

博士論文

効率的なタンパク質のキャプチャークロマトグラフィープロセス
Efficient capture chromatography processes of proteins

2017年1月

矢田 友一

山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻

要旨

これまでサイトカインのようなバイオ医薬品においては、微量で効果が発揮されるために生産量が少なくて済むことから、その製造方法の効率化に焦点は当てられていなかったが、現在、バイオ医薬品の中心となる抗体医薬品は投与量が多く、年間生産量が1トンを超えるような抗体医薬品も存在する。アップストリーム工程と呼ばれる、細胞培養における生産量は飛躍的なブレークスルーもあり、十数年前と比較して、10倍以上となる飛躍的な進展が見られている。一方、ダウンストリーム工程と呼ばれる精製プロセスにおいては、画期的な技術革新は無いものの、抗体の性質上、品目毎に詳細な精製方法を確立する必要はなく、抗体精製プラットフォームが確立しつつある。精製工程の中心となる既存技術のクロマトグラフィー担体の性能は近年、著しく向上してきており、製造コスト低減のために、これらのクロマトグラフィー担体を効率的に使用することが求められることから、キャプチャー工程に使用される Protein A クロマトグラフィー (PAC) 担体や、ポリッシングに用いられるイオン交換クロマトグラフィー (IEC) 担体の吸着保持機構を解明することは抗体精製プラットフォームの強化に繋がるものと考えられる。

PAC は、モノクローナル抗体 (mAb) 分離プロセスにおける効率的なキャプチャー工程として一般的に用いられている。通常、動的吸着容量 (DBC) が、PAC 担体を選択する際の重要なパラメータとして用いられる。しかしながら、**aggregates** を溶出中に、効率的に除去することが出来れば、以降のポリッシング工程をより効率的に行うことが可能となる。第2章では、mAb の **aggregates** 除去における適切な PAC 担体の選択方法を提案した。2種の異なる mAb を用いて、5種の PAC 担体の直線的 pH 勾配溶出実験を行ない、**aggregates** ならびにモノマーの溶出挙動を調べたところ、1つの mAb の **aggregates** は、mAb モノマーと比較してより強く保持された。一方、もう一つの mAb は異なる溶出挙動を示し、PAC 担体に弱く保持されたピーク、強く保持されたピークとして溶出された。そこで、段階的溶出実験によって2つのタイプの **aggregates** を取り除くために、2つのプロトコルを検証した。プロトコル A は、サンプルロード、平衡バッファーによる洗浄、及び低 pH 溶出で構成し、プロトコル B では、プロトコル A の洗浄に 1.0M のアルギニンによる洗浄を追加した。その結果、プロトコル A における洗浄ではピークが観察されなかった。一方、プロトコル B におけるアル

ギニン洗浄中にはプロトコル A に較べて著しいピークが観察された。プロトコル B において、1 つの PAC カラムはアルギニン洗浄中に、より小さなピークを示し、aggregates 除去能力は、他の PAC カラムと比較してより高い結果を示した。これらの結果より、本方法が、適切な PAC カラムの選択に有用であることが分かった。

イオン交換クロマトグラフィー (IEC) はタンパク質精製における非常にポピュラーな手法であるが、温度についてはそれほど留意されないパラメータである。そのため、実験室では比較的低温で実験が行われても、製造プロセスでは室温、あるいはそれ以上で実施されることも多い。一方、温度の違いによって選択性が変化することがよく知られている。

第 3 章では、キャプチャークロマトグラフィープロセスを設計する簡便な方法を開発するために IEC の典型的なタンパク質の DBC を、簡素化された細孔拡散モデルに基づいて解析した。 ud_p^2/ZD_m は細孔拡散モデルから導かれた無次元数パラメータであり、 u は移動相線速度、 d_p は細孔径、 Z はカラム・ベッド高さ、 D_m は分子拡散係数である。6 種類の陽イオン交換クロマトグラフィーカラムを用いて典型的なタンパク質 (Lysozyme と mAb-A) の破過曲線を、異なる温度 (8、13、18、23、28°C) でそれぞれ測定した。その結果、DBC/SBC 比 (カラムベッド有効率) は実験データから計算した ud_p^2/ZD_m (SBC : 静的吸着容量) によく相関された。この結果から、DBC/SBC と ud_p^2/ZD_m のプロットが、タンパク質の効果的なキャプチャー工程を設計することに有用であることが分かった。

Abstract

Biologics (recombinant protein drugs) such as cytokines are used in low dose. Consequently, as the production size is not big, the efficiency of the manufacturing process was not considered important. However, for some high-dose recombinant monoclonal antibody (mAb) products, an annual production of 1 ton or more is required. In order to improve the production process of mAb various technologies have been developed. The cell culture process called the upstream process has been dramatically improved, which results in ten-fold increases in the mAb concentration over the last 10 years.

Although there have not been epoch-making innovations in the purification process called the downstream process (DSP), so-called platform DSPs have been established. This is because a product-specific purification process is not needed as the properties of mAbs are basically similar. Increasing cost pressure requires much efficient DSPs as they are expensive and increase the total production cost. Platform DSPs usually consist of three chromatography steps, a capture step by protein A chromatography (PAC) followed by two polishing steps (ion-exchange chromatography, IEC). Such chromatography packing materials (media, gels or resins) have been improved remarkably recently. It is now possible to construct an efficient DSP by choosing suitable chromatography media and proper operating conditions based on mechanistic models.

Protein A chromatography (PAC) is commonly used as a capture step in mAb separation processes. Usually dynamic binding capacity is used for choosing the right PAC. However, if aggregates can be efficiently removed during elution, it can make the following polishing steps easier. In chapter 2, a method for choosing the right PAC media in terms of mAb aggregate removal is proposed. Linear pH gradient elution experiments of two different mAbs on various PAC columns were carried out, where the elution behavior of aggregates as well as the monomer was measured. Aggregates of one mAb were more strongly retained compared with the mAb monomer. Another mAb showed different elution behavior, where the aggregates were eluted as both the weakly and strongly retained peaks. In order to remove the two types of aggregates by stepwise elution two protocols were tested. The first protocol A consisted of the sample loading, the wash with the equilibration buffer and the low pH elution. The wash stage of the second protocol B included the wash with 1.0 M arginine. No detectable peaks were observed during the wash stage of protocol A whereas significant peaks were monitored during the arginine wash of protocol B. One of the PAC columns showed a smaller peak during the arginine wash. In addition, both the aggregate removal and the monomer yield were higher with protocol B compared with the other PAC columns. This method was found to be useful for choosing the right PAC column.

The temperature is not considered a critical parameter in DSPs. However, the

manufacturing process is most often carried out at room temperature whereas the early-stage process development may be performed at low temperatures in the laboratory. It is also important to know the temperature dependence of chromatography performance for the process validations. In chapter 3, the dynamic binding capacity (DBC) of model proteins on ion-exchange chromatography (IEC) was analyzed based on a simplified pore diffusion model in order to develop a simple method for designing a capture chromatography process. A dimensionless parameter, $ud_p^2 / (ZD_m)$ was derived from the pore diffusion model, where u_0 is the superficial velocity, d_p is the particle diameter, Z is the column bed height, and D_m is the molecular diffusion coefficient. Breakthrough curves of model proteins (Lysozyme and mAb) were measured for cation exchange chromatography columns at various temperatures (8, 13, 18, 23 and 28°C). The DBC/SBC values (column efficiency) was calculated from the experimental data were well correlated to $ud_p^2 / (ZD_m)$ (SBC = static binding capacity). The DBC/SBC - $u_0d_p^2 / (ZD_m)$ curve was found to be useful for designing efficient capture processes of proteins

目次

第1章 緒言

第2章 Aggregates 除去に基づく Protein A アフィニティークロマトグラフィーの選 択法

2.1 序論

2.2 理論

2.3 材料と方法

2.4 結果および考察

2.5 小活

第3章 タンパク質キャプチャークロマトグラフィーにおける吸着能の予測

3.1 序論

3.2 イオン交換クロマトグラフィー (IEC) 理論

3.3 材料と方法

3.4 結果および考察

3.5 小活

第4章 総括

参考文献

本研究に関連する著者の発表論文

関係論文等

参考論文

謝辞

第1章 緒言

サイトカインの精製プロセスは、プロダクト毎に性質が異なるため、分離プロセスが異なり、また複雑であるのに対して、抗体の場合、ある程度類似な精製プロセスとなることから、この精製プロセスは抗体精製プラットフォームと呼ばれている。抗体医薬は、生体がもつ免疫システムの主役である抗体を主成分とした医薬品で、一つの抗体が一つの標的（抗原）だけを認識する特異性を利用する。Fig.1 に抗体医薬の主な作用機序を示す。標的に対する高い特異性を利用するため、薬理効用が高い、副作用が少ない等のメリットがある。

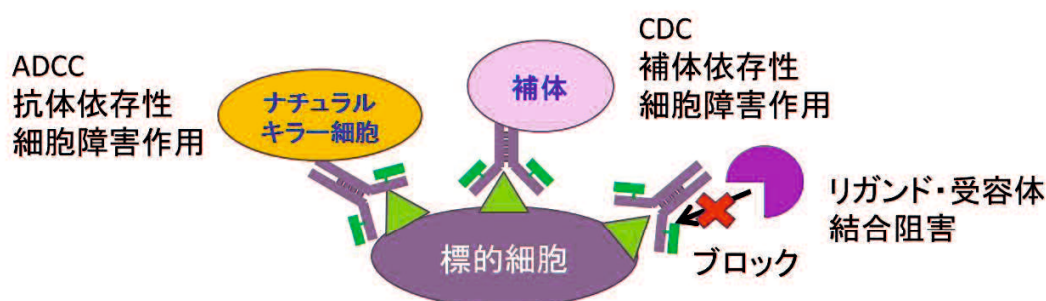


Fig.1 抗体医薬品の主な作用機序

抗体医薬品の市場規模は、年々増加し、52,000百万ドル（2013年）とも言われている。また、現在、医薬品の売上げ上位10品目のうち、6品目が抗体医薬品であり（2015年）、今後も、抗体医薬品および次世代抗体医薬品の市場規模は更に拡大すると予想される。一方、精製のコスト低減、効率的な製造プロセスの開発、人的リソースの省力化および開発スピードの加速化が課題となる。

タンパク質はpHや温度、塩濃度などのプロセスパラメータにセンシティブであり、バイオ医薬品は高純度な品質が求められることから、その精製操作にはクロマトグラフィーがよく用いられる。目的タンパク質の純度、収率はそのプロセスパラメータ依存的に変化し、これらのパラメータの適切な設定が重要である。

クロマトグラフィーは主にTable 1に示すようなモードがあるが、抗体精製の場合、抗体と特異的な結合を示すProtein AをリガンドとしたProtein Aアフィニティークロマトグラフィー（PAC）を利用することにより、多くの不純物が含まれる培養液から高純度な抗体を得ることが可能であることから、PACをキャプチ

ヤー精製プロセス（初期精製）としてその精製プロセスがデザインされるのが一般的である。これが、抗体精製プラットフォームと呼ばれる所以であり、適切な抗体精製プラットフォームの構築は、冒頭に述べた課題に対する非常に有用なツールとなる。典型的な抗体精製プラットフォームをFig.2に示す。

Table 1 タンパク質クロマトグラフィーの種類

クロマトグラフィーの種類	原理	溶出方法
サイズ排除クロマトグラフィー	分子サイズ・形状	イソクラティック
イオン交換クロマトグラフィー	タンパク質電荷	直線的勾配、あるいは段階的勾配
疎水性相互作用 クロマトグラフィー	疎水性	直線的勾配、あるいは段階的勾配
逆相クロマトグラフィー	疎水性	直線的勾配、あるいは段階的勾配
アフィニティー クロマトグラフィー	目的タンパク質との 特異性	直線的勾配、あるいは段階的勾配
ミックスモード クロマトグラフィー	イオン交換、疎水性等の組 み合わせ	直線的勾配、あるいは段階的勾配

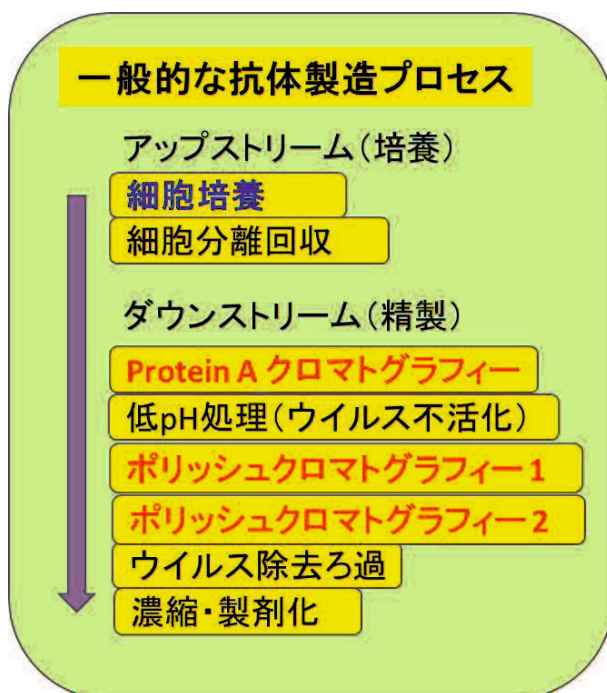


Fig.2 典型的な抗体精製プロセス

特に抗体精製プラットフォームの重要な工程であるクロマトグラフィーの効率化は最も重要な課題であると考えられる。PAC 工程はプラットフォーム化するために必須な工程であるが、高コストであることがボトルネックとなるため、プラットフォーム化に適した充填剤の選択は重要である。近年では PAC 担体の開発が飛躍的に進み、Fig.3 に示すような動的吸着容量 (DBC) の増加や高流速化といった高性能化がなされており、参入企業の増加に伴い、プロセスレベルで使用可能な PAC 担体の選択肢も増えている[1]。Protein A は、システイン残基を含まないアミノ酸残基 (~60 残基) から成る 5 つの IgG 結合ドメイン (E、D、A、B、C) と 2 つの細胞膜結合ドメイン (X,M) を有しているが (Fig.3)、Table 2 に示したような PAC 担体は、IgG 結合ドメインを改変することにより、アルカリ耐性を高くする等の Protein A 性能向上が図られている。例えば、MabSelect SuRe (GE Healthcare) は B ドメインを改変・多量体化し、KanCapA (KANEKA)、Toyopearl AF650 (Tosoh) はドメインを改変・多量体化している。担体毎にその改変手法が異なっているため、Protein A の構造が変化していることから、その構造認識部位も変化している可能性がある。

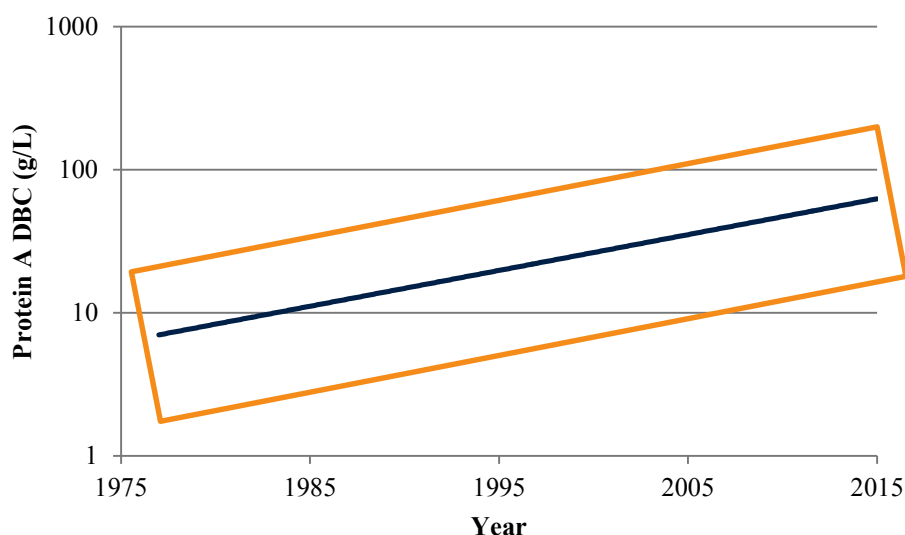


Fig. 3 PAC担体のDBCの変遷

(文献1のFig.1を改訂したもの)

