

UPLC™ および HPLC 適合性のある MaxPeak™ Premier Protein SEC カラムを用いたモノクローナル抗体の迅速なサイズバリエーション分析

Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

ハイスループットで迅速なサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析法は、バイオ医薬品の加工および製剤開発のサポートに有用な場合があります。さらに、迅速な SEC 分析法は、製造プロセスをサポートするリアルタイムの純度分析に、より効果的でしょう。これらのアプリケーションでは、SEC を使用して、製品の安全性や有効性に影響を与える自己会合したまたは凝集したタンパク質の不純物やタンパク質のフラグメント化をモニターできます。

以前のアプリケーションノートで、Waters™ MaxPeak Premier Protein SEC カラムおよび生理的な pH（7.4）とイオン強度の移動相を用いて、効果的な分離とカラム寿命の延長の達成が可能であることが実証されました。その結果として、最近導入されたこれらの UPLC バージョンおよび HPLC バージョンのカラムの性能とカラム寿命を、それぞれの指定最大値に近い圧力で動作させて評価したところ、分析時間は 2.1～3.0 分でした。

この試験では、Waters ACQUITY™ Premier Protein SEC（250 Å、1.7 μm、4.6 × 150 mm）カラムとサイズが 4.6 × 150 mm および 7.8 × 150 mm の 2 本の XBridge™ Premier Protein SEC（250 Å、2.5 μm）カラムの寿命を、500 回の分析にわたって正常に評価できました。4 種類の市販のモノクローナル抗体バイオシミラーの自己会合型および選択したフラグメント化したサイズバリエーションについて、分離性能を評価しました。

アプリケーションのメリット

- 迅速な SEC 分析（2.1～3.0 分）、UPLC および HPLC システムでの mAb サイズバリエーションの SEC 分析
-

- 指定されたカラム最大圧力近くで 500 回を超える分析を行えるカラム寿命
- カラム寿命試験全体にわたる、HMWS および LMWS 不純物レベルでの再現性の測定

はじめに

ハイスループットで迅速な SEC 分析法は、製品の安全性や有効性に影響を与える可能性のある凝集タンパク質不純物やタンパク質のフラグメント化のモニタリングに有用であり、分析時間が短縮されることにより、製造プロセスや製剤開発の加速に役立ちます^{1,2}。さらに、迅速な SEC 分析法は、リアルタイムの純度分析にもより効果的であり、登録されている製造プロセスに対応できる可能性があります³。以前の実験で、長さ 300 mm の 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、生理的 pH (7.4) およびイオン強度で、高分解能分離および長期安定性を提供することが実証されています。これには、親水性ヒドロキシ末端ポリエチレン酸化物 (PEO) と結合した pH 安定エチレン架橋ハイブリッド (BEH) SEC 粒子と PEO 修飾したカラムハードウェアを使用して、タンパク質と表面の相互作用を低減したことが大きく寄与しています⁴。その結果として、迅速でハイスループットの SEC 分析機能、および長さ 150 mm の UPLC バージョンと HPLC バージョンの MaxPeak Premier SEC カラムのカラム寿命を、それぞれの指定最大値に近い動作圧力で使用して評価したところ、分析時間は 2.1~3.0 分でした。

この試験では、ACQUITY Premier Protein SEC (ポアサイズ 250 Å、粒子径 1.7 µm) 4.6 × 150 mm カラムと内径 4.6 mm および 7.8 mm の 2 本の XBridge Premier (250 Å、2.5 µm) カラムを、現在米国でバイオシミラーとして入手できる 4 種類のモノクローナル抗体 (mAb) 医薬品の分析の 500 回の注入にわたって評価しました。ベバシズマブ、インフリキシマブ、リツキシマブのサンプルはバイオシミラー医薬品であり、トラスツズマブのサンプルは先発医薬品でした。自己会合型および選択したフラグメント化した mAb サイズバリエーションについて、分離性能を評価しました。

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、トラスツズマブは、先発バイオ医薬品 (Herceptin、21 mg/mL) を使用しました。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-A カラムヒーター搭載
検出:	ACQUITY UPLC TUV 検出器 (5 mm チタンフローセル付き)
波長:	280 nm
バイアル:	ポリプロピレン 12 × 32 mm スクリューネック、キャップおよびスリット入り 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:	<p>ACQUITY Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μm、4.6 × 150 mm + mAb サイズバリエーション標準試料 (製品番号: 176004783)</p> <p>XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μm、4.6 × 150 mm + mAb サイズバリエーション標準試料 (製品番号: 176004781)</p> <p>XBridge Premier Protein SEC 250 Å、2.5 μm、7.8 × 150 mm + mAb サイズバリエーション標準試料 (製品番号: 176004779)</p>
カラム温度:	室温
サンプル温度:	6 °C
注入量:	<p>インフリキシマブおよびリツキシマブ: 7.8 × 150 mm カラムでは 5 mL、4.6 × 150 mm カラムでは 2 mL</p> <p>ベバシズマブおよびトラスツズマブ: 7.8 × 300 mm カラムでは 2.5 mL、4.6 × 150 mm カラムでは 1 mL</p>

