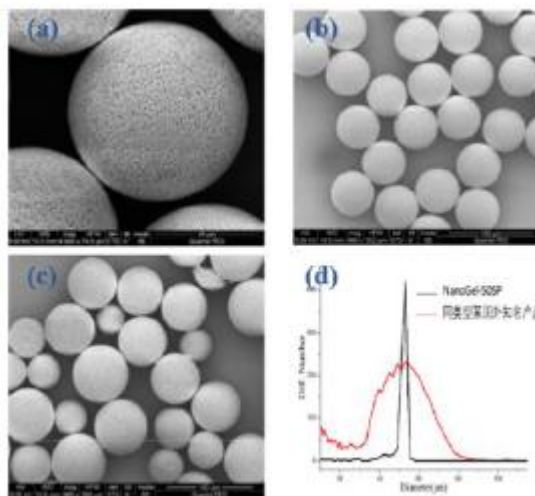


NanoGelシリーズ イオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

大規模生物製薬の生産効率を向上させ、コストを削減するため、特に単クローン抗体 (mAb) やウイルスワクチンなどの生物大分子の分離・精製ニーズに対応するために、精密製造技術を用いて新世代の高性能イオン交換クロマトグラフィー媒体であるNanoGel-50SP、NanoGel-50SP HP、NanoGel-50Q、およびNanoGel-50Q HCを開発しました。このシリーズ製品は、優れた機械的強度、良好な化学的安定性、均一な粒径、およびオープンな超大孔構造を持つポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS-DVB) 微粒子を基材としています。表面の親水性改質によって非特異的吸着が抑制され、独自の表面機能化技術と組み合わせることで、高流速、高分解能、高結合容量、低逆圧などクロマトグラフィーの特長を持っています。

図1. NanoGel-50SPは、ある国際的に有名な充填材P-50XSとの走査電子顕微鏡比較およびコールター粒径測定結果



注: 図a, bはNanoGel-50SP、図cはP-50XS、図dはコールター粒径測定による2種類の媒体の比較を示しています。

図1は、NanoGel-50シリーズのイオン交換クロマトグラフィー媒体とP-50XSの単分散性の比較図です。図からわかるように、NanoGel-50シリーズのクロマトグラフィー媒体の微粒子は粒径が均一である一方、P-50XSは微粒子の粒径分布が広く、一部に団粒 (agglomeration) 成分が含まれています。

表1. イオン交換機能基の分類と用途

タイプ	強陽イオン交換	強陰イオン交換
化学構造	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
略称	SP	Q
主な特徴	酸性が強い、pH1-14に適用	塩基性が非常に強い、pH1-14に適用
pKa値	<2	>12

表2. NanoGel-50 (SP および Q) の基本属性データ

名称	NanoGel-50SP	NanoGel-50SP HP	NanoGel-50Q	NanoGel-50Q HC
分離原理	強陽イオン交換	強陽イオン交換	強陰イオン交換	強陰イオン交換
基質	単分散ポリスチレン/ジビニルベンゼン (PS-DVB)			
粒径	~50 μm			
配基	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$		$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
配基密度	~0.16 meq/mL	~0.14 meq/mL	~0.20 meq/mL	~0.25 meq/mL
動態結合量	~100 mg/mL (Lys)	~70 mg/mL (hIgG)	~80 mg/mL (BSA)	~120 mg/mL (BSA)
最大耐圧	2.0MPa			
CIP在位清洗	1M NaOH			

pH安定性	1~14
化学安定性	すべての一般的な緩衝液、1M 酢酸、1M 塩酸、70% エタノール、30% イソプロパノール、30% アセトニトリル、1% SDS、6M 尿素などの一般的な有機溶剤に安定。強酸化剤（例：次亜塩素酸塩）や酸化酸（例：硝酸）にさらされないようにし、強還元剤（例：亜硫酸塩）や両剤（例：ホルムアルデヒド）に接触しないように注意。
使用温度	4-30° C
保存条件	20% エタノール、4-25° C

