アプリケーションノート

バイオ医薬品

堅牢性と信頼性に優れた遺伝子組み換え Protein A Monolith カラムによる抗体価測定

著者

Te-Wei Chu and
Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

未精製の細胞培地の上清を迅速にスクリーニングすることにより、生物製剤抗体の製造時における最適な採取時間を決定できます。Bio-Monolith カラムと遺伝子組み換えプロテイン A アフィニティリガンドを使用することには複数のメリットがあります。まず、Bio-Monolith 構造には幅広い貫通孔があり、詰まりのリスクを最小限に抑えられます。また、遺伝子組み換えプロテイン A は、天然プロテイン A に関連する IgG に対して選択性を提供しますが、リガンド純度が高くなり構造が堅牢になります。最後に、このカラムはスモールスケール精製にも使用できるため、特に重要品質特性（CQA）の測定において、他の分析技法を使用できます。

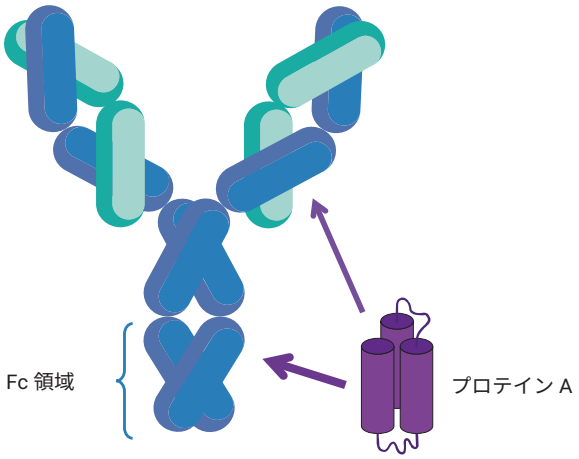

図 1. プロテイン A の免疫グロブリン G（IgG）との相互作用

はじめに

天然プロテイン A は黄色ブドウ球菌から分離された表面タンパク質であり、さまざまな種の多数の異なるタイプの免疫グロブリンの Fc 領域に対する高い結合親和性を備えています。天然プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーは、未精製の細胞培地の上清からモノクローナル抗体を精製する際の最適なメソッドとなっています。遺伝子組み換えプロテイン A にはさらなるメリットがあり、純粋な形状で生成でき、固定相への固定化により理想的な方向で最適な結合を実現するように設計できます。

また、カラム寿命の延長にも有用であり、遺伝子組み換えプロテイン A を用いない場合は、細胞培地の上清が持つ未精製の性質によって寿命が短くなる場合もあります。寿命の延長が可能になるのは、カラムクリーンアップに求められる厳しい条件への耐性が、天然 Protein A カラムよりも高いためです。

このアプリケーションノートでは、アジレントの新しい遺伝子組み換え Protein A Bio-Monolith カラムの寿命を試験します。

実験方法

試薬および調製

すべての化学製品および試薬は HPLC グレード以上のものを使用しており、Sigma-Aldrich（現 Merck）または VWR Scientific から入手しました。水は、Milli-Q A10（Millipore）を用いて精製しました。

サンプル

サンプルは、1 mg/mL の遺伝子組み換え IgG モノクローナル抗体を含むバイオリアクタから収集した、未精製のチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞培地の上清を用いました。

装置構成

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC を次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ（G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンプラ（G5668A）、サンプル冷却器（オプション #100）を搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（G7116A）、バイオイナート熱交換器（オプション #019）を搭載
- Agilent 1260 Infinity II 可変波長検出器（G7114A）

メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	Bio-Monolith rProtein A、 4.95 × 5.2 mm （p/n 5190-6903）
結合バッファ（溶出液 A）	50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4
溶出バッファ（溶出液 B）	100 mM クエン酸、pH 2.6
クリーンアップバッファ	1）100 mM リン酸ナトリウム中に 1 M の NaCl、pH 7.4 2）50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4 中に 20 % の イソプロパノール
グラジエントプロファイル	時間　%B 0.0 ～ 0.5　0（結合） 0.6 ～ 1.8　100（溶出） 1.9 ～ 4.0　0（再コンディショニング）
流量	1 mL/min
カラム温度	24 °C
検出	UV、280 nm
注入量	必要に応じて 1 ～ 20 µL

結果と考察

以前の研究[1]の場合と比較してさらに高濃度の宿主細胞タンパク質を含む未精製の細胞培地の上清溶液を選択し、Bio-Monolith rProtein A カラムの堅牢性について調査しました。

