

Cellufine™ MAX IB

ミックスモードクロマトグラフィー充填剤はイオン交換クロマトグラフィー充填剤や疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤とは異なるユニークな選択制を持つ特徴があることが知られています。セルファイン MAX IB はプロテインA担体の精製後のモノクローナル抗体 (Mab) の精製に使用する新しいミックスモード担体です。ポリアリルアミンの表面修飾とその一部にブチル基を修飾することで高塩濃度でもタンパク質が吸着する特長があります。この一級アミノ基とブチル基のハイブリットリガンド構造によってミックスモードとしての機能を付与しています。モノクローナル抗体のポリッシング工程に加えて、血漿分画製剤にもユニークな選択性を示します。このミックスモードクロマトグラフィー充填剤は定置洗浄液に耐性のあるセルロース粒子を用いているため極めて安定です。また高度に架橋されたベース担体を用いているため高流速で圧力が低い特徴を備えます。充填剤の特長を表1に示します。

表1 セルファインMAX IBの特長

	特長
リガンド	ポリアリルアミン、部分的にブチル基を修飾
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)
流速	≥ 500 cm/h (0.3 MPa) I.D. 10 cm-L 13 cm, 純水 24 °C
BSA 吸着量 (mg/mL)	64 (低塩濃度条件) ¹ 59 (高塩濃度条件) ²
定置洗浄	0.5 M NaOH
推奨洗浄試薬	エタノール (70 %), イソプロパノール (30%), グアニジン HCL (6 M) 尿素 (6 M)
保存方法	温度 2~8°C、20 % (v/v) エタノール

¹ 50 mM Tris-HCL, pH 8.5,

² 50 mM Tris-HCL, pH 8.5 + 0.2 M NaCl.

カラム充填方法

- 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。同時にカラムの流路も洗浄しておく。
- 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パッキング用のバッファーを加えて懸濁する。
- 4) 自然沈降体積を測定するために、スラリーの一部を 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% = 自然沈降カラム体積 / 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 50%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。

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

(セルファイン MAX IB の場合、純水を使用時に $Cf = 1.35 \sim 1.4$ が最適となる。)

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.35 で最適なパッキング結果が得られる場合、必要な 50%スラリー量は以下の通り計算できる。

$$(100 \times 2) \times 1.35 = 270 \text{ mL}$$

ノート：コンプレッションファクターCf はカラム充填効率（付録 1 を参照のこと）に極めて重要な因子となる。最適化するためには必要に応じてカラムの圧縮を調節する必要がある。

- 8) 目標としているカラム体積にするために、カラム高さを計算する。
例えば、内径 2.5cm のカラムを使用して、100mL 体積のカラムとしたい場合、目標となるカラム高さは以下の様に計算できる。

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

- 9) 下部アダプターを所定の位置に取り付ける。カラム底部の出口を開けた後、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シリンジやポンプで除く。空気が入らないようにバッファーはカラム底部から 1cm 程度は残して置くが良い。
- 10) 必要に応じて、リザーバーをカラムの上部に設置した後、スラリーの全量をカラムに加える。
ノート： 手動でのパッキングの場合、均一な充填を達成するために、スラリーは一気にカラムに加えること。
- 11) カラム底部の出口のエンドフィッティングを閉める。
- 12) 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。
- 13) カラム底部の出口を開けてゲルを沈降させる。ゲルが沈降すると、充填用バッファーよりもゲルの方が早く沈降するため液面が透明になる。2～3 cm までバッファーが透明になったらカラム底部の出口を閉じる。
- 14) 注意深くバッファー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。
- 15) 上部アダプターを準備する。シリンジなどを利用して上部アダプターの流路に存在するすべての空気を除去して充填用バッファーで満たしておく。
- 16) カラムに上部アダプターを設置する。カラム内への空気の混入を避けること。
- 17) パッキングバッファーを 200 cm/h で、5 分間通液して、リークしていないことを確認する。次に 600cm/h または圧力 0.3 MPa で 30 分通液して充填剤を圧縮していく。
Note: この段階ではカラムの背圧*が 0.25～0.30 MPa になるように流速を調節すること。この流速は安定的なカラムパッキングを保証するために、充填後の操作流速よりも高流速である必要がある。
*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。その後カラム上部アダプターから充填用バッファーが流れるように流路を変更する（上部アダプターは外さないこと）。ゆっくりと上部アダプターを下げていく。上部アダプターから空気と充填用バッファーがあふれてくるようになる。上部アダプターを充填剤の表面の位置まで下げていく。
- 19) 上部アダプターから充填用バッファーを通液出来るようにした後、カラム底部の出口を開けて流速 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) ステップ7で計算したコンプレッションファクターを利用して目標となるカラム高

