

博士論文

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)**

2019年2月

市原 隆光

山口大学大学院 医学系研究科

要旨

抗体医薬品等のバイオ医薬品の製造は、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を研究している。

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。

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。

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スルー精製を、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、フロースルーモードでの使用は 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。新規開発の陽イオン交換担体 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実験計画法 (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スルー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、最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。

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考える。

目次

第1章 緒言

第2章 抗体医薬品製造のための統合フロースルー精製の評価と96ウェルプレートを用いた精製条件の最適化

2.1 序論

2.2 理論

2.3 材料と方法

2.4 結果および考察

2.5 小括

第3章 連結カラムによる抗体医薬品の連続フロースルー精製

3.1 序論

3.2 材料と方法

3.3 結果および考察

3.4 小括

第4章 参考文献

第5章 総括

第6章 本研究に関する著者の発表論文

6.1 関係論文等

6.2 参考論文

第7章 謝辞

第1章 緒言

抗体医薬品等のバイオ医薬品の製造は、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。Figure 1 に典型的な抗体医薬品の製造プラットフォームを示す。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。その中で精製工程は、Figure 2 に示すように、宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、宿主細胞由来 DNA、生成物由来分子 (凝集体、断片体)、ウイルスなどの様々な種類の不純物を除去するために、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り、製造プロセスの効率化は重要な課題となっている。

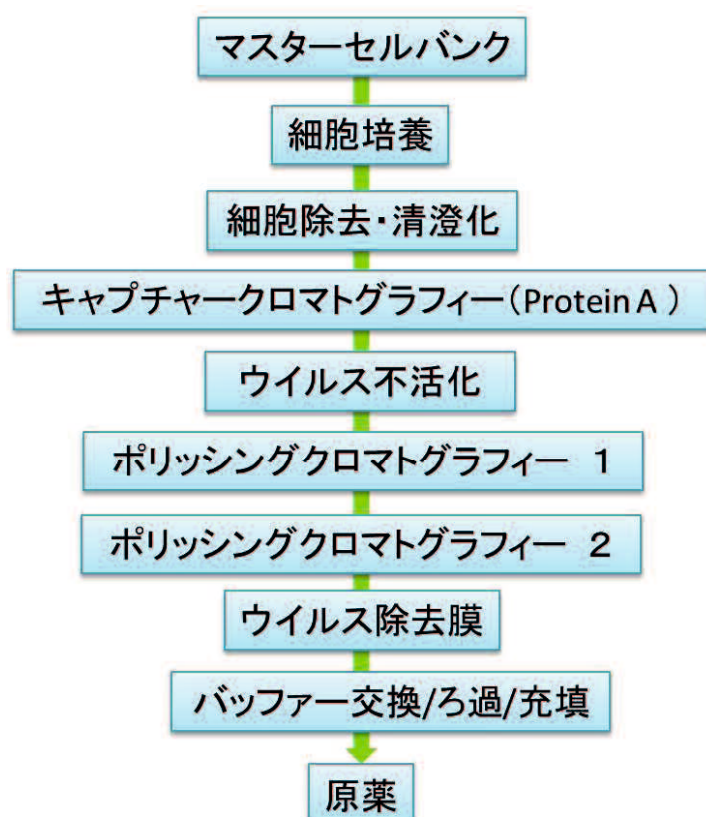


Figure 1. 抗体医薬品の製造プラットフォーム

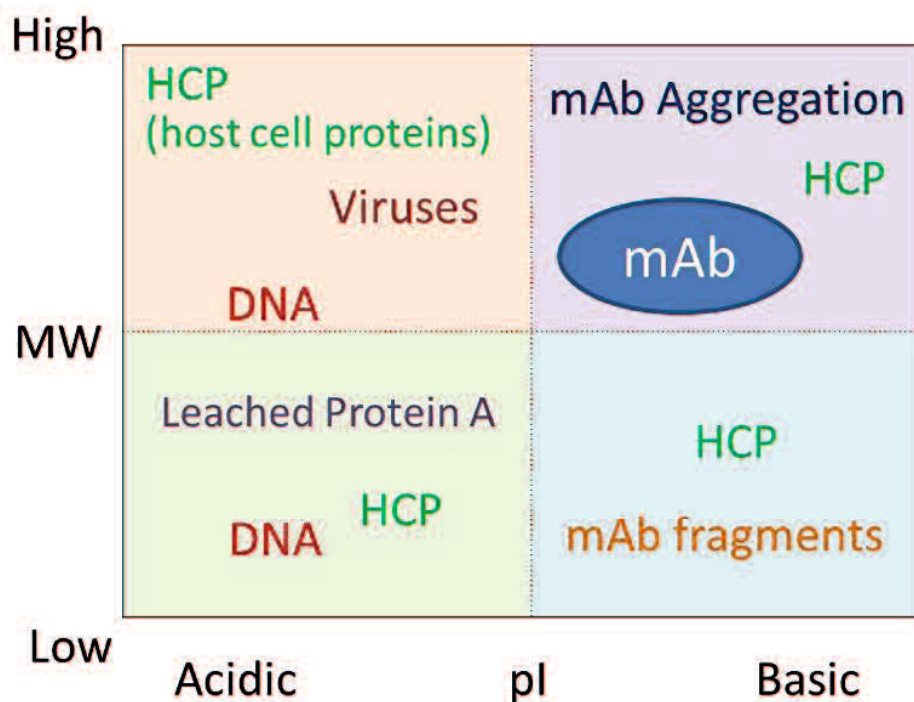


Figure 2. 除去すべき不純物とその特性

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の研究をしている。

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は、マルチカラムをスイッチングすることにより、吸着—洗浄—溶出—再生の工程を繰り返すシステムである。吸着工程でカラムどうしが連結しているため、ファーストカラムから目的産物がリークするまでロードでき、カラムの充填担体全体の吸着能力を有効に使うことができる。これにより、カラムの小型化と緩衝液の使用量の削減が可能であると考えられる。生産コストについては、生産バッチ数が少ない初期臨床試験用原薬の生産において、高価なアフィニティー担体の使

用量を削減できることから、より効果的であると考えられる。

複数のモードのカラムを用いた連結フロースルーカラムクロマトグラフィーによる精製は、負荷量の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、設備の小型化、工程時間の短縮、原材料の削減の可能性がある。近年では、Table 1 に示すようなクロマトグラフィーの各種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る。各工程条件を至適化することにより、これらを組み合わせて、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) 濃度、宿主細胞由来 DNA 濃度、抗体のモノマー含量など、抗体原薬の一般的な品質規格に適合し、総回収率も良好なプロセスを構築できる可能性がある。

これらの背景をもとに、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カラム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。

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。

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スルーカラムクロマトグラフィー精製を、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。

Table 1. 抗体医薬品精製に用いられるクロマトグラフィー

クロマトグラフィーのモード	略語	原理
アフィニティー	AFC	生物的親和性
陽イオン交換	CEX	静電氣的相互作用（標的物質の正荷電）
陰イオン交換	AEX	静電氣的相互作用（標的物質の負荷電）
疎水性相互作用	HIC	疎水性(水系移動相)
ミックスモード	MMC	イオン交換、疎水性などの組み合わせ
ハイドロキシアパタイト	CHT	陽イオン交換と金属アフィニティー
活性炭	AC	分子間力、非共有結合
逆相	RPC	疎水性（有機溶媒系移動相）
サイズ排除	SEC	分子サイズ、形状

第2章 抗体医薬品製造のための統合フロースルー精製の評価と 96 ウエルプレートを用いた精製条件の最適化

2.1 序論

バイオ医薬品製造のための抗体 (mAb) 精製技術、およびプロセスは、バッチ単位操作の共通配列に基づくプラットフォーム精製プロセスの導入以来、実質的に成熟している[1]。これらの取り組みのほとんどは、高性能精製技術の導入による既存のプロセステンプレートの改善に焦点を当てている。このテンプレートプロセスは、迅速なプロセス定義を可能にし、大量の抗体産生に成功することが証明されている[2]。

しかし、現在の大規模バッチ製造においては、アップストリームの培養工程とダウンストリームの精製工程の高い運転コスト、および高い設備投資コスト[3]、そして、スケールアップおよび移転の速度[4]、およびタンクからタンクへの液体移送による大きな設備占有面積を含むいくつかの課題に直面している[2]。これらの課題に対処する高度な処理方法として、統合された連続製造が提案されている[5]。

従来アプローチに比べて統合された処理の潜在的な利点は、処理時間が短縮され、オペレーターの介入が減少し、操作効率が向上する可能性があることである。さらに、より小さい装置および設備の使用は、製造量のより大きな柔軟性を提供する。ダイレクトクロマトグラフィーカラムローディング[9]、インライン希釈[10]、マルチカラムキャプチャー[11]、およびシングルパスタンジェンシャルフローフィルトレーションを含む[12]、個々のユニット操作からなる連続処理のための実施戦略が検討され、議論されている[6-8]。さらに、多くの企業では、連続処理のための独自の評価と実現可能性調査を実施している[13, 14, 15]。

バイオ医薬品産業において、クロマトグラフィーは、その高い分解能のために広く使用されている分離および精製技術である。バイオリアクターからのハーベストに続いて、一次キャプチャー工程、二次精製工程、および最終ポリッシング工程を含む少なくとも 3 つの単位操作が行われる。抗体の精製プロセスの大部分は、プロテイン A ベースのクロマトグラフィー担体によるキャプチャー工程を含み、その結果、単一ステップで高度の純度、および回収がも

たらされる。そして、高密度灌流細胞培養、および連続キャプチャークロマトグラフィーを含む連続処理は、バイオプロセスのスケーリングのボトルネックを解消する普遍的なバイオ製造プラットフォームとしてうまく活用することができる[13]。

ポリッシング段階では、疎水性相互作用 (HIC) クロマトグラフィー、ミックスモード (MMC) クロマトグラフィー、またはヒドロキシアパタイト (CHT) クロマトグラフィーが使用され得るが、一般に、陽イオン交換 (CEX)、および陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーを組み込む[16]。これらの工程は、ウイルス、宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、および DNA クリアランスを提供し、さらに凝集体、望ましくない生成物変異種およびその他の微量な汚染物質を除去する[17]。陽イオン交換 (CEX)、または陰イオン交換 (AEX) のいずれかの各クロマトグラフィー工程は、標的蛋白質および不純物の物理化学的特性に依存して、段階的溶出 (結合/溶出) モード、またはフロースルーモードで行うことができる。連続マルチカラムクロマトグラフィーは、いずれかのクロマトグラフィーモードを使用して適用することができるが、抗体は、陽イオン交換 (CEX) クロマトグラフィーの段階的溶出 (結合/溶出) モードでより頻繁に使用され、処理に必要な担体容量は、主に担体の産生物結合能力に依存する。陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーの場合のように、微量不純物の吸着とは対照的である。フロースルーのコンセプトは、不純物が目的物質よりも少ない供給原料からの生産性を、さらに向上させる可能性がある。例えば、陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーは、抗体精製における酸性不純物除去のためによく知られており[18-20]、疎水性相互作用 (HIC) クロマトグラフィーは、凝集体および宿主細胞由来蛋白質低減のための有効な工程である[21]。ミックスモード (MMC) クロマトグラフィーは、バイオプロセス産業においても適用されている[22]。さらに、完全に接続されたフロースルー精製システムは、複数の中間プールタンクを排除し、単一の処理スキッドアプローチによって設備投資を大幅に削減することができる[23-24]。

そこで本研究では、フロースルー陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーに加えて、フロースルーモードで、活性炭 (AC) と新たに開発したフロースルー陽イオン交換 (CEX) クロマトグラフィーの担体を用いた。活性炭 (AC) は、非共有結合相互作用によって分子を吸着する高い表面積を有する多孔質材料である。蛋白質溶液から小分子を除去するための活性炭 (AC)

の使用が報告されている[25]。また、活性炭 (AC) は、抗体収率への影響を最小限にして、低分子量の蛋白質性不純物が効率的に除去され得ることが見出され、高分子量抗体の精製にも適用されている[26]。

陽イオン交換 (CEX) 担体に対するフロースルー操作を用いた抗体の凝集体クリアランスが報告されている[28]が、不純物の結合が弱く、pH と導電率の狭い操作領域がこのモードの課題の1つであった。そこで、抗体プロセス溶液からの選択的フロースルー凝集体除去を可能にするように、最適化された表面化学処理を有する新しい陽イオン交換 (CEX) 担体が開発された[29-32]。

