

# 抗体特異的 AFC 用充填剤

## TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (高吸着型) TOYOPEARL AF-rProtein A-650F (高流速型)

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F及びAF-rProtein A-650Fは、抗体精製用の耐アルカリ性の高吸着型及び高流速型(ハイスルーブット型)のプロテインA固定化アフィニティークロマトグラフィー用充填剤です。モノクローナル抗体の精製に適しています。

### 構造

TOYOPEARL HW-65 

### 特長

- TOYOPEARL HWタイプの特長は全て有しています。
- 吸着量が高い。(静的吸着量 68 g/L以上:高吸着型)
  - 速い流速が出せ、短時間で処理できます。(滞留時間1分:高流速型)
  - 大型カラムで大量に使用でき、工業化に適しています。
  - HPLCシステムが使用でき、操作性に優れています。
  - アルカリ耐久性に優れ、NaOH溶液による洗浄、CIPが可能です。
  - リガンド(rプロテインA)の漏れが少ない。

### 主な対象物質

- 抗体

### TOYOPEARL プロテインA 充填剤

品番	品名	吸着量 (免疫グロブリンG)	容量	価格(円)
0023425	TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F	≧68 g/L	10 mL	77,000
0023426			25 mL	165,000
0023427			100 mL	330,000
0022803	TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	≧45 g/L	10 mL	77,000
0022804			25 mL	165,000
0022805			100 mL	330,000

出荷形態: 20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。

粒子径(膨潤時): 30~60 μm 保存温度: 2~8℃

ToyoScreenもご利用いただけます。:トヨパールを充填した初期スクリーニング用カラムです。(詳しくはP.168参照) 大量にご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。プロテインAリガンド漏出率測定キット(ELISAキット)につきましては、当社営業までお問い合わせください。

### 0.1 mol/L NaOH CIPサイクルと抗体吸着量

	初期	CIP 100回	CIP 200回	CIP 300回
IgG 吸着量 (動的)	38 g/L	35 g/L	32 g/L	27 g/L
(変化率)	100 %	92 %	84 %	71 %
リガンド漏出率	22 ppm	7 ppm	5 ppm	7 ppm

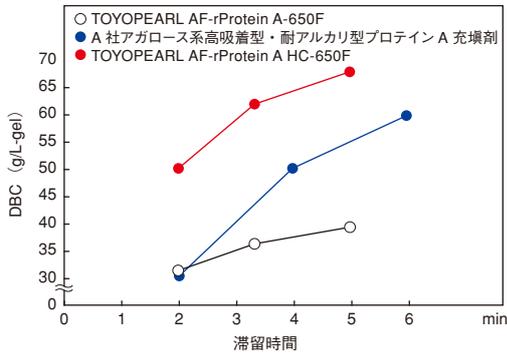
※CIP条件: 0.1 mol/L NaOH、8.2 カラム容積 (CV)、接触時間16.7分

### 3ロットの再現性

	Lot A	Lot B	Lot C
IgG 吸着量 (静的)	51.0 g/L	50.1 g/L	53.1 g/L
IgG 吸着量 (動的)	35.7 g/L	33.6 g/L	35.6 g/L
IgG 精製純度*	98.8 %	98.5 %	98.5 %

\*SEC法による

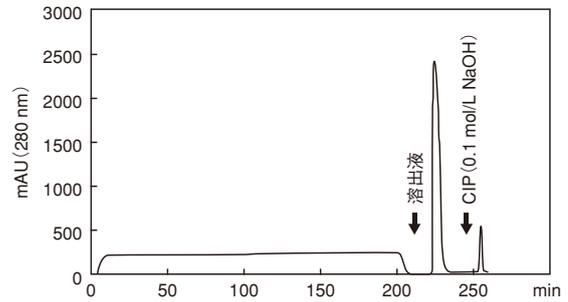
## IgGの動的吸着量と滞留時間の関係



カラム; TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F  
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F  
A社アガロース系高吸着型・耐アルカリ型プロテインA充填剤  
カラムサイズ; 5 mm I.D. × 5 cm  
溶離液; 20 mmol/L リン酸緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0)  
試料; ヒトポリクローナル IgG (1 g/L)