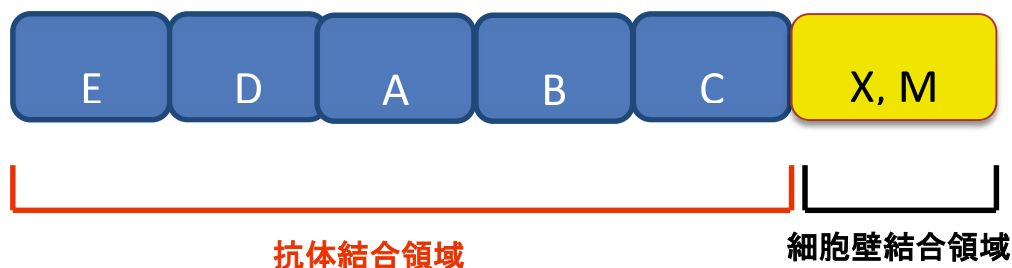


Fig.4 Protein Aリガンド

このような背景の中、近年、PACに関してコスト削減のための効率的な使用を目的とした研究が多く行われており、連続プロセスに関する研究も報告されている[2]。

一方、プラットフォーム化に向けた検討においては、DBCだけでなく、プロダクトの性質に依らずに一定品質のプロダクトが得られる充填剤が望まれる。しかしながら、PAC担体の目的がより多くのプロダクトを精製するためのキャプチャーであることや、分離モードが抗体に対する特異的結合を利用したアフィニティークロマトグラフィーであることから、その分離選択性に関する報告は少ない。

また、中間精製に一般的に用いられるイオン交換クロマトグラフィー (IEC) や、疎水相互作用クロマトグラフィーにおいても高性能化が進んでおり、その分離特性の詳細も理解されている。しかしながら、これらのクロマトグラフィーの分離条件等の検討においては、抗体に関して特異的な結合をする訳ではなく、タンパク質の持つアミノ酸の総電荷数や、疎水性に基づく分離モードであることから、抗体毎にDBCや分離特性等を考慮した検討を実施する必要がある。これらの検討は、経験則やDOE (実験計画法) に基づいて行われているのが現状であることから、効率的なプロセス開発手法の確立が必要であるが、モデル化することによりこれらの課題を克服することが可能と考えられ、そのような検討も実施されてきている。これらの背景をもとに、第2章では、PAC担体における吸着・分離特性の違いに着目し検討した。DBCや高流速化のような直接的に評価可能な生産性パラメータだけでなく、その分離特性を知ることが出来れば、製造プロセスの目的に応じた充填剤を選択出来、抗体精製プラットフォームを強化することが出来ると考えられる。また、第3章では、イオン交換クロマトグラフィーの効率的なプロセス開発手法の確立を目的とし、吸着特性の簡便な推算方法についての検討をモデル化により実施した。

第2章 Aggregate 除去に基づく Protein A アフィニティークロマトグラフィーの選択法

2.1 序論

抗体 (mAb) 精製において、Protein Aクロマトグラフィー (PAC) はmAbとの高い親和性、培養上清をカラムに直接吸着させることが可能といった利点から、広く用いられている [3-5]。一般的に、mAbのための典型的ダウンストリームプラットフォームプロセス (DSP) は3つのクロマトグラフィー・ステップから構成され、PACの後に2つのポリッシングクロマトグラフィー・ステップが実施される [3-5]。しかしながら、PAC担体が非常に高価なことから、ターゲットとなるmAb、あるいは効率的なプロセス構築のために最適なPAC担体を選択することが非常に重要な課題である。典型的なPAC操作は、Fig.6に図式的に示される。

PACの重要な特性の1つは、動的吸着容量 (DBC) であり、短い滞留時間において高いDBCを得ることが出来れば、カラム容量や工程時間を減らすことが可能であり、高い生産性を得ることが出来る [6-11]。DBCに加えて、収率と精製されたmAbの純度は、重要な問題である。PACカラムに結合したmAbは、酸性溶液 (pH 4.0 以下) によって溶出されるため、mAbの変性を避けるためにより穏やかな溶出条件が望まれる。不純物に関しては、宿主細胞タンパク質 (HCPs) と DNA [7,12] に加えて、aggregates が免疫原性反応を引き起こす [13, 14] ということが知られていることから、aggregates のような抗体由来の不純物、凝集物の除去が必須である。aggregates を PAC によって除去することが出来れば、以降のポリッシングクロマトグラフィー工程をより簡便にすることが出来、結果として、効率的で費用効果が高い DSP となる。

Protein A は mAb の Fc 領域を主に認識するが、Fab 領域との相互作用を有することも知られている [15, 16]。現在、アルカリ耐性 Protein A リガンドが開発され、水酸化ナトリウム溶液 [16-18] による PAC カラムの洗浄が可能である。そのようなアルカリ耐性リガンドは Fab との親和性が弱まることが報告されている [16-18]。不純物の非特異性の吸着も課題であり [7]、これは Protein A リガンドと PAC 担体のベースマトリックスの両方に依るものと考えられる。そのような非特異性の吸着を抑えるために、アルギニンのようなアミノ酸を含む溶液が洗浄、ならびに溶出が有用であることがよく知られている [19-21]。

本研究は、抗体医薬品の製造プロセスに必須の PAC による精製プロセス設計

の際の PAC 担体選択のために必要な DBC の比較、ならびに aggregates 除去に着眼した PAC 担体の選択法の提案を目的としている。本章では、DBC、および aggregates 除去の両方の観点から、各 PAC 担体の比較結果についてまとめた。

aggregates の溶出 pH を確認するために 5 種の PAC 担体における直線的 pH 勾配溶出実験を実施し、得られた aggregates 溶出挙動についてサイズ除外クロマトグラフィー (SEC) を用いて解析した。また、高いモノマー回収率で効率的に aggregates を取り除くために、2 つの異なる洗浄プロトコル (アルギニン無し、アルギニン有り) を用いた段階的溶出実験を行なった。

2.2 理論

2.2.1 アフィニティークロマトグラフィーとその利用

クロマトグラフィーは物質の物理的または化学的な性質の差を利用して目的物質を分離する方法である。物質の生物学的な性質、特異的親和力の差を利用して分離を行うクロマトグラフィーはアフィニティークロマトグラフィー (AC) と呼ばれ、高い選択性を有する分離手法である。

アフィニティー担体は、目的物質に対して生物学的親和性を有するリガンド(特異的相互作用を及ぼし合う物質対の一方)を不溶性基材に固定化して調製される。不溶性基材には、多孔性粒子が主に用いられる。目的物質とリガンドの結合が立体障害により阻害される場合には、基材とリガンドの間にスペーサーを導入すると効果的な場合がある。AC では、通常、親和性の高いリガンドと目的物質との組み合わせが選ばれるため、目的物質は吸着体に強く結合する。そのため、吸着体にできる限り多くの目的物質を吸着させた後に、pH、イオン強度、あるいは洗浄物質等の組み合わせにて不純物を洗い流した後に、適当な溶離条件 (pH、変性剤、イオン強度等) にて目的物質を回収する手法が用いられることが多い (Fig.6)。AC の操作は Fig.5 に示すように吸着、洗浄、溶離、再平衡化を 1 サイクルとする回分操作が一般的である。

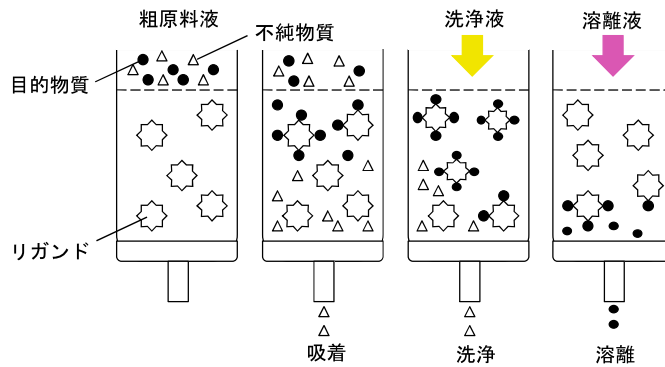
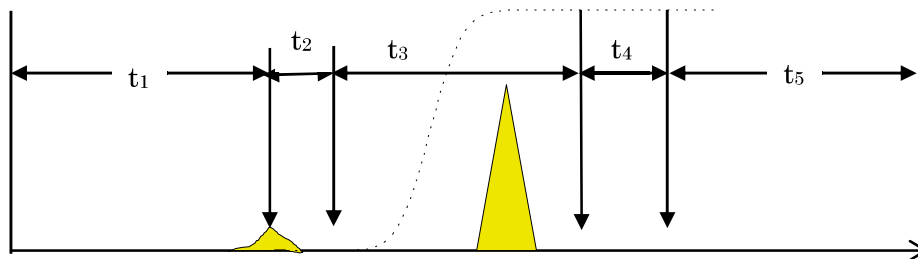


Fig.5 アフィニティークロマト(AC)原理



t_1 : 試料負荷、 t_2 : 不純物洗浄、 t_3 : 溶出、 t_4 : 充填剤洗浄、 t_5 : 再平衡化、 t_6 : 殺菌(CIP)

全操作時間 $t_c = t_1 + t_2 + t_3 + t_4 + t_5 (+t_6)$

Fig.6 アフィニティークロマトグラフィ(AC)操作模式図

2.2.2 吸着容量

吸着剤(充填剤)を充填した固定相(カラム)に目的物質(C_0)を含む液を供給すると、カラム入り口付近から順次吸着が進行し、吸着体は飽和されていく(Fig.7)。カラム内で吸着が進行するのは比較的短いゾーンで、これを吸着帯というが、吸着帯がカラム下端に達すると、Fig.7 に示すように流出液中に目的物質が現れ始める。そしてカラム内の吸着体が完全に飽和する(飽和吸着量 C_s)と、流出液中の目的物質濃度(C)は入口濃度(C_0)と等しくなる。この曲線が破過曲線である(Fig.8)。

破過曲線の形状は吸着平衡関係、吸着容量、目的物質の物質移動速度、供給

液流速などによって変わり、それに従って破過時間、それまでに全カラムで吸着される目的物質の量が増えることになる。ACでは通常破過点を基準として吸着操作は打ち切られるので（10%破過点の70–80%）、吸着条件を決定するためには破過曲線の形状を知ることが重要である。

どの担体においてもカラム形状は無次元濃度 $X(=C/C_0)=1$ に近づくにつれて穏やかになる傾向がある。

液体クロマトグラフィー(LC)の分離・精製において、カラムに破過点まで試料供給し、脱着操作を行う。一般に無次元濃度 $X(=C/C_0)=0.1$ になった点を破過点（10%破過、10%ブレイクスルーポイント）とし、破過点に達するまでの供給量を破過体積 V_B として動的吸着量（DBC）を算出する。また、 $X(=C/C_0)=0.55\sim 0.6$ になった点を V_C として静的吸着量（SBC）と飽和吸着量 C_s をそれぞれ算出する。DBCは理論段数 N と同様に移動相混合拡散、固定相拡散、境膜物質移動の寄与により決定されるが、タンパク質のクロマトグラフィーでは固定相拡散支配となる。

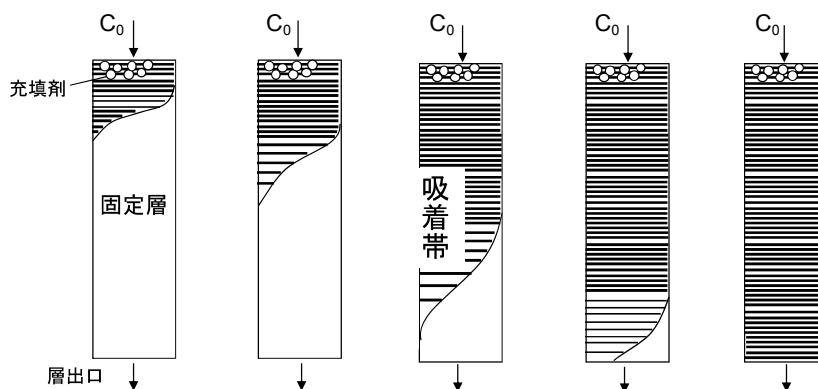


Fig.7 固定相内溶液濃度分布

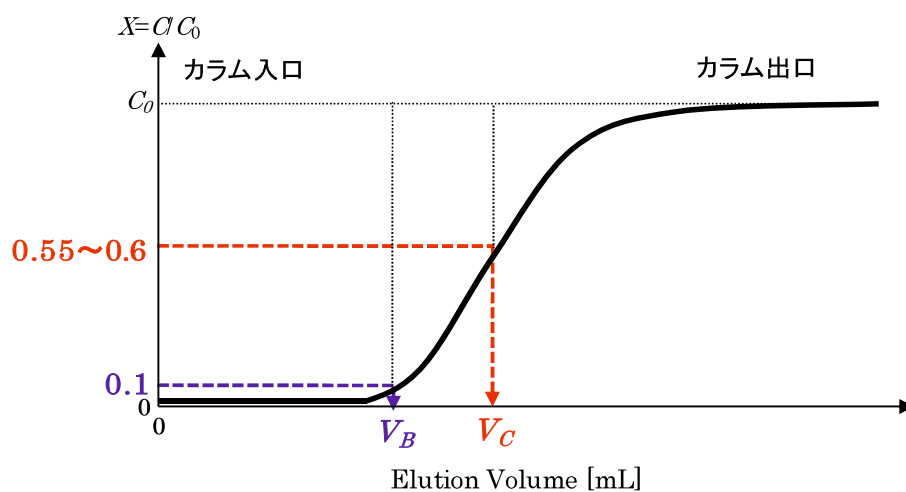


Fig.8 破過曲線

2.3 材料と方法

2.3.1 モノクローナル抗体

3種のモノクローナル抗体 mAb-A、mAb-B、及びmAb-Cを本研究に使用した。mAb-Aは、無血清馴化したNS0細胞を用い、無血清培地にて、37°C、12日間培養し、抗体生産量は0.64 g/Lであった。この培養上清を、PAC、及び2つのIECで精製し、DBC測定に用いた。mAb-B、及びmAb-Cは、無血清馴化したCHO細胞を無血清培地にて、37°C、14日間培養し、抗体生産量は、それぞれ0.89 g/L、1.36 g/Lであった。この2種の培養上清を直線的pH勾配溶出、段階的溶出実験に用いた。

2.3.2 PAC担体及びカラム

本研究に使用した5種のPAC担体をTable 2に示す。直線的pH勾配溶出実験、及びDBC測定には1 mLプレパックカラムを用いた。また、段階的溶出実験には約5 mLのプレパックカラムを用いた。すべてのプレパックカラムはサプライヤーより購入したものをを用いた。

Table 2 本研究で使用した各担体の特性

PAC 担体	Supplier	d_p [μm]	Alkaline resistance	Base matrix	V_t [mL]	
					直線的 pH 勾配溶出実験	段階的溶出 実験
ProSep UltraPlus	MerckMillipore	60	No	Glass	1	5
MabSelect	GE-HealthCare	85	No	Agarose	1	4.7
MabSelect SuRe	GE-HealthCare	85	Yes	Agarose	1	4.7
Toyoperal AF650	Tosoh	40	Yes	Poly- methacrylate	1	5
KanCapA	KANEKA	75	Yes	Cellulose	1	5

d_p = nominal particle diameter, V_t = packed bed volume

2.3.3 クロマトグラフィー装置

クロマトグラフィー装置は GE ヘルスケア 自動化液体クロマトグラフィーシステム ÄKTA explorer 100 および ÄKTA FPLC を用いた。これらのシステムの概略図を Fig.9 に示す。

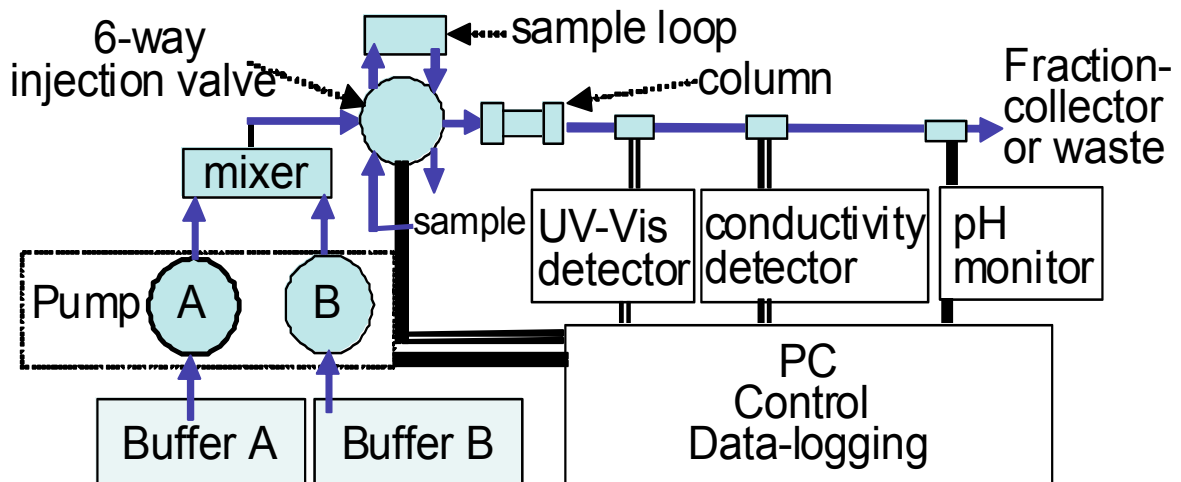


Fig.9 クロマトグラフィー装置の概略図

2.3.4 DBC の測定

平衡化バッファー(0.02M リン酸ナトリウム緩衝液/0.14M 塩化ナトリウム, pH 7.5)でカラムを平衡化し、精製された mAb-A を測定波長 280 nm で初期濃度の 10%となるまでロードしたところを DBC とした。ロード後、平衡化バッファーで洗浄し、溶出バッファー(0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液/0.06M 塩化ナトリウム, pH 3.5)で溶出した。測定温度は室温とした。

