

モノクローナル抗体のsmall scale 精製と分析を 1 台の LC システムで実現

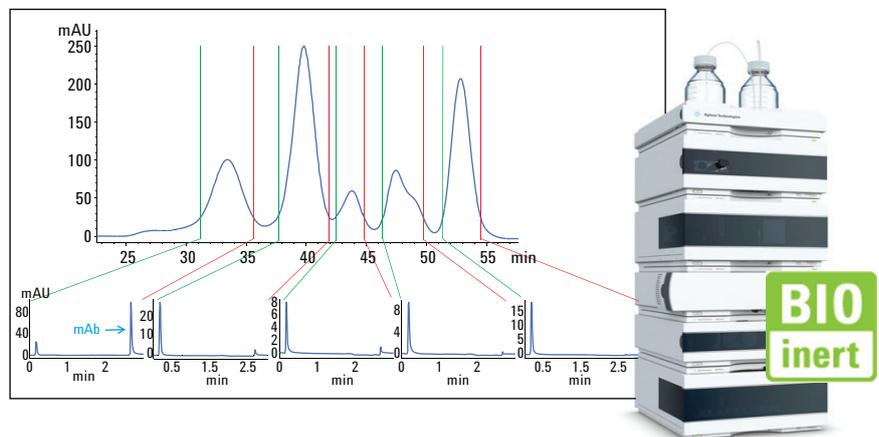
Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC システムによる大容量注入によるタンパク質の精製

アプリケーションノート

バイオ医薬品

著者

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany



概要

このアプリケーションノートは、細胞溶解液からのモノクローナル抗体 (mAb) の small scale 精製とその後の分析を、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC システム 1 台で行うためのアプリケーションソリューションを紹介します。プロテイン A の精製用分取カラムとサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用する精製ステップと最終精製ステップを、Agilent 1260 Infinity バイオイナートマニュアルインジェクタを使用する大容量注入により統合しました。定量と同定のために Agilent Protein A Monolith カラムを使用し、精製済み mAb の分析について解説しました。さらに、イオン交換クロマトグラフィーにより、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで計算した 4 成分イオン強度グラジエントで電荷変異体を分析しました。

Verified for Agilent
1260 Infinity II LC
Bio-inert System



Agilent Technologies

はじめに

タンパク質の精製および分析のための分取および分析メソッドでは、2つの異なる機器のセットアップが必要です。タンパク質の前処理では大注入容量と高流量が必要ですが、分析メソッドでは少注入容量とより低速の流量が必要です。従来より、前処理および分析には、それぞれの目的に特化して作成された2種類の機器が使用されています。

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオートナリ LC を使用すれば、この2つの作業を1台で行うことができます。このアプリケーションノートは、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞溶解液からモノクローナル抗体 (mAb) を回収する2ステップ精製手法に、サイズ排除による最終精製ステップが続く手法を紹介しています。続いて、精製された mAb フラクシオンを分析スケールで、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて同定および定量し、イオン交換クロマトグラフィー (IEX) を用いて電荷変異体の特性分析を行いました。

E.coli 細胞溶解液は、モノクローナル抗体のスケールスケール精製用に、ハイブリドーマ細胞培地の上澄みのサロゲートモデルシステムとして使用しました。単一ステップ精製手法で目的の純度を十分に実現できるのはかなりまれなケースです。一般的に、高純度のタンパク質の精製には、回収、中間精製、最終精製の少なくとも3つの精製ステップが必要です。したがって、このアプリケーションノートでは、回収ステップと最終精製ステップから成る2ステップ精製メソッドを使用しました。最初のステップで、プロテイン A を使用し、mAb をアフィニティークロマトグラフィーによって回収しました。プロテイン A は、バクテリア黄色ブドウ球菌から分離されたサイズ 56 kDa の表面タンパク質です。プロテイン A は、他の免疫グロブリン (Ig) G の変異体の中でヒト IgG1 に高い親和性で結合するため、抗体の精製のための最も普及している技法です¹。サイズ排除クロマトグラフィーを使用する最終精製ステップでは、例えば、カラム充填剤への非特異性結合に起因する任意の残留混入物を除去します。

より高い純度にするために、SEC による最終精製の前に IEX などの付加的な精製ステップを追加することができます²。異なる選択性を用いたさまざまなクロマトグラフィー技法が、生体分子の精製のための強力な組み合わせを形成します。

