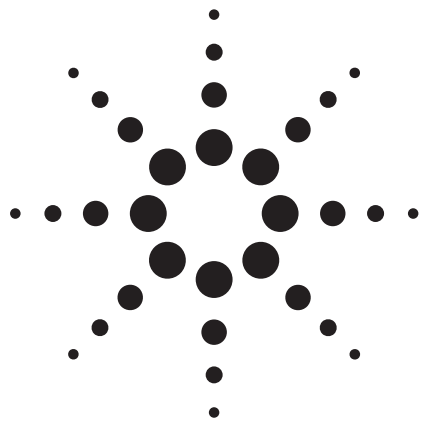




培養細胞生成および 精製プロセスモニタリングにおける Agilent バイオモノリスQA カラムによる 高速 IgM 定量

アプリケーション

生物医薬品

概要

現在、自己免疫疾患、伝染性疾患、癌などの治療のために、多くの IgM モノクローナル抗体が開発されています。こうした分子への関心が高まっていることにより、細胞培養上澄み液の IgM 濃度を測定し、クロマトグラフィフラクションにおける IgM やタンパク質汚染物質の分布を記録できる、正確かつ単純な高速分析メソッドの必要性が生じています。IgG モノクローナルに関するこの種のアプリケーションには高性能プロテイン A カラムが用いられますが、IgM は親和性リガンドの溶出に必要な強酸条件により容易に変性するため、他の手法を探す必要があります。多くの場合、IgM モノクローナル抗体は、カチオン交換カラムかアニオン交換カラムのいずれか、またはその両方で強い保持力を示します。そのため、このアプリケーションのメソッドとしては、イオン交換クロマトグラフィが有力な候補になります。Agilent バイオモノリス QA カラム（強アニオン交換）を使えば、IgM 精製プロセスをモニタリングし、細胞培養上澄み液の IgM 濃度を定量することができます。



Agilent Technologies

はじめに

Agilent バイオモノリス HPLC カラムを用いた高速分離は、クロマトグラフィフラクションにおける生成物および汚染物質の分布をモニタリングするモノリシックアッセイで威力を発揮します。

Agilent バイオモノリス HPLC カラムを使えば、IgM 精製プロセスが指定条件内に収まっていることを示すデータを、PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動アッセイや免疫アッセイよりもずっと速く採取することができます。こうしたデータは、初期開発やその後のプロセスバリデーションにおいて精製プロセス分析を行う際にも重要となります(図 1)。感度、直線性、精度、分離速度も、細胞培養上澄み液の IgM 定量に適しています(図 2)。

実験手法

条件

カラム	Agilent バイオモノリス QA 部品番号 5069-3635 内径 5.2 mm × 4.95 mm
移動相 A	10 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
移動相 B	250 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0
グラジエント	10 分で A から B への直線的グラジエント (20 mL)
検出	UV、280 nm
流量	2 mL/min



Agilent バイオモノリス HPLC カラム (左)、
バイオモノリスカラムハウジングおよびモノリシックディスク (右)

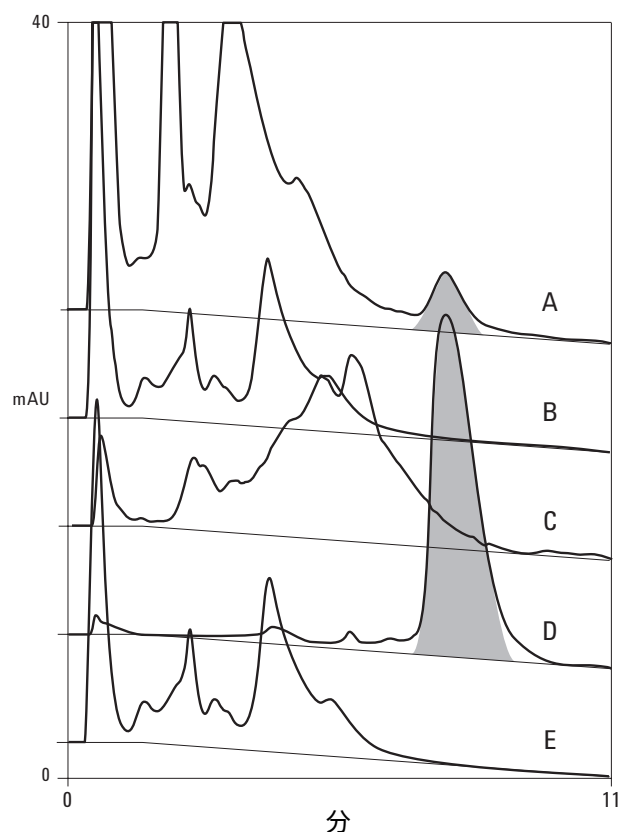


図 1. Agilent バイオモノリス QA 分析カラムを用いて採取および分析した、
一連のヒドロキシアパタイト クロマトグラフィ フラクション (A~E)

