

抗体精製用疎水クロマトグラフィー新規TOYOPEARL グレードの開発

崎 間 恵 美
橋 本 佳 巳
三 苫 惠 民

Development of a New TOYOPEARL Hydrophobic Interaction Chromatographic Resin for Antibody Purification

Emi SAKIMA
Yoshimi HASHIMOTO
Yasutami MITOMA

In view of ever expanding demand for therapeutic antibodies in medical market, we may expect that the chromatographic resins for use in the manufacture and purification of antibodies would also go on increasing in market demand. We have now developed a new grade Toyopearl hydrophobic interaction chromatographic (HIC) resin (TOYOPEARL PPG-600M) good for the use at intermediate stage of antibodies manufacturing process.

The new resin was designed to possess an optimal pore size for antibody molecules and a moderate hydrophobicity that was intermediate between the ether and phenyl-based ligands. Compared with the current Tosoh's HIC resins and competitors' products, this resin exhibited not only higher binding capacity and more efficient recovery but also better selectivity in removing impurities from the antibodies of ascites samples.

1. はじめに

近年、抗体の医薬品としての需要は過去20年間にわたって増加を続けており、現在、数種類の抗体がFDAにより医薬品として認可されている¹⁾。代表的なものとしては転移性乳癌治療薬のハーセプチン、再狭窄予防薬のレオプロ等があり、それぞれ全世界で年間約400億円の売り上げがある。抗体医薬の市場は今後も伸びることが考えられ、2010年には総額約500億ドルに達するとの予想もある。

抗体医薬の製造では、抗体を発現する細胞を培養、膜による前処理を行った後、純度を上げるために3ステップあるいはそれ以上のクロマトグラフィーで精製を行うことが多い。精製プロセスとしては、粗精製、

中間精製、最終精製を適用するのが一般的である。中間精製以降のステップでは疎水クロマトグラフィー^{2),3)}、イオン交換クロマトグラフィーなどが使用されるが、その担体には不純物との良好な分離性能と共に抗体に対する吸着容量が高いことが要求される。

TOYOPEARLは親水性のビニルポリマーを基剤とした半硬質多孔性球状のクロマトグラフィー担体で、その優れた耐圧性と化学的安定性から、ラボスケールからプラントスケールの大量精製まで適用が可能であり、医薬品、食品精製等様々な分野で広く利用されている。

これまでに、我々は目的精製物に合わせてTOYOPEARL細孔径の最適化⁴⁾⁻⁶⁾を行うことで吸着容量を向上させる技術を検討してきた。その技術を応用

した例としては、2002年4月に上市したインスリン粗精製用イオン交換クロマトグラフィー担体 TOYOPEARL MagaCap SP-550ECがある。

今回、我々は抗体の中間精製用にターゲットを絞り、この細孔径最適化技術の適用と新規リガンドの検討により、良好な吸着容量と不純物との優れた分離選択性の両立を目標とした疎水クロマトグラフィー新規 TOYOPEARLグレードの開発を行った。

本稿では、疎水クロマトグラフィー新規 TOYOPEARLグレードの開発の概要と基本的性質、特徴について述べる。

2. 実験

[1] 試作担体の調整

親水性ビニルポリマーである既存のTOYOPEARLと同様の基材を用いて、様々な細孔径を持つベースゲルを調整した。その後、ゲル表面修飾反応において各リガンドを導入した担体を作成した。中間精製用を想定し、粒子径は40~90 μ mに設定した。ベースゲル細孔径調整、リガンド導入反応、粒子径制御は常法に従って行った。

[2] 試作充填剤の物性評価

(1) 細孔特性

細孔特性は排除限界分子量で測定した。10.7mm I.D.*150mmステンレスカラムに担体を充填し、純水を流速0.47mL/min(線速30cm/h)で通液しサンプルを溶出した。標準試料はブルラン(昭和電工製、STANDARD P-82)を用いた。測定装置はHLC-8120GPC(東ソー製)を使用し、検出はRIで行った。

