

# HEAおよびPPA HyperCel 樹脂

タンパク質分離用  
混合モード・クロマトグラフィー

## お客様のメリット

混合モード樹脂には以下の特長があります。

- 疎水性部位を直接捕捉することにより低イオン強度でタンパク質を精製
- 新たなリガンド選択性により複雑な混合物を分離
- イオン交換などクロマトグラフィーの各ステップに対して直交的



## 製品情報

HEAおよびPPA HyperCel樹脂は、バイオ医薬品製造環境におけるタンパク質の捕捉と不純物の除去のために設計されたクロマトグラフィー樹脂であり、工業規模にスケールアップできます。「混合モード」でのメカニズムは、タンパク質とリガンドとの静電相互作用および疎水性相互作用を組み合わせたものです。HEAおよびPPA HyperCel樹脂がもたらす独創的な選択性は、イオン交換や従来のHIC（疎水性相互作用クロマトグラフィー）とは一線を画すものであり、スクリーニングを行うことによりプロセス開発を簡素化できます。

たとえば、混合モードでの相互作用のメカニズムを利用して、タンパク質アイソフォームの識別や、等電点が同等またはきわめて近いタンパク質の識別が可能です。通常この分離は従来の方法では不可能でした。本樹脂は機械的に安定しているため、実験室スケールから生産スケールのカラムで高流速にて使用できます（圧力対流速のデータについては図2を参照）。

### 製品の説明

HEAおよびPPA HyperCel樹脂は、混合モード・クロマトグラフィー樹脂群に属し、MEP HyperCel（疎水性電荷誘導）を補完するものです。HEAおよびPPA HyperCelはHyperCel樹脂上に固定した合成リガンドを持ちます。この樹脂は機械的に安定したベースマトリックスであり、現在は100 Lを超えるカラムでのタンパク質の生産に用いられています。

これらのリガンドには脂肪族アミン（HEA－ヘキシルアミン）と芳香族アミン（PPA－フェニルプロピルアミン）が含まれ（図1参照）、それぞれ異なる選択性と疎水性を持ちます（図4および5を参照）。


## 技術データ

表1: HEAおよびPPA HyperCel樹脂の主な特性

粒子サイズ	80 - 100 μm (平均)
ビーズの組成	高多孔性架橋セルロース
BSAに対する動的結合容量 (10%破過) <sup>1</sup>	40 - 60 mg/mL
リガンド:	
脂肪族アミン (HEA)	ヘキシルアミン
芳香族アミン (PPA)	フェニルプロピルアミン
BSA回収率 (%)	≥ 90
稼働pH	2 - 12
洗浄pH	1 - 14
耐圧性	< 3 bar (44 psi)
通常稼働時の圧力	< 1 bar (14 psi)

<sup>1</sup> PBS中5 mg/mLのBSAを用いて測定、流速: 100 cm/h。

### HEAおよびPPAリガンドの構造

- HEA HyperCel → n-ヘキシル置換基  
- CH<sub>2</sub> - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - CH<sub>3</sub>
- PPA Hypercel → フェニルプロピル置換基  
- CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - 

リガンド密度: 50 μmoles/mL超  
リガンドの臨界pKa値 = 8

図1

### 動作メカニズムの原理および一般的ガイドライン

（カラムの充填、バッファー、および推奨事項についての詳細は、製品の添付文書を参照。）

### タンパク質結合

通常タンパク質結合は、主に疎水性相互作用により中性pH（PBS、pH 7.4）にて達成されます。強塩基性タンパク質の結合には高いpH（pH 9.0）が必要な場合があります（図7、HEA HyperCel樹脂へのリゾチームの結合を参照）。

結合時の推奨塩濃度においては、顕著なイオン交換結合は起こりません。従来のHICとは異なり、結合は生理に近い条件において低イオン強度で起こります。一般的にリオトロピック塩などの塩類添加の必要はありませんが、適量の塩類（例：硫酸アンモニウム0.5 M）を添加することでタンパク質の吸着を促進できる場合があります（図6参照）。

PPA HyperCelは芳香族リガンドを持ち、HEA HyperCelより強い疎水性を示します。結合容量はタンパク質の機能です。BSAのようなモデルタンパク質では、HEAおよびPPA HyperCel樹脂に対する結合容量は通常40～60 mg/mLになります（PBS、pH 7.4、0.14 M NaClバッファー、流速100 cm/hの場合）。容量に影響する因子には、温度（図3参照）、滞留時間、等電点、目的タンパク質の疎水性、カラムの充填品質などがあります（スクリーニングにはPRCプレパック・カラムの使用を推奨します）。

## タンパク質の溶出

タンパク質の溶出は、pHがタンパク質のpIを下回り、リガンドのpKa値より低くなったときに静電的反発力によって起こります。溶出はpHを（7から2まで）低下させて行います。一部のタンパク質はpHの変化なしに塩濃度を下げるだけで溶出できるからです。最適化は、実験室スケールでは塩下降勾配溶出実験により達成できますが、プロセス・スケールではステップワイズ溶出が選択されます。この方法は疎水特性の異なる不純物からの目的タンパク質の分離にも利用できます。塩基性タンパク質はpH変化またはステップ溶出の早い段階で脱離し、酸性タンパク質はその後により多くが脱離します（図7参照）。

従来のHICとは異なり、目的タンパク質は希釈バッファー中で回収されるため、中間透析ろ過の必要性が減少します。これによりユニット操作を省力化できるため、プロセスの経済性の向上に寄与します。

## 圧力対流速

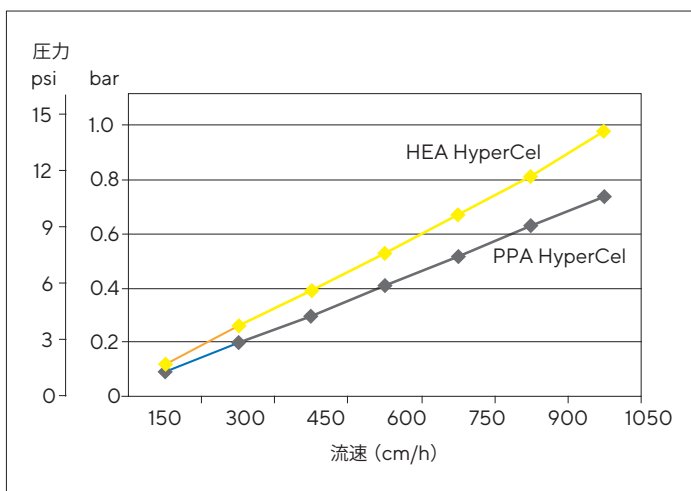


図2：カラム：内径16 mm × 高さ20 cm。HEAおよびPPA HyperCel樹脂は、圧力に対して流量が線形に変化するため、プロセス・スケールでの低圧カラムにおける操作に最適な特性を有しています。

## BSA結合容量に対する温度の影響

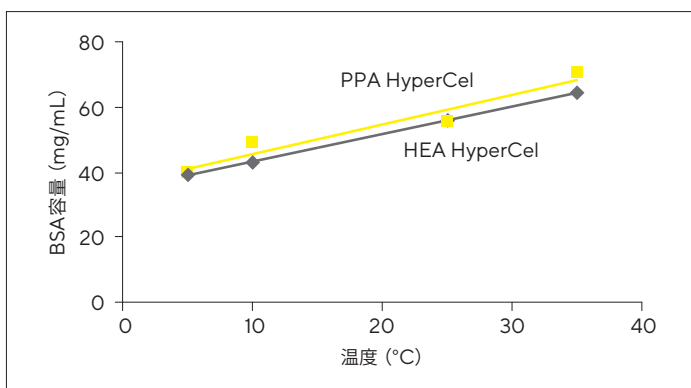


図3：モデルタンパク質：pH 7.4のPBS中でHEAおよびPPA HyperCel樹脂（7 mLカラム、100 cm/h）に結合したBSA（5 mg/mL）。

図3に示す実験は、HEAおよびPPA HyperCel樹脂へのタンパク質との結合が主に疎水性相互作用によることを実証しています。HICによるタンパク質結合はエントロピー駆動であり、BSAに対する結合容量が増加していることでもわかるとおり、相互作用は温度の上昇とともに増加します。実際には、頑健性と最適な容量を見極めるための試験では、バッファーと実験室内の温度を一定に保つよう特に注意する必要があります。

## HEAおよびPPA HyperCel、MEP HyperCel、従来のHIC、陰イオン交換樹脂の比較

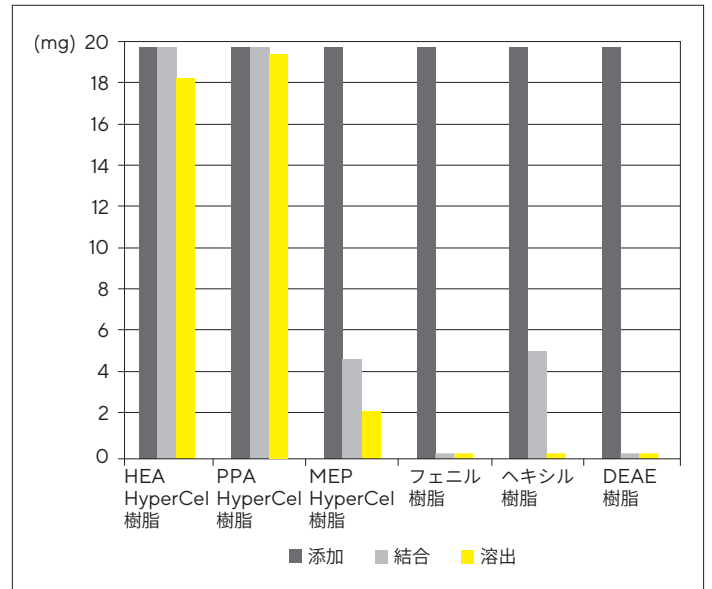


図4：各種樹脂におけるpH 7.4のPBSバッファー中でのウシ血清アルブミン（BSA）の吸着／脱離。詳細は本文を参照。

HEAおよびPPA HyperCel樹脂の選択性の違いを、MEP HyperCel樹脂（HCIC—疎水性電荷誘導クロマトグラフィー）、従来のHIC樹脂（フェニルおよびヘキシルリガンド）、陰イオン交換樹脂（DEAE）と比較して示すために、各種の標準的タンパク質を用いて一連の実験を行いました。図4はpH 7.4のPBSバッファー中でのウシ血清アルブミン（BSA）の吸着／脱離を示しています。BSAはHEA HyperCel樹脂にもPPA HyperCel樹脂にも効率よく保持されましたが、MEP HyperCel樹脂にはあまり保持されなかったことをデータは示しています。PBS中では、塩を添加しないと、BSAはフェニルとヘキシルのどちらのHIC樹脂にもあまり結合しませんでした。このような非最適条件では（pH 7.4であり、塩濃度が高すぎるため）、BSAは陰イオン交換（DEAE）樹脂にも結合しませんでした。

## HEA HyperCel樹脂とPPA HyperCel樹脂の選択性の違い： $\alpha$ -キモトリプシノーゲンAの吸着／脱離

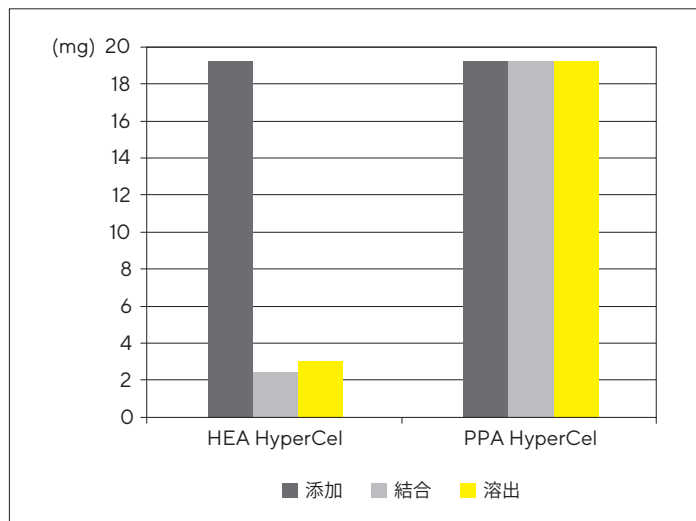


図5：HEAとPPAのリガンドは性質が異なります（脂肪酸と芳香族）。これが各種タンパク質に対する選択性の違いに表れます。図5は $\alpha$ -キモトリプシノーゲンA（2 mg/mL）に対する結合・溶出特性を示しています（pH 7.4、0.14 M NaClを含むPBS中で結合、pH 5.0、4.0、または3.0の0.02 M酢酸ナトリウムで溶出）。PPA HyperCel樹脂の方がこのモデルタンパク質と強く結合し、回収率も良いことがデータからわかります（pH 4.0での溶出が最も効率的）。

## 1.7 M硫酸アンモニウムの存在下でのHEAおよびPPA HyperCel樹脂のBSA結合容量

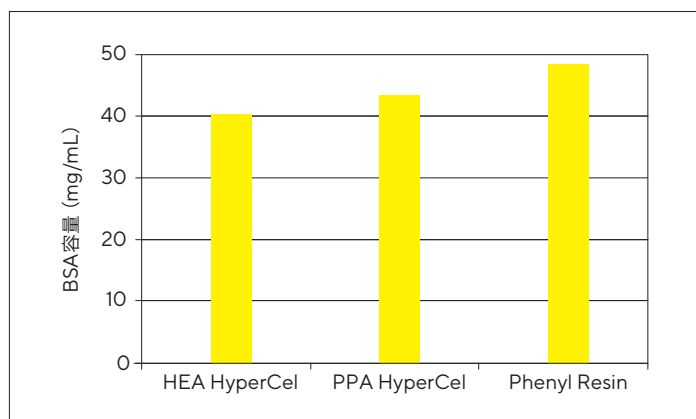


図6：従来のHIC結合条件（1.7 M硫酸アンモニウム）下におけるHEAおよびPPA HyperCelへのBSAの結合。

図6に示すように、HEAおよびPPA HyperCel樹脂は、硫酸アンモニウムなどのリオトロピック塩が存在するような「従来の」疎水性相互作用条件下でも使用できます。このような条件下でのBSA結合容量が従来のHIC樹脂（フェニル樹脂）の結合容量に近いことがデータからわかります。組換えタンパク質の吸着を強化するために、より低濃度の塩（硫酸アンモニウム0.5 M）を使用しました（データは掲載していません）。

## 応用例

### 例1. HEAおよびPPA HyperCel樹脂によるタンパク質混合物の分離

HEA HyperCel樹脂とPPA HyperCel樹脂では、タンパク質に対する捕捉性や選択性が異なるため、プロセス開発の初期段階でスクリーニングが必要になります。図7の例は、標準タンパク質混合物を内径1.1 cm、長さ7 cmのカラムに添加した際のクロマトグラフィー・プロファイルです。ステップ溶出に続いてpH 5.4から2.6への勾配溶出を、すべてリン酸ナトリウム／クエン酸バッファーを用いて行いました。強塩基性タンパク質リゾチームは、pH 7.4ではPPA HyperCel樹脂に結合せず、素通り画分中に残ることをデータは示しています。一方、イオン反発を弱めて結合pHを10.0まで上げると、リゾチームはHEA HyperCel樹脂に保持することができました。

実際には、pIおよび疎水性が不明のタンパク質については、2つのリガンドに対して異なるpHと塩濃度でスクリーニングする必要があります。スクリーニングには1 mLまたは5 mLの調製済みPRCプレバック・カラムを使用すると便利です。

