Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

サイズ排除UPLCの分析法開発 ～トラスツズマブ抗体の分解産物分析～

Stephan Koza, Paula Hong, Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- 抗体フラグメントと高分子量型の分離度および感度の向上
- ハイスループットSEC分析
- SE-UPLC 分析法移管を容易にする頑健な分析法開発

ウォーターズのソリューション

BEH200 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

Empower™ 3 ソフトウェア

キーワード

サイズ排除クロマトグラフィー、UPLC、モノクローナル抗体、トラスツズマブ、タンパク質分解

はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、従来からバイオ医薬品のタンパク質凝集体や高分子量型（HMW）、好ましくない免疫原性効果や薬効の減少と関連する重要な分解経路に関する分析の主要な手法となっています[1,2]。SEC で検出されるモノクローナル抗体（mAb）のさらなる分解経路はこれらのタンパク質のヒンジ領域での非酵素的なペプチド結合の加水分解で、これにより抗体は 1 本または両方の Fab 領域を欠くこととなります[3]。このような低分子量の分解物（LMW）の同定についてはアプリケーションノート 720004254EN: "Analysis of Proteins by Size- Exclusion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry Under Non-Denaturing Conditions" をご参照ください。

システム内の拡散を抑えた Ultra Performance Liquid Chromatography（UPLC®）を 2 µm 以下の充填剤とあわせて使用することで、SEC のアイソクラティックにおける分離を向上させ、感度を高めることに加え、さらにはスループットを高めることが可能です。非変性条件の移動相を使用する凝集体モニタリングに加え、mAb ヒンジ領域のフラグメンテーションの度合をモニタリングするのに、サイズ排除 UPLC（SE-UPLC）を選択するメリットを抗 HER2 IgG_1 mAb であるトラスツズマブを用いて検証しました。SEC 分析法において分離を向上させ分析法の頑健性を高めるには、様々なパラメーターの調整が考えられますが、本アプリケーションでは移動相組成（pH およびイオン強度）がこの分離に与える影響を検証しました。また、開発した SE-UPLC 分析法をうまく移管するための基本的なポイントについても考察しています。

実験方法

試料：IgG_1 mAb 試料として有効期限を超過したトラスツズマブ（21 mg/mL）を用意しました。

LC 条件

システム：　ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

検出：　TUV 検出器（チタンセル）

検出波長：　280 nm

カラム：　ACQUITY UPLC BEH200 SEC
1.7 µm, 4.6 x 150 mm
（製品番号 186005225）

カラム温度：　25℃（アクティブプレヒーターなし）

サンプル温度：4℃

注入量：　5 µL（その他の場合は別途記述）

流速：　0.4 mL/min

移動相：　4 種類の溶液を Auto•Blend Plus テクノロジーにより調製
A: 100 mM 1 塩基リン酸ナトリウム
B: 100 mM 2 塩基リン酸ナトリウム
C: 1 M 塩化ナトリウム
D: 水

最終移動相組成：　25 mM リン酸ナトリウム pH6.8, 200 mM 塩化ナトリウム
（その他の場合は別途記述）

データ管理

ソフトウェア：Empower3 ソフトウェア、Auto•Blend Plus

結果および考察

以下の考察で SE-UPLC の分析法開発時に検討すべきパラメーターのいくつかについて概要を示します。これらの SEC 分析法開発ステップは UPLC SEC を使用したものですが、同じ原理がすべての SEC 分析に適用できます。分析法の性能はピーク形状、分離、定量信頼性により評価しました。

移動相の最適化（イオン強度、pH）

ポアサイズ、充填剤基材、官能基、粒子径、カラムサイズなどについて適切なカラムの選択をした後、SEC 分析法開発の一般的な次のステップは、良好なピーク形状と分離を確保する移動相の検討です。移動相のイオン強度や pH の調整は、4 液混合送液システムと 4 液混合の利点を活かしたソフトウェア Auto•Blend Plus を使用することで、非常に簡便に行うことができます[4]。本アプリケーションでは、すべての実験においてこの移動相調製法を使用しました。

