

抗体医薬品生産培養技術の課題と展開

金子 佳寛

人間の体内には免疫システムという優れた防御機構があり、それを利用したのが抗体医薬品である。特に高純度で特異性の高いモノクローナル抗体は、疾患に関係する抗原だけを特異的に認識して結合する性質があり、多くの診断や治療の現場で使用されている。KohlerとMilstein (1975)¹⁾によってハイブリドーマ技術が確立されてから35年以上が過ぎ、この技術は医薬品の源として利用可能なモノクローナル抗体を次々と創出してきた。今では全世界で48以上の抗体医薬品がさまざまな疾患治療のために承認され、その何倍もの数が臨床開発中²⁾である。近年その需要量は増大傾向にあり、社会的ニーズとして薬効があり安全性の高い高品質の抗体医薬品をより効率的に生産するシステムの構築が求められている。本稿では抗体医薬品の安定生産・低コスト化に向けた取組みからスケールアップの実例や培養工程の開発例、培養技術における未解決な重要課題について紹介する。抗体医薬品の安定生産・低コスト化が求められる背景として、抗体医薬品は、これまでのエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子といったバイオ医薬品と比較して、1回の投与量が多く、必要製造量が格段に多いことがあげられる。抗体医薬品を必要とされている患者さんに確実かつ安定な供給を実現し、同時に高コスト構造から脱却して低コスト化を実現するためには、より生産性の高い効率的な生産システムを追求していく必要がある。その一環として、培養工程のスケールアップや技術開発を電荷的多様性などの抗体特有の物性プロファイルを十分に理解しながら課題解決していくことが要求される。

抗体医薬品とは

抗体医薬品には抗がん薬としてのアバスタチン、ハーセプチンや関節リウマチ治療薬としてのヒュミラ、エンブレル、レミケード、アクテムラなどが知られており、がん領域をはじめとして自己免疫疾患領域の製品が多い。抗体は抗原だけを特異的に認識して結合する性質をもつことから、たとえば抗がん薬としてのアバスタチンは血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) を抗原として認識する抗体であり、血管新生を抑制することでがん細胞の栄養供給に必要なルートを遮断する。ハーセプチンは乳がん細胞上のタンパク質 (抗原) であるヒト上皮成長因子受容体2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 : HER-2) に結合する抗体で

ある。詳細は弊社のHPをご覧ください(図1参照)、ここでの抗原タンパク質が異物であることを示す目印となることで、抗体がくっつき免疫細胞を呼び寄せ、がん細胞を殺傷する。がん細胞に特異的に発現している抗原タンパク質 (目印) が正常細胞にはほとんど発現しておらず、正常な細胞にはほぼ影響を与えない。関節リウマチ治療薬としてのヒュミラやレミケードでは、リウマチの炎症を引き起こすトリガーとなる物質の一つ、過剰産生された腫瘍壊死因子 α (Tumor Necrosis Factor α : TNF α) を抗原として認識し、これに対し特異的に結合することで炎症や関節破壊を抑制する効果を発揮する (アクテムラはInterleukin-6 : IL-6受容体に結合する抗体で、リウマチの原因物質の一つIL-6のシグナル伝達を阻害することによって抗リウマチ効果を発揮する)。

抗体医薬品の特徴

抗体医薬品は疾患に関係する抗原だけを特異的に認識して結合できることから、特異性が高く副作用が少ない特徴をもつ。さらにサイトカインなどのほかのバイオ医薬品に比べて投与量が多いこともあげられる。加えて、特殊な分子特性 (巨大な分子量・複雑な構造・翻訳後修飾) をもち、生物の合成系 (特に動物細胞培養) を利用して製造することから、不純物の中から目的の抗体を作るイメージで、本質的に不均一性を含む。また、感染因子への配慮も必要である。さらには動物種によって、細胞から分泌生産される抗体の糖鎖構造に差があり、ヒト細胞はヒトの糖鎖構造を維持するので、その点は有利と

