セルファインアフィニティ担体およびミックスモード担体を用いたモノクローナル抗体精製の２ステップ精製

セルファインは真球状の多孔性セルロース粒子の表面に様々なリガンド（官能基）を修飾したクロマトグラフィー充填剤です。抗体医薬、ワクチン、タンパク質製剤などバイオ医薬品の製造に使用されています。

抗体医薬は優れた薬効や低い副作用などの利点を受けて、低分子医薬品に代わる大きな市場を形成しています。しかし抗体医薬の主役であるモノクローナル抗体はタンパク質であることから、高度な精製技術が必要となります。精製工程の主役となるプロテインAクロマトグラフィーは、極めて高価で製造コストを圧迫する主要因となりますので、コストパフォーマンスに優れた充填剤の選定が重要です。ＪＮＣは担体コストと性能を両立させた世界最高水準のプロテインＡクロマトグラフィー充填剤「セルファインSPA-HC」を販売してきました。しかしプロテインＡクロマトグラフィーはタンパク質をリガンドとするためダウンストリームプロセスに占めるコストは高くなります。別のアプローチとして、精製工程のステップそのものを省略することがコスト低減には有効です。

この報告ではプロテインＡクロマトグラフィーによるキャプチャー工程と、セルファインMAX IBによるポリッシング工程の2ステップ精製で、モノクローナル抗体の高純度精製を達成する方法を報告しています。2ステップ精製を実現することで、ダウンストリーム精製の設備投資を抑え、ランニングコストの低減が図れます。

１．精製の概要

CHO 細胞培養によって生じた不純物には宿主細胞由来の夾雑物（Host Cell Protein = HCP）や、宿主細胞由来の DNA 断片、プロテイン A クロマトグラフィー工程時に生じる漏出したプロテイン A 断片などがある。これら複雑な不純物を除去するステップとして、２つのクロマトグラフィー工程（2 ステップ精製）での精製を試みた。

１）プロテイン A クロマトグラフィー

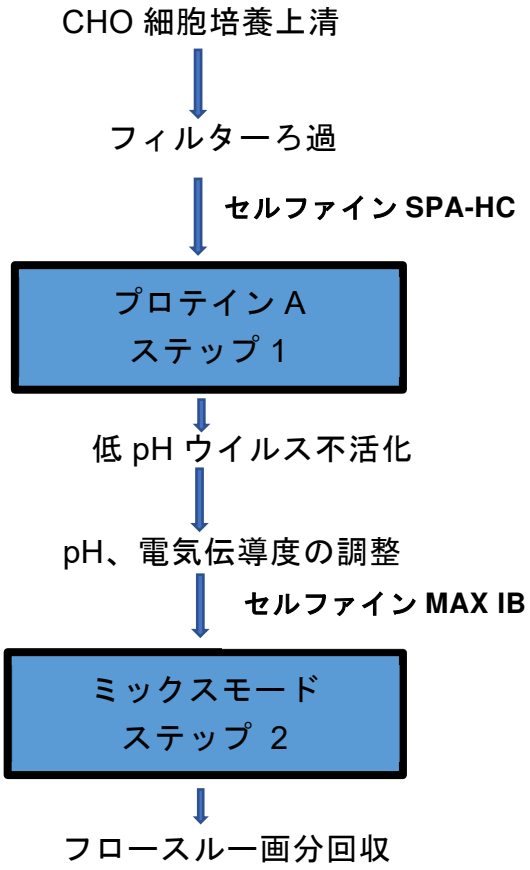
CHO 細胞由来の複雑な不純物を精製する第 1 ステップとなる工程となる。抗体とアフィニティー活性がある Staphylococcus aureus 由来のプロテイン A を固定化したクロマトグラフィーカラムによって、不純物の 99%以上を取り除く重要なステップとなる。セルファインではアルカリ耐性の高い組換えプロテイン A リガンドを固定化したセルファイン SPA-HC を販売している。独自の粒径制御技術により吸着量と耐圧性のバランスを極限まで高めた

