

## サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の メソッド開発における移動相の最適化

### 著者

Richard Hurteau  
Agilent Technologies, Inc.,  
Wilmington, DE, USA

### 概要

モノクローナル抗体 (mAb) 製品の凝集は、その治療薬としての効能に悪影響を与えます。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、治療用のタンパク質およびペプチド中の凝集体のモニタリングに非常に効果的なメソッドです。このアプリケーションノートでは、標準タンパク質混合物中のモノマー、ダイマー、凝集体の特性評価における、Agilent AdvanceBio SEC カラムを使用したメソッドの最適化を解説します。

## はじめに

mAb、抗体薬複合体 (ADC)、Fc-融合タンパク質、抗体フラグメント、その他の治療用タンパク質およびペプチドなどのモノクローナル抗体製品は、多数の疾患や医学的症候の治療に使用されています。mAb 製品はバイオ医薬品業界における使用が急速に拡大してきました。世界での販売額は 2020 年までに 1,250 億米ドルに達すると予想されています<sup>1</sup>。

治療用タンパク質の製造と生産は、5,000 以上の重要なプロセス段階を含む場合もある非常に複雑なプロセスです<sup>2</sup>。mAb 製品の生産中の凝集は有効性と安全性に悪影響を与え、医薬品としての承認を受けられないという結果を招きます<sup>3,4,5</sup>。このため、タンパク質またはペプチドに存在する凝集の量はバイオ医薬品業界において重要な品質特性 (CQA) です。SEC は、治療用のタンパク質およびペプチド中のモノマー、ダイマー、凝集体、分解生成物をモニタリングするための、標準分析メソッドと考えられています<sup>3</sup>。

AdvanceBio SEC カラムは、高均質な 2.7 μm 粒子で充填され、効率的な分離と非特異的な相互作用を最小限にする、低吸着ポリマーコーティングシリカ固定相を含んでいます。これらのカラムは、さまざまな濃度の緩衝液や塩を含む多数の移動相と組み合わせて使用できます。

緩衝液と塩の濃度の最適化は、カラムによる分離の品質を最大限に高める重要な要素であり、ピークテーリング、歪んだピーク形状、不十分な分離度、移動相が誘発するタンパク質の凝集を生じさせる二次的応答を防ぎます<sup>3</sup>。カラムを直列接続で使用して、分離能を向上させることもできます。このアプリケーションノートでは、さまざまなサイズや化学的性質を持つタンパク質のクロマトグラフィーにおいて、異なる移動相の組成が与える影響を解説します。イソプロピルアルコールは、AdvanceBio SEC カラムでは使用する必要がないことから、二次的応答を低減させるための移動相の組成では使用しませんでした。

## 試薬と実験方法

### サンプル

- ヒト血漿由来の IgG、Sigma、I4506-10MG
- SigmaMAb Antibody Drug Conjugate (ADC) Mimic、Sigma、MSQC8-0.5MG
- ウシ膵臓由来のインスリン、Sigma、I5500
- ウシ心臓由来のシトクローム c、Sigma、C3131-50MG
- ゲルろ過スタンダード、Bio-Rad、1511901
- ウシ血漿由来の IgG、Sigma、I9640
- ウマ心臓由来のミオグロビン、Sigma、M1882
- ブルラン多糖類標準キット SAC-10、Agilent、p/n PL2090-0100
- Agilent バイアル、スクリュートップ、茶色、認定、2 mL、100 個  
バイアルサイズ:12 × 32 mm  
(12 mm キャップ) (p/n 5188-6535)
- Agilent スクリューキャップ、圧着、青色、PTFE/白色シリコンセプタム、100 個  
キャップサイズ:12 mm  
(p/n 5190-7021)

### カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm  
(p/n PL1180-5301)
- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm  
(p/n PL1180-5350)

### LC システム

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナートオートサンブラ (G5667A)
- Agilent 1200 ALS/フラクションコレクターサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity DAD 検出器 (G1315C)

### 分析条件

緩衝液は流量 1 mL/min、カラム温度 25 °C、冷却器は 4 °C、波長 220 nm に設定しました。

## 結果と考察

### リン酸緩衝液濃度の最適化

異なるリン酸ナトリウム緩衝液の濃度が mAb 製品や他のタンパク質のクロマトグラフィーに与える影響を調査するために、一連の実験を実施しました。塩化ナトリウムを使用せずに、pH 7.0 のさまざまなリン酸ナトリウムの濃度を、ヒト IgG、ADC 模倣体化合物、インスリン、シトクローム c をサンプルとして分析しました。リン酸緩衝液の濃度は、50、100、150、200、400、600 mM としました。1 mg/mL 溶液を 10  $\mu$ L 注入しました。1,000 mM リン酸緩衝液も使用しましたが、システムに過剰な圧力を加えカラムが損傷したため、推奨しません。図 1 はヒト IgG のクロマトグラムを示しています。リン酸緩衝液の濃度が 400 または 600 mM のとき、不十分なクロマトグラムが示され、この濃度が低くなると IgG モノマーのピークはよりシャープになりました (図 1)。400 と 600 mM のリン酸濃度では凝集体ピークがより大きいことが明らかであり、IgG サンプルでの凝集が移動相によって誘発されたことが示唆され (図 1 の 4.25 分付近のピーク)、不適切な結果をまねきました。IgG モノマーのテーリングファクタは、リン酸緩衝液の濃度が 600 から 100 mM へと下がるにつれて減少しました (表 1)。IgG モノマーとダイマー間のピーク分離度は、リン酸緩衝液の濃度が低くなるにしたがって増大しました (表 2)。最小のテーリングファクタと最大の分離度は、150 mM リン酸緩衝液で得られました。この濃度は IgG サンプルにおける推奨条件です (表 1 と表 2)。

