

# pHグラジエントイ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チャージバリエーションの分離メソッドの開発

藤村 大樹、安藤 恵美子

## ユーザーベネフィット

- ◆ 複雑なチャージバリエーションを高分離に再現性良く分析できます。
- ◆ オンラインpHモニターを使用することで、pHの変化やカラムの平衡状態を確認することができます。

## ■はじめに

モノクローナル抗体の製造過程や保管中には、多くの不純物が生成されます。主な不純物の一つであるチャージバリエーションは、C末端リシンの不均一性や脱アミド、酸化などによって生成される不純物であり、抗体医薬品の安定性や効能に影響を及ぼす恐れがあるため、チャージバリエーションを適切に分離・検出、モニタリングすることがガイドラインICH-6Bにより定められています。チャージバリエーションの分析には一般的にイオン交換クロマトグラフィー (IEX) が使用されます。溶離液の塩化ナトリウム濃度を徐々に上げて分離する塩グラジエント溶離がしばしば用いられますが、高濃度の塩を加えるために溶離液の粘度が高くなり、カラム圧が高くなります。そのため流量に制限され、分析時間が長くなることが課題となります。チャージバリエーション分析に使用可能な別の分離手法として、溶離液のpHを変化させて溶出するpHグラジエント溶離が挙げられます。pHグラジエント溶離であれば、塩濃度の低い溶離液を用いることができるため、カラム圧が比較的強く抑えられ、短時間でチャージバリエーションを分離することができます。本稿は、pHグラジエント溶離によるチャージバリエーション分析の条件検討の例を紹介いたします。

## ■分析条件

本稿の代表的な分析条件を以下の表1 に示します。溶離液には緩衝域の異なるHEPES、MES、酢酸ナトリウムの等モル混合水溶液を酢酸もしくは水酸化ナトリウム水溶液でpH 5.0およびpH 10.6に調整しました。

System	: Nexera XS inert
Column	: Shim-pack™ Bio IEX SP-NP (100 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm)*1
Mobile phase A	: 20, 50, 100 mmol/L MES-HEPES-sodium acetate (pH 5.0)
Mobile phase B	: 20, 50, 100 mmol/L MES-HEPES-sodium acetate (pH 10.6)
Flow rate	: 0.3, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6 mL/min
Time program (B Conc.)	: 0-100% (0-15 min) → 100% (15-20 min) → 0% (20.1-30 min)
Column temp.	: 25°C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 280 nm (SPD-M40), UHPLC inert cell
Vial	: TORAST™-H Glass vial*2

\*1 P/N : 227-31005-03, \*2 P/N : 370-04301-01

## ■溶離液濃度の検討

溶離液濃度によるチャージバリエーションの分離への影響を検討するために、20、50、100 mmol/Lに調整した溶離液を用い、pHグラジエントによるチャージバリエーションの分離分析を実施しました。図1 のクロマトグラムの通り、溶離液の濃度を下げることで、各ピークの分離は向上しました。

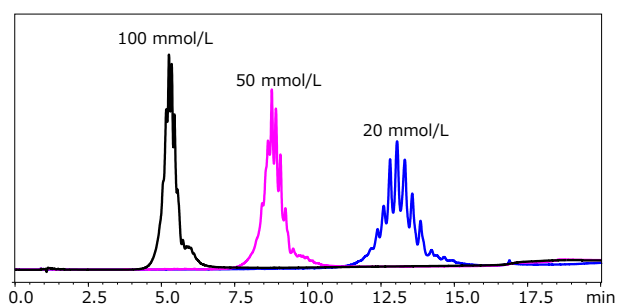


図1 各溶離液濃度におけるセツキシマブバイオシミュラーのクロマトグラム

## ■グラジエント勾配の検討

分離条件を最適化するため、グラジエント勾配、流量および配管内径の影響を確認しました。まず、流量を0.6 mL/minに固定し、B液濃度が100%になるまでのグラジエント勾配設定を3.3、5.0、6.7、10、20 %/min と変えて、最も強度の大きなピークの面積値およびピークバレー比 (p/v比) を比較しました。結果を図2および表2に示します。グラジエント勾配が緩やかになるほど、ピーク高さは減少しましたが、分離は向上し、ピーク面積値も高くなる傾向にありました。ただし、グラジエント勾配を緩くすると全体的な分析時間は長くなりました。この結果から、グラジエント勾配は分離と分析時間に影響を及ぼすことが考えられます。配管内径の検討以降は分離が最も良好であった3.3 %/minのメソッドを使用しました。

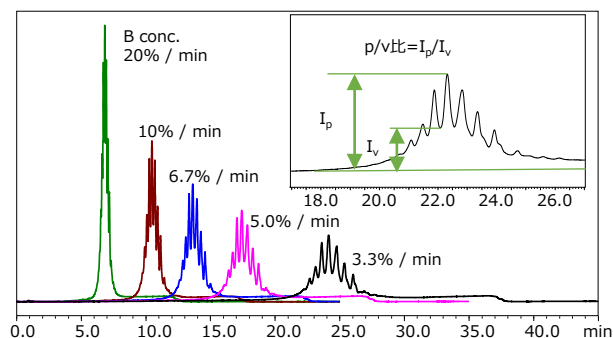


図2 グラジエント勾配によるクロマトグラムの比較

表2 グラジエント勾配によるピーク面積値とp/v比の比較

グラジエント勾配 (%/min)	面積値	p/v比
20	343398	-
10	349000	12.8
6.7	358131	15.6
5.0	369935	15.8
3.3	381634	16.2