高流速、低反圧

高流速クロマトグラフィーは、精製プロセスの期間を短縮し、生産効率を向上させます。NanoGel-50シリーズ製品は、従来のPS-DVB「硬ゲル」の高い機械強度を持ちつつ、単分散性に優れた微粒子の優れた物理特性を有しており、その結果、低反圧で高流速という利点を備えています。下図は、NanoGel-50イオン交換クロマトグラフィー媒体が、高流速範囲においても良好な圧力-流速線形関係を維持していることを示しています。

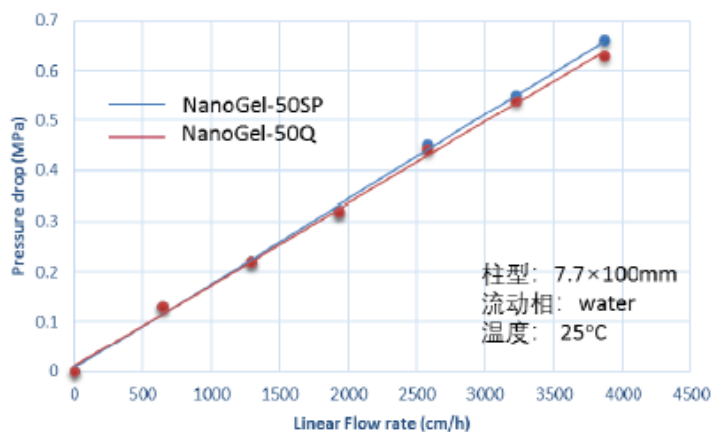


図2. NanoGel-50SPとNanoGel-50Qの圧力と流速の関係を示すグラフ

高分離能

NanoGelシリーズ製品は、単分散性の物理特性とオープン型の超大孔による高効率の物質移動の特性により、優れた分離能を示します。例えば、NanoGel-50SPは、標準的なタンパク質分離において、分離能に優れたことで知られる同タイプのある国外有名製品よりも優れた分離能を示しました（図3）。

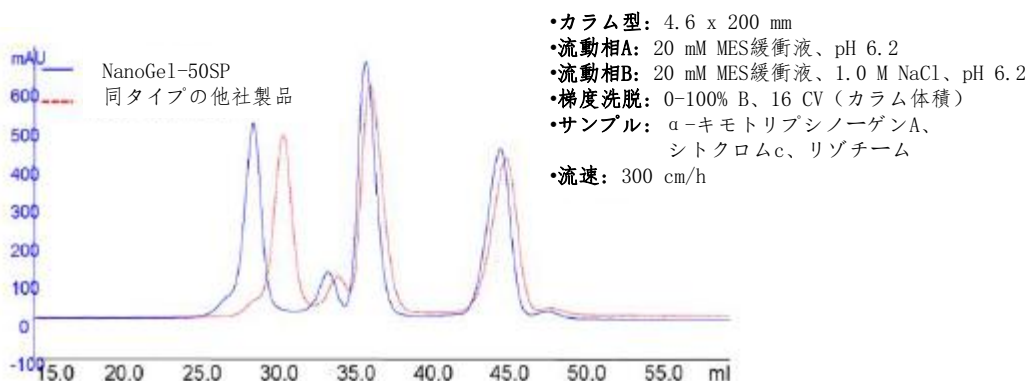


図3. NanoGel-50SPと製品P-50XSの標準タンパク質分離の比較

高効率な物質移動で高流速下でも高い動的結合容量を実現

NanoGel-50SPおよびNanoGel-50Qは、独自の表面機能化技術を採用しているため、高い動的結合容量を持つという利点があります。また、これらの製品はオープン型の超大孔構造による高速な物質移動が可能のため、NanoGel-50シリーズ製品は高流速（保留時間が短い場合）でも安定した高動的結合容量を維持します。詳細は下図をご覧ください。

