

## 学位論文の要旨

タンパク質に水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を化学修飾した PEG 化タンパク質は高い生体内安定性と低抗原性を有する優れた医薬品である。しかし既存の化学合成法 (液相 PEG 化反応) では PEG 修飾反応の精密な制御は困難である。そのため PEG 化タンパク質医薬品には修飾数および修飾位置の異なる PEG 化タンパク質異性体が含まれている。このため生成物は限外濾過, イオン交換クロマトグラフィー (Ion exchange chromatography, IEC) など複数の単位操作を組み合わせた煩雑な分離工程を経て精製される。さらにタンパク質表層には薬効発現に重要な役割を担っているアミノ酸が存在し, むやみに PEG を修飾すると活性が著しく低下する場合がある。ゆえに特定部位に PEG 鎖が修飾された PEG 化タンパク質を創成する技術が求められている。本研究では IEC 担体上へのタンパク質の固定化より PEG 修飾部位を限定し, 生成物を連続的に分離するプロセスの解明を研究目的とした。

第 1 章では PEG 化タンパク質のクロマトグラフィー分離に関連した研究についてまとめてある。

第 2 章では機構モデルに基づき IEC における PEG 化タンパク質の分子認識機構を解析した。PEG 化タンパク質と未修飾タンパク質の溶出塩濃度差は PEG 化タンパク質の PEG 水和層の厚みによく相関された。また多孔性微粒子型 (SPHP) と比較し貫通孔型 (SPMONOLITH) における lysozyme の溶出塩濃度は高い値を示したが吸着サイト数  $B$  値は同じ値をとった。これは lysozyme と基材 (メタクリレート) の疎水性相互作用のためであると推測される。さらに未修飾タンパク質と同様に PEG 化タンパク質も移動相 pH が等電点に近づくと溶出塩濃度および吸着サイト数  $B$  値はともに低下した。

固相 PEG 化反応における反応収率および修飾数・位置選択性を調べた。多孔性微粒子のイオン交換担体 (SPHP) における固相 PEG 化反応では PEG の分子量が低下するほど収率は向上した。また粒子径が小さいほど収率は向上した。これらの結果より収率は PEG の細孔内拡散効率に影響を受けると考えられる。貫通孔型のイオン交換担体 (SPMONOLITH) における固相 PEG 化反応でも PEG の分子量が低下するほど収率は向上した。しかし PEG 濃度を増加させても収率は 3 割を超えることはなかった ( $M_{w,PEG}5000$ )。貫通孔型では多孔性微粒子型よりリジン残基が遮蔽された状態で lysozyme がカラムに吸着していると考えられる。多孔性微粒子型両性イオン交換担体 (Hydroxyl apatite chromatography, HAC) では収率は 9 割に達した ( $M_{w,PEG}5000$ )。また HAC では IEC と比較し吸着サイト数がおおよそ 1 低下した。これらの結果より IEC ではカラム吸着に使用されたリジン残基が HAC では電荷反発により PEG 修飾可能な位置に存在すると考えられる。さらに PEG 修飾位置を pH 勾配クロマトグラフィーにより同定した。液相 PEG 化反応では Lys1, 13, 33, 96, 97, 116 がランダムに修飾された。一方 IEC における固相 PEG 化反応では Lys13, 97, 116 が優先的に修飾され PEG 修飾位置

を限定できた。しかし HAC における固相 PEG 化反応では液相 PEG 化反応と同様にランダムに PEG 化反応が進行した。多孔性微粒子型担体における固相 PEG 化反応では自由拡散領域である細孔内での活性化 PEG の拡散効率が低下する。このため見かけの細孔内拡散係数が低下するほど反応までに活性化 PEG が加水分解される割合が増し収率が低下すると考えられる。また IEC と比較し HAC では吸着サイト数 B 値が 1 低下したことは IEC ではカラムに吸着され修飾されなかった Lys33 が HAC では PEG 修飾されたことと対応すると考えられる。さらに B 値の低下（タンパク質のカラムへの吸着面積の低下）に伴い収率は増加する一方で選択性が低下した。一方貫通孔型 IEC カラムでは位置が限定できるものの収率は低い値を示した。

第 3 章では生成物の分離プロセスを構築するため試料（モデルタンパク質, PEG およびモデル PEG 化タンパク質）の物質移動特性を解析した。最適化されたマイクロ化 Taylor 法により分子拡散係数,  $D_m$  を測定した。また *van Deemter* 式により試料の細孔内拡散係数,  $D_s$  を算出した。また物質移動特性および分配係数  $K$  を用いて機構モデルに従い PEG 化タンパク質とタンパク質の分離度の流速依存性を算出した。PEG 化タンパク質のような分子半径の大きな分子を多孔性微粒子型クロマトグラフィーにて分離する際には、流速を増加させると分離度が著しく低下することが明示された。

