

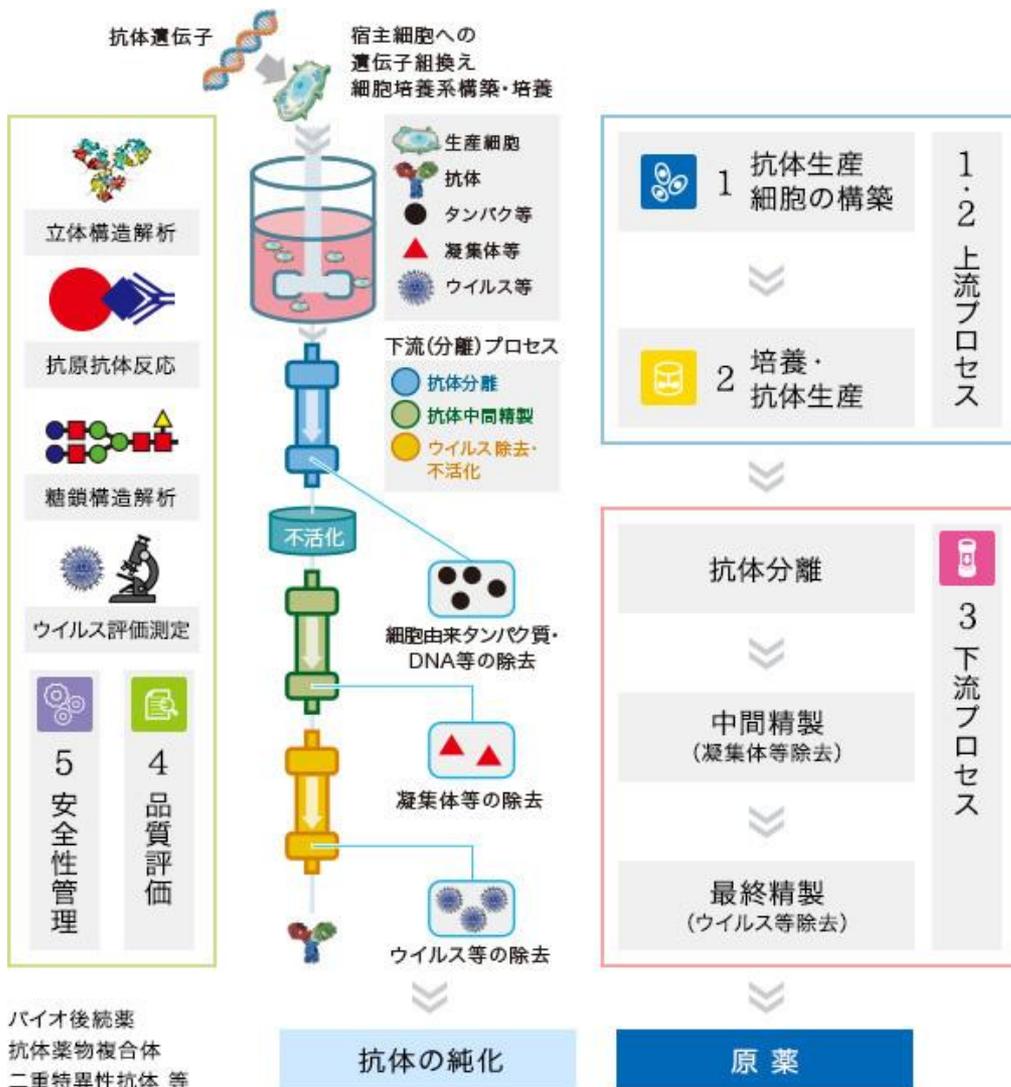


2016年9月8日
JASIS 2016 新技術説明会

最新の抗体定量用高性能 アフィニティークロマトグラフィーカラムのご紹介

東ソー株式会社
バイオサイエンス事業部

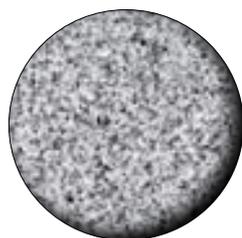
抗体医薬品(原薬)製造の流れ



- **細胞培養液中の抗体の迅速定量**
 - **開発**
培養条件の検討・最適化
(培養液組成; 緩衝液、pH、添加物など)
 - **製造**
培養液中の抗体量のモニタリング

