Bio-Monolith Protein G カラム - mAb 抗体価測定用の優れたカラム

アプリケーションノート

生物製剤・バイオシミラー

著者

Phu T. Duong

Agilent Technologies, Inc.

概要

近年、モノクローナル抗体 (mAb) はさまざまな疾患の治療に対応する主要な生物製剤製品の 1 つとなっています。これらの抗体は、病因物質を適切にターゲティングするために、特定の遺伝的体質に合わせて設計されています。これらの抗体の開発では、高収率のクローンを選択するために、プロテイン A、プロテイン G アフィニティ分析カラムを使用して細胞培地上清から抗体価および濃度を測定します。プロテイン A およびプロテイン G カラムの両方で、不活性な重合体のモノリスがサポートとして使用されています。いずれのカラムも抗体に対して高い親和性を備えているため、細胞培地の上清中の抗体にのみ結合し、表 1 に示すように、異なる選択性を持っています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Bio-Monolith Protein G カラムを紹介します。このカラムは高速な分析と高保持容量を実現します。高特異性に対する直線性を示すデータが提供されています。直線性の解析結果により、カラムが細胞培地の上清中の mAb を正確に定量分析できる能力を備えていることが明らかになりました。さらに、寿命解析データにより、カラムの高い再現性と、長い寿命にわたって安定性および低い背圧を持つことが示されました。Bio-Monolith Protein G カラムは、Bio-Monolith Protein A カラムの補完となり、モノクローナル抗体の抗体価測定用カラムの新たな選択肢となります。

Agilent Technologies

表1. 異なる IgG サブクラスに対する Agilent Bio-Monolith Protein A および Protein G の結合親和性 [1、2]。

抗体	Protein A	Protein G
ヒト		
ヒト IgG1	++++	++++
ヒト IgG2	++++	++++
ヒト IgG3	–	++++
ヒト IgG4	++++	++++
ヒト IgA	++	–
ヒト IgD	++	–
ヒト IgE	++	–
ヒト IgM	++	–
マウス		
マウス IgG1	+	++
マウス IgG2a	++++	++++
マウス IgG2b	++++	+++
マウス IgG3	+	+++
マウス IgM	+/–	–
抗体フラグメント		
ヒト Fab	+	+
ヒト F(ab')2	+	+
ヒト scFv	+	+
ヒト Fc	+	+
ヒト K	+	+
ヒト λ	+	+

++++ = 強い親和性
+++ = 中位の親和性
++ = 弱い親和性
+ = わずかな親和性
– = 親和性なし

材料とメソッド

- リン酸二水素ナトリウム一水和物 (Sigma-Aldrich Corp. p/n S3522) (MW 137.99)
- リン酸水素二ナトリウム二水和物 (Sigma p/n 71643) (MW 177.99)
- クエン酸一水和物 (Sigma p/n C7129) (MW 210.14)
- 塩化ナトリウム (Sigma p/n S5886) (MW 58.44)
- リン酸、85 wt % in H_2O、99.99% 微量金属元素分析用 (Aldrich p/n 345245)
- 水酸化ナトリウム溶液、50〜52 %、IC 用 (FLUKA 72064) (MW 40)
- グリシン、電気泳動用、¡99 % (Sigma p/n G8898) (MW 75.07)
- 氷酢酸 (Sigma p/n A9967) (MW 60.05)
- 塩酸、36.5〜38.0 %、BioReagent、分子生物学用 (Sigma p/n H1758)
- Escherichia coli 細胞溶解液キット (Sigma p/n CB0500)
- Creative Biolabs 社のチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞上清および溶解液、昆虫細胞上清、ヒト化 CHO 細胞由来モノクローナル抗体 (IgG2 および IgG3)

メソッド

移動相 A は結合および洗浄バッファで、50 mM のリン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4 を含んでいます。2 つの原液 (0.2 M) は、リン酸二水素ナトリウム一水和物 27.6 g を水に溶かした液 1 L と、リン酸水素二ナトリウム二水和物 35.6 g を水に溶かした液 1 L です。

50 mM のリン酸ナトリウムバッファと 50 mM の塩化ナトリウムを含む pH 7.4 の 2 L のリン酸ナトリウムを作るには、

1. 195 mL のリン酸二水素ナトリウム一水和物原液と 305 mL のリン酸水素二ナトリウム二水和物を混合します。マグネティックスターラーを使用して撹拌します。
2. 5.8 g の塩化ナトリウムを加えて、撹拌し続けます。
3. 1 L の脱イオン水を加えます。
4. 溶液の pH を測定し、pH 7.4 になるように NaOH または 3 M リン酸で調整します。
5. 溶液を 2 L の計量フラスコに注ぎ、水をマークまで追加します。

移動相 B は、21 g のクエン酸一水和物を約 600 mL の水中で撹拌して溶解することによって作った 0.1 M クエン酸 pH 2.0 を含む溶出バッファです。pH 2.0 になるように 1 M HCl で調整した後、水で溶液を希釈して計量フラスコ中で 1 L にします。

CHO 細胞上清、溶解液、昆虫細胞溶解液 (すべてのサンプルはスピン済み)、ヒト化モノクローナル IgG1、IgG2、IgG3 は Creative Biolabs (ニューヨーク) から購入しました。

Escherichia coli 溶解液は Sigma-Aldrich Corp の推奨プロトコルに従って前処理しました [3]。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) が含まれています。溶解液は、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、500 単位のベンゾナーゼに 1.0 g の細胞ペーストを加えて準備します。この混合物を短時間ボルテックスし、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確実に抽出します。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す。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す。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することができます。この場合は 40 mg/mL です。

その後、いくつかの上清に、IgG1、IgG2、IgG3 をスパイクします。上清を最終濃度 10 mg/mL になるまで結合バッファ (バッファ A) で希釈し、IgG1、IgG2、IgG3 のような精製済みのヒト化単一モノクローナル抗体を 2 mg/mL となるよう、スパイクします。

分析条件

カラム:	Agilent Bio-Monolith Protein G、直径 5.2 mm、長さ 4.95 mm (p/n 5190-6900)
結合バッファ:	A、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4
溶出バッファ:	B、0.1 M クエン酸、pH 2.0
サンプル:	クロマトグラムを参照
注入量:	クロマトグラムを参照
流量:	1.0 mL/min (または、クロマトグラムを参照)
グラジエント:	時間 (分) % A 0 100 0.4 100 0.5 0 2.0 0 2.1 100 4.2 100
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ナリ LC

結果と考察

特異性と選択性

A表 1 に示されるように、Protein G カラムは、Protein A カラムと比べて異なるヒト化モノクローナル抗体サブクラスに対して強い結合親和性を備え、Protein G のみが IgG3 サブクラスに対する親和性を備えています。図 1A のデータは Bio-Monolith Protein G カラムの特異性および抗体価のモニター能力、つまり上清に含まれる抗体の存在や濃度を示しています。カラムに、CHO 細胞の上清にスパイクされた精製済みの遺伝子組み換えヒト化 mAb である IgG3 を含むサンプルを注入しました。この mAb は CHO 細胞株内で発現しました。Protein G カラムでのみ IgG3 は取り込まれ 1.0 mL/min で約 1.6 分に溶出されたこと、一方で、すべての宿主細胞タンパク質はカラムによって取り込まれず、フロースルーピークで溶出されたことをデータは示しています。

Protein A カラムと Protein G カラムの選択性が異なることを示すために、それぞれのカラムに個別にモノクローナル抗体 IgG1、IgG2、IgG3 を注入しました。IgG1 と IgG2 は 2 つのカラムで取り込まれましたが (データは示されていません)、IgG3 は Bio-Monolith Protein A では取り込まれません。IgG3 はフロースルーピークとして溶出されました。そして、IgG3 は Bio-Monolith Protein G カラムによってのみ取り込まれて溶出されました (図 1A と図 1B を比較)。

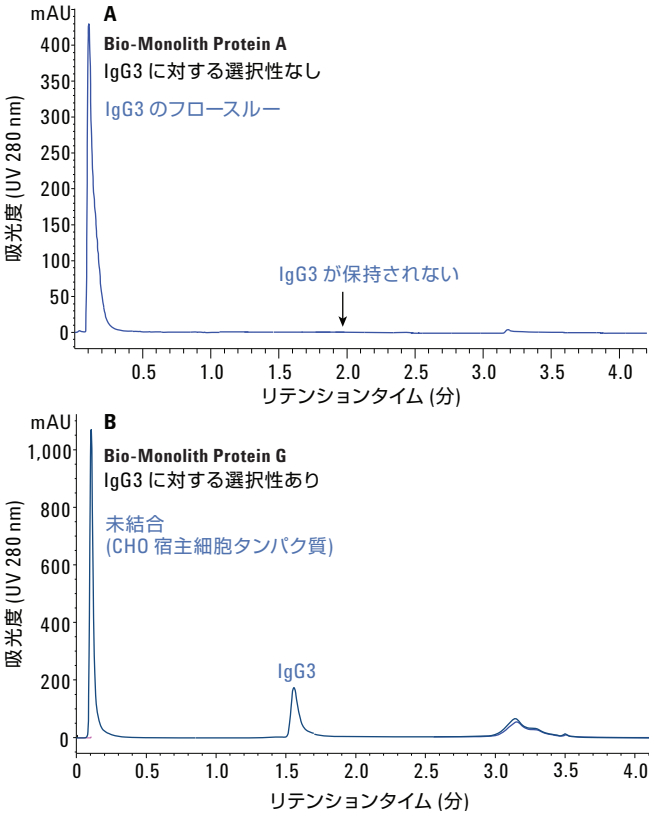

図 1.A) IgG3 は Bio-Monolith Protein A カラムでは結合されません。IgG3 はフロースルーピークとして溶出されました。2 mg/mL のヒト化 IgG3 が結合バッファと混合されました (3 µL がカラムに注入されました)。B) Agilent Bio-Monolith Protein G カラムは IgG3 がスパイクされた細胞培養液 (5 µL の 2.0 mg/mL IgG3 が 10 mg/mL CHO 細胞上清と混合されカラムに注入) から短時間で IgG3 のみを取り込みました。

より厳しいテストを実行して Bio-Monolith Protein G カラムの特異性が宿主細胞タンパク質との結合親和性を持たないことが確認できました。E. coli 細胞溶解液、CHO 細胞溶解液、CHO 細胞上清、昆虫細胞溶解液からの宿主細胞タンパク質サンプルを使用しました。これらの溶解液は、カラムに対する非特異性結合に大きな影響を与えるドデシル硫酸ナトリウムを含む溶解バッファによって抽出された宿主細胞タンパク質を含んでいました。これらのサンプルは抗体を含まず、宿主細胞タンパク質のみを含んでいました。カラムが適切に設計されていない場合は、試験結果は特異性の低いものになるでしょう。図 2 は、任意の宿主細胞上清のタンパク質が、カラムと親和性を持っていないことの証拠です。すべての宿主タンパク質はフロースルーピークとして溶出されました。データから、Bio-Monolith Protein G カラムは宿主細胞タンパク質とのいかなる親和性も持っていなかったことが分かります。

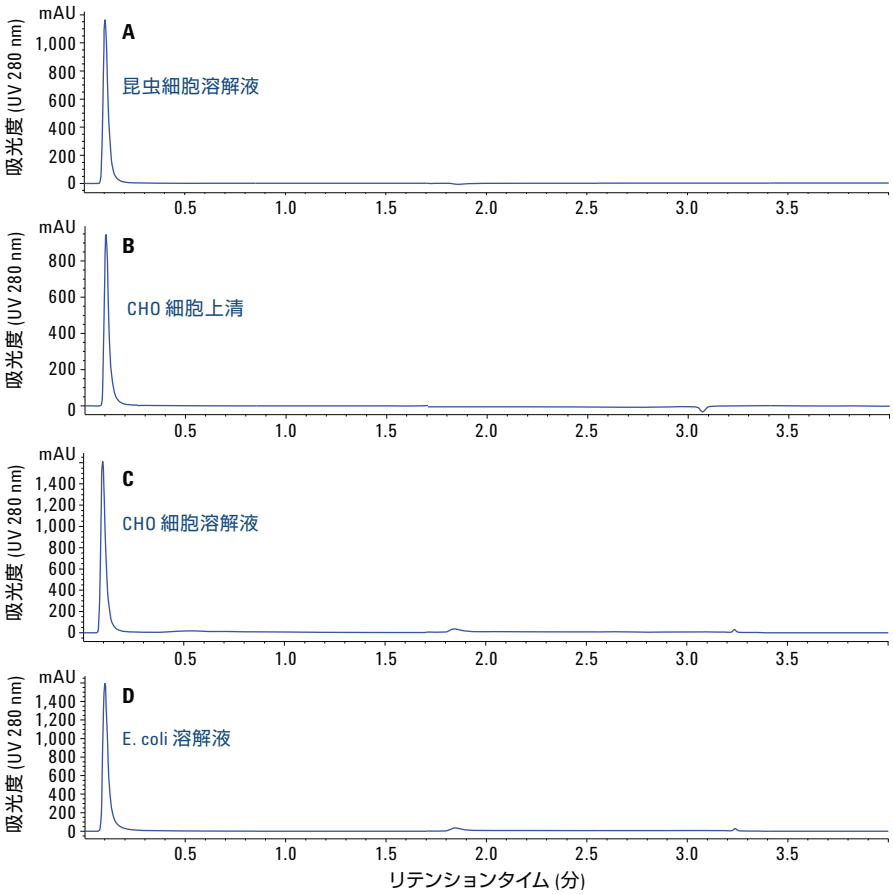

図 2.Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの特異性タンパク質が 10 mg/mL となるよう結合バッファで希釈し、5 µL 注入A) 昆虫細胞溶解液、B) CHO 細胞上清、C) CHO 細胞溶解液、D) E. coli 溶解液

正確な定量

開発の初期段階での細胞株の選択や、製造段階で最適な培養時間を決定するには、mAb 抗体価の正確な定量が不可欠です。mAb の正確な定量における Bio-Monolith Protein G カラムの能力を示すために、さまざまな量 (µg) の精製済み IgG をカラムに注入しました。得られたピーク面積対 IgG の量のデータを使用して、直線性のある線を構成し、分析の正確さを決定しました。図 3 は Protein G カラムからのピーク面積の直線性を示し、収穫細胞培地に含まれるさまざまな濃度範囲の mAb の定量にカラムを使用できることが分かります。カラムにはほんの 2 µg の IgG が注入されました。S/N 比は、2 µg の場合 1:1 よりも高くなりませんでした (データは示されていません)。このカラムの最大保持容量は約 400〜500 µg IgG (データは示されていません) で、細胞株の選択と製造中に達する濃度の範囲をカバーしています。