2.3.5 直線的 pH 勾配溶出実験

平衡化バッファー(0.02M リン酸ナトリウム / 0.02M クエン酸緩衝液, pH 6.0)で平衡化後、カラム 1 mL あたり 15 mg の抗体試料をロードした。5 C.V の平衡化バッファーで洗浄後、平衡化バッファーから 0.02M クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 3.5 を用いて、20 C.V の直線的勾配溶出を実施した。流速は 0.33 mL/min (接触時間 3 分)とした。各フラクションサンプルは 1 mL ずつ分画し、吸光度 280 nm で測定した。得られたフラクションサンプルのモノマー含量はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析カラムで分析した。

2.3.6 段階的溶出実験

接触時間は、ガラス基材の ProSep UltraPlus は 2.5 分とし、それ以外の 4 種のカラムは 4 分とした。サンプルは 2.2.3 章で示した 3 種の培養上清を用い、それぞれ洗浄条件の異なる 2 つのプロトコールで実験を行った。

・プロトコール A : 平衡化バッファー(0.02M リン酸ナトリウム緩衝液/0.14M NaCl, pH 7.5)により平衡化した各々のカラムに培養上清を 30 mg/mL-bed となるようロード後、7.5 C.V の平衡化バッファーで洗浄した。洗浄後、溶出バッファー(0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 / 0.06M NaCl, pH 3.5)により、目的画分を溶出し、測定波長 280 nm における吸光度 1.0 以上のピークを溶出画分とした。

・プロトコール B : アルギニン溶液による洗浄においては、ロード後、4 C.V の平衡化バッファー、5 C.V の 1.0M アルギニン, pH 7.5、4 C.V の平衡化バッファーで洗浄した。ロード、及び溶出条件はプロトコール A と同様とし、測定波長 280 nm における吸光度 1.0 以上のピークを溶出画分とした。

なお、ProSep UltraPlus, 及び MabSelect については、アルギニン 1.0M に加えて、1.5M、2.0M についても比較した。

2.3.7 抗体濃度の測定

mAbs の濃度測定には分析用 Protein G アフィニティーカラム(POROS G20, 4.6 mm I.D × 50 mm, Applied Biosystems)を用い、流速は 5 mL/min とした。カラムの平衡化と洗浄には 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 / 0.15M 塩化ナトリウム (pH 7.5) を用い、溶出には 0.15M 塩化ナトリウムを含む希塩酸溶液 (pH 2) で溶出した。測定波長は 280 nm とした。

2.3.8 モノマー含量の分析

モノマー含量分析には分析用 SEC カラム TSKgel Super SW 3000 (7.8 mm id×300 mm, Tosoh Bioscience, Japan)を用いた。移動相は 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液 / 0.15M 塩化ナトリウム, pH 7.5 を用い、流速は 0.5 mL/min、測定波長は 280 nm とした。HPLC 装置は Agilent 1100、1200 シリーズ (Agilent, USA) を用い、室温下で分析した。

2.3.9 SDS PAGE による解析

SDS PAGE 用ゲルは 4-12% Bis-Tris NuPAGE pre-cast polyacrylamide gel (Life Technologies, USA)、MOPS running buffer を用いた。サンプルはリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で抗体濃度 1 mg/mL となるよう希釈した。素通り画分のような低濃度のサンプルは希釈無しとした。サンプル 65 μ L を 25 μ L の NuPAGE lithium dodecylsulfate (LDS) sample buffer (×4) と 10 μ L の NuPAGE sample reducing agent と混合し、70°C で 10 分間インキュベートした。非還元 SDS PAGE の場合には、NuPAGE sample reducing agent をミリ Q 水として混合した。分子量マーカーは、SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Life Technologies) を用いた。サンプル 10 μ L をゲルにロードし、150 V、65 分間泳動し、GelCode Blue Stain Reagent (PIERCE, USA) で染色した。

2.4 結果

2.4.1 mAb-Aを用いたDBCの比較

DBC は PAC における最初の重要な特性であり、現在、商品化されている PAC 担体の殆どは、4 分程度の接触時間で 35~40 mg/mL 以上の DBC を有している。mAb-A を用いた 10%ブレイクスルーポイントにおける DBC の比較結果を Table 3 に示す。その結果、ProSep UltraPlus の DBC は既報 [21] と同様の値である他の 4 種の担体よりも高い値を示した。

Table 3 本研究で用いた PAC 担体の DBC の比較

Name	DBC [mg/mL-bed]	RT [min]
ProSep UltraPlus	55	2.5
MabSelect	44	4
MabSelect SuRe	46	4
Toyoperal AF-650	33	4
KanCapA	45	4

DBC = dynamic binding capacity at 10% breakthrough、RT = residence time

2.4.2 直線的 pH 勾配溶出実験

サンプルとして mAb-B、mAb-C を用いて、直線的 pH 勾配溶出実験を行なった。結果を Figs.11-1~11.5、及び Figs.12-1~12-5 に示す。mAb-B では aggregates は抗体主ピークよりも遅れて溶出された。即ち、aggregates は PAC カラムにより強く結合し、溶出のためには低い pH が必要となる。類似の溶出挙動は既に報告されており [22-23]、その挙動は Fig.10 によって示される。しかしながら、mAb-C における aggregates の溶出挙動は、mAb-B の挙動と比較して、複雑な挙動を示し (Figs.12-1~12.5)、MabSelect SuRe のデータで示すように、2 つのピークが確認された。この結果から、mAb-C において、2 つの異なるタイプの aggregates が存在することが示された。そして、その 1 つのピークは PAC へのより弱い親和性を持つと考えられた。

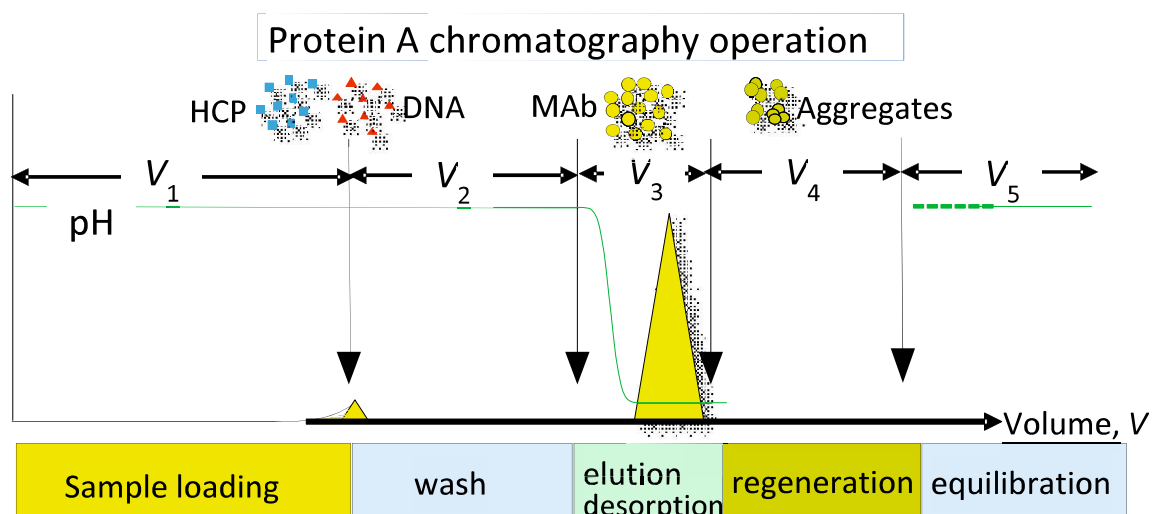


Fig. 10 Protein A アフィニティークロマトグラフィー (PAC) 操作

The sample solution containing mAb (target material), contaminants such as host cell proteins (HCPs) and DNAs, and aggregates is fed to the column before the breakthrough of mAb occurs. This volume, V_1 , is often used for calculating the dynamic binding capacity (DBC) as $DBC = C_F V_1 / V_t$ where C_F = sample mAb concentration and V_t = column bed volume. After the sample loading period, the column is washed to remove HCPs and DNAs remained. The low-pH solution is applied to the column to elute (desorb) the product (mAb). Aggregates is expected to be bound the column, which is desorbed during the regeneration period.

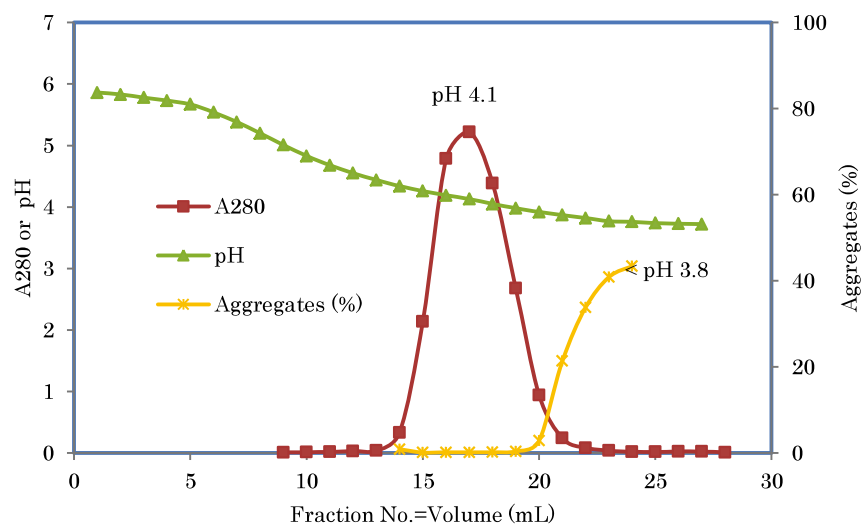


Fig. 11-1 mAb-B における ProSep UltraPlus の直線的 pH 勾配溶出プロフィール

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

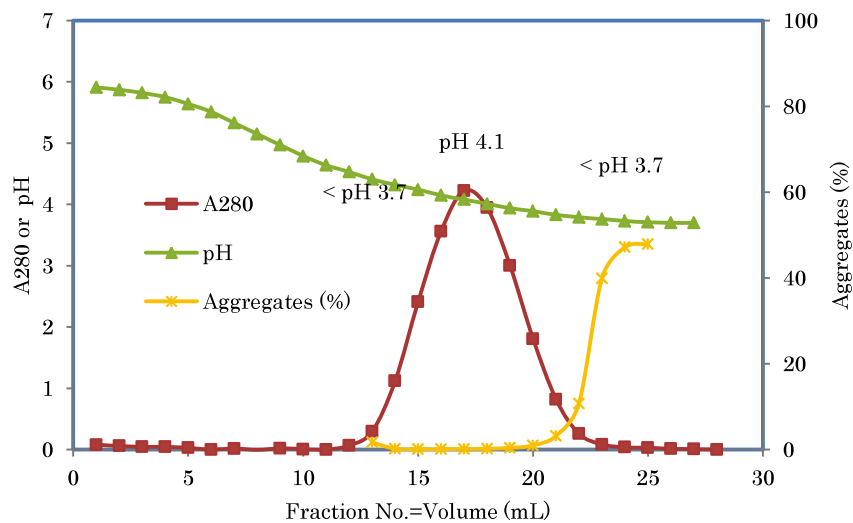


Fig. 11-2 mAb-B における MabSelect の直線的 pH 勾配溶出プロフィール

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

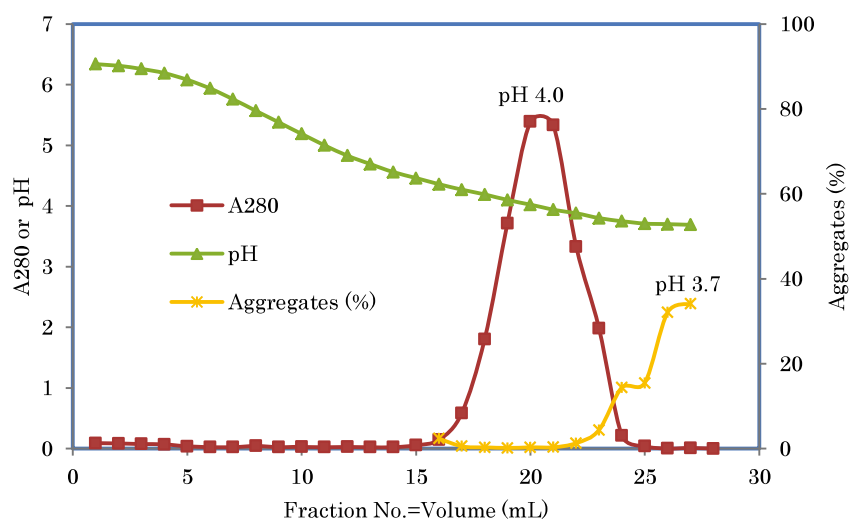


Fig. 11-3 mAb-B における MabSelect SuRe の直線的 pH 勾配溶出プロフィール
 Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

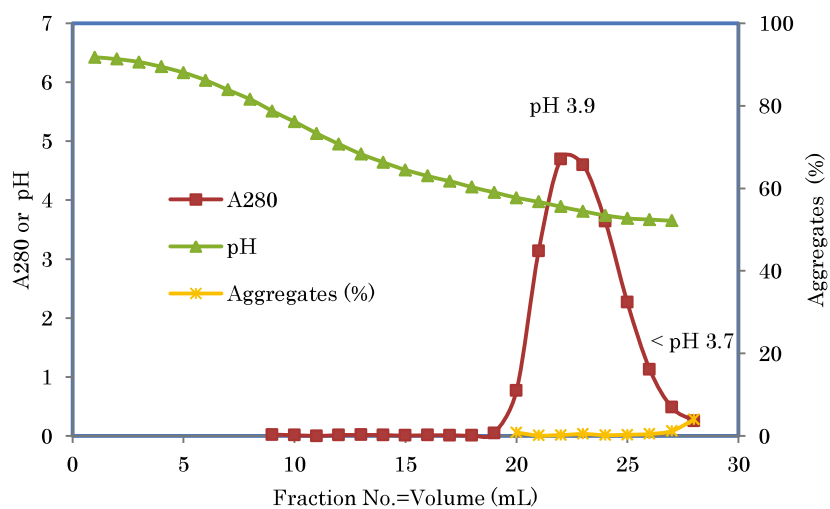


Fig. 11-4 mAb-B における Toyopearl AF650 の直線的 pH 勾配溶出プロフィール

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

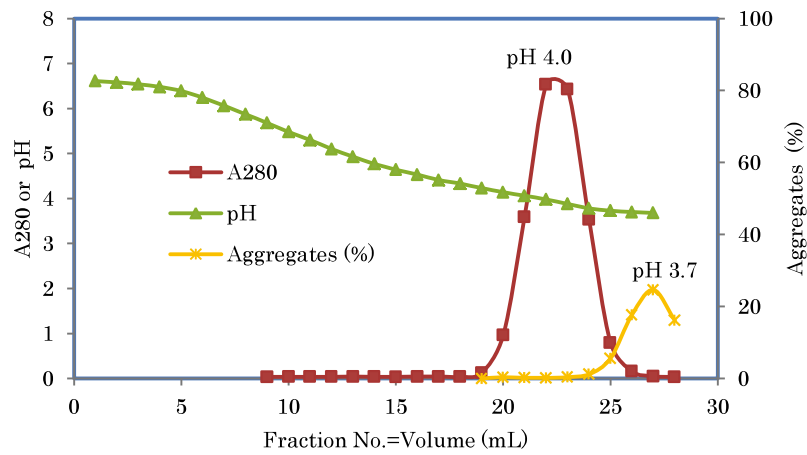


Fig. 11-5 mAb-B における KanCapA の直線的 pH 勾配溶出プロファイル
 Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

