

pH グラジエント溶出による モノクローナル抗体電荷変異体の 分離の向上

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Andrew Coffey
Agilent Technologies, Inc.

概要

イオン交換は、穏やかな条件下でタンパク質混合物を分離するための非常に有効な技術であり、溶離液として塩濃度を徐々に上げ、なだらかなグラジエントを適用したものが最も一般的です。pH グラジエント溶離液は、等電点電気泳動などの特殊なアプリケーションを除き使用頻度が非常に低く、複雑な緩衝液系を必要とすることがあります。ただし、今日の新しいクォータナリ HPLC システムは、従来の緩衝液塩から pH グラジエント溶出プロファイルを生成するのに理想的な機器です。このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムに設置した Agilent バイオ Mab カラムと Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを使用し、モノクローナル抗体の電荷アイソフォームを分離するために pH グラジエント溶出を使用したときの利点について説明します。



Agilent Technologies

はじめに

タンパク質は、酸性および塩基性の側鎖官能基を持つ多くのアミノ酸が含まれる複雑な生体分子です。これらの官能基には、カルボン酸 (アスパラギン酸およびグルタミン酸) およびフェノール (チロシン) からアミン (リジンおよびヒスチジン) およびグアニジン (アルギニン) に加え、その他の中性極性または疎水性残基などがあります。特定の pH ではタンパク質は全体に電荷を帯び (有効電荷が 0 になるその等電点を除く)、相補的な電荷を持つ吸着剤と相互作用を起こします。したがって、塩基性タンパク質は陽イオン交換カラムに保持されます。

従来のイオン交換メソッドでは、タンパク質と吸着剤の相互作用と競合し、最後にその相互作用に勝ってカラムから分子を溶出させるように、イオン強度 (塩濃度) が徐々に上がる溶離液を使用しています。ただし、陽イオン交換クロマトグラフィーでは、pH の上昇によりタンパク質が中性または負に帯電し、カラムから溶出する pH グラジエントも使用することができます。

バイオ製造中のわずかな変化によって電荷変異体を持つ可能性があるモノクローナル抗体など、より複雑なタンパク質の研究や分析が進むにつれて、このアプローチは大きな注目を集め始めています。図 1 に示すように、これらの違いには、C 末端リジンの喪失、脱アミド化およびシアリル化 (分子がより酸性になる)、またはスクシンイミド生成や COOH 側鎖のアミド化 (分子がより塩基性になる) などがあります。

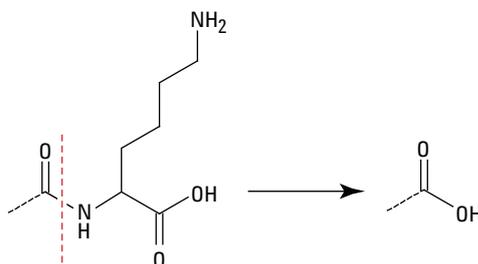
ここでは、従来の塩グラジエント溶出では分離が困難なモノクローナル抗体の電荷異性体を分離できる pH グラジエントを作成する方法を示しました。

材料および実験方法

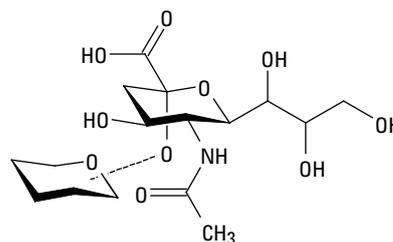
Agilent バイオ IEX カラムには、機能性親水性ポリマ層がグラフトされた強固なポリマ系非多孔質粒子が充てんされています。この強固な粒子が、全多孔質粒子の拡散制限により生じるバンドの広がり効果を軽減することで、高い分離能と高い分離効率を提供します。化学結合された親水性コーティングが非特異的な結合の効果を大幅に軽減し、高いレベルの再現性を実現します。

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC ポンプのクォータナリチャンネル機能を使用し、二水素オルトリン酸ナトリウム溶液と水素オルトリン酸二ナトリウム溶液をさまざまな割合で混合して、既知のイオン強度と pH を持つ緩衝液の