設計となっている。このため高流速、高吸着によるコストパフォーマンスの高いクロマトグラフィー充填剤となっている。

2）ミックスモードクロマトグラフィー

第 2 ステップでは、ミックスモードクロマトグラフィーを使用した。プロテイン A では除去が不十分な抗体の凝集体、プロテイン A 漏出タンパク質、宿主由来夾雑物を基準以下に精製することができる。今回検証したプロセスではこのステップをフロースルーモードで使用した。つまり目的物である抗体をカラムに素通りさせて、不純物をカラムに吸着させる方法である。セルファインでは 2 ステップ精製を実現させるミックスモードクロマトグラフィーとして**セルファイン MAX IB** を販売している。

図 1　モノクローナル抗体精製手順



3）精製手順のまとめ

今回の精製手順のフローを図 1 に示す。細胞培養後の抗体サンプルを 2 つのクロマトグラフィー工程で精製した。

2．プロテイン A クロマトグラフィー

セルファイン SPA-HC を JNC（株）が販売するエンプティカラム「Empty 5 mL Mini Column　(ID.14.6mm x H 30mm, カタログ No.: EMC5SK)」に充填した。

培養細胞を除去した後、0.22um フィルターで不溶性分を除去した CHO 細胞培養上清を用意した。

プロテイン A クロマトグラフィー工程による精製結果を図 2 に示す。

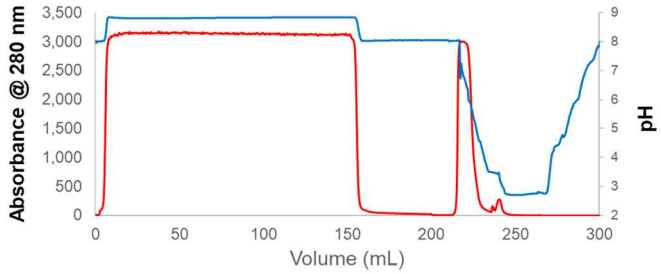


図 2．セルファイン SPA-HC 工程

カラム条件

カラム: 5mL ミニカラム（1.46 cm ID x H3.0 cm）

サンプルロード:10% DBC（4 分）の 80%量 = 200mg

抗体濃度: 5mg/mL

流速: 1.25 mL/min = 滞留時間 4min

溶出: 10 CV、60 mM 酢酸 pH 3.5

抗体の回収率は 93%と良好な結果を得た。回収したモノクローナル抗体と、CHO 細胞培養上清のモノクローナル抗体を HPLC カラムで分析したところ、2 量体以上の凝集体が効率よく除去されていることが判った（図 3、表 1）。

サンプル	培養上清 %	SPA-HC 溶出画分 %
高分子凝集体	21.3	3.9
IgG 二量体	10.1	6.0
IgG 単量体	68.6	90.2

表１ セルファイン SPA-HC による凝集体除去

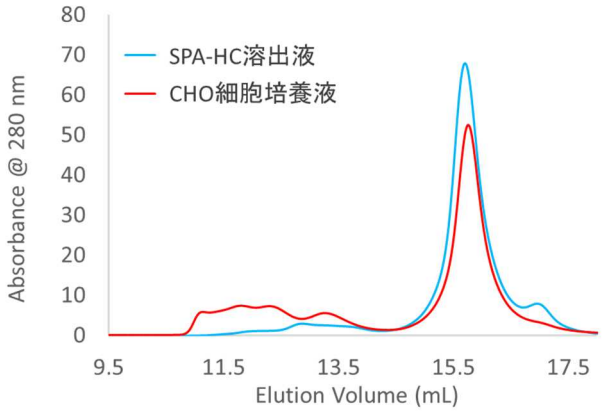


図３ セルファイン SPA-HC による凝集体の除去

HPLC カラム：TSK gel Super SW mAb HR

移動相：200 mM リン酸 Na pH 6.7 + 0.1M 硫酸 Na

検出器：PDA 280 nm

驚くことにプロテイン A クロマトグラフィー工程を経ることでモノクローナル抗体の凝集体が減少した。このことは、後工程のポリッシング工程において、クロマトグラフィーの負荷を減らすことができることを示している。これはセルファイン SPA-HC のプロテイン A リガンドが一般的に使用される Z ドメインではなく C ドメインを修飾したプロテイン A リガンドを使用していることに起因しているのかもしれない。

