

平成22年度戦略的基盤技術高度化支援事業  
「低コストなタンパク質の精製を実現するための装置開発」

研究開発成果等報告書

平成23年9月

委託者 近畿経済産業局

委託先 財団法人 京都高度技術研究所

## 目 次

第1章 研究開発の概要 .....	2
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標 .....	2
1-2 研究体制 .....	9
1-3 成果概要 .....	10
1-4 当該研究開発の連絡窓口 .....	11
第2章 本論 .....	11
最終章 全体総括 .....	36

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### [背景]

バイオテクノロジーの興隆につれて、遺伝子工学によるタンパク質の精密な分子設計が可能となり、当初産業用酵素などが主流であった工業用タンパク質の用途も治療薬や診断薬などに広がり、それらが大きなマーケットを獲得するようになってきている。

医療用タンパク質の国内市場を図1に示す。1990年初めから急速に市場が拡大しており、2005年には5,000億円を超えている。この中でも抗体医薬はその従来にない素晴らしい医療成果をガンや自己免疫疾患といった従来難しかった医療分野に挙がりつつあり、2007年で世界の

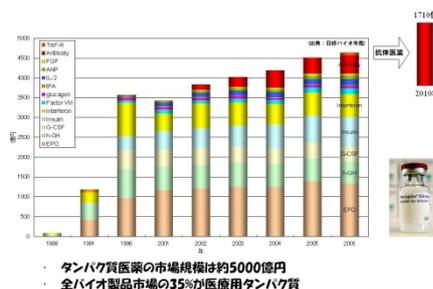


図1. 医療用タンパク質の国内市場動向

市場規模が263億ドル、国内市場が1,800億円にまで成長している。反面、例えば、ある抗体医薬を標準的な患者ひとりが処方された場合、その負担は年間300万円にも達する事実があり、かつてないほどの高額医療を社会に提示しており、医療保険行政の限界も相俟って、大きな医療格差社会を生み出す火種として懸念が深まっているのも事実である。抗体医薬が高額となる原因はその製造工程からきている。図2に抗体医薬品の各工程の製造コストの割合を示す。タンパク質を工業的に製造するためには、現状では培養細胞を宿主とする以外に有効な手段がないため、細胞培養により製造している。細胞培養により製造する場合、目的のタンパク質を宿主由来の夾雑物（タンパク質、核酸、脂質等）と分別・純化する分離・精製のプロセスは必須である。

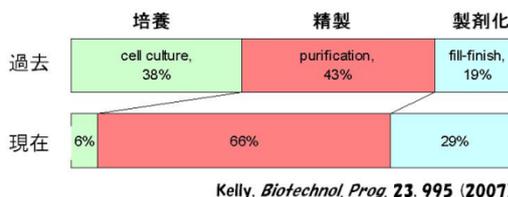


図2 抗体医薬品の製造コスト割合

製造プロセスのアップストリームである培養プロセスでは、培養細胞のホスト・ベクター系の改良や培地の改良などの不断の改善が続けられた結果、従来に比べ10倍以上の生産性の向上が図られている一方、ダウンストリームである分離・精製プロセスは単純なスケール・アップを続けるのみで生産性の向上は見られず、その結果としてこの分離・精製プロセスが抗体医薬の全製造コストの2/3を占めるとされており、製造プロセス全体において事実上のコスト・ボトルネックになっている。

さらにタンパク質の生産にて効果が期待できるのは、カラムのライフサイクル・マネジメントである。既存のバッチ操作を採用しているプロセスの場合、充填剤（クロマト担体）が非常に高価なため、一回の分離・精製プロセスが終了すると本格的かつ入念なカラム（充

填充剤) 洗浄・殺菌(高 pH のアルカリ溶液などが一般的に用いられる)とその確認(バリデーション)を行ってカラムを再生し、次の使用に備える。このような再生を繰り返して最長 100 回程度、時期にして 1 年近くまでの運用を図る場合がある。このような徹底した再生(洗浄・殺菌)と確認(バリデーション)は、特に医薬品タンパク質の場合レギュレーション(GMP)に規定された省略不能の作業であり、時間的、コスト的、労務的に負担の大きな作業である。高価であるがゆえ、同じカラムを多種のタンパク質の精製に運用するケースもあり、このようなクロス・コンタミネーションを避ける作業は重作業であるが、レギュレーション上重要視されている。しかしながら、このような再生工程の繰り返しは消耗品であるカラム充填剤にとっては著しい化学的ダメージとなるため、例えば抗体医薬の大規模精製に常用されるプロテイン A・アフィニティー・クロマトグラフィー担体の場合などでは、このような再生の繰り返しの間に 3 割~5 割程度の処理能力の低下が見られ、実際の運用では工程処理量の途中見直しや劣化を見込んだ余裕あるカラム・サイズの設定(より多くの充填剤量)が必要になる。

#### [本研究開発の理念および方針]

本開発はこのような状況下で実現を目指すものであり、「大量生産時代に従来の少量生産の手法を適応して限界を呈したクロマトグラフィー技術に対して、プロセスの基本である単位操作に回帰して生まれた革新的な技術シーズ」を元手にして破壊的な価格競争力をもった分離・精製プロセスの開発、提供を究極の目的とする。

医薬品製造工程においては、GMP に規定された多くのレギュレーションがあり、容易に参入できるものではない。そこで、本開発では医薬品製造の前段階である中規模製造プロセスのための分離・精製工程に適用可能なシステムの開発を目指す。

タンパク質の開発においては、タンパク質の構造決定、機能の効果の実証、製造プロセスの検討、毒性試験、第三者への機能評価の依頼などのために数 10mg から数 g 程度の量のタンパク質の製造は必須の過程となっている。この程度の量のタンパク質製造においては、タンパク質開発者、特に医薬品開発ベンチャーは製造設備を有しておらず、多くの場合タンパク質受託製造メーカーに製造を依頼している。本開発はこの規模のタンパク質生産プロセスに適した低コスト分離・精製プロセスの開発を目指すものである。

タンパク質を数 10mg から数 g 程度製造するためには、数 10L~100L 程度の容量の培養を行う必要がある。例えば、50L の培養をタンパク質受託製造メーカーに依頼する場合、遺伝子構築費用に 10~20 万円、培養費用に約 100 万円、分離・精製費用に 100~200 万円を請求される。分離・精製工程ではそのほかにも精製プロトコルの作製に数 10 万円~100 万円程度を請求されることがある。つまり、分離・精製コストが全製造コストの 50%以上を占めていることになる。この製造費用・コスト比率を顧客に提示した場合、精製コストの高さに驚かれ、結局のところ受注の成立とならない場合や労務費コストによりより安価で受託する海外メーカーにとられる場合が非常に多いとのことである。

また、少量生産のコスト高により、抗体の薬効が確かめられずに捨てられる例も多くなる。従って、タンパク質の受託製造の件数を増やし、治療薬や診断薬の開発を促進するためには、精製コストを現状の半分から 1/3 にすることが必須である。精製コストの増大の要因としては、

- ①精製に用いる機材である分離カラムの価格（クロスコンタミを考えると使い回しができない）
- ②精製のためのスペースの確保
- ③精製のためのクロマトグラフィー装置が高度化され高価であること、受託件数が少ないため、精製装置の稼働率に問題があること
- ④精製に日数がかかることから、精製作業を行う作業者の人件費がかかること

などが上げられる。

この分離・精製のプロセスにおいては、吸着クロマトグラフィー法は多彩な分離モード（アフィニティー・イオン交換・疎水性等）を提供でき、その精度・収率・再現性等において他の分離法より優れている点が多く、主流をなしてきた。しかしながら、タンパク質に対する吸着クロマトグラフィーでは 1950 年代のバイオテクノロジー勃興期より単位操作に本質的な大きな革新・変更はなく、専ら「平衡化」→「(試料タンパク質) 吸着」→「(未吸着画分) 洗浄」→「(目的タンパク質) 溶出」→「カラム再生」といった一連の工程を、ひとつのカラムに対して目的（平衡化・吸着・洗浄・溶出・再生）のための展開溶液を逐次的に注入しておこなうバッチ（回分）操作がスケールの大小や分離モードに関わらず行われている。従って、カラムの充填剤容量はすべての目的タンパク質を十分に吸着できる量が必要とされ、工程時間は一連の工程の単純合算となる。カラムの充填容量はカラムコストに直結し、さらに装置の大型化、精製スペースの面積化と精製コスト増大の原因となっている。このような需要動向に対してクロマトグラフィー開発は無策であったわけではない。バッチ（回分）操作の対極の単位操作として「連続操作」があることは他の産業の例を引くまでもなく自明であり、分野を問わず常道な製造プロセス効率化の有効手段であるが、クロマトグラフィーにおいてもその「連続」化の獲得に向けた技術発明があった。それが固相担体を移動層とする移動層クロマトグラフィーである。しかしながら、この方法では液体ほど簡単に移動させられない微細な固相担体粒子を常時流動させなければならないために、粒子の摩耗や不均一流動によるカラムの性能低下などが露呈し、ほとんど実用には至らなかった。

本開発において目指すところは、吸着クロマトグラフィー法によるタンパク質の分離・精製におけるコストの低減のための技術開発としてクロマトグラフィーの連続化を達成するための装置を開発することにある。

タンパク質の分離・精製コストが低減できない最大の原因は、上述のように「連続操作」が困難であることによる。「連続操作」を困難にしている最大の原因がカラムの分離特性の限界にある。カラムの分離特性が現在の 10 倍（10 倍のスピードで分離が可能）になれば

ば、「連続操作」を簡単な装置で達成することが可能となる。既存のバッチ操作のクロマトグラフィーを連続操作に置き換えることで操作時間を短縮し、必要クロマト充填剤(担体)を大幅に削減し、充填剤のディスポーザブル使用を可能にしてコストの大幅な低減ができる。本課題で実用化を目指す「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」は、長年手付かずであった分離・精製プロセスの主体をなすカラム・クロマトグラフィー法の単位操作を、厳格なコスト面の制約を加えつつ、技術的に厳しく見直した結果創出したものである。これまで、非効率ながら続けられてきた試料大量化に対応するカラムサイズの大型化ならびに設備の大型化、バッチ操作による長時間化、分離の各ステップ間の溶液調整の手間、煩雑かつ高コストな再生・バリデーション等の種々の“常識”を抜本的に覆す産業上有用なパラダイム・シフト、すなわち「回分(バッチ)」から「連続」プロセスへの転換”をバイオ分野における分離・精製プロセスへ導入できるイノベーションである。

#### [課題解決のための指針]

タンパク質の分離・精製工程のコスト削減を実現するためには、超高速かつ大量にタンパク質を「吸着」・「溶出」できる特性を備えた充填剤をこの連続プロセスに用いない限り、装置の複雑化や充填剤使用量の増加は避けられないが、これまでクロマトグラフィーに用いられてきた分離担体の選択的吸着および溶出特性および物質移動特性では限界があった。

従来の充填剤は球状の多孔質粒子が一般に用いられている。液は粒子と粒子の隙間を流れ、液に含まれる成分は粒子に存在する細孔表面に化学結合した官能基に吸着することにより分離が達成される。分離は粒子径が小さいほど高速化が可能であるが、粒子を小さくすると粒子間の隙間も小さくなり、負荷圧は大きくなってしまう。粒子充填型カラムを使用する限り、高速分離が可能で負荷圧が小さいカラムを作製することは不可能である。

一方、マイクロメートルサイズのマクロ細孔とシリカ骨格およびシリカ骨格中にナノメートルサイズのメソ細孔とからなる新規な多孔質シリカゲルを用い、棒状の一体型(モノリス)カラムが本プロジェクトの実施者である株式会社京都モノテックにより開発・実用化されている。図3にシリカモノリスの構造を示す。モノリス

