

# 低分子化抗体精製用の新規アフィニティー担体の開発

村田 大・水口 和信\*

## 多様化する抗体医薬品の分子フォーマット

抗体医薬品は有効性が高く副作用が少ないため、多くの疾患への適用が期待されており、高い成長率を維持しながら拡大を続けている<sup>1)</sup>。これまでは少数の大型薬が市場の大半を占めていたが、その市場構造は転換期を迎え、現在は少量多品種化が進んでいる。現在上市されているほとんどの抗体医薬品は、注射薬として開発される完全長型のモノクローナル抗体が主流であり、中和活性やADCC（antibody-dependent-cellular-cytotoxicity：抗体依存性細胞傷害）活性、CDC（complement-dependent cytotoxicity：補体依存性細胞傷害）活性といった抗体本来の特性が利用されている。一方で、がん免疫細胞を誘引する完全長型の二重特異性抗体の開発や、完全長型抗体の分子構造の改変や断片化により高機能化した次世代抗体医薬品の開発も活発化しており、今後、さまざまな機能を有する抗体医薬品の実用化が期待される<sup>2)</sup>。

Fc領域を有さない低分子化された抗体であるFab型抗体は、定常領域であるFc領域に由来するADCCやCDC活性を有せず、中和活性を利用した医薬品として開発が行われてきた。近年では、Fab型抗体からなる二重特異性抗体の安定生産技術が開発され、血中安定性も比較的長く優れた二重特異性抗体としての開発が期待されている。さらに低分子化した分子フォーマットとして、可変領域のみからなるscFvの開発も盛んに行われている。また、scFvの二重特異性抗体としてDiabodyやscFvをタンデム化した次世代型の低分子化抗体医薬品の開発が活発になりつつある（図1）。タンデムscFvの一つはすでに承認医薬品としても市場に供給され、高い治療効果を上げている<sup>3)</sup>。他にも3個以上のフォーマットの低分子化抗体や完全長抗体と低分子化抗体の融合タンパク質、低分子化抗体と酵素などの別の機能分子との融合タンパク質などが開発され、抗体医薬品全体の多様化が進んでいる。

## 次世代型抗体の精製技術

このように各種フォーマットの次世代型抗体医薬品開発が進む中、その精製技術も多様化している。完全長抗体の精製には、抗体分子のFc領域を特異的に認識する抗体結合タンパク質であるプロテインAをリガンドとするアフィニティー担体（PA担体）の使用が主流となっ

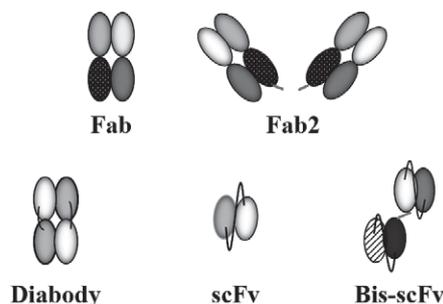


図1. 低分子化抗体の分子フォーマット

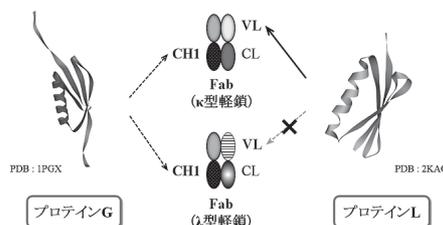


図2. PGとPLの抗体認識部位

ている。抗体医薬品の多様化に伴い、Fc領域を含まない抗体フォーマットやFc領域を改変した抗体フォーマットなど、PA担体では精製できない次世代型抗体が出現する中、その精製用担体の開発が求められている。

Fc領域を含まないFabやscFvなどの低分子化抗体は、イオン交換クロマトなどの特異性の低い担体による精製が必要なため、その精製プロセス開発には細かな条件設定が要求される。低分子化抗体を特異的に精製可能なアフィニティー精製用担体として、軽鎖可変領域（VL）への特異的結合能を有するタンパク質であるプロテインL（以下、PL）をリガンドとするアフィニティー担体が利用される（図2）。しかし、PLはκ型軽鎖を認識するがλ型軽鎖に結合せず、また、抗体種によってアフィニティーが大きく異なりプラットフォーム化が困難である<sup>4)</sup>。Fab型抗体精製には、軽鎖の種類に依存せず重鎖定常領域であるCH1領域を認識するタンパク質であるプロテインG（以下、PG）<sup>5)</sup>をリガンドとするアフィニティー担体の利用が期待できるが、Fc領域と比較してCH1領域への結合能が小さいため、結合容量が低いことが課題となっている（図2）。抗体の各部位を認識するラクタド重鎖抗体断片（VHH）をリガンドとする担体

\*著者紹介 株式会社カネカ バイオテクノロジー研究所

も上市されているが、結合容量や溶出特性などの課題を抱えている。現状、各種低分子化抗体の精製用アフィニティー担体には課題があり、完全長抗体精製におけるPA担体のような優れた高性能アフィニティー担体が存在しない。多様な技術を駆使した次世代型抗体医薬品開発の活性化が進む中で、精製工程プロセス開発の簡略化に対応できる高機能な低分子化抗体精製用アフィニティー担体が期待されている。筆者らは、野生型のPLおよびPGの弱点を克服することで、プラットフォームに適した低分子化抗体精製用の高機能新規アフィニティー担体の開発を行い、それらの製品化を行ってきた。

