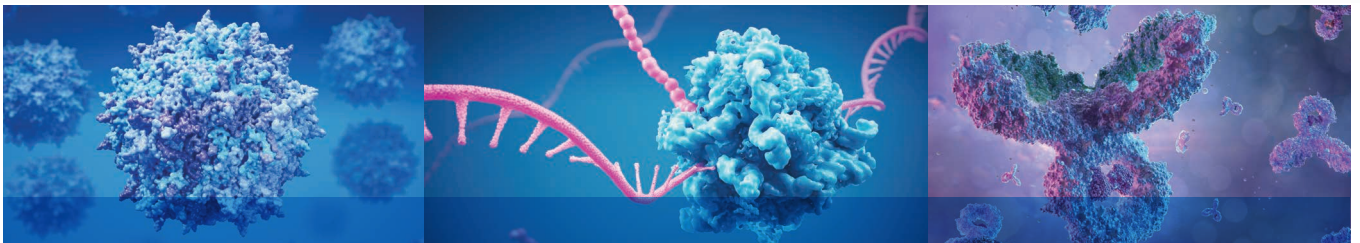


# 生物製剤の凝集体分析

アジレントのサイズ排除カラム



# 生体分子の凝集とフラグメンテーションの正確な測定

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）では、水溶性溶離液を使用して、タンパク質やオリゴヌクレオチドなどの複雑な生体高分子をサイズの違いによって分離します。この分析法は、生物製剤中に存在する凝集体の定量に不可欠です。ダイマーなどの凝集体のサイズは、モノマータンパク質と大きく異なることから、SEC によってさまざまな形態を分離することが可能です。実際、生物製剤凝集体の定量には、SEC と UV または光散乱検出器が標準的な手法として使用されています。

モノクローナル抗体などのバイオ医薬品の製造は複雑なプロセスであり、培養、単離、精製、および製剤の過程でタンパク質の凝集体が問題になることがあります。凝集体形成は、ジスルフィド結合を介して共有結合される場合と、共有結合されない場合があります。ダイマーやそれ以上の凝集体が存在すると、最終製品の効能や安全性に悪影響がおよぶ可能性があるからです。そのため、プロセス開発段階で、凝集体の含有量を定量し、製品の重要な品質特性（critical quality attributes, CQA）を確立する必要があります。また、最終製品の特性解析において、凝集が最小化され、安全なレベルに抑えられていることを確認しなければなりません。

アジレントは 30 年以上にわたり、SEC 用のカラムおよび機器分野をリードしてきました。優れた分離能とスピードを実現するアジレントの SEC 用カラムは、バイオ医薬品の迅速かつ効率的な開発をサポートします。アジレントは厳しい品質基準を守ること、すべての製品の信頼性を確保しています。本書では、生物製剤分野の進化に貢献する堅牢な主力機器、高度なサブ 2 μm カラム、次世代カラムなど、幅広い SEC ポートフォリオを取り上げています。

## シンプルな検索

アジレントの eSelector ツールおよびワークフローと消耗品ガイドを使用すれば、ワークフローに最適なカラムと消耗品がすぐに簡単に見つかります。



[www.agilent.com/chem/eselectortools](http://www.agilent.com/chem/eselectortools)



[www.agilent.com/chem/ordering-guides](http://www.agilent.com/chem/ordering-guides)

## アプリケーションに適した SEC カラムの選択チャート

SEC カラムの選択において、ポアサイズは間違いなく最も重要な要素です。ポアサイズによって分離できる成分が決まるためです。Agilent AdvanceBio SEC カラムのポアサイズは 120 ~ 1000 Å です。このため、ペプチド、モノクローナル抗体 (mAb)、大型生物製剤 (アデノ随伴ウイルス (AAV) や mRNA など) を含むサンプルを高分離能で分離できます。SEC カラムの分子量範囲は、球状タンパク質で確立されている相関に基づきます。SEC は最終的に、溶液中のサイズに基づいて分離します。各種生体分子の分子量との厳密な相関関係はありません。AAV はその分子量が示すサイズよりコンパクトであるため、予想より小さいポアサイズが適しています。オリゴヌクレオチドは溶液中で非常に大きくなることが多いため、大きいポアが必要です。サンプルが大きすぎて 1000 Å の AdvanceBio SEC で分離できない場合は、2000 Å の Agilent Bio SEC-5 カラムの使用を推奨します。

