

Nmab®Pro ProteinA 親和クロマトグラフィー媒体

製品紹介

Protein A 親和クロマトグラフィーは、Protein A リガンドが特定の抗体に対して高い結合力を持つことを利用して、抗体を分離精製する方法です。Protein A 親和クロマトグラフィーは、抗体の下流工程を大幅に簡素化し、抗体の分離精製の標準的な手法となっています。現在の市場では、Protein A 親和クロマトグラフィー媒体は、多糖類（アガロース、デキストラン、セルロース）を基材とするものと、合成高分子（ポリアクリレート、ポリアクリルアミド）を基材とするものの2種類に大別されます。アガロース基材は膨潤状態で優れた特性を持ち、耐アルカリ性にはありますが耐圧性に欠けます。したがって、親和容量は高いものの、機械的強度が低く、耐圧性が劣ります。上流の発酵技術が進歩し、抗体の発現量が増加するにつれて、下流の親和捕獲が抗体生産のボトルネックとなり、既存のProtein A 親和クロマトグラフィー媒体の容量要求が高まっています。このニーズに応えるため、アガロースを基材として、独自の微粒子改質技術を使用して、その機械的強度と親和容量を向上させた高性能Protein A リガンド充填材を開発されました。これは、Nmab® Pro 製品に基づいて作られたものです。この製品は、より高い親和容量と純度を持っています。また、この親和媒体は高い親和容量を持つだけでなく、Nmab® Pro はその優れた結合特性、耐アルカリ性、圧力および流速特性を引き継いでおり、抗体製造企業が生産・精製コストを削減し、工程を最適化するための最良の選択肢です。

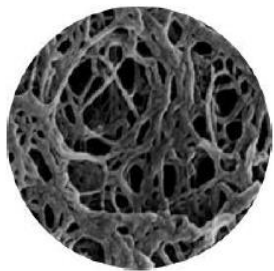


図1. NAb® Pro Protein A親和クロマトグラフィー媒体の電子顕微鏡画像。

市場の同類製品に比べ、以下の独特な特徴があります：

- (a) 結合容量が高い：一般的な単一抗体のプロジェクトでは、平均動的結合容量が約60～80mg/mLです。
- (b) 耐アルカリ性に優れている：0.5M NaOHに24時間浸漬しても結合容量はわずか20%しか低下しません。
- (c) 配基の脱落が少ない：20ppm未満です。
- (d) 宿主細胞タンパク質（HCP）の残留量：通常1000ppm未満で、SuRe LXに匹敵します。
- (e) 回収率が高い：90%以上です。
- (f) 純度が高い：親和性洗脱の純度が99%以上です。
- (g) 圧力流速特性が良好：伝統的な4FF/6FFシリーズ媒体に対して優れています。

表1. NAb® Protein A 親和クロマトグラフィー媒体技術仕様

項目	詳細情報
製品型番	NMab®Pro
分離原理	Protein A 親和捕捉
基質	アガロース
粒径	69μm
配基結合方式	エポキシ結合
動的結合容量*	≧65 mg/mL（人IgG、6分間滞留時間）
最大耐圧	0.3MPa
CIP定置洗浄	0.1-0.5M NaOH
推奨流速	100-500cm/h
pH安定性	2～12
化学安定性	全ての一般的な緩衝液、10mM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 °C
保存	20% エタノールまたは2% ベンジルアルコール、2-8 °C

圧力-流速曲線テスト

異なる流速下での圧力変化は以下の通りです。この圧力・流速特性は、工業生産における充填材の流速要求を満たし、従来の4FF/6FFソフトゲルシリーズの充填材よりも優れています。

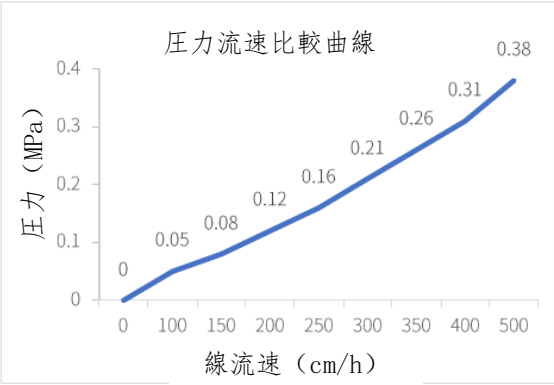
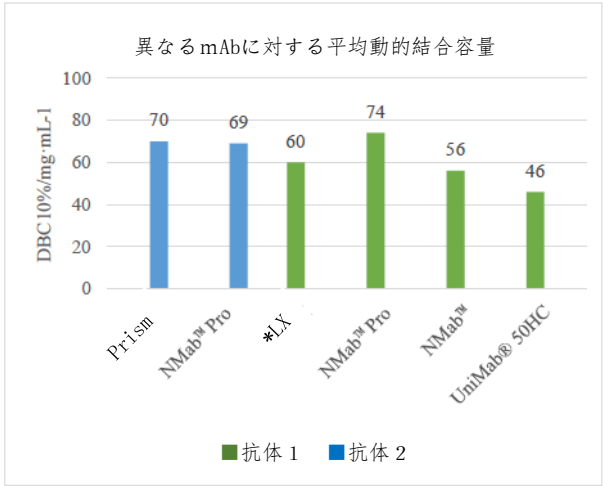