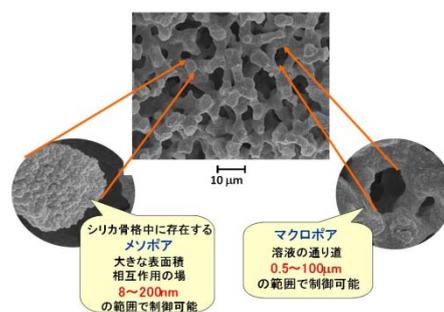
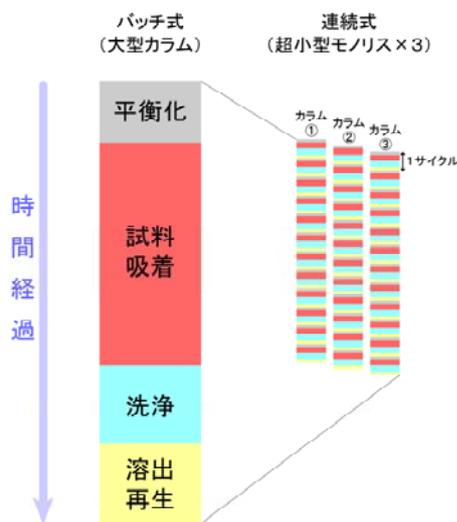


図3 シリカモノリスの構造

カラムと粒子充填カラムを比較した場合、シリカ骨格が粒子に相当し、細孔が粒子間の隙間に相当する。モノリスカラムの場合は細孔径を大きく保ったまま骨格を小さくすることが可能であり、これにより高速分離と低負荷圧を同時に実現することが可能となる。

このシリカモノリスカラムに官能基として適切なアフィニティリガンドを導入することで超高速かつ大量にタンパク質を「吸着」・「溶出」できる特性を備えたカラムの開発が、本プロジェクトの実施者である株式会社京都モノテックと独立行政法人産業技術総合研究

所において行われているが、このカラムを用いることにより、従来の分離・精製に用いられてきたカラムと比較し、はるかに小型のカラム（例えばミリリットル・サイズ）を複数個（典型的例ではわずかに2ないし3個）並列に設置し、それぞれのカラムにおいて「平衡化」→「(試料タンパク質) 吸着」→「(未吸着画分) 洗浄」→「(目的タンパク質) 溶出」といった工程を短時間で繰り返させることにより大量の培養液を短時間で精製することが可能となる。その際それぞれのカラムへの送液を異なる溶液とすることで、個々のカラムでは常に別の工程を行わせる。図4に連続クロマトグラフィー装置による操作の概念図を示す。たとえばカラム数3個の場合を例にとると、カラム①では「(試料タンパク質) 吸着」を行っているとする、カラム②では「(未吸着画分) 洗浄」→「(目的タンパク質) 溶出」を、カラム③では次の「(試料タンパク質) 吸着」に備えて「平衡化」を行っているといった具合に時差操作が行われる。このことにより、いずれかのカラムでは常に「(試料タンパク質) 吸着」を行っているという操作が可能になり、総プロセス時間は「(試料タンパク質) 吸着」に必要な時間と理論上ほぼ同じになる。



**本課題で提案する連続クロマトグラフィー操作の時間短縮およびコスト削減効果(概念図)**

連続式では、3つのカラムのうち、いずれかで吸着操作が行われており、バッチ式の吸着操作に要する時間のみでほぼすべてのクロマト・プロセスが終了してしまうことに注意。毎サイクルのクロマトが少量なので、極小型のカラムしか必要とせず、カラム充填剤が大幅に節約できる。

**図4 連続クロマトグラフィー装置による操作の概念図**

このような少数のカラムでの連続操作は、移動特性に優れたカラム（モノリス）の存在により可能となってきている。また先に述べたように、既存の一般的なクロマトグラフィー装置で行われているバッチ操作と比べてみると、「(試料タンパク質) 吸着」以外の3工程に別途必要な時間が実効的に省かれるため、時短効果が期待できる。この効果は、カラムのサイズが大型化するほど、すなわち処理すべき試料タンパク質の量が大量になるほど著しい時短効果として現れ、それに伴う労務コストなどにも大きな削減効果をもたらすことが期待できる。

**[研究目的及び目標]**

超高速分離が可能なタンパク質リガンド固定化シリカモノリスカラムと「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の実用化を行うことにより、受託機会別に使用され高コストの大きな要因となっている分離カラムの使用容量を削減する。さらに、連続クロマトグラフィー装置の実用化により、クロマト装置の低コスト化、精製時間を大幅に圧縮する

ことを可能とする。その結果として、細胞培養によるタンパク質製造におけるタンパク質の分離・精製コストを 1/2 以下にすることを目的とする。

そのため、治療薬や診断薬などに広く応用されているタンパク質の開発において、タンパク質の構造決定、機能の効果の実証等のために数 10mg から数 g の量のタンパク質の製造は必須の過程となっている。従って、この過程での目的のタンパク質と宿主由来の夾雑物を分別・純化する分離・精製のプロセスのコストを 1/2 以下に低減することが可能な「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」を 4 台試作するとともに高効率クロマトグラフィーカラムの開発を行う。

具体的には、以下の実施項目ごとに目標及び具体的な実施計画を定めた。

## 1) 実施内容

### ① タンパク質精製用シリカモノリスカラムの開発

#### ①-1 シリカモノリスの構造の最適化

従来の粒子充填型カラムと比較し、高速での分離を可能とし、使用するカラムサイズを 1/10 以下にすることを目標とする。

#### ①-2 表面修飾技術の開発

抗体精製用のプロテイン A およびプロテイン G 修飾を行う。シリカ表面に高密度で修飾を行うことにより、最大で 40mg/ml-bed の抗体結合容量を実現する。さらに溶液の流速が 2,000cm/hr. という従来の充填カラムの 10 倍の速さでも 25mg/ml-bed を維持することを可能とする。

ヒスチジンタグタンパク質精製のニッケルキレート修飾を行い、ヒスチジンタグタンパク質を最大で 60mg/ml-bed の抗体結合容量を実現する。さらに溶液の流速が 2,000cm/hr. という従来の充填カラムの 10 倍の速さでも 30mg/ml-bed を維持することを可能とする。

### ② カートリッジ型シリカモノリスカラムの開発

#### ②-1 カラムホルダの開発

カラム容量が 1~10mL の範囲で耐圧が 10MPa 以上を有し、分離能を低下させないようデッドボリュームを最小とできるディストリビューターを有するカラムホルダの作製を行う。ディストリビューターは通常 SUS 性のフィルターを使用するが、タンパク質が SUS に吸着することはよく知られており、本開発においてはこのディストリビューターもシリカモノリスで作製する。

#### ②-2 カートリッジ型カラムの開発

カラム容量が 1~10mL のカートリッジ型のシリカモノリスの作製を行う。耐圧性が 10MPa 以上で、50℃以下で成形可能とする。

### ③ 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の開発

#### ③-1 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の最適設計仕様書の作成

タンパク質は変性が起こりやすいため、精製工程は可能な限り短時間で行わなければならない。従って、連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置においては、特にポンプ流量の設定が重要になる。培養量、培養液中のタンパク質濃度から 1 日あたりの処理量に応じて吸着工程のポンプ流量、その他の工程のポンプ流量・送液時間を容易に設定可能なシステムとする。製造原価 3,000 千円、販売価格 8,000 千円を目指す。

#### ③-2 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の設計図面の作成

90\*98\*160cmのラック内に全ての部品を効率的に収納する。

#### ③-3 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の組み立て

誤配線、誤配管無く設計図面通りに組立・配線がなされていること。

#### ③-4 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」制御ソフトの開発

ソフトは市販ソフトでは使用不可能であるので、制御及びデータ処理ソフトを新規に作成する。

#### ③-5 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の総合運転

漏電なきこと、異常発熱がないこと、液漏れなきことを確認後、各部が仕様書通り動作することを確認する。

### ④ 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の性能評価

#### ④-1 タンパク質精製の評価

バッチ式での精製性能に劣らない性能を目標とする。具体的には、

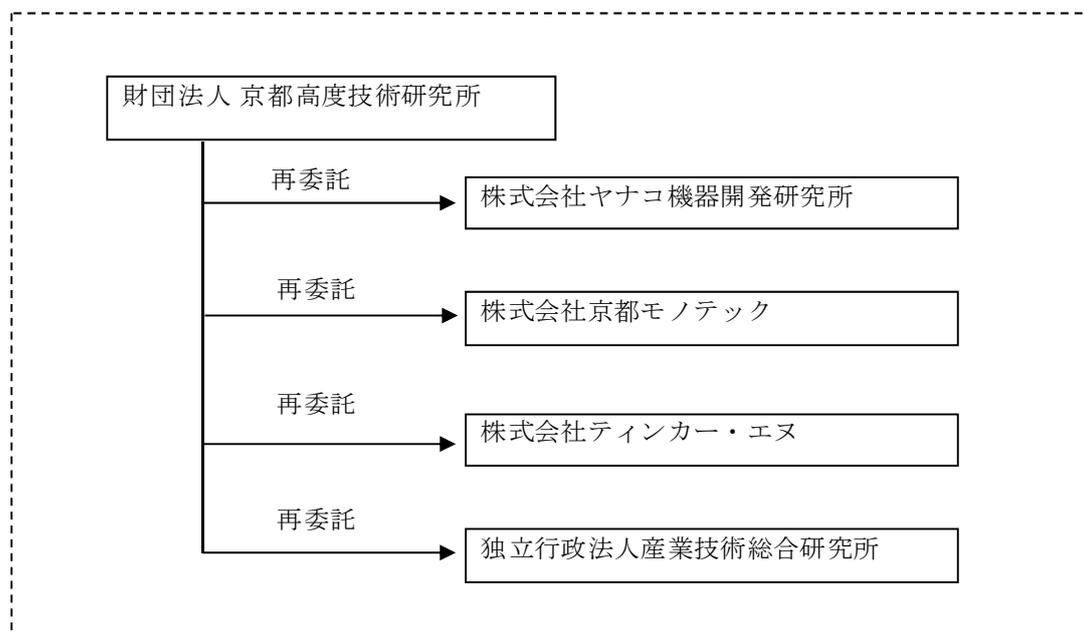
1. 溶出サイクルごとの再現性の測定・評価：精製済みタンパク質として、2種類以上のモノクローナル抗体およびタグ付きタンパク質を用いて吸着溶出実験を行い、サイクルごと溶出ピーク面積のばらつきを測定する。サイクルごとのばらつきの度合いとしては、 $\pm 10\%$ 以内に収まることを目標値とする。
2. 回収率の測定・評価：モデル実験として、精製済みタンパク質として2種類以上のモノクローナル抗体およびタグ付きタンパク質を用いて連続精製実験を行い、吸着・溶出操作により回収されるタンパク質の量を測定することにより、回収率の測定を行う。また、実証実験として、動物細胞で発現させたモノクローナル抗体および微生物宿主において発現させたタグ付きタンパク質それぞれ2種類以上について連続精製実験を行い、吸着・洗浄・溶出の条件の最適化を試みるとともに、回収されるタンパク質の量を測定する。モデル実験においては回収率 90%以上、実証実験においては70%以上の回収率を目標とする。
3. 精製度の測定・評価：動物細胞で発現させたモノクローナル抗体および微生物宿主において発現させたタグ付きタンパク質それぞれ2種類以上について、連続精製実験を行い、その結果得られた精製タンパク質の精製度を電気泳動法およびゲルろ過クロマトグラフィー法で測定する。アフィニティ精製とイオン交換クロマトグラフィーを用いた連続クロマトグラフィーにより、連続クロマトグラフィー操作だけで 95%以上の純度の精製タンパク質を得ることを目標とする。

#### ④-2 性能評価に用いるタンパク質の選定と培養液の作製

性能評価に用いるタンパク質としては、モノクローナル抗体およびタグ付きタンパク質を対象に、本措置の利用の汎用性を示すために 10 種類以上のタンパク質を選定し、上記タンパク質精製の評価実験に供することを目標とする。具体的には、

1. モノクローナル抗体については、改良型プロテインAアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いた連続精製実験に供するために、2から最大 5 種類の IgG タイプのモノクローナル抗体を選定し、動物培養細胞である CHO 細胞での発現・培養を行う。大量培養による培養液の調製は外注により行う。
2. タグ付きタンパク質としては、ニッケルキレートカラムクロマトグラフィーを用いた連続精製実験に供するために、2から最大 5 種類のヒスタグタンパク質を選定し、大腸菌宿主およびブレビバクテリア宿主を用いた発現を試みる。大腸菌宿主では、選定したタンパク質を細胞内で発現させる。最大 20L 培養を 5 回行うことにより、100L 培養規模の培養とし、培養液から菌体を集め、細胞破碎したのち、可溶性部分を回収したものを培養液とする。ブレビバクテリアは、分泌発現用宿主として、培地中にヒスタグタンパク質を発現させる。ブレビバクテリアを用いた培養液の大量調製は外注により行う。

