Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

サイズ排除および逆相UPLCによるPEG化タンパク質の分析

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

アプリケーションのメリット

- PEG 化タンパク質製剤中の PEG タンパク質複合体、非 PEG 化タンパク質と遊離の活性 PEG レベルの分析に向けた 2 種類の UPLC® の選択肢 SE-UPLC および RP-UPLC を紹介
- SE-UPLC は PEG 化タンパク質と非修飾タンパク質の迅速かつ高分離能の分離を提供
- 本アプリケーションでは、PEG タンパク質複合体、非 PEG 化タンパク質、遊離の活性 PEG の疎水性の違いに基づいた分離を RP-UPLC により提供

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® Protein Separation Technology (PrST)カラム

ACQUITY UPLC TUV および ACQUITY UPLC ELSD を備えた ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

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、タンパク質、SE-UPLC、ゲルろ過クロマトグラフィー、ポリエチレングリコール、PEG、PEG 化タンパク質、逆相クロマトグラフィー、RP-UPLC

はじめに

最初の PEG 化バイオ医薬品である pegademase は、ウシ由来酵素であるアデノシンデアミナーゼと分子量 5 KDa のポリエチレングリコール（PEG）の複合体で、1990 年に発表されました。pegademase は重症複合型免疫不全（SCID）の治療に用いられます。2012 年の時点で、10 種類の承認済 PEG 化複合体が市販され、その他候補薬も臨床研究段階です。[1] 数あるメリットの中でも、PEG 化によりバイオ医薬品の薬物動態的安定性が向上します。しかしながら、興味深いことに、通常の健康な人の約 25% は、このような PEG がパーソナルケア製品で広く使用された結果によると考えられる抗 PEG 抗体をもつことが報告されています。抗 PEG 抗体の発生は PEG 複合体による診療においても認められています。[2, 3] PEG 化複合体の薬効もおそらく安全性もどちらも PEG 化の程度によって決まるため、PEG 化の程度はモニターすべき重要な品質要因です。

PEG 化タンパク質は、イオン交換（IEC）、サイズ排除（SEC）、逆相（RPC）クロマトグラフィーを含む数多くの方法で分離されます。[4] 本アプリケーションでは、分子量 50 KDa のタンパク質、40 KDa の活性 PEG（aPEG）とその複合体の 3 種類についての分離を UPLC で SEC（SE-UPLC）と RPC（RP-UPLC）を用いて評価しました。RP-UPLC 分析法は蒸発光散乱検出器（ELSD）にそのまま適合するように開発しました。こういった種類の分析に対する SEC の利用は報告されていますが [5]、SEC モードによる本アプリケーションでの分離成功の程度は、結局のところ 3 種類の化合物の流体力学的半径と多分散性によって決まります。また、本アプリケーションにおける逆相分離の成功は 3 種類の化合物の疎水性によって決まります。

実験方法

サンプル詳細

全てのサンプルは共同研究先から御提供頂きました。また記載の濃度は名目値です。

分析条件

（別途記載の無い限り）

LC条件

LC システム：ACQUITY UPLC H-Class Bio システム
（30 cm カラムヒーター付）

検出：ACQUITY UPLC TUV 検出器
（5 mm チタンフローセル）
設定：280 nm、
1 Hz サンプリングレート
ACQUITY® ELSD 検出器

設定：Gain ＝ 500、
Data Rate ＝ 20 pps
Time Cont. ＝ Fast
Gas Pressure ＝ 40.0 psi
Nebulizer Heating at 10% Power Level
Drift Tube Temp. 50 ℃

カラム：Waters ACQUITY UPLC BEH450 SEC カラム、
450 Å、2.5 µm、
4.6 × 150 mm
（製品番号：176002996）

Waters ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラム、
200 Å、1.7 µm、4.6 × 150 mm
（製品番号：186005225）

