

---

# 新規プロテインA担体： 抗体結合容量に対する合成ポリマー構造設計の影響

## Novel Protein A Resin: Synthetic Polymer Matrix Design Impact on Antibody Binding Capacity

安陪毅由 昀山昌輝 川井 洋 中村 聡 岡野友亮 塩谷知範 田守功二 王 勇  
Takayoshi Abe Masaki Momiyama Hiroshi Kawai Satoshi Nakamura Yusuke Okano Tomonori Shiotani Kouji Tamori Yong Wang

Synthetic polymer matrix designs with various physicochemical properties were investigated as an alternative to commercially available Protein A resins. Through JSR Poronomics™, our proprietary technology for the design of hydrophilic and porous resins with large surface area, JSR has developed a novel Protein A resin with high antibody binding capacity.

The polymer for the porous resins with various structures and immobilized recombinant Protein A were tested for antibody binding capacity. Based on the series of experiments, it was found that hydrophilic matrices resulted in high antibody binding capacity. However, the hydrophilic matrices were highly compressible due to their soft porous polymer characteristics. To avoid deformation due to compression, cross-linking was introduced to synthesize a hydrophilic rigid porous polymer. The effects of polymer bead size and porosity were also investigated in order to develop an optimal biopharmaceutical manufacturing process. The optimal bead size was determined to be 50µm for high antibody binding capacity and low column pressure. The pore distribution of the beads was also designed for rapid antibody diffusion. It was determined that matrices with larger surface areas enabled higher antibody binding capacity. The novel protein A resin thus created allows for ease of packing and excellent hydrodynamic properties.

### 1 緒言

抗体医薬の市場は成長著しく、2010年にはおよそ452億ドルと前年比で11%上昇しており、製薬企業や医薬品製造受託機関(CMO)における開発競争が世界中で激化している<sup>1)</sup>。抗体医薬品は、低分子化合物を中心とした従来の薬剤には無い有用性があり、がんや関節リウマチの治療薬として高い評価を得ている一方で、低分子医薬品と比較して薬価が高いという課題がある<sup>2)</sup>。

抗体医薬品の製造工程は、培養と精製の二つから成る<sup>3)</sup>。培養工程では、目的の抗体を培養し、遠心分離で抗体原液を回収する。精製工程では、プロテインA担体

を用いたアフィニティーカラム、イオン交換カラム、ウイルス除去フィルターなどにより、抗体原液から宿主細胞タンパク質(Host cell protein ; HCP)、DNA、ウイルスなどを除去することで高純度の抗体を回収し、抗体医薬品となる。近年、培養効率は1 g/Lからおよそ10 g/Lまで飛躍的に向上しているが、精製効率はあまり向上しておらず、高製造コストの一因となっている。特に、プロテインA担体は高価であるため、抗体回収性能や再使用回数の向上など、低コスト化に対する市場ニーズが非常に高いのが現状である<sup>1)</sup>。

アフィニティー精製工程を図1に示す。プロテインA担体

を充填したカラムに様々な不純物を含んだ抗体原液を通過し、抗体を特異的に吸着させる。中性バッファーで不純物を洗浄し、酸性バッファーで抗体を脱離させることで高純度の抗体を回収する。その後、アルカリ水溶液でカラムを洗浄し、中性バッファーで平衡化して再使用する。このため、プロテインA担体の性能として高い抗体の動的結合容量(DBC)、耐圧性、アルカリ耐久性などが求められる。プロテインA担体は、アガロースやシリカベースの多孔質粒子表面をプロテインAで修飾したものが主流だが、アガロースベースの粒子は軟らかく、流速の変化や抗体原液中の不純物の付着などによりカラム圧の急上昇を招き易く、シリカベースの粒子はアルカリに弱い<sup>4)</sup>。そこで、本論文ではこれらの欠点を克服する新しいポリマー構造設計技術、“Poronomics™”を確立したこと、また、この技術により合成したベース粒子の表面に独自の改変プロテインAを修飾したプロテインA担体の性能評価結果について報告する。

