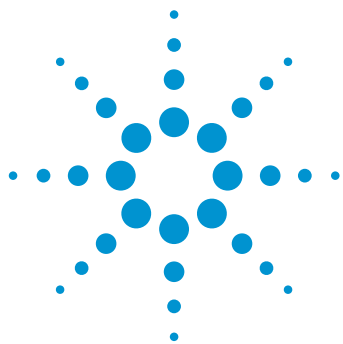




サイズ排除および弱カチオン 交換クロマトグラフィーによる、 モノクローナル抗体の オンライン 2D-LC 特性解析

アプリケーションノート

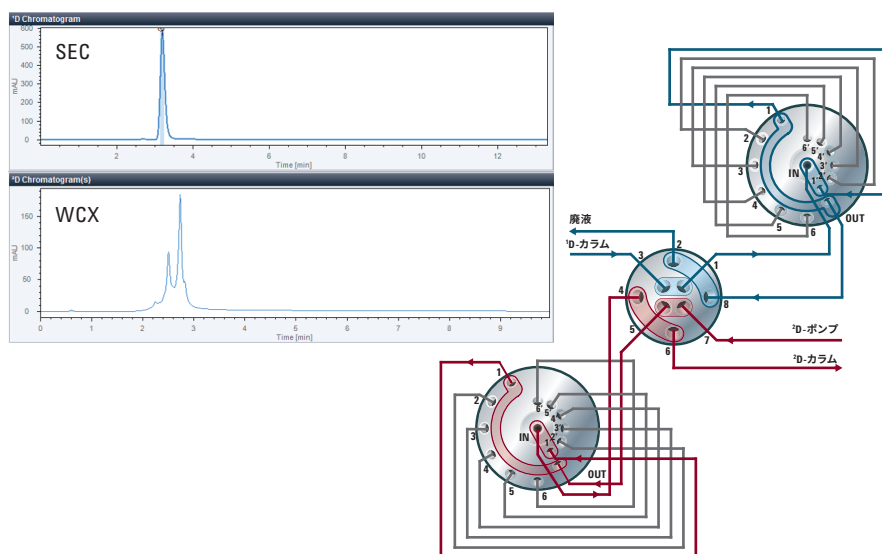
生物製剤

著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

概要

バイオ医薬品の特性解析ですべての重要な品質特性を評価するのは、非常に複雑かつ膨大な作業となる場合があります。オンライン 2D-LC 分析では、1 回の分析でさまざまな分析方法を組み合わせで各種パラメータをモニタリングできます。このアプリケーションノートでは、一次元目のサイズ排除クロマトグラフィーによる凝集分析と、二次元目のイオン交換クロマトグラフィーによる電荷変異体プロファイリングの組み合わせについて説明します。ハートカット 2D-LC によって、一次元目から二次元目にピークをオンラインで移行できます。このため 13 分以内に非常に高精度な凝集分析と電荷変異体プロファイリングを実行し、最も重要な 2 つの品質特性を組み合わせでオンラインで分析できます。また高分解能サンプリング 2D-LC では 1D のピーク面積全体を二次元目に移行するため、共溶出化合物の検出と正確な 2D-LC 定量が可能です。



Agilent Technologies

はじめに

バイオ医薬品の予想外の免疫原性反応のトリガーに対して安全性と効能を確保するには、詳細かつ徹底的な特性解析が非常に重要です。製品の開発と生産のさまざまな段階において、各種パラメータのモニタリングが必要です。プロセス開発の初期段階では、大量のサンプルのスクリーニングが必要です。この膨大な調査には、抗体価測定分析、凝集調査、電荷変異体とグリカンのプロファイリング、ペプチドマッピングなどの重要な品質特性が含まれます。バイオ医薬品の完全な特性解析は、使用するメソッドが広範囲で複雑なため、手間、時間、コストのかかる作業です。その中でもモノクローナル抗体 (mAb) で最も重要な 2 つの品質特性は、凝集と電荷変異体の分析¹です。

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションでは、2 種類の分析を 1 つのオンライン設定に組み合わせて、効率の向上と手作業の削減を実現しています (フラクションコレクションや再注入が不要です)。高分解能サンプリング 2D-LC では、従来の 2 種類の 2D-LC モード ((マルチ) ハートカット 2D-LC とコンプリヘンシブ 2D-LC) が相互に補完的に機能するだけでなく、両方のモードの利点を組み合わせて使用できます。マルチハートカット 2D-LC² と同じバルブ設定で、一次元目で連続するカットを最大 10 個定義できます。特にアフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、イオン交換クロマトグラフィー (IEX)、高分解能サンプリングなどのバイオクロマトグラフィーでは、より広い対象領域や一次元目で分離されなかった広いピークを分析できるので便利です。

