[TECHNOLOGY BRIEF]

ガードカラムの使用による UPLCサイズ排除クロマトグラフィーカラムの寿命改善

目的

ガードカラムの使用により、ACQUITY UPLC® BEH200 SEC, 1.7 µm カラムの長期安定性が改善することを実証する。

背景

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、通常、タンパク質ベースの医薬品の凝集体やサイズ変異体の分析に用いられます。特に関心がもたれるのは、免疫原性に関係があると考えられている溶解性のある凝集体で、様々な化学的、物理的条件がバイオ医薬品の凝集体量に影響を与えることが数々の研究で示されています。このような影響を減少させるため、一般的にタンパク質ベースの医薬品には添加剤や安定剤が添加されます。このような添加剤は長期間におけるカラム安定性を悪化させ、その結果、保持時間、ピーク形状、分離パターンが変化し、不正確な定量結果を招きます。カラムを回復させるために様々な洗浄方法が用いられますが、洗浄には時間がかかることが多い上に、結局効果がない場合もあります。最後の手段として頻繁なカラムの交換を行うことになりますが、これは高いコストを課し、分析を遅延させてしまいます。SEC カラムの長期的安定性を増大し、時間とコストを節約していただくツールとして、ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7 µm ガードカラムをご紹介します。

ソリューション

生体高分子を対象とした UPLC® SEC セパレーションは、ACQUITY UPLC H-Class Bio システムと 2 µm 以下の充填剤を用いた ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラムとを融合させることにより実現します。ACQUITY UPLC BEH200 SEC カラムに使用されている充填剤は、化学的耐性が高く、何百回にもおよぶ注入に耐えうる機械的耐性も併せ持っていますが、試料に含まれる様々な成分がカラムに悪影響を及ぼす場合もあります。BEH200 SEC カラムにガードカラムを装着することで、添加剤存在下においても何百回もの注入に耐えられるようカラムの安定性を高めることが可能です。

本アプリケーションで示す実験では、タンパク質標準品、ウラシル、マウスモノクローナル抗体（mAb）を BEH200 SEC, 1.7 µm, 4.6x150 mm カラム単独と、カラムと同じ充填剤を使用したガードカラム（4.6x30 mm）を装着した BEH200 SEC, 1.7 µm, 4.6x150 mm カラムとで分析しました。試料とした mAb はポリソルベート 80、スクロース、リン酸ナトリウムを含む代表的なバイオ医薬品製剤の添加剤で希釈しました。BEH200 SEC カラム単独で 500 回以上、ガードカラムを接続した BEH200 SEC カラムでは 900 回以上の試料注入を行いました。ガードカラムは 200 回注入ごとに交換しました。BEH200 SEC カラム単独で分析した場合、550 回注入後、mAb モノマーのカラム効率（理論段数）は 5000 段から 3000 段に低下しています。同一試料の注入を行った、ガードカラムを装着した BEH200 SEC カラムでは、900 回以上の注入試験後も、mAb モノマーのカラム効率に顕著な変化は認められませんでした（図 1）。数か所に見られるカラム効率の落ち込みは、ガードカラム交換により解消されています。ガードカラムの交換前には毎回、カラム単独でのカラム効率も確認しました。初期の試験結果と比較したデータには、ガードカラムの使用により、長期的なカラムの安定性が高まることが示されています（図 2）。カラム単独での mAb の分離については、480 回注入後にピーク高さの減少とピークテーリングの増加が認められ、mAb のモノマーとダイマーの USP 分離度は 26% 低下する結果となっています。一方、ガードカラムによって保護されたカラムでは、900 回以上の注入においてもピーク高さ、ピークテーリングに顕著な変化はありませんでした。mAb のモノマーおよびダイマーの USP 分離度も比較的変化せず、ガードカラムの効果が表れています。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

まとめ

BEH200 SEC 分析カラムをガードカラムとあわせて使用することで、添加剤存在下においても、モノクローナル抗体のより安定した分析や定量を行うことが可能となります。添加剤やその他のマトリックス成分は徐々に SEC の分離に悪影響を及ぼすことがありますが、定期的にガードカラムを交換することにより、900 回以上の注入にわたって分析カラムの性能を保つことができます。ガードカラムの利用により、コストの削減のみならず、最小限のダウンタイムでのより安定なモノクローナル抗体とその水溶性凝集体の分析が実現します。

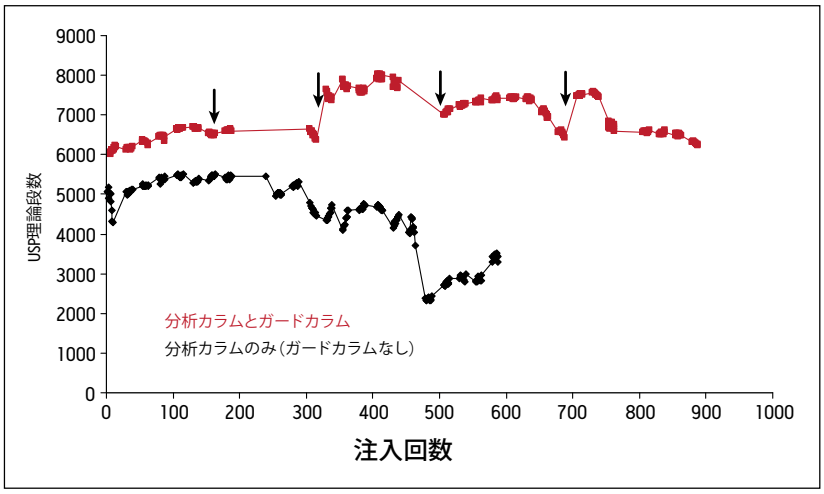
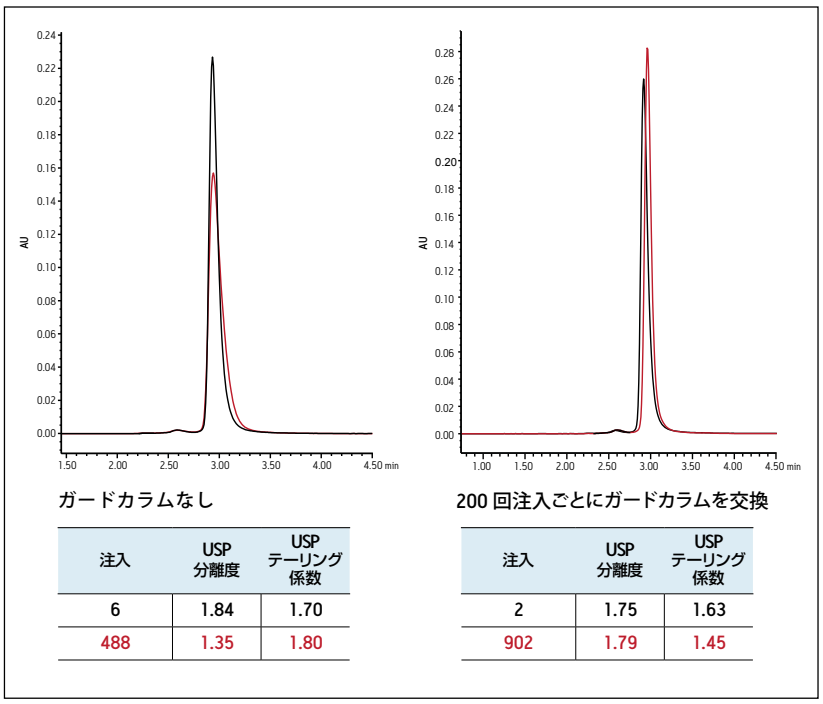


図 1. カラム効率に対する 30 mm ガードカラムの効果。矢印はガードカラムの交換時点を示す。



注入	USP 分離度	USP テーリング係数
6	1.84	1.70
488	1.35	1.80

注入	USP 分離度	USP テーリング係数
2	1.75	1.63
902	1.79	1.45

図 2. mAb 分離性能における 30 mm ガードカラムの効果
BEH200 SEC カラムでの製剤化 mAb 試料の多数回注入前後のクロマトグラム。

注：右のクロマトグラムは、分析カラムのカラム効率を確認するため、ガードカラムをはずして分析した結果。
分析条件：0.025 M リン酸ナトリウム /pH 6.8、0.15 M 塩化ナトリウム、0.4 mL/min、30℃

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 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、UPLCはWaters Corporationの登録商標です。
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。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年06月 720004034JA PDF