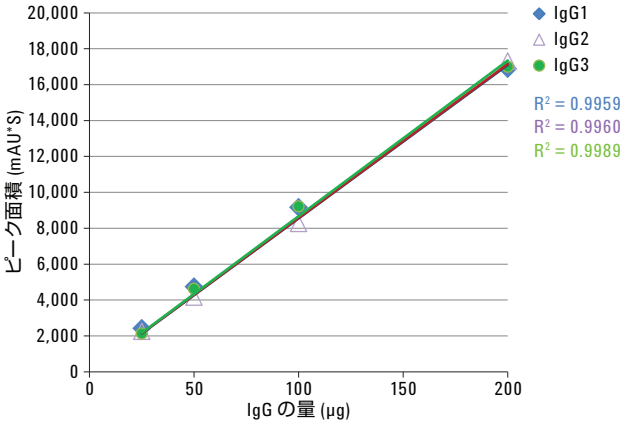

図 3.Agilent Bio-Monolith Protein G カラムによるモノクローナル抗体の直線性。検量線は、25〜200 µg の IgG のピーク面積データを含んでいます。

別のベンダーのプロテイン G カラムよりも広い保持範囲

図 4A は、Bio-Monolith Protein G カラムと別のベンダーの 2.1 × 30 mm、4,000 Å、プロテイン G カラムの直線性を IgG3 の広い保持範囲について比較したものです。アジレントのカラムが形成した直線性のある保持範囲は 25〜200 µg IgG3 でしたが、もう一方のカラムではベンダーの技術資料で推奨されているように 25〜100 µg IgG3 のみで直線性のあるデータを示しました。大きな保持容量範囲で直線性を示さないのは、カラムが大きな保持範囲ですべての mAb を保持することができないためです。実際、図 4B に示すように別のベンダーのプロテイン G カラムには 200 µg の保持範囲で mAb の漏出ピークがあります (一部の IgG3 はカラムに保持されずフロースルーピークとして溶出されました)。

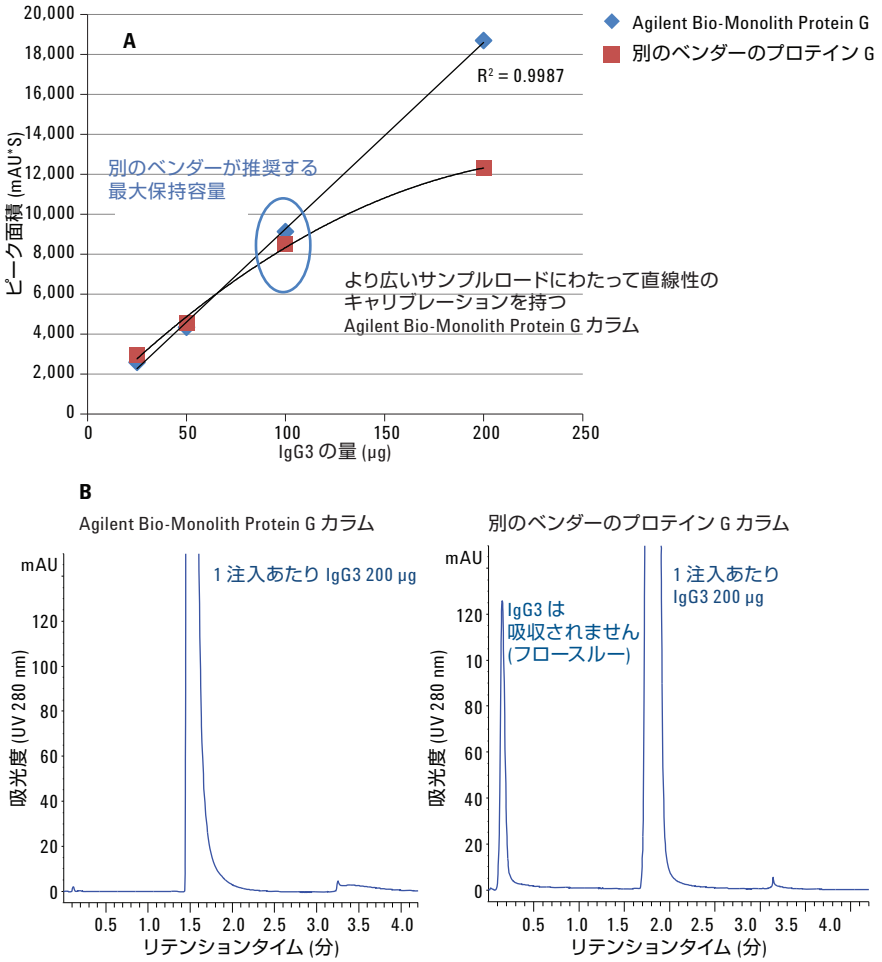

図 4. A) Agilent Bio-Monolith Protein G カラムと別のベンダーのプロテイン G カラムの直線性のある保持範囲の比較B) 200 µL 未満の保持で、別のベンダーのカラムは、Bio-Monolith Protein G では観察されないフロースルーを示します。このように、Bio-Monolith Protein G はより高い保持容量を備えています。