## 2 実験

### 2.1 試料

ベース粒子は、水相に対して有機相を懸濁させる懸濁重合により合成した。有機相として、モノマーおよび多孔質化のための有機溶剤の混合物を使用した。この様にして合成した種々のベース粒子の表面官能基(エポキシ基)と改変プロテインAのアミノ基を結合させることでプロテインA担体を合成した。

### 2.2 評価

#### 2.2.1 粒径測定

粒径は、シスメックス社製FPIA-3000を用いて体積平均粒径を測定した。

#### 2.2.2 比表面積測定

多孔質粒子の比表面積は、試料を真空乾燥させ、島

津製作所製のオートポアIV9520(水銀圧入法)を用いて測定した。比表面積の測定対象はボア径で10 nmから5 μmの範囲とした。

#### 2.2.3 弾性率測定

弾性率は、フィッシャー・インストルメンツ社製フィッシャー・スコープHM2000を用いて、粒子直径の5%を圧縮したときの圧力を測定し、球の中心を通る粒子断面に相当する円の面積で除して求めた。

#### 2.2.4 抗体の動的結合容量(DBC)測定

抗体の動的結合容量(DBC)は、GEヘルスケア社製AKTAprime plusを用いて測定した。プロテインA担体を充填するカラムサイズは、内径5 mm、高さ20 cmとした。DBCは、ロードした抗体液濃度の10%が破過したときの抗体液量を測定し、このときの結合抗体質量を担体容量で除して求めた。特に記載のない限り、滞留時間(Residence Time)は4分とした。

#### 2.2.5 DNA、宿主細胞タンパク質(HCP)測定

抗体回収液中のDNAは、インビトロジェン社製DNA測定キット(ピコグリーン法)を用いて測定した。抗体回収液中のHCP測定は、シグナス・テクノロジーズ社製HCP測定キット(ELISA法)を用いて測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 ポリマー構造設計

#### 3.1.1 親水性

DBCはプロテインA担体の最も重要な性能の一つである。DBCが高い程、生産性が向上するためである。DBCに対するプロテインA担体の親水性の影響について検討を行なった。図2に結果を示す。親水性は、ベース粒子のモノマー組成における親水基の割合から計算した。プロテインA担体の親水性が高い程、DBCは高くなる

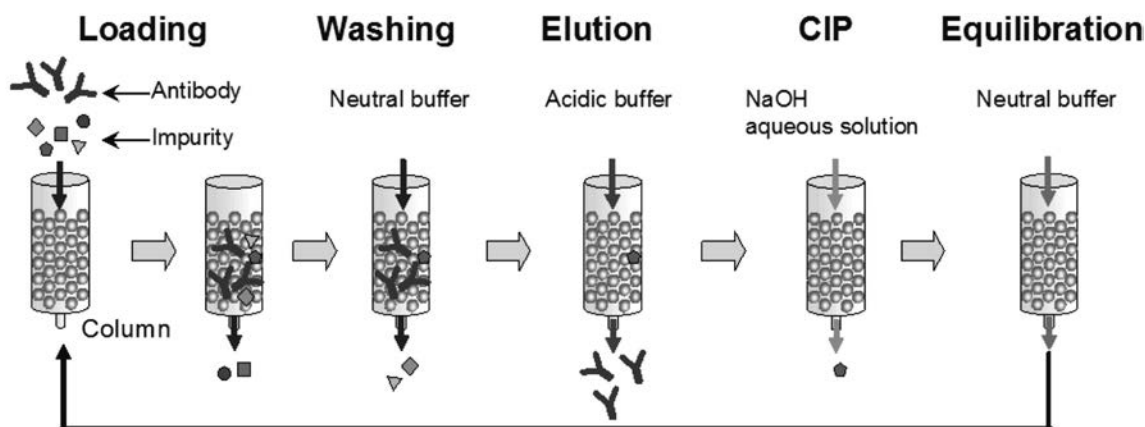


Figure 1 Affinity chromatography process

ことが分かる。

粒子表面が親水性となることで、プロテインAの立体構造を安定に保ち、また、抗体が多孔質粒子内部に拡散しやすく、抗体を吸着させやすいと考えられる。しかしながら、親水性の粒子は軟らかく、カラム圧が高くなることから、多孔質ポリマー設計に架橋構造を取り入れている。