流速:	0.75 ~ 2.0 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 クロマトグラフィーデータシステム
------------------	-----------------------------

結果および考察

ACQUITY Premier Protein (4.6 × 150 mm) 、XBridge Premier Protein (4.6 × 150 mm) 、XBridge Premier Protein (7.8 × 150 mm) SEC カラムで、4 種類の mAb サンプルの定量可能な高分子種 (HMWS) および低分子種 (LMWS) の不純物のハイスループット SEC 分離を 500 回の分析にわたって評価しました。これら 4 種類の mAb 医薬品サンプルが ACQUITY および XBridge Premier SEC カラムの寿命に与える影響についての徹底的な試験は、以前に行われています⁴。このため、この試験では、mAb サンプルは報告されているタイムポイント (0 または初期値、100、200、300、400、500 回目の注入) でのみ評価し、中間タイムポイントにブランク試料 (水) 5 μL の注入を行いました。10X DPBS 濃縮液を LC で水と混合し、1X PBS 移動相も作成しました。さらに、10X DPBS 濃縮液および Milli-Q 18 MΩ 水は、使用前に 0.1 μm フィルターで滅菌ろ過しました。ベバシズマブおよびトラスツズマブの注入量は、4.6 × 150 mm カラムで 1.0 μL、7.8 × 150 mm カラムで 3.0 μL でした。インフリキシマブおよびリツキシマブでは注入量はそれぞれ 2.0 μL および 6.0 μL でした。

この試験で使用した流速とその結果の圧力が、表 1 に示されています。使用した流速は、カラムの推奨最大カラム圧力またはその周辺でカラム寿命を試験するために選択しました。推奨カラム圧力は、カラムを取り付けた状態で観測されたシステム圧力から、カラムの代わりにゼロデッドボリュームユニオン (製造番号: [289000439 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/289000439-union-zero-dead-volume.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/289000439-union-zero-dead-volume.html)) を取り付けた状態で観測された LC システム圧力を減算することで決まる、カラムのみに起因する圧力を表します。3 本のカラムすべてで、流速が推奨最大値を超えました。これらの流速では、4.6 × 150 mm ACQUITY Premier カラ

ムおよび XBridge Premier カラムのカラム圧力は推奨最大値近くでした。7.8 × 150 mm XBridge Premier カラムを、このカラムの推奨流速の 2 倍である UPLC システム (2.00 mL/分) の最大流速で実行したところ、カラム圧力は推奨最大値を十分に下回っていました。4.6 × 150 mm カラムでは、カラムと TUV 検出器の間に 0.0025 インチ (64 μm) の PEEK コネクター (製品番号: [700009971 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009971-assy-tube-inlet-0025-id-peek-nut-85.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009971-assy-tube-inlet-0025-id-peek-nut-85.html)) を使用し、7.8 × 150 mm カラムでは 0.004 インチ (100 μm) の PEEK コネクター (製品番号: [700009972 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009972-tubing-assembly-detector-inlet-peek-0004-id-with-peek-nut-85-lon.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/service-parts--kits/700009972-tubing-assembly-detector-inlet-peek-0004-id-with-peek-nut-85-lon.html)) を使用しました。

カラム	指定最大値		実測値		
	流速 (mL/分)	カラム圧力 (PSI, [bar])	流速 (mL/分)	合計圧力 (PSI, [bar])	カラム圧力 (PSI, [bar])
ACQUITY Premier SEC (4.6 × 150 mm)	0.50	7000, [483]	0.75	8720, [601]	6700, [462]
XBridge Premier SEC (4.6 × 150 mm)	0.50	4500, [310]	1.00	7010, [483]	4270, [294]
XBridge Premier SEC (7.8 × 150 mm)	1.00	4500, [310]	2.00	6900, [476]	3540, [244]

表 1. 流速と観測された圧力

ACQUITY Premier と 2 本の XBridge Premier カラムで分離された mAb のクロマトグラムの拡大図が図 1 に示されています。3 本のカラムすべてで、微量レベルの HMWS および LMWS 不純物に関して、類似した全体的クロマトグラフィープロファイルが得られました。4.6 × 150 mm XBridge カラムでは、他の 2 本のカラムと比較して予想どおり低い分解能が得られました。これは、使用した直線速度が高いのがこの理由の一部です。さらに、4.6 × 150 mm XBridge カラムの粒子径 (2.5 μm) も、4.6 × 150 mm ACQUITY カラム (1.7 μm) の粒子径より約 50% 大きく、内径が大きい 7.8 × 150 mm XBridge カラムでは LC システムのバンド拡散の影響をあまり受けません⁵。この試験で使用した LC システムの 5 シグマ (5σ) バンド拡散の測定値は 7.9 μL でした⁶。ACQUITY カラムを 7.8 × 150 mm XBridge カラムと比較すると、一般に ACQUITY カラムの方が粒子径が小さいため、HMWS バリエーションのより良好な分離が観察されます。一方、LMWS2 は一般に、LC システムのバンド拡散効果のために、7.8 × 150 mm XBridge カラムの方がモノマーのピークテールからより良く分離されます。