高速分離

Bio-Monolith Protein G は高速分離が可能です。図 5 には、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min と、さまざまな流量で IgG3 を分析した結果を示しています (カラムは最高 3.0 mL/min で使用できます。データは示されていません)。表 2 に流量と動作グラジエントを示します。

流量が増加すると、IgG3 ピークの保持は短くなります。しかし、すべての流量間で相対ピーク面積は類似していました。つまり、カラムは同様の回収率をすべての流量で示します (表 3)。

表 2. Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの保持能力の評価で使用された流量と動作グラジエント。

時間 (分)	%A	%B
1.0 mL/min		
0	100	0
0.4	100	0
0.5	0	100
1.7	0	100
1.8	100	0
4.2	100	0
1.5 mL/min		
0	100	0
0.3	100	0
0.4	0	100
1.3	0	100
1.4	100	0
3.0	100	0
2.0 mL/min		
0	100	0
0.2	100	0
0.3	0	110
0.9	0	100
1.0	100	0
2.1	100	0
2.5 mL/min		
0	100	0
0.1	100	0
0.3	0	100
0.7	0	100
0.8	100	0
1.7	100	0

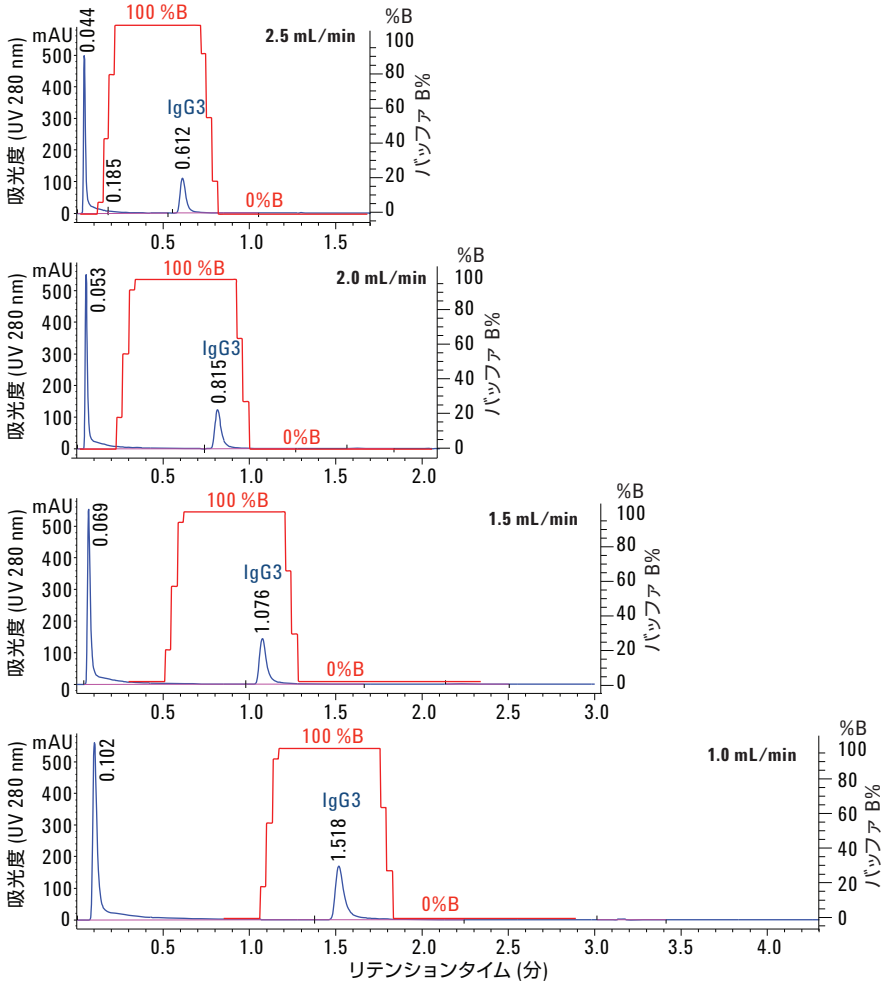

図 5. 複数の流量での IgG3 と Agilent Bio-Monolith Protein G カラムとの結合の評価。5 µL の注入 (2.0 mg/mL の IgG3 と 5 mg/mL の CHO 細胞宿主タンパク質との混合物)。