さにしたとき、カラム体積も目標体積となっているはずである。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。カラム体積は目標とするカラム体積に近づけるべきである。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に調製したスラリー濃度が薄い、ゲルが圧縮されすぎてコンプレッションファクターが計算よりも高くなっている可能性がある。この場合、再充填するかこの体積を受け入れる必要がある。この体積を受け入れる場合、カラム体積に従って、操作時の流速を変更すること。

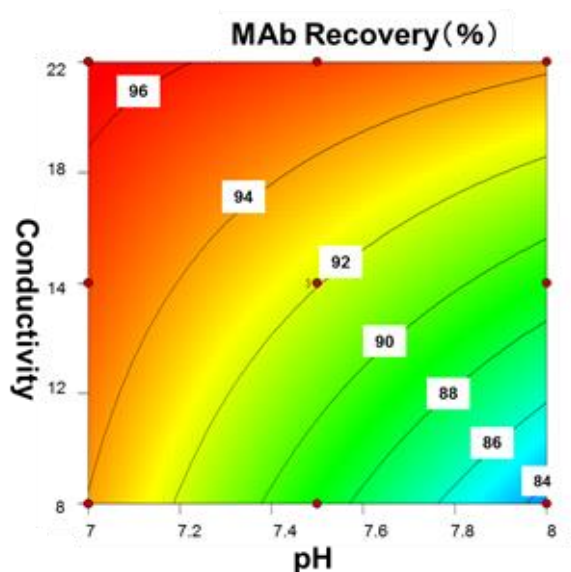
- 21) カラム充填効率は付録 1 に記載されるように HETP、非対称性 (As) を確認することで評価する。

操作ガイドライン

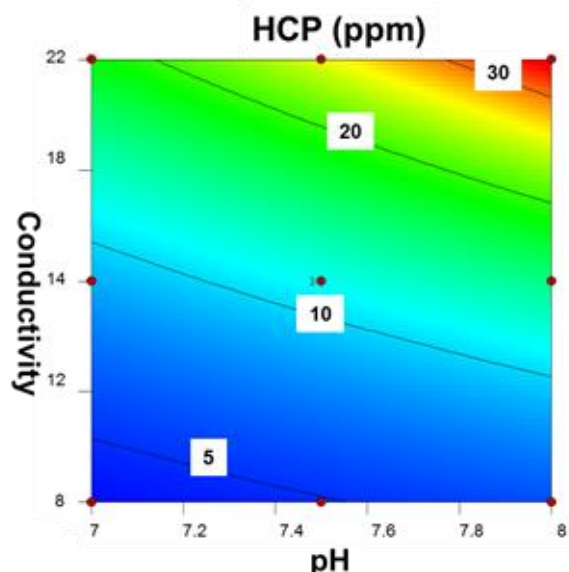
セルファイン MAX IB は一級アミノ基の陰イオン交換基とブチル基の疎水基をリガンドとしてミックスモードの特長を示す。この様な特徴を示すことから吸着と溶出の性能は pH と電気伝導度（イオン強度）の影響を強く受ける。このため操作条件は注意深く最適化すべきである。図 1 では実験計画法（DOE）による条件検討の結果を等高線で示している。パネル A では pH と電気伝導度をパラメータとして、モノクローナル抗体（mAb）の回収率が最適になるような条件をスクリーニングしている。パネル B では CHO 宿主タンパク質（HCP）の除去性能のスクリーニングを行っている。