#### 1-2 研究体制



本研究開発は、財団法人京都高度技術研究所が管理人となり、総括研究代表者として株式会社ヤナコ機器開発研究所 服部隆俊代表取締役が、副総括研究代表者として株式会社京都モノテック 水口博義代表取締役が就任した。

本プロジェクトに参画した研究組織及びその管理体制は、上図に示されるように管理人である財団法人京都高度技術研究所から、株式会社ヤナコ機器開発研究所、株式会社京都モノテック、株式会社ティンカー・エヌ、および独立行政法人産業技術総合研究所が再委託を受ける形態での参画となっている。

### 1-3 成果概要 .....

#### ① タンパク質精製用シリカモノリスカラムの開発

シリカモノリスのマクロ細孔径を、試作した「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の流量および耐圧性に適合するように最適化した。またメソ細孔径を抗体分離およびヒスタグタンパク質分離において、結合容量が最大になるように最適化した。さらに、抗体分離、ヒスタグタンパク質分離が可能となるようシリカモノリス表面にプロテインAおよびニッケルキレートを化学的に結合させる技術を確認した。試作したシリカモノリスカラムの抗体結合容量を溶媒の速度を変化させて測定した結果、抗体結合容量が40mg/ml以上、ヒスタグタンパク質結合容量が60mg/ml以上のカラムの開発に成功した。また、溶媒の速度を通常の10倍の速さで流した場合においても、抗体結合容量が25mg/ml以上を維持することができた。これにより、本開発で試作したシリカモノリスカラムは従来の粒子充填カラムと比較して10倍の処理能力があることを実証した。すなわち、1/10のカラム体積で同じ処理能力を持つということができ、開発目標を達成した。

#### ② カートリッジ型シリカモノリスカラムの開発

カラム容量が1、5、10mlのカートリッジ型シリカモノリスカラムの開発を行い、耐圧が20MPa以上を有し、抗体の結合容量の低下がないことを確認した。また、シリカモノリス製のディストリビューターを作製し、分離能の向上とメタルレスカラムの開発に成功した。結果として、性能を低下させることなくカラムコストを低減することが可能となり、開発目標を達成した。

#### ③ 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の開発

「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の最適設計仕様の作成、作成した仕様に基づいた装置の設計としての、試作1号機の図面の作成、試作1号機の性能検討結果を反映した試作2、3、4号機の設計仕様、設計図面の作成、作成した図面に基づく試作1号機の組み立て、及び試作2、3、4号機の組み立て、装置の制御用ソフト開発と組み立てた試作1号機を用いて開発したプログラムの検証によるソフトの改良を行い、最終的に本研究開発でも悔いのないとした「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の実用機としての性能を満たす装置の開発を行い、開発目標を達成した。

#### ④ 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の性能評価

3種類の異なる発現系を用いて調製した混合溶液サンプルを用いて開発した「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の性能の評価実験を行った。プロテインA変異体で抗体と強く結合する改変タンパク質をアフィニティリガンドタンパク質として導入した

シリカモノリス担体を組み合わせて用いることにより、抗体医薬品として急速に利用が進んでいるモノクローナル抗体の連続精製において、90%以上の高い回収率、95%以上の高純度のモノクローナル抗体の精製を、担体との接触時間 12 秒という高流速条件で達成できることを確認し、開発目標を達成した。

以上のことを総合すると、開発したシリカモノリスカラムと開発したクロマトグラフィー装置を組み合わせて使用することにより、細胞培養により発現したタンパク質であるモノクローナル抗体タンパク質の分離・精製コストは、現在の精製コストに対して、容易に 1/2 以下にできるものと考えられ、開発目標を達成した。

#### 1-4 当該研究開発の連絡窓口 .....

財団法人 京都高度技術研究所  
経営・新事業創出支援本部長 孝本 浩基  
〒600-8813  
京都市下京区中堂寺南町134番地  
Tel:075-315-3625 (代表) Fax:075-315-3614  
E-mail:komo@astem.or.jp

#### 第2章 本論 .....

本研究開発は、これまでに独立行政法人産業技術総合研究所が主に開発してきた「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の有効活用により、タンパク質製造におけるコストのうち、大きな割合をしめる分離・精製コストの削減に大きく貢献できることを検証確認することが大きな目的であり使命である。この目的・使命達成のために、まず第1義的に、モノクローナル抗体精製をターゲットとし、「A. 超高速分離が可能なシリカモノリス・アフィニティカラム担体の開発」を行うことと、本研究開発以前においては、連続プロセス型液体クロマトグラフィーの有用性検証をバラックタイプの装置で試行していたが、本研究開発において、「B. 実用機タイプとして装置をシステムアップする」こととし、この2つの成果、すなわち、分離カラムの開発と精製装置の実用化により、モノクローナル抗体の精製において、その製造コスト削減に貢献できる技術として完成させることを目標に研究開発を推進してきた。

このことに加えて、これまでモノクローナル抗体に特化して開発を進めてきた連続プロセス型液体クロマトグラフィーの適用を、より幅広い範囲のタンパク質群に適用するために、「C. ヒスタグタンパク質を対象に、連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置を用いた連続精製の可能性について検討するとともに、その適用条件等を検討し、タグタンパク質の新たな精製プロセスとして確立する」ことを目標に研究開発を行った。なお、この

研究開発においては、タグタンパク質として抗体精製用アフィニティリガンドタンパク質を対象とした。その際、リガンドの特性解析を同時に進め、より改良を行うことで、アフィニティ精製においてより優れた特性を有するリガンドを用いたタグ精製の実証を行うだけでなく、得られたアフィニティリガンドタンパク質を、上記「A. 超高速分離が可能なシリカモノリス・アフィニティカラム担体の開発」に即利用することを検討した。また、これらの検討のために、便宜的に「①タンパク質精製用シリカモノリスカラムの開発」、「②カートリッジ型シリカモノリスカラムの開発」、「③連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置の開発」、および「④連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置の性能評価」という実施項目を設定し、本研究開発の実施にあたったが、それらの項目はいずれにおいても上記 A、B、C に関わる検討内容が含まれていたことを付記する。

本研究開発の実施内容および結果・成果について、以下に、設定した 4 つの実施項目ごとに順に記述する。

## 2-1 タンパク質精製用シリカモノリスカラムの開発

### 2. 1. 1 シリカモノリスの構造の最適化

シリカモノリスはマイクロメートルサイズのマクロ細孔とナノメートルサイズのメソ細孔の 2 種類の細孔を有している。

タンパク質精製用カラムにおいては、マクロ細孔は溶液の通り道となり、マクロ孔の大きさは分離性能と通液性を決定する。マクロ細孔が小さいほど分離性能は良くなるが、通液性は悪くなる。本開発においては、抗体の培養液を高速で大量に精製できるカラムの開発を目標としており、分離性能と通液性が両立するマクロ細孔を作製しなければならない。目標としては、溶媒の線速度が 2,000cm/hr. (市販の抗体精製カラムの 10 倍速である) の時に抗体の結合容量が 25mg/ml-bed を維持すること、つまり従来の抗体精製カラムの 10 倍の性能を有することとした。

マクロ細孔の大きさはゲル作製における出発組成、ゲル化温度を変えることにより制御を試みた。マクロ細孔径の測定は自動ポロシメーターにより行った。これは細孔構造のある試料に水銀を圧入し、水銀が細孔に入りこむときの圧力から細孔径を求めるものである。自動ポロシメーターで細孔径を測定した結果を図 2-1-1 に示す。1  $\mu\text{m}$  以上にあるピークがマクロ細孔径を示しており、0.1  $\mu\text{m}$  以下にあるピークがメソ細孔径を示している。マクロ細孔径は 2  $\mu\text{m}$  ~ 5  $\mu\text{m}$  の範囲で制御できていることが分かる。本開発においては、抗体精製カラムを連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置で用いる際には最大圧力が 20MPa という制限があるので、溶媒の線速度が 2,000cm/hr. の時に負荷圧が 20MPa 以下であることがカラムにとっては必須の条件である。

シリカモノリスにおけるメソ細孔は分離の場を提供するものである。メソ細孔が小さいほど表面積が大きくなり、分離可能な抗体の量を多くできる。しかしながら、メソ細孔が小さすぎると細孔内を抗体が出入りできなくなり、抗体を分離することができなくなる。

抗体の分子量は5万～10万程度であり、このような大きな分子が入り出ることができるためにはメソ細孔径は数10nm～100nm程度の大きさが必要であると考えられる。従来の粒子充填カラムにおいては粒子中に約100nm程度の細孔が存在している。モノリスカラムの場合は粒子充填カラムと比較し、より小さなメソ細孔径でも同じ分子用の分子が入り出ることができるので、本開発においては15～50nm程度のメソ細孔を作製し、抗体の分離特性を調べることにより最適なメソ細孔を作製した。

メソ細孔の大きさはゲル化後のエーシング条件およびゲルの焼成条件を変えることにより制御をおこなった。メソ細孔径の測定は自動比表面積・細孔分布測定装置により行った。自動比表面積・細孔分布測定の結果を図2-1-2に示す。本開発では11nm～50nmの範囲で制御をおこない、特性を評価した。

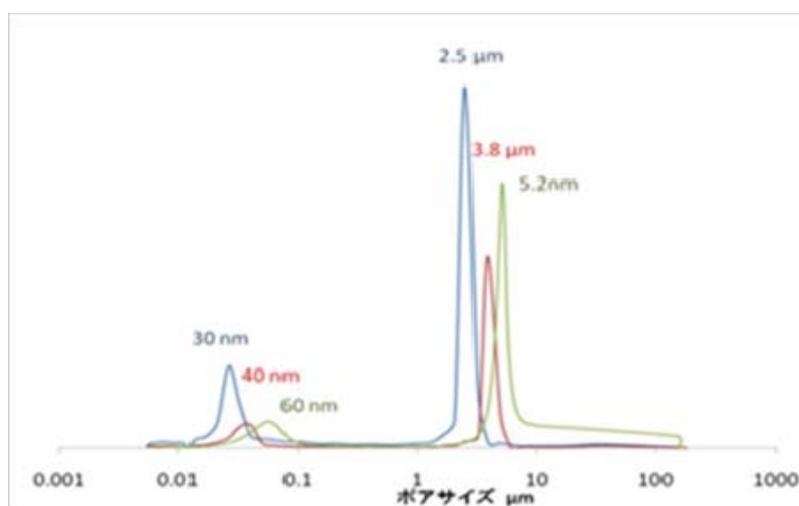


図 2-1-1 自動ポロシメーターで測定したシリカモノリスの細孔径分布測定結果

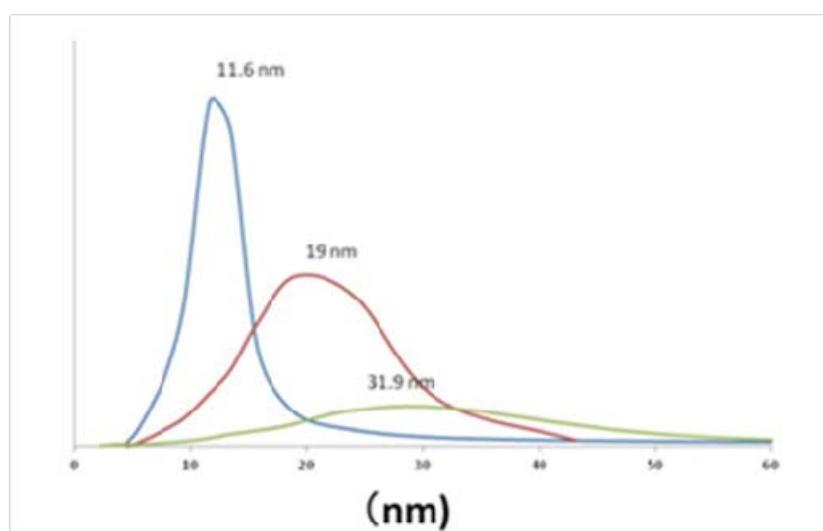


図 2-1-2 自動比表面積・細孔分布測定装置によりメソ細孔径を測定した結果

## 2. 1. 2 表面修飾技術の開発

抗体精製用カラムを作製するためには、抗体を選択的に吸着させるプロテイン A をシリカモノリス表面に化学的に結合させなければならない。本開発で用いるプロテイン A は独立行政法人産業技術総合研究所で開発されたものであり、末端に化学結合させるためのカルボキシル基を有している。よって、シリカ表面にはアミノ基を有していることが必要である。

