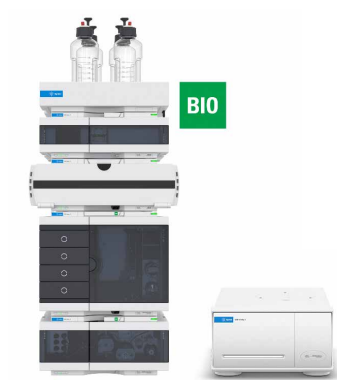


Agilent 1260 Infinity II 多角度光散乱 検出器を用いたモノクローナル抗体の SEC-MALS 分析



著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

概要

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と多角度光散乱 (MALS) 検出を組み合わせることにより、単量体および凝集体タンパク質の正確で信頼性の高い分離と分子量 (MW) 測定が可能になります。Agilent 1260 Infinity II 多角度光散乱検出器は複数の角度で散乱光の強度を測定できるため、Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムを組み合わせることで、バイオ医薬品の分析においてより正確な絶対分子量 (MW) を得ることができます。1290 Infinity II Bio LC は、まったく鉄を含まない流路と、SEC で使用されるような塩ベースの緩衝液に対する高い耐性を備えた、バイオクロマトグラフィーで使用される条件向けに特別に設計されています。

はじめに

SEC は、モノクローナル抗体 (mAb) のような生物製剤タンパク質の特性解析、特に MW、サイズ、凝集体比の評価に不可欠なツールです。これらのパラメータを決定することは、すべてのライフサイクルの段階を通して、製品の特性解析と品質管理においてきわめて重要です。凝集体やフラグメントの比率が高いことは、製品が不安定であることを示す重要な指標となります。そのため、主生成物および潜在的な分解生成物についての詳細な特性解析を行うことは、バイオ医薬品の安全性にとって非常に重要であり、規制機関から求められている項目です。¹

従来のタンパク質の SEC では、規定された MW の異なるタンパク質を含む標準混合物を注入して、紫外 (UV) 検出器や示差屈折率 (RI) 検出器などの濃度検出器で検出し、カラムキャリブレーション (較正曲線) を得ます。SEC 分離を成功させるための重要な要因は、静電相互作用や疎水性相互作用などの「非特異的な」反応によって、タンパク質とカラムが相互作用しないことです。カラムキャリブレーションは溶出量に関係しているため、非特異的な静電相互作用や疎水性相互作用が存在すると、MW 測定が不正確になる可能性があります。

従来の SEC に強力な MALS を追加することにより、「非特異的な」カラム相互作用やカラムにロードされたサンプルの量とは無関係に、絶対 MW を測定できるようになります。光散乱検出器は、カラムキャリブレーションなしで MW を測定できます。さらに、分子サイズがレーザーの波長と比較して十分に大きい場合は、MALS を使用して、回転半径 (Rg) による分子サイズに関する情報を得ることができます。通常、この手法は、Rg が 10 nm を超える分子 (異方性散乱体とみなされる) で使用されます。したがって、球状タンパク質のような等方性散乱体には適用されません。^{2,3}

実験

機器

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム:

- Agilent 1290 Infinity II Bio フレキシブルポンプ (G7131A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)、サンプルサーモスタット付き (オプション #101)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)、クイックコネクト標準フロー Bio 熱交換器 (G7116-60071) 付き
- Agilent 1290 Infinity II 可変波長検出器 (G7114B)、Bio ミクロフローセル VWD、3 mm、2 μ L、RFID 付き (G1314-60189)
- Agilent 1260 Infinity II 多角度光散乱検出器 (G7885A)

注: このアプリケーションノートに示されている測定はすべて、Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムなど、他の Agilent Bio LC ソリューションでも実行できます。

カラム

Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 \times 300 mm、2.7 μ m (PL1180-5301)

ソフトウェア

この実験では、Agilent WinGPC ソフトウェア、バージョン 1.0 を使用しました。それ以降のバージョンも適用可能です。

試薬、溶媒、およびサンプル

超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak、Merck-Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム七水和物、水酸化ナトリウムは Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から入手しました。ウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。MabThera (リツキシマブ) は Medizone Germany GmbH (ミュンヘン、ドイツ) から購入し、冷蔵庫で約 7 年間保管しました。

