

# Downstream 38



**HPLC ソリューション** —  
UNICORN 制御システムとシリカ担体



**オリゴヌクレオチド合成** —  
ラボスケールでの生産



**GMP 対応の設備づくり** —  
供給業者を 1 ヶ所に



**バイオプロセス・センター** —  
専用施設の誕生



# 目次

## 3. **OligoPilot 400 オリゴヌクレオチド・シンセサイザー** New

OligoPilot 400システムは、研究室環境で単一口ットのオリゴヌクレオチドを 30 mmol まで合成することができます。

## 6. **お客様の安定したプロセスを実現**

BioProcess HPLC システムに UNICORN 制御ソフトウェアが導入されました。新機能と Kromasil 社の RPC 担体との組合せで弊社の HPLC ソリューションがさらに充実しました。

## 9. **STREAMLINE Direct カラムは CHO 細胞やハイブリドーマ細胞の細胞膜を傷つけません**

カラム下部のスクリーンを除き、振動アームによる分散システムを備えた新デザインの STREAMLINE Direct カラムは壊れやすい細胞の精製にきわめて適しています。

## 12. **GMP に対応した製造設備の導入**

AppTec Laboratories 社のフィラデルフィア新工場でクロマトグラフィーシステムとメンブレンシステムを納入する業者を 1ヶ所に絞った理由を伺いました。

## 16. **マケドニア・スコピエでのクロマトグラフィーによるアルブミン製造**

### —実績ある確実な製造方法

マケドニアのスコピエに、アルブミンの製造にクロマトグラフィーを利用した 2 番目の施設が作られました。この施設では 20 年以上前から同じ方法で EU 薬局方に準拠したアルブミンを製造しています。

## 19. **BioProcess センターの新設**

スウェーデンのウプサラ本社では、ラージスケールプロセス専用の新しい研究開発施設を 11 月初めに開設しました。この施設の誕生により、バイオ医薬品の製造用大型装置の研究開発の可能性が広がりました。

## 20. **高純度プラスミド DNA のプロセス・プロトコールをスケールアップ**

遺伝子治療では、ウイルス感染や拒絶反応の危険性が低いという理由でプラスミド DNA が多く使われています。ÅKTApilot システムに対応してスケールアップした精製方法で、高純度プラスミド DNA の生産が可能です。

## Fast Trak 講習会・セミナー

### 22. **Fast Trak 2005 年度新規セミナー**

抗体分子のダウンストリームプロセス／膜分離を利用したダウンストリームプロセス／プラスミド DNA とウイルスベクターのプロセス開発

### 23. **Fast Trak 2005 年度エキスパートセミナー**

変化する環境への対応

## 学会レポート

### 10. **Gab 2004**

## 学会のお知らせ

### 15. **Cap '05 への招待**

2005 年 5 月 22 日～ 25 日

アメリカ・アリゾナ州フェニックス

### 18. **第 4 回 Plasma Product Biotechnology Meeting 2005 (血漿製剤バイオテクノロジー学会) への招待**

2005 年 5 月 9 日～ 12 日

ギリシャ・クレタ島、ポルト・エルンダホテル

ÅKTA, ÅKTAcrossflow, ÅKTAdesign, ÅKTApilot, ÅKTApurifier, BioProcess, BPG, Chromaflow, Downstream, Fast Trak, Fast Trak Validation, FineLINE, INdEX, MabSelect, MabSelect SuRe, MabSelect Xtra, Oligopilot, OligoProcess, Sephacryl, Sephadex, Sepharose, SOURCE, STREAMLINE, UNICORN and UniFlux are trademarks of Amersham plc. Amersham plc, a General Electric company, going to market as GE Healthcare.

Avastin is a trademark of Genentech Inc.

Enbrel is a trademark of Amgen Inc.

DeltaV and Plant Web are trademarks of Emerson Process Management.

Humira is a trademark of Abbott Laboratories.

Kromasil is a trademark of Eka Chemicals.

OligoPilot 400 is covered by U.S. Patent Nos. 5,641,459; 5,807,525. The use of OligoPilot 400 is licensed under U.S. Patent Nos. 4,973,679 and corresponding patents issued in other countries, when synthesis of polynucleotides is performed thereon using solid phase supports provided from a licensed supplier. Patented reagents suitable for use with this instrument are available from licensed sources. No other license is granted to the purchaser either directly or by implication, estoppel or otherwise. Patented reagents suitable for use with this instrument are available from licensed sources.