また、抗体精製用カラムはその使用時において洗浄操作の工程でアルカリ溶液を使用することが多い。アルカリ洗浄はプロテイン A 自体を壊すことがないように 10~50mM 程度の濃度のものが用いられる。これに対して、シリカはアルカリ耐性が弱く 50mM のアルカリ溶液には溶けてしまう。これでは抗体精製用カラムとして用いることができない。そこで、アルカリ耐性を向上させるため、本開発ではシリカ表面をアルカリ耐性を有するポリマーで覆うこととした。ポリマーとしてはアミノ基を有するポリ-L-リジンをを用いた。これにより、耐アルカリ性とプロテイン A を結合させるための官能基を同時に得ることができる。シリカとポリ-L-リジンは直接化学結合できないので、シリカとポリ-L-リジンを結合させるためにまず、シリカ表面に $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランを化学結合させ、シリカ表面にエポキシ基を導入した。続いて、このエポキシ基にポリ-L-リジンを結合させ、続いてポリ-L-リジンのアミノ基にプロテイン A を結合させるという手順を行った。作製した抗体精製のプロテイン A 修飾カラムの性能を、抗体を分離することで測定した。

得られた測定結果の一例を図 2-1-3 に示す。

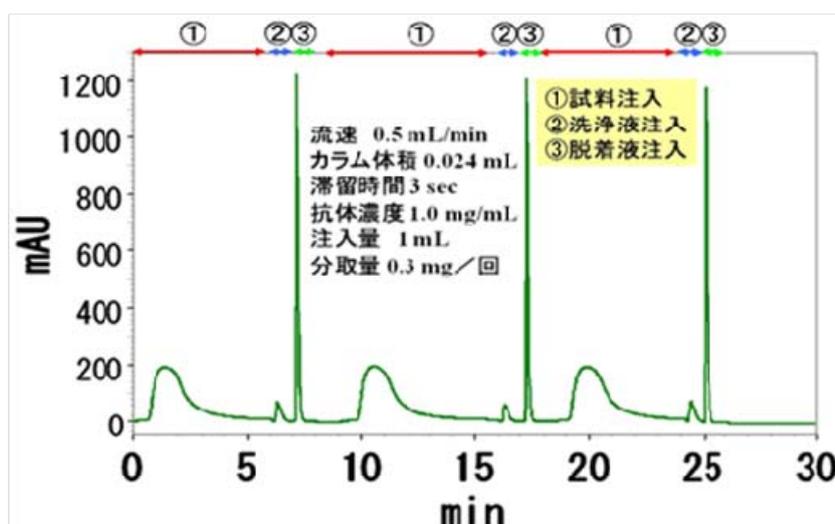


図 2-1-3 抗体精製カラムの抗体吸着能の評価結果の例

図 2-1-3 では抗体の吸着→洗浄→溶出→再生の各工程を 3 回繰り返している。いずれ

も非常に再現性のいいデータが得られており、この抗体精製カラムが抗体を安定に結合していることが分かる。このクロマトグラムから抗体精製カラムの抗体結合容量を算出することができる。抗体結合容量は溶媒の流速に依存するので、流速を変えて結合容量を測定した結果を図 2-1-4 に示す。

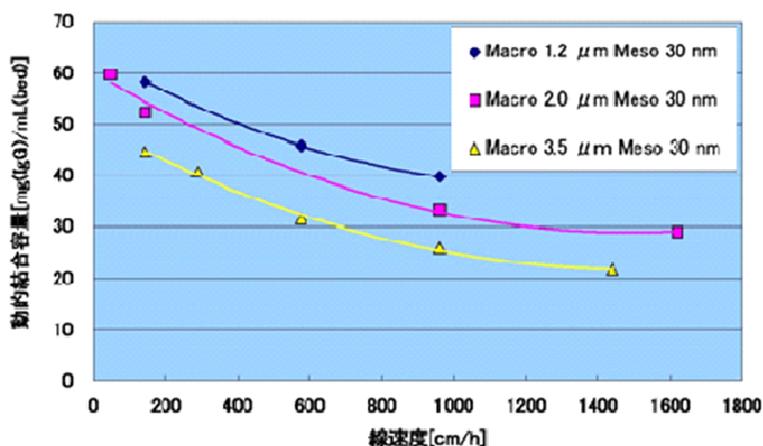


図 2-1-4 シリカモノリス抗体精製カラムの抗体結合容量と流速の関係  
(メソ細孔径を一定とした場合)

図 2-1-4 はメソ細孔径を一定とし、マクロ細孔径を変化させた場合の結合容量を示している。マクロ細孔径が小さいほど結合容量が大きく、マクロ細孔径が  $2\mu\text{m}$  以下では線速度  $2,000\text{cm/hr}$  程度の非常に高速でも結合容量が  $30\text{mg/mL}$  程度を維持していた。これは本開発の目標である  $25\text{mg/ml}$  を上まわっており、目標は達成できた。従来の粒子充填型のカラムでは流速が速くなると結合容量が極端に低下することが大きな問題であったが、シリカモノリスカラムでは流速依存性が非常に小さく、従来の粒子充填カラムの 10 倍の精製能力があることを実証できた。

このような測定の結果、抗体精製に最適なメソ細孔径は  $30\text{nm}$  程度であることが明らかとなった。これは従来の充填カラムの  $100\text{nm}$  程度よりも非常に小さく、大きな表面積のカラムを使用することが可能となり、このことからシリカモノリスが抗体精製カラムとして有利であることが明らかである。

次に、ヒスチジンタグタンパク質精製用カラムの開発について報告する。ヒスチジンタグタンパク質精製の Ni キレート修飾は、エポキシ基を有するアルコキシドにカルボキシル基 2 個を有するアミンを反応させ、得られた化合物をシリカ表面に化学的に結合させるというものである。シリカ表面に化学結合させた後に Ni イオン錯体を作製した。

作成した担体を用いた、ヒスチジンタグタンパク質を精製した時のクロマトグラムを図 2-1-5 に示す。

図 2-1-5 においては、溶媒として  $50\text{mM}$  リン酸ナトリウム +  $500\text{mM}$  NaCl を用い、

イミダゾールの濃度を調節することによりヒスチジンタグタンパク質の吸着および溶出を調整した。この図においては、12分まではイミダゾール濃度が低いのでタンパク質はNiキレートに吸着する。7.5分付近のピークは吸着しきれなかったタンパク質がカラムから出てきてしまっているためにできたピークである。20分を過ぎてイミダゾールの濃度が十分高くなったところでタンパク質が溶出している。この時の吸着したタンパク質の量は68mg/mlであり、目標の60mg/mlを十分に達成できたことが確認できる。

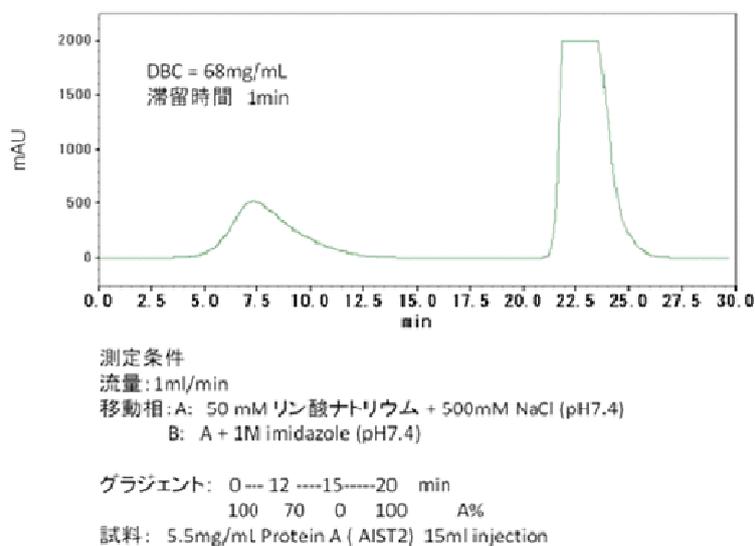


図 2-1-5 Ni キレート結合シリカモノリスカラムによるヒスチジンタグタンパク質の精製クロマトグラム

精製したタンパク質の量を電気泳動により調べた結果を図 2-1-6 に示す。この図においては、3 種類のメソ細孔径を有するゲルを用い、試料として過剰な量のプロテイン A (AIST II) を付加し、最初に通ら過ぎた溶液と、溶出溶媒によりカラムに吸着していた AIST II が溶出してきた溶液をそれぞれ採取し、電気泳動でのバンドの濃さを比較した。クロマトグラムの結果と合わせ回収率は 95%と見積もられ、非常に優秀なカラムであることが確認できた。

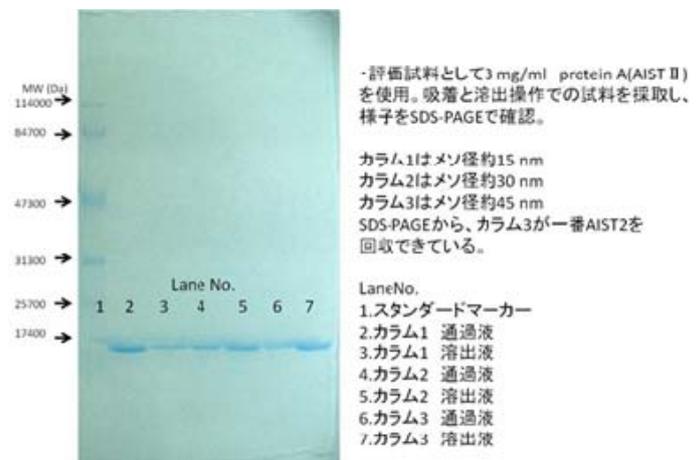


図2-1-6 Niキレートカラムにより精製できるタンパク質の量を電気泳動で調べた結果

## 2-2 カートリッジ型シリカモノリスカラムの開発

### 2. 2. 1 カラムホルダーの開発

カラムコストを下げるために、消耗部分となるカラム本体と再使用が可能なカラムホルダーを別々に作製し、組み合わせて使用できる抗体精製カラムの開発を行った。作製したカラムホルダーを図2-2-1に示す。

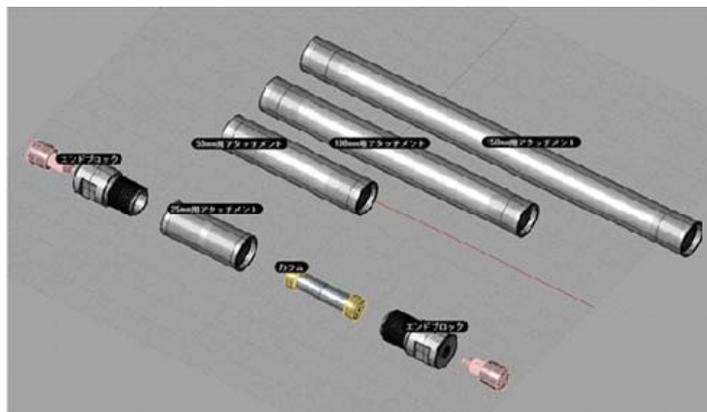


図2-2-1 カラムホルダーの外観

カラムサイズに合わせて直径、長さを変更可能にしている。また、本開発ではフィルター機能とディストリビューター機能を兼ねるシリカモノリスフィルターの作製も行った。このフィルターではタンパク等の非特異的な吸着が起こってはいけないので、シリカモノリス中のメソ細孔をなくすこととした。試作したモノリスフィルターの特性を評価した結果を図2-2-2示す。これは、同じカラムを用いフィルターのみを取り替えて評価したもの

である。カラムの分離能を示す理論段数が図中に示されており、モノリスフィルターを用いたカラムの理論段数が 20214 段に対し、従来の SUS フィルターを用いた場合は 18212 段という結果であった。実際に作製したカートリッジカラムおよびカラムホルダの写真を図 2-2-3 に示す。

