

SEPARATION REPORT

高性能アフィニティークロマトグラフィーカラム TSKgel[®] Protein A-5PW について

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. 基本的性質	1
2 - 1. 充填剤の性質	1
2 - 2. 標準的分離条件	1
2 - 3. 溶離液中の塩濃度と添加剤の影響	2
2 - 4. 溶離液 pH の影響	3
2 - 5. 検量線	4
2 - 6. 耐久性	5
2 - 7. アルカリ洗浄	5
2 - 8. 充填剤のロット間差	6
3. 分離例	6
3 - 1. 高速分析	6
3 - 2. モノクローナル IgG の定量（添加回収試験）	7
4. おわりに	7

1. はじめに

免疫グロブリン G (IgG) を中心とした抗体医薬に対する需要はますます増加しています。抗体医薬の研究開発や製造プロセス構築においては、IgG 発現のスクリーニングのため細胞培養液中の IgG の迅速かつ高精度な定量が必要になります。さらに商業製造プロセスにおいても IgG の定量は重要な品質管理項目の一つです。この目的のため、Protein A をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー (AFC) が用いられます。本レポートでは、IgG の高速・高精度分析を目的として開発された AFC カラム TSKgel Protein A-5PW について、基本的性質、特長、分離例などをご紹介します。

2. 基本的性質

2-1. 充填剤の性質

TSKgel Protein A-5PW は、多孔性の親水性ポリマー基材 TSKgel G5000PW に、遺伝子組換え Protein A を導入した充填剤を PEEK カラムに充填した AFC カラムです。Protein A は IgG の Fc 領域と特異的に結合するため、IgG と夾雑物を含む細胞培養上清などの試料から IgG を特異的に吸着、分離することができます。また、濃度既知の IgG を用いて検量線を作成することにより、濃度未知の試料中の IgG を定量することができます。

本カラムの基材、リガンド及びリガンド固定化方法は、分取用充填剤 TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650F と同様です。そのため、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F と類似した分離選択性を持ちます。

基材の粒子径が大きく機械的強度が高いため、本カラムは高流速下で使用でき、IgG のハイスループット分析にも使用可能です。また、溶媒変化に対する充填剤の膨潤収縮が小さいため、有機溶剤を添加した溶離液を用いることも可能です。

更に化学的安定性が高く、耐アルカリ性のあるリガンドを用いているため、NaOH 水溶液による洗浄も可能です。NaOH 水溶液によりカラムを洗浄する際には、試料注入バルブから 0.5 ~ 2 mL の 0.1 mol/L NaOH 水溶液を注入してください。

表 1 に本カラムの仕様を示します。

表 1 TSKgel Protein A-5PW カラムの仕様

品名	TSKgel Protein A-5PW	
品番	0023483	
充填剤	基材	多孔性の親水性ポリマー
	平均粒子径	20 μ m
	平均細孔径	100 nm
	リガンド	遺伝子組換え Protein A
カラム	サイズ	4.6 mm I.D. \times 3.5 cm
	材質	PEEK
	出荷溶媒	20% エタノール水溶液

2-2. 標準的分離条件

多くの IgG は中性付近 (pH 7.0 ~ 7.5) で Protein A に吸着し、酸性条件下 (pH 2.5 ~ 3.5) で溶出するため、TSKgel Protein A-5PW による抗体の分離には、通常、pH の異なる 2 液のステップグラジエント溶出法を用います。

溶離液としては、吸着用、溶出用ともりん酸塩緩衝液が一般的ですが、溶出用には低 pH のクエン酸塩緩衝液も使用できます。吸着用溶離液で予めカラムを平衡化後 (カラム容積の 5 倍以上を流す)、試料を注入し、IgG のみを吸着させます。その後、溶出用溶離液に切り替え、IgG を溶出させます。

