

Capto adhere

MULTIMODAL MEDIA

Capto™ adhere はマルチモーダルのBioprocess担体で、プロセススケールにおけるProtein A精製後のモノクローナル抗体 (MAb) 精製用に開発されました (図1)。強マルチモーダルリガンド (図2) は従来のイオン交換担体と選択性が異なります。Capto adhereはDNA、宿主細胞由来タンパク質 (HCP)、漏出Protein A、二量体およびさらに大きな凝集体、ウイルスなどの主要な夾雑物を1ステップで除去できるため、MabSelect SuReと組み合わせた2ステップ工程を組立てられます。必要に応じて、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィーを組合せ、Capto adhereをあらゆるMAb精製プラットフォームの最終工程の第2または第3ステップに組み込むことができます。

Capto adhereの主な特長:

- ・ 高い結合容量および生産性
- ・ Protein A精製画分に含まれる夾雑物を製剤レベルまで除去
- ・ 幅広いpHおよび塩濃度で操作可能
- ・ 2ステップクロマトグラフィーにより、時間と運転コストを削減

高剛性マトリックスにより高流速が可能に

Capto adhereは剛性の高いアガロースマトリックスをベースとしており、高流速で使用可能です。高度架橋アガロースベースのマトリックスにより、担体の化学的、物理的安定性が向上しました。ベースマトリックスの一般的な特長は Data File 11-0035-45 (Capto MMC) に記載されています。Capto adhereはプロセスクロマトグラフィーおよび洗浄時に使用する一般的な条件で安定しています (表1)。



図1 2ステップ (MabSelect SuRe/Capto adhere) 工程によるMAbの大規模精製を可能にするCapto adhere

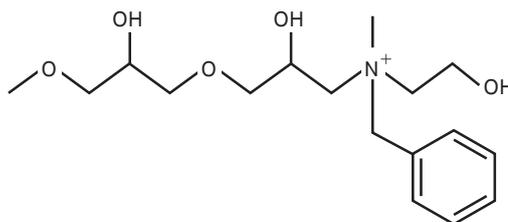


図2 Capto adhereのリガンド、N-Benzyl-N-methyl ethanolamineの構造
相互作用する官能基が数種類あります。最も顕著なのはイオン結合、水素結合および疎水性相互作用です。

凝集体の除去

培養液中の発現量が高くなると凝集体や夾雑物量が増加する傾向があります。Capto adhereは製剤レベルで求められる値まで凝集体を除去できます。

MabSelect SuReで精製したIgG1 (BioInvent International, Sweden) を含む細胞培養上清をサンプルとして使用しました。この溶出画分について凍結融解を数回繰り返して、凝集体を形成しました。Superdex 200を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによる測定の結果、この画分の凝集体含量は約6%でした。

表1 Capto adhereの仕様

ゲルマトリックス	高度架橋アガロース
荷電基	マルチモード強イオン交換体
イオン交換容量	0.09 ~ 0.12 mmol Cl-/ml 担体
粒子径*1	75 µm (d50v)
流速*2	> 600 cm/h
	カラム内径1 m、ベッド高20 cm、20℃、< 3 bar (0.3 MPa)、水と同等の粘度のバッファーを使用の場合
pH安定性*3	
短期	2~14
長期	3~12
操作温度*4	4~30℃
化学耐性*5	クロマトグラフィーに通常使われるすべての水系バッファーで安定
	1 M酢酸、1 M NaOH
使用不可	酸化剤、陰イオン性洗剤

- *1 d₅₀は粒度分布から求められた平均粒子径を示します。
- *2 高流速下では夾雑物に対する除去能が低下する場合があります。
- *3 pH安定性(短期):カラムクリーニングの際に短時間接触できるpH範囲です。
pH安定性(長期):担体の性能を大きく損なうことなく操作できるpH範囲です。
- *4 Capto adhereは低温室で使用することができますが、夾雑物に対する除去能が低下する場合があります。
- *5 1 M NaOH、40℃で一週間保存したところ、結合容量や漏出炭素量に顕著な変化はみられませんでした。

