

PEG 化バイオ医薬品の分析はこれで決まり！

TSKgel カラムによる PEG 化たんぱく質の分離



ポリエチレングリコール (PEG) を結合したバイオ医薬品は、血中での滞留性制御や腎排出の抑制、免疫原性の低下、薬効の持続、可溶化、安定化などを目的として開発されています。また分岐 PEG を結合させることで、さらに機能性を高めた医薬品もあります。しかし PEG 化医薬品は PEG の結合数や結合部位により異性体を生じるため、異性体の分離、分析が重要です。これまでに研究、開発された主な PEG 化バイオ医薬品と、その分析に利用された HPLC モードおよび利用可能な TSKgel カラムの情報を以下の表にまとめました。

主な参考文献

- 1) Y. Zhai et al., J. Biotechnol. 142 (2009) p.259-266, Enhanced circulation half-life of site-specific PEGylated rhG-CSF: Optimization of PEG molecular weight
- 2) S. Jevsever et al., Biotechnol. J., 5 (2010) p.113-128, Review, PEGylation of therapeutic proteins
- 3) A. Moosmann et al., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) p.209-215, Analytical and preparative separation of PEGylated lysozyme for the characterization of chromatography media
- 4) M. R. Sherman et al., Bioconjugate Chem., 23 (2012) p.485-499, Role of the Methoxy Group in Immune Responses to mPEG-Protein Conjugate
- 5) R. Shekhawat et al., PLOS ONE, March 13 (2019) p.1-33, Structural similarity, characterization of Poly Ethylene Glycol linkage and identification of product related variants in biosimilar pegfilgrastim, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212622>

