

# 博士論文

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

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科  
医歯薬学専攻  
生体機能分子動態学研究室

平成 25 年入学 山田 剛士  
主指導教員 太田 茂

# 目次

## 【略語一覧】

1 章 序論.....	1
1 節 医薬品市場の動向.....	1
2 節 バイオロジクス医薬品の薬価.....	2
3 節 抗体医薬品.....	3
4 節 抗体関連医薬品精製の難しさ.....	5
5 節 一般的な抗体医薬品の精製プロセス.....	7
1 項 プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー.....	8
2 項 Polishing クロマトグラフィー.....	8
3 項 抗体医薬品原薬の製造コストの到達点.....	9
6 節 画期的抗体医薬品精製法に必要な要素.....	11
1 項 抗体に使用可能な精製法.....	11
2 項 保持モードとフロースルーモードの比較.....	11
3 項 デプスろ過膜への可溶性不純物の吸着.....	12
2 章 デプスろ過膜を用いた完全フロースループロセスの構築.....	14
1 節 緒言.....	14
1 項 デプスろ過膜の不純物除去性能を向上させるアプローチ.....	14
2 項 バイオ医薬品製造で使用するデプスろ過膜.....	15
2 節 デプスろ過膜の不純物除去性能の改良.....	17
3 節 A1HC と EXT の不純物除去性能の違い.....	20
4 節 A1HC と EXT の組み合わせ効果.....	23
5 節 完全フロースループロセス.....	25
6 節 小括.....	27
3 章 完全フロースループロセスの収率改善.....	28
1 節 緒言.....	28
2 節 pH 最適化による収率の改善効果.....	29
3 節 その他の収率改善アイデア.....	30
4 節 小括.....	30
4 章 総括.....	31
【実験の部】.....	36
【引用文献】.....	40
【本論文の基礎となる原著】.....	45
謝辞.....	46

## 【略語一覽】

2D-PAGE : two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

A1HC : Millistak+ A1HC depth filters

AC : Zeta Plus activated carbon depth filter

ADCC : antibody dependent cellular cytotoxicity

BSA : bovine serum albumin

CDC : complement dependent cytotoxicity

CHO : chinese hamster ovary

DFS : diafiltrated supernatant

DSP : downstream process

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EXT : Zeta Plus EXT depth filters

FCCS : filtered cell culture supernatant

FcRn : neonatal Fc receptor

HCP : host cell protein

HMWs : high molecular weight species

Ig : immunoglobulin

mAb : monoclonal antibody

NH2 : Toyopearl NH2-750F anion-exchange resin

SEC : size exclusion chromatography

USP : upstream process

# 1章 序論

## 1節 医薬品市場の動向

先進国の多くで医療費の高騰が国の財政を圧迫していることが問題となっている。この高騰の背景には医薬品支出の増加が一因として挙げられる。世界の医薬品市場規模は年々拡大しており、2014年にはついに1兆ドルを超えるまでに至っている（図1）<sup>[1-3]</sup>。近年の世界の医薬品売上上位50品目に占めるバイオ医薬品売上高の推移をみると、2004年のバイオ医薬品比率は14.4%であったのに対し、2013年には45.4%となっており、驚くべき早さでバイオ医薬品市場が成長していることが分かる（図2）<sup>[3,4]</sup>。また、世界の医薬品売上上位10品目を見ると、2004年時点ではエリスロポエチン製剤が挙がるのみであったが、2014年には世界の医薬品売上上位10品目のうち、6品目がモノクローナル抗体あるいは抗体関連物質で占められている<sup>[5]</sup>。

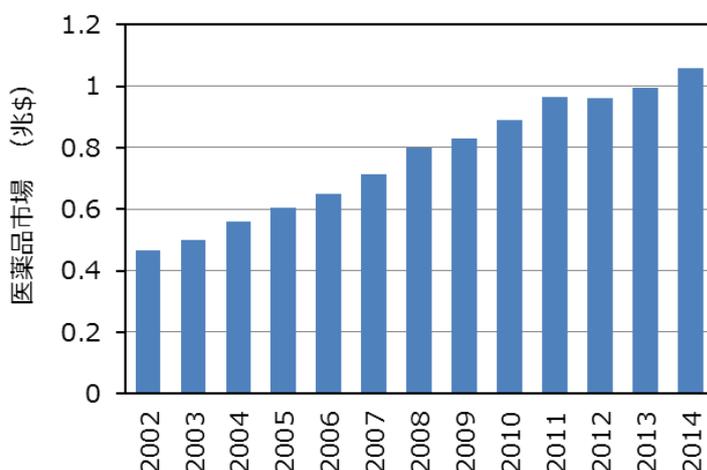


図1 医薬品市場の成長；漆原良一，明解 医薬品産業、医薬経済社、製薬協 産業ビジョン 2025 を参考に作成<sup>[2,3]</sup>

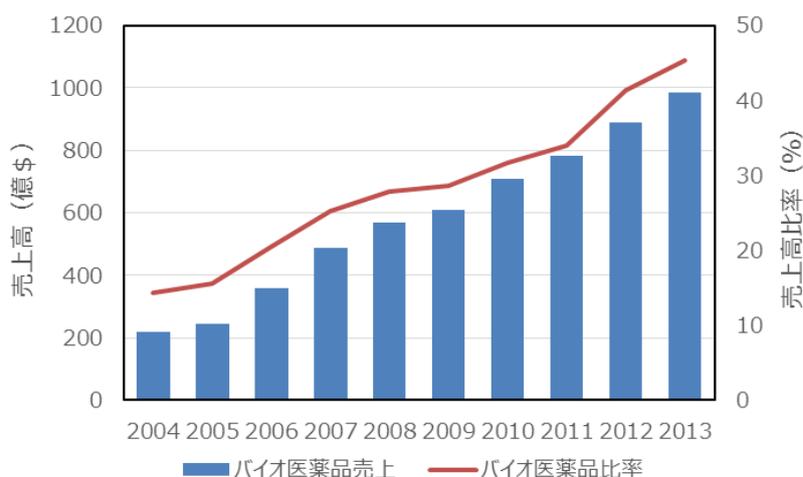


図2 世界上位50品目におけるバイオ医薬品売上高推移；製薬協 産業ビジョン 2025 を参考に作成<sup>[3]</sup>

## 2節 バイオロジクス医薬品の薬価

抗体医薬品の登場で医薬品作用機序の選択肢が増えたことにより、従来は治療がなく、満足できる治療効果が得られなかった疾患領域で患者が救えるようになったことは大いに歓迎すべきことである。一方、抗体医薬品による治療はその薬価が高額であるため医療経済的には憂慮すべき課題となっている。代表的な抗体医薬品、バイオロジクス医薬品、低分子医薬品の薬価を表1にまとめた<sup>[6]</sup>。実際に治療にかかる費用は疾患領域、投与方法、体重などによって変わってくるが、薬価から薬剤費の傾向を捉えることが出来る。抗体、タンパク質を含むバイオロジクス医薬品は低分子医薬品と比較して薬価が顕著に高いこと、バイオロジクス医薬品の中でも特に抗体医薬品の薬価は高いことがわかる。バイオロジクス医薬品の高いコストは、医療費の増大という課題の中で重要な問題となってきている<sup>[7]</sup>。

表1 代表的な医薬品の薬価

カテゴリ	医薬品	薬価(円) <sup>※</sup>
抗体	オブジーボ点滴静注100mg	364,925
抗体	リツキサソ注10mg/mL(500mg)	213,815
抗体	アバスチン点滴静注用400mg/16mL	158,942
タンパク質	グラン注射液M300	21,117
タンパク質	エスポー注射液3000シリンジ	1,800
低分子	ジャヌビア錠50mg	137
低分子	ミカルディス錠40mg	115
低分子	リリカOD錠150mg	155
低分子	リピトール錠10mg	99
低分子	アスピリン「バイエル」	3

※小数点以下は四捨五入した。

### 3節 抗体医薬品

抗体は生体の免疫機能を担う分子であり、5つのアイソタイプ（IgG、IgM、IgA、IgE、IgD）が存在する<sup>[8]</sup>。IgGはさらに4種のサブクラス（IgG1~4）に分類され、抗体医薬品としてはIgG1が最も多く用いられており、IgG4、IgG2が用いられることもある<sup>[9]</sup>。IgG1の模式図を図3に示した。IgG1は分子量約50,000の重鎖2本と分子量約25,000の軽鎖2本がジスルフィド結合によって連結された分子量約15,000の糖タンパク質である<sup>[10]</sup>。抗体には可変領域と定常領域と呼ばれる領域があり、可変領域で抗原（ターゲット）に結合する<sup>[11]</sup>。可変領域のアミノ酸配列は抗体によって多様であり、この多様性が様々な抗原に対して高い特異性を生み出す要因となっている。定常領域のうち、Fc領域は抗体機能に重要な領域であり、抗体依存性細胞障害活性（antibody dependent cellular cytotoxicity：ADCC活性）や補体依存性障害活性（complement dependent cytotoxicity：CDC活性）に関与している<sup>[11,12]</sup>。また、体内動態を制御する分子FcRnとの結合にもFc領域が重要である<sup>[8,12]</sup>。抗体はその特異性の高さから目的とする薬効が得やすく、副作用が生じにくい。また、抗原に応じて中和活性、アゴニスト活性、ADCC活性、CDC活性などの多くの活性を有しており、様々な機能を有している。更に、半減期もIgG1で3週間程度と長く、医薬品としては理想的な分子の一つである。このような特徴を有した抗体を、遺伝子組換え技術によって人工的に生産したものが抗体医薬品である。表2に示した通り、今日までに、多くの抗体医薬品が日本、アメリカ、欧州で認可されている<sup>[13]</sup>。

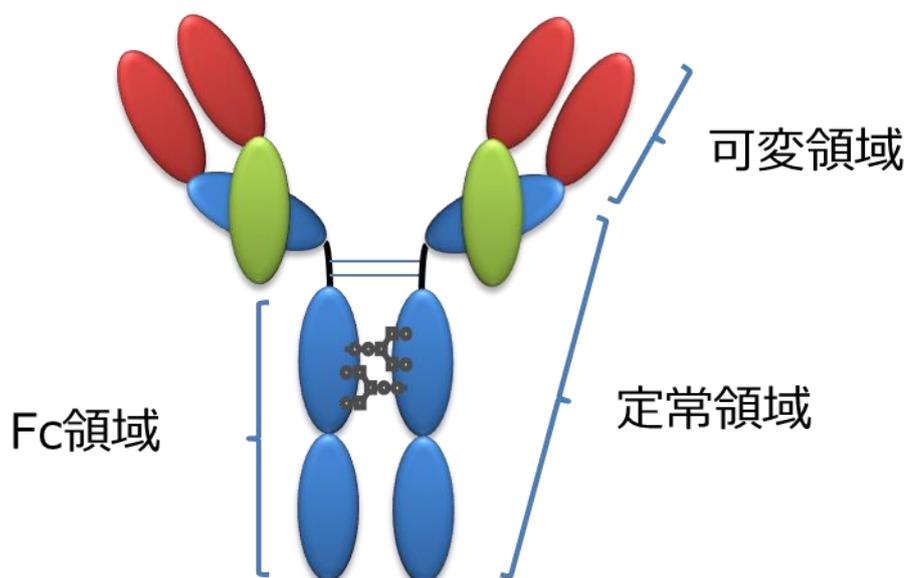


図3 IgG1抗体の模式図

表2 これまでに日米欧で認可された抗体医薬品； 国立医薬品食品衛生研究所 HP を参考に作成<sup>[13]</sup>

分類	商品名	構造	産生細胞
マウス抗体	Orthoclone OKT3	IgG2a	mouse hybridoma
	Zevalin	IgG1 $\kappa$ (MX-DTPA : 90Y標識)	CHO
	Zevalin	IgG1 $\kappa$ (MX-DTPA : 111In標識)	CHO
	Bexxar	IgG2a $\lambda$ (131I標識)	mammalian cell
	Removab	mIgG2a $\kappa$ , rIgG2b $\lambda$	rat/mouse bridoma
	Blincyto	scFv-scFv	-
キメラ抗体	ReoPro	IgG1 (Fab)	mammalian cell
	Rituxan/MabThera	IgG1 $\kappa$	CHO
	Simulect	IgG1 $\kappa$	Sp2/0
	Remicade	IgG1 $\kappa$	Sp2/0
	Erbix	IgG1 $\kappa$	Sp2/0
	Adcetris	IgG1 (MMAE修飾)	CHO
	Sylvant	IgG1 $\kappa$	CHO
	Unituxin	IgG1 $\kappa$	Sp2/0
	Anthim	IgG1 $\kappa$	-
	Zinbryta	IgG1 $\kappa$	NS0
ヒト化抗体	Synagis	IgG1 $\kappa$	NS0
	Herceptin	IgG1 $\kappa$	CHO
	Mylotarg	IgG4 $\kappa$ (カリケアマイシン修飾)	NS0
	Campath	IgG1 $\kappa$	CHO
	Xolair	IgG1 $\kappa$	CHO
	Raptiva	IgG1 $\kappa$	CHO
	Avastin	IgG1 $\kappa$	CHO
	Tysabri	IgG4 $\kappa$	NS0
	Actemra	IgG1 $\kappa$	CHO
	Lucentis	IgG1 $\kappa$ Fab	E. Coli
	Soliris	IgG2/4 $\kappa$	NS0
	Cimzia	Fab' +PEG	E. Coli
	Poteligeo	IgG1 $\kappa$	CHO
	Perjeta	IgG1 $\kappa$	CHO
	Kadcyla	IgG1 $\kappa$ (メイタンシン修飾)	CHO
	Gazyva	IgG1	CHO
	Entyvio	IgG1	CHO
	Keytruda	IgG4 $\kappa$	-
	Praxbind	IgG1 Fab	CHO
	Nucala	IgG1 $\kappa$	CHO
	Empliciti	IgG1 $\kappa$	NS0
	Taltz	IgG4	CHO
	Cinqair	IgG4 $\kappa$	NS0
	Tecentriq	IgG1 $\kappa$ (N298A)	CHO
Ocrevus	IgG1	-	
ヒト抗体	Humira	IgG1 $\kappa$	CHO
	Vectibix	IgG2 $\kappa$	CHO
	Simponi	IgG1 $\kappa$	Sp2/0-Ag14
	Stelara	IgG1 $\kappa$	Sp2/0
	Ilaris	IgG1 $\kappa$	Sp2/0-Ag14
	Arzerra	IgG1 $\kappa$	NS0
	Prolia/Xgeva ランマーク	IgG2	CHO
	Yervoy	IgG1 $\kappa$	CHO
	Benlysta	IgG1 $\lambda$	NS0
	Raxibacumab	IgG1 $\lambda$	murine cell
	Cyramza	IgG1	NS0
	Opdivo	IgG4	CHO
	Cosentyx	G1/ $\kappa$	CHO
	Repatha	IgG2	CHO
	Prauluent	IgG1	CHO
	Portrazza	IgG1 $\kappa$	NS0
	Darzalex	IgG1 $\kappa$	CHO
	Lumicef, Siliq	IgG2 $\kappa$	CHO
	Lartruvo	IgG1	NS0
	Zinplava	IgG1	CHO
	Bavencio	IgG1 $\lambda$	CHO
	Imfinzi	IgG1 $\kappa$	CHO
	Dupixent	IgG4	CHO