塩濃度 150-350 mM、pH 6.0-7.5 の範囲でトラスツズマブの SE-UPLC による分離を評価しました（図 1）。このデザインスペース内では、視覚的評価において塩濃度 250-350 mM、pH 6.0-6.5（25 mM リン酸バッファー）の範囲で最適かつ安定なクロマトグラムが得られました。ゲルろ過充填剤でよく見られることですが、移動相のイオン強度が低くなるとモノクローナル抗体モノマーのピークテーリングが増大します[4]。また、このピークテーリングは pH 6.0-6.5 の範囲で明らかに減少する傾向が観察されました（図 2）。この場合の pH 範囲は、トラスツズマブ製剤の pH（pH 6.0）とよく一致しています。この分析に求める結果は、製品由来の不純物、つまり HMW と LMW の面積比（% 面積）です。試した移動相組成範囲で、HMW とその後に溶出される LMW2（Fab アーム）のピークが検出され、これら不純物を合わせた % 面積がインタクトの mAb モノマーのピーク形状（テーリングファクター）により顕著な影響を受けることはありませんでした。しかし、モノマーのピークテーリングの増大は、結果として先に溶出される LMW1（1 本の Fab アームが欠損した mAb）の % 面積を大きく増加させてしまいます（図 3）。これらのデータに基づいて、高い再現性をもってクロマトグラフィープロファイルが得られる条件を検討し、pH 6.25（25 mM リン酸バッファー）、300 mM 塩化ナトリウムの移動相を選択しました（図 4）。

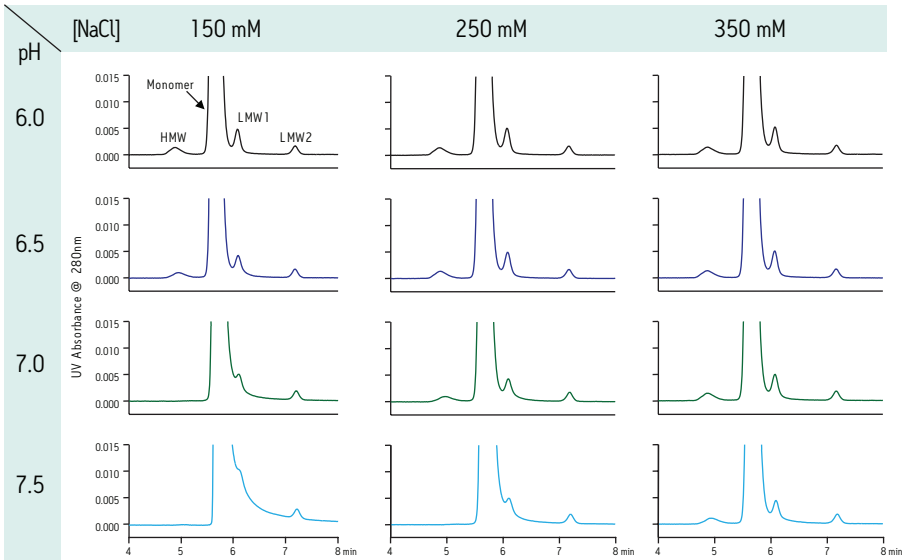


図1. トラスツズマブのSEC分離におけるpH、イオン強度の影響を示す拡大クロマトグラム ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7 μmカラム、4.6x300 mmカラム使用

