

ペプチド創薬に向けたHPLCメソッド開発の効率化

クロムソードジャパン株式会社/お問合せ : info@chromsword.co.jp

サマリー

- HPLCの条件設定確立に効果的かつ大幅な時間短縮が可能である自動メソッド開発のトータルソリューションソフト、クロムソード (Offline, Auto, AutoRoust) を用いて、市販のペプチドミックスを用いて、HPLCのメソッド開発を行った。
- 通常の迅速最適化モードでも分離条件を自動で検討することは可能であったが、今回新たに追加された**高分子迅速最適化**では、より分離度のよい分析条件を開発することができた。
- 溶媒の溶出する濃度範囲を指定 (この場合はCANの濃度を8-26%) することで、より効率的に上手くメソッド開発を行うことができた。
- さらにいくつかのカラムに関して、高分子迅速最適化モードで自動スクリーニングを行い、それぞれの条件で最適なメソッドを構築した。
- オフラインシミュレーションを用いて、より最適なメソッドを検討することができた。



背景・目的

- 近年、医薬品ではもちろんのこと、農薬、化学物質、食品、環境衛生等の品質管理や安全性の確認、または製品の研究開発においても、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)およびLC/MSはもはや欠くことのできない分析機器のひとつとなっている。
- 最近、次世代の創薬研究のターゲット分子として、生体内中分子、すなわち、ペプチド、核酸、糖といったものが注目されており、その中でもペプチドは抗体医薬品の課題をクリアできるものとして期待されている。しかし、低分子化合物と異なり、それらの合成から精製までは未だ困難を有する場合が多い。
- しかし、HPLC/LCMSの活用が不可欠なペプチドでは、HPLCの分析メソッドの開発も困難で、溶媒、カラム、流速、カラム温度、グラジエントといったパラメーターが最適化された分離・分析条件の容易かつ迅速な確立法が求められている。
- 全く新しくなったChromSword Auto 5.0では生体内高分子用のAIアルゴリズムが追加されており、ペプチドをはじめとした核酸、糖、タンパク質といった比較的高分子におけるHPLCのメソッド開発が自動で行えるようになった。本発表ではペプチド創薬に向けたHPLCの分析メソッド開発における効率化の例を紹介する。

HPLCメソッド開発プロセス

- ハードウェアのセッティング後、カラムや溶媒のスクリーニングプロセスから、初期移動相を設定し、条件最適化を行い、必要に応じて頑健性評価テストを行う。
- 各プロセスは複雑で時間がかかり、属人的になりがちである。



メソッド開発の効率化ソリューション

オートモード (ChromSword Auto)

- LCを完全制御、クロムソードがもつAIアルゴリズムで、自動的にHPLCのグラジエント条件を作成

オフラインモード (Off Line)

- 構造式からクロマトグラムをシミュレーション



- 分析結果をもとにクロマトグラムをシミュレーション



HPLCダイレクトコントロール

適切な開発メソッドを選択し、後はタロムソードにお任せ!

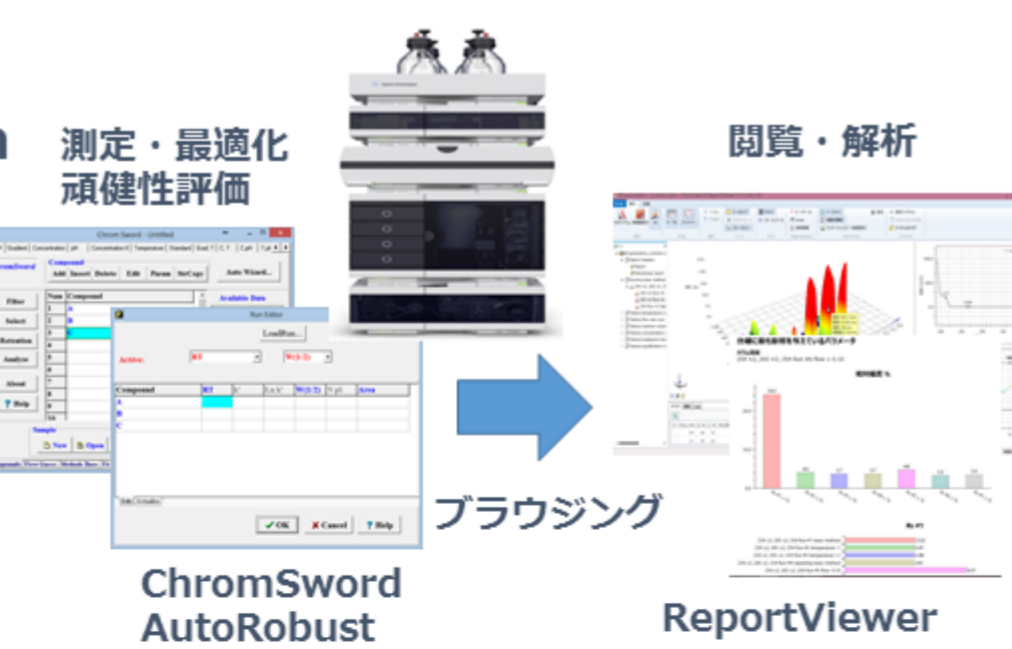
「生体内高分子」ペプチド、核酸、糖、タンパク質などに対応

3-5回の測定で最適グラジエント

メインピークにフォーカスグラジエント

方法

- HPLC : Agilent 1290 method development system (Quaternary pump) x 8 カラムスイッチングバルブ, x 12 溶媒選択バルブ フोटダイオードアレイ検出器
- カラム : ZORBAX Eclipse Plus Silica C18
ZORBAX Poroshell 120 Phenyl Hexyl
ZORBAX Pursuit Silica/Pentafluorophenyl
ZORBAX PLRP-S 100A
InertSustainSwift C18
- カラム温度 : 40℃
- 移動相 : 0.1%TFA アセトニトリル/水



- サンプル
Sigma H2016 standard peptide mix
- 1. Gly-Tyr
- 2. Val-Tyr-Val
- 3. Met-Enkephalin
- 4. Angiotensin II
- 5. Leu-Enkephalin

メソッド開発フロー

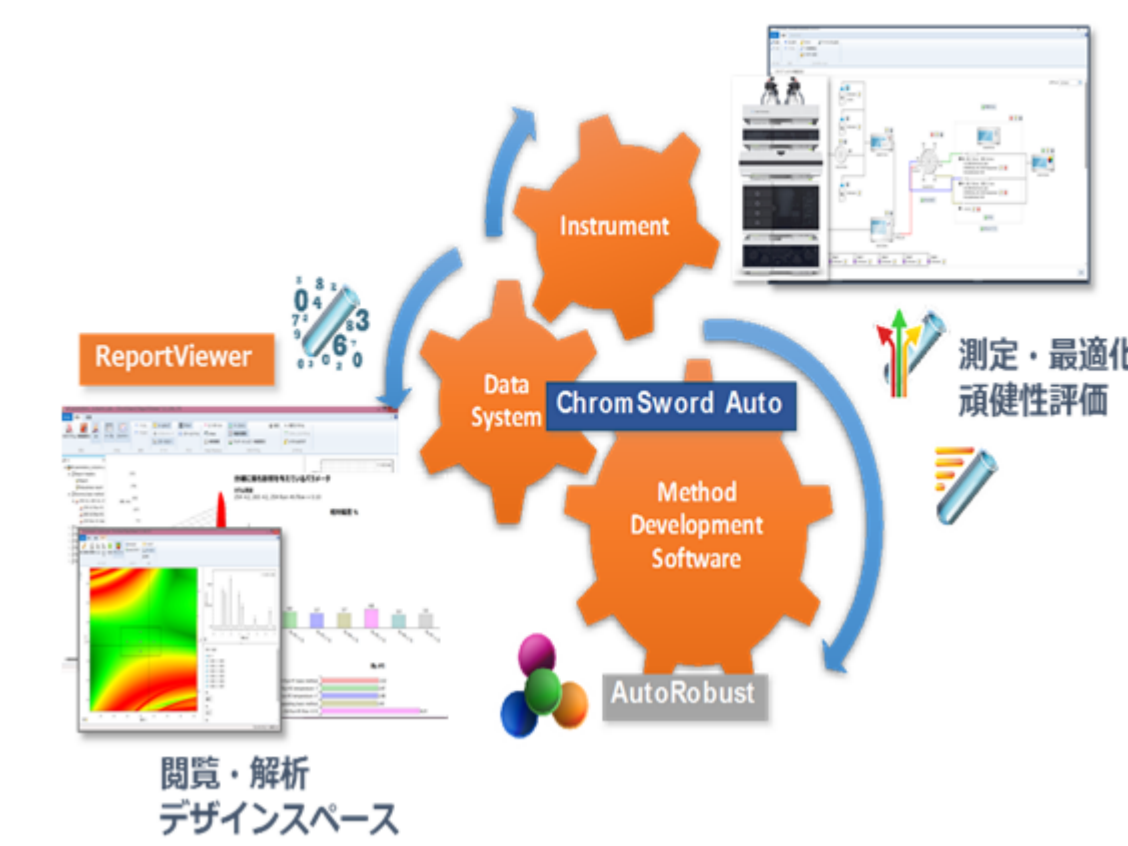
① 迅速最適化 (通常モード vs. 高分子モード)

ZORBAX Eclipse Plus Silica C18

② カラムスクリーニング

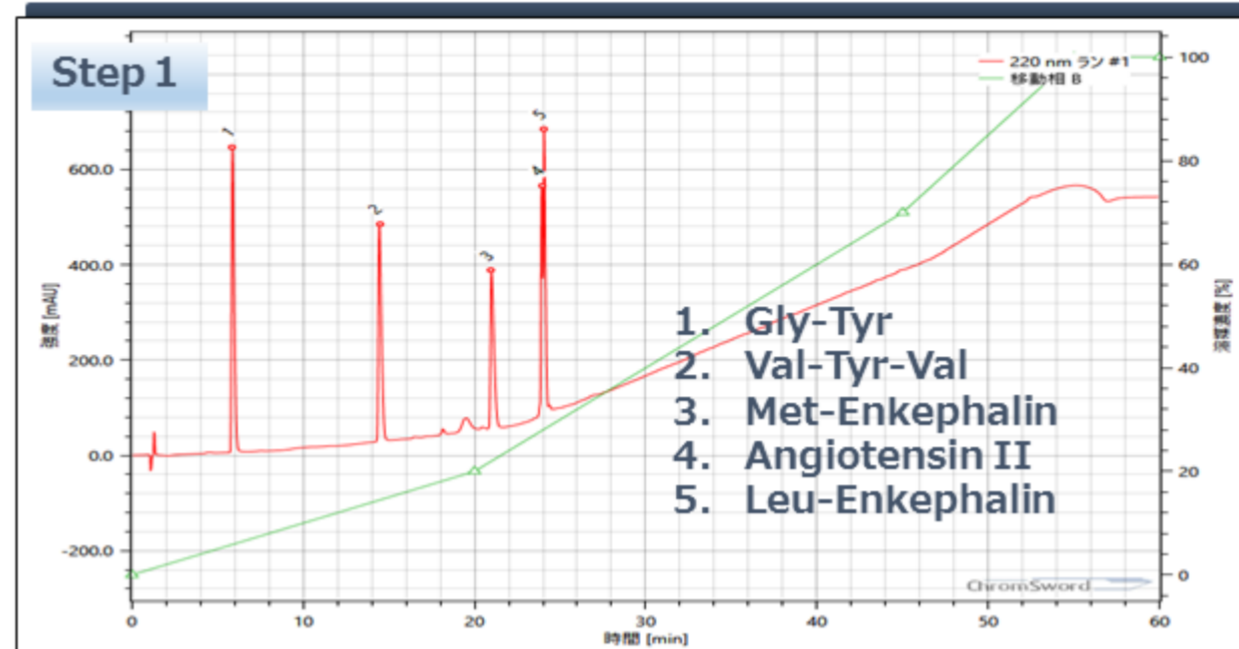
ZORBAX Poroshell 120 Phenyl Hexyl
ZORBAX Pursuit Silica/Pentafluorophenyl
ZORBAX PLRP-S 100A
InertSustainSwift C18

③ オフラインシミュレーションによる最適化

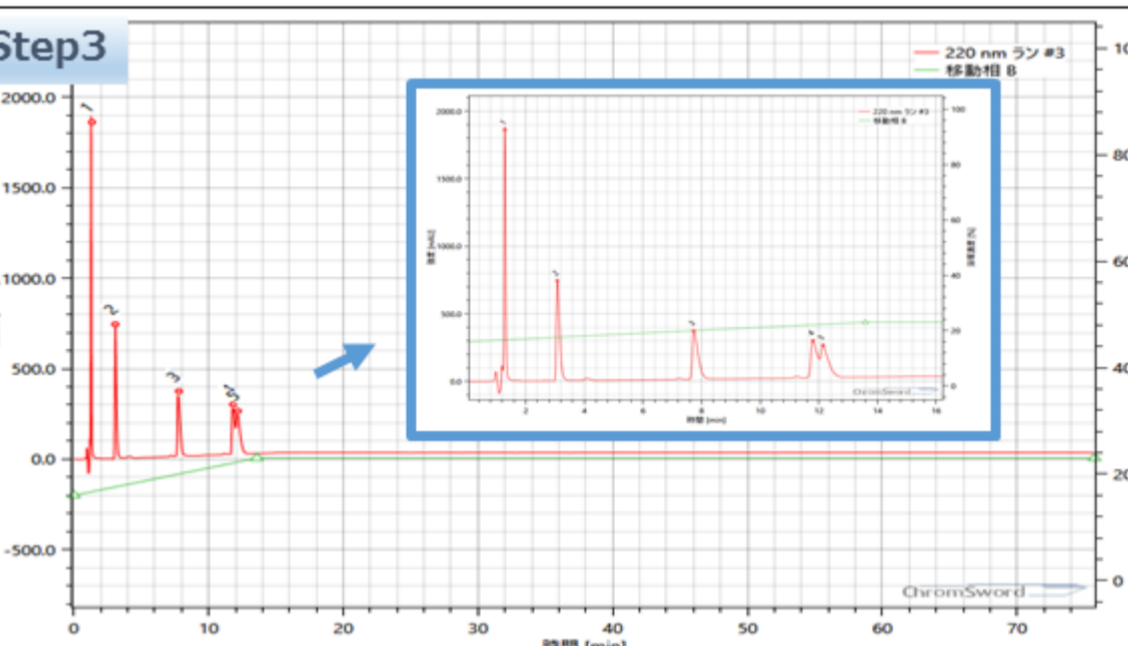
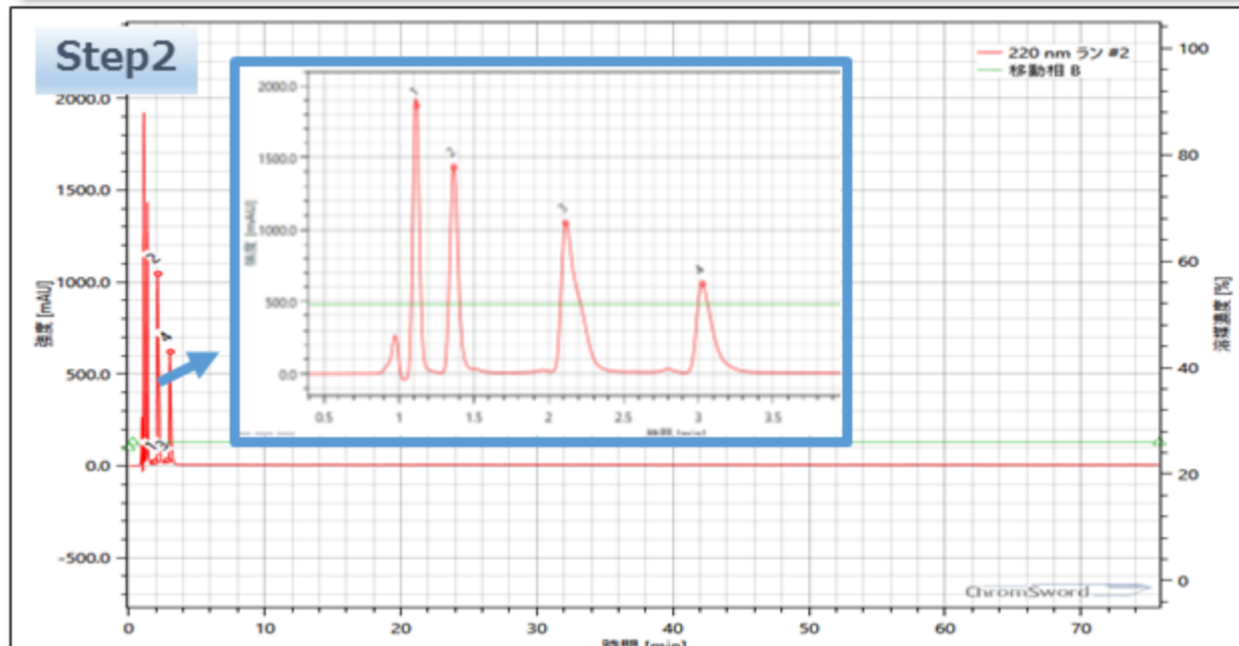


① 迅速最適化 <3~5回の実測定>

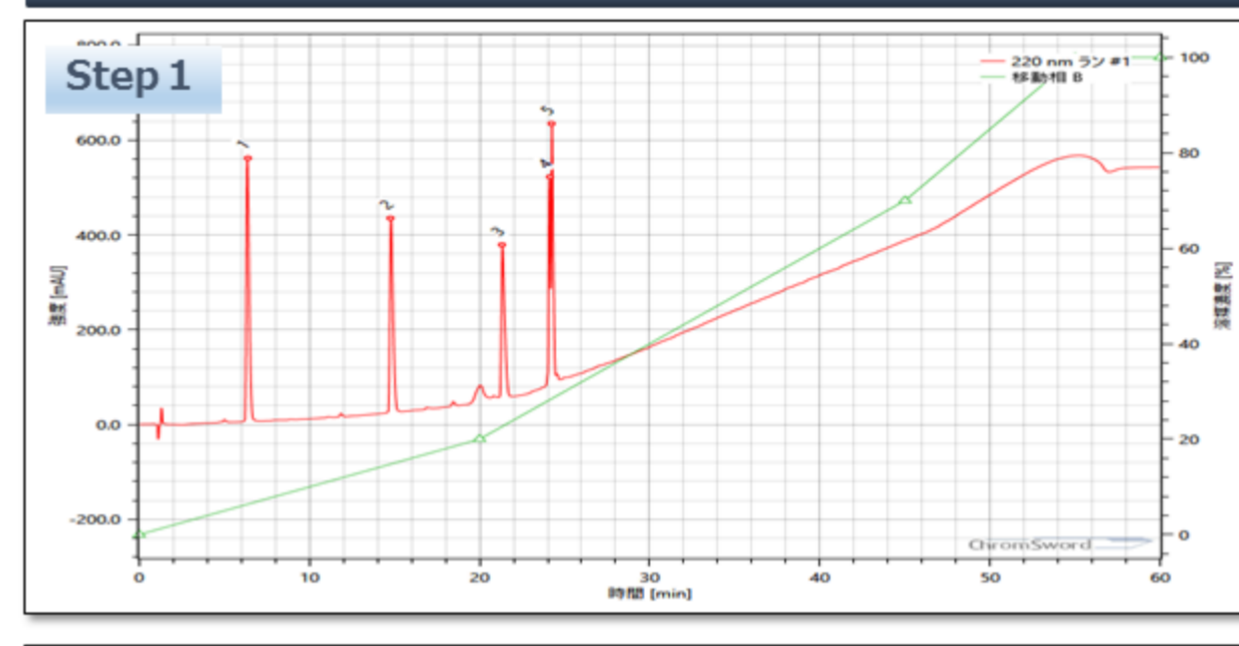
ZORBAX Eclipse Plus Silica C18
0.1% TFA H2O/ACN, 1mL/min, 40℃



溶媒濃度範囲を極性側に設定したほうが上手くできる

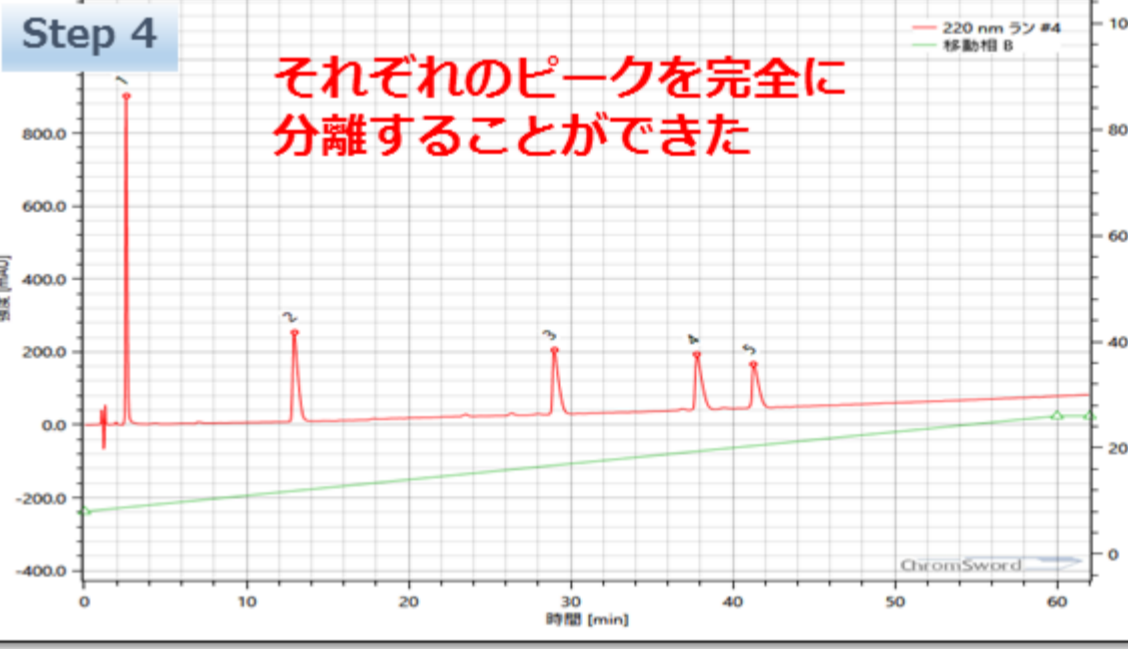
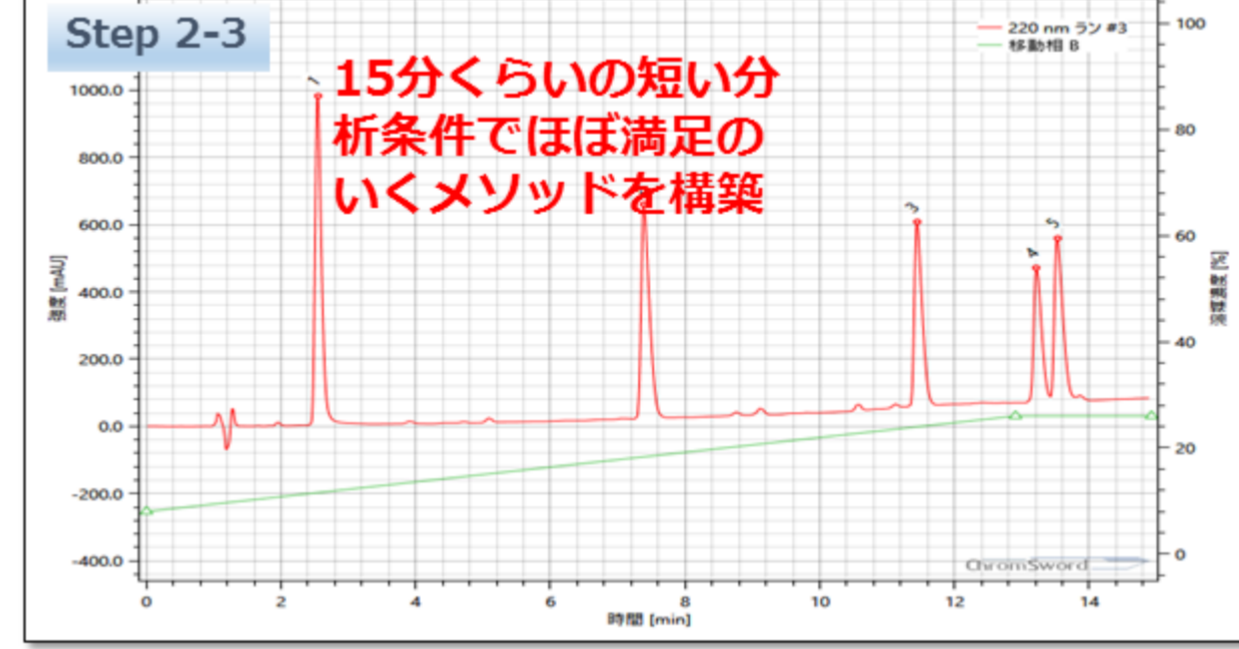


① 高分子迅速最適化モード(溶媒濃度範囲=8~26%)



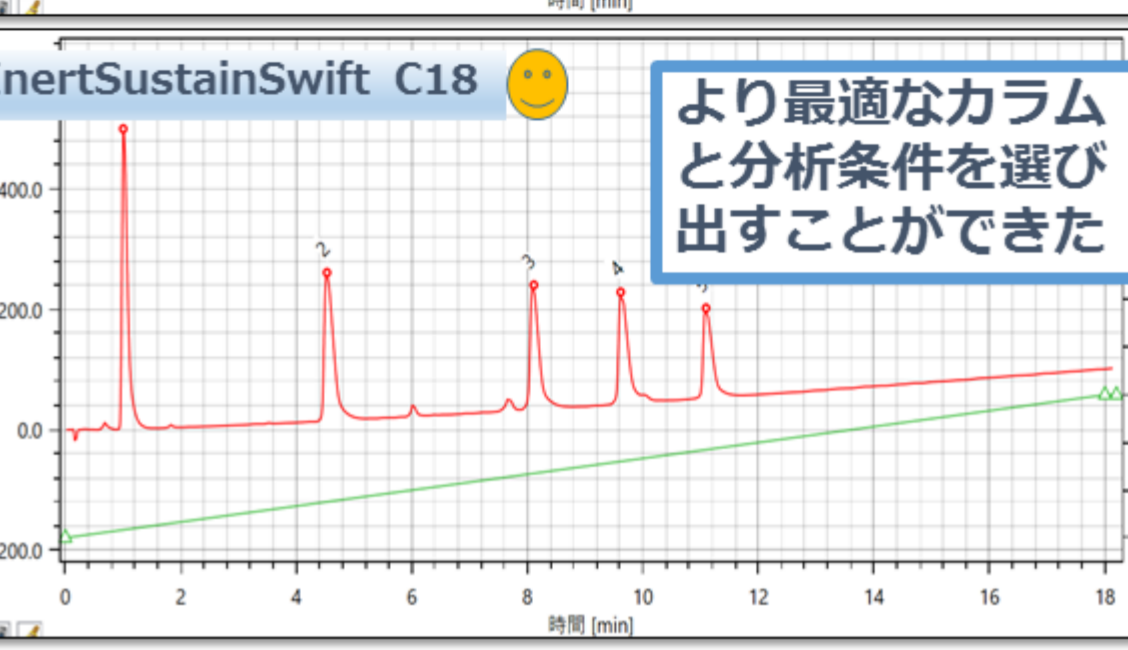
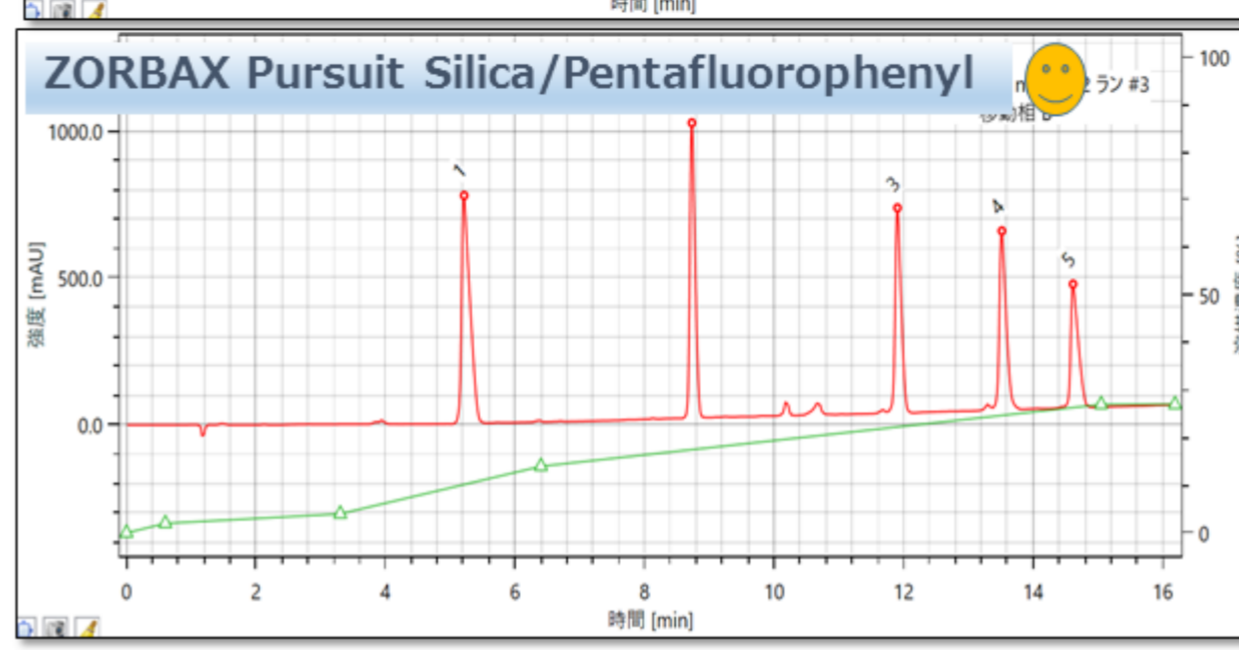
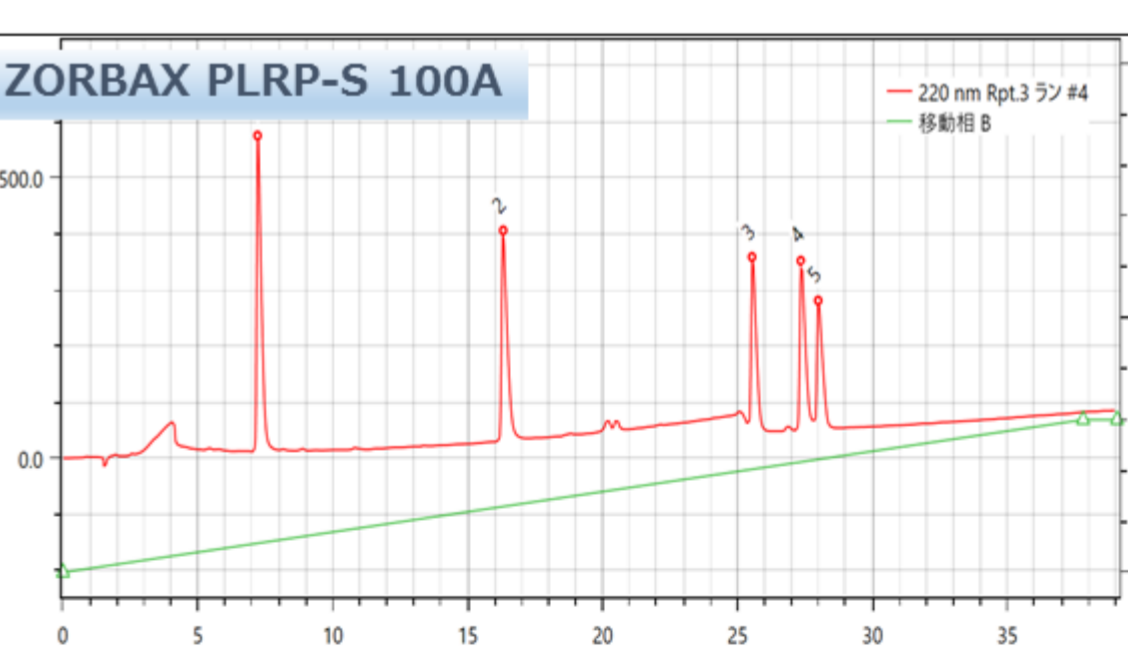
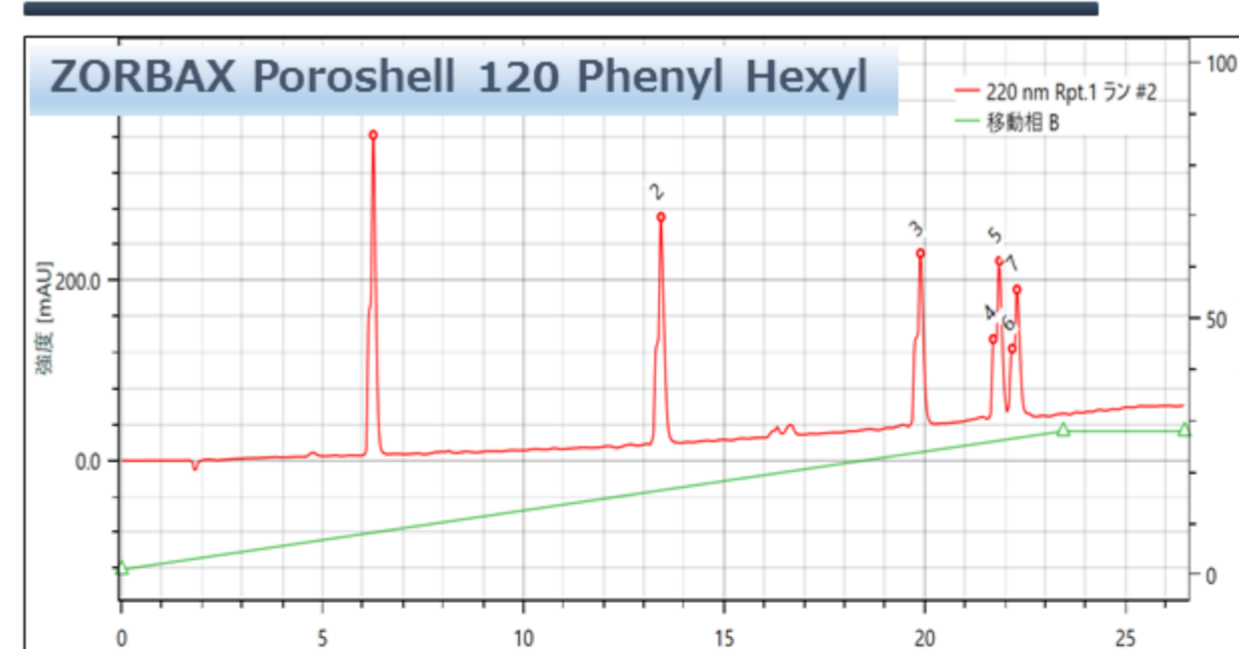
高分子モードを用い、高極性側に溶媒濃度範囲を設定することで、ペプチドのメソッド開発を簡単にできることが分かった

ZORBAX Eclipse Plus Silica C18
0.1% TFA H2O/ACN, 1mL/min, 40℃

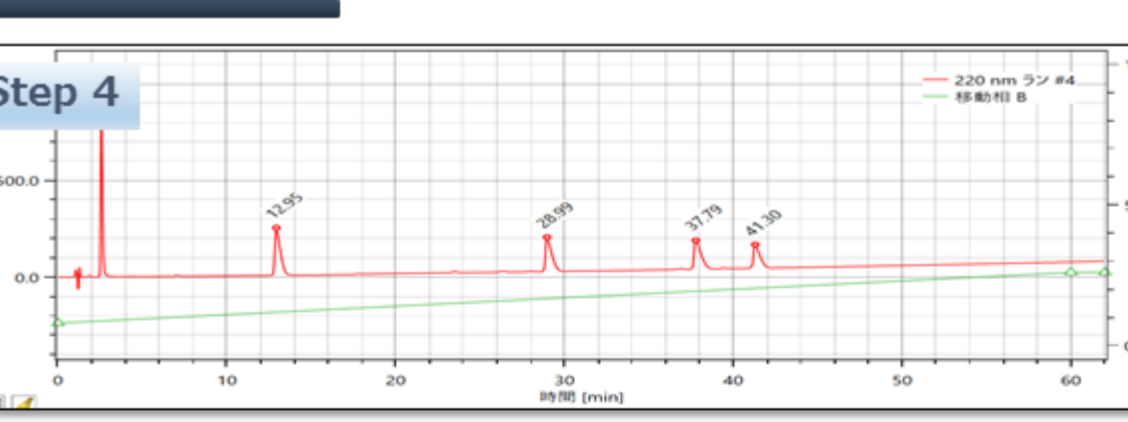
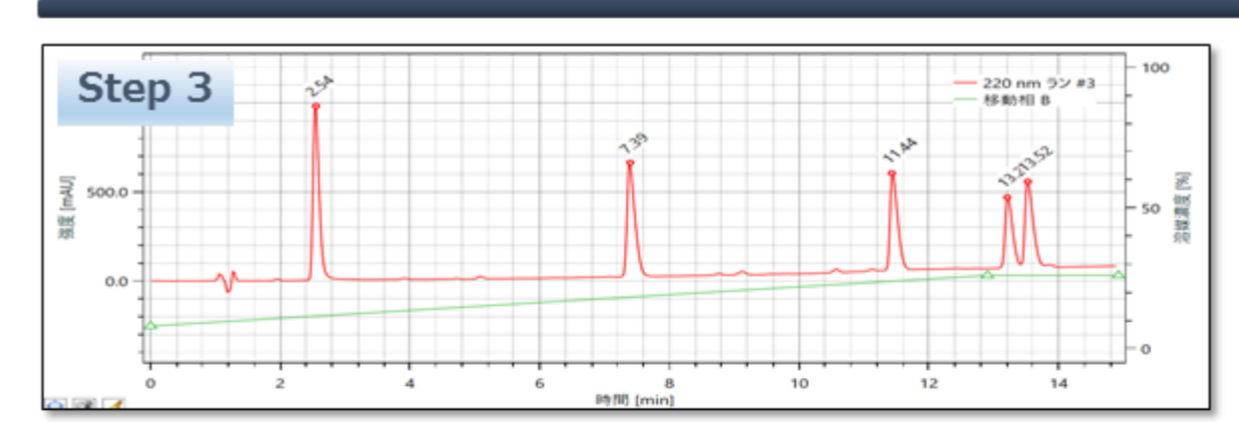


② 自動カラムスクリーニング

0.1% TFA H2O/ACN, 1mL/min, 40℃



③ オフラインシミュレーションによる最適化



最低2回の実データを入力

最適化シミュレーション