溶媒とサンプル前処理

15.22 g のリン酸二水素ナトリウムと 46.41 g のリン酸水素二ナトリウム七水和物を用いて、2 L の 150 mM リン酸緩衝液を調製しました。水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7 に調整しました。調製したリン酸緩衝液を 0.2 μ m メンブレンフィルタで 3 回ろ過しました。サンプルは、4 mm 再生セルロースメンブレン、ポアサイズ 0.2 μ m の Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタ (部品番号 5190-5106) を用いてろ過しました。BSA は、調製したリン酸緩衝液中で濃度 20 mg/mL になるように溶解しました。MabThera は、濃度 10 mg/mL に調製しました。

注: 生理学的 pH のリン酸緩衝液は、細菌や藻類が繁殖しやすいため、少なくとも数日ごとに交換する必要があります。緩衝液交換の間には、汚染を防ぐために、LC を水/有機物混合液で洗浄する必要があります。緩衝液塩の結晶化を防ぐため、分析後にポンプの流量を停止するのではなく、低流量に設定する必要があります。

表 1. メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
流量	0.6 mL/min
移動相	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.3 回ろ過
注入量	5~20 μ L
ストップタイム	22 分
ニードル洗浄	フラッシュポート、3 秒、水:イソプロパノール 80:20 (v/v)
オートサンブラ温度	8 °C
カラム温度	30 °C
DAD 検出	280 nm、ピーク幅 > 0.05 分 (10 Hz)
MALS 検出	セル温度 30 °C、20 角で収集

結果と考察

静的光散乱では、検出器のキャリブレーションや検出器間の遅延設定のために測定を1回行うことが必要です。タンパク質の場合、ここで選択される分子は多くの場合 BSA です。図 1 は、AdvanceBio SEC 300 Å、7.8 × 300 mm、2.7 μm カラムでの BSA 単量体、二量体、三量体、四量体、それ以上の凝集体の分離結果を示しています。単量体と凝集体の優れた分離が確認されました。BSA 単量体は、キャリブレーションと検出器の設定に使用しました。異なる凝集体種について計算された値は、単量体の値のほぼ倍数で一致することがわかりました。図 1 は、VWD の UV シグナル、および一般的にタンパク質分析に使用される 90°、1260 Infinity II MALS 検出器で使用可能な最小角度 (12°) と最大角度 (164°) での 3 つの代表的な MALS シグナルを示しています。

分子が大きいほど、MALS 検出器の感度はより高くなります。⁴ MALS はモル質量の影響を受けやすい検出器であり、シグナル強度はサンプルの濃度に依存しますが、モル質量にも依存します。モル質量が高いほど、シグナル強度は高くなります。一方で、UV 検出器のような濃度検出器のシグナル強度は、測定波長における吸光係数のようなサンプル定数とともに、サンプル濃度にも依存します。BSA の高次凝集体は、UV シグナルでは強度が小さいですが、MALS シグナルでは明確に確認できます (図 2)。さらに、小さい角度のシグナルは、BSA の大きい凝集体に対して最高の感度を示します。

