

サイズ排除クロマトグラフィーを用いたタンパク質凝集体分析におけるUHPLC装置の重要性

Amy Farrell¹, Jonathan Bones¹,
and Ken Cook²

¹ NIBRT, Dublin, Ireland; ² Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK

キーワード

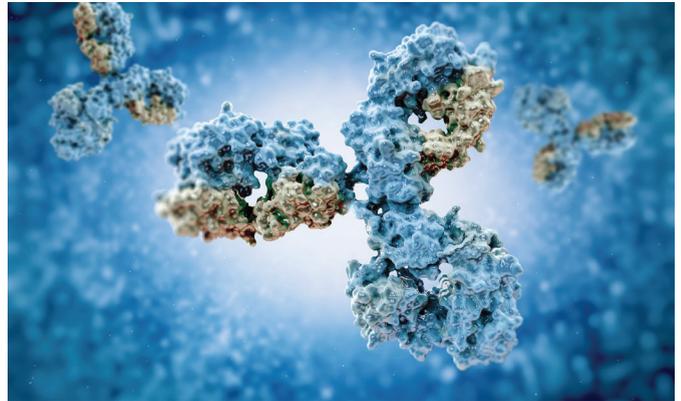
MABPac SEC-1、モノクローナル抗体、mAb、タンパク質凝集体分析、バイオ医薬品、カラム前拡散

目的

Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex クォータナリ UHPLCシステムを使用したモノクローナル抗体の凝集体分析におけるThermo Scientific MabPac™ SEC-1カラムの適用可能性を確認する

はじめに

タンパク質凝集体分析で用いられるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラムは内径7.8 mm、流速1.0 mL/minでの使用が業界標準となっています。この分析には従来型のHPLCシステムを使用することが多く、上記のような比較的高い流速であれば十分な性能を発揮します。しかしシステム内での拡散が少ないUHPLCの登場により、低流速用カラムと高分解能固定相を使用できるようになりました。そのため近年では、内径の小さなSECカラムが登場していますが、内径7.8 mmの高流速カラムと比べて分離性能が思うように得られないことがあり



ます。その原因は内径が小さく充填が難しいためと一般的に考えられていますが、この原因として可能性が高いのは、実は比較データ取得に用いられるUHPLCシステムです。内径の小さなSECカラムを用いて低流速で分析を行う場合、カラム性能を維持するために適切なチューブや低拡散流路がUHPLCに備わっている必要があります^{1,2}。

Vanquish FlexクォータナリUHPLCシステムは低拡散かつ不活性 (イナート) な流路を持つUHPLCシステムであり、バイオ医薬品分析に最適なシステムです。本アプリケーションノートでは、カラム前段部分で意図的に拡散を発生させ、異なる流速におけるカラム前拡散の影響について確認しました。

内径および流速の異なる複数のMabPac SEC-1カラムを用いて分離を行いました。

MABPac SEC-1カラムを用いて、モノクローナル抗体の凝集体分析におけるVanquish UHPLCシステムの適用可能性を確認しました。MABPac SEC-1カラムはシリカベースであり、特定のタンパク質の分離を妨げる二次相互作用を抑える独自のジオール親水性層が共有結合で修飾されています^{2,3}。SECは分析成分のカラム先端濃縮が起こらない数少ないクロマトグラフィー法の一つです。そのため特に内径の小さなカラムで低流速分析を行う場合、使用するシステムのカラム前拡散が非常に重要になります。吸着クロマトグラフィーでは、アイソクラティック溶出条件下であっても、カラム先端部分で注入されたサンプルがある程度、フォーカシングされることが期待されます。一方SECでは、サンプル体積がカラムを通過する際の拡散によって大きくなる一方です。したがって、注入時に特有の拡散が発生する従来型のHPLCシステムでは多くのカラムで期待される分離能が得られません。カラム前拡散の影響については複数の研究で検討されており、拡散が発生するHPLCシステムではピーク幅が最大で50%程度広がりやすくなります。

低拡散のVanquish UHPLCシステムを用いて、SEC分析における拡散の影響を調べました。分離には、MabPac SEC-1カラムにおいて一般的に使用される高塩濃度バッファー (pH 6.8) を用いました。

実験

消耗品

- Fisher Scientific™ HPLC グレード水 (P/N 10449380)
- 脱イオン水、比抵抗18.2 MΩ·cm
- Fisher Scientificリン酸二ナトリウム(無水) (P/N 10440481)
- Fisher Scientificリン酸一ナトリウム(無水) (P/N 10751135)
- Fisher Scientific塩化ナトリウム (P/N 11964051)
- Thermo Scientific Virtuoso™ バイアルIDシステム (P/N 60180-VT100)
- Virtuoso 9 mm広口SureStop™ スクリュースレッドバイアルコンビニエンスキット (P/N 60180-VT405)

サンプル調製

ベバシズマブは、適宜0、5、10、または 20%の溶媒を含む移動相で希釈して25 mg/mLの溶液にしました (図4参照)。

分離条件

装置

以下で構成されるVanquish Flex クォータナリ UHPLCシステム:

- Vanquish Flex システムベース (VF-S01-A)
- クォータナリポンプF (P/N VF-P20-A)
- スプリットサンプラーFT (P/N VF-A10-A)
- カラムコンパートメント (P/N VH-C10-A)
- ダイオードアレイ検出器HL (P/N VH-D10-A)
- Thermo Scientific LightPipe™ フローセル、スタンダード、10 mm (P/N 6083.0100)

カラム: MabPac SEC-1, 7.8 × 300 mm (P/N 088460)
MabPac SEC-1, 4 × 300 mm (P/N 074696)

SEC バッファー

移動相: 0.2 M NaCl/100 mMリン酸バッファー (pH 6.8) 溶液
流速: 内径7.8 mmカラムの場合は1.0 mL/min、内径4 mmカラムの場合は0.3 mL/min
カラム温度: 30°C
注入量: 1 µL (特記されていない場合)
UV: 214 nm

データ処理

Thermo Scientific Dionex™ Chromeleon™ 7.2 SR2クロマトグラフィーデータシステムをデータの収集および解析に使用しました。

結果および考察

カラム前拡散

内径が4.0 mmおよび7.8 mmのカラムを用いてカラム前拡散の影響を調べました。それぞれのカラムの最適な流速は0.3 mL/minおよび1.0 mL/minです。流速の低下により、カラム前拡散の影響を受けやすくなるため、使用する流速はシステムのセットアップに著しい影響を及ぼします。

内径7.8 mmのカラムを使った高流速（1.0 mL/min）では、カラム前チューブを一般的な内径100 μm のものから75 μm のものに変えても違いは認められず、図1の重ね書きクロマトグラムで確認できるように、ピーク幅、非対称性、および分解能に違いは見られませんでした。7.8 mmカラムで用いた1.0 mL/minの流速では、カラム前の100 μm のチューブで30 barの背圧が発生したのに対し、75 μm のチューブにより発生した背圧は90 barと、背圧に変化が見られたものの、チューブ変更による分離の改善は確認されませんでした。Vanquishシリーズは100 μm のチューブが標準仕様となっていることから、本システムは内径7.8 mmカラムを用いたSEC分析システムとして、すでに最適化されていることが分かります。

一方、内径4 mmのカラムを流速0.3 mL/minで使用した場合には極めて明らかな変化がありました。標準的なHPLCシステムの構成を再現するため、100 μm および75 μm のチューブだけでなく180 μm のチューブも使用しました。180 μm のチューブの構成はSEC分離で一般的に使用されているものです。図2の重ね書きクロマトグラムで示すように、カラム前に内径180 μm のチューブを使用すると分離性能が著しく低下しています。つまり、内径4 mmのSECカラムを0.4 mL/minの流速で分析に用いる場合、標準的なHPLCシステムではこのような分離性能の低下が予測されます。古いHPLCシステムでは注入バルブ拡散が加わるため、さらにこの影響が大きくなります。

