

ラボスケールにおける リコンビナント抗体大量調製フローの効率化

本報では、川合 重人 様（株式会社未来創薬研究所）が構築されたリコンビナント抗体の大量調製フローをご紹介します。培養スケール 10 L における抗体調製の効率化を試みた例で、細胞培養装置 WAVE Bioreactor SYSTEM 2/10EH や限外ろ過装置 QuixStand System を用いることで、従来の方法より抗体調製にかかる時間が大幅に短縮され、かつ抗体収量をあげることが可能になりました。

データ提供・執筆：株式会社未来創薬研究所 川合 重人 様

①はじめに

我々は新規抗体医薬のシーズ探索を目的とし、モノクローナル抗体やそのキメラ抗体を作製し免疫組織化学染色による発現解析や *in vitro* / *in vivo* 薬効評価を行っている。キメラ抗体等のリコンビナント抗体の *in vivo* 評価では 100 mg レベルの抗体量が必要となるため、抗体の調製に労力が必要である。今回 GE ヘルスケア バイオサイエンス社の機器を用い、抗体を大量調製するシステムを構築したので報告する。

新しく構築したフローと従来のフローの流れについては、図 2 を参照いただきたい。

②リコンビナント抗体の産生

リコンビナント抗体の産生には浮遊細胞である CHO 細胞株 DG44 (Invitrogen) を用い、培地には CHO-S-SFM II (Invitrogen) を用いた。WAVE Bioreactor 用培養バッグ CELLBAG10L/S を 2 枚用い、細胞密度： 5×10^4 cells/ml、容量：2 L/バッグの条件で細胞を播種し、WAVE Bioreactor にて揺動速度 15 rpm、揺動角度 6° 、5% CO_2 通気量 0.2 L/min、 37°C にて培養を行った。4 日後に培地を追加し計 5 L/バッグとし、揺動速度を 25 rpm、揺動角度を 7° に

変更し培養を続けた。また、同じ細胞密度、容量で播種し、5% CO_2 インキュベーターにて従来のフラスコ培養を行い、比較対照とした。

（結果）

培養上清中の抗体濃度、生細胞密度および生細胞率を経時的に測定した（図 1）。WAVE Bioreactor を用いた条件では、12 日間培養後に生細胞率が 20% を下回った時点で培養上清を回収した。従来法では 10 日間培養後に生細胞率がほぼ 0% になった時点で培養上清を回収した。WAVE Bioreactor を用いた培養法では途中で培地を追加したため、従来法と比べて培養期間が延長できたと考えられた。培養終了時における抗体濃度は WAVE Bioreactor を用いた培養法では 21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、従来のフラスコ培養法から得られた 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ よりも抗体産生量が増加した。また、培養終了後に行う器具の廃棄についても効率化された。培養に用いたものはオートクレーブ処理をしてから廃棄するが、培養に使ったフラスコでは 1 回のオートクレーブで処理できる数が限られた。これに対し WAVE Bioreactor で用いる培養バッグ (CELLBAG) は畳んでオートクレーブができるため、廃棄にかかる時間を 1/5 に短縮することができた。（10 L 培養時での比較）