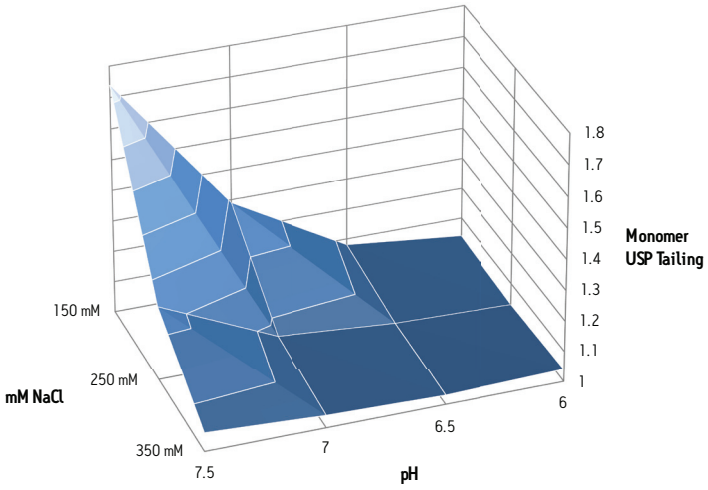


図2. トラスツズマブモノマーの USPピークテーリングへのpH、イオン強度の影響を示す応答曲面

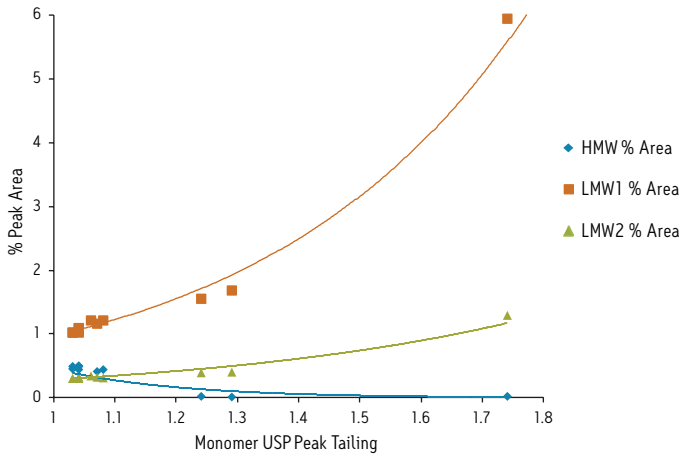
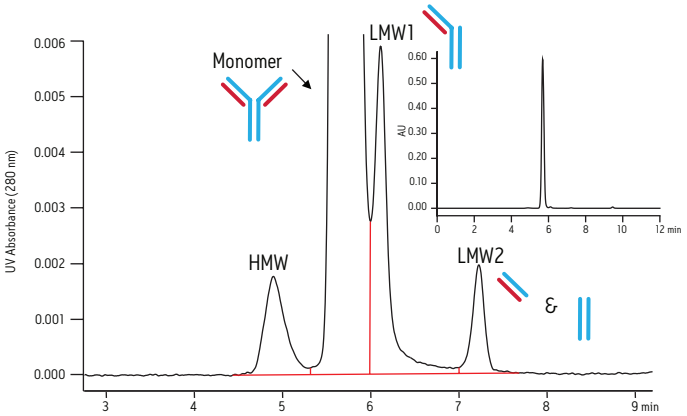


図3. pH、イオン強度の最適化実験より得られた、モノマーピークのテーリングがトラスツズマブの HMW、LMW の面積比に及ぼす影響。各ピークについては図1、図4を参照。



Evaluation (n=4)		HMW	Monomer	LMW1	LMW2
Average Peak	Area (%)	0.51	98.02	1.15	0.33
%RSD	Area (%)	0.98	0.03	1.31	3.08

図4. 最適化した SE-UPLC の拡大およびフルスケール（中枠）クロマトグラム。トラスツズマブモノマー、HMW およびフラグメント（LMW）の定量結果を表に表示。

この方法により、タンパク質試料中の HMW 型の再現性ある評価が可能ですが、あわせて分析超遠心法や非対称フィールドフローフラクショネーション法のような異なる手法を使い、より精密な評価を行うことも重要です。