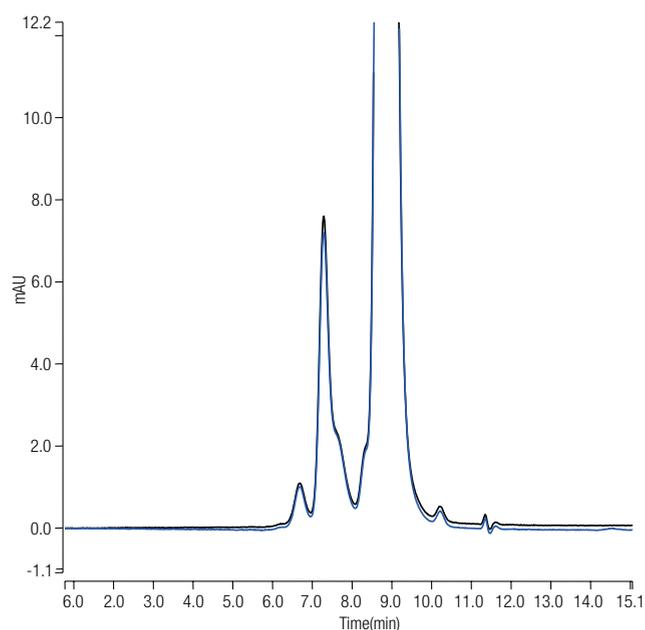


図1: 注入バルブとカラムの間に内径100 μm のチューブを用いたシステムと75 μm のチューブを用いたシステムにおけるペバシズマブのSEC分析のクロマトグラム重ね合わせ。カラム内径は7.8 mm。

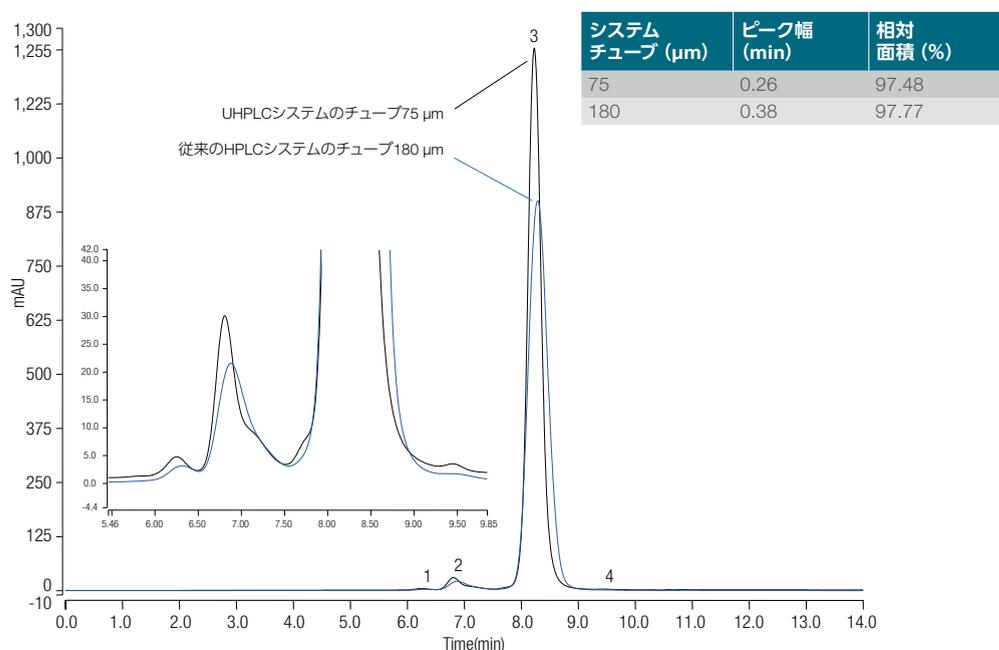


図2: カラムの前に内径180 μm のチューブを用いた場合と内径75 μm のチューブを用いた場合のペバシズマブの重ね合わせ。カラム内径は4.0 mm。

モノマーのメインピークの相対面積は一定に保たれていますが、半値幅が0.26分から0.38分へと上昇し著しい拡散が確認されるとともに、ピーク高さの低下による感度低下も確認されました。また、凝集体ピークでは分離能と解像度の低下も見られ、凝集体の分析が難しくなると考えられます。ピーク拡散およびブロードなピーク形状は、存在量の少ないバリエーションのピーク波形処理精度に影響を与えます。100 μm のチューブでは拡散の影響がいくつか確認されました（データ未掲載）。また、チューブ内径を50 μm まで小さくしても内径75 μm のチューブを超える改善は確認されなかったことから、ピーク拡散を排除する最適なチューブ内径は75 μm であることが分かりました。

注入するサンプルはメソッド固有となる本質的な拡散の一種であるため、その量もSECにおけるピーク拡散で重要な役割

を果たします。まず、1 μL のペバシズマブを内径4 mmのカラムに流速0.3 mL/minで注入しました。次に、10倍希釈したサンプルを10 μL 注入し、カラムにロードされる物質の絶対量であるオンカラム量を一定に保って分析を行いました。その結果、オンカラム量が同じであっても、サンプル注入量の増加によってピーク幅が広がり、結果として凝集体ピークの感度、分離能および解像度も低下し、拡散の影響が明らかとなりました（図3）。メインピークの前にはショルダーがあり、これは二つ目のダイマーピークの分離と同じく消失します。このことから、SECでは注入量を可能な限り少なく抑えることが重要であると分かります。サンプルを高濃度に維持することでカラム注入量を抑制できるため、拡散防止に有効となります。

