

## Eshmuno® CP-FT 樹脂

凝集体をフローモードで除去するために開発された陽イオン交換樹脂。

治療用モノクローナル抗体 (mAb) において凝集体が存在した場合、免疫原性反応の増加や効果の低下により、患者の方々にとって大きなリスクとなります。凝集体は他の mAb の不純物とは異なり、プロテイン A クロマトグラフィーでは効率よく除去することができません。タンパク質の凝集体はモノマーと等電位点や疎水特性が非常に類似しているため、モノマーとの分離が特に課題となります。

Eshmuno® CP-FT 陽イオン交換 (CEX) 樹脂は特にフローモードのクロマトグラフィー操作モードで mAb 凝集体を効率よく除去するために開発されており、従来の結合/溶出 CEX クロマトグラフィーに比べてローディング容量が一桁上回ります。Eshmuno® CP-FT 樹脂を使用すれば製造の柔軟性とプロセス強化がいつそう向上するとともに、mAb のダウンストリーム精製における総コストが削減できます。

### 利点

#### パフォーマンスの向上

- mAb 凝集体のフローモード除去に優れています
- 高負荷容量時の収率向上

#### コスト削減

- 樹脂とバッファーの使用量を大きく削減
- 製造プラントのサイズを縮小 (カラムやバッファータンクの小型化など)

#### 強化プロセス

- 低塩濃度のプロセス条件であるため、次ステップのイオン交換ステップの前に希釈する必要がありません
- 処理体積が非常に小規模になり、ウイルス除去のためのろ過、限外ろ過が節約できます

#### 簡便な使用

- 基材のビーズは硬質なので、高流速でカラム充填も容易です



## フロースルーの効率化

Eshmuno® CP-FT 樹脂はクロマトグラフィーに有利な強い結合条件 (pH 4.0 ~ 5.5、3-7 mS/cm) で凝集体を効率よくフロースルー除去するために開発されました。このような条件下では、当初は mAb モノマー、mAb 凝集体はどちらも Eshmuno® CP-FT 樹脂に結合します。この樹脂の表面には新規の CEX テンタクル (触手) 化学構造があり (図 1)、モノマーはサイズの大きな凝集体があると外れやすくなっており、クロマトグラフィーのメカニズムによって凝集体を効率よく除去できます。

図 2 の例では、従来法では除去が容易ではないレベルの凝集体 (7%) を含む mAb フィード液の場合でも、効率よく除去できることを示しています。モノマーは凝集体よりもずっと速くカラムを通過 (破過) します。カラム負荷量 600 g/L の場合のモノマーの回収率は 85% を超えていますが、負荷量が 1000 g/L までフロースルー中の凝集体は 1% 未満です。

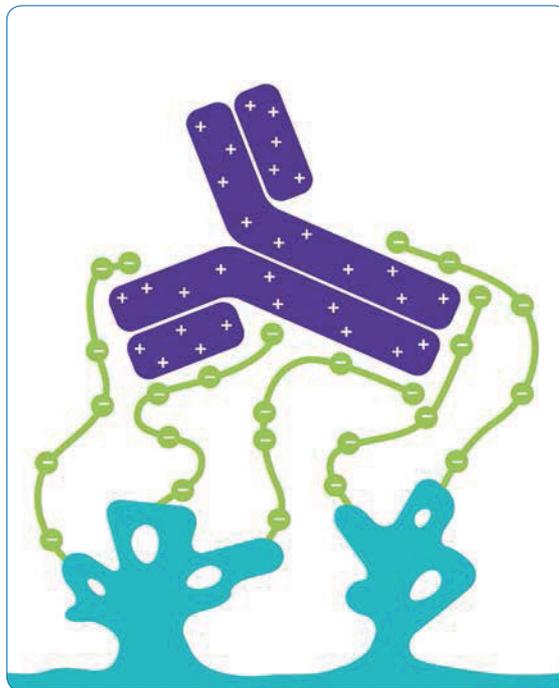


図 1.

