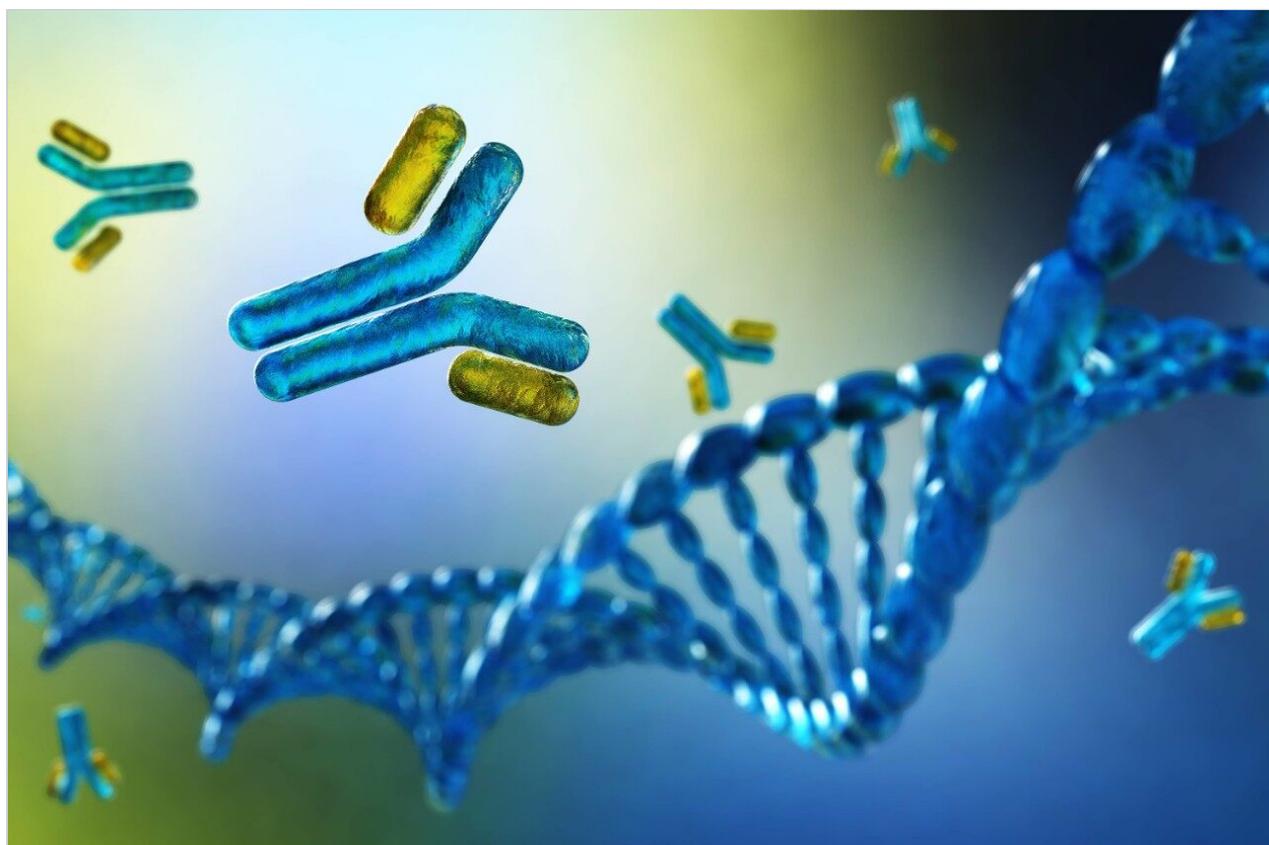


## UPLC、UHPLC、HPLC クロマトグラフィーシステムで BioResolve SEC mAb カラムを使用した、mAb 凝集体、モノマーおよびフラグメントの高分離能サイズ排除クロマトグラフィーセパレーション

---

Pamela C. Iraneta, Stephan M. Koza

日本ウォーターズ株式会社



研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

---

## 要約

Waters BioResolve SEC mAb、200 Å、2.5 µm カラムは、モノクローナル抗体 (mAb) の凝集体、モノマー、フラグメントの高分離能のセパレーション用に最適化されており、QC テスト済みです。mAb サイズバリエーション標準試料は、カラム性能の証明に使用され、必要な mAb サイズバリエーションの定量で頑健な分離が行えるシステムおよびカラムの選択に役立ちます。このカラムは、mAb 用に開発およびテストされていますが、分子量が約 450 kDa ~ 17 kDa のタンパク質サイズバリエーションの SEC 分離にも同等に検討できます。

内径 7.8 mm のカラムは、UPLC、UHPLC、HPLC プラットホームでの、mAb フラグメント (約 100 kDa) からの mAb モノマー (約 150 kDa) の分離で、最大の効率が得られることが示されています。内径 4.6 mm のカラムは、低拡散 UPLC システムや、バンド拡散がより大きい UHPLC または HPLC クロマトグラフィープラットフォームを用いた mAb 凝集体のモノマーからの分離など要求が厳しくない分離において、内径 7.8 mm のカラムに比べてより経済的で、正確な定量ができる同等の性能を備えます。

製造された各 BioResolve SEC mAb カラムの性能は、IdeS 消化済み NISTmAb フラグメントが含まれている Waters NIST mAb ベースのサイズバリエーション標準試料でテストされています。これらのカラム性能確認試験は、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムを使用して実施します。このアプリケーションノートでは、LC のバンド拡散ボリュームが、選択した SEC カラムの内径および長さに基づいて、mAb の分離にどのように影響するかが示されています。

## アプリケーションのメリット

- BioResolve SEC mAb カラムの性能は、Waters mAb サイズバリエーション標準試料を使用して個別にテストされており、mAb の分析にすぐに使用できることが保証されています
- 適切な内径および長さのカラムを使用して、UPLC、UHPLC、HPLC システムで高分離能セパレーションを実現できます
- Waters mAb サイズバリエーション標準試料を使用して個別に SEC カラムの性能試験を実施することにより、mAb サイズバリエーションの信頼性の高い定量に必要な分離能が得られることへの信頼性が向上します

---

## はじめに

水系サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の重要性はこれまで、遺伝子組換えタンパク質ベースのバイオ医薬品の有効性と安全性を確保するための、タンパク質凝集体および自己集合型 (高分子量分子種、HMWS) の相対定量について、十分確立されていることです<sup>1</sup>。近年、非変性 SEC でのモノクローナル抗体 (mAb) フラグメント (低分子種、LMWS) の定量に対する関心が高まっています。フラグメンテーションの原因は、酵素や宿主細胞のタン

パク質によるものではなく、重鎖上部ヒンジ領域での金属イオンに誘導された動的な加水分解切断にあるようです。その結果、Fabフラグメント（約 50 kDa）、単一の Fab ドメインがある Fc（Fab/c、約 100 kDa）、および両方の Fab ドメインが加水分解された場合に低レベルの Fc フラグメントが生成されます<sup>2</sup>。