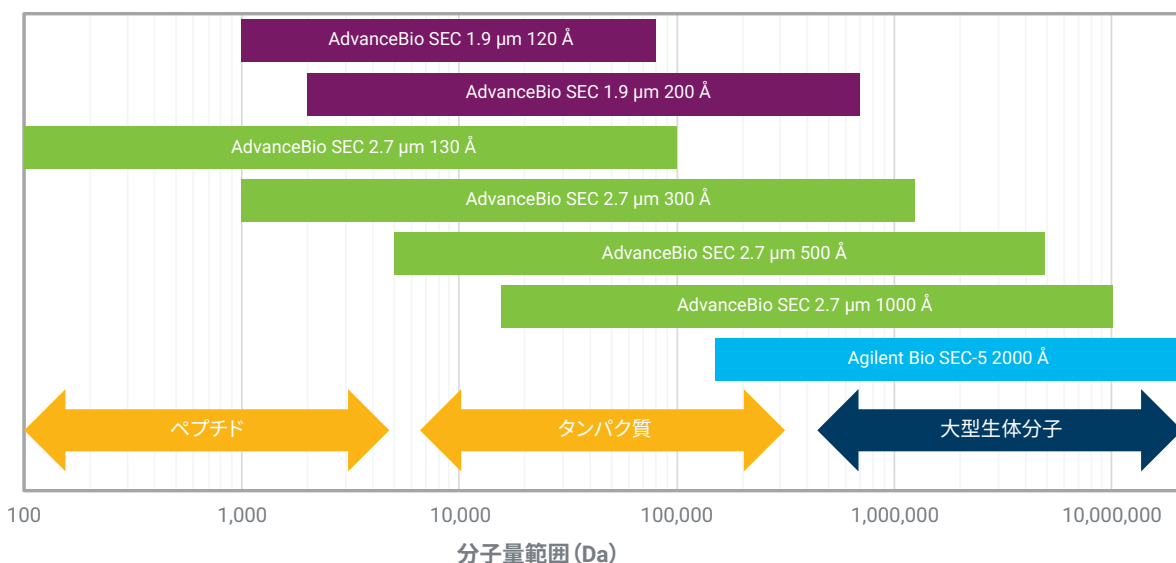


図 1. アプリケーション別の Agilent AdvanceBio SEC 推奨カラム。分子量範囲はタンパク質に基づきます。

アプリケーション	粒子径	ポアサイズ	サンプルサイズ範囲*	最大圧力
<b>AdvanceBio SEC</b>				
ペプチドおよび小型タンパク質	2.7 μm	130 Å	100 Da ~ 120 kDa	40 MPa
	1.9 μm	120 Å	1 ~ 80 kDa	62 MPa
mAb とその他のタンパク質	2.7 μm	300 Å	1 kDa ~ 1.25 MDa	40 MPa
	1.9 μm	200 Å	2 ~ 700 kDa	62 MPa
AAV、小径 VLP	2.7 μm	500 Å	5 kDa ~ 5 MDa または Rh 3 ~ 25 nm	40 MPa
VLP、大型オリゴヌクレオチド、LNP	2.7 μm	1000 Å	15 kDa ~ 10 MDa または Rh 5 ~ 40 nm	40 MPa
<b>Agilent Bio SEC-5</b>				
VLP、大型オリゴヌクレオチド	5 μm	2000 Å	150 kDa ~ 10 MDa または Rh 5 ~ 75 nm	24 MPa
<b>PROTEEMA</b>				
天然および合成ポリマー / ペプチド	3 μm	100 Å	100 Da ~ 150 kDa	20 MPa
天然および合成ポリマー / タンパク質	3 μm	300 Å	1 kDa ~ 1.2 MDa	20 MPa
	5 μm	300 Å	1 kDa ~ 1.2 MDa	15 MPa
	5 μm	1000 Å	1 kDa ~ 7.5 MDa	15 MPa

\*分子量範囲はタンパク質に基づきます。

# AdvanceBio SEC

凝集体分析に最適なソリューション



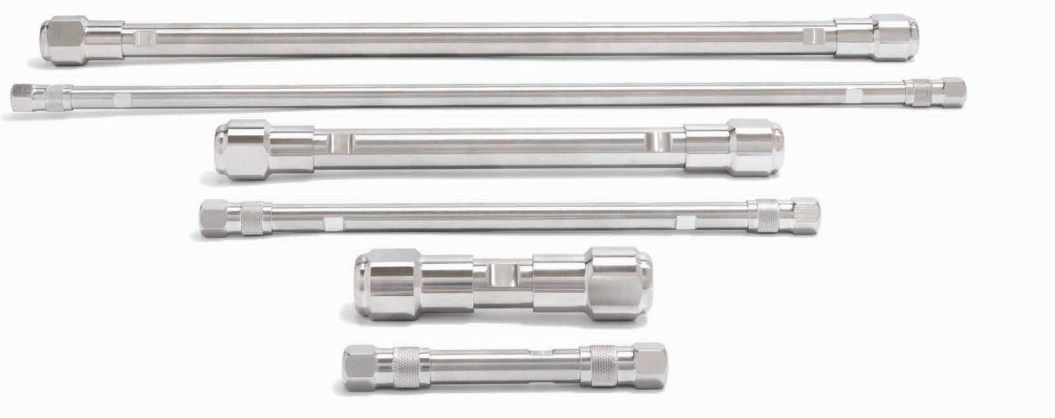
## ルーチンアプリケーションにも高度なアプリケーションにも適したサイズ排除カラム

AdvanceBio SEC カラムは、mAb やその他のタンパク質、ペプチドの凝集体およびフラグメント分析において、正確かつ高精度の定量分析を実現するよう最適化されています。アジレントが設計、開発したこの革新的な SEC カラムにより、メソッドの堅牢性と信頼性が高まります。サンプルの再分析が不要になるため、ラボの生産性が向上します。カラム間、バッチ間およびラボ間で一貫した結果を得られるため、異なる部門または事業所においても確実にメソッドを移管できます。

AdvanceBio SEC 2.7  $\mu\text{m}$  カラムはルーチンの SEC ニーズに対応した堅牢なカラムで、アジレント独自の親水性コーティングにより、移動相に余分な塩や有機溶媒を加えることなく、サンプルと固定相の間の二次的作用を最小限に抑えます。抗体薬物複合体のような粘着性のあるサンプルでも、このカラムは二次的作用を最小限に抑えて、正確な結果を導きます。AAV、mRNA、およびその他の大型生体分子用に、より大きいポアサイズ (500  $\text{\AA}$  と 1000  $\text{\AA}$ ) もご用意しています。

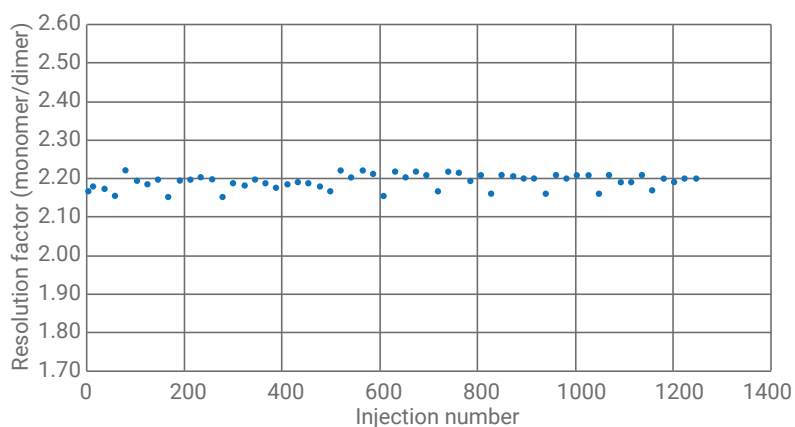
AdvanceBio SEC 1.9  $\mu\text{m}$  カラムは、SEC 分離を 1 つ上のレベルに引き上げます。小さい粒子と親水結合相が、効率よく、分離能の高い分離を実現します。最高 62 MPa の安定性が、高スループットに必要な高速の流量をもたらします。200  $\text{\AA}$  のポアサイズは、徹底的な mAb 特性解析に必要なダイマー、モノマー、フラグメントの同時分離に最適化されたものです。

- 分析スピードが向上し、納期を遵守できます
- 分離能が向上し、さらに正確な定量が可能です
- 感度が向上し、低濃度で含まれる凝集体の定量が可能です
- 再現性が向上し、再分析のリスクが減らせます