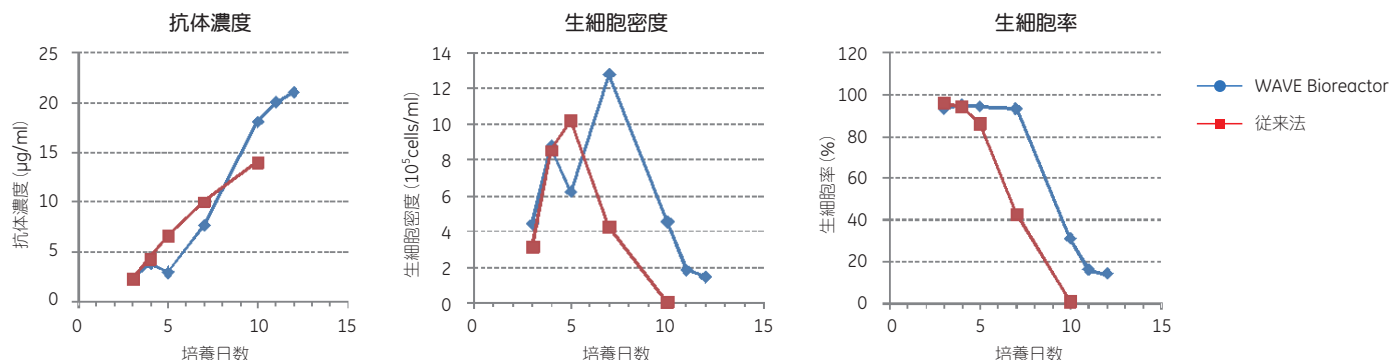


図 1 WAVE Bioreactor および従来法で抗体産生細胞を培養した培養上清中の抗体濃度、生細胞密度および生細胞率

細胞株 CHO細胞株 DG44 (Invitrogen社)
 培地 CHO-S-SFM II (Invitrogen社)

