

## ●新規機能性 TOYOPEARL イオン交換グレードの開発

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 荒木 康祐  
中村 孝司

### 1. はじめに

近年のバイオ医薬品市場の成長は著しく、2009年に1000億ドル弱であった市場が、2016年頃には約1500億ドルまで拡大する見通しである。これには特に抗体医薬品の成長が貢献しており、この傾向は今後も継続すると予想されている<sup>1)</sup>。一方で、バイオ医薬品は高価であり、その普及が患者や公的機関の経済的負担を増加させている点が問題視されている。そのため、バイオ医薬品の製造コストの低減に向けた取り組みが、一層と医薬品メーカーに求められている状況にある。

バイオ医薬品の原薬製造プロセスは、大別して培養と精製の二工程から成る。まず、培養工程では微生物や動物細胞を培養し、目的のタンパク質や抗体を産生させる。次に、精製工程で培養液に多く含まれる夾雑物を除去し、目的物を高純度化して原薬を得る。図1に抗体医薬品の製造プロセスの一例を示した<sup>2)</sup>。抗体医薬品は動物細胞から産生された後、クロマトグラフィーや濾過など複数の手法を組み合わせることで精製されている。ここで、培養工程の生産性については、この20年ほどで大幅に向上（培養液1L当たりの抗体生産

量が1g未満から約10gまで向上）したのに対して、精製工程に関してはこれに追従できるほど改善が進んでいない。このことがコストダウンの障壁の一つとなっており、精製工程の生産性向上は、未だ課題として残っているのが現状である<sup>3)</sup>。

本稿では、バイオ分離向け液体クロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL<sup>®</sup> のうち、最近上市された二種類のイオン交換グレードを紹介する。具体的には、アニオン交換体 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F、カチオン交換体 TOYOPEARL Sulfate-650F の基本特性について述べる。これらの充填剤は新しい機能を有しており、バイオ医薬品の精製効率・生産性の更なる改善に寄与することが期待される。

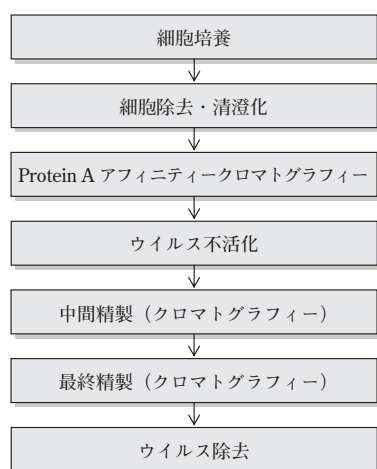
### 2. 実 験

#### [1] 試 薬

ポリクローナル免疫グロブリン G (IgG) としては、ガンマグロブリン筋注（化血研製）を用いた。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。アンチトロピン III としては、ノイアート静注用（日本血液製剤機構製）を使用した。ウシ血清アルブミン (BSA) などその他の試薬は、和光純薬工業から購入した。

#### [2] 動的吸着容量の測定

各種充填剤を 5 mm I.D. × 50 mm（アニオン交換体の場合）または 6 mm I.D. × 40 mm（カチオン交換体の場合）のカラムに充填し、測定に用いた。試料溶液としては、濃度 2 g/L の BSA（アニオン交換体の場合）または濃度 1 g/L のポリクローナル IgG（カチオン交換体の場合）を含む緩衝液を用いた。充填カラムを液体クロマトグラフ（東ソーまたは GE ヘルスケア製）に接続し、UV 280 nm の吸光度をモニタリングしながら、上記の試料溶液を所定の流速でカラムに負荷した。得られた破過曲線から求めた 10 %破過までの試料負荷量に基づき、充填剤の動的吸着容量を計算した。