このワークフローで使用したモノクローナル抗体は、anti-c-Myc 抗体です。図 1 に、IEX イオン強度グラジエントでわずかな酸性および塩基性の電荷変異体を分離したクロマトグラムを示しています。

SEC 最終精製ステップ後に精製された mAb の分析は、純度と定量を求めるワークフローの中の重要な部分です。特に医薬品で使用される mAb については、医薬品の効能および安全性を確保するために生体分子の徹底的な特性解析が重要です。ペプチドマッピングや凝集分析の他に、特性解析手法の一つとして、mAb の電荷変異体の決定があり、通常はイオン交換クロマトグラフィーを行います。このアプリケーションノートでは、精製された mAb の分析として、プロテイン A クロマトグラフィーによる同定に加え、定量も含めています。さらに、電荷変異体の観点から、弱カチオン交換クロマトグラフィーを使用し、Agilent Buffer Advisor ソ

フトウェアで計算した4成分イオン強度グラジエントにより、mAb の特性解析を行いました。

機器1台での生体分子の分取および分析技法の統合を可能にするには、大容量注入が分取部分で必要です。1260 Infinity バイオイナートマニュアルインジェクタとバイオイナート PEEK ループを使用すれば、最大 20 mL の大容量注入が可能です。

このアプリケーションノートは、1260 Infinity バイオイナートクオートナリ LC を用いた、5 mL の *E.coli* 細胞溶解液からのモノクローナル抗体 anti-c-Myc の精製とこれに続く最終精製と分析を紹介しています。

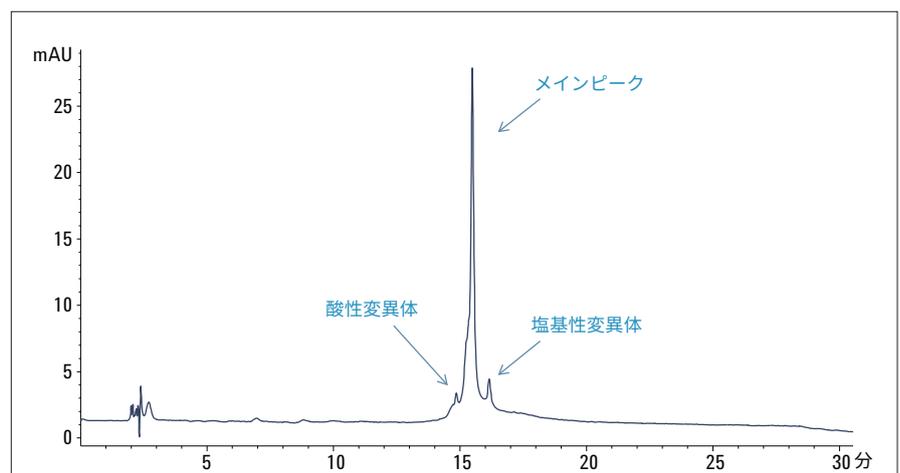


図 1
anti-c-Myc モノクローナル抗体の IEX クロマトグラム。

実験方法

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオートナリ LC システムは、次のモジュールで構成されています。

- Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオートナリポンプ (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 高性能バイオイナートオートサンブラ (G5667A)
- Agilent 1290 Infinity サーマスタット (G1330B)、サンプル冷却用
- Agilent 1290 Infinity サーマスタット (G1330B)、フラクション冷却用
- Agilent 1290 Infinity サーマスタットカラムコンパートメント (G1316C)、バイオイナート溶媒熱交換器を搭載
- Agilent 1260 Infinity ダイオードアレイ検出器 VL (G1315D) とバイオイナート標準フローセル、10 mm)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナート分析スケールフラクションコレクタ (G5664A)
- Agilent 1260 Infinity バイオイナートマニュアルインジェクタ (G5628A)
- 接続キャピラリー : 0.5 mm (内径) PEEK

カラム

- HiTrap Protein A HP、1 mL (GE Healthcare、英国リトルチャルフォント)
- Superdex 200、10/300 GL、13 μ m、10 \times 300 mm (GE Healthcare、英国リトルチャルフォント)
- Agilent Protein A Monolith
- Agilent Bio MAb、4.6 \times 250 mm、5 μ m、PEEK

ソフトウェア

- LC および LC/MSシステム用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition、Rev. C.01.04 [35]
- Agilent Buffer Advisor ソフトウェア、Rev. A.01.01

