

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による モノクローナル抗体 (mAb) フラグメント およびダイマーの分析



Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムが mAb フラグメントと 凝集体の分離に適している理由

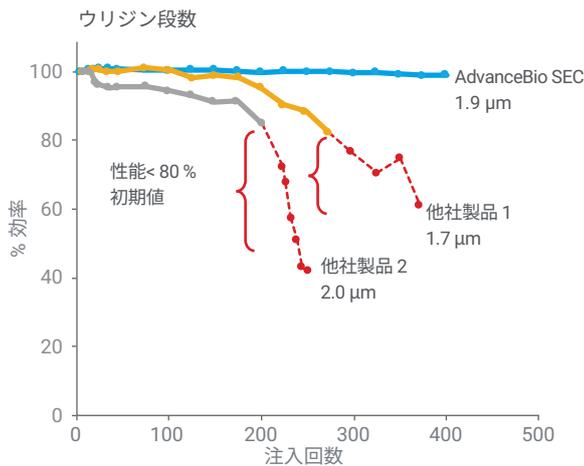
- AdvanceBio 1.9 µm 独自の単分散シリカ粒子は、クラス最高の機械的な堅牢性を実現できるように作られています。このため UHPLC と HPLC のいずれの機器にも適しており、カラム寿命も延ばすことができます。¹
- 1.9 µm 粒子の AdvanceBio SEC カラムは、低分子量タンパク質フラグメントと mAb 凝集体およびダイマーを、1 本のカラムで高い分解能で高速分離できる理想的なポア特性を備えています。²
- 独自の親水性相が実現する不活性な表面により、ADC や mAb との二次的疎水性相互作用を最小限に抑えられます。

低分子量 (LMW) フラグメントと高分子量 (HMW) ダイマーおよび凝集体は、医薬品の開発、保管、出荷、または配達中に、生物製剤タンパク質から形成される可能性があります。これらのサイズバリエーションは重要な品質特性 (CQA) であり、医薬品の薬物動態や効力の免疫原性反応と差異を防ぐために、十分に特性解析する必要があります。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるサイズベースの分離は、モノクローナル抗体 (mAb) などの生物製剤のサイズバリエーションを分析して純度レベルをモニタリングするための標準的な手法です。SEC はカラムの固定相のポアを通るタンパク質の透過性のみに基づいており、固定相との相互作用の種類は関係ありません。このため、球状タンパク質およびペプチドは動的な半径 (サイズ) に基づいて分離されます。大きいタンパク質と凝集体が最初に溶出してから、フラグメントと小さいペプチドが溶出します。

mAb フラグメントと凝集体の分離と分解能に影響を与える重要要素

粒子サイズとポアの特性は、ピーク形状、ピーク感度、および分解能を改善する重要な要素です。サイズの近い凝集体やフラグメントを効率的に分離するには、適切なポアサイズが必要です。ポアが大きいと、ポア内の生体分子の透過効率が上がり、化合物間の溶出時間での拡散が大きくなります。一方、ポア容積によって充填剤の強度が低下し、壊れやすくなります。SEC カラムで適切に分離するには、分解能と機械的強度の適度なバランスを見つけることが重要です。

SEC 樹脂の表面との**二次的相互作用**によって、ポアを自由に通過しにくくなり、サイズベースの分離が妨げられる可能性があります。SEC カラムを選択する場合は、二次的相互作用を最小限に抑制できる粒子が必須です。



カラム： 4.6 × 300 mm
移動相： 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
流量： 0.35 mL/min
温度： 室温
検出器： 220 nm
サンプル： Bio-Rad タンパク質混合物およびウリジン
 (50 回注入ごとに液流を停止)

図 1. AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm カラムの優れた機械的安定性：400 回の注入で段数の低下が 2 % 未満

推奨開始条件³

パラメータ	設定値
カラム	AdvanceBio SEC 200 Å 4.6 × 300 mm、1.9 μm (部品番号 PL1580-5201)
機器	Agilent 1260 Infinity II パイオイナート LC システム
流量	0.35 mL/min
移動相	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
波長	280 nm
カラム温度	25 °C
サンプル	ストレスを加えた mAb (1 μg、カラムに注入)。100 mM の重炭酸ナトリウム pH 9.0 でストレスを加え、40 °C で一晩インキュベーションした mAb サンプル。

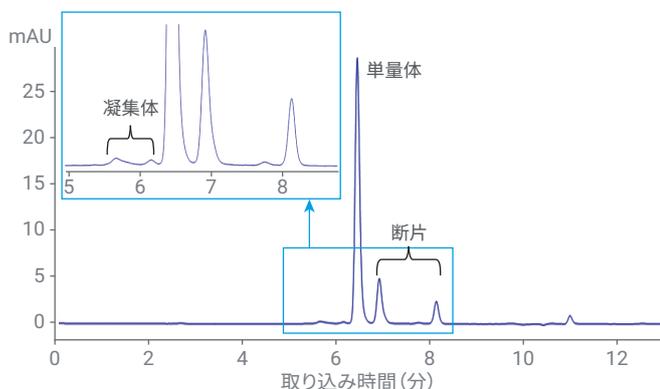


図 2. ストレスを加えた mAb サンプル中の凝集体とフラグメントを、AdvanceBio SEC 200 Å 4.6 × 300 mm、1.9 μm カラムで推奨開始条件下で分離した結果

クロマトグラフィー条件を最適化する方法

最初のクロマトグラムを表示した後に、分離を改善したりタンパク質の溶解性を維持したりするには、次の調整を検討します。

移動相のイオン強度 - その他の塩を必要とするプロトコルに一般的に使用されるバッファ：

- 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の塩化ナトリウム
- 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の硫酸ナトリウム
- 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 50 ~ 100 mM の尿素。その他の類似した塩 (KCl など) や塩酸 Guanidinium も使用できます。

pH - ± 0.2 単位の増分で調整します。AdvanceBio SEC カラムの安定性範囲は pH 2.0 ~ 8.5 です。

温度 - SEC 分離は一般的に 10 ~ 30 °C で行います。疎水ペプチドの分解能と回収率を改善するには、より高い温度が必要ことがあります。また、温度の影響を受けやすいタンパク質の生物活性を最大の状態を保つために、SEC を低温室で行うこともあります。低温で分離を実行するときは、圧力をモニタリングして過圧を防ぎ、必要に応じて流量を調整します。Agilent AdvanceBio SEC カラムの最高使用温度は 80 °C です。

注：温度を上げるとタンパク質が変性する可能性があります。

有機溶媒の添加剤

- 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 ~ 10 % の EtOH (または MeOH や CH₃CN などのその他の同種の溶媒) を含む溶液は、高疎水性タンパク質に適しています。
- 50 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 % の DMSO を含む溶液は、システイン残留物の含有量が高く酸化/凝集しやすいタンパク質に添加できます。

注：粘度の高い移動相を使用する場合は、最大使用圧力を超えないようにするために、流量の低減が必要になることがあります。

参考文献

1. 凝集体およびフラグメントの高速分離 - [5994-0873.JAJP](#)
2. モノクローナル抗体および抗体薬複合体のサイズ排除クロマトグラフィー分析 - [5994-0827.JAJP](#)
3. Agilent AdvanceBio SEC 1.9 μm Column user guide - [5994-0739EN](#)
4. Elevate Your mAb Aggregate Analysis - [5994-2709EN](#)
5. Agilent AdvanceBio SEC 120 Å 1.9 μm PEEK ライナ付きカラムを用いた抗体フラグメント薬物複合体の分析 - [5994-3045.JAJP](#)
6. 生物製剤に含まれる凝集体の高速高分離サイズ排除クロマトグラフィー - [5991-6458.JAJP](#)

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å カラムの基礎： 最適な性能と分離のためのヒント

サンプルに関する考慮事項

- サンプルをろ過して粒子を除去します。
- ガードカラムやインラインフィルタを使用してカラム寿命を延ばします (特に複雑なサンプルや「汚れた」サンプルを使用する場合)。
- カラムがしっかりと接続されており、リークがないことを確認します。
- システムのデッドボリュームを最小限にして、サブ 2 µm の SEC 粒子の分解能を最大化します。超低拡散キットを 1290 モデルの LC に取り付けてさらにシステムボリュームを減らし、バンド幅が拡大しないようにします。⁴
- 注入量をできるだけ少なくして、分解能を最大化します。最大注入量をカラム容量の 1 % にして、サンプル注入量を 1 ~ 5 µL にすることを推奨します。

カラム選択の要素

次の基準を用いて、サンプルに適したカラムを選択します。

- カラムが長いほど分解能が向上するため、ダイマーからのモノマーの分離、またはフラグメントからのモノマーの分離に適しています。
- 狭いカラム内径：
 - 注入量を減らすことが可能です。使用できるサンプル量が限られる場合に適しています。
 - 流量を下げるのが可能です。未変性 MS での効率的な脱溶媒/イオン化に適しています。³
- PEEK ライナ付きカラムを使用すると、サンプルと金属面の二次的相互作用を最小限に減らしてピーク形状を改善できます。このため、このようなカラムは揮発性移動相バッファにも最適です。⁵
- 高次凝集体の分析では、AdvanceBio SEC 300 Å、2.7 µm カラムを使用すると、mAb 凝集体、ダイマーおよびモノマーを同レベルの信頼性の高い性能で高速かつ確実に定量できます。⁶