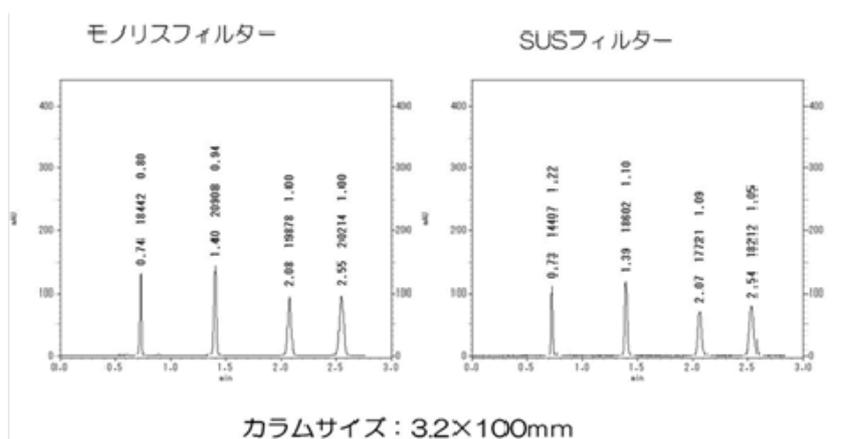


図 2-2-2 モノリスフィルターの性能評価結果

図 2-2-2 に示しているのは 10ml サイズと 0.5ml サイズのカラムとホルダーである。従来型のカラムと本開発で作製したカートリッジ型カラムでは、投入した抗体がすべて吸着してカラムから出てきていないこと、溶出ピークの形状が一致していることから分離特性は全く同じであると言える。結論として、カートリッジ型カラムは従来型と同じ性能を有しており、消耗部分を大幅に減少でき。コストの削減が可能となった。



図 2-2-3 作製したカートリッジ型カラムとカラムホルダーの写真

## 2. 2. 2 カートリッジ型カラムの開発

さらなるコストダウンと使い勝手の良さを目指してホルダーの改良を行った。作製した改良版のカートリッジ型シリカモノリスカラムの写真を図 2-2-4 に示す。



図 2-2-4 改良版カートリッジ型シリカモノリスカラム

このカラムはシリカモノリスの周囲を熱収縮チューブで被覆し、さらにその周りを樹脂で固定しただけの構造であり、作製およびシリカモノリスの取り換えも容易にでき、さらなるコストダウンが可能である。写真のカラムは容量 5ml であり、耐圧性は 20MPa まで問題なく使用できた。図 2-2-5 に改良版のカートリッジ型シリカモノリスカラムと容量 1ml の従来型カラムの抗体精製特性の比較を行った結果を示す。

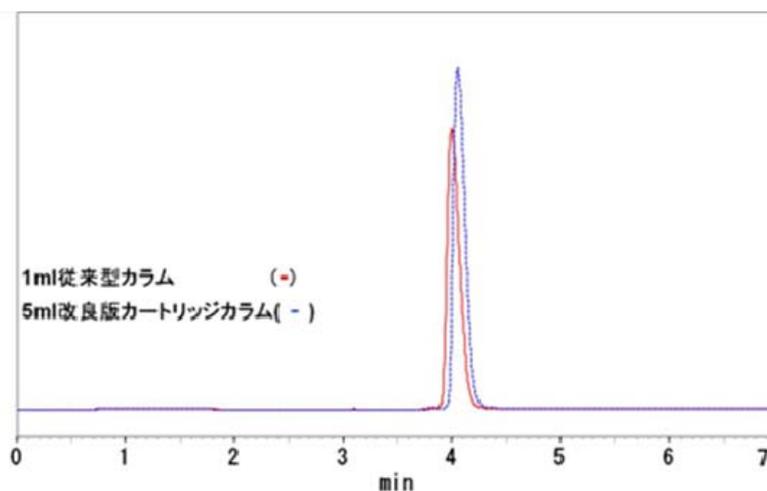


図 2-2-5 改良版カートリッジ型シリカモノリスカラムの抗体分離特性

この試験は、図 2-2-6 と同様の試験であり、従来型カラムと全く同じ分離特性を示しており、改良版も抗体精製カラムとして十分な性能を有していることが確認できた。

高純度のヒト抗体をヒト血清中に混合したものを試料とし、血清中の抗体が精製できるかの試験を行った。その結果、抗体以外のバンドは見られず、高純度に精製できていることが確認できた。

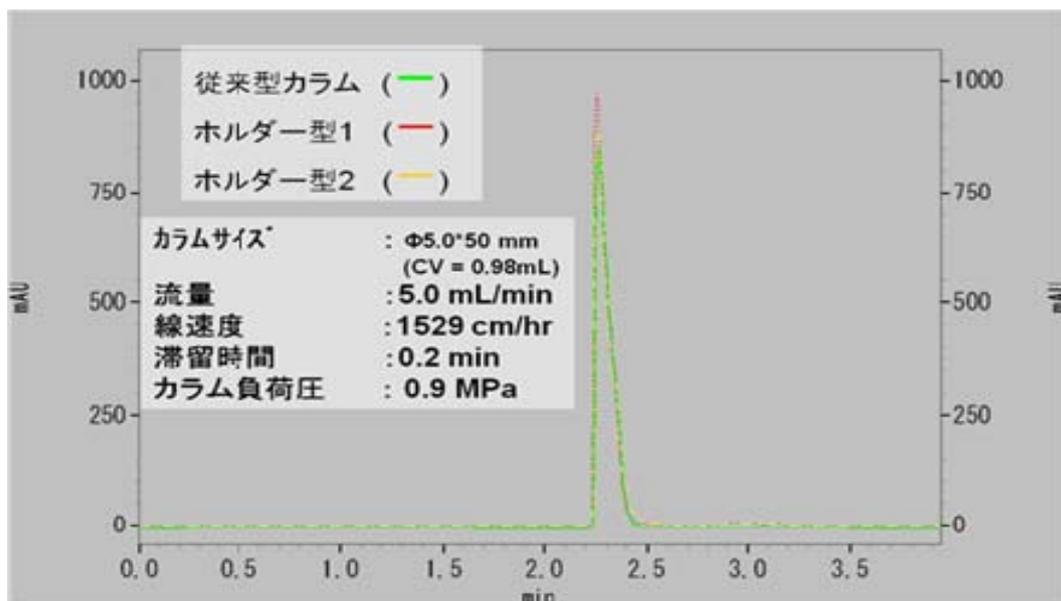


図 2-2-6 カートリッジ型シリカモノリスカラムと従来型カラムとの抗体精製性能の比較

### 2-3 連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置の開発

#### 2. 3. 1 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の最適設計仕様書の作成

装置の最適設計仕様書作成のために、まず、開発するクロマトグラフィー装置の流路構成とその流路を切り替えるための各種バルブ、送液のためのポンプ、溶出をモニターするためのモニターを制御するためのソフト開発に必要なパラメータを定めた。本装置を組み立てるために必要な部品としては、P1、P2、P3 で示す送液ポンプ、R1、R2、R3、R4、R5 で示す、ロータリーバルブ、SW1、SW2 で示す電磁バルブ、UV-M で示す、UV モニター、cond で示す、電導度モニター、配管のためのチューブ、E1 から E6 で示される溶媒用リザーバー容器、R1 から R5 で示される溶液回収用リザーバー容器、S で示される、サンプル溶液用容器、G で示される溶液濃度勾配作製用電磁バルブ、M で示されるミキサーがあげられる。

このうち、配管のためのチューブおよびリザーバー容器については、ユーザーの使用目的により大きく変わることから、それ以外の部品について、市場より調達可能な部品を検索

するとともに、調達が困難と考えられたミキサーについては、独自に開発することにした。

開発した装置としては、送液できる最大の流量として、50mL/分、バルブの耐圧として10Mpaとした。このことにより、作製した装置は、3L/時間、36L/日のサンプルを処理することができる。

なお、本研究開発においては、構成する部品として市場より調達可能な部品を対象にして、できるだけコスト削減について検討した。当初目的は、製造原価として、300万円を目指したが、UVモニターの調達コストが部品コストに大きな負担となったため、試作機段階の製造コストとしては、目標の約倍のコストがかかることになり、そのため、部品調達コストに開発コスト、販売即品コスト、メンテナンスコスト等が更に加わることを考慮すると、販売できる価格帯としては、1,200万円±200万円程度になることが予想された。そのため、目標に掲げた、「製造原価 3,000 千円、販売価格 8,000 千円を目指す。」ということは、困難な状況であるが、今後、部品調達特にUVモニターに係る調達コストを抑えることで、当初目標達成を本研究開発終了後においても継続的に検討することにする。本装置の動作制御プログラムについては、下記、2. 3. 4 に示す開発課題である、「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」制御ソフトの開発、において検討が行われた。最終的な仕様書作成においては、下記、2. 3. 3 において組み立てた試作1号機の製作過程において、その動作確認と並行して行い、最終的に図 2-3-1 に示す 26 ページに及び蛋白質精製装置制御プログラム機能仕様書 (confidential) として完成させた。



図 2-3-1 タンパク質精製装置制御プログラム機能仕様書の表紙のページ

### 2. 3. 2 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の設計図面の作成

全課題において定めた流路構成に従って、P1、P2、P3 で示す送液ポンプ、R1、R2、R3、R4、R5 で示す、ロータリーバルブ、SW1、SW2で示す電磁バルブ、UV-M で示す、UVモニター、cond で示す、電導度モニター、配管のためのチューブ、E1 からE6で示される溶媒用リザーバー容器、R1からR5で示される溶液回収用リザーバー容器、

Sで示される、サンプル溶液用容器、Gで示される溶液濃度勾配作製用電磁バルブ、Mで示されるミキサーの適切な配置と、それらの配線について検討するために、試作1号機的设计図面(外觀図面、部品配置図面、電気関係の配線図面)を作成した。

図2-3-2に試作1号機の外観図面を結果の一例として示す。

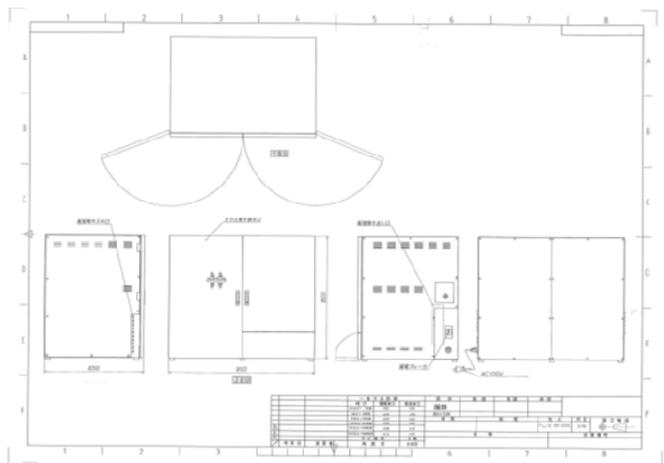


図2-3-2 設計した試作1号機の外観図面

試作1号機は、90\*98\*160cm以内の空間に収まるように設計しており、当初目的を達成した設計となっている。

この設計に基づき、下記に示すように、装置を作製し、その動作を確認したところ、装置制御に関わる配線に関わる設計は十分満足できる結果であったが、各部品配置に相当余裕があること、配管系が思いのほか長く、配管に由来する容量が大きかったこと、送液を制御するバルブと溶出・回収のためのバルブの配置が同一平面にない等、使い勝手の観点で改良の余地があることが判明した。そこで、試作1号機的设计・組み立て、動作確認、性能評価の結果をフィードバックして、設計を大幅に変更し、試作2号機的设计を行った。

図2-3-3に試作2号機の外観図面を示す。なお、試作1号機において、配線に関しては、申し分ないことから、試作2号機については、試作1号機の配線図面をそのまま踏襲した。

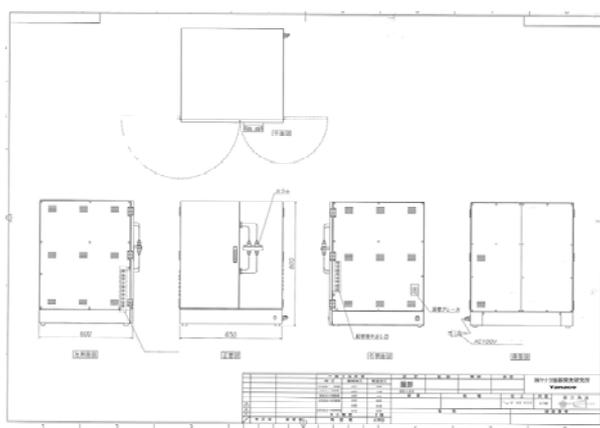


図2-3-3 設計した試作2号機の外觀図面

試作2号機の外觀は、試作1号機に比べて、約半分の容量になっているのと、すべてのポンプ、バルブが前面に位置していることから、試作1号機に比べて非常に使い勝手が良くなっている。また、各々のポンプ、バルブ、カラムを結ぶ配管の長さも試作1号機とは比べ物にならないほど短くできており、大幅な改良がおこなわれた。そこで、試作2号機の設計を最終設計とし、試作3号機および試作4号機の設計図面とした。

