

セルファインによる CHO 細胞培養上清からのモノクローナル抗体精製

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、高純度に精製するためには高度な技術が必要となります。また精製に用いるクロマトグラフィー充填剤は各社から市販されていますが、リガンド量や表面分布状況、粒子径、耐圧性など複雑な因子によって、各社独自の性能の違いが見られます。また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。

セルファインでは抗体医薬を精製するために必要な3つの充填剤、すなわちプロテインAクロマトグラフィー「セルファインSPA-HC」、陰イオン交換クロマトグラフィー「セルファインMAX Q-h」、陽イオン交換クロマトグラフィー「セルファインMAX GS」をラインナップしています。これらの充填剤は高流速に耐えられるようにJNC（株）独自の高度架橋技術によって高機能化された多孔性セルロース粒子を担体としています。

この報告ではセルファインによるCHO細胞培養上清からの3ステップ精製の実例を紹介します。セルファインを用いることでモノクローナル抗体を高純度で精製することができました。

1. 精製の手順

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、3つのクロマトグラフィー工程を経る必要がある。

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) 陰イオン交換クロマトグラフィー

第2ステップでは陰イオン交換クロマトグラフィーを使用した。この工程では負に帯電している宿主由来のDNA断片を始め、第1ステップでリークしたプロテインAリガンド、HCPなどを取り除くことができる。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。セルファインでは耐圧性および高吸着性を発揮する**セルファイン MAX Q-h** を販売している。

3) 陽イオン交換クロマトグラフィー

第 3 ステップでは最後の不純物を精製して原薬水準まで精製度を高めることになる。不純物には HCP、プロテイン A リーク断片などが微量に存在している。しかし抗体の 2 量体をはじめとする重合体も深刻な不純物であろう。

今回の検討では**セルファイン MAX GS** を使用した。セルファイン MAX GS はモノクローナル抗体の単量体と重合体を分離することができる画期的な強陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤として開発した。近年の細胞培養技術の向上によって抗体の発酵力価は上昇したが、抗体の重合体が多く形成されて深刻な不純物となっている。セルファイン MAX GS はこの問題を解決するのに有効な選択肢となる。

4) 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 3 つのクロマトグラフィー工程で精製することになる。

2. プロテイン A クロマトグラフィー工程

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

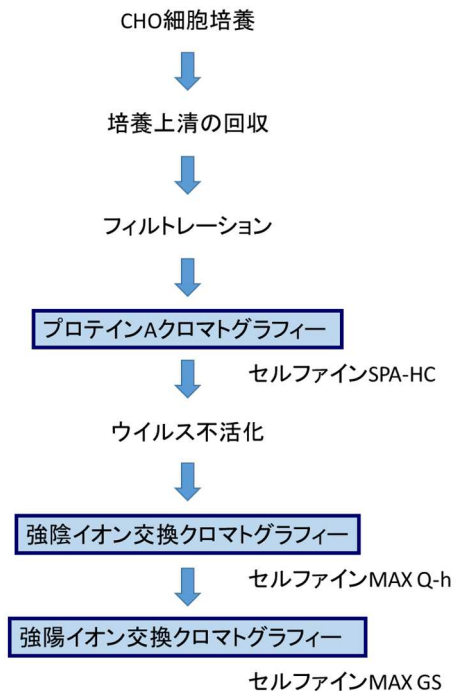


図 1 モノクローナル抗体精製手順

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 (抗体濃度 1.01mg/mL) を用意した。

プロテイン A クロマトグラフィー工程は図 2 に示される条件で行われた。

カラムにロード (通液) する CHO 細胞培養上清サンプル量は以下のように計算した。セルファイン SPA-HC の滞留時間 4 分における 10% ブレークスルーポイント時の動的吸着量は 67mg/mL であった。これは 10% の抗体が漏れ出てくる時点での動的吸着量のため、抗体が漏れ出てこないように、動的吸着量の 80% の抗体量をロードすることにした。

$$67 \times 0.8 = 53.6 \text{ mg mab/ mL-column}$$

工程	通流量 [CV]	バッファー
平衡化	5	20 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH7.5
サンプル ロード	267 mL	mab supernatant 1.0 mg_mab/ml
洗浄	10	20 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH7.5
溶出	5	60 mM Acetate-Na, pH3.5
酸洗浄	5	0.1M AcOH
洗浄	3	20 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH7.5
CIP	5	0.1M NaOH
平衡化	10	20 mM Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH7.5

