

Fractogel™

フラクトゲル

バイオ医薬品精製用担体



Fractogel™ フラクトゲル プロセシング材料

生体高分子の分離工程の効率を向上

抗体、抗原、ホルモン、酵素、成長因子を含むバイオ医薬品は、バイオテクノロジー製品の中で重要な地位を占めます。バイオ医薬品の適切な精製方法の開発は、成功のための重要なカギとなります。そのためには宿主細胞タンパク質や DNA、ウイルスのような鍵となる不純物を確実に分離することができ、なおかつ安定である、クロマトグラフィー担体と技術を選択しなければなりません。表面トポロジーを増強する「**テンタクル構造**」は、生産プロセスに有利な特長を樹脂にあたえます。

バイオ医薬品製造のスペシャリストは 15 年以上にわたってフラクトゲルを使用しています。この 10 年で、セミリジッド・フラクトゲル担体を用いた多数のダウンストリームプロセスが開発されてきました。

フラクトゲル担体の高い効率性と経済性は、生体高分子との強い結合性と材質の耐久性によるものです。フラクトゲルは、高収率を維持したまま、長期間、繰り返し使用することができます。また、フラクトゲルは高流速でも結合容量が高いため、収量を上げるだけでなく、時間も節約し、プロセス効率の向上につながります。また、標的分子が不安定である場合には特に強力な精製ツールとなります。テンタクル交換体により、フラクトゲルは生体高分子とより強固に結合するため、従来の樹脂と比べて、高塩濃度条件下のサンプル結合容量に与える影響は低下します。

このようにフラクトゲルはより信頼性のある結果をもたらし、柔軟な使用、幅広いアプリケーションへの応用が可能です。フラクトゲル担体は、バイオ医薬品製造に従事するすべての方に、多くの使用実績を提供することができます。そして、従来の樹脂と比べフラクトゲル担体は製造レベルの精製効率を向上させます。また、フラクトゲルはより高収率で、より高流速で扱うことができるため、処理時間を短縮することができます。さらにフラクトゲルは長期間の使用と繰り返しの使用が可能であるため、製造の経済性向上が大きな利点となります。

ユーザーのメリット

高流速で高結合容量	▶ ハイスループット処理
高い耐圧性	▶ 高流速での使用
高い化学的安定性	▶ 洗浄が容易
優れたタンパク質結合能	▶ 効率的なキャプチャー
生物活性を維持	▶ 高収率
狭い粒径分布	▶ 優れた分離能
ウィルス、DNA、エンドトキシンの効率的な除去	▶ 高純度の標的分子
レギュラトリサポートファイルの提供	▶ プロセスバリデーションのサポート

フラクトゲルとは…

マトリクス

フラクトゲル粒子の形状は、デキストラン、アガロース、セルロースのような通常用いられる親水性クロマトグラフィーの樹脂とは大きく異なります。フラクトゲルは合成メタクリル酸ベースのポリマー樹脂で、高い耐圧性を有し、高流速での精製を可能にします。フラクトゲルは粒径 40 から 90 μm のビーズで構成されています。ゲルろ過クロマトグラフィー用のフラクトゲル BioSEC と、高分離 S-type イオン交換体の粒径は 20 から 40 μm です。絡み合ったポリマー凝集体で形作られる細孔のサイズは約 800Å で、タンパク質のビーズ内への自由な分散が可能です。ポリマー内のエーテル結合により、表面は強親水性です。

テンタクル構造

長い、直鎖状のポリマー鎖（テンタクル）に、リガンドが配されています。すべてのテンタクルは、フラクトゲルビーズ骨格構造のヒドロキシル基に共有結合しています。そのため、ビーズと修飾された表面は再生と洗浄に対し、安定です。テンタクル構造の主な利点は、立体障害の影響を受けずに、生体分子に立体的に結合できるリガンドが多数あることです。ゆえに標的生体分子により強固に結合しますが、分離工程ではそれは可逆的でもあります。それぞれのリガンドは様々なアプリケーションに使用が可能です。（イオン交換、アフィニティー、疎水性相互作用クロマトグラフィー）