樹脂のテンタクル (触手) 構造は多結合点の 3 次元的イオン交換ネットワークを形成し、タンパク質のリガンドへのアクセスが容易で、高速な物質移動が可能となります。

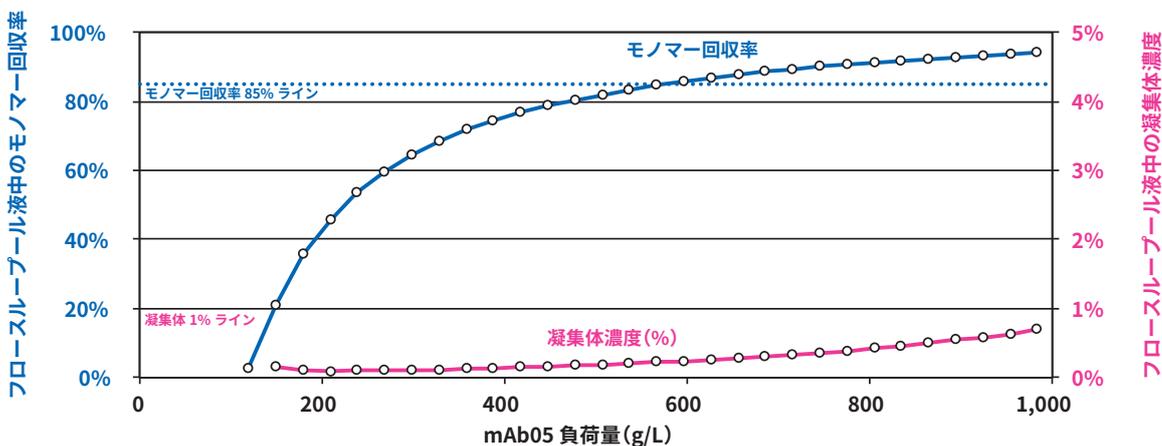


図 2.

mAb05 溶液のカラムへの負荷量に対する mAb05 モノマーの累積回収率 (青色—)。mAb05 溶液のカラムへの負荷量に対する凝集体の累積濃度 (ピンク色—)。

高負荷量の場合に Eshmuno® CP-FT 樹脂をフロースルー CEX クロマトグラフィーに使用すると、従来の結合/溶出クロマトグラフィーのプロセスに比べて非常に経済的になります。例えば、1 kg の mAb を Eshmuno® CP-FT 樹脂を使用して 1,000 g/L の負荷量で精製する場合、必要な樹脂はわずかに 1 L で、バッファーも 150 L です (図 3)。CEX 結合/溶出クロマトグラフィーでは負荷量 80 g/L の場合で樹脂 12.5 L、バッファー 3,125 L が必要になりますので、大幅な節約となります。

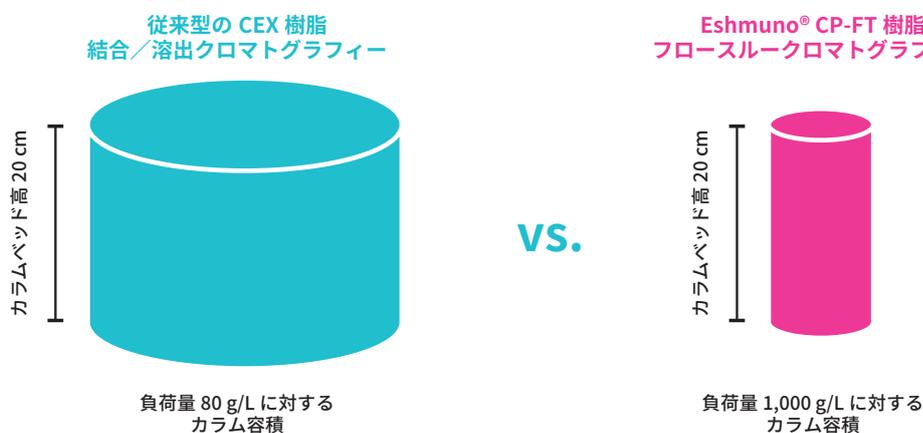


図 3.

1 kg の mAb 精製に要するカラム容積。

## 実証されたパフォーマンス

異なる mAb フィード液 2 種に対し、3 ステップのダウンストリーム精製の一部として凝集体と宿主由来タンパク質の除去を試験しました (図 4)。この 3 ステップ精製は、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーステップ (Eshmuno® A 樹脂) の後に CEX クロマトグラフィーを結合/溶出モード (Eshmuno® CPX 樹脂) またはフロースルーモード (Eshmuno® CP-FT 樹脂) で用い、最後に強陰イオン交換 (AEX) 樹脂 (Eshmuno® Q 樹脂) ステップを置いたものです。

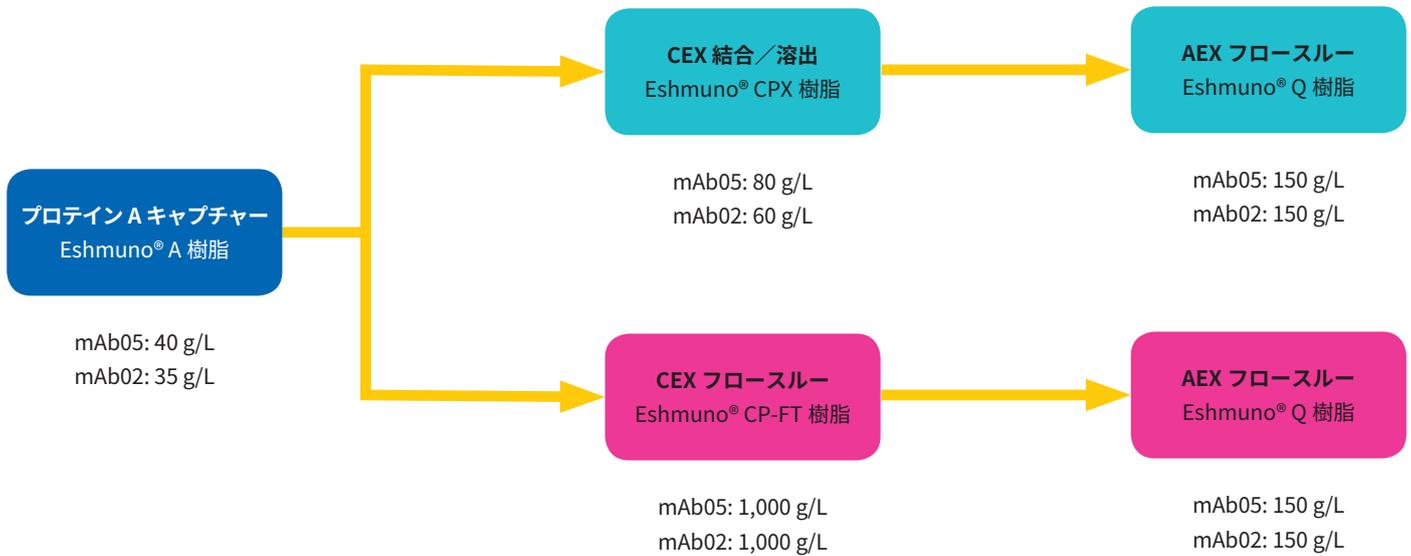


図 4.

mAb05 および mAb02 の 3 ステップ精製のフローチャート。各精製ステップにおける負荷量は各ステップ単位操作の下に列記。

表 1.

mAb05 の精製について、CEX 結合/溶出クロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製と、CEX フロースルークロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製を比較。

クロマトグラフィーステップ	負荷量 (g/L)	モノマー回収率	フロースルー プール液中の 凝集体	フロースループール 液中の宿主由来タン パク質 (ppm)	mAb 濃度 (g/L)
1. キャプチャー: Eshmuno® A 樹脂 (pH 5.0 に調整)	40	88%	3.10%	47	15.1
2. CEX 結合/溶出: Eshmuno® CPX 樹脂	80	87%	0.40%	3	15.8
3. AEX フロースルー: Eshmuno® Q 樹脂	150	>99%	0.40%	1	3.1
2. CEX フロースルー: Eshmuno® CP-FT 樹脂	1,000	92%	0.60%	17	13.6
3. AEX フロースルー: Eshmuno® Q 樹脂	150	>99%	0.60%	3	8.7

表 2.

mAb02 の精製について、CEX 結合/溶出クロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製と、CEX フロースルークロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製を比較。

