

Cellufine™ SPA-HC

セルファイン SPA-HC はモノクローナル抗体やγグロブリンなどの抗体を、細胞培養液や血清や血漿などから精製するためのアフィニティークロマトグラフィー充填剤です。セルファイン SPA-HC は真球状の高度に架橋されたセルロース粒子にアルカリ耐性の高い組換えプロテイン A リガンドを多点で強固に固定化しています。このため優れた流速特性、低いプロテイン A 漏出量、高い動的吸着量を示します。またアルカリ安定性が高く、定置洗浄（CIP）後も良好な吸着性能を維持します。高度に架橋されたベース担体を使用しているため、高流速の条件でも使用可能です。

この新しいプロテイン A クロマトグラフィー充填剤を使用することで、抗体医薬やγグロブリン製剤のダウンストリームプロセスの効率化やリードタイムの短縮を実現することができます。

セルファイン SPA-HC の特長を表 1 に示します。

表 1 セルファインSPA-HCの性能と特徴

	特徴
リガンド	アルカリ耐性組換えプロテイン A
ベース担体	高度に架橋されたセルロース粒子
粒子径	平均 70 μm
リガンド固定化方法	多点での共有結合
流速	≥600 cm/h (0.3 MPa) 内径 30 cm-高さ 20 cm カラム、純水 (24 °C) で測定
動的吸着量 (DBC)	≥ 70 mg /ml (C ₁₀ 、ポリクローナル IgG) ¹
推奨定置洗浄液 (CIP)	0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液
使用可能温度	4 °C ~ 40 °C
保存条件	2~8 °C in 20 % ethanol

¹ C₁₀ DBC : 10%ブレイクスルーポイント時の吸着量。滞留時間 6 分で測定。ポリクローナル IgG はヒト血清由来を用いた。

カラムへのパッキング（充填）手順

- 1) カラム体積 < 1 L の場合；必要量の充填剤スラリーをガラスフィルターでろ過して、5 倍容量の純水で 3 回洗浄する。この操作で保存液を除去する。洗浄は必要に応じてバッファーを用いても良い。
- 2) カラム体積 > 1 L の場合；製品ボトルを静置することで充填剤を十分に沈降させた後、保存液をデカンテーションで取り除く。その後、純水を加えてスラリー状に懸濁させる。再び静置させて充填剤を十分に沈降させた後、上清を取り除く。この操作を 2～3 回繰り返して保存液を置換する。
- 3) 最後の洗浄が完了したら、50～60%のスラリーになるように充填バッファーを加えて懸濁する。
- 4) スラリーの 1 部を 50mL メスシリンダーに入れて、4 時間以上または終夜で静置する。
- 5) 自然沈降体積を測定して正確なスラリー濃度を計算する。計算式は以下の通り。
スラリー濃度% = 自然沈降ベッド体積 / 全体積
- 6) スラリー濃度が 50% になるようにパッキング用バッファー量を調節する。
- 7) カラムに充填するスラリー量は以下の計算式で算出できる。

$$50\% \text{スラリー量} = (\text{目標カラム体積} \times 2) \times (Cf)$$

Cf はコンプレッションファクターで、以下の式で導かれる。：

$$Cf = \text{自然落下沈降体積} / \text{パッキング体積}$$

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.15 で最適な充填結果が得られる場合、必要なスラリー量は以下の通り計算できる。

$$(100 \times 2) \times 1.15 = 230 \text{ mL}$$

Note： 充填剤のコンプレッションファクター Cf は充填効率に重要な因子です（付録 1 を参照下さい）。可働栓カラムなどを使用すると Cf 値を調節しやすくなります。

- 8) 目的のカラム体積を達成するために、目標となるベッド高さを計算します。
例えば、100mL のカラム体積としたい場合、内径 2.5cm のカラムでのベッド高さは以下の計算式で算出されます。

$$\begin{aligned} \text{目標ベッド高さ} &= \text{カラム体積 (mL)} / \text{カラム断面積 (cm}^2\text{)} \\ &= 100 / \pi \times (\text{カラム半径})^2 \\ &= 100 / 4.91 \\ &= 20.4 \text{ cm} \end{aligned}$$