このアプリケーションノートでは、SEC による凝集分析と、弱カチオン交換クロマトグラフィー (WCX) の組み合わせについて説明します。WCX では、短時間 (13 分間) のオンライン分析にハートカット 2D-LC を使用し、mAb の電荷変異体を後でプロファイリングしました。また高分解能サンプリングでは 1D のピークをすべて二次元目に移行して、潜在的な共溶出不純物を同定し、正確な 2D-LC 定量を実行できます。

分析条件

装置

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションを次のモジュールで構成しました。

- **一次元目ポンプ:** Agilent 1260 Infinity バイオナートクォータナリポンプ (G5611A)
- **二次元目ポンプ:** Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、冷却システム付
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A)、2 ポジション/4 ポートデュオバルブ (2D-LC) バルブヘッド (G4236A) 付
- Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) × 2 と 40 µL ループ付のマルチハートカットバルブ (G4242-64000) × 2
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) × 2、10 mm の Max-Light カートリッジセル (G4212-60008) 付

カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 300Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm (p/n PL1580-3301)
- Agilent Bio MAb、WCX、4.6 × 50 mm、1.7 µm、ステンレス (p/n 5190-2401)

ソフトウェア

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition ソフトウェア、バージョン C.01.07 [27] と Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソフトウェア、バージョン A.01.03

溶媒およびサンプル

すべての溶媒は LC グレードのものでした。超純水は、0.22 µm メンブレンカートリッジ (Millipak) 付の Milli-Q Integral システムで生成しました。塩化ナトリウムと一塩基性および二塩基性のリン酸ナトリウムは、Sigma-Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入しました。

mAb 溶液は 50 mM のリン酸緩衝液、pH 6.2 (10 mg/mL) で注入しました。mAb 溶液は、Agilent Captiva プレミアムシリンジフィルタ、再生セルロース膜、直径 15 mm、ポアサイズ 0.45 µm (p/n 5190-5109) でろ過しました。

結果と考察

一次元目では、Agilent AdvanceBio SEC 300Å に
よって mAb の凝集を分析しました。メインピー
クの前に、ほぼベースライン分離された小さ
い凝集ピークが検出されました (図 1 の挿入
図)。統合後の凝集量は 1 % でした。

クロマトグラフィー条件

パラメータ	値
一次元目パラメータ	
1D カラム	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å
1D 移動相	50 mM リン酸バッファ、pH 6.2
1D 流速	0.5 mL/min
二次元目パラメータ	
モード	ハートカットと高分解能サンプリング
2D カラム	Agilent Bio mAb WCX
2D 移動相	A) 25 mM のリン酸緩衝液、pH 6.2 B) 25 mM のリン酸緩衝液、pH 6.2 に含まれる 500 mM の塩化ナトリウム
2D グラジエントストップタイム	6 分
2D サイクル時間	10 分
2D 流速	0.5 mL/min
2D グラジエント	0.00 分 – 5 % B 5 分 – 30 % B 6 分 – 40 % B
2D 時間セグメント	ハートカット 時間 1D 3.13 モード 時間ベース サンプリング時間 0.11 高分解能プリング 時間 1D 3.05 モード 時間ベース サンプリング時間 5 秒 カット 8
注入量	5 µL
サーモスタットオートサンブラ	6 °C
カラム温度	室温
DAD	280 nm、4 nm、参照値 360 nm、100 nm
ピーク幅	0.025 分 (レスポンス時間 0.5 秒) (10 Hz)

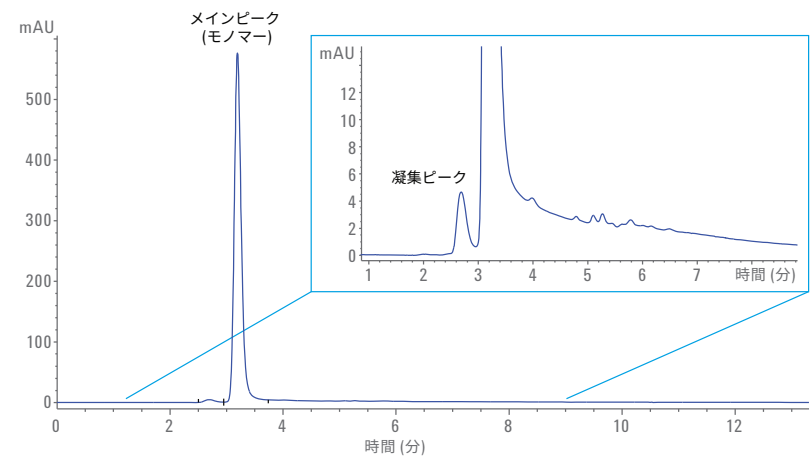


図 1. Agilent AdvanceBio SEC 300Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm カラムによるサイズ排除クロマトグラフィーの凝集分析