本研究では、従来の段階的溶出 (結合/溶出) クロマトグラフィープラットフォームの代わりとして、抗体医薬品精製のための統合フロースルークロマトグラフィー技術の使用を検討した。そして、プロセス最適化は、96 ウェルプレートを用いた、小規模のロード条件のスクリーニングによる実験計画法 (DOE) 評価によって実施した。

2.2 理論

2.2.1 ポリッシングクロマトグラフィー工程

標準イオン交換クロマトグラフィーのポリッシング工程では、蛋白質および不純物を結合させるために、設定された pH の低塩濃度緩衝液 (移動相) でまずイオン交換クロマトグラフィーカラムを平衡化する。サンプルのロード後、カラムを洗浄して、未結合または弱く結合した不純物を同じ緩衝液で除去する。次いで、同じ pH で高塩濃度の溶出緩衝液をカラムに供給して、生成物 (抗体) を脱着 (溶出) する。しっかりと結合した不純物は、非常に高い塩濃度緩衝液および水酸化ナトリウム溶液を用いてカラムから除去される。次いで、カラムを2回目の操作のために再平衡化する。この動作を Figure 3 に模式的に示す。

吸着 (結合) および溶出の両方について、緩衝液の pH および塩濃度を適切に選択することは非常に重要である。さらに、サンプルの負荷と流速は、プロセス効率 (生産性) を高めるための重要なパラメーターである。

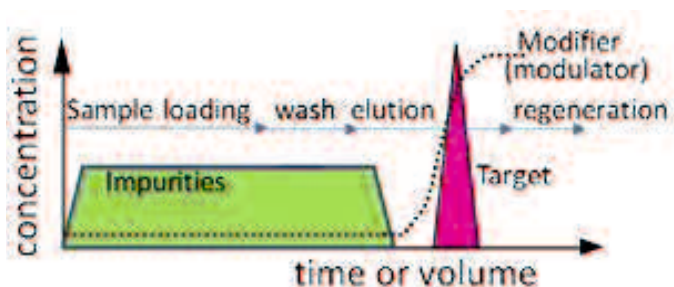


Figure 3. 段階的溶出（結合/溶出）クロマトグラフィー

精製工程の典型的な3つのクロマトグラフィーの効率は低いことから、精製工程の効率を高めるために、様々な連続クロマトグラフィー操作法が提案されている。キャプチャークロマトグラフィーについては、周期的向流

(PCC : periodic counter-current) クロマトグラフィー操作と呼ばれるマルチカラムスイッチング技術が知られている。ポリッシングクロマトグラフィー工程は、PCCを用いて操作することもできる。しかし、ポリッシングステップの目的は、試料供給物から少量の不純物を除去することであるため、フロースルークロマトグラフィー (FTC) と呼ばれる負の吸着操作モードを使用することが可能である。サンプルフィードが連続的にカラムに供給されている間、不純物が吸着され、出口からのフロースルーストリームは精製された抗体を含む (Figure 4)。

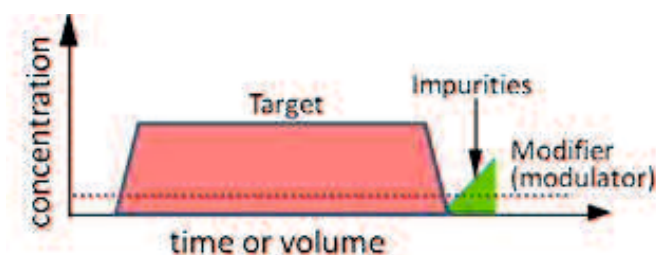


Figure 4. フロースルークロマトグラフィー

段階的溶出（結合/溶出）クロマトグラフィーとフロースルークロマトグラフィーにおける物質の挙動を Figure 5 に模式的に示す。

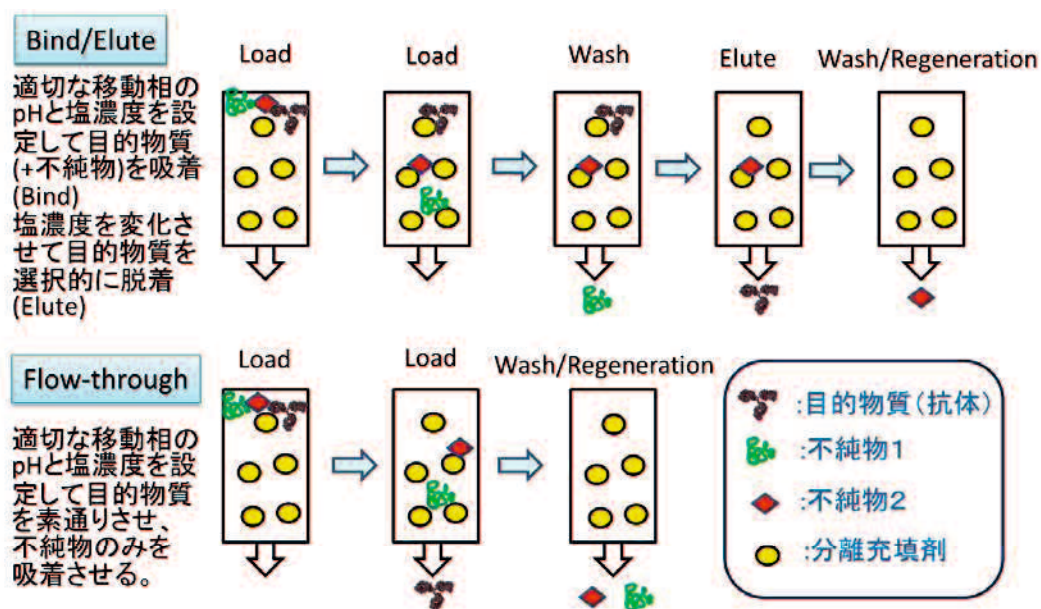


Figure 5. 段階的溶出（結合/溶出）クロマトグラフィーとフロースルークロマトグラフィーにおける物質の挙動

2.2.2 フロースルークロマトグラフィー操作

最適化されたフロースルークロマトグラフィープロセスを設計するためには、抗体が吸着されず不純物はしっかりと結合している移動相条件を知る必要がある。イオン交換クロマトグラフィーでは、保持は基本的に Figure 6 に示す概念に基づいて理解される。

フロースルークロマトグラフィー操作を用いて異なる等電点 (pI) を有する不純物を除去するためには、陽イオン交換 (CEX) クロマトグラフィーおよび陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーの両方が必要である。活性炭のような異なる吸着様式 (親和性相互作用) のさらなるフロースルークロマトグラフィーは、陽イオン交換 (CEX) クロマトグラフィーおよび陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーによって容易に捕捉されない不純物を除去するのに有効である。

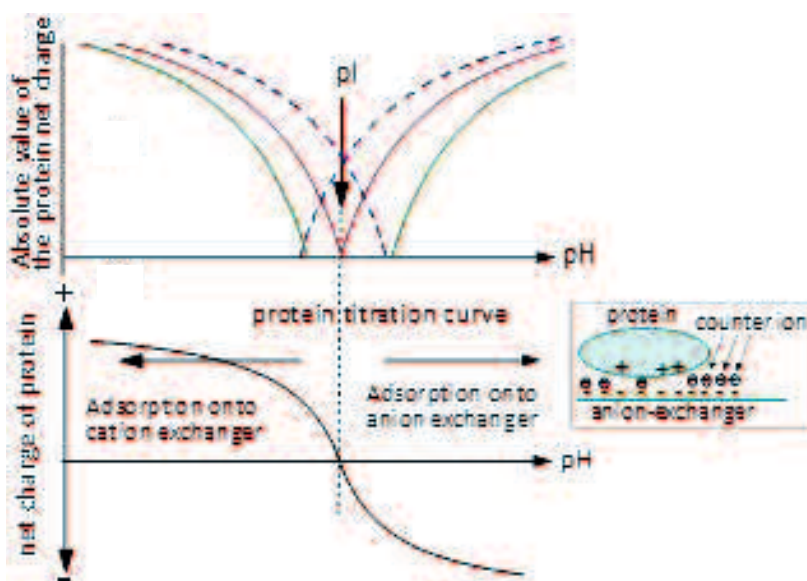


Figure 6. イオン交換クロマトグラフィーにおける蛋白質の結合[42]

2.3 材料と方法

2.3.1 担体およびカラム

活性炭 (AC) 粉末 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Millistak +® CR40 デバイス[33]に活用されるプロトタイプ製品) を、OmniFit® (Diba Industries Inc., Danbury, CT, USA) クロマトグラフィーカラム (10 mmφ×13 mmH) に充填した。陽イオン交換担体 (CEX1) として、配位子密度が、抗体ダイマーの選択性を最大化するように最適化されたプロトタイプ[29] (S-官能基を有する表面グラフトされた剛性親水性ポリビニルエーテルポリマー、平均粒径=50μm)

(Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を 0.2mL の MediaScout® MiniChrom カラム (5 mmφ×10 mmH) に充填した。陰イオン交換 (AEX) 担体として、Eshmuno® Q 1mL MiniChrom (Merck KGaA, Darmstadt, Germany 1250650001) を用いた。フロースルー陽イオン交換 (CEX) 性能の比較として、Tricon®™カラム 0.4 mL (5 mmφ×20 mmH) に充填した SP Sepharose® Fast Flow (CEX2) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いた。96 ウェルプレート (AcroPrep™ Advance 96 Filter Plate, Pall, Cat. No. PN8184) 内の静的結合実験には、各バルク担体を用いた。

2.3.2 フロースルー精製および96 ウエルプレート実験のための緩衝液

酢酸ナトリウム (Cat. No. 1.37012.5000, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、トリス塩酸 (Cat. No. 016-17453, Wako, Osaka, Japan)、酢酸 (Cat. No. 17114-08, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)、トリス (Cat. No.41101-08, Kanto Chemical)、塩化ナトリウム (Cat. No. 38129-08, Kanto Chemical)、および水酸化ナトリウム (10M, Cat. No. 37901-08, Kanto Chemical)を用いて、特定の pH および濃度の緩衝液を調製した。pH 5 または pH 6 で評価した全ての担体は、1 M 酢酸 (pH 2.5) または 2 M トリス塩基 (pH 11) のいずれかを用いて pH 5 または pH 6 に調整した 25 mM 酢酸ナトリウムのバックグラウンド緩衝液を用いた。また pH 7 で評価したすべての担体は、pH 7 に調整した 25 mM トリス塩酸緩衝液を用いた。

2.3.3 HPLC 用試薬

リン酸水素二ナトリウム (Cat. No. 197-02865, Wako)、リン酸二水素カリウム (Cat. No. 28721-55, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、塩酸 (1 M, Cat. No. 083-01095, Wako)、イソプロピルアルコール (Cat. No. 166-04831, Wako)、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Cat. No. 207-06275, Wako)、リン酸 (Cat. No. 167-02166, Wako)を用いて、HPLC による IgG 定量分析を行った。リン酸二水素ナトリウム (Cat. No. 37239-00, Kanto Chemical)、リン酸 (Cat. No. 167-02166, Wako)、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 (Cat. No. 37240-00, Kanto Chemical)を用いて、HPLC によるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析を行った。一般的な分析試薬としては、塩化ナトリウム (Cat. No. 191-01665, Wako)、メタノール (Cat. No. 25183-3B, Kanto Chemical)を用いた。

2.3.4 抗体

2種類の抗体 mAb-A および mAb-B を本研究に使用した。各モデル抗体の特性を Table 2 に示す。これらの抗体は、CHO 細胞の培養により生産され、キャプチャー精製工程のプロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した後、低 pH によるウイルス不活化処理後の凍結プロセス溶液

として得た。

Table 2. この研究で使用した抗体リスト

Protein	Subtype	pI*
mAb-A	IgG1	7.66
mAb-B	IgG1	8.16

*pI (Isoelectric point) as calculated from the primary amino acid sequence (Genetyx, Tokyo, Japan).