Use of Primer Support for the synthesis of polynucleotides is licensed under the following patents when the synthesis is performed on an instrument provided by a licensed supplier: U.S. Patent Nos. 4,973,679; 5,047,524 and 5,262,530; and corresponding patents issued in other countries.

No other license is granted to the purchaser either directly or by implication, estoppel or otherwise.

Amersham Biosciences AB  
Bjorkgatan 30, SE-751 84 Uppsala Sweden

Amersham Biosciences UK limited  
Amersham Place, Little Chalfont  
Buckinghamshire, England HP7 9NA

Amersham Biosciences Corp  
800 Centennial Avenue, Piscataway, New Jersey  
08855, USA

Amersham Biosciences Europe GmbH  
Postfach 5480 D-79021 Freiburg Germany

アマシヤム バイオサイエンス株式会社  
〒169-0073  
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルディング

The views expressed by contributors and correspondents are their own and do not necessarily reflect the views of Amersham Biosciences.

©2004 General Electric Company -All rights reserved.

[www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com)  
[www.bioProcess.amershambiosciences.com](http://www.bioProcess.amershambiosciences.com)

編集長: Valerie Sedgwick  
[valerie.sedgwick@ge.com](mailto:valerie.sedgwick@ge.com)

日本語版制作: アマシヤム バイオサイエンス株式会社

合成オリゴヌクレオチドは、創薬や治療のほか、分子診断など多くの分野で用いられています。新製品 OligoPilot 400 シンセサイザーは、これらの用途に迅速に対応し、パイロットスケールで単一ロットのオリゴヌクレオチドを合成できる信頼性と費用対効果に優れた装置です。



実績あるテクノロジーを活用し、臨床試験や分子診断用の単一ロットのオリゴヌクレオチドをパイロットスケールで合成します。ウォークイン式ヒュームフードへの搬入出を考慮して装置の高さを調節できるようになっています。

## OligoPilot 400 オリゴヌクレオチド・シンセサイザー — ラボスケールでの生産

**オ**リゴヌクレオチド合成における 20 年の実績と、お客様との相互協力により、GE Healthcare は医薬品開発や分子診断に合成オリゴヌクレオチドを必要とする企業のニーズを的確に捉えてきました。そこから生まれたのが OligoPilot 400 です。この最新装置は小型の ÄKTAoligopilot と大型の OligoProcess システムの中間に位置しています。OligoPilot 400 の合成スケールは径 70 ~ 100 mm のカラムを使用した場合 (表 1 参照)、4 ~ 30 mmol に達します。1 サイクルでの合成量は 20 mer オリゴヌクレオチド 150 g 以上に相当します。

### 確実なテクノロジーと低コスト

OligoPilot 400 には、ÄKTAoligopilot や OligoProcess と同じ UNICORN ソフトウェアによるフロースルーテクノロジーが搭載されており、ハイレベルな学術的、技術的サポートが提供されています。

OligoPilot のフロースルーテクノロジー\*は、治療用オリゴヌクレオチド市場で実証されています。ラージスケールでも同等の結合容量を保持し、わずか 1.5 倍量のホスホアミダイトモノマーしか消費しません。フロースルーテクノロジーにはさらに 3 つの利点があります。合成サイクル時間が短いので全体的な生産時間を短縮できること、無駄が少ないこと、そして高精度ポンプとの組み合わせにより試薬の接触時間をさらに正確にコントロールできることです。

### 一般の研究室で、安全性と利便性の高い合成を実現

OligoPilot 400 は試薬ボトルとカラムリアクターを 1 ユニットに統合したシステムです。このため、操作がしやすく場所をとりません。回転式のカラムホルダーは広い作業スペースを必要とせず、カラムを確実に安全に固定でき、溶媒送液もスムーズに行えます。

\* カップリング試薬は合成カラム内をバンド状に移動し、反応に使われた試薬は逐次補充されるので、反応終了時のアミダイトの濃度は反応開始時と変わりません。

専用の試薬ボトルホルダーは、ボトル内の試薬を最も効率良く使えるようにボトルとその位置に工夫が凝らされています。

OligoPilot 400 はパイロットスケールの合成装置ですが、研究室で使用できるので、設備費や施設費を軽減することが可能です。装置の高さはスプリング式の支持部で簡単に調節でき、研究室の入口の高さに合わせて上下すれば、装置の搬入出が簡単にできます。