フラクション A:	細胞培養上澄み液
フラクション B:	サンプルロードからのフロースルー
フラクション C:	溶出前洗浄
フラクション D:	IgM 溶出ピーク
フラクション E:	溶出後洗浄

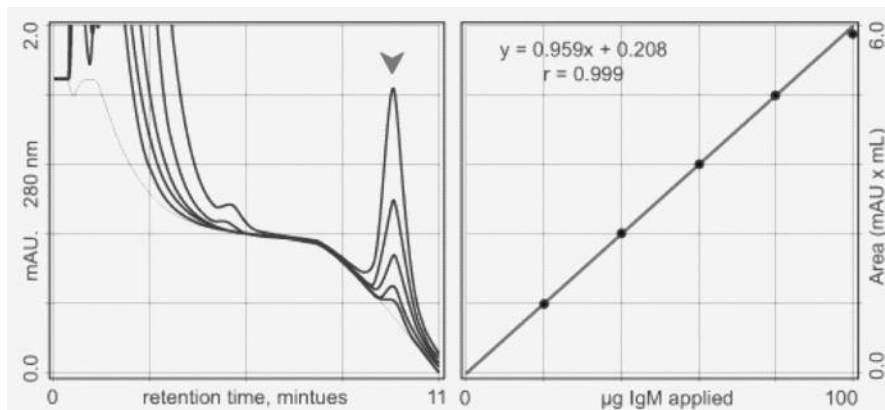


図2. 2倍に希釈した細胞培養上澄み液の分析結果：ピークを積分し、プロットしました。

結果と考察

セラミックヒドロキシアパタイト CHT タイプ II (Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を用いて、IgM を精製しました。この CHT タイプ II 精製ステップで得られた 5 つのフラクションをバイオモノリス QA カラムを用いてモニタリングしました。精製ステップに CHT タイプ II を使用し、精製モニタリングに Agilent バイオモノリス QA カラムを使用すれば、プロテイン A 分取および分析分離に用いられる強酸バッファ条件への IgM の曝露を抑えることができます。

図1に示す結果を見ると、すべての IgM がヒドロキシアパタイトカラムに結合し(フラクション B)、洗浄中にも結合を維持し(フラクション C)、グラジエント中に完全に溶出している(フラクション D および E) ことがわかります。この分析で得られた別のクロマトグラムを用いて、タンパク質汚染物質に対する IgM の比率をもとに、プールするフラクションを決定しました。この評価分析に用いたバッファ条件は、ほとんどの IgM のアニオンおよびカチオン交換スクリーニングに適しています。この分析により、予想どおりのフラクションに IgM が存在し、他のフラクションには存在しないことが容易に確認されました。プロセス開発に用いたのと同じ機器とバッファで評価アッセイを実行できるため、PAGE や ELISA による分析にサンプルを回す手間をかけずに、すぐにフィードバックを得ることができます。IgM 検量線の作成にも バイオモノリス QA カラムを使用しました。この検量線により、細胞培養上澄み液の IgM 濃度を測定できます。図2に、2倍に希釈した細胞培養上澄み液の IgM の分析結果を示しています。ELISA により IgM 濃度を約100 µg/mL と推定し、IgM ピーク面積を積分およびプロットしました。このアッセイの直線範囲は、培養細胞の開発および製造に必要な生成範囲を十分にカバーしています。

結論

Agilent バイオモノリス QA カラムを使えば、クロマトグラフィフラクションにおける生成物の精製および汚染物質の分布を効果的にモニタリングできます。この手法を用いた分析では、IgM 精製プロセスが指定条件内に収まっていることを示すデータを、PAGE アッセイや免疫アッセイよりもずっと速く採取することができます。こうしたデータは、精製プロセスの初期開発のほか、その後のプロセスモニタリングや品質管理にも適用できます。Agilent バイオモノリス QA カラムは、細胞培養上澄み液の IgM 抗体の高速分離と精密定量を可能にします。この定量分析は、IgM 生成および精製プロセス全体で利用することができます。

謝辞

使用したデータや数字は、許可を得たうえで、Pete Gannon 氏、Richard Richieri 氏、Simin Zaidi 氏、Roy Sevilla 氏、Alexander Brinkman 氏の「A High Speed Monolithic Assay for IgM Quantitation in Cell Culture Production and Purification Process Monitoring (培養細胞生成および精製プロセスモニタリングにおける IgM 定量の高速モノリシックアッセイ)」(Third Wilbio Conference on Purification of Biological Products: 生物学的製剤の精製に関する第3回 Wilbio カンファレンス、9月24～26日、米国マサチューセッツ州ウォルサム)から引用しました。

アジレントの連絡先

Taegen Clary, Agilent Technologies Inc.
5301 Stevens Creek Blvd. Santa Clara, CA 95051 USA

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 7, 2008
5989-9674JAJP



Agilent Technologies