

Agilent Bio-Monolith rProtein A カラムによる 60 秒での mAb 抗体価測定

プロセス開発およびプロセス最適化のための
ハイスループットのクローン選択

著者

Dr. Te-Wei Chu and
Ivan Huang
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

Agilent Bio-Monolith rProtein A（遺伝子組み換えタンパク質 A）分析カラムは、Bio-Monolith およびアフィニティクロマトグラフィーファミリーの最新製品です。このカラムは、モノクローナル抗体（mAb）の抗体価の高速分析とスモールスケール精製を実現するとともに、2D-LC のような他の分析ワークフローに簡単に組み込むことができます。このアプリケーションノートでは、遺伝子組み換えタンパク質 A カラムを最大流量で試験し、天然タンパク質 A カラムに対する架橋実験を実施します。mAb 抗体価測定用のクロマトグラフィー結合/溶出メソッドについて実証し、ここではクローン選択、プロセス開発、プロセス最適化などのハイスループットアプリケーションに適した超高速の分析時間（1 分）を達成しました。架橋実験において、リテンションタイム、検量線の直線性と偏差、サンプルキャリーオーバー、回収率などの性能特性は、天然カラムと遺伝子組み換えカラムで検出可能な差は見られませんでした。この研究は、天然タンパク質 A カラムから rProtein A カラムへの移行を確実に進めるうえで有用です。

実験方法

1.ハイスループット mAb 抗体価分析

材料および試薬

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

サンプルには、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。

- 1260 Infinity II バイオイナートポンプ (G5654A)
- 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ (G5668A)、サンプル冷却器 (オプション 100) を搭載
- 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
- 1260 Infinity II 可変波長検出器 (G7114A)

メソッド条件

HPLC 条件		
カラム	Agilent 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	
グラジエント プロファイル	時間 (分)	%B
	0.0 ~ 0.2	0 (結合)
	0.3 ~ 0.65	100 (溶出)
	0.66 ~ 0.90	0 (再コンディショニング)
(分析後 0.1 分)		
流量	3 mL/min	
カラム温度	25 °C	
検出	UV、280 nm	
注入量	4 µL (10 µg ロード)	

2.架橋実験

材料および試薬

ハイスループット mAb 抗体価分析実験で使

サンプル

サンプルには、1.5 mg/mL の遺伝子組み換え IgG モノクローナル抗体および同じ濃度の精製済み遺伝子組み換え 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 1290 Infinity II Bio LC システムは、次のコンポーネントで構成されています。

- 1290 Infinity II Bio ハイスピードポンプ (G7132A)
- 1290 Infinity II Bio マルチサンブラ (G7137A)
- 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット、バイオ熱交換器を搭載 (G7116B)
- 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) および各バイオフローセルを搭載した可変波長検出器

メソッド条件

HPLC 条件		
カラム	Agilent Bio-Monolith rProtein A、4.95 × 5.2 mm (p/n 5190-6903)	
	Agilent Bio-Monolith Protein A、4.95 × 5.2 mm (p/n 5069-3639)	
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	
グラジエント プロファイル	時間 (分)	%B
	0.0 ~ 0.5	0 (結合)
	0.6 ~ 2.6	100 (溶出)
	2.7 ~ 4.0	0 (再コンディショニング)
流量	1.5 mL/min	
カラム温度	25 °C	
検出	UV、280 nm	
注入量	5 ~ 50 µL (25 µg ロード)	

結果と考察

ハイスループット mAb 抗体価分析

ハイスループットメソッドでは、クロマトグラフィー分析時間が 1 分の高速 mAb 抗体価測定について実証しました (図 1)。精製済み (結合/溶出済み) mAb のリテンションタイムは約 0.61 分であり、これは CHO 細胞培地の上清の宿主細胞タンパク質を含む約 0.05 分の不純物のピークから良好に分離されました。図 1 において、mAb をスパイクした未精製上澄みの繰り返し注入は、一貫した堅牢な性能を示し、背圧レベル 12.5 MPa で 1 時間あたり 60 サンプルというスループットでした。実験全体を通して、ピーク形状、リテンションタイム、背圧に顕著な変化は見られませんでした。図 2 には、異なるサンプルロード量のクロマトグラムを示しました。次に、注入量に対してピーク面積をプロットし、検量線を作成しました (図 3)。検量線が示すように、優れた直線性レスポンス ($R^2 = 0.9993$) が得られ、2 つの別セットのサンプルの mAb 量が正確に測定されました。これらのデータから、今回の高速分析メソッドによって mAb 抗体価が正確に測定できることを実証しました。

