

生物製剤に含まれる凝集体の 高速高分離サイズ排除クロマトグラフィー

アプリケーションノート

生物製剤・バイオシミラー

著者

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

タンパク質凝集は、生物製剤タンパク質の重要な品質特性です。凝集は安全性に大きく影響する可能性があり、抗原反応が生じる場合があるためです [1]。凝集のためにバイオ医薬品の効能が低下することもあり、また、プロセスの経済性を大きく損なう可能性があります。タンパク質は、pH、温度、または濃度の変化などのストレス条件にさらされたときにしばしば凝集します。そのため、製造の多くの異なる段階で凝集が発生する可能性があります。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、凝集の定量に最適なメソッドと見なされてきました。

生物製剤の開発中 (例えばクローン選択中、または厳密な「実験計画法」のアプローチによる発酵条件の最適化中など) に凝集形成をモニタリングすると、非常に多くのサンプルが使用され、サイズ排除分析が必要になる場合があります。

SEC に通常使用される条件では、多くの場合、分析時間が 20 分以上になり、多数のサンプルを分析する能力が大幅に制限されます。Agilent AdvanceBio SEC カラムは、分離のスピードを上げてこのような分析のボトルネックを大幅に削減できるように、高度に最適化された粒子サイズとポアサイズを使用して設計されています。このアプリケーションノートでは、分析の正確さを損なうことなく、サンプルスループットを向上させるためのテクニックについて説明します。



Agilent Technologies

材料とメソッド

試薬、サンプル、および材料

免疫グロブリン G (IgG) は Sigma-Aldrich から購入し、タンパク質標準混合液は Bio-Rad Laboratories から入手しました。タンパク質標準混合液の成分は、サイログロブリン (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) です。すべての化学物質と溶媒は HPLC グレードであり、Milli-Q 純水システムで生成された非常に純度の高い水を使用しました。

機器

完全なイナート仕様である Agilent 1260 Infinity クオータナリバイオイナート LC を使用しました。これは、以下のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ 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 シリーズサークルスタート (G1330B)
- Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G1315D)、バイオイナートフローセル搭載

使用したソフトウェアは Agilent ChemStation B.04.03 です。

分析条件

カラム:	Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 150 mm、2.7 μm (p/n 1180-3301)、 Agilent AdvanceBio SEC 300Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm (p/n 1180-5301)、 他社製ジオールカラム、7.8 × 300 mm、5 μm
移動相:	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
TCC 温度:	30 °C
注入量:	5 μL
流量:	0.5~1.4 mL/min (図の凡例を参照)
検出:	220 nm の UV

結果と考察

AdvanceBio SEC カラムでは、サンプルのせん断劣化や粒子間の詰まりのリスクなしに最大限の効率を実現するように設計された、2.7 μm の粒子が使用されています。独自の製造方式で、ポアのサイズと構造、およびポアの量を制御しています。親水性ポリマーコーティングを利用すると、確実にタンパク質のピークがシャープになり、分離されます。図 1 には、AdvanceBio SEC カラムを使用した場合および同じ寸法 (7.8 × 300 mm) の他社製カラムを使用した場合のタンパク質標準の分離を比較した SEC クロマトグラムを示します。AdvanceBio SEC カラムは、タンパク質標準の分離において、他のカラムと比較して高い効率を示しました。AdvanceBio SEC カラムは、IgG モノマーについて理想的な分離ピーク形状を示しました (ピーク 4)。オブアルブミンダイマー (ピーク 5) は、他社製カラムと比較して良好に分離されました。これらの結果から、AdvanceBio SEC カラムの優れた性能が実証されています。

