

Cellufine™ MAX DexS-VirS

デキストラン硫酸ポリマー

をリガンドとした新しいクロマトグラフィー充填剤です。ヘパリン固定化担体と同じアフィニティー活性を持ちます。ウイルスやウイルス様粒子（VLP）を精製することができます。

デキストラン硫酸は非動物原料由来の多糖類から合成されている。デキストラン硫酸はヘパリンと類似の生物活性を持つことが報告されている。例えば HIV-1 の複製を *in vivo* で阻害したり、ヘパリン補因子 II と結合活性がある。またデキストラン硫酸はイオン交換クロマトグラフィー充填剤の陽イオン交換リガンドとしても知られている。JNC 株式会社はウイルスや VLP を精製することができる高分子デキストラン硫酸をリガンドとした、セルファイン MAX DexS-VirS を開発した。この新しい充填剤は高度に架橋された結晶セルロースをベース粒子として採用している。このため大スケールのバイオ医薬品製造プロセスにおいて好適に使用することができる。アルカリ条件による定置洗浄が可能で、低い背圧で高流速を通液することができる。表 1 にこの新しいウイルスと VLP を吸着させるアフィニティークロマトグラフィー充填剤の特長を示す。

表 1 セルファイン MAX DexS-VirS の特長

特長	
ベース担体	高度架橋セルロース粒子
粒径	平均 90 μm (40-130 μm)
リガンド	高分子デキストラン硫酸
定置洗浄 (CIP)	0.5 M NaOH
リゾチーム吸着量 (mg/ml)	≥ 56 mg/ml
操作圧力	< 0.3 MPa

セルファイン MAX DexS-VirS の吸着性能

モデルタンパク質を用いて、セルファイン MAX DexS-VirS、セルファインサルフェイトおよび市販のデキストラン硫酸固定化アガロース担体のタンパク質吸着量を比較した。実験計画法によって作成した等高曲線の結果を図 1 に示す。各担体の 10% ブレークスルー時の動的吸着量の比較を図 2 に示す。

図 1 セルファイン MAX DexS-VirS へのラクトフェリン吸着量の等高曲線

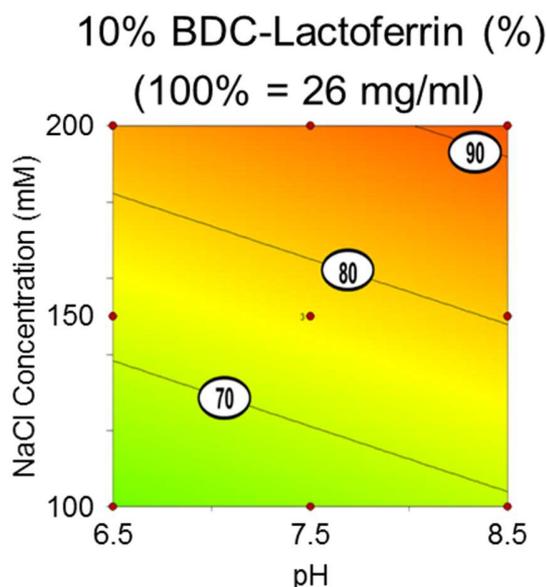
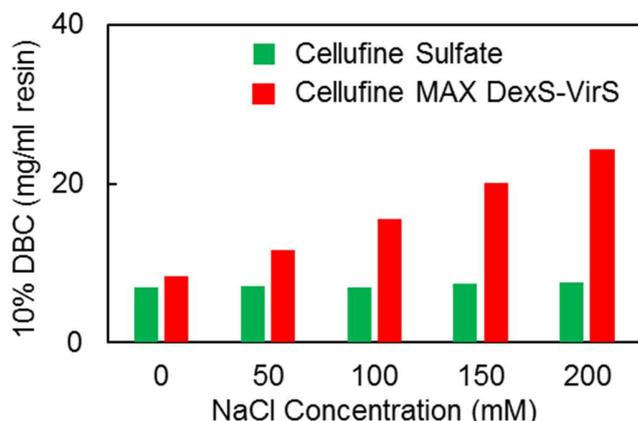


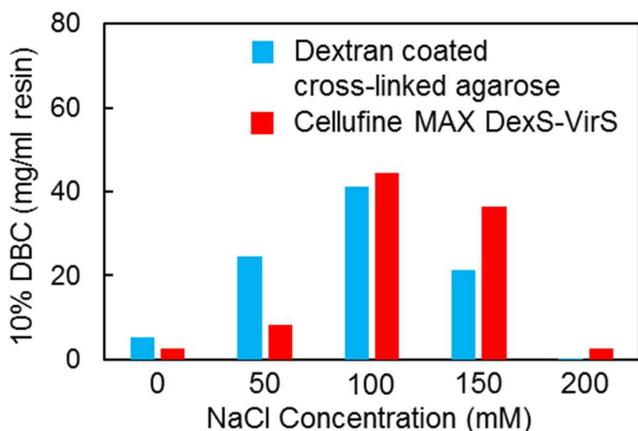
図 2 ラクトフェリンを用いた動的吸着量の比較



動的吸着量は内径 5mm x 高さ 2.5cm (カラム体積 0.49mL) を用いて、0.125ml/ml (滞留時間 4 分) の流速で測定した。ロードする 2mg/ml ラクトフェリン溶液は塩濃度の異なる吸着バッファー 50 mM Tris HCl バッファー pH 7.5 に異なる濃度の NaCl を加えて調製した。濃度はそれぞれ 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl とした。

ポリクローナル IgG を用いた吸着量測定は pH 5.0 の酢酸バッファーに広範囲の塩濃度の各バッファーを調製して評価した。結果を図 3 に示す。

図 3 ポリクローナル抗体を用いた動的吸着量の比較



動的吸着量は内径 5mm x 高さ 2.5cm (カラム体積 0.49mL) を用いて、0.125ml/ml (滞留時間 4 分) の流速で測定した。ロードする 2mg/ml ポリクローナル IgG 溶液は塩濃度の異なる吸着バッ

ファー 10 mM 酢酸バッファー pH 5.0 に異なる濃度の NaCl を加えて調製した。濃度はそれぞれ 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl とした。

不活化インフルエンザウイルスの吸着例

デキストラン硫酸固定化アガロース担体は鶏卵尿膜腔液由来または、細胞培養由来の不活化インフルエンザウイルスの高純度精製に使用されている (参考文献 1)

参考文献 1, *Data file 28-9616-49 AA. Capto DeVirS, GE Healthcare Bio-Sciences AB*

不活化されたインフルエンザウイルス (A/duck/Hokkaido/Vac-2/2007 H7N7) を用いて動的吸着量を測定した。測定には内径 5mm x 高さ 2.5cm (カラム体積 0.49mL) を用いた。10 mM リン酸バッファーに 120mM NaCl を加えて pH 7.4 に調製した吸着バッファーを用いた。流速は 0.2 ml/min (線速 60 cm/h、滞留時間 2.5 分) で通液した。カラムからのウイルスの破過量は、回収画分の HA 活性 (ヘマグルチニン活性) を測定することで評価した。この結果を図 4 および表 2 に示す。

図 4 インフルエンザウイルスを用いた動的吸着量

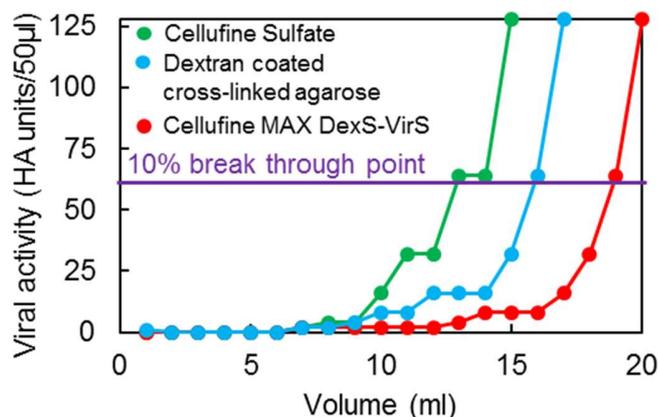


表 2 セルファイン MAX DexS-VirS からの不活化インフルエンザウイルスの回収率

A) セルファインサルフェイト

工程	HA 活性		全タンパク質量			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
ロードサンプル	153,600	100	4.8	100	31.3	18.5	100	120.6
フロースルー	9,080	5.9	3.2	67.2	356.5	—	—	—
溶出 1	69,920	45.5	0.2	4.1	2.8	2.0	10.7	28.3
溶出 2	35,120	22.9	0.09	1.8	2.5	0.8	4.1	21.8
全回収率	114,120	74.3	3.5	73.1	30.8	—	—	—

B) 市販のデキストラン硫酸固定化アガロース担体

工程	HA		全タンパク質量			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
ロードサンプル	204,800	100	7.6	100	17.1	24.9	100	121.4
フロースルー	21,620	10.6	4.2	54.5	192.1	—	—	—
溶出 1	122,560	59.8	0.4	5.0	3.1	1.6	6.2	12.7
溶出 2	37,280	18.2	0.12	1.5	3.1	1.5	6.1	41
全回収率	181,460	88.6	4.7	61.0	25.6	—	—	—

C) セルファイン MAX DexS-VirS.

工程	HA		全タンパク質量			DNA		
	HAU	%	mg	%	ng/HAU	mg	%	pg/HAU
ロードサンプル	204,800	100	6.4	100	31.3	24.7	100	120.6
フロースルー	7,760	3.8	4.1	64.2	530.7	—	—	—
溶出 1	139,520	68.1	0.4	5.9	2.7	3.0	12.0	21.3
溶出 2	64,160	31.3	0.1	1.5	1.5	3.4	13.9	53
全回収率	211,440	103.2	4.6	71.6	21.7	—	—	—

考察

セルファイン MAX DexS-VirS のラクトフェリンの動的吸着量は、200 mM NaCl を含む pH 8.5 の吸着バッファの条件では 20mg/ml 以上であった。同様の条件では、セルファインサルフェイトの場合、10mg/ml の吸着量に留まる。デキストラン硫酸固定化担体のポリクローナル IgG の吸着量比較では、pH 5.0 の条件において吸着量は塩濃度に依存的に変化した。不活化インフルエンザウイルスの吸着量はセルファインサルフェイトや市販のデキストラン硫酸固定化担体と比較して、セルファイン MAX DexS-VirS の吸着量は 55%もの増加を示した。

まとめるとセルファイン MAX DexS-VirS はセルファインサルフェイトと比較して、ウイルス粒子に極めて高い吸着性能を示した。

セルファインを用いたウイルスやVLPの追加精製

セルファインETクリーン (ポリε-リジン固定化担体) -生理食塩水の pH、イオン強度 (イオン強度 $\mu = 0.02 - 1.0$ 、温度 0 - 25 °C) の条件でグラム陰性菌由来のエンドトキシンを除去することができるアフィニティクロマトグラフィー充填剤。

- ET クリーン S (細孔の排除限界分子量 2,000 Da、多くのタンパク質は細孔内に入らない)
- ET クリーン L (細孔の排除限界分子量 $> 2 \times 10^6$ 、多くのタンパク質は細孔内に入る)

セルファイン GH-25 脱塩カラム -真球状のセルロース粒子で、3000 Da の排除限界分子量の狭い細孔を持つ。タンパク質は細孔内に入らずフロースルーされるが、塩などの低分子は細孔内に入るため脱塩用途で使用できる。

ご注文の情報

製品名	容量	カタログ No.
セルファイン MAX DexS-VirS	5 x 1 ml ミニカラム	21 800-51
	1 x 5 ml ミニカラム	21 800-15
	10 ml	21 800
	50 ml	21 801
	500 ml	21 802
	5 lt	21 803
	10 lt	21 804

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

東京都千代田区大手町二丁目2番1号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 3-3243-6219

eメール: cellufine@jnc-corp.co.jp

Web サイト: <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>