

Cellufine™ SPA-HC

細胞培養上清や血清/血漿のような複雑な不純物からのモノクローナル抗体 (mAb) を含む免疫グロブリンの精製のために設計されたアフィニティークロマトグラフィー充填剤

セルフライン SPA-HC は、高度に架橋された球状セルロース粒子にアルカリ耐性の高いプロテイン A リガンドを固定化したクロマトグラフィー充填剤です。優れた流速特性、低いプロテイン A 溶出量、高い動的結合能力を特徴とします。また複数サイクルの定置洗浄 (CIP) 後も良好な吸着活性を維持します。ベース担体となる高度に架橋されたセルロース担体は、近年の大型カラムでの使用に対応するために開発されました。この新しい高性能アルカリ耐性プロテイン A 固定化担体は、抗体医薬のダウンストリームプロセスにおいて、効率的な精製プロセスの構築を可能にします。セルフライン SPA-HC の特性を以下の表 1 にまとめます。

表 1, セルフラインSPA-HCの性能および特徴

	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	高度架橋セルロース粒子
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 NaOH
使用可能温度	4~50°C、1 週間の保存期間において、性能劣化は見られない。
保存条件	2~8°C、20 % (v/v) エタノール、5 年間で安定。
化学安定性	1 週間の保存試験において、以下の溶媒で吸着量に変化が見られない。 30% (v/ v) イソプロパノール、20~70% (v/ v) エタノール、8 M 尿素、6 M グアニジン-HCl 又は 0.1 M 酢酸。
pH 安定性	3 - 12

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。

優れた動的吸着量 (DBC)

ヒトポリクローナル抗体の動的吸着量を市販のプロテインA充填剤と比較した。滞留時間を変化させた場合の、セルファイン SPA-HC と市販高度架橋アガロースビーズプロテインA担体の動的吸着量を比較したデータを図1に示す。セルファイン SPA-HC は市販品と比較して優れた動的吸着量を示した。また表1では、滞留時間4分および6分で、より幅広い市販品プロテインA充填剤との動的吸着量を比較評価した。

図1 市販プロテインA充填剤とのポリクローナル抗体を用いた DBC 比較

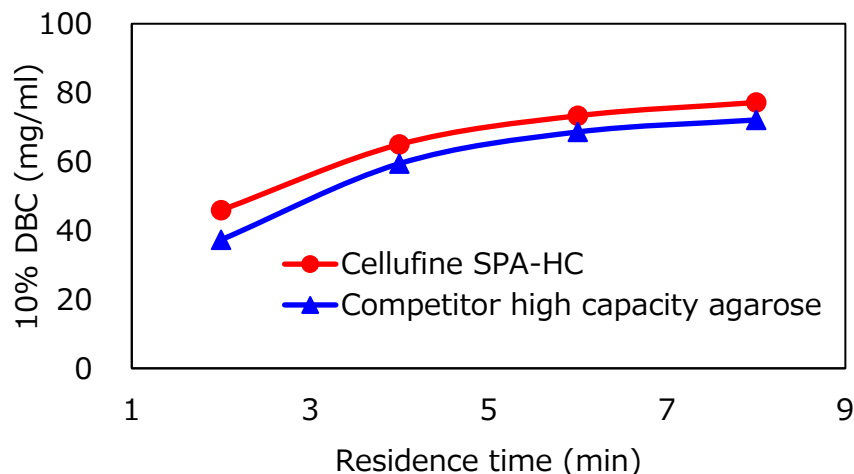


表1 さまざまな市販充填剤との動的吸着量の比較

ベース基材	物性		pAb 10% DBC (mg/mL)	
	粒子サイズ * (μM)	操作流速** (cm/h at 0.2MPa)	4 min	6 min
セルファイン SPA-HC	70	200	67	72
架橋アガロース	85	220	57	68
	60	130	75	79
ポリビニルエーテル ポリマー	50	-	52	55
ポリメタクリレート	45	120	68	75
メタクリルポリマー	50	100	67	71
架橋セルロース	75	260	60	69

