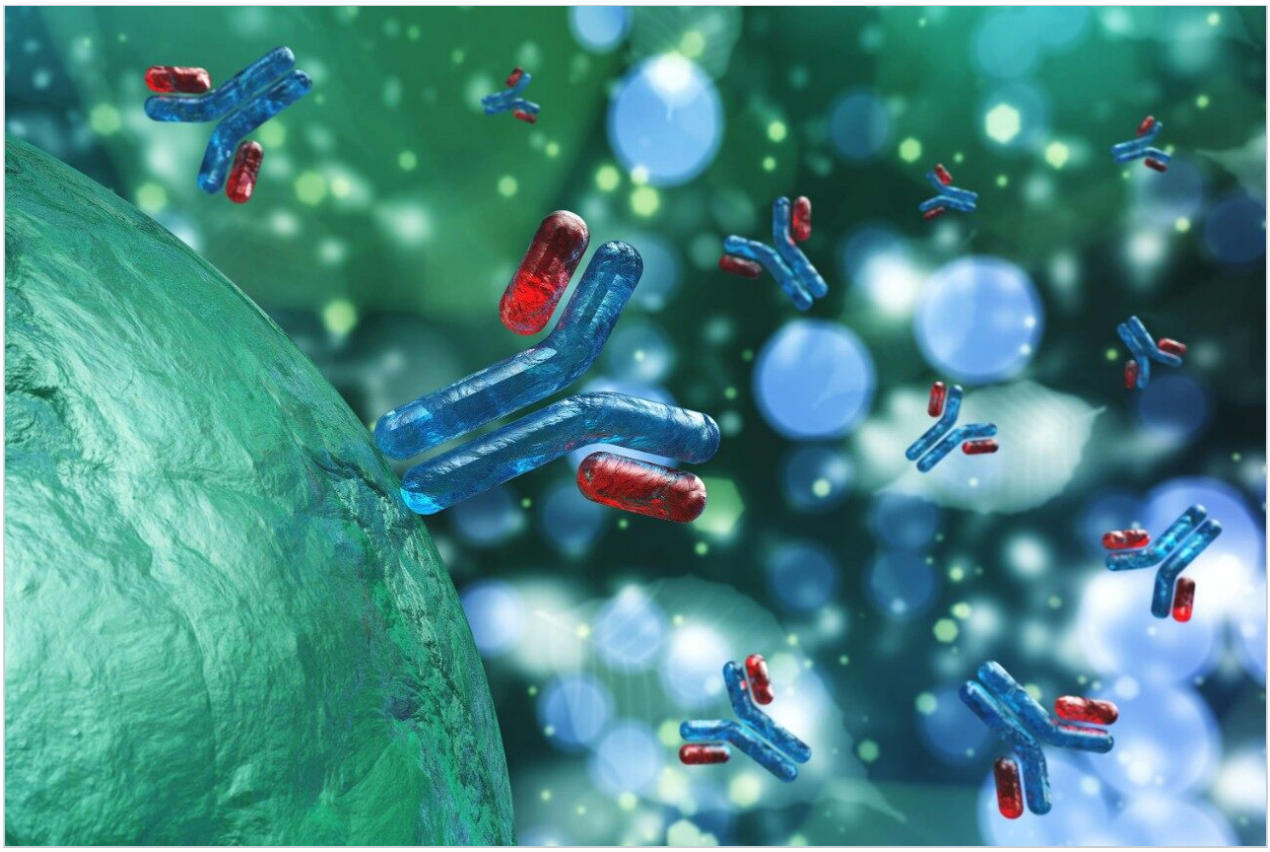
Waters™

アプリケーションノート

UHPLC システム間にわたるモノクローナル抗体のサイズ排除クロマトグラフィー分析法の移管

Zhimin Li, Paula Hong, Patricia R. McConville

日本ウォーターズ株式会社



本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

このアプリケーションブリーフでは、Agilent 1260 Infinity Bio-Inert LC システムから、ACQUITY 30 cm シングルゾーンカラムマネージャー（CM-30S）を搭載した ACQUITY Arc Bio システムへの、モノクローナル抗体分析用サイズ排除クロマトグラフィー分析法の移管について説明します。 LC でのバンド拡散に基づいて最適な SEC カラムを選択することにより、同等の保持時間、モノマー、高分子種と低分子分解物の面積 %、ならびに再現性が得られました。

