

SEPARATION REPORT

分取用 AFC カラム TSKgel[®] FcR-III 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	2
2 - 3. 分離条件の影響	3
2 - 4. 試料負荷量の影響	4
2 - 5. 耐久性	4
2 - 6. 洗浄法	5
2 - 7. 保存安定性	1
3. 応用例	6
(1) 抗体の分離例	6
(2) フラクシヨンの分析と精製結果	7
4. おわりに	8

1. はじめに

抗体医薬品は、ガンや自己免疫疾患などの治療薬として需要がますます増大しており、世界各地で生産設備が新設、増強されています。抗体医薬品の均一性を担保するためには、さまざまな品質管理および品質分析が要求されます。特に、抗体のFc領域に存在する糖鎖構造の違いは、近年の研究で抗体医薬品の薬効、物理的安定性、免疫原性、血中半減期など、重要な物性に影響することが報告されており¹⁾⁻³⁾、研究段階のみならず生産バッチ毎に詳細な分析が必要とされています。

抗体の糖鎖の違いを迅速に分析可能な製品として、当社では抗体医薬品の作用機序に密接に関わる「ヒトFc受容体(FcγRIIIa)」を固定化した高性能アフィニティークロマトグラフィー(AFC)カラム TSKgel FcR-IIIa-NPR を販売しております。同カラムを用いることで、糖鎖構造や活性に基づいた分離パターンが30分以内で得られ、抗体医薬品の品質分析に有用と考えられます。一方で、FcR-IIIa-NPR で分離されるピーク成分をそれぞれ詳細に解析するためには mg オーダーの量を得る必要があります。このような背景により、結合容量を大幅

に増加した分取用カラム TSKgel FcR-IIIa-5PW を商品化したしました。本稿では、TSKgel FcR-IIIa-5PW の基本的性質と応用例を紹介いたします。

2. 基本的性質

2-1. 充填剤の性質

TSKgel FcR-IIIa-5PW は、多孔性の親水性ポリマー基材に、遺伝子組換え FcγRIIIa をリガンドとして導入した充填剤を PEEK 製カラムに充填した抗体分取用 AFC カラムです。FcγRIIIa リガンドは、天然型のアミノ酸配列の一部を改変して物理化学的安定性を向上させており、FcR-IIIa-NPR と同一の構造を有しています。

多孔性の基材を用いることで、FcR-IIIa-NPR に対して 100 倍以上の吸着容量向上を達成しており、1 回の測定で 5 mg 以上の抗体の分取が可能です。また、安定化した FcγRIIIa を使用することで優れた耐久性と長期保存安定性が得られています。

表 1 に分析用カラム FcR-IIIa-NPR と分取用カラム FcR-IIIa-5PW の仕様の比較を示します。

表 1 TSKgel FcR-IIIa-NPR および TSKgel FcR-IIIa-5PW の仕様

品番		0023513	0023532
品名		TSKgel FcR-IIIa-NPR	TSKgel FcR-IIIa-5PW
特徴/使用目的		高分離能/高速分析用	高吸着容量/ラボスケール分取用
充填剤	基材	親水性ポリマー (非多孔性)	親水性ポリマー (多孔性)
	平均粒子径	5 μm	10 μm
	リガンド	改変型ヒト FcγRIIIa (大腸菌生産)	
カラム	サイズ	4.6 mm I.D. × 7.5 cm	7.8 mm I.D. × 7.5 cm
	材質	PEEK	
	出荷溶媒	0.025 % ProClin®300 + 0.65 mmol/L クエン酸 + 9.35 mmol/L クエン酸三ナトリウム (pH 6.5)	
使用条件	抗体負荷量	5 ~ 50 μg	最大 ≥ 5 mg
	標準的な測定時間	30 分	180 分
	適正流速	1.0 mL/min	0.3 mL/min
	最大圧力損失	9.0 MPa	1.0 MPa
	pH 範囲	pH 4.0 ~ 8.0 (短期)、pH 5.0 ~ 7.0 (長期)	
	温度	15 ~ 25 °C	
保管条件		出荷溶媒に置換し、冷蔵 (2 ~ 8 °C)	

“ProClin” は Rohm and Haas Company の登録商標です。

2-2. 標準的分離条件

多くの抗体は中性付近 (pH 6.0 ~ 7.5) で Fc γ RIIIa に吸着し、酸性条件下 (pH 4.0 ~ 5.0) で溶出するため、TSKgel FcR-IIIa-5PW による抗体の分離には、通常、pH の異なる2液による pH グラジエント溶出法が用いられます。