*粒子サイズは販売元の公開情報を参照した。

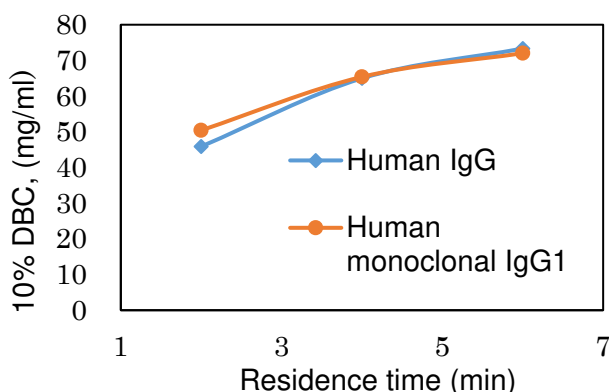
**操作流量のデータは以下の論文から取得した (J. Chro. A 1554 (2018) 45-60 を参照)。

DBC は以下のように測定した。1mL ミニカラム (6.7 mmID x 3 cmL) を 20 mM Na-Phosphate バッファー + 0.15M NaCl at pH 7.5 で平衡化した。ヒトポリクローナル抗体 (pAb) ストック溶液 (50 mg / mL ヒト IgG) を平衡バッファーで 5 mg / mL IgG 濃度に調整し、0.22 μM ポアサイズのボトルトップフィルターでろ過して微粒子を除去した。DBC は 10%ブレイクスルーポイントで測定した。

モノクローナル抗体の吸着量の比較

セルファイン SPA-HC はヒトモノクローナル抗体 IgG1 の吸着においても優れた動的吸着量を示した (図 2)。この結果から実際の抗体医薬精製においても優れた吸着特性を維持していることが判る。

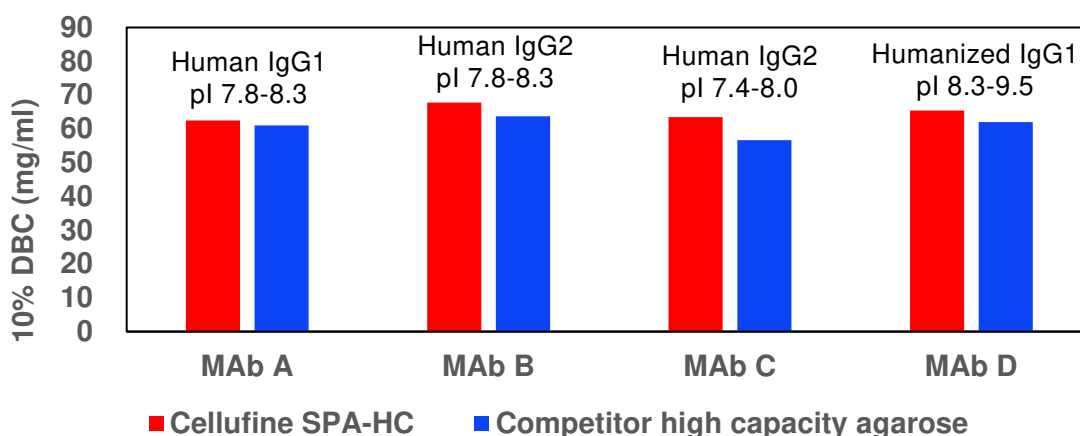
図 2, mAb および pAb の DBC 比較



ヒト pAb (IgG 血清由来) は市販品を使用した。ヒトモノクローナル抗体 IgG1 は CHO 細胞で培養された抗体を予め精製後、動的吸着量の測定に使用した。

異なる等電点およびサブタイプのモノクローナル抗体を用いて、表面電荷の違いが動的吸着量に及ぼす影響を評価した。この結果、セルファイン SPA-HC は幅広い等電点を特徴とするモノクローナル抗体に対して、比較対象の市販の高度架橋アガロース担体と比較して高い動的吸着量を示した (図 3)。

