

ステロジェン・バイオペレーション社 (Sterogene Bioseparations Inc. 略称:ステロジェン社)は、1985年に米国カリフォルニア州ロサンゼルス近郊で創設された会社です。

説立目的は、主に医薬製剤企業、血液製剤企業、バイオテクノロジー企業において、製造される医薬品 / 診断薬品グレードの生体高分子(タンパク質、ペプチド、核酸、その他)の分離精製で利用されるクロマトグラフィの担体や、それに付随して使用されるシステム等の研究開発及び製造 / 販売を行っています。

ステロジェン社では、当初血液製剤企業で血液分画に使用される大量プロセス用クロマトグラフィ担体を開発し、販売を初めました。近年では、遺伝子治療で利用されるウイルス・ベクターの分離精製用クロマトグラフィ担体及び最新のシステムデザイン等を、顧客と共同で研究開発しています。

ステロジェン社で製造しているプロセス用クロマトグラフィ担体は、米国の幾つかの顧客先において既にFDA (Food and Drug Administration) の認可を受け、市場で販売されている医薬品の製造工程で使用されており、また一部は米国 / 欧州において臨床試験に入っています。

ステロジェン社製品群の特徴

アガロースゲル(担体)

他社のアガロースゲル(担体)の製造方法は、浮遊反応(Suspension Polymerization)によるバッチ製造法を採用しており、このため反応時に界面活性剤を必要とし、ゲル製造後に洗浄はしますが、一部の界面活性剤が残存してしまいます。一方、ステロジェン社のアガロースゲルの製造方法は、全く異なる連続製造法のため、界面活性剤を一切必要としません。

したがってステロジェン社のアガロースゲルは、界面活性剤などの不純物を一切含まないので、他社製品と比較して、非特異的吸着が非常に少なくなります。ステロジェン社のアガロースゲルは、粒径が60 μ m ~ 5mmの範囲で製造することができます。ゲル自身の堅さは、特許出願中の特殊な方法で架橋の度合を調整することによって、頑強にして耐圧力を高めたり、一切架橋をしないこともできます。

アフィニティー クロマトグラフィ用活性化担体
ステロジェン社で開発されたALDモノアルデヒド

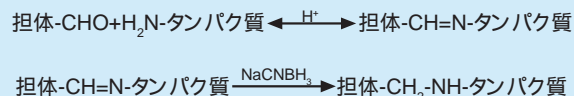
ド固定化法は、簡便で効率良く低分子のペプチドから高分子のタンパク質までをリガンドとして担体に固定化できる方法です。従来のCNBr固定化法と比較して、固定化されたリガンドの解離がほとんどなく、安定性に優れているので、NaOHなどを使用した洗浄方法が可能で、またオートクレープも可能です。

ステロジェン社では、この安定したモノアルデヒド基を高密度で導入したアガロース担体を各種の粒径や架橋度合で取り揃えており、酸性 / 塩基性のタンパク質を、高い固定化効率(>90%)で担体に固定化できます。

充填カラムでのリガンド固定化

ALDモノアルデヒド固定化法は、リガンドの固定化において、活性化ゲルが充填されているカラムに通液していく工程だけで簡便にでき、バッチでの攪拌などの作業が一切不要です。この簡便なリガンドの固定化方法は、特に大きなカラムに充填する際の大量なゲルへの固定化に非常に便利です。

またALDモノアルデヒド固定化法のリガンド固定化は室温で行えますが、これは固定化するリガンド(例:タンパク質、ペプチド)自身の温度に対する安定性に依存しますので、一部のリガンド固定化は低温で行う必要があります。



再現性に優れた固定化法

従来の固定化法で生じていた担体の活性部位の加水分解や失活が、リガンドの固定化効率における再現性を失う原因となっていました。この点においても、ALDモノアルデヒド固定化法は、担体の活性部位の加水分解や失活が無いので、リガンドの固定化における再現性に、とても優れています。またオートクレープも可能です。ALDモノアルデヒド固定化効率のロット間のばらつきは5%以下です。