# 堅牢な AdvanceBio SEC カラムで カラム寿命を延ばす

AdvanceBio SEC カラムは、安定性が高く二次的反応が少ない化学的性質、および強度の高い粒子とカラム充填剤という特長を備えており、堅牢性が高く長寿命です。このためお客様は SEC カラムから最大限の価値を得ることができます。



カラム： AdvanceBio SEC 2.7  $\mu\text{m}$  300  $\text{\AA}$ 、  
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  
流量： 1.0 mL/min

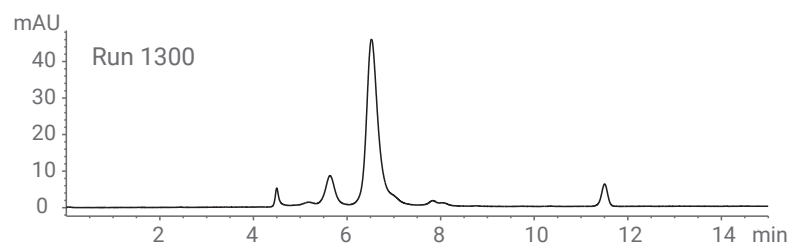
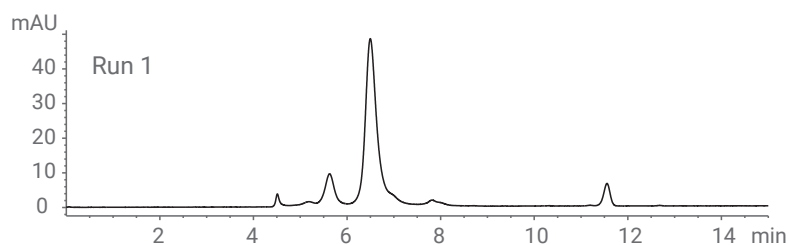
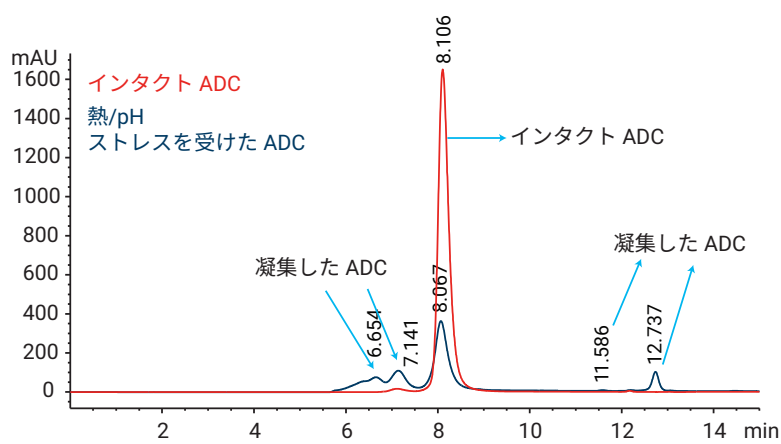


図 2. IgG サンプルのプロファイルは、1,300 回の注入後も変わりませんでした (下)。  
IgG のモノマーとダイマーの分離係数と定量についてもカラム寿命を通して動作範囲に収まっていた (上)。

# 親水性 SEC メディアにより二次的反応が少なく、 複雑な生物製剤に最適

AdvanceBio SEC カラムには独自の親水性コーティングが施されているため、二次的反応を最小限に抑え、回収率を上げて、サンプルに関する情報を確保できます。



カラム： AdvanceBio SEC 2.7  $\mu\text{m}$  300  $\text{\AA}$ ,  
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： PBS、150 mM 塩化ナトリウムを含む  
50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4

カラム温度： 室温

注入量： 10  $\mu\text{L}$

流量： 0.8 mL/min

検出器： UV、220 nm

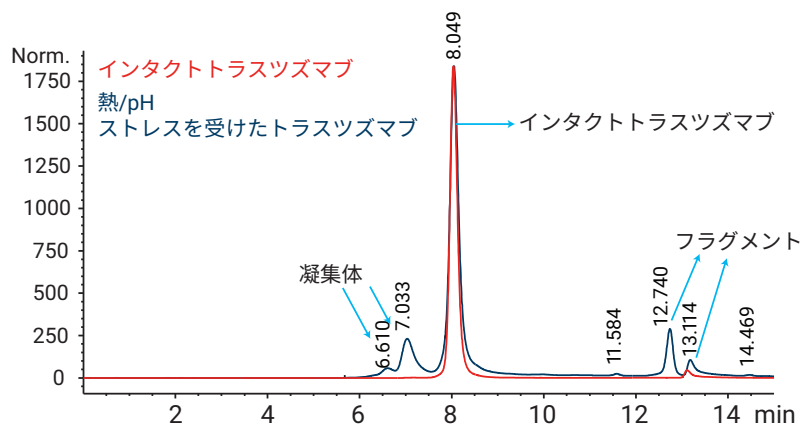
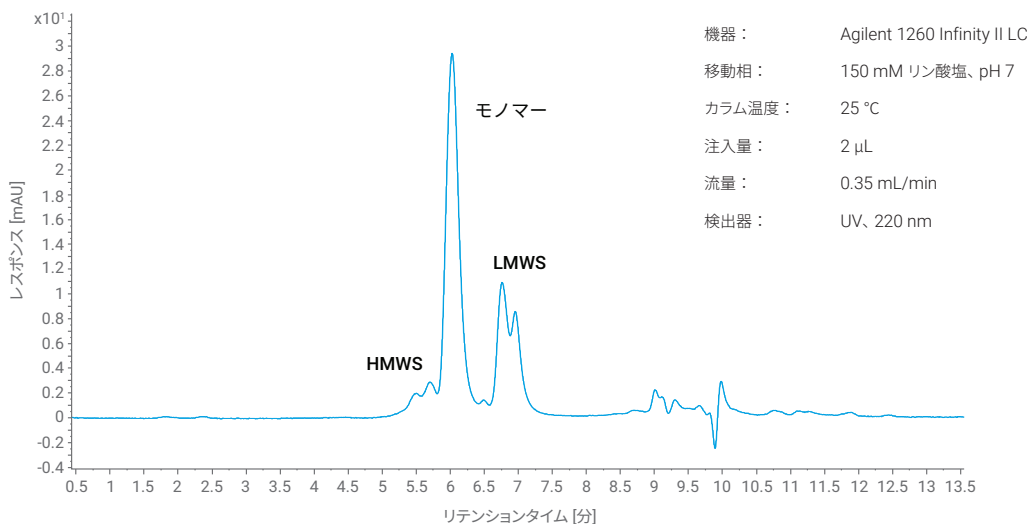


