Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

サイズ排除UPLC（SE-UPLC）によるモノクローナル抗体の多価凝集体分析

Stephan Koza, Matthew Lauber, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションの利点

- ACQUITY UPLC® SEC テクノロジーにより、従来のHPLCをベースとしたSECと比較して、1.8 MDaまでの高分子量タンパク質の分離を向上
- ダイマー以上の多量体を含むモノクローナル抗体凝集体分析において、BEH450 SEC カラムを BEH200 SEC カラムと連結することにより分離範囲が拡大

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC BEH450 SEC、2.5 µm　カラム
ACQUITY UPLC BEH200 SEC、1.7 µm　カラム
ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
BEH450 SEC タンパク質スタンダードミックス
Auto•Blend™ Plus テクノロジー
Empower® 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア

キーワード

サイズ排除クロマトグラフィー、SEC、モノクローナル抗体、mAb、タンパク質、SE-UPLC、ゲルろ過クロマトグラフィー、高分子、IgM、多量体

はじめに

モノクローナル抗体（mAb）はバイオ医薬品の展望において、重要な位置を占めるタンパク質クラスとなっています。水溶性のタンパク質凝集体は、その量とともに価数も重要品質特性（CQA）であり、ヒトへの使用に際しては、mAb 調製段階でのモニタリングが要求されます。タンパク質の凝集は、細胞培養から医薬品の保存期間に至る製造工程のすべての段階で生じる可能性があり、タンパク質医薬品の安全性や効能に有害に働く部分的な変性やその他タンパク質構造の摂動の存在を示唆している場合もあります。[1]

工程や製品の安定性の指標として、低い価数の（ダイマーのような）凝集体の濃度を定量的に評価することも重要ですが、タンパク質バイオ医薬品製剤においては、高い価数の多量体を形成している水溶性凝集体の分布を明らかにすることも重要です。このような多量体は、T 細胞非依存性の免疫学的経路の引き金となる能力をもつため、免疫応答をより強く誘発する可能性があります。[2]

先頃発表したポアサイズ 450 Å、粒子径 3 µm 以下のカラム充填剤を使用した ACQUITY UPLC BEH450 SEC カラムは、サイズ排除 UPLC® （SE-UPLC）の分離対象となる分子量範囲を拡大するよう設計されており、IgM や自己会合タンパク質多量体のような水和半径の大きな生体高分子の分析も可能になります。[3] 本アプリケーションでは、mAb の分析により、この 450 Å のポアサイズを持つ粒子径 3 µm 以下のカラム充填剤（BEH450）の評価を行い、高分子のタンパク質複合体分析において、UPLC をベースとしたサイズ排除分離が従来の HPLC によるサイズ排除と比較して優れている点を示しました。加えて、ポアサイズ 200 Å と 450 Å の ACQUITY UPLC BEH SEC カラムを連結して多価凝集体を含む mAb サンプルを分析することにより得られる利点についてもデータを示します。

実験方法

サンプルについて

特に記載がない限り、すべてのサンプルは移動相で希釈しました。タンパク質は、単品の標準品または混合物として販売されているものを使用しました。IgG_1 mAb は、使用期限の過ぎたバイオ医薬品のトラスツズマブを用いました。特に記載がない場合、サンプル濃度は 1.0 mg/mL（設定値）としました。

分析条件（その他条件は別途記載）

LC条件

システム：	ACQUITY UPLC H-Class Bio/30 cm カラムヒーター
検出：	ACQUITY UPLC TUV 検出器 /5 mm チタンセル Wyatt 社製 miniDAWN TREOS 光散乱検出器
検出波長：	280 または 214 nm
カラム：	ACQUITY UPLC BEH450 SEC、2.5 µm、4.6 x 150 mm（製品番号 176002996）および 4.6 x 300 mm（製品番号 176002997）ACQUITY UPLC BEH200 SEC、1.7 µm、 4.6 x 150 mm（製品番号 186005225）および 4.6 x 300 mm（製品番号 186005226）
HPLC カラム：	シリカベース、ジオール、450 Å、8µm、7.8 x 300 mm
カラム温度：	室温
サンプル温度：	10℃
注入量：	5 µL
流速：	0.35 mL/min
移動相：	5 mM リン酸バッファー、250 mM 塩化ナトリウム、pH6.8 （Auto•Blend Plus テクノロジーにより自動調製）
グラジエント：	アイソクラティック
標準品：	BEH450 SEC タンパク質スタンダードミックス（製品番号 186006842）
サンプルバイアル：	不活性ガラス製 12 x 32 mm スクリューネックトータルリカバリーバイアル キャップ・ プレスリット PTFE/ シリコンセプタム付き（製品番号 186000385DV）

