

学位論文内容の要旨	
学位論文題目	効率的なタンパク質のキャプチャークロマトグラフィープロセス (Efficient capture chromatography processes of proteins)
氏名	矢田 友一
<p>これまでサイトカインのようなバイオ医薬品においては、微量で効果が発揮されるため、生産量も少なく済むことからその製造方法の効率化に焦点は当てられていなかったが、現在、バイオ医薬品の中心となる抗体医薬品(mAb)は投与量が多く、年間生産量が1トンを超えるような抗体医薬品も存在する。アップストリーム工程と呼ばれる、細胞培養における生産量は飛躍的なブレークスルーもあり、十数年前と比較して、10倍以上となる飛躍的な進展が見られている。一方、ダウンストリーム工程と呼ばれる精製プロセスにおいては、画期的な技術革新は無いものの、抗体の性質上、品目毎に詳細な精製方法を確立する必要はなく、抗体精製プラットフォームが確立しつつある。精製工程の中心となる既存技術のクロマトグラフィー担体の性能は近年、著しく向上してきており、製造コスト低減のために、これらのクロマトグラフィー担体を効率的に使用することが求められることから、キャプチャー工程に使用される Protein A クロマトグラフィー (PAC) 担体や、中間精製に用いられるイオン交換クロマトグラフィー (IEC) 担体の吸着保持機構を解明することは抗体精製プラットフォームの強化に繋がるものと考えられる。</p> <p>PAC は、モノクローナル抗体 (mAb) 分離プロセスにおける効率的なキャプチャー工程として一般的に用いられており、通常、動的吸着容量 (DBC) が、PAC 担体を選択する際の重要なパラメータとして用いられる。しかしながら、aggregates を溶出中に、効率的に除去することが出来れば、以降のポリッシング工程をより効率的に行うことが可能となる。第2章では、mAb の aggregates 除去について、適切な PAC 担体の選択方法を提案した。2種の異なる mAb を用いて、5種の PAC 担体の直線的 pH 勾配溶出実験を行ない、aggregates ならびにモノマーの溶出挙動を調べたところ、1つの mAb の aggregates は、mAb モノマーと比較してより強く保持された。一方、もう1つの mAb は異なる溶出挙動を示し、PAC 担体に弱く保持されたピーク、強く保持されたピークとして溶出された。そこで、段階的溶出実験によって2つのタイプの aggregates を取り除くために、2つのプロトコルを検証した。プロトコル A は、サンプルロード、平衡バッファーによる洗浄、及び低 pH 溶出で構成、プロトコル B では、プロトコル A の洗浄に 1.0M のアルギニンによる洗浄を追加した。その結果、プロトコル A における洗浄ではピークが観察されなかった。一方、プロトコル B におけるアルギニン洗浄中にはプロトコル A に較べて著しいピークが観察された。プロトコル B において、1つの PAC カラムはアルギニン洗浄中に、より小さなピークを示し、aggregates 除去能力は、他の PAC カラムと比較してより高い結果を示した。これらの結果より、本方法が、適切な PAC カラムの選択に有用であることが分かった。</p> <p>温度はクロマトグラフィープロセスにおいてそれほど留意されないパラメーターである。そのため、実験室では比較的低温で実験が行われても、製造プロセスでは室温で実施されることも多い。しかしながら実際には分離性能は温度で変化し、製造工程における管理パラメーターとしても重要である。第3章では、キャプチャークロマトグラフィープロセスを設計する簡便な方法を開発するために IEC の典型的なタンパク質の動的吸着容量 (DBC) を、簡素化された細孔拡散モデルに基づいて解析した。無次元数パラメータである $u_0 d_p^2 / Z D_m$ は細孔拡散モデルに由来し、u_0 は線速度、d_p は粒子径、Z はカラム・ベッド高さ、D_m は分子拡散係数である。陽イオン交換クロマトグラフィーカラムを用いて典型的なタンパク質 (リゾチームと mAb) の破過曲線を、様々な温度 (8、13、18、23、28°C) 測定した。その結果、DBC/SBC 比 (カラム効率) は実験データから計算した $u d_p^2 / Z D_m$ (SBC: 静的吸着量) によく相関された。この結果から、DBC/SBC - $u_0 d_p^2 / Z D_m$ 曲線が、タンパク質の効果的なキャプチャー工程を設計することに有用であることが分かった。</p>	