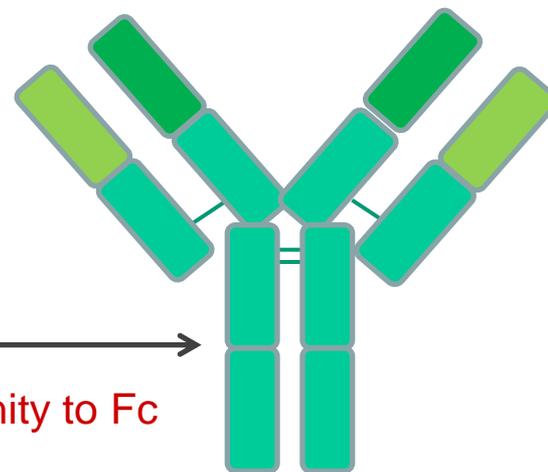


HPLC用カラム: TSKgel[®] Protein A-5PW



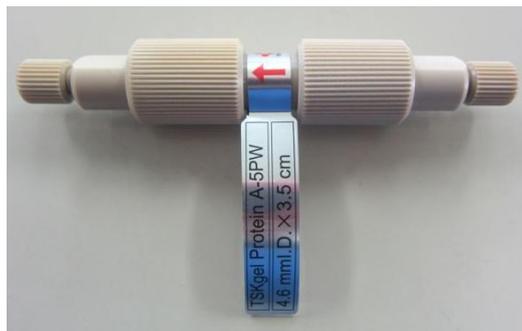
rProtein A

→
Affinity to Fc



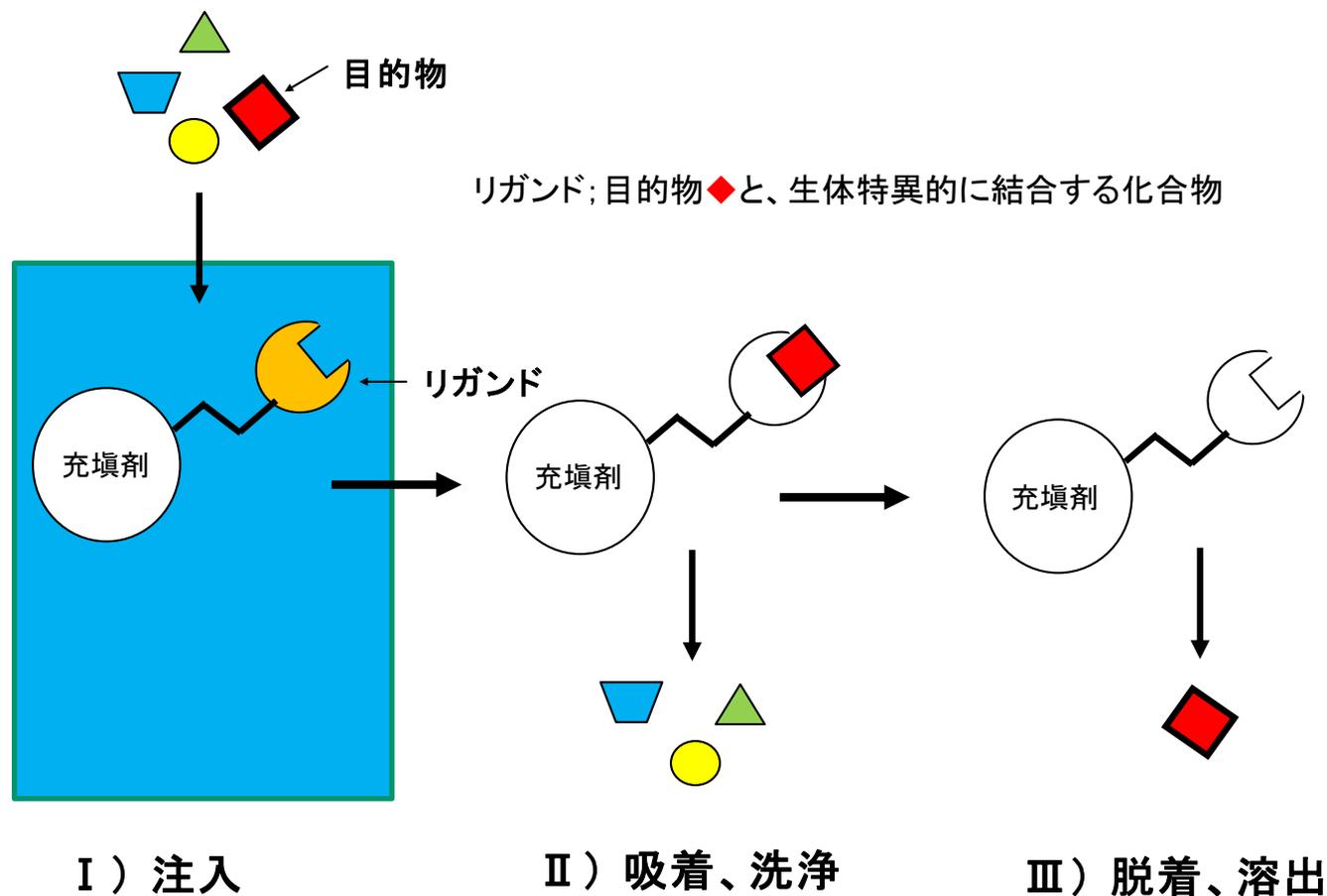
多孔質親水性ポリマー粒子
(粒子径: 20 μ m、細孔径: 100 nm)

免疫グロブリンG
(IgG)



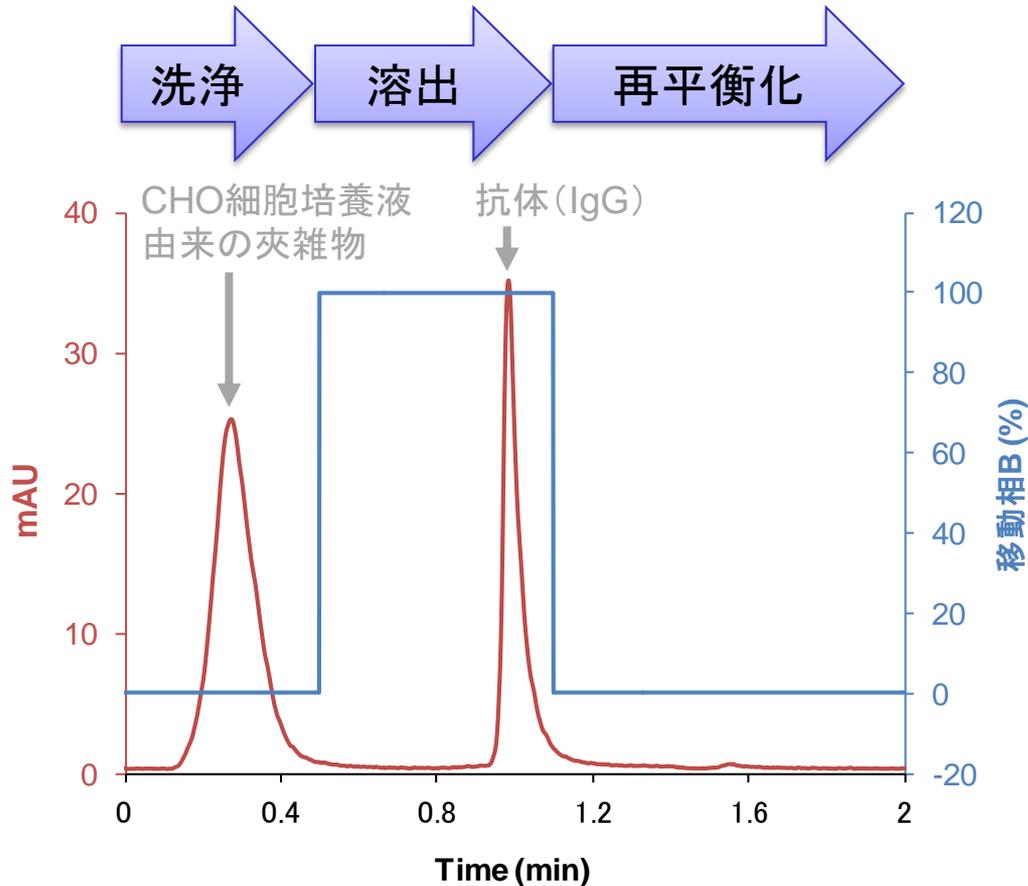
品番	0023483
カラム部材	PEEK
カラムサイズ	4.6 mm I.D. × 3.5 cm
最大圧力損失	2.0 MPa
最大使用流速	4.0 mL/min