短い分析時間で最適な分解能を得られるように、メインピークのハートカットを二次元目に移行し、2 μm 未満のカラム、Agilent Bio MAb、WCX、4.6 $\times$ 50 mm、1.7 μm で電荷変異体を分析しました。図2の2D-LCビューアでは、上のクロマトグラムに一次元目(凝集分析)を表示しています。電荷変異体の分析用に二次元目に移行したハートカット(下のクロマトグラム)がマークされています。電荷変異体の分析では、メインピークの他に2つの酸性変異体と

1つの塩基性変異体が見られます。酸性種と塩基種は、メインピークに関連するそのリテンションタイム(RT)に基づいて定義します。カチオン交換クロマトグラフィーでは、メインピーク前の変異体溶出を酸性、メインピーク後の変異体溶出を塩基性³として定義します。

2 μm 未満の充填剤を使用した短い Agilent Bio MAb カラム (50 mm) を使うことで、短時間でも二次元目で高分解能の電荷変異体分析を実行できます。従来の電荷変異体分析では 250 mm のカラム (5 μm の粒子径) を使って 30 ~ 40 分かかっていましたが、今回の分析時間は全体で 10 分間でした⁴。2D-LC 分析全体のサイクル時間は、カラム再生も含めて約 13 分間でした。

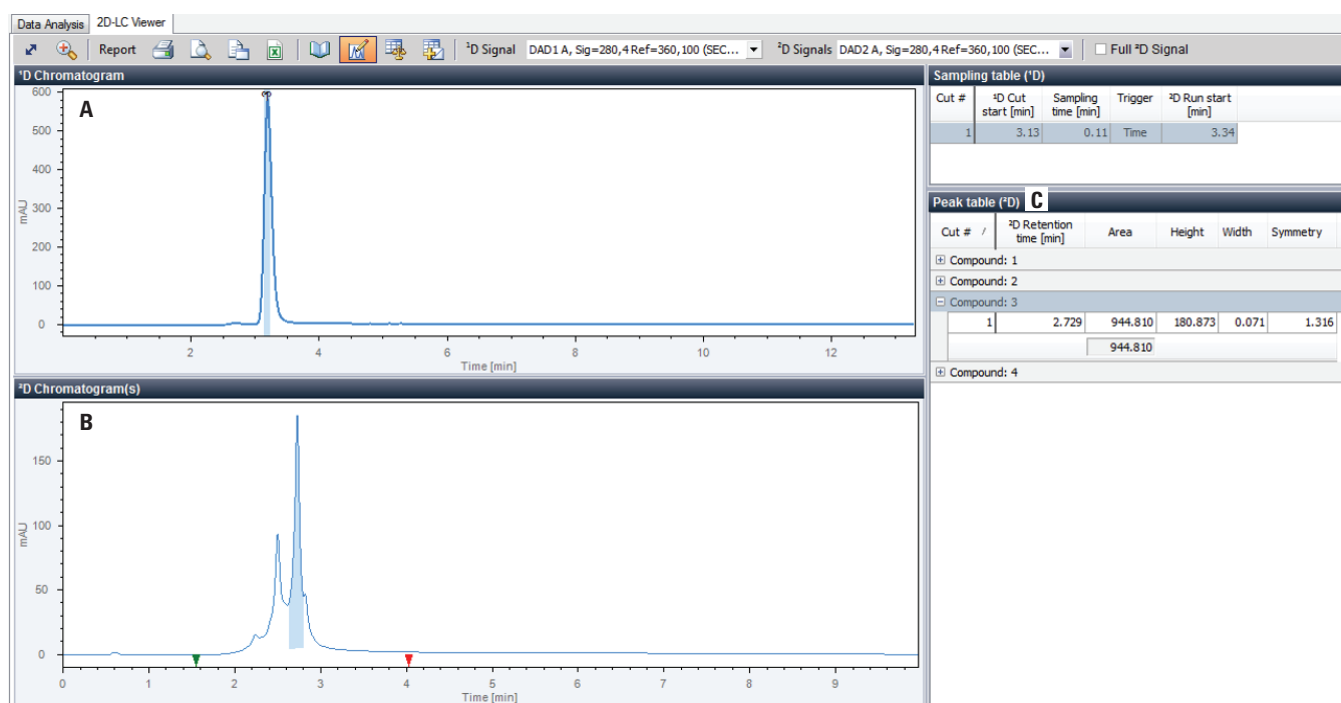


図2. 一次元目の SEC 凝集分析 (A) と二次元目の WCX 電荷変異体分析 (1D 信号、B) を示す 2D-LC ビューア。1D ピーク表 (C) で、二次元目クロマトグラムの詳細がわかります。1D ピーク表でマークされている化合物が、1D クロマトグラムで青色の領域として表示されています。緑色と赤色の矢印が、二次元目の統合領域を示しています。

