

Technical Report

溶離液のpHリアルタイム測定によるデータ信頼性の向上 —モノクローナル抗体中の凝集体・電荷変異体分析へのpHモニターの適用事例—

Improvement of data reliability by real-time measurement of eluent pH
—Application of pH monitor to the analysis of aggregates and charge variants in monoclonal antibodies—

安藤 恵美子¹、藤村 大樹¹、松本 恵子¹

Abstract:

バイオ医薬品は、開発から出荷までの各工程において適切な品質管理を行う必要があり、分析における信頼性の向上やデータトレーサビリティの重要性が高まっています。バイオ医薬品の主成分であるたんぱく質やペプチドは構造中に多くの解離基を持つため、高速液体クロマトグラフィーによる分析では溶離液のpHが分離に影響を与えます。このことから、pHは分析条件の最適化時に検討対象の一つとなることがあります。しかし、溶離液のpHは調製時に確認するのみで、長時間にわたる連続分析中のpHの変動によって分離や再現性の低下などが引き起こされることがあります。pHモニター pHM-40は、リアルタイムでカラム溶出後のpHの測定が可能です。分析データシステム LabSolutions によりクロマトグラムとpH測定値は一つのデータ内に一元管理され、データの信頼性とトレーサビリティの向上に貢献します。本稿では、モノクローナル抗体中の凝集体や分解物の分析における移動相ブレンディング機能を活用した溶離液の自動調製とpHの確認、および電荷変異体のpHグラジエント分析におけるpHモニターの活用例をご紹介します。

Keywords: pHモニター pHM-40、モノクローナル抗体、バイオ医薬品

1. 背景

バイオ医薬品の開発から出荷までにおける品質評価は非常に重要であり、ガイドライン^[1]に準拠して品質・有効性・安全性を評価することが定められています。

バイオ医薬品の主成分であるたんぱく質やペプチドは、構造中に多くの解離基を持つため、溶離液のpHが荷電状態を変化させ、分離や再現性などに影響を与えることがあります^[2]。そのため、調製時の溶離液のpHだけでなく、分析時の溶離液のpHのモニタリングが望ましいです。また、医薬品製造においてはデータトレーサビリティも重要であり、一連の分析条件や結果を容易に確認可能であることも求められています。

2. pHモニター pHM-40

pHモニター pHM-40を検出器の後ろに配置して (Fig. 1)、カラムから溶出した溶離液のpHをモニターしたり、pHの変化をリアルタイムで測定・記録することができます。分析時のpH条件に対する信頼性を担保するとともに、予想した結果が得られなかった場合の原因究明のための1つの指標として活用することができます。

測定範囲はpH 1 ~ 14と幅広く、多様なpHの溶離液での条件検討を可能にします。測定したpHとクロマトグラムは一つのデータ内に一元管理され、データの信頼性とトレーサビリティの向上に貢献します。

本稿では、サイズ排除クロマトグラフィーを用いたモノクローナル抗体の凝集体分析における溶離液pH条件の検討と、イオン交換クロマトグラフィーを用いたモノクローナル抗体の電荷変異体分析におけるpHグラジエント条件の検討においてpHM-40を使用した例をご紹介します。

