

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6093364号  
(P6093364)

(45) 発行日 平成29年3月8日(2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C O 7 K</b> 1/18	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	1/18
<b>C O 7 K</b> 14/62	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/62
<b>B O 1 J</b> 20/281	<b>(2006.01)</b>	B O 1 J	20/22

D

請求項の数 8 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2014-533247 (P2014-533247)	(73) 特許権者	516105833
(86) (22) 出願日	平成24年9月28日 (2012. 9. 28)		ジーイー・ヘルスケア・バイオプロセス・
(65) 公表番号	特表2014-530211 (P2014-530211A)		アールアンドディ・アクチボラダ
(43) 公表日	平成26年11月17日 (2014. 11. 17)		スウェーデン国 エスイー-75184
(86) 国際出願番号	PCT/SE2012/051040		ウプサラ ブヨルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W02013/048330	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成25年4月4日 (2013. 4. 4)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成27年9月25日 (2015. 9. 25)	(72) 発明者	ブレッカン, エッグアート
(31) 優先権主張番号	1100722-6		スウェーデン、エス-751 84、ウプ
(32) 優先日	平成23年9月30日 (2011. 9. 30)		サラ、ビヨルクガタン 30番、ジーイー
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)	(72) 発明者	エリクソン, チェル
			スウェーデン、エス-751 84、ウプ
			サラ、ビヨルクガタン 30番、ジーイー
			・ヘルスケア
			・ヘルスケア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロインスリンからインスリンを精製する方法であって、  
開裂プロインスリンの試料を、官能化されていない内側コアとイオン交換リガンドで官能化された外側官能化層とを有する多孔質シェルビーズを含むクロマトグラフィー媒体上にロードする段階と、  
インスリンをリガンド上に吸着させる段階と、  
100～1000cm/時の流量でクロマトグラフィー媒体からインスリンを溶出する段階と  
を含んでなり、溶出されたインスリンが85%を超える純度を有する方法。

10

【請求項 2】

シェルビーズが20～100μmの直径を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

シェルビーズが20～80μmの直径を有する、請求項1又は請求項2記載の方法。

【請求項 4】

シェルビーズの官能化層が厚さ3～9μmの層を含む、請求項1乃至請求項3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

シェルビーズの官能化層が厚さ5～7μmの層を含む、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

20

## 【請求項 6】

リガンドが、スルホネート ( $\text{SO}_3^-$ )、スルフェート ( $-\text{OSO}_3^-$ )、ホスフェート ( $-\text{OPO}_3^{2-}$ ) 及びホスホネート ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) からなる群から選択される強陽イオン交換基である、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 7】

コアが、アガロース、デキストラン、セルロース、デンプン、プルラン、ポリアクリル酸アミド、ポリメタクリル酸アミド及びポリ(ヒドロキシアルキルアクリレート) からなる群から選択される極性ポリマーで満たされている、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

インスリンが細菌内で産生される、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は生体分子精製の分野内にある。さらに詳しくは、本発明は内側コア及び外側官能化層を有する特定の種類のシェルビーズを用いるインスリンのクロマトグラフィー精製に関する。本方法は、90%を超える非常に高い純度での精製を可能にする。

## 【背景技術】

## 【0002】

インスリンは、細菌 (*E. coli*) 又は酵母中で産生される。細菌の場合、(プロインスリンとして発現される)インスリンは封入体中に産生され、これが変性、リフォールディング及び再生後にいくつかの段階で精製される。通常、いくつかのクロマトグラフィー段階が濾過段階、プロインスリンからインスリンへの酵素開裂段階、沈殿結晶化段階及び製剤化段階と組み合わせられる。酵母発現系の場合には、封入体は形成されない。この点を除けば、プロセスは細菌発現系の場合と全く同様である。

20

## 【0003】

インスリンは年間数トンが製造され、インスリンの使用は年々増加している。とりわけ開発途上国においてますます多くの人々が糖尿病を発症している。インスリンの需要の増加は、効率的な製造方法及びプロセスの利用を必要にする。収率は常に重要であり、高い収率を与える方法は通常は良好なプロセス経済性を与え、これはより手頃な価格の生成物に転換される。手頃な価格は、生成物をより広い患者基盤に対して利用可能にするための基本パラメーターである。これはまた、増加するコスト圧力の下で悩んでいるヘルスケアセクターに対して不要の圧迫を加えないようにするためにも重要である。