データ管理

Empower 3 ソフトウェア

UNIFI® 情報システム

Wiatt 社製　Astra ソフトウェア

架橋実験詳細

共有結合した高分子量 IgG 凝集体は Waters インタクト mAb スタンダード（製品番号 186006552）、Pierce 社製リジン特異的クロスリンキング試薬、BS3 にて調製しました。最終濃度 10 mg/mL の抗体を用い、試薬、抗体をモル比 5:1 で混合し、30 分反応させました。

結果および考察

IgMおよびIgMダイマー分離におけるSE-UPLCとSE-HPLCの比較

IgM（分子量 900 kDa の 5 量体免疫グロブリン）および分子量 1.8 MDa の 2 量体の分離について、BEH450 UPLC カラムをシリカベースの粒子径 8 µm の HPLC カラムと比較しました（図 1）。サンプル注入量と流速はカラムサイズにより調整し、どちらのカラムでの分析も ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで行いました。BEH450 UPLC カラムでは、IgM（5 量体）とその 2 量体との分離が大きく改善し、感度についても HPLC カラムと比較して 50% 以上高いピーク強度が得られました。分離効率におけるこの顕著な改善は、基本的にカラム充填剤の粒子径を微小化したことに由来します。また、クロマトグラムの最初に溶出している多量体ピークに示されるように、BEH450 UPLC カラムの対象分子量範囲が IgM 2 量体より高分子側に拡大したことも観察されます。

