

バイオシミラー抗体の生理的 pH および塩濃度での最新のサイズ排除クロマトグラフィー分離

Stephan M. Koza, Hua Yang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

医薬品中のタンパク質誘導体である自己集合型、凝集型、およびフラグメント化した不純物の状態は、重要品質特性（CQA）であり、非変性サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して幅広くモニターされています。多くの場合、最新のサンプルハイスループット SEC カラムでこれらの不純物の正確な定量を行うために使用されている移動相は、調剤バッファの pH を逸脱し、塩濃度をはるかに高くすることが必要になり、その結果、SEC 分析中に凝集タンパク質の解離が起きる場合があります¹。そこで、その代替策として、現在入手可能なバイオシミラーモノクローナル抗体の分析において、3つの HPLC システム適合 SEC カラム（Waters XBridge Premier カラム（粒子径 2.5 μm 、ポアサイズ 250 \AA ）、前世代の Waters BioResolve SEC mAb カラム（200 \AA 、2.5 μm ）、Cytiva SuperDex 200 Increase カラム）で、生理的 pH（約 7.4）および塩濃度（約 150 mM）のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）を SEC 溶離液として使用することについて評価しました。更に、粒子径 1.7 μm の UPLC バージョンの XBridge Premier SEC カラムとの比較を示します。

アプリケーションのメリット

- 生理的 pH（約 7.4）および塩濃度（約 150 mM）の前後に調製したバッファで SEC を使用することで、タンパク質医薬品サイズバリエーションの評価における機能および安定性が改善
- 事前に作成したダルベッコ PBS バッファを SEC 溶離液として使用した、迅速な分析法開発および簡素化したルーチン展開
- 生理的に適合する PBS バッファを使用した場合、デキストラン-粒子ベースのカラムでの SEC 分離と比較して、

サンプルスループットが大幅に改善

- プラットホーム分析的 SEC 分析法の汎用性が向上

はじめに

Waters XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 µm カラムおよび ACQUITY Premier Protein SEC 250 Å、1.7 µm カラムは、2つの新技术を搭載した製品です。まず、特許取得済みのケミストリー（MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) テクノロジー）により、カラム本体、エンドフィッティング、フリットの金属表面が修飾されています。この修飾の目的は、分析種のタンパク質と金属表面の間のイオン性相互作用と金属複合体の形成を大幅に低減しつつ、金属製カラムハードウェアを使用した場合に得られる高効率と再現性のある粒子充填機能を維持することにあります。更に BEH SEC 粒子のジオール結合の代わりにヒドロキシ末端を持つポリエチレンオキシド（PEO）を用いることにより、イオン性および疎水性の二次的相互作用を更に最小限に抑えます。これらの改善により SEC カラムが誕生し、30年以上前に導入された SuperDx 200 など、非金属製カラムハードウェアに架橋デキストラン-アガロースを充填して使用することで得られた、タンパク質に対する不活性化のメリットの多くが活かされています¹。一方、これらの最新のカラムでは、BEH 粒子強度が高まり、BEH 粒子サイズが小さくなったことで、サンプルスループットが大幅に高まりました。単純なシリカベースの SEC 粒子と比較すると、エチレン架橋ハイブリッド（BEH）粒子の使用により、長時間にわたる塩基性 pH 安定性（pH 範囲 2.5 ~ 8.0）が得られます。ただし、pH 上限は現行の Cytiva SuperDex 200 Increase カラム（pH 範囲 3 ~ 12）ほどは高くありません。

このような新しいカラムテクノロジーの不活性特性を活用する試みとして、SEC 移動相として、生理的な pH（約 7.4）および塩濃度（約 150 mM）のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）、塩濃度 120 mM（0.8X DPBS）～ 300 mM（2X DPBS）の使用について評価しました。調剤バッファの pH および等張性が大幅に逸脱している SEC 移動相では、評価するタンパク質サンプルの自己集合状態が変化する可能性があります¹。一方、医薬品タンパク質の調剤バッファにできるだけ近い組成の SEC 移動相を使用することが望まれますが、多くの場合、実際にはそれが不可能です。あるいは、pH および浸透圧が生理的条件に近いバッファを使用することで、有効な SEC 分離が得られ、タンパク質の自己集合についてより意味のある評価ができる可能性があります。その点、移動相として DPBS を使用することで、血清、間質液、リンパ液など、静脈投与や皮下投与などの非経口医薬品タンパク質が曝露される一次液と同等の pH 7.4 および高張性が得られます。

