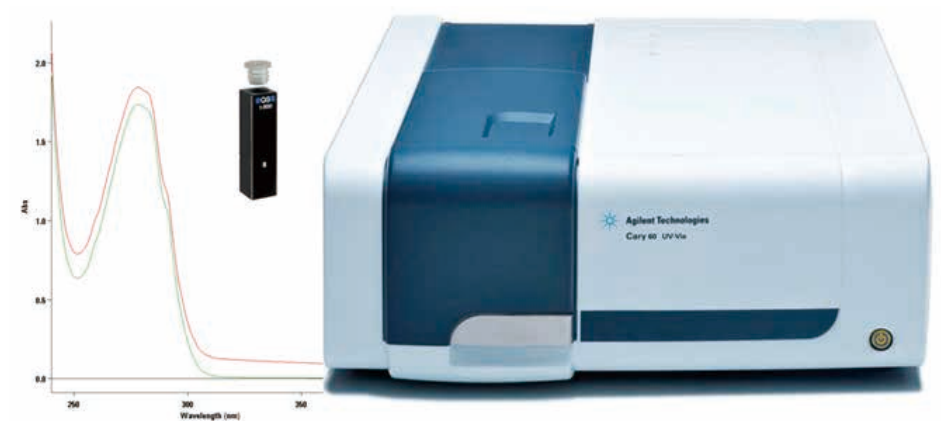


## mAb 凝集体の特性解析

HPLC メソッドと Cary 60 UV-Vis を用いて開発した  
迅速なメソッドの比較



### 著者

Arunkumar Padmanaban,  
Sreelakshmy Menon  
Agilent Technologies, Inc.

### はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) は、製薬会社によって広く製造されている重要なバイオ製品です。生物化学的プロセスにおいて mAb の使用が増加するに伴い、製薬会社にとって mAb を詳細に特性解析できる手法がきわめて重要になっています。タンパク質の凝集体は生物活性に影響を与えるため、規制機関、学術機関、およびメーカーの間で活発な議論が行われています (1)。肉眼では見えないタンパク質の凝集体は、タンパク質が安定した構造のときは表出しないエピトープを曝露することがあります。凝集体の存在を高い信頼性で同定することは、mAb の特性解析において非常に重要になります。

凝集体の形成は多くの要因の影響を受け、製造、精製、製剤、保管の段階で起こります。したがって、タンパク質の凝集体の存在を同定する迅速な QC メソッドが有効です。このメソッドは、抗体製造のライフサイクルにおける多くの段階 (クローンスクリーニングなど) で用いられるほか、保管時の継続した製品モニタリングにも使用されます。タンパク質の凝集体を検出するための分析メソッドとして UV 分光分析を用いる利点是非破壊であるということです。また、サンプル量が少なく済み、サンプル前処理の要件は最小限に抑えられ、サンプルの分析が簡単です。

この研究では、凝集体の存在を示す迅速な QC メソッドについて説明します。このメソッドでは Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を使用して、異なるストレス条件下で生成された mAb 溶液の凝集体を同定しています。凝集体の存在は、タンパク質の凝集体を特性解析する際の標準メソッドである、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析により立証されました。

## 実験方法

### 試薬とサンプル

市販の mAb は地元の薬局から購入し、メーカーの指示に従って保管しました。リン酸ナトリウム 一塩基性および二塩基性は Sigma-Aldrich 社から購入しました。緩衝液を新しく精製し、使用前に 0.22 μm メンブレンでろ過しました。

### サンプル前処理

mAb サンプルに対して、熱ストレスおよび加速凍結融解ストレス (後述) という 2 つの異なるストレスメソッドにより凝集体を誘導しました。分析測定のコントロールとして、未処理 (ストレスを加えていない) のサンプルを使用しました。

### 熱ストレス

mAb サンプルを水に希釈して濃度 1 mg/mL にしました。100 μL の希釈した mAb サンプルを 0.5 mL エッペンドルフチューブに移しました。次に、エッペンドルフサーモミキサーにより 65 °C で 5 分間および 10 分間インキュベーションを行い熱ストレスを加えました。サンプルを室温まで冷却させてから、分析測定を実施しました。

### 加速凍結融解ストレス

100 μL の 1 mg/mL mAb サンプルを 0.5 mL エッペンドルフチューブに移しました。これらのチューブを、溶液が凍結するまでエタノールドライアイスバス内に浸しました。次に、凍結させたサンプルをすぐにサーモミキサーに入れて、30 °C で 4 分間置きました。サンプルを完全に解凍してから、再度急速冷凍しました。この凍結融解サイクルを 15 回繰り返した後、特性解析を実施しました。

