

治療用小型タンパク質の 高分離サイズ排除クロマトグラフィー分析

著者

Sandeep Kondaveeti,
Te-Wei Chu, and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

凝集などのタンパク質変性プロセスは、安定したタンパク質製剤の開発を妨げる要因の 1 つです。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) HPLC を用いた製剤用タンパク質の純度と凝集体の測定は、比較的シンプルな手法です。SEC メソッドを定期的にキャリブレーションすることで、再現性が高まり、精度が向上して、サンプルやバッチに関する潜在的な問題の早期発見が可能になります。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm カラムを、サブ 2 µm 粒子技術を用いた他社製カラムと比較します。遺伝子組み換えヒト成長ホルモン (hGH)、顆粒球コロニー刺激因子 (hG-CSF)、インターフェロン α-2b (INF α-2b) タンパク質の分析により、小型タンパク質の治療アプリケーションにおける AdvanceBio カラムの優れた性能を実証します。

はじめに

近年、生物製剤として知られる生物由来の治療薬の開発が大きく進んでおり、非常に多くの病気の治療に用いられています。一部の生物製剤には、成長因子やサイトカインなどの小型タンパク質治療薬が含まれています。これらには、血液、筋肉、骨の細胞の生成、成熟、活性を調節するという重要な役割があるためです。例えば、ヒト成長ホルモン (hGH) は、ホルモン欠乏症を原因とする緩慢成長または成長遅延を示す子どもや大人の成長を促すために使用されています¹。顆粒球コロニー刺激因子 (hG-CSF) は、化学療法を受けるがん患者の治療に使用され、細胞傷害性の治療薬によって減少した白血球細胞レベルの増大を促進します²。インターフェロンは糖タンパク質の 1 つで、複数の治療用途がありますが、部分的に折り畳まれていない種を形成したり、特に pH や熱の劣化にさらされる場合は凝集したりすることが知られています³。

凝集などのタンパク質の変性プロセスは、安定したタンパク質製剤の開発を妨げる主要な要因の 1 つです。米国薬局方のモノグラフメソッドでは、これらのタンパク質の純度と凝集体の測定に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) HPLC が推奨されています。SEC は比較的シンプルな手法です。SEC は、固定相のポア構造への単純拡散を利用します。より大きい分子は粒子に浸透できず最初に溶出しますが、より小さい分子はポア中に容易に拡散して、後から溶出します。Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm カラムは、生体分子の水性サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用に設計されています。粒子は独自の技術を用いて製造されており、より小さいタンパク質やペプチドなどの分子を分離できるように、最適なポアサイズとポア容量が組み合わせられています。

実験方法

試薬およびサンプル

すべての化学薬品および試薬は HPLC グレード以上のものを使用し、Sigma-Aldrich (現 Merck) または VWR Scientific から入手しました。水は、Milli-Q A10 (Millipore) を用いて精製しました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC 装置を、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンプラ (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 ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、バイオイナートフローセル (オプション #028) を搭載

ソフトウェア

OpenLab 2.2 CDS

メソッド条件

| HPLC 条件 | |
|---------|---|
| カラム | AdvanceBio SEC 1.9 µm 120 Å, 4.6 × 300 mm (p/n PL1580-5250) |
| 移動相 | 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0 |
| 流速 | 0.30 または 0.35 mL/min (文中に示すように) |
| カラム温度 | 25 °C |
| 注入量 | 2 µL, 1 mg/mL |
| サンプル | 低分子量タンパク質標準混合物 ヒト成長ホルモン, rhGH ヒト顆粒球コロニー刺激因子, rG-CSH |
| 合計分析時間 | 15 ~ 20 分 (流速による) |

