

●高吸着型精製用担体 TOYOPEARL GigaCap シリーズの開発

バイオサイエンス事業部 開発部 セパレーションセンター

久保 雄二
中村 孝司
中谷 茂

1. 背景

近年、組み換え DNA 技術や細胞培養技術の急速な進歩に伴い、微量な生体タンパク質を多量に生産可能となり、タンパク質などバイオ医薬品の市場規模は大きく拡大した¹⁾。バイオ医薬品には、成長著しい免疫グロブリン G (IgG) を中心とした抗体医薬の他、酵素、インスリン等のホルモン、血液凝固因子、ワクチン、エリスロポエチン、サイトカイン、インターフェロンなどが挙げられる。これらバイオ医薬品の実用化に伴い、培養工程で製造されたタンパク質を液体クロマトグラフィーの原理に基づいて精製する分離精製用担体の需要も大きく伸び、その市場規模は全世界で 500 億円程度と推定されている。また、生産性向上のため培養工程における発現量が増加しており、同時に精製工程においても分離性能・生産性・コストパフォーマンスに優れた新しい分離精製用担体の開発が必要とされてきている。この問題点を解決する一つの効果的な方法が、精製用担体の高吸着容量化であり、この技術により、一度に精製可能な培養液処理量が多くなるため、精製工程での生産性を著しく改良することが可能となる²⁻⁵⁾。また、精製用担体の使用量の削減やカラムサイズの縮小、吸脱着溶媒、洗浄溶媒の削減などコストダウンも可能となる⁶⁾。

タンパク質の液体クロマトグラフィーは、分離モードによって主に以下の 5 種類に大別される。即ち、タンパク質を、そのサイズによって分離するサイズ排除クロマトグラフィー、抗体精製用 Protein A に代表されるアフィニティークロマトグラフィー、多くのタンパク質の精製に広く使用されるイオン交換クロマトグラフィー、疎水性リガンドを固定化した疎水性相互作用クロマトグラフィー、複数の相互作用を合わせ持つミックスモードクロマトグラフィーである^{6),7)}。当事業部では、これらの分離モード用担体として TOYOPEARL 及び TSKgel を製品化している。さらには近年、高吸着型 Protein A 担体、高吸着型イオン交換体 TOYOPEARL GigaCap シリーズ担体、高吸着型

疎水性相互作用クロマトグラフィー用担体、高吸着型ミックスモードクロマトグラフィー用担体等の新規高性能担体を製品化してきた。この中で、特に汎用性の高い高吸着型イオン交換体 TOYOPEARL GigaCap シリーズ担体については、スルホン酸基やカルボキシル基を有する強、弱カチオン交換体、4 級アンモニウム基を有する強アニオン交換体を製品化してきた⁸⁾。本稿では、新たに開発したジエチルアミノエチル基を官能基として有する弱アニオン交換体 TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M、また粒子サイズを小さくすることで分離能を更に改善した TOYOPEARL GigaCap シリーズ S グレードの基本的性能について報告する。

2. 実験項

[1] 試薬、充填剤

ガンマグロブリン (ポリクローナルヒト IgG) 及び牛血清アルブミン、インスリン、トランスフェリン、オブアルブミン、トリプシンインヒビター、リボヌクレアーゼ A、チトクローム C、リゾチーム等のタンパク質や酢酸、酢酸ナトリウム、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、NaCl、NaOH などの試薬は和光純薬(株)から購入した。Capto DEAE、SP Sepharose HP、Capto SP ImpRes、Q Sepharose HP、Capto Q ImpRes は GE Healthcare 社(株)製の製品を用いた。Fractogel EMD DEAE は Merck 社(株)製の製品を用いた。TOYOPEARL は東ソー(株)製の製品を用いた。

[2] 動的吸着量の測定

各種精製用担体を、それぞれ 6 mm I.D. × 40 mm のステンレス製カラムに充填し用いた。吸着緩衝液には、カチオン交換体の場合、0.05 mol/L 酢酸ナトリウム (pH4.7) を用い、アニオン交換体の場合、0.05 mol/L トリス塩酸 (pH8.5) を用いた。タンパク質として、カチオン交換体の場合はガンマグロブリンを用い、アニオン交換体の場合はウシ血清アルブミンを用いて、上記の吸着緩衝液へ溶解し 1 mg/mL の濃度へ