(2) タンパク質溶出挙動

7.5mm I.D.*75mmステンレスカラムに担体を充填し、1.8M硫酸アンモニウムを含む0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)から0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)へのリニアグラジエントでサンプルの溶出を行った。サンプルはBSA(Sigma社製、A-8022)、モノクローナル抗体(Anti-LH IgG、東ソー東京研究所より)、マウス腹水(Anti-IgE IgG、東ソー東京研究所より)を用いた。測定装置はポンプ(東ソー製CCPM-)、オートサンプラー(東ソー製AS-8020)、カラムオープン(東ソー製CO-8020)、検出器(東ソー製UV-8020、検出波長:280nm)により構成した。またシステムのコントロール、データ処理には東ソー製スーパーシステムコントローラSC-8020を用いた。

(3) human γ -globulins 静的吸着容量

0.8M硫酸アンモニウムを含む0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)中でサンプルを50分間担体に吸着させ、上

清に残った未吸着のサンプル量から吸着したサンプル量を算出した。サンプルはhuman γ -globulins(Sigma社製、G-4386)を用いた。タンパク質の濃度決定には分光光度計(島津製作所製、UV-160A)を用いた。

(4) モノクローナル抗体(Anti-LH IgG)動的吸着容量
7.8mm I.D.*200mmステンレスカラムに担体を充填し、0.8M硫酸ナトリウムを含む0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)で30分間平衡化した後、サンプル(モノクローナル抗体、Anti-LH IgG、濃度1mg/mL)を流速2.39mL/min(線速300cm/h)でカラムにアプライした。280nmの吸光度をモニターし、元の濃度の10%のサンプルがカラムから漏れだした時間を測定し、動的吸着容量を求めた。その後、未吸着のサンプルを1.1M硫酸アンモニウムを含む0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)で洗い流した後、吸着されたサンプルを0.1Mリン酸バッファ(pH7.0)で溶出させ、溶出回収量、回収率を求めた。サンプルはモノクローナル抗体(Anti-LH IgG、東ソー東京研究所より)を用いた。

3. 結果と考察

[1] ベースゲル細孔径の最適化

Fig.1に示したように、ベースゲルの細孔径を小さくした場合、表面積は大きくなり、分子量の小さなタンパク質に対しては吸着に有効な表面積が大きくなるが、細孔に入れないような分子量の大きなタンパク質に対しては吸着に有効な表面積が小さくなる。反対に、細孔径を大きくした場合、分子量の小さなタンパク質に対しては吸着に有効な表面積は小さくなるが、分子量の大きなタンパク質に対しては吸着に有効な表面積は大きくなる。上記の考えに基づき、抗体(IgG)吸着に対して最適なベースゲル細孔径を検討した。

様々な大きさの細孔径を持つベースゲルにポリエーテルをリガンドとして導入した試作担体について、IgGが主成分であるhuman γ -globulinsの静的吸着容量を調べた。また、細孔特性を表すパラメータとして排除限界分子量測定を行った。排除限界分子量と γ -globulins吸着容量の関係を図2に示した。排除限界分子量80万前後で吸着容量が最も高く、これはTOYOPEARL既存グレードと比較するとHW-65とHW-55の中間の細孔径に相当した。

Fig.3に示したように、吸着容量で最適な結果が得られた担体の細孔特性(較正曲線)の中心分子量を長さに換算する⁷⁾と、排除限界分子量80万の場合、中心細孔直径は140前後と推定された。IgG分子の大きさ(約100 \times 150)⁸⁾と考え合わせると妥当な結果と

