

平成25年度戦略的基盤技術高度化支援事業
「ブレビバチルス菌を用いた抗体精製用タンパク質製造技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成26年 3月

委託者 関東経済産業局

委託先 公益財団法人千葉県産業振興センター

目 次

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	1
1-2 研究体制	5
1-3 成果概要	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	10
第2章 本論	11
最終章 全体総括	23

第1章 研究開発の概要

本事業では、抗体精製用のアフィニティリガンドとして使用されるプロテインA、ならびにプロテインLを低コストで提供可能な製造技術を開発する。現在上市されている大腸菌を宿主とするプロテインAは非常に高価であり、またプロテインLは現在上市されている製品が無いため、いずれも低コストでの生産技術の開発が強く望まれている。そこで、タンパク質の分泌生産能に優れたブレヴィバチルス菌を宿主とした安価な発酵生産技術を開発するとともに、併せてプロテインA及びプロテインLを高機能化することにより、アフィニティリガンドとしての使用量を減らし、もって抗体医薬の低価格化に資する。

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

近年、副作用の少ない効果的な治療薬として抗体医薬品が注目され、本格的な実用段階に入っている。抗体医薬品の開発は米国が先行しており、2007年の世界市場は2.6兆円(富士経済)である。国内においても2002年に上市され、市場規模は2007年には850億円、2008年には1,500億円(日経バイオ年鑑より)と急速に拡大している(図1)。2008年の世界の医薬品売上15位以内に抗体医薬品が5品目入っており、そのうちリツキサンとレミケードは世界の年間の売上が60億ドルを超える。いずれも前年比2桁の伸びであり、発売後10年程度経過したものでも前年比10%以上の伸びを示すものがある。抗体医薬品は、予想外の副作用が生じにくく、投与後血中で長時間安定に存在することができるため、次世代バイオ医薬品の主役として期待されており、10～15年後の国内市場は3,400億円、世界市場は5兆円に拡大すると予測されている(富士経済)。

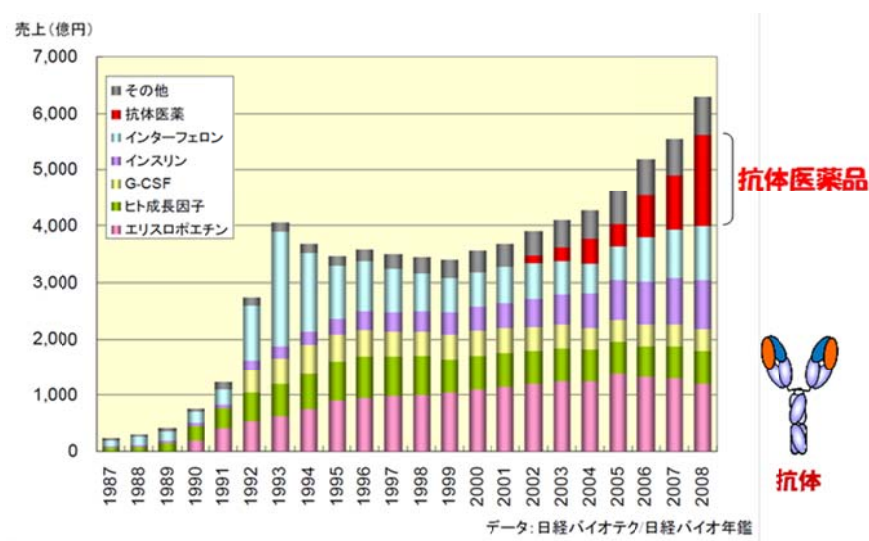


図1 日本国内におけるバイオ医薬品市場の伸長状況

一方で、抗体医薬品は高度な開発や、細胞培養により高品質に製造する必要があるため、開発費、製造費に巨額の投資を要求される。また、治療に際し、大量に投与しなければならず、薬価が非常に高価であることから、国民の医療費負担は極めて大きなものとなっている。さらに、日本でも医療費抑制のために厚生労働省主導で後発医薬品（ジェネリック医薬品）の普及が進められている。この動きにあわせて各医薬品メーカーはジェネリック医薬品の積極生産へシフトしつつある。現在のところ、抗体医薬品分野でのジェネリック医薬品は日米欧が承認していないが、2010年台に特許期間が終了する抗体医薬品も数多くあり、今後の市場拡大が確実視されており、日本国内においても抗体医薬品のジェネリック医薬品（バイオシミラー）への動きはより加速していくものと考えられる。またバイオシミラーにおいては、現行製品の半額程度の薬価での供給が要求されることとなり、新薬以上にコスト競争がし烈を極めることは確実である。これらのニーズを踏まえ、バイオシミラーを含めた抗体医薬品の更なる普及に向けた低コスト化が強く望まれている。

抗体医薬品は、抗体発現細胞株の樹立、大量培養、抗体の精製等の工程を経て製造される。このうち抗体精製工程のコストは大きく、抗体医薬品の低コスト化には、この精製工程を低コストで行なうことが課題である。この点を解決するためには、抗体医薬品精製工程に用いられるアフィニティカラムの低コスト化、特にこのコストの40%以上を占めるアフィニティリガンドタンパク質であるプロテインAの安価な製造技術の開発が極めて有効な手段である。

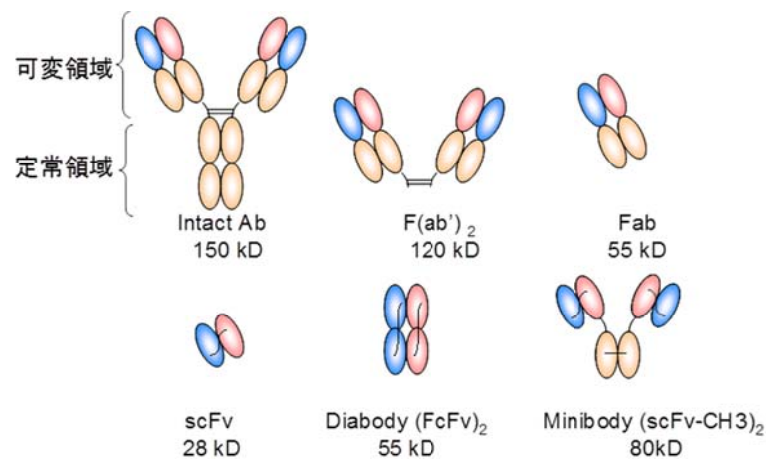


図2 完全長抗体、低分子抗体の構造

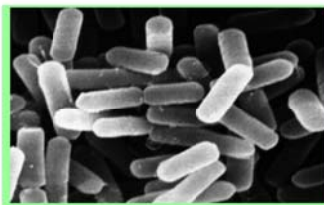
また、抗体医薬品は細胞培養により生産される完全分子型抗体が現在の主流であるが、次世代型低分子抗体医薬品として低分子化を図った改良型抗体（低分子抗体）の開発が指向されて

いる（図2）。一般的に、低分子抗体は半減期が短いものの分子量が小さいことで組織浸透性にすぐれ、酵母や大腸菌による低コスト生産や抗体分子の修飾が可能であるが、低分子抗体精製工程の製造コストが普及の妨げとなっている。これら次世代型低分子抗体医薬品をより低価格で提供するためには、完全分子型抗体精製におけるプロテインAのように、低分子抗体の精製工程に用いることができるアフィニティリガンドタンパク質であるプロテインLの低コストでの製造技術の開発が併せて求められている。