高い吸着量

リガンドが固定化されたゲルの高吸着量は、分離精製工程においての効率や、経済性の面から、非常に重要です。

ステロジェン社の活性化担体製品群の一つであるアクチゲルALDの活性化官能基濃度(40 ~ 50 μ mol/ml)は驚異的に高いです。

このことによりアクチゲルALDのリガンド固定化後のゲルに対するタンパク質吸着量は、60mg/mlゲルという高吸着量を容易に可能にしました。この高吸着量は特に診断薬品での製品化において、低分子量のリガンドやペプチドを固定化し、特定のタンパク質 / 抗体を精製する際などにとても有用です[低分子量リガンドの固定化量:アクチゲルALD(40 ~ 50 μ mol/mlゲル)、他社製品(10 ~ 15 μ mol/mlゲル)]。

リガンドの漏れがない安定した固定化法

ALDモノアルデヒド固定化法は、従来のグルタルアルデヒド固定化法とも全く違うものです。グルタルアルデヒド固定化法は強力なシッフ塩基を形成しますので、マイルドな還元剤では容易に第二級アミノ結合に還元されず、残ったシッフ塩基が不安定のまま解離現象を起こし、リガンドの漏れが生じてきます。

一方、ALDモノアルデヒド固定化法では、マイルドな還元剤でほとんどのシッフ塩基が第二級アミノ結合に還元されるので、不安定なカップリングによるリガンドの漏れがありません。

ALDモノアルデヒド固定化法は、第一級アミノ基を含むペプチド / タンパク質(抗体)などのリガンドを担体に固定化する方法です。固定化反応が始まると、瞬時に担体側のモノアルデヒド基と、リガンド側の第一級アミノ基が可逆的なシッフ塩基を形成するので、これを還元剤を用いて、安定した第二級アミノ結合に還元します。

還元化は20分から2時間で完了します。

ます。

その際使用する還元剤はマイルドなため、リガンド分子中に存在するジスルフィド結合を壊すことはありません。固定化されたリガンドの漏れは、医薬品 / 診断薬品の製造において、とても重要な問題となります。

従来の固定化方法ですと、担体の活性部位と、タンパク質のアミノ基、チオール基、OH基、カルボキシル基など各種の部位が反応し、一定のカップリングが不可能でした。このためリガンドの漏れの問題が生じていました。

一方、ALDモノアルデヒド固定化法はタンパク質の第一級アミノ基としか反応せず、カップリング後は非常に安定した第二級アミノ結合を形成しますので、リガンドの漏れが無く、検出可能感度(0.1ppm)を下回ります。

リガンドの活性が失われない

グルタルアルデヒド固定化法だとリガンドとしてのタンパク質間同志で架橋化現象が起きてしまい、失活する恐れがありますが、ALDモノアルデヒド固定化法では、このような架橋化現象は起こらず、活性も十分保持されます。

ALDモノアルデヒド固定化法のカップリング条件

pH:3~10(個々のリガンド特性に依存)

温度:0~40°C(個々のリガンド特性に依存)

時間:20分~2時間(個々のリガンド特性に依存)

ブロッキング:エンドキャップ不要

タンパク質のダイレクト・キャプチャー

(直接分離精製)セルスルー ビッグビーズ

従来のプロセススケールでのペプチド/タンパク質の分離精製工程は、動物細胞培養液及び菌体培養液から目的とするペプチド/タンパク質の回収及び分離精製の二点が必要でした。

ペプチド/タンパク質などの培養液からの回収において、通常遠心分離または微細ろ過、もしくは両工程を利用して、固形粒子物を除去します。次に限外ろ過膜などを使用して、培養液を濃縮します。

従来のクロマトグラフィ樹脂は、細胞、細胞片、凝集したタンパク質などで、すぐに目詰まりを起こしてしまいますので、カラムに負荷する培養液からは、完全にこれらの固形物質を除去しておかなくてはなりませんでした。

しかしこの遠心分離や微細ろ過工程は、時間

やコストがかかるだけでなく、品質問題も生じてきます。破碎された細胞から排出してくるプロテアーゼやグリコシダーゼは、目的とするタンパク質などを分解し、また分離精製工程を複雑にし、精製コストの上昇につながります。クルードな培養液中に置かれる時間が長ければ長いほど、より多くの目的とするタンパク質などが分解され、損失してしまいます。

一方、クルードな培養液中から目的とするタンパク質などが、ダイレクト・キャプチャー(Direct Capture:直接分離精製)できれば、タンパク質の分解が防げ、また品質も上げることができ、歩留まりも向上します。

