

UniGel-65Q HC イオン交換クロマトグラフィー媒体

製品紹介

イオン交換クロマトグラフィー（Ion Exchange Chromatography）は、生体分子の表面電荷（種類、数、分布）の違いに基づいて異なる生体分子を分離する方法です。弊社は単分散均一粒径および多分散ポリマー微粒子に基づいたイオン交換クロマトグラフィー媒体を提供しています。この媒体は、親水性表面改質を施した後にイオン交換基を結合しており、アプリケーションのニーズに応じて多様な製品シリーズを提供し、捕捉、中程度の精製、精密精製、分析精製の各段階における応用に対応します。卓越した生体分子の相溶性とカラムベッドの安定性を持ち、実験室での精製から産業規模の生産に至るまでの包括的なソリューションを提供します。大規模な生物製薬の生産効率を向上させ、コストを削減するために、特に抗体（mAb）、ウイルス、ワクチン、および大分子量の再組換えタンパク質などの生物大分子の分離・精製ニーズに対応するために、この新世代の高性能イオン交換媒体であるUniGel-65Q HCを開発されました。この製品は、高い結合容量、優れた耐アルカリ性、高速流速、高い分解能、低逆圧のクロマトグラフィー特性を備えています。

UniGel-65Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体の利点：

単分散PMMA微粒子：より高速な流速と高いカラムベッドの使用が可能

優れた親水性：非特異的吸着が低い

優れた化学的およびpH安定性：使用寿命を延ばす効果がある

高い再現性：優れた再現性を提供

表 1. UniGel-65Q HC 技術仕様

項目	内容
製品型番	UniGel-65Q HC
分離原理	強陰イオン交換
基質	ポリメタクリル酸メチル（PMMA）
粒径	約65 μm
配基	$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
配基密度	約0.24 meq/mL
動的結合容量	約140 mg/mL（BSA）
最大耐圧	0.5 MPa
CIP定置洗浄	0.5 M NaOH
推奨流速	150-750 cm/h
pH安定性	2~12
化学安定性	通常使用される緩衝液、1M 酢酸、1M 水酸化ナトリウム、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、30% アセトン、1% SDS、6M 尿素などの一般的な有機溶剤に対して安定しています。強力な酸化剤との接触は避けてください。
使用温度	2~30℃

高い結合容量と優れた耐アルカリ性

UniGel-65Q HCは基材と配基密度を最適化しており、高い動的結合容量と耐アルカリ性を持っています。室温でUniGel-65Q HCを1M NaOH溶液に24時間浸漬した後でも、結合容量は137.06 mg/mLから137 mg/mLにわずかに減少しただけで、ほぼ変わりません（図1）。

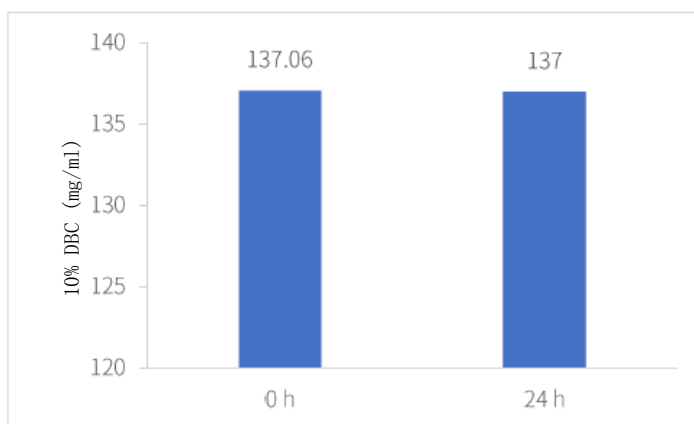


図1. UniGel-65Q HCのアルカリ処理前後における動的結合容量（BSA）の比較。

高流速、低逆圧

高流速の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。UniGel-65Q HCは、従来のPMMA「ハードゲル」の高い機械的強度と、単分散球状媒体の優れた物理特性を兼ね備えているため、低逆圧と高流速の利点を持っています。UniGel-65Q HC イオン交換クロマトグラフィー媒体は、脱イオン水および0.4M NaClを流動相とした場合、いずれも高流速範囲で良好な圧力-流速線形関係を示します（図2）。

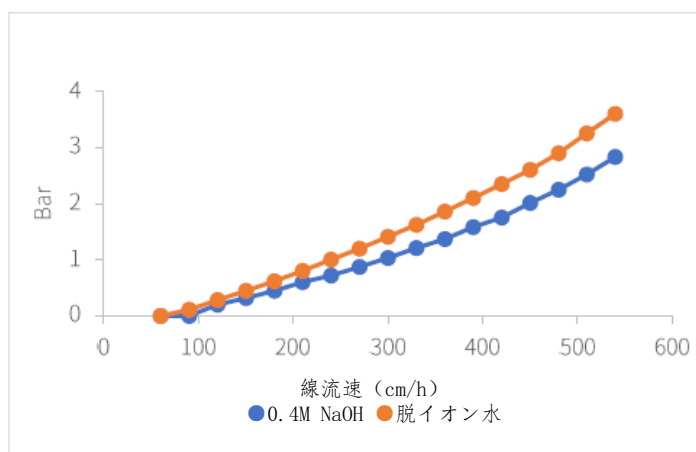


図2. UniGel-65Q HCの圧力-流速曲線。
カラム直径 (i. d.) 200mm、高さ (H) 250 mm

製品の応用

UniGel-65Q HCは、迅速かつ高効率なクロマトグラフィー媒体として、生物大分子（単クローン抗体、ウイルス、ワクチン、高分子量の再組換えタンパク質など）のクロマトグラフィー精製において優れた性能を発揮します。単クローン抗体の精製においては、フロースルーモードを採用し、ホストセルプロテイン（HCP）が200 ppm未満、Protein A残留が2 ppm未満、純度が99%以上であり、回収率は90%以上に達します（表2）。

表2. UniGel™-65Q HC による異なる上サンプル量でのHCP除去効果

サンプル	HCP (ppm)	proA (ppm)	純度 (%)	回収率 (%)
フィード	1901	19.99	96	—
UniGel-65Q HC 流出液	128	1.33	99.3	95.8

クロマトグラフィーカラムの充填

UniGel-65Q HCは製品は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压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-65Q HC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。

トラブルシューティング

UniGel-65Q HC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
	ポンプと収集器の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
	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
サンプルの吸着が不十分	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）
	サンプルのpHが不適切	pHを調整し、結合強度を増加させる
サンプルが洗脱過程で洗脱されない	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
	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）
分離率の低下	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
	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	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。

UniGel-65Q HCイオン交換クロマトグラフィー媒体仕様書

製品型式	包装	製品番号
UniGel-65Q HC	30 mL	04084-065100-2030
	50 mL	04084-065100-2050
	100 mL	04084-065100-2100
	300 mL	04084-065100-2300
	500 mL	04084-065100-2500
	1 L	04084-065100-1001
	5 L	04084-065100-1005
	10 L	04084-065100-1010
	50 L	04084-065100-1050
	100 L	04084-065100-1100

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も提供可能です。その他の規格やカスタムメイドのご要望については、お問い合わせください。