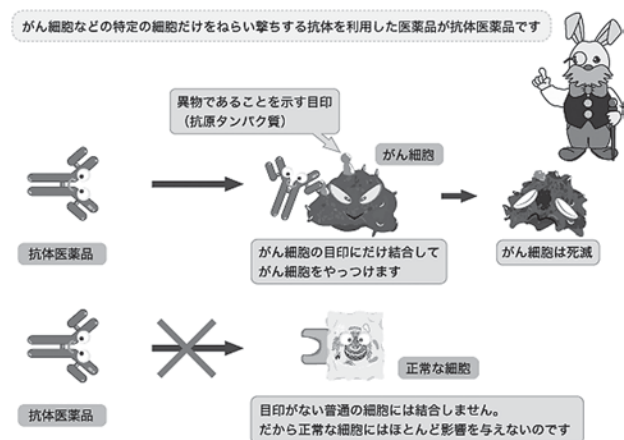


図1. 抗体医薬品とは (弊社HPより転載)

著者紹介 中外製薬 (株) 製薬研究部生物技術担当 (グループマネージャー) E-mail: kanekoys@chugai-pharm.co.jp

考えられるが、万一ウイルスの汚染があった場合にはヒトにすぐに感染する危険もはらんでいる。現在、浮遊馴化したチャイニーズハムスターオーバリー（CHO）細胞はバイオリスクに関わる情報が明確であり安全性が高い上に、細胞の増殖性が良く、規制当局による医療用タンパク質製造の使用許可を広く得ていることがあり、世界中で多く使用されている³⁻⁵⁾。

抗体医薬品市場の現状と今後

2005年から2010年までの抗体医薬品市場（世界）の年平均成長率は20%であり、医薬品市場全体の4%、医療用タンパク質製品の11%と比べて顕著に高い成長率を示しており、近年その存在感がますます高くなってきている。2010年の世界バイオ医薬品トップ10のうち、ヒュミラ、エンブレル、レミケード、アバスタチン、ハーセプチンを含む7品目が抗体医薬品である。国内に目を向けると2002年に初めて抗体医薬品としてレミケードが発売されたのを皮切りに、年々抗体医薬品の占める割合が増大し、2011年ではバイオ医薬品市場全体の44.8%を占めるまでに至っている。抗体医薬品市場は今後も成長を続けていくものと予測されており、副作用の少ない薬として、またアンメットメディカルニーズに対する新薬としての期待が高まる一方で、ほかのバイオ医薬品に比べて投与量が多く必要製造量が格段と多いことから安定供給体制・低コスト化への取り組みが一層と求められている。

安定供給・低コスト化に向けた取り組み

第一に堅牢性を確保することが重要となる。そのためには、製法の能力を十分に理解し、品質を良く理解することが求められる。第二に生産性の向上、つまり、効率を追求しつつ需要に適合するよう生産量を最大化していく。培養工程では生産量を上げるための手段として、①生産量を増加させる、②スケールアップを行う（培養タンクを大きくする）、③設備を拡張する（培養タンク数を増やす）ことがあげられる。参考として、精製工程ではスループットを高める手段として、①スケールアップを行う（カラムの大型化/膜面積の増量）、②設備を拡張する（精製ラインを複数用意する）、③キャパシティをあげる、④精製速度を上げる（Run数を稼ぐ）ことがあげられる。たとえば、生産量を増加させるためには、目的のプロダクト（抗体医薬品の基となる原薬）を高発現する細胞株の樹立が大前提となるが、その細胞株のポテンシャルを最大限に引き出すための培養方法（培地、培養条件）を徹底的に最適化する必要がある。その際に単に生産量を上げれば良いのではなく、安全性・有効性に影響を与えずに、求められる品質を維持しながら生産量を増加させることが重要となる。