Capto adhereの性能を最大限に引き出すためには、夾雑物を可能な限り担体に吸着させ、一方で単量体のMAbを素通りさせるのに最適な条件をスクリーニングする必要があります。至適化には実験計画 (DoE) 法の採用をおすすめします。DoEの設定についての詳細はApplication Note 28-9078-89を参照してください。

pH、電気伝導度および添加濃度は結合容量に影響するため、DoEの変数とします。溶出にpHグラジエントを用いて結合モードに関する予備実験を行い、DoEのpH範囲を決定します。溶出位置は溶出ピーク頂点のpHより低めのpHに設定します。pHの上限は約2 pH高い値にします。この実験結果を表2にまとめました。

この抗体に関して、回収率はpHに影響を受け、電気伝導度および100~200 mg/mlの範囲であれば添加濃度にも依存しません。pHを高い値から低い方へ変化させると、回収率は非直線的に増加します (図3)。

凝集体のクリアランスはpH、電気伝導度および添加濃度(図4)に影響を受けます。pHおよび電気伝導度が高いほど、あるいは添加濃度が低いほど、凝集体の除去効率が向上します。上記の結果を用いて、凝集体除去に適した添加条件 (pH 6.5、電気伝導度30 mS/cm) を選択しました。図5にそのクロマトグラム、表3に添加濃度が凝集体クリアランスに及ぼす影響をまとめました。265 mg/mlのサンプルを添加した場合、総回収率は94%でした。約120 mg/mlのサンプルを添加した場合には凝集体含量が6%から0.6%へ、1/10に減少しました。

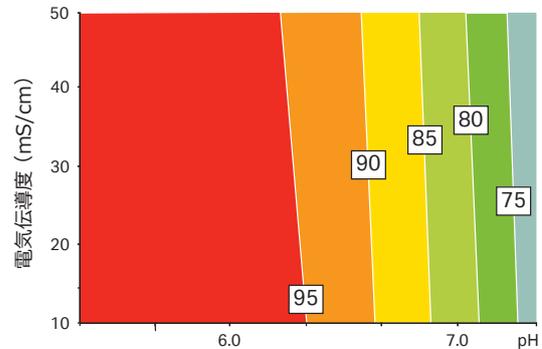


図3 回収率に対するpHの影響を示す相関図

添加濃度および電気伝導度は回収率に大きな影響を及ぼしません。pHが低いと回収率は高くなります。回収率はパーセントで表示しています (□内)。

表2 DoEによる実験の結果

pH	電気伝導度 (mS/cm)	添加濃度 (mg IgG/ml)	凝集体 (% in flowthrough)	回収率 (%)
5.5	10	100	0.77	94
5.5	10	200	0.98	100
5.5	50	100	0.3	94
5.5	50	200	0.52	99
6.25	30	150	0.29	93
6.25	30	150	0.25	95
7	10	100	0.13	47
7	10	200	0.29	76
7	50	100	0.24	74
7	50	200	0.35	68

表3 出発物質と各濃度のサンプル添加時および溶出画分中の凝集体含量

添加濃度 (mg IgG/ml)	凝集体	
	%	除去率
出発物質	6	Not applicable
60	0.7	8.8
120	0.6	10.3
150	0.9	6.4
180	1.2	4.9
265	2.2	2.7
プール画分	1.3	4.8
溶出画分	~ 60	Not applicable

ウイルスクリアランス

Capto adhereのウイルスクリアランス試験を2つの代表的なウイルス、マウス微小ウイルス（MVM）およびマウス白血病ウイルス（MuLV）を用いて行いました。まず、モノクローナル抗体IgG1をCHO細胞培養上清からMabSelect SuReを用いて精製しました。溶出液回収画分のバッファー濃度およびpHを一般的な条件に調整しました。また、電気伝導度は塩化ナトリウムを添加して10または30 mS/cmに調整しました。そのサンプルにウイルス溶液をスパイクし、次にCapto adhereに素通りモードで添加しました。10 mS/cmにおける対数（log10）除去率はMVMおよびMuLVに対してそれぞれ5.8および4.5でした。従来のイオン交換担体は機能しない高い電気伝導度（30 mS/cm）条件下においても、除去率はMVMおよびMuLVに対してそれぞれ5.9および3.6でした（表4）。

