

連載企画

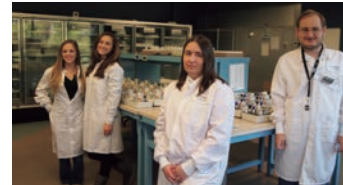
フロンティアーズ

## FRONTIERS


  
part of Maravai LifeSciences

www.cygnustechnologies.com

Cygnus Technologies 社 (1997 年創業, 本社: アメリカ) は, 宿主細胞由来タンパク質 (HCP: Host Cell Protein) やその他のバイオプロセスに関連する混入物質の検出と分析を行う製品とサービスを提供しています。



## バイオ医薬品開発における混入物分析の重要性

遺伝子組換えにより細胞で発現させたタンパク質 (最終産物) には, 混入物として HCP や宿主細胞由来の DNA, 製造工程由来の不純物である BSA などの血清成分, 培地成分, 添加物, 精製用レジン (担体) の成分が含まれます。

HCP は, 組換え抗体, タンパク質, ワクチン, 遺伝子治療や細胞治療のためのウイルスベクターなどを産生する時に, 宿主細胞から分泌されたり, 製造工程で細胞が溶解したりすることで生成されます。

多くの HCP は無害ですが, 中には免疫原性を持つものや, 原薬と相互作用するもの, 原薬に直接作用することで有効成分を減少させるもの, 製剤のバッファーに干渉することでその安定性を低下させるものが存在します。

こうした成分の最終産物への残存は, **医薬品の安全性, 有効性および安定性に影響を及ぼす**可能性があるため, 可能な限り最小限のレベルまで削減・除去する必要があります。そのため HCP の測定は, バイオ医薬品開発におけるリスクマネジメントにおける重要項目の一つです。

## HCP 検出の難しさ

HCP を正確に測定できる ELISA を構築することは容易ではありません。HCP 測定用の ELISA は単一の標的因子を検出・定量するのではなく, **数百から数千種類の個々のタンパク質をひとつのアッセイで定量するもの**だからです。

これらのタンパク質は, サイズ, 免疫原性, 生物活性などの点で非常に異なっており, これらが複雑に入り混じっている試料の中からより多くの HCP を測定できる広範な反応性を持った抗体を作製しなければなりません。また, 各プロセス段階や原薬中の HCP の組成が全く異なる場合もあり, HCP を等しく検出する ELISA 系の構築は困難です。

Cygnus 社では独自の技術により, **試料中の HCP を幅広く検出できる抗体プール**を開発し, 汎用 HCP ELISA キットとして販売しています (p.14~15 参照)。

## HCP/タンパク質産生過程で混入する異物の検出キット ▶ p.14~

### ELISA ▶ p.14~15

精製の各段階での HCP 検出・半定量に適しています。  
ウェスタンブロットングよりも高感度な検出が可能です。

高感度

半定量

### DNA 検出試薬 ▶ p.16

試料中に混在する宿主細胞由来 DNA を高感度に検出します。  
CHO 細胞由来/E. coli 由来/NS/O 細胞由来 DNA 用の, チューブまたはウェルフォーマットの製品があります。

高感度

定量

### 定量的 PCR ▶ p.16

CHO 細胞由来/E. coli 由来 DNA 用の, チューブまたはウェルフォーマットの製品があります。

定量

### ウェスタンブロットング ▶ p.14

精製初期段階での HCP 検出に適しています。バンド当たり 1 ng 程度の感度で検出が可能です。

検出

## ウイルスクリアランスの評価

## MockV MVM キット ▶ p.17

バイオ医薬品の製造において、ウイルスの混入リスクは避けて通れません。細胞バンク由来か、製造工程由来かに関わらず、ウイルス汚染が起こると深刻な健康被害のリスクが生じます。そのため、各国の規制当局はバイオ医薬品企業に対し、臨床試験の前や市販薬として認可される前に、製造プロセスにおけるウイルス除去の有効性の検証を求めています。

現在、ウイルス除去効率の検証は小規模なスパイク試験によって行われていますが、これにはスパイク試験に特化したバイオセーフティレベルの実験室と十分な訓練を受けた人材が必要であり、その結果、バイオ医薬品の開発コストが高騰する要因にもなっています。2020年、Cygnus社は、バイオ医薬品業界が求めるプロセス開発の初期段階でのウイルスクリアランス評価のニーズに応えるため、**MockV MVM アッセイキット** (p.17) を発表しました。非感染性の疑似ウイルス粒子 (MVP, Mock Viral Particle) を使用するユニークな手法で、ウイルスクリアランス研究に伴うコストとリスクを軽減することができます。**経済的かつ実用的で、正確にウイルスクリアランスの有効性を評価できる唯一の市販キット**です。

