

ジオール結合相からポリマーコーティングシリカへの SEC メソッドの移管

著者

Richard Hurteau
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムには、低吸着ポリマーコーティングシリカ固定相のきわめて均一な 2.7 μm 粒子が充填されています。これらのカラムは、非特異的な相互作用を最小限に抑えた効率的なサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分離を実現します。ジオール結合相に基づく従来の Agilent ZORBAX GF-250 および GF-450 カラムを AdvanceBio SEC カラムに置き換えることにより、より優れた分析結果を得ることができます。これらのカラム技術を検証するために、一連の実験を実施しました。

はじめに

SEC は、モノクローナル抗体 (mAb) 医薬品およびその他の治療用タンパク質中に存在する凝集体量を測定するための標準的分析法と見なされています¹。mAb 医薬品、治療用タンパク質、およびペプチドは多くの疾患および病状の治療に用いられていますが^{2, 3}、その製造および保管の過程で形成されるタンパク質凝集体は、医薬品の効能や安全性に悪影響を及ぼし、薬剤障害を引き起こすおそれもあります^{4, 5}。アジレントは、SEC 用カラムとして、ジオール結合相カラムおよびシリカベースのポリマーコーティングカラムを提供しています。

このアプリケーションノートでは、従来の 2 種類のジオール結合相カラム Agilent ZORBAX GF-250 および ZORBAX GF-450 のメソッドを最適化しました。メソッドの最適化は、新しいシリカベースのポリマーコーティングカラムである Agilent AdvanceBio SEC 130 Å および AdvanceBio SEC 300 Å についても行いました。メソッドの最適化時には、AdvanceBio SEC 300 Å および 130 Å 標準試薬 (表 1 ~ 2) とウシ膵臓由来インスリン (分子量 5.7 kDa) の 3 種類をサンプルとして使用しました。AdvanceBio SEC 標準試薬では、多様なサイズのタンパク質に対するカラムの分離能がわかります。また、インスリン標準試薬は、ZORBAX GF-250 カラムから AdvanceBio 130 Å カラムへのメソッド移管の評価例として用いました。

材料

- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å 標準試薬 (p/n 5190-9417)
- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å 標準試薬 (p/n 5190-9416)
- ウシ膵臓由来インスリン、Sigma 社、I6634
- 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/白シリコンセプタム、100 個、キャップサイズ: 12 mm (p/n 5190-7021)

表 1. AdvanceBio SEC 300 Å 標準試薬

化合物	分子量
1.チログロブリン	670 kDa
2.Y-グロブリン	150 kDa
3.オプアルブミン	45 kDa
4.ミオグロビン	17 kDa
5.アンジオテンシン II	1 kDa

表 2. AdvanceBio SEC 130 Å 標準試薬

化合物	分子量
1.オプアルブミン	45 kDa
2.ミオグロビン	17 kDa
3.アプロチニン	6.7 kDa
4.ニューロテンシン	1.7 kDa
5.アンジオテンシン II	1 kDa

カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm、300 Å (p/n PL1180-5301)
- Agilent AdvanceBio SEC 130 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm、130 Å (p/n PL1180-5350)
- Agilent ZORBAX GF-250、9.4 × 250 mm、4 μm、150 Å (p/n 884973-901)
- Agilent ZORBAX GF-450、9.4 × 250 mm、6 μm、300 Å (p/n 884973-902)

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プリング (G5667A)
- 1200 ALS/フラクションコレクタ用 Agilent サーマスタット (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity サーマスタット付カラムコンパートメント (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity DAD (G1315C)

分析条件

緩衝液の流量を 1 および 1.2 mL/min に指定、カラム温度 25 °C、冷却器設定温度 4 °C、波長 220 nm

結果と考察

メソッドの最適化

カラムの移動相条件を最適化するために、移動相のテストを行いました。最初に、50、100、150、200、400、および 600 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0、NaCl 無添加) を使用して分析を行いました。次に、リン酸緩衝液をリン酸塩濃度 150 mM、pH 7.0 に保ち、NaCl 塩濃度を 50、100、150、200、および 500 mM に変化させました。AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムでの分析時には、流量を 1.0 mL/min に維持しました。ZORBAX GF-250 および GF-450 カラムについては、流量を 1.2 mL/min に維持しました (カラム寸法が異なるため、線速度が同じになるように流量を換算)。最適な条件を判断する際は、標準試薬のピーク間の分離度と分解能が最大になること、ピークに歪みやショルダーがないこと、リテンションタイムがシフトしないこと、サンプル、移動相、およびカラム間の二次相互作用によるテーリングファクタが最小になることを基準としました。

