

氏名	<small>みなくち かずのぶ</small> 水口 和信
授与学位	博士(生命科学)
学位記番号	医博甲第1326号
学位授与年月日	平成25年9月4日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科, 専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程)応用分子生命科学系専攻
学位論文題目	プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる抗体の効率的精製のための工学的解析
論文審査委員	主査 山口大学 教授 山本 修一 山口大学 教授 赤田 倫治 山口大学 教授 堤 宏守 山口大学 准教授 田中 一宏 山口大学 助教 吉本 則子

## 【学位論文内容の要旨】

プロテインAアフィニティークロマトグラフィー(PAC)は、高機能医薬品として期待されている抗体医薬品の必須精製プロセスとして利用されている。しかしながら、PAC担体(充填剤)は高価であり、プロセスの最適化や担体の有効利用が必要である。また、そのための迅速な条件設定方法(high-throughput process development method)の開発も急務である。本研究では、PACによる抗体の効率的精製のための工学的解析を行った。

PACにおいてプロテインAリガンドの化学的安定性の向上は、効率的な洗浄を可能とし、担体寿命を延長しうる。また、リガンド特性は、抗体を効率的に結合・溶出するための重要なファクターとなる。計算化学と遺伝子工学的手法を用いたリガンド改変技術を用い、PCAの高寿命化にかかる耐化学薬品性の付与と抗体の溶出特性改良を行った。遺伝子工学技術を用いたランダム変異導入により、リガンド特性を改変する試みが多数実施されてきたが、医薬品製造用のリガンドであることから、より少ない変異導入に留めることが求められていた。そこで計算化学を用いた構造予測に基づく熱力学的安定性の解析をベースに、プロテインAの抗体結合性ドメイン1つにつき、2個の変異導入のみでその性能を改変した。一つはアルカリ耐性にかかる変異とし、0.1mol/Lの洗浄を可能とした。もう一つは、プロテインAが抗体のFc部分とFab部分に結合する特性に着目した変異である。抗体のFc部分のうちプロテインAと結合する部分の保存性は高く抗体毎にそのアフィニティは大きく変化しないが、Fab部分はサブクラスおよび抗体毎に結合力が異なり溶出pHの幅を大きくすることが知られていた。よって、先に導入した耐化学薬品性にかかる変異と共にFabへの結合能を欠くような変異を導入し、溶出時の酸性pHを全ての抗体に対し3.5~4.0の間に制御できるプロテインAリガンドを有する担体を創出した。本研究に用いるプロテインA担体は、ここで得られたリガンドを用いたものを中心にPAC工程に関し効率的な精製プロセス構築にかかる知見を得た。次に、PACにおける抗体の拡散物質移動を考慮した吸着特性推定モデルを用い、各管理パラメーターの相関関係を評価した。実際のPAC操作においては、短時間にできるだけ多量の抗体をPACに結合させる条件を推定しなければならない。抗体のPACにおける

動的吸着量 DBC は流速あるいは滞留時間に依存する。流速を速くするあるいは滞留時間を短くすると DBC は減少するが、これは抗体の拡散物質移動抵抗によるものである。

拡散物質移動抵抗は細孔内拡散係数  $D_s$  と粒子径  $d_p$  により推定することができる。非吸着状態における等組成溶出実験から、さまざまな PAC カラムについて  $D_s$  を測定した。次に、破過曲線実験から 10% の DBC と 55-60% の DBC をほぼ制的吸着量 SBC として決定した。DBC/SBC はカラム有効利用率を表し、 $D_s$ ,  $d_p$ , 滞留時間 ( $Z/u$ ) の関数となる ( $Z$ : ベッド充填高さ、 $u$ : 移動相線速度)。直角平衡 (不可逆吸着) の定形濃度分布解から DBC/SBC は無次元変数  $ud_p^2/ZD_s$  の関数となると導かれる。さまざまな PAC に対する DBC/SBC の実験結果は、 $ud_p^2/ZD_s$  によく相関した。この工学 (数学) モデルから、各種担体に関し、滞留時間、粒子径、ベッド高といった操作パラメーターとカラム有効利用率を推定することができる。 $D_s$  は非吸着条件で測定するので、少量の試料溶液を用い短時間で実験を行なうことができるが、0.5mL 以下のカラムでは充填特性の影響が大きく、配管その他の死体積の見積もり誤差の影響を受けることからスケールダウン実験の限界が示唆された。小型カラムの充填状態は DBC, SBC にも影響するので、より信頼性の高い情報を得るには、適正に充填されたカラムを用いる必要があるが、担体毎に充填特性が異なることから、その適切なスケールは担体毎に異なる。小型カラムへ一律なスケールダウンを行って各種担体間の比較検討を行う場合には、その結果解釈の妥当性に関し潜在リスクが存在する。正確な測定のためには最低でも 1mL 容以上のカラムでの測定が推奨された。

