

BioAccord™ システムによる、バイオ医薬品のチャージバリエーション分析の加速

Robert E. Birdsall, Brooke M. Koshel, Ying Qing Yu

Waters Corporation

要約

イオン交換クロマトグラフィー (IEX) は、バイオ医薬品の開発および製造プロセスの一環として、製品/プロセス関連のチャージバリエーションを分離する能力のある重要な手法です。ただし、光学検出のみを使用する場合、掘り下げた情報が得られるこの手法の価値は限定されます。この試験では、Waters 高純度 IonHance™ CX-MS pH 濃縮液を BioAccord 液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) システムと組み合わせて使用し、MS に適合する IEX ベースの分析法を開発しました。分離は、BioResolve™ SCX mAb カラムを使用して行い、waters_connect™ インフォーマティクスプラットフォームによって制御される BioAccord システムでデータを取り込み、このプラットフォームを用いてデータを解析しました。この試験の結果によって、IonHance CX-MS pH 濃縮液を使用してバイオ医薬品に関連するチャージバリエーションを分離する際に、質量スペクトルデータを取り込んで自動的にデコンボリューションできることが示されています。さらに、光学検出器が搭載された ACQUITY™ Premier システムを用いた比較試験により、BioResolve SCX mAb カラムは、pH グラジエントと「塩」グラジエントのいずれかを用いても同等の性能を発揮し、バイオ医薬品の製造に関連する開発および製造の活動の支援の柔軟性が向上することが示されています。

アプリケーションのメリット

- IonHance CX-MS 濃縮液により、チャージバリエーションの MS 同定が容易になる
- BioResolve SCX mAb カラムの pH/塩との適合性により、導入の柔軟性が向上
- ACQUITY Premier システムによって一貫した性能が実現し、アッセイ結果が改善される

はじめに

IEX は、分析種と吸着剤または固定相の間の電荷の相互作用に基づく手法です。タンパク質の場合、アミノ酸の官能基に関連する表面電荷とその修飾が、反対の電荷を示す活性吸着部位と協調的に相互作用します。これにより IEX は、バイオ医薬品に関連する、製品/プロセス関連のチャージバリエーションを分離する有用な手法になります^{1,2}。IEX での分析種の溶出は多くの場合、塩濃度を高めて固定相の活性部位への分析種の吸着を抑制して分析種のモビリティを達成する、塩濃度勾配に基づくメカニズムで行われます。ただし、塩濃度勾配に基づくメソッドには、高塩濃度のバッファーや揮発性の塩の使用によるイオン化抑制があるために、これらのメソッドは MS と適合しないことが多い欠点があります。この点で、塩濃度勾配に基づくメソッドは光学的検出に限定され、そのため得られる有用な情報の量が限られます。これの代替は、pH を使用して分析種を溶出する方法です。この場合、イオン強度を一定に保ち、移動相の pH を変えることでタンパク質や吸着部位の電荷を操作します。これらのアプローチは、チャージバリエーションに関する情報がより多く得られる MS 検出との適合性のため、より魅力的です。ただし、許容可能な分離および MS 検出器レスポンスが得られる適切なバッファーを見つけることが、困難に課題になる場合があります。

最近、ウォーターズでは、バイオ医薬品の分析に関連する課題に対処するように特別に設計された製品を投入して、ポートフォリオを拡大しています（図 1A）。これらの製品の一環として、IonHance CX-MS 濃縮液および BioResolve CX pH 濃縮液は、バイオ医薬品の分析での革新的な一歩になっています。これらの特別に設計されたバッファーは、すぐに使用できる事前調合済みの 10 倍濃縮液として出荷されます。この濃縮液は、希釈すると幅広い範囲にわたって直線的な pH レスポンスを示すように設計されており（図 1B）、IEX ベースの分析に適しています。この試験では、mAb バイオ医薬品に関連するチャージバリエーションの分析におけるこれらの製品の価値を実証し、医薬品の開発と製造を加速するためにこれらを導入する方法に焦点を合わせています^{3,4}。

A)



B)