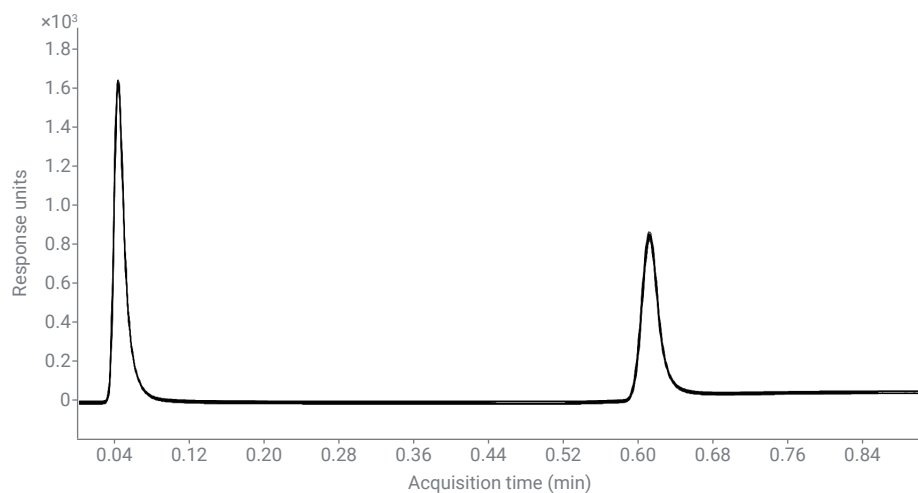


図 1. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム:60 回連続注入のクロマトグラムの重ね表示。最初のピークは培地上澄み中の宿主細胞タンパク質不純物を示しており、2 番目のピークは精製済み mAb です。

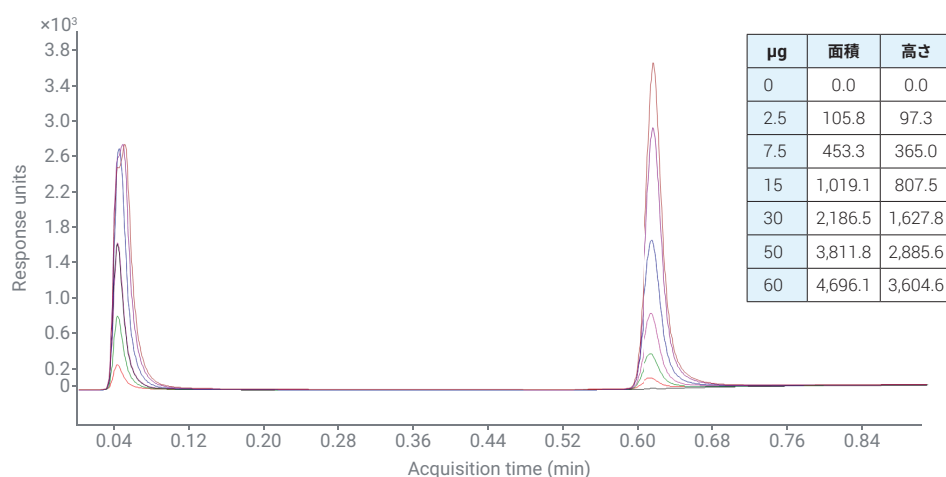


図 2. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム：検量線。検量線を作成するためにサンプルロード量を増大させたクロマトグラムの重ね表示

