

# Amsphere<sup>®</sup> A3を用いたプロテイン A 工程の連続精製検討

## Continuous Capture Step of a Monoclonal Antibody Downstream Process with Amsphere<sup>™</sup> A3

板谷 佳織<sup>\*1</sup> 土井 良<sup>\*2</sup> 岡野 友亮<sup>\*3</sup>  
Kaori Itaya Ryou Doi Yuusuke Okano

松田 隆志<sup>\*4</sup> 花村 政暁<sup>\*5</sup>  
Takashi Matsuda Masaaki Hanamura

「Amsphere」はJSR株式会社の登録商標です。

There is increased interest in continuous processing for Immunoglobulin G (IgG) purification in bind and elute mode. This is because such continuous chromatography offers higher productivity and cost effectiveness than conventional batch mode. We have developed a continuous chromatography unit operation with a high-capacity monoclonal antibody (mAb) affinity resin, Amsphere<sup>™</sup> A3, and compared its performance with the other resin in the market. Good chromatographic performance was obtained in regard to dynamic binding capacity (DBC) at high flow rate, and impurity clearance such as host cell protein (HCP) and DNA. Also, the results were comparable to those of batch process. These results show that high productivity with good impurity clearance can be expected at continuous capture step using Amsphere A3.

### 1 はじめに

抗体医薬品は、がんや難病の治療分野において、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。その市場成長は著しく、2016年には約891億ドル(医薬品市場の約14%)であり、2022年には約1,728億ドルで医薬品市場の約20%を占めると予想されている<sup>1)</sup>。

抗体医薬品の製造工程は、培養工程と精製および工程に分けられる。培養工程では、目的の抗体を産生する細胞を培養し、遠心分離等で細胞を分離して抗体原液を回収する。続く精製工程ではまず、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー担体(プロテインA担体)による精製(プロテインA工程)が実施される(Figure 1)。プロテインA担体は抗体に特異的に吸着するタンパク質であるプロテ

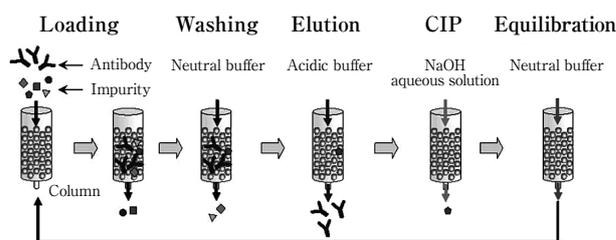


Figure 1 Protein A purification process.

インAをポリマー、セルロース、アガロース等からなる粒子に担持させたものである。プロテインA担体を充填したカラムに、抗体原液を通液して(抗体負荷)、抗体をカラムに吸着させ、HCP(Host Cell Protein: 宿主由来タンパク質)やDNA等の不純物を洗浄工程で除去し、その後酸性バッファーで抗体を溶出する。プロテインA担体は抗体を高純度に精製可能であるため、抗体精製に必須なツールとなっている。また、プロテインA担体は高価なため、一度の培養で得られた抗体原液は、複数回のプロテインA工程に分けて精製することが想定されており、

\*1 2013年入社 筑波研究所  
\*2 2010年入社 筑波研究所  
\*3 2007年入社 JSR・慶応義塾大学 医学化学イノベーションセンター  
\*4 2007年入社 筑波研究所  
\*5 2001年入社 筑波研究所

抗体溶出後にアルカリ水溶液によるCIP (Cleaning In Place: 定置洗浄) 工程を経て中性バッファーで平衡化されることで、数十～数百サイクル繰り返し使用される。

近年、培養工程の技術進歩により一度の培養で得られる抗体量が向上し、精製工程についても単位時間当たりの精製効率の向上が求められている。特にプロテインA工程については、一度に多量の抗体を処理できる高DBC (Dynamic Binding Capacity: 動的結合容量) および、工程時間を削減できる高流速処理可能な性質を持つ担体が求められている。JSRではプロテインA担体の研究開発を鋭意行い、2016年にAmsphere A3を上市した。Amsphere A3は高DBCを示す高性能プロテインA担体であり、既に多くの企業で採用されている。