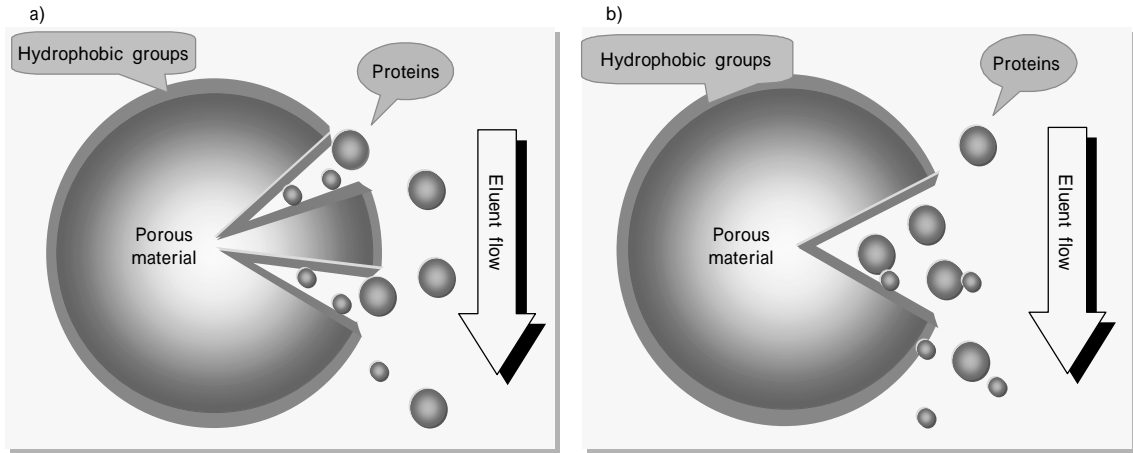


Fig. 1 Relationship between pore size and effective surface area for binding to proteins.
 a) small size pore
 b) large size pore

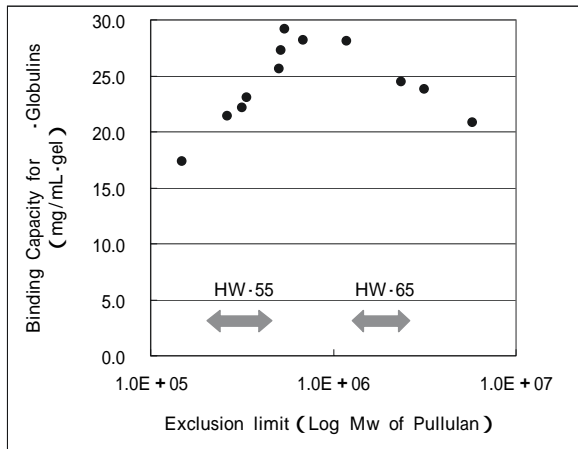


Fig. 2 Relationship between -globulins binding capacity and exclusion limit.
 Resin : Polyether bonded TOYOPEARL (All research sample)
 Sample : human -globulins

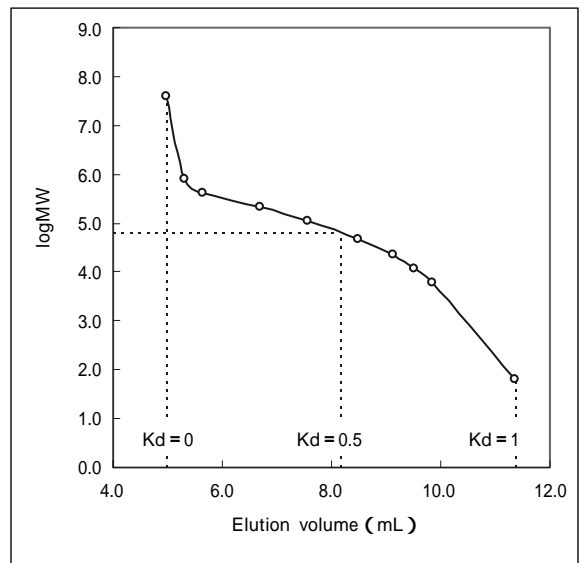


Fig. 3 Calibration curve of optimized material for antibody binding.

Conditions :
 Column size ; 10.7 mmI.D.*150 mm
 Eluent ; H₂O
 Flow rate ; 0.47 mL/min (linear velocity : 30 cm/h)
 Detection ; RI
 Sample ; Pullulan, ethylene glycol
 Injection ; 40 μL

考えられる。

[2] リガンドの選択

これまでに、当社既存品の疎水クロマトグラフィー担体としてはEther-650M、Phenyl-650M、Butyl-650M等がある。Fig.4に示したように、マウス腹水の分離において、Ether-650MではアルブミンとIgGの良好な分離が得られているが、Phenyl-650M、Butyl-650Mではやや分離選択性が劣っていた。一方、Ether-650Mでは吸着容量は低いがPhenyl-650M、Butyl-650Mでは吸着容量に優れている⁹⁾。分離選択性と吸着容量の両方に優れた充填剤が求められる中間精製ステップでの使用を想定した場合、リガンドの疎水性はEtherとPhenylの中間となるものが適当と考えた。そこで、共通のベースゲルに既存品と同様のEther、Phenyl、Butyl、およびEtherとPhenylの中間の疎水性を有する