### 3.1.2 粒径

抗体医薬品の精製工程におけるカラム圧の上限はおよそ3 barと言われており、プロテインA担体は高DBCかつ低カラム圧であるのが理想的である。DBCとカラム圧に対するプロテインA担体の粒径の影響について、検討を行った。図3に粒径とDBCおよびカラム圧の関係を示す。粒径が小さい程、高DBCとなるが、カラム圧も上昇する。粒径が50  $\mu\text{m}$ の場合において、DBCとカラム圧のバランスが取れる結果となった。

### 3.1.3 比表面積

図4に粒径が50  $\mu\text{m}$ であるプロテインA担体の比表面積とDBCの関係を示す。比表面積が大きい程、高DBCとな

ることが分かる。これは、比表面積が大きいほど、抗体が多孔質ポリマー内部に多く拡散して吸着し、高DBCとなることを示している。

### 3.1.4 弾性率

表1に粒子の弾性率測定結果を示す。多孔質ポリマー設計に架橋構造を取り入れたプロテインA担体JWT203は、アガロースベースのものと比較して硬いことが分かる。充填層は、カラム直径が大きくなるに従ってカラム壁の支持を失い、圧縮されやすいことが分かっている<sup>5)</sup>。アガロースのような柔らかい粒子を充填した大直径カラムの場合、高流速では圧力が急激に上昇する圧密が発生する懸念がある。一方、JWT203は比較的硬いため、圧密は発生しにくいと考えられる。

### 3.2 性能評価

以上の検討により、親水性、粒径、比表面積のポリマー構造設計技術、“Poronomics™”を確立した。この技術により最適化したベース粒子の表面に改変プロテインAを修飾し、プロテインA担体JWT203を合成した。JWT

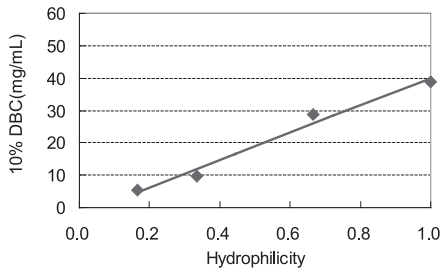
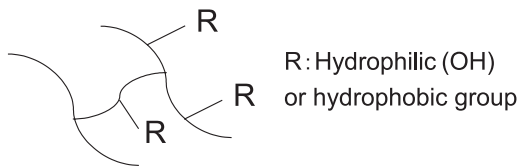


Figure 2 Influence of hydrophilicity on DBC

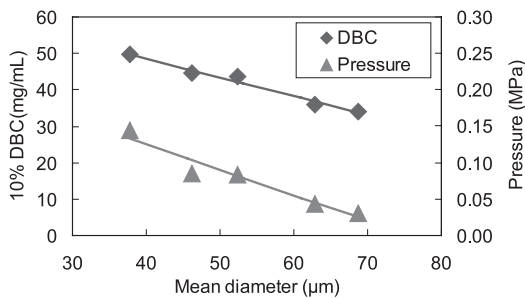


Figure 3 Influence of bead size on DBC and column pressure

Table 1 Compressive elasticity modulus

JWT 203	Agarose media 1	Agarose media 2
8.0 MPa	1.6 MPa	1.7 MPa

Defined as the pressure when the bead is compressed 5% in diameter along the direction of force.

