

●抗体定量用アフィニティークロマトグラフィー カラム TSKgel® Protein A-5PW の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 セパレーション G

藤井 智
荒木 康祐

1. はじめに

近年、バイオ医薬品市場の成長は著しく、特に免疫グロブリン G (IgG) を中心とした抗体医薬品については、2012 年に 460 億ドルであった市場規模が、2018 年には 772 億ドルまで拡大すると予測されている¹⁾。抗体医薬品の研究開発や製造プロセス構築では、細胞培養液中の IgG の迅速かつ高精度な定量が必要とされる。さらに、その商業製造プロセスにおいても、重要な品質管理項目として IgG 濃度の評価が行われる。これらの場面で、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、IgG 定量法の一つとして用いられている。

当事業部では、分取用 Protein A 充填剤として、高い吸着容量とアルカリ耐久性を有する TOYOPEARL® AF-rProtein A-650F と TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F を商品化している。最近、我々はこれらの製造技術をベースとして、抗体医薬品の研究開発及び品質管理分野での IgG 定量をターゲットとした AFC カラム「TSKgel® Protein A-5PW」を開発・上市した。本稿では、当該カラムの基本的な性質や特徴について報告する。

2. TSKgel Protein A-5PW の基本特性

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 カラムである。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液上清などの試料から IgG を特異的に吸着、分離することが可能である。また、濃度既知の IgG 試料を用いて試料負荷量とピーク面積との関係を基に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る。

本カラムの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 と同様であり、基材である TSKgel G5000PW も TOYOPEARL と同じ化学的性質を持つため、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F と類似した分離選択性を有すると考えられる。

また、本カラムは、高流速下で使用できるよう基材の粒子径や機械的強度が最適化されているため、IgG のハイスループット分析に使用可能である。

本カラムの仕様を表 1 に示す。

表 1 TSKgel Protein A-5PW カラムの仕様

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.×3.5 cm
	材 質	PEEK*
	出 荷 溶 媒	20 %エタノール水溶液

*Polyetheretherketone

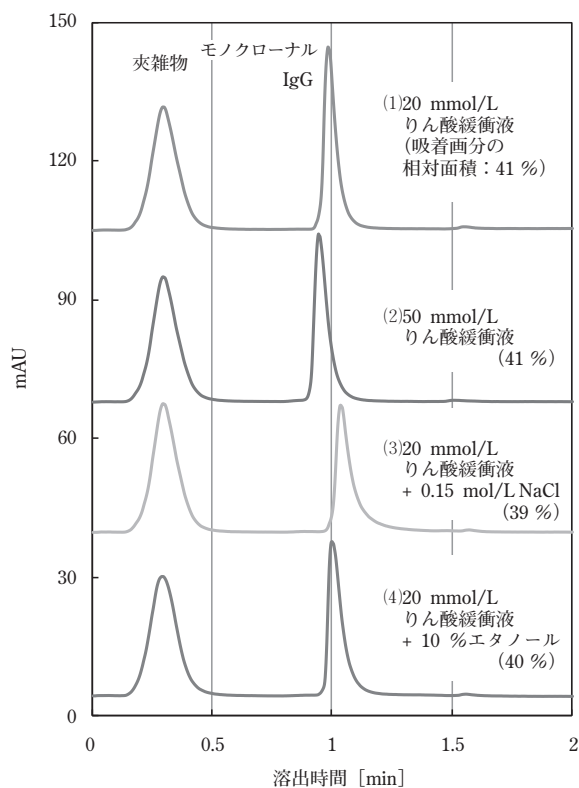
2.2 標準的分離条件

多くの IgG は中性付近 (pH 7.0 ~ 7.5) で Protein A と結合し、酸性条件下 (pH 2.5 ~ 3.5) でそれが解離するため、本カラムを用いた IgG の分離では、通常、pH の異なる 2 液のステップグラジェント溶出法を用いる。具体的には、中性付近の吸着用溶離液であらかじめカラムを平衡化後、試料を注入し、IgG のみを吸着させる。その後、酸性の溶出用溶離液に切り替えて IgG を溶出させる。溶離液としては吸着、溶出用ともりん酸塩緩衝液が一般的であるが、溶出には低 pH のクエン酸塩緩衝液も使用できる。

