

Take A Deep Breath

And let us take you to a
new state of biologics Zen

バイオロジクスの
新たな次元となる
Zen を体験してください。

 **bioZen**TM
the bio series



Novel
Particles

+

8

Chemistries

+



Biocompatible
Hardware

+



Technical
Gurus

ペプチドマッピング

凝集体分析

チャージバリエーション分析 (IEX)

ペプチド定量

インタクトおよびフラグメント分析

NEW インタクトマス

薬物抗体比

磁気ビーズによる免疫捕獲



GIL Sciences

ギールサイエンス株式会社

 **phenomenex**[®]
...breaking with traditionSM

www.phenomenex.com/bioZen

装置の音に集中しましょう。
オートサンプラーがカチッと鳴ります。
すると、目の前のクロマトグラムに
次のピークが現れます。



私たちは忙しくしていました。

なぜなら、様々な専門家のチームを編成して、
何かを新しく開発したからです。

それは、バイオ関連の分析に使用できる
様々な種類の革新的な製品ですか？

YES

それは、プライミング効果を抑制する新たなチタン製
ハードウェアを採用した製品ですか？

YES

その製品に、顧客のアプリケーションを反映する
品質管理試験のプログラムを実行していますか？

YES

困った時にサポートしてくれるバイオ専門のスタッフがいますか？

YES

これからも世界中のお客様のバイオセパレーション
ニーズに応えるように約束しますか？

YES

これだけではありません。ようこそ、bioZen の世界へ。





活力と集中のための革新 4-8

BioTi™: 生体適合性カラムハードウェア	4-5
3つの革新的な充填剤プラットフォーム	6
8つの固定相、そして種類は今後も増える	7
ザ・チーム: バイオ専門スタッフの紹介	8

あなたの生物学的製剤分析の原動力となる 9-19

ペプチドマッピング	9
凝集体分析	10-11
チャージバリエーション分析	12-13
ペプチド定量	14
インタクトおよびフラグメント分析	15
インタクトマス	16
薬物抗体比 (DAR)	17
バイオ品質管理試験	18



バイオセパレーションの成功につながる安定な道 20-21

bioZen™ カラムの簡単な選び方

あなたの可能性を広げるエキスパートたち 22-27

サイズ排除 (SEC) に適する塩濃度のバッファー	22
DIY: モノクローナル抗体 (mAb) の脱グリコシル化	23
インタクトマス分析を行う前の脱グリコシル化の重要性	23
サイズ排除 (SEC) と逆相カラムの負荷量	24
有機溶媒とサイズ排除	25
タンパク質分析をした後のカラム洗浄法	25
bioZen を試してみよう	26-27



生体適合性 カラムハードウェア

Phenomenex が開発した新しいチタン搭載ハードウェアとフリットは、生体適合性であるため、タンパク質やペプチドの完全性に影響を与えません。カラムのプライミングの必要性を最小限に抑えましたので、安心してご使用いただけます。



- チャージバリエーション分析
- ペプチドマッピング
- **凝集体分析**
- ペプチド定量
- 薬物抗体比
- インタクトマス
- インタクトおよびフラグメント分析



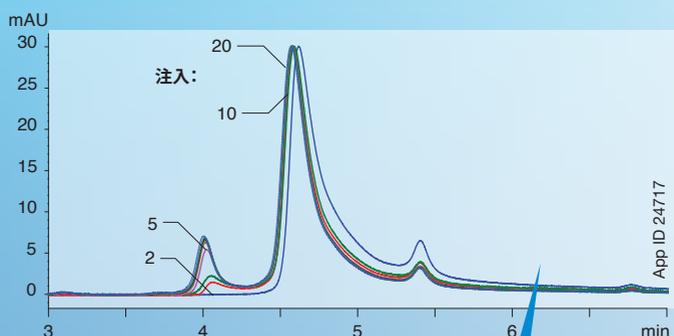
生体適合性カートリッジ式ガードシステムでカラムの寿命を延ばそう

生体適合性のある新しい SecurityGuard™ Standard と SecurityGuard ULTRA は、容易に使用できるカートリッジ式ガードカラムであり、カラムや装置の性能に悪影響を及ぼす夾雑物を取り除きます。それぞれの bioZen™ カラムには、分析の用途に対応するマッチしたガードカートリッジが別売りでご用意されています。詳しくは、28ページをご覧ください。

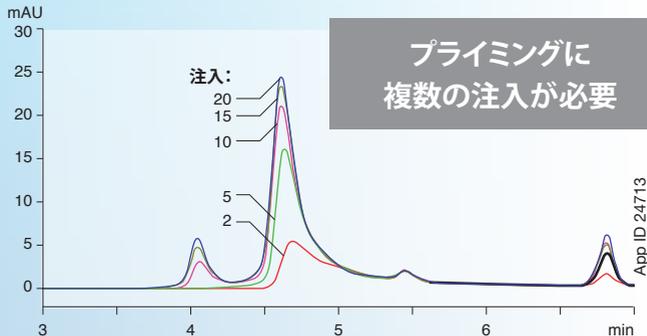
bioZen™ チタン製 BioTi™ HPLC/UHPLC ハードウェアは、タンパク質などとの望ましくない二次的相互作用、キャリアオーバー、および低い回収率などの問題を抑制するように設計されています。

重ね合わせた連続注入 – タンパク質プライミングの比較

bioZen チタン製 BioTi ハードウェア



従来のステンレス鋼ハードウェア



私たちは、皆様がカラムのプライミングに尽くす時間を短縮できるように、生体適合性のある新しいチタン製 BioTi ハードウェアを開発しました。

— Jason Anspach, Ph.D.
Senior Scientist

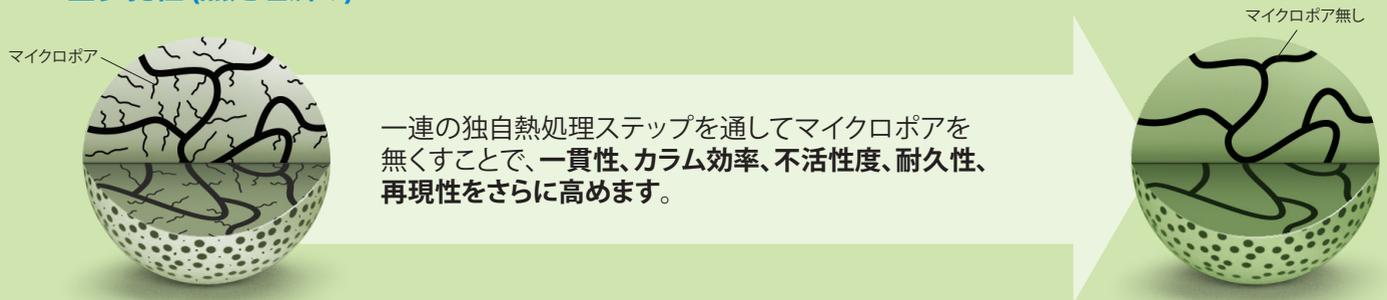
Conditions for both columns:

- Column:** bioZen 1.8 μm SEC-3
- Dimension:** 150 x 4.6 mm
- Mobile Phase:** 50 mM Dipotassium Phosphate + 100 mM Sodium Sulfate, pH 5.0
- Flow Rate:** 0.3 mL/min
- Temperature:** Ambient
- Detection:** UV @ 280 nm
- Sample:** 1. γ-Globulin, 5 mg/mL
2. Ovalbumin, 1 mg/mL

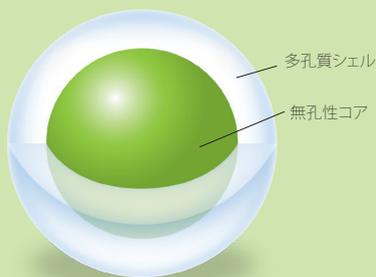
3種類の最先端充填剤プラットフォーム

3つの新しい bioZen™ 充填剤プラットフォームはすべて、タンパク質の特性評価アプリケーションにおいて欠かせないレベルの性能、耐久性、再現性を活かせるように、Phenomenex が独自で設計かつ製造しました。各プラットフォームは、粒子径と形態を制御するために異なる独自処理技術が用いられます。

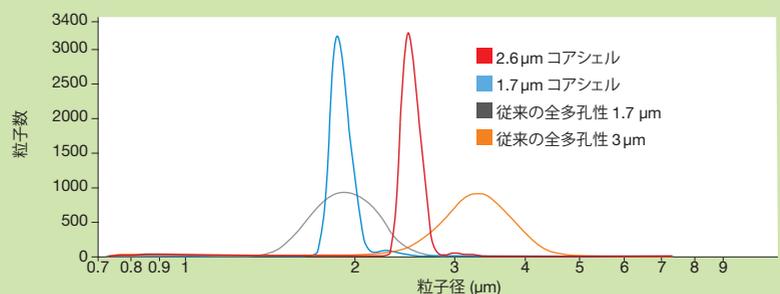
全多孔性 (熱処理済み)



コアシェルテクノロジー

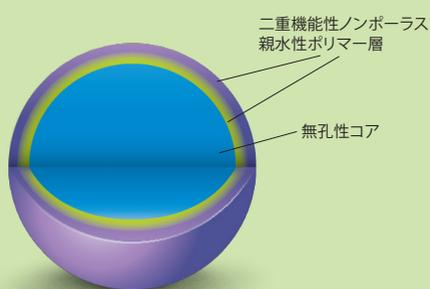


均一な粒径分布

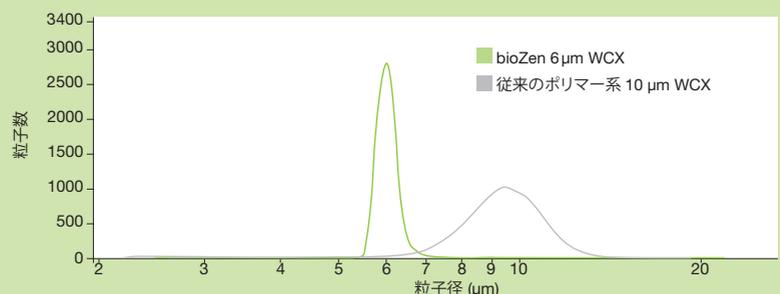


ナノ構造技術を組み入れたゾルゲル処理方法を用いて、球形の個体シリカコアの周りに耐久性のある均質な多孔質シェルが合成されます。この高度に最適化されたプロセスは、業界トップクラスのカラム充填技術と組み合わせることによって、極めて高い効率と感度を実現する、再現性の高いカラムを作り上げます。

均一粒径 ポリマー系 ノンポーラス



均一な粒径分布



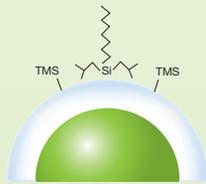
慎重に制御されるモノサイズ粒子技術は、極めて高い均一性の充填剤を確保し、高い性能と信頼性を提供します。この革新的な無孔性粒子は、複雑なイオン交換相のバックボーン (担体) として優れています。

7種類の bioZen 固定相

bioZen™ は、主要なバイオ医薬品のワークフローにまたがる単一の革新的な製品ラインです。バイオ医薬品のために設計した高性能かつ高品質の充填剤と固定相をぜひご体験ください。

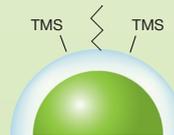


インタクト用



bioZen Intact XB-C8
3.6 μm

C8の固定相が程よい疎水性相互作用と選択性を提供します。



bioZen WidePore C4
2.6 μm

インタクトタンパク質の素早い浸透に有効な大きい細孔径のコアシェル充填剤。C4の固定相が低い疎水性保持力を提供するため、特に強く保持されやすい生物製剤に対して有効です。

サイズ排除 (SEC) 用



bioZen SEC-2
1.8 μm

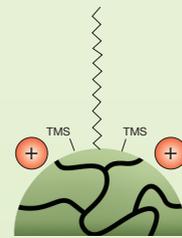
極めて高い不活性度と理論段数を有する高密度の全多孔性充填剤。1 k~450 kDaの低分子量範囲に最適です。



bioZen SEC-3
1.8 μm

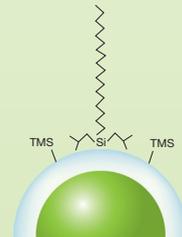
極めて高い不活性度と理論段数を有する高密度の全多孔性充填剤。10 k~700 kDaの高分子量範囲に最適です。

