

学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
学位論文題目	抗体医薬品製造における連続クロマトグラフィー精製技術の活用
氏 名	市原 隆光
<p>抗体医薬品等のバイオ医薬品の製造では、一般に動物細胞を用いて目的産物を発現させた培養液から、複数の精製工程を組み合わせることにより、高度に精製された原薬を用い、製剤化して医薬品とする。抗体医薬品の製造においては、その構造の共通特性を生かしてプラットフォーム化が進められ、多くの医薬品が開発されている。近年では、培養工程における細胞育種技術の向上、培地や培養条件の改良により、抗体の発現量が飛躍的に向上し、製造コストの低減に寄与している。その中で、精製工程においては、複数のカラムクロマトグラフィーやフィルター処理などを組み合わせた複雑なバッチ製造であるため、製造プロセスの効率化は重要な課題となっている。このような状況の中で、抗体医薬品等のバイオ医薬品製造への連続生産技術の活用が注目されている。培養工程においては、細胞培養状態を保ちつつ、一定の速度で培地を供給しながら同時に同量の培養液を抜き取る、灌流培養による連続生産が研究されているが、流加培養による生産性が向上していることから、生産性や経済性のバランスも考慮して選択と技術開発が進むと考えられる。また、精製工程においては、複数の小型カラムによる連続カラムクロマトグラフィーシステムを用いた連続精製や、フローズルクロマトグラフィーの連結による連続精製プロセスを研究している。</p> <p>本論文では、複数のモードのカラムを用いた連結フローズルクロマトグラフィー連続精製法によるポリッシング精製を検討した。そして、従来のバッチ式精製法に代わる、統合された連結フローズルカラムクロマトグラフィーの組み合わせを確立し、バイオ医薬品の品質規格に適合する原薬の製造フローを見出した。</p> <p>第2章では、モードの異なる各種カラム担体（新規開発のプロトタイプを含む陽イオン交換担体 CEX1、CEX2、陰イオン交換担体 AEX、活性炭 AC）によるフローズルカラムクロマトグラフィーで、抗体医薬品のプロセス液の精製を実施し、品質として、宿主細胞由来蛋白質（HCP）、宿主細胞由来 DNA、抗体の単量体、および二量体と多量体（HMW）、抗体分解物（LMW）などの含量と回収率等を評価し、組み合わせの検討を行った。また、96 ウェルプレート精製を用いた実験計画法（DOE）による2種類の抗体医薬品の精製条件の最適化を、4つの応答パラメーター（回収率、DNA濃度、HCP濃度、単量体比率）について、3つの入力パラメーター（pH、導電率、抗体負荷）の影響を評価し、最適操作条件を見出した。</p> <p>そして、第3章では、複数の連結カラムによる抗体医薬品の連続フローズル精製を、実験計画法（DOE）から導かれた至適条件下で評価し、その性能を検証した。至適条件は、インラインによる pH 調整、および導電率の希釈を必要としない、容易な操作により達成されるものであった。その結果、陽イオン交換担体を通常の吸着溶出モードで使用したケースより、フローズルモードでの使用は15～50倍高い負荷量を達成し、抗体二量体などの高分子不純物の低減に有効であった。新規開発陽イオン交換担体 CEX1 は、従来の陽イオン交換担体 CEX2 と比較して約10倍の抗体二量体の除去性能を示した。また、活性炭をプロセスに導入することは、宿主細胞由来蛋白質（HCP）および宿主細胞由来 DNA の低減に有効であり、後段のプロセスへの負担を軽減する。96 ウェルプレート精製を用いた DOE による精製条件の最適化は、各抗体の等電点などの特性を反映した最適な操作条件を見出すために有効であり、異なるモードのカラム連結間の希釈や pH 調整が不要な条件を見出すことも可能であった。そして、構築した連結フローズル精製プロセスで精製した原薬は、宿主細胞由来蛋白質（HCP）濃度、宿主細胞由来 DNA 濃度、抗体の単量体含量などの一般的な抗体原薬の品質規格に適合した。総回収率は80%を越え、至適化された連結フローズルカラムクロマトグラフィーでは95%を越える、良好なプロセスを構築できることが確認された。</p> <p>これにより、カラム担体への負荷量向上によるカラムサイズの小型化とタンクレスの生産設備による、設備コストの低減、工程時間の短縮、原材料の削減などの可能性が示唆された。また、近年では、各モードに適した新規の担体やフィルターなどが開発されつつあり、各工程への適用が期待される。統合された連結フローズルクロマトグラフィー連続精製法は、抗体医薬品を含むバイオ医薬品のこれまでのバッチ式精製法に代わる、新たなプラットフォームとして有効であり、今後の原薬製造で活用されていくと考える。</p>	

# 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 1528 号	氏名	市原 隆光
最終試験担当者	主 査 審 査 委 員 審 査 委 員 審 査 委 員 審 査 委 員	山本 修一 赤田 倫治 堤 宏守 田中 一宏 吉本 則子	
<b>【論文題目】</b> 抗体医薬品製造における連続クロマトグラフィー精製技術の活用 (Application of continuous chromatographic purification technology in the manufacturing of therapeutic monoclonal antibodies)			
<b>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</b> <p>抗体医薬品等のバイオ医薬品の製造では、一般に細胞を用いて目的産物を発現させた培養液から、複数の精製工程を組み合わせることにより、高度に精製された原薬を得る。近年では、培養工程の技術向上により、抗体の発現量が飛躍的に向上しているが、精製工程は、複数のカラムクロマトグラフィーや膜処理などを組み合わせた複雑なバッチ製造であるため、その効率化は重要な課題となっている。このような状況の中で、連続生産技術が注目されており、精製工程においては、複数のカラムによる連続クロマトグラフィーシステムやフロースルークロマトグラフィーの連結による連続精製プロセスが研究されている。</p> <p>本論文では、複数のモードのカラムを用いた連結フロースルークロマトグラフィー連続精製法によるポリッシング精製を検討した。そして、従来のバッチ式精製法に代わる、統合された連結フロースルーカラムクロマトグラフィーの組み合わせを確立し、バイオ医薬品の品質規格に適合する原薬の製造フローを見出した。</p> <p>第1章で、現状の技術を俯瞰している。第2章で、モードの異なる各種カラム担体(陽イオン交換担体 CEX1、CEX2、陰イオン交換担体 AEX、活性炭 AC)によるフロースルーカラムクロマトグラフィーで、抗体医薬品のプロセス液の精製を実施し、品質として、宿主細胞由来蛋白質(HCP)、宿主細胞由来DNA、抗体の単量体、および二量体と多量体(HMW)、抗体分解物(LMW)などの含量と回収率等を評価し、組み合わせの検討を行った。また、96 ウェルプレート精製を用いた実験計画法(DOE)による2種類の抗体医薬品の精製条件の最適化を、4つの応答パラメーター(回収率、DNA濃度、HCP濃度、単量体比率)について、3つの入力パラメーター(pH、導電率、抗体負荷)の影響を評価し、最適操作条件を見出した。</p> <p>第3章では、複数の連結カラムによる抗体医薬品の連続フロースルー精製を、DOEから導かれた至適条件下で評価し、その性能を検証した。至適条件は、インラインによるpH調整、および導電率の希釈を必要としない、容易な操作により達成されるものであった。その結果、陽イオン交換担体を通常の吸着溶出モードで使用したケースより、フロースルーモードでの使用は15~50倍高い負荷量を達成し、</p>			

抗体二量体などの高分子不純物の低減に有効であった。新規開発陽イオン交換担体 CEX1 は、従来の陽イオン交換担体 CEX2 と比較して約 10 倍の抗体二量体の除去性能を示した。また、活性炭をプロセスに導入することは、HCP および DNA の低減に有効であり、後段のプロセスへの負担を軽減する。96 ウェルプレート精製を用いた DOE による精製条件の最適化は、各抗体の等電点などの特性を反映した最適な操作条件を見出すために有効であり、異なるモードのカラム連結間の希釈や pH 調整が不要な条件を見出すことも可能であった。構築した連結フロースルー精製プロセスで精製した原薬は、HCP 濃度、DNA 濃度、抗体の単量体含量などの一般的な抗体原薬の品質規格に適合した。総回収率は 80 % を越え、至適化された連結フロースルーカラムクロマトグラフィーでは 95 % を越える、良好なプロセスを構築できることが確認された。

以上の結果により、カラム担体への負荷量向上によるカラムサイズの小型化とタンクレスの生産設備による、設備コストの低減、工程時間の短縮、原材料の削減などの可能性が示唆された。また、近年では、各モードに適した新規の担体やフィルターなどが開発されつつあり、各工程への適用が期待される。統合された連結フロースルークロマトグラフィー連続精製法は、抗体医薬品を含むバイオ医薬品のこれまでのバッチ式精製法に代わる、新たなプラットフォームとして有効であり、今後の原薬製造で活用されていくと結論づけている(第 5 章)。

公聴会には、本学の教員・学生に加えて、化学・製薬関連会社の研究者が参加し、活発な質疑応答がなされた。主な質問は、以下の 4 点についてであった。

- [1] 二量体や HCP の除去挙動が、抗体の破過挙動と大きく異なる理由。
- [2] スケールダウンメリットあるいは生産性向上の具体的な推算値。
- [3] 活性炭に抗体がほとんど吸着せず回収率が高い理由。
- [4] 複数の担体を混合して充填したカラムの利用の可能性。

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: Takamitsu Ichihara, Takao Ito, Yasuhiko Kurisu, Kevin Galipeau, Christopher Gillespie  
論文題目: Integrated flow-through purification for therapeutic monoclonal antibodies processing  
学術雑誌名: mAbs  
巻、号、頁: Volume 10, pp. 325-334  
発行年月: 2018 年 2 月発行
- (2) 著者氏名: Takamitsu Ichihara, Takao Ito, Christopher Gillespie  
論文題目: Polishing approach with fully connected flow-through purification for therapeutic monoclonal antibody  
学術雑誌名: Engineering in Life Sciences  
巻、号、頁: DOI: 10.1002/elsc.201800123  
発行年月: 2019 年 1 月 オンライン公開
- (3) 著者氏名: Noriko Yoshimoto, Takamitsu Ichihara and Shuichi Yamamoto  
論文題目: Connected flow-through chromatography processes as continuous downstream processing of proteins  
学術雑誌名: 25th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2018)  
巻、号、頁: Paper no. BIO-03,  
発行年月: 2018 年 11 月発行