

## 製造スケールのプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー樹脂を用いたハイスループット分析スケールのモノクローナル抗体の自動精製

---

Stephan M. Koza, Caitlin M. Hanna, Albert H. W. Jiang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 要約

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞調整培地からの、プロテイン A アフィニティーに基づく分析スケールの自動化されたモノクローナル抗体 (mAb) の精製について説明します。この手順はコスト効率が高く、分析者が選択したプロセススケールのプロテイン A 樹脂、96 ウェル 0.2  $\mu\text{m}$  フィルタープレート、およびオービタルプレートシェーカーを使用して、120  $\mu\text{g}$  ~ 240  $\mu\text{g}$  の mAb を精製できることが実証されました。精製メソッドの複数のピペッティングステップ (12 ステップ/サンプル) は手作業でも実行できますが、Andrew+ ロボットプラットフォームを使用することで、分析者の作業にかかる時間が短縮され、精製の面倒さや、ミス発生の可能性が大幅に低減され、約 1 時間で 48 サンプルを精製できます。Andrew+ ロボット用の直感的な OneLab ビジュアルプログラミングインターフェースにより、開発および検証された精製プロトコルの展開に加えて、この手順および同様のプレートベースの手順の最適化と評価が容易になります。

最終的な手順により、精製および中和された mAb サンプルが得られます。120  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{L}$  で回収率 85% 以上) をロードした場合、濃度が 1.02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  以上になり、240  $\mu\text{g}$  (100  $\mu\text{L}$  で回収率 94% 以上) をロードした場合、濃度が 2.27  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になります。サイズバリエーション分析 (サイズ排除クロマトグラフィー、SEC) のサンプル前処理としてのこの手順の評価および LC-MS を用いた遊離 N 型糖鎖プロファイリングも紹介されています。

---

## アプリケーションのメリット

- ハイスループット、自動分析スケール（120 µg ~ 240 µg）のプロテイン A アフィニティーバッチ精製で、細胞培養液から mAb を高サンプル回収率（85% 以上）で精製
- 分析者が選択したプロセススケールのプロテイン A または他のアフィニティークロマトグラフィー樹脂（プロテイン L または G）を使用
- 前処理時間は 48 サンプルで約 1 時間
- SEC 分析および遊離 N 型糖鎖解析において、宿主細胞由来のタンパク質やその他の干渉物質を効果的に除去

---

## はじめに

細胞培養サンプルからの医薬品の組換えモノクローナル抗体（mAb）のハイスループットな分析スケール精製は、細胞培養プロセスの開発を支援するために不可欠です<sup>1</sup>。信頼性および再現性の高い精製は、サンプル前処理や分析の妨げになる可能性があるサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、遊離 N 型糖鎖解析、ペプチドマッピング、および調整培地成分、宿主細胞のタンパク質、核酸が干渉する可能性のあるその他の分析法での成功を促進します。

ここ数十年で、プロテイン A アフィニティーキャプチャーを使用した mAb の分析スケール精製のために、多数のアプローチおよび形式が開発されました。このプロテイン A 精製試験の主な目標は、分析者が選択したプロセススケールのプロテイン A 樹脂を使用して、mAb 質量要件を最小限に抑え、回収率および mAb の最終濃度を最大化できる自動メソッドを開発することです。

---

## 実験方法

mAb（トラスツズマブ）調製物を複数の供給元から入手し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）または遺伝子導入されていない CHO 調整（14 日間）細胞培地（NTM）で、ラベル記載の濃度に希釈しました。Syd Labs, Inc. の支援により、NTM はスピナーフラスコ内で遺伝子導入されていない CHO-K1 細胞を使用して調製しました。2 ~ 15 日目に使用済み培地をフラスコから収集し（平均細胞生存率約 90%）、プールして、0.2 µm でろ過しました。