試料

- Agilent anti-c-Myc モノクローナル抗体 Clone 9E10 を 5 mL *E.coli* 細胞溶解液にスパイクしました。

すべての溶媒は LC グレードを使用しました。超純水は、0.22 μ m メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。PBS (リン酸緩衝生理食塩水) は PAA (GE Healthcare、英国リトルチャルフォント) から購入しました。MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸一水和物) および MES-Na (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩) は、Merck 社 (ドイツ、ダルムシュタット) から購入しました。NaCl は、VWR 社 (米国ペンシルベニア州ラドナー) から購入しました。*E.coli* 細胞とセルリテック B プラスキットは、Sigma-Aldrich 社 (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。アミコンウルトラ遠心式フィルター 30K は、Millipore 社 (米国マサチューセッツ州ビレリカ) から購入しました。

溶媒およびサンプル

| | プロテイン A 精製 | SEC 最終精製 | プロテイン A 分析 | IEX – 20 mM MES (Buffer Advisor の計算) |
|-------|--------------------------|-------------|--------------------------|---|
| 緩衝液 A | PBS | PBS | PBS | H ₂ O _{dd} |
| 緩衝液 B | グリシン-HCl, 100 mM、pH 3 | | グリシン-HCl, 100 mM、pH 3 | NaCl、1 M |
| 緩衝液 C | | | | MES、60 mM |
| 緩衝液 D | | | | MES-Na、35 mM |

表 1 溶媒

クロマトグラフィー条件

| | 分取 | |
|---------------------|--|--|
| | プロテイン A 精製 | SEC 最終精製 |
| 流量: | 0.5 mL/分 | 0.5 mL/分 |
| カラム: | HiTrap Protein A HP、1 mL (GE Healthcare) | Superdex 200、10/300 GL、13 µm、10 × 300 mm (GE Healthcare) |
| グラジエント: | 0.00 分 100% A 40.00 分 100% A 41.00 分 100% B 65.00 分 100% B ストップタイム: 65 分 | イソクラティック - 100% A ストップタイム: 80 分 |
| 注入量: | 5 mL (マニュアル注入、5 mL パイオイナート PEEK サンプルループを使用) | 500 µL (マニュアル注入、500 µL パイオイナート PEEK サンプルループを使用) |
| 温度 TCC: | 室温 | 室温 |
| サーモスタットフラクションコレクタ | 6 °C | 6 °C |
| DAD: | 280 nm/4 nm | 280 nm/4 nm |
| ピーク幅: | Ref.: オフ > 0.05 分 (レスポンス時間 1.0 秒) (5 Hz) | Ref.: オフ > 0.05 分 (レスポンス時間 1.0 秒) (5 Hz) |
| フラクションコレクション | | |
| ピーク検出器モード: | スレッショールドのみ → 10 mAU | スレッショールドのみ → 20 mAU |
| フラクショントリガモード: | 最大ピーク時間 3 分のピークベース | 最大ピーク時間 10 分のピークベース |
| フラクショントリガタイムテーブル: | 0 分 → オフ 40 分 → オン | — |

SEC 最終精製ステップの分離技法によって、分画された試料はかなりの程度まで希釈されました。試料にクロマトグラフィー分析を適用する前に、アミコンウルトラ遠心式フィルター 30K を使用して濃縮ステップを実施しました。

Agilent Buffer Advisor ソフトウェアを用い 20 mM MES 緩衝液濃度について pH 6.4 で、25 分間で 0 から 200 mM NaCl までの IEX 4 成分イオン強度グラジエントを計算しました。Buffer Advisor

