



プロテイン A による IgG の親和性捕捉と AdvanceBio SEC による凝集分析の連携

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションによる分析

アプリケーションノート

生物製剤

著者

Patrick Cronan, Timothy Rice, and Michael Kruger
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションによる生物製剤サンプル中の凝集体の定量について取り上げます。一次元目でプロテイン A による親和性捕捉を行い、二次元目でサイズ排除クロマトグラフィーを実施しました。一次元目から二次元目へサンプルを移送する際に、マルチハートカットを使用しました。この手法により、フラクションコレクションや複数回の注入を行うことなく、特性解析すべてを 1 回の分析で完了することができました。



Agilent Technologies

はじめに

タンパク質医薬品は小分子医薬品に比べてはるかに複雑です。この複雑さを解明することが、そのまま分析上の課題へとつながっています。これらのタンパク質分子には、開発から患者の手に渡るまでのさまざまな段階で詳細な特性解析が必要となります¹。

プロテイン A は、*Staphylococcus aureus* の細胞膜に存在する免疫グロブリン Fc (IgG) 受容体です。このタンパク質は、ヒト IgG 1、IgG 2、IgG 4、およびウサギやマウスなど他の種の IgG など、ポリクローナルおよびモノクローナル IgG に対して強い親和性を示します。IgG の分取スケールおよび製造スケールでの精製には、この特性を利用した固定化プロテイン A が広く使用されています。分析スケールでは、Agilent バイオモノリスプロテイン A HPLC カラムを使用することにより、複雑な混合物または純粋なサンプル中の IgG を迅速に定量したり IgG の小規模な精製を行ったりできます^{2, 3}。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、生物製剤サンプル中の凝集体の定量に最適なメソッドです。プロテイン A による IgG の捕捉に続いて SEC による凝集分析を行うことで、分析するサンプルの純度を高め、特性解析をより正確に行うことができます。Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションを利用すれば、この分析を 1 回の注入で完了できます。2D-LC ソリューションでは、プロテイン A による IgG の捕捉を一次元目で行います。次に、捕捉した IgG を溶出させ、マルチハートカットループに取り込んで二次元目の Agilent AdvanceBio SEC カラムで溶出して、正確な凝集分析を実施できます。

実験方法

機器

今回の調査で使用した 2D-LC ソリューションでは、一次元目システムとして Agilent 1260 Infinity バイオイナート LC を使用しました。この 1260 Infinity バイオイナート LC を、マルチハートカットループとして機能する Agilent 2D-LC クイックチェンジバルブ (12 個の 40 μ L サンプルループを搭載) と Agilent 1290 Infinity 高速ポンプを通して二次元目のクロマトグラフィーに接続しました。二次元目では、ダイオードアレイ検出器 (DAD) を使用しました。図 1 に、使用した機器モジュールを示します。

ソフトウェア

システムの設定、2D-LC メソッドの設定、および 2D-LC データ取り込みのコントロールには、Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition ソフトウェアと Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソフトウェアを使用しました (図 2)。