図 3 異なる等電点およびサブタイプの mAb での吸着量評価



CHO 細胞培養サンプルからのモノクローナル抗体の精製

始めにロード量を決定するために、CHO 細胞培養で発現した精製済みのヒトモノクローナル抗体を用いて、1 M Tris 塩基と 1 M NaCl で pH 7.5 および 15 mS / cm の導電率に調整した。抗体濃度 1.25 g / L にサンプルを調整し、滞留時間 4 分間で 10%動的吸着量 (10%ブレイクスルー時) を測定した。

CHO 培養上清をカラムにロードする液量は事前に測定した 10%動的吸着量の 80%の液量を吸着させることにした。CHO 培養上清をロード後、1 mL カラムを 10 CV 平衡化バッファーでベースラインまで洗い流した。吸着されたヒトモノクローナル抗体は、10 CV の 60 mM 酢酸ナトリウム pH 3.0 で溶出した。回収した溶出画分を 1 M Tris 塩基で中和後に、以下の評価項目を測定した。

- A) A280nm によるヒトモノクローナル抗体の回収率
- B) ELISA による CHO 細胞由来タンパク質およびプロテイン A 溶出量
- c) SEC によるヒトモノクローナル抗体の凝集体量

上記の検討によって得られた結果を表 2 に示す。

Table 2, mAb 精製後のサンプル評価

	mAb ロード量 (mg/mL)	溶出 CV	% 収量	CHO-HCP (ppm)	プロテイン A リーク量 (ppm)	% mAb 凝集体
ロードサンプル	-	-	-	8.68 x 10 ⁵	-	-
SPA-HC	53	3.0	89	1800	4	1.4
市販アガロース	51	3.9	89	1820	8	1.9

この実験から、CHO 培養上清由来のヒトモノクローナル抗体が、セルファイン SPA-HC によって効率的に吸着され、高純度で不純物の除去が達成されたことが示された。

溶出 pH のハイスループレットスクリーニング

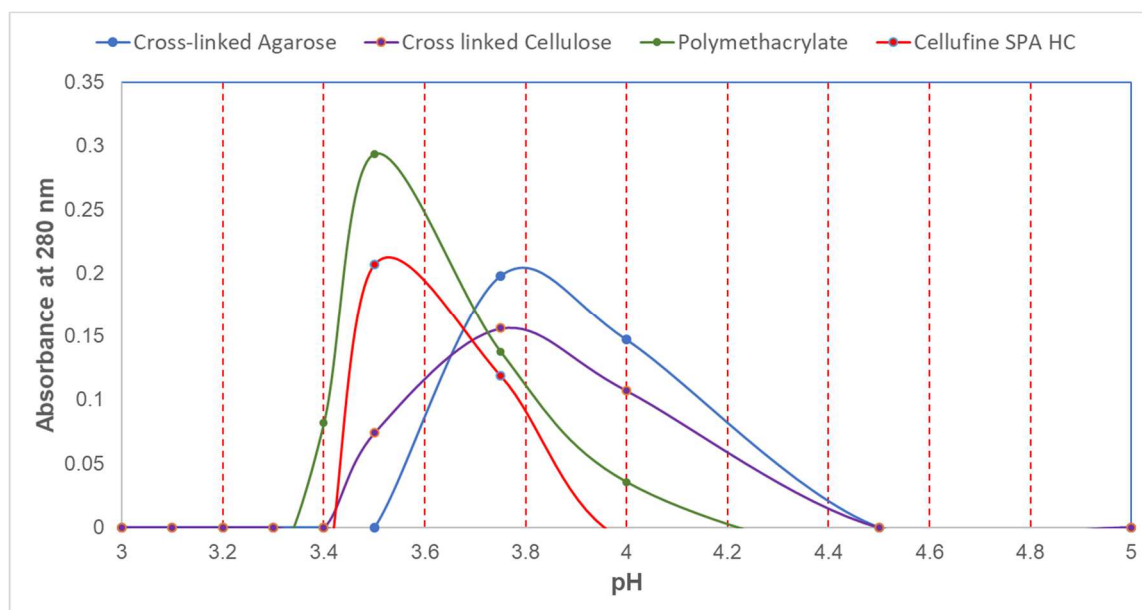
溶出 pH のハイスループレットスクリーニングは、遠心用スピнкаラム (0.45 μm ポアサイズフィルター; Ultrafree MC) を使用して評価した。