表4 ドイツNewLab BioQualityAG社で実施したCapto adhereのウイルスクリアランス試験

pH 6.75、温度22℃の条件下で、2回試験を実施

ウイルス	電気伝導度 (mS/cm)	Log10 除去率 ± 95% 信頼限界
MVM	10	5.8 ± 0.3
MVM	30	5.9 ± 0.3
MuLV	10	4.5 ± 0.4
MuLV	30	3.6 ± 0.4

カラム: Tricorn™ 5/50, ベッド高 3 cm
 サンプル: MabSelect SuRe溶出画分
 添加量: 265 mg of MAb/ml担体
 結合バッファー: 20 mMクエン酸、300 mM塩化ナトリウム、pH 6.5 (電気伝導度 30 mS/cm)
 溶出バッファー: 0.1 M 酢酸, pH 3.0
 滞留時間: 2 min
 システム: ÄKTExplorer™ 100

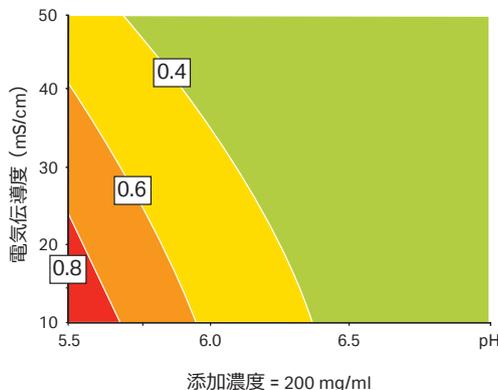
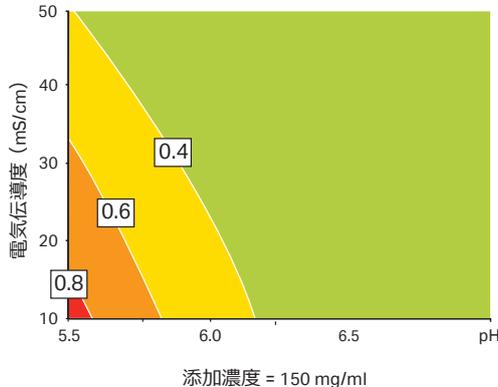
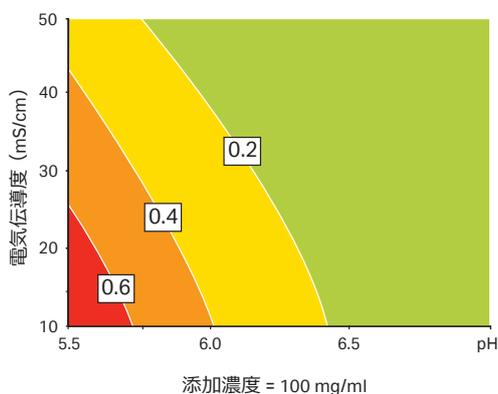


図4 凝集体クリアランスに対するpH、電気伝導度および添加濃度の影響を示す相関図

pHおよび電気伝導度を高くし、添加濃度を低くすると最も効率よく凝集体が除去できる。素通り画分中の凝集体濃度はパーセントで表示しています（□内）。

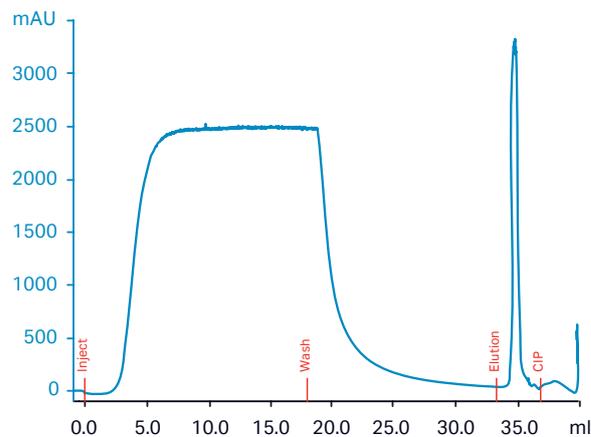


図5 IgG1 MAbの精製: Capto adhereによる最終精製

MAbの2ステップ精製

MAbの大規模精製工程には通常3つのクロマトグラフィーステップが含まれます。第一ステップは、Protein Aカラムによるアフィニティー精製で、一般に99%程度という高純度で回収ができます。次には、凝集体や他の夾雑物を除くために、陽イオンおよび陰イオン交換クロマトグラフィー、場合によっては疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）と組み合わせることで精製します。弊社ではクロマトグラフィー担体製品群を駆使してこの工程を簡略化します。