#### 4節 抗体関連医薬品精製の難しさ

抗体関連医薬品は、その構造の複雑さから合成法による製造が困難である。そこで、現状では動物細胞を用いた生産が一般的であり、多くは扱いやすさや医薬品製造実績からチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）が用いられている。ところが、動物細胞を用いて生産すると、培地由来の数十～百種程度の成分、宿主細胞由来タンパク質（HCP）や宿主細胞由来 DNA が混入する。CHO 細胞の場合、その遺伝子は 24,000～30,000 あると言われており、検出方法として一般的な二次元電気泳動（2D-PAGE）で培養上清を解析した場合（図 4）、数百から千種程度の HCP が混入していることが確認されている<sup>[14-17]</sup>。このように、動物細胞を用いて生産すると、多くの不純物が混入するため、目的物質を精製する難易度が高くなる。特に、HCP はその免疫原性への懸念から優先的除去対象とされており、医薬品品質として 100 ppm 未満でのコントロールが求められている<sup>[18,19]</sup>。HCP の単位に用いられている「ppm」は単位抗体量当たりの HCP 量を意味しており、「ng/mg-mAb」と表記されることもある。つまり、HCP 濃度 100 ppm とは、抗体に対して HCP が 0.01% 程度しか残存していないことを意味している。

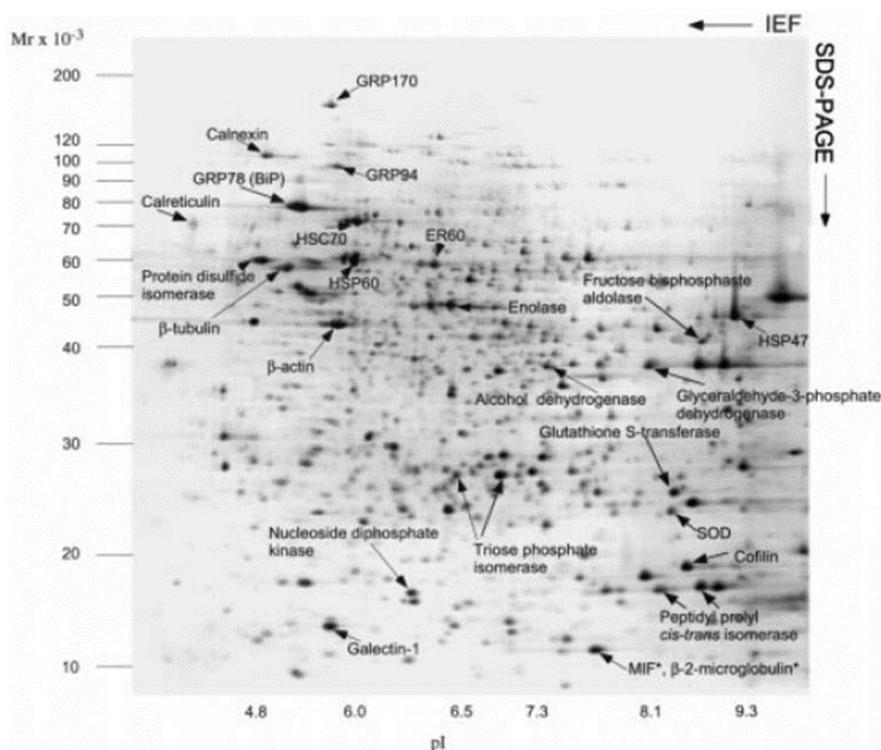


図 4 HCP の代表的な 2D-PAGE ; Champion et al., Electrophoresis, 20 (1999)より引用<sup>[17]</sup>

また、生産された抗体は単一ではなく、多様性があることが知られている<sup>[20]</sup>。一般的に、抗体を生産すると、重合体、ピログルタミン酸化、デアミデーション体、酸化体、切断体、C 末リジン切断体などが生じる<sup>[20]</sup>。これらに加え、Fc 領域に付加する糖鎖にも多様性があり、これらが含まれることで生産された抗体は不均一な集団となっている<sup>[20]</sup>。理想的には単一の成分となるように調製されることが医薬品として望ましいが、現状の生産技術では不可能である。多くのバリ

アントは薬効、動態、安全性に影響がないため、抗体医薬品の製造では、特に安全性への影響が懸念される集団を精製で除去し、残りはその組成比を維持する形で抗体医薬品の品質は管理されている。安全性に影響を与えるバリエーションの代表は免疫原性のリスクが高いとされている重合体であり、優先的な除去対象となっている<sup>[10]</sup>。一般的に重合体の医薬品目標品質は5%未満とされている<sup>[18,19]</sup>。実際には、多くの市販抗体の重合体含量は1%未満で管理されていることが多い<sup>[9]</sup>。重合体は目的抗体が会合した物質であり、目的抗体と極めて近い性質を有していることから、除去は容易ではない。一般的に、重合体含量はサイズ排除クロマトグラフィー分析の高分子量体（High molecular weight species : HMWs）で管理される。

抗体は物理的耐性が比較的強い方ではあるが、一般的にタンパク質は熱や酸、アルカリに弱く、変性しやすい物質である。また、HCPや重合体などの精製除去対象は、目的抗体と同じくタンパク質であり、その基本的性質は類似している。これらの制約により、選択可能な精製法は限定される。その中で効果的な精製方法を見出し、効果的な精製プロセスを構築する必要がある。

## 5 節 一般的な抗体医薬品の精製プロセス

抗体同士の特性は類似点も多いことから、複数の医薬品候補抗体を迅速かつ効果的に開発していくため、図 5 に示すようなプラットフォームプロセスと呼ばれる一般化された手順で精製されることが多い。抗体医薬品のプラットフォームプロセスは、その精製難易度の高さから、基本的にカラムクロマトグラフィーを主体とした複雑なプロセスとなっている。典型的には細胞分離、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<sup>[21-25]</sup>。カラムクロマトグラフィーは、樹脂投資コストの低減のため、あるいはカラムサイズの限界により、1 製造当たり複数サイクルに分けて実施されるまた、クロマトグラフィー前に pH や導電率調整を行うことも多く、個々のステップで回収タンクが必要となる。

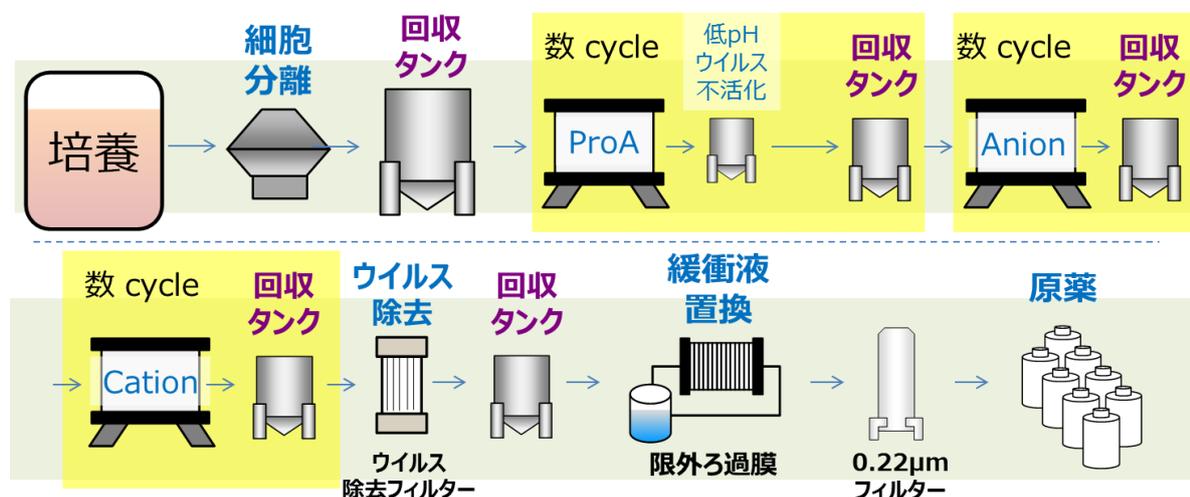


図 5 典型的な抗体プラットフォームプロセス；ProA：プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、Anion：陰イオン交換クロマトグラフィー、Cation：陽イオン交換クロマトグラフィー

## 1 項 プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー

プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーは、Protein A というタンパク質が抗体の Fc 領域に特異的に結合する性質を利用したアフィニティー精製法である。Protein A は、*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）の細胞壁に存在する 46.7 kDa のタンパク質であり、塩酸やグアニジン、尿素などの強い変性剤を用いても活性が保持されるため、樹脂の再生が可能である。近年用いられているプロテイン A 樹脂には、遺伝子組み換え技術によって特異性はそのままにアルカリ耐性を有した改変体が用いられることが多い。

プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーは、その精製純度や収率の高さ、医薬品に使用された実績から、抗体医薬品精製に広く用いられている<sup>[26]</sup>。ところが、プロテイン A 樹脂には、一般的なイオン交換樹脂の 30 倍にも及ぶその高い担体価格（～200 万円/L 樹脂）に起因した高い製造コストの他<sup>[27,28]</sup>、溶出プロテイン A の抗原性などの課題がある。プロテイン A 樹脂は通常、投資コスト削減を目的に、数十から数百回再利用して用いられる<sup>[29,30]</sup>。

## 2 項 Polishing クロマトグラフィー

Polishing クロマトグラフィーは、最初の精製工程（プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーなど）で残存した不純物を医薬品品質まで磨き上げるクロマトグラフィーの通称である。抗体医薬品の精製では、表 3 に示した陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーから、除去する不純物の特性に応じて 2 種を選択されることが多い<sup>[31]</sup>。これらは、プロテイン A 樹脂と比較すると安価ではあるが、プロテイン A 樹脂と同様に、再利用して使用することが可能である<sup>[32]</sup>。

表 3 Polishing クロマトグラフィー

	保持または分配機構	代表例
陽イオン交換クロマトグラフィー	静電的相互作用	カルボキシメチル (CM) スルホプロピル (SP)
陰イオン交換クロマトグラフィー	静電的相互作用	ジエチルアミノエチル (DEAE) 第四級アミノエチル (Q)
疎水性クロマトグラフィー	疎水性相互作用	ブチル フェニル
吸着クロマトグラフィー	水素結合 ファンデルワールス引力など	ハイドロキシアパタイト

### 3 項 抗体医薬品原薬の製造コストの到達点

製造コストの試算は、設備稼働率（年間生産量）、タイター（培養液中の抗体濃度）、製造プロセス、製造設備、労働環境などの前提によって大きく変動するが、全ての前提条件が報告されていることは少ないため、その値の解釈には注意を払う必要がある。以下に、参考情報として最適化を行った際の 1g 当たりの抗体医薬品製造コスト試算について 2 つの知見を紹介する。

Kelley は、5g/L のタイターで、15 t 生産培養槽 6 基を用い、1 精製ラインでプラットフォームプロセスにより生産した製造コストの試算で、ブロックバスタークラスの供給量となる年間 10 t の抗体医薬品原薬を生産したケースで \$20~23/g、年間 1 t の抗体医薬品原薬を生産したケースで \$53~110/g、年間 100kg の抗体医薬品原薬を生産したケースで \$345~1,010/g と報告している<sup>[21]</sup>。また、Walther らは、5g/L のタイターの条件で、10 t 生産培養槽 2 基を用いて年間 1537 kg の生産したケースで \$22/g と報告している<sup>[33]</sup>。両者の試算は設備のスケールが異なるため、一概に比較は出来ないが、それぞれの設備稼働率を最大に発揮したケースで \$20/g 程度と同程度であることから、この辺りが現状プラットフォームプロセス製造コストの限界と考えられる。また、平均的な抗体必要生産量が年間 100~200 kg 程度であることから、一般的な抗体医薬品では最適化しても \$345~1,010/g 程度の製造コストがかかることがわかる<sup>[21]</sup>。更に、表 4 に示す通り、原薬製造コストに占める設備投資コストの割合は 24~50% と高い<sup>[21]</sup>。製造コストを下げるためには使用する消耗品や原材料だけでなく、設備投資コストの削減も合わせて考えていく必要がある。

表 4 製造コストに占める設備投資コストの割合

		Model large-scale plant	Small-scale plant using disposables
設備費 /total cost %	10 ton/yr	25	—*
	1 ton/yr	45	24
	0.1 ton/yr	50	36

\*計算上算出は可能であるが、製造バッチ数が非現実的であるため割愛

バイオ医薬品製造においては、その作業の性質の違いから、凍結細胞ストックの溶解から拡大培養、生産培養、細胞分離までの Upstream process (USP)、精製から原薬取得までの downstream process (DSP) で区切ることが可能である。Farid は、USP と DSP のコストはタイターが 0.1 g/L の仮定で 55 : 45、タイターが 1 g/L の仮定で 30 : 70 と報告している<sup>[34]</sup>。タイターが高くなると DSP のコスト比率が高くなる原因は、主に以下の 2 点である。一点目は、タイターの向上に伴って単位培地当たりの生産物が増加するため、相対的に培地の単位抗体グラム当たりのコストは低下し、USP コストを低減出来ることにある。もう一点は、抗体精製に必要な樹脂量や緩衝液量は精製する抗体量に比例して多くなる、つまり、タイターの向上に伴ってむしろ 1 製造当たりの DSP コストが高くなることにある。近年のタイターは、図 6 に示す通り、培養技術などの進歩により 5~10 g/L に到達しており、USP と DSP コスト比はさらに DSP に傾くことが想

定される<sup>[35]</sup>。また、タイターを向上させるために細胞密度も増加している事実もあり、これによって夾雑物も増加することから、精製の難易度が益々高くなってきている。