中間、最終精製はカチオン交換、アニオン交換、疎水性相互作用クロマトグラフィーなど、基序の異なる手法を組み合わせることで行われることが多い。

図1 抗体医薬品の製造プロセス例<sup>2)</sup>

### [3] 分離選択性の評価

各種充填剤を 5 mm I.D. × 50 mm (アニオン交換体の場合) または 7.5 mm I.D. × 75 mm (カチオン交換体の場合) のカラムに充填し、これを液体クロマトグラフに接続して評価を行った。試料溶液としては、所定の緩衝液に BSA (アニオン交換体の場合)、モノクローナル IgG (アニオン、カチオン交換体の場合)、アンチトロンビン III (ヘパリン様アフィニティー分離検討の場合) を溶解したものを使用した。試料溶液をカラムへ注入した後、塩濃度リニアグラジエント法で溶出を行った。

### [4] カラム圧力損失の測定

各種充填剤を 2.2 cm I.D.、4.4 cm I.D. または 30 cm I.D. カラムに充填し、それに純水 (室温) を所定の流速で通液した際の圧力損失を測定した。

## 3. 結果と考察

### [1] アニオン交換体 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F

#### (1) タンパク質吸着容量

種々の pH、塩濃度条件における BSA 動的吸着容量を、従来のアニオン交換型トヨパール (TOYOPEARL Q-600C AR) と比較した結果を表 1 に示す。pH の低下や塩濃度の増加に伴って、従来品では吸着容量が大きく低下したのに対して、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F は比較的高い吸着容量を維持できる (塩耐性を有する) ことが分かった。

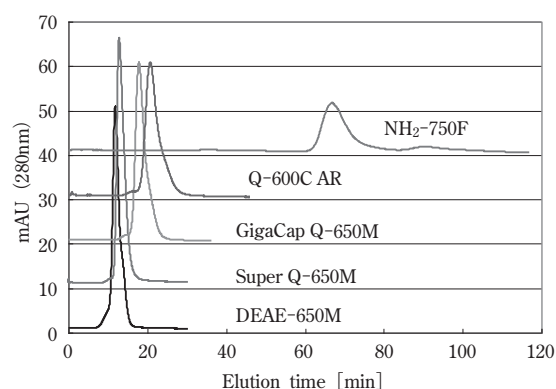
このように、生理食塩水程度の塩を含む条件において、従来品では目的タンパク質を効果的に吸着できないため、その精製を行うには、試料溶液の塩濃度を下げる前処理 (希釈、脱塩など) が必要となる。一方、塩耐性を持つ TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F を用いれば、

このような前処理操作の省略、ひいては精製工程の時間短縮 (コストダウン) が可能と考えられる。

#### (2) タンパク質の分離選択性

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 及び従来のアニオン交換型トヨパールにより得られた BSA のクロマトグラムを図 2 に示す。いずれの充填剤でも同一の塩濃度リニアグラジエント溶出を行ったが、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F で BSA の溶出時間が最も遅かったことから、このゲルがより高い塩耐性を有することがあらためて示唆された。

次に、分離選択性を比べると、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F でのみ二峰性のピークが得られていることが分かる。これらのピークを分取・分析した結果、BSA の単量体 (溶出時間: 約 65 分) と二量体 (同: 約 90 分) が分離していることが分かった。このことから、



カラムサイズ: 5mm I.D. × 50mm  
 試料: BSA, 1mg  
 グラジエント: 溶離液 A から溶離液 B への 120 分リニアグラジエント  
 溶離液 A: 0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)  
 溶離液 B: 2.0mol/L NaCl + 0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)  
 流速: 1.0mL/min  
 検出: UV280nm

図 2 アニオン交換型トヨパールにおける BSA のクロマトグラム

表 1 ウシ血清アルブミン (BSA) に対する動的吸着容量の pH 及び塩濃度依存性: TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F と従来のアニオン交換型トヨパール (Q-600C AR) の比較

試料溶解液	BSA 動的吸着容量 [g/L]	
	TOYOPEARL NH <sub>2</sub> -750F	TOYOPEARL Q-600C AR
0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) +0mol/L NaCl	65	90
0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) +0.15mol/L NaCl	46	27
0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) +0.15mol/L NaCl	42	16
0.02mol/L Bis-Tris-HCl 緩衝液 (pH6.0) +0.15mol/L NaCl	38	11

