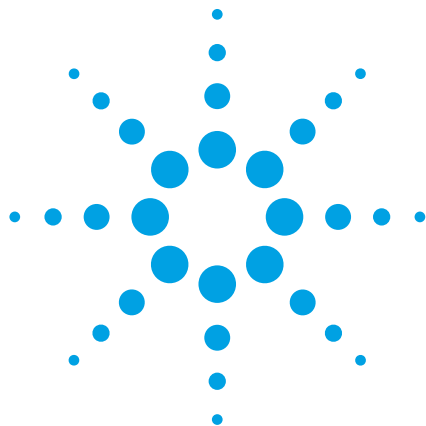




Agilent 1260 Infinity バイオイナート クォータナリ LC システムを用いた ペプチドマッピング、SEC、IEX による 治療用タンパク質の物理化学的分析

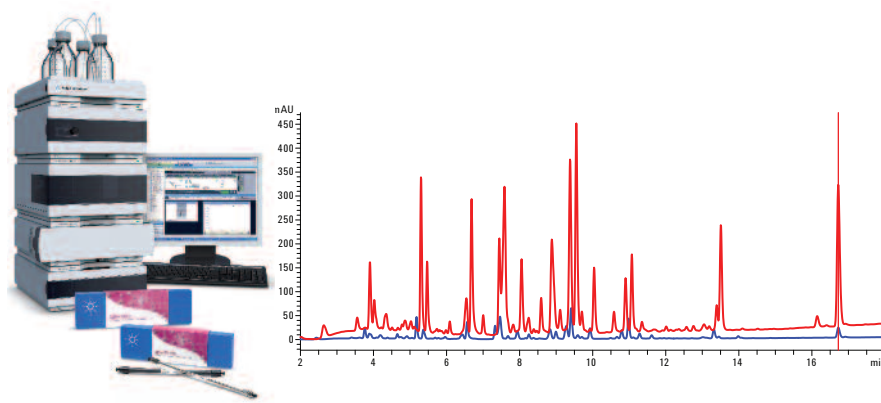
アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Srividya Kailasam; Jochen Strassner,
Martin Vollmer
Agilent Technologies
Bangalore, India and
Waldbronn, Germany

P.M. Sundaram, Bharathi Sriram
GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd,
Bengaluru, India



概要

新しい Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC システムを用いて、治療用タンパク質 P128 を分析するための高感度/高速 LC メソッドを開発しました。サブ 2- μm カラム技術を用いて、最適化したペプチドマップを作成し、P128 の分析時間を短縮しました。新しい Agilent Bio-HPLC カラムを用いて、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) とイオン交換クロマトグラフィー (IEX) をおこない、タンパク質前処理において生じる可能性のある不純物やアイソフォームを検出しました。バイオ不活性および耐腐食性を備えた機器と、簡単で再現性の高いメソッドを組み合わせたこのソリューションは、QA/QC ラボのルーチン分析に最適です。



Agilent Technologies

はじめに

医薬品開発のあらゆる段階では、医薬品の安全性や効果を確認するために、治療用タンパク質の詳細な物理化学的分析が求められます。一般に、タンパク質医薬品の属性や完全性の証明には、ペプチドマッピング、SEC、IEX といった複数の (LC ベースの) アッセイが用いられます。P128 は、整数質量 28 kDa の抗ブドウ球菌タンパク質です。E coli で組み換えにより発現します。このアプリケーションノートでは、P128 のトリプシン消化で生じたペプチドの逆相クロマトグラフィによる分離と、新しいバイオ LC カラムを用いた IEX および SEC による構造変異型の同定において、Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC システムの適合性を実証しています。

実験手法

完全なバイオ不活性を備えたバイオ分析対応の Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムを使用しました。最大圧力は 600 bar で、以下のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC ポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 バイオイナート高性能オートサンブラ (G5667A)
- Agilent 1200 シリーズサーモスタット (G1330B)
- Agilent 1260 カラムコンパートメント、バイオイナートクリックイン加熱エレメントを搭載 (G1316C オプション 19)
- Agilent 1260 DAD、Max-Light 60 nm、高感度フローセルを搭載 (G4212B オプション 33)
- ソフトウェア : ChemStation B.04.02

サンプルパスには金属コンポーネントが一切使われていないため、サンプルが金属表面に接触することはありません。溶媒送液でも、ステンレススチールや鉄のコンポーネントは使われていません。