カラムの操作とクリーニング

- 流量とカラム内径を合わせます。³ - 最適な SEC 分離のためには、内径の小さいカラムの流量を減らし、カラムの過圧を防ぐ必要があります。より狭い内径 2.1 ~ 4.6 mm のカラムは、サンプルの効率的な脱溶媒/イオン化を必要とする未変性 MS に最適です。
 - 使用流量³：
 - 4.6 × 150 mm、0.1 ~ 0.7 mL/min
 - 4.6 × 300 mm、0.1 ~ 0.5 mL/min
 - 内径 2.1 mm のカラム、0.05 ~ 0.10 mL/min
- 流量の増加をデフォルトから 1 mL/min² 以下に下げます。流量を徐々に増やすとカラム寿命が伸びます。アジレントのソフトウェアでは、この設定は LC ランプ制御の [詳細設定] セクションにあります。
- LC メソッドの圧力上限をカラムの圧力上限に合わせます (AdvanceBio SEC 1.9 µm カラムの場合は 62 MPa)。これは、LC の最大圧力機能がカラムの最大圧力機能より大きい場合に重要です。
- カラムはバックフラッシュしないでください。カラムは必ず矢印の方向にフラッシュして流量を調整し、圧力が 40 MPa 未満になるようにします。
- カラム容量の 20 倍以上の洗浄液でフラッシュする前後に、カラム容量の 5 倍以上の超純水で洗浄します。
- 適切な SEC 標準で、システム性能を定期的に確認します。

カラムの保管

- 短期間の保管 (2 週間未満) - カラムを分析用の移動相内で保管します。
- 長期間の保管 (2 週間以上) - ろ過した 100 mM のリン酸ナトリウム、pH ≤ 7.0 でカラムを保管します。場合により、0.02 % の NaN₃ 水溶液または 20 % のメタノール水溶液を使用します。カラム容量の 10 倍以上でカラムをフラッシュします。メタノールやエタノールの導入前に水でフラッシュすることを常に推奨します。20 % のメタノールとの間で切り替える場合は、カラムフラッシュを低流量で実行し、高粘性によるカラムの過圧を防ぐ必要があります。低流量で開始し、4.6 mm のカラムでは 0.1 mL/min 以下、2.1 mm のカラムでは 0.05 mL/min 以下の流量でフラッシュします。圧力は必ず 40 MPa 未満に維持してください。カラムは室温で保管します。

標準品、カラム、消耗品などの情報

説明	部品番号
サンプル前処理消耗品	
Captiva ディスポーザブルシリンジ、5 mL、100 個	9301-6476
Captiva プレミアムシリンジフィルタ、PES、15 mm、0.2 μm、100 個	5190-5096
標準	
Agilent NISTmAb、4 × 25 μL	5191-5745
AdvanceBio SEC 300 Å 用標準液	5190-9417
AdvanceBio SEC カラム	
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm ガード、4.6 × 30 mm (推奨)	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm、4.6 × 300 mm (推奨)	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm、4.6 × 150 mm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm ガード、2.1 × 50 mm、PEEK ライナ付き SS	PL1980-1201PK
AdvanceBio SEC 200 Å、1.9 μm、2.1 × 150 mm、PEEK ライナ付き SS	PL1980-3201PK
カラムフィッティングとコネクタ	
Agilent InfinityLab クイックコネクタフィッティング (カラム注入口と出口で2個必要)	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックコネクタキャピラリー MP35N 0.12 × 105 mm (クイックコネクタフィッティング用) ※別途クイックコネクタフィッティングが必要	5500-1578
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) ※別途クイックコネクタフィッティングが必要	5067-5966
クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 × 280 mm (クイックターンフィッティング用) ※別途クイックコネクタフィッティングが必要	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
キャピラリー MP35N 0.17 × 100 mm SL/SL ps/ps (ガードとカラムの接続用) ※別途クイックコネクタフィッティングが必要	5500-1278
超低拡散キット *	
Agilent 1290 Infinity II LC 用超低拡散チューブキット	5067-5963
Agilent 1290 Infinity II Bio 用超低拡散チューブキット	5004-0007

説明	部品番号
サンプル容器消耗品	
A-Line スクリューバイアル、2 mL、12 × 32 mm (12 mm キャップ) 茶色、ラベル付、100 個	5190-9590
スクリューキャップ、12 mm、圧着、青色、PTFE/白色シリコンセブタム、100 個	5190-7021
バイアルインサート、250 μL、5.6 × 30 mm、不活性化ガラス、樹脂足付、100 個	5181-8872
InfinityLab ウェルプレート 96/0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒と添加剤	
InfinityLab UltraPure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
InfinityLab UltraPure LC/MS MeOH、1 L (カラム保管用)	5191-4497
ギ酸、5 mL	G2453-85060
溶媒ろ過消耗品†	
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
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 μm、100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 μm、100 個	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
溶媒処理消耗品	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
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 セーフティパーズボトル、1 L	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き (活性炭フィルタ 5043-1193 は含まれない)	5043-1221
InfinityLab 活性炭フィルタ、タイムストリップ付き、58 g (5043-1221 用)	5043-1193

* 1290 Infinity II Bio システム用に推奨

† この表に掲載されていない溶媒を使用する場合は、分析前に InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリを使用します。

凝集体およびフラグメント分析用のその他の SEC カラムソリューションについては、ホームページをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, October 11, 2021
5994-3947JAJP
DE44462.411099537

 **Agilent**
Trusted Answers