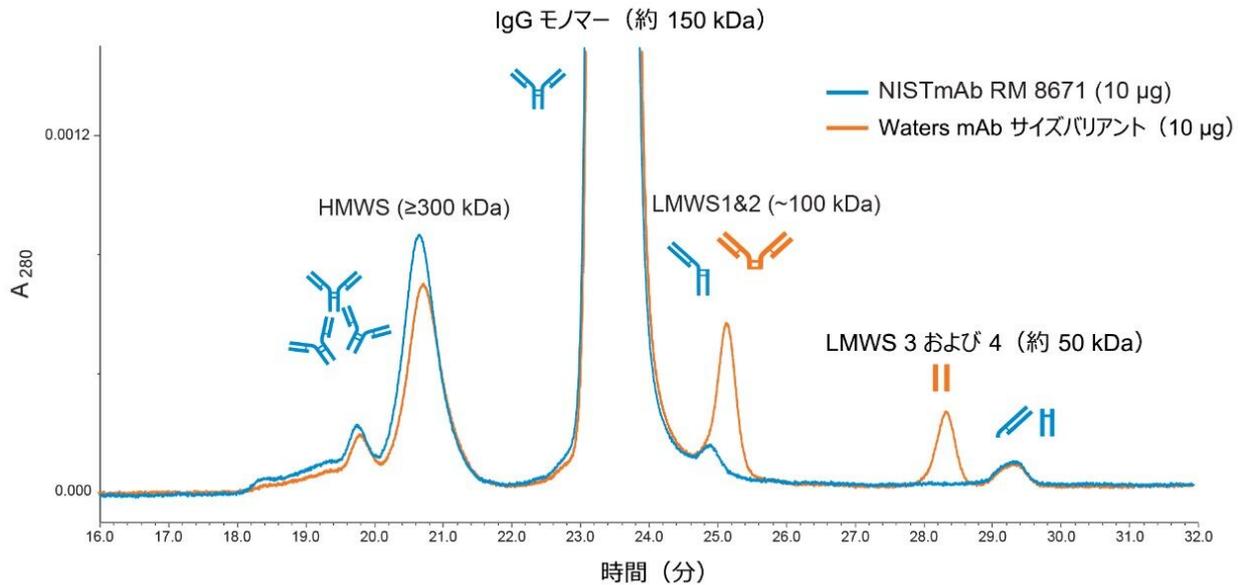


図 1. BioResolve SEC mAb、200 Å、2.5 µm、7.8 × 300 mm カラムを使用した、NISTmAb RM 8671 および Waters mAb サイズバリエーション標準試料の mAb 凝集体、モノマー、およびフラグメントの分離。LMWS:  $F(ab')_2$  および  $Fc/2)_2$  IdeS フラグメント（オレンジ）。Fab/c、Fab、Fc 加水分解フラグメント（青）。条件：室温、0.3 mL/分

メインの mAb モノマー（約 150 kDa）からの HMWS（ $\geq 300$  kDa）の分離は一般に、モノマーにサイズが近く、モノマーのテールで溶出し、通常存在量が少ない Fab/c フラグメントの分離と比べて、はるかに容易であることがわかります（図 1）。ただし、LC システムの改善、効率の良い SEC カラム、さらに、LC のバンド拡散が成分の分離にどのように影響するかをよりよく理解することにより、これらのさまざまな mAb 形態の信頼性の高い分離を達成できる能力が高くなっています<sup>3</sup>。

各 BioResolve SEC mAb カラムの性能は、低拡散 LC システムで、mAb サイズバリエーション標準試料を使用してテストされており、その機能が示されています。観察される分離のクロマトグラフィー効率、クロマトグラフィーシステムの各コンポーネント（インジェクター、チューブ、カラム、検出器）の影響を受けます。このアプリケーションノートでは、観察される分離のクロマトグラフィー効率でのカラムサイズ（内径（I.D.）および長さ）とバンド拡散との関係を示す、さまざまな LC システムの一連のクロマトグラムが示されます。内径 7.8 mm 長さ 300 mm のカラムは、最新の LC のバンド拡散とは無関係に、高分離能セパレーション、および凝集体、モノマー、フラグメントの正確な定量を達成しました。

## 実験方法

バンド拡散は、50/50 アセトニトリル/水で希釈した 0.16 mg/mL カフェインを使用して測定しました（UPLC 吸光度試験溶液キット、製品番号：[700002642](#) <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=700002642>>、溶液 7）。移動相は 50/50 アセトニトリル/水（v/v）で、流速は 0.5 mL/分でした。カラムの代わりにゼロデッドボリュームユニオン（製品番号：[700002636](#) <<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=7200002636>>）を使用しました。平衡化時間 10 分間の後、ブランク移動相を 3 回注入し、続いて 1～2 分間の実行時間で 0.5  $\mu$ L のカフェインを 5 回連続して注入しました。カフェインの 4.4% でのピーク幅（5 $\sigma$  ピーク幅）の値を平均しました。平均値に 500  $\mu$ L/分を掛けて、報告した 5 $\sigma$  カラム外拡散（5 $\sigma_{ec}$ ）ボリュームを求めました。3 つのシステム（4 つの構成）の拡散データが表 1 に示されてます。

LC システム	システム容量（ $\mu$ L）	4.4% での 5 $\sigma$ W（ $\mu$ L）	USP テーリング
1) CH-A を装着した ACQUITY UPLC H-Class Bio	16.8	10	1.25
2) CH-30A を装着した ACQUITY UPLC H-Class Bio	22.6	13	1.33
3) 30 cm CH を装着した CHACQUITY Arc Bio	43.4	30	1.37
4) CH を装着した Alliance HPLC	61.6	49	1.66

表 1. LC システムのバンド拡散特性。

### サンプル前処理：

Waters mAb サイズバリエーション標準試料（製品番号：[186009284](#) <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186009284>>）には 160  $\mu$ g の安定化して凍結乾燥した NISTmAb RM8671 が含まれており、これには 2  $\mu$ g の非還元 IdeS 消化 NISTmAb フラグメント（F(ab')<sub>2</sub> および (Fc/2)<sub>2</sub>）が添加されています。各バイアルの凍結乾燥した内容物は、70  $\mu$ L の MilliQ 水を使用して溶解しました。

### 分析条件

#### LC 条件

システム：

ACQUITY UPLC H-Class Bio、5 $\sigma$  バンド拡散 = 10  $\mu$ L、13  $\mu$ L

ACQUITY Arc Bio、5 $\sigma$  バンド拡散 = 30  $\mu$ L

	Alliance HPLC、5 $\sigma$ バンド拡散 = 49 $\mu$ L
検出器:	ACQUITY UPLC H-Class Bio 用 5mm Ti フローセルを装着したチューナブル紫外線 (TUV)、ACQUITY Arc Bio および Alliance 用 10mm バイオイナートフローセルを装着した 2489 UV/Vis
検出:	280 nm、10 Hz、高速フィルター
バイアル:	マキシマムリカバリーサンプルバイアル (製品番号: 186000327C)
カラム:	BioResolve SEC mAb、200 Å、2.5 $\mu$ m、 4.6 mm $\times$ 150 mm (製品番号: 176004592*) 4.6 mm $\times$ 300 mm (製品番号: 176004593*) 7.8 mm $\times$ 150 mm (製品番号: 176004594*) 7.8 mm $\times$ 300 mm (製品番号: 176004595*)  * カラムおよび付属バイアル 1 本 (mAb サイズバリエーション標準試料入り) が含まれます
カラム温度:	35 °C アクティブプレヒーター CH-A (ACQUITY UPLC H-Class)、CH-30A (ACQUITY UPLC H-Class)、および対流式ヒーター 30-cm CH (ACQUITY Arc)、CH (Alliance)
サンプル温度:	8 °C
サンプル:	2.28 mg/mL Waters mAb サイズバリエーション標準試料
サンプル注入量:	可変: 1.8、3.5、5、または 10 $\mu$ L、カラム構成 (内径および長さ) により異なる

