

# モノクローナル抗体凝集体評価用非対称フローFFF、 分析用超遠心分離とサイズ排除クロマトグラフィー

## 一般情報

ID0010

アプリケーション：製薬、医学

テクノロジー：AF4-UV

機器構成：Postnova AF2000 MT、PN2311 UV-Vis

キーワード：非対称 FFF、モノクローナル抗体、凝集体

## モノクローナル抗体凝集体

タンパク質の凝集は、医薬品製剤と新薬開発の品質管理において重要な問題になっています。薬物の活性、バイオアベイラビリティ、および有害な(自動)免疫反応などの副作用の可能性は、バイオ医薬品の凝集体の存在と量に直接関係します。モノクローナル抗体は特に治療薬として使用されています。

しかし、製剤の行程で抗体凝集をもたらし可能性があり、免疫システムの負の反応を引き起こす可能性があります[1]。

## 従来の評価方法

モノマー、オリゴマー、および抗体凝集体を分離する必要があるため、これら抗体の特性評価は依然として困難な課題です。このため、確立された手法としては、分析超遠心分離(AUC)やサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)などが使用されています。ただし、これら手法は抗体凝集体の特性評価への適用にはいくつかの制限があります。

AUC は抗体凝集体の高分解能でのサイズ分離、定量、および特性評価が可能となります。しかし、限られた再現性、高い運用コスト、および専門的な技術の必要性により、一般的な分析ツールとしての AUC の普及は進んでおりません。さらに、サイズ分離されたフラクションのさらなる分析は不可能です。

SEC はバイオ医薬品の抗体凝集体の特性評価に最も一般的に使用されている分離手法です。SEC の制限は、カラム内で使用される固定相に密接に関連しています。タンパク質のカラム内ゲルへの吸着、サンプルを変化させ生物活性を損なうせん断効果、さらにカラムを介した凝集体のろ過等による低い回収率は不正確な結果につながる可能性があります。さらに、特殊なカラムパッキングに必要な有機修飾剤と溶離液により、抗体が変化し、カラム出口で検出される凝集体の比率が変化する可能性があります。さらなる制限は、カラムのサイズ排除限界であり、測定法の上限モル質量と粒子サイズ範囲が制限されます。結果として、SEC では AUC や FFF などよりも凝集体の量が少なく、粒子サイズが小さくなる傾向が見られます。

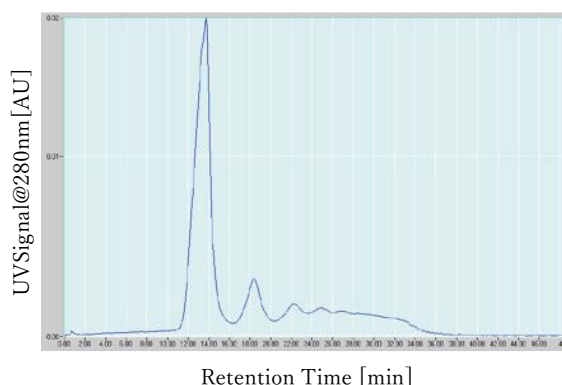


図1：AF4-UV 280 nmにて測定した抗体のフラクトグラム

## AF4 による評価

非対称フロー・FFF(AF4)は革新的な分離技術であり、AUC および SEC に関連する問題を克服した最適な評価手法です。AF4 は、充填カラムの代わりに充填されていない分離チャンネルを使用する分離技術です。固定相が無いことにより、せん断応力、マトリックスとの相互作用のないサンプル分離、短時間分析、溶媒選択性に優れているという利点があります。また、AF4 は、1 kDa(1 nm)から数 MDa (10  $\mu$ m)までの幅広い範囲の分離を可能とします。したがって、モノマー、可溶性および不溶性凝集体、さらには目に見えない粒子フラクションを含む凝集現象の全体像が分析可能となります。

## MALS と DLS による検出

AF4 は様々な検出器と接続でき、多くの情報を得ることが可能です。UV 検出器は凝集体を定量する為に使用されます。さらに、多角度光散乱検出器(Postnova PN3621 MALS)および動的光散乱検出器(Malvern Zetasizer Nano DLS)は、分離された凝集体に関するさらなる特性評価情報として絶対分子量と分子(粒子)サイズを提供する検出器です。これらの理由から、FDA は近年、抗体製剤の特性評価に AF4-MALS の使用を推奨しております[2]。

## AF4、AUC、SEC のデータ比較

AF4 の測定例として、凝集体を含むモノクローナル治療用抗体サンプルの特性評価データを図 1 に示します。PN3211 UV 検出器を備えた AF4 にて測定しました。それと並行して、AUC と SEC を使用して、同じサンプルを評価しました。

	AF4	AUC	SEC
凝集体量%	28.00	24.00	1.00

表 1: AF4、AUC、SEC にて測定された凝集体量

測定結果より AF4(28%)と AUC(24%)で測定された凝集体の量が非常に類似しており、互いによく一致していることを示しています。ただし、SEC 測定から得られた結果は明らかに異なり、1%の総含有量のみを示しています。これは、凝集体の大部分がすでにカラムの充填剤の影響により劣化、変化してしまったか、カラムに吸着している可能性があることを示しています。

## AF4 の利点

非対称フロー・FFF は SEC と同様の情報を提供しますが、パッキング材料が無いことにより、凝集体の劣化を防ぐ低せん断条件とサイズ排除の制限が無いのは大きな利点につながります。AUC と比べて、AF4 は操作が簡単で、オートサンプラーも使用でき、分離したフラクションも可能です。

## 参考文献

- [1] Guidance for Industry on Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products Food and Drug Administration (FDA), April 2014.
- [2] Draft Guidance for Industry on Immunogenicity-Related Considerations for the Approval of Low Molecular Weight Heparin for NDAs and ANDAs, Food and Drug Administration (FDA), August 2014.