

Altura SEC 300 Å カラムによる 低塩濃度条件での大幅な性能向上

著者

Daniel Meston, Anne Blackwell,
and Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

帯電表面への生体分子の非特異的吸着は、顕著なピークテーリングを引き起こします。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は一般的に生理学的条件 (150 mM NaCl, pH 7.2) ¹ で実施されますが、この条件では非特異的吸着が助長され、感度や分解能の低下につながります。金属への結合は非特異的吸着の主な原因の一つであり、その結果、従来のステンレス製カラムは、バイオ医薬品の高性能分析における制約となっています。ステンレス製の接液部をウルトライナートテクノロジーによりコーティングした表面に置き換えることにより、低塩濃度での分離性能を大幅に向上させ、下流のワークフローにおける SEC の適用性を高めることができます。

はじめに

サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質の凝集、コンフォメーションの変化、重合など、バイオ医薬品のサイズをモニタリングするための標準的なアプローチです。生体分子はカラム内を移動して、分子が小さいほど粒子のポア容積内に深く浸透し、より長く保持されます。ただし、生体分子には、pKa 値の異なる多数の活性点が含まれているため、SEC では、帯電した表面、最も一般的には、露出したシラノール基やカラムハウジングの金属表面との間で、大幅な非特異的相互作用が発生することがよくあります。²非特異的吸着を最小限に抑えて、分離性能を向上させるためには、多くの場合、高塩濃度の緩衝系が必要になります。

ここでは、小型タンパク質、大型モノクローナル抗体（mAb）、および抗体薬物複合体（ADC）の分離において、新しい Agilent Altura SEC 300 Å カラムがもたらす大きな利点について報告します。Altura HPLC カラムは、金属結合を防止するウルトライナートテクノロジーを採用しており、特に低塩濃度の移動相条件下において、従来のステンレス製カラムケーシングと比較して、ピークテーリングを最小限に抑えます。リゾチームなどの小型タンパク質や、リツキシマブなどの mAb、抗体薬物複合体であるサシツズマブゴビテカンについては、わずか 25 mM という低塩濃度においても、ピークテーリングが 2 分の 1 以下に低減しました。

実験方法

試薬および調製

超純水は、0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ（Millipak）を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。緩衝液塩はすべて HPLC グレードであり、タンパク質は Sigma-Aldrich から凍結乾燥された状態で購入し、すべての mAb および抗体薬物複合体であるサシツズマブゴビテカンは、Evidentic から購入しました。ゲルろ過標準（部品番号 1511901）は、Biorad から購入しました。

サンプル調製

すべてのサンプルを、50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 により、1 mg/mL に希釈しました。

使用機器

- Agilent Infinity III 1260 多波長検出器（部品番号 G7165A）
- Agilent Infinity III 1260 マルチカラムサーモスタット（部品番号 G7116A）
- Agilent Infinity III 1260 Bio マルチサンプリング（部品番号 G5668A）
- Agilent Infinity III 1260 バイオイナートポンプ（部品番号 G5654A）

ソフトウェアおよびデータ処理

- Agilent OpenLab CDS Acquisition バージョン 2.8
- Agilent OpenLab CDS Analysis バージョン 2.8

メソッド条件

表 1. メソッド条件

パラメータ	値																					
カラム	– Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 × 300 mm、2.7 μm （部品番号 PL1580-5301） – Agilent Altura SEC 300 Å、4.6 × 300 mm、2.7 μm、 ウルトライナートテクノロジー採用（部品番号 PL1580- 5301A）																					
移動相	溶出液 A) 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 溶出液 B) 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 + 500 mM NaCl																					
流量	0.35 mL/min																					
A:B*	所定の NaCl 濃度を実現するために使用した溶出液条件 <table><tr><th>溶出液 A %</th><th>溶出液 B %</th><th>NaCl 濃度（mM）</th></tr><tr><td>95</td><td>5</td><td>25</td></tr><tr><td>90</td><td>10</td><td>50</td></tr><tr><td>80</td><td>20</td><td>100</td></tr><tr><td>50</td><td>50</td><td>250</td></tr><tr><td>20</td><td>80</td><td>400</td></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>500</td></tr></table>	溶出液 A %	溶出液 B %	NaCl 濃度（mM）	95	5	25	90	10	50	80	20	100	50	50	250	20	80	400	0	100	500
溶出液 A %	溶出液 B %	NaCl 濃度（mM）																				
95	5	25																				
90	10	50																				
80	20	100																				
50	50	250																				
20	80	400																				
0	100	500																				
カラム温度	25 °C																					
注入量	1 μL																					
合計分析時間	20 分																					
UV	220 nm																					
レスポンスタイム	10 Hz																					

