

SEC-HPLC から SEC-UHPLC への移行は、これで決まり！

USP<129>に基づいたモノクローナル抗体分析の SEC-UHPLC への移行



USP<129> Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies¹ の改定が、USP<621> Chromatography ガイドライン²に続き検討されています。今回、抗体医薬品のクロマトグラフィー等による試験法を規定した USP General Chapter のなかで、たんぱく質のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)用の L59 に該当する HPLC カラムに、超高速・高性能クロマトグラフィー(UHPLC)カラムが追加されています。今回の UHPLC カラムの追加では、システム適合性については USP<621>に準拠するとされています。USP<621>の改訂内容は、既にテクニカルノート TSKgel No.31³で紹介しています。

●SEC-HPLC から SEC-UHPLC への移行

今回の USP<129>の改定案は、USP Pharmacopeia Forum (PF) 49(3)に記載されており、USP-NF 2024, Issue 3 として 2024 年 12 月 1 日に正式発行が予定されています。これによると従来の L59 のカラムサイズ(30 cm)に UHPLC 用の 30 cm カラム(TSKgel UP-SW3000 など)が追加記載されています。

PF	LGS#	Column Brand	Type of Test	Comments
49(3)	<u>L59</u>	TSKgel UP SW3000 (UP-SW3000-LS)*	Assay	Determination of HMWS, main peak (monomer), and LMWS. 4.6 mm x 30 cm, 2 μm.
49(3)	<u>L59</u>	TSKgel G3000SWxL	Assay	Determination of HMWS, main peak (monomer), and LMWS. 7.8 mm x 30 cm, 5 μm.

PF; Pharmacopeia Forum

*TSKgel UP-SW3000-LSはTSKgel UP-SW3000の改良製品

ここでは、USP129/L59 および USP<621>に準拠した、UHPLC の 30 cm カラムおよび 15 cm カラムについて分離条件例を記載します。モノクローナル抗体の分析における HPLC から UHPLC への移行の実施例は、テクニカルノート TSKgel No.31 を参照ください。

システム	SEC-HPLC (L59)	SEC-UHPLC (L59準拠)	SEC-UHPLC (USP621準拠)
カラム	TSKgel G3000SWxL	TSKgel UP-SW3000-LS	TSKgel UP-SW3000-LS
	TSKgel G2000SWxL	TSKgel UP-SW2000	TSKgel UP-SW2000
カラムサイズ	7.8 mm I.D. x 30 cm	4.6 mm I.D. x 30 cm	4.6 mm I.D. x 15 cm
充填剤粒子径	5 μm	2 μm	2 μm
溶離液 (例)	0.02 mol/L リン酸カリウムバッファー(pH 6.2), 0.25 mol/L KCl		
流速	0.5 mL/min	0.3 mL/min	0.2 - 0.5 mL/min
検出	UV (280 nm)	UV (280 nm)	UV (280 nm)
試料 (抗体)	10 mg/mL USP Monoclonal IgG System Suitability RS (標準試料例)		
試料注入量	20 μL	10 μL	5 μL
温度	室温	室温	室温

USP(L59)該当カラムとしては TSKgel G3000SWxL (5 μm, HPLC)⁴ から TSKgel UP-SW3000-LS (2 μm, UHPLC)⁵ への移行が代表的ですが、その他の L59 に該当するカラムとして、断片抗体の分離に優れる TSKgel G2000SWxL から TSKgel UP-SW2000⁶ への移行や、凝集体の分離に優れる TSKgel G4000SWxL (8 μm)から TSKgel UP-SW Aggregate⁷ (3 μm)への移行も同様な分離条件の変更が可能です。

●SEC-HPLC (60cm カラム; 30 cm x 2)から SEC-UHPLC (30 cm カラム)への移行

高分離能を目的とした SEC-HPLC カラムを 2 本接続した分析系から TSKgel UP-SW3000-LS の 30 cm カラムへの移行例については USP<621>を参考にした条件変更が可能です。モノクローナル抗体の分析において USP<621>の指針に適合した分析条件では TSKgel G3000SW_{XL} の 30 cm カラムから TSKgel UP-SW3000-LS の 15 cm カラムへ移行することで、分離能は同等以上を維持したまま分析時間が約 50 %に短縮され、溶離液も約 80 %削減でき³、SEC-HPLC 60 cm カラム(30 cm x 2)から SEC-UHPLC 30 cm カラムへの移行で同様な削減効果が期待できます。

モノクローナル抗体の分離例は、既報のテクニカルノート TSKgel No.31 やその他テクニカルノートのバックナンバー⁸⁻¹²を参照ください。

システム	SEC-HPLC (L59)	SEC-UHPLC (USP621準拠)
カラム*	TSKgel G3000SW _{XL}	TSKgel UP-SW3000-LS
	TSKgel G2000SW _{XL}	TSKgel UP-SW2000
カラムサイズ	7.8 mm I.D. x 30 cm x 2 (60 cm)	4.6 mm I.D. x 30 cm
充填剤粒子径	5 μm	2 μm
溶離液 (例)	0.02 mol/L リン酸カリウムバッファ (pH 6.2), 0.25 mol/L KCl	
流速	1.0 mL/min	0.2 - 0.35 mL/min
検出	UV (280 nm)	UV (280 nm)
試料 (抗体)	10 mg/mL USP Monoclonal IgG System Suitability RS (標準試料例)	
試料注入量	20 μL	5 - 10 μL
温度	室温	室温

*充填剤粒子径は TSKgel G4000SW_{XL}(8 μm)から TSKgel UP-SW Aggregate(3 μm)では異なるが、移行条件は同様

●参考文献、関連資料

1. USP<129>, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>
2. USP<621>, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf>
3. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 31、HPLC-SEC から UHPLC-SEC への更新は、これで決まり！
4. 東ソー、セパレーションレポート No. 46、TSKgel SW_{XL} シリーズについて
5. 東ソー、セパレーションレポート No.116、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000-LS について
6. 東ソー、セパレーションレポート No.124、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW2000 について
7. 東ソー、セパレーションレポート No.122、高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW Aggregate について
8. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 1、SEC カラムを性能アップしよう！！
9. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 3、抗体の SEC 分析は、これで決まり！
10. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 9、USP 該当 HPLC カラムはこれで決まり！
11. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 13、超高速・高分離 SEC 分析はこれで決まり！
12. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 24、生体高分子の UHPLC-SEC 分析はこれで決まり！

※東ソー技術資料は、弊社ホームページの「関連資料」から閲覧、ダウンロードが可能です。<https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litip>



TOSOH

※ “TSKgel”は東ソー株式会社の登録商標です

※ 掲載のデータ等は、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) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2
 大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 バイオサイエンス ☎(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
 バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
 お問い合わせE-mail ●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp
 ●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp
 ●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp