

博士論文

バイオ医薬品のフロースルークロマトグラフィープロセスの設計方法

(Method for designing flow-through chromatography processes of biologics)

2020年5月

長谷川 純子

山口大学大学院 医学系研究科

要旨

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は医薬品市場で主流となりつつある一方、従来の低分子医薬品と比較して製造コストが高額となっている。バイオ医薬品はバイオテクノロジー技術を活用して一般的に動物細胞に目的タンパク質を生産させ精製して製造される。製造工程のうち培養工程は、発現細胞株、培地、培養条件の改善により培養液中における目的タンパク質の発現量を向上させることにより製造コストの削減が行われている。一方、細胞培養により発現された目的タンパク質を精製する精製工程では、高流速・高吸着量クロマトグラフィー担体の開発による改善が試みられているが、培養工程での高発現量に対応できるほどの改善は見られておらず、バイオ医薬品製造における精製工程の効率化は重要な課題である。

近年バイオ医薬品製造の効率化の一つの手段として連続製造が注目されており、精製工程では複数のカラムを用いる連続カラムクロマトグラフィーや、複数の工程を組み合わせる連続的に実施する手法などが検討されている。抗体タンパク質(mAb)医薬品精製では、通常複数のクロマトグラフィーが逐次実施される。最初のクロマトグラフィーステップはキャプチャーといい、mAbに強い親和性を持つプロテインAクロマトグラフィー(PAC)が通常用いられる。培養中に生成される培養細胞(ホストセル)由来不純物[ホストセルタンパク質(HCP)、ホストセルDNA、ウイルス]および生産物(mAb)由来不純物[重合体や断片]を非常に低レベルまで除去しなければならないので、さらにクロマトグラフィー精製プロセスが必要となる。これらのステップはポリッシュと呼ばれる。

ポリッシュプロセスには、フロースルークロマトグラフィーが多く活用される。フロースルークロマトグラフィー(FTC)では、試料をクロマトグラフィーカラムに連続的に供給する。不純物がクロマトグラフィー担体へ吸着し、目的タンパク質は吸着せずに通過し連続的に回収される。負荷と同時に目的タンパク質の回収が生じるため擬似的に連続的なプロセスと捉えることができる。更にはメンブレンクロマトグラフィーを用いることでシングルユース化も可能であることから、精製工程の効率化に対する一つの解決策と考えられている。FTCにおける至適条件は、経験論を基に検討されることが多く系統立てた手法はあまり開発されていない。

本論文ではフロースルークロマトグラフィーによるタンパク質の分離機構の解析と簡単なプロセス設計方法および最適方法を構築することを目的とした。モデル系としては、イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質のモノマーとダイマーの分離を選択し、構築したモデルを実験により検証した。

フロースルークロマトグラフィーの分離機構をモデル化するためには平衡関係を表す分配係数と物質移動を支配する細孔内拡散係数 D_s が必要となる。本モデルでは、塩濃度 I の関数として得られる分配係数 K 、および分配係数 K と D_s により計算される理論段数 N により溶出曲線を計算し、目的成分が不純物と完全に分離する試料負荷量 V_f を算出した。分

配係数 K は塩濃度勾配溶出実験 (LGE) を異なる勾配で実施することにより作成される $GH\cdot I_R$ 曲線 (GH :規格化した勾配、 I_R :溶出ピークの塩濃度) から塩濃度 I の関数として求めることができる。このモデルにより、任意のカラムサイズに対して滞留時間 RT と分離可能な最大試料負荷量 V_F の関係を推定することが可能である。

分配係数 K は塩濃度 I に強く依存するので、FTC では移動相組成 I の適切な設定が重要であることと、分離挙動がわずかな塩濃度の変動で大きく変化することがモデルシミュレーションから判明した。モデルおよびモデルシミュレーションは、モデルタンパク質モノマーのダイマーからの分離実験で検証された。

生産性 P に着目した FTC プロセス最適化方法を開発し、操作条件と生産性の関係について検討した。粒子径 d_p を小さくすると生産性 P は増加する。また、 P は、滞留時間 RT を短くすることにより増加するが、粒子径 d_p が大きいと十分な分離が達成できないことがある。 d_p と RT には、 $(d_p^2 \times RT)$ という関係が成立することが明らかとなり、これにより適切な粒子径と滞留時間を選択することができる。

イオン交換クロマトグラフィーのタンパク質分離は移動相 pH にも強く依存する。モデル系の分離において直線勾配溶出(LGE)では、移動相 pH が $pH = 6$ から 7 になると保持が強くなるとともに分離がよくなるが、FTC では、適切な移動相塩濃度を選ぶと同じ分離性能を得ることができる。

本研究で確立された FTC モデルは、Q sepharose HP カラムを用いたモデルタンパク質 BSA のモノマーとダイマーの分離を予測することができた。このモデルを用いることで塩濃度勾配溶出実験 (LGE) 結果から FTC プロセスの条件を予測することができ、最適なプロセスを簡便に設計することができる。

Continuous manufacturing including process integration is considered to improve the process economy of protein drug production. An operation method known as flow-through chromatography (FTC) is expected to be an efficient method for separating a target protein as a pseudo continuous method.

In FTC, a target protein is eluted from the chromatography column without adsorption whereas contaminants are strongly bound. In this paper, we developed a simple and fast method for determining the sample feed volume for FTC processes by ion-exchange chromatography. The method uses the distribution coefficient as a function of mobile phase salt concentration, which can be determined by linear gradient elution experiments. The proposed method was verified by a model separation system (removal of dimer from BSA monomer by anion exchange chromatography).

Continuous or integrated downstream processing is expected to increase the productivity of protein drug production. However, it is not easy to design and operate continuous downstream processing as many batch chromatography unit operations are involved. An operation method known as flow-through chromatography (FTC) is an efficient method for separating a target protein. In FTC, a target protein is recovered from the chromatography column without adsorption whereas contaminants are tightly bound.

Although the operation is simple, choosing the right mobile phase, column dimension and operating conditions is not easy as the separation is quite sensitive to mobile phase salt concentration and pH as well as operating conditions. In this study, we developed an optimization method for FTC. The model system was removal of protein dimer from the monomer by anion exchange chromatography. It was shown that by choosing the right mobile phase salt concentration and the flow-velocity (residence time) similar high productivities can be obtained at pH 6.0, 7.0 and 8.0. It was also found that FTC processes are quite sensitive to the mobile phase salt concentration.

目次

第1章 緒言

第2章 フロースルークロマトグラフィープロセス設計のためのモデルと検証

2.1 序論

2.2 理論

2.3 材料と方法

2.4 結果および考察

2.5 小括

第3章 フロースルークロマトグラフィープロセスの設計と最適化

3.1 序論

3.2 理論

3.3 材料と方法

3.4 結果および考察

3.5 小括

第4章 参考文献

第5章 総括

第6章 本研究に関する著者の発表論文

6.1 関係論文等

6.2 参考論文

第7章 謝辞

第1章 諸言

バイオ医薬品は低分子医薬品と比較して高い特異性を持つことから医薬品の主流になりつつある。2017年世界医薬品売上上位10品目のうち7品目が抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品であった。バイオ医薬品はバイオテクノロジー技術を活用して一般的に動物細胞に目的タンパク質を発現させ、培養上清液を精製して製造される。バイオ医薬品の製造費用は従来の化学合成により生産される低分子医薬品と比べて高く、コストダウンが必須である。近年、培養工程は発現細胞株、培地、培養条件の改善により培養液中の生産量を向上させることにより製造原価の低下に図ってきた。培養工程において5~10倍の生産性の向上を達成している場合もあり、ある一定の成果が見られている。細胞培養により発現された目的タンパク質はクロマトグラフィー、ろ過により不純物が除去され精製される。バイオ医薬品の精製工程で除去の対象となるのは、目的タンパク質の凝集体や切断体などの製品由来不純物と、培養工程で用いた培地や細胞基材に由来するDNA、宿主由来タンパク質等のプロセス由来不純物が挙げられる。精製工程では性質の異なる多くの不純物を除去する必要があるため、複数の種類のクロマトグラフィーを組み合わせる行うのが一般的である。Figure 1に抗体医薬品の精製工程の例を示す。3つのクロマトグラフィーが組み合わされるのが主流であり、抗体医薬品の場合、Protein Aによるアフィニティクロマトグラフィーの後、ポリッシング工程としてイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等が組み合わされて使用される。近年では異なる官能基を一つのクロマトグラフィー担体へ結合させたミックスモードクロマトグラフィーも開発されている。培養工程における発現量の向上に対応するため、精製工程では高流速・高吸着量クロマトグラフィー担体の開発による改善が試みられているが、培養工程の高発現量に対応しきれずバイオ医薬品製造工程におけるボトルネックとなっており精製工程の効率化は重要な課題である。

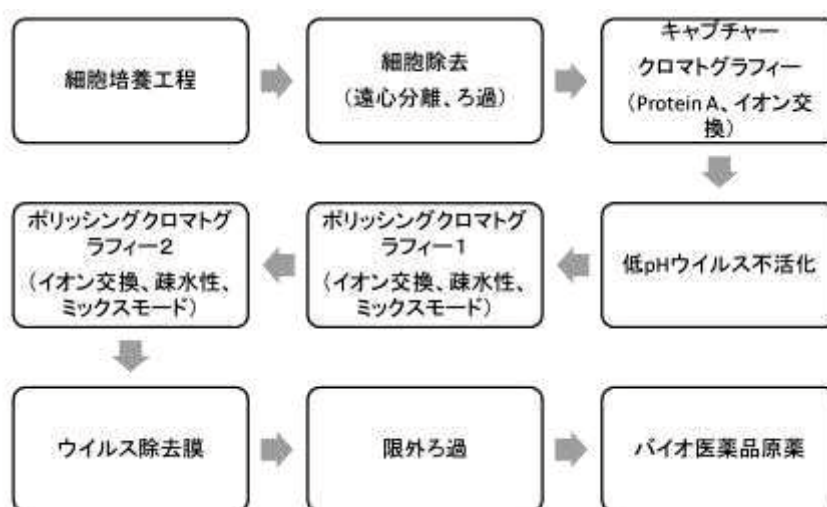


Figure 1 バイオ医薬品の精製工程の例

精製工程で用いられるクロマトグラフィーには吸着・脱着モードとフロースルーモードの2種類ある。それぞれの模式図を Figure 2 および Figure 3 に示す。吸着・脱着モードの場合には、不純物は吸着せず負荷および洗浄ステップにおいて洗い流され、また一部不純物は洗浄、溶出条件においてもクロマトグラフィー担体に吸着したままとなる。溶出時には pH、塩濃度を変化させ目的タンパク質のみが選択的に回収される。フロースルーモードでは不純物が吸着し目的タンパク質のみが素通りする pH、塩濃度で試料を負荷し、目的タンパク質のみを選択的に回収する。フロースルーモードでは、試料をカラムへ通液するのみで分離を行うため、吸着・脱着モードのクロマトグラフィーと比較してステップ数が少なく操作が簡便で、使用するバッファー量も少量となる。擬似的に連続して試料を負荷、回収していることから、生産性の高いクロマトグラフィーモードであると考えられている。また官能基を膜に結合させたメンブレンクロマトグラフィーを利用するとシングルユース化も可能となり、更なる生産性の向上が見込める。異なる性質の多くの不純物を除去するためには、陽イオン交換クロマトグラフィー（CIEC）および陰イオン交換クロマトグラフィー（AIEC）の両方を、吸着・脱着モードとフロースルーモードで使い分けて用いられる。