1. 0.02mL の 50% (v/v) スラリーをピペットで分注してスピнкаラムに加えた。
2. 0.4mL の平衡化バッファー (20 mM Na-リン酸バッファー+ 0.15 M NaCl at pH 7.5) で 2 回洗浄した。
3. 平衡化バッファーに溶解した 5 mg/mL 精製ポリクローナル IgG を 0.4mL 加えた。
4. 0.4mL の平衡化バッファーで 2 回洗浄した。

5. 0.1M グリシンバッファー (pH 5.0, 4.5, 4.0, 3.75, 3.5, 3.4, 3.3, 3.2, 3.1 3.0.)
で溶出した。
6. 各溶出サンプルをマルチウェルプレート (low UV acrylic, Corning)に回収し、UV プレ
ートリーダー (Molecular Dynamics)で 280nmの吸収極大からタンパク質量を測定した。

セルファイン SPA-HC、架橋アガロース (85 μM ビーズサイズ)、ポリメタクリレート (45 μM ビーズサイズ)、および架橋セルロース (75 μM ビーズサイズ) の比較データを以下の図 4 に示す。

図 4, 溶出 pH のハイスループットスクリーニング



上記の結果では、セルファイン SPA-HC とメタクリレート担体では pH3.5 にピークが極大化していた。その他の担体は pH3.8 でピークが極大化した。溶出 pH の違いは、プロテイン A リガンドの構造の違いに起因している。

今回、紹介した溶出 pH の評価方法は、少ないサンプルで、極めて迅速に溶出 pH を評価する方法と言える。

セルファイン SPA-HC の CIP 安定性

担体の定置洗浄 (CIP) はクロマトグラフィー操作のサイクルごとに常時実施される。セルファイン SPA-HC を 0.1M NaOH を用いて 150 サイクルで CIP 繰り返し試験を行った。動的吸着量の評価はポリクローナル抗体を用いて評価した。本検討の結果を図 4 に示す。

図 4 0.1M NaOH CIP 試験（暴露時間 15 分、150 サイクルの使用）

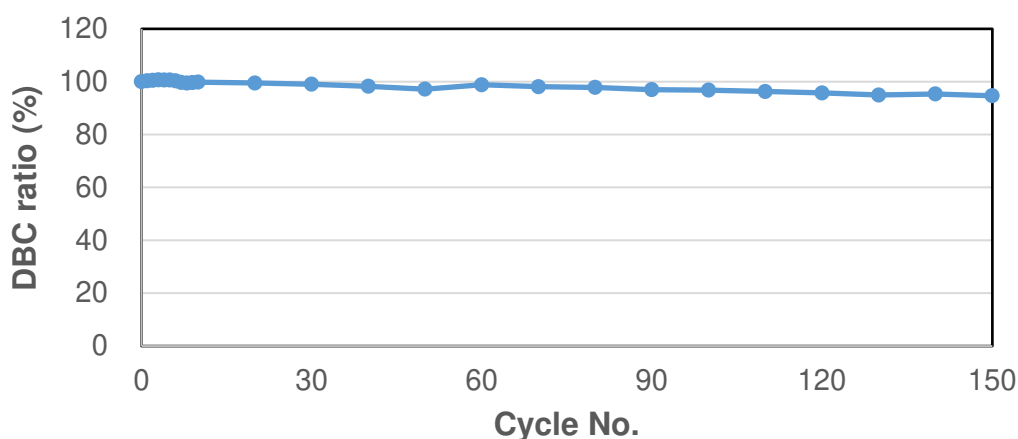


図 4 が示すように、0.1M NaOH を用いた CIP150 サイクル後においても動的吸着量は 95%以上の吸着活性を示した。実験前の動的吸着量は 75 mg/mL、150 サイクル後は 72 mg/mL であった。

サイクル間 CHO-HCP の“キャリーオーバー”

