



抗体および抗体フラグメント精製の CaptureSelect® レジンを含むPhyTip® カラム

Introduction

PhyNexus PhyTip®カラムは、高いタンパク質活性を維持しながら、少量のサンプルからの堅牢で高品質、再現性のある分離が必要な場合に、組換えタンパク質および抗体の精製に最適であると実証済みの技術です。PhyTipカラムを処理するために開発された革新的なメソッドは、平衡結合と溶出をもたらす、実質的にデッドボリュームがなく、効率的な捕捉と高濃度の溶出で活性タンパク質を得ることを可能にし、製造容量にスケラブルな結果をもたらします(Figure 1)。カラムは取り付けの容易さと高処理量のために、多くのリキッドハンドリングシステムによってサポートされています。

PhyNexusはBAC BVのCaptureSelect®レジンを含むPhyTipカラムを提供しています。抗体フォーマットの新しいスペクトルが進化するにつれて、現在のアフィニティリガンドは、要求される結合および溶出特異性を必ずしも提供するとは限りません。CaptureSelect製品は、Camelid由来の単ドメイン抗体フラグメントに基づく独自技術によって作られたアフィニティリガンドです。これらの製品は、安定性、親和性、および選択性などのユニークな特性の組み合わせを有しており、精製コストの低減、高品質の製品、開発期間の削減、および不確実性を排除する精製プロセスの柔軟性の向上という点で競争上の利点をもたらす、プロトコルの合理化と、最終製品が目的とする抗体種であることを確実にします。

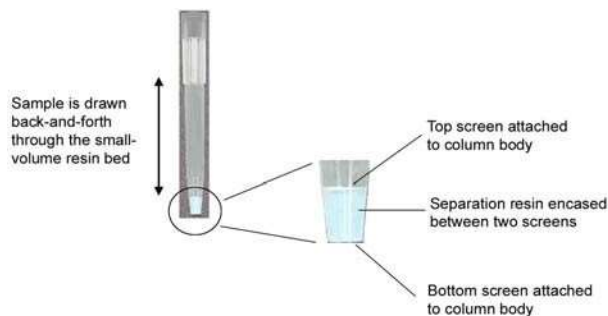


Figure 1: 40uLレジンを含むPhyTipカラム

これは新規抗体ドメインに対する特異的アフィニティによって達成されます(Figure 2)。

PhyNexusのカスタムパッキングプログラムを通して、研究者の方々がPhyTipカラムフォーマットでCaptureSelectレジンを使用する利点があります。ここではBACのほんの一部のレジン製品である、Fc specific CaptureSelect Human Fc affinity matrix、またはKappa chain specific CaptureSelect Fab Kappa matrixのいずれかを用いた、CaptureSelect Multi Species AlbuminおよびhIgGキャプチャーによるBSA枯濁に関するこのデュアルプラットフォームで得られたデータを取り上げます。

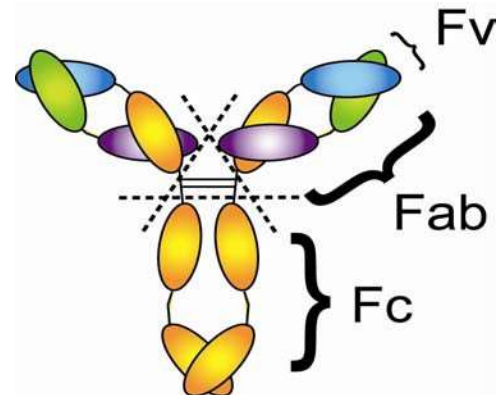


Figure 2: CaptureSelect Antibody Toolbox精製リガンド: 新規抗体ドメインに特異的。

Resin:

- Human Fc affinity matrix: For all subclasses of Human IgG
- Multi Species affinity matrix: For IgG from multiple species
- Human Fab kappa affinity matrix: For all Human kappa Fab fragments
- Human Fab lambda affinity matrix: For all Human lambda Fab fragments
- IgA affinity matrix: For Human IgA
- IgM affinity matrix: For Human and Murine IgM
- IgG4 affinity matrix: For Human monoclonal and polyclonal IgG4's

Materials and Methods

CaptureSelect Multi Species Albuminをレジンはサイズ10、20、および40 μ Lの1mL PhyTipカラムに充填しました。PhyNexus製のMEAパーソナル精製システムを用いて、これらのカラムを3回繰り返し、PBS緩衝液からウシ血清アルブミン(SeraCare Life Sciences)を除去しました。各吸引および排出ステップの後に20秒間休止し、流速0.5mL/min、500 μ L PBS中で1サイクルの往復流でカラムを平衡化しました。平衡化したカラムに、0.5mL/minでステップ後に20秒休止させ4回の前後捕捉サイクルを行うことにより、BSAでスパイクした500 μ L PBS、0.05% Tween 20からBSAを捕捉し、最終濃度0.84mg/mLまで求められました。NanoDrop UV分光計を用いて、フロースルーを280nmでの吸光度について測定しました。

CaptureSelect Human Fc affinity matrix、またはCaptureSelect Fab Kappa affinity matrix レジンを10、20、または40 μ L含有する1mL PhyTipカラムを用いて、hIgGでスパイクした500 μ LのPBS、0.05% Tween 20サンプルを最終濃度0.01mg/mLまで精製しました。カラムは1mL/minの流速を使用して1mL PBS中で1サイクルの前後流で平衡化し、各吸引および排出ステップの後20秒休止しました。平衡化されたカラムは1mL/minで20秒休止を用いて、4回の前後捕捉サイクルを行うことにより、500 μ LのhIgGサンプルを捕捉しました。カラムを500 μ L PBS中で1mL/minで1サイクル洗浄し、そして500 μ L 140mM NaClについて繰り返しました。溶出は0.2mMリン酸塩 pH3.0、140mM NaClのカラムレジンの3倍を、1mL/minおよび20秒休止で4サイクルを用いました。1M Tris pH9.0を用いて、サンプルを溶出緩衝液容量の1/4で中和しました。

15 μ Lの中和溶出液をPBSで120 μ Lに調整し、0.05% Tween 20および80 μ LをHPLCイオン対形成逆相カラムに注入しました。hIgGに対応するピーク下面積を積分し、標準曲線にフィットさせて注入質量を決定しました。別法として、SDS PAGEによりサンプルを分析しました。

Results

Bovine Serum Albumin Depletion 牛血清アルブミン枯濁

血清のような複雑な生物学的サンプルでは、高濃度のアルブミンが特定のアッセイの信頼性を妨げることがあります。1mLのPhyTipカラムを用いて、CaptureSelect Multi Species Albuminの動的結合能を測定しました。500 μ LのPBS、0.05% Tween 20を、約0.8mg/mLの最終濃度まで牛血清アルブミン(BSA)でスパイクしました。10、20または40 μ LのCaptureSelect Multi Species Albuminを含むPhyTipカラムを用いて、BSAのサンプルを枯濁させた。サンプルフロースルーを280nmでの吸光度について測定し、7 μ g/ μ Lレジンの結合容量を決定した(Table 1)。PhyTipカラムはBSAのサンプルを枯濁させるのに十分であり、再現性が高いです。

Human IgG Capacity

ヒト免疫グロブリンG(hIgG)の精製のために、BACはいくつかのCaptureSelectレジンを提供しています。CaptureSelect Human FcアフィニティマトリックスおよびCaptureSelect Fab Kappa affinity matrixレジンをhIgGの回収について測定しました。研究者が遭遇する可能性がある低発現IgGサンプルをシミュレートすることによって、システムにストレスを加えました。PhyTipカラムは開始濃度0.01mg/mLのhIgGでサンプルからIgGの5~10%を回収しました(Figure 3 and Table 2)。

Table 1: Binding capacity of CaptureSelect Multi Species Albumin

Resin Bed Volume	Binding Capacity (mg BSA/mL resin)	Average Capacity (mg BSA/mL resin)
10 μ L- PhyTip column 1	7.5	
10 μ L- PhyTip column 2	4.5	
10 μ L- PhyTip column 3	8.5	6.8
20 μ L- PhyTip column 1	7.8	
20 μ L- PhyTip column 2	7.8	
20 μ L- PhyTip column 3	7.8	7.8
40 μ L- PhyTip column 1	5.5	
40 μ L- PhyTip column 2	5.4	
40 μ L- PhyTip column 3	6.5	5.8

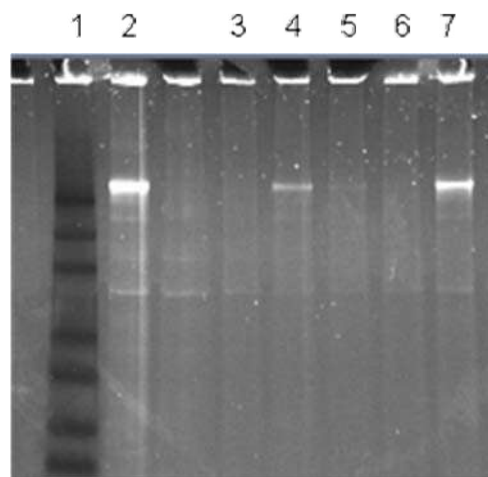
動的結合能は開始時のサンプル濃度に比例します。より高濃度の1.0 mg/mL hIgGのサンプルを精製する場合、動的結合能は約3.5 mg/mLです(Table 3)。血清などの高濃度サンプルからIgGを精製すると、

結合能は15 mg / mLになります。PhyTipカラムフォーマットは非常に汎用性が高く、少量のサンプルの精製条件を決定するための情報は、大規模な精製にも拡張できます。

**Table 2: PhyTip columns containing 5mL Human Fc resin
Capture of 200 μ L 10mg/mL hIgG samples**

	Uncaptured hIgG (μ g)	% captured	Capacity (mg/mL resin)	Average Capacity (mg/mL resin)
Fc -1	102.7	32	9.5	8.4
Fc -2	110.9	26	7.8	
Fc -3	110.7	26	7.9	

Figure 3: 500 μ L 0.01 mg/mL IgG サンプルのSDS-Page分析。80 μ L CaptureSelect Human Fab kappa affinityレジンを含むPhyTipカラムでサンプルを処理しました。図はゲルを流し、クマシーブルーで染色し、そして脱色した後に撮影したゲルの写真です。Lane 1に分子量マーカーを付加しました。分析開始時のサンプルをLane 2に装填しました。Lanes 3-7はそれぞれ、予備平衡化緩衝液(3)、サンプル フロースルー(4)、洗浄1(5)、洗浄2(6)、溶出(7)のPhyTipカラム処理後の種々の緩衝液からのアリコートを表します。



Discussion

PhyTipカラムは抗体および組換えタンパク質の少量精製に適したプラットフォームです。これらのカラムから得られる高い性能は、精製を大規模な製造スケールのカラムにスケールアップするという、前例のない能力を提供します。少量精製を行うことで、情報に基づいた決定を下すためのデータを提供し、研究者がより早期にプロセスの決定を行うことができます。興味深いターゲットに抗体相互作用をスクリーニングする場合、PhyTipカラムの並列ウォークアウェイ機能により、労力および時間コストの削減ができます。

PhyTipカラムの柔軟性は、異なる抽出媒体を利用す

る能力によって強化されます。BACから入手可能な affinity matricesは、抗体および抗体断片の精製に新たな解決法を提供します。BACのCaptureSelectレジンは特異抗体ドメインに対するアフィニティー リガンドの開発に伴い、従来のバクテリア被覆タンパク質を大きく上回る効果を発揮します。抗体のFc定常領域に対するアフィニティーは、カップ軽鎖とのみ相互作用することにより制限されるタンパク質Lレジンよりも明らかに有利です。タンパク質Aとは異なり、CaptureSelect Fcは4つの human IgGサブクラスすべてに結合することができます。

Fabフラグメントを精製する場合、CaptureSelect KappaとCaptureSelect Lambdaの組み合わせは、すべてのFabフラグメントを精製する唯一の利用可能な製品を提供します。IgMはサイズが大きく、凝集したり不安定になったりする傾向があり、精製が困難であるため、研究者によって見落とされてきましたが、現在では真のアフィニティーベースの捕獲技術を用いた研究に適しています。

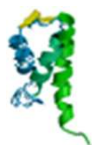
少量の精製を十分な効率で実施することの有用性は、患者血清サンプルのように、サンプルが貴重であったり、少量であったりする場合に特に有用です。診断開発のための血清プロファイリングなどの特定の応用は、疾患の早期発見につながる可能性があります。IgAに対するアフィニティーを有するCaptureSelectレジン、IgAが炎症性疾患のバイオマーカーとして関与し、特定の領域に薬物を送達することができる上腸経細胞輸送性分子としての役割に関与していることが示唆されているため、特に興味深いです。PhyNexus技術とBAC技術は、バイオセラピューティクスと疾患診断プロセスにおける主要なボトルネックに対する新たな解決策を提供します。

Conclusion

PhyNexus分離カラムとBACレジンの組み合わせは、Fc融合、FabおよびFAB断片、IgA、IgM、およびIgG4などのIgGサブクラスなどの新規開発抗体フォーマットのスペクトルについて、最も効率的かつ正確な初期段階評価を提供します。結合および溶出条件に対するBACレジンの特異性は、それらを多くの高感度かつ特異的な用途に最適にし、PhyTipカラムは、それらの最適化を探求するための効率的なプラットフォームを提供します。PhyTipカラムの柔軟性は、結合および溶出条件をスクリーニングするための小さな比較可能な樹脂容量から、分析アッセイのための一貫した収率でより大きな容量への迅速なデータ生成を可能にします。初期実験の結果は、予測可能な後期製造分離に対してスケラブルです。最適化プロセスの自動化および小型化は、データ収集の速度およびデータの質を改善し、エラーを回避し、貴重な試薬の使用を制限します。開発プロセスの早い段階で、より多くのコンストラクトにより少量から濃縮タンパク質を生成することで、追加の分析が可能になり、その後パイプラインでよりよく特性化された生物療法が可能になります。

Table 3: Binding capacity of CaptureSelect resins of 1mg/mL IgG samples

	Binding Capacity (mg hIgG / mL resin)
Human Fab kappa	3.4
Human Fc	3.5



PhyNexus

www.phynexus.com



The Affinity Experts

www.bac.nl
www.captureselect.com

Ordering information

For more information about the PhyNexus Custom Resin Packing Program, visit the website www.phynexus.com or call 408-267-7214. For additional information about BAC CaptureSelect resins visit www.bac.nl or call +31 35 69 92 614