

Cellufine™ MAX DexS-HbP

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つため、血漿由来のタンパク質を分離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 株式会社はデキストラン硫酸をリガンドとしたヘパリン固定化担体の代替品となるセルファイン MAX DexS-HbP 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 にこの新しいヘパリン代替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-HbP 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	デキストラン硫酸
CIP	0.5 M NaOH
リゾチーム吸着量 (mg/ml)	≥ 50 mg/ml
操作圧力	< 0.3 MPa
操作流速	最大 1200 cm/h

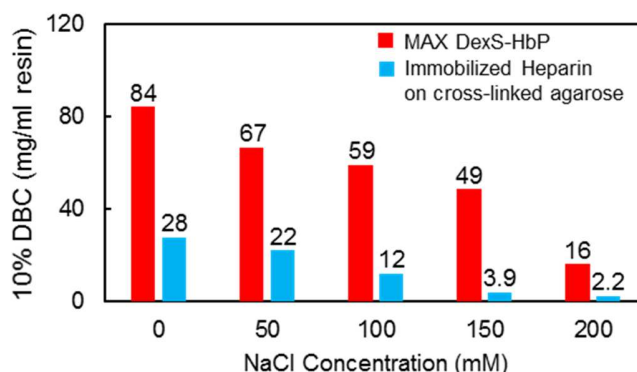
セルファイン™ は JNC 株式会社の登録商標です。

セルファイン MAX DexS-HbP 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-HbP および市販のヘパリン固定化アガロース担体のタンパク質吸着量を比較した。

まずモデルタンパク質にはリゾチームを用いた。様々な塩濃度条件における動的吸着量 (DBC) を図 1 に示す。

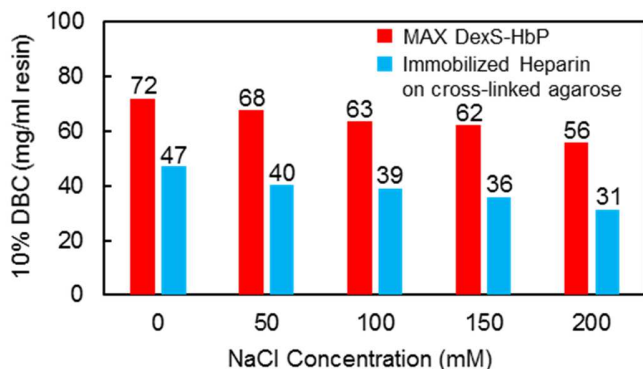
図 1 リゾチームを用いた動的吸着量の比較



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 リゾチーム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 9.5 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。

次いでモデルタンパク質としてラクトフェリンを用いて動的吸着量を測定した。動的吸着量の非悪を図 2 に示す。

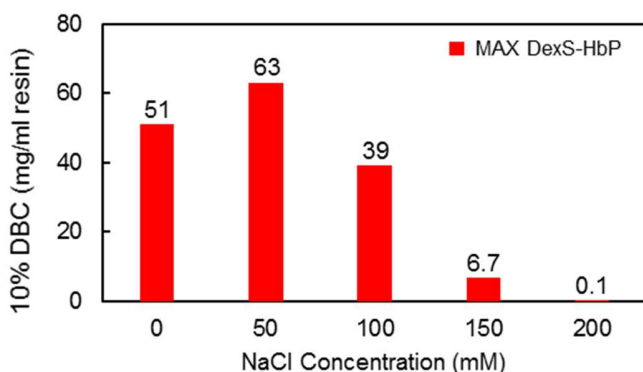
図 2 ラクトフェリンを用いた動的吸着量の比較



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 10 mM リン酸 Na 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。

次にポリクローナル IgG 吸着試験は pH 5.0 の酢酸バッファーを用いて動的吸着量を測定した。動的吸着量の結果を図 3 に示す。

図 3 ポリクローナル IgG を用いた吸着量の比較



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 Na 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。

さらに広範囲の pH 条件、塩濃度を用いた吸着試験の結果を表 2 に示す。

表 2 ポリクローナル IgG を用いた広範囲の条件における動的吸着量の測定

10% DBC ポリクローナル IgG (mg/ml)			
NaCl Concentration (mM)	150	200	250
pH 5.0 * ^a	6.7	0.1	< 0.1
pH 7.0 * ^b	< 1	0	0
pH 8.0 * ^c	0	0	0

動的吸着量は図 3 と同条件で測定した。ロードする 2mg/ml ポリクローナル IgG 溶液は以下のバッファーで調製した。a) 10mM 酢酸 pH 5.0、b) 10mM リン酸 Na pH 7.0、c) 50mM Tris-HCl pH 8.0。

考察

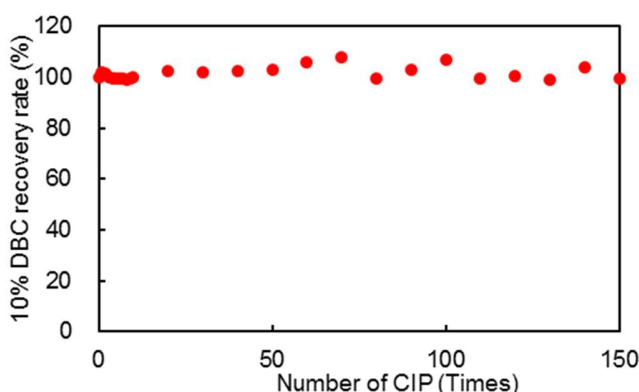
リゾチームとラクトフェリンの吸着量測定の結果から市販のヘパリン固定化アガロース担体と比較して極めて高い吸着量を示した。いずれのモデルタンパク質においても 150mM NaCl の塩濃度以下において、45mg /ml の動的吸着量を示した。ヘパリンアフィニティクロマトグラフィーは治療用ヒトラクトフェリンの最終工程において使用されてきた (参考文献 1)。一方でポリクローナル IgG は 150 mM NaCl 以上の濃度かつ pH 7~pH 8 の条件ではセルフライン MAX DexS-HbP は吸着しなかった。

参考文献 1: *Choi et al Glycoconjugate J. 2008 August; 25(6): 581-593*

定置洗浄(CIP)の繰り返し試験

0.5M NaOHを用いた150回の定置洗浄繰り返し試験において、リゾチームの動的吸着量に変化は見られなかった。タンパク質吸着量の変化率に関して図4に示す。

図4 0.5M NaOHを用いた150回の定置洗浄繰り返し試験



定置洗浄のサイクル間で測定した動的吸着量は内径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 リゾチーム溶液は吸着バッファー50 mM Tris HCl バッファーpH 9.5 + 0.15mM NaCl で調製した。溶出バッファーは50 mM Tris HCl pH 9.5 + 1.0 M NaCl を用いて溶出した。定置洗浄の各ステップの概要を表3に示す。

考察

セルファイン MAX DexS-HbP は0.5M NaOHを用いた150回の定置洗浄において、優れた活性を維持していた。

表4 定置洗浄の概要

工程	流速 (ml/min)	CV
平衡化 (吸着バッファー)	0.5	10
サンプルロード 2 mg/ml リゾチーム溶液	0.125	70
洗浄 (吸着バッファー)	0.5	10
溶出 (吸着バッファー+1M NaCl)	0.5	30
洗浄 (吸着バッファー)	0.5	10
定置洗浄 (0.5M NaOH)	0.5	10
再平衡化 (吸着バッファー)	0.5	10

セルファイン MAX DexS-HbP によるアンチトロンビンⅢの精製例

ヘパリン固定化担体はアンチトロンビン III をウシ全血漿から直接精製するために使用されている (参考文献2)。

参考文献2 *Data file 18-1134-77 AE HiTrap Heparin HP Figure 5. GE Healthcare Biosciences AB*

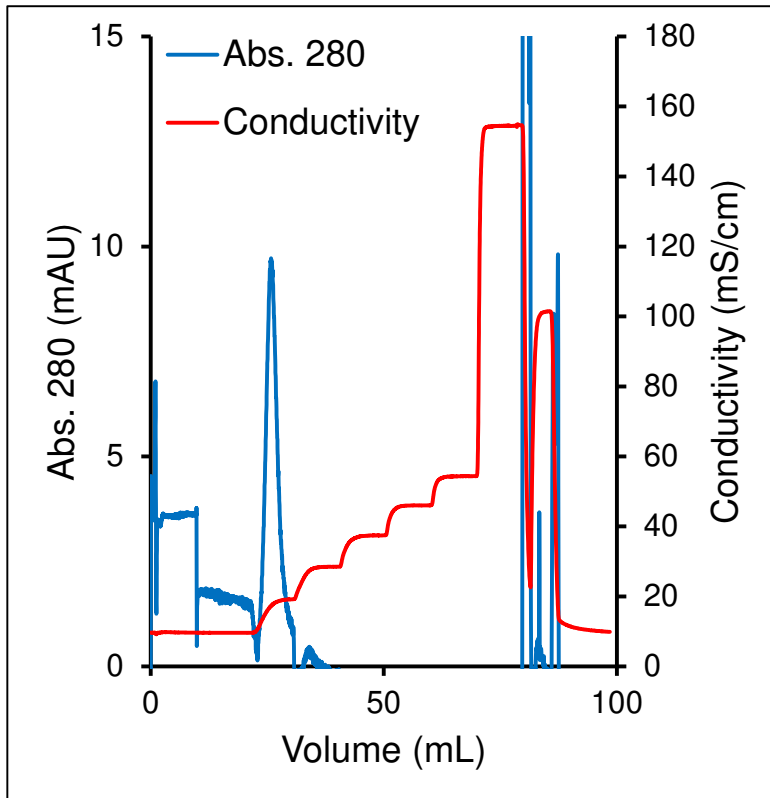
アンチトロンビンⅢの吸着および溶出のクロマトグラムおよび精製結果を図5に示す。

動的吸着量は内径5mm x 高さ2.5cm (カラム体積0.49mL)を用いた。吸着バッファー (100 mM Tris HCl, 10 mM クエン酸三ナトリウムバッファーpH 7.4) に2.0 mg/ml 濃度になるようにアンチトロンビンⅢ (Neuart) 溶液を調製し、1.5 ml をロードした。溶出は段階的に NaCl 濃度を変化させて (吸着バッファー + 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,

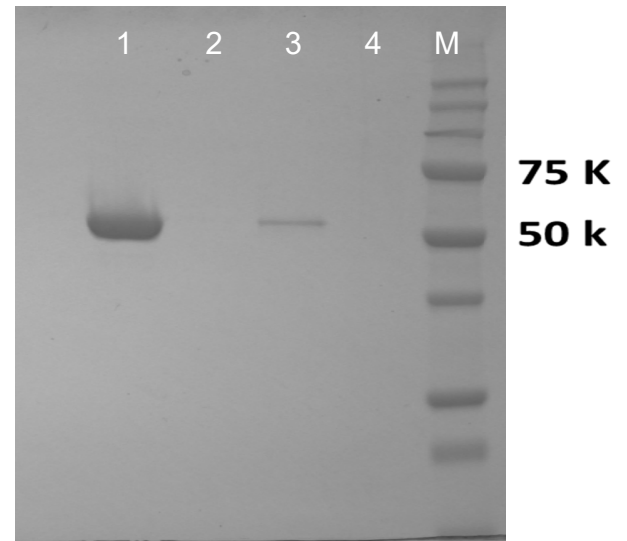
0.5, 2 M NaCl) 溶出した。溶出画分は SDS-PAGE (還元条件) により、純度を確認した。

図 5 セルファイン MAX DexS-HbP によるアンチトロンビンⅢのクロマトグラフィー

A) クロマトグラム



B) SDS-PAGE による精製度の評価



- 1 アンチトロンビンⅢ (Neuart)
- 2 フロースルー (FT)
- 3 0.1 M NaCl 溶出画分
- 4 2.0 M NaCl 溶出画分
- M 分子量マーカー

モデルタンパク質の吸着事例の総括

ラクトフェリンの吸着例では、セルファイン MAX DexS-HbP を用いた場合、200 mM NaCl までの塩濃度で pH 7.5 の条件において、10%ブレイクスルー時の動的吸着量は 56 mg/ml 以上であった。一方で市販のヘパリン固定化アガロース担体では 31 mg/ml の吸着量であった。いずれの担体も NaCl 濃度を増加させると動的吸着量は減少する傾向にあった。ポリクローナル IgG の事例ではヘパリン固定化アガロース担体の場合、ほとんど吸着しなかった。対照的にセルファイン MAX DexS-HbP では 50 mM NaCl の塩濃度の条件でポリクローナル IgG は 63 mg/ml の動的吸着量を示した。それ以上の塩濃度では動的吸着量は減少し、200 mM NaCl でほとんど吸着しなくなった。

まとめると、デキストラン硫酸を修飾したセルファイン MAX DexS-HbP は、ラクトフェリン、リゾチームに関して、生理食塩水レベルの高塩濃度の条件下で高い吸着性能を示した。ポリクローナル IgG に関し

では、アフィニティ活性は弱いものの、低塩濃度の条件下では吸着活性を示した。またアンチトロンビンⅢのような血漿由来のタンパク質においては、血漿から簡単に、高純度のタンパク質精製が可能であった。

セルファインを用いた血漿由来タンパク質の追加精製

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 $0 - 25 ^\circ C$) 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-HbP	5 x 1 ml ミニカラム	21 700-51
	1 x 5 ml ミニカラム	21 700-15
	10 ml	21 700
	50 ml	21 701
	500 ml	21 702
	5 lt	21 703
	10 lt	21 704

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 メールアドレス: cellufine@jnc-corp.co.jp

ホームページアドレス: <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>