カラム実験は、パッキングからその評価まで一定の時間を有し、正確な評価結果を得ようとする場合、SBC の測定等には多くの担体および試料溶液を必要とする。より少量の担体および試料で、より高いスループットで担体性能を評価する手法として 96 ウェルマイクロプレート (MP) を用いた HTS (ハイスループットスクリーニング) 手法が SBC 測定に利用できるかその妥当性を評価した。HTS による試験では、吸着平衡に達するまでの時間が担体毎に異なる点に注意する必要がある。これは担体毎に細孔内拡散係数が異なることと相関する。0.1-0.2 mL の作業溶液量と 0.01mL 以下の PAC 担体で吸着実験が可能であり、特に SBC の算出には魅力的な手法である。MP を用いた HTS 手法は、プロテイン A クロマトグラフィーの溶出条件の設計にも応用可能と考えられた。MP を用いた HTS 評価系の他に、96 ウェル MP 用のリキッドハンドリングシステムに装着可能なミニカラムをロボットで操作する手法が一般化しつつある。しかしながら、上述したように、カラムスケールの問題から PAC に関しては、これらのカラムからどのようなデータがプロセス設計に利用できるかについては慎重に検討する必要がある。PAC による抗体の効率的精製プロセスの構築のためには、優れたプロテイン A リガンドの設計と開発、およびそれを固定化するための抗体精製に適切な担体 (多孔性粒子) の選択が必要である。最適に充填された PAC カラムからは動的吸着量等を、細孔内拡散係数、粒子径、カラム高さ、流速により推定することができ、生産性やベッド有効利用率などを考慮して、最適なプロセスを設計することができる。実際のプロセスにおいては、不純物の吸脱着挙動に起因する純度や回収率の低下、脱着効率や再生・洗浄方法、担体の寿命なども重要であり、今後検討が必要である。

# 【論文審査結果の要旨】

現在バイオ医薬品の主流となっている抗体医薬品の工業的規模でのクロマトグラフィー精製プロセスを効率よく実施することは重要な課題である。本論文では抗体精製プロセスで、最も重要な役割を果たしているプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー(以下 PAC)の効率的精製のための工学的解析を行っている。

はじめに、抗体との親和性を維持したまま薬剤耐性(アルカリ耐性)を持つようにプロテイン A を遺伝子工学により改変することを試みた。分子デザインにより in silico で候補を絞り込み、実際に遺伝子操作で作成したプロテイン A を調査したところ、予定通り親和性は、ほぼ維持され、また薬剤耐性が付与されていた。PAC 充填剤は非常に高価であり、その寿命を長くするためには、アルカリ洗浄が必要となる。このためには、プロテイン A に遺伝子操作でアルカリ耐性を付与しなければならないが、今回の改変プロテイン A はアルカリに強い耐性を示した。また、天然のプロテイン A は Fc 以外に Fab にも親和性を持つが、この改変プロテイン A では、Fab の親和性はほぼ消失しており、その結果、溶出時の効率を改善することができた。

PAC 充填剤は非常に高価であり、また開発初期においては、精製プロセス開発に使用できる抗体の量も限られている。できるだけ小スケールでプロセス設計に利用できる信頼性の高いデータを迅速に取得する方法が求められている。96well-マイクロプレート(MP)法により、静的吸着量(吸着等温線)の測定を行った。作業容量が 0.2mL にもかかわらず、250 倍のスケールでのデータとほぼ同等な値を得ることができた。MP では同時に多数のデータを取得できるメリットもあるが、動的吸着量についての情報を得ることは難しいことも明らかとなった。精度良い測定のためには、プロテイン A 充填剤を正確に各ウェルに分注することが必要であり、その方法は充填剤の物性により異なることを明らかとしている。また、通常のフラスコと比較すると混合かくはんが難しいこと、サンプリングすることは量的に不可能であることなどから、吸着の経時変化を測定して物質移動速度(拡散係数)を決定する方法としては適していないと考えられた。

動的吸着量の推定については、数学モデルに基づき非吸着条件下で求めた細孔内拡散係数  $D_s$ 、粒子径  $d_p$ 、滞留時間( $Z/u$ )で構成される無次元変数  $d_p^2/[D_s(Z/u)]$ により解析した。動的吸着量と静的吸着量の比(DBC/SBC)は、カラムベッド有効利用率を意味するが、DBC/SBC は、この無次元変数によく相関された。カラムの小型化について、充填剤の特性に依存するので明確な基準を設けることは難しいが、1mL 程度までは、再現性があり、工業スケールプロセス設計に利用できるデータが取れることが示唆された。細孔内拡散係数の精度良い測定のためには 15mL 程度のカラムを使用した。非吸着条件化での等組成溶出実験なので、使用する試料の量はわずかであり、実験時間も短い。

公聴会においては、化学会社や医薬品会社の研究者から、多くの質問がなされた。

質問は 主として以下の 3 つの観点に分類された。

- [1] ProteinA の抗体への親和性を遺伝子工学的的手法により自在に制御する可能性と妥当性について(Fc への親和性を消失させ Fab に結合することは可能か。溶出 pH を上げるために結合親和性を改変できるか。改変によりどの選択性が変化するのか。Fc への親和性の変化。)
  - [2] カラム性能評価に対する工学的解析におけるパラメータの意味と利用方法について(リガンド特性の有効利用への影響。粒子径の影響。)
  - [3]抗体精製のプロセス開発における課題と今後の展望について(コスト面を考慮して proteinA リガンドの改変が最適な選択肢と考えられるか。合成リガンドが主体になることはないのか。)
- どの質問に対しても発表者からの確かつ明確に回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、新規性に優れ、博士(生命科学)論文に十分値するものと判定した。