結合、溶出、カラムの再コンディショニングのステップグラジエントを含む反復シーケンスを使用しました。250 回注入ごとの結果を、図 2、3、および 4 に示します。1,500 回の注入後、クリーンアップバッファを使用して、カラム再生ステップ（「メソッド条件」を参照）を導入しました。その後、このステップを 500 回注入ごとに実行しました。このような分析困難な未精製のサンプルマトリックスで予想されたように、圧力が段階的に増大しました（図 5）。

ただし、図 6 と 7 からわかるように、定期的なクリーンアップにより、3,000 回の注入を通して、カラムは一貫して信頼性の高いピーク面積と抗体価分析を継続して実現しました。

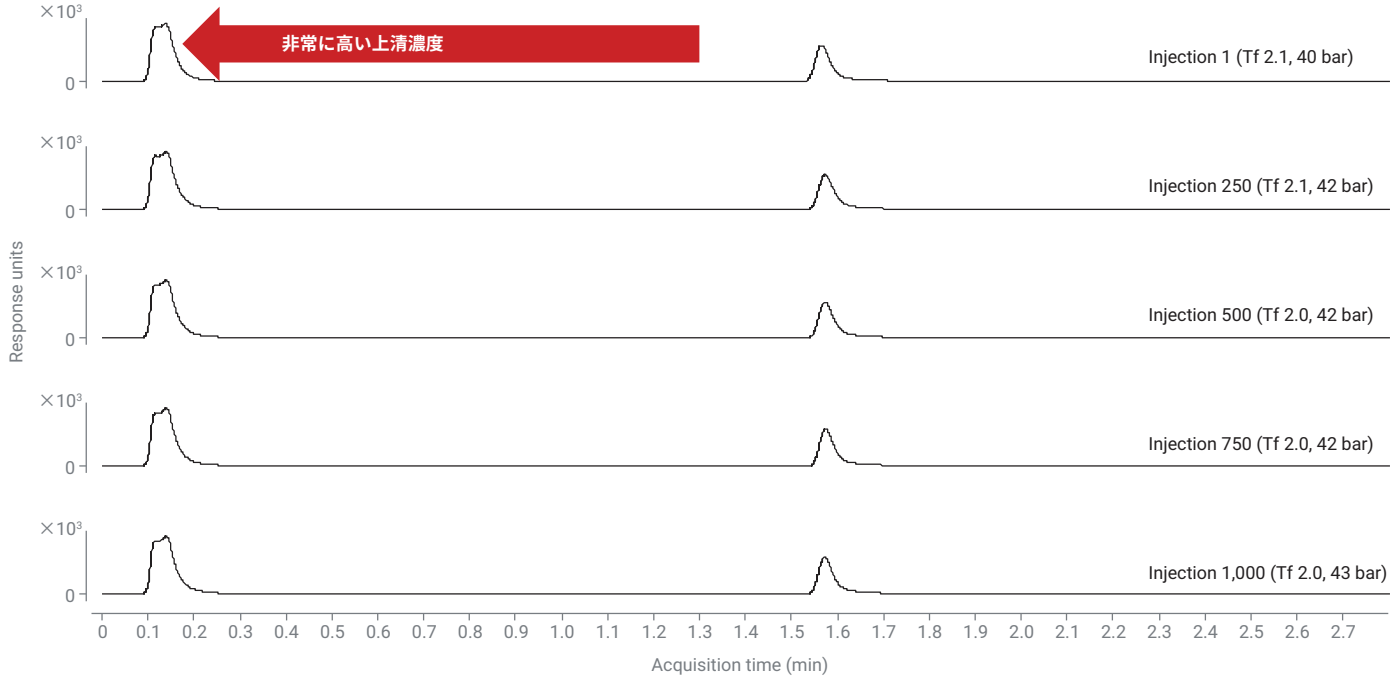

図 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム寿命：注入 1 ～ 1,000 回

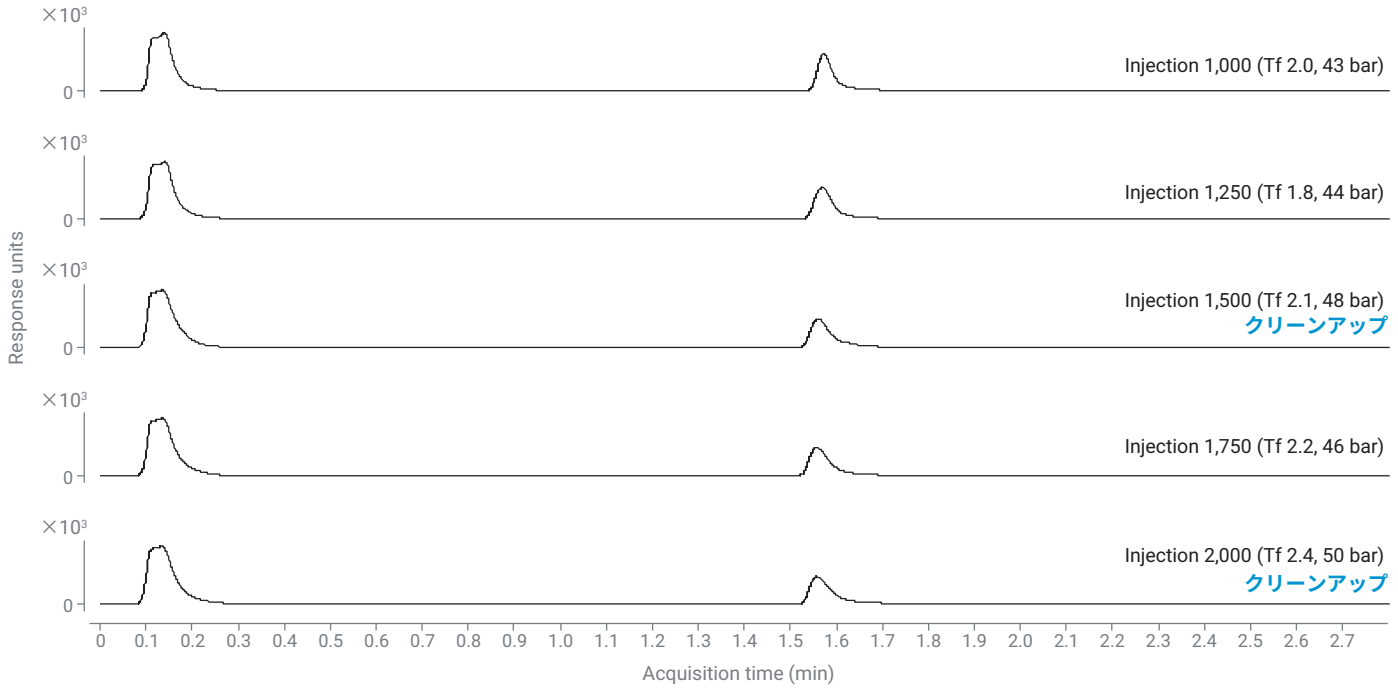

図 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム寿命：注入 1,000 ～ 2,000 回