0.15 mol/L NaCl などの高濃度の塩を溶離液に添加することもできますが、疎水性の高い IgG はカラムへの非特異的吸着が起こる場合がありますのでご注意ください。また、疎水性の高い IgG の分離の際にはエタノールなどの水溶性有機溶媒やアルギニン (0.2 mol/L) を吸着用、溶出用の両溶離液へ添加することも非特異的吸着の抑制に効果的です。但し、これらの場合には溶離液の切替えによりベースラインが変動する場合がありますので、試料を注入する前に溶離液の切替えのみを実施してご確認ください。

表 2 に代表的な溶離液の例を示しますが、IgG によって最適条件が異なる場合がありますので条件検討の実施をお勧めします。図 1 にポリクローナル IgG の分離例を示します。

表 2 溶離液の例

例 1	溶離液 A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4 溶離液 B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
例 2	溶離液 A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4 / エタノール = 90/10 (v/v) 溶離液 B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5 / エタノール = 90/10 (v/v)
例 3	溶離液 A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4 溶離液 B : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5

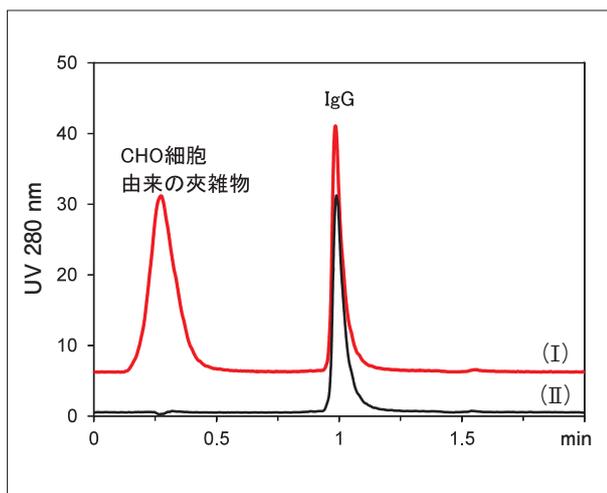


図 1 ポリクローナル IgG の分離

〈測定条件〉

カラム : TSKgel Protein A-5PW

(4.6 mm I.D. × 3.5 cm)

溶離液 A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4

B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5

溶離液切替 : 0 → 0.5 分 溶離液 A

0.5 → 1.1 分 溶離液 B

1.1 → 2.0 分 溶離液 A (再平衡化)

(ポンプとインジェクタとの間にステイックミキサ (容量 10 μL) を装着)

流速 : 2.0 mL/min

検出 : UV 280 nm

温度 : 25 °C

注入量 : 20 μL

試料 : (I) 0.5 g/L ポリクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清

(II) 0.5 g/L ポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)

2-3. 溶離液中の塩濃度と添加剤の影響

種々の溶離液にてモノクローナル IgG を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞培養液上清を分離したときのクロマトグラムを図 2 に示します。いずれの溶離液でも IgG を溶出できますが、溶出時間やピーク形状が異なることがわかります。ここで用いたモノクローナル IgG の場合、0.15 mol/L NaCl を含む溶離液 (クロマトグラム (3)) ではピークの溶出が最も遅く、テーリングを示しました。一方、0.2 mol/L アルギニンを含む溶離液 (クロマトグラム (5)) では溶出が最も早くな

りましたが、0.15 mol/L NaCl の場合と同様にピーク形状はテーリングでした。しかし、このモノクローナル IgG の場合には吸着画分の相対ピーク面積に顕著な差は認められず、吸着能や回収率に対する影響が小さいことが示唆されました。

このように、溶離液組成により IgG の溶出挙動が異なりますが、IgG の特性によっても溶出挙動が異なることが予想されます。前項にも記載したように最適条件は IgG によって異なる場合がありますので条件検討の実施をお勧めします。

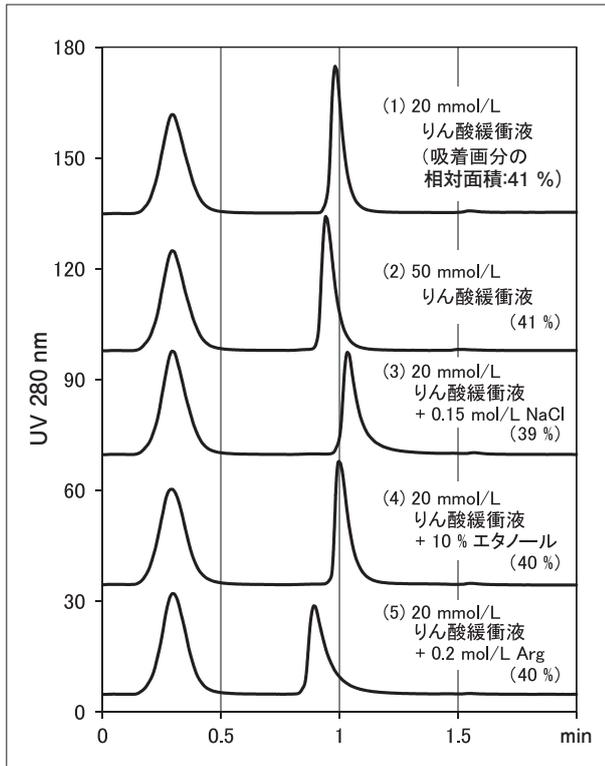


図2 モノクローナル IgG の分離に対する溶離液塩濃度及び添加剤の影響

〈測定条件〉

溶離液と試料を除き図1と同じ。

溶離液

- (1) A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
- (2) A : 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
B : 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
- (3) A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
+ 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4
B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
+ 0.15 mol/L NaCl, pH 2.5
- (4) A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
/ エタノール = 90/10 (v/v)
B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
/ エタノール = 90/10 (v/v)
- (5) A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
+ 0.2 mol/L アルギニン, pH 7.4
B : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
+ 0.2 mol/L アルギニン, pH 2.5

試料 : 0.5 g/L モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清

2-4. 溶離液 pH の影響

モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清を種々の pH の溶離液 B で溶出したときのクロマトグラムを図3に示します。pHが高くなるに従い溶出が遅くなりました(クロマトグラム(1)~(3))が、このモノクローナル IgG の場合にはピーク形状や吸着画分の相対ピーク面積に対する影響はほとんど認められませんでした。また、クエン酸ナトリウム緩衝液を用いた場合(クロマトグラム(4))にも同様に溶出できることがわかります。なお、pH 2.5 のクエン酸ナトリウム緩衝液と pH 2.2 のリン酸ナトリウム緩衝液の溶出時間がほぼ同等になっているのは、ここで用いたクエン酸ナトリウム緩衝液の濃度がリン酸ナトリウム緩衝液よりも高いため、pH 変化がより早く起こったものと考えられます。

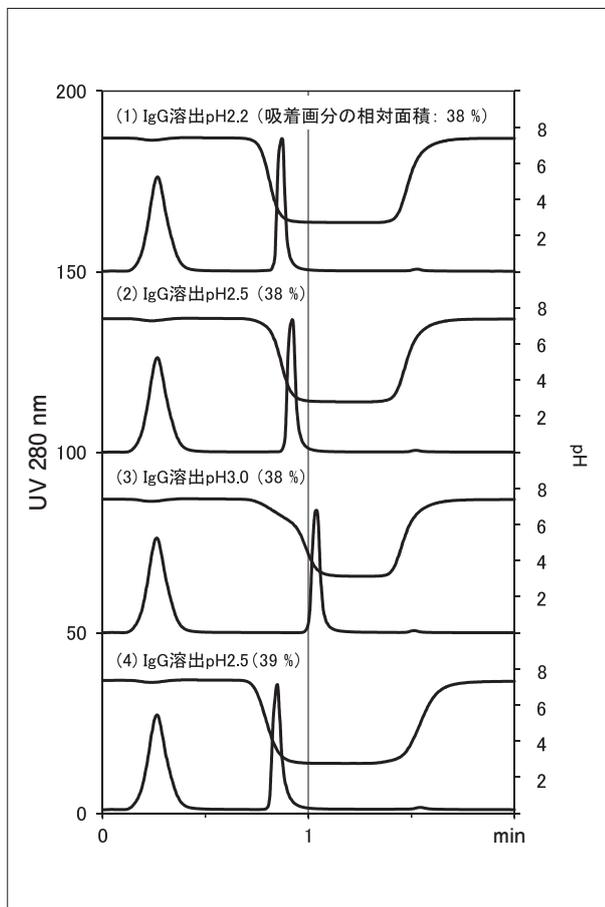


図3 モノクローナル IgG の分離に対する溶離液 pH の影響

〈測定条件〉

溶離液を除き図2と同じ。

溶離液

- A : 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
- B : (1) 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.2
(2) 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
(3) 20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 3.0
(4) 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5