不意の溶媒漏れに対処できるようにフロント部分が独立しています。溶媒漏れがあれば下部の溶媒漏れトレイに流れ落ちて回収されるようになっています。内蔵センサーが溶媒漏れを感知すると直ちにアラームが作動します。

電動キャビネットは、起動前に自動的にパージされます。パージ後は高圧状態が維持され、圧力が低下するとアラームが作動します。アラームをマニュアルで作動させることもできます。

この3つのアラーム（溶媒漏れ、圧力低下、マニュアル）のいずれかが作動すると、上流から OligoPilot 400 への大量の溶媒の送液が自動的に停止します。



図 1. オリゴヌクレオチド合成のため OligoPilot 400 システムに FineLINE 70 カラムを接続。

## フレキシブルな FineLINE カラム

FineLINE アジャスタブルカラムはオリゴヌクレオチド合成に適したカラムです。可動式アダプター（ベッド高を容易に調節可能）が備えられており、再現性の高い充填が可能です。OligoPilot 400 には FineLINE 70 oligo と FineLINE 100 oligo が適しています（図 1）。表 1 に詳細をまとめました。

表 1. FineLINE カラムの径と合成スケール

カラム径 (mm)	ベッドボリューム (ml)	スケール (mmol) *
70	100 ~ 385	4 ~ 5
100	204 ~ 785	8 ~ 31

\* Primer Support 200 を 200  $\mu\text{mol/g}$  で使用、ベッド高 2.6 cm および 10 cm。

## 市場の期待に応えられることを実証

OligoPilot 400 が市場のニーズに応えるものであることを確認するため、弊社の中央研究所（スウェーデン・ウプサラ）でシステムの動作全体を対象に検証試験を行ないました。その結果、弊社はハードウェアの仕様だけでなく、アプリケーション保証も提供できることを確認しました。TEST 13 ([3' T TTT AAA CCC GGG 5']) は、システムハードウェアの検証に使用している新しいテスト用フラグメントです。また TEST 20 ([3' TT TGA AGC GAA TTA GCC ATA 5']) は、ハードウェアと固相支持体の両方の検証に使用されています。

図 2 は TEST 13 の実際に得られたデータを示しています。TEST 13 および 20 合成オリゴヌクレオチドの解析データを表 2 にまとめました。

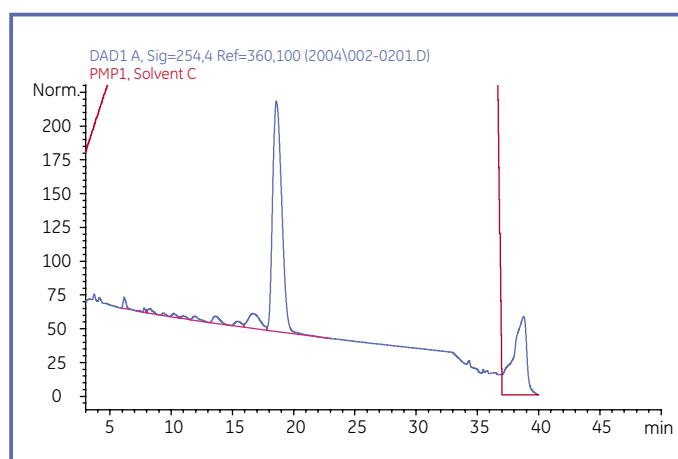


図 2. ホスホロチオエート TEST 13 のイオン交換クロマトグラフィー FLP=84 %、n-1/PO=7.2 %、収量 88 OD/  $\mu\text{mol}$

表 2. 動作範囲全体を対象とした検証試験の解析データから、OligoPilot 400 ハードウェアと固相支持体が市場のニーズを満たし、スケラビリティがあることが確認できます。

シーケンス	スケール (mmol)	完全長 (FLP) (%)	n-1/PO (%)	収量 (OD/ $\mu\text{mol}$ )
Test 13	4	81	10.2	87
	15	84	7.2	88
Test 20	4	76	4.1	109
	30	65	8.8	120

