

# モノクローナル抗体の超高純度精製は、これで決まり！

疎水クロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL® Phenyl-650M による精製  
(オープンアクセス学術論文から)



抗体医薬品の製造におけるダウンストリーム工程では、一般にキャプチャー工程（プロテインAアフィニティークロマトグラフィー）に続き、ポリッシング工程として二段階の異なる分離モードでのクロマトグラフィーを行います。疎水クロマトグラフィー（HIC）は、特に凝集体などの不純物の除去に効果的な分離モードです。

I. R. A. P. Bresolin, N. Lingg, I. T. L. Bresolin and A. Jungbauer

Hydrophobic interaction chromatography as polishing step enables obtaining ultra-pure recombinant antibodies

J. Biotechnology: X6 (2020) 100020 /CC BY 4.0, <https://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100020>

## (要旨)

- ・ HIC 用充填剤である TOYOPEARL Phenyl-650M を用いたポリッシングにより、抗腫瘍壊死因子抗体（anti-tumor necrosis factor alpha ; TNF $\alpha$ 、IgG $_1$ ）を超高純度に精製することができた。
- ・ HIC における吸着等温線、破過曲線、クロマトグラフィー分離などの評価がなされた。
- ・ HIC で精製された抗体の純度は 99.9 %、回収率は 96.2 %であった。抗体画分に混入する不純物である凝集体、宿主由来たんぱく質（HCP）、DNA は、それぞれ検出限界以下であると確認できた。
- ・ この HIC 分離法は、超高純度の抗体が要求される場合のダウンストリーム工程として有用である。

## ●抗腫瘍壊死因子抗体（anti-tumor necrosis factor alpha ; TNF $\alpha$ 、IgG $_1$ ）の精製

### 抗体試料の精製プロセス



試料；抗腫瘍壊死因子抗体（anti-tumor necrosis factor alpha ; TNF $\alpha$ 、IgG $_1$ ）  
リファレンス抗体；アダリムマブ（Adalimumab、販売名：Humira®）

動的吸着容量（TOYOPEARL Phenyl-650M）；12.05 g/L

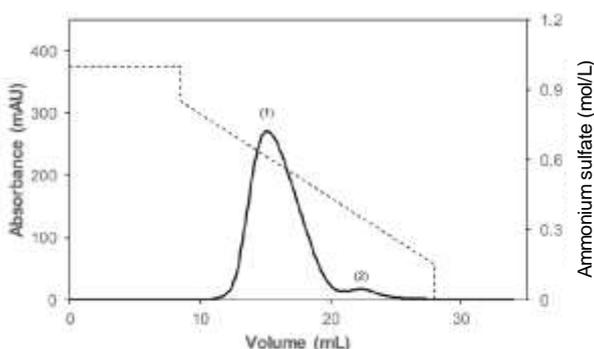
カラムサイズ；5 mm I.D. x 2.55 cm、

滞留時間；2.5 min（流速；0.2 mL/min）

溶離液；20 mmol/L リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.4）+ 1 mol/L 硫酸

凝集体の分析、定量；TSKgel® G3000SWXL

## ●TOYOPEARL Phenyl-650M を用いた疎水クロマトグラフィー（HIC）による抗体の超高純度精製



<分離条件>

カラム；TOYOPEARL Phenyl-650M (5 mm I.D. x 2.55 cm)

溶離液；バッファーA：1 mol/L 硫酸を含むバッファーB

バッファーB：20 mmol/L リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.4）

1) バッファーA (12 CV)

2) バッファーB：15%から85%ヘリニアグラジエント (40 CV)

3) バッファーB：100% (5 CV)

流速；0.2 mL/min

検出；UV (280 nm)

試料；anti-TNF $\alpha$  IgG $_1$  (2 g/L, 2 mL)

Ref.; I. R. A. P. Bresolin et al., J. Biotechnology: X6 (2020) 100020 /CC BY 4.0

<https://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100020>

(クロマトグラフィー分離での抗体のピーク 1、ピーク 2 の純度検定は裏面に続く)

## ●疎水クロマトグラフィー (HIC) により精製された抗体 (Peak 1) の純度検定

試料	濃度 (g/L) <sup>a</sup>	抗体純度 (%) <sup>b</sup>	凝集体 (%) <sup>c</sup>	HCP (ppm) <sup>d</sup>	dsDNA (ppb) <sup>e</sup>
anti-TNF $\alpha$ IgG1 (精製前)	2.00	98.04	1.53	342.5	< 0.41*
anti-TNF $\alpha$ IgG1 + salt (試料添加)	2.00	98.31	1.55	173.7	< 0.41*
<b>Peak 1 (精製画分)</b>	<b>0.96</b>	<b>99.90</b>	<b>&lt; 0.06*</b>	<b>&lt; 2.0*</b>	<b>&lt; 0.85*</b>
Peak 2	0.03	59.88	57.55	< 63*	< 27*
Adalimumab (Humira)	2.00	99.56	0.33	n.d. (181.6)**	< 0.41*

<sup>a</sup> by UV at 280 nm, <sup>b</sup> by SEC at 280 nm, <sup>c</sup> by SEC at 215 nm, <sup>d</sup> ELISA, <sup>e</sup> PCR resDNASEQ<sup>®</sup>

\* Below lower limit of detection (LLOD), undiluted sample used

\*\*Data from LC/MS/MS by Oliviero et al., Easy, Fast and Reproducible Analysis of Host Cell Protein (HCP) in Monoclonal Antibody Preparations, Application Note (2019) Ref.; I. R. A. P. Bresolin et al., J. Biotechnology: X6 (2020) 100020, <https://doi.org/10.1016/j.btexc.2020.100020>, data modified from original