抗体医薬品精製用のアフィニティリガンドタンパク質として、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞壁に存在するプロテインAと呼ばれるタンパク質が利用されている。プロテインAを生産する黄色ブドウ球菌は感染症の起因菌であることから、プロテインAタンパク質は、現在、発現用宿主として大腸菌を用いた遺伝子組換え技術による発酵生産物として製造されている。現法では組換えプロテインAの精製工程が多段階必要な上に、大腸菌由来の毒素（エンドトキシン）を除去する必要があるため、製造費の高コスト化が生じている。

一方、本事業参画者である株式会社プロテイン・エクスプレスでは、タンパク質を高効率に分泌生産ができ、エンドトキシンをもたない *Brevibacillus choshinensis* 菌（以下、プレビバチルス菌という。図3）宿主ベクター系を用いて、プロテインAの抗体結合領域の分泌発現生産に成功している。

Brevibacillus choshinensis (枯草菌近縁種)



- ☆ 優れたタンパク質分泌発現能
- ☆ 培養時に目的タンパク質の分解が少ない
- ☆ 培養の容易性
- ☆ 精製の容易性
- ☆ 安全性の高い微生物 (GILSP遺伝子組換え微生物)
- ☆ 低いエンドトキシンレベル

図3 プレビバチルス菌の特徴

ところで、抗体医薬品の精製工程の低コスト化のためには、プロテインA自身の安価な製造のほかに、プロテインAの高機能化を図る技術開発が行なわれている。

具体的には、

- ①プロテインAをアルカリ条件下に対し耐性化することで、アルカリでの洗浄によるプロテインAアフィニティ担体の劣化（分解等）を防ぎ、アフィニティカラムの使用回数を増やす方法
- ②担体へのプロテインAの固定化に配向性を持たせることで、プロテインAアフィニティ担体の抗体結合容量を増加させ、プロテインAアフィニティ担体の使用量を減らす方法
- ③プロテインAアフィニティ担体に結合した抗体は酸性条件で溶出するが、酸により抗体の変性・凝集などがおきてしまう。弱酸性で溶出できるようにすることで、抗体の変性を防ぎ、効率よく抗体精製をできるようにする方法

などがある。

①については、GEヘルスケア社（特許第4391830号 変異免疫グロブリン結合タンパク質）、プロテノバ社（特許第4179517号 イムノグロブリン親和性リガンド）などが特許権利化している。GEヘルスケア社はレプリジェン社と、プロテノバ社は東ソー株式会社と提携し、アルカリ耐性プロテインAアフィニティカラムの製造、販売を行なっている。しかし、いずれも大腸菌を宿主としてアルカリ耐性プロテインAを生産しているために、その製造コストが大きくなっている。

本事業参画者である独立行政法人産業技術総合研究所の巖倉らは、上記②、③の高機能化に取り組み、弱酸性で溶出可能で、かつ配向性を制御して一点で固定化できるプロテインA技術を開発した（図4）。このようにして開発した高機能化プロテインAは、市販品に比べて約2倍の抗体結合能があり、より温和な条件で抗体を溶出することができることで、酸性での溶出の際に抗体が変性しない点で優れている。しかし、この高機能化プロテインAの工業的生産方法はいまだ確立しておらず、安価な製造技術の開発が課題となっている。

本研究開発は、巖倉らの開発した技術を基に設計された高機能化プロテインAを、プレビバチルス菌を用いて低コストで効率的に製造できる技術開発を行なうことにより、他社で開発されているプロテインAに比べて、優位性があり、競争力のある高機能化プロテインAを国内外に提供することを目的としている。また、同技術手法を用いて、現在、世界的にも競合会社の少ない高機能化プロテインLの安価な製造技術の開発を行なうことで、国際競争の面で優位性を持つと考えられる。

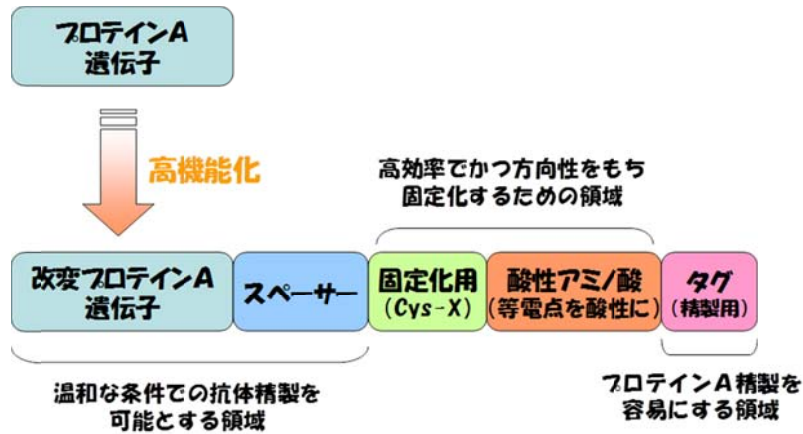
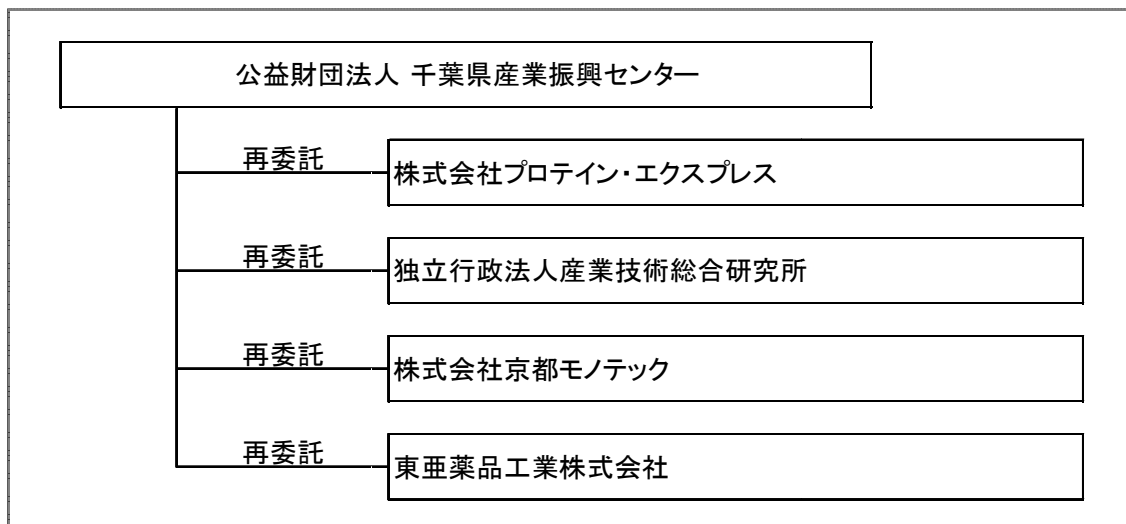