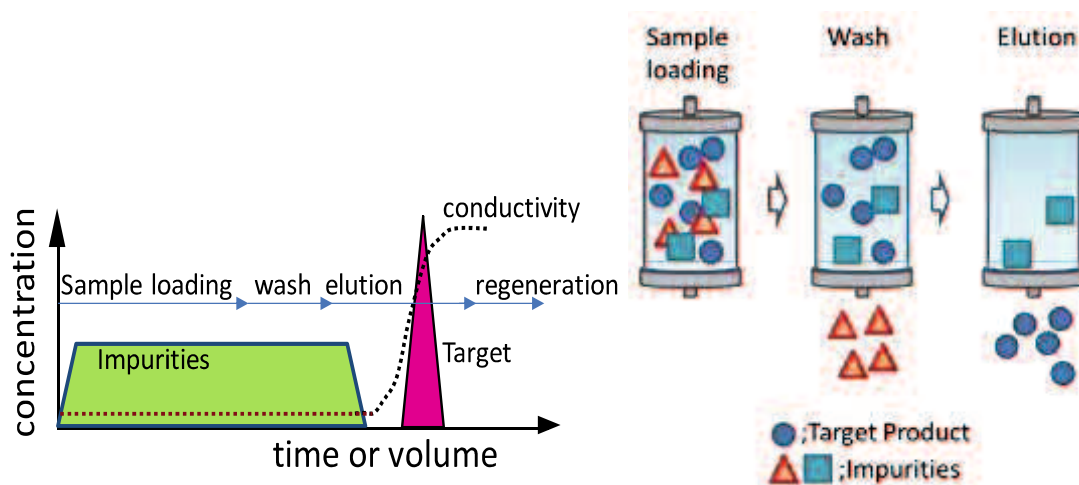


Figure 2 吸着・脱着クロマトグラフィー

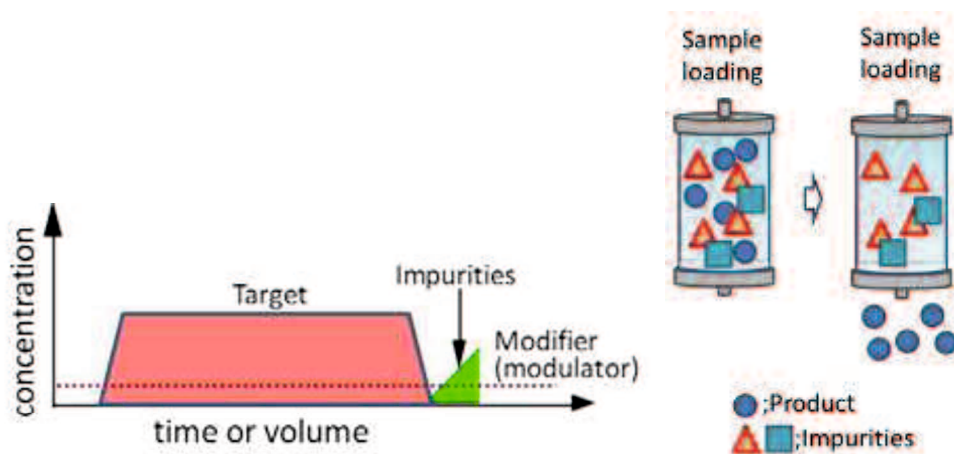


Figure 3 フロースルークロマトグラフィー

近年ではバイオ医薬品製造の効率化の一つとして連続製造が注目されており、精製工程においても連続プロセスの設計が試みられている。精製工程における連続プロセスの手法として主に研究されているのは、連続カラムクロマトグラフィーや複数工程を連結させたプロセスである。従来バッチ法と連続プロセスの例を Figure 4 に示す。連続カラムクロマトグラフィーは吸着・脱着モードのクロマトグラフィーステップに用いられ、複数の小型カラムを連続的に切り替えていくことで連続的に試料を処理する手法である。連続的に試料が処理されることからプロセスの総時間の短縮にもつながり生産性の向上が見込まれている。試料負荷時にクロマトグラフィーカラムを連結し漏れ出た目的タンパク質を後段のカラムが捕捉することで、クロマトグラフィー担体の吸着容量を最大化し必要カラム容量を小さくすることができる。主に抗体医薬品のキャプチャークロマトグラフィーで用いられる、Protein A 担体は精製工程における製造コストの大半を占めるため、連続カラムクロマトグラフィーを用いてカラムを小型化することでクロマトグラフィー担体の費用削減が期待されている。ポリッシングクロマトグラフィー工程においても、吸着-脱着モードのクロマトグラフィーステップにおいて連続カラムクロマトグラフィーが用いられる場合もある。複数工程の連結プロセスは主にポリッシングクロマトグラフィー工程において検討されている。通常、異なるクロマトグラフィー工程を 2 つ以上実施する間には前段のクロマトグラフィーから回収した溶出液を回収、保管し、場合によっては pH、導電率、塩濃度などの調節を実施する。連結プロセスにおいては従来二つ以上の工程としていたプロセスが連結され、ほぼ一つのプロセスとして連続して処理されることによりプロセス時間が短縮され生産性が向上する。この連結プロセスにおいてはフロースルークロマトグラフィーが多用される。フロースルークロマトグラフィーは前述したように負荷と同時に目的タンパク質の回収が生じるため擬似的に連続的なプロセスと捉えることができる。異なる種類のポリッシング工程をフロースルークロマトグラフィーとして開発し連結する他、ウイルス除去膜のような他のろ過工程と組み合わせ一連の工程として処理することができる。

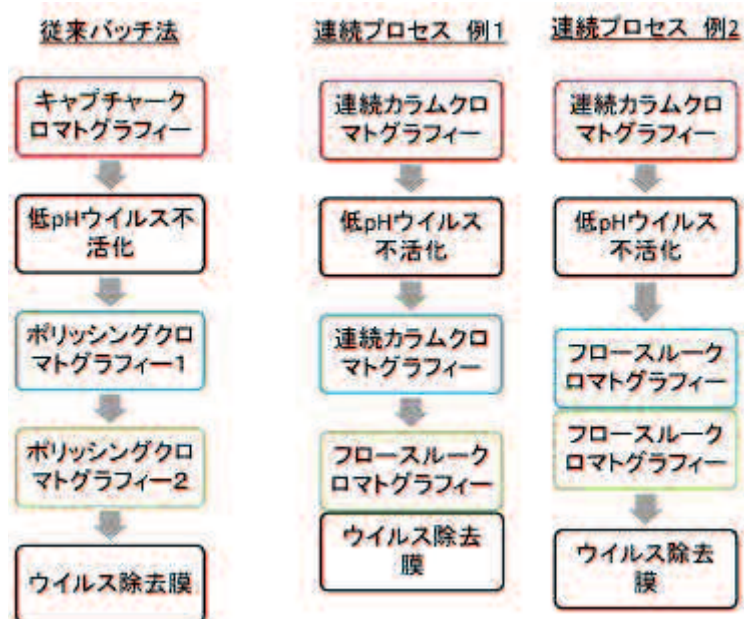


Figure 4 従来バッチ法と連続プロセスの例

フロースルークロマトグラフィー (FTC) はバイオ医薬品の精製工程においてよく使用され、連続プロセスを構築する上でも重要な手法の一つであるにも関わらず、その至適条件設定は経験論を基に検討されることが多く系統立てた手法はあまり開発されていない。本論文では、バイオ医薬品製造における FTC のプロセス設計方法を構築することを目的として、タンパク質のモノマーとダイマーの分離についてモデル式を確立し検証を行った。

第2章 フロースルークロマトグラフィープロセス設計を加速化するためのモデル

2.1 序論

バイオ医薬品はバイオテクノロジー技術を応用して動物細胞に目的タンパク質を発現させ、培養上清液を精製して製造される。精製工程では性質の異なる多くの不純物を除去する必要があるため、複数の種類のクロマトグラフィーを組み合わせる行うのが一般的である。異なる性質の多くの不純物を除去するため、目的タンパク質と不純物の電荷、等電点(pI)を利用して分離され、吸着・脱着モードとフロースルーモードで使い分けられる。

フロースルークロマトグラフィー (FTC) ではカラムの平衡化、試料の負荷、押出し、カラムの再生という4ステップが行われる (Figure 5)。負荷時の pH、塩濃度は目的タンパク質が素通りし不純物がより強く吸着する条件が選択する必要があるが、負荷液量が多くなると不純物も溶出してくる。FTC における負荷液量と不純物の分離の模式図を Figure 6 に示す。試料負荷液量が多すぎた場合には不純物が回収液に混入してしまう。不純物と分離するためには試料の負荷は不純物が溶出するより前に試料の送液を停止し、目的タンパク質のみを回収する必要がある。一方試料負荷液量を低下させ過ぎた場合、不純物が混入することは避けられるが処理できる最大液量負荷していないため生産効率は低下する。不純物が破過する直前に目的タンパク質の回収を終了するよう試料負荷液量を設定するのが、生産性高く不純物を除去する最適条件である。また、ピークの広がりやクロマトグラフィー担体の粒子径や流速に依存するため、クロマトグラフィーカラム内の物質移動についても考慮する必要がある。しかしながら FTC の操作パラメーター設定は、経験論に基づいた試行錯誤により決定されていることが多い。

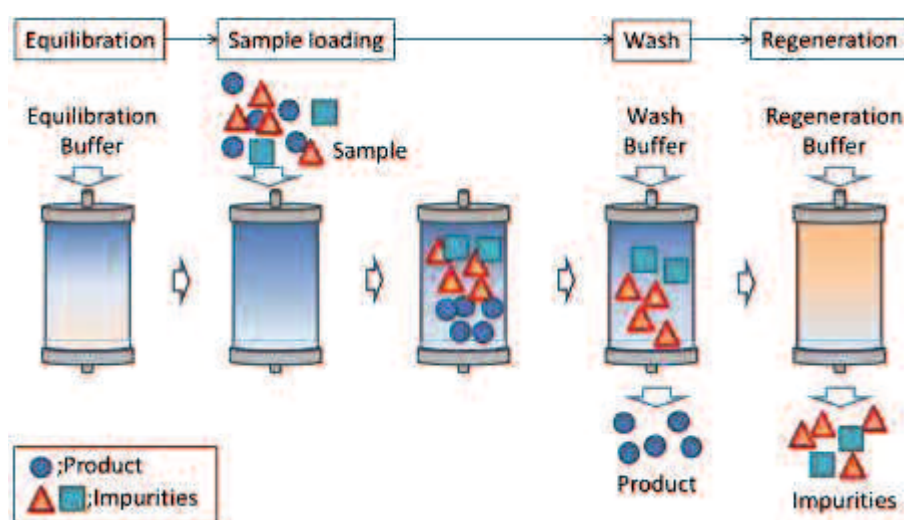


Figure 5 フロースルークロマトグラフィーにおける目的タンパク質と不純物の溶出

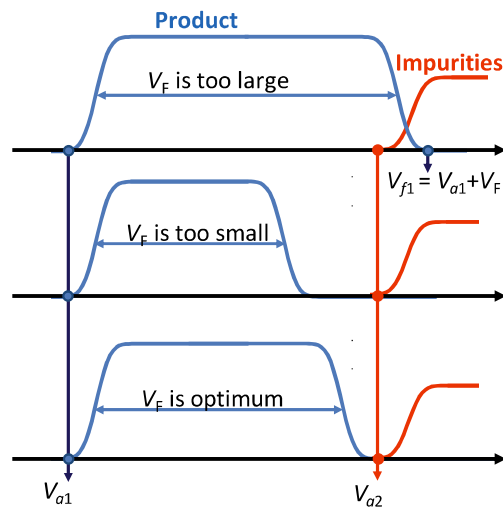


Figure 6 フロースルークロマトグラフィーにおける最適負荷液量

FTC のプロセス設計において、目的タンパク質が吸着せず不純物が強く吸着する条件 (pH および塩濃度) を見つけ出すことが重要である。イオン交換クロマトグラフィーにおけるタンパク質の吸着は Figure 7 に示す概念に基づいて理解される。移動相 pH が目的タンパク質の等電点 (pI) より高い場合、目的タンパク質は負電荷を帯び陰イオン交換クロマトグラフィー (AIEC) に吸着する。同様に移動相 pH が目的タンパク質の等電点 (pI) より低い場合、目的タンパク質は正電荷を帯び陽イオン交換クロマトグラフィー (AIEC) に吸着する。イオン交換クロマトグラフィーにおけるタンパク質の吸着の強さはタンパク質表面における電荷の数と移動相内の塩濃度 I により決定される。タンパク質の電荷が多い場合でも移動相における塩濃度により吸着は弱められる。このタンパク質の吸着と塩濃度の関係は、各塩濃度 I における分配係数 K により表すことができる。モノマーとダイマーの K - I プロットの例を Figure 8 に示す。分配係数 K が高い場合には ($K \gg 100$)、タンパク質は非常に強く吸着する。 K が 10 を下回るような場合には、タンパク質はカラム内を移動することができる。吸着・脱着クロマトグラフィーでは K が高い塩濃度で吸着させ、FTC の場合は K が低く目的物質が素通りする条件で操作される。 K - I プロットは各塩濃度における吸着を測定することで描くことができるが、相当数の実験を必要とする。塩濃度勾配溶出法 (Linear gradient elution, LGE) モデルでは、 K - I プロットを簡単に少ない実験数で求めることができる。本研究では、濃度勾配溶出実験 (LGE) モデルから求められた分配係数 K 、滞留時間 RT 、理論段数 N をパラメーターとして FTC における分離モデルを確立することを目的とした。

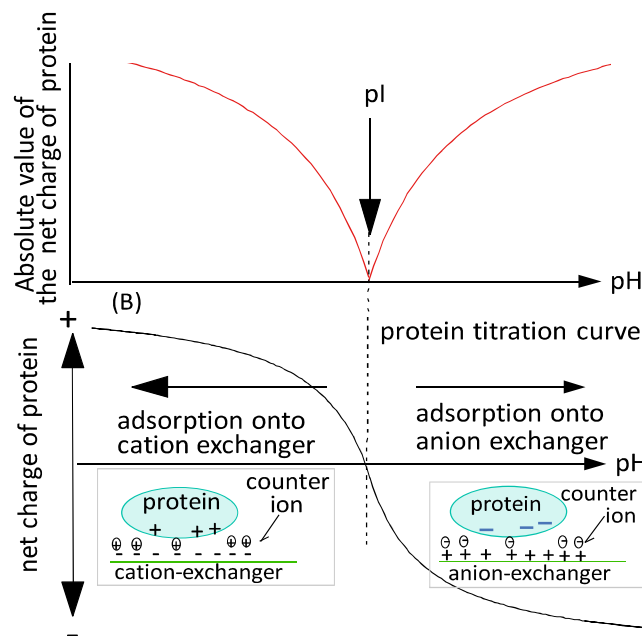


Figure 7 イオン交換ロマトグラフィーにおけるタンパク質の結合

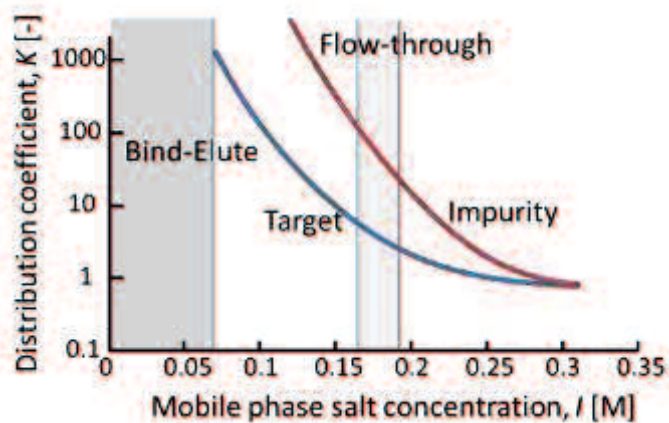


Figure 8 モノマーおよびダイマーの K - I プロット

2.2 理論

2.2.1 塩濃度勾配溶出 (LGE) 法を用いた分配係数 K の決定

勾配の傾き g (M/mL) を変化させた LGE 実験から、ピーク頂点の塩濃度 I_R を測定する (Figure 9)。ピーク塩濃度 I_R と規格化した塩濃度勾配 GH は両対数プロットとなり(1)式で表すことができる。規格化した塩濃度勾配 GH は $GH = gV_0H = g(V_t - V_0)$ として求められ、 V_0 は空隙容量、 V_t は総カラムボリューム、 H は $H = (V_t - V_0) / V_0 = (1 - \epsilon) / \epsilon$ で、相体積比である。

$$GH = I^{B+1} / [A(B+1)] \quad (1)$$

(1)式における A および B は、分配係数 K に関わるパラメーター A 、ならびに相互作用に関わる吸着サイト数 B である。 A および B から分配係数 K は(2)式で求められる。

$$K = AI^{-B} + K_C \quad (2)$$

ここで K_C は非吸着時における K の定数である。

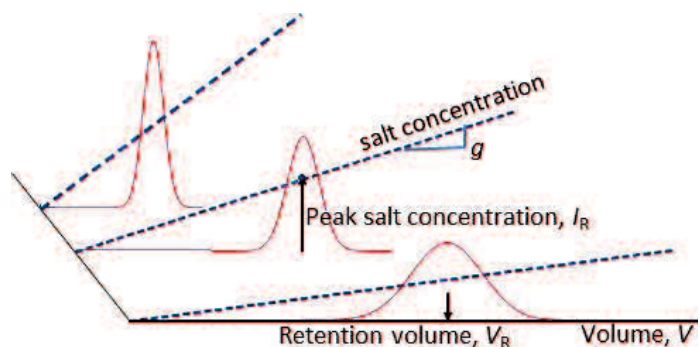


Figure 9 異なる勾配における塩濃度勾配溶出ピークの模式図

2.2.2 フロースルークロマトグラフィーにおける試料負荷液量の決定

FTC は試料負荷とほぼ同時に溶出液の回収が開始されるが連続したシステムではなく、不純物の破過前に試料負荷を終了させる必要がある。FTC において目的タンパク質と不純物の混合液を一定液量負荷したときの、クロマトグラム模式図を Figure 10 に示す。

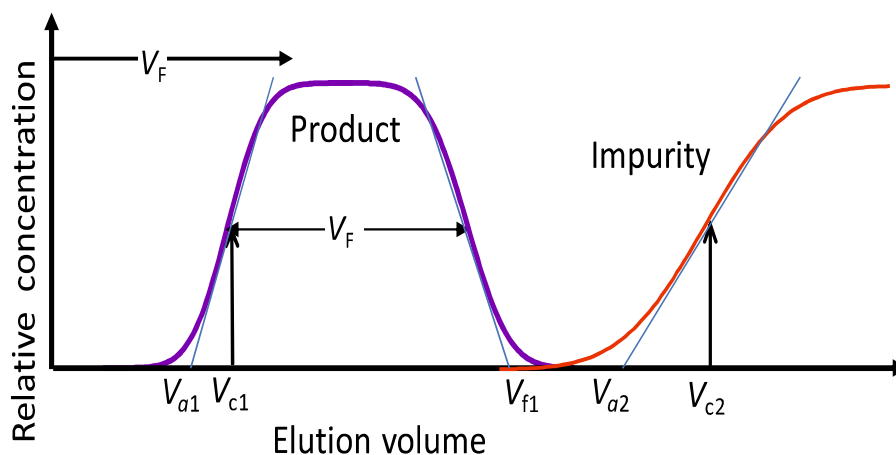


Figure 10 フロースルークロマトグラフィーによる目的物質と不純物の溶出

溶出開始液量を V_a 、溶出終了液量を V_f とし、成分 1 (目的物質) に添字 1 を、成分 2 (不純物) に添字 2 を付ける。分配係数から求められる溶出液量を V_c とすると、成分 1 および成分 2 の V_{c1} 、 V_{c2} は、それぞれの分配係数 K の関数として(3)、(4)式で表すことができる。

$$V_{C1} = V_o + (V_t - V_o)K_1 \quad (3)$$

$$V_{C2} = V_o + (V_t - V_o)K_2 \quad (4)$$

破過開始液量 V_a ならびに溶出終了液量 V_f は、ピークの広がりを考慮して(5), (6)式の関係式が成り立つ。

$$V_a = V_c + W_{ab}^v / 2 \quad (5)$$

$$V_f = V_c + W_{ab}^v / 2 + V_F \quad (6)$$

ここで、 W_{ab} は破過曲線を直線で近似したときの破過時間であり、

$$W_{ab}^2 = 2\pi(Z/u)^2 (1 + HK)^2 / N$$

W_{ab}^2 は時間の関数であるので、液量に換算すると(7)式のように表すことができる。

$$W_{ab}^{v2} = W_{ab}^2 \cdot F^2 = 2\pi(Z/u)^2 \cdot F^2 \cdot (1 + HK)^2 / N \quad (7)$$

ここで Z はカラム長、 N は理論段数、 u は線速度、 F は流速である。線流速 u はカラム断面積 A_c 、空隙率 ε を用いて $u = F / (A_c \varepsilon)$ として表されることから、(7)式は(8)式へ変換することができる。

$$\begin{aligned} W_{ab}^{v2} &= 2\pi(Z \cdot A_c \varepsilon / F)^2 \cdot F^2 \cdot (1 + HK)^2 / N \\ &= 2\pi V_o^2 (1 + HK)^2 / N \end{aligned} \quad (8)$$

以上より、バンドの広がりを表す W_{ab}^v は(9)式となる。

$$W_{ab}^v = V_o(1 + HK) \cdot \sqrt{2\pi/N} = V_c \cdot \sqrt{2\pi/N} \quad (9)$$

(9)式を(5), (6)式に代入することにより、成分 1 および成分 2 の溶出開始液量 V_a 、溶出終了液量 V_f は(10)～(13)式が成り立つ。

$$\begin{aligned} V_{a1} &= V_{c1} - (V_{c1} \cdot \sqrt{2\pi/N_1})/2 \\ &= V_{c1}[1 - \sqrt{\pi/(2N_1)}] \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} V_{a2} &= V_{c2} - (V_{c2} \cdot \sqrt{2\pi/N_2})/2 \\ &= V_{c2}[1 - \sqrt{\pi/(2N_2)}] \end{aligned} \quad (11)$$

$$V_{f1} = V_{c1}[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] + V_F \quad (12)$$

$$V_{f2} = V_{c2}[1 + \sqrt{\pi/(2N_2)}] + V_F \quad (13)$$

モノマーとダイマーが完全に分離し、ダイマーがカラム出口に到達する直前にモノマー回収を終了するよう操作する場合を考えると、 $V_{f1} = V_{f2}$ が成り立ち試料負荷量 V_F は(14)式から求めることが出来る。

$$V_{f1} = V_{f2}$$

$$V_{c1}[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] + V_F = V_{c2}[1 - \sqrt{\pi/(2N_2)}]$$

$$V_F = V_{c2}[1 - \sqrt{\pi/(2N_2)}] - V_{c1}[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] \quad (14)$$

無次元化した $V_F^* = V_F/V_0$ は $V_t = V_0(1+H)$ より

$$V_F^* = \varepsilon(1 + HK_2)[1 - \sqrt{\pi/(2N_2)}] - \varepsilon(1 + HK_1)[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] \quad (15)$$

理論段数 $N = Z/HETP$ については、(16)式で表される。

$$HETP = Z/N = A_0 + C_0 u \quad (16)$$

ここで A_0 は軸方向を表し、 C_0 は以下の式で表される。

$$C_0 = (d_p^2/30D_s)[HK^2/(1+HK)^2]^* \quad (17)$$

d_p は粒子径、 D_s は細孔内拡散係数である。通常 FTC は比較的早い線流速で操作されるため A_0 は無視できる。したがって HETP は

$$HETP = Z/N = C_0 u \quad (18)$$

V_F^* を算出する流れを Figure 11 に示す。成分 1 および 2 の D_s を非吸着条件でのアイソクラティック溶出実験または塩濃度勾配実験により求めたのち、*GH-IR* 曲線から A 、 B を