クロマトグラフィーステップ	負荷量 (g/L)	モノマー回収率	フロースルー プール液中の 凝集体	フロースループール 液中の宿主由来タン パク質 (ppm)	mAb 濃度 (g/L)
1. キャプチャー: Eshmuno® A 樹脂 (pH 6.0 に調整)	35	97%	2.88%	228	14.9
2. CEX 結合/溶出: Eshmuno® CPX 樹脂	60	98%	1.84%	63	9.9
3. AEX フロースルー: Eshmuno® Q 樹脂	150	99%	1.44%	4	3.1
1. キャプチャー: Eshmuno® A 樹脂 (pH 4.0 に調整)	35	97%	2.43%	302	15.4
2. CEX フロースルー: Eshmuno® CP-FT 樹脂	1,000	91%	0.77%	181	13.7
3. AEX フロースルー: Eshmuno® Q 樹脂	150	>99%	0.98%	9	8.5

mAb05 のケーススタディ 1 では、1,000 g/L 負荷の CEX フロースルークロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製の宿主由来タンパク質と凝集体の除去量は、80 g/L 負荷の結合／溶出 CEX クロマトグラフィーステップを含む 3 ステップ精製と同程度であることが示されました。CEX フロースルーステップを使用した場合にはフィード液の電導度が低く、Eshmun<sup>o</sup> Q 樹脂の AEX フロースルーステップにかける前に希釈する必要があります。このため次ステップのウイルス除去のためのろ過、限外ろ過の処理量が少なくて済みます。その結果、Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂を使った場合には樹脂とバッファー量が非常に少なくて済むので、強化したプロセスの際の凝集体の除去に理想的なものとなります。

mAb02 のケーススタディ 2 では、Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂を用いたフロースルークロマトグラフィーステップは結合／溶出 CEX クロマトグラフィーステップよりも高効率であり、mAb 凝集体のレベルを目標値の 1% 未満に低減できることがわかりました。CEX 結合／溶出クロマトグラフィーステップでは負荷条件を最適化 (pH 6.0) して負荷量を 80 g/L から 60 g/L に下げた場合でも、凝集体のレベルを 1% 未満には下げることができませんでした。この結果は、Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂によるフロースルークロマトグラフィーステップには特別な選択能があり、フィード液中の特に除去困難な凝集体の除去が可能になっていることを示しています。

## フロースルーによるウイルス除去

また、Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂によるウイルスのクリアランス試験も実施し、強結合条件下のフロースルーで mAb05 フィード液中の異種指向性マウス白血病ウイルス (X-MuLV) およびマウス微小ウイルス (MVM) の除去が可能であることが示されました。負荷量 1,000 g/L の条件では、累積の対数除去率 (LRV) は X-MuLV では 3.4、MVM では 3.1 でした (図 5)。この結果は、Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂を凝集体のフロースルー除去に用いれば、ダウンストリームの精製工程としてのウイルス除去にも総じてプラスに貢献していることを示しています。

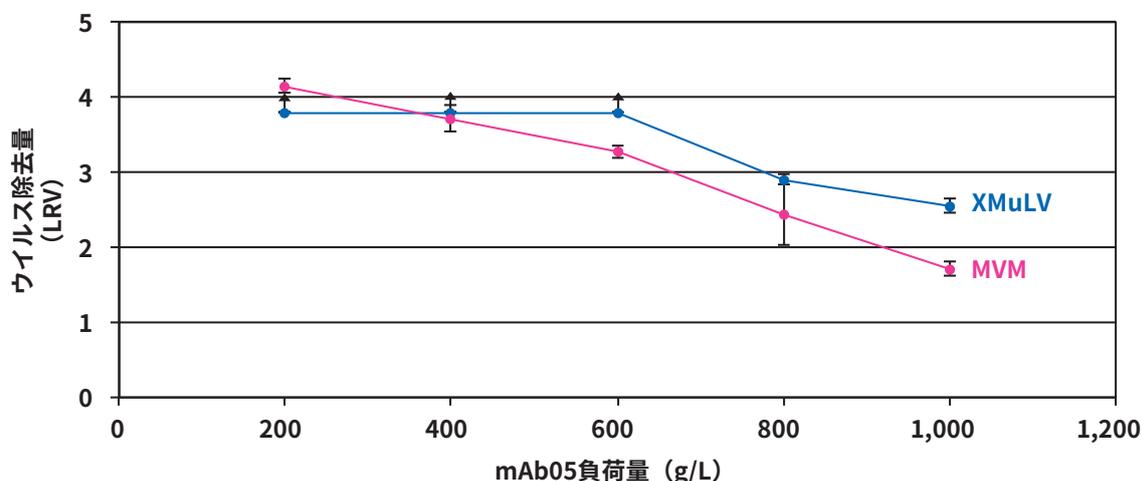


図 5. 凝集体 10% の mAb05 のフィード液を酢酸バッファー (100 mM、pH5.0、導電率 5.0 mS/cm) で透析し、ウイルスを添加後、1.0 mL (内径 0.66 cm、カラムベッド高 3 cm) の Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂カラムでフロースルー処理。ウイルス除去率は処理中を通じて評価し、LRV を Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂への負荷量の増加に対して図示する。ウイルス検出がゼロの試料収集点を矢印で示す。