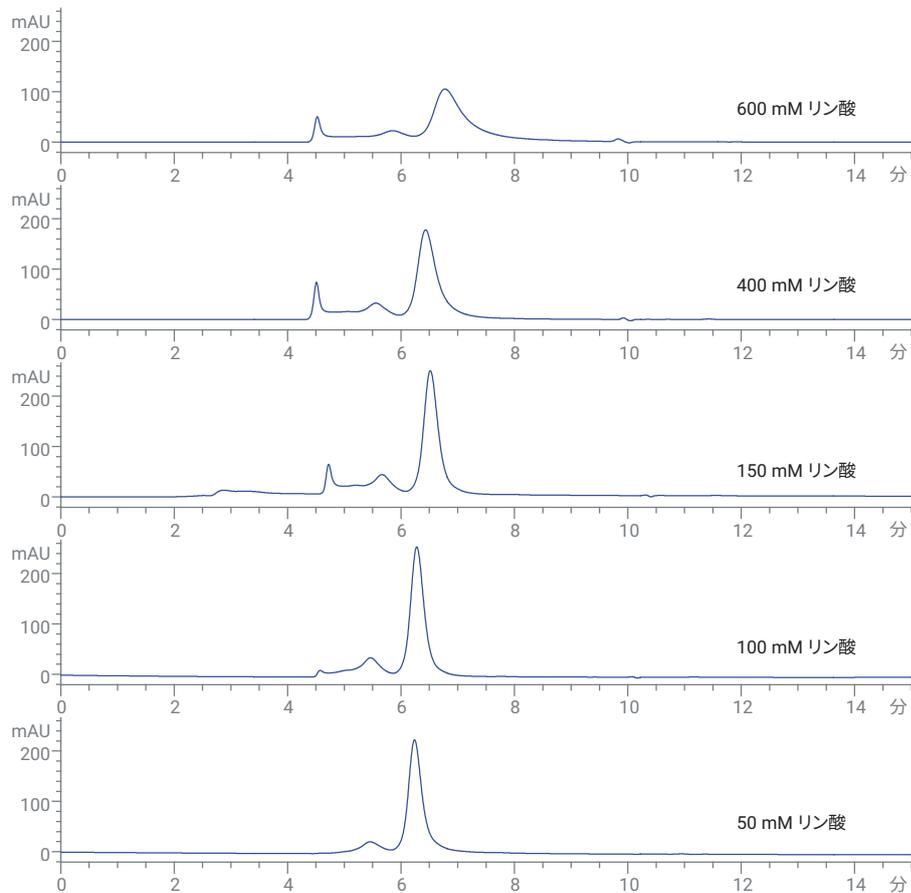


図 1. リン酸濃度に対する IgG のクロマトグラム

表 1. リン酸濃度に対するテーリングファクタ

化合物	MW (kDa)	pI	50	100	150	200	400	600
IgG	150	6.8	1.33	1.12	0.73	1.25	1.31	1.94
ADC	164	N/A	1.55	1.37	N/A	1.56	2.48	N/A
インスリン	5.7	5.3	2.48	2.36	2.44	2.51	1.73	1.09
シトクローム c	12.3	9.3	2.1	N/A	1.7	1.3	1.10	1.06

表 2. リン酸濃度に対する IgG のモノマーとダイマーの分離度

化合物	MW (kDa)	pI	50	100	150	200	400	600
IgG	150	6.8	1.33	1.18	1.41	1.31	1.14	0.79

表 3. リン酸濃度に対するリテンションタイム

化合物	MW (kDa)	pI	50	100	150	200	400	600
IgG	150	6.8	6.24	6.28	6.29	7.55	6.44	6.77
ADC	164	N/A	6.36	6.52	N/A	6.51	6.96	N/A
インスリン	5.7	9.3	10.74	10.12	9.52	9.62	11.46	12.02
シトクローム c	12.3	5.3	9.18	10.8	9.4	8.55	8.53	8.58

600 mM リン酸緩衝液における ADC のピークスプリットは、広く、テーリングがあり、二次的反応によりわずかにリテンションタイムが長くなりました (表 3、図 2)。リン酸緩衝液の濃度が低くなるにしたがって、テーリングファクタの減少、ピークの形状とサイズの向上が測定から観察され (表 1、図 2)、リン酸緩衝液濃度の範囲は 150 ~ 50 mM が適切であることが分かりました。