サンプル

サンプルとして、Sigma 社から購入した IgG 標準物質 (p/n I9640) を使用しました。

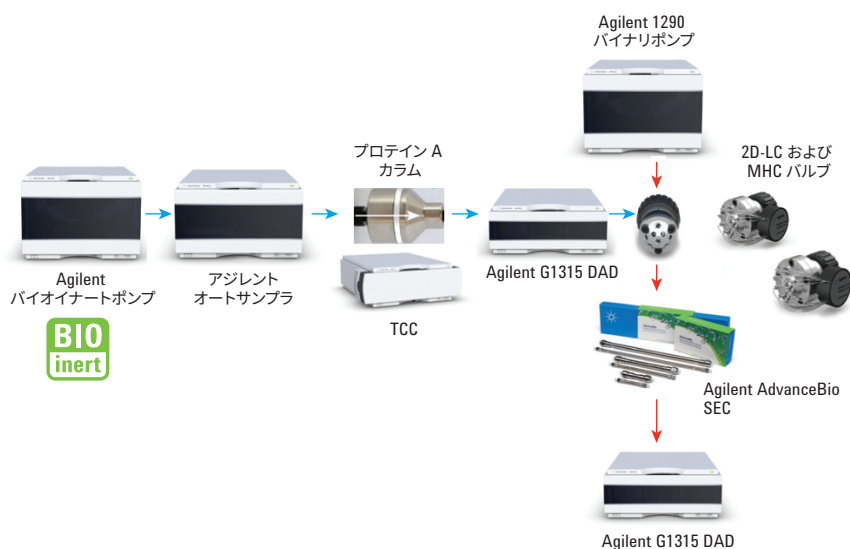
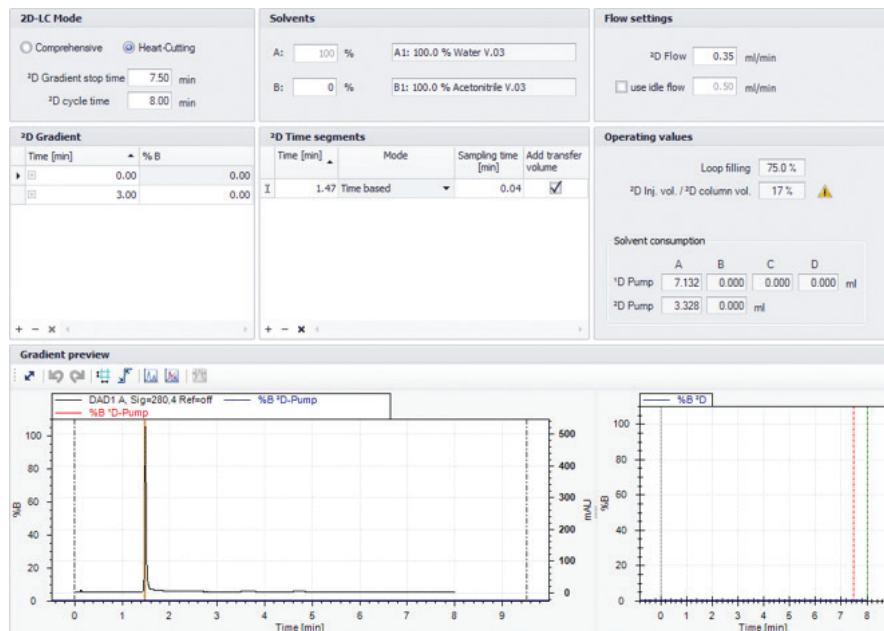


図 1. 一次元目に Agilent バイオモノリスプロテイン A カラム、二次元目に Agilent AdvanceBio SEC を用いた 2D-LC ソリューションの構成。

A



B

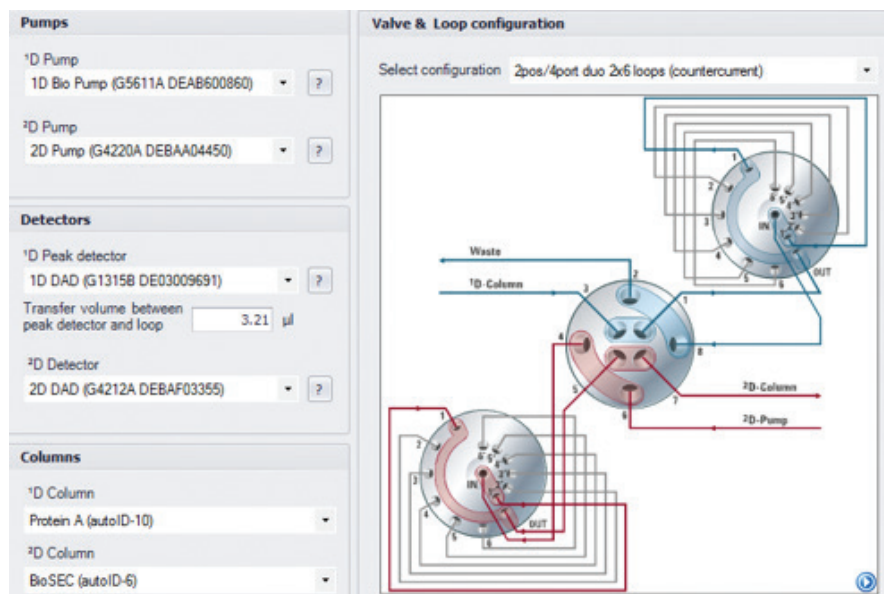


図 2. Agilent OpenLab CDS ChemStation 2D-LC ソフトウェアによる 2D-LC システムの設定、二次元目のグラジエントとマルチハートカットの設定、および一次元目の参照クロマトグラムと一次元目のグラジエントの重ね表示。メソッド設定ダイアログでは、複数の時間およびタイミングイベントを簡単に設定できます。