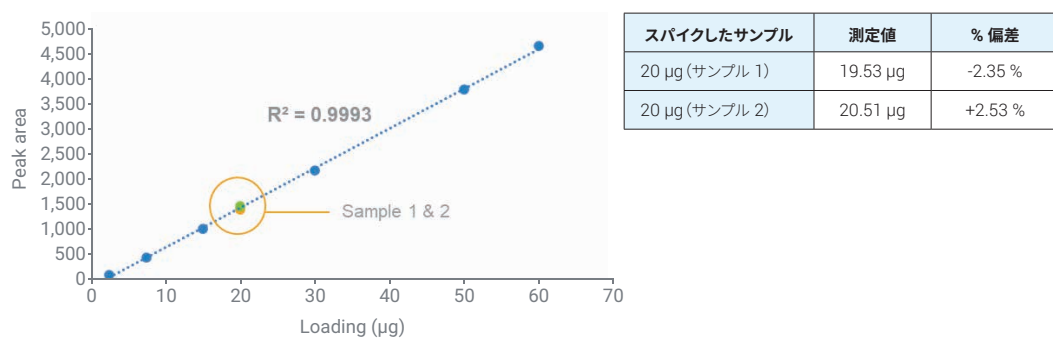


図 3. Agilent Bio-Monolith rProtein A カラム: 検量線の直線性レスポンスと % 偏差

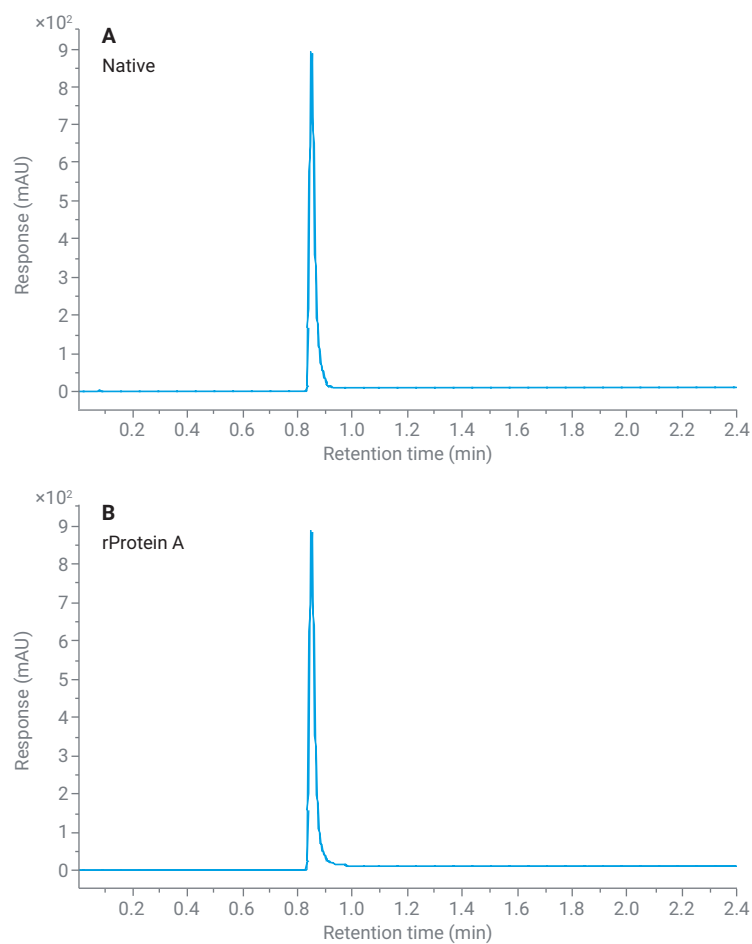
架橋実験

2 種類の Bio-Monolith Protein A カラムの性能を同じ条件下で試験しました。精製済み mAb のリテンションタイムとピーク形状（図 4）、検量線の直線性レスポンスとスパイクしたサンプルの回収率（図 5 および 6）、サンプルキャリーオーバー（図 7）など、すべての特性について、天然カラムと rProtein A カラムでほぼ差が見られませんでした。