30

## 【0004】

したがって、高い収率で純粋な生成物を与える迅速でより経済的な方法を得ることは望ましいであろう。

## 【0005】

シェルビーズを用いるインスリンのクロマトグラフィー精製は、以前には提唱されていなかった。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0006】

【特許文献 1】英国特許第 1054523 号明細書

## 【発明の概要】

## 【0007】

本発明は、クロマトグラフィー媒体のローディング(クロマトグラフィー媒体 1 ml 当たりロードされる生成物のグラム数)を通常の技法に比べて 3 倍に増加させ、クロマトグラフィー媒体の消費量を低減させ得るインスリン精製方法を提供する。これは、一層コスト効率の良いプロセスに直接転換することができる。加えて、本明細書においてクロマ

50

トグラフィー段階においてシェルビーズを用いる本方法はより高い速度で運転でき、所定の時間でより多くの生成物の製造を可能にすることで、即ちこの特定のクロマトグラフィー段階のための時間を短縮することで、プロセスを一層経済的なものにする。

【0008】

本発明は、ビーズの最外層のみが官能化されていること（即ち、官能性リガンドがビーズの最外層のみに見出され、コアには見出されないこと）を特徴とするシェルビーズを用いる生体分子精製方法を提供する。官能化層の厚さは調節することができ、官能化されていないビーズのコアは例えばデキストランで満たされるか、或いは空のままであり得る。

【0009】

官能化層を有するクロマトグラフィービーズは、大きい粒子のより良好な圧流特性を維持しながら、ずっと小さい完全官能化ビーズ上での分解能に匹敵する分解能を有する可能性がある。かかるシェルビーズの能力は本質的に官能化されたビーズ体積の分率によって表され、したがって同じサイズの完全官能化ビーズより低い。

【0010】

かくして本発明は、プロインスリンからインスリンを精製する方法であって、開裂プロインスリンの試料を、内側コア及びイオン交換リガンドを備えた外側官能化層を有する多孔質シェルビーズを含むクロマトグラフィー媒体上にロードする段階、インスリンをリガンド上に吸着させる段階、並びに100～1000 cm/時、好ましくは300～600 cm/時の流量でクロマトグラフィー媒体からインスリンを溶出する段階を含んでなり、溶出されたインスリンが85%を超える、好ましくは90%を超える純度を有する方法に関する。

【0011】

本方法で使用されるシェルビーズは、20～100 μm、好ましくは40～80 μmの直径を有している。

【0012】

シェルビーズの官能化層は、厚さ3～9 μmの層、好ましくは厚さ5～7 μmの層を含んでいる。

【0013】

イオン交換リガンドは、スルホネート ( $\text{SO}_3^-$ )、スルフェート ( $-\text{OSO}_3^-$ )、ホスフェート ( $-\text{OPPO}_3^{2-}$ ) 及びホスホネート ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) のような強陽イオン交換基である。

【0014】

一実施形態では、シェルのコアは、コアを一層高密度にしてより良好な分解能（より幅の狭いピーク）を与えるために適当な極性ポリマーで満たされている。かかる極性ポリマーは、アガロース、デキストラン、セルロース、デンプン、プルラン又は完全合成ポリマー（例えば、ポリアクリル酸アミド、ポリメタクリル酸アミド、ポリ（ヒドロキシアルキルアクリレート））であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、本発明の精製方法で使用されるシェルビーズの模式的である。

【図2】図2は、シェルビーズクロマトグラフィーを用いたインスリンの精製を示すグラフである。

【図3】図3は、2種の媒体を充填したカラムに加わる背圧に対するベッド高さ及び流量の効果を示している。

【図4】図4は、市販の媒体及び本発明で使用されるシェルビーズ媒体を用いたインスリン精製の比較を示している。

【図5】図5は、市販の媒体及び本発明で使用されるシェルビーズ媒体に対する流量の効果を示している。

【図6】図6は、市販の媒体及びシェルビーズ媒体上でのインスリン精製の結果を示している。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0016】

