

UniMab® 50 Protein A 親和性クロマトグラフィ媒体

製品紹介

世界の医薬品市場において、抗体医薬品は連続して売上ランキングの上位を占め、市場競争もますます激化しています。抗体生産コストの削減は市場競争力を高めるための重要な要素です。抗体生産のボトルネックを解決するには、まず第一歩としてProtein A親和性クロマトグラフィの改良が必要です。UniMab® 50 Protein A 親和性クロマトグラフィメディアは抗体製造企業のために開発されました、優れた機械的強度、低反発、優れた化学安定性、耐アルカリ性、および高流速下での高い動的結合容量の製品です。

「UniMab® 50 は、独自の特許技術を使用して製造した高性能、耐アルカリ性の再結合型Protein A親和性クロマトグラフィメディアです。このメディアは、単分散多孔性ポリメタクリル酸メチル（PMMA）微粒子を基材とし、専有の表面修飾技術とエポキシカップリングによりProtein Aを結合させて製造され、単クローン抗体やFc（機能性クロマトグラフィ）フラグメントが含まれる組み換えタンパク質類のバイオ大分子の分離精製に適しています。UniMab® 50は、優れた機械的強度、低反発力、優れた化学安定性、耐アルカリ性を持ち、高流速下でも高い動的結合容量を維持できるため、実験室から工業生産に至る幅広いニーズに対応します。

新世代のUniMab® 50 Protein A親和性クロマトグラフィメディアは、抗体精製の親和性クロマトグラフィメディアとして、高流速でも高い動的結合容量を維持できるため、単クローン抗体およびFcフラグメントを含有する組み換えタンパク質の大規模な精製に理想的な選択肢です。これにより、企業の生産コストを低減し、競合製品に対して次のような独自の優位性を持ちます。

- (a) 耐アルカリ性があり、0.1～0.5 M NaOHでの洗浄に耐え、寿命が長く、生産コストが低い
- (b) 単分散で均一な粒径を持つ高強度の親水性基材を使用し、より高い操作圧力と線性流速に対応可能。
- (c) 耐アルカリ性のProtein Aは独自の固定結合技術で使用し、基材の脱落が少なく、耐アルカリ性が強化されている。
- (d) 高流速下で40 mg/mLヒトIgGの高い動的結合容量を持ち、全行程でより高い結合容量と、より低い非特異的吸着を実現し、同種の製品に比べて優れた性能を示しています。
- (e) 最大流速が約800 cm/h、最大耐圧力が約0.8 MPaで、同種製品よりも高性能を発揮。
- (f) 異なる抗体の洗浄脱落の条件が均一で、抗体精製プロセスの理想的な選択肢です。

表1. UniMab®50親和媒体仕様

項目	詳細
製品名	UniMab® 50
分離原理	Protein A 親和捕獲
基質	ポリメタクリル酸メチル（PMMA）
粒径	50 μm
配基結合方式	エポキシ結合
動態結合容量	~40 mg・mL ⁻¹ （人IgG，5分間の滞留時間）
最大耐圧	0.8 MPa
CIP（定置洗浄）	0.1-0.5 M NaOH
推奨流速	100-800 cm/h
pH安定性	2～12
化学安定性	すべての一般的な緩衝液、10 mM 塩酸、0.1M ホスホ酸（pH 3）、6M 尿素、6M グアニジン塩酸塩、30% イソプロパノール、20% エタノール
使用温度	2-40℃
保存	20%エタノールまたはメタノール中、2-8℃

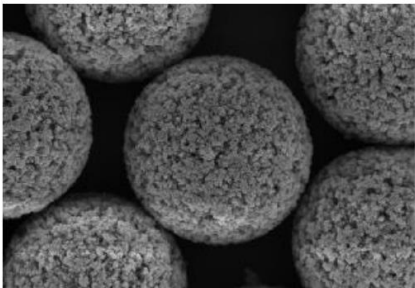


図 1. UniMab®50親和媒体の電子顕微鏡画像

溶剤互換性試験

25℃の条件で、充填剤を異なる濃度および種類の試薬中に24時間浸漬し、浸漬前後で充填剤がIgGに対する静的結合能力（≧95%以上が適合とする）の比較を行い、充填剤と溶剤の互換性を評価します。関連する試薬の種類と濃度の結果は以下の表に示されています。

表2. 関連溶解試薬の種類と濃度の結果

名称	濃度
甲醇	2%
酢酸ナトリウム	1 M
塩化ナトリウム	4 M
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	100 mM
酢酸	1 M
エタノール	100%
アセトン	2. 50%
塩酸グアニジン	6 M
グリシン	1 M
尿素	6 M
イソプロパノール	30%
クエン酸ナトリウム	1 M
ポリエチレングリコール	5%
ポリエチレングリコール （分子量 1500）	1%
塩化ナトリウム	0. 1 M
Tween 80	1%
Tween 20	1%
ショ糖	1 M
n-プロパノール	5%
Triton X-100	1%

UniMab® 50 安定性試験

化学安定性試験

50℃環境温度で、UniMab® 50充填剤を異なるpH値（pH1～14）の溶液中に浸漬し、24時間保管後、浸漬液中のTOC値を測定することで、化学安定性を評価しました。結果は以下の通りです。

