

●低分子化抗体精製向けアフィニティークロマトグラフィー 充填剤 TOYOPEARL[®] AF-rProtein L-650F の開発

バイオサイエンス事業部 開発部 セパレーショングループ

小林 秀峰
荒木 康祐

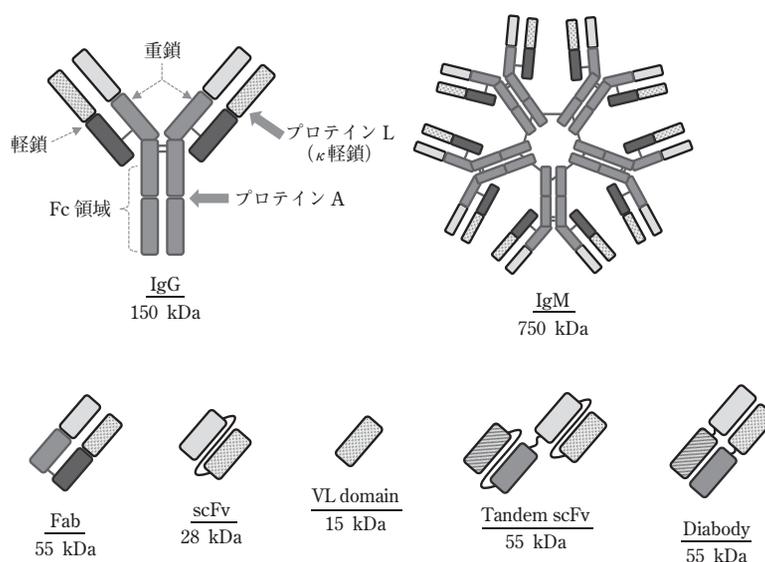
1. はじめに

抗体医薬品は、高い治療効果と副作用の軽減が期待できる疾患関連分子に特異的に結合する抗体を遺伝子組換え技術等を応用して作製したものである。2015年度までに日米欧で承認された抗体医薬品は40品目を超え¹⁾、医薬品の売上げに占める割合は益々増加している。近年、次世代型の抗体医薬品として、抗体の構造の改良や修飾を施した、低分子型、二重特異性型、融合抗体型などの研究、開発が活発になっている^{2, 3)}。

現行型の抗体医薬に使用されている免疫グロブリン G (IgG) は、軽鎖 (L鎖) と重鎖 (H鎖) の2つのポリペプチド鎖がそれぞれ2本ずつジスルフィド結合を介して結合し、Y字型のヘテロテトラマー構造をしている。次世代型の低分子化抗体は、抗原結合部位である可変領域 (VL, VH) を残して、定常領域などを削り、分子量を小さく改良したものである。抗体は低分子化をすることで、組織などへの浸透性が向上し、固形ガンや脳などへの投薬として効果を高めることや^{4, 5)}、大腸菌などの微生物生産系を用いることで^{6, 7)}、生

産コストの低減などが期待されている。また、体内半減期が完全長抗体と比較して短くなる傾向があることや、目的部位への化学的修飾が容易である特徴から、ラジオアイソトープなどを付与したイメージング用途や⁸⁾、ポリエチレングリコール (PEG) 付加により半減期を延長させた医薬品への用途などに使われ始めている^{9, 10)}。低分子化抗体は、その目的に応じて Fab、scFv、Diabody 等、またこれらを連結させた構造 (図1) のものなど様々な研究、開発がなされている³⁾。

現行型の抗体は、Fc領域に高い親和性を持つプロテイン A をリガンドとした担体をアフィニティー工程で使用する確立された精製プラットフォームが標準法として利用されている¹¹⁾。一方、Fc領域を含まない低分子化抗体については、精製の標準法が未確立であり、低分子化抗体の工業生産において、汎用のイオン交換クロマトグラフィー担体や疎水性相互作用クロマトグラフィー担体などを適宜組合せた手法で精製が行われている¹²⁾。そのため、精製工程の構築に、多大な労力が必要とされており、アフィニティー工程に使用可能なクロマトグラフィー担体が望まれている。今



太矢印：リガンド (プロテイン L、プロテイン A) の結合部位

図1 抗体及び低分子化抗体の代表的な構造

回、低分子化抗体を精製に有効とされるκ軽鎖に特異的な親和性を持つ組換えプロテインLをリガンドとするアフィニティー充填剤 TOYOPEARL AF-rProtein L-650F を新たに商品化した。既存市販品と比較した基本性能を表1に示す。本稿では本商品の基本的な特徴について報告する。