カラムサイズ: 5mm I.D. × 50mm、試料: 2g/L BSA、流速: 1mL/min (滞留時間 1分)

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F は、従来品にないユニークな分離選択性を有すると考えられる。

### (3) 抗体凝集体分離への応用

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F によるモノクローナル IgG の分離例を図 3 に示した。サイズ排除クロマトグラフィーによるフラクション分析の結果、図中の Fraction #1 に IgG の単量体が、Fraction #2 に IgG の凝集体（二量体～）が主に溶出していることが明らかとなった。つまり、前項で述べた BSA だけでなく、IgG の単量体と凝集体の分離にも有用であることが確認された。

IgG（抗体）の凝集体は免疫原性を有し、副作用を引き起こす可能性が示されているため、抗体医薬品の精製プロセスにおいて、抗体の単量体（有効成分）と凝集体を分離することは重要な課題の一つとされている<sup>4)</sup>。この場面において、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F は精製効率の改善に寄与し得ると考えられる。

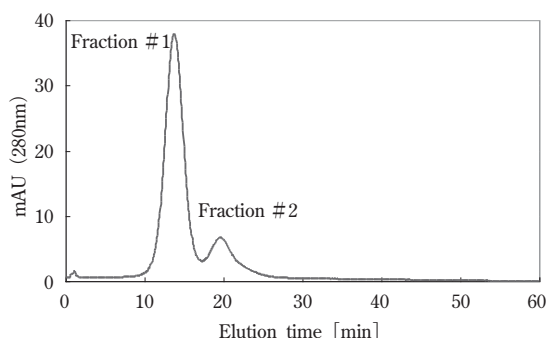
### (4) カラムスケールアップ

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F を 4.4 cm I.D.、30 cm I.D. カラムに充填し、カラム圧力損失を評価した結果を図 4 に示す。工業スケールの精製プロセスで用いられるような大型カラム（30 cm I.D. × 20 cm）においても、線速度 300 cm/h 以上（滞留時間 4 分以内）での通液が可能であった。

## [2] カチオン交換体 TOYOPEARL Sulfate-650F

### (1) 抗体吸着容量

IgG 動的吸着容量の塩濃度依存性について、競合品と比較した結果を図 5 に示した。TOYOPEARL Sulfate



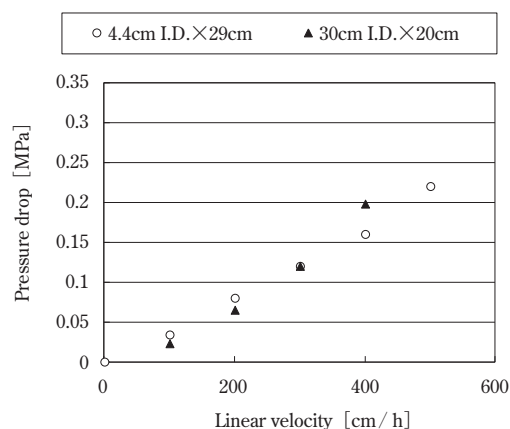
カラムサイズ：5mm I.D.×50mm  
 試料：モノクローナル IgG、0.5mg  
 グラジエント：溶離液 A から溶離液 B への 60 分リニアグラジエント  
 溶離液 A：0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)  
 溶離液 B：1.0mol/L NaCl+0.02mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0)  
 流速：1.0mL/min  
 検出：UV280nm

図 3 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F による IgG 単量体と凝集体の分離

-650F では、幅広い塩濃度範囲において、競合品と同等以上の吸着容量が得られた。このことから、当該充填剤は競合品より優れた塩耐性を有しており、3-〔1〕-〔1〕項で述べた TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F と同様のメリットを持つと考えられる。