conventional ion exchanger



Tentacle ion exchanger

アプリケーションのメリット

フラクトゲルの利点

Removal/Isolation
of DNA

より高い収量

優れた表面修飾技術により、全てのフラクトゲル製品が高結合容量を有しています。

フラクトゲルイオン交換樹脂を用いると、その標的分子との強固な結合により、従来の樹脂と比べて、キャプチャーステップはより効率的になります。

この効率的なキャプチャーにより、他の分離担体と比べはるかに高い収量を得ることができます。

より安全な製品

炭水化物素材の担体と比べ、フラクトゲルは微生物分解に耐性を有しています。

そのためエンドトキシンのコンタミネーションのリスクが大幅に低減しています。

加えてフラクトゲルは洗浄可能であるため、長期間使用することができます。

これは、微生物を用いて作成された組み換えタンパク質の精製時に、特に有用な特長です。

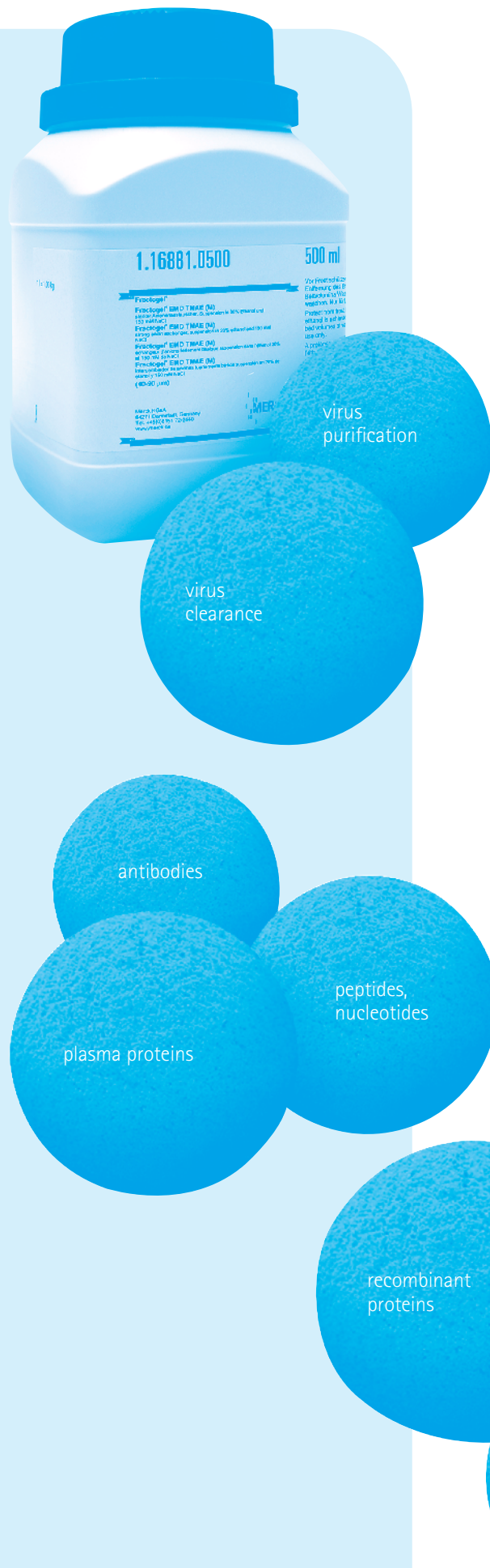
高い経済性

フラクトゲルは高い化学的安定性を有しているため、繰り返し使用することが可能です。

そのため樹脂の寿命はきわめて長く、頻繁に樹脂を交換する必要もないため、コストを削減することができます。

フラクトゲルの特徴

粒径	S-type: 20–40 μm M-type: 40–90 μm
細孔径	約 800Å
マトリックス	架橋ポリメタクリレート
pH 耐性	pH 1 up to 13
耐圧限界	8bar
線速 (カラム直径による)	up to 360cm/h (S-type) up to 800cm/h (M-type)
保管	150mM NaCl, 20% ethanol
再生	1-2M NaCl for IEX, Chelate, TA, BioSEC, except HIC
洗浄	0.1-0.5M NaOH



迅速なタンパク質精製

フラクトゲルの主なアプリケーション分野は、タンパク質の分離です。

フラクトゲルイオン交換体は、非組み換えもしくは組み換え血漿因子を、ハイスループットに精製することができます。

ペプチドや低分子量物質（NADP、ATP、ガングリオシドなど）も効率的に精製することができます。

ヒスチジンを豊富に含むタンパク質はフラクトゲルキレートを用いて精製することができます。

効率的なポリッシング

IgG、IgM、組み換えタンパク質、血漿因子などの、効率的なポリッシングステップとして、フラクトゲル BioSEC を用いたゲルろ過クロマトグラフィー（SEC）を使用することができます。

高収率な抗体分離

抗体を精製する際、サンプルを直接フラクトゲル SO_3^- (M)、フラクトゲル SE Hicap にロードすることができます。一方、血清アルブミン、核酸、フェノールレッドはフラクトゲルに結合しません。

