

# 動的高吸着充填剤Toyopearl GigaCap S-650Mの特性

南陽研究所 HLC充填剤グループ

久保 雄二  
坂根 光  
中村 孝司

## 1. 背景

近年、医薬品用途等で生体高分子であるタンパク質、酵素、核酸等に対する需要が急激に増加している。バイオ医薬品の製造は一般的に、培養による生産工程と、その後の分離・精製工程とに大別される。医薬品の製造では特にその純度や安全性の管理が重要であり、その精製は幾つもの複雑な工程を経て綿密に実施されている。分離・精製工程は、一般的に3ステップ (Capture, Intermediate Purification, Polishingなどのクロマトグラフィー工程) で実施されている<sup>1), 2)</sup>。Capture工程は、目的物質を迅速に粗精製する工程であるが、近年培養工程におけるタンパク質発現レベルが高くなっていることから、充填剤の特性として高吸着量、高流速使用、高耐久性などの性能が必要とされている<sup>1)</sup>。当社はトヨパール等の各種充填剤を有しているが、Capture工程に適した吸着量の高い充填剤を有していないことより高吸着量で且つ通液特性に優れた充填剤の開発を行った。

本稿では、新しく開発した動的高吸着充填剤 Toyopearl GigaCap S-650M (カチオン交換体) の基本的性質、特徴について紹介する。

## 2. 実験

### [1] 試薬、充填剤

ヒトIgGはバクスター社製ガンマガードもしくは化血研製ガンマグロブリンを購入し用いた。リボヌクレアーゼA、チトクロームC、リゾチームはシグマアルドリッチ (株) から購入した。酢酸、NaCl、NaOHなどの試薬は和光純薬 (株) から購入した。

SP Sepharose XLはGE Healthcare社製の製品を用いた。Fractogel SE HiCapはMerck社製の製品を用いた。Toyopearlは東ソー (株) 製の製品を用いた。

### [2] 動的高吸着量の測定

ヒトIgGの動的高吸着量の測定では、試料としてガン

マガード (バクスター社製) を用いた。ガンマガードには少量のアルブミンが添加されているため、rProtein A Sepharose FF (GE Healthcare社製) を用いてIgGを精製した後、使用した。rProtein A Sepharose FFを7.5mm I.D. x 7.5cmのステンレスカラムに充填後、流速 1.5mL/min、吸着buffer (20mmol/L リン酸buffer, pH7.0) で平衡化した。ガンマガード2.5gを吸着buffer 50mLに溶解し、1mL注入した。アルブミンが溶出した後、カラムに吸着したIgGを脱着buffer (0.1mol/L 酢酸buffer, pH3.0) で溶出、回収した。得られたIgG溶液を0.1mol/L 酢酸buffer (pH4.7) で希釈し、IgG溶液 (タンパク質濃度; 1mg/mL, pH; 4.7) を調製した<sup>3)</sup>。

各種カチオン交換体を6.0mm I.D. x 4cmのステンレスカラムに充填し、吸着buffer (0.1 mol/L酢酸buffer, pH4.7) を流速1.0mL/minで送液し平衡化した。上記で調製した IgG溶液 (濃度 1mg/mL) を流速 1.0mL/min. (線速度212cm/hr) でカラムに送液し破過曲線を得た。充填剤の動的高吸着量 (Dynamic binding capacity : DBC) は得られた破過曲線の10%破過点の溶出容量から算出した。吸着したIgGは脱着buffer (0.1mol/L 酢酸buffer + 1.0mol/L NaCl, pH 4.7) を用い溶出回収し、そのUV吸光度 (280nm) から回収量を算出し、DBCの値に対する割合を回収率 (%) とした。

リゾチームのDBCの測定も同様な方法で測定した。リゾチームの場合、吸着buffer (50mmol/L グリシン, pH 9.0) に溶解し5mg/mL溶液を調整した。得られた溶液を、それぞれ106cm/hr、212cm/hr、424cm/hrの線速度でカラムにロードし、破過曲線を取得後、DBCを測定した。

### [3] 静的吸着量の測定

0.1mol/L 酢酸buffer (pH4.7) で平衡化した充填剤 1mLを300mL三角フラスコに入れ、ここに平衡化bufferで調整した化血研製ガンマグロブリン溶液 (濃度5mg/mL) を52mL添加した。得られた懸濁液を、

振とう恒温槽を用い、25℃で3時間(振とう速度：85min<sup>-1</sup>)振とうした。上清の残存IgG量をUV吸光度(280nm)の測定値から算出し、その値をIgGの総仕込み量から差し引いて充填剤の静的吸着量(Static binding capacity: SBC)とした。