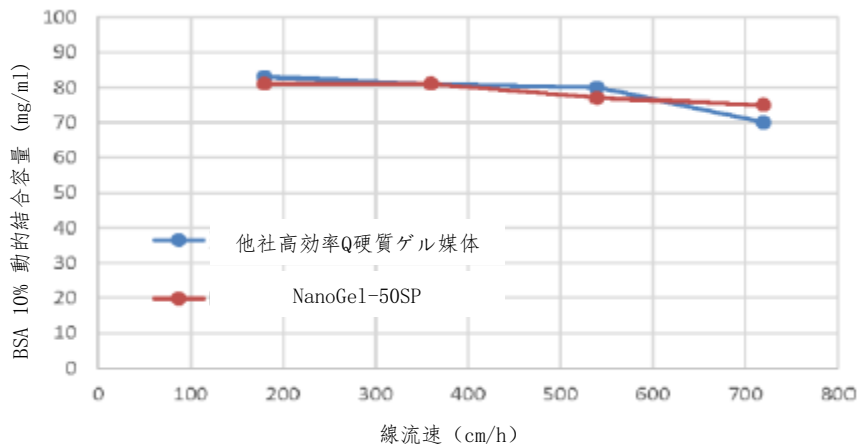


図4. NanoGel-50Qは同タイプの高効率物質移動を特徴とする「硬ゲル」クロマトグラフィー媒体と異なる保留時間での動的結合容量の比較。

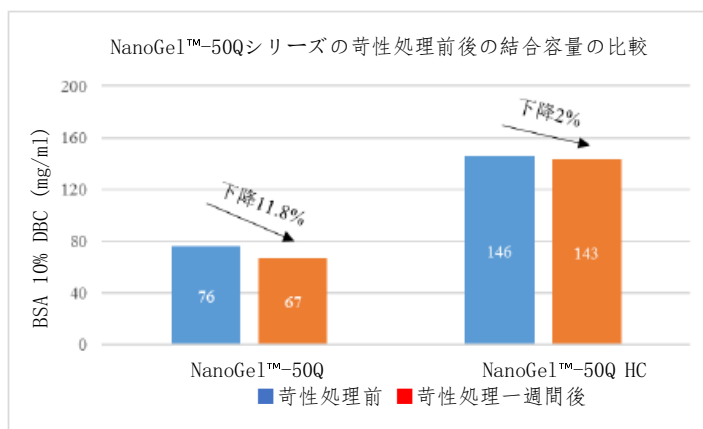


図5. NanoGel-50QおよびNanoGel-50Q HCの苛性処理前後の結合容量の比較。

広範囲の塩濃度において安定した動的結合容量を実現

NanoGelシリーズ製品は、一定の耐塩性を持っており、同タイプ他製品と比較して、異なる塩濃度条件でもより安定した動的結合容量を示します（図6）。この特性により、広範囲の電導プロセス条件で、ターゲットタンパク質の吸着や不純物の除去が可能となり、純化プロセスの開発における柔軟性や生産効率の向上が期待できます。

テスト条件: カラム型: 2.5 x 50 mm; サンプル平衡液: 20 mM MES/20 mMまたは100 mM NaCl, pH 4.5
 サンプル濃度: 5 mg/mL 単クローン抗体 流速: 300 cm/h
 ■ 20mM NaClでのDBC ■ 100mM NaClでのDBC

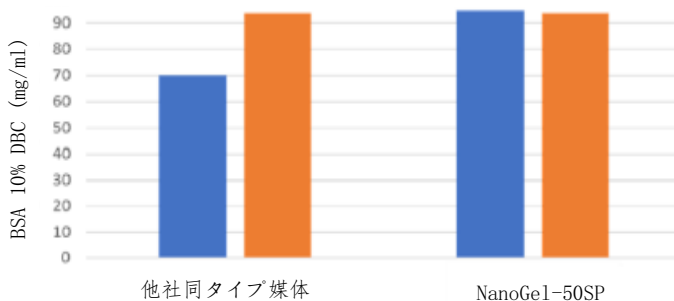
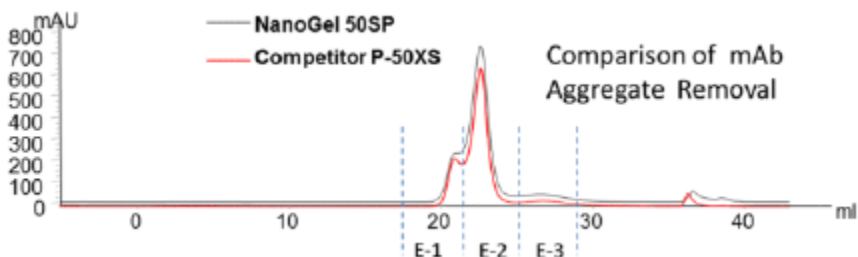


