

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文題目	バイオ医薬品のフロースルークロマトグラフィープロセスの設計方法 (Method for designing flow-through chromatography processes of biologics)
--------	--

氏 名	長谷川 純子
-----	--------

抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は医薬品市場で主流となりつつある一方、従来の低分子医薬品と比較して開発・製造コストが高額であることが問題となっている。バイオ医薬品はバイオテクノロジー技術を活用して一般的に動物細胞に目的タンパク質を生産させ精製して製造される。製造工程のうち培養工程は、発現細胞株、培地、培養条件の改善により培養液中における目的タンパク質の発現量を向上させることにより製造コストの削減が試みられている。一方、細胞培養液から目的タンパク質を精製する精製工程では、高流速・高吸着量クロマトグラフィー担体の開発による改善が試みられているが、培養工程での高発現量に対応できるほどの改善は見られておらず、バイオ医薬品製造における精製工程の効率化は重要な課題である。

近年バイオ医薬品製造の効率化の一つの手段として連続製造が注目されており、精製工程では複数のカラムを周期的に切り替えて運転する連続クロマトグラフィーや、複数の工程を連結して連続的に実施する手法などが検討されている。抗体タンパク質(mAb)医薬品精製では、通常複数のクロマトグラフィーが逐次実施される。最初のクロマトグラフィーステップはキャプチャーといい、mAb に強い親和性を持つプロテイン A クロマトグラフィー(PAC)が通常用いられる。培養中に生成される培養細胞(ホストセル)由来不純物[ホストセルタンパク質(HCP)、ホストセル DNA、ウイルス]および生産物(mAb)由来不純物[重合体や断片]を非常に低レベルまで除去しなければならないので、さらにクロマトグラフィー精製プロセスが必要となる。これらのステップはポリッシュと呼ばれる。

ポリッシュプロセスには、フロースルークロマトグラフィーが多く活用される。フロースルークロマトグラフィー(FTC)では、試料をクロマトグラフィーカラムに連続的に供給する。不純物は担体へ吸着し、目的タンパク質は吸着せずに通過し連続的に回収される。負荷と同時に目的タンパク質の回収が生じるため擬似的に連続的なプロセスと捉えることもできる。さらにメンブレンクロマトグラフィーを用いることでシングルユース化も可能であることから、精製工程の効率化に対する一つの解決策と考えられている。フロースルークロマトグラフィー工程における至適条件は、経験論を基に検討されることが多く系統立てた手法はあまり開発されていない。

本論文ではフロースルークロマトグラフィーによるタンパク質の分離機構の解析と簡単なプロセス設計方法および最適方法を構築することを目的とした。モデル系としては、イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質のモノマーとダイマーの分離を選択し、構築したモデルを実験により検証した。

フロースルークロマトグラフィーの分離機構をモデル化するためには平衡関係を表す分配係数と物質移動を支配する細孔内拡散係数  $D_p$  が必要となる。本モデルでは、塩濃度  $I$  の関数として得られる分配係数  $K$ 、および分配係数  $K$  と  $D_p$  により計算される理論段数  $N$  により溶出曲線を計算し、目的成分が不純物と完全に分離する試料負荷量  $V_F$  を算出した。分配係数  $K$  は塩濃度勾配溶出実験

(LGE)を異なる勾配で実施することにより作成される  $GH-I_R$  曲線 ( $GH$ :規格化した勾配、 $I_R$ :溶出ピークの塩濃度)から塩濃度  $I$  の関数として求めることができる。

このモデルにより、任意のカラムサイズに対して滞留時間  $RT$  と分離可能な最大試料負荷量  $VF$  の関係を推定することが可能である。

分配係数  $K$  は塩濃度  $I$  に強く依存するので、FTC では移動相組成  $I$  の適切な設定が重要であることと、分離挙動がわずかな塩濃度の変動で大きく変化することがモデルシミュレーションから判明した。モデルおよびモデルシミュレーションは、モデルタンパク質モノマーのダイマーからの分離実験で検証された。

生産性  $P$  に着目した FTC プロセス最適化方法を開発し、操作条件と生産性の関係について検討した。粒子径  $d_p$  を小さくすると生産性  $P$  は増加する。また、 $P$  は、滞留時間  $RT$  を短くすることにより増加するが、粒子径  $d_p$  が大きいと十分な分離が達成できないことがある。 $d_p$  と  $RT$  には、 $(d_p^2 \times RT)$  という関係が成立することが明らかとなり、これにより適切な粒子径と滞留時間を選択することができる。

イオン交換クロマトグラフィーのタンパク質分離は移動相  $pH$  にも強く依存する。モデル系の分離において直線勾配溶出(LGE)では、移動相  $pH$  が  $pH=6$  から7になると保持が強くなるとともに分離がよくなるが、FTC では、適切な移動相塩濃度を選ぶと同じ分離性能を得ることができる。

# 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 1096 号	氏名	長谷川 純子
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 審査委員	吉本 則子 赤田 倫治 堤 宏守 田中 一宏 鬼村 謙二郎 山本 修一	
<b>【論文題目】</b> バイオ医薬品のフロースルークロマトグラフィープロセスの設計方法 (Method for designing flow-through chromatography processes of biologics)			
<b>【論文審査の結果及び試験，諮問の結果】</b> <p>抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は医薬品市場で主流となりつつあるが、従来の低分子医薬品