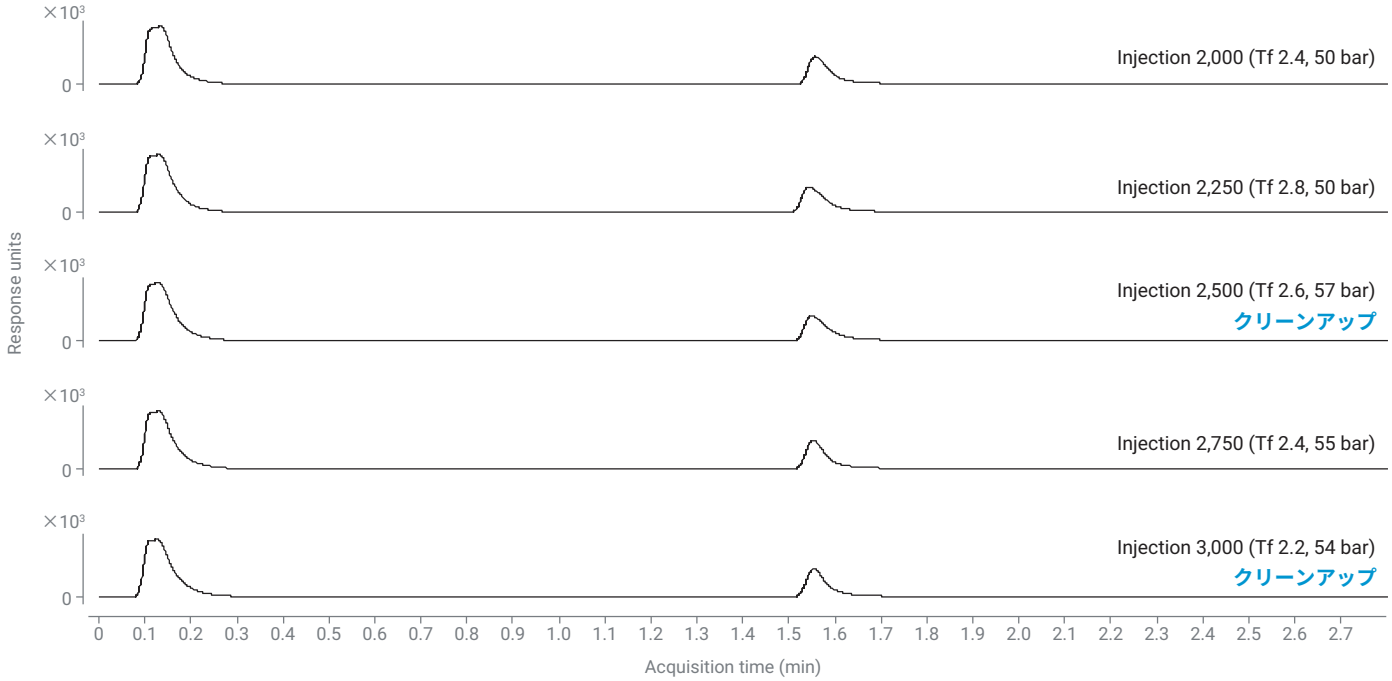

図 4. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム寿命：注入 2,000 ～ 3,000 回

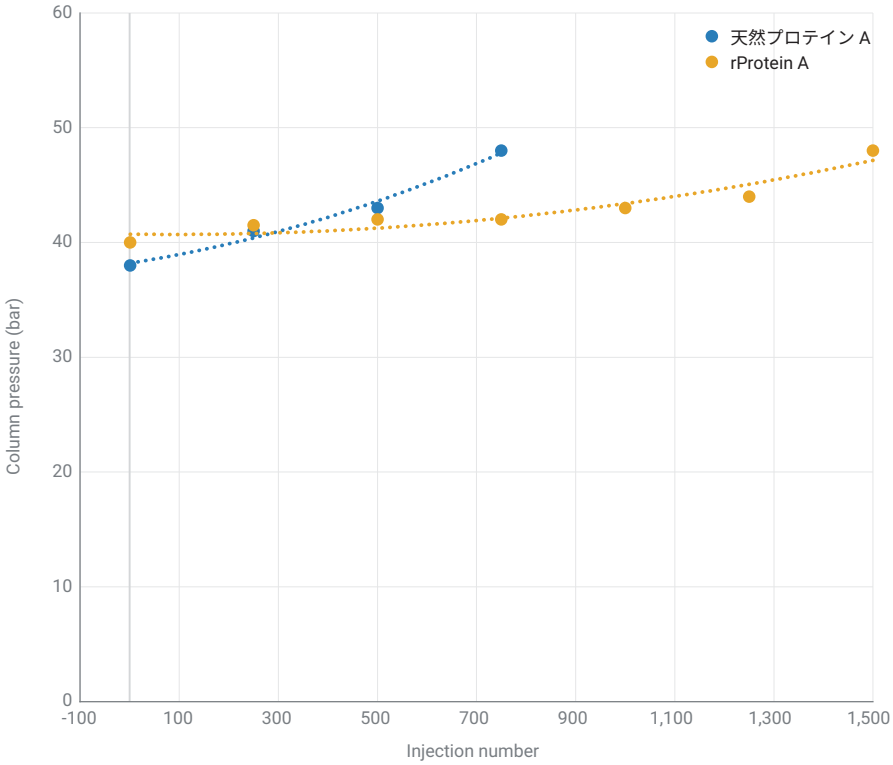

表 1.カラム圧（bar)と注入回数

注入	天然プロテイン A	rProtein A
1	38.0	40.0
250	41.0	41.5
500	43.0	42.0
750	48.0	42.0
1,000		43.0
1,250		44.0
1,500		48.0