調整した。充填したカラムへ送液ポンプと UV 検出器 (280 nm) を接続し、調整したタンパク質溶液を線速度 212 cm/h の流速で負荷させた。得られた吸着破過曲線から、充填剤の動的吸着容量 (Dynamic binding capacity : DBC) を算出した。吸着させたタンパク質は脱着し、その回収液の UV 吸光度から、タンパク質の回収率を計算した。

[3] 静的吸着量の測定

カチオン交換体はゲル 1 mL、アニオン交換体はゲル 3 mL を計量し、300 mL 三角フラスコへ投入し用いた。吸着緩衝液およびタンパク質は、上記 [2] 記載の物質と同じものを用いた。それぞれ、タンパク質負荷溶液濃度が 10 mg/mL、全タンパク質負荷量 210 mg/mL-gel となるように、上記三角フラスコ中へタンパク質と吸着緩衝液を投入した。得られた反応スラリーを室温で 3 時間攪拌後、上清中に含まれる未吸着タンパク質量を UV 吸光光度計で定量し、その数値から静的吸着容量 (Static binding capacity : SBC) を計算した。

[4] タンパク質分離選択性の測定

各種精製用担体を、それぞれ 7.5 mm I.D. × 75 mm のステンレス製カラムに充填し用いた。溶離液には、カチオン交換体の場合、緩衝液 A として 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) を用い、緩衝液 B として 1.0 mol/L の塩化ナトリウムを含む 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて、A 液 100% から B 液 100% まで 60 分リニアグラジエントのグラジエント勾配でタンパク質を分離した。アニオン交換体の場合、緩衝液 A として 0.05 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用い、緩衝液 B として 1.0 mol/L の塩化ナトリウムを含む 0.05 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) を用いて、A 液 100% から B 液 100% まで 120 分リニアグラジエントのグラジエント勾配でタンパク質を分離した。タンパク質として、カチオン交換体の場合、リボヌクレアーゼ A、チトクローム C、リゾチームを用い分離選択性を測定した。アニオン交換体の場合、トランスフェリン、オブアルブミン、トリプシンインヒビターを用いて分離選択性を測定した。またインスリン、モノクローナル抗体のアニオン交換体による分離では、トリス塩酸緩衝液を用いてリニアグラジエント条件で測定した。

[5] タンパク質サイズの動的吸着容量への影響測定

各種アニオン交換クロマトグラフィー精製用担体

を、それぞれ 6 mm I.D. × 40 mm のステンレス製カラムに充填し用いた。タンパク質として牛血清アルブミンを用いた場合、上記 [2] 記載の方法と同一の方法で動的吸着容量を測定した。一方、タンパク質としてガンマグロブリンを用いた場合は、吸着緩衝液には 0.015 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.7) を用い同様な方法で測定した。

[6] 充填剤の使用耐久性の測定

6 mm I.D. × 40 mm のステンレス製カラムに各精製用担体を充填し、ガンマグロブリンまたは牛血清アルブミンの動的吸着容量を測定した。動的吸着容量は、上記 [2] 記載の方法と同じ方法で測定した。吸着タンパク質を脱着させ、その後、アルカリ洗浄液で洗浄した。アルカリ洗浄条件は、0.5 mol/L NaOH 溶液を洗浄液として用い、流速 0.5 ml/min. で 1 時間洗浄した。次いで吸着緩衝液を用い 30 分洗浄した。これを洗浄 1 サイクルとし、所定の回数洗浄後、再度吸着容量の測定を繰り返した。洗浄回数は 100 回実施した。

3. 結果と考察

[1] TOYOPEARL GigaCap シリーズ精製用担体の新グレードの製品化

タンパク質等バイオ医薬品の製造プロセスは、初期の培養工程とその後の精製工程に大別される。精製工程では、医薬品中への不純物の混入を避けるため、高純度での精製が要求されている。そのため精製工程は、キャプチャー工程、中間精製工程、最終精製工程の 3 工程で実施することが一般的に推奨されている⁹⁾。これら精製工程では、各種精製用担体を数十～数百リットルの大型カラムへ充填し、液体クロマトグラフィーの原理によって不純物と目的成分の分離が行われる。