学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
学位論文題目	Efficient capture chromatography processes of proteins (効率的なタンパク質のキャプチャークロマトグラフィープロセス)
氏 名	TOMOKAZU Yada
<p>Biologics (recombinant protein drugs) such as cytokines are used in low dose. Consequently, as the production size is not big, the efficiency of the manufacturing process was not considered important. However, for some high-dose recombinant monoclonal antibody (mAb) products, an annual production of 1 ton or more is required. In order to improve the production process of mAb various technologies have been developed. The cell culture process called the upstream process has been dramatically improved, which results in ten-fold increases in the mAb concentration over the last 10 years.</p> <p>Although there have not been epoch-making innovations in the purification process called the downstream process (DSP), so-called platform DSPs have been established. This is because a product-specific purification process is not needed as the properties of mAbs are basically similar. Increasing cost pressure requires much efficient DSPs as they are expensive and increase the total production cost. Platform DSPs usually consist of three chromatography steps, a capture step by protein A chromatography (PAC) followed by two polishing steps (ion-exchange chromatography, IEC). Such chromatography packing materials (media, gels or resins) have been improved remarkably recently. It is now possible to construct an efficient DSP by choosing suitable chromatography media and proper operating conditions based on mechanistic models.</p> <p>Protein A chromatography (PAC) is commonly used as a capture step in mAb separation processes. Usually dynamic binding capacity is used for choosing the right PAC. However, if aggregates can be efficiently removed during elution, it can make the following polishing steps easier. In chapter 2, a method for choosing the right PAC media in terms of mAb aggregate removal is proposed. Linear pH gradient elution experiments of two different mAbs on various PAC columns were carried out, where the elution behavior of aggregates as well as the monomer was measured. Aggregates of one mAb were more strongly retained compared with the mAb monomer. Another mAb showed different elution behavior, where the aggregates were eluted as both the weakly and strongly retained peaks. In order to remove the two types of aggregates by stepwise elution two protocols were tested. The first protocol A consisted of the sample loading, the wash with the equilibration buffer and the low pH elution. The wash stage of the second protocol B included the wash with 1.0 M arginine. No detectable peaks were observed during the wash stage of protocol A whereas significant peaks were monitored during the arginine wash of protocol B. One of the PAC columns showed a smaller peak during the arginine wash. In addition, both the aggregate removal and the monomer yield were higher with protocol B compared with the other PAC columns. This method was found to be useful for choosing the right PAC column.</p> <p>The temperature is not considered a critical parameter in DSPs. However, the manufacturing process is most often carried out at room temperature whereas the early-stage process development may be performed at low temperatures in the laboratory. It is also important to know the temperature dependence of chromatography performance for the process validations. In chapter 3, the dynamic binding capacity (DBC) of model proteins on ion-exchange chromatography (IEC) was analyzed based on a simplified pore diffusion model in order to develop a simple method for designing a capture chromatography process. A dimensionless parameter, $u_0 d_p^2 / (Z D_m)$ was derived from the pore diffusion model, where u_0 is the superficial velocity, d_p is the particle diameter, Z is the column bed height, and D_m is the molecular diffusion coefficient. Breakthrough curves of model proteins (Lysozyme and mAb) were measured for cation exchange chromatography columns at various temperatures (8, 13, 18, 23 and 28°C). The DBC/SBC values (column efficiency) was calculated from the experimental data were well correlated to $u_0 d_p^2 / (Z D_m)$ (SBC = static binding capacity). The DBC/SBC - $u_0 d_p^2 / (Z D_m)$ curve was found to be useful for designing efficient capture processes of proteins</p>	

学位論文審査の結果及び試験，試問の結果報告書

(論文博士用)

山口大学大学院医学系研究科

報告番号	医博乙 第 1080 号	氏名	矢田 友一
最終試験担当者	主査 山本 修一	査査委員 赤田 倫治	査査委員 堤 宏守
	査査委員 田中 一宏	査査委員 吉本 則子	
【論文題目】 効率的なタンパク質のキャプチャークロマトグラフィープロセス (Efficient capture chromatography processes of proteins)			
【論文審査の結果及び試験，試問の結果】 <p>世界の医薬品売り上げの上位 10 品目の過半数を占めるバイオ医薬品である抗体医薬は優れた医薬品ではあるが投与量も多くまた高価であるので、製造プロセスを効率化することが望まれている。通常抗体医薬は動物細胞を培養する工程(upstream process)と、その培養液中に分泌された抗体を不純物から精製する工程(downstream process, DSP)により製造される。近年の細胞工学の進歩により培養液中の抗体濃度は 2~10g/L という高濃度を達成することができているが、その結果、精製工程(DSP)に大きな負荷がかかり、60%以上のコストを占める状況となっている。抗体の DSP は複数のクロマトグラフィーから構成されており、特にその最初のステップであるキャプチャークロマトグラフィーの効率化は重要である。現在は、経験と実験計画法(DOE)によりキャプチャークロマトグラフィーの条件設定がされているが、数学モデル(メカニスティックモデルあるいは機構モデル)によりデータ取得とプロセス設計することが望まれる。また、吸着特性のみに基づいて分離剤を選定しているが、脱着溶出時の選択性も不純物除去の観点からは重要である。</p> <p>本研究ではキャプチャークロマトグラフィーにおける吸着特性と脱着溶出特性について、メカニスティックモデルを用いた合理的な設計方法を提案することを目的としている。</p> <p>第 1 章では抗体キャプチャークロマトグラフィーの標準モードであるプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーに関連してプロテイン A のリガンドとしての特性、遺伝子工学による改変、さらにはリガンドを固定化したクロマトグラフィー分離剤の進歩についてレビューしている。</p> <p>第 2 章ではプロテイン A クロマトグラフィー(PAC)の選択性について凝集体分離に着目して解析し、最適な分離剤の選定方法を提案している。天然型および改変型の Protein A 分離剤 5 種類について、pH 勾配溶出により重合体の溶出挙動を測定した。重鎖(H鎖, Heavy chain)が欠損した抗体を含む培養中には、欠損 H 鎖に由来する不均一な凝集体(type 2 凝集体)があり、単量体から遅れて溶出する通常の凝集体とは異なる分離挙動を示した。分離挙動はリガンドごとに異なり、改変リガンドでは単量体より前に溶出された。アルギニンを添加した洗浄工程により改変リガンド PAC では、type 2 凝集体が除去できた。また、1 種類の改変リガンド PAC ではアルギニン洗浄工程が不要で単純な洗浄でも除去できることが示唆された。そこで、単純な洗浄で回収された画分を天然型リガンド PAC に負荷し、脱着溶出したところ、溶出画分はすべて凝集体であった。これらの結果から、pH 勾配溶出実験を行い、凝集体の分離挙動を把握しておけば、適切な PAC と効率的な洗浄方法を設計</p>			

