

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14303  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K05228  
研究課題名（和文）次世代バイオ医薬品の高速・大容量分離が可能なギガポア-アフィニティ分離剤の開発

研究課題名（英文）Development of a gigapore chromatographic resins that enables rapid and large-scale separation of biopharmaceuticals

研究代表者  
熊田 陽一（Kumada, Yoichi）  
京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：70452373  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト抗体をはじめとするバイオ医薬品の高効率かつ高速なクロマトグラフィ分離を実現するために、ギガポア構造を有するクロマトグラフィ担体の利用を検討した。エポキシ系モノリス構造を有するクロマトグラフィ担体を開発し、当該レジンのイオン交換クロマトグラフィにおける性能を静的ならびに動的的手法によって評価した。その結果、従来のアガロース系クロマトグラフィレジンと比較して、高流速域において高い動的吸着容量ならびに低いHETPが得られ、ヒト抗体を高い分解能で高速分離できることが明らかとなった。本研究で得られた知見は抗体医薬を始めとする多様なバイオ医薬品の高速分離に適応できる優位性のある成果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
モノリス構造を有するエポキシ系クロマトグラフィビーズの開発によって従来では困難であった低圧力損失のカラムの大型化が可能となった。特に高速域における高い分解能を有するクロマトグラフィカラムの開発はこれまでになされておらず、優位性の高い成果である。また、既存のメタクリル系クロマトグラフィ担体のギガポア化についてもデキストログラフティングの分子サイズをコントロールすることでポアボリュームと吸着容量を厳密に制御可能であることを明らかにした。これらの成果の学術的ならびに社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the use of chromatographic carriers with gigapore structure in order to achieve high-efficiency and rapid chromatographic separation of biopharmaceuticals such as human antibodies. A chromatographic support with an epoxy-based monolithic structure was developed, and the performance of the resin in ion-exchange chromatography was investigated by static and dynamic methods. Consequently, compared with conventional agarose-based chromatography resins, high dynamic adsorption capacity and low HETP were obtained at high flow rates, and it was clarified that human antibodies could be separated with high resolution and high efficiency. The results obtained in this research was a superior and the resin can be applied to high-speed separation of various biopharmaceuticals including antibody drugs.

研究分野：生物化学工学

キーワード：chromatography human antibodies anion-exchange giga pore

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌を始めとする遺伝子疾患の特異的かつ効果的な治療のために、抗体医薬やウイルス様粒子、エクソソームを始めとしたバイオ高分子の臨床研究が盛んに行われ、注目を浴びている。バイオ高分子は、直径 10 ~ 200 nm ほどのナノ粒子であり、工業生産を行う場合、上流プロセスについては既存施設ならびに方法の流用が可能である一方で、下流プロセスについては、粒子サイズ、表面特性、生産濃度が従来の低分子医薬品とは大きく異なるため、プロセスの再構築を余儀なくされる。

バイオ高分子を培養液中から高効率に分離・精製するための最初のキャプチャー工程は、大容量の吸着クロマトグラフィが望ましい。一方、既存のクロマト担体として、アガロースなどの多孔性粒子担体が用いられてきたが、バイオ高分子の粒子サイズは 10 ~ 200 nm とアガロース担体の細孔径 (5 ~ 20 nm) と比べて遥かに大きく、バイオ高分子を高効率に補足するためのギガポア担体の開発が必要である。さらに、バイオ高分子の表面に提示されている膜タンパク質や外皮タンパク質は、アフィニティ精製の際のキャプチャーターゲットとして最適である一方で、これらを特異的に捕捉可能な分子認識リガンドの開発は、学術分野ならびに産業界においてもやや遅れているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究ではバイオ高分子のダウンストリームプロセスに利用可能な高効率な吸着クロマト技術を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

バイオ高分子の補足に適した貫通孔 (ギガポア) を有するモノリス型粒子担体を用いることで、モノリス担体特有の高い液流動特性と低い圧力損失を維持しつつ、バイオ高分子が吸着するための最適な比表面積を提供可能である。さらに、モノリス担体を敢えて粒子状に整形することで、大型カラムへの均一な充填が可能となる点も本研究の強みであり、産業利用にも適している。このような類まれなる特徴を有するギガポア担体を用いた吸着クロマトグラフィプロセスは未だ報告されていない。

ギガポア-クロマト担体充填カラムを作製し、本カラムの動的吸着容量の算出、操作条件の最適化、さらにはスケールアップパラメーターの抽出を行う。特にギガポア担体の高い液流動性とアフィニティリガンドの高い選択的吸着性を両立することで、上部位お高分子の大容量かつ高速なアフィニティ精製が実現可能となり、結果として次世代バイオ医薬品の分離精製コストならびに操作時間の大幅な削減が可能となる。