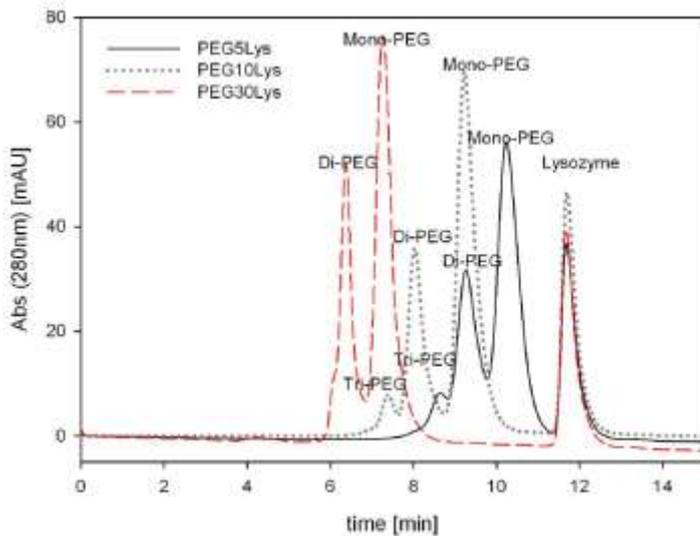
●PEG 化バイオ医薬品の分子量特性と HPLC での分析例

一般名	製品名 (市販名)	薬物の分子量	PEG の分子量 (薬物あたりの結合数)	分離モードおよび TSKgel 対応カラム (太青字は報告例)	
PEG化断片抗体(Fab)	n/a	361-960 kDa	40 kDa (8-24)	SEC	TSKgel G4000SW_{XL} , UltraSW Aggregate UP-SW Aggregate
PEG化アデノシンデアミナーゼ	Adagen® (Pegadamase)	96-126 kDa	5 kDa (11-17)	SEC, IEC	TSKgel UP-SW3000, G3000SW _{XL}
PEG化L-アスパラギナーゼ	Oncaspar® (Pegaspargase)	483-548 kDa	5 kDa (69-82)	SEC	TSKgel G4000SW_{XL} , UltraSW Aggregate UP-SW Aggregate
PEG化ヒト成長ホルモン (レセプター拮抗剤)	Somavert® (Pegvisomant)	42-52 kDa	5 kDa (4-6)	IEC, HIC	TSKgel SP-STAT® , SP-NPR® Phenyl-5PW
PEG化ウリカーゼ	Krystexxa® (Pegloticase)	540 kDa	10 kDa (9, ホモ4量体あたり)	SEC	TSKgel G5000PW_{XL}
PEG化インターフェロンα	n/a	n/a	20 kDa (1-2)	SEC	TSKgel G5000PW_{XL}
		(IFN 19kDa)	20, 30, 40 kDa	IEC	TSKgel SP-5PW , SP-STAT
PEG化インターフェロンα-1b	n/a	60 kDa	40 kDa (1)	SEC, IEC	TSKgel UP-SW3000, G3000SW _{XL} SP-STAT, SP-5PW
PEG化インターフェロンα-2a	Pegasys®	60 kDa	40 kDa (1 分岐)		
PEG化インターフェロンα-2b	Pegintron®	31 kDa	12 kDa (1)		
PEG化インターフェロンβ-1	Plegridy®	44 kDa	20 kDa (1)	SEC	TSKgel G3000PW_{XL} , G4000SW UltraSW Aggregate, UP-SW Aggregate
PEG化インターロイキン2	n/a	20 kDa	5 kDa (1)	HIC	TSKgel Phenyl-5PW
	Neulasta® (Pegfilgrastim) Biosimilar Pegfilgrastim	39 kDa	20 kDa (1)	SEC, IEC	TSKgel G3000SW_{XL} , SP-5PW
PEG化エリスロポエチン	Mircera®, CERA	60 kDa	30 kDa (1)	SEC	TSKgel SuperSW3000 , UP-SW3000 G3000SW _{XL}
	Omontys® (recalled in 2013)	45 kDa	40 kDa (1, 分岐)		
PEG化エリスロポエチン-α	n/a	60 kDa	10 kDa (> 5)	SEC	TSKgel G5000PW_{XL}
PEG化抗-TNFα, Fab'	Cimzia® (Certolizumab pegol)	91 kDa	40 kDa (1, 分岐)	SEC	TSKgel UP-SW3000, G3000SW _{XL}
PEG化 血液凝固第八因子	Adynovate® (Rurioctocog alpha pegol)	330 kDa	20 kDa (2-3)	SEC	TSKgel G4000SW_{XL} , UltraSW Aggregate UP-SW Aggregate
PEG化 血液凝固第九因子	Refixia® (Nonacog beta pegol)	98 kDa	40 kDa (1, 分岐)	SEC	TSKgel UP-SW3000, G3000SW _{XL} UltraSW Aggregate, UP-SW Aggregate
PEG化フェニラルアニンアンモニア リアーゼ	Palynziq® (Pegvaliase pqpz)	1,000 kDa	20 kDa (9)	n/a	n/a
PEG化アブタマー	Macugen® (Pegaptanib)	50 kDa	40 kDa (1, 分岐)	SEC, RPC	TSKgel UP-SW2000, ODS-100V
PEG化リボソーム	Doxil®, Caelyx®, Onivyde®	n/a	n/a	SEC	TSKgel G5000PW _{XL}
PEG化スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)	n/a	n/a	10 kDa (2.5, サブユニット)	SEC	TSKgel G5000PW_{XL}
PEG化アルブミン	n/a	n/a	10 kDa (17-22)	SEC, IEC	TSKgel G5000PW_{XL} , Q-STAT
PEG化α-ラクトアルブミン	n/a	20-36 kDa	5 kDa (1-5, 分岐)	SEC	TSKgel G2000SW , G3000SW UP-SW2000, UP-SW3000
PEG化β-ラクトグロブリン	n/a	23-33 kDa	5 kDa (1-3)	IEC	TSKgel SP-STAT
PEG化エボラウイルスたんぱく質 (VP35/GP2)	n/a	28-48 kDa?	20, 40 kDa (n/a)	SEC, IEC	TSKgel G3000SW_{XL} , G4000PW_{XL} SP-NPR, SP-STAT
PEG化リゾチーム、PEG化リボヌクレアーゼA	n/a	20-100 kDa	5-30 kDa (1-3)	SEC, IEC	TSKgel G3000SW_{XL} , SP-NPR , SP-5PW SP-STAT

