

# ●高吸着型新規プロテイン A 充填剤の開発

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

藤井 智  
中村 孝  
中谷 司  
中谷 茂

## 1. はじめに

近年のバイオ医薬品市場の成長は著しく、2002年に4000億円弱であった市場が2012年には1兆円に近づきつつある。これには特に抗体医薬品の市場拡大が大きく貢献し、2012年の抗体医薬品市場は4000億円にまで成長している。抗体医薬品は人の防御機構である免疫システムを利用したものであり、高純度で特異性の高いモノクローナル抗体は疾患に関係する抗原だけを特異的に認識して結合する性質を持ち、多くの診断や治療の現場で使用されている<sup>1), 2)</sup>。抗体医薬品は製造コストが高くかつ治療に際し大量投与が必要のため、治療費用の点で患者負担が大きいのが難点となっており、製造コスト低減が望まれている。抗体医薬品の製造工程は培養と精製工程からなっているが、培養工程では培養技術の進歩により、従来培養液1L当たり1g未満の発現量から10gまで大幅に向上してきた。一方、精製効率はあまり向上しておらず、高コストの一因といわれている。図1は抗体医薬品の製造プロセスの一例を示したが、いわゆるプラットフォーム精製プロセスといわれている。抗体医薬品は動物細胞を用いて製造されるが、培養細胞分離後、粗精製工程としてProtein Aアフィニティークロマトグラフィーが使用される。その後、ウイルス不活化処理され、中間精製、最終精製工程、ウイルス除去を経て製剤化される<sup>3), 4)</sup>。

Protein Aとは黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するタンパク質で、抗体のFc領域に結合する性質を有するため、充填剤に固定化され抗体の精製に使用されて

きた。特長は抗体に高い選択性を有するため高純度、高回収率で抗体を精製でき、後工程への影響も小さく、種々の細胞培養液に適応可能なことである。一方、課題としてはアルカリ耐久性が低いこと、吸着量が低いこと、リガンドが漏れやすいこと等が挙げられる。

当事業部では、Protein Aアフィニティークロマトグラフィー用充填剤としてアルカリ耐久性を向上させたTOYOPEARL® AF-rProtein A-650Fを2010年に商品化したが、ユーザーからは吸着量のさらなる向上が要望されていた。今回、アルカリ耐久性を維持しつつ、吸着量を向上させるとともに、リガンドの漏れを抑えたTOYOPEARL AF-rProtein A HC-650Fを商品化した。本稿では新商品の基本的な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）、リン酸二水素ナトリウム・二水和物、クエン酸・一水和物、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウムなどの試薬は和光純薬株から購入した。

モノクローナル抗体および細胞培養液は、Tosoh Bioscience GmbH（ドイツ）から提供を受けた。

### [2] 静的吸着量の測定

メスピペット内に沈降させて秤量したAF-rProtein A HC-650F（約1 mL）を二方コックを取り付けたディスポーザブルカラムに移し、充填剤の7.5倍量の0.1 mol/Lクエン酸緩衝液（pH 3.0）で洗浄後、充填剤の10倍量の0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）で

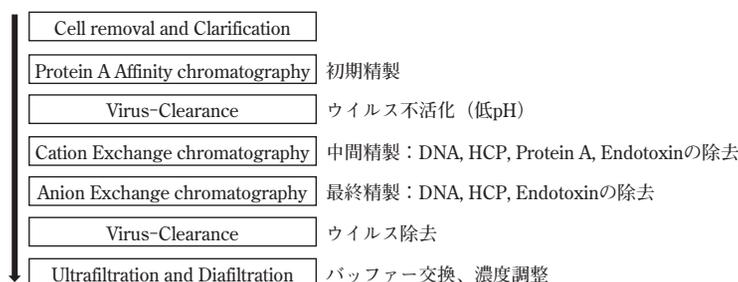


図1 抗体医薬品の製造プロセス例

平衡化した。ガンマグロブリン 150 mg と 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加して、充填剤 1 mL あたりガンマグロブリンが 20 mg となるように調整後、25°C で 90 min 振盪して吸着させた。脱液後、充填剤の 10 倍量の 0.02 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) で充填剤を洗浄した。充填剤の 7.5 倍量の 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で吸着したガンマグロブリンを溶出させて溶出液を 250 mL メスフラスコに収集した。メスアップ後、280 nm の UV 吸光度を求め、その数値、抗体の吸光度係数及び充填剤量から静的吸着量 (Static binding capacity : SBC) を計算した。