* 溶出液 A と B を混合することにより、塩濃度条件を変化させました。ゲルろ過標準サンプルは、150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0 を使用して分析しました。

表 2. 分析対象物であるタンパク質の pI 値

分析対象物	pI
α-キモトリプシノーゲン	9.1
リゾチーム	11.4
ミオグロビン	7
オボアルブミン	5.1
サシツズマブゴビテカン	8.5
インフリキシマブ	7.6
リツキシマブ	9.4
エクリズマブ	6.1

結果と考察

Altura コーティングは、低塩濃度条件下でのピークテーリングを最小限に抑えます。

Altura ウルトライナートテクノロジーにのみ起因する性能向上を測定するために、同一ロットの SEC 充填剤を、ステンレス製ハードウェアまたは Altura ハードウェアにそれぞれ充填しました。

表 3 および図 1 は、一連の代表的なタンパク質におけるピークテーリングの変化を示しており、pI 値が 7 を超えるタンパク質については、調査した最低の塩濃度条件下で、対称性が少なくとも 2 倍向上しています。リゾチームおよびサシツズマブゴビテカンの代表的なクロマトグラムを図 2 および 3 に示していますが、これらは、Altura SEC カラムを使用した場合、250 mM 未満の塩濃度においては、ピークの対称性が全体的に向上することを示しています。塩濃度を 500 mM まで増加させると、ステンレス表面への吸着が高い塩濃度によって大幅に抑制されており、両方のカラムで同様の性能を示しています。ただし、塩濃度が増加すると、溶出時間が全体的に遅くなることが観察されており、これは疎水性相互作用が引き起こされたことを示しています。また、高塩濃度の移動相では、特にバイオイナート仕様ではない LC を使用する場合、LC システムの摩耗や破損のリスクも高まります。

表 3. 代表的なタンパク質におけるテーリングファクターと塩濃度との関係。N/A は、きわめて高いテーリングを示します。

サンプル	Na (mM)	ピーク テーリング SS	ピーク テーリング Altura	Altura による 対称性の向上
α-キモトリプシノーゲン	25	2.93	1.02	2.87
α-キモトリプシノーゲン	50	1.62	0.95	1.70
α-キモトリプシノーゲン	100	1.05	0.90	1.18
α-キモトリプシノーゲン	250	0.85	0.82	1.03
α-キモトリプシノーゲン	400	0.80	0.78	1.02
α-キモトリプシノーゲン	500	0.77	0.75	1.02
オボアルブミン	25	0.98	0.98	1.02
オボアルブミン	50	0.97	0.96	1.02
オボアルブミン	100	0.95	0.94	1.02
オボアルブミン	250	0.92	0.91	1.02
オボアルブミン	400	0.92	0.90	1.02
オボアルブミン	500	0.92	0.90	1.02
リゾチーム	25	9.25	4.46	2.07
リゾチーム	50	5.45	2.23	2.45
リゾチーム	100	2.49	1.41	1.76
リゾチーム	250	1.15	1.04	1.11
リゾチーム	400	1.06	1.01	1.04
リゾチーム	500	1.05	1.01	1.04
サシツズマブゴビテカン	25	N/A	6.15	N/A
サシツズマブゴビテカン	50	N/A	5.96	N/A
サシツズマブゴビテカン	100	13.70	1.90	7.22
サシツズマブゴビテカン	250	1.54	1.23	1.25
サシツズマブゴビテカン	400	1.31	1.19	1.10
サシツズマブゴビテカン	500	1.27	1.18	1.08
リツキシマブ	25	N/A	1.98	N/A
リツキシマブ	50	4.56	1.28	3.57
リツキシマブ	100	1.25	1.09	1.15
リツキシマブ	250	1.08	1.07	1.01
リツキシマブ	400	1.07	1.06	1.01
リツキシマブ	500	1.07	1.06	1.01
エクリズマブ	25	1.08	1.07	1.01
エクリズマブ	50	1.08	1.07	1.01
エクリズマブ	100	1.08	1.06	1.01
エクリズマブ	250	1.07	1.06	1.01
エクリズマブ	400	1.08	1.06	1.01
エクリズマブ	500	1.08	1.06	1.01