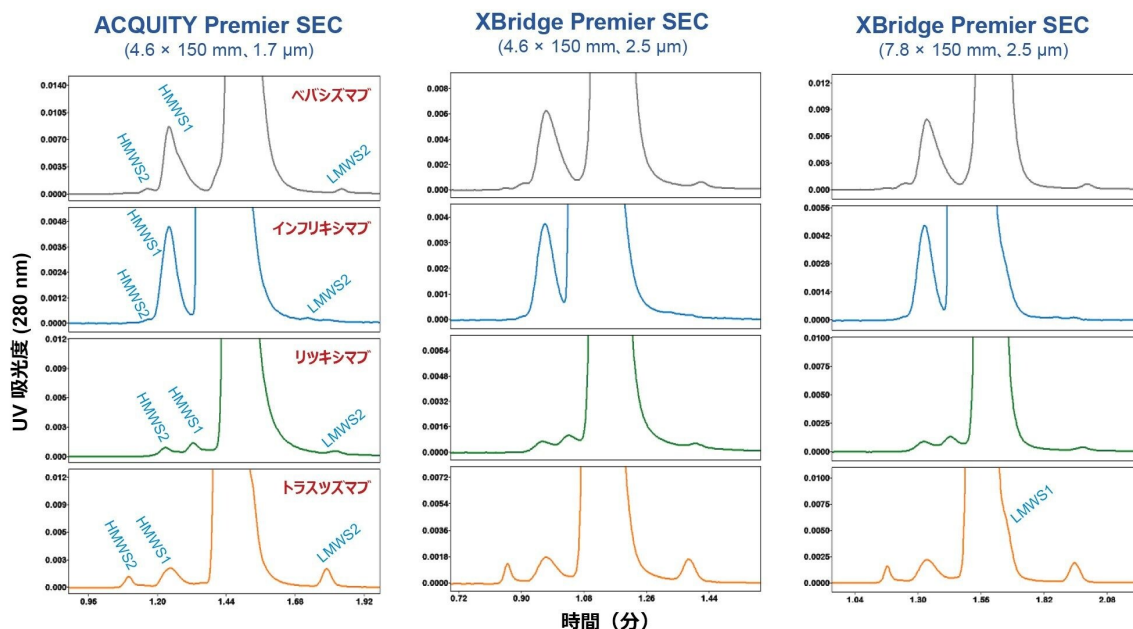


図 1. 長さ 150 mm の MaxPeak Premier SEC カラムを使用した、ハイスループットのバイオシマラー mAb サンプルの SEC 分離の比較。使用した流速は、4.6 × 150 mm ACQUITY Premier SEC カラムでは 0.75 mL/分、4.6 × 150 mm XBridge Premier SEC カラムでは 1.0 mL/分、7.8 × 150 mm XBridge Premier SEC カラムでは 2.0 mL/分で、分析時間はそれぞれ 2.8 分、2.1 分、3.0 分でした。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

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、抗体のフラグメント化も LMWS1 および LMWS2 として観察されます。これらの条件で、LMWS1 は、主に mAb のヒンジ領域の単一の開裂の結果であり、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 のフラグメントをもたらすと推定され、7.8 × 150 mm カラムでトラスツズマブのメイン（モノマー）ピークの小さなテーリングショルダーとして観察されるだけあるため、定量しませんでした。ヒンジ領域の両方の重鎖の開裂によって生成された単一の Fab ドメインと Fc ドメインで主に構成される LMWS2 を、一貫して存在量が低い（ $\leq 0.02\%$ ）ために報告されなかったインフリキシマブを除くすべての抗体サンプルについて、定量しました。LMWS2 は一般に LMWS1 と同じ分解経路で生成されるため、選択したサンプルの分解経路をモニターするには、LMWS2 のみを定量するのが妥当な可能性があります。

図 2 ~ 図 4 に、3 つのカラム寿命試験での代表的クロマトグラムの拡大図が示されています。保持時間、および HMWS および LMWS2 のサイズバリエーションの分離（部分的に分離されたショルダーピークを含む）に関して、全体的なクロマトグラフィープロファイルが一貫して表示されることが観察されます。