### 高機能プロテインL担体の開発

野生型のPLはκ型軽鎖VL領域の相対的高い領域に結合するが、κ型であっても抗体種ごとに結合能に大きな差があり、PL担体の吸着容量がターゲットごとに大きく異なることが課題となっていた。筆者らは、より広範囲な抗体種に対して高い結合能を有する新規PLリガンドの開発を目指し、分子設計と性能評価を繰り返すことで、評価に用いた複数のFabに対する結合能のばらつきがもっとも小さいPL改変体をリガンド候補として取得した。このPL改変体をセルロース基材に固定化し、高機能PL担体であるKANEKA KanCap™ Lを開発した(以下、KanCap L)。2種類のFabとDiabodyに対する動的結合容量(dynamic binding capacity: DBC)を市販のPL担体と比較した結果、いずれの分子種に対しても、KanCap Lは市販のPL担体と比較して有意に高いDBCを示した(図3)。特にFab(B)は、市販のPL担体での精製が困難であったが、KanCap Lは約20 mg/mL-gelのDBCを示し、アフィニティー精製を含む効率的な精製プロセスの構築が可能であることが分かった。

次に、Fabの生産時に不純物としてその除去が課題となる軽鎖モノマー/ダイマーの除去性能の評価を行った。Fabを組換え生産した酵母培養上清をKanCap Lに負荷し、溶出条件のスクリーニングを行った。中性pHの吸

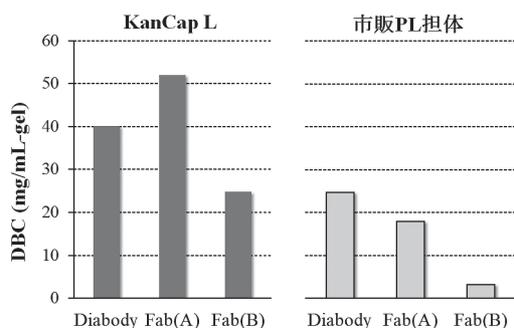


図3. KanCap Lと市販PL担体のDBCの比較

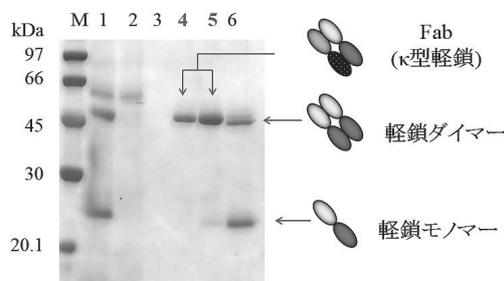


図4. KanCap Lを用いたFabと軽鎖モノマー/ダイマーの分離。[SDS-PAGE (非還元条件) M: マーカー, 1: 培養液上清, 2: 負荷画分, 3: 洗浄画分, 4: 溶出画分1 (pH 3.1), 5: 溶出画分2 (pH 3.1), 6: 溶出画分3 (pH 2.5)].

着条件では、Fabと軽鎖モノマー/ダイマーのいずれもがKanCap Lに吸着するが、最適化した溶出pHによるステップワイズ溶出でFabと軽鎖モノマー/ダイマーを効果的に分離可能であった(図4)。これは、KanCap Lリガンドが野生型のPLよりもκ型軽鎖に高い結合能を有することで、軽鎖の数により各分子種の分離精製が可能となったことによるものと考えられた。また、κ型軽鎖の数に依存した分離能は、κ型軽鎖とλ型軽鎖を含む二重特異性抗体の精製への応用など、既存のPL担体やPA担体では不十分であった分離精製に適用可能であると期待できる。

### 高機能プロテインG担体の開発

野生型PGは、Fc領域への結合に加えCH1領域への結合能を有するが、その結合が弱いために一般的にはFabの精製には使用困難と考えられている<sup>6)</sup>。そこで筆者らは、ヒトFab(CH1)への結合能が向上した新規PGリガンドの開発を行った。PG改変体ライブラリーを設計し、再構成型無細胞タンパク質合成系を用いた*in vitro*スクリーニング法(“PUREfex® RD”システム; ジーンフロンティア株式会社)により、野生型PGと比較してCH1領域に対する結合能(結合定数:  $K_A$ )のアフィニティーマチュレーションを行った。CH1領域への結合能が向上した複数のPG改変体を取得し、その配列解析により変異部位の特定を行った(図5)。

特定した複数の変異の組合せ評価を行い取得したPG改変体をリガンドとしてセルロース基材に固定化し、高機能PG担体であるKANEKA KanCap™ Gを開発した(以下、KanCap G)。3種類のFab(ヒト化IgG, キメラIgG, ヒトポリクローナルIgG由来)に対するDBCを市販のPG担体(2種類)およびCH1領域へ特異的に結合能する重鎖抗体断片VHHをリガンドとした担体(以下、VHH担体)と比較した(図6)。その結果、いずれのFabに対してもKanCap Gは市販担体と比較して有意に高いDBCを示し、KanCap GはFabの効率的な精製プロセス