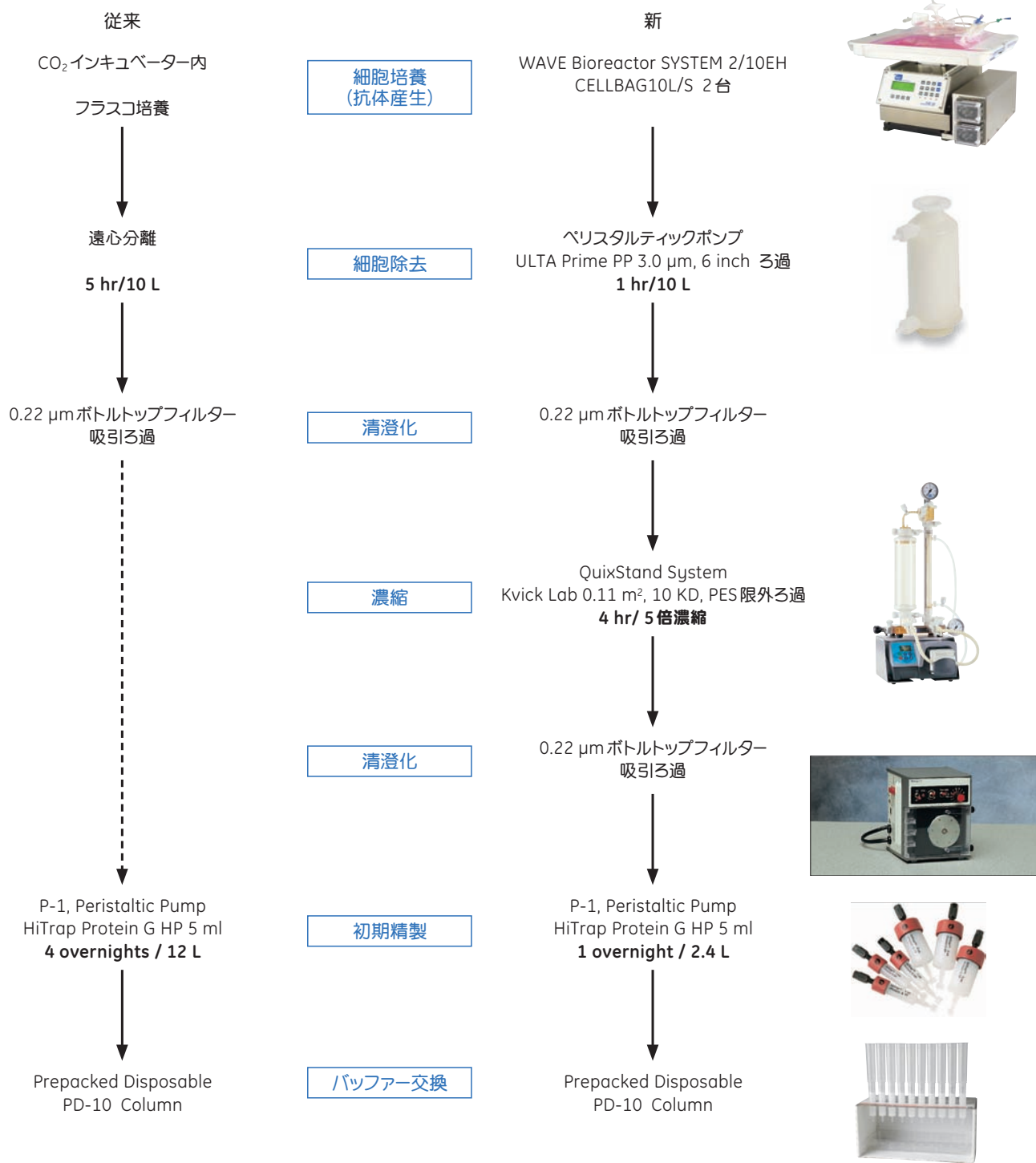


図2 リコンビナント抗体の調製フロー

③ 培養上清からの細胞除去

回収した培養上清は、限外ろ過システム QuixStand System に付属するペリスタポンプ、もしくは一般的なペリスタポンプ（日本ミリポア社製、Cat. No. XX8200115等）を用いカプセルフィルター ULTA Prime PP 3.0 μm を通すことにより大きな粒子をろ過し、さらに0.22 μm ボトルトップフィルター（1,000 mL, Cat. No. 431174、コーニング社）を用いて微粒子をろ過した。ULTA Prime PP 3.0 μm には容量が異なる2、4、6 inchの製品があるが、今回は6 inch品を用い、WAVE Bioreactor 2台で培養した培養上清10Lを処理した。

(結果)

処理に要した時間は0.22 μm ろ過を含め、準備から後片付けまで1時間以内であった。ULTA Prime 導入前は清澄化処理を3,000 rpm、15分の遠心分離で行っていた。1回に遠心分離できる処理量が約800 mlであったため、10 L培養した場合は遠心処理をくり返さなくてはならず、遠心前の分注を含めて清澄化に約5時間かかっていた。

経験的に、ULTA Primeの2 inch容量タイプでも4～6 Lの培養上清を処理できるが、血清含有培地を用いた場合や培養期間が長い等の理由で細胞 debrisが多い場合には処理容量が低下するので注意が必要である。容量が限界に近づいた際には流速が低下する。なお、0.22 μm ボトルトップフィルターの材質はセルロースアセテート（CA）とポリエーテルスルホン（PES）の二種類が販売されているが、CAではろ過速度が顕著に低下する場合があるので、主にPESを用いている。

④ 培養上清の濃縮

続いて0.22 μm フィルターでろ過した培養上清を QuixStand

System および限外ろ過カセット Kwick Lab 0.11 m^2 , 10 KD, PES を用いて室温で濃縮を行った。今回は WAVE Bioreactor で培養した10 Lと従来法で培養した2 Lを合わせ、計12 Lを約2.4 Lまで濃縮した（今回の濃縮では約4時間を要した）。濃縮に伴い濃縮速度は若干低下したものの、問題なく処理することが可能であった。次の精製工程では HiTrap Protein G HP 5 ml カラムを用いているが、吸着量を確保するためにはサンプル添加流速は5 ml/min 以下にする必要がある。このため培養液を直接カラムに添加するとサンプル添加があまりに長時間になるため、10時間ごと、3 Lを目安に中断し、精製をくり返していた。今回、濃縮後の2.4 Lのサンプル量であれば1回のovernightでカラムに添加できるため、くり返し精製をしなくて済み、精製にかかる時間を大幅に短縮できた。濃縮後は0.22 μm フィルターでろ過し4℃にて保存した。なお QuixStand System および Kwick Lab 0.11 m^2 , 10 KD, PES は NaOH 洗浄が可能であり、エンドトキシンの不活化対応も容易であった。

