

使用纤维素系色谱载体 (Cellufine) 的 高效单克隆抗体精制方法

序言

在单克隆抗体 (mAb) 生产工艺的下游 (精制工艺), 蛋白质 A 柱的捕获工艺以及被称为纯化 (Polishing) 的去除杂质工艺, 通常采用色谱分离方法。在该纯化工艺中, 多采用离子交换等需要实施两个步骤的色谱。此次我们介绍的是把在该纯化工艺中所使用的 2 个层析柱连接, 并进一步在流穿模式下使用的方法 (FT-FT 模式, 图 1)。使用这种方法, 无需进行纯化工艺层析柱之间的 pH 值及导电性调节等的复杂操作, 即可高效地去除杂质。

实验方法

实验材料

蛋白质 A 载体: Cellufine SPA-HC (JNC)

混合模式载体: Cellufine MAX IB (JNC)

阳离子交换载体: Cellufine MAX GS 及 Cellufine MAX DexSHbP (JNC)

玻璃柱: 5 mm I.D. x 25 mm H (max. 0.5 mL)

含有抗体的 CHO 细胞培养上清液: 获取自次世代生物医药品制造技术研究组合 (MAB 组合)。

HPLC 用色谱柱: TSKgelSuperSWmAb HR(东曹)

HCP ELISA 套组: CHO Host Cell Protein ELISA Kit, 3rd Generation F550(Cygnus)

蛋白质 A ELISA 套组: Tosoh R40 and R28 Protein A Mix-N-Go ELISA F910 (Cygnus)

HCD qPCR 套组: CHO DNA Amplification Kit in Tubes D555T (Cygnus)

FT-FT (流穿) 模式评价所需上样液的制备

将含有抗体的 CHO 细胞培养上清液置于蛋白质 A 载体后, 将通过醋酸缓冲液溶出的粗提液使用 0.1M 的盐酸调制 pH 值后, 进行了病毒灭活。然后, 利用 Tris 缓冲液和 NaCl 溶液调制, 使 pH 值达到 7.0 (± 0.1)、电导率达到 6.0 (± 0.1) mS/cm, 并使用缓冲液 (20 mM AcOH-Tris pH7.0 + cond. 6 mS/cm NaCl) 将 mAb 浓度稀释到了 10 g/L。



图 1. 新型 mAb 精制过程

FT-FT 模式纯化色谱

将 1 种混合模式载体和 2 种阳离子交换剂分别填充至玻璃柱，并加以使用。如图 2 所示，将混合模式载体（Cellufine MAX IB）作为前段层析柱，将阳离子交换载体（Cellufine MAX GS 或者 Cellufine MAX HbP）作为后段层析柱连接使用。使包含 305 mg（1020 mg / ml-resin）的单克隆抗体测试溶液流经该连接的层析柱，并回收所通过的溶液。详细的色谱条件如下所示：

层析柱容量：各 0.3 mL

层析柱尺寸：5 mm I.D. × 15 mm bed

流速：0.075 mL/min

滞留时间：4 min

上样样品：如上所述

上样量：29.5 mL

方案：参照下述表 1

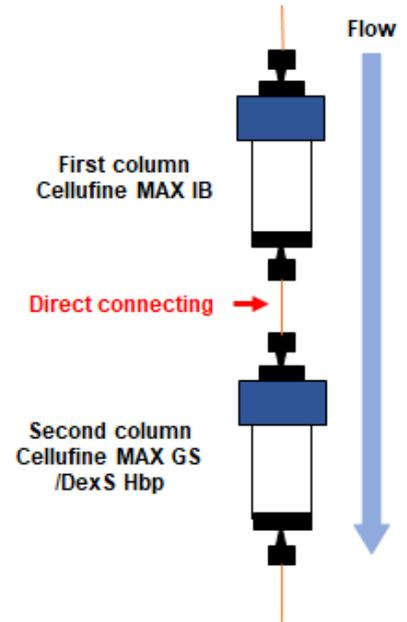


Figure 2. Directly connected columns

Step	Buffer or sample	上样量(CV)	流速 (mL/min)	回收/废弃
平衡化	20mM AcOH-Tris pH 7.0 + cond 6 mS/cm NaCl	2	0.075	废弃
上样	10.4 mg/mL mAb pH 7.0 + cond. 6 mS/cm NaCl (agg. 2.3%)	98	0.075	回收
挤压	20 mM AcOH-NaOH pH7.0 +cond. 6 mS/cm NaCl	15	0.075	回收

表 1. 纯化工艺方案

分析

测量吸光度，并按照 $1.4 \text{ AU (A280)} = 1 \text{ g/L of mAb}$ 计算出了浓度。通过 HPLC，测量了抗体中聚集体的浓度。使用 ELISA 法，测量了作为杂质的宿主细胞蛋白质（HCP）和 Ligand（配体）蛋白质 A 的漏出量，并通过 qPCR 对残留 DNA 进行了定量。

结果

表 2 汇总了相关测量结果。此次，我们探讨研究了混合模式载体 Cellufine MAX IB 及后续两种作为阳离子交换剂的 Cellufine MAX GS 和 Cellufine MAX DexSHbP，但无论是哪种情况，实验数值均突破了所设定的标准。mAb 的回收率均在 90% 以上，并且聚集体含量为 1.0%。宿主细胞蛋白质减少到 10 ppm 左右，漏出蛋白质 A 和宿主衍生 DNA 的数量均减低到了检测界限值以下。

	上样量 (mg/mL-resin)	抗体回收率 (%)	聚集体 (%)	HCP (ng/mg-mAb)	漏出 ProA (pg/mg-mAb)	DNA (pg/mg-mAb)
Requirement	-	>90	< 2.0	< 100	<10	<10
Loading sample	-	-	2.3	648	5.1	<1
MAX IB / MAX GS	1020	93	1.0	13.8	<2	<1
MAX IB / MAX DexSHbP	1020	93	1.0	9.2	<2	<1

表 2. FT-FT 模式纯化结果

结语

在抗体药物的精制过程中，纯化工艺是非常重要的步骤，是去除杂质的最后堡垒。常规方法是在该纯化工艺中结合使用离子交换色谱和疏水性相互作用色谱，但是为了让这些色谱在各自不同的条件下表现出最佳的性能，需要在色谱之间追加使用设备（槽、过滤设备等）及实施相关作业（交换缓冲液、调节浓度等）。这使得纯化工艺过程变得繁杂且需要高成本。

此次，我们把纯化工艺所使用的两个层析柱连接起来，实施无需在中间进行制备作业的 FT-FT 模式，确认了可充分去除单克隆抗体精制过程中的杂质。强阳离子交换剂可以有效去除单克隆抗体精制过程中的聚集体已经为众人所知，但其实两个 Cellufine 强阳离子交换剂（Cellufine MAX GS 和 Cellufine MAX DexSHbP）也能够有效地去除聚集体。另外，作为混合模式载体的 Cellufine MAX IB 能够在相对宽泛的条件下，吸附单克隆抗体精制过程中的杂质，而且在与组合阳离子交换剂相同的条件下使用。抗体药物的精制工艺有望通过使用这种具有独特特性的 Cellufine 载体，变得更加简便。

致谢

本研究的部分内容是在经济产业省“平成 25 年度（2013 年度）针对个别化医疗的下一代医药品创造基础技术开发（符合国际标准的下一代抗体医药等制造技术）”及“平成 26 年度（2014 年度）旨在实现下一代医疗及诊断的药物研发基础技术开发事业（符合国际标准的下一代抗体医药等制造技术）”、以及国立研究开发法人日本医疗研究开发机构（AMED）的“旨在实现下一代医疗及诊断的药物研发基础技术开发事业（JP19ae0101057）”的支持下，得以实施。