※HIC により、市販抗体医薬品アダリムマブよりも、さらに純度の高い抗体画分が得られました。

## ●抗体の精製における HIC 用充填剤の選択のポイント

- ・抗体の疎水性に合わせ、適した疎水性の HIC 用充填剤 (官能基、細孔径、粒子径などの違い) を選択し、抗体の回収率および分離選択性 (不純物の除去) を最適化
- ・分離における溶離液条件 (バッファー濃度、pH、塩濃度、流速、グラジエントの傾き、温度など) を最適化
- ・リニアグラジエント溶出では、抗体がグラジエントの中央部へ溶出するような堅牢な条件を選択
- ・HIC 充填剤の疎水度; (低) Ether-650/PPG-600 < Phenyl-650/600 < Butyl-650/600 < Hexyl-650 (高)

## ●HIC 用充填剤およびスクリーニング用カラム製品一覧表

品番	品名	粒子径 (μm)	容量* (mL)	備考	品番	品名	粒子径 (μm)	容量 (mL)	備考
0016173	TOYOPEARL Ether-650M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045220	SkillPak TOYOPEARL Ether-650M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0021302	TOYOPEARL PPG-600M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045218	SkillPak TOYOPEARL PPG-600M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0014478	TOYOPEARL Phenyl-650M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045217	SkillPak TOYOPEARL Phenyl-650M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0021888	TOYOPEARL Phenyl-600M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045216	SkillPak TOYOPEARL Phenyl-600M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0007477	TOYOPEARL Butyl-650M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045215	SkillPak TOYOPEARL Butyl-650M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0021449	TOYOPEARL Butyl-600M	40 - 90	100	充填剤 (ボトル)	0045214	SkillPak TOYOPEARL Butyl-600M	40 - 90	1 mL x 5本	カラム
0019956	TOYOPEARL SuperButyl-550C	50 - 150	100	充填剤 (ボトル)	0045219	SkillPak TOYOPEARL Hexyl-650C	50 - 150	1 mL x 5本	カラム
0019026	TOYOPEARL Hexyl-650C	50 - 150	100	充填剤 (ボトル)	0045233	SkillPak HIC (TOYOPEARL Butyl-650M, Phenyl-650M, PPG-600M, Hexyl-650C, Ether-650M)	-	1 mL x 5種類 x 1本	カラム
0043276	TSKgel Ether-5PW (20)	15 - 25	25	充填剤 (ボトル)	0045234	SkillPak HIC (TOYOPEARL Butyl-600M, Phenyl-600M, PPG-600M, Hexyl-650C, Ether-650M)	-	1 mL x 5種類 x 1本	カラム
0043176	TSKgel Ether-5PW (30)	20 - 40	25	充填剤 (ボトル)	0045235	SkillPak HIC (TOYOPEARL Butyl-650M, Phenyl-650M, PPG-600M)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
0043277	TSKgel Phenyl-5PW (20)	15 - 25	25	充填剤 (ボトル)	0045236	SkillPak HIC (TOYOPEARL Butyl-600M, Phenyl-600M, PPG-600M)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
0043177	TSKgel Phenyl-5PW (30)	20 - 40	25	充填剤 (ボトル)	0045237	SkillPak HIC (TOYOPEARL Phenyl-650M, PPG-600M, Hexyl-650C)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
					0045238	SkillPak HIC (TOYOPEARL Phenyl-600M, PPG-600M, Hexyl-650C)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
					0045256	SkillPak TOYOPEARL Ether-650M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045254	SkillPak TOYOPEARL PPG-600M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045253	SkillPak TOYOPEARL Phenyl-650M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045252	SkillPak TOYOPEARL Phenyl-600M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045251	SkillPak TOYOPEARL Butyl-650M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045250	SkillPak TOYOPEARL Butyl-600M	40 - 90	5 mL x 1本	カラム
					0045255	SkillPak TOYOPEARL Hexyl-650C	50 - 150	5 mL x 1本	カラム

\*充填剤は、グレードにより異なる粒子径および異なる容量の製品があります

SkillPakには 1 mLカラム (7 mm I.D. x 25 cm) と 5 mLカラム (8 mm I.D. x 10 cm) があります

1 mLタイプは、入口: 「品番 0017955 オシネ (フェラル付)」 を使用、「品番 0016566 ハンディコネクタ・1/16」 (PEEK) は使用不可

出口: メスコネクタに直接接続可能、オスコネクタに接続する場合はユニオン 「品番 0017898 オシネユニオン」 等を使用

5 mLタイプは、入口、出口: 「品番 0016566 ハンディコネクタ・1/16」 あるいは 「品番 0017955 オシネ (フェラル付)」 を使用

※ "TOYOPEARL"、"トヨパール"、"TSKgel"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※ "SkillPak"は Tosoh Bioscience LLC の製品名です

※ "Humira"は AbbVie, Inc.社の、"resDNASEQ"は ThermoFisher Scientific 社の登録商標です

※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください



## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社営業部 ☎(03) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2  
 大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
 名古屋支店 バイオサイエンス ☎(052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7  
 福岡支店 ☎(092) 781-0481 〒810-0001 福岡市中央区天神1-13-2  
 仙台支店 ☎(022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1  
 カスタマーサポートセンター ☎(0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>

HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>

お問い合わせE-mail [hlc@tosoh.co.jp](mailto:hlc@tosoh.co.jp)