以下、若干の非限定的な実施例に関連して本発明を一層詳しく説明しよう。

## 【0017】

材料及び方法：

本明細書には、Sephacrose HFA 55に基づく3種のシェルビーズ構築物及び2種の基準プロトタイプ/樹脂が示されている(図1、表1)。

## 【0018】

図1中で左から右に向かって、プロトタイプS6(最外層中にSリガンドが含まれるが、コアは未官能化のままである)、プロトタイプS20(プロトタイプS6と同じだが、コアはデキストランT150(Mp 150000)で満たされている)、プロトタイプS26(プロトタイプS20と同じだが、Sリガンドはデキストラン延長剤(Mp 10000)上にカップリングされている)、プロトタイプS12(ビーズ全体が官能化されている基準プロトタイプ)及びCaptor SP ImpResである。最初の4つのプロトタイプは77 $\mu$ mの粒子サイズを有するのに対し、Captor SP ImpResは40 $\mu$ mの粒子サイズを有する。

## 【0019】

## 【表1】

表1. 試験したプロトタイプの性質

プロトタイプ	粒径( $\mu$ m)	シェル厚さ( $\mu$ m)	リガンド密度(LD)( $\mu$ mol/ml)	官能基体積分率	LD/官能基体積分率
S6	77.5	6.41	42	0.42	163
S12 基準品	77.5	充満	103	1	167
S20	77.5	6.51	42	0.42	161
S26	77.5	7.78	50	0.49	166

## 【0020】

Sephacrose HFA 55に基づくシェル媒体の製造プロトタイプS6の合成：Sephacrose HFA 55のアリル活性化

Sephacrose HFA 55をガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。ゲル(700mLの水切りゲル)を三口丸底フラスコ内に秤取した。NaOH(700mL、50%溶液)を添加し、機械的攪拌を開始した。スラリーを水浴上で50に加熱した。約1時間後、126mLのアリルグリシジルエーテル(AGE)を添加した。次いで、スラリーを一晩激しく攪拌し続けた。約20時間後、スラリーをガラスフィルターに移し、蒸留水( $\times$ 4)、エタノール( $\times$ 4)及び蒸留水( $\times$ 4)で洗浄した。

## 【0021】

次いで、アリル含有量を滴定によって測定したところ、215 $\mu$ mol/mLであった。

## 【0022】

シェル活性化(部分臭素化)

アリル化ゲル(100mL)をフラスコ内に秤取し、100mLの蒸留水を添加した。0.524mLの臭素を800mLの蒸留水に溶解し、アリル化ゲルスラリーに添加した。この量の臭素は、約7.5 $\mu$ mのシェル厚さを与える(それに対応している)と考えられる。臭素溶液は、アリルゲルスラリーを激しく攪拌しながら瞬時に添加した。約10分後、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

## 【0023】

SO<sub>3</sub><sup>-</sup>基のシェルカップリング

100mLの部分臭素化ゲル(上記参照)をフラスコに移し、100mLの蒸留水に溶

解した10gの亜硫酸ナトリウムと混合した。攪拌しながら、50%NaOHを添加してpH12にし、続いて50で16時間攪拌し、ガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。次いで、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0024】

結合した $SO_3^-$ 基の量は $43\mu mol/mL$ と推定された。

【0025】

#### コアのアリル除去

50mLのS-シェルゲル(上記参照)を蒸留水(50mL)に溶解した20%(v/v)チオグリセロールと混合した。pHを10に調整し、続いて50で20時間攪拌した。次いで、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

10

【0026】

プロトタイプS12の合成:

#### Sepharose HFA 55のアリル活性化

Sepharose HFA 55をガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。ゲル(700mLの水切りゲル)を三口丸底フラスコ内に秤取した。NaOH(700mL、50%溶液)を添加し、機械的攪拌を開始した。スラリーを水浴上で50に加熱した。約1時間後、245mLのアリルグリシジルエーテル(AGE)を添加した。次いで、スラリーを一晩激しく攪拌し続けた。約20時間後、スラリーをガラスフィルターに移し、蒸留水( $\times 4$ )、エタノール( $\times 4$ )及び蒸留水( $\times 4$ )で洗浄した。

【0027】

次いで、アリル含有量を滴定によって測定したところ、 $290\mu mol/mL$ であった。

20

【0028】

#### ビーズの活性化(臭素化)

アリル化ゲル(50mL)をフラスコ内に秤取し、50mLの蒸留水及び2.0gの酢酸ナトリウムを添加した。臭素(飽和水溶液)を、持続的な黄色い色が得られるまで添加し、続いて過剰の臭素をギ酸ナトリウムで分解し、ガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0029】