３．ミックスモードクロマトグラフィー

ポリッシング工程としてミックスモードクロマトグラフィーを用いたフロースルー精製を行った。すなわち不純物をカラムに吸着して、モノクローナル抗体はカラムを素通りさせる方法である。

ポリッシング工程では、セルファイン独自のミックスモードクロマトグラフィー充填剤であるセルファイン MAX IB を用いた。まずセルファイン SPA-HC による精製で得られた溶出画分を 1.0 M トリスバッファーで pH7.0、電気伝導度 6 mS/cm になるように調製した。その後、カラムに使用する前処理として 0.22μm PES フィルターでろ過した。セルファイン MAX IB でのクロマトグラフィー精製結果を示す（図４）。

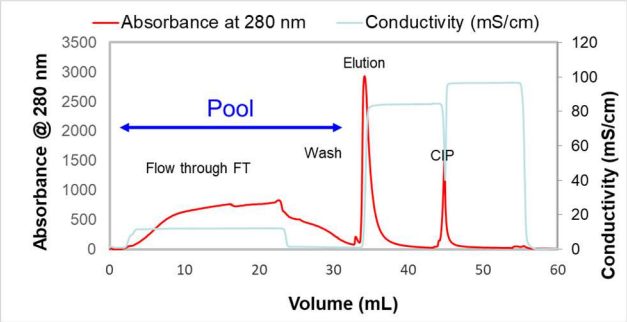


図４．セルファイン MAX IB のポリッシング工程

カラム条件

カラム: 1mL ミニカラム

平衡化バッファー：10 CV of 60 mM 酢酸 Na pH 7

サンプルロード:20 mL(抗体量として 120mg)

抗体濃度:6 mg/mL

流速: 0.25 mL/min = 滞留時間 4min

溶出: 1M NaCl

定置洗浄：0.5M NaOH

1mL ミニカラムに充填されたセルファイン MAX IB を 10 CV（カラム体積）の平衡化バッファー（60 mM 酢酸ナトリウムバッファー, pH 7.0）で平衡化した。サンプルは抗体濃度を 6mg/mL に調製したものを 20 mL（抗体量として 120 mg）をカラムに通した。フロースルー画分を抗体サンプルとして回収した。次いで 5CV の平衡化バッファーでカラムを洗浄しな

がら洗浄液をフロースルー画分に加えて回収した。カラムに吸着された分子を回収するために 1 M NaCl を 5CV 通液して溶出した。定置洗浄は 0.5M NaOH を使用した。

図 4 のクロマトグラムに示されるように、サンプルロード直後から目的物であるモノクローナル抗体の UV ピークが検出された。モノクローナル抗体の回収はフロースルーしたサンプルならびに５CV 分の洗浄液を回収した。

回収したモノクローナル抗体画分の不純物の残留量を確認した（表 2）。精製された抗体画分の回収率は 81%となり、一部の抗体はセルファイン MAX IB に吸着されていた。