### 2. 3. 3 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の組み立て

上記の項目で設計した図面に従って、装置の組み立てを行った。

図2-3-4に組み立てた試作1号機の写真を示している。



図2-3-4 設計図面に従って組み立てた試作1号機

この写真図は、正面から写したものである。右側側面に、カラムから溶出した溶液の回収のためのバルブ等が配置されている。

組み立てた試作1号機を用いて、動作制御のためのプログラムの確認や、実液を用いた

装置の性能評価を行った。その際の、結果をもとに、改良型である試作2号機以降の試作機に反映した。

図2-3-5は、改良型試作機である試作2号機の写真を示している。



図2-3-5 設計図面に従って組み立てた試作2号機

試作2号機を用いた際の使い勝手および利用現場での装置設置等については、試作1号機とは比べ物にならないほどの改良がおこなわれたため、試作2号機で検証装置としての改良が完了し、同じ仕様の試作3号機、および試作4号機を組み立て、装置組み立ての再現性、タイムプログラムの開発、装置利用の幅を広げるために配管系の開発に利用した。

## 2. 3. 4 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」制御ソフトの開発

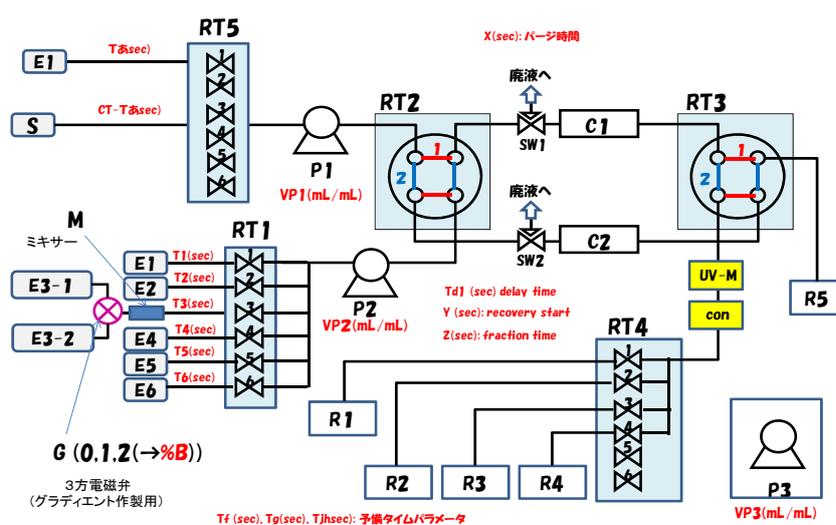


図2-3-6 流路構成と動作プログラム作製用パラメータを示す図

図 2-3-6 に示す流路構成を持つ装置の動作制御用ソフトの開発を行い、以下の項目に関して、その機能仕様書（兼取り扱い説明書）（図 2-3-1）を作成した。

開発した制御プログラムを用いて、実際クロマトグラフィーを行うためには、装置利用者の精製目的に対して、タイムプログラムを作成する必要がある。クロマトユーザーのニーズは多様であると考えられることから、本研究開発においては、個々のユーザーのニーズに対応したタイムプログラムについては、本研究開発項目では対応していないが、プロテインAタイプのアフィニティ担体を用いたモノクローナル抗体の精製目的に関しては、本装置の性能検証を兼ねてタイムプログラムを作成した。また、このタイムプログラムをデフォルトのテンプレートファイルとして、本装置の実用化（上市）の際には、用いることとした。

タイムプログラムとは、経過時間に対して、どのような制御シグナルを出かを定めたものであり、表形式で表示される構成を有するものである。デフォルトテンプレートにおいては、ポンプおよびバルブの作動の状態および順番を定めているが、そのための信号を出すタイミングすなわち経過時間を変えてシグナルを出すことは、ユーザーからの入力により任意に変えることができるようになっている。

### 2. 3. 5 「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の総合運転

上記、2. 3. 3において組み立てられた試作 1号機、2号機、3号機および4号機については、溶媒として、脱気後、0.22 ミクロンの滅菌フィルターを通じた純水を用いて、タイムプログラムとしては、動作確認用テンプレートを用いて、異常発熱が無いか、液漏れが無いか、送液が行われているか等の確認を行った。ポンプP1、P2の流速を、1 mL/分から 50 mL/分まで適宜変化させ、送液を行いながら、配管チューブとバルブとの結合部等をチェックすることにより、液漏れが無いことを確認するとともに、回収用リザーバーに排出される溶液の量を図ることにより、送液が正常に行われていること、更に、流速を 1 mL/分と設定したのち、入力パラメーターを変更し、動作確認の作業が、12 時間及び 24 時間を要するように、適宜パラメーターを入力し、12 時間もしくは 24 時間の連続運転を行った。その結果、12 時間及び 24 時間の連続運転中及び運転直後においても、ポンプ動作、バルブ切り替えは正常に働くこと、および、装置自体に異常な発熱が起っていないことを確認した。

更にプログラムに搭載されている、メンテナンスモードのうち、4つのメンテナンスモードを用いて、選択した溶媒リザーバーからの溶液が、選択した回収リザーバーへ、選択したポンプにより送液が起きていることを、手動で確認し、メンテナンスモードも設計した様に正常に作動することを確認した。

なお、実液を用いた総合運転は、次の 2-4 連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置の性能評価においても実施した。

## 2-4 連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置の性能評価

装置の性能評価においては、培養液もしくは培養菌体からの無細胞抽出液を用いた実液を用いた連続精製実験を行うことが必要である。そのためには、評価に用いるためのサンプル溶液を適切に選定することが重要である。本研究開発においては、試作装置の開発及びその性能評価において適切なモノクローナル抗体およびタグ付きタンパク質の開発を行い、モノクローナル抗体については、3種類を選定し、CHO細胞での発現培養液を用い、プロテインAタイプアフィニティ担体による精製のための装置の性能評価実験に供した。また、タグ付きタンパク質としては、抗体精製用アフィニティリガンドを対象に、326種について、それぞれの発現遺伝子を作製し、大腸菌での発現効率を調べ、その中から発現効率の良いものを11種選定し、大量培養を行い、この培養菌体からのタンパク質抽出液を調製を行った。更に、タグ付きタンパク質のうちで、モノクローナル抗体精製実験に使用するシリカモノリス担体に導入するためのリガンド蛋白質に関しては、3種類のタンパク質を選定し、これを分泌発現させることにより得られた培養液を、タグタンパク質の精製のための装置の性能評価実験に供するだけでなく、シリカモノリスアフィニティ担体の作製にも供した。一方、本課題実施においては、対象とする蛋白質ごとに、装置のタイムプログラムを合わせることが必要であり、また、精製して回収されるタンパク質標品の安定化のための後処理としての中和や希釈を行う必要があるため、デフォルトテンプレートファイルを適宜変更するとともに、試作機の配管を適宜つなぎ変えることが必要であった。このように、性能評価を目指した課題2-4の実施においては、色々な項目を複合的に実施することにより行われた。課題遂行においては、当初計画の「タンパク質精製の評価」という項目と「性能評価に用いるタンパク質の選定と培養液の作製」の順番を逆転させ研究開発を実施したが、本成果報告においては計画書の記載に従って記載する。

### 2. 4. 1 タンパク質精製の評価

#### 2. 4. 1. 1 CHO細胞で発現させたモノクローナル抗体を用いた精製の評価

試作1号機を用いたモノクローナル抗体の精製の評価にあたり、分離精製の用いられる各種溶媒を整備して、その溶媒の通液順番を定めた。用いた溶媒としては、カラム初期化（抗体吸着）用溶媒（E1）、洗浄用溶媒（E2）、溶出用溶媒（E3）、再生用溶媒1（E4）、再生用溶媒2（E5）及び再生用溶媒（E6）の6種類を用いた。この溶媒に対応するように、試作機の配管構成を行い測定した。カラムとしては、プロテインAタイプ改良リガンドであるAIST IIをアフィニティリガンドとして導入したシリカモノリスカラム（サイズ1 mL）を2本用いた。試作機において流路系が正しく構成されており且つその制御プログラムが正しく実施されているかを調べるために、E1からE6までの溶液がそれぞれ異なった電導度を示すことから、電導度をモニターすることで、その動作の正常性を調べた。その結果、図2-4-1に示すように、プログラムしたタイムテーブルに従って、溶出液の電導度が目的通り変化することが示された。

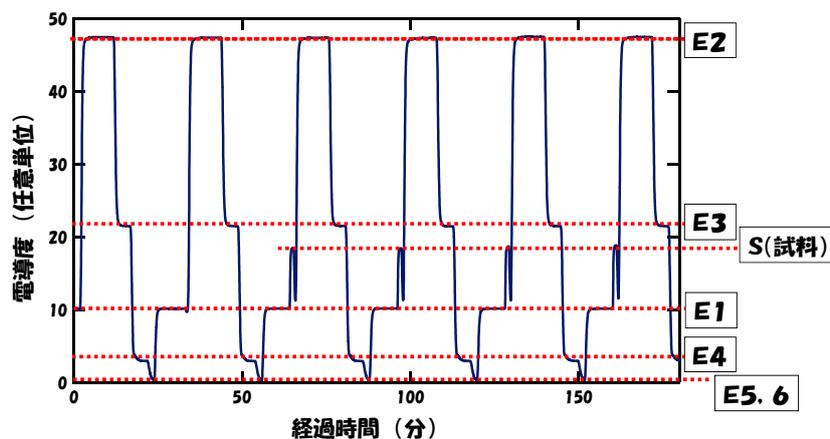


図 2-4-1 電導度モニターによる通液の正常性の検証

図 2-4-1 においては、E1、E2 液を、10 カラム容量、E3、E4 液を 5 カラム容量、E5、E6 液を 1 カラム容量それぞれ通液をし、カラム 1、カラム 2 に、サンプル溶液をそれぞれ 2 回注入し、サンプルの注入前に、E2、E3、E4、E5、E6、E1 という順番に通液し、カラムの初期化を行ったとき（すなわち、2 サイクルの初期化 + 4 サイクルのクロマト）の結果を示している。赤色の破線は、図の右側に示すように、各溶媒由来の電導度を示している。なお、カラムスイッチにより、サンプル注入後のカラム内のサンプルの溶出に伴う電導度の変化が図に示されており、図中、S（試料）で示される波線が、それに該当する。

図 2-4-1 に示される結果は、溶媒の切り替え、送液が再現性良く行われていること、且つ、サンプルの注入も正しく行われていることを示している。この結果より、試作機 1 号は、当初設計通りの機能を示しているものと検証できた。

同様の試験を、試作 2 号機、3 号機および 4 号機について行い、同様の結果が得られた。

モノクローナル抗体の精製の評価においては、CHO 細胞で発現させたモノクローナル抗体を用いて行った。

評価に用いたモノクローナル抗体としては、抗体 1（クローン番号 Ra3-42）、抗体 2（クローン番号 HUC3-48）、および抗体 3（クローン番号 Mab-1）を用いた。このうち、抗体 1 及び抗体 2 については、培養を外注し、抗体 3 については、2 年前作製し凍結保存しているものを用いた。抗体 1 及び 2 については、それぞれ 5L の培養液が作製された。

予備的な精製実験の結果、抗体 1 及び抗体 2 は、E3 溶媒として、pH3.5 の溶出溶媒を用いて溶出させたのち、精製タンパク質を透析により中和したところ、沈殿が生じるため、回収率が大幅に悪化することが判明した。そこで、本研究開発において開発した装置に装備した P3 ポンプを用いて、精製タンパク質の溶出と同時に中和溶媒と混合させるこ

とにより、酸性の暴露時間を最小にすることをを行った。変更した流路構成を用い、新たな溶媒リザーバとして Ed を導入することにより、E3 溶媒を用いた時の回収サンプルを Ed 溶媒で混合中和することで、モノクローナル抗体が安定な中性溶液として、R4 リザーバーに回収した。

