

● 改変型 Fc レセプターの量産技術の開発

ライフサイエンス研究所 蛋白質改変グループ
 ライフサイエンス研究所 培養技術グループ
 ライフサイエンス研究所 蛋白質改変グループ
 ライフサイエンス研究所 培養技術グループ

寺尾 陽介
 今泉 暢
 山中 直紀
 半澤 敏

1. 緒言

近年、抗体を治療薬として利用する抗体医薬品の開発が大きく進展しており、抗体医薬品が医薬品売り上げトップ 10 の上位半分を占めるに至っている。抗体医薬品の市場は、全世界で 5 兆円 (2015 年) 規模となっており、年率 10% 弱の伸びで 2020 年には 8 兆円に達すると予想されている¹⁾。

抗体医薬品は動物細胞の培養などで製造され、各種フィルターろ過やカラムクロマトグラフィーを利用して精製後、製品化される。カラムクロマトグラフィーによる精製では、ProteinA ゲル (GE ヘルスケア社製) によるアフィニティークロマトグラフィーの利用が一般的となっている (シェア ~ 80%)。東ソーにおいても TOYOPEARL[®] AF-rProteinA HC-650F が昨年上市され、注目をされている。

Fc レセプター (以下、FcR) は、体内の免疫機構に関与し、免疫グロブリン分子 (IgG) の Fc 領域に結合する一連のタンパク質である²⁾。FcR は、生体内の多様な分子の存在下で抗体と選択的に結合して免疫応答を司ることから、抗体精製用のアフィニティークロマトグラフィー用リガンドとして従来品より高い選択性を発揮することが期待されている。これまでに天然型 FcR の耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性を向上させた改変型 FcR³⁻⁶⁾、改変型 FcR をトヨパールゲルへと効率的に固定化する方法⁷⁻⁸⁾、微生物による FcR の製造方法を開発してきた⁹⁻¹⁴⁾。本報では、東京研究所の技術実証設備 (主反応槽 1.5 m³) を用いて構築した FcR 量産技術について述べる。

2. 製造方法詳細

図 1 に、構築した量産方法の概略図を示した。

[1] 発現菌株

FcR は、FcR 遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、高密度培養により大量発現させている。発現ベク

ターには pTrc99A を用い trc プロモーターの下流にシグナルペプチド遺伝子、改変型 FcR 遺伝子、固定化タグ遺伝子の順に遺伝子を挿入した。なお、シグナルペプチドは発現量向上の為、既知の pelB シグナルに当社独自の改変を行ったもの¹⁵⁾、固定化タグはチオール基の高い反応性を利用してトヨパールに結合させるためシスチンを含むペプチドを用いた¹⁶⁾。発現菌株には、大腸菌 W3110 株を用いた。これらベクターと大腸菌ともに安全性が確認され経済産業省の GILSP リストに掲載されている。マスターセルバンク 30 本を作成し、その 1 本からワーキングセルバンク 50 本を作成し、-80℃で凍結保存している。

[2] 培養工程 (高密度培養による FcR 高生産)

ワーキングセルのうち 1 本を用いてラボスケールの 3 L 培養槽での前々培養、100 L 培養槽での前培養を経て 1.5 m³ 培養槽にて培養する。最終的に菌体量は 100 g/L に達し、菌体内に 1.1 ~ 1.3 g/L の FcR が蓄積した¹⁷⁻¹⁹⁾。

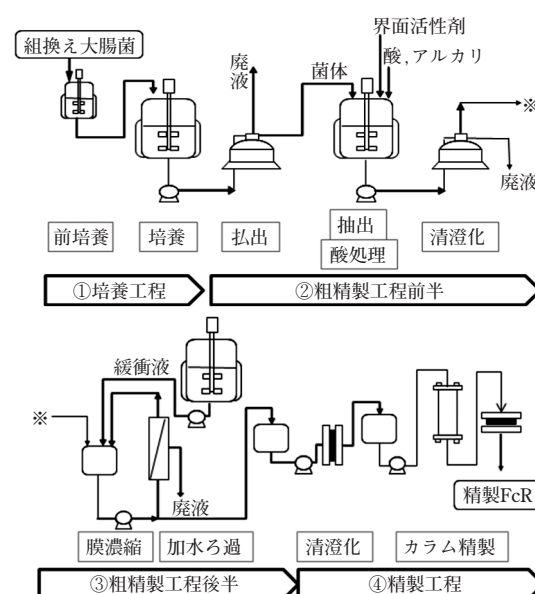


図 1 量産方法の概略図

[3] 粗精製工程（抽出、酸処理、各種分離操作による粗精製）

高密度培養液を遠心分離して大腸菌菌体を回収し、界面活性剤等の薬剤によってFcRを抽出する。薬剤には、陽イオン界面活性剤と非イオン性界面活性剤を組み合わせた独自の動物原料フリーの抽出試薬を作製した²⁰⁾。