サンプル	回収率 %	HCP ppm	漏出プロテイン A
ロード	-	9.5	3.9
抗体画分	81	3.9	0.5
溶出	9.1	11.5	3.4

表 2　MAX IB 後の不純物

セルファイン MAX IB に吸着された抗体の性質を確認するために HPLC カラムによる抗体の分析を行った。

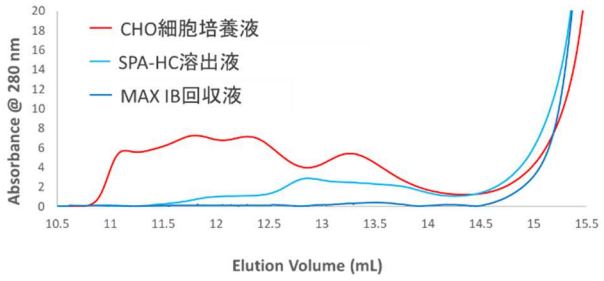


図 5 HPLC による凝集体の分析

HPLC カラム：TSK gel Super SW mAb HR

移動相：200 mM リン酸 Na pH 6.7 + 0.1M 硫酸 Na

検出器：PDA 280 nm

セルファイン MAX IB を素通りしたモノクローナル抗体画分から抗体の凝集体が効率よく除去されていることが判った（図 5, 表 3）。

今回の CHO 細胞培養液の凝集体は二量体が 10.1%、高分子凝集体が 21.3%と極めて多いサンプルを使用した。一般的に凝集体は培養工程のコントロールで減少させることが可能である。今回の検討ではセルファイン MAX IB の性能を評価するため、このような凝集体の多いサンプルを使用した。

	培養液 %	SPA-HC 溶出液 %	MAX IB 回収 %
凝集体	21.3	3.9	0.6
二量体	10.1	6.0	1.9
単量体	68.6	90.2	97.6

表 3 ステップごとの凝集体の推移

モノクローナル抗体の凝集体は CHO 細胞培養上清の 21.3%から 0.6%まで明瞭に減少させることができた。二量体は CHO 細胞培養上清の 10.1%から 1.9%まで減少させることができた。

まとめ

セルファインを用いて CHO 細胞によって培養されたモノクローナル抗体を２つのクロマトグラフィー工程で高純度に精製する方法を紹介しました。今回紹介したセルファイン SPA-HC とセルファイン MAX IB の 2 ステップ精製は、宿主由来タンパク質（ＨＣＰ）、漏出プロテインＡ、抗体の凝集体を効率よく、合理的なレベルまで精製することができる画期的な方法と言えます。細胞培養技術の進展に伴って、モノクローナル抗体の発酵力価が増加しています。それに伴って抗体の凝集物が多く形成されるなどの副作用も問題となってきました。今回紹介した２つのクロマトグラフィーの工程を経ることで抗体凝集体を含む不純物を極めて高純度に除去することができました。2 ステップ精製はモノクローナル抗体のダウンストリーム工程においてコストの削減、リードタイムの短縮化に寄与する優れた方法と言えます。

最後に今回の検証で得られた一連の不純物のプロファイルを表 4 に示します。

工程	CHO-HCP	ProA リーク量	抗体凝集物	回収率
	[ppm]	[ppm]	[%]	[%]
CHO 培養上清	56342	-	31.4	-
セルファイン SPA-HC	17.9	4.3	9.9	92.8
セルファイン MAX IB	4	0.5	2.5	75

表 4 2 ステップクロマトグラフィーの不純物プロファイル

製品に関する情報案内

製品の詳細な情報はホームページを閲覧下さい。

セルファイン SPA-HC
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-9/
セルファイン MAX IB
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-8/
取扱説明書および技術資料は以下のホームページから pdf でダウンロードできます。
https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/

ご注文の案内

日本語名称	パックサイズ	カタログ No.	価格（円）
セルファイン SPA-HC	1ml x 1 (Mini-Column)	21900-11	33,000
	1ml x 5 (Mini-Column)	21900-51	55,000
	5ml x 1 (Mini-Column)	21900-15	55,000
	10ml	21900	71,500
	50ml	21901	お問い合わせ
	500ml	21902	お問い合わせ
	5 lt	21903	お問い合わせ
	10 lt	21904	お問い合わせ
セルファイン MAX IB	1ml x 5 (Mini-Column)	21600-51	17,880
	5ml x 5 (Mini-Column)	21600-15	17,880
	10ml	21600	12,390
	50ml	21601	29,500
	100ml	21602	468,000
	500ml	21603	お問い合わせ
	5 lt	21604	お問い合わせ
	10 lt	21605	お問い合わせ

各種お問い合わせ、技術に関するご案内

（北米 & ヨーロッパ）
JNC America, Inc.
411 Theodore Fremd Avenue, Suite 206 South,
Rye, NY 10580

Tel: 914-921-5400
Fax: 914-921-8822
Email: 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: 03 3243 6150
Fax: 03 3243 6219
Email: cellufine@jnc-corp.co.jp