### [3] 動的吸着量の測定

充填剤を 5 mmI.D. × 50 mm のガラスカラムに充填して用いた。吸着液に 0.02 mol/L リン酸、0.15 mol/L NaCl 緩衝液 (pH 7.4) を、脱着液に 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) を用いた。上記吸着緩衝液にガンマグロブリンを希釈して濃度 1、5 および 10 mg/mL の吸着液を調製した。充填したカラムに送液ポンプと UV 検出器を接続し、吸着液で平衡化後、調製したガンマグロブリン溶液を 0.2、0.3 および 0.5 mL/min で負荷した。負荷濃度の 10% 破過容量から、充填剤の動的吸着量 (Dynamic binding capacity : DBC) を算出した。

### [4] 細胞培養液からの抗体の分離精製

充填剤を 5 mmI.D. × 50 mm のガラスカラムに充填して用いた。吸着液に 0.02 mol/L リン酸、0.15 mol/L NaCl 緩衝液 (pH 7.4) を、溶出液に 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) を、洗浄液に 0.1 mol/L NaOH を用いた。充填したカラムに送液ポンプと UV 検出器を接続し、吸着液で平衡化後、モノクローナル抗体と細胞培養液から調製した抗体濃度既知の細胞培養液を一定量負荷させ、素通り画分を溶出させて、クロマトグラムのベースラインが下がるまで吸着液で洗浄した。次に溶出液 5 mL をカラムに負荷させ吸着物を溶出させ、メスシリンダーに回収した。回収した溶出画分の溶出量と吸光度から求めた回収量と負荷した抗体量から回収率を求めた。さらに、回収した溶出画分をサイズ排除クロマトグラフィー分析より抗体のピーク面積比率から回収画分純度を求めた。

### [5] 充填剤のアルカリ耐久性

充填剤を 5 mmI.D. × 50 mm のガラスカラムに充填して 0.1 mol/L NaOH を用いた Cleaning in place (CIP) によりアルカリ耐久性を評価した。吸着液に 0.02 mol/L リン酸、0.15 mol/L NaCl 緩衝液 (pH 7.4) を、溶出液に 0.1 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) を、洗浄液に 0.1 mol/L NaOH を用いて吸着工程 (10

Column volume (10 CV))、溶出工程 (5 CV)、平衡化工程 (吸着液 7 CV)、洗浄工程 3 CV、15 分)、平衡化工程 (5 CV) のサイクルを繰り返した。20 回の繰返し毎に抗体濃度 5 mg/mL の吸着液で 10% 破過の動的吸着量を測定した。

### [6] カラム圧力損失

22 mmI.D. × 30 cm リザーバーを取り付けた 22 mmI.D. × 20 cm のポリカーボネート製カラム (出入口フィルター : 10 μm) を 50% スラリー濃度の充填剤で満たし、純水 10 mL/min で充填した。20 分後、純水の送液を止めて、カラム圧力が大気圧まで低下した後、カラムをリザーバーと切り離し、入口側フィルターを取り付けてカラムを作製した。定量ポンプの送液ラインにカラム入口と並行にデジタル圧力計を取り付け、純水を送液して 1 分後の圧力計指示値を読み取った。さらに、ポンプの流速設定値を変更し、1 分後の圧力計指示値を読み取った。この操作を繰り返して、流速と圧力の関係を調べた。また、充填剤を含まない空カラムを接続した場合のシステム圧力損失をそれぞれの流速であらかじめ測定しておき、測定したカラム圧力損失から、システム圧力損失を引いて正味のカラム圧力損失を求めた。

## 3. 結果と考察

### [1] 高吸着型 AF-rProtein A HC-650F の商品化

表 1 に今回開発した AF-rProtein A HC-650F と旧タイプの比較を示す。粒子径は同一とし、吸着量を向上させるために基材のポロシティーすなわち空孔率を大きくした。また、リガンドである Protein A は、改変型 IgG 結合ドメインの六量体で、抗体に対する配向性も改良されたものを使用した。Protein A は両者とも多点結合により基材に結合させた。これらの改良により新商品は旧タイプの 1.6 倍の静的吸着量を有していることを確認した。

### [2] 抗体の動的吸着量

抗体の粗精製工程では抗体を速やかに分離・濃縮することを目的としている。充填剤の能力は処理速度と処理容量が重要な因子となり、動的吸着量は充填剤の能力を示す重要な指標となる。

2010 年に商品化した AF-rProtein A-650F と今回商品化した AF-rProtein A HC-650F 及び競合品の抗体の動的吸着量を IgG 濃度 = 1 mg/mL、カラム内滞留時間 2、3.3、5 min で評価した。結果を図 2 に示した。各滞留時間で既存製品 (AF-rProtein A-650F) に比べ 1.6 倍以上の高い吸着量を有していることを確認した。

表1 TOYOPEARL AF-rProtein A-650F と AF-rProtein A HC-650F の IgG 静的吸着量比較

	rProtein A-650F	rProtein A HC-650F
担体	TOYOPEARL	TOYOPEARL
粒子径 [μm]	30-60	30-60
空孔率 [%]	76	86
固定化リガンド	組換え Protein A (改変型 C ドメイン四量体)	組換え Protein A (改変型 C ドメイン六量体) 配向性改良型
結合方法	多点結合	多点結合
IgG 静的吸着量 [g/L]	50	80

