

Nmab® ProteinA 親和クロマトグラフィー媒体

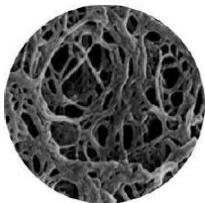
製品紹介

Protein A 親和クロマトグラフィーは、Protein A 配基とターゲット抗体との特異的な結合能力を利用して抗体の分離・精製を行う方法です。Protein A 親和クロマトグラフィーは、抗体の下流分離精製プロセスを大幅に簡素化し、抗体の分離精製の標準となっています。現在市場に出回っている Protein A 親和クロマトグラフィー媒体は、主に多糖類（アガロース、デキストラン、セルロース）を基質とするものと、合成ポリマー（ポリアクリレート、アクリルアミド）を基質とするものの二大カテゴリに分かれています。アガロース基質は、膨潤状態で網目構造を持ち、比表面積が大きいいため、親和性の高い結合容量を持つ一方で、機械的強度が低く、耐圧性が劣ります。

長期にわたる研究開発の結果、世界をリードする微粒子精密製造技術により、微粒子の材料構成、粒径の大きさ、粒径の均一性、孔径の大きさ、そして表面特性を非常に精密に制御することが可能になりました。この技術を基に、最初に単分散Protein A 親和クロマトグラフィー媒体UniMab®を開発しました。UniMabは、ポリアクリレートを基質とした充填材であり、機械的強度が高く、耐圧性に優れ、カラムベッドの安定性が高く、物質移動が速いという特徴を持っています。そのため、多くの抗体製造業者に好評を得ており、特に抗体の連続流精製分野で評価されています。

上流発酵技術の進歩に伴い、抗体の発現量が増加し、下流の親和性捕捉が抗体製造のボトルネックとなってきました。これにより、下流の Protein A 親和クロマトグラフィー媒体の結合容量に対する要求が高まっています。このニーズに応えるために、アガロースを基質とし、特有の微粒子改質技術を用いてその機械的強度を強化し、さらに独自のProtein A 配基技術を組み合わせ、UniMabよりも高い結合容量を持つ Nmab® Protein A 親和クロマトグラフィー媒体を開発しました。Nmab®は、高い結合容量に加えて、優れた結合特異性、耐アルカリ性、圧力-流速特性を備えており、抗体製造業者にとって単クローン抗体の精製コストを削減するための優れた選択肢となります。

図1. Nmab® 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。

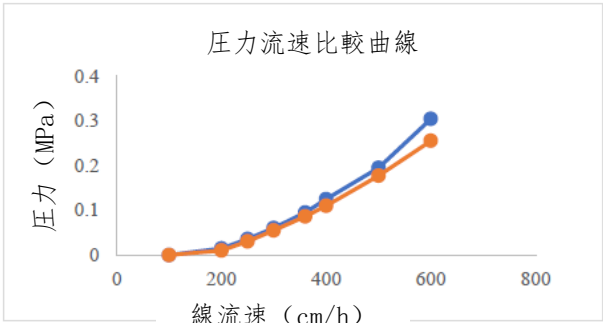
- (a) 結合容量が高い：一般的な単一抗体のプロジェクトでは、平均動的結合容量が約 55 mg/mLです。
- (b) 耐アルカリ性に優れている：0.5M NaOHに24時間浸漬しても結合容量はわずか11%しか低下しません。
- (c) 配基の脱落が少ない：10ppm未満です。
- (d) 宿主細胞タンパク質（HCP）の残留量：通常1000ppm未満で、SuRe LXに匹敵します。
- (e) 回収率が高い：90%以上です。
- (f) 純度が高い：親和性洗脱の純度が98%以上です。
- (g) 圧力流速特性が良好：伝統的な4FF/6FFシリーズ媒体に対して優れています。

表1. Nmab® 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®
分離原理	Protein A 親和捕捉
基質	アガロース
粒径	90µm
配基結合方式	エポキシ結合
動的結合容量*	～55 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、10 mM 塩酸、0.1 M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