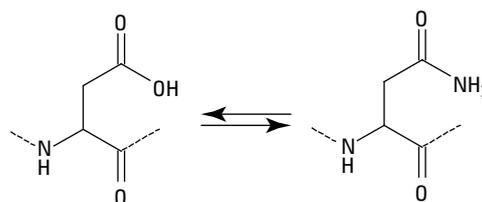
(a) C 末端リジンの喪失



(b) グリカンのシアリル化



(c) アミド化/脱アミド化



(d) スクシンイミド生成

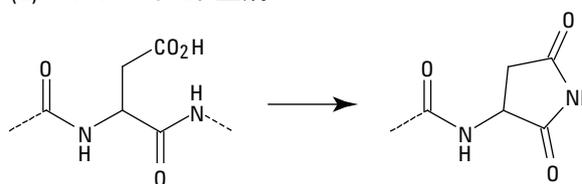


図 1. 電荷変異体の原因となる反応

組成を調製しました。この緩衝液系は、幅広い pH 範囲 (通常は pH 5.7~8.0) で一般に使用されています。

この工程を容易にするために、アジレントの Buffer Advisor を使用しました (図 2a、2b、2c)。適切な緩衝液条件と原液の組成を入力すると、クォータナリポンプで使用するための必要なグラジエントタイムテーブルがソフトウェアによって計算されます。

条件

カラム	Agilent バイオ Mab、NP5、4.6 x 250 mm
移動相	A: 水 B: 1.6 M NaCl C: 100 mM Na ₂ HPO ₄ D: 100 mM Na ₂ HPO ₄ C および D を事前に指定された割合で混合することにより、必要な pH 範囲で選択した強度の緩衝液を生成しました。
グラジエント	pH 6.0~8.0、0~20 分 0~800 mM NaCl、20~25 分 800 mM NaCl、25~30 分
流量	1.0 mL/min
温度	周囲温度
注入量	10 µL
サンプル	IgG モノクローナル抗体
サンプル	濃度 2 mg/mL (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中、pH 6.0)
検出	UV、220 nm
機器	Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

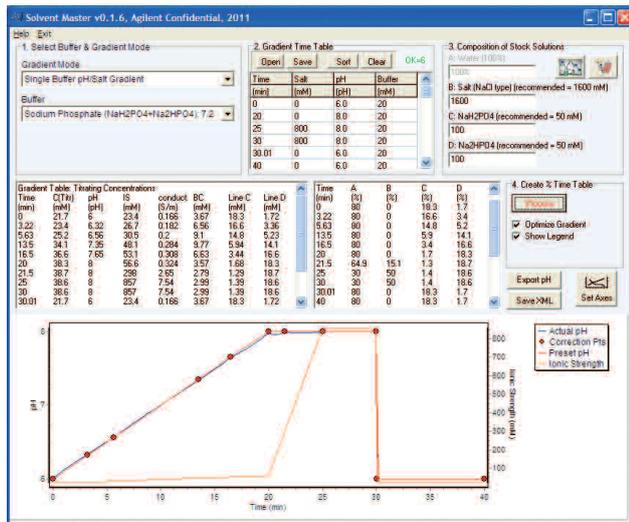


図 2a. プロトタイプ Buffer Advisor ソフトウェアのスクリーンショット (線形 pH グラジエントを保持するために計算した追加の暫定的なグラジエントステップ: 3.22、5.63、13.5、16.5、21.5 分)

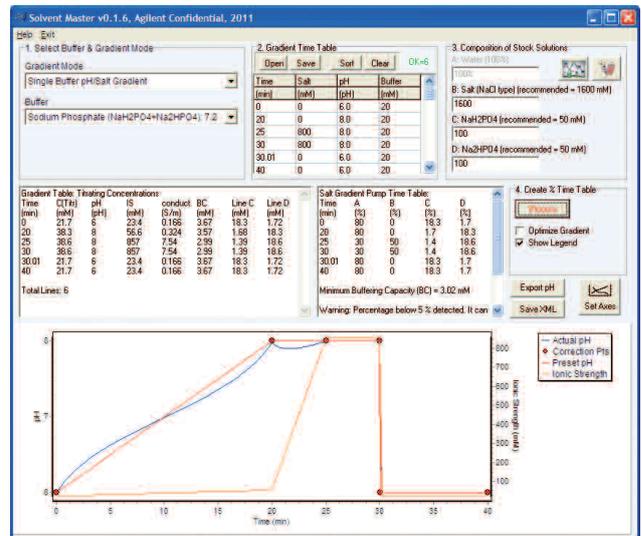


図 2b. Buffer Advisor ソフトウェアのスクリーンショット (暫定的なグラジエントステップがない最適化されていないもの、非線形グラジエントを示す)

