



●抗体精製用アフィニティークロマトグラフィー充填剤 TOYOPEARL® Super A の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 セパレーション G

宇野 雅俊
佐藤 龍一
村中 和昭
小林 秀峰

1. 緒言

抗体医薬品は、特定の分子に選択的に結合する性質を有するバイオ医薬品の一種であり、がんやリウマチ等の治療薬として 100 種類以上の抗体が承認されている。抗体医薬品の市場規模は大きく、2025 年には全世界で約 3,000 億米ドルに達すると見込まれている¹。しかし、抗体医薬品は従来の低分子医薬品に比べて製造コストが非常に高く、コスト低減が大きな課題となっている。

抗体医薬品は、培養細胞によって産生された抗体分子を精製することで製造される。初期精製工程で用いられる Protein A アフィニティークロマトグラフィー (Protein A-AFC) は、抗体を分子特異的に吸着させることで精製する技術である。しかし、比較的価格が高く、劣化しやすい Protein A-AFC 充填剤を使用するため、製造工程全体におけるコストに占める比率が高いとされている²。よって、Protein A-AFC 充填剤は効率よく培養液から抗体を精製できることが求められている。

Protein A-AFC 充填剤を用いた精製の効率化に重要な項目は「充填剤使用量あたりの抗体精製量が多いこと」、「充填剤を繰り返し使用しても性能を維持すること」、「高流速で使用可能なこと」の 3 点である。これらはそれぞれ「抗体の動的吸着量」「アルカリ洗浄耐性」「基材の通液特性」を指標として評価されることが多い。また、Protein A-AFC は精製工程の初期段階に位置し、この工程で得られる粗精製物の純度が高いほど後工程の精製効率が向上するため、高い不純物除去能も重要とされる (図 1)。

Protein A-AFC 充填剤は、多孔質粒子基材の表面に、抗体分子へ特異的に結合するタンパク質 Protein A を結合させた構造を有するものが主流である。我々は、2010 年に高流速型の TOYOPEARL AF-rProtein A-650F (A-650F)、2013 年に高吸着型の TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (HC-650F) を商品化してきた。



図 1 抗体医薬品の一般的な製造スキーム

特に HC-650F は高い吸着量が特徴で、市場で高い評価を得ている。

今回、HC-650F と同等の吸着量に加え、アルカリ耐久性、通液特性、不純物除去能を向上させた TOYOPEARL Super A (Super A) を開発した。本稿では、Super A の基本性能について、既存製品および他社市販品との比較を交えて報告する。

なお、本製品の開発は、抗体の精製工程の効率化を通じて、抗体医薬品の生産コストが低減され、より多くの人々の健康に貢献することを目的としている。

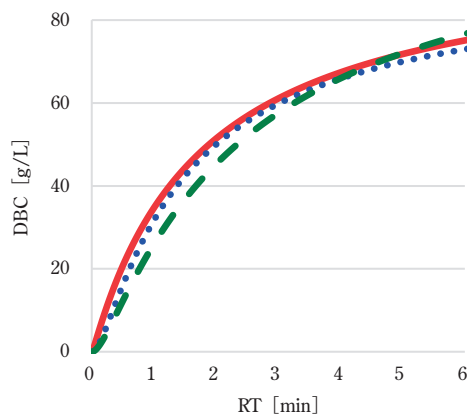
2. Super A の充填剤としての性能

Protein A-AFC 充填剤に求められる性能として、重要な指標は「抗体の動的吸着量」「アルカリ洗浄耐性」「基材の通液特性」の 3 項目である。さらに、不純物除去能の指標として挙げられるのは、抗体凝集体に関わる「抗体の溶出 pH」と、原料由来の不純物に関わる「宿主由来タンパク質類の残留量」である。以下、Super A の各性能指標について詳述する。

[1] 抗体の動的吸着量

動的吸着量（Dynamic Binding Capacity：DBC）は、充填剤に連続的に試料溶液を通液させながら測定する単位充填剤量当たりの抗体吸着量の指標であり、高いDBCはコスト要因である充填剤の使用量を削減できる。DBCは滞留時間（Residence Time：RT）と正の相関があり、DBC-RT特性曲線から各製品の特徴を評価できる。