圧力の比較テスト結果は以下の通りです。300cm/hの条件で、NMab®の圧力はわずか0.05 MPaであり、国際的に有名なProtein Aクロマトグラフィー媒体であるSuRe LXとはほぼ同等です。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。テストに使用されたカラムの仕様はXK16、H14.5cm、移動相は0.5M塩化ナトリウム溶液です。青色のラインがNMab® ProteinA媒体で、赤色のラインが海外のブランドの媒体です。



より高い結合容量

複数のモノクローナル抗体 (mAb) サンプルを用いたテスト結果によると、NMab®の動的結合容量 (10%ブレイクスルー、滞留時間5分) の平均値は約55mg/mLであり、国際的に有名なProtein Aクロマトグラフィー媒体であるSuRe LXに近いことが確認されました。高い結合容量のパフォーマンスは優れています。このように訳すことができます。

配基脱落低

NMab® Protein Aでは、複数の単抗プロジェクトで配基脱落が10 ppm未満に抑えられています。

単抗プロジェクト	配基脱落 (ppm)
mAb1	5.06
mAb2	0.68

宿主タンパク質残留が低い

複数の単抗純化プロジェクトで、NMab® Protein A 媒体のHCP残留量は1000ppm以内であり、国際的に有名なProtein A

クロマトグラフィーメディアSuRe LX、UniMabと同等のパフォーマンスを示しています。

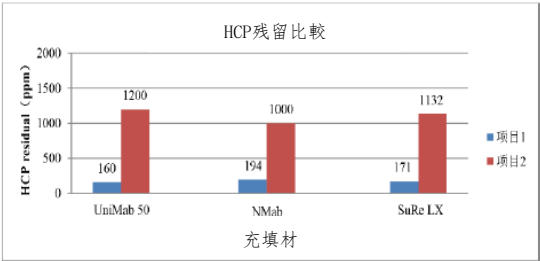
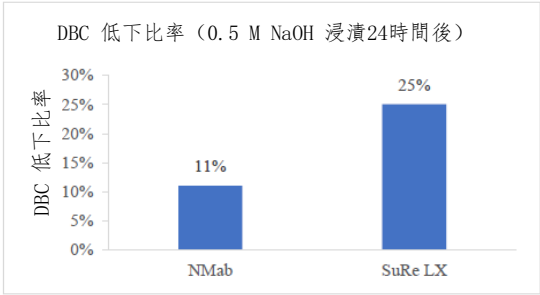


図 4. NMab®媒体における宿主タンパク質の主残留量比較図。

耐アルカリ性試験

25℃で、充填材を0.5M水酸化ナトリウムに24時間浸漬します。特定の抗体Bを使用して、親和充填材の強アルカリ浸漬前後に動的結合容量 (DBC) を測定し、浸漬後のDBCが浸漬前に比べてどれだけ低下するかを耐アルカリ性能の評価指標とします。DBCの低下率が小さいほど、耐アルカリ性が高いことを示します。



寿命周期

NMab充填材が単クローン抗体 (mAb) に対して150回のサイクルにおける動的結合容量 (dynamic binding capacity, DBC)、純度、圧力、および一定使用回数内の充填材性能の変化を評価しました。各サイクルにはmAb細胞培養液の充填、洗浄、洗脱、CIPおよび再平衡のステップは含まれていません。図6、図7、図8および図9は、それぞれ異なる使用サイクルでのUV280、DBC、純度および圧力の変化を示しており、充填材の使用寿命を評価するためのものです。