流速:	0.200 mL/分 (内径 4.6 mm 用) /0.575 mL/分 (内径 7.8 mm 用)
シール洗浄溶媒:	10% メタノール (HPLC グレード) /90% 18.2 MΩ 水 v/v (シール洗浄間隔を 0.5 分に設定)
サンプルマネージャ洗浄液:	18.2 MΩ 水
移動相 A:	50 mM リン酸ナトリウム pH 7.0、200 mM KCl
移動相 B および C:	18.2 MΩ 水
移動相 D:	10% アセトニトリル/90% 25 mM リン酸ナトリウム pH 7.0+ 100 mM 塩化カリウム
シリンジ吸引速度:	30 μL/分
ニードル配置:	1.0 mm
エアギャップ:	なし
データチャンネル:	ACQUITY TUV ChA 280 nm。システム圧力、室温
移動相 A:	水 1 L あたり、無水二塩基性リン酸ナトリウム 2.66 g、リン酸一塩基性リン酸カリウム一水和物 4.36 g、塩化カリウム 14.91 g を混合し、滅菌済み 0.2 μm ナイロンフィルターユニットを使用してろ過して (ろ過済み移動相は pH 6.9) 調製します
クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower 3 FR 3.0

---

## 結果および考察

SEC は、クロマトグラフィーのユニークでチャレンジングな形態です。理想的な条件下 (分析法開発が必要) では

、固定相との相互作用がないか最小限に抑えられた状態で、タンパク質がカラムを通過して移動します。保持はなく、充填剤の多孔質構造内に特別に設計されたポアサイズによってもたらされるサイズ妨害によって発生する拡散による分離のみ。結果として、分析種がインジェクターから検出器に移動する際に分析種ゾーンに発生するバンドの拡散量が、SEC の分離能に大きく影響します。mAb 凝集体 (HMWS) およびフラグメント (LMWS) の SEC 分析でのバンド拡散の影響、および分離でのカラム外拡散の影響の掘り下げた評価については、以前に公開されたアプリケーションノートを参照してください。<sup>4,5</sup>。

## バンド拡散の測定

バンド拡散実験を実施してバンド拡散を評価する場合、SEC が目的の分析である場合は、ピーク幅がピーク高さの 4.4% の位置でバンドの広がりを測定することが重要です。分離して定量する不純物の多くは、ピーク高さがメインピークの高さの 4.4% を大きく下回っています (図 2)。メインの mAb ピークの 5 $\sigma$  効率および USP テーリング係数での LC のバンド拡散の影響が、約 100 kDa のフラグメントの分離の達成に重要な役割を果たします。これらのデータはカラムの不具合やバンド拡散の問題の潜在的な指標であるため、分析法開発中にこれらのパラメーターを文書化することは役に立ちます。結果的に、この分析のデータを標準的な手順に組み込んで、貴重なサンプルを分析する前に、カラムとシステムが目的に適合していることを確認する役に立てることができます。

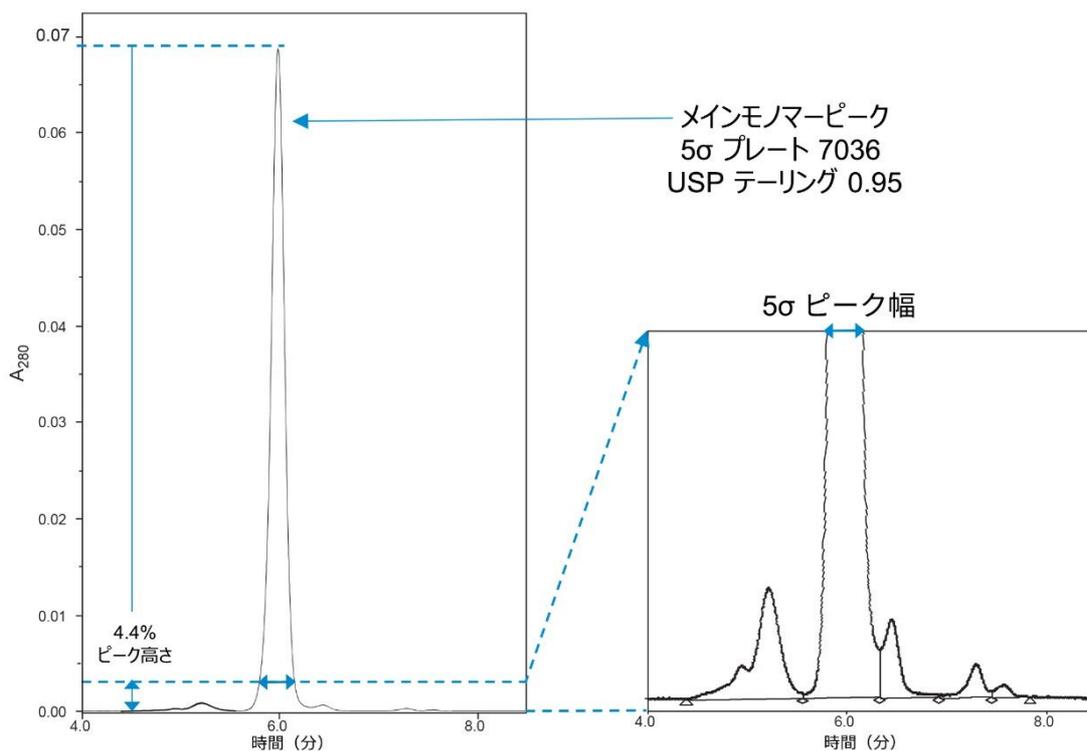


図 2. ACQUITY UPLC H-Class Bio システムおよび BioResolve SEC mAb、4.6 × 150 mm カラムを用いた Waters mAb サイズバリエーション標準試料の分離。条件は実験セクションに記載されています。

Waters mAb サイズバリエーション標準試料を使用して、以下に示す 4 つのカラムそれぞれのクロマトグラフィー性能でのさまざまなバンド拡散の影響を、体系的に調査しました。同じカラムを各システムで評価しました。すべての評価の前後にカラムを確認し、その性能が維持されていることを確認しました。BioResolve SEC mAb カラムの箱に入っている個々の品質レポートクロマトグラムは、基本的に以下の例に示す ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで生成されるものと同じです。

これらの実験では、4 つのサイズの BioResolve SEC mAb カラム (4.6 × 150 mm、4.6 × 300 mm、7.8 × 150 mm、7.8 × 300 mm) を、比較的最新の 3 つの LC システムで使用しています。

- 拡散が最小 (UPLC) のシステムは ACQUITY UPLC H-Class Bio であり、長さ 150 mm のカラムヒーター (CH-A) 付きでは拡散が 10  $\mu\text{L}$  5 $\sigma_{\text{ec}}$ 、長さ 300 mm のカラムヒーター (CH-30A) 付きでは拡散が 13  $\mu\text{L}$  5 $\sigma_{\text{ec}}$  で、どちらもアクティブプレヒーティング付きです。
- 拡散が中程度 (UHPLC) のシステムは ACQUITY Arc Bio であり、拡散は 30  $\mu\text{L}$  5 $\sigma_{\text{ec}}$  でした。すべてのカラムで、30 cm 強制対流式カラムヒーター (30 cm CH) を使用しました。
- 拡散が最大 (HPLC) のシステムは Alliance であり、拡散は 49  $\mu\text{L}$  5 $\sigma_{\text{ec}}$  でした。すべてのカラムで、強制対流カラム式ヒーターボックスを使用しました。

