

モノクローナル抗体および抗体薬複合体の サイズ排除クロマトグラフィー分析

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm カラム

著者

Veronica Qin,
Agilent Technologies, Inc.

概要

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、生物製剤用タンパク質中のサイズ変異体の特性解析に使用される一般的な手法です。このアプリケーションノートでは、異なるメーカーの 2 μm およびサブ 2 μm の SEC カラムを使用して、モノクローナル抗体 (mAb) と抗体薬複合体 (ADC) の SEC 分析を比較します。Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm カラムには、mAb と ADC の高分離能分離を実現する独自の利点があります。

はじめに

生物製剤用タンパク質の高分子量 (HMW) 凝集体と低分子量 (LMW) フラグメントは、さまざまなストレス条件によって誘発され、医薬品の開発、保管、出荷、配達のプロセス中に形成されることがあります。これらのサイズ変異体は、十分な特性解析が必要となる重要品質特性 (CQA) です。免疫原性反応、薬物動態や効能における相違は、医薬品に含まれるこれらの種の存在が原因となって生じる場合があります^{1, 2}。SEC は mAb や ADC からサイズ変異体を分析するための標準的手法です。しかし、ADC の SEC 分析は、疎水性ペイロードの存在のために困難が伴います。こういった特性は、カラムの固定相との間で望ましくない二次的相互作用の原因となる可能性があります。このアプリケーションノートでは、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムと、他社の主な SEC カラム 2 種 (いずれも粒径が 2 µm またはサブ 2 µm) を用いた mAb と ADC の SEC 分析について解説します。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラム特有の結合相は、他社製カラムと比べて mAb と ADC の分析に適した性能を有しています。これにより、優れたピーク形状、分離能、二次的相互作用の低減が実現します。

実験方法

試薬、サンプル、材料

SILu Lite SigmaMAb 汎用抗体標準と SigmaMAb ADC Mimic は MilliporeSigma 社から購入し、水で 1 mg/mL に再溶解しました。一塩基性および二塩基性のリン酸水素ナトリウムと塩化ナトリウムは MilliporeSigma 社から購入しました。化学物質はすべて 99.5 % 以上の純度のものを使用しました。水は、Milli-Q A10 純水生成装置 (Millipore) で精製しました。溶液は毎日新しく調整し、使用前に 0.22 µm メンブランフィルターでろ過しました。

装置構成

LC システム

Agilent 1260 Infinity LC を次の構成で使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートクォータリポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却器 (オプション #100) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション #019) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器 (G7114A)

カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm (4.6 × 300 mm、1.9 µm、200 Å)
- A 社 (4.6 × 300 mm、1.7 µm、200 Å)
- B 社 (4.6 × 300 mm、2.0 µm、250 Å)

ソフトウェア

Agilent OpenLab 2.2 CDS

パラメータ	1260 Infinity II LC
カラム温度	25 °C
移動相	50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0
流量	0.35 mL/min
注入量	1 ~ 2 µL
検出	UV、220 nm

結果と考察

図 1 に、IgG1 mAb (SigmaMAB) サンプル (F(ab')₂ と Fc フラグメントとの混合) の分離を比較した SEC クロマトグラムを示しています。表 1 から分かるように、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムは、単量体と低分子量種について、カラム A とカラム B よりもシャープなピーク形状を示します。二量体/単量体と単量体/LMW1 はいずれも、他社製カラム 2 種よりも AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm でも適切に分離できます。3 つのカラムの中で、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムが、mAb 単量体からの HMW 種と LMW 種の分離に最も適した性能を発揮しています。このカラムは、最も狭いピーク幅、最高の分離能、そしてカラム A よりも低い背圧を示しています。カラム B は、粒径がわずかに大きいので背圧は最も低くなりますが、性能が劣っています。

図 2 は、各メーカーの寸法が同じ (4.6 × 300 mm) SEC カラム 3 種を使用した ADC (SigmaMAB ADC) の SEC クロマトグラムを比較したものです。カラム A は、ピーク幅が広く、ピークは 2 個以上に割れており、疎水性ペイロードとカラムの固定相との二次相互作用を示しています。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムはカラム B よりもピーク形状がシャープです。さらに、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムでは LMW フラグメントのピーク (赤の円内) を適切に分離できます (Rs = 2.55)。比較すると、カラム A ではピークをまったく分離できず、カラム B では部分的にのみピークを分離できます。これらの結果は、ADC 分析における AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムの優れた性能を実証しています。