表 3. Agilent Bio-Monolith Protein G カラムは、すべての流量で同様なフロースルーと IgG3 ピークの相対パーセントを提供。

流量 (mL/min)	総面積 (mAuU*S)	フロースルーピーク面積 (mAU*S)	フロースルーピーク相対面積 (%)	IgG3 ピーク面積 (mAU*S)	IgG3 ピーク相対面積 (%)
2.5	798	521	65.3	277	34.7
2.0	1,056	709	67.1	347	32.9
1.5	1,390	932	67.1	458	32.9
1.0	2,069	1392	67.3	677	32.7

図 6 はカラムの背圧の直線性のある線を示しています。カラムを 0.5 mL/min 間隔でテストし、1 から 2.5 mL/min に増加すると背圧は直線的に増加しました。カラムの最大背圧は 150 bar です。Bio-Monolith Protein G カラムの標準的な分離流量は 1.0 mL/min です。機器の流量を 1.0 mL/min に設定したときのカラム背圧は約 24 bar でした。流量が 2.5 mL/min に増加すると、カラムの背圧は約 60 bar に増加しました。前述のように、最大背圧においてカラムの IgG 結合に与える影響は最小限でした。

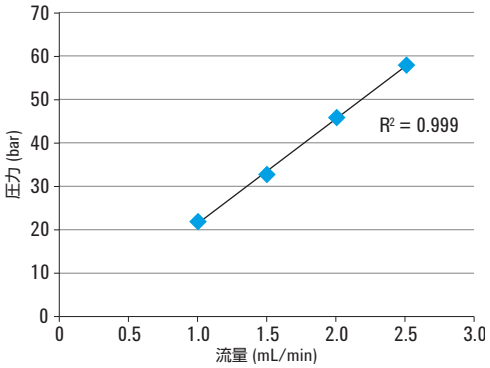

図 6. 流量と背圧の関係。流量が直線的に増加すると、Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの背圧が直線的に増加しました。

さまざまな溶出バッファの互換性

図 7 は Bio-Monolith Protein G カラム用のさまざまな溶出バッファの互換性を示しています。IgG3 のピークは多くの異なる酸性溶離液によって溶出されます。表 4 は酸性溶離液の強度と pH を示しています。12 mM HCl 以外の溶離液は同様のリテンションタイムでカラムから IgG3 を溶出することができます (他の IgG についても同様のデータが観察されました)。他の溶出バッファによって溶出される IgG3 ピークのリテンションタイムに比べると、12 mM HCl の IgG3 ピークのリテンションは長くなりました。この溶出バッファは、濃度を 0.1 M に上げると、他の溶出バッファと同様のリテンションで IgG3 を溶出するのに十分な強度を得ました。

各酸性溶離液がわずかに異なるピーク幅およびテーリングファクターで IgG3 ピークを形成したことも注目に値します。IgG のリテンションタイム、ピーク幅、テーリングファクターが、酸性溶離液の種類と強度に依存していることが、示唆されています。したがって、適切な IgG 分析のためには、酸性溶離液の種類や濃度は、検討のうえ決定されなければなりません。

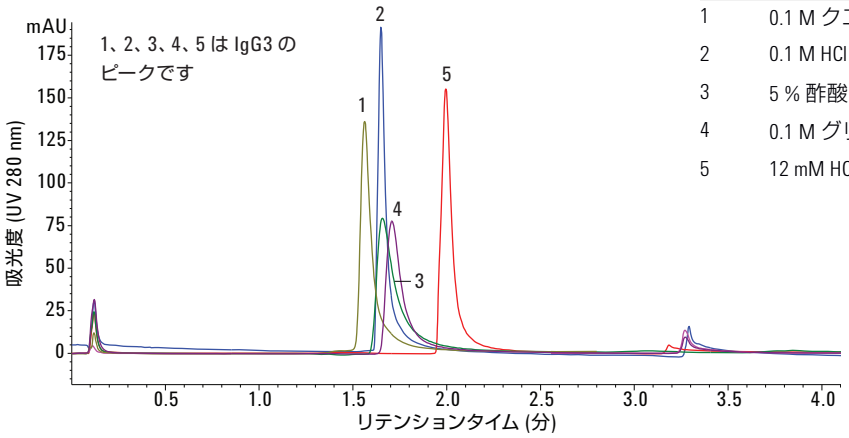

図 7. 異なる酸性溶離液によって Agilent Bio-Monolith Protein G カラムから溶出されたヒト化 IgG3 のピーク。

表 4. さまざまな酸性溶離液の互換性と IgG に与える影響

ピーク番号	酸	PW (ピーク半値幅)	5% TF	圧力 (bar)、1 mL/min
1	0.1 M クエン酸 pH 2.0	0.058	1.68	24
2	0.1 M HCl	0.053	1.58	24
3	5 % 酢酸	0.071	1.85	24
4	0.1 M グリシン	0.075	1.82	24
5	12 mM HCl	0.068	1.69	24