決定する。予測する条件の滞留時間 RT および塩濃度 I を選択したのち、 V_F^* を算出する。

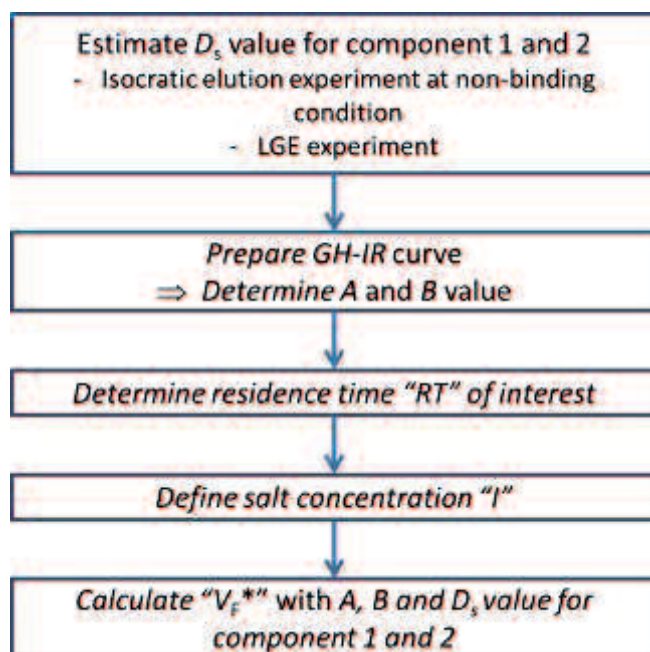


Figure 11 フロースルークロマトグラフィー予測モデルの流れ

本研究では、非吸着条件でのアイソクラティック溶出実験により求められた $D_{s1} = 1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D_{s2} = 8.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $K_{C1}=0.70$ 、 $K_{C2}=0.70$ を計算に用いることとした。

2.2.2 FTC 溶出プロファイルの予測シミュレーション

2.2.1 で前述した方法で V_F^* を算出することは出来るが、溶出プロファイルをメカニスティックモデルを用いて算出することは視覚的に FTC プロファイルを確認することができ有用である。 $N > 20$ で等温線が線形、すなわち K が一定の場合、Single zone spreading parameter models では同一の溶出プロファイルとなる。本研究では数値シミュレーションに下記モデル式を用いた。

$$\frac{\partial C}{\partial t} + H \frac{\partial C_s}{\partial t} = D_{L,e} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u \frac{\partial C}{\partial z} \quad (19)$$

D_L は有効分散係数であり、固定相拡散による分散と軸拡散の両方を考慮した分散係数である。本研究では瞬時平衡 $C_s = K_C C$ が成り立つと仮定した。

D_L は理論段数 N と関連しており、(20)式で表される。

$$\frac{1}{N} = \frac{2(D_{L,e}/u)}{Z} \quad (20)$$

式(19)に対する解析結果は次式で与えられる。

$$C/C_0 = f(N, T^*) - f(N, T^* - T_F^*) \quad (21)$$

$f(x, y)$ 、 T^* 、 T_F^* はそれぞれ、

$$f(x, y) = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}(\sqrt{x} - \sqrt{y}) \quad (22)$$

$$T^* = t / [(Z/u)(1 + HK)] \quad (23)$$

$$T_F^* = t_F / [(Z/u)(1 + HK)] \quad (24)$$

で与えられる。誤差関数 $\operatorname{erfc}(x)$ は(25)式で表される。

$$\operatorname{erfc}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-t^2} dt = 1 - \operatorname{erf}(x) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (25)$$

C_0 は試料負荷濃度、 t_F は試料負荷時間である。本計算では $C_{01} = 9 \text{ kg/m}^3$ 、 $C_{02} = 9 \text{ kg/m}^3$ を用いた。

2.3 材料と方法

2.3.1 試料と溶液

本研究ではモデルタンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。2つの異なるBSA(製品 No. A1900、A7511)をSigma-Aldrich(St.Louis, MO, USA)から購入し用いた。から分取した。いくつかのBSA製品はダイマーと凝集体が含まれており、製品によりモノマー、ダイマー、凝集体の含まれる割合が異なる。A1900はモノマーが多く含まれ、A7511はダイマーと凝集体が多く含まれている。ダイマー試料はサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex HiLoad 26/600, GE-Healthcare)を用いて分取された。

陰イオン交換クロマトグラフィー(AIEC)はQ-Sepharose HP(GE-Healthcare, USA)を用いた。Q-Sepharose HP樹脂は高架橋6%アガロースビーズを担体とし平均粒子径は34 μm である。その他の試料は分析グレードが用いられた。

2.3.2 カラム

Q-Sepharose HPはプラスチックカラム($d_c=9 \text{ mm}$, $Z=30 \text{ mm}$, $V_t=1.91 \text{ mL}$, $d_c=9 \text{ mm}$, $Z=50 \text{ mm}$, $V_t=3.18 \text{ mL}$, または $d_c=9 \text{ mm}$, $Z=150 \text{ mm}$, $V_t=9.53 \text{ mL}$)へメーカー推奨手順に

従いパッキングされた。

2.3.3 塩濃度勾配溶出 (LGE) 実験

塩濃度勾配 (LGE) 実験は完全自動化液体クロマトグラフィー装置(AKTA explorer または AKTA Pure, GE Healthcare)を用いて 298±1K で実施された。10 mM Tris-HCl, 18mM NaCl, pH7 で平衡化した Q sepharose HP カラムへ 1-10 mg/mL の BSA 試料(0.1-0.5 mL) 負荷し、10 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH7 を用いて異なる塩濃度勾配で溶出した。流速 F_v は特に記載がない限り 1.0 mL/min であった。

カラム排除容積 ε はデキストラン (分子量>2000) 溶液を用いて $\varepsilon = V_t / V_0$ として測定された。 V_t はカラム容量、 V_0 はカラム排除容量である。

ピークの保持時間 (液量) における塩濃度 I_R は予め測定していた導電率と塩濃度の標準曲線を用い、ピークの導電率から求められた。 I_R は異なる濃度勾配スロープ g で測定され、標準化した濃度勾配 $GH = g(V_t - V_0)$ に対してプロットされた。塩濃度勾配スロープ g は、次式を用いて計算される。

$$g = (I_f - I_0) / V_g, \quad (26)$$

I_f は最終塩濃度、 I_0 は勾配開始塩濃度、 V_g は濃度勾配液量である。LGE 実験は 4 つの異なる濃度勾配を用い、1 条件につき 2 回ずつ測定した。実験設定はこれまで報告している手法と同等に移動相 10mM Tris-HCl バッファ(pH7.0)、カラム ($d_c=9$ mm, $Z=50$ mm, $V_t=3.18$ mL, $\varepsilon=0.36$) を用いて実施した。

2.3.4 フロースルークロマトグラフィー (FTC) 実験

フロースルークロマトグラフィー (FTC) 実験は LGE 実験と同様の実験設定で実施された。操作はアイソクラティック溶出とほぼ同様であり、Q sepharose HP カラム ($d_c=9$ mm, $Z=150$ mm, $V_t=9.53$ mL, $\varepsilon=0.33$) を 10 mM Tris-HCl, 18mM NaCl, pH7 で平衡化した後、平衡化バッファで溶解した BSA 溶液($C_0 = 1$ mg/mL)を連続的に送液した (流速 $F_v = 2$ mL/min)。試料負荷液量 400 mL を負荷し、さらに 100 mL の平衡化バッファを送液した後、カラムは 1.0 M NaCl を含むバッファで洗浄された。試料負荷開始後 110mL から 20 mL ずつ分取し、各分画はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析に用いられた。

2.3.5 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 実験

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 実験は標準的な HPLC 装置(JASCO, Japan)を用いて行われた。カラムは東ソー (Tokyo, Japan) の TSK gel G3000SWxL column ($d_c = 0.78$ cm, $Z = 30$ cm) が用いられた。移動相 (0.05 M sodium phosphate, 0.1M NaCl, pH 7.0) を 0.5 mL/min で送液し、試料溶液 0.1-0.2 mL を注入した。検出は UV 吸光 280 nm で行っ

た。

2.4 結果および考察

2.4.1 移動相塩濃度の関数としての拡散係数

Q sepharose HP を用いて、BSA の塩濃度勾配溶出実験(LGE)を行った。BSA のモノマーを成分 1、ダイマーを成分 2 とし、モノマーおよびダイマーの溶出ピークから I_R を測定した。その結果得られた $GH-IR$ プロットを Figure 12 に示す。得られたプロットの回帰曲線は式 (1) によく当てはまっており ($R^2 > 0.95$)、 A および B は回帰曲線から求められた。

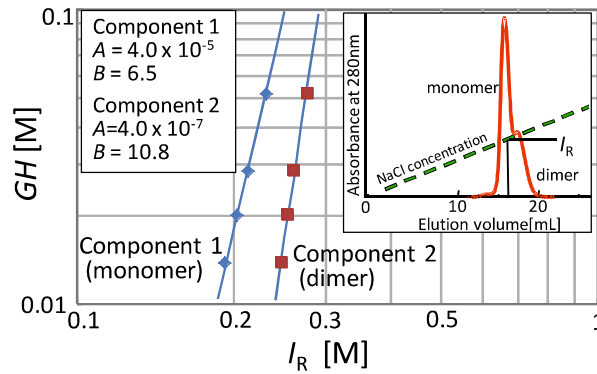
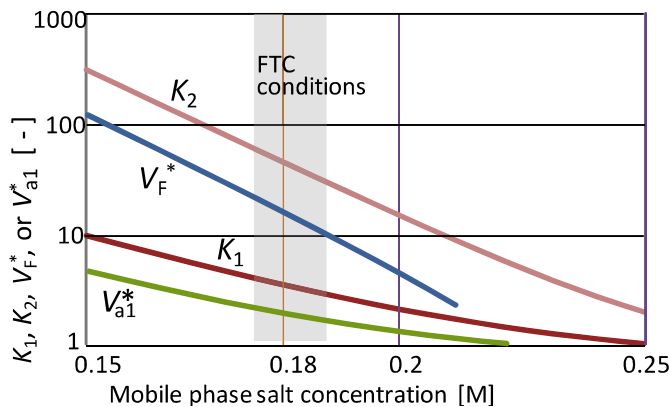


Figure 12 Q Sepharose HP におけるモノマーおよびダイマーの $GH-IR$ プロット

成分 1 および成分 2 の分配係数 K_1 および K_2 を塩濃度 I の関数として $GH-IR$ 曲線から求め、Figure 13 に示す。分配係数 K_1 および K_2 から試料負荷液量 V_F^* 並びに成分 1 の溶出開始液量 V_{a1}^* も塩濃度 I の関数として算出し、同様に Figure 13 に示す。 K_1 および K_2 は非常に強く塩濃度 I に相関するため、 I の小さな変化でも V_F^* 並びに V_{a1}^* は大きく変化する。塩濃度 I が低くなるほど成分 1 と成分 2 の分配係数 K の差は大きくなり、試料負荷液量 V_F^* を増加させることができる。一方で、塩濃度 I を低くするほど回収開始液量 V_{a1}^* も増大す



るため、試料負荷開始から成分 1 の回収開始までに時間を要することとなる。

Figure 13 Q Sepharose HP における分配係数 K_1 , K_2 , 試料負荷液量 V_F^* 並びに破過開始

液量 V_{a1}^* (RT=240s, $Z=50$ mm, $\varepsilon=0.40$)

2.4.2 フロースルークロマトグラフィーの溶出プロファイル予測

得られたパラメーター A, B を基に予測される FTC プロファイルを Figure 14 に示す。塩濃度 0.18M と 0.2M における溶出プロファイルを比較した。Figure 14 に示されたように、塩濃度を 0.02M 低下させるだけで試料負荷液量 V_F^* は劇的に増加する。一方で塩濃度の低下は上述したように破過開始液量 V_{a1}^* を増加させる。

