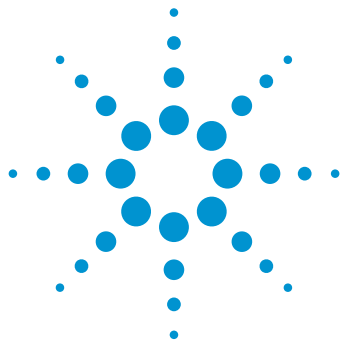




Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC から Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC への シームレスなメソッド移管

リツキシマブの先発薬およびバイオシミラーの電荷変異体分析

アプリケーションノート

生物製剤とバイオシミラー

著者

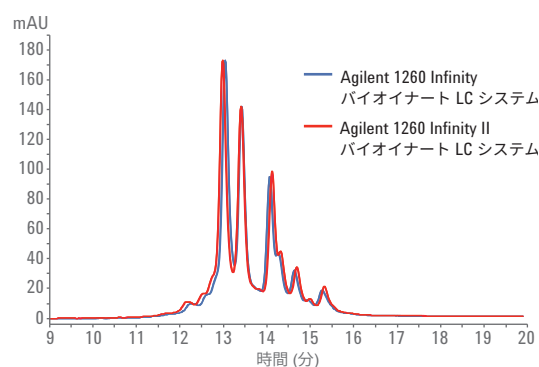
Sonja Schneider

Agilent Technologies, Inc.

Waldbronn, Germany

概要

バイオ医薬品の電荷不均一性のモニタリングは、有効かつ安全な医薬品を生産するためにきわめて重要となります。これは、電荷パターンの変化が有害な免疫反応につながる可能性があるためです。このアプリケーションノートでは、リツキシマブの先発薬とバイオシミラーの電荷変異体分析について取り上げます。先発薬とバイオシミラーでは、電荷変異体のピークパターンは類似していたものの、個々のピーク強度には明らかな差異が見られました。また、Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC 間でのメソッド移管を評価したところ、同等の結果が得られました。リテンションタイムは良好に一致し、その最大偏差は 0.5 % 未満でした。どちらのシステムも、リテンションタイムとピーク面積に関して高精度の結果を示しました。



Agilent Technologies

はじめに

機器間のメソッド移管は、業界を問わず、ラボにとって重要なトピックです¹。製薬業界およびバイオ医薬品業界でも、例えばラボの近代化に伴う作業として、検証済みのメソッドを、同等の結果を維持しつつ機器間で移管することが必須となります。

バイオ医薬品業界では、高価な医薬品である新たなモノクローナル抗体 (mAb) が相次いで開発されており、これがより安価なバイオシミラーの継続的な開発へとつながっています。バイオシミラー mAb の安全性と効能の評価においては、先発薬とバイオシミラーを比較することが不可欠です。その際に実施される広範な調査では、抗体価の分析、凝集体の調査、電荷変異体およびグリカンのプロファイリング、ペプチドマッピングなど、重要な品質特性の評価が行われます。そのうち最も重要性の高い品質特性として、凝集体の調査と電荷変異体パターンの分析の 2 つがあげられます²。このアプリケーションノートでは、mAb として、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の治療や多剤併用化学療法に用いられているリツキシマブの先発薬とバイオシミラー³を使用しました。

これらの mAb について、弱カチオン交換クロマトグラフィー (WCX) により電荷変異体パターンを分析しました。また、2 種類のバイオイナートシステム (Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム) の同等性を実証するために、両システムで得られた分析結果を比較しました。

実験方法

機器

実験には、Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システムを使用しました。これらのシステムを構成するモジュールは次のとおりです。

Agilent 1260 Infinity バイオイナート
クォータナリ LC システム

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高性能バイオイナートオートサンブラ (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B)、サンプル冷却用
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)、バイオイナート溶媒熱交換器を搭載
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 (G1315C)、10 mm バイオイナート標準フローセルを搭載