新製品 Super A、既存製品 HC-650F、および他社市販品のDBCを測定し、得られた結果から算出した特性曲線を図2に示す。いずれの製品も高い吸着量を示したが、頻用されるRT = 4 min付近ではSuper Aが最も高い吸着量を示した。また、Super-AはRTが高い高流速域において、他社市販品よりも高い吸着量を示した。



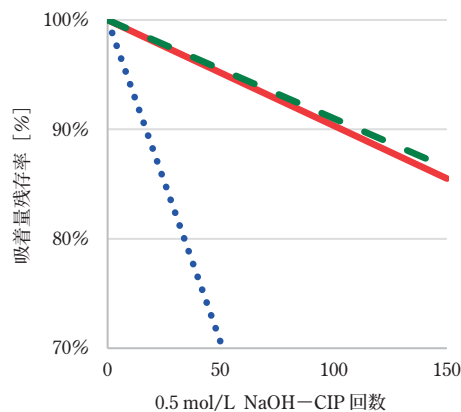
赤色実線：Super A、青色点線：HC-650F、緑色破線：他社市販品
カラムサイズ：6.0 mmI.D.×4.0 cm（充填剤量：1.1 mL）
試料：1.0 g/L ヒトモノクローナル抗体
吸着液：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）
検出：UV 280 nm
DBC 測定基準：10%破過

図2 DBC-RT 特性曲線

[2] アルカリ洗浄に対する耐性

Protein A-AFC では、不純物や汚染物を除去して性能を元に戻すため、精製バッチ間ではNaOH水溶液を用いた定置洗浄（Clean In Place：CIP）が行われる。しかし、NaOHによるCIPは充填剤の吸着量を低下させる要因である。低下率が一定に達すると製品寿命と見なされるため、高いアルカリ洗浄耐性は充填剤の更新頻度削減に寄与する。

[1] と同じ3製品に対し、0.5 mol/L NaOH水溶液を用いた耐久試験を実施した結果を図3に示す。Super Aは高いアルカリ耐性を示し、100回の洗浄操作に対し、吸着量は10%の低下に抑えられており、HC-650Fに対して約6倍の耐久性を示した。



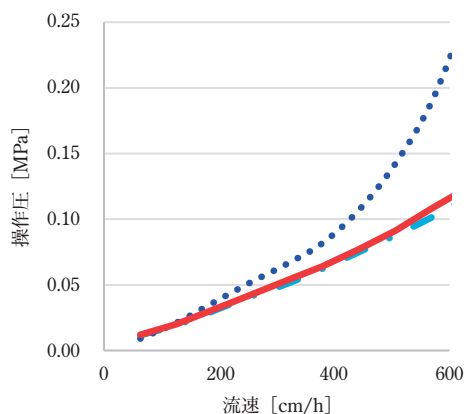
赤色実線：Super A、青色点線：HC-650F、緑色破線：他社市販品

図3 アルカリ耐久試験の結果

[3] 基材の通液特性

充填剤は通液時に操作圧が発生するが、充填状態が正常であれば操作圧は流速と比例する。しかし、通液特性の悪い充填剤は、一定以上の流速において、流速に対して圧力が指数関数的に増大する性質を有するため、高流速条件での使用が難しく、精製プロセスの高効率化を阻害する。

通液特性を評価するため、当社3製品の圧力-流速依存性の測定結果を図4に示す。HC-650Fは圧力の非線形な上昇傾向が見られたのに対し、Super Aは圧力と流速の比例関係を維持し、良好な通液特性を示した。



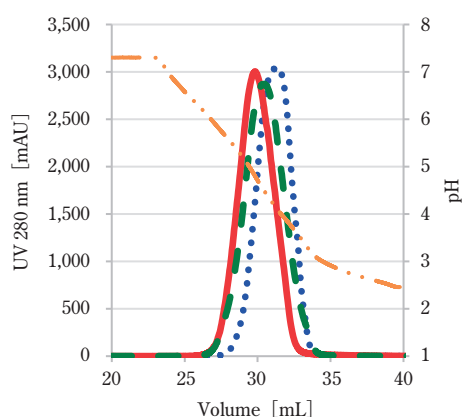
赤色実線：Super A、青色点線：HC-650F、水色点破線：A-650F
カラムサイズ：22 mmI.D.×20 cm（充填剤量：76 mL）
溶媒：純水

