

サイズ排除クロマトグラフィーによる タンパク製剤の凝集体分析

藤村 大樹、安藤 恵美子、鈴木 里沙

ユーザーベネフィット

- ◆ 充填剤と試料との静電相互作用や疎水性相互作用を抑制することにより、モノクローナル抗体や抗体薬物複合体の凝集体および分解物との分離が向上します。
- ◆ 高塩濃度の移動相を用いた分析でも再現性の高いデータ取得が可能です。

■はじめに

タンパク質は製造や保管時の温度、pH、濃度の変化などにより容易に凝集します。モノクローナル抗体 (mAb) や抗体薬物複合体 (ADC) のようなタンパク製剤の凝集は、安全性や効能への影響が懸念されています¹⁾。そのため、製造過程や保管によって生成される凝集体のモニタリングが行われています。一般的なモニタリングの方法として、分子サイズの大きな成分から順に溶出する分離モードのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分析が挙げられます。しかし、mAbの場合は充填剤との静電相互作用、ADCの場合は充填剤との疎水性相互作用による吸着が起これ、単量体と凝集体や分解物の分離が困難になることが知られています^{2), 3)}。信頼性の高いデータ採取のためにはこれら副次的相互作用を考慮する必要があります。

本稿では、当社のサイズ排除クロマトグラフィーカラム “Shim-pack™ Bio Diol” を使用した、mAb、ADCの凝集体分析例を紹介します。なお、システムは高塩濃度の移動相に対し耐腐食性があり、流路内に対する試料の吸着を抑えた “Nexera XS inert” を用いました。

■試薬および分析条件

市販のmAb 1 mg、ADC 0.5 mgに、超純水をそれぞれ 1 mL、0.5 mL加え、1 mg/mLに調製し分析に供しました。mAbおよびADCの分析条件はそれぞれ表1および表2に示します。mAb分析で起こる吸着、その原因である静電相互作用は移動相に塩を添加することにより抑制できることが知られています³⁾。そこで、移動相の100 mmol/Lりん酸緩衝液に150 mmol/Lの塩化ナトリウムを加え、添加時非添加時の分析結果を比較しました。また、疎水性相互作用を抑制するためには、アルコールやアセトニトリルなどの有機溶媒が汎用されます^{2), 3)}。一方で、SECカラムは一般的に耐圧が低いため、本稿では粘度が低いアセトニトリルを採用し、移動相100 mmol/Lりん酸緩衝液への添加量を変化させることでADC分析の分離条件を検討しました。

■mAbの凝集体分析

図1に、塩化ナトリウム非添加および150 mmol/L添加の移動相を用いた場合のクロマトグラムを示します。単量体のピーク付近 (5.5~8.7分) に溶出する凝集体 (図1中-1)、分解物 (図1中-3) のピーク図を併せて示します。塩化ナトリウム非添加の移動相では、単量体のピーク (図1中-2) がテーリングしたのに対し、塩化ナトリウムを150 mmol/L添加した移動相では、テーリングが抑制されました。これに伴い凝集体や分解物のピーク分離も改善されました。これらの結果から、塩化ナトリウムの添加により、充填剤とmAb間の静電相互作用が抑制され、分離向上効果があることが分かりました。