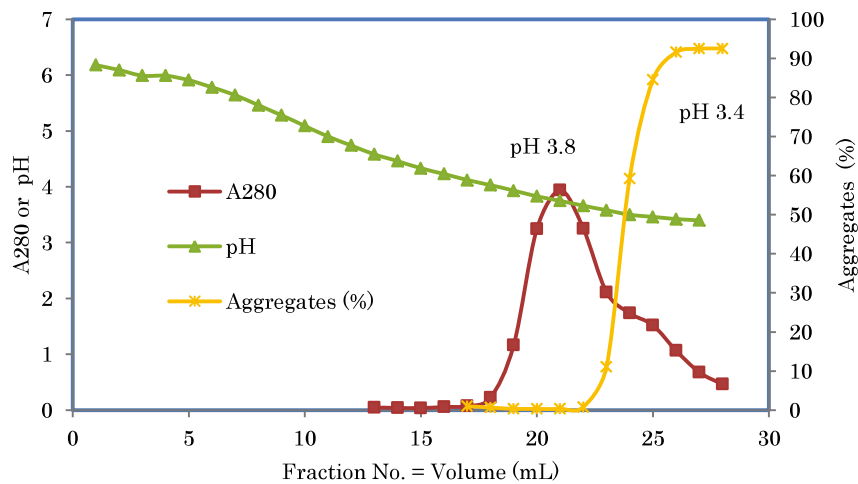


Fig. 12-1 mAb-C における ProSep UltraPlus の直線的 pH 勾配溶出プロファイル

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

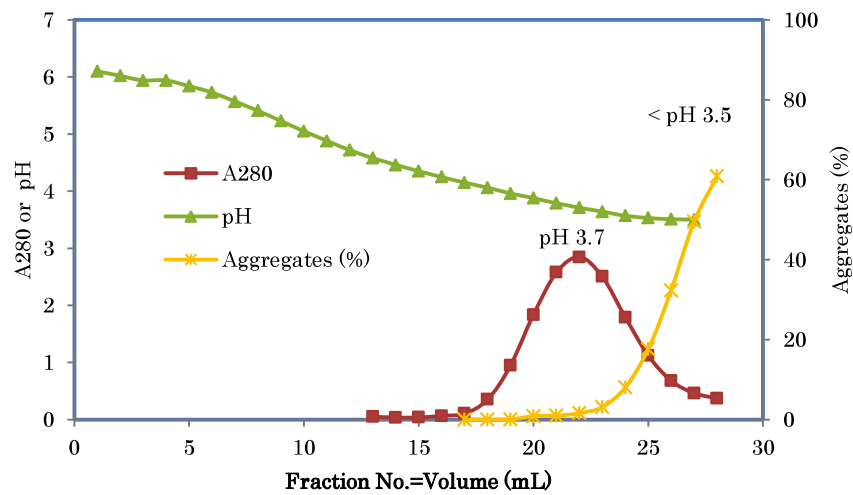


Fig. 12-2 mAb-C における MabSelect の直線的 pH 勾配溶出プロファイル
 Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

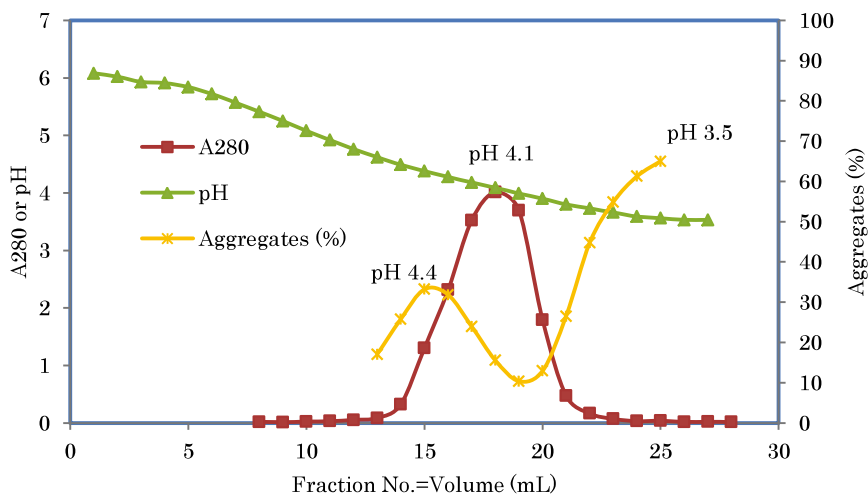


Fig. 12-3 mAb-C における MabSelect SuRe の直線的 pH 勾配溶出プロファイル
 Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

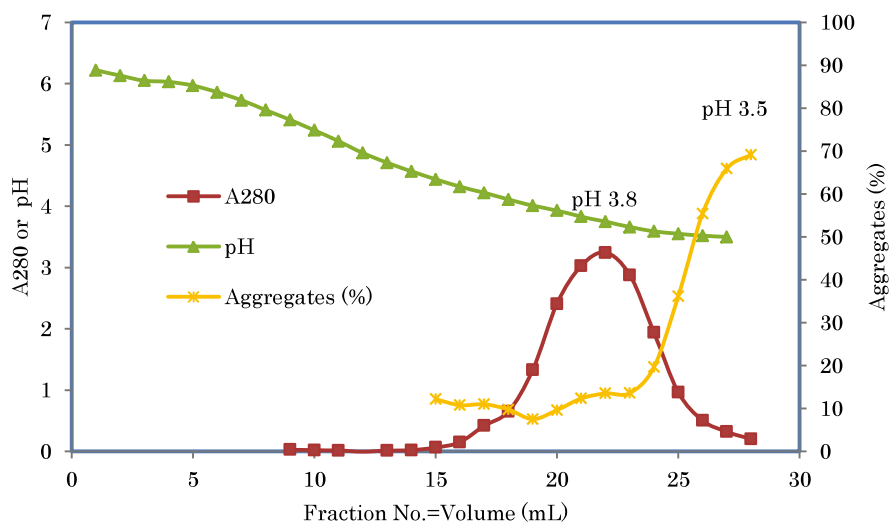


Fig. 12-4 mAb-C における Toyopearl AF650 の直線的 pH 勾配溶出プロフィール

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

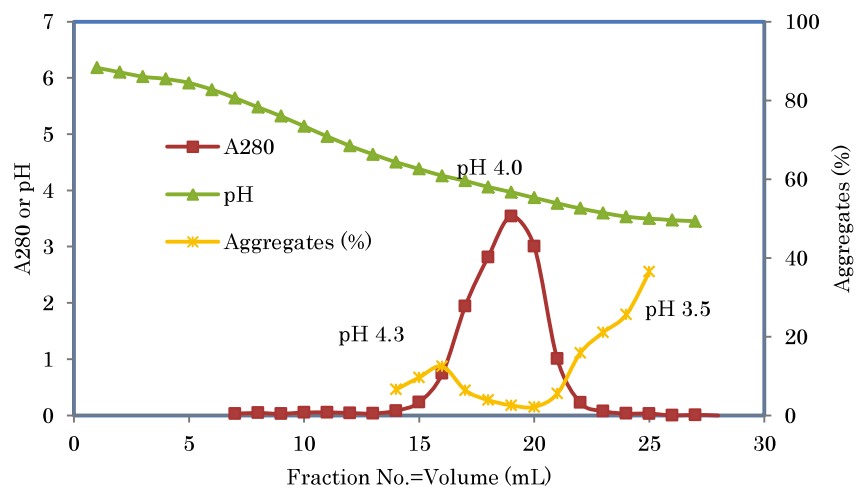


Fig. 12-5 mAb-C における KanCapA の直線的 pH 勾配溶出プロフィール

Fraction volume was 1 mL. Aggregates content is the ratio of aggregates to the total mAb in the fraction analyzed by SEC.

2.4.3. 段階的溶出による Aggregates 除去

mAb-C における両方のタイプの aggregates を除去するためのサンプルロード後における効果的な洗浄プロトコルを検討した (Fig.13)。これまで、いくつか

の洗浄プロトコルが、非特異的に吸着された不純物を除去するために提案されてきた[11, 20]。その中で、タンパク質-タンパク質相互作用や疎水的相互作用を抑えることが可能であるアルギニンが効果的な添加物であることを知られており、洗浄バッファーにしばしば用いられている[18-20]。我々はアルギニンの aggregates 除去に対する効果を 2.3.6 章で述べたプロトコル B (アルギニン有り) を用いて調べた。プロトコル A (アルギニン無し)、及びプロトコル B (アルギニン有り)、それぞれの溶出曲線を Figs.14-1~14-5 に示す。遺伝子工学的に改変されたアルカリ耐性リガンドを有する担体である MabSelect SuRe、Toyopearl AF650 において、洗浄ステップの段階で多くの aggregates が溶出され、アルギニンによる洗浄によりモノマー含量を向上させることが可能であった (Table 4) (Fig.16-1, 16-2) 一方、Native Protein A リガンド (ProSep UltraPlus、MabSelect) に対するアルギニン添加の効果は改変リガンドと比較して少なかった (Table 4) (Fig.15-1, 15-2)。効果の少なかった ProSep UltraPlus と MabSelect について、アルギニン濃度を高めて洗浄ステップを実施したが同様の結果であった (Table 5)。

改変リガンドにおいて、アルギニンによる洗浄が効果的であることが分かったが、アルギニンは非常に高コストであること、高濃度アミノ酸であるため、排水処理への負荷が大きいことから、製造コストを考慮した場合、アルギニン無しの洗浄プロトコルが望ましい。KanCapA において、プロトコル A (アルギニン無し) で得られるモノマー含量は、プロトコル B (アルギニン有り) とほとんど同じであることが分かったことから (Table 4, Fig.17-1, 17-2)、プロトコル A (アルギニン無し) で aggregates が KanCapA-PAC から効果的に洗浄可能なことが示唆された。これを確かめるために、サンプルロードから洗浄までの素通り画分を KanCapA-PAC から分画し、MabSelect SuRe-PAC (Fig.18 (A)) のサンプルとして使用した。その結果、Fig. 18 (B)で示すように、シャープなピークが MabSelect SuRe-PAC から得られ、その大部分が Aggregates であることが確認された。

ProSep UltraPlus、MabSelect SuRe、及び KanCapA-PAC カラムから溶出したフラクションを還元 SDS-PAGE、非還元 SDS-PAGE によりそれぞれ分析した。非還元 SDS-PAGE の結果 (Fig.19 A のレーン 2) から、KanCapA の素通り画分に多量の aggregates が含まれていることが分かった。しかしながら、Heavy Chain は Fig.19 B (還元 SDS-PAGE) のレーン 2 で観察されず、Heavy Chain より分子

量が小さなバンドが認められた。N末端シーケンス分析によってこのバンドを解析した結果、Fc領域が欠損した Heavy Chain であることが確認された。この結果から、mAb 由来の Aggregates が KanCapA に結合せず、素通りすると考えられた。類似した結果が MabSelect SuRe で得られたが、Fig.19A と 19 B のレーン 6 に示されるように、素通り画分の aggregates は KanCapA と比較してより少なかった。

aggregates が Protein A に結合することを考慮すると、PAC 工程で aggregates を除去することは困難であることが考えられる。しかしながら、幾つかの研究結果から、aggregates が mAb モノマーより強く PAC と結合する傾向があることが分かっており、適切な溶出条件を調整することにより、より強く結合した aggregates を除去することが可能であることも示唆された。

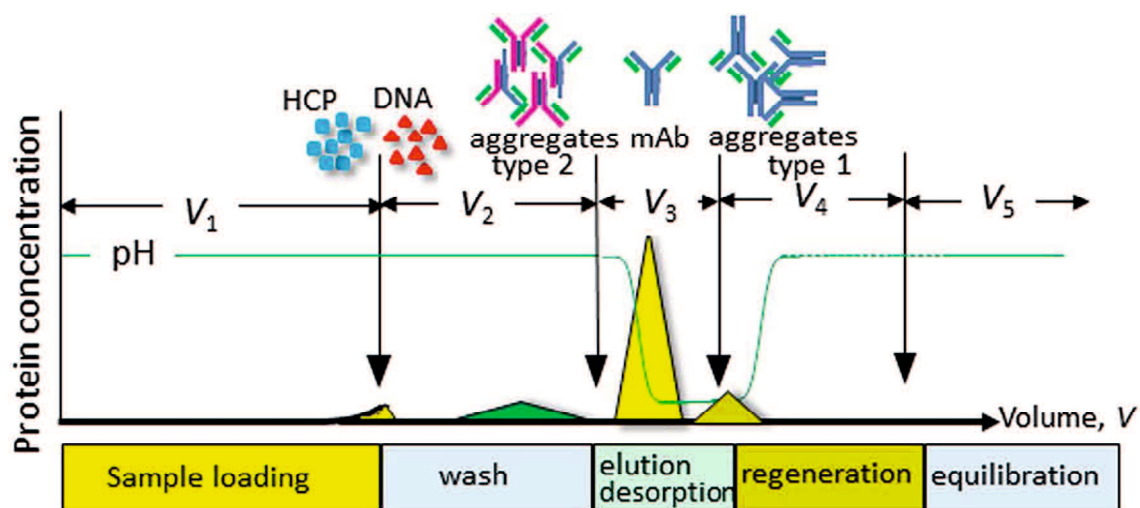


Fig.13 Protein A アフィニティークロマトグラフィー操作

Protein A chromatography is commonly used as an efficient capture step in mAb separation. By choosing the right protein A chromatography media, different types of aggregates (type 1: normal mAb-stronger binding and type 2: hybrid and truncated mAb weaker binding) can be efficiently removed during the wash and the elution periods. This study proposes a method to select the best media, which can make the following polishing chromatography steps easier.

