

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0116

研究課題名（和文）低分子抗体の生成・PEG化反応を高速化するモジュール化モノリス担体の開発

研究課題名（英文）Development of sequential and reaction process with monolithic column module for small antibodies PEGylation

研究代表者

吉本 則子（Yoshimoto, Noriko）

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：40432736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：断片化抗体の連続的な生成・分離を実施する断片化酵素固定化モノリスの開発およびモノリスカラムの後続にprotein Aおよびprotein Lの2種類のアフィニティーカラムを連結させたプロセスの開発を行った。分子量25000以下の過剰断片は精製カラムを素通りするが、断片化抗体あるいは未反応の抗体は、いずれかのカラムで回収可能であった。ポリクロナル抗体を基質として、断片化抗体のカラム滞留時間、pH、温度の影響に調べた結果、反応収率はカラム滞留時間に依存的であるが、高温条件で有れば短い滞留時間でも収率を改善させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では断片化酵素を固定化したカラムとアフィニティーカラムを連続化することで、分子サイズ、電荷分布によらず高純度で断片化抗体を簡単に回収することを可能とした。このプロセスでは、多様な抗体断片から抗原認識部位を含むものを高純度で回収することができ、断片化酵素によるアフィニティーリガンドのダメージも回避できる。断片化カラム、精製カラムは全て連結させ、全ての操作を全自動で実施できるようにした。このため、従来の断片化反応後の煩雑な分離精製操作の省力化が可能となった。また、本研究ではポリクロナル抗体を用いて検討を行っており、様々な抗体の断片化反応において本プロセスが適応可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed a digestion enzyme-immobilized monolith for the continuous fragmentation and separation of fragmented antibodies. Following the column, we connected two types of affinity columns, Protein A and Protein L. Excess fragments with a molecular weight below 25,000 bypass the purification column, while fragmented antibodies or unreacted antibodies could be recovered from either of the columns. Using polyclonal antibodies as a substrate, we investigated the effects of column residence time, pH, and temperature on fragmented antibody yield. The results indicated that while the reaction yield is dependent on the column residence time, high-temperature conditions can improve the yield even with shorter residence times.

研究分野：生物分離工学

キーワード：continuous fragmentation fragmented antibodies protein A chromatography protein L chromatography digestion

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

断片化抗体は、抗体タンパク質のトリプシンおよびペプシンなどのタンパク質分解酵素により処理することで比較的容易に得られる。しかし、反応処理後の分離精製操作は煩雑となり、イオン交換クロマトグラフィーをはじめとする複数のクロマトグラフィー操作が必要となる[1][2][3]。しかし、断片化抗体の電荷分布・分子サイズは多様であり、生成した断片化抗体ごとにクロマトグラフィープロセスの最適化が必要となる[5]。一方、抗体タンパク質の分離には、アフニティーをもつクロマト担体が開発されている。ヒト化モノクローナルIgG抗体の場合は、Fc領域と特異的に結合する protein A 担体が、精製プロセスの第一段階で使用され、高収率で培養液からの回収を可能としている。軽鎖の一部を認識する protein L 担体も開発されており、抗原認識部位を有する断片化抗体は protein L に結合可能となるものもある。これら2種類のアフニティー担体を組み合わせると、断片化抗体の高純度な精製が期待できる。しかしながら、これらの担体は、リガンド自体がタンパク質であり、タンパク質分解酵素を含む反応液の分離に用いた場合、リガンドタンパク質の分解の懸念がある。このため、本研究では、分解酵素を担体に固定化した固定化分解酵素担体を用いて、アフニティー担体と組みあわせることで、高効率かつ高純度な断片化抗体の生成プロセスの開発を目指した。また、従来の多孔性担体では、巨大タンパク質である抗体の拡散抵抗が大きい[6]。このため、本研究では、細孔が貫通したモノリス担体を、分解酵素の固定に用い、断片化反応に用いることとした。

2. 研究の目的

本研究では、Fig.1 に示すアフニティークロマトグラフィーを用いた高純度精製プロセスと抗体断片化工程を統合することで、簡便な断片化抗体の生成プロセスの開発を目的とした。抗体断片化工程では、後段で用いる担体への影響と抗体の拡散抵抗を考慮し、モノリス担体への分解酵素の固定化を検討した。

