

抗体精製用次世代型プロテインAアフィニティ担体 Amsphere® A3

Next generation Protein A chromatography resin for antibody purification Amsphere™ A3

ライフサイエンス事業部 バイオプロセス部

「Amsphere」はJSR株式会社の登録商標です。

1 はじめに

近年、バイオ医薬品の中でも特に抗体医薬が、がんや難病の治療分野で、有効性が高く副作用が少ない医薬品として急速に開発が進んでいる¹⁾。その市場成長も著しく、既存の製薬企業や新興バイオベンチャーにおける開発競争が世界中で激化している。ただし抗体医薬品は、従来の薬剤である低分子化合物には無い有用性があり、高い評価を得ている一方で、低分子医薬品と比較して生産性が低いという課題がある²⁾。

抗体医薬品の製造工程は、大きく分けると培養工程と精製工程の二つから構成される。培養工程では、目的の抗体を産生する細胞を培養し、遠心分離で細胞を分離し、抗体原液を回収する。精製工程では、プロテインAアフィニティ担体を用いたアフィニティーカラムで精製し、その後ウイルス不活化、イオン交換カラム精製、バッファー交換、ウイルスのフィルター除去を経て、抗体原液からHCP (Host Cell Protein: 宿主由来タンパク質) やDNA、ウイルスなどの不純物を除去することで高純度の抗体を回収し、抗体医薬品の原薬となる。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³⁾、それに対し精製効率においては大きな向上は見られておらず、一回の培養で得た抗体原液を、複数回で精製するなど生産効率のボトルネックとなっている。このような問題を解消し生産効率を向上させるため、一度のクロマト精製で多量の抗体原液を処理できる高DBC (Dynamic Binding Capacity: 動的結合容量) 担体のニーズが高

まっている。また、抗体医薬品にも将来多品種化が見込まれており、高速処理をし、なるべく短時間で製造を切り替えたいという市場の要求が高く、クロマト工程においても高流速で精製可能な担体が求められている。このようなユーザーニーズを満たす次世代型のプロテインAアフィニティ担体Amsphere A3の設計コンセプトや実性能を紹介する。

2 プロテインAアフィニティ担体に求められる性能

アフィニティ精製工程をFigure 1に示す。プロテインAアフィニティ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液し、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アフィニティ

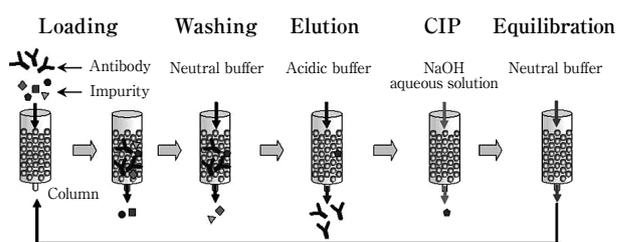


Figure 1 アフィニティ精製工程

担体の性能として高DBC, 耐圧性, 耐アルカリ性が求められる。プロテインAアフィニティ担体は、アガロースやセルロースといった多糖類, シリカ, ポリマーなど様々な多孔質粒子の表面をプロテインAで修飾したものが現在市場に出回っている。その中でも大半のシェアを占めているのがアガロースをベースとしている粒子であり, 抗体医薬品製造への使用実績が最も多い。しかしながら, アガロース粒子は軟らかく, 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, 高流速でのDBCが低下する傾向がある。またシリカ粒子はアルカリに弱いなどの問題点もある⁴⁾。これら欠点を克服した新しいポリマー構造設計技術及び独自の改変プロテインAの確立をし, 次世代型のプロテインAアフィニティ担体Amsphere A3を開発した。

3 Amsphere A3の材料設計

Amsphere A3は抗体とアフィニティのあるプロテインAリガンドをベースとなる粒子表面上に結合させることで作成される。前述したように, 抗体医薬の精製工程における圧力の上限となるカラム圧を考慮せねばならず, 低カラム圧かつ高DBCであるのが理想的である。そこで, Amsphere A3のベースである粒子は粒径と比表面積の最適化を実施し, リガンドであるプロテインAは抗体とのアクセスを良好にするため, 二次構造に直線性をもたせるよう遺伝子組み換えを行い, 従来製品よりも飛躍的にDBCを向上させた。さらには, 粒子の表面を処理することにより表面の親水性を大幅に高め, 非特異的な吸着を抑制し, 粒子への不純物付着を低減させ, 他社アガロースタイプの担体と同等以上の性能とした。

