低分子タンパク質、ペプチド分析のためのサイズ排除クロマトグラフィーの進歩 :分子量概算に用いる較正曲線の評価

Paula Hong, Stephan Koza, and Kenneth J. Fountain Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- SE-UPLC により、低分子量タンパク質、 ペプチドの分離とスループットを改善
- 真の分子量に基づくペプチド分離のための 最適化条件
- 疎水性ペプチドの分子量推定の信頼性を 高めるための有機溶媒移動相の適合性

はじめに

2010年には、欧米や日本では 60 種類を超える治療用ペプチドが入手可能であり、 最近の流れではこの数は増加の一途をたどると考えられます¹。:低分子医薬 品開発が停滞し、ペプチド合成の改良と連動して、Vasopressinのアナログや Enfuvirtideのような合成ペプチドを含むペプチド医薬品研究開発への興味が高 まっています^{2,3}。

しかしながら、複雑なバイオ医薬品の特性を完全に解析するためには、それぞれの 生体高分子について、異なる物理的特性に関する情報を得るための様々な分析手 法が必要となります。これらの手法の一つであるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)では、生体高分子と製造工程に由来する物質の両方の分子量特性が得ら れます^{2,3}。このクロマトグラフィーモードでは、一連の既知標準品の溶出プロ ファイルと未知の生体高分子の溶出容量を比較することにより、流体力学半径 に基づいたみかけの分子量が得られます。ただし、非理想または二次的な相互 作用の影響を受けず、大きさのみに依存して分離が行われた場合にのみ、意味 のある情報が得られます。

私たちは、これまでモノクローナル抗体分析において細孔径 200Å で粒子径 2 µm 以下の SEC 充填剤と Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC[®]) との融合に よって大きなメリットが得られることを紹介してきました。しかし、この充填剤 は小さな生体高分子 (<80,000Da)の分析にとっては理想的であるとは言え ません⁴⁵。本アプリケーションでは、細孔径 125Å で粒子径 2 µm 以下の充填剤 が低分子量タンパク質やペプチドの分離にもたらす効果をご紹介します。また、 SEC 充填剤の物理的および化学的、両方の特性が分子量概算に用いられる SEC の較正曲線に与える影響についても言及します。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC[®] BEH125 SEC, 1.7 µm カラム ACQUITY UPLC H-Class Bio システム Auto•Blend Plus[™] テクノロジー

キーワード

サイズ排除クロマトグラフィー、SEC、ペプチド、 タンパク質、SE-UPLC、ゲルろ過クロマトグラ フィー、較正曲線

実験方法

試料調製: すべての試料は 25 mM リン酸ナトリ ウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH6.8 のバッファー にて調製。タンパク質、ペプチドはそれぞれ標品 (Sigma-Aldrich)を使用。試料濃度は 1-5 mg/mL。 特に記載のない限り、全ての試料は個々に試験 を行いました。

LC 条件

- システム: ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、 カラムマネージャ または 30 cm カラムヒーター
- 検出: TUV 検出器 (チタンセル)
- 検出波長: 280 nm、214 nm
- カラム: ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 µm, 4.6 x 150 mm (P/N 186006505)

ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 μm, 4.6 x 300 mm (P/N 186006506)

ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7 μm, 4.6 x 150 mm (P/N 186005225)

BioSuite[™] 125 UHR, 4 µm, 4.6 x 300 mm (P/N 186002161)

- カラム温度: 30℃
- サンプル温度:10℃
- 注入量: 2-8 山

流速: 0.4 mL/min

移動相: 25 mM リン酸ナトリウム、 150 mM 塩化ナトリウム、pH 6.8、 25 mM リン酸ナトリウム、 250 mM 塩化ナトリウム、pH 6.2 30 % アセトニトリル、0.1 %TFA (Auto・BlendPlus テクノロジーにより調製)

グラジエント:アイソクラティック

バイアル: マキシマムリカバリーバイアル (P/N 186002802)

データ管理

ソフトウェア: UNIFI[™] v1.5 ソフトウェア

結果および考察

分子量サイズに基づく較正曲線は、分子量既知の標準品の溶出容量または溶出 時間によって得られ、一般的に直線または三次曲線であり、未知のタンパク質 やペプチドの大まかな分子量推定に用いられます。較正曲線の直線部分で最も 高い分離度が得られ、溶出が分子の流体力学半径に依存するため、較正曲線 には非直線部分も存在します。SEC 較正曲線の直線範囲を決定する主要要因は、 細孔径ですが、他にカラムの総細孔容積、細孔径分布が挙げられます。

充填剤サイズ(粒子径)の影響

サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、より小さい充填剤を使用する利点に ついては、カラム効率(理論段数)と分離の改善を示した資料を作成しており ますので参考文献をご参照ください⁵。ごく最近まで多くの研究では粒子径 3 µm 以上の充填剤について様々な評価が行われてきましたが、2 µm 以下の SEC カラム 充填剤の登場により分離とカラム効率のさらなる改善が実現します。