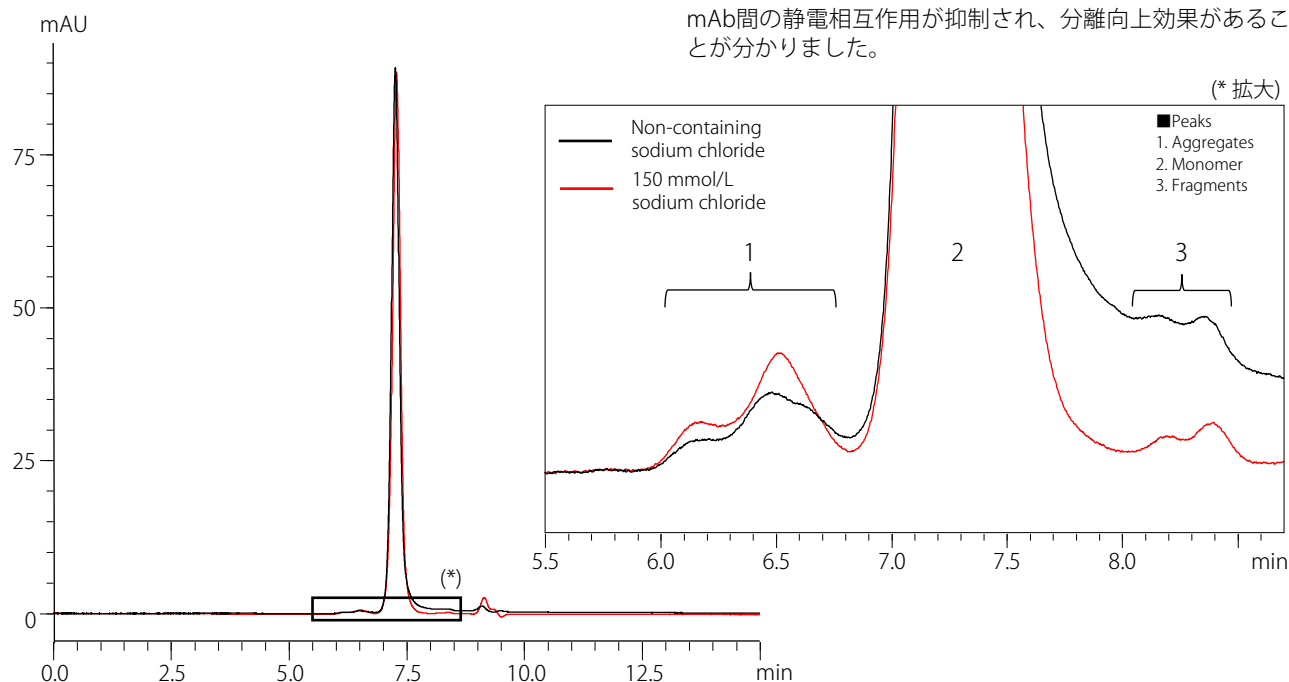


図1 塩化ナトリウム添加/未添加時のmAbのクロマトグラムの比較

■ ADCの凝集体分析

ADC凝集体分析における、移動相中のアセトニトリル濃度の影響を調べました。図2の拡大図に示した通り、アセトニトリル非添加時では、単量体のピークがブロードかつテーリングしました。これに対し、アセトニトリル添加時では、その添加濃度の上昇に従いピーク形状が改善しました。これらの結果から、アセトニトリル添加によるADCと充填剤との疎水性相互作用に対する抑制効果が示されました。ADCでは、抗体に結合した低分子医薬品の疎水性や結合数によって充填剤との疎水性相互作用の度合いが異なるため、ADCの種類に応じ、最適な有機溶媒濃度の検討が必要となります。ただし有機溶媒の過剰な添加は、試料の変性を引き起こす可能性があるため、注意が必要です。

■ まとめ

本稿では、モノクローナル抗体 (mAb) および抗体薬物複合体 (ADC) の凝集体をNexera XS inertおよびShim-pack Bio Diolを用いて分析した例をご紹介します。これらの分析では、塩濃度や有機溶媒の濃度が分離に大きく影響するため、試料と充填剤間に副次的相互作用が働かないよう、適切な種類と濃度を検討する必要があります。

高濃度の塩を含む移動相や、緩衝液に有機溶媒を加えるような移動相は分離向上効果が認められるものの一般的なHPLCシステムにとって過酷な条件です。今回、耐腐食性に優れたNexera XS inertを用いることで、最適な移動相条件による分析が支障なくでき、単量体と凝集体や分解物の分離を改善することができました。

表1 mAb の分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack Bio Diol-300 ^{*1} (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
Mobile Phase	: 100 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 6.9) containing 150 mmol/L sodium chloride or not
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Vial	: TORAST™-H Glass Vial (Shimadzu GLC) ^{*2}
Injection volume	: 5 μL (1 mg/mL mAb)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