## 2 プロテインA工程の連続精製

プロテインA工程は前述したように抗体精製に必須の工程であるが、担体自体が高価であるためプロセスコストが高く、コスト削減およびProductivity (生産性) の向上が求められている。Productivityは、単位時間・単位担体量あたりの処理抗体量であり、次式で示される<sup>2)</sup>。

$$\text{Productivity (g/(hr}\cdot\text{L))} = \frac{\text{抗体処理量 (g)}}{\text{工程時間 (hr)} \times \text{使用担体量 (L)}} \quad (1)$$

例えば、高DBC担体を使用することで、担体使用量が低減できProductivityは向上する。また前述のとおり、抗体原液は複数回にわけて処理されるが、高DBC担体を適用することで、処理回数が低減され工程時間を短縮でき、Productivityは向上する。Productivityの定義に直接には含まれないが、使用するバッファー溶液量、必要なオペレーターの人数と労働時間、設備のサイズなど

もプロテインA工程のプロセスコストに大きく寄与する重要な因子であり、これらの低減・削減が可能なプロセスの構築が求められている。

上記の課題を解決する手段として、プロテインA工程の連続精製が検討されている。従来のバッチ精製では1本のカラムに対して、抗体負荷から溶出、再生、再平衡化が実施される。バッチ精製の場合、処理抗体液量は破過によるロスを抑制できる範囲で設定される。1本のカラムの最大吸着容量は破過曲線上ではFigure 2(a)で示されるが、一般的にはFigure 2(b)に示されるように負荷した抗体溶液濃度の10%が破過した(10% BT (Breakthrough: 破過))時のDBCの70%~90%とする場合が多く、担体が本来有する吸着容量を十分に活用できない。一方、連続精製ではカラムを2本以上用意し、1本目のカラムから破過した抗体は2本目のカラムで吸着する。例えばFigure 2(c)では、カラムへの抗体負荷量をX% BT時のDBCとし、破過した抗体は2本目のカラムに負荷される。このように、連続精製では担体の吸着容量を最大限に利用するため担体の使用量を低減できる。また、一方のカラムに抗体を負荷している間に他方のカラムの洗浄・溶出工程を実施できるため操作時間の短縮が可能である(Figure 3)。さらに操作時間を短縮するため、連続精製ではバッチ精製よりも高流速で実施される。今後、培養工程を含む抗体医薬品製造の工程全体を連続化することで、設備の省スペース化や操作時間の短縮によるコスト低減が期待されており<sup>3)</sup>、医薬品製造工程のトレンドになると予想されている。

そこで本稿では、Amsphere A3を連続精製へ適用した際の性能評価として、①高流速かつ高抗体負荷時のDBC

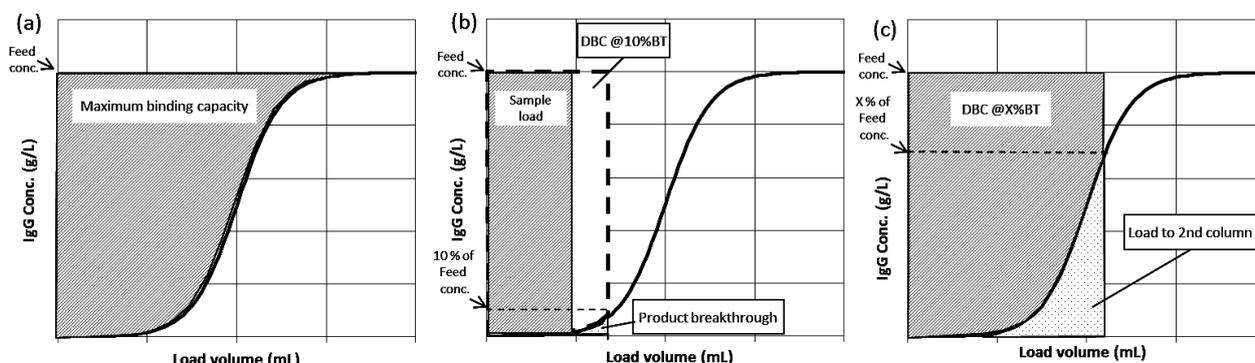


Figure 2 Breakthrough curve and capacity utilization. Maximum binding capacity of column is described as (a). DBC @10%BT is the area within dotted line at (b). To avoid product loss, sample load amount of batch chromatography is 70% to 90% of DBC. With continuous chromatography, capacity utilization increases described as (c) because second column capture breakthrough product.