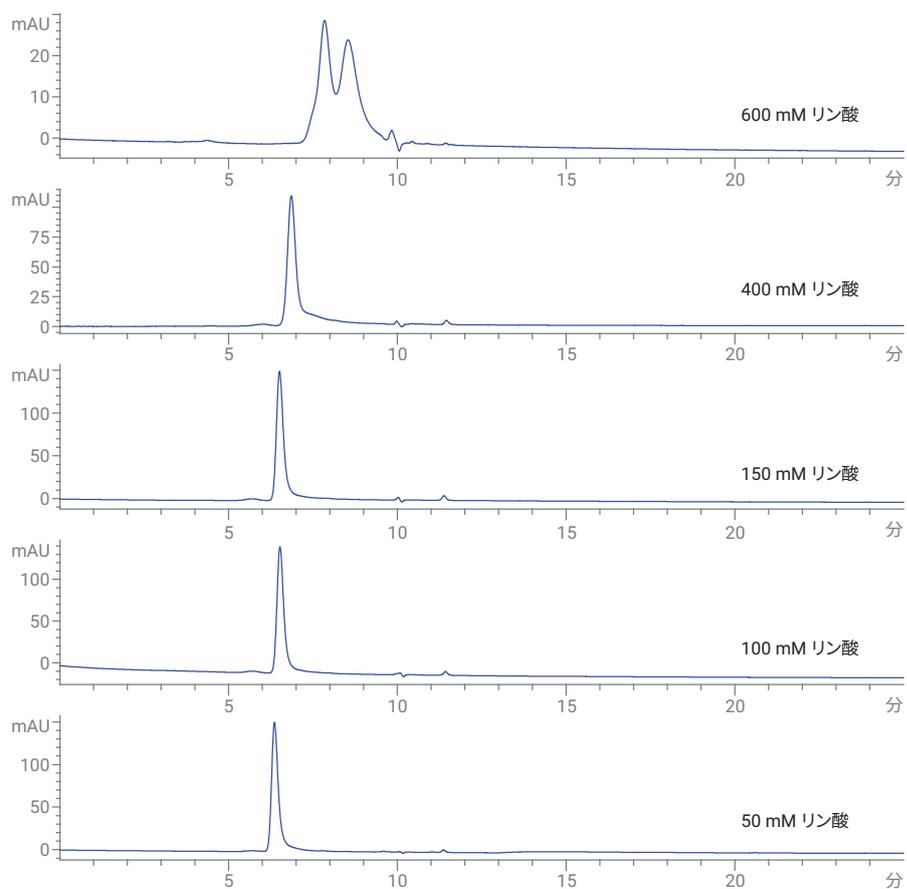


図 2. リン酸濃度に対する ADC のクロマトグラム

インスリンでは、高品質のクロマトグラムの取得が困難であることが報告されました。特に大きな問題は、インスリンの SEC クロマトグラムにおけるピークテーリングとフロンティングに関する問題です<sup>6</sup>。600 および 400 mM の濃度のリン酸緩衝液では、ピーク形状の歪みや不十分な回収が観察されました。リン酸濃度が低くなるほど、より高く、よりシャープなピークが観察されていることから、より低い緩衝液濃度が適切であることが示されました (図 3)。テーリングファクタは 50 ~ 150 mM の範囲のリン酸緩衝液において一定でした (表 1) が、50 と 100 mM リン酸緩衝液ではリテンションタイムのシフトも測定されました (表 3)。これは二次的反応を示しており、150 mM リン酸が適切な移動相であることを示唆しています。

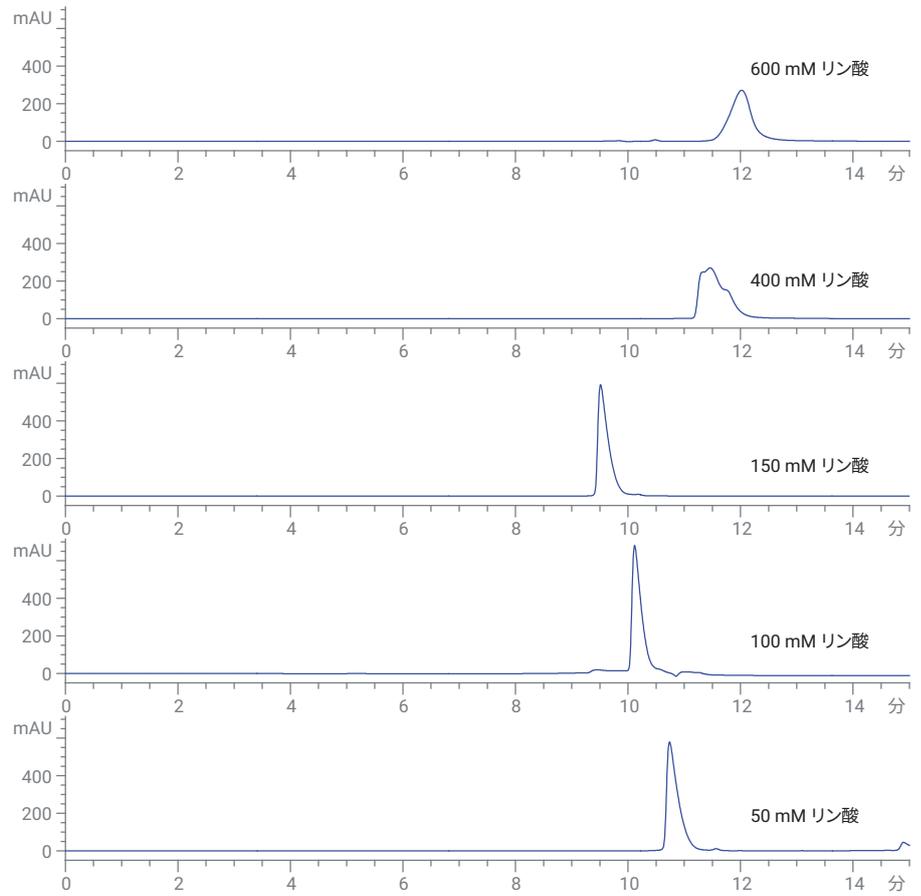


図 3. リン酸濃度に対するインスリンのクロマトグラム

表 4. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対するテーリングファクタ

化合物	MW (kDa)	pI	0	50	100	150	200	500
IgG	150	6.8	0.73	1.16	1.19	1.19	1.21	1.62
ADC	164	N/A	N/A	1.51	N/A	1.43	1.43	1.52
インスリン	5.7	5.3	2.55	2.61	2.55	2.53	2.39	2.18
シトクローム c	12.3	9.3	1.7	3.32	1.27	1.11	1.07	1.02

表 5. 150 mM リン酸、pH 7.0、50~500 mM NaCl における IgG のモノマーとダイマーの分離度

化合物	MW (kDa)	pI	0	50	100	150	200	500
IgG	150	6.8	1.41	1.37	1.36	1.43	1.36	1.37

シトクローム c について同様の実験を行ったところ、調査した他のタンパク質とは異なり、シトクローム c のクロマトグラムではリン酸濃度が高くなるにしたがって、テーリングファクタは減少し、ピーク形状はよりシャープになり、より高いピーク面積となり(図 4、表 1)、すべての濃度で二次的反応がほとんどないことが示されました。このことは、400 または 600 mM リン酸緩衝液がシトクローム c の移動相に適していることを示唆しています。