ペプチド用



bioZen Peptide PS-C18
1.6 μm & 3 μm

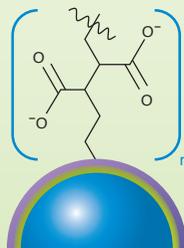
C18に加えて、ポジティブチャージをもつ官能基が充填剤表面に修飾されており、良好な保持を提供します。



bioZen Peptide XB-C18
1.7 μm & 2.6 μm

ジイソブチル基の側鎖を導入した C18であり、酸性と塩基性のペプチドを全体的に保持します。

イオン交換



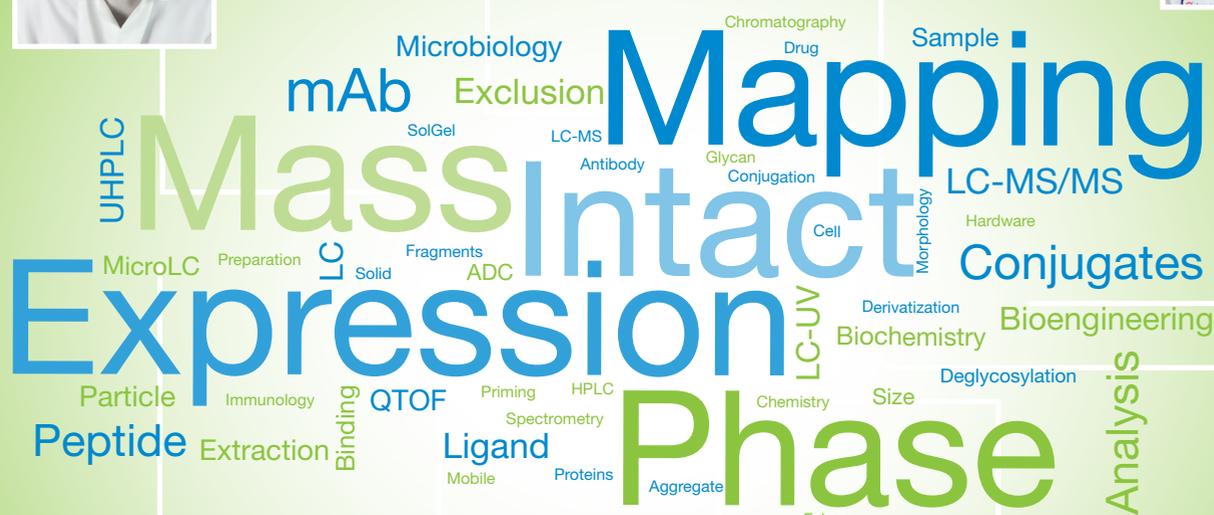
bioZen WCX
6 μm

タンパク質を包み込み、酸性および塩基性の変異体 (バリエント) によって分離する、線状ポリカルボキシレート鎖を結合したモノサイズ粒子です。

バイオ専門 チームの紹介



我々の専門テクニカルサポートチームには、タンパク質化学、コンジュゲーション、サンプル前処理、分析、そして検出のすべてにおいて、驚くほどの経験豊富なスタッフがいます。お困りがございましたら、お気軽にお問い合わせください。

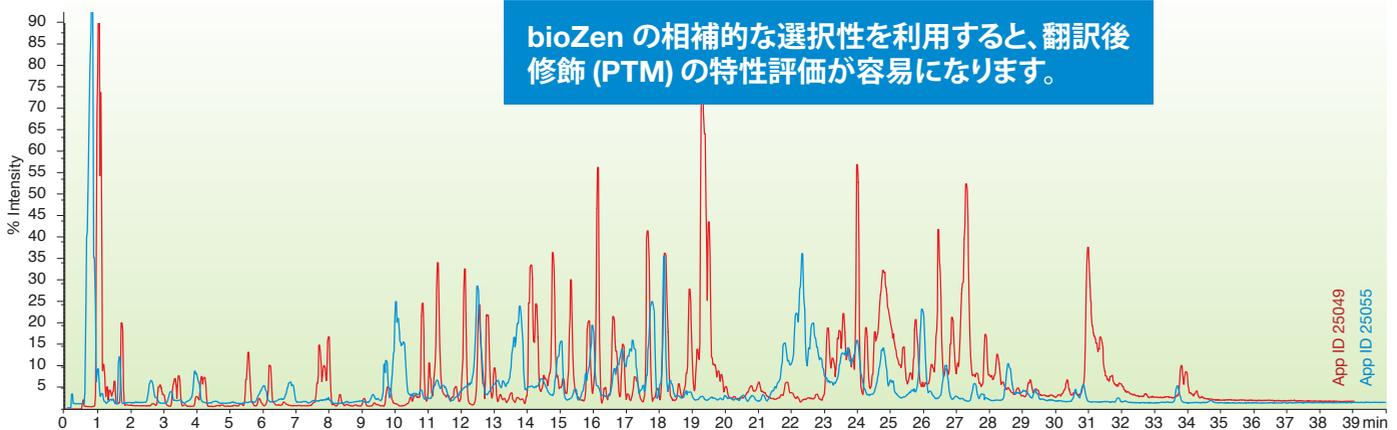


ペプチドマッピング

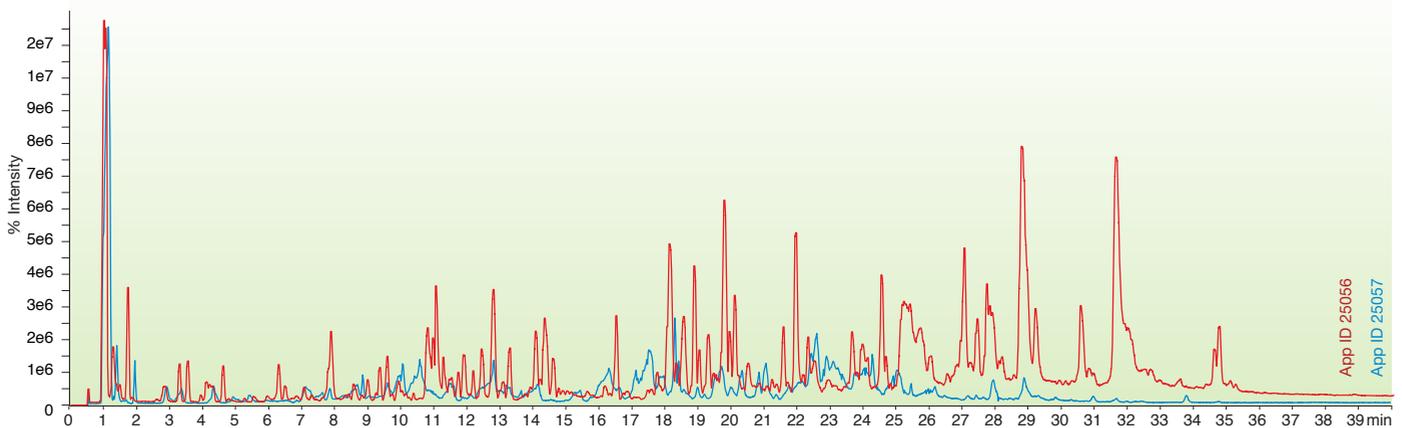
消化されたモノクローナル抗体 (mAb) や抗体薬物複合体 (ADC) には、翻訳後修飾 (PTM) を理解するのに極めて重要な化合物が数多く含まれています。そのため、私たちは非常に有用かつユニークな選択性を提供できる 2 種類の bioZen™ Peptide カラムを開発しました。高い性能を誇るコアシェル型充填剤もしくは熱処理済みの全多孔性充填剤を活用することによって、ピーク形状、ピークキャパシティ、そして感度を全体的に向上させることができるので、分析の高速化が有効的に実現できます。

トラスツズマブのバイオシミラーのペプチドマップ

bioZen の相補的な選択性を利用すると、翻訳後修飾 (PTM) の特性評価が容易になります。



インフリキシマブのバイオシミラーのペプチドマップ



Conditions for all columns:

Columns: bioZen 1.6 μ m Peptide PS-C18
bioZen 2.6 μ m Peptide XB-C18
Dimension: 150 x 2.1 mm
Part No.: 00F-4770-AN
00F-4768-AN
Mobile Phase: A: 0.1% Formic Acid in Water
B: 0.1% Formic Acid in Acetonitrile

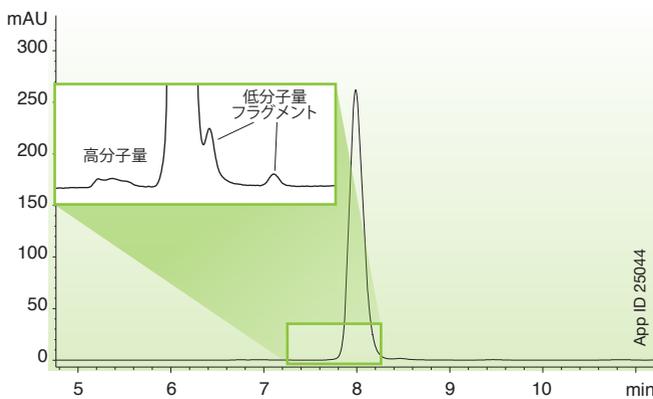
Gradient: Time (min) % B
0 1
0.5 1
50 50
55 50
56 95
Flow Rate: 0.3 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: QTOF (SCIEX® X500B)

凝集体分析

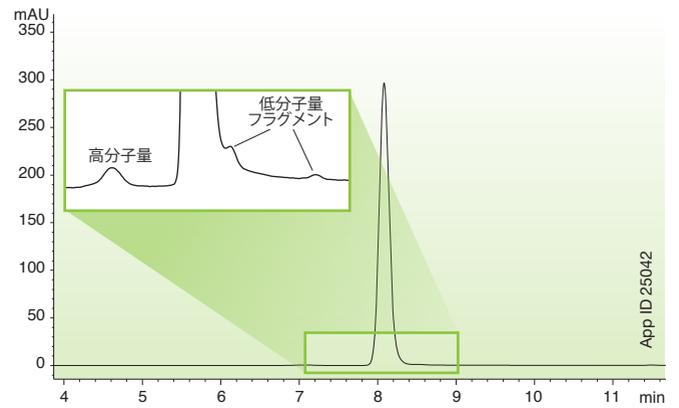
mAb 凝集体の濃度がしばしば極低レベル (単量体と比較してピーク面積が 0.1 % 未満) であり、フラグメントの分離が必要なため、適正な分離度およびピーク形状を得ることがますます重要となっています。このニーズに対処するために、Phenomenex は堅牢な SEC カラムのセットを開発しました。UHPLC レベルの効率と高感度を提供する bioZen™ SEC カラムは、さらに低濃度である 標的の分離と同定を促進します。



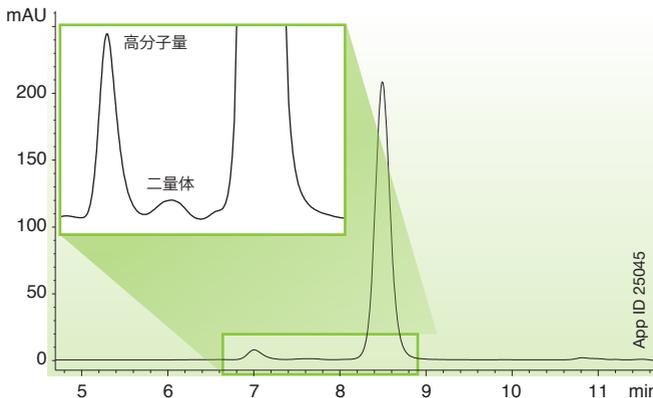
セツキシマブ



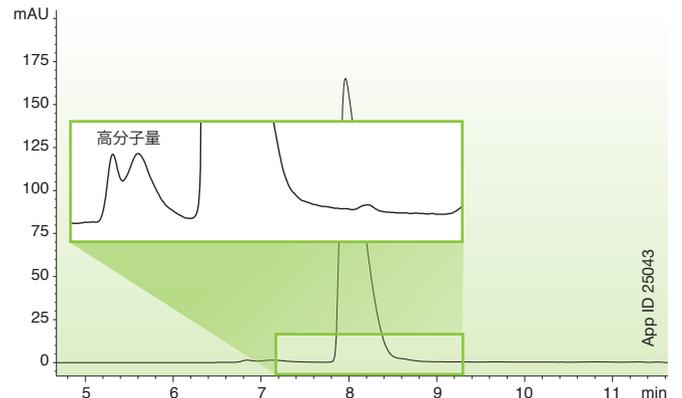
トラスツズマブ



リツキシマブ



インフリキシマブ-abda



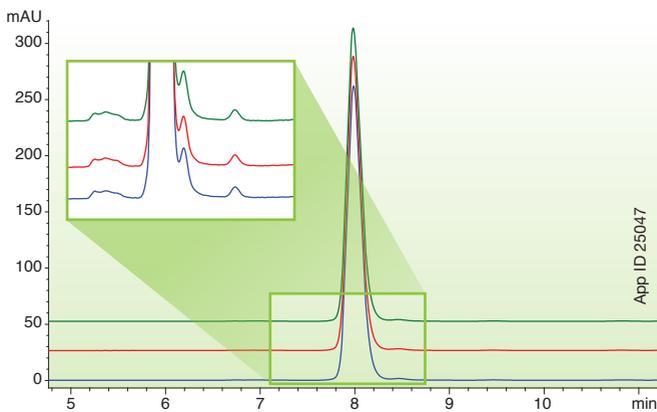
Conditions same for all samples:
 Column: bioZen 1.8 μm SEC-3
 Dimension: 300 x 4.6 mm
 Part No.: 00H-4772-E0
 Mobile Phase: 50 mM Potassium Phosphate +
 250 mM Potassium Chloride (pH 6.8)
 Flow Rate: 0.35 mL/min