#### [4] タンパク質溶出挙動

6mm I.D. × 4cmのステンレスカラムに各充填剤を充填し、ポンプに接続した。(東ソー製CCPM- ) 20mmol/Lリン酸buffer (pH7.0) にリボヌクレアーゼ A (10 mg/mL)、チトクロームC (3.5 mg/mL)、リゾチーム (6.5 mg/mL) を溶解しサンプル溶液を調整した。サンプル100 μLをカラムにロードし、リニアグラジエント条件でタンパク質を分離した。(グラジエント条件: buffer A 20mmol/Lリン酸buffer(pH7.0)、buffer B 20mmol/Lリン酸buffer (pH7.0) + 1.0mol/L NaCl、60分リニアグラジエント、流速1.0mL/min.) 測定装置はSC-8020 (東ソー製)を用いた。検出器はUV8020 (東ソー製)を用い280nmでモニターした。

#### [5] 圧力損失の測定

PEEKカラム (22mm I.D. × 20cm) に各種充填剤を充填した。充填溶媒は純水を用い、線速度400cm/hrで充填した。得られた充填カラムに純水を流しながら、各線速度での圧力を測定した。その値から空のカラムで測定した圧力を差し引いて充填剤の圧力損失とした。

### 3. 結果と考察

#### [1] ヒトIgGの動的吸着量

開発品Toyopearl GigaCap S-650Mの動的吸着量(DBC: Dynamic Binding Capacity)の評価は、医薬

品用途などで需要が多く、市場の成長率も大きいヒトIgGを用いて実施した<sup>4)</sup>。ヒトIgGとしてガンマガード(バクスター社製)を用いて評価を行ったが、アルブミンが少量含まれているため、r Protein Aカラムで精製したのち使用した。DBCの測定結果をTable 1に示した。Toyopearl GigaCap S-650Mは、東ソー既存品であるToyopearl SP650CやSP550Cよりも、大幅に抗体の吸着量が高くなり、市販の高吸着能充填剤と比較しても高い吸着能を有していることがわかった。DBCを測定したときの破過曲線をFig.1に示した。DBCは10%破過高さにおける溶出容量から計算した。

#### [2] ヒトIgGの静的吸着量

Toyopearl GigaCap S-650M及びToyopearl SP-650C、SP550CのSBCをバッチ方式で測定した。各充填剤のSBCとDBCの比較結果をFig.2に示した。Toyopearl既存品では、SBCに対するDBCの値は減少率50%以上と大きく低下した。これに対し、開発品である

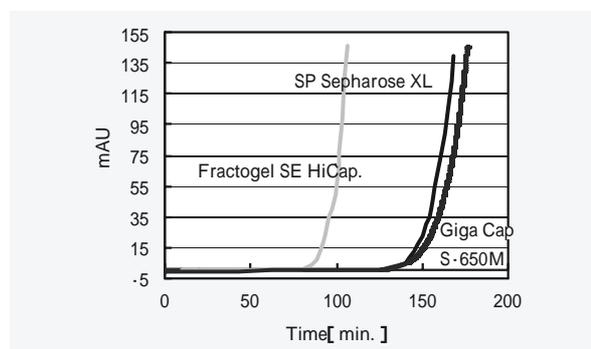


Fig. 1 10% height breakthrough curves of human IgG on cation exchange resins. Column size: 6mm I.D. × 4cm bed height. Sample: polyclonal human IgG (1mg/mL). Buffer: 0.1mol/L acetate buffer (pH 4.7). Flow velocity: 212 cm/hr. Detection: UV 280 nm

Table 1 Dynamic binding capacity for polyclonal human IgG

	Particle size (μm)	Ion exchange capacity (meq/mL)	Dynamic binding capacity (mg/mL-gel)	Recovery %
Toyopearl SP650C	50-150	0.12	12	98
Toyopearl SP550C	50-150	0.13	14	98
SP Sepharose XL	50-150	0.17	140	98
Fractogel SE HiCap	40-90	0.08	68	97
Toyopearl GigaCap S-650M	50-100	0.16	145	98

Dynamic binding capacity is determined from 10% breakthrough curve. Column size: 6 mm I.D. × 40mm height. Sample: polyclonal human IgG (1 mg/mL). Buffer: 0.1mol/L acetate buffer (pH4.7). Flow velocity: 212 cm/hr. Detection: UV 280 nm. Elution buffer: 0.1mol/L acetate buffer (pH4.7) + 1.0mol/L NaCl.