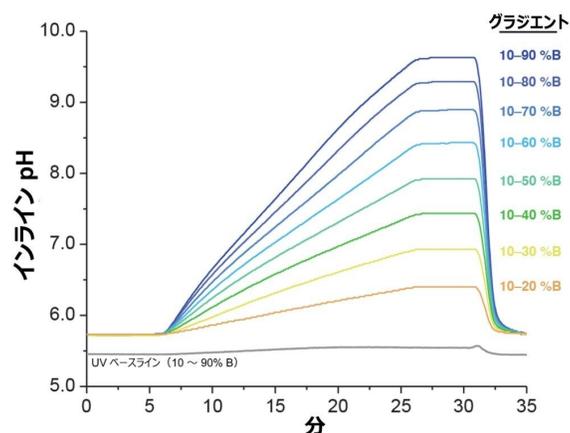


図 1. バイオ医薬品分析の加速

A) バイオ医薬品の分析に対するウォーターズの転機をもたらすアプローチにより、BioAccord システム、BioResolve 製品ライン、ACQUITY Premier テクノロジーなどの製品イノベーションが生まれました。

B) Waters CX pH 濃縮液のインライン pH 測定で、グラジエントに基づく直線性の比例した応答が認められました。

実験方法

塩化ナトリウム、MES 一水和物、MES 塩は、Fisher Chemical から購入しました。インフリキシマブ製剤レミケード (Remicade™) およびその承認済みバイオシミラー Renflexis™ は、Amerisource Bergen から購入し、製造者の指示に従って投与濃度 (10 mg/mL) に調製し、そのまま注入しました。

BioAccord LC-MS システムの条件

LC システム:	ACQUITY Premier システム (BSM の改良版)
検出:	ACQUITY TUV、FC = Ti 5mm、 $\lambda = 280、214 \text{ nm}$
バイアル:	QuanRecovery™ MaxPeak™ バイアル (製品番号 : 186009186)

カラム:	BioResolve SCX mAb カラム、3 μ m、2.1 mm \times 100 mm (製品番号: 186009056)
カラム温度:	40 $^{\circ}$ C
サンプル温度:	10 $^{\circ}$ C
注入量:	2 μ L
流速:	0.100 mL/分
移動相 A:	IonHance CX-MS pH 濃縮液 A (製品番号: 186009280)
移動相 B:	IonHance CX-MS pH 濃縮液 B (製品番号: 186009281)
RDa 設定:	
イオン化モード:	ESI+
取り込みモード:	フルスキャン
取り込み範囲:	高 (m/z 400 ~ 7000)
スキャンレート:	1 Hz
キャピラリー電圧:	1.5 kV
コーン電圧:	125 V
脱溶媒温度:	350 $^{\circ}$ C
Intelligent Data Capture:	有効

クロマトグラフィーソフトウェア:

waters_connect の UNIFI™ アプリケーション
v2.1.2.4

グラジエント (IonHance CX-MS 濃縮液)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.100	54.3	45.7	初期条件
45.00	0.100	40.0	60.0	6
46.00	0.100	2.0	98.0	6
49.00	0.100	2.0	98.0	6
50.00	0.100	54.3	45.7	6
70.00	0.100	54.3	45.7	6

ACQUITY Premier LC/UV の条件

LC システム:

ACQUITY Premier システム (QSM の改良版)

検出:

ACQUITY TUV、FC = Ti 5mm、 $\lambda = 214、280 \text{ nm}$

バイアル:

QuanRecovery MaxPeak バイアル (製品番号
: 186009186)

カラム:

BioResolve SCX mAb カラム、 $3 \mu\text{m}$ 、 $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$
(製品番号: 186009056)

カラム温度:

$40 \text{ }^\circ\text{C}$

サンプル温度:

$10 \text{ }^\circ\text{C}$

注入量:

$1 \mu\text{L}$

流速:	0.100 mL/分
移動相 A:	BioResolve CX pH 濃縮液 A (製品番号 : 186009063) または 20 mM MES バッファー、pH 6.7
移動相 B:	BioResolve CX pH 濃縮液 B (製品番号 : 186009064) または 20 mM MES バッファー、200 mM NaCl 含有、pH 6.7
移動相 C:	H ₂ O
移動相 D:	H ₂ O
クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower™ 3、FR4