アフィニティークロマトグラフィーの原理



➤ 特異性(選択性)が高い

CHO細胞培養液上清中のIgGの分離



カラム: TSKgel Protein A-5PW
 試料: ヒトポリクローナルIgG (0.5 g/L) + CHO細胞培養液上清, 20 μ L
 移動相A: 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
 移動相B: 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
 グラジエント(ステップワイズ):
 0.0 \rightarrow 0.5 min; 移動相A
 0.5 \rightarrow 1.1 min; 移動相B
 1.1 \rightarrow 2.0 min; 移動相A
 流速: 2.0 mL/min
 検出: UV 280 nm
 カラム温度: 25 $^{\circ}$ C

※ 10 μ Lスタティックミキサーを使用
 (ポンプとインジェクションバルブ間に装着)

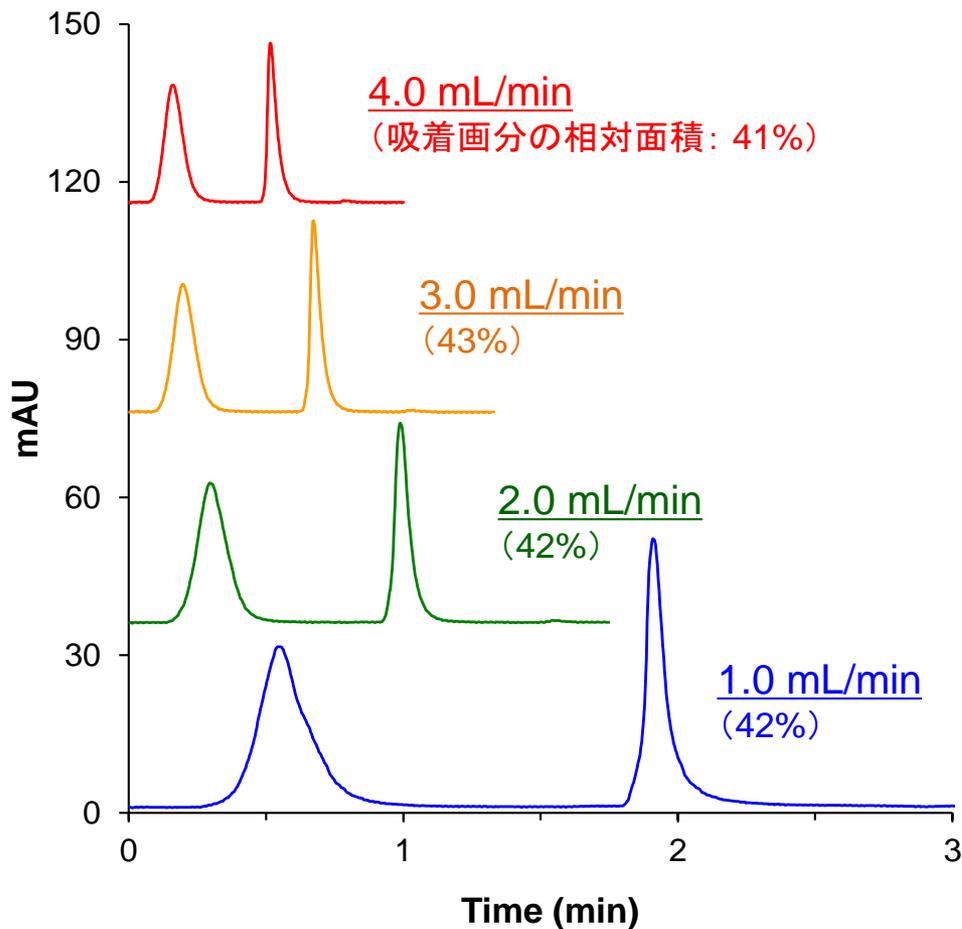
■ pHグラジエント法(中性 \rightarrow 酸性)で、抗体と夾雑物を分離



TSKgel Protein A-5PWの特長

- 抗体(IgG)の高速分離・定量が可能
- 幅広い定量範囲
- 高い耐久性
(繰り返し使用、アルカリ洗浄)
- 良好なロット間再現性
- 各種抗体への適用性

流速の影響 (クロマトグラム)



カラム: TSKgel Protein A-5PW
 試料: ヒト化モノクローナルIgG (0.5 g/L)
 + CHO細胞培養液上清, 20 μ L
 グラジエント:

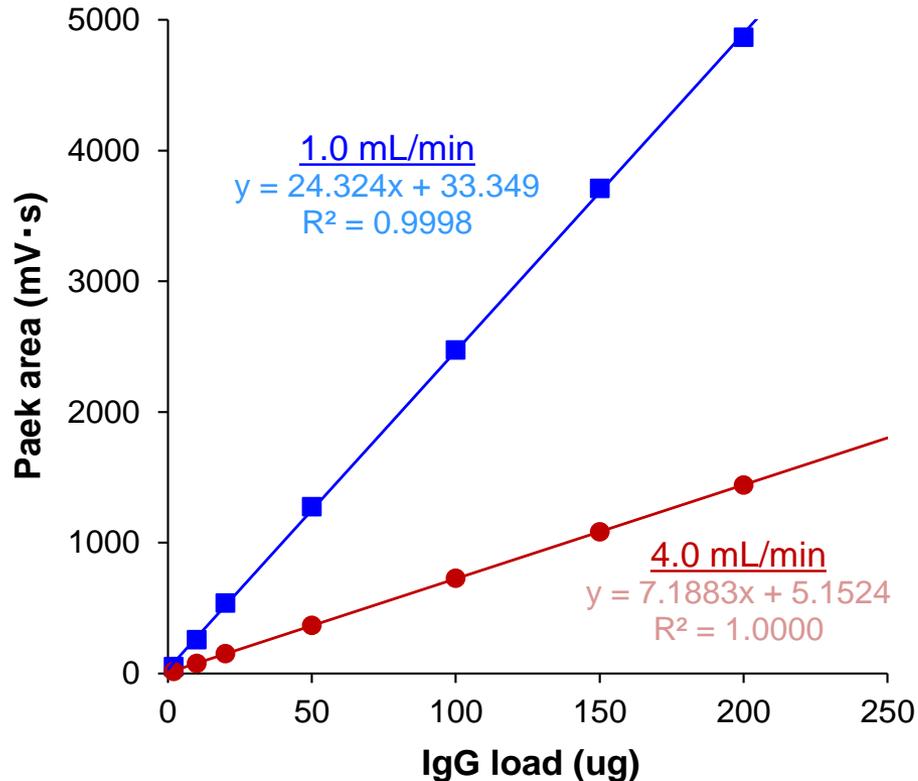
流速 (mL/min)	移動相A (min)	移動相B (min)	移動相A (min)
4.0	0 - 0.25	0.25 - 0.55	0.55 - 1.00
3.0	0 - 0.33	0.33 - 0.73	0.73 - 1.33
2.0	0 - 0.50	0.50 - 1.10	1.10 - 2.00
1.0	0 - 1.00	1.00 - 2.20	2.20 - 4.00

流速: 1.0 - 4.0 mL/min

その他の条件はスライド5と同じ

- 流速を上げると、より短時間での分析が可能。
- 1.0 - 4.0 mL/minの範囲で、IgGのピーク形状、回収率、定量範囲は同等であった。

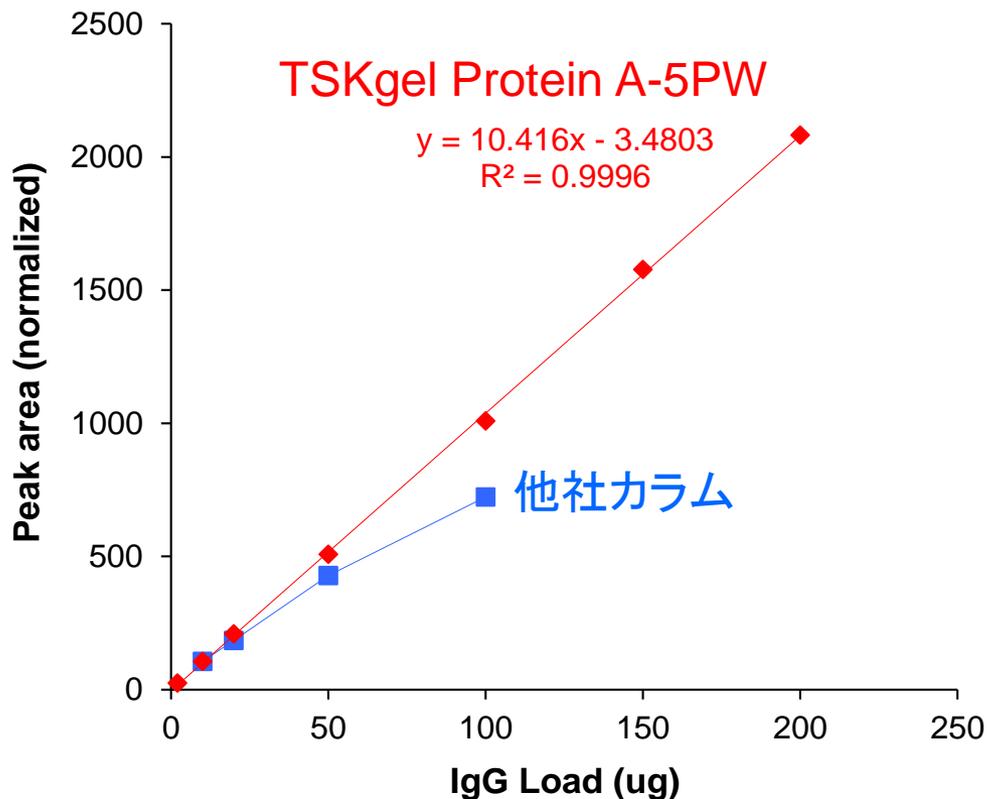
流速の影響 (IgG検量線)



カラム: TSKgel Protein A-5PW
試料: ヒト ポリクローナルIgG (0.1 - 10 g/L), 20 μ L
流速: 1.0 - 4.0 mL/min

その他の条件はスライド7と同じ

他社Protein Aカラムとの比較（検量線）



カラム: TSKgel Protein A-5PW
 他社カラム (4.0 mm I.D. × 3.5 cm, PEEK)
 試料: ヒト ポリクローナルIgG (0.1 - 10 g/L), 20 μL

他社カラムは、次のメーカー推奨条件で評価した。

移動相A: 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
 + 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4