第 4 章では、プラスミド・ワクチンなどの巨大分子の分離に適している貫通孔型モノリスキロマトグラフィーを用いて PEG 化タンパク質反応液の分離条件を最適化した。具体的には移動相の pH, 塩濃度直線勾配, 圧力損失などを考慮し複数の異性体を迅速に精密分離する手法を開発した。本手法は 1 測定あたり 6 分以内で実施可能であり, PEG 化反応プロセスの解析に適応できる。

第 5 章では上述の結果を総括した。

## Abstract

PEGylated protein where polyethylene glycol, PEG molecules are covalently attached to protein surface is efficient pharmaceutical product because it has high stability and shows low antigenicity due to their large hydrodynamic radius. However it is difficult to control the consecutive and competitive PEGylation reactions. Therefore reaction mixture contains various kinds of PEGmers such as mono-, di-, multi-PEGylated proteins and their positional isomers. This is not negligible issue because the biological activity and conformational stability are different from isoform to isoform. In addition multi-PEGylation causes a decrease in the activity because PEGylation site plays an important role for pharmacological activity. Furthermore end-product is expensive because several unit operations are used such as ultrafiltration, ion exchange chromatography, IEC. Therefore it is important to develop the technique that can control not only the number of PEGylation sites but also the site of PEGylation. Chromatography is a key technique for analytical and preparative separation of bio-molecules. Chromatography column can be used as a reactor, where the separation immediately after the reaction is possible. This method often called 'solid phase PEGylation' or 'on-column PEGylation' permits integration of reaction and separation. Although this technique is quite efficient, it is difficult to optimize on column reaction conditions and establish the rational purification process of PEGylated protein after the reaction. The purpose of this study is to control PEGylation reaction site by the immobilization of protein on column and to design the consecutive separation process of PEGylated proteins after the reaction.

In chapter 1, the studies related to chromatographic separation of PEGylated protein were summarized.

In chapter 2, molecular recognition and separation mechanism of PEGylated protein in chromatography was studied based on the mechanistic model. Good correlations between  $\Delta I_R$  which is decrease of elution salt concentration by PEGylation and  $\Delta R_h$  which is hydrated layer of PEG on PEGylated protein were found. Elution salt concentration of lysozyme in monolith type IEC column (SPMONOLITH) was high compared to porous particle type IEC column (SPHP) even if both of binding sites,  $B$  value was same. This is because hydrophobic interaction between lysozyme and base matrix (methacrylate) of SPMONOLITH is high. Over the pH range examined  $I_R$  and binding site,  $B$  values for both PEGylated and non-PEGylated forms decreased when the mobile phase pH approaches the pI. On column PEGylation was investigated based on the yield and selectivity. In SPHP the yield increased when molecular weight,  $M_w$  of activated PEG decreased. In addition, the yield increased when particle diameter decreased and activated PEG concentration increased. These results show the reaction is inhibited by diffusion behavior inside pore of activated PEG. In SPMONOLITH the yield also

increased when molecular weight,  $M_w$  of activated PEG decreased. However, the yield was not improved when activated PEG concentration increased ( $M_{w,PEG}$  5000). This is because lysine residues on SPMONOLITH is covered by ion exchange ligands compared to SPHP. In porous particle type hydroxyl apatite chromatography column (HAC), the yield was improved compared to IEC. Binding site,  $B$  value of HAC decreased compared to IEC. These results show the blocked lysine residue on IEC can react with activated PEG on HAC. Furthermore, PEGylation site was determined by pH gradient chromatography. PEGylation sites of on column PEGylation were restricted compared to liquid phase PEGylation. The selectivity of mono-PEG and PEGylation site on HAC decreased compared to IEC.

In captor 3, experimental conditions of Taylor dispersion method were optimized to determine the molecular diffusion coefficient,  $Dm$  values of caffeine, BSA, PEG, PEGylated BSA with the three PEEK tubes. The low  $Dm$  values for PEGylated BSA can be associated with the PEG chain induced large hydrated radius,  $R_h$  values. The diffusion coefficient inside porous particle,  $Ds$  of them were measured based on the *van Deemter* equation.  $Ds$  values of PEGylated BSA significantly decreased compared to these of BSA in Non-binding pulse response experiment. The  $Dm$ ,  $Ds$  and  $K$  values reasonably predict the peak spreading and resolution based on the mechanistic model.

In captor 4, separation conditions of PEGmers and positional isomers in monolith chromatography which is suitable for the separation of large molecule such as plasmid and vaccine were optimized. The optimization was carried out based on mobile phase pH, gradient volume, the number of resolved peaks, peak resolution, analysis time and pressure drop. The method achieved separation of PEGmers and positional isomers within a few minutes under low pressure. This is applicable to analysis of reaction kinetics and process analytical technology, PAT where the system can optimize process performance and assure quality of product by monitoring, analysis and control of manufacturing process.

In captor 5, above-mentioned results were summarized.