この試験では Waters BioResolve SEC mAb カラム（ジオール結合 BEH、200 Å、粒子径 2.5 µm、ステンレススチール製ハードウェア）、Waters XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 µm カラム（PEO 結合 BEH、MaxPeak HPS ハードウェア）、Waters XBridge Premier カラム（粒子径 2.5 µm、ポアサイズ 250 Å）、Cytiva SuperDex 200 Increase カラム（ガラスおよびポリマー製ハードウェアに 8.6 µm の架橋デキストラン-アガロース粒子を充填）を選択しました。更に、XBridge Premier カラムの粒子径 1.7 µm の UPLC ACQUITY バージョンとの比較を示します。現在

バイオシミラーとして米国で入手できる4種のモノクローナル抗体（mAb）のSEC分離を評価しました。

実験方法

サンプルの説明

バイオシミラー mAb はベバシズマブ（Mvasi、25 mg/mL）、インフリキシマブ（Avsola、10 mg/mL）、リツキシマブ（Ruxience、10 mg/mL）であり、オリジネーターのバイオ医薬品はトラスツズマブ（Herceptin、21 mg/mL）でした。すべてのサンプルを、希釈せずに、1回以上の凍結融解サイクルを経た後に分析しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio、CH-30A APH カラムヒーター搭載
検出:	ACQUITY UPLC TUV 検出器、5 mm チタンフローセル装着、波長：280 nm および 214 nm
バイアル:	ポリプロピレン 12 × 32 mm スクリューネックバイアル（キャップ付き、スリット入り PTFE/シリコーンセプタム付き）、容量 300 μ L、100 本入り（製品番号：186002639）
カラム:	XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μ m、7.8 × 300 mm カラム + mAb サイズバリアント標準（製品番号：176005070） ACQUITY Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μ m、4.6 × 300 mm カラム + mAb サイズバリアント標準（製品番号：176005072） BioResolve SEC mAb カラム、200 Å、2.5 μ m、7.8 mm × 300 mm（製品番号：176004595） Cytiva Superdex 200 Increase 10/300 GL カ

	ラム、10 × 300 mm (製品番号: 28990944)
カラム温度:	室温
サンプル温度:	6 °C
注入量:	2 ~ 10 mL
流速:	0.25 ~ 0.5 mL/分
移動相 A:	リン酸緩衝生理食塩水 (DPBS、10X) 、ダルベッコ調剤 10X (Alfa Aesar、J61917) (0.1 µm 滅菌フィルターでろ過済み)
移動相 B:	Milli-Q 18 MΩ 水 (0.1 µm 滅菌フィルターでろ過済み)

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: Empower 3 (FR 4)

結果および考察

A. DPBS 濃度が XBridge Premier SEC および BioResolve SEC mAb のカラム性能に及ぼす影響

BioResolve SEC mAb カラムおよび XBridge Premier カラムについて、4 種のバイオシミラー mAb を様々な濃度の DPBS で評価しました。両方のカラムで、7.8 × 300 mm のカラムサイズを流速 0.5 mL/分で評価しました。存在量の少ないサイズバリエーションに対する感度を高めるため、UV 吸光度 280 nm ではなく、UV 吸光度 214 nm を使用しました。ただし、モノマーのピークが検出器の直線性範囲を上回っていたため、使用したサンプルロード量での定量ではこれは有効ではありませんでした。BioResolve SEC mAb カラムの結果を図 1 に示します。XBridge Premier SEC カラムの結果は図 2 に示します。これらのサンプルでは、HMWS2 および HMWS1 は主に mAb の多量体型および mAb の二量

体自己集合型と推測されます。これらのサンプルでは、LMWS1 および LMWS2 として抗体のフラグメント化も観察されました。LMWS1 は主に mAb のヒンジ領域での単回切断により、共有結合した Fc ドメインと単一の Fab ドメインで構成される約 100 KDa のフラグメントが生じた結果と予測されます。一方、LMWS2 は主に単一の Fab ドメインおよび Fc ドメインで構成されています。