図 3. AdvanceBio SEC 粒子には不活性コーティングが施されているため、ADC のピーク形状がシャープになり、テーリングが少なくなります (上)。ADC の疎水性は関連 mAb より高いこともよくあります (下)。

AdvanceBio SEC カラムは、他社製カラムより二次的反応が少ないため、回収率と分離能が高くなります。

#### A : Agilent AdvanceBio SEC 1.9 $\mu\text{m}$ 、120 $\text{\AA}$ 、4.6 x 300 mm



#### B : 他社製カラム 1.7 $\mu\text{m}$ 、125 $\text{\AA}$ 、4.6 x 300 mm

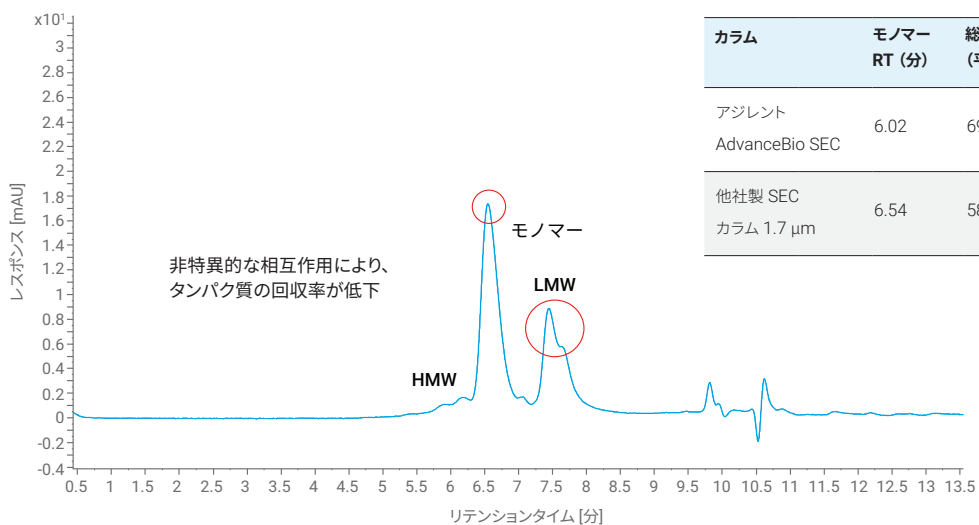


図 4. Agilent AdvanceBio カラムと他社製カラムを用いた、高分子量種 (high molecular weight species, HMWS)、モノマー、低分子量種 (low molecular weight species, LMWS) の分離の比較。他社製カラムは二次的反応が大きいため、サンプル回収率が低く、2 種類の LMWS を分離できていません。

# 高分離能とハイスループットにより 分析時間を短縮

大きいポアサイズの小さな粒子の場合、従来の 300 mm カラムから 150 mm カラムに切り替えることができます。これによりスループットが向上し、分析時間を半分に短縮して余剰時間を生み出すことができるため、より多くのサンプルを分析したり、次のプロジェクトに着手したりすることができます。

