

セルロース系クロマトグラフィー担体（セルファイン）を用いた

効率的なモノクローナル抗体の精製方法

緒言

モノクローナル抗体（mAb）製造プロセスのダウストリーム（精製工程）では、プロテイン A カラム捕捉工程とポリッシングと呼ばれる不純物除去工程にクロマトグラフィー分離が採用されることが一般的である。このポリッシング工程では、イオン交換などの 2 ステップのクロマトグラフィーが使われることが多い。今回我々はこのポリッシング工程に使用される 2 つのカラムを連結し、更にフロースルーモードで使用する方法を紹介する（FT-FT モード、図 1）。この方法を用いることで、ポリッシング工程カラム間の pH や電気伝導度の調整などの面倒な操作を行うことなく、効率的に不純物除去を行うことができた。

実験方法

実験材料

プロテイン A 担体: セルファイン SPA-HC (JNC)

ミックスモード担体: セルファイン MAX IB (JNC)

陽イオン交換担体: セルファイン MAX GS と セルファイン MAX DexS HbP (JNC)

ガラスカラム: 5 mm I.D. x 25 mm H (max. 0.5 mL)

抗体を含んだ CHO 細胞培養上清: 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合(MAB 組合)より入手した。

HPLC カラム: TSKgel SuperSW mAb HR(東ソー)

HCP ELISA キット: CHO Host Cell Protein ELISA Kit, 3rd Generation F550 (Cygnus)

プロテイン A ELISA キット: Tosoh R40 and R28 Protein A Mix-N-Go ELISA F910 (Cygnus)

HCD qPCR キット: CHO DNA Amplification Kit in Tubes D555T (Cygnus)

FT-FT モード評価用ロード液の調製

抗体を含んだ CHO 細胞培養上清をプロテイン A 担体に向け、酢酸緩衝液で溶出した粗精製液を 0.1M 塩酸で pH を調製し、ウイルス不活化を行った。その後、pH 7.0(±0.1)、電気伝導度 6.0(±0.1) mS/cm となるようにトリス緩衝液と NaCl 溶液で調製し、緩衝液（20 mM AcOH-Tris pH7.0 + cond. 6 mS/cm NaCl）で mAb 濃度が 10 g/L となるように希釈した。

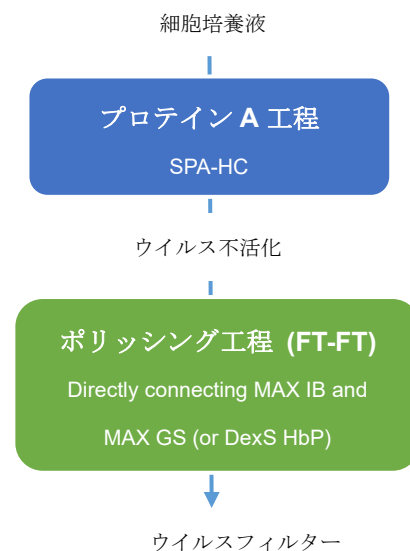


図 1. 新規な mAb 精製プロセス

FT-FT モードポリッシングクロマトグラフィー

ミックスモード担体 1 種と陽イオン交換体 2 種をそれぞれガラスカラムにパッキングして用いた。ミックスモード担体（セルファイン MAX IB）を前段カラム、陽イオン交換担体（セルファイン MAX GS もしくはセルファイン MAX HbP）を後段カラムとして図 2 に示すように連結して用いた。この連結したカラムに 305 mg(1020 mg/ml-resin)のモノクローナル抗体を含んだ試験液を流し、通過液を回収した。詳細なクロマトグラフィー条件を下記に示す。