この特徴により、精製前のサンプルの前処理を除くことができます。

効果的な DNA 除去

タンパク質を精製する際、フラクトゲル陰イオン交換体を用いて、DNA を除去することができます。

フラクトゲル陽イオン交換体ではフロースルーで DNA を除去することができます。

フラクトゲル陰イオン交換体を用いて、小スケールからラージスケールのプラスミド DNA を精製することができます。

ウイルス分離を改善

フラクトゲル陰イオン交換体を用いて、ダウンストリームプロセスから多様なウイルスを効果的に除去できることが、明らかにされています。

ウイルスが樹脂に強く結合するため、異なる塩濃度を用いることで、混入ウイルスとタンパク質を分離することができます。

フラクトゲル TMAE とフラクトゲル DEAE を用いたウイルスクリアランスでは、5～6 ログのオーダーでウイルスを減少させます。しかしながら、その後高

塩濃度で樹脂から溶出されたウイルス画分には、ウイルス減少のバランスを算出できる、多量の生存ウイルスが含まれていることが明らかにされています。樹脂に吸着したウイルスを精製する際の、ローディングと溶出の条件については、その後研究が行われました。

ウイルス精製には、遠心分離や SEC といった従来の方法に代わってフラクトゲル TMAE もしくは DEAE が一般的になりつつあります。

つまり、混入ウイルスと同様に、ウイルス粒子の生産もフラクトゲルを用いることで容易に行うことができます。

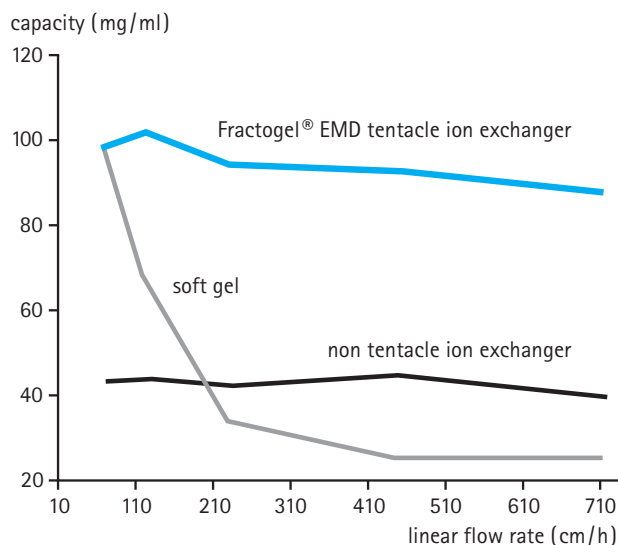


図 1: 流速が結合容量に与える影響
フラクトゲルイオン交換体のみが高流速で高結合容量を維持します。

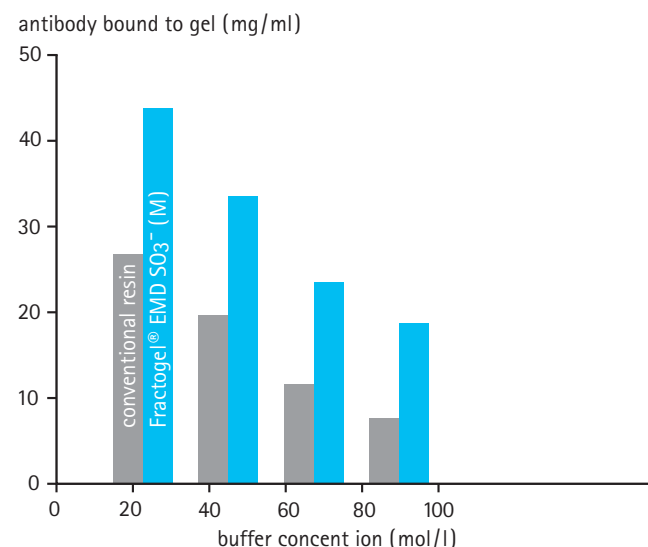


図 2: pH 6.5 での陽イオン交換体の抗体結合能
フラクトゲルイオン交換体は、高塩濃度下でも高結合容量が維持されます。バッファー濃度は塩化ナトリウムとリン酸ナトリウムのモル濃度の合計を表しています。

最良の投資

高い安定性 - 最良の長期的投資

テンタクルは非常に安定であるため、フラクトゲルは何百回も繰り返し使用することができます。0.2Mの水酸化ナトリウムで8ヶ月間以上処理をしても、最初の結合容量の10パーセント低下にも至りません。