さらに、抽出液の純度を向上させるため、酢酸でpHを3～4としてFcR以外の夾雑タンパク質を沈殿させる。pH調整前と比較しFcRの純度が10倍以上向上し²¹⁾、また、抽出液中の残存大腸菌も殺菌される。

さらに限外ろ過膜による濃縮と脱塩を行い次工程へ

と進む。

[4] 精製工程（カラムクロマトグラフィー分離による精製）

粗精製FcRは、陽イオン交換（TOYOPEARL[®] CM-650M：CMカラム精製）と疎水性相互作用（TOYOPEARL[®] Phenyl-650M：phenylカラム精製）クロマトグラフィーの2本のカラムクロマトグラフィーで高収率に精製される（図2及び図3）。大腸菌は細胞膜にエンドトキシンを含むため、人体に投与すると発熱源となり残存が大きな問題となるが、クロマトグラフィーに使用する水を全て脱エンドトキシン水を用いることでエンドトキシンは管理規格値20 EU/mg以下に低減される²²⁾。

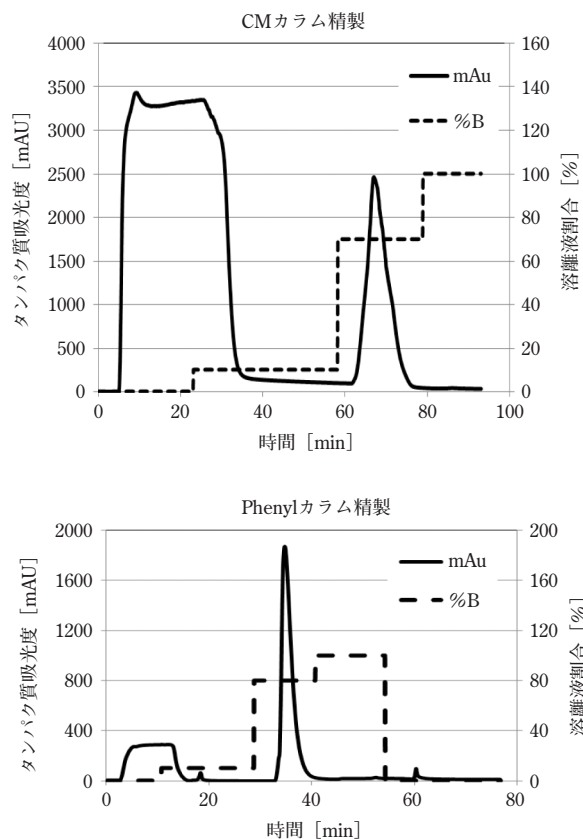
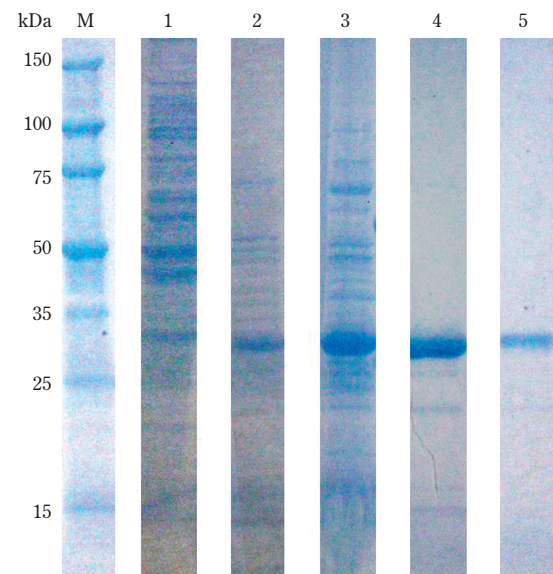


図2 カラム精製クロマトグラム (CM & Phenyl)

[5] 製品分析

製造したFcRの品質目標として以下の表1に示す



電気泳動後CBBによりタンパク質を染色。M：分子量サイズマーカー、1：抽出液、2：酸処理液、3：濃縮液、4：CMカラム精製溶出液、5：Phenylカラム精製溶出液。

図3 各工程でのSDS-PAGEによるタンパク質純度分析結果

表1 品質管理規格値と分析結果

分析項目	規格値	分析値		
		Lot A	Lot B	Lot C
GPC 分析	95%以上	99%	99%	96%
RP-HPLC 分析	95%以上	97%	99%	98%
SDS-PAGE 分析	単一バンド	単一	単一	単一
吸光スペクトル 280/250 の比	1.2 以上	2.0	2.2	2.4
タンパク質濃度	10 g/L	10.1	11.2	10.9
エンドトキシン濃度	20 EU/mg 以下	0.5	3.0	0.02
伝導度	2 mS/cm 以下	1.3	0.8	1.7

表2 安全性試験結果

項目	試験法 被験動物等	検体	結果
急性毒性	ラット静注	30 mg/mL 水溶液	LD50>600 mg/kg (死亡例なし)
変異原性	AMES	30 mg/mL 水溶液	陰性
抗原性	全身アナフィラキシー試験 (モルモット)	1 μ g/mL 水溶液	1 μ g/匹 (3 μ g/kg) : 抗原性-
		10 μ g/mL 水溶液	10 μ g/匹 (30 μ g/kg) : 抗原性+*