⑤ 培養上清のクロマトグラフィー精製

濃縮した培養上清は P-1, Peristaltic Pump を用いて HiTrap Protein G HP 5 ml カラムにアプライし定法により精製を行った。溶出画分はバッファー交換用カラム PD-10 Column を用いて PBS にバッファー置換した。精製した抗体は SDS-PAGE 電気泳動と CBB 染色で十分な精製度であることを確認した。なお、特に抗体アグリゲート（凝集体）や夾雑物等を除去したい場合には、ÄKTAexplorer 10S と分取用ゲルろ過クロマトグラフィーカラム（HiLoad 26/60 Superdex 200 pg）を用いて最終精製を行っている。（図3、4）ÄKTAexplorer 10S は、マウス免疫や ELISA 等に用いられる抗原タンパク質の精製等、抗体以外のアプリケーションでも用いている。

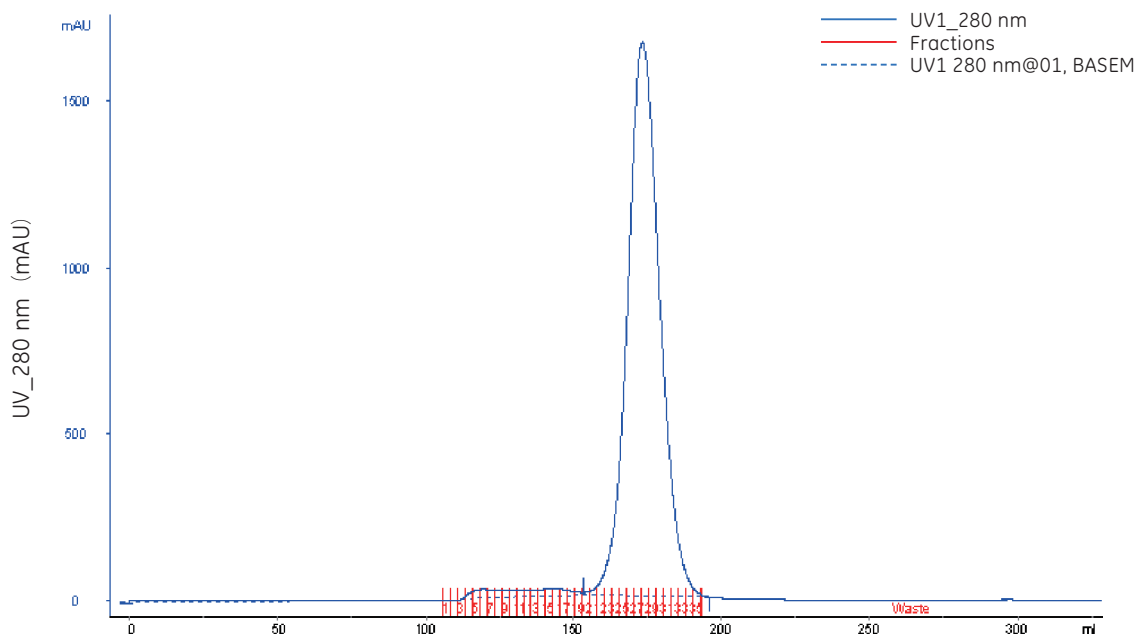


図3 リコンビナント抗体のゲルろ過クロマトグラフィーの結果

HiTrap Protein G HP カラムで精製したリコンビナント抗体を HiLoad 26/60 Superdex 200 pg を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。バッファーには PBS を用い、流速は 2 ml/min とした。フラクション 23-33 を回収した。