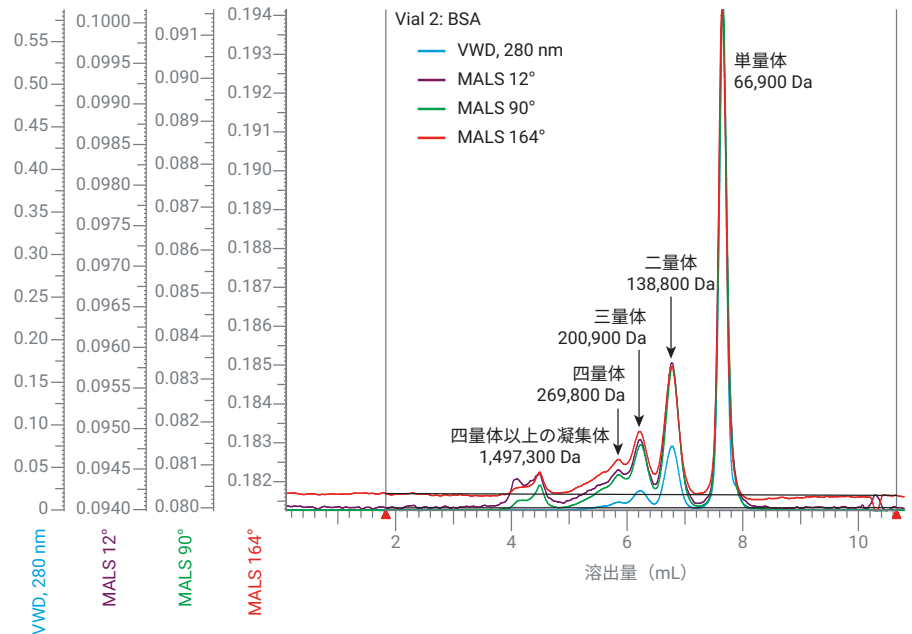


図 1. BSA の SEC MALS 分析結果。280 nm における VWD (青)、および 12° (紫)、90° (緑)、164° (赤) の 3 つの MALS 角度のシグナル。単量体、二量体、三量体、四量体、それ以上の凝集体の対応する MW の結果とともに表示しています。

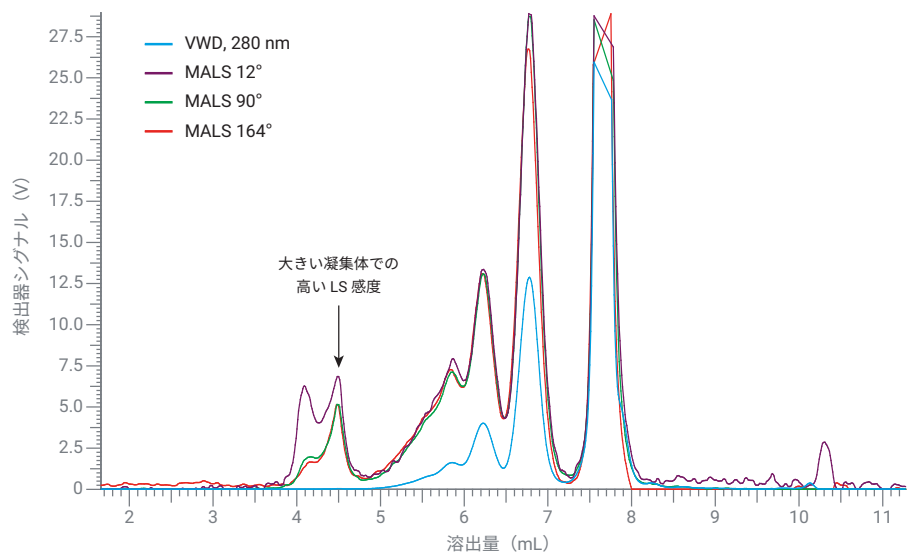


図 2. BSA の SEC-MALS 分析結果 - 拡大図。280 nm における VWD (青)、および 12° (紫)、90° (緑)、164° (赤) の 3 つの MALS 角度のシグナルから、分子サイズが大きくなるにつれて、MALS 対 UV 感度が高くなるのがわかります。

