

# 高速液体クロマトグラフィーによる 抗体医薬品の分析事例

藤村 大樹、安藤 恵美子、大矢 知佳、鈴木 里沙

## ユーザーベネフィット

- ◆ 抗体医薬品と充填剤間の相互作用を低減することで再現性の高いデータ採取ができます。
- ◆ 高濃度の塩を含む移動相を用いた分析においても安定したデータ採取が可能です。

## ■はじめに

近年、ゲノム編集や細胞融合などのバイオテクノロジーを利用して開発・製造されたバイオ医薬品は、難病を含む様々な疾患に対して治療効果が期待できることから、世界中でその利用が広がっています。バイオ医薬品の中心とも言えるモノクローナル抗体 (mAb) や抗体薬物複合体 (ADC) といった抗体医薬品は、標的分子に対する特異性と親和性を持つことから、高い治療効果と副作用の軽減などの利点が知られています。しかし、動物細胞を利用して製造されることから、化学合成を基に製造する低分子医薬品とは異なり、構造上の不均一性を防ぐことは困難です。そのため、各工程で適切な品質管理を行う必要があります。例えば、製造工程においては、目的物質由来の不純物を分離し、含有率を明らかにすることが生物製品の規格及び試験方法であるICH-Q6B<sup>1),2)</sup>に定められており、その多くは液体クロマトグラフィーを用いて実施されます (図1)。

本稿では、高濃度の塩を含む移動相に対する耐久性に優れたイナートUHPLCシステム“Nexera XS inert”を用いた、mAbおよびADCの品質管理を目的とした分析事例をご紹介します。また、抗体の種類により、不純物の種類や量が異なるため、各試料について分析条件を最適化することは重要です。本稿では、最適化テクニックも併せてご紹介しますのでご参考ください。

表1には、抗体医薬品分析で広く用いられているTSKgel®シリーズ (東ソー株式会社) を項目・目的・分析手法別に示しており、本稿の分析は、表1中のカラムを使用しました。