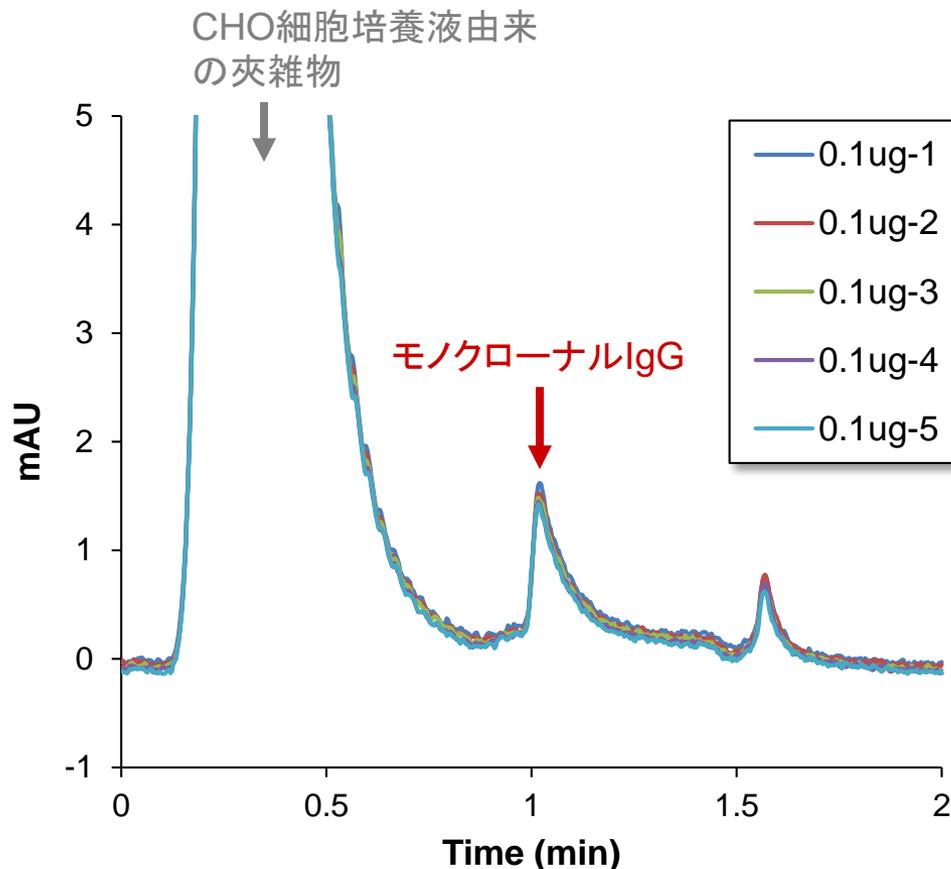
移動相B: 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
 + 0.15 mol/L NaCl, pH 2.5

グラジエント(ステップワイズ):
 0.0 → 0.2 min; 移動相A
 0.2 → 1.2 min; 移動相B
 1.2 → 2.0 min; 移動相A

その他の条件は、スライド5と同じ

- TSKgel Protein A-5PWは、他社カラムに比べて広い定量範囲を示した。
- 負荷量 3,000 μg (150 g/L × 20 μL) のIgGを、希釈なしで定量可能であることも確認。

低濃度IgG (1 mg/L) の分析



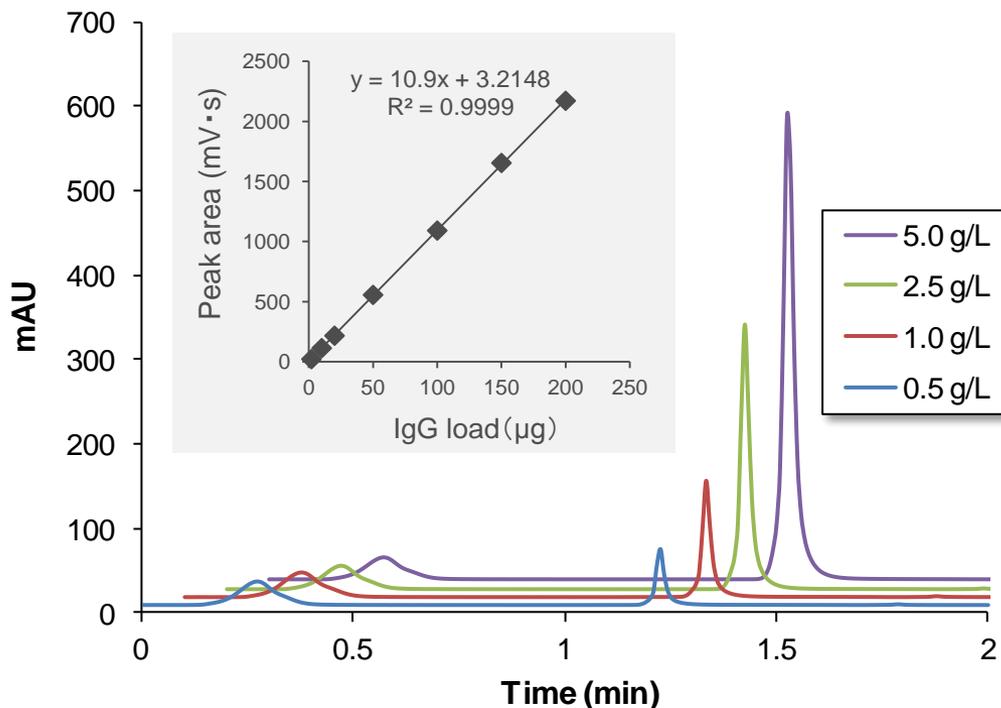
カラム: TSKgel Protein A-5PW
 試料: ヒト化モノクローナルIgG (1 mg/L)
 + CHO細胞培養液上清, 100 μ L

その他の条件はスライド5と同じ

- 注入量を増すことにより、低濃度分析が可能。
- 1 mg/L - 1 g/Lの範囲で、直線性の高い検量線が得られる事を確認。(R² \geq 0.999)

モノクローナルIgGの添加回収率

クロマトグラム



添加回収率

IgG (g/L)		Recovery (%)
Spiked Conc.	Results	
0.5	0.50	100
1.0	1.05	105
2.5	2.60	104
5.0	5.13	103