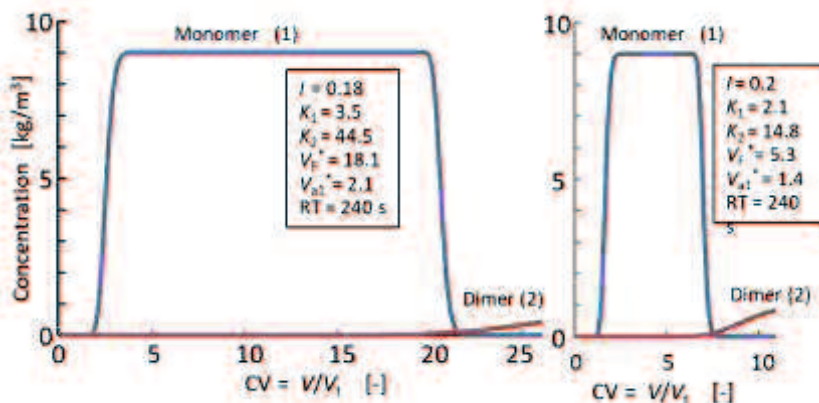


Figure 14 異なる塩濃度における FTC 溶出プロファイルシミュレーション

2.4.3 フロースルークロマトグラフィー (FTC) 実験による検証

FTC 実験を実施することにより、本研究におけるモデルを検証した。移動相塩濃度は 2.4.2 において溶出プロファイルを予測した 0.18M を選択した。ダイマーの溶出を検出するために、本実験における試料負荷液量 V_F はモデルから計算された液量よりも多く負荷することとした。FTC 実験結果を Figure 15 に示す。UV ではダイマーの破過は検出できないため、フロースルー分画を分取し、SEC により分析した。分析結果を Figure 16 に示す。

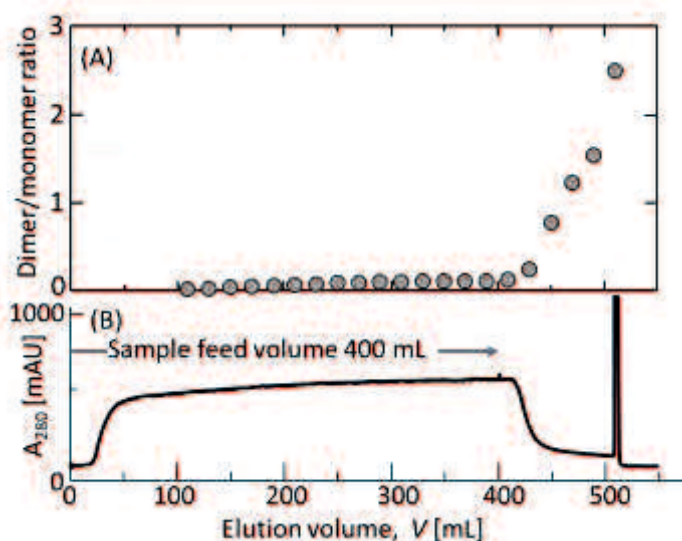


Figure 15 Q sepharose HP を用いた BSA の FTC 実験における Dimer/Monomer 比率 (A) および溶出プロファイル (B)

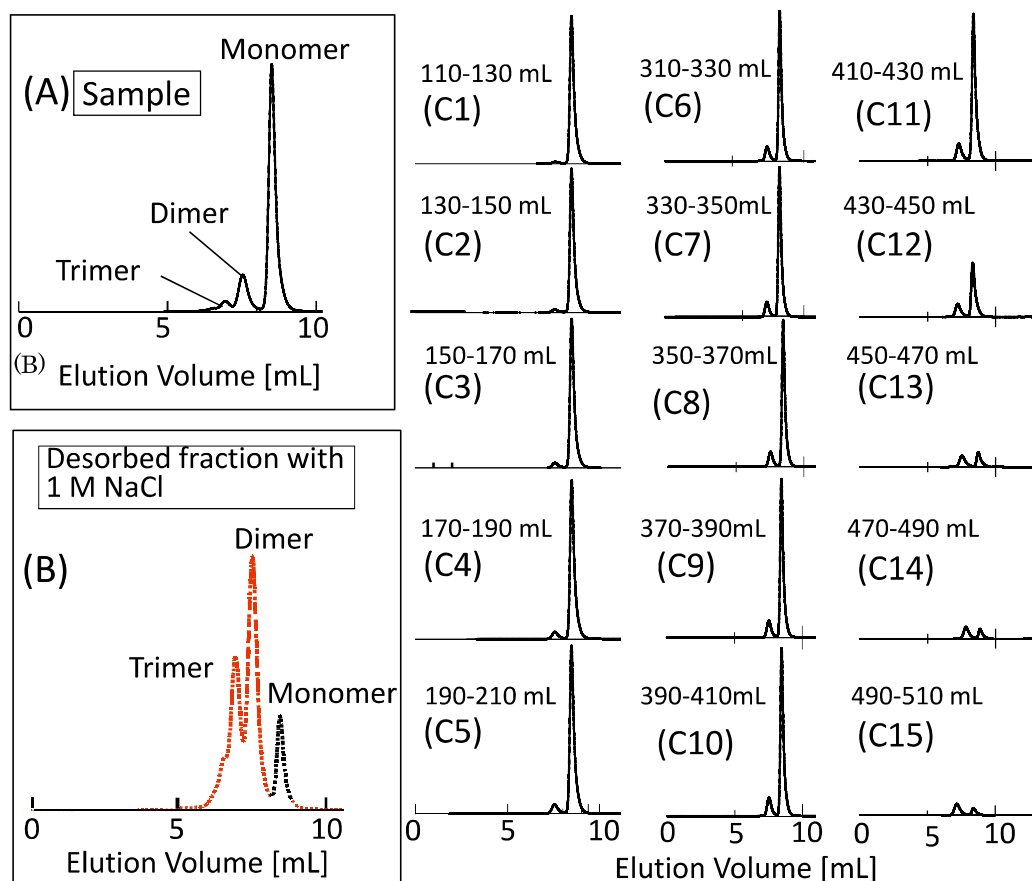


Figure 16 Q sepharoseHP のフロースルーフラクションの SEC 分析結果 (A. 負荷試料、
B. 1M NaCl 洗浄分画、C. 各フロースルー分画)

Table 1 に V_{a1} および V_F についてモデルより予測された結果と FTC 実験の結果を示す。FTC 実験に用いたカラムのカラム容量 V_c は 9.5 mL である。UV の立ち上がりは 20 mL から確認され、モノマーのピークであると考えるとほぼ計算による推測と一致する。Figure 16 に示されたように、負荷した BSA 試料と比較するとダイマー及びトライマーは 190 mL まで除去された。フロースルー分画分取終了後に 1.0M NaCl を含むバッファで洗浄した分画にはモノマーは少なくダイマー、トライマー等の凝集体が多く含まれた。

Table 1 計算より予測される試料負荷量と回収開始液量

	モデル予測			実験結果	
	K [-]	V_a^* [-]	V_a [mL]	V_a^* [-]	V_a [mL]
成分 1 モノマー	3.5	2.2	29	3	20
成分 2 ダイマー	44.5	22.7	216	21	202

2.5 小括

FTC は Figure 6 ならびに Figure 10 で示したように完全連続操作ではなく、不純物が破過する前に試料負荷を終了させる必要がある。また細孔内拡散による試料の広がりの影響で破過曲線は線流速により変化する。FTC プロセスを適切に予測し操作するためには、塩濃度に依存した分配係数と細孔内拡散などを考慮した zone spreading パラメーターを考慮したモデルが必要である。本研究では FTC の条件を迅速かつ簡単に決定できる方法を開発し、モデルタンパク質 BSA を用いてモノマーとダイマーの AIEC による除去を確認した。計算に必要なパラメーターは LGE 実験により決定され、ある塩濃度条件下における試料負荷液量 V_F を簡単に予測することができた。Figure 12 に示されたようにイオン交換クロマトグラフィー (IEC) による凝集体の分離は大変困難であり、塩濃度勾配溶出を用いても完全に分離することができない。Figure 14 で示されたように 0.02M の塩濃度の違いで FTC による凝集体の分離に大きな影響を及ぼす。したがってより慎重に FTC の条件を決定することが必要であり、モデルを用いて多くの実験を実施する前に溶出プロファイルを簡単に予測できるのはプロセス開発において非常に有用となる。

FTC では試料が連続的に負荷され不純物濃度が目的物質の濃度より相当低いことにより、UV では不純物の溶出が検出できない (Figure 15)。不純物をプロセスの操作中に検出できるプロセス分析技術 (PAT) の開発も必要である。

バイオ医薬品の開発においては、イオン交換クロマトグラフィーは FTC として多く用いられ、不純物を除去するのに有用である。疎水性クロマトグラフィー (HIC) といった異なるモードのクロマトグラフィーも FTC プロセスとして利用可能である。LGE 実験は HIC に対しても有効であり、本研究の応用も可能と考えられる。

第3章 フロースルークロマトグラフィープロセスの最適化

3.1 序論

ここまで、フロースルークロマトグラフィー(FTC)の分離機構のモデル化を行い直線勾配溶出(LGE)実験から得られた分配係数 K と塩濃度 I の関係および細孔内拡散係数 D_s を用いたシミュレーションが可能であることを示し、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)分離によるウシ血清アルブミン (BSA) のモノマーとダイマーの分離の妥当性を検証した。

実際のプロセス設計では最適化が必要であるが、何を指標として最適化をするかが問題となる。本章では FTC モデルを用いて生産性の高い FTC プロセスの最適化を行うことを目的とする。

3.2 理論

3.2.1 クロマトグラフィー工程における生産性

Figure 17 に示すような、目的試料をカラムに吸着し、溶出(脱着)するクロマトグラフィー操作では、次式で定義される生産性 P を指標とすることが多い。

$$P = (\text{注入試料質量}) / [(\text{カラム体積})(\text{サイクル時間})]$$

$$= (C_0 V_F) / (t_c V_C) \quad (26)$$

ここで、 C_0 は試料の目的成分濃度、 V_F は試料負荷容量、 V_C はカラム体積である。サイクル時間 t_c は、すべての工程を合計した時間であり、Figure 17 では次式となる。

$$t_c = t_1 + t_2 + t_3 + t_4 + t_5 \quad (27)$$

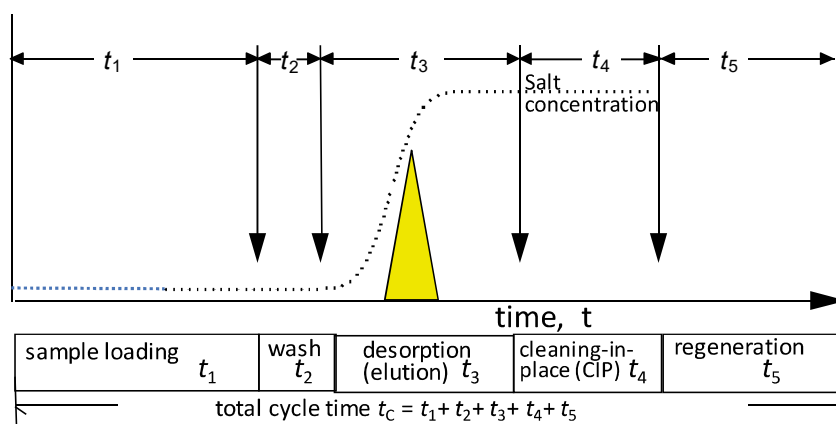


Figure 17 吸着-脱着クロマトグラフィープロセス

(27)式で示されるように、吸着脱着クロマトグラフィーでは生産性はサイクル時間に反比例するため、流速 u を速くし試料負荷(sample loading)の時間を短縮することにより生産性を向上させることができる。しかしながら、あまりにも流速を速くすると動的吸着量(DBC)が急激に低下するので生産性も低下する (Figure 18)。