通常では別々になっていた回収及び分離精製工程が同時にワンステップでできれば、工程数の大幅な削減と、それによるコスト削減が可能となります。

ステロジェン社のセルスルー ビッグビーズ製品群は、通常の低圧カラムを使用して、クルードな培養液(動物細胞培養液、菌体培養液など)や血清から目的とするタンパク質をダイレクト・キャプチャーできる世界で初めての製品です。大粒径(300~500 μ mもしくは800~1,100 μ m)アガロースゲルを充填するカラムは通常の低圧カラムの上下についている網スクリーンを、約180 μ m孔径(300~500 μ m樹脂用)もしくは約480 μ m孔径(800~1,100 μ m樹脂用)のスクリーンと取り換えます。

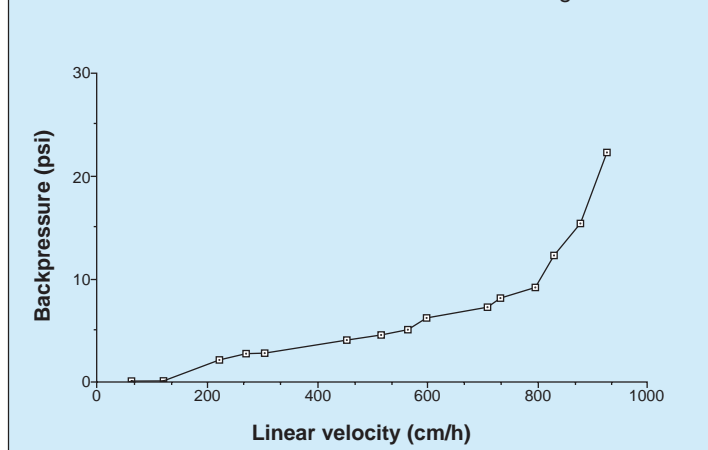
大粒径アガロースゲルが充填されていることにより、固形粒子物は、ゲルとゲルの隙間を通り抜けることができ、溶解しているペプチド/タ

ンパク質などは、ゲルに導入された官能基に吸着します。

残存する固形粒子物は、平衡化バッファーを高流速で順洗浄/逆洗浄を交互に行い、除去することができます。この後吸着しているペプチド/タンパク質を溶出バッファーで溶出します。セルスルー ビッグビーズは、4%架橋された大粒径アガロースゲルに、ユニークな表面処理が施され、そこにスパーサー・アームを介して、官能基を導入しているため、タンパク質などのダイナミック吸着量も十分高いです。(図2.参照)

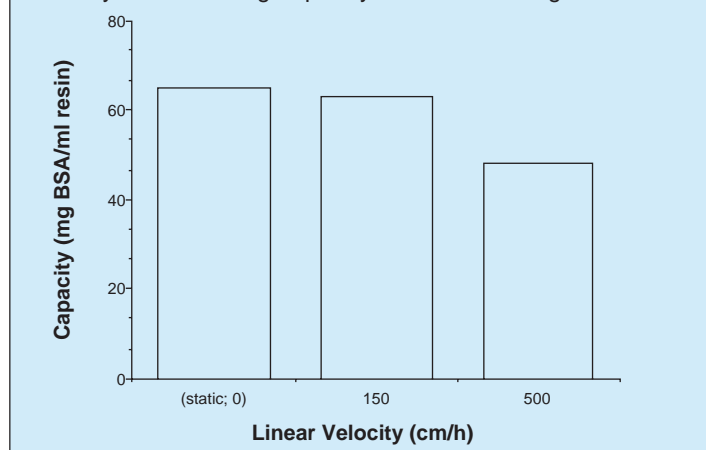
セルスルー ビッグビーズの耐薬品性は、高塩濃度、1M NaOH、高濃度尿素/グアニジン/有機溶媒が使用でき、安定的pH範囲は、pH2~14です。

図1. Pressure-flow curve at 1 m column bed height



For the flow rate test, a 2.5cmx100cm Q Cellthru BigBead Plus column was prepared with a 0.9% saline running buffer. Backpressure on the column was measured at selected linear velocities.

図2. Dynamic binding capacity of Q Cellthru BigBead Plus



Bovine serum albumin binding capacities of anion exchange Cellthru BigBead Plus. For the albumin binding test, 1.5cmx5cm columns were used at selected linear velocities. Buffer A : 50mM Tris, pH 8.5 ; Buffer B : 50mM Tris, pH 8.5, 0.5M NaCl. Albumin, 800mg, dissolved in Buffer A at 10mg/ml was applied to the column. After washing, bound protein was eluted and quantitated. The protein amounts eluted were plotted against flow rates.