回収率分析

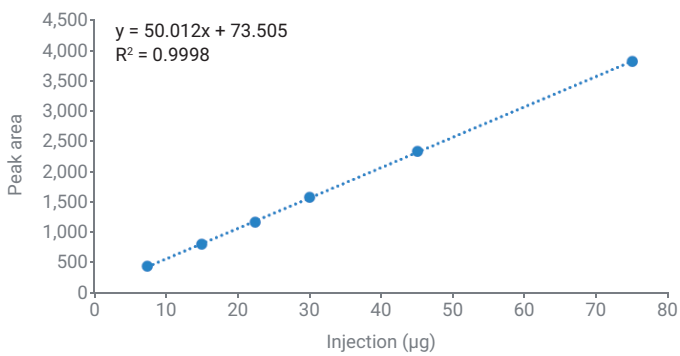
天然カラムと rProtein A カラムの回収率を比較するとともに、他社製の 2 種類の rProtein A カラムをこの実験に使用しました。他社製カラムの動作流量に合わせて、流量を 2 mL/min に調整しました。次の mAb サンプルを追加しました。

- Agilent-NISTmAb (p/n 5191-5744)
- Sigma-Aldrich の Sigma SiLu mAb (SiLu Lite、p/n MSQC4)



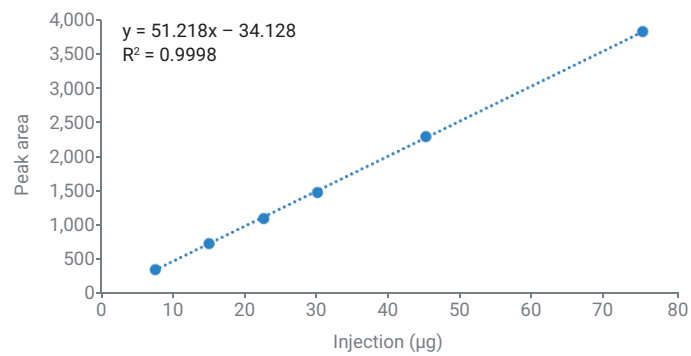
	ネイティブ	rProtein A
リテンションタイム (分)	0.850 ± 0.001	0.850 ± 0.001
ピーク高さ	880.9 ± 8.1	881.8 ± 5.3