*1 : P/N 227-31010-01、*2 : P/N 370-04301-01

表2 ADCの分析条件

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack Bio Diol-300 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
Mobile Phase	: 0, 5, 10, 15% acetonitrile in 100 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 6.9)
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Vial	: TORAST-H Glass Vial (Shimadzu GLC)
Injection volume	: 5 μL (1 mg/mL ADC)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

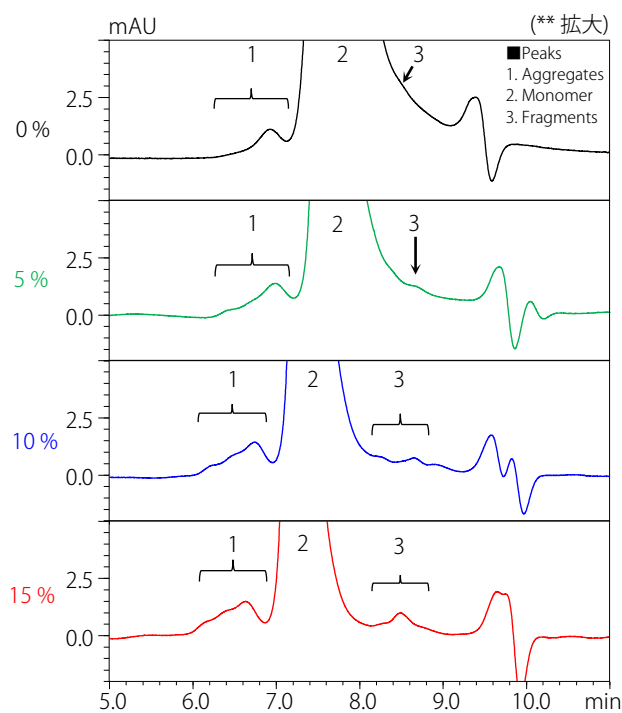
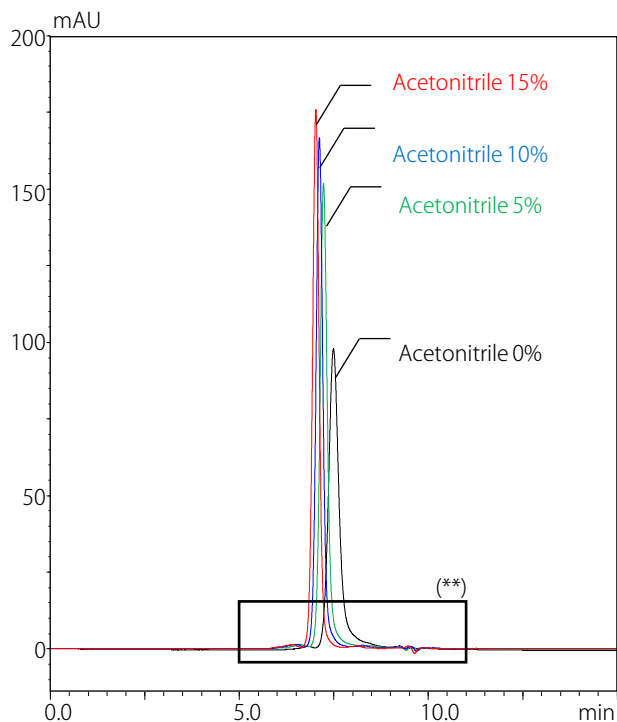


図2 移動相中アセトニトリル濃度の分離への影響

参考文献

- 1) Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J., 8, E501-E507 (2006).
- 2) Striegel, A. M.; Yau, W. W.; Kirkland, J. J.; Bly, D. D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, (2009).
- 3) 荒川力, 江島大輔, 津本浩平, Pete Gagnon. 溶媒によるクロマトグラフィーの制御, 生化学 第80巻 第1号, pp.45-51, (2008).

Nexera, Shim-packは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
TORASTは、株式会社 島津ジーエルシーの商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

01-00273-JP 初版発行：2022年 2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022