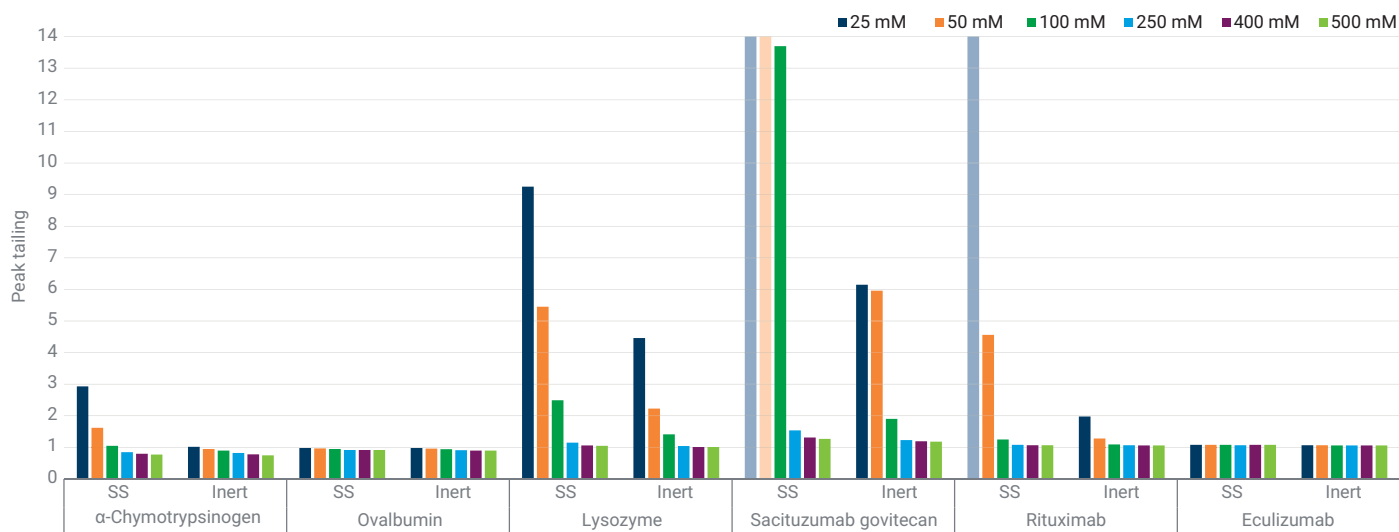


図 1. 表 1 に要約した、NaCl 濃度がタンパク質、mAb、および ADC のピークテーリングに与える全体的な影響。網かけしたバーは、他の条件のスケール外のきわめて高いテーリングを示しています。