- 9) カラムを組み立てる。カラム底部のエンドフィッティングを開けた後、バッファーをカラムに加えながら、下部フィルターに残存している空気を除く。空気が入らないようにバッファーはカラム底部から 1cm 程度は残しておくが良い。
- 10) カラム出口を閉める。
- 11) 空気がゲル内に入り込まないように注意しながらスラリーを一気にカラム内に注ぎ

込む。

Note: 均一な充填を達成するために、スラリーは一度にカラムに加えること。

- 12) カラム出口を開けてゲルを沈降させる。ゲルが沈降すると、ゲルの方が早く沈降するため液面が透明になる。2～3 cm までバッファが透明になったら流出口を閉じる。
- 13) 注意深くバッファをカラム上部まで満たす。このとき沈降しているゲルが浮き上がらないようにする。
- 14) 上部アダプターを準備する。
- 16) 上部アダプターとカラム液面の間に空気が入らないように上部アダプターをカラムに設置する
- 17) 上部アダプターを固定した後、最初に 200cm/h の流速で 5 分通液してカラムからの移動相のリークを確認する。次に流速を 600cm/h に上昇させる。このとき圧力が 0.3MPa を超えないように注意すること。ベッド高さが安定するまで 30 分間通液する。

Note: カラムの圧力*が 0.25～0.30 MPa になるように流速を調節すること。安定的な充填をするためには、充填後の操作圧よりも早い流速でゲルを沈降させること。

*この圧力は充填剤を含むカラムシステム全体の圧力である。充填剤にかかる圧力を確認するには、事前に充填剤を加えない条件でカラムを組み立てて背圧を確認しておくが良い。圧力損失はカラム入口側の圧力計で測定すること。

- 18) ゲルの高さが安定した後、通液を止める。次いでカラム出口を閉じる。その後カラム上部の入口の配管を外す。ゆっくりと上部アダプターを下げていく。このときカラム内のバッファは入口を逆流して流れ出る。この操作によって上部アダプター内の空気はカラム外へ押し出される。上部アダプターをゲル上部まで下げていく。
- 19) 流速 600cm/h で通液する。上部アダプターよりもベッドが縮む場合、上部アダプターを下げて調節する。
- 20) 最終的なカラム高さからカラム体積を計算する。計画していたカラム体積より多い場合、上部アダプターを下げて調節していく。一方で計画していたカラム体積よりも低い場合、カラムに投入する前のスラリー濃度が低いか、ゲルが圧縮されすぎている可能性がある。この場合、再充填するか、現在のカラム体積で運転することになる。現在のカラム体積を受け入れる場合は、操作流速を現在のカラム体積に合わせて調節する必要がある。
- 21) パッキング状態を評価するために、HETP とピーク非対称性 (A_s) を確認する。(付録 1 を参照のこと)

お取り扱いガイドライン

セルファイン SPA-HC は野生型のプロテイン A リガンドと同等の抗体イソタイプへのアフィニティー活性があります。ベース担体は水酸基を多く持つ天然多糖のセルロースを用いているため、宿主由来のタンパクの非特異的吸着が低い特徴を持っています。プロテイン A に吸着した抗体は pH3~pH4 の酸性条件で溶出することができます。プロテイン A はセルロース粒子に多点で共有結合されていますので、プロテイン A リガンドの漏出が低く、繰り返し使用性に優れています。セルファイン SPA-HC はアルカリ耐性を向上させた組換えプロテイン A リガンドを固定化しています。このため 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を用いた定置洗浄 (CIP) を 160 回通液しても動的吸着性能は維持されています。必要であれば 0.5M 水酸化ナトリウム水溶液も使用できます。50 回の定置洗浄後でも 80% の動的吸着性能を維持します。