定置洗浄後のカラム性能の回収率

図 8 は定置洗浄後 (CIP) に Bio-Monolith Protein G カラムが完全な性能を回復できることを示しています。カラムには、CHO 細胞上清に IgG3 をスパイクした溶液が 1,000 回以上注入された後、IgG3 が注入されました。カラムが汚れると、IgG3 のピーク幅が広がりピーク高が低くなったことが、データからわかります (定置洗浄前後の図 8A と図 8B を比較)。カラムが一部の IgG3 を取り込めず、IgG3 がフロースルーピークとして溶出したこともわかります (図 8、クロマトグラム A)。

カラムを洗浄した後、完全な性能を回復し、IgG3 を完全に取り込みました (図 8B を参照)。図 9 はカラムが適切に洗浄される前後での広いダイナミック保持範囲の直線性の比較データを示しています。CIP の前後の IgG3 ピーク面積は極めて類似し高い直線性を示しています。カラムが効果的に洗浄され、表 5 に記載された清浄プロトコルを使用できることがデータから示されました。

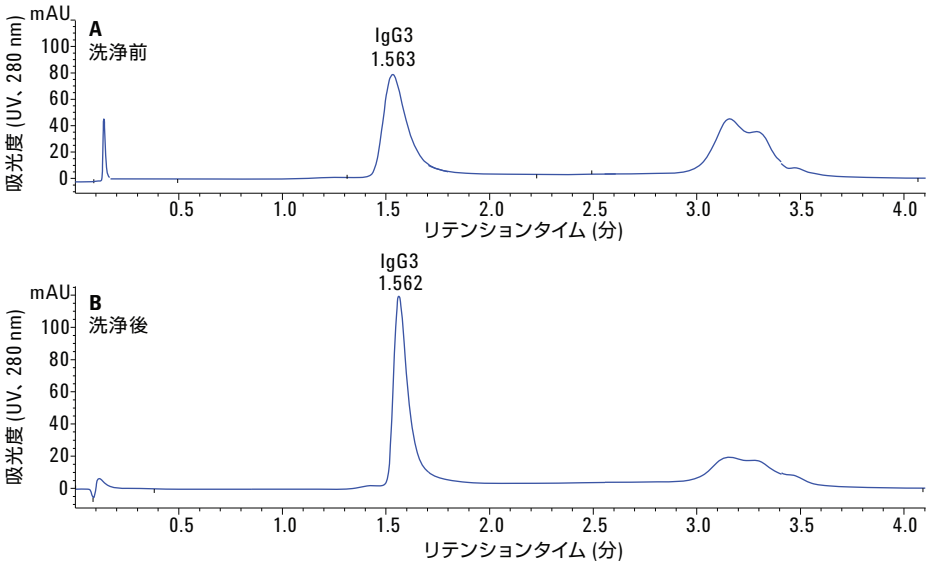

図 8. A) 1000 回の注入後、Agilent Bio-Monolith Protein G カラムに IgG3 を注入しました。カラムは汚れていました。B) カラムを洗浄して完全に性能を回復しました。

表 5. Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの定置洗浄プロトコル。
残存している汚染物質がカラムに入るのを防ぐため、このプロトコルの最初のステップにおいて 0.2〜0.5 mL/min で逆方向に流しました。

ステップ	溶液	洗浄カラム容量 (CV)
1	0.1 M NaOH	10〜20
2	脱イオン水	10〜20
3	0.5 M リン酸ナトリウムバッファ、pH 7.4	10〜20
4	結合バッファによりカラムを再平衡	50

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。夾雑物がカラムから完全に溶出しないことや、カラム内に析出することがあります。カラム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。ユーザーガイドでは、この他の再生に関する提案を紹介しています。

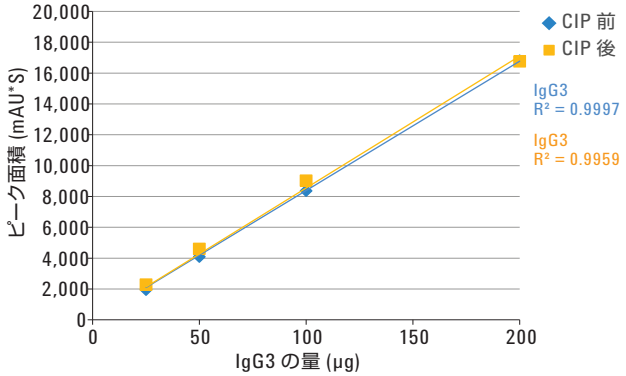

図 9.定置洗浄前後での Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの直線性の比較

寿命と再現性

図 10 と 11 は、1,000 回連続して IgG3 と CHO 細胞上清に溶解液を加えたものを Bio-Monolith Protein G カラムに注入した結果を示しています。カラムは 40 回 CHO 細胞上清 + 溶解液が注入された後、10 回 IgG3 が注入されました。このシーケンスは 1,000 回の注入が洗浄のために停止することなく連続的に設定されました。結合、分離、溶出能力に関するカラム性能を犠牲にすることなく、IgG3 のピークリテンションタイムおよびピーク面積 (図 9)、ピークテーリングファクターおよびピーク幅 IgG3 (図 10) の完全性はほとんど変化しませんでした。