2-5. 検量線

TSKgel Protein A-5PW カラム及び他社 Protein A カラムを用い、異なる負荷量で市販ポリクローナル IgG を分離し、IgG 負荷量に対する吸着成分のピーク面積をプロットし、最小二乗法による近似直線（検量線）と決定係数を求めた結果を図 4 に示します。他社 Protein A カラムでは高濃度域での直線性が低下したのに対し、TSKgel Protein A-5PW カラムでは負荷量の広い範囲で

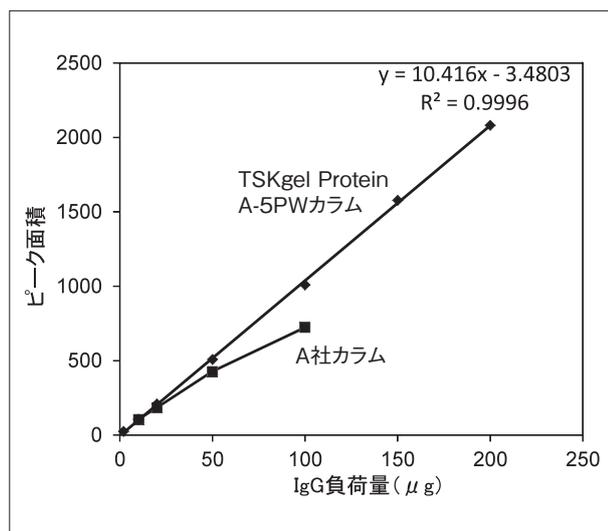


図 4 IgG の検量線

〈測定条件〉

(1) TSKgel Protein A-5PW (4.6 mm I.D. × 3.5 cm)
試料を除き、図 1 と同じ。

試料：0.1 ~ 10 g/L ポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)

(2) 他社カラム (4.0 mm I.D. × 3.5 cm, PEEK)
溶離液と溶離液切替条件を除き (1) と同じ。

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

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

溶離液切替：0 → 0.2 分 溶離液 A

0.2 → 1.2 分 溶離液 B

1.2 → 2.0 分 溶離液 A (再平衡化)

ピーク面積との間に良好な直線関係が得られた (0.1 ~ 10 g/L (2 ~ 200 μg), $R^2=0.9996$) ことから、IgG の定量範囲が広く、培養初期の低濃度試料から高濃度試料まで測定可能であることがわかります。また、このときのクロマトグラムを図 5 に示します。低負荷量から高負荷量まで良好なクロマトグラムが得られました。また、図 6 に示すように、10 % エタノールを含む溶離液を用いた場合でも検量線の直線性は良好でした。

