

アジレント HPLC 用バイオモノリス プロテイン A カラムによる ヒト・ポリクローナル IgG の迅速な定量

アプリケーション

バイオ医薬品

著者

Lidija Urbas, Peter Brne, Boštjan Gabor,
Sašo Plevcak, and Miloš Barut
BIA Separations
Teslova 30
SI-1000 Ljubljana
Slovenia

Taegen Clary
Agilent Technologies Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95052
USA

概要

プロテイン A は、黄色ブドウ球菌の免疫グロブリン Fc 領域 (IgG) 受容体で、ポリクローナル/モノクローナル IgG との強い親和性を持つタンパク質です。IgG の分取/生産スケールの精製には、固定化したプロテイン A 受容体をクロマトグラフィー媒体で分離する方法が一般に使用されています。プロテイン A クロマトグラフィーでは、高い選択性と回収率により、複雑な混合物から IgG をワンステップで分離できます。また、選択性と回収率が高いという同じ理由から、プロテイン A クロマトグラフィーは分析スケールでの利用も可能です。HPLC 用バイオモノリスプロテイン A カラムを使用すれば、複雑な混合物や純粋なサンプルに含まれる IgG の分析分離/定量作業を高速化できます。ここでは、簡単なメソッドを紹介して、実際にバイオモノリスプロテイン A カラムがヒト血漿からのポリクローナル IgG の分析分離/定量に利用できることを示します。ここに示すメソッドは、大規模な IgG 生産の全工程にわたる発酵力価のモニタリングにも使用できます。



Agilent Technologies

はじめに

バイオモノリスプロテイン A カラムは、高い選択性と回収率を維持したまま、流量に左右されない分離を実現します。このカラムには、穴や空隙ではなく連続したチャンネルがある薄いモノリスディスクが充填されています。こうしたモノリス構造では、特に大きな生体分子の場合、拡散がなくなり、物質の移動が速やかに進みます。

IgG の分離/定量作業の迅速化は、発酵/生産スケールの精製工程全体を通してさまざまな判断を下す上で非常に重要です。IgG 生産物が安全規準と純度仕様を満たしていること、IgG の精製工程が最大限の効率で稼働していることを示すデータも非常に重要になります。バイオモノリスプロテイン A カラムを使用すれば、PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) や免疫反応測定を行うよりも格段に早くこのデータを得ることができます。この分離の感度、直線性、精度、速度は、(ヒト血漿や細胞培養液といった) 複雑なサンプルからの IgG の定量に十分対応できます。



アジレントのバイオモノリスプロテイン A カラム (左)、
バイオモノリス・カラムのハウジングとモノリスディスク (右)

実験手法

条件

カラム	アジレントのバイオモノリスプロテイン A カラム (部品番号 5069-3639)、 5.2 mm (内径) × 4.95 mm
移動相 A	PBS 緩衝液、pH 7.4
移動相 B	0.5 M 酢酸、pH 2.6
グラジエント	ステップグラジエント: 0-0.5min (B:0%)、0.5-2.5min (B:100%)、 2.5-3min (B:0%)
検出	UV 280 nm
流量	1 mL/min
HPLC システム	高圧グラジエント HPLC システム、 Agilent 1200

結果と考察

バイオモノリスプロテイン A カラムを使用してヒト血清からポリクローナル IgG を単離しました。バイオモノリス・カラムによる分離が流量に依存しないことを示すために流量を変えて同じ分離を行いました。図 1 は、流量を 1 mL/min (10 カラム容積/min に相当する流量) から 2 mL/min (20 カラム容積/min に相当する流量) に変更しても IgG 溶出プロフィールが良好に保持されていることを示しています。サンプルに含有される IgG の有無や濃度については、数分以内に確実なデータが得られます。