クロマトグラフィーのサイクル間の CHO 細胞由来タンパク質（CHO-HCP）のキャリーオーバー（不純物の次サイクルへの持ち込み）に関して、モノクローナル抗体（mAb）およびポリクローナル抗体（pAb）を用いて定量した。CHO-HCP は ELISA により測定した。結果を表 3 に示す。

最初に CHO 細胞培養上清（mAb）をカラムに通して溶出させた。定置洗浄をせずに 2 サイクル目ではポリクローナル抗体（pAb）をカラムに通して、溶出 pAb 内に存在する CHO-HCP のキャリーオーバーを評価したところ 86ppm のキャリーオーバーが観測された。次いで 3 サイクル目に再び CHO 細胞培養上清をカラムに通して溶出させた。この後、0.1M NaOH を用いてカラム内を定置洗浄した。4 サイクル目ではポリクローナル抗体（pAb）をカラムに通して、溶出 pAb 内に存在する CHO-HCP のキャリーオーバーを評価したところ 13ppm のキャリーオーバーが観測された。定置洗浄無しの 2 サイクル目と比較してキャリーオーバーを減少させることができた。同様に 0.5M NaOH における検討もサイクル 4~5 で評価した。

この実験によって定置洗浄によって CHO-HCP のキャリーオーバーを効果的に減少できることを証明した。しかし 0.1M NaOH と 0.5M NaOH でキャリーオーバーの減少度合はさほど変化しなかった。この結果からキャリーオーバーへの対策は 0.1M NaOH の定置洗浄で十分であることが判る。

表 3, サイクル間の CHO-HCP “キャリーオーバー”

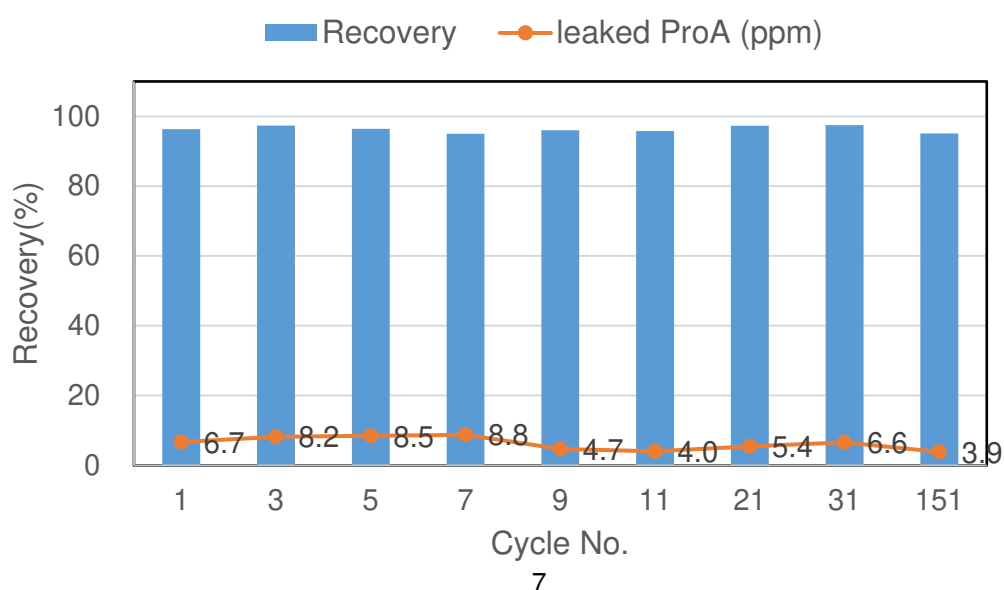
サイクル No	サンプル	CHO-HCP (ppm)	% HCP Clearance by SPA-HC	% “Carry-over” to next cycle
	ロードサンプル	777,000		
1	mAb 溶出 サイクル 1	306	> 99	28.2
2	pAb 溶出 - NO CIP	86	-	
3	mAb 溶出 サイクル 3	238	> 99	5.5
4	pAb 溶出 - 0.1M CIP	13	-	
5	mAb 溶出 サイクル 5	260	> 99	3.2
6	pAb 溶出 - 0.5M CIP	8	-	