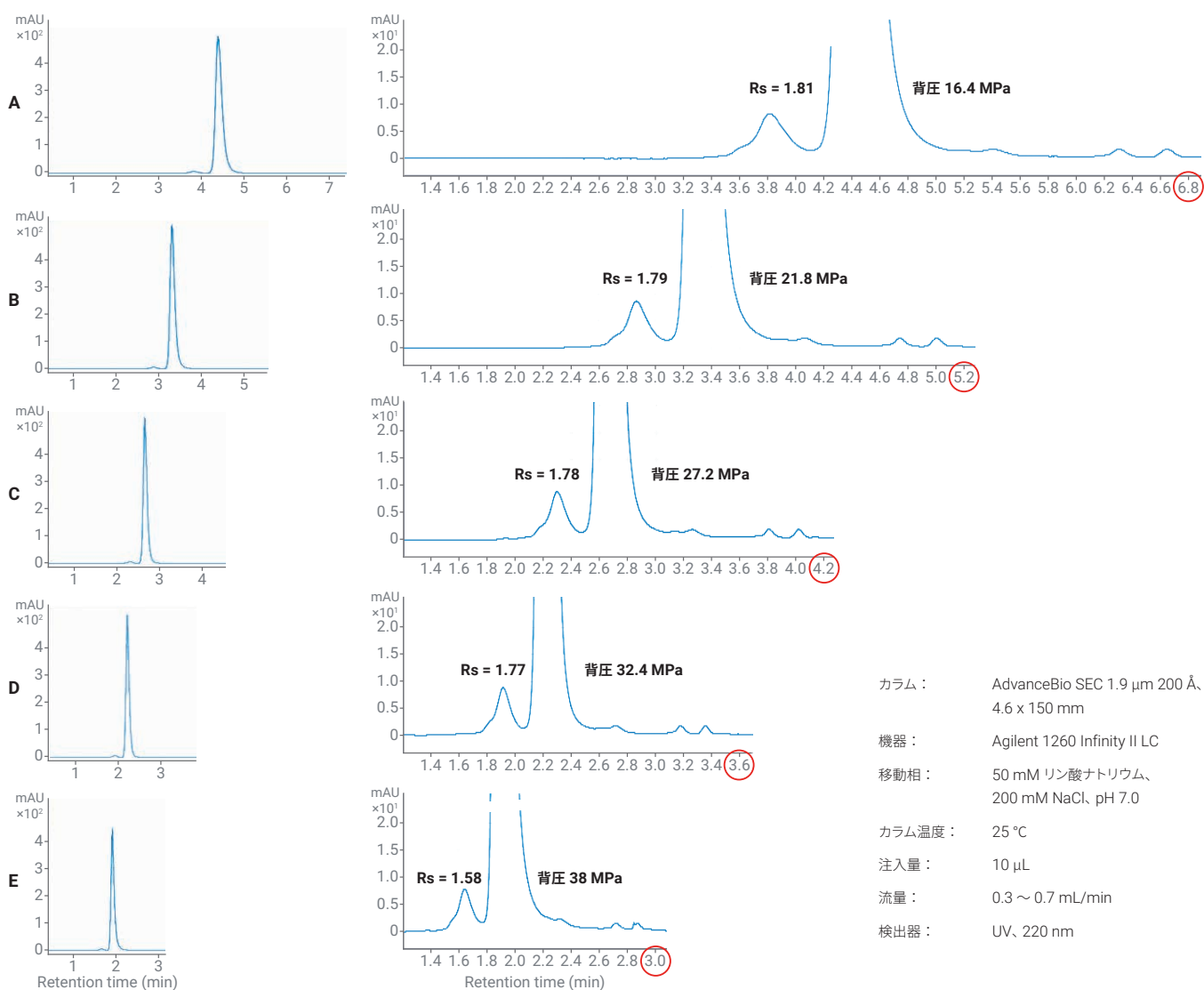


図 5. SigmaMAb のサイズ排除クロマトグラム。4.6 × 150 mm の SEC カラムを用いて 50 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、pH 7.0 で分析。流量はそれぞれ A) 0.3 mL/min、B) 0.4 mL/min、C) 0.5 mL/min、D) 0.6 mL/min、E) 0.7 mL/min。0.7 mL/min の場合、1 時間で 20 個（1 日 24 時間で 480 個）のサンプルを分析できます。



# 超大型生物製剤分析に最適なポアサイズ

AAV、ウイルス様粒子（VLP）、オリゴヌクレオチド、脂質ナノ粒子（LNP）は、細胞および遺伝子治療、ワクチンのための次世代の生物製剤です。これらの新しい分析困難な生物製剤の特性解析には、先進的な優れた技術が必要になります。

今回新たに 500 Å および 1000 Å のポアサイズが追加になりました。従来の Agilent AdvanceBio SEC カラムの優れた特長はすべて維持しながら、より大きい直径のサンプルにも対応できるようになったため、AAV、VLP、オリゴヌクレオチド、LNP などの超大型生体分子 (> 1 MDa) の凝集体分析に最適です。AdvanceBio SEC カラムは、他社カラムと比較して優れた分離能とテーリングが少なくなることを示しています（図 4）。この優れた分離能により、堅牢なデータ解析を実行することができ、信頼性の高い結果が得られます。

## AdvanceBio SEC カラム

カラム： AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7 μm, 4.6 x 300 mm (p/n PL1580-5325)  
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7 μm, 4.6 x 300 mm (p/n PL1580-5302)  
他社 1 700 Å, 3 μm, 4.6 x 300 mm  
他社 2 450 Å, 2.5 μm, 4.6 x 300 mm  
他社 2 1000 Å, 3 μm, 4.6 x 300 mm  
移動相： 50 mM リン酸ナトリウム + 400 mM NaCl, pH 7.2  
流量： 0.35 mL/min  
検出器： 蛍光、λex 280 nm、λem 348 nm

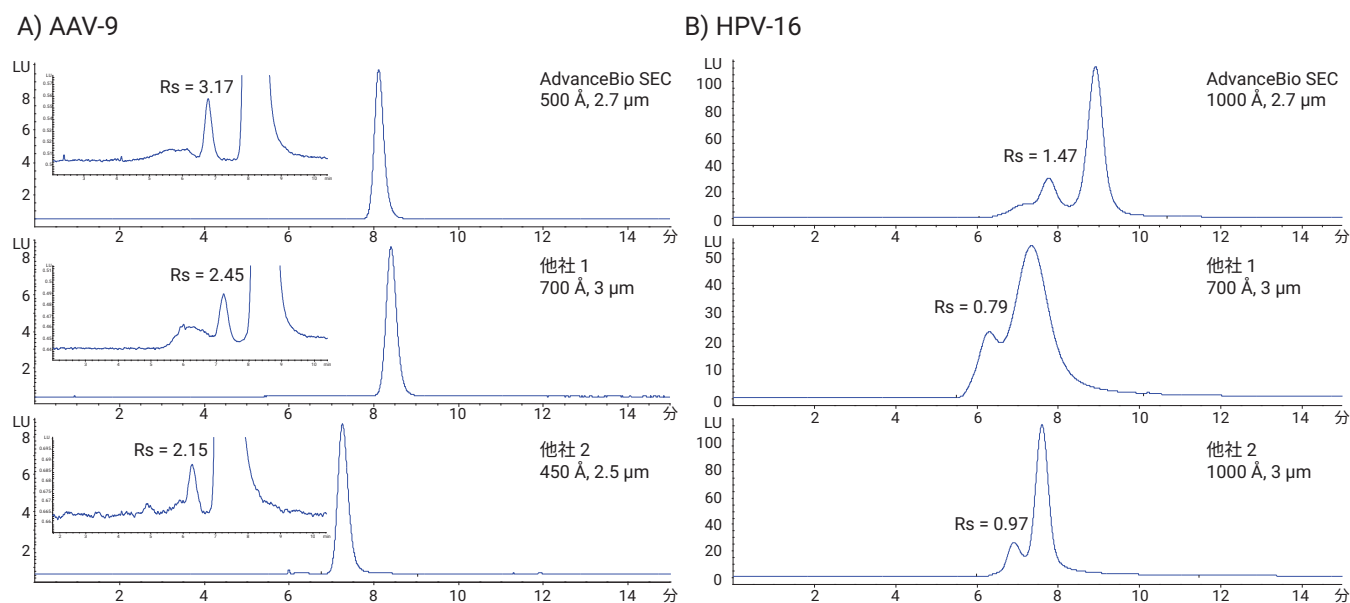


図 6. タンパク質ベースの次世代治療薬を用いた実験において、Agilent AdvanceBio SEC カラムは他社製カラムより分離能が高く、テーリングが少なくなっています。

AdvanceBio SEC 500 Å および 1000 Å カラムは、オリゴヌクレオチド標準で高い分離能と広い分離範囲を示しています。

## AdvanceBio SEC 500 Å および 1000 Å カラム

カラム: AdvanceBio SEC 500 Å, 2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 300 mm  
AdvanceBio SEC 1000 Å, 2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 300 mm  
移動相: 150 mM リン酸緩衝液, pH 7.0  
流量: 0.175 mL/min  
カラム温度: 30 °C  
検出器: UV, 260 nm

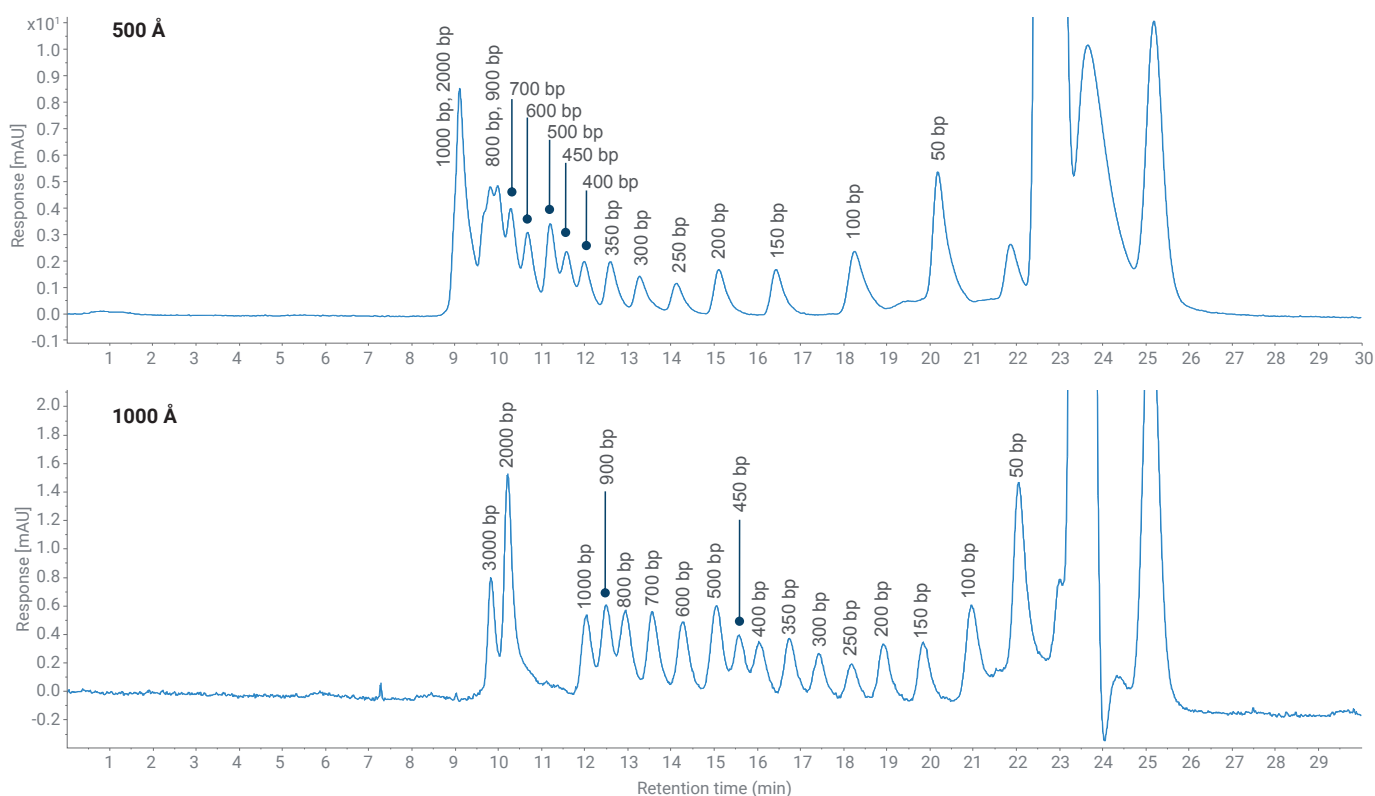


図 7. 50 ~ 3,000 bp の 50 bp DNA ラダー。特に大型オリゴヌクレオチドで優れた分離能を示しています。



### 未来のニーズに応える HPLC を導入

新しい Agilent Infinity III LC シリーズ、カラム、溶媒、ソフトウェア、サービスなど、分析 HPLC ソリューションの包括的なポートフォリオをご覧ください。

<https://explore.agilent.com/hplc-assistance-jp>

# Agilent Bio SEC-5

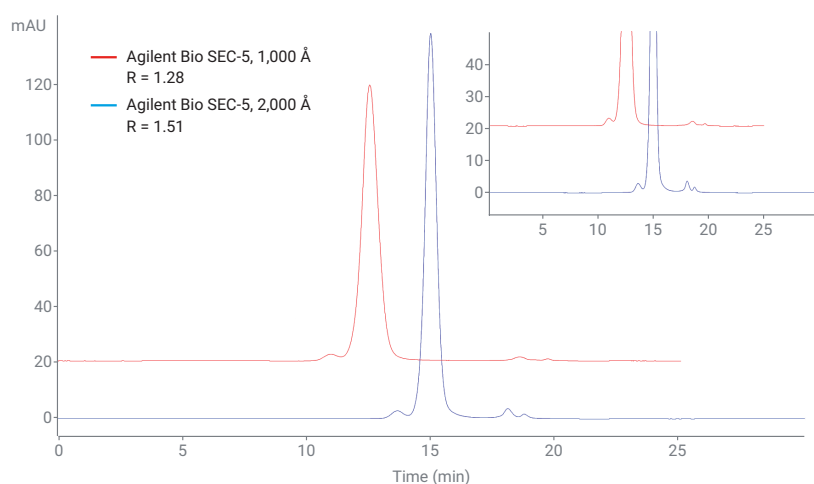
ポアサイズ 2000 Å



## 超大型生物製剤用の特大ポア

サンプルサイズが AdvanceBio SEC カラムの最大ポアサイズを超える場合、Agilent Bio SEC-5 2000 Å カラムなら必要な大きいポアサイズに対応できます。Bio SEC-5 2000 Å カラムは、ポアサイズが 100 ~ 2000 Å、最大内径寸法が 21.2 mm という大型 Bio SEC ポートフォリオの一部です。

## Agilent Bio SEC-5 カラム



カラム : Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、  
5 μm、2000 Å  
Bio SEC-5、7.8 × 300 mm、  
5 μm、1000 Å

