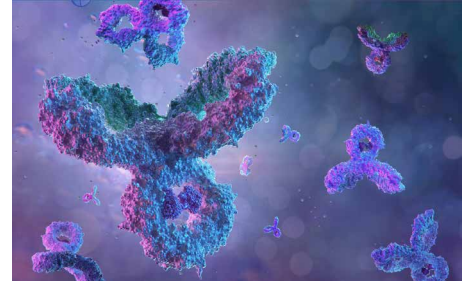


AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング HPLC カラムによるポリソルベート分解分析



概要

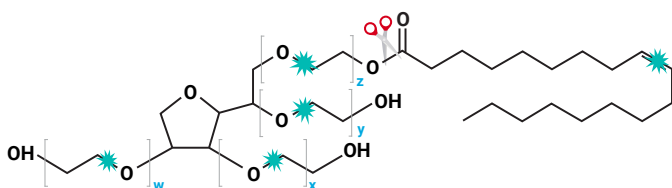
ポリソルベートは、点眼液や咳止めシロップから洗口液や日焼け止めに至るまで、ヘルスケア製品の至るところで使用されている成分です。ポリソルベートは、これらの製品において乳化剤、可溶化剤、界面活性剤、安定剤として機能します。モノクローナル抗体 (mAb)、抗体薬物複合体 (ADC)、二重特異性タンパク質、融合タンパク質などのタンパク質ベースの治療薬では、ポリソルベート 20 とポリソルベート 80 が最も一般的に使用される界面活性剤です。ポリソルベートには、タンパク質の凝集やタンパク質と表面の相互作用を防止して、治療薬の安定性を維持する機能があります。ポリソルベートのもう 1 つの利点は、その高い生体適合性と低毒性特性です。ポリソルベートには複雑な構造があり、さまざまな国際薬局方の現在の規制では、それぞれ独自の純度要件が規定されています。さらに、ポリソルベートのグレードによっては純度が高いものもあり、エンドキシンや過酸化物の濃度が低いものもあります。

ポリソルベートに関連する重要な問題は、分解しやすいために治療薬の安定性が損なわれることです。ポリソルベート分解の 2 つの主なメカニズムは、加水分解と酸化です。加水分解は化学的に起こることもありますが、頻度は低く、通常は極端な pH レベルで起こります。より一般的には、宿主細胞内に存在するタンパク質である、リパーゼやエステラーゼによる酵素加水分解が起こります。2024 年、米国薬局方は、リポタンパク質リパーゼがポリソルベート分解で重要な役割を果たすことから、宿主細胞タンパク質安定同位体標識標準として販売を開始しました。¹一方、酸化は残留過酸化物により引き起こされ、一般的な pH と温度条件下でも、光曝露や遷移金属により促進されます。

ポリソルベート 80

酸化

加水分解



$$w + x + y + z = 20$$

図 1. ポリソルベート分解の 2 つのメカニズムである加水分解と酸化を示す図。加水分解は脂肪酸を切断する一方、酸化はポリソルベート構造の数か所で起こる可能性があります。

現在、界面活性剤分解に関する規制当局のガイダンスは存在しませんが、その分析について留意しておくことがきわめて重要になります。ポリソルベートについては、米国食品医薬品局（FDA）や欧州医薬品庁による監視が強化されています。^{2, 3}開発の初期段階でこの種のアッセイを実施することは、パイプラインの後期における品質問題の防止に役に立ちます。また、バイオ医薬品企業も、この種の分析に対する関心と認識を高めています。^{4, 5}このワークフローと消耗品ガイドでは、ラボで簡単に界面活性剤分解分析を実施できるようにするためのヒントとコツを含む、包括的なワークフローを紹介します。この分析を早期に実施することにより、後の時期や段階におけるタンパク質の安定性の問題を予防して、軽減することができます。

ベストプラクティス

サンプル前処理

サンプル前処理は、このワークフローの最大の問題点の 1 つです。サンプル前処理の全体的な目的は、ポリソルベートおよびポリソルベート成分から生物製剤を除去することです。サンプル前処理をまったく実施しないか、またはタンパク変性沈殿処理を実施するかの 2 つの選択肢があります。

- 一般的に、サンプル前処理は常に実施する必要があるため、このステップを回避することは推奨しません。Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムはワイドポアカラムですが、大量のタンパク質を注入するとカラムに負荷がかかり、ポリソルベートピークを妨害する可能性があります。一方、低濃度（ $\leq 10 \text{ mg/mL}$ ）で低容量（ $\leq 15 \mu\text{L}$ ）のタンパク質を、推奨される開始条件下でグラジエントを用いて注入すると、タンパク質は約 1 分で溶出し、ポリソルベートピークを妨害しません。
- タンパク変性沈殿処理は、タンパク質を除去するための一般的なアプローチです。例えば、50 % メタノールと 50 % エタノールの混合物を使用してタンパク質を沈殿させ、上澄みを分析に利用することができます。上澄みは、開始時の移動相条件と厳密に一致するように希釈する必要があります。タンパク変性沈殿処理の利点は、非常に濃縮されたタンパク質溶液に適しているということです。

推奨する開始条件

表 1. 2.1 x 50 mm Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムを用いた界面活性剤プロファイリングの分析で推奨される LC メソッド

パラメータ	設定値
流量	0.25 mL/min
移動相	A : 10 mM 酢酸アンモニウム B : メタノール
カラム温度	25 °C
グラジエント	0 ~ 0.2 分、0 % B 0.2 ~ 0.6 分、0 ~ 50 % B 0.6 ~ 1.5 分、50 % B 1.5 ~ 5.1 分、50 ~ 95 % B 5.1 ~ 7 分、95 % B 7 ~ 8 分、95 ~ 0 % B 8 ~ 10 分、0 % B
ニードル洗浄	20:80 メタノール:水、10 秒間フラッシュ
1290 Infinity II ELSD 条件	エバポレータ温度 : 30 °C ネブライザ温度 : 30 °C ガス流量 : 1.20 SLM

クロマトグラフィー条件の最適化

- 酢酸アンモニウムは、吸湿性の高い塩です。可能な場合は、高純度バッチを少量で購入して、重量測定値が一定であることを確認します。
- 移動相の pH は、安定したカラムケミストリと再現性の高い分離のために維持する必要があります。
- ポリソルベートには「粘性性」があるため、キャリアオーバーを回避するためにニードル洗浄を強く推奨します (表 1)。遊離脂肪酸がキャリアオーバーの原因となっている場合は、メタノール/水洗浄のメタノール含有量を増加させることを検討します。
- 流量の増加率を、デフォルトから 1 mL/min 以下に下げてください。流量を徐々に増加させるとカラム寿命が延び、急激な過圧を防ぐことができます。この設定は、Agilent MassHunter ソフトウェアの場合、LC ポンプ制御の [Advanced (詳細設定)] セクションにあります。
- カラムに適合するように、LC メソッドの圧力上限を設定します。AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムの場合、この圧力を 60 MPa に設定する必要があります。ただし、寸法が 2.1 x 50 mm および 4.6 x 50 mm のカラムの場合は、40 MPa の制限があります。
- カラムとガードカラムの性能をモニタリングするには、いくつかの仕様を選択して、その仕様を定期的に追跡します。

蒸発光散乱検出器 (ELSD)

- 塩濃度が高くなると、ELSD ネブライザの汚れや詰まりが早期に発生するため、水性相で 10 mM 以下の酢酸アンモニウムを使用することを考慮します。
- ベースラインのノイズが増加するか、または感度が低下した場合は、ネブライザとエバポレータチューブをクリーニングします。手順については、ELSD のマニュアルを参照してください。⁷
- ネブライザの問題を最小限に抑制するために、高性能の LC ポンプを使用します。その結果として、再現性が向上します。

質量分析

- 目的のリテンションタイム外で LC ストリームを廃液側に分岐させます。これは特に、メソッドの最後の高有機洗浄中や、可能な場合はボイドボリュームが溶出している間に適用します。
- HPLC グレード以上の溶媒を使用します。
- MS イオン源の定期的なクリーニング手順を確立します。
- サンプルにリン酸緩衝液が含まれている場合は、リン酸塩が質量分析計のシグナルを抑制するため、緩衝液を交換するか、または非常に少量だけ注入します。