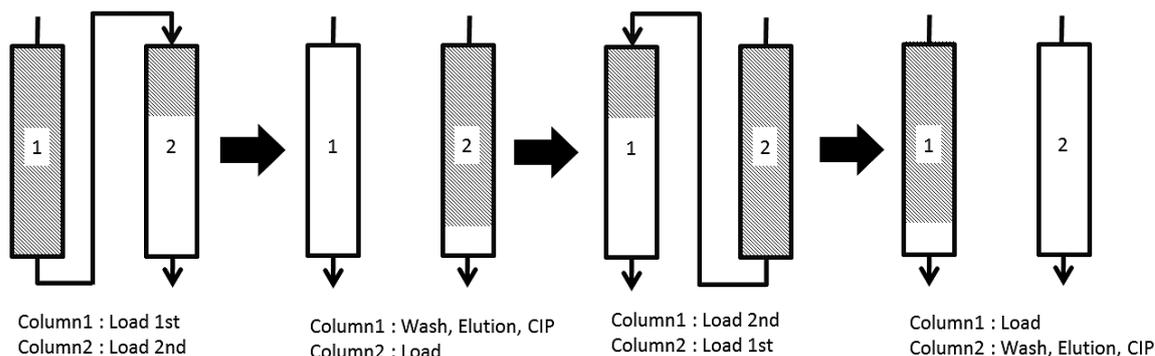


Figure 3 Twin-column continuous chromatography.

測定, ②連続精製システムソフトウェアを用いたProductivityシミュレーション, ③連続精製システムを用いた抗体原液精製能の評価の3点を実施した。また, ①③については市販の連続精製用アガロース担体との比較を実施した。

### 3 実験

#### 3.1 高流速域でのDBC測定

Amsphere A3およびアガロース担体をBH (ベッド高) 50 mmになるように各々充填したI.D.(カラム径)5 mmのガラス製カラムに, 約5 g/Lに調製したヒトポリクローナル抗体溶液を通液した。抗体溶液濃度の50%, 70%, および90%が破過した際の抗体吸着容量(g)を求め, DBC (g/L)を算出した。保持時間は2分(線流速150 cm/hr), 1分(線流速300 cm/hr), 0.5分(線流速600 cm/hr)の3条件とした。ただしアガロース担体については保持時間0.5分の場合, メーカーの推奨流速外であったため測定を実施していない。

#### 3.2 Productivityシミュレーション

ID 5 mm, BH 50 mmカラム2本に充填されたAmsphere A3を使用し15 gのヒトポリクローナル抗体を連続精製する際に要する精製時間から, (1)式で定義したProductivityを算出した。精製時間の計算にはConti-Chrom®システム(ChromaCon社製)のChrom IQ softwareを使用した。抗体濃度(1.5 g/L, 4.5 g/L), 保持時間(2分, 1分, 0.5分), および抗体負荷量(50% BT時, 70% BT時, 90% BT時のDBC)を変化させて計算した。条件および抗体負荷以降の精製スキームはTable 1に示した。抗体負荷量は実験3.1の結果から決定した。比較としてバッチ精製時のProductivityについても計算を実施した。精製スキームは連続精製と同様とし, 抗体負荷量は10% BT時のDBCの80%とした。

Table 1 Productivity simulation conditions

	Continuous process	Batch process
Resin	Amsphere A3	
Column I.D. (cm)	0.5	0.5
Column BH (cm)	5	20
Number of columns	2	1
IgG titer (g/L)	1.5, 4.5	1.5, 4.5
Target Loading amount (g)	15	15
RT (min)	2 min (150 cm/hr) 1 min (300 cm/hr) 0.5 min (600 cm/hr)	4 min (300 cm/hr)
Loading	50%, 70%, 90%	80% of 10% BT

Step	CV*	RT (min)
Wash I	3	CIP: 2 for continuous 8 for batch Other: Same as condition above
Wash II	3	
Wash III	3	
Elution	3	
Strip	3	
EQ1	3	
CIP	3	
EQ2	3	

