

弱カチオン交換 (WCX) クロマトグラフィーによる mAb 電荷 変異体分析



モノクローナル抗体 (mAb) は、主要製薬会社の大半が製造する代表的なバイオ医薬品です。mAb は約 150,000 ダルトンで、いくつかの修飾が起こり、このクラスの巨大分子の複雑さを増しています。修飾は、タンパク質が生成される時、または製造・保存される時に起こる可能性があります。C 末端切断、脱アミド化、グリコシル化の変化、およびアミノ酸の削除・置換などの修飾は、mAb の全体的な電荷に影響を与え、電荷変異体と見なされます。電荷変異体は通常、イオン交換クロマトグラフィーによってモニタリングされます。^{1,2}最終製品の有効性・安全性・および免疫原性が損なわれないようにするためには、電荷変異体などの重要品質特性 (CQA) をモニタリングすることが欠かせません。アメリカ食品医薬品局 (FDA) などの政府機関は、生物製剤承認申請 (Biologics License Application) を提出する際に電荷変異体データを要求します。

電荷変異体分析は確立された手法ですが、この分析には課題が残っています。頻繁に使用されるバッファは塩濃度が高く、液体クロマトグラフィーシステムやカラムに用いられている従来のステンレス製ハードウェアを腐食する恐れがあります。Agilent 1290 Infinity II Bio LC や Agilent 1260 Infinity II バイオイナートシステムなどの生体適合性または生体不活性システムを使用すれば、この問題を軽減できます。流路にはまったく、鉄やステンレス鋼が使用されていません。フィッティングとキャピラリーはすべて合金 MP35N で作られているため、腐食が軽減されます。また、酸化などの腐食による反応が起こるのを防ぎます。1290 Infinity II Bio LC では、正確で精密なグラジエントを生成するバイナリポンプが利用できます。特に電荷変異体分析で典型的な浅いグラジエントの生成に最適です。さらに、クォータナリポンプオプションで Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用すれば、さまざまな緩衝液条件で電荷変異体分析を簡単に実施でき便利です。

Agilent Bio MAb カラムは弱カチオン交換カラムで、モノクローナル抗体の電荷異性体分析に適したカラムです。³PEEK ハードウェアが利用可能なため、1290 Infinity II Bio LC システム全体で鉄を含まない流路を実現します。再現性の高い結果を得るのに不可欠です (図 1)。⁴

さらに、カラム自体が mAb 分離用に特別に設計されており、親水性ポリマーコーティングに結合された非常に高密度で極めて均一な弱カチオン交換層を備えています。これは、非特異的な相互作用を排除するように設計されたもので、バイオシミラーの比較研究に理想的です (図 2)。⁵