カラム外拡散

バイオ医薬タンパク質分析に用いられる多くのクロマトグラフィー分離モードでは、分析対象の物質をカラムヘッドで濃縮し、グラジエントにより溶出します（たとえばイオン交換や逆相）。この手法ではカラムの手前（プレカラム）での拡散はクロマトグラムに大きな影響を及ぼしません。しかし、SEC でのアイソクラティックモードは、カラム後（ポストカラム）の拡散だけではなく、プレカラムの拡散による分離の悪化がおこりやすいクロマトグラフィーモードです。SEC 分析で、粒子径 2 µm 以下のカラムを使用する主要なメリットの一つとして一般的に使用される粒子径 5-10 µm のカラムと比べ、ピーク拡散が著しく減少する点が挙げられます。しかしこの利点はカラム外拡散により容易に相殺されてしまいますので、分析対象のピーク拡散を考える上ではクロマトグラフィー装置や設定が重要となります。

SE-UPLC での定量分析においてはカラム外拡散の影響が最も問題となります。特に、重要な分離部分のうち、後に溶出する成分のピーク面積値が、前に溶出するピークと比べて非常に小さい場合、この影響が顕著となります。拡散の小さいシステムを選択し、その性能を最適化し、適切なチューブやフィッティング類を使用することが必須です。

SE-UPLC で UV 吸収を検出に使用する場合、カラム外拡散の原因となるのはオートサンプラーと検出器です。SE-UPLC のすべての利点を実現するためには必要な圧力下での使用を前提として設計された低拡散システムが必要とされます。そのため、使用する分析条件下で期待される装置性能が得られるかどうかについて十分評価する必要があります。

システムだけではなく、カラムとシステムをつなぐチューブやフィッテイングによってカラム外拡散がひきおこされることもあります。UPLC システムに使われているキャピラリーチューブによるカラム外拡散の程度を推移方程式によって評価することも重要です。長いチューブでの拡散は "Taylor-Aris" の式から、短いチューブでの拡散は Attwood と Golay の式から求められます。

$$\sigma^2 \upsilon,\text{tubing} = \frac{(\pi \cdot r^2 \cdot L)^2}{3 + (24 \cdot \pi \cdot L \cdot \frac{D_m}{F})}$$

ここで、$\sigma^2 \upsilon$, tubing は、分散またはチューブに由来するバンド拡散を、r と L はキャピラリーの半径、および長さを表します。Dm は、分析種の拡散係数で、F は流速です [5]。拡散係数約 4×10^{-7} cm^2/s [6] のトラスツズマブの分析で、推奨される流速が 0.4 ml/min の時、分析種の拡散がないという限定条件では、チューブの長さが数メートルを越さない限り、この式は Attwood と Golay の式に簡略化することができます。

$$\sigma^2 \upsilon,\text{tubing} = \frac{(\pi \cdot r^2 \cdot L)^2}{3}$$

上記の式はチューブにおける拡散が、チューブの長さの二乗、内径の四乗に比例することを示しています。この関係は、実用的な範囲内でできるだけ短く、内径の小さいチューブを使用することで、SE-UPLC の性能が最大化するということを示しています。

サンプル流路の一部として使われるキャピラリーチューブに加えて、システムとカラムを接続するフィッテイングの選択と正しい使用が SE-UPLC において非常に重要です。この点において、チューブの切断面が滑らかでチューブ壁面と直角であることも重要です。カラムの手前のフィッテイングは SE-UPLC 分析でかかる圧力（～ 500 bar）に耐えられ、外れたりボイドを生じたりすることがないものである必要があります。一度締めると固定されるタイプのフィッテイング (swaged fittings) を使っている場合には、カラム交換時にカラムとフィッテイングを

正しく接続するため、チューブとフィッテイングを交換することも大切です。図 5 にチューブ接続が不適切または失敗した場合におこる再現性の低い定量結果の例を示しました。この例では、意図的に 0.6 mm の空隙によりカラム接続部分に約 1.2 µL のボイドを生じさせています。これにより、モノマーピークと LMW1 との USP 分離度は 1.50 から 1.46 に低下し、LMW 1のピーク面積比は 1.13% から 1.21% と著しく（7%）増加する結果となりました。これに対し、HMW と LMW2 の面積比はさほど変化しませんでした。これは両ピークが主ピークであるモノマーピークと十分に分離し、また HMW の溶出がモノマーピークより早いこともあり、HMW、LMW2 の面積値がモノマーピークのテーリングの変化の影響を受けにくかったためと考えられます。予期した結果ではありますが、この例は SE-UPLC による定量法がカラム外拡散の影響を受けやすいことを示唆しています。