4 Amsphere A3 実性能特性

Amsphere A3の抗体結合容量性能をFigure 2に示す。4種のモノクローナル抗体を用い, DBC測定を行ったところ, いずれの抗体種でも高いDBCを示した。すなわち抗体種に対する依存性は低く, 様々な抗体種に優れた抗体結合性を保有していることが分かる。また, Amsphere A3を使用し, 培養液から抗体を精製した回収液中の不純物量(Host Cell Protein量:HCP量)を測定したところ, HCP除去効率において, アガロースタイプの粒子と同等性能, 他社製品のポリマータイプの粒子よりも良好であり, 抗体精製におけるプロテインAアフィニティ精製の次工程への負荷低減に期待がもてる性能である(Figure 3)。プロテインAアフィニティ担体は高いDBCやHCP除去能

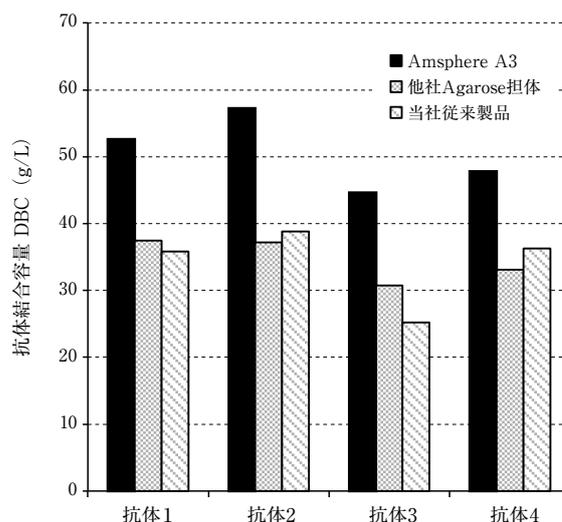


Figure 2 Amsphere A3と他社製品とのDBC性能比較

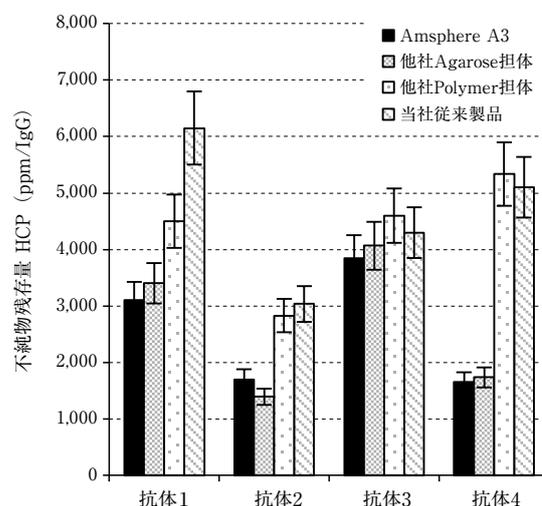


Figure 3 Amsphere A3と他社製品との不純物除去性能比較

に加えて, アルカリ溶液で洗浄し再利用するため, 耐アルカリ性も求められる。抗体を回収した後のCIP(Cleaning In Place: 定置洗浄)工程では, 安価で効果的な水酸化ナトリウム水溶液を使用するのが一般的で, ベース粒子とプロテインAの双方について, 耐アルカリ性が求められる⁵⁾。Amsphere A3のベース粒子については, アルカリへの耐性を高めるポリマー構造設計をしており, プロテインAリガンドについてもアルカリ性に強い配列に改変した独自の改変プロテインAを適用している。Figure 4に0.5 M 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, Amsphere A3は他社担体と比較するとDBCの低下が緩やかであった。また