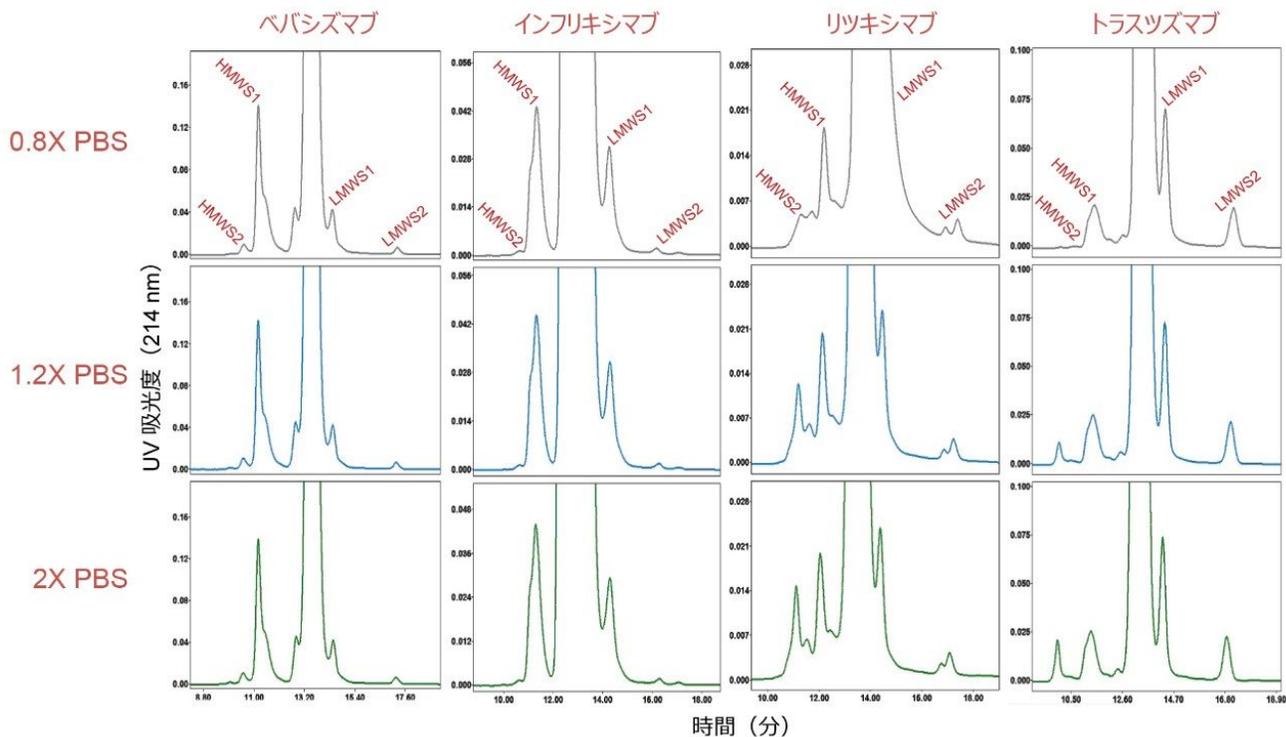


図 1. *BioResolve SEC mAb*、200 Å、2.5 μm、7.8 × 300 mm カラムで様々な濃度のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を使用した場合のバイオシミラー *mAb* サンプルの積み重ねプロット。実験条件は本文中に記載。