と予想される新規リガンドのポリエーテル基を導入した担体を試作し、物性を比較した。Fig.5にマウス腹水 (Anti-IgE IgGを含む) のクロマトグラム測定結果を示した。Phenyl基、Butyl基を導入した充填剤ではアルブミンとIgGの溶出ピークが重なっていたのに対し、新規リガンドのポリエーテルを導入した担体ではEtherを導入した担体と同様にマウス腹水に含まれる夾雑物であるアルブミンとIgGの良好な分離が確認された。

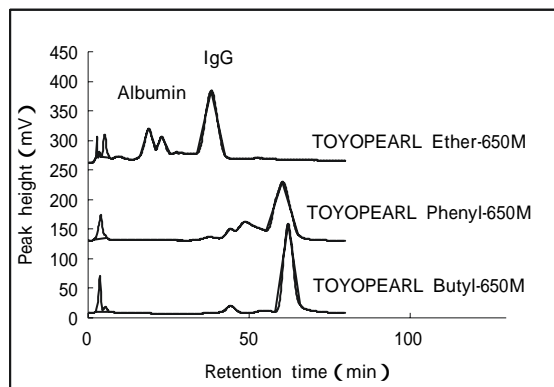


Fig. 4 Separation of mouse ascites fluid on some HIC materials.

Conditions :

Column size ; 7.5 mmI.D.*75 mm

Eluent ; a) 0.1 M Phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)

b) 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

Gradient ; a) to b) 30 min linear

Flow rate ; 1mL/min (linear velocity : 136 cm/h)

Detection ; UV (280 nm)

Sample ; Monoclonal IgG1 (Anti human IgE) in mouse ascites fluid (diluted four times)

Injection ; 100 μ L

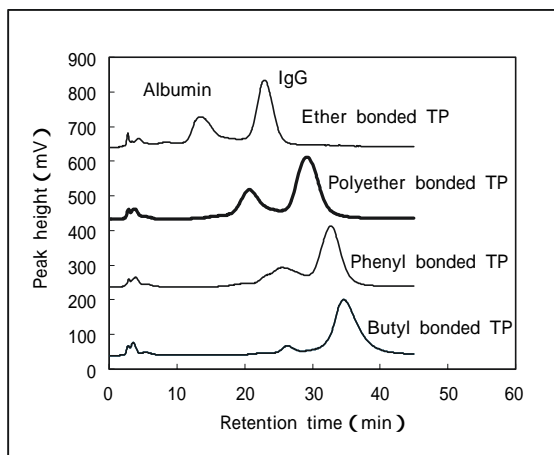


Fig. 5 Separation of mouse ascites fluid on some HIC materials.

Conditions :

Column size ; 7.5 mmI.D.*75 mm

Eluent ; a) 0.1 M Phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)

b) 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

Gradient ; a) to b) 30min linear

Flow rate ; 1mL/min (linear velocity : 136 cm/h)

Detection ; UV (280 nm)

Sample ; Monoclonal IgG1 (Anti human IgE) in mouse ascites fluid (diluted four times)

Injection ; 100 μ L

[3] 開発担体の基本的性質

以上の検討から抗体精製に最適化した細孔特性を持つベースゲルにポリエーテル基を導入した担体を調製し、基本的性質を調べた。

(1) 標準タンパク質の分離性能

Fig.6に市販の標準タンパク質3種類の分離例を示し

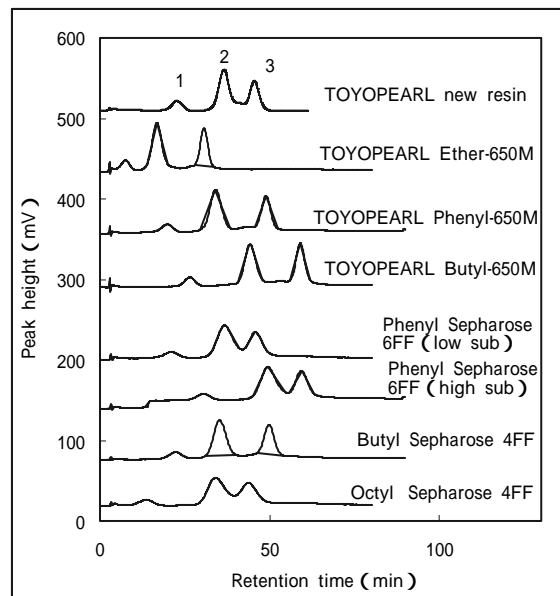


Fig. 6 Separation of standard proteins.