抗体医薬品製造の低コスト化においては、既にタイター向上の効果は小さくなっており、むしろ DSP コストの低減について考える必要がある。しかしながらプラットフォームプロセスを用いている限り、どれだけ最適化を実施しても樹脂の性能に限界があるため、著しいコスト削減は期待出来ない。 $\$20/\text{g}$  という原薬生産コストの壁を超えるためには、抗体精製方法の革新的な改良が必要となる。

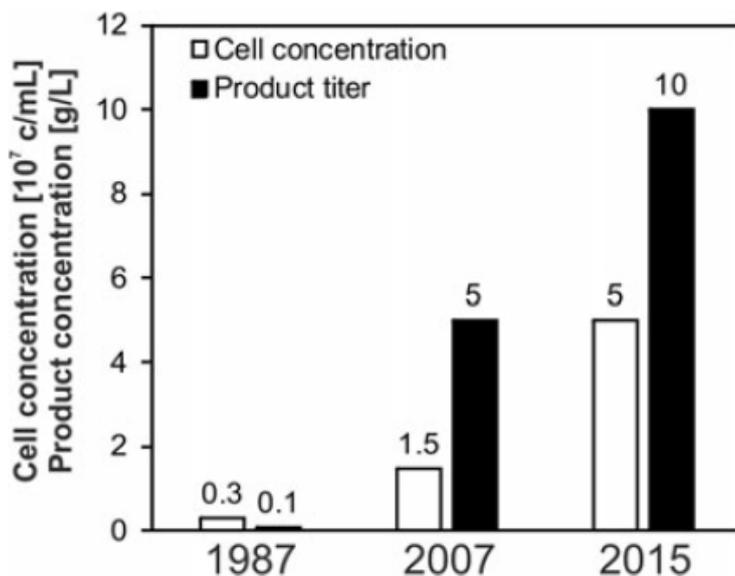


図6 技術の進歩に伴うタイター及び細胞密度の推移 ; Kunert et al., Appl. Microbiol Biotechnol., 100 (2016) より引用<sup>[35]</sup>

## 6節 画期的抗体医薬品精製法に必要な要素

### 1項 抗体に使用可能な精製法

先述の通り、抗体は極めて安定なタンパク質の一つと言われているが、タンパク質である以上、高温や強酸、強アルカリ条件、有機溶媒への暴露によって不可逆的に変性するため、精製法には制約が生じる。一般的に、タンパク質の精製にはカラムクロマトグラフィーが用いられるが、抗体においても例外ではない。先に示したプラットフォームプロセスでも、カラムクロマトグラフィーが精製の中心を担っている。しかしながら、精製法としては、細胞分離やウイルス除去、最終ろ過に用いられているように、ろ過法も実績があり、利用することが可能である。また、限外ろ過膜を用いた低分子量不純物除去も利用可能である。

### 2項 保持モードとフロースルーモードの比較

精製には図7に示す通り、2つのモードが存在する<sup>[36-39]</sup>。一つは目的物を保持する保持モードであり、ポジティブモードとも呼ばれる。サンプルをレジンなどの固定相（担体）に通液して目的物を吸着させ、洗浄緩衝液を通液して不純物を洗いながした後、溶出緩衝液で目的物を溶出させる手法である。プラットフォームプロセスでは、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーや陽イオン交換クロマトグラフィーなどがこれに該当する。もう一つはフロースルーモードであり、ネガティブモードとも呼ばれる。サンプルを固定相に通液して不純物を吸着させ、目的物は固定相に吸着せず、そのままフロースルーとして回収する手法である。プラットフォームプロセスでは、陰イオン交換クロマトグラフィーやろ過がこれに該当する。フロースルーモードの方がシンプル且つ簡便な手法であり、適用が可能であれば選択することが好ましい。

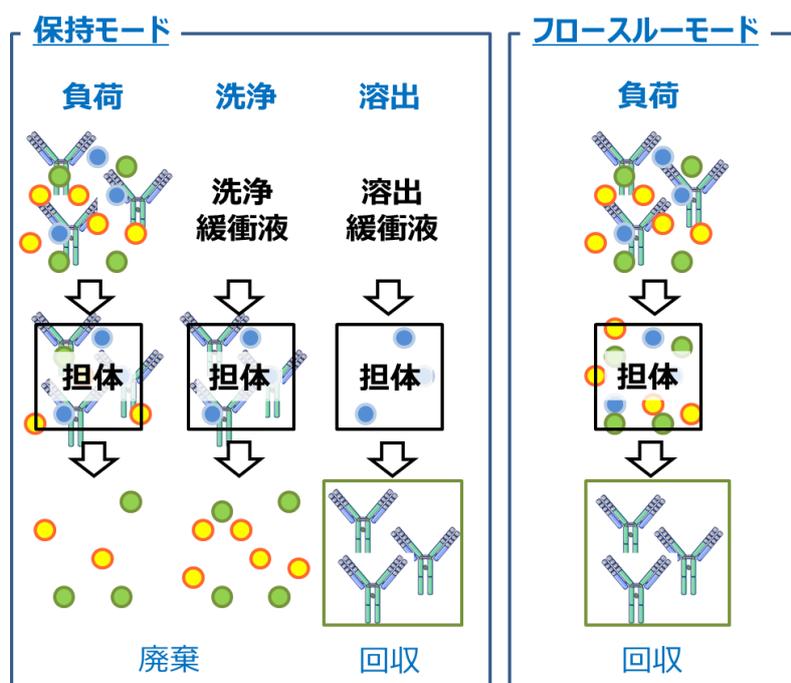


図7 保持モードとフロースルーモード

### 3項 デプスろ過膜への可溶性不純物の吸着

フローモードの中でもろ過法は安価で簡便な手法である。図 8 に示す通り、ろ過法には大きく分けて 2 種類存在する。一つ目は精密ろ過法と呼ばれる手法で、均一な孔を有する膜にサンプルを通液することで、孔のサイズより大きな粒子を膜表面に保持し、孔より小さな粒子を通過させる方法である。もうひとつは深層（デプス）ろ過法と呼ばれる手法であり、セルロースなどの繊維を層状に圧縮したデプスろ過膜にサンプルを通液することで、膜表面だけではなく、内部でも粒子を保持することが可能である。精密ろ過膜は、分離精度が高い半面、閉塞しやすいという特徴を持ち、ろ過滅菌などに用いられることが多い。デプスろ過膜は、分離精度はやや劣る一方で、ろ過性が高く、閉塞しにくいという特徴を持ち、細胞分離や溶液の清澄化に用いられる。これらのろ過法は何れも、細胞、細胞破砕物、ウイルス、不溶性粒子など、粒子を除去する目的で用いられているが、精製に用いる上では、閉塞しないという点はとても重要であり、この観点でろ過法を精製法として選択する際にはデプスろ過法の方が好ましいと考えられる。

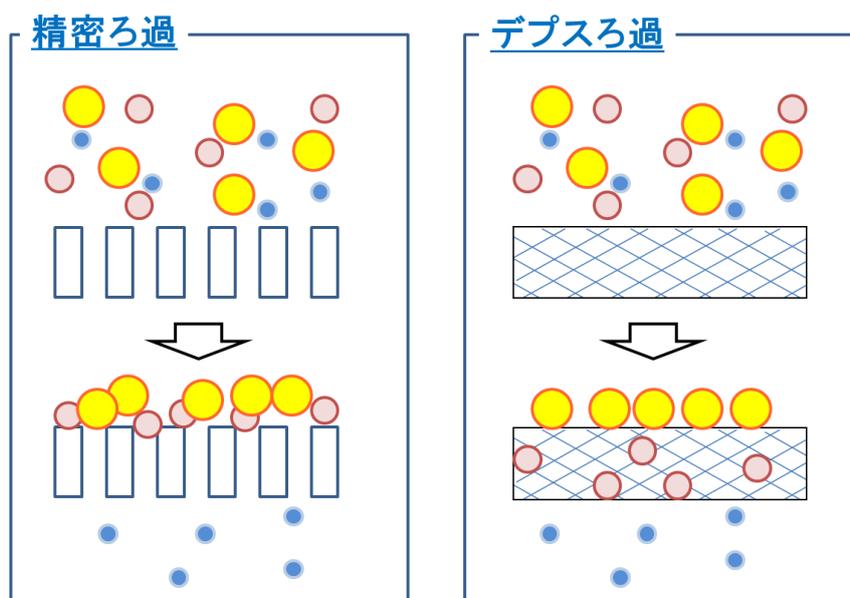


図 8 精密ろ過とデプスろ過

近年、デプスろ過膜において、粒子を除去する性質以外に、可溶性不純物を吸着する性質も有していることが報告されている。Yigzaw らは、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー前に実施するデプスろ過の効果について検証している<sup>[40]</sup>。その結果、図 9 に示す通り、プロテイン A 回収液において、デプスろ過膜への負荷量依存的に HCP 濃度が低減できることを示している。また、培養上清をデプスろ過膜に通液することで DNA 濃度も低減できることを示している。なお、培養上清をデプスろ過膜に通液しただけでは HCP 濃度はほとんど変化していないことも報告している。このことは、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーで除去できない HCP がデプスろ過膜処理により選択的に除去されていることを示している。

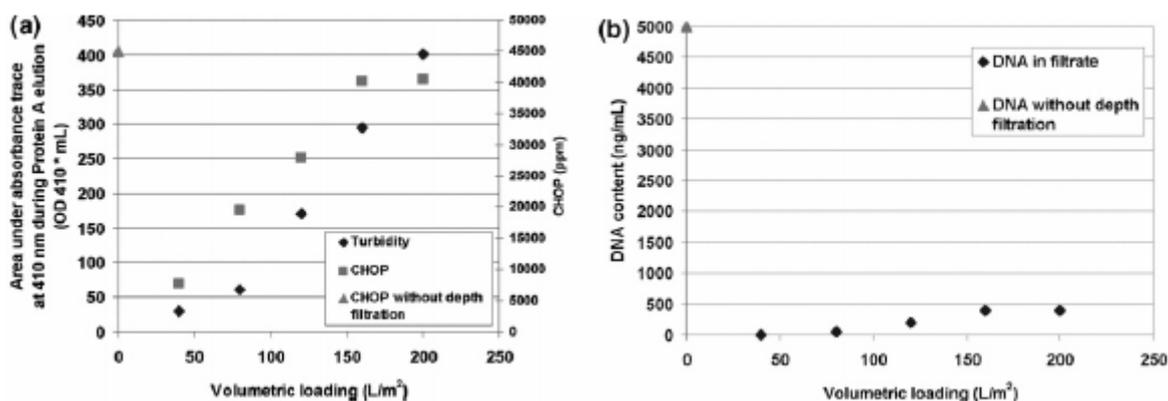


図9 デプスろ過膜による HCP 及び DNA の除去効果 ; Yigzaw et al., Biotechnol. Prog., 22 (2006) より引用<sup>[40]</sup>

Roush らは、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー後、低 pH ウイルス不活化液をデプスろ過膜に通液することで、9~17%の HCP が除去されることを報告している<sup>[41]</sup>。また、Yigzaw らと同様に、培養上清をデプスろ過膜に通液することで DNA 濃度も低減できることを示している。

Schreffler らは、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー後、低 pH ウイルス不活化液をデプスろ過膜に通液することで、HCP が除去されることを、1000 L 培養スケールで検証し、Polishing 工程の陰イオン交換クロマトグラフィーの代替になることを証明している<sup>[42]</sup>。

デプスろ過法は、抗体精製に用いることが可能な精製手法の一つであること、抗体精製に既に用いられており医薬品製造にすぐに適用可能であること、ろ過法はフロースルーモードであり精製手法としてシンプル且つ簡便であること、そして精密ろ過法と比較してろ過性が高く、精製手法として適用しやすいことなど、抗体精製において有用な特徴と実績を十分に有している。一方で、これまでの知見はデプスろ過膜に可溶性不純物を除去する性質があることを示しているが、その使われ方はプラットフォームプロセスの延長上であり、抗体精製プロセスの革新的な改良には至っていない。この原因としては、HCP 除去性が限定的であり、精製により培養上清から十分に低減されて以降の工程でしか効果的に利用できないことにある。

本研究は、革新的な抗体医薬品精製プロセスを構築することを目的に、デプスろ過に着目して研究を行った。

## 2章 デプスろ過膜を用いた完全フロースループロセスの構築

### 1節 緒言

#### 1項 デプスろ過膜の不純物除去性能を向上させるアプローチ

先述の通り、デプスろ過膜による可溶性不純物の吸着はいくつか報告はあるが、その吸着能はクロマトグラフィーを置き換えるほど高くはなく、このままでは抗体精製法として用いることは困難である。そこで、吸着能を高めるためのアプローチをその吸着メカニズムを基に立案した。Yigzaw らは、BSA (bovine serum albumin) に塩化ナトリウムやエタノールを添加してデプスろ過膜に通液することで、相互作用について検証している<sup>[40]</sup>。図 10 に示した通り、これらの添加により、BSA 吸着量が減弱したことから、デプスろ過膜によるタンパク質の吸着には静電的相互作用と疎水性相互作用が関与していることがわかる。また、エタノール添加よりも塩化ナトリウム添加において吸着が大きく減弱したことから、疎水性相互作用よりも静電的相互作用の寄与率が高いことがわかる。

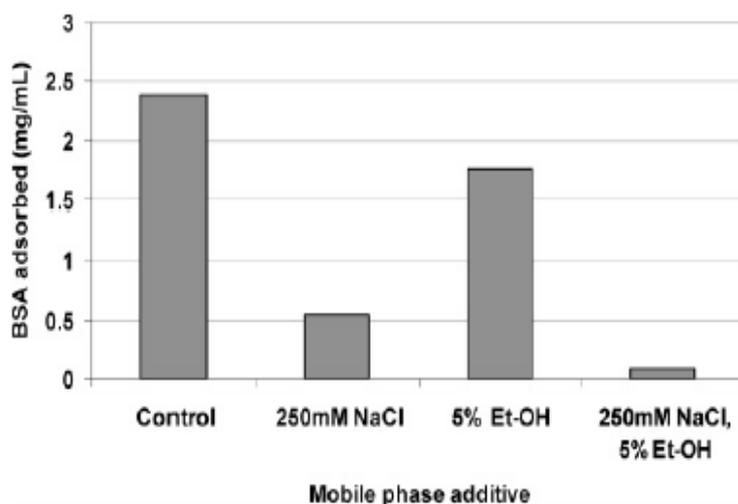


図 10 デプスろ過膜によるタンパク質吸着メカニズム ; Yigzaw et al., *Biotechnol. Prog.*, 22 (2006) より引用<sup>[40]</sup>

静電的相互作用を利用して精製を行う、イオン交換クロマトグラフィーの典型的な溶出パターンを図 11 に示した。一般的に、静電的相互作用は低導電率（イオン強度）で強くなり、高導電率では弱くなる。静電的相互作用を利用しているイオン交換カラムクロマトグラフィーでは、導電率が低い状態でタンパク質を吸着させ、導電率を高めることで溶出させる方法が用いられている。デプスろ過膜に通液するサンプルの導電率を下げることで静電的相互作用を高めることで、可溶性不純物の吸着量を増加させることが出来る可能性が考えられた。本研究では、導電率を下げる方法として濃縮・緩衝液置換を用い、コンセプト検証を行った。

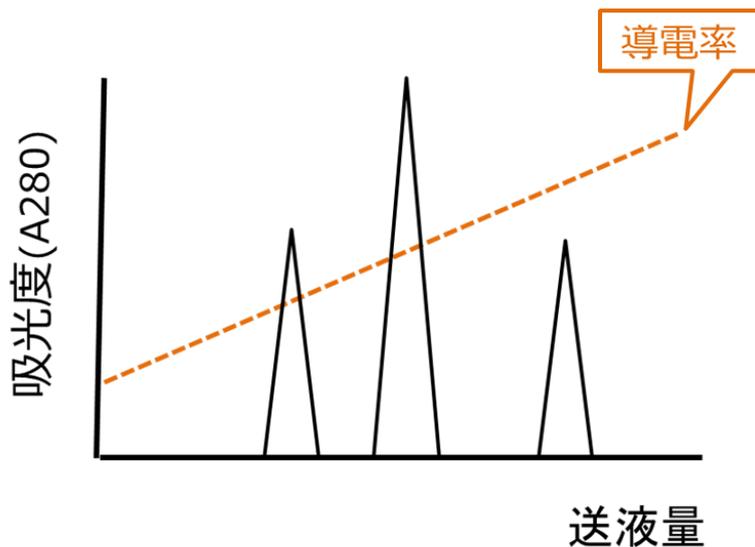


図 11 イオン交換クロマトグラフィーにおける典型的なクロマトグラム

## 2 項 バイオ医薬品製造で使用されるデプスろ過膜

多くのデプスろ過膜は 3 種の成分で構成される<sup>[43]</sup>。一つ目は繊維性の成分であり、セルロースやポリプロピレンが用いられている。二つ目はろ過助剤であり、珪藻土やパーライトが用いられている。最後は、繊維とろ過助剤を結合させるレジンバインダーである。レジンバインダーにはポリアミド-ポリアミンエピクロロヒドリン樹脂やポリアミンエピクロロヒドリン樹脂が用いられることが多い<sup>[43]</sup>。レジンバインダーに含まれるポリアミンが静電的相互作用を、脂肪族や芳香環が疎水性相互作用を発揮すると考えられている<sup>[43]</sup>。これらの成分の組み合わせや含量、膜の圧縮率、層の段数などにより、デプスろ過膜の特性が変化する。

バイオ医薬品製造で使用されているデプスろ過膜の特徴を表 5 に示した<sup>[43]</sup>。代表的なものとして、ミリスタック HC シリーズ、Zeta plus EXT SP シリーズ、Zeta plus EXT ZA(ZB) シリーズがある。ミリスタック HC シリーズには空隙の大きなものからそれぞれ、D0HC、C0HC、B1HC、A1HC、X0HC が、Zeta plus SP シリーズにはそれぞれ、05SP、10SP、30SP、50SP、60SP、90SP が、Zeta plus EXT シリーズにはそれぞれ、60ZA(60ZB)、90ZA(90ZB)、120ZA(120ZB) が市販されている。本研究ではバイオ医薬品製造プロセスで一般的に使用されている代表的なデプスろ過膜として HC シリーズから A1HC、EXT シリーズから 120ZA または 60ZB を選択して用いた。

本研究では、デプスろ過法の HCP 除去性能を飛躍的に向上させる条件に関して検討を行った。また、HCP 除去性能を向上させることにより可能となった抗体の完全フロースループロセス、及びそのプロセスがもたらした製造コスト低減につながる効果について評価を行った。

表5 バイオ医薬品製造で使用される市販デプスろ過膜の特徴 ; Singh et al., Biotechnology and Bioengineering, 113 (2016) より引用<sup>[43]</sup>

Depth filter	Manufacturer	Retention range ( $\mu\text{m}$ )	Material	Purpose	Positive charge type, functionality, notes
Zeta plus 10SP02A	3M	1.0–7.0	cellulose, perlite, and diatomaceous earth	Primary clarification of cell culture	Weak, primary amine
Zeta plus 30SP02A	3M	0.8–5.0	cellulose, perlite, and diatomaceous earth		Weak, primary amine
Milli stak DOHC	EMD	0.8–9.0	cellulose, resin, and diatomaceous earth		Strong positive charge
Milli stak COHC	Millipore	0.2–2.5	cellulose, resin, and diatomaceous earth		Strong positive charge
	EMD				
SUPRA disk K700	Pall	5.0–7.0	cellulose, resin, and diatomaceous earth	Secondary clarification of cell culture	Strong positive charge
Zeta plus 90ZB05A	3M	0.2–0.8	cellulose, perlite, and diatomaceous earth		Strong, quaternary amine
Emphaze <sup>TM</sup>	3M	0.2–0.8	Functionalized polypropylene non-woven, and polyamide membrane		Strong, quaternary amine
Milli stak XOHC	EMD	0.05–0.1	cellulose, resin, and diatomaceous earth		Strong positive charge
Milli stak B1HC	Millipore	0.05–0.7	cellulose, resin, and diatomaceous earth		Strong positive charge
	EMD				
SUPRA disk KS50	Pall	0.2–2.0	cellulose, resin, and diatomaceous earth		Strong positive charge
Clarisolve <sup>®</sup> 20MS, 40MS, and 60HX	EMD Millipore	20MS: 0.8–20; 40MS: 0.8–40; 60HX: 8–60	Polypropylene non-woven fibers, cellulose, resin, and diatomaceous earth	For precipitation and flocculation	Strong positive charge for 20MS and 40MS; No charge for 60HX

## 2 節 デプスろ過膜の不純物除去性能の改良

デプスろ過膜の HCP 除去性能を確認するため、モノクローナル抗体 B (mAb B) 含有培養上清 (Filtered cell culture supernatant : FCCS) を 2 種のデプスろ過膜 A1HC 又は EXT に通液した。その結果、低負荷条件において A1HC でわずかな HCP 吸着が確認されたが、EXT にはほとんど吸着しなかった (図 12a)。この結果は Yigzaw らが報告している結果と同様であり、培養上清をそのままデプスろ過膜に通液してもその HCP 除去性能は極めて弱いことが確認された<sup>[40]</sup>。一方で、HMWs に関しては両デプスフィルターで 0.7% 程度の減少が確認された (図 13a)。除去が確認された HMWs はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析の 22~26 分に溶出する成分が主であり、分子サイズの大きな不純物が選択的に除去されていることが確認された (図 14)。

続いて、mAb B 含有緩衝液置換培養上清 (Diafiltrated supernatant : DFS) を 2 種のデプスろ過膜 A1HC 又は EXT に通液した。DFS は、FCCS に対して限外ろ過膜を用いて 10 mM Tris-HCl (pH8.0) に緩衝液置換したサンプルである。その結果、A1HC、EXT の何れのデプスろ過膜を用いた場合でも、HCP 及び HMWs の両不純物は、FCCS を使用した際と比較するとデプスろ過膜への吸着量が大幅に増大することが明らかになった (図 12、図 13)。また、その吸着は負荷量の増加と共に低下することが確認されたが、100 L/m<sup>2</sup> の時点でも維持されていた。

FCCS と DFS の導電率はそれぞれ 11~13 mS/cm、0.6~0.7 mS/cm であった。一般的に、静電的相互作用は低導電率 (イオン強度) で強くなり、高導電率では弱くなる。先述のように、静電的相互作用を利用しているイオン交換カラムクロマトグラフィーでは、導電率が低い状態でタンパク質を吸着させ、導電率を高めることで溶出させる方法が一般的に用いられている。このことから、導電率の低い環境では静電的相互作用は強いということが分かる。つまり、コンセプト通り、FCCS よりも導電率が大幅に低下した DFS を用いることで、HCP や HMWs とデプスろ過膜の静電的相互作用が強くなり、吸着量が著しく増加した可能性が考えられる。他にも、限外ろ過膜による緩衝液置換の際に除去された低分子量不純物が関与している可能性が考えられる。図 14 と図 15 に示した SEC 分析の 45~55 分に溶出する成分を比較すると、緩衝液置換により低分子量不純物が大幅に除去されていることが確認された。低分子量不純物もデプスろ過膜に吸着することが想定されるが、これが除去されたことによって競合物質が少なくなり、HCP や HMWs が吸着可能なデプスろ過膜のスペースが拡大したことが考えられる。

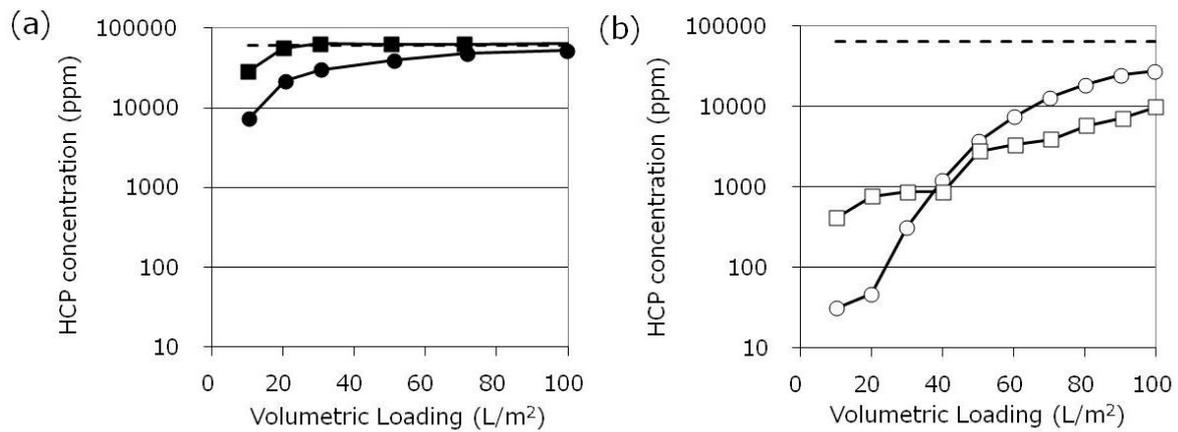


図 12 デプスろ過膜への負荷量と残存 HCP 濃度の関係；培養上清(a)又は緩衝液置換培養上清(b)を A1HC(●又は○)、あるいは EXT(■又は□)に通液。波線は負荷液の HCP 濃度を示す。

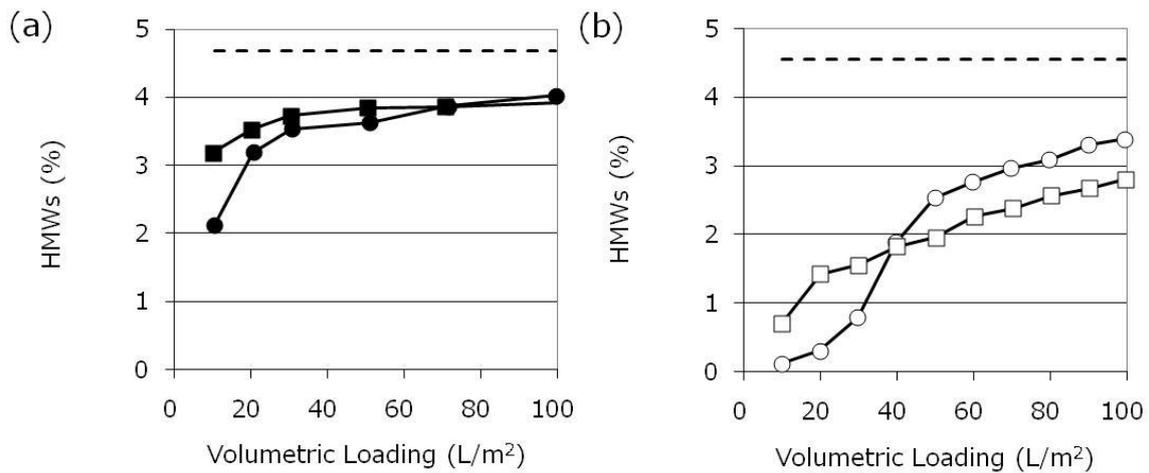


図 13 デプスろ過膜への負荷量と HMWs 含量の関係；FCCS(a)又は DFS(b)を A1HC(●又は○)、あるいは EXT(■又は□)に通液。波線は負荷液の HCP 濃度を示す。

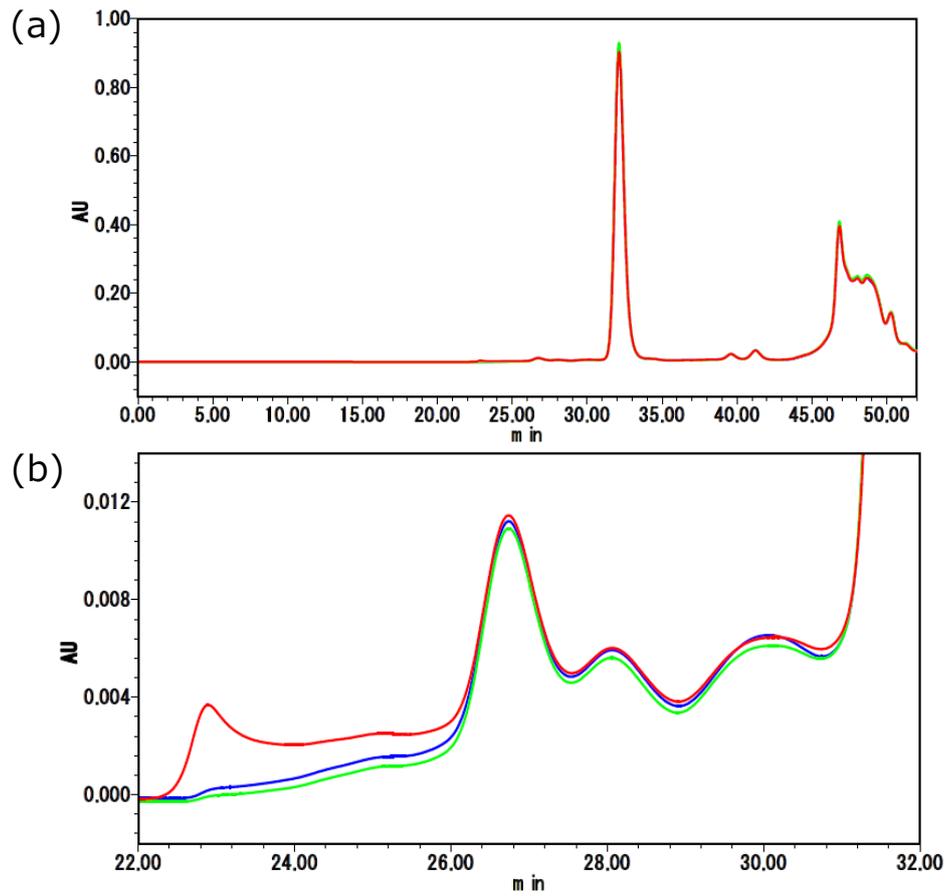


図 14 FCCS に対してデプスろ過処理したサンプルの SEC 分析チャート比較；100 L/m<sup>2</sup> の FCCS（赤）を A1HC（緑）又は EXT（青）に通液。(a)にチャートの全体像を、(b)には 22 分から 32 分までの拡大図を示す。