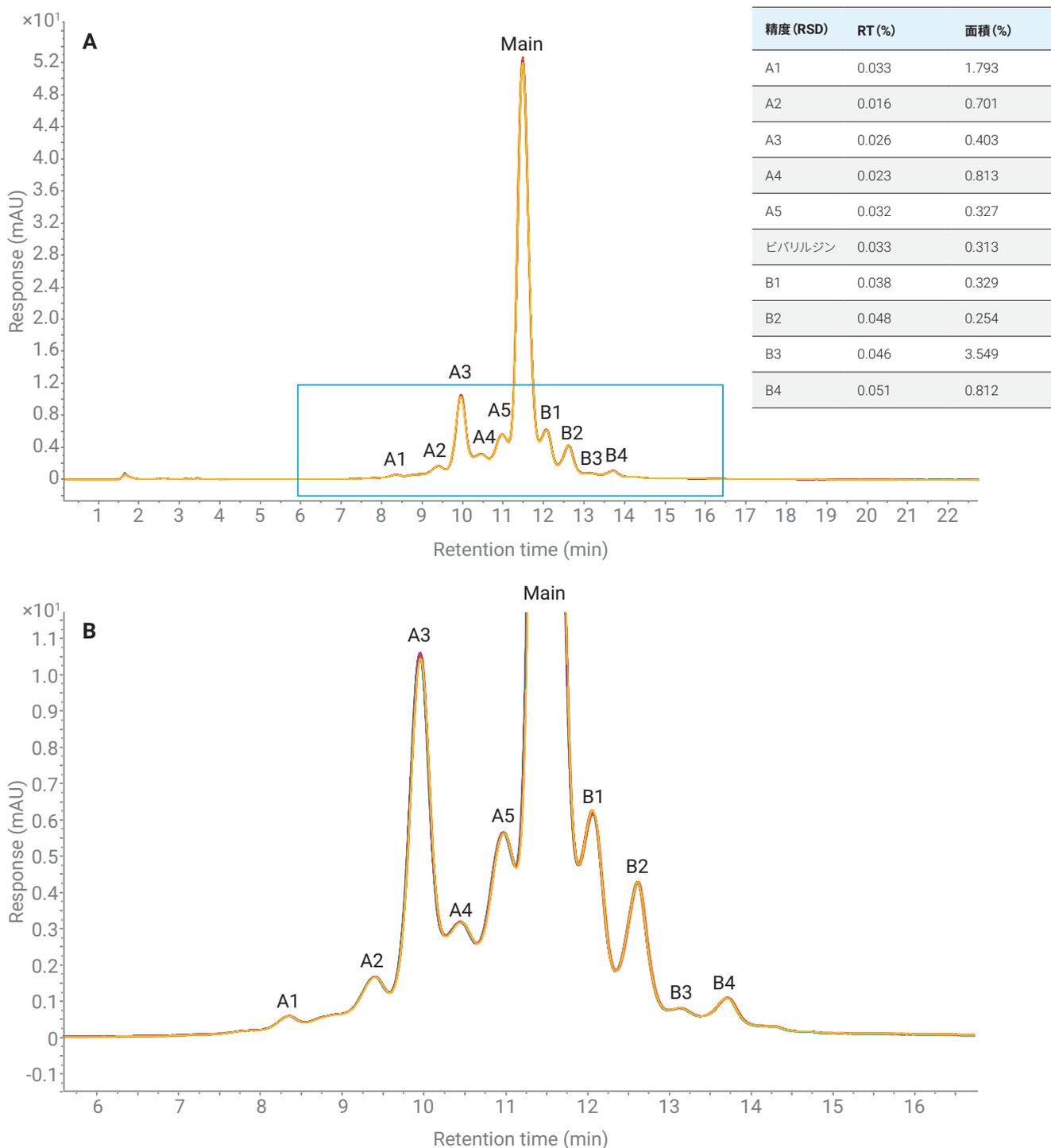


図 1. トラスツマブの酸性および塩基性バリエント。その後の 7 回の分析では、リテンションタイムとピーク面積に関して再現性の高い結果が得られています。

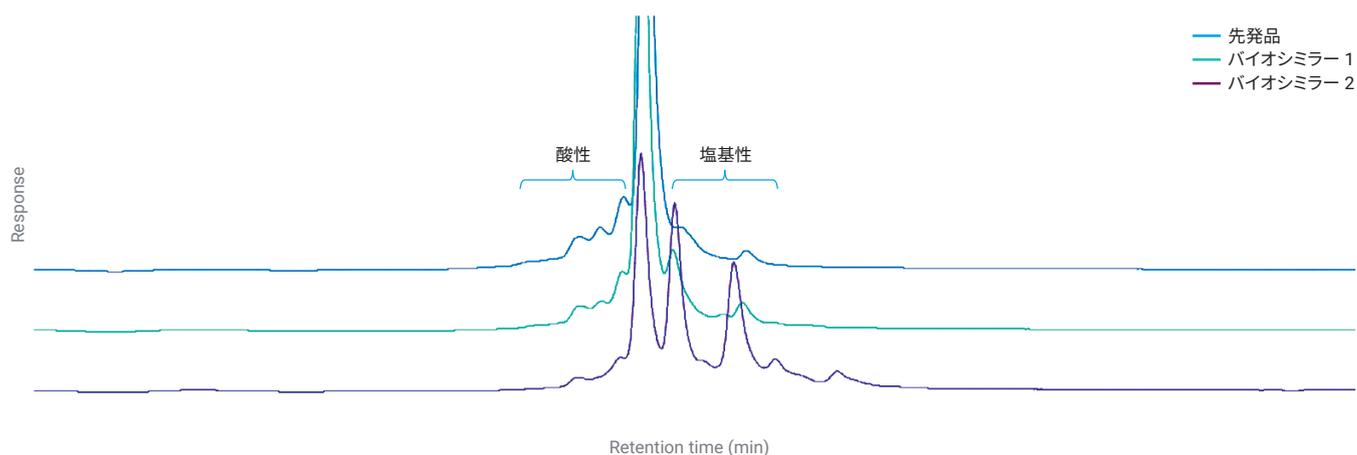


図 2. リツキシマブと 2 つのバイオシミラーの電荷変異体の比較

クロマトグラフィー条件を最適化するためのベストプラクティス

目的の分解能を達成し、電荷変異体を最適に分離するには、次の 2 つのパラメータが極めて重要です。すなわち、移動相の最適な pH と最適なグラジエントの傾きを決定することです。両方の因子が分離に大きな影響を与える可能性があります。表 1 は、パラメータの最適化をどこから始めればいいのかを示しています。

	塩グラジエント	pH グラジエント
パラメータ	設定値	設定値
カラム	Bio MAb, NP5, 2.1 x 250 mm, PEEK (部品番号 5190-2411)	Bio MAb, NP5, 2.1 x 250 mm, PEEK (部品番号 5190-2411)
推奨 LC システム	Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム、高速ポンプ使用	Agilent 1290 Infinity II Bio LC システム、 Flex (クォータナリ) ポンプ使用
移動相	A : 30 mM リン酸バッファ、pH 6.8 B : 30 mM リン酸緩衝液、pH 6.8、500 mM NaCl	A : 水 B : 1.6 M NaCl C : 100 mM Na ₂ HPO ₄ D : 100 mM Na ₂ HPO ₄
グラジエント	0 ~ 100 mM NaCl, 0 ~ 30 分 100 ~ 500 mM, 30 ~ 31 分 イソクラティック 500 mM, 31 ~ 35 分 ポストタイム 15 分	pH 6.0 ~ 8.0, 0 ~ 20 分 0 ~ 800 mM NaCl, 20 ~ 25 分 800 mM NaCl, 25 ~ 30 分