* n/a; 情報なしまたは不明

AdagenはEnzon社、OncasparはBaxalta社、SomavertはPfizer社、KrystexxaはHorizon Rheumatology社、PegasysはF. Hoffmann-La Roche社、PegintronはMerck Sharp & Dohme社、PlegridyはBiogen社、NeulastaはAmgen社、MirceraはF. Hoffmann-La Roche社、OmontysはAffymax社、CimziaはUCP Groups社、AdynovateはBaxalta社、RefixiaはNovo Nordisk Health Care社、PalynziqはBiomarin社、MacugenはEyetechnics Pharmaceuticals社、Doxil、CaelyxはJanssen Products社、OnivydeはIpsen Biopharm社の登録商標です

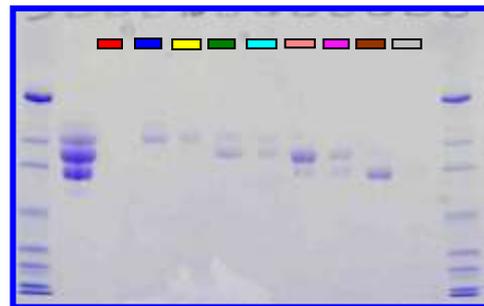
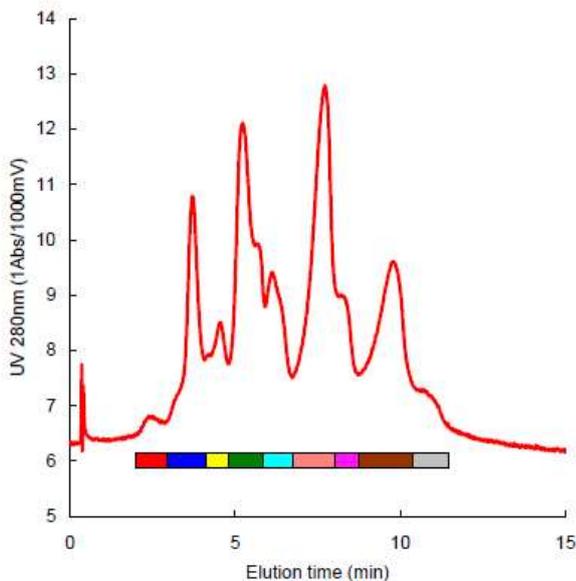
●分子量の異なるPEG化リゾチームのTSKgel G3000SW_{XL}を用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)による分析



カラム: TSKgel G3000SW_{XL}, 7.8 mm I.D. x 30 cm (5 μm)
 溶離液: 100 mmol/L リン酸塩バッファー (pH 6.7) + 100 mmol/L Na₂SO₄ + 0.05 % アジ化ナトリウム
 流速: 0.75 mL/min
 検出: UV (280 nm)
 試料: PEG 化リゾチーム

PEG 化リゾチームには、PEG が最大 3 分子導入されており、SEC では導入数の多いものから順に溶出しています。また、導入した PEG の分子量が大きくなるほどカラムからの溶出は早くなります。

● PEG 化医薬品 (Somavert) の TSKgel SP-STAT を用いたイオン交換クロマトグラフィー (IEC) による分離



非還元 SDS-PAGE 電気泳動

カラム: TSKgel SP-STAT, 4.6 mm I.D. x 10 cm (7 μm)
 溶離液: バッファー A) 20 mmol/L 酢酸ナトリウム/バッファー (pH 4.2)
 バッファー B) 0.5 mol/L NaCl を含むバッファー A) (pH 4.2)
 グラジエント: バッファー B) 0 % から 40 % (20 min.)
 流速: 1.5 mL/min 検出: UV (280 nm)
 試料: Somavert (5 g/L, 10 μL)

PEG 化バイオ医薬品の多くは、たんぱく質のアミノ基に PEG が導入されています。そのため PEG の導入数が多くなるほど正電荷が減少しますので、陽イオン交換カラムでは早く溶出します。



※ "TSKgel"、"TSKgel STAT"、"NPR"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です
 ※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
 大阪支店 バイオサイエンスG ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 バイオサイエンスG ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川12743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp