

バイオモノリスプロテイン A による 細胞培養のモノクローナル抗体力価の モニタリング

アプリケーションノート

バイオ医薬品およびバイオシミラー

著者

Phu T Duong
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

バイオ医薬品業界でのモノクローナル抗体製造の後処理には、一般に回収、中間精製、および最終精製の3つのクロマトグラフィー手順が含まれます。プロテイン A は回収手順に頻繁に使用され、優れたスループット (容量および速度) を提供すると同時に、ターゲット分子、つまり免疫グロブリンの濃縮に重要な役割を果たします。高コストの分取や大量のプロテイン A を使用する際に細胞培養上清のモノクローナル抗体の力価と収率をモニタリングするには、小規模 (分析スケール) の手順を使用して、モノクローナル抗体の力価を測定し、モノクローナル抗体を採取する最適な時間を特定する必要があります。このアプリケーションノートでは、充填済みのアジレントバイオモノリスプロテイン A カラムを使用して、細胞上清からモノクローナル抗体の力価をすばやく測定する方法について説明します。



Agilent Technologies

方法および材料

リン酸ナトリウム (一塩基および二塩基)、クエン酸一水和物 (Sigma-Aldrich (p/n C1901))、および *Escherichia coli* 細胞溶解液キットを Sigma-Aldrich Corp. (p/n CB0500) から購入しました。ヒト化 CHO 細胞由来モノクローナル抗体 (IgG1) を Bio-Creative Labs から購入しました。

溶離液 A を平衡化、結合、および再平衡化に使用しました。このバッファには 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4 が含まれます。1 L の 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4 を生成するには、3.1 g の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ と 10.9 g の Na_2HPO_4 (無水) を蒸留水に溶解して 1 L にします。これが 25 °C で pH 7.4 の 0.1 M (100 mM) リン酸ナトリウムバッファです。このバッファは 4 °C で最大 1 か月間保管できます。この原液を脱イオン水で 1:5 に希釈し (200 mL の原液に 800 mL の脱イオン水を加える)、20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4 を得ました。溶離液 B はタンパク質の溶離に使用し、0.1 M クエン酸、pH 2.8 が含まれます。1 L のクエン酸バッファを調製するには、21 g のクエン酸一水和物を計量し、静かに攪拌しながら約 600 mL の水に溶解し、pH が 2.8 になるまで 1 M HCl で調整します。最後に、脱イオン水を使用して、計量フラスコの 1 L の位置までこの溶液を希釈します。

メーカー推奨のプロトコルに従い、*E. coli* 上清を得ました。簡単に説明すると、このキットには Cellytic B、細菌溶解試薬 (500 mL)、リゾチーム溶液 (10 × 1 mL)、ベンゾナーゼ (25,000 単位)、プロテアーゼ阻害剤混合物 (5 mL) が含まれます。1.0 g の細胞ペーストを計量し、10 mL の Cellytic B 試薬、0.2 mL のリゾチーム、0.1 mL のプロテアーゼ阻害剤、および 500 単位のベンゾナーゼと混合しました。この混合物を短時間攪拌し、10 分間混合して (手で、またはシェーカーを使用して)、可溶性タンパク質を抽出しました。次に、混合物を 5,000 × g で 10 分間遠心分離し、不溶性物質を沈殿させました。可溶性タンパク質分画 (上清) を細胞残渣 (遠心管底部の沈殿物) から慎重に取り出しました。Bradford タンパク質アッセイを使用して、上清のタンパク質濃度の概算値を計算しました。

タンパク質の概算濃度は 40 mg/mL でした。説明に従って上清に IgG1 をスパイクしました。つまり、40 mg/mL *E. coli* 上清に 2.5 mg/mL 精製ヒト化 IgG1 をスパイクしました。混合後、混合物を移動相 A (20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4) を使用して 1:1 の比でさらに希釈し、IgG1 は 1.25 mg/mL、*E. coli* 上清は 20 mg/mL の最終濃度になるようにしました。

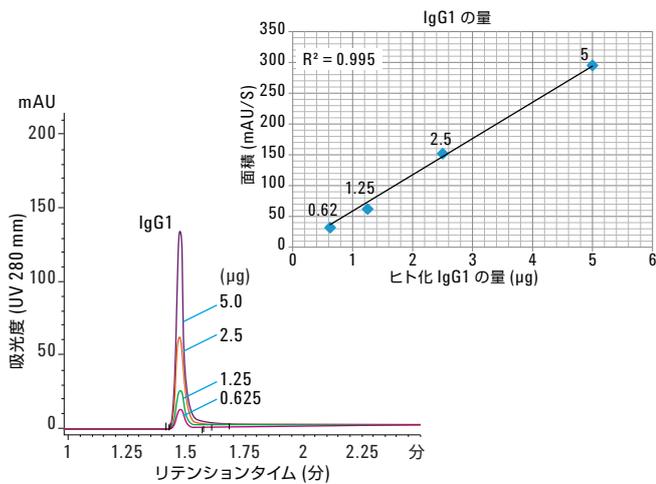
条件

カラム:	アジレントバイオモノリスプロテイン A (p/n 5069-3639)
サンプル:	ヒト化 IgG1 および <i>E. coli</i> 溶解液
溶離液:	A) 20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 B) 0.1 M クエン酸、pH 2.8
注入量:	クロマトグラムを参照
流量:	1.0 mL/min (指定がない場合)
グラジエント:	時間 (分) % B
	0 0
	0.5 0
	0.6 100
	1.7 100
	1.8 0
	3.5 0
温度:	25 °C
検出器:	UV、280 nm
システム:	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータリ LC システム

結果と考察

モノクローナル抗体の力価の定量

モノクローナル抗体の力価および収率の正確な定量は、細胞培養溶解液 (上清) に含まれるモノクローナル抗体の量の測定と採取時間の特定に役立ちます。これは抗体製造の非常に重要な手順です。IgG1 の定量についてのバイオモノリスプロテイン A カラムの能力を示すために、さまざまな量 (μg) の精製済み IgG1 をカラムに注入しました。図 1 に、カラムにロードしたヒト化 IgG1 の量の直線領域 (0.625~5 μg の範囲のヒト化 IgG1 で構成) を示します。この直線の検量線が標準曲線です。この相関関係は、さまざまな濃度範囲の採取細胞培養培地に含まれるモノクローナル抗体の定量にバイオモノリスプロテイン A カラムを使用できることを示しています。このカラムには 0.312 μg のヒト化 IgG1 も注入しました (データポイントは示していません)。ここでの S/N 比は量が 0.312 μg のときの 1:1 よりも高くなりました。最大ロード容量は約 400~500 μg IgG でした。



カラム: アジレントバイオモノリスプロテイン A
 サンプル: ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A: 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 溶媒 B: 0.1 M クエン酸、pH 2.8
 流量: 1.0 mL/min
 グラジエント: 0% B で 0.5 分間保持、100% B で 0.6~1.7 分、
 0% B で 1.8~3 分
 注入: クロマトグラムに示すさまざまな量
 温度: 25 °C
 検出器: UV、280 nm
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

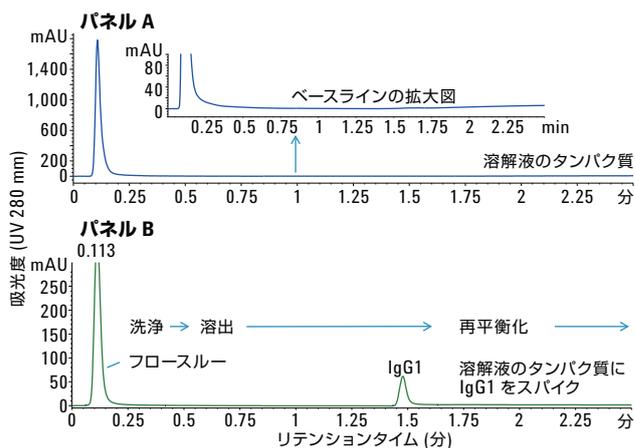
図 1. アジレントバイオモノリスプロテイン A カラムによるモノクローナル抗体の定量

この例では、図 2 のデータは 5~0.625 µg のヒト化 G1 の範囲を示しています。このカラムには 0.312 µg のヒト化 IgG1 も注入しました (データポイントは示していません)。S/N 比は、量が 0.312 µg のときの 1:1 よりも高くなりました。最大ロード容量は約 400~500 µg IgG でした。

採取した細胞培養上清から得られた IgG1 力価の測定

モノクローナル抗体を精製するための最初の手順は、細胞培養溶解液 (上清) 中のモノクローナル抗体を測定することです。このためには、モノクローナル抗体に固有の親和性を持ち、モノクローナル抗体だけを保持、定量できるカラムが必要です。

バイオモノリスプロテイン A カラムの特異性は図 2 を見れば明らかです。上清 (*E. coli* 溶解液のタンパク質) にモノクローナル抗体 (IgG1) が含まれない場合、パネル A のクロマトグラムにはどのタンパク質の保持も示されません。上清のすべてのタンパク質がカラムを通過しました。パネル A のベースラインの拡大図がこれを詳しく示しています。パネル B は、このカラムがモノクローナル抗体だけを取り込み、分離したことを示しています (*E. coli* の上清に IgG1 をスパイク)。IgG1 の量を事前に測定し、前述の標準曲線 (図 1) を使用して再度確認したところ、約 1.25 µg/µL でした。バイオモノリスプロテイン A カラムはモノクローナル抗体だけを取り込み、約 1.4 分で溶離しました。



カラム: バイオモノリスプロテイン A
 サンプル: ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A: 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 溶媒 B: 0.1 M クエン酸、pH 2.8
 流量: 1.0 mL/min
 グラジエント: 0% B で 0.5 分間保持、100% B で 0.6~1.7 分、
 0% B で 1.8~3 分
 注入量: パネル B、*E. coli* 細胞溶解液上清と IgG1 との混合物
 注入量: 2 µL (1.25 mg/mL の IgG1 を 20 mg/mL の *E. coli* 上清にスパイク)
 温度: 25 °C
 検出器: UV、280 nm
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

図 2. アジレントバイオモノリスプロテイン A カラムは、IgG1 をスパイクした採取済み細胞培養から IgG1 だけをすばやく取り込みます。パネル A: *E. coli* 細胞溶解液上清、パネル B: *E. coli* 細胞溶解液と IgG1 との混合物注入量: 2 µL (1.25 mg/mL の IgG1 と 20 mg/mL の *E. coli* 上清との混合物)

IgG1 結合、ピーク面積、カラム背圧に与える流量の影響

3つの異なる流量、1.0、1.5、および2.0 mL/min を使用して、流量が IgG1 結合とカラム性能に与える影響を確認しました (図 3)。変化を容易に観察できるように、この実験では IgG1 および *E. coli* の濃度を2倍にしてロードしました。流量を上げても、カラムの IgG1 結合には影響はほとんどありませんでした (表 1)。未結合タンパク質 (*E. coli* タンパク質) の割合、相対面積、および結合した IgG1 の相対面積は、流量が異なっても変化しませんでした (表 1)。

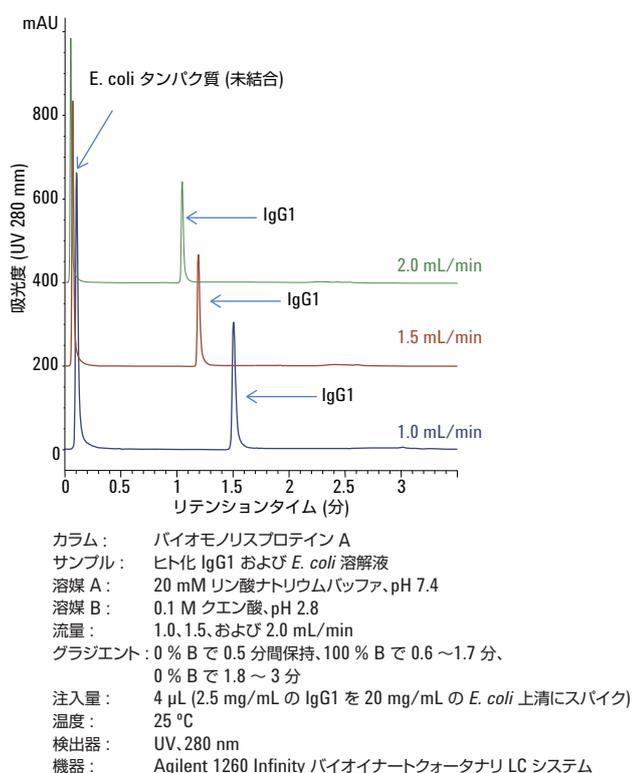


図 3. IgG1 とアジレントバイオモノリスプロテイン A カラムとの結合を複数の流量で評価しました。クロマトグラムの変化と信号の完全性を容易に観察できるように、この実験ではさらに多くのサンプルをロードしました。

表 1 のデータは、流量が増加するとカラム背圧も直線的に上昇することを示しています (図 4)。一般に、1.0 mL/min での操作にはバイオモノリスプロテイン A カラムをお勧めします。ただし、カラムの定格は最大背圧 72 bar です。この特定の機器では、1.0 mL/min におけるカラム背圧は 32 bar となりました。流量を 2.0 mL/min に上げると、カラム背圧は 68 bar まで上昇しました。前述のように、最大背圧においてカラムの IgG1 結合に与える影響は最小限でした。したがって、高い流量で高速分析を行うことが可能です。

表 1. 未結合タンパク質および IgG1 の流量とピーク相対面積の関係

流量 (mL/min)	未結合タンパク質の面積 (mAu/S)	IgG1 の面積 (mAu/S)	未結合タンパク質の相対面積 (%)	IgG1 の相対面積 (%)	圧力 (bar)
1.0	1230	738	63	37	32
1.5	840	492	63	37	47
2.0	636	363	64	36	68

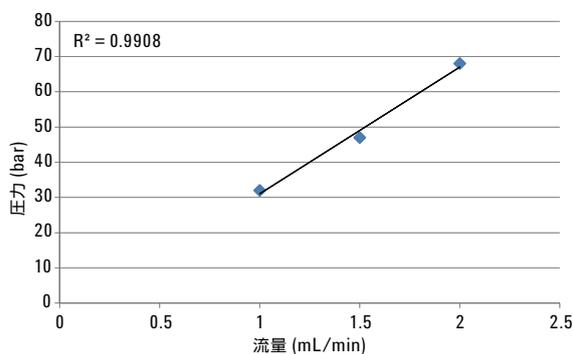
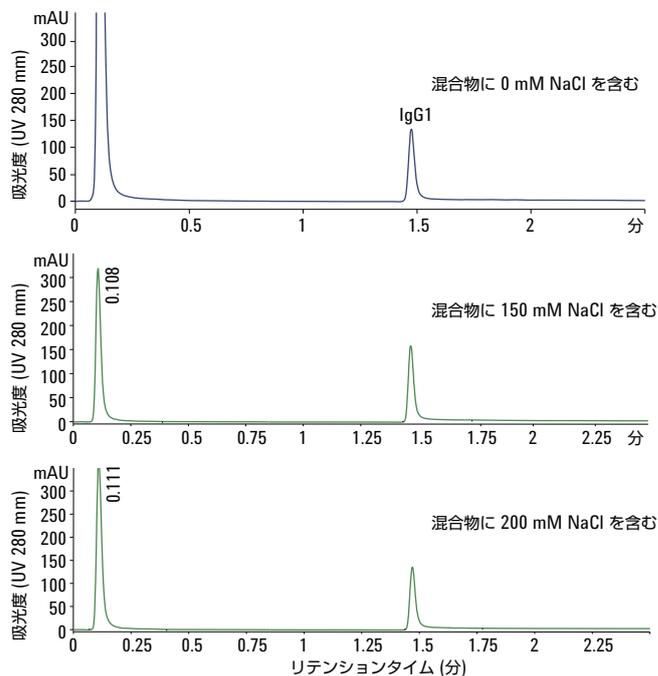


図 4. 流量と背圧の関係。カラム流量を直線的に上げると (1.0、1.5、および 2.0 mL/min)、カラム背圧が直線的に増加します。

耐塩性 - 細胞培養上清とさまざまな濃度の塩を含む IgG1 の混合物

多くの場合、細胞培養上清には、タンパク質を安定化させるために塩化ナトリウム (NaCl) や塩化カリウム (KCl) などの中性塩が含まれます。通常は 100~200 mM の塩濃度を使用します。ただし、塩は、アフィニティおよびイオン交換メソッドなど、多くの精製プロセス向けの強い溶離溶媒です。一部のメソッドでは、わずか 50 mM の NaCl が結合したタンパク質をカラムから溶離させ、分離に用いられるタンパク質をカラムで保持できなくなる場合があります。したがって、アフィニティバイオモノリスプロテイン A カラムが特定量の塩に対する耐性を持っていることが重要です。この実験では、IgG1 と混合した上清を 0~200 mM の NaCl に溶解し、カラムの耐塩性を示しました。図 5 に、0、150、および 200 mM 濃度の NaCl と混合したサンプルのデータを示します。結果から、バイオモノリスプロテイン A カラムが高塩濃度のサンプルに対する耐性を持ち、ピーク形状に歪みも生じないことがわかります。さらに、3 つのすべての塩濃度から得られたピーク面積の計算値では、どの変化も無視できる程度であることが示されています (表 2)。



カラム : バイオモノリスプロテイン A
 サンプル : ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A : 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 溶媒 B : 0.1 M クエン酸、pH 2.8
 流量 : 1.0 mL/min
 グラジエント : 0 % B で 0.5 分間保持、100 % B で 0.6 ~ 1.7 分、
 0 % B で 1.8 ~ 3 分
 温度 : 25 °C
 注入量 : 4 μ L (2.5 mg/mL の IgG1 を 20 mg/mL の *E. coli* 上清にスパイク)
 温度 : 25 °C
 検出器 : UV、280 nm
 機器 : Agilent 1260 Infinity バイオイネートクォータナリ LC システム

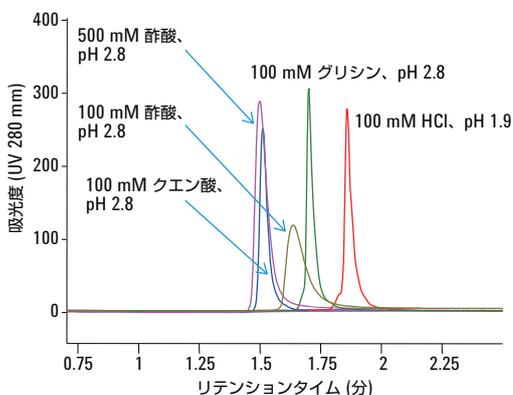
図 5. IgG1 および *E. coli* 上清サンプルをさまざまな塩濃度と混合して、アジレントバイオモノリスプロテイン A カラムに注入し、塩が含まれるサンプルの処理能力を評価しました。注入量 : 2 μ L (1.25 mg/mL の IgG1 と 20 mg/mL の *E. coli* タンパク質との混合物)

表 2. 注入サンプルに塩が含まれる場合のカラム性能への影響は最小限です。

NaCl (mM)	IgG1 の面積 (mAu/S)
0	293
150	312
200	296

さまざまな溶出バッファの影響

図 6 のデータは、溶出バッファがバイオモノリスプロテイン A カラムに与える影響を示しています。このデータは、多くの異なる酸性バッファを使用して IgG1 ピークを溶出できることを明らかに示しています。IgG1 ピークのピーク高さとしリテンションタイムを観察しました。pH 2.8、100 mM 濃度の HCl、グリシン、クエン酸、および酢酸を使用しました。これらの溶出バッファは、IgG1 について異なるリテンションタイムを持つ非常に近いピーク高さを示します。ピーク形状とピーク幅は、100 mM 酢酸を除き非常に類似しています。この溶出バッファの濃度を 500 mM まで上げると、ピーク高さとし形状が他の溶出バッファと同程度になりました。したがって、酸性バッファに基づいてバッファの濃度を決定する必要があります。

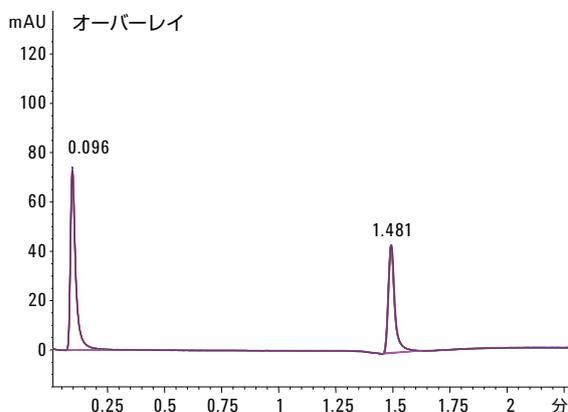
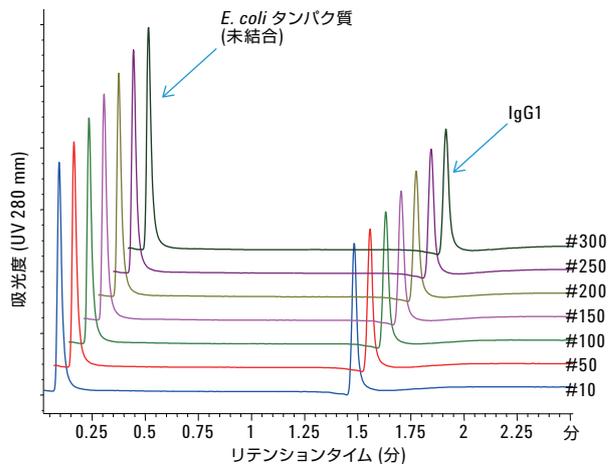


カラム: バイオモノリスプロテイン A
 サンプル: ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A: 20 mM リン酸ナトリウムバッファ, pH 7.4
 溶媒 B: pH 2.8 のさまざまなバッファ
 流量: 1.0 mL/min
 グラジエント: 0% B で 0.5 分間保持、100% B で 0.6~1.7 分、0% B で 1.8~3 分
 注入量: 4 μ L (2.5 mg/mL IgG1)
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 検出器: UV、280 nm
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

図 6. さまざまな溶出バッファが IgG1 のピーク高さとし形状に与える影響。注入量: 4 μ L (1.25 mg/mL の IgG1 と 20 mg/mL の *E. coli* タンパク質との混合物)

再現性 – 定置洗浄前の 300 回の注入

図 7 および表 3 のデータは、カラムの再現性を確認するための 300 回の連続注入の結果を示しています。この結果は、300 回の注入後も、カラムが定置洗浄まで IgG1 の結合および分離能力を失わずに、リテンションタイム、ピーク面積、およびピーク幅の完全性を同一に維持していることを示します。



カラム: バイオモノリスプロテイン A
 サンプル: ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A: 20 mM リン酸ナトリウムバッファ, pH 7.4
 溶媒 B: 0.1 M クエン酸, pH 2.8
 流量: 1.0 mL/min
 グラジエント: 0% B で 0.5 分間保持、100% B で 0.6~1.7 分、0% B で 1.8~3 分
 注入量: 2 μ L (1 mg/mL の IgG1 を 10 mg/mL の *E. coli* 上清にスパイク)
 温度: 25 $^{\circ}$ C
 検出器: UV、280 nm
 機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

注: 注入 20 回ごとに 3 つの洗浄サイクルを使用して、すべての残留物をカラムから確実に溶出させました (サンプル注入なしで前述の分析条件を使用)。

図 7. アジレントバイオモノリスプロテイン A カラムの再現性、定置洗浄前に 300 回注入。注: できる限り多くの残留物をカラムから溶出できるように、注入 20 回ごとにサンプルを含まない 3 回の注入を洗浄手順として使用しました (サンプル注入なしで前述の分析条件を使用)。洗浄データ (本書では示していません) は、20 回の注入でカラム上の残留物が無視できる程度であることを示しています。

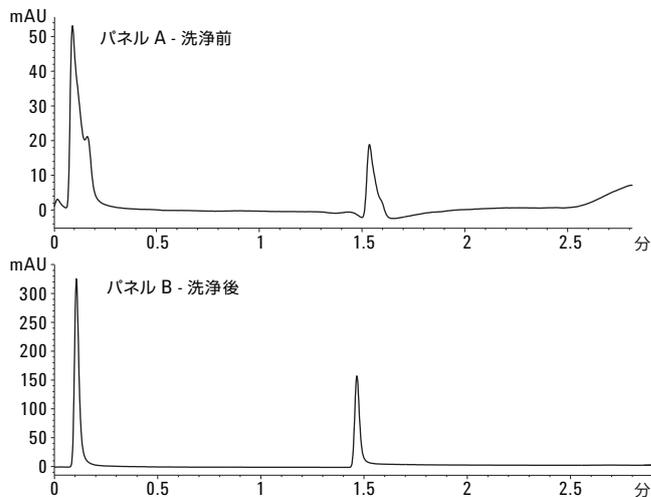
表 3. 定置洗浄前、300 回の注入後の IgG1 のリテンションタイム、ピーク面積、およびピーク幅 (n = 300 の標準偏差は 0.75)

