



Agilent BioHPLC サイズ排除クロマトグラフィーカラム

タンパク質凝集体・分解物を 高速かつ確実に分離

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

AGILENT BioHPLC サイズ排除クロマトグラフィーカラム

タンパク質凝集体および分解物の 高速、高分離能の分離を実現

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、単量体、二量体、凝集体、分解物の定量に欠かせない手法です。こうしたタイプのタンパク質分離には、最高レベルの精度とスピードが求められます。

サイズ排除クロマトグラフィー用の **Agilent BioHPLC カラム**は、バイオ医薬品分析においてスピードと信頼性、精度を実現します。ワークフローへの統合も容易です。また、ポアサイズとサイズを幅広く取り揃えることにより、さまざまな分析に対応が可能です。

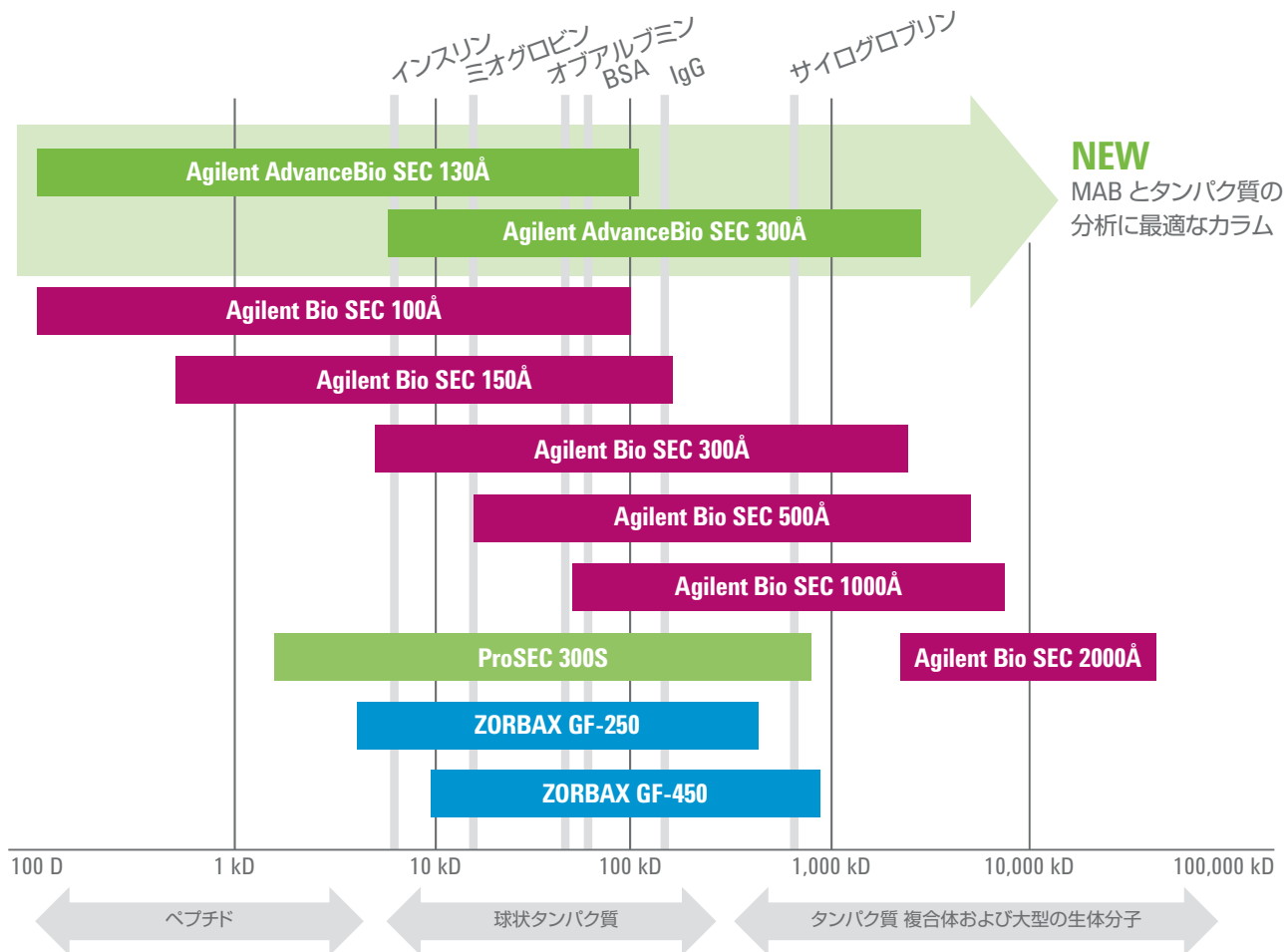
30 年以上にわたって、アジレントは、SEC 用のカラムおよび機器分野をリードしてきました。最高の分離能とスピードを実現するアジレントのカラムは、医薬品の迅速かつ効率的な開発をサポートします。そのため、人生を変える画期的な医薬品を、それを必要としている人のもとに迅速かつ効率的に届けることができます。

AdvanceBio SEC は Agilent SEC カラムファミリーに新たに加わった最新の技術、粒子、ケミストリによる製品で、mAb 凝集体とタンパク質の高精度で正確な定量を実現するために設計されています。



アプリケーションに適した SEC カラムの選択チャート

アジレントの幅広い SEC カラムラインナップなら、分析対象物やメソッドパラメータに応じて、完璧な分離を実現するためのカラムを選択することができます。このチャートでは、一般的な分子タイプで最高の結果が得られるポアサイズの範囲をまとめています。



目次: 最先端の生体分子アプリケーションに対応する Agilent BioHPLC SEC カラム

モノクローナル抗体の分離用に設計された

新しいテクノロジー

Agilent AdvanceBio SEC カラム 4

質量分析装置によるタンパク質の分析

Agilent Bio SEC-3 HPLC カラム 9

大型の生体分子

Agilent Bio SEC-5 HPLC カラム 11

単一のカラムによる球状タンパク質分析

Agilent ProSEC 300S カラム 12

USP L35 を要求する SEC プロトコル用

Agilent ZORBAX GF-250 および

ZORBAX GF-450 カラム 13

創薬、QC/QA、製薬

単一のカラムでさまざまなサンプルに対応 14

精製 23

高度な検出器 24

タンパク質同定および不純物プロファイリング用の

LC システム 25

製品情報 28

タンパク質凝集体および分解物の高速高分離能分離の詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

AGILENT ADVANCEBIO SEC カラム

AdvanceBio SEC カラムは、mAb 凝集体およびタンパク質の SEC 分析の正確で高精度な定量を実現します。この新しい SEC テクノロジーは次のことを実現するために設計されています。

- より正確な定量のための高分離能
- 期限内にデータを提供するための分析の高速化
- サンプルの完全性の確保
- 低濃度の場合でも高い感度での凝集体の定量

さらに、AdvanceBio SEC カラムは、サンプルの再分析が不要な堅牢で信頼できるメソッドを提供することによってラボの生産性を向上させます。また、メソッドを QA/QC を含め他の場所に容易に移管することができ、後期段階の候補およびバッチでの失敗のリスクを低減できます。

正確な定量のための最適な分離能

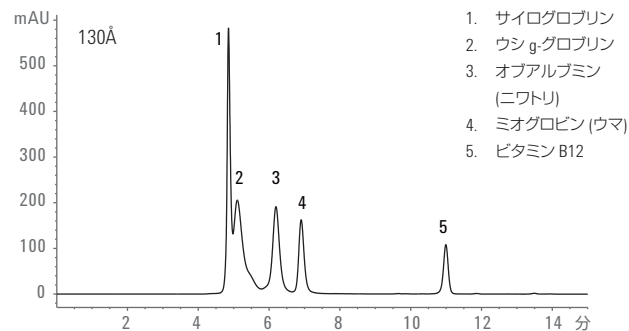
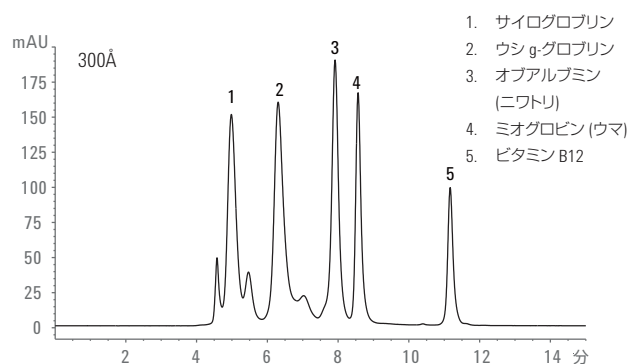
右のクロマトグラムは、AdvanceBio SEC 300Å と 130Å カラムを用いて BioRad ゲルろ過標準混合物の分離を比較しています。

上のクロマトグラム: AdvanceBio SEC 300Å カラムは mAb などの大型のタンパク質の定量に適した分離能を備えています。

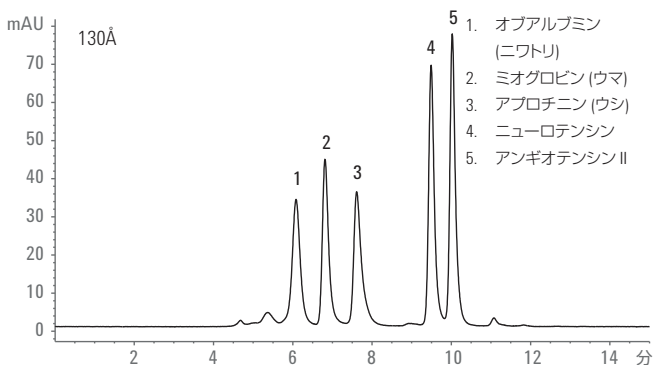
下のクロマトグラム: AdvanceBio SEC 130Å カラムは、タンパク質断片、小型のタンパク質、ペプチドなどの定量に適した分離能を備えています。

BioRad ゲルろ過標準混合物 #1511901

カラム: AdvanceBio SEC、7.8 x 300 mm 移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0



BioRad ゲルろ過標準混合物を用いて AdvanceBio SEC 300Å および 130Å の分離能を示しています。300Å は優れた分離能を実現します。

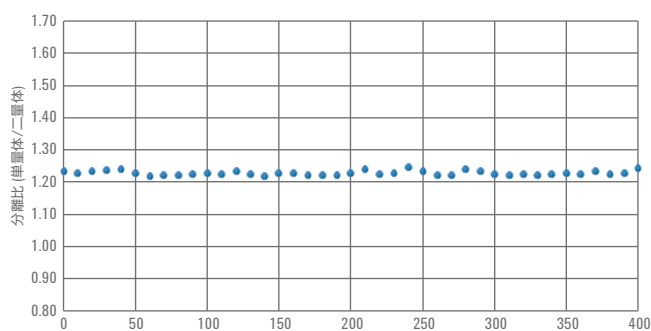


タンパク質とペプチド混合物を用いて、AdvanceBio SEC 130Å の小型のペプチドおよびタンパク質の分離能を示しています。

期限内でのデータの提供—サンプルスループットの向上

AdvanceBio SEC カラムの長さを 300 mm から 150 mm に短くして流量を 1.0 mL/min から 2.0 mL/min に高速にすることにより、分析時間を 12 分から 3 分に短縮することができました。さらに、IgG の単量体と二量体の分離能は、定量に十分で 400 回以上の注入にわたって一貫していました。

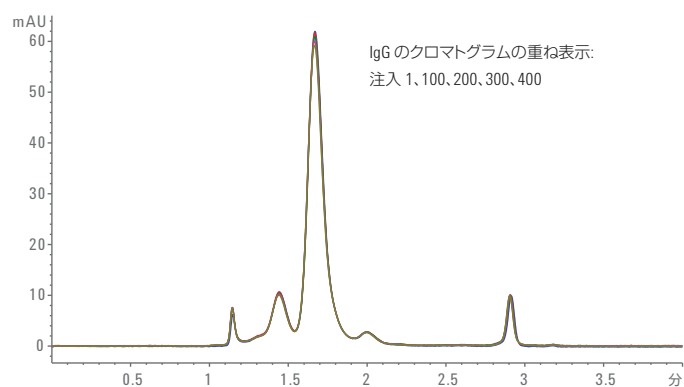
400 回の注入にわたっての分離能



カラム: Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 150 mm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

1 回目から 400 回目の注入のクロマトグラムの重ね表示



Agilent 130Å AdvanceBio SEC タンパク質標準

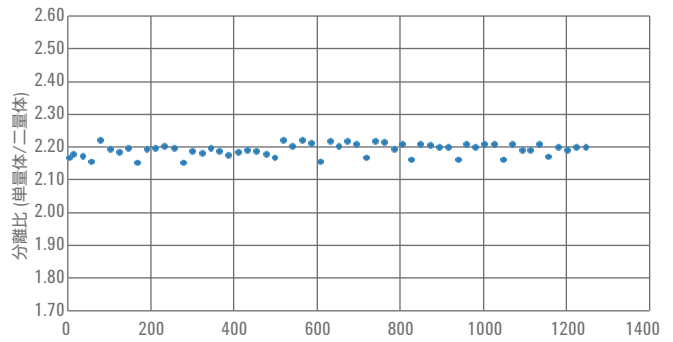
タンパク質標準混合物は、Agilent 130Å AdvanceBio サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計され、選択された 5 つのタンパク質 (オブアルブミン、ミオグロビン、アプロチニン、ニューロテンシン、アンギオテンシン II) で構成されています。この標準を使用して、タンパク質の精製や分析を含むさまざまなアプリケーションでカラムのキャリブレーションおよび最適なシステム性能の確認を定期的に行うことができます。

Agilent 300Å AdvanceBio SEC タンパク質標準

タンパク質標準混合物は、Agilent 300Å AdvanceBio サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計され、選択された 5 つのタンパク質 (サイログロブリン、g-グロブリン、オブアルブミン、ミオグロビン、アンギオテンシン II) で構成されています。この標準を使用して、タンパク質の精製や分析を含むさまざまなアプリケーションでカラムのキャリブレーションおよび最適なシステム性能の確認を定期的に行うことができます。

サンプルの完全性の確保

導入プロトコルの一部として、従来のタンパク質 SEC カラムでは、非特異的な相互作用の原因である部位をブロックするために、BSA で条件付けする必要があります。Agilent AdvanceBio SEC カラムで用いた新しい結合相は、非特異的な相互作用を低減しサンプルの完全性を維持する表面不活性を実現することによって、この問題を回避しています。



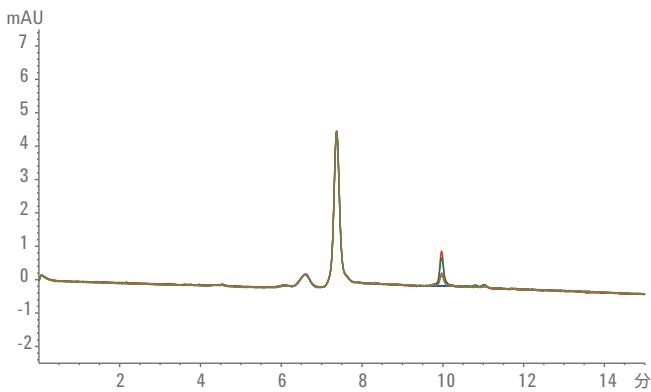
カラム: AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 x 300 mm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0

サンプル: IgG

プロットは 1300 回の注入シーケンスにわたる IgG 単量体と二量体との間の分離能を示しています。

タンパク質の回収率に問題は観察されず、サンプルの完全性を維持

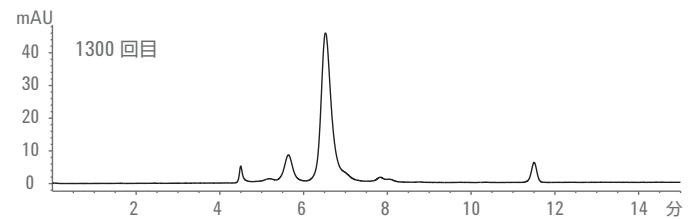
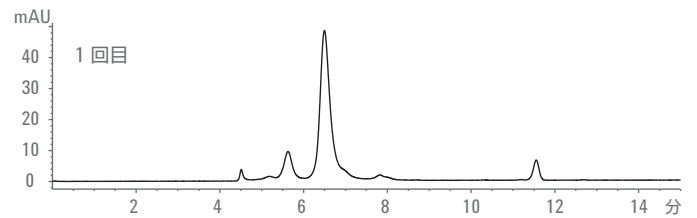


カラム: AdvanceBio SEC, 300Å, 7.8 x 300 mm

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム, pH 7.0

0.1 µg BSA オンカラムに相当する 0.1 mg/mL の BSA 1 µL を 5 回繰り返して注入。オンカラムへのロード量が 0.1 µg であっても BSA ピーク面積は一貫しています。

注入回数	単量体のピーク面積
1	50.5
2	49.6
3	50.6
4	50.0
5	50.2



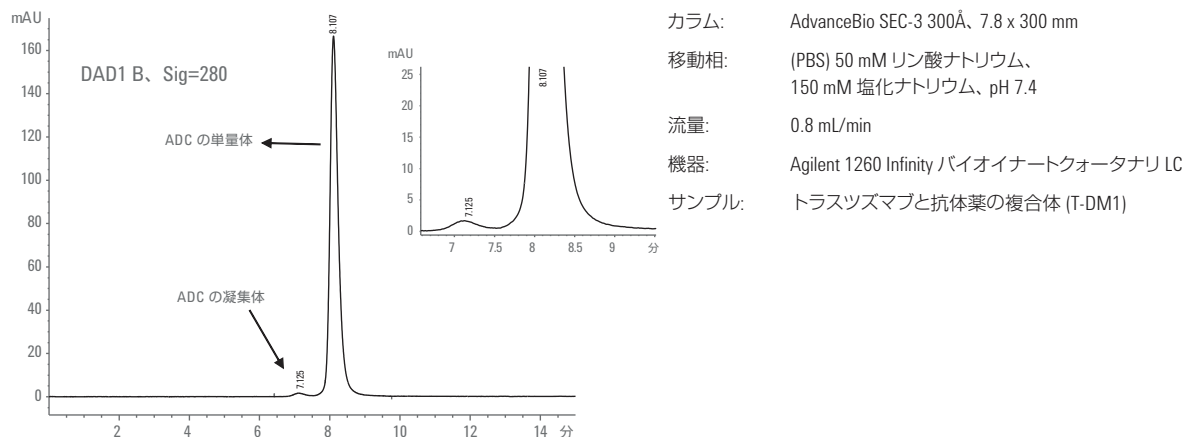
IgG サンプルのプロファイルは 1300 回の注入後も変わりませんでした (上の左)。IgG の単量体と二量体の分離係数と定量についてもカラム寿命を通して動作範囲に収まっていました。

低濃度でも凝集体の定量を実現

AdvanceBio SEC-3、300Å、

7.8 x 300 mm、2.7 μm カラムを用いて分離能とベースライン安定性が得られました。

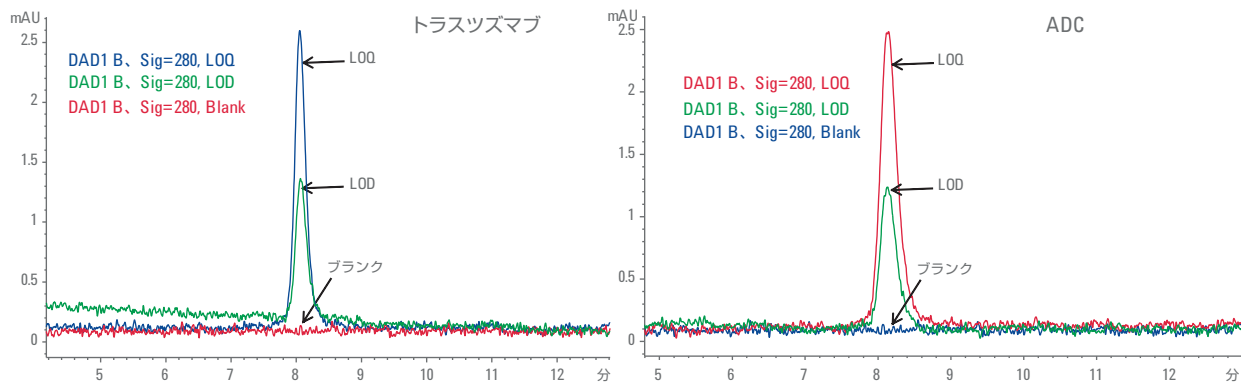
これにより、mAb および抗体薬の複合体 (ADC) サンプル中の二量体および凝集体の低濃度レベルでの定量を実現できました。



インタクト T-DM1 (ADC) の SEC プロファイル。

検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ)

トラスツズマブと ADC の LOD および LOQ はそれぞれ 15 μg/mL および 31 μg/mL でこのメソッドが高感度であることが示されました。



blankと重ねて表示したトラスツズマブとADCのLODとLOQのクロマトグラム。

限りなく優れた生体分子分析を実現

SEC は、長年にわたってバイオポリマー分析の主力テクニックとなっています。特に、タンパク質凝集体の検出や定量には広く用いられています。高度な検出器を使えば、重要なパラメータにおける感度を高め、さらなる情報を引き出すことができます。こうした分析は、規制が強化されている状況では、とりわけ重要です。Agilent 1260 Infinity Bio-SEC MDS は、大型生体分子の分析のために設計されたソリューションです。

高度な検出器により、生体分子の分子量、大きさ、形状を正確に測定することができます。金属を含まないサンプルフローパスの

コンポーネントや、鉄やステンレススチールを用いない溶媒送液ユニット設計により、表面における不要な作用が最小限に抑えられることで、生体分子の完全性が保たれ、データ品質の信頼性が高まります。直観的で使いやすいソフトウェアを組み合わせれば、この高性能システムにより、再現性の高い情報を簡単に引き出すことができます。

- ・ **正確な分子量**: 相対値ではなく実際のモル質量を測定できます。
- ・ **高感度の凝集体分析**: きわめて低い濃度の凝集体を検出できます。
- ・ **分子サイズの解析**: 生体分子の水和半径を測定できます。

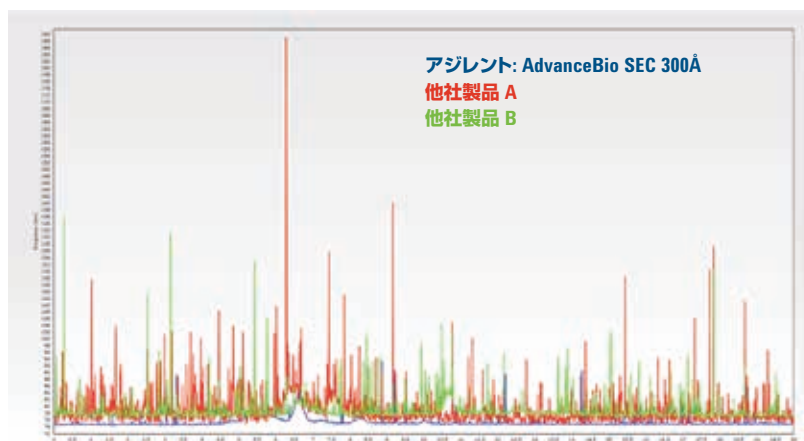
・ **あらゆるユーザーに対応**: 経験にかかわらず、必要な分析結果が得られます。

・ **再現性**: 高度な検出の再現性が高まります。

・ **サンプルの完全性の確保**: サンプルが接触する表面は、完全な金属フリー設計になっています。

・ **操作の容易さ**: シンプルなユーザーインターフェースから高度な情報を引き出せます。

高度な検出テクニック



AdvanceBio SEC カラムは粒子流出が最も少ないため、ベースラインノイズは最も低減されます。



質量分析に適した粒子技術

Bio SEC-3 の粒子技術は、MS に適した溶媒に対して安定しており、**Agilent Bio SEC-3 カラム** は質量分析に適切です。堅牢な粒子により、ベースライン安定性と低 MS シグナル抑制を実現します。その他に次のような利点があります。

- SEC-MS で使用される変性の有機/水系移動相との互換性
- 高塩および低塩条件での優れた安定性
- 分析からラボ調整までに対応するスケールビリティ

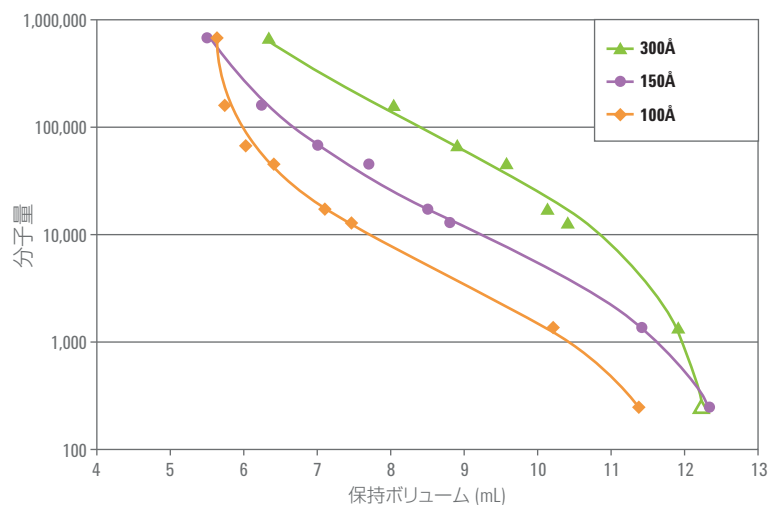
Agilent Bio SEC-3 カラムは Agilent SEC-5 カラムと同じ粒子技術を使用しているため、より小型の生体分子に対応する高い分離能が必要な場合に、効率に優れた選択肢となります。



Bio SEC-3 カラムの仕様

結合相	ポアサイズ (Å)	粒子径 (μm)	タンパク質の MW 範囲 (Da)	pH 範囲	流量 (mL/min)	推奨使用圧力 (bar)
Bio SEC-3	100	3	100~100,000	2~8.5	0.1~1.25 (7.8 mm id), 0.1~0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-3	150	3	500~150,000	2~8.5	0.1~1.25 (7.8 mm id), 0.1~0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-3	300	3	5,000~1,250,000	2~8.5	0.1~1.25 (7.8 mm id), 0.1~0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)

Bio SEC-3 のタンパク質の検量線

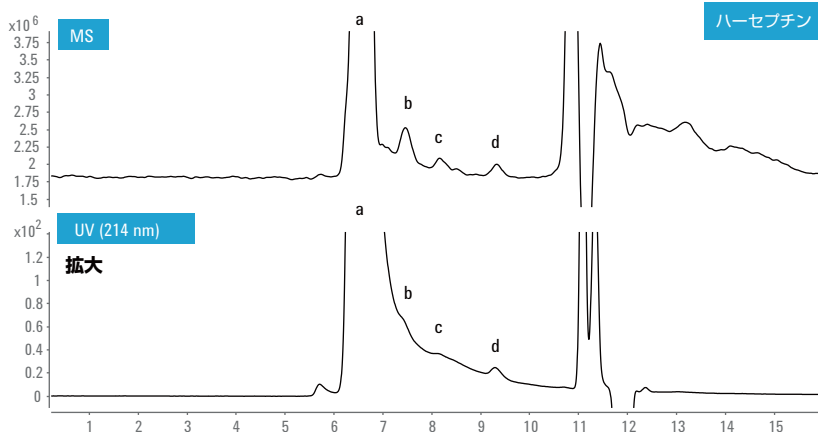


カラム:	Bio SEC-3 7.8 x 300 mm, 3 μm	タンパク質	MW/ダルトン	保持ボリュウム		
				300Å	150Å	100Å
移動相:	リン酸ナトリウム 150 mM, pH 7.0	サイログロ	670,000	6.34	5.50	5.63
		プリン				
流量:	1.0 mL/min	g-グロブリン	150,000	8.03	6.24	5.74
		BSA	67,000	8.90	7.00	6.03
検出器:	UV	オプアルブミン	45,000	9.57	7.70	6.41
		ミオグロビン	17,000	10.12	8.50	7.10
		リボヌクレアーゼ A	12,700	10.40	8.80	7.46
		ビタミン B12	1,350	11.90	11.40	10.20

質量分析法はピークの構造と同定を求めるための優れた技術です。

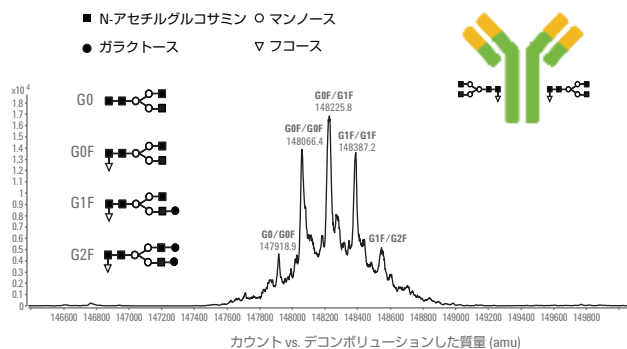
SEC と MS とを接続することにより、DAD や UV を使用する場合には得られない情報を得ることができます。しかし、SEC 用に使用する代表的な移動相はバッファと塩を含むため、MS とは互換性がありません。変性移動相 (アセトニトリルとギ酸およびトリフルオロ酢酸と混合した水など) に変更することによって、SEC カラムは直接 MS に接続されます。

SEC-MS 分析 (インタクト mAb)

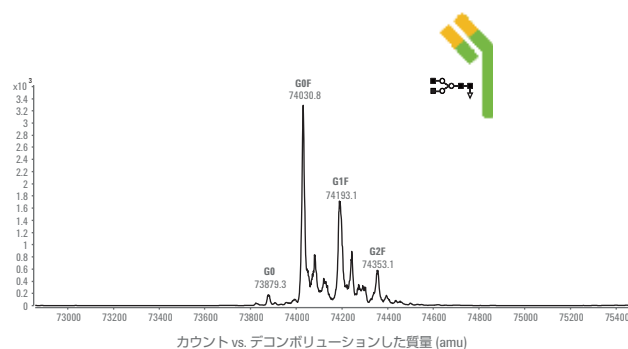


カラム:	Bio SEC-3 7.8 x 300 mm、3 μm	MS:	Agilent 6540 Q-TOF
LC:	Agilent 1290 Infinity バイオイナート クォータナリ LC	移動相:	20 % ACN、0.1 % ギ酸、 0.1 % TFA
		流量:	1 mL/min
		温度:	24 °C

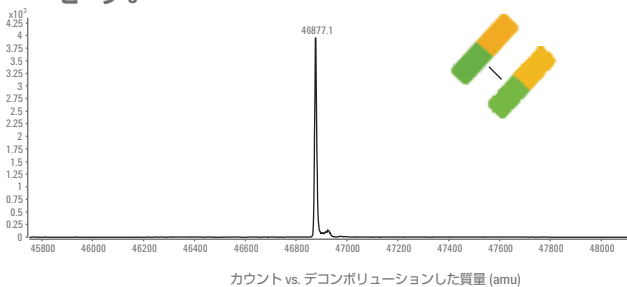
ピーク a



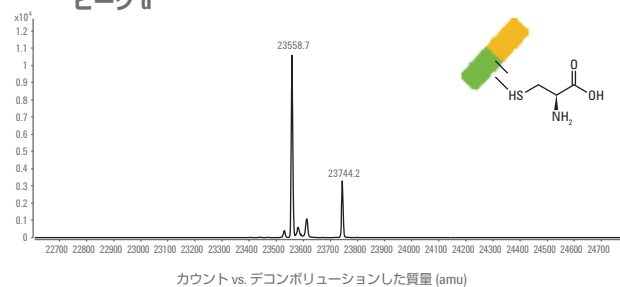
ピーク b



ピーク c



ピーク d



ピーク a はインタクト mAb 単量体のピークとさまざまなグリコフォームを表しています。ピーク b、c、d はフラグメントです。

大型の生体分子に対応する 優れた性能

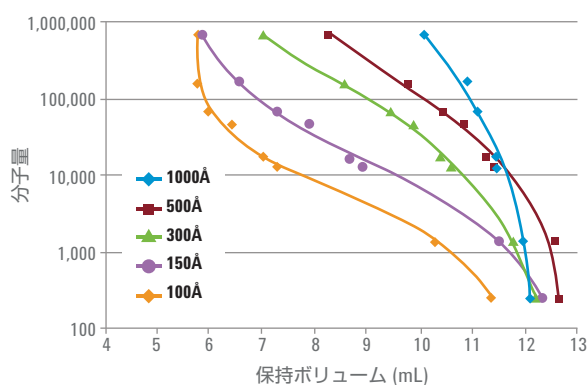
複数の分子量を持つ大型の生体分子やサンプルを扱う場合は、**Agilent Bio SEC-5 カラム**が理想的な選択肢です。このカラムでは、効率と安定性を高めるために、独自の中性親水性層で被膜された 5 μm シリカ粒子が充填されています。6 種類のポアサイズにより、幅広い分子量範囲で最適な分離能を実現します。

- **優れた分離能:** 大型の分子で優れた分離能を実現します。
- **優れた安定性と効率:** 独自の中性親水性層により実現します。
- **ピークキャパシティと分離能の向上:** 特別に設計された充填剤により、ポア容積が増加しています。
- **堅牢な性能:** 卓越した再現性とカラム寿命を備えています。
- **優れた安定性:** 高 pH、高塩、低塩といった条件下で優れた安定性を発揮します。
- **フレキシブルなメソッド開発:** ほとんどの水系パッファを使用できます。
- **広い適合性:** 2000Å までのポアサイズにより、ワクチンなどの高分子量の生体分子に対応します。

Bio SEC-5 カラムの仕様

結合相	ポアサイズ (Å)	粒子径 (μm)	タンパク質の MW 範囲 (Da)	pH 範囲	流量 (mL/min)	推奨使用圧力 (bar)
Bio SEC-5	100	5	100 ~ 100,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-5	150	5	500 ~ 150,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-5	300	5	5,000 ~ 1,250,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-5	500	5	15,000 ~ 2,000,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-5	1000	5	50,000 ~ 7,500,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)
Bio SEC-5	2000	5	>10,000,000	2 ~ 8.5	0.1 ~ 1.25 (7.8 mm id)、 0.1 ~ 0.4 (4.6 mm id)	103 (1500 psi)

Bio SEC-5 のタンパク質の検量線



カラム: Bio SEC-5、
7.8 x 300 mm、5 μm
移動相: 150 mM リン酸
ナトリウム、pH 7.0
流量: 1.0 mL/min
検出器: UV

タンパク質	MW/ ダルトン	保持ボリューム				
		1000Å	500Å	300Å	150Å	100Å
サイログロブリン	670,000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
g-グロブリン	158,000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67,000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
オプアルブミン	45,000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
ミオグロビン	17,000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
リボヌクレアーゼ A	12,700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
ビタミン B-12	1,350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
ウラシル (浸透限界マーカー)	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

多数のポアサイズにより、幅広い分子量範囲で最適な分離能を実現します。

単一カラムで球状タンパク質を分析

Agilent ProSEC 300S カラムは、球状タンパク質分析用に特別に設計されたシングルカラムソリューションです。ポアサイズを選択と最適化によって直線性の分離範囲が広がったため、幅広い球状タンパク質の分析に使用することができます。粒子はきわめて堅牢で、使用中に断片化して溶出することはありません。そのため、非常に安定したベースラインが得られます。

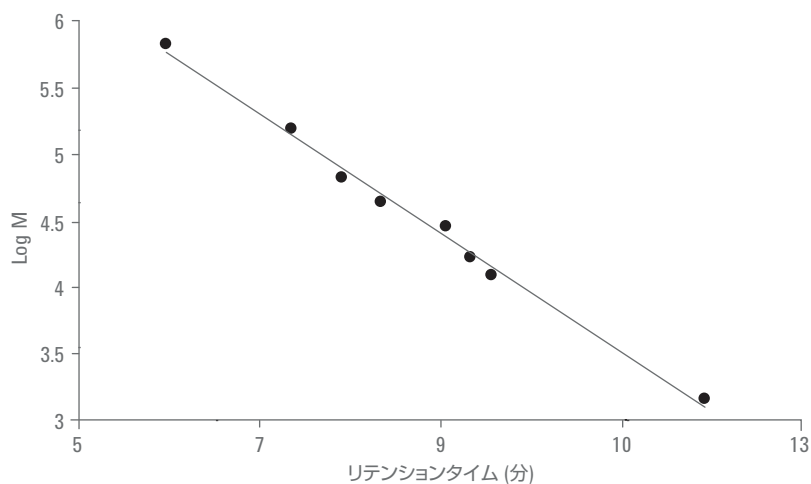
- **安定した性能:** 使用時のブリードがない堅牢なシリカ粒子を使用しています。
- **簡単なメソッド開発:** 広い直線分離範囲を備えているため、ポアサイズを選択する必要がありません。単一のカラムでほとんどの球状タンパク質を分析できます。
- **完璧な分離を実現する選択肢:** 2種類のカラム内径により、マルチ検出器 SEC に対応します。
- **感度の向上:** 光散乱検出器と使用すれば、二量体、三量体、凝集体を分析できます。



ProSEC 300S カラムの仕様

結合相	ポアサイズ (Å)	粒子径 (µm)	タンパク質の MW 範囲 (Da)	pH 範囲	流量 (mL/min)	推奨使用圧力 (bar)
ProSEC 300S 300		5	1,500 ~ 800,000	2 ~ 7.5	<1.5 (7.5 mm id), <0.5 (4.6 mm id)	250 (3700 psi)

球状タンパク質を使用した ProSEC 300S カラムのキャリブレーション



カラム: ProSEC 300S
7.5 x 300 mm, 5 µm

移動相: 0.3 M NaCl を含む 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 6.8)

流量: 1.0 mL/min

検出: UV 280 nm

サンプル: タンパク質サンプル

タンパク質の分子量

MW/ダルトン	タンパク質
670,000	サイログロブリン
155,000	g-グロブリン
66,430	ウシ血清アルブミン
44,287	オプアルブミン
29,000	炭酸脱水酵素
16,700	ミオグロブリン
12,384	シトクローム c
1,423	バシトラシン

の検量線は、リテンションタイムと分子量の対数の直線相関性を示しています。完璧なサイズ排除分離が行われていることがわかります。

USP L35 が必要な SEC メソッド向け

ZORBAX GF-250 および ZORBAX GF-450

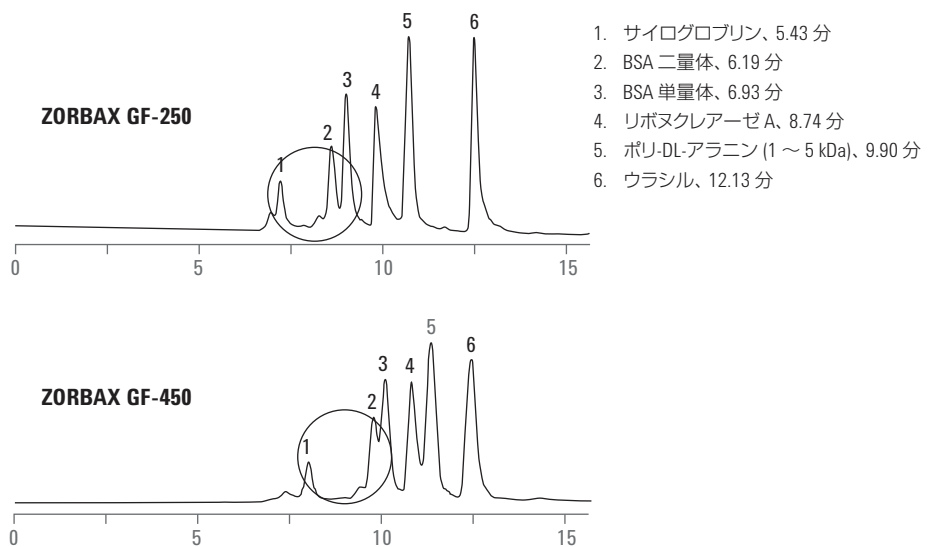
サイズ排除 (ゲルろ過) カラムは、親水性ジオール結合相を使用することで、高いタンパク質回収率 (通常は >90 %) を実現しています。また、独自のジルコニア修飾を施したシリカにより、広い pH 範囲に対応しています。

- **エンドツーエンドの分析:** セミ分取から分取までのカラムサイズが用意され、3 mL/min までの流量で使用できます。
- **高い回収率:** 親水性ジオール結合相が、90 % を超える回収率を実現します。
- **堅牢性:** 精密なサイズの多孔質シリカ微細球により、ポアサイズと粒子サイズのばらつきが小さくなっています。
- **有機修飾剤に対応 (<25 %):** 変性剤にも対応するため、非特異的反応が最小限に抑えられます。
- **広い適合性:** 広い pH 範囲に対応します: pH 3 ~ 8

ZORBAX GF-250 および ZORBAX GF-450 カラムの仕様

結合相	ポアサイズ (Å)	粒子径 (μm)	タンパク質の MW 範囲 (Da)	pH 範囲	流量 (mL/min)	推奨使用圧力 (bar)
ZORBAX GF-250	150	4	4,000 ~ 400,000	3.0 ~ 8.0	<3.0	350 (5,104 psi)
ZORBAX GF-450	300	6	10,000 ~ 900,000	3.0 ~ 8.0	<3.0	350 (5,104 psi)

セミ分取カラムを使用したタンパク質の分離



カラム: ZORBAX GF-250、
9.4 x 250 mm、4 μm

カラム: Agilent ZORBAX GF-450、
9.4 x 250 mm、6 μm

移動相: 0.2 M Na₂HPO₄、pH 7.0

流量: 5.0 mL/min

検出: UV 280 nm

サンプル: 200 μL



このタンパク質分離例では、GF-450 および GF-250 分取カラムの相補的な関係が示されています。GF-450 カラムでは、GF-250 カラム (ポアサイズが小さい) の直線分離範囲から排除される分子量の大きい生体分子を確実に分離することができます。

さまざまなサンプルに対応できる ADVANCEBIO SEC カラム

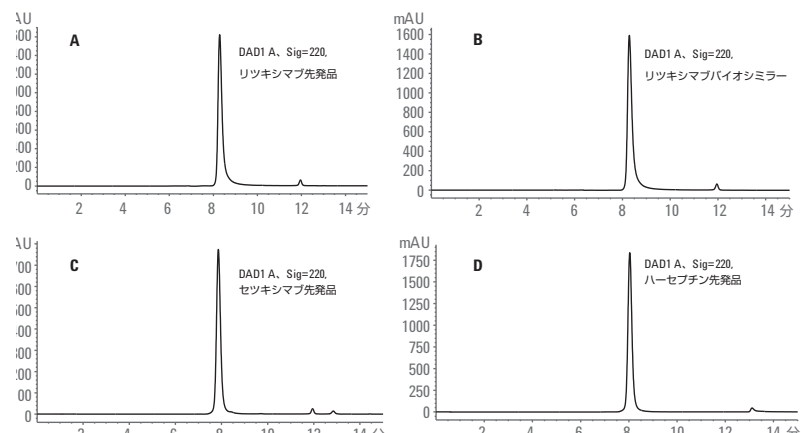
複数のバイオ医薬品の分析に使用 される単一の AdvanceBio SEC カラムとメソッド

さまざまなサンプルタイプ、生物製剤 mAb、
先発品、バイオシミラー、ADC で、同じ水性
移動相を使用できます。

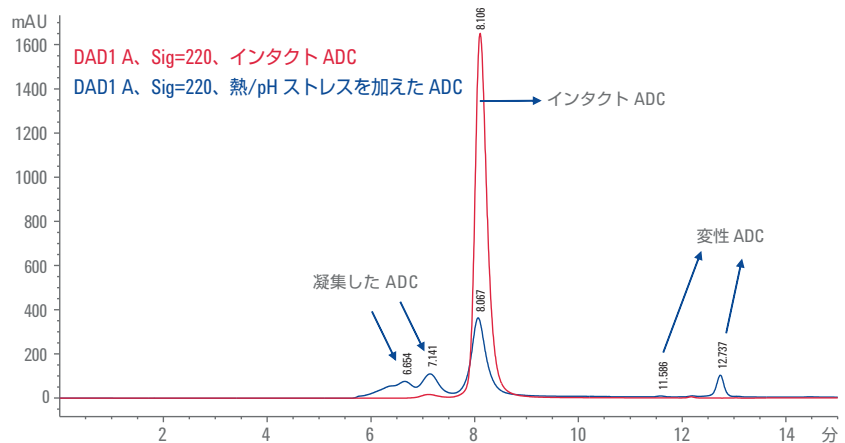
- カラム: AdvanceBio SEC-3 300Å,
7.8 x 300 mm
- 移動相: (PBS) 50 mM リン酸ナトリウム、
150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4
- 流量: 0.8 mL/min
Agilent 1260 Infinity バイオイナート
クォータリ LC
- サンプル: リツキシマブ先発品、リツキシマブ
バイオシミラー、セツキシマブ
先発品、ハーセプチン先発品、ADC

リテンションタイムとピーク面積の精度 (n=6)

サンプル	リテンションタイム		ピーク面積	
	平均 (分)	RSD	平均 (mAU/分)	RSD
リツキシマブ先発品	8.28	0.04	99.33	1.21
リツキシマブ バイオシミラー	8.29	0	100	0
セツキシマブ先発品	7.86	0	99.60	0.96
ハーセプチン先発品	8.034	0	100	0
ADC	8.106	0.005	98.91	0.33



インタクト治療用 mAb, A: リツキシマブ先発品, B: リツキシマブバイオシミラー、
C: セツキシマブ先発品, D: ハーセプチン先発品の SEC プロファイル。



pH/熱ストレスを加えた 2 mg/mL ADC と未変性 (コントロール、赤のトレース) ADC の
AdvanceBio SEC クロマトグラムの重ね表示。

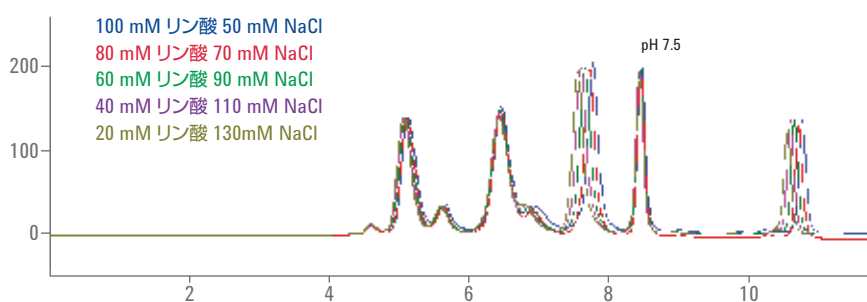
幅広い移動相で 効率の高いサイズ分離を実現

幅広い塩条件で堅牢な性能と 分離能を実現

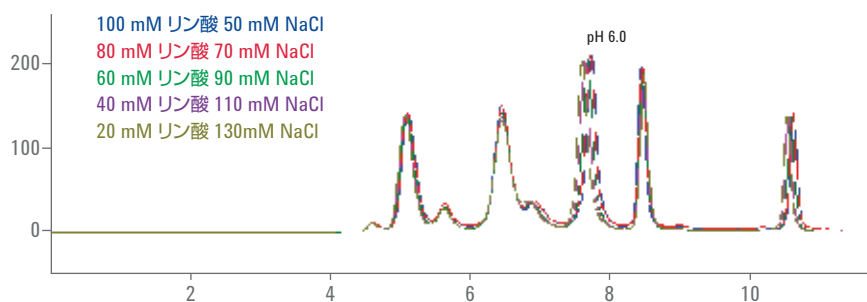
Agilent AdvanceBio SEC カラムは、幅広い塩条件で堅牢な性能を実現します。また、その優れた性能が長い間維持されます。

SEC 分離のメカニズムはサイズにもとづいているため、固定相との二次的反応は避けなければなりません。AdvanceBio SEC カラムは画期的な粒子テクノロジーにより高い塩濃度を使用しないサイズ分離を実現しており、非特異的なイオン性相互作用を低減します。

カラム: AdvanceBio SEC-3、300Å、7.8 x 300 mm
BioRad ゲルろ過標準 #1511901



ここで、ピーク形状には一貫性があり、非特異的な相互作用の特性の歪みは見られません。



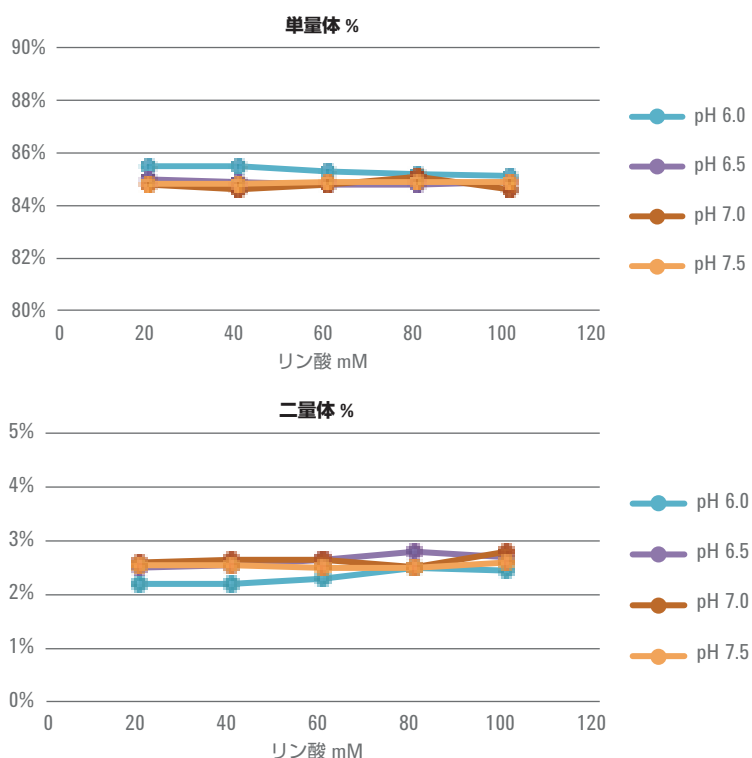
SEC リテンションタイムは溶液内の分子サイズと関係します。溶出時間のわずかな変化は、タンパク質の流体力学半径に pH および塩濃度が与える影響によるものと考えられます。

メソッドを短時間で最適化するソフトウェア

規制機関は、実験計画において、メソッドの堅牢性および再現性を備えた最適な分析メソッドを確立するよう要求しています。手動でこれを確立する場合、非常に多くの移動相を準備し、各移動相を変更する際に LC の平衡化が必要となるため、時間がかかるプロセスとなります。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用すると、4 つのコンポーネント (2 種類のバッファと水と塩溶液) からバッファをオンシステムで準備できるので、プロトコルを簡素化できます。

右の分析では BSA 単量体と二量体の定量の堅牢性について、移動相 (pH 6.0 ~ 7.5) と 20 mM ~ 100 mM の範囲のバッファ濃度の 20 種類の組み合わせを使用して調査しました。



カラム: AdvanceBio SEC、300Å、
7.8 x 300 mm

サンプル: BSA

単量体および二量体の定量へのリン酸バッファ濃度と pH の影響。



手動でのバッファ調製



自動オンラインダイナミックバッファ調製

バッファ調製の時間と費用を削減

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、バッファ調製の自動化を支援します。わずか 4 つの原液を動的に調製するので、多数のバッファ溶液を作成および調製する必要がなくなります。

パフォーマンスの向上: 自動バッファ調製により、メソッド開発が迅速化します。

時間の節約: コータナリ混合により、pH や塩濃度の異なる多数のバッファを容易に混合し、バッファ調製が迅速化します。

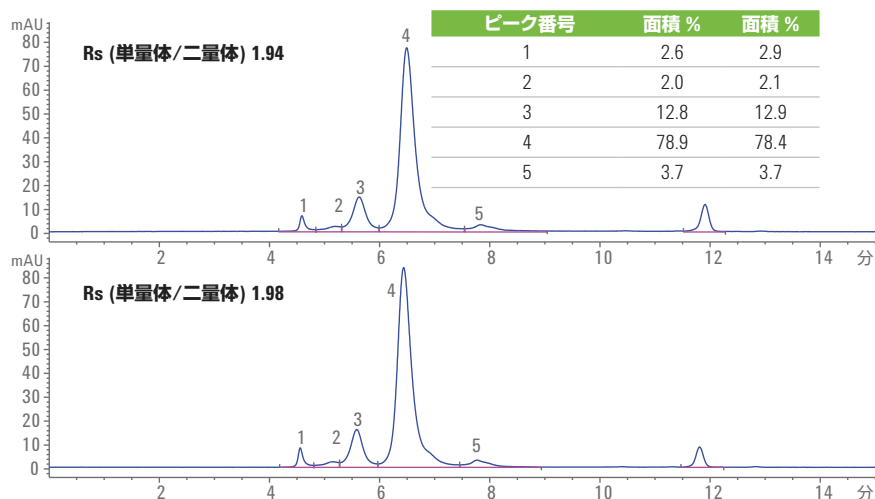
コストの削減: サンプル分析前に最適な溶媒条件を評価できるので、サンプルの無駄が減り、分析時間が短縮されます。

ADVANCEBIO SEC で不確実性を排除

バッチ間の再現性

医薬品開発においてデータを期限内に提供する必要がある場合、堅牢なメソッドとカラムを持つことが必要です。

AdvanceBio SEC カラムはカラム寿命を通して高い性能と再現性を提供します。カラム間およびバッチ間のデータについては 5 ページと 6 ページを参照してください。

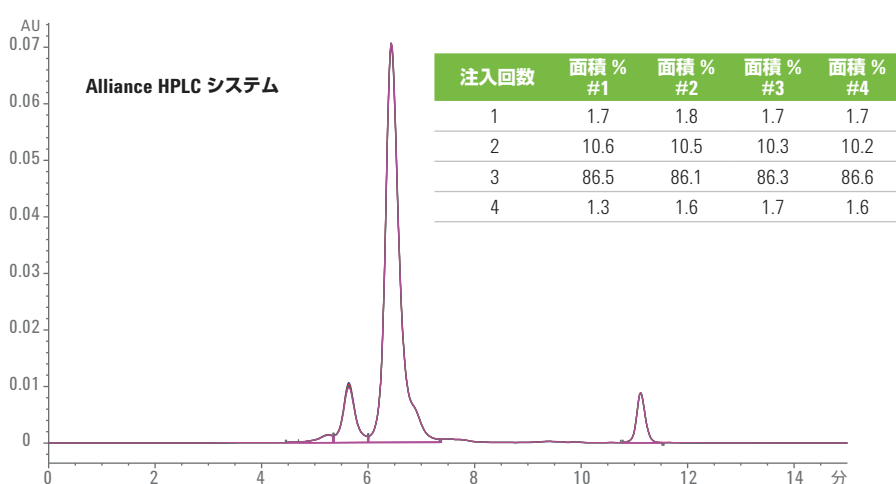


AdvanceBio SEC 300A 4.6 x 300 mm, 2.7 μm カラムを用いた 2 つの異なるバッチの媒体からの γ-グロブリン (IgG) の分析。ピーク 3 と 4、つまり二量体と単量体の間の分離およびパーセント率のピーク面積は、バッチ間の再現性が優れていることを示しています。

機器間

候補生物製剤が開発から承認までを進む中で、同一部署内または別の部署、場所、企業の他の LC 機器へのメソッドの移管が必要となります。AdvanceBio SEC カラムの 2.7 μm の粒子サイズは、200 bar 以下の圧力で分離能を得ることができます。一般的な HPLC システムを使用して分析できるので、メソッド開発時に利用可能な機器を考える必要はありません。

Waters Alliance HPLC システムでの 4 回の連続注入の重ね表示



Waters の Alliance HPLC システムで AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 300mm, 2.7μm を用いたポリクローナル IgG 4 回連続クロマトグラムの重ね表示。

さまざまなカラムサイズにおける高い性能

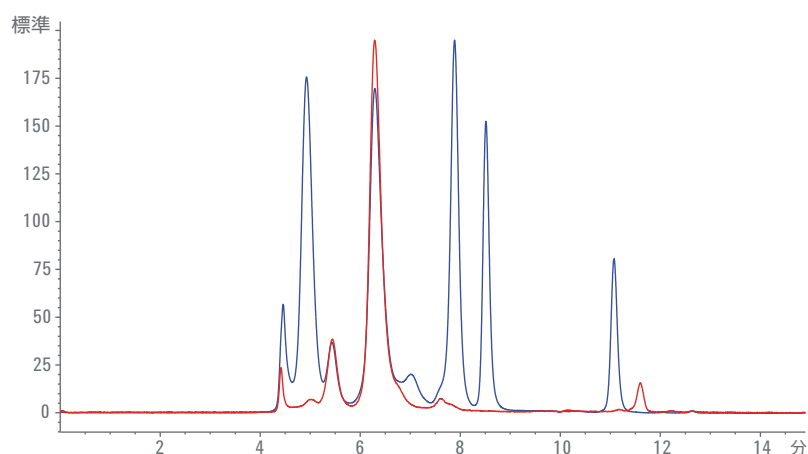
感度を向上するための UHPLC メソッド

UHPLC 機器は、きわめて低い分散および高い精度を実現し、開発早期に最適な LC です。感度が必要で場合によってはサンプル量が少ないアプリケーションでは、内径がより小さいカラムが使用されます。SEC の場合、内径は 4.6 mm です。これらのカラムで使用される流量は通常 0.3 ~ 0.7 mL/min です。

さまざまな機器でのカラム性能を比較するために、BioRad ゲルろ過標準 #1511901 (青ピーク) と市販のポリクローナル IgG を使用しました。データは、異なるラボで異なるカラムおよび異なるテストサンプルロットを用いて生成されました。

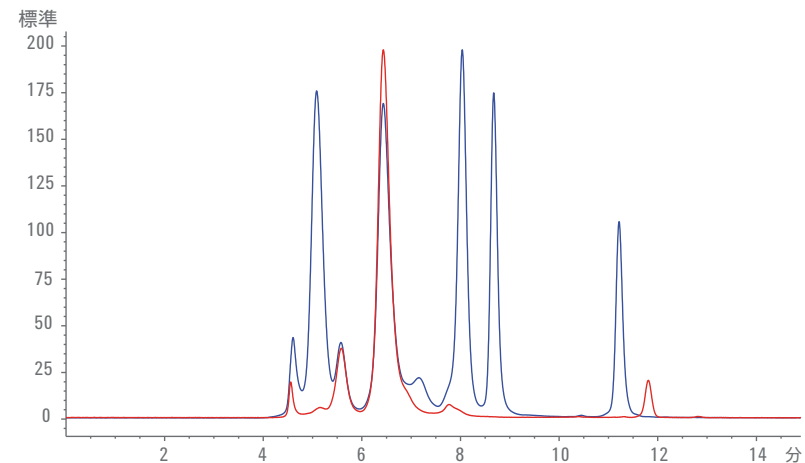
Agilent 1260 Infinity DAD (G1315D) バイオイナートフローセルを搭載した Agilent 1290 Infinity バイナリ LC (1200 bar)。

AdvanceBio SEC 4.6 x 300 mm カラムを流量 0.35 mL/min で使用。



Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC (600 bar)。

AdvanceBio SEC 4.6 x 300 mm カラムを流量 0.35 mL/min で使用。

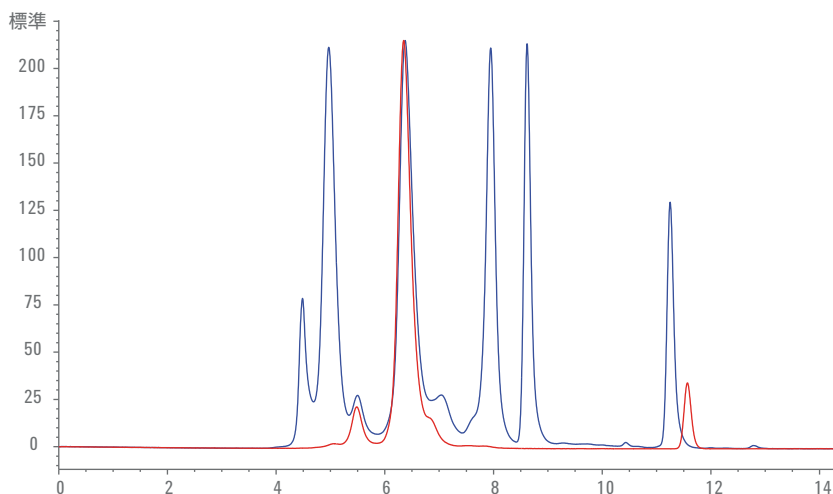


堅牢性を実現する HPLC メソッド

QC メソッドに必要な精度と再現性を提供する堅牢なメソッドを実現するために、一般的な HPLC 機器が、よく採用されます。堅牢な HPLC メソッドを実現するために、より大きな内径 7.8 mm のカラムが HPLC システムで日常的に使用されています。このタイプの LC システムで分離能を得るには、長さ 300 mm のカラムで 1.0 mL/min、サンプルスループットを得るには長さ 150 mm のカラムで最大 2 mL/min が最適な流量です。

Agilent 1100 HPLC 機器 (400 bar)。

AdvanceBio SEC 7.8 x 300 mm カラムを流量 1.0 mL/min で使用。



AdvanceBio SEC カラムにより、候補物質が発見から開発、製造へと移行するときのカラムの交換や新しいメソッドの評価が不要になります。AdvanceBio SEC カラムのサイズを変えるのみです。

最適化された 2.7 μm 粒子サイズのアジレントの AdvanceBio SEC カラムは、200 bar 以下の標準的な圧力で優れた性能を実現します。

メソッドは、機器から機器へおよびラボからラボへ移管できます。

UHPLC データは欧州の研究開発ラボで生成され、HPLC データは米国の技術サポートラボで、異なる科学者が異なるサンプルと異なるカラムを使用して生成されました。

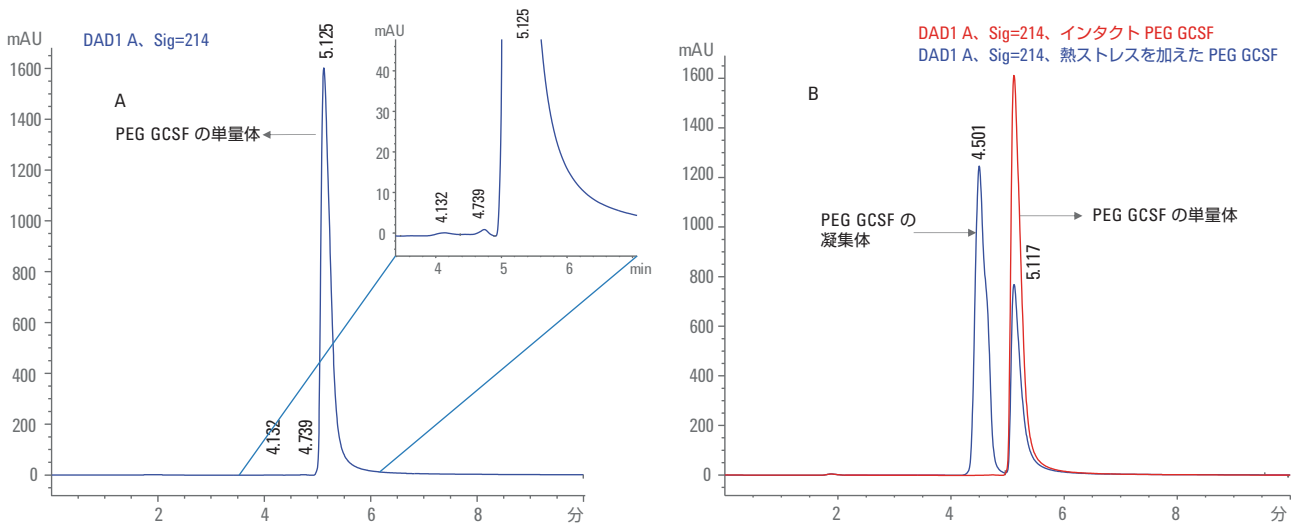
SEC モノグラフメソッド

PEG 化タンパク質の分析

PEG 化とは、タンパク質や薬へのポリエチレングリコール (PEG) ポリマーの共有結合です。分子を PEG 化する利点には、バイオアベイラビリティの増大、血清半減期の延長、免疫原性の低減があります。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、PEG 化タンパク質の高分子質量不純物を識別するために用いられるメソッドです。次の SEC メソッドでは、Agilent AdvanceBio SEC 130Å、7.8 x 300 mm、2.7 μm カラムを用いたドラフトモノグラフによりペグフィルグラスタム (PEG GCSF) を同定しました。

この結果、単体の面積率とリテンションタイムの標準偏差がモノグラフによって設定された許容基準内に収まることが確認されました。さらに、Agilent SEC カラムを用いて、強制的にストレスを与えた試験で生成された PEG GCSF の凝集体を適切に分離、検出、定量することができました。



カラム: AdvanceBio SEC 130Å、7.8 x 300 mm
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム
 移動相 (モノグラフに準じる): 800 ボリュームの水に含まれる 85 % v/v のオルトリン酸溶液 6.8 mL を 10 N 水酸化ナトリウムで pH 2.5 に調整したもの、50 ボリュームのエタノール、および 150 ボリュームの水の混合液。

流量: 1 mL/min
 温度: 25 °C
 サーモスタット: オートサンブラ: 4 °C
 検出器: 214 nm (1260 DAD VL+, G5615-60022 バイオイナートフローセル)
 注入量: 3 μL

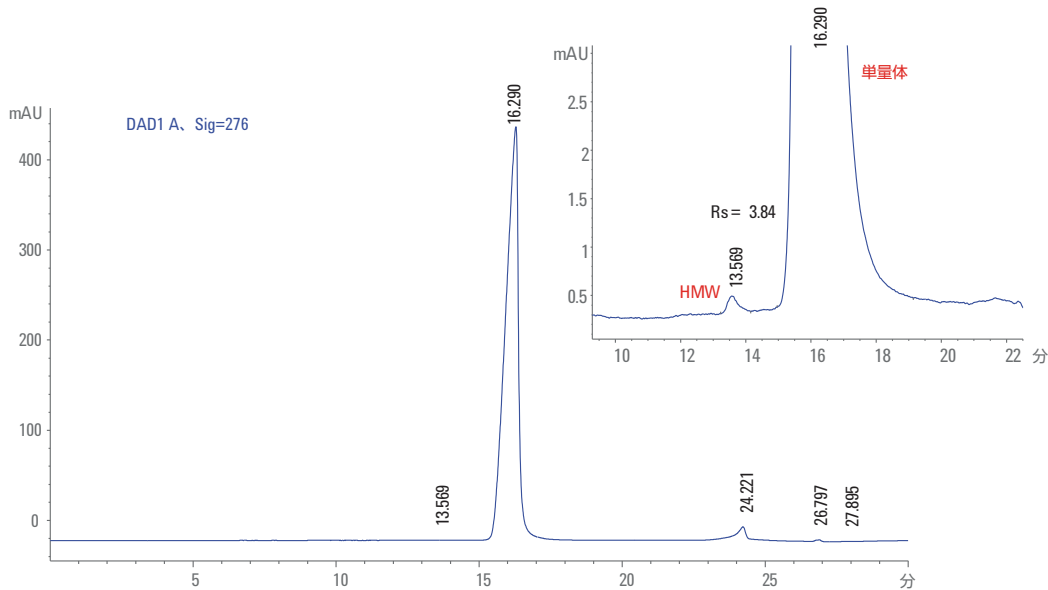
AdvanceBio SEC 130Å、7.8 x 300 mm、2.7 μm カラムでの PEG GCSF のサイズ排除クロマトグラフィー。

A. インタクト PEG GCSF、凝集体の拡大表示。B. インタクト PEG GCSF、凝集体の熱ストレスを加えたサンプルの重ね表示。

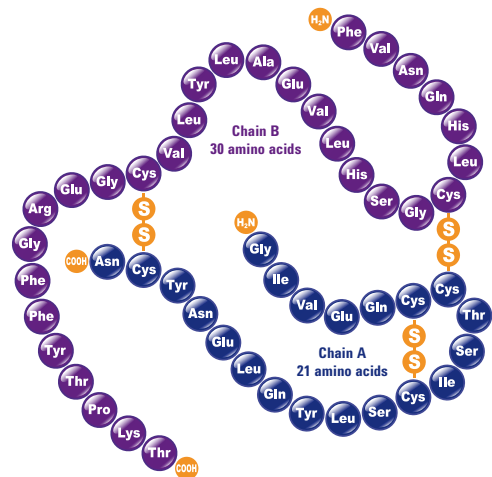
インスリンの分析

インスリンは血糖の恒常性を調節する小さいポリペプチドホルモンです。バイオ医薬品企業は遺伝子工学を使用して、多様で長時間作用するインスリン類似体を開発しています。

次のデータは、修正したドラフトモノグラフ SEC メソッドを用いてインスリン類似体とその凝集体を分析することによって得られました。ポアサイズが小さい Agilent AdvanceBio SEC 130Å、7.8 x 300 mm、2.7 μm カラムによって、単量体と凝集体との間で優れた分離能を実現できました。



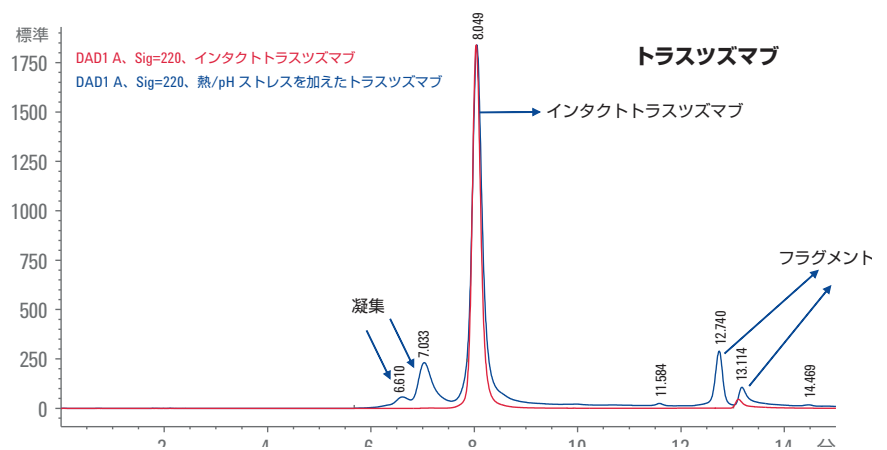
カラム:	AdvanceBio SEC 130Å、7.8 x 300 mm
機器:	Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システム
移動相	L-アルギニン (1.0 g/L)/酢酸 (99 %)/アセトニトリル; 65/15/20 (v/v/v)
流量:	0.4 mL/min
温度:	室温
サーモスタット	
オートサンブラ:	4 °C
検出器:	276 nm (1260 DAD VL+, G5615-60022 バイオイナート フローセル)
注入量:	10 μL



タンパク質の安定性をモニタリング

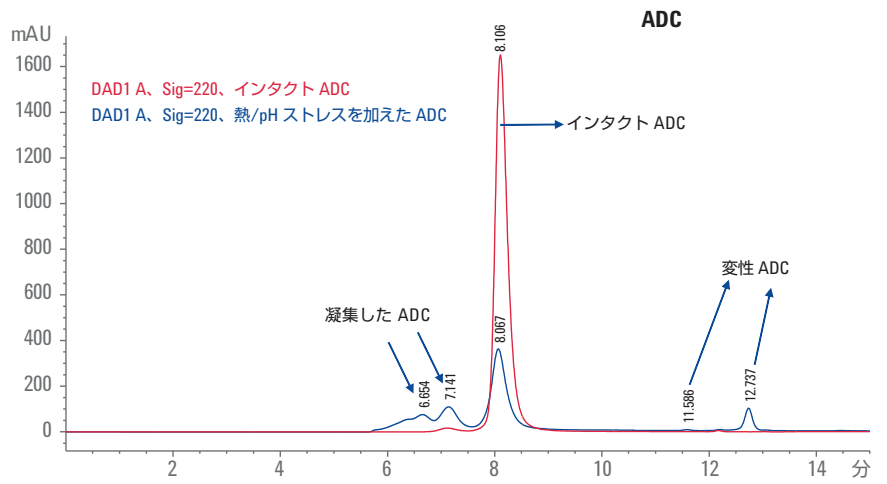
AdvanceBio SEC カラムは、凝集体に加え変性トラスツズマブおよび ADC を分離しました。どちらの場合も、サンプルにストレスがかかるにつれて凝集体は増加しました。

mAb およびより高い疎水性の ADC の両方で、同じ水性移動相が使用されました。



pH/熱ストレスを加えた 2 mg/mL ハーセプチンと未変性の (赤のトレース) トラスツズマブのクロマトグラムの重ね表示。

- カラム: AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 300 mm
 - 移動相: 50 mM リン酸ナトリウム, 150 mM 塩化ナトリウム, pH 7.4
 - 流量: 0.8 mL/min
 - システム: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC
 - サンプル: トラスツズマブと抗体薬の複合体 (T-DM1)
- ストレスを加えたサンプルは、pH 1.0、10、6.0 に調整し 60 °C で 60 分間インキュベーションしました。



pH/熱ストレスを加えた 2 mg/mL ADC と未変性の (赤のトレース) ADC のクロマトグラムの重ね表示。

バイオ精製および セミ分取の精度を向上

Agilent BioHPLC カラムは、信頼性の高いバイオ精製およびセミ分取アプリケーションに対応するサイズが用意されています。Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC システムおよび 1260 Infinity バイオイナートフラクションコレクタと組み合わせれば、ピークベースのフラクションコレクションの精度を高めることができます。

SEC とフラクションコレクション

カラム: Bio SEC-3, 300Å,
7.8 × 300 mm, 3 μm
移動相: バッファ A: 50 mM リン酸
ナトリウムバッファ
+ 150 mM NaCl, pH 6.8
流量: 1 mL/min
グラジエント: アイソクラティック
注入量: 30 μL

サーモスタット

オートサンブラと FC: 8 °C

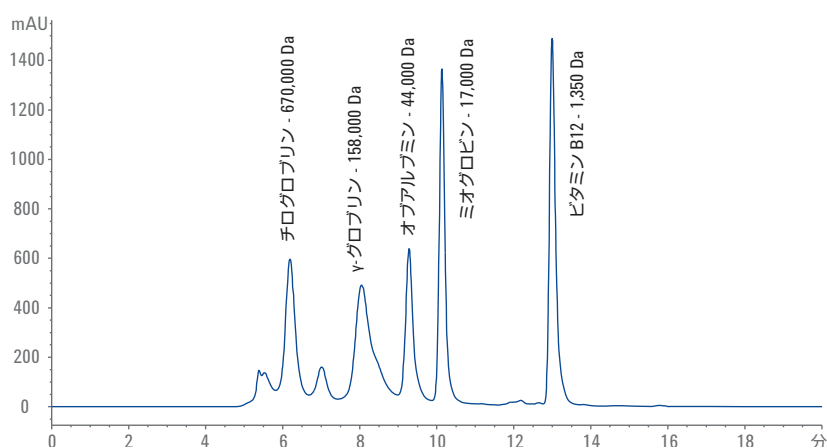
温度 TCC: RT

DAD: 280 nm/4 nm, Ref.: オフ

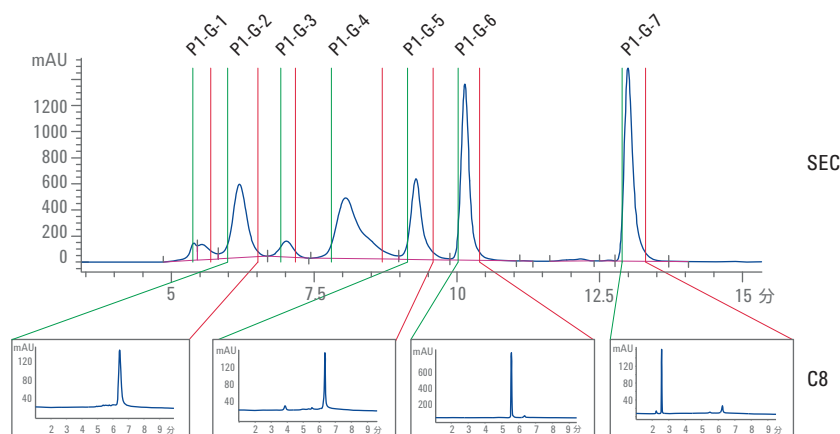
ピーク幅: >0.05 分 (レスポンス時間
1.0 秒) (5 Hz)

各フラクションの分析—逆相 C8

カラム: ZORBAX 300SB-C8,
4.6 × 50 mm, 5 μm
移動相: バッファ B: ACN + 0.09 % TFA
バッファ C: H₂O_{dd} + 0.1 % TFA
流量: 1 mL/min
グラジエント: 0 分 5 % B, 95 % C
10 分 95 % B, 5 % C
分析時間: 10 分
停止時間: 10 分
注入量: 100, 50, 10 μL
サーモスタット
オートサンブラと FC: 8 °C
温度 TCC: 70 °C
DAD: 280 nm/4 nm
Ref.: オフ
ピーク幅: >0.05 分 (レスポンス時間
1.0 秒) (5 Hz)



サイクログロブリン、g-グロブリン、オプアルブミン、ミオグロビン、ビタミン B12 を含むゲルろ過標準を、SECにより分離しました。その後、ディープウェルプレートの特定のウェルにフラクションを自動的に採取しました (ピークベースのフラクショントリガーモードを使用)。その後、逆相 C8 カラムを用いてフラクションを再分析しました。



フラクションの再分析により、ピークベースのフラクショントリガーモードを用いた分画手順の精度が確認されています。カラムコンパートメントの 2-ポジション/6-ポートバルブを使えば、自動カラム切り替えが可能です。

光散乱検出で感度を向上

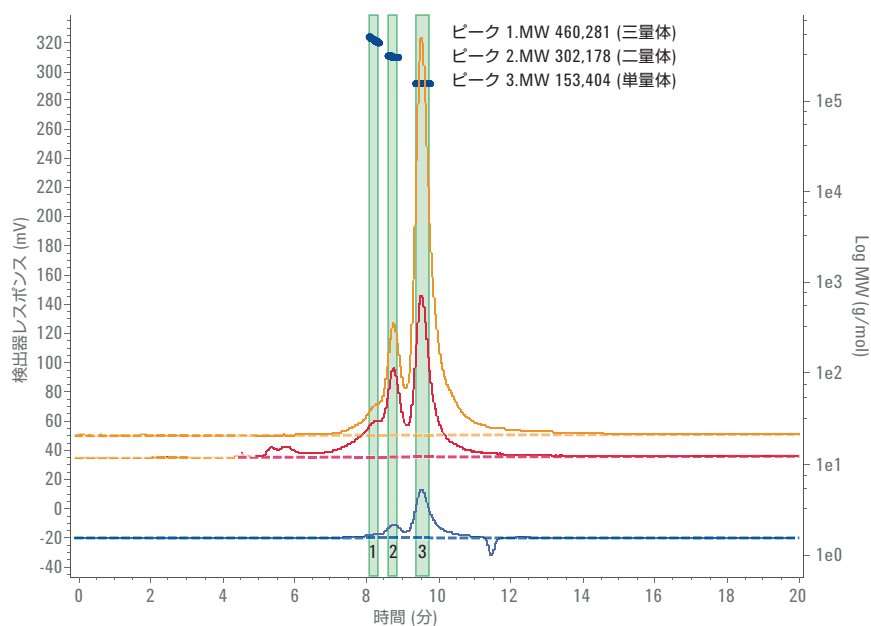
光散乱検出器を濃度検出器 (UV や RI など) と組み合わせれば、絶対的な分子量のデータが得られます。光散乱検出では、UV や RI といった濃度検出と比べて、凝集体の感度が高くなります。

ここでは、クロマトグラムの 3 つの領域 (単量体、二量体、三量体) と、ソフトウェアにより導出した分子量情報を示しています。予想されたとおり、光散乱検出器のシグナルは、分子量の大きい物質に対して反応性が著しく高くなりました。これにより、検出下限と凝集体定量の精度が向上しています。

大きいタンパク質の高凝集体の研究では、ポアサイズがより大きいカラムを用いると最大の情報を得ることができます。

ここでは高凝集体全体で分離を実現するために、Agilent Bio SEC-5 500Å カラムを用いました。

光散乱検出による検出下限の向上



オレンジ = UV 280 nm

赤 = 光散乱, 90°

青 = 示差屈折率

カラム: Bio SEC-5、500Å、7.8×300 mm、ステンレス
 移動相: 50 mM リン酸ナトリウム、250 mM NaCl、pH 7.0
 注入量: 50 μL
 流量: 1.0 mL/min
 温度: 30 °C
 サンプル: ウシ g-グロブリン
 サンプル濃度: 1.0、2.0、4.0 mg/mL
 検出: UV 280 nm、LS 15° および 90°、RI
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC システムと
 Agilent 1260 Infinity GPC/SEC マルチ検出器スイート

ウシ IgG の単量体 (領域 3)、二量体 (領域 2)、三量体 (領域 1) の検出器シグナル。分析時間は 20 分でした。

AGILENT 1260 INFINITY バイオイナートクォータナリ LC: 限りなく優れた生体分子分析を実現



サンプル流路における金属フリーを実現した Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、新たな水準の性能と信頼性を実現します。

この堅牢なシステムは、タンパク質やバイオ医薬品の分析に一般的に用いられる、扱いの困難な溶媒条件に対応することができます。また、非特異的結合に伴う問題も軽減します。Agilent イオン交換 BioHPLC カラムと組み合わせれば、最高の分離を実現することができます。

100% バイオイナートサンプルフローパス

オートサンブラからカラムコンパートメント、検出器に至るまでのあらゆるキャピラリーとフィッティングから完全に金属を排除しています。そのため、生体分子が接触するのはセラミックか PEEK だけです。これにより、金属表面とタンパク質やペプチドの二次的な反応を防ぎ、ピークテーリング、低回収率、カラム寿命の短縮といった問題を回避します。

真の UHPLC 性能

最高 600 bar のパワーレンジと、小さい粒子を用いた最新のカラムテクニックで求められる高圧への耐性を備えています。そのため、1.7 μm までの粒子サイズのあらゆる SEC および IEX カラムに完璧に適合します。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアは、塩グラジエントおよび pH グラジエントを作成する高速で容易な方法を提供します。

Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC の詳細については、agilent.com/chem/lc:jp をご覧ください。

毎日の分析で堅牢性と安全な動作を 約束するキャピラリーおよびフィッティング技術

1260 Infinity バイオイナート LC では、金属フリーのバイオ不活性と高圧耐性という独自の組み合わせを備えたキャピラリーおよびフィッティング技術が使われています。以下の 3 種類のキャピラリーが導入されています。

- 送液ライン用の腐食耐性の高いチタンキャピラリー
- オートサンブラおよびカラムコンパートメントの金属クラッド PEEK キャピラリー
- 分離カラム下流の低圧部品の PEEK キャピラリー

金属クラッド PEEK キャピラリーでは、独自の接続システムが採用されています。これにより、あらゆる接続で完全なバイオ不活性が実現します。機械的に連結された PEEK チップは、水平移動や回転による圧力への耐性が高いため、フィッティングを締める際のキャピラリーのトルクが排除されます。

詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



タンパク質の同定と不純物プロファイリングに対応する アジレントの HPLC システム



新しい Agilent 1290 Infinity II LC:

次世代 UHPLC により次の 3 点で効率が向上

- ▶ 分析効率を最大化: 優れた分離性能と検出性能で最高品質の分析データを提供
- ▶ 装置効率を最大化: 最高のサンプル収容数と最速の注入サイクル時間、および最適化した操作性の統合
- ▶ ラボ効率を最大化: 現在のインフラとのシームレスな統合と従来の機器からのスムーズなメソッド移管を実現

1290 Infinity II LC ではハイスピードポンプまたはフレキシブルポンプを利用可能



Agilent 1260 Infinity バイナリ LC システム:

600 bar のパワーレンジ、高速 80 Hz 検出器、最大 10 倍の感度により、新たな水準の HPLC 分析を実現

HPLC に 100 % 対応し、UHPLC 機能も備えています。そのほか、以下の特長を備えています。

- ▶ 腐食耐性があり生物学的に不活性な流路
- ▶ 広い pH 範囲
- ▶ バイオ分析およびバイオ精製用に最適

あらゆる標準的 UHPLC アプリケーションに対応



Agilent 1260 Infinity マルチ検出器 Bio-SEC システム:

タンパク質ベースの医薬品で再現性の高い高度な分析を実現する専用ソリューション

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は高度な光散乱検出器と組み合わせることにより、生化学分析における溶液中の分子の分子量および大きさの正確な測定を可能にし、同時に大型の生体分子の分析においてより高感度の凝集体検出を実現します。

- ▶ 正確かつ高い再現性で分子量と大きさを測定
- ▶ 市場をリードする低デッドボリウム光散乱検出器で凝集体を高感度に検出
- ▶ 高度な検出により分子の大きさおよび分子量を正確に測定

大型の生体分子に適したより高い感度が必要なアプリケーションに使用可能

HPLC システムの詳細については、agilent.com/chem/lc:jp をご覧ください。

製品情報

Agilent AdvanceBio SEC HPLC カラム:

モノクローナル抗体、タンパク質、ペプチドの SEC 分析向けの最新テクノロジー

品名	130Å	300Å
分析カラム		
4.6 x 300 mm, 2.7 µm	PL1580-5350	PL1580-5301
4.6 x 150 mm, 2.7 µm	PL1580-3350	PL1580-3301
7.8 x 300 mm, 2.7 µm	PL1180-5350	PL1180-5301
7.8 x 150 mm, 2.7 µm	PL1180-3350	PL1180-3301
分析用ガードカラム		
4.6 x 50 mm, 2.7 µm	PL1580-1350	PL1580-1301
7.8 x 50 mm, 2.7 µm	PL1180-1350	PL1180-1301



Agilent AdvanceBio SEC タンパク質標準

品名	サイズ	部品番号
130Å	1.5 mL バイアル	5190-9416
300Å	1.5 mL バイアル	5190-9417



Agilent Bio SEC-3 HPLC カラム: MS 検出によるタンパク質の分析に対応

品名	100Å	150Å	300Å
分析カラム			
4.6 x 300 mm, 3 μm	5190-2503	5190-2508	5190-2513
4.6 x 150 mm, 3 μm	5190-2504	5190-2509	5190-2514
7.8 x 300 mm, 3 μm	5190-2501	5190-2506	5190-2511
7.8 x 150 mm, 3 μm	5190-2502	5190-2507	5190-2512
分析用ガードカラム			
4.6 x 50 mm, 3 μm	5190-6846	5190-6847	5190-6848
7.8 x 50 mm, 3 μm	5190-2505	5190-2510	5190-2515
分取カラム			
21.2 x 300 mm, 3 μm	5190-6850	5190-6851	5190-6852
分取用ガードカラム			
21.2 x 50 mm, 3 μm	5190-6854	5190-6855	5190-6856



Agilent Bio SEC-5 HPLC カラム: 複数の分子量の成分を持つ大型の生体分子およびサンプルに対応

品名	100Å	150Å	300Å	500Å	1000Å	2000Å
分析カラム						
4.6 x 300 mm, 5 μm	5190-2518	5190-2523	5190-2528	5190-2533	5190-2538	5190-2543
4.6 x 150 mm, 5 μm	5190-2519	5190-2524	5190-2529	5190-2534	5190-2539	5190-2544
7.8 x 300 mm, 5 μm	5190-2516	5190-2521	5190-2526	5190-2531	5190-2536	5190-2541
7.8 x 150 mm, 5 μm	5190-2517	5190-2522	5190-2527	5190-2532	5190-2537	5190-2542
分析用ガードカラム						
4.6 x 50 mm, 5 μm	5190-6857	5190-6858	5190-6859	5190-6860	5190-6861	5190-6862
7.8 x 50 mm, 5 μm	5190-2520	5190-2525	5190-2530	5190-2535	5190-2540	5190-2545
分取カラム						
21.2 x 300 mm, 5 μm	5190-6863	5190-6864	5190-6865	5190-6866	5190-6867	5190-6868
分取用ガードカラム						
21.2 x 50 mm, 5 μm	5190-6869	5190-6870	5190-6871	5190-6872	5190-6873	5190-6874



**Agilent ProSEC 300S カラム:
球状タンパク質の分離 (USP L33) に対応**

品名	100Å
分析カラム	
4.6 x 250 mm, 5 μm	PL1547-5501
7.5 x 300 mm, 5 μm	PL1147-6501
7.5 x 600 mm, 5 μm	PL1147-8501
分析用ガードカラム	
4.6 x 50 mm, 5 μm	PL1547-1501
7.5 x 50 mm, 5 μm	PL1147-1501



**ZORBAX GF-250 および GF-450 ゲルろ過カラム: USP L35 の使用が必要な
分析プロトコルに対応**

品名	サイズ	部品番号
分析カラム		
GF-250, 150Å	4.6 x 250 mm, 4 μm	884973-701
GF-250, 150Å	9.4 x 250 mm, 4 μm	884973-901
GF-450, 300Å	9.4 x 250 mm, 6 μm	884973-902
分析用ガードカラムおよびキット		
ZORBAX Diol ガードカートリッジ, 4 個	4.6 x 12.5 mm, 6 μm	820950-911
ZORBAX Diol ガードカートリッジ, 2 個	9.4 x 15 mm, 6 μm	820675-111
内径 4.6 mm 用ガードハードウェアキット		820999-901
内径 9.4 mm 用ガードハードウェアキット		840140-901
PrepHT カラム		
PrepHT GF-250, 150Å	21.2 x 250 mm, 6 μm	877974-901
PrepHT GF-450, 300Å	21.2 x 250 mm, 6 μm	877974-910
PrepHT 用ガードカラムおよびキット		
ZORBAX Diol PrepHT ガードカートリッジ, 2 個	17 x 7.5 mm, 5 μm	820212-911
内径 21.2 mm 用ガードカートリッジハードウェアキット		820444-901
PrepHT エンドフィッティング, 2 個		820400-901



アジレントのカラムは革新を続けています

アジレントはタンパク質および mAb の特性分析の要件に対応するために AdvanceBio カラム製品群を革新し続けます。

Agilent AdvanceBio カラムは、SEC による凝集体の分析、IEX による電荷変異体の分析、逆相カラムによるインタクト質量、1 次構造、不純物のプロファイリング、親水性相互作用による切断グリカン、アフィニティークロマトグラフィーによる mAb の抗体価の測定などの特性分析の精度およびスピードが向上するように設計されています。

Agilent BioHPLC カラム

アフィニティ 抗体価の測定 および精製	逆相 タンパク質の同定および 不純物のプロファイリング	HILIC グリカン分析	サイズ排除 (ゲルろ過) 凝集体分析	イオン交換 電荷変異体の分析
Bio-Monolith Protein A	AdvanceBio RP-mAb	AdvanceBio Glycan マッピング	AdvanceBio SEC, 2.7 μm	Bio-Monolith (QA, DEAE, SO ₃)
Bio-Monolith Protein G	AdvanceBio ペプチドマッピング ZORBAX RRHD 300Å, 1.8 μm Poroshell 300 PLRP-S ZORBAX 300SB ZORBAX アミノ酸分析 (AAA)	ZORBAX RRHD 300Å, 1.8 μm	Bio SEC-3 Bio SEC-5 ProSEC 300S ZORBAX GF-450 ZORBAX GF-250	Bio MAb Bio IEX (SAX, SCX, WAX, WCX) PL-SAX PL-SCX

タンパク質および mAb の適切な特性分析を実現します。

www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

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

アジレントの製品は、研究目的でのみ使用できます。

診断目的では使用できません。

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. 2015

Printed in Japan, December 16, 2015

5991-2898JAJP



Agilent Technologies