## 固相支持体と合成溶媒

高品質な固相支持体とそれに準じた合成溶媒を用いることで、OligoPilot 400 での高効率な合成が実現します。

弊社の標準的な固相支持体である Primer Support 200 は、アミダイトや溶媒の消費を最小限に抑え、常に高収率を得られる費用対効果の高い治療用オリゴヌクレオチド（30 mer 未満）の合成を可能にします。200  $\mu\text{mol/g}$  でロードした場合、多孔質ガラスの場合に比べて合成コストを 30 % 削減します。弊社は、Regulatory Support File を提供しており、業界の需要に応じた生産能力を擁しています。

弊社では標準の Primer Support の他に Custom Primer Support 200 や、さらに塩基長の長いオリゴヌクレオチド合成用および RNA 用の支持体も提供しています。

## 詳細なノウハウと徹底したサービス

オリゴヌクレオチド合成はスケールの大きさにかかわらず複雑な作業であり、装置と同様に経験がきわめて重要です。弊社にはご参照いただけるような豊富な経験を有しています。例えば、弊社の分子生物学技術専門家チームは、プロセス・バリデーションの実施や規制要件の遵守に関して、多くのオリゴヌクレオチド製造企業をサポートしてきました。現在は、そのうちの数社が臨床試験を行なっています。

OligoPilot 400 でのオリゴヌクレオチド合成に関して弊社が提供する知的サポートは、保守・点検サービスと同様にきわめて高水準です。また、弊社の幅広い保守・点検サービスでは、確実に交換部品や専門的なサポートを提供できるように、サービス担当者が常に待機しています。

### その他の情報

データファイル 11-0025-14 には OligoPilot 400 の詳細な技術仕様が紹介されています。その他、資料等のご請求はバイオダイレクトライン（Tel: 03-5331-9336）までお問合せください。



# 「まさに われわれが求めていた サイズだ」

最近 OligoPilot 400 システムを導入した  
Girindus America 社 最高経営責任者  
Greg McParland 氏



弊社は、産業用高圧液体クロマトグラフィープロセスとクロマトグラフィー用担体、プロセス用ソフトウェア・ハードウェア、幅広いサポートを含むトータル・ソリューションを提供しています。ひとつのメーカーがすべてを供給するという簡便なサービスを提供することでお客様の安定したプロセスを実現します。



PolyPeptide Laboratories 社（スウェーデン）の生産設備（許可を得て転載）

## お客様の安定したプロセスを実現

**信** 頼性、最小限の稼働休止期間、費用対効果は、生産プロセスの重要な要素です。現在、弊社の高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）関連製品は製品力の強化と組合せて、これらの要素をさらに効果的に満たすことができます。

定評ある UNICORN ソフトウェアによるシステム制御に加え、シリカ担体の世界的メーカーである Kromasil 社（Akzo Nobel 社の一事業部）とのコラボレーションにより、バイオ医薬品、低分子タンパク質、ペプチドの生産などさらに高圧を要する用途に応じたトータル・ソリューションの提供が可能になりました。

### 実績あるコンビネーション

スウェーデン南部のマルメー市にある PolyPeptide Laboratories 社では、ペプチド精製プロセスの 50% に弊社の低圧用および高圧用カラムと Kromasil 社の担体を組み合わせて使用しています。現在、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーのプロトコールに径 200、300、450、600、1,000 mm の各種カラムが使われています。PolyPeptide Laboratories 社は、弊社のカラムと Kromasil 社のシリカ担体の組み合わせで、高収率かつ高品質のカラム性能と、工業生産に必要なロバスト性が得られると判断されています。図 1 は製造記録から抜粋したデータです。