図 11 は 1,000 回注入実験の過程中、ピーク幅およびテーリングファクターへの影響がごくわずかであることを示しています。

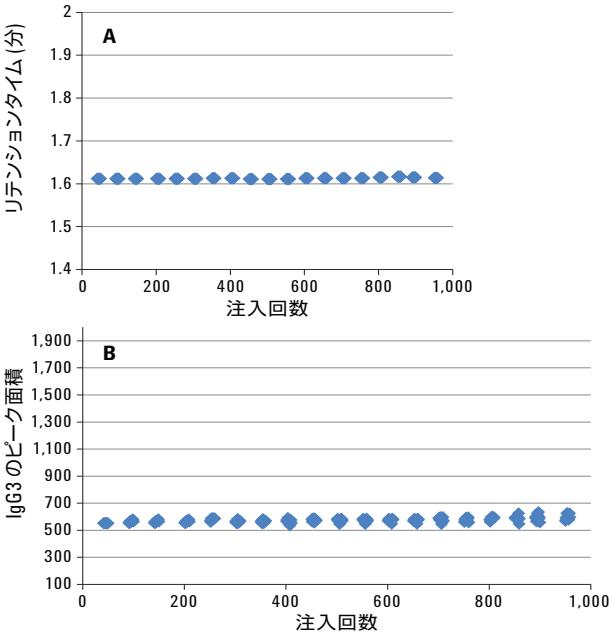

図 10. 1,000 回以上注入し定置洗浄しない場合の Agilent Bio-Monolith Protein G カラムの再現性。A) リテンションタイム。B) IgG3 のピーク面積。40 回注入した後に 10 回の注入が記録され、1,000 回にわたって注入を実行しました。IgG3 のリテンションタイムとピーク幅は変化しませんでした (標準偏差 = 2.5、n = 100)。

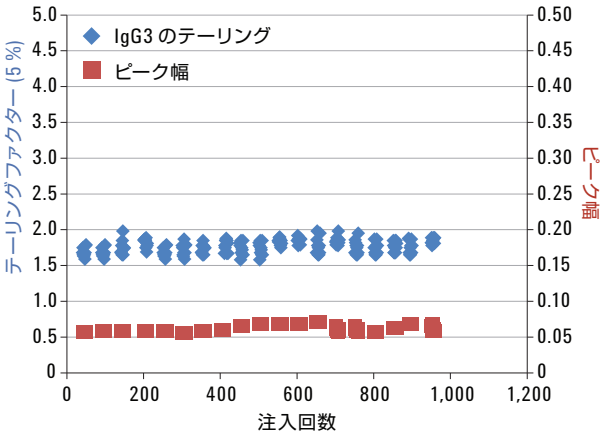

図 11. Agilent Bio-Monolith Protein G カラムへの 1,000 回の注入での IgG3 ピークのピーク幅とテーリングファクターの一貫性。

結論

Agilent Bio-Monolith Protein G カラムはモノクローナル抗体のサブクラスに対する高い親和性を持っています。上清からの mAb について直線性のある広い保持範囲にわたって取り込むことができ正確に定量できます。カラムを有効に使用することで、データを犠牲にせずに、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。動作背圧は極めて低く、Bio-Monolith Protein G カラムが 600 bar 未満の HPLC 機器で動作できることが示されました。カラムとさまざまな酸性溶離液を組み合わせることで、条件に応じた測定を簡単に実行することが可能です。Agilent Bio-Monolith Protein A および Protein G カラムは補完的に使用でき、Protein G は Protein A とは結合しない mAb に対する親和性を備えています (逆も同様)。これらのカラムは、広い範囲の mAb 変異体の抗体価を迅速に測定するための手段を提供します。

References

1. Richman, D. D.; Cleveland, P. H.; Oxman, M. N.; Johnson, K. M. The binding of 1. Staphylococci protein A by the sera of different animal species. J. Immunol. **1982**, 128, 2300-2305.
2. Frank, M. B. Antibody Binding to Protein A and Protein G beads; 5. In Molecular Biology Protocols; Frank, M. B., Ed.; Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA, **1997**.
3. Anon. CelLytic B Plus Kit. Catalog numbers CB0500 and CB0050. Technical Bulletin. Sigma-Aldrich, Corp. St. Louis, MO, USA.

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.aglient.com/chem/jp) をご覧ください。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015, 2017, 2018

Printed in Japan July 6, 2018
5991-6094JAJP

Agilent Technologies