図4 高機能化プロテインAの構造

1 - 2 研究体制

【研究組織（全体）】



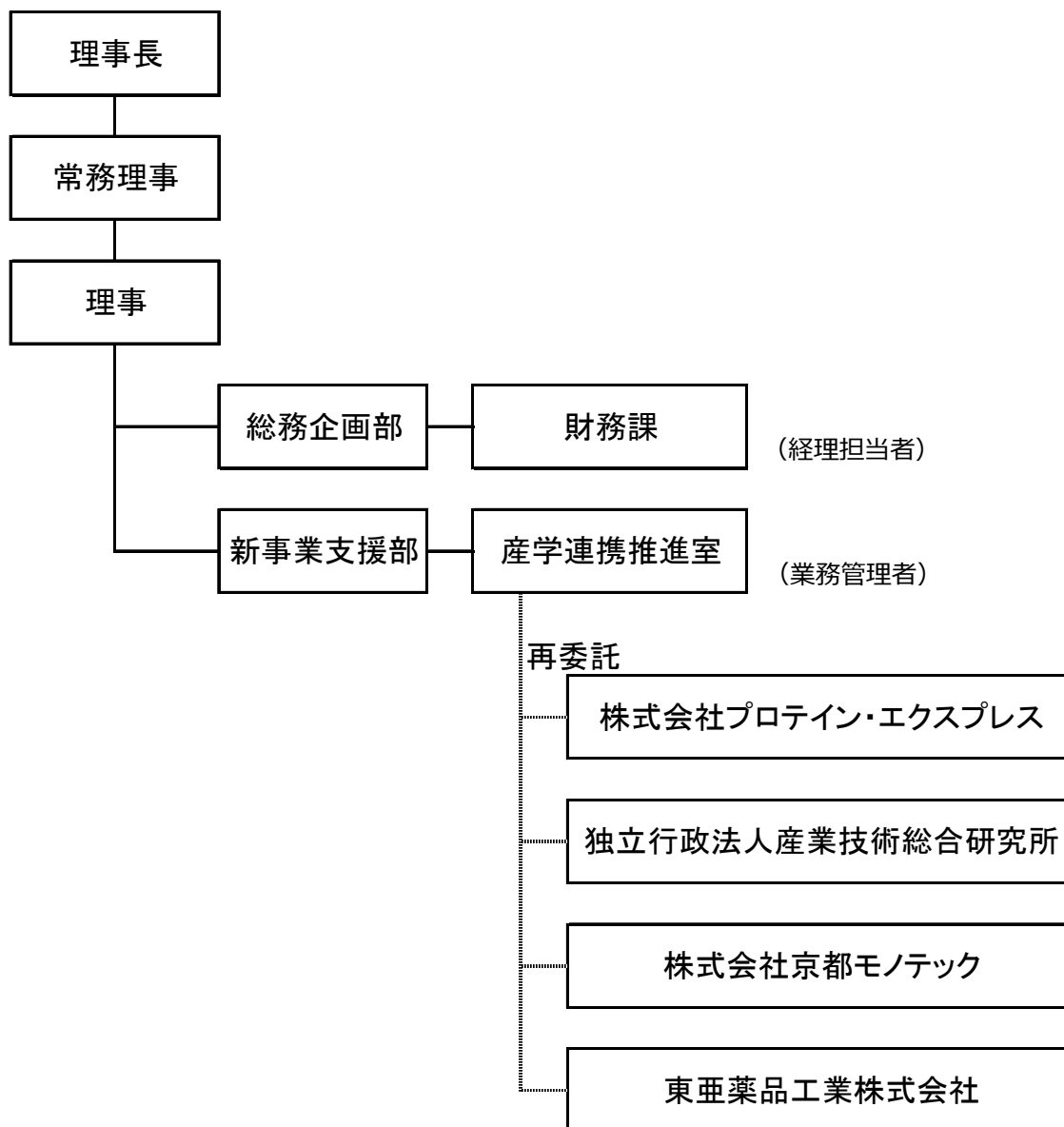
総括研究代表者 (PL)
株式会社プロテイン・エクスプレス
専務取締役 進 照夫

副統括研究開発代表者 (SL)
株式会社プロテイン・エクスプレス
執行役員 研究開発部長
渡辺 俊介

【管理体制】

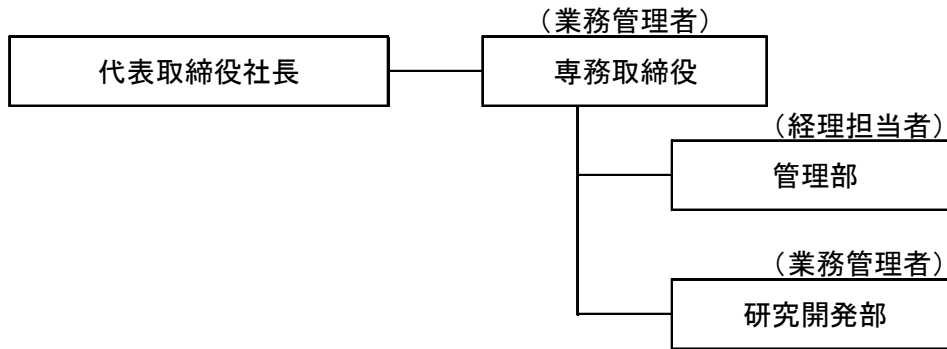
(1) 事業管理機関

[公益財団法人千葉県産業振興センター]

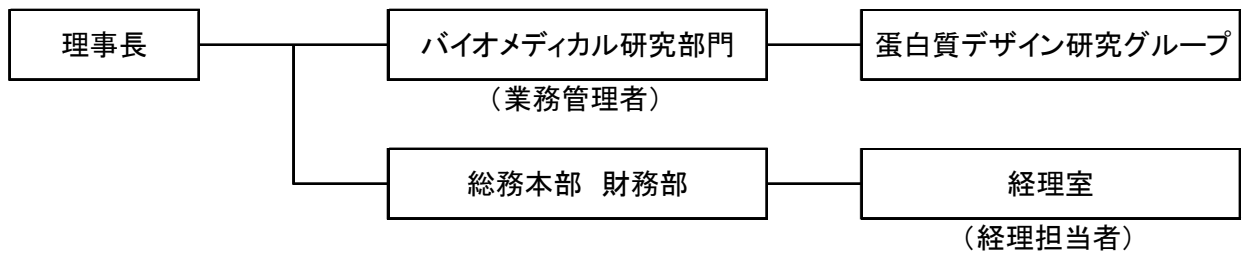


(2) 再委託先

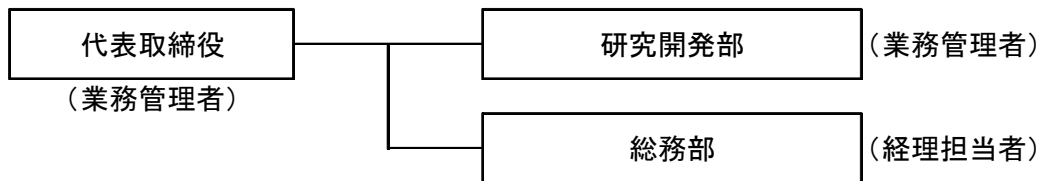
[株式会社プロテイン・エクスプレス]