高純度が得られるProtein A担体の吸着ステップ後、新しく開発されたマルチモーダルのCapto adhereを採用することにより、MAb精製工程にMabSelect SuReとCapto adhereをベースとした2ステップ工程を組立てることが可能になります（図6）。このコンセプトを検証するために、IgG1 (Polymun Scientific, Austria)を含む細胞培養上清をまずMabSelect SuReで精製し、次にCapto adhereで最終精製を行いました。

Capto adhereステップの回収率は92%でした。HCP濃度は250 ng/mlから20 ng/ml (7.5 ppm)へ減少し、Protein A含量は検出限界以下でした。MabSelect SuRe溶出画分の凝集体濃度はすでに低く (< 0.7%)、最終精製後は検出限界以下になりました（図7、赤線）。Capto adhereに吸着した物質を溶出すると約5%の凝集体（および他の低分子量不純物）が含まれていたことから、Capto adhereが結合ステップ後に残存した凝集体を効率よく吸着することが示されました（図7、青線）。

MabSelect SuRe/Capto adhereの2ステップ工程とMabSelect SuRe、Capto SおよびCapto Qをベースとした3ステップ工程（図6）を比較したところ、両者とも回収率は同等、不純物も製剤として受け入れられるレベルであること示されました（表5：HCP含量< 10 ppm、Protein A濃度は検出限界以下、凝集体濃度は0.1%未満）。

2ステップクロマトグラフィー工程は、典型的な3ステップの精製工程と比較して、時間の短縮および運転コストの削減によって生産性が向上します。

MABの3ステップ精製

必要に応じて、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、あるいはHICと組合せて、Capto adhereをあらゆるMAB精製プラットフォームの最終工程として第二または第三ステップに組み込むことができます（図6）。

Capto Qの工程を2ステップモデルに加えたところ、このステップにおける回収率は99.7%、すでに低レベルのHCPはさらに50%減少しました（データなし）。

添加条件

—Capto adhereの一般的な傾向

各種抗体を用いて実施したDoEにより、以下の一般的な傾向が確認されました（図8）。

- ・ 回収率を最大にするには、添加濃度は高く、pHは低く、電気伝導度は高くする。
- ・ 凝集体の除去効率を最大限にするには、pHは高く、一方で添加濃度と電気伝導度は低くする。
凝集体のクリアランスは、Protein AやHCPと比較して、電気伝導度の影響を受けにくい。
- ・ Protein AおよびHCPのクリアランスを最大にするには、pHは高く、一方で電気伝導度と添加濃度は低くする。

たとえ各指標に対する最適条件が一致しなくても、これら4つすべての指標に対して十分な値が得られる条件は、比較的広い範囲で存在します。

Protein A抗体とCapto adhereを用いた2ステップ工程で得られた5種類のMABの至適添加条件における回収率、夾雑物のクリアランスを表6に示しています。この表からも、至適電気伝導度は予測が困難ですが、pHは通常等電点よりも低い値をとることがわかります。

操作

迅速なメソッド開発

選択性およびプロセス条件に関する初期のスクリーニングは、プレパックのHiTrapカラムとÄKTAexplorerで行うことができ、メソッド開発を迅速に進めることができます。

表5 2ステップ工程（MabSelect SureとCapto adhere）または3ステップ工程（MabSelect Sure、Capto SとCapto Q）で精製したMABの回収率および純度の比較

結果	2ステップ工程	3ステップ工程
総回収率 (%)	90	90
凝集体 (%)	< 0.1	< 0.1
Protein A (ng/ml)	< 5	< 5
Protein A (ppm)	n.q.	n.q.
HCP (ng/ml)	20	20
HCP (ppm)	7.5	3