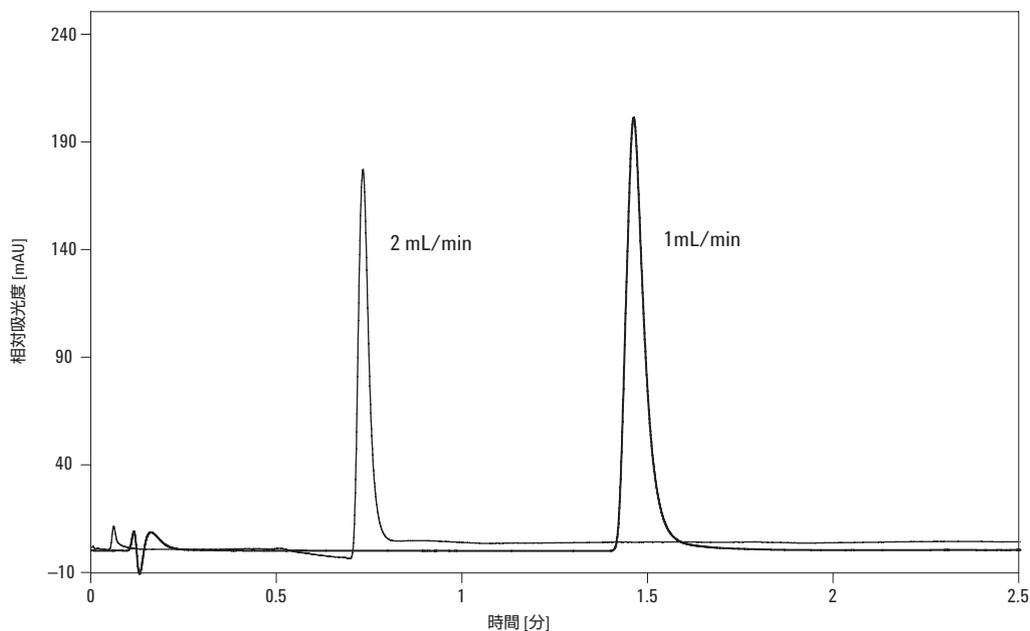


図 1. 流量に左右されないバイオモノリスプロテイン A カラムによる IgG 溶出プロフィール

選択性と回収率は、分析/生産のいずれのスケールの IgG 分離にとっても非常に重要な要素です。バイオモノリスプロテイン A カラムは複雑な混合物から IgG を選択的に捕獲します。図 2 は、ヒト血漿という複雑なサンプルからのバイオモノリスプロテイン A カラムによる IgG の分離を示したものです。ヒト血漿を結合緩衝液 (PBS 緩衝液、pH 7.4) で 10 倍に希釈し、10 μ L のサンプルを 1 mL/min の流量でプロテイン A カラムに注入しました。100 % 緩衝液 A から 100 % 緩衝液 B へ切り替える 1 段階の濃度勾配を適用して IgG を単一ピークで溶出しました。図 3 は、図 2 の分離で得たヒト血漿画分全体を SDS PAGE 分析にかけた結果です。IgG は、分離以前の血清 (レーン 1) にも、精製済みの IgG 標準物質 (レーン 2) にも、図 2 の分離による溶出画分、すなわちピーク 2 (レーン 4) にも存在します。素通り画分、すなわち図 2 のピーク 1 (レーン 3) には、IgG1 も IgG2 も含まれず、プロテイン A に結合しない IgG3 だけが残ります。ヒト血漿からの IgG の回収 (捕獲) 率は、濃度の

分かっている IgG をスパイク添加し、それによって得られる検量線との比較によって決定した値です。血漿サンプルの IgG 含有濃度は、公表データと比較して決定したものです。IgG はカラムに結合しましたが、他の血漿タンパク質はすべて素通り画分に残っています。回収率は、95~100 % と判定されます。

細胞培養上澄み液の IgG 含有濃度を決定することはきわめて重要です。細胞ベースの生産で IgG の収率を最大限に高め、高い力価を達成するには、迅速かつ確実な分析メソッドが必要とされます。バイオモノリスプロテイン A カラムを使用して、6 点からなる検量線を作成しました。この検量線を使用すれば複雑な混合物の IgG 含有濃度を決定することができます。図 4 は、IgG の初期濃度を 2 mg/mL とし、ヒト IgG の 2 倍希釈用溶液を分離したときの結果です。IgG のピーク面積の累計がプロットされています。

