

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F を用いた Fab 断片の精製

Purification of Fab fragments by TOYOPEARL AF-rProtein L-650F

TOYOPEARL AF-rProtein L-650F は、IgG の κ 軽鎖可変領域 (VL, Light chain variable region) に特異的に結合する組換え Protein L をリガンドとした担体で、Fab や scFv を代表とする抗体断片や低分子化抗体などの精製に適しています。

IgG はパパイン酵素によりヒンジ部分で 2 分子の Fab と 1 分子の Fc に断片化されます。単離された Fab は抗原結合性の断片として有用です。本報では、TOYOPEARL AF-rProtein L-650F を使用してヒト化モノクローナル抗体のパパイン酵素消化物から Fab 断片の精製を試みた結果を報告します。同時に、Protein G 固定化担体、Protein A 固定化担体との比較も行いました。

初めに、図 1 の手順に従って、ヒト化モノクローナル抗体をパパイン酵素消化して分解物を調製しました。有機溶媒を含む溶離液を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより分解物の消化率を確認した結果 98% でした。図 2 に消化前後のクロマトグラムを示します。次に TOYOPEARL AF-rProtein L-650F、Protein G 固定化担体、Protein A 固定化担体を用いて、抗体分解物から Fab 断片を精製しました。素通り画分及び溶出画分を分取し、各フラクションを消化率の確認と同条件のサイズ排除クロマトグラフィーにより分析し、精製物を確認しまし

た。

図 3 及び図 4 に精製時および精製物を確認したクロマトグラムを示します。TOYOPEARL AF-rProtein L-650F を使用した場合、Fab 断片のみが結合し、Fab 断片を選択的に単離できることが確認できました。一方、Protein G 固定化担体、Protein A 固定化担体を使用した場合、Fab 断片と Fc 領域ともに結合するため、溶出画分②に両方が混在する結果となりました。Protein A や Protein G は IgG の Fc 領域に結合するリガンドですが、一部の抗体種において Protein A は重鎖可変領域 (VH, Heavy chain variable region) に、Protein G は重鎖定常領域 (CH1, Heavy chain constant region domain 1) にも結合することが知られています。そのため、今回の検討では、Fab 断片と Fc 領域を完全に分離することが出来なかったと考えられます。

以上の結果から、TOYOPEARL AF-rProtein L-650F は、ヒト化モノクローナル抗体のパパイン酵素消化物からの Fab 断片の効率的な精製に有効であることが判りました。