図 1 mAb 体の回収率と CHO 宿主タンパク質除去性能を指標とした操作条件のスクリーニング

パネル A, モノクローナル抗体回収率



パネル B, HCP 除去率

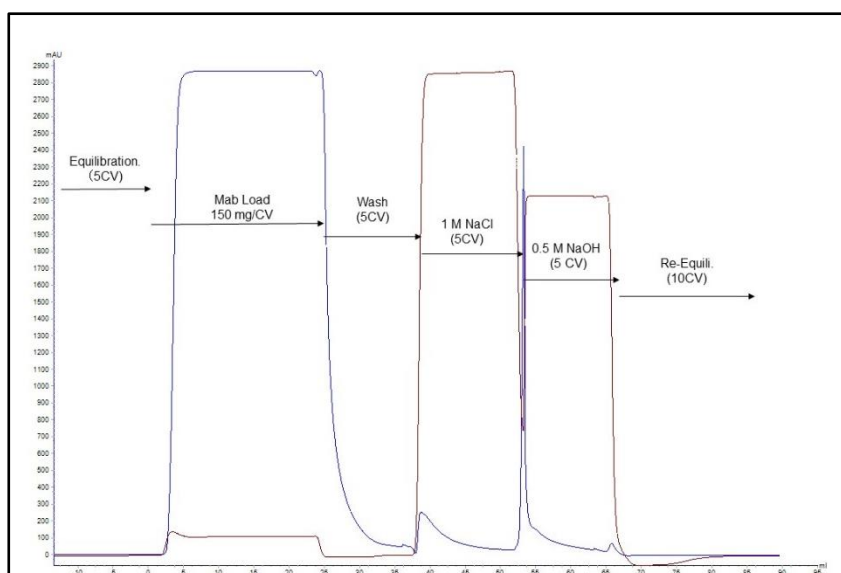


上述した等高性を用いることで、モノクローナル抗体の回収率を最大化しながら、CHO-HCP の除去を達成できる最適な操作条件（pH とイオン強度）を選択することができる。

プロテイン A 担体後の Mab のフローズルー精製

セルファイン MAX IB はプロテイン A クロマトグラフィー後のセカンドステップにおいて、フローズルーモード（目的物を素通りさせる操作法）での精製が可能なクロマトグラフィー充填剤である。図 2 では CHO 細胞培養によって得られたモノクローナル抗体発酵液をプロテイン A クロマトグラフィーで処理した後、セルファイン MAX IB でフローズルーモード精製した際の典型的なクロマトグラムを示している。

図 2 プロテイン A クロマトグラフィー後のフローズルー精製



セルファイン MAX IB を 5 mmID x 13.5 cmL (2.65 mL) のカラムに充填した後、平衡化バッファ（20 mM Tris-HCL pH 7.0）を流速 1.325 mL/min (407 cm/h) の条件でカラムを平衡化する。プロテイン A クロマトグラフィーによる吸着された抗体サンプルは 60 mM 酢酸, pH3.5 で溶出した。その後 60 分間のサン条件によるウイルス不活化を行った。次いで、塩基性の Tris バッファ、平衡化バッファを用いて pH 7.0 にした後、平衡化バッファや NaCl を用いて Mab 濃度を 18.0 mg/mL、電気伝導度 5 mS/cm に調製した。0.22um フィルターで不溶物を除去した後、150mg/mL 担体となるサンプル量をセルファイン MAX IB に通液して、フローズルー画分と平衡化バッファによる洗浄画分を回収した。カラム洗浄によってベースラインが安定した後、5 カラム体積 (CV) 分の NaCl で洗浄した。次に 5 CV 分の

0.5M NaOH で定置洗浄した。カラムは次の操作に備えるように 10 CV 分の平衡化バッファーで置換した。

上述の検討では、プロテインAクロマトグラフィー後の溶出サンプルを少ない操作でバッファー調製することができて簡便にサンプルを用意することができた。またフロースルーモード精製のため、Mab は高い回収率を示した。精製後の CHO-HCP、dsDNA (HCD)、リークプロテインA、抗体凝集物のプロファイルを表 2 に示す。表 2 では比較対象としてセルファイン MAX Q-h および市販デキストラン修飾アガロース Q 担体と比較している。これらの担体に関してもフロースルーモードによる精製を行った。