図2. セルファイン SPA-HC 工程の条件一覧

カラム: Empty 5 mL Mini Column

(ID. 14.6mm x H 30mm, カタログ No.: EMC5SK)

流速: 1.265 ml/min (滞留時間 4分)

カラム 1mL に吸着される抗体量は 53.6mg となる。今回は 5mL カラムを使用するため、268mg の抗体量をロードすることができる。CHO 細胞の抗体濃度は 1.0mg/mL のため、今回の場合 268mL の CHO 細胞培養液をロードすることが可能と計算できる。

セルファイン SPA-HC のクロマトグラムを図3に示す。

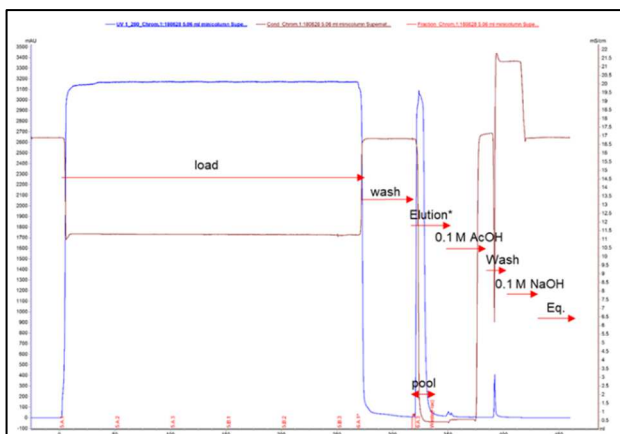


図3. セルファイン SPA-HC のクロマトグラム

青線は 280nm の UV 値、茶色は電気伝導時計のチャートを表す。

カラムに吸着したモノクローナル抗体は溶出液として 60 mM 酢酸ナトリウム (pH3.5) を 5 CV (カラム体積量) 流すことで回収した。モノクローナル抗体を回収後に、残存する不純物を測定した結果を図4に示す。

モノクローナル抗体の回収量は 95%となり、ロードサンプル量に対して高い回収量となった。今回は溶出液を 5 CV 回収したが、溶出液をさらに回収すれば回収率は高くなる。しかしこの場合、回収液量も増加するため、その後の工程に影響を与えるため注意が必要である。

CHO 細胞培養液の宿主由来タンパク質 (HCP) をクロマトグラフィー前後で比較したところセルファイン SPA-HC の工程で 99.7%の不純物がモノクローナル抗体から除去されていた。この結果からもわかるように、プロテイン A クロマトグラフィー工程が、抗体医薬精製において極めて重要な精製工程であることが判る。

工程	CHO-HCP [ppm]	ProA リーク量 [ppm]	抗体 凝集物 [%]	回収率 [%]
CHO 培養上清	928000	-	-	-
セルファイン SPA-HC	2350	14.2	1.8	95

図4 プロテイン A 工程後の不純物

CHO-HCP (CHO 細胞培養由来の宿主タンパク質) および ProA リーク量 (プロテイン A リガンド漏出量) は市販の ELISA キットで測定した。抗体の回収率は Abs280nm で測定。抗体凝集体濃度は SEC カラムを用いて分析した。

3. 酸処理によるウイルス不活化

プロテイン A クロマトグラフィー工程後に、回収されたモノクローナル抗体サンプルを酸性条件にしてウイルス不活化した。モノクローナル抗体サンプルに 1M 酢酸を加えて pH3.4 に

調製して1時間、室内で静置した。

ウイルス不活化後に、1M Tris-HCl および超純水を用いてモノクローナル抗体サンプルを pH7.5、電気伝導度 6 mS/cm になるように調整して次のクロマトグラフィー工程のサンプルとした。

4. 陰イオン交換クロマトグラフィー工程

プロテイン A クロマトグラフィー工程後のステップには陰イオン交換クロマトグラフィーによる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。セルファインには多くの陰イオン交換クロマトグラフィー充填剤をラインナップしているが、その中でも吸着量が高く、耐圧性の高いセルファイン MAX Q-h を使用した

