

高性能 IEC カラムを用いた pH グラジエント溶離法によるバイオ医薬品の分離

バイオ医薬品は近年大きな進歩を遂げています。特にたんぱく質医薬品においてはアミノ酸配列を改変することで体内半減期を延長させたものや、活性を向上させたものなどもあります。しかしながら、たんぱく質医薬品はバリエーションを生じやすく、品質管理上これらの分析は不可欠です。そこで今回、高性能イオン交換クロマトグラフィー用カラム2種を用い、pHグラジエント溶離法による各種たんぱく質のバリエーション分離を検討しました。

装置は、株式会社島津製作所製Nexera™ XS inertにpHモニターpHM-40を接続して測定に用いました。陰イオン交換クロマトグラフィーには、TSKgel Q-STAT®を用い、2種の組換えヒトアルブミンとヒト血清アルブミンの分離を検討しました。陽イオン交換クロマトグラフィーには、TSKgel SP-STATを用い、

ヒトIgGの分離を検討しました。溶離液は、異なるpH域で緩衝能を持つ3種の塩を混合したものを用いました。

陽イオン交換クロマトグラフィーでは、いずれの試料にも複数の成分が存在することが確認できました(図1)。また、宿主によって溶出時間が大きく異なっていました。

陰イオン交換クロマトグラフィーでは、抗体のバリエーションの分離を試みるとともに塩グラジエント溶離法との比較も行いました。結果を図2に示します。塩グラジエント溶離法ではバリエーションの分離は確認できませんでしたが、pHグラジエント溶離法では複数のピークを確認することができました。以上より、イオン交換クロマトグラフィーによるたんぱく質のバリエーション分析にはpHグラジエント溶離法が有用であることが示唆されました。

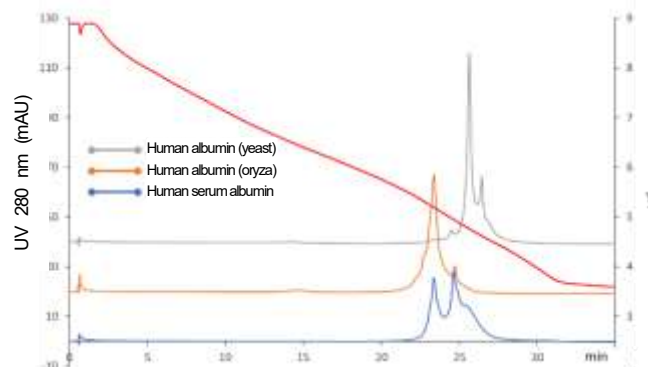


図1 pH グラジエント溶離法を用いた各種ヒトアルブミンの分離比較

分析条件

Instruments	: Nexera XS inert + pHM-40
Column	: TSKgel Q-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)
Mobile phase	: A; 50 mmol/L HEPES+50 mmol/L MES+50 mmol/L acetic acid pH 9.0 : B; 50 mmol/L HEPES+50 mmol/L MES+50 mmol/L acetic acid pH 3.5
Gradient	: A→B (30 min; Linear gradient)
Temperature	: 25 °C
Flow rate	: 0.5 mL/min
Detection	: UV (280 nm)
Injection vol.	: 20 µL
Samples	: Recombinant human albumin (yeast, oryza); human serum albumin

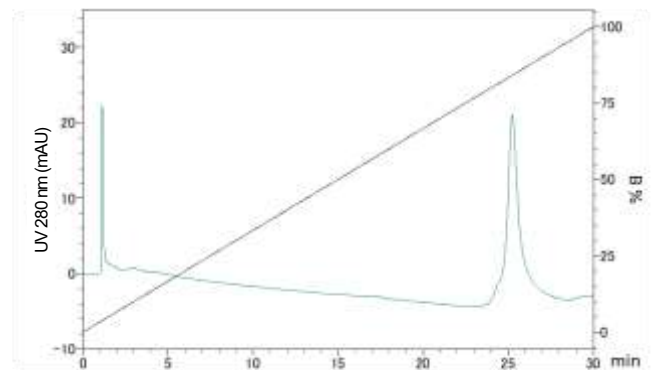
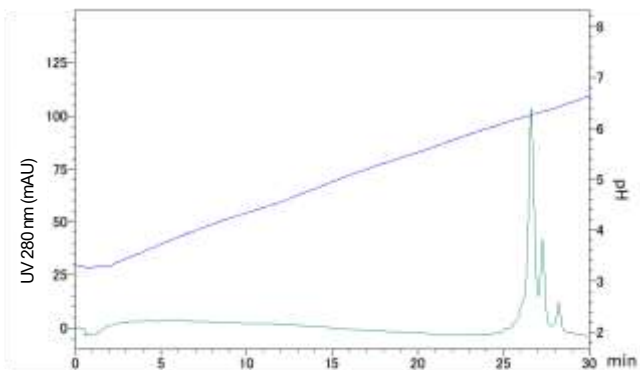


図2 pH グラジエント溶離法と塩濃度グラジエント溶離法の分離比較(ヒト IgG)

分析条件		分析条件	
Instruments	: Nexera XS inert + pHM-40	Instruments	: Nexera XS inert + pHM-40
Column	: TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)	Column	: TSKgel SP-STAT (4.6 mm I.D. x 10 cm)
Mobile phase	: A; 50 mmol/L HEPES+50 mmol/L MES +50 mmol/L acetic acid pH 3.5 : B; 50 mmol/L HEPES+50 mmol/L MES +50 mmol/L acetic acid pH 7.0	Mobile phase	: A; 50 mmol/L citrate buffer pH 4.0 : B; 50 mmol/L citrate buffer+1 mol/L NaCl pH 4.0
Gradient	: A→B (30 min; Linear gradient)	Gradient	: A→B (30 min; Linear gradient)
Temperature	: 25 °C	Temperature	: 25 °C
Flow rate	: 0.5 mL/min	Flow rate	: 0.5 mL/min
Detection	: UV (280 nm)	Detection	: UV (280 nm)
Injection vol.	: 20 µL	Injection vol.	: 20 µL
Sample	: Human IgG (Sigma standard)	Sample	: Human IgG (Sigma standard)

品番	品名	イオン交換基	粒子径	カラムサイズ
0021961	TSKgel Q-STAT	第四級アンモニウム	7 µm	4.6 mm I.D. × 10 cm
0021964	TSKgel SP-STAT	スルホプロピル基	7 µm	4.6 mm I.D. × 10 cm



※ 本アプリケーションは、株式会社島津製作所との協業による成果です。
 ※ 本内容は、2023年日本薬学会第143年会にてポスター発表しました。

※ “TSKgel”、“TSKgel STAT”は日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。

※ “Nexera”は株式会社島津製作所またはその関係会社の日本および他の国における商標です。

※ 掲載のデータ等ははその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください。

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎(03) 6636-3733 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1
 大阪支店 川村仁尚 ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 川村仁尚 ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎(092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>