出発の抗体含有試料は、最初に室温の水浴中で凍結ストックを解凍し、続いて pH および導電率の溶液調整によって調製した。

測定された導電率が 3 mS/cm 以下になるまで、モデル抗体溶液の導電率を水で希釈することによって調整した。モデル抗体溶液を、1 M 酢酸 (pH 2.5) または 2 M トリス塩酸 (pH 11) のいずれかにより、活性炭 (AC) および陰イオン交換 (AEX) 担体のためには pH 7 に調整し、陽イオン交換 (CEX) 担体のためには pH 5 に調整した。pH 調整後、使用前に、全ての蛋白質溶液を 0.2 mm Millex® フィルター (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて濾過した。

2.3.5 フロースルー精製手順

すべての実験は、液体クロマトグラフィーシステム ÄKTA® Avant 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で行った。Figure 7 は、各単位操作の位置を評価するために使用された、実現可能性調査マトリックスを示す。4 つの精製戦略 (Figure 7 #1 - #4) を、フロースルーモードで比較した。各ユニット操作はバッチで pH の事前調整を行った。#1 および #2 は、2 つの活性炭 (AC) カラムを直列に使用した。陰イオン交換 (AEX) 担体および陽イオン交換 (CEX) 担体の体積は、2 つのカラムを直列に接続することによって次のステップのために十分なロード溶液を得るように調整した (#1 および #3 の AEX、#2 および #4 の CEX)。

各抗体溶液の組成物の詳細を Table 3 に示す。

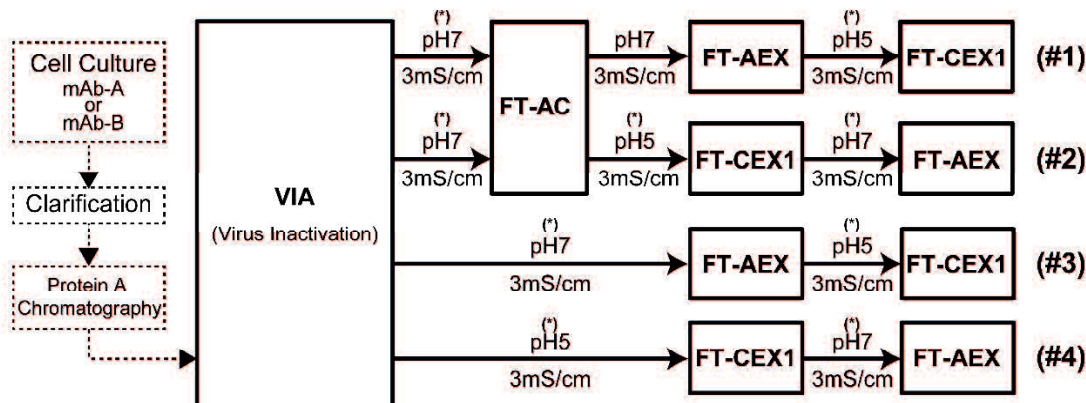


Figure 7. フロースルー技術の精製戦略のテストマトリックス

(*) Sample conditions were adjusted by buffer dilution and/or pH adjustment.

Table 3. フロースルー実験および 96 ウェルプレート実験で使用された抗体濃度および不純物の要約

Study	Protein	Concentration (mg/mL)	DNA (pg/mg)	HCP (ng/mg)	HMW1 (%)	HMW2 (%)	Monomer (%)	LMW1 (%)	LMW2 (%)
Flow-through study	mAb-A	8.32	17117	782	0.95	1.42	96.1	1.49	0.00
	mAb-B	10.9	3985	1888	2.47	1.72	94.2	1.57	0.03
96-well plate study	mAb-A	9.33	8552	885	1.44	1.35	95.9	1.23	0.09
	mAb-B	10.94	4047	2191	1.22	1.86	95.4	1.44	0.11

2つの活性炭カラムおよび陰イオン交換カラムを、1分間の滞留時間で 25 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7 を用い平衡化した。すべてのカラムローディングは、3分間の滞留時間（#2, #4 では 0.33 mL / min、#1, #3 では 0.66 mL / min）で行った。活性炭（AC）カラムには、総量 600 mg mAb / mL media のロードをしながら、100 mg mAb / mL media 負荷ごとに流出液を分画した。陰イオン交換（AEX）カラムを 200 mg mAb / mL resin でロードし、40 mg mAb / mL resin ごとに流出液の分画を行った。陽イオン交換（CEX1）カラムを pH 5 酢酸ナトリウム緩衝液（滞留時間 = 3min、#1, #3 では 0.07 mL / min、#2, #4 では 0.14 mL / min）で平衡化した。平衡の同じ流動条件（滞留時間 = 3 min）で、pH 5 および 3 mS / cm の抗体含有試料を用いて 1000 mg mAb / mL resin 以上の

ロードを達成し、200 mg mAb / mL resin ごとに流出液の分画を行った。また、同じ滞留時間で 1900 mg mAb / mL resin のロードをすることにより、陽イオン交換担体の CEX1 と CEX2 の直接比較を行った。

2.3.6 96 ウエルプレート実験

実験計画法 (DOE) スクリーニングを行って、活性炭 (AC) と陽イオン交換 (CEX1) 担体の最適な不純物結合能力を同定した。平衡化された活性炭 (AC) および陽イオン交換 (CEX1) 担体を、各ウェル当たり 10 μ L の担体を 96 ウエルプレートに分配した。適切な平衡緩衝液で、ウェル当たり 500 μ L で洗浄し、続いて 1 分間振盪した。500 \times g で 5 分間、遠心分離 (Himac Compact Centrifuges, CF16RXII, HITACHI) により緩衝液を除去した。平衡緩衝液での洗浄を合計 3 回繰り返した。次に、抗体の溶液 (mAb 溶液組成を詳述する Table 7 参照) を 800 μ L/well で導入し、マイクロプレートシェーカーを用いて 20 分間混合し、遠心分離して液体を除去し、96 ウエルコレクションプレートに集めた。

標的の抗体負荷量を達成するために、ロード工程を繰り返し、緩衝液でフラッシュを行った。静的容量実験は、3 つの異なる pH 値 (pH5、pH6、pH7)、3 つの異なる抗体の負荷量 (500 mg mAb / mL resin、1000 mg mAb / mL resin、1500 mg mAb / mL resin) の組み合わせで行った。そして、処理後の上清の抗体回収量、残存 DNA、および残存宿主細胞由来蛋白質 (HCP) の量に基づいて計算された純度に関するすべてのデータ処理を、JMP®11 ソフトウェア (SAS Institute Inc., 米国ノースカロライナ州キャリー) における標準最小二乗モデルからの pH、導電率およびローディングの交差効果に関する予測プロファイル機能によって分析した。

2.3.7 HPLC 抗体濃度測定

抗体濃度は、HPLC-プロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーで測定した。POROS®A/20 アフィニティーカラム (Life Technologies Japan Ltd, Tokyo, Cat. No. 1-5024-12) を用いて、Shimadzu Prominence システムで測定した。測定波長は 280 nm で検出した。結合緩衝液は、9.4 mM リン酸カリウム緩衝液、および 0.6 mM リン酸ナトリウム緩衝液、150 mM 塩化ナトリウム、およ

び5% IPA (pH 7.9) の組み合わせであり、溶出緩衝液は 12 mM 塩酸、125 mM 塩化ナトリウム、および5% IPA (pH 2.0) であった。適用されたサンプル容量は、 $< 1 \text{ mg mAb} / \text{mL}$ のサンプルについては $15 \mu\text{L}$ であり、 $\geq 1 \text{ mg mAb} / \text{mL}$ では $3 \mu\text{L}$ であった。すべての工程は、 $1.5 \text{ mL} / \text{min}$ の一定の流速で行った。抗体濃度は、低濃度および高濃度それぞれ $0.05 \sim 1 \text{ mg} / \text{mL}$ および $1 \sim 20 \text{ mg} / \text{mL}$ の既知の標準抗体を用いて得られた濃度校正曲線に基づいて計算した。

2.3.8 HPLC サイズ排除クロマトグラフィー分析

モノマー含量分析は、TOSOH TSKgel®G3000SWXL カラム ($5 \mu\text{m}$, $7.8 \text{ mm ID} \times 300 \text{ mm}$, Tosoh Corp., Cat. No. 08541) を用いて、Shimadzu Prominence / Nexera X2 システムを用いて測定した。測定波長は 280 nm とした。移動相は、mAb-A については、 0.3 M NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で、mAb-B については、 1 M NaCl を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) だった。流速は $0.5 \text{ mL} / \text{min}$ の一定に設定した。適用された試料容量は $10 \mu\text{L}$ であった。

2.3.9 HCP-ELISA を用いた宿主細胞由来蛋白質の濃度測定

市販のマイクロタイタープレート ELISA 法 (Cygnus Technologies, CHO HCP ELISA kit, 3G, Cat. No. F550) を用いて、宿主細胞由来蛋白質(HCP)を検出した。試料希釈用緩衝液 (Cygnus Technologies, Cat. No. 1028) で希釈し、検出に使用したプレート分光光度計 (Perkin Elmer Japan, Wallac, EnVision™, 2104 Multilabel Reader) を用いて、製造元の標準アッセイプロトコールに従って分析した。

2.3.10 DNA 分析

QIAamp DNA Mini Kit (250) (QIAGEN, Cat. No. 51306) を用いて DNA を抽出し、定量的 PCR (qPCR) を用いて残留宿主細胞 DNA を測定した。増幅反応は、7500 高速リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で行った。サンプルを分析し、既知の量の一本鎖 DNA (resDNASEQ Quantitative CHO DNA Kits, Life Technologies Japan, Cat. No. 4403965) を用いて生成された標準曲線と $3 \sim 300000 \text{ pg} / \text{mL}$ の範囲で比較した。

2.4 結果および考察

2.4.1 不純物クリアランス

抗体製造プロセス液の中の主要な不純物には、宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、DNA、高分子量の抗体凝集体 (HMW)、および低分子量の抗体分解産物 (LMW) が含まれる。4 つの異なるダウンストリームテンプレートを用いて、抗体のプロテイン A アフィニティークロマトグラフィー後の精製を実施した (Figure 8)。抗体関連凝集物 (HMW) の減少は、すべてのケースにおいて、新しいフロースルー陽イオン交換 (CEX1) クロマトグラフィー工程を用いて達成され、モノマー抗体含量 98% を上回った。陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィー工程は、mAb-A についてわずかな低分子量の抗体分解産物 (LMW) 除去に寄与した。抗体二量体および多量体が区別される場合、二量体 (HMW2) は陽イオン交換 (CEX1) クロマトグラフィー工程によって有意に減少した。mAb-B 多量体 (HMW1) の低減は、pH 調整によって主に達成されたが、活性炭 (AC)、および陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィー工程によって完全に除去された。mAb-B について観察された pH 調整の効果は、mAb-A よりも有効であった。

各ポリッシング工程から得られた宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、および DNA 濃度を Figure 9 に示す。活性炭 (AC) を使用しない精製は、DNA、および宿主細胞由来蛋白質 (HCP) 含量の適度な減少を示した。しかし、DNA と宿主細胞由来蛋白質 (HCP) の減少は、活性炭 (AC) によってさらに促進された。mAb-B に関して、Figure 9 に示したように、pH 調整時に可溶性の DNA、および宿主細胞由来蛋白質 (HCP) の不純物が沈殿した。pH および導電率の調整に続いて、0.2 ミクロンのフィルターを使用したろ過で、相補的な不純物の減少が示された。不純物の析出現象がフロースルーポリッシングに役立つ可能性がある。続いて活性炭 (AC) によって捕捉された。結果として、3 mS/cm の導電率を有するプロテイン A クロマトグラフィー後の低 pH ウイルス不活性化溶液 (VIA) から pH7 への変化は、DNA (99.3~99.4%)、HCP (72~73%) および HMW1 (90~95%) 有意な濃度低下をもたらした。