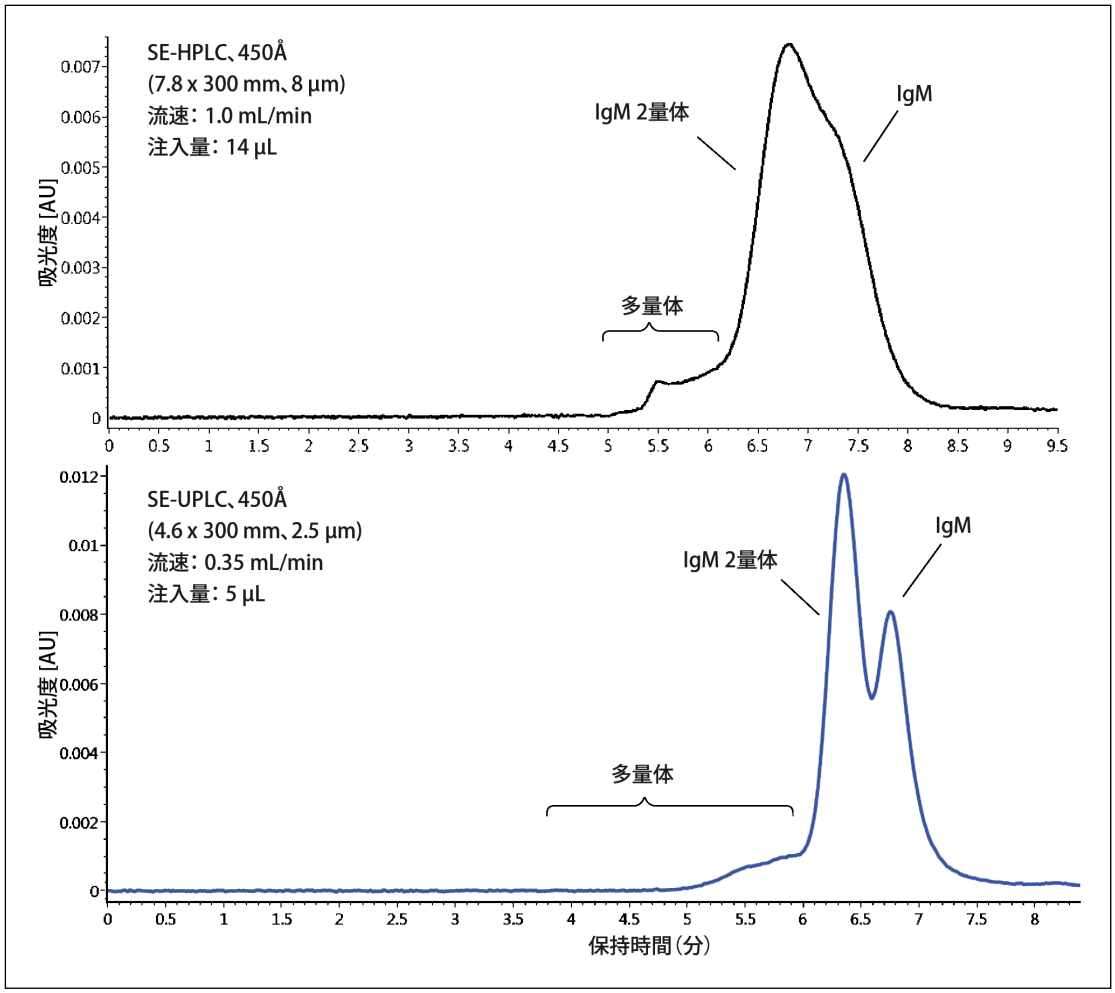

図 1　IgM（5 量体、900 kDa）とその 2 量体（1.8 MDa）の分離におけるシリカベースの粒子径 8 µm、ポアサイズ 450 Å の HPLC SEC カラム（長さ 300 mm）および ACQUITY UPLC BEH450 SEC カラム（長さ 300 mm）との比較。サンプル注入量、流速はカラムサイズに従って標準化。ピーク同定については SEC-MALS により確認。

mAb凝集体分析における測定分子量範囲の拡大

ACQUITY UPLC BEH200 の対象分子量範囲（約 450 kDa）を超えるサイズのタンパク質の分離に対して、ACQUITY UPLC BEH450 カラムがもたらす卓越した分離能力は、これら 2 種のカラムを連結して分析することで、より広い分子量範囲で SE-UPLC 分離を行うことができるという利点を示唆します。図 2 に Waters® BEH200 タンパク質スタンダードミックス（製品番号 186006518）を用いて、ACQUITY UPLC BEH200 カラム、ACQUITY UPLC BEH450 カラムそれぞれ単独（カラム長 300 mm）と、150 mm の BEH200 カラム、BEH450 カラムを連結した（BEH200 の後方に BEH450 を接続）場合とで、分離を比較して示しました。BEH200 カラムの 1.7 µm 充填剤の背圧は BEH450 カラムの 2.5 µm 充填剤の背圧より高いので、この実験では BEH200 カラムを前方につなぎました。この 2 種類のカラムを接続して分析した結果は図 2 の中段に示しました。両カラムを連結することにより、サイログロブリンとそのダイマーの分離に見られるように、BEH200 カラムを単独で使用した場合と比較して高分子側の分離が改善します。加えて、低分子側については、BEH450 カラムを単独で使用した場合と比較し、IgG と BSA の分離に向上が見られます。