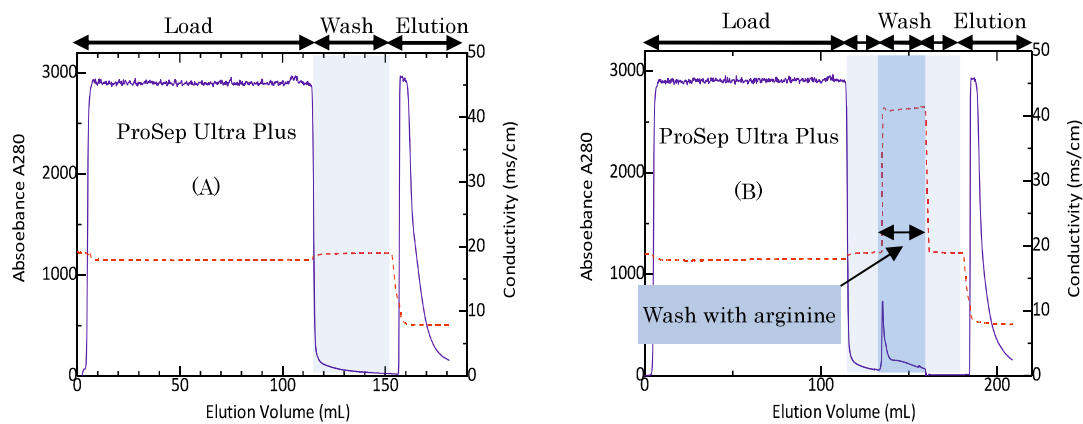


Fig. 14-1 ProSep UltraPlus における 2 種の異なる洗浄プロトコルを用いた mAb-C の段階的溶出 PAC

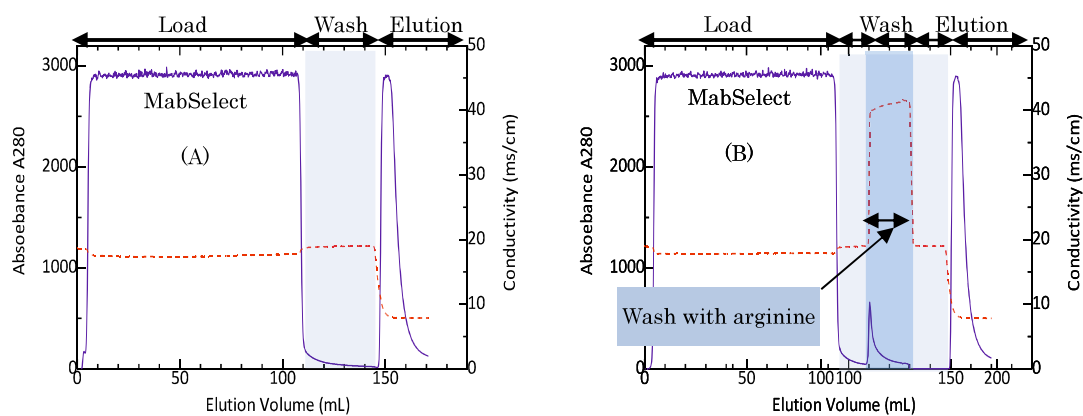


Fig. 14-2 MabSelect における 2 種の異なる洗浄プロトコルを用いた mAb-C の段階的溶出 PAC

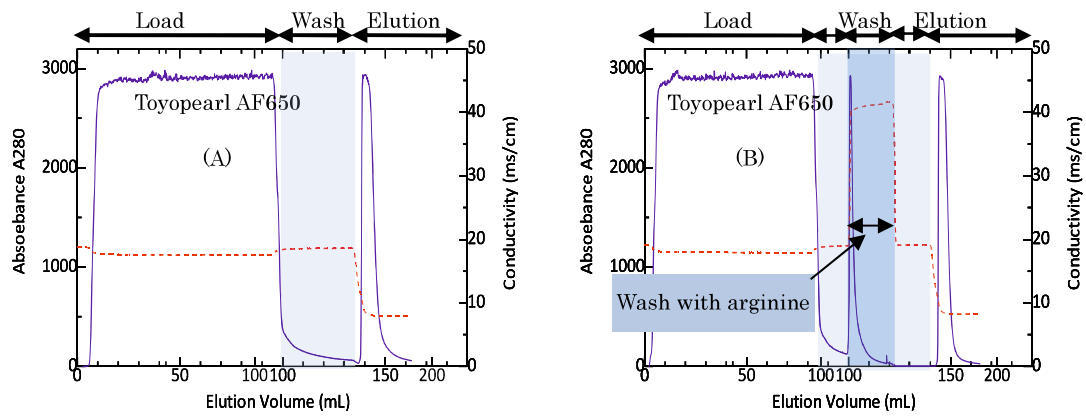


Fig. 14-3 Toyopearl AF650 における 2 種の異なる洗浄プロトコルを用いた mAb-C の段階的溶出 PAC

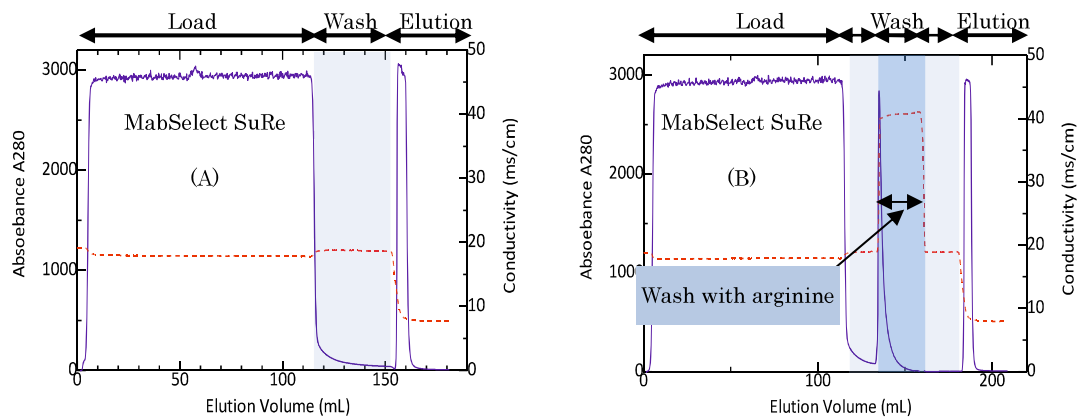


Fig. 14-4 MabSelect SuRe における 2 種の異なる洗浄プロトコルを用いた mAb-C の段階的溶出 PAC

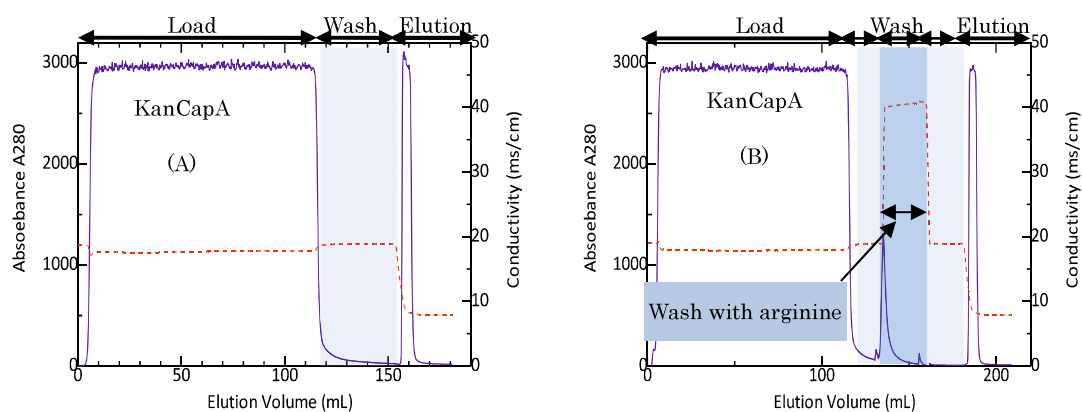


Fig. 14-5 KanCapA における 2 種の異なる洗浄プロトコルを用いた mAb-C の段階的溶出 PAC

Table 4 段階的溶出クロマトグラフィーによるmAb-Cのモノマー含量とモノマー収率

PAC rein	Alkaline resistance	Monomer content ¹ [%]		Monomer Yield ² [%]	
		Protocol A Non-arginine wash	Protocol B Arginine wash	Protocol A Non-arginine wash	Protocol B Arginine wash
ProSep UltraPlus	No	72	75	61	60
MabSelect	No	79	87	61	57
MabSelect SuRe	Yes	74	95	60	61
Toyoperal AF-650	Yes	75	95	57	56
KanCapA	Yes	94	95	60	59

¹ Monomer content was calculated as the ratio of the recovered monomer to the total mAb recovered (monomer + aggregates) by SEC.

² Monomer yield was calculated as the ratio of the recovered monomer to the amount of mAb in the load sample.

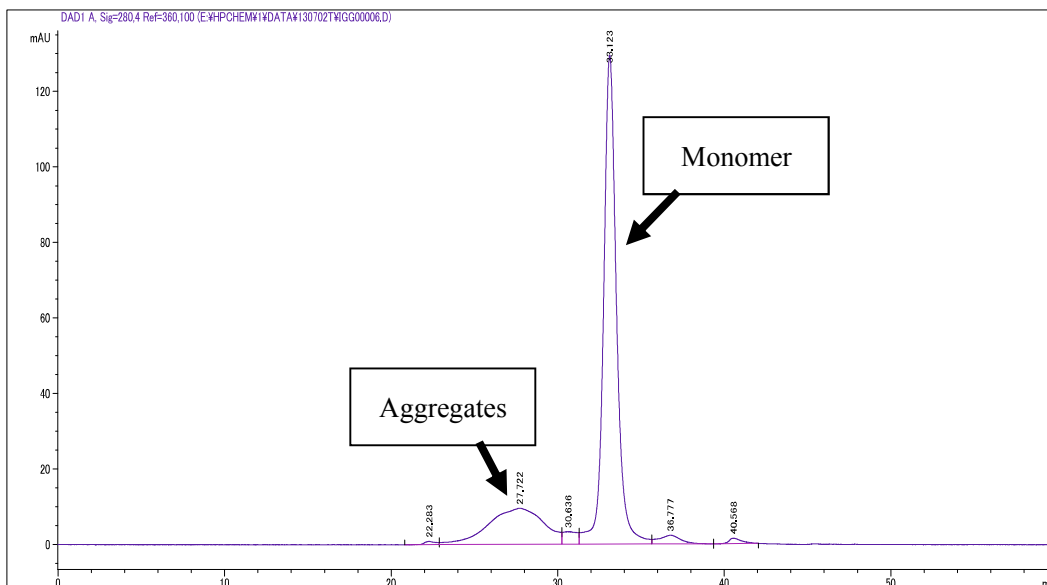


Fig.15-1 プロトコル A を用いた場合の ProSep UltraPlus-PAC における溶出画面の SEC クロマトグラム

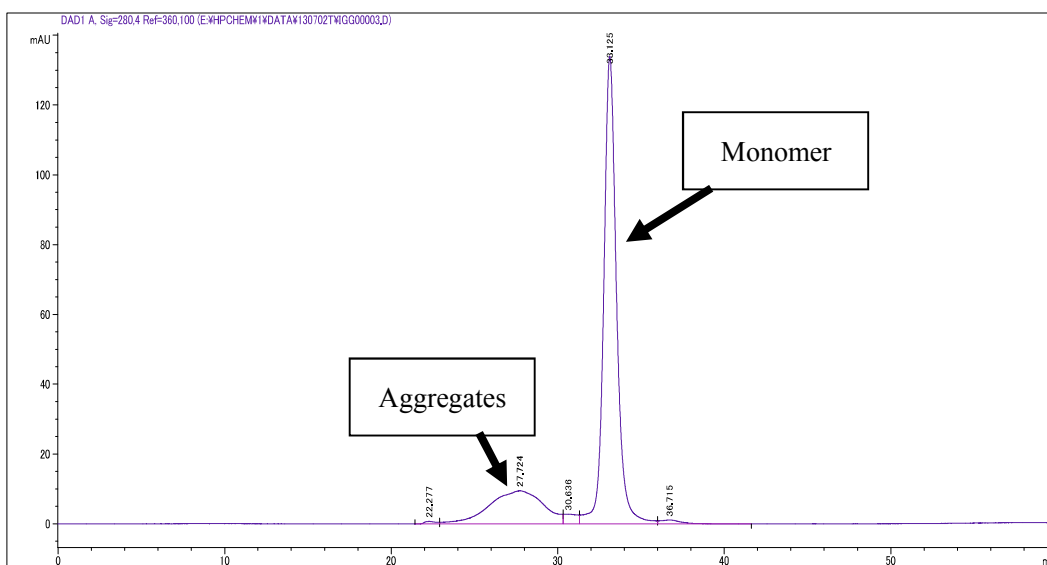


Fig.15-2 プロトコル B を用いた場合の ProSep UltraPlus-PAC における溶出画面の SEC クロマトグラム

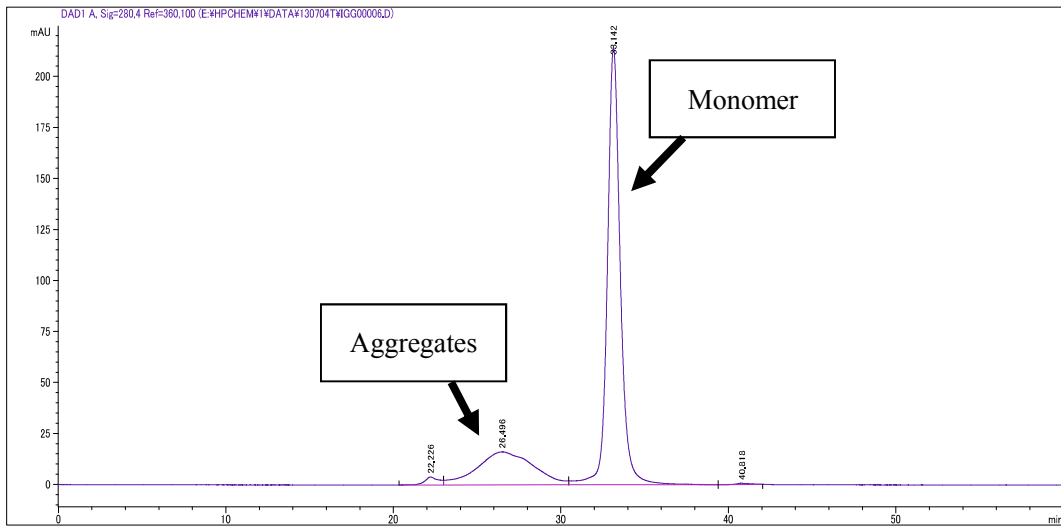


Fig.16-1 プロトコルAを用いた場合の MabSelect SuRe-PAC における溶出画分の SEC クロマトグラム

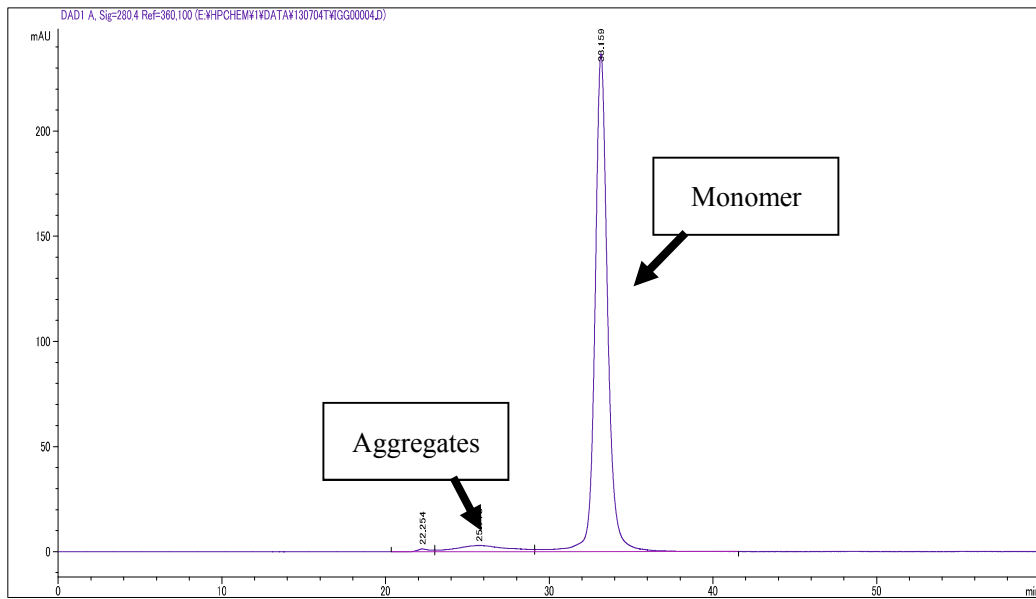


Fig.16-2 プロトコルBを用いた場合の MabSelect SuRe-PAC における溶出画分の SEC クロマトグラム

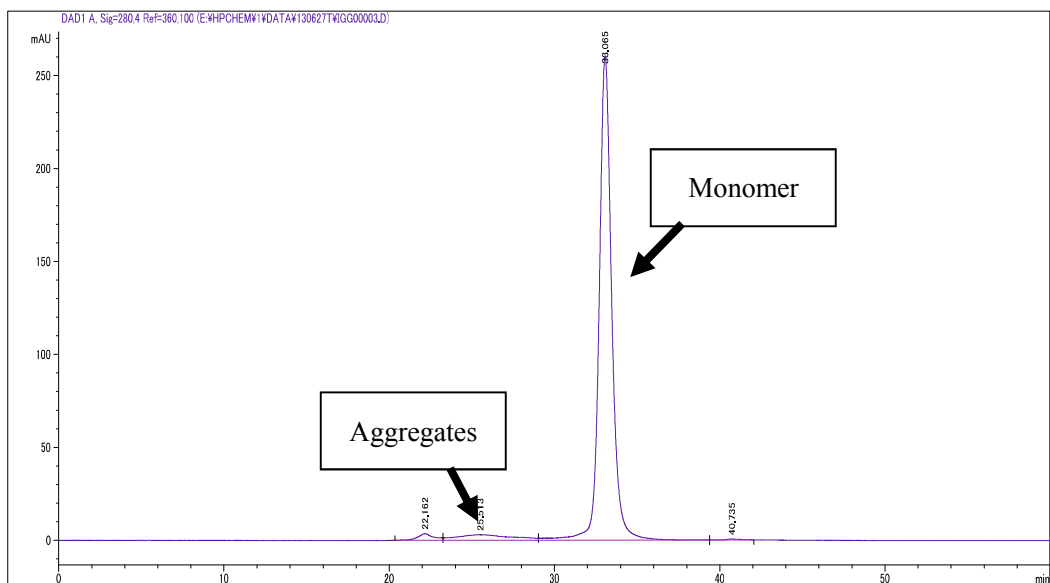


Fig.17-1 プロトコル A を用いた場合の KanCapA-PAC における溶出画分の SEC クロマトグラム

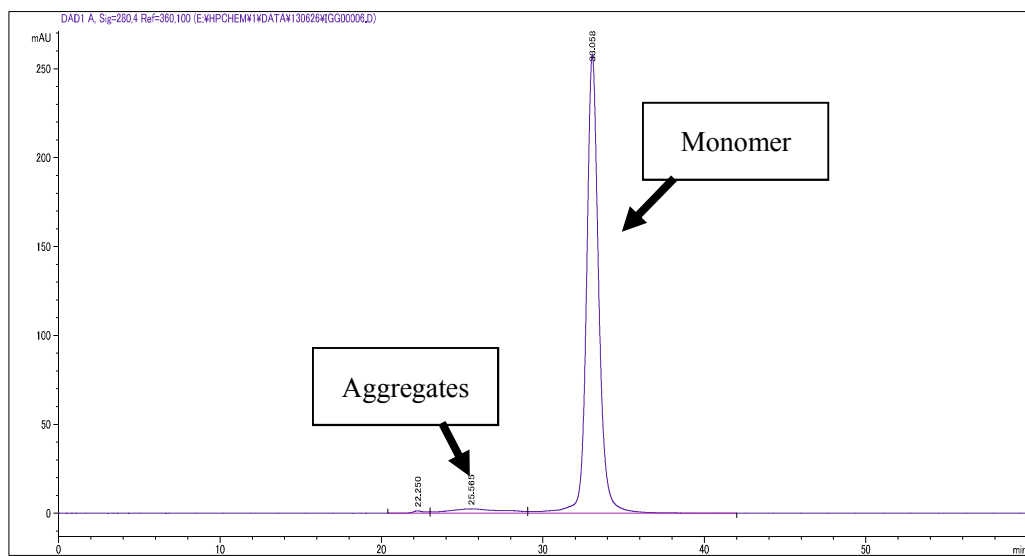


Fig.17-2 プロトコル B を用いた場合の KanCapA-PAC における溶出画分の SEC クロマトグラム

Table 5 Native Protein Aリガンドにおけるアルギニンの効果の検証

PAC resin	Monomer content ¹ [%]			Monomer Yield ² [%]		
	1.0M Arginine wash	1.5M Arginine wash	2.0M Arginine wash	1.0M Arginine wash	1.5M Arginine wash	2.0M Arginine wash
ProSep UltraPlus	75	78	79	60	60	59
MabSelect	87	86	86	57	59	58

¹ Monomer content was calculated as the ratio of the recovered monomer to the total mAb recovered (monomer +aggregates) by SEC.