- CHO細胞培養液上清中のモノクローナルIgGについて、何れの濃度でも100 - 105 %の回収率が得られた。

カラム: TSKgel Protein A-5PW

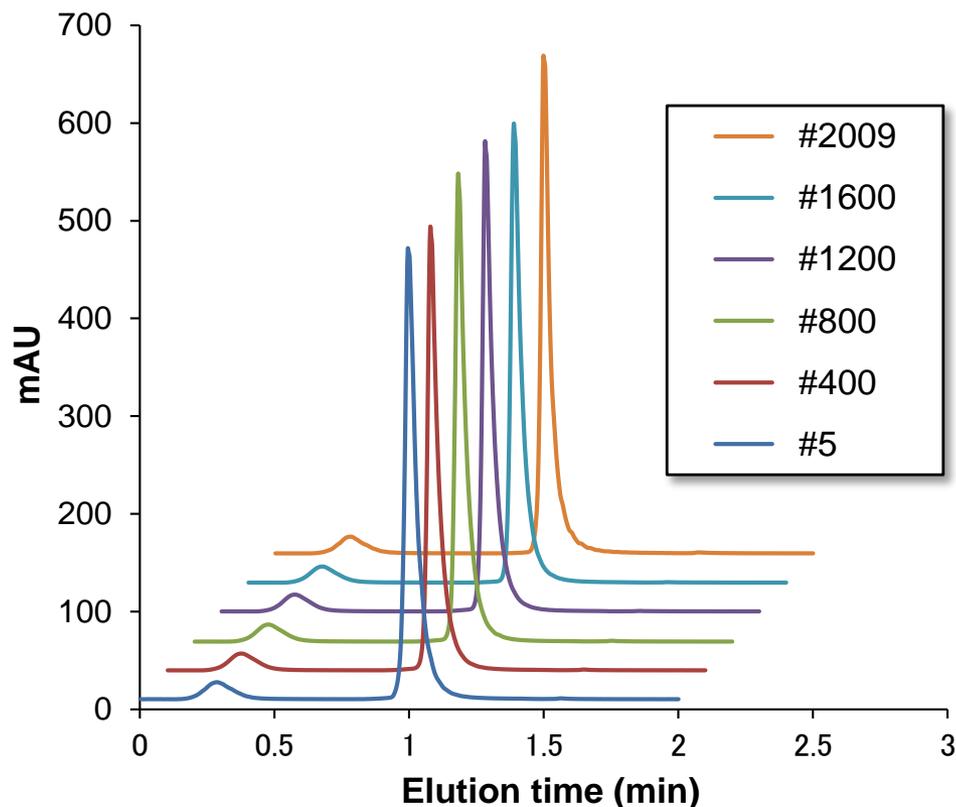
試料: ヒト化モノクローナルIgG(0.1 - 10 g/L) + CHO細胞培養液上清,
20 μL

その他の条件はスライド5と同じ

- 抗体 (IgG) の高速分離・定量が可能
- 幅広い定量範囲
- 高い耐久性
(繰り返し使用、アルカリ洗浄)
- 良好なロット間再現性
- 各種抗体への適用性



カラム耐久性(連続注入時のクロマトグラム)



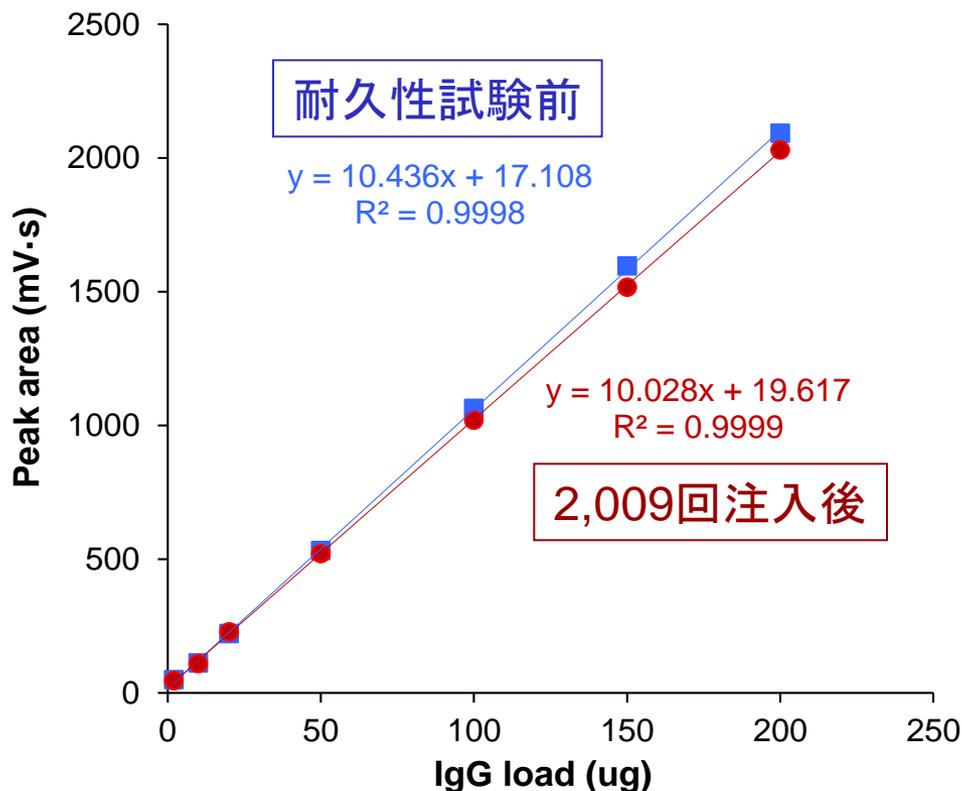
カラム: TSKgel Protein A-5PW
試料: ヒト ポリクローナルIgG (10 g/L)
+ CHO細胞培養液上清, 20 μ L

その他の条件はスライド5と同じ

■ CHO細胞培養液上清を2,000回以上注入しても、ピーク形状に変化は見られなかった。



カラム耐久性(連続注入前後のIgG検量線)