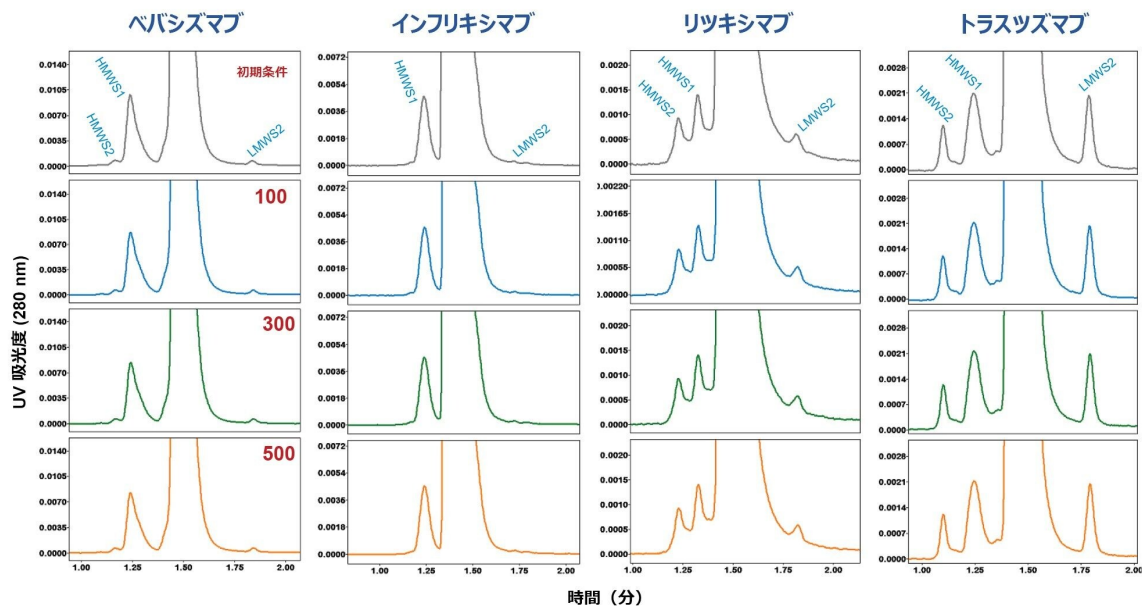


図 2. ハイスループットカラム寿命試験で ACQUITY Premier SEC (4.6 × 150 mm) を使用して得られたバイオシミラー mAb サンプルのクロマトグラムの拡大図。おおよその初回注入および 100 回目、300 回目、500 回目の注入が示されています。DPBS を移動相として使用し、流速は 0.75 mL/分で、分析時間は 2.8 分でした。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

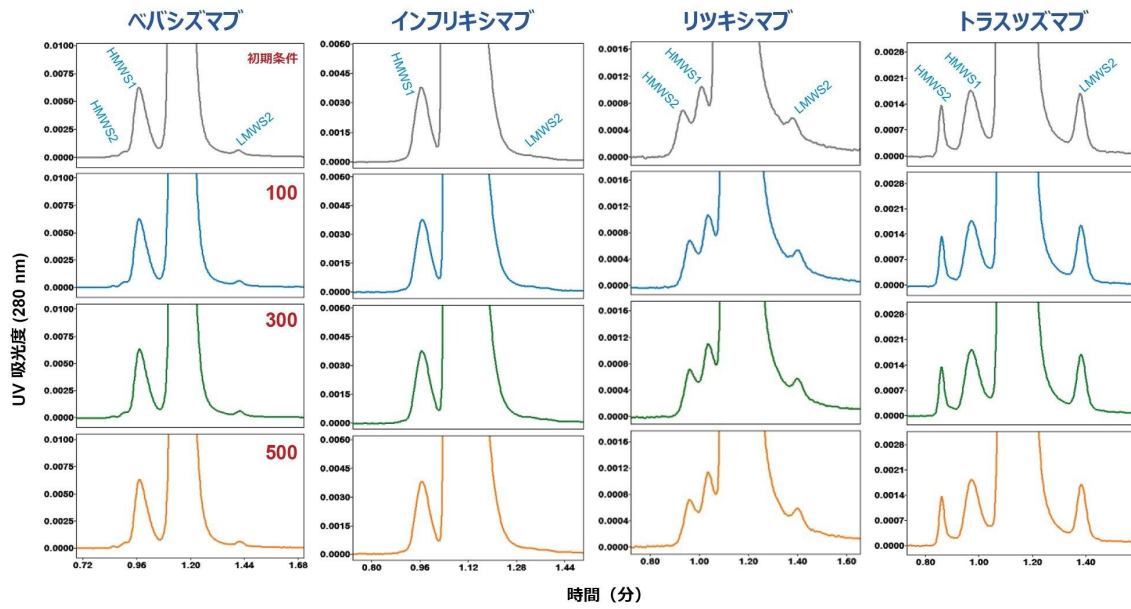


図3. ハイスループットカラム寿命試験で *XBridge Premier SEC* (4.6 × 150 mm) を使用して得られたバイオシミュラー *mAb* サンプルのクロマトグラムの拡大図。およそその初回注入および100回目、300回目、500回目の注入が示されています。DPBSを移動相として使用し、流速1.00 mL/分、分析時間2.1分でした。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