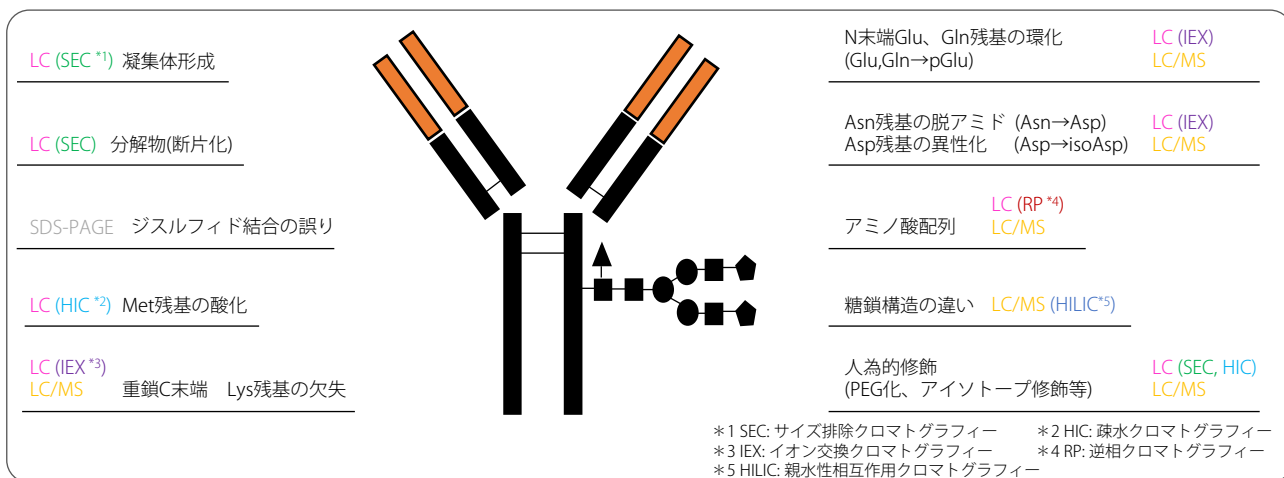


図1 抗体医薬品の不純物とその分析手法

表1 抗体医薬品の不純物の分析手法および使用されるカラム

項目	目的	分析手法	カラム
凝集体	凝集体や分解物の含量を測定	サイズ排除クロマトグラフィー	TSKgel UP-SW3000 TSKgel UP-SW2000 TSKgel SuperSW mAb TSKgel UltraSW Aggregate TSKgel G3000 SWXL TSKgel G2000 SWXL TSKgel SuperSW3000 TSKgel Super SW2000
異性体	電荷の異なる異性体の含量を測定	イオン交換クロマトグラフィー	TSKgel CM-STAT® TSKgel SP-STAT® TSKgel Q-STAT®
抗体薬物複合体	異性体の含量を測定 抗体・薬物結合比の算出	疎水クロマトグラフィー	TSKgel Butyl-NPR® TSKgel Phenyl-5PW
構造	分子構造や原薬に特異的な性質の評価	逆相クロマトグラフィー	TSKgel Protein C4-300
糖鎖構造	糖鎖構造の一定性を評価	親水性相互作用クロマトグラフィー	TSKgel Amide-80
力価	生物活性の定量	アフィニティークロマトグラフィー	TSKgel ProteinA-5PW TSKgel Boronate-5PW TSKgel FcR-IIIa-NPR TSKgel FcR-IIIa-5PW

## ■ サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるmAb、ADCの凝集体、分解物の分析

mAbやADCの凝集体や分解物は、薬効や副作用、薬剤の安定性などに影響する重要な因子です<sup>3)</sup>。これらの評価には一般的にSECが用いられます。今回は市販のmAb標準品と、同mAbに低分子化合物を結合させた市販のADC標準品を用いて表2,3に示す条件にて凝集体評価を行いました。図2に示すmAbの分析においては、多量体、単量体および分解物のピークを5分以内で分離することができました。また、ADCにおける凝集体評価では、カラム充填剤とADCとの疎水性相互作用の影響により、ピークがブロードとなり正しく凝集体評価が行えないことがしばしば起こります (図3A)。この影響を抑制する方法としてアセトニトリルやアルコールなど有機溶媒の添加が効果的であることが知られています<sup>4)</sup>。本分析では移動相に2-プロパノールを添加した結果、良好な分離が得られました (図3B)。

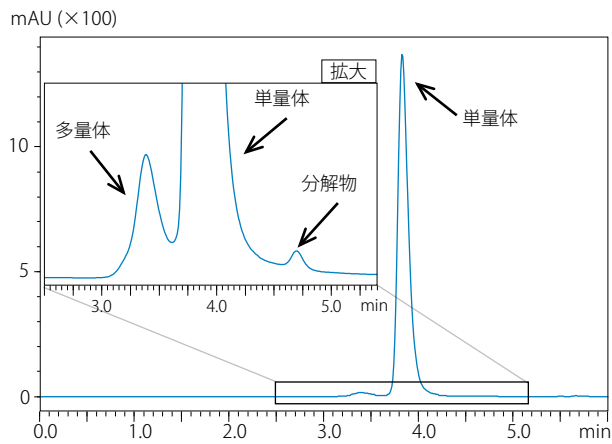


図2 mAb凝集体分析のクロマトグラム

表2 mAb凝集体分析条件 (図2)

System	: Nexera XS inert
Column	: TSKgel UP-SW3000 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
Guard Column	: TSKgel guardcolumn UP-SW DC
Isocratic Mode	
Mobile Phase	: 100 mmol/L (sodium) phosphate buffer containing 100 mmol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 7.0)
Flow Rate	: 0.4 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Vial	: TORAST™-H Glass Vial <sup>*5</sup>
Injection Volume	: 5 μL
Sample	: NIST mAb (10 mg/mL)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