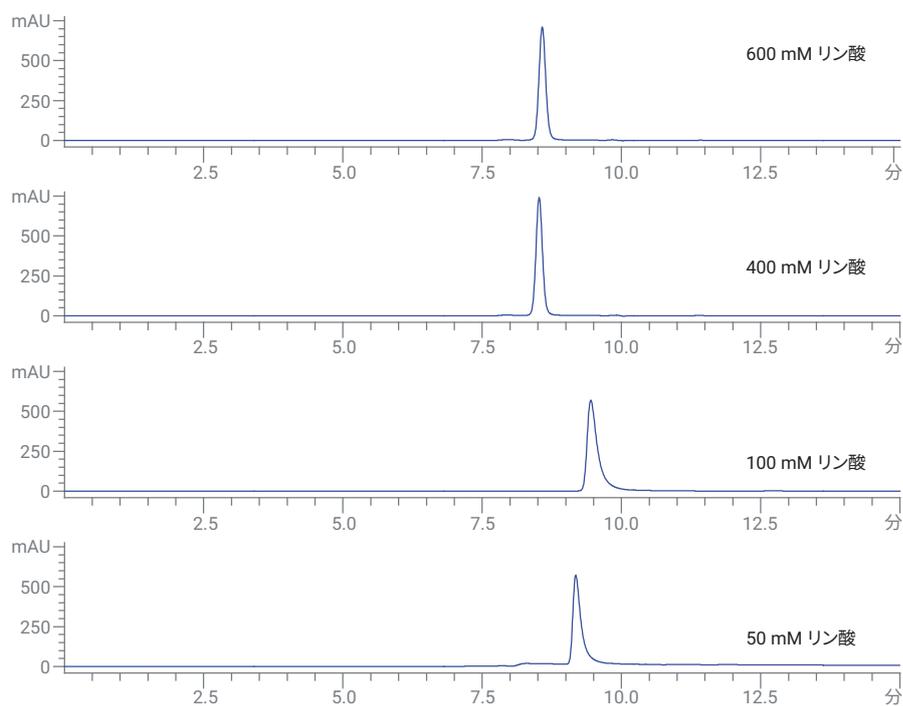


図 4. リン酸濃度に対するシトクローム c のクロマトグラム

### リン酸緩衝液中の塩化ナトリウム濃度の最適化

次に、前述の実験と同じ分析対象物について、ほとんどのタンパク質で従来から使用されている一定濃度 150 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用し、塩化ナトリウムの濃度を 50、100、150、200、500 mM として一連の実験を行いました。

IgG では、すべての条件で凝集体が存在し、NaCl の濃度が 50 から 500 mM に上昇するにつれて凝集体ピークのサイズが大きくなっていくことから、塩分濃度の増大が IgG 凝集の原因であることが示唆されます (図 5)。つまり、塩化ナトリウムの移動相への添加は 150 mM リン酸緩衝液では推奨されません。

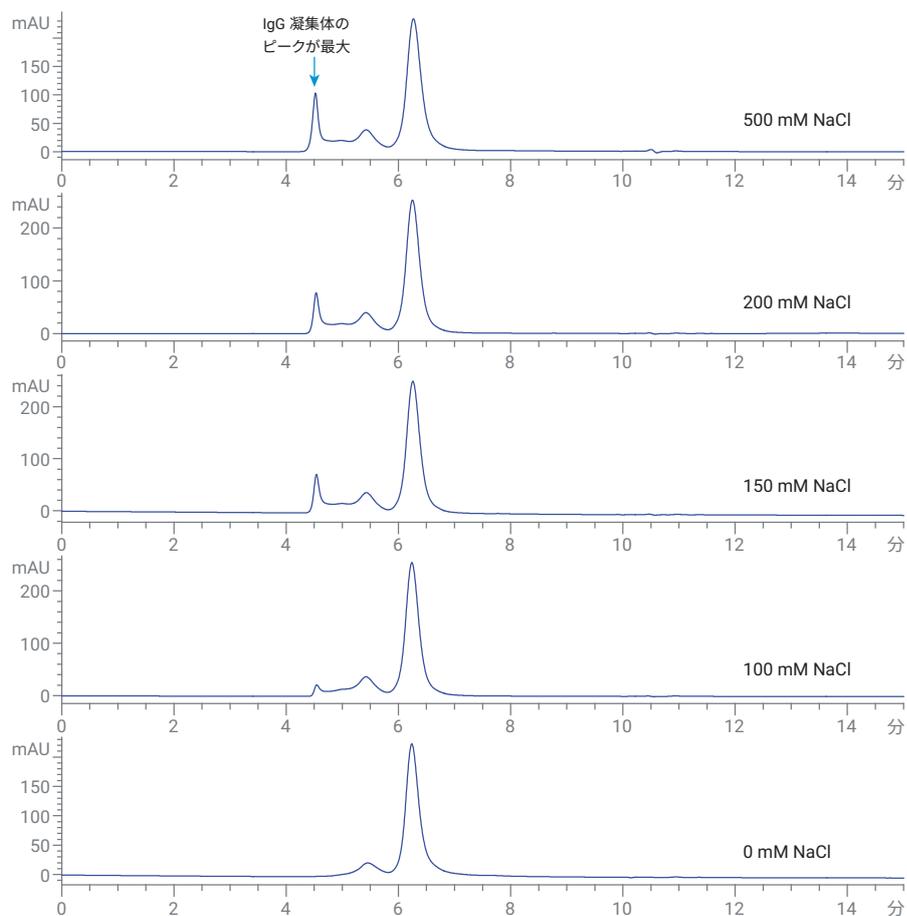


図 5. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対する IgG のクロマトグラム

ADC 模倣体のピークは、すべての塩濃度で類似しました。テーリングファクタは、すべての塩分濃度範囲でほとんど一定のままでした (図 6、表 4)。ピーク形状とテーリングファクタは、すべての塩化ナトリウムの濃度で類似しており、塩化ナトリウムの移動相への添加はほとんど影響しないことが示されました。