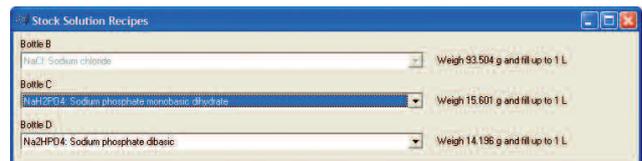


図 2c. Buffer Advisor ソフトウェアのスクリーンショット (緩衝液の原液を調製するための配合を示す)

結果と考察

タンパク質を分離するために弱陽イオン交換カラムを使用するときの pH の重要性と、塩グラジエントを使用したときのリテンションタイムに与える pH の影響については、すでに示しています (アジレントアプリケーションノート 5990-9628JAJP)。pH のわずかな変化を使用して選択性を変えることができます。ただし、弱陽イオン交換カラムの動作はイオン強度の影響も受けます (図 3)。したがって、pH グラジエントの実験でイオン強度も重要な役割を果たすのは驚くべきことではありません。

図 4 に、IgG モノクローナル抗体の一連のクロマトグラムを示します。それぞれ、pH 6.0~8.0 (0~20 分) の後に従来の塩グラジエントクリーンアップ (20~25 分) と再平衡化 (25.01~35 分) を行って得られたものです。各クロマトグラムは、異なる緩衝液濃度と、その結果生じるイオン強度 (20~50 mM) で取得しました。この作業には Buffer Advisor ソフトウェアを使用し、必要なグラジエントタイムテーブルを同じ原液から作成しました。

いずれの場合も、IgG は pH グラジエントの後半 (pH 7.0 ~ 8.0)、実際には 20 mM で溶出しました。IgG サンプルは、グラジエントの塩クリーンアップ部分までは溶出しないため、分離を最適化するようにこのメソッドを改良することができます。

図 4 に、30 mM の緩衝液強度を使用した溶出条件で優れた分離能が観察されることを示します。ただし、これは IgG がグラジエントの後半に溶出するという事実によるものです。したがって、Buffer Advisor ソフトウェアを使用して、30 mM と 50 mM の両方の緩衝液強度を使用した分離について、それぞれ pH 7.0~8.0、0~20 分および pH 6.5~7.5、0~20 分の異なる pH グラジエントをプログラミングしました。