## 4. 研究成果

iSEC の解析結果より、Fig.1 に示す通り、MPR60-nude の細孔の 85% が、ウシ IgM およびヒト IgG を含むタンパク質にアクセス可能であった。これらの結果は、MPR60-nude の細孔が、タンパク質の浸透に十分な大きさであることを示している。MPR60-Q におけるウシ IgM の分配係数は、それぞれ 0.52 であり、デキストランのグラフトティングおよびリガンドのコンジュゲーションにより、細孔径が大きくなったことが示唆された。

また、Fig.2 に示す通り、MPR60-Q におけるヒト IgG の分配係数は、0.62 であり、POROS XQ や Capto Q と比較して粒子内深くに浸透可能であることが明らかとなった。Q Sepharose FF の  $K_D$  値は 0.45 から 0.83 の範囲であり、細孔径の分布が広いことが示唆された。一方で、MPR60-Q の  $K_D$  値は 0.51 から 0.68 と非常に狭い範囲であり、モデルタンパク質に対して十分な大きな細孔径を有していることが明らかとなった。以上の結果から、MPR60-Q の細孔径はタンパク質の浸透に十分な大きさであり、その細孔分布は比較的均一であることが示唆された。また Table 1 に示すように、各レジンの  $K_D$  値から細孔径を算出すると、MPR60-Q が 88.8nm と最も大きく、ターゲットであるヒト IgG の約 10 倍の大きさであることが明らかとなった。以上の結果より、MPR60-Q はヒト IgG に対して、十分な大きさの細孔を有し、細孔内で対流を促進する可能性が示唆された。MPR60-Q の細孔径が大きければ、高流速においてより小さな圧力損失でタンパク質を分離精製することが可能となる。これは、Q Sepharose FF などと比較して、治療用タンパク質の迅速な分離に非常に有用であると考えられる。

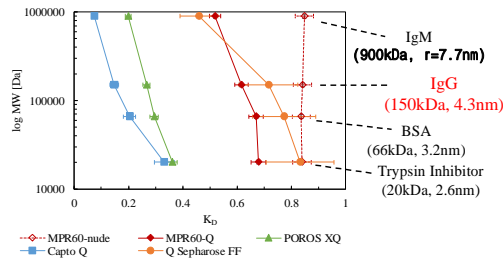


Fig.1 各レジンにおける分配係数  $K_D$  分布

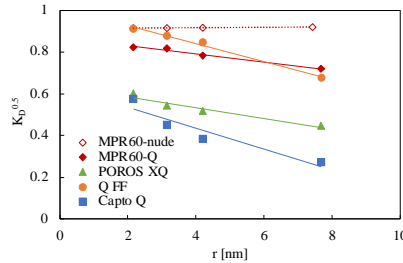


Fig.2 タンパク質の半径と分配係数の関係

Table.1 iSEC による各レジンの細孔径測定値

Resins	MPR60-nude	MPR60-Q	POROS XQ	Q Sepharose FF	Capto Q
Pore Diameter [nm]	Not determined	88.8	49.3	46.9	25.5

Fig.3 に LGE によるヒト IgG に対する陰イオン交換クロマト担体の van Deemter 曲線を示す。縦軸は Reduced HETP,  $h$ , 横軸は Reduced velocity,  $v'$  を示している。

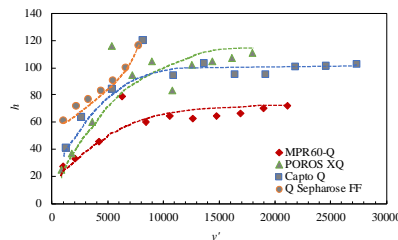


Fig.3 LGE によるヒト IgG に対する陰イオン交換クロマト担体の van Deemter 曲線

MPR60-Q は全ての線流速において最も低い  $h$  を示し、特に線流速 1222cm/h に相関する  $v' = 7200 \sim 10980$  間以上において、MPR60-Q は一定の  $h$  を示した。これは、ヒト IgG が MPR60-Q の粒子内へ深く浸透可能であったため、線流速に依存せず、粒子内で対流が促進されたと考えられる。この結果に対し、MPR60-Q と同様にヒト IgG の粒子内深くへの分配が確認された Q Sepharose FF は  $v'$  が 8000 以上において、圧縮が確認されたため、測定不可能であった。また、ヒト IgG が粒子内へほとんど分配しなかった Capto Q と POROS XQ は MPR60-Q と同様の傾向を示しましたが、 $h$  は高い値に留まった。高流速域における MPR60-Q、Capto Q 及び POROS XQ は、ヒト IgG に対して粒子内で、拡散律速であることが考えられる。以上の結果から、MPR60-Q は高流速域において物質移動抵抗を最も低減できるレジンであり、ヒト IgG をより効率的に分離できる可能性が示唆された。