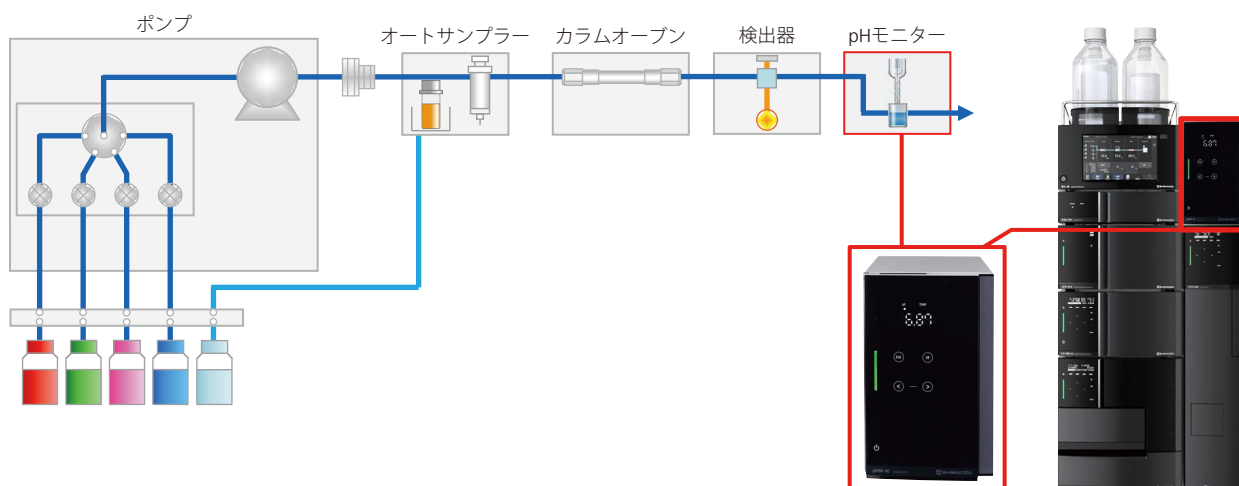


Fig. 1 pHモニターを含む低圧グラジエントシステムの流路図と設置の例

3. 溶離液のpHの最適化への活用事例

抗体医薬品中の凝集体や分解物といった不純物を分析する手法の1つに、サイズ排除クロマトグラフィーがあります。モノクローナル抗体のサイズ排除クロマトグラフィーでは、溶離液のpHによって単量体や凝集体、分解物の荷電状態が変わり、分離が変化することがあります。そこで、溶離液のpHをpH 5.7からpH 7.2まで変化させ、分離に最適なpHの条件の検討時に、分析中のpHをpHM-40で確認した例を示します。溶離液調製には移動相ブレンド機能^[2]を使用し、pHの異なる溶離液を自動的に調製して連続的に分析を行いました (Table 1)。

Fig. 2にpH 7.2におけるクロマトグラムとpHデータを、Fig. 3に単量体の溶出時間前後の拡大クロマトグラムとpHデータを示します。pHの推移から、自動調製した溶離液のpHが目的の値となっていることや、分析中も安定したpHとなっていることが確認できました。クロマトグラムとpHデータを重ね書きすることで、分離結果とpH測定値を関連づけて把握できます。

Table 1 分析条件

| | |
|----------------|---|
| System | : Nexera™ XS inert |
| Column | : Shim-pack™ Bio Diol-300 *1 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm) |
| Mobile phase | : A: 200 mmol/L (Monosodium) phosphate buffer B: 200 mmol/L (Disodium) phosphate buffer C: 1 mol/L NaCl D: Water |
| Flow rate | : 0.25 mL/min |
| Column temp. | : 25 °C |
| Sample | : Monoclonal Antibody Standard (Conc. 500 μg/mL) |
| Vial | : TORAST™-H Glass Vial *2 (島津ジーエルシー社製) |
| Injection vol. | : 5 μL |
| Detection | : 280 nm (SPD-M40, inert cell) |