内径 7.8 mm のカラムのクロマトグラフィー結果が図 3 に、内径 4.6 mm のカラムのクロマトグラフィー結果が図 4 に示されています。

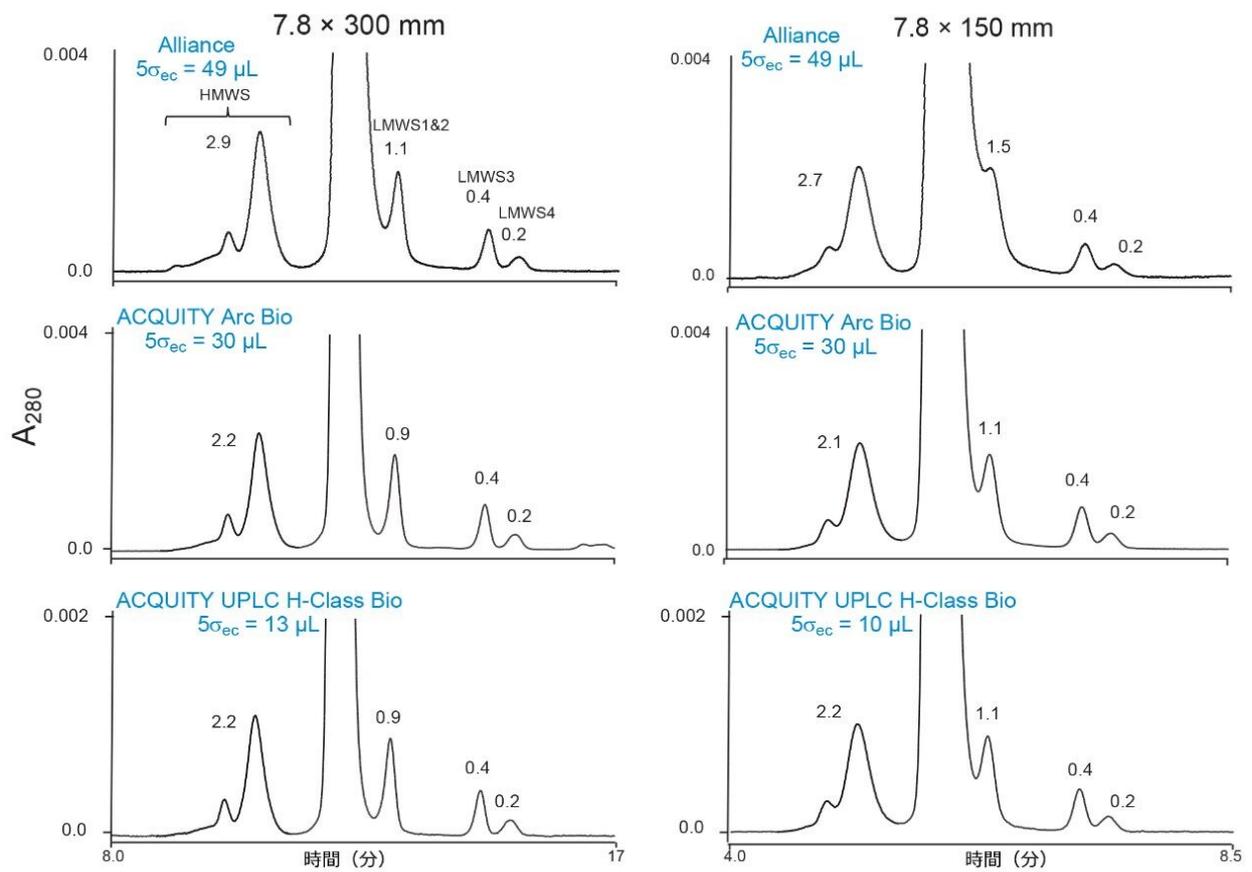


図 3. バンド拡散が 49 μL (Alliance)、30 μL (ACQUITY Arc)、および 10 または 13 μL (ACQUITY UPLC H-Class) の LC システム、並びに 7.8 × 300 mm と 7.8 × 150 mm の *BioResolve SEC mAb* カラムを用いた *Waters mAb* サイズバリエーション標準試料の分離。各クロマトグラムについて面積の割合が報告されています。条件は実験セクションに記載されています。

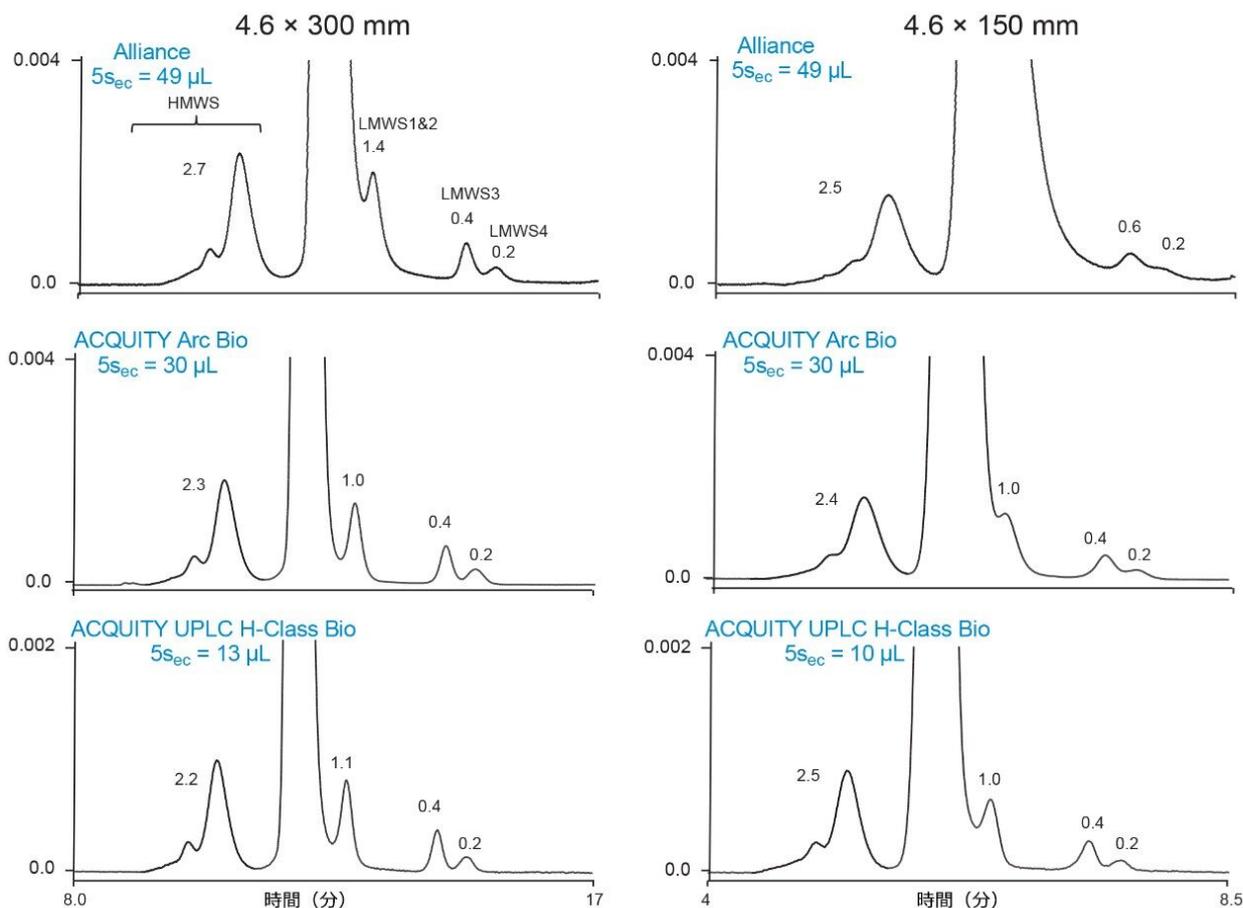


図 4. バンド拡散が 49 µL (Alliance)、30 µL (ACQUITY Arc)、および 13 または 10 µL (ACQUITY UPLC H-Class) の LC システム、並びに 4.6 × 300 mm と 4.6 × 150 mm の BioResolve SEC mAb カラムを用いた Waters mAb サイズバリエーション標準試料の分離。各クロマトグラムについて面積の割合が報告されています。条件は実験セクションに記載されています。