Fig.4 に各線流速における分離度  $R_s$ 、Fig.5 に陰イオン交換クロマト担体の各線流速における分離度  $R_s$  を示す。

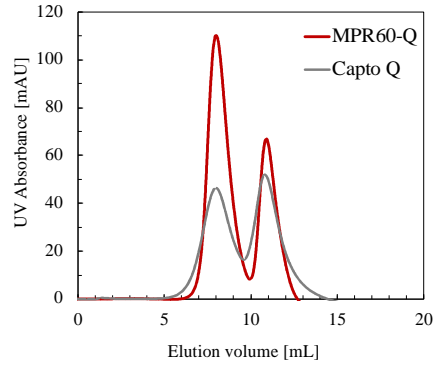


Fig.4 各陰イオン交換クロマト担体の線流速 305cm/hにおけるヒト IgG と BSA の分離

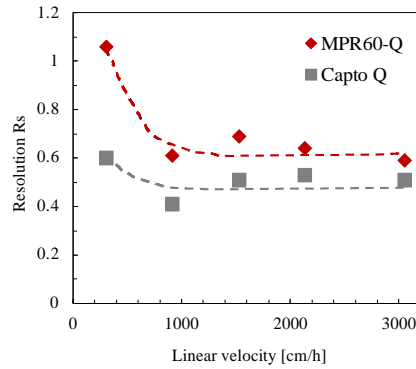


Fig.5 陰イオン交換クロマト担体の各線流速における分離度  $R_s$

線流速 305cm/h におけるヒト IgG と BSA の分離度は、MPR60-Q で 1.06、Capto Q で 0.60 であった。線流速 915~3056cm/h においては MPR60-Q と Capto Q の分離度は一定の値を示し、MPR60-Q の平均  $R_s$  値は  $0.63 \pm 0.04$  であった。以上の結果より、MPR60-Q は Capto Q と比較して、全ての線流速において高い分離度を示したことから、高流速域においても高い分離性能を発揮できることがわかる。

Fig.6 にヒト IgG の各線流速における破過曲線を、Fig.7 にヒト IgG の各線流速における  $DBC_{10\%}$  値、Fig.10 にヒト IgG の各線流速における  $DBC_{10\%}/EBC$  値を示す。

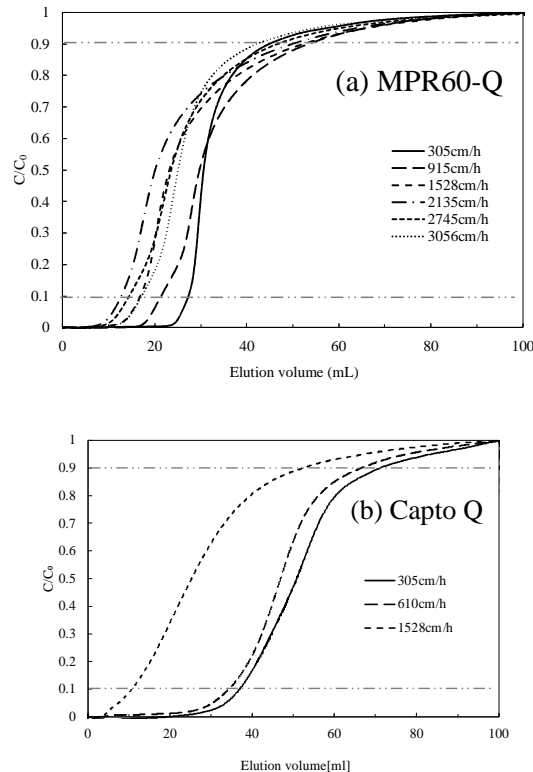


Fig.6 ヒト IgG の各線流速における破過曲線

(a)MPR60-Q (b)Capto Q

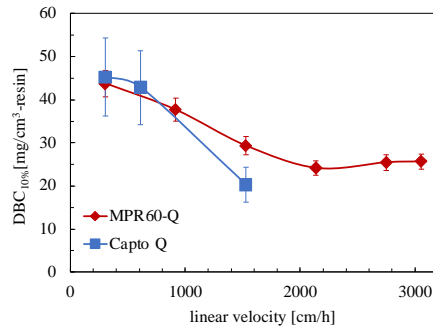
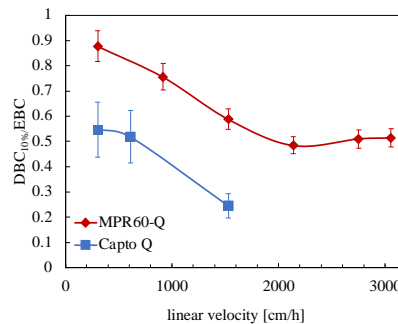
Fig.7 ヒト IgG の各線流速における DBC<sub>10%</sub> 値Fig.8 ヒト IgG の各線流速における DBC<sub>10%</sub>/EBC 値