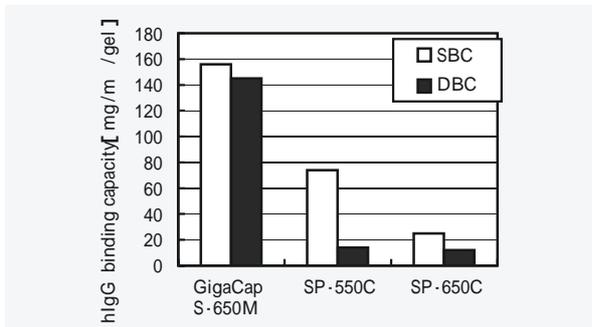


Fig. 2 Comparison between Static binding capacity and Dynamic binding capacity for human IgG.

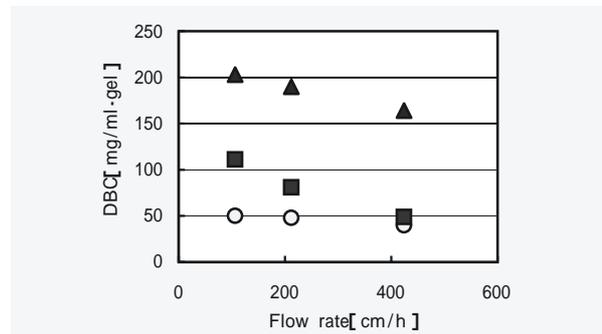


Fig. 3 Flow-rate dependence of Dynamic binding capacity for Lysozyme. : Giga Cap S-650M, : Toyopearl SP-550C, : Toyopearl SP-650M

GigaCap S-650MではDBCは殆ど低下せず、SBCと同等の値を示した。この結果より、開発品はタンパク質を動的に吸着させるような精製プロセスに適した充填剤であることがわかった。

Toyopearl既存品では、タンパク質の動的吸着条件下では、充填剤の細孔深部までタンパク質が拡散しにくいいため、細孔内部表面に固定化されたイオン交換基が十分に有効活用されず、結果としてSBCに比べDBCは大きく低下したものと考えられる。これに対し開発品では、動的吸着条件下でもイオン交換基がタンパク質に対し有効に作用するよう設計しているため、DBCの低下が小さいと推測している。

[ 3 ] リゾチーム動的吸着量の流速依存性

東ソー既存品及び開発品のリゾチームに対するDBCを測定した。リゾチームのDBCは、サンプル溶液の通液速度（線速度）を変えて測定した。結果をTable2に示した。GigaCap S-650MのDBC線速度依存性は、既存品であるToyopearl SP-650Mと同等であることを確認した（Fig.3）。但し、開発品は相対的にDBCの値が高く高流速下でも、そのDBC値の低下は小さかった。

[ 4 ] タンパク質の溶出挙動

開発品のタンパク質溶出挙動については、他社品の高吸着能充填剤と比較した。結果をFig.4に示したが、タンパク質としてはモデル物質としてリボヌクレアーゼA、チトクロームC、リゾチームに対する溶出挙動を比較した。タンパク質の分離溶出挙動は、NaClのリニアグラジエント溶出により測定した。開発品の溶出挙動は他社品であるSP Sepharose XLとほぼ同等の溶出挙動を示し、Fractogel SE HiCapの溶出挙動は、他の2つとは異なった。この分離選択性の相違は、イオン交換基導入状態の違いによるものと考えている。Fractogel SE HiCapは、スルホエチル基を有するイオン性モノマーを充填剤にグラフト重合することにより調整されている。このためイオン交換基は近接して導入され、タンパク質を多くのイオン交換基で吸着することで保持力が強くなり、分離選択性に影響したと推測している。

[ 5 ] 充填剤の物理的強度

物理的強度が小さい充填剤（柔らかい充填剤）は、大型カラムで使用すると充填剤が自重で圧縮され、細孔容積が減少し、吸着量の低下及びカラム閉塞などの問題が生じる。このような充填剤ではカラム高さを低

Table 2 Flow-rate dependence of Dynamic binding capacity for Lysozyme

	Particle size (μm)	Ion exchange capacity (meq/mL)	DBC at 106cm/hr (mg/mL-gel)	DBC at 212cm/hr (mg/mL-gel)	DBC at 424cm/hr (mg/mL-gel)
Toyopearl SP650M	40-90	0.13-0.17	50	48	40
Toyopearl SP550C	50-150	0.14-0.18	111	81	49
GigaCap S-650M	50-100	0.16	203	190	164

Column size : 6 mm I.D. x 4cm bed height. Sample : lysozyme (5mg/mL). Buffer : 50mmol/L glycine (pH9.0). Flow velocity : 106, 212, 424 cm/hr. Detection : UV 280 nm