我々は、この精製工程の生産性や製造コストの削減が可能となる高吸着型精製用担体 TOYOPEARL GigaCap シリーズの製品化を行ってきたが、新たに官能基としてジエチルアミノ基を有する弱アニオン交換体 TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M、及び粒子サイズを小さくすることで分離能を更に改善した TOYOPEARL GigaCap シリーズ S グレードを製品化した。DEAE タイプについては、既存製品である TOYOPEARL DEAE-650M が FactorVIII 等の中間精製に用いられているが、処理能力が不十分であったため、今回、高吸着型の担体を新たに製品化した。S グレードに関しては、最終精製工程などでの不純物の分離能改善を目的として、より高純度に精製可能な高吸

着型のグレードとして新たに製品化した。

[2] タンパク質の吸着容量

それぞれの新規製品の各種タンパク質に対する吸着容量を評価した。結果を **Table 1**、**Table 2**、**Table 3** に示した。いずれの製品も既存製品にくらべ高い吸着容量を有していることを確認した。

[3] タンパク質の分離選択性

それぞれの新規製品の各種モデルタンパク質に対する分離選択性を評価した。結果を **Fig. 1**、**Fig. 2**、**Fig. 3**、**Fig. 4** に示した。**Fig. 1**、**Fig. 2** では DEAE タイプの分離選択性を評価したが、DEAE タイプは、既に製品化されている Q タイプとは分離選択性が異なり、顧客の用途に応じた選択肢の広がり期待でき

Table 1 Comparison of dynamic binding capacity^a for bovine serum albumin on weak anion exchanger

Resin	Particle size [μ m]	Ion exchange capacity [meq/mL]	Dynamic binding capacity ^b [mg/mL-gel]	Recovery ^b [%]	Static binding capacity ^c [mg/mL-gel]
TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	50-100	0.23	165	100	179
TOYOPEARL DEAE-650M	40-90	0.11	25	97	30
Capto DEAE	90	0.29-0.35	140	96	143
Fractogel EMD DEAE (M)	40-90	-	-	-	52

^a Dynamic binding capacities were determined at 10% breakthrough curve. Column size: 6 mm I.D. $\times$ 40 mm height. Sample: bovine serum albumin 1 mg/mL. Flow velocity: 212 cm/hr. Detection: UV at 280 nm.

^b Binding buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5.

Elution buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5, 0.5 mol/L sodium chloride.

^c Binding buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5.

Table 2 Comparison of dynamic binding capacity^a for gamma-globulin on cation exchange resin

Resin	Particle size [μ m]	Ion exchange capacity [meq/mL]	Dynamic binding capacity ^b [mg/mL-gel]	Recovery ^b [%]	Static binding capacity ^c [mg/mL-gel]
TOYOPEARL GigaCap S-650S	20-50	0.24	164	99	177
TOYOPEARL SP-650S	20-50	0.16	-	-	47 ^d
TOYOPEARL GigaCap S-650M	50-100	0.16	145	98	156
TOYOPEARL GigaCap CM-650M	50-100	0.24	100	97	120
SP Sepharose HP	24-44	0.15	65	100	105
Capto SP ImpRes	36-44	0.12	27	100	89

^a Dynamic binding capacities were determined at 10% breakthrough curve. Column size: 6 mm I.D. $\times$ 40 mm height. Sample: gamma-globulin 1 mg/mL. Flow velocity: 212 cm/hr. Detection: UV at 280 nm.

^b Binding buffer: 0.05 mol/L sodium acetate buffer, pH 4.7.

Elution buffer: 0.05 mol/L sodium acetate buffer, pH 4.7, 0.5 mol/L sodium chloride.

^c Sample: gamma-globulin. Binding buffer: 0.05 mol/L sodium acetate buffer, pH 4.7.