新たな流路構成の変えた試作 1 号機で、抗体 1 の培養液を用いて行った連続精製の結果を図 2-4-2 に示す。図中、左の縦軸は、280nm の吸光度を、右の縦軸は、電導度を、横軸は、クロマト開始からの経過時間を示している。黄色で示したところは、E3 溶液を通液により、抗体 2 の溶出液を回収している時間帯を示している。

図には、1 mL のプロテイン A タイプ改良リガンドである AIST II をアフィニティリガンドとして導入したシリカモノリスカラムを用い、流速 5 mL/分（接触時間=12 秒）という高流速でサンプルおよび各種試料を通液し、サイクル数 16 回（カラムあたり 8 回）で連続注入を行ったときの結果を示している。カラムおよび装置の初期化に要する時間を含め約 12 時間で約 3 L の培養液を 1 mL のカラム 2 本で処理することができた。

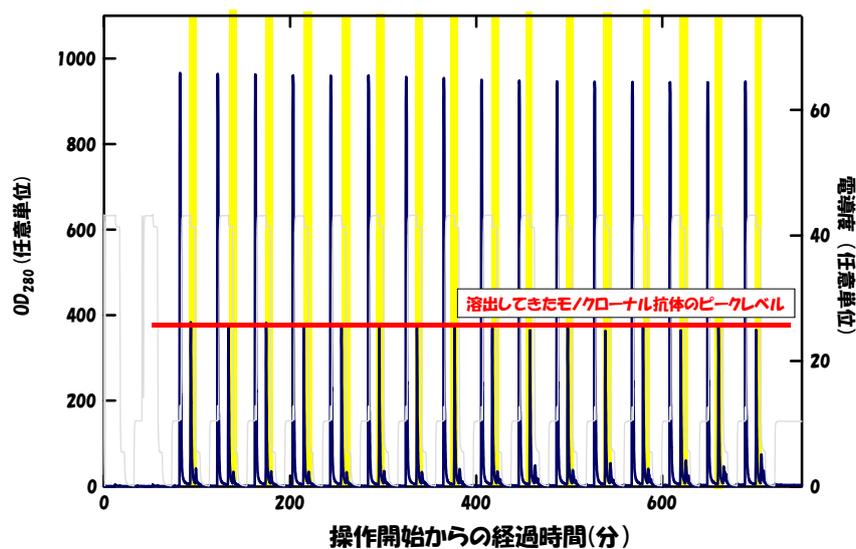


図 2-4-2 抗体 1 の培養液を用いた連続クロマトグラフィー

図中赤色の線は、精製された抗体 1 の溶出ピークの高さを示している。16 回のサイクルにおいても、再現性良く溶出が行われていることを示している。ピークの高さで見ると、サイクルごとのピークの高さの変動幅は、 $\pm 5\%$  以内に収まっていた。BCA 法によりタンパク質例量を行った結果、回収した精製タンパク質の総量は、12.3mg であった。

図 2-4-3 は、回収した抗体 1 を、SDS-PAGE で解析した結果を示している。

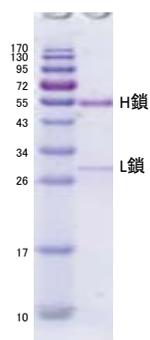


図 2-4-3 精製回収したタンパク質の SDS-PAGE

図に示されるように、SDS-PAGE で文益する限り、H鎖およびL鎖に該当するタンパク質バンドは認められず、非常に高純度に精製がおこなわれたことを示している。

抗体 1 の培養液中の抗体力価（免疫測定法により測定）は、4.8mg/L であり、用いた 3 L の培養液中には、12.4mg のモノクローナル抗体が存在していると予想された。この結果を用いて、精製の回収率を計算すると、回収率 =  $100 \times 12.3$ （回収タンパク質量） /  $12.4$ （推定培養液中のモノクローナル抗体量） = 99.1% とであった。培養液中の抗体量の測定法と精製した抗体のタンパク質量の測定手段が異なっているが、回収率が約 99% ということと精製したタンパク質の純度の結果と合わせると、試作装置を用いた連続精製において、非常に高い回収率で、高純度の精製が高流速条件で達成されたことを示している。

同様な結果が、抗体 2 および抗体 3 においても得られた。抗体 1、2、3 を用いた精製における結果を表 2-4-1 に示している。

表 2-4-1 精製結果のまとめ

	培養液量 (L)	培養液の抗体濃度 (mg/L)	培養液中の抗体量 (mg)	精製回収タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
抗体 1	3	4.8	14.4	14.3	99.3
抗体 2	3	1.7	5.1	4.7	92.2
抗体 3*	3	21	63	52	82.5*

\*約2年前に作製し、冷凍保存していた培養液を用いたため回収率が減少したものと考えられる

以上の結果により、モノクローナル抗体に関しては、当初目標を超える結果が達成できた。

#### 2. 4. 1. 2 タグタンパク質を用いた精製の評価

タグタンパク質を用いた精製の評価に関しては、試作機の完成時期の問題で、試作機を

用いた評価が困難であったため、試作機の基となった、バラックタイプの装置を用いて、試料の連続注入による連続クロマトグラフィーが適用できるか？もしくは、適用のための条件等の検討を行った。

バラックタイプの精製装置での精製において、精製に用いる溶媒の組成とその溶媒の通液順番を定めた。用いた溶媒としては、カラム初期化（抗体吸着）用溶媒（E1）、洗浄用溶媒（E2）、溶出用溶媒（E3）、再生用溶媒1（E4）、再生用溶媒2（E5）及び再生用溶媒（E6）の6種類を用いた。この溶媒に対応するように、配管構成を行い、図 2-4-7 に示す配管構成とした。本装置の場合、部品構成の関係で、回収用リザーバーとして、R1 から R4 までしか用いることができないという制限がある。カラムとしては、ヒスタグ精製用カラムとして、GE ヘルスケア社の HisTrap カラム(サイズ 5mL)を2本用いた。

評価用のタグ付きタンパク質としては、下記研究項目で選定したタンパク質を用いた。なお、プレビバチルスで分泌発現させた3種類のタグ付きタンパク質については、培養液中の対象タンパク質が高濃度に含まれていたが、予備的な検討において、培養液に含まれる未知物質が、HisTrap カラムへのタグ付きタンパク質の選択的結合を強力に阻害することが判明したため、本装置の評価用サンプルとしては不適切であることが判明した。そのため、本研究開発における精製の評価としての利用を断念した。

プロテイン A の改良型タグ付きタンパク質に関しては、下記の研究項目において改良型リガンドとしての利用可能性が高いものを 10 種類選んで、それぞれ 8L の培養を 5 回行い、計 40L の培養液からの発現菌体を集め、その菌体を破砕し、無細胞抽出液を調製し、遠心分離により不溶物と可溶物に分け、清澄化した無細胞抽出液とし、これを評価用サンプル溶液とした。

図 2-4-4 は、Mutant-1 と名づけたタグ付きタンパク質について、40L 培養の菌体からの清澄化した無細胞抽出液約 2L を用いた時の試料連続注入型の連続クロマトグラフィーのクロマトグラムを示している。

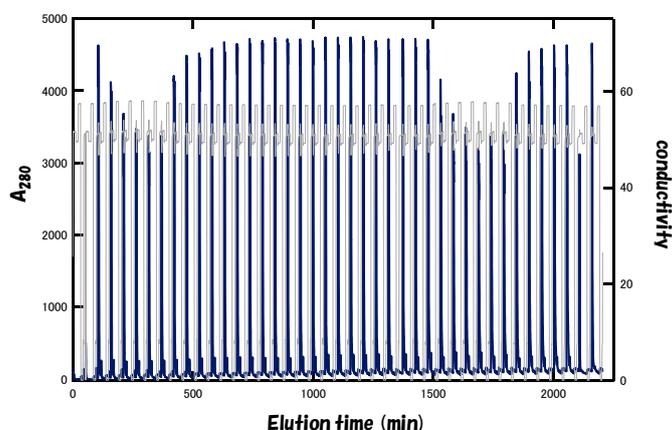


図 2-4-4 Mutant-1 の連続精製クロマトグラム

図は、5mL の HisTrap カラムを用い、サンプル通液 (P1 ポンプ) の流速を 1mL/分、溶媒通液 (P2 ポンプ) の流速を 2.5mL/分という条件で、サイクル数 40 回 (カラムあたり 20 回) の連続精製の結果である。この条件では、約 40 時間の連続運転を行う必要があった。図中クロマトグラムに乱れが生じているが、これは、用いた装置が、バラックタイプのため、送液ポンプの性能など、各 부품の性能に問題があるためと考えられた。なお、ポンプ送液の再現性については、本研究開発の試作機において設計段階からポンプの仕様を注意深く検討し、送液安定性に優れたポンプを装備することによりこの問題は解消できている。

図 2-4-5 は、図 2-4-4 のクロマトグラムにうちの適当な 2 サイクル分のクロマトグラムを示している。

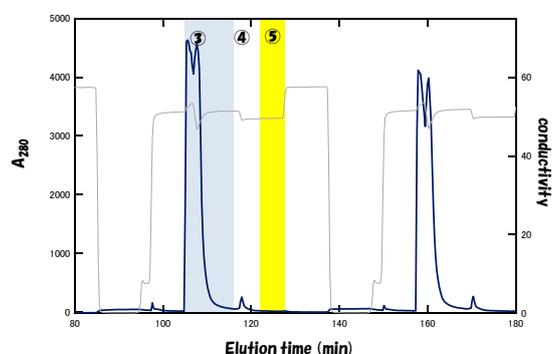


図 2-4-5 Mutan-1 の連続精製クロマトグラムの一部分のクロマトグラム

図 2-4-5 においては、目的のタグタンパク質の溶出は、④で示した時間帯であり、③で示した時間帯は、洗浄工程の時間帯、⑤で示した時間帯は、再生工程での時間帯である。なお、精製対象のタグタンパク質は、構成するアミノ酸残基として、トリプトファンを含まないため 280nm の吸光度が他のタンパク質に比べて著しく小さい。

回収した各サンプルを SDS-PAGE での分析結果を分析したところ、ヒスタグ精製において、いくつかの問題点が指摘された。

問題点 1 として、HisTrap カラムだけでは、目的のタグ付きタンパク質をほぼ純品にまで精製できず、精製度を上げるためには更なる精製工程が要求されることがあげられる。この点は、モノクローナル抗体のアフィニティ精製と対比される結果であり、精製度に関しては、分離担体の性能に依存することが明白である。

問題点 2 として、目的タグタンパク質が、洗浄画分に多量に認められることである。このことにより、ヒスタグ精製における目的タグタンパク質の回収率が大幅に減少するものと考えられる。この問題が生じる理由としては、HisTrap カラム表面のニッケルキレートと目的タンパク質中のヒスタグ部分との結合が単一的でなく、最低 2 価、すなわち、強い結合と弱い結合状態があり、それぞれ洗浄及び溶出に用いられる低濃度 (50mM) 及び高

濃度（200mM）のイミダゾールにさらされることにより、弱く結合している目的タンパク質が洗浄工程で溶出されているものと考えられる。この問題は、タグ配列と精製用担体との問題であり、本研究開発で開発した装置に由来する問題ではないことは明白である。

結果として、HisTrap による連続精製では、純度が不十分であったため、回収した部分精製タグ付きタンパク質を用いて、イオン交換クロマトグラフィーに本装置を利用することをを行った。