2. 実験項

[1] 試薬

リン酸水素二ナトリウム十二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、硫酸ナトリウム、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウムなどの試薬は和光純薬工業(株)、パパインはSigma-Aldrich社、ヒト由来ポリクローナル抗体（ポリクローナルIgG）は広島和光(株)より購入した。ヒト化モノクローナル抗体（モノクローナルIgG）は、Tosoh Bioscience GmbHから提供されたものを使用した。

[2] 抗体のパパイン消化¹³⁾

0.15 mol/L 塩化ナトリウム、0.01 mol/L システイン、0.01 mol/L EDTA、0.1 g/L パパインを含む0.05 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）にポリクローナルIgG又はモノクローナルIgGを3 g/Lとなるように加え、25℃で17時間消化させた。消化率をTSKgel[®] G3000SW_{XL}を用いたサイズ排除クロマトグラフィー分析により確認した後、ヨードアセトアミドを添加し反応を停止させた。

[3] 動的吸着量の測定

充填剤を4.6 mm I.D. × 50 mm のステンレス製カラムに充填した。実験項 [2] に従い、ポリクローナルIgGの消化物を得た。続いてFc領域やλ軽鎖などプロテインLへ結合しない成分を取り除いてFab成分を調製した。調製したFab溶液を0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）で2 g/Lの濃度に希釈し、試料溶液とした。充填カラムを液体クロマトグラフへ接続し、UV 280 nmの吸光度をモニタリングしながら、試料溶液を所定の流速でカラムへ負荷した。得られた

破過曲線の10%破過時の試料負荷量から、充填剤の動的吸着量（Dynamic binding capacity：DBC）を算出した。

[4] 静的吸着量の測定

充填剤を1 mL計量し、ディスポーザブルカラムに移した。充填剤の4倍量の0.1 mol/Lクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.2）で洗浄後、4 mLの0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）を用いて溶媒置換する操作を2回繰り返す、平衡化した。150 g/LのポリクローナルIgG 2 mLと0.1 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）4 mL加え、25℃で90分間攪拌して吸着させた。脱液後、0.1 mol/L硫酸ナトリウムを含む0.02 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）を4 mL使用して充填剤を洗浄する操作を6回繰り返した。0.1 mol/Lクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.4）を4 mL加えて通液させた後、0.1 mol/Lクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.2）を4 mL加える操作を4回繰り返す、吸着したポリクローナルIgGを溶出させた。溶出させたポリクローナルIgG溶液を250 mLにメスアップし、280 nmの吸光度を測定し、静的吸着量（Static binding capacity：SBC）を算出した。

[5] 充填剤のアルカリ安定性

充填剤を1 mL計量し、ディスポーザブルカラムへ移した。純水で保存溶媒を置換し、続いて0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を4 mL用いて3回置換し脱液した。0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液4 mLを加えスラリーとして、25℃で攪拌した。所定時間経過後、実験項 [4] に従い、静的吸着量の測定を行い、吸着量の減少率を算出した。

[6] Fabの精製

2 g/LのモノクローナルIgGを原料として実験項[2]に従い、Fc成分とFab成分が含まれるパパイン消化液を調製した。充填剤をカラムへ充填し、液体クロマトグラフへ接続し、パパイン消化液を1.2 mLカラムへ添加した。この時、素通り成分を回収した。次に、洗浄液として0.1 mol/Lクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）をUV 280 nmの吸光度がベースラインに戻

表1 TOYOPEARL AF-rProtein L-650Fの基本性能

項目	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	他社市販品
ベースゲル	親水性ポリマー	架橋アガロース
リガンド	組換えプロテインL	組換えプロテインL
粒子径	30-60 μm (平均 45 μm)	(平均 85 μm)
IgG 静的吸着量	64 g/L以上	45 g/L以上
保存溶媒	20 %エタノール	20 %エタノール

・その他項目：生菌数、エンドトキシン、異物、溶出物の規格値は既存製品と同一。

・本商品、及び他社市販品の基本性能は、製品カタログより転載。

るまで通液させた後、溶出液とした 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) に切り替え、吸着成分を回収した。回収した各画分について、TSKgel® UP-SW3000 を用いてサイズ排除クロマトグラフィー分析を行い、LC データ収集アプリケーション (LC-8020 Model II Ver. 5.04) を用いて計算を行った。

[7] カラム圧力損失

充填剤を 4.4 cm I.D. カラムに充填し、純水を所定の流量で通液した際の圧力損失を測定した。

3. 結果と考察

[1] タンパク質の吸着量

ポリクローナル IgG に対する静的吸着量、及びポリクローナル IgG から調製した Fab に対する動的吸着量を評価した結果を表 2 に示す。他社市販品と比べて、静的吸着量では 1.7 倍、動的吸着量はカラム内滞留時間 4 分において 1.8 倍以上となり、優れた吸着量を有していることを確認した。