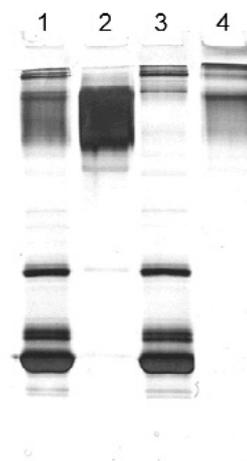
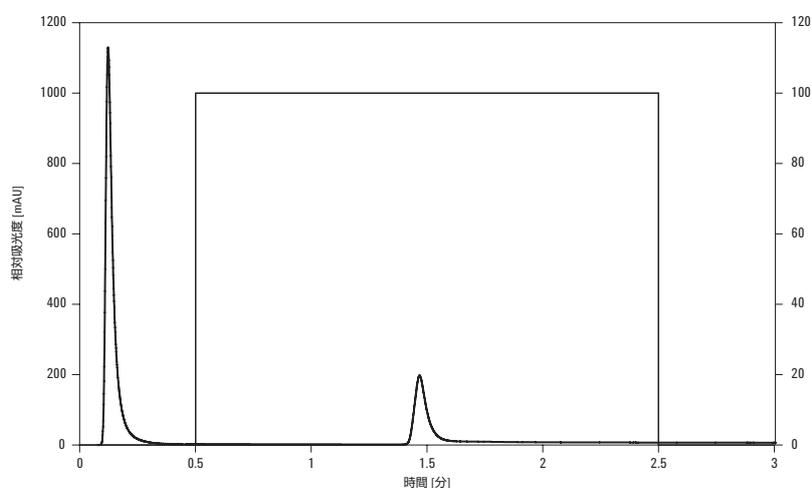


図 2. ヒト血漿からの IgG 分離に関するバイオモノリスプロテイン A カラムの選択性。IgG がプロテイン A に結合し、100 % 緩衝液 B のステップグラジエントが適用されて IgG が 1.5 分で溶出しています。

図 3. 図 2 の分離で得たヒト血漿画分に関する SDS PAGE 分析

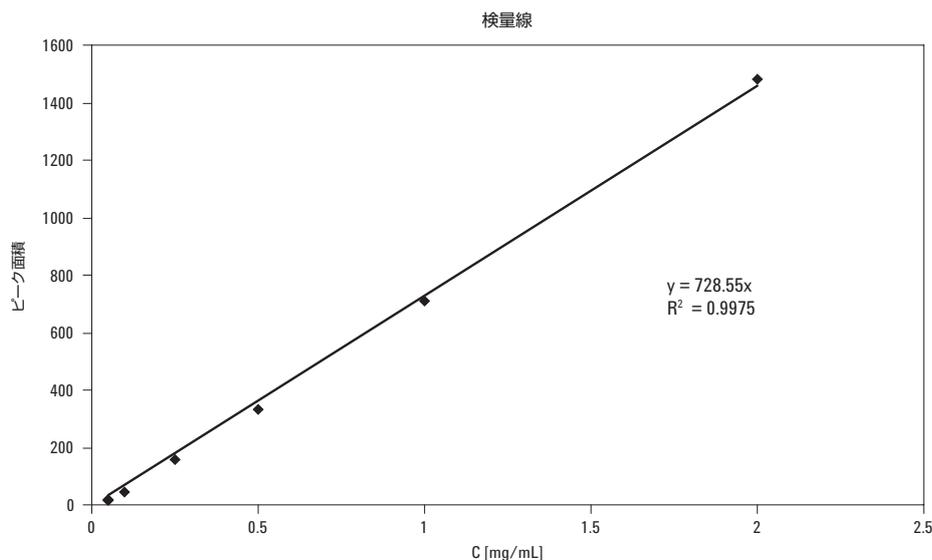


図 4. ヒト IgG の 2 倍希釈用溶液に関する結果

この測定グラフの直線レンジは、IgG 育成/生産細胞培養液からの分離に必要とされる生産レンジ全体をカバーしています。

結論

バイオモノリスプロテイン A カラムは、IgG 精製のモニタリングや生産物の純度確認に効果的に利用できます。このカラムによる分析結果は、精製工程が仕様通りに稼働しているかどうかを判断するための材料として使用でき、また、PAGE や免疫反応測定を行うよりも格段に早く結果が得られます。バイオモノリスプロテイン A カラムは、(95~100 パーセントという) 高い回収率を維持しながら 1~2 分で IgG を分離します。この分離の感度、直線性、精度、速度は、IgG の定量にも十分対応できるレベルにあります。このメソッドは、さまざまな複合物サンプルの分析分離や定量に支障なく利用できます。

詳細情報

アジレント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。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2008
Published in Japan
October 16, 2008
5989-9733JAJP