抗体医薬品製造の培養工程と開発例

抗体医薬品の製造（培養）工程は、液体窒素の気相中に凍結保存されている抗体産生細胞株を凍結融解（細胞起こし）することから一般的にスタートする。ここでいう抗体産生細胞株は、一過性発現ではなく安定発現株を使用し、製造時における堅牢性を維持するために、限界希釈法などによりシングルセルクローニングを施した均一性の高い細胞集団を指し、マスターセルバンク（MCB）やワーキングセルバンク（WCB）としてセルバンク化されたものである。スピナーフラスコなどで細胞を起こした後、培地組成・温度・攪拌条件・ガス交換・pHなどの培養パラメーターをコントロールしながら拡大培養を行い、最終的に数千～1万Lスケールの生産培養槽にて生産培養が行われる。生産培養後は遠心分離やフィルターろ過によって細胞が取り除かれた後、培養液中に産生された目的タンパク質（抗体）は精製工程へ移送される。種々のクロマトグラフィーによる不純物除去、濃縮などの精製工程を経て抗体医薬品の基となる原薬になる。弊社にて製造されている抗体医薬品アクテムラの場合、宇都宮工場にアクテムラ専用の生産培養槽（1万Lスケール）を8基擁している。

次に培養工程の開発例を紹介する。製法開発段階では生産量を最大化するのだが、一般的には主流であるフェドバッチ培養法の培養条件を最適化することで目的を達成していく。また、この段階では品質に影響を与える培養パラメーターを特定することがきわめて重要となる。

開発ステージが進んで製法のvalidationと評価の段階になると、製造スケールにて①堅牢性（生産量や細胞生存率）の確認、②再現性（培養制御）の確認、そして③滅菌/洗浄validationを行う必要がある。同時に、実験室スケールにて①スケールダウンモデルの構築、②培地ロット間差試験、③操作範囲の検証を行う。中でもスケールダウンモデルの構築はきわめて重要となる。製造スケールは大容量であることから1回の操業を実施するだけでも非常に大きなコストがかかる上、製造のための設備占有率が高いために検討に必要な多くの操業を短期間に実施することはできない。そのため製造スケールを反映したスケールダウンモデルの構築は開発を効率良く進めるための前提であり、このスケールにて培地やその添加物として利用されることのある加水分解物などのロット間差を確認する原材料試験や製造時オペレーションの許容管理幅の検討などを行う。

世界的な潮流と未解決な重要課題

安定供給体制・低コスト化への取り組み（コストの追求）は世界的な潮流としてますます進展していくものと考えられる。この実現には、まず高い生産性を実現するためのマテリアルとして不可欠な高産生細胞株（安定発現株）

を早期に取得する技術の確立が必要である。また、製造スケールへのスケールアップ工程を含めた製造期間が非常に長いため、①樹立した細胞株が長期間にわたって安定した培養ができる方法を確立した上で⁴⁾、②生産培養時に細胞株のポテンシャルを最大限に引き出すための高生産培養法を開発し、さらに、③汎用性の高い技術としてプラットフォーム化していくことが重要である。したがって、抗体医薬品生産培養技術の重要課題は、長期間にわたって再現性の高いアウトプット（産生量）を実現する堅牢性、高生産性に加え、その生産性とトレードオフの関係となる品質を高い状態で維持することである。高品質を維持した効率的な生産培養方法を構築するためには、目的生産物である抗体の修飾メカニズムを十分に理解した上で培養制御することが重要である。抗体は特殊な分子特性から、抗体そのものに電荷の多様性があり、これをコントロールする必要がある。たとえば、一般的なCHO細胞のバッチ培養では、培養後期に生存率が低下する。培養日数の異なる培養上清サンプルをプロテインAカラムクロマトグラフィーにより精製し、イオン交換クロマトグラフィー（IEC）プロファイルと比較評価した結果を図2に示した⁵⁾。IECのメインピークbの肩に検出されたピークSは培養後期の7日目に出現しており（1.65%）、さらにピークaの前にあるマイナーピークx1とx2は8日目（0.66%）と10日目（0.30%）で初めて観察された（表1）。遺伝子組換えにより創製された抗体の電荷的多様性が報告されており、すべての改変が相補性決定領域内で見られた^{6,7)}。図2と表1で示した抗体の電荷的多様性比率のプロファイル変化（Peak S, x1, x2）も、このような改変が細胞死により細胞外に出されたプロテアーゼなどにより比較的容易に酵素修飾されやすいために生じた可能性が考えられた。最終的にどのピークを不純物と判断するかは未知ピークを分取し毒性試験などの安全性試験を含め多面的に評価した上で決めることになる。たとえば培養7日目の品質プロファイルで安全性が認められた場合には、培養8日目、培養10日目で新たなピークとして検出されているx1, x2ピークは、抗体の多様性を含めた生産物の品質保証の面から逸脱することになる。そこで、培養7日目の生存率（19.4%）を下回る前に培養をストップさせることで品質の逸脱を回避することが可能となる。