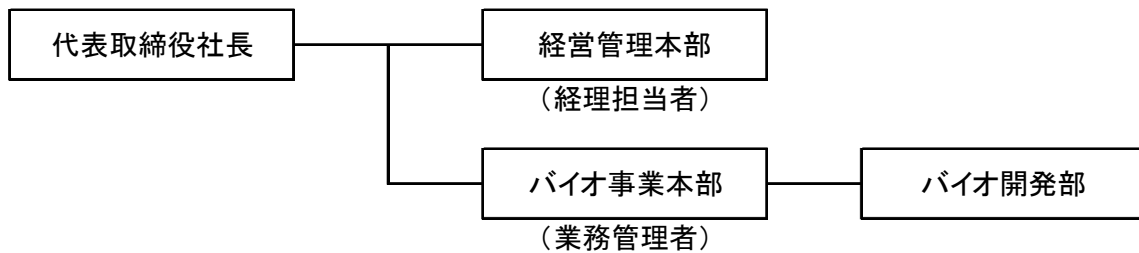
[独立行政法人 産業技術総合研究所]



[株式会社京都モノテック]



[東亜薬品工業株式会社]



【管理員および研究員】

事業管理機関；公益財団法人千葉県産業振興センター

① 管理員

氏名	所属・役職
伊藤 譲	新事業支援部 産学連携推進室 チーフ研究開発コーディネーター
西海 みどり	新事業支援部 産学連携推進室 専任主事

再委託先

(研究員)

株式会社プロテイン・エクスプレス

氏名	所属・役職
進 照夫	専務取締役
渡辺 俊介	執行役員 研究開発部長
砂子 智美	研究開発部 研究員
赤羽 美穂子	研究開発部 研究員

独立行政法人 産業技術総合研究所

氏名	所属・役職
広田 潔憲	バイオメディカル研究部門 蛋白質デザイン研究グループ長
巖倉 正寛	バイオメディカル研究部門 蛋白質デザイン研究グループ招聘研究員

株式会社京都モノテック

氏名	所属・役職
水口 博義	代表取締役
皿良 剛	研究開発部 主任研究員

東亜薬品工業株式会社

氏名	所属・役職
嶋崎 智史	バイオ事業本部 バイオ開発部 部長
沖野 洋一	バイオ事業本部 バイオ開発部 バイオ開発課 課長
江口 弘道	バイオ事業本部 バイオ開発部 バイオ研究課 主任
藤田 和也	バイオ事業本部 バイオ開発部 バイオ開発課

(3) アドバイザー

氏名	所属・役職
亀山 松寿	株式会社バイオリサーチアンドサプライ 執行役員 製造技術部長
大高 誠治	ダイソー株式会社 クロマト開発部 主任
小梅川 純一	株式会社バイオフィロンティアパートナーズ 技術顧問
高木 広明	ウシオ電機株式会社 顧問

1-3 成果概要

【1】. プレビバチルス菌による高機能化プロテインA生産性向上化開発

産業技術総合研究所で保有するプロテイン A アミノ酸変異体ライブラリーから、野生型と比べ、中性付近での抗体（イムノグロブリン G、以下 IgG という。）との親和性が大きく、弱酸性で溶出しやすい変異体（高機能化プロテイン A）の候補配列を選択した。

高機能化プロテイン A の発現量を指標に、プレビバチルス菌用の発現ベクターのプロモーター、ターミネーター、シグナル配列、さらに培地等発酵培養条件を最適化し、プレビバチルス菌による高機能化プロテイン A の高生産条件を確立した。

【2】. 高機能化プロテイン A 精製方法の開発

高機能化プロテイン A を生産させたプレビバチルス培養液から、2 種類のカラムを使用した効率的な精製プロセスを確立した。さらに同方法をタンパク質連続精製装置へ適用させることで、使用カラム容量の削減に成功した。

シリカモノリスカラムを支持体とした Ni キレートカラムの開発、ポリマーモノリスを支持体としたイオン交換カラムの開発を行い、いずれについても、モノリス構造を持っているために

高流速条件下で使用することができ、このような条件において従来品と同等以上の性能を有していることを確認した。

【3】. 高機能化プロテイン A のスケールアップ製造方法の開発

ブレビバチルス菌の発酵培養のスケールアップを実施するために、10L→30L→200L と段階的に培養量を増やし、それぞれのスケールにおける条件設定を行なった。高機能化プロテイン A 精製プロセスのスケールアップも実施し、ラボスケールと同等の製品を取得することができ、製造コストは従来法の 1/5 程度まで削減できた。

高機能化プロテイン A 固定化アフィニティ担体を作製し、従来品以上の性能であることを確認した。

また、高機能化プロテイン A の毒性試験を行い、その安全性に問題が無いことを確認、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）への対応を行い、事業化に向けた体制を構築した。

【4】. 高機能化プロテイン L 製造方法の開発

プロテイン L に関してもプロテイン A と同様に高機能化の変異体の製造検討を実施した。野生型と比べ、高親和性の変異体の取得を達成したが、生産性の低さから、実用化のための開発に長期間が要されると判断し、まずは野生型の実用化開発に取り組んだ。

野生型プロテイン L をブレビバチルス菌で生産するために発現ベクターの最適化を行ない、その生産量を約 10 倍とした。また、この培養精製から、2 段階の精製工程を経ることで、純度の高いプロテイン A 標品を取得できることを見出した。

1 - 4 当該研究開発の連絡窓口

事業管理機関

公益財団法人千葉県産業振興センター

所在地：〒273-0864 千葉県船橋市北本町 1-17-25 ベンチャープラザ船橋 1 階

担当者：伊藤 譲

TEL：047-426-9200

FAX：047-426-9044

E-mail：sangaku@ccjc-net.or.jp

第2章 本論

2-1 プレバチルス菌による高機能化プロテインA生産性向上化開発

中性付近で抗体に対する結合能が変わらず、より弱酸性での抗体の溶出が可能な高機能化プロテインAの開発を目的に、アミノ酸配列の設計を行った。配列設計の方針としては、リード配列を元に配向制御固定化できるようにデザインした配列を偽野生型配列とし、その網羅的1アミノ酸置換変異体ライブラリーから、目的の性質を有する変異体タンパク質を選択（スクリーニング）することにした。ライブラリーからの選択においては、既に開発しているリガンドスクリーニング用のアレイ解析装置を利用して、各変異体リガンドに中性条件で結合した抗体が酸性条件で解離・溶出する状況を観察し、pH5 にしてから結合した抗体の半分が解離するまでに必要な時間（T0.5）を測定し、これを溶出のしやすさの指標として選択した（図5）。