\*5: 370-04301-01

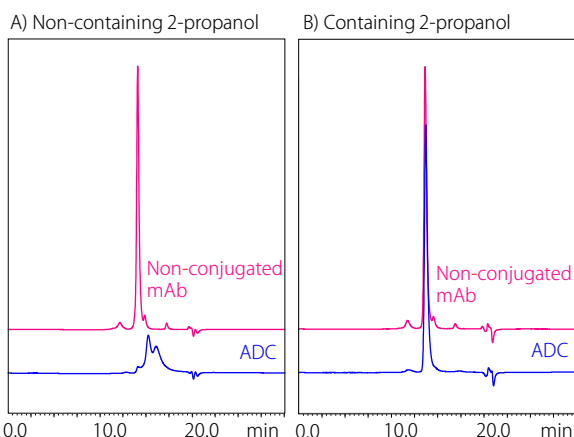


図3 mAbおよびADCのクロマトグラム

表3 mAbおよびADCの分析条件 (図3)

System	: Nexera XS inert
Column	: TSKgel UP-SW3000 (300 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
Guard Column	: TSKgel guardcolumn UP-SW DC
Isocratic Mode	
Mobile Phase for condition A	: 200 mmol/L (potassium) phosphate containing 250 mmol/L KCl (pH 7.0)
Mobile Phase for condition B	: 200 mmol/L (potassium) phosphate containing 250 mmol/L KCl (pH 7.0) / 2-propanol = 85:15
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Vial	: TORAST-H Glass Vial <sup>*5</sup>
Injection Volume	: 5 μL
Sample	: Non-conjugated mAb (0.5 mg/mL), ADC (5 mg/mL)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

\*5: 370-04301-01

## ■ イオン交換クロマトグラフィー (IEX) による電荷異性体 (チャージバリエント) の分析

mAbの構造は複雑であり構造上の不均一性を持つため、電荷の異なる異性体、チャージバリエントも存在します<sup>3)</sup>。抗体医薬品の場合、電荷状態の違いにより安定性や効能などに影響を及ぼす恐れがあるため、正しく評価する必要があります。このようなチャージバリエントは、電荷の強さの差を利用して、IEXにより分離が可能です。今回は3種類のmAbを使用し、表4に示す条件にて各試料中のチャージバリエントに由来する複数のピークを確認することができました(図4)。

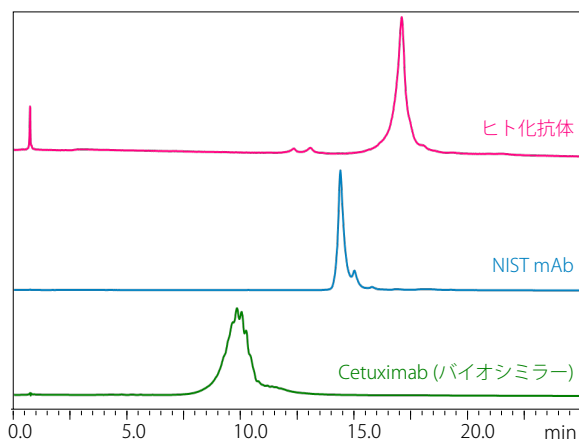


図4 3種類のmAbのクロマトグラム

表4 mAbのチャージバリエント分析条件 (図4)

System	: Nexera XS inert
Column	: TSKgel CM-STAT (100 mm × 4.6 mm I.D., 7 μm)
Gradient Mode	: 0 – 55% B (0 – 30 min)
Mobile Phase A	: 20 mmol/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (pH 6.0)
Mobile Phase B	: Mobile Phase A containing 500 mmol/L NaCl
Flow Rate	: 0.8 mL/min
Column Temp.	: 25 °C
Vial	: TORAST -H Glass Vial <sup>*5</sup>
Injection Volume	: 5 μL
Sample	: Humanized antibody (1 mg/mL), NIST mAb (5 mg/mL), Cetuximab (Biosimilar 5 mg/mL)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