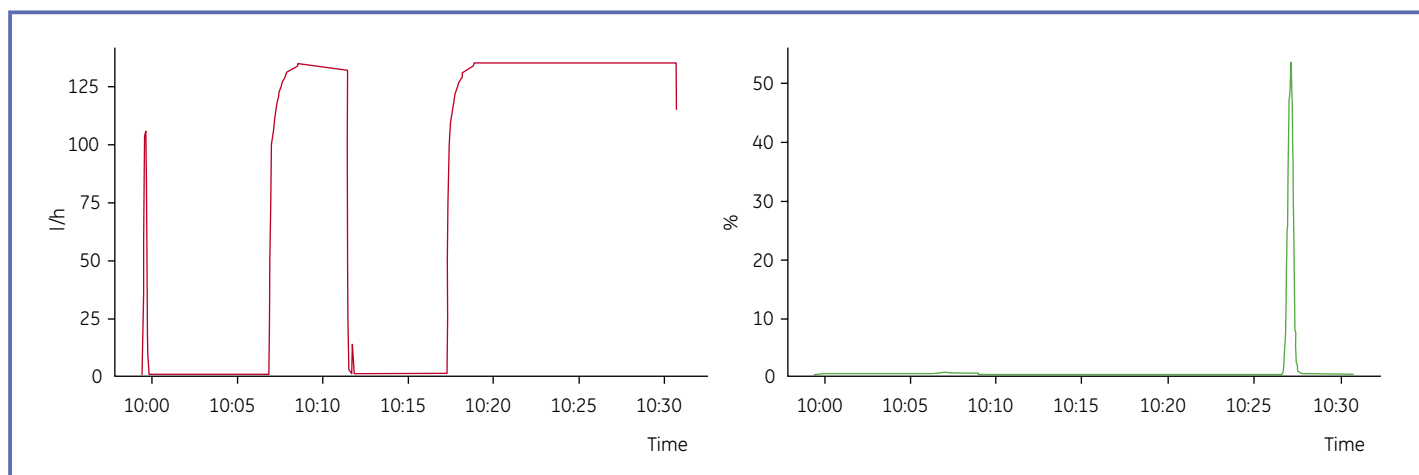


図 1. BioProcess HPLC カラム（径 300 mm）と Kromasil RPC 担体で最適な充填が実現することを証明した PolyPeptide Laboratories 社の製造記録データ（ベッド高 54.8 cm、カラム容量 38.73 ℓ）

## ハードウェア

BioProcess HPLC カラムは径 50 ~ 1,000 mm まで揃っており、100 bar までのカラム圧で使用できます。BioProcess カラムはカラムベッド全体に均一に移動相が分散するので、信頼性と再現性の高いデータが得られます。正確な圧力調節により数分間で充填が完了し、担体の圧縮を防ぐことができます。

- 上流プロセスから下流プロセスまで
- 場所を取らないカラムスタンド
- カラムローテーション
- スケールアップ・ダウンが簡単
- 移動が容易
- ダイナミックアキシャルコンプレッションによる容易な充填
- 分離効率の向上

BioProcess HPLC システムは UNICORN の制御による全自動システムなので、無人で 24 時間稼働させることができ、生産コストの削減とスループットの向上が可能になります。BioProcess HPLC システムは 3,000 L/h までの流速設定が可能なので多目的に活用でき、複数の生産ラインでひとつのシステムを共用できることから、生産能力を向上させることができます。モジュラーデザインの装置は移動できるので、柔軟性の高い設備レイアウトが可能になり、GMP で定められた据付面積を縮小でき、システムの拡張や移設も可能です。

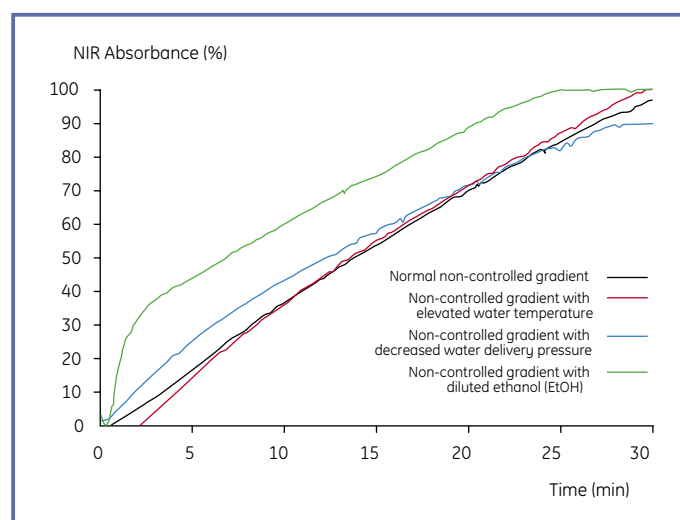
- 製品のモニタリングと細分化
- 注入ループ
- カラムとシステムの保護
- 3ヘッド式ダイアフラムポンプ
- コンパクトなモジュラーデザイン
- 高度なシステム・ドキュメンテーション