## 実証された Eshmun<sup>o</sup> テクノロジー

Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂は当社の高性能の Eshmun<sup>o</sup> プラットフォームの製品で、ダウンストリームの精製プロセスに要求される高い生産性を実現するために設計されたクロマトグラフィー樹脂の製品群の一つです。Eshmun<sup>o</sup> の基材のビーズ (図 6) は親水性のポリビニルエーテルポリマーで、これにより高流速を実現し、処理時間を短くできます。Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂は、単純なフロー充填、あるいはアキシャルコンプレッションのいずれの方法でも、製造スケールのサイズのカラムへ容易に充填できます。図 7 は内径 10 cm および 20 cm のカラムに対する圧力-流速曲線で、直線的にスケールアップできことが示されています。

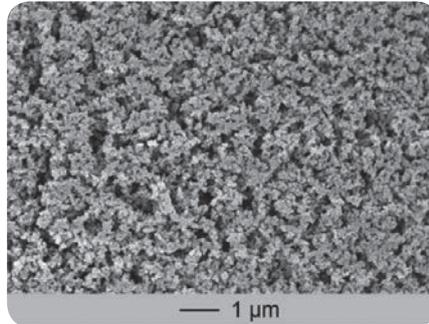
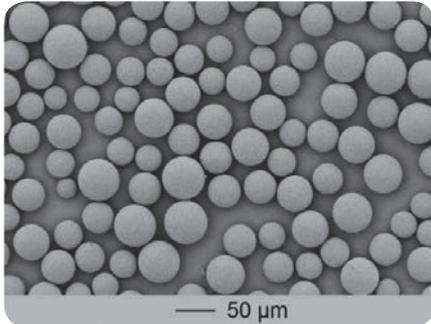


図 6.

粒子サイズ 50 μm の Eshmun<sup>o</sup> CP-FT 樹脂の SEM 写真。

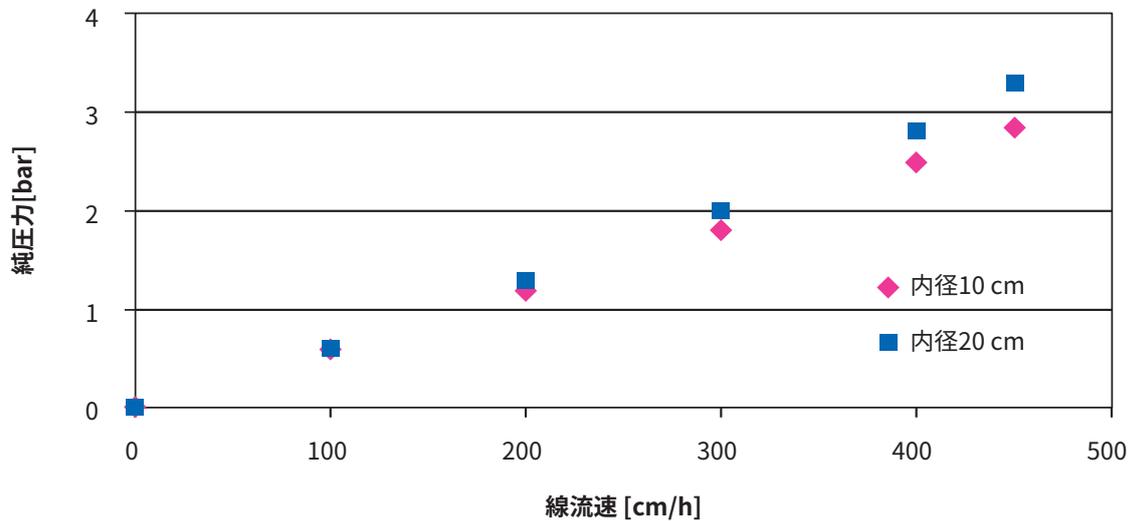


図 7.