Temperature: 30 °C
 Detection: UV @ 280 nm
 Sample: As noted

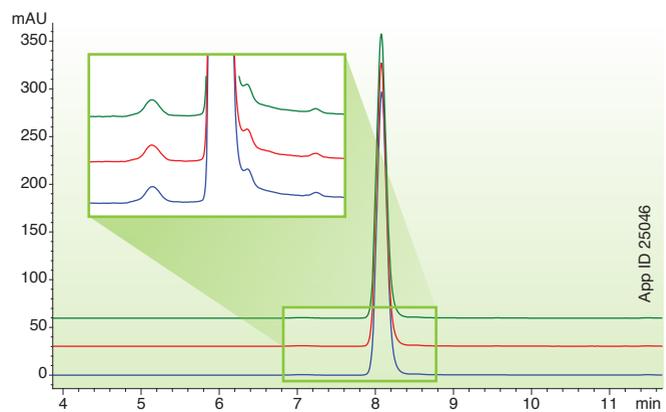
凝集体分析

bioZen™ SEC カラムの高い不活性度と充填剤の均一性が、結果の再現性を大きく向上させます。これを生体適合性の BioTi™ ハードウェアと組み合わせることによって、良好な凝集体回収率を得るようになります。

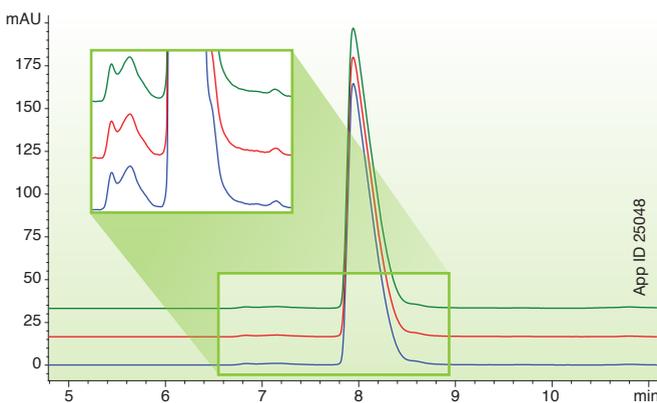
セツキシマブの三重注入



トラスツズマブの三重注入



インフリキシマブ-dyybの三重注入

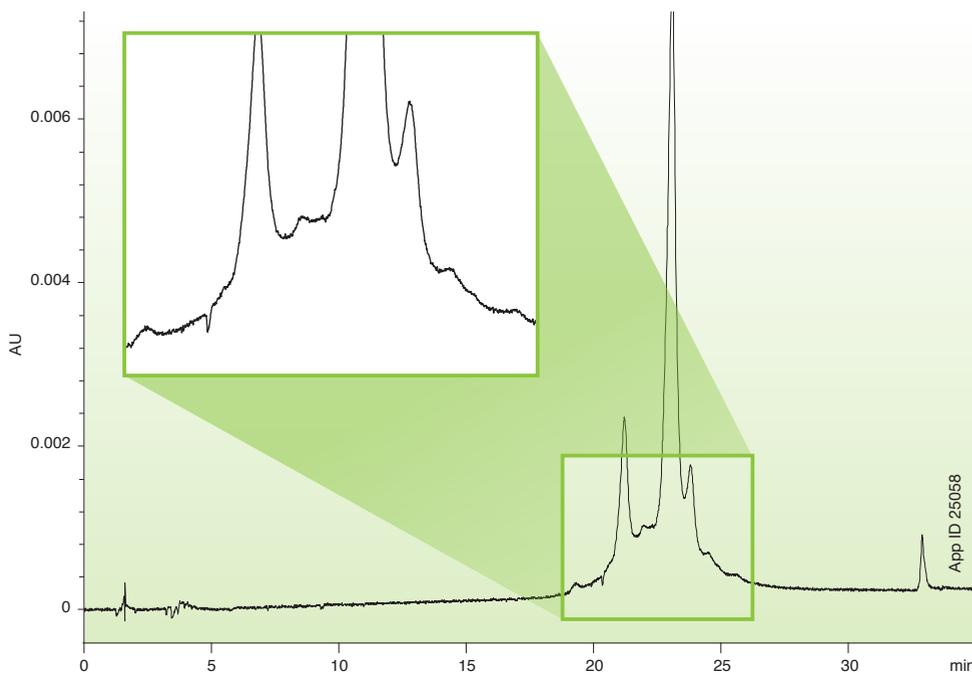


Conditions same for all samples:
Column: bioZen 1.8 μ m SEC-3
Dimension: 300 x 4.6 mm
Part No.: 00H-4772-E0
Mobile Phase: 50 mM Potassium Phosphate +
250 mM Potassium Chloride (pH 6.8)
Flow Rate: 0.35 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: As noted

チャージバリエーション分析

bioZen WCX は、バイオ医薬品の創造と開発における翻訳後修飾 (PTM) から生じる天然タンパク質の変異体を一貫して解析するために作られました。均一粒径の無孔性ポリマー粒子に結合された複数の線状ポリカルボキシレート鎖がタンパク質を包み込み、酸性および塩基性の変異体によって分離します。高度に調整かつ制御されたプロセスにて製造されている bioZen WCX は、不活性度の高い充填材と生体適合性チタン製 BioTi カラムハードウェアにより、優れた回収率を提供し、タンパク質の多様性を再現性よく特徴づけます。

トラスツズマブ (MES 塩グラジエント)

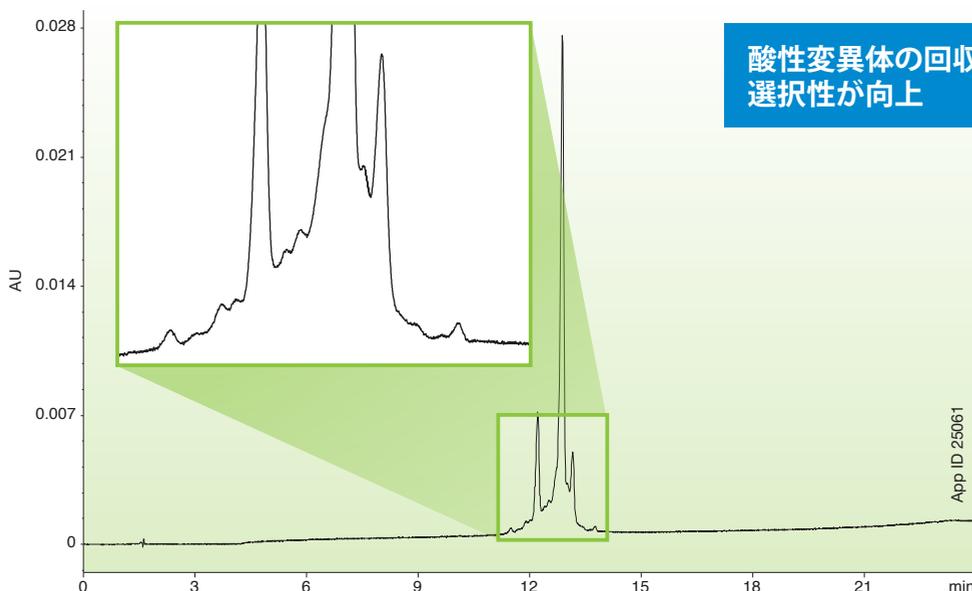


Column: bioZen 6 μ m WCX
Dimension: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4777-E0
Mobile Phase: A: 20 mM MES (pH 5.6)
 B: 20 mM MES + 300 mM NaCl (pH 5.6)
Gradient:

Time (min)	% B
0	15
1	15
31	45
31.1	100
34	100
35	15

Flow Rate: 1 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: Trastuzumab

トラスツズマブ (pH グラジエントバッファー)



酸性変異体の回収率と
選択性が向上

Column: bioZen 6 μ m WCX
Dimension: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4777-E0
Mobile Phase: A: CX -1 (pH 5.6) pH Gradient Buffer*
 B: CX -1 (pH 10.2) pH Gradient Buffer*
Gradient:

Time (min)	% B
0	0
1	0
21	100
23	100
24	0

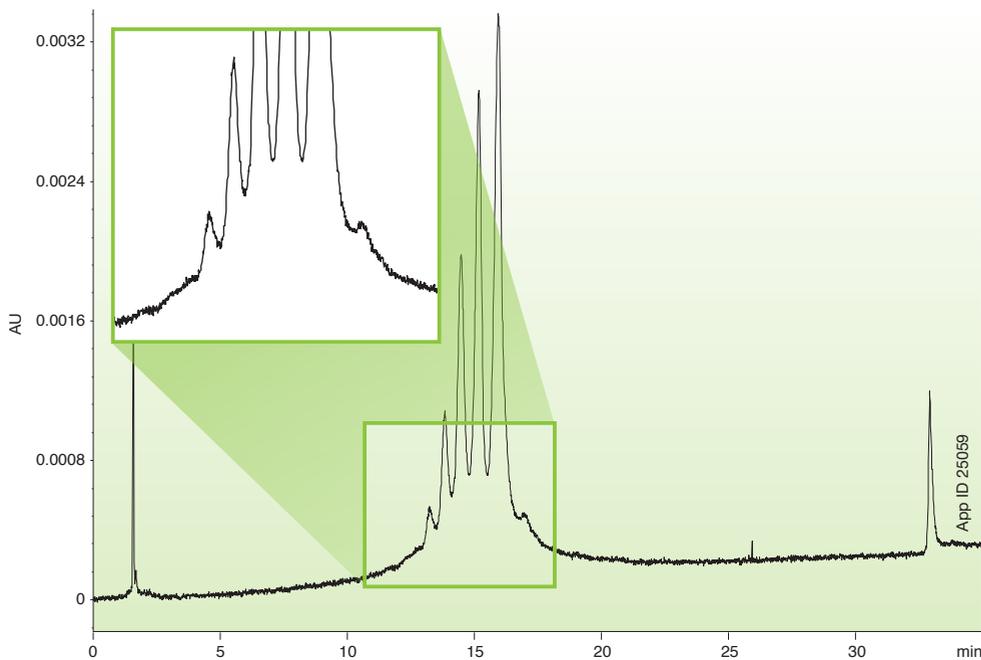
Flow Rate: 1 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: Trastuzumab

* From Thermo Fisher Scientific® Inc.

チャージバリエーション分析

均一粒径の無孔性ポリマー粒子は、ポリカルボン酸塩鎖の完全な媒体として役立つ一方、これらの堅牢な粒子はまた、bioZen™ WCX が通常、厳しい溶媒の pH および塩勾配システムに対しても不変であることを保証します。タンパク質のチャージバリエーション、イノベーター、またはバイオシミラーを分離かつ定量する必要がある場合、この充填剤の耐久性と高い安定性が、一貫性のある選択性と組み合わせることで、pH と塩グラジエントをどちらも利用できるようになります。選択肢があることは有利に働きます。

セツキシマブ (MES 塩グラジエント)

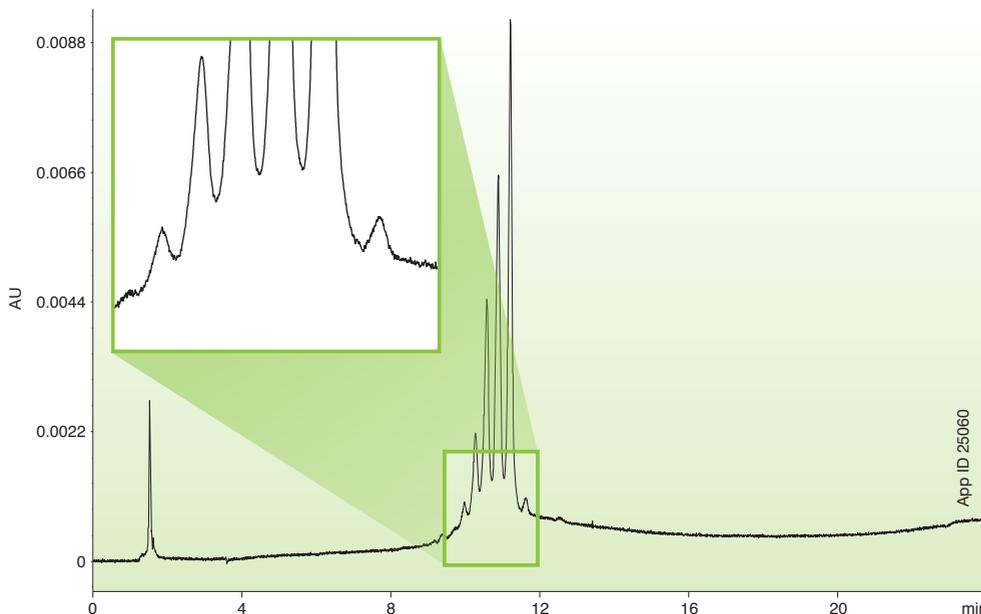


Column: bioZen 6 μ m WCX
Dimension: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4777-E0
Mobile Phase: A: 20 mM MES (pH 5.6)
B: 20 mM MES + 300 mM NaCl (pH 5.6)
Gradient:

Time (min)	% B
0	15
1	15
31	45
31.1	100
34	100
35	15

Flow Rate: 1 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: Cetuximab, biosimilar expressed in HEK
Acknowledgment: Sample graciously gifted by Catherine Bladen, Absolute Antibody

セツキシマブ (pH グラジエントバッファー)



Column: bioZen 6 μ m WCX
Dimension: 250 x 4.6 mm
Part No.: 00G-4777-E0
Mobile Phase: A: CX -1 (pH 5.6) Gradient Buffer*
B: CX -1 (pH 10.2) Gradient Buffer*
Gradient:

Time (min)	% B
0	0
1	0
21	100
23	100
24	0

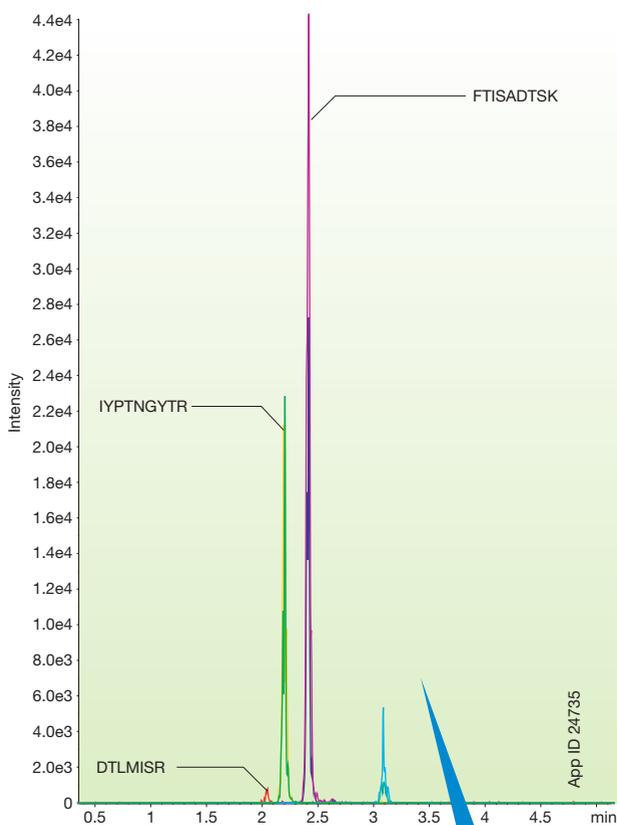
Flow Rate: 1 mL/min
Temperature: 30 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: Cetuximab, biosimilar expressed in HEK
Acknowledgment: Sample graciously gifted by Catherine Bladen, Absolute Antibody
* From Thermo Fisher Scientific Inc.

 absolute
antibody

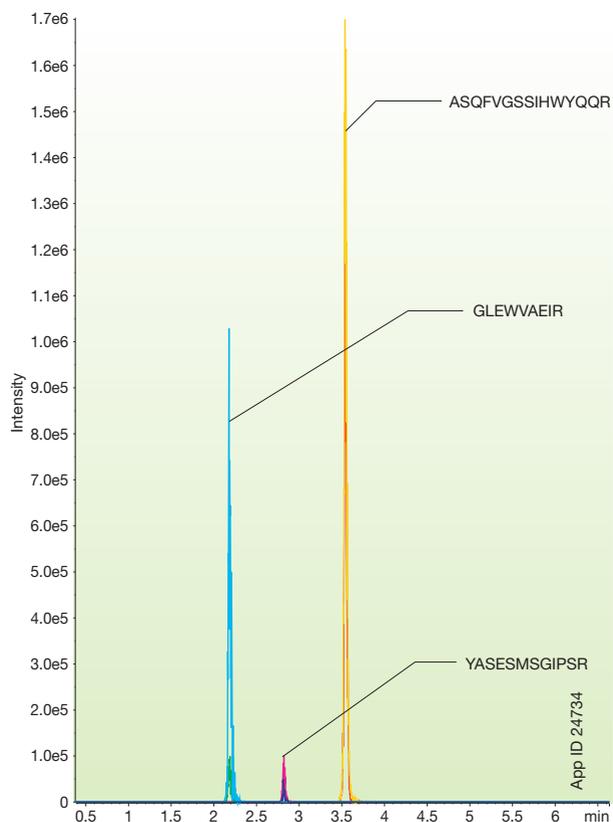
ペプチド定量

生体マトリックスからのシグネチャーペプチドを定量する場合、マトリックス抑制領域からのシグナルロスを防ぐには親水性ペプチドのピーク形状が良好で、保持が十分であることが必要です。両タイプの bioZen™ Peptide カラム (PS-C18 と XB-C18) は、近縁のペプチドにも優れた選択性を提供するように開発されました。さらに、これらには塩基性ペプチドのピーク形状をよりシャープにする特徴がありません。bioZen Peptide XB-C18 の場合は、イソブチル基の側鎖が充填剤表面の二次的相互作用を抑制し、ピークテーリングを最小限にします。bioZen Peptide PS-C18 は、ポジティブチャージをもつ弱塩基性官能基が充填剤表面に修飾されており、塩基性の分析対象物を反発する効果によってピークテーリングを抑えます。

トラスツズマブ エムタンシン (Kadcyla) (4つのシグネチャーペプチド)



インフリキシマブ (3つのシグネチャーペプチド)



bioZen Peptide PS-C18 が提供する
良好なピーク形状と感度

MagBeads



ストレプトアビジンコート
結合能力の高い磁性粒子により、タンパク質とペプチド分子の精製、洗浄、分離が速くなり、信頼性も高まります。

Conditions same for both samples:

Column: bioZen 3µm Peptide PS-C18
Dimensions: 50 x 2.1 mm
Part No.: 00B-4771-AN
Mobile Phase: A: 0.1% Formic Acid in Water
B: 0.1% Formic Acid in Acetonitrile

Gradient: Time (min)	% B
0	3
1	3
4.5	25

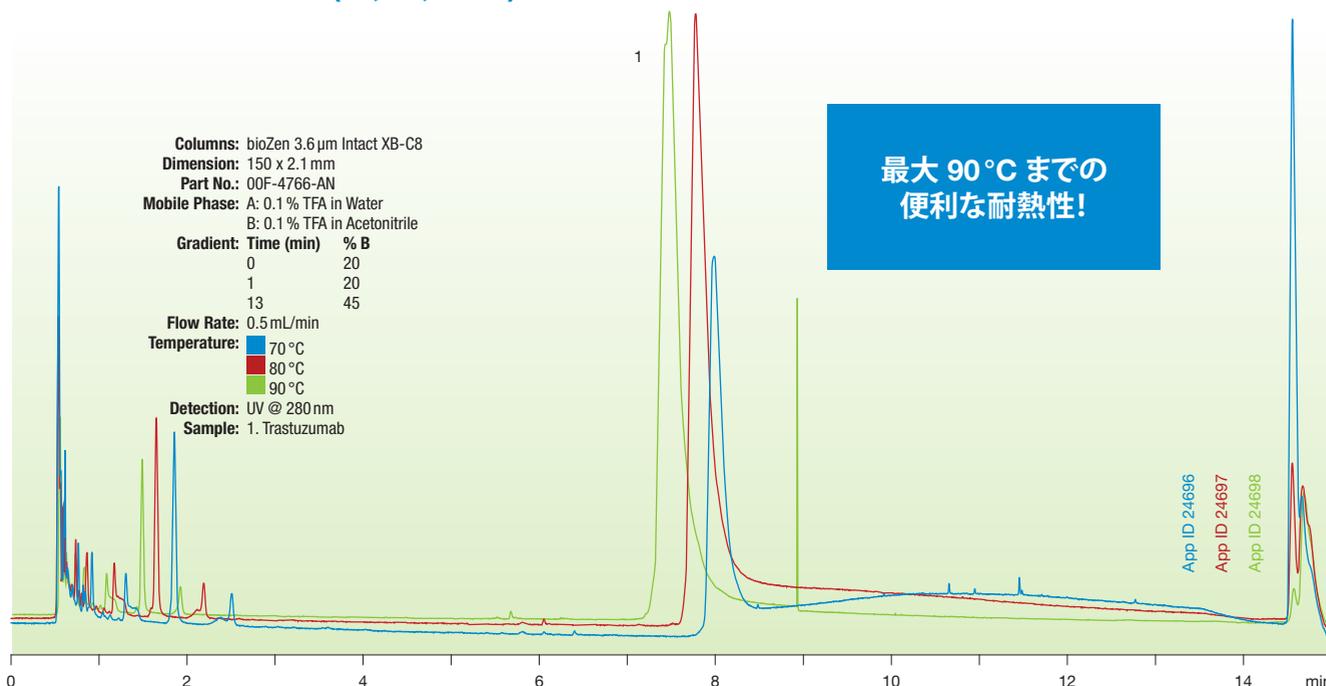
Flow Rate: 0.5 mL/min
Temperature: 22 °C
LC System: ExionLC™ AD HPLC
Detection: MS/MS
Detector: SCIEX® QTRAP® 5500
Sample: As noted

インタクトおよび フラグメント分析

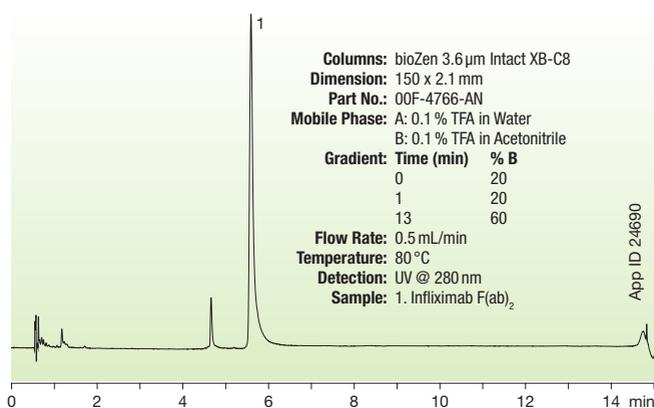
インタクト生物製剤フラグメントの不純物プロファイリングと特性は困難な作業であります。その訳とは、変異体間の非常に小さな差異を特定する必要があるからです。両タイプの bioZen WidePore カラム (XB-C8 と C4) は、精密に製造された大きい細孔径を有するコアシェル粒子で充填されており、標的 **HC/LC、Fc/Fab、またはアイソフォーム間の分離を向上するとともに、ピーク幅の減少と感度の向上を実現します。**



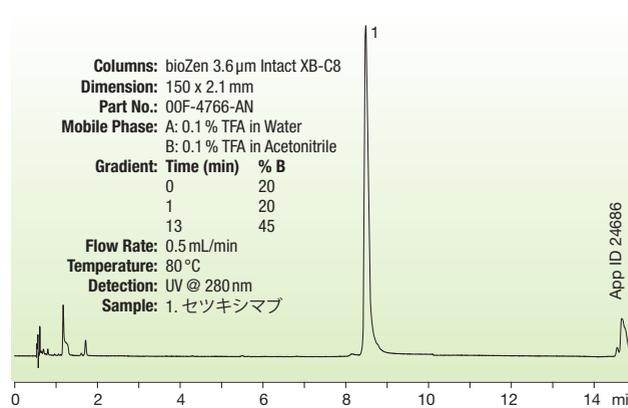
インタクトトラスツマブ (70, 80, 90 °C)



インフリキシマブ F(ab)₂



セツキシマブ

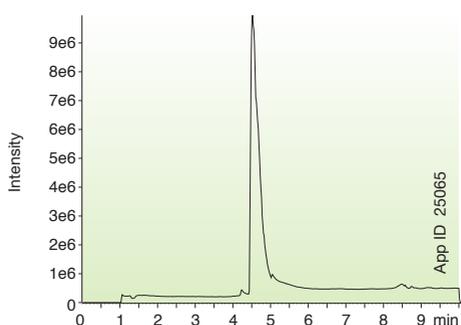


インタクトマス

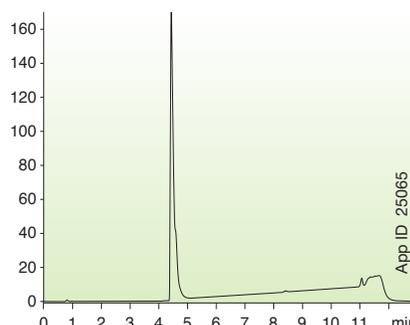
インタクトマス分析は、グリコフォームの相対存在量だけでなく、その安定性を示すこともできます (ESI-MS では、分解された mAb が良好な荷電状態エンベロープをもたらさない)。高分解能 MS を用いたインタクトマス分析で翻訳後修飾 (PTM) を特定する場合は、**超高速分析時間でしっかりとしたピーク形状のデータを提供**する bioZen™ WidePore C4 および Intact XB-C8 カラムが非常に有用です。特にグリコフォームの相対存在量を確認するのに有効です。

bioZen Intact XB-C8と SCIEX® X500B を用いたトラスツズマブのインタクトマス

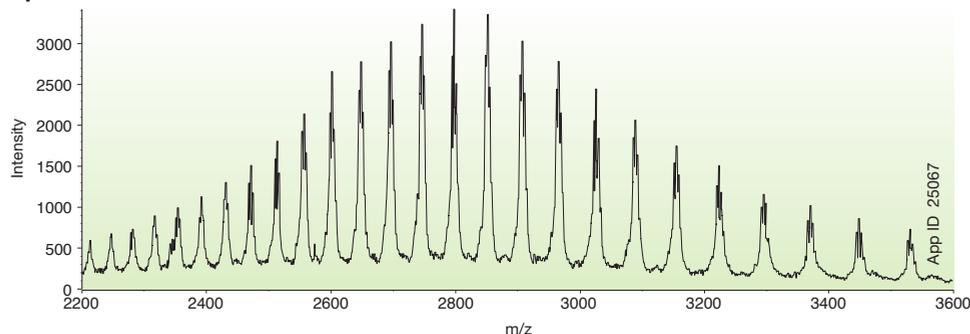
TIC



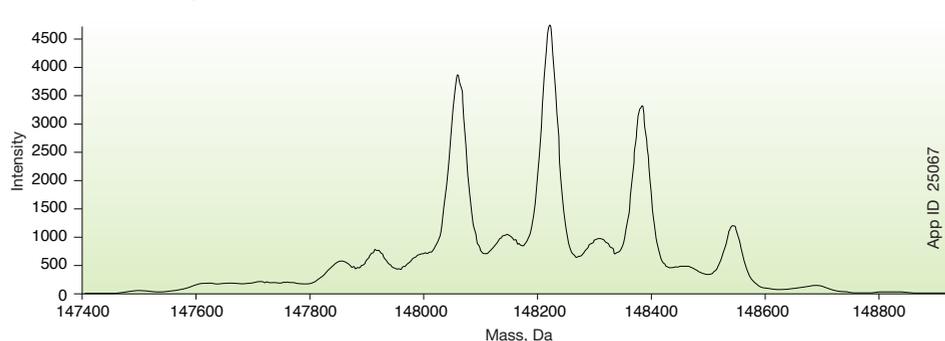
UV



Spectra



Deconvoluted Spectra



Columns: bioZen 3.6 μm Intact XB-C8
 Dimension: 150 x 2.1 mm
 Part No.: 00F-4766-AN
 Mobile Phase: A: 0.1 % Formic Acid in Water
 B: 0.1 % Formic Acid in Acetonitrile / Isopropyl alcohol (50:50)
 Gradient: Time (min) % B
 2.5 20
 10 65
 10.1 95
 Flow Rate: 0.3 mL/min
 Temperature: 90 °C
 Detection: QTOF (SCIEX X500B)
 Sample: Trastuzumab

X500B QTOF システムでバイオ医薬品特性解析ワークフローをシンプルに

X500B は、使いやすいベンチトップ型の QTOF システムであり、ワークフローをシンプルにし、スループットを向上します。頑健な計測器に、パワフルで直観的なソフトウェアを備えることで、従来に比べて、迅速かつ容易に特性解析を実施することが可能になります。

詳しくはこちらへ: sciex.com/X500B

※ SCIEX社は、Phenomenex の姉妹会社です。株式会社島津ジーエルシーと SCIEX社の間に、取引提携関係はありません。

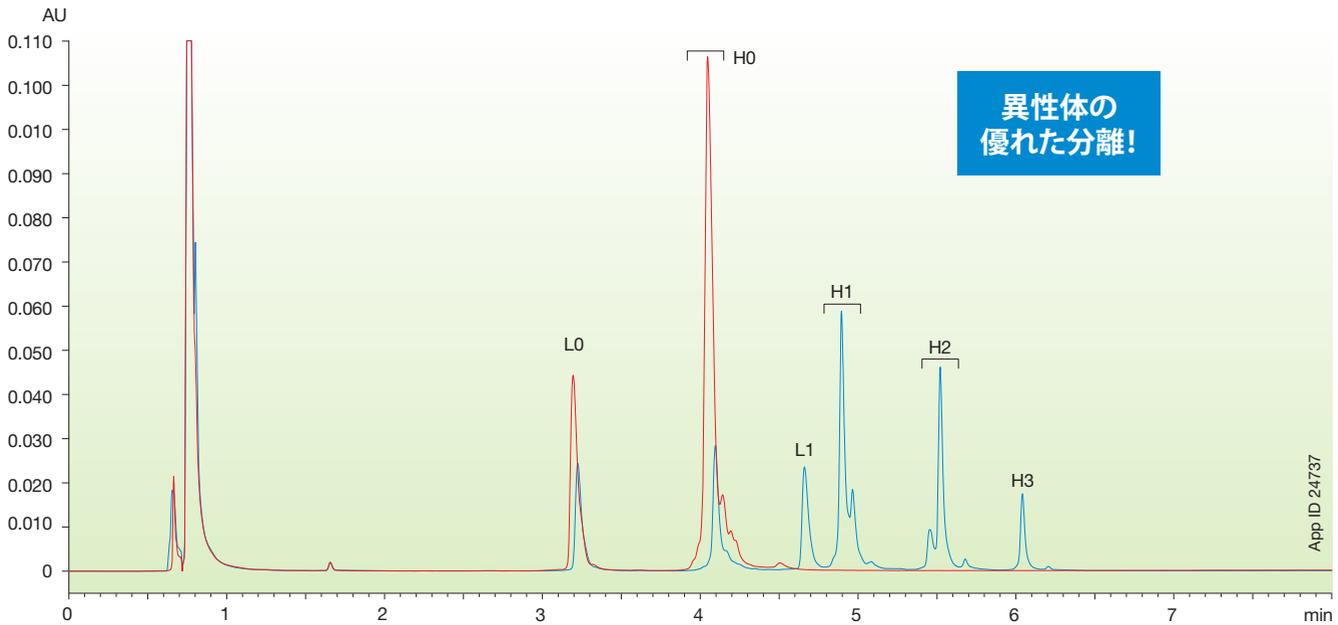
SCIEX



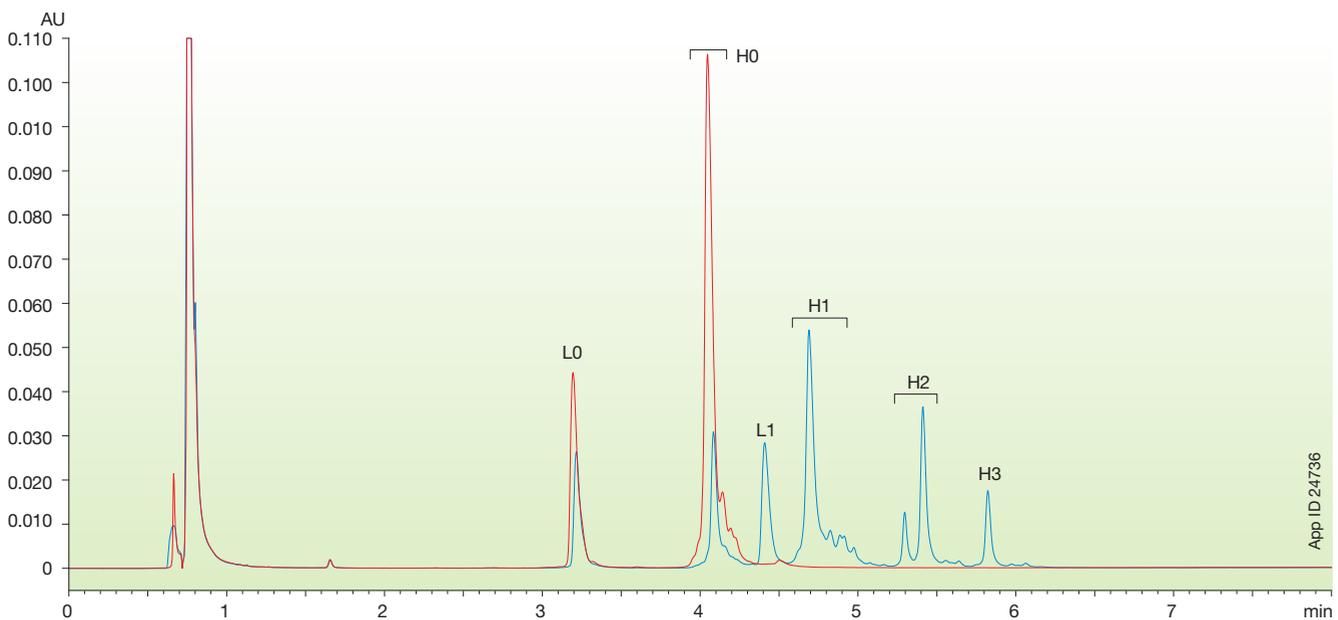
薬物抗体比 (DAR)

有効性と安全性に直接影響を及ぼすので、各 ADC (抗体薬物複合体) の共役を十分に理解する必要があります。bioZen Intact XB-C8 カラムは、ADC の薬物負荷分布と DAR (薬物抗体比) を測定するのに優れた性能を提供します。充填剤の大きな細孔径が、インタクト ADC と適度な保持力をもつ固定相との相互作用を促進します。また、bioZen Intact はコアシェルカラムであるため、異なる薬物負荷の ADC を分離させるために必要な高い理論段数を提供します。

ハーセプチン-vcMMAE (bioZen 3.6 μ m Intact XB-C8)



ハーセプチン-mcMMAE (bioZen 3.6 μ m Intact XB-C8)



Acknowledgment
We would especially like to thank Colin McKee and ADC Biotechnology LTD for their support and ADC samples for this application.

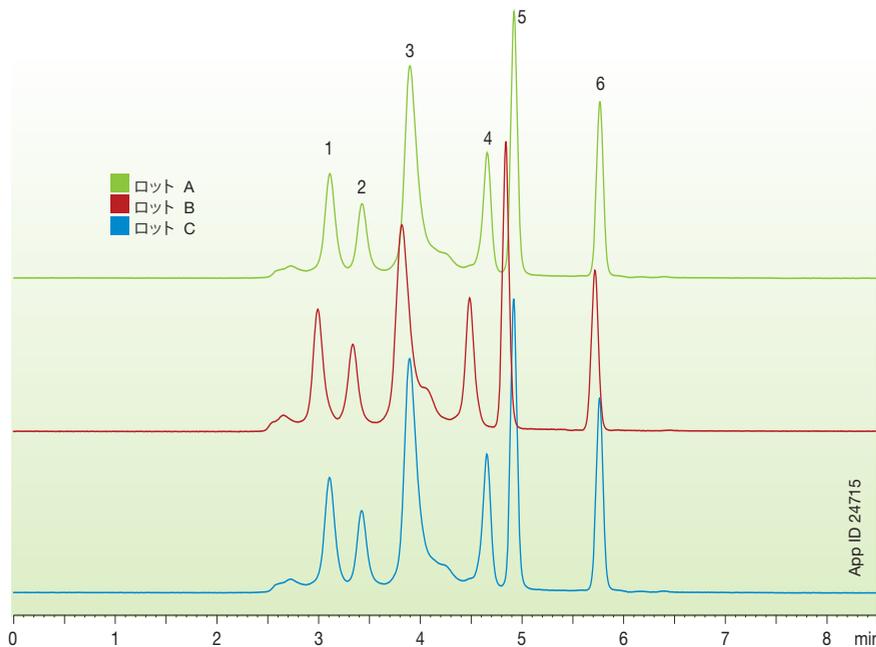
分析条件はこちらをご覧ください：
www.phenomenex.com/bioZen

バイオ品質管理試験

Phenomenex では、製造と品質管理のあらゆる段階において、お客様のバイオ医薬品分析を念頭に置いています。まずは、ワークフローを向上させる革新的な製品の開発に焦点を当て、その次に、その製品がいつでも確実に再現良く製造されるように努めています。これらの製品の品質をさらに高めるために、お客様が最終的に必要とする性能を再現できるように、特定の分析条件を用いてカラムを検査しています。

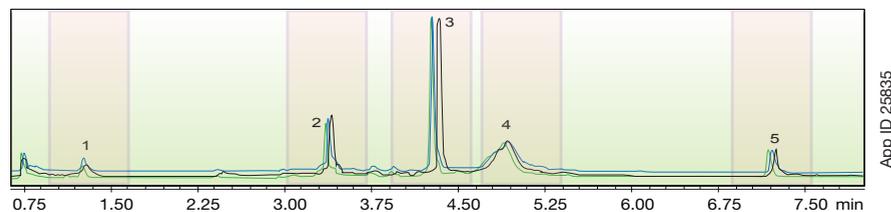
弊社の bioZen™ 製品でバイオ医薬品研究の更なる進歩を築くことができるように、我々は、各充填剤バッチと各カラムの様々な品質管理試験を徹底的に行い、お客様に最高品質の製品をお届けします。

ロット間差 (bioZen 1.8µm SEC-3)



Column: bioZen 1.8µm SEC-3
Dimensions: 150 x 4.6 mm
Part No.: 00F-4772-E0
Mobile Phase: 100 mM Sodium Phosphate in Water pH 6.8
Flow Rate: 0.3 mL/min
Temperature: Ambient
Detection: UV @ 280 nm
Sample: 1. Thyroglobulin (669 kDa)
2. IgA (300 kDa)
3. IgG (150 kDa)
4. Ovalbumin (44 kDa)
5. Myoglobin (17 kDa)
6. Uridine

ロット間差 (bioZen 2.6µm WidePore C4)

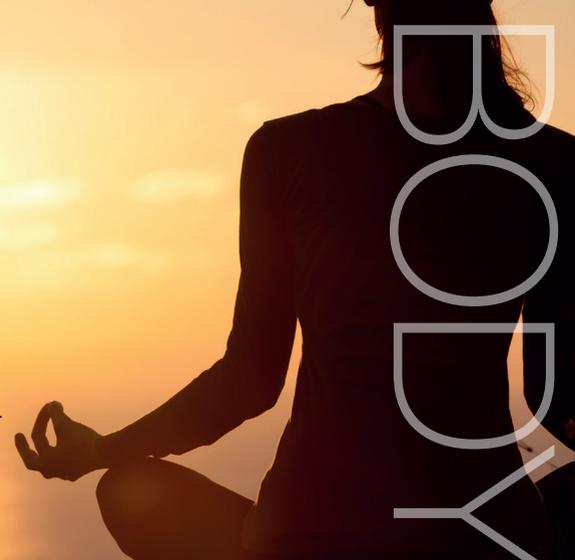


Column: bioZen 2.6µm WidePore C4
Dimension: 100 x 2.1 mm
Part No.: 00D-4786-AN
Mobile Phase: A: 0.1 % TFA in Water
B: 0.1 % TFA in Acetonitrile
Gradient: 25-60 % B in 15 minutes
Flow Rate: 0.3 mL/min
Temperature: 60 °C
Detection: UV @ 280 nm
Sample: 1. RNase A (13.7 kD)
2. Cytochrome c (12 kD)
3. Lysozyme (14.3 kD)
4. Holotransferrin (76-81 kD)
5. Apomyoglobin (16 kD)

mAbs の免疫捕獲

磁気ビーズを用いたサンプル前処理

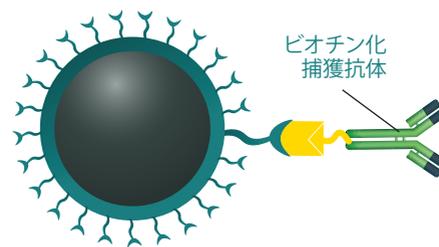
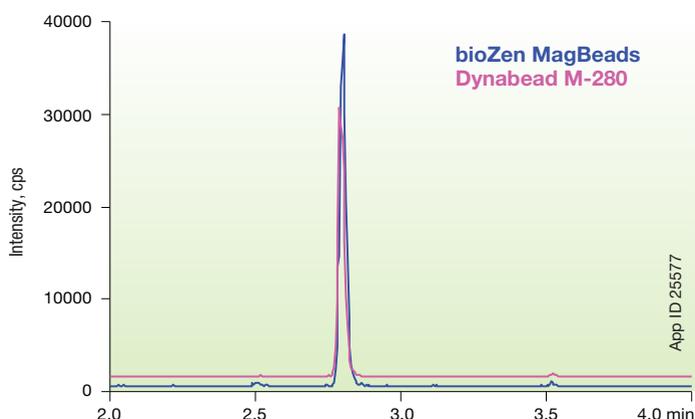
bioZen MagBeads は、タンパク質とペプチド分子の精製、クリーンアップ、分離に使用され、表面がストレプトアビジンコートされた常磁性親和性ビーズを uses。磁気ビーズは、均一粒子と結合する高能力を最大化して、短時間に正確で信頼できる結果を出すことで、従来のサンプル前処理選択肢に比べ、迅速なソリューションを提供します。



bio
zen
key

リツキシマブシグネチャーペプチド - ASGYTFTSYNMHWK

Dynabeads M-280 と bioZen MagBeads の比較



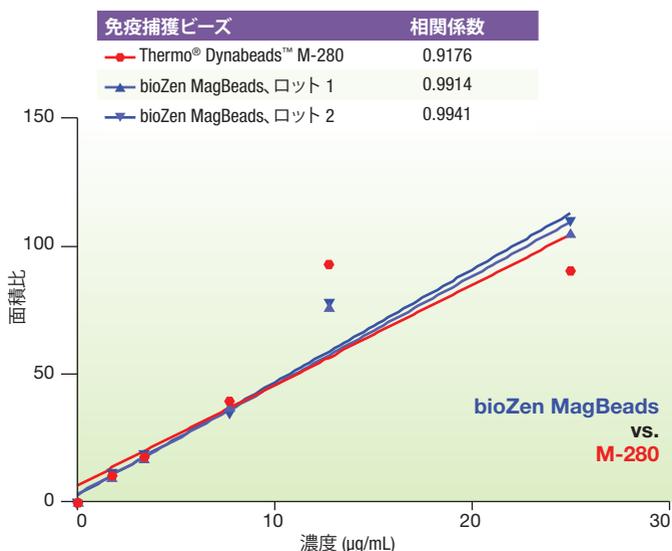
Column: bioZen 3µm Peptide PS-C18
Dimension: 50 x 2.1 mm
Part No.: 00B-4771-AN
Mobile Phase: A: 0.1% Formic acid in Water
B: 0.1% Formic acid in Acetonitrile
Gradient: 3-50% B in 4.5 minutes
Flow Rate: 0.3 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: SCIEX® X500B Q-TOF
Sample: Rituximab 1.5 µg/mL (ASGYTFTSYNMHWK)

bioZen MagBeads は、**回収率の改善とペプチド定量化の精度の向上**を提供します。

bioZen MagBeads の結合活性は、正確で高感度の結果を実現します。

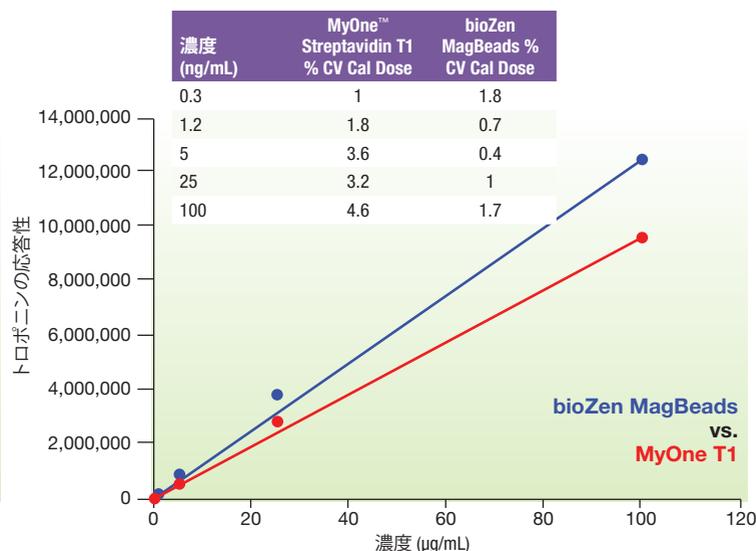
リツキシマブ

- 非特異的結合の低減
- ロット間の優れた再現性



トロポニン

- アッセイ精度の向上
- 応答性の改善



比較として提示したデータはすべてのアプリケーションを代表するものではありません。

bioZen カラムの 簡単な選び方

我々は、生物製剤の分析に必要とされるカラム性能を求め、お客様の声に応えるように、情熱を込めて、bioZen™ 製品ラインナップを開発しました。bioZen シリーズは、バイオ医薬品のあらゆる開発段階で、非常に幅広い分離方法にわたって優れた汎用性を提供します。

スクリーニング / 初期開発 mAb

ペプチドマッピング (RP-MS)

- 全 (whole) mAb
 - 抗原結合領域 (Fab region)
- bioZen Peptide PS-C18
bioZen Peptide XB-C18

Charge Variant (IEX)

bioZen WCX

凝集 (SEC)

bioZen SEC-3

凝集 (High-Throughput SEC)

bioZen SEC-3

平均 DAR ADC (RP-UV)

bioZen Intact XB-C8





前臨床
mAb

処方
(SEC)

bioZen™ SEC-2
bioZen SEC-3

Charge Variant
(IEX)

bioZen WCX

mAb 全般
(RP-UV)

bioZen WidePore C4
bioZen Intact XB-C8

インタクトマス
(RP-MS)

bioZen WidePore C4
bioZen Intact XB-C8

mAb 全般
(SEC-UV)

bioZen SEC-2
bioZen SEC-3

ペプチド定量
(RP-MS)

bioZen Peptide PS-C18
bioZen Peptide XB-C18



生体適合性チタンハードウェア：
すべてのワークフローにおいて、回収率と再現性を向上！

タンパク質分析に詳しい “ZenMasters” からのヒント サイズ排除 (SEC) に適する 塩濃度のバッファー



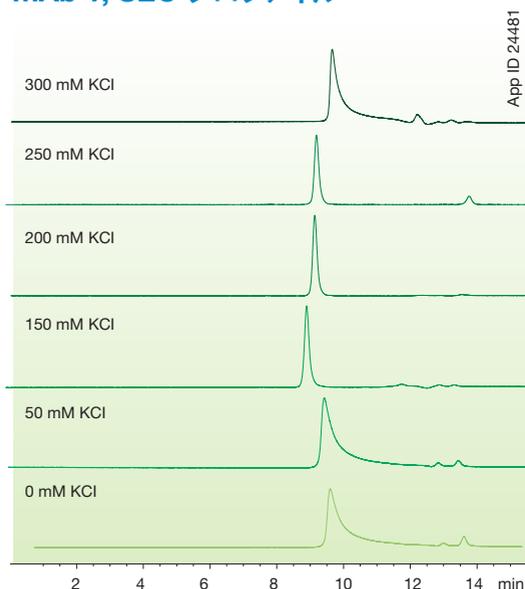
Dani Xing

Technical Guru - Bioseparations

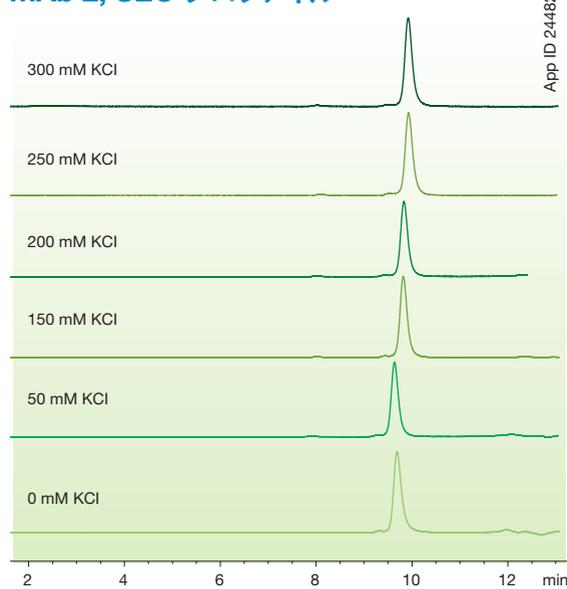
SEC を用いた mAb 凝集体の分析メソッドを開発する際には、非特異的な相互作用を防ぐために移動相条件を最適化することが重要です。以下の2つの異なるバイオシミュラー mAb の分析では、移動相における塩濃度の変化の影響をご覧ください。mAb 1 は、望ましいピーク形状を得るために適度な塩濃度が必要でしたが、mAb 2 の場合は、塩を添加しなくても良好でした。しかし、塩濃度を増加させることによって、ピーク形状の漸進的な改善が見られました。

理想的には、メソッドや分析の必要条件に基づいて、緩衝液および塩濃度を最適化します。しかし、いくつかの異なる mAb を評価しなければならない時など、プラットフォーム法が必要な場合は、pH 6.8 のリン酸一カリウム (50 mM) と塩化カリウム (250 mM) の移動相を用いて、メソッド開発を始めてみることを推奨します。

mAb 1, SEC プロファイル



mAb 2, SEC プロファイル



Conditions same for both samples, except where noted:

Column: bioZen™ 1.8 μm SEC-3

Dimensions: 300 x 4.6 mm

Part No.: 00H-4772-E0

Mobile Phase: 50 mM KH₂PO₄, pH 6.8
KCl (as indicated)

Flow Rate: 0.3 mL/min

Detection: UV @ 280 nm

Temperature: Ambient

脱グリコシル化に関するトピックス

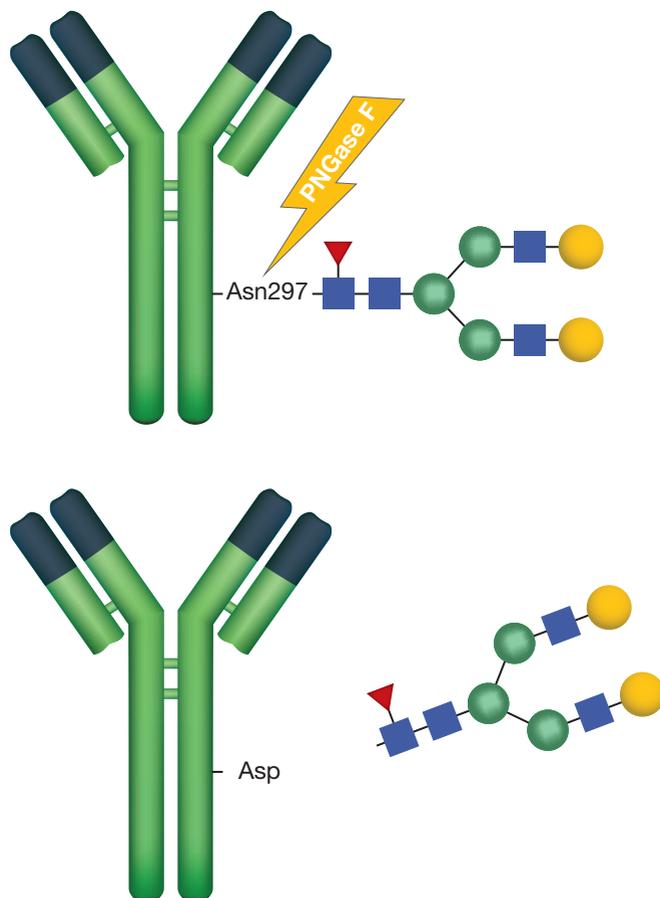


どのように抗体を脱グリコシル化すべきですか？

PNGase F は、コアフコシル化 α (1-3) であるものを除き、無差別に N-グリカンを切断するエンドグリコシダーゼです。

PNGase F を用いる大部分の手順は、もともと複雑な糖タンパク質（すなわち複数のグリコシル化部位を有するタンパク質）を脱グリコシル化するために開発されたものです。例えば、糖タンパク質の一般的な手本であるウシのフェチュインには、18か所のグリコシル化部位があります⁽¹⁾。そのため、確実にすべてを脱グリコシル化させるために、夜通しの脱グリコシル化法がほとんどの開発される手順に用いられます。

しかし、次の日まで待てない場合は、何をしたら良いのでしょうか？それほど複雑ではない糖タンパク質（Asn297 の保存領域に2つのグリコシル化部位がある IgG1 など）の場合、より短い消化時間が許容されます。実際には、脱グリコシル化を速めるために設計された PNGase F が市場で販売されており、場合によっては10分以内で完了させることができます。さらに、グリコシル化部位はアクセスしやすいため、変性は必要ありません⁽²⁾。



なぜインタクトマス分析の前に ADC または抗体を脱グリコシル化した方が良いのですか？

試料がどれくらいの数の異なるグリコフォームを有するかに依存しますが、グリコシル化の複雑性が高いほど、厄介なスペクトルにつながる可能性が高まります。ADC は特に困難です。

そのため、脱グリコシル化を行えば、より良いスペクトルを得ることができるはずです。つまり、異なる DAR 種の相対定量的評価を改善することができ、平均 DAR も改善できます。

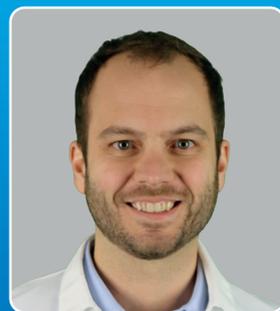
常に注意しておくべきことが1つあります。それとは、N-結合グリカンの脱グリコシル化はアスパラギン酸 (Asp) を生じ、その結果として 1 Da の質量シフトが生じます。また、PNGase F 反応緩衝液はたいてい Tris 緩衝液であり、pH が比較的に高いということを意識しておかなければなりません。脱アミド化（一般にアスパラギン-グリシン (N-G) モチーフの脱アミド化）が起こることがあるので、より速い脱グリコシル化手順が望ましいかもしれません。

1. Nwosu, Charles C., et al. "Simultaneous and Extensive Site-Specific N- and O-Glycosylation Analysis in Protein Mixtures." *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 5, June 2011, pp. 2612-2624., doi:10.1021/pr2001429

2. Hosfield, C., Engel, L., Paguio, A., Surowy, T., Jones, R., Ford, M., Uhr, M., Rosenblatt, M. Recombinant PNGase F for Glycoprotein Analysis. Promega Corporation Web site. <http://www.promega.com/resources/pubhub/recombinant-pngase-f-for-glycoprotein-analysis-article/> Updated 2013. Accessed January 29, 2018.

タンパク質分析に詳しい“ZenMasters”からのヒント

サイズ排除 (SEC) と 逆相カラムの負荷量



Chad Eichman, Ph.D.
BioPharm Global Marketing Manager

どのように SEC カラムの負荷量を確認できますか？

サイズ排除カラムの場合、サンプル容量とサンプル濃度の2つの考慮事項があります。

原則として、カラム容量の 5% 未満に相当するサンプル容量を注入しましょう。理論的には、5 mL 以下の容量を有する 300 x 4.6 mm カラムの場合、200 μ L までが注入量の限界です。実際には、10~30 μ L の注入量が一般的です。

もう一つ重要な考慮事項がサンプル濃度です。タンパク質の濃度が高ければ高いほど、試料の粘性は高くなります。この粘性の差によって、ピーク形状が歪んでしまう可能性があります（これは、排除効果もしくは「ビスカスフィンガリング」と呼ばれる溶媒先端のいずれかを介して起こります）。最適な濃度を実験的に定めなければなりません、良い出発点は 1 mg/mL です。

bioZen™ Intact と bioZen Peptide カラムの負荷量はどのくらいですか？

bioZen Peptide カラムは、他の逆相 LC カラムと同様な注入量でも大丈夫です。内径 4.6 mm のカラムを用いたペプチド分析においては、5~20 μ g の消化物またはペプチド混合物が（特に LC-MS に対して）良好な感度をもたらします。最大 50 μ g の消化物を注入してもピーク幅がそれほど広がることはありません。内径 2.1 mm のカラムを使用する場合は、注入量をそれなりに調整する必要があります。

bioZen Intact カラムは、充填剤の表面積が小さいため、注入量によってピーク形状が劇的に影響される可能性があります。従って、最適な結果を得るには、最適な注入量を実験的に定める必要があります。内径 4.6 mm の場合は 5 μ g で、内径 2.1 mm のカラムを用いる場合は 1 μ g が良い出発点です。注入量を増やすと、ピークのテーリングが悪化したり、ピーク幅が大幅に拡大する可能性があります。



有機溶媒と サイズ排除

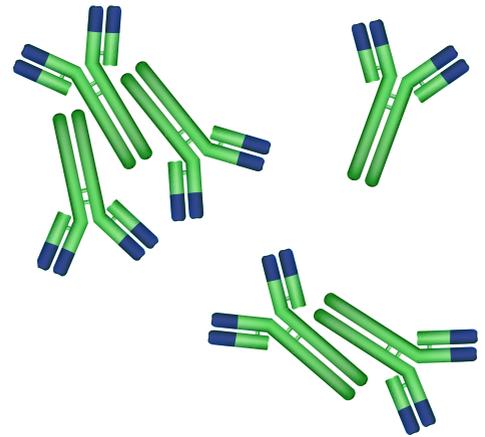


有機溶媒とサイズ排除

サイズ排除 (SEC) カラムで理想な分離 (すなわち分析対象物と固定相との二次的な相互作用を伴わない純粋の分離) を得るには、少量 (5~15%) の有機修飾剤 (イソプロパノールまたはアセトニトリル) を移動相に添加する必要があるかもしれません。

しかし、この問題は、タンパク質が天然状態のままで本当に残れるかどうかです。凝集の主な原因はいくつかありますが、その一つは、単量体 (モノマー) とフラグメントとの間の疎水性相互作用です。

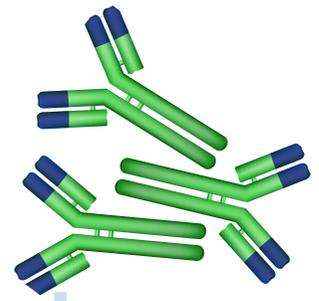
ADC のほとんどの分析メソッドには有機修飾剤が移動相に多少添加されており、IPA (15%) が最もよく利用されています。これは、凝集体を解析するのに適切であると広く受け入れられていますが、超遠心分析沈降速度法 (sedimentation velocity analytical ultracentrifugation; SV-AUC) を用いて結果を確認する必要があるかもしれません。