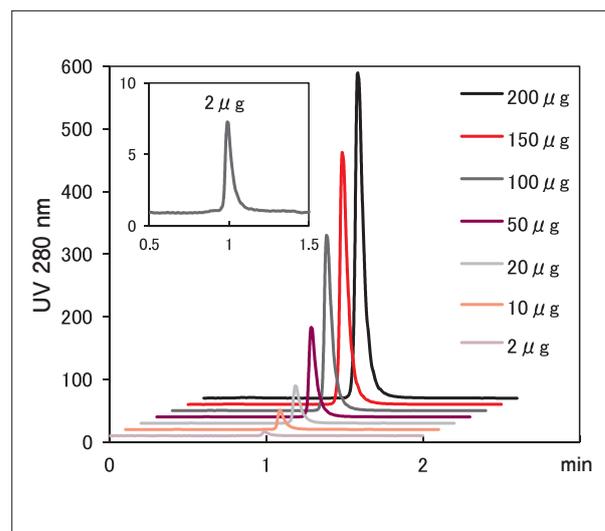


図 5 試料負荷量の異なる IgG のクロマトグラム

〈測定条件〉

図 4 (1) と同じ。

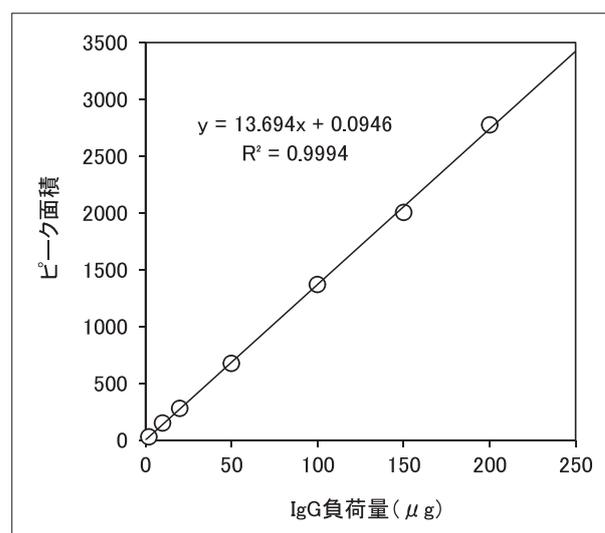


図 6 IgG の検量線 (10% エタノール含有溶離液)

〈測定条件〉

溶離液を除き、図 4 (1) と同じ。

溶離液 A：20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4
/ エタノール = 90/10 (v/v)

B：20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 2.5
/ エタノール = 90/10 (v/v)

2-6. 耐久性

ポリクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清を試料として 2,000 回以上の連続注入試験を行いました。図 7 に約 400 回注入ごとのクロマトグラムを示しますが、ピーク形状に顕著な変化は認められませんでした。また、2,009 回注入後に市販ポリクローナル IgG を用いて検量線を作成したところ、図 8 に示すように試験前後で直線性に差は見られませんでした。

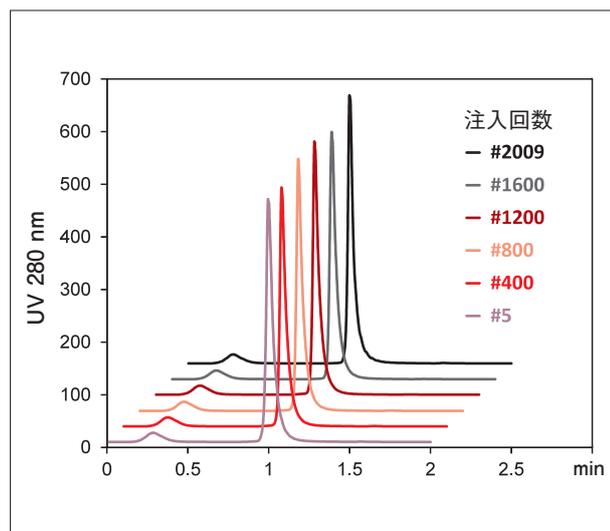


図 7 連続注入試験時のクロマトグラム
(測定条件)

図 1 と同じ。

試料：10 g/L ポリクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清

しかしながら、試料中に不溶性物質が含まれる場合、カラムの入口に蓄積しやすく、性能の低下を引き起こすことがあります。カラムへの注入前に試料をろ過する、あるいは、インジェクタとカラムの間にラインフィルタ（品名：ラインフィルタキット PEEK、品番：0018014）を取り付け、適宜交換することにより、カラムの劣化を防いで長期間安定した測定を行うことができます。