結果と考察

タンパク質は、酸性、塩基性、中性、親水性などの性質を持つさまざまな側鎖官能基を含む複雑な分子です。二次的な相互作用を回避するための最適な条件を見つけることは容易ではありません。しかし、AdvanceBio SEC 製品には、シリカ粒子にポリマー表面コーティングが施され、これらの問題の多くを克服しています。分離のメカニズムは、溶液中の分子サイズ（流体力学的半径）の違いによって決まります。タンパク質構造は本質的に密集した球状であることが多く、タンパク質は極端な温度、pH、塩組成などのストレス条件下において、二量体以上の高次のユニットとして凝集していることが少なくありません。これはタンパク質分子に特有の問題です。凝集したタンパク質が存在すると、治療用分子として投与する場合に、副作用を引き起こすことがあります。SEC は、タンパク質の凝集を定量、モニタリングするための最適なツールとなります。図 1 に、低分子量のタンパク質標準とペプチド標準の SEC 分離を示します。図 2 に、リテンション時間を基にした、各標準の検量線を示します。このカラムの最適な分子範囲は 1 ~ 80 kDa になることが推定できます。

| ピーク | タンパク質/ペプチド | 分子量 (Da) |
|-----|------------|----------|
| 1 | オボアルブミン | 44,000 |
| 2 | ミオグロビン | 17,000 |
| 3 | アプロチニン | 6,700 |
| 4 | ニューロテンシン | 1,700 |
| 5 | ウリジン | 244 |

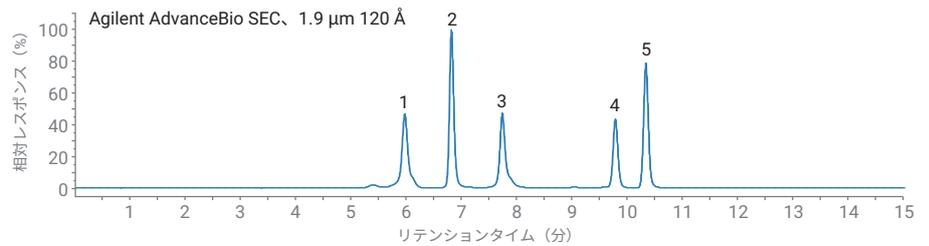


図 1. 0.35 mL/min での低分子量タンパク質とペプチド混合物のサイズ排除クロマトグラム

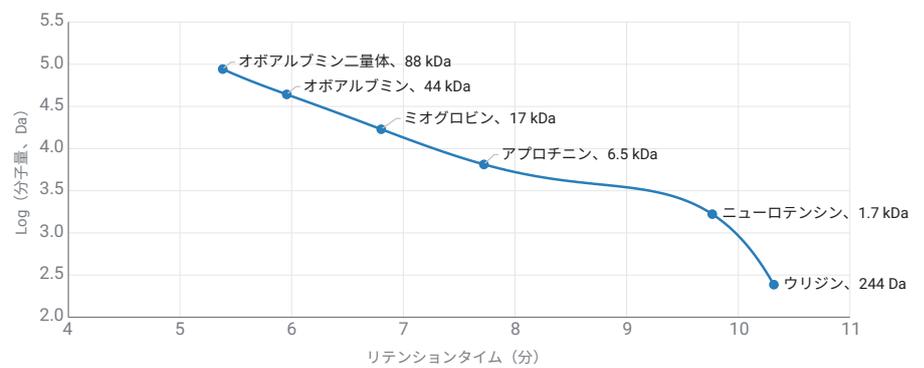


図 2. 低分子量のタンパク質標準とペプチド標準の AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å 検量線

AdvanceBio SEC カラムを用いて単量体および二量体の含有量を定量化する場合であっても、適切なタンパク質分子量標準を使用して定期的にキャリブレーションを実行することをおすすめします。定期的なキャリブレーションにより、再現性が高まり、精度の向上につながります。また、潜在的な問題の早期発見が可能となり、システムのダウンタイムやトラブルシューティングを低減できます。タンパク質の分離では、十分に特性解析された複数のタンパク質を標準として使用し、カラムの測定範囲全体を網羅できるようにする必要があります。SEC を効果的に使用するために、標準を選択する上で 2 つの重要な点があります。1 つは、分析対象物質と固定相との二次的反応を最小限に抑える必要があることです。もう 1 つは、分析対象となる分子のサイズと適合するポアサイズを選択することです。

このアプリケーションノートでは、遺伝子組み換え型 hGH および hG-CSF 治療用タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析について、サブ 2 μm 粒子技術による現行の他社のカラムと比較して Agilent AdvanceBio SEC 120 \AA 1.9 μm カラムによる高分離能分離を説明します。移動相条件をさらに最適化することによって、未分解インターフェロンおよび熱分解したインターフェオンアルファ-2b (IFN α -2b) を SEC 分離して比較しました。