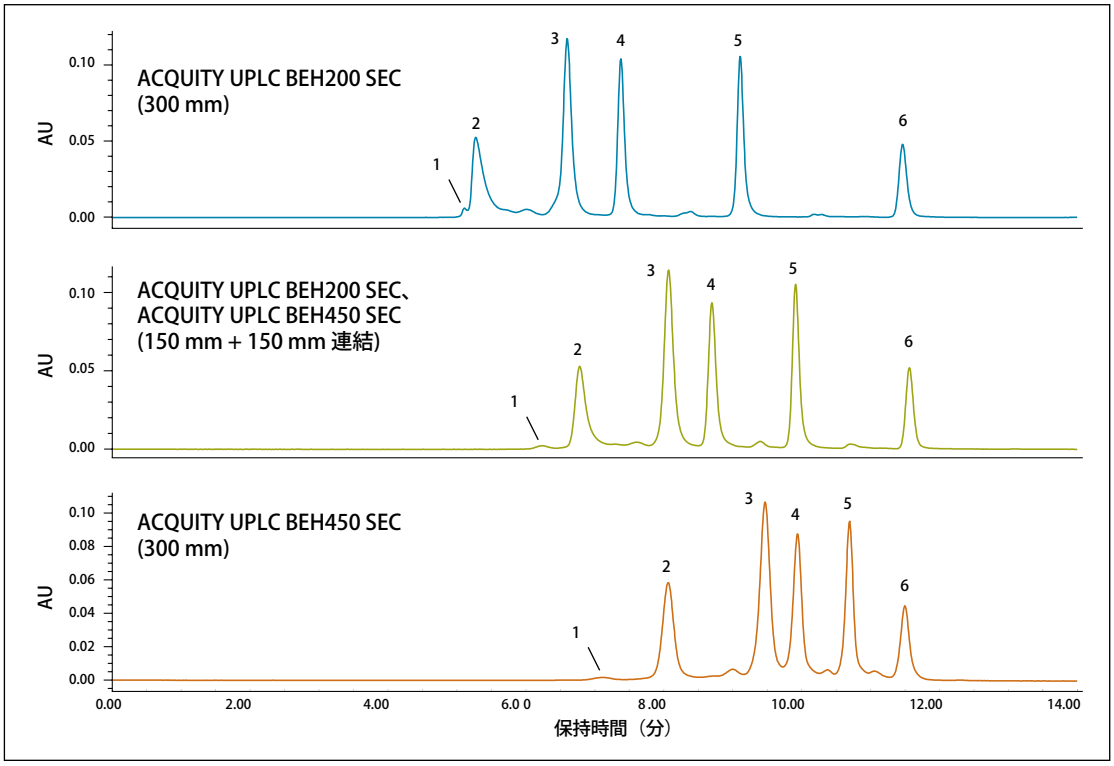

図 2　ACQUITY UPLC BEH450 カラム（300 mm）と ACQUITY UPLC BEH200 カラム（300 mm）との比較。中段は、150 mm の BEH450 カラム、BEH200 カラムを接続して分析した結果。カラムは Waters パーツ（製品番号 186006613）で接続。各ピークの成分は以下の通り。1. サイログロブリン ダイマー（1340 kDa）、2. サイログロブリン（667 kDa）、3. IgG（150 kDa）、4. BSA（66 kDa）、5. ミオグロビン（17 kDa）、6. ウラシル（112 Da）

2 種類の異なるポアサイズの SEC カラムを連結して使用することでより広い分子量範囲での分析が可能となります。その一例が、mAb の多量体、3 量体、2 量体、単量体の分離です。この分離の確認に際し、十分量の安定した多量体を得るため IgG（製品番号 186006552）を架橋して、共有結合した 2 量体、多量体を調製し、このサンプルを BEH200 および BEH450 カラムによって分離可能な mAb 凝集体の分子量範囲を明らかにするための実験に用いました。架橋反応により高濃度の多量体が生成されるので、多角光散乱（MALS）測定により容易に特性解析ができますが、架橋反応の特性により、ピークの多分散性が高まり、また試薬のタンパク質への非架橋付加もおこります。図 3 のクロマトグラムに、MALS データにより行ったピーク同定結果とともに、BEH200 および BEH450 カラムを接続して使用することによる利点を示しました。BEH200 カラムのみを使用した場合には、単量体と 2 量体で優れた分離が得られました。しかし、BEH450 カラムでの分離と比較すると、3 量体以上の凝集体は、BEH200 カラムの排除限界付近に溶出しています。2 本のカラムを連結することにより（図 3 中段）、多価凝集体の分離も改善し、さらに BEH450 カラム単独の場合と比べ、単量体と 2 量体の分離も改善しています。