図6. 異なる塩濃度におけるNanoGel-50SPとP-50XSの動的結合容量の比較

NanoGel-50SPおよびNanoGel-50Qは、高流速と高動的結合容量の特性を兼ね備えており、迅速かつ効率的なクロマトグラフィー工程に非常に適しています。また、優れた分離能により、

精密な純化段階で従来のイオン交換クロマトグラフィー媒体よりも優れた不純物除去能力を発揮します。オープン型の超大孔構造を持つため、生物大分子（単クローン抗体、ウイルス/ワクチン、および高分子量の組換えタンパク質など）のクロマトグラフィー純化用途において、より大きな利点を提供します。図7では、NanoGel-50SPが単クローン抗体の多量体除去用途において、同タイプの国外有名製品P-50XSと同等の多量体除去効果と回収率を示したことを示しています。



クロマトグラフィーカラムの充填

NanoGelシリーズ製品は20%エタノール中で保存されており、1.5 kgのスラリーが1 Lの媒体体積に相当します。推奨される充填スラリーの移動相は0.1 M NaClまたは純水で、推奨充填係数は1.05です。NanoGelシリーズ製品は高い機械的強度を持つ「硬ゲル」であり、低圧カラムから中高圧カラムまでの充填が可能です。適切なカラムフィルタープレートのサイズは10~23 μmです。充填手順は以下の通りです。

1) 必要なクロマトグラフィー媒体スラリーの質量を計算する

必要なスラリー質量 (kg) = 目標カラム体積 (L) × 1.5 kg/L × 1.05

例：内径40cm、長さ20cmの25Lのカラムを充填するには、スラリー質量は25L × 1.5kg/L × 1.05 = 約39.375kgとなります。正確にスラリーの容積を計量するには、計量前にスラリー濃度を均一にする必要があります。（プラスチックスプーンや50rpm以下の機械で緩やかに攪拌し、攪拌後は静置時間を10分以内にしてください）。

2) スラリーの準備

充填前に、0.1M NaCl（または純水）を充填液として使用します。以下では、充填液は0.1M NaCl（または純水）のことを指します。

実験室規模の小型カラム（内径<50 mm）

計算した20%エタノールのスラリーをろうとに移し、濾過した後、カラム容量の3倍の充填液を加えます。プラスチック製のスプーンでゆっくり攪拌した後、再度ろ過します。この手順を2回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67~2倍にします（スラリー濃度50%~60%）。

大カラム（内径≥50 mm）：

計算した20%エタノールのスラリーを均質化タンクに移し、2時間以上静置して沈降させます。その後、上澄み液を除去し（上澄み液には若干の濁りがある場合があります）、上澄み液と同体積の充填液を追加します。ゆっくり攪拌した後、再度2時間以上静置沈降させ、上澄み液を除去します。この手順を2~3回繰り返して、スラリー中の20%エタノールが完全に充填液に置換された後、充填液を追加して、最終的にカラム体積の1.67~2倍にします（スラリー濃度50%~60%）。

注意：スラリー準備時に、媒体が圧縮や摩擦を受けないよう注意してください。磁気攪拌や圧力式の蠕動ポンプは使用しないでください。機械攪拌の場合、攪拌ブレードが容器の壁に近づきすぎないようにしてください。また、クロマトグラフィー媒体を再充填する場合は、前述のろ過、沈降の手順でスラリーを準備してください。

3) カラム充填

流動充填：

3-1) 上述のスラリーを均一に分散させ、カラムに移します。

3-2) 充填液を移動相として使用し、カラム充填を開始します（カラム充填開始時、流出液に多少の濁りが見られることがありますが、1~2カラム体積が流れた後、澄んできます）。

注意：カラム充填を開始する流速が高すぎないようにしてください。

3-3) カラムベッドの高さが安定したら、流速を目標の最高流速（使用流速の2倍を推奨）または目標の最高圧力（1.0 MPaを超えないことを推奨）にまで引き上げます。圧力が一定になった後、さらに20分間安定させます。