できることが明らかとなった。また、従来、改変型 PAC は抗体の Fab 部位への親和性が削除され、本来の Fc 部位への親和性のみが支配的になると言われているが、改変部位によっては Fc 部分あるいは、重合体への親和性が異なることが示唆された。

第 3 章ではキャプチャクロマトグラフィーの吸着特性を細孔内拡散モデルに基づいて解析する方法を提案し実験により検証している。一般にキャプチャクロマトグラフィーの吸着特性は破過曲線の 10%破過点から計算される動的吸着量(DBC)で評価され、DBC を滞留時間(RT)の関数として測定し、目的とする DBC が得られる RT を選定するという手法が用いられる。しかしながら、異なる粒子径や、温度が変化したときの推算是できない。細孔内拡散モデルから無次元数 $F_0 = d_p^2 / (D_m RT)$ を導き、動的吸着量と静的吸着量(SBC)の比、DBC/SBC との相関を行った(d_p :粒子径、 D_m :分子拡散係数)。異なる粒子径(34, 90 μm)と異なる温度(8、13、18、23、28 $^{\circ}\text{C}$) で二つの塩基性タンパク質(lysozyme, 抗体)の DBC を測定し、DBC/SBC を F_0 に対してプロットしたところ非常に良く相関された。この相関式を使用することにより任意のカラムサイズ、温度、滞留時間 RT に対する DBC を精度よく推定することができ、プロセス条件が決定できる。また、細孔内拡散が存在しない貫通型分離剤であるモノリスでは SBC/DBC は温度に依存せず一定であった。

第 4 章では上述の結果を総括した。

公聴会には、本学の教員・学生、および製薬会社や化学会社の研究者が参加し、多くの質問がなされた。質問は、主として以下の4つの観点に分類された。

- [1] 改変型 protein A リガンドと凝集体の選択性・親和性は、その改変部位から予想できるのか。
- [2] 欠損 H 鎖を含む凝集体以外に欠損 H 鎖の単量体は存在しないのか。
- [3] 選択性が高い場合は、吸着量をどのように評価するのか。培養液を使用すれば低くなるので、精製抗体を使用するのか。
- [4] 選択性と回収率については、関係があるのか。

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(学術)論文に十分値するものと判定した。論文内容および審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

関連論文 計 3 編 (査読付き国際会議のプロシーディング 1 編含む)

- (1) 著者氏名: Tomokazu Yada, Koichi Nonaka, Masayuki Yabuta, Noriko Yoshimoto, and Shuichi Yamamoto
論文題目: Choosing the right protein A affinity chromatography media can remove aggregates efficiently.
学術雑誌名: Biotechnology Journal
巻、号、頁: vol. 12, No.1, DOI: 10.1002/biot.201600427
発行年月: 2017 年 1 月 online 公開中
- (2) 著者氏名: Noriko Yoshimoto, Tomokazu Yada, and Shuichi Yamamoto
論文題目: A simple method for predicting the adsorption performance of capture chromatography of proteins
学術雑誌名: Japan Journal of Food Engineering
巻、号、頁: Vol.17, No.3, pp.95 – 98
発行年月: 2016 年 9 月発行
- (3) 著者氏名: Tomokazu Yada, Yu Isakari, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto and Ales Podgornik
論文題目: Predicting the adsorption performance of capture chromatography of proteins
学術雑誌名: Proceeding of APCCHE 2015 Congress, Melbourne, 2015,
巻、号、頁: Paper no. 3135077
発行年月: 2015 年 9 月発行