表3. pH 安定性試験結果

異なる pH 値の浸漬液	TOC (PPM)
pH1: 100mM HCl	197. 2
pH2: 10mM HCl	96. 5
pH3: 1mM HCl	41. 7
pH4: 0. 1mM HCl	37. 6
pH7: 超純水	36. 3
pH10: 20mM ホウ酸 (NaOH調整)	96. 3
pH11: 20mM ホウ酸 (NaOH調整)	125. 5
pH12: 10mM NaOH	154. 8
pH13: 1M NaOH	979. 5
pH14: mM NaOH	3069

温度安定性試験

UniMab® 50 充填剤を40℃の恒温箱に置き、それぞれ20％エタノールおよび2％ベンジルアルコール溶液に浸漬して4週間保存し、毎週、填充材のIgGの動的結合容量を測定し、その結果から充填剤の安定性を評価します。次の表には、3回分の充填剤が2種類異なる浸漬液で保存された際の動的結合容量の変化が示されています。
（動的結合容量の単位：mg/mL Gel（5分間の保持時間））。

表4. 温度安定性試験

測定周期	IgG 動的結合容量 （20％エタノール浸漬保存）		
	NO. 1	NO. 2	NO. 3
初始条件	39. 8	39. 6	39. 4
第1週	40. 1	39. 6	39. 6
第2週	39. 9	39. 2	39. 4
第3週	39. 5	39. 6	39. 4
第4週	39. 6	39	39. 2

溶剤残留測定

適切な溶剤を使用して、UniMab® 50 充填剤の製造過程で残留する溶剤を抽出・濃縮し、その残留量を測定した結果は以下の表に示されています。

表 5. 溶剤残留測表

溶剤	制御要求
DMF	≦5 ppm
エタノール	NA

細胞培養液中のモノクローナル抗体（mAb）捕捉応用

次は、UniMab® 50 親和性クロマトグラフィメディアが細胞培養液中でモノクローナル抗体を捕捉する性能に関する実験結果です。実験は、UniMab® が卓越したモノクローナル抗体の親和性と捕捉能力を持つことを示しています。

設備	AKTA purifier
カラム	NmTRAP 1mL
サンプル	モノクローナル抗体細胞培養液上澄み、5 mL
流速	0.2 ml/min
平衡液	PBS
洗浄液	20 mM NaAC, pH 5.5
洗脱液	20 mM NaAC, pH 3.5
再生	0.1M NaOH
滞留時間	5分

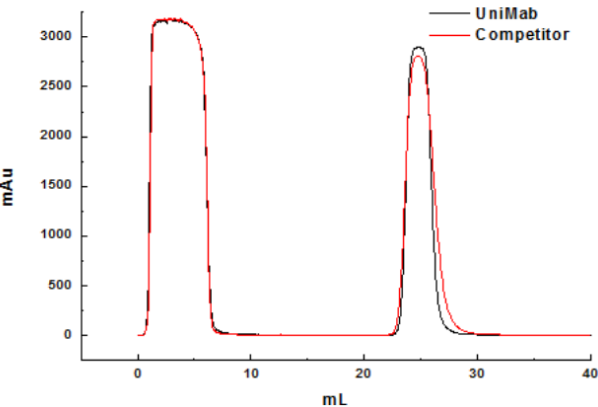


図2. UniMab® 50による細胞培養液中のモノクローナル抗体の純化分離性能。

表6. UniMab® 50によるモノクローナル抗体（mAb）の回収率

滞留時間 （分）	サンプル 体積（ml）	サンプル 量（ml）	洗脱 （CVs）	回収率 （％）
0.5	5	33.5	23.2	69.3
2	5	33.5	26.8	79.9
4	5	33.5	31.8	94.9

操作案内

スラリー濃度測定

UniMab® 50 親和性クロマトグラフィメディアは、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。

$Cs\text{ (％)}=100\times\left(Vr/10 \right)=10Vr$ ---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 1.05-1.1 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し、必要な体積Vs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、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、カラムヘッドの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2 CVの0.5 M NaCl溶液で平衡化し、その後、2.0 M NaCl溶液を使用し、100 cm/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7. UniMab® 50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0.5 M NaCl
線速度	50〜200 cm/h
検出	5%アセトン上サンプル: UV 280 nm、2M NaCl上サンプル: 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) : 3〜5CV0.1〜0.5MNaOH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: 20 mM PB+150 mM NaCl、pH 7.4）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。

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。

注意: 使用過程中、サンプルおよび移動相は必ず0.45 μmのフィルターで濾過してください。

故障排除

もし、UniMab® 50HC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。

UniMab® 50親和性クロマトグラフィー媒体製品仕様書

製品型番	包装	品番
UniMab® 50	30 mL	17010-050100-2030
	50 mL	17010-050100-2050
	100 mL	17010-050100-2100
	300 mL	17010-050100-2300
	500 mL	17010-050100-2500
	1 L	17010-050100-1001
	5 L	17010-050100-1005
	10 L	17010-050100-1010
	50 L	17010-050100-1050
	100 L	17010-050100-1100

注：7.7 mm × 22 mm、16 mm × 25 mm、7.7 mm × 100 mmのカラムプリパックをご提供可能です。その他の規格やカスタマイズのご要望がある場合は、お問い合わせください。