部分精製した Mutant-1 イオン交換クロマトグラフィーは、試作2号機を用いて、連続精製を行った。

図 2-4-6 は、ヒスタグ精製で回収した部分精製 Mutant-1 標品を用いて、連続注入型の連続クロマトグラフィーを行ったときのクロマトグラムを示している。

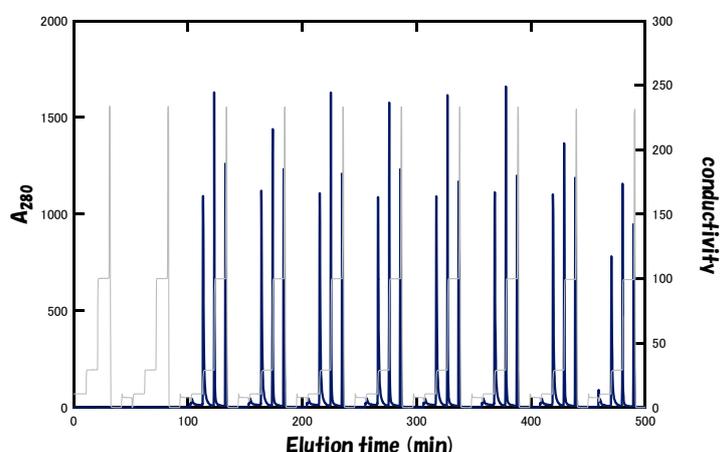


図 2-4-6 部分精製 Mutant-1 サンプルの連続精製クロマトグラム

図 2-4-7 は、図 2-4-6 のクロマトグラムにうちの適当な2サイクル分のクロマトグラムを示している。

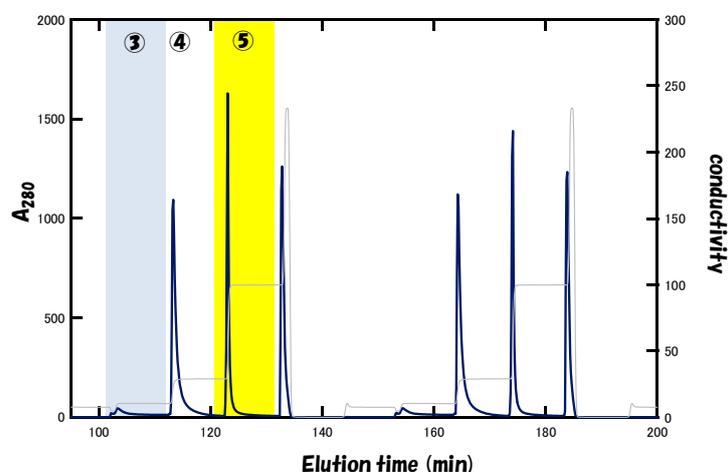


図 2-4-7 Mutant-1 の連続精製クロマトグラムの一部分のクロマトグラム

このクロマトにおいて、④で示すピークが精製・回収過分であり、この部分 SDS-PAGE で分析することで、高純度に精製されていることが示された。

以上の結果、ヒスタグ精製で回収したサンプルを、イオン交換クロマトグラフィーで更に精製することにより、目的のタグ付きタンパク質を高純度に精製することができた。以下同様に、Mutant-2 から Mutant-10 までのヒスタグタンパク質の連続精製を行い、それぞれ高純度のタンパク質の回収を行った。

回収したタンパク質は、凍結乾燥により長期保存ができるようにするとともに、乾燥した標品を適宜適切な溶液に溶解し、タグ付きタンパク質の機能である、ヒト抗体との結合活性をピアコアを用いて測定するとともに、シリカモノリスカラムに導入して、ヒト抗体の精製実験に用いた。ヒト抗体の精製実験に関しては、担体に結合した抗体の溶出・回収の pH 依存性を測定し、その応答を調べた。

いずれも、ヒト抗体と強い結合活性を示すことと、マイルドな酸性条件で結合した抗体を遊離・回収できることが示された。今後、得られた結果を詳細に検討し、新たな抗体精製用アフィニティリガンドとしての実用化可能性についても検討を行う予定にしている。

## 2. 4. 2 性能評価に用いるタンパク質の選定と培養液の作製

### 2. 4. 2. 1 モノクローナル抗体

性能評価用モノクローナル抗体の培養液の調整に関しては、「2. 4. 1. 1 CHO 細胞で発現させたモノクローナル抗体を用いた精製の評価」の項目に記載した。

### 2. 4. 2. 2 大腸菌を用いた性能評価に用いるタグ付きタンパク質の作製

評価用タグ付きタンパク質の選定のために、産総研にライブラリーとして精製・保管しているプロテインAタイプのアフィニティリガンドタンパク質の中から 326 種の変異体について、ヒトポリクローナル抗体との結合特性に関して、ピアコアを用いて測定した。その結果を、図 2-4-8 と図 2-4-9 に示す。

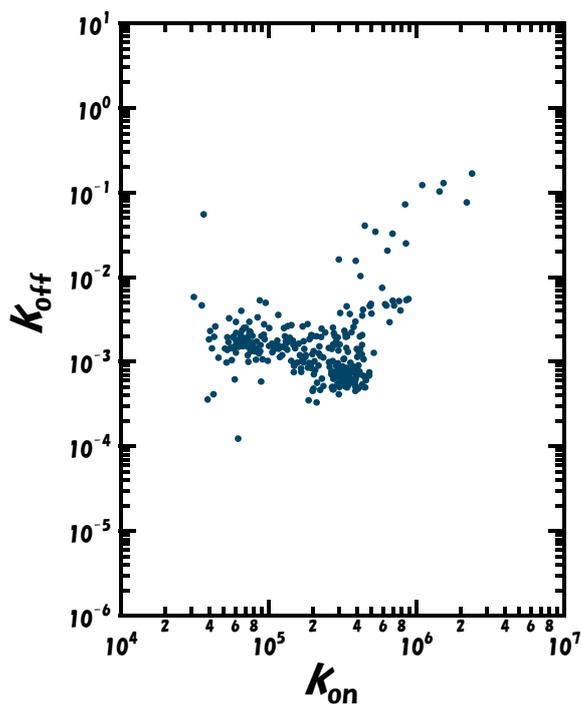


図 2-4-8 変異体リブラリータンパク質のピアコア測定結果のまとめ (1)

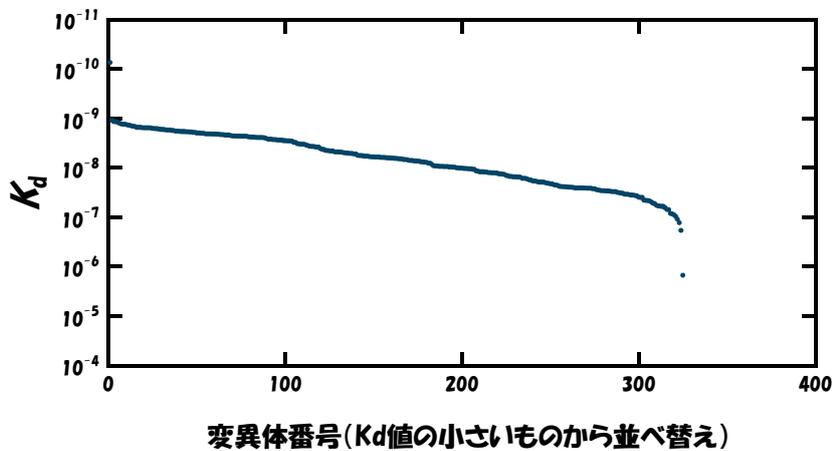


図 2-4-9 変異体リブラリータンパク質のピアコア測定結果のまとめ (2)

更に、これら 326 種の変異体について、それぞれの発現遺伝子を作製し、大腸菌での発現効率を調べた。発現効率は、発現遺伝子を導入した大腸菌を培養し、培養菌体全てを SDS-PAGE で解析した。SDS-PAGE 解析において、目的の位置に強いタンパク質バンドが認められた変異体を発現・蓄積が悪い変異体であるとした。

このようにして、ピアコアの解析結果で、中性条件において、ヒトポリクローナル抗体

と強い結合を示し、且つ、SDS-PAGE において、濃いタンパク質バンドを示す変異体の中から、上位 10 個の変異体を選択した。

選択した変異体について、それぞれ、1 回に 8L の培養を行い、培養菌体を集め、フレンチプレスで菌体を破碎したのち、ストレプトマイシン処理により染色体 DNA 等の核酸を沈殿除去し、清澄化した試料を作製した。この操作を、それぞれ 5 回行い、変異体ごとに作製した清澄化溶液を合わせ、それぞれの変異体の試料とした。作製した試料は、評価に供するまでの間、-20 度で凍結保存した。

#### 2. 4. 2. 3 プレバクテリアを性能評価に用いるタグ付きタンパク質の作製

プレバクテリアは、タグ付きタンパク質を菌体外に効率よく分泌する発現宿主として知られている。この宿主を用いたタグ付きタンパク質の発現を行い、培養上清を用いることで、大腸菌宿主での菌体内発現において、手間となる菌体の破碎操作を行う必要がなくなり、精製コストの低減につながると考えられる。そのため、これまでに開発し、より実用化の可能性がある変異体タンパク質について、プレバクテリアでの発現を行い、その培養液を用いた装置の性能評価を計画した。

プレバクテリアにおける発現及び大量培養は外注により行った。

プレバクテリアを用いた分泌発現は、非常に効率よく行われ、図 2-4-10 に示されるように、培養液タンパク質の 50%以上を目的のタグタンパク質が蓄積していることが示された。

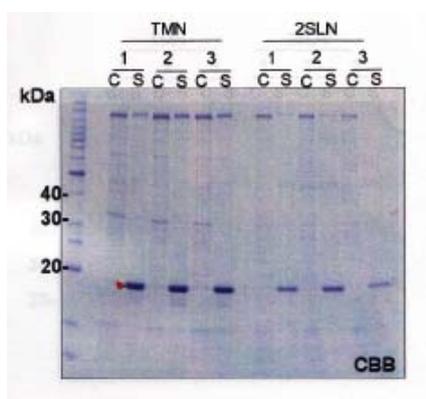


図 2-4-10 プレバクテリアでの発現タンパク質の SDS-PAGE 解析

結果、調整された培養液上清中には、目的のタグ付きタンパク質が約 1 mg/mL という高い濃度で含まれており、組み換えタンパク質の発現宿主として優れていることが明らかとなった。

## 最終章 全体総括

本研究開発においては、超高速分離が可能なタンパク質リガンド固定化シリカモノリスカラムと「連続プロセス型液体クロマトグラフィー装置」の実用化を行うことにより、受託機会別に使用され高コストの大きな要因となっている分離カラムの使用容量を削減する。さらに、連続クロマトグラフィー装置の実用化により、クロマト装置の低コスト化、精製時間を大幅に圧縮することを可能とする。その結果として、細胞培養によるタンパク質製造におけるタンパク質の分離・精製コストを 1/2 以下にすることを目的に、4 つの研究項目において研究開発がすすめられた。

上記に記述してきたように、各研究開発項目において、多くの点で目標をはるかに超える多くの成果が得られた。一方、本研究開発期間については、実質 5 カ月ということもあり、いくつかの点で、今後引き続き検討が必要な事柄が残されたことも事実である。

例えば、現在急速な勢いで成長しているモノクローナル抗体を利用した抗体医薬品の精製に関して言えば、プロテインA変異体をアフィニティリガンドとして導入したシリカモノリスを分離担体として用い、試作した連続精製装置を用いて、モノクローナル抗体を発現するCHO細胞の培養上清を試料として用いることにより、1mLのカラムに対して、5mL/分での流速(すなわち、接触時間 12 秒)での高速処理において、高純度且つ高回収率の精製を達成することができ、従来の方法と比較した場合、同一スケールの精製という観点では、1mLのカラムに対して0.5mL/分の流速(すなわち接触時間2分)の流速での処理速度で行っている精製処理速度を 10 倍に高めることができた。もし、同一の処理速度を達成するためには、従来の担体を 10 倍使用する必要がある、この点においても、分離精製に要するコストを 1/10 に下げることが可能にしている。このように、モノクローナル抗体の精製コスト削減という観点においては、本研究開発の結果は、設定の目標値をはるかに超える成果が上がっている。また、本研究開発において作製した試作2号機、3号機、4号機は、その使い勝手を含め、これまでのバラックタイプの装置とは比べ物にならないほどの高性能であり、実用機としての完成度が高いものであった。今後、モノクローナル抗体製造ユーザーに対しては、実用機として広く活用が期待される。

一方、モノクローナル抗体精製以外への展開に関しては、主に、用いる担体の性能に由来する問題点が考えられ、HisTrapを代表とするニッケルキレートアフィニティリガンドとしたアフィニティ精製等への展開に関しては、担体の開発を含め、今後の解決すべき課題が明らかになったと考えられる。なお、本装置を組み合わせて使用することにより、1回のクロマトグラフィーでは精製度が上がらない場合において、複数のクロマトグラフィーを組み合わせることにより高純度の精製が達成されることが示された。このようなことから、本装置の利用範囲を、いわゆる、アフィニティ精製用に特化して使用するのではなく、より一般的なクロマトグラフィー分離にも適用可能であることが示された。このような可能性を含め、今後、開発した本装置の具体的な利用法の開発を今後とも継続的に行うことが望まれる。