*1 P/N: 227-31010-01 *2 P/N: 370-04300-01

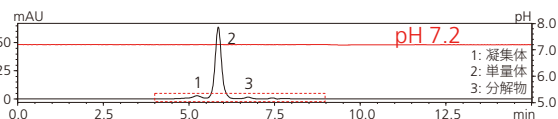


Fig. 2 pH 7.2におけるクロマトグラム

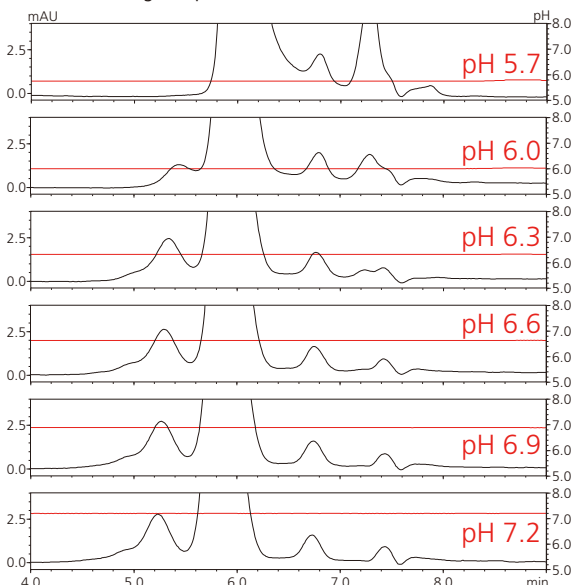


Fig. 3 溶離液のpHとクロマトグラムの推移

Nexera, Shim-pack および TORAST は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

4. pHグラジエント分析への活用事例

抗体医薬品中の電荷変異体の分析では、抗体の電荷不均一性を利用した分析が行われます。緩衝域の異なるHEPES、MES、酢酸ナトリウム水溶液の等モル混合液をNaOH水溶液でpH 5.0とpH 8.2に調整して溶離液とし、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、セツキシマブ バイオシミラーをpHグラジエント分析した例を示します。分析条件をTable 2に示します。

Fig. 4より、pHが移動相B濃度の増加に伴いpH 5.5からpH 8.0付近で直線的に変化していることが確認できました。また、溶離液濃度を初期濃度に戻した後、クロマトグラムはベースライン付近へ低下 (約18 min) し、続いてpHが初期値に戻りました (時間差は、溶離液のpHの変化に応じてカラムが平衡状態に達した後、検出器からpHモニターに溶離液が到達するまでの時間)。ベースラインだけでなく、pHが安定したことも確認することで、カラム平衡化の完了を明確にすることができます。

Table 2 分析条件

| | |
|------------------|--|
| System | : Nexera XS inert |
| Column | : Shim-pack Bio IEX SP-NP ³ (100 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm) |
| Mobile phase | : A: 20 mmol/L HEPES-MES-Sodium acetate (pH 5.0) B: 20 mmol/L HEPES-MES-Sodium acetate (pH 8.2) |
| Gradient program | : B Conc. 0% (0-0.5 min) – 100% (0.5-10 min) – 0% (15.1-25 min) |
| Flow rate | : 0.6 mL/min |
| Column temp. | : 25 °C |
| Sample | : Cetuximab Biosimilar (Conc. 1 mg/mL) |
| Vial | : TORAST-H Glass Vial (島津ジーエルシー社製) |
| Injection vol. | : 5 μL |
| Detection | : 280 nm (SPD-M40, inert cell) |

*3 P/N: 227-31005-03

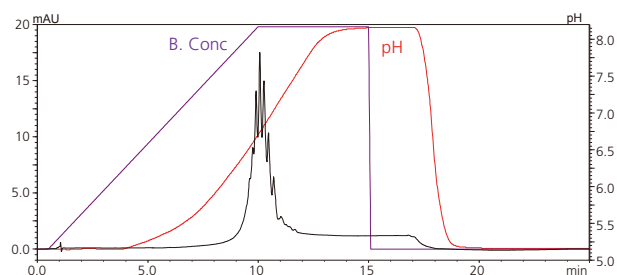


Fig. 4 セツキシマブのクロマトグラムとpHの推移

5. まとめ

バイオ医薬品の主成分であるたんぱく質やペプチドは溶離液のpHによる影響を受けやすく、分析時の溶離液のpHをモニタリングすることが望まれます。本稿では、pHモニター pHM-40を用いて、モノクローナル抗体中の不純物分析における分析中のpHを測定しました。溶離液のpHが意図した値で安定していることや、直線的なpHグラジエントが確認できました。また、pHデータとクロマトグラムが一元管理されることから、信頼性とデータトレーサビリティの向上に貢献します。

参考文献

- [1] 生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定 (平成13年5月1日 医薬審発第571号)
- [2] 安藤恵美子、藤村大樹、松本恵子、2022. サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるモノクローナル抗体 (mAb) の分析における分析条件の最適化

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行: 2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022