さらに、推奨の方法で洗浄を実施した後、調整されたタンパク質サンプル中に樹脂由来の物質は検出されません。

また、数百回の精製と再生サイクルを経てもクロマトグラフィーの分離能力は低下しません。

対応するデータはすべて各レギュラトリーサポートファイル(RSF)にまとめてあります。

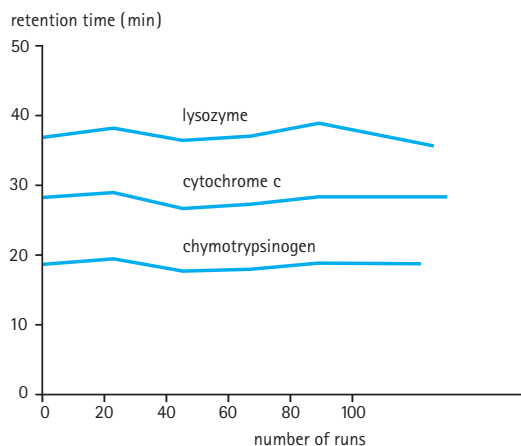


図 3:

フラクトゲル $\text{SO}_3^-(\text{M})$ の、精製と再生を100 サイクル繰り返した際の精製結果の再現性
タンパク質の溶出位置は少なくとも100回は同様です。

参考資料

B. G. Huyghe et al.; Purification of a Type 5 Recombinant Adenovirus Encoding Human p53 by Column Chromatography; Human Gene Therapy 6, (1995), 1403-1416

D. Josic et al.; Size-exclusion chromatogr. of plasma proteins with high molecular masses; J. Chromatogr. A 796, (1998), 289-298

J. K. Walter et al.; Validation of Viral Safety for Pharmaceutical Proteins; in: Bioseparation and Bioprocessing, G. Subramanian (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Vol. I (1998) pp 465-496

A. Eon-Duval and G. Burke; Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process; J. Chromatogr. B 804, (2004), 327-335

A. Kamen and O. Henry; Development and optimization of an adenovirus production process; J. Gene Med 6, (2004), 184-192

H. Leibl et al.; Method for the isolation of biologically active monomeric immunoglobulin A from a plasma fraction. J. Chromatogr. B 678, (1996), 173-180

B. E. Fischer et al.; Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII, Thromb Res. 84, (1996), 55-66

M. Kaufmann; Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures; J. Chromatogr. B 699, (1997), 347-369

T. Burnouf et al.; Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma; J. Chromatogr. B 715, (1998), 65-80

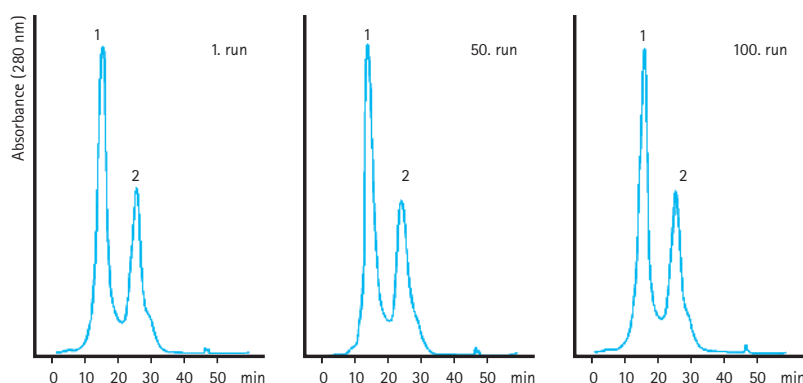


図 4:

フラクトゲル TMAE(M) にサンプルを100 回繰り返しロードした際のクロマトグラフィー結果の再現性

コナルブミン（ピーク 1）とヒト血清アルブミン（ピーク 2）の混合物の分離を表しています。フラクトゲル TMAE(M) カラム (50-10) を用いたクロマトグラムです。

抗体の精製

フラクトゲルを用いて最良の結果を

抗体製造用クロマトグラフィー技術の中で、フラクトゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーは重要な役割を果たします。フラクトゲルには、高流速での高い結合容量、高い選択性、高効率、高い回収率と拡張性などといった数々の利点があります。フラクトゲルは共有結合で結合した柔軟な直鎖状ポリマーが表面に修飾されているため、直鎖状ポリマーに固定化されたイオン交換基の有効範囲が増大します。これにより、キャプチャーステップのモノクローナル抗体の結合容量が増大します。他の一般的な樹脂に比べ、テンタクルタイプのイオン交換体は最大で2倍、もしくはそれ以上の抗体結合容量があります。フラクトゲル SO_3^- もしくは COO^- を用いたカチオン交換クロマトグラフィーはキャプチャーステップに適しています。フラクトゲル SO_3^- もしくは COO^- は血清アルブミン、DNA、宿主細胞タンパク質、Protein A 漏出物のような不純物を除去することができるからです。強アニオン交換体フラクトゲル TMAE も DNA を除去する能力に優れ、大規模な抗体製造に適しています。