## 十分にコントロールされたグラジエント形成

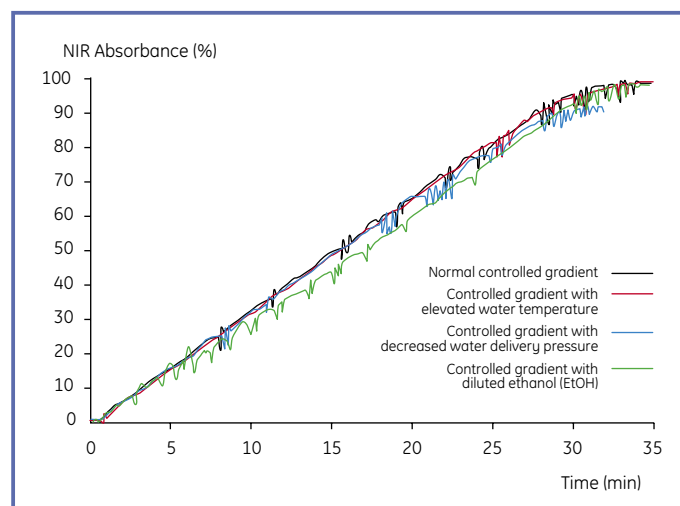
溶媒またはバッファーによるグラジエントの改良により、ピーク分離とプロセス経済性が著しく向上します。BioProcess HPLC システムはどのような流速設定でも幅広い範囲のグラジエント形成が可能です。条件の厳しいグラジエントでも非常に正確にコントロールします。

BioProcess HPLC システムのグラジエントループはエアトラップが組み込まれているので、気泡を含まずに正確かつ再現性の高い有機溶媒の混合が可能です。したがってプロトコルをパイロットスケールから生産スケールへ移行する場合や装置間で移行する場合にスムーズに行うことができます。

BioProcess HPLC Type II システムには、移動相を監視するインライン式定量センサーが装備されています。このセンサーにより、グラジエント混合ループへのフィードバック制御に加え、温度や送液方法、グラジエント用バッファーや溶媒の組成などの許容差に関係なく、どのようなスケールでも再現性の高いグラジエントを形成でき、予測通りの結果を確実に得ることができます。



温度、送液圧、グラジエント用溶媒の組成がグラジエント形成の精度と再現性に及ぼす影響。



十分にコントロールされているグラジエントは、グラジエント用溶媒の特性の変化による影響が少ない。

## ソフトウェア UNICORN

第一サントリーファーマ株式会社が弊社の HPLC システムを導入したのは、UNICORN を使うことでスケールアップが容易になることが理由のひとつでした。第一サントリーファーマ株式会社 プロダクト・マネージャー 今井芳宏氏は「HPLC システムに UNICORN 制御ソフトウェアが搭載されたこと知り、購入を決定しました」とおっしゃっています。

BioProcess HPLC システムは、標準搭載した UNICORN CU950 コントローラーで制御されています。UNICORN は 1 台のコンピュータで 4 プロセスまで効率的に制御でき、フレキシブルなプロトコール設定、広範なデータ評価、すぐれたレポート機能といった特徴を備えています。

プロトコールエディタのウィザード機能を使ってさまざまなプロセス段階を作成でき、各ポンプ、バルブ、レベルセンサーの設定が可能です。また各装置の監視やグラジエント条件の設定もできます。

データ評価／比較機能ではデータ解析を行うことができますが、オリジナルデータの改変や削除は禁止されています。監査証跡にはすべてのアクセスと実施した操作が記録されており、プロトコールやロットに関する詳細なデータはひとつのデータファイルに収録され、容易にバックアップできます。また、プレートカウントやピーク面積などのパラメータの計算や、反復作業の自動化も可能です。

構成を柔軟に設定できるレポートフォーマットで、プロセスに関する詳細な情報が記されたレポートを簡単に作成することができます。レポートはプロセス終了後自動的にあるいは 1 回のクリック操作で簡単にプリントアウトできます。

UNICORN のドキュメンテーション機能、レポート機能、システム制御により、バリデーション基準の適合と GMP 環境の遵守にまつわるプレッシャーを軽減します。UNICORN は FDA 21 CFR part 11 を全面的に遵守しており、電子記録および電子署名に関する規制要件をクリアしています。

## 担体

Kromasil 社との提携により、世界のトップブランドからラージスケールの HPLC 用シリカ担体を提供できるようになりました。Kromasil 担体は HPLC を利用する生産プロセスや分析など、ほとんどの用途に適しています。

Kromasil 担体は球形で、さまざまな用途に応じたビーズ径の担体を提供しています。Kromasil 担体の大きな特徴は、カラムの圧縮や詰まりを抑える優れた力学的安定性と、カラムベッドの寿命を長く保てる優れた化学安定性です。最近、Kromasil 社は大量のシリカ担体を安定供給するため、大規模な生産施設の建設に投資しました。