アプリケーションのメリット

- ACQUITY Arc Bioシステムおよび Agilent 1260 Infinity Bio-inert システム間にわたるモノクローナル抗体の SEC 分析法のシームレスな移管
- ACQUITY CM-30S を使用すると、従来の LC 分析法の実行と、25 cm を超えるカラムを必要とする分析法の開発が可能になる

はじめに

水系サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、タンパク質凝集体（高分子種、HMWS）の相対的定量で確立された手法です[1]。 タンパク質凝集体は、望ましくない免疫原性作用および有効性の低下と相関していることが、これまでに報告されています[2]。 このため、SEC 分析法では、さまざまな超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）システムの間での分析法移管の際に、HMWS の量を他の分解物の量とともに、再現性ある定量をできることが重要です。

分析法移管の際に考慮する必要がある重要な 1 つのシステム特性は、一般にバンド拡散とも呼ばれるカラム外拡散です。カラム外拡散が大きいと、特に固定相との相互作用が最小限またはまったくない拡散駆動型の分離である SEC 分離で、分離能にいつも悪影響が出てしまいます[3]。 LC システムに最適な SEC カラムサイズを選択することで、カラム外拡散の影響を最小限に抑えることができます[4]。これを説明するために、Agilent 1260 Infinity Bio-inert システムから CM-30S を搭載した ACQUITY Arc Bio システムへの SEC 分析法の移管を実証していきます。 CM-30S は、ACQUITY Arc システム用のカラムマネージャーの新しい拡張です[5]。 これによって、より長いカラムが必要な従来の分析法を実行する機能が維持され、カラム格納本数が最大 15 カラム（2 つの CM-30S を使用）に拡張されて、より大きなカラムでの分析法開発が可能になります。

結果および考察

液体クロマトグラフィーでは、ピークのバンドの広がりは、およそカラム外拡散およびオンカラムの拡散ボリュームの合計です[6]。 カラム外拡散は実験によって決定できる値であり、$5\sigma_{ec}$（ピーク高さの 4.4% でのピーク幅に流速を掛けた値）で表されます[6,7]。Agilent 1260 Infinity Bio-inert システムの $5\sigma_{ec}$ 測定値は 31 µL であり、CM-30S を搭載した ACQUITY Arc Bio システムの場合は 50 µL です。分析法移管の主要な目標は、HMWS のパーセント面積と同等の定量値を得ることです。LC システムでのバンド拡散に基づく最適な SEC カラム選択のガイダンスに従い[4]、固定相粒子サイズ 3.5 µm の内径 7.8 mm × 300 mm の SEC カラムを選択しました。

乳がん治療に使用される抗 HER2 IgG1 モノクローナル抗体であるトラスツズマブ[8]（有効期限後）の SEC 分析を、Agilent 1260 Infinity Bio-inert システム（Agilent 1260 Bio）と、CM-30S を搭載した ACQUITY Arc Bio システムの両方で実行しました。図 1 に、2 つのシステムの間で、保持時間および分離能が同程度の同等なクロマトグラフィープロファイルが観察されることが示されています。両方のクロマトグラムで、単一の HMW のピークと 1 つの低分子（LMW）のピークが、メインのモノマーピークからベースライン分離されました。モノマーピークに隣接して、分離されないショルダーピーク（「*」とラベル付け）が認められました。分析法の移管可能性を考慮して、モノマーピークはこのショルダーを含むように波形解析しました。