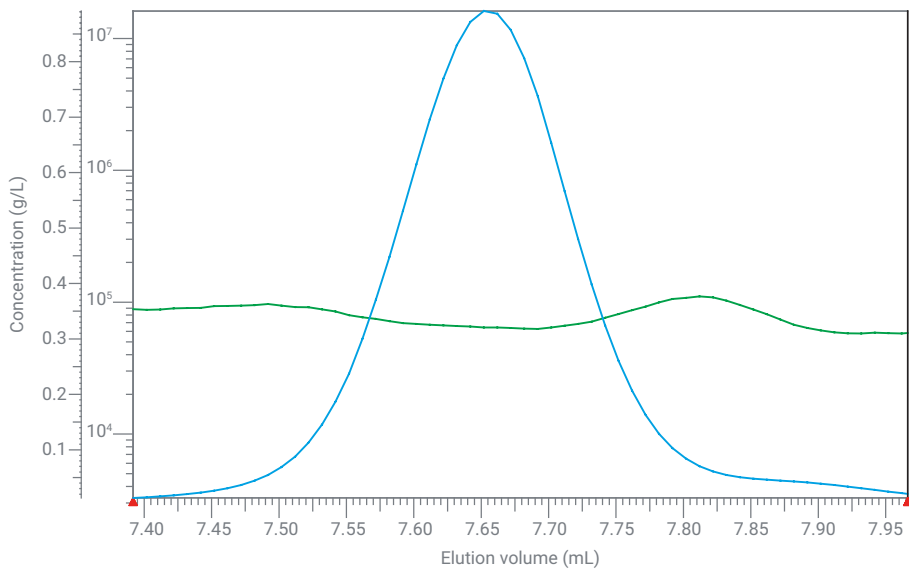


図 3. 単分散ピーク(平坦な緑色のシグナル)を示す BSA 単量体(青色の UV シグナル)

BSA 単量体のような純粋な単量体タンパク質は、SEC クロマトグラムに単分散ピークを生成し、規定された MW を持つ 1 種類の分子が含まれています (図 3、ピーク限界内の平坦な緑色のシグナル)。

図 4A および 4B は、モノクローナル抗体 MabThera (リツキシマブ) の SEC-MALS による特性解析結果を示しています。MALS 分析により、単量体ピークの MW は 144,000 Da であることがわかりました。この MW は文献に記載されている値と一致しています。⁵ 連続 10 回の MW 測定の再現性は、相対標準偏差 (RSD) が 0.139 % と優れていました。図 4B は、凝集体とフラグメントを詳細に観察したものを示しており、二量体以上の凝集体の測定が可能です。さらに、103,400 Da のピークが検出されており、これは重鎖フラグメントの可能性を意味します。メインピークのショルダー部は、単量体ピークの質量として検出されました。