溶離液としては、種々の緩衝液が使用できますが、幅広い pH 範囲で緩衝能を有するクエン酸塩緩衝液が多用されます。一般的な CHO 細胞で作製したヒト IgG₁ 抗体を分離する場合、吸着用溶離液 (溶離液 A) として 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)、溶出用溶離液 (溶離液 B) として 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) が用いられます。溶離液 A で予めカラムを平衡化した後 (カラム容量の3倍量程度流す)、試料を注入して抗体を結合させます。その後、リニアグラジエントにて溶離液 B に切り替えて抗体を溶出させます。ピークが溶出した後、できるだけ速やかに溶離液 A にて再平衡化することで、酸性緩衝液によるカラムの劣化を抑制できます。本カラムに使用される Fc γ RIIIa リガンドは一定の耐酸性を有しますが、酸性緩衝液への長時間暴露はカラムの劣化を早める原因とな

りますので、ご注意ください。

また、抗体や夾雑物質の種類によっては、非特異的な吸着によりカラムに蓄積することで、徐々に抗体の保持時間が早くなることがあります。多くの場合、これらは静電的な相互作用により吸着しているものと考えられ、NaCl などの塩を 150 ~ 500 mmol/L 添加した緩衝液を適宜通液して洗浄するか、溶離液 A 及び B にそれぞれ 150 mmol/L 程度の NaCl を添加した緩衝液を使用することで抑制可能です。

表 2 に標準的な分離条件を示しますが、抗体によって最適条件が異なる場合がありますので、抗体ごとに条件検討の実施をお勧めします。

Fc γ RIIIa リガンドの抗体親和性は、温度の影響を大きく受けることが知られています。測定再現性を得るために、カラムオープンの使用を強く推奨します。図 1 にカラムオープン温度を 15 °C 及び 25 °C に設定して抗体を分離した際のクロマトグラムを示します。温度が高い状態では抗体への親和性が低下し、抗体保持時間が短くなることがわかります。一方、ピークの分離はカラム温度が高い方が良好です。

表 2 標準的な分離条件

	条件 1	条件 2
溶 離 液	A : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) B : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)	A : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 + 150 mmol/L NaCl (pH 6.0) B : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 + 150 mmol/L NaCl (pH 4.0)
グラジエント 条 件	0 - 10 分 B 0 % 10 - 130 分 B 0 % → B 100 %, リニアグラジエント 130 - 150 分 B 100 % ※測定前後に 10 分間の平衡化ステップを実行	
流 速	0.3 mL/min (平衡化ステップは 1.0 mL/min)	
検 出	UV 280 nm	
備 考	標準的な分離条件	静電的相互作用による非特異的吸着を抑制する条件

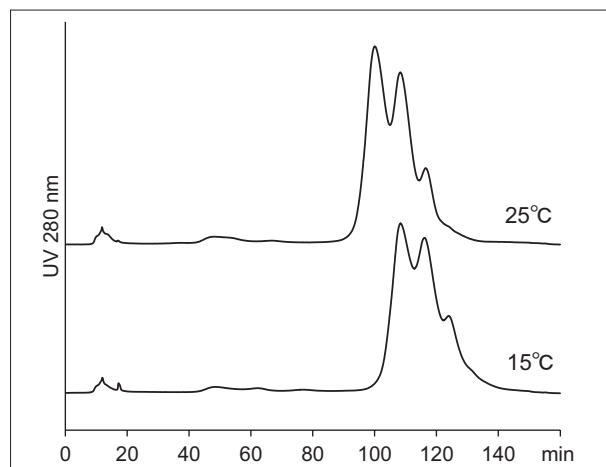


図 1 カラム温度が分離に与える影響

〈測定条件〉

カラム : TSKgel FcR-IIIa-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)
 溶離液 A : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)
 溶離液 B : 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)
 グラジエント : 0 - 10 分 B 0 %
 10 - 130 分 B 0 % → 100 %, リニアグラジエント
 130 - 150 分 B 100 %
 流 速 : 0.3 mL/min
 検 出 : UV 280 nm
 温 度 : 図中に記載
 試 料 : ヒト化モノクローナル抗体, 5 mg

2-3. 分離条件の影響

2種のグラジエント勾配にて種々の流速でモノクローナル抗体の分離を行い、測定条件の違いが分離に与える影響を確認しました(図2)。流速に関しては低い方が、

グラジエント勾配については緩やかな方が、より良好な分離が得られることがわかります。本抗体における最適な測定条件は流速0.3 mL/分、グラジエント時間120分(B 0 - 100%)と考えられました。

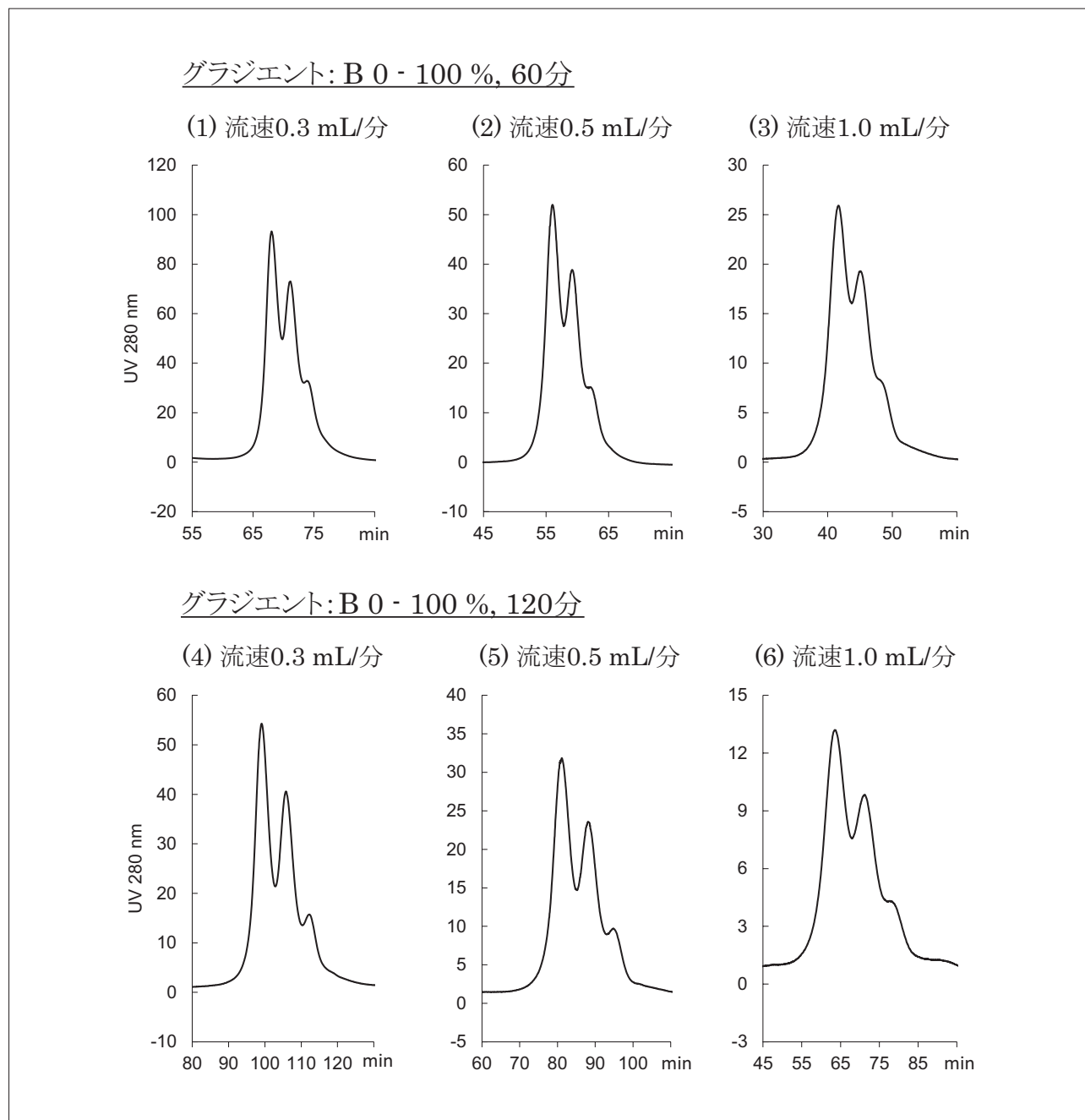


図2 各測定条件における分離ピークの比較

〈測定条件〉

カラム: TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)

溶離液 A: 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)

溶離液 B: 50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)