^d Sample: Lysozyme. Binding buffer: 0.02 mol/L phosphate buffer, pH 6.0.

Table 3 Comparison of dynamic binding capacity^a for bovine serum albumin on anion exchanger

Resin	Particle size [μ m]	Ion exchange capacity [meq/mL]	Dynamic binding capacity ^b [mg/mL-gel]	Recovery ^b [%]	Static binding capacity ^c [mg/mL-gel]
TOYOPEARL GigaCap Q-650S	20-50	0.20	191	99	200
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	50-100	0.17	172	97	191
Q Sepharose HP	24-44	0.15	81	99	114
Capto Q ImpRes	36-44	0.12	40	100	92

^a Dynamic binding capacities were determined at 10% breakthrough curve. Column size: 6 mm I.D. $\times$ 40 mm height. Sample: bovine serum albumin 1 mg/mL. Flow velocity: 212 cm/hr. Detection: UV at 280 nm.

^b Binding buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5.

Elution buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5, 0.5 mol/L sodium chloride.

^c Binding buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5.

る。Sグレードのカチオン交換及びアニオン交換タイプの評価結果を Fig. 3、Fig. 4 に示したが、Mグレードに比べ溶出ピークは、よりシャープ化されており、微量不純物の分離能が改善されている。最終精製工程での精密分離用途での利用が期待される。

[4] タンパク質サイズの動的吸着容量への影響

各種アニオン交換体のタンパク質サイズの動的吸着容量への影響を測定した。結果を Table 4 に示したが、TOYOPEARL GigaCap シリーズ担体は、サイズの大きいタンパク質を用いても既存製品にくらべ十分に高い吸着容量を有することを確認した。これにより、タ

ンパク質サイズによらず、種々のタンパク質の精製に利用可能であると考えられる。

[5] 充填剤の使用耐久性

一般的にタンパク質の精製に使用されたカラムは、タンパク質の吸着・脱着操作の後、カラムの殺菌のため、NaOH による洗浄操作（CIP 操作：Cleaning in place）が行われ、再利用される¹⁰⁾。この時、NaOH に対する安定性が低いと、充填剤の選択性や吸着能が低下し、その結果充填剤の交換頻度が高くなるため、タンパク質医薬品の製造コストが高くなる。ここでは、アルカリ性洗浄液として、0.5 mol/L NaOH を使用し

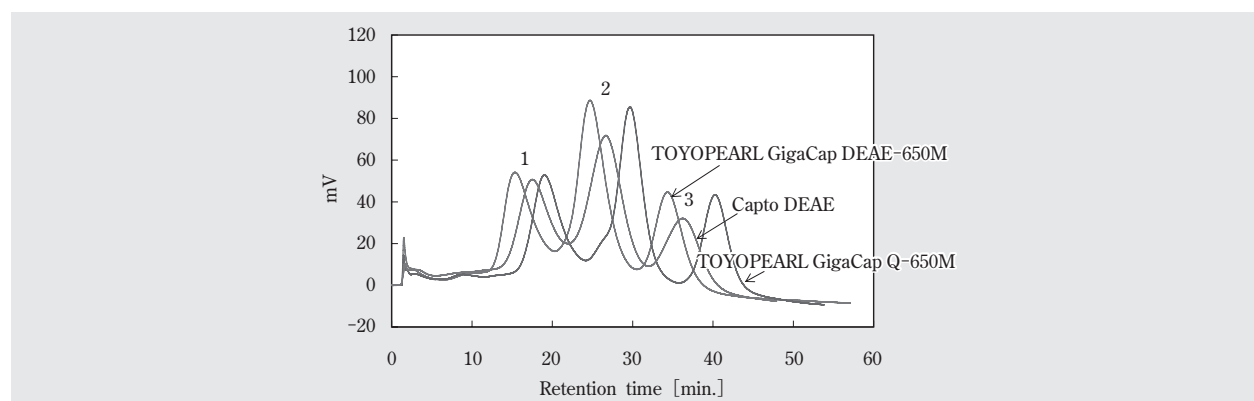


Fig. 1 Protein selectivity of TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M
Column size: 7.5mm I.D.×75 mm height. Buffer A: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5. Buffer B: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5, 1.0 mol/L sodium chloride. Gradient: 120 min. linear gradient from buffer A 100% to buffer B 100%. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: UV at 280 nm. Sample: 1. transferrin 2.9 mg/mL, 2. ovalbumin 6.5 mg/mL, 3. trypsin inhibitor 10.0 mg/mL. Injection volume : 100 μ L.