クロマトグラフィーの結果をレビューする前に、Waters mAb サイズバリエーション標準試料のさまざまな成分を考慮することが重要です。市販の mAb 医薬品中の低分子量分子種の成分の割合は一般に非常に低く、製品バッチ間でばらつきがあるため、このようなサンプルを標準試料として使用するの、好ましいことではありません。この欠点に対処するために、ウォーターズは mAb サイズバリエーション標準試料を作成しました。標準試料の各バイアルには、160 µg の米国標準技術研究所 (NIST) mAb 標準物質 (RM) 8671 が含まれており、IdeS (FabRICATOR®) 消化済み NISTmAb 2 µg が添加されています。図 5 に、mAb サイズバリエーション標準試料のさまざまな成分のソースが説明されています。クロマトグラム (図 5b) から分かるように、NISTmAb に内在する約 100 kDa の Fab/c フラグメントは、IdeS によって生成された約 100 kDa の F(ab')<sub>2</sub> フラグメントよりわずかに早く溶出しています。溶出順序は流体力学的ボリュームの差異とみなされるため、Fab/c は、F(ab')<sub>2</sub> と比較して、モノマーから分離することが困難になります。NISTmAb RM 8671 中の Fab/c について示された分離度を達成するために、7.8 ×

300 mm の BioResolve SEC mAb カラムを低流速 (0.3 mL/分) で使用しました。詳細については、mAb Size Variant Standard care and use manual (『mAb サイズバリエーション標準試料取扱説明書』) (製品番号: [720006811EN](https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135068415&type=USRM) <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=135068415&type=USRM>>) を参照してください。NISTmAb RM 8671 の詳細については、nist.gov を参照してください。<sup>6</sup>。

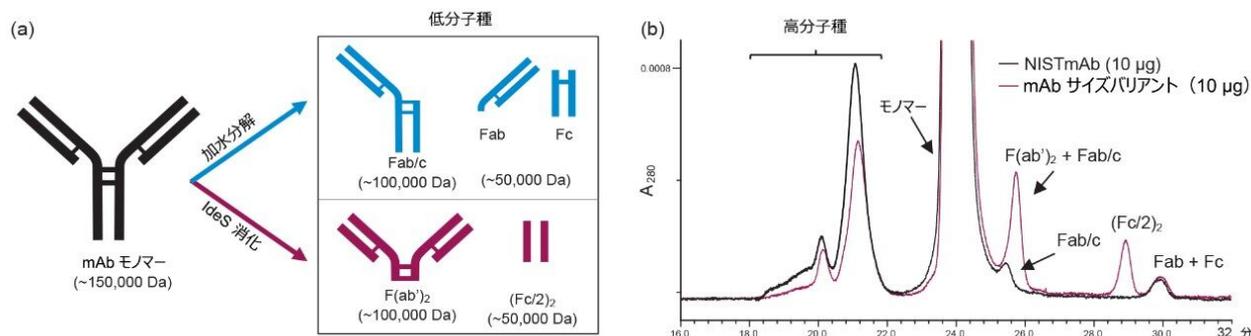


図 5. (a) および (b) の mAb の図は、インタクトモノマーと NISTmAb および mAb サイズバリエーション標準試料で検出されたフラグメントの違いを示しています。NISTmAb の代表的な  $A_{280}$  SEC クロマトグラム (黒色のトレース) と改良型 mAb サイズバリエーション標準試料 (赤色のトレース)。モノマーに加えて、高分子種と低分子種の両方を表示するためにトリミングされています。F(ab')<sub>2</sub> と Fab/c は、流体力学的ボリュームが類似しているため、分離されていません。データは、BioResolve SEC mAb、200 Å、2.5 µm、7.8 × 300 mm カラムを使用して、室温で流速 0.3 mL/分で、280 nm の吸光度で測定して収集しました。

図 3 の内径 7.8 mm のカラムでの mAb サイズバリエーション標準試料の分離に示されているように、HPLC、UHPLC、UPLC システムと 7.8 × 300 mm カラムで得られた HMWS、メイン、フラグメントの各ピークの間隔度がクロマトグラム上で非常に類似していることがわかります。7.8 × 150 mm の短いカラムでは、予測されたように低分離度の分離ですが、HPLC システムでの LMWS1 および 2 についての性能が目に見えて低下していることも示されています。HMWS は、3 つの LC システムでの両方の内径 7.8 mm のカラムで十分に分離されています。

図 3 の 7.8 × 150 mm カラムは、UPLC システムで LMWS1 および 2 に対して十分な分離能を示していると思われるかもしれませんが、LMWS1 および 2 のピーク面積のほとんどは、添加した IdeS によるフラグメント F(ab')<sub>2</sub> によるものであることを理解することが重要です。前述したように、このフラグメントは、自然界に存在する Fab/c フラグメントよりもわずかに小さい (つまり、わずかに良く分離されている) ように見えます (図 5)。

図 4 の内径 4.6 mm のカラムにバンド拡散が及ぼす影響は、前述の内径 7.8 mm のカラムの場合とは異なっています。LMWS1 および 2 は、3 つのシステムすべてで 4.6 × 300 mm のカラムで分離されており、バンド拡散が増加すると、明らかに分離度が低下しています。この傾向は、カラム長が 150 mm の場合にさらに顕著です。異なる LC システムでの 4.6 × 300 mm カラムでは、HMWS の分離に大きな変化は見られませんが、バンド拡散が増加すると、カラム長 150 mm では HMWS の分離がわずかに低下しています。

## 凝集体の分離度

図3および図4のクロマトグラムで目視で認められた傾向を、Empower システムスタビリティパラメーターを使用して定量しました。凝集体の分離では、50% 高さ (HH) での USP 分離度を使用して、これらのカラムの3つのシステムにわたって、メインのモノマーピークとダイマーの間の分離の品質を評価しました。ベースライン分離についてよく言われる値 1.5 は、ほとんどの実際のクロマトグラフィー分離には無関係です。実際のサンプルが許容できる分離として採用される基準値は、1.75 ~ 2.0 です<sup>7</sup>。この高い値へのシフトは、ピークの非対称性の影響および SEC 分離で見られる異なる面積の影響によるものです。<sup>7</sup>。図6では、ダイマーのメインピークの高さについて、4.6 × 150 mm カラムを除くすべてのカラムで、3つの LC システムにわたって分離度が基本的に同じであることがわかりました。3つの LC システムにわたって 4.6 × 150 mm カラムで得られた分離度が 26% 低下しても、多くの凝集体分析で、許容できるレベルを上回っています。