機器 : Agilent 1260 Infinity II LC、  
クォータリポンプ付

移動相 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、  
400 mM 塩化ナトリウム

サンプル : 5 μL

カラム温度 : 室温

流量 : 0.6 mL/min

検出器 : UV、220 nm

図 8. 同じ VLP を Agilent Bio SEC-5 2000 Å カラムと Bio SEC-5 1000 Å カラムで分析しました。

# PROTEEMA SEC カラム

## ジオール結合相



### USP L20 分類の多目的カラム

PROTEEMA カラムは、分子量 100 ~ 7,500,000 Da の範囲にある天然および合成タンパク質、ペプチド、酵素、ゼラチン/コラーゲンの水系ゲル浸透クロマトグラフィー / サイズ排除クロマトグラフィー (GPC/SEC) 分析に適しています。2 種類の粒子サイズ、3 種類のポアサイズ、ステンレスとパイオイナーの両ハードウェアオプションなど、さまざまなカラム構成を利用できます。PROTEEMA Lux カラムは、光散乱検出用にコンディショニングされた状態で納品されます。このジオール SEC 相は USP L20 が必要な分離に適しています。

カラム： PROTEEMA 100 Å、300 Å、1000 Å、8 x 300 mm

移動相： リン酸緩衝液 pH 6.6 (34 mmol) + 0.5 M NaCl

カラム温度： 23 °C

流量： 1 mL/min

検出器： RI

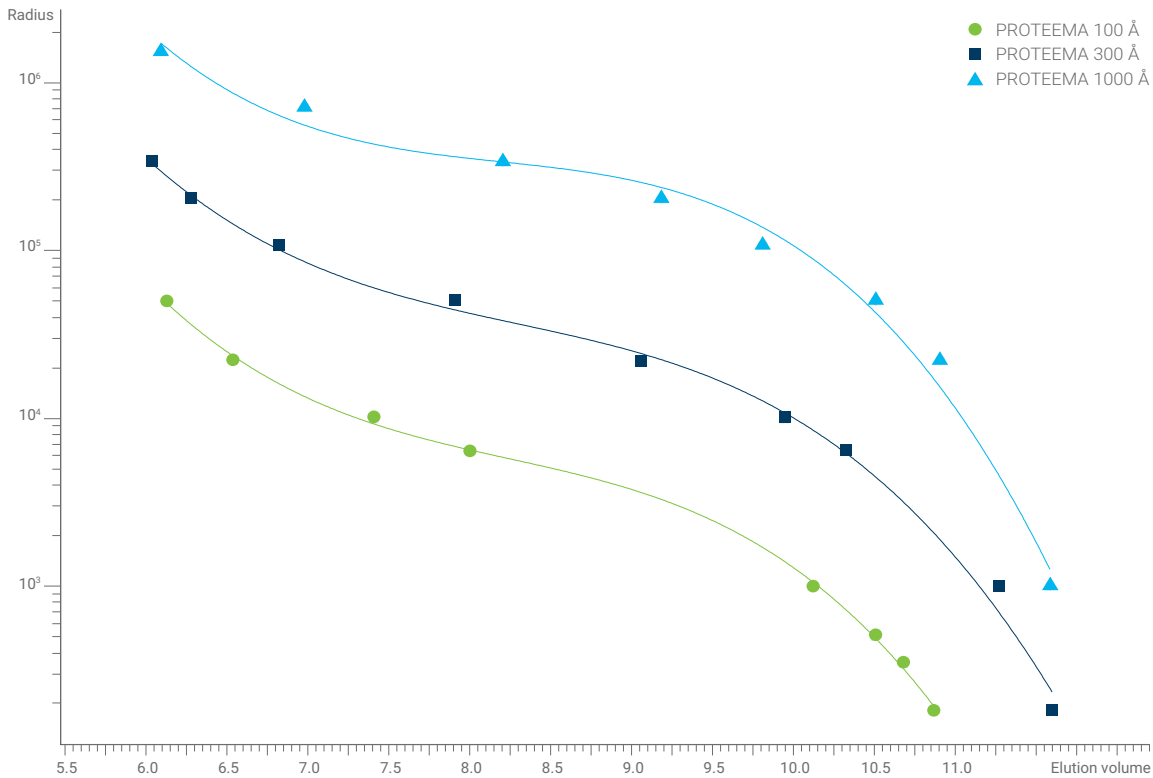


図 9. ポアサイズが 100 Å、300 Å、1000 Å の PROTEEMA カラムの分離範囲を示すプルラン検量線

# SEC のタンパク質標準

優れたカラム性能とシステム適合性



## AdvanceBio SEC 130 Å および 300 Å タンパク質標準

各標準は、厳選された 5 種類のタンパク質（オボアルブミン、ミオグロビン、アプロチニン、ニューロテンシン、アンジオテンシン II）からなるタンパク質混合物であり、130 Å または 300 Å の Agilent 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、定期的にカラムのキャリブレーションや最適なシステム性能の確認ができます。

カラム： AdvanceBio SEC 2.7 μm 7.8 x 300 mm

移動相： 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量： 1.0 mL/min

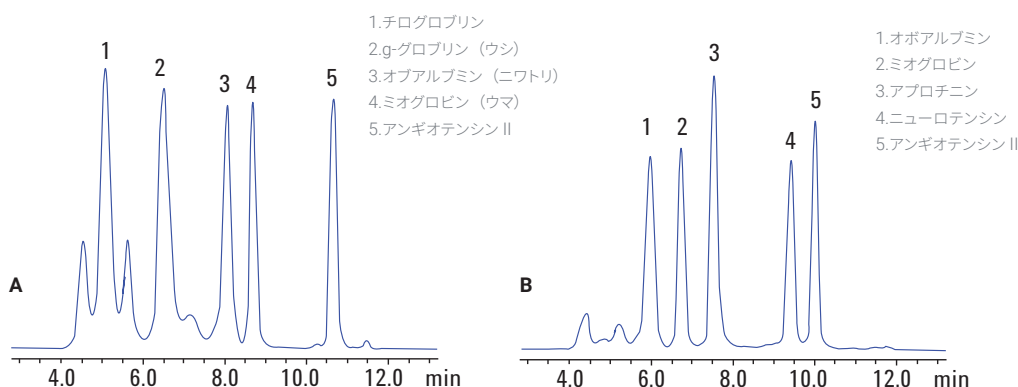


図 10. A) AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準を AdvanceBio SEC 300 Å カラムで分離  
B) AdvanceBio SEC 130 Å タンパク質標準を AdvanceBio SEC 130 Å カラムで分離