最適化されたメソッドによる標準試薬の評価

AdvanceBio SEC 300 Å 標準試薬を使用した 4 種類のカラムの性能評価には、次のパラメータを使用しました。

- 標準試薬の全体的なクロマトグラフィー
- IgG の単量体と二量体の分離度
- アンジオテンシン II のピークのテーリングファクタ
- リテンションタイムがシフトしないこと

ポアサイズの比較的大きいカラムに適している AdvanceBio SEC 300 Å 標準混合試薬の分離では、AdvanceBio SEC 300 Å カラムにおいて、他の 3 種類のカラムよりも良好な結果が得られました。AdvanceBio SEC 300 Å カラムでは、標準試薬の 5 つのピークがすべてベース

ライン分離され、IgG の単量体と二量体の分離度が最も高く、アンジオテンシン II のピークのテーリングファクタが最も低くなりました (表 4、図 1A–1D)。

表 4. 最適な移動相による各カラムの分解能

カラム	最適な移動相	IgG 単量体/二量体の分離度	アンジオテンシン II の TF
AdvanceBio SEC 300 Å	150 mM リン酸緩衝液	1.83	1.07
AdvanceBio SEC 130 Å	N/A	N/A	N/A
ZORBAX GF-250	150 mM リン酸緩衝液	0.91	1.61
ZORBAX GF-450	200 mM リン酸緩衝液	0.97	1.92