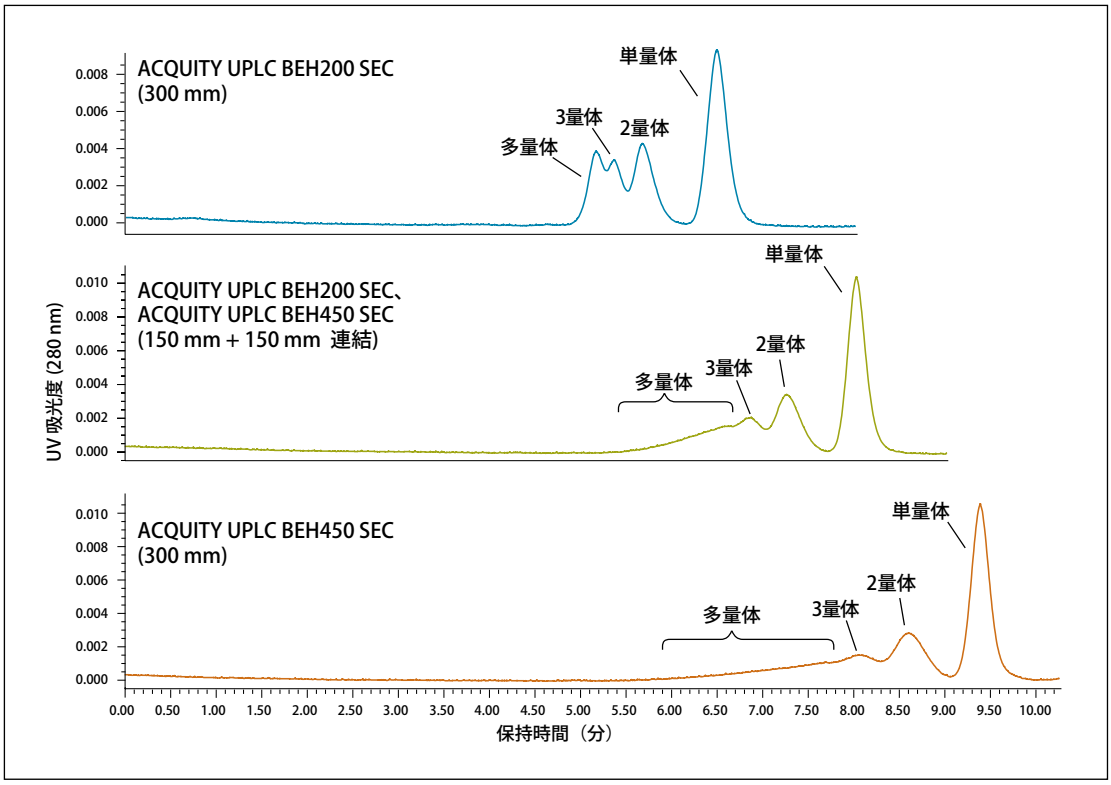

図 3　共有結合で架橋した抗体サンプルを用いた ACQUITY UPLC BEH450 SEC カラムと ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラム（カラム長 300 mm）との分離比較、および BEH450 カラムと BEH200 カラム（カラム長 各 150 mm）を連結した場合の比較。カラムの連結には Waters パーツ（製品番号 186006613）を使用。ピークの同定は SEC-MALS により行いました。

次に、BEH200、BEH450 カラムを連結して、バイオ医薬品 IgG1 mAb（トラスツズマブ）の SE-UPLC 分析を行いました。より実際的な実験にするため、トラスツズマブサンプルの凍結融解を繰り返し、共有結合によらない凝集体を増加させました。凝集体の量は BEH200 カラム（カラム長 300 mm）または、BEH200 と BEH450 カラムを連結して評価し、図 4 に結果を示しました。BEH200、BEH450 カラムを連結して分析した場合では、BEH200 カラムを単独で使用した場合と比較し、2 量体と 3 量体の分離が向上するとともに、多量体の分離が観察されました。反対に、mAb ヒンジ領域の切断により生じる mAb フラグメントについては、BEH200 カラム単独で、より高い分離が得られました。[4]

