

2P-233 低分子化抗体精製用アフィニティリガンドの開発

○村田 大^{1,2}, 吉田 慎一^{1,2}, 金光 侑莉恵^{1,2}, 水口 和信^{1,2},
大窪 雄二¹
(¹カネカ, ²次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)
Yuji.Okubo@kaneka.co.jp

Fab 型抗体等の低分子化抗体は次世代型抗体医薬品や診断薬として開発が進められており、多様な分子形態が存在する。既存の低分子化抗体精製用アフィニティ担体としてはプロテイン G (PG) やプロテイン L (PL) をアフィニティリガンドとした担体が知られている。しかし市販の PG 担体は、結合容量が十分でないことに加え、試料負荷・洗浄工程での漏出により低回収率となること、PL 担体は、溶出工程で低 pH 条件を要することや、精製対象の低分子化抗体が κ 軽鎖型であっても結合容量が低い場合があること等が課題となり、プロテイン A 担体の様なプラットフォーム型製造プロセスへの適用は実現していない。そこで私たちは上記の課題を解決し、工業的に使用可能な担体開発を目指している。

まず私たちは PG に着目し、PG が持つ Fab 中の重鎖定常領域に対する弱い結合能の向上を試みた。PG 改良法としては、リボソームディスプレイ法による in vitro screening 法を利用した。変異導入と濃縮のサイクルをまわして選抜を行った結果、Fab への結合定数が野生型 PG と比較して 100 倍程度向上した複数の改変体の取得に成功した。取得した改変型 PG を固定化した担体は Fab 精製回収率が 90%以上となり、回収率が 10%未満であった市販 PG 担体に対して大幅な回収率向上を確認した。さらに、改変型 PG を固定化した担体は Fab に対して高い結合容量を示した。

これらの結果から、アフィニティリガンド開発における本 in vitro screening 法の有用性を示した。また取得した改変型 PG をリガンドとする担体により、Fab 精製における新しいプラットフォーム化技術の構築を期待できる。

Affinity ligands for the antibody fragments purification

○Dai Murata^{1,2}, Shinichi Yoshida^{1,2}, Yurie Kanemitsu^{1,2}, Kazunobu Minakuchi^{1,2},
Yuji Okubo¹
(¹KANEKA, ²Manufacturing Technology Association for Biologics)

Key words protein, purification

2P-234 Fc レセプターを用いた新規抗体医薬品用アフィニティ分離剤の開発

○田中 亨, 朝岡 義晴, 木津 奈都子, 青木 大, 西山 はるか,
井出 輝彦
(東ソー)
tooru-tanaka-pb@tosoh.co.jp

【背景と目的】ガンや自己免疫疾患の治療薬として抗体医薬品が開発され、近年、市場が大きく拡大している。しかしながら、分子量 15 万の巨大分子である抗体を高品質かつ安定的に製造することは現在でも容易なことではない。特に Fc 領域の 2 カ所に結合する N-型糖鎖は多様性に富み、本糖鎖構造の違いにより免疫細胞上の Fc レセプター (FcR) との結合性が変化し、医薬品の薬効に影響することが数多く報告されている。そこで、FcR をリガンドとしたアフィニティ分離剤を用いれば抗体を糖鎖構造に基づいて分離可能となり、糖鎖構造のバラつきを抑えた、安定かつ高品質な医薬品製造が実現できると考え、Fc レセプターを用いた抗体精製用アフィニティ分離剤の開発を実施した。

【方法】進化学法により FcR のアミノ酸配列を改変し、耐酸性 FcR を開発した。本 FcR を大腸菌にて調製後、分離剤用ゲル粒子 (トヨパール) に固定し FcR 固定化分離剤を調製した。また、本分離剤に適した抗体精製方法として、酢酸緩衝液 (pH4.7) とグリシン緩衝液 (pH3) によるグラジエント溶出法を構築した。

【結果】モノクローナル抗体を用いて FcR 分離剤によるクロマト操作を行った結果、大きく 2 つのピークに分離した。これらのピークを分取し糖鎖構造解析を行った結果、両者の糖鎖構造分布に大きな違いを見出した。

Development of the novel affinity resin for antibody by using Fc receptor

○Toru Tanaka, Yoshiharu Asaoka, Natsuko Kizu, Masaru Aoki, Haruka Nishiyama, Teruhiko Ide
(Tosoh Corp.)