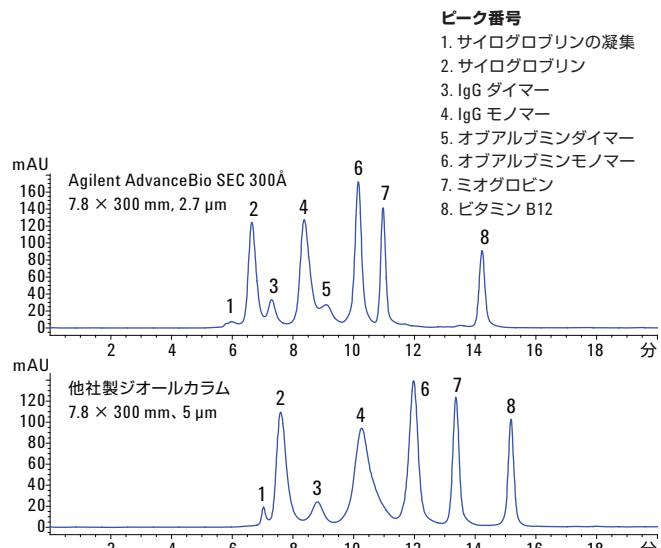


図 1. 0.8 mL/min の高分離能条件の下でのタンパク質標準のサイズ除外。分析時間は 20 分です。Agilent AdvanceBio SEC カラムの優れた性能を示しています。

300 mm のカラムを使用し、流量が 0.8 mL/min である「標準的な」高分離能条件下では、分析時間は 20 分です。そのため、最大スループットは 1 時間当たり 3 つのサンプルとなり、96 個のサンプルを分析するためにかかる日数は 1.3 日を超えます。生産性を上げたい場合、短い 150 mm カラムを使用すると、それに対応して実行時間が短くなります。図 2 には、流量 0.8 mL/min で稼働する 300 mm および 150 mm の AdvanceBio SEC カラムで実行された免疫グロブリン G の分離を示します。リテンションタイムは、150 mm カラムでは半分になります。また、モノマーのピークとダイマーのピークの間の分離係数が 1.73 の場合、定量の正確さが損なわれることはありません。短い AdvanceBio SEC カラムを使用すると、短い分析時間での mAbs の高分離能分析が可能になります。

生物製剤のタンパク質の凝集は、效能と毒性に影響し、免疫原性の亢進に関わってきました。SEC 分析によって凝集を正確に定量できるかどうかは、主として、モノマーと凝集のピーク間の分離能によって決まります。そのため、直線速度が分離能に影響する SECにおいて、分離能と定量の 2 つが非常に重要なパラメータとなります。これらの 2 つのパラメータを評価するために、150 mm カラムで異なる流量をテストしました。AdvanceBio SEC カラムの優れた粒子の安定性により、性能を確保しつつ、高流量で分析を実行できます。流量を増やすと、分離係数は小さくなります。ただし、モノマーのピーク面積の定量は、大部分は変わらないままであるため(図 3)、さらに多くのサンプルをスクリーニングしてそれらの凝集体の含有量を測定できます。

サンプルスループットを最大限に引き上げることで、競合における優位性と信頼性の高い結果が得られ、それが経済的な利益につながります。カラムの長さを短くして流量を増やすことは、高速な SEC 分析を実現するためのシンプルな分かりやすい手法です。表 1 に、流量と、1 日当たりのサンプル分析の回数の、理論的な計算を示します。1.5 mL/min の流量で、分析時間が 4.8 分の場合、1 日で 300 個のサンプルを分析することができ、スループットが 4.2 倍まで高くなります。

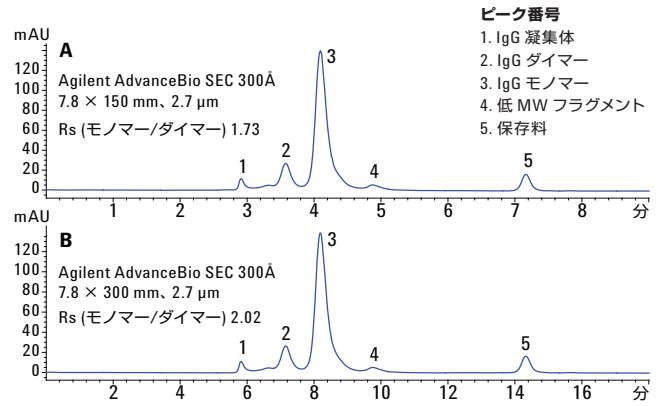


図 2. 流量 0.8 mL/min の高分離能条件下での免疫グロブリン G のサイズ排除。150 mm カラムで分析時間が 9 分の場合 (A) と、300 mm カラムで実行時間が 18.5 分の場合 (B)。