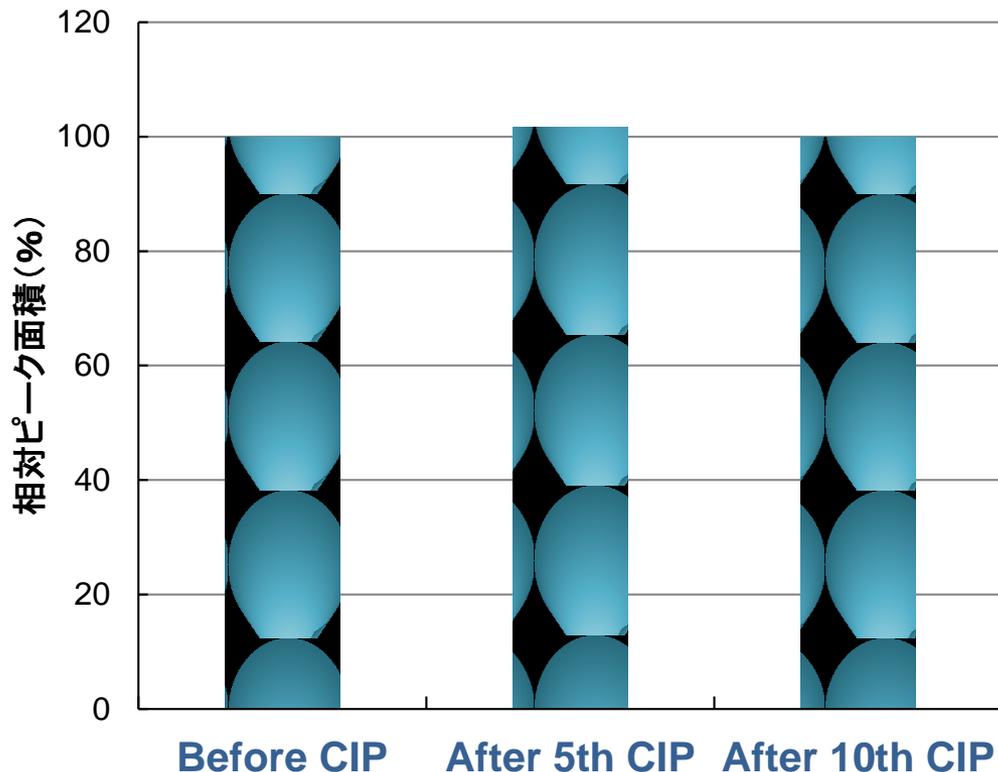
カラム: TSKgel Protein A-5PW
試料: ヒトポリクローナルIgG (0.1 - 10 g/L), 20 μ L

その他の条件はスライド5と同じ

■ 2,000回以上のCHO細胞培養液上清の注入後でも、検量線(定量性)の変化なし。



カラムのアルカリ洗浄 (Clean in Place, CIP)



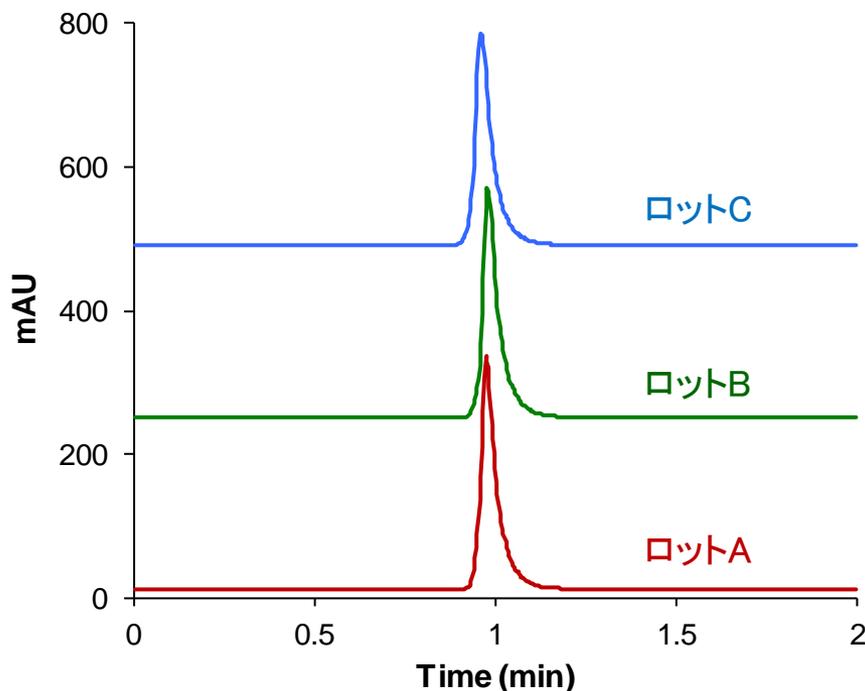
カラム: TSKgel Protein A-5PW
試料: ヒト ポリクローナルIgG (10 g/L), 20 μ L
CIP手順: 0.1 mol/L NaOH水溶液500 μ Lを繰り返し注入 (接触時間: 1.2分)

その他の条件はスライド5と同じ

- 0.1 mol/L NaOHによるCIPを10回繰り返しても、回収率は低下しなかった。
- アルカリ耐性のあるリガンド、固定化法を用いているため、TSKgel Protein A-5PWは、アルカリによるCIPが可能。

ゲル(充填剤)ロット再現性

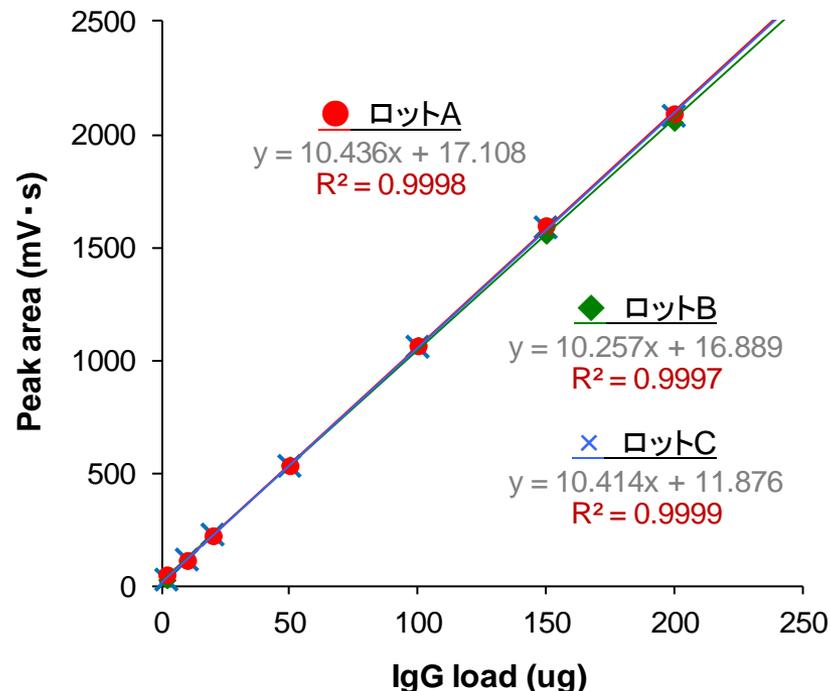
5 g/L ポリクローナルIgGのクロマトグラム



カラム: TSKgel Protein A-5PW
 試料: ヒト ポリクローナルIgG (0.1 - 10 g/L), 20 μ L

その他の条件はスライド5と同じ

IgGの検量線



■ クロマトグラム、検量線について
 良好なゲルロット再現性を示した。



- 抗体 (IgG) の高速分離・定量が可能
- 幅広い定量範囲
- 高い耐久性
(繰り返し使用、アルカリ洗浄)
- 良好なロット間再現性
- 各種抗体への適用性