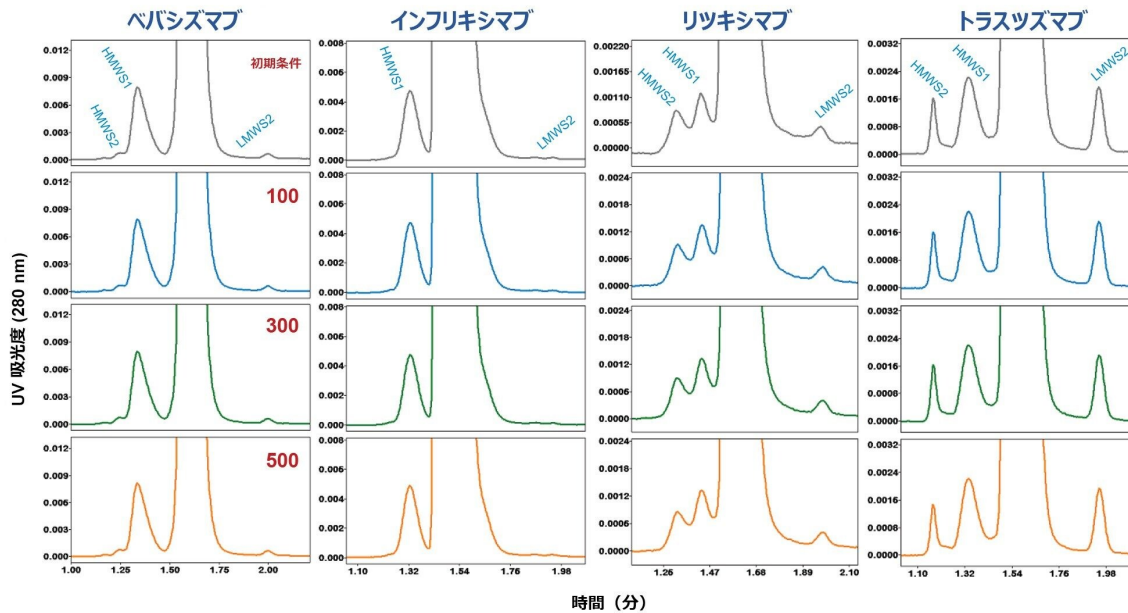


図 4. ハイスループットカラム寿命試験で *XBridge Premier SEC* (7.8 × 150 mm) を使用して得られたバイオシミラー *mAb* サンプルのクロマトグラムの拡大図。おおよその初回注入および 100 回目、300 回目、500 回目の注入が示されています。DPBS を移動相として使用し、流速 2.00 mL/分、分析時間 3.0 分でした。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

クロマトグラムで同定された測定可能な HMWS および LMWS サイズバリエーションの相対ピーク面積の変化が図 5 ~ 7 に示されています。さらに、すべてのサンプルについて、機能的なカラム効率の変化を評価するために、HMWS1 の分離を評価しました。500 回を超える注入を通して、HMWS および LMWS の不純物の相対定量測定値および HMWS1 の分離は、3 本のカラムすべてで相対的に変わりませんでした。これにより、これらのカラムでは、推奨流速を超えて使用した場合に、性能を維持できることが示されています。ただし、これらの高流速では、指定されたガイドライン内の流速で使用する場合と比較して、カラム寿命が短くなることが予測されます。