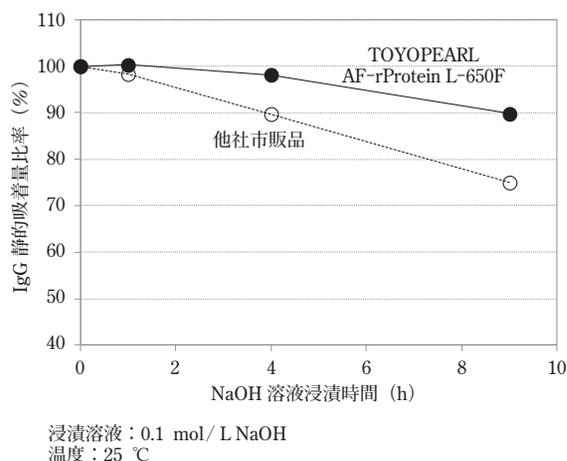


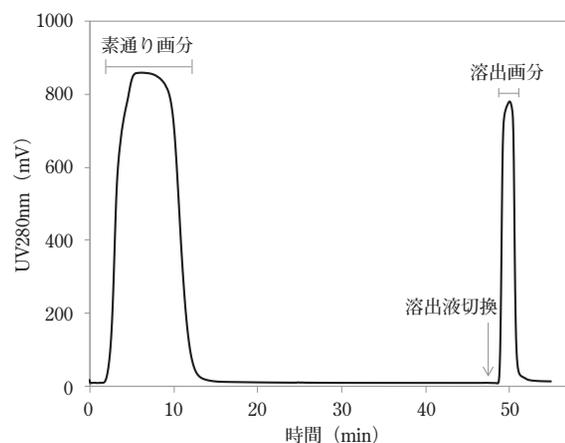
図 2 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム中での吸着量の保持率

[2] アルカリ安定性

タンパク質医薬品の精製工程では、定置洗浄 (CIP) に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムが標準として使用されている。そこで、実験項 [5] に従い、充填剤を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムへ浸漬して評価を行い、経過時間後の IgG 静的吸着量の保持率を調べた結果を図 2 に示す。9 時間の浸漬処理において 90 % の吸着量を維持しており、他社市販品の吸着量の低下速度との比較では 1/2 となり、高いアルカリ安定性を示した。

[3] パパイン消化液からの Fab の分離精製

分離精製時のクロマトグラムを図 3 に示す。精製前の試料、素通り画分、溶出画分をサイズ排除クロマトグラフィーで分析した結果を図 4 に示す。ピークの同定は SDS-PAGE による分子量の確認、及びプロテイン A 担体に対する吸着性の確認により行った (デー



カラムサイズ: 5.0 mm I.D.×50 mm (充填剤量: 1 mL)
 流速: 0.25 mL/min.
 吸着液: 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、
 0.15 mol/L 塩化ナトリウム
 洗浄液: 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)
 溶出液: 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5)
 試料: 2 g/L ヒトモノクローナル抗体のパパイン消化液、1.2 mL
 検出: UV 280 nm

図 3 Fab 精製クロマトグラム

表 2 静的吸着量及び動的吸着量

項目	TOYOPEARL AF-rProtein L-650F	他社市販品	備考
静的吸着量 (g/L)	71	42	
動的吸着量 (g/L)	49	26	滞在時間 4.0 分
	33	19	滞在時間 3.3 分

・静的吸着量

負荷 IgG: 充填剤 1 mL 当たり 300 mg
 吸着液: 0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5)
 脱着液: 0.1 mol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) 及び (pH 2.4)

・動的吸着量

カラムサイズ: 4.6 mm I.D.×50 mm
 負荷 Fab: 2 g/L (0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5)
 吸着量: 10 % 破過量

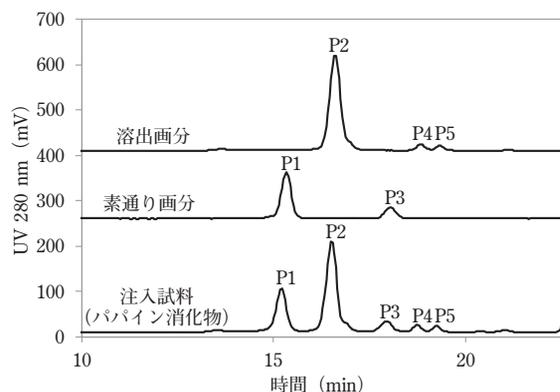
タ不掲載)。回収した各画分に含まれる成分のピーク面積比を表3に示した。溶出画分にはFab (P2)、及びFab分解成分 (P4、P5) のみが回収され、Fc (P1)、及びFc分解成分 (P3) は検出されなかった。また、素通り画分にFab成分 (P2、P4、P5) は検出されなかった。