を使用し pH スカウンティングによって、分離に最適な pH 値を推定しました (データは示していません)。

| | 分析 | |
|---------------------------|--|---|
| | プロテイン A 分析 | IEX |
| 流量: | 0.75 mL/分 | |
| カラム: | Agilent Protein A monolith | Bio MAb カラム、4.6 × 250 mm、5µm |
| グラジエント: | 0.50 分 100.0% A 1.50 分 100.0% B 3.00 分 100.0% A ストップタイム: 3 分 ポストタイム: 5 分 | 0.00 分 A: 51.4% B: 0.0% C: 11.9% D: 36.7% 25.00 分 A: 30.7% B: 20.0% C: 11.1% D: 38.2% 30.00 分 A: 0.9% B: 50.0% C: 11.3% D: 37.8% 35.00 分 A: 0.9% B: 50.0% C: 11.3% D: 37.8% 36.00 分 A: 51.4% B: 0.0% C: 11.9% D: 36.7% ストップタイム: 36 分 ポストタイム: 20 分 |
| 注入量: | 0.156 ~ 40 µL | 20 µL |
| 温度 TCC: | 室温 | |
| サーモスタットオートサンブラとフラクションコレクタ | 6 °C | |
| DAD: | 280 nm/4 nm | |
| ピーク幅: | Ref.: オフ > 0.05 分 (レスポンス時間 1.0 秒) (5 Hz) | |

結果と考察

5 mL *E. coli* 溶解液にモノクローナル抗体 anti-c-Myc をスパイクし、1260 Infinity バイオイナートマニュアルインジェクタと 5 mL バイオイナート PEEK ループを使用して 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システムに注入しました。

図 2 に示すように、プロテイン A でコーティングされた分取アフィニティカラムを使用して、mAb を *E. coli* 溶解液から精製することができました。100 mg/mL を超える非常に多くのタンパク質を含む *E. coli* 細胞溶解液の成分から mAb を回収して適切に分離しました。分取カラム、マニュアルインジェクタ、内径 0.5 mm の PEEK キャピラリーの背圧が低いために、システムは極めて低い背圧で運転できました。分析システム全体の背圧は 5 bar より低く、カラムへの背圧は 1 bar 未満でした。

図 3A に示したとおり、SEC を使用する精製手法の第 2 ステップは、プロテイン A の回収ステップ後にいくつかの非特異的に結合したタンパク質を明らかにしました。この場合も、システムは 10 bar を超えない非常に低い背圧で運転することができました。5 個のピークは分画され、各フラクションは限外ろ過により濃縮し、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーおよび IEX でさらに分析しました。

図 3B は、mAb の最初の分析として、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーによる同定を示しています。SEC クロマトグラムの最初のピークは mAb の存在を示し、該当するプロテイン A 分析は有意なリテンションを示しています。逆に、他のフラクションは代表的なリテンションを示さず、プロテイン A によって mAb が回収されていないことが示されました。