3. 研究の方法

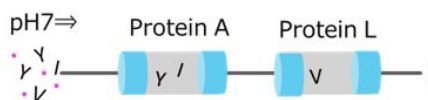
基質となる抗体には、一部ヒト化モノクローナル抗体(mAb)を用いたが、主としてポリクローナル抗体(polyIgG)を用いた。アフニティークラムには、protein A 担体 (mabselecture (cytiva)、kancap A(kaneka))と protein L 担体 (kancap L(kaneka))が予め充填されたもの、あるいは手詰めしたものを用いた。mAb は、培養液から protein A により精製したものを用い、polyIgG は、protein L カラムで精製したものを用いた。固定化分解酵素を用いたカラム操作による断片化反応では、後段に2種類のアフニティー担体を接続し、全自動クロマトグラフィーにより、自動で断片化反応と精製操作の切り替えを行い、未反応抗体および生成した断片化抗体のそれぞれの回収を行った。遊離パピンの断片化反応の特定に基づき、移動相流速、温度、pH をプロセスの操作変数とし、収率の変化について調べた。

4. 研究成果

4.1 断片化反応の条件検討

固定化分解酵素による抗体断片化反応の条件検討と比較データを取得するために、遊離の状態での分解酵素を用いた断片化反応の特性について調べた。タンパク質分解酵素はパピンをを用いた。パピンをを用いた断片化反応では活性化のためにシステインを含む溶媒が用いられる。しかしカラム操作では、通液操作によりカラム内の平衡化を行う際は、カラム体積の3倍量が必要とし、バッチ操作と比較して多くの溶媒が必要となる。このため本研究では、システインの有無による活性の違いについて着目した。断片化反応液中の分子サイズをゲルろ過クロマトグラフィーにより調べたところ、システイン無しの条件でも、抗体タンパク質のピークの消失は確認でき、断片化反応が進行可能であることが分かった。また、アフニティークロマトグラフィーと電

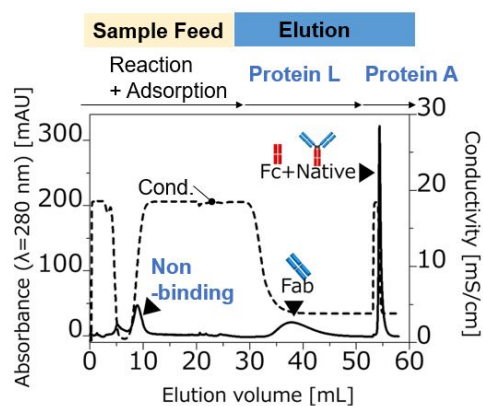
Reaction and adsorption



Elution from protein L column



Elution from protein A column



Reaction conditions
[IgG] = 10 mg/mL, volume 100 μ L, T_r = 300 min, 50°C

Fig. 1 断片化抗体を連続的に生成分離するクロマトグラフィープロセスの概念図

気泳動により反応液中成分を分析したところ、protein L に吸着され Fab 領域を含む断片の生成収率は温度に依存して増加することが分かった。反応時間が 50 分程度であると、37 °C では収率は 5 から 15%と低い値をとった。反応温度を 37 °C から 60 °C まで上昇させると断片化収率は 30-40%程度まで向上した(Fig.2)。また、非還元での電気泳動での分析より、37 °C では、分子量が 50 kDa 付近の断片が多く存在するのに対し、50 °C、60 °C の条件では 100 kDa の断片も多く存在することが確認された。断片化部位が温度により変化することが示唆されたが、断片化抗体の生成収率は十分であると判断し、カラム操作による断片化反応では溶媒中にシステムを含まないものを用いることとした。また、抗体タンパク質に対する断片化収率は mAb と polyIgG でほぼ違いはみられなかった。精製抗体に対する動的吸着量について調べたところ、滞留時間が 1 分以上あれば protein A および L とともに約 40 mg/mL-gel であった。ただし、断片化反応液を通液させるごとに数%ずつの吸着量の低下を示した。また、温度の上昇に伴い活性の増加がみられたが、今回用いた polyIgG の変性温度を調べたところ 55 °C 近傍であり、これ以上の温度では濁度の上昇がみられたため、固定化担体を用いた連続断片化反応の最大検討温度は 50 °C とした。