目的の分析対象成分のリテンションタイムを検量線で比較することによって、二次相互作用の兆候があるかどうかを判断できます。予測よりも早くまたは遅く溶出するピークや、形状が適切でないピークは、移動相条件が十分に最適化されていない可能性を示す兆候です。図 3 に、リテンションタイムが 20 kDa 周辺のタンパク質と良好に一致する hG-CSF の AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA カラムでのサイズ排除クロマトグラムを示します。

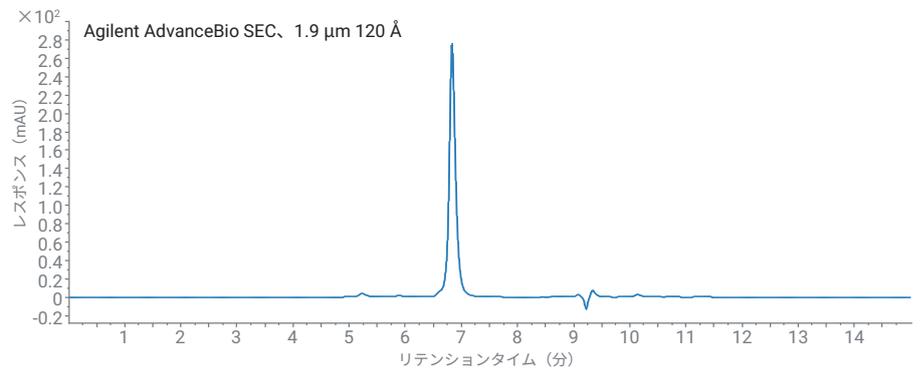


図 3. 0.35 mL/min での Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA 4.6 \times 300 mm カラムによる hG-CSF のサイズ排除クロマトグラム

図 4 に、AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA カラムと他社のサブ 2 μm カラムでの hG-CSF 分析でのベースラインの拡大図を示します。下のグラフのクロマトグラムは、二次相互反

応に関連した問題を示しています (予想よりも遅い時間に溶出し、ピークテーリングがあります)。

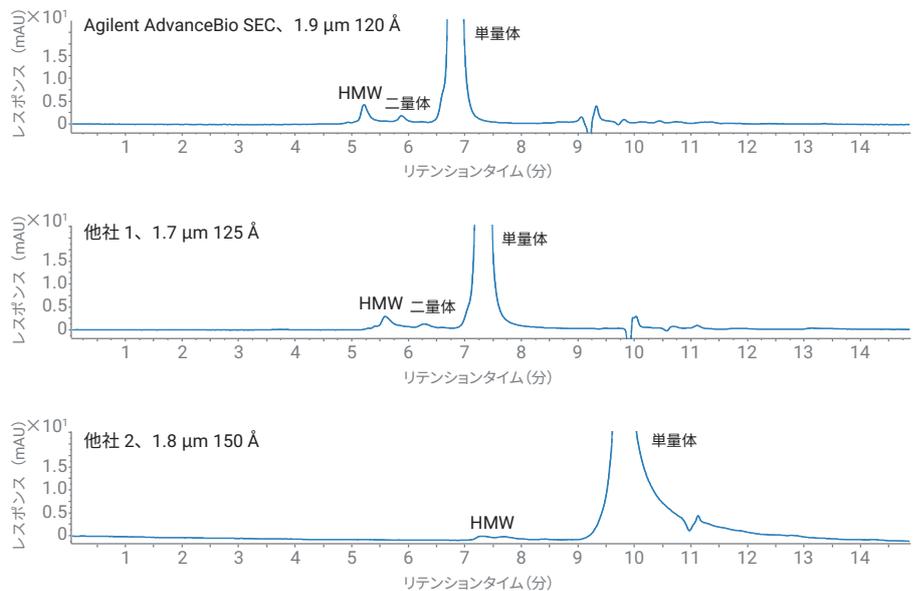


図 4. 0.35 mL/min での hG-CSF のサイズ排除クロマトグラムの拡大図

他の多くの生物製剤用タンパク質は、類似した分子量を持ち、このために同じく AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA カラムでの分析に適しています。hGH の遺伝子組み換え型であるソマトロピンには、翻訳後修飾のために、またはダウンストリーム処理の結果として、いくつかの不純物が含まれている可能性があります。