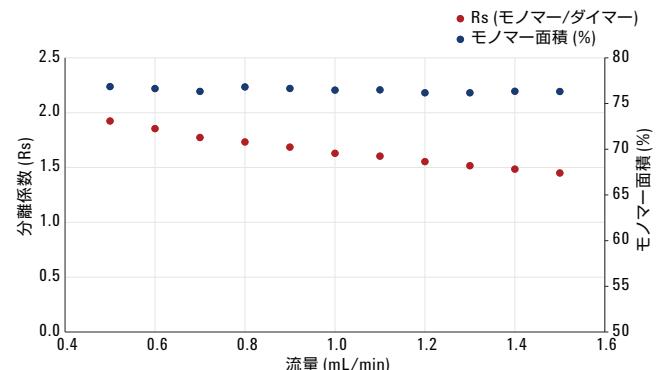


図 3. 分離係数とモノマー面積の割合 (%) の決定に対する流量の影響。

表 1. 流量を増やしてサンプルスループットを高めることによる生産性の向上。

カラム長 (mm)	流量 (mL/min)	分析時間 (分)	1 時間 当たりの サンプル数	1 日 当たりの サンプル数
300	0.8	20	3	72
150	0.5	15	4	96
150	0.6	12	4~5	120
150	0.7	10	5~6	144
150	0.8	9	6~7	160
150	0.9	8	6~7	180
150	1.0	7	7~8	205
150	1.1	6.5	8~9	220
150	1.2	6	8~9	240
150	1.3	5.5	11	260
150	1.4	5	12	288
150	1.5	4.8	12~13	300

図 4 では、異なる流量で 300 mm カラムと 150 mm カラムを使用した場合の重ね表示の SEC クロマトグラムを示します。モノマー含有量の正確な定量を維持しながら、4 分の 1 の時間で高速な SEC 条件を実現できることは明らかです。

結論

本研究では、生物製剤のタンパク質における凝集の分析のスループットを大幅に向上させるために、高い流量で短い Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用することの利点が実証されました。カラムの長さを 300 mm から 150 mm に短くして、流量を 0.8 mL/min から 1.5 mL/min に増やすことにより、サンプルスループットと生産性を 400 % 引き上げ、96 個のサンプルを分析するために必要な時間を 1.3 日から 8 時間未満に短縮することができます。

参考文献

1. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, I. Kimber. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.* **2014**, 11(2), 99–109.

詳細情報:

これらのデータは一般的な結果を示したものです。

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.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

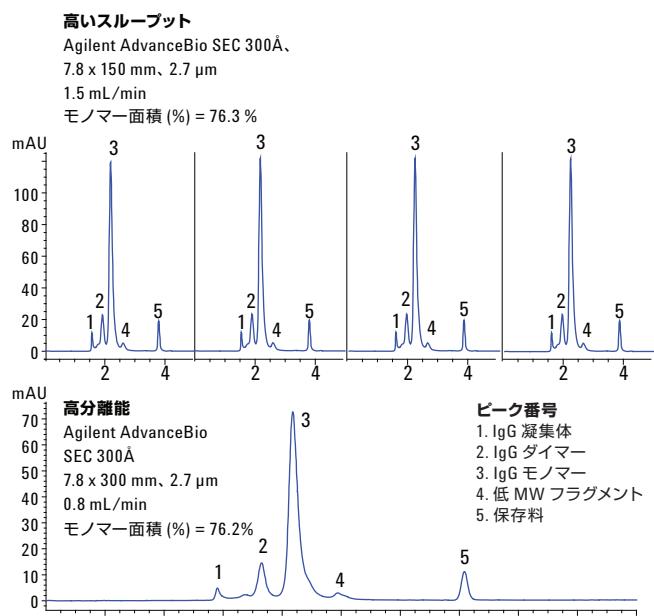


図 4. 高スループットかつ高分離能の条件下での免疫グロブリン G の比較クロマトグラム。

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

November 24, 2015

5991-6458JAJP



Agilent Technologies