グラジエント: 図中に記載

流速: 図中に記載

検出: UV 280 nm

温度: 25℃

試料: ヒト化モノクローナル抗体, 1 mg

2-4. 試料負荷量の影響

TSKgel FcR-III A-5PW は表面積の大きな多孔性の基材を使用しているため、高い抗体吸着容量を有しています。図3に抗体負荷量を1～10 mgまで変化させた際

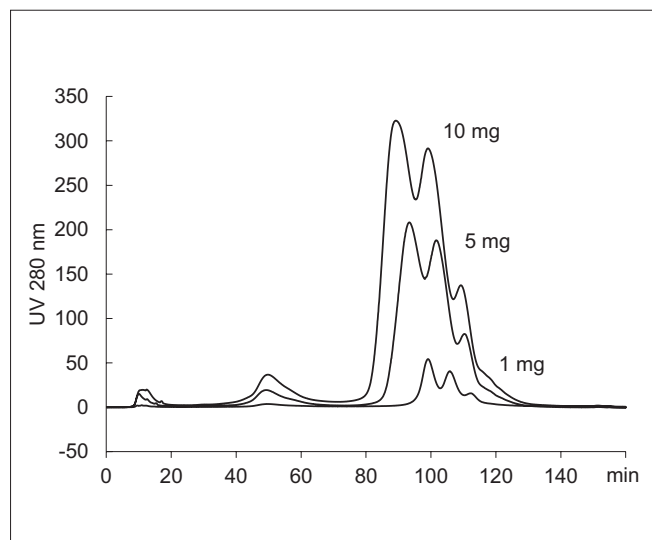


図3 抗体負荷量が分離に与える影響

のクロマトグラムを示します。負荷量が小さい程ピーク分離が良い傾向がありますが、10 mg 負荷時にも本抗体に特徴的な3本のピークが確認できました。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液 A：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)
溶離液 B：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)
グラジエント：0 - 10分 B 0 %
10 - 130分 B 0% → 100 %,
リニアグラジエント
130 - 150分 B 100 %
流速：0.3 mL/min
検出：UV 280 nm
温度：25 °C
試料：ヒト化モノクローナル抗体 (試料負荷量は図中に記載)

2-5. 耐久性

モノクローナル抗体を試料として、100回の連続測定を行いました。図4に10回注入ごとのクロマトグラム

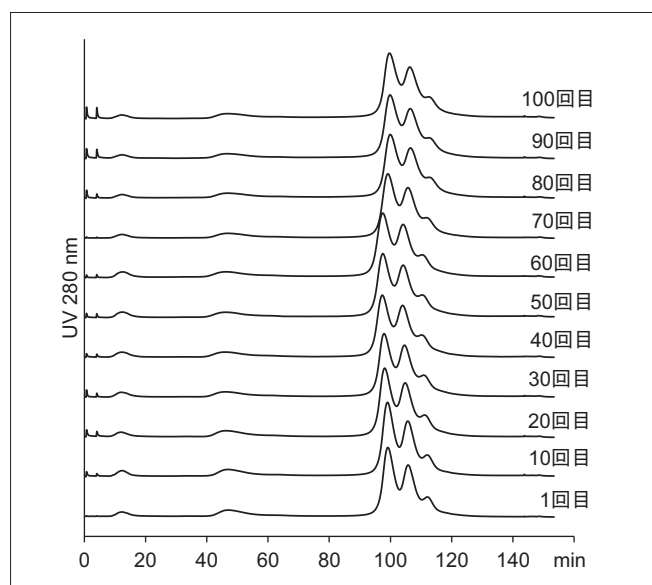


図4 耐久性試験時のクロマトグラム

を示しますが、抗体の保持時間や分離度に顕著な変化は認められませんでした。

〈測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)
溶離液 A：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)
溶離液 B：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)
グラジエント：0 - 10分 B 0 %
10 - 130分 B 0% → 100 %,
リニアグラジエント
130 - 150分 B 100 %
流速：0.3 mL/min
検出：UV 280 nm
温度：25 °C
試料：ヒト化モノクローナル抗体, 1 mg

※クエン酸塩緩衝液はカビ等の微生物が発生し易いため、溶離液を0.2 μmのフィルターでろ過する、定期的に新しい溶離液に交換するなどの対策を適宜実施してください。また、カラムとインジェクションバルブの間にラインフィルターの設置を推奨します。