## プロテイン A

ロボットシステム:	Extraction+ モジュールを搭載した Andrew+ ピペッティングロボット
フィルタープレート:	Pall™ AcroPrep™ Advanced 96 ウェルフィルタープレート - 350 μL、0.2 μm Supor™ メンブレン (製品番号: 8019)
コレクションプレート:	Waters QuanRecovery™ 700 μL 96 ウェルプレート (製品番号: 186009184)
プロテイン A 樹脂:	Cytiva MabSelect™ (製品番号: 17519901)、スラリーは約 25% (1: 1、PBS: 50%)。50% 樹脂を 1000 g で 3 分間遠心分離し、樹脂容量と同量の 400 mM NaCl、20% エタノールと上清を交換します。
PBS:	リン酸緩衝生理食塩水: 137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、pH 7.4
NB:	中和バッファー: 1M トリス、pH 7.5
EB:	溶出バッファー: 100 mM グリシン、pH 3.0
オービタルシェーカー:	Eppendorf ThermoMixer® C (8 °C)
ソフトウェア:	OneLab (Andrew Alliance/Waters)

## SEC

LC システム:	ACQUITY Premier UPLCバイナリーマネージャ (BSM または QSM) 付き、CH-A カラムヒーター、または BioAccord™ LC-MS (ESI-ToF) システム
----------	--

検出:	ACQUITY UPLC TUV 検出器 (5 mm チタンフローセル付き)、波長: 280 nm
バイアル:	ポリプロピレン 12 × 32 mm スクリューネックバイアル (キャップ付きおよびスリット入り PTFE/シリコーンセブタム付き)、容量 300 $\mu$ L、100 個入り (製品番号: 186002639)
カラム:	ACQUITY Premier Protein SEC 250 Å、2.5 $\mu$ m、4.6 × 150 mm カラム + mAb サイズバリエーション標準試料 (製品番号: 176004783)
カラム温度:	25 °C
サンプル温度:	6 °C
注入量:	5 $\mu$ L
流速:	0.5 mL/分
移動相:	酢酸アンモニウム、LC-MS グレード (Supelco LiChropur™、LC-MS 用溶離液添加剤、73594)、0.1 $\mu$ m 滅菌フィルターでろ過、200 mM または指示どおり
クロマトグラフィーソフトウェア:	Empower™ 3 (FR 4)

## LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
サンプル収集:	Waters QuanRecovery™ 700 $\mu$ L 96 ウェルプレート、製品番号: 186009184

カラム:	ACQUITY UPLC Glycan BEH™ Amide カラム、製品番号: 186004742 (1.7 μm、2.1 mm × 150 mm、130 Å)
カラム温度:	60 °C
サンプル温度:	6 °C
注入量:	15 μL
移動相 A:	50 mM ギ酸アンモニウム、pH 4.4 (LC-MS グレード、製品番号: 186007081)
移動相 B:	アセトニトリル

## グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	1.0	25	75	初期条件
3.50	1.0	42	58	6
3.55	1.0	60	40	6
3.75	1.0	60	40	6
3.80	1.0	25	75	6
5.00	1.0	25	75	6

## ACQUITY RDa 検出器の設定

質量範囲:	<i>m/z</i> 400~7000
モード:	ESI+
サンプリングレート:	10 Hz

コーン電圧:	45
脱溶媒温度:	300
キャピラリー電圧:	1.50 kV
インフォーマティクス:	糖鎖データベースを使用した精密質量スクリーニング

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	waters_connect
------------------	----------------

---

## 結果および考察

### 分析法開発

以前に説明されているプロテイン A アフィニティーおよびその他のモードのクロマトグラフィー用のフィルタープレートベースのアプローチを適用して、自動 mAb 精製メソッドを実施しました<sup>1-3</sup>。使用した基本のプロトコルの概要が図 1 に示されています。この比較的簡単な手順には、1 サンプルあたり 12 回のピペッティングステップと 4 回のインキュベーションステップが必要になります。ここで紹介した mAb プロテイン A の自動精製の最適化には、溶出バッファの pH だけでなく、結合および溶出のメカニズム、容量、時間の評価が含まれていました。

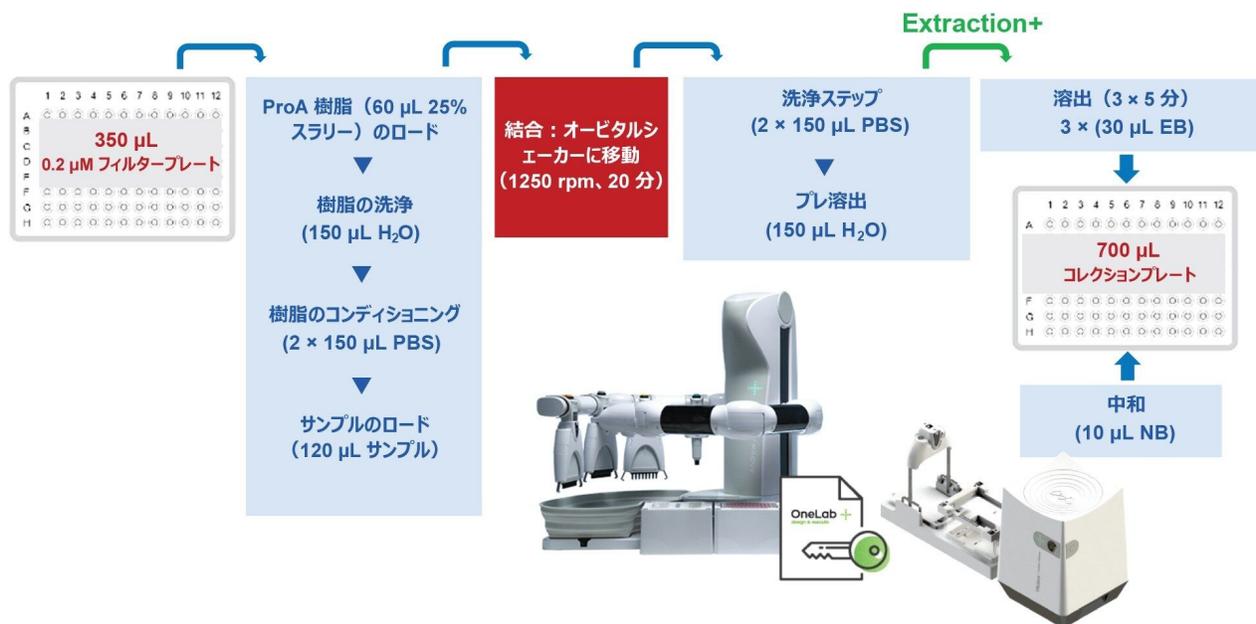


図 1. CHO 細胞調整培地からのモノクローナル抗体の、分析スケールの自動プロテイン A アフィニティー精製のダイアグラム。これには、Extraction+ デバイスを搭載した Andrew+ ロボットプラットフォームと OneLab ビジュアルプログラミングインターフェースを使用しました。溶出バッファー (EB) および中和バッファー (NB) は、実験方法のセクションで定義しています。

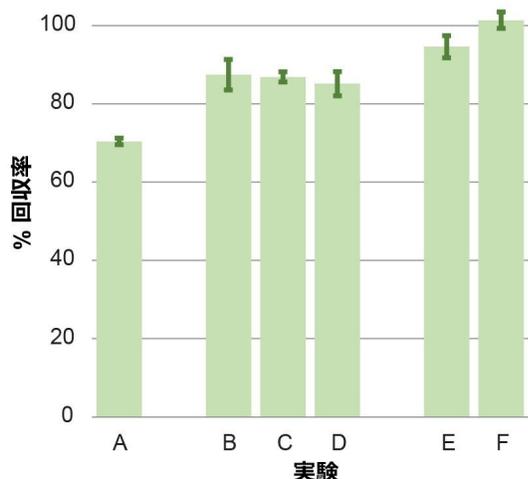
効果的な結合を生じるためには、ロードステップ中にプロテイン A 樹脂を懸濁することが不可欠になります。そのためにオービタルプレートミキサー (1250 rpm で 20 分間、8 °C) を使用すると、ピペット吸引と分注を繰り返すよりも (ロードステップごとに最大 2 分間) 高い mAb 回収率が得られました。最新の Andrew+ ロボットプラットフォームを使用した場合、分析者が実行する必要がある操作は、20 分間の結合ステップ中のフィルタープレートとオービタルシェーカーの間の移動のみとなります。

溶出バッファー (グリシン) の pH も、プロテイン A からの mAb 回収率の重要な要因です。ここでは、pH 値 3.0 未満で mAb の回収率の増加が観察されましたが、アーティファクトである多量体凝集 (高分子種、HMWS) の増加も観察されました。結果として、最終的な分析法では 100 mM のグリシン (pH 3.0) を溶出に使用しました。これは、溶出サンプルに 1: 9 の比率で添加した 1.0 M のトリス (pH 7.5) で効果的に中和することができました。平衡化、洗浄、溶出ステップ用に送液するバッファー容量も最適化しました。1 つのピペティングステップでの複数の容量を OneLab のグラフィカルインターフェース内で簡単にプログラミングできたことにより、このプロセスが大幅に簡素化されました。

## 分析法の評価

ターゲットサンプル力価  $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、ロード容量  $120 \mu\text{L}$  において、 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  以上の濃度で  $100 \mu\text{L}$  の精製 mAb サンプルを調製するというこの精製手順の目標は、毎日の繰り返し実験で達成されました（実験 B および C、図 2）。これらのサンプルの回収率は 87% でした。より低い力価  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  での  $120 \mu\text{L}$  ロードではわずか 70% の回収率が観察されました。一方、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  のサンプルで  $120 \mu\text{L}$  のロードを 2 回（それぞれ 20 分間）行ったところ、回収率は 85% に増加しました。また、精製された mAb サンプルの最終濃度は  $1.02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  でした（実験 A および D、図 2）。ロードが低いほど mAb の喪失割合が大きいことから、フィルタープレートまたはプロテイン A 樹脂による非特異的喪失が発生している可能性が高いことが示されます。記載されているように、これらの実験では、8 または 4 の液相と固相の容量比（容量<sub>サンプル</sub>/容量<sub>樹脂</sub>）を使用し、以前に説明されているハイスループット SEC メソッドを使用して、プロテイン A 精製の結果をモニターしました<sup>4</sup>。

提案されたメソッドでは、 $15 \mu\text{L}$  のプロテイン A 樹脂で  $240 \mu\text{g}$  の mAb を精製できることも示されました（実験 E、図 2）。ここでは 2 回の実験を行いました。1 回目の実験では、 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  の  $120 \mu\text{L}$  ロードステップ（各 20 分、液相と固相の容量比 = 8）を 2 回実施しました。2 回目の実験では、プロテイン A 樹脂の容量および mAb の濃度を 2 倍にしました（実験 E および F、図 2）。2 回目の実験では、液相と固相の容量比を 2 分の 1 に減らして 4 にしています。オービタルシェーカーに配置した場合、サンプルロードの容量を 2 倍にする実験では、使用中の  $350 \mu\text{L}$  フィルタープレートに対応できませんでした。いずれの実験でも 95% 以上の回収率が得られました。ただし、 $15 \mu\text{L}$  のプロテイン A 樹脂に  $240 \mu\text{g}$  の mAb をロードすると、精製サンプルの濃度は約 2 倍高くなります。これはさらに、細胞培養の mAb 力価が必要とされる濃度の精製サンプルより著しく低い場合に、複数の結合ステップが有用であることを実証しています。この試験では実施しませんでした。これらのデータからは、より高いサンプル濃度、またはより多くの結合ステップ、およびウェルあたり  $30 \mu\text{L}$  の樹脂を使用することで、最大  $480 \mu\text{g}$  の mAb を精製できることが示唆されています。



チャートID	A	B	C	D	E	F
初期の mAb 濃度 (µg/µL)	0.50	1.00	1.00	0.50	1.00	2.00
mAb 容量 (µL)	120	120	120	2 × 120	2 × 120	120
mAb ロード (µg)	60	120	120	120	240	240
ProA 培地の容量 (µL 単位、25% スラリー)	60	60	60	60	60	120
液相と固相の比	8	8	8	8	8	4
溶出量 (3 X µL)	30	30	30	30	30	60
中和量 (µL)	10	10	10	10	10	20
% 回収率	70.4	87.5	86.9	85.2	94.6	101.4
精製 mAb 濃度 (µg/µL)	0.42	1.05	1.03	1.02	2.27	1.22

図 2. ロード試験の実験と回収率。120 µg 以上のサンプルロードでは、85% 以上の回収率が観察されました。詳細は本文に記載しています。エラーバーは得られた値の範囲を表します (n = 2)。データは ACQUITY Premier BSM UPLC で収集しました。

拡張した再現性試験では、ターゲット mAb の精製 (1.0 µg/µL で 120 µL) により 90% 以上の回収率が達成されています。この評価では、mAb サンプルを PBS で 1.0 µg/µL になるように希釈し、2 つ目のサンプルは mAb が同じ濃度になるまで NTM にスパイクして調製しました。合計 SEC ピーク面積に基づいて、両方とも 8 回の繰り返しを評価しました (280 nm 検出)。いずれのサンプルにおいても、同程度の高いサンプル回収率が得られ、PBS サンプルでは 94.4 ± 5.8% の回収率、NTM サンプルでは 90.8 ± 5.4% (95% CI) の回収率が得られました。また、精製 mAb 濃度はいずれも 1.09 µg を超えていました。

プロテイン A メソッドでは、信頼性の高い回収率に加えて、ネイティブサイズのバリエーションおよび遊離 N 型糖鎖についての分析をさらに進めるための mAb サンプルの比較的効果的な精製が実現できました。平均細胞生存率が低い (90%) ため、図 3 に示す SEC クロマトグラムで観察されるように、NTM では、両方の分析に干渉する可能性がある成分 (宿主細胞タンパク質、DNA など) が非常に高レベルであることが示されています。

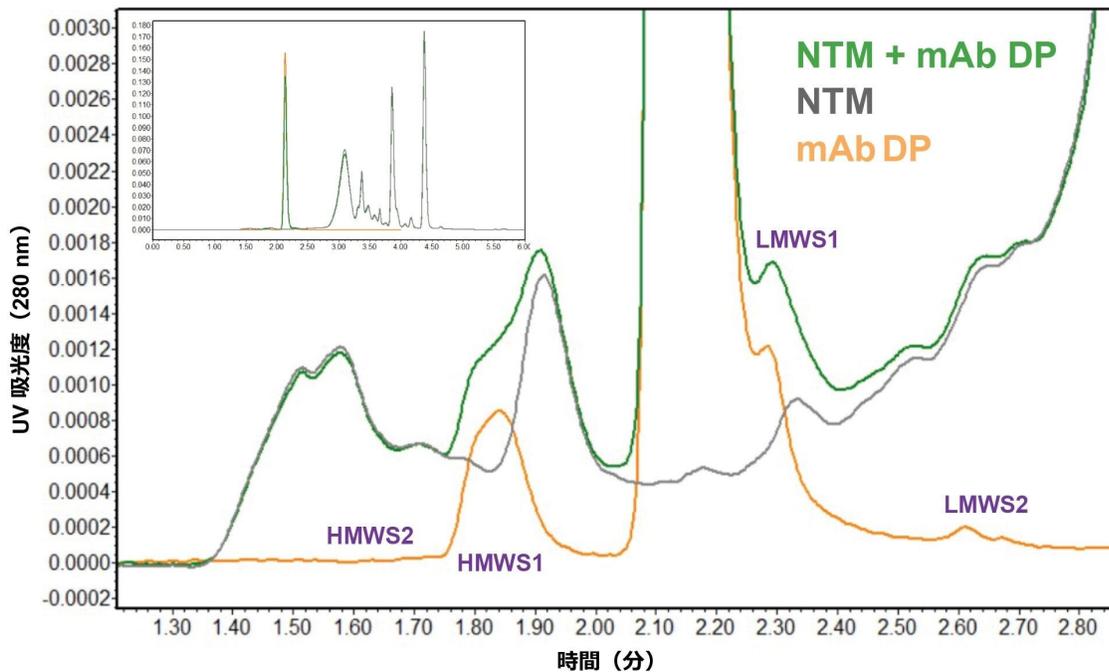


図3. ここに示されているのは、遺伝子導入されていない CHO 細胞培地の SEC クロマトグラムのフルスケールおよび拡大図です。ニート培地 (NTM、グレー) および mAb 医薬品をスパイク済み培地 (NTM+DP、緑色) の両方を示しています。PBS を使用した医薬品の  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  希釈 (DP、オレンジ色) も示されています。詳細は本文に記載しています。データは ACQUITY Premier BSM UPLC で収集しました。

SEC を使用して、プロテイン A 精製サンプルの HMWS および低分子量サイズバリエーション (LMWS) の相対存在量を、元のサンプル (対照群) と比較して評価しました (図 4)。図 3 に示されているクロマトグラムと比較すると、妨害成分が大幅に除去されていることがわかります。ただし、プロテイン A の精製手順によって、mAb HMWS レベルが変化することがわかりました。微量 (0.05% 未満) の多量体 HMWS2 がアーティファクトとして生成され、二量体 HMWS1 は一部が回収されています。HMWS1 サイズバリエーションの絶対回収率は、プロテイン A 精製プロセスで追加の HMWS1 フォームが生じないと仮定すると、スパイクを行った NTM サンプルでは 68%、スパイクを行った PBS サンプルでは 59% と推定されました。プロテイン A アフィニティー分取精製を使用する場合の HMWS mAb バリエーションの定量的回収に関する課題は、より精度の高い LC ベースの方法を導入した場合でも生じることが以前に報告されています<sup>6</sup>。このバイアスにもかかわらず、ここに示されているプロテイン A 法は、調整培地サンプル中の HMWS のレベルについて価値のある情報が得られる可能性があります。この試験の範囲からは外れますが、精製メソッドをさらに最適化することで、サイズバリエーションの評価の正確性を向上できる可能性があります。

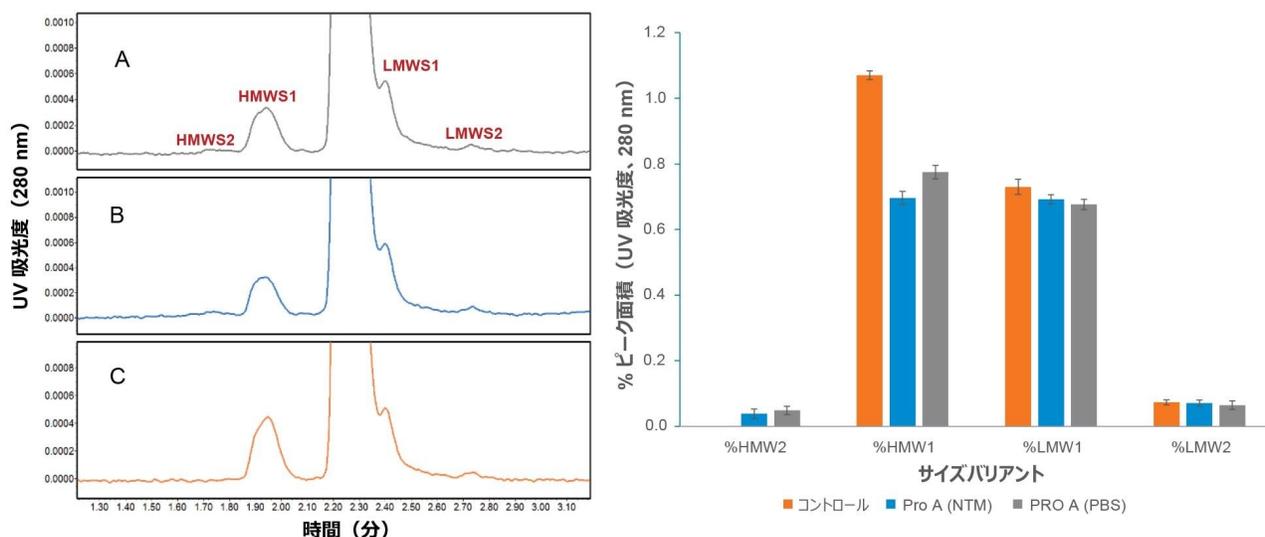
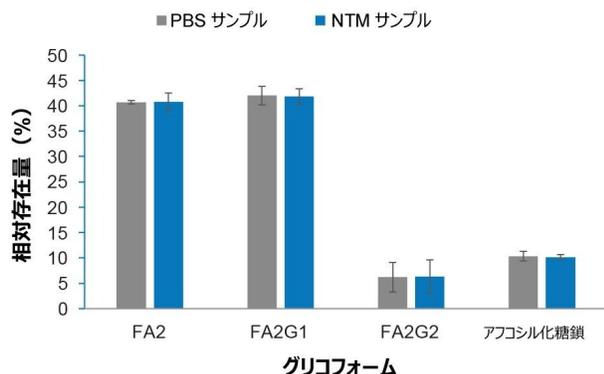


図 4. ここで示されているのは、A: PBS (n=8、グレー)、および B: 遺伝子導入されていない CHO 細胞調整培地 (NTM, n=8、青色) にスパイクしたプロテイン A 精製 mAb の SEC-UV 定量結果の評価であり、C: スパイク対照群 (n=3、オレンジ色) と比較しています。クロマトグラフィーの条件は本文に記載しています。エラーバーは得られた値の不確実性 (95% CI) を表します。データは ACQUITY Premier BSM UPLC で収集しました。

プロテイン A 精製の有効性は、遊離 N 型糖鎖解析と組み合わせた場合にも有効でした。CHO 細胞プロテオームの一部として、6000 を超えるタンパク質および糖タンパク質が同定されました。その多くは mAb のプロテイン A 精製中にさえ完全には除去されません<sup>7</sup>。提案されている N 型糖鎖解析用の mAb 精製の有用性に対処するため、それぞれ NTM と PBS からプロテイン A 精製した mAb サンプルの間で比較を行いました (図 5)。これらの結果は、以前に報告されたように、ESI-ToF 検出器搭載ハイスループット LC-MS 分析法を使用して生成されたものです<sup>7</sup>。主要な mAb グリコフォームでは同等の結果が観察され、SEC で観察された全体的な精製の程度と一致していました。mAb 製品開発に役立つ可能性がある微量のグリコフォーム 3 種は、製品の安全性 (FA2BG1) または有効性 (FA2G2S1 および M5) に影響を与える可能性があります。これらのうち、観察された唯一の有意な変化は、NTM から精製された mAb で、高マンノース型糖鎖 (M5) の相対存在量が 0.38% から 0.58% へ増加したことです。この増加は、共精製 HCP の存在量が低いためである可能性があります。この実験では取り上げていませんが、プロテイン A 洗浄ステップで使用する容量および溶液 (図 1) を変更することで、HCP 除去がさらに改善されることがあります。

### A. 主要糖鎖のプロファイル



### B. 低存在量の糖鎖

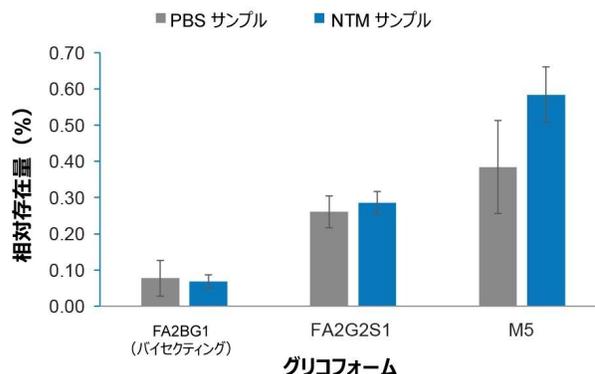


図 5. それぞれ PBS (グレー) および NTM (青色) から精製した mAb の UPLC-MS N 型糖鎖プロファイルの比較。エラーバーは 95% 信頼区間を示します ( $n = 4$ )。このメソッドを使用することで、存在量の多い糖鎖と存在量の少ない糖鎖について、複数種のサンプル間で N 型糖鎖のプロファイルを比較できます。