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可能であるが、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る。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を吸着及び溶出用溶離液へ添加すると、非特異的吸着の抑制に効果的である。但し、これらの場合には溶離液の切替えによるベースラインの変動が生じる場合

があるので、試料を注入する前に溶離液の切替えのみを実施して確認する必要がある。

例として、種々の溶離液にてヒト化モノクローナル 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 1 に示す。いずれの溶離液でも IgG を溶出できたが、溶出時間やピーク形状が異なった。ここで用いたヒト化モノクローナル 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、テーリングを示した。しかし、このヒト化モノクローナル 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溶離液組成の影響が小さいことが示唆された。



〈測定条件〉

カラム：TSKgel Protein A-5PW (4.6 mm I.D.×3.5 cm)

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)

試料：0.5 g/L ヒト化モノクローナル IgG を含む CHO 細胞

培養液上清

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タティックミキサ

(容量 10 μ L) を装着)

流速：2.0 mL/min

検出：UV 280 nm (フローセル 1 mm、検出感度 Range 0.5)

温度：25 $^{\circ}$ C

注入量：20 μ L

図 1 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

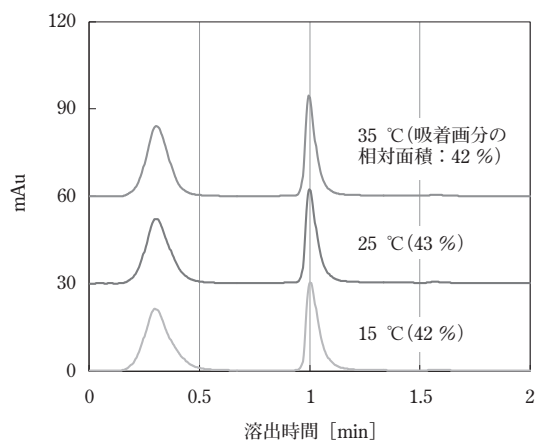
ノクローナル IgG の場合、0.15 mol/L NaCl を含む溶離液 (クロマトグラム (3)) ではピークの溶出が最も遅く、テーリングを示した。しかし、このヒト化モノクローナル IgG の場合には吸着画分の相対ピーク面積に顕著な差は認められず、吸着能や回収率に対する溶離液組成の影響が小さいことが示唆された。

このように、溶離液組成により IgG の溶出挙動が異なるが、IgG の特性によっても溶出挙動が変わることが予想される。つまり、最適な分離条件は IgG の種類によって異なる可能性があるため、条件検討を適宜実施することが望ましいだろう。

また、前記ヒト化モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清を、種々の pH の溶出用溶離液を使用して分離した場合、pH が高くなるに伴いモノクローナル IgG の溶出が遅くなったが、その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なかった²⁾。

2.3 分析温度の影響

ヒト化モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清を、種々のカラム温度で分離したときのクロマトグラムを図 2 に示す。15 ~ 35 $^{\circ}$ C の条件で、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見られなかった。一方、吸着画分のピークトップ時間は、温度が低くなるにしたがってわずかに遅くなる傾向を示した。



〈測定条件〉

溶離液と温度を除き図 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

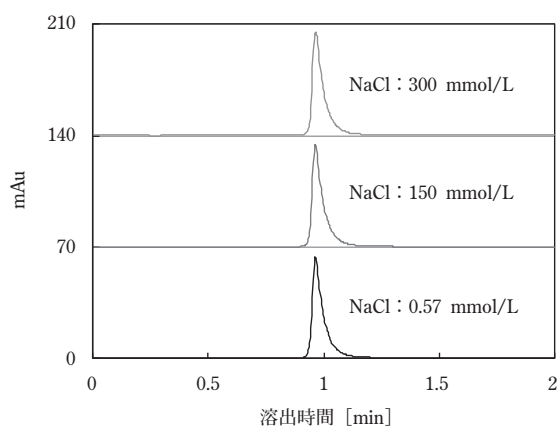
B：20 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液，pH 2.5

