えた mAb を比較しました。このクロマトグラフィー分析では、単量体より先に溶出したピークを凝集体、後に溶出したピークを分解物と見なしました [2]。

図 5 に、pH/熱ストレスを加えたリツキシマブ先発薬およびバイオシミラーの SEC プロファイルを示します。このプロファイルから、AdvanceBio SEC カラムにより、インタクト mAb と同じ分析メソッドで、mAb の凝集体と分解物が分離され、検出されたことがわかります。ピーク面積率から求めた、先発薬およびバイオシミラー中の凝集体とフラグメントの相対的な定量結果を表 2 にまとめます。

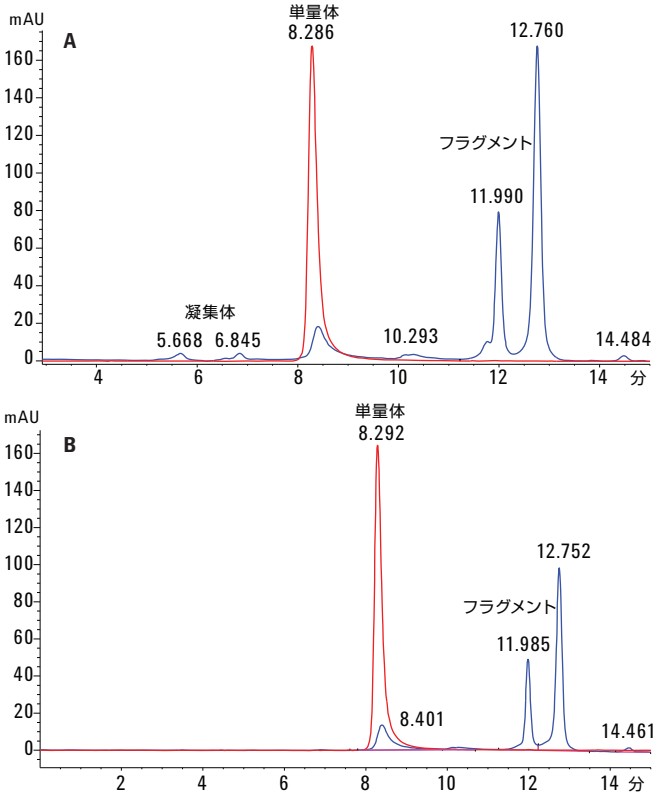


図 5. Agilent AdvanceBio SEC による分析結果: (A) リツキシマブ先発薬のインタクトサンプル (赤線) と pH/熱ストレスを加えたサンプル (青線) のクロマトグラムの重ね合わせ表示、(B) リツキシマブバイオシミラーのインタクトサンプル (赤線) とストレスを加えたサンプル (青線) のクロマトグラムの重ね合わせ表示

表 2. リツキシマブ先発薬およびバイオシミラーのインタクト mAb とストレスを加えた mAb の相対面積率

インタクト先発薬		ストレスを加えた先発薬	
時間	**面積 %**	**時間**	**面積 %**
8.288 (単量体)	100	1.289	4.24
		5.668	2.26
		6.845	2
		8.40 (単量体)	13.6
		10.29	2.81
		11.99	23.22
		12.76	51.01
		14.48	1.11
インタクトバイオシミラー		**ストレスを加えたバイオシミラー**	
時間	**面積 %**	**時間**	**面積 %**
8.292 (単量体)	100	8.40 (単量体)	16.832
		11.985	24.24
		12.75	57.36
		14.46	1.5

興味深いことに、先発薬 mAb では、ストレスにより凝集種の相対ピーク面積がバイオシミラーより増加しています。ただし、フラグメンテーションパターンとフラグメントのピーク面積は、どちらの mAb も非常によく似ています。ストレスを加えた後の先発薬およびバイオシミラーでは、単量体がそれぞれ 13 % と 16 % 検出されました。また、どちらの mAb についても、主要形態は、約 12.75 分に溶出しているフラグメントであり、その割合は 50 % を超えています。

最後に、それぞれ分子量がわずかに異なる市販のモノクローナル抗体と ADC に対する AdvanceBio SEC カラムの分離能を評価するために、各サンプルを 1 回ずつ注入して分析しました。その結果のクロマトグラムの重ね合わせ表示を 図 6 に示します。AdvanceBio SEC カラムにより、治療用 mAb および ADC のリテンションタイムに明らかな違いが見られ、それぞれを分子質量にもとづいて分離することができました。この結果は、AdvanceBio SEC カラムが、これらの分子の分析に適していることを示します。

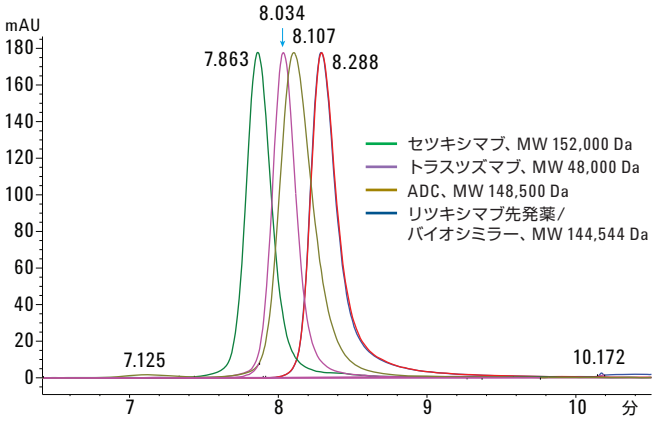


図 6. Agilent AdvanceBio SEC、300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムにより分離したリツキシマブ先発薬/バイオシミラー、トラスツズマブ、セツキシマブ、および ADC のクロマトグラムの重ね合わせ表示

結論

mAb にもとづく医薬品の開発プロセスは複雑です。また、多数の物理化学的特性解析により、純度、凝集、および製品に関連するその他の変異体を測定することが求められます。単量体、高分子部分、および 低分子部分の未変性条件下でのモニタリングおよび定量には、サイズ排除クロマトグラフィーが広く使用されてきました。今回の実験では、Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 300 mm、2.7 µm カラムを用いて、リツキシマブのインタクトサンプルおよびストレスを加えたサンプルを未変性条件下で分離する単純なメソッドを開発しました。この最適化されたメソッドでは、インタクトサンプルの単量体が単一の対称ピークとして純度 100 % で分離され、凝集体やフラグメントの兆候は見られませんでした。また、ストレスを加えたサンプルについても、凝集体およびフラグメントを分離し、定量することができました。これは、AdvanceBio SEC のように、mAb およびその質量変異体を優れた感度で高分解能分離可能なカラムだからこそ成し得たことです。また、この分析結果には、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC の安定した生体不活性性と腐食耐性も貢献しています。

参考文献

1. Başak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, **2005**.

詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの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.aglient.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。

本資料に記載の情報、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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan
October 16, 2015
5991-6304JAJP

Agilent Technologies