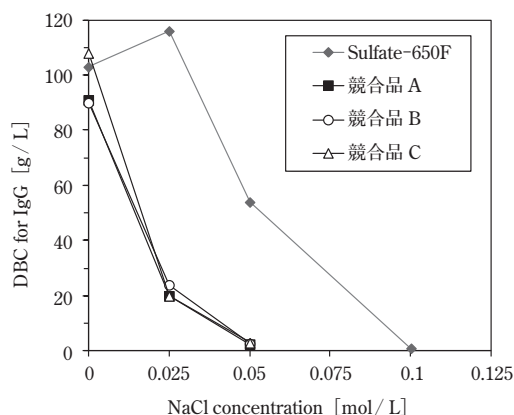
### (2) 抗体凝集体分離への応用

TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F と同様に、TOYOPEARL Sulfate-650F も優れた IgG 凝集体分離性能を有することを確認した。図 6 に、種々のカチオン交換型充填剤によるモノクローナル IgG の単量体と凝集体の分離結果をまとめた。競合品や従来のカチオン交換型トヨパール (TOYOPEARL GigaCap® S-650M) と比べて、



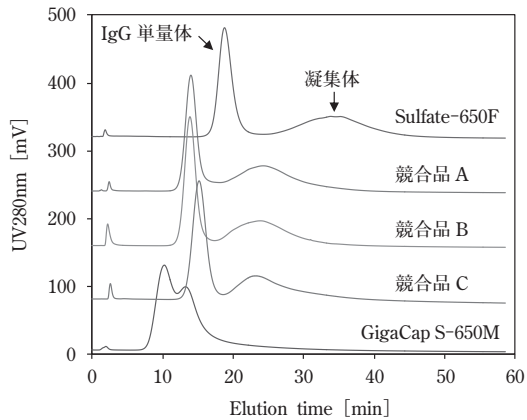
カラムサイズ：4.4cm I.D.×29cm、30cm I.D.×20cm  
 移動相：H<sub>2</sub>O (室温)

図 4 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F における流速（線速度）とカラム圧力損失の関係



カラムサイズ：6mm I.D.×4cm  
 試料：1g/L ポリクローナル IgG + 0.054mol/L 酢酸緩衝液 + NaCl (pH5.5)  
 流速：0.28mL/min (滞留時間：4分)

図 5 TOYOPEARL Sulfate-650F 及び競合品における、IgG 動的吸着容量 (DBC) の塩濃度依存性



カラムサイズ：7.5mm I.D.×7.5cm  
 試料：モノクローナル IgG (酸・熱処理品)、0.3mg  
 グラジエント：溶離液 A から溶離液 B への 58.5 分リニアグラジエント  
 溶離液 A：0.025mol/L NaCl+0.054mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.5)  
 溶離液 B：1.0mol/L NaCl+0.054mol/L 酢酸緩衝液 (pH5.5)  
 流速：1.0mL/min  
 検出：UV280nm

図6 種々のカチオン交換型充填剤による IgG 単量体と凝集体の分離

当該充填剤はより優れた選択性・分離能を示した。この結果から、TOYOPEARL Sulfate-650F を抗体精製プロセスに組み込むことで、これまで以上に効率的な凝集体除去が可能となることが示唆された。

### (3) ヘパリン様アフィニティー分離への応用

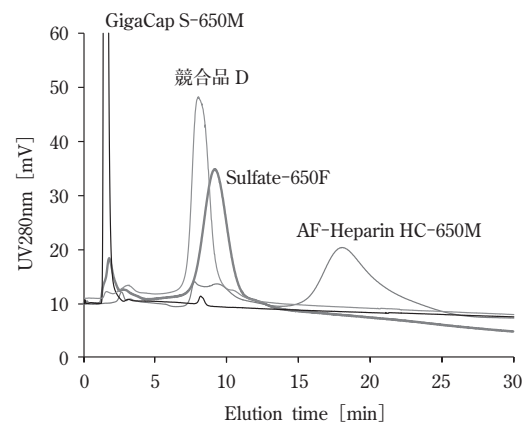
ヘパリンとは、化学構造中に多くの硫酸基をもつムコ多糖の一種であり、血液凝固因子や成長因子などに対して特異的な親和性を示すことが知られている。この親和性を利用するヘパリンアフィニティークロマトグラフィーは、血液製剤などの精製プロセスにおいて重要な役割を果たしている<sup>5)</sup>。

