

タンパク質間反応のための新規プラットフォーム

—抗体分離の簡便化・高速化・低コスト化に向けて—

概要

バイオ医薬品に代表される抗体の精製過程では、煩雑な工程をとまなう前処理・分離・精製のために、長時間を要し、また、精製に用いられる既存の分離剤では、低耐久性・低回収率・低再現性などの理由から、高い費用が発生します。

久保拓也 京都大学大学院工学研究科 准教授、大塚浩二 同教授、内藤豊裕 同助教、久保田圭（社会人博士課程／第一三共株式会社）、谷川哲也（株式会社ケムコ）らは、これらの諸問題を解決するために、安価な樹脂を利用して作製した多孔性材料（スポンジモノリス）を用いて抗体の高速分離に成功し、2017年3月14日付で英誌 *Scientific Reports* 電子版に掲載されました。本成果は、バイオ医薬品精製の高速化、簡便化および低コスト化、また、新規医薬品開発の迅速化に寄与すると期待されます。

1. 背景

低い副作用や体内での高い安定性などの利点から、近年、抗体医薬品開発が急速に進められています。通常、細胞培養によって得られる抗体は、煩雑な前処理、複数の精製過程を経て単離されます。一方で、抗体医薬品開発においては、臨床検査段階においても年間 100 kg 以上のターゲット抗体が必要となり、市販化される医薬品の場合にはさらに大量の単離・精製が必要になるため、大量かつ高速での精製技術が求められています。また、新薬開発段階では、候補の抗体のスクリーニングのために、多検体の分析が必要になります。精製、分析のいずれについても、Protein A を固定化した分離カラムによる免疫グロブリン G (IgG) の分離のように、タンパク質間の特異的な相互作用を利用したアフィニティクロマトグラフィーが一般的に用いられています。現在の方法では、Protein A を固定化したシリカゲルやアガロースの粒状充填剤を分離剤として用いる場合が多いですが、現行以上の高い通水性や低コスト化を実現するのは難しいと言えます。そのため、上記の分離・精製過程の簡便化、高速化、低コスト化の開発途上、現在の抗体医薬品の低コスト化に対するボトルネックになっていると考えられます。

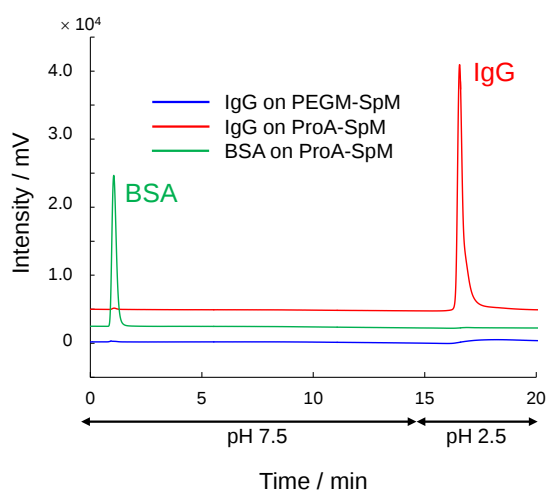
一方、我々は、汎用の比較的安価な合成樹脂を用いて、超高通水性の多孔性樹脂²⁾（スポンジモノリス³⁾）を利用した新規アフィニティクロマトグラフィー用カラムを着想しました。通常の粒状充填剤とは異なり、スポンジのような柔らかい素材を用いることで、操作性が格段によくなり、カラム作製に費やす操作も簡便化できます。さらに、連続的につながった大きな貫通孔（10 マイクロメートル以上）のおかげで、低い負荷圧を保ったままで通常の 10 倍以上の通水速度を実現できます。本研究では、タンパク質が結合可能なエポキシ基を含むスポンジモノリスを開発し、その表面に Protein A を固定化することで、IgG の高速分離を試みました。また、同じくタンパク質間反応の足場としての可能性を明らかにするために、消化酵素である Pepsin を固定化したカラムも作製し、抗体のオンライン消化⁴⁾ も行いました。