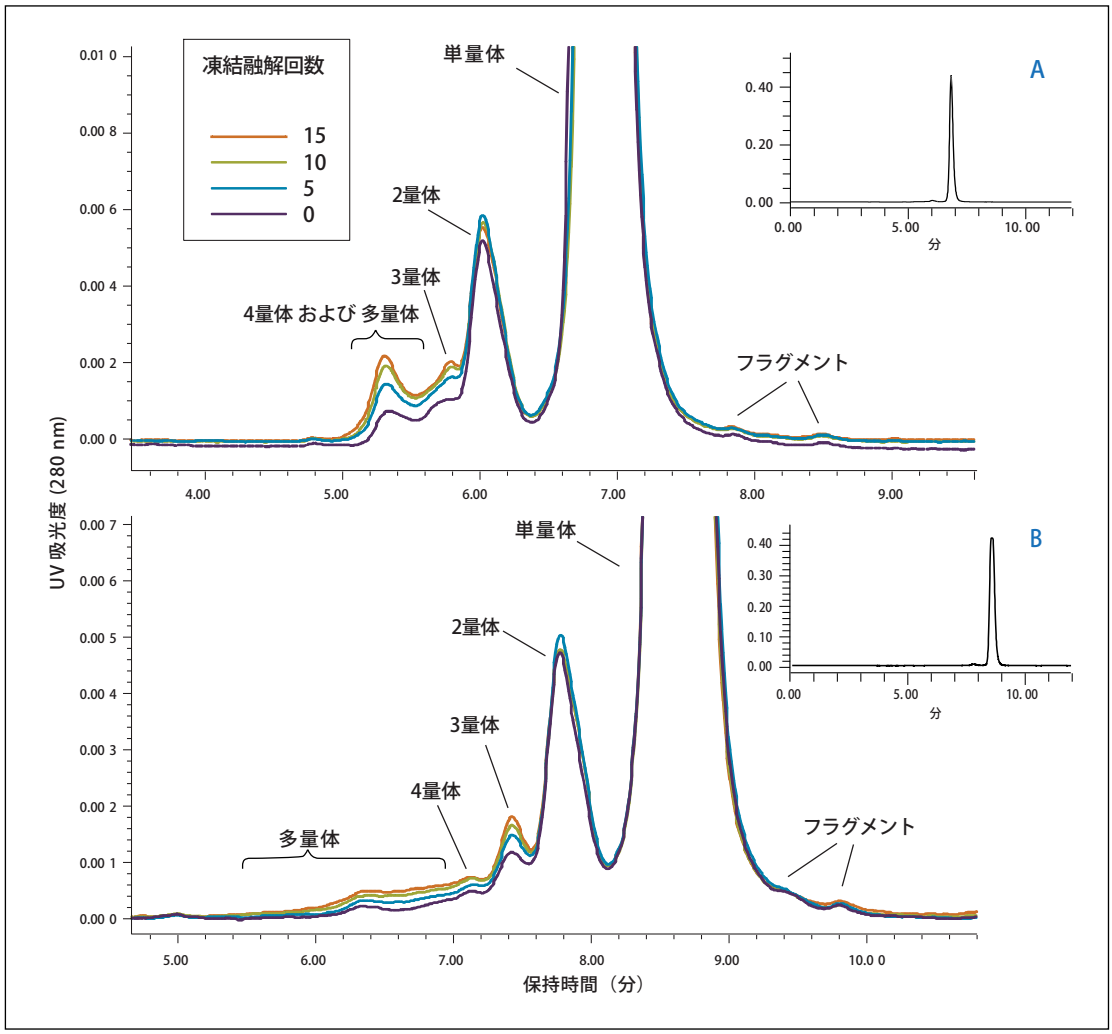

図 4　300 mm BEH200 カラム（A）および BEH200、BEH450 カラム（各 150 mm）を連結した場合（B）の凍結融解（0、5、10、15 回）によるトラスツズマブ（IgG_1）凝集体の分離の比較。低濃度のピークの同定は、溶出位置および図 3 での同定結果から予測。

一連の凍結融解実験のプロファイルの変化を評価すると、どちらのカラム構成においても、凍結融解を繰り返す度に、3 量体と多量体の全体量が増加していることが視覚的に観察できます。また、2 量体の相対量は、3 量体と多量体の合計の相対量と同様に、両方のカラム構成で一致する結果となりました（図 5）。この定量比較を行うにあたって、BEH200 カラムを単独に使用した場合、分離が不十分で正確な積分が難しいため、3 量体と多量体は合計して算出しました。しかし、BEH200、BEH450 カラムを連結した分析結果では、3 量体と 4 量体の分離に改善が見られ、このようなアプリケーションにおいて、2 種のカラムを連結して使用することに顕著な利点が認められます。加えて 3 量体や 4 量体より、価数の大きな凝集体の分布についても、より正確なモニタリングが可能です。以上の結果は、先に図 2 で示したデータとも一致しており、BEH200 カラムの球状タンパク質に対する対象分子量上限が、サイログロブリン（667 kDa）や IgG4 量体（600 kDa）付近であることを示しています。一方、BEH450 カラムの上限は、IgM2 量体（1.8 MDa）付近であり、この分子量は IgG の 12 量体に相当します。より大きなポアサイズをもつ BEH450 カラムによってもたらされるさらなる情報により、タンパク質凝集体の度合いとともに、疫免疫原性の変化に影響する可能性がある凝集体の価数が把握できることとなり、バイオ医薬品タンパク質の特性解析に有用であると考えられます。