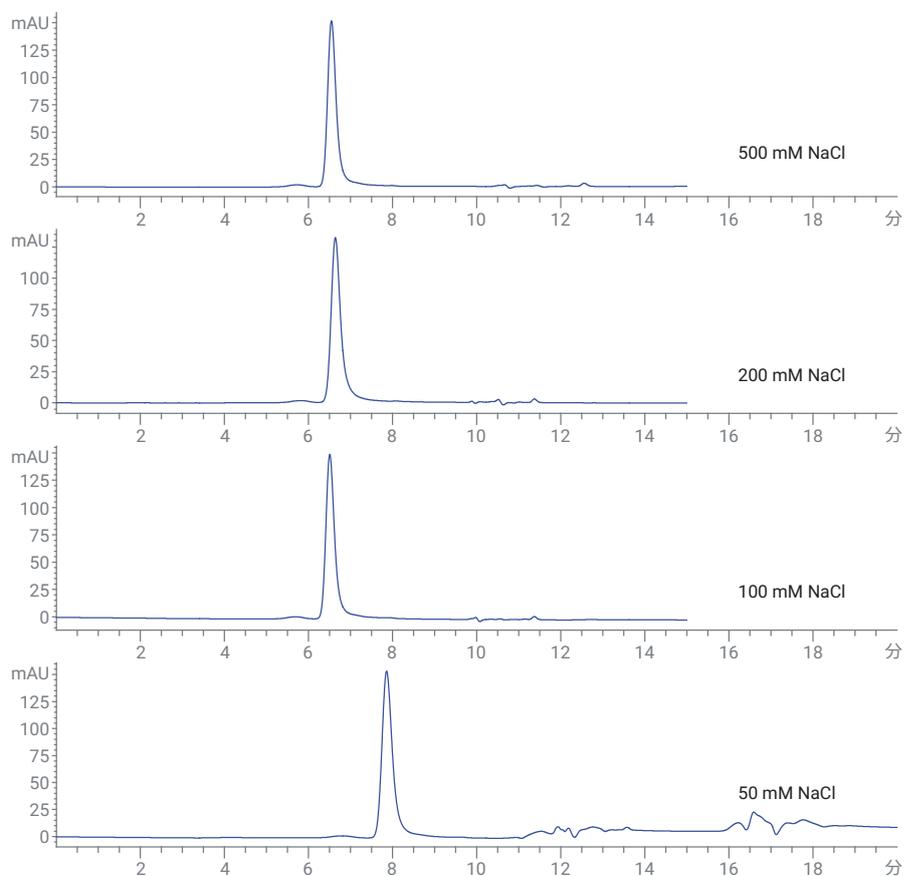


図 6. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対する ADC のクロマトグラム

インスリンのピークは塩濃度 500 mM で歪み、塩濃度が 200 から 50 mM でより適切なピーク形状が示されました (図 7)。NaCl をリン酸緩衝液に添加してもピーク形状は向上しないため、NaCl の 150 mM リン酸緩衝液への添加は不要でした。

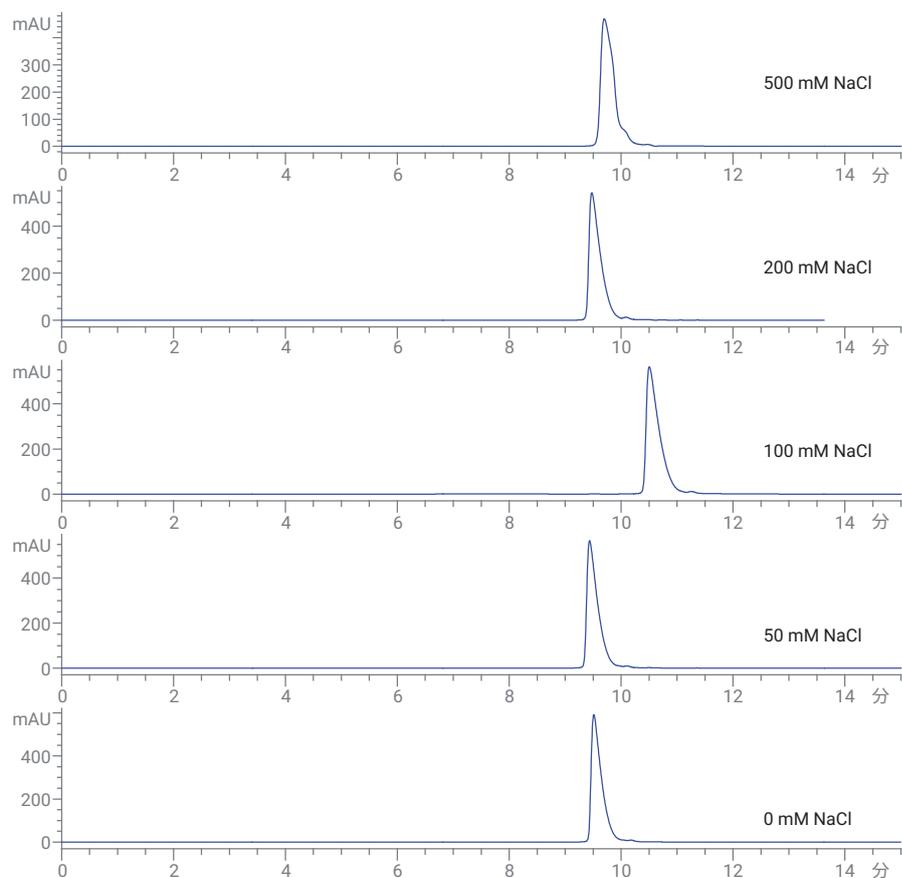


図 7. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対するインスリンのクロマトグラム

シトクローム c のピークは、NaCl 濃度が 500 から 100 mM の範囲で、形状も大きさも類似していました (図 8)。テーリングファクタは、NaCl 濃度が低くなるにしたがって大きくなり (表 4)、NaCl 濃度が 100 から 0 mM までの範囲でリテンションタイムは長くなり始め (表 6)、二次的の反応が示されました。つまり、150 mM リン酸と 150 ~ 500 mM NaCl が移動相の組成として適していることが示唆されました。