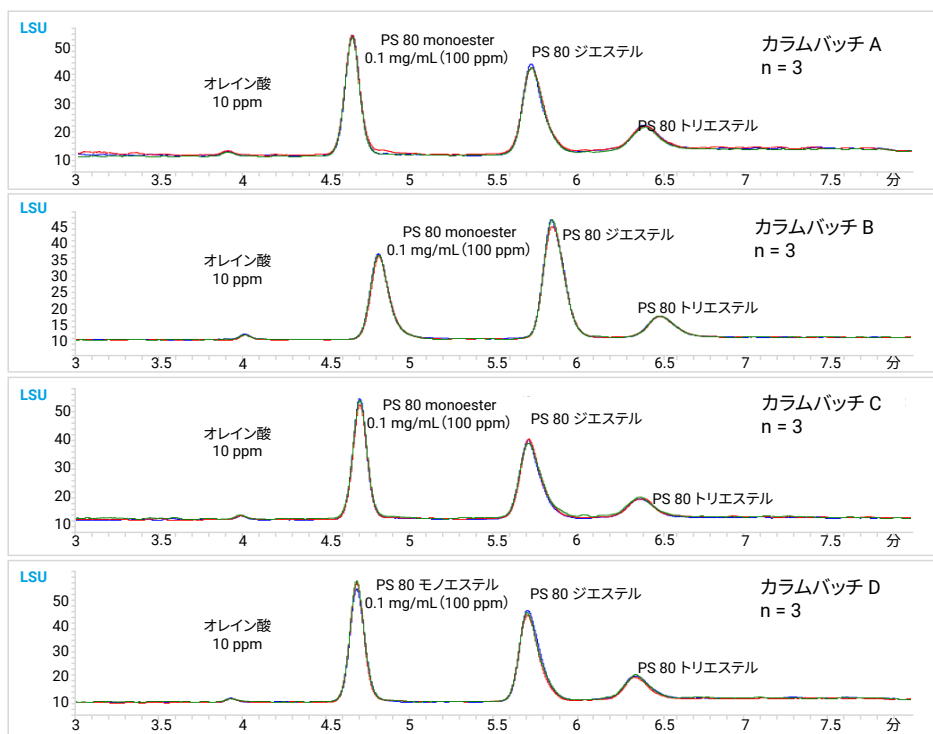


図 2. Agilent AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムは、バッチ間での高い再現性を実証しています。高い再現性を実現する重要な要因の 1 つは、移動相を一貫した方法で前処理することです。⁶

バッチ間リテンションタイム (n = 12)		
分析対象物	平均	%RSD
オレイン酸	3.97	1.1
PS 80 モノエステル	4.72	1.3

バッチ間ピーク面積 (n = 12)		
分析対象物	平均	%RSD
オレイン酸	7.27	7.9
PS 80 モノエステル	263.1	12.4

バッチ間分離能 (n = 12) (オレイン酸および PS 80 モノエステル)		
分析対象物	平均	%RSD
オレイン酸塩-PS 80	4.97	3.1

はじめに

AdvanceBio 界面活性剤プロファイリングカラムは、界面活性剤とその分解生成物を、高分離能かつハイスループットのメソッドで特性解析するために独自に設計されています。

最適なカラム寸法の選択

- 長さ 50 mm カラムは、ポリソルベート加水分解のスクリーニングに最適です。このメソッドは、10 分の分析で遊離脂肪酸とポリソルベートモノエステルのピークを高分離能分離するように設計されています。
- 長さ 50 mm カラムには、内径 2.1 mm と 4.6 mm が用意されています。内径 2.1 mm は感度を向上させる必要がある場合に、内径 4.6 mm は大量注入が必要な場合に最適です。
- 長さ 100 mm と 150 mm カラムは、分離能を向上させる場合に最適です。ポリソルベート酸化分析では、多くのさまざまな分解副生成物により、分解プロファイルがより複雑になるため、これらのカラムが最適です。
- ガードカラムは分析カラムの寿命を延ばしますが、分析カラムの内径と一致させる必要があります。

適切な検出器の選択

- ポリソルベートには発色団がないため、UV 分析はこのアプリケーションには適していません。
- ポリソルベート分析で選択されることが多い検出器は、ELSD 検出器または荷電化粒子検出器 (CAD) です。
- 質量分析計、特に高分離能精密質量分析機器は、タンデム質量分析による構造分析の解明や精密質量測定に適していますが、特により複雑な酸化分析の場合に有用です。

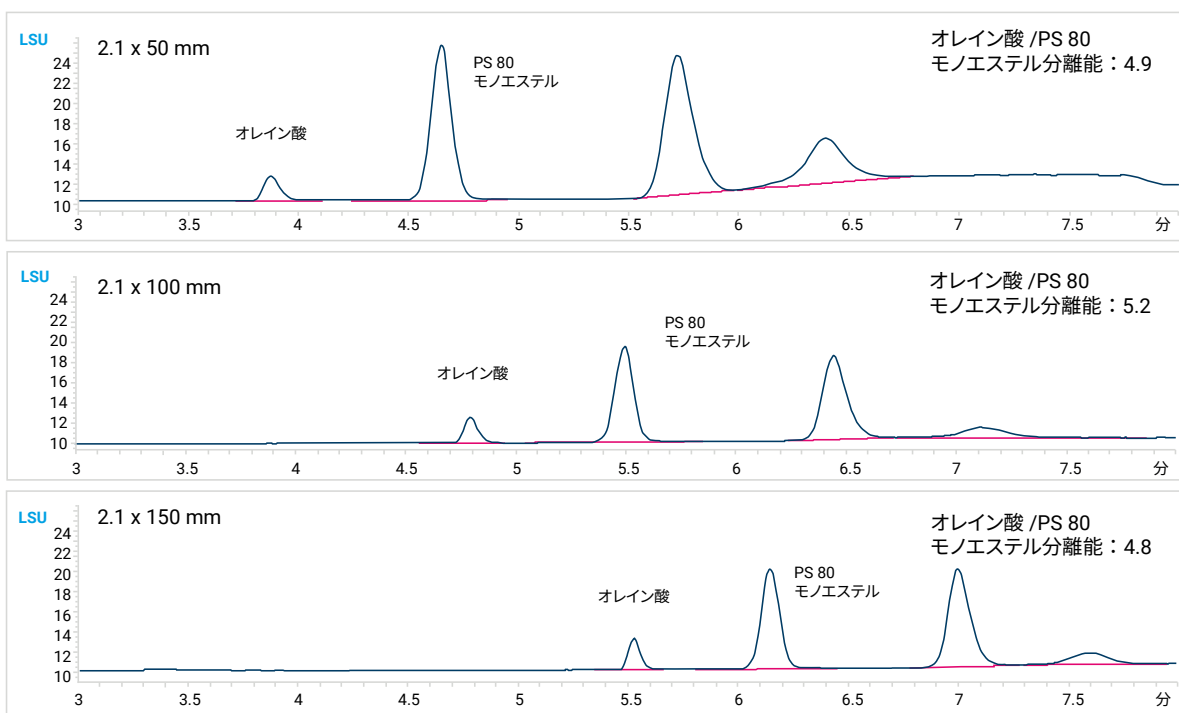


図 3. カラムが長いほど分離能は向上しますが、遊離脂肪酸とポリソルベートモノエステルのピークを分離するには、2.1 x 50 mm カラムで十分です。100 mm カラムを使用すると分離能はわずかに向上しますが、その差はそれほど大きくありません。⁸

カラム、標準試料、消耗品などの情報

リスト 1：AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング HPLC カラム

製品	部品番号
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、2.1 x 50 mm	865750-907
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、2.1 x 100 mm	861775-907
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、2.1 x 150 mm	863750-907
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、2.1 mm Fast Guard (3 個)	821126-927
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、4.6 x 50 mm	865973-907
AdvanceBio 界面活性剤プロファイリング、4.6 mm Fast Guard (3 個)	820951-927

リスト 2：タンパク質/ペプチド標準試料

製品	部品番号
Agilent NIST mAb、25 µL	5191-5744
Agilent NIST mAb、4 x 25 µL	5191-5745

リスト 3：消耗品と溶媒

製品	部品番号
接続部品とチューブ	
InfinityLab クイックコネクタ LC フィッティング	5067-5965
クイックコネクタキャピラリー、ステンレス、0.12 x 105 mm	5500-1173
InfinityLab クイックコネクタフィッティングアセンブリ、固定済み 0.12 x 105 mm キャピラリー付き (カラム注入口接続用)	5067-5957
InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口接続用)	5067-5966
クイックターンキャピラリー、SST、0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用)	5500-1191
クイックターンフィッティングの取り付けツール	5043-0915
Agilent 1290 Infinity II 用超低拡散チューブキット	5067-5963