グラジエント (BioResolve CX pH 濃縮液)

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	初期条件
45.00	0.100	61.0	39.0	0.0	0.0	6
46.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
49.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
50.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6
70.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6

グラジエント（20 mM MES バッファー、pH 6.7）

時間	流速 (mL/分)	%A	%B	%C	%D	曲線
初期条件	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	初期条件
38.00	0.100	72.0	28.0	0.0	0.0	6
39.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
44.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
45.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6
70.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6

結果および考察

UV ベースの IEX チャージバリエーション分析は、プロセス制御の支援や製造環境でのモニタリングアッセイとして、ならびに安定性試験や製剤試験でのスクリーニングアッセイとして、後期段階の開発で頻繁に導入されます。UV ベースのアッセイを使用する場合、結果から有用な推論を行うために、チャージバリエーションに関する既存の知見や経験の実験が必要です。この例として、mAb ベースの治療薬レミケードの UV クロマトグラムが、図 2A に示されています。この場合、医薬品の一方または両方の C 末端リジン残基（ピーク 1～3）が切断されています。IEX クロマトグラフィーでは、アミノ酸残基リジンによって分け与えられる電荷によって、これらの分子種を分離できますが、予備知識を持っていない場合、あるいは直接に実験を行わないと、どのピークがどの切断分子種に対応するかは、必ずしもわかりません。一方、この分析に MS ベースのアプローチを採用すると、追加の実験の必要なしで、切断分子種の直接質量情報が得られます。

このことを実証するため、図 2A に示されているように、BioAccord LC-MS システムで IonHance CX-MS pH 濃縮液を使用して IEX 分離を行い、BioResolve SCX mAb カラムで 0.3% B/分のグラジエントを使用して、チャージバリエーションを分離しました。光（TUV）検出器と MS（RDa）検出器を直列に接続して、チャージバリエーションのデュアル検出を行いました。3つの主要ピークの MS スペクトルデータのデコンボリューションが、図 2B に示されています。デコンボリューション済みスペクトルを見ると、各ピークのスペクトルに +128 Da の質量シフトが観察され、リジン残基が付加されていることが示されました。これによって切断分子種を質量によって直接同定することができ、ピーク 1～3 はそれぞれ 0 個、1 個、2 個のリジン残基の存在に対応します。MS ベースの IEX 分析のメリットは、リジンの切断分子種を同定できるではありません。図 2C に示されているように、質量情報を使用してサンプル間または医薬品間の違いを識別できます。この例では、UNIFI アプリケーションを使用して、イノベーターであるレミケードとそのバイオシミラーの Renflexis を、同じ分離条件を用いてバイナリー比較しました。図 2C に示されているように、デコンボリューション済みスペクトルを比較すると、プロファイルがずれています（破線の円）。質量データをさらに調べると、これらの差はサンプル間のグリコシル化パターンの違いに起因することがわかります。これらの例では、プロセス開発の一環とし

て MS を用いたチャージバリエーションの速やかな評価、および Waters IonHance CX-MS 濃縮液などの製品を使用してこのようなワークフローをいかに円滑に進めることができるかが、実証されています。