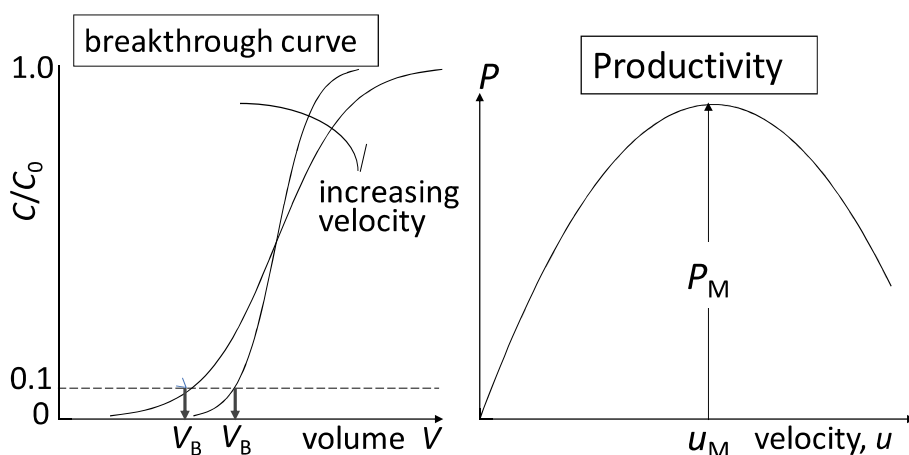


Figure 18 破過曲線(breakthrough curve)と生産性 P の流速依存性

実際のダウンストリームプロセスでは多くの場合、処理されるべきサンプルの量 ($C_0 V_F$) と作業時間 (t_C) は固定されている。したがって、処理されるサンプル量 ($C_0 V_F$) を決めた時間 (t_C) で処理できるラカム容量 (V_B) が選択されるべきである。また、カラムを繰り返し使用する繰り返しバッチ製造の最適化についても、本計算方法を用いることができる。

3.2.2 フロースルークロマトグラフィー (FTC) における生産性

フロースルークロマトグラフィー (FTC) は試料を連続的に負荷している間、カラムを通過した液を回収する。FTCにおけるサイクル時間 t_C は吸着-脱着クロマトグラフィーの式(26)より簡素となり、次式で示される。

$$t_C = V_{F1} / F_V \quad (28)$$

ここで V_{F1} は溶出終了液量、 F_V は流速である。FTC では試料負荷後、目的物質を完全に溶出させるため移動相を送液する。また、アプリケーションによっては FTC カラムはシングルユースの場合もあるため、カラムからの脱着、CIP、再生といった工程の時間はサイクル時間に考慮していない。カラムが再利用される場合でも、FTC においてはサイクル時間のうち試料負荷時間が大部分を占めており、これらの工程は新しいカラムが接続されている間にプロセスとは独立して完了する。この方法は膜分離システムと類似している。

溶出終了液量 V_{F1} は 2.2.2 において説明されたように、式(26)から式(33)で表すことがで

きる。

$$V_{f1} = V_{c1}[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] + V_F = V_{c1}(1 + 1.25 / N_1^{0.5}) + V_F \quad (29)$$

$$V_{C1} = V_o + (V_t \cdot V_o)K_1 \quad (30)$$

$$\begin{aligned} V_F &= V_{C2}[1 - \sqrt{\pi/(2N_2)}] - V_{c1}[1 + \sqrt{\pi/(2N_1)}] \\ &= V_{C2}(1 - 1.25 / N_2^{0.5}) - V_{c1}(1 + 1.25 / N_1^{0.5}) \end{aligned} \quad (31)$$

$$V_{C2} = V_o + (V_t \cdot V_o)K_2 \quad (32)$$

$$1 / N_1 = C_1^o (u/Z) \quad (33)$$

$$C_1^o = (d_p^2 / 30D_{s1})[HK_1^2/(1 + HK_1)^2] \quad (34)$$

$$1 / N_2 = C_2^o (u/Z) \quad (35)$$

$$C_2^o = (d_p^2/30D_s^2)[HK_2^2/(1+HK_2)^2] \quad (36)$$

上記計算には成分 1 および成分 2 の細孔内分散 D_{s1} 、 D_{s2} 、ならびに分配係数 K が移動相塩濃度 I の関数として必要である。分配係数 K は LGE 実験より求められる次式で表される。

$$K = AI \cdot B + K_C \quad (37)$$

FTC における生産性 P は式(26)に式(28)を代入し C_o を削除して、

$$P^o = (V_F)/(V_{f1} RT) \quad (38)$$

ここで RT は滞留時間であり次式で表される。

$$RT = V_t / F_v \quad (39)$$

本研究では、非吸着条件でのアイソクラティック溶出実験により求められた $D_s = 1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D_s = 8.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $K_{C1}=0.7$ 、 $K_{C2}=0.7$ 、 $Z = 50 \text{ mm}$ 、 $\varepsilon = 0.4$ を計算に用いることとした。

3.2.3 FTC 溶出プロファイルの予測シミュレーション

2.2.2 で前述した方法と同様に FTC 溶出プロファイルを予測した。

3.3 材料と方法

3.3.1 試料と溶液

本研究ではモデルタンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いた。2 つの異なる BSA (製品 No. A1900、A7511)を Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)から購入し用いた。から分取した。いくつかの BSA 製品はダイマーと凝集体が含まれており、製品によりモノマー、ダイマー、凝集体の含まれる割合が異なる。A1900 はモノマーが多く含まれ、A7511 はダイマーと凝集体が多く含まれている。ダイマー試料はサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex HiLoad 26/600, GE-Healthcare) を用いて分離された。

陰イオン交換クロマトグラフィー(AIEC)は Q-Sepharose HP (GE-Healthcare, USA)を用いた。Q-Sepharose HP 樹脂は高架橋 6%アガロースビーズを担体とし平均粒子径は 34 μm である。その他の試料は分析グレードが用いられた。

3.3.2 カラム

Q-Sepharose HP はプラスチックカラム ($d_c=9\text{ mm}$, $Z=30\text{ mm}$, $V_t=1.91\text{ mL}$, $d_c=9\text{ mm}$, $Z=50\text{ mm}$, $V_t=3.18\text{ mL}$, または $d_c=9\text{ mm}$, $Z=150\text{ mm}$, $V_t=9.53\text{ mL}$)へメーカー推奨手順に従いパッキングされた。

3.3.3 塩濃度勾配溶出 (LGE) 実験

塩濃度勾配 (LGE) 実験は完全自動化液体クロマトグラフィー装置(AKTA explorer または AKTA Pure, GE Healthcare)を用いて 298 \pm 1K で実施された。10 mM Tris-HCl, 18mM NaCl バッファで平衡化した Q sepharose HP カラムへ 1-10 mg/mL の BSA 試料 (0.1-0.5 mL) 負荷し、10 mM Tris-HCl, 1M NaCl バッファを用いて異なる塩濃度勾配で溶出した。流速 F_f は特に記載がない限り 1.0 mL/min であった。

カラム排除容積 ϵ はデキストラン (分子量 >2000) 溶液を用いて $\epsilon = V_t / V_0$ として測定された。 V_t はカラム容量、 V_0 はカラム排除容量である。

ピークの保持時間 (液量) における塩濃度 I_R は予め測定していた導電率と塩濃度の標準曲線を用い、ピークの導電率から求められた。 I_R は異なる濃度勾配スロープ g で測定され、標準化した濃度勾配 $GH=g(V_t \cdot V_0)$ に対してプロットされた。塩濃度勾配スロープ g は、次式を用いて計算される。

$$g = (I_f - I_0) / V_g, \quad (37)$$

I_f は最終塩濃度、 I_0 は勾配開始塩濃度、 V_g は濃度勾配液量である。LGE 実験は 4 つの異なる

る濃度勾配を用い、1条件につき2回ずつ測定した。

3.4 結果および考察

3.4.1 試料負荷液量と塩濃度の関係

成分1および成分2の分配係数 K_1 および K_2 を塩濃度 I の関数として $GH-IR$ 曲線から求め、分配係数 K_1 および K_2 から試料負荷液量 V_F^* 並びに成分1の破過開始液量 V_{a1}^* も塩濃度 I の関数として算出した (Figure 19)。成分1および成分2はそれぞれ、モノマーおよびダイマーとする。 K_1 および K_2 は非常に強く塩濃度 I に相関するため、 I の小さな変化でも V_F^* 並びに V_{a1}^* は大きく変化する。塩濃度 I が低くなるほど成分1と成分2の分配係数 K の差は大きくなり、試料負荷液量 V_F^* を増加させることができる。一方で、塩濃度 I を低くするほど回収開始液量 V_{a1}^* も増大するため、試料負荷開始から成分1の回収開始までに時間を要することとなる。実際のFTC操作では $K_1 < 10$ 、 $V_F^* > 10$ であることが望ましい。

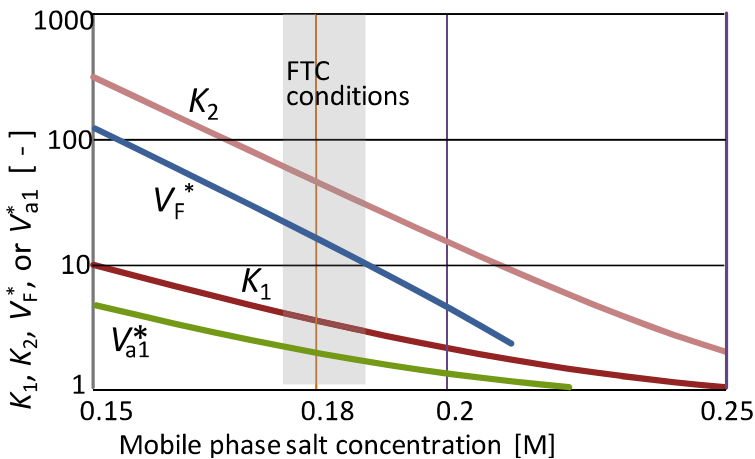


Figure 19 Q Sepharose HP における分配係数 K_1 , K_2 , 試料負荷液量 V_F^* 並びに破過開始液量 V_{a1}^* と塩濃度 I の相関 (RT=240 秒)

Figure 19 で示されたように、RT=4 分の場合に塩濃度 $I=0.18M$ がモノマーとダイマーを分離するために相応しい条件である。Figure 20 に塩濃度 $I=0.180\pm 0.05 M$ の場合の FTC 予測溶出プロファイルを示す。モノマーの溶出開始液量は $0.2M$ の方がやや小さく早く回収を回収できるが、試料負荷液量は $0.18M$ では $0.2M$ の半分以下となる。Figure 19 で明確であったように、 V_F^* と V_{a1}^* は少しの塩濃度の変化に敏感で、実際の操作においてはバッファ調製時の塩濃度を注意深くモニターする必要がある。

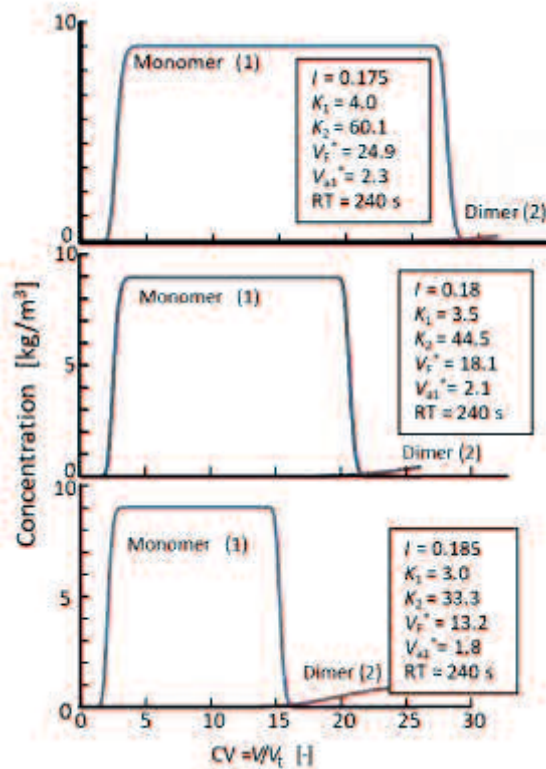


Figure 20 FTC 予測溶出プロファイルの塩濃度による違い ($I=0.175, 0.180, 0.185$ M, $d_p = 34 \mu\text{m}$, pH 7.0)

3.4.2 フロースルークロマトグラフィーにおける保持時間及び粒子径の影響

クロマトグラフィー担体の滞留時間 RT 及び粒子径 d_p が変化した場合の FTC を考える。クロマトグラフィーによる分離は、物質移動により支配されているため、滞留時間 RT 及び粒子径 d_p は FTC のパフォーマンスに影響を与えるはずである。 RT 及び d_p を変化させた場合に予測される FTC 溶出プロファイルを Figure 21 および Figure 22 にそれぞれ示す。 RT を変化させた場合、 RT が長くなるほど試料負荷液量 V_F が増加する。一方 d_p を変化させると、 d_p が減少するほど試料負荷液量 V_F が増加する。いずれの場合も、物質移動抵抗が低下する方向へ進む場合に分離が改善し試料負荷液量 V_F が増加する。