² Monomer yield was calculated as the ratio of the recovered monomer to the amount of mAb in the load sample.

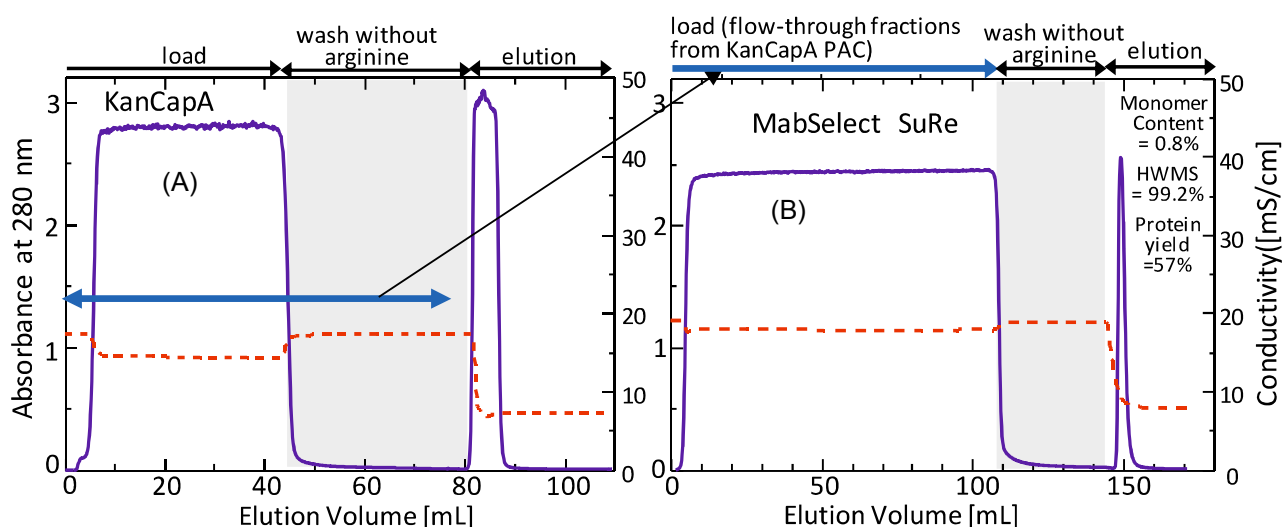


Fig.18 MabSelect Sure における KanCapA 素通り画分の段階的溶出 PAC

Protocol A was used for both experiments. The sample for MabSelect Sure PAC was the pooled fraction from the start to the elution volume of 75 mL for KanCapA PAC stepwise elution.

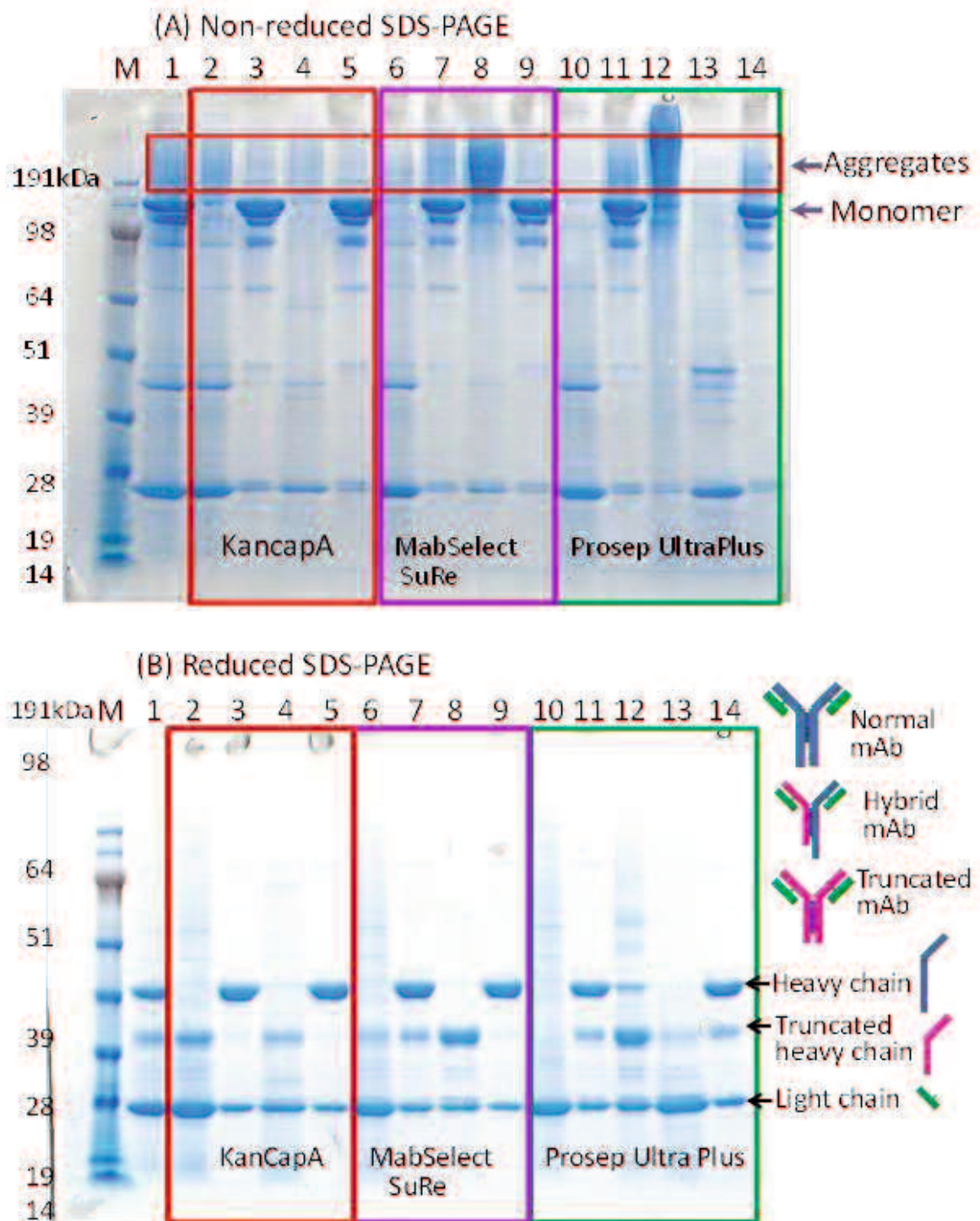


Fig. 19 KanCapA, MabSelect SuRe, and ProSep UltraPlus を用いた段階的溶出クロマトグラフィーの溶出フラクションの SDS PAGE による解析

Lane 1: Culture supernatant, Lane 2: Flow-through, Lane 3: Eluate (without arginine wash), Lane 4: Arginine wash peak, Lane 5: Eluate (with arginine wash), Lane 6: Flow-through, Lane 7: Eluate (with arginine wash), Lane 8: Arginine wash peak, Lane 9: Eluate (with arginine wash), Lane 10: Flow-through, Lane 11: Eluate (without arginine wash), Lane 12: CIP peak (After elution, Non arginine wash), Lane 13: Arginine wash peak, Lane 14: Eluate (with arginine wash). The sample was the clarified cell culture supernatant of mAb-C.

2.5 小括

aggregates が PAC において、Protein A リガンドにより強く結合し[21-24]、mAb モノマーと一緒に溶出されることが予想されたため、PAC 操作によって aggregates を除去することは困難であると考えられる。

本研究において、これまで報告されている aggregates と異なるタイプの PAC に弱い親和性を示す aggregates が観察された。本研究結果から、このタイプの aggregates が Fig.20 (C) (c)中にタイプ2の aggregates として示した通り、Protein A リガンドに結合出来る Fc 領域の数が異なることが示唆された。この Fc 領域は、立体構造中に埋もれたり、消失していたりする可能性が考えられる、あるいは、タンパク質構造が変化していることが考えられることから[26]、PAC への親和性が、弱くなることが示唆された。これまで、回収した mAb の純度を向上するために、幾つかの洗浄プロトコルの重要性が報告されている[11, 18-21]。しかしながら、これらの報告されている洗浄プロトコルは殆どの場合、PAC によって aggregates を除去することが困難と考えられるため、それらの洗浄プロトコルは宿主細胞タンパク質のクリアランスにフォーカスされている[4, 12]。Teeter らによって示される通り、Fig.20 中の強く保持された aggregates (B) (b)のために、選択的なモノマーの溶出を可能にするような溶出プロトコルを設計出来る可能性が示唆された[22]。

遺伝子組換えアルカリ耐性 protein A リガンドは、Fab との親和性を失うことがこれまで報告されており[15-17]、KanCapA と Toypearl AF650 では C ドメインの遺伝子を変異させたのに対して、MabSelectSuRe は、B ドメインの遺伝子が組み替えられている。これらの担体は、Fab、あるいは異なる種類の aggregates に対して、同様の親和性を示すものと考えられる。しかしながら、本研究において、PAC 担体間における DBC の値は顕著な差が見られなかった一方で、aggregates

の溶出挙動は PAC 担体間で異なる結果となった。そのような親和性の差異は DBC に直接的な関係がないため、事前に PAC に対する異なる種類の aggregates の親和性を予測することは不可能と考えられる。改変リガンドの Fab に対する親和性が殆ど無いことはよく知られている一方、本研究によって、Fc の構造の違いや、それらを含む凝集体への構造認識が、改変リガンド毎に異なることが明らかにされた。また、この特性を利用して、適当な担体を選定することにより、これら目的物由来不純物 (aggregates) を効果的に除去できることが示された。

更に、直線的 pH 勾配溶出実験は重要な情報を提供することが出来、ターゲットとなる mAb の適切な段階的溶出クロマトグラフィーのプロトコルを設計するための有用な手法として用いることが出来ることが分かった。

溶出におけるもう一つの重要な問題は溶出 pH であり、溶出 pH が低すぎる場合 (pH < 3)、回収された mAb の品質を低下させる可能性があり、それは低 pH 溶出中、あるいは溶出後に aggregates が生じると考えられる[27-29]。アルカリ耐性 protein A リガンドからの溶出 pH の値は、Fab 領域に対する相互作用を部分的に失うため、Native Protein A リガンドに対するものより一般に高いと考えられ[30, 31]、回収された mAb の品質への影響を低減出来る。一方、回収率を向上させるために低い pH を選択することは、mAb モノマーと aggregates の共溶出となり、品質低下に繋がる。

本研究は、aggregates 除去ならびに DBC と溶出 pH に関して、目的とする mAb を効率的に取得するために最適な PAC 担体を選択出来る可能性を示した。

現在では、非対称の抗体や断片抗体のようなさまざまな非標準的なバイオ医薬品が開発されてきている。それらの分子は、標準的な mAb と比較して aggregates をより形成しやすい傾向があるが、最初に数種の PAC 担体で aggregates の溶出挙動を調べるために直線的 pH 勾配溶出実験を実施し、aggregates が mAb ピークの前に溶出される PAC 担体が確認された場合、その担体を選択して、段階的溶出のために洗浄プロトコルを作成する手法はこれらの aggregates 除去に有用な場合があると考えられる。

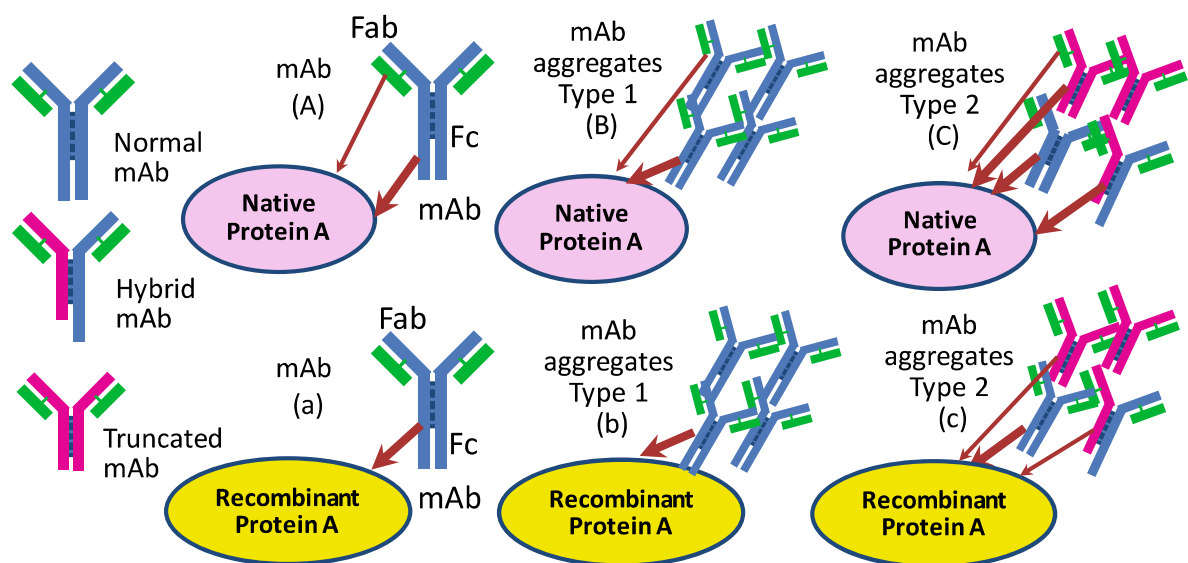


Fig. 20 Protein A- mAb の相互作用

(A) native-Protein A has weak interaction with Fab region as well as strong binding with Fc region. (a) Alkaline stable recombinant Protein A does not have weak interaction with Fab. (B) (b) Type 1 aggregates are bound to Protein A more strongly than mAb monomer does as they have more binding Fc sites. (C) Type 2 aggregates are bound to native-protein A with Fab and Fc regions. (c) As Fc regions of Type 2 aggregates are buried or partially lost, the interaction with Protein A becomes weaker than the interaction between mAb monomer and Protein A.