- 滞留時間3分以上で60 g/L以上の高い動的吸着量が得られます。

## 細胞培養液からのモノクローナル抗体の精製



カラム; TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D. × 5 cm)  
吸着液; 20 mmol/L リン酸緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0)  
溶出液; 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0)  
流速; 0.2 mL/min  
検出; UV (280 nm)  
試料; 細胞培養液 40 mL (ヒト化IgG<sub>1</sub>: 1 g/L)  
\*精製画分は、TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>による純度チェックにより、純度95%と確認された

- 一段階の精製で、純度95% (SEC法)の抗体画分が得られています。

## CHO 宿主細胞由来たんぱく質 (HCP) の除去 (ハイスループットスクリーニング)

	充填剤量 (μL)	たんぱく質負荷量 (g/L gel)	溶出 (pH)	流速 (cm/h)	溶出画分HCP量 (μg/L)
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	200	5	3.9	100	19.2
市販耐アルカリ rProtein A 充填剤	200	5	3.9	100	59.7
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	200	5	3.9	250	9.8
市販耐アルカリ rProtein A 充填剤	200	5	3.9	250	30.5
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F	200	25	3.9	250	47.3
市販耐アルカリ rProtein A 充填剤	200	25	3.9	250	629.6

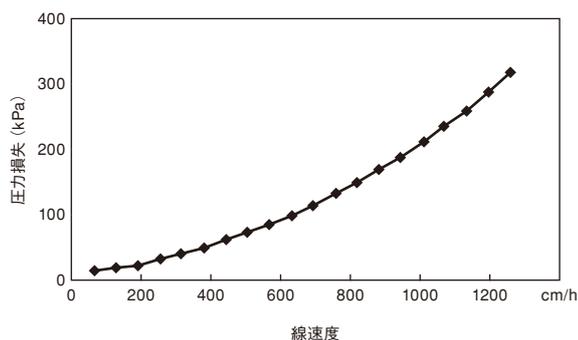
カラム; Atoll MediaScout® RoboColumns (5 mm I.D. × 1 cm)  
吸着溶離液; 予備実験で各充填剤で最適化されたものを使用  
TOYOPEARL AF-rProtein A-650F: 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) + 0.15 mol/L NaCl  
市販充填剤: 0.1 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) + 0.15 mol/L NaCl  
溶出液; 酢酸緩衝液 (pH 3.9)  
試料; モノクローナル抗体 (IgG<sub>1</sub>, humanized) 1 g/L、細胞培養液に抗体を添加したもの

HCP含量はELISA (Cygnus Technologies) で測定  
MediaScoutはAtoll社の登録商標です。

\*このデータは、Univ. of Applied Science EsslingenのU. Breuninger博士のご厚意によりです。

- TOYOPEARL AF-rProtein A-650Fは、市販耐アルカリ性rProtein A充填剤に比べ、HCPの除去に優れています。

## 流速と圧力損失の関係 (水通液時)



カラム; 22 mm I.D. × 20 cm

- TOYOPEARL AF-rProtein A-650Fは、高流速での使用に対応できます。

## 群特異的 AFC 用充填剤

### TOYOPEARL AF-Heparin HC-650

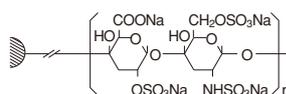
AF-Heparin HC-650は親水性ビニルポリマーを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用充填剤TOYOPEARL HW-65 (たんぱく質排除限界分子量 $5 \times 10^6$ ) にヘパリン (ブタ粘膜) を導入した群特異的アフィニティークロマトグラフィー用充填剤です。

#### ▼ 特長

- HPLCシステムが使用でき高流量でも流せます。
- 大型カラムで大量に処理でき工業化に適しています。
- 汎用性があります。

#### ▼ 構造

TOYOPEARL HW-65



#### ▼ 主な対象物質

- 血液凝固因子、補体
- RNA及びDNAポリメラーゼ
- リポたんぱく質
- 酵素

#### 一覧表

品番	品名	容量	価格(円)
0020030	TOYOPEARL AF-Heparin HC-650M	10 mL	8,000
0020031		100 mL	77,000

出荷形態：20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。 粒子径(膨潤時)：40~90 μm 保存温度：2~8℃  
ToyoScreenもご利用いただけます。トヨパールを充填した初期スクリーニング用カラムです。(詳しくはP.168参照) 大量にご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。