Fig.7 より、MPR60-Q の DBC<sub>10%</sub> 値は線流速 305cm/h において 43.7mg/cm<sup>2</sup>-resin であり、2135cm/h までは線流速の増加とともに徐々に減少した。しかし、線流速 1528cm/h～3056cm/h においては、MPR60-Q の DBC<sub>10%</sub> 値は 24.1～26.5 mg/cm<sup>2</sup>-resin の範囲で一定となった。Capto Q の DBC<sub>10%</sub> 値は、線流速 305cm/h の時の 45 mg/cm<sup>2</sup>-resin から 1528cm/h の時の 20.3 mg/cm<sup>2</sup>-resin へと急激に減少した。また、Capto Q は 1528cm/h においてカラム内で圧縮が確認されたことに対し、MPR60-Q は同じ線流速以上の高流速域において、高い DBC<sub>10%</sub> 値でヒト IgG を吸着できることが明らかとなった。Fig.8 では算出された MPR60-Q 及び Capto Q における DBC<sub>10%</sub> 値を各レジンに対するヒト IgG の最大吸着容量を縦軸に示す。Fig.8 より、MPR60-Q では、線流速 3056cm/h において静的条件下におけるキャパシティの 52%を示していることがわかる。さらに、MPR60-Q の DBC<sub>10%</sub> 値及び (DBC<sub>10%</sub>/EBC) 値の変動は小さく、Capto Q と比較して線流速に依存しないことを示しており、この結果は、LGE 実験から得られた Reduced HETP, *h* の値と相関している。以上の結果から、MPR60-Q は Capto Q と比較して、静的条件においては劣るものの、動的条件、特に高流速域において物質移動抵抗を低減し、且つ高い吸着容量を兼ね備えるレジンであることが明らかとなった。

## 結言

- ・ MPR60-Q に対するヒト IgG の最大吸着容量は 49.87mg/cm<sup>3</sup>-resin であった。
- ・ MPR60-Q の見かけの細孔径は 88.8nm と最も大きく、ヒト IgG の約 10 倍の大きさであることが明らかとなった。
- ・ MPR60-Q は他のレジンと比較し、全ての線流速において最も低い *h* 値を示した。
- ・ MPR60-Q は Capto Q と比較し、全ての線流速域において高い分離度(*R<sub>s</sub>* 値)を示した。
- ・ MPR60-Q は高流速域 (1528～3056cm/h) において、高い DBC<sub>10%</sub> 値を維持可能であることが明らかとなった。
- ・ MPR60-Q は、ヒト IgG に対して、十分な大きさの細孔径を有し、物質移動抵抗が小さく、高流速下においてより効率的な分離を実現できることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haingomaholy Michelle Rakotondravao, Norio Ishizuka, Keita Sakakibara, Ryota Wada, Emi Ichihashi, Ryosuke Takahashi, Takatomo Takai, Jun-Ichi Horiuchi, Yoichi Kumada	4. 巻 1656
2. 論文標題 Characterization of a macroporous epoxy-polymer based resin for the ion-exchange chromatography of therapeutic proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 462503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2021.462503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoichi Kumada, Yuya Hasegawa, Jun-ichi Horiuchi	4. 巻 131
2. 論文標題 Efficient and robust isolation of rabbit scFv antibodies using antigen-coupled multilamellar vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 299-304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2020.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haingomaholy Michelle Rakotondravao, Ryosuke Takahashi, Takatomo Takai, Yumiko Sakoda, Jun-Ichi Horiuchi, Yoichi Kumada	4. 巻 55
2. 論文標題 Control of Accessible Surface Areas and Height Equivalent to a Theoretical Plate using Grafted Dextran during Anion-Exchange Chromatography of Therapeutic Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Engineering of Japan	6. 最初と最後の頁 267-274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1252/jcej.22we035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoichi Kumada, Haingomaholy Michelle Rakotondravao, Yuya Hasegawa, Yuki Iwashita, Hiromichi Okura, Seiichi Uchimura, Jun-ichi Horiuchi	4. 巻 134
2. 論文標題 Strategies for selection and identification of rabbit single-chain Fv antibodies as ligand in affinity chromatography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 233-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2022.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------