流量	0.25 mL/min	0.25 mL/min
注入量	1 ~ 5 µL	1 ~ 5 µL
温度	室温	室温
検出	280 nm	280 nm

表 1. 推奨初期条件

移動相に関する考慮事項

- 目的とする動作 pH および一定の電荷を保つため、移動相にはバッファを混合する必要があります（濃度は通常 20 ~ 30 mM）。
- リン酸緩衝液はほぼ常に pH 6 ~ 7 の範囲です。その他の互換性のあるバッファには、酢酸、トリス、MES 含有バッファ、アセトニトリル、メタノールなどがあります。mAb サンプルは移動相に溶けなければなりません。
- カラムから mAb を溶出するには、競合イオンを導入する必要があります。これには通常、100 mM ~ 500 mM の塩化ナトリウムを用いることができます。
- 塩化ナトリウムを添加すると移動相の pH が変化するので、pH を再調整する必要があります。
- 最適な結果を得るには、希釈バッファでは細菌の増殖がよく起こるので、新しく調製したバッファはすぐに使用しない場合は、冷蔵庫に保管する必要があります。またカラムの目詰まりを防ぐために、バッファをフィルタ処理することをお勧めします。

pH グラジエントバッファに関する考慮事項

- イオン交換クロマトグラフィーでは、塩グラジエントの方が一般的です。ただし、pH グラジエントを代替方法として使うことができ⁶⁷、より高い分解能が得られる可能性があります。Bio MAb HPLC カラムは pH 2 ~ 12 で安定しています。
- mAb pH グラジエントは通常、pH 6 から始め、pH 7 ~ 8 まで上昇させ、塩化ナトリウム塩のカラムクリーンアップ/平衡化ステップがあります。
- 典型的な溶出バッファとしては、リン酸一ナトリウムとリン酸二ナトリウムが用いられます。

より一般的なタンパク質移動相に関する考慮事項

- 開始バッファの pH は、カチオン交換クロマトグラフィーのタンパク質の PI よりも 0.5 ~ 1 pH 単位低くする必要があります。
- タンパク質の pl がわからない場合は、pH 6 から始めるのが適切です。