Waters ACQUITY UPLC BEH300 C_4 カラム、
300 Å、1.7 µm、2.1 × 50 mm
（製品番号：18600449）

カラム温度：SEC：40 ℃、RPC：90 ℃

サンプル温度：10 ℃

注入量：SEC：10 µL、C_4：5 µL
（別途記載の無い限り）

流速：SEC：0.4 mL/min、
C_4：0.5 mL/min

移動相：SEC：200 mM ギ酸アンモニウム、
5%ACN

C_4：水（A）/ ACN（B）、
0.1%（v/v）TFA

グラジエント：SEC：アイソクラティック
C_4：グラジエント

時間（分）	%A	%B
Initial	95	5
1	95	5
16	5	95
17	5	95
20	95	5
25	95	5

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア：
Waters Empower® 2 FR5

結果および考察

SE-UPLC

評価には、幅広い分子量範囲に対応できるBEH200（ポアサイズ200Å）とBEH450（ポアサイズ450Å）のSE-UPLCカラム（長さ150 mm）を連結[6]して用いました。分子量50 KDaのタンパク質、40 KDaのaPEGおよびPEG-タンパク質複合体で構成される所有権のあるサンプルは共同研究先から入手しました。200 mMギ酸アンモニウムと5%（v/v）アセトニトリルからなる揮発性の移動相をこれら分析種に対して選択しました。このバッファー組成によりaPEGと複合体の重要なペアについて最適な分離が得られ、また揮発性のバッファーであるため、UV吸収に比べてaPEGの感度が向上する蒸発光散乱検出器（ELSD）を用いた場合にも使用できます。本研究に用いた40 KDaのaPEGは約300 nmを極大とするブロードで弱いUV吸収をもちます。そのため、評価を行った高負荷量のaPEGサンプルは280 nmUV吸収で十分な感度が得られます。複合体、50 KDaのタンパク質および40 KDaのaPEGについてのフルスケールクロマトグラムを図1に示しました。さらに、図2にはaPEGおよび複合体のクロマトグラムの重ね書きを示しました。これら3つのサンプルのクロマトグラムに基づくと、SEC法により複合および非複合タンパク質の有用な分離が得られますが、主に複合体が存在する場合、複合体とaPEGの分離は低濃度のaPEG定量には不十分であることは明らかです。