2. 研究手法・成果

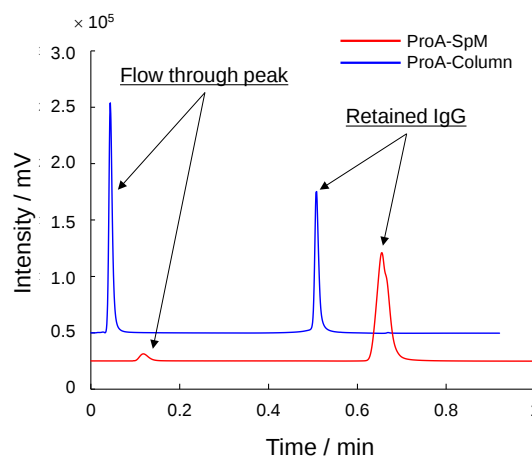
エチレンーグリシジルメタクリレート共重合体 (PEGM) 基材のスポンジモノリスを液体クロマトグラフィー用のカラムに充填し、Protein A 固定化スポンジモノリス (ProA-SpM) を作製しました。同様に、Pepsin を固定化したスポンジモノリス型カラム (Pep-SpM) も作製しました。

標的タンパク質である IgG を用いて ProA-SpM を評価した結果、グラジエント溶出⁵⁾条件において、中性から酸性に移動相を変化させることで、IgG のピークを得ることに成功しました。また、牛血清アルブミン (BSA) を試料に用いた場合には、溶媒ピークと同時間に溶出することから、Protein A と IgG の特異的な相互作用が発現したと考えられます。次に、作製した ProA-SpM の有用性を評価するために、高流速下における評価を行った結果、市販の Protein A カラム (ProA-Column) では、流速の増加とともにフロースルーピーク⁶⁾が出現しますが、ProA-SpM では、流速 9.0 mL/min においても良好な回収率が得られました。さらに、Pepsin を固定化したカラムにおいては、比較的高流速条件 (100 mL/h) においても、良好な抗体の消化が確認されました。以上のことから、本研究で提案した新規スポンジ材料は、アフィニティ反応の新規プラットフォームとして有効であることが示唆されました。

-
- 1) アフィニティクロマトグラフィー：主としてタンパク質同士または低分子物質との親和性によって物質を分離する方法。
 - 2) 多孔性樹脂：多数の細孔（小さなあな）を含むプラスチック。
 - 3) スポンジモノリス：スポンジ状の固まり。分離分野では柱状のスポンジ材料。
 - 4) 消化：酵素によるタンパク質の分解。
 - 5) グラジエント溶出：クロマトグラフィーにおいて、溶出力の強い溶液を徐々に流して、吸着物をゆっくりと溶出させる手法。
 - 6) フロースルーピーク：クロマトグラフィーにおいてカラムに保持されずに溶出する物質のピーク



Protein A固定化スポンジモノリス (ProA-SpM) を用いたIgGとBSAの分離



高流速下 (9.0 mL / min) におけるProA-SpM及びProA-Column (市販品) を用いたIgG分離

3. 波及効果、今後の予定

本研究の成果は、急速に開発が進む抗体医薬品の分離・精製プロセスの簡便化、高速化、低コスト化に寄与すると期待されます。また、タンパク質間反応の足場としての可能性を示したことから、バイオ医薬品開発の迅速化や新規抗体の構造解析にも有用であると考えられます。

4. 研究プロジェクトについて

京都大学運営費交付金

<論文タイトルと著者>

タイトル : New platform for simple and rapid protein-based affinity reactions

著者 : Kei Kubota, Takuya Kubo, Tetsuya Tanigawa, Toyohiro Naito, Koji Otsuka

掲載誌 : Scientific Reports

<イメージ図>