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート
クォータナリ LC システム

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却器 (オプション #100) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション #019) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR (G7115A)、バイオイナートフローセル (オプション #028) を搭載

カラム

Agilent Bio mAb、非多孔質、2.1 × 250 mm、5 µm HPLC カラム、PEEK (p/n 5190-2411)

ソフトウェア

- Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1
- Agilent Buffer Advisor A.01.01 [009]

LC 機器のコントロールおよび LC データの解析には、Agilent OpenLAB CDS バージョン 2.1 を使用しました。OpenLAB CDS バージョン 2.1 は、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、およびシングル四重極質量分析のすべてに対応可能なソフトウェアシステムです。共通のユーザーインターフェースを備え、テンプレートからドラッグアンドドロップ操作でインタラクティブにレポートをカスタマイズすることが可能です。

サンプル

リツキシマブの先発薬およびバイオシミラーのサンプルは、インド国内の薬局で購入しました。

試薬

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 メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を装着した Milli-Q Integral システムで生成しました。一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、および塩化ナトリウムは、Sigma-Aldrich 社 (米国セントルイス) から購入しました。

クロマトグラフィー条件

パラメータ	値				
塩濃度を変化させるグラジエント: 0 ~ 200 mM	時間 (分)	A) 水	B) NaCl (1,000 mM)	C) NaH ₂ PO ₄ (55 mM)	D) NaH ₂ PO ₄ (50 mM)
NaCl, 30 mM リン酸ナトリウム	0.00	43.1	0.0	31.0	25.9
緩衝液, pH 6.8 (Buffer Advisor で グラジエントを計算)	30.00	22.3	20.0	22.7	35.0
	35.00	22.3	20.0	22.7	35.0
ストップタイム	35 分				
ポストタイム	30 分				
流量	0.25 mL/min				
注入量	2 µL				
サンプリング温度	10 °C				
カラム温度	25 °C				
DAD	280 nm/4 nm、Ref.: オフ				
ピーク幅	> 0.025 分 (レスポンスタイム 0.5 秒) (10 Hz)				

結果と考察

一般に、イオン交換クロマトグラフィーのメソッド開発は、pH スカウティングによって電荷変異体の分離に最適なクロマトグラフィー条件を特定することから開始します。リツキシマブの電荷変異体の分離には、リン酸緩衝液によるグラジエントを選択し、イオン強度を直線的に上昇させるために塩化ナトリウムを用いました。リン酸緩衝液で最適な緩衝能が得られる pH 領域は pH 6 ~ 7.5 です。これを踏まえ、pH スカウティングを pH 6.2 から開始し、0.2 刻みで pH 7.2 まで徐々に上昇させました。図 1 に、リツキシマブバイオシミラーを使用した pH スカウティングのクロマトグラムを示します。調整後の pH に応じて、リテンションタイムおよび分離能に明らかな違いが観察されました。4 成分グラジエントは、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアにより、調整後のすべての pH 値について 4 種類の同じ原液を使用して計算しました。Buffer Advisor ソフトウェアで計算した、動的に混合される 4 成分グラジエントを用い

ることで、pH スカウティングのワークフローを短縮し、簡素化することができました⁴。特に、Buffer Advisor ソフトウェアの計算にもとづいて動的に混合されるグラジエントは、手作業で調製した緩衝液を用いる混合済みの 2 成分グラジエントと比べ、緩衝液の調製時間が大幅

に短縮されました。また、新しい緩衝液組成を導入およびフラッシュするための分析シーケンスの中断が不要になりました。pH スカウティングの結果から、最高の分離能が得られた pH 6.8 を選択し、以降のすべての分析に使用しました。