最終精製溶液の不純物クリアランスを含む全体の抗体純度を Table 4 に要約した。全てフロースルークロマトグラフィー精製技術を利用するこの研究に

おける、全ての組み合わせは、優れた不純物クリアランスを提供し、抗体医薬品の原薬品質規格に対して、十分な精製性能を達成した。

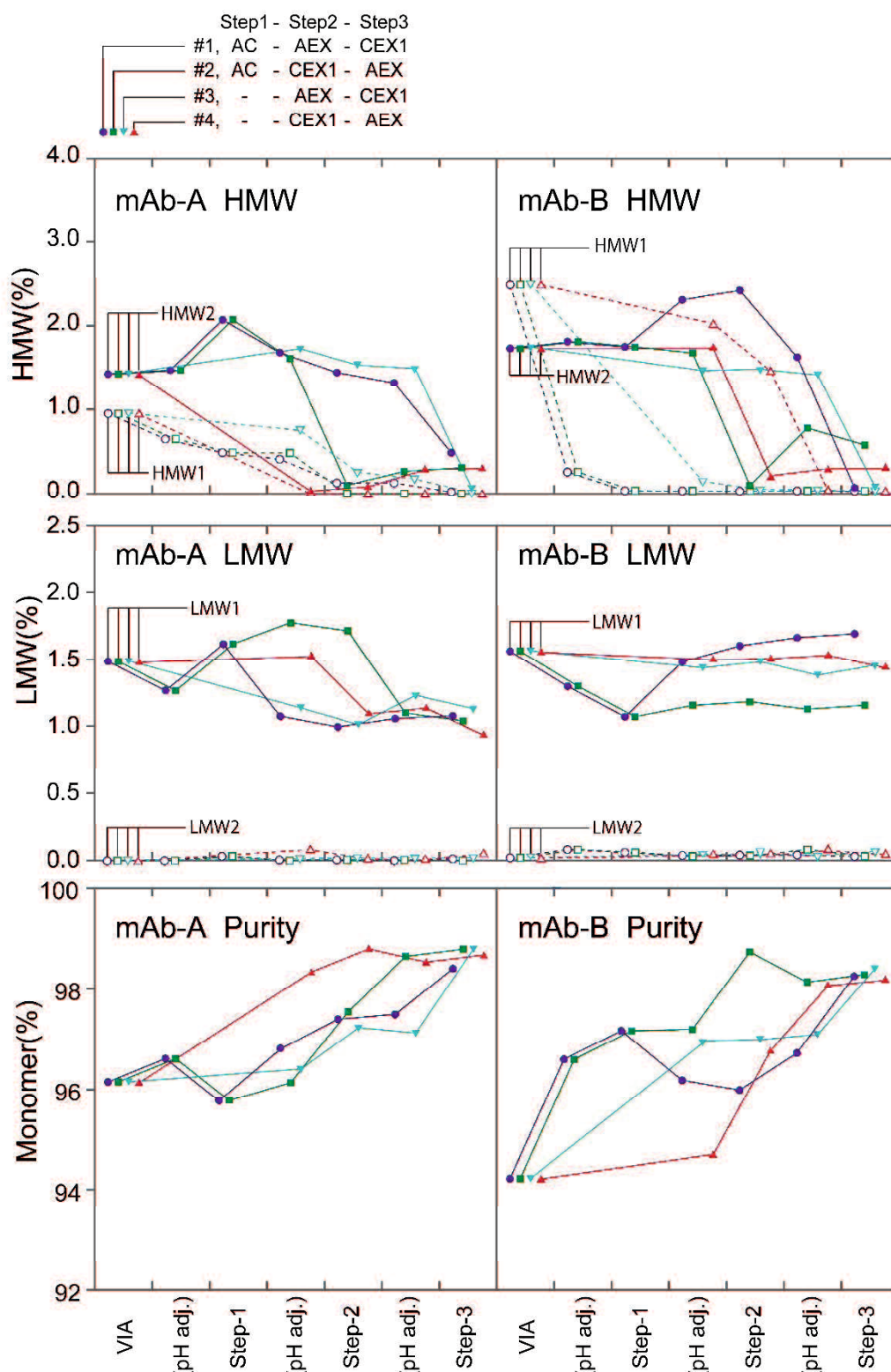


Figure 8. フロースルー精製全体にわたるモノマー%純度および抗体関連不純物 (LMW1、LMW2、HMW1およびHMW2) の推移
 HMW1 および HMW2 がそれぞれ抗体多量体および二量体を指す

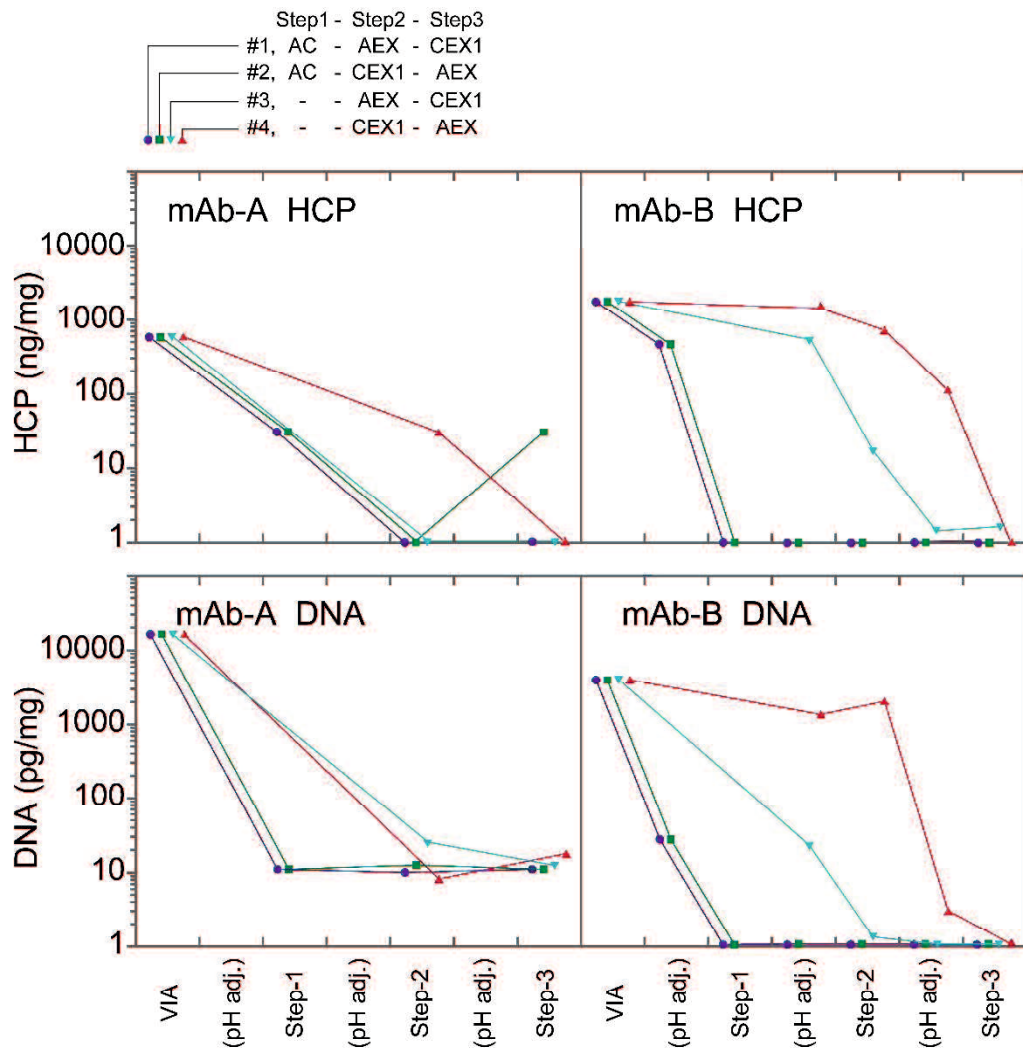


Figure 9. mAb-A および mAb-B のフロースループロセスにおける HCP および DNA 濃度の推移

Table 4. 適用された各プロセスにおける最終精製溶液純度の要約

Protein	Process step	Concentration	DNA	HCP	HMW1	HMW2	Monomer	LMW1	LMW2
		(mg/mL)	(pg/mg)	(ng/mg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
mAb-A	#1 AC-AEX-CEX1	2.55	< 11.8	< 0.4	0.02	0.49	98.4	1.08	0.01
	#2 AC-CEX1-AEX	2.67	< 11.2	31.0	0.00	0.31	98.6	1.04	0.01
	#3 AEX-CEX1	2.43	< 12.3	< 0.4	0.00	0.07	98.8	1.13	0.02
	#4 CEX1-AEX	1.78	< 16.8	< 0.6	0.00	0.36	98.6	0.94	0.06
mAb-B	#1 AC-AEX-CEX1	3.95	< 0.76	< 0.25	0.00	0.07	98.2	1.68	0.03
	#2 AC-CEX1-AEX	3.06	< 0.98	< 0.33	0.00	0.57	98.2	1.16	0.03
	#3 AEX-CEX1	3.11	1.10	2.00	0.00	0.06	98.5	1.44	0.04
	#4 CEX1-AEX	3.60	0.70	< 0.28	0.00	0.29	98.2	1.44	0.04

2.4.2 抗体収率

評価された4つの精製系のそれぞれについての mAb-A および mAb-B の全プロセス収率を Figure 10 (a)に示す。全体のプロセス収率は、80～86%の許容範囲内であった。活性炭 (AC) の存在は、存在しない場合よりも全体的に収率が低くなったが、すべてのプロセス順序は、mAb-A と mAb-B の精製ターゲットに適合した。Figure 10 (b)に示すステップ回収率を比較すると、活性炭 (AC) と陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーの両方が 94～97%の有効回収率を示した。フロースルー陽イオン交換 (CEX1) クロマトグラフィーの抗体回収率は、88～91%とやや低い。これは、二量体を含む一部の抗体が補足されたためと考えられるが、後述するロード量の最適化から改善することができる。と考える。

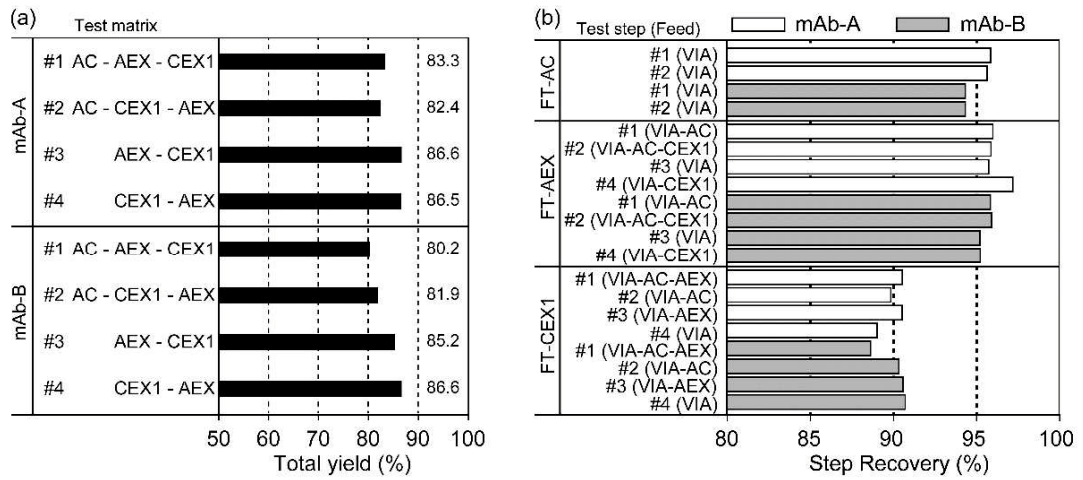


Figure 10. 総回収率と工程回収率

(a) Total mAb yield for the various flow-through downstream purification trains. (b) MAb step recovery as a function of the different unit operations applied, where the previous steps are shown in the left of bar. See text for a complete description of the different technologies evaluated.