## ■ 流量の検討

流量の影響を検討するためグラジエント勾配を6.7%/minに固定し、流量設定をを0.3、0.4、0.45、0.5、0.6 mL/minと変え、最も強度の高いピークの面積値およびp/v比を比較しました。流量を下げると動的吸着容量が大きくなることによって、ピーク面積値は増加する傾向にありました(図3)。流量を下げるほど分離はわずかに低下する傾向にありました。全体のピーク強度が向上することで、より多くのチャージバリエーションの同定が可能でした。以降の検討は0.3 mL/minで行うこととしました。

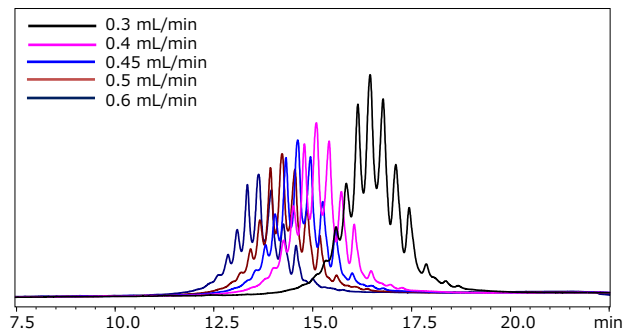


図3 チャージバリエーションの分離における流量の影響

表3 チャージバリエーションの分離における流量の影響

流量 (mL/min)	面積値	p/v比
0.6	358131	2.137
0.5	441653	2.106
0.45	487867	2.059
0.4	546360	2.027
0.3	737573	1.887

## ■ 配管内径の検討

オートサンプラーからカラムまでの配管内径の影響を図4および表4に示します。なお、図4のクロマトグラムは比較のため、最大強度のピークで保持時間を配管内径0.13 mmに合わせました。配管内径を細くするほど、ピーク拡散が抑制され、半値幅は小さくなり、ピークバレー比は良好な値を示しました。

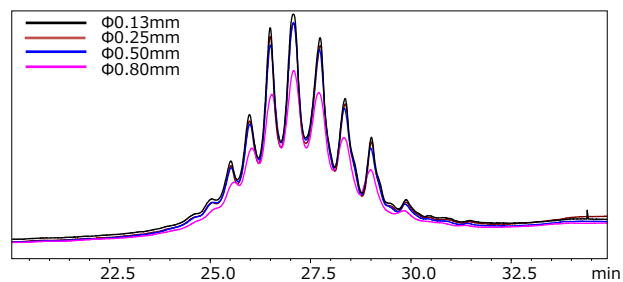


図4 配管内径の違いによるクロマトグラムの変化

表4 配管内径の違いによるチャージバリエーションの分離への影響

配管内径(mm)	p/v比	半値幅
0.80	1.748	0.55
0.50	2.231	0.42
0.25	2.244	0.39
0.13	2.467	0.39

Nexera、Shim-pack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

01-00459-JP 初版発行：2022年9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, 2022

## ■ 保持時間再現性の検討

流量 0.3 mL/min、グラジエント勾配 3.3 %/min、配管内径 0.13 mm の条件で6回繰り返し分析した際のクロマトグラムを図5に、各ピークの保持時間の平均値と相対標準偏差(%RSD)を表5に示します。すべてのピークにおいて相対標準偏差は0.05%未満となり、高い再現性が得られることを確認しました。

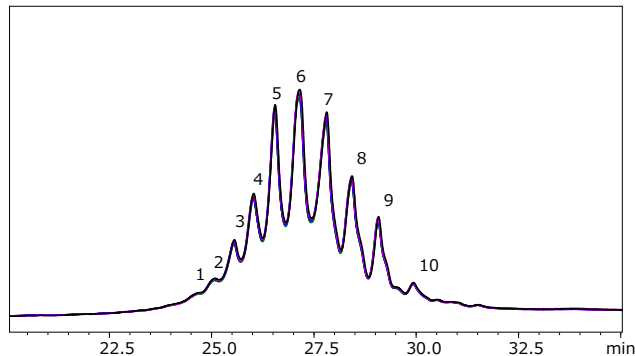


図5 繰り返し分析の時のクロマトグラムの重ね書き (n=6)

表5 保持時間の平均値と相対標準偏差(%RSD) (n=6)

No.	保持時間 (min)	RSD (%)
1	24.69	0.046
2	25.08	0.028
3	25.55	0.025
4	26.02	0.022
5	26.54	0.021
6	27.14	0.025
7	27.80	0.023
8	28.42	0.021
9	29.07	0.022
10	29.92	0.017

## ■ まとめ

バイオイナートUHPLC Nexera XS inert およびカチオン交換クロマトグラフィーカラム Shim-pack Bio IEX SP-NPを用い、モノクローナル抗体のチャージバリエーションについて、pHグラジエント溶離条件の最適化を行いました。より高分離の分析を行う場合には、溶離液濃度を低くし、グラジエント勾配を緩やかにすることが有効です。流量が上がることで分離はわずかに向上しますが、ピーク強度が小さくなるため微小なチャージバリエーションピークが検出できなくなる可能性があります。配管内径も分離にわずかに影響を及ぼします。高分離で再現性の高い分析結果を得るためには、低流量での流量精度やグラジエント正確さ、酸や塩基、塩に対する耐久性のあるLCシステムと、高い分離能を持つカラムを組み合わせることが重要です。