

共有結合した高分子量インスリンの分析

高性能サイズ排除クロマトグラフィーによる分析速度と
分離能の向上

著者

Sandeep Kondaveeti
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent AdvanceBio SEC 120 Å ポアサイズ (サブ 2 μm 親水性ポリマーコーティングのシリカ充填剤) カラムを用いて HPLC サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) メソッドでインスリンを分析しました。その結果を従来のメソッドや他社製カラムと比較し、性能や効率を評価しました。インスリンと高分子量タンパク質の分離能は、AdvanceBio カラムを用いた従来のメソッドでの結果と比べて大幅に向上しました。クロマトグラフィー分析時間は短縮し、ハイスループットのインスリンサンプルの分析が実現できました。

はじめに

インスリンは血糖の恒常性を調節する小さいポリペプチドホルモンであり、糖尿病の治療に広く使われています。製薬会社は、遺伝子工学的手法を用いて、作用が長時間持続する多様なインスリン類似体を開発してきました。インスリンの単量体は酸性条件や高温下でアミロイド様の線維を形成することが、以前から知られています¹。インスリン類似体は天然のインスリンよりも凝集する傾向が強いため、インスリン類似体の製造メーカーでは、このことが特に問題になります²。注射用インスリンの重要な品質管理特性の1つに高分子量（HMW）タンパク質として一般的に知られているインスリンの線維状化の管理があります。現在の米国薬局方（USP）と欧州薬局方（EP）の高分子量凝集体分析のモノグラフメソッドの測定は、HPLC サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）に基づいています^{3,4}。EPメソッドによると、「ポアサイズ 12 ~ 12.5 nm、クロマトグラフィー R の親水性シリカゲル（5 ~ 10 μm）で、共有結合している二量体や重合体とインスリンの単量体の分離に適したグレード」で、長さ 30 cm、内径 7.5 mm 以上を使用すると規定されています。しかし、このメソッドでは分析時間が 35 分と長く、ハイスループットなサンプル分析を実施しているラボでは膨大なコストがかかります。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC 120 Å ポアサイズ（サブ 2 μm 親水性ポリマーコーティングのシリカ充填剤）カラムを用いて開発した SEC メソッドを紹介します。このメソッドの利点は、従来の薬局方のメソッドと比べて分析時間が短縮すること、インスリンおよび共有結合した高分子量インスリンを高分離能で分離できることです。

実験方法

試薬およびサンプル

すべての化学製品および試薬は HPLC グレード以上のものを使用しており、Sigma-Aldrich（現 Merck）または VWR Scientific から入手しました。水は、Milli-Q A10（Millipore）を用いて精製しました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC の構成は次のとおりです。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ（G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ（G5668A）、サンプル冷却器（オプション #100）付き
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、バイオイナート熱交換器（オプション #019）付き
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器（G7114A）

メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm 120 Å, 4.6 × 300 mm (p/n PL1580-5250)
移動相	アルギニン (1.0 g/L) / 酢酸/アセトニトリル (65/15/20 v/v/v)
流量	0.30 mL/min
カラム温度	25 °C
注入量	2 μL
サンプル	ヒトインスリンコントロール、熱ストレスを加えたインスリン (60 °C, 6 時間)
合計分析時間	15 分

ソフトウェア

OpenLab 2.2 CDS

サンプル前処理

コントロールのヒトインスリン（Sigma、I2643）と熱ストレスを加えたインスリンサンプルは Ph. Eur. に従って調製しました。

サンプルは 0.01 N 塩酸溶液に再溶解し、4.0 mg/mL に希釈後、さらに希釈し、最終濃度を 2 mg/mL にしました。

結果と考察

このアプリケーションでは、USP および EP モノグラフで規定されている条件下でインスリンサンプル中の高分子量部分を分析する際の AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm カラムの性能評価について取り上げます。米国および欧州薬局方メソッドで規定されている酸性移動相は、0.65 g/L の L-アルギニン、15% 酢酸、20% (v/v) アセトニトリルで構成されています。この移動相により、インスリンの非共有結合での自己会合やカラムの相互作用を防ぐとともに、サンプル中の共有結合した高分子量部分の存在レベルを評価する

