Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

モノクローナル抗体のサイズ排除クロマトグラフィーにおける、ACQUITY Arc システムを用いた HPLC から UHPLC への分析法移管

Brooke M. Koshel and Sean M. McCarthy
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- Arc™ Multi-Flow path™ テクノロジーによる HPLC 分析と UHPLC 分析の再現
- Agilent 1100 シリーズから ACQUITY Arc システムへの SEC-HPLC のシームレスな分析法移管
- 分析法を HPLC から UHPLC へ分析法を更新することによる、生産性向上

はじめに

モノクローナル抗体のようなバイオ医薬品の分析において、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は一般的な分析技術です。SEC は医薬品のライフサイクルにおいて、創薬から商品化までの全過程で用いられます。組織の中でも多数のラボへ、または外部の委託機関へ分析条件が移管されるため、製品の品質と一貫性を保つためラボ間で分析法が同等であることが法規制で定められています。出荷時の他の試験と同様に、分析に用いる装置に頑健性があり複数のラボに分析法を展開しやすいことは重要です。ACQUITY Arc システムは、HPLC と UPLC® の橋渡しとなり、ラボ間でシームレスに分析法を移管します。従来の HPLC の分析条件を容易に再現でき、Arc Multi-Flow Path テクノロジーを利用して、UHPLC 条件への簡便な移管も可能です。本アプリケーションノートでは、モノクローナル抗体を用いた SEC 分析条件を Agilent 1100 シリーズから ACQUITY Arc システムへ移管します。ACQUITY Arc システムにおける再現性を評価した後に、ピーク面積と保持時間を用いて、分析法の同等性を評価します。最終的に、分離向上と分析時間短縮のために、この HPLC 条件を UHPLC 条件に更新します。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY Arc システム

2489 紫外可視光（UV/Vis）検出器

XBridge® Protein カラム

Empower® 3 クロマトグラフィーデータシステム

キーワード

分析法移管、ACQUITY Arc、
SEC、モノクローナル抗体

実験方法

LC条件

LCシステム：	ACQUITY Arc システム （2489 紫外可視光（UV/Vis）検出器、パス 1） Agilent 1100 シリーズ LC システム （クォータナリポンプ、ダイオードアレイ検出器）
検出波長：	280 nm
サンプリングレート：	20 Hz
カラム温度：	30℃
移動相：	0.02 M リン酸ナトリウム、 0.3 M 塩化ナトリウム水溶液、pH 6.8
サンプル温度：	5℃
注入量：	30 µL

HPLC条件

HPLC カラム：	東ソー TSK gel G3000SW$_{XL}$ 250 Å、 5 µm、7.8 mm × 300 mm
流速：	0.5 mL/分
分析時欄：	35 分

UHPLC条件

UHPLC カラム：	XBridge Protein BEH SEC、200 Å、 3.5 µm、7.8 mm × 300 mm
流速：	0.714 mL/分
分析時欄：	24.5 分

データ管理

Empower3 CDS ソフトウェア、SR2

結果および考察

従来の SEC-HPLC 条件を Agilent 1100 シリーズから ACQUITY Arc システムに移管すると、同等で再現性のよい結果が得られます。

Agilent1100 シリーズから ACQUITY Arc システムへの分析法移管を行いました。モノクローナル抗体リツキシマブを移動相にて 1mg/mL に調製し、USP Medicines Compendium（公定書情報）に基づいた SEC 分析条件を用いました。公定書は廃止となりましたが、SEC における業界の典型的な分析条件として用いられています。基準となるクロマトグラムを得るために、東ソーの SEC カラムを Agilent 1100 シリーズの装置に接続してリツキシマブの分析を行いました（図 1A）。続いて、ACQUITY Arc システムのパス 1 流路を用いて全く同じ分析条件で分析を行いました（図 1B）。クロマトグラムを見ると、高いレベルで類似しています。保持時間とピーク面積%も同等です（表 1）。装置の相違による保持時間のずれは約 0.2 分でしたが、面積%が同等であることが重要です。