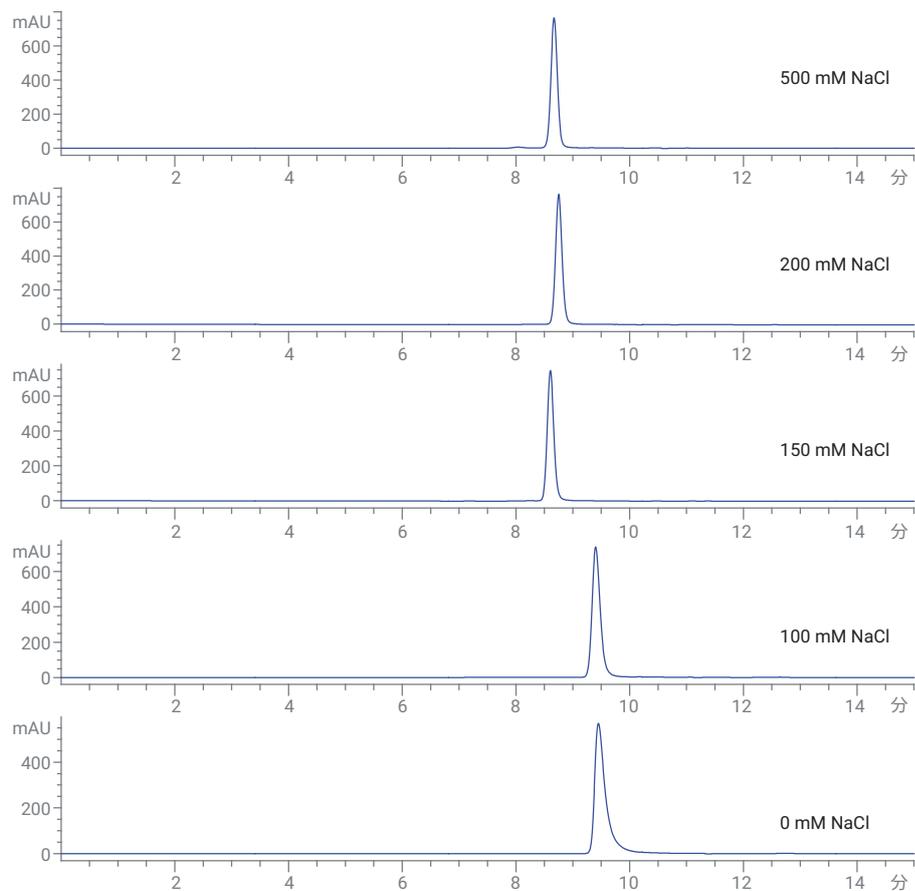


図 8. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対するシトクローム c のクロマトグラム

表 6. 150 mM リン酸緩衝液中の NaCl 濃度に対するリテンションタイム

化合物	MW (kDa)	pI	0	50	100	150	200	500
IgG	150	6.8	6.77	6.27	6.31	6.28	6.29	6.32
ADC	164	N/A	N/A	7.56	6.51	N/A	6.55	6.64
インスリン	5.7	5.3	9.52	10.29	9.43	10.51	9.48	9.7
シトクローム c	12.3	9.3	9.4	8.72	9.4	8.61	8.75	8.67

### 直列接続したカラム: カラム長

カラム長は、分離能とスループットのニーズを基に決める必要があります。図9は、AdvanceBio SEC 300 Å カラムの長さを変えた場合の Bio-Rad ゲルろ過標準の分離を示しています。使用した AdvanceBio SEC 300 Å カラムは、7.8 × 150 mm、7.8 × 300 mm、2本を直列接続した 7.8 × 300 mm カラムです。カラム長が長くなると分離度が向上し、分析時間も長くなり、システム圧力も高くなります。

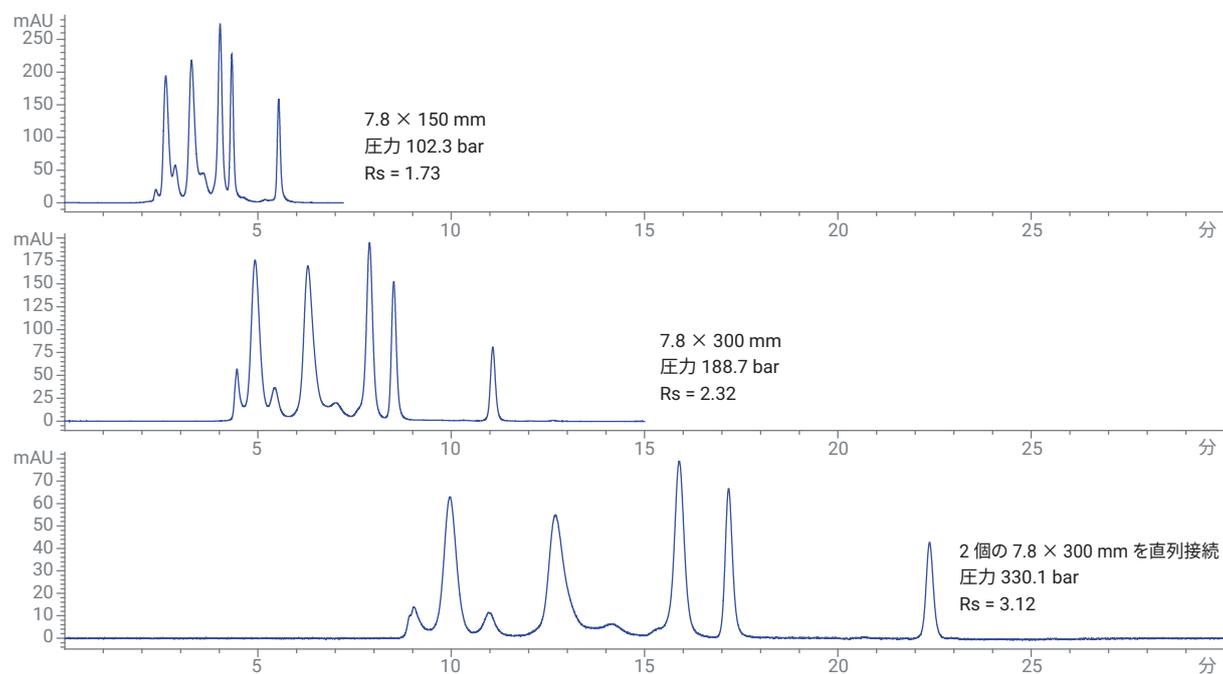


図9. 異なるカラム長の AdvanceBio SEC 300 Å カラムを用いた Bio-Rad ゲルろ過標準の分離

### 直列接続したカラム: ポアサイズ

また、AdvanceBio SEC 130 Å カラムと AdvanceBio SEC 300 Å カラムを個々に使用した場合、そして直列接続した場合で Bio-Rad ゲルろ過スタンダードを分離しました。オボアルブミンとミオグロビン間の分離能は、カラムを直列接続して使用すると向上しました (図 10)。これはおそらくカラム長全体が長くなったためです。各タンパク質に対してポアが

小さすぎるため、このスタンダード中の最も大きなタンパク質は、130 Å カラムで排除されます。ウシ血清に由来する IgG とミオグロビンについても 130 および 300 Å AdvanceBio SEC カラムを個々に使用した場合、そして直列接続した場合で分析しました。より分子量の大きい IgG (150 kDa) とそのダイマーは AdvanceBio SEC 130 Å では分離されず、AdvanceBio SEC 300 Å で分離されました。