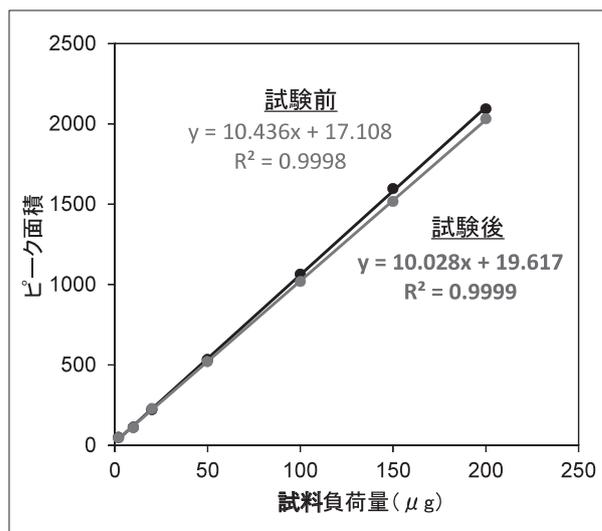


図 8 連続注入試験前後の IgG の検量線
(測定条件)

図 1 と同じ。

試料：0.1～10 g/L ポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)

2-7. アルカリ洗浄

一般的に、カラムに強く吸着した成分の除去には NaOH 水溶液による洗浄が有効ですが、カラムにダメージを与える可能性があります。そこで、アルカリ洗浄前後のカラム性能を確認しました。洗浄は、試料注入バルブを用いて 0.1 mol/L NaOH 水溶液 500 μL を注入することにより行いました。これを 5 回繰り返した後、ポリクローナル IgG を注入し吸着画分のピーク面積を測定しました。さらに、5 回注入（合計 10 回注入）した後のピーク面積も測定しました。アルカリ洗浄前後のピーク面積（相対値）を図 9 に示します。5 回後、10 回後のピーク面積はアルカリ洗浄前のピーク面積とほぼ同じで、カラムの吸着能に変化は見られませんでした。

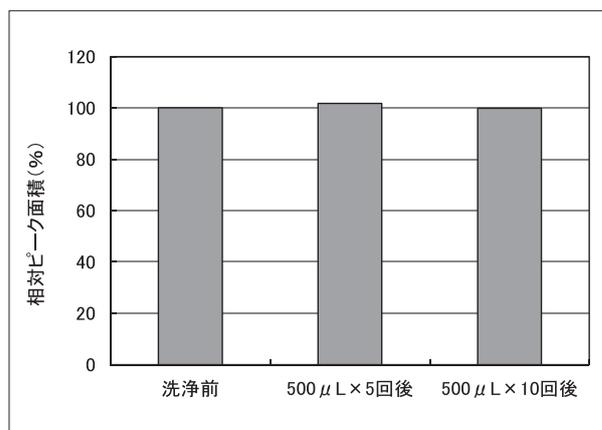


図 9 アルカリ洗浄前後の相対ピーク面積

(測定条件)

試料を除き、図 1 と同じ。

試料：10 g/L ポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)
(試料注入バルブを用いて 0.1 mol/L NaOH 水溶液 500 μL を注入。5 回注入ごとにポリクローナル IgG を分離。)