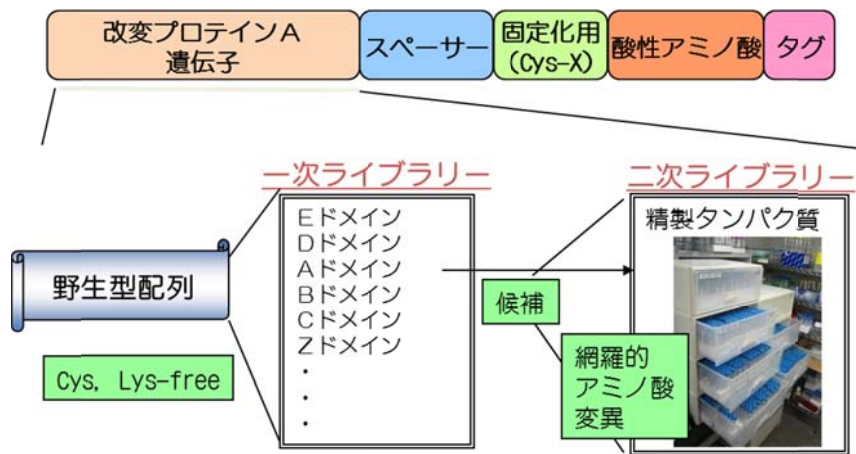


図5 高機能化プロテインA変異体ライブラリー

ピアコアによる測定から求めた解離定数（Kd）も併せて調べた結果、中性での抗体との結合力が強く、且つ pH 5 で溶出がし易い変異体を複数選択できた。さらに、これら変異の組み合わせ変異体を 20 種類以上作製し、同様の測定・解析を行い、より優れた候補変異体を複数選択した。これらの変異体を大腸菌で発現させ、精製して得られたリガンドタンパク質をモノリス担体に配向制御固定化し、抗体精製用カラムを作製した。作製したカラムを用いて実際に抗体を精製してみたが、その際、溶出工程における pH を変動させて抗体回収率の pH 依存性を調べた。候補変異体の中で、AIST-3 と命名した変異体が、中性での結合力、及び、弱酸性での溶出の容易さの 2 つの観点で、顕著に機能が改良された変異体であることから、この AIST-3 を実用に供すべき高機能化プロテインAとして選定した。この高機能化プロテインA候補配列のIgGとの結合に関する特性は、中性での親和性については、野生型と比べ約 170 倍に、IgG が 50% 解離する pH は野生型で 3.75 であったのが、5.25 と弱酸性での解離特性に優れたものであった（表1）。

	従来品（野生型）	高機能化プロテイン A
中性での抗体との結合能 (Kd, M)	1.30×10^{-9}	2.23×10^{-11}
50%解離するpH	3.75	5.25

表1 高機能化プロテイン A の特性（野生型との比較）

高機能化プロテイン A 配列をブレヴィバチルス菌用発現ベクターに導入した。その際、種々のプロモーター、ターミネーター、シグナル配列を検討し、最も高い生産性の組み合わせを取得した。加えて、培地組成等の発酵培養条件についても至適化を行い、高機能化プロテイン A の高生産条件を確立した。ラボスケールでの生産において、至適化前の生産量から約 1.5 倍へ増加させる事ができた。

2-2 高機能化プロテインA精製方法の開発

高額である Ni キレートカラムなどの精製用担体の必要使用量をできるだけ低減し、また精製時間を短縮させるために、既に開発済みのタンパク質連続精製装置を用いて、高純度、高回収率で精製可能なプロセスの開発を行なった。

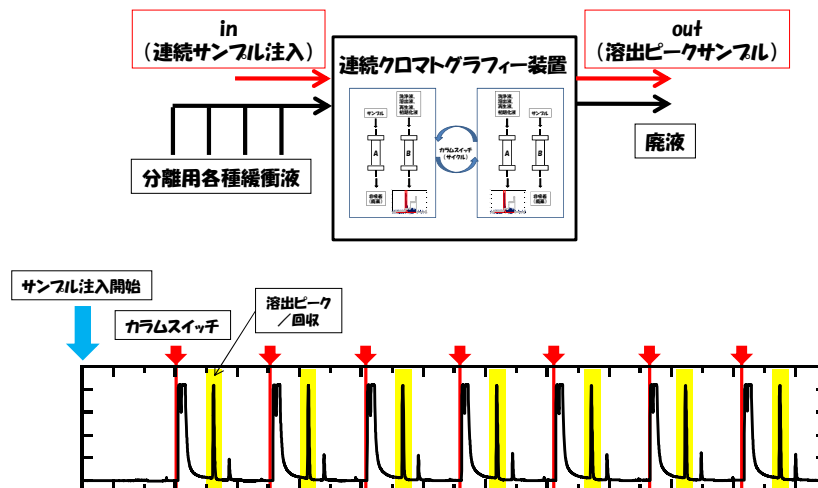


図6 高機能化プロテインA精製工程の概要

図6は、2本の同じカラムを並列に用いて、カラムスイッチにより試料を連続的に注入しながらクロマトグラフィーを行うタンパク質連続精製装置の概略を示している。一方のカラムにサンプルを添加していると同時に、もう一方のカラムでは、目的物質の溶出、カラムの洗浄・再生を行う。この工程を交互に繰り返し行うことで、精製に必要な時間を短縮するとともに、カラムの使用量を通用の10分の1以下にすることが可能になる。

ブレバチルス菌の培養液中には、Ni キレートカラムに強く結合し、同カラム精製を強く阻害する物質が共存する。そのため、先ず DEAE 陰イオン交換カラムを用いた連続クロマトグラフィー精製により阻害物質を除去した後、Ni キレートカラムによる連続クロマトグラフィー精製を行うことにした（2段階連続クロマトグラフィー）。図7は清澄化した培養上清に対して、2段階連続クロマトグラフィーを適用した精製工程の概略を示している。第1段階目の DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて、洗浄と溶出の条件を適切に設定することにより、Ni キレートカラム結合阻害物質を除去でき、第2段階目の Ni キレートカラムによる精製を効率よく行うことが出来た。本方法を用いることで、高純度精製が可能であることに加え、この2段階連続クロマトグラフィーにおいては、第1段階目において溶出回収される溶液を引き続き第2段階目のタンパク質連続精製装置に注入できるため、全体としての精製時間がほとんど増えないこと、すなわち、精製時間を大幅に短縮できることが示された。