2.4.3 動的破過曲線

活性炭 (AC) の宿主細胞由来蛋白質 (HCP) と DNA の動的破過曲線 (dynamic breakthrough curves) を Figure 11 (a) に示す。620 mg mAb / mL media のロードが達成されたときに、1.9 % のわずかな宿主細胞由来蛋白質 (HCP) 破過が検出されたが、DNA の破過プロファイルは、同じ負荷で低レベルのままであった。このことから、不純物成分の違いにより、活性炭 (AC) の結合能に差があることが示唆された。また、311 mg mAb / mL media で 90 % の累積総抗体回収率が達成された。

Figure 11 (b) に示すように、陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーは、明確な DNA ブレークを示さず、活性炭 (AC) と類似の抗体回収を示した。しかし、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) 濃度は、より低い負荷量で直ちに増加し、活性炭 (AC) が、この抗体の陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーよりもはるかに良好な宿主細胞由来蛋白質 (HCP) クリアランスを提供することを示した。

フロースルー陽イオン交換 (CEX) クロマトグラフィーによる凝集体 (HMW) の除去は、Figure 11 (C) に示すように、モノマーと凝集体 (HMW) のブレークスルー曲線として評価した。全てのモノマーブレークスルー曲線は、400 mg / mL resin 負荷量で急速に飽和した。凝集体の除去と抗体の収率には、負荷量とのトレードオフがある。負荷量が少なければ凝集体の除去は良好であるが、抗体の収率は低下する。モノマーの純度は、凝集体のブレークスルーによって変化した。抗体多量体 (HMW1) は、わずかに減少したが、負荷量と共に増加した。二量体 (HMW2) は、すべてのプロセス構成において抗体多量体 (HMW1) よりも高いクリアランスを示した。2 種類の陽イオン交換 (CEX) 担体の動的破過曲線を比較すると、CEX1 の二量体 (HMW2) 除去効果が高い。CEX2 と比較して CEX1 は、約 10 倍の抗体二量体 (HMW2) の優れた除去能力を示した。

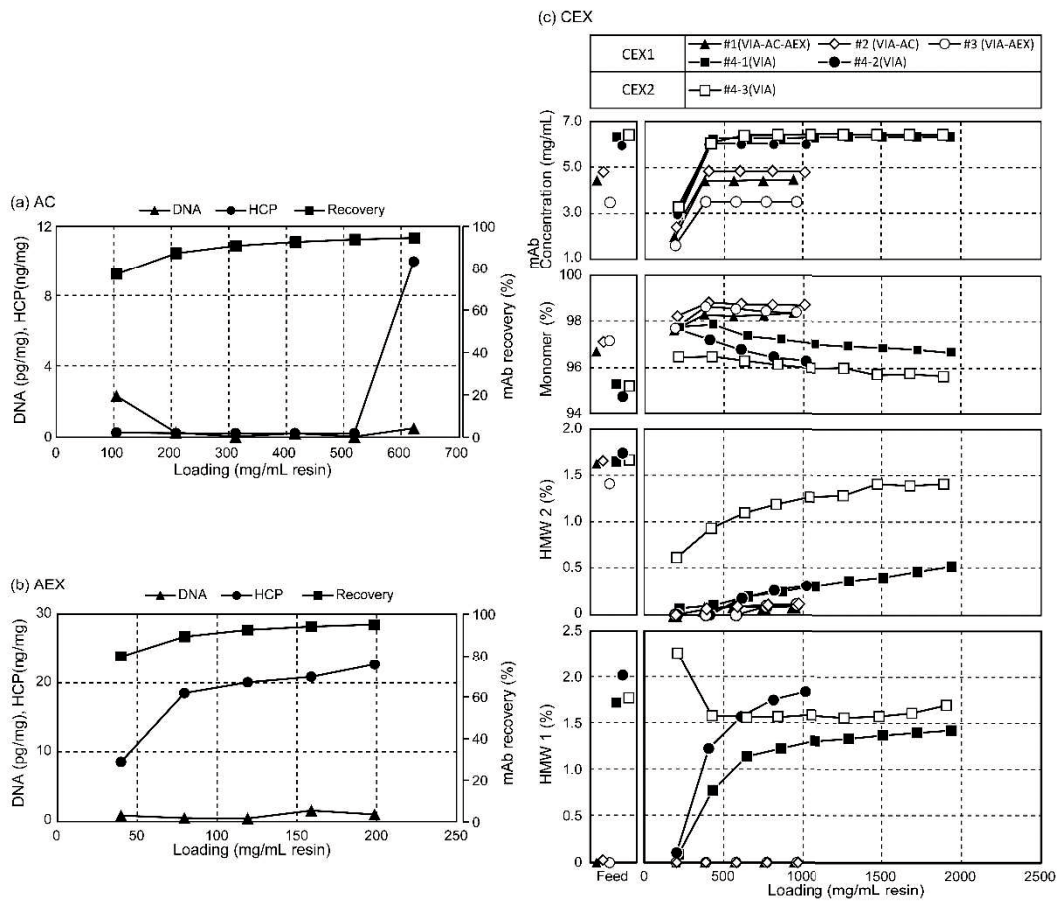


Figure 11. 不純物濃度の変化

(a) DNA and HCP effluent from AC (#1 and #2) as a function of mAb-B loading. DNA feed = 28 pg / mg, HCP feed = 512 ng / mg. (b) DNA and HCP effluent from AEX (#3) as a function of mAb-B loading. DNA feed = 23 pg / mg, HCP feed = 537 ng / mg. (c) Breakthrough concentrations of mAb concentration, Monomer, HMW1 and HMW2 species from CEX1 (CEX prototype) and CEX2 (SP Sepharose® Fast Flow) as a function of mAb-B loading.

2.4.4 ロード条件の分析

フロースルーの活性炭 (AC) および陽イオン交換 (CEX1) クロマトグラフィ工程の最適化は、溶液条件、すなわち、溶液の pH および導電率の作用として、抗体モノマーおよび不純物の破過濃度の差異を説明しなければならない。そこで、抗体回収、モノマー純度の向上、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) および DNA の減少に対する溶液 pH、導電率および負荷量の影響を評価するために、完全多因子の実験計画法 (DOE) スクリーニングを設計し評価した。

活性炭 (AC) の実験計画法 (DOE) スクリーニングの結果を Figure 12 に示す。評価した両方の抗体 (mAb-A、mAb-B) について、98%以上の抗体回収を達成するために少なくとも 1000 mg mAb / mL resin の負荷量が必要であった。活性炭 (AC) について予想されたように[33]、溶液 pH は抗体回収にほとんど影響を与えなかったが、不純物クリアランスは pH の作用として変化した。例えば、mAb-A の宿主細胞由来蛋白質 (HCP) クリアランスは、pH の低下とともに増加したが、DNA クリアランスは影響を受けなかった。しかし、mAb-B については、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) と DNA 結合の両方が、溶液 pH の上昇とともに増加した。宿主細胞由来蛋白質 (HCP) クリアランスに対する導電率の効果は、抗体依存性であることが観察され、mAb-A は非感受性であり、mAb-B は導電率の低下と共に宿主細胞由来蛋白質 (HCP) クリアランスの改善を示した。活性炭 (AC) の結果は、適切な負荷条件下では、1500 mg mAb / mL media 負荷でも高レベルの不純物除去が可能であることを示した。

フロースルー陽イオン交換担体 (CEX1) の実験計画法 (DOE) スクリーニングの結果を Figure 13 に示す。活性炭 (AC) について観察された傾向と同様に、抗体回収率は、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) または DNA クリアランスにほとんど影響を与えずに、1500 mg mAb / mL resin の負荷で約 95 %の回収率が可能である。抗体負荷量の増加とともに回収率は向上した。予想されたように、溶液の導電性を高めることは、モノマー純度に負の作用があり悪影響を及ぼした。評価した両方の抗体には、4 mS / cm 以下の導電率が必要である。導電率とは対照的に、凝集体、宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、および DNA の除去のための最適 pH 条件は、抗体依存性であることが判明し、mAb-A については pH5.5~pH6.0 が最適であり、mAb-B については pH6.5~pH7.0 であった。

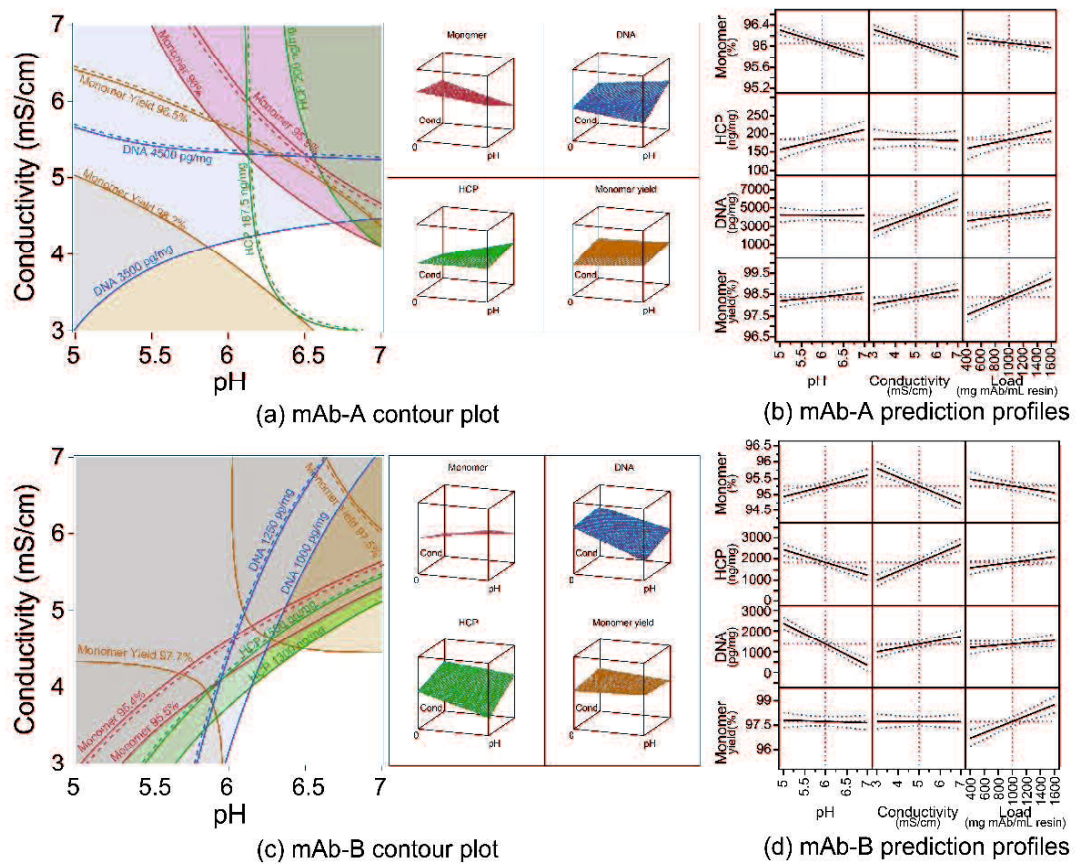


Figure 12. 活性炭（AC）に対する DOE スクリーニングの運転条件プロフィール

The effect of three input parameters (pH, conductivity, mAb loading) was evaluated for four response parameters: monomer yield, DNA, HCP, % monomer. Both response contour plots for pH and conductivity (a) and (c) were plotted at the loading of 1000 mg mAb / mL resin.

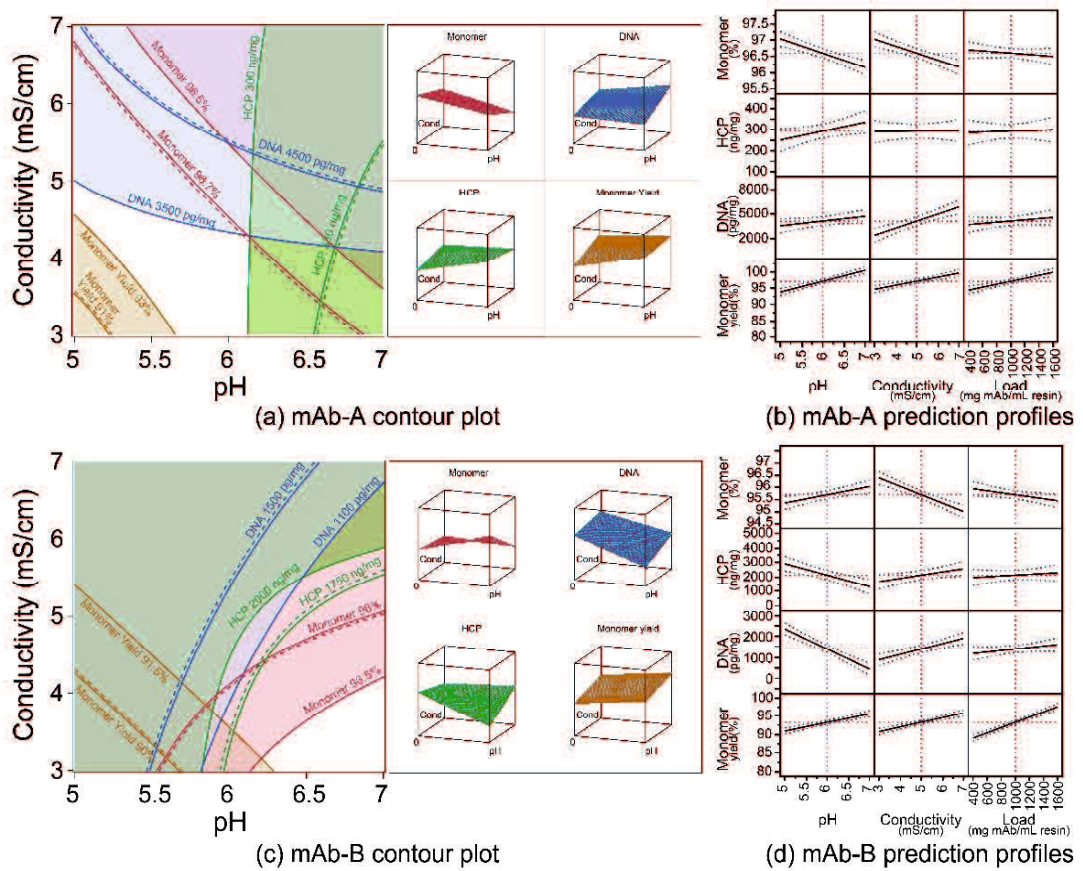


Figure 13. 陽イオン交換担体(CEX1)の DOE スクリーニングの運転条件プロファイル

The effect of three input parameters (pH, conductivity, mAb loading) was evaluated for four response parameters: monomer yield, DNA, HCP, % monomer. Both response contour plots for pH and conductivity (a) and (c) were plotted at the loading of 1000 mg mAb / mL resin.