2-6. 洗浄法

精製対象の試料によっては充填剤の表面が汚染され、抗体保持力や分離度の低下、圧力損失の上昇などが生じる可能性があります。このような現象が発生した際には、500 mmol/L の NaCl を含む緩衝液や 20 vol% のエタノールを含む緩衝液をインジェクター経由で 0.5 ~ 2.0 mL 注入する方法により充填剤の表面を洗浄することで、性能を回復できることがあります。

本カラムに使用されている Fc γ RIIIa リガンドはアルカリ耐久性が十分ではないため、洗浄液として水酸化ナトリウム水溶液等のアルカリ溶液は使用できません。また、たんぱく質の変性剤や高濃度の有機溶媒などもリガ

ンドを劣化させる原因となりますので、洗浄剤としては不適です。

2-7. 保存安定性

図 5 に本カラムを指定の保存緩衝液封入下、10 °C で保管した際の抗体結合容量維持率、理論段数及びシンメトリー係数の変化を示します。12 ヶ月以上の期間に亘って充填剤上に固定化した Fc γ RIIIa リガンドが安定して機能することがわかりました。ただし、本カラムのリガンドは、各種プロテアーゼや微生物の影響により性能が低下する可能性がありますので、保管時には適切な管理が必要です。

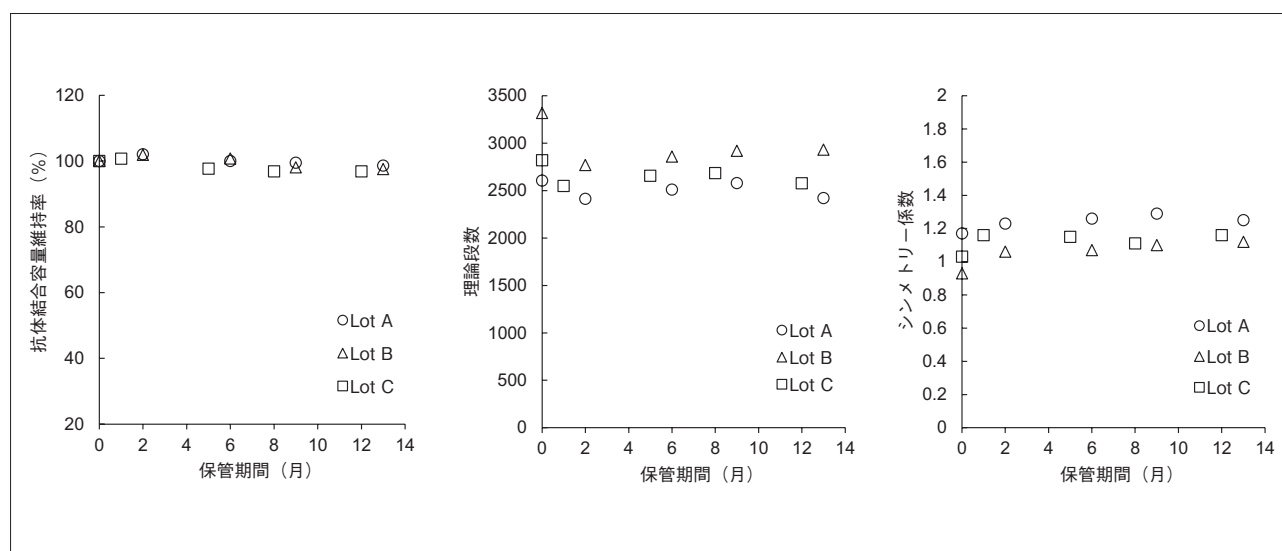


図 5 カラムの保存安定性

〈抗体結合容量の測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)
 溶離液 A：20 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)
 溶離液 B：20 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)
 グラジエント：0 - 30 分 B 0 %
 30 - 42 分 B 100 %
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 試料：ヒト γ -グロブリン, 100 mg

※ カラム吸着分を回収し、吸着容量を測定しました

〈理論段数およびシンメトリー係数の測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. × 7.5 cm)
 溶離液：100 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液
 + 100 mmol/L 硫酸ナトリウム (pH 6.7)
 流速：1.0 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25 °C
 試料：1 % アセトン水溶液, 10 μ L

3. 応用例

(1) 抗体の分離例

FcR-III A-5PW による抗体の分離例を以下に示します。抗体サンプルとして CHO 細胞で生産したヒトモノクローナル抗体をプロテイン A カラムで精製した試料を用いました。本抗体を分析用カラム FcR-III A-NPR で測定した結果を図 6 に示します。成分がピーク 3 本に分離され、それぞれのピーク面積の割合はピーク 1 よ