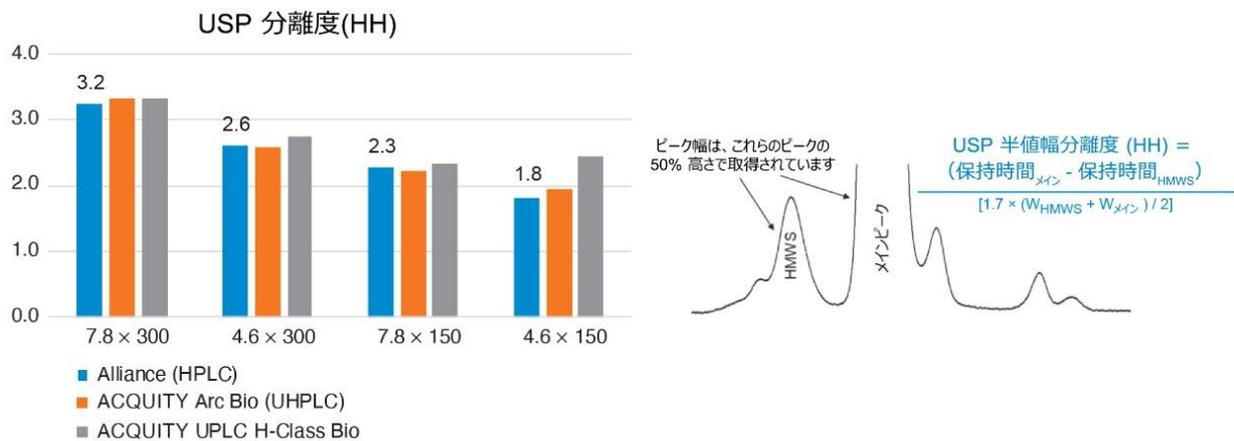


図 6. 3つの LC システムにわたる 4 カラムセットのダイマーメインピークの USP 分離度 (HH) のデータ。分離度の式が示されています。条件は実験セクションに記載されています。

## フラグメントの分離度

LMWS1 および 2 の分離度を定量的に測定して比較するには、別の種類の分離度の尺度 (ピーク対谷比 (p/v)) が必要です。図7に示す p/v パラメーターは通常、異なる面積のピークの間や、溶出位置が非常に近くで (部分的に共溶出)、従来使用されていた分離度の式から分離度の値が得られない場合に、分離の品質を定量的に使用されます。p/v の値を使用すると、フラグメント分析など、非常に困難な分離の定量評価が可能になります。SEC で近接して溶出するピークの定量に  $p/v \geq 2.0$  の基準を使用した例が、インスリンの USP 薬局方モノグラフに記載されています<sup>8</sup>。USP インスリンモノグラフでは、インスリンサンプル中の高分子タンパク質 (HMWP) の相対量を定量する際に、末端  $p/v \geq 2.0$  が必要です<sup>8</sup>。USP 分離度 (HH) 値は、本研究のすべてのカラム構成/システムの組み合わせで使用できたわけではないため、これらの比較に開始 p/v パラメーターを使用しました。

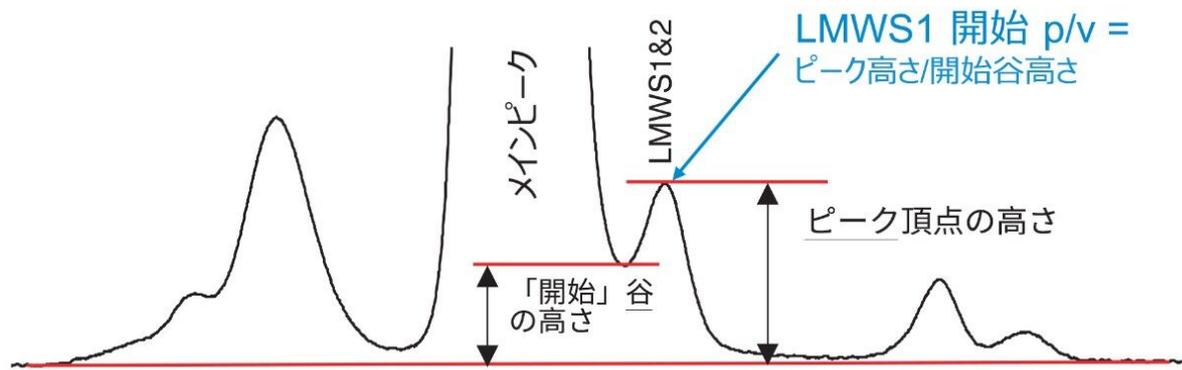


図 7. LMWS1 および 2 の開始  $p/v$  のクロマトグラフィー例と計算

図 8 では、 $p/v$  分離度の値が、UPLC および UHPLC システムにわたってすべての構成で一貫して維持されています。一般的に、 $p/v$  比は 3 を超えると再現性が低くなります（データは示されていません）。予想どおり、長さ 300 mm のカラムで得られた分離度は、長さ 150 mm のカラムで得られた分離度よりも高くなっています。この図には  $4.6 \times 150$  mm のカラムの結果は含まれていません。それは、このカラムが、Alliance で LMWS1 と 2 を分離できず、他のシステムで、 $p/v$  が 1.6 以下であったためです。 $p/v$  の分離度が 1 を超えると、LMWS1 および 2 の % 面積が徐々に減少し、 $p/v > 2$  に近づくと横ばい状態になり始めます。この傾向は、Alliance のすべてのカラムで見られます。

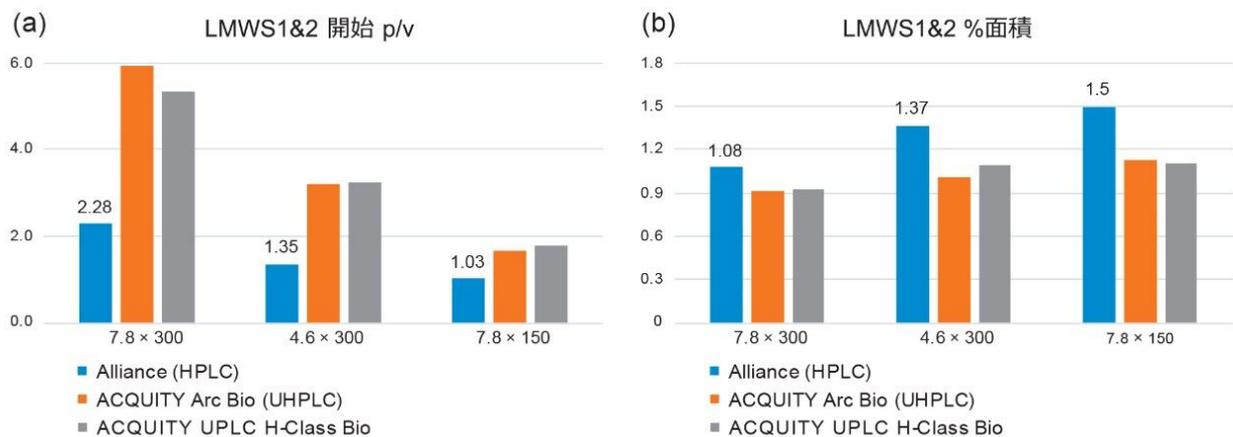


図 8. 3 つのシステムにわたって使用した 3 種のカラムでの (a) LMWS1 と 2 の開始  $p/v$ 、および (b) LMWS1 と 2 の面積。条件は実験セクションに記載されています。