Conditions :

Column Size ; 7.5 mmI.D.*75 mm

Eluent ; a) 0.1M Phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)

b) 0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)

Gradient : a) to b) 60min linear

Flow rate ; 1mL/min (linear velocity : 136 cm/h)

Detection ; UV (280 nm)

Sample ; RNase A(1) Lysogyme(2) Chymotripsinogen A(3)
1 mg/mL

Injection ; 100 μ L

た。本開発担体は既存品Ether-650MとPhenyl-650Mの中間の疎水性を持つことが分かる。

(2) マウス腹水の分離性能

実サンプルに近いと考えられるマウス腹水(中程度の疎水性を有するモノクローナル抗体Anti-IgEを含む)を用いて様々な疎水クロマトグラフィー担体で分離の比較を行った。Fig.7にその結果を示した。他社競合品である疎水基導入アガロース系ゲルではいずれもマウス腹水に含まれるアルブミンのピークがIgGピークと重なっており、夾雑物(アルブミン)と目的物の分離が確認されなかった。これに対し、本開発担体ではアルブミンとIgGがよく分離していることがわかる。

(3) 抗体とアルブミンの分離性能

医薬品として製造される抗体は多岐に渡り、様々な疎水性を持つと考えられる。そこで、比較的疎水性の高い抗体(モノクローナル抗体(Anti-LH IgG))と夾雑物とのモデルサンプルを作成し、分離を他社競合品であるPhenyl Sepharose 6FF (high sub)と比較した。Fig. 8にその結果を示した。他社競合品ではBSAピークがかなりブロードとなっており、抗体のピークは確認されなかった。これに対して、本開発担体では2つ

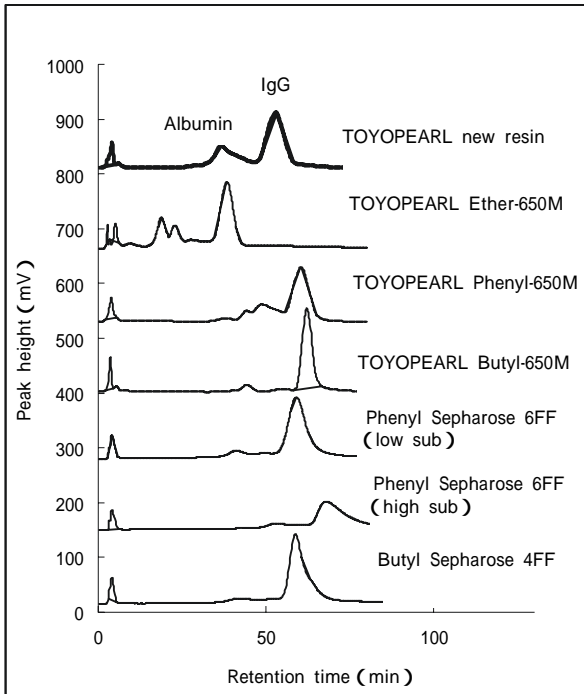


Fig. 7 Separation of mouse ascites fluid.
 Conditions :
 Column Size ; 7.5 mmI.D.*75 mm
 Eluent ; a) 0.1 M Phosphate Buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)
 b) 0.1 M Phosphate Buffer (pH 7.0)
 Gradient : a) to b) 60 min linear
 Flow rate ; 1mL/min (linear velocity : 136 cm/h)
 Detection ; UV (280 nm)
 Sample ; Monoclonal IgG1 (Anti human IgE) in mouse ascites fluid (diluted four times)
 Injection ; 100 μ L

の良好なピークが確認された。

(4) human γ -globulins 静的吸着容量

Table 1 にhuman γ -globulins 静的吸着容量測定結果を示した。競合品のPhenyl Sepharose 6FF (high sub) で最も高い吸着容量が得られた。また既存品 Butyl-650M でも高い吸着容量が得られた。これらの担体に対し、本開発担体は吸着容量では劣るものの、分離選択性に優れた担体の中では良好な吸着容量が得ら