2.5 小括

第2章では、2つの抗体の精製のために、活性炭（AC）およびフロースルー陰イオン交換（AEX）および陽イオン交換（CEX）クロマトグラフィー工程からなる、全てフロースルー精製技術を利用した革新的なダウンストリームプロセスについて検討した。フロースループロセスの全体的な開発は、フロースルー技術の組み合わせで実証した。すべての組み合わせにより、2つの抗体に、良好な不純物クリアランスと、高い総回収率のプロセスがもたらされた。典型的な抗体精製プロセス[34]と比較して、不純物クリアランスを伴う全体の抗体純度は良好であった。

活性炭は、第1の単位操作工程として、堅牢なDNAおよび宿主細胞由来蛋白質（HCP）除去を示し、後続の陰イオン交換担体（AEX）を強化して、不純物の負荷を低減することができる。両方の抗体について $3 \log_{10}$ より大きいDNAクリアランスが、活性炭（AC）で観察されたが、宿主細胞由来蛋白質（HCP）除去は、試験した2つの抗体の間で変化した。宿主細胞由来蛋白質（HCP）集団の違いは、これらの2つの抗体についての活性炭（AC）の宿主細胞由来蛋白質（HCP）低減の差で説明することができる。活性炭（AC）の特性として、宿主細胞由来蛋白質（HCP）やDNAの低減、および抗体回収の信頼性が高いことが判明した（Figure 11 (a)）。宿主細胞由来蛋白質（HCP）クリアランスに対するpHおよび導電率の影響は、抗体依存性であることが観察された。この観察は、宿主細胞由来蛋白質（HCP）等電点の差[26]、濃度および集団の差異の結果である[35,36]。従って、pHと導電率の組み合わせで最適な宿主細胞由来蛋白質（HCP）クリアランス条件を定義することができる。両方の抗体の実験計画法（DOE）スクリーニングから、活性炭（AC）工程の「スイートスポット」は、約pH6~pH7、および4mS/cm未満の導電率を定義した。

陰イオン交換（AEX）クロマトグラフィーは、宿主細胞由来蛋白質（HCP）およびDNAの除去を一貫して促進することが観察された。活性炭（AC）と陰イオン交換担体（AEX）の抗体回収の結果（Figure 10(b)）から、活性炭（AC）工程を含める判断は、不純物クリアランスと抗体回収のバランスから決定されるべきである。陰イオン交換（AEX）クロマトグラフィーの結果は、宿主細胞由来蛋白質（HCP）のクリアランスが低いことを示している（Figure 11(b)）。

宿主細胞由来蛋白質 (HCP) と DNA の堅牢なクリアランスは、活性炭 (AC) と陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーの組み合わせから容易に達成される。さらに、必要とされる後続の AEX 担体容量は、相補的な活性炭 (AC) 工程によって減少させることができる。これは、Figure 9 の活性炭 (AC) と陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーとの組み合わせによる mAb-A における宿主細胞由来蛋白質 (HCP) の段階的低減から観察される。

新しいフロースルー陽イオン交換担体 (CEX1) は、強く結合した凝集体の競合的結合挙動とモノマーのより速いブレイクスルーを利用して、非常に高い抗体負荷量で、抗体凝集体の優れたクリアランスを提供した (Figure 11)。CEX1 の最適化された表面化学修飾の選択性は、CEX1 による特異的凝集体除去の機能が二量体除去において役割を果たすことを示している。実験計画法 (DOE) の結果は、また予想されたように、モノマー収率の増加と共にモノマー純度の負の傾向を示した (Figure 13)。単位カラム体積当たり精製された蛋白質の量として定義される担体生産性は、ここで使用される担体の組み合わせの結果として、段階的溶出 (結合/溶出) モードに対して増加すると予想される。CEX1 は、CEX2 よりも抗体二量体除去に優れ (Figure 11)、そして、段階的溶出 (結合/溶出) モードでの使用のために設計された現在の陽イオン交換担体と比較して、約 10 倍の抗体二量体 (HMW2) の優れた除去能力を示した。実験計画法 (DOE) の最適化の結果は、負荷量が典型的には、約 30~100 mg mAb / mL resin の段階的溶出 (結合/溶出) モード陽イオン交換担体の負荷よりも [37]、15~50 倍高く達成することを示す。この結果プロセスは、より高い負荷を伴うクロマトグラフィーで、カラム担体容量の低減、および凝集体除去に焦点を当てた、容易なフロースルーモード操作で達成することができる。

陽イオン交換担体上のモノマーと凝集体との間の分離は、成分の選択性から競合結合動態によって達成される [38]。この吸着試験では、HMW によるプレ吸着モノマーの徐々の置換は [39]、観察されなかった (Figure 11)。しかしながら、CEX2 の HMW1 の初期流出液の値は、ロード段階中の入口濃度を超えていた。これは、より強力に保持された抗体二量体 (HMW2) と、弱く結合した抗体多量体 (HMW1) との間の競合結合平衡のためと考えられる。

第 3 工程として、陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィーを配置した場合、抗体二量体 (HMW2) レベルのわずかな増加が観察されるため、ここで試

験された抗体に関して、CEX1は最終ポリッシングの位置に配置されるべきである。これらの結果は、完全なプロセス開発の一部として、様々なポリッシング工程の順序を調査すべきであることを示唆している。

これらの技術の最適化には、緩衝液条件のチューニングと、接続フロースルー操作を考慮した、抗体ローディングが必要である。陽イオン交換 (CEX1) クロマトグラフィーの「スイートスポット」は、抗体の等電点 (pI) の影響を受けると推定される (Figure 13)。観察された各抗体の最適 pH 傾向は、分子の推定等電点 (pI) と一致する。低い等電点 (pI) の mAb-A は、フロースルー陽イオン交換担体 (CEX1) の最適凝集体クリアランスのために、より低い pH を必要とする。

この実現可能性調査の結果は、完全なフロースループロセスのパフォーマンスを最大限にするために、調整する必要のある最適な操作ウィンドウのライブラリの存在を反映している。ここで述べたフロースルー評価は、pH5、pH6、pH7 のみで行ったが、ウイルス不活化 (VIA) 工程からのインライン希釈と、pH5 と pH7 間のインライン pH 調整は、それらを接続するために必要である。実験では、2~3 倍の希釈、または pH 調整剤の 1~3% 添加を使用した。しかし実験計画法 (DOE) の結果は、低導電率および pH7 で動作する完全に接続されたフロースルー精製トレインが、mAb-B に実用的であり得ることを示唆している。また、mAb-A では、pH6 を適用することができ、ウイルス不活化 (VIA) 工程後は、インラインで pH を調整することなくフリースルー精製トレインが適用できると推察された。

ここで評価された技術の適用は、伝統的なバッチポリッシングプロセスを置き換えるために使用される。特に、陽イオン交換 (CEX) 工程のためのカラム担体容積の必要量を低減させ、ポリッシングプロセスを大幅に単純化する。さらに、これらの技術は、現在のプロセスと比較して、大幅なコスト削減をもたらすことが期待できる[31]。そして、これらの新技術は、単一の処理スキッドで生産を可能にする潜在的な可能性を有し、より短い処理時間で、より高い生産性を提供する、将来のテンプレートプロセスに適用することができる。このような 1 回のスキッド操作の利点は、中間保管タンクを使用しない単位操作で、プロセス統合をもたらし、コンパクトな設備における、柔軟性を伴う連続生産を可能にする。

第3章 連結カラムによる抗体医薬品の連続フロースルー精製

3.1 序論

本研究では、カラム連結アプローチの適用性を試験するために、単一のクロマトグラフィー装置を用いた抗体精製のための、フロースルー精製カラムの接続方法を評価した。抗体の精製条件は、第2章の実験計画法 (DOE) から導かれた至適条件を用いた。また、一連の活性炭 (AC)、フロースルー陽イオン交換 (CEX) および陰イオン交換 (AEX) クロマトグラフィー間のインラインによる pH および導電率の調整を行わずに同一条件で実施した。そして、宿主細胞由来蛋白質 (HCP)、DNA、および生成物に関連する不純物のプロセス負荷、抗体収率、および不純物クリアランスを評価するために、実験室スケールによる検証を行った[43]。

3.2 材料と方法

3.2.1 機器

活性炭 (AC) および陽イオン交換 (CEX) 担体を、個別に (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) Tricon® 5 mm 直径×2.5 cmH カラムに 0.5 mL 充填した。陰イオン交換 (AEX) 担体は、1 mL の予め充填されたカラムを使用した。フロースルー精製実験は、完全自動化液体クロマトグラフィーシステム、ÅKTA® Avant 25 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて、カラムを直列に接続して実施した。そして、AC-AEX-CEX および AEX-CEX の 2 つのフロースルー精製トレインを試験した。

3.2.2 連結フロースルークロマトグラフィー

すべてのカラムを、25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (15 mL) で平衡化した。pH 6 および導電率 1.87 mS / cm の緩衝液条件を平衡化に使用した。使用した精製プロセスの条件は、実験計画法 (DOE) [40]によって最適化した。接続されたカラムを 0.2 mL / min の流速で流し、20 mL ごとに流出物を分画しながら、

200 mL で 1500 mg 以上の抗体負荷を目標とした。負荷条件は、緩衝液希釈、および pH 調整によって、pH 6、および 4 mS / cm の導電率に調整した。この条件設定は、製造プロセスにおいて採用するのが容易である。各カラムの滞留時間は、次の通りである。AC=2.5 min、AEX=5 min、CEX=2.5 min である。60 mL、120 mL、および 180 mL での 3 つの累積負荷結果を、分画の混合物から評価して、負荷の影響を確認した。25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6, 1.87 mS/cm) 10 CV で洗浄した後、1 M NaCl を含む 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6, 83.9 mS/cm) 10 CV ですべてのカラムを溶出した。

3.2.3 分析技術

収集されたすべてのサンプルの、累積収率、純度、HMW、LMW、DNA、および宿主細胞由来蛋白質 (HCP) を分析した。抗体濃度は、Shimadzu Prominence システム (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) を有する POROS® A/20 アフィニティーカラム (Life Technologies Japan Ltd, Tokyo) を使用する HPLC-プロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって分析した。HMW および LMW の分析用 SEC は、Shimadzu Prominence/Nexera X2 システムを備えた TOSOH TSKgel® G3000SWXL カラム (東ソー) を用いて行った。市販のマイクロタイタープレート ELISA 法、CHO HCP ELISA キット (Cygnus Technologies) を用いて宿主細胞由来蛋白質 (HCP) を検出した。宿主細胞由来 DNA を、定量的 PCR、7500 高速リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて測定した。

3.3 結果および考察

一連の連続フロースルー精製工程 (AEX-CEX および AC-AEX-CEX) から得られた典型的なクロマトグラムを Figure 14 に示す。接続されたカラムのフロースルーピークは、従来のバッチ処理と比較して処理時間が短縮された。2 つのクロマトグラム間の開始フロースルーピークのわずかな差は、保持容量 (AEX-CEX=23 min、AC-AEX-CEX=29 min) によるものである。0.2 mL/min でのロード工程のカラム圧力は非常に低く、製造スケールでのディスプレイポンプシステムに利用可能な圧力であった。しかし、非常に高い溶出圧力