### 3節 A1HC と EXT の不純物除去性能の違い

A1HC と比較すると EXT の方が、導電率を低下させることにより HCP 除去量が増大することが確認された (図 12)。この結果は、EXT の方が A1HC よりもより強い静電的相互作用でタンパク質を吸着可能であることを示唆している。これまでの報告で、デプスろ過膜とタンパク質の相互作用には静電的相互作用と疎水性相互作用が関与していることが知られている<sup>[40][41]</sup>。FCCS において A1HC でわずかな HCP の吸着が確認されているが、A1HC は EXT よりも疎水性相互作用が強く、これによって高い導電率の条件下においても HCP が吸着できる可能性が考えられる (図 12)。mAb B 含有 DFS をデプスろ過膜に通液した際、40 L/m<sup>2</sup>未満の負荷量では、A1HC は EXT よりも多くの HCP を吸着した。一方、40 L/m<sup>2</sup>以上の負荷量ではこの現象は逆転し、EXT は A1HC よりも多くの HCP を吸着した (図 12)。この現象も、A1HC と EXT とで、HCP の吸着メカニズムが異なっていることを意味している。

また、SEC 分析の結果から、26.8、28.2、30.2 分に主要な HMWs が溶出することが確認されている (図 15b)。それぞれに対して負荷量と HMWs 含量の関係について解析を行ったところ、いずれの負荷量においても 26.8、28.2 分に溶出する HMWs は A1HC の方が EXT よりも効果的に除去されていることが確認された (図 16)。また、30.2 分に溶出する HMWs は 30 L/m<sup>2</sup>までは両デプスろ過膜で同様の推移となるが、それ以上は A1HC の除去能が急激に弱くなることが確認された。この、各 HMWs の除去パターンの違いによって、総 HMWs 含量が 40 L/m<sup>2</sup>で交差する結果となっていることが明らかになった (図 15)。上述の A1HC と EXT が得意とする相互作用を踏まえて考えると、26.8、28.2 分に溶出する HMWs は疎水性相互作用により効果的に除去され、30.2 分に溶出する HMWs は静電的相互作用によって除去されることが考えられる。このような成分単位で確認される相互作用の違いによる除去性への影響は HCP の各成分においても生じていることが推察される。つまり、異なる相互作用を得意とする A1HC と EXT の組み合わせることにより、より効果的に HCP や HMWs を除去できることが期待される。

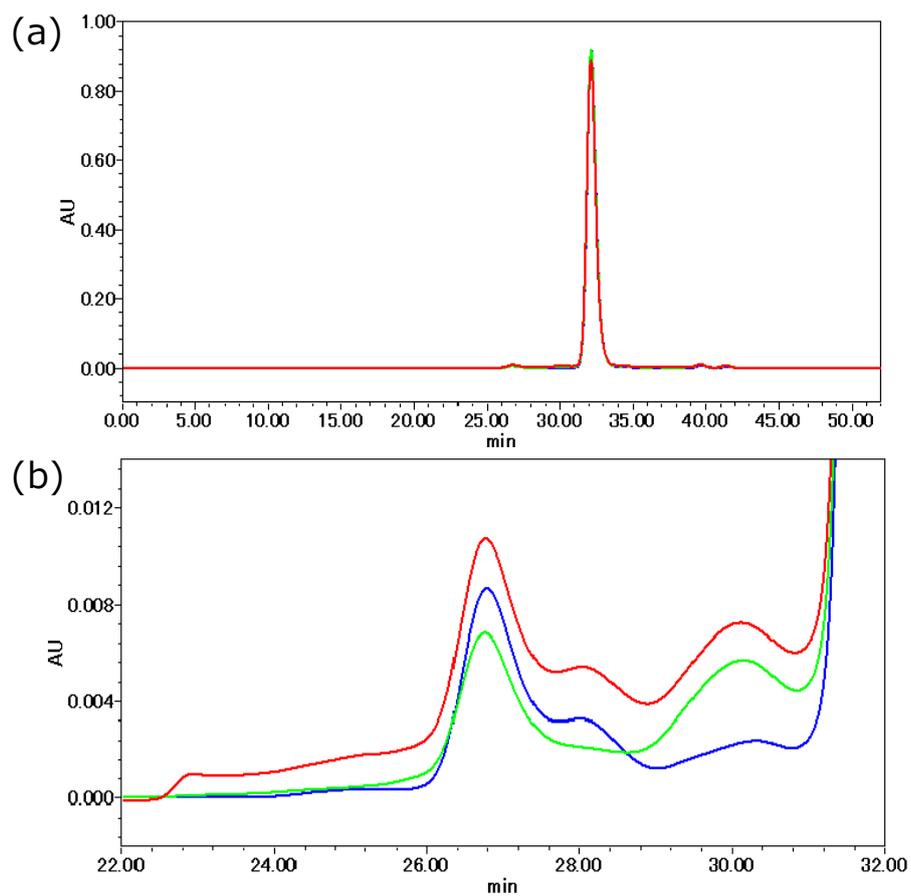


図 15 DFS に対してデプスろ過処理したサンプルの SEC 分析チャート比較；100 L/m<sup>2</sup>の DFS（赤）を A1HC（緑）又は EXT（青）に通液。(a)にチャートの全体像を、(b)には 22 分から 32 分までの拡大図を示す。

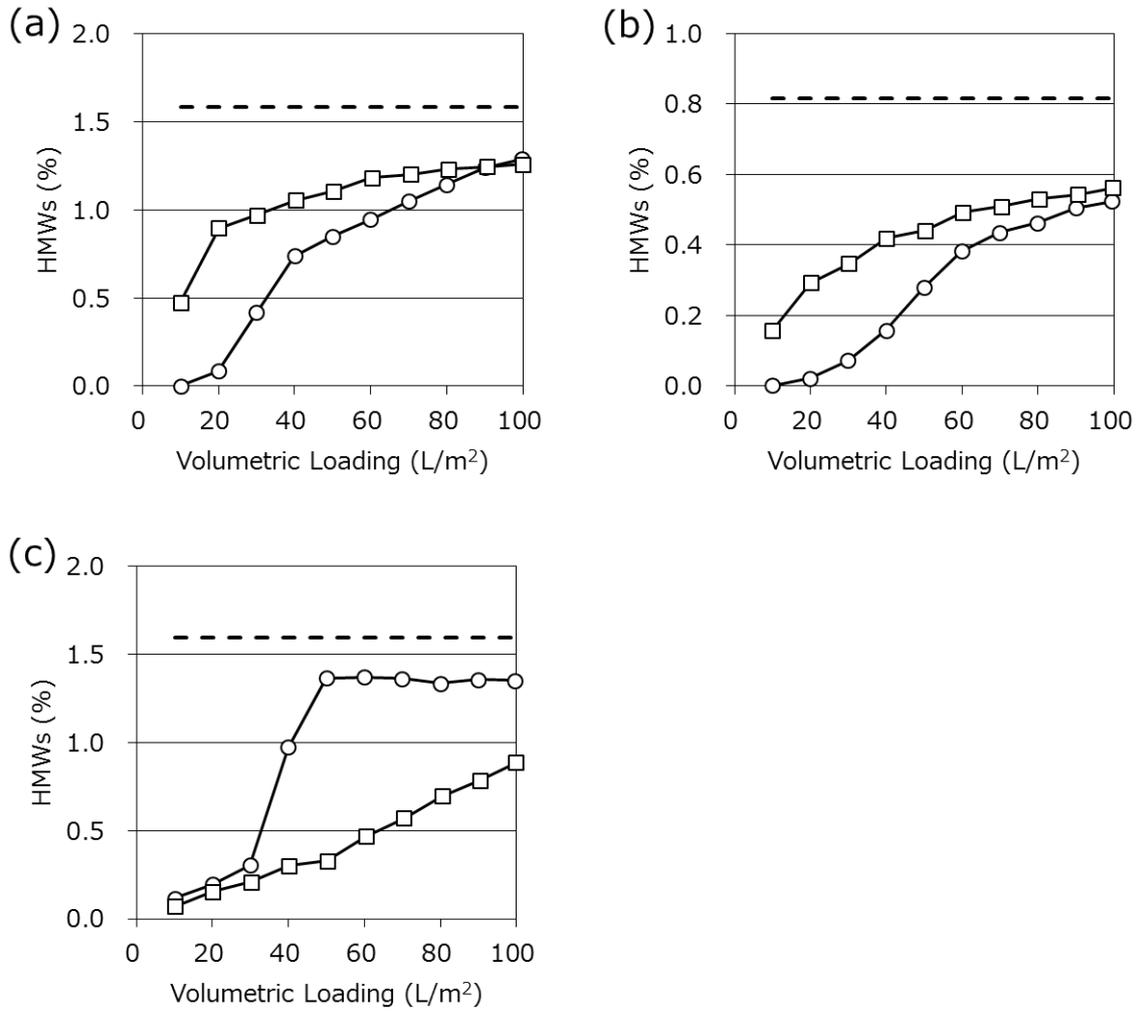


図 16 デプスろ過膜への負荷量と各 HMWs 含量の関係 ; DFS を A1HC(○)、あるいは EXT(□)に通液。(a) に 26.8 分、(b) に 28.2 分、(c) に 30.2 分に溶出する HMWs の推移を示した。波線は各 HMWs 成分の負荷液の含量を示す。

#### 4節 A1HC と EXT の組み合わせ効果

2種のデプスろ過膜（A1HC 及び EXT）を組み合わせることで2段階処理を行い（表6）、その不純物除去性の確認を行った（表7、表8）。評価には mAb A 含有 DFS を用いた。

その結果、Step 1では、A1HC、EXTのいずれでも HCP の吸着が確認された。特に、EXT を用いた場合では、1/100 まで HCP が除去され、これは 1/25～1/300 の除去性を有するプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーに匹敵する値であった<sup>[44,45]</sup>。この結果は、EXT デプスろ過が、従来の抗体精製プロセスで標準的に採用されているプロテイン A アフィニティー樹脂の置き換えになり得ることを示している。

Step2では、全ての組み合わせで Step1 よりも HCP 濃度は低下した。最も HCP が除去されたのは Run2 および Run3 であり、A1HC と EXT を組み合わせる条件であった。これらの組み合わせの残存 HCP 濃度は 80 ppm 程度であり、医薬品目標品質とされる HCP 濃度 (< 100 ppm) となっていることが確認された<sup>[18,19]</sup>。また、何れも同程度の値を示したことから、A1HC と EXT の順列を変えても同程度に HCP を除去可能であることが明らかになった。同じデプスろ過膜を組み合わせる Run1、Run4 は、それぞれ 2 倍の膜面積を使用した想定となるが、これらの条件では、HCP 濃度は目標品質に到達しなかった。Run4 の EXT 組み合わせの結果は 104 ppm であり、医薬品目標品質に後一歩及ばない程度までは除去可能であったが、Step1 では HCP を 1/100 まで除去している一方で、Step2 では 1/3 程度しか除去できていない。このように、同一のデプスろ過膜を組み合わせる、あるいは膜面積を増加させるアプローチは効率が悪いことが分かる。これらの結果は、異なるデプスろ過膜を組み合わせることによってより効率的に HCP を除去出来ることを意味しているだけでなく、前節で述べた HMWs の例と同様に、それぞれのデプスろ過膜が少なくとも一部は異なる集団の HCP を除去している可能性を示している。また、更に HCP を除去するためには、原理の異なる他の精製モードを組み合わせることが重要であることが分かる。

HMWs に関しては、全ての組み合わせにおいて Step1 で半減した。Step2 でも、Run1 から 3 では更に半減することが確認されたが、Run4 はあまり減少しなかった。Run4 で残存する HMWs はおそらく EXT では除去しにくい集団であることが想定される。この結果からも、異なるデプスろ過膜の組み合わせが、不純物除去において重要であることを示している。

表9に示した収率に関しては A1HC も EXT も 85%を超える結果となっているが、EXT の方が 10%程度高い結果が得られた。

表6 デプスろ過の組み合わせパターン

	Run1	Run2	Run3	Run4
Step1	A1HC	A1HC	EXT	EXT
Step2	A1HC	EXT	A1HC	EXT

表 7 デブスろ過の組み合わせが HCP 除去性に与える影響

	HCP (ppm)			
	Run1	Run2	Run3	Run4
DFS	36134			
Step1	21109	20656	302	352
Step2	1497	86	78	104

表 8 デブスろ過の組み合わせが HMWs 除去性に与える影響

	HMWs (%)			
	Run1	Run2	Run3	Run4
DFS	1.34			
Step1	0.45	0.47	0.56	0.61
Step2	0.20	0.24	0.25	0.50