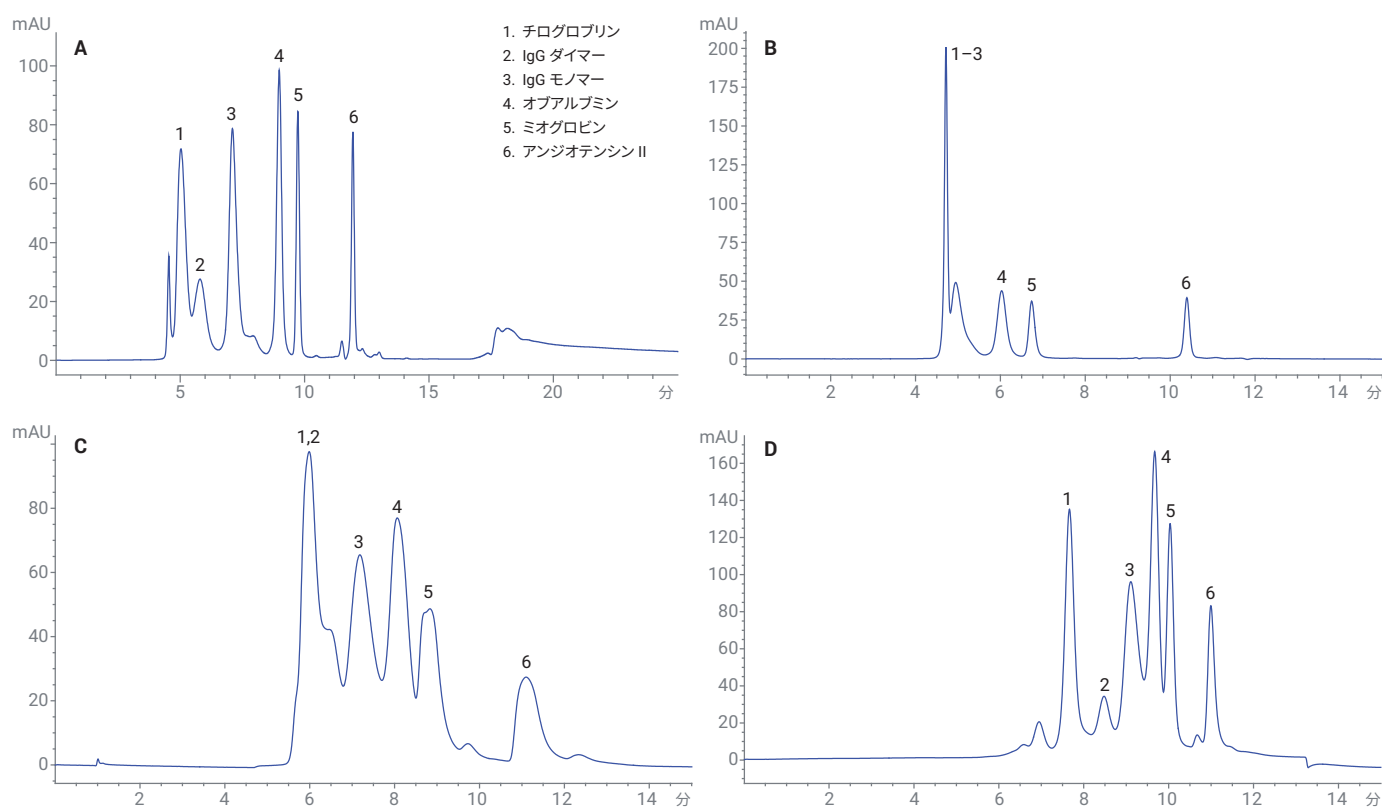


図 1. 4 種類のカラムでそれぞれに最適な移動相 (表 4) を使用して AdvanceBio SEC 300 Å 標準試薬を分析した結果。

A) AdvanceBio SEC 300 Å、B) AdvanceBio SEC 130 Å、C) ZORBAX GF-250、D) ZORBAX GF-450。

AdvanceBio SEC 300 Å カラムと同じポアサイズを持ち、結合相の異なる ZORBAX GF-450 カラムでは、5 つのピークすべてをベースライン分離することはできませんでした。また、IgG の単量体と二量体の分離度は AdvanceBio SEC 300 Å カラムよりも低い値となりました (表 4、図 1D)。

より小さいポアサイズの AdvanceBio SEC 130 Å カラムでは、どの移動相条件下でも、AdvanceBio SEC 300 Å 標準試薬に含まれる最大の化合物 3 種を分離できませんでした (図 1B)。また、ポアサイズの小さい ZORBAX GF-250 カラムでは、IgG の単量体と二量体の分離度が低く、アンジオテンシン II のピークのテーリングファクタが高い値になりました (図 1C、表 4)。

AdvanceBio SEC 130 Å 標準試薬

AdvanceBio SEC 130 Å 標準試薬を使用した 4 種類のカラムの分解能の評価には、次の基準を使用しました。

- 標準試薬の全体的なクロマトグラフィー
- オブアルブミンとミオグロビンのピークの見分度
- アンジオテンシン II のピークのテーリングファクタ
- リテンションタイムがシフトしないこと

AdvanceBio 130 Å タンパク質標準試薬の 5 つのピークをすべてベースライン分離できたのは、AdvanceBio SEC 130 Å カラムのみでした (図 2A–2D)。また、4 種類のカラムのうちアンジオテンシン II のテーリングファクタが最小だったのも AdvanceBio SEC 130 Å カラムでした (表 5)。オブアルブミンとミオグロビンのピークの見分度は、AdvanceBio SEC 300 Å の方が高い値になりましたが、このカラムでは標準試薬の最後の 2 つのピークを分離できませんでした (表 5、図 2A)。すなわち、AdvanceBio SEC 130 Å カラムを使用したクロマトグラフィーは、AdvanceBio SEC 300 Å カラムよりも良好な結果となりました。AdvanceBio 130 Å タンパク質標準試薬がポアサイズの小さい AdvanceBio SEC 130 Å カラムに適していることを踏まえると、これは予測どおりの結果でした。