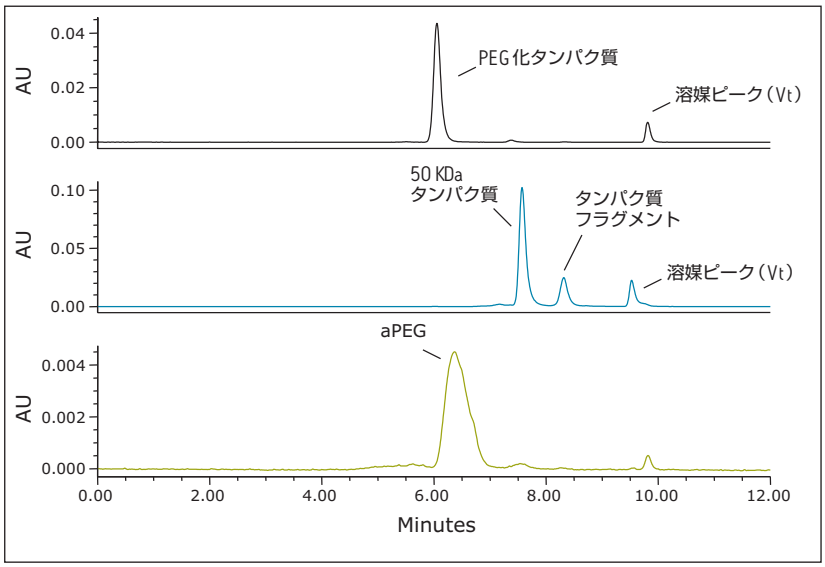

図1. PEG化50 KDaタンパク質（黒）、50 KDaタンパク質（青）、活性40 KDa PEG（緑）のSE-UPLC UVクロマトグラム（280 nm）

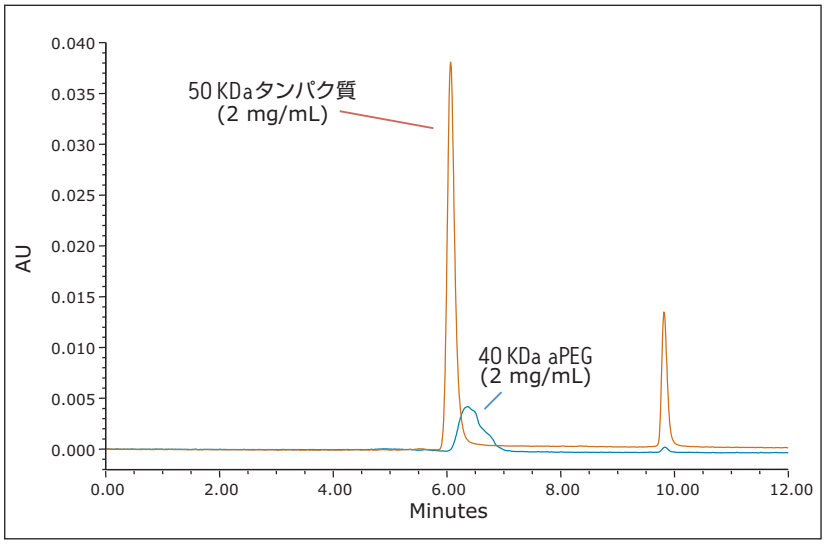

図2. PEG化50 KDaタンパク質（茶）と活性40 KDa PEG（青）のSE-UPLC UVクロマトグラム（280 nm）重ね書き

これらの結果は、PEG 化タンパク質と遊離の aPEG 定量に向けた SEC ベースの分離は場合によって達成できない可能性があることを示しています。これは、aPEG 自身および aPEG-タンパク質複合体の溶出プロファイルをブロードにする、aPEG の多分散性など多くの要因によるものです。さらに、結合した PEG とタンパク質表面間の相互作用の性質によりサイズベース分離の有用性が制限されます。究極的には、SEC 分離の成功を決定する重要な要因は、aPEG、タンパク質および複合体の流体力学半径（R_h）の分布です。SEC 分離成功に必要な R_h 値は Fee と Van Alstine の研究で提案された関係を用いて経験的に概算することができます。[7,8] これらの関係に基づくと、所定の分子量において PEG の R_h は一般的にタンパク質に比べてずっと大きくなります。SEC で分離するには、一般的に 2 つの成分における R_h 値の比は約 1.26 以上か、もしくは逆に 0.79 以下である必要があります。[8] 球状タンパク質では、これは分子量が 2 倍になることに相当します（$R_h \propto MW^{1/3}$）。この理論的な関係を用いると、混合物から非 PEG 化タンパク質、aPEG、複合体を分離できるサイズベースの分離を開発することは困難であることは明らかです。表 1 には、これらの成分について様々な分子量の組み合わせで予測される R_h の比を示しました。幅広い分子量のタンパク質および PEG をカバーしたこの予測結果から、SEC により 3 つの成分を全て分離できると予測される成分の組み合わせは 3 種類しかありません。本研究に用いた 50 KDa タンパク質と 40 KDa aPEG の予測値は、aPEG および複合体どちらもタンパク質とは十分な分離を達成しているという実験的に観測された結果を裏付けています。しかしながら、複合体と aPEG との R_h 比（1.07）は 1.26 を大きく下回っており、これら 2 成分では不十分な分離が観測された結果と一致していました。

Protein MW (Da)	PEG MW (Da)	$R_{h,PEG}/R_{h,pro}$	$R_{h,pro+PEG}/R_{h,pro}$	$R_{h,pro+PEG}/R_{h,PEG}$
25000	5000	0.93	1.42	1.53
50000	5000	0.74	1.32	1.78
100000	5000	0.59	1.24	2.11
150000	5000	0.51	1.20	2.35
25000	10000	1.37	1.71	1.25
50000	10000	1.09	1.52	1.40
100000	10000	0.86	1.38	1.60
150000	10000	0.75	1.32	1.75
25000	20000	2.02	2.22	1.10
50000	20000	1.61	1.89	1.18
100000	20000	1.27	1.64	1.29
150000	20000	1.11	1.54	1.38
25000	40000	2.98	3.08	1.03
50000	40000	2.37	2.52	1.07
100000	40000	1.88	2.10	1.12
150000	40000	1.64	1.91	1.17

表 1. 各成分流体力学半径 [PEG（$R_{h,PEG}$）、タンパク質（$R_{h,pro}$）、複合体（$R_{h,pro+PEG}$）] の推測される比率。比率が 1.26 以上または 0.79 以下（緑）であることは、SEC により 2 成分の十分な分離が推測されることを示唆しています。比率が 0.79 と 1.26 の間の値（青）であることは、2 成分の十分な分離は予測できないことを示唆しています。3 成分全て分離すると推測される組み合わせのタンパク質と aPEG の分子量は緑でハイライトしています。.