図 5 に、前述と同じ条件で分析を実施したソマトロピンのサイズ排除クロマトグラムを示します。挿入図はベースライン領域の拡大図で、二量体以上の高次の分子量の凝集体がはっきりとわかります。

他のタンパク質の場合、最適なピーク形状と分離能を得るには、さらなるメソッド開発が必要となる可能性があります。異なる移動相条件を使用して実験し、表 2 に示すように、IFN α -2b のピーク形状およびタンパク質回収率のために最適な構成を決定しました。

表 1. hG-CSF の高分子量 (HMW)、二量体、単量体のピークのピーク面積データ

| | AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA | | | | 他社 1、1.7 μm 125 \AA | | | | 他社 2、1.8 μm 150 \AA | | | |
|-----|---|-------|--------|----------|---|-------|--------|----------|---|-------|--------|----------|
| | RT (分) | % 面積 | Rs USP | ピークテーリング | RT (分) | % 面積 | Rs USP | ピークテーリング | RT (分) | % 面積 | Rs USP | ピークテーリング |
| HMW | 5.22 | 2.61 | | 1.16 | 5.59 | 2.49 | | 1.28 | 7.40 | 2.01 | | 1.37 |
| 二量体 | 5.88 | 1.02 | 2.41 | 1.11 | 6.27 | 0.83 | 1.68 | 1.26 | N.D. | | | |
| 単量体 | 6.82 | 96.37 | 3.77 | 1.13 | 7.31 | 96.68 | 3.04 | 1.11 | 9.74 | 97.99 | | 2.13 |

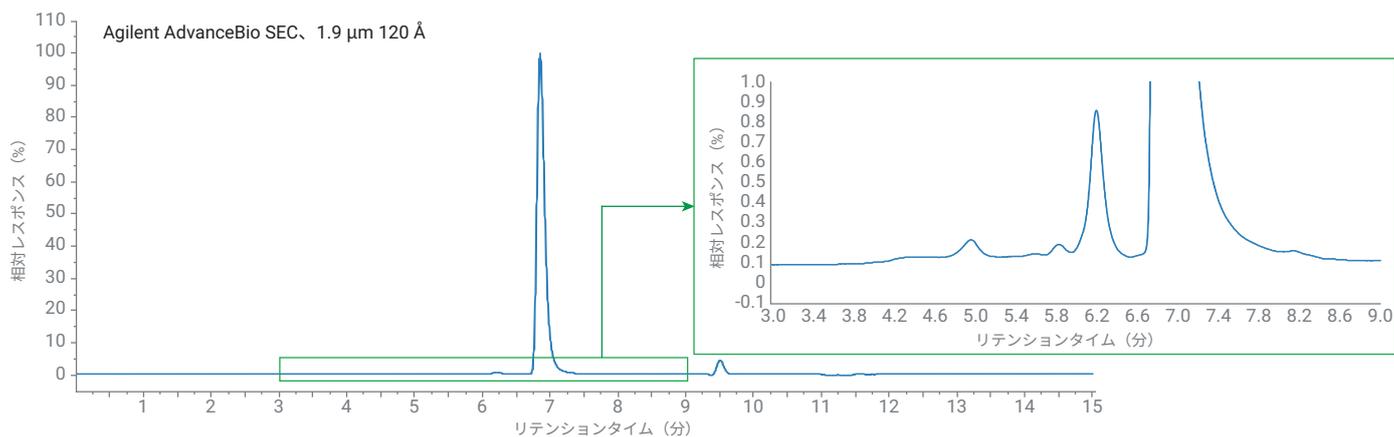


図 5. ソマトロピン (rhGH) のサイズ排除クロマトグラム

表 2. IFN α -2b 用にメソッド最適化中のピーク形状のデータ

| NaCl (mM) | ピーク幅 (min) | テーリング | 分離能 HMW-単量体 | 分離能 単量体-LMW |
|-----------|------------|-------|-------------|-------------|
| 100 | 0.20 | 2.88 | 1.94 | 1.98 |
| 150 | 0.18 | 2.65 | 2.25 | 2.31 |
| 200 | 0.16 | 2.52 | 2.26 | 2.66 |
| 250 | 0.15 | 2.39 | 2.84 | 2.86 |
| 400 | 0.14 | 2.08 | 3.32 | 3.59 |