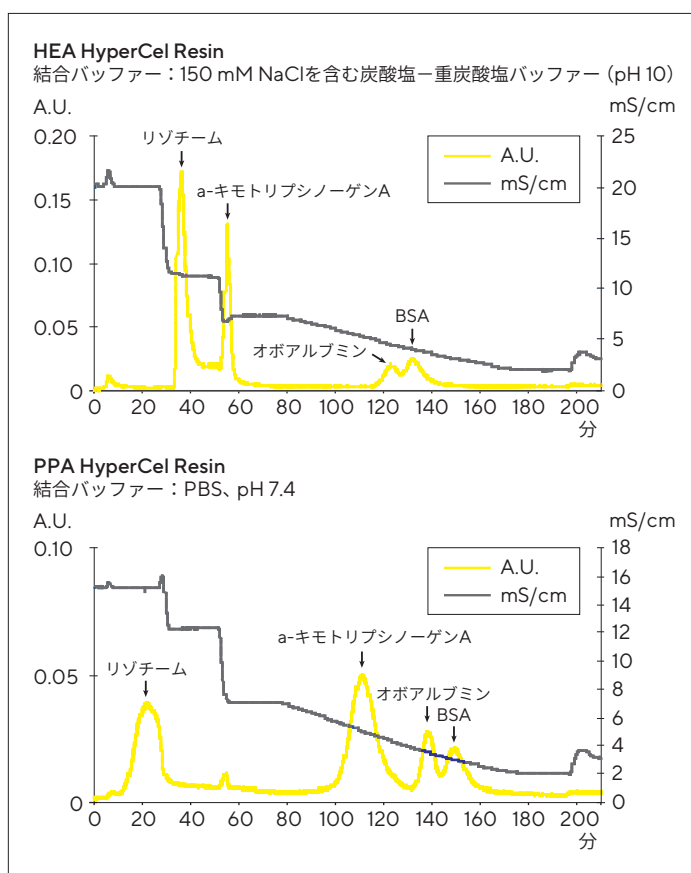


図7：サンプル量：1 mL；カラム容量：7 mL；タンパク質：BSA、オボアルブミン、リゾチーム、 $\alpha$ -キモトリプシノーゲンA、濃度各2 mg/mL。

例2. 1 mL、5 mL、および直列接続した2 × 5 mLのHEA Hyper-Cel PRCプレパック・カラムにおけるろ過した大腸菌溶菌液からの組換えGST (グルタチオンSトランスフェラーゼ) の分離

図8の例は、容量の異なる (1 mLおよび5 mL) PRCプレパック・カラムおよび直列に接続した (2 × 5 mL) PRCプレパック・カラムを用いた実際の原料分離の再現性を示します。溶菌液を50 mMのTris-HCl pH 8.0バッファーで10倍に希釈し、溶出はpH 5.0、4.0、および3.0の各pHステップにより行いました。それぞれのクロマトグラムは完全に重なり合い、試験に用いた3種のPRCカラム、直列接続カラムにおける分離の一貫性が示されました。

SDS-PAGEによる純度分析では、溶出画分の純度レベルがいずれの場合でも同等であることを示しました (図9参照)。

#### PRCプレパック・カラムにおけるrGSTのスケールアップ

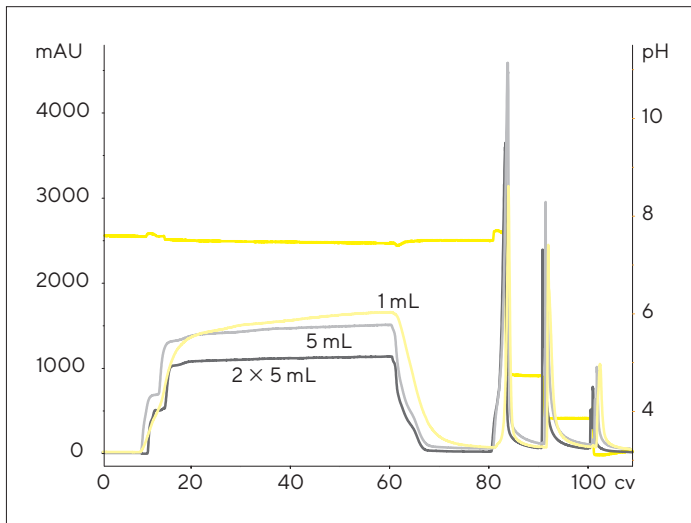


図8

溶出画分のSDS-PAGE (NuPAGE™ Novex™ 4 – 12% Bis-Tris ゲル、クーマシー染色)

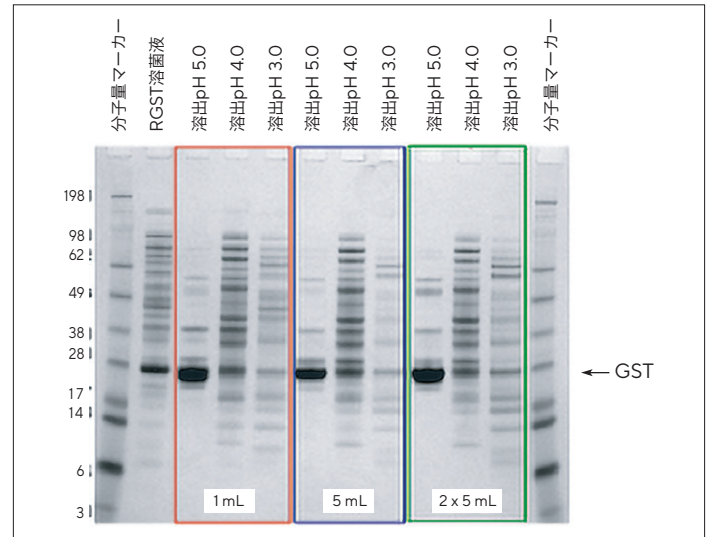


図9

### 例3. HEA HyperCel樹脂での主な血漿不純物からの部分精製されたポリクローナルIgGの分離

この実験の目的は、原料中に存在する夾雑物質から目的IgGを分離することでした。HEA、PPA、およびMEP HyperCel樹脂の3種類の混合モード樹脂をテストしました。

図10では最良の結果が得られたHEA HyperCel樹脂のクロマトグラムだけを示しています。IgG (メインの溶出、E2) はHSA (溶出E3) と明確に分離されました。また、質量分析を用いた分子量に基づく分析でも (データは掲載していません)、より分子量の小さい夾雑物からの分離ができたことや (溶出E1)、IgGがHSAのピークとともに溶出されて部分的に分離されたことがわかりました。

#### HEA HyperCel樹脂のクロマトグラム

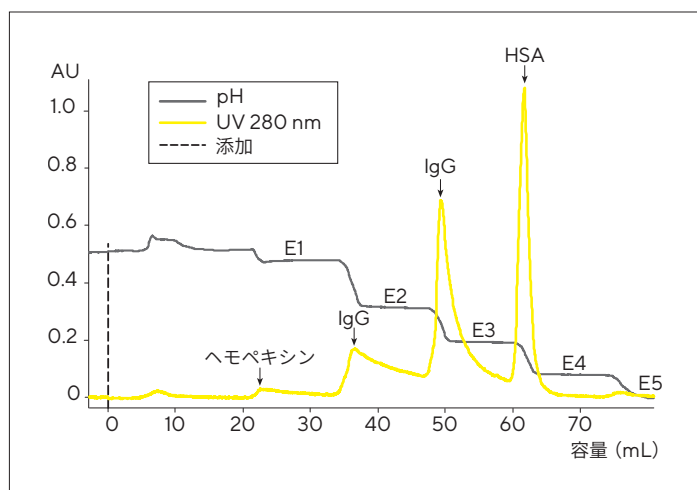


図10: カラム: 内径0.66 cm × 高さ7 cm; 樹脂容量: 2.4 mL。流量100 cm/h; pH 7.4のPBSで平衡化; 部分精製されたヒトポリクローナルIgG (純度60%) 5 mLを3.8 mg/mL、pH 8.4、8.3 mS/cmで添加; 5 CVのPBSで洗浄; pH 7.0 (溶出1)、pH 5.4 (溶出2)、pH 4.4 (溶出3)、pH 3.4 (溶出4)、pH 2.6 (溶出5) で0.2 Mリン酸ナトリウム/100 mMクエン酸で溶出; 1 M水酸化ナトリウムで再生。

### 例4. PPA HyperCel樹脂での低分子量組換えタンパク質アイソフォームの分離および分解

NovImmune社 (スイス、Plan les Ouates) のGiovanni Magistrelli医師の厚意によるサンプル

この例は、細胞培養上清中に低濃度で発現した組換えタンパク質のアイソフォームを捕捉・識別する、混合モード・クロマトグラフィー樹脂 (本例ではPPA HyperCel樹脂) の独自の分解能を示しています。

上清をpH 7.4 (PBS) でPPA HyperCel樹脂カラムに添加し、pH 5.0、4.0、および2.6で画分を溶出しました。

図11に示すSELDI-MS分析 (ELISAアッセイにより確認。掲載していません) は、分子量 (MW) が8.0~8.3 kDaのアイソフォーム群が最初に溶出し、次いでMWが8.5 kDa超のアイソフォーム群が溶出することを示しています。したがって、差異が微小なタンパク質でも混合モード・クロマトグラフィーを用いれば少なくとも部分的には分離できます。

#### HEA HyperCel樹脂から115 mL (灰色) および125 mL (橙色) で溶出した画分のSELDI分子量分析 (Da)

図11

6

**例5. HEA HyperCel樹脂での組換えF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの精製**  
ESTBB (フランス、Bordeaux) のX. Santarelli氏およびJ. Pezzini氏の厚意による

HEA HyperCel樹脂をクロマトグラフィーの捕捉ステップとして用いて、SF9昆虫細胞中のバキュロウイルス発現により得られた組換えF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを精製しました。HEA HyperCel樹脂に試料をpH 6.0、4.0、および2.0で添加し、SDS-PAGE、ELISA、およびBCAの各アッセイにより分析しました。図12に示した結果は、pH 6.0では素通り画分中にも溶出物中にもタンパク質は見出せなかったことを示しています。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントはpH 4.0で溶出し(回収率82%、39倍の精製度)、HCP (宿主細胞タンパク質) はpH 2.0で溶出しました。

**添加および溶出の分析**

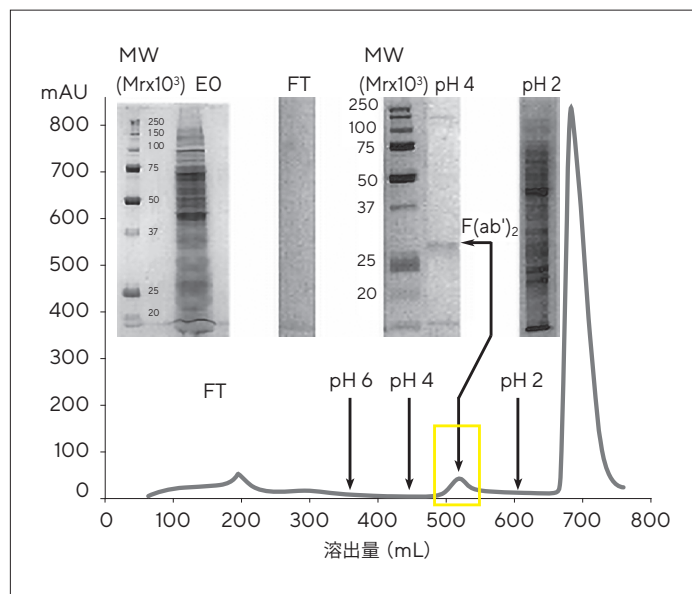


図12：添加および溶出中にクロマトグラムで識別された画分をELISA (掲載していません) およびSDS-PAGEを用いて分析し、F(ab')<sub>2</sub>を識別および定量しました。

**発注情報**

	HEA HyperCel Resin	PPA HyperCel Resin
25 mL	20250-026	20260-025
100 mL	20250-033	20260-030
1 L	20250-041	20260-040
5 L	20250-042	20260-045
10 L	20250-056	20260-052
1 mL PRCプレパック・カラム、内径5 mm × 50 mm	PRC05X050HEAHCEL	PRC05X050PPAHCEL
5 mL PRCプレパック・カラム、内径8 mm × 100 mm	PRC08X100HEAHCEL	PRC08X100PPAHCEL
Robocolumn 200 μL、1列8本	SR2HEA	SR6PPA
Robocolumn 600 μL、1列8本	SR6HEA	SR6PPA

# お問い合わせ先

詳細については、[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)をご覧ください。

ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社

営業部

Phone : 03 6478 5201 | Fax : 03 6478 5495

[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

〒140-0001 東京都品川区北品川1-8-11 Daiwa品川Northビル4階

※製品仕様は予告なく変更される場合があります。