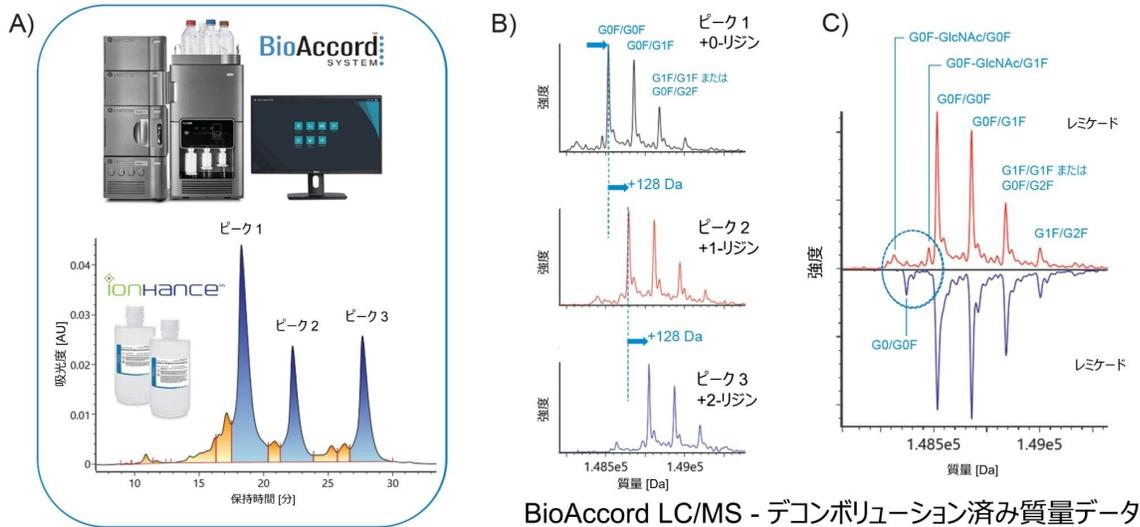


図 2. チャージバリエーションの IEX-MS 分析

A) IonHance CX-MS pH 濃縮液を使用して、BioResolve SCX mAb カラムで分離を行い、BioAccord システムで取り込んだレミケードの UV クロマトグラム。リジンの切断分子種がピーク 1～3 とラベル付けされています。

B) ピーク 1～3 について取り込んだデコンボリューション済み質量データで、+128 Da の質量シフトが観察されました。

C) イノベーターのレミケードとバイオシミラーの Renflexis のデコンボリューション済み質量データのバイナリー比較。質量差は、インタクト mAb のグリコシル化レベルの差として識別されました。

この試験の一環として、BioResolve SCX mAb カラムを、高塩濃度バッファーを使用する従来または旧来のメソッドが導入されている可能性のあるダウンストリームの活動を支援する能力に関して評価しました。そのために、製造環境に導入された LC 構成の代表的な光学検出器 (UV) を備えた ACQUITY Premier システムについて、比較試験を行いました (図 3A)。UV ベースのメソッドとして、IonHance MS pH 濃縮液の代わりに Waters BioResolve CX pH 濃縮液を使用しました。どちらの濃縮液も pH の直線グラジエントを得るように設計されていますが、使用されている試薬の純度と、MS (IonHance CX-MS) 検出または UV (BioResolve CX) 検出用に調合された有効 pH 範囲に、違いがあります。この点を考慮して、BioResolve CX pH 濃縮液を使用した IEX 分離には、0.5 % B/分の変更したグラジエントを使用しました。図 3B に示されているように、BioResolve CX 濃縮液により、IonHance MS-CX 濃縮液と同じ忠実度でレミケードのチャージバリエーションを同等に分離できる pH グラジエントが得られました (図 2A)。さらに、この結果の

高い再現性 (%RSD < 1.0) により、BioResolve CX 濃縮液が安定していて、製造環境に適した頑健な性能を発揮できることが示されています。

最後に、2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) を使用するメソッドが、BioResolve CX pH 濃縮液の結果から派生して得られ、従来の塩ベースのメソッドをサポートする BioResolve SCX mAb カラムの機能が実証されました。図 3C に示されているように、BioResolve SCX mAb カラムは、塩グラジエントを使用した場合のチャージバリエーションプロファイルと再現性 (%RSD < 1.0) の点で同等の結果を示すことができ、より従来型の分離メソッドで、頑健にカラム性能を発揮できることが実証されました。これらの結果により、BioResolve SCX mAb カラムを Waters IonHance CX-MS または BioResolve CX pH 濃縮液と併用することで、ラボ全体に導入できる柔軟な IEX プラットホームが得られ、バイオ医薬品を効果的に開発および製造するための分析法の最適化が加速されることが実証されています。

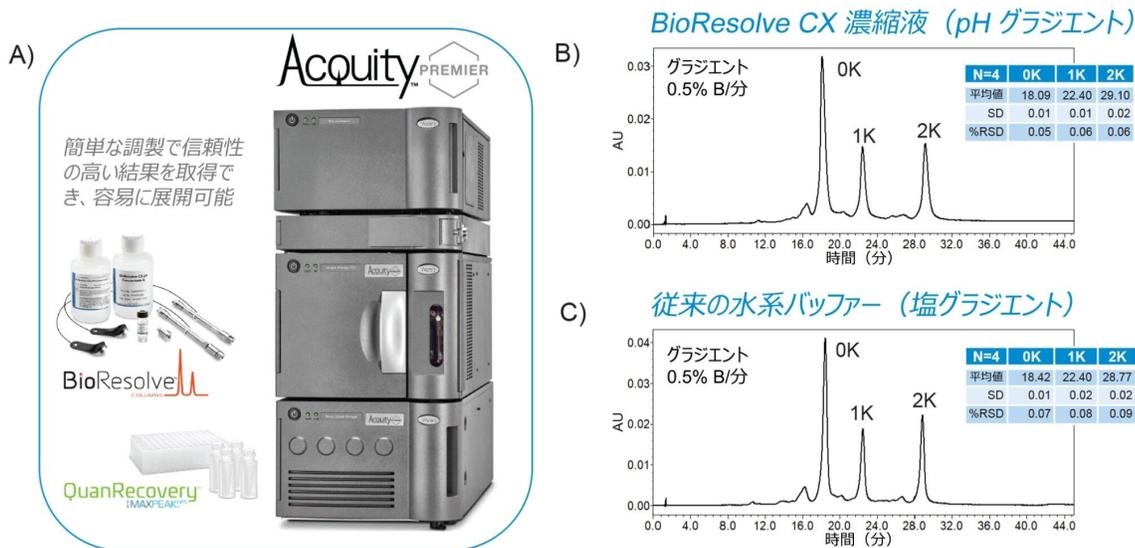


図 3. IEX-UV 比較試験

A) UV 検出器を搭載した ACQUITY Premier システムを使用して、BioResolve SCX mAb カラムで実行された分離から IEX-UV データを取り込みました。

B) BioResolve CX pH 濃縮液を使用した IEX プロファイルは、IEX-MS プロファイルと同等でした (図 2A)。

C) BioResolve SCX mAb カラムでは、高塩濃度グラジエント (MES バッファーおよび 200 mM NaCl) を使用した場合と pH グラジエントを使用した場合とで、プロファイルと再現性に関して同等の結果が得られました。

結論

IEX は、バイオ医薬品の開発および製造プロセスの一環として、製品/プロセス関連のチャージバリエーションを分離する能力のある重要な手法です。この手法のメリットを完全に実現させるために、ウォーターズは、革新的な BioResolve SCX mAb カラムと CX pH 濃縮液でそのポートフォリオを拡張しました。この試験では、BioResolve SCX mAb カラムと IonHance CX-MS pH 濃縮液を併用することで、医薬品を MS で調査し、IEX ベースの分析でチャージバリエーションを直接同定できることが実証されました。さらに、UV ベースの分析に合わせてカスタマイズされた BioResolve CX pH 濃縮液により、これらの分析法をダウンストリームに移行し、バイオ医薬品の製造に関連する開発および製造活動の支援の柔軟性を向上させることができます。

参考文献

1. Fekete *et al.* Ion-exchange Chromatography for the Characterization of Biopharmaceuticals. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015; 113:43–55.
2. Du *et al.* Chromatographic Analysis of the Acidic and Basic Species of Recombinant Monoclonal Antibodies. *mAbs*. 2012 Sep-Oct; 4(5):578–85.
3. Eyer B *et al.* How Similar Is Biosimilar? A Comparison of Infliximab Therapeutics in Regard to Charge Variant Profile and Antigen Binding Affinity. *Biotechnol J*. 2019 Apr; 14(4).
4. Jung *et al.* Physicochemical characterization of Remsima. *mAbs*. 2014; 6(5):1163–77.

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

バイオ医薬品のための BioAccord LC-MS システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <<https://www.waters.com/514228>>

UNIFI 科学情報システム <<https://www.waters.com/134801648>>

[Empower 3 メソッドバリデーションマネージャー \(MVM\) <https://www.waters.com/534328>](https://www.waters.com/534328)
[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007706JA、2022 年 8 月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー](#)
[環境設定](#)