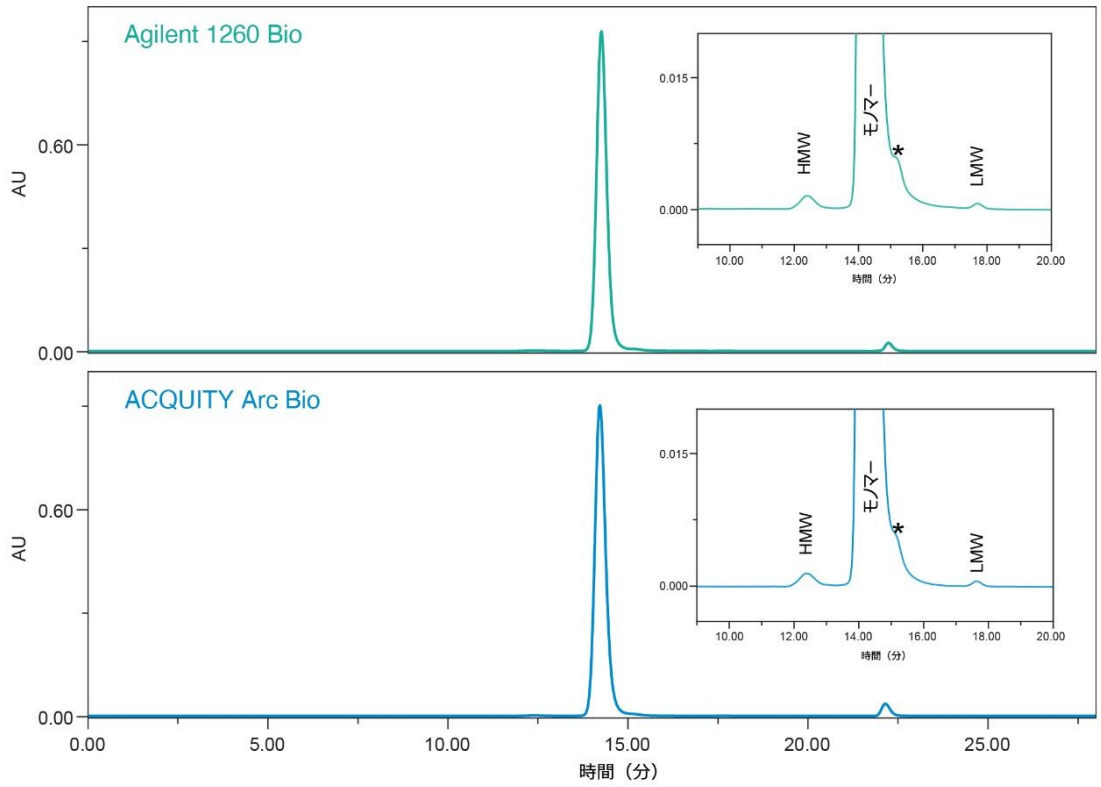


図 1. *Agilent 1260 Infinity Bio-inert* システム（「*Agilent 1260 Bio*」とラベル付け）および *CM-30S* を搭載した *ACQUITY Arc Bio* システムで取り込んだトラスツズマブの *SEC* クロマトグラム。（分析法：*XBridge Protein BEH SEC* カラム、200 *Å*、3.5 µm、7.8 mm × 300 mm、20 mM リン酸塩バッファー/350 *mM* 塩化ナトリウム（*pH 6.8*）、トラスツズマブ 10 *mg/mL*、注入量 10 µ*L*、流速 0.5 *mL*/分）。

モノクローナル抗体やその他のタンパク質ベースの薬剤の製品ライフサイクルでは、タンパク質凝集が、望ましくない免疫原性応答や有効性の低下を引き起こす可能性があるため、主要な課題になっています。SEC 分離の最も重要な目標の 1 つは、凝集体、つまり HMW 分子種の割合を測定することです。表 1 に、両方の UHPLC システムでの HMW とモノマーの間の平均分離度（Rs）、ピーク高さの 50% でのピーク幅、HMW ピークのピークの 4.4% でのピーク幅が示されています。これら 2 つのシステムにわたる、HMW とモノマーの間の分離および HMW のピーク幅に、無視できるほどのわずかな違いが観察されました。

HMW ピーク	分離度	50% での幅（分）	4.4% での幅（分）
Agilent 1260 Bio	2.6	0.510	1.166
ACQUITY Arc Bio	2.5	0.524	1.195
差	**0.1**	**-0.01**	**-0.03**

表 1. システム間の、*HMW* のピークとモノマーのピークの平均（*n* = *6*）分離度（*Rs*）、HMW のピークの 50% でのピーク幅、4.4% でのピーク幅の比較。

表 2 に、HMW のピーク、モノマーのピークおよび LMW 分子種のピークの面積 % と再現性をまとめています。面積 % の比較では、HMW、モノマー、LMW に差はなく、両システムにわたるすべての分析種の %RSD は、最大で 0 が 2 桁 の 0.00% であることが示されました。