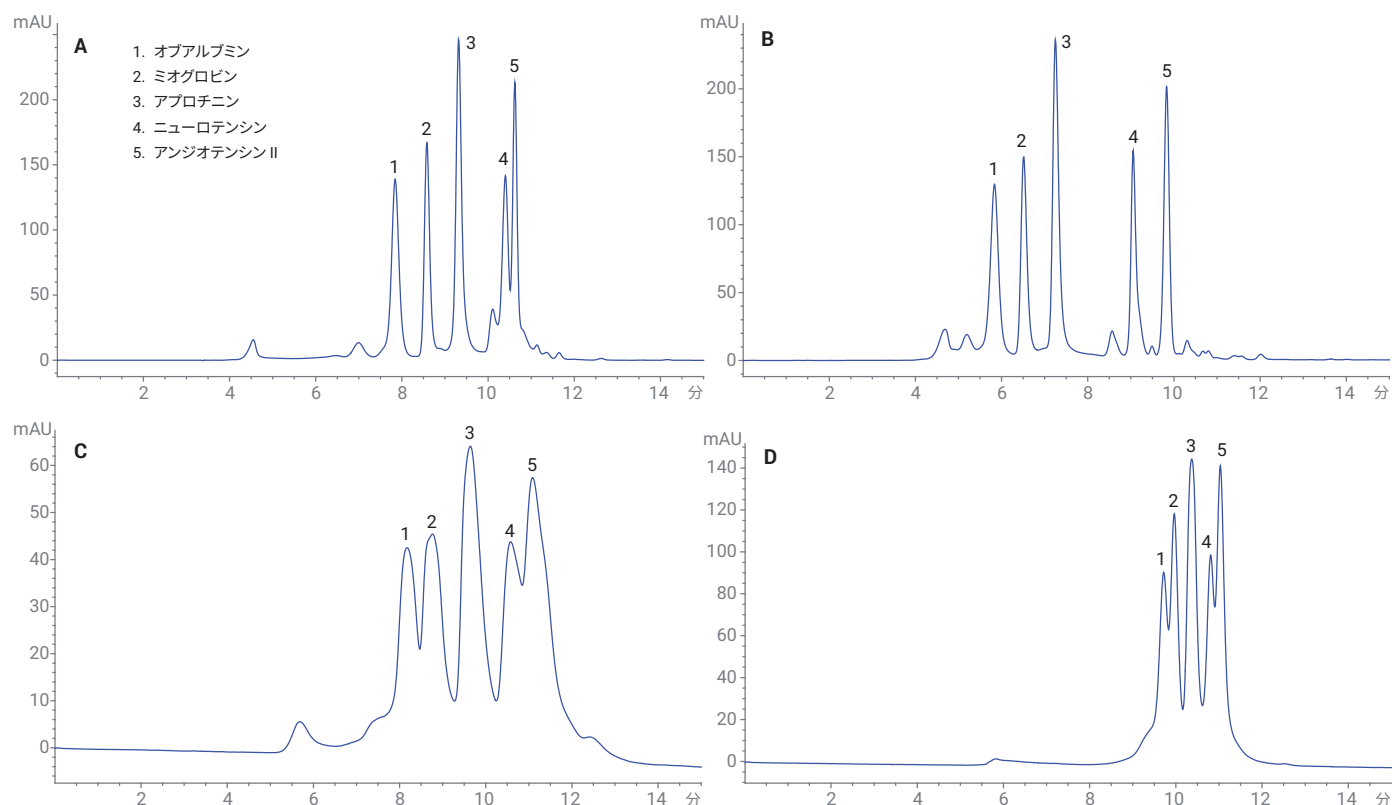


図 2. 4 種類のカラムでそれぞれに最適な移動相 (表 5) を使用して AdvanceBio SEC 130 Å 標準試薬を分析した結果。

A) AdvanceBio SEC 300 Å、B) AdvanceBio SEC 130 Å、C) ZORBAX GF-250、D) ZORBAX GF-450

ZORBAX GF-250 カラムは、最初の 2 つのピークの分離度が AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムよりも大幅に低く、アンジオテンシン II のピークのテーリングファクタが高くなりました。この分解能の低下は、ZORBAX GF-250 のポアサイズが AdvanceBio 130 Å カラムと同等であるにもかかわらず起こりました (表 5)。また、ZORBAX GF-250 カラムでは、標準混合試薬を分離するために、より高濃度のリン酸緩衝液が必要でした (表 5)。ZORBAX GF-450 カラムについては、GF-250 カラムとポアサイズの違いはあるものの、GF-250 カラムと同様の分解能を示しました (表 5)。

AdvanceBio 130 Å および 300 Å カラム (2.7 μm) の粒子サイズが ZORBAX GF-250 (4 μm) および GF-450 (6 μm) カラムより小さいことも、各標準試薬に対してより高い分解能が得られた要因です。AdvanceBio カラムの背圧は、ZORBAX GF-250 および GF-450 カラムよりも平均 100 bar 程度高くなります。それでも AdvanceBio SEC カラムは背圧が約 180 bar を下回っており、一般的な HPLC システムにも十分対応することができます。

インスリン標準試薬

このアプリケーションノートでは、カラム比較用の最後の標準試薬としてウシ膵臓由来インスリンを使用しました。インスリンの分子量が 5.7 kDa であることから、この標準試薬に最適なカラムの判断には、AdvanceBio SEC 130 Å カラムと ZORBAX GF-250 (ポアサイズ 150 Å) カラムを選択しました。ZORBAX GF-250 カラムで生成されたクロマトグラムには、テストしたどの移動相でもピーク形状に歪みが生じました。一方、AdvanceBio SEC 130 Å カラムで生成されたクロマトグラムには、歪みは認められませんでした。このことから、インスリン標準試薬には、AdvanceBio SEC 130 Å カラムの方が適していると言えます (図 3A および 3B、表 6)。