陰イオン交換クロマトグラフィー工程は図5に示される条件で行われた。

工程	通液量 [CV]	バッファー
平衡化	5	20 mM Tris-HCl , pH7.5
サンプルロード	26.5 mL	7.40 mg_mab/ml, pH7.5, 6 mS/cm
洗浄	5	20 mM Tris-HCl , pH7.5
塩洗浄	5	1M NaCl
CIP	5	0.5M NaOH
平衡化	15	20 mM Tris-HCl , pH7.5

図 5. セルファイン MAX Q-h 工程の条件一覧

カラム: Empty 1 mL Mini Column

(ID. 6.7mm x H 30mm, カタログ No. : EMC1SK

流速: 0.265 ml/min (滞留時間 4分)

充填剤: セルファイン MAX Q-h

今回の検討ではプロテイン A クロマトグラフィー工程後のステップは陰イオン交換クロマトグラフィーによるフロースルーモードでの精製を試みた。従って図 6 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ロード量を回収することとなる。

続いてカラム内に残存した不純物を 1M 塩化ナトリウム水溶液で洗浄したとこ UV ピークが検出された。CIP 溶液を通液した後も同様に UV ピークが検出されており、モノクローナル抗体サンプルから不純物が除去されていることがうかがえる。

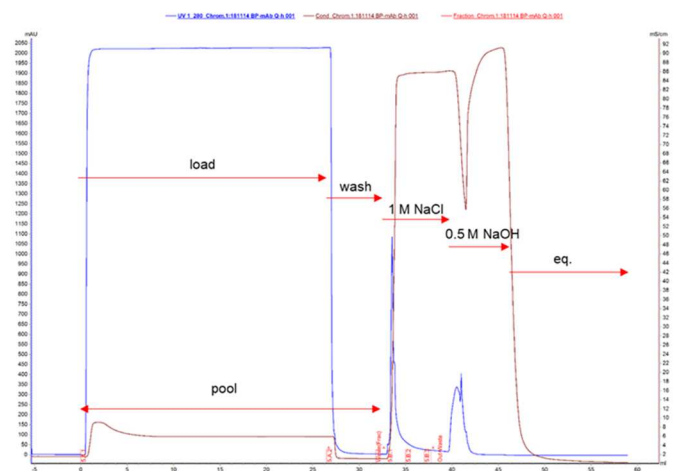


図 6. セルファイン MAX Q-h のクロマトグラム

青線は 280nm の UV 値、茶色は電気伝導時計のチャートを表す。

回収したモノクローナル抗体サンプルの不純物の残留量を確認した結果を図 7 に示す。セルファイン SPA-HC 後に残存していた宿主細胞由来タンパク質 (HCP) は 49ppm まで減少させることができた。またモノクローナル抗体の回収率は 98% と、サンプルロード量に対して極めて高い回収率を示した。これはサンプルロード時に調製したバッファー条件において、モノク

ローナル抗体がカラムに吸着されず、完全にカラムを通過したことを示している。

工程	CHO-HCP [ppm]	ProA リーク量 [ppm]	抗体凝集物 [%]	回収率 [%]
セルファイン SPA-HC	2350	14.2	1.8	95
セルファイン MAX Q-h	49	8	1.2	98

図 7 陽イオン交換クロマトグラフィー後の不純物

測定方法は図 4 に記載の方法で測定。

今回の検討ではサンプルを pH7.5、電気伝導度を 6 mS/cm の条件に調製したが、モノクローナル抗体の種類によって等電点は異なるため、予めカラムに吸着しない条件を選定して条件を確定させる必要がある。

5. 陽イオン交換クロマトグラフィー工程

最終ステップでは陽イオン交換体による精製を試みた。このステップでは細胞培養時に生じるモノクローナル抗体の凝集体を除去して原薬水準まで精製度を上げる必要がある。ここでは抗体の凝集体を選択的に除去することができるユニークな強陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤セルファイン MAX GS を用いて検証した。

前ステップで得られたモノクローナル抗体サンプルを 1M 酢酸および超純水を用いて pH5、電気伝導度 6mS/cm に調製してロードサンプルとした。陰イオン交換クロマトグラフィー工程は図 8 に示される条件で行われた。

工程	通液量 [CV]	バッファー
平衡化	5	20 mM Acetate-Na + 50 mM NaCl, pH5.0
ロード サンプル	10.7 mL	7.40 mg_mab/ml, pH5.0, 6 mS/cm
洗浄	5	20 mM Acetate-Na + 50 mM NaCl, pH5.0
溶出	10	20 mM Acetate-Na + 0.19 M NaCl, pH5.0
塩洗浄	5	1M NaCl
CIP	5	0.5M NaOH
平衡化	20	20 mM Acetate-Na + 50 mM NaCl, pH5.0