2段階連続クロマトグラフィー（ブレビバチルス用）

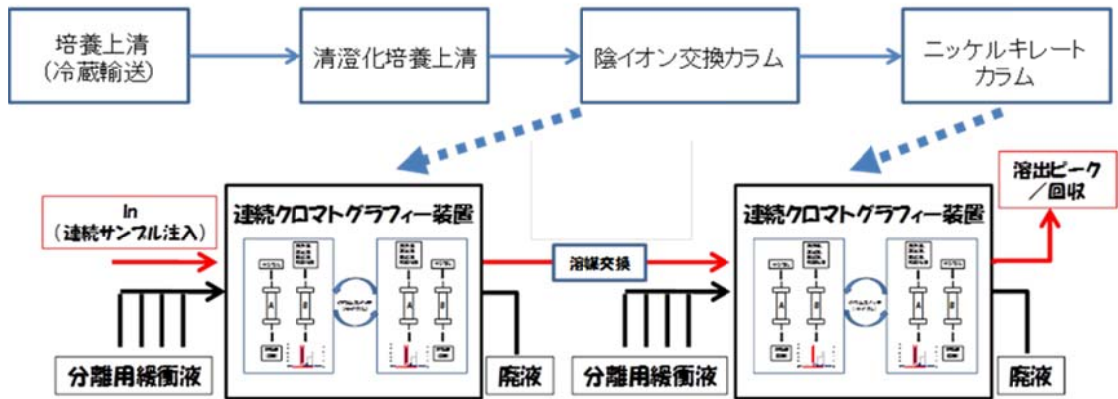


図7 高機能化プロテイン A 精製工程の概要

本精製工程に使用するカラム担体をタンパク質連続精製装置へ導入するためには、安価で高流速で使用可能な Ni キレートカラム、イオン交換カラムの開発が求められ、まず、Ni キレートカラムの開発を試みた。高流速での分離特性に優れたシリカモノリス担体を基材としキレート化合物を導入、次いで Ni イオンを配位させた Ni キレートシリカモノリスカラムの開発を行なった。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種類の細孔を有した構造であり、マクロ細孔はカラムの分離効率およびカラム負荷圧を決定する。マクロ細孔が大きいと負荷圧は小さくなり、高流速での対応が可能となることで、短時間での精製処理を行なうことができるが、マクロ細孔が大きくなると分離能が悪くなってしまう。メソ細孔は分離するための対象となる分子量によってサイズをかえなければならない。今回のターゲットである高機能化プロテイン A のような分子量が 1 万を超える大きな分子を分離するためには数 10nm 以上のメソ細孔径が必要とされる。しかし、メソ細孔径を大きくするとシリカモノリスの表面積が減少し、カラム単位体積当たりの結合容量が減少してしまう。したがって、メソ細孔は可能な限り小さくするほうが分離効率を上昇させる。そこで、本開発では高機能化プロテイン A 精製に適したマクロ細孔径、メソ細孔径の最適化を試みた。その後、キレート化合物の種類や結合条件、Ni イオンの導入条件等の最適化を行い、従来品と比べ、高流速時における分離特性の優れた Ni キレートシリカモノリスカラムを作製可能とした(図8)。

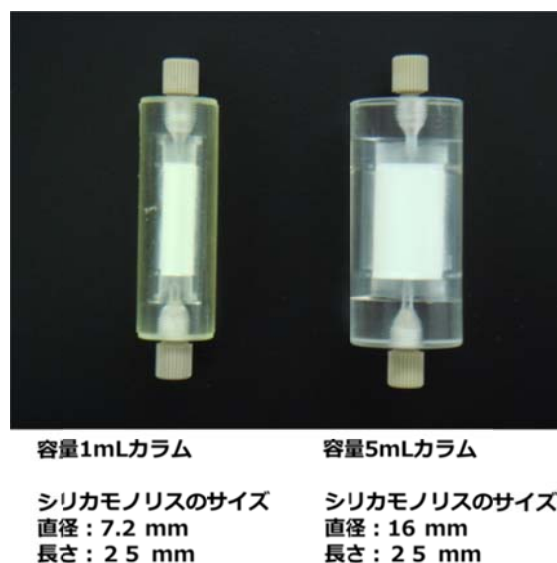


図8 Niキレートシリカモノリスカラム（試作品）の外観

次いで、イオン交換カラムの開発を実施した。イオン交換カラムは実際の使用の際に強アルカリ溶液での洗浄工程が含まれることが想定される。シリカモノリス担体はアルカリ溶液に弱いために、イオン交換カラムの基材として適さない。そこで、ポリマーモノリスを基材とすることで、高流速かつ強アルカリ条件下での使用が可能なイオン交換カラムの開発を行なうこととした。エポキシ樹脂をベースとしたポリマーモノリスにアニオン交換用に *N,N*-diethyl-1,3-diaminopropane、カチオン交換用に *p*-aminobenzenesulfonic acid を導入した。どちらもカラムとして最適な 2 μ m 程度の細孔径を有するポリマーモノリスを作製することができた。アニオン交換ポリマーモノリスを用いてタンパク質の分離を行った結果、塩濃度を直線的に変化させることによりタンパク質の分離ができており、イオン交換基の導入を確認することができた（図9）。ポリマーモノリスは表面積が小さいことにより、分離特性の速度依存性に優れており、滞留時間が 1 分程度でも結合容量の低下はほとんど見られない。開発した試作品においても高流速では市販カラムを上回る結果も得られている。

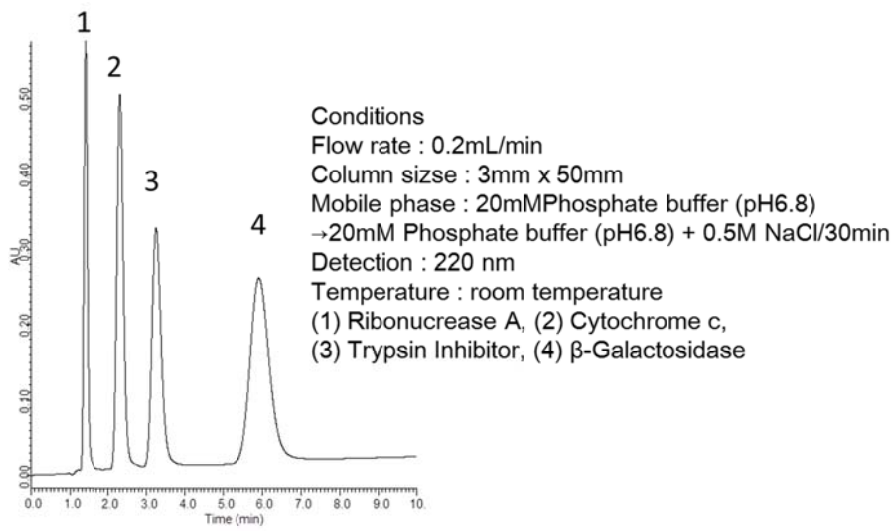


図9 イオン交換カラム試作品を使用したタンパク質の分離例

2-3 高機能化プロテインAのスケールアップ製造方法の開発

ブレヴィバチルス菌は、培養中の攪拌効率により菌の生育速度が大きく変動する。したがって、ラボスケールで最適化された発酵培養条件を実製造スケールへとスケールアップする際には、発酵培養中の菌の生育数や pH の変動を指標にスケールアップ時の発酵培養条件を再設定する必要がある。そこで、10L スケール（ラボスケール）で設定した培養条件を 30L、200L と段階的に適用、再設定を行ない、ラボスケールと同等の高機能化プロテイン A が生産可能な条件を決定した。

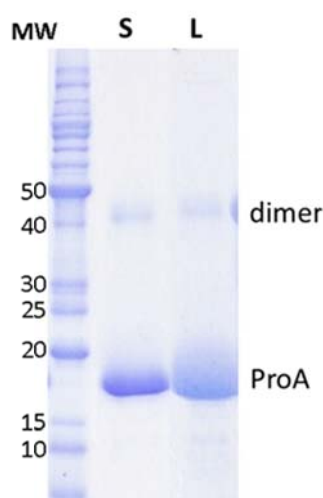


図10 イオン交換カラム試作品を使用したタンパク質の分離

次いで、ラボスケールで構築したタンパク質連続精製装置を使用したプロセスのスケールアップを検討した。イオン交換カラム精製、Ni キレートカラム精製それぞれの工程について、ラボスケールで得られた結合容量を元に、カラムサイズ、流速を設定し、16L の培養液での試験を実施した。結果、精製物はラボスケールで得られた標品と同等の純度（～100%）、回収率であり、精製プロセスのスケールアップも問題なく実施できることを確認した（図10）。タンパク質連続精製装置を使用しない場合と比べ、精製に使用する担体量を大きく削減でき、そのコストは従来比 1/5 程度になった（図11）。