0.15 M NaCl、カラムベッド高 20 cm、12% 圧縮の充填で 0.15 M NaCl をランニングバッファーとした場合のフロー。

## 容易なサニタイゼーション

Eshmun<sup>®</sup> CP-FT 樹脂は容易に殺菌洗浄でき、酸・アルカリ条件いずれにおいても優れた安定性を示します。図 8 は 100 回の定置洗浄 (CIP) (各回の洗浄は 60 分間の 1.0 M 水酸化ナトリウム処理) 後でも 3 種のタンパク質の分離に大きな違いがないことを示しています。

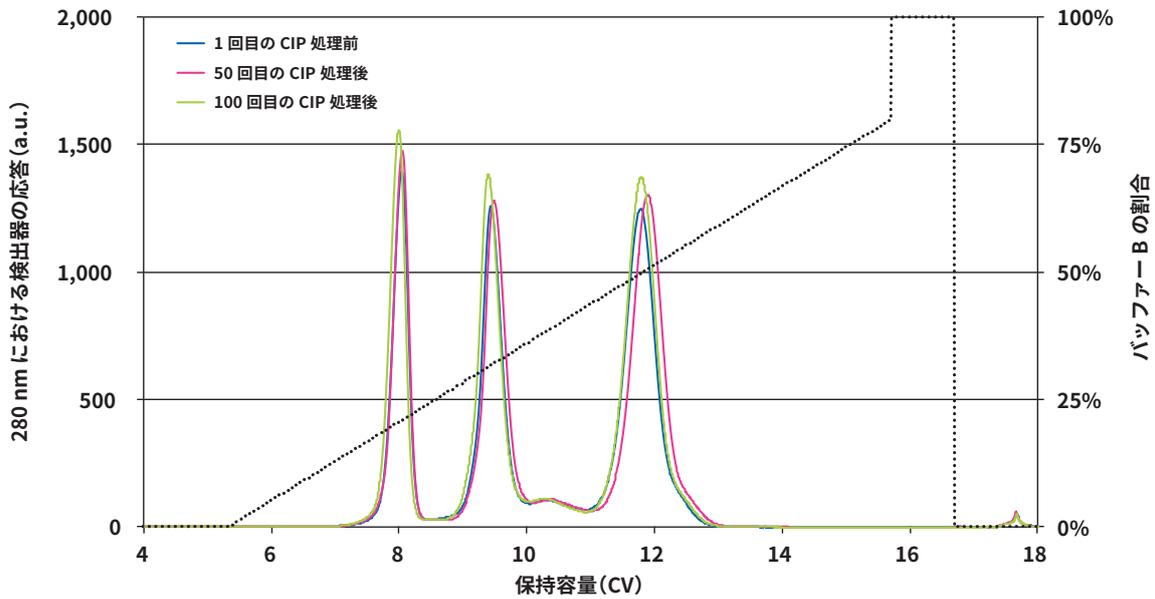


図 8.  $\beta$ -ラクトグロブリン (7.0 mg/mL)、シトクロム c (4.5 mg/mL)、リゾチーム (3.5 mg/mL) を含む 50 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) を 7.85 mL の Eshmun<sup>®</sup> CP-FT 樹脂カラム (内径 1.0 cm、ベッド高 10 cm) に添加。これらのタンパク質を 50 mM の酢酸ナトリウム (pH 5.0) のリニアグラジェントでゆっくり溶離させた。塩濃度は 10CV 以降では 1.0 M の塩化ナトリウム (pH 5.0) の 80% まで増加させた。クロマトグラムは Eshmun<sup>®</sup> CP-FT 樹脂カラムによる試行 1 (青)、試行 50 (赤紫) および試行 100 (緑) における  $\beta$ -ラクトグロブリン、シトクロム c、リゾチームの分離を示し、各試行では 60 分間の 1.0 M 水酸化ナトリウム処理を行っている。

## プロセス開発ツール

Eshmun<sup>®</sup> CP-FT はプレパック済みの、即時使用のカラムがご利用いただけます。MiniChrom はラボスケールのプロセス開発用で、すべてのクロマトグラフィーシステムでご利用いただけます。RoboColumn<sup>®</sup> プレパックカラムはクロマトグラフィーロボットシステムと併用して、ハイスループットのプロセス開発に利用できます。これらの小容量カラムは初期の樹脂スクリーニング、スケーリングおよび最適化の試験に理想的です。