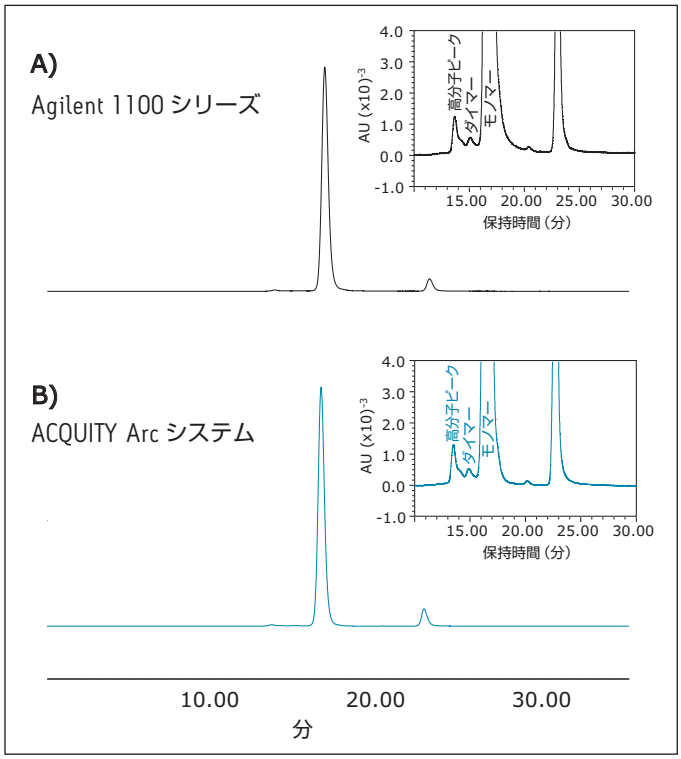

図 1. A) Agilent 1100 シリーズと B) ACQUITY Arc システムで取得した SEC データの比較。挿入図は、ダイマーのピーク・高分子ピークとモノマーの主ピークとの分離を示します。

製品の一貫性が業界のスタンダードとして要求され、適合性要件を満たす必要もあるため、装置の再現性は重要です。図 2 のように、上記の分析条件で取得した繰り返し注入 (N=5) のクロマトグラムはほとんどずれがありません。表 2 に 2 つのシステムによる保持時間、ピーク面積%、分離度をまとめています。

高分離と分析時間短縮に向けた SEC-HPLC から SEC-UHPLC への変更

ACQUITY Arc システムを用いると、HPLC と UHPLC の分析を同じ装置で実施することができます。このメリットを生かすために、東ソー SEC カラムを XBridge Protein BEH SEC カラムに変更しました。充填剤の粒子径を小さくすると、他のパラメーターも変更する必要があります。2 つのカラムの断面積は等しいため、移管後の分析条件での流速 F_2 は下式のように充填剤粒子径の比率に比例します。

$$F_2 = F_1 \times \frac{d_2^2}{d_1^2} \times \frac{d_{p1}}{d_{p2}}$$

F_1 は移管前の分析条件での流速、d_1 と d_2 はそれぞれ移管前後の分析条件でのカラムの内径、d_{p1} と d_{p2} はそれぞれ移管前後の分析条件でのカラム充填剤の粒子径を示します。この式を使うことで、移管後の流速は 0.714 mL/ 分と計算されました。この流速を用いた移管後の分析時間 t_2 は下式によって計算されます。

$$t_2 = t_1 \left(\frac{F_1}{F_2}\right)\left(\frac{d_2^2}{d_1^2}\right)\left(\frac{L_2}{L_1}\right)$$

ここで t_1 は移管前の分析時間、L_1 と L_2 は移管前後のカラム長を示します。移管後の分析時間は 24.5 分となります。この新しい分析条件は USP で許可された調整としてガイドラインを満たすので、SEC 分析条件の再バリデーションは不要です。

システム	保持時間 (分)			ピーク面積 (%)	
	高分子ピーク	ダイマー	モノマー	凝集体	モノマー
Agilent 1100 シリーズ	13.66	15.06	16.69	1.28	98.63
ACQUITY Arc システム	13.49	14.87	16.47	1.29	98.65
Δ	0.17	0.19	0.22	0.01	-0.02

表 1. Agilent 1100 シリーズと ACQUITY Arc システムにおける HPLC-SEC の比較。凝集体は、モノマー・高分子ピークを含む図 1・図 2 でモノマーより早く溶出する全てのピークを指します。全ての結果は 5 回注入の平均値です。

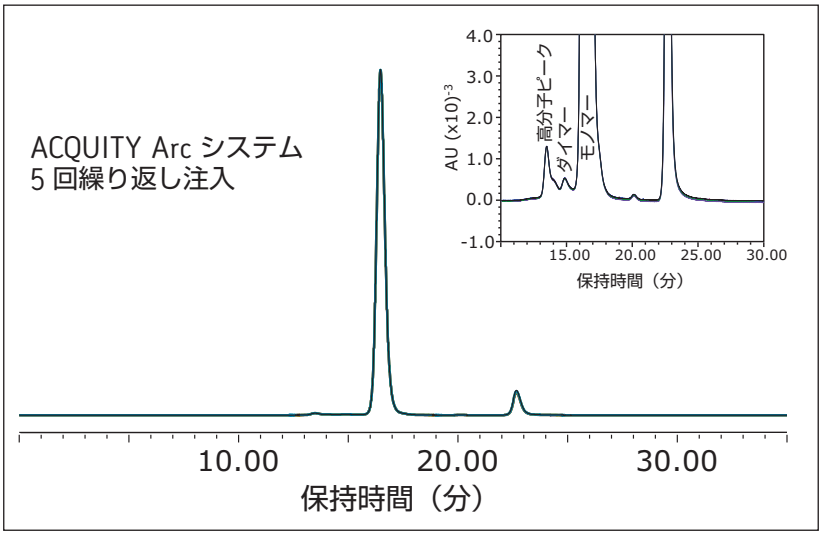

図 2. ACQUITY Arc システムにて分析した 5 回繰り返し注入の重ね書きクロマトグラム。挿入図は、ダイマーや高分子ピークとモノマーの分離を示します。

システム	ピーク面積比 (%)						分離度 (ダイマー - モノマー)		
	凝集体			モノマー			$\bar{x}$	σ	%RSD
	$\bar{x}$	σ	%RSD	$\bar{x}$	σ	%RSD			
Agilent 1100 シリーズ	1.28	0.01	1.04	98.63	0.01	0.01	1.52	0.06	3.92
ACQUITY Arcシステム (HPLC)	1.29	0.01	1.04	98.65	0.01	0.01	1.54	0.03	1.64
ACQUITY Arcシステム (UHPLC)	1.29	0.02	1.49	98.63	0.02	0.02	1.75	0.02	1.26