第3章 タンパク質キャプチャークロマトグラフィーにおける吸着能の予測

3.1 序論

一般的に、タンパク質やその他の生物製剤は、いくつかのクロマトグラフィー・ステップ [32, 33] によって精製され、キャプチャークロマトグラフィーと呼ばれる最初の精製工程は選択的に目的タンパク質を吸着して、濃縮されたフラクションを脱着させることを目的とする非常に重要なプロセスである

(Fig.21)。選択性に加えて、カラムサイズを決定するための吸着能は、プロセス経済性の観点から非常に重要なパラメータである。それは、平衡分離プロセスではないため、プロセス設計のためには、流速、カラムベッド高さ、温度、担体粒子径のようなパラメータによって影響を受ける DBC を予測することが求められる[34-38]。しかしながら、プロセス開発の初期においてはサンプル量が制限されること、開発スケジュールが非常にタイトとなることから、パラメータを調整することは容易ではなく、DBC を予測するシンプルで迅速な方法が必要とされる。

本研究では、IEC 担体の典型的なタンパク質の DBC を無次元化された細孔拡散モデルに基づいて分析し、DBC における 担体の粒子径、流速、温度のようなパラメータの影響を調べた。

特に、開発初期においては、プロセススケールとラボスケールの温度が異なることがよくあることから、温度の影響について詳細に調べた。

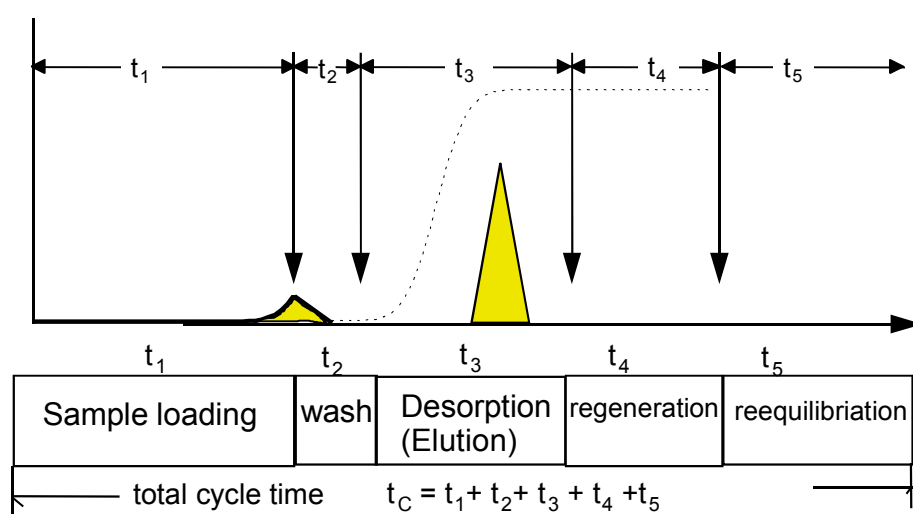


Fig. 21 キャプチャークロマトグラフィー操作

Productivity P is determined by $P=C_0(t_1/t_c)(F/V_t)$ where C_0 is the sample feed

concentration, F is the volumetric flow rate, and V_t is the column bed volume[3]

3.2 イオン交換クロマトグラフィー (IEC)

IEC とは分離しようとする物質の持つ電荷とクロマトグラフィー担体の保持している電荷との間の相互作用、すなわち静電的相互作用を利用して分離精製する。目的物がタンパク質である場合には、両性多価電解質であることから、その構成アミノ酸側鎖などの荷電性官能基を利用した IEC を行うことができる。タンパク質は見かけ上、正味の電荷(正と負の電荷の代数和)が 0 である pH を等電点(pI)と呼ぶ。 pI より高い pH では負の電荷の数が pH とともに増加し、逆に pI より低い pH では正の電荷が増加する。その結果、 pI より低い pH では陽イオン交換体に、高い pH では陰イオン交換体に吸着される(Fig.22)。タンパク質のイオン交換体への吸着は、対イオンすなわちイオン強度によっても大きく変化する。タンパク質とイオン交換体との平衡を考えると、①固定相における対イオン濃度がタンパク質の吸着によりほとんど変化しない、②固定相における対イオンの活量がイオン交換体に取り込まれた対イオンの量に比例する、という仮定のもとに分配係数 K は次式(1)で表される。

$$K = C_s / C_m = \text{constant} / I^Z \quad (1)$$

ここで I は対イオン濃度(イオン強度)、 Z はタンパク質 1 分子が吸着されることにより交換される対イオンの数、即ち、タンパク質の正味の電荷を意味する。分配係数 K はイオン強度 I の Z 乗に依存することが分かる。タンパク質は多価高分子電解質であり、 Z の値は 2 桁となることも多い。したがって、わずかな I の変化により K が大きく変化すると予想される。これらの要因に加え、イオン交換体の持つ緩衝能のため pH を変化させるのが容易ではないといった理由により、pH による勾配溶質よりも一定 pH で塩濃度による勾配溶出を用いる方法が一般的である。

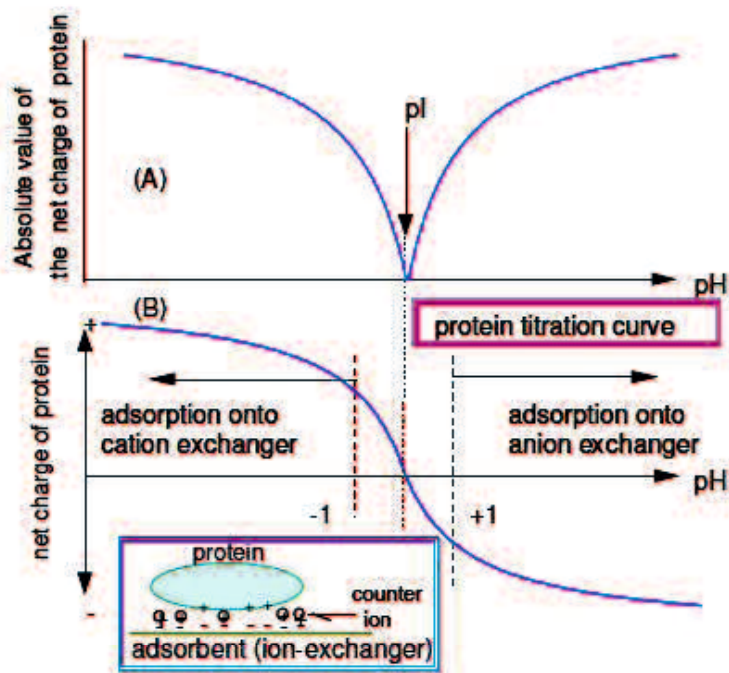


Fig.22 イオン交換クロマトグラフィーの原理

3.3. 材料と方法

3.3.1 材料

サンプルはリゾチーム（分子量 ca.14,300, 生化学工業）と第 2 章で使用した mAb-A を標準タンパク質として使用した。実験に使用した充填剤を Table 6 に示す。カラムは全てサプライヤーによるプレパックカラムを用いた。緩衝液等は、特に指定のない限り Wako の試薬特級を用いた。

Table 6 本研究に使用した充填剤

Resin	Z (cm)	dc (cm)	dp (μm)	Vt (mL)	特徴
SP Sepharose Fast Flow (SPFF) ¹⁾	2.5	0.7	90	0.96	多孔性
SP Sepharose XL (SPXL) ¹⁾	2.5	0.7	90	0.96	多孔性
SP Sepharose High Performance (SPHP) ¹⁾	2.5	0.7	34	0.96	多孔性 グラフトポリマー リガンド
Fractogel SE Hicap (FGSE) ²⁾	1.92	0.82	40-90	1.01	多孔性 グラフトポリマー リガンド
POROS HS20 (PHS20) ³⁾	5.0	0.46	20	0.83	多孔性 貫通細孔
CIM SO ₃ ²⁾	0.9	1.2	-	1.02	対流貫通孔 モノリス

基材 1) Agarose, 2) Methacrylate, 3) Polystyrene-divinylbenzene

Z: カラム高さ、dc: カラム径、dp: 粒子径、Vt: カラムベッドボリューム

3.3.2 クロマトグラフィー装置

クロマトグラフィー装置は GE ヘルスケア 自動化液体クロマトグラフィーシステム ÄKTA explorer 100 および ÄKTA FPLC を用いた。

3.3.3 方法

3.5.1 吸着容量の算出

25mM クエン酸ナトリウム緩衝液/20mM 塩化ナトリウム (pH 5.0) で十分にカラムを平衡化後、タンパク質濃度をそれぞれ A₂₈₀ 値が 1~1.2 となるよう 25mM クエン酸ナトリウム緩衝液/20mM 塩化ナトリウム (pH 5.0) で調製した各タンパク質溶液を滞留時間が 1 分となるよう、8、13、18、23、28°C でそれぞれ連続的

にカラムに供給し、溶出液タンパク質濃度 C を測定し破過曲線を得た。タンパク質濃度は A280 値を分子吸光係数で除して算出した。典型的な破過曲線を Fig.5 に示す。

DBC を決定するために、破過曲線は、移動相線速度 u 、または滞留時間 Z/u_0 の関数として測定される。表面速度 u_0 以下の式で示される。

$$u_0 = Fv/Ac \quad (2)$$

Fv は体積流量、 Ac はカラム底面積 ($Ac = \pi dc^2/4$) を示す。

DBC は以下の式によって、一般に定義される [32-34]。

$$DBC = C_0 V_B / V_t \quad (3)$$

C_0 はロードサンプルの濃度、 V_B は $C=C_B$ における破過容量、 V_t はカラムベッドボリュームを表す。タンパク質クロマトグラフィーでは、 $C_B/C_0=0.1$ (10%破過容量) となる容量として定義される (Fig.23)。同様に、静的吸着容量 (SBC) は以下の式で計算される。

$$SBC = C_0 V_c / V_t \quad (4)$$

ここで、 V_B は $C/C_0=0.55 - 0.60$ となる容量として定義される。

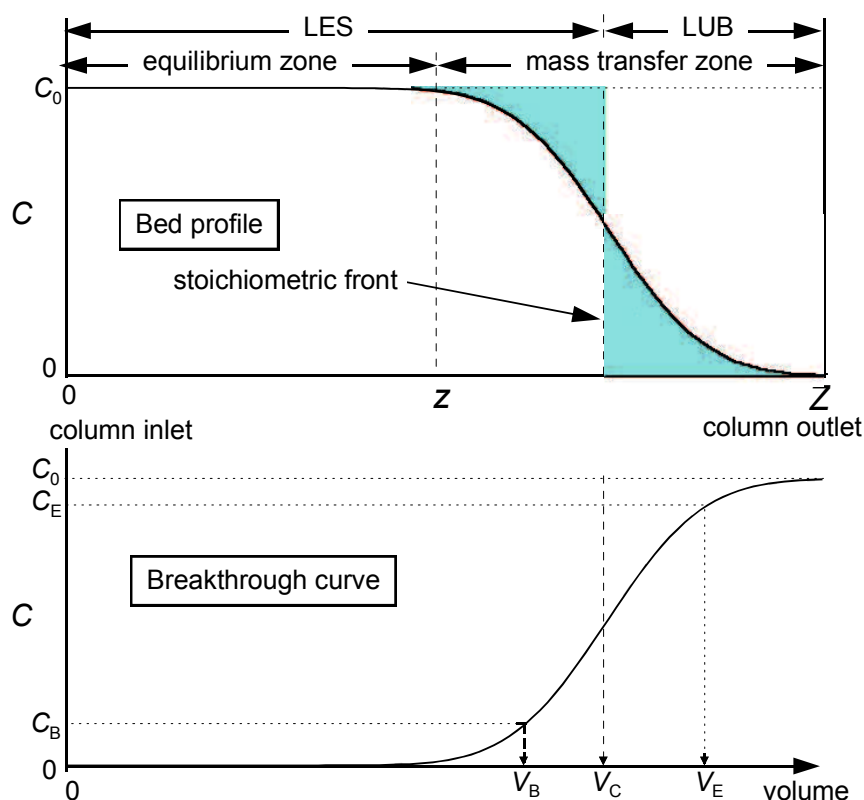


Fig.23 クロマトグラフィーにおける濃度プロファイルと破過曲線
 LUB = length of unused bed, LES = length of equilibrium section

一般的に、移動相線速度 u の増加、あるいは接触時間 Z/u の低下に伴い、DBC は減少する[33-38]。プロセス設計のためには、DBC を u と Z に関連づけることが可能な式があることが必要であり、これまで幾つかの経験的な式が提案されてきた[37]。

以下の無次元数は一定のパターンの破過曲線を支配する細孔内拡散の不可逆的等温線から導かれる[33, 39]。

$$d_p^2/[D_s(Z/u)] \tag{5}$$

ここで、 d_p は充填剤の粒子径、 D_s は細孔内拡散係数である。 D_s は非吸着条件下でパルス応答実験により求めることが出来る。しかしながら、 D_s が利用できない場合は、分子拡散係数 D_m を次式に用いることが出来る。

$$d_p^2/[D_m(Z/u)] \quad (6)$$

この無次元数は直線的イソクラティック溶出の無次元速度 $v=ud_p/D_m$ に類似している。

r HETP（理論段数相当高さ） ($h=\text{HETP}/d_p$) と v のプロットは広範囲な実験条件のデータが同スケールで比較することが可能であり、カラム性能評価に有用であることが知られている[40]。HETP は次式により、ピークの保持時間 t_R とピークの標準偏差 σ から計算される。

$$\text{HETP} = Z (\sigma/t_R)^2 \quad (7)$$

破過曲線における DBC/SBC と $d_p^2/[D_m(Z/u)]$ のプロットは、カラム性能を理解するのに有用であると考えられる。

3.4 結果と考察

3.4.1 破過曲線

2種のタンパク質の DBC と温度の関係を Fig.24 に示す。予想通り、温度の上昇に伴い、多孔性担体（SPFF, SPHP, SPXL, FGSE, 及び PHS20）の DBC は上昇した。特に、拡散係数が大きく、分子量の小さな Lysozyme では、温度依存性が弱かったが、分子量の大きい mAb-A の温度依存性は Lysozyme よりも強いことが分かった。また、粒子径の小さな担体の場合、Lysozyme と mAb-A で温度依存性の差が小さくなることから、粒子径が小さいことにより拡散距離が短くなるためと推察される。PHS20 は Perfusion chromatography と呼ばれ、多孔性の充填剤であるが、Through pore と呼ばれる貫通孔を有することにより、拡散の影響をより少なくし、流速特性を向上させている充填剤である。PHS20 では、粒子径が小さいことに加え、貫通孔を有することにより、拡散の影響が少なくなったと考えられた。これらの結果は、DBC の温度依存性がタンパク質分子量、あるいは担体粒子径の増加により有意になることを示している。SBC は、グラフトポリマーリガンドを有する担体である SPXL と FGSE において IgG を除いて温度依存性は認められなかった。対流クロマトグラフィー（CIM SO3 モノリス・ディスク）による DBC は、温度依存性は無かった。CIM SO3 は対流貫通孔を主体とした一体材料であるモノリス型カラムである。モノリス型カラムは、表面

積を大きくすることが出来ないことから、吸着容量を高くすることについては多孔性充填剤に劣るものの、流速特性が非常に高いことから、工程時間の短縮が図れるという利点があり、その点で前述の POROS HS20 と類似する特性を持つ。上述の結果は、細孔拡散モデルに基づいた現象として理解することが出来る。

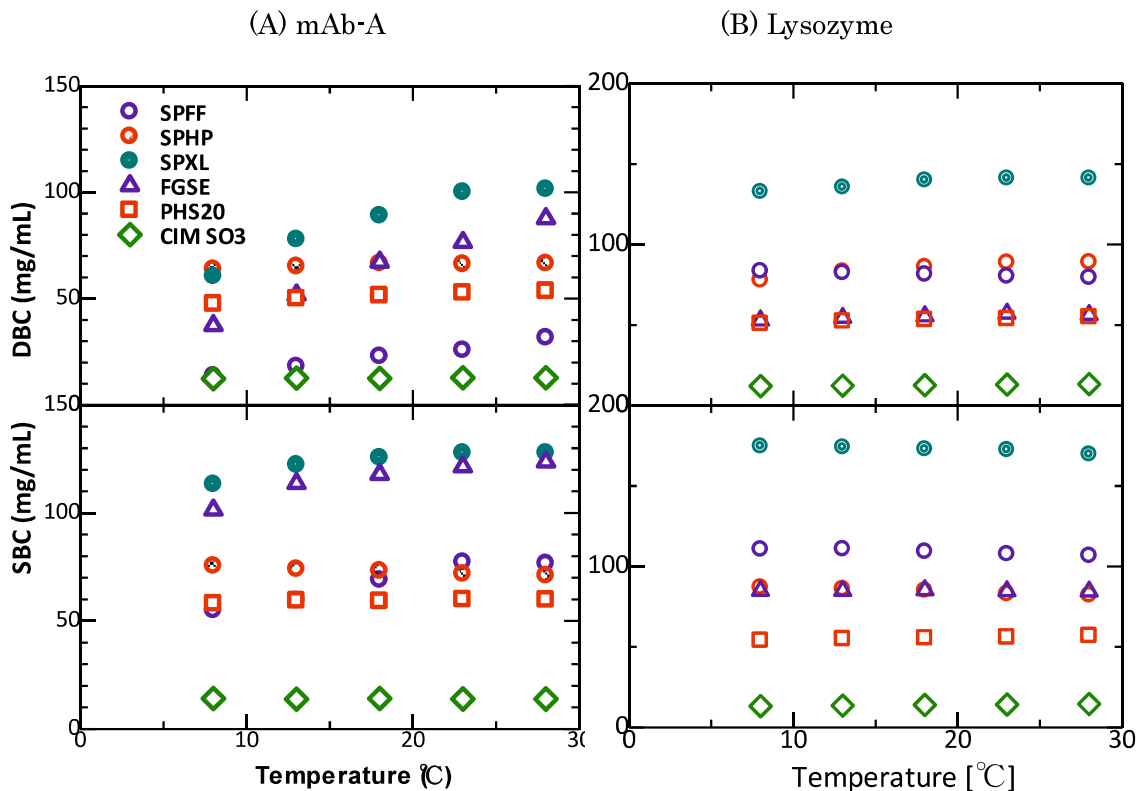


Fig. 24 2種のタンパク質における温度と破過曲線の関係

SPFF= SP Sepharose FF, SPHP= SP Sepharose HP, SPXL= SP Sepharose XL,
 FGSE= Fractogel SE Hicap, PHS20= POROS HS20,
 CIMSO3=CIM SO3 monolithic disk