% 面積	HMW			モノマー			LMW		
	平均値	SD	%RSD	平均値	SD	%RSD	平均値	SD	%RSD
Agilent 1260 Bio	0.26	0.00	0.00	99.68	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
ACQUITY Arc Bio	0.26	0.00	0.00	99.68	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00
差	**0.00**			**0.00**			**0.00**		

表 2. 両システムでのトラスツズマブの *SEC* 分離のピーク面積（% 面積）の再現性（*n* = *6*）の比較

CM-30S を搭載した ACQUITY Arc Bio システムは、Agilent 1260 Infinity Bio-inert システムよりカラム外拡散が大きいが、最適な SEC カラムを選択することにより、SEC 分離への影響は最小限に抑えられています。カラム外拡散は、オンカラム拡散に比べて十分に小さく、このため、これら 2 つの UHPLC システムの間で同等の分離が得られました。

結論

モノクローナル抗体の SEC 分析法は、Agilent 1260 Infinity Bio-Inert UHPLC システムから、ACQUITY 30 cm シングルゾーンカラムマネージャー（CM-30S）を搭載した ACQUITY Arc Bio システムに正常に移管されました。重要品質特性である HMW 分子種の面積 % の差は、両システムにわたって 0.00% の範囲内でした。面積 % の再現性は、すべての分子種について 0.00% RSD 内に収まりました。

CM-30S で構成されている ACQUITY Arc Bio システムは、従来の SEC 分離でよく使用される内径 7.8 mm × 300 mm 長のカラムに容易に対応できます。このアプリケーションブリーフで、ACQUITY Arc Bio システムを用いた高分離能セパレーションの再現性と、凝集体、モノマー、フラグメントを正確に定量できることを実証しました。さらに、ACQUITY Arc Bio システムの構成に 2 つの CM-30S を組み込むと、最大 15 本のカラムまで格納できるようになり、最新の UHPLC システムとより大きなカラムでの分析法開発に利点をもたらします。

参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein biotherapeutics and their Aggregates*J. Liq.Chromatogr.* Relat.Technol., 2012, 35, 2923–2950.
2. Rosenberg, AS.Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective.*The AAPS Journal,* 2006, 8:501–7.
3. Iraneta, P.; Koza, S. High Resolution Size-Exclusion Chromatography Separations of mAb Aggregates, Monomers, and Fragments using BioResolve SEC mAb Columns on UPLC, UHPLC, and HPLC Chromatography Systems.Waters Application Note, 2020, 720006956EN. < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/high-resolution-size-exclusion-chromatography-separations-of-mab-aggregates,-monomers,-and-fragments-using-bioresolve-sec-mab-columns-on-uplc,-uhplc,-and-hplc-chromatography-systems.html>
4. Koza, S.; Reed, C.; Chen, W. Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal Column for Your Method.Waters Application Note, 2019, 720006336EN. < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-system-dispersion-size-exclusion-chromatography-analysis-monoclonal-igg-antibody-aggregates-fragments-selecting-optimal-column-configuration.html>
5. Instrument Specifications, ACQUITY Arc System, Waters Spec Sheet, 720005400EN. < https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134849388>
6. Koza, S.; Reed, C.; Chen, W. Evaluating the Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Proteins.Waters Application Note, 2019, 720006337EN < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-system-dispersion-size-exclusion-chromatography-analysis-proteins.html> .
7. Hong, P.; McConville, P. Dwell Volume and Extra-Column Volume: What Are They and How Do They Impact Method Transfer.Waters White Paper, 2016, 720005723EN <

https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134895769> .

8. Koza, S.; Hong, P.; Fountain, KJ.Size-Exclusion UltraPerformance Liquid Chromatography Method Development for the Analysis of the Degradation Products of the Trastuzumab Antibody.Waters Application Note, 2012, 720004416EN. <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2012/size-exclusion-ultra-performance-liquid-chromatography-method-development-degradation-products-trastuzumab-antibody.html>

ソリューション提供製品

ACQUITY Arc Bio システム <https://www.waters.com/134966135>

Empower クロマトグラフィーデータシステム <https://www.waters.com/10190669>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <https://www.waters.com/514228>

720007075JA、2020 年 10 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.