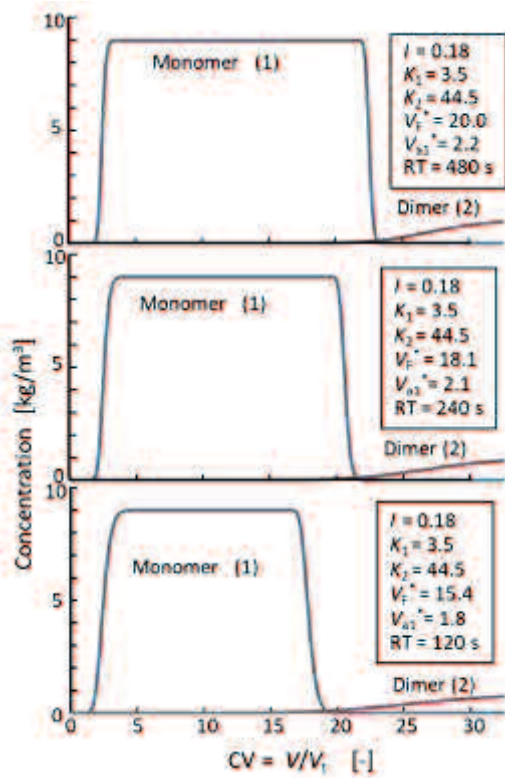


Figure 21 滞留時間 RT の FTC への影響 (RT=120, 240, 480 秒, $d_p = 34 \mu\text{m}$, pH 7.0)

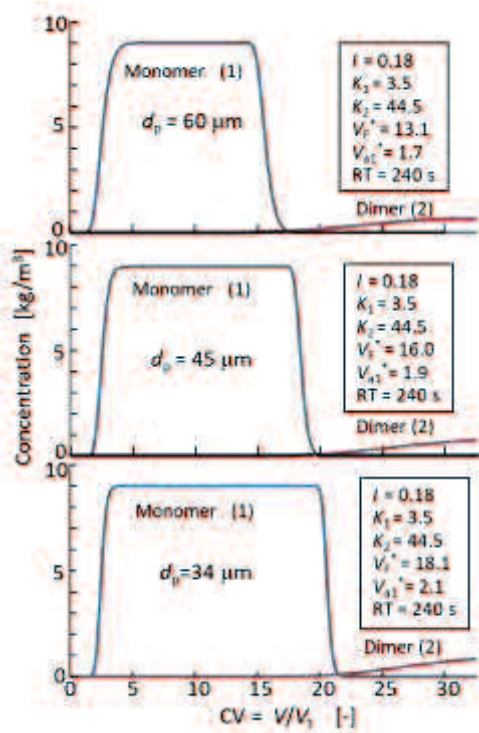


Figure 22 粒子径 d_p の FTC への影響 ($d_p = 34, 45, 60 \mu\text{m}$, RT=240 秒, $d_p=34 \mu\text{m}$, pH 7.0)

異なる粒子径および異なる滞留時間を用いた場合における分離時間を、無次元化した試料負荷液量に対してプロットした図を Figure 23 に示す。Figure 23 に示された曲線上では同じ生産効率を示す。さらに生産性 P を式(23)および式(25)を用いて計算し、無次元化した試料負荷液量に対してグラフ化した (Figure 24)。同じ滞留時間で比較すると粒子径が小さい方が試料負荷液量が増加するが、分離時間も長く必要となる。滞留時間が長くなると、粒子径 $60\mu\text{m}$ の場合には粒子径 $34\mu\text{m}$ と比較して生産性がやや低下する。粒子径 $60\mu\text{m}$ を用いた場合には滞留時間 2 分で操作するのは不可能である。総じて、小さい粒子径の担体を用い高流速で操作することにより高い生産性を得ることができる。粒子径 d_p を変化させたときの適切な滞留時間 RT は次式(38)で計算することができる。

$$d_p^2 RT = d_p^2 (Z / u_0) = \text{一定} \quad (38)$$

粒子径および滞留時間を変化させた場合の生産性は Table 3 に示す。粒子径が小さいほど生産性は向上する。

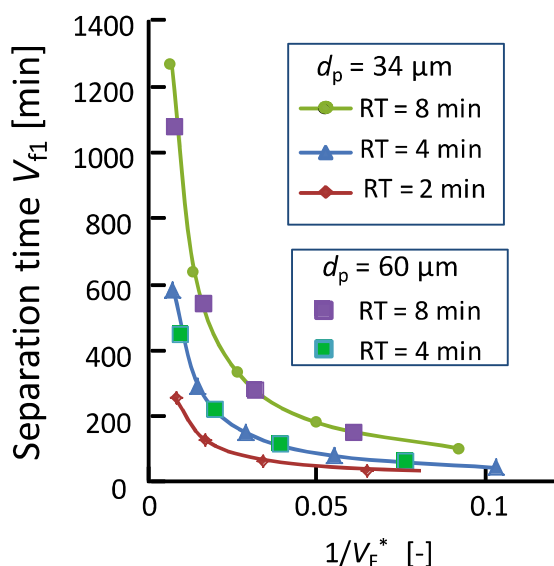


Figure 23 試料負荷液量と分離時間の関係

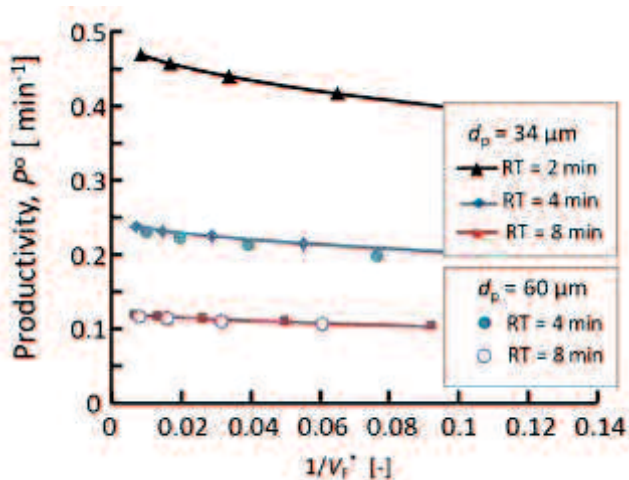


Figure 24 試料負荷液量と生産性の関係

3.4.2 フロースルークロマトグラフィーにおける pH の影響

イオン交換クロマトグラフィーは移動相の塩濃度 I と同様に pH の変化にも大きく影響を受ける。pH による FTC プロセスの影響を理解するため、pH6 および pH8 における A 、 B を LGE 実験より求めた。酸性タンパク質の陰イオン交換クロマトグラフィー (AIEC) に対する吸着液量は移動相の pH を上げることで増加することが分かっている。pH6、7、および 8 における A 、 B の値を Table 2 に示す。モノマーおよびダイマーの吸着サイト数 B は、移動相の pH が上がるにつれ増加する。

Table 2 pH6, 7, 8 における A , B 値

	pH	A	B
Monomer	6	8.19×10^{-5}	5.5
	7	4.00×10^{-5}	6.5
	8	1.24×10^{-5}	8.5
Dimer	6	1.36×10^{-5}	7.5
	7	6.40×10^{-7}	10.8
	8	2.50×10^{-7}	12.6

粒子径、pH、滞留時間を変化させたときに、各組み合わせで生産性 P が最大となる条件を Table 3 に示す。いずれの pH においても試料負荷液量 $V_f^* = 20 \pm 0.5$ 、モノマーの分配係数 $K_1 < 7$ の場合の FTC プロセスにおける最適な塩濃度 I が決定された。

Table 3 最適化された FTC プロセス

d_p	pH	RT	I	K_1	K_2	V_F^*	V_{fl}^*	P^0
[μm]		[s]	[M] ^{a)}	[-]	[-]	[-]	[-]	[s ⁻¹]
34	6	240	0.131	6.5	53	19.9	99.7	0.00362
34	7	240	0.178	3.7	50	20.5	94.4	0.00332
45	7	438	0.178	3.7	50	20.5	165.2	0.00207
60	7	750	0.178	3.7	50	20.5	295.2	0.00117
90	7	1680	0.178	3.7	50	20.5	661	0.000517
34	8	240	0.218	5.5	53	20.7	100.4	0.00343

a) kmol/m³

凝集体の除去、本研究においてはダイマーの除去、は一般的に分離が難しい。濃度勾配溶出 (LGE) ですら二つのピークを完全分離 (ベースライン分離) するには分離時間を非常に長くしない限り実現できない。LGE では二つの溶出ピークの距離として ΔI_R として定義される (Figure 25)。一方 FTC では二成分の分離は分配係数の差 $\Delta K=K_2-K_1$ でもたられる。

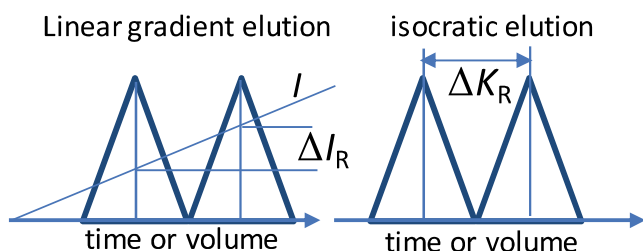


Figure 25 濃度勾配溶出とアイソクラティック溶出における 2 成分の分離能

BSA のモノマーとダイマーについて $GH=0.002$ で LGE 実験を行った際の、溶出ピーク塩濃度 I_{R1} (モノマー), I_{R2} (ダイマー), ΔI_R , K_1 ならびに K_2 を Table 4 に示す。 ΔI_R は pH7 の方が pH6 よりも大きく、LGE においては pH7 の方が分離能が高い。一方いずれの pH においても K_1 と K_2 は類似しており、FTC においては適切な塩濃度を選択することで pH にかかわらず同等の分離が可能である。

Table 4 LGE 実験における分離 ($GH=0.002$)

pH	I_{R1}	I_{R2}	ΔI_R	K_1	K_2
	[M]	[M]	[M]	[-]	[-]
6	0.121	0.164	0.0437	10	10.4
7	0.148	0.217	0.0693	10.6	9.9

3.5 小括

イオン交換クロマトグラフィーをによるウシ血清アルブミン (BSA) のモノマーとダイマーの分離を目的とし、FTC プロセスを設計、最適化することが出来た。LGE 実験から得られたパラメーターを用いて、FTC の溶出プロファイルを計算することができた。FTC では小さい粒子径の樹脂を用いることで生産性が向上する。しかし粒子径を小さくすることによりカラム圧力は上昇するため、カラム圧力が操作範囲内である粒子径である必要がある。濃度勾配溶出と比較すると FTC の分離性能は高い。これは二成分の分離に必要な分配係数の差を生み出す適切な移動相の塩濃度を設定できることによる。しかしながら FTC は移動相の pH および塩濃度の小さな変化に大きな影響を受けるため正確なバッファ調製および測定が FTC プロセスを適切にコントロールすることが非常に重要である。適切な塩濃度の移動相を選択することで、pH6, 7, および 8 において高い生産性の効率的な分離を行うことができる。FTC では試料が連続的に負荷され不純物濃度が目的物質の濃度より相当低いことにより、UV では不純物の溶出が検出できない。そのため、本研究で示されたような数値計算シミュレーションは FTC プロセスにおける不純物の溶出挙動を理解する有用なツールとなる。クロマトグラフィーのシミュレーションを行うモデル方法は複数あり、複数のモデル取り扱うことができるソフトウェアが販売されている。しかしながらそれらのソフトウェアでは必要なパラメーターを取得する方法は含まれていない。また、複数のモデルから正しいモデルを選択するのは難しく、使いこなすにはクロマトグラフィーの基礎知識が必須である。