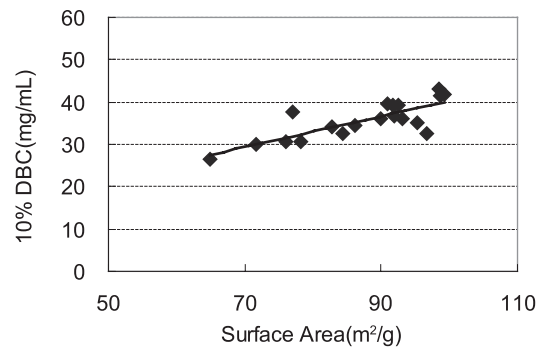


Figure 4 Influence of porosity on DBC

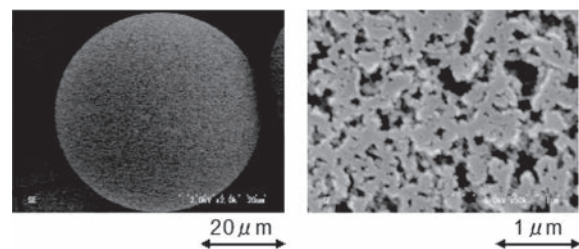


Figure 5 SEM image of JWT 203

203のSEM写真を図5に示す。以下、JWT203の性能評価結果の詳細について述べる。

### 3.2.1 滞留時間とDBC

図6に滞留時間とDBCの関係を示す。充填カラムへの抗体原液の滞留時間が長い程、DBCは高くなる傾向にある。つまり、カラムへの通液速度を遅くする程、抗体はプロテインA担体内部へ拡散し、多く吸着する。JWT203は短い滞留時間、すなわち、高流速域でアガロース担体に比べて高いDBCを示すことが分かる。

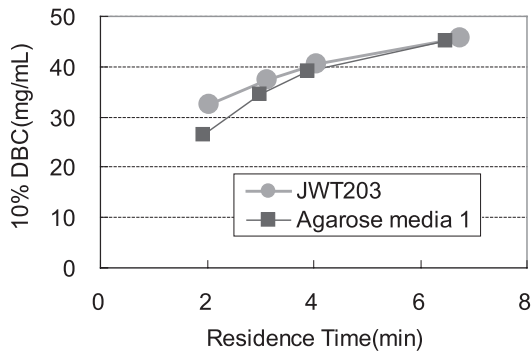


Figure 6 Residence time influence on DBC

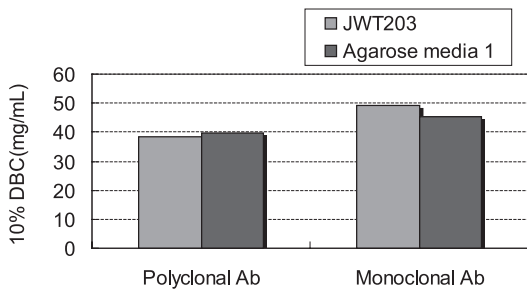


Figure 7 DBC with purified polyclonal antibody and monoclonal antibody soup

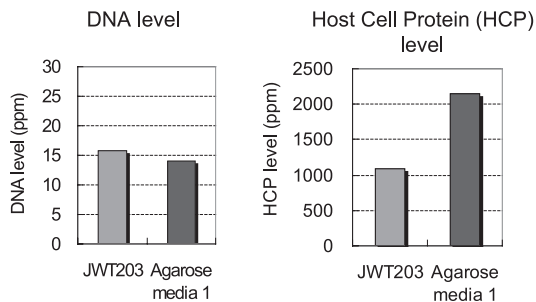


Figure 8 DNA and HCP clearance level in monoclonal antibody eluate

### 3.2.2 抗体種とDBC

抗体種によるDBCへの影響を確認するため、精製ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体原液にて、DBCを測定した。図7に結果を示す。いずれの抗体種でも高いDBCであった。すなわち、抗体種に対する依存性は低く、様々な抗体種に適用できる可能性が高いと考えられる。