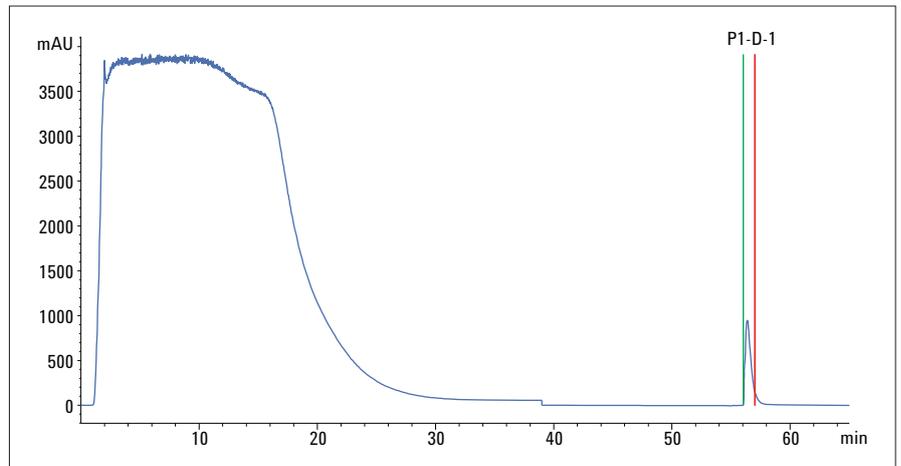


図 2
プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーによる mAb の精製。

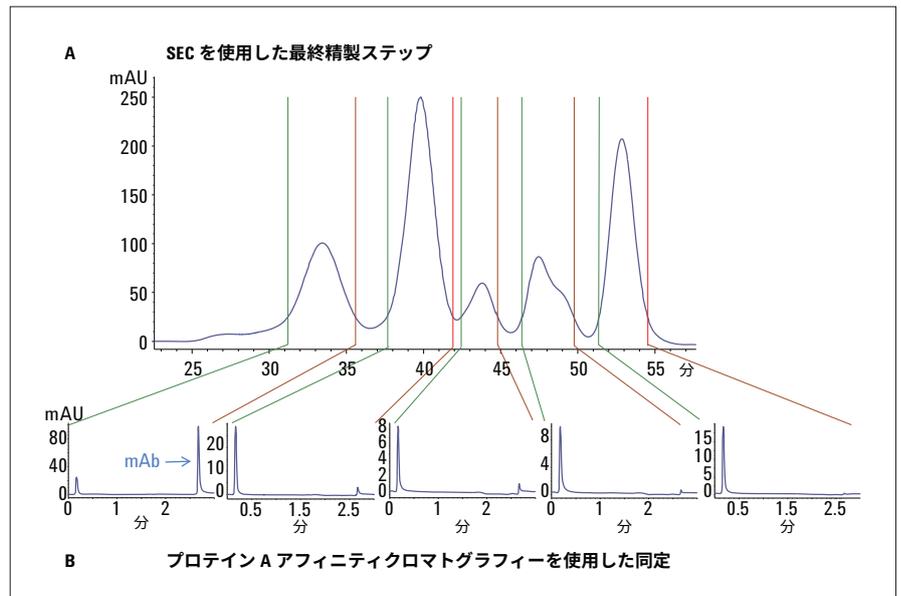


図 3
A) SEC を用いた最終精製ステップと B) プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーによる分画された mAb の同定。

次のステップを検討することによって、マニュアルでの注入およびフラクションコレクションに関連付けられるさまざまな問題を容易に防止できます。

- *Linked pump* の *Configuration* のオプションで、ポンプをフラクションコレクタに接続します。この重要な設定により、流量を適切に指示して、フラクションのバイアルまたはウェルの過剰充填を回避します。
- *Single sample* で分析を開始して、*Sample info* のオプションで指定されている正しい位置でフラクションコレクションを確実に開始します。
- マニュアルインジェクタを使用する場合も、*Sample info* オプションの *Sample parameters* にバイアル位置を入力します。入力しない場合、システムはブランクランを実行します。

同定に加え、純粋な anti-c-Myc を用いて測定された検量線を使用し、精製された mAb をプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーで定量しました。検量線は、図 4 に示すように、オンカラムで 78 ng ~ 20 µg の全タンパク質について 0.99874 の適切な相関係数を示しました。精製された anti-c-Myc の定量結果は、濃度 0.94 mg/mL でした。