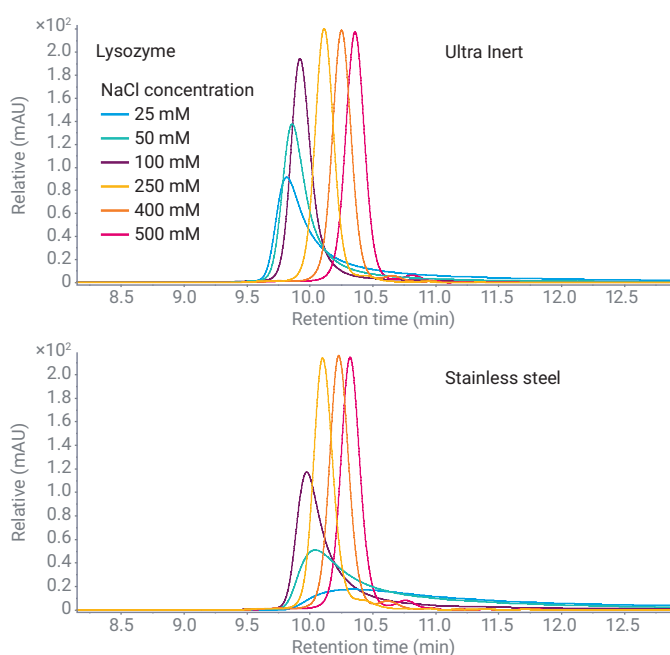


図 2. 50 mM リン酸緩衝液に対して異なる濃度の NaCl を添加した場合において、ウルトラライナートカラムとステンレス製カラムを使用して、リゾチームについて得られた代表的なクロマトグラム

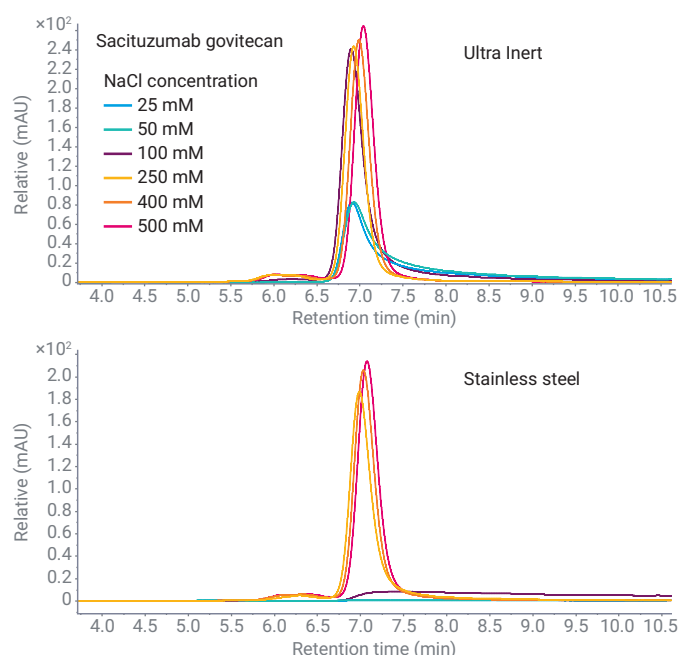


図 3. 50 mM リン酸緩衝液に対して異なる濃度の NaCl を添加した場合において、ウルトラライナートカラムとステンレス製カラムを使用して、ADC であるサシツズマブゴビテカンについて得られた代表的なクロマトグラム

図 4 は、低塩濃度において、ウルトライナートハードウェアがクロマトグラムにどのような影響を与えるのかを明確に示しています。リゾチームや A-CT などの球状タンパク質は、25 mM NaCl において、ステンレス製カラムではテーリングが発生しますが、これは Altura ウルトライナートテクノロジーにより、大幅に軽減されます。特に、リツキシマブや ADC であるサシツズマブゴビテカンなどの mAb は、ステンレス製ハードウェアを使用した場合、25 mM ではシグナルがきわめて低いか、あるいはまったく検出されないのに対して、Altura ハードウェアでは（多少のテーリングはあるものの）、ピークを確認することができます。これらのデータは、金属との相互作用の影響を受けやすい生体分子の SEC を実施する際に、Altura ウルトライナートテクノロジーにより、塩濃度を大幅に低減できることを示唆しています。

表面電荷が全体的に正であるタンパク質では、ウルトライナートカラムハードウェアが大きな利点をもたらす一方、より酸性の表面特性を持つタンパク質や mAb では、非特異的吸着の影響をはるかに受けにくくなります。例えば、pI が 6.1 のエクリズマブや pI が 5.1 のオボアルブミンは、ウルトライナートハードウェアや塩濃度の増加による利点が得られません。最後に、興味深い観察結果として、 α -キモトリプシノーゲンにおいて、最高の塩濃度で明確なピークフロンティングが発生したことが挙げられます（図 5）。これは、個々のタンパク質に対して SEC 条件を最適化する必要があることを示しており、Altura ハードウェアは、金属結合を排除するために塩への依存を低減することにより、その最適化を実現することができます。