## メインピーク

すべての SEC mAb のクロマトグラムの中心はメインピークです。図 3 および図 4 のクロマトグラムから、バンド

拡散によりメインピークの効率が低下していることが明らかです。分離の効率が低下すると、分析種のピーク高さが低くなります。バンド拡散が分析の感度に与える影響についてはあまり議論されていませんが、これは、これらの分離で定量しようとしている不純物のシグナル対ノイズ比にピーク高さの低下が直接影響するためです。

図 9a では、バンド拡散ボリュームと 5 $\sigma$  プレート数の相関係数の平方 ( $R^2$ ) 値を見ると、カラムボリュームが減少するにつれて相関性が強くなるが示されています。 $R^2$  値は、バンド拡散ボリュームの違いによって説明できるプレート数の変動の割合を表します。つまり、バンド拡散ボリュームの増加によって、メインピークの 5 $\sigma$  プレート数の減少が 84 ~ 100% となるという説明がつかます。直線相関の傾きについては、内径 4.6 mm のカラムの傾きは内径 7.8 mm のカラムのものに比べて急であり、内径 4.6 mm のカラムの方が拡散ボリュームの影響が大きいことが示されています。4.6  $\times$  300 mm カラムでさえも 7.8  $\times$  300 mm カラムほど効率が良くないことも、注目に値します。このことは、UPLC システムですらバンド拡散が性能を制限していることを示唆しています。

拡散ボリュームおよびそのテーリングファクターは独立変数ではありません。ただし、メインピークプレートに対する拡散ピークボリューム (図 9a) とテーリングファクター (図 9b) の間での  $R^2$  値をメインピークプレートと比較すると、メインプレートでの変化に対する影響について、内径 4.6 mm のカラムより内径 7.8 mm のカラムでより強い役割を果たすのは、バンド拡散テーリングファクターであることが示唆されます。現時点では、これらの観察結果がどの程度普遍的にすべてのシステムに適用できるかは不明ですが、拡散ピークのテーリングを減らすことで、内径 7.8 mm の構成について、さらに優れた性能が得られる可能性があることが示唆されます。

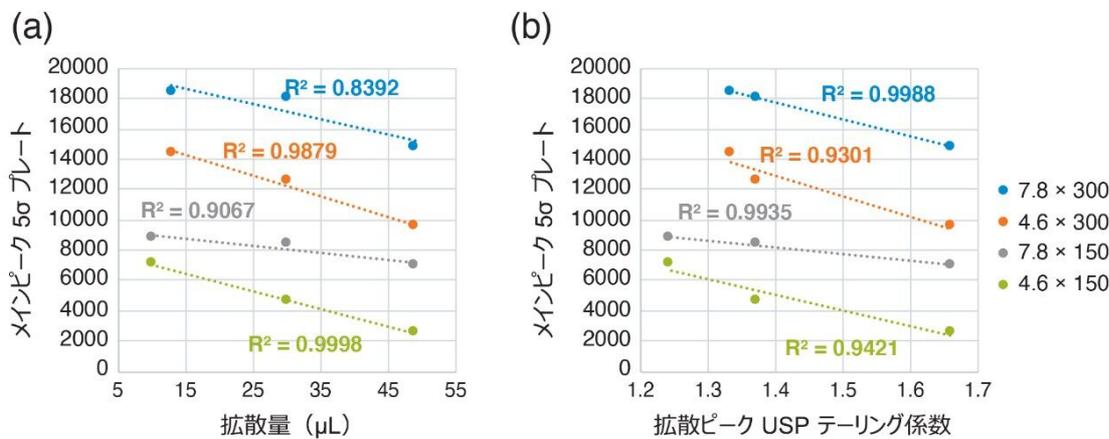


図 9. メインピークの 5 $\sigma$  プレートに対するバンド拡散の影響。(a) 拡散ボリュームの影響、(b) 拡散ピーク USP テーリングファクターの影響。条件は実験セクションに記載されています。

長さ 300 mm のカラムに焦点を合わせると、LMWS1 および 2 の p/v は、メインピークと拡散ピークの両方のテーリングファクターに最も強く影響していることが観察されました。これらの p/v 値は、メインピークプレート (内径 4.6 mm の場合は  $R^2$  値 0.88、内径 7.8 mm の場合は  $R^2$  値 0.95) およびバンド拡散ボリューム (内径 4.6 mm の場合は  $R^2$  値 0.80、内径 7.8 mm の場合は  $R^2$  値 0.64) の影響をまだ受けていることがわかりました。ただし図 10 に記載されているほどの影響力ではありません。メインピークのテーリングファクターも拡散ピークのテーリン

グファクターと強く相関しているため（図 9b）、フラグメント分析のために分離度を向上する手段として拡散ピークでのテーリングの最小化を検討する必要があります。

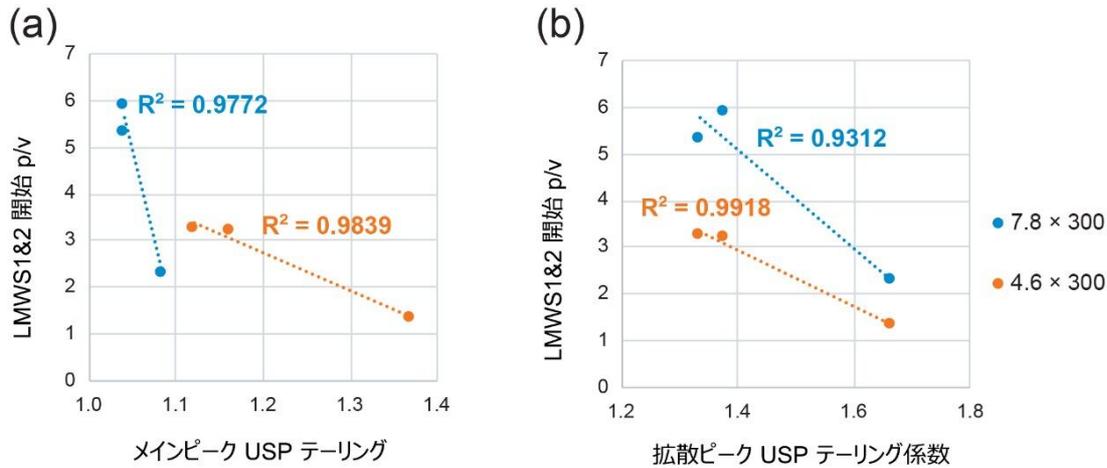


図 10. LMWS1 および 2 の  $p/v$  に影響する要因： (a) メインピークの USP テーリングファクター、 (b) 3 つの LC システムにわたる長さ 300 mm のカラムの拡散ピークの USP テーリングファクター。条件は実験セクションに記載されています。

## 結論

Waters BioResolve SEC mAb カラムは、mAb HMWS、モノマー、LMWS の高分離度で再現性のある分離を実現できます。内径 7.8 mm カラム構成により、HPLC、UHPLC、UPLC システムで、内径 4.6 mm のカラムより優れたクロマトグラフィー性能が実現します。このため、内径 7.8 mm カラム構成は、高分離能セパレーション、特に部分的に分離した LMWS1 (Fab/c) の分析が必要な場合に、最も推奨される構成です。内径 4.6 mm のカラムは、UPLC システムで、および UHPLC や場合によっては HPLC での HMWS の分析で、内径 7.8 mm のカラムとほぼ同程度に効果的である可能性があります。内径 4.6 mm のカラムの利点は、サンプル必要量と移動相消費量が低減されることに加えて、より経済的であることです。