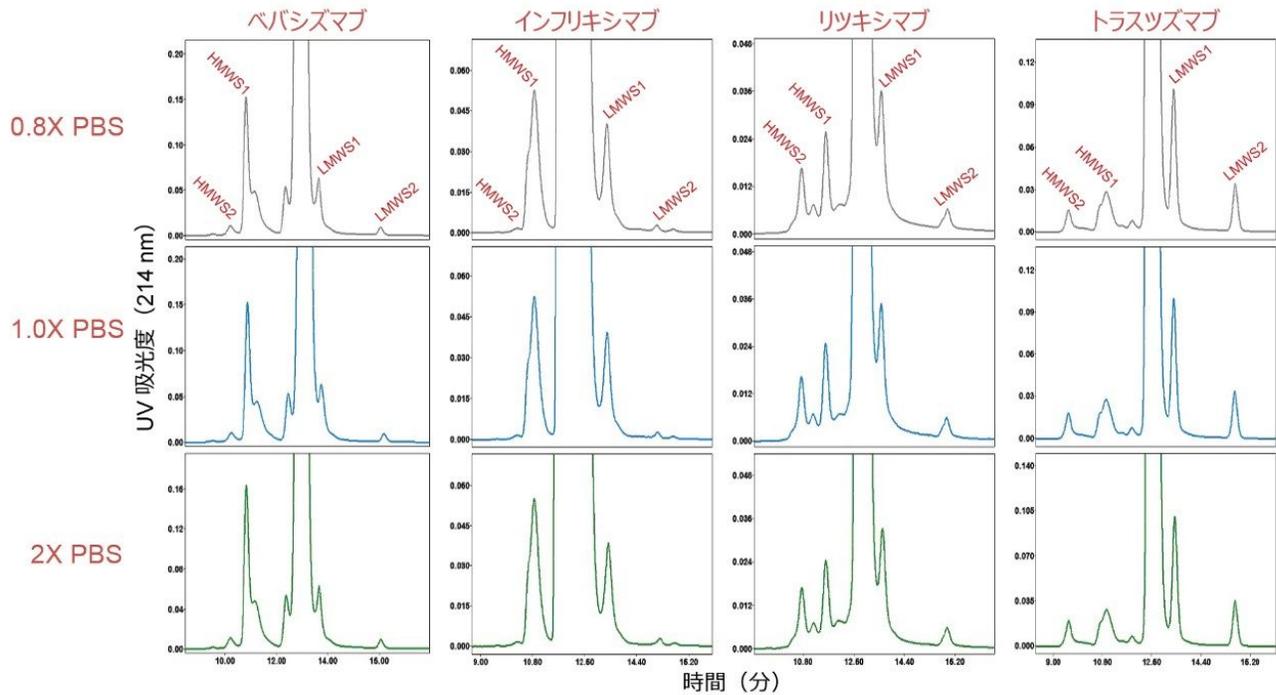


図 2. XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μm、7.8 × 300 mm カラムで様々な濃度のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を使用した場合のバイオシミラー mAb サンプルの積み重ねプロット。実験条件は本文中に記載。

ベバシズマブおよびインフリキシマブについては、HMWS の回収率および LMWS1 のフラグメント分離において、両方のカラムで 0.8X DPBS ~ 2X DPBS の範囲で同等の結果が観察されました。一方、BioResolve カラムでは、リツキシマブおよびトラスツズマブについて、多量体 HMWS (HMWS2) の回収率が大幅に低下し、0.8X DPBS の条件で LMWS1 フラグメントの分離の低下が見られました。リツキシマブでは、1.2X DPBS 濃度で BioResolve カラムに対する有害な影響はほぼ解消されました。一方、トラスツズマブでは、2X DPBS 濃度で HMWS2 の最大の回収率が得られましたが、この傾向から、完全な回収率は間の 1.5X DPBS 濃度で得られると考えられます。対照的に、XBridge Premier カラムでは、リツキシマブとトラスツズマブについて 0.8X DPBS ~ 2X DPBS で一貫性の高い結果が得られました。これらの結果は、XBridge Premier カラムハードウェアおよび粒子の表面ケミストリーにより、ステンレススチール製ハードウェアを使用した前世代のジオール結合 BEH SEC カラムと比較して、4 種のバイオシミラー mAb との非特異的相互作用が低減したことを示しています。具体的には、この結果は、これらの mAb の等電点 (pI) と関連している可能性があります。報告されているトラスツズマブおよびリツキシマブの pI の測定値はそれぞれ pI = 9.1 および pI = 9.4 で、ベバシズマブ (pI = 8.3) およびインフリキシマブ (pI = 7.6) よりもはるかに塩基性であることから、充填粒子上のシラノールなどの低含有量の負電荷との陽イオン性相互作用が大きくなる可能性があります²。この結果は、Premier SEC カラムでは、前世代のジオール結合 BEH SEC カラムと比較して、幅広い範囲の条件で有効な分離が得られることを示しており、プラットフォーム SEC 分析法での使用により適しているはずで

