

Cellufine™ MAX IB

プロテインAクロマトグラフィー後のポリッシング精製に 使用できるミックスモードクロマトグラフィー充填剤

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性を持つ特徴があることが知られている。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ある。ポリア릴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る。基本的な特長と化学安定性を表1に示す。

図1に示すように、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イオン交換と疎水相互作用のミックスモードとしての機能を付与している。セルファイン MAX IB は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ある。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ている。粒径が90μmの高度架橋セルロース粒子を使用しているため、バイオ医薬のダウンストリームプロセスの大型スケールでの使用に最適である。

図1 リガンドの構造

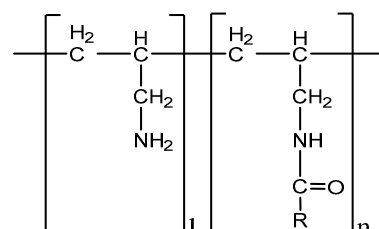


表1 セルファイン MAX IB の特長

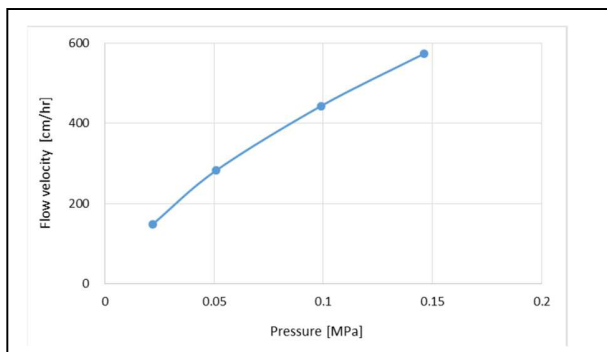
	特長
ベース担体	高度架橋セルロース粒子
平均径	平均 90 μm (40-130 μm)
リガンド	ポリア릴アミン、部分的にブチル基を修飾
イオン交換容量	> 80 μeq/mL
定置洗浄 (CIP)	0.5 M NaOH
滅菌	オートクレーブ 121°C、20 min
推奨洗浄条件*	エタノール (70%), イソプロパノール (30%), グアニジン HCL (6M) 尿素 (6M)

* カラム背圧が極めて高くなった場合、不純物のキャリーオーバー（次回クロマトグラフィーへの持ち込み）が発生している。この際にリストに記載の条件で洗浄する。カラムフィルターや充填剤の表層に不純物が蓄積している場合、それを除去するために使用時とは逆の方向で通液することを推奨する。

セルファイン MAX IB の流速特性

セルファイン MAX IB は高度に架橋されたセルロース粒子をベース担体として用いているため流速特性に優れている。図 2 に 10cm ID x L13 cm のカラムを用いて、移動相を純水（24℃±1）で通液した際の流速特性を示す。500 cm/h の流速を 0.3 MPa 以内の圧力で通液することができる。

図 2 圧力-流速カーブ



優れた塩耐性を持つセルファイン MAX IB

セルファイン MAX IB は一級アミノ基をリガンドとするため、通常のイオン交換クロマトグラフィー充填剤とは異なり、高塩濃度でもタンパク質を吸着する特長を持つ。表 2 に示されるように 0.2M NaCl を加えた条件においても、NaCl を加えていない条件と比較して、吸着性能の劣化はほとんど見られない。ブチル基のリガンド濃度はモノクローナル抗体よりも不純物を吸着するようにコントロールされている。

表 2 BSA 吸着性能に対する“塩耐性”

特長	値
BSA 吸着量 (静的吸着量)	64 mg/mL (low salt) ***
	59 mg/mL (high salt) ****
IgG 回収率 (フロースルーモード)	> 95%