## Cygnus Technologies 社のミッション、ビジョン

Cygnus社が初の汎用 CHO 細胞 HCP ELISA キットを開発・商品化したのは20年以上前のことです。業界のパイオニアとして、現在ではバイオ医薬品の開発・製造に使用されるほぼすべての細胞培養系の HCP ELISA キットのほか、精製レジン由来の浸出物 (プロテイン A, AAV リガンド)、増殖培地の添加物 (インスリン, BSA など)、下流工程の酵素 (エンドヌクレアーゼ, ベンゾナーゼなど) の混入を検出する ELISA キットなど、数多くの製品をご提供しています (p.15)。

Cygnus社は、医薬品業界と各国の規制当局からその高度な技術を高く評価されています。新技術である**抗体アフィニティ抽出法 (AAE 法)** と質量分析を組み合わせた AAE-MS を、これまでノウハウを培ってきた HCP ELISA と組み合わせることで、バイオプロセスにおける混入物検出技術をさらに発展させていきます。また、数多くの世界的なバイオ医薬品企業の医薬品製造プロセスに特化した、カスタム HCP ELISA の開発も行っています (p.17)。

当社の目標は、規制当局からの要求の早期解決や、医薬品候補の安全性を高めることによる臨床試験移行パイプラインの増加など、プロセス開発初期から最終製品上市に至るまでをお手伝いすることで、よりスムーズなバイオ医薬品の上市に貢献することです。

## Cygnus 社独自の AAE 法とは

組換え体タンパク質の産生において、精製プロセスの一貫性および産物純度の確認に用いられる HCP ELISA 測定系には、試料中に存在する幅広い HCP に対する交差が求められます。測定系で使用しているポリクローナル抗体の試料中総 HCP に対する網羅性 (カバー率) 評価にはこれまで 2D ウェスタン法が行われてきました。しかし 2D ウェスタン法は変性させた試料に抗体を反応させる点などから、感度および特異性に不十分な点があります。

## AAE 法と従来法の比較

検出法	AAE 法	2D ウェスタン法 (従来法)
感度	≧95%	50~70%
特異性	≧99.5%	(~50) ~80%
適用試料	製造の初期・最終工程	製造の初期工程のみ



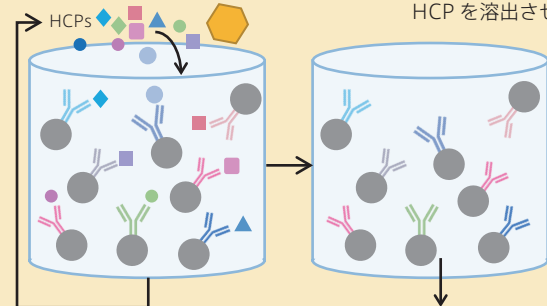
Cygnus (シグナス) という名前は、英語で白鳥のヒナを意味する「cygnet」に由来しています。創業者の Ken (Dr. Kenneth Hoffman) が鳥好きで、「みにくいアヒルの子」の物語が好きだったことも影響していると言われています。

また、はくちょう座 (Cygnus) はギリシャ神話にエピソードがあり、重要な星座でもあります。このロゴは、Ken の娘である Melissa がデザインしました。尾が抗体の形をしているのがポイントです。

この20年間で、Cygnus社製品は HCP 検出のグローバルゴールドスタンダードへと成長を遂げました。今日、Cygnus社の真価はバイオ医薬品業界において発揮されています。

AAE 法は下記の手法により、高い感度で抗体の評価を行います。

- ① 抗 HCP 抗体を樹脂に固定したアフィニティカラムに繰り返し HCP 試料をアプライし、抗体に HCP を最大量結合させる。
- ② その後、HCP を溶出させる。



- ③ **二次元電気泳動+銀染色** and/or **質量分析** にてアプライ前の HCP 試料と溶出後 HCP 試料の比較評価を行う。
- ④ ELISA に使用している抗体が抗原 (HCP) 全体のどれくらいの割合を認識しているかが分かる。(例えば上記では 10 種類中 8 種、カバー率 80%)

※未捕捉の HCP を MS 分析で同定するオプションもあります。