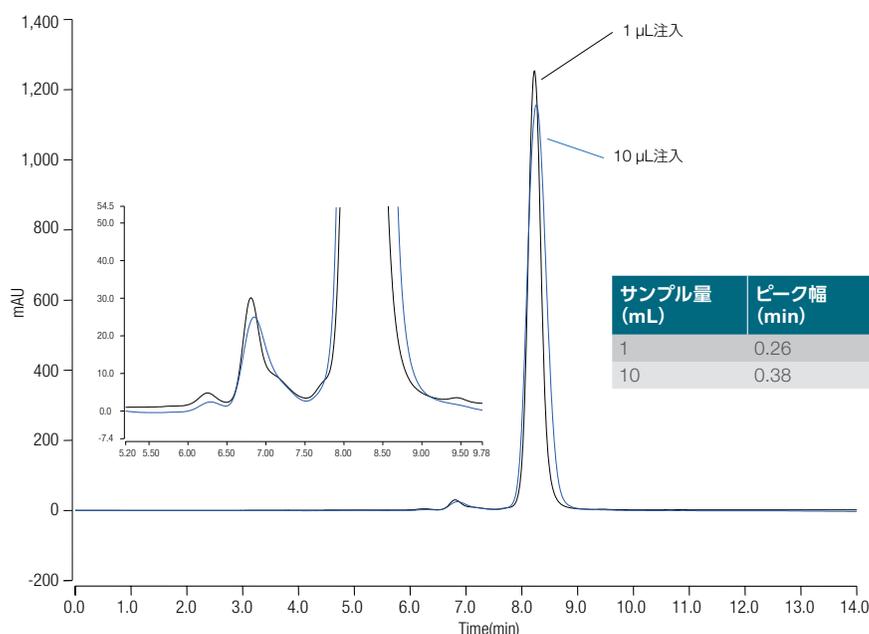


図3: 4 mmのSECカラムを使用した場合のピーク拡散における注入量の影響

溶媒添加

疎水性の二次相互作用が確認されるSECカラムでは、ピーク形状の改善を目的とした溶媒の使用について複数の研究報告があります。未変性タンパク質サンプルで有機溶媒を使用するとタンパク質のアンフォールディングが引き起こされますが、その影響の程度はタンパク質により異なります。タンパク質のフォールディングでは、タンパク質の中心に疎水性アミ

ノ酸が、親水性環境に接触する外側には親水性アミノ酸が位置するように折り置まれることが一般的です。有機溶媒の使用はタンパク質周辺のマトリックス性質を変化させ、タンパク質のフォールディング構造に影響を及ぼします。そこで有機溶媒添加による影響を調べ、その結果を図4に示しました。