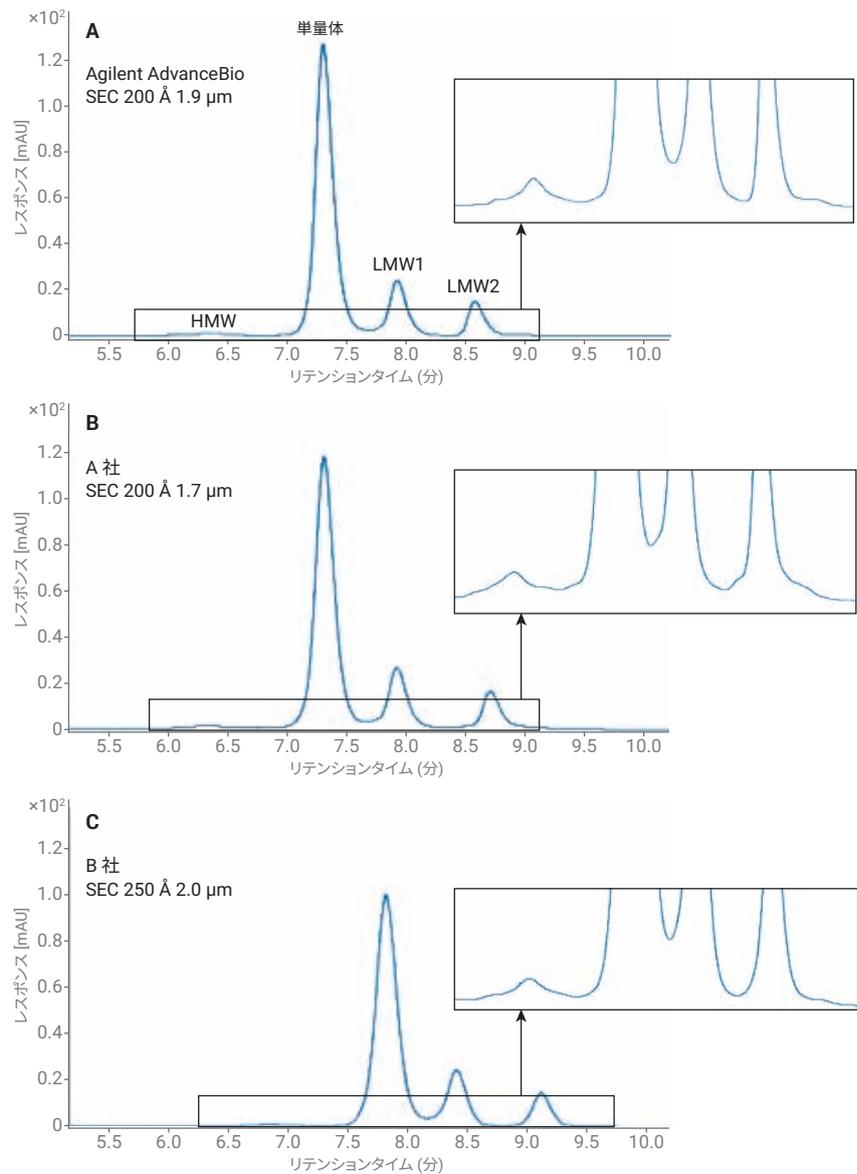


図 1. 4.6 × 300 mm SEC カラムと、50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0、0.35 mL/min で分析した、SigmaMAB (F(ab')₂ と Fc フラグメントとの混合) のサイズ排除クロマトグラム

表 1. 3 つの SEC カラムのピークの幅、分離能、背圧の比較

カラム	半値幅			分離能		背圧 (bar)
	単量体	LMW1	LMW2	二量体/ 単量体	単量体/ LWM1	
Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm	0.159	0.154	0.148	2.79	2.28	340
A 社の SEC 200 Å 1.7 µm	0.172	0.166	0.160	2.46	2.09	354
B 社の SEC 250 Å 2.0 µm	0.194	0.182	0.169	2.49	1.83	260