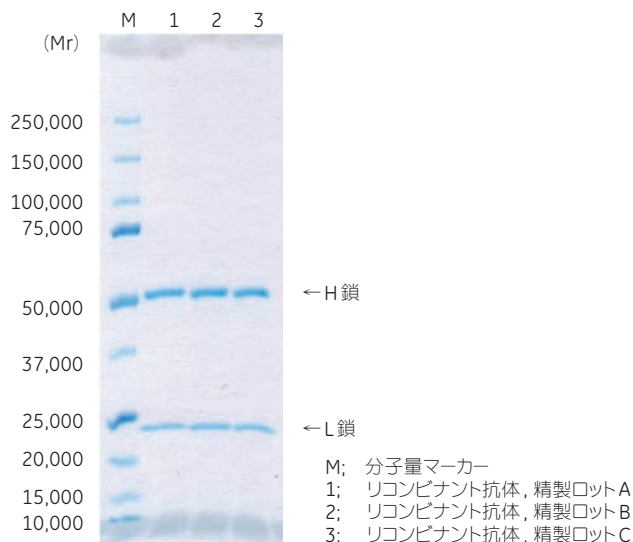


図4 精製後のリコンビナント抗体のSDS-PAGE結果

HiTrap Protein G HPカラムで精製したリコンビナント抗体を、サンプルバッファー中で95°Cにて5分間の熱変性処理を行い、1 µg/レーンずつSDS-PAGEを行った。泳動には8～16%グラジエントミニゲルを用い、CBB染色によりタンパク質を検出した。

まとめ

本手法は、培養条件の至適化を行えばすぐに他のリコンビナント抗体精製にも応用することができ、初期の抗体医薬研究をはじめとしたモノクローナル抗体の大量調製に役立ちます。

また、細胞培養装置 WAVE Bioreactor、限外ろ過装置 QuixStand Systemは、共にスケールアップに対応する製品ラインナップがご

ざいますので、10 Lを超えるスケールでの抗体調製をお考えのお客様にも適したフローとなっています。

本手法にご興味のあるお客様や、さらにスケールの大きいフロー構築をお考えのお客様は、ぜひバイオダイレクトライン (03-5331-9336) までお問合せください。

株式会社 未来創薬研究所

未来創薬研究所は、中外製薬と三井物産、実験動物中央研究所の共同出資により2005年4月に誕生しました。当研究所では、疾患解析や遺伝子解析など病態および、ゲノム情報から効率よく抗体医薬品を生み出す新しいゲノム創薬の研究体制を構築し、研究を進めてきました。

東京大学駒場オープンラボラトリー内に研究拠点をもち、大学の研究機関が有する先端的な知見や情報に、中外製薬が持つ薬剤開発技術、三井物産のビジネス創造力、実験動物中央研究所における先端技術を応用したヒト疾患モデル動物作出技術、これらを用いた新しい *in vivo* 評価システムを融合させ、革新的な医薬品探索を進めています。

ホームページ： <http://www.forerunner-pharma.co.jp>

製品名	用途	包装	コード番号
細胞培養			
WAVE Bioreactor SYSTEM 2/10EH 動物細胞システム	ラボスケール細胞培養装置	1式	問合せ
CELLBAG10L/S	細胞培養バッグ 10 L, スクリューキャップ付	1枚	CB0010L10-03
細胞除去・溶液濃縮			
ULTA Prime PP 3.0 µm	ポリプロピレンデプスフィルター	3個	28-9084-73
QuixStand System	タンパク質濃縮・脱塩用システム	1式	問合せ
Kvick Lab 0.11 m ² , 10 KD, PES	タンパク質濃縮・脱塩用限外ろ過カセット	1個	56-4113-25
クロマトグラフィー精製			
P-1, Peristaltic Pump	低圧クロマトグラフィー用ポンプ	1式	18-1110-91
ÅKTAexplorer 10S	クロマトグラフィーシステム	1式	問合せ
HiTrap Protein G HP	抗体精製用カラム	1×5 ml	17-0405-01
Prepacked Disposable PD-10 Columns	脱塩・バッファー交換用自然落下/遠心分離型カラム	30本	17-0851-01
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg	ゲルろ過クロマトグラフィーカラム	1本	17-1071-01

※製品の詳細や製品価格は弊社 Web サイト等でご確認ください。

© 2009 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社 本書の全部または一部を無断で複製複製することは、著作権法での例外を除き、禁じられています。掲載製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載内容は、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370
e-mail: Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

取扱店