

NMab Titan ProteinA親和性クロマトグラフィー媒体

製品紹介

NMab Titan ProteinA親和性クロマトグラフィー媒体グローバルな医薬品市場において、抗体医薬品の売上は引き続きトップを維持しており、市場競争がますます激化しています。抗体生産コストの削減は市場競争力を高める重要な要因の一つです。下流の精製分野では、Protein A親和性クロマトグラフィーは薬物の品質を左右する重要なプロセスであるだけでなく、コスト管理の重要なステップでもあります。抗体製造企業の効率的な生産のために、クロマトグラフィー媒体に求められる高い機械的強度、低逆圧、優れた化学的安定性および耐アルカリ性を満たすために、この三代目ソフトゲルProtein A親和性クロマトグラフィー媒体が開発されました。

NMab Titanは、独自の特許技術を用いて製造した高性能、耐アルカリ性組み換え（リコンビナント）Protein A親和性クロマトグラフィー媒体です。この充填材は高架橋アガロース微粒子を基材とし、専有の表面修飾技術を利用してエポキシ結合でProtein Aタンパク質リガンドを結合させて製造され、モノクローナル抗体、二重抗体、多重抗体、およびFcフラグメントを含むリコンビナントタンパク質などの生物大分子の分離・精製に適しています。NMab Titan親和性クロマトグラフィー媒体は、機械的強度が高く、低逆圧、化学的安定性が良好で、耐アルカリ性が強いといった特徴を持ち、高流速下でも高い動的吸着容量を保持でき、研究室での調製からパイロットスケールおよび産業規模の生産までの多様なニーズに対応します。

優位性:

- ✓高剛性アガロース基質により、機械的強度が高く、大規模生産に適している。
- ✓高効率の物質移動と高い動的結合容量により、コスト削減と効率向上が可能。
- ✓表面親水性が良く、非特異的吸着が低く、抗体の回収率が高い。
- ✓改良された耐アルカリ性リガンドにより、リガンドの脱落が少なく、長寿命。

表1. NMab Titan ProteinA 親和性クロマトグラフィー媒体技術仕様

品名	NMab Titan
分離原理	ProteinA 親和
基質	アガロース
平均粒径	約75 μ m
配基結合方式	エポキシ結合
動的結合容量	約70 mg/mL (ヒトIgG、6分の滞留時間)
最大耐圧	0.5MPa
CIP (インプレース洗浄)	0.1-0.5M NaOH
推奨最高流速	500 cm/h (カラムサイズ: 600×250mm)
pH安定性	3-12 (作業中)、2-14 (CIP)
化学安定性	通常の緩衝液全般、10 mM 塩酸、0.1M クエン酸 (pH3)、6M 尿素、6M 塩酸グアニジン、30% イソプロパノール、20% エタノール
使用温度	2-40 $^{\circ}$ C
保存	20% エタノールまたは2% ベンジルアルコール、2-8 $^{\circ}$ C

優れた圧力-流速曲線

NMab Titan媒体は、優れた機械的特性を持ち、より高い流速条件下で発生する圧力にも耐えることができます。これにより、より高いカラムベッドがサポートされ、抗体のバッチ処理量を増加させることができ、抗体生産効率が向上し、必要な設備を削減することが可能です。

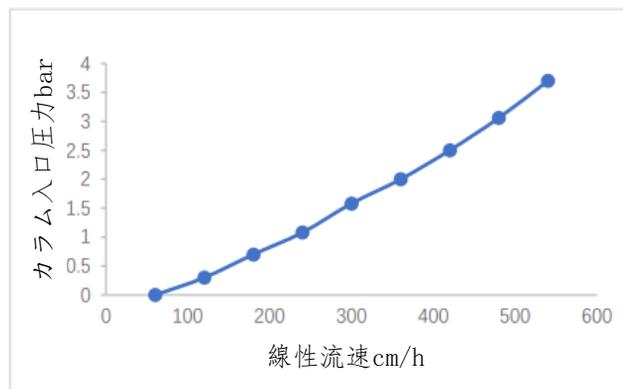


図1. NMab Titan媒体の圧力-流速変化図
(テストカラムサイズ:
内径600mm、高さ247mm; 移動相: 水溶液)

高いモノクローナル抗体の動的結合容量

異なるモノクローナル抗体サンプルを用いたテストの結果、新世代のProtein A親和クロマトグラフィー媒体であるNMab Titanは、動的結合容量 (DBC_{10%}) がより高いことが示されました。これにより、生産コストが効果的に削減され、生産効率が向上します。