図 2. NMaB Pro 媒体の圧力と流速の変化図
テストカラム型: ID: 200 H: 18cm; 移動相: 0.5M 塩化ナトリウム溶液

単クローン抗体 (mAb) の結合容量

複数の単クローン抗体サンプルに対する試験の結果、NMaB Proの動的結合容量（10%ブレイクスルー、滞留時間5分）は、平均で70mg/mL前後となり、単クローン抗体1においては、NMaB ProはUniMaB 50HCよりも高い結合容量を示しました。また、国際ブランド* LXと比べても結合容量が高く、性能は優れています。単クローン抗体2においては、NMaB Pro は国際ブランドPrismaと同等の性能を示しました。



二重抗体 (BsAb) の結合容量

ある二重抗体サンプルの試験では、

NMaB Proの動的結合容量（10%ブレイクスルー、滞留時間5分）は41.52mg/mLであり、高い結合容量を示し、国際ブランドPrismaとはほぼ同等の性能を示しました。

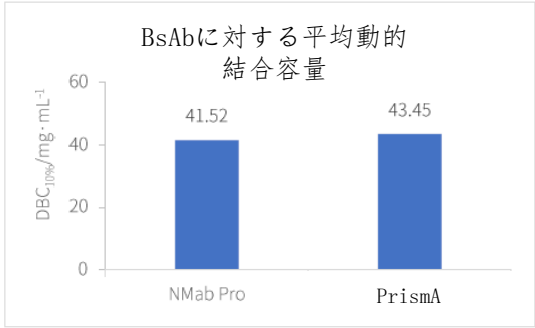


図 4. 動的結合容量比較図

静的耐アルカリ性試験

25℃の条件下で、NMaB Proの結合容量を測定し、充填材を0.5M NaOH溶液に24時間浸漬します。アルカリ浸漬後のNMaB Proの結合容量を測定し、詳細は下表2をご参照ください。

表 2. 24時間耐アルカリ性試験表。

アルカリ浸漬前 結合容量 (mg/mL)	アルカリ浸漬後 結合容量 (mg/mL)	容量低下率 (%)
66.04	52.61	20.33

動的結合容量検証データ

図5に示されているように、0.5M NaOHを使用したインプレース洗浄（CIP）で、各サイクルのアルカリ接触時間は15分間です。NMaB Proの結合容量をテストし、160サイクルの洗浄後にNMaB Proの動的結合容量が26.57%低下しました。

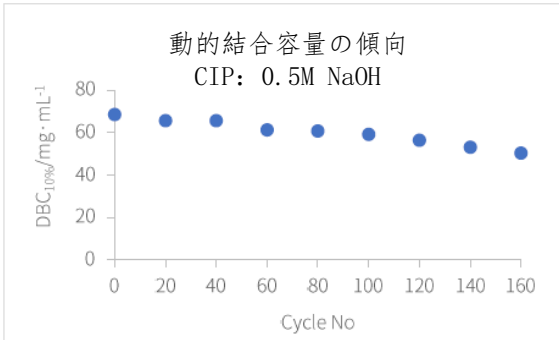


図 5. ある単クローン抗体HCCFの耐アルカリ性 DBC データ

細胞培養液中の単クローン抗体（mAb）捕獲用途の比較

以下は、NMab® Pro親和媒体が細胞培養液中の単クローン抗体を捕獲する際の洗脱体積、回収率、HCPおよびPorAの性能評価を示したもので、Prismaを対照としています。実験の結果、NMab® Proは優れた単クローン抗体の親和捕獲能力を持ち、Protein A クロマトグラフィー媒体 Prisma と同等の性能を示しました。

表 3. 実験条件表

設備	Avant （NM-BD-003）
カラム	1.1mL MILLIPORE カラム
サンプル	単クローン抗体上清培養液
平衡液	20mM PB + 150mM NaCl, pH7.4
洗脱液	20mM NaAc-HAc, pH3.6
滞留時間	5 分