0.1M NaOH による CIP、150 サイクルにおけるプロテインA溶出量

1mL のセルフライン SPA-HC ミニカラムを 0.02M Tris-HCl バッファー, 0.15M NaCl pH 7.5 で平衡化した。その後 60 mg のポリクローナル抗体を用いて流速 0.125 mL/min で抗体をロードした (10%ブレイクスルー時の DBC の 80%吸着量をロード)。吸着した抗体を 60 mM 酢酸ナトリウムバッファー, pH 3.0 で溶出した。次いで 100mM 酢酸バッファーで洗浄後、0.1M NaOH で暴露時間 15 分で定置洗浄した。

150 サイクル後においても動的吸着量は 95%以上の活性を維持していた。またプロテイン A 溶出量は 9ppm 以下であった。これらの結果を図 5 に示す。

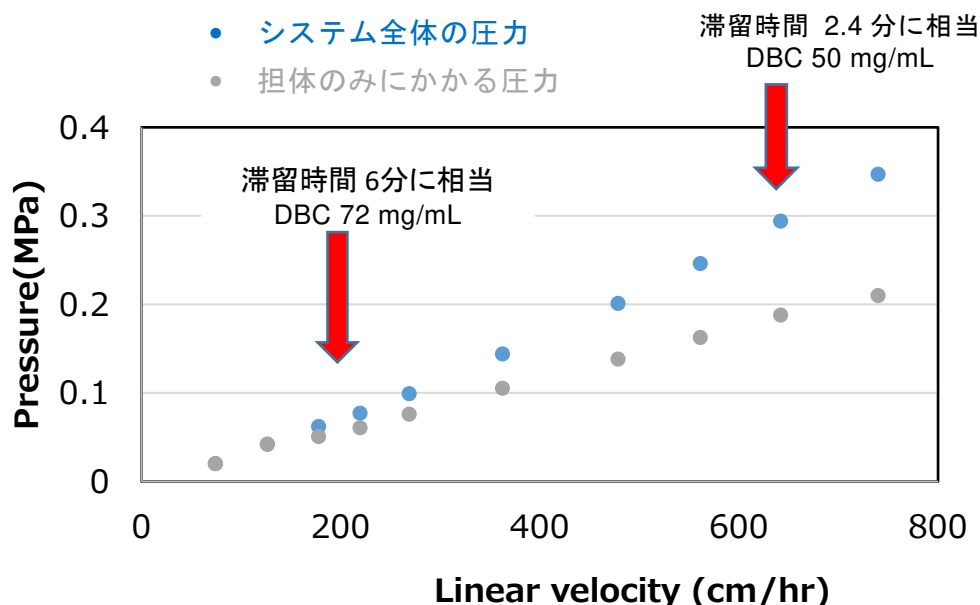
図 5 CIP150 サイクル後の pAb 回収率および溶出プロテインAの評価



パイロットスケール（1-2L）における流速特性

セルファイン SPA-HC のベース粒子は高度に架橋されたセルロース粒子を使用している。このため抗体医薬の製造に使用されるラージスケールカラムで十分に使用することができる。セルファイン SPA-HC は流速 650 cm/h の条件において、0.3MPa 以内の操作圧力で使用することができる（使用カラ：10cmID x 20 cm、担体体積 1.57 L）。流速 750cm/h までの流速と圧力の関係を図 6 に示す。

図 6, パイロットスケールにおける流速特性カーブ



流速特性試験は 10 cmID x 20 cm カラム (Axichrom 10/300, 1.57L CV, GE healthcare) を用いた。移動相は 20-25 °C の純水を用いた。

上記の試験から、パイロットスケールにおいて、0.3MPa の操作圧の条件においても、滞留時間 2.4 分 (流速 650cm/h) で操作すること可能であった。滞留時間 2.4 分での動的吸着量は 50 mg/mL と高い吸着性能を持つ。このためセルファイン SPA-HC は生産スケールにおいて効率的なプロセス構築が可能なクロマトグラフィー充填剤と言える。

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/en/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 mAb 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。 バインド&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。

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

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