3-4) ピストンをゲル面の下2～3 mmに調整します。

軸向圧縮充填（内径>300 mm）：

(1) カラムを洗浄し、空気を排出します。

(2) スラリータンクをカラムに接続し、カラム内の余分な溶液を除去します。ピストンをカラムの底まで5cmほど降ろします。

(3) 供給バルブを開き、ピストンを上昇させながら充填を開始します。充填速度は200～300cm/hです。スラリー濃度に基づいて充填量を決定し、ピストンの移動距離を換算します。注入が終わったら、供給バルブを閉じ、ピストンを下げてカラムを圧縮します。圧縮速度は60～100cm/hで、充填材が完全に沈降し、カラムベッドの高さが安定したら、ピストンの移動を停止し、カラムベッドの高さを読み取ります。この時点で、1.05の圧縮比を基に最終的なピストンの位置を計算します。

注意： 充填時に気泡が入らないように、通常は計算された媒体量に対して120%以上の量で充填を行ってください。

カラム効率評価

充填したクロマトグラフィカラムをまず2 CV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、脱イオン水でクロマトグラフィカラムを平衡し、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. UniGel®シリーズ充填イオン交換クロマトグラフィーカラムのカラム効率測定方法。

項目	内容
サンプル	2M NaCl
サンプル量	カラム体積の1～5%
洗脱液	0.5M NaCl
線速度	100cm/h
検出	2M NaCl 上サンプル：電気伝導率計
合格基準	As: 0.8-1.5; Plates (N/m): >3000

使用方法

1. **平衡**：5CV以上の平衡緩衝液でカラムを平衡させ、流出液の導電率とpHが変わらなくなるまで（平衡液と一致する）、緩衝液としてBuffer A、たとえば20mM PBS, pH7.0を使用します。具体的な緩衝液は、ターゲットタンパク質の安定性や等電点に応じて、イオン交換媒体の種類を選択し最適化してください。

2. **サンプルロード**：固体サンプルは平衡液で溶解してください。低濃度サンプル溶液は濃縮し、高濃度サンプル溶液は平衡液で希釈してください。サンプルの流路閉塞を避けるため、サンプルは遠心または膜フィルター処理を行ってください。

サンプルロード量は、媒体の結合容量とサンプル中のターゲットタンパク質の含有量に基づいて計算されます。サンプルロード前に、結合容量緩衝液が可能な限り平衡液と一致していることを確認してください。

3. **洗脱**：サンプルロードが完了した後、平衡緩衝液でベースラインが安定するまで洗浄を続けます。必要に応じて、塩濃度や流動相のpHを変更して、クロマトグラフィー媒体に吸着されたサンプルを段階的に洗脱します。

4. **再生洗浄（CIP）**：定期的なCIP洗浄は、媒体ベッド内のタンパク質沈殿物や汚染物の蓄積を防止し、クロマトグラフィー媒体の結合容量、分離効果、流動特性などの性能を維持するのに役立ちます。汚染物の種類に応じて、各プロセスに特定のCIP洗浄方法を設計する必要があります。CIP洗浄の頻度は、初期原料液の性質やプロセス条件によります。以下のCIP洗浄方法を推奨します。

順次、5CVの1-2M NaCl、5CVの0.5-1M NaOH、3CVの水、次いで5CVの1M酢酸で洗浄します。

保存方法

使用後のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムは、再生が完全に行われた後、20%エタノールまたは10 mM NaOH中で密封保存し、保存温度は4~25℃を推奨します。

未使用のクロマトグラフィー媒体やプリパックカラムについては、エタノールの揮発や微生物の繁殖を防ぐため、3か月ごとに20%エタノールを交換することを推奨します。

NanoGelシリーズイオン交換クロマトグラフィー媒体仕様書

製品番号	包装	品番	製品番号	包装	品番
NanoGel-50SP	30mL	04062-050200-2030	NanoGel-50Q	30mL	04064-050200-2030
	50mL	04062-050200-2050		50mL	04064-050200-2050
	100mL	04062-050200-2100		100mL	04064-050200-2100
	300mL	04062-050200-2300		300mL	04064-050200-2300
	500mL	04062-050200-2500		500mL	04064-050200-2500
	1L	04062-050200-1001		1L	04064-050200-1001
	5L	04062-050200-1005		5L	04064-050200-1005
	10L	04062-050200-1010		10L	04064-050200-1010
	50L	04062-050200-1050		50L	04064-050200-1050
	100L	04062-050200-1100		100L	04064-050200-1100
NanoGel-50SPHP	30mL	04062-050150-2030	NanoGel-50QHC	30mL	04064-050150-2030
	50mL	04062-050150-2050		50mL	04064-050150-2050
	100mL	04062-050150-2100		100mL	04064-050150-2100
	300mL	04062-050150-2300		300mL	04064-050150-2300
	500mL	04062-050150-2500		500mL	04064-050150-2500
	1L	04062-050150-1001		1L	04064-050150-1001
	5L	04062-050150-1005		5L	04064-050150-1005
	10L	04062-050150-1010		10L	04064-050150-1010
	50L	04062-050150-1050		50L	04064-050150-1050
	100L	04062-050150-1100		100L	04064-050150-1100