温度：15, 25, 35 $^{\circ}$ C

図 2 分析温度の影響

2.4 試料塩濃度の影響

IgG 定量に供される細胞培養液中の塩濃度は、培養環境等により一定でないことが考えられる。そこで、塩濃度の異なる IgG 試料を測定した結果を図 3 に示す。NaCl 濃度 0.57 ~ 300 mmol/L の範囲では、IgG ピークの形状や面積にほとんど変化は認められなかった。塩濃度の異なる試料であっても、IgG がカラム内の充填剤に特異的に吸着し、溶出時には塩濃度の影響が排除されたためと考えられる。



〈測定条件〉
試料、温度を除き、図 2 と同じ
試料：1 g/L ヒトポリクローナル IgG (NaCl 濃度の異なる溶離液 A に溶解)
温度：25 °C

図 3 試料塩濃度の影響

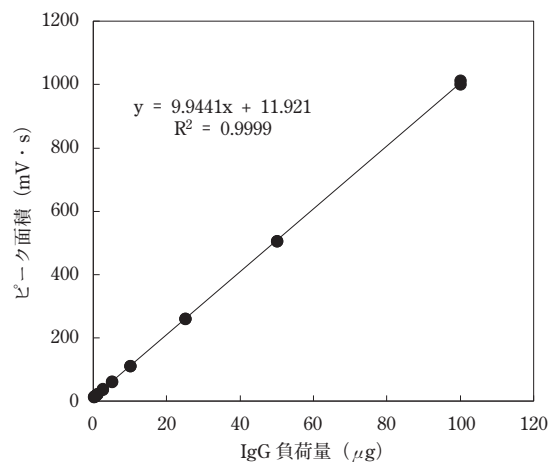
2.5 検量線

ヒトポリクローナル IgG を試料とした検量線の評価では、20 μ L 注入の場合、IgG 濃度 0.1 ~ 10 g/L (負荷量として 2 ~ 200 μ g) の範囲で良好な定量性を示すことが分かっている²⁾。そこで、ここではさらに IgG 濃度範囲を広げた場合の定量性を確認した。

まず、低濃度域として、注入量 100 μ L、IgG 濃度 0.001 ~ 1 g/L (0.1 ~ 100 μ g) の条件で定量性を評価した。結果を図 4 に示す。IgG 負荷量とピーク面積との間に良好な直線関係が得られ、S/N 比=10 を指標として求めた定量下限は 0.5 mg/L (0.05 μ g) となった。一方、高濃度域の定量性確認として、注入量 20 μ L、IgG 濃度 0.1 ~ 150 g/L (2 ~ 3,000 μ g) の条件で検量線を作成した結果を図 5 に示す。前述の低濃度域と同様に良好な直線関係が得られたことから、高濃度域での IgG 定量も可能であることが分かった。

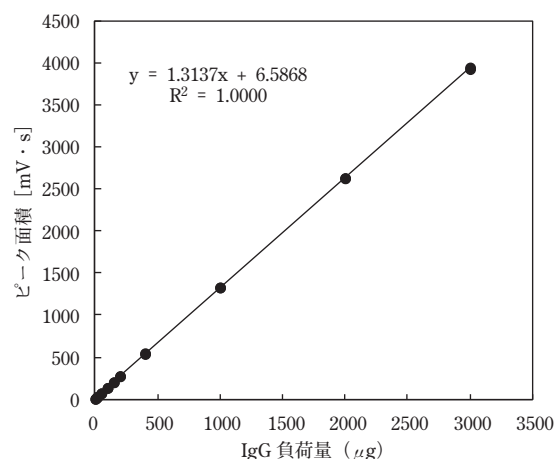
2.6 耐久性

ヒトポリクローナル 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っ



〈測定条件〉
試料、注入量、温度を除き図 2 と同じ
試料：0.001 ~ 1 g/L ヒトポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)
注入量：100 μ L
温度：25 °C

図 4 IgG の低濃度域検量線



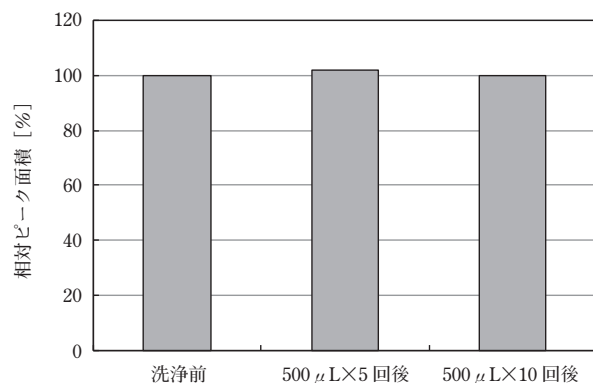
〈測定条件〉
試料、温度、UV 計検出感度を除き図 2 と同じ
試料：0.1 ~ 150 g/L ヒトポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)
注入量：20 μ L
温度：25 °C
UV 計検出感度：Range 4