リテンションタイムと面積の精度は、一次元目と二次元目の 7 回の連続注入で決定しました。一次元目では、凝集ピークとメインピークを評価しました。二次元目では、4 つのピーク (2 つの酸性変異体、1 つのメインピーク、1 つの塩基性変異体) を評価しました。図 3 の 2D-LC ビューアは、一次元目と二次元目の 7 回の連続分析の重ね表示と、RT およびピーク面積

の精度値を示しています。一次元目では RT と面積精度が高く、それぞれ 0.08 % 未満と 0.5 % 未満でした。二次元目でも RT と面積の精度が高く、それぞれ 0.09 % 未満と 2.1 % 未満でした。

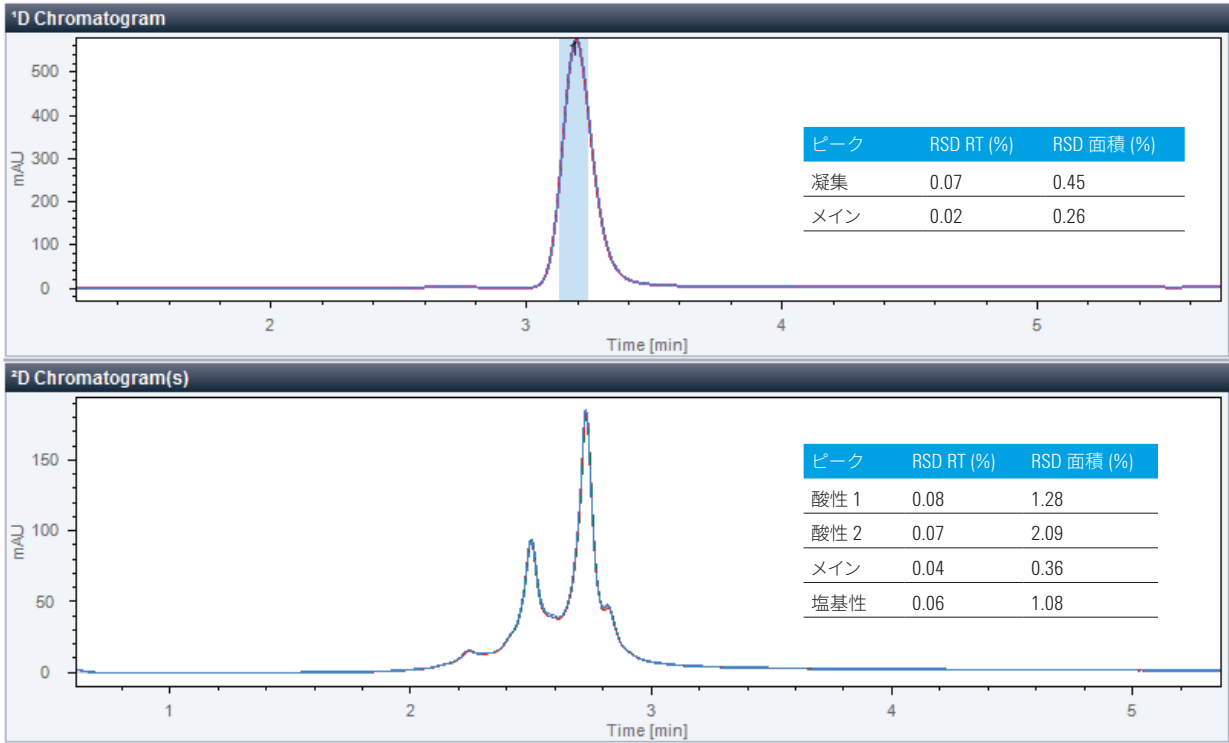


図 3. 7 回の連続した 2D-LC 分析の重ね表示: 1D 凝集分析および 2D 電荷変異体分析

SEC 分析後の共溶出不純物を確認するため、高分解能サンプリングを使って、一次元目の完全なピークが含まれるようにメインピークを 8 つにカットしてサンプリングしました (図 4)。二次元目では WCX の後に共溶出不純物は検出されませんでした。8 つのクロマトグラム (8 つのカット) はすべて類似しており、異なるのは信号強度のみという結果となりました。