表 3. Eshmun<sup>®</sup> CP-FT カラム樹脂の特性

Eshmun <sup>®</sup> CP-FT カラム樹脂	
クロマトグラフィーのタイプ	強陽イオン交換体
官能基	スルホイソブチル基
基材	表面修飾した硬質親水性ポリビニルエーテルポリマー
平均粒子径 (d50)	50 $\mu$ m
pK 値	< 1
pH 安定性	pH 2 ~ 14
機械的安定性	8 bar
線流速	最大 400 cm/h (純圧力 < 3.0 bar) (ただし 20 x 内径 10 cm のカラム、10 ~ 12% の圧縮 (圧縮率 1.11 ~ 1.14 相当)、移動相として 150 mM NaCl を使用した場合)
保管条件	20% EtOH + 150 mM NaCl 溶液、室温
出荷時溶液	20% (v/v) EtOH + 150 mM NaCl 溶液

## ご注文情報

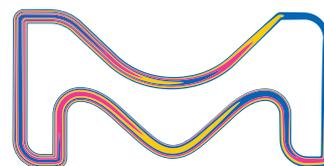
品名	カタログ番号
Eshmuno® CP-FT カラム樹脂、10 mL	1.20093.0010
Eshmuno® CP-FT カラム樹脂、100 mL	1.20093.0100
Eshmuno® CP-FT カラム樹脂、500 mL	1.20093.0500
Eshmuno® CP-FT カラム樹脂、5 L	1.20093.5000
MiniChrom Eshmuno® CP-FT 樹脂プレパックカラム、1 mL 8x20mm	1.25168.0001
MiniChrom Eshmuno® CP-FT 樹脂プレパックカラム、5 mL 8x100mm	1.25169.0001
MiniChrom Eshmuno® CP-FT 樹脂プレパックカラム、0.2 mL 5x10mm	1.25170.0001
RoboColumn® Eshmuno® CP-FT 樹脂プレパックカラム、0.2 mL 8PC 5x10mm	1.25171.0001
RoboColumn® Eshmuno® CP-FT 樹脂プレパックカラム、0.6 mL 8PC 5x30mm	1.25172.0001
<b>バッファー調製</b>	
リン酸 75% EMPROVE® EXPERT	100250
リン酸水素二カリウム (無水) EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, USP	137010
塩化ナトリウム EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, JP, USP	137017
リン酸二水素ナトリウム・二水和物 EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, USP, JPE	137018
水酸化ナトリウム (粒状) EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, JP, NF	137020
水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) EMPROVE® EXPERT	137031
TRIS (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トロメタモール) EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JPC, USP	108386
TRIS (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トロメタモール) 高純度 EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JPC, USP, ACS	108307
TRIS (ヒドロキシメチル) アミノメタン 塩酸塩 EMPROVE® EXPERT	108219
塩酸 (1 mol/L) EMPROVE® EXPERT	110165
酢酸 (1 mol/L) EMPROVE® EXPERT	137035
酢酸 30% EMPROVE® EXPERT Ph Helv	137047
酢酸 (氷酢酸) 100% EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, JP, USP	137000
酢酸ナトリウム (無水) EMPROVE® EXPERT USP	137046
酢酸ナトリウム・三水和物 EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, JP, USP	137012
<b>カラム洗浄と保管</b>	
エタノール 20% EMPROVE® EXPERT	480910
エタノール 20% (v/v) 入り 150 mMol/L 塩化ナトリウム溶液 EMPROVE® EXPERT	480940
塩化グアニジン EMPROVE® EXPERT	137037
水酸化ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) EMPROVE® EXPERT	137058
水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mol/L) EMPROVE® EXPERT	137060
無水エタノール (医薬品製造用添加剤に適) EMPROVE® exp Ph Eur, BP, JP, USP	100986
2- プロパノール 70% (v/v) EMPROVE® EXPERT USP	137040
2- プロパノール EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JP, USP	100995
ベンジルアルコール EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, JP, NF, ACS	137043

詳細情報につきましては弊社ウェブサイト  
[MerckMillipore.com](http://MerckMillipore.com) をご覧ください。

Facebookもチェック 

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ 



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaAの登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は2018年7月時点の情報です。  
©2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

## メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.jp](http://www.merckmillipore.jp)

E-mail: PScommercialservice\_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143 Fax: 03-5434-4827

MK\_DS2057JA Ver. 1.0-1807-PDF-H