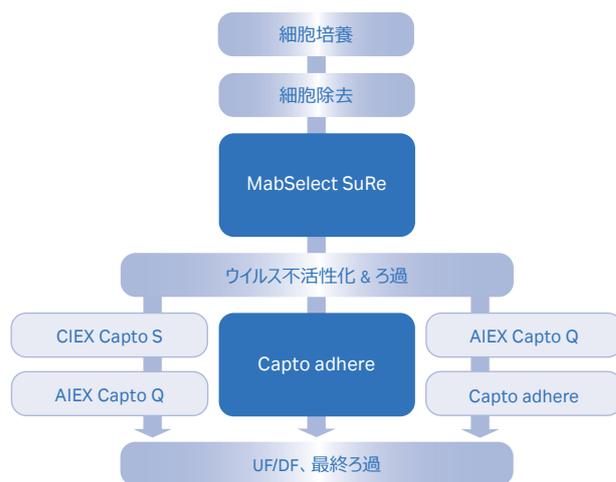


図6 Capto adhereを組込んだMABの精製スキーム

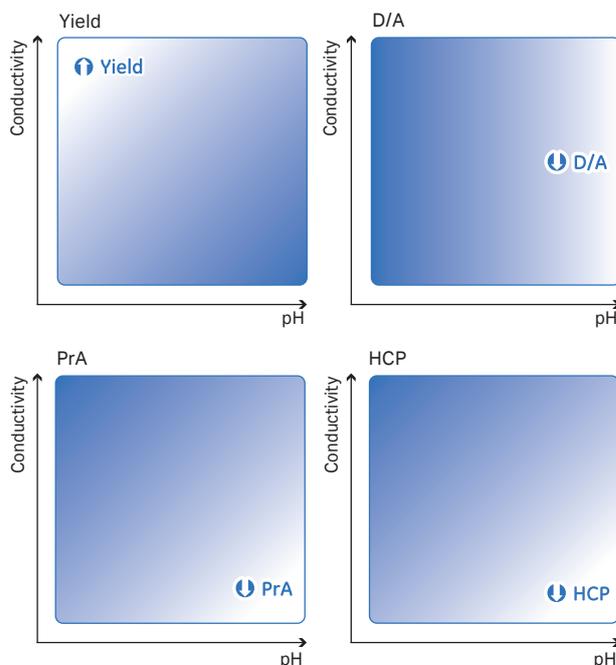


図8 添加条件（電気伝導度とpH）と回収率（Yield）ならびに凝集体（D/A）、Protein A（PrA）、HCPクリアランスの一般的な傾向

表6 異なる5種類のMAbの至適添加条件における回収率ならびに凝集体、Protein A、HCPクリアランス

MAb	pI	pH	電気伝導度 (mS/cm)	回収率 (%)	凝集体 (%)	Protein A (ppm)	HCP (ppm)
1	~9	7	8	90	0.5	n.q.	< 15
2	8.3-8.9	5.5	3	95	0.6	n.q.	2
3	7.5 - 8.4	6	2	95	0.8	n.q.	9
4	7.7 - 8.0	7	20	91	0.2	n.q.	30
5	6.5 - 9.0	7.5	20	92	< 0.1	n.q.	7.5

カラム: Superdex 200 10/300 GL
 サンプル: Capto adhereステップでの素通り画分 (赤) と溶出画分 (青)
 添加量: 各50 µl
 バッファー: 0.01 Mリン酸ナトリウム、2.7 mMリン酸カルシウム、137 mM塩化ナトリウム、pH 7.4
 流速: 0.5 ml/min
 システム: ÄKTExplorer