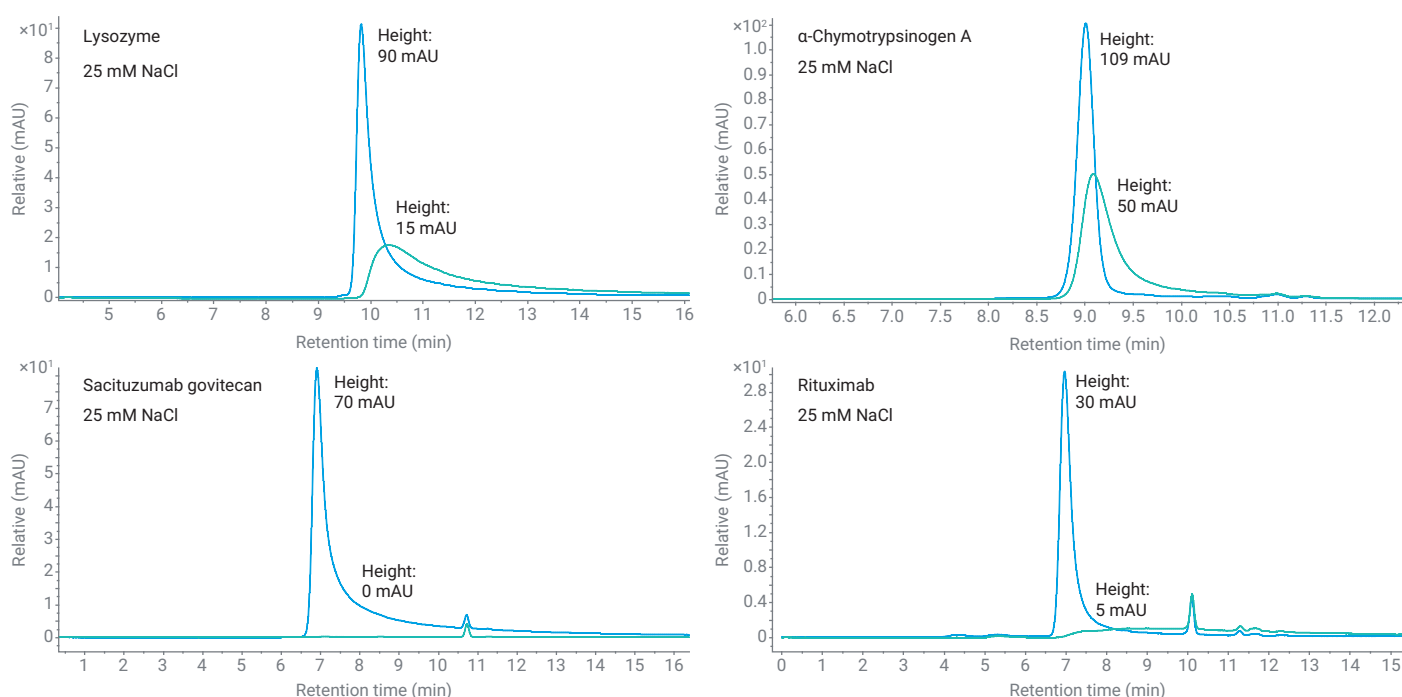


図 4. 低塩濃度（50 mM リン酸緩衝液 + 25 mM NaCl）において、ウルトライナートカラムとステンレス製カラムから得られた代表的なクロマトグラム

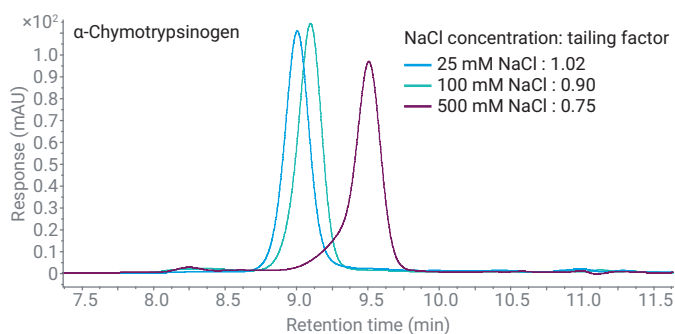


図 5. Agilent Altura SEC カラムにおける α -キモトリプシノーゲンのピークテーリングファクターと NaCl 濃度との関係

タンパク質凝集体の高感度定量を可能にする Altura コーティング

二量体や三量体の形成を伴うタンパク質凝集は、SEC によって評価される重要品質特性（CQA）です。ICH では、高分子量（HMW）および低分子量（LMW）の合計のピーク面積を、定量して合理的に説明する必要がありますが、³したがって、凝集体定量は、正確で高感度である必要があります。

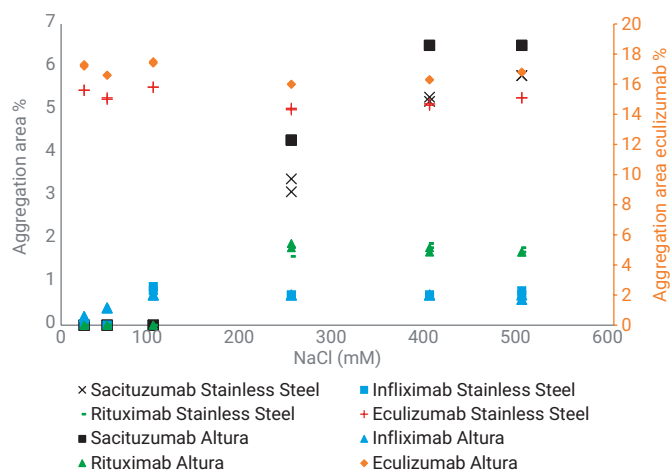


図 6. mAb および ADC におけるタンパク質凝集と塩濃度との関係

図 6 は、本研究で評価したすべての mAb および ADC において、Altura カラムでは、ステンレス製カラムよりもタンパク質凝集体を高感度に検出でき、凝集をより正確に測定できることを明確に示しています。図 7 は、ADC であるサシツマブゴビテカンの代表的なクロマトグラムを示しており、この図から、Altura カラムがステンレス製カラムよりも、HMW 凝集体を正確に定量していることがわかります。興味深いことに、凝集体のピーク形状が改善されたことで、二量体に加えて、より高次の多量体ピークも観察することができるようになりました。一方、ステンレス製カラムでは、この 2 つを区別することができませんでした。ウルトラライナートカラムでのメインピークと凝集体ピークとの間の分解能は 1.41 ですが、ステンレス製カラムでは 1.33 であり、分離能力が向上していることが示されました。さらに、pI 値が高い mAb であるリツキシマブについても、ウルトラライナートカラムでは 1.72 という分解能が得られましたが、250 mM NaCl でのステンレス製カラムでは 1.58 でした。一方、エクリズマブについては、大幅には改善されませんでした。観察される凝集体の量を低減するためには、より低い塩濃度条件で分析することが可能であり、Altura ウルトラライナートテクノロジーはこれを容易にします。