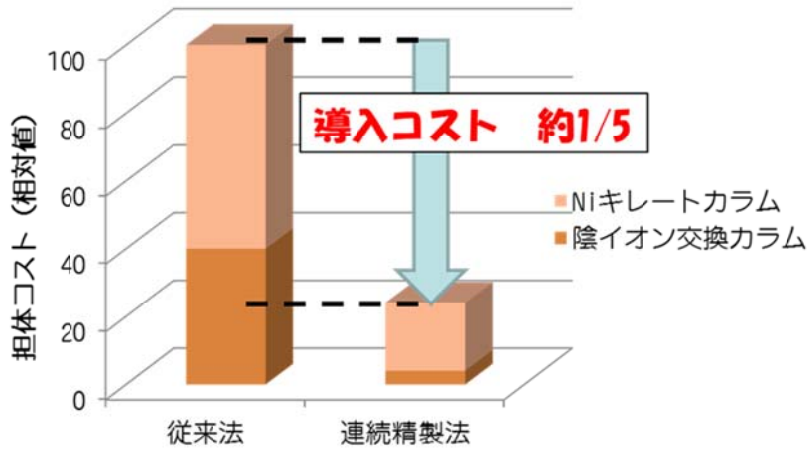


図1 1 従来法と連続精製システムにおける樹脂導入コストの比較

得られた高機能化プロテイン A 試作品を担体に固定化し、その特性評価を実施した。担体として、シリカモノリス、およびシリカビーズの2種類を用いた試験を実施した。シリカモノリス担体を用いた場合では、始めにシリカモノリス表面をポリ-L-リジンによってコーティングを行なうことで、非特異的な吸着を抑制するとともにリジンのアミノ基を介して高機能化プロテイン A の固定化を可能とした。コーティング時の反応条件を最適化し、使用するポリ-L-リジン量を従来の 1/10 に削減し、その後、高機能化プロテイン A の固定化条件の最適を行なった。高機能化プロテイン A の導入量は 16mg/mL-resin であり、これは、高流速時の条件下において、他社製品と比べ 10 倍の IgG 結合能となり、シリカモノリス担体表面上に高機能化プロテイン A が高密度かつ配向性をもって固定化できていること、高機能化プロテイン A の IgG に対する親和性が高いことによるものであることが示された (図1 2)。

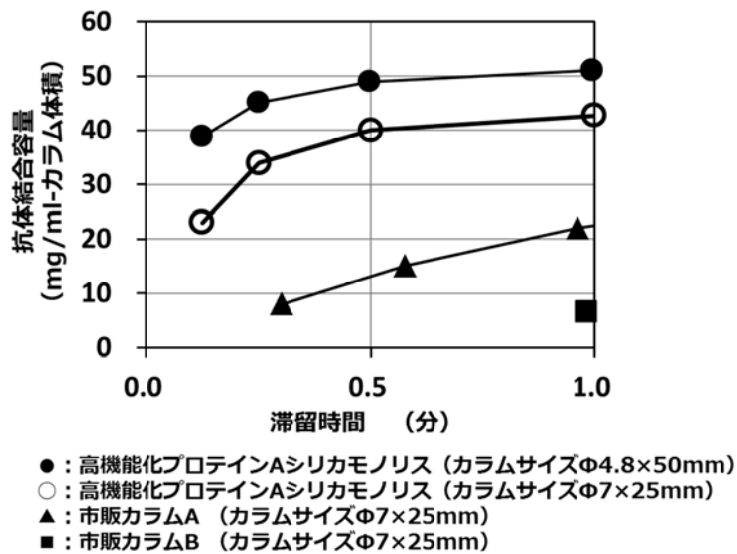


図1 2 高機能化プロテイン A シリカモノリスカラムの特性評価

さらに、高機能化プロテイン A をシリカビーズへ固定化させ、抗体精製に関する評価を実施した。その結果、高機能化プロテイン A の担体への結合量は 13.7 mg/mL-resin であり、この担体を用いた IgG に対する動的結合容量 (dynamic binding capacity, DBC) は 46 mg/mL-resin であった。他社製品の数値と比較したところ、短い接触時間においても高い DBC 値が得られたことが確認された (表 2)。

担体	DBC (mg/mL-担体)	接触時間 (分)
高機能化プロテイン A 担体 (試作品)	46	1.0
他社製品 (参考値)	30~35	2.4

表 2 高機能化プロテイン A シリカビーズの特性評価

プロテイン A 固定化担体は抗体医薬品の製造に使用されているが、抗体の溶出の際に、わずかではあるがプロテイン A が抗体とともに溶出されることが分かっている。野生型ではその安全性について試験が行われているが、本事業で開発を行なっている高機能化プロテイン A についても同様の安全性が得られるか、毒性試験にて確認を行った。高機能化プロテイン A について静脈内に単回投与した時の毒性を、ラットを用いて検討、生理食塩液を投与する対照群を設けた。動物は 6 週齢の CrI:CD(SD) SPF ラット (1 群雌雄各 5 匹) を用い、単回投与後 14 日間観察した。結果を以下に示す。

- 1) 死亡状況：雌雄全ての投与群で死亡動物はみられなかった
- 2) 一般状態：雌雄の全ての投与群で異常は認められなかった
- 3) 体重：雌雄全ての投与群で異常はみられなかった
- 4) 剖検：雌雄全ての投与群で投薬起因性の変化はみられなかった

以上の結果から本試験における高機能化プロテイン A はラットに単回静脈内投与した時の最小致死量には至らないと推定された。今回の投与量は、FDA による抗体医薬品精製時において許容されるリークされたプロテイン A 量の 10^6 倍程度であり、今回の結果からプロテイン A は安全であることが安全係数 10^6 をもって示されたこととなる。

本研究開発における高機能化プロテイン A の製造は、宿主としてブレヴィバチルス菌を利用している。従って、遺伝子組換え微生物の産業利用に該当するため、遺伝子組換え生物等の使用

等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）第 13 条第 1 項の規定に基づき、経済産業大臣宛に遺伝子組換え生物等（遺伝子組換え微生物）の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認申請を行なう必要がある。平成 24 年度にて遺伝子組み換え微生物の安全性試験を行い、その結果を用いて、本年度、東亜薬品工業株式会社内を製造場所とした大臣確認申請書を提出し、第二種使用等拡散防止措置の確認書を受領した。このことで、事業終了後における高機能化プロテイン A の製造販売に対し、速やかに実施可能な体制が構築できた。

2-4 高機能化プロテインL製造方法の開発

高機能化プロテインAを設計した手順を参考にして、高機能化プロテインLの配列設計を行った。図13は、高機能化プロテインL作製の概要を示している。リード配列として野生型プロテインLの配列を元に配向制御固定化を可能とする偽野生型配列をデザインした。この配列を元に、網羅的1アミノ酸置換変異体を作製し、大腸菌に発現させて精製し、2次ライブラリーを作製した。プロテインLはプロテインAと比べ、抗体への親和性が低いことが短所の1つであると考えられるために、抗体と強い親和性を示す変異体を獲得することを目的に、2次ライブラリーについてアレイ解析を行った。特に結合の強さが増大した変異体について、ピアコアによる測定で解離定数(Kd)を求め、この結果を併せて5種類の変異体を選択し、その組合せ変異体を作製した。