## 結論

これらのデータをまとめると、Andrew+ ロボットプラットフォームを採用することで、清澄化した細胞培養サンプルから 120  $\mu\text{g}$  ~ 240  $\mu\text{g}$  の mAb のフィルタープレートベースのプロテイン A アフィニティー精製を、高い回収率 (90% 超) で効果的に実行できることを実証しています。わずか 60  $\mu\text{g}$  の mAb でも、低回収率 (70%) で精製できます。このメソッドでは、MabSelect 樹脂を使用する場合、少なくとも 480  $\mu\text{g}$  の精製上限が予測されています。ただし、この値は、選択した製造スケールのプロテイン A 樹脂の結合キャパシティによって異なることがあります。このメソッドにより、0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過されたサンプルは、ロード量に応じて最大 2.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで濃縮できます。

自動化された手順では、1 サンプルごとに 12 回の個別のピペティングステップが実行され、ユーザーによる操作が必要となるのは、20 分間の結合ステップ中のフィルタープレートとオービタルシェーカーの間の移動のみとなります。このメソッドでは、48 サンプルの前処理時間は約 1 時間で、そのうちの 35 分間には 20 分間の結合ステップと、mAb 溶出における 5 分間のホールド時間 3 回が含まれています。最後に、宿主細胞タンパク質、およびその他の SEC および遊離 N 型糖鎖分析の干渉物が効果的に除去され、アーティファクト凝集の発生が最小限に抑えられることが実証されました。

---

## 参考文献

1. Hopp J, Pritchett R, Darlucio M, Ma J, Chou JH., “Development of a High Throughput Protein a Well-Plate Purification Method for Monoclonal Antibodies” .*Biotechnol Prog.*2009 Sep-Oct; 25(5):1427–32.
2. Coffman, Jonathan L., Jack F. Kramarczyk, and Brian D. Kelley., "High - Throughput Screening of Chromatographic Separations: I. Method Development and Column Modeling." *Biotechnology and bioengineering* 100.4 (2008): 605–618.
3. Bergander, T., Nilsson - Välimaa, K., Öberg, K. and Lacki, K.M., “High - Throughput Process Development: Determination of Dynamic Binding Capacity Using Microtiter Filter Plates Filled With Chromatography Resin” .*Biotechnology progress*, 24(3), pp.632–639.2008.
4. Stephan M. Koza, Albert H. W. Jiang, and Ying Qing Yu, “Rapid SEC-UV Analysis of Monoclonal Antibodies Using Ammonium Acetate Mobile Phases” Waters Application Note [720007852](#), February 2022.
5. Dunn ZD, Desai J, Leme GM, Stoll DR, Richardson DD. “Rapid two-dimensional Protein-A Size Exclusion Chromatography of Monoclonal Antibodies for Titer and Aggregation Measurements from Harvested Cell Culture Fluid Samples.*MAbs.*2020;12(1):1702263.
6. Jones, M., Palackal, N., Wang, F., Gaza - Bulseco, G., Hurkmans, K., Zhao, Y., Chitikila, C., Clavier, S., Liu, S., Menesale, E. and Schonenbach, N.S., 2021. “ “High - Risk” Host Cell Proteins (HCPS): A Multi - Company Collaborative View” .*Biotechnology and Bioengineering*, 118(8), pp.2870–2885.
7. Caitlin M. Hanna, Stephan M. Koza, and Ying Qing Yu, Automated High-Throughput N-Glycan Labelling and LC-MS Analysis for Protein A Purified Monoclonal Antibodies” .Waters Application Note [720007854](#), February 2023.

---

## ソリューション提供製品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY UPLC チューナブル UV 検出器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[UNIFI バイオ医薬品プラットフォームソリューション <https://www.waters.com/waters/10195515>](https://www.waters.com/waters/10195515)

[waters\\_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

---

720007861JA、2023年2月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)