ことができます。評価に用いる AdvanceBio SEC 1.9 μm カラムはシリカ粒子が親水性ポリマーでコーティングされており、分析対象物と粒子表面の望ましくない二次的相互作用を最小限に抑えることができます。さらにこのカラムは優れた分離能を備え、高分子量タンパク質の正確な定量が可能です。図 1 に Ph. Eur. のインスリンコントロール標準を用いたシステム適合性のクロマトグラムを示します。粒子径 1.9 μm カラムでの単量体と高分子量部分の分離能 (Rs) は 4.03 であり、これはモノグラフのシステム適合性要件である 2.0 以上の分離能を大幅に上回っています。インスリンのコントロールサンプル中の高分子量タン

パク質のピーク面積 (表 1) は適合性要件である 1% 未満です。AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm カラムを用いたこのメソッドでは総分析時間は約 15 分です。従来の粒子サイズの大きい親水性シリカカラムを用いる Ph. Eur. モノグラフの分析時間は 35 分と報告されています。従来の粒子サイズの大きい親水性シリカカラムを用いる Ph. Eur. モノグラフの分析時間は 35 分と報告されています。

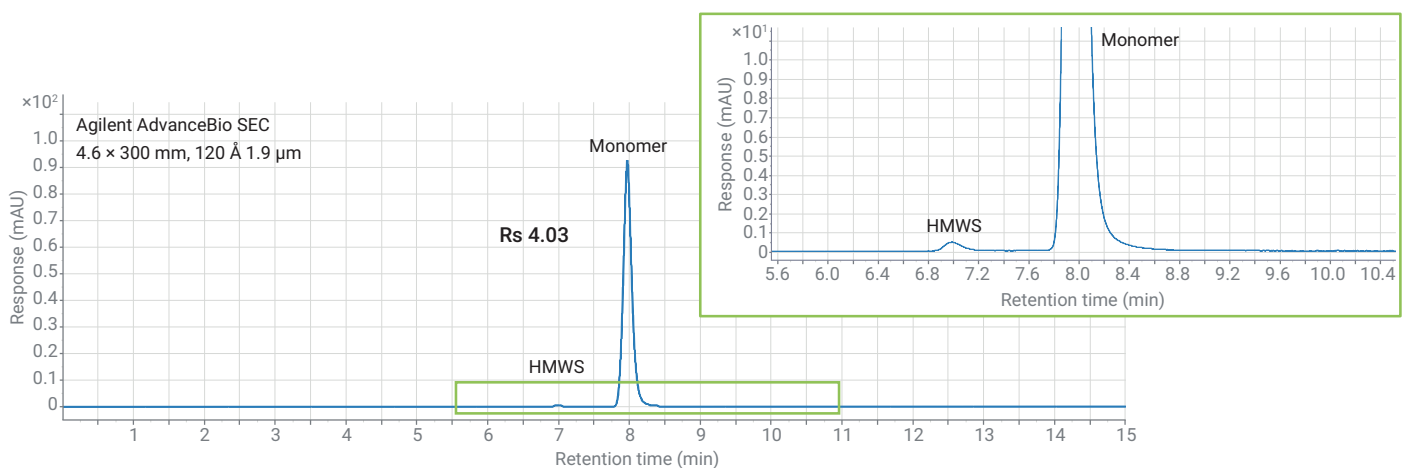


図 1. ヒトインスリンコントロールの単量体および高分子量部分のサイズ排除クロマトグラム

表 1. ヒトインスリンコントロールの SEC 分析の結果のまとめ

ピーク ID	RT (分)	% 面積	Rs USP	ピークテーリング	幅 50%
インスリン高分子量	6.99	0.67		1.48	0.15
インスリン単量体	7.96	99.33	4.03	1.04	0.12