## ソリューション

製造プロセスに対応した HPLC ソリューションは、システム、担体、カラムとサポートで構成されています。モジュラーデザインの装置は移動できるので、柔軟性の高い設備レイアウトが可能になり、GMP で定められた据付面積を縮小できます。また、ユーザーに優しい UNICORN 制御ソフトウェアにより無人で 24 時間稼働させることができ、コスト全体の削減につながります。Kromasil 社との提携は、プロセス用ハードウェアとデザインを向上し、お客様のニーズを満たす HPLC ソリューションを開発する新たな機会を生み出すと考えています。

### 関連文献

BioProcess HPLC Pilot システム	18-1171-03
BioProcess MPLC/HPLC システム	18-1167-77
BioProcess HPLC カラム	18-1167-74

### パンフレット

More pressure - less worry	11-0007-13
----------------------------	------------

### その他の情報

HPLC ソリューションに関するその他の情報については、営業担当者にお問合せください。



大容量の哺乳類細胞培養液を EBA カラムで処理する際には、細胞膜を傷つけないことが特に重要です。細胞がカラムを通過する時に細胞膜が壊れると、遊離した細胞内成分が精製に悪影響を及ぼし、処理時間が長引くことになりかねません。以下に紹介する最新の研究の結果、非常に傷つきやすい細胞でも適切な対策を施せばそのような心配は無用であることが証明されました。



STREAMLINE Direct カラムには「拡張吸着流動床 (EBA)」の簡便性と生産性を高めるデザイン改良が施されています。例えば、カラム下部のネットをなくし、下側に注入口のある振動アームを備えた分散システムで原料を注入します。

## STREAMLINE Direct カラムは CHO 細胞やハイブリドーマの細胞膜を傷つけません

STREAMLINE Direct カラムには「拡張吸着流動床 (EBA)」の簡便性と生産性を高めるデザイン改良が施されています。例えば、カラム下部のネットをなくし、下側に注入口のある振動アームを備えた分散システムで原料を注入します。

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞やハイブリドーマは、特に壊れやすい細胞であることがよく知られています。これらの細胞が STREAMLINE Direct カラムを通過できるかどうかを、新型注入口を再現した試験装置で調べました\*1。

### 注入口の流出速度と径の影響

注入口から液が流出する速度（注入口の流出速度、 $1 \sim 10 \text{ ms}^{-1}$ ）と注入口の径（ $0.4 \sim 1.2 \text{ mm}$ ）を評価しました。両極端の処理条件下で細胞膜の状態を評価できるように、流出速度と径の範囲を幅広く設定しました。分散システムの注入口を通過した細胞から遊離した乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の量を測定し、無傷の細胞の LDH 濃度と比較して細胞膜の損傷度を評価しました。

### 細胞膜への悪影響がない

STREAMLINE Direct カラムの注入口を再現した注入構造を一般的な流速  $200 \sim 800 \text{ cm/h}$  で通過した細胞は細胞膜を損傷しないことがわかりました。この流速は注入口の流出速度  $0.5 \sim 2 \text{ ms}^{-1}$  に相当します。例えば、通過前の生存率 95 % の CHO 細胞は  $4 \text{ ms}^{-1}$  の高流速でも細胞膜が破壊されないことが示されました。生存率 46 % のハイブリドーマでは、注入口の径が  $0.4 \text{ mm}$  の場合を除き（評価した最小径、STREAMLINE Direct カラムの注入口の径は  $0.8 \text{ mm}$ ）同じ流出速度で細胞膜の損傷が認められませんでした。

通常の処理には不適切な高速で（注入口の流出速度  $8 \sim 10 \text{ ms}^{-1}$ ）注入口を通過した場合には細胞膜の損傷が認められますが、注入口の流出速度を高速にして注入口の径を小さくすれば細胞膜の損傷が大きくなるという傾向は明らかです。

この評価の全体的な所見から、STREAMLINE rProtein A 等の STREAMLINE 吸着剤は、STREAMLINE Direct カラムにて推奨流速の上限で使用した場合でも、細胞膜の損傷を防ぐことがわかります。

この試験の詳細とデータはアプリケーションノート 11-0025-15 に記載されています。

\*1 Boehringer Ingelheim Pharma 社（ドイツ・ビーバラハ）の協力を得て実施。