*呼吸障害、不安行動等。30分後に回復

管理規格値を作成した。技術実証設備では3回の試作を行ったが、すべてのロットで規格値を満たす純度が得られた。

[6] 安全性

製造されたFcRを固定したゲルは、ユーザー（製薬メーカー等）により、抗体医薬品製造の精製工程に使用されるため、FcR自体の安全性（急性毒性、変異原性、抗原性）が求められる。そこで、急性毒性、変異原性、抗原性を外部委託で分析した。その結果、FcRの安全性に問題ないことが確認できた（表2）。

[7] 安定性

精製FcRには当初保存中に凝集・沈殿が発生する問題があった。原因を追究したところ、FcRの溶解度はある種のイオンに強く影響を受けることが判明した。そこで、製造したFcRを純水に対して十分に透析することでこの問題を解決した²³⁾。

製造したFcR水溶液の保存安定性を継続的に観察した。低濃度、高濃度でのFcR溶液を作製し、各種条件にて保存安定性を確認したところ、4℃以下での保存条件下で約1年にわたり、分解等は認められず、

安定に保存できることを確認することが出来た（図4）。

3. まとめ

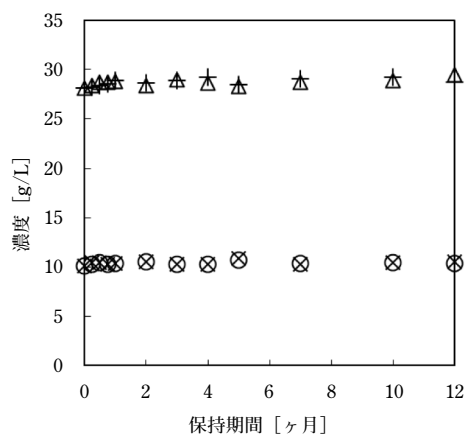
抗体医薬精製用アフィニティークロマトグラフィーに使用するゲルのリガンドとして、FcRの製造方法の構築、ラボスケールからパイロットスケールへのスケールアップの検討、パイロットプラントを使用してFcRの製造を実施した。製造したFcRは製品規格を満たすことが確認され、1年間安定に保存可能であることも確認できた。FcRを固定化したFcRゲルは1Lあたり50gのIgGを吸着し（動的吸着量）、200回以上繰り返し使用できる。

4. 謝辞

培養技術の構築に当り多数のご助言を頂きました中部大学教授の山根恒夫先生に感謝いたします。さらに筆者らと共に本技術の開発に携わった村山敬一主席研究員、井出輝彦副理事、大江研究員、小林研究員、田中研究員、朝岡研究員、野口研究員他多数の皆様には感謝いたします。

5. 参考文献

- 1) 西島正弘、バイオ医薬品、化学同人、1-6 (2013)
- 2) J.V.Racetch, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 457 (1991)
- 3) 畑山 耕太、朝岡 義晴、田中 亨、井出 輝彦、特開 2011-206046
- 4) 寺尾 陽介、半澤 敏、今泉 暢、特開 2013-146234
- 5) 半澤 敏、今泉 暢、寺尾 陽介、特開 2013-112640
- 6) 朝岡 義晴、田中 亨、小林 秀峰、井出 輝彦、畑山 耕太、特開 2014-27916



保存条件：△=30 g/L, -20℃；+=30 g/L, 4℃；
○=10 g/L, -20℃；×=10 g/L, 4℃

図4 保存安定性

- 7) 田中 亨、井出 輝彦、飯田 寛、特開 2010-126436
- 8) 田中 亨、小林 秀峰、朝岡 義晴、井出 輝彦、大江 正剛、豊嶋 俊薫、伊藤 博之、特開 2013-59313
- 9) 穂谷 恵、井出 輝彦、田中 亨、特開 2008-245580
- 10) 小林 秀峰、井出 輝彦、特開 2009-201403
- 11) 田中 亨、井出 輝彦、特開 2009-278948
- 12) 朝岡 義晴、井出 輝彦、特開 2011-72246
- 13) 畑山 耕太、穂谷 恵、井出 輝彦、田中 亨、特開 2011-97898
- 14) 寺尾 陽介、半澤 敏、特開 2011-200147
- 15) 特許出願中
- 16) 朝岡 義晴、田中 亨、小林 秀峰、大江 正剛、井出 輝彦、特開 2014-187993
- 17) 今泉 暢、半澤 敏、特開 2012-34591
- 18) 今泉 暢、半澤 敏、特開 2013-85531
- 19) 今泉 暢、半澤 敏、特開 2013-188141
- 20) 寺尾 陽介、半澤 敏、山中 直紀、特開 2013-252099
- 21) 山中 直紀、寺尾 陽介、半澤 敏、特開 2014-90709
- 22) 寺尾 陽介、半澤 敏、特開 2014-118402
- 23) 特許出願中