分析法移管

信頼できる SE-UPLC 分析法が開発された後に、異なる部署や外部の受託研究機関などに分析法を移管する必要が生じるかもしれません。先に示しましたように、体系的で綿密な開発工程により、使用するカラムが製造者によって適切に管理されていれば、移動相組成や pH のわずかな変化には影響されない確かな定量法を作成することができます。

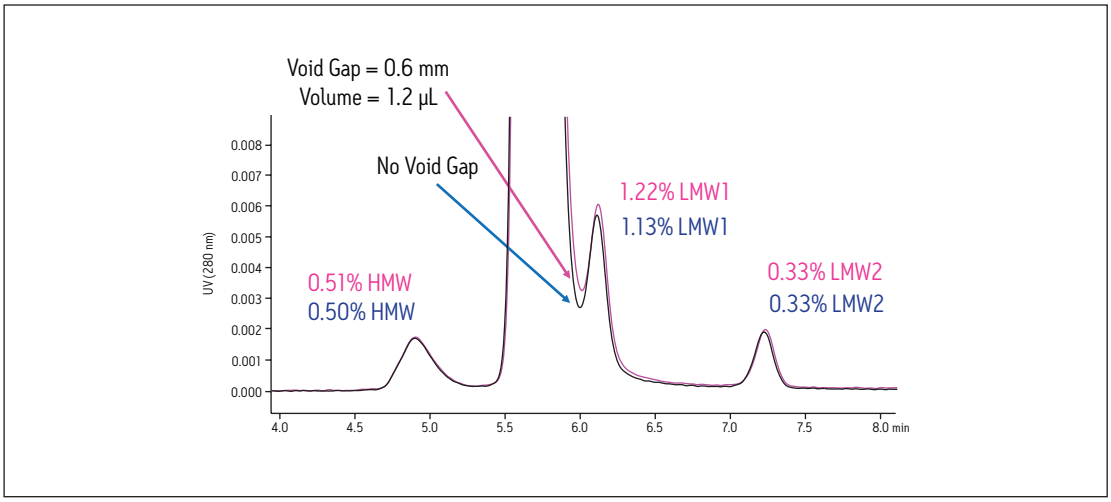


図5. 最適化条件での SE-UPLC 拡大クロマトグラム。不適切なカラム接続が面積比に与える影響を示します。この例では、カラムヘッドとキャピラリーチューブとの接続部分に0.6 mmの空隙を生じさせました。

SE-UPLC の分析法移管で次に重要な検討事項は、移管元および移管先で使われているクロマトグラフィーシステムのカラム外拡散についてです。この点においては、システム構成の詳細な資料、注意を要する装置と接続箇所（図 6）、システムの性能、そして分析者への適切なトレーニングが分析法移管を成功させる鍵となります。また、カラム外拡散に関するクロマトグラフィーシステムの性能を正確に評価するための適切なコントロール試料の使用もお奨めします。

