

## 抗体価測定で卓越したカラム寿命を誇る Bio-Monolith Protein A カラム



### 著者

Andrew Coffey and  
Sandeep Kondaveeti  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

Bio-Monolith Protein A カラムは、細胞培地上清中の IgG 濃度を迅速にスクリーニングできる優れたツールであることが実証されています。このカラムは、広いダイナミックレンジ（オンカラム注入量 1 µg 未満から 150 µg 超）を備え、未精製の細胞培地の上清から IgG 濃度をすばやく正確に求めることができるため、クローンの高速スクリーニングや最適な細胞回収時間の決定に最適です。

従来、このような未精製サンプルでは、カラムの汚染、非特異的な結合の問題、またはキャリーオーバーが生じ、カラム寿命が限定されるのが一般的でした。定置洗浄（CIP）などの手順を組み込むことでカラム性能を回復させることができますが、このアプリケーションノートでは、CIP ステップを挟まなくても、長いカラム寿命が維持されることを検証します。

## はじめに

抗体価の測定では、あらゆる細胞培養手順で重要な役割を果たすタンパク質濃度を測定します。モノクローナル抗体の場合、プロテイン A にもとづくアフィニティクロマトグラフィーが、ターゲット免疫グロブリン IgG の捕捉と放出（および定量）に効果的なツールになります。高速アフィニティクロマトグラフィーは、最も生産的なクローンの特定にも不可欠であり、多様なプロセスパラメータの影響を評価したり、バッチの進捗状況をモニタリングして最適な細胞回収時間を決定することができます。ただし、未精製の細胞培地の上清は複雑なサンプルマトリックスであることから、従来のプロテイン A アフィニティカラムは容易に汚染される可能性があります。これに対し、1.2 ~ 1.5 µm のチャンネルを持つワイドポアのモノリス型固定相は、キャリアオーバーを最小限に抑えながら、優れた堅牢性を実現します。Bio-Monolith Protein A カラムには、高架橋型ポリ（グリンジルメタクリレート-コ-エチレンジメタクリレート）ポリマーを天然プロテイン A でコーティングした固定相が採用されています。µg レベルの IgG1 および IgG2 に対して良好な性能が得られることがわかっており<sup>1</sup>、抗体価の測定、非常に小規模な精製とその後分析、さらに 2D-LC 構成での補間的手法との組み合わせに十分対応できます。

このアプリケーションノートでは、CIP の実施前でも、カラム寿命が長期間にわたって維持されることを実証します。寿命の長期化により、実行できる分析回数が従来よりも増加するため、ユーザーにとってはこれが大きな利点となります。

## 実験方法

### 試薬

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。

すべての化学物質および試薬は、HPLC グレード以上のものを Sigma-Aldrich 社（現 Merck 社）または VWR Scientific 社から入手しました。水は、Milli-Q A10（Millipore）を用いて精製しました。

### 機器

Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC 装置を、次のモジュールで構成しました。

- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートポンプ（p/n G5654A）
- Agilent 1260 Infinity II バイオイナートマルチサンブラ（p/n G5668A）、サンプル冷却器（オプション 100）搭載
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット（p/n G7116A）、バイオイナート熱交換器（オプション 019）搭載
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 WR（p/n G7115A）、バイオイナートフローセル（オプション 028）搭載

### ソフトウェア

OpenLab 2.3 CDS

### メソッド条件

HPLC 条件	
カラム	Bio-Monolith Protein A
結合バッファ（溶出液 A）	50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4
溶出バッファ（溶出液 B）	100 mM クエン酸、pH 2.6
グラジエントプロファイル	時間（分） %B 0.0 ~ 0.5 0（結合） 0.6 ~ 1.8 100（溶出） 1.9 ~ 4.0 0（再生）
流量	1 mL/min
カラム温度	24 °C
検出	UV、280 nm
注入量	必要に応じて 2 ~ 40 µL

### サンプル

サンプル溶液は、CHO 細胞溶解液上清をリン酸緩衝液で 1:3 v/v の割合で希釈し、ヒト IgG を最終濃度が 5 mg/mL になるようにスパイクして調製しました。

タンパク質のキャリアオーバーの測定には、ブランクとして、CHO 細胞溶解液上清をリン酸緩衝液で 1:3 v/v の割合で希釈した溶液とリン酸緩衝液のみの溶液も使用しました。