BEH SEC UPLC カラム (1.7 µm) とシリカ SEC HPLC カラム (4 µm) を用いて、一連の タンパク質およびペプチドを水系移動相 (25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化 ナトリウム、pH6.8)、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムにて分析しました (図1)。 ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 µm を用いることにより、タンパク質、ペプチドの 溶出容量は HPLC カラムと比べ減少し、分析時間が短縮されました。加えて、この 2 µm 以下の充填剤による分析では、感度の向上、ピーク幅の減少が確認され ました。主成分の USP 分離度を、BEH SEC UPLC カラム (1.7 µm) とシリカ SEC HPLC カラム (4 µm) について算出しました (図 2)。使用する充填剤による SEC の分離度の違いは、主に細孔径および細孔容量によって決まりますが、充填 剤自体の粒子径も近接した分子量の近いピークの分離に影響します。図 2 に 示したように混合試験試料のピーク 2-8 の USP 分離度は、4 µm SEC カラムと比 較し、24-200 % 増大しました。また、予測通り、125Å SEC UPLC カラムでは、 20,000Da 以下の分子量範囲で最大の分離の改善が見られました。

細孔径の影響

低分子量タンパク質、ペプチドの分析では、一般的に細孔径 200Å 以下の SEC 充填剤用いられます。このような細孔径のカラムは、100,000Da 以下の分子量 範囲で最大の分離をもたらします。細孔径の影響を評価するため、一連のタン パク質、ペプチドを125Åおよび 200Åの粒子径 2 µm 以下の充填剤のカラム で水系移動相(25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH6.8)を 使用して分析しました。

2



図1 タンパク質、ペプチドの SEC 分離における粒子径の影響



図2 図1に示すタンパク質、ペプチドのUSP分離度。USP分離度は Rs=2(tR2-tR1)/(W1+W2)、tR=保持時間、w=50%ピーク高さのピーク幅 により算出。

細孔径が分子量範囲に及ぼす影響を検証するため、各カラムの 較正曲線を評価しました(図3)。前述のように、細孔径はSEC 較正 曲線の直線部分に大きく影響します。細孔径125Å および200Åの 粒子径2µm以下のBEH充填剤を用いたカラムの比較はこの現象を よく表しています。ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7µm カラムによる 較正曲線は、400,000から44,000Daの分子量範囲で最大の直 線性と同時に最大の分離度を示しました。同様にACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7µm カラムでは、44,000から1,000Daのほとんど のペプチドバイオ医薬品の分子量範囲で最大の分離度が得られ ました。予測したように、充填剤の細孔径はカラムの使用分子量 範囲に大きな影響を与えます。200 Åの充填剤は1,000,000から 約44,000Daの分子量にわたって高い分離度をもたらし、125Å の充填剤では44,000から約1,000Daが最適の分子量範囲と考 えられます。



図3 較正曲線への細孔径の影響。ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 µm カラムおよび ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7 µmカラム、4.6 x150 mm による比較。

3

移動相組成による影響

生体高分子の流体力学半径に基づく SEC 分離では、分析種と充填剤との間の吸着を最小限にすることを前 提としています。この二次的相互作用は試料と充填剤のシラノール基との間でおこるイオン性相互作用や、 試料と充填剤の疎水性部分との間に生じる疎水性相互作用など様々なメカニズムによって引き起こされます。 しかし、イオン交換作用は移動相へのバッファーや塩の添加や pH 調整により最小限に抑えることが可能で あり、また疎水性作用についても有機溶媒やその他添加剤の使用により一般的に最小化することができます。 ペプチドの分離をサイズに基づいて行う場合には、これらの点を考慮し、移動相条件を注意深く評価する 必要があります。

前述のように、ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 μm カラムは 20,000 以下の分子量範囲で高い分離度を示し ます。この最適な分子量範囲における SEC 分離能力を詳しく調べるため、9,000Da 以下の一連のペプチドを 水系移動相条件で分析しました。移動相の pH および塩濃度について分析法の評価を行った結果、塩濃度 150-350 mM、移動相 pH 6.2-7.4 の範囲において保持時間に対する影響が最小となりました(データは示し ていません)。全ての水系移動相条件においてほとんどのペプチド、低分子タンパク質(<17,000Da)は予測 される保持時間より遅く溶出され、溶出順序も報告されている分子量とは異なる結果となりました。例えば、 Bradykinin フラグメント 1-7 (MW 757) は、Angiotensin (MW 1296) や Bradykinin (MW 1060)のようなより 大きな分子量のペプチドより早く溶出されています (図 4a)。塩濃度を高めても保持時間に顕著な影響が見 られなかったことから、これらの結果も "イオン交換 "メカニズム以外にペプチド - カラム間の非理想的な相互 作用が存在することを示唆しています。