B. SuperDx 200 Increase、XBridge Premier、および ACQUITY Premier で DPBS を用いたバイオシミラー mAb の分離

XBridge Premier に加え、Cytiva SuperDx 200 Increase 10/300 GL (8.6 mm、10 × 300 mm) カラムおよび ACQUITY Premier 1.7 mm、4.6 × 300 mm、SEC カラムで DPBS (1X) 移動相を使用して、4 種のバイオシミラー mAb を分析しました (図 3)。デキストラン-アガロース架橋粒子および生体高分子用カラムハードウェアを使用した SuperDx カラムテクノロジーは、30 年以上にわたり、生理的条件付近でのタンパク質やペプチドの精製および分析に一般に使用されています。また、SuperDx カラムは、粒子径が大きく、充填剤がより圧縮されているため流速限界が低く、粒子径 5 mm 以下のシリカベースカラムと比較して分析時間が長くなりますが、タンパク質およびペプチドとの非特異的相互作用が非常に低く抑えられています。更に、粒子径が大きい場合、より大きい多量体型のタンパク質がろ過で除かれにくかったり、圧力の影響でタンパク質の自己集合状態が変化したりする可能性があります。

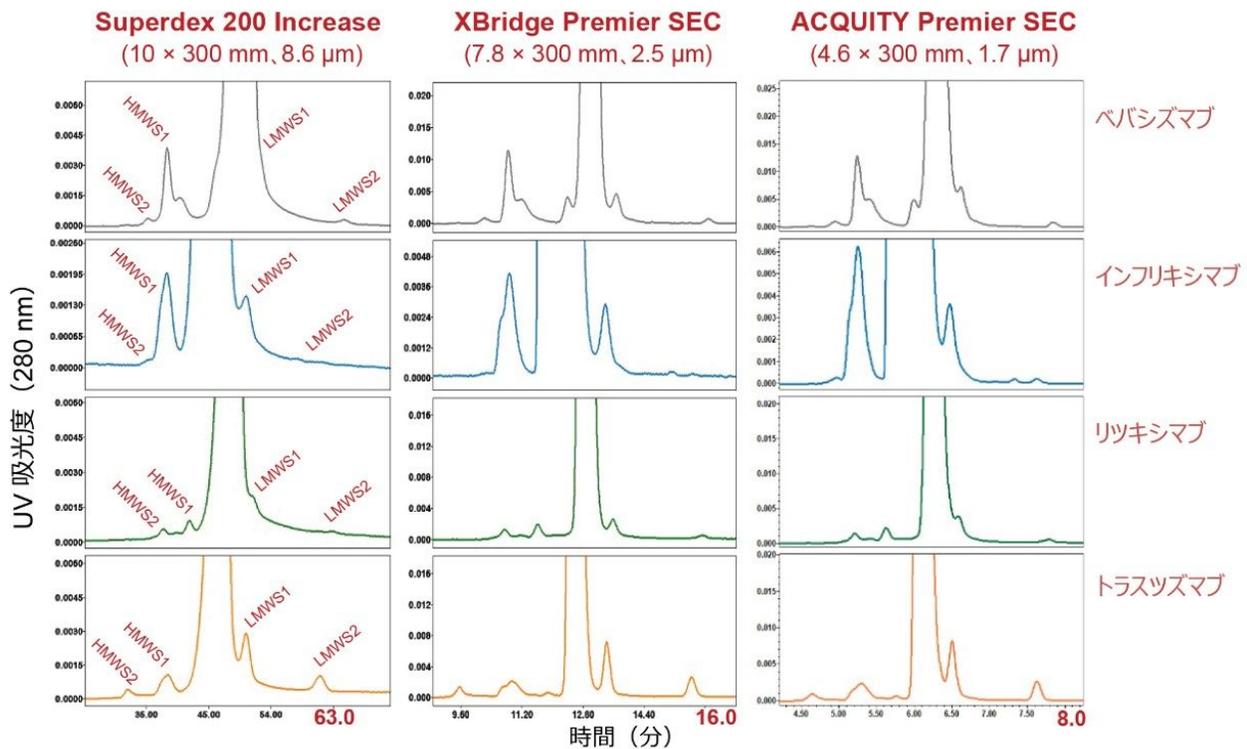


図 3. 選択したカラムで 1X ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を移動相として使用した場合のバイオシミラー mAb サンプルの SEC 分離の積み重ねプロット。実験条件は本文中に記載。

この試験では、SuperDx カラムでは、分離を最大化するために流速 0.25 mL/分を使用しました。SuperDx および類似の SEC カラムでは、タンパク質とカラムの相互作用が低レベルであるにもかかわらず、非特異的イオン性相互作用に