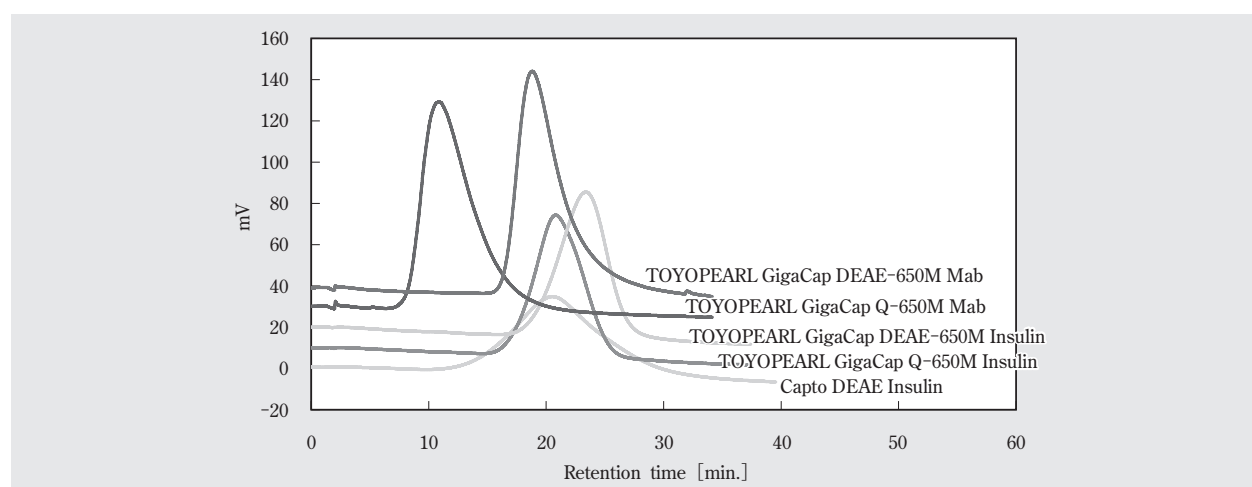


Fig. 2 Protein selectivity of various proteins on TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M
Column size: 7.5mm I.D.×75 mm height. Insulin separation : Buffer A 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5. Buffer B 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5, 1.0 mol/L sodium chloride. Gradient 60min. linear gradient from buffer A 100% to buffer B 100%. Flow rate 1.0 mL/min. Detection UV at 280 nm. Sample Insulin 4.9 mg/mL. Injection volume 100 μ L. Monoclonal antibody separation : Buffer A 0.015 mol/L Tris-HCl, pH 8.7. Buffer B 0.015 mol/L Tris-HCl, pH 8.7, 0.5 mol/L sodium chloride. Gradient 60min. linear gradient from buffer A 100% to buffer B 100%. Flow rate 1.0 mL/min. Detection UV at 280 nm. Sample monoclonal antibody 4.5 mg/mL. Injection volume 100 μ L.