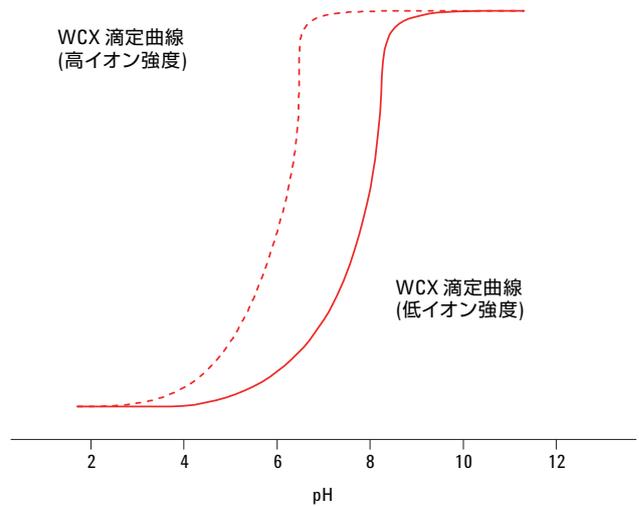


図 3. 弱陽イオン交換器の一般的な滴定曲線

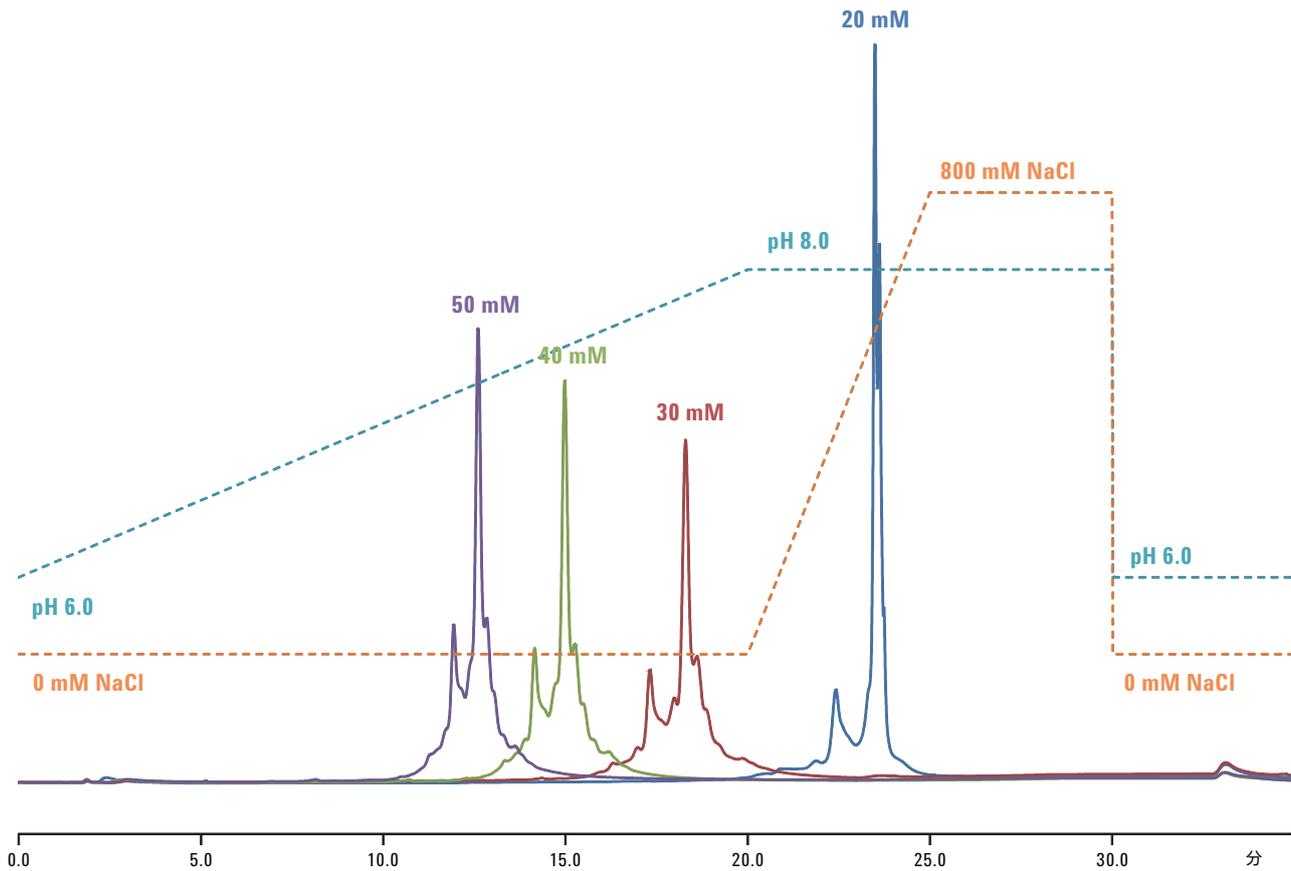


図 4. さまざまなイオン強度における IgG モノクローナル抗体のクロマトグラム

図 5a および 5b に、メイン IgG ピークが 11 分に溶出する結果のクロマトグラムを示します (酸性の変異体は早く、塩基性の変異体は遅く溶出する)。この 2 つのクロマトグラムは実際に非常によく類似していますが、30 mM の緩衝液強度の方が、電荷変異体のピーク定義がわずかに良好です。

おそらくグラジエント時間の延長、または pH 範囲の縮小によって、さらに最適化を行い、分離能の向上を試みることができます。

結論

モノクローナル抗体などの複雑なタンパク質の分離に pH グラジエントイオン交換クロマトグラフィーを使用することは、分析者にとって有効な手段となります。ただし、pH 値の異なる 2 つの個別の緩衝溶液を調製し、線形グラジエントを実行するだけでは、pH を直線的に変化させることはできません。要求を満たすグラジエントの結果を確実に得るために必要な調整値を計算するためには、コンピュータソフトウェアが必要です。この技術は分析条件とイオン強度に左右されます。さらに、開始および終了 pH も選択性に影響を与えます。