2 個のカラムを直列に接続してサンプルを分析した場合も、モノマーとダイマーの間の分離は向上しませんでした (図 11)。

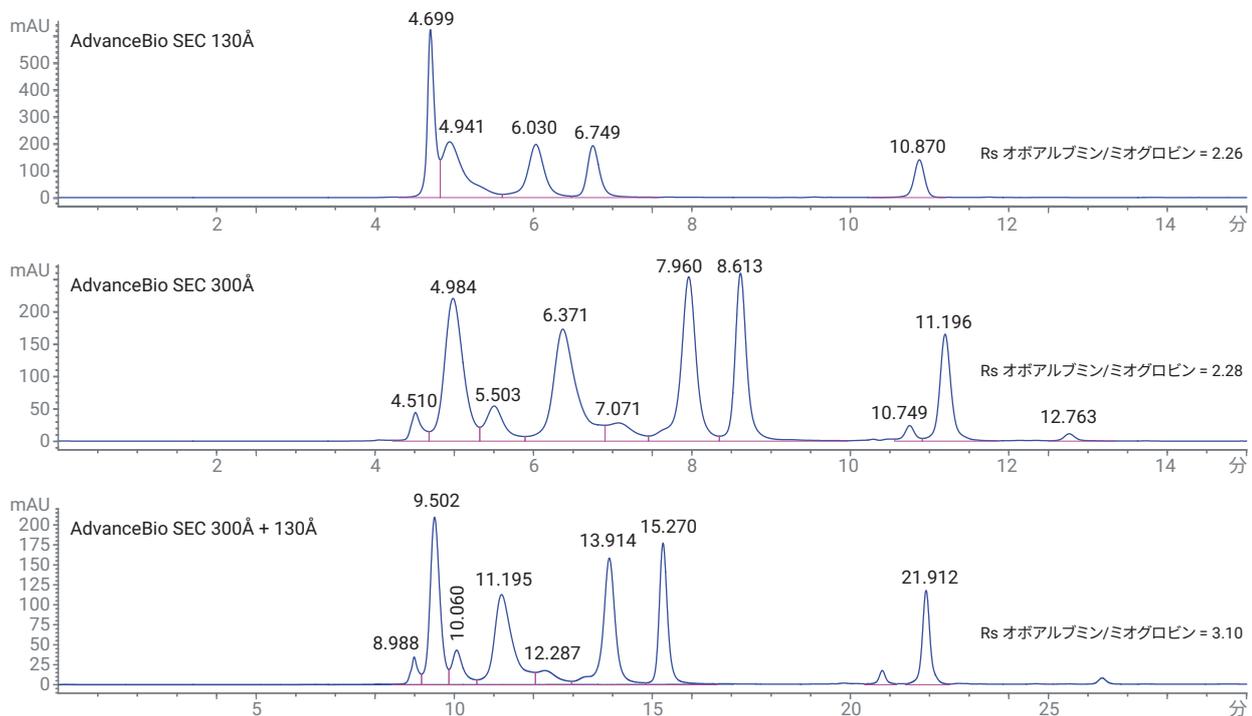


図 10. 130 Å と 300 Å カラムを個別に使用した場合、および直列接続で使用した場合の Bio-Rad ゲルろ過スタンダードの分離

より小さなミオグロビン分子は、カラムを個々に使用した場合に両方で分離し、カラムを直列接続して使用してサンプルを分析した場合に分離度が向上しました (図 12)。しかしこの向上は、カラム長が長くなったことに起因する

ものと考えられます。最後の一連の実験では、AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムを個々に使用した場合、そして直列接続したものを使用した場合で、多糖類を分析しました。より大きな多糖類では、2 個のカラムを