#### $SO_3^-$ 基のカップリング

50mLの臭素化ゲル(上記参照)をフラスコに移し、25mLの蒸留水に溶解した10gの亜硫酸ナトリウムと混合した。攪拌しながら、50%NaOHを添加してpH12にし、続いて50で18時間攪拌した。次いで、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

30

【0030】

結合した $SO_3^-$ 基の量は $103\mu mol/mL$ と推定された。

【0031】

プロトタイプS20の合成:

#### Sepharose HFA 55のアリル活性化

Sepharose HFA 55をガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。ゲル(700mLの水切りゲル)を三口丸底フラスコ内に秤取した。NaOH(700mL、50%溶液)を添加し、機械的攪拌を開始した。スラリーを水浴上で50に加熱した。約1時間後、126mLのアリルグリシジルエーテル(AGE)を添加した。次いで、スラリーを一晩激しく攪拌し続けた。約20時間後、スラリーをガラスフィルターに移し、蒸留水( $\times 4$ )、エタノール( $\times 4$ )及び蒸留水( $\times 4$ )で洗浄した。

40

【0032】

次いで、アリル含有量を滴定によって測定したところ、 $215\mu mol/mL$ であった。

【0033】

#### シェル活性化(部分臭素化)

50

アリル化ゲル(100 mL)をフラスコ内に秤取し、100 mLの蒸留水を添加した。0.524 mLの臭素を800 mLの蒸留水に溶解し、アリル化ゲルスラリーに添加した。この量の臭素は、約7.5 μmのシェル厚さを与える(それに対応している)と考えられる。臭素溶液は、アリルゲルスラリーを激しく攪拌しながら瞬時に添加した。約10分後、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0034】

SO<sub>3</sub><sup>-</sup>基のシェルカップリング

100 mLの部分臭素化ゲル(上記参照)をフラスコに移し、100 mLの蒸留水に溶解した10 gの亜硫酸ナトリウムと混合した。攪拌しながら、50% NaOHを添加してpH 12.5にし、続いて50 で18時間攪拌した。次いで、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

10

【0035】

結合したSO<sub>3</sub><sup>-</sup>基の量は43 μmol/mLと推定された。

【0036】

コアの活性化(臭素化)

50 mLのシェルカップルドビーズ(上記参照)をフラスコ内に秤取し、50 mLの蒸留水及び2.0 gの酢酸ナトリウムを添加した。臭素(飽和水溶液)を、持続的な黄色い色が得られるまで添加し、続いて過剰の臭素をギ酸ナトリウムで分解し、ガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

20

【0037】

ビーズのコア中のデキストランカップリング

50 gのデキストラン(MW:150000 g/mol)を、周囲温度で2~4時間ゆっくりと攪拌することで50 mLの蒸留水に溶解した。50 mLの水切りコア活性化HFA 55ビーズ(シェルにSO<sub>3</sub><sup>-</sup>基が結合したものを)デキストラン溶液に添加し、溶液を50 で1時間攪拌した。攪拌しながら、6.25 mLの50% NaOHを添加した。溶液を50 で16時間攪拌し、次いでガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0038】

プロトタイプS26の合成:

Sepharose HFA 55のアリル活性化

Sepharose HFA 55をガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。ゲル(400 mLの水切りゲル)を三口丸底フラスコ内に秤取した。NaOH(400 mL、50%溶液)を添加し、機械的攪拌を開始した。スラリーを水浴上で50 に加熱した。約1時間後、72 mLのアリルグリシジルエーテル(AGE)を添加した。次いで、スラリーを一晩激しく攪拌し続けた。約20時間後、スラリーをガラスフィルターに移し、蒸留水(x4)、エタノール(x4)及び蒸留水(x4)で洗浄した。

30

【0039】

次いで、アリル含有量を滴定によって測定したところ、215 μmol/mLであった。

【0040】

ビーズの活性化(臭素化)

400 mLのアリル化ビーズ(上記参照)をフラスコ内に秤取し、500 mLの蒸留水及び2.0 gの酢酸ナトリウムを添加した。臭素(飽和水溶液)を、持続的な黄色い色が得られるまで添加し、続いて過剰の臭素をギ酸ナトリウムで分解し、ガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

40

【0041】

デキストランカップリング

320 gのデキストラン(MW:100000 g/mol)を、周囲温度で2~4時間ゆっくりと攪拌することで400 mLの蒸留水に溶解した。400 mLの水切り活性化HFA 55ビーズ(上記参照)をデキストラン溶液に添加し、溶液を50 で1時間攪拌した。攪拌しながら、50 mLの50% NaOHを添加した。溶液を50 で16時間攪拌

50

し、次いでガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。結合したデキストランの量は  $17 \text{ mg/mL}$  であった。

【0042】

デキストラン修飾 Sepharose HFA 55 のアリル活性化

デキストラン修飾 Sepharose HFA 55 をガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。ゲル ( $200 \text{ mL}$  の水切りゲル) を三つ口丸底フラスコ内に秤取した。NaOH ( $200 \text{ mL}$ 、 $50\%$  溶液) を添加し、機械的攪拌を開始した。スラリーを水浴上で  $50^\circ\text{C}$  に加熱した。約1時間後、 $36 \text{ mL}$  のアリルグリシジルエーテル (AGE) を添加した。次いで、スラリーを一晩激しく攪拌し続けた。約16時間後、スラリーをガラスフィルターに移し、蒸留水 ( $\times 4$ )、エタノール ( $\times 4$ ) 及び蒸留水 ( $\times 4$ ) で洗浄した。

10

【0043】

次いで、アリル含有量を滴定によって測定したところ、 $220 \mu\text{mol/mL}$  であった シェル活性化 (部分臭素化)

アリル化ゲル ( $50 \text{ mL}$ ) をフラスコ内に秤取し、 $500 \text{ mL}$  の蒸留水を添加した。 $0.27 \text{ mL}$  の臭素を  $50 \text{ mL}$  の蒸留水に溶解し、アリル化ゲルスラリーに添加した。この量の臭素は、約  $7.5 \mu\text{m}$  のシェル厚さを与える (それに対応している) と考えられる。臭素溶液は、アリルゲルスラリーを激しく攪拌しながら瞬時に添加した。約10分後、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0044】

残りのアリル含有量 (ビーズのコア中のアリル基) は  $130 \mu\text{mol/mL}$  であった。

20

【0045】

$\text{SO}_3^-$  基のシェルカップリング

$50$  の部分臭素化ゲル (上記参照) をフラスコに移し、 $100 \text{ mL}$  の蒸留水に溶解した  $5 \text{ g}$  の亜硫酸ナトリウムと混合した。攪拌しながら、 $50\%$  NaOH を添加して  $\text{pH} 12$  にし、続いて  $50^\circ\text{C}$  で16時間攪拌した。次いで、ゲルをガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

【0046】

結合した  $\text{SO}_3^-$  基の量は  $50 \mu\text{mol/mL}$  と推定された。

【0047】

コアの活性化 (臭素化)

$50 \text{ mL}$  のシェルカップルドビーズ (上記参照) をフラスコ内に秤取し、 $50 \text{ mL}$  の蒸留水及び  $2.0 \text{ g}$  の酢酸ナトリウムを添加した。臭素 (飽和水溶液) を、持続的な黄色い色が得られるまで添加し、続いて過剰の臭素をギ酸ナトリウムで分解し、ガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

30

【0048】

ビーズのコア中のデキストランカップリング

$50 \text{ g}$  のデキストラン ( $\text{MW}: 150000 \text{ g/mol}$ ) を、周囲温度で2~4時間ゆっくりと攪拌することで  $50 \text{ mL}$  の蒸留水に溶解した。 $50 \text{ mL}$  の水切りコア活性化 HFA 55 ビーズ (シェルに  $\text{SO}_3^-$  基が結合したものを) をデキストラン溶液に添加し、溶液を  $50^\circ\text{C}$  で1時間攪拌した。攪拌しながら、 $6.25 \text{ mL}$  の  $50\%$  NaOH を添加した。溶液を  $50^\circ\text{C}$  で16時間攪拌し、次いでガラスフィルター上において蒸留水で洗浄した。