図4 ペプチドのSEC分離における移動相の影響

これらのペプチドについて SEC 分離を最適化するため、移動相の評価を行いました。ペプチドバイオ医薬品の SEC 分析で一般的に使用される移動相は、変性溶媒でしばしば有機溶媒や酸、変性剤、アルギニンのような 電荷添加剤を含みます。このような移動相は、非理想的な(疎水性および/またはイオン性)相互作用を 最小化し、一部のペプチドについてはサイズに基づいた分離を行うために有効です⁶。加えて、これらの移動 相はペプチドの立体構造を変化させ、保持に影響を与えることもあります。ペプチドはネイティブな条件下で は安定な二次構造を形成していますが、変性剤により同じポリペプチドがランダムコイル構造を形成するよ うになります。このような立体構造の変化は生体高分子の流体力学半径を増加させ、溶出容量を変化させ ます。 有機溶媒、イオンペア試薬を含む移動相を用いて、ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 μm カラムの試験を実施 しました(図 4)。アセトニトリルは疎水的相互作用を最小化するため、トリフルオロ酢酸はイオンペア試薬と して"イオン交換"や電荷間の相互作用を軽減するために使用しました。予測通り、この移動相(30% ア セトニトリル、0.1%TFA)により保持時間が早まり、対照性の高い形状のピークが得られました。さらに、 100% 水系移動相での分離と比べ、Bradykinin フラグメント 1-7、Angiotensin I、Bradykinin は分子量に従っ た予測通りの順序で溶出しました(図 4b)。これらの溶出順序の変化は二次的相互作用の低減やペプチドの 立体構造、流体力学半径の変化によるものと考えられます。

SEC 較正曲線を比較すると、移動相組成が分子量の小さい生体分子の SEC 分離に与える影響がより顕著に 表れています(図 5)。水系移動相条件(25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH6.8) ではペ プチドの溶出順序が不規則です。しかし、アセトニトリルと TFA を移動相に用いることにより、サイズ排除 クロマトグラフィーの理論から予測される三次式による較正曲線が得られ、直線範囲に基づいて信頼性のあ る分子量推定が可能です。例えば、Aprotinin のダイマー(ピーク 2a) は、14,370Da と計算され、これは予 測値 13,022Da の 11% 以内の誤差です。水系移動相条件下では、較正曲線で直線性が得られないためこの ような分子量推定はできません。



図5 移動相がACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 µmカラムの較正曲線に及ぼす影響

5

結論

サイズ排除クロマトグラフィーはサイズに依存する分析法として生体高分子の分析に多用されてきました。細孔径 125Å、粒子径 2 µm 以下の 充填剤を低拡散の ACQUITY UPLC H-Class Bio システムと組み合わせることによって分離を向上させ、さらに低分子タンパク質分析においても SE-UPLC によるハイスループット化を実現させることが可能です。しかし、カラムやシステムにかかわらず、信頼できる分子量推定を行う ためには、SEC の分析法開発時に二次的相互作用の最小化を検討することが重要です。

ACQUITY UPLC BEH125 SEC, 1.7 µm カラム、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムが SEC 分析の効率化を実現します。

- 従来の SE-HPLC 充填剤と比較して、分離とスループットを向上
- 細孔径が大きな充填剤と比較して、80,000-1,000Daの分子量範囲の分離度を向上
- ペプチドと充填剤の間におこる二次的相互作用を低減する変性移動相にも適合
 ペプチドバイオ医薬品製造における分子量特性解析、純度試験に最適

参考文献

- 1. Vlieghe, P, Lisowski, V, Martinez, J, Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. Drug Discovery Today, (2010), 15: 1/2 40-56.
- 2. Irvine, G.B., Size-exclusion high performance liquid chromatography of peptides: A review. Anal. Chim. Acta 1997 352: 387-397.
- 3. Irvine, G.B., Molecular Weight Estimation for Native Proteins Using High-Performance Size-Exclusion Chromatography, The Protein Protocols Handbook. In: Walker JM, editor.: Humana Press; 2002. p. 573-9
- 4. Fountain KJ, Hong, P, Serpa, S, Bouvier, ESP and Morrison, D. Analysis of Biomolecules by Size-Exclusion UltraPerformance Liquid Chromatography. Waters Corporation, Application Note [serial on the Internet]. 2010; (WA64226).
- 5. Hong P, Fountain KJ. Method Development for Size-Exclusion Chromatography of Monoclonal Antibodies and Higher Order Aggregates. Waters Corporation, Application Note, 2011.

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp

 東京本社 〒140-0001
 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル
 TEL
 03-3471-7191
 FAX
 03-3471-7118

 大阪支社 〒532-0011
 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F
 TEL
 06-6304-8888
 FAX
 06-6300-1734

 ショールーム
 東京
 大阪

 テクニカルセンター
 東京
 大阪
 名店屋
 福岡
 札幌

Waters および ACQUITY UPLC、UPLC は Waters Corporation の登録商標です。 Auto•Blend Plus、UNIFI、BioSuite および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。 その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。