化学物質と試薬

P128 を GangaGen Biotechnologies Pvt. Ltd. から入手しました。トリス塩基、尿素、DTT、ヨードアセトアミドを Sigma Aldrich から購入しました。トリフルオロ酢酸、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウムを Fluka から購入しました。アセトニトリル (LiChrosolv) と Millipore 水を用いて、移動相を調製しました。

クロマトグラフィ条件

カラム

カラム 1 : Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm (p/n 959758-302)

カラム 2 : Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0 mm × 150 mm、2.7 μm (p/n 693975-302)

LC メソッド

注入量 : 2 μL

移動相 A : 2 % ACN と 0.1 % TFA を含む水

移動相 B : 100 % ACN と 0.08 % TFA

流速 :

0.2 mL/min		0.4 mL/min	
分	%B	分	%B
0	2	0	2
9	15	4.5	15
60	45	30	45
63 – 64.5	80	31.5 – 32.25	80
66 – 81	2	33 – 40.5	2
0.6 mL/min		0.8 mL/min	
分	%B	分	%B
0	2	0	2
3	15	2.25	15
20	45	15	45
21 – 21.5	80	15.75 – 16.12	80
22 – 27	2	16.5 – 20.25	2

UV 検出 : 230 nm/4 nm、リファレンス : 400/60 nm (214、240、260、280 nm でもデータを採取)

ペプチドマッピング

サンプル前処理

タンパク質を尿素の存在下で DTT により還元し、ヨードアセトアミドによりアルキル化しました。希釈したサンプルを限外ろ過したのち、トリスバッファ (pH 7.6) 中でトリプシンにより一晩消化しました。消化中、酵素と基質の比率は 1:20 を維持しました。10 % 酢酸溶液 1 μL を添加し、酵素活性を抑制しました。真空濃縮によりサンプルを乾燥させ、0.25 M トリスバッファ (pH 7.6) 100 μL に再溶解しました。

サイズ排除クロマトグラフィ

カラム

カラム 1 :	Agilent Bio-SEC-3、3 μm 、300 Å、7.8 mm $\times$ 300 mm (p/n 5190-2511)
カラム 2 :	Agilent Bio-SEC-5、5 μm 、300 Å、7.8 mm $\times$ 300 mm (p/n 5190-2526)
カラム 3 :	ブランド A SEC-5、5 μm 、300 Å、7.8 mm $\times$ 300 mm

LC メソッド

注入量 :	1 μL
移動相 A :	150 mM 塩化ナトリウムを含む 150 mM リン酸ナトリウム (pH = 7.0)
流速 :	1 mL/min
UV 検出 :	220 nm/4 nm リファレンス : オフ (230、280 nm でもデータを採取)

イオン交換クロマトグラフィ

サンプルを限外ろ過により脱塩し、20 mM リン酸ナトリウム (pH=6) に抽出しました。

カラム

カラム 1 :	Agilent Bio MAb NP 5、PK、4.6 mm $\times$ 250 mm、5 μm (p/n 5190-2407)
カラム 2 :	Agilent Bio MAb NP 10、PK、4.6 mm $\times$ 250 mm、10 μm (p/n 5190-2415)
カラム 3 :	ブランド B WCX-10、4.0 mm $\times$ 250 mm、10 μm

LC メソッド

注入量 :	2 μL										
移動相 A :	20 mM リン酸ナトリウム (pH = 6.0)										
移動相 B :	1.0 M 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム (pH = 6.0)										
流速 :	0.5 mL/min										
	<table><tr><th>分</th><th>%B</th></tr><tr><td>0</td><td>10</td></tr><tr><td>35</td><td>35</td></tr><tr><td>36</td><td>10</td></tr><tr><td>45</td><td>10</td></tr></table>	分	%B	0	10	35	35	36	10	45	10
分	%B										
0	10										
35	35										
36	10										
45	10										
UV 検出 :	220 nm/4 nm、リファレンス : オフ (220、230、240、280 nm でもデータを採取)										

結果と考察

ペプチドマッピング

一般に、タンパク質医薬品の属性の証明には、ペプチドマッピングが用いられます。ペプチドマップの作成では、治療用タンパク質のタンパク質分解ののちに、高分離能逆相 HPLC をおこないます。分析の目的は、すべてのタンパク質フラグメントをクロマトグラフィ分離および検出し、完全な配列包括度を得ることです。分析するサンプルが数百もの化合物を含む複雑なものであるため、ペプチドマッピングには、きわめて長い時間がかかります。医薬品開発の初期段階では、検出テクニックとして質量分析を用いて、すべてのペプチドフラグメントを同定します。QA/QC の後期では、UV 検出によるペプチドプロファイルの確認がもっとも一般的です。バイオ不活性を備えた機器は、疎水性ペプチドや金属表面に付着する傾向のあるタンパク質の分析において、特に大きな効果を発揮します。