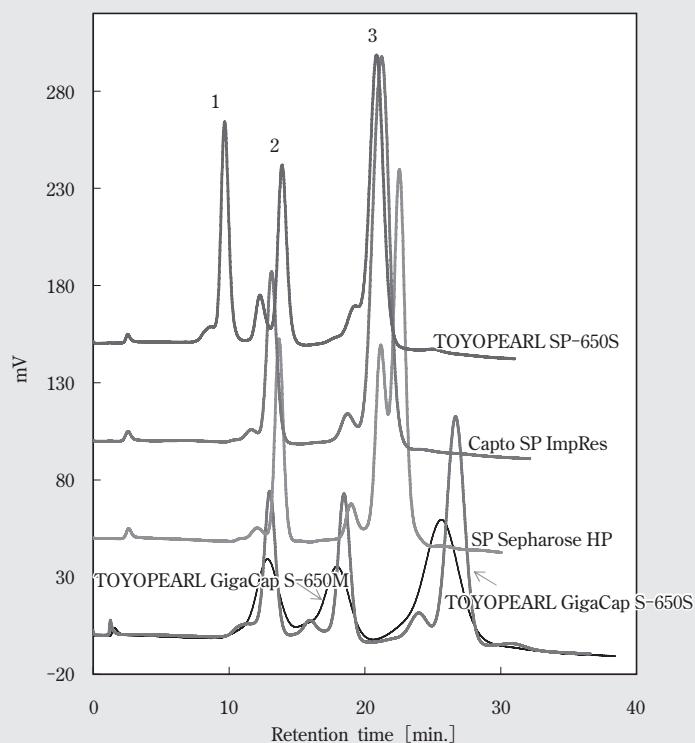


Fig. 3 Protein selectivity of TOYOPEARL GigaCap S-650S

Column size: 7.5 mm I.D.×75 mm height. Buffer A: 0.02 mol/L phosphate buffer, pH 7.0. Buffer B: 0.02 mol/L phosphate buffer, pH 7.0, 1.0 mol/L sodium chloride. Gradient: 60 min. linear gradient from buffer A 100% to buffer B 100%. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: UV at 280 nm. Sample: 1. ribonuclease A 9.8 mg/mL, 2. cytochrome C 3.6 mg/mL, 3. lysozyme 6.4

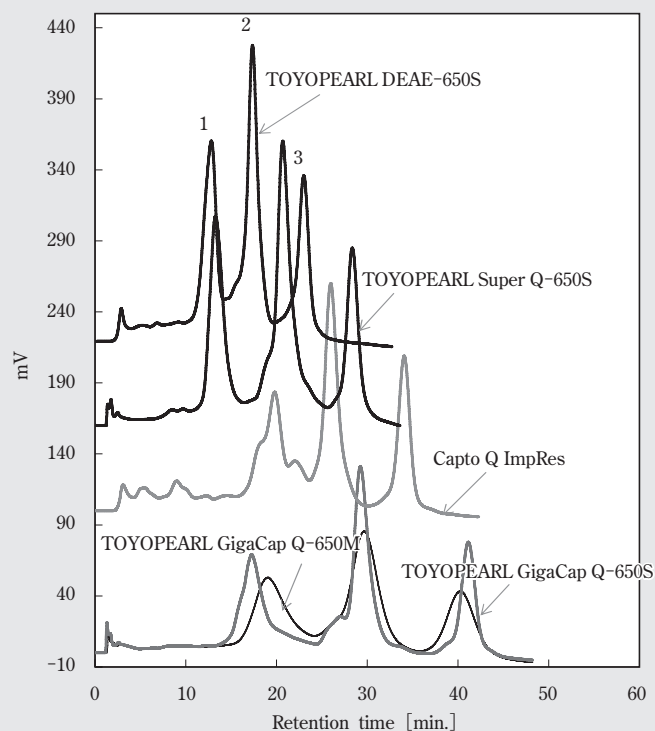


Fig. 4 Protein selectivity of TOYOPEARL GigaCap Q-650S

Column size: 7.5 mm I.D.×75 mm height. Buffer A: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5. Buffer B: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.5, 1.0 mol/L sodium chloride. Gradient: 120 min. linear gradient from buffer A 100% to buffer B 100%. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: UV at 280 nm. Sample: 1. transferrin 2.9 mg/mL, 2. ovalbumin 6.5 mg/mL, 3. trypsin inhibitor 10.0 mg/mL. Injection volume : 100 μ L.

Table 4 Effect of protein size on dynamic binding capacity^a of anion exchanger

Resin	Dynamic binding capacity (g/L)	
	BSA ^b 66kDa	gamma-globulin ^c 160kDa
TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M	170	103
TOYOPEARL GigaCap Q-650S	181	92
TOYOPEARL GigaCap Q-650M	173	104
TOYOPEARL Q-600C AR	108	90
TOYOPEARL Super Q-650M	145	13
TOYOPEARL QAE-550C	29	32
TOYOPEARL DEAE-650M	25	51

^a Dynamic binding capacities were determined at 10% breakthrough curve.
Column size: 6 mm I.D. × 40 mm height. Flow velocity: 212 cm/hr.