表 2. Agilent 1100 シリーズと ACQUITY Arc システムでの HPLC 条件・UHPLC 条件の数値比較。凝集体は、モノマー・高分子ピークを含む図 1・図 2 でモノマーより早く溶出する全てのピークを指します。全ての結果は 5 回注入の平均値です。

この UHPLC 分析条件でリツキシマブの分析を行い、HPLC の分析結果と比較しました。HPLC の結果 (図 3A) と UPLC の結果 (図 3B) を比較すると、ダイマーと主ピークとの分離が向上しました。UHPLC では、ピークがシャープになり、溶出時間も早まりました。UHPLC では分離は向上しましたが、凝集体ピークとモノマーのピーク面積比は二つの分析条件で同等でした。この結果、リツキシマブと固定相の間には相互作用が最小限になっており、SEC 分離として理想的な条件であったことがわかります。表 2 で UHPLC と HPLC の分析結果データを比較しています。

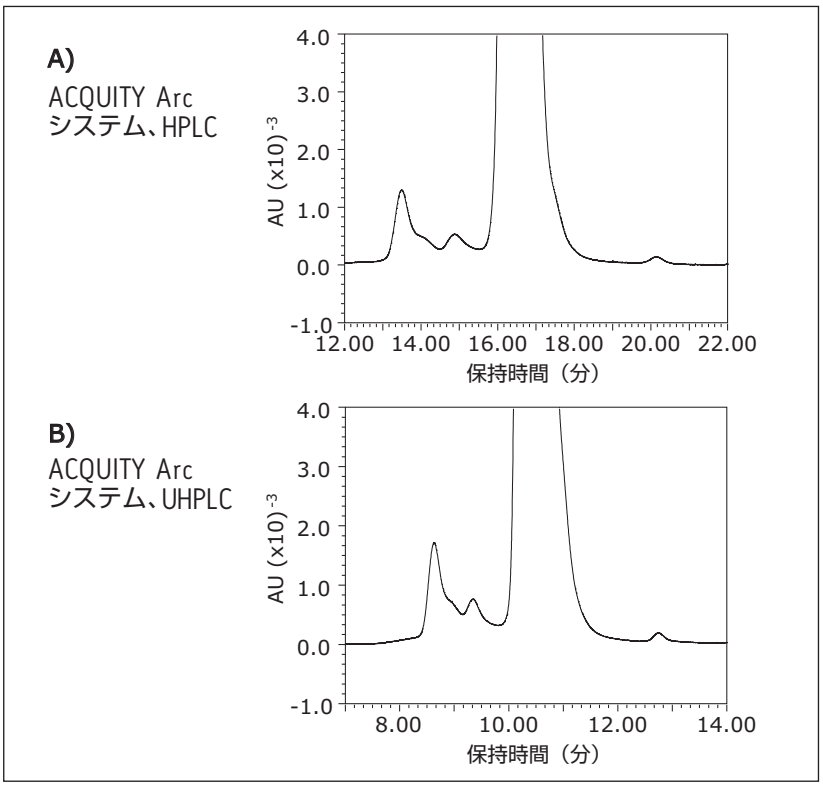

図 3. ACQUITY Arc システムにて取得された HPLC 条件 (A) と UHPLC 条件 (B) での SEC 分析結果の比較。UHPLC での分析結果では、ピークがよりシャープで分析時間が短くなりました。

結論

ACQUITY Arc システムは、従来の HPLC 分析を再現する要求のみならず、UHPLC 分析を導入するニーズにもお応えします。本アプリケーションでは Agilent 1100 シリーズ HPLC から ACQUITY Arc システムへ SEC 分析を、分析条件のパラメーターを変えることなく、再現性良く移管することを示しました。また、ACQUITY Arc システムは、製品の一貫性を証明するために重要である高い再現性を示すと共に、SEC-HPLC から SEC-UHPLC への移管により、ピーク面積%を HPLC の結果と同等に保ちつつ、分離の向上、分析時間の短縮をも実現しました。

参考文献

1. ACQUITY Arc System Brochure. Waters Brochure. 2015 (P/N 720005393EN).
2. U.S. Pharmacopeial Convention <http://www.usp.org/global/medicines-compendium> (accessed March 2015).
3. U.S. Pharmacopeial Convention, General Chapter <621> Chromatography, USP38-NF33. Official from August 1, 2015.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、XBridge、Empower、UPLC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
Multi-flow path および Arc は Waters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2016 Waters Corporation. Produced in Japan. 2016年3月 720005510JA PDF