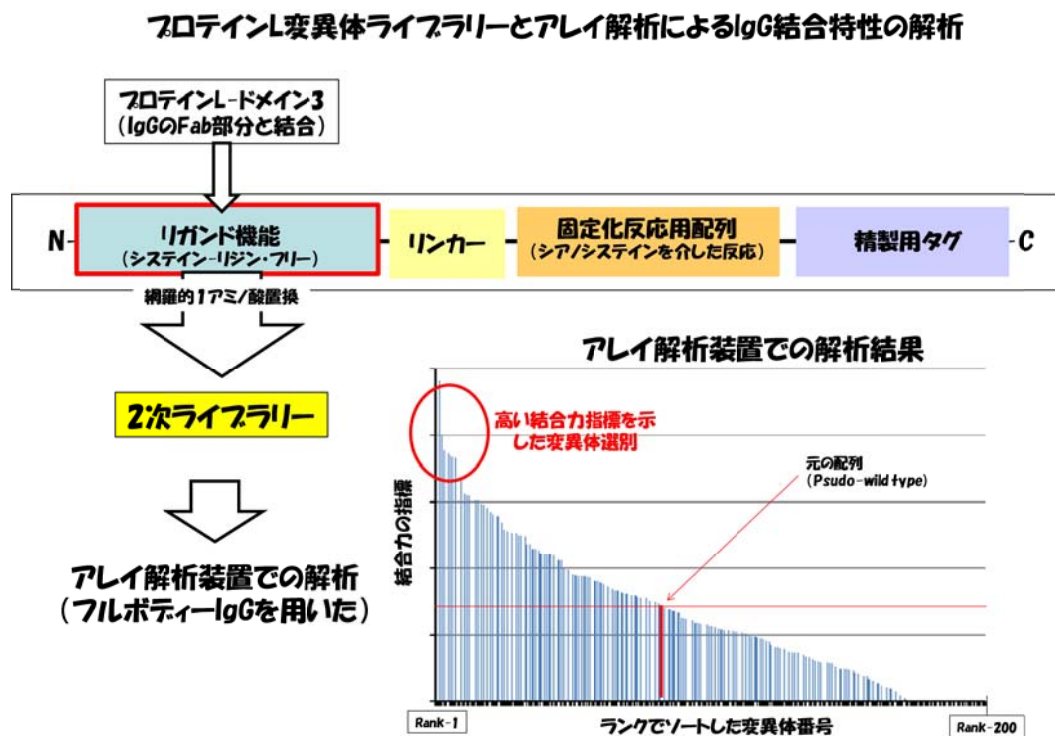


図13 プロテインL変異体ライブラリーの特性評価

高機能化プロテインL候補配列をブレヴィバチルス菌の発現ベクターに導入し、その生産量を確認したところ、ほとんど発現が確認できないことに加え、菌の生育も通常に比べ、遅くなっていた。ブレヴィバチルス菌の生産系は誘導系ではなく、定常的なもののため、菌の生育に悪影響を及ぼすようなターゲットの場合、上記のような現象はしばしば見られることである。そこで、IPTGにより誘導発現可能なブレヴィバチルス菌発現ベクターを作製した。この発現ベクターに高機能化プロテインL候補配列遺伝子を導入、ブレヴィバチルス菌に組み込んだところ、IPTG添加

により高機能化プロテイン L の発現は確認できたものの、その生産量はプロテイン A に比べ、1/100 程度とわずかであり、実用化開発には非常に困難であることが示唆された。世界的にもプロテイン L (アフィニティカラム) は競合が少なく、野生型プロテイン L はブレヴィバチルス菌で発現が確認できていることから、高機能化型に先行して野生型プロテイン L の製造開発に取り組むこととした。

高機能化プロテイン A の生産に分泌シグナルの選択はその生産量に与える影響が大きいとの知見が得られている。そこで、野生型プロテイン L の生産における分泌シグナル配列の最適化を行なうために、ブレヴィバチルス菌で機能できる 5 種類のシグナル配列を選択、野生型プロテイン L の生産量を確認した。その結果、一般的に使用されているシグナル配列と比べ、野生型プロテイン L の生産性を約 10 倍にするシグナル配列を見出した。このシグナル配列を用いた培養上清からの、プロテイン L の効率的な精製方法について検討を行ない、2 種類のカラムを使用することで、回収率が 65%、高純度で精製可能な条件を決定した。

最終章 全体総括

現在、市場を急激に伸ばしている抗体医薬品の製造に関して、プロテイン A アフィニティカラム精製工程は、必須の工程である。しかし、プロテイン A が高価なことにより、プロテイン A アフィニティカラムの高コスト化、最終的には抗体医薬品の高コスト化の大きな要因となっている。本事業においては、プロテイン A の製造コストを低減させると共に、プロテイン A をカラム担体に配向制御して固定化させることによりカラムの使用量を削減させ、かつ弱酸性下で抗体をカラムから解離させることにより、IgG の凝集体発生を抑えて抗体の回収率を上げることにより、総合的に抗体精製コストの大幅な低減を目指した。

その結果、プロテイン A 変異体ライブラリーより、中性付近での IgG との親和性が高く、弱酸性で溶出可能な高機能化プロテイン A 変異体配列を決定した。この高機能化プロテイン A 変異体遺伝子をブレビバチルス菌に導入して発現効率を向上させると共に、タンパク質連続精製装置を用いた精製プロセスの最適化を行い、製造コストを従来法の 1/5 にすることができた。加えて、担体に固定化した高機能化プロテイン A と IgG との結合能を 1.5 倍以上にすることができ、カラム使用量の削減を可能とした。

さらに、高機能化プロテイン A の安全性評価及びカルタヘナ法に係る大臣確認申請を実施し、事業化のための体制を構築した。このことにより、本事業終了後、速やかに高機能化プロテイン A の事業化を実施することが可能となった。

また、高機能化プロテイン A をタンパク質連続精製装置で精製するために、高流速で使用可能な Ni キレートシリカモノリスカラムの開発を行なった。その結果、従来品と同等以上の性能を有するカラムを製造することができた。よって、今後、高機能化プロテイン A の精製工程での使用にとどまらず、スピнкаラム、96 ウェルカラムのような、ハイスループットでの使用を前提とした Ni カラムを販売する予定である。

プロテイン L については、世界的にみても競合製品がほとんどないことを踏まえて、まずは野生型プロテイン L での事業化を目指すこととした。野生型はブレビバチルス菌での製造が可能であるとの結果は得られていたものの、その生産性の低さが課題であったが、本事業において鋭意検討を重ねた結果、生産性を 10 倍とし、低コストでの精製工程を確立することができた。引き続き、低分子抗体の開発を実施している製薬企業等との共同研究も考慮し、スケールアップの検討や安全性評価等の事業化を視野に入れた検討を実施していく予定である。