カラム寸法

- カラムの内径 (id) は、分析する mAb の量に基づいて選択することが推奨されます。一般的なガイドラインは、注入量がカラム容量全体の 1 ~ 2 % を超えないようにすることです。例えば、2.1 x 50 mm のカラムでは 1.7 µL 以下の注入量とすることが理想的ですが、4.6 x 50 mm のカラムでは 8.3 µL の注入量を処理できます。内径 2.1 mm のカラムを選択した場合、拡散を最小限に抑えるように LC を配管する必要があります。
- 250 mm などの長いカラムでは分解能が高くなり、50 mm などの短いカラムでは分析時間を短縮できます。

粒子径

- 一般的に、粒子径が小さいほど分離効率は高まりますが、動作圧力が高くなります。
- mAb のような大きな生体分子は拡散速度が遅いため、粒子サイズは分解能にそれほど影響しません。
- 水溶性緩衝液を用いた場合の溶出液は比較的粘性が高く、背圧が高くなる可能性があります。
- Bio MAb HPLC カラムの粒子サイズと最大背圧は次のとおりです：
 - 1.7 µm: 689 bar
 - 3 µm: 551 bar
 - 5 µm: 413 bar
 - 10 µm: 275 bar
- もう 1 つの考慮しなければならないのは、PEEK ハードウェアの圧力限界が 400 bar であり、5 および 10 µm の粒子サイズでしか利用できないことです。塩グラジエントはステンレスを腐食する恐れがあるため、生体不活性または生体適合性 LC システムに加えて PEEK カラムを使用すると、システムの堅牢性が維持されます。

カラム寿命と再現性

- 流量範囲は、0.1 ~ 1.0 mL/min です。内径 2.1 mm のカラムは通常 0.2 ~ 0.4 mL/min の流速で使用し、内径 4.6 mm のカラムは通常 0.5 ~ 1.0 mL/min で使用します。背圧を監視しながら、最初は流量をゆっくりと上げて、カラムが動作圧力限界を超えないようにする必要があります。
- Bio MAb HPLC カラムは 80 °C まで耐えることができます。ただし、カラムの寿命を延ばすには、通常の操作を 10 ~ 50 °C としなければなりません。
- 再現性を最大にするには、グラジエントの平衡化/クリーンアップステップを 5 ~ 10 カラム容量にする必要があります。
- 分析カラムの寿命を延ばすためには、ガードカラムの使用を検討してください。
- 長期間保存する場合は、カラムを少なくとも 15 カラム分の容積でフラッシュし、0.1 % アジ化ナトリウムを含む 20 mM リン酸緩衝液で pH 6 で保存してください。
- PEEK ハードウェアを使用するカラムは、PEEK フィッティング（部品番号 5042-8957）と組み合わせる必要があります。