直列接続した場合にのみ分離がみられました (図 13)。

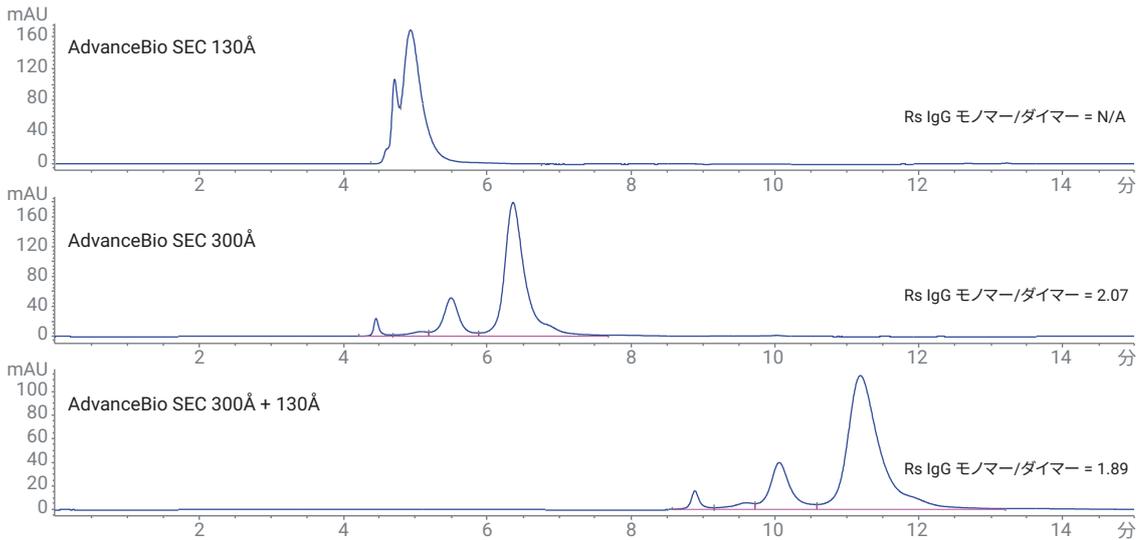


図 11. 130 Å と 300 Å カラムを個別に使用した場合、および直列接続で使用した場合のウシ血清由来の IgG の分離

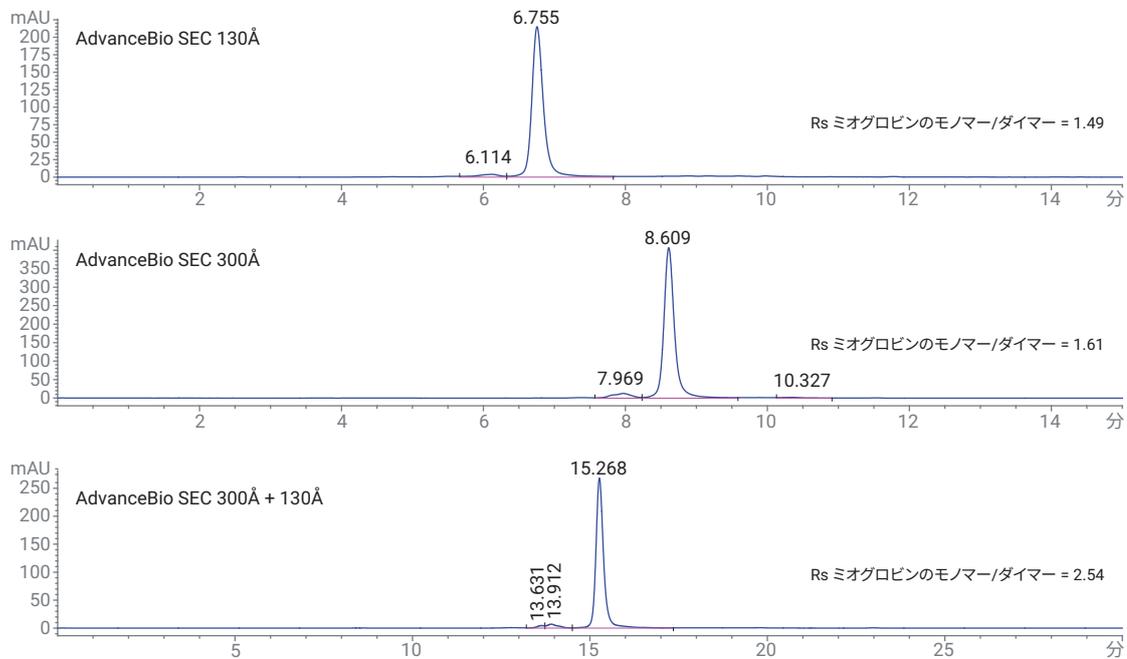


図 12. 130 Å と 300 Å カラムを個別に使用した場合、および直列接続で使用した場合のミオグロビンの分離

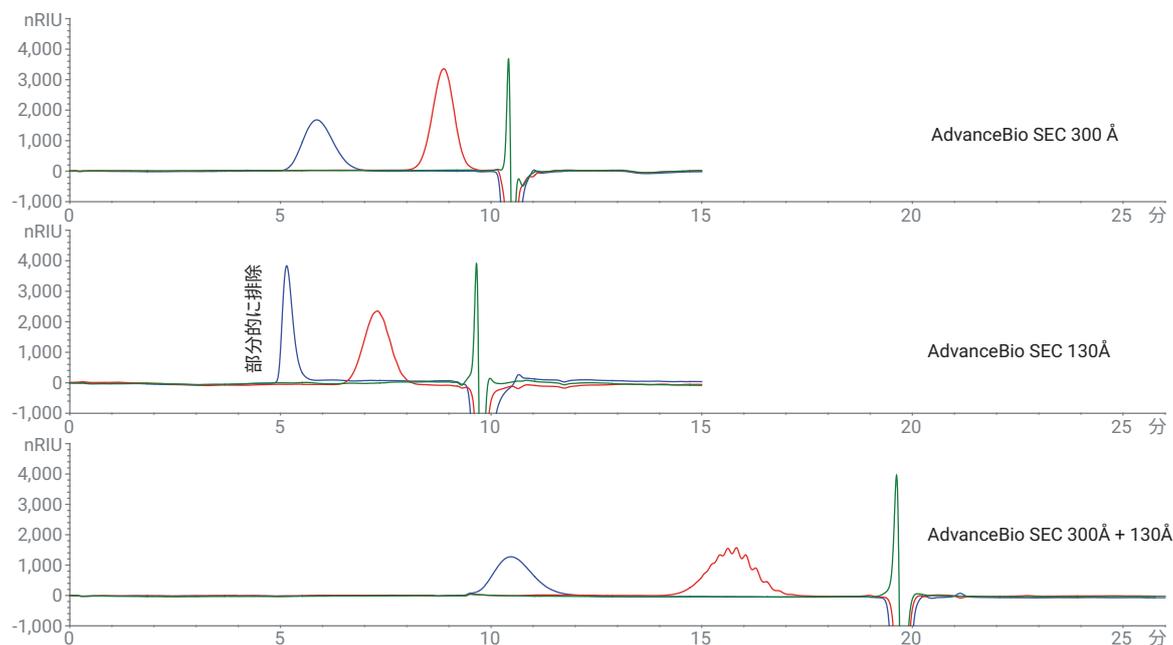


図 13. 300 Å と 130 Å カラムを個別に使用した場合、および直列接続で使用した場合に分離された多糖類サンプル

## 結論

タンパク質とカラム間の二次的反応により、ピークテーリング、ピーク形状の歪み、サンプル回収率の不良、分離能の低下が発生することがあります。これを効果的に最小化するためのメソッド開発において、移動相の最適化は基本的かつ重要な要素です。また、誤った結果を招くタンパク質の凝集を最小限に抑えられます。緩衝液の選択についても、必要な緩衝液の最小量を使用し、必要な場合のみ NaCl を添加する必要があります。これにより、腐食、摩耗、摩滅のリスクを低減し、カラムを長期にわたって使用できます。AdvanceBio SEC カラムを最適化されたメソッドで使用することが、バイオ医薬品業界の重要な品質特性であるモノマー、ダイマー、凝集体の特性評価に不可欠です。

## 参考文献

1. Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs* **2015**, 7(1), 9-14.
2. Lagassé, H. A. D.; et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development, *F1000Res* **2017**, 6, 113.
3. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates, *J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol.* **2012**, 35(20), 2923-2950.
4. Aggregation of Monoclonal Antibody Products: Formation and Removal, *BioPharm International* **2013**, Mar 1, 26(3).
5. ADC Targets Fail Because of Aggregation Problems, *Pharmaceutical Technology Editors, PharmTech* **2017**, Nov 14.

6. Yu, C. M.; Mun, S.; Wang, N. H. Phenomena of insulin peak fronting in size exclusion chromatography and strategies to reduce fronting, *J. Chrom. A* **2008**, 1192(1), 121-129.

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

**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。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2018  
Printed in Japan, August 7, 2018  
5994-0154JAJP