注目すべきは、表 1 の推測される R_h 比は概算値で、R_h 比が 1.0 に近づくにつれて 2 成分の分離成功の可能性が低減することです。しかしながら、境界の R_h 比にある成分について良好な SEC 分離が得られる可能性もあり、そういった成分については実験的に検討する必要がある場合もあります。さらに、非 PEG 化タンパク質と PEG 化タンパク質を定量するためのアプリケーションなど、3 成分中 2 つだけの分離が必要な場合、分子量の最も大きいタンパク質と分子量の最も小さい 5 KDa の PEG の組み合わせを除き全てにおいて、有用な SEC 分離（表 1 の $R_{h,pro+PEG}$ / $R_{h,pro}$ 列）が予測されることも注目すべき点です。

RP-UPLC

SEC に代わる方法として、PEG 化はタンパク質の疎水性に大きく影響するであろうという理解の下、非 PEG 化タンパク質、aPEG、複合体の混合物の分離に C_4 結合相を用いた RP-UPLC を評価しました。この分析には、観測されたピークの特性化を助け、遊離 PEG の十分な感度を得るために、UV 検出の後ろに ELSD を連結して用いました。サンプルの回収率とピーク形状の質を最大化するために、カラム温度として 90 ℃を選択しました。図 3 には、3 種類の成分について得られたクロマトグラムの重ね書きを示しました。この条件下で得られた選択性およびピーク幅により、3 つの分析種間で卓越した分離が得られました。図 4 には、複合したサンプルの ELSD および TUV（280 nm）のクロマトグラム重ね書きを示しています。ELSD（黒）では、低濃度の非 PEG 化タンパク質（名目値 3.4%）だけでなく低濃度（名目値 5%）の aPEG のピークも観測されました。レスポンスがリニアではなく、分析種の性質と移動相組成に依存するため、ELSD で決定した値は相対値です。結果として、UV280 nm のピーク面積に基づく非 PEG 化タンパク質の濃度は有意に高くなりました（13.1%）が、サンプル中の低濃度の遊離 aPEG は、UV 吸収の検出限界以下でした。従って、1 回の分析で 3 成分全ての濃度を効率的にモニターするには、両方の検出器を連結して用いることが必須です。

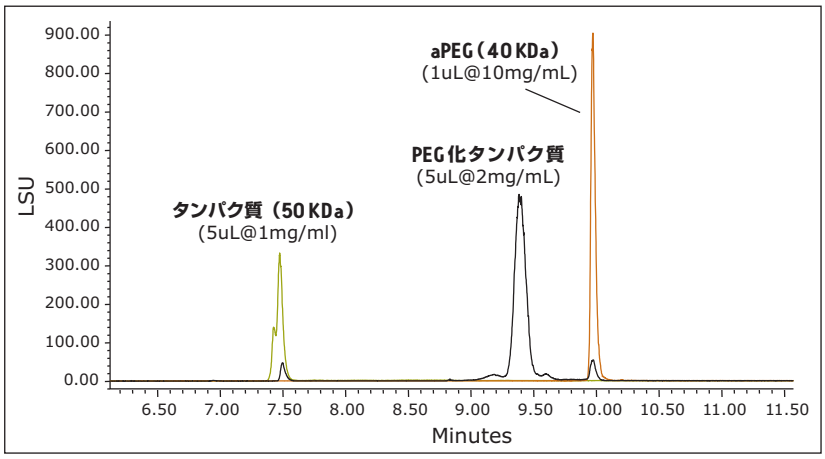

図 3. PEG 化 50 KDa タンパク質（黒）、50 KDa タンパク質（緑）、活性 40 KDa PEG（茶）の C_4 RP-UPLC ELSD クロマトグラム重ね書き