図 8 セルファイン MAX GS 工程の条件一覧

カラム: Empty 1 mL Mini Column

(ID. 6.7mm x H 30mm, カタログ No.: EMC1SK)

流速: 0.265 ml/min (滞留時間 4分)

充填剤: セルファイン MAX GS

最終ステップのセルファイン MAX GS ではモノクローナル抗体をカラムに吸着させる吸着モードで精製を行った。クロマトグラムを図 9 に示す。

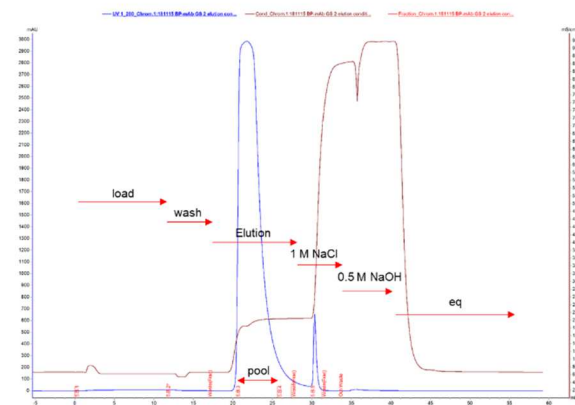


図 9 セルファイン MAX GS のクロマトグラム

青線は 280nm の UV 値、茶色は電気伝導時計のチャートを表す。

クロマトグラフィー後に回収したモノクローナル抗体の不純物量を図 10 に示す。最終的に宿主細胞由来タンパク質量は 5ppm、プロテイン A リーク量は 0.2ppm、抗体凝集物は 0.5% の純度まで達成することができた。

工程	CHO-HCP [ppm]	ProA リーク量 [ppm]	抗体 凝集物 [%]	回収率 [%]
セルファイン MAX Q-h	49	8	1.2	98
セルファイン MAX GS	5	0.2	0.5	90

図 10 陽イオン交換クロマトグラフィー後の不純物

測定方法は図 4 に記載の方法で測定。

回収率に関しては90%と少し低い結果となった。これはカラムに吸着した抗体が溶出しなかったわけではなく、溶出時の回収液量を少なく回収したことに起因する。セルファイン MAX GS のユニークな特徴は凝集体がモノクローナル抗体の単量体に対して、より強固にカラムに吸着することである。そこで溶出時の回収量を変化させることで抗体凝集体不純物を低減させることができる。

余談だが、通常の S リガンドを持つ強陽イオン交換クロマトグラフィー充填剤ではモノクローナル抗体と凝集体を選択的に除去することはできない。このため抗体凝集体が多いサンプルを精製したい場合にはセルファイン MAX GS の選択を推奨している。

まとめ

この技術コラムでは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 3 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。最近では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。セルファインでは今回紹介した 3 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した検討事例を紹介しました。この方法はモノクローナル抗体の種類に依存せず堅牢性が高く、抗体医薬の精製に有効に使用できます。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図 11 に示します。

工程	CHO-HCP [ppm]	ProA リーク量 [ppm]	抗体凝集物 [%]	回収率 [%]
CHO 培養上清	928000	-	-	-
セルファイン SPA-HC	2350	14.2	1.8	95
セルファイン MAX Q-h	49	8	1.2	98
セルファイン MAX GS	5	0.2	0.5	90

図 11 3 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.html>

セルファイン MAX Q-h、セルファイン MAX GS

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-6.html>

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/index.html>

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 Q-h	Robo Column® 5-10	20600-802	お問い合わせ
	1ml x 5 (Mini-Column)	20600-51	14,900
	5ml x 5 (Mini-Column)	20600-55	38,600
	100ml	20600	26,000
	500ml	20601	88,000
	5 lt	20602	お問い合わせ
	10 lt	20603	お問い合わせ
	セルファイン MAX GS	1ml x 5 (Mini-Column)	21300-51
5ml x 5 (Mini-Column)		21300-55	38,600
100ml		21300	31,200
500ml		21301	118,640
5 lt		21302	お問い合わせ
10 lt		21303	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.
555 Theodore Fremd Ave,
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