この研究では、26 kDa 組み換え発現 NBE に関するデータを紹介します。このタンパク質は、GangaGen Biotechnologies がヒト治療用に開発しているバクテリオファージタンパク質 P128 です。大型生体分子の分析用に開発された Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC 機器と Agilent Bio HPLC カラムを組み合わせ、このタンパク質のペプチドマッピング、SEC、イオン交換クロマトグラフィをおこないました。

UV ベースのペプチドマップは、組み換えタンパク質医薬品の製造中や処理中に生じる配列異常を検出するために、QA/QC NBE 環境においてしばしば作成されます。

図 1 は、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC と以下の 2 つの逆相カラムにより得られたペプチドマップを示しています。

- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18
3.0 × 100 mm、1.8 μm
- Agilent Poroshell 120 EC C18
3.0 × 150 mm、2.7 μm

この例では、Agilent Eclipse Plus カラムのほうが、わずかに優れた分離能が得られました。そのため、これ以降の分析では、このカラムを使用しました。

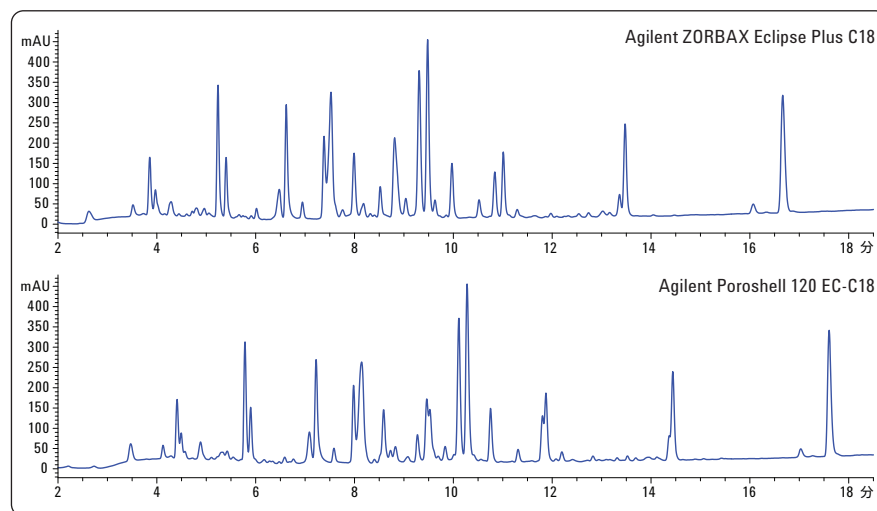


図 1
P128 消化物の分析。使用カラム a) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm、
b) Agilent Poroshell 120 EC C18 3.0 mm × 150 mm、2.7 μm。流速 0.6 mL/min、対応するグラジエント
を使用

きわめて複雑な混合物では、できる限り高い分離能が求められます。ペプチドマッピングなどのこうした分析では、多くの場合、分析時間がきわめて長くなります。サブ 2- μm (STM) 粒子技術と UHPLC 機器を組み合わせれば、分離能を維持しながら、分析時間を大幅に短縮することができます (図 2a – 2d)。