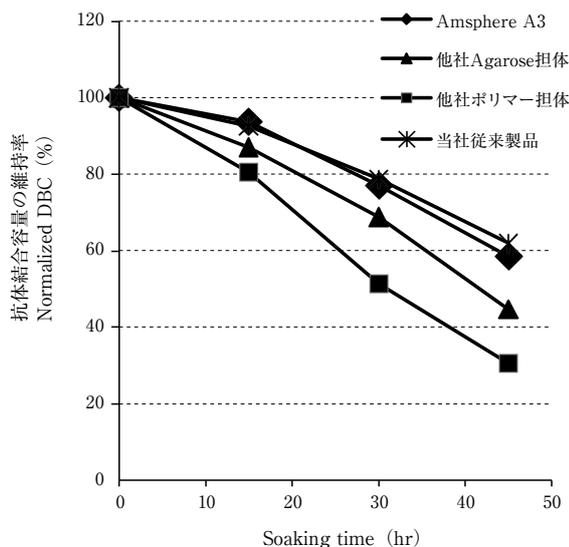


Figure 4 Amsphere A3と他社製品のアルカリ耐性比較

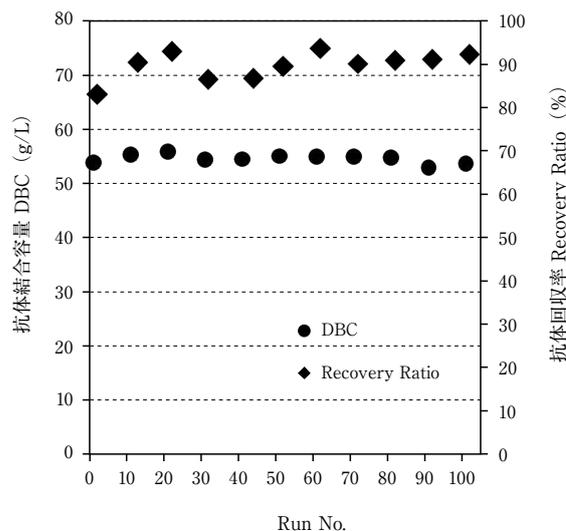


Figure 6 CIPサイクルテスト結果

別のアルカリ耐性試験として、繰り返し試験を実施している。Figure 5にプロセスフロー、Figure 6にアルカリ洗浄回数とDBC・抗体回収率の結果を示す。結果、100サイクル繰り返す間にDBC及び抗体回収率に低下は確認されなかった。このことより、安定して繰り返し使用が可能なが示されている。

5 まとめ

2012年にAmsphere Protein Aを発売して以来、顧客の声を聴きながら、改良を重ね、ポリマー合成技術、ならびにプロテインAなどタンパク質に関する設計技術と担

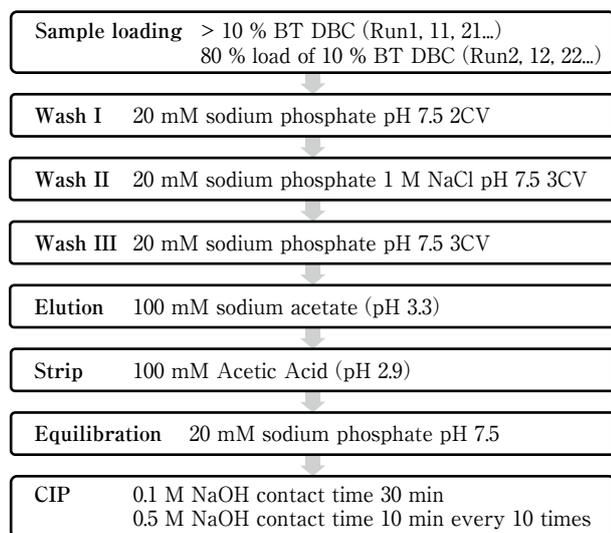


Figure 5 サイクルテストプロセスフロー



Figure 7 製品イメージ

体表面への結合技術を駆使することで、Amsphere A3の製品化に至った (Figure 7)。Amsphere A3は、特に重要性能である抗体の動的結合容量、不純物除去性能、耐アルカリ性において優れたアフィニティ精製用担体であり⁶⁾、抗体医薬の生産性に飛躍的な向上が期待できる。

急速に拡大していく抗体医薬の世界市場に対応し、欧米や中国のグループ会社および事業拠点が連携することで、世界各国の顧客へ展開しており、今後、抗体医薬品製造への採用に期待が高まっている。

参考文献

- 1) Ecker, D. M.; Jones, S. D.; Levine, H. L, The therapeutic monoclonal antibody market, *mAbs*, **7**, 9 (2015).
- 2) 金子佳寛；抗体医薬品生産培養技術の課題と展開, 生物工学会会誌, **91**, 511 (2013).
- 3) Elvin, J. G.; Causton, R. G.; Walle, C. F.; Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing, *Int. J. Pharmaceutics*, **440**, 83 (2013).
- 4) D. S. Hage, et. al., Handbook of Affinity Chromatography, Taylor and Francis Group, London, **15** (2006).
- 5) Minakuchi; K., et al. Remarkable alkaline stability of an engineered protein A as immunoglobulin affinity ligand: C domain having only one amino acid substitution. *Protein Science*, **22**, 1230 (2013).
- 6) Hanamura; M, et al. Bio Process International 2015. Presentation and Poster sessions.