標準品、カラム、消耗品などの情報

説明	部品番号
リスト 1：電荷変異体分析用 Bio MAb HPLC カラム	
Bio MAb HPLC カラム、NP5、2.1 x 50 mm、PEEK	5190-2412
Bio MAb HPLC カラム、NP5、2.1 x 250 mm、PEEK	5190-2411
Bio MAb HPLC カラム、NP5、4.6 x 50 mm、PEEK	5190-2408
Bio MAb HPLC カラム、NP5、4.6 x 250 mm、PEEK	5190-2407
Bio MAb HPLC カラム、NP10、2.1 x 50 mm、PEEK	5190-2420
Bio MAb HPLC カラム、NP10、2.1 x 250 mm、PEEK	5190-2419
Bio MAb HPLC カラム、NP10、4.6 x 50 mm、PEEK	5190-2416
Bio MAb HPLC カラム、NP10、4.6 x 250 mm、PEEK	5190-2415
Bio MAb HPLC カラム、NP1.7、4 x 10 mm、ガード	5190-2402
Bio MAb HPLC カラム、NP3、4 x 10 mm、ガード	5190-2404
Bio MAb HPLC カラム、NP5、4 x 10 mm、ガード	5190-2406
Bio MAb HPLC カラム、NP10、4 x 10 mm、ガード	5190-2414
Bio MAb HPLC カラム、NP1.7、4.6 x 50 mm	5190-2401
Bio MAb HPLC カラム、NP3、4.6 x 50 mm	5190-2403
Bio MAb HPLC カラム、NP5、4.6 x 250 mm	5190-2405
Bio MAb HPLC カラム、NP10、4.6 x 250 mm	5190-2413
Bio MAb HPLC カラム、NP5、10 x 250 mm	5190-6884
Bio MAb HPLC カラム、NP5、21.2 x 250 mm	5190-6885
リスト 2：標準溶液	
Agilent NIST mAb、25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb、4 x 25 µL	5191-5745
リスト 3：消耗品と溶媒	
接続とチューブ	
Swagelok フィッティング、ポリケトン、PEEK ハードウェア用、10 個	5042-8957
InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング、ステンレス製ハードウェア専用	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口での接続用、ステンレス製ハードウェア専用)	5067-5966
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 200 mm、ステンレス製ハードウェア専用	5500-1595
フィッティングユニオンバイオイナート対応、MP35N 10-32 コーン。ゼロデッドポリウム	5023-2625
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm、ステンレス製ハードウェア専用	5500-1596
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915
インライン圧カリリーフバルブキット (蛍光フローセルの後に別の検出器を直列で使用する場合に使用)	G4212-68001
6 カラム選択バルブ、分析用、バイオイナート対応 1290 Infinity II Bio LC システム	5320-0025
クイックチェンジ 2 ポジション/10 ポートバイオバルブ、1300 bar クイックチェンジバイオバルブヘッドを含む、キャピラリーキットは含まず	5067-6682
Agilent 1290 Infinity II Bio 用超低拡散チューブキット	5004-0007
キャピラリーキット、2 ポジション/10 ポートスイッチングバルブ、バイオ用	5013-0002
キャピラリーキット、6 選択バルブ用、バイオイナート、内径 0.12 mm 1290 Infinity II Bio LC システム	5005-0070

説明	部品番号
リスト 3：消耗品と溶媒	
サンプル容器	
高回収率バイアル、スクリュートップ、固定インサート付き、透明、インサート容量 300 µL、100 個。バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5188-6591
キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個 キャップサイズ：12 mm	5182-0717
バイアル、クリンプ/スナップトップ、ポリプロピレン、認定、250 µL、1,000 個 バイアルサイズ：12 x 32 mm (11 mm キャップ)	9301-0978
キャップ、スナップ、透明、PTFE/シリコン/PTFE セプタム、100 個 キャップサイズ：11 mm (5190-3155 用)	5182-0566
InfinityLab 96 ウェルプレート、0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab 96 ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒と添加物	
InfinityLab UltraPure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
溶媒ろ過	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
フィルタメンブレン、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 枚	5191-4341
フィルタメンブレン、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 枚	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
溶媒処理	
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き	5043-1221
InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g	5043-1193
セーフティスターターキットとバージボトル、InfinityLab セーフティバージボトル (部品番号 5043-1339) とセーフティキャップスターターキット (部品番号 5043-1222) を含む	5043-1340
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab セーフティバージボトル	5043-1339

参考文献：

1. Characterize mAb Charge Variants by Cation-Exchange Chromatography
[5991-5273EN](#)
2. Charge Variant Analysis, Application Compendium
[5994-2074EN](#)
3. Analysis of Intact and C-terminal Digested IgG1 on an Agilent Bio MAb 5 μ m Column
[5991-0895EN](#)
4. How Shallow Can You Go? Agilent 1290 Infinity II Bio LC システムによる mAb 電荷変異体分析のグラジエント勾配と分離条件の最適化
[5994-2692JAJP](#)
5. Charge Variant and Aggregation Analysis of Innovator and Biosimilars of Rituximab
[5994-1496EN](#)
6. pH グラジエント溶出によるモノクローナル抗体電荷変異体の分離の向上
[5990-9629JAJP](#)
7. High-resolution Analysis of Charge Heterogeneity in Monoclonal Antibodies Using pH-gradient Cation Exchange Chromatography
[5991-1407EN](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

DE99980273

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, February 9, 2024

5994-6053JAJP