

学位論文内容の要旨

学位論文題目

タンパク質重合体の効率的分離方法

氏名

伊藤 大祐

タンパク質医薬品、中でも組み換えタンパク質による抗体医薬品や血漿分画製剤のような人体への投与量が多いものは製剤中の不純物が重篤な副作用につながる可能性がある。不純物の中には、目的物質以外のみならず、目的物質の重合体 (dimer や aggregate) も免疫原性の増強や血圧低下の促進など副作用の原因となる重要な不純物として挙げられる。製剤中の重合体の含有量には厳しい規制があり、血漿分画製剤において静注用免疫グロブリン製剤は二量体より大きい重合体 (aggregate) が 1%未満であることが義務付けられている。また、組み換えタンパク質においても重合体除去は重要な工程である。これらの重合体分離の方法は、いくつか実用化された方法があるが、高い選択性と高い単量体 (monomer) 回収率を実現している例はなく、現状では単量体の回収率を犠牲にしていることが多い。

本研究では、効率的なタンパク質重合体分離プロセスの開発を目的とし、PEG 沈殿法および PEG 添加静電的相互作用クロマトグラフィー法における単量体と重合体の分離挙動を数学的モデルに基づいて解析した。

第2章では PEG 沈殿においては単量体と重合体の溶解度を算出し、その溶解度差から単量体の回収率と純度を予測し、実証することで PEG 沈殿での重合体分離方法について評価した。その結果、dimer, aggregate の回収率が下がり始める PEG 濃度から少し PEG 濃度が上昇すると monomer の回収率も下がり始める傾向があることが分かった (予測値と実測値)。したがって、pH および PEG 濃度を変動パラメータとして条件設定をした場合、重合体を含む試料 (A7511) の monomer 回収率を維持しつつ純度 100%を達成する沈殿条件の設定は難しいことが分かった。この問題を解決する方法としては単量体と重合体の溶解度差をさらに大きくする必要があり、塩濃度や塩の種類を変更するなど、さらなる変動パラメータの追加検討をする必要がある。

第3章では PEG 添加静電的相互作用クロマトグラフィーにおいて理論式を用いて PEG の添加効果を解析した。具体的には、溶出位置のシフト、溶出曲線の幅や結合様式(吸着サイト数)を求める実験を行った。その結果、添加する PEG 濃度が高いほど、 t_R は高くなり溶出が遅れることが確認された。また、pH が等電点から離れるほど monomer, dimer の吸着サイト数 B が増加していくことが分かった。これらの結果から PEG 添加により、BSA の固相 (リガンド) への吸着が促進されることが示唆された。移動相に PEG を添加すると σ_v が大きくなる、すなわちピーク幅が広がる。これは、PEG を添加することで移動相の粘度が増大したため、タンパク質の拡散性が低下したからであると考えられる。実際、PEG 添加クロマトにおける移動相の粘度 η が増加するほど、 σ_v も大きくなることが確認された。PEG を移動相に添加すると、分離度 R_s が大きくなることが分かった。 R_s が増大したということは monomer と dimer の溶出ピーク位置の差が、PEG を添加したことによるピーク幅の増大という負の影響を上回っていることを意味している。さらに、 $\Delta t_R'$ はタンパク質の分子量 M_w に依存して増大する傾向が確認された。これにより、PEG の添加効果が選択的排除効果であることが示唆された。以上の知見から、PEG を移動相に添加することで重合体を分離するための条件設定には移動相 PEG 濃度での monomer と dimer の溶出塩濃度およびピークシフト差、ピーク幅を求めることが必要となる。この値から monomer と dimer の分離挙動をシミュレーションし、予測を立てて条件の最適化を進めていくことが効率的なプロセス開発では重要であると考えられる。

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

(博士後期課程博士用)