Table 1 Static binding capacity of some HIC resins for human γ -globulins

HIC resin	-Globulins binding capacity (mg/mL-gel)
TOYOPEARL new resin	25
Butyl-650M	34
Phenyl-650M	26
Fractogel EMD Phenyl (S)	17
Phenyl Sepharose 6FF (high sub)	41
Butyl Sepharose 4FF	27
Octyl Sepharose 4FF	17

Adsorption Buffer ; 0.1 M phosphate buffer containing 0.8 M ammonium sulfate (pH7.0)

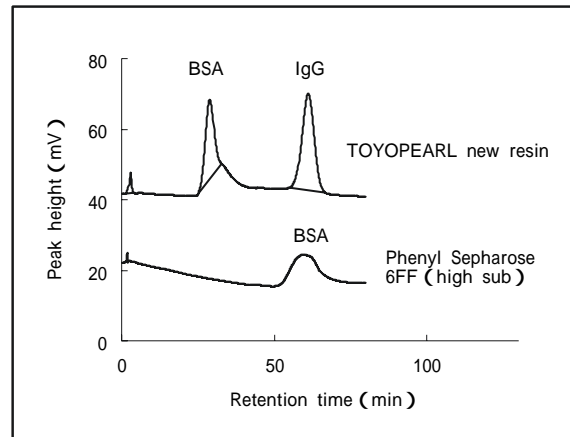


Fig. 8 Separation of IgG and BSA.
 Conditions :
 Column Size ; 7.5 mmI.D.*75 mm
 Eluent ; a) 0.1M Phosphate buffer containing 1.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)
 b) 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)
 Gradient : a) to b) 60 min linear
 Flow rate ; 1mL/min (linear velocity : 136 cm/h)
 Detection ; UV (280 nm)
 Sample ; BSA 3 mg/nL, monoclonal IgG1 (Anti-LH) 1 mg/mL
 Injection ; 100 μ L

れた。

(5) 抗体動的吸着容量

実際の抗体精製での使用を想定し、抗体 (モノクローナル抗体、Anti-LH IgG) 溶液を連続フィードして動的吸着容量の測定を行った。比較のため、当社既存品であるPhenyl-650M、および他社競合品であるPhenyl基導入アガロース系ゲルについても同時に測定を行った。Fig.9に結果を示した。既存のTOYOPEARL Phenyl-650Mと比較して本開発担体は高い吸着容量を示した。

連続フィード後、洗浄液で未吸着のサンプルを洗い

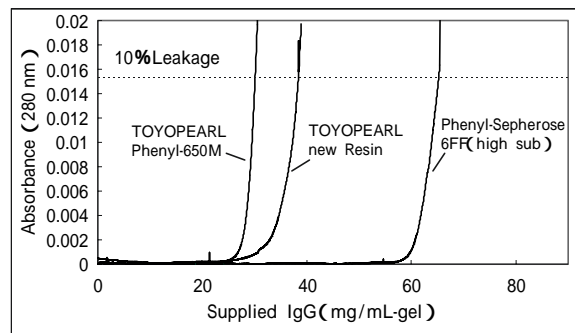


Fig. 9 Comparison of breakthrough curves.
 Conditions :
 Column size ; 7.8 mmI.D.*20 cm
 Flow rate ; 2.39 mL/min (linear velocity : 300 cm/h)
 Detection ; UV (280 nm)
 Feed ; monoclonal IgG1 (Anti-LH) 1 mg/mL in 0.1M Phosphate buffer containing 0.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)

Table 2 Dynamis binding capacity for monoclonal IgG1 (Anti-LH)

HIC Resin	Dynamic binding capacity (mg/mL-gel, 10%leakage)	Eluted amount (mg/mL-gel,)	Recovery ¹ (%)
TOYOPEARL New Resin	38	39	100
TOYOPEARL Phenyl-650M	30	29	95
Phenyl Sepharose 6FF (high sub)	65	59	89

¹Recovery : (Eluted amount/dynamic binding capacity) × 100

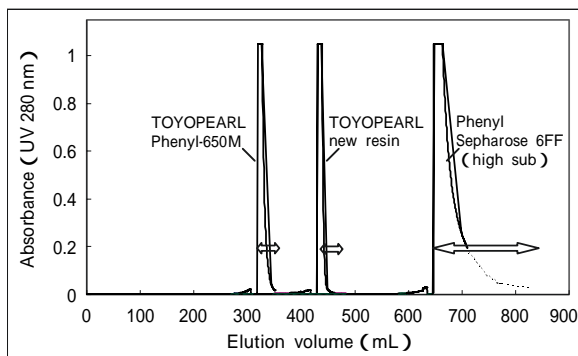


Fig.10 Comparison of elution chromatogram.