2-8. 充填剤のロット間差

図10に3ロットの充填剤を用いてポリクローナルIgGを分離した際のクロマトグラムを示します。IgGのピーク

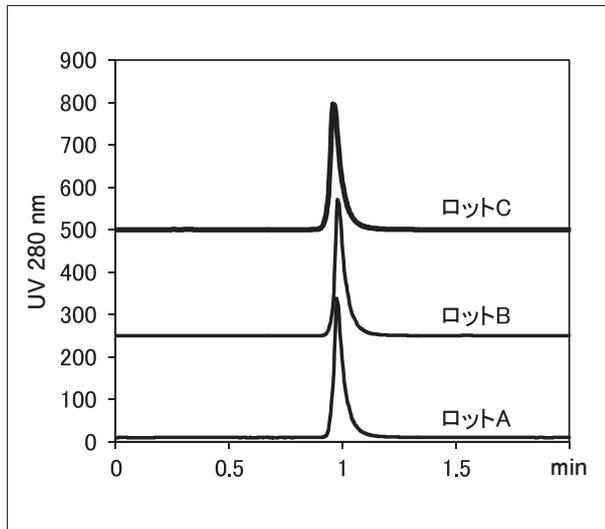


図10 充填剤3ロットでのIgGのクロマトグラム

〈測定条件〉

試料を除き、図1と同じ。

試料：5 g/L ポリクローナル IgG（溶離液 A に溶解）

ク形状に顕著な差は見られず、充填剤ロット間差が小さいことがわかります。また、図11に示すようにロット間で検量線の直線性に顕著な差は見られませんでした。

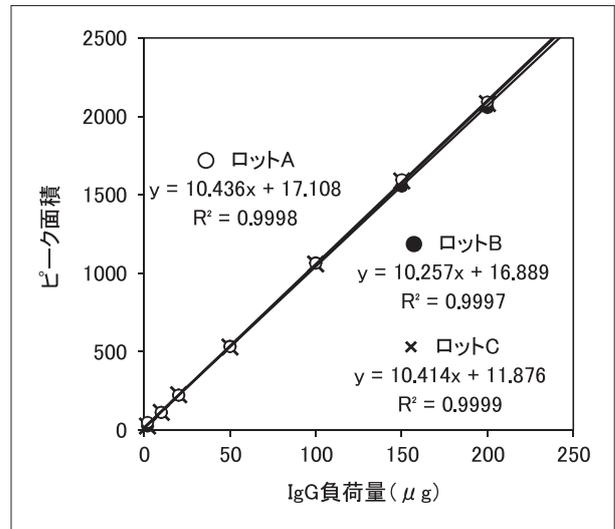


図11 充填剤3ロットでのIgGの検量線

〈測定条件〉

図1と同じ。

試料：0.1～10 g/L ポリクローナル IgG（溶離液 A に溶解）

3. 分離例

3-1. 高速分析

図12に異なる流速でモノクローナルIgGを含むCHO細胞培養液上清を分離したときのクロマトグラムを示します。流速1.0 mL/minから4.0 mL/minの範囲

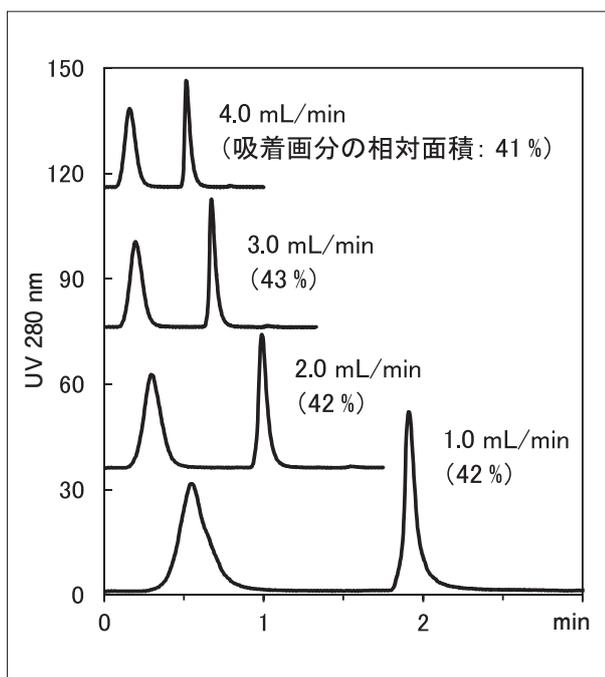


図12 分離に対する流速の影響

では吸着画分の相対面積にほとんど差はありませんでした。また、ポリクローナルIgGを用いて、流速1.0 mL/min及び4.0 mL/minで作成した検量線を図13に示します。いずれの流速でも良好な直線性が得られました。

〈測定条件〉

流速と溶離液切替条件

流速	溶離液 A	溶離液 B	溶離液 A
1.0 mL/min	0 → 1.00 分	1.00 → 2.20 分	2.20 → 4.00 分
2.0 mL/min	0 → 0.50 分	0.50 → 1.10 分	1.10 → 2.00 分
3.0 mL/min	0 → 0.33 分	0.33 → 0.73 分	0.73 → 1.33 分
4.0 mL/min	0 → 0.25 分	0.25 → 0.55 分	0.55 → 1.00 分