図3. NMab Titan媒体を用いたモノクローナル抗体純化時の動的結合容量

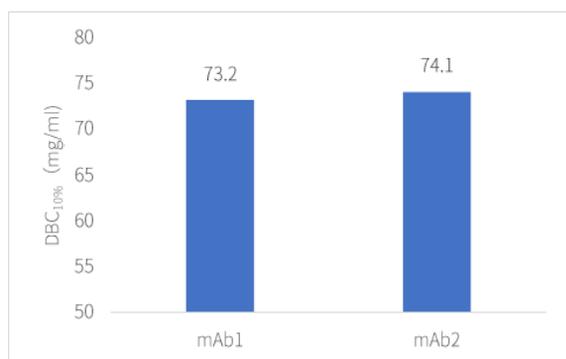


図2. NMab Titan媒体を用いた
モノクローナル抗体純化時の動的結合容量

効果的な二重標的抗体の捕捉

異なる二重標的抗体試料に対するテスト結果から、NMab Titanは、さまざまな二重標的抗体に対して動的結合容量が著しく向上しており、より少ない充填材で同じ生産量を確保でき、サンプル処理効率が向上することが示されました。

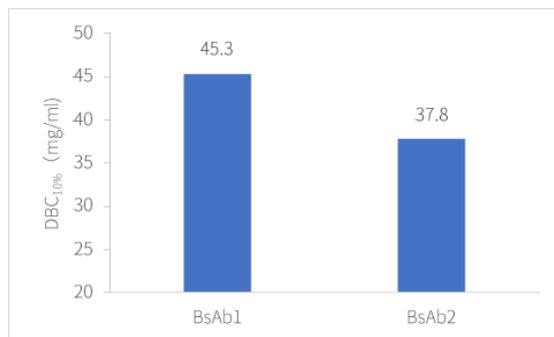


図3. NMab Titan媒体を用いた
二重標的抗体の動的結合容量

優れた耐アルカリ性

25°Cで0.5M NaOHに24時間浸漬した結果 (サンプル: モノクローナル抗体)、NMab Titanの結合容量はわずか2.5%しか減少しませんでした。これにより、NMab Titanは優れた耐アルカリ性を示し、抗体製造における媒体の使用寿命を大幅に延長し、製造効率を向上させ、製造コストを削減することができます。

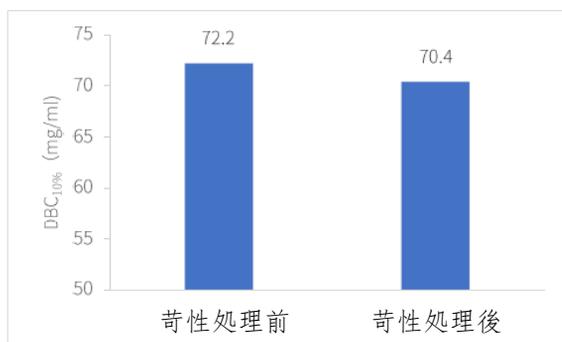


図4. NMab Titanは25°Cで0.5M NaOHに24時間浸漬しても、結合容量が安定して保持される。

優れた耐アルカリ性と長い使用寿命により、生産効率を向上させ、コストを削減します。

NMab TitanとNMab Proを用いたあるモノクローナル抗体HCCFの寿命検証試験では、アルカリ洗浄プログラムは以下のように行われました。

- 1) 各サイクルごとに0.1M NaOHでCIPを30分間実施。
- 2) 120サイクル後、20サイクルごとに0.5M NaOHで30分間洗浄し、さらに30分間浸漬。
- 3) 160サイクル後、10サイクルごとに0.5M NaOHで30分間洗浄し、さらに30分間浸漬。合計16回実施。

NMab Titan媒体は300サイクル後でも、DBG10%が24%しか減少しませんでした。NMab Titanの優れた耐アルカリ性により、抗体製造における媒体の寿命が大幅に延び、生産コストが削減されます。

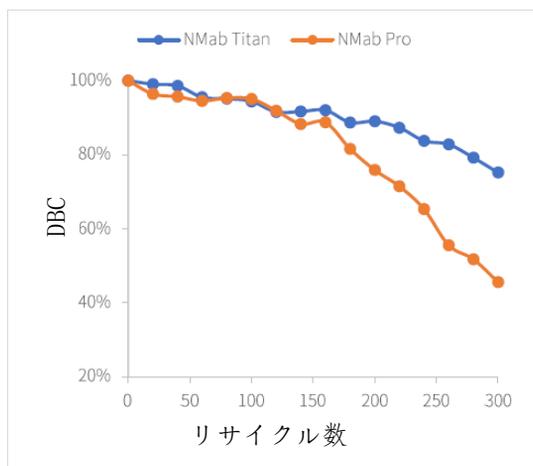


図5. NMab Titanがあるモノクローナル抗体で行った寿命検証の結果

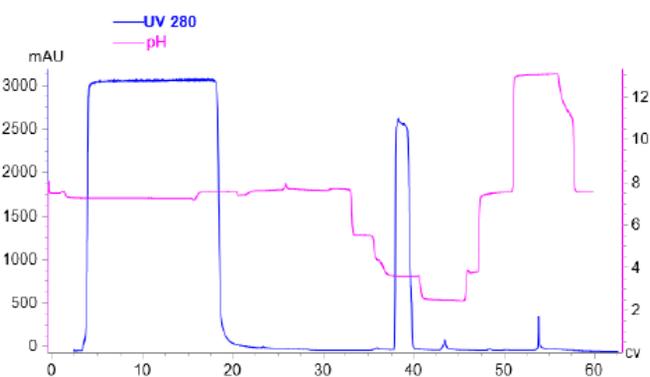


図6. NMab Titanによる細胞培養液中の単クローン抗体の純化・分離性能

細胞培養液におけるモノクローナル抗体 (mAb) のキャプチャーに関するアプリケーション

以下は、NMab Titan親和媒体を使用して、細胞培養液からモノクローナル抗体をキャプチャーする際の洗脱ボリューム、回収率、および宿主細胞タンパク質 (HCP) や脱落配基フラグメント (ProA) の除去効率などの性能評価です。

実験条件:

- サンプル: モノクローナル抗体上清培養液
- 平衡: 20mM PB + 150mM NaCl, pH7.4
- 洗浄: 20mM HAc-NaAc, pH5.5
- 洗脱: 20mM HAc-NaAc, pH3.6
- 再生: 0.1M NaOH
- 滞留時間: 5分

この条件下でのNMab Titanの性能を評価します。

表2. NMab Titan媒体の親和クロマトグラフィー性能評価結果

項目	洗脱体積 (CVs)	HCP (ppm)	ProA (ppm)	純度 (%)	回収率 (%)
NMab Titan	2.07	332	5	98.5	95.1

操作案内

スラリー濃度測定

NMab Titan親和性クロマトグラフィーマディアは、20%エタノール溶液中に保存されており、約65% (v/v) のスラリー濃度 (Cs) で瓶詰めされています。スラリー濃度は、クロマトグラフィーマディアの固定沈降体積がメディア総体積に対する割合を示します。Csを正確に測定する必要がある場合は、メディア容器内のメディアを均一に混合し、その後、10mLのスラリーを量筒に移して一晩静置し、沈殿体積Vrを読み取ってスラリー濃度を計算します。

$$Cs (\%) = 100 \times (Vr / 10) = 10Vr \quad \text{---式1}$$

最適なカラム充填効果を得るためには、0.5 M NaCl溶液で50~70%のスラリーを調製することをお勧めします。

媒体の前処理

1, カラム体積 (Vc) の計算:

$$Vc = h \times \pi r^2 \quad \text{---式2}$$

h: カラムの高さ; r: カラムの半径

2, 必要なスラリー量 (Vs) の計算:

通常、クロマトグラフィ媒体は圧縮されると体積が減少します。最適な充填密度を得るため、スラリー量を多めに用意することを推奨します。圧縮比 (CF) は通常 1.15-1.2 です。

$$Vs = 100 \times (Vc \times CF) / Cs \quad \text{---式3}$$

3, 充填用スラリーの用意:

原容器のスラリーを均一に攪拌し、必要な体積を計量し、適切な容器に移し、自然に沈降させます。上澄みを慎重に取り除き、カラムの体積の5倍の溶媒 (例: 0.5 M NaCl) を加えてスラリーを洗浄し、保存液を除去します。その後、スラリー濃度を目的の濃度 (50-70% v/v) に調整します。

クロマトグラフィカラムの充填方法:

(NmXK 16/20 クロマトグラフィカラムの例)

1. カラム充填溶液を使用して、カラム末端部の接続部を素早く流し、気泡を取り除きます。その後、カラムの出口を閉じ、底部に1~2 cmの充填溶液を残します。
2. 充填溶液を使用して、カラムヘッドと配管内の気泡を除去します。
3. 充填用スラリーを吊るして、ガラス棒等を使用してカラム内壁に沿って連続的に注入し、充填液でカラムの壁を洗浄しながらカラムを充填させます。次にカラムヘッドを取り付けます。操作中に気泡が入らないように注意してください。
4. カラムの底部の出口を開き、クロマトグラフィシステムポンプを起動させ、推奨される圧力範囲内で一定の流速または一定の圧力でカラムを加圧します。カラムベッドが安定した後、媒体と液の境界面にマークを付けます。
5. ポンプとカラム出口を閉じ、カラムヘッドの入口のパイプを緩め、マークした線の2-3 mm下までピストンを押し下げます。その後、カラムヘッド入口のパイプを締めます。

カラム効果の評価

充填したクロマトグラフィカラムをまず2CVの0.5M NaCl溶液で平衡化し、その後、2.0M NaCl溶液を使用し、100cm/hの流速でカラム効率を評価します。また、脱イオン水でカラムを平衡し、アセトン溶液を用いてテストを行うことも可能です。具体的な試験データについては表3を参照してください。

表3. UniMab® 50HCクロマトグラフィカラムの効率試験条件

サンプル	5% (v/v) のアセトン水溶液または2M NaCl
サンプル量	1~5%カラム体積
流動相	脱イオン水または0.5M NaCl
線速度	50~200 cm/h
検出	5%アセトンサンプルロード: UV280nm、2M NaClサンプルロード: 電気伝導率計測
合格基準	As: 0.8~1.5; Plates (N/m): >2500

使用方法

- 1, **洗浄および平衡化:**使用前に、順次洗脱液（例：100 mM グリシン、pH 3.0）および平衡液（例：20 mM PB + 150 mM NaCl、pH 7.4）でカラムを洗浄および平衡化します。
- 2, **サンプルのロード:**サンプル量は最大で 媒体(DBC10%) の0.8倍を超えないこと。
- 3, **洗浄:**5CV 平衡液（例：20 mM PB + 150 mM NaCl、pH 7.4）でカラムを洗浄します。
- 4, **洗脱:**5CVのクエン酸、酢酸、またはグリシン酸、pH 3-4でカラムを洗脱します。
- 5, **洗浄:**5CVの1M 酢酸でカラムを清洗します。
- 6, **再生 (Cleaning-in-place, CIP) :**3~5CV0.1~0.5MNaOHでカラムを再生洗浄します。必要に応じて時間を延長して浸漬します。
- 7, **再平衡化:**5CVの平衡液（例：20mM PB+150mM NaCl、pH7.4）でカラムを洗浄し、再平衡化します。
- 8, **保存:**使用終了後、まず純水でカラム内の緩衝塩を置換し、その後20%エタノールで保存します。注意：使用過程中、サンプルおよび移動相は必ず0.45 μmのフィルターで濾過してください。

長期保存

長期保存メディアは20%エタノールまたは2%チオマロールで密閉保存し、保存温度は2~8℃を推奨します。エタノールの揮発や微生物の成長を防ぐために、3ヶ月ごとに20%エタノールを交換することをお勧めします。

故障排除

もし、NMab Titan親和性クロマトグラフィ製品の使用中に問題が発生した場合は、以下の表を参照して解決するか、または私たちにお問い合わせください。

現象	原因分析	対策提案
カラム 圧力上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	機器のオンラインフィルターが詰まっている	汚染物質を除去して洗浄する、またはフィルターを交換する。サンプルと緩衝液を使用前にフィルター処理する
	カラムベッドが圧縮されている	カラムを再充填する
	カラムの使用期間が長すぎる	新しいカラムに交換するか、カラム媒体を交換する
	ポンプと収集器の間のバルブが開いていない	出口を開く
カラム上の 沈殿物	疎水性タンパク質、脂肪タンパク質、または脂質の蓄積	非イオン性界面活性剤で洗浄（例：0.1% Tergitol 15-S-9 または Triton X-100 reduced/酸化還元剤）、0.5M NaOH、または1Mグアニジン塩酸塩；その後、少なくともカラム体積の5倍の毒性除去フィルター緩衝液（pH 7-8）で洗浄
	タンパク質の変性による沈殿	2倍のカラム体積の50 mM NaOH、または50 mM NaOHと1.0 M NaCl、または0.1 M H ₃ PO ₄ 、または6 M グアニジン塩酸塩と10 mM NaOHでカラムを洗浄し、少なくとも10分以上洗浄します。その後、カラム体積の5倍以上の消毒された緩衝液（pH 7-8）で洗浄します。

NMab Titan親和性クロマトグラフィー媒体製品仕様書

NMab Titan	30 mL	17013-080100-2030
	50 mL	17013-080100-2050
	100 mL	17013-080100-2100
	300 mL	17013-080100-2300
	500 mL	17013-080100-2500
	1L	17013-080100-1001
	5L	17013-080100-1005
	10L	17013-080100-1010
	50L	17013-080100-1050
	100L	17013-080100-1100

注：7.7 mm × 22mm、16mm × 25mm、7.7 mm × 100 mm のプレパックカラムも提供可能です。詳細な規格やカスタマイズのご要望については、お問い合わせください。