上述ではあまり触れなかったがコストの追求には製造に使用する原材料コストを下げることも必要であり、未解決な課題となっている。動物細胞培養に使用する培地は微生物や植物細胞培養に比べて高価である。また、発現系に限らず抗体の精製に使用する樹脂はプロテインAを含めて大変高価である。この十数年で産生量はmg/Lのオーダーからg/Lのオーダーへ飛躍的に改善したが、10 g/Lまで生産性が改善してもこれに追従できる精製法がまだ見いだせていないのが現状であり、高産生量に適

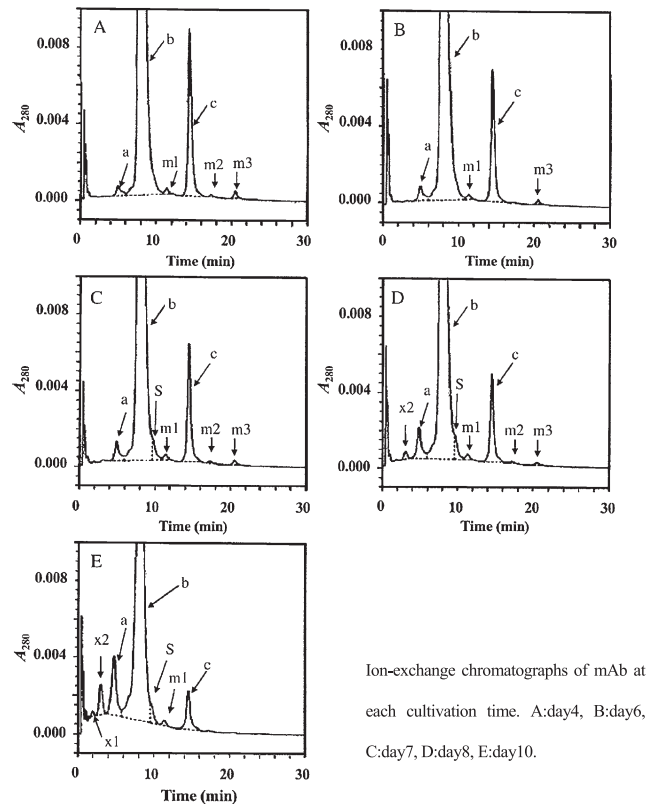


図2. 抗体の電荷的多様性（CHO細胞培養例）⁵⁾

表1. 抗体の電荷的多様性（培養日数と各ピーク比率の変化）⁵⁾

Sampling Date	Peak Area Ratio (%)								
	x1	x2	a	b	S	m1	c	m2	m3
Day 4	ND ^a	ND	1.06	84.48	ND	0.46	13.34	0.15	0.51
Day 6	ND	ND	1.59	87.00	ND	0.46	10.65	ND	0.30
Day 7	ND	ND	2.11	85.60	1.65	0.51	9.69	0.15	0.29
Day 8	ND	0.66	3.52	85.63	1.96	0.55	8.01	0.12	0.20
Day 10	0.30	2.99	7.71	84.95	1.57	0.58	4.89	ND	ND

^aNot detected

した精製方法の確立もまた未解決な重要課題である。今後、安価な培地・樹脂の開発に加えて、既成概念に囚われない画期的な低コスト生産方法の開発が望まれるところである。

文献

- 1) Kohler *et al.*: *Nature*, **256**, 495 (1975).
- 2) Walsh *et al.*: *Nat. Biotech.*, **28**, 917 (2010).
- 3) Omasa *et al.*: *Cur. Pharm. Biotech.*, **11**, 233 (2010).
- 4) Kaneko *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 274 (2010).
- 5) Kaneko *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 281 (2010).
- 6) Harris *et al.*: *Biomedical Sci. and Appl.*, **752**, 233 (2001).
- 7) Vlasak *et al.*: *Cur. Pharm. Biotech.*, **9**, 468 (2008).