図 5 IgG の高濃度域検量線

た結果、ピーク形状に顕著な変化は認められなかった。また、連続注入の前後で、検量線の直線性に差は見られなかった²⁾。

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 (アルカリ洗浄) が有効であるが、カラムにダメージを与える可能性がある。そこで、アルカリ洗浄に対する本カラムの安定性を評価した。図 6 に、0.1 mol/L NaOH 水溶液 500 μ L を繰り返し注入する方法でアルカリ洗浄を行い、洗浄前後で



〈測定条件〉
 試料、温度を除き図2と同じ
 試料：10 g/L ヒトポリクローナル IgG (溶離液 A に溶解)
 温度：25 $^{\circ}$ C
 (試料注入バルブを用いて 0.1 mol/L NaOH 水溶液 500 μ L を注入。
 5 回注入ごとにヒトポリクローナル IgG を測定。)

図6 アルカリ洗浄前後の相対ピーク面積

の IgG ピーク面積を比較した結果を示す。洗浄 5、10 回後のピーク面積は洗浄前とほぼ同じであったことから、カラムの吸着能は変化していないものと考えられた。

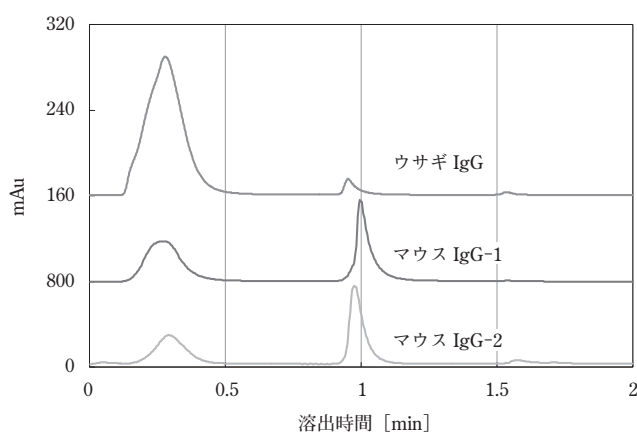
2.8 高速分析

流速 1.0 ~ 4.0 mL/min の範囲で、ヒト化モノクローナル IgG を含む CHO 細胞培養液上清を分離した結果、流速を変化させても吸着画分の相対面積にほとんど差は生じなかった。また、流速 1.0 mL/min 及び 4.0 mL/min の条件で作成したヒトポリクローナル IgG の検量線の比較において、いずれの場合も良好な直線

性が得られることが確認された。なお、流速 4.0 mL/min では、1 分以内でのハイスループット分析が可能であった²⁾。

2.9 各種 IgG の分析

Protein A に対してヒト IgG と同様のアフィニティーを持つとされる、マウス及びウサギ IgG の分析を検討した。マウスモノクローナル IgG を含むマウス腹水と、ウサギ IgG (リコンビナント) を含む CHO 細胞培養液上清のクロマトグラムを図 7 に示す。結果、両方の試料において IgG を吸着、溶出できることが確認された。



〈測定条件〉
 試料、温度を除き図2と同じ
 試料：ウサギ IgG (リコンビナント) を含む CHO 細胞培養液上清
 マウスモノクローナル IgG を含むマウス腹水
 温度：25 $^{\circ}$ C

図7 ウサギ IgG 及びマウス IgG の吸着、溶出クロマトグラム

3. まとめ

本稿では IgG の高速分析用 AFC カラム TSKgel Protein A-5PW について紹介した。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る。また、IgG の定量範囲が広いため、培養初期の低濃度試料から高濃度試料まで分析可能である。本カラムが抗体医薬品分野における IgG の定量分析で、広く使用されることを期待したい。

引用文献

- 1) 特許庁、平成 26 年度 特許出願技術動向調査報告書 (概要) 抗体医薬
- 2) 東ソー株式会社、セパレーションレポート、No. 117