\*CV = Column Volume

#### 3.3 モノクローナル抗体のDBC測定

Amsphere A3およびアガロース担体をBH 50 mmで各々充填したID 5 mmのガラス製カラムに抗体濃度1.6 g/LのBevacizumab BS(バイオシミラー)の抗体原液を通液することでDBCを測定した。通液時の保持時間は0.75分(線

流速400 cm/hr), 0.5分(線流速600 cm/hr)の2条件とした。また, ID 5 mm, BH 100 mmのカラムにAmsphere A3を充填し, 保持時間1.5分(線流速400 cm/hr)にて同様の抗体原液を通液することでDBCを測定した。

### 3.4 モノクローナル抗体のバッチ精製

Amsphere A3を充填したID 5 mm, BH 100 mmのカラムに抗体濃度1.6 g/LのBevacizumab BSの細胞培養液を保持時間1.5分(線流速400 cm/hr)で通液した。抗体負荷量は10 %BT時のDBCの80 %とした。精製スキームはTable 2に示した。溶出画分を回収し, 回収抗体溶液とした。

### 3.5 モノクローナル抗体の連続精製

ID 5 mmのガラス製カラムにAmsphere A3およびアガロース担体を各々BH 50 mmになるように2本充填した。抗体濃度1.6 g/LのBevacizumab BSの細胞培養液をカラムに通液し, 連続精製を4サイクル実施した。精製に

はツインカラム連続精製システムContiChrom (Chroma-Con社製)を用いた。精製のスキームはTable 2に示した。溶出画分を回収し, 回収抗体溶液とした。

### 3.6 回収抗体溶液の分析

回収抗体溶液の抗体濃度を算出し, これと抗体負荷量から回収率を算出した。回収抗体溶液中のHCP残留量はCHO HCP ELISA kit 3G (Cygnus technologies Inc.), プロテインA漏出量はProtein A Mix-N-Go™ ELISA Kit for Amsphere ligands (Cygnus technologies Inc.), DNAはQuant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてそれぞれ測定した。

## 4 結果および考察

### 4.1 高流速域でのDBC測定とProductivityのシミュレーション

連続精製では高流速精製による処理時間短縮が求められる。そのため, 連続精製用担体は高流速処理が可能でかつ高流速領域で高DBCが得られるよう設計されている。Amsphere A3の場合, BH 100 mmカラムへCF (Compression Factor: 充填圧縮率)1.25での充填時, 通液時許容圧3 bar以下の条件では, 通液可能な最大線流速は725 cm/hrである。そのため, BH 50 mmのカラムについては保持時間0.5分(線流速600 cm/hr)での超高流速運転が可能である。ヒトポリクローナル抗体を用いて, Amsphere A3と連続精製用担体との, 高流速領域のDBCを測定した結果をFigure 4に示す。Amsphere A3は高流速域でも連続精製用担体と同等のDBCを示しており, 連続精製に適した担体であると言える。

測定したDBC値を用い, バッチ精製時と連続精製時のProductivityを計算した結果をFigure 5に示す。同抗体量を処理する場合でも, 連続精製はバッチ精製よりも高いProductivityを示した。Productivityは前述のとおり, 処理抗体量を使用担体量と工程時間で除したものである。連続精製時の使用担体量はバッチ精製時の1/2としており, Productivityの向上へ寄与した。また, バッチ精製よりも高線流速で精製することで工程時間が削減され, Productivityの向上に寄与した。一方, バッチ精製よりも低線流速の150 cm/hrで精製する場合でも高Productivityが得られたが, これは連続精製では抗体負荷とそれ以外の洗浄等の工程を同時に実施するため工程時間の増加が抑えられるためである。従って, 抗体負荷が連続的に実施されるよう精製条件を最適化し, 工程時間を最短とすることが, 連続精製の条件検討では必要となる。

Table 2 Purification conditions

	Continuous process	Batch process
Resin	Amsphere A3 50 μm Agarose	Amsphere A3
Column I.D. (cm)	0.5	0.5
Column BH (cm)	5	10
Number of columns	2	1
RT (min)	0.75 min (400 cm/hr) 0.5 min (600 cm/hr)	1.5 min (400 cm/hr)
Loading	70 %BT	80 % of 10 % BT
Number of cycles	4	1