吸着液：0.1 mol/L リン酸緩衝液、pH 7.0  
 脱着液：0.1 mol/L クエン酸緩衝液、pH 3.0

また、IgG 濃度 = 5、10 mg/mL の試料の動的吸着量を IgG 濃度 = 1 mg/mL の結果と合わせて、図 3 に示した。負荷する抗体濃度が増加しても動的吸着量が低下することはなかった。

[3] 細胞培養液からの抗体の分離精製

抗体を含む細胞培養液を負荷して素通り画分を溶出

後、吸着成分を溶出させたクロマトグラムを図 4 に示す。回収した溶出画分の溶出量と吸光度から求めた抗体の回収率は 98.5% であった。さらに、回収した溶出画分を分析したサイズ排除クロマトグラフィーの抗体のピーク面積比率は 97.4% であった。クロマトグラムを図 5 に示す。

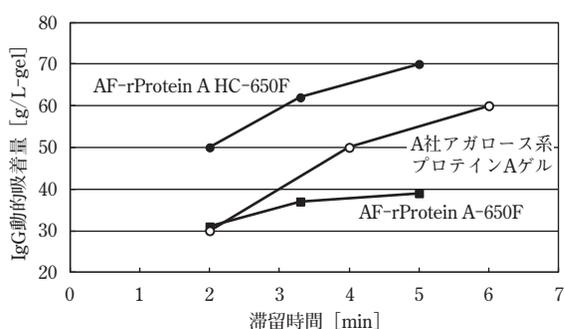


図 2 TOYOPEARL AF-rProtein A-650F と AF-rProtein A HC-650F の IgG 動的吸着量  
 カラムサイズ：5 mmI.D.×50 mm (充填剤量：1 mL)  
 負荷IgG：1 mg/mL (0.02 mol/Lリン酸、0.15 mol/L NaCl、pH 7.4)  
 動的吸着容量：10%破過量

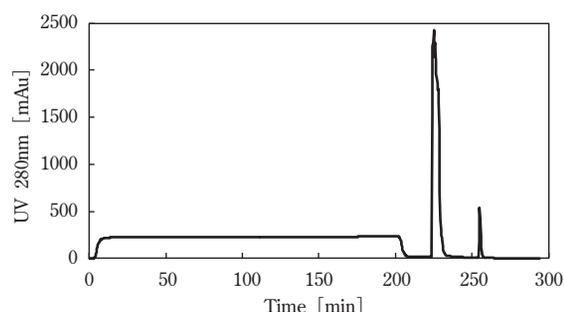


図 4 細胞培養液からの抗体の分離精製  
 カラムサイズ：5 mmI.D.×50 mm (充填剤量：1 mL)  
 流速：0.2 mL/min.  
 試料：1.0 g/L ヒト化IgG1/40 mL 細胞培養液  
 吸着液：0.02 mol/Lリン酸、0.15 mol/L NaCl緩衝液、pH 7.4  
 溶出液：0.1 mol/Lクエン酸緩衝液、pH 3.0  
 洗浄液：0.1 mol/L NaOH  
 検出：UV 280 nm

図 2 TOYOPEARL AF-rProtein A-650F と AF-rProtein A HC-650F の IgG 動的吸着量

図 4 細胞培養液からの抗体の分離精製

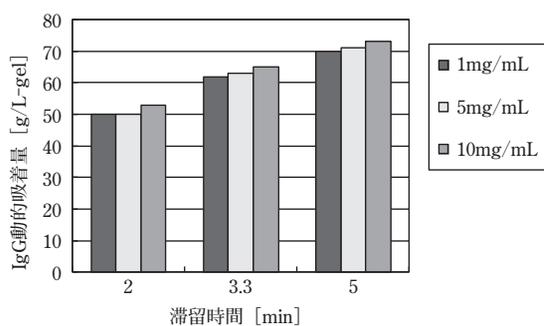


図 3 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F の IgG 動的吸着量  
 IgG 負荷濃度の影響  
 カラムサイズ：5 mmI.D.×50 mm (充填剤量：1 mL)  
 負荷IgG溶液：0.02 mol/Lリン酸、0.15 mol/L NaCl緩衝液、pH 7.4  
 動的吸着量：10%破過容量