40

【実施例】

【0049】

実験1: 基準樹脂 Capt o SP Imp Res 上における開裂プロインスリンからのインスリン精製

開裂プロインスリンからインスリンを精製する。除去すべき3種の夾雑物、即ちプレペーク、トランケート型インスリン及び主夾雑物が存在している。これは、基準樹脂 Capt o SP Imp Res を使用することで成功裡に達成された (図2)。

【0050】

50

図2は、1mlのCapt o SP ImpRes (0.5cm i.d.)上でのインスリンの精製を示している。インスリン供給濃度は9mg/ml樹脂であり、ローディング容量は2mlであった。緩衝液Aは50mM酢酸ナトリウム、pH4+47.5%エタノールであった。緩衝液Bは50mM酢酸ナトリウム、pH4、250mM NaCl+47.5%エタノールであった。勾配は10カラム容積にわたって0~60%緩衝液Bであった。主夾雑物は1M NaClを含む緩衝液Aで溶出された。流量は0.4ml/分(滞留時間5分)であった。UVトレース及び導電率が示されている。

【0051】

実験2：基準樹脂に対する、様々なシェルビーズプロトタイプ上でのインスリン精製の比較

高濃度のエタノールの存在下で精製を行うが、凝集/繊維化の問題が起こり得るためにロードは比較的低い(約18g/L)。エタノールの存在は、望ましくない比較的高い背圧を与える。したがって、圧流制限を回避するためにより大きいビーズ上でのシェルビーズ構築物(より低い背圧)を使用することの可能性を検討した。Capt o SP ImpRes及びより大きいシェルビーズに関する背圧の比較を図3に示す。

【0052】

図3は、Capt o SP ImpRes (40µm)並びにシェルビーズS6、S20及びS26(77µm)を充填したカラムに加わる背圧に対するベッド高さ及び流量の効果を示している。0.4ml/分及び0.8ml/分の流量は、それぞれ120cm/時及び240cm/時の線流量に相当している。

【0053】

シェルビーズ構築物をそのインスリン精製能力について試験した。結果は、シェルビーズを使用すれば(プロトタイプS20では)インスリンを>90%の純度に精製するのが可能であることを示した(図4)。予想通り、完全に官能化された基準プロトタイプS12に関する分解能はシェルビーズプロトタイプよりずっと悪かった。

【0054】

図4は、1mlのCapt o SP ImpRes (0.5cm i.d.)及び2mlのシェルビーズプロトタイプ(0.5cm i.d.)上でのインスリン精製の比較を示している。インスリン供給濃度は9mg/ml樹脂であり、ローディング容量は2ml(Capt o SP ImpRes)又は4ml(シェルビーズプロトタイプ)であった。緩衝液Aは50mM酢酸ナトリウム、pH4+47.5%エタノールであった。緩衝液Bは50mM酢酸ナトリウム、pH4、250mM NaCl+47.5%エタノールであった。勾配は10カラム容積にわたって0~60%緩衝液Bであった。主夾雑物は1M NaClを含む緩衝液Aで溶出された。シェルビーズプロトタイプに関する滞留時間は2.5分(240cm/時)であったのに対し、Capt o SP ImpResに関しては5分であった。

【0055】

実験3：シェルビーズプロトタイプ及び基準樹脂上における夾雑物からのインスリンの分離に対する流量の効果

基準樹脂Capt o SP ImpRes上においては、120及び240cm/時の流量のそれぞれで分離は良好であった。しかし、シェルビーズに関しては、最大480cm/時までの流量で分離が良好であった(図5)。シェルビーズ上においては、最大480cm/時までの流量で純度は>90%であった。

【0056】

図5は、Capt o SP ImpRes及びシェルビーズプロトタイプ(S20)に対する流量の効果を示している。カラム容積は両樹脂に関して2mlであった。インスリン供給濃度は9mg/ml樹脂であった。ローディング容量は4mlであった。緩衝液Aは50mM酢酸ナトリウム、pH4+47.5%エタノールであった。緩衝液Bは50mM酢酸ナトリウム、pH4、250mM NaCl+47.5%エタノールであった。勾配は15カラム容積にわたって0~90%緩衝液Bであった。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 7 】

実験4：基準樹脂上及び基準樹脂（C a p t o S P I m p R e s）と同じベースマトリックスを用いて作製されたシェルビーズプロトタイプ上におけるインスリン精製