山口大学大学院医学系研究科

報告番号	医博甲 第 1499 号	氏名	伊藤 大祐
最終試験担当者	主 査	山本 修一	
	審 査 委 員	赤田 倫治	
	審 査 委 員	堤 宏守	
	審 査 委 員	田中 一宏	
	審 査 委 員	吉本 則子	
【論文題目】			
タンパク質重合体の効率的分離方法 (Study on Efficient separation methods for protein aggregates)			
【論文審査の結果及び最終試験の結果】			
<p>抗体医薬は優れた医薬品ではあるが投与量が多いため、不純物の除去が重要となる。特にタンパク質重合体は免疫原性があるので、非常に低レベルにしなければならない。通常はクロマトグラフィーにより除去されているが、その効率は低く、高性能な除去方法の開発が期待されている。</p> <p>本論文では、水溶性高分子 Polyethylene glycol(PEG)を使用した選択的重合体沈殿および、PEGを移動相に添加したイオン交換クロマトグラフィー(IEC)における重合体分離特性向上について研究調査し、最適な分離方法について考察している。</p> <p>第1章では重合体分離手法についてレビューしている。</p> <p>第2章ではPEG沈殿においては単量体と重合体の溶解度を算出し、その溶解度差から単量体の回収率と純度を予測し、実証することでPEG沈殿での重合体分離方法について評価した。その結果、dimer, aggregateの回収率が下がり始めるPEG濃度から少しPEG濃度が上昇するとmonomerの回収率も下がり始める傾向があることが分かった(予測値と実測値)。したがって、pHおよびPEG濃度を変動パラメータとして条件設定をした場合、重合体を含む試料のmonomer回収率を維持しつつ純度100%を達成する沈殿条件の設定は難しいことが分かった。この問題を解決する方法としては単量体と重合体の溶解度差をさらに大きくする必要があり、塩濃度や塩の種類を変更するなど、さらなる変動パラメータの追加検討をする必要がある。</p> <p>第3章ではPEG添加静電的相互作用クロマトグラフィーにおいて理論式を用いてPEGの添加効果を解析した。具体的には、溶出位置(溶出塩濃度I_R)のシフト、溶出曲線の幅や結合様式(吸着サイト数B)を求める実験を行った。その結果、添加するPEG濃度が高いほど、I_Rは高くなり溶出が遅れることが確認された。また、pHが等電点から離れるほどmonomer, dimerの吸着サイト数Bが増加していくことが分かった。これらの結果からPEG添加により、BSAの固相(リガンド)への吸着が促進され、分離度R_sが大きくなることが分かった。</p>			

R_s の増加は monomer と dimer の溶出ピーク位置の差が、PEG を添加したことによる。さらに、ピーク位置のシフトはタンパク質の分子量とともに増加することが確認され、PEG の添加効果が選択的排除効果であることが示唆された。以上の知見から、PEG を移動相に添加することで重合体を分離するための条件設定には移動相 PEG 濃度での monomer と dimer の溶出塩濃度およびピークシフト差、ピーク幅を求めることが必要となる。この値から monomer と dimer の分離挙動をシミュレーションし、予測を立てて条件の最適化を進めていくことが効率的なプロセス開発では重要であると考えられる。

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、化学会社・製薬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] 使用する PEG の分子量の選択指針、
- [2] PEG 沈殿と PEG 添加クロマトグラフィーのどちらの効率がよいのか。PEG 添加クロマトグラフィーを実プロセスに導入する際の問題点はあるのか。
- [3] PEG 沈殿とエタノール沈殿の違い。またエタノール沈殿でのタンパク質変性はどうか。
- [4] 一般的な回収率はどの程度か。

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。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: Noriko Yoshimoto, Daisuke Itoh, Yu Isakari, Shuichi Yamamoto
論文題目: Salt tolerant chromatography provides salt tolerance and a better selectivity for protein monomer separations
学術雑誌名: Biotechnology Journal
巻、号、頁: Vol.10, No.12, pp. 1929-1934
発行年月: 2015 年 11 月発行
- (2) 著者氏名: Daisuke Itoh, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto
論文題目: Retention mechanism of proteins in hydroxyapatite chromatography - multimodal interaction based protein separations: A model study
学術雑誌名: Current Protein and Peptide Science,
巻、号、頁: Vol.19, doi: 10.2174/1389203718666171024122106
発行年月: 2018 年発行
- (3) 著者氏名: Daisuke Itoh, Masataka Hamachi, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto
論文題目: Determining molecular diffusion coefficients as important physical properties for chromatography of biologics
学術雑誌名: Proceedings of 23th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2016)
巻、号、頁: S03-45, pp.355-359 ISBN 978-604-73-4690-5
発行年月: 2016 年 10 月発行