結論

今回の研究では、mAb と ADC の分析において、HMW および LMW のサイズ変異体のピーク形状と分離の観点から、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラム、他社製の 2 µm カラム、サブ 2 µm カラムの 3 つのカラムを比較しました。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムは mAb の分析において、HWM および LMW 種について他社製カラムより優れたピーク形状と分離能を示します。ADC のような疎水性が高いサンプルの場合、AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムには明確な利点があります。望ましくない二次相互作用が大幅に低減され、シャープで左右対称なピーク、十分に分離された LMW フラグメントピークを得ることができます。対照的に、他社の 2 つのカラムでは深刻な非特異性結合が問題となり、ピークが割れ、ピークの幅が広がり、LMW ピークを分離することができません。

参考文献

1. Rosenberg, A. S. Effects of Protein Aggregates: an Immunologic Perspective. *AAPS J* **2006**, 8(3), E501-507.
2. De Groot, A. S.; Scott, D. W. Immunogenicity of Protein Therapeutics. *Trends Immunol.* **2007**, 28(11), 482-490.

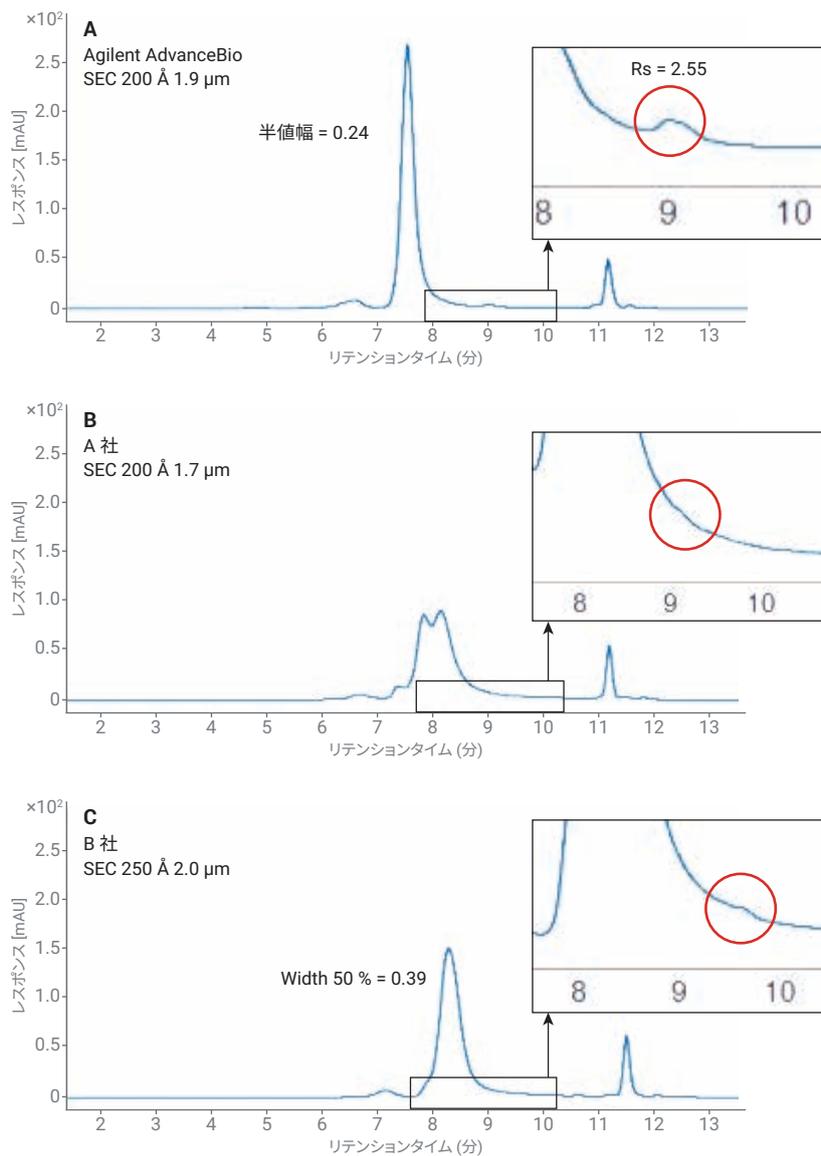


図 2. 4.6 × 300 mm SEC カラムと 50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0、0.35 mL/min で分析した、SigmaMAB ADC のサイズ排除クロマトグラム

ホームページ

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

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, April 8, 2019
5994-0827JAJP