図 6 に、異なる 3 つのサブ 2 μm SEC カラムを用いたインターフェロナルファ-2b の参照物質の分析のサイズ排除クロマトグラムを、リテンションタイムとピークテーリングのデータとともに示します。INF α -2b 不純物を SEC で分離する場合、カラム性能の違いによって分離能に違いが生じる可能性があるため、分解サンプルを使用して実験を繰り返しました。

インターフェロナルファ-2b では、分子が部分的に折り畳まれていないことが凝集体の形成に関与しますが、部分的に折り畳まれていない種はやや安定していることが示唆されました³。さらに、O-結合型グリコシル化が存在する場合は、これらの分子の熱安定性が低下することがあります⁴。大腸菌細胞株はグリコシル化変異体を導入しないため、遺伝子組み換え型タンパク質の製造での細胞株の選択は重要なパラメータです。

| INF α -2b 用に最適化された HPLC 条件 | |
|-----------------------------------|---|
| カラム | Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA , 4.6 \times 300 mm (p/n PL1580-5250) |
| 移動相 | 200 mM リン酸ナトリウム + 250 mM NaCl, pH 6.5 |
| 流速 | 0.35 mL/min |
| カラム温度 | 25 $^{\circ}\text{C}$ |
| 注入量 | 2 μL , 1 mg/mL |
| サンプル | インターフェロナルファ-2b (INF α -2b) 熱ストレスが加えられたインターフェロナルファ-2b (INF α -2b) : 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 分間 |
| 合計分析時間 | 15 min |

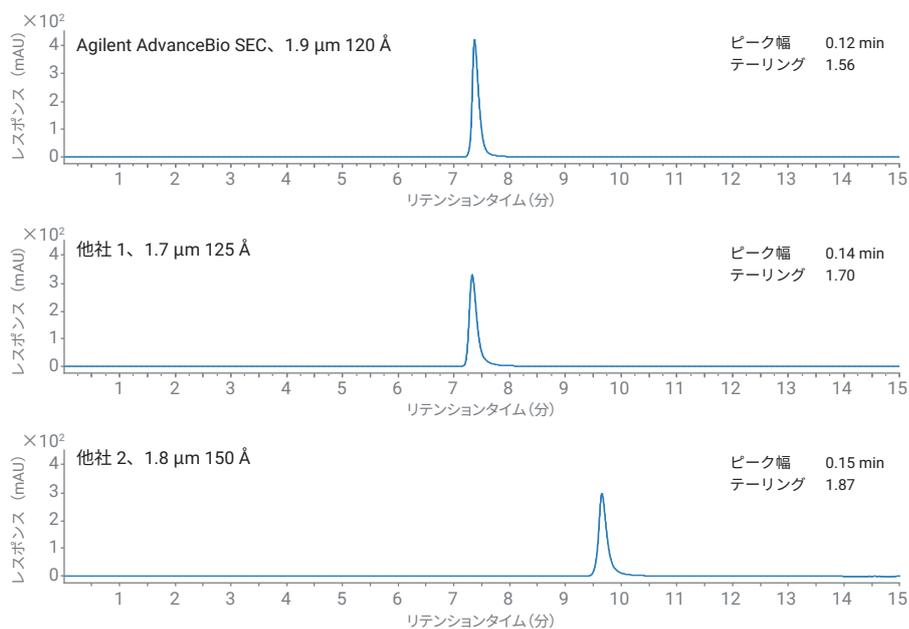


図 6. インターフェロン α -2b のサイズ排除クロマトグラム

インターフェロナルファ-2b サンプルを熱分解 (60 °Cに 30 分間) にさらすことによって、様々な不純物を導入することができました。図 7 に示すように、不純物には早く溶出する高分子量種 (HMW) も遅く溶出する低分子量種 (LMW) も含まれています。予測したとおり、単量体に対する HMW の分離能と LMW 種に対する単量体の分離能の両方が、

AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 \AA カラムで最も良い結果が示されました。このカラムは、未分解サンプルの以前の分離において、ピーク幅が最も狭く、ピークテーリングが最小限になりました。