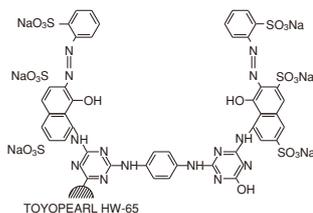
## 群特異的 AFC 用充填剤

### TOYOPEARL AF-Red-650

色素をリガンドとしたFFLC用トヨパールのアフィニティークロマトグラフィー用充填剤です。すぐれた物性をもつTOYOPEARL HW-65をベースゲルとし、Reactive Red120を結合させた群特異的アフィニティークロマトグラフィー用充填剤です。

#### ▼ 構造

- TOYOPEARL AF-Red-650



#### ▼ 特長

- TOYOPEARL HWタイプの特長は全て有しています。
- 速い流速が出せ、短時間で処理できます。
  - 大型カラムで大量に使用でき、工業化に適しています。
  - HPLCシステムが使用でき、操作性に優れています。
  - 分離能が優れています。

#### ▼ 主な対象物質

- NAD(P)<sup>+</sup>依存性酵素
- 酸化還元酵素、脱水素酵素
- キナーゼ
- プラスミノージェン
- カルボキシペプチダーゼ

#### 一覧表

品番	品名	容量	価格(円)
0008651	TOYOPEARL AF-Red-650ML	25 mL	16,000
0008706		500 mL	272,000

出荷形態：1 mol/L NaClを含む20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。  
粒子径(膨潤時)：40~90 μm  
保存温度：2~8℃  
ToyoScreenもご利用いただけます。トヨパールを充填した初期スクリーニング用カラムです。(詳しくはP.168参照) 大量にご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。

#### たんぱく質結合量

品名	LDH (g/L)	HK (g/L)
TOYOPEARL AF-Red-650ML	14	2.0

LDH：NAD<sup>+</sup>依存性乳酸脱水素酵素 HK：NADP<sup>+</sup>依存性ヘキソキナーゼ

数字は主分画のみの回収率を表わしているため、個々の活性の全回収率は10~20%高くなります。

#### 回収率

酵 素	精製率(倍)	
	AF-Red-650ML	AF-Red-650ML
アルコール脱水素酵素	119	68
グルタミン酸脱水素酵素	94	41
6-フォスフォグルコン酸脱水素酵素	58	35
リンゴ酸脱水素酵素	240	178
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	188	46
グルタチオン還元酵素	123	49

# 群特異的 AFC 用充填剤

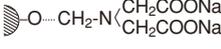
## TOYOPEARL AF-Chelate-650

TOYOPEARL AF-Chelate-650は親水性ビニルポリマーを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用充填剤TOYOPEARL HW-65 (たんぱく質排除限界分子量 $5 \times 10^6$ ) にイミノジ酢酸を導入した金属キレートアフィニティー用充填剤です。

### ▼ 特長

- HPLCシステムが使用でき高流量でも流せます。
- 大型カラムで大量に処理でき工業化に適しています。
- 汎用性があります。

### ▼ 構造

TOYOPEARL HW-65 

### ▼ 主な対象物質

- 金属親和性たんぱく質、ペプチド
- His-tagたんぱく質

### ▼ 原理

アミノ酸の中で特にヒスチジン、システイン、トリプトファンは、金属と特異的に結合する、という性質を利用するクロマトグラフィーです。充填剤の表面に存在するイミノジ酢酸基に金属を配位させることにより、これらのアミノ酸残基が表面に露出させているたんぱく質を選択的に吸着します。一般に用いられる金属は $\text{Cu}^{2+}$ と $\text{Zn}^{2+}$ です。 $\text{Cu}^{2+}$ は結合力が非常に強く、試料によっては $\text{Cu}^{2+}$ にしか結合しないものがあります。 $\text{Zn}^{2+}$ は $\text{Cu}^{2+}$ に比べ結合力は弱く、試料を選択的に溶出させるのに有効です。

