

# 抗体精製用充填剤は、これで決まり！！(2)

陰イオン交換体・フロースルー (FT) で凝集体、不純物を除去！

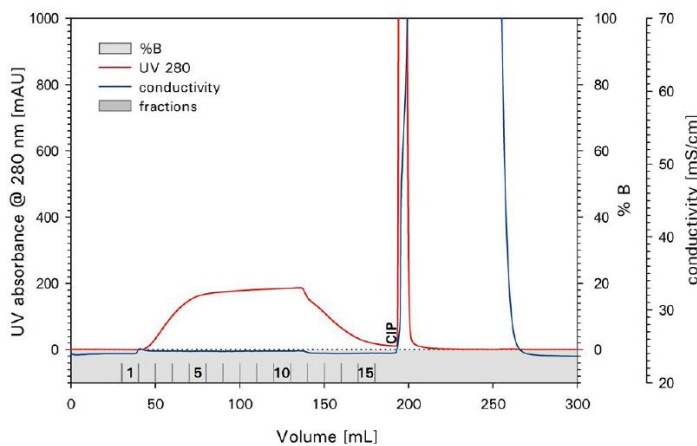


抗体医薬品の精製工程では、第一精製ステップのプロテイン A 充填剤によるアフィニティー分離が重要とされ、この精製工程だけで、抗体の純度は 95 %程度まで高めることができます。しかしながら抗体の医薬品としての純度としてはまだ不十分で、さらなるクロマトグラフィー工程で精製が必要です。主な不純物は、抗体の凝集体、抗体断片、宿主由来のたんぱく質(HCP)、DNA、ウイルス、プロテイン A 充填剤から漏出したプロテイン A リガンド等です。これらの不純物は、陰イオン交換体および陽イオン交換体(ミックスモード含む)、疎水用充填剤などで除去できます。最近では、フロースルー (FT) モード(目的の抗体モノマーは吸着させずに溶出させ、不純物のみを吸着除去)が多用されています。

中でも、**特に充填剤の細孔径が大きい TOYOPEARL® NH<sub>2</sub>-750F を用いることで、凝集体やウイルス、エンドキシン(大腸菌由来試料の場合)などを吸着除去することが可能です。**

## 高吸着・塩耐性陰イオン交換体 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F の特長

### ●陰イオン交換体を用いたフロースルーモードによる抗体の精製(1)



#### 分離条件

- カラム : TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F, 6.6 mm I.D. x 5.85 cm (2.0 mL)
- 溶離液 : 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 0.25 mol/L NaCl
- : CIP; 1 mol/L NaCl 溶液(凝集体などの不純物の溶出)
- 流速 : 300 cm/hr
- 検出 : UV (280 nm)
- 温度 : 室温
- 試料 : ウイルス不活化(酸)処理したモノクローナル抗体(100 mg in 100 mL)

※フロースルー条件; 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 0.25 mol/L NaCl で、凝集体は 28 %から 0 %へ除去できた(単量体の回収率 75 %)。

### ●フロースルーモードでの抗体の精製(2)

TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F で精製された抗体画分から、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F のフロースルー分離により、凝集体、HCP、DNA、漏出 ProteinA などが除去されました。

陰イオン交換クロマトグラフィープロセス	条件	モノマー回収率(%)	凝集体(%)*	HCP Log Red.	DNA (pg/mg)	Protein A (ppm)
TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F (フロースルー)	プロテインA画分**	N/A	3.1	1.7	0.3	<0.05
	条件A	95	2.6	2.3	検出限界以下***	<0.05
	条件B	88	1.0	2.5	検出限界以下***	<0.05

\* Aggregate determined according to Bond et al., J. Pharm. Sci. 99, (2009) 2582-2597.

\*\* プロテインA画分: TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F、溶出液: 0.1 mol/L glycine プロテインA画分試料は、30分のウイルス不活化処理後、TrisでpH 6.8 - 7.0に調整したもの

\*\*\* resDNASeq Quantitative CHO DNA Kit (Life Tech)による測定

参考文献; Multi-Column Continuous Chromatography for Protein A Capture and Orthogonal Polishing of Monoclonal Antibodies, A. Grabski et al.,

PREP 2016, Poster, presentation data を一部改編

●TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F の特長は...