り 48 %、33 %、19 % でした。同様に同抗体 5 mg を分取用カラム FcR-III A-5PW で精製して得たクロマトグラムを図 7 に示します。溶出液が pH 5.0 に到達した時点より抗体が溶出し、FcR-III A-NPR での分析結果と同様に 3 成分が確認できました。フラクションは抗体溶出時点より 2 分間隔で分取し、1 mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) を各 100 μ L ずつ添加して中和しました。

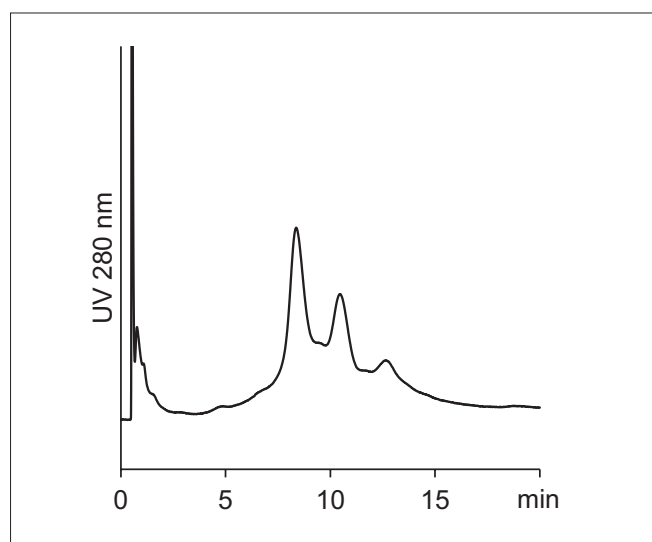


図 6 FcR-III A-NPR によるモノクローナル抗体の分離

〈測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. \times 7.5 cm)
溶離液 A：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)
溶離液 B：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)
グラジエント：0 - 2 分 B 0 %
2 - 20 分 B 0 % \rightarrow 100 %
リニアグラジエント
20 - 25 分 B 100 %
25 - 30 分 B 0 %

流速：1.0 mL/min

検出：UV 280 nm

温度：25 $^{\circ}$ C

試料：ヒトモノクローナル抗体、20 μ g

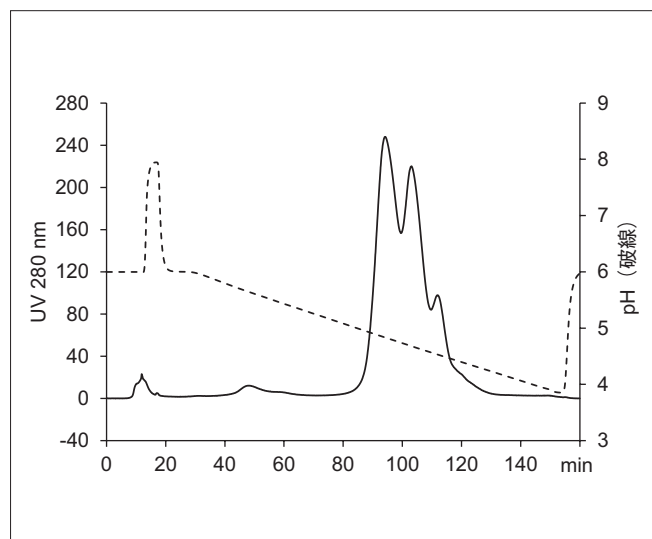


図 7 FcR-III A-5PW によるモノクローナル抗体の分離

〈測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-5PW (7.8 mm I.D. \times 7.5 cm)
溶離液 A：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)
溶離液 B：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)
グラジエント：0 - 10 分 B 0 %
10 - 130 分 B 0 % \rightarrow 100 %
リニアグラジエント
130 - 150 分 B 100 %