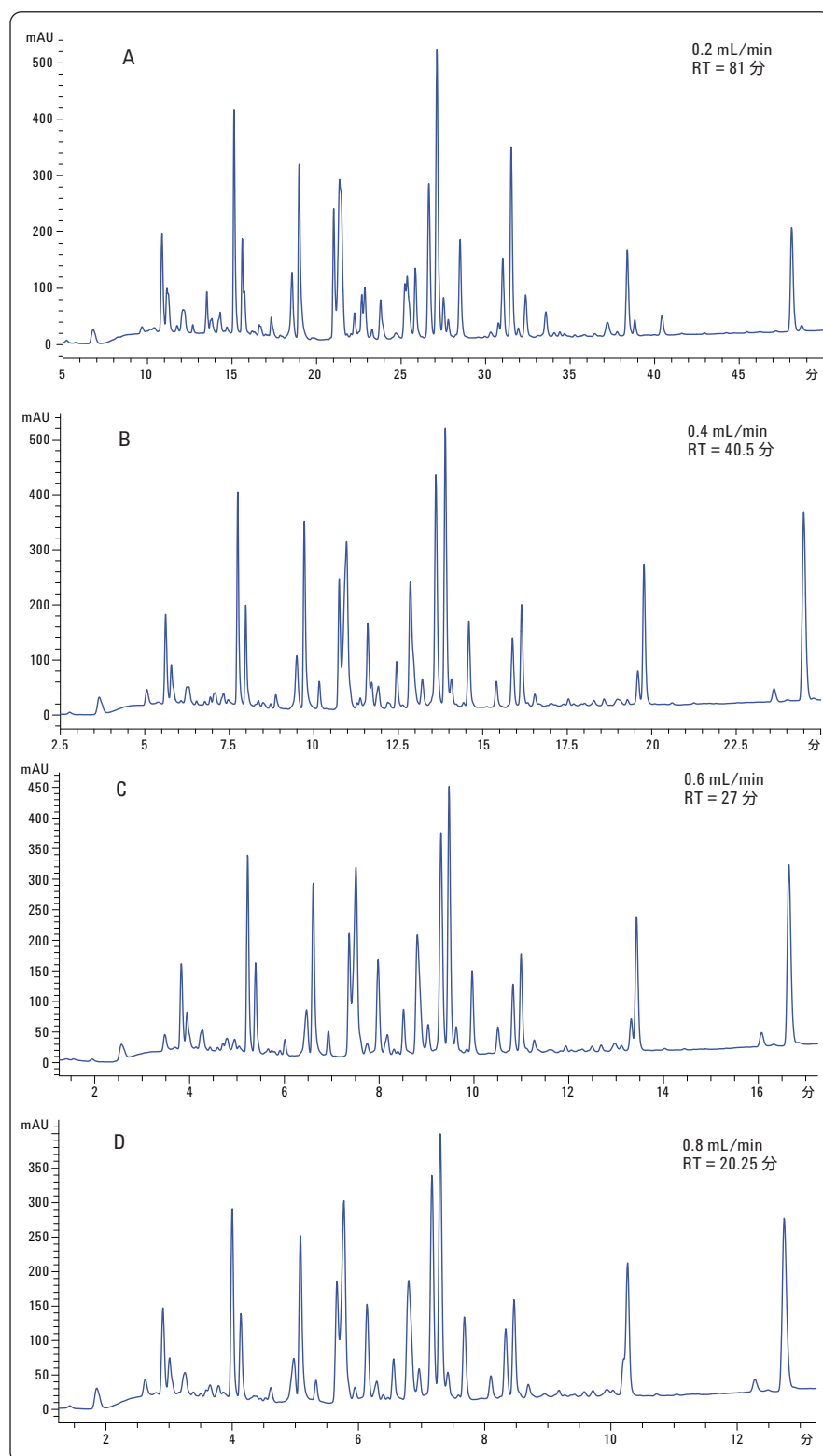


図 2a–2d
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm カラムで異なるグラジエントと流速を用いた P128 消化物の分析

特定の NBE の属性や完全性を証明し、規制要件を満たす目的で治療用タンパク質分析をおこなう場合、分析の堅牢性と再現性をもっとも重要な要素となります。Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm カラムと Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC を用いて、5 回繰り返し注入をおこないました (図 3 は、リテンションタイムとピーク面積の優れた再現性を示しています)。

少量の不純物の検出には、高感度分析が求められます。Max-Light フローセル技術を搭載した Agilent 1260 Infinity DAD では、旧タイプのフローセルを備えた Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus の 10 倍の感度が得られます (図 4)。この技術では、たとえば、発現クローンの変異から修飾を検出できます。また、貴重なサンプルの消費量も少なくなります。60 mm Max-Light フローセルを備えた Agilent 1260 Infinity DAD (G4212B) では、Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus 検出器 (G1315C) に比べて、10 倍も感度が向上しました。