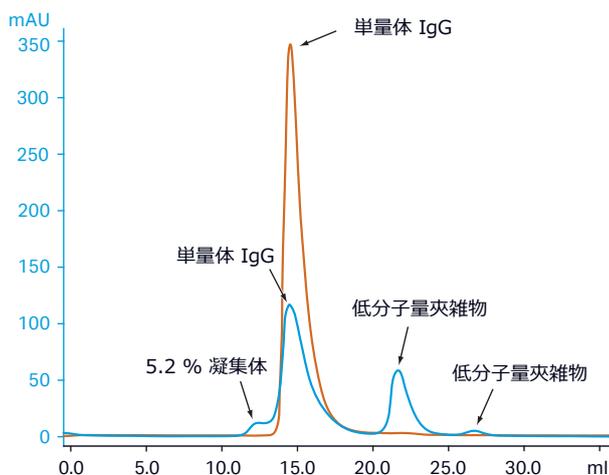


図7 Capto adhereの素通りおよび溶出画分のゲルろ過クロマトグラフィーの分析結果

素通り画分 (赤) : 単量体IgG 溶出画分 (青) : 5.2%の凝集体、単量体IgG、低分子量夾雑物

TricornまたはXKカラムを用いたさらなる至適化およびメソッド開発をすれば、生産スケールへスケールアップできます。

ÄKTAdesignシステムのUNICORNソフトウェアを用いれば、その至適化されたメソッドを生産スケールのプロセスシステムへ簡単に移行できます。

スケールアップ

一般にスケールアップは、ベッド高と線流速 (cm/h) を一定 (一定滞留時間) にしたままでカラムベッド径および実流速 (l/min) を増加します。カラムのベッド高または滞留時間が変わると、回収率および重要な不純物のクリアランスが変化する可能性があるため、製造予定のベッド高でバリデーションを実施してください。

洗浄および殺菌

定置洗浄 (Cleaning-in-place ; CIP) は、再生後に充填カラム内に残存する脂質、エンドトキシン、核酸、沈殿または変性したタンパク質などの夾雑物を除去する方法です。定期的にCIPを行えば、担体ベッド中の夾雑物の蓄積を防ぐことができ、Capto adhereの結合容量、流速特性および基本的な性能の維持に役立ちます。

各サイクル後にCIPを実施することが一般に推奨されています。

存在する夾雑物の種類に応じて工程ごとに適したCIPプロトコールを計画する必要があります。CIPの頻度は供給原料の特性および条件に依存します。Capto adhereは、1 M NaOH、2 M NaClまたは70%エタノールなどの標準的なCIPに用いられる溶媒に耐性があります。

保存

使用後の担体は、容器に入れ4~30℃で保存してください。必ずねじぶたを完全に閉めてください。充填済みカラムは20%エタノールで平衡化して微生物の繁殖を抑えてください。保存後、使用する前には、5ベッドボリューム以上の添加バッファーで平衡化してください。

装置

Capto adhereは実験室スケールから製造スケールで使用されるほとんどすべてのクロマトグラフィー装置で使用可能です。おすすめの装置については表7を参照してください。

製造スケールクロマトグラフィー用 BioProcess担体

Capto adhereは製造スケールクロマトグラフィー用に開発されたBioProcess担体の一つです。本製品はバリデートされた方法で製造され、安定供給をしています。またプロセスバリデーションおよび規制当局への申請を支援する、Regulatory Support Files (RSF) を提供しています。

表7 Capto adhere充填に適切なカラム

カラム種類	サイズ (内径)
Tricorn	5 mm, 10 mm
XK	16 mm, 26 mm
FineLINE™	35~350 mm
BPG™	100~300 mm*
BioProcess LPLC	100~1200 mm
Chromaflo™	400~2000 mm

*BPG 450はCapto adhereを使用する上で耐圧が低いため適していません。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Capto adhere	25 ml	17-5444-10
	100 ml	17-5444-01
	1 l	17-5444-03
	5 l	17-5444-04
	10 l	17-5444-05
HiTrap Capto adhere	60 l	17-5444-60
	5×1 ml	28-4058-44
	5 × 5 ml	28-4058-46

Capto adhere バルク担体は20% エタノールに懸濁された状態で供給しています。詳細は最寄りの弊社販売代理店へお問合せください。

Application notes	Code No.
Optimization of loading conditions on Capto adhere using design of experiments	28-9078-89
Selective removal of aggregates with Capto adhere	28-9078-93
Two-step purification of monoclonal IgG1 from CHO cell supernatant	28-9078-92
Other literature	
Data file MabSelect SuRe	11-0011-65
Data file Capto Q Capto S	11-0025-76

謝辞

BioInvent international AB(Lund, Sweden)より、NSφ細胞株供給原料、Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Nassdorfer Lindell, 1190 Vienna, Austria)より、CHO細胞培養上清を提供いただきました。ウイルスクリアランス試験はNewLab BioQuality AG(Erkrath, Germany)で実施いただきました。

www.cytivalifesciences.co.jp

掲載されている内容および価格は2020年6月現在のものです。価格は希望小売価格（消費税は含まれておりません）であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている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。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
〒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@cytiva.com