試料：モノクローナル IgG（0.5 g/L）を含む CHO 細胞培養液上清
（その他の条件は図1と同じ。）

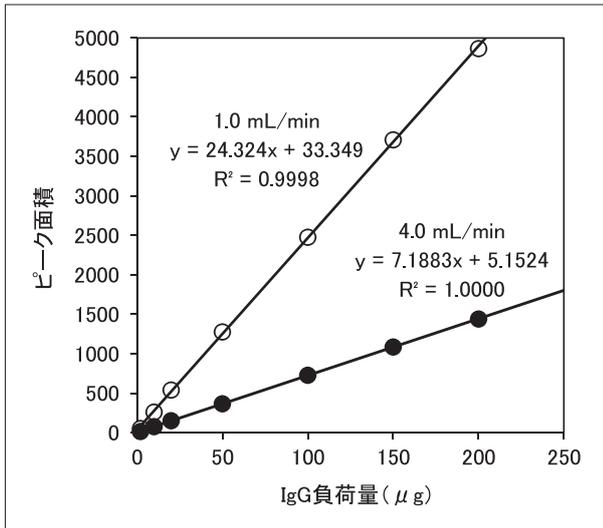


図 13 検量線に対する流速の影響

〈測定条件〉

試料を除き、図 12 と同じ。

試料：0.1 ～ 10 g/L ポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)

3-2. モノクローナル IgG の定量 (添加回収試験)

濃度既知のモノクローナル IgG を用いて検量線を作成しました。次に、同じモノクローナル IgG を添加した CHO 細胞培養液上清を分離し、モノクローナル IgG の回収率を求めました。クロマトグラムと検量線を図 14 に、添加回収率を表 3 に示します。いずれの濃度でも 100 ～ 105 % の回収率が得られ、広い濃度範囲で IgG を定量できることがわかります。

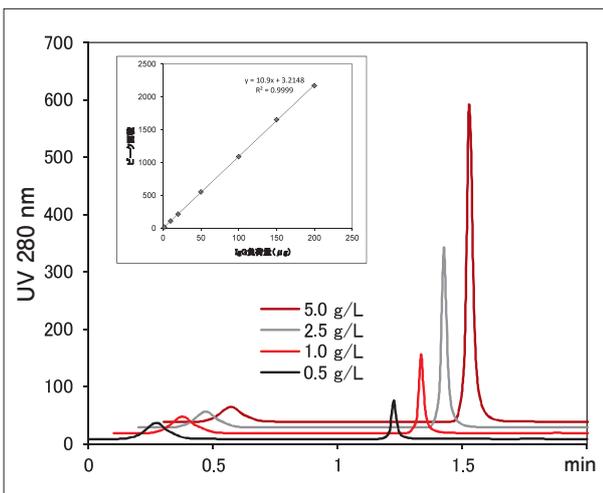


図 14 モノクローナル IgG の分離

〈測定条件〉

試料を除き、図 1 と同じ。

試料：0.1 ～ 10 g/L モノクローナル IgG (20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 + 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4 に溶解)

0.5 ～ 5.0 g/L モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清

表 3 添加回収率

IgG (g/L)		回収率 (%)
添加濃度	定量結果	
0.5	0.50	100
1.0	1.05	105
2.5	2.60	104
5.0	5.13	103

(分離条件は図 14 参照)

4. おわりに

以上、高性能アフィニティークロマトグラフィーカラム TSKgel Protein A-5PW について紹介しました。本カラムは耐久性に優れており、アルカリ洗浄も可能なことから、夾雑物を多く含む細胞培養液中の IgG の迅速かつ高精度な定量に適しています。また、IgG の定量範囲が広いので、培養初期の低濃度試料から高濃度試料まで分析可能です。

※ “TSKgel”、“TOYOPEARL” は東ソー株式会社の登録商標です。



TOSOH

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 バイオエッセンス	☎ (06) 6209-1948	〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオエッセンス	☎ (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
山口営業所	☎ (0834) 63-9888	〒746-0015 山口県周南市清水1-6-1
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

お問い合わせ e-mail tskgel@tosoh.co.jp

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