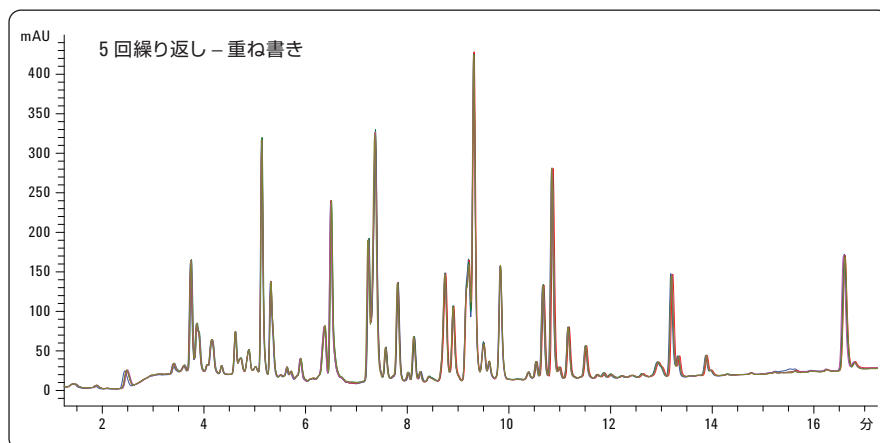


図 3
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm カラムを用いた P128 消化物の 5 回繰り返し分析の重ね書き。流速 0.6 mL/min、対応するグラジエントを使用

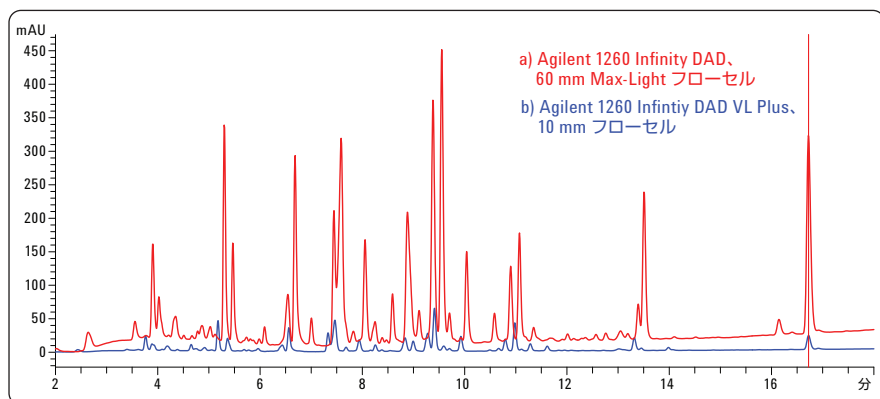


図 4
a) 60 mm Max-Light フローセル搭載 Agilent 1260 Infinity DAD と b) Agilent 1260 Infinity DAD VL Plus (G1315C) を備えた Agilent 1260 Infinity バイオイナート HPLC システムと Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm、1.8 μm カラムを用いた P128 消化物のクロマトグラムの重ね書き。
流速 0.6 mL/min、対応するグラジエントを使用

サイズ排除クロマトグラフィ

タンパク質の完全性や、未変性コンホメーション中に二量体や多量体の形成がないことを証明する際には、UV 検出と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) が一般的な分析テクニックとして用いられます。サイズ排除の欠点は、分離能が低いことです。二次相互作用を最小限に抑えながら、優れた分離能を得られる小型粒子 SEC カラムは、不純物や多量体形成を検出するための強力なツールです。ペプチドマッピングと同じタンパク質を用いて、SEC 分析をおこないました。2 つの 5- μm 粒子カラムと 1 つの 3- μm 粒子カラムの結果を比較しています。混合物中に存在する第 2 の化合物は、Agilent Bio-SEC 3- μm カラムでのみ検出されました (図 5)。