- 充填剤の細孔径が大きく、凝集体、ウイルス、エンドキシンなどの巨大不純物が除去可能です
- アルカリ耐久性が高く、0.1~0.5 mol/L NaOH で洗浄することで、繰り返し使用が可能です
- ウイルスクリアランスは Log Reduction (対数表示) で 4 ないし 6 です
- 塩耐性 (salt-tolerant) イオン交換体であり、高塩濃度の溶離液中でも高い吸着能力を維持します
- スクリーニング用カラムとして SkillPak™ (1 mL、5 mL) を用意しています
- その他、TOYOPEARL Sulfate-650F、TOYOPEARL Hexyl-650C や TOYOPEARL MX-Trp-650M などの不純物を除去できるトヨパール充填剤を用いることで、さらなる高純度精製が可能です

●TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F の仕様

項目	規格
官能基	1級アミノ基
イオン交換容量 (meq./L)	0.07 - 0.13
粒子径 (μm)	30 - 60
静的吸着容量 (IgG, g/L)	≥ 70
菌体数 (CFU/mL)	≤ 100
エンドキシン (EU/mL)	≤ 10
異物	≤ 6
溶出物	≤ 0.2 %

フロースルー条件 (例)

溶離液 ; 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0 - 8.0)  
 溶離液中の塩濃度 ; 160 - 500 mmol/L NaCl  
 抗体試料負荷量の目安 ; 50 g/L ゲル  
 ※抗体の吸着力により、至適 pH、塩濃度は変わります。

●TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F を用いた凝集体の分離、除去に関する文献、ポスター発表

- 1) Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations, N. Yoshimoto et al., Biotechnol. J., 10 (2015) 1
- 2) Multi-Column Continuous Chromatography for Protein A Capture and Orthogonal Polishing of Monoclonal Antibodies, A. Grabski et al., PREP 2016, Poster presentation
- 3) IgG Purification, Better, Faster, Cheaper, P. Gagnon et al., Bioprocess International Conference, 2016, Poster presentation
- 4) Purification of monoclonal antibodies entirely flow-through mode, T. Yamada et al., J. Chromatogr., B 1061-1062 (2017) 110-116
- 5) 原田 隆、「陰イオン交換カラムにおける抗体精製のポテンシャル」 東ソーセミナー2019, 2019年10月

●抗体凝集体等除去用イオン交換体 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 製品一覧表

品番	品名	粒子径 (μm)	容量 ** (mL)	備考
0023439	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	30 - 60	250	充填剤 (ボトル)
0045209	SkillPak TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	30 - 60	1 mL x 5本	カラム
0045245	SkillPak TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	30 - 60	5 mL x 1本	カラム
0045226	SkillPak AIEX (TOYOPEARL GigaCap Q-650M, GigaCap DEAE-650M, NH <sub>2</sub> -750F)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
0045228	SkillPak Antibody (TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, AF-rProtein L-650F, NH <sub>2</sub> -750F, Sulfate-650F, GigaCap Q-650M, GigaCap S-650S)	-	1 mL x 6種類 x 1本	カラム
0045229	SkillPak mAb Platform (TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, NH <sub>2</sub> -750F, Sulfate-650F)	-	1 mL x 3種類 x 2本	カラム
0045230	SkillPak Salt Tolerant (TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F, Sulfate-650F)	-	1 mL x 2種類 x 3本	カラム
0045232	SkillPak Best-in-Class (Ca <sup>++</sup> Pure-HA*, TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F, AF-rProtein L-650F, NH <sub>2</sub> -750F, Sulfate-650F)	-	1 mL x 5種類 x 1本	カラム

\* Ca<sup>++</sup>Pure-HA† 7 mm I.D. x 2.5 cm, カラム入口側は「品番0017955オシネ (フェラル付)」を使用、出口側はメスコネクタに直接接続可能  
 \*\* 充填剤は、グリ出口側を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  
 SkillPakには 1 r 8 mm I.D. x 10 cm, 入口、出口側は「品番0016566ハンディコネクタ・1/16(PEEK)」あるいは「品番0017955オシネ (フェラル付)」で接続可能  
 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"は日本等における東ソー株式会社の登録商標です。  
 ※ "Ca<sup>++</sup>Pure-HA"は日本等における Tosoh Bioscience LLC の登録商標です。  
 ※ "SkillPak"は Tosoh Bioscience LLC の製品名です。  
 ※ 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)