推奨バッファー

平衡化バッファー: 50 mM リン酸バッファー, 0.15 M 塩化ナトリウム, pH 7.4

溶出バッファー: 60 mM 酢酸バッファー, pH3.0

定置洗浄液 (CIP) : 0.1M NaOH

純水

ガンマグロブリンを用いた動的吸着量の測定

動的吸着量 (Dynamic binding capacity) はモノクローナル抗体の種類によって異なります。本来は精製されたモノクローナル抗体を用いて 10% ブレークスルー時の動的吸着量を求めます。それが難しい場合、下記に記載されているガンマグロブリンやポリクローナル抗体を用いた方法によって、クロマトグラフィー充填剤の性能を確認します。

1. カラムを準備する。充填剤のパッキング後は付録 1 に記載される方法で充填状態を評価すること。
2. カラムを 20% (V/V) エタノール水溶液で保存している場合、5CV (カラム体積) の平衡化バッファーで洗浄する。
3. サンプルとして 1mg/ml のヒトガンマグロブリン溶液 (平衡バッファーで溶解) を準備する。測定機器に搭載の分光光度計を用いて、吸収極大 280nm での吸収値を測定して

おく。トガンマグロブリン溶液を通液して UV 値が一定になる値を A_{max} と呼ぶ。 A_{max} から 10%の UV 値になる地点を 10%ブレイクスルーポイントと呼ぶ。

4. 測定装置内の配管は、1mg/ml のガンマグロブリン溶液を含めて、使用する各バッファーで置換しておくこと。
5. カラムを平衡バッファーを用いて 5CV で洗浄する。
6. ガンマグロブリン溶液を滞留時間*6 分の流速で通液する。UV 値が 10%ブレイクスルーポイントを超えて A_{max} の 50%に到達するまで通液を続ける。
*滞留時間と流速の関係は以下の計算式で算出できる。
流速 (ml/min) = カラム体積 (mL) / 滞留時間 (min)
7. UV 値が A_{max} の 50%に到達した後、5CV の平衡バッファーでカラムを洗浄して未吸着の抗体を除去する。
8. 次に 5CV の溶出バッファーで抗体を溶出させる。
9. 溶出抗体を回収して、抗体の回収率を測定する。
10. 抗体の回収後に、10CV の純水でカラムを洗浄する。
11. 3CV の 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を 15 分間カラムに接触させることで、溶出されなかった抗体やカラム内の不純物を除去させて、カラム内を定置洗浄する。
12. 定置洗浄後に 5CV の平衡化バッファーでカラム内のバッファーを置換する。
13. カラムを保管する場合、カラム内の平衡化バッファーを 20%(v/v) エタノール水溶液に置換する。長期間使用しない場合は 2~8°C の冷蔵保存をする。

精製プロトコール

細胞培養などで得られたサンプルを遠心分離で夾雑物を除去する。その後 0.22um のフィルターで不溶物を除去する。予め精製モノクローナル抗体で 10%ブレイクスルーポイント時の動的吸着量を求めおき、培養液をどれくらい通液すればよいかの指針とする。動的吸着量以上の培養液の通液を避けるため、10%ブレイクスルーポイント時の動的吸着量の 80%の吸着量になるまで通液する。例えば、培養液の抗体力価が 1g/L のサンプルの場合を考える。予めセルファイン SPA-HC の 10%ブレイクスルー時の動的吸着量 (10%BT 時 DBC) は 70mg/mL (滞留時間 6 分) と求めた。この場合、カラムに通液する培養液量、流速、カラムへの通液時間は以下の計算式で算出できる。

$$\begin{aligned} \text{培養液の通液量 (mL)} &= [\{10\%BT \text{ 時の DBC} \times 0.80\} \times \text{カラム体積}] / \text{抗体力価} \\ &= [\{70 \times 0.80\} \times 100] / 1 \\ &= 5600 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{滞留時間 6 分の流速} &= \text{カラム体積} / \text{滞留時間} \\ &= 100 / 6 = 16.7 \text{ mL/min} \\ \text{タンパク質のカラムへの通液時間} &= \text{通液量 (mL)} / \text{流速 (mL/min)} \\ &= 5600 / 16.7 = 335 \text{ min}\end{aligned}$$

細胞培養液を精製する場合、以下のような処理を要する場合がある。

- カラムに通液する前の細胞培養サンプルは事前に pH と電気伝導度を測定しておく。必要であれば平衡バッファーと同程度になるように調節すること。多くの細胞培養後のサンプルは pH7.4 で推奨バッファーと同程度の塩濃度になるはずである。
- 培養後モノクローナル抗体の発酵力価が低い場合、サンプルを 30-50kDa の限外ろ過膜で処理することで通液量を減らす処理をする。
- カラムに吸着しない夾雑物は培養液を通液後 1～2 CV で出てくるため、UV 値が一気に上昇するが、抗体サンプルの破過ではない。
- 培養サンプルの最後の 50mL を回収しておく。カラムに吸着しなかったモノクローナル抗体が検出しないことを確認しておくこと。未吸着の抗体が検出された場合、次回の精製でサンプル通液量を少なくすること。
- 培養サンプルを通液後非特異的吸着の宿主タンパク質 (HCP) や dsDNA を除去するために、15CV 程度の平衡化バッファーによる洗浄を要する場合がある。
- 抗体の溶出後、溶出サンプルを 1M トリスバッファーなどで pH3.5 に調節して、30 分間のウイルス不活化処理をする。
- ウイルスの不活化処理後、次のカラム工程 (ポリッシング工程) のサンプルとするために、サンプルの pH と電気伝導度を調整する。

セルファイン SPA-HC 後の精製ステップ

セルファイン SPA-HC による精製の後、高純度に精製するためのポリッシングステップで以下の不純物を除去する必要があります。a) 宿主細胞タンパク質 (HCP)、b) プロテイン A 溶出リガンド、c) 宿主由来 dsDNA、d) mAb 凝集体 (> 300 kDa 分子量) などです。またモノクローナル抗体のダイマー (2 量体) の除去も必要となります。セルファインは、これらの汚染物質を除去するためのラインナップを各種取りそろえています。詳細については、Web サイト <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/> をご覧ください。

- **Cellufine MAX IB** は、1 級アミンと疎水基リガンドを固定化した新しいミックスモードクロマトグラフィー充填剤です。HCP やプロテイン A 溶出リガンドおよび、モノクローナル抗体の凝集体をフロースルーモードで効率的に除去することができます。
 - 中性バッファーで操作できます。
 - 0.2 M NaCl までの広い塩濃度で使用できます。
- **Cellufine MAX GS** は、モノクローナル抗体の 2 量体や凝集体の除去に優れた性能を発揮する陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤です。結合 & 溶出モードで使用します。
 - Tris 塩基で pH 4.5、電気伝導度を 5 mS / cm 未満にして使用します。
- **Cellufine MAX Q-h** は宿主由来タンパク質 (HCP)、プロテイン溶出物、宿主 dsDNA などをフロースルーモードで除去することができます。
 - Tris 塩基で pH 8.5、電気伝導度を 12 mS / cm 未満にして使用します。

Clean In Place (CIP) の推奨事項

セルファイン SPA-HC は、0.1M水酸化ナトリウム水溶液で定置洗浄（3 CV、15 分の暴露時間）した場合において、160 回の繰り返し使用後も動的吸着量が 85%以上の活性を維持します。0.5M水酸化ナトリウム水溶液で定置洗浄（3 CV、15 分の暴露時間）した場合において、50 回の繰り返し洗浄後は 80%以上の活性を維持します。

推奨流量

Cellufine SPA-HC は高度に架橋されたセルロース担体をベース担体としています。このため高流速で安定的に使用できます。

- 線速 2,800 cm/h で純水を流した場合の圧力は 0.3 MPa 以下で操作可能。（直径 2.2cm×20cm ベッド高さのカラムを使用）
- 線速 600 cm/h で純水を流した場合の圧力は 0.3 MPa 以下で操作可能。（直径 30 cm ×20cm ベッド高さのカラムを使用）

