

# サイズ排除クロマトグラフィーによる モノクローナル抗体サイズバリエーション 最適分離条件探索の効率化

藤崎 真一、細井 千尋

## ユーザーベネフィット

- ◆ LabSolutions MDにより、モノクローナル抗体の凝集体/単量体/分解物の分離と、移動相pH/流量といった各種パラメーターとの関係を視覚化（デザインスペース）し、良好な分離を与える頑健性の高い条件を効率的に探索できます。
- ◆ 耐腐食性に優れたNexera™ XS inertにより、高濃度の塩を含む移動相を用いた分析でも安定したデータ採取が可能です。
- ◆ pHM-40により、リアルタイムでカラム溶出後の移動相のpHをモニタし、クロマトグラムと共に管理できます。

## ■はじめに

モノクローナル抗体（mAb）を利用した抗体医薬品は、製造過程や保管状態によって二量体や多量体などの凝集体を形成することがあり、安全性や効能への影響が懸念されます。また、ICH-Q6Bでは、抗体医薬品中の単量体と凝集体などの不純物を分離し、その含有割合を明らかにすることが定められています。このため、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いた凝集体のモニタリングは、製造過程における重要な分析のひとつとされています。SEC分析においては、塩濃度や移動相pHを網羅的に検討することで、試料と充填剤間の副次的相互作用の抑制も考慮した分析法の最適化が必要な一方、高濃度のハロゲン塩を含む移動相の使用によるHPLCシステムへのダメージが懸念されます。本稿では、耐腐食性に優れたNexera XS inertに、リアルタイムでカラム溶出後のpHを測定するpHモニター（pHM-40）と、分析法開発支援ソフトウェアLabSolutions MDを組み合わせて、抗体医薬品のサイズバリエーションに対して、良好な分離と頑健性を両立するHPLC条件を、効率的に探索する事例についてご紹介します。

## ■分析条件

mAbの凝集体、単量体、分解物の分離の最適化検討に用いた分析条件を表1に示します。まず、移動相中の塩化ナトリウム濃度を変化させ、分離に与える影響を評価し、最適濃度を決定しました。次に、最適塩濃度に対して移動相pH、流量、カラムオープン温度を変動させることで、分離を網羅的に検討し、最適分離条件を探索しました。

表1 最適化検討条件

|  |   |
|--|---|
| System : Nexera XS inert (Method Scouting System)      |   |
| Mobile phase :   |   |
| pump A :   | 200 mmol/L disodium hydrogen phosphate in water |
| pump B :   | 200 mmol/L sodium dihydrogen phosphate in water |
| pump C :   | 1 mol/L sodium chloride in water                |
| pump D :   | Water   |
| Sample : Monoclonal Antibody Standard (0.5 mg/mL)      |   |
| Column : TSKgel UP-SW3000 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm) |   |
| Vial : TORAST-H Glass Vial (Shimadzu GLC) *1           |   |
| Analytical conditions (Isocratic)                      |   |
| Column Temp. :   | 20, 25, 30 °C                                   |
| Flow rate :  | 0.15, 0.2, 0.25 mL/min                          |
| Injection Vol. :                                       | 5 μL  |
| Detection :  | 280 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)              |

\*1 P/N 370-04301-01

## ■移動相中の塩化ナトリウム濃度の評価

移動相中の塩濃度の影響を評価するために、LabSolutions MDの移動相ブレンディング機能（C190-0563<sup>1</sup>参照）により、塩化ナトリウム濃度を自動で調整しながら連続的に分析を行いました。具体的には、100 mmol/Lりん酸緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を50 mmol/Lから300 mmol/Lまで50 mmol/L刻み（6水準）で変動させることで、凝集体、単量体、分解物に関して最適な分離を与える濃度を検討しました。図1に50 mmol/Lと150 mmol/LにおけるmAbのクロマトグラムを示します。移動相中の塩化ナトリウム濃度が最も低い50 mmol/Lでは、カラム充填剤とmAb間の静電相互作用により、凝集体（図1中A）と単量体（図1中B）の分離度、及び単量体と分解物（図1中C）のピークバレー比が小さい値を示しました。一方で、150 mmol/Lの濃度においては、これらの値が改善しました（図2）。この結果より、以降の分離条件検討においては、移動相中の塩化ナトリウム濃度を150 mmol/Lとしました。

