[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムによる バイオ医薬品・生物学的製剤分析の高速化

- 免疫グロブリン製剤のサイズ排除（ゲルろ過）分析 -

目的

ACQUITY UPLC® H-Class Bioの使用により、バイオ医薬品や生物学的製剤の凝集体分析で用いられることが多いサイズ排除（ゲルろ過）分析を高分離かつ高速に行う

ウォーターズソリューション

ACQUITY UPLC H-Class Bio

ACQUITY UPLC BEH200 SECカラム

Auto•Blend™ Plus

キーワード

バイオ医薬品

生物学的製剤

抗体医薬品

免疫グロブリン

凝集体

サイズ排除

ゲルろ過

はじめに

抗体医薬を中心とするバイオ医薬品への期待は年々高まっており、開発、製造も加速されております。特にタンパク質医薬品の特性解析では、低分子医薬品と異なり、非常に多角的な分析が要求されます。

Watersは、増大する生体高分子分析への要求に対応したシステムソリューションを提案しております。UPLC性能はそのままに、サイズ排除(SEC)やイオン交換(IEX)で用いられる高塩濃度移動相送液に対する耐久性、試料の吸着、使いやすさを考慮したACQUITY UPLC H-Class Bioシステムは、バイオ医薬品分析を強力にバックアップします。

さらに、タンパク質、ペプチド、核酸、糖鎖それぞれの分析に特化した豊富なカラムラインナップ、アプリケーションを融合させることにより、開発期間の短縮、製造管理の効率の向上を実現させます。

本アプリケーションでは、免疫グロブリン製剤の凝集体分析を例にとり、UPLCカラムシリーズ初のSECカラムであるACQUITY UPLC BEH200 SECカラムでの分析例をご紹介します。

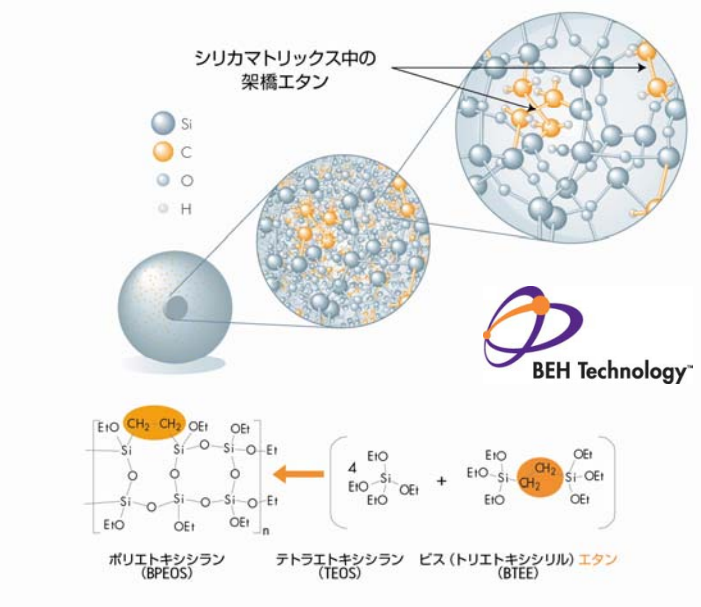
尚、HPLCによる分析データ、免疫グロブリン製剤試料は、
大阪大学大学院　工学研究科　内山進先生に
ご提供いただきました。

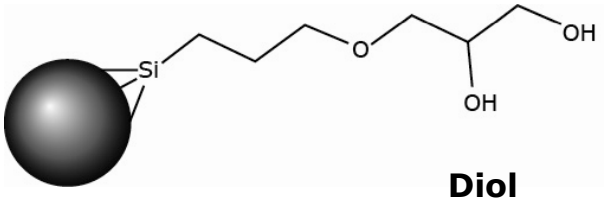
ACQUITY UPLC H-Class Bioシステム

ACQUITY UPLC BEH200 SECカラム

ACQUITY UPLC BEH200 SECカラム

ACQUITY UPLC BEH200 SECカラムでは、UPLCのために開発された粒子径1.7 µm のエチレン架橋ハイブリッド(BEH)パーティクルを充てん剤に採用しております。ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムでの使用により、抗体医薬品等の凝集体分析時間を最大1/10に短縮することが可能です。また、二次的相互作用が低減されるため、従来のシリカベースのSECカラムで問題となってきたピークテーリング等の問題が減少します。これまで、二次的相互作用を抑えるために装置やカラムに負荷をかける高塩濃度の移動相を使用せざるを得ませんでしたが、 ACQUITY UPLC BEH200 SECカラムは、低塩濃度の移動相による分析も可能です。
（最終ページに示した参考資料もあわせてご参照ください）

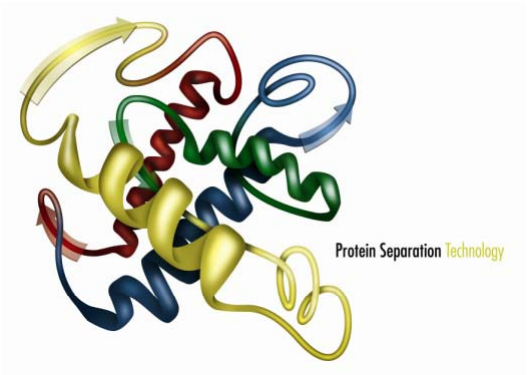




■ BEHテクノロジー採用による二次的相互作用低減と高いカラム耐久性

ACQUITY UPLC BEH200 SECカラムでは、4.6x150 mm、4.6x300 mmの2サイズをラインナップ。
4.6x150 mmカラムにより、従来の7.8x300 mmカラムと同等の分離をきわめて短時間で得ることが可能です。さらに、4.6x300 mmカラムの使用により、分離を向上させることも可能です。迅速な分析には150 mmカラムを、さらに詳細な分析には300 mmカラムが適しています。

製品番号	カラム	サイズ
186005225	ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7µm	4.6 x 150 mm
186005226	ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7µm	4.6 x 300 mm



Waters ACQUITY UPLC システム
でのみ使用可

分析条件

LC 条件(UPLC)

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
分析時間:	5分(150 mmカラム) 10分(300 mmカラム)
カラム:	ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7 µm, 4.6 x 150 mm または、4.6 x 300 mm
カラム温度:	25 ℃
移動相 :	PBS pH7.4
流速:	0.4 mL/min
注入量:	0.5 µL (免疫グロブリン製剤A) 1.5 µL (免疫グロブリン製剤B)
検出波長 :	280 nm

LC 条件(HPLC)

LC システム:	Alliance® 2695-2489UV検出器
分析時間:	30 分
カラム:	シリカベースSECカラム ブランドA 5 µm, 7.8 x 300 mm
カラム温度:	25 ℃
移動相 :	PBS pH7.4
流速:	0.5 mL/min
注入量:	2 µL (免疫グロブリン製剤A) 10 µL (免疫グロブリン製剤B)
検出波長 :	280 nm

分析例1 –免疫グロブリン製剤A –

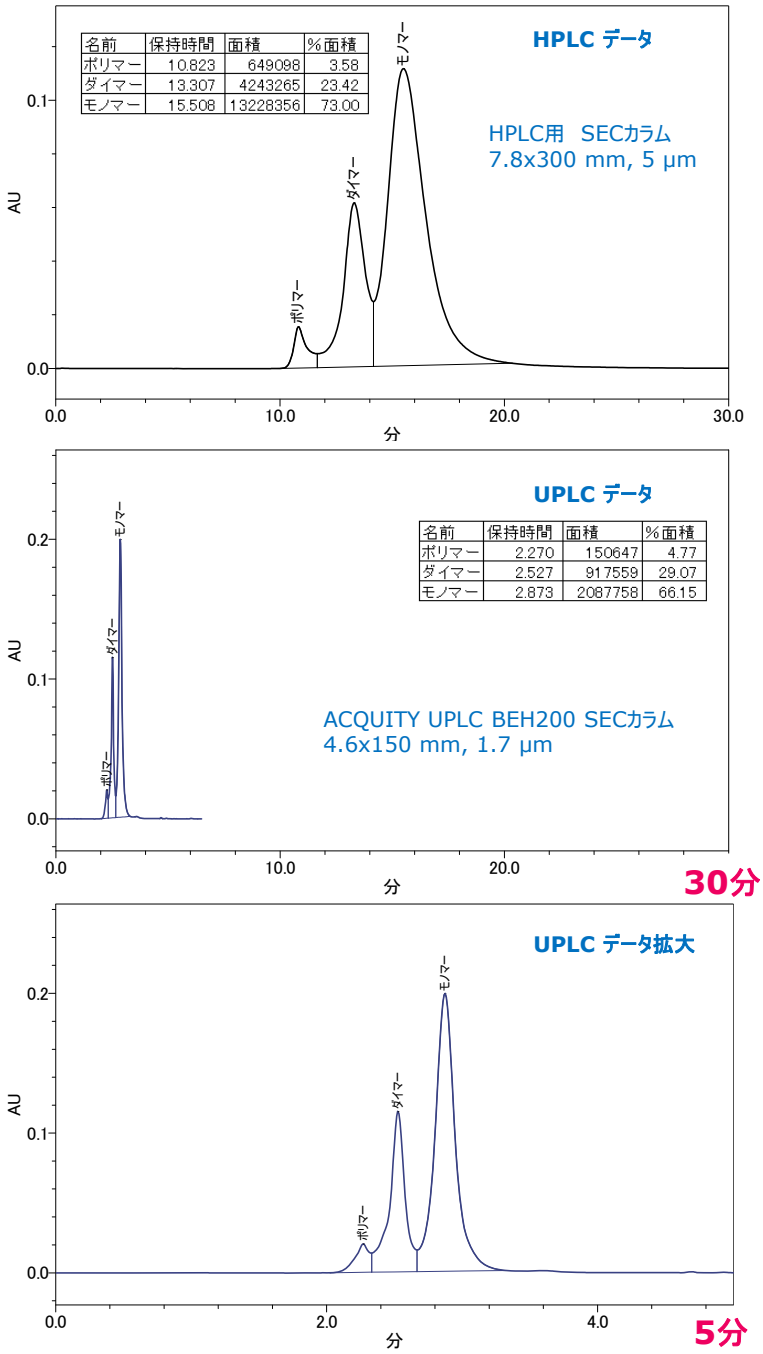


図1. ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、ACQUITY UPLC BEH200 SECカラムによる 50 mg/mL 免疫グロブリン製剤A 分析結果 -HPLCデータとの比較-

上段は、HPLCシステムおよびHPLCカラムで実施した免疫グロブリン製剤Aの分析結果です。中段は、ACQUITY UPLC H-Class Bio システム、ACQUITY UPLC BEH200 SECカラムによるクロマトグラムをHPLCでの分析時間30分のスケールで表示したものです。きわめてシャープなピーク、短時間での分析データが示されています。下段は、中段のクロマトグラムの拡大図です。HPLC と同試料、同移動相による分析結果です。

粒子径1.7 umのACQUITY UPLC BEH200 SEC カラムによる高い分離性能と拡散を最小限に抑えたACQUITY UPLC H-Class Bioシステムとの融合により、従来30分かかっていた分析を、分離を維持しつつわずか5分で実現させることが可能です。

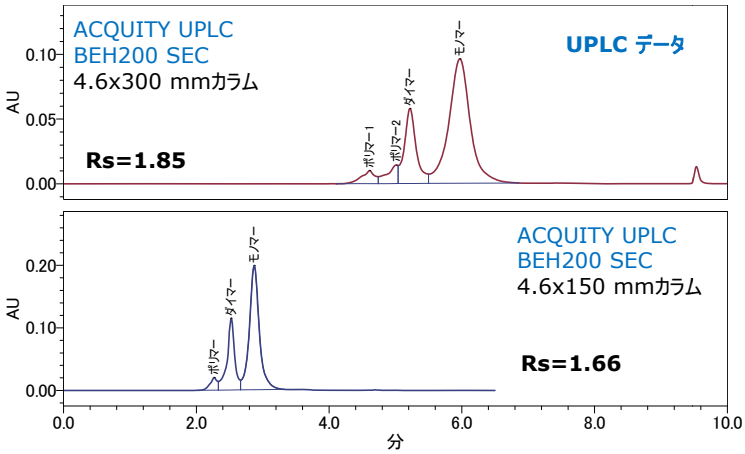


図2. 300 mmカラムによる分離の向上

50 mg/mL 免疫グロブリン製剤AをACQUITY UPLC H-Class Bioシステム、ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラムで分析。

図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

カラム長を300 mmとすることにより、さらに分離が向上します。ここでは、モノマーとダイマーの分離が向上したことに加え、トリマー以上の多量体（図中では、ポリマー1、ポリマー2と表示）の分離も向上しています。

分析例2 －免疫グロブリン製剤B－

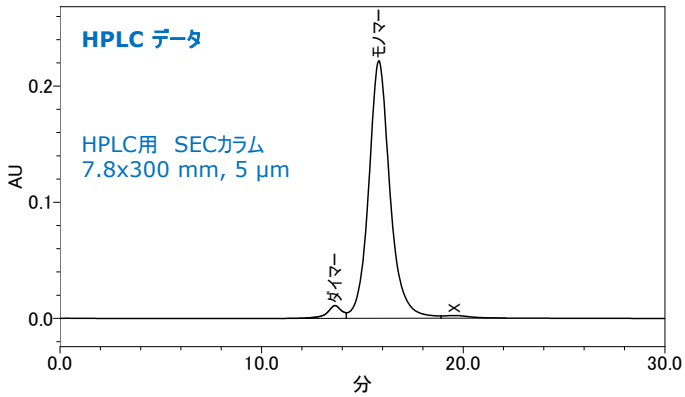


図3. HPLCによる10 mg/mL 免疫グロブリン製剤B 分析結果

免疫グロブリン製剤Aと同様に、免疫グロブリン製剤Bについても、HPLCデータとUPLCデータの比較を行いました。
HPLCでは、30分の分析時間を要しました。

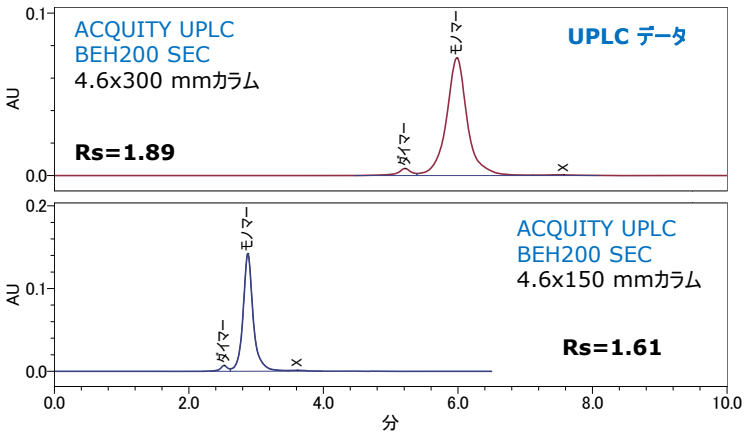


図4. UPLCによる10 mg/mL免疫グロブリン製剤B 分析結果

10 mg/mL免疫グロブリン製剤BをACQUITY UPLC H-Class Bioシステム、ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラムで分析。

図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

免疫グロブリン製剤Bについても、HPLCで30分を要する分析を5分に短縮。
より高い分離を求めた300 mmカラム使用時にも、分析時間は10分に短縮されました。

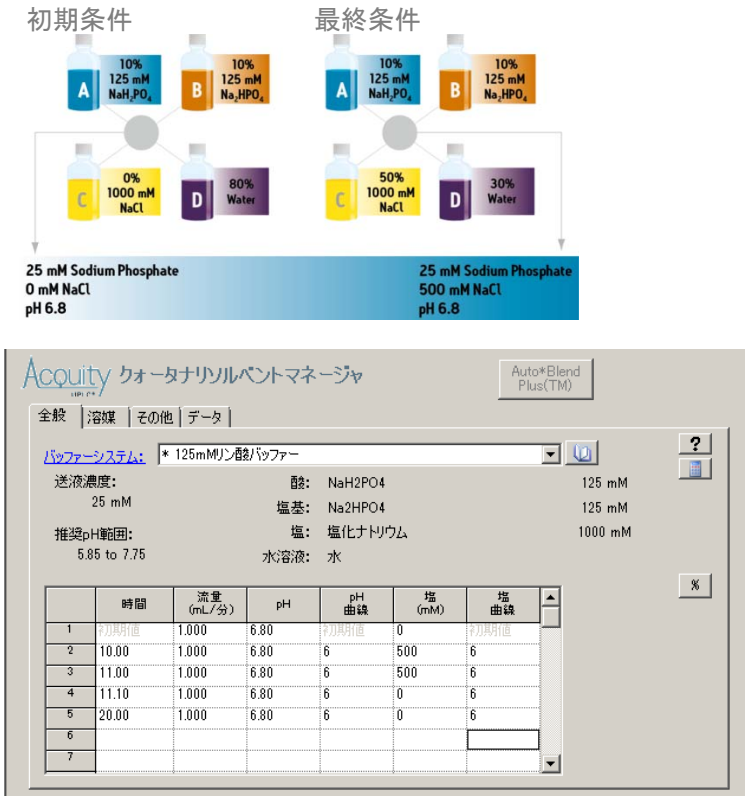


図5. ACQUITY UPLC H-Class Bioの機能 -Auto•Blend Plus 設定画面-

ACQUITY UPLC H-Class Bio の機能
ー Auto•Blend Plus ー

今回は、HPLCでの移動相と同一のプレミックスのPBSを用いましたが、サイズ排除やイオン交換の分析では、様々なpH、塩濃度の移動相が用いられます。ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムに搭載されているAuto•Blend Plus テクノロジーは、溶媒調製、溶媒置換の作業を軽減し、使いやすさを優先した機能です。左図はリン酸バッファを使用したイオン交換の分析条件例です。ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムの精密な4液混合機能を利用して、4種の溶媒をセットし、所定のpH、塩濃度で送液を行います。送液条件は、%ではなく、pH6.8、塩濃度500 mMのように、pH、モル濃度で入力できます。

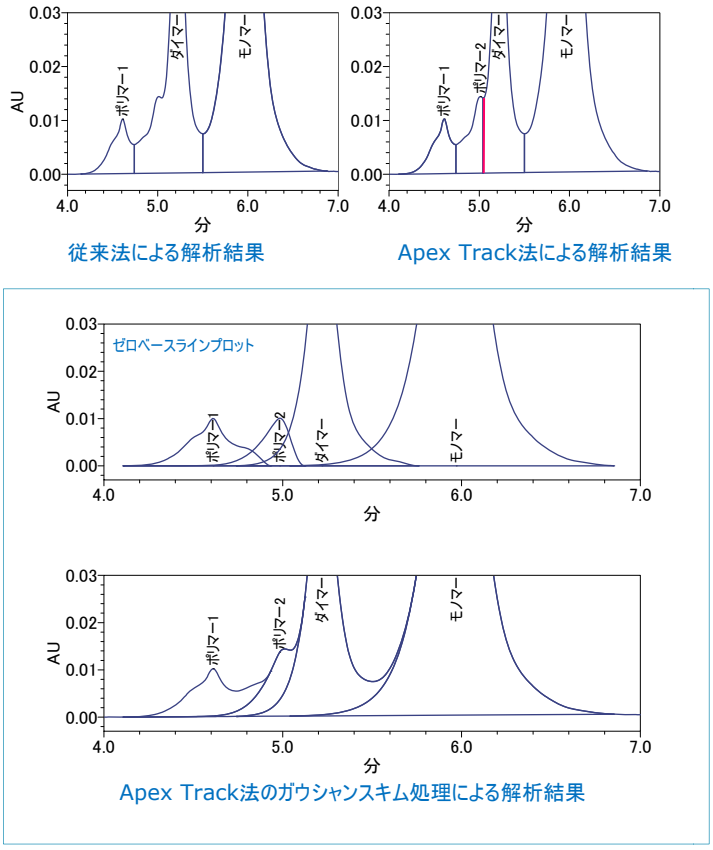


図6. Empower 3 ソフトウェアの機能 -ガウシャンスキムによるベースライン-

Empower 3 ソフトウェアの機能
ーApex Track ガウシャンスキムー

SECでの分析では、一般的に完全分離が難しい試料が多く、垂直分割処理を行って面積値、面積%を計算するケースが多いと考えられます。

Empower 3では、従来より用いられてきた垂直分割を基本とする方法のほか、Watersが開発した二次微分によりピークを認識するApex Track法の2種類の解析法が使用できます。Apex Track法の利点の一つは、従来法では認識できない緩やかなショルダーピークの検出が可能な点で、マニュアル処理を減少させます。

また、Apex Track法のガウシャンスキム機能を用いますと、親ピークに対してガウシャン関数を適用してベースラインを作成します。場合によっては、より適切な評価を行うことができるのではないかと推測されます。

結果と考察

ACQUITY UPLC H-Class Bioシステム、ACQUITY UPLC BEH200 SECカラム(4.6x150 mm)を使用することにより、従来、HPLCで30分かかっていた免疫グロブリン製剤AおよびBの分析を分離を損なうことなく5分で行いました。さらに4.6x300 mmカラムの使用により、分離を向上させることも可能でした。この場合でも、分析時間は10分と分析時間を1/3に短縮しています。図2、図4にそれぞれのカラムでのモノマーとダイマーの分離度を示しましたが、トリマー以上の凝集体を含む免疫グロブリン製剤Aでは、ダイマーと同時溶出していたピークがより分離する結果となりました。

結論

ACQUITY UPLC H-Class BioシステムおよびACQUITY UPLC BEH200 SECカラムの使用により、分離を維持しつつ、分析時間を1/6に短縮することが可能でした。300 mmカラムの使用により、さらに分離を追求することも可能です。また、同程度の分離を行う場合、従来のカラムと比較してカラムボリュームが1/6程度に小さくなるため、分析時間のみならず、平衡化や洗浄にかかる時間も大幅に削減することができます。
増大する分析試料の分析時間短縮、分離の向上によるデータの信頼性の増大は、生産効率の向上に大きく貢献するものと考えられます。

参考資料

ACQUITY UPLC H-Class Bioカタログ	720003482JA
Empower3 ソフトウェアカタログ	720001257JA
バイオセパレーション化学製品カタログ (Bioseparations and Analysis)	720002148EN
テクノロジーブリーフ ACQUITY UPLC H-Class Bioシステムにおけるサイズ排除クロマトグラフィーの信頼性	720003602JA
プロダクトソリューション EMPOWER SOFTWARE APEXTRACK INTEGRATION ALGORITHM	720000592EN

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC および Alliance は Waters Corporation の登録商標です。Auto・Blend、BEH Technology、Empower および The Science of What's possibleはWaters Corporation の商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2011年4月 Produced in Japan. 2011040002 PDF

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル 11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