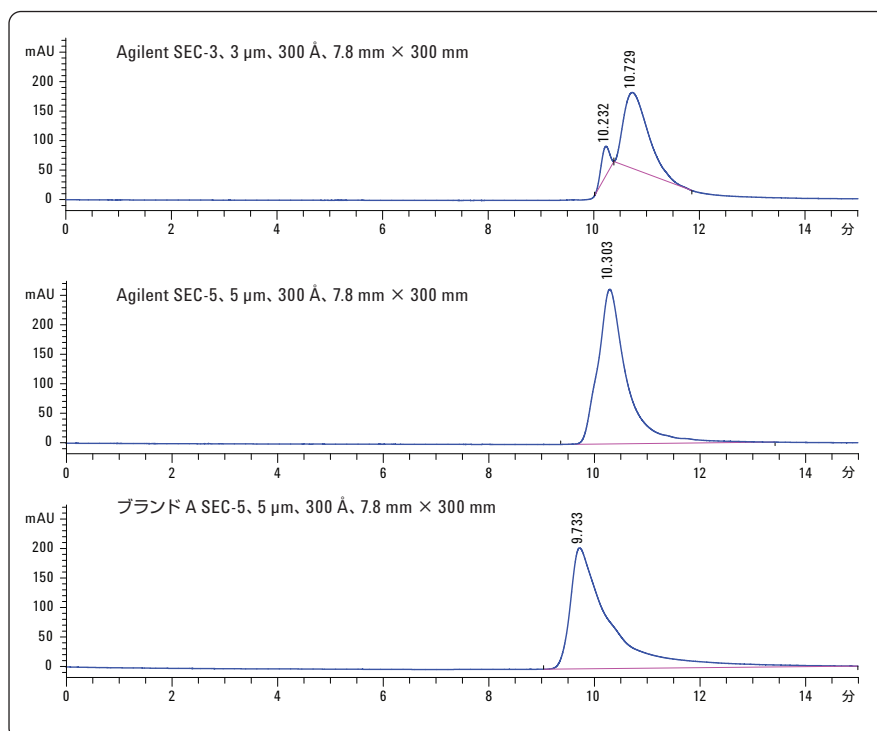


図 5
Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC と異なる SEC カラムを用いた P128 治療用タンパク質サンプルのサイズ排除クロマトグラフィ分析

イオン交換クロマトグラフィ

イオン交換クロマトグラフィは、製造または処理手順中に、末端リシン残基の酸化や脱アミド、切断により生じる可能性のある NBE の電荷変異体の分離に用いられます。メインピークから塩基性および酸性変異体を分離するためには、高い分離能のほかに、表面の二次相互作用を最小限に抑えることが求められます。Agilent Bio Mab 5 および Bio Mab 10 カラムと、同じ寸法の市販カラム (ブランド B) を用いて、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムで P128 タンパク質製剤の脱塩サンプルを分離しました。Agilent Bio Mab 5 カラムで、最高のピーク形状と効率が得られました (図 6)。

結論

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムと Agilent Bio HPLC カラムを組み合わせれば、治療用タンパク質医薬品 P128 の物理化学特性分析における強力で汎用性の高いメソッドが実現します。治療用タンパク質分析用のアジレントのソリューションは、バイオ不活性、優れた分離能、耐腐食性、高感度、高速分離を実現します。

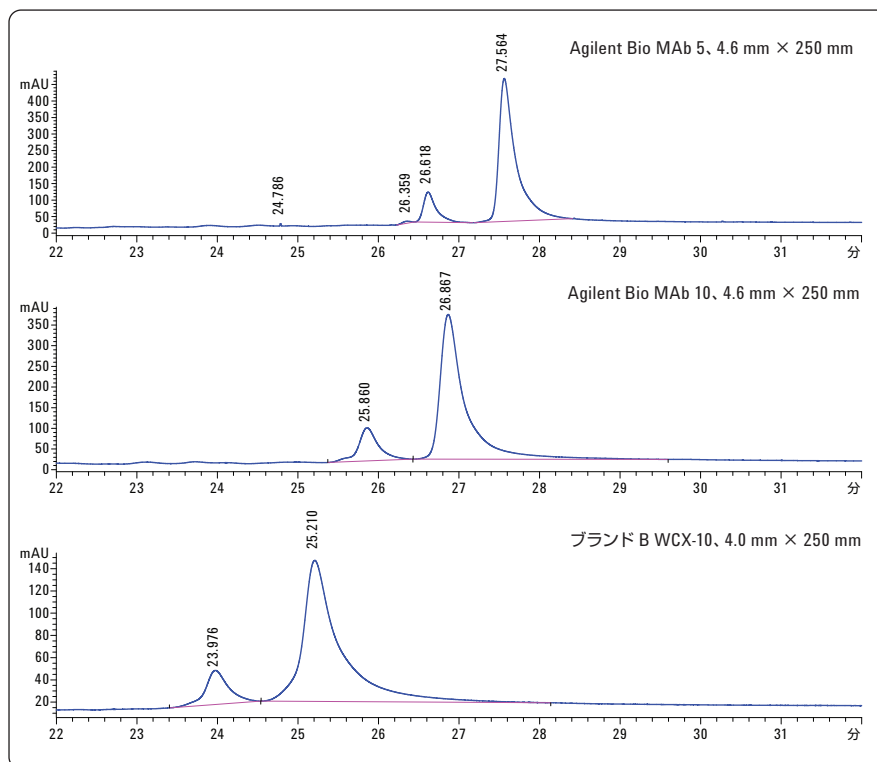


図 6
Agilent 1260 バイオイナートクォータナリ LC システムと異なるカチオン交換カラムを用いた P128 治療用タンパク質サンプルの弱カチオン交換クロマトグラフィ

www.agilent.com/chem/jp

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。本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
February 1, 2011
5990-6192JAJP



Agilent Technologies