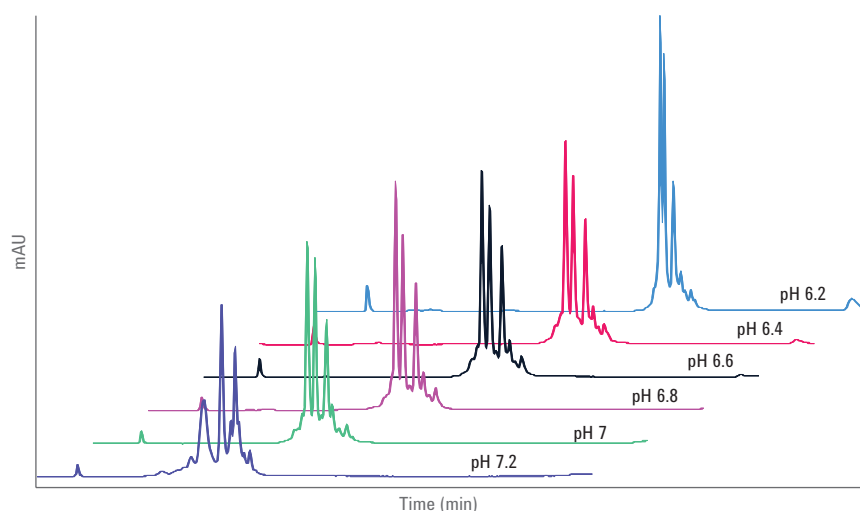


図 1. Agilent 1260 Infinity II パイオイナート LC でのリツキシマブバイオシミラーを用いた pH 6.2 ~ 7.2 の pH スカウティング

図 2 は、pH 6.8 で分析したリツキシマブの先発薬およびバイオシミラーのクロマトグラムと比較です。個々のピークの強度に明らかな差異があることがわかります。両方のクロマトグラムを重ね合わせると、ピーク品質に関しては同様のパターンが得られていますが、特に塩基性変異体の量が大幅に異なることが確認できます (図 3)。バイオシミラーで最も強度の高い 2 種類の塩基性変異体が C 末端リジンの変異体であることは、以前のアプリケーションノートで同定されています⁵。

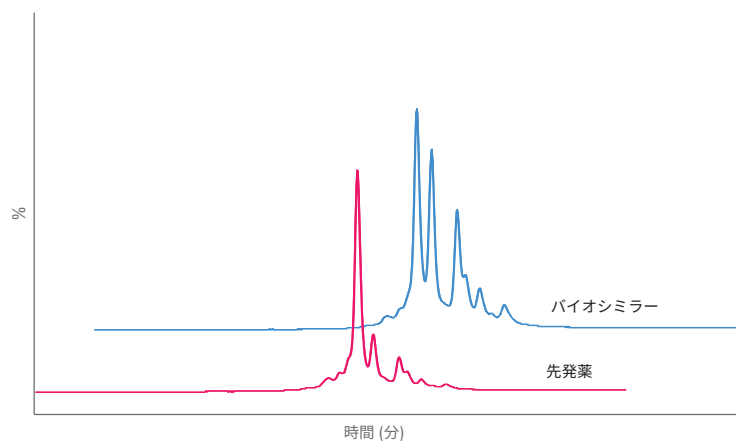


図 2. Agilent 1260 Infinity II パイオイナート LC により pH 6.8 で分離したリツキシマブの先発薬とバイオシミラーの電荷変異体プロファイルの比較

