

サイズ排除クロマトグラフィーによる 高分解能、ハイスループットの モノクローナル抗体分析

Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラム

著者

Veronica Qin
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムを用いた、モノクローナル抗体 (mAb) の高分解能、ハイスループットのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析について説明します。最適化されたサブ 2 µm 粒子による高速分離と高分解能によって、正確な定量が可能です。

はじめに

凝集とフラグメントは、生物製剤タンパク質の重要品質特性であり、十分な特性解析が必要です。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、これらのサイズバリエーションの分析に一般的に使用される方法です。ハイスループットな SEC 分析が必要となるケースがあります。例えばクローン選択中の医薬品開発の初期段階やプロセス開発中には、日常的に大量のサンプルの分析が必要です。AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムでは独自の耐久性の高いサブ 2 µm 粒子を使用するため、高分解能での高速分析が可能です。これらの特長によって、サンプルスループットを大幅に向上させながら、堅牢で正確な結果を得ることができます。

実験方法

材料

MilliporeSigma から購入した SiLu Lite SigmaMAb ユニバーサル抗体標準に水を加え溶解し 1 mg/mL としました。リン酸水素ナトリウムおよびリン酸水素二ナトリウムと塩化ナトリウムは MilliporeSigma から購入しました。化学物質はすべて純度 ≥99.5 % のものを使用しました。水は、Milli-Q A10 純水生成装置 (Millipore) で精製しました。溶液は毎日調製し、使用前に 0.22 µm メンブランフィルタでろ過しました。

装置構成

LC システム

Agilent 1260 Infinity LC を次の構成で使用しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートクォータナリポンプ (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却器 (オプション #100) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)、バイオイナート熱交換器 (オプション #019) を搭載
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器 (G7114A)

分析条件

パラメータ	1260 Infinity II LC
カラム温度	25 °C
移動相	50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl, pH 7.0
流量	0.3 ~ 0.7 mL/min
注入量	1 µL
検出	UV (220 nm)

カラム

- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm、4.6 × 300 mm (p/n PL1580-5201)
- Agilent AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm、4.6 × 150 mm (p/n PL1580-3201)

ソフトウェア

Agilent OpenLab 2.2 CDS

結果と考察

図 1 に凝集およびフラグメントを含む mAb の SEC クロマトグラムを示します。300 mm カラムを使用し、0.35 mL/min、0.4 mL/min、0.5 mL/min の流量で分析しました。0.5 mL/min の流量でも、二量体/単量体と単量体/フラグメント 1 の両方で優れた分解能を達成しました (表 1)。0.35 mL/min の流量と比較すると、分解能の低下なしで分析時間を 28 % 短縮できました。

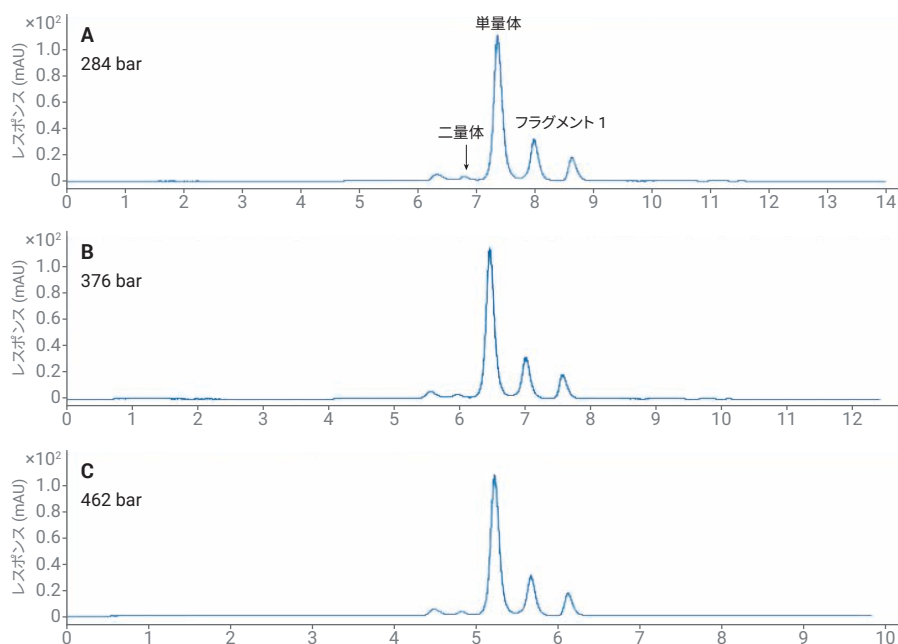


図 1. SigmaMAb のサイズ排除クロマトグラム ($(F(ab')_2$ フラグメントおよび Fc フラグメントを混合)。4.6 × 300 mm の SEC カラムを用いて 50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl, pH 7.0 で分析。流量はそれぞれ A) 0.35 mL/min、B) 0.4 mL/min、C) 0.5 mL/min

より短い 150 mm カラムを使用すると、高速でハイスループットの SEC 分析が可能となります。これは通常、生物製剤開発の初期段階や高速分析が必要な場合（プロセスのモニタリング中など）に使用されます。図 2 は、150 mm の AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 μm カラムで、0.7 mL/min までのさまざまな流量をテストした結果です。

表 1. さまざまな流量でのピークテーリングファクターと分解能

流量 (mL/min)	テーリングファクター (単量体)	分解能 (二量体/単量体)	分解能 (単量体/フラグメント 1)
0.35	1.18	1.98	2.37
0.4	1.16	1.96	2.36
0.5	1.14	1.91	2.29

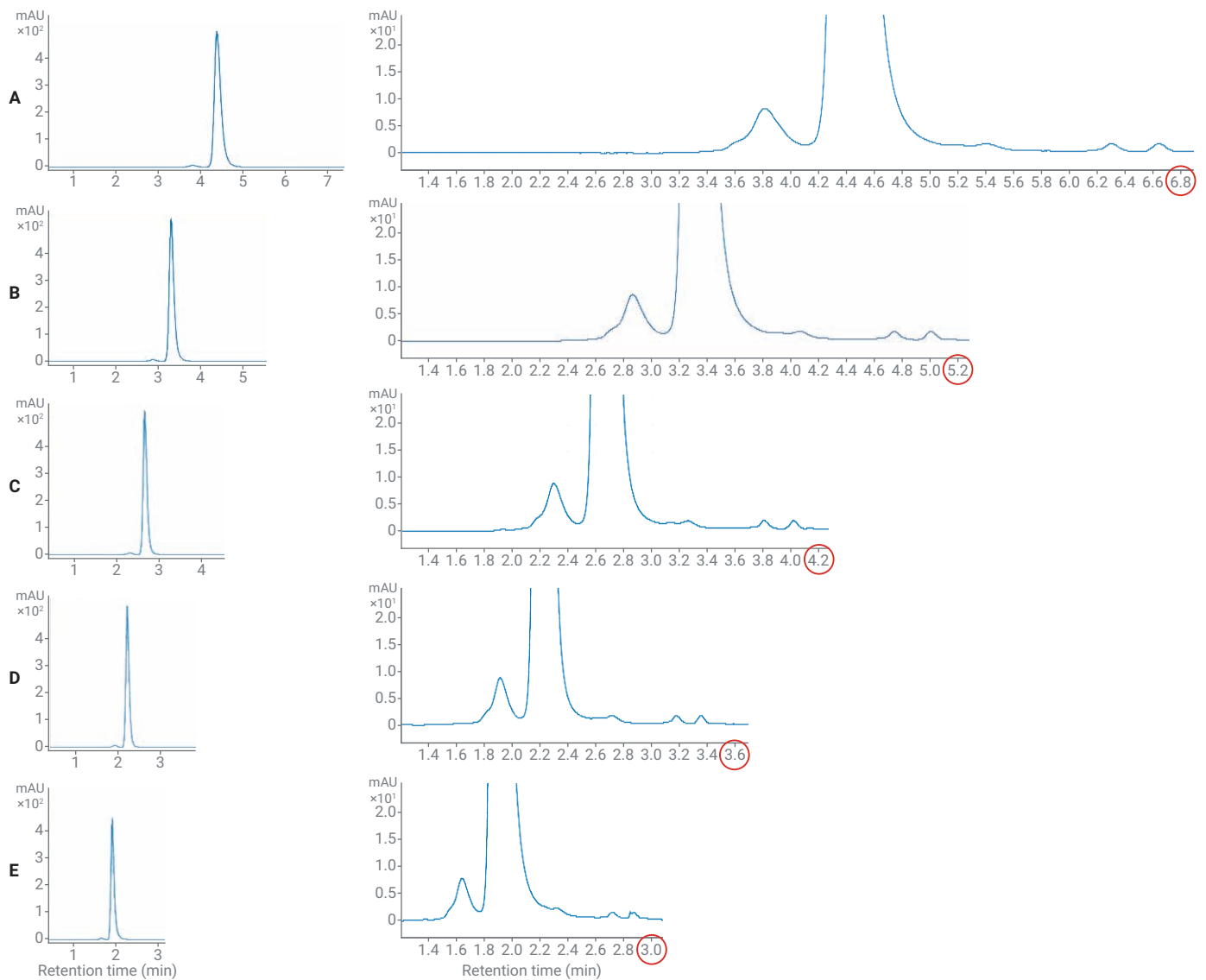


図 2. SigmaMAb のサイズ排除クロマトグラム。4.6 × 150 mm の SEC カラムを用いて 50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0 で分析。流量はそれぞれ A) 0.3 mL/min、B) 0.4 mL/min、C) 0.5 mL/min、D) 0.6 mL/min、E) 0.7 mL/min

このカラムの独自の粒子によって、高流量でも二量体/単量体を安定的に高分解能で分析し、二量体ピーク面積を正確に定量できます(表 2)。

表 2 は、流量がサンプルスルーットに与える影響の計算結果です。流量を 0.3 mL/min から 0.7 mL/min に上げると、1 日あたり 480 サンプルを分析できます。つまり、スルーットが 2.3 倍向上します。300 mm カラム、0.3 mL/min では 1 日に 105 サンプルしか分析できないため、これと比較するとスルーットが 4.6 倍向上しています。

結論

今回の実験結果は、mAb 凝集体の高速分析における AdvanceBio SEC 200 Å 1.9 µm カラムの優れた性能を示しています。高耐久性粒子によって、流量を上げてでも高分解能での分析が可能です。カラム長を 300 mm から 150 mm に短縮し、流量を 0.3 mL/min から 0.7 mL/min に上げることで、サンプルスルーットを 4.6 倍向上させることができます。

表 2. 分解能、単量体の面積%、サンプルスルーットに流量が与える影響

流量 (mL/min)	分析時間 (分)	背圧 (bar)	分解能 (二量体/単量体)	二量体面積%	1 時間あたりの サンプル数	1 日 (24 時間) あたりの サンプル数
0.3	6.8	164	1.81	2.33	8 ~ 9	211
0.4	5.2	218	1.79	2.35	11 ~ 12	276
0.5	4.2	272	1.78	2.35	14	342
0.6	3.6	324	1.77	2.39	16 ~ 17	400
0.7	3.0	380	1.58	2.30	20	480

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. 2019
Printed in Japan, March 28, 2019
5994-0828JAJP