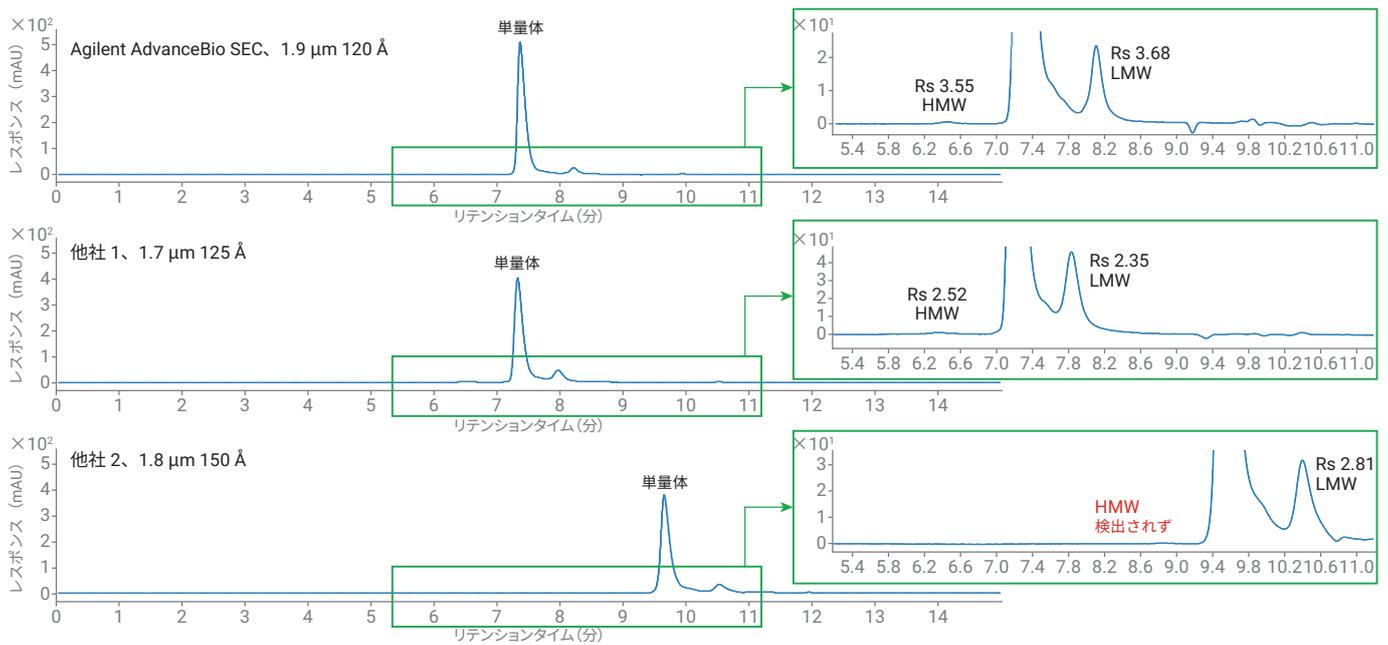


図 7. 熱ストレスが加えられたインターフェロン α -2b のサイズ排除クロマトグラム

結論

Agilent AdvanceBio SEC は、幅広いカラム寸法とポアサイズが用意されており、サイズが異なる様々な分子の分析に適しています。本書で取り上げた AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 µm カラムは、治療用小型タンパク質アプリケーションの高分離能 SEC 分析において、他社の粒子サイズやポアサイズの特性が類似したカラムと比べて優れた性能を示します。

AdvanceBio SEC サイズ排除カラムを適切な標準物質によってキャリブレーションすることで、適切な測定範囲を把握できます。これらの標準物質により、検量線を使用して未知分子の分子サイズを推定できます。また、標準を選択して定期的なキャリブレーションを行うことは有用で、経時的にカラム性能をモニタリングできるため、潜在的な問題を早期に発見することが可能です。発見した問題に対して是正措置を取ることで、最終的にシステムのダウンタイムを低減し、生産性を向上することができます。

参考文献

1. Bayol, A. et al. *Pharmeuropa Bio.* **2004**, 2004(1), 35–45.
2. Advani, S. H. et al. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2010** (Jul–Sep), 31(3), 79–82.
3. Sharma, V. K.; Kalonia, D. S. *Pharmaceutical Research* **2003**, 20, 1721–1729
4. Johnston, M. J. W. et al. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28, 1661–1667

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. 2020
Printed in Japan, March 30, 2020
5994-1829JAJP
DE.1110648148