### 3.2.3 抗体回収液中の不純物量

モノクローナル抗体原液を精製した抗体回収液中の不純物含有量を測定した。図8にHCPおよびDNA含有量の

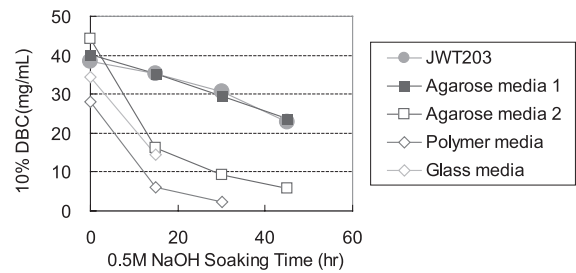


Figure 9 Alkali stability test results with various protein A medias

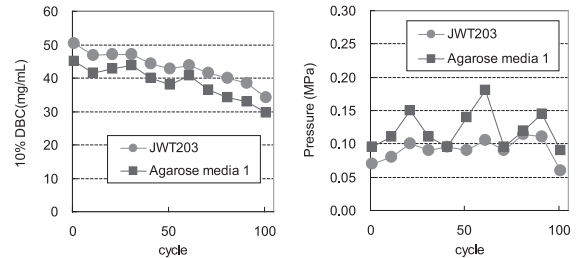
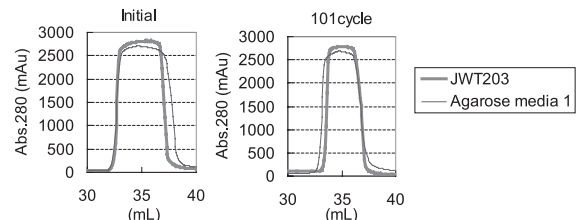


Figure 10 Cleaning-in-place (CIP) result



	Initial	After 101 CIP Cycles
JWT203*	1.20CV	0.91CV**
Agarose media 1*	1.49CV	1.13CV**

\* JSR standard protocol with residence time of 4min. Eluted with 50mM Sodium citrate (pH 3.2)

\*\* Lower Column volume (CV) value because of reduced DBC

Figure 11 Monoclonal antibody elution profile

測定結果を示す。JWT203はアガロース担体と比較して同等レベルであることが分かった。

### 3.2.4 アルカリ耐久性

プロテインA担体の性能には、高いDBCや耐圧性に加えて、アルカリ耐久性も求められる。抗体を回収した後の定置洗浄(CIP)工程では、安価で効果的なアルカリ水溶液(0.1~0.5 M NaOH)を使用するのが一般的である。しかし、シリカ粒子や天然のプロテインAはアルカリ性に弱い。ベース粒子とプロテインAの双方について、アルカリ耐久性が必要である。JWT203のベース粒子については、アルカリ耐久性を高めるポリマー構造設計としており、プロテインAについてはアルカリ性に強い配列とした独自の改変プロテインAを適用している。図9に0.5M NaOH水溶液への浸漬時間とDBCの関係を示す。厳しいアルカリ条件にもかかわらず、JWT203はDBCの低下が緩やかであることが分かる。

図10にアルカリ洗浄回数とDBCの関係を示す。アルカリ洗浄条件は、プロテインA担体を0.5M NaOH水溶液で15分浸漬させた後、洗浄バッファー(20 mMリン酸, 150 mM NaCl)で平衡化する工程を1回とした。DBCは10回毎に測定した。JWT203を100サイクル使用した場合でも、DBCの低下が緩やかである。カラム圧もほぼ一定で、粒子強度はアルカリ洗浄の影響を受けないことが分かる。

### 3.2.5 抗体溶出プロファイル

アフィニティー精製による抗体回収液量は、次の工程のイオン交換カラムにおける処理量に直接影響する。高濃度で回収できれば、イオン交換カラムでの処理量が減り、生産性が向上する。図11に抗体溶出プロファイルを示す。抗体溶出には、50 mMクエン酸バッファーを用いた。

JWT203はアガロース担体と同等レベルであることが分かった。

## 4 まとめ

親水性、粒径、比表面積のポリマー構造設計技術、“Poronomics™”により合成したベース粒子表面に独自の改変プロテインAを修飾し、プロテインA担体JWT203を開発した。JWT203は、特に重要性能である抗体の動的結合容量(DBC)、耐圧性、耐アルカリ性においてバランスの取れたアフィニティー精製用粒子であることが分かった。今後は、ユーザーへの展開と更なる改良を進めて行く。

## 謝辞

本テーマの黎明期に尽力いただいた宮路正昭氏、河合孝広氏に感謝申し上げます。

## 発表先

BPI 2011(BioProcess International Conference and Exhibition), Poster

## 参考文献

- 1) 日経BP社編:“日経バイオテク”, 日経BP社, 東京 (2011.6.20), p. 3.
- 2) 伊藤 勝彦:“ファルマシア”, **45**, 655, (2009).
- 3) 川嶋 裕幸:“ファルマシア”, **45**, 683, (2009).
- 4) D. S. Hage ed.: “Handbook of Affinity Chromatography”, Taylor and Francis Group, London (2006), p. 15.
- 5) J. J. Stickle, A. Fotopoulos: *Biotechnol. Prog.*, **17**, 744 (2001).