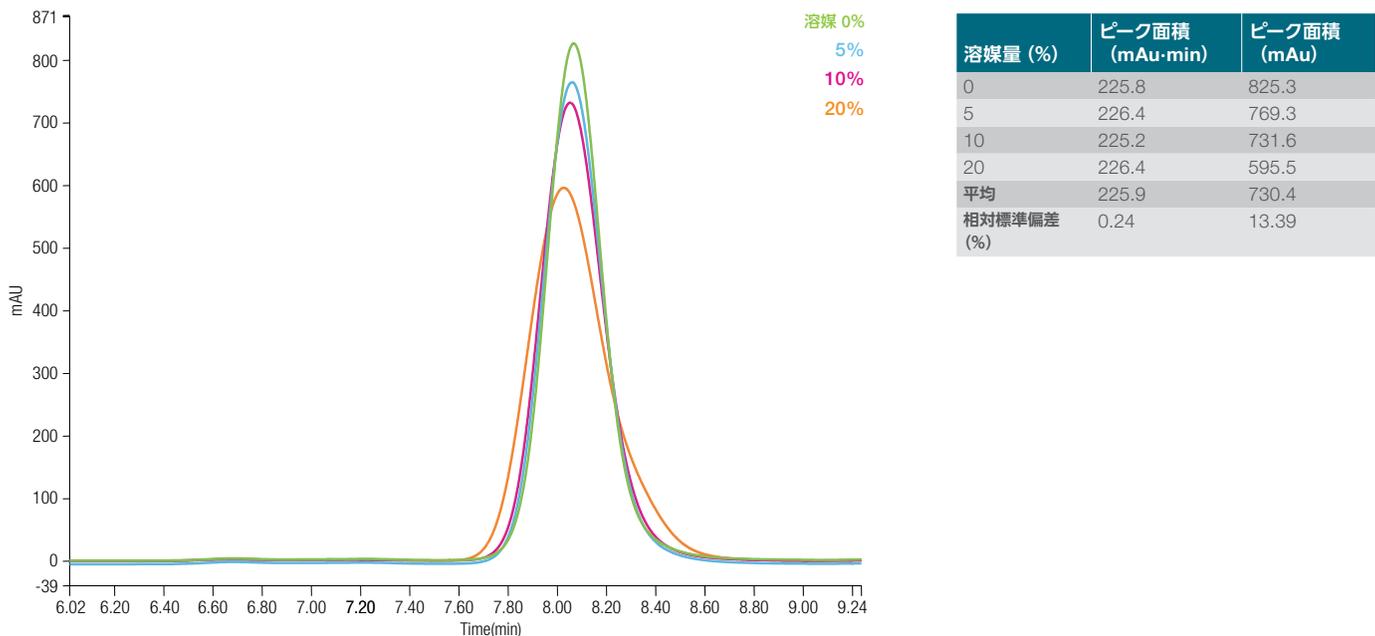


図4: SECバッファー条件への溶媒の添加

ピーク保持時間および非対称性は、アセトニトリルを移動相に添加した場合では変化しませんでした。これは、MAbPac SEC-1カラムがシリカ樹脂との二次相互作用を排除する独自の親水性境界層を備えているため、カラムとタンパク質サンプルとの間に疎水性の二次相互作用が発生しなかったためと考えられます。しかしながら、ピーク高さについては5%の溶媒添加であっても低下し、溶媒添加量の増加とともにピーク幅が広がっています。これは、タンパク質の部分的なアンフォールディングと構造安定性の低下による影響だと考えられます。タンパク質の形状およびフォールディングサイズは大きな分布を持つため、サイズ排除分析では幅の広いピークが観察されます。つまり20%の溶媒では、タンパク質の形状やフォールディングサイズへの影響がクロマトグラムに顕著に現れていることが示されています。この影響の程度はタンパク質により異なりますが（未掲載）、溶媒を添加するとすべてのタンパク質においてピークに何らかの障害が確認されました。そのため、ピークの非対称性が許容範囲の場合、溶媒添加は不要であるか、推奨されません。

結論

SECはカラム前拡散の影響を受けやすいクロマトグラフィーです。ワイドボアカラムでは高流速を用いることでその影響を最小限に抑えることができます。流速を0.3 mL/minに下げたり、カラム内径を4 mm未満とする場合では、最適な分離性能を達成するために低拡散UHPLCシステムの使用が必須になります。低拡散UHPLCシステムでは、注入バルブからカラムまでの接続に内径75 μmのトランスファーチューブを使用するためさらなる最適化が必要になるかもしれません。

SEC分析においてカラム樹脂との非特異的相互作用がもたらす問題は、MAbPac SEC-1カラムの開発時に取られた対策により解決されたと考えられます。タンパク質凝集体、特にモノクローナル抗体の凝集体分析において十分に満足できる分解能を持つことが分かりました。また、ピーク形状改善のための溶媒の使用は不要であることが示されました。

疎水性の二次相互作用が発生するカラムでピーク形状を改善するための溶媒添加は、不要な相互作用の抑制には有用かもしれませんが、タンパク質に対するアンフォールディングや構造安定性の変化などの影響を必ず考慮しなければなりません。

References

1. Grznárová, G.; Polakoviča, M.; Ačaia, P.; Görnerb, T. Extra-column dispersion of macromolecular solutes in aqueous-phase size-exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1040(1), 33–43.
2. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E.S.P. Size exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2012** Nov; 35(20), 2923–2950.
3. Arakawa, T.; Philo, J. S.; Ejima, D.; Tsumoto, K.; Arisaka, F. Aggregation analysis of therapeutic proteins, *BioProcess International*, **2006**, 4(10), 42–43.

© 2017 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転写を禁じます。 HPLC067_A17060B
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記載されている内容は予告なく変更することがあります。
ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC