タンパク質凝集体分析の高速化
Rapid Analysis of Protein Aggregation

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

岩崎　裕子[1]、内山　進[2]
Hiroko IWASAKI[1], Susumu UCHIYAMA[2]

[1]日本ウォーターズ株式会社、[2]大阪大学大学院工学研究科
[1]Nihon Waters K.K. , [2] Graduate School of Engineering Osaka University

INTRODUCTION

バイオ医薬品の重要性は近年ますます高まっており、治療法のない疾患に対する医薬品の新規開発も強く期待される。凝集体モニタリングは、バイオ医薬品の品質・安全性の確保、製造プロセス改善の目的のみならず、低分子医薬品のターゲットタンパク質等、様々なタンパク質研究においても必須である。

これまでモニタリングには主にHPLC-SEC（サイズ排除液体クロマトグラフィー）が利用されてきたが、凝集体の不十分な分離、長い分析時間が研究開発や品質管理において律速段階となっている。
この問題を解決することを目的として、免疫グロブリン製剤を試料とし、UPLC（超高性能液体クロマトグラフィー）システムおよび粒子径1.7 µmのUPLCカラムを用いて凝集体モニタリングを行った。

METHODS

2種の免疫グロブリン製剤について、UPLCでSEC分析を行い、従来のHPLCシステムによるデータと比較した。検出や移動相はHPLCと同一とし、カラムにあわせて注入量、移動相の流速を変更した。

UPLC分析条件

LCシステム:	ACQUITY UPLC H-Class Bio TUVシステム
検出:	UV 280 nm
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℃
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）
移動相:	PBS pH7.4
流速:	0.4 mL/min

HPLC分析条件

LCシステム:	Alliance 2695-2489システム
検出:	UV 280 nm
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℃
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）
移動相:	PBS pH7.4
流速:	0.5 mL/min

RESULTS

図1、図2に示したように、ACQUITY UPLC H-Class BioおよびACQUITY UPLC BEH200 SECカラムの採用により、分離を向上させつつ、分析時間を従来の1/6、5分に短縮することが可能であった。
これらの分析には4.6 x 150 mmカラムを使用したが、さらに分離能が高い300　mmカラムでの分析結果を図3、図4に示した。150 mmカラムでの分析結果と比較し、免疫グロブリン製剤A, Bともにモノマーとダイマーの分離が向上した。トライマー以上の多量体を含む免疫グロブリン製剤Aについては、多量体の分離にも改善が見られた。分析時間は従来の1/3、10分であった。

DISCUSSION

1.7 µmの充填剤を使用したカラムと拡散を最小限に抑えたシステムを融合させたUPLCテクノロジーが、従来、分析に長時間を要してきたSEC分析においても高速かつ高分離分析を可能にすることがあきらかとなった。

年々増加している医薬品研究開発、品質管理の効率化のほか、タンパク質の結晶化能の評価に用いられるSECによる凝集体分析を効率化することにより、タンパク質の立体構造解明の迅速化への貢献も可能で、UPLCテクノロジーは、タンパク質研究を大きく加速する技術であると考えられる。

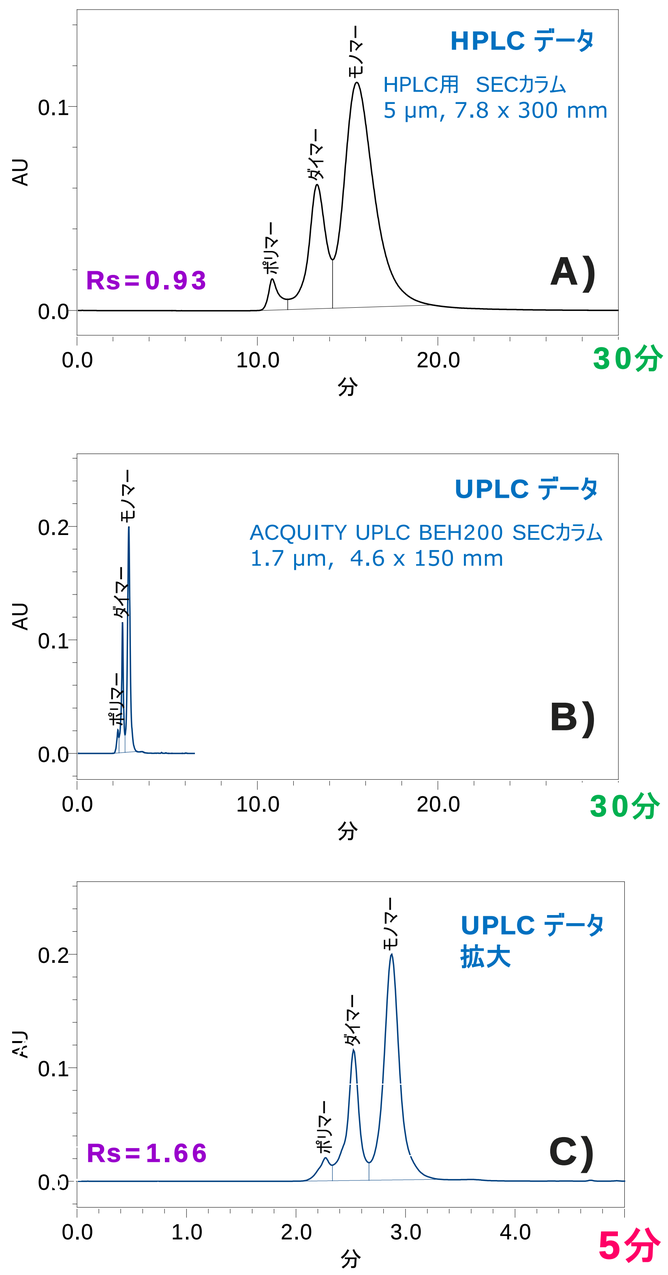


図 1. 50 mg/mL 免疫グロブリン製剤 AのSEC分析結果

A) HPLCシステムによる分析結果
B) UPLCシステムによる分析結果（HPLCデータに合わせ、X軸を30分とした）
C) UPLCシステムによる分析結果（ B) のデータのX軸を5分とした）
図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

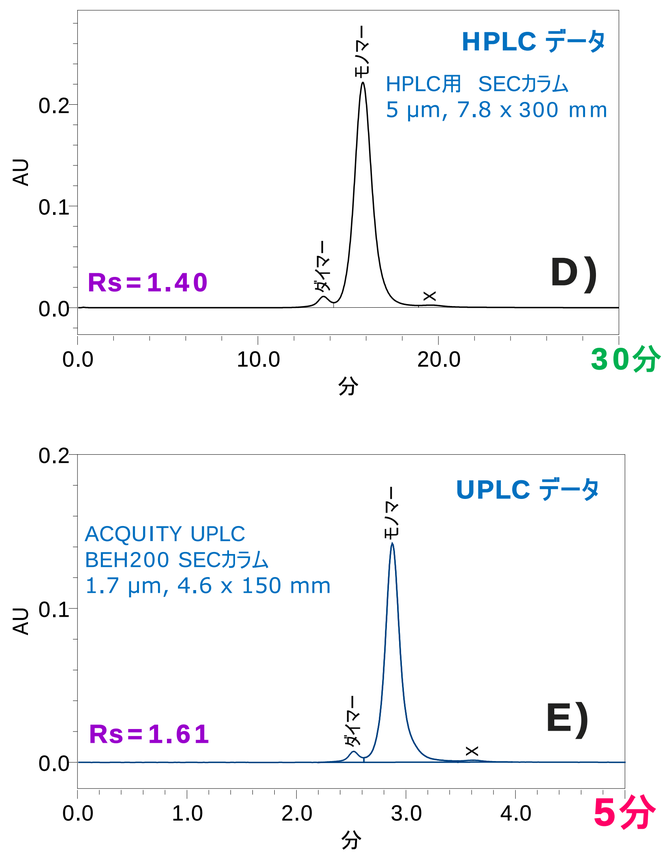


図 2. 10 mg/mL 免疫グロブリン製剤 BのSEC分析結果

D) HPLCシステムによる分析結果
E) UPLCシステムによる分析結果
図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

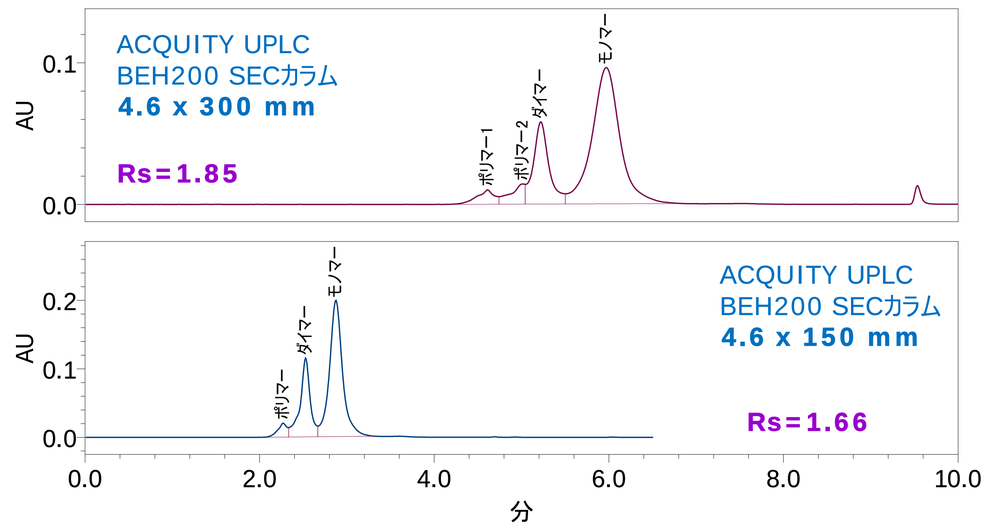


図 3. ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 4.6 x 300 mmカラム による免疫グロブリン製剤 Aの分析結果

下図はACQUITY UPLC BEH200 SEC, 4.6 x 150 mmによる分析結果。
図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

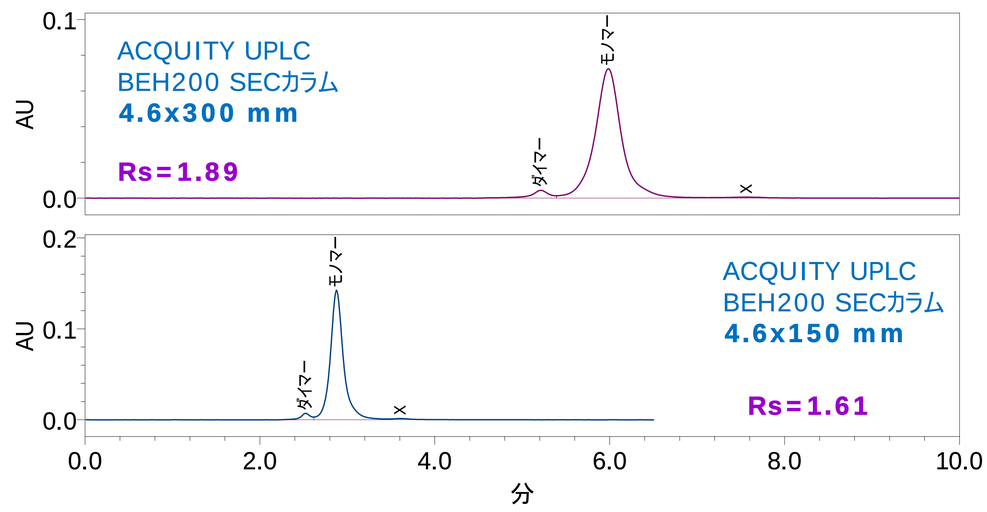
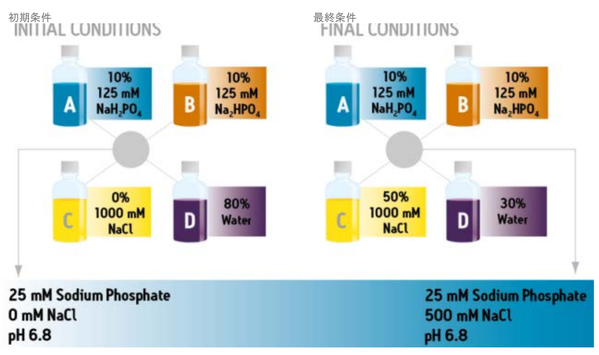


図 4. ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 4.6 x 300 mmカラム による免疫グロブリン製剤 Bの分析結果

下図はACQUITY UPLC BEH200 SEC, 4.6 x 150 mmによる分析結果。
図中のRsはモノマーとダイマーの分離度を示す。

Auto・Blend Plus 装置メソッド画面



H-Class Bioの4液混合機能

ACQUITY UPLC H-Class Bio

参考
ACQUITY UPLC H-Class Bioの機能
-Auto・Blend Plus-

様々なpH、塩濃度の移動相を用いるサイズ排除やイオン交換分析に最適な溶媒調製機能。

H-Class Bio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、バッファー濃度、塩濃度で送液。

送液条件は、%ではなく、pH 6.8、塩濃度500 mMのように、pH、モル濃度で入力。

©2012 Waters Corporation
MKT12004