### 一覧表

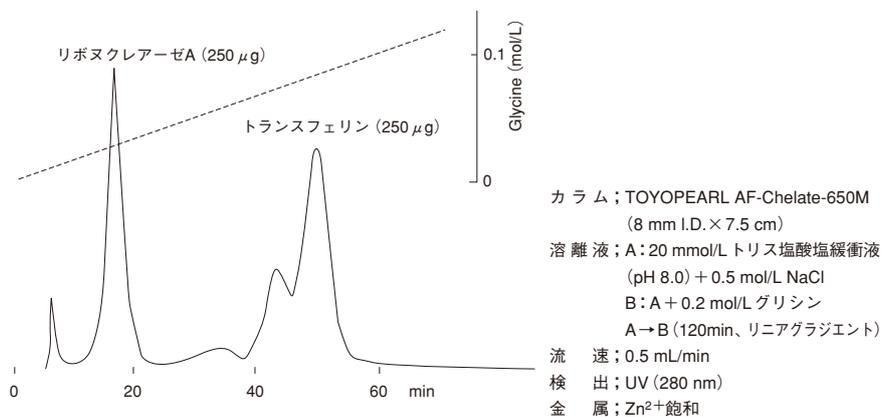
品番	品名	容量	価格(円)
0014475	TOYOPEARL AF-Chelate-650M	25 mL	22,000
0014476		250 mL	182,000

出荷形態：20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。

粒子径(膨潤時)：40~90  $\mu\text{m}$

ToyoScreenもご利用いただけます。：トヨパールを充填した初期スクリーニング用カラムです。(詳しくはP.168参照)  
大量にご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。

### ▼ たんぱく質の分離



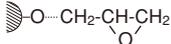
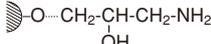
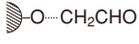
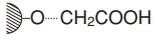
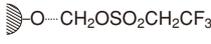
- 溶出方法には、pHグラジエントやイミダゾールグラジエントを行うことができます。

## 活性化型 AFC 用充填剤

### TOYOPEARL AF-Epoxy-650 TOYOPEARL AF-Amino-650 TOYOPEARL AF-Formyl-650 TOYOPEARL AF-Carboxy-650 TOYOPEARL AF-Tresyl-650

群特異的アフィニティー用充填剤同様 TOYOPEARL HW-65 (たんぱく質排除限界分子量  $5 \times 10^6$ ) をベースゲルとした充填剤です。活性基にリガンドを導入してご使用ください。

#### ▼ 構造

- TOYOPEARL AF-Epoxy-650  
TOYOPEARL HW-65 
- TOYOPEARL AF-Amino-650  
TOYOPEARL HW-65 
- TOYOPEARL AF-Formyl-650  
TOYOPEARL HW-65 
- TOYOPEARL AF-Carboxy-650  
TOYOPEARL HW-65 
- TOYOPEARL AF-Tresyl-650  
TOYOPEARL HW-65 

#### ▼ 特長

- リガンド導入の際、きびしい反応条件が使用可能です。  
(例) 強酸、強アルカリ、有機溶媒
- ハードな条件で洗浄可能です。  
(例) 強酸、強アルカリ、有機溶媒
- 溶出分離に種々の溶出液が使えます。  
(例) 界面活性剤、有機溶媒
- 高流速で流せます。
- 塩濃度の変化で体積変化がありません。
- 工業用に適した物理化学的性質を持っています。
- 粒子径 (膨潤時) 40~90 μm

#### 一覧表

品番	品名	容量	価格 (円)
0008000	TOYOPEARL AF-Epoxy-650M*4	10 g (乾燥品)	18,000
0008038	TOYOPEARL AF-Epoxy-650M*4	100 g (乾燥品)	157,000
0008002	TOYOPEARL AF-Amino-650M	25 mL*1	14,000
0008039	TOYOPEARL AF-Amino-650M	100 mL*1	48,000
0008004	TOYOPEARL AF-Formyl-650M*3	25 mL*2	14,000
0008040	TOYOPEARL AF-Formyl-650M*3	100 mL*2	48,000
0008006	TOYOPEARL AF-Carboxy-650M	25 mL*1	12,000
0008041	TOYOPEARL AF-Carboxy-650M	100 mL*1	44,000
0014471	TOYOPEARL AF-Tresyl-650M*3*4	5 g (乾燥品)	18,000
0014472	TOYOPEARL AF-Tresyl-650M*3*4	100 g (乾燥品)	314,000

出荷形態：\*1：20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。大量にご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。

\*2：1%グルタルアルデヒド

\*3：保存温度：2~8℃

\*4：吸湿注意

## TOYOPEARL AF-Tresyl-650Mへのたんぱく質の固定化率

たんぱく質 (pI)	固定化用緩衝液	
	0.1 mmol/L NaHCO <sub>3</sub> + 0.5 mol/L NaCl (pH 8.0)	1.0 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)
α <sub>1</sub> 酸性グリコたんぱく質 (1.8~2.8)	2.3 %	58 %
α-1-アンチトリプシン (4.0)	25	98
大豆トリプシンインヒビター (4.3~4.6)	85	—
ウシ血清アルブミン (4.9)	31	99
ヒトグロブリン (5.8~7.3)	80	—
ミオグロビン (6.8~7.8)	55	99
α-キモトリプシン (9.1)	70	100
チトクロムC (10.1)	43	46
リゾチーム (11.0)	100	—

たんぱく質：各10 g/L、温度：25℃、時間：4時間

1.0 mol/L リン酸カリウム緩衝液を用いると、等電点にかかわらず、たんぱく質を効率良く固定化することができます。

固定化方法に関しては、TSKgel Tresyl-5PWの項 (P.81) をご参照ください。

## 活性化型AFC用充填剤へのリガンドの標準固定化条件

TOYOPEARL	リガンドの官能基	固定化条件		
		カップリング溶液	添加剤	反応時間
AF-Epoxy-650	アミノ基	pH 9~11の水溶液	無	40℃、24 h
	チオール基	pH 7~8の水溶液	無	25℃、24 h
	水酸基	0.1 mol/L 水酸化ナトリウム (反応性は低い)	無	40℃、24 h
AF-Amino-650	カルボキシル基	pH 4~6の水溶液	EDC* <sup>1</sup>	25℃、24 h
	アルデヒド基	0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7)	NaCNBH <sub>3</sub>	25℃、24 h
AF-Formyl-650	アミノ基	0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7)	NaCNBH <sub>3</sub>	25℃、16 h
AF-Carboxy-650	アミノ基	pH 4~6の水溶液	EDC* <sup>1</sup>	25℃、24 h
AF-Tresyl-650	アミノ基及びチオール基	1.0 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7~8)* <sup>2</sup>	無	25℃、4 h
		0.1 mol/L 炭酸塩緩衝液 (pH 8.5) + 0.5 mol/L NaCl* <sup>3</sup>	無	25℃、16 h

\*<sup>1</sup> EDC:1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)カルボジイミド\*<sup>2</sup> ペプチド、たんぱく質、核酸の固定化用\*<sup>3</sup> 一般低分子固定化用

## TOYOPEARL AF-Epoxy-650Mへのリガンド固定化量

リガンド	固定化量 (mmol/L)	リガンド	固定化量 (mmol/L)	リガンド	固定化量 (mmol/L)
■ 抗生物質		■ アミノ酸		■ チオール化合物	
バシトラシンA	21	L-アスパラギン酸	4	メルカプトエタノール	156
アンピシリン	95	L-リジン	20	グルタチオン	52
グラミジジンS	24	L-トリプトファンメチルエステル	35	■ 糖類	
セファロsporinC	19	L-グリシン	100	D-グルコサミン	28
				β-シクロデキストリン	3
				■ アミン類	
				スペルミン	40
				スペルミジン	47

## TOYOPEARL AF-Amino-、AF-Carboxy-、AF-Formyl-650Mにおけるたんぱく質固定化収率

たんぱく質	pI	固定化収率 (%)		
		AF-Amino	AF-Carboxy	AF-Formyl
オブアルブミン	4.2	36	5	3 (16*)
トリプシンインヒビター	4.3-4.6	45	87	—
ウシ血清アルブミン	4.9	94	19	24 (64*)
トランスフェリン	4.9-6.2	—	—	35 (50*)
ヒトIgG	5.8-7.3	31	52	66
ミオグロビン	8.1	—	—	43
チトクロムC	10.1	18	47	65
リゾチーム	11.0-11.4	30	77	99

固定化条件：ゲル2 g (湿潤)：たんぱく質40 mg

カップリング溶液：0.5 mol/L NaCl (pH 4.5~6) + EDC 60 mg (AF-Amino、AF-Carboxy)

0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7) + 100 mg NaCNBH<sub>3</sub> (AF-Formyl)

\*0.1 mol/L MOPS緩衝液 (pH 7.5) + 80 mmol/L 塩化カルシウム