## UV スペクトルスキャン

Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いて、コントロールサンプルおよびストレスを加えた mAb サンプルのスペクトルスキャンを実行しました。50 μL のサンプルを Agilent サブマイクロ長方形石英製キュベット (光路長 10 mm) に入れました。240 ~ 380 nm のブランク補正ベースラインに対するサンプルの吸光度を記録しました。図 1 の式 (2) を用いて、凝集体インデックス (A.I.) を算出しました。データの取り込みと解析には、Agilent Cary WinUV スキャンアプリケーションソフトウェアを使用しました。

$$AI = \left( \frac{OD350}{OD280 - OD350} \right) * 100$$

図 1. 凝集体インデックスの算出式

ここで、OD 350 は 350 nm での吸光度 (%Abs) を表しており、OD280 - OD350 は 280 および 350 nm それぞれにおける吸光度の差です。

## サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

サンプルの SEC 分析には、Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムを使用しました。このシステムは以下で構成されています。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプ
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート高性能オートサンブラ
- Agilent 1260 Infinity サーモスタット、バイオイナート熱交換器搭載
- Agilent カラムコンパートメント
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL Plus
- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm LC カラム

LC パラメータを表 1 に示します。これらのパラメータは別の研究 (3) から採用しており、分離の際に再利用しました。単量体と凝集体のピーク面積を算出し、コントロールサンプルと比較しました。データの取り込みと解析には、OpenLAB CDS ChemStation を使用しました。

表1. LC 分析条件

パラメータ	設定
移動相 A	150 mM リン酸ナトリウム pH 7.0
カラム	AdvanceBio SEC 2.7 μm 300 Å 7.8 × 300 mm カラム
TCC 温度 (°C)	25 °C
イソクラティック分離	移動相 A
分析時間	15 分
注入量	5 μL
流量	0.8 mL/min
DAD	220 および 280 nm

## 結果と考察

### UV 分光分析

UV 吸光分光分析は、タンパク質溶液の定量測定を実施する最もシンプルで非破壊の方法を実現します。

今回のメソッドでは、化学的誘導体化や複雑な色素連結反応を用いずにタンパク質を定量できます。

Cary 60 UV-Vis 分光光度計を用いて、異なる条件下で凝集体の形成を誘導した mAb サンプルを測定しました。Cary 60 のキセノンフラッシュランプ光源は感光性サンプルに劣化を生じさせないため、生体サンプルの測定に適しています。アジレントは、サンプル量が 5 μL ~ 1 mL の範囲の幅広い石英製キュベットを提供しています。この研究では、サンプル量が 50 μL で光路長が 10 mm のサブマイクロ石英製キュベットを使用しました。このキュベットを使用することにより、サンプルの損失が最小限に抑えられ、少ないサンプル量で測定が実施できました。

320 nm を超える吸光度信号は、凝集体分子による光の散乱に起因するものです。凝集体がないタンパク質溶液では、320 nm を超える吸光は存在しません (4)。ストレスを加えていない mAb サンプルとストレスを加えた mAb サンプルのスペクトルスキャンを図 2 に示します。パネル A は、熱ストレスを加えたサンプルの吸収スペクトルを示しています。350 nm において光学密度が少し増大しているのがわかります。このスペクトルは、350 nm において光学密度が大幅に増大している、パネル B の凍結融解ストレスを加えたサンプルのスペクトルとは対照的です。