HCP・DNA 除去

宿主細胞タンパク質 (hcp) の除去はモノクローナル抗体の製造に特有の課題です。フラクトゲルカチオン交換体は、そのような不純物も一回のステップで約 50ppm もしくはそれ以下の残留レベルまで、除去することが出来ます。アプリケーションによっては、強カチオン交換体よりも弱カチオン交換体の方が有効である場合があります (図 5)。また、DNA はカチオン・アニオン交換クロマトグラフィーを用いて、モノクローナル抗体と分離することができます (図 6)。

ゲルろ過

フラクトゲル BioSEC フラクトゲル BioSEC (S) は、ラージスケールカラムにおいても、高分離能、高化学安定性、高力学的強度を発揮します。図 7 に示すとおり、フラクトゲル BioSEC (S) は単一の抗体を迅速に精製することが可能です。つまり、フラクトゲル BioSEC (S) はウイルスや凝集した抗体の除去に重要な役割を果たすことができます。フラクトゲル BioSEC (S) は研究室レベルから製造レベルまで幅広くご使用いただけます。

疎水性相互作用

フラクトゲル Propyl、フラクトゲル Phenyl 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) はどの抗体精製スキームにも用いることが出来ます。抗体をカラムに直接注入することができ、グラジエントで塩濃度を低下させることで抗体を溶出させることが出来ます。イオン交換体で精製された分画を、塩を除去することなくカラムに注入することが出来ます (図 8)。フラクトゲル Propyl/Phenyl は優れた選択性を有しており、マトリックスが高い力学的安定性を有しているため高速処理を行うことが可能です。多くの文献で述べられているように、分離能及び安定性は、クロマトグラフィー担体のコストとバランスを取らざるを得ない場合が多いようです。しかし、全てのアプリケーションにおいてテンタクルテクノロジーは信頼性のある効果的な方法であると同時に高い生産性を有していることから、ユーザーにとって有益な選択肢となります。

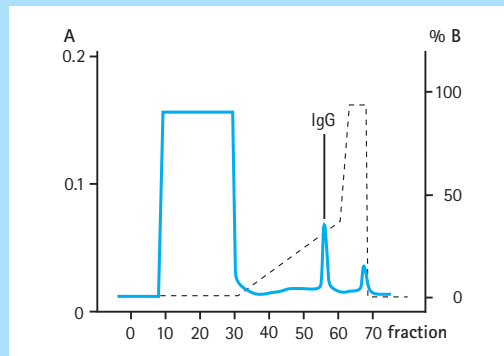


図 5:

フラクトゲル SO_3^- (S) を用いたハイブリドーマ細胞培養上清の陽イオン交換クロマトグラフィー (column: 150x10mm, buffer A: 20mM Sodium phosphate, pH6.5) 1M NaCl (Buffer A に追加) を用いてグラジエントで溶出しました (流速: 1mL/min)。サンプルには、もともとアルブミンは含まれていません。

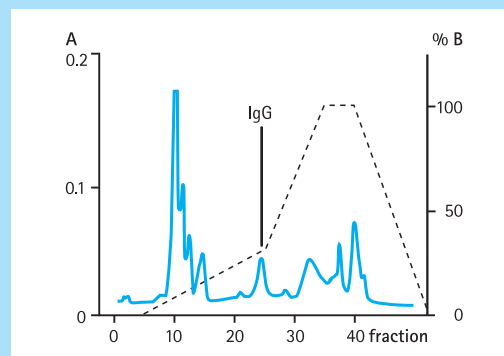


図 6:

フラクトゲル TMAE (S) を用いたハイブリドーマ細胞培養上清の陰イオン交換クロマトグラフィー アルブミンと DNA は高塩濃度で溶出され (1M NaCl のグラジエント)、IgG ときれいに分離されました (buffer: 20mM Tris-HCl, pH8.0 (流速: 1ml/min))。

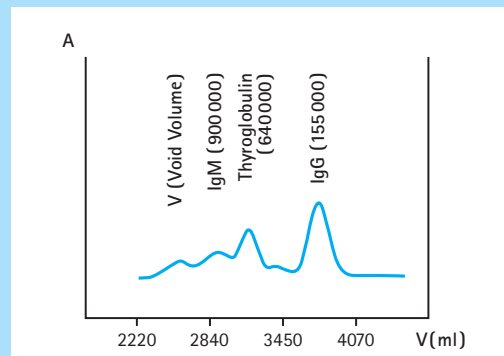


図 7:

フラクトゲル Bio SEC (S) を用いた標準たんぱく質混合物 (IgG、チオグロブリン、IgM) のゲルろ過クロマトグラフィー (1000x100 column; bed height: 95cm; 流速: 5cm/hr; 溶出液: 20mM Na-citrate, 200mM NaCl, 2mM CaCl_2 , pH7.4)