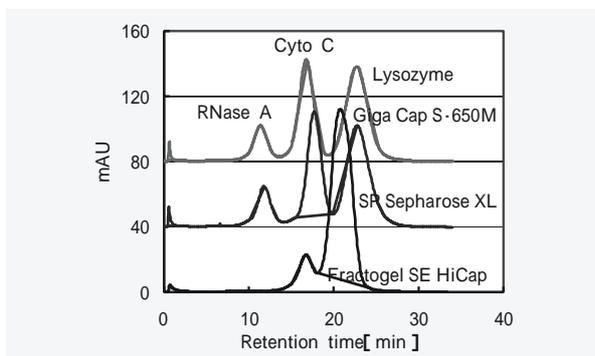


Fig. 4 Resolution of protein separation. Column size : 6mm I.D. × 4cm bed height. Flow-rate : 1.0 mL/min. Sample : ribonuclease A (10 mg/mL), cytochrome C (3.5 mg/mL) and lysozyme (6.5mg/mL). Sample load : 100  $\mu$ L. Gradient : 60-min linear gradient from buffer A to buffer B. Buffer A : 20mmol/L phosphate (pH 7.0). Buffer B : 20mmol/L phosphate + 1mol/L NaCl (pH7.0) Detection : UV (280nm)

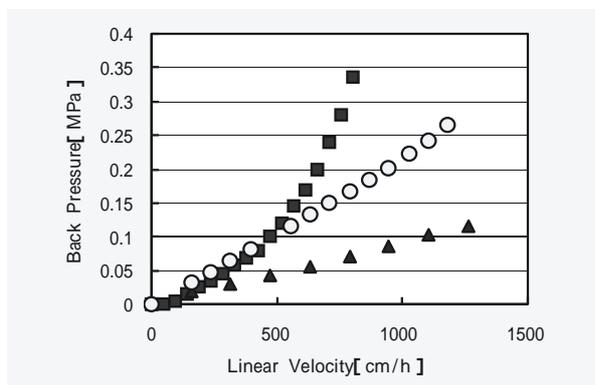


Fig. 5 Pressure-flow properties for cation exchange resins. Column size ; 22 mm I.D. × 20 cm. Mobile phase ; distilled water. Temp.; 25 °C ; Toyopearl Giga Cap S650M. : Toyopearl SP650M. : SP Sepharose XL

くし、流速を下げるが必要となるが、生産性の低下に繋がる。従って、生産規模の精製では、充填剤の物理的強度は重要な性能の一つとなっている。充填剤の物理的強度は、Fig. 5 に示すように、充填剤をカラムに充填した後、溶離液を流し、カラムの圧力損失を測定することで評価した。開発品は既存品、他社品と比較して高流速下でも圧力損失が小さく、大型カラムでの使用も可能である。

#### [6] アルカリ耐性

タンパク質の精製に使用された充填カラムは、非特異的に吸着し溶出してこないタンパク質を完全に脱着させるためや、カラムの殺菌のため、通常NaOHによる定置洗浄操作（CIP操作）が実施され、再使用される<sup>5)</sup>。この時、NaOHに対する安定性の低い充填

Table 3 CIP Study of GigaCap S-650M

	DBC for Lysozyme (g/L-resin)	
	Prior to NaOH	After 50 Cycles
GigaCap S-650M	167	163

Column cycled 50 times including a 1.0M NaOH cleaning (exposure time at least 1hr. per cycle) Flow-rate 280cm/hr

剤は、繰り返し使用している間に、その選択性や吸着能が低下することがある。通常、充填剤のアルカリ洗浄には0.5～1.0M NaOHが使用されているが、開発品のアルカリ安定性は1.0M NaOHを用い調査した。リゾチームのDBCを測定した後アルカリ洗浄を行い、50回繰り返し使用した前後での吸着能の変化を測定した。結果をTable 3に示した。結果より、開発品のアルカリ安定性は良好で、50サイクル使用した後もその吸着能は、殆ど低下しないことを確認した。

#### 4. まとめ

本検討では、タンパク質などの精製工程、特に Capture工程での使用に有益な、高い吸着能を有し、且つ高流速下でも使用可能な充填剤を開発することができた。本開発品の吸着能は、当社既存品である Toyopearl SPタイプと比較しても格段にその性能が改良されており、又他社品と比較しても、圧力損失が小さく、より高流速下での使用が可能であるという優れた特徴を有している事が確認できた。

本開発品を用いることによりタンパク質の精製速度が著しく速くなり、生産性が格段に向上することが期待できる。

#### 参考文献

- 1) Gail Sofer, *Handbook of Process Chromatography*, 10-55 (1997)
- 2) Arne Staby, Jan H. Jacobsen, *Journal of chromatography A*, 1118,168 (2006)
- 3) Kuniyo Inouye, Iori Ueno, *Biochem.*,131,97 (2002)
- 4) (財) 国際医学情報センター機関紙, 22(4), 27, (2002)
- 5) Kiessling Matthias, Mack Margot., *Analytical Sciences*, 7, 199 (1991)