トラブルシューティング

UniGel®シリーズイオン交換製品を使用する際に問題が発生した場合は、以下の表を参考にし
て解決するか、ご連絡ください。

トラブル内容	原因分析	推奨対策
カラム圧力の上昇	流速が高すぎる	流速を下げる
	ポンプと収集器間のバルブが開いていない	出口を開く
	装置のインラインフィルターが詰まっている	不純物を除去して洗浄する、または交換する。使用前にサンプルと緩衝液を0.45 μmまたは0.2 μmで濾過する。
	ラム前の詰まり	20BVの充填液を使用してカラムを逆流洗浄する
	サンプルがカラム上で沈殿した	定置洗浄を行い、サンプル溶液の濃度を調整する
	サンプルが膨張する、または一部の物質が強く吸着して充填材に残留している	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
	カラムベッドが圧縮された	カラムを再充填する
サンプルの吸着が不十分	カラムの使用時間が長い	カラムまたはカラム充填材を交換する
	サンプル溶液中のイオン強度が高すぎる	サンプル溶液中のイオン強度を低下させる（希釈や脱塩などの手段を使用）
サンプルが洗脱過程で洗脱されない	サンプルのpHが不適切	pHを調整し、結合強度を増加させる
	洗脱液のイオン強度が低すぎる	洗脱液の濃度を増加させる
	洗脱液の洗浄能力が低すぎる	洗浄能力の高い洗脱液に交換する
	洗脱液のpHが不適切	洗脱液のpHを調整する
分離率の低下	カラムに疎水性が強い残留不純物がある場合	定置洗浄を実施する（再生条件を参照）
	洗脱条件が不適切（例：勾配度が急すぎる、流速が高すぎる）	洗脱条件を変更し、より緩やかな勾配洗脱や等度洗脱を採用し、流速を下げる
	カラムが正しく充填されていない	カラムを再充填する
	カラムの上端や下端に大きな混合空間がある	充填材の上表面を増やすか、カラム後部の体積を減らす
	カラムの過負荷	カラムを洗浄し、再び平衡を取り、上サンプル量を減らす
	粒径が大きい	同じタイプでより小さい粒径の充填材に交換する
サンプルのロード回数が増えるとサンプルの吸着能力が低下する	選択性の差がある	他のタイプの充填材に交換する
	サンプル中の不純物が充填材に結合し正常な結合を妨げている	定置洗浄操作を実行する（再生条件を参照）
使用中にカラムベッドに割れ目が発生する	溶液が十分に脱気されていない	0.5MNaClで均一に混合し、充填を平衡させる
	溶液中に気泡がある	圧力を下げて気泡を除去する
	外部空気がシステムに入り込んでいる	より多くの緩衝液を追加し、システム内の気体を完全に除去する
ベースラインの漂移	カラムが十分に平衡されていない	平衡時間を増加させる
	洗脱液A、Bが同一紫外波長で吸収係数が異なる	異なる波長を使用するか、空白基準を設定する
	洗脱液が不純物である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
不明なノイズピークが現れる	前のサンプルが完全に洗脱されていない	カラムを再生する
	洗脱液が不純物である	高純度のクロマトグラフィーグレード試薬を使用する
	微量の疎水性不純物がカラムに結合し平衡やサンプルの適用過程で濃縮され洗脱時にピークとして現れる	カラムを洗浄する
平衡時間が長すぎる	CIP後すぐに再平衡	まず2CVのBuffer B（1M NaClを含む）を使用し、その後Buffer Aで平衡を行います。