4.2 パパイン固定化モノリス担体の開発

ポリメタクリレートを基材とするモノリスにパパインを固定化し、合成基質および抗体タンパク質の断片化収率を調べた。抗体タンパク質に対しては、常温条件においても 40%程度の断片化収率が得られた。ただし、使用回数ごとに活性の低下がみられた。また、合成基質は、水系溶媒ではモノリス担体に全て吸着し、活性を確認することができず、イソプロパノールを含む条件において僅かな活性が確認された。このことからモノリス担体の基材表面の影響が著しく大きいと判断し、現在、基材材質の条件検討を実施している。以下では、すべて従来型のアガロース担体を基材とするパパイン固定化担体を用いた検討結果を示す。

4.3 分解酵素固定化担体とアフィニティークロマトグラフィーを連続した断片化抗体生成プロセスの反応収率

室温条件において、一定量の抗体溶液を分解酵素固定化担体が充填されたカラムに通液し、断片化反応を実施した。カラム滞留時間を 30 分から 26 時間に変動させ収率を調べたところ、protein L から回収される断片化抗体の収率は時間とともに増加し最大で 60%まで向上した(Fig.3 上段)。それ以降の時間では、protein A および L のいずれのカラムにも吸着されない、過剰断片化物の割合が上昇した。いずれの時間においても、protein L に含まれる断片化抗体の分子量は 37 kDa で均一であることが分かった(Fig.3 中段)。処理時間当たりの生産性は、操作時間が 100 分程度で最大となった(Fig.3 下段)。

遊離の分解酵素で温度上昇による収率向上が確認されたことから、本プロセスにおいても反

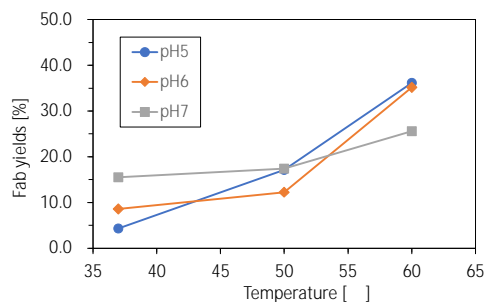
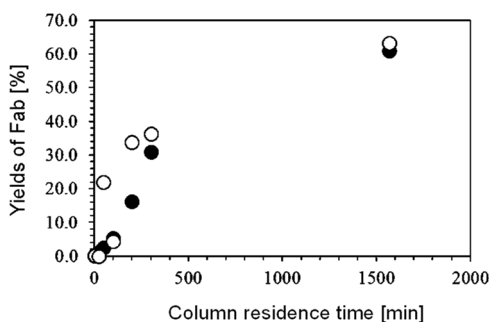
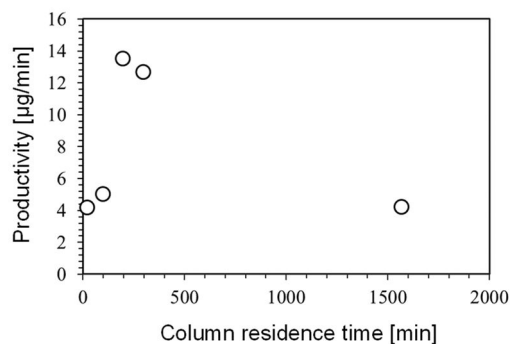
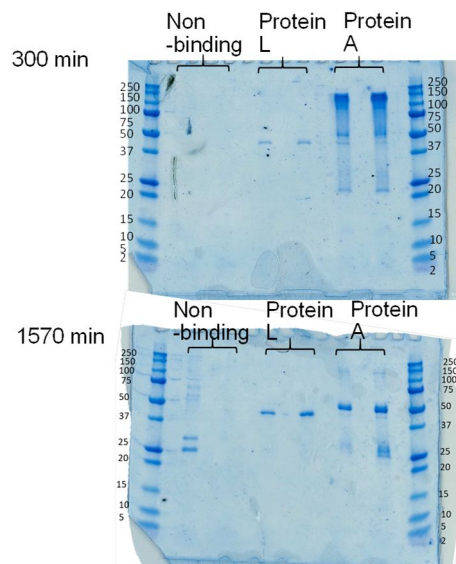