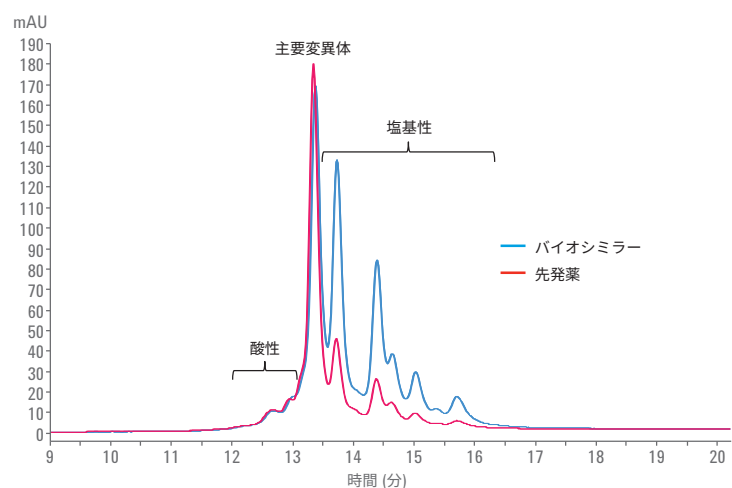


図 3. Agilent 1260 Infinity II パイオイナート LC により分離したリツキシマブの先発薬とバイオシミラーの電荷変異体プロファイルの重ね合わせ

システムの同等性を実証するために、電荷変異体の分析メソッドをまったく同じ条件で 1260 Infinity バイオイナート LC および 1260 Infinity II バイオイナート LC に適用しました。図 4 は、1260 Infinity バイオイナート LC (青) および 1260 Infinity II バイオイナート LC (赤) の両システムで得られた WCX クロマトグラムを重ね合わせたものです。表 2 に、リテンションタイムの比較を示します。両方のバイオイナートシステムで得られたリテンションタイムは良好に一致し、その最大偏差は 0.5 % 未満でした。

1260 Infinity バイオイナート LC および 1260 Infinity II バイオイナート LC でリツキシマブバイオシミラーを 5 回連続注入し、リテンションタイムとピーク面積の精度を評価しました。これにより得られた分離結果と、各注入のリテンションタイムおよびピーク面積の精度を、1260 Infinity バイオイナート LC については 図 5、1260 Infinity II バイオイナート LC については 図 6 に示します。どちらのシステムでも、リテンションタイムとピーク面積に関して高精度のクロマトグラフィー結果が得られることがわかりました。

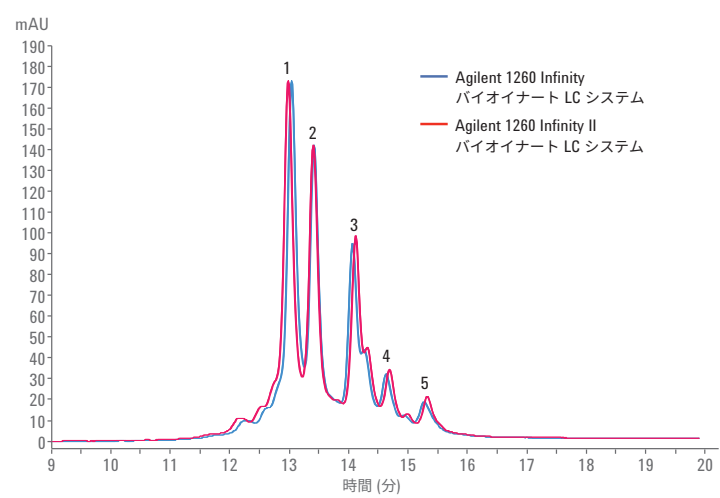


図 4. Agilent 1260 Infinity バイオイナート (青) および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC (赤) により pH 6.8 で WCX 分離したバイオシミラーの重ね合わせクロマトグラム

表 2. Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC により pH 6.8 で WCX 分離したバイオシミラーのリテンションタイムの比較

	Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システム (分)	Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム (分)	偏差 (%)
ピーク 1	13.37	13.31	0.47
ピーク 2	13.75	13.73	0.17
ピーク 3	14.40	14.44	-0.28
ピーク 4	14.95	15.01	-0.39
ピーク 5	15.59	15.65	-0.41