表 2 2ステップ精製後の不純物プロファイルと Mab 回収率

	Elution Buffer from ProA	HCP (ng/mg mAb)	Leak ProA (ng/mg_mAb)	Aggregate (%)	HCD (pg/mg mAb)	Recovery (%)
Loading solution	60 mM Acetate Buffer (pH 3.5)	72	3.0	1.7	10	100
Cellufine MAX Q-h		22	2.1	1.9	< 10	97
Polymer modified Agarose Q		27	2.1	1.8		96
Cellufine MAX IB		3	0.0	1.0		95

サンプルの準備とサンプルロード

サンプルに存在する不溶物を遠心分離かフィルターで取り除く。サンプル濃度は 1~20 mg/ml になるように平衡化バッファーで調製しておく。平衡化バッファーは pH とイオン強度を調節して、Mab が最大限回収できる条件にする。必要であればサンプルを透析、脱塩フィルター、脱塩カラムなどで脱塩して、目的のイオン強度になるように調製する。

推奨バッファー

平衡化バッファー: 10 - 50 mM リン酸 Na, 0 - 0.15 M NaCl, pH 6.0~9.0

または 10 - 50 mM Tris-HCl, 0 - 0.15 M NaCl, pH 7.5~9.0

溶出バッファー: 平衡化バッファーに 0.1 - 2.0 M NaCl を添加

再生と平衡化

サンプルの分離後、5 CV の高塩濃度の溶出バッファー (1~2 M NaCl を含む) で洗浄す

る。ついて 0.5 M NaOH によって定置洗浄することで再生する。定置洗浄後は 10 CV の平衡化バッファーを通過することで pH と電気伝導度は平衡化バッファーと同等になる。

脱パイロジェン

カラムに 5 CV の 0.2 M NaOH を通過して 16 時間静置する。その後 5～10 CV の蒸留水を通過する。最後に平衡化バッファーで平衡化する。0.2 M NaOH-20 % (v/v) エタノールを使用するとさらに効果的にエンドトキシンが除去される。さらに効率化したい場合、0.2 M NaOH-90% (v/v) エタノールを使用すると、2 時間でエンドトキシンを除去できる。

定置洗浄液 (CIP)

0.5 M NaOH を 3 CV、5 分間かけて通過するか、0.1 M NaOH で置換後に終夜で静置すること。

推奨する操作流速

セルファイン MAX IB 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る。このため高流速で安定的に使用できる。

- 線速 1,000 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 500cm/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)

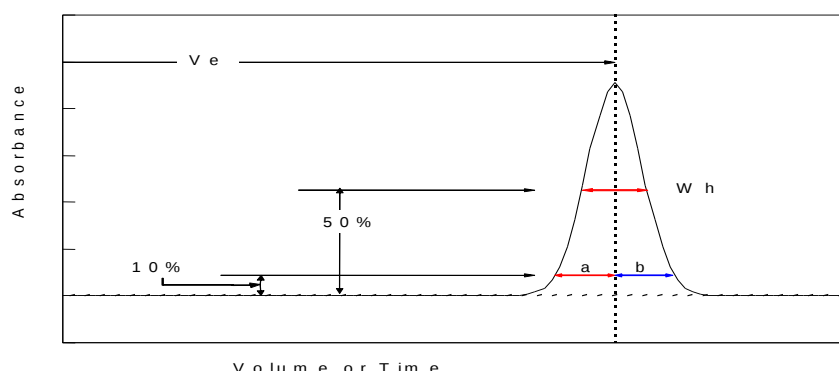
推奨保存方法

密閉して凍結しないように 2～8℃の冷蔵で保存する。常温で 4 週間までバルク状態およびカラム充填状態で短期保存できる。40℃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なかった。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℃の冷蔵で保存する。

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 (移動相 : 水および吸着バッファー) 1 M NaCl (移動相 : 0.1~0.4M NaCl 溶液)
流速 (cm/h)	30 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)



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。

計算式

$$HETP = L/N$$

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

$$As = b/a$$

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。