高分子量インスリンの EP モノグラフ SEC 測定メソッドでは、SEC 粒子サイズが 5 ~ 10 μm と規定されていますが、USP モノグラフでは粒子サイズの制限の規定は特にありません。今回の研究の一環として、AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm カラムと他社製の サブ 2 μm 粒子で 内径 4.6 mm、長さ 300 mm の SEC カラムを用いて比較を実施しました (図 2)。粒子径 1.9 μm のアジレント製カラムは、他社製カラムと比較して分離能 (Rs) が大幅に向上 (>50%) することが示されています。分離能の向上はインスリン単量体のピークテーリングからも明らかです。他社製の 2 つの SEC カラムと比較してアジレントの SEC カラムでは低分子量のフラグメントのピークが良好に分離しています。他社製の 2 つの SEC カラムで見られた大きなピークテーリングは、カラムの望ましくない二次的相互作用による可能性があります。インスリンピークの溶出時間が異なっているのはカラムのポアサイズの違いによることに注意が必要です。熱ストレスを加えたインスリンサンプル中の高分子量部分のピーク面積のパーセントは、すべてのカラムで 1% を超えており、サンプルは適合性試験の基準に適合しないことが示されました。ただし、Agilent SEC 120 Å、1.9 μm カラムは他社製カラムと比較して、より高い % で凝集体の分離ができました。

データを表 2 に示します。AdvanceBio SEC 120 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm カラムを用いたメソッドで、単量体と共有結合している二量体のピーク効率が向上し、さらに更新したメソッドで分離能が向上し、分析時間も短縮できます。USP (USP37-NF32S1) と EP のガイドラインに従うと、カラム調整の最大許容値は、イソクラティック分析メソッドで粒子サイズの 50% 減少、カラムの内径の 25% の変更になります。これらの要件に基づいて、サブ 2

μm の粒子サイズ、内径 4.6 mm のカラムを用いてインスリンを分析する SEC メソッドについて、さらにメソッドバリデーションや最新の粒子技術を確立されたメソッドに組み込む最適化が必要になります。

表 2. ストレスを加えたインスリンサンプルを他社製カラムで SEC 分析した結果のまとめ

ピーク ID	Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm			他社製 1 SEC 125 Å 1.7 μm			他社製 2 SEC 150 Å 1.8 μm		
	% 面積	ピーク テーリング	ピーク幅 50 %	% 面積	ピーク テーリング	ピーク幅 50 %	% 面積	ピーク テーリング	ピーク幅 50 %
高分子量種	1.93			1.57			1.10		
インスリン 単量体	97.66	1.00	0.13	97.85	1.10	0.13	98.80	1.37	0.14
低分子量種	0.41			0.58			0.20		