これらの実験では、使用する LC システムに、一般的な構成でのコンポーネントでの拡散をさらに低減するための変更は加えませんでした。たとえば、接続チューブの長さや内径を減らすと、拡散がさらに減少することがよく知られています<sup>9</sup>。ウォーターズでは、BioResolve SEC mAb カラムの「準備不要な」性能を、mAb サイズバリエーション標準試料を使用して低拡散 LC システムで各カラムについて試験しています。クロマトグラムは、図 3 および図 4 の ACQUITY UPLC H-Class システムで示されているクロマトグラムと同様のはずです。BioResolve SEC mAb の 4 種類の異なるバッチの代表的な QC テストの結果が、図 11 に示されており、高度の再現性が実証されています。

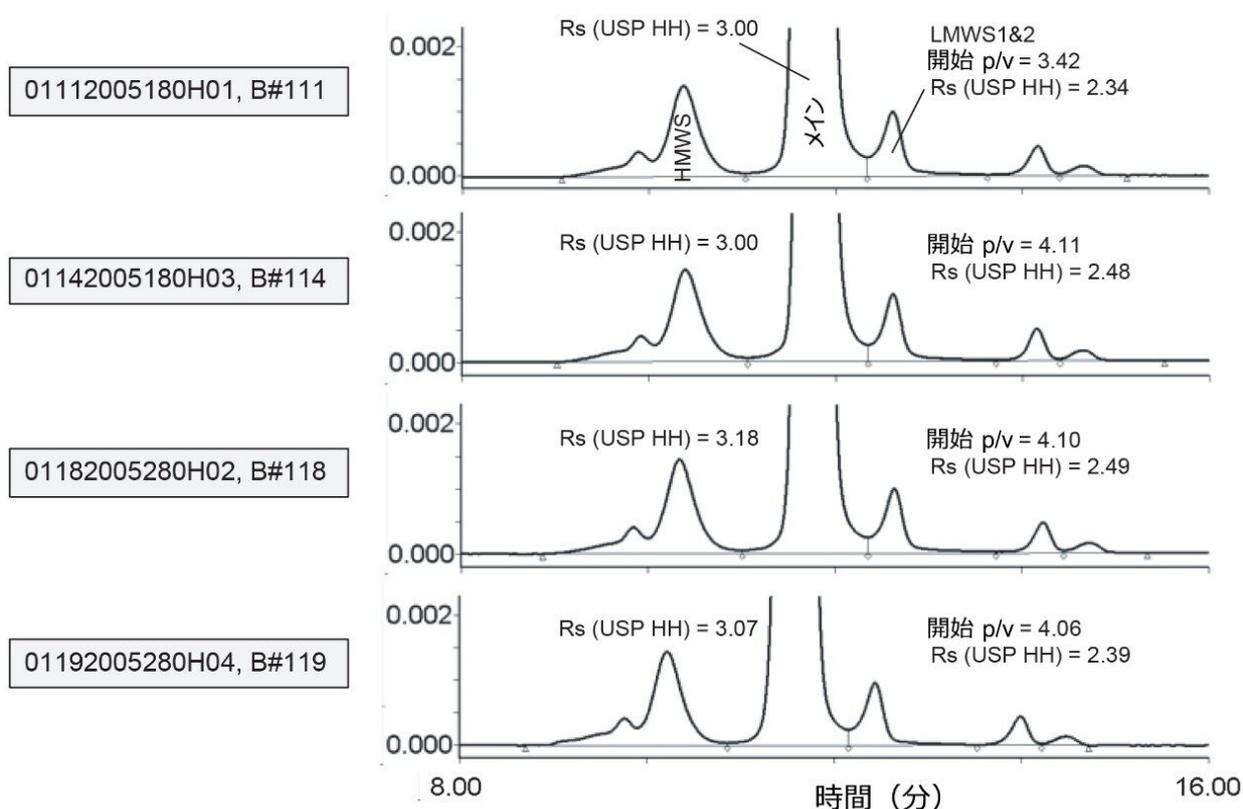


図 11. Waters mAb サイズバリエーション標準試料を使用し、同じ ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで分析した、7.8 × 300 mm の BioResolve SEC mAb カラムの 4 つの異なるバッチでの分離度の比較。条件は実験セクションに記載されています。

mAb バイオ医薬品の研究、開発、製造での SEC 導入の成功は、使用している LC システムの拡散レベルに対応できるカラムを理解して選択することに依存しており、特にバリデーション済みの分析法で信頼性の高いデータの生成に役立ちます。頑健な分離を実現するうえで、カラムと LC システム流路の両方との二次的な相互作用を最小限に抑える分離条件の開発は、SEC 分析法の成功に不可欠です。最終的に、目的の mAb を分析する前に、カラム、LC システム、移動相、分析法の準備が確実に完了していることを確認するために、信頼性の高い mAb ベースのリファレンスサンプルを確立して使用することを検討することが重要です。

## 参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2012, 35, 2923–2950.

2. Cordoba, A. J.; Shyong, B. J.; Breen, D.; Harris, R. J. Non-Enzymatic Hinge Region Fragmentation of Antibodies in Solution. *J. Chromatogr., B*. 2005, *818*, 115-12.
3. Koza, S. M.; Chen, W. High Resolution and High Throughput Size-Exclusion Chromatography Separations of IgG Antibody Aggregates and Fragments on UHPLC and HPLC Systems with 2.5 µm BEH Particles. Waters Application Note, [720006522EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135016169>> , April 2019.
4. Koza, S. M.; Reed, C. E.; Chen, W. Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Monoclonal IgG Antibody Aggregates and Fragments: Selecting the Optimal Column for Your Method. Waters Application Note, [720006336EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996417>> , June 2019.
5. Koza, S. M.; Reed, C. E.; Chen, W. Evaluating the Impact of LC System Dispersion on the Size-Exclusion Chromatography Analysis of Proteins. Waters Application Note, [720006337EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134996381>> , June 2019.
6. NISTmAb, Humanized IgG1κ Monoclonal Antibody, Reference Material 8671: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/8671.pdf> <<https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/8671.pdf>>
7. Dolan, J. W. LC Troubleshooting: Peak Tailing and Resolution. *LC · GC Europe* June 2002: 1-4.
8. USP43-NF39, Official Monographs/Insulin. May 1, 2016; 4314-17.
9. Fekete, S.; Guillarme, D. Influence of Connection Tubing in Modern Size Exclusion Chromatography and Its Impact on the Characterization of mAbs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, *149*, 22–32.

## 謝辞

著者らは、BioResolve SEC mAb カラムの開発で果たしたその役割に対して Steve Shiner、Steven Byrd、Justin McLaughlin に、このプロジェクトの支援でのガイダンスと尽力に対して Bill Warren に感謝いたします。

NIST は、National Institute of Standards and Technology の登録商標です。

FabRICATOR は Genovis AB の登録商標です。

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY Arc Bio システム <<https://www.waters.com/134966135>>

ACQUITY UPLC H-Class Plus Bio システム <<https://www.waters.com/10166246>>

Alliance HPLC システム <<https://www.waters.com/534293>>

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

Empower 3 クロマトグラフィーデータソフトウェア <<https://www.waters.com/10190669>>

720006956JA、2020 年 8 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.