3.4.2 DBC/SBC と無次元変数の相関

Fig.24で示したデータを DBC/SBC と $d_p^2/[D_m(Z/u)]$ の関係に基づいて、再プロットした。Fig.25に DBC/SBC (カラムベッド有効率)と $d_p^2/[D_m(Z/u)]$ の関係を示す。Fig.25に示す通り、SPFF、SPHP、SPXL、及びPHS20については DBC/SBC は、分子拡散モデルから導かれる無次元数 ud_p^2/ZD_m によく相関された。3.2で述べたよ

うに、モノリス・クロマトグラフィーのDBCは温度に依存しなかった。モノリスクロマトグラフィーのDBCは細孔内拡散現象に基づく物質移動がないため、流速依存性が無いことが知られている。FGSEのデータは相関していなかったため、Fig.25に記載しなかった。原因は明らかではないが、グラフトポリマー鎖は温度の違いにより、構造が変化する可能性がある。本プロットは、細孔内拡散の温度依存性が分子拡散の温度依存性と同じであるという仮定に基づくものである。即ち、Stokes-Einstein式 ($D_m\mu/T=\text{constant}$) を D_m の温度依存性に使用したものである[41]。 μ は溶液の粘性、 T は絶対温度を示す。 DBC/SBC と $dp^2/[D_s(Z/u)]$ の相関を用いることで、より精密な相関を得られ、細孔内拡散係数 D_s は非吸着条件化におけるパルス応答実験により測定することが出来る。 SBC に関しては、96穴フィルタープレートを用いたハイスループットなバッチ吸着実験により、より少ない実験誤差でデータを得ることが出来る[42]。

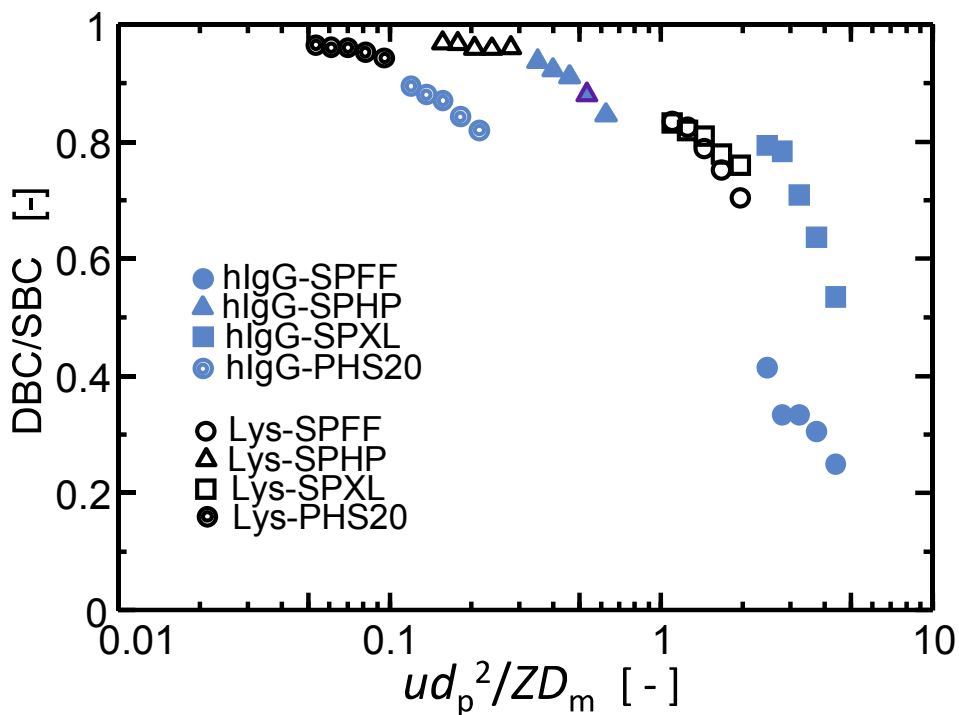


Fig.25 mAb-A、及び Lysozyme における DBC/SBC と ud_p^2/ZD_m の関係

The molecular diffusion coefficient D_m was calculated by the equation proposed by Young et al.[10].

3.5 小括

- ・ mAb-A の IEC における吸着容量は、温度依存性の強い充填剤と弱い充填剤があることが分かった。これらの結果は拡散移動物質抵抗の温度依存性によるものと考えられる。

- ・ 分子量が小さく、拡散係数の大きな Lysozyme ではどの充填剤においても、吸着容量に対する温度依存性が弱かった。

- ・ IEC におけるタンパク質の DBC/SBC(カラム効率)は移動相線速度 u 、粒子径 d_p 、カラムベッド高さ Z 、及び分子拡散係数 D_m を含む無次元パラメータ ud_p^2/ZD_m によく相関する事が分かった。

- ・ 細孔内拡散係数 D_s と移動相線速度 u を利用すれば、より精密な推算が可能であるが、同じ基材の充填剤であれば、本相関が十分有用であると考えられた。

本研究結果より、吸着容量は細孔内拡散現象に基づく物質移動の影響が大きいと考えられた。吸着容量に影響を及ぼす主たるファクターとしては通常、イオン強度、滞留時間等が考えられるが、今回、得られた結果から、温度や充填剤の特性、タンパク質分子量の違いもファクターとなることが分かった。その他のファクターとして pH も考えられるが、さらに充填剤に対するタンパク質の吸着特性への影響を調べるためには、これらのファクターについても調べていく必要がある。

4 総括

本研究では、pH 直線的勾配溶出法と段階的溶出法を用いて、PAC における mAb のモノマーと aggregates を分離対象物とし、各種 PAC 担体の挙動の違いを調べ、効果的なプロセス開発を行うための検討を行った。また、IEC における DBC の予測が可能か検討し、効率的にキャプチャープロセスを実施するための検討を試みた。

2章では、mAb の PAC における mAb モノマーと aggregates の分離を対象として、その吸着挙動保持挙動を調べたところ、限定的ではあるものの、Fc の構造の違いや、それらを含む凝集体への構造認識が、改変リガンド毎に異なることが本研究により明らかになった。また、この特性を利用して、適当な担体を選定することにより、これら目的物由来不純物 (aggregates) を効果的に除去できること、及び pH 直線的勾配溶出実験と段階的溶出実験を行ない、プラットフォーム化に有利な PAC 担体の選択することにより、効率的な抗体精製プロセスを構築することが可能であることを示した。

3章では、IEC における DBC と分子拡散係数の関係を調べることにより、DBC の予測が可能か検討を試みた。その結果、DBC/SBC (カラム効率) は流速 u 、粒子径 d_p 、カラムベッド高さ Z 、及び分子拡散係数 D_m を含む無次元パラメータ ud_p^2/ZD_m によく相関する事が分かった。この結果から、モデルを用いた DBC の予測が可能である可能性が示された。

本研究では、PAC による分離精製手法、IEC における吸着特性について検討を行ったが、それぞれの検討により得られた結果は、効率的な抗体精製プラットフォームの構築に有用な手法と考えられる。

参考文献

- [1] Glen, R. Bolton, Krunal, K. Meha,: The role of more than 40 years of improvement in Protein A chromatography in the growth of the therapeutic antibody industry *Biotechnol. Progr.* 2016, 32, 1193-1201.
- [2] Oliver, K., Luis, D., Xiaochun, H., and Michael, S.: Continuous bind-and-elute protein A capture chromatography: Optimization under process scale column constraints and comparison to batch operation *Biotechnol. Progr.* 2016, 32, 938-948.
- [3] Fahrner, R. L., Knudsen, H. L., Basey, C. D., Galan, W., et al.: Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2001, 18, 301-327.
- [4] Shukla, A. A., and Thömmes, J.: Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 2010, 28, 253-261.
- [5] Aldington, S., and Bonnerjea, J.: Scale-up of monoclonal antibody purification processes. *J. Chromatogr. B* 2007, 848, 64-78.
- [6] McCue, J. T., Kemp, G., Low, D., Quiñones-García, I.: Evaluation of protein-A chromatography media. *J. Chromatogr. A* 2003, 989, 139-153.
- [7] Hahn, R., Schlegel, R., and Jungbauer, A.: Comparison of protein A affinity sorbents. *J. Chromatogr. B* 2003, 790, 35-51.
- [8] Hahn, R., Bauerhansl, P., Shimahara, K., Wizniewski, et al.: Comparison of protein A affinity sorbents: II. Mass transfer properties. *J. Chromatogr. A* 2005, 1093, 98-110.
- [9] Perez-Almodovar, E. X., Carta, G.: IgG adsorption on a new protein A adsorbent based on macroporous hydrophilic polymers. I. Adsorption equilibrium and kinetics. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8339-8347.
- [10] Perez-Almodovar, E. X., Carta, G.: IgG adsorption on a new protein A adsorbent based on macroporous hydrophilic polymers: II. Pressure–flow curves and optimization for capture. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8348-8354.
- [11] Shukla, A. A., Hinckley, P.: Host cell protein clearance during protein A chromatography: development of an improved column wash step. *Biotechnol. Progr.* 2008, 24, 1115-1121.
- [12] Cromwell, M. E., Hilario, E., Jacobson, F.: Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* 2006, 8, E572-E579.

- [13] Vázquez - Rey, M., Lang, D. A.: Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108, 1494-1508.
- [14] Ishihara, T., Kadoya, T., Yoshida, H., Tamada, T. et al.: Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein A affinity chromatography and cation exchange chromatography: Structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. *J. Chromatogr. A* 1093, 2005, 126-138.
- [15] Ghose, S., Hubbard, B., Cramer, S. M.: Binding capacity differences for antibodies and Fc - fusion proteins on protein A chromatographic materials. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 96, 768-779.
- [16] Hober, S., Nord, K., Linhult, M.: Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B* 2007, 848, 40-47.
- [17] Yoshida, S., Murata, D. , Taira, S., Iguchi, K., et al. Rational design and engineering of protein A to obtain the controlled elution profile in monoclonal antibody purification. *Chem-Bio Informatics Journal*, 12, 1-13(2012).
- [18] Arakawa, T., Philo, J. S., Tsumoto, K., Yumioka, R., et al.: Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein Expr. Purif.* 2004, 36, 244-248.
- [19] Ejima, D., Yumioka, R., Tsumoto, K., and Arakawa, T.: Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography. *Anal. Biochem.* 2005, 345, 250-257.
- [20] Yumioka, R., Tsumoto, K., Arakawa, T., Ejima, D.: Screening of effective column rinse solvent for Protein-A chromatography. *Protein Expr. Purif.* 2010, 70, 218-223.
- [21] Natarajan, V., and Zydney, A. L.: Protein A chromatography at high titers. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110, 2445-2451.
- [21] Teeters, M., Benner, T., Bezila, D., Shen, H., et al.: Predictive chromatographic simulations for the optimization of recovery and aggregate clearance during the capture of monoclonal antibodies. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 6134-6140.
- [23] Ishihara, T., Nakajima, N., Kadoya, T.: Evaluation of new affinity chromatography resins for polyclonal, oligoclonal and monoclonal antibody pharmaceuticals. *J. Chromatogr. B* 2010, 878, 2141-2144.

- [24] Pan, H., Chen, K., Pulisic, M., Apostol, I., Huang, G.: Quantitation of soluble aggregates in recombinant monoclonal antibody cell culture by pH-gradient protein A chromatography. *Anal. Biochem.*, 2009, 388, 273-278.
- [25] Gagnon, P. :Purification tools for monoclonal antibodies., Validated Biosystems,1996, pp.164-165.
- [26] Wu, H., Kroe-Barrett, R., Singh, S., Robinson, A. S. et al. : Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 2014, 588, 936-941.
- [27] Shukla, A. A., Hinckley, P. J., Gupta, P., Yigzaw, et al.: Strategies to address aggregation during protein A chromatography. *BioProcess Int.* 2005, 3, 36-45.
- [28] Shukla, A. A., Gupta, P., and Han, X.: Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography: case study for an Fc fusion protein. *J. Chromatogr. A* 2007, 117, 22-28.
- [29] Joshi, V., Shivach, T., Kumar, V., Yadav, N. et al.: Avoiding antibody aggregation during processing: establishing hold times. *Biotech. J.*, 2014, 9, 1195-1205.
- [30] Ghose, S., Allen, M., Hubbard, B., Brooks, C. et al.: Antibody variable region interactions with Protein A: Implications for the development of generic purification processes. *Biotech. Bioeng.*, 2005, 92, 665-673.
- [31] Minakuchi, K., Murata, D., Okubo, Y., Nakano, Y., et al.: Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution. *Protein Sci.* 2013, 22, 1230-1238.
- [32] Ladisch, M. R. ; *Bioseparations Engineering : Principles, Practice, and Economics*, John Wiley and Sons, New York, 2001
- [33] Carta, G. and Jungbauer, A. ; *Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up*, Wiley-VCH, Weinheim, 2010
- [34] Yamamoto, S. and Sano, Y. : Short-cut method for predicting the productivity in affinity chromatography. *J. Chromatogr.B*, 1993, 597, 173-179.
- [35] Hahn, R., Bauerhansl, P., Shimahara, K., Wizniewski, C., Tscheliessnig, A., and Jungbauer, A. : Comparison of protein A affinity sorbents: II. Mass transfer properties. *Journal of Chromatography A* , 2005, 1093 (1), 98-110.
- [36] Perez-Almodovar, E. X., Carta, G. : IgG adsorption on a new protein A adsorbent based on macroporous hydrophilic polymers. I. Adsorption equilibrium and kinetics.

- J.Chromatogr. A. , 2009, 1216, 8339-8347 .
- [37] Iyer, H., Henderson, F., Cunningham, E., Bork, C. and Conley, L. : Considerations during development of a protein A-based antibody purification process. *BioPharm.* , 2002, 15 (1), pp. 14-20+53.
- [38] Natarajan, V, Zydney, A. L.; Protein A chromatography at high titers. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110, 2445-2451.
- [39] LeVan, M. D., Carta, G., and Carmen, M. : Adsorption and Ion Exchange, Perry's Chemical Engineers' Handbook, Section 16. McGraw Hill, New York. , 1999
- [40] Yamamoto, S, Nakanishi, K, and Matsuno, R. : Ion-exchange chromatography of proteins. Dekker, New York, 1988.
- [41] Young, M. E., Carroad, P. A., and Bell, R. L. : Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, 1980, 22 (5), 947-955.
- [42] Yoshimoto, Y, Minakuchi, K, Itoh, D, Isakari, Y, and Yamamoto, S.: High - throughput process development methods for chromatography and precipitation of proteins. Advantages and precautions. *Eng. Life Sci.*, 2013, 13, 446-455.

本研究に関連する著者の発表論文

1. 関係論文等

(a) 査読のある雑誌等

(1) 著者氏名 : Tomokazu Yada, Koichi Nonaka, Masayuki Yabuta, Noriko Yoshimoto, and Shuichi Yamamoto

論文題目 : Choosing the right protein A affinity chromatography media can remove aggregates efficiently

学術雑誌名 : Biotechnology Journal, DOI: 10.1002/biot.201600427

巻、号、頁 : 未定

発行年月 : 平成 29 年発行予定(オンライン公開中)

(本文との関連 : 本論文の第 2 章と関連)

(2) 著者氏名 : Noriko Yoshimoto, Tomokazu Yada, and Shuichi Yamamoto

論文題目 : A simple method for predicting the adsorption performance of capture chromatography of proteins

学術雑誌名 : Japan Journal of Food Engineering

巻、号、頁 : Vol.17, No.3. pp.95 – 98

発行年月 : 平成 28 年 9 月発行)

(本文との関連 : 本論文の第 3 章と関連)

(b) 査読のある国際会議の会議録等

(1) 著者氏名 : Tomokazu Yada, Yu Isakari, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto and Ales Podgornik

論文題目 : Predicting the adsorption performance of capture chromatography of proteins

学術雑誌名 : Proceedings of APCChe 2015

巻、号、頁 : Paper no. 3135077

発行年月 : 平成 27 年 9 月発行

(本文との関連 : 本論文の第 3 章と関連)

(c) その他 なし

2. 参考論文

(a) 査読のある雑誌等 なし

(b) 査読のある国際会議の会議録等 なし

(c) その他 なし

謝辞

本研究に対して終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました山本修一教授に心より謝意を表します。また、本研究に対してご討論、ご指導を賜りました吉本則子助教、及びカネカ株式会社 水口和信氏に感謝の意を表します。

更に、本研究にご協力いただきました山口大学工学部 応用化学 バイオプロセス設計工学研究室の諸氏、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合に深く感謝いたします。

また、最後にこのような研究の機会をお与えくださるとともに、多大なご支援をいただきました第一三共株式会社 バイオ医薬研究所 簗田雅之所長、研究第一グループ 野中浩一グループ長に深謝致します。