図 2 の各パネルの挿入図は、同じデータを両対数プロットしたものです。これらは、全吸光度に対する散乱の寄与を示しています。

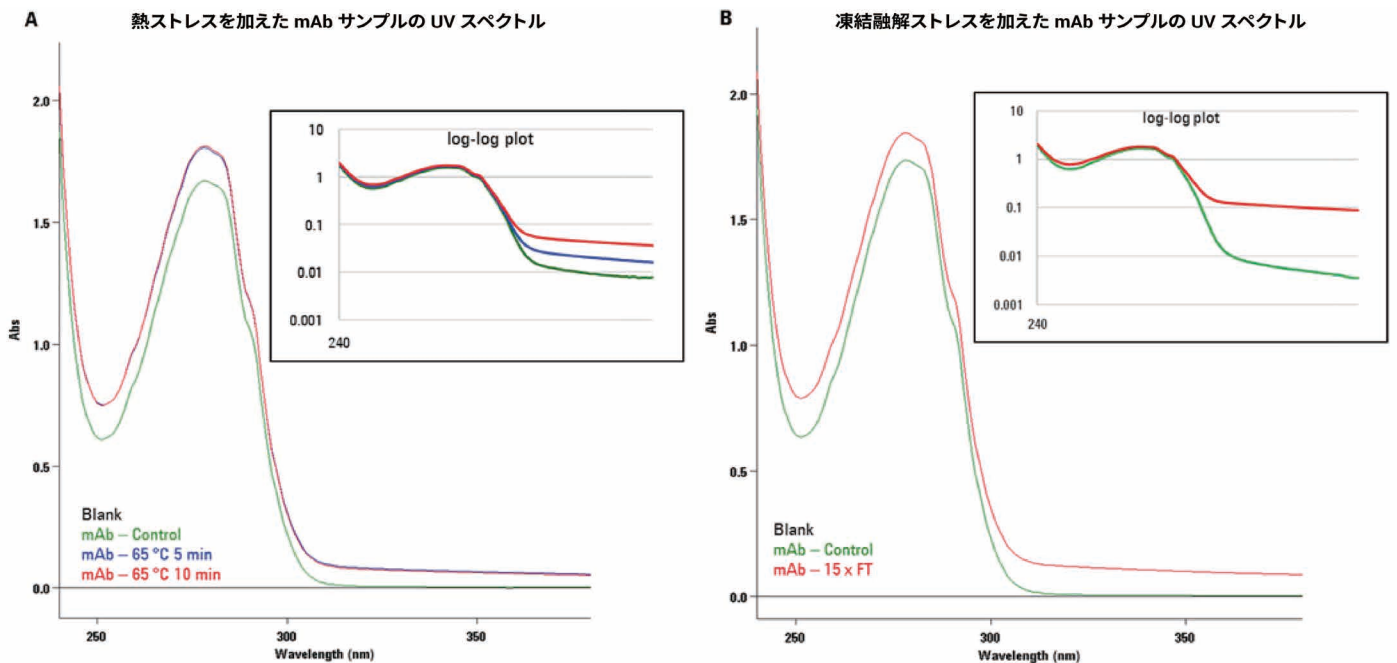


図 2. ストレスを加えていない mAb サンプルとストレスを加えた mAb サンプルの UV 吸収スペクトル。パネル A は熱ストレスを加えたサンプル、パネル B は凍結融解ストレスを加えたサンプルです。挿入図は、両対数プロットを示しています。

UV トレースにおいてシフトが増大していることから、溶液の光学密度が変化していることは明らかです。

図 1 の式を用いてこれらのデータから凝集体インデックス (A.I.) を算出しました。凝集体インデックスの変化を表 2 に示します。凍結融解サイクルを繰り返したサンプルは、コントロールサンプルおよび熱ストレスを加えたサンプルよりも凝集体インデックスが高くなっています。これらのデータから、凍結融解ストレスでは熱ストレスよりも大きな凝集体が形成されていることがわかります。これを引き起こした要因には、氷と液体の境界面での部分的なアンフォールディング、緩衝液塩が結晶化する際の pH の変化、氷結晶成長時の溶質濃度などがあります。

### SEC 分析

すべてのサンプルを、粒子サイズ 2.7  $\mu\text{m}$  の Agilent AdvanceBio SEC カラムで分析しました。AdvanceBio SEC カラムは、単量体ピーク、凝集体ピーク、および製剤中の低分子保存料を効率的に分離しました。短い分析時間内で、単量体および凝集体のピークを高分解能で分離できました。

表 2. 異なる条件下でストレスを加えていないサンプルとストレスを加えたサンプルの凝集体インデックスの変化

サンプル	OD 280 nm	OD 350 nm	凝集体インデックス
ストレスを加えていない IgG	1.57	0.01	0.5
65 °C - 5 分	1.69	0.02	1.1
65 °C - 10 分	1.72	0.04	2.5
15 回の凍結融解 (FT)	1.82	0.10	5.8

熱ストレスを加えたサンプルの SEC クロマトグラムを図 3 のパネル A、凍結融解ストレスを加えたサンプルの SEC クロマトグラムをパネル B に示します。すべてのサンプルにおいて、合計ピーク面積の約 99 % を占める主要な単量体ピークが観察されました。コントロールサンプルでは、7 分に小さい凝集体ピークが存在していることがわかりました。熱ストレスを加えたサンプルのクロマトグラムでは、リテンションタイム 6 分に別のピークが現れています。このピークは、コントロールサンプルには存在していません。さらに、処理済みサンプルでは 11 分のあたりでベースラインが増大しており、これは mAb 分解物を示しています。クロマトグラムは、熱処理により一部の固有の凝集体が高次の凝集体種に変化したことを示しています。凝集体の全ピーク面積は同じですが、SEC 分析により異なる形態の凝集体が分離できています。パネル B は、コントロールサンプルと 15 回凍結融解したサンプルのクロマトグラムを重ねて表示したものです。