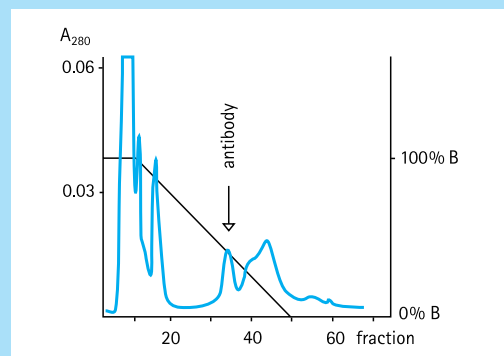
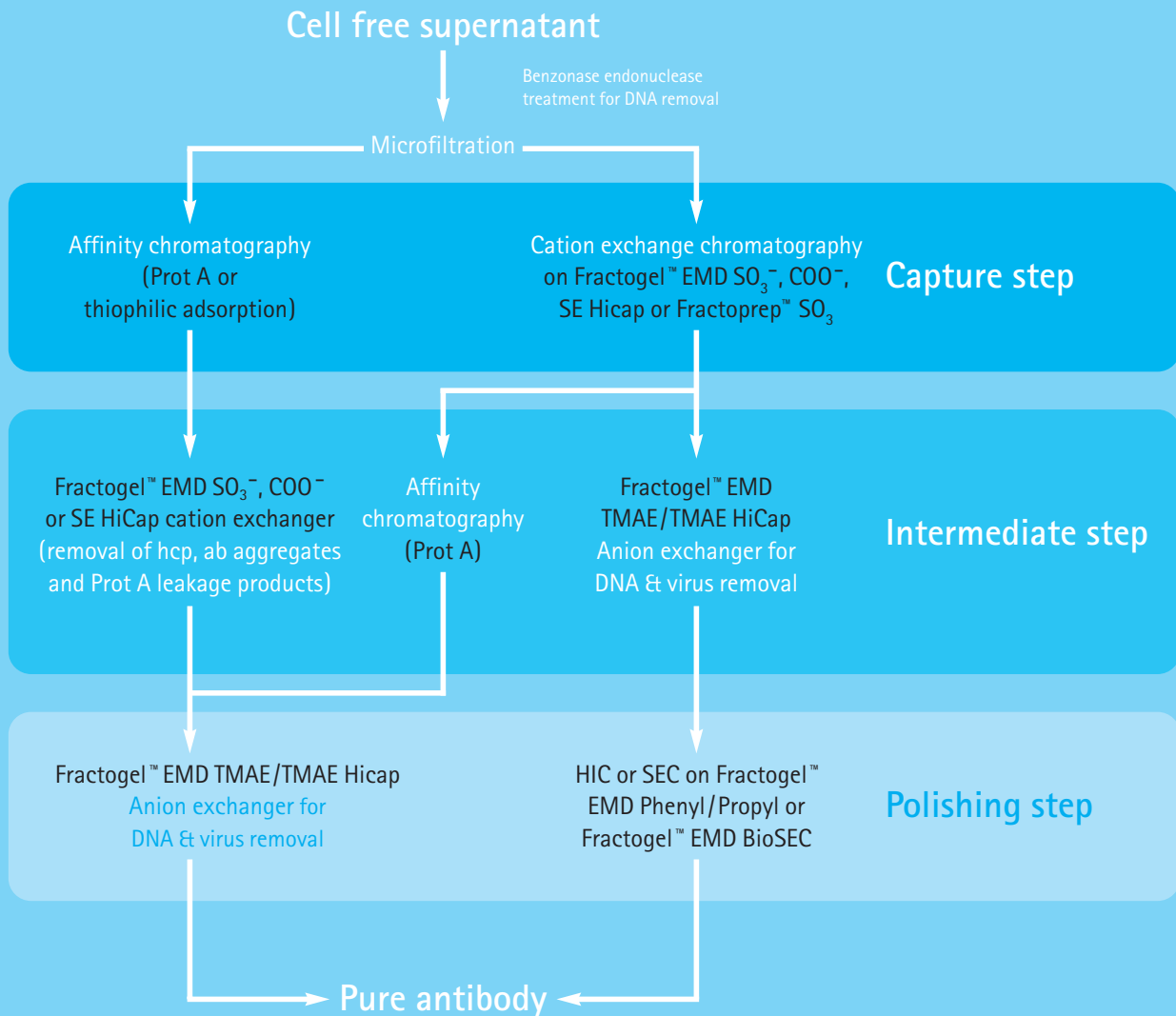


図 8:

フラクトゲル Propyl (S) を用いたモノクローナル抗体の分離 抗体は塩濃度を低下させるグラジエントで溶出しました。 (buffer A: 20mM Sodium Phosphate + 0.9M ammonium sulfate, pH7.0; buffer B: 20mM sodium phosphate, pH7.0; 流速: 1mL/min)

General downstream processing scheme for antibody production



フラクトゲル担体の利点

- テンタクルによるイムノグロブリンの高い結合容量
- お客様のプロセスに予測可能な拡張性を
- 高い選択性と回収率による、高い効率性

注文案内

製品名	製品番号	用量 [mL]	粒径 [μm]	結合容量 [per mL gel]	クロマトグラフィー タイプ
フラクトゲル 強陰イオン交換					
フラクトゲル TMAE (M)	1.16881	10, 100, 500, 5000	40-90	100 mg BSA	強陰イオン交換
フラクトゲル TMAE Hicap (M)	1.10316	10, 100, 500, 5000	40-90	180 mg BSA	
フラクトゲル TMAE Medcap (M)	1.16885	100, 500	40-90	150 mg BSA	
フラクトゲル TMAE (S)	1.16887	10, 100, 500, 5000	20-40	100 mg BSA	
フラクトゲル 弱陰イオン交換					
フラクトゲル DEAE (M)	1.16883	10, 100, 500, 5000	40-90	100 mg BSA	弱陰イオン交換
フラクトゲル DMAE (M)	1.16884	10, 100, 500, 5000	40-90	100 mg BSA	
フラクトゲル DMAE (S)	1.16889	10, 100, 500	20-40	100 mg BSA	
フラクトゲル 強陽イオン交換					
フラクトゲル SO ₃ ⁻ (M)	1.16882	10, 100, 500, 5000	40-90	130 mg Lys	強陽イオン交換
フラクトゲル SE Hicap (M)	1.14894	10, 100, 500, 5000	40-90	140 mg Lys	
フラクトゲル SO ₃ ⁻ (S)	1.16890	10, 100, 500	20-40	150 mg Lys	
フラクトゲル 弱陽イオン交換					
フラクトゲル COO ⁻ (M)	1.16886	10, 100, 500, 5000	40-90	100 mg Lys	弱陽イオン交換
フラクトゲル COO ⁻ (S)	1.16891	10, 100, 500	20-40	150 mg Lys	
フラクトゲル ゲルろ過用担体					
フラクトゲル BioSEC	1.10317	150, 250, 1000, 5000	20-40	5-1,000 kDa	ゲルろ過
フラクトゲル アフィニティー担体					
フラクトゲル Chelate (M)	1.10338	10, 250, 500, 5000	40-90	80 μmol Cu	金属アフィニティー
フラクトゲル 活性化担体					
フラクトゲル Epoxy (M)	1.16961	10g, 100g	40-90	0.5-1.0 mmol/g	リガンド固定化用活性化担体
フラクトゲル 疎水性相互作用担体					
フラクトゲル Propyl (S)	1.10085	10, 100, 500	20-40	25 mg Ovalb.	弱疎水相互作用
フラクトゲル Phenyl (S)	1.16197	10, 100, 500	20-40	25 mg Ovalb.	強疎水相互作用

フラクトゲルの FDA 登録情報

製品名	製品番号	BB-MF No.
フラクトゲル TMAE S, M, Hicap	1.16881, 1.16887, 1.10316	4140
フラクトゲル SO ₃ ⁻ , S, M	1.16882, 1.16890	4384
フラクトゲル DEAE, S, M	1.16883, 1.16888	4752
フラクトゲル COO ⁻ , S, M	1.16886, 1.16891	7193
フラクトゲル BioSEC S	1.10317	8114
フラクトゲル DMAE S, M	1.16889, 1.16884	8965
フラクトゲル Chelate S, M	1.16426, 1.10338	8254

関連製品のご紹介

Fractogel™ Ion Exchange Screening Kits

フラクトゲル イオン交換体 スクリーニングキット

フラクトゲル イオン交換体 スクリーニングキットはタンパク質、ペプチド、核酸等の分離精製用バイオクロマトグラフィー担体であるフラクトゲル イオン交換体を充填したスカウトカラム (1 mL 容量) のセットです。

特徴・用途

- 医薬品製造など工業用プロセスにおいて定評あるイオン交換体を充填
- ゲルのスクリーニング、迅速かつ最適なメソッド構築用に！
- 小スケールでの精製・濃縮用に、前処理用に！
- スケールアップの際は大量精製用バルクメディアをご提供
- シリンジでのマニュアル操作とクロマトグラフィーシステムでの使用に対応
- **ハイスループット**
最大線流速 600-800 cm/hr まで使用可能
- **ハイフレキシビリティ**
1つのアプリケーションに対し様々な担体をテスト可能
- **ハイパフォーマンス**
得られた結果はより大きなスケールへ容易に適用可能
- **コンビニエントフォーマット**
1 mL のカラムボリュームで大事なサンプルのロスを最小限に