カラム容量: 各 0.3 mL

カラムサイズ: 5 mm I.D. × 15 mm bed

流速: 0.075 mL/min

滞留時間: 4 min

ロードサンプル: 上述

ロード量: 29.5 mL

プログラム: 下記表 1 参照

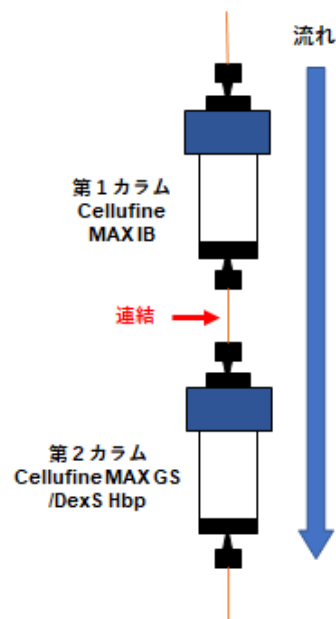


図 2. 連結カラム

Step	Buffer or sample	ロード量 (CV)	流速 (mL/min)	回収/廃棄
平衡化	20mM AcOH-Tris pH 7.0 + cond 6 mS/cm NaCl	2	0.075	廃棄
ロード	10.4 mg/mL mAb pH 7.0 + cond. 6 mS/cm NaCl (agg. 2.3%)	98	0.075	回収
押出し	20 mM AcOH-NaOH pH7.0 +cond. 6 mS/cm NaCl	15	0.075	回収

表 1. ポリッシング工程プログラム

分析

吸光度を測定し、 $1.4\text{AU}(A_{280}) = 1\text{ g/L of mAb}$ として濃度を算出した。抗体中の凝集体濃度は HPLC で測定した。不純物としての宿主細胞由来タンパク質 (HCP) およびリガンドプロテイン A の漏出量は ELISA 法によって測定し、残留 DNA は qPCR で定量した。

結果

測定結果をまとめたものを表 2 に示した。今回ミックスモード担体セルファイン MAX IB とそれに続く陽イオン交換体としてセルファイン MAX GS およびセルファイン MAX DexS HbP の二つを検討したが、いずれの場合も設定した基準をクリアする値となった。mAb の回収率としては、いずれも 90%以上であり、凝集体含有率は 1.0%であった。宿主細胞由来タンパク質は 10 ppm 程度まで低減し、漏出プロテイン A および宿主由来 DNA の量はいずれも検出限界以下まで低減した。

	ロード量 (mg/mL-resin)	抗体回収率 (%)	凝集体 (%)	HCP (ng/mg-mAb)	漏出 ProA (pg/mg-mAb)	DNA (pg/mg-mAb)
Requirement	-	> 90	< 2.0	< 100	<10	<10
Loading sample	-	-	2.3	648	5.1	<1
MAX IB / MAX GS	1020	93	1.0	13.8	<2	<1
MAX IB / MAX DexS HbP	1020	93	1.0	9.2	<2	<1

表 2. FT-FT ポリッシング結果

まとめ

抗体医薬品の精製プロセスにおいて、ポリッシング工程は不純物を除去する最後の砦となる重要なステップである。このポリッシング工程には従来、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性相互作用クロマトグラフィーを組合せて用いてきたが、これらクロマトグラフィーはそれぞれ異なる条件で最適なパフォーマンスを示すため、クロマトグラフィー間での追加設備（タンク、濾過装置など）や作業（バッファー交換、濃度調製など）が必要であった。このことはポリッシング工程を煩雑でコストのかかるプロセスにしている。

今回我々はポリッシング工程で使用する2つのクロマトグラフィーカラムを連結し、間に調製作業などを行わない FT-FT モードを実施、モノクローナル抗体の精製プロセスにおける不純物を十分に除去できることを確認した。強陽イオン交換体はモノクローナル抗体の精製において凝集体除去に有効な事が知られているが、2つのセルフイン強陽イオン交換体（セルフイン MAX GS とセルフイン MAX DexS HbP）もこの凝集体除去に有効である。また、混合モード担体であるセルフイン MAX IB は比較的広い条件でモノクローナル抗体の精製における不純物を吸着し、組み合わせる陽イオン交換体と同じ条件で使用することが可能である。こうしたユニークな特性を持ったセルフイン担体を使用することで抗体医薬の精製工程はより簡便なものになることが期待される。

謝辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（JP19ae0101057）」の支援によって行われた。