\*5: 370-04301-01

## ■疎水クロマトグラフィー(HIC)によるADCの薬物抗体結合比の分析

ADCの低分子薬物の不均一性は薬効に影響を及ぼす恐れがあります。ここでは、HICによる分析手法をご紹介します。

ADCは市販のADC mimicをそのままHIS分析に供し、表5に示す条件にて薬物抗体価 (Drug Antibody Ratio, DAR) を評価しました。その結果、低分子薬物の結合数が0~6の異なるADCを分離することができました (図5)。

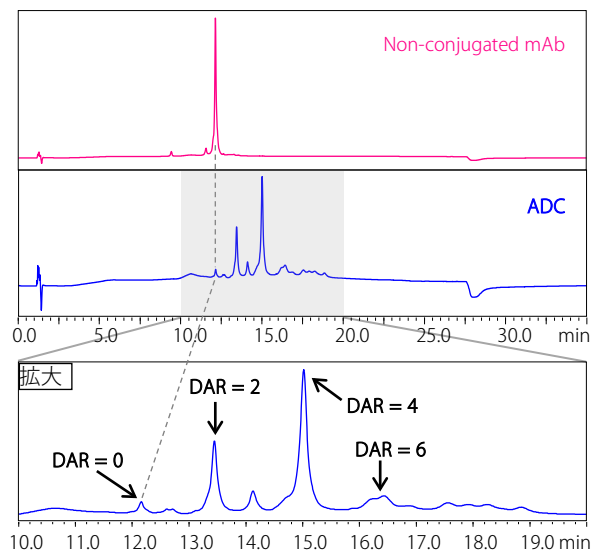


図5 DAR分析結果

表5 DAR分析条件 (図5)

System	: Nexera XS inert
Column	: TSKgel Butyl-NPR (100 mm × 4.6 mm I.D., 2.5 μm)
Gradient Mode	: 0 – 100% B (0 – 20 min)
Mobile Phase A	: 25 mmol/L (sodium) phosphate buffer containing 1.5 mol/L sodium sulfate (pH 7.0)
Mobile Phase B	: 25 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 7.0) / 2-propanol = 80:20
Flow Rate	: 0.5 mL/min
Column Temp.	: 35 °C
Vial	: TORAST-H Glass Vial *5
Injection Volume	: 10 μL
Sample	: Non-conjugated mAb (0.5 mg/mL), ADC (5 mg/mL)
Detection	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

\*5: 370-04301-01

## ■まとめ

抗体医薬品、抗体薬物複合体の品質管理に関わる様々な分析例や分析条件の最適化テクニックをご紹介します。サイズ排除クロマトグラフィーにおいては、mAbの迅速で良好な分離を得ることができ、ADCの分析では移動相組成を調製することで充填剤との疎水性相互作用を抑制し、良好な分離を得ることができました。イオン交換クロマトグラフィーでは、電荷の強さの差を利用して、酸性、塩基性のチャージバリエーションが分離できました。疎水クロマトグラフィーではシステイン結合型のADCを低分子化合物の結合数の違いにより分離することができました。

抗体医薬品の分析などの高濃度の塩を含む移動相を使用する分析でも、耐腐食性に優れた本システムを用いることで安定したデータ採取が可能です。

### <参考文献>

- 1) ICH Q6B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 医薬品規制調和国際会議, www.ich.org
- 2) 厚生労働省医薬局審査管理課, 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について (平成13年5月1日 医薬審発第571号)
- 3) バイオ医薬品ハンドブック 第4版 Biologicsの製造から品質管理まで (株式会社じほう)
- 4) 荒川力, 江島大輔, 津本浩平, Pete Gagnon溶媒によるクロマトグラフィーの制御, 生化学 第80巻 第1号, pp.45 -51, (2008).

Nexera, TORASTは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。  
TSKgel, TSKgel STAT, TSKgel NPRは東ソー株式会社の登録商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

01-00259-JP 初版発行：2022年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。  
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。

新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022