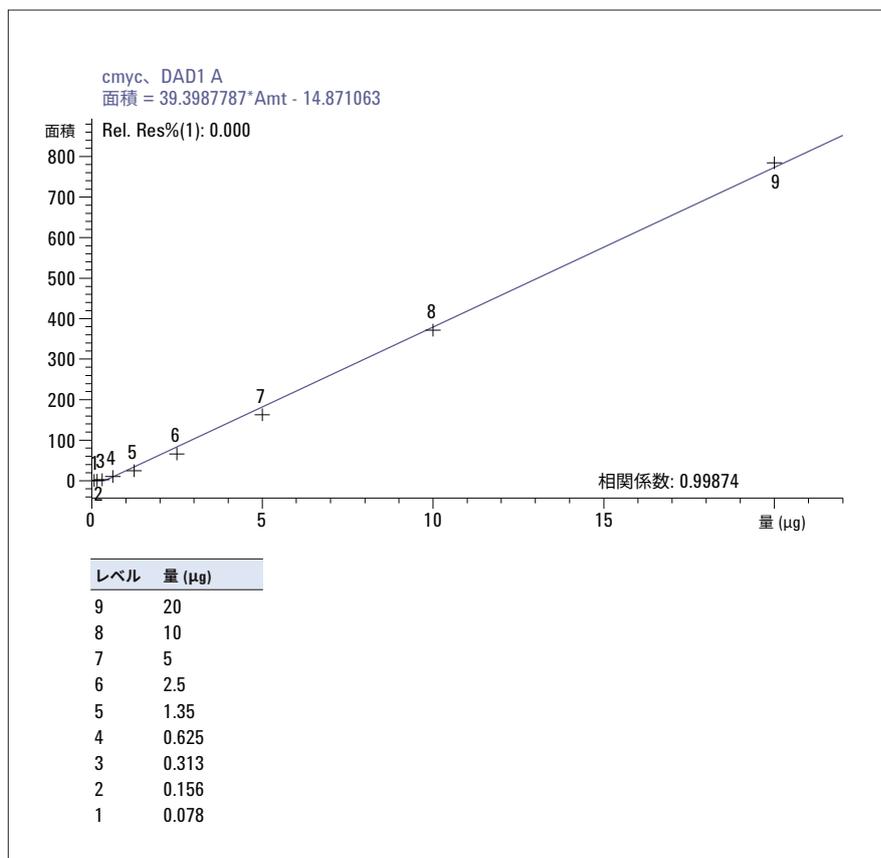


図 4
プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーによる anti-c-Myc の検量線。

最終ステップとして、電荷変異体の観点から精製された mAb を、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで計算した pH 6.4 での 4 成分イオン強度グラジエントを使用して分析しました。図 5 に示すように、IEX クロマトグラムが、anti-c-Myc mAb のわずかな酸性および塩基性の電荷変異体を明らかにしました。

クロマトグラムは、*E. coli* 溶解液に添加される前の純粋な anti-c-Myc モノクローナル抗体のクロマトグラム (図 1) とほとんど等しいように見えます。このため、精製が成功したものと判断できます。

結論

このアプリケーションノートは、Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC 1 台でスモールスケールのタンパク質分取とその後の分析について紹介しています。分取カラムを使用した 2 ステップの精製手法を適用して、*E. coli* 細胞溶解液からのモノクローナル抗体 anti-c-Myc を精製しました。最初のステップではプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーを使用して anti-c-Myc を回収し、*E. coli* 細胞溶解液の他の成分から mAb を分離しました。SEC 最終精製ステップでは、プロテイン A アフィニティ回収後のいくつかの非特異的に結合するタンパク質を明らかにしました。これは、分画され、ターゲット分子である mAb から適切に分離されました。両方の精製ステップで、1260 Infinity バイオイナートマニュアルインジェクタを使用した大容量注入が必要です。さらに、両方のステップで、10 bar を下回るきわめて低い背圧、分析システム全体では 5 bar より低い背圧で、システムを運転することができました。

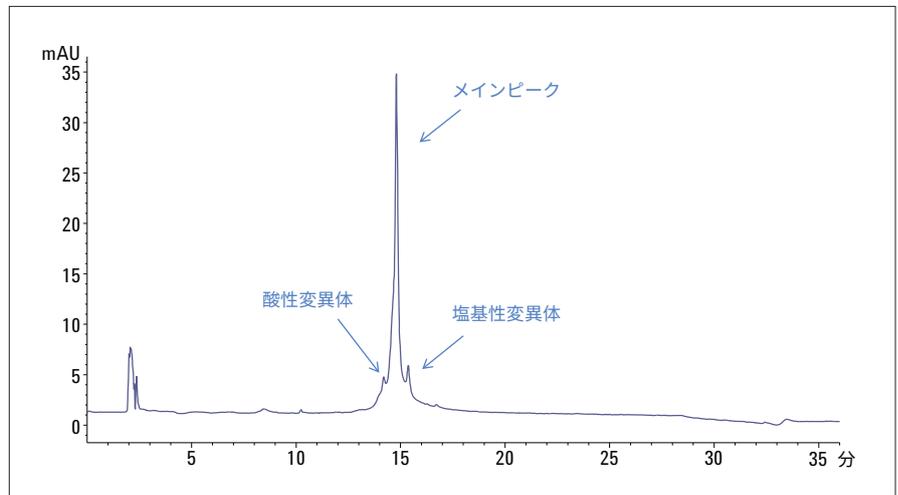


図 5
精製された anti-c-Myc モノクローナル抗体の電荷変異体の分析。

試料の分画および濃縮の後、同定、定量、電荷変異体の観点から mAb を分析しました。anti-c-Myc の検量線はおおよそ 4 桁の異なる質量にわたって、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーによる定量で相関関係が 0.99874 の適切な相関を示しました。さらに、Agilent Buffer Advisor ソフトウェアで計算した 4 成分イオン強度グラジエントで電荷変異体を分析しました。

Agilent 1260 Infinity バイオイナートクオータナリ LC システムにより、機器 1 台でスモールスケールの分取と分析のワークフローを実現できます。

参考文献

1. D. Low *et al.* Future of antibody purification, *Journal of Chromatography B* 848: 48–63, **2007**.
2. “Protein Purification Handbook”, GE Healthcare.

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いません。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・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May 1, 2016

5991-1195JAJP



Agilent Technologies