シェルビーズの概念を使用すれば、大きいビーズ（77 μm）上において良好な精製を達成し得ることが上記の実験で示された。

## 【 0 0 5 8 】

本実験では、シェルビーズの概念をC a p t o S P I m p R e sのより小さいビーズ（40 μm）に適用した。2種のシェル厚さ（2及び5 μm）をそれぞれ官能化した。予想通り、シェルビーズプロトタイプはC a p t o S P I m p R e sに比べて改善された分解能を有していた（図6）。

10

## 【 0 0 5 9 】

図6は、C a p t o S P I m p R e s上及びC a p t o S P I m p R e sと同じベースマトリックスを用いて作製されたシェルビーズプロトタイプ上におけるインスリン精製を示している。シェルビーズプロトタイプは、それぞれ2 μm及び5 μmの官能化層を有していた。ロードは、50 mM酢酸ナトリウム、pH4及び10%エタノール中の6.5 mg開裂インスリン/ml樹脂であった。溶出段階1は、50 mM酢酸ナトリウム、pH4、170 mM NaCl、50%エタノールを用いて行った。溶出段階2は、NaCl濃度が1 Mであった点を除けば溶出段階1と同じであった。

## 【 0 0 6 0 】

結果及び考察：

20

HFA SPシェルビーズプロトタイプ及びC a p t o S P I m p R e s上において得られた推定生産性の比較を、インスリンプロセスからの現実データを用いて実施した。

## 【 0 0 6 1 】

生産性の計算は、C I E X段階のみを見ながら実施した。

## 【 0 0 6 2 】

全てのシミュレーションに関し、I n t e l l i g e n t I n c . から入手したS u p e r P r o D e s i g n e r , v e r s i o n 8 . 5 , B u i l d 3を使用した。シミュレーションは、インスリンを15 g/Lの濃度で処理することに関して行った。15 g/Lの濃度は、この段階におけるインスリンの平均濃度として選択した。収率は両樹脂に関して85%であった。シミュレーションのために使用したベッド高さは20 cmであった。

30

## 【 0 0 6 3 】

シミュレーションは、HFA SPシェルビーズプロトタイプに関しては480 cm/時、またC a p t o S P I m p R e sに関しては120 cm/時のローディング段階流量を用いて行った。これは、HFA SPシェルビーズプロトタイプに関しては2.5分の滞留時間（RT）を与え、C a p t o S P I m p R e sに関しては10分のRTを与える。全ての他の流量は、HFA SPシェルビーズプロトタイプに関しては600 cm/時、またC a p t o S P I m p R e sに関しては250 cm/時に設定した。ただし、両樹脂に関して規定の時間（即ち、15分）に設定した再生/CIP段階は除外する。両樹脂に関し、20 gインスリン/L樹脂のワーキング/有効容量を使用した。

40

## 【 0 0 6 4 】

シミュレートしたポリッシング段階は下記の操作を含んでいた。

平衡化：C a p t o S P I m p R e sに関しては4 CV、HFA SPシェルビーズに関しては2 CV。

ロード：50 gインスリン/L樹脂。

洗浄：3 CV。

溶出：15 CV勾配0~70%、25 CV及び3 CV 100%。

CIP：15分。

再平衡化：C a p t o S P I m p R e sに関しては4 CV、HFA SPシェルビ

50

ーズに関しては2CV。

【0065】

HFA SPシェルビーズプロトタイプを用いるプロセスに関する運転時間は1時間8分であるのに対し、Capto SP ImpResを含むプロセスは2時間39分を要する。表1は、これら2種のシミュレーションからの結果を示している。

【0066】

【表2】

表1. 生産性シミュレーションで得られた結果

樹脂	流量 (cm/時) (ローディング)	滞留時間 (分) (ローディング)	流量 (cm/時) (他の段階)	時間 (時間&分)	生産性 (kg/時)
HFA SP シェルビーズ	480	2.5	600	1:08	7.58
Capto SP ImpRes	120	10	250	2:39	3.22