は、小さいカラムの直列接続の結果であった。これに対応するためには、異なる緩衝液の使用やカラム担体のディスポーザブル化のような別の方法を考慮してもよい。

画期的なプロファイルは、Figure 15 に示すように評価された。AEX-CEX トレーンへのサンプル負荷が増すと、宿主細胞由来蛋白質（HCP）レベルの増加が検出された。初期負荷（<328 mg）における宿主細胞由来蛋白質（HCP）のわずかなリークは、陰イオン交換（AEX）クロマトグラフィー[40]について第2章で述べたレベルと同等であった。初期の破過 DNA は、656 mg の負荷で検出された。一方で、活性炭（AC）を工程に加えると、宿主細胞由来蛋白質（HCP）および DNA のはるかに良好なクリアランスが得られた。最大の宿主細胞由来蛋白質（HCP）リークは 70 ng/mg IgG に減少し、DNA 破過は 1306 mg 負荷まで制御した。

陽イオン交換（CEX）カラムから回収された抗体の最初のピーク立ち上がり部分には、本質的に凝集体を含まず、最も弱く保持された抗体モノマーが含まれる[41]。第1の分画の抗体濃度は、陽イオン交換（CEX）カラムへのモノマー結合に起因して低かったが、第2の分画（328 mg 負荷）で急速に飽和した。

Figure 16 に示すように「AC→AEX→CEX」では、総カラム担体量（2 mL）に対して、1469 mg 抗体相当のプロセス液を通液しても、HCP : 14 ng / mg、DNA : 0.18 pg / mg、monomer : 97.2 %と原薬の標準品質規格（HCP : < 100 ng / mg、DNA : < 10 pg / mg、monomer : > 95 %）を満たすものであった。また、回収率は、96 %と良好であった。更に活性炭（AC）を組み込むことで、より堅牢な宿主細胞由来蛋白質（HCP）および DNA のクリアランスと、高い回収率が達成できた。

この接続されたフロースルー精製アプローチの結果は、典型的な活性炭（AC）工程を含まない、陽イオン交換（CEX）と陰イオン交換（AEX）の段階的溶出（結合/溶出）クロマトグラフィーの負荷と比較して、より高い処理能力を示した。陽イオン交換（CEX）および陰イオン交換（AEX）の必要カラム担体容量は、それぞれ 1 / 75、および 1 / 15 に削減可能であった。全ての連結カラムの担体容量、および平衡化、洗浄、溶出ステップの低減は、典型的なプロセス（CEX : 40 g IgG / L resin、AEX : 100 g IgG / L resin）と比較して緩衝液の使用量を約 95 %低減できる。

これらの結果から、連結フロースルー連続精製法は、クロマトグラフィー担

体容量、および緩衝液の使用量の低減、単一クロマトグラフィシステムによる操作、および中間保管タンクの除去を達成することができる画期的な精製法であることが示唆された。

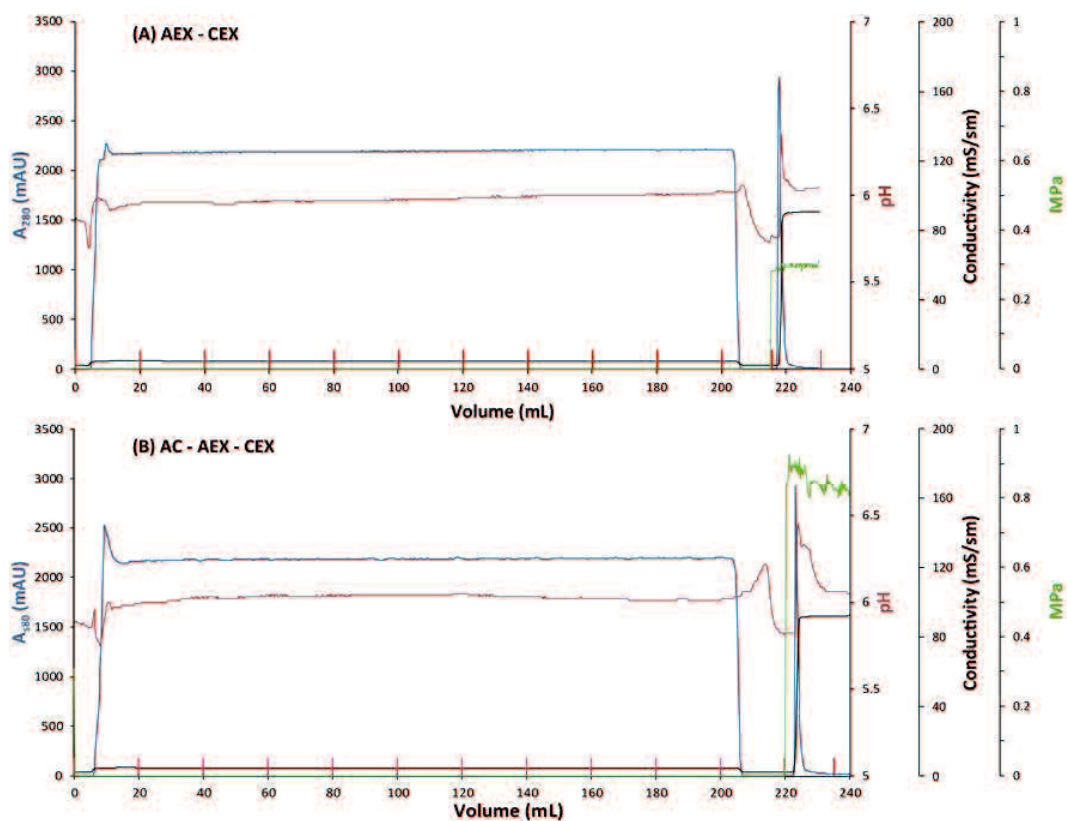


Figure 14. 直列接続されたフロースルー精製ステップから得られた典型的なクロマトグラム

(A) AEX-CEX, (B) AC-AEX-CEX.

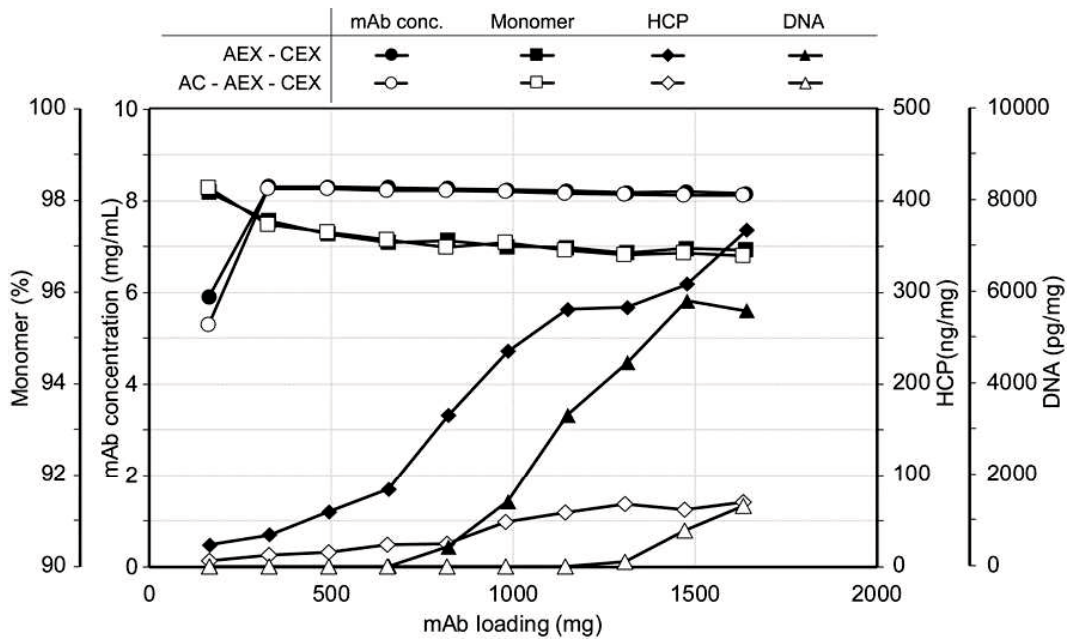


Figure 15. 不純物濃度の変化と破過プロファイルの比較

Feed condition is; mAb concentration = 8.2 mg / mL, HCP = 567 ng / mg IgG, DNA = 7276 pg / mg IgG, HMW1 = 0.78 %, HMW2 = 1.65 %, Monomer = 96.53 %, LMW1 = 0.93 %, LMW2 = 0.1 %.

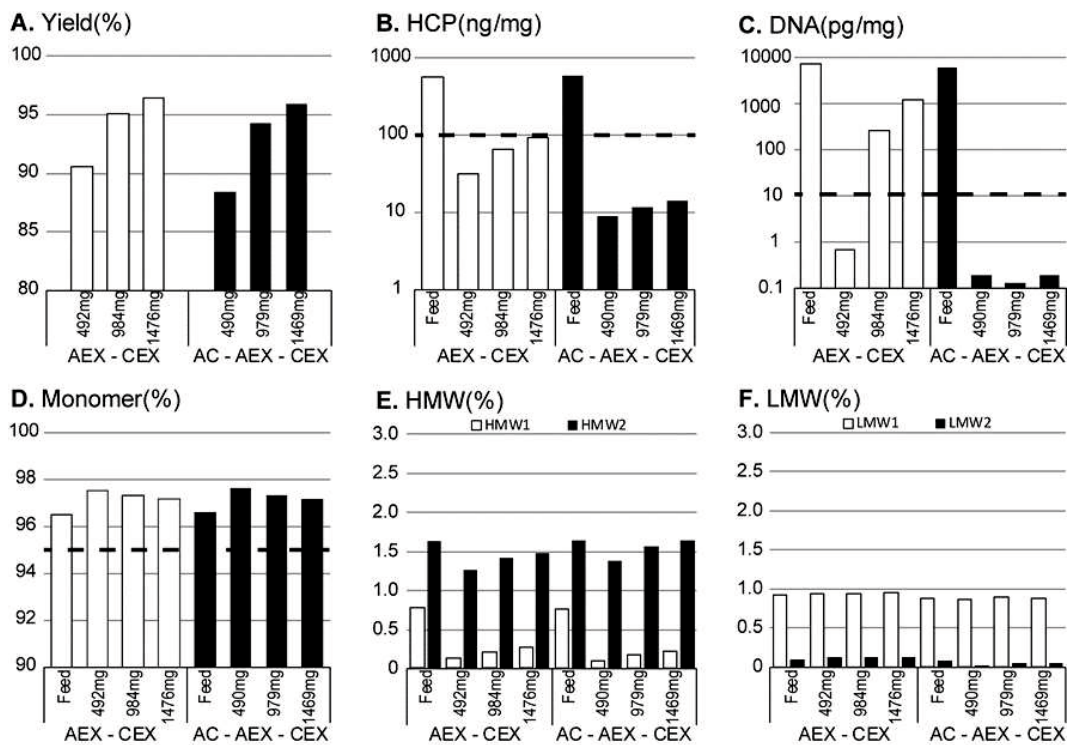


Figure 16. 異なるロード量での連結フロースルー精製による累積流出液プールの分析

(A) Yield, (B) HCP, (C) DNA, (D) Monomer, (E) HMW, (F) LMW.

Bold dot line is target bulk drug specification.