結果と考察

この 2D 分離は、モノクローナル抗体 (mAb) 凝集体の分析を高速化するうえで役立ちました。凝集体の特性解析の 2 つのステップをまとめることで、分析全体を 1 回の注入で行い、フラクションコレクションステップを完全に排除することができました。図 3 は、プロテイン A による親和性捕捉を用いた一般的な分離例です。サンプル中の IgG は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で捕捉し、その後 500 mM の酢酸 (水溶液) により溶出させました。

図 4 は、プロテイン A を 2D 分析の一次元目として使用した場合に、プロテイン A から遊離した IgG をその直後に SEC ステップで分析できること示しています。

メソッド

一次元目の分離 – プロテイン A による親和性捕捉と UV 検出	
カラム	Agilent バイオモノリスプロテイン A (p/n 5069–3639)、室温
流量	0.75 mL/min
移動相 A	100 mM PBS
移動相 B	500 mM 酢酸
グラジエント	0 分 – B 0 %
	0.5 分 – B 0 %
	0.51 分 – B 100 %
	2.5 分 – B 100 %
	2.6 分 – B 0 %
二次元目の分離 – SEC	
カラム	Agilent AdvanceBio SEC 300 Å、4.6 × 150 mm、2.7 µm (p/n PL1580-3301)、25 °C
流量	0.35 mL/min
移動相	10 mM PBS pH 7.4、イソクラティック
2D-LC モード	マルチハートカット

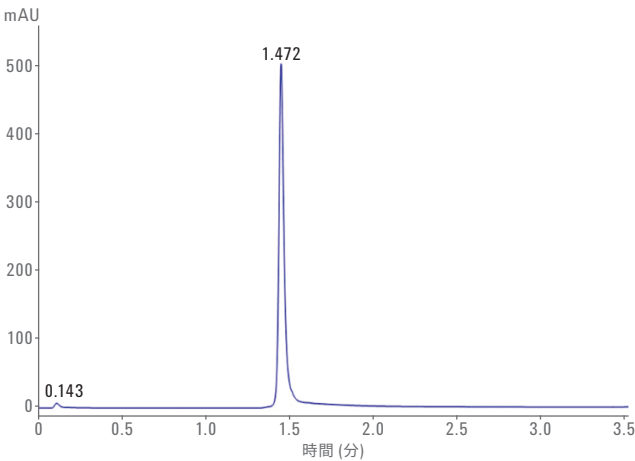


図 3. Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを用いた、プロテイン A による親和性捕捉を利用した IgG の分離

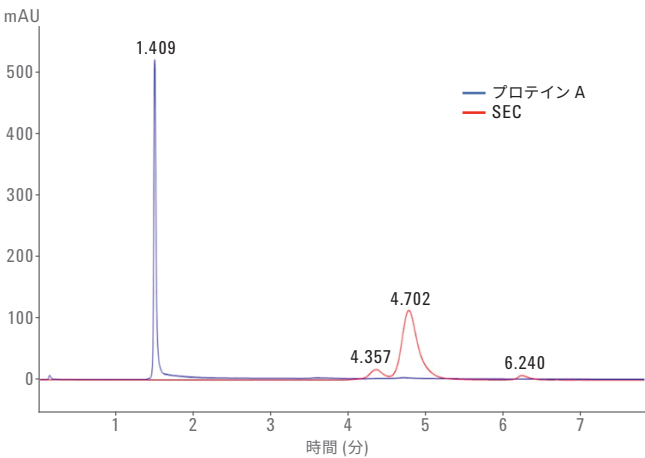


図 4. IgG の、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを用いたプロテイン A による親和性捕捉と Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いたサイズ排除分離