製品	部品番号
フィルタ	
InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタアセンブリ、UHPLC 用 (内径 2.1 mm、ポアサイズ 0.2 µm のフィルタディスク 5 個を含む)、90 mm フレキシブルキャピラリー付き	5067-1603
InfinityLab クイックチェンジフィルタディスク、内径 2.1 mm、ポアサイズ 0.2 µm、5 個、InfinityLab クイックチェンジインラインフィルタ用	5067-1610
サンプル容器	
高回収率バイアル、スクリュートップ、固定インサート付き、透明、インサート容量 300 µL、100 個。バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5188-6591
キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセブタム、100 個。キャップサイズ：12 mm	5182-0717
バイアル、スクリュートップ、ポリプロピレン、認定、250 µL、1,000 個。バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5190-2243
キャップ、スクリュー、青、認定、PTFE/白シリコンセブタム、500 個。キャップサイズ：12 mm	5185-5863
InfinityLab 96 ウェルプレート、0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab 96 ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389
溶媒	
LC/MS 用 InfinityLab 水、1 x 1 L	5191-5121-001
LC/MS 用 InfinityLab メタノール、1 x 1 L	5191-5111-001
溶媒処理	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティパーズボトル	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab チャコールフィルタ、58 g	5043-1193
セーフティスターターキットとパーズボトル、InfinityLab セーフティパーズボトル (部品番号 5043-1339) とセーフティキャップスターターキット (部品番号 5043-1222) を含む	5043-1340
質量分析	
LC/MS 標準溶液、ESI-TOF、100 mL	G1969-85000
API-TOF リファレンス質量溶液キット	G1969-85001
リントフリー布、23 x 23 cm、綿 100 %、15 個	05980-60051
布ヤスリ、8000 グリット (2 µm)	8660-0852

参考文献

1. Host Cell Protein Contaminants in mAb and Protein Therapy Manufacturing. <https://www.usp.org/biologics/host-cell-proteins>.
2. Aryal, B.; Lehtimäki, M.; Rao, V. A. Stress Mediated Polysorbate 20 Degradation and Its Potential Impact on Therapeutic Proteins. *Pharm. Res.* **2024**, 41, 1217-1232. DOI: 10.1007/s11095-024-03700-7.
3. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency. Information for the Package Leaflet Regarding Polysorbates Used as Excipients in Medicinal Products for Human Use, EMA/CHMP/190743/2016, Last Revised December 2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/information-package-leaflet-regarding-polysorbates-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf.
4. Wuchner, K.; Yi, L.; Chery, C.; Nikels, F.; Junge, F.; Crotts, G.; Rinaldi, G.; Starkey, J.; Bechtold-Peters, K.; Shuman, M.; et al. Industry Perspective on the Use and Characterization of Polysorbates for Biopharmaceutical Products Part 1: Survey Report on Current State and Common Practices for Handling and Control of Polysorbates. *J. Pharma. Sci.* **2022**, 111, 1280-1291. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.02.009.
5. Wuchner, K.; Yi, L.; Chery, C.; Nikels, F.; Junge, F.; Crotts, G.; Rinaldi, G.; Starkey, J.; Bechtold-Peters, K.; Shuman, M.; et al. Industry Perspective on the Use and Characterization of Polysorbates for Biopharmaceutical Products Part 2: Survey Report on Control Strategy Preparing for the Future. *J. Pharma. Sci.* **2022**, 111, 2955-2967. DOI: 10.1016/j.xphs.2022.08.021.
6. He, C.; Hale, W.A.; Coffey, A.; Tripodi, A.P.; McQuay, A. Shining Light on Polysorbate Hydrolysis by LC/ELSD Featuring the AdvanceBio Surfactant Profiling HPLC Column; Agilent Technologies application note, publication number 5994-8123EN, **2025**.
7. Agilent InfinityLab LC Series Evaporative Light Scattering Detectors; Agilent Technologies user manual, publication number D0013647 Rev. B, **2022**.
8. In-Depth Characterization of Surfactant and Surfactant Degradation in Biotherapeutic Applications: Agilent AdvanceBio Surfactant Profiling HPLC columns; Agilent Technologies brochure, publication number 5994-8065EN, **2025**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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おりません。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-004903

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, March 06, 2025

5994-8101JAJP