表 9 デブスろ過の組み合わせが収率に与える影響

	Yield (%)			
	Run1	Run2	Run3	Run4
Step1	85	85	95	95
Step2	87	94	88	95

## 5 節 完全フロースループロセス

新たな抗体精製プロセスには、開発期間短縮の観点で、従来のプラットフォームプロセスと同様に汎用性の高さが求められる。汎用性を確認することを目的に、HCP 濃度や HMWs 含量、抗体種の異なる 3 種の DFS を用いて検証を行った。その結果、いずれの抗体を含む DFS を用いた場合でも、A1HC、EXT 処理で、HCP は 1/200~1/600 まで安定的に除去されることが確認でき、高い汎用性があることが確認できた（表 10）。HMWs 除去に関しては、mAb A の HMWs は、A1HC 処理で表 8 及び表 11 に示す通り、再現良く効果的に除去されることが確認された。一方、mAb C の HMWs は、A1HC で除去されず、後段の EXT によって大幅に除去されることが確認された。この様に、使用する DFS 又は抗体種の違いに由来する HMWs の組成の違いに応じて、より効果的に除去出来るデプスろ過膜が異なることが明らかになった。2 種のデプスろ過膜を組み合わせることによって HMWs は 1/4~1/6 まで安定的に除去されることが確認され、お互いの弱点を補完し、汎用性がより高くなっていることが明らかになった（表 11）。

mAb A を含む DFS を用いた場合、表 7 の結果と同様、EXT 処理までの工程で HCP の医薬品目標品質に到達した。しかしながらその値は異なっており、A1HC 処理のみの際の HCP 濃度は、表 7 に示した組み合わせ効果検証時の方が約 2 倍となっていた。両実験の違いは A1HC の製造ロットのみであり、この違いが HCP 除去性に影響を与えた可能性が考えられた。また、大幅な HCP の除去は確認されたが、mAb B、C を含む、mAb A よりも HCP 濃度が高い DFS を用いた場合は医薬品目標品質に到達しなかった。医薬品製造では、これらのようなデプスろ過膜の製造ロットの影響、DFS の多様性に対応し、安定的に医薬品品質にコントロールする必要がある。そこで、A1HC 及び EXT の組み合わせに加え、Zeta Plus activated carbon depth filter（AC：活性炭デプスろ過膜）を用いたろ過やフロースルーモードで精製が可能である Toyopearl NH2-750F 樹脂（NH2）を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを実施する完全フロースループロセスで、不純物がどこまで低減できるか検証した。

活性炭は、多孔性の炭素を主体とする物質であり、抗体の 150,000 よりも小さな、特に 1000~3,500 辺りの分子量の物質の除去を得意としている<sup>[47,48]</sup>。A1HC 及び EXT 処理を行ったサンプルに対し、活性炭処理を行ったところ、HCP は定量限界未満まで低減された。さらに、HMWs 除去性を有している NH2 を用いてフロースルーモードの陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果、HMWs 含量が半減することが確認出来た<sup>[49]</sup>。HCP 濃度や HMWs 含量、抗体種の異なる 3 種の DFS を用いた一連の精製により、安定的に十分なマージンを持って医薬品目標品質の HCP 濃度（1~100 ppm）、HMWs 含量（< 0.5%）を達成することが可能であることが示された。本結果は、完全ネガティブモードの抗体精製プロセスとして医薬品目標品質を達成した初めての知見である。

表 12 に示した通り、収率に関しては、A1HC や EXT 処理はいずれの DFS を用いた場合においても 80%以上、活性炭処理は 70%程度であった。陰イオン交換クロマトグラフィーは抗体種によって異なり、70~90%と開きがあった。これらより求めた総収率は 42~47%であり、カラム

精製を主体とした従来法の 65%と比較すると低い値を示したため、収率の改善は課題として挙げられる<sup>[53]</sup>。

表 10 完全フロースループロセスにおける HCP 濃度推移

	HCP (ppm)		
	mAb A	mAb B	mAb C
DFS	34949	65196	167047
A1HC	11268	11145	150448
EXT	55	328	770
AC	<5	<4	<5
NH2	-	-	-

- : not tested

表 11 完全フロースループロセスにおける HMWs 含量推移

	HMWs (%)		
	mAb A	mAb B	mAb C
DFS	1.2	4.5	4.2
A1HC	0.5	2.3	4.5
EXT	0.3	0.9	0.5
AC	0.3	0.9	0.5
NH2	0.1	0.4	0.2

表 12 完全フロースループロセスの収率

	Yield (%)		
	mAb A	mAb B	mAb C
A1HC	87	91	86
EXT	93	92	89
AC	65	71	68
NH2	90	71	89
	47 <sup>a</sup>	42 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>

a: 総収率

## 6節 小括

緩衝液置換によってデプスろ過の不純物除去性能が飛躍的に向上し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーに匹敵する品質レベルに達することを確認した。また、異なるデプス膜を組み合わせることにより、効果的に不純物を除去可能であることを明らかにした。さらに、デプスろ過精製法に不純物含量や抗体種に対する汎用性があることを確認すると共に、更なる **Polishing** 精製法として他のフロースルー精製法を組み合わせ、安定的に医薬品品質を達成することが可能な、堅牢な完全フロースループロセスが構築可能であることを見出した。

### 3章 完全フロースループロセスの収率改善

#### 1節 緒言

構築した完全フロースループロセスの課題は収率が低い点である。静電的相互作用に影響する因子として導電率以外にも pH が知られている。図 17 に示す通り、緩衝液 pH の変化に伴い、タンパク質の電荷は大きく変化する<sup>[54]</sup>。この曲線はタンパク質ごとに固有であるが、緩衝液の pH が高くなるにつれ、電荷がマイナスに変化する傾向は普遍的である。また、表 5 に示す通り、デプスろ過膜はプラスに帯電していることから、タンパク質側からみると、pH が高い方がよりデプスろ過膜に吸着すると考えられる<sup>[43]</sup>。一方、図 18 に示す通り、担体側（デプスろ過膜）にも pH による電荷の変化が想定される。一般的に、4 級アミン構造は幅広い pH でプラスの帯電を維持できるが、それ以外のアミン構造では pH が高くなりすぎると電荷が消失する<sup>[43]</sup>。EXT のように 4 級アミン構造で構成される担体は強イオン交換担体、それ以外のアミン構造で構成される担体は弱陰イオン交換担体とばれる<sup>[43]</sup>。これらの要素により、pH により収率が変動することが考えられるため、収率改善のアプローチの一つとして検討を行った。なお、疎水性相互作用も pH によって変動する可能性はあるが、一般的なタンパク質精製で用いられる pH5~8.5 の範囲では大きく変動しないことが報告されている<sup>[55]</sup>。

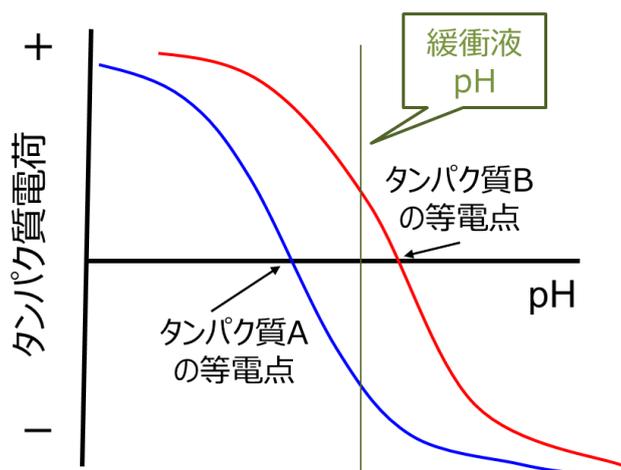


図 17 タンパク質側の素因

	Low pH		High pH	
Weak anion exchange	+	+	+/ $\pm$	$\pm$
Strong anion exchange	+	+	+	+

図 18 担体側の素因

## 2 節 pH 最適化による収率の改善効果

デプスろ過膜に負荷する DFS の pH を変えてその影響を確認した結果を表 13 に示す。評価には mAb A 含有 DFS を用いた。A1HC 処理でも EXT 処理でもこれまで用いてきた pH8 から低下させることにより、収率が向上することが確認された。ミリストック HC シリーズを用いた検討で、少なくとも pH7.5 から 6.5 に下げた条件において、HCP 除去性を維持したまま収率が向上することが報告されており、本結果から、この法則は EXT にも適用されることが確認された<sup>[42]</sup>。

また、同時に HCP 除去性の変化についても確認を行ったところ、A1HC 処理では、pH8 の条件で 1/3 未満まで HCP が除去されることが確認された。この結果は、2 章 4 節や 2 章 5 節で確認された 1/3～2/3 程度の除去性よりわずかに高いが、この違いは単純にこれまでの負荷量が 100 L/m<sup>2</sup> と 2 倍量だったことが原因と考えられる。pH を下げていくと、除去性は飛躍的に高くなり、pH6、7 では 1/200 未満まで除去が可能であった。負荷量が異なるため除去性の優劣は判断できないが、この結果は少なくとも 100 L/m<sup>2</sup> 負荷の EXT 処理の除去性を上回ることが確認された。さらに、pH5 まで下げると除去性は 1/40 程度まで低下した。本結果から、A1HC を用いた場合、最も効果的に HCP を除去できる pH は 6～7 付近であることが明らかになった。一方、EXT 処理では pH を 8 から低下させるに従い、HCP 除去性は低下し、pH8 では 1/140 であったが、pH5 では 1/10 程度であった。EXT は 4 級アミン構造で構成されていることから、タンパク質側の電荷のみを考慮すればよく、高い pH ほど吸着量の増大が確認されたと考えられる<sup>[43]</sup>。一方で、A1HC には弱イオン交換の要素が含まれており、pH8 条件ではデプスろ過膜側の帯電が弱くなったと考えられる。

以上の結果から、pH6～7 付近で両デプスろ過膜の処理を行うことで、HCP 除去性を維持または向上させると共に収率が改善する可能性が見出された。但し、pH の変化に伴ってデプス膜吸着の選択性が変化している可能性が考えられるため、今後完全フロースループロセスに適用するに当たり、異なる pH での組み合わせ効果の検討は必要となる。

表 13 pH と収率、HCP 除去性の関係

pH	Yield (%)				HCP (ppm)			
	5	6	7	8	5	6	7	8
DFS			-		28324	23852	23906	25165
A1HC	98	98	95	88	729	101	105	7495
EXT	97	97	96	92	2787	299	239	182

### 3節 その他の収率改善アイデア

その他の収率改善のアプローチとして以下を想定している。①本検討で用いたような HMWs 含量がデプスろ過後に十分低値になる場合、HMWs 除去を目的とした陰イオン交換クロマトグラフィー工程をなくすことにより 10~30%の収率向上が期待できる。②活性炭処理の膜面積は最適化検討を行っていないため、HCP 除去性能との兼ね合いで収率の向上が期待できる<sup>[47,48]</sup>。

### 4節 小括

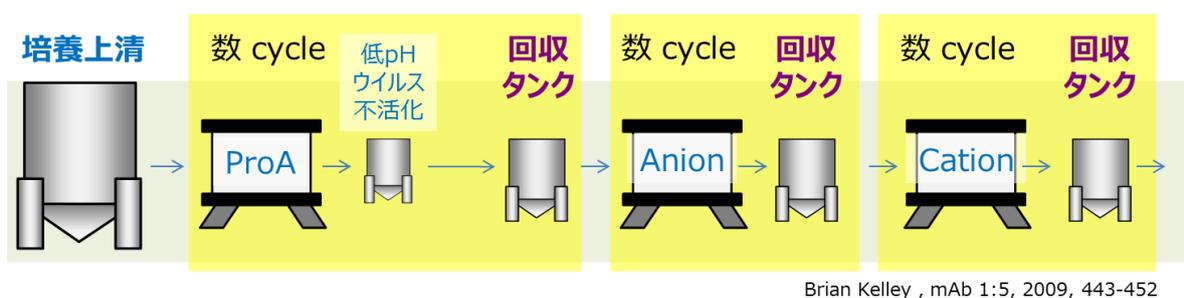
完全フロースループロセスにおいて、収率の改善が課題として挙げられたが、pH6~7 の条件で精製することで収率を改善できるだけでなく、不純物除去性も向上させることが出来る可能性を見出した。また、AC や NH<sub>2</sub> で構成される polishing 工程を使用する培養上清に応じて削減、あるいは最適化することによって収率をさらに向上させることが出来る可能性を考察した。

## 4章 総括

緩衝液置換によってデプスろ過の不純物除去性能が飛躍的に向上し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーに匹敵する品質レベルに達することを確認した。また、デプスろ過精製法に不純物含量や抗体種に対する汎用性があることを確認すると共に、更なる Polishing 精製法として他のフロースルー精製法を組み合わせ、安定的に医薬品品質を達成出来る、堅牢な完全フロースループロセスが構築可能であることを確認した。収率が低い点は課題ではあるが、Polishing 工程の組み合わせや DFS の pH、各膜面積の最適化を行うことで十分に改善する余地があることを確認、考察した。

カラム精製を主体としたプラットフォームプロセス（従来法）と完全フロースループロセスを比較した模式図を図 19 に示した。以下に、完全フロースループロセスの特徴について①原材料コスト、②製造設備、③プロセス時間、④緩衝液、⑤ラボ検討の視点でまとめた。

### 従来法



### 完全フロースルー法

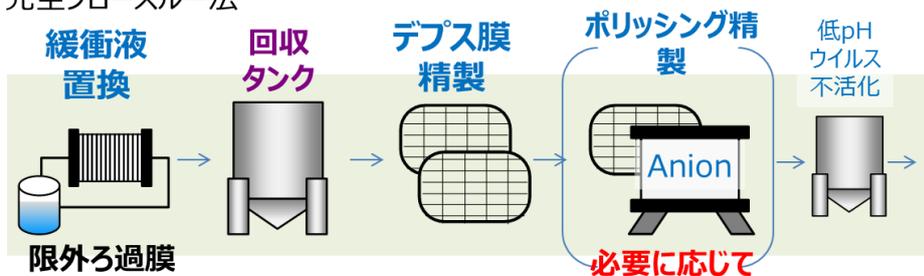


図 19 従来法と完全フロースループロセスの違い；ProA：プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、Anion：陰イオン交換クロマトグラフィー、Cation：陽イオン交換クロマトグラフィー

### ①精製部材コスト

一般的に、樹脂はその高いコストの問題から、ラボで洗浄、再生、滅菌条件を検討して繰り返し使用が可能であることを確認したのち、実製造で 50～300 回程度再使用する<sup>[26,29,30,32]</sup>。最も高価なプロテイン A 樹脂の再使用回数は 50～100 回程度で設定されていることが多い<sup>[26]</sup>。近年の臨床試験の成功率は 11～17%であることを考えると、樹脂使用最大繰り返し数まで到達する機会は少なく、バイオリジクス医薬品の開発コスト、特に初期開発段階でのコストは高くなっている<sup>[50]</sup>。完全フロースループロセスでは、デプスろ過膜を使用単位で購入することから、臨床試験の成功確率の影響を受けることなく、従来法と比較して初期投資コストを抑制することが可能となる。また、本検討では、AIHC、EXT それぞれの負荷量を 100 L/m<sup>2</sup>に設定しており、これら 2 種のデプスろ過膜のコストはプロテイン A 樹脂を 80～100 回繰り返し使用した際のコストに相当する。このように、完全フロースループロセスは、上市製造でも従来法と同程度のコストで製造することが可能となる。なお、本検討の完全フロースループロセスで用いた試薬、デバイスはすべて医薬品製造グレードであり、すぐにでも医薬品製造に適用可能である。