## 結果と考察

長期にわたるカラム性能の変化を測定する前に、Bio-Monolith Protein A カラムに、ヒト IgG を 5 mg/mL でスパイクした CHO 細胞溶解液上清を注入して、検量線を作成しました。そのクロマトグラムを図 1 に示します。この一連の測定では、サンプルを注入するごとに、結合バッファ（100 % 移動相 A、50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4）でカラムを洗浄し、スパイクしたサンプルに対してブランク注入をすることで注入量を増加させて、ヒト IgG の注入量を変化させました。サンプルの注入後、溶出バッファ（100 % 移動相 B、100 mM クエン酸、pH 2.6）に切り替えて、結合したヒト IgG を溶出しました。この溶出条件下では、オンカラム注入量 200 µg に対するピークレスポンスが 3,000 mAU を超えました（図中の、近似直線から外れているオレンジ色のプロット）。この値は、検出器の直線範囲を超えています。ピーク面積とタンパク質注入量の関係をプロットすることにより、検量線を作成しました。これを図 2 に示します。

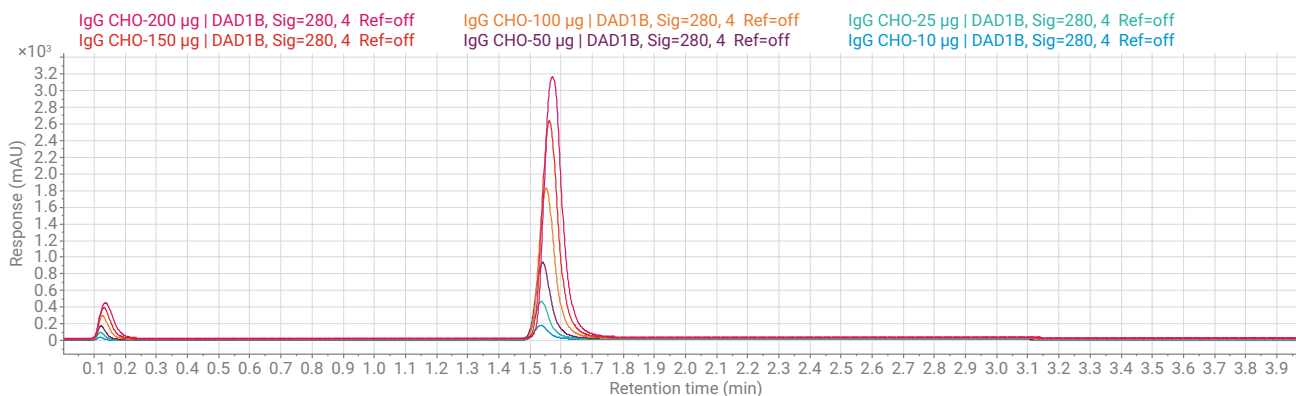


図 1. 注入量増加によるクロマトグラムの重ね書き

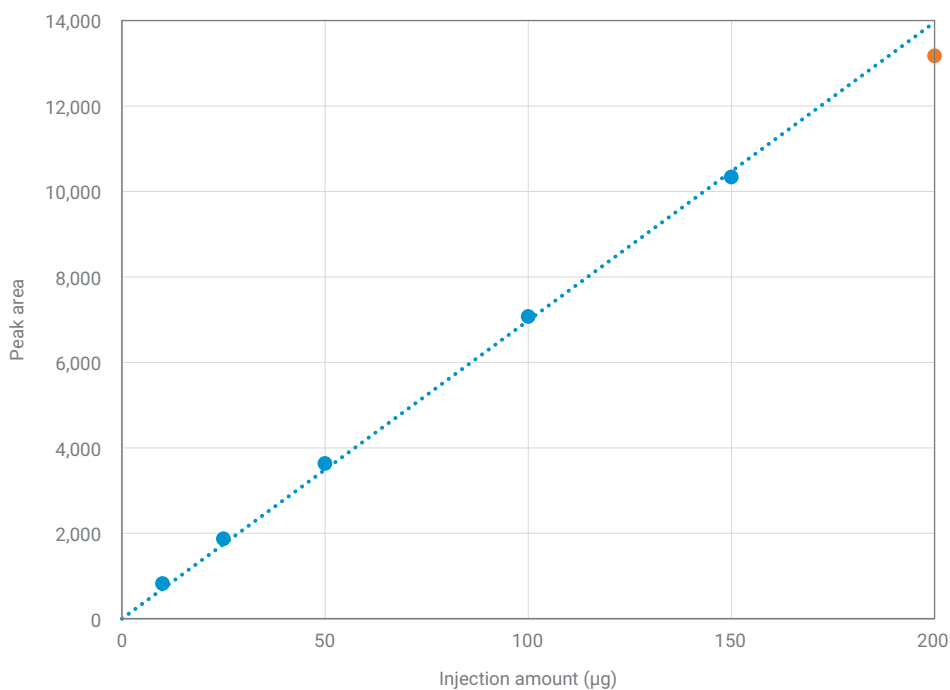