図 5. カラム圧（bar)と注入回数

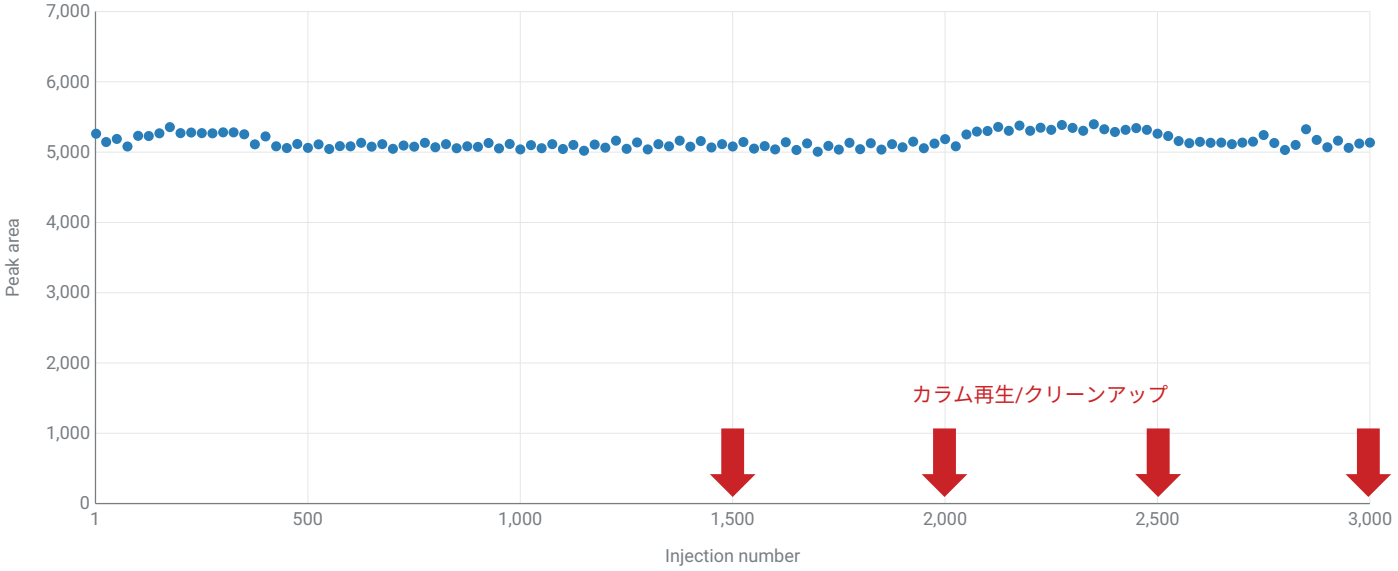

図 6. ピーク面積と注入回数

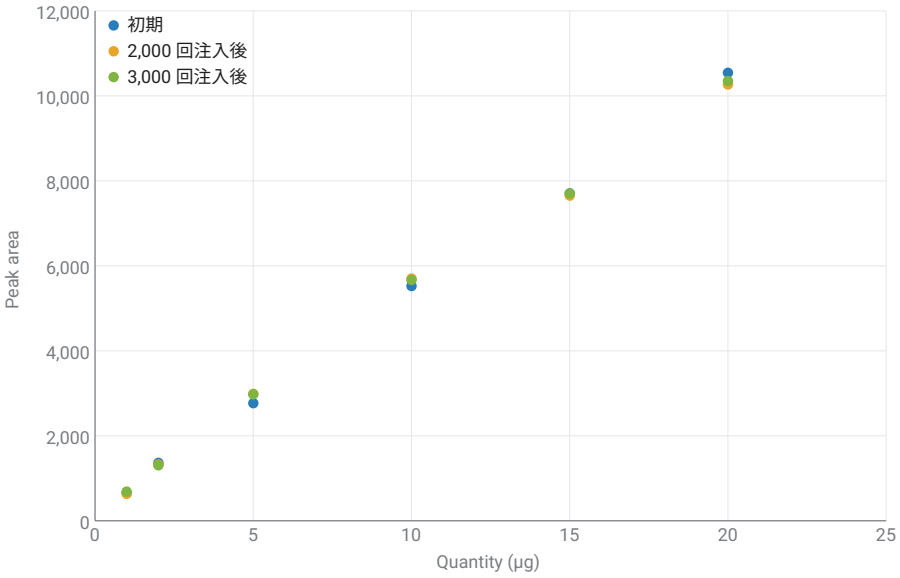

図 7. ピーク面積と注入量（µg）

表 2. ピーク面積と注入量（µg）

注入量 (µg)	初期	2,000 回注入後	3,000 回注入後
1	654	633	688
2	1,363	1,323	1,308
5	2,766	2,984	2,979
10	5,526	5,699	5,666
15	7,706	7,653	7,699
20	10,541	10,268	10,347

結論

このアプリケーションノートでは、Bio-Monolith rProtein A カラムが抗体価分析において、同等の天然型 Protein A カラムの性能を上回る一貫して信頼性の高い性能を実現できることを示しました。

参考文献

1. Coffey, A.; Kondaveeti. Improved Lifetime of Bio-Monolith Protein A Columns for Titer Determination. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2168EN, **2020**.

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. 2021

Printed in Japan, February 16, 2021
5994-3088JAJP
DE44232.1414699074

Agilent
Trusted Answers