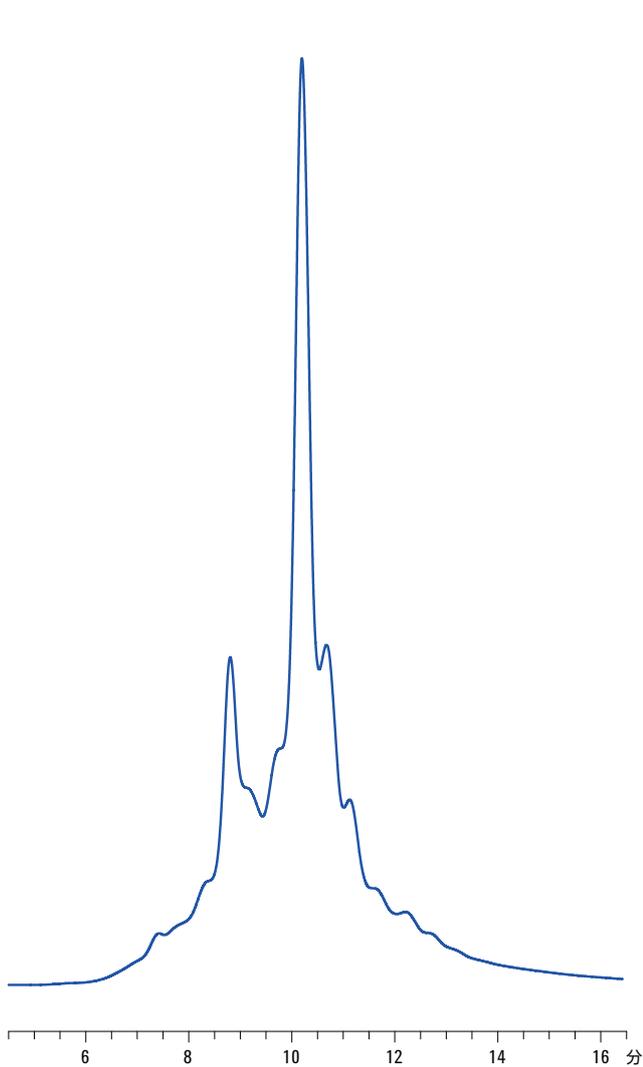


図 5a. pH 7.0~8.0 (0~20 分)、30 mM における IgG モノクローナル抗体のクロマトグラム

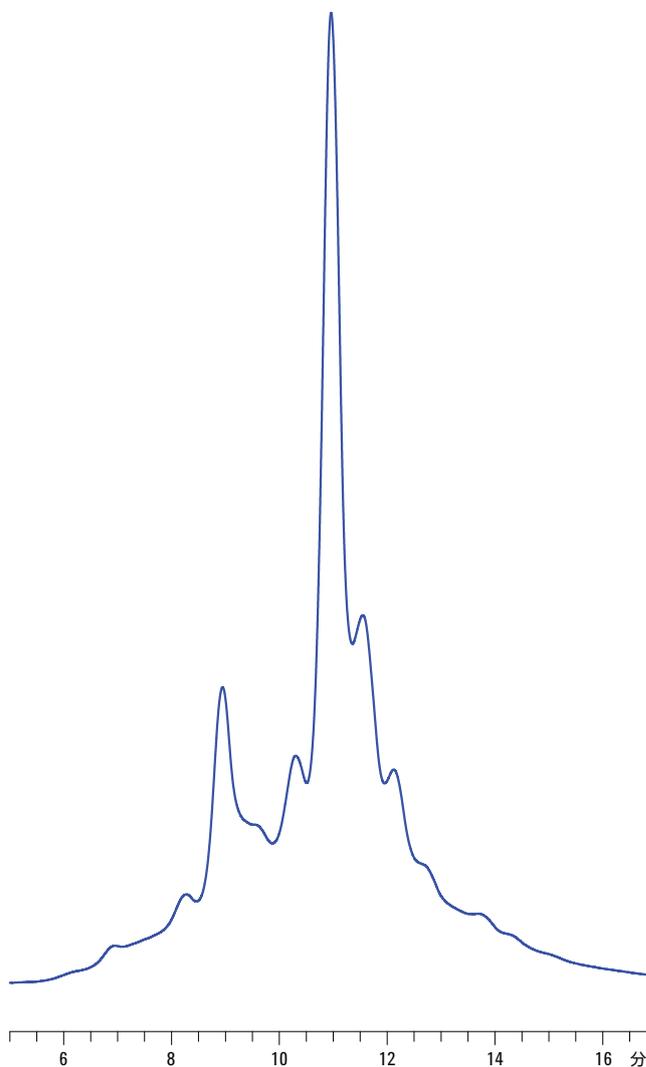


図 5b. pH 6.5~7.5 (0~20 分)、50 mM における IgG モノクローナル抗体のクロマトグラム

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 Web 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., 2011

Printed in Japan

December 16, 2011

5990-9629JAJP



Agilent Technologies