Step	Buffer	CV
Load	Bevacizumab BS, Titer 1.6 g/L	-
Wash I	20 mM Sodium Phosphate, pH7.5	3
Wash II	20 mM Sodium Phosphate, 1 M NaCl, pH7.5	3
Wash III	20 mM Sodium Phosphate, pH7.5	3
Elution	100 mM Sodium Acetate, pH3.3	3
Strip	100 mM Acetic Acid, pH2.8	3
EQ1	20 mM Sodium Phosphate, pH7.5	3
CIP	0.5 M NaOH	3
EQ2	20 mM Sodium Phosphate, pH7.5	3

\*CIP: RT (Residence Time) = 2 min, 150 cm/hr (continuous process), RT = 4 min, 150 cm/hr (batch process), Other: RT is same as condition above.

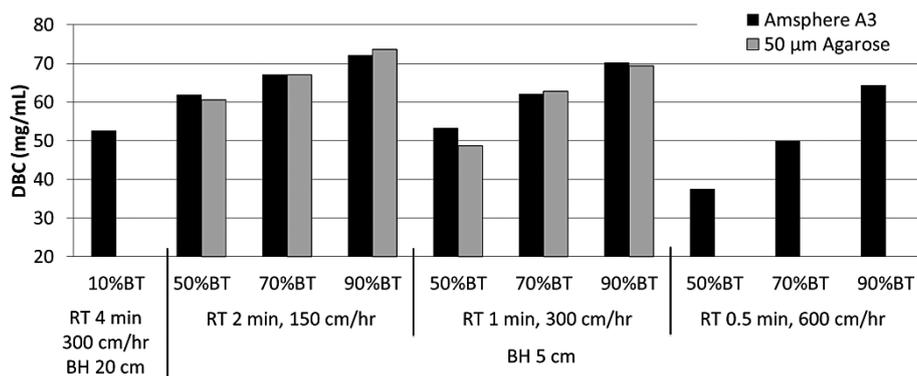


Figure 4 DBC comparison between Amsphere A3 and Agarose resin.

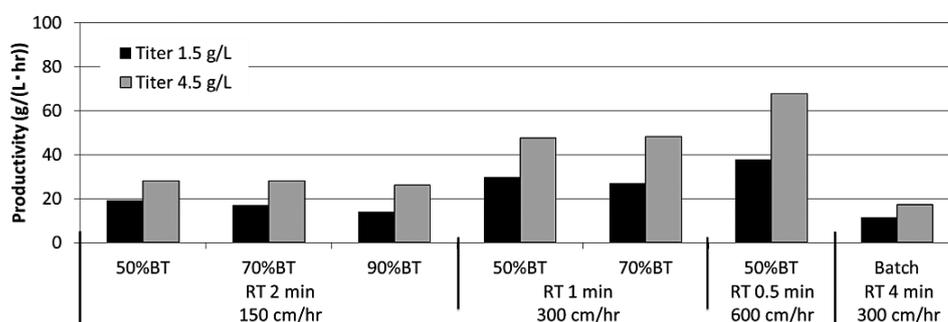


Figure 5 Productivity of Amsphere A3 with various conditions.

連続精製条件間で比較すると、高流速ほど処理時間は短縮され、高いProductivityを示した。例えば、保持時間2分のDBC @50 % BTと保持時間1分のDBC @70 % BTはほぼ同等であるが、工程時間が短縮される後者のほうがProductivityは高くなった。また、抗体濃度が高いほどProductivityは向上した。これは高抗体濃度では抗体溶液量が低減され、結果として抗体負荷に要する時間が短縮されたためである。一方で抗体負荷量は、同保持時間の条件下ではProductivityにほとんど影響しなかった。こ

れは、抗体負荷量が多くなるほど処理に要するサイクル数が低減される一方で、1サイクルあたりの精製時間は長くなり、これらの効果がトレードオフになるためである。

#### 4.2 連続精製時の精製能比較

3.5節に示した条件でツインカラム連続精製システムを用いた抗体精製を実施した。Amsphere A3での抗体回収率はバッチと同等であった。また、流速によらず98 %以上と高い回収率が得られ、前項でシミュレートした通りのProductivityが得られた (Table 3)。