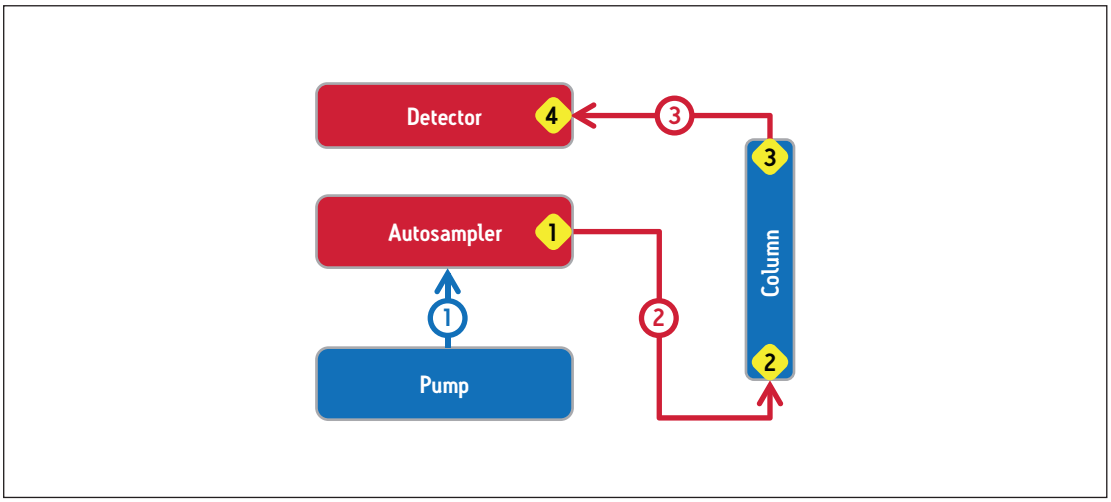


図6. SE-UPLC 分析法を他の装置に移管する際、特に注意すべき装置やチューブを赤で、カラム外拡散を引き起こす可能性がある重要なフィッテイング部分を黄色のひし形で示しました。本アプリケーションで論じてきた特に懸念される高圧がかかる接続箇所はオートサンプラーとカラムの間です（チューブ2）。本アプリケーションで使用した、黄色で示した重要な接続箇所、赤で示したチューブのウォーターズ製品番号は、以下の通りです。接続箇所 1（p/n 700002645、700002635）、接続箇所2（p/n 700003169、700003114、700003115）、接続箇所 3、4（p/n 41001905）、チューブ2、3（p/n 700008914）

結論

サイズ排除クロマトグラフィーは、これからもモノクローナル抗体とその凝集体分析の標準的な手法として利用され続けます。さらに SE-UPLC の高い分離能力により、ネイティブ状態でのヒンジ領域のフラグメンテーションを判定することも可能になります。また、分析条件は、移動相（pH、イオン強度）や流速、カラム長、使用するシステムとその構成を含めて体系的に評価される必要があります。これら SEC 分析におけるパラメーターの最適化には、分離度、ピークテーリング、定量的再現性など重要な性能基準に基づいた評価も必要でしょう。

SE-UPLC 分析法が最適化され、頑健性の高いものであれば、分析法移管はスムーズに達成できます。しかし、分析者は、最小のカラム外拡散を維持するため、最初だけでなく部品やカラムを交換した際にも、使用するクロマトグラフィーシステムが正しく構成されているかどうかに注意を払う必要があります。

参考文献

1. Rosenberg AS. *Effects of protein aggregates: an immunologic perspective.* The AAPS Journal. 2006; 8:501-7.
2. Philo JS. *Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?* The AAPS Journal. 2006; 8:564-71.
3. Xiang T, Lundell E, Sun Z, Liu H. *Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis.* Journal of Chromatography B. 2007; 858:254-62.
4. Golovchenko NP, Kataeva IA, Akimenko VK. *Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium.* Journal of Chromatography A. 1992; 591:121-8.
5. Fountain KJ, Neue UD, Grumbach ES, Diehl DM. *Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2-µm porous particles.* Journal of Chromatography A. 2009; 1216:5979-88.
6. Brandt JP, Patapoff TW, Aragon SR. *Construction, MD simulation, and hydrodynamic validation of an all-atom model of a monoclonal IgG antibody.* Biophysical Journal. 2010; 99:905-13.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

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 名古屋 福岡 札幌

Waters および ACQUITY UPLC UPLC は Waters Corporationの登録商標です。

Auto•Blend、Empower 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。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan.

2012年10月 720004416JA PDF