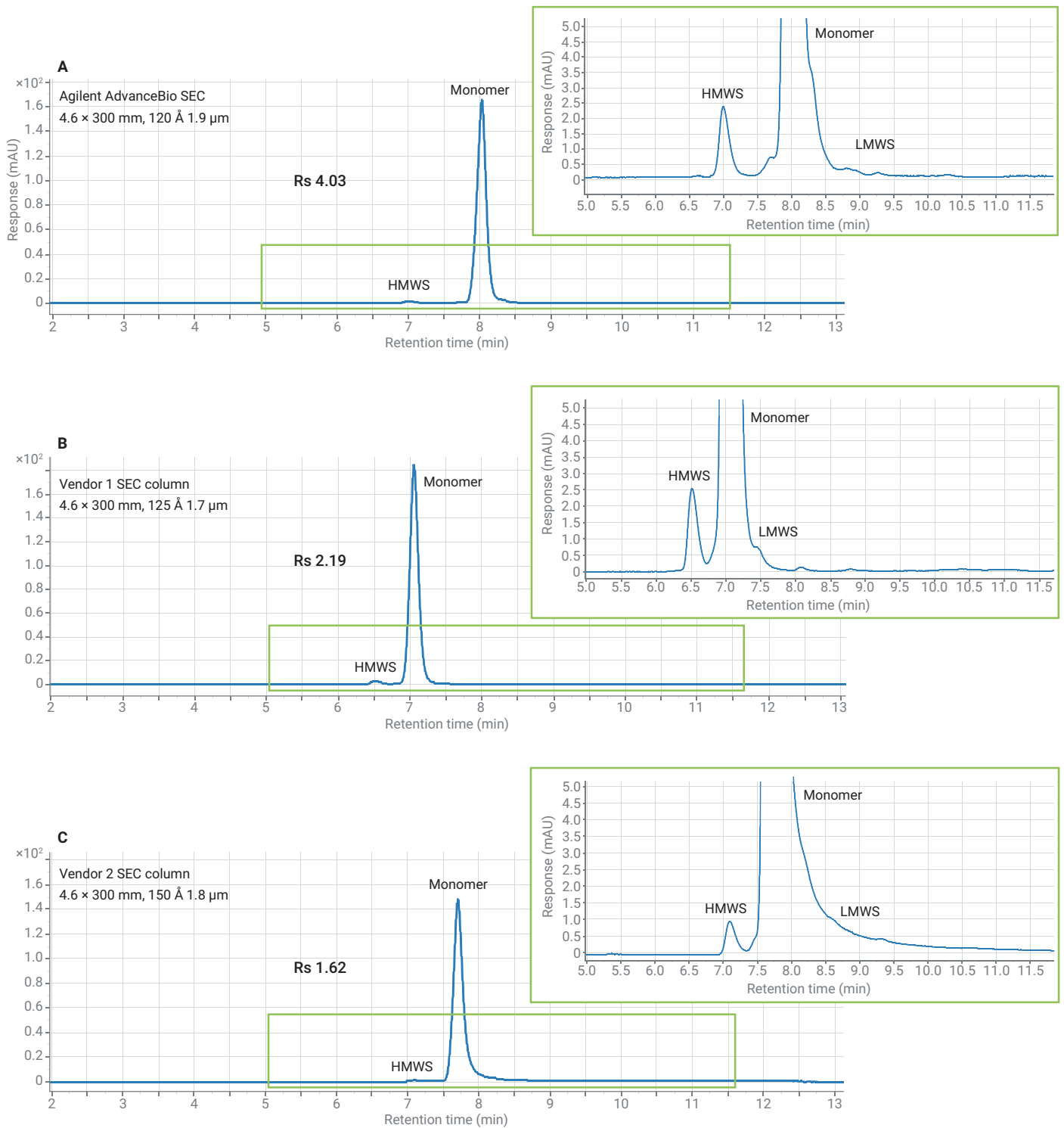


図 2. 他社製 SEC カラムによる、凝集体および低分子量のフラグメントを含むストレスを加えたインスリンの分析

結論

サイズ排除クロマトグラフィーは、治療用製剤の共有結合をもつ高分子量インスリン分析の USP および EP の標準メソッドです。今回、アジレントおよび他社製の SEC カラムを用いて、このメソッドの性能を示すクロマトグラフィープロファイルが得られました。これらの結果から、インスリンの SEC 分析で、Agilent BioAdvance SEC カラムと Agilent Infinity II バイオイナート LC システムを用いると、従来の SEC HPLC メソッドと比較して分離能が大幅に向上することが示されました。また、分析時間の短縮や移動相の使用の削減が実現しました。

参考文献

1. Yang, Y., *et al.* An Achilles' Heel in an Amyloidogenic Protein and Its Repair: Insulin Fibrillation and Therapeutic Design." *J. Biol. Chem.* **2010**, 10806–10821.
2. Librizzi; Fabio; Rischel. The Kinetic Behavior of Insulin Fibrillation is Determined by Heterogeneous Nucleation Pathways. *Protein Science* **2005**, 12, 3129–3134.
3. Insulin Monograph, *USP Pharmacopeial Forum*, 31(5), 1375.
4. European Pharmacopeia 5.0, *Human Insulin Monograph* **2005**, 838, 1800–1802.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, February 6, 2020
5994-1566JAJP
DE.3023032407