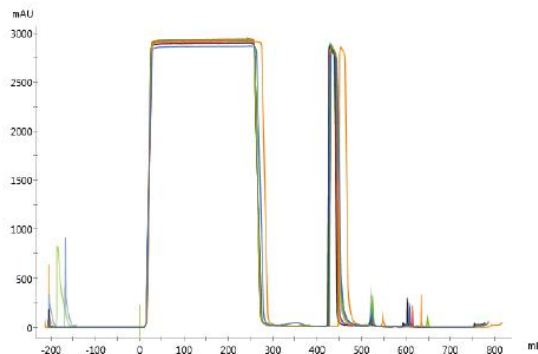


図 6. NAb® 寿命の各10サイクル毎のデータ重ね合わせ図 (UV280)

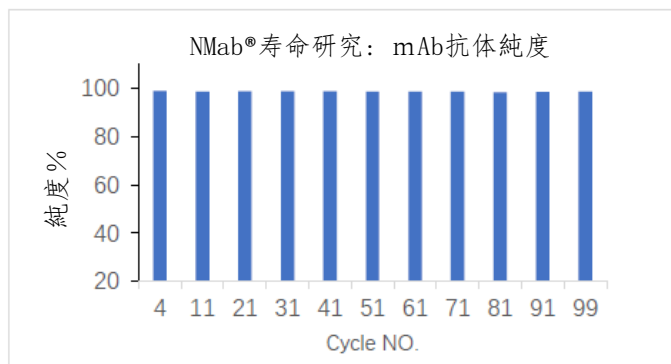


図 8. NAb® 寿命テスト 洗脱サンプルの純度検査データ

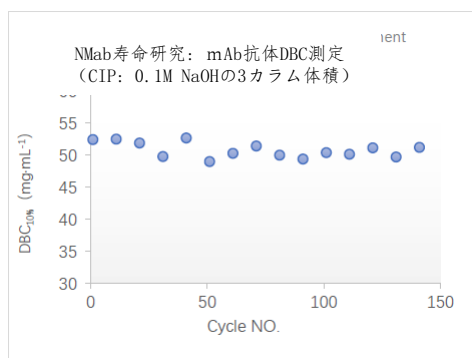


図 7. NAb® 寿命テスト DBC10% の傾向

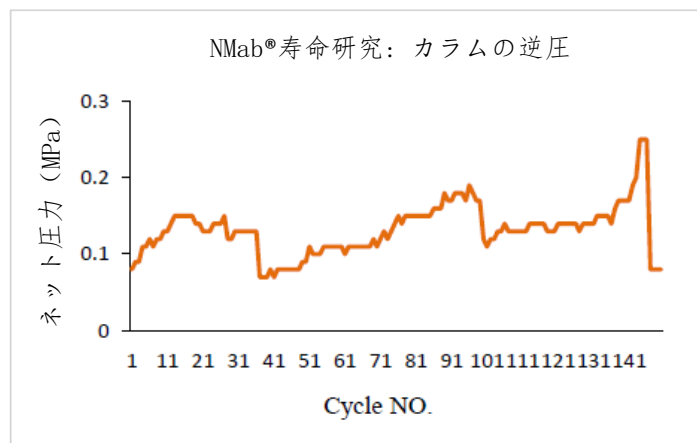


図 9. NAb® 寿命テスト カラム圧力データ

結論

150回の寿命周期テストを経た結果、NAb®充填材の結合容量はすべて初期結合容量の90%以上を維持し、その減少は比較的緩やかでした。分離性能、圧力、流速の性能も安定しており、100回以上の再使用が可能で、寿命周期は良好であると評価できます。

操作案内

スラリー濃度測定

NMab®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、0.5 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:

$Vc = h \times \pi r^2$ ---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1～2 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: 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) : 3~5CV 0.1~0.5MNaOH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0.45µm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、NMab®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®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®	30 mL	17013-090100-2030
	50 mL	17013-090100-2050
	100 mL	17013-090100-2100
	300 mL	17013-090100-2300
	500 mL	17013-090100-2500
	1 L	17013-090100-1001
	5 L	17013-090100-1005
	10 L	17013-090100-1010
	50 L	17013-090100-1050
	100 L	17013-090100-1100

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。