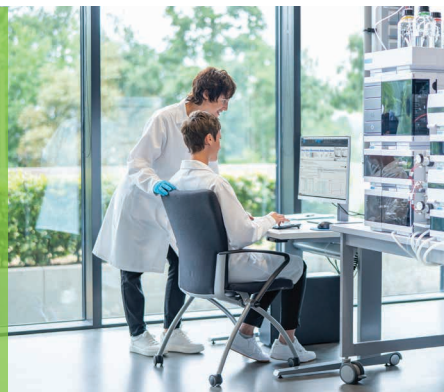
## タンパク質標準キットによる高い柔軟性

キット化されたタンパク質標準により、特定の分析やトラブルシューティングの状況に最適なタンパク質標準を選択することができます。PSS-PROKIT では、分子量範囲 243 Da (シチジン) ~ 670 kDa (サイログロブリン、Rh 9.1) の凍結乾燥された標準が 10 種類、ボトル入りで提供されます。PSS-PROKITR1 には、3 ~ 4 種類の凍結乾燥された混合済み標準が入った 3 種類のバイアルが 5 本ずつ含まれます。これらのキットにより、独自の混合物の設計や、個々のタンパク質でのトラブルシューティング、完全に分離された標準をあらかじめ調合した混合物の使用などが柔軟にできるようになります。

### Agilent ReadyCal キットの構成

バイアル	成分
緑キャップ	サイログロブリン、アルブミン、シトクローム C、シチジン
赤キャップ	ガンマグロブリン、β-ラクトグロブリン、アプロチニン
白キャップ	アルブミン (ウシ)、ミオグロビン、ビタミン B12

## 製品情報



アジレントでは、サンプル前処理、カラム、消耗品、標準物質、機器など、ワークフロー全体の製品を提供しています。

### AdvanceBio SEC カラム、2.7 $\mu\text{m}$

寸法 (mm)	粒子サイズ ( $\mu\text{m}$ )	130 Å	300 Å	500 Å	1000 Å
4.6 x 300	2.7	PL1580-5350	PL1580-5301	PL1580-5325	PL1580-5302
4.6 x 150	2.7	PL1580-3350	PL1580-3301	PL1580-3325	PL1580-3302
4.6 x 50、ガード	2.7	PL1580-1350	PL1580-1301	PL1580-1325	PL1580-1302
7.8 x 300	2.7	PL1180-5350	PL1180-5301	PL1180-5325	PL1180-5302
7.8 x 150	2.7	PL1180-3350	PL1180-3301		
7.8 x 50、ガード	2.7	PL1180-1350	PL1180-1301	PL1180-1325	PL1180-1302

### AdvanceBio SEC カラム、1.9 $\mu\text{m}$

寸法 (mm)	粒子サイズ ( $\mu\text{m}$ )	120 Å	200 Å
4.6 x 300	1.9	PL1580-5250	PL1580-5201
4.6 x 150	1.9	PL1580-3250	PL1580-3201
4.6 x 30、ガード	1.9	PL1580-1250	PL1580-1201
2.1 x 150、PEEK ライニング SS	1.9	PL1980-3250PK	PL1980-3201PK
2.1 x 50、PEEK ライニング SS、ガード	1.9	PL1980-1250PK	PL1980-1201PK

### Bio SEC-5 カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ ( $\mu\text{m}$ )	Bio SEC-5 2000 Å
4.6 x 300	5	5190-2543
4.6 x 150	5	5190-2544
4.6 x 50、ガード	5	5190-6862
7.8 x 300	5	5190-2541
7.8 x 150	5	5190-2542
7.8 x 50、ガード	5	5190-2545
21.2 x 300	5	5190-6868
21.2 x 50、ガード	5	5190-6874

## PROTEEMA カラム

寸法 (mm)	粒子サイズ (μm)	ポアサイズ (Å)	ステンレス	バイオイナート	PROTEEMA Lux 光散乱対応
4.6 x 30	3	ガードカラム	PRM050303	PRM050303BI	
4.6 x 250	3	100	PRM0525031E2	PRM0525031E2BI	
4.6 x 250	3	300	PRM0525033E2	PRM0525033E2BI	
4.6 x 250	5	300	PRM0525053E2	PRM0525053E2BI	
8 x 50	5	ガードカラム	PRA080505	PRA080505BI	PRA080505LS
8 x 300	5	100	PRA0830051E2	PRA0830051E2BI	PRA0830051E2LS
8 x 150	5	300	PRA0815053E2	PRA0815053E2BI	
8 x 300	5	300	PRA0830053E2	PRA0830053E2BI	PRA0830053E2LS
8 x 300	5	1000	PRA0830051E3	PRA0830051E3BI	PRA0830051E3LS

## AdvanceBio SEC 標準

製品名	フォーム	部品番号
AdvanceBio SEC 130 Å タンパク質標準	凍結乾燥固体	5190-9416
AdvanceBio SEC 300 Å タンパク質標準	凍結乾燥固体	5190-9417

## PSS タンパク質標準

製品名	フォーム	部品番号
GPC/SEC-キャリブレーションキット、個別の標準 10 個	凍結乾燥固体	PSS-PROKIT
ReadyCal キットタンパク質、1 つあたり 3 ~ 4 種類のタンパク質を混合 × 5 個	凍結乾燥固体	PSS-PROKITR1

## Agilent NIST mAb

製品名	フォーム	部品番号
Agilent-NISTmAb、25 μL (10 mg/mL、総量 0.25 mg)	冷凍液	5191-5744
Agilent-NISTmAb、4 x 25 μL (10 mg/mL、総量 1 mg、各 0.25 mg)	冷凍液	5181-5745

詳細：その他の SEC カラム (Bio SEC-3 およびその他のポアサイズの Bio SEC を含む) については、[www.agilent.com/chem/advancebio-aggregate](http://www.agilent.com/chem/advancebio-aggregate) をご覧ください。

## Agilent CrossLab サービス

Agilent CrossLab は、サービスと消耗品を統合し、お客様のワークフローのサポート、生産性の向上や運用の効率化など、重要な成果を実現するためのお手伝いをさせていただきます。アジレントは CrossLab を通じてあらゆる場面で「見えない価値」を提供し、お客様の目標達成を支援します。CrossLab は、メソッドの最適化、柔軟なサービスプラン、あらゆるスキルレベル向けのトレーニングを提供します。またお客様が機器やラボを管理して最高の性能を実現できるように、その他の製品やサービスも多数ご用意しています。

Agilent CrossLab の詳細と、見えない価値から優れた成果を生み出す例については、[ホームページ](#)をご覧ください。



ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。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。

DE-003739

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2025  
Printed in Japan, January 10, 2025  
5994-7711JAJP