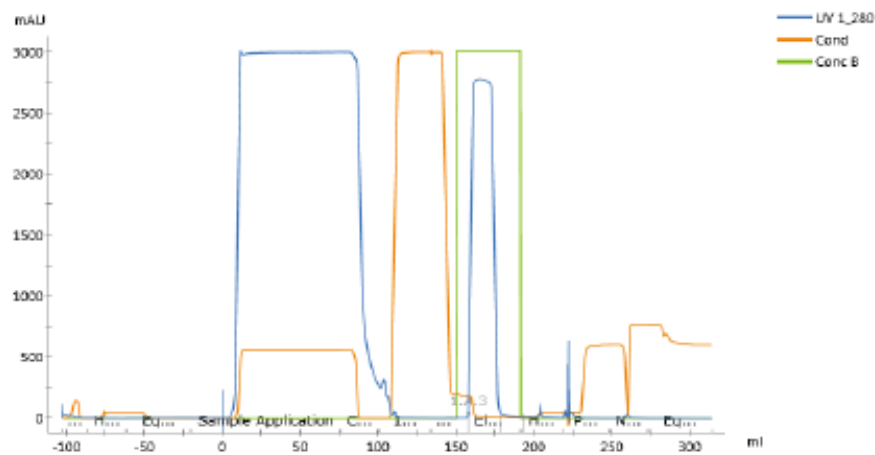


図 6. Prisma による細胞培養液中の単クローン抗体の純化分離性能

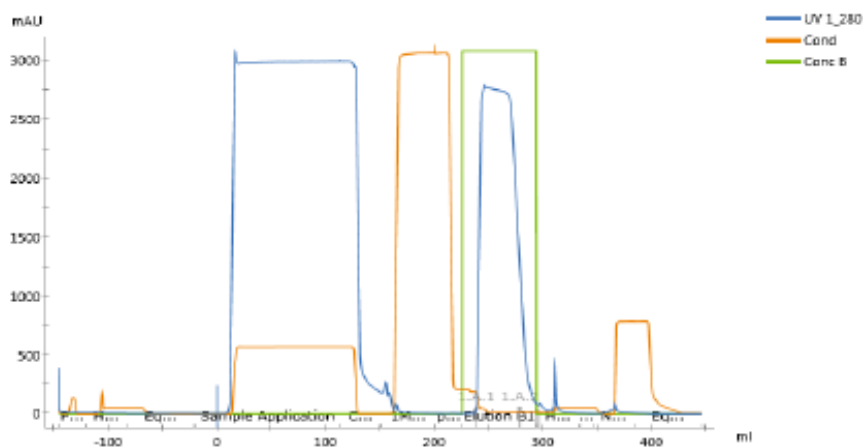


図 7. NMab® Proによる細胞培養液中の単クローン抗体の純化分離性能

表 4. NMab® Pro クロマトグラフィー媒体結果比較表。

クロマトグラフィー媒体	洗脱体積 (mL)	回収率 (%)	HCP (ppm)	ProA (ppm)
NMab® Pro	3.1	99.20%	354.8	13
Prisma	2.5	98.80%	500.2	6

操作案内

スラリー濃度測定

NMab®Pro親和性クロマトグラフィーメディアは、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メ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。

$Cs\ (\%) = 100 \times (Vr / 10) = 10Vr$ ---式1

最適なカラム充填効果を得るためには、0.5M 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:

$Vc = h \times \pi r^2$ ---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、クロマトグラフィー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。

$Vs = 100 \times (Vc \times CF) / Cs$ ---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1～2cm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。具体的な試験パラメーターについては表3を参照してください。

表3. NMab®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: 100mM グリシン、pH3.0）および平衡液（例: 20mM PB + 150mM NaCl、pH7.4）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: 20mM PB + 150mM NaCl、pH7.4）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、pH3-4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) : 3~5CV0.1~0.5M NaOH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0.45µm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、NMa[®]Pro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®Pro親和性クロマトグラフィー媒体製品仕様書

品名	包装	品番
NMab®Pro	30 mL	17013-070100-2030
	50 mL	17013-070100-2050
	100 mL	17013-070100-2100
	300 mL	17013-070100-2300
	500 mL	17013-070100-2500
	1 L	17013-070100-1001
	5 L	17013-070100-1005
	10 L	17013-070100-1010
	50 L	17013-070100-1050
	100 L	17013-070100-1100

注：7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mm のクロマトグラフィープリパックカラムを提供可能です。その他の規格やカスタム製品については、お問い合わせください。

日本販売 三島国際貿易株式会社

〒411-0044 静岡県三島市徳倉三丁目18-5

TEL (055) 988-3590 E-mail: jaina@jaina-msm.com