第4章 参考文献

1. Carta, G., A. R. Ubiera and T. M. Pabst; "Protein Mass Transfer Kinetics in Ion Exchange Media: Measurements and Interpretations," *Chem. Eng. Technol.*, 28, 1252–1264 (2005)
2. Carta, G. and A. Jungbauer; *Protein Chromatography: Process Development and Scale-up*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2010)
3. Chmielowski, R. A., L. Mathiasson, H. Blom, D. Go, H. Ehring, H. Khan, H. Li, C. Cutler, K. Lacki, N. Tugcu and D. Roush; "Definition and Dynamic Control of a Continuous Chromatography Process Independent of Cell Culture Titer and Impurities," *J. Chromatogr. A*, 1526, 58–69 (2017)
4. Ecker, D.M., S. D. Jones and H. L. Levine; "The Therapeutic Monoclonal Antibody Market," *MAbs*, 7, 9–14 (2015)
5. Farid, S. S.; "Economic Drivers and Trade-offs in Antibody Purification Processes," *Biopharm Int.*
6. Gronemeyer, P., R. Ditz and J. Strube; "Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing," *Bioengineering (Basel)*, 1, 188–212 (2014)
7. Hasegawa, S., C.-S. Chen, N. Yoshimoto and S. Yamamoto; "Optimization of Flow-Through Chromatography of Proteins," *J. Chem. Eng. Japan*, 53, 1 (2020)
8. Hunter, A. K. and G. Carta; "Effects of Bovine Serum Albumin Heterogeneity on Frontal Analysis with Anion-exchange Media," *J. Chromatogr. A*, 937, 13–19 (2001)
9. Ichihara, T., T. Ito, Y. Kurisu, K. Galipeau and C. Gillespie; "Integrated Flow-through Purification for Therapeutic Monoclonal Antibodies Processing," *MAbs*, 10, 325–334 (2018)
10. Ichihara, T., T. Ito and C. Gillespie; "Polishing Approach with Fully Connected Flow-through Purification for Therapeutic Monoclonal Antibody," *Eng. Life Sci.*, 19, 31–36 (2019)
11. Ishihara, T., M. Miyahara and K. Yamamoto; "Monoclonal Antibody Purification Using Activated Carbon as a Replacement for Protein A Affinity Chromatography," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1102, 1–7 (2018)
12. Jiang, M., K. A. Severson, J. C. Love, H. Madden, P. Swann, L. Zang and R. D. Braatz; "Opportunities and Challenges of Real-time Release Testing in Biopharmaceutical Manufacturing," *Biotechnol. Bioeng.*, 114, 2445–2456 (2017)
13. Ladisch, M. R.; *Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics*. pp. 252–257, Wiley, New York, U.S.A. (2001)
14. Marichal-Gallardo, P. A. and M. M. Alvarez; "State-of-the-Art in Downstream

- Processing of Monoclonal Antibodies: Process Trends in Design and Validation,” *Biotechnol. Prog.*, 28, 899–916 (2012)
15. Podgornik, A., S. Yamamoto, M. Peterka and N. L. Krajnc; “Fast Separation of Large Biomolecules Using Short Monolithic Columns,” *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 927, 80–89 (2013)
 16. Suda, E. J., K. E. Thomas, T. M. Pabst, P. Mensah, N. Ramasubramanian, M. E. Gustafson and A. K. Hunter; “Comparison of Agarose and Dextran-grafted Agarose Strong Ion Exchangers for the Separation of Protein Aggregates,” *J. Chromatogr. A*, 1216, 5256–5264 (2009)
 17. Tseng, Y. F., T. C. Weng, C. C. Lai, P. L. Chen, M. S. Lee and A. Y. C. Hu; “A Fast and Efficient Purification Platform for Cell-based Influenza Viruses by Flow-through Chromatography,” *Vaccine*, 36, 3146–3152 (2018)
 18. Weaver, J., S. M. Husson, L. Murphy and S. R. Wickramasinghe; “Anion Exchange Membrane Adsorbers for Flow - through Polishing Steps: Part II. Virus, Host Cell Protein, DNA Clearance, and Antibody Recovery,” *Biotechnol. Bioeng.*, 110, 500-510 (2013)
 19. Weigel, T., T. Solomaier, A. Peuker, T. Pathapati, M. W. Wolff and U. Reichl; “A Flow-through Chromatography Process for Influenza A and B Virus Purification,” *J. Virol. Methods*, 207, 45–53 (2014)
 20. Yamamoto, S., M. Nomura and Y. Sano; “Scaling Up of Medium-performance Gel Filtration Chromatography of Proteins,” *J. Chem. Eng. Japan*, 19, 227–231 (1986)
 21. Yamamoto, S., M. Nomura and Y. Sano; “Adsorption Chromatography of Proteins: Determination of Optimum Conditions,” *AIChE J.*, 33, 1426–1434 (1987)
 22. Yamamoto, S.; “Plate Height Determination for Gradient Elution Chromatography of Proteins,” *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 444–451 (1995)
 23. Yoshimoto, N., K. Minakuchi, D. Itoh, Y. Isakari and S. Yamamoto; “High-throughput Process Development Methods for Chromatography and Precipitation of Proteins: Advantages and Precautions,” *Eng. Life Sci.*, 13, 446–455 (2013)
 24. Yoshimoto, N., D. Itoh, Y. Isakari, A. Podgornik and S. Yamamoto; “Salt Tolerant Chromatography Provides Salt Tolerance and a Better Selectivity for Protein Monomer Separations,” *Biotechnol. J.*, 10, 1929–1934 (2015)
 25. Yoshimoto, N. and S. Yamamoto; “Simplified Methods Based on Mechanistic Models for Understanding and Designing Chromatography Processes for Proteins and Other Biological Products—Yamamoto Models and Yamamoto Approach—,” *Preparative chromatography for Separation Of Proteins*, Chap.4, pp,

- 111–157, Wiley, New York, U.S.A. (2017)
26. Yoshimoto, N., Y. Sugiyama and S. Yamamoto; “A Simple Method for Calculating the Productivity of Polyphenol Separations by Polymer-based Chromatography,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 812–816 (2017)
 27. Hahn, T., T. Huuk, V. Heuveline and J. Hubbuch; “Simulating and Optimizing Preparative Protein Chromatography with ChromX,” *J. Chem. Educ.*, 9, 1497–1502 (2015)
 28. Leweke, S. and E. von Lieres; “Chromatography Analysis and Design Toolkit (CADET),” *Comput. Chem. Eng.*, 113, 274–294 (2018)
 29. Pfister, D., L. David, M. Holzer and R. M. Nicoud; “Designing Affinity Chromatographic Processes for the Capture of Antibodies. Part I: A Simplified Approach,” *J. Chromatogr. A*, 1494, 27–39 (2017)
 30. Podgornik, A., M. Hamachi, Y. Isakari, N. Yoshimoto and S. Yamamoto; “Effect of Pore Size on Performance of Monolithic Tube Chromatography of Large Biomolecules,” *Electrophoresis*, 38, 2892–2899 (2017)
 31. Saleh, D., G. Wang, B. Müller, F. Rischawy, S. Kluters, J. Studts and J. Hubbuch; “Straightforward Method for Calibration of Mechanistic Cation Exchange Chromatography Models for Industrial Applications,” *Biotechnol. Prog.*, e2984 (2020)
 32. Wang, G.; “Advancing Downstream Process Development-mechanistic Modelling and Artificial Intelligence,” Ph.D Thesis, Karlsruhe Institute for Technology, Germany (2018)
 33. Yamamoto, S. and Y. Sano; “Short-cut Method for Predicting the Productivity of Affinity Chromatography,” *J. Chromatogr. A*, 597, 173–179 (1992)
 34. Yamamoto, S., P. K. Watler, D. Feng and O. Kaltenbrunner; “Characterization of Unstable Ion-exchange Chromatographic Separation of Proteins,” *J. Chromatogr. A*, 852, 37–41 (1999)
 35. Yoshimoto, N. and S. Yamamoto; “Simplified Methods Based on Mechanistic Models for Understanding and Designing Chromatography Processes for Proteins and Other Biological Products-Yamamoto Models and Yamamoto Approach-,” *Preparative Chromatography for Separation of Proteins*, Chap. 4, pp. 111–157, Wiley, Hoboken, U.S.A. (2017)

第5章 総括

本論文では、抗体医薬品に代表されるタンパク質医薬品のクロマトグラフィー精製プロセスの効率化手法として期待されているフロースルークロマトグラフィープロセスについて、その分離機構を解析し、モデル化を行った。モデル系としてウシ血清アルブミンのモノマー・ダイマーのイオン交換クロマトグラフィー分離を選択し、モデルを検証した。このモデルと直線勾配溶出(LGE)データを用いるプロセス設計方法を開発した。さらに、開発されたプロセス設計方法による最適化手法についても検討した。

得られた知見をまとめると以下となる。

- 1) フロースルークロマトグラフィー(FTC)の分離機構は対象とする 2 成分の分配係数 K と細孔内拡散係数 D_s により記述することができ、任意のカラムサイズに対して滞留時間 RT と分離可能な最大試料負荷量 V_F の関係を推定することが可能である。
- 2) イオン交換クロマトグラフィーにおける分配係数 K は塩濃度 I に強く依存し、 $K(I)$ の測定あるいは推算是困難であるが、直線勾配溶出(LGE)における溶出塩濃度 I_R と規格化した勾配 GH の関係($GH-I_R$)から求めた $K-I$ が FTC のモデルシミュレーションに使用できることを明らかにした。
- 3) 分配係数 K は塩濃度 I に強く依存することにより、FTC では移動相組成 I の適切な設定が重要であることと、分離挙動がわずかな塩濃度の変動で大きく変化することがモデルシミュレーションから判明した。
- 4) モデルおよびモデルシミュレーションは、モデルタンパク質モノマーのダイマーからの分離実験で検証された。
- 5) 生産性 P に着目した FTC プロセス最適化方法を開発し、操作条件と生産性の関係について検討した。粒子径 d_p を小さくすると生産性 P は増加する。また、 P は、滞留時間 RT を短くすることにより増加するが、粒子径 d_p が大きいと十分な分離が達成できないことがある。 d_p と RT には、 $(d_p^2 \times RT)$ という関係が成立することが明らかとなり、これにより適切な粒子径と滞留時間を選択することができる。
- 6) イオン交換クロマトグラフィーのタンパク質分離は移動相 pH にも強く依存する。モデル系の分離において直線勾配溶出(LGE)では、移動相 pH が pH =6 から 7 になると保持が強くなるとともに分離がよくなるが、FTC では、適切な移動相塩濃度を選ぶと同じ分離性能を得ることができる。

第6章 本研究に関する著者の発表論文

6.1 関係論文等

6.1.1 査読のある雑誌等

- (1) 著者氏名 : Sumiko Hasegawa, C-S. Chen, N. Yoshimoto, S. Yamamoto
論文題目 : Accelerated Method for Designing Flow-Through Chromatography of Proteins
学術雑誌名 : Journal of Chemical Engineering of Japan
巻、号、頁 : Vol.53, No.5, pp.206-213, 2020. <https://doi.org/10.1252/jcej.20we002>
(本文との関連 : 本論文の第2, 3章と関連)
- (2) 著者氏名 : Sumiko Hasegawa, C-S. Chen, N. Yoshimoto, S. Yamamoto
論文題目 : Optimization of Flow-Through Chromatography of Proteins
学術雑誌名 : Journal of Chemical Engineering of Japan
巻、号、頁 : Vol.53, No.5, pp.214-221, 2020. <https://doi.org/10.1252/jcej.20we003>
(本文との関連 : 本論文の第2, 3章と関連)

6.1.2 査読のある国際会議の会議録等

- (1) 著者氏名 : Noriko Yoshimoto, Sumiko Hasegawa and Shuichi Yamamoto
論文題目 : A method for designing flow-through chromatography processes
学術雑誌名 : Proceedings of 25th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2018)
発行年月 : Volume 268, 2019.
<https://doi.org/10.1051/mateconf/201926801004>
(本文との関連 : 本論文の第2章と関連)

第7章 謝辞

本研究に対して終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、山本修一教授に心より謝意を表します。また、本研究に対してご討論とご指導を賜りました、吉本則子准教授に感謝の意を表します。

更に、本研究にご協力いただきました、伊藤大祐氏、Chyi-Shin Chen 氏に深く感謝致します。