TOYOPEARL Sulfate-650F はヘパリンと類似した表面構造 (多くの硫酸基) を有することから、ヘパリン親和性物質の一つであるアンチトロンビン III を用いて、その保持挙動を評価した。その結果、当該充填剤のアンチトロンビン III に対する保持力は、ヘパリン固定化トヨパール (TOYOPEARL AF-Heparin HC-650F) に及ばなかったものの、他社製のヘパリン様アフィニティー充填剤 (競合品 D) と同等以上であることが明らかとなった (図7)。また、TOYOPEARL GigaCap S-650M ではアンチトロンビン III は保持されなかったことから、TOYOPEARL Sulfate-650F は、一般的なカチオン交換体にはない独特のヘパリン様アフィニティーを有すると考えられる。即ち、TOYOPEARL Sulfate-650F は抗体精製だけでなく、血漿タンパク質のアフィニティー精製の分野において

も有用である可能性が示された。

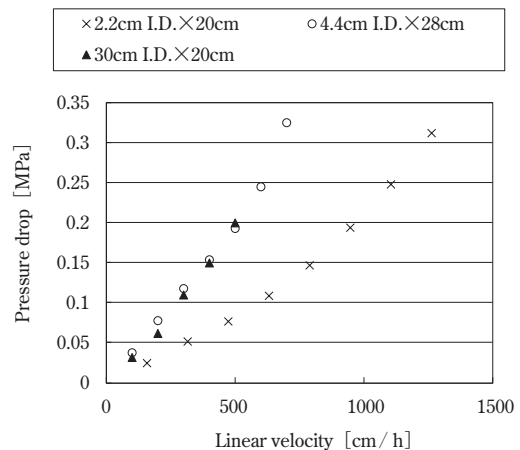
### (4) カラムスケールアップ

TOYOPEARL Sulfate-650F を 2.2 ~ 30 cm I.D. カラムに充填し、カラム圧力損失を評価した結果を図8に示す。30 cm I.D. × 20 cm の大型カラムにおいても、極端な圧力損失の上昇がなく、線速度 300 cm/h 以上 (滞留時間4分以内) での通液が可能であった。従って、TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F と同じく、実験室から工業スケールまでの分離精製プロセスに適用可能であると考えられた。



カラムサイズ：7.5mm I.D.×7.5cm  
 試料：アンチトロンビン III、0.15mg  
 グラジエント：溶離液 A から溶離液 B への 30 分リニアグラジエント  
 溶離液 A：0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH7.5)  
 溶離液 B：2.0mol/L NaCl+0.02mol/L リン酸緩衝液 (pH7.5)  
 流速：1.0mL/min  
 検出：UV280nm

図7 各種充填剤におけるアンチトロンビン III のクロマトグラム



カラムサイズ：2.2cm I.D.×20cm、4.4cm I.D.×28cm、30cm I.D.×20cm  
 移動相：H<sub>2</sub>O (室温)

図8 TOYOPEARL Sulfate-650F における流速 (線速度) とカラム圧力損失の関係

#### 4. まとめ

本稿では、バイオ分離向け新規液体クロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F 及び TOYOPEARL Sulfate-650F の基本特性を紹介した。両グレードとも、従来のトヨパール製品でカバーできていなかったニーズに答え得る、新しい機能を有することを示した。これらの充填剤が、バイオ医薬品の品質向上のみならず、現在の課題に位置付けられている製造コスト低減の一助となることを期待したい。

#### 引用文献

- 1) 青木謙治、Mizuho Industry Focus、**156** (2014)
- 2) 福澤時秀、抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請、14-26 (2009)
- 3) P. Gronemeyer, R. Ditz, J. Strube, *Bioengineering*, **1**, 188-212 (2014)
- 4) M. Vazquez-Rey and D. A. Lang, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1494-1508 (2011)
- 5) A. Johnston and W. Adcock, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **17**, 37-70 (2000)