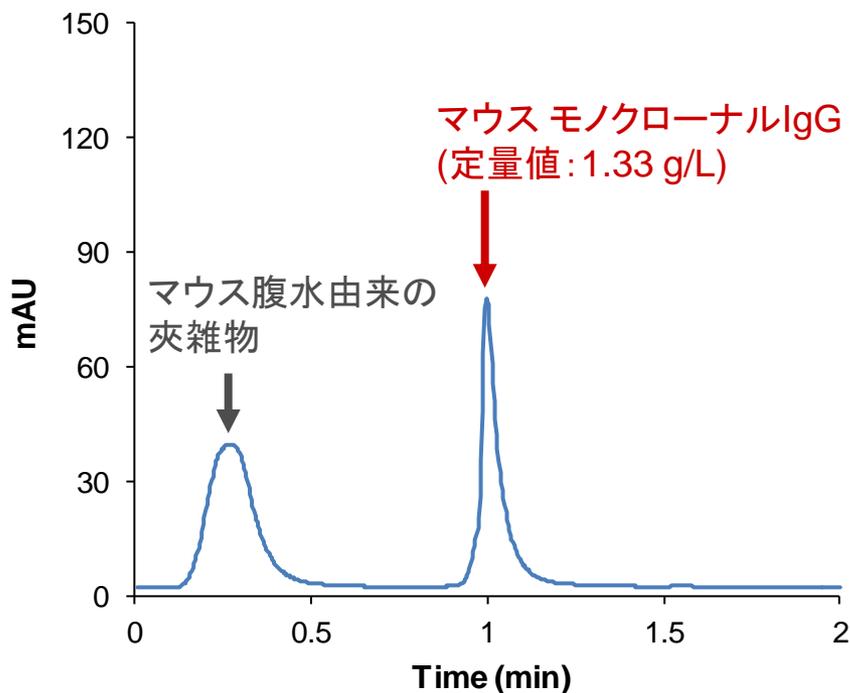


種々の抗体に対するProtein Aの親和性

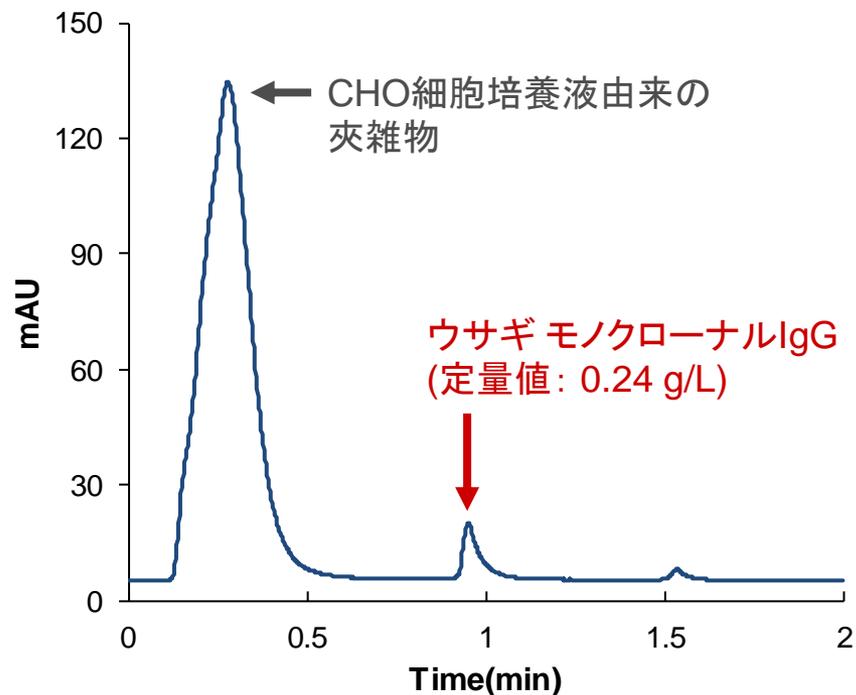
Species	Subclass	Protein A ligand of TSKgel Protein A-5PW	Native Protein A
Human	IgG1	+++++	++++
	IgG2	+++++	++++
	IgG3	-	-
	IgG4	+++++	++++
Mouse	IgG1	++++	+
	IgG2a	+++++	++++
	IgG2b	+++++	+++
	IgG3	++++	++
Rat	IgG1	++++	-
	IgG2a	-	-
	IgG2b	+++	-
	IgG2c	++++	-
Goat	IgGs	++++	-
Chicken	IgY	-	-
Rabbit	IgG	+++++	++++

マウス、ウサギ抗体の分離例

マウスIgG



ウサギIgG



カラム: TSKgel Protein A-5PW

試料: マウスモノクローナルIgGを含むマウス腹水, 20 μ L

ウサギモノクローナルIgGを含むCHO細胞培養液上清, 20 μ L

その他の条件はスライド5と同じ

まとめ

抗体の高速定量用アフィニティークロマトグラフィーカラム「TSKgel Protein A-5PW」をご紹介します。

- CHO細胞培養液などの試料に存在するIgGを、1～2分程度で定量可能。
- 低～高濃度(1 mg/L - 150 g/L)にわたって、IgGの定量が可能。
- 2,000回以上の繰り返し使用、及び、0.1 mol/L NaOHによる洗浄が可能。
- ロット間差が小さい。
- ヒト、マウス、ウサギなど各種抗体の定量に利用できる。