### ②製造設備

従来法では、カラムサイズの上限やコストの問題から、複数サイクルに分けてクロマトグラフィーが実施されるが、完全フロースループロセスでは一括処理が可能になる。また、本検討では、工程途中で pH や導電率調整などの中間体に対する調整を行わないシンプルなプロセスを採用している。つまり、前工程の溶出液がそのまま次工程の負荷液となるため、単純に連結することで連続的に精製することが可能となる。これに伴い、従来法では各工程単位で必要であった工程中間体回収タンクが不要となる。また、システムの圧力上限を超えなければ全ての精製を一つのポンプで実施可能であり、従来法で使用している各ステップの複雑なクロマト装置が全て不要となる。また④で述べるように、使用緩衝液数、液量が削減可能であり、緩衝液保管タンクも削減可能となる。これらの削減により、製造設備のコンパクト化も可能となる。現状、バイオリジクス医薬品の製造は、原薬品質評価だけではなく工程単位の評価も合わせて実施することで、プロセス全体を管理するという考え方が主流となっている。完全フロースルー精製により連続化が可能となるが、これまでのプロセスに存在した工程の区切りがなくなるため、今後、プロセス管理の考え方について規制側も含めた整理が必要となるかもしれない。

### ③プロセス時間

プロセスの連続化に伴い、作業時間も削減が可能となる。報告されている情報をもとに算出した従来法のプロセス時間と本試験手順から見積もられる完全フロースループロセスのプロセス時間を図 20 にまとめた<sup>[52][53]</sup>。完全フロースループロセスでは、緩衝液置換のための作業時間は追加されるが、従来法のプロテインアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーに相当する時間を連続に処理できるため、全体として大幅に作業時間を低減することが可能となる。その結果、従来法のクロマトグラフィーに相当するプロセス時間としては約 1/3 まで削減可能であり、ウイルス不活化、ウイルスろ過、処方成分への緩衝液置換といった抗体医薬品製造に必須なプロセス時間を加味した全体のプロセス時間

も 2/3 まで削減可能であることが明らかになった。作業時間の短縮は、年間製造バッチ数の増加につながるため、相対的に設備コストの低減につながる。

また、プロセス時間として見えない準備・片づけ作業でも完全フロースループロセスのメリットがある。従来法では精製前にカラムのパッキングや性能評価が、精製後には樹脂の再生、滅菌、保管、カラムのアンパッキング、洗浄確認といった作業が必要となるが、完全フロースループロセスで使用するデプスろ過膜は再使用しない、いわゆる Single-Use で使用するため、これらの作業は不要となる。一方で、細胞分離工程でも同様の作業はあるが、例えば 15,000 L スケールの培養の場合、A1HC、EXT でそれぞれ 150 m<sup>2</sup> の膜の準備が必要となり、市販されている一番大きな膜が A1HC で一枚当たり 1.1 m<sup>2</sup>、EXT で 2.8 m<sup>2</sup> であることを考えると製造単位の設置作業はかなりの重労働になることが想像される。この点については、デプスろ過膜の本来の使用目的は粒子の除去であり、精製法に特化したデバイス形態とはなっていない。メーカーと共同で、フロースルー精製によりふさわしいデバイスの形態を模索していく余地が十分にある。

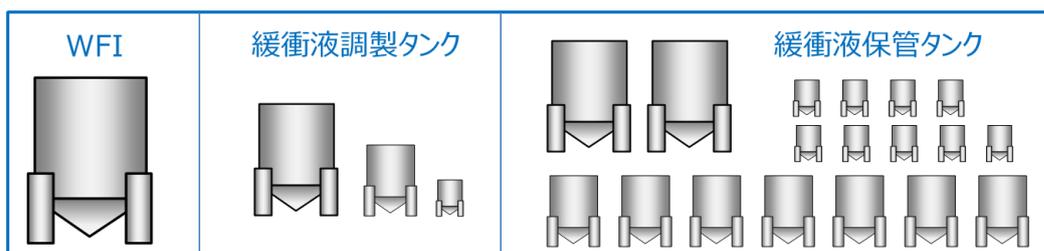
	Process time (h)																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
従来法	ProA							VI	Anion				Cation					VF	UF/DF													
完全フロースループロセス	UF/DF		FT		VI		VF		UF/DF																							

図 20 従来法と完全フロースループロセスの時間比較；ProA：プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー、VI：低 pH ウイルス不活化、Anion：陰イオン交換クロマトグラフィー、Cation：陽イオン交換クロマトグラフィー、VF：ウイルス除去膜、UF/DF：濃縮・緩衝液置換、FT：フロースルー精製

#### ④緩衝液

本試験では、使用する緩衝液の種類や量も考慮して実施した。通常、クロマトグラフィーでは、複数の緩衝液を使用し、それに応じて保管するタンクも同じ数だけ必要となる。例えば、ポジティブモードのクロマトグラフィーの場合、平衡化緩衝液、負荷後洗浄緩衝液、溶出緩衝液、カラム再生緩衝液、カラム保管緩衝液が必要であり、場合によっては平衡化前緩衝液や負荷後洗浄緩衝液などを追加して用いられる。また、各工程のクロマトグラフィーで共有の緩衝液が使用できる場合もあるが、基本的に各クロマトグラフィーで使用する緩衝液は異なるため、従来法のプロセス全体で考えると、20 種弱の緩衝液が必要となる<sup>[51]</sup>。また、緩衝液の調製にもタンクが必要となるため、調製量に応じたサイズの緩衝液調製タンクが別途必要となる。一方、本試験の完全フロースループロセスでは、精製工程に唯一 10 mM Tris-HCl (pH8.0)しか使用しておらず、システム洗浄用のアルカリ、処方緩衝液や原薬の安定化剤として用いる界面活性剤を加えたとしてもわずか 4 種の緩衝液しか使用しない。完全フロースルー精製法を採用することで、試薬コストを大幅に削減可能であると共に、図 21 に示すように、大幅にタンク数を減らすことが可能となる。抗体製造設備において、緩衝液タンクが占めるエリアは精製に関するエリアよりも大きい<sup>[51]</sup>。タンクの削減により、コンパクトな製造設備とすることが可能となる。

## 従来法



## 完全フロースルー法 (イメージ)

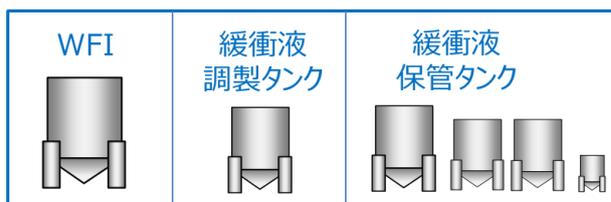


図 21 従来法と完全フロースループロセスの緩衝液タンク比較

### ⑤ラボ検討

クロマトグラフィーでのカラム再使用に際してはラボスケールでの再生条件の検討、繰り返し使用回数の検討を経て製造に適用される<sup>[29,30,32]</sup>。検討に際して、操作条件は製造を想定して設定されるため、当然ながら 1 ランにかかる時間は製造と同じになる。また、これらの検討には精製品の収率、品質、不純物含量、洗浄性の確認が伴う。このため、最大 300 回にも及ぶこれらの検討には、期間も労力もかなりのものとなる。Single-Use で使用するデプスろ過膜を用いた場合にはこれらの検討は不要となる。一方で、デプスろ過膜でのラボ検討にも課題がある。デプスろ過膜で市販されている最少の膜面積は 23~25 cm<sup>2</sup> であり、100 L/m<sup>2</sup> の負荷量での検討を実施する際には数百 mL のサンプルが必要になる。一方、樹脂の検討の場合、1 mL~3.9 mL 程度の樹脂を使って検討が行われており、プロセス時間算出に用いたプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーの条件を参考にすると、10~40 mL のサンプルで一回の検討を行うことが可能となる<sup>[29,30,32,52,53]</sup>。より小さなスケールのデプスろ過膜が市販されると状況は変わるが、現状ではデプスろ過膜の検討には比較的大量のサンプルが必要となっている。

以上、本研究により、デプスろ過膜を用いた完全フロースループロセスを抗体医薬品製造に適用できる可能性を示すと共に、完全フロースループロセスは精製部材コスト、製造設備、使用緩衝液、ラボ検討など多岐の項目に渡って従来法に比べて優れている点があることを明らかにした。完全フロースルー精製法を用いることによって、従来よりも低生産コストで安全な医薬品を安定的に供給できる可能性を示すことが出来た。

今後、実際に医薬品製造に使用していくためには更にいくつかの検証が必要となる。特に重要な要素が実績であり、実際に完全フロースループロセスで製造した医薬品が臨床試験で安全性が証明されるまでは真の意味でプロセスが構築できたとは言えない。それに至るまでもスケール

アップが可能か、原薬の安定性に問題がないか、特性解析により未知の不純物が含まれていないか、重要操作パラメーターの同定と許容範囲の設定など確認すべき事項が残されている。

また、より効率的かつ安価なプロセスを実現するためには、完全な連続製造プロセスとする必要がある。現状、大きなボトルネックとなっているのは濃縮・緩衝液置換操作の連続化、低 pH ウイルス不活化操作であり、これらの連続化が達成できない状況ではこれ以上のプロセス時間短縮は望めない。プロセスの連続化については近年、盛んに研究が進められており、これらの操作の連続化も報告されてきている<sup>[56,57]</sup>。これらの技術も積極的に取り入れながら、最終的には完全な連続精製プロセス構築を目指して検討を進めていきたい。

最後に、本研究を契機に、抗体製造コストが大幅に削減され、高まる医療費の増大抑制につながることを期待する。

## 【実験の部】

### 試薬・資材

Millistak+ A1HC depth filters (23 cm<sup>2</sup>) は、EMD Millipore (Darmstadt, Germany) より入手した。Zeta Plus EXT depth filters (120ZA 及び 60ZB, 25 cm<sup>2</sup>) 及び Zeta Plus Activated Carbon (R53, 25 cm<sup>2</sup>) depth filters は、3M (Meriden, CT, USA) より入手した。Toyopearl NH2-750F anion-exchange resin は、Tosoh (Tokyo, Japan) より入手した。Toyopearl NH2-750F anion-exchange resin は、3 mm×15 cm の glass columns (Kyoshin Kogyo, Tokyo, Japan) にパッキングして使用した。

本研究で使用した3種の抗体 (mAb A, mAb B 及び mAb C) は、全て IgG1 サブクラスであり、約 150 kDa の分子量を有している。これらは、協和発酵キリン株式会社で無血清培地により Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて生産した。検討に使用した培養上清は、pH4.5~4.6 酸沈殿処理を行ったもの (filtered cell culture supernatant : FCCS) を用いた。FCCS の 10 mM Tris-HCl (pH8.0) への緩衝液置換は Pellicon 3 system (EMD Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて行い、緩衝液置換培養上清 (diafiltrated supernatant : DFS) を得た。全ての試薬は analytical grade を用いた。

### デプスろ過及び分画

デプスろ過膜 (A1HC 又は EXT) は、使用前に 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化を行った。その後、mAb B を含む pH8.0 に調整した FCCS 又は DFS を、100 L/m<sup>2</sup> の負荷量で A1HC 又は EXT に通液した。通液流速はそれぞれ 3.8、4.2 mL/min であり、膜面積 1m<sup>2</sup> 辺りの流速が 100 L/h となる速度で実施した。フロースルー画分は 10 L/m<sup>2</sup> ごとに分画した。FCCS、DFS に含まれる mAb B の濃度はそれぞれ 2.8、3.0 mg/mL であった。

### デプスろ過の組み合わせ

デプスろ過膜の組み合わせを表 6 に示した。2つのデプスろ過膜を Step1、Step2 の2段階で処理することで、デプスろ過の組み合わせ効果について検証した。Step1 は、mAb A を含む DFS を用いて「デプスろ過及び分画」と同じ条件で実施し、通液終了後に 10 L/m<sup>2</sup> の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で後押しを行った。フロースルー画分及び後押し画分を混和し、Step2 の負荷液とした。Step2 は Step1 と同じ条件で実施し、フロースルー画分及び後押し画分を混和して回収液を得た。

### 完全フロースルー精製

mAb A、B、C を含む DFS を用い、「デプスろ過の組み合わせ」と同様に、A1HC、EXT の順でデプスろ過を行った。DFS に含まれる mAb A、B、C の濃度はそれぞれ 2.3、3.0、2.4 mg/mL であった。次いで、得られた混和液を同様の条件で Zeta Plus activated carbon depth filters (AC) に通液した。さらに、AC 回収液を、50 g/L-resin の負荷量で、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に平衡化した Toyopearl NH2-750F 陰イオン交換カラム (NH2) に通液した。NH2 への通液速度は 300 cm/h で実施した。AC 回収液を通液後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で後押しを行い、NH2 回収液を得た。

## 抗体濃度分析

抗体濃度の分析は、Protein A column (4.6×50 mm; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて実施した。サンプルをインジェクトした後、移動相 A [20 mM sodium phosphate and 300 mM NaCl (pH 7.0)] で洗浄し、移動相 B [20 mM sodium phosphate and 300 mM NaCl (pH 2.8)] で溶出させた。流速は 3 mL/min の条件で、検出は 214 nm の吸光度を測定することで行った。分析は常温 (25°C) で実施した。

## サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

重合体の指標として SEC 分析の高分子量画分 (high molecular species : HMWs) を用いた。SEC 分析は、2 連結した G3000SWXL columns (7.8 mm i.d. × 30 cm; Tosoh, Tokyo, Japan) を用いて実施した。移動相には 500 mM sodium chloride, 5% ethanol, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) を用いた。流速は 0.5 mL/min の条件で、検出は 215 nm の吸光度を測定することで行った。HMWs 含量は緩衝液由来ピークを除いたピークエリアを用いて算出した。

## HCP 濃度分析

HCP 濃度は、sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cygnus Technologie, Southport, NC, USA) を用いて行った。操作手順は添付のマニュアルに従った。

## pH 検討

平衡化緩衝液にはそれぞれ 10 mM Tris-HCl (pH 5.0)、10 mM Tris-HCl (pH 6.0)、10 mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いた。平衡化緩衝液を用いて平衡化したデプスろ過膜 (A1HC 又は EXT) に、それぞれの pH に調整した DFS を通液した。負荷量は A1HC を 50 L/m<sup>2</sup>、EXT を 100 L/m<sup>2</sup> とした。通液流速はそれぞれ 3.8、4.2 mL/min であり、膜面積 1m<sup>2</sup> 辺りの流速が 100 L/h となる速度で実施した。pH 調整後の DFS に含まれる mAb A の濃度はそれぞれ 5.2~5.4 mg/mL であった。