これによると、ストレスを加えたサンプルでは 7 分に凝集体のピーク面積が増大しています。

表 3 に示されている単量体と凝集体のピーク面積のパーセント率は、熱分解と比較して凍結融解サイクルを繰り返した方が凝集の度合いが高くなることを示しています。UV スペクトルも同様の結果を示しました。

表 3. 異なる条件下の SEC クロマトグラムから得た凝集体と単量体ピークのピーク面積 %

mAb サンプル	ピーク面積 %	
	凝集体	単量体
ストレスを加えていない mAb	0.73	99.13
65 °C - 5 分	0.68	99.23
65 °C - 10 分	0.67	99.20
15 回の凍結融解 (FT)	1.18	98.65

凝集体の存在を評価することにより、UV 吸光度データと SEC データに相関があることがわかります。UV 吸光メソッドでは凝集体を分離できませんが、SEC 特性解析を実施する前の迅速なツールとして使用できます。UV 吸光メソッドには、サンプル量が少なく済む、サンプルの再利用が可能、機器のセットアップが簡単、分析時間が 1 分未満という利点があります。

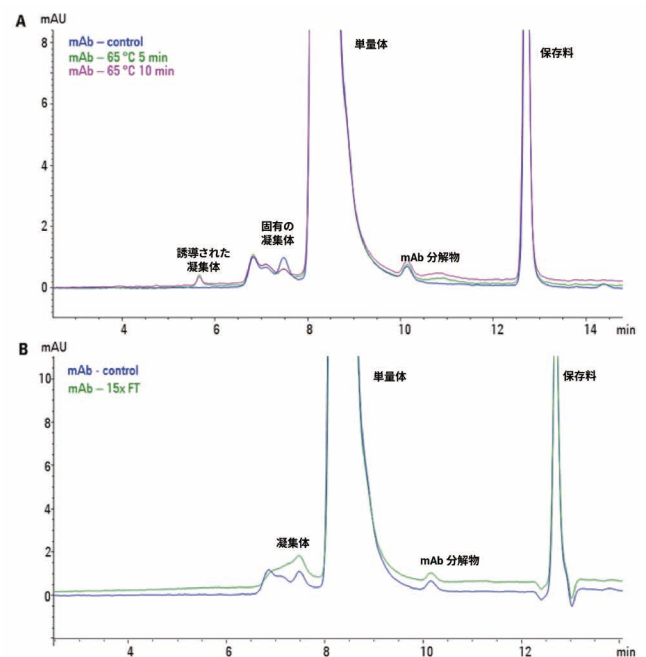


図 3. ストレスを加えていない mAb サンプルとストレスを加えた mAb サンプルの SEC クロマトグラムの重ね表示。パネル A は熱ストレスを加えたサンプルで、凝集体ピークが形成されていることを示しています。パネル B は凍結融解ストレスを加えたサンプルで、凝集体ピークが増大していることを示しています。

## 結論

この研究の結果は、Agilent Cary 60 UV-Vis 分光光度計の使用により、モノクローナル抗体溶液中の凝集体の存在をモニタリングできることを示しています。今回のメソッドでは異なる形態の凝集体を分離することはできませんが、SEC 分析で凝集体を分離する前に凝集体の存在を同定する、迅速なスクリーニングメソッドとして使用できます。Agilent AdvanceBio SEC カラムを Agilent 1260 Bio-LC システムで使用することにより、短い分析時間で mAb 凝集体を高分解能で分析できることが立証されました。

## 参考文献

1. Vázquez-Rey, et al. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, 108.
2. Hawe, A, et al. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci.* **2009**, 38.
3. Coffey, A, et al. A comprehensive workflow to optimize and execute protein aggregate studies. Agilent Technologies publication number 5991-7476EN. 2017.
4. Raynal, B, et al. Quality Assessment and Optimization of Purified Protein Samples: Why and How? *Microb Cell Fact.* **2014**, 13.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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いません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2020  
Printed in Japan, March 13, 2020  
5991-7974JAJP  
DE.6858912037