ポリマー型担体

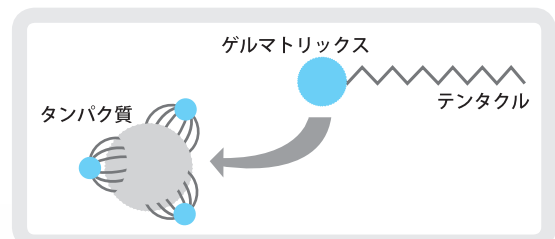
高い安定性（耐圧性、耐薬品性）→ 長いカラム寿命、操作性良好、高流速

テンタクルテクノロジー

ターゲット分子のより強固な吸着 → 結合容量大 (100-180mg/mL ゲル)



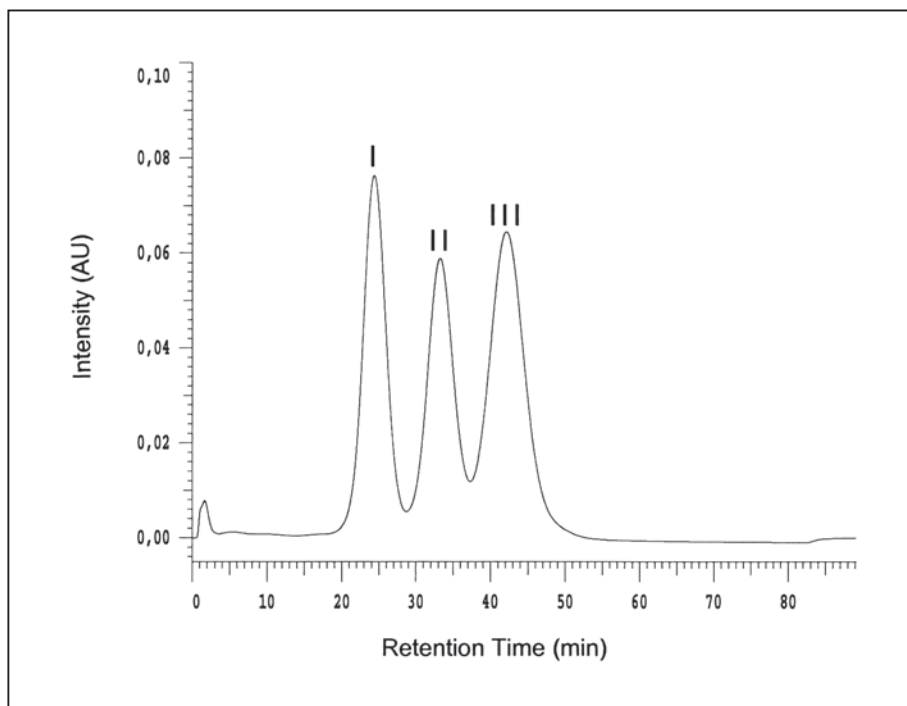
迅速かつ高収量の分離を実現！



キャプチャー工程、精製の初期段階で能力を発揮



テストクロマトグラム (フラクトゲル SO_3^- スカウトカラム)



サンプル：キモトリプシノーゲン (ピーク I)、チトクローム C (ピーク II)、リゾチーム (ピーク III)
20mM NaH_2PO_4 , pH 6.0, 0-80 min: 0%-80% 1M NaCl によるグラジエント溶出

キット構成

フラクトゲル AEX スクリーニングキット (注文番号 1.50502.0001)

●フラクトゲル DMAE スカウトカラム	1 × 1mL
●フラクトゲル DEAE スカウトカラム	1 × 1mL
●フラクトゲル TMAE スカウトカラム	1 × 1mL
●フラクトゲル TMAE Hicap スカウトカラム	1 × 1mL
●コネクター：ルアーロック female/ 1/16" male	4

フラクトゲル CEX スクリーニングキット (注文番号 1.50503.0001)

●フラクトゲル SO_3^- スカウトカラム	1 × 1mL
●フラクトゲル SE Hicap スカウトカラム	1 × 1mL
●フラクトゲル COO^- スカウトカラム	1 × 1mL
●コネクター：ルアーロック female/ 1/16" male	3



本紙記載の製品構成は 2009 年 7 月 1 日現在のものです。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、あらかじめご了承ください。

メルク株式会社

パフォーマンス・ライフサイエンス化学品事業部

〒153-8927

東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー5F

Tel:0120-189-390 / Fax:0120-189-350

E-mail:service@merck.co.jp

<http://www.merck-chemicals.jp>