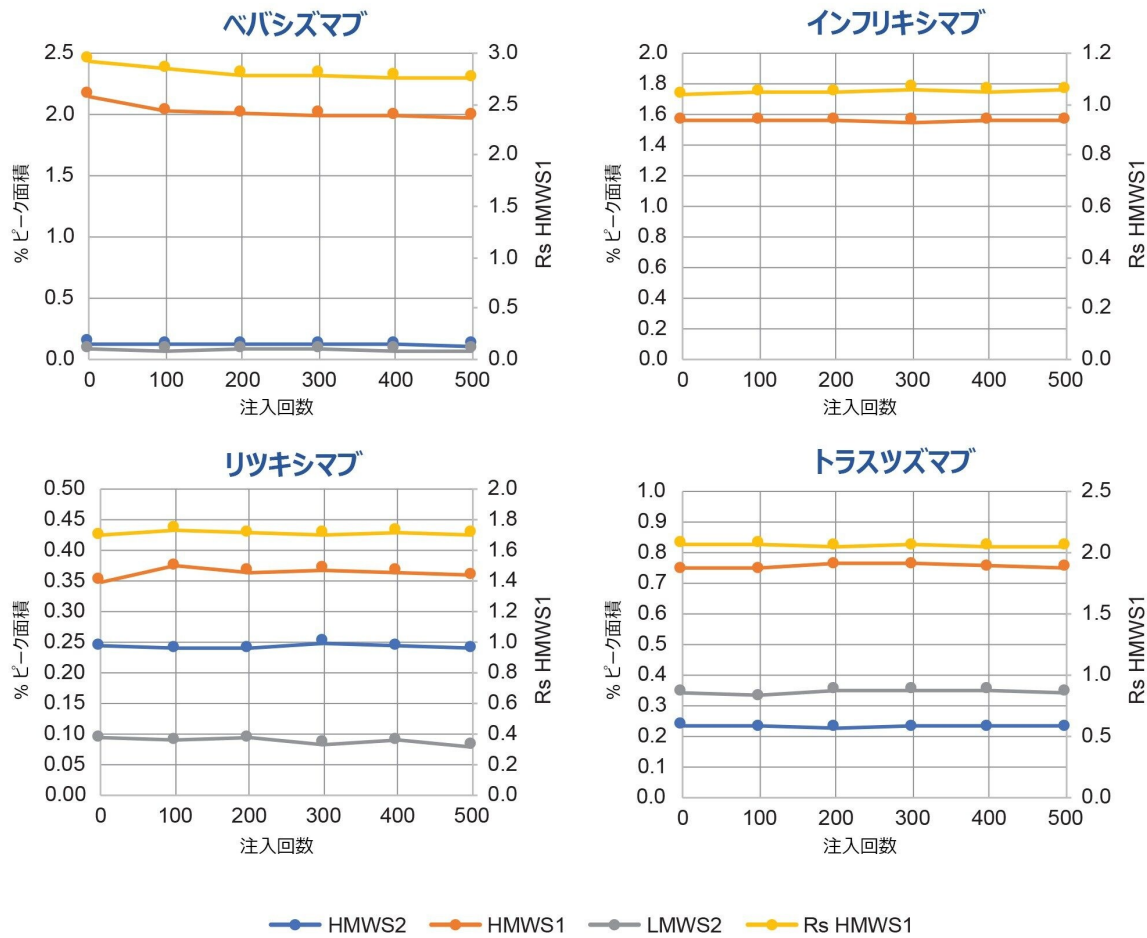


図 5. ACQUITY Premier Protein SEC (4.6 × 150 mm) カラムのハイスループット寿命試験 (図2) で得られたバイオミラー *mAb* サンプルの定量結果。HMWS および LMWS2 の相対存在量 (左軸) および HMWS1 の分離度 (R_s , 半値幅 USP 分離度) の値 (右軸) が、プロットされています。2 回分析したタイムポイント。ほぼ最初の注入と注入番号 50、100、200、300、400、500 が示されています。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