より、タンパク質サイズバリエーションの一部が完全に回収されないことと報告されています³。そのため、このカラムで 0.8X ~ 2X の DPBS 濃度でバイオシミラー mAb を評価し、回収率の再現性が高いことを実証しました（データは示していません）。その結果、分析用超遠心機（AUC）などの追加の裏付けデータがない状況で、SuperDx カラムを使用して観察された HMWS の内容を使用して、XBridge Premier SEC カラムおよび ACQUITY Premier SEC カラムの有効性を評価しました。以前記載したように、XBridge Premier SEC カラムで使用した流速は 0.5 mL/分でした。ACQUITY Premier SEC の流速はほぼ最大の 0.35 mL/分で、XBridge カラムで使用した線速度の 2 倍でした。その結果、SuperDx 200 カラム、XBridge Premier カラム、ACQUITY Premier カラムでの分析時間はそれぞれ 100 分、25 分、12.5 分となりました。

SuperDx、XBridge Premier、ACQUITY Premier カラムにおいて、バイオシミラー mAb について一貫したクロマトグラフィープロファイル（図 3）および HMWS1 および HMWS2 について同等の定量結果（図 4）が得られましたが、カラム効率や LC バンド拡散のため、分離度に大きな差が見られました。SuperDx カラムの流速を XBridge Premier カラムで使用した線速度の 30% まで減少させることで、HMWS バリエーションの効果的な分離が認められ、LMWS1 フラグメントが部分的に分離されましたが、分析時間は約 4 倍になりました。XBridge Premier カラムの分離効率を得るには、3 本の SuperDx カラムで、線速度を 3 分の 1 に減らして一連の測定を行うことが必要で、分析時間はほぼ 9 倍になると予測されました（実験は行っていません）。

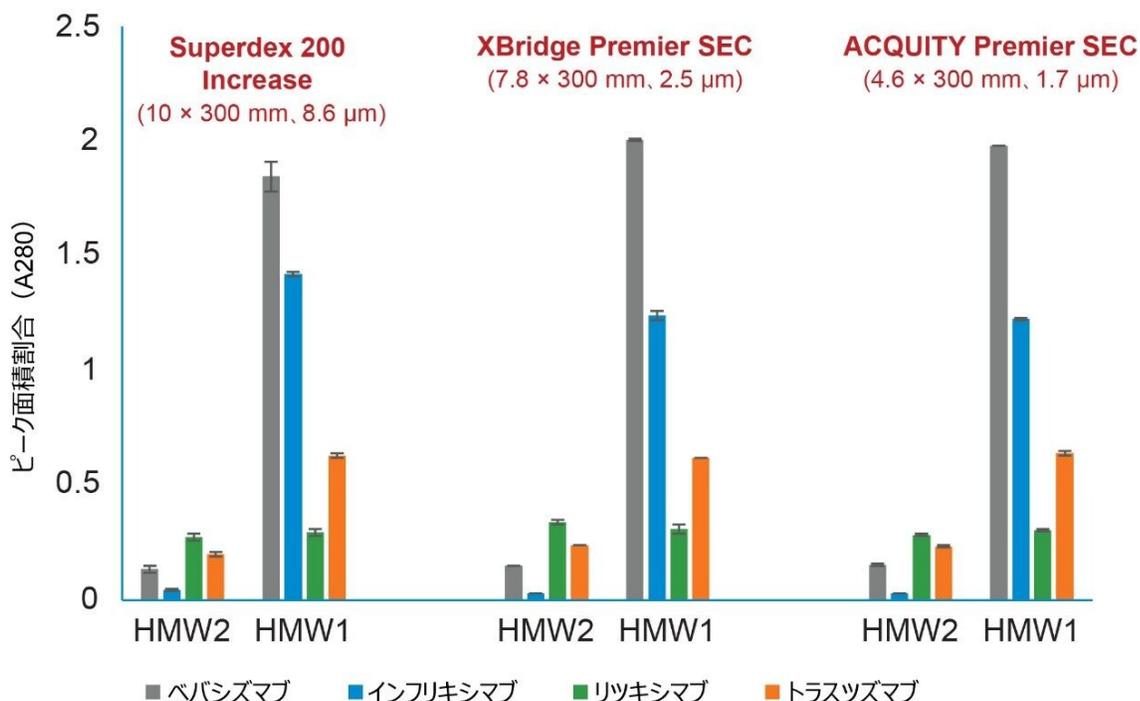


図 4. SuperDx 200、XBridge Premier 250 Å、ACQUITY Premier 250 Å、SEC カラムで、1X ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を移動相として使用して、バイオシミラー mAb HMW1 および HMW2 サイズバリエーションの相対存在量の測定値を比較しました。クロマトグラムを図 3 に示します。エラーバーは 2 回の繰り返し測定値の範囲を示します。実験条件は本文中に記載。