Key words antibody, Fc receptor, purification

2P-235 穏和な条件下で抗体精製を可能にするリガンドタンパク質の設計

○塚本 雅之^{1,2}, 大石 郁子¹, 渡邊 秀樹¹, 本田 真也^{1,2,3}
(¹産総研・バイオメディカル, ²MAB組合, ³東大院・新領域)
s.honda@aist.go.jp

副作用の少ない抗体医薬品製造プロセスにおける分離・製造工程の技術革新が、その安全性・信頼性の向上には重要であると考え。現在、その分離・精製工程においては、天然型のプロテイン A をリガンドとするアフィニティ・クロマトグラフィーが用いられている。溶出操作を行う際に、酸性溶液 (pH=2~3) を使用する必要があり、抗体が変性または凝集することが問題である。

本研究では、ヒト免疫グロブリン (IgG) 抗体に対する天然型プロテイン A の B ドメイン (PAB) の相互作用を改変させたリガンドタンパク質 (改変型 PAB) を設計し、これまでよりも穏和な条件下で抗体溶出を可能とするアフィニティ・カラムを作製することを目的とする。天然型 PAB が IgG1 抗体と結合した複合体の X 線結晶構造解析データを用いて、相互作用界面にある PAB のアミノ酸変異導入部位を決定した。変異導入をヒスチジン残基に限定し、改変型 PAB のライブラリーを作製した。コンビナトリアル・スクリーニングによって、IgG1 に対する結合力が pH の変化に対して天然型より感受性が高い改変型 PAB の配列情報を取得した。これまでの PAB 変異体と IgG の相互作用解析の情報と取得した配列の統計解析を用いて、これまでよりも高い pH で抗体溶出できる改変型 PAB を作製した。そして、その改変型 PAB をアフィニティ・クロマトグラフィーのリガンドとして用いた際の、モデル抗体の分離・精製の結果について報告する。

Engineered protein A ligands facilitate the affinity purification of IgG under mild acidic conditions.

○Masayuki Tsukamoto^{1,2}, Ayako Ooishi¹, Hideki Watanabe¹, Shinya Honda^{1,2,3}
(¹Biomed. Res. Inst., AIST, ²MAB, ³Grad. Front., Univ. Tokyo)

Key words protein engineering, purification, antibody

2P-236 抗体精製用のアフィニティリガンド蛋白質及び担体の開発

○広田 潔憲^{1,3}, 大高 誠治^{2,3}, 巖倉 正寛¹
(¹産総研・バイオメディカル, ²ダイソー, ³次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)
kiyo.hirota@aist.go.jp

【背景と目的】

抗体医薬品は効果が高く副作用が少ない医薬品として期待されているが、種類によってはアフィニティ精製する際に凝集体が形成されたりする等の問題がある。また、今後開発が進むことが予想される低分子化抗体に関しては、より高性能のアフィニティ担体が望まれる。そこで、よりマイルドな条件下で全長抗体を精製することが可能なりガンド蛋白質や、低分子化抗体により親和性の高いリガンド蛋白質を開発するために研究開発を進めてきた。

【方法】

プロテイン A やプロテイン L の抗体結合ドメインを配向制御固定化できるように改変した後、その変異体ライブラリーを作製し、抗体に対する親和性や酸溶出の容易さ等を解析した。

【結果】

酸溶出の容易なりガンド蛋白質に関しては、目的の性質を持っているリガンドを複数選抜でき、それらをダイソー製の担体に固定化することによって、よりマイルドな条件 (pH=4.5) で全長抗体を精製することが可能な担体を開発することができた。また、低分子化抗体精製用のリガンドに関しては、選抜したリガンドを固定化することによって、約 1 割吸着容量の高い担体を作製することができた。

Development of affinity ligands and media for antibody purification

○Kiyonori Hirota^{1,3}, Seiji Ohtaka^{2,3}, Masahiro Iwakura¹
(¹Biomed. Res. Inst., AIST, ²Daiso Co., Ltd., ³Manufacturing Technology Association for Biologics)

Key words therapeutic antibody, affinity purification, affinity ligand, affinity medium