Fig.2 パパインの Fab 生成収率に対する温度の影響



Feed; IgG conc. = 10 mg/mL, Volume 100 μ L
 Reaction column; papain immobilized resin (thermfish packed column 1 mL, 4.17 mL
 Residence time; T_R = Column volume / Feed flow rate
 $T = 25^\circ\text{C}$, pH7



Productivity = Amount of obtained Fab / Processing time

Fig.3 抗体断片化生成分離プロセスにより得られる Fab の生成収率(上段)および純度(中段)と生産性(下段)

応カラムの温度制御を行い、収率の向上を試みた。温度調整は分解酵素固定化カラムにサンプルが入る際に、所定温度に到達するように制御し、精製工程は常温で行った。この結果、37では活性の上昇はみられなかったが、50の条件において、室温の2倍近い高い収率が得られた(Fig.4)。Fig.2に示した遊離のパパインを用いた反応収率の上昇量よりも大きな増加がみられたが、今回の固定化担体は、拡散抵抗が温度上昇とともに低下することも計測しており、酵素自体の活性上昇と基質抗体の担体における拡散抵抗の減少の両方の効果により、収率の増大が得られたと考えられる。

まとめ

タンパク質分解酵素固定化カラムとアフニティーカラムを連続化したクロマトグラフィープロセスにより、高純度な断片化抗体が得られた。反応収率は、カラム滞留時間に依存し、26時間で60%程度まで上昇する。モノリス担体を

酵素固定化担体として使用した場合、モノリス基材の影響が大きく基質および分解物の蓄積により活性の維持が困難であった。しかし、高温での活性の上昇が示され、固定化担体で懸念された拡散抵抗についても改善されている可能性が示唆された。

引用文献

- [1] J.B. Tandale, et.al., *J. Chromatogr. B* 1159 (2020) 122400.
- [2] A.W.L. Kinman, et.al., *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 800.
- [3] N. Ulmer, et.al., *Biotechnol. J.* **14** (2019) 1.
- [4] J. Kittelmann, et. al., *J. Chromatogr. A.* **1510** (2017) 33.
- [5] G. Carta, et.al., *Chem. Eng. Technol.* 28 (2005) 200500122.

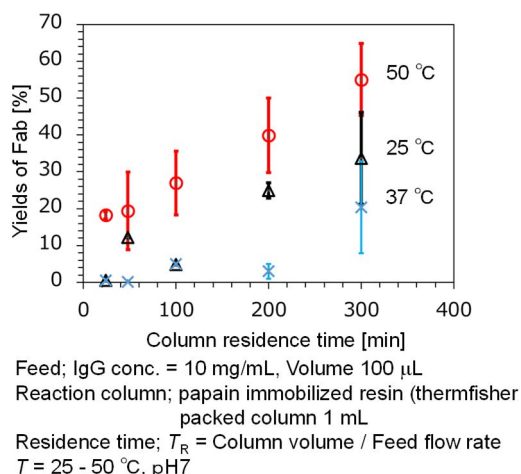


Fig. 4 抗体断片化生成分離プロセスにおける Fab 生成収率に対する温度の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshimoto Noriko	4. 巻 23
2. 論文標題 Continuous Protein Modification and Separation Process with Chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japan Journal of Food Engineering	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11301/jsfe.21601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 国沢 樹、吉本 則子
2. 発表標題 フロー式IgG抗体断片化反応に及ぼす温度の影響
3. 学会等名 日本食品工学会第23回（2022年度）年次大会（岡山）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 国沢 樹、吉本 則子
2. 発表標題 固定化ババイン担体を用いた連続式IgG断片化-精製操作の検討
3. 学会等名 化学工学会第87回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平岡 恋奈、吉本則子
2. 発表標題 断片化抗体を用いたPEG化Fabの合成と分離
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉井 秀和, 吉本 則子
2. 発表標題 抗体タンパク質のprotein A固定化クロマト担体における吸着現象の熱力学的解析
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nanako HOSHINO, Joao SIMOES-CARDOSO, Noriko YOSHIMOTO, Shuichi YAMAMOTO
2. 発表標題 Thermodynamic analysis of bovine serum albumin adsorption onto grafted ion exchange ligands
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
	アレシュ ポドゴニック (Ales Podgornik)	リュブリャナ大学・Biotechnical Faculty・Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スロベニア	リュブリャナ大学			