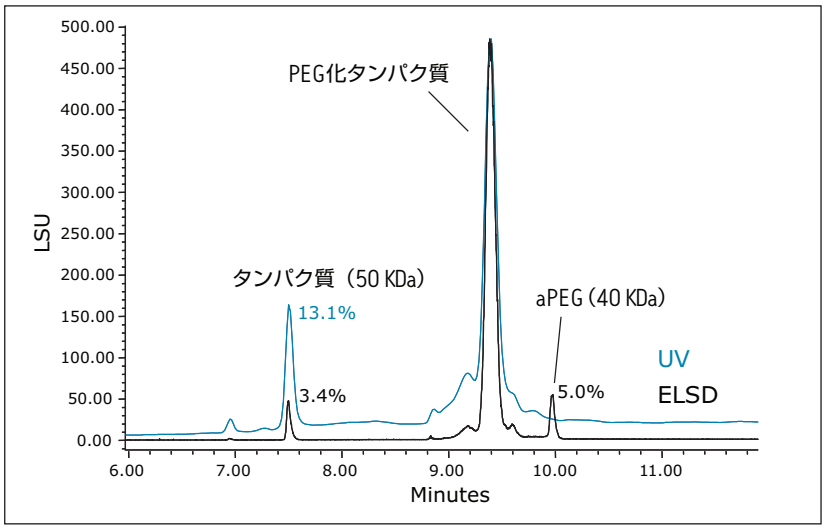

図 4. RP-UPLC BEH300 C_4 カラムを用いて分離した PEG 化 50KDa タンパク質の ELSD（黒）および UV280 nm（青）の重ね書き（標準化）

結論

非 PEG 化タンパク質、aPEG、複合体の R_h 値が十分に異なっていれば、SE-UPLC によりタンパク質 PEG 化反応における未反応成分と PEG 化タンパク質の迅速な分離が得られます。タンパク質と PEG 分子量の組み合わせによる R_h 値から、多くの状況で 3 成分全てに対し SE-UPLC で十分な分離は得られないことが予測されました。これはまさに本アプリケーションのケースで、40 KDa PEG と PEG 化 50 KDa タンパク質の R_h 値が SE-UPLC により分離可能なだけの有意差がないことがモデルから正しく予測されました。しかしながら、多くの場合、SE-UPLC はサンプル中の PEG 化および非 PEG 化タンパク質を分離するため、特に分子量の大きいPEG（20 および 40 KDa）が用いられるサンプルに使用できます。

比較して、この特定のアプリケーションでは、300 Å BEH カラムを高温（90℃）で用いて疎水性の違いに基づき 3 種類の成分全てを十分に分離できることが分かりました。さらに、UV および ELSD 検出器両方を連結して用いることで定量にも利用できます。

参考文献

1. Banerjee SS, Aher N, Patil R, Khandare J. Poly (ethylene glycol)-Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications. *Journal of Drug Delivery.* 2012; 2012.
2. Armstrong JK, Hempel G, Koling S, Chan LS, Fisher T, Meiselman HJ, et al. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer.* 2007; 110:103-11.
3. Garay R, Labaune J, editors. Immunogenicity of polyethylene glycol (PEG). The Open Conference Proceedings Journal; 2011.
4. Fee CJ, VAN ALSTINE JAM. Purification of pegylated proteins. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 2011; 149:339.
5. Li N, Ziegemeier D, Bass L, Wang W. Quantitation of free polyethylene glycol in PEGylated protein conjugate by size exclusion HPLC with refractive index (RI) detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48:1338.
6. Koza S, Lauber, M., and Fountain, K.J. . The Analysis of Multimeric Monoclonal Antibody Aggregates. Waters Application Note. 2013; 720004713EN
7. Fee CJ, Van Alstine JM. Prediction of the viscosity radius and the size exclusion chromatography behavior of PEGylated proteins. *Bioconjug Chem.* 2004; 15:1304-13.
8. Fee CJ, Van Alstine JM. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chemical engineering science.* 2006; 61:924-39.

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 富山

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

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan.

2014年4月 720004782JA PDF