3.4 小括

バイオ医薬品プロセスの開発および製造は、統合された連続処理に向けられている可能性が高い。そして、新しい技術や手法を模索している中で、プロセスの強化を考慮する必要がある。この研究は、一連のすべての工程が、中間生成物保管タンクを使用せずに、プールレス操作で接続された、抗体医薬品の統合フロースルー精製法を実証するものであった。すべてのフロースルー精製工程の接続方法は、実験計画法 (DOE) から導き出された条件であり、インラインによる pH 調整、および導電率を調整するための希釈を必要としない、容易な操作により達成された。

ここで報告した接続フロースルーの原理は、以下の工程から構成される。活性炭 (AC) カラムクロマトグラフィーによる、宿主細胞由来蛋白質 (HCP) および DNA を含む低分子量 (LMW) 不純物の除去、陰イオン交換 (AEX) カラムクロマトグラフィーによる、酸性の宿主細胞由来蛋白質 (HCP) および DNA を含む負に帯電した不純物の除去、陽イオン交換 (CEX) カラムクロマトグラフィーによる、抗体関連の凝集物を含むより大きな分子種の除去。これは、プロセスを大幅に簡素化し、プロセスの効率を向上させ、一貫して大幅にコストを削減し、抗体医薬品製造テンプレートへの採用に魅力的な、堅牢で強力なツールである。接続されたフロースルー連続精製法はプロセスを強化し、高い抗体収率と不純物クリアランス、そして高いプロセス負荷を可能とする。これらの技術は、個々のユニット操作の置換、または組み合わせにより、抗体医薬品の精製のための完全なプロセステンプレートとして使用することができる。この新しいプロセスは、ユニット操作間の統合を強化し、最終的には連続処理を可能にするように設計される。

これらの新しいプロセスを採用するには、さらなるエンジニアリングが必要であり、モニタリング、サンプリング、分析管理、バッチ定義、検証研究、および文書化など、操作上および規制上の課題に対処する必要がある。

今後は、これらの多くの利点と潜在的な利点が認識され、技術課題や規制ガイドダンスなどの要素に対して、理解し対応する必要がある。

第4章 参考文献

4.1 参考文献

1. Marichal-Gallardo PA, Alvarez MM. State-of-the-Art in Downstream Process of Monoclonal Antibodies: Process Trends in Design and Validation. *Biotechnol Prog.* 2012;28 (4): 899-916. doi: 10.1002/btpr.1567.
2. Kelley B. Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnol Prog.* 2007;23(5): 995–1008. doi: 10.1021/bp070117s.
3. Sommerfeld S, Strube J. Challenges in biotechnology production – generic processes and process optimization for monoclonal antibodies. *Chemical Engineering and Processing.* 2005;44: 1123-1137. doi: 10.1016/j.cep.2005.03.006.
4. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan , Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches. *J Chromatogr B.* 2007;848: 28–39. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.026.
5. Konstantinov K, Cooney C, White Paper on Continuous Bioprocessing. *ISCOMP White Paper.* 2014;4: 1-14.
6. Jungbauer A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. *Trends in Biotechnology.* 2013;31(8): 479-492. doi:10.1016/j.tibtech.2013.05.011
7. Zydney AL. Perspectives on integrated continuous bioprocessing – opportunities and challenges. *Curr Opin Chem Eng.* 2015;10: 8-13. doi:10.1016/j.coche.2015.07.005
8. Walther J, Godawat R, Hwang C, Abe Y, Sinclair A, Konstantinov K. The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production. *J Biotechnol.* 2015;213: 3-12. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.05.010
9. Shamashkin M, Godavarti R, Iska T, Coffman J. A tandem laboratory scale protein purification process using Protein A affinity and anion exchange chromatography operated in a weak partitioning mode. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110(10):2655-2663. doi: 10.1002/bit.24955.
10. Winters D, Chu C, Walker K. Automated Two Step Chromatography Using an

- AKTA Equipped with In-Line Dilution Capability. *J Chromatogr A*. 2015;1424:51-58. doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.092.
11. Holzer M, Osuna-Sanchez H, David L. Multi-column chromatography: a new approach to relieving capacity bottlenecks for downstream processing efficiency. *Bioprocess Int*. 2008;6:74–82.
 12. Dizon-Maspat J, Bourret J, D'Agostini A, Li F, Single Pass Tangential Flow Filtration to Debottleneck Downstream Processing for Therapeutic Antibody Production. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(4):962-970. doi: 10.1002/bit.24377.
 13. Warikoo V, Godawat R, Brower K, Jain S, Cummings D, Simons E, Johnson T, Walther J, Yu M, Wright B, McLarty J, Karey K, Hwang C, Zhou W, Riske F, Konstantinov K. Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109(12):3018-3029. doi: 10.1002/bit.24584.
 14. Pollock J, Bolton G, Coffman J, Ho SV, Bracewell DG, Farid SS. Optimizing the design and operation of semi-continuous affinity chromatography for clinical and commercial manufacture. *J Chromatogr A*. 2013;1284:17–27. doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.082.
 15. Godawat R, Konstantinov K, Rohani M, Warikoo V. End-to-end integrated fully continuous production of recombinant monoclonal antibodies. *J Biotechnol*. 2015;213: 13-19. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.393.
 16. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *mAbs*. 2010;2(5): 480-499. doi:10.4161/mabs.2.5.12645.
 17. Goswami S, Wang W, Arakawa T, Ohtake S. Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics. *Antibodies*. 2013;2(3):452-500. doi:10.3390/antib2030452
 18. Wang C, Soice N, Ramaswamy S, Gagnon B, Umana J, Cotoni K, Bian N, Cheng KS. Cored anion-exchange chromatography media for antibody flow-through purification. *J Chromatogr A*. 2007;1155(1):74–84. doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.030.
 19. Weaver J, Husson S, Murphy L, Wickramasinghe SR. Anion Exchange Membrane Adsorbers for Flow-Through Polishing Steps: Part II. Virus, Host Cell Protein, DNA Clearance, and Antibody Recovery. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(2):500-510. doi:

10.1002/bit.24724.

20. Gjoka X, Gantier R, Schofield M. Transfer of a three step mAb chromatography process from batch to continuous: Optimizing productivity to minimize consumable requirements. *J Biotechnol.* 2017;242, 11–18. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.005.
21. Ghose S, Tao Y, Conley L, Cecchini D. Purification of monoclonal antibodies by hydrophobic interaction chromatography under no-salt conditions. *mAbs.* 2013;5(5):795–800. doi: 10.4161/mabs.25552.
22. O’Connor E, Aspelunda M, Bartnika F, Bergec M, Coughlinb K, Kambaramia M, Spencerb D, Yanb H, Wanga W. Monoclonal antibody fragment removal mediated by mixed mode resins. *J Chromatogr A.* 2017;1499:65–77. Doi:10.1016/j.chroma.2017.03.063
23. Phillips M, Mann F, Ribault S. Continuous mAb processing. *Euro Biotech News.* 2013;12(6-7):40-41.
24. Zhang J, Conley L, Pieracci J, Ghose S. Pool-less processing to streamline downstream purification of monoclonal antibodies. *Eng Life Sci.* 2017;17(2):117–124. doi:10.1002/elsc.201600104
25. Marsh H. Rodríguez-Reinoso F. *Activated Carbon*; Elsevier Science: Oxford;2006.
26. Stone MT, Kozlov M. Separating proteins with activated carbon. *Langmuir.* 2014;30(24): 8046–8055. doi:10.1021/la501005s.
27. Hill DA, Mace P, Moore D. Frontal chromatographic techniques in preparative chromatography. *J Chromatogr A.* 1990; 523: 11-21. Doi:10.1016/0021-9673(90)85007-I
28. Suda EJ, Thomas KE, Pabst TM, Mensah P, Ramasubramanyan N, Gustafson ME, Hunter AK, Comparison of agarose and dextran-grafted agarose strong ion exchangers for the separation of protein aggregates. *J Chromatogr A.* 2009;1216(27):5256–5264. doi: 10.1016/j.chroma.2009.05.021.
29. Kozlov M, Potty A, Galipeau K, Hamzik J, Umana J, Peeck L. Removal of protein aggregates from biopharmaceutical preparations in a flow-through mode. EMD Millipore Corporation. WO2013138098A1. 2013.
30. Gillespie C, Kozlov M, Phillips M, Potty ASR, Skudas R, Stone M, Xenopoulos A, Dupont A, Jaber J, Cataldo W. Integrating continuous and single-use methods to establish a new downstream processing platform for monoclonal antibodies. In:

- Subramanian, G. (Ed.). Continuous Processing in Biopharmaceutical Manufacturing: Wiley-VCH; 2015.
31. Xenopoulos A, Phillips M, Moya W, Jaber J, Kozlov M, Potty A, Stone MT, Cataldo W, Gillespie C, Purification of Biological Molecules. EMD Millipore Corporation. WO2014004281 A1. 2014.
 32. Xenopoulos A, A new, integrated, continuous purification process template for monoclonal antibodies: Process modeling and cost of goods studies. *J Biotechnol.* 2015; 213:42-53. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.020.
 33. EMD Millipore. The use of Millistak+[®] Activated Carbon (AC) for downstream purification of monoclonal antibodies. Application note; 2015. Lit No. AB57750000 Rev. A.
 34. Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *New Biotechnology.* 2011;28(5):458-463. doi: 10.1016/j.nbt.2011.03.015.
 35. Chase HA. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 1984;297:179–202.
 36. Nash DC, Chase HA. Comparison of diffusion and diffusion-convection matrices for use in ion-exchange separations of proteins. *J Chromatogr A.* 1998;807(2):185–207.
 37. Stein A, Kiesewetter A. Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimized binding and HCP removal. *J Chromatogr B.* 2007;848(1):151–158. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.10.010.
 38. Reck JM, Pabst TM, Hunter AK, Wang X, Carta G, Adsorption equilibrium and kinetics of monomer–dimer monoclonal antibody mixtures on a cation exchange resin. *J Chromatogr A.* 2015;1402: 46–59. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.007.
 39. Reck JM, Pabst TM, Hunter AK, Carta G. Separation of antibody monomer-dimer mixtures by frontal analysis. *J Chromatogr A.* 2017;1500:96–104. doi: 10.1016/j.chroma.2017.04.014.
 40. Ichihara, T., ITO, T., Kurisu, Y., Galipeau, K. et. al., Integrated flow-through purification for therapeutic monoclonal antibodies processing. *Mabs*, 2018 Vol.10, Issue 2, 325-334.
 41. Suda, E.J., Thomas, K.E., Pabst, T.M., Mensah, P. et al., Comparison of agarose and

dextran-grafted agarose strong ion exchangers for the separation of protein aggregates. *J Chromatogr A*. 2009, 1216, 5256–5264.

42. Yoshimoto, N., Yamamoto, S. Simplified methods based on mechanistic models for understanding and designing chromatography processes for proteins and other biological products -Yamamoto Models and Yamamoto Approach- in *Preparative chromatography for separation of proteins*, Chp.4, pp, 111-157, Wiley, 2017.
43. Takamitsu Ichihara, Takao Ito, Christopher Gillespie. Polishing approach with fully connected flow-through purification for therapeutic monoclonal antibody. *Engineering in Life Sciences*. 2019 Vol.19, Issue 1, 31-36.

第5章 総括

抗体医薬品等のバイオ医薬品の製造は、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を研究している。

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。

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。

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スルー精製を、実験計画法 (DOE) から導かれた最適条件下で評価し、その性能を検証した。最適条件は、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、抗体二量体などの高分子不純物の低減に有効であった。新規開発の陽イオン交換担体 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実験計画法 (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スルー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、最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。

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考える。

第6章 本研究に関する著者の発表論文

6.1 関係論文等

6.1.1 査読のある雑誌等

(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, Issue 2, pp. 325-334

発行年月 : 平成30年2月発行

(本文との関連 : 本論文の第2章と関連)

(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 : volume 19, Issue 1, pp. 31-36

発行年月 : 平成31年1月発行

(本文との関連 : 本論文の第3章と関連)

6.1.2 査読のある国際会議の会議録等

(1) 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)

発行年月 : 21-22 Nov. 2018 in Makati City, Philippines

(本文との関連 : 本論文の第2章、第3章と関連)

6.1.3 その他

(1)著者氏名：市原 隆光

論文題目：抗体医薬品製造における連続生産技術の活用

学術雑誌名：化学工学会バイオ部会 Newsletter

巻、号、頁：Vol.46, pp.21-22

発行年月：平成30年1月発行

(本文との関連：本論文の第1章と関連)

6.2 参考論文

6.2.1 査読のある雑誌等

(1)著者氏名：Tomoya Sugita, Makoto Katayam, Mina Okochi, Ryuji Kato, Takamitsu Ichihara, Hiroyuki Honda

論文題目：Screening of peptide ligands that bind to the Fc region of IgG using peptide array and its application to affinity purification of antibody.

学術雑誌名：Biochemical Engineering Journal

巻、号、頁：79, 33-40.

発行年月：2013年発行

第7章 謝辞

本研究に対して終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、山本修一教授に心より謝意を表します。また、本研究に対してご討論とご指導を賜りました、吉本則子准教授に感謝の意を表します。

更に、本研究にご協力いただきました、メルク株式会社 伊藤隆夫氏、栗巢康彦氏、アステラス製薬株式会社 バイオ技術研究所の諸氏に深く感謝致します。

最後に、このような研究の機会を与えくださると共に、多大なるご支援をいただきました、アステラス製薬株式会社 バイオ技術研究所 伴和敏所長に深く感謝致します。