*** 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

**** 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) + 0.2 M NaCl

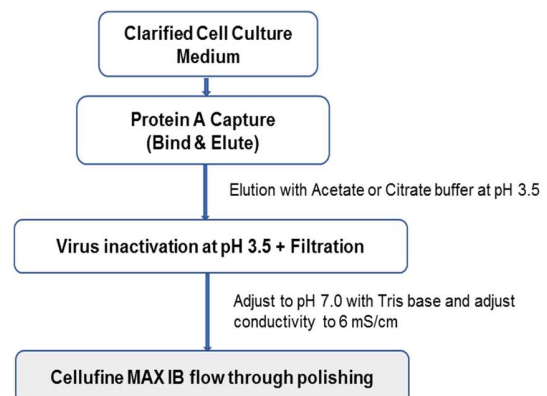
推奨する定置洗浄液（CIP）

0.5M NaOH での定置洗浄が可能。定置洗浄後は 20 %エタノールで、25℃で保存する。

プロテインAクロマトグラフィー後の Mab 精製

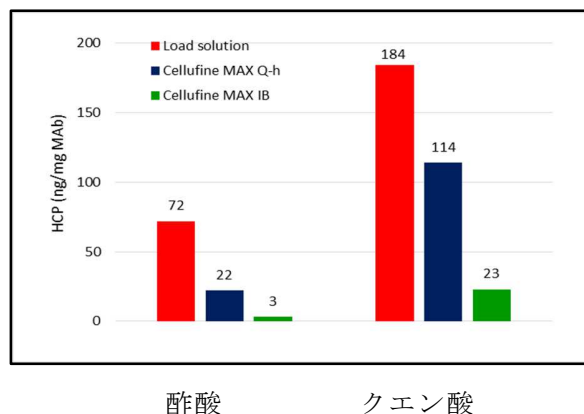
CHO 細胞培養によって得られたモノクローナル抗体（Mab）をプロテインAクロマトグラフィーで精製した。その後セルファイン MAX IB をフロースルーモード（目的物を素通りさせる操作法）で使用して、宿主由来タンパク質（HCP）の除去を行った（図 3）。

図 3 2 ステップ精製の工程手順



この実験では平衡化バッファの電気伝導度と溶出バッファのイオン種（クエン酸、酢酸）を評価した。比較対象として、セルファイン MAX Q-h や市販のデキストラン修飾アガロースイオン交換クロマトグラフィー充填剤を用いた。これらの担体では Mab がフロースルーするような pH 条件に平衡化バッファを調節した。実験結果を図 4 に示す。

図 4 プロテインA後のHCP除去



プロテインAクロマトグラフィーの溶出フラクションをフロースルーモードで精製した結果、セルファイン MAX IB は陰オン交換クロマトグラフィーセルファイン MAX Q-hと比較してHCPの除去に優れていた。またこのときの抗体回収率は95%

以上であった。酢酸バッファーでの除去が最もHCPの除去性能が優れていた。

次に宿主由来DNA(HCD)、および抗体凝集体の除去性能を確認した。これらの結果を表3に示す。充填剤を5 mm ID x 3 cm Lカラムに充填した後、平衡化バッファー(60 mM Tris-酢酸バッファー pH 7.0)で平衡化した。プロテインAクロマトグラフィーに吸着したモノクローナル抗体は60 mM 酢酸, pH 3.5で溶出した後、ウイルスを不活化した。次いでTrisバッファーでpH 7.0に調製した後、電気伝導度が6 mS/cmになるようにNaClや平衡化バッファーで希釈した。その後、サンプル内の不溶物を0.22 µm フィルターで除去してロードサンプルとした。ロードするサンプル量は190 - 200 mg Mab / mL-resinになるようにロードした。このときの流速は0.75 mL/min(滞留時間4分)とした。フロースルー画分を回収して、不純物を測定した。

表 3 プロテインAクロマトグラフィー後のフロースルー精製による不純物の評価

	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

結論

参考文献1で報告されているように、クエン酸ナトリウムなどの多価のバッファーは、陰イオン交換クロマトグラフィーの表面ゼータ電位を減少させる効果があり、結果としてタンパク質の吸着量を減少させる効果が見られた。セルファイン MAX IB の場合、クエン酸バッファーの効果は限定的だった。さらにHCP、溶出プロテインA、HCDの除去、および抗体凝集体の除去性能は優れていた(表3)。またセルファイン MAX IB は14 mS/cm (120 mM NaCl) のような高塩濃度の条件においてもHCPの優れた除去性能を示した。このことはプロテインAクロマトグラフィーの溶出サンプルを不活化した後、pHを7.0に調節すれば直接にセルファイン MAX IB にサンプルロードすることができることを示している。図2に示

したプロテインAクロマトグラフィー後にセルファイン MAX IB を用いる2ステップ精製は細胞培養由来のモノクローナル抗体の精製において、効率性の高い戦略である。

参考文献

1) Douglas B. Burns, Andrew L. Zydney. Buffer effects on the zeta potential of ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science Volume 172, Issues 1-2, 1 July 2000, Pages 39-48

注文情報

製品名	容量	カタログ No.
Cellufine MAX IB	5 x 1 ml ミニカラム	21-600-51
	1 x 5 mL ミニカラム	21-600-15
	10 mL	21600
	50 mL	21601
	100 mL	21602
	500 mL	21603
	5 L	21604
	10 L	21605

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 : 03-3243-6219

eメール: cellufine@jnc-corp.co.jp

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>