[4] カラム圧力損失

カラムサイズ 4.4 cm I.D. × 28 cm における圧力損失を図5に示す。少なくとも線速度 1,000 cm/h までの範囲で通液が可能であり、その範囲において急激な圧力損失の上昇は見られなかった。一般的にアフィニティークロマトグラフィーを用いた目的物の吸着、溶出はベッド高さ 15 ~ 20 cm に充填し、滞留時間 3 ~ 6 分で行われており、カラム高さ 16.5 cm の場合では滞留時間 3 分は線速度 300 cm/h に相当することから、本充填剤は、大型カラムへスケールアップした際においても、実用的な線速度範囲で使用できることが確認できた。

4. まとめ

本稿では、低分子化抗体のアフィニティー精製を可能とする新商品 TOYOPEARL AF-rProtein L-650F の性能を紹介した。他社市販品と比べて、吸着量及びア



カラム：TSKgel UP-SW3000、4.6 mm I.D.×15 cm×2 本
流速：0.2 mL/min
溶出液：20%アセトニトリル、0.15%トリフルオロ酢酸、0.1% ギ酸
試料：パパイン消化物、図3の各画分、10 μ L
検出：UV 280 nm

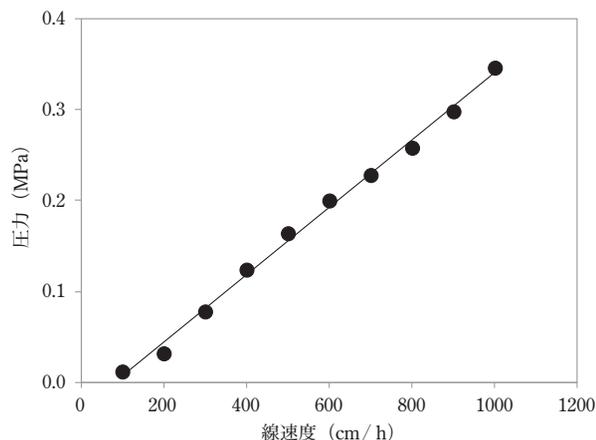
図4 各画分のサイズ排除クロマトグラフィー分析

表3 各成分のピーク面積比

	P1	P2	P3	P4	P5
注入試料	27.89	58.02	6.53	4.11	3.55
素通り画分	80.84	n.d.	19.16	n.d.	n.d.
溶出画分	n.d.	89.37	n.d.	5.65	4.98

n.d.: 検出限界以下 (not detected)

単位: (%)



カラムサイズ：4.4 cm I.D.×28 cm
通液：純水

図5 流速と圧力損失の関係

ルカリ耐久性に優れている結果が得られた。また、Fc領域への結合性は認められず、 κ 軽鎖を持つ Fab を効率的に分離精製することが可能であった。本商品が次世代型抗体医薬品の候補として開発が広がっている低分子化抗体の標準的な精製工程の確立に寄与することが期待される。

5. 参考文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 website(http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/Mab_T1.pdf)
- 2) 赤羽、政策研ニュース、47、6-11(2016)
- 3) C. J. Payes et al., *Rev. Cell Biol. Mol. medicine*, 1(3), 1-52(2015)
- 4) T. Yokota et al., *Cancer Res.*, 52, 3402-3408(1992)
- 5) J. Niewoehner et al., *Neuron*, 81(1), 49-60(2014)
- 6) A. Frenzel et al., *Front. Immunol.*, 4, 1-20(2013)
- 7) O. Spadiut et al., *Trends Biotechnol.*, 32(1), 54-60(2014)
- 8) A. C. Freise et al., *Mol. Immunol.*, 67, 142-152(2015)
- 9) A. P. Herrington-Symes et al., *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 4, 689-698(2013)
- 10) Y. Liu et al., *J. Pharm. Sci.*, 97(6), 531-545(2008)
- 11) A. A. Shukla et al., *J. Chromatogr. B*, 848, 28-39(2007)
- 12) M. Spitali, *Process scale purification of antibodies*, 349-372(2009)
- 13) S. M. Andrew et al., *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 16.4.1-16.4.10(2003)