## 使用緩衝液タンク数・サイズの見積もり

一般的な抗体医薬品製造 (従来法) で使用される緩衝液調製タンクや緩衝液保管タンクの数、サイズ感は Guldager の報告を引用した<sup>[51]</sup>。

## プロセス時間の計算

Xenopoulos の報告から設定項目を、Fahrner らの報告からクロマトステップ数、溶出液量を引用し、従来法のスケジュールを見積もった<sup>[52,53]</sup>。以下に前提条件を記載する。作業時間は時間単位で切り上げて求めた。クロマト前に実施する pH 調整や均一化のための攪拌、次工程へ進むための工程管理試験にかかる時間は割愛した。

表 14 培養上清の設定値

設定項目	パラメーター
培養上清液量	15000 L
抗体濃度	3 g/L
抗体量	45 kg

表 15 プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーの設定値

設定項目	パラメーター
カラムサイズ	140 cm 内径×20 cm 高さ
樹脂量	樹脂量：308 L
負荷抗体量	上限 40 g/L-resin
樹脂接液時間	3 分
線流速	400 cm/hr
1 バッチ当たりのサイクル数	4
工程収率	93%

表 16 プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーの操作条件

クロマト条件	通液量	時間
平衡化	5 CV	15 分
Load	約 4000 L	約 40 分
Wash1	3 CV	9 分
Wash2	3 CV	9 分
Wash3	3 CV	9 分
Elute	5 CV	15 分
CIP	3 CV	9 分

表 17 ウイルス不活化の設定値

設定項目	パラメーター
不活化時間	1 時間
膜ろ過時間	2 時間

表 18 陰イオン交換クロマトグラフィーの設定値

設定項目	パラメーター
カラムサイズ	180 cm 内径×20 cm 高さ
樹脂量	樹脂量：509 L
負荷抗体量	上限 100 g/L-resin
樹脂接液時間	6 分
線流速	200 cm/hr
1 バッチ当たりのサイクル数	1
工程収率	98%

表 19 陰イオン交換クロマトグラフィーの操作条件

クロマト条件	通液量	時間
プレ平衡化	3 CV	18 分
平衡化	4 CV	24 分
Load	約 3700 L	44 分
Chase	7 CV	42 分
再生	3 CV	18 分
CIP	2 CV	12 分

表 20 陽イオン交換クロマトグラフィーの設定値

設定項目	パラメーター
カラムサイズ	160 cm 内径×20 cm 高さ
樹脂量	樹脂量：402 L
負荷抗体量	上限 65 g/L-resin
樹脂接液時間	6 分
線流速	200 cm/hr
1 バッチ当たりのサイクル数	2
工程収率	90%

表 21 陽イオン交換クロマトグラフィーの操作条件

クロマト条件	通液量	時間
プレ平衡化	2 CV	12 分
平衡化	5 CV	30 分
Load	約 5200 L	78 分
Wash	5 CV	30 分
溶出	5 CV	30 分
再生	2 CV	12 分
CIP	2 CV	12 分

表 22 ウイルスろ過の設定値

設定項目	パラメーター
ろ過時間	4 時間
工程収率	98%

表 23 濃縮・緩衝液置換の設定値

設定項目	パラメーター
ろ過時間	6 時間
置換緩衝液液量	8 倍量
工程収率	98%

## 【引用文献】

- [1] Thomson pharma HP : <http://ip-science.thomsonreuters.jp/press/release/2015/pharma-sales-to-grow/>
- [2] 漆原良一, 明解 医薬品産業, 医薬経済社
- [3] 製薬協 産業ビジョン 2025 世界に届ける創薬イノベーション, 日本製薬工業協会, (2016)
- [4] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs.* 7 (1) (2015) 9-14
- [5] 荒川博之, 最新 医薬品業界の動向とカラクリがよ〜くわかる本[第5版], 秀和システム
- [6] 厚生労働省HP : 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について (平成 29 年 10 月 1 日適用) , <http://www.mhlw.go.jp/topics/2016/04/tp20160401-01.html>
- [7] E.A. Blackstone, P.F. Joseph, The economics of biosimilars, *Am Health Drug Benefits*, 6 (8) (2013) 469-478
- [8] 垣内史堂, 図解 免疫学, オーム社
- [9] A. Goyon, V. D'Atri, O. Colas, S. Fekete, A. Beck, D. Guillaume, Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation, *Journal of Chromatography B*, 1065-1066 (2017) 35-43
- [10] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A.V. Dorsselaer, S. Sanglier-Cianféran, Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *analytical chemistry*, 85 (2) (2013) 715-736
- [11] 関根進, 抗体医薬の現状と課題, *Science & Technology Trends*, October (2009) 13-25
- [12] M. Jain, N. Kamal, S.K. Batra, Engineering antibodies for clinical applications, *Trends in Biotechnology*, 25 (7) (2007) 307-316
- [13] 国立医薬品食品衛生研究所 HP : <http://www.nihs.go.jp/dbcb/mabs.html>
- [14] X. Wang, A.K. Hunter, N.M. Mozier, Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment, *Biotechnology and Bioengineering*, 103 (3) (2009) 446-458
- [15] X. Xu, H. Nagarajan, N.E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, W. Chen, M. Xie, W. Wang, S. Hammond, M.R. Andersen, N. Neff, B. Passarelli, W. Koh, H.C. Fan, J. Wang, Y. Gui, K.H. Lee, M.J. Betenbaugh, S.R. Quake, I. Famili, B.O. Palsson, J. Wang, The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line, *Nature biotechnology*, 29 (8) (2011) 735-741

- [16] D.C. Krawitz, W. Forrest, G.T. Moreno, J. Kittleson, K.M. Champion, Proteomic studies support the use of multi-product immunoassays to monitor host cell protein impurities, *Proteomics*, 6 (2006) 94–110
- [17] K.M. Champion, D. Arnott, W.J. Henzel, S. Hermes, S. Weikert, J. Stults, M. Vanderlaan, L. Krummen, A two-dimensional protein map of Chinese hamster ovary cells, *Electrophoresis*, 20 (1999) 994-1000
- [18] F. Wang, D. Richardson, M. Shameem, Host-cell protein measurement and control, *BioPharm International*, 28 (6) (2015) 32–38
- [19] J.H. Chon, G. Zarbis-Papastoitsis, Advances in the production and downstream processing of antibodies, *N. Biotechnol.*, 28 (5) (2011) 458-63
- [20] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *Journal of Pharmaceutical Science*, 97 (7) (2008) 2426-2447
- [21] B. Kelley, Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads, *mAbs*, 1 (5) (2009) 443-452
- [22] D. Low, R. O’Leary, N.S. Pujar, Future of antibody purification, *Journal of Chromatography B*, 848 (2007) 48–63
- [23] A.A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, D. Low, Downstream processing of monoclonal antibodies—application of platform approaches, *J. Chromatogr. B*, 848 (2007) 28–39
- [24] D. Low, R. O’Leary, N.S. Pujar, Future of antibody purification, *J. Chromatogr. B*, 848 (2007) 48–63
- [25] H.F. Liu, J. Ma, C. Winter, R. Bayer, Recovery and purification process development for monoclonal antibody production, *mAbs*, 2 (5) (2010), 480-499
- [26] A.S. Rathore, M. Pathak, G. Ma, D.G. Bracewell, Re-use of protein A resin: fouling and economics, *BioPharm International*, 28 (3) (2015)
- [27] D.K. Follman, R.L. Fahrner, Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A, *J. Chromatogr. A*, 1024 (2004) 79–85
- [28] A.D. Naik, S. Menegatti, H.R. Reese, P.V. Gurgel, R.G. Carbonell, Process for purification of monoclonal antibody expressed in transgenic *Lemna* plant extract using dextran-coated charcoal and hexamer peptide affinity resin, *Journal of Chromatography A*, 1260 (2012) 61– 66

- [29] R. Hahn, K. Shimahara, F Steindl, A. Jungbauer, Comparison of protein A affinity sorbents III. Life time study, *J. Chromato. A*, 1102 (2006) 224–231
- [30] S. Lute, L. Norling, M. Hanson, R. Emery, D. Stinson, K Padua, G. Blank, Q. Chen, K. Brorson, Robustness of virus removal by protein A chromatography is independent of media lifetime, *J. Chromatogr. A*, 1205 (2008) 17–25
- [31] 日本生化学会編 新生化学実験講座1 タンパク質I 分離・精製・性質, 東京化学同人
- [32] L. Norling, S. Lute, R. Emery, W. Khuu, M. Voisard, Y. Xu, Q. Chen, G. Blank, K. Brorson, Impact of multiple re-use of anion-exchange chromatography media on virus removal, *J. Chromatogr. A*, 1069 (2005) 79–89
- [33] J. Walthera, R. Godawata, C. Hwanga, Y. Abeb, A. Sinclairb, K. Konstantinov, The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production, *Journal of Biotechnology* 213 (2015) 3–12
- [34] S.S. Farid, Economic Drivers and Trade-Offs in Antibody Purification Processes, *BioPharm International*, 2009 Supplement (7)
- [35] R. Kunert, D. Reinhart, Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 100 (2016) 3451–3461
- [36] M.F.X. Lee, E.S. Chan, B.T. Tey, Negative chromatography: Progress, applications and future perspectives, *Process Biochemistry*, 49 (2014) 1005–1011
- [37] I.T.L. Bresolin, M.C.M. Souza, S.M.A. Bueno, A new process of IgG purification by negative chromatography: adsorption aspects of human serum proteins onto omega-aminodecyl-agarose, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 2087–2093
- [38] M.C.M. Souza, I.T.L. Bresolin, S.M.A. Bueno, Purification of human IgG by negative chromatography on  $\omega$ -aminohexyl-agarose, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 557–566
- [39] M. Ventani, L. Giovannoni, U. Gottschalk, Antibody purification using membrane adsorbers, *BioPharm International*, Supplements, (2009)
- [40] Y. Yigzaw, R. Piper, M. Tran, A.A. Shukla, Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification, *Biotechnol. Prog.*, 22 (2006) 288-296

- [41] D.J. Roush, Y. Lu, Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology, *Biotechnol. Prog.*, 24 (2008) 488-495
- [42] J. Schreffler, M. Bailley, T. Klimek, P. Agneta, W.E. Wiltsie, M. Felo, P. Maisey, X. Zuo, E. Routhieret, Characterization of post-capture impurity removal across an adsorptive depth filter, *Bioprocess International*, (2015)
- [43] N. Singh, A. Arunkumar, S. Chollangi, Z.G. Tan, M. Borys, Z.J. Li, Clarification technologies for monoclonal antibody manufacturing processes: Current state and future perspectives, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (4) (2016) 698-716
- [44] T. Ishihara, M. Hosono, Improving impurities clearance by amino acids addition to buffer solutions for chromatographic purifications of monoclonal antibodies, *J. Chromatogr. B*, 995 (2015) 107-14.
- [45] U Gottschalk, *Process Scale Purification of Antibodies*, John Wiley & Sons Inc., (2009).
- [46] A.A. Shukla, P. Hinckley, Host cell protein clearance during protein A chromatography: development of an improved column wash step, *Biotechnol Prog.*, 24 (5) (2008) 1115-21
- [47] The use of Millistak+® Activated Carbon (AC) for downstream purification of monoclonal antibodies, EMD Millipore Application Note, AB57750000
- [48] M.T. Stone, M. Kozlov, Separating proteins with activated carbon, *Langmuir*, 30 (2014) 8046–8055
- [49] TOYOPEARL® NH2-750F Flow-through aggregate removal from monoclonal antibodies, TOSOH BIOSCIENCE Application Note, AN91 0216
- [50] J. Pollock, G. Bolton, J. Coffman, S.V. Ho, D.G. Bracewell, S.S. Farid, Optimising the design and operation of semi-continuous affinity chromatography for clinical and commercial manufacture, *J. Chromatogr. A*, 1284 (2013) 17-27
- [51] N. Guldager, Next-generation facilities for monoclonal antibody production, *Pharmaceutical Technology*, 33 (7) (2009)
- [52] A. Xenopoulos, A new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: Process modeling and cost of goods studies, *J. Biotechnol.*, 213 (2015) 42-53.

- [53] R.L. Fahrner, H.L. Knudsen, C.D. Basey, W. Galan, D. Feuerhelm, M. Vanderlaan, G.S. Blank, Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes, *Biotechnol Genet Eng Rev.*, 18 (2001) 301-27.
- [54] Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications, Third Edition (2011) 93-133
- [55] Hydrophobic Interaction Chromatography, ファルマシア バイオテック株式会社
- [56] A.L. Zydney, Continuous downstream processing for high value biological products: A Review, *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (3) (2016) 465–475
- [57] S.A. Parker, L. Amarikwa, K. Vehar, R. Orozco, S. Godfrey, J. Coffman, P. Shamlou, C.L. Bardliving, Design of a Novel Continuous Flow Reactor for Low pH Viral Inactivation, *Biotechnology and Bioengineering*, (2017) [Epub ahead of print]

## 【本論文の基礎となる原著】

Tsuyoshi Yamada, Koichi Yamamoto, Takashi Ishihara, Shigeru Ohta, Purification of monoclonal antibodies entirely in flow-through mode, *Journal of Chromatography B* 1061–1062 (2017) 110–116

## 謝辞

本研究を行うにあたり、幅広い見地、経験からご指導、ご鞭撻を賜りました、広島大学大学院医歯薬保健学研究科 太田 茂教授に心から御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なる直接のご指導、ならびに多大なるご助言をいただきました協和発酵キリン株式会社 石原 尚氏に心から深く感謝御礼申し上げます。

そして本研究に際して、数々のご助言、ご協力をいただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 紙谷 浩之教授、同研究科 古武 弥一郎准教授、同研究科 佐能 正剛助教、協和発酵キリン株式会社 山本 耕一氏に厚く御礼申し上げます。

本研究において、審査、ご助言を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 松尾 裕彰教授、同研究科 小池 透教授、同研究科 熊谷 孝則准教授に深謝いたします。

本研究の遂行に際して、ご協力いただきました協和発酵キリン株式会社 宮原 真紀氏、同佐藤 光氏、始め皆様に御礼申し上げます。

最後に、このような勉強する環境を与え支えてくれた家族に心から感謝いたします。