このプロセスから、プロテイン A による分離と SEC による分離をつなげて 1 回の分析で実行する Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションの有効性が実証されました。次に、2D メソッドを使用して、SEC によるさまざまな凝集濃度の検出をテストしました。IgG 標準物質を 65 °C の高温槽中に 24 時間放置して熱ストレスを加えました。この加熱により、図 5 と図 6 を比較するとわかるように、凝集体の濃度が上昇しました。また、図 6 から、凝集体が単量体種および二量体種と明確に分離されているのがわかります。

結論

Agilent 1290 Infinity 2D-LC ソリューションでは、mAb の抗体価と凝集状態を 1 つのメソッドで柔軟かつ効率的に測定できます。フラクションコレクションや複数回の注入は不要です。2D-LC ワークフローの一次元目に使用した Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムは、抗体価測定のため分析スケールで mAb を精製するために、また凝集分析前の最初の精製ステップに有用です。また、Agilent AdvanceBio SEC 300 Å カラムは、凝集種と単量体の分離において優れた性能を示し、2D-LC ワークフローの二次元目での評価を正確に行うことができました。

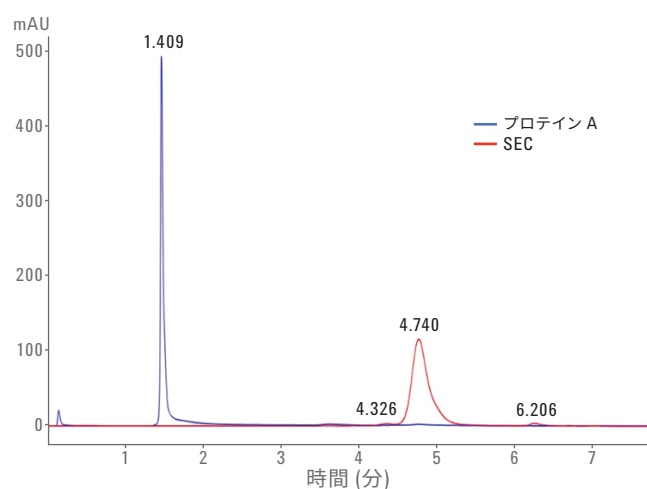


図 5. 熱ストレスを加えた IgG の、Agilent バイオモノリスプロテイン A カラムを用いたプロテイン A による親和性捕捉と Agilent AdvanceBio SEC カラムを用いたサイズ排除分離

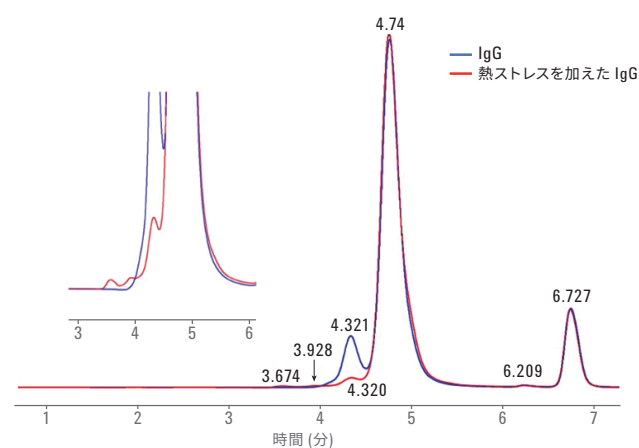


図 6. IgG および熱ストレスを加えた IgG の Agilent AdvanceBio SEC 2D サイズ排除分離クロマトグラムの重ね表示

参考文献

1. Vanhoenacker, G.; *et al.* Analysis of Monoclonal Antibody Digests with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2880EN, **2013**.
2. Lidija, U.; *et al.* Rapid Human Polyclonal IgG Quantification Using the Agilent Bio-Monolith Protein A HPLC Column. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-9733EN, **2008**.
3. Duong, P. T. Agilent Bio-Monolith Protein A Monitors Monoclonal Antibody Titer from Cell Cultures. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2990EN, **2014**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, September 1, 2016

5991-7223JAJP



Agilent Technologies