

論文内容要旨

デプスろ過膜を用いた抗体医薬品の
完全フロースルー精製に関する研究

主指導教員：太田 茂教授

(医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学)

副指導教員：紙谷 浩之教授

(医歯薬保健学研究科 核酸分析化学)

副指導教員：古武 弥一郎准教授

(医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学)

山田 剛士

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【序論】

抗体関連医薬品は、その特異性の高さから有効性・安全性に優れているが高価であり、医療費の増大という課題の中で重要な問題となってきた。抗体関連医薬品の生産過程では、宿主細胞由来タンパク質（HCP）や抗体の重合体（HMWs）が不純物として生じるが、一般的に医薬品品質としてそれぞれ 100 ppm 未満、5%未満での管理が求められる。これらは抗体と性質が似ていることから精製の難易度が高い。そのため抗体精製には、その使用実績と堅牢性の高さからプラットフォームプロセス（PF）と呼ばれるプロセスで精製されることが多い。通常、PF は、細胞分離、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、ウイルス不活化、2 段階の Polishing クロマトグラフィー、ウイルス除去、濃縮緩衝液置換の順に実施されている。しかしながらこの PF を用いるとコストがかかるため、抗体医薬品の価格を下げるためには革新的な精製プロセスが必要である。本研究では、新たな精製法としてろ過法の一つであるデプスろ過法に着目した。デプスろ過膜は、PF で細胞分離や清澄化に実績があり、弱いながらも不純物吸着性能を有していることが報告されている。これらの知見を基に、デプスろ過膜が有する不純物除去性能を高めることが出来れば、抗体医薬品精製法に適用し、革新的な精製プロセスが構築出来ると考え、研究を行った。

【方法】

使用サンプル：CHO 細胞で生産した IgG1 抗体を含む酸沈殿処理培養上清を用いた。

デプスろ過：Merck 社の Millistak+ A1HC デプス膜（A1HC）または 3M 社の Zeta Plus EXT デプス膜（EXT）を用いた。

完全フロースルー精製：A1HC、EXT、Zeta Plus activated carbon デプス膜（AC）、Toyopearl NH2-750F 陰イオン交換カラム（NH2）の順に通液した。

抗体濃度分析：Protein A column を使い、HPLC で分析した。

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）：G3000SWXL columns を使い、HPLC で分析した。

HCP 濃度分析：ELISA 法で分析した。

【結果・考察】

・デプス膜による不純物除去性能の改良

培養上清に対し、限外ろ過膜を用いて 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に緩衝液置換（DFS）すると、デプス膜への HCP 吸着性能が飛躍的に向上することが明らかになった。また、HMWs も、

緩衝液置換により飛躍的な除去性の向上が確認された。緩衝液置換によって除去性が向上したことから、デプス膜の有する静電的相互作用が増強されたことが原因と考えられた。

・デプス膜の組み合わせ効果

2種のデプスろ過膜（A1HC 及び EXT）を組み合わせ、2段階処理を行い、その不純物除去性の確認を行った。その結果、同じデプスろ過膜よりも異なるデプスろ過膜を組み合わせの方が、不純物除去性能が高いことが明らかになった。この結果は、それぞれのデプスろ過膜が異なる集団の不純物を除去している可能性を示している。

・完全フロースループロセス

不純物含量や抗体種が異なる3種のDFSを用い、A1HC 及び EXT の組み合わせに加え、フロースルーモード精製が可能である活性炭デプスろ過（AC）や陰イオン交換精製（NH₂）を実施し完全フロースループロセスの検証を行った。その結果、いずれのDFSを用いた場合でも、安定的に医薬品品質を達成できることが確認できた。この結果から、完全フロースループロセスが、不純物含量や抗体種に対する汎用性、医薬品品質に対する堅牢性を有することが確認できた。一方、収率はプラットフォームプロセスと比較すると低い値を示したため、収率の改善は課題である。収率改善のアプローチとしては、pHの最適化が効果的である可能性を見出している。

・完全フロースループロセスがもたらす効果

完全フロースルー精製では、プロセス自体が飛躍的にシンプルになり、以下の様なメリットが生じる。①連続精製が可能になることから、中間体保管用タンクやクロマト装置の削減が可能、②緩衝液使用量の大幅な減少に伴い、緩衝液タンク、試薬の削減が可能、③連続化に伴い、作業時間が大幅に短縮可能。以上の様に、完全フロースループロセスは、抗体医薬品製造コストを大幅に低減できる可能性が確認された。

【結論】

デプスろ過膜の不純物除去性能を飛躍的に高める条件を見出すことに成功した。また、抗体の完全フロースルー精製が実現可能であることを検証し、抗体製造コストを大幅に削減出来る可能性を見出した。本研究を契機に、高まる医療費の増大抑制につながることを期待する。

【基礎となる原著論文】

T. Yamada et al., Journal of Chromatography B 1061–1062 (2017) 110–116