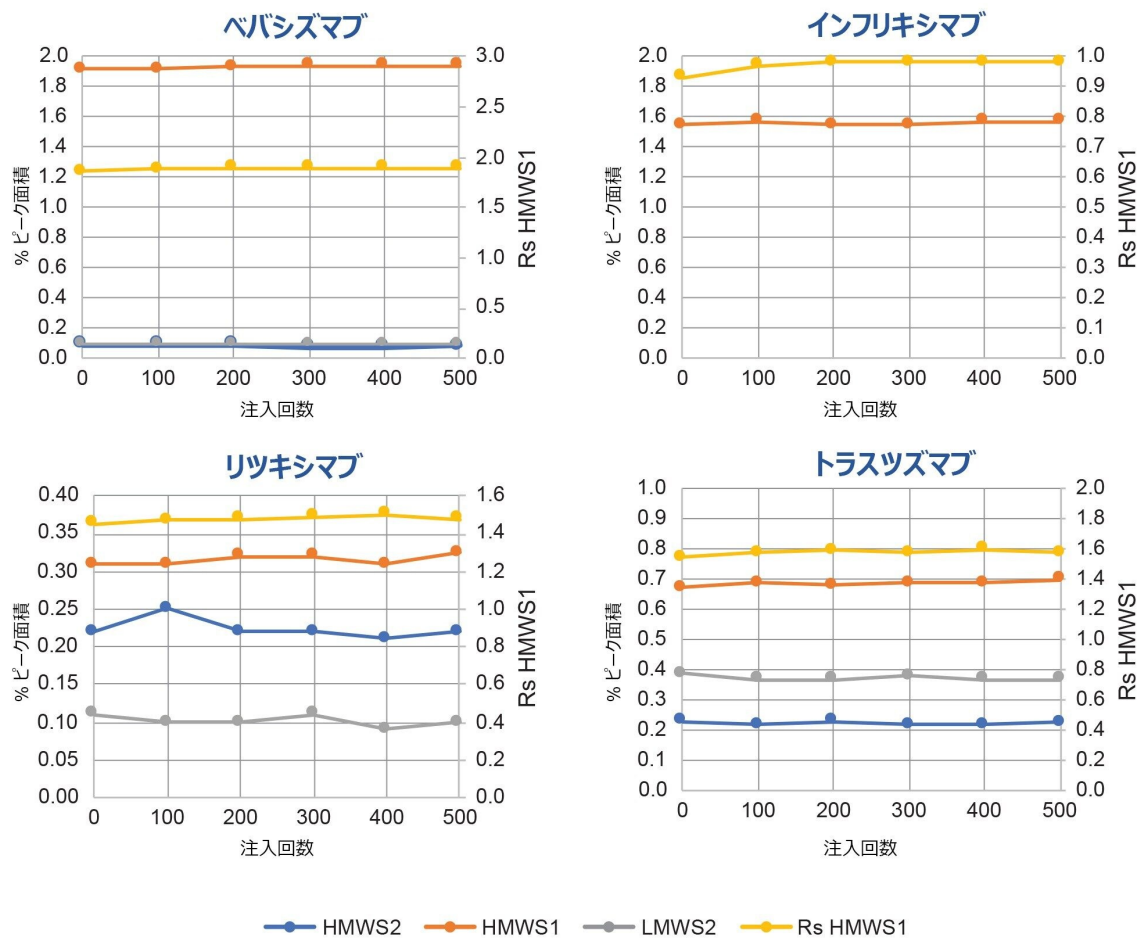


図 6. XBridge Premier Protein SEC (4.6 × 150 mm) カラムのハイスループット寿命試験 (図 3) で得られたバイオシミラー *mAb* サンプルの定量結果。HMWS および LMWS2 の相対存在量 (左軸) および HMWS1 の分離度 (Rs、半値幅 USP 分離度) の値 (右軸) が、プロットされています。最初と最後のタイムポイントのみを 2 回分析しました。ほぼ最初の注入と注入番号 50、100、200、300、400、500 が示されています。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

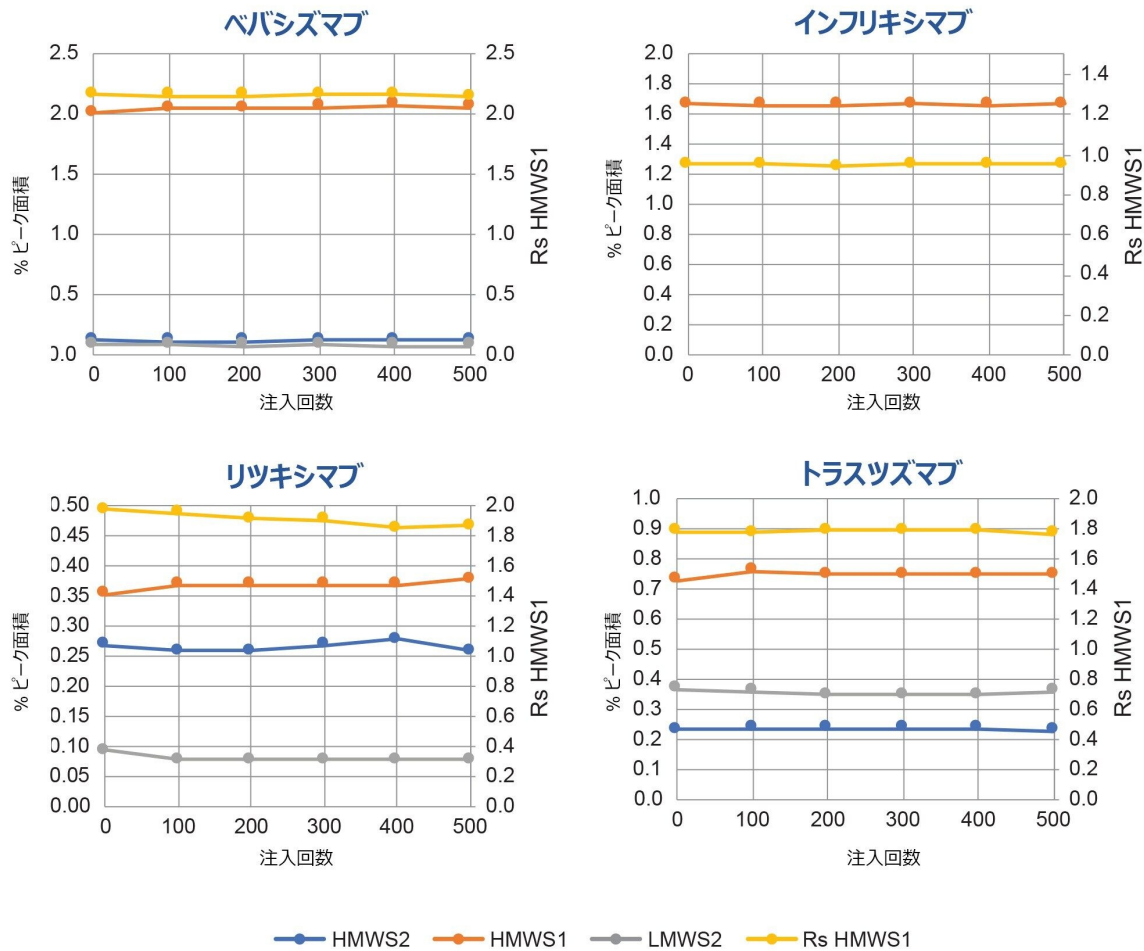


図 7. XBridge Premier Protein SEC (7.8 × 150 mm) カラムのハイスループット寿命試験 (図 2) で得られたバイオシミラー mAb サンプルの定量結果。HMWS および LMWS2 の相対存在量 (左軸) および HMWS1 の分離度 (Rs、半値幅 USP 分離度) の値 (右軸) が、プロットされています。最初と最後のタイムポイントのみを 2 回分析しました。ほぼ最初の注入と注入番号 50、100、200、300、400、500 が示されています。その他の実験条件およびピークの説明は、本文に記載されています。