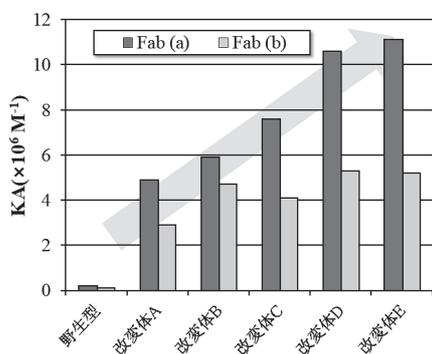


図5. *In vitro*スクリーニングにより取得したPG改変体とFabへの結合能

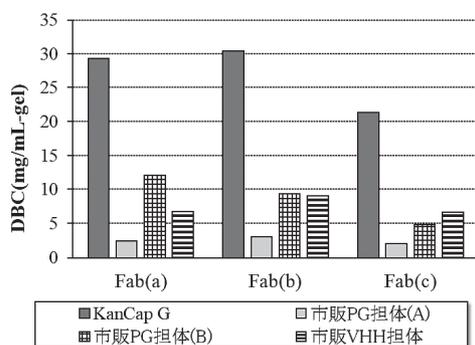


図6. KanCap Gと市販PG担体、市販VHH担体との比較

の構築に汎用的に使用可能であることが分かった。

次に、組換え酵母を用いて生産したFabの効率的な精製法の開発検討を実施した。組換え酵母培養上清中にはFabの他に軽鎖モノマー/ダイマーが存在するが<sup>7)</sup>、KanCap GはCH1領域に結合し軽鎖モノマー/ダイマーは吸着しない。よって、これら不純物は、負荷時に非吸着画分で除去され、それに続く洗浄、溶出ステップで高純度、高収率にFabの精製が可能であった(図7)。

また、KanCap Gは、CH1領域に結合するため、κ型軽鎖およびλ型軽鎖を有する両Fabを精製可能であると期待できる。λ型軽鎖を有するFabを大腸菌の菌体破碎液上清に混合したモデル負荷液を調製し、KanCap Gを用いた精製評価を実施した。非常に夾雑物が多い負荷液からでも、ワンステップでFabの高純度精製が可能であった(図8)。

### おわりに

筆者らはタンパク質アフィニティリガンドの分子設計と改変体スクリーニング技術を駆使し、従来のPL担体およびPG担体の課題を克服した高機能担体として、KANEKA KanCap™ LおよびKANEKA KanCap™ Gを開発した。これらの担体の使用により、低分子化抗体だけでなく、二重特異性抗体などの次世代抗体の製造プ

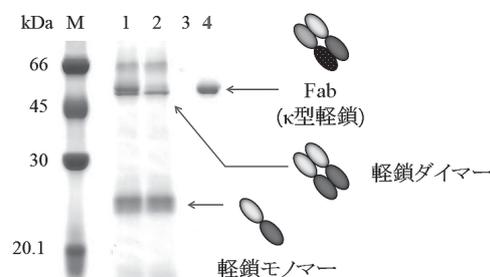


図7. KanCap Gを用いたFabと軽鎖モノマー/ダイマーの分離。[SDS-PAGE (非還元条件) M: マーカー, 1: 培養液上, 2: 負荷画分, 3: 洗浄画分, 4: 溶出画分]。

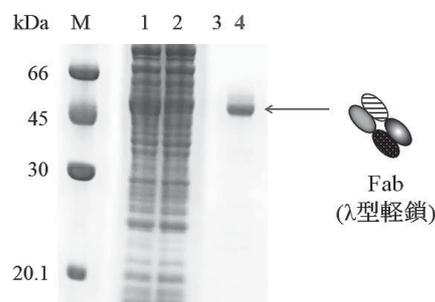


図8. KanCap Gを用いたFab (λ型軽鎖)の精製。[SDS-PAGE (非還元条件) M: マーカー, 1: 培養液上清, 2: 負荷画分, 3: 洗浄画分, 4: 溶出画分]。

ロセス構築に関し、アフィニティ精製をキャプチャー工程とするプラットフォーム化プロセスの開発が可能となると期待できる。これらの成果により、次世代抗体医薬品の研究開発期間およびプロセス開発期間の短縮・加速が可能となり、優れた医薬品の早期開発を可能とすることで世界の健康に貢献していきたい。

### 謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の（課題番号JP18ae0101057）の支援によって行われた。

### 文 献

- 1) Ecker, D. M.: *mAbs*, **7**, 9 (2014).
- 2) Strohl, W. R.: *Protein Cell*, **9**, 86 (2018).
- 3) Reichert, J. M.: *mAbs*, **7**, 1 (2015).
- 4) Nilson, B. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 2234 (1992).
- 5) Erntell, M. et al.: *Mol Immunol.*, **25**, 121 (1992).
- 6) Proudfoot, K. A. et al.: *Protein. Expr. Purif.*, **3**, 368 (1992).
- 7) 小林和男ら：生物工学, **86**, 390 (2008).