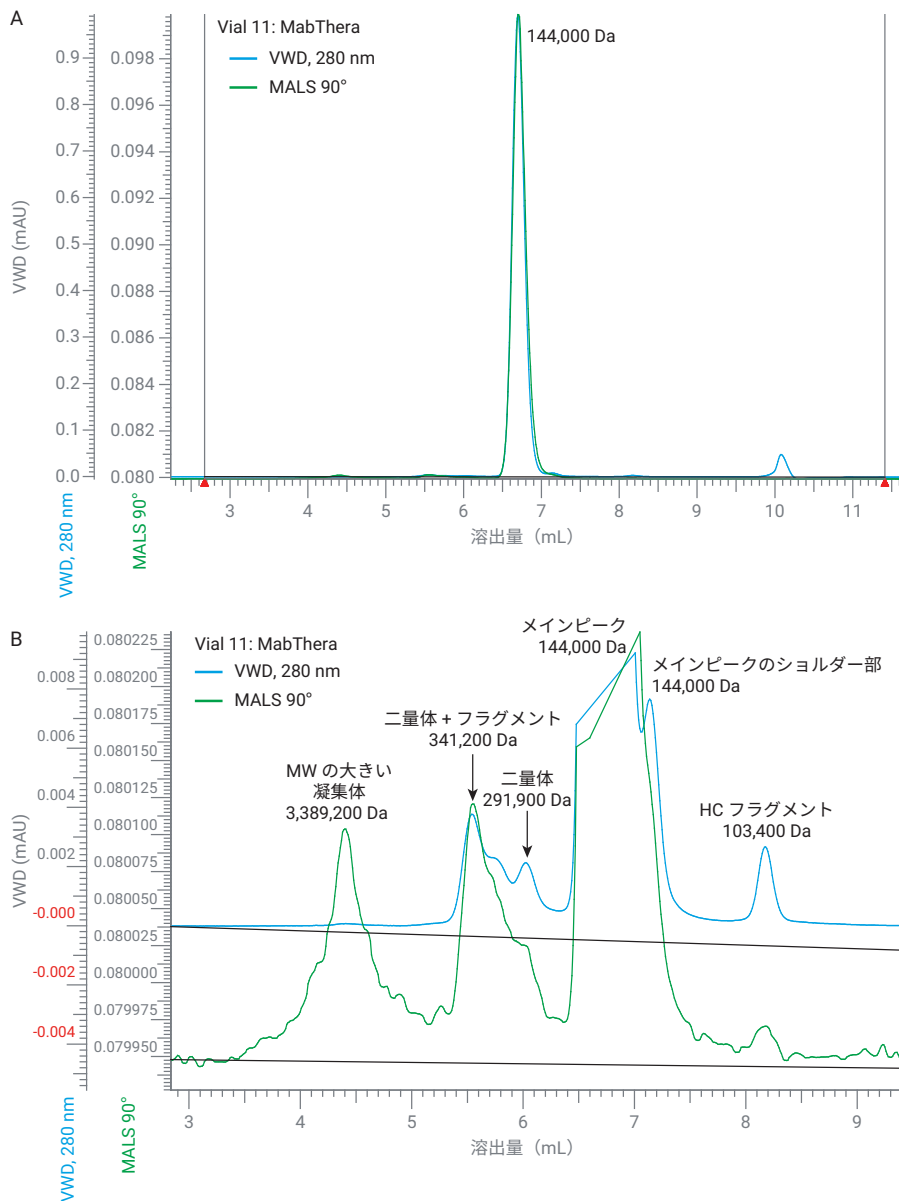


図 4. (A) MabThera (リツキシマブ) の SEC MALS 分析結果。UV (青) と 90° における MALS シグナル (緑)。単量体ピークの MW 測定結果は 144,000 Da でした。(B) 凝集体とフラグメントの詳細の拡大図。

結論

20 角の MALS 検出器を使用することにより、絶対モル質量を高精度で計算することが可能になります。MALS 検出器は、特に高次のタンパク質凝集体に対して UV 検出よりも高い感度を示しており、従来の SEC に貴重な情報を追加します。角度が小さいため、高分子量の凝集体を高感度かつ高精度で測定することができます。Agilent AdvanceBio SEC 300 Å カラムの優れた分離能により、単量体、二量体、それ以上の凝集体、mAb フラグメントを明確に分離することができるため、分離されたピークの一意的 MW 測定が可能になります。

Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムと Agilent 1260 Infinity II 多角度光散乱検出器を組み合わせることにより、完全に生体試料に適合した流路が実現するため、高濃度の塩を含む緩衝液を使用する測定条件や鉄反応性サンプルを測定するといった、一般的には分析困難な場合でも、信頼性の高い結果が得られます。

参考文献

1. Narhi, L. O.; Schmit, J.; Bechtold-Peters, K.; Sharma, D. Classification of Protein Aggregates. *J. Pharma. Sci.* **2012**, *101*(2), 493–498.
2. バイオ医薬品における光散乱およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) *Agilent Technologies white paper*, publication number 5994-6110JAJP, **2023**.
3. Wagner, C.; Innthaler, B.; Lemmerer, M.; Pletzenauer, R.; Birner-Gruenberger, R. Biophysical Characterization of Adeno-Associated Virus Vectors Using Ion-Exchange Chromatography Coupled to Light Scattering Detectors. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(21), 12715.
4. Van Bruijnsvoort, M.; Wahlund, K. G.; Nilsson, G.; Kok, W. T. Retention Behaviour of Amylopectins in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Studied by Multi-Angle Light Scattering Detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *925*, 1–2, 171–182.
5. Flores-Ortiz, L. F.; Campos-García, V. R.; Perdomo-Abúndez, F. C.; Pérez, N. O.; Medina-Rivero, E. Physicochemical Properties of Rituximab. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2014**, *37*(10), 1438–1452.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE74740235

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 15, 2024

5994-7664JAJP