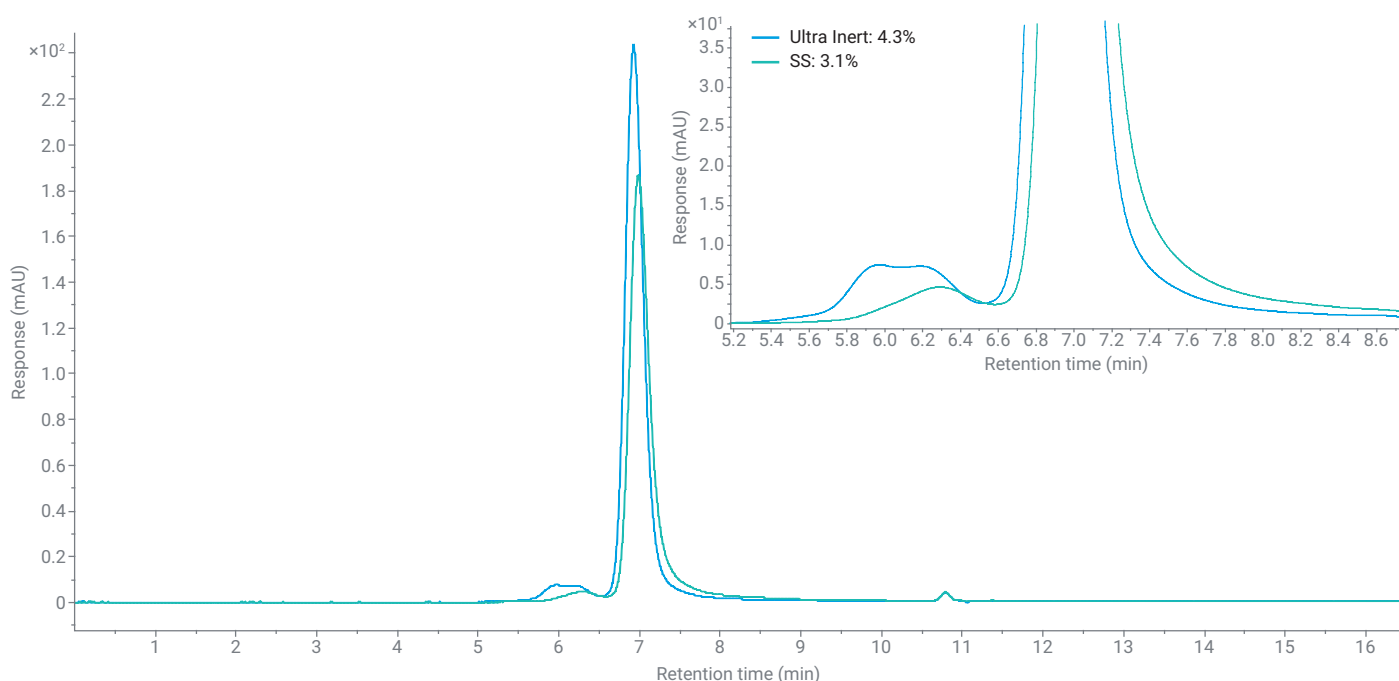


図 7. サシツマブゴビテカンの代表的なクロマトグラム。この図から、Agilent Altura カラムがステンレス製カラムよりも、1 % 超タンパク質凝集が多いことがわかります。分離は、250 mM NaCl において実施しました。ウルトラライナート TF : 1.23、Rs : 1.4、ステンレス TF : 1.54、Rs : 1.33

結論

SEC は、サイズに基づいた CQA を評価するための LC において非常に重要なモードですが、非特異的吸着による悪影響や、分離性能を確保するために必要な高塩濃度により、この手法の適用範囲が制限されています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Altura ウルトラハイナートテクノロジーが、非特異的金属結合を大幅に軽減し、その結果、ステンレス製ハードウェアと比較して、より低い塩濃度でピーク幅の低減と感度の向上を実現できることを明確に示しています。ほとんどのタンパク質には、最適な塩濃度範囲が存在することが実証されています。塩濃度が低すぎると望ましくない吸着が生じる一方、高すぎると疎水性相互作用が生じ、性能の低下やさらなる凝集を引き起こす可能性があります。したがって、Altura ハードウェアは、利用できる塩濃度条件の有効範囲を拡大することにより、メソッド開発における汎用性をさらに向上させます。金属と分析対象物との相互作用を効果的に軽減することにより、さまざまなサンプル間でプラットフォームを使用するための堅牢なメソッドが実現し、サンプル再分析の必要性が低減します。

参考文献

1. Kříž, Z.; et al. How Ionic Strength Affects the Conformational Behavior of Human and Rat Beta Amyloids – A Computational Study. PLoS ONE **2013**, 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0062914.
2. Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces. Adv. Colloid. Interface Sci. **2011**, 162(1–2), 87–106. DOI: 10.1016/j.cis.2010.12.007
3. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B. (1999) Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf> (Accessed: 12 May 2026).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE-015542

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2026
Printed in Japan, June 12, 2026
5994-9268EN