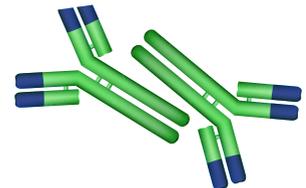
+



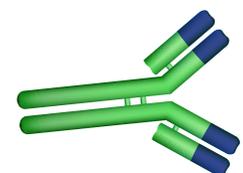
↓



↓



↓



タンパク質分析に使用するカラムは、どのように洗浄すべきですか？

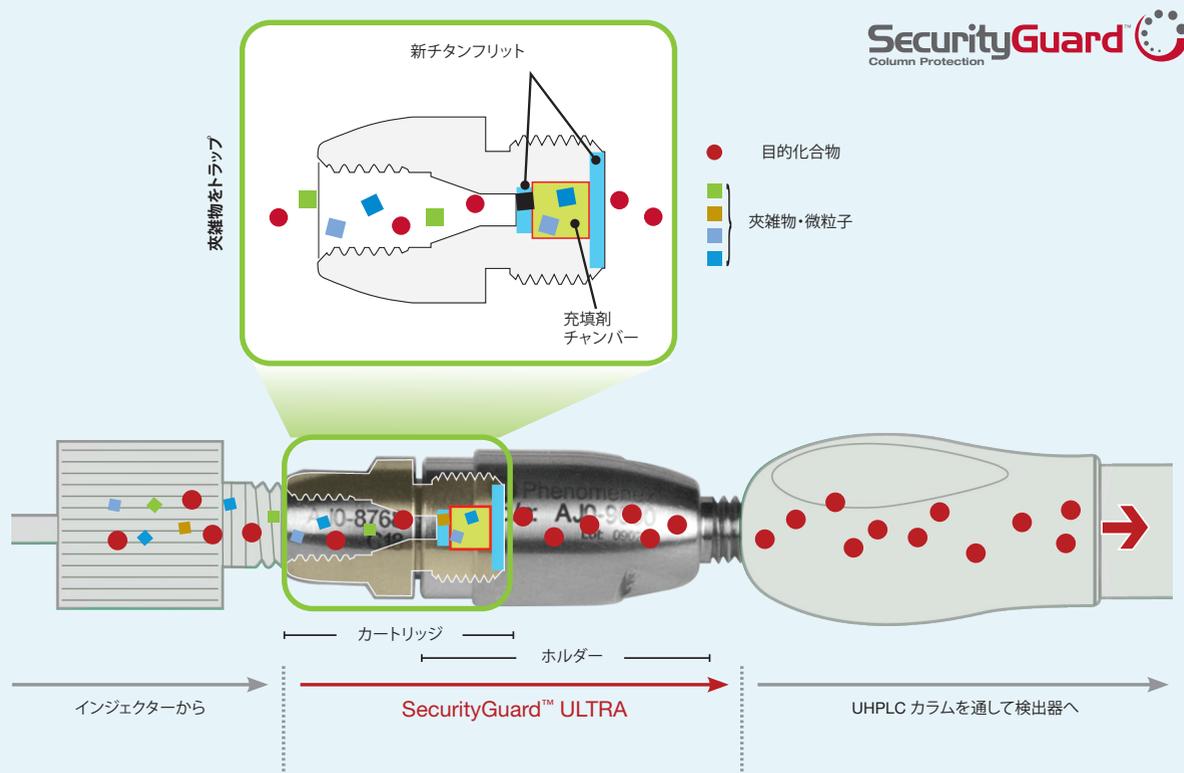
タンパク質とカラムの固定相との間で強いイオン性相互作用が起きていると思われる場合は、6M 塩酸 Guanidinium または 10% DMSO などの変性剤で洗浄してください。タンパク質が比較的に疎水性である場合は、まず水 95~100% で緩衝液を洗い流してから、水 (95%) / アセトニトリル (5%) ~ 水 (5%) / アセトニトリル (95%) のグラジエント洗浄を行ってください (カラム容量の約3~5倍の送液量を推奨します)。背圧がカラムの推奨圧力制限を超えないようにご注意ください (必要に応じて流量を調整してください)。

カラムと装置を保護する 生体適合性ガードシステム

LC カラムの性能を保ち、分析装置と検出器の維持にかかる時間とコストを最小限に抑える最も有効な方法は、LC カラムにガードシステムを接続することです。夾雑物や微粒子を取り除いてくれる SecurityGuard™ カートリッジ式ガードシステムは、カラムだけでなく、HPLC および UHPLC システムを容易に保護します。



チタンフリット搭載 SecurityGuard ULTRA カートリッジ式ガードシステム



※カートリッジの図は縮尺通りに描かれていません。

小容量試料のクリーンアップを高性能に行う

乾燥処理（溶媒留去）と再溶解を必要としない Strata-X マイクロエリューション96-ウェル SPE プレートは、一貫したサンプル前処理の結果を提供し、2つの大きなメリット（絶対回収率の向上と前処理時間の大幅な節約）をもたらします。

strata[®]X
Polymeric SPE

Strata-X ポリマー系 SPE

試料をカラムに注入する前に脱塩することで、より正確な結果とカラム寿命の延長を得ることができます。

www.phenomenex.com/StrataX



製品ラインナップ



bioZen™ 製品 - 生体適合性ハードウェアを搭載

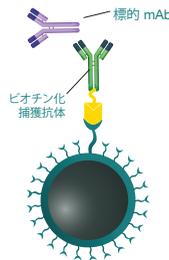
bioZen カラム (mm)	生体適合性 SecurityGuard™ カートリッジ								ホルダー	
	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1	50 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6	250 x 4.6	内径 2.1 mm 用	内径 4.6 mm 用	
								/3pk	/10pk	ea
bioZen 1.6 μm Peptide PS-C18	00B-4770-AN	00D-4770-AN	00F-4770-AN	—	—	—	—	AJO-9803	—	AJO-9000
								/10pk	/10pk	ea
bioZen 3 μm Peptide PS-C18	00B-4771-AN	—	00F-4771-AN	00B-4771-E0	—	00F-4771-E0	—	AJO-7605	AJO-7606	KJO-4282
								/3pk	/10pk	ea
bioZen 1.7 μm Peptide XB-C18	00B-4774-AN	00D-4774-AN	00F-4774-AN	—	—	—	—	AJO-9806	—	AJO-9000
bioZen 2.6 μm Peptide XB-C18	00B-4768-AN	00D-4768-AN	00F-4768-AN	00B-4768-E0	—	00F-4768-E0	—	AJO-9806	AJO-9808	AJO-9000
bioZen 2.6 μm WidePore C4	00B-4786-AN	00D-4786-AN	00F-4786-AN	00B-4786-E0	00D-4786-E0	00F-4786-E0	00G-4786-E0	AJO-9816	AJO-9818	AJO-9000
bioZen 3.6 μm Intact XB-C8	00B-4766-AN	00D-4766-AN	00F-4766-AN	00B-4766-E0	—	00F-4766-E0	—	AJO-9812	AJO-9814	AJO-9000

	50 x 2.1	100 x 2.1	150 x 2.1	250 x 2.1	50 x 4.6	100 x 4.6	150 x 4.6	250 x 4.6	300 x 4.6	内径 4.6 mm 用	ホルダー
											/3pk
bioZen 1.8 μm SEC-2	00B-4769-AN	—	00F-4769-AN	—	—	—	00F-4769-E0	—	00H-4769-E0	AJO-9850	AJO-9000
bioZen 1.8 μm SEC-3	00B-4772-AN	—	00F-4772-AN	—	—	00D-4772-E0	00F-4772-E0	—	00H-4772-E0	AJO-9851	AJO-9000
										/10pk	ea
bioZen 6 μm WCX	00B-4777-AN	00D-4777-AN	00F-4777-AN	00G-4777-AN	00B-4777-E0	00D-4777-E0	00F-4777-E0	00G-4777-E0	—	AJO-9400	KJO-4282

※Part No. AJO-7606 のカートリッジには分析用 SecurityGuard ホルダー (Part No. KJO-4282) が必要です。
その他のカートリッジには SecurityGuard ULTRA ホルダー (Part No. AJO-9000) が必要です。

bioZen MagBeads ストレプトアビジンコート

フォーマット	製品番号	濃度	ビーズ径
25 mg (サンプル数約 50)	KSO-9531	20 mg/mL	1.0 μm
50 mg (サンプル数約 100)	KSO-9532		
500 mg (サンプル数約 1000)	KSO-9533		



生体適合性のあるアクセサリーでタンパク質の回収率を保証。



Phenex シリンジフィルター

PES メンブレンは、高速フローであり、タンパク質の吸着性も極めて低いです。

www.phenomenex.com/SFfinder



Verex バイアル、キャップ、キット

高品質で様々な種類の認定バイアルとキャップを備えています。

www.phenomenex.com/VialFinder



バイオロジクスに Zen の力を取り入れよう!



アイルランド
t: +353 (0)1 247 5405
eireinfo@phenomenex.com

アメリカ (米国)
t: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com

イギリス (英国)
t: +44 (0)1625-501367
ukinfo@phenomenex.com

イタリア
t: +39 051 6327511
italiainfo@phenomenex.com

インド
t: +91 (0)40-3012 2400
indiainfo@phenomenex.com

チェコ共和国
t: +420 272 017 077
cz-info@phenomenex.com

オーストラリア
t: +61 (0)2-9428-6444
auinfo@phenomenex.com

オーストリア
t: +43 (0)1-319-1301
anfrage@phenomenex.com

オランダ
t: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

カナダ
t: +1 (800) 543-3681
info@phenomenex.com

シンガポール
t: +65 800-852-3944
sginfo@phenomenex.com

スロバキア
t: +420 272 017 077
sk-info@phenomenex.com

スイス
t: +41 (0)61 692 20 20
swissinfo@phenomenex.com

スウェーデン
t: +46 (0)8 611 6950
nordicinfo@phenomenex.com

スペイン
t: +34 91-413-8613
espinfo@phenomenex.com

デンマーク
t: +45 4824 8048
nordicinfo@phenomenex.com

ドイツ
t: +49 (0)6021-58830-0
anfrage@phenomenex.com

ニュージーランド
t: +64 (0)9-4780951
nzinfo@phenomenex.com

ノルウェー
t: +47 810 02 005
nordicinfo@phenomenex.com

フィンランド
t: +358 (0)9 4789 0063
nordicinfo@phenomenex.com

フランス
t: +33 (0)1 30 09 21 10
franceinfo@phenomenex.com

ベルギー
t: +32 (0)2 503 4015 (フランス語)
t: +32 (0)2 511 8666 (オランダ語)
beinfo@phenomenex.com

ポーランド
t: +48 22 104 21 72
pl-info@phenomenex.com

ポルトガル
t: +351 221 450 488
ptinfo@phenomenex.com

メキシコ
t: 01-800-844-5226
tecnicomx@phenomenex.com

ルクセンブルク
t: +31 (0)30-2418700
nlinfo@phenomenex.com

タイ
t: +66 (0) 2 566 0287
thaiinfo@phenomenex.com

中国
t: +86 400-606-8099
cninfo@phenomenex.com

台湾
t: +886 (0) 0801-49-1246
twinfo@phenomenex.com

◎ **その他の国/地域:**
米国本社
t: +1 (310) 212-0555
info@phenomenex.com



www.phenomenex.com

Phenomenexの製品は世界中どこでもお求めいただけます。
他の国・地域の販売代理店については、Phenomenex USA 海外事業部
(international@phenomenex.com) までお問い合わせください。

規約
Phenomenex の標準規約に従うものとします。
詳細は www.phenomenex.com/TermsAndConditions をご覧ください。

商標
Strata, bioZen, SecurityGuard, Phenex および Verax は Phenomenex の商標です。SCIEX および QTRAP は AB SCIEX Pte. Ltd. の登録商標です。ExionLC は AB SCIEX Pte. Ltd. の商標です。
SCIEX™ はライセンズの許諾を受けて使われています。Thermo および Thermo Fisher Scientific Inc. は Thermo Fisher Scientific Inc. の登録商標です。
Strata-X は Phenomenex が特許を所有しています。日本国特許 第4312605号
SecurityGuard は Phenomenex が特許を所有しています。米国特許 第6,162,362号
注意: 分析カラム用 SecurityGuard ホルダーのみに適用し、その他の SemiPrep, PREP, ULTRA ホルダーおよびすべてのカートリッジには適用しません。
研究利用に限定。臨床診断法への利用禁止。
Disclaimer
比較として提示したデータはすべてのアプリケーションを代表するものではありません。
© 2020 Phenomenex, Inc. All rights reserved.



東京営業部	TEL.03(5323)6611	FAX.03(5323)6622
大阪支店	TEL.06(6220)0500	FAX.06(6220)0601
横浜支店	TEL.045(965)7900	FAX.045(965)7901
東北営業所	TEL.024(534)2191	FAX.024(536)1518
筑波営業所	TEL.029(858)3700	FAX.029(858)3780
北関東営業所	TEL.048(778)5001	FAX.048(778)5005
千葉営業所	TEL.043(248)2441	FAX.043(248)2485
名古屋営業所	TEL.052(931)1761	FAX.052(931)1814
広島営業所	TEL.082(233)1101	FAX.082(233)1110
九州営業所	TEL.092(738)6633	FAX.092(738)6636
総合技術センター	TEL.04(2934)2121	FAX.04(2934)2128
カスタマーサポートセンター	TEL.04(2934)1100	FAX.04(2934)3361
福島工場	TEL.024(533)2244	FAX.024(534)2139

本社 〒163-1130 東京都新宿区西新宿6丁目22番1号 新宿スクエアタワー30F
TEL.03(5323)6611 FAX.03(5323)6622
<https://www.gis.co.jp> E-mail:info@gis.co.jp