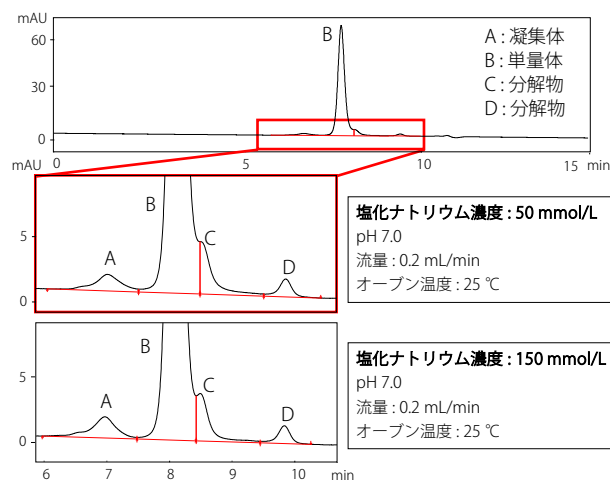


図1 塩化ナトリウム濃度が50及び150 mmol/Lでのクロマトグラム

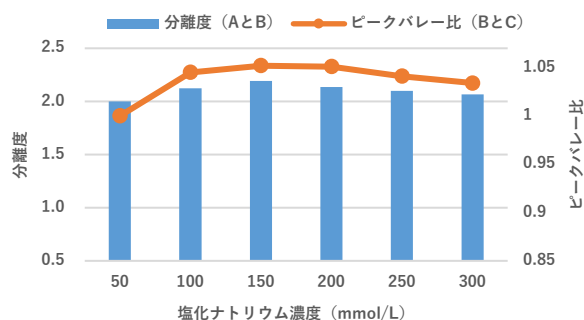


図2 各塩化ナトリウム濃度における分離度及びピークバレー比

## ■ 移動相pH、流量、オープン温度の評価

タンパク質は多くの解離基を有するため、pH によって荷電状態が異なることでカラム充填剤との副次的相互作用の大きさが変化し、ピーク形状に影響を及ぼします。また、最適な流量及びカラムオープン温度は、充填剤粒子径やポアサイズ、試料の物性及び化学的性質等により異なります。そこで、移動相pH、流量、カラムオープン温度を変動させることで、mAbの凝集体、単量体、分解物の分離を網羅的に検討しました。移動相pHを6.1、6.7、7.3、流量を0.15、0.20、0.25 mL/min、カラムオープン温度を20、25、30 °Cのそれぞれ3水準で変動させた結果を図4~6に示します。また、横軸に移動相流量、縦軸に移動相pHを取り、凝集体と単量体の分離度、及び単量体と分解物のピークバレー比のデザインスペースを図3に示します。図中の赤色領域は分離度及びピークバレー比の値が大きく、青色領域は値が小さい領域を示します。LabSolutions MDのデザインスペースにより、凝集体と単量体の分離度、及び単量体と分解物のピークバレー比は、移動相pHが7.3、流量が0.15 mL/min、カラムオープン温度が30 °Cにおいて最適（図3内左上の青色点）であることが一目わかります。また、分析者の勘と経験に依存せず、科学的な根拠に基づいたメソッド開発が可能となります。移動相pHの検討（図4）に関しては、pHが6.1から7.3まで高くなるにつれて、凝集体と単量体の分離度、及び単量体と分解物のピークバレー比が向上しました。これは、mAbのpIが7付近であり、pH 6.1の移動相中においてより強く正に帯電した一部のmAb分子による、カラム充填剤との静電相互作用による影響と考えられます。また、流量及びカラムオープン温度の検討（図5及び図6）に関しては、流量が低くカラムオープン温度が高いほど、凝集体と単量体の分離度、及び単量体と分解物のピークバレー比が向上しました。各クロマトグラムに重ね描きした移動相pH値から、流量及びオープン温度の検討中の移動相はpH 7.3で安定していたことも確認できます。pHモニターの結果は、各種パラメータを変更した際に分離挙動が想定と異なったケースにおいて、その原因因子のひとつとして活用することもできます。

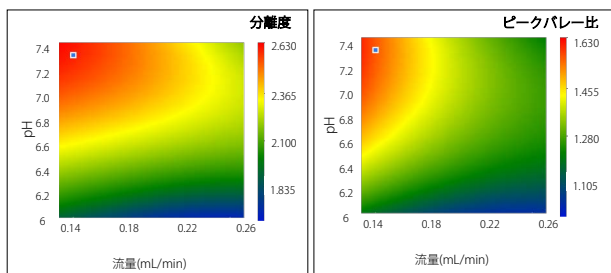


図3 凝集体(A)と単量体(B)の分離度のデザインスペース(左)  
単量体(B)と分解物(C)のピークバレー比のデザインスペース(右)  
(カラムオープン温度: 30 °C)

## ■ まとめ

Nexera XS inert及びpHM-40とLabSolutions MDを組み合わせることで、抗体医薬品のサイズバリエーションに対する最適分離条件探索を効率化する事例についてご紹介しました。Nexera XS inertの優れた耐腐食性により、高濃度のハロゲン塩を含む移動相の条件下でも安定した分析を実現します。また、デザインスペースにより、勘と経験に依存しない分析法の最適化を可能とします。

NexeraおよびLabSolutions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。

# 株式会社 島津製作所

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。

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にご登録いただけますと、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, 2023

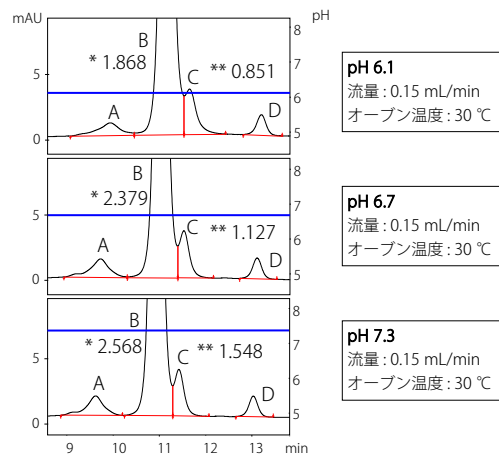


図4 移動相pHを変動させたクロマトグラム（図中青線はpH値）  
A: 凝集体、B: 単量体、C: 分解物、D: 分解物

\* Resolution of A and B, \*\* Peak-to-valley ratio of B and C

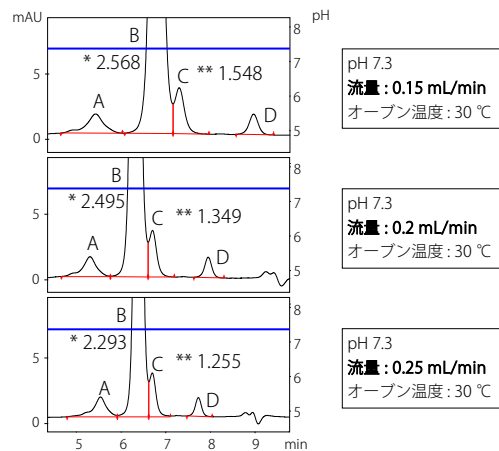


図5 流量を変動させたクロマトグラム（図中青線はpH値）  
A: 凝集体、B: 単量体、C: 分解物、D: 分解物

\* Resolution of A and B, \*\* Peak-to-valley ratio of B and C

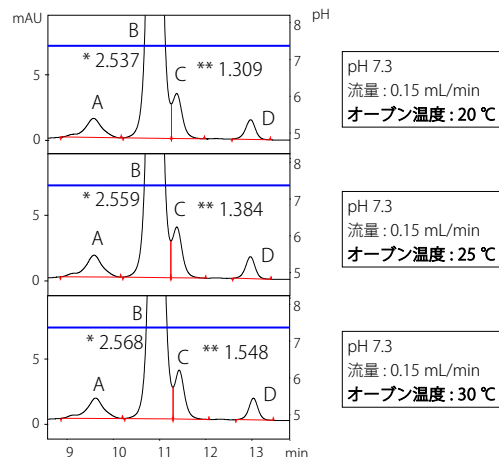


図6 オープン温度を変動させたクロマトグラム（図中青線はpH値）  
A: 凝集体、B: 単量体、C: 分解物、D: 分解物

\* Resolution of A and B, \*\* Peak-to-valley ratio of B and C

### 〈参考文献〉

- 1) LabSolutions MDを用いた移動相のpHスクリーニングの自動化による最適分離条件探索の効率化 (C190-0563)