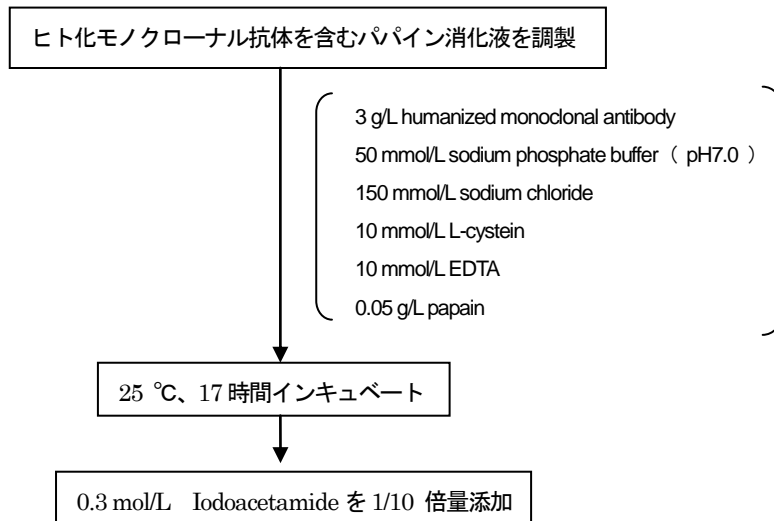
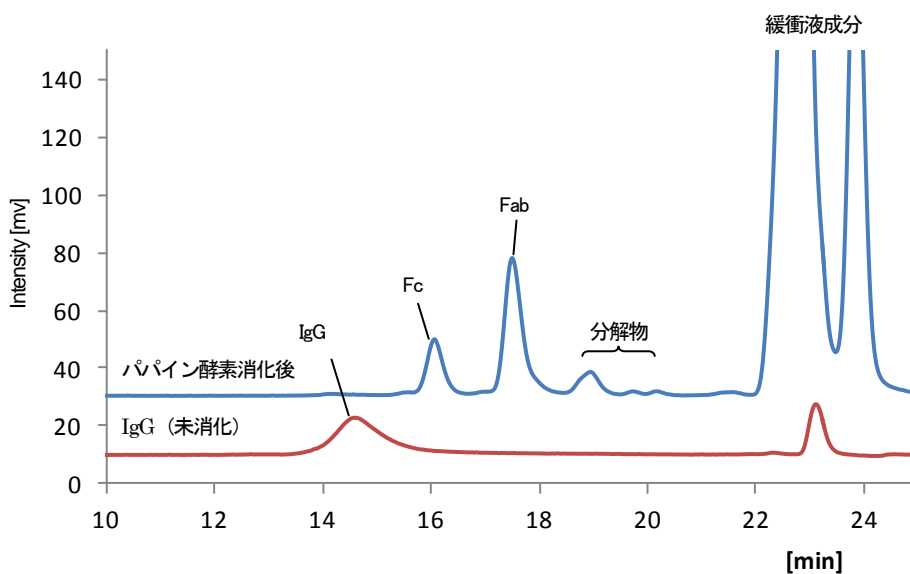
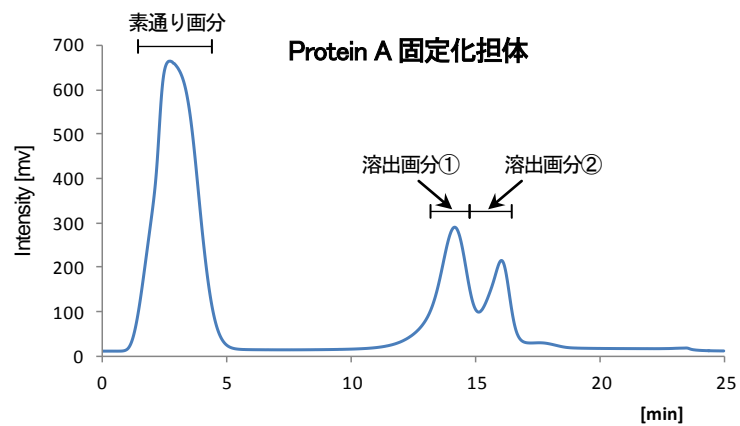
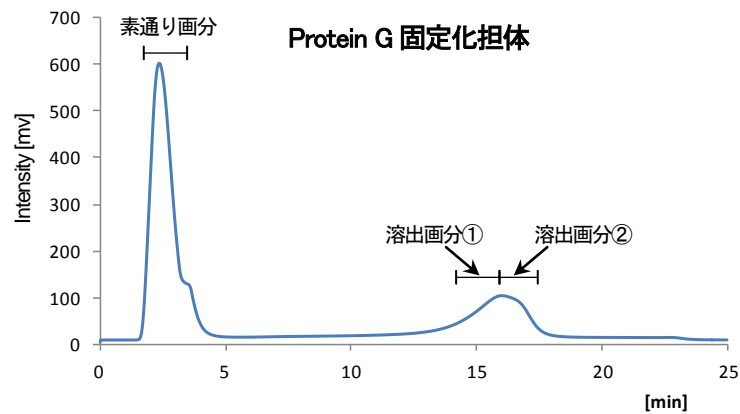
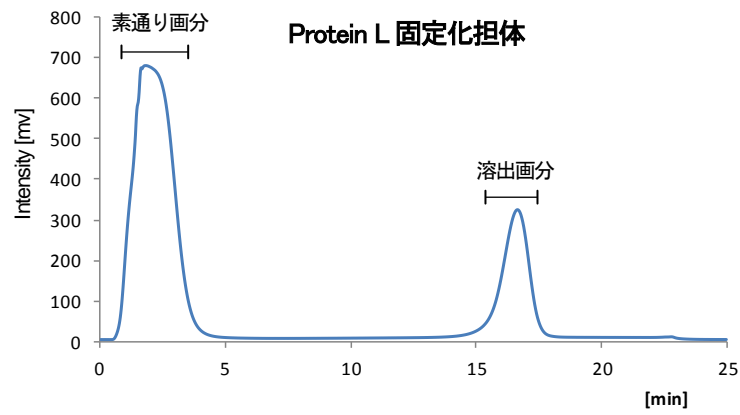


図 1 パパイン酵素消化による抗体断片試料作製手順



Conditions
 Column : TSKgel UP-SW3000 (4.6 mm I.D. x 15 cm) × 2 本
 Eluent : 0.1 % trifluoroacetic acid in 20 % acetonitrile
 Flow rate : 0.2 mL/min
 Injection volume : 10 μL
 Detection : UV (280 nm)