結論

ACQUITY カラムおよび XBridge Premier 250 Å SEC カラムのカラムハードウェアおよび充填する粒子ケミストリーの技術的進歩により、生理的 pH の移動相を使用することによりカラム寿命が延びることが、以前に実証されました⁴。

この以前のカラム寿命試験では、長さ 300 mm のカラムを使用した推奨最大値を下回る流速での高分離能分離に焦点を合わせていましたが、今回の試験では 150 mm のカラムを使用した迅速なハイスループット分離を評価しました。より短いカラム長さに加えて、推奨最大流速を超える高い流速も試験し、分析時間の結果は 2.1 ~ 3.0 分でした。

この試験では、UPLC 適合性のある 4.6 × 150 mm ACQUITY Premier SEC カラムと XBridge Premier SEC カラム、および HPLC 適合性のある 7.8 × 150 XBridge Premier SEC カラムを、低拡散 UPLC (5σ バンド拡散 7.9 μL) で評価しました。十分な圧力限界 (例えば、Waters Arc™ HPLC システム、圧力限界 9500 PSI、655 bar) の HPLC システムでは、記載された流速で 4.6 × 150 mm カラムを実行できる一方で、HPLC システムのバンド拡散量を大きくすると、分離性能が低下する場合があります。このため、HPLC システムでは、内径を大きくした 7.8 × 150 XBridge Premier SEC カラムを使用することを推奨します。HMWS2、HMWS1、LMWS2 の定量に関する一貫した性能、および 500 回を超える注入にわたって、HMWS1 (主にダイマー) のサイズバリエーションとメインピーク (モノマー) の間の分離が実証されました。現在バイオシミラーとして市販されている一連の 4 種類の抗体医薬品の性能を評価しました。

この試験では、移動相を 0.1 μm のフィルターで滅菌ろ過し、顕微鏡で見える微粒子やより大きい微粒子 (≥ 0.1 μm) が含まれていないと考えられる適切に調合された医薬品サンプルを分析しました。これら 2 つの要因により、カラムが汚れる可能性が大幅に低下します。ただし、顕微鏡で見える微粒子やより大きい微粒子が分析する開発サンプルに大量に含まれている場合は、ガードカラム (MaxPeak Premier Protein SEC Guard、製品番号: [186009969 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009969-maxpeak-premier-protein-sec-guard-250a-25--m-46-x-30-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009969-maxpeak-premier-protein-sec-guard-250a-25--m-46-x-30-mm-1-pk.html)) や遠心分離などのサンプル前処理の使用を推奨します⁶。

参考文献

1. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Nari LO, Topp EM. "Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates" *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):417-430.
2. Eon - Duval, Alex, Hervé Broly, and Ralf Gleixner. "Quality Attributes of Recombinant Therapeutic Proteins: An Assessment of Impact on Safety and Efficacy as Part of a Quality by Design Development Approach." *Biotechnology progress* 28, no.3 (2012): 608-622.
3. Mou, Xiaodun, Xiaoyu Yang, Hong Li, Alexandre Ambrogelly, and David J. Pollard. "A High Throughput Ultra-Performance Size Exclusion Chromatography Assay for the Analysis of Aggregates and Fragments of Monoclonal Antibodies." *Pharmaceutical Bioprocessing* 2, no.2 (2014): 141-156.
4. Stephan M. Koza, Hua Yang, and Ying Qing Yu, "MaxPeak Premier Protein SEC 250 Å Column Lifetimes at Physiological pH for Polysorbate (Tween) Formulated Biosimilar Monoclonal Antibodies" , 2022, Waters Application Note, [720007523](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009969-maxpeak-premier-protein-sec-guard-250a-25--m-46-x-30-mm-1-pk.html).

5. Stephan M. Koza, Corey Reed, and Weibin Chen, "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", 2019, Waters Application Note, [720006336](#).
6. Guide to Size-Exclusion Chromatography (SEC) of mAb Aggregates, Monomers, and Fragments, Waters Brochure, [720006067EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=134957469>> .

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) <<https://www.waters.com/10166246>>

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

[Empower クロマトグラフィードータシステム](https://www.waters.com/10190669) <<https://www.waters.com/10190669>>

720007584JA、2022 年 3 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](#)