図 4. 天然カラムと rProtein A カラムのクロマトグラムと mAb ピークの結果の比較



スパイクしたサンプル	測定値	% 偏差
25 μg (純粋)	25.25 μg	0.99 %
25 μg (上澄み中)	26.09 μg	4.35 %

図 5. rProtein A カラム：直線性レスポンス



スパイクしたサンプル	測定値	% 偏差
25 μg (純粋)	24.94 μg	-0.23 %
25 μg (上澄み中)	25.78 μg	3.12 %

図 6. 天然タンパク質 A カラム：直線性レスポンス

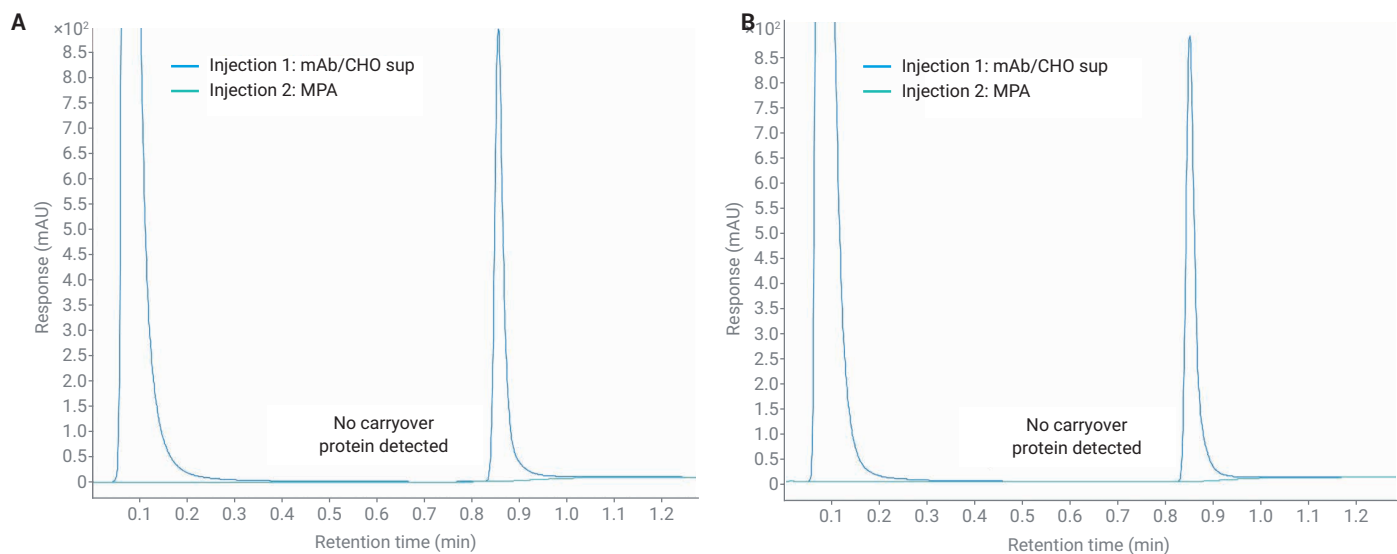


図 7. キャリーオーバー分析。結合バッファ（MPA）の次の注入で、検出可能なタンパク質のキャリーオーバーは見られませんでした。(A) rProtein A カラム。(B) 天然タンパク質 A カラム

カラムなし（ユニオンあり）の移動相 B で希釈した、精製済み mAb サンプルを注入して、mAb ピークのベースライン曲線下面積（AUC）を取得しました。カラムを使用して、溶出した mAb の AUC を取得しました。同じ量の mAb サンプルをベースライン AUC として用いました。

回収率 % = (溶出した mAb の AUC / ベースライン AUC) × 100

結果と分析

rProtein A カラムの平均回収率は天然タンパク質 A カラムより 1 % 低いものの、2 種類の外社製カラムと比較して良好な回収率を示しました。nProtein A カラムは回収率の点で多少優れていましたが、3 種類の mAb サンプルで最も堅牢な回収率を示したのは rProtein A カラムでした。

HPLC 条件	
カラム	Agilent Bio-Monolith rProtein A, 4.95 × 5.2 mm (p/n 5190-6903)
	Agilent Bio-Monolith Protein A, 4.95 × 5.2 mm (p/n 5069-3639) 他社 A および B の rProtein A カラム
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
グラジエントプロフィール	時間 (分) %B
	0.0 ~ 0.4 0 (結合)
	0.5 ~ 1.3 100 (溶出)
	1.31 ~ 4.0 0 (再コンディショニング)
流量	2 mL/min
カラム温度	25 °C
検出	UV, 280 nm
注入量	4 µL (10 µg ロード)

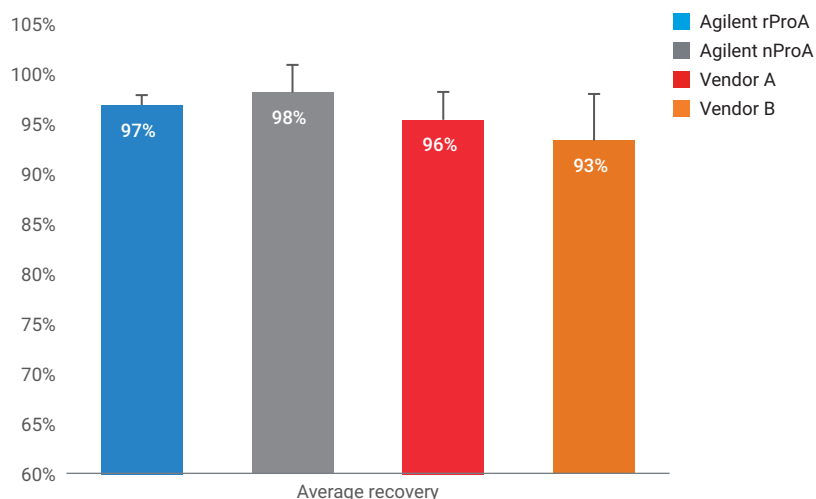


図 8. mAb 回収率結果の比較

結論

このアプリケーションノートでは、最大流量 3 mL/min において、Agilent Bio-Monolith rProtein A カラムが堅牢な性能を発揮することを示しました。このアプリケーションノートの後半の部分では、天然カラムと rProtein A カラムの架橋実験を実施して、rProtein A カラムが天然タンパク質 A カラムとほぼ同じまたは同等の性能を実現していることを実証しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタ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, August 18, 2021
5994-3969JAJP
DE44389.5535300926