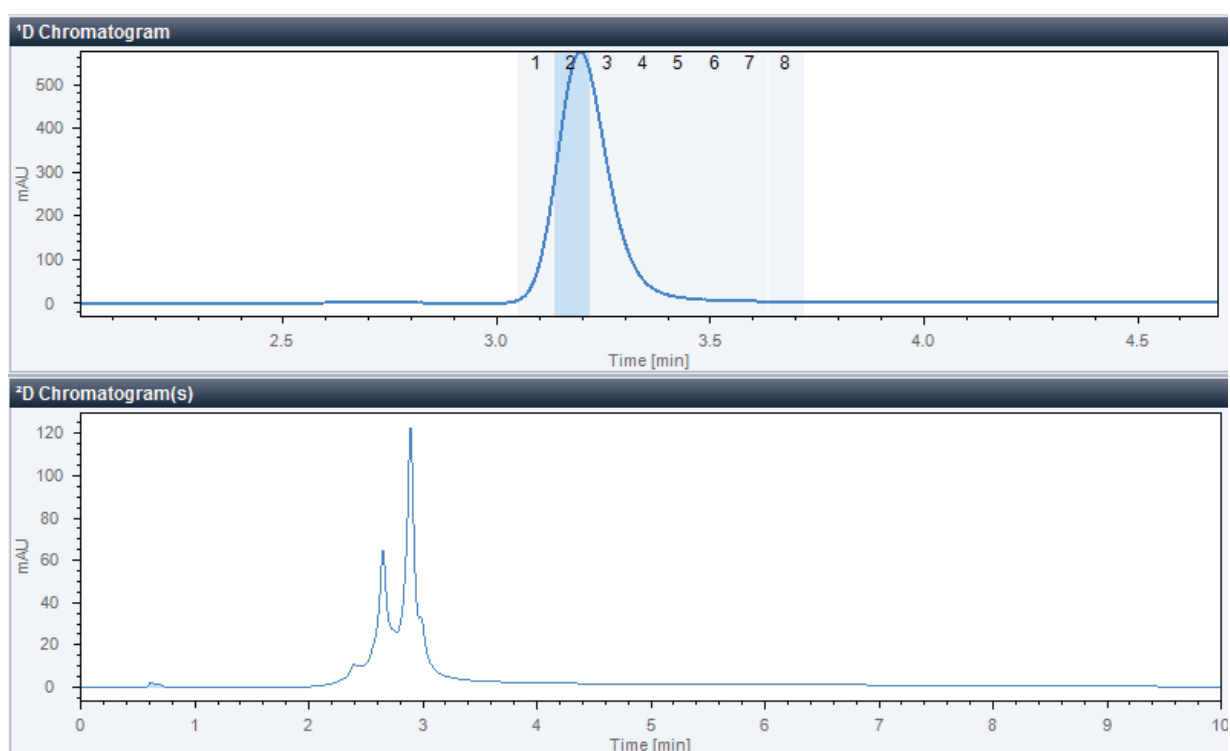


図 4. 一次元目の SEC 凝集分析による 2D-LC 分析。その後の二次元目の電荷変異体分析で選択した、一連の HiRes サンプリングカットを示しています。共溶出不純物は検出されませんでした。

結論

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC ソリューションを使用して凝集と電荷変異体の分析を組み合わせ、mAb を分析しました。ハートカット 2D-LC クロマトグラフィーによる SEC と WCX を組み合わせた分析では、13 分間という短い分析時間内でどちらの次元でも高い分解能と精度が得られました。凝集体の量は、メインピークの約 1 % でした。二次元目の電荷変異体の分析では、メインピークの他に、2 つの酸性変異体と 1 つの塩基性変異体が見られました。高分解能サンプリングでは SEC の一次元目の比較的広いピークを 8 つにカットしてサンプリングして二次元目に移行し、潜在的な共溶出不純物を検出できました。この場合、二次元目の WCX 分析の後に共溶出ピークは検出されませんでした。

参考文献

1. ICH, ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
2. Access Agilent Newsletter March 2016: <http://www.agilent.com/en-us/newsletters/accessagilent/2016/mar/2D-LChrs?cid=12822>
3. Du, Y.; *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies, *MAbs* Sep 1 **2012**, 4(5), 578–585.
4. Schneider, S. Simple Method Optimization in mAb Charge Variant Analysis using pH Gradients Generated from Buffer Advisor with Online pH and Conductivity Monitoring, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-3365EN, **2014**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, June 1, 2016

5991-6906JAJP



Agilent Technologies