Conditions :

Column Size ; 7.8 mmI.D.*20 cm

Flow rate ; 2.39 mL/min (linear velocity : 300 cm/h)

Detection ; UV (280 nm)

Feed ; monoclonal IgG1 (Anti-LH) 1 mg/mL

in 0.1M Phosphate buffer containing 0.8 M ammonium sulfate (pH 7.0)

Wash ; 0.1 M Phosphate buffer containing 1.1 M ammonium sulfate (pH 7.0)

Elute ; 0.1 M Phosphate Buffer (pH7.0)

Feed (until 10%leak) Wash (6 min) Elute (Recovered as shown by arrows)

流した後、溶出液でサンプルを溶出させた。Fig.10、Table 2に結果を示した。本開発担体では最も狭いピーク幅でサンプルが溶出した。これは不純物との分離に有効であり、高サンプル濃度での回収、精製時間の短縮等の利点がある。また、競合品の回収率が89%であるのに対し、本開発担体では100%の回収率が得られた。

以上の結果から、本開発担体は抗体の分離精製に対して良好な吸着容量を持ち、かつ回収効率が良く、高い回収率を持つことがわかる。

4.まとめ

本検討では、ベースゲル細孔径の最適化と適切なリガンドを選択することでアルブミン/IgGの優れた分離選択性と良好な抗体吸着容量、高い回収率の両立を

達成した。また、疎水クロマトグラフィーではサンプルの特性に応じて適切な疎水性を持つ担体を選択することが必要であるが、本開発担体は新規リガンドを選択したことで既存品では対応できなかったサンプルにも応用の可能性があると考えられる。本開発担体はTOYOPEARL PPG-600Mとして2003年4月に上市した。

今後、疎水クロマトグラフィーによる抗体精製の分野では、抗体の多様性から様々な選択性を有した担体の供給が要求されるものと予想される。これまでに構築した細孔径最適化技術をベースに、新たなリガンド導入技術を検討することで幅広いニーズに対応する担体の開発を継続していく予定である。

参考文献

- 1) (財)国際医学情報センター機関紙、22(4)、27 (2002)
- 2) G.Raspi, M.Spinetti, G.Teri, E.Bramanti, *Chromatographia Supplement*, 53, 174 (2001)
- 3) M.P.Smith, M.A.Bulmer, R.Hjorth, N.J.Titchener-Hooker, *J.of Chromatography A*, 968, 121 (2002)
- 4) Y.Hashimoto, K.Shiigi, H.Moriyama, Y.Kato, ISPPP予稿集, 21, 65 (2001)
- 5) Y.Hashimoto, K.Shiigi, Y.Kato, H.Moriyama, Y.Kato, ISPPP予稿集, 21, 66 (2001)
- 6) T.Kamichika, Y.Hashimoto, K.Shiigi, E.Sakima, Y.Mitoma, ISPPP予稿集, 22, 48 (2002)
- 7) S.Kuga, *J.of Chromatography*, 206, 449 (1981)
- 8) R.Li, V.Dowd, D.J.Stewart, S.J.Burton, C.R.Lowe, *Nature Biotechnology*, 16, 190 (1998)
- 9) R.Hahn, K.Deinhofer, C.Machold, A.Jungbauer, *J.of Chromatography B*, 790, 99 (2003)

著 者
氏名 崎 間 恵 美
Emi SAKIMA
入社 平成13年4月1日
所属 科学計測事業部
ゲル製造部
セパレーションセンター

著 者
氏名 橋 本 佳 巳
Yoshimi HASHIMOTO
入社 昭和62年4月1日
所属 科学計測事業部
ゲル製造部
セパレーションセンター

著 者
氏名 三 苫 恵 民
Yasutami MITOMA
入社 昭和59年4月2日
所属 科学計測事業部
ゲル製造部
セパレーションセンター
セパレーションセンター長