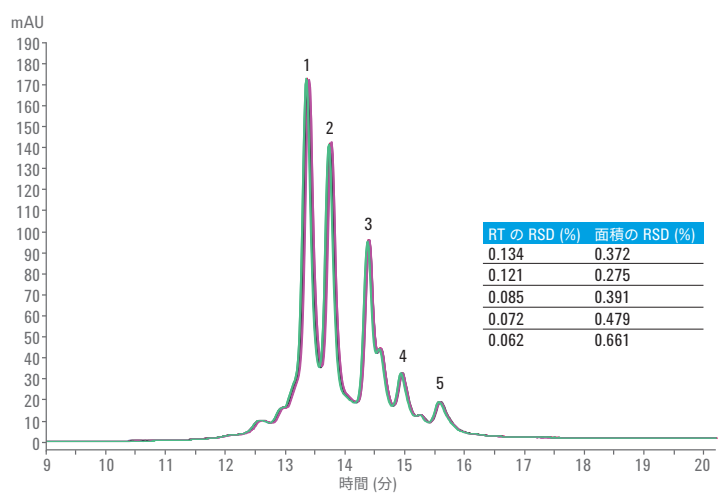


図 5. Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC にリツキシマブバイオシミラーを 5 回連続注入して得られた電荷変異体の重ね合わせクロマトグラム

結論

弱カチオン交換クロマトグラフィーによりリツキシマブの先発薬とバイオシミラーの電荷変異体分析を実施しました。Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで pH 6.2 ~ 7.2 のグラジエントを計算してメソッド開発/pH スカウティングを行った結果をもとに、これらのサンプルについてリン酸緩衝液系で最善の分離能が得られた pH 6.8 を選択しました。先発薬とバイオシミラーの電荷変異体パターンの比較から、ピークパターンは類似しているものの、個々のピークの強度に明らかな差異があることがわかりました。また、pH 6.8 での分離を Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC および Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC で実施しました。両システムで得られたリテンションタイムは良好に一致し、その最大偏差は 0.5 % 未満でした。このことから、これらのバイオイナートシステム間の高い同等性が実証されました。また、どちらのシステムでも、リテンションタイムとピーク面積に関して高精度の結果が得られることがわかりました。

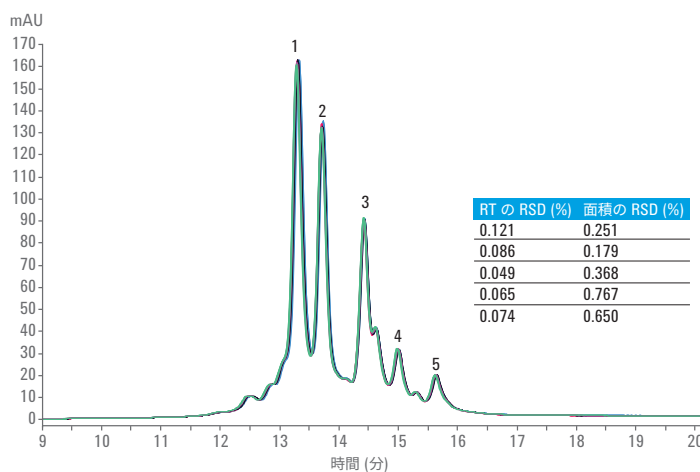


図 6. Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC にリツキシマブバイオシミラーを 5 回連続注入して得られた電荷変異体の重ね合わせクロマトグラム

参考文献

1. Agilent 1290 Infinity with ISET, *Agilent Technologies User Manual*, part number G4220-90314, **2015**.
2. ICH, ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
3. Roy, P. S.; *et al.* Comparison of the efficacy and safety of Rituximab (Mabthera) and its biosimilar (Reditux) in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemo-immunotherapy: A retrospective analysis. *Indian J. Med. Paediatr Oncol.* **2013**, 34(4), 292-298.
4. Schneider, S.; Strassner, J. Optimizing protein separations with cation exchange chromatography using Agilent Buffer Advisor, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0565EN, **2012**.
5. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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, November 1, 2016
5991-7442JAJP



Agilent Technologies