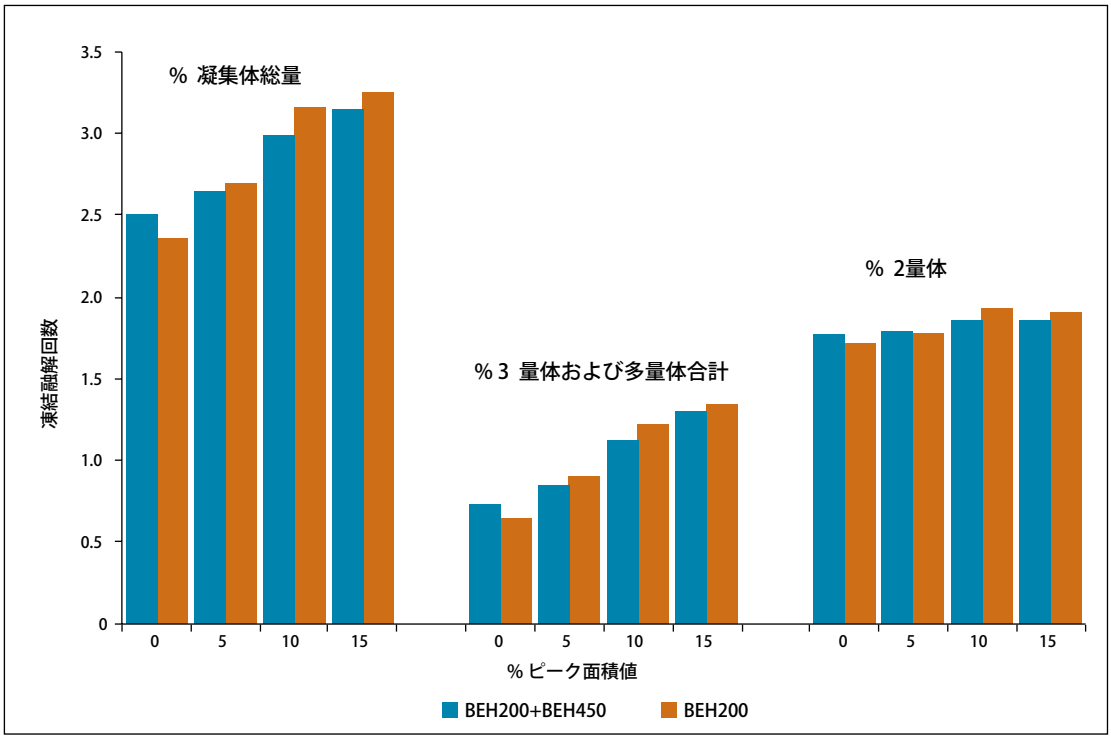

図 5　トラスツズマブ（IgG_1）に見られる凍結融解を繰り返すこと（0、5、10、15 回）により生成された凝集体の相対ピーク面積値の比較。図 4 に示したクロマトグラムから算出。

まとめ

バイオ医薬品タンパク質の調製において、水溶性凝集体の量とその特性はどちらも非常に重要な品質特性です。BEH450 SEC カラムの採用により、SE-UPLC 分析における分子量範囲が拡大し、同じ 450 Å のポアサイズをもつ HPLC カラムと比べ、分離を大きく改善することができます。BEH450 SEC カラムをポアサイズ 200 Å の BEH200 SEC カラムと連結して使用することにより、SE-UPLC の感度、分離、スループットにおける優位性とともに、mAb の 2 量体と多量体両方の分析が可能となる幅広い分子量範囲での分析が実現します。

ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで、ACQUITY UPLC BEH450 SEC、2.5 µm カラムを ACQUITY UPLC BEH200 SEC、1.7 µm カラムと接続して使用することにより、以下のメリットが得られます。

- 従来の SE-HPLC カラムと比較し、分離とスループットが向上
- SE-UPLC の分離対象範囲が拡大（約 10 kDa から約 1,800 kDa）
- 単量体と 2 量体の分離を十分に保ちながら多価の mAb 凝集体分布の観測が可能に

Reference

1. Cromwell ME, Hilario E, Jacobson F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* 2006; 8:E572-9.
2. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *The AAPS Journal*. 2006; 8:501-7.
3. Koza S, Fountain KJ. Advances in Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Macromolecular Proteins. Waters Application Note 720004618EN. 2013 February.
4. Hong P, Koza S, Fountain KJ. Analysis of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry Under Non-Denaturing Conditions. Waters Application Note 720004254EN. 2012 March.

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、ACQUITY、ACQUITY UPLC、Empower、UNIFI、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
Auto•Blend Plus 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。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年8月 720004713JA PDF