図 2 パパイン消化物のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離

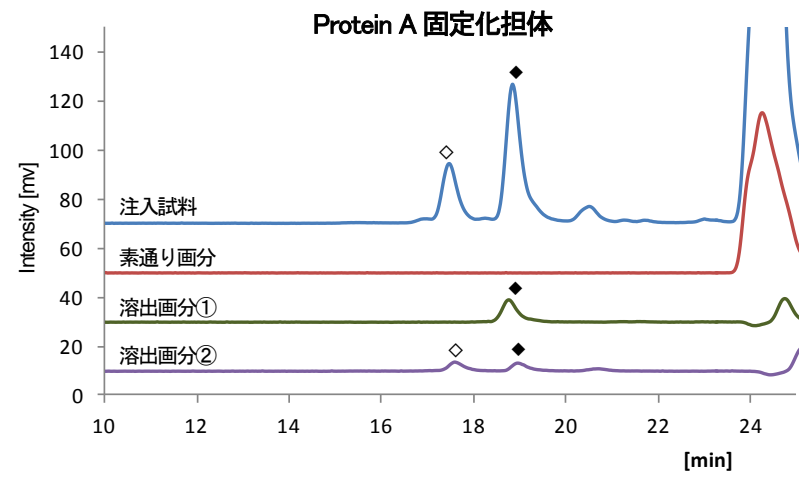
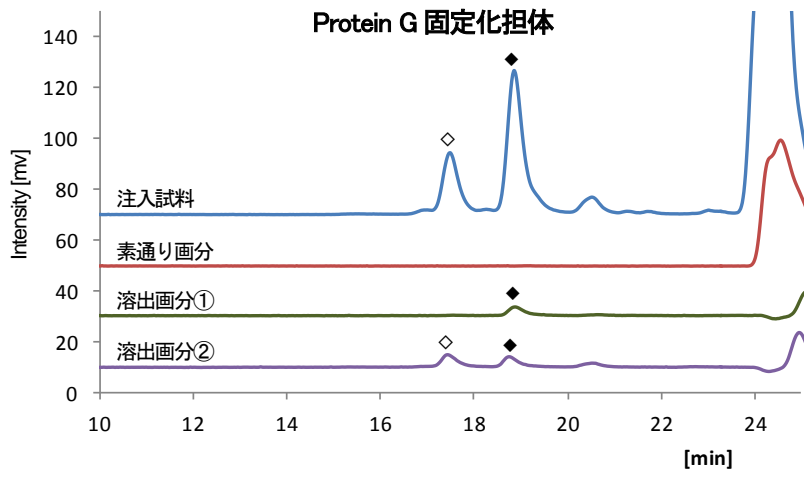
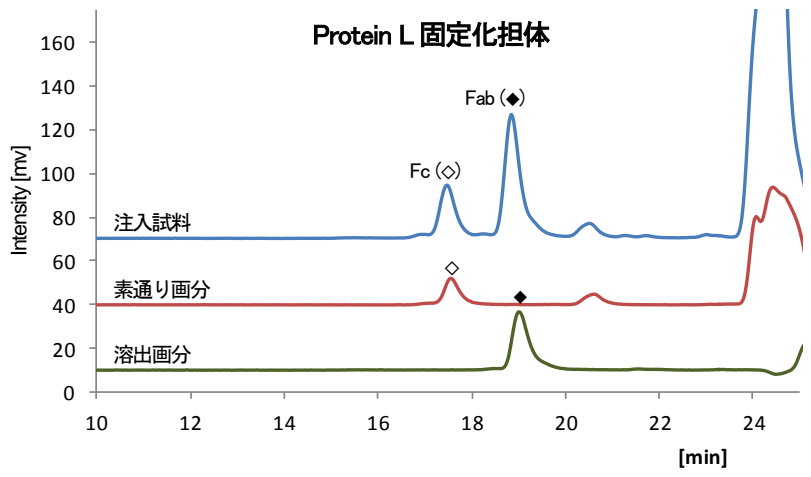


Conditions

Column : [A] TOYOPEARL AF-rProtein L-650F (5 mm I.D. x 5 cm)
 [B] Protein G Sepharose 4 Fast Flow (5 mm I.D. x 5 cm)
 [C] TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (5 mm I.D. x 5 cm)

Eluent A : 0.1 mol/L sodium citrate (pH 6.5)
 Eluent B : 0.1 mol/L sodium citrate (pH 2.2)
 Gradient : B conc. (0 min) 0% → (1 min) 0% → (16 min) 100 %
 Flow rate : 0.5 mL/min
 Sample : Papain digests of 3 g/L humanized monoclonal antibody
 Injection volume : 1.5 mL
 Detection : UV (280 nm)

図3 各担体を用いたパイン消化物の精製クロマトグラム



※分析条件は図2に記載

図4 各画分のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離