図4 流速と操作圧の相関

[4] 抗体の溶出 pH

Protein A-AFC は中性条件で抗体を吸着させ、酸性条件で溶出・回収する。しかし、抗体は酸性条件で凝集体を形成することがあり、低い pH での溶出は回収抗体の純度低下を招く。その結果、収率が低下し、コスト増大の要因となる。そのため、より温和な酸性条件で抗体を溶出できる性能が望ましいとされる。

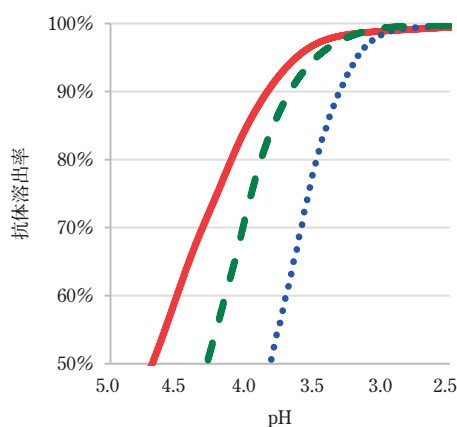
[1] と同じ 3 製品に対して中性条件下で抗体を吸着後、pH グラジエント溶出を行った結果を図 5、溶出特性曲線を図 6 に示す。Super A は pH 4 で 90% の抗体が回収されており、他社市販品より温和な酸性条件で溶出可能であることが示された。



赤色実線：Super A、青色点線：HC-650F、緑色破線：他社市販品
 橙色点破線：pH (右縦軸)

カラムサイズ：6.0 mmI.D.×4.0 cm (充填剤量：1.1 mL)
 試料：1.0 g/L ヒトモノクローナル抗体
 吸着液：0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)
 溶出液：0.1 mol/L クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)
 検出：UV 280 nm

図 5 グラジエント溶出クロマトグラム



赤色実線：Super A、青色点線：HC-650F、緑色破線：他社市販品

図 6 溶出特性曲線

[5] 宿主由来タンパク質の残留量

Protein A-AFC は Protein A の抗体特異的結合能を利用して高純度の抗体を回収するが、培養液中の宿主由来タンパク質類 (Host Cell Proteins : HCP) を完全に除去することは困難である。Protein A-AFC で除去できなかった HCP や抗体凝集体は、次工程以降のイオン交換クロマトグラフィーや疎水クロマトグラフィーなどで除去されるが、Protein A-AFC 工程で回収した抗体溶出液に含まれる不純物が少ないほど、次工程以降での精製効率が向上する。

Super A および他社市販品を用いて培養液から抗体精製を行い、酸溶出液中の不純物量を ELISA 法および SEC 法で測定した結果を表 1 に示す。Super A の溶出液は、いずれの不純物も他社市販品より少なく、高純度で精製できていることが示された。

表 1 溶出液中の不純物濃度

不純物	Super A	他社市販品
HCP 濃度 [†] [ppm]	143	576
抗体凝集体 [‡] [%]	1.70	3.30

[†] ELISA 法で測定、[‡] SEC 法で測定

3. まとめ

本稿では、抗体医薬品の初期精製に用いられる Protein A アフィニティークロマトグラフィー充填剤において、既存製品よりも性能を向上させた新製品 TOYOPEARL Super A の性能を紹介した。Super A は高い吸着量・頑強なアルカリ耐性・良好な通液特性によって、最小限の充填剤量で多量の抗体を高効率で精製可能である。また、精製した得られた抗体溶液の純度は非常に高く、精製プロセス全体の高効率化に寄与する。

本製品が今後も成長を続ける抗体医薬品の生産効率向上に貢献することが期待される。

4. 引用文献

1. Antibody Therapy Market Accelerates with Breakthroughs in Monoclonal Treatments and Expanding Clinical Use - Antibody Therapy Market Size and Forecast 2025 to 2034, Precedence Research
2. Bansode, V., Gupta, P., Kateja, N. and Rathore, A.S., Contribution of protein A step towards cost of goods

for continuous production of monoclonal antibody therapeutics. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **97**: 2420-2433 (2022).

本報告中における TOYOPEARL は日本およびその他の国における東ソーの登録商標です。

開発担当者

第二開発部セパレーション G

宇野雅俊、佐藤龍一、村中和昭、小林秀峰