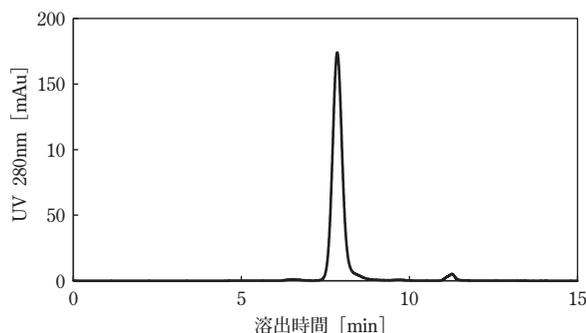


図 5 精製抗体のサイズ排除クロマトグラフィー分析  
 カラム：TSKgel G3000SW<sub>XL</sub>, 7.8 mmI.D.×30 cm  
 流速：1.0 mL/min.  
 溶出液：0.1 mol/Lリン酸、0.3 mol/L NaCl、pH 6.8  
 試料：抗体画分、2 μL  
 検出：UV 280 nm

図 3 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F の IgG 動的吸着量  
 IgG 負荷濃度の影響

図 5 精製抗体のサイズ排除クロマトグラフィー分析

#### [4] 充填剤のアルカリ耐久性

抗体を溶出させた後の充填剤の洗浄には、細胞培養液由来の汚染物質を除去するためにアルカリ性水溶液などの使用が望ましい。AF-rProtein A HC-650Fの0.1 mol/L NaOHのCIP繰り返しによる動的吸着量変化を図6に示す。0.1 mol/L NaOHによるCIP繰り返しでは200回繰り返し後の動的吸着量変化は10%以下であり、安価で効率的なアルカリ溶液に対する耐久性が高いことを確認した。

#### [5] カラム圧力損失

22 mmI.D. × 20 cm カラムサイズのAF-rProtein A HC-650FとAF-rProtein A-650F充填剤のカラム圧力損失を図7に示す。AF-rProtein A HC-650Fのカラム圧力損失はAF-rProtein A-650Fに比べて高線速度領域で若干高くなるが、線速度=500 cm/hr程度までは同等であり、0.1 MPa以下である。Protein A充填剤を用いて行う抗体の吸着、溶出は、一般的に20~25 cm ベッド高さのカラムを用いて、滞留時間3~6分で行われており、カラム高さ20 cmの場合、滞留時間3分は線速度=400 cm/hrに、滞留時間6

分は線速度=200 cm/hrに相当する。AF-rProtein A HC-650F充填剤はこの線速度領域で使用できることを確認した。

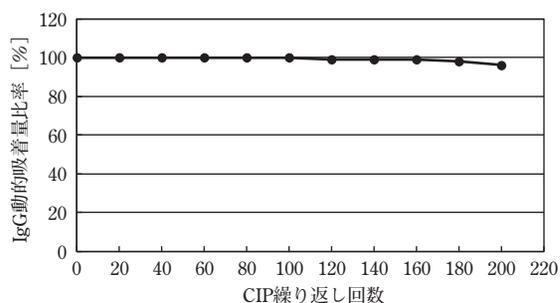
#### 4. まとめ

本稿では、抗体の初期精製に有効な新商品 Protein A アフィニティークロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F 充填剤の性能を紹介した。先に商品化した TOYOPEARL AF-rProtein A-650F は機械的強度がより高く、ハイ スループット型として、一方、新たに商品化した TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F は高吸着型として抗体の初期精製に適した充填剤である。

抗体医薬品市場の成長は著しく、今後も成長を続けると予測されている。これらの充填剤が抗体医薬品の生産性向上、製造コスト低減及び精製純度の改善に寄与することが期待される。

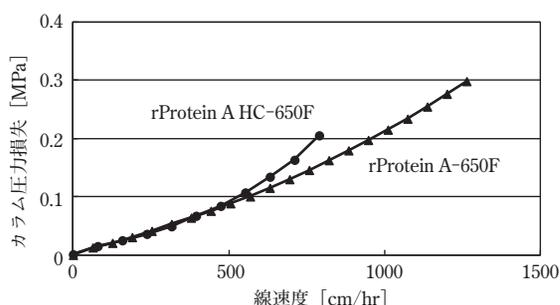
#### 引用文献

- 1) 金子佳寛、生物工学, **91**, 9, 511-513 (2013)
- 2) 松崎淳一、生物工学, **91**, 9, 495-498 (2013)
- 3) 山本修一、BIO INDUSTRY, **28**, 7, 35-46 (2011)
- 4) J.Strube, Chemical Engineering and Processing, **44**, 1123-1137 (2005)



カラムサイズ: 5 mmI.D. × 50 mm (充填剤量: 1 mL)  
 サイクル 吸着工程: 10カラム容量 (CV)、溶出工程: 5 CV、  
 平衡化工程: 7 CV、  
 洗浄工程: 3 CV、平衡化工程: 5 CV  
 IgG濃度: 5 mg/mL  
 動的吸着量: 10%破過容量

図6 NaOHのCIP繰り返しによるIgG 動的吸着量変化



カラムサイズ: 22 mmI.D. × 20 cm  
 通液: 純水

図7 カラム圧力損失