表 5. より高濃度の移動相による各カラムの分解能

カラム	最適な移動相	IgG 単量体/二量体の分離度	アンジオテンシン II の TF
AdvanceBio SEC 300 Å	150 mM リン酸緩衝液、 150 mM NaCl	2.67	1.29
AdvanceBio SEC 130 Å	100 mM リン酸緩衝液	2.29	0.86
ZORBAX GF-250	600 mM リン酸緩衝液	0.59	3.03
ZORBAX GF-450	600 mM リン酸緩衝液	0.62	2.46

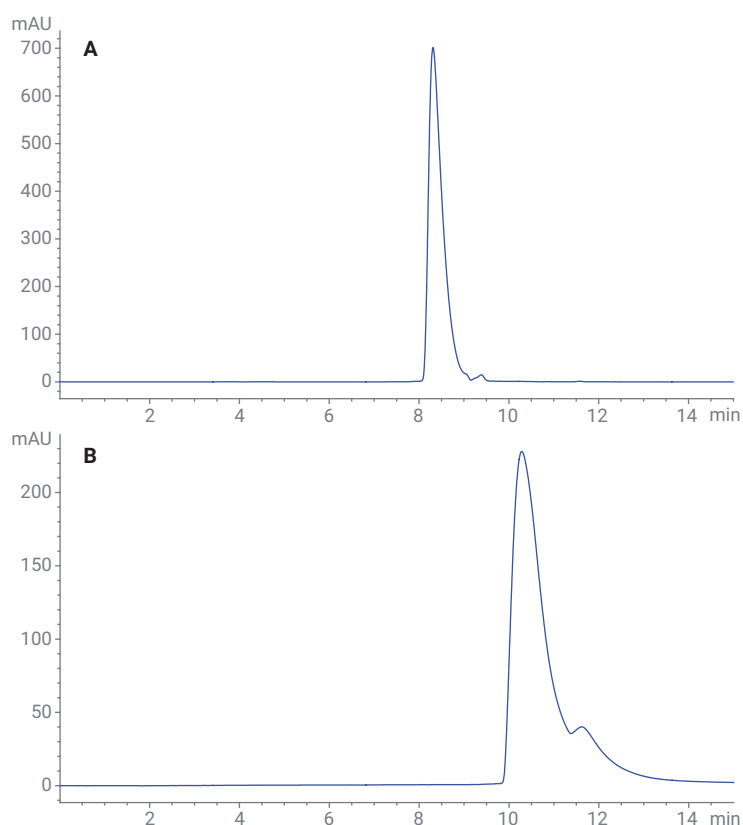


図 3. 2 種類のナローポア SEC カラムでそれぞれに最適な移動相 (表 5) を使用してインスリン標準試薬を分析した結果。A) AdvanceBio SEC 130 Å、B) ZORBAX GF-250

表 6. インスリンのピーク形状の最適化を目的としたカラムの比較

カラム	最適な移動相	インスリンの RT	インスリンの TF
AdvanceBio SEC 130 Å	200 mM リン酸緩衝液	8.54	1.74
ZORBAX GF-250	200 mM リン酸緩衝液	ピーク	ピークにショルダーが発生

結論

AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムには、低吸着のポリマーコーティングシリカ固定相を使用した粒子技術が採用されています。これらの AdvanceBio SEC カラムにより、幅広いタンパク質およびペプチド標準物質をカバーした AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å 標準試薬に対し、ZORBAX GF-250 および GF-450 カラムよりも優れたクロマトグラフィーが実現されました。また、AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å カラムでは、20 % 低い流量で 3 種類のすべての標準試薬がより短時間で溶出しました。この溶出時間の短縮は、移動相の調製および廃棄に要する時間の短縮と、移動相の調製に必要な物質の低減につながります。さらに、この労力の軽減とコストの削減がラボの生産性向上にもつながります。こういった成果は、低吸着のポリマーコーティングシリカ固定相に基づく粒子技術へメソッドを移管して性能を高めることが、価値のある投資であることをさらに裏付けています。

参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **2012**, 35(20), 2923–2950.
2. H. A. Daniel Lagassé, *et al.* Recent advances in (therapeutic protein) drug development, *F1000 Research* **2017**, February 7.
3. Lau, J. L.; Dunn, M. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1 June **2018**, 26(10), 2700–2707.
4. Aggregation of Monoclonal Antibody Products: Formation and Removal, *BioPharm International* March 1 **2013**, 26(3).
5. ADC Targets Fail Because of Aggregation Problems, Pharmaceutical Technology Editors, *PharmTech* 2017, November 14, **2017**.

ホームページ

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. 2019

Printed in Japan, February 13, 2019

5994-0625JAJP