Table 3 Recovery and measured productivity

Resin	Continuous process			Batch process
	Amsphere A3		50 μm Agarose	Amsphere A3
RT (min)	0.75 min (400 cm/hr)	0.5 min (600 cm/hr)	0.75 min (400 cm/hr)	1.5 min (400 cm/hr)
Loading	70 % BT	70 % BT	70 % BT	80 % of 10 % BT
Binding Capacity (g/L-resin)	65	49	71	34
Calculated Productivity (g/(L·hr))	30	35	29	27
Recovery (%)	98	99	95	97
Measured Productivity (g/(L·hr))	30	35	28	26

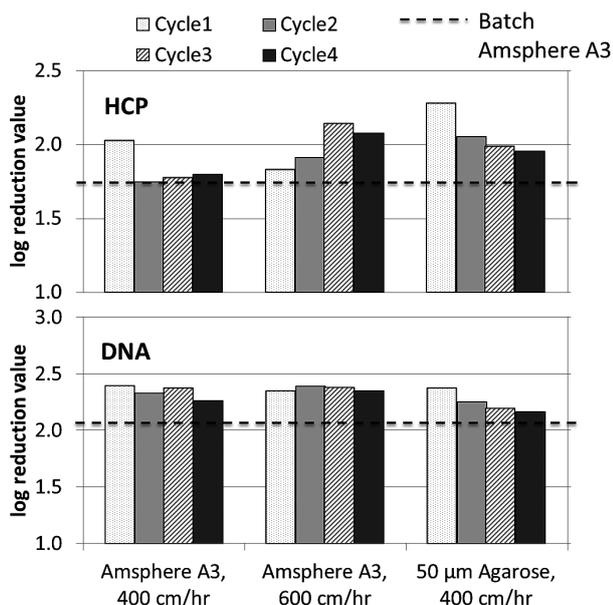


Figure 6 Impurity clearance.

回収抗体溶液中の不純物除去性能を確認した結果をFigure 6に示す。HCP除去率およびDNA除去率はバッチ精製時と同等であり、アガロース担体とも遜色ない結果が得られた。また、精製時の流速が異なる場合でも同等の不純物除去性能が得られた。本結果より、Amsphere A3は連続精製に問題なく適用でき、バッチ精製時と同等の精製能が発揮されると期待される。

## 5 おわりに

本稿ではAmsphere A3を連続精製に適用した際の性能を確認した。高流速領域でのDBCは連続精製用担体と同等の高い値であり、高いProductivityが得られることが示された。また、ツインカラム連続精製システムを用いて実際に抗体原液の精製を行い、バッチ精製時との不純物除去性能の同等性、および連続精製用担体との性能同等性を確認した。以上より、Amsphere A3を連続精製に

適用することで、従来のバッチ精製と同等の不純物除去性能を保持しプロテインA工程のProductivity向上が期待できる。

さらにProductivityを向上させるには、4.1項で述べたように、高抗体濃度、高流速精製および連続的に抗体負荷が実施される条件で使用することが望ましい。また、同保持時間では担体あたりの抗体負荷量を上げてもProductivityに顕著な影響は見られなかったが、サイクル数の低減が見込める。これにより、Buffer使用量の低減、CIP工程に使用されるアルカリ水溶液との総接触時間の短縮による担体寿命の向上が期待でき、これらも考慮してプロセスを構築していくことが求められると考える。また、本稿中では検討されていないが、不純物除去性能は抗体負荷工程および洗浄工程の流速および接液量の影響を受ける可能性がある。従って、今後多様な条件での検討を実施することで、連続精製という高負荷・高流速条件の不純物除去能をより向上させる条件を見出すこと、さらには連続精製条件に適した担体の設計に取り組む所存である。

## 発表先

BioProcess International Conference & Exhibition 2017, 2017/9/25-28

## 参考文献

- 1) 赤羽宏友：医薬産業政策研究所リサーチペーパー・シリーズNo.71 (2018年3月)。
- 2) T. M. Spaeth, M. Angarita, D. Baur, M. Morbidelli, R. Lievrouw, M. Bavand, G. Lissens, G. Storehlein: *BioPharm International*, **26**, Issue 10, 33 (2013)。
- 3) C. A. Challener: *BioPharm International*, **31**, Issue 4, 14 (2018)。