図 2. ヒト IgG の注入量対ピーク面積により作成した検量線

検出器が飽和しないようにするには、タンパク質が適度な濃度に収まるように、細胞培地の上清をさらに希釈する必要があるでしょう。

検量線の作成後、IgG のキャリアオーバーや、ヒト IgG と共溶出する可能性のある宿主細胞タンパク質の非特異的な結合が起こっていないことを確認するために、Bio-Monolith Protein A カラムで、希釈した細胞培地の上清のブランクグラジエントを実施しました (図 3)。その後、希釈してヒト IgG をスパイクした細胞培地の上清を 50 回注入してから追加のブランク注入を行う一連の分析を繰り返し、合計 800 回以上

の注入を行いました。図 4 は、注入 1 回目、250 回目、500 回目、および 750 回目のクロマトグラムを重ね表示したものです。実験中 (4 日間にわたって実施)、ピーク形状が著しく劣化することはありませんでした。また、ピーク高さやテーリングファクターも一定に保たれ、サンプルが未精製であることによるカラムのクリーニングは必要ありませんでした。

図 5 に、希釈してヒト IgG をスパイクした細胞培地の上清を 50 回注入した後に行った最初のブランク注入のクロマトグラムを示します。50 回の注入後も IgG のキャリアオーバーはほとんどなく、0.2 % 未満に抑えられています。このわずかなキャリアオーバーも、それに続くブランクグラジエント後には解消されています。