ACQUITY Premier SEC カラムで、XBridge Premier SEC カラムの 2 倍の線速度で測定した場合、サンプルスループットが最大化すると共に、HMWS 不純物の有効な分離および定量が得られました。一方、ACQUITY UPLC H-Class Bio (CH-30 カラムヒーター搭載) では、線速度の大幅な低下および 5σ バンド拡散 (18 μL) により、XBridge Premier と比較して、LMWS1 フラグメントの分離が大幅に悪くなりました。これは、後者の方が内径が大きく、その結果、ピーク容量が大きいためです⁴。

この結果から、XBridge および ACQUITY Premier SEC カラムで、1X DPBS 生理的バッファー (pH 7.4、塩濃度 150 mM) を移動相とした場合、評価したバイオシミラー mAb の有効かつ頑健な SEC 分離が得られ、デキストラン-アガロース粒子ベースのカラムと比較して、大幅に高い SEC サンプルスループットが得られることが実証されました。1X DPBS はあらゆるタンパク質の SEC 分析で有効な移動相であることは期待できませんが、DPBS を様々な濃度で使用することで、分析法開発、移管が簡素化し、mAb およびその他のタンパク質に簡単に使用できる可能性があります。この試験では、粒子径 1.7 μm のカラムで使用する場合は DPBS 濃縮液を 0.1 μm 滅菌フィルターでろ過しましたが、粒子径 2.5 μm 以上のカラムでは、0.2 μm フィルターでろ過したバッファーが一般に許容されます。結論として、このデータ

から、SEC カラムの開発に MaxPeak Premier HPS および BEH-PEO テクノロジーを適用することで、タンパク質-カラム間の非特異的相互作用が低減したカラムが得られることが実証されました。このことは、他のバッファーシステムを使用した分析法を開発および展開する場合にもメリットになる可能性があります。

結論

カラムハードウェアおよび充填パーティクルケミストリーの技術的進歩により、XBridge および ACQUITY Premier 250 Å、SEC カラムでは、前世代のジオール結合 BEH SEC カラムと比較して、非特異的タンパク質-カラム間相互作用が低減しました。このような機能の向上により、試験したバイオシミラー mAb で実証されたように、生理的な pH（約 7.4）および塩濃度（約 150 mM）付近のバッファーを用いた SEC により、タンパク質医薬品の HMWS および LMWS の評価が可能になります。この試験では、XBridge および ACQUITY Premier SEC カラムは、非特異的相互作用に関しては、架橋デキストラン-アガロース粒子を充填した SuperDx 200 SEC カラムと同等でしたが、サンプルスループットが大幅に良好でした。XBridge および ACQUITY Premier SEC カラムでは、約 10 KDa ~ 650 KDa の範囲の mAb およびその他の医薬品タンパク質サイズバリエーションについて、調製済みダルベッコ PBS またはその他のバッファーシステムを使用して、プラットホーム SEC 分析法の汎用性、迅速な分析法開発、簡素化したルーチン展開を実現できる可能性があります。

参考文献

1. Tsutomu Arakawa, Daisuke Ejima, Tiansheng Li, John S. Philo. The Critical Role Of Mobile Phase Composition In Size Exclusion Chromatography Of Protein Pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 99, Issue 4, 2010, Pages 1674–1692.
2. Alexandre Goyon, Melissa Excoffier, Marie-Claire Janin-Bussat, Balazs Bobaly, Szabolcs Fekete, Davy Guillaume, Alain Beck. Determination Of Isoelectric Points And Relative Charge Variants Of 23 Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Journal of Chromatography B*, Volumes 1065–1066, 2017, Pages 119–128.
3. Jie Wen, Tsutomu Arakawa, John S. Philo. Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions, *Analytical Biochemistry*, Volume 240, Issue 2, 1996, Pages 155–166.
4. Stephan M. Koza, Corey Reed, Weibin Chen. Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

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

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

720007484JA、2022 年 1 月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)