推奨保存方法

密閉して凍結しないように 2 - 8 ° C の冷蔵で保存下さい。40°Cの加速試験で 1 か月保存

した場合、吸着量に変化は見られませんでした。また 25°C、で 6 カ月保存した場合、10°C で 2.5 年保存した場合も同様に吸着量に変化は見られませんでした。

長期保存する場合、20%エタノールで凍結しないように 2 - 8 ° C の冷蔵で保存下さい。

ご注文情報

製品名	容量	カタログ No.
セルファイン SPA-HC	1 x 1 mL (ミニカラム)	21900-11
	5 x 1 mL (ミニカラム)	21900-51
	1 x 5 mL (ミニカラム)	21900-15
	10 mL	21900
	50 mL	21901
	500 mL	21902
	5 L	21903
	10 L	21904

購買/技術サポート

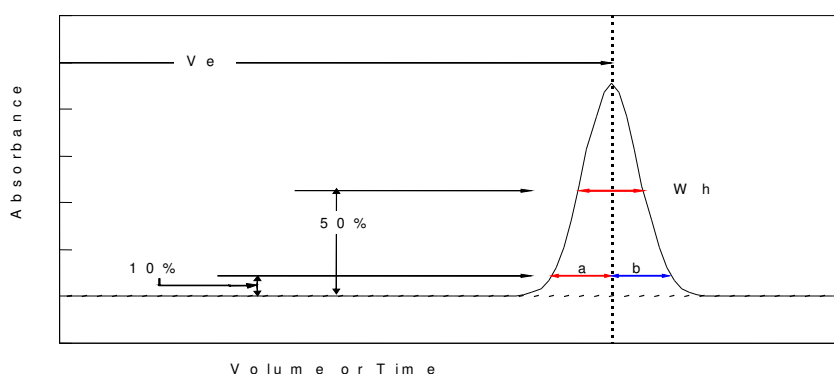
(北米)
 JNC America Incorporated
 555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206
 Rye, NY 10580 USA
 TEL: 914-921-5400
 FAX: 914-921-8822
 E-mail: cellufine@jncamericany.com

(日本、アジア、その他)
 JNC 株式会社
 ライフケミカル事業部
 〒100-8105
 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
 新大手町ビル 9 階
 Tel: +81-3-3243-6150
 Fax: +81-3-3243-6219
 E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

付録 1: セルファイン充填後のカラム評価方法

カラムの充填状態は理論段プレート数 (N)、理論段数相当高さ (HETP)、非対称性 (As) などの指標を使用して評価します。これらの評価指標は、測定条件の影響を受けます。たとえばカラムの直径/高さの違い、配管、溶媒サンプル量、流速、温度などの変化などによって変化します。したがって、毎回同じ測定条件を使用してカラム充填後の評価を行って同等性を確認する必要があります。

パラメータ	条件
サンプルロード量	カラム体積の 1 -2.5%の液量
サンプル組成	1-2 % (v/v) アセトン または 1 M NaCl
流速 (cm/h)	200 cm/h
検出器	吸光度 OD 280nm (アセトンの場合) 電気伝導度 (NaCl の場合)



計算式

$$HETP = L/N$$

$$N = 5.54 \times (V_e/W_h)^2$$

$$As = b/a$$

L	カラム高さ [cm or m]
V_e	溶出時間 (または溶出体積)
W_h	ピーク高さの半値時のピーク幅
a, b	ピーク高さの 10%高さにおける (a) 中心より前半部のピーク幅 (b) 中心より後半部のピーク幅
注意	単位は合せて計算すること。

一般的に、N の値は大きいほど優れています (同様に、HETP の値は小さいほうが優れています。)。非対称性 (As) は 1 に近い値が理想ですが、一般に許容される値の範囲は 0.8 ~1.6 です。