流速：0.3 mL/min

検出：UV 280 nm

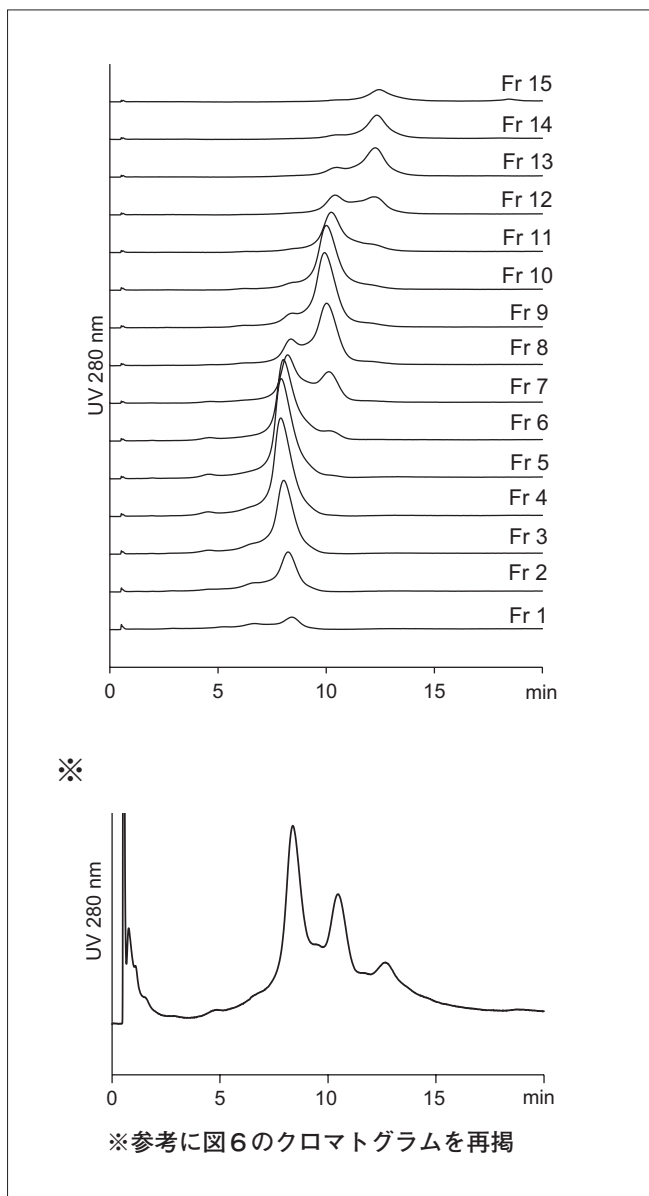
温度：25 $^{\circ}$ C

試料：ヒトモノクローナル抗体、5 mg

(2) フラクシオンの分析と精製結果

分取した各フラクションを 280 nm の吸光度法により濃度を算出した後、FcR-III A-NPR を用いて分析しまし

た。結果を図 8 に示します。各ピークについて純度 80 % 以上のフラクションを混合すると、表 3 の精製結果が得られました。



〈測定条件〉

カラム：TSKgel FcR-III A-NPR (4.6 mm I.D. × 7.5 cm)
 溶離液 A：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)
 溶離液 B：50 mmol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)
 グラジエント：0 - 2 分 B 0 %
 2 - 20 分 B 0 % → 100 %,
 リニアグラジエント
 20 - 25 分 B 100 %
 25 - 30 分 B 0 %

流 速：1.0 mL/min

検 出：UV 280 nm

温 度：25 °C

試 料：分取フラクション，各 20 μL

図 8 フラクシオンの TSKgel FcR-III A-NPR による測定

表 3 精製結果

成 分	回収フラクション	純度 [%]	収量 [mg]
Peak 1	Fr1 ~ Fr6	98.6	2.1
Peak 2	Fr9 ~ Fr11	89.7	1.0
Peak 3	Fr13 ~ Fr15	87.9	0.5

4. おわりに

以上、抗体医薬品向け分取用 AFC カラムである TSKgel FcR-III A-5PW について概説しました。FcR アフィニティークロマトグラフィーは抗体医薬品の糖鎖構造や活性に基づいた知見が得られるため、品質管理に有用と考えられます。高速分析を行う場合は分析用カラム FcR-III A-NPR を、各ピークを分取し、その構造、機能、安定性を評価する場合は、分取用カラム FcR-III A-5PW をご使用ください。

〈参考文献〉

- 1) Martin Schiestl, *et al.*, *Nature Biotechnology*, 29, 310-312 (2011)
- 2) Jing Fang, *et al.*, *Biochemistry*, 55, 860-868 (2016)
- 3) Dietmar Reusch, *et al.*, *Glycobiology*, 25, 12, 1325-1334 (2015)

※“TSKgel”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
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 <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>