注入回数	IgG1 のリテンション タイム (分)	IgG1 の面積 (mAu/s)	IgG1 のピーク幅 (分)
10	1.48	89	0.02
50	1.48	88	0.02
100	1.48	88	0.02
150	1.48	87	0.02
200	1.48	88	0.02
300	1.48	87	0.02

再生および定置洗浄

パネル A (図 8) は、未結合タンパク質と IgG1 の両方の歪んだピークを示しています。ピークのリテンションタイムもシフトしています。これは、カラムを再生する必要性を示しています。パネル B (図 8) は、提案された手順による洗浄後にカラム性能が復元されたことを示します。簡単に説明すると、バイオモノリスプロテイン A カラムは、1.0 M NaCl、pH 7.0~8.0 が含まれるリン酸ナトリウムバッファなど、カラムボリュームの 20 倍のバッファを使用して 0.5 mL/min で洗浄することにより再生できます。このカラムは低-pH 溶液 (1.0 mM HCl または 1.0 M グリシン-HCl、pH 2.5 など) を使用して 0.5 mL/min で洗浄する必要があります。次に、カラムボリュームの 10 倍の脱イオン水で洗浄し、次の注入の前にカラムボリュームの 20 倍のバッファ A (20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4) で再度平衡化します。

場合によっては、モノリスカラムの簡単な再生では不十分なことがあります。サンプル分子がカラムから完全に溶出しなかったことや、カラム上に析出することもあります。カラム上へのこのような汚染物質の蓄積によって分離能や結合能力が失われ、背圧が上がったり、カラムが完全に詰まったりすることがあります。サンプルに含まれる汚染物質の種類に応じて特定の定置洗浄プロトコルを設定する必要があります。表 4 に適切なプロトコルを示しています。



カラム： アジレントバイオモノリスプロテイン A
 サンプル： ヒト化 IgG1 および *E. coli* 溶解液
 溶媒 A： 20 mM リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4
 溶媒 B： 0.1 M クエン酸、pH 2.8
 流量： 1.0、1.5、および 2.0 mL/min
 グラジエント： 0% B で 0.5 分間保持、100% B で 0.6~1.7 分、
 0% B で 1.8~3 分
 注入量： 2 μ L (2.5 mg/mL の IgG1 を 20 mg/mL の *E. coli* 上清にスパイク)
 温度： 25 $^{\circ}$ C
 検出器： UV-280 nm
 機器： Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

図 8. パネル A は洗浄前のバイオモノリスプロテインカラムを、パネル B は洗浄後にカラム性能が回復したことを示しています。

表 4. 定置洗浄の提案プロトコル。注：プロトコルの最初の手順では、汚染物質がカラムの奥に進入しないように、カラムを 0.2~0.5 mL/min の逆流方向に置く必要があります。

手順	溶液	量 - カラムボリューム
1	0.1 M NaOH	10~20
2	脱イオン水	10~20
3	0.5 リン酸ナトリウムバッファ (濃縮結合バッファ)	10~20
4	結合バッファでカラムを再平衡化	50

結論

アジレントバイオモノリスプロテイン A カラムはモノクローナル抗体に対する非常に高い親和性を持っています。このカラムが 1.4 分以内に上清からモノクローナル抗体だけを取り込み、正確に定量し、採取時間を評価できることは明らかです。カラムを有効に使用することで、データの品質を損なわずに、さまざまな流量でモノクローナル抗体を定量することができます。これまでに説明した、さまざまな溶出バッファに対応するカラムの柔軟性に加えて、含有塩濃度の高いサンプルに対する耐性により、実験手順を容易に設計することができます。

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Printed in Japan

January 8, 2014

5991-2990JAJP



Agilent Technologies