【0067】

これら1組のシミュレーションに基づけば、HFA SPシェルビーズプロトタイプに関する生産性はCapto SP ImpResに比べて約2倍であることがわかる。

【図1】

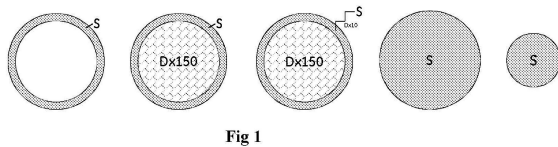


Fig 1

【図2】

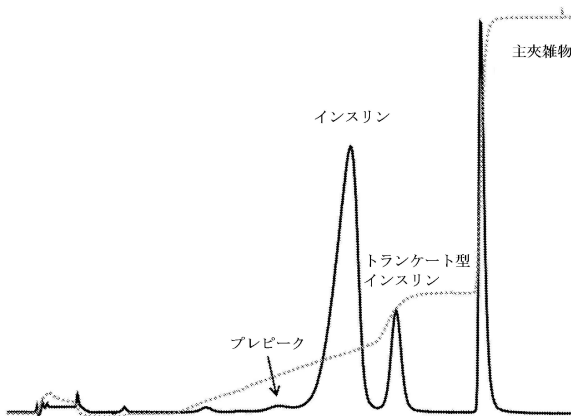


Fig 2

【図3】

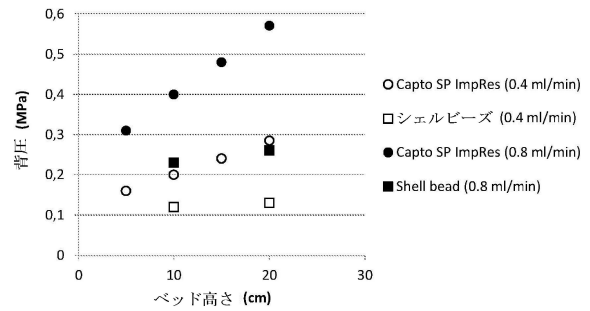


Fig 3

【 図 4 】

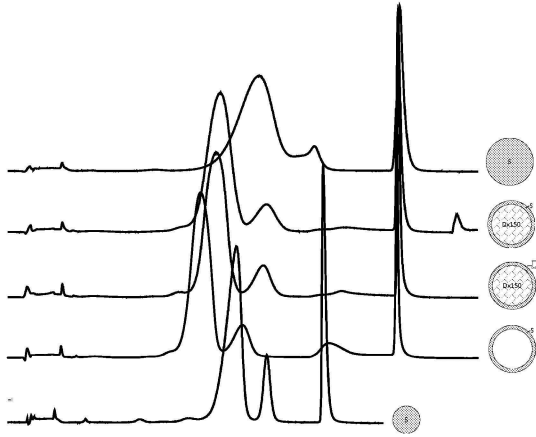


Fig 4

【 図 5 】

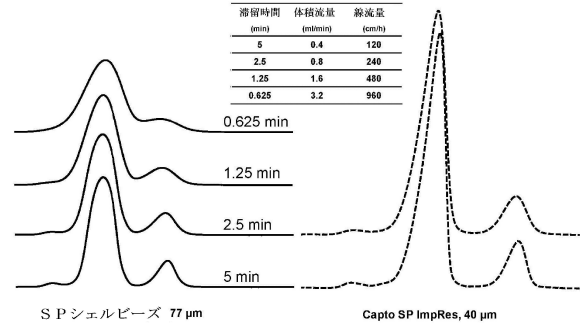


Fig 5

【 図 6 】

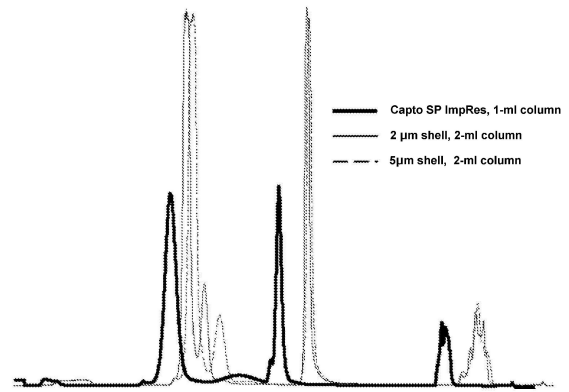


Fig 6

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ヨハンソン, ボー・レナート  
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 シャナガー, ジャミル  
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第00013826 (EP, A1)  
国際公開第2011/102790 (WO, A1)  
特表2010-534336 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

B 0 1 J 2 0 / 2 8 1

G 0 1 N 3 0 / 0 2

G 0 1 N 3 0 / 8 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )

P u b M e d