Detection: UV at 280 nm.

^b Sample: bovine serum albumin 1 mg/mL. Binding buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.5.

^c Sample: gamma-globulin 1 mg/mL. Binding buffer: 0.015 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.7.

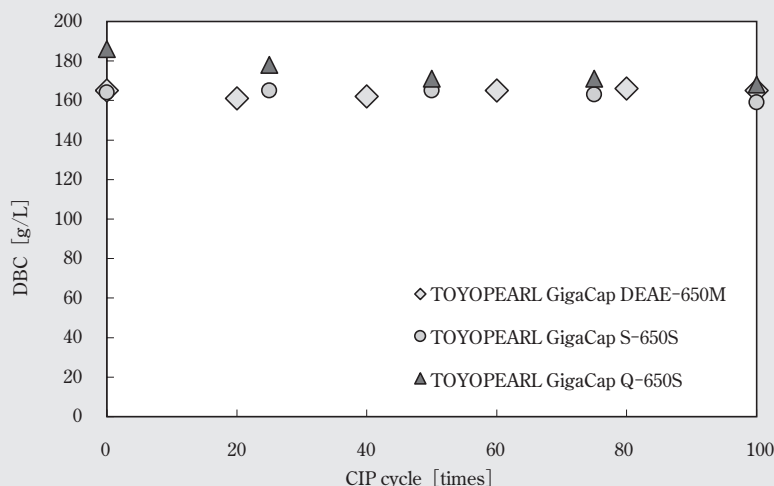


Fig. 5 Cleaning in place stability test
CIP conditions; Alkaline washing solution: 0.5 mol/L sodium hydroxyde. Washing flow rate: 0.5 ml/min. Alkaline washing time: 1h. DBC conditions; Column size: 6 mm I.D.×40 mm height. Sample: gamma-globulin 1 mg/mL for cation exchanger. BSA 1 mg/mL for anion exchanger. Binding buffer: 0.05 mol/L sodium acetate buffer pH4.7 for cation exchanger. 0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.5 for anion exchanger. Flow linear velocity: 212 cm/hr. Detection: UV at 280 nm.

て、その繰り返し使用耐久性を評価した。結果を **Fig. 5** に示した。タンパク質動的吸着容量の変化を確認したが、100回の洗浄操作の後でも吸着能の変化は認められなかった。

4. まとめ

本稿では、タンパク質等バイオ医薬品の精製効率化に有効な TOYOPEARL GigaCap シリーズ精製用担体の新製品の性能を紹介した。弱アニオン交換体 TOYOPEARL GigaCap DEAE-650M は、ジエチルア

ミノエチル基を有する新規高吸着型イオン交換体であり、一方、TOYOPEARL GigaCap シリーズ S グレードは、粒子サイズを小さくすることにより更なる高分離能化を達成した高吸着型イオン交換体である。タンパク質等バイオ医薬品の生産性の向上及び製造コスト削減、精製純度の改善に寄与することが期待される。

引用文献

- 1) 山口照英, Bio Industry, 30, 1, 47-53 (2013)
- 2) B. Lain, Bioprocess International, 26-34 (2009)

-
- 3) Gail Sofer, Handbook of Process Chromatography, 27-113 (1997)
 - 4) 山本修一, 生物工学ハンドブック, 480-512 (2005)
 - 5) K. Wrzosek, Journal of chromatography A, 1218, 6987-6994 (2011)
 - 6) U. Gottschalk, Process scale purification of antibodies, 1-254 (2009)
 - 7) P. Gagnon, Journal of chromatography A, 1221, 57-70 (2012)
 - 8) 久保雄二, 分離技術, 38, 4, 16-19 (2008)
 - 9) 石原尚, バイオプロダクション, 151-156 (2006)
 - 10) S. Ahuja, Handbook of Bioseparations (2000)