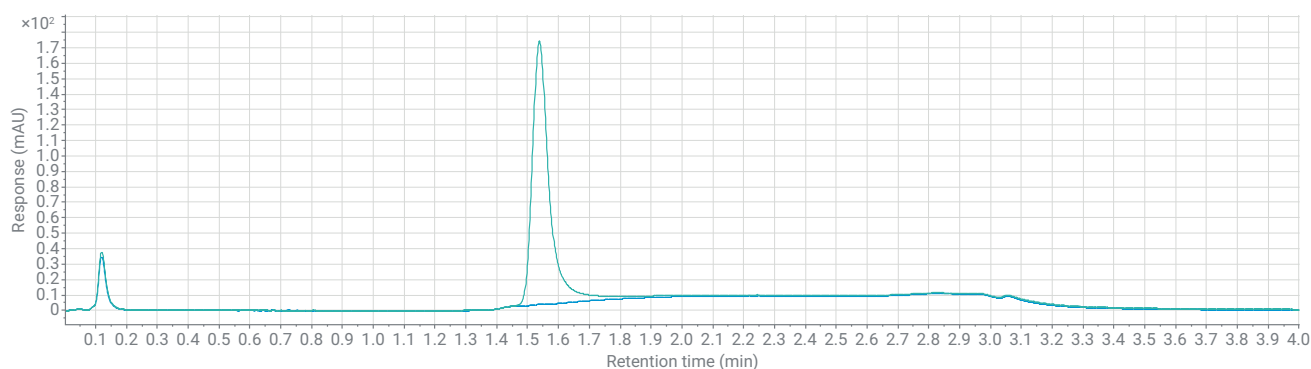


図 3. 最初のブランク注入 (上清のみ) と、それに続く最初の注入 (10 µg のヒト IgG) のクロマトグラム

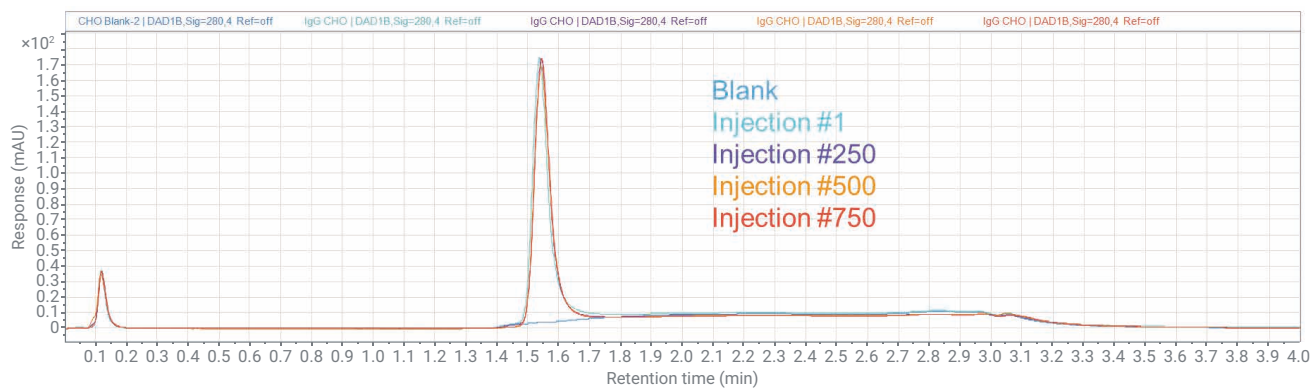


図 4. 注入 1 回目、250 回目、500 回目、および 750 回目のクロマトグラムの重ね表示。ピーク形状やピーク面積がほとんど変化していません。

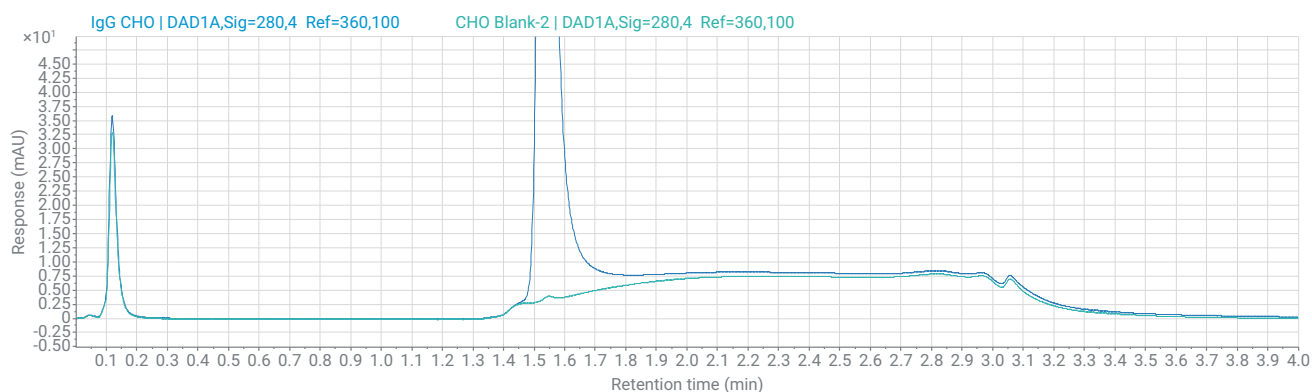


図 5. 50 回目の注入と、それに続くブランク上清の注入のクロマトグラム。キャリアオーバーはほとんど認められません (0.2% 未満)。

## 結論

目詰まりを低減するためのわずかな改良により、Bio-Monolith Protein A カラムでは、宿主細胞タンパク質の非特異的な結合がほとんど起こらないことがわかりました。キャリアオーバーもほぼ認められず、未精製の細胞培地の上清を 750 回注入した後もピーク形状の劣化が最小限に抑えられ、卓越したカラム寿命を発揮しました。

今回の調査結果から、このカラムが、抗体価レベルを迅速かつ正確に測定できる優れたツールであり、数百ものサンプルの連続スクリーニングに適していることが実証されました。

## 参考文献

1. Dumont, E. et al. mAb Titer Analysis with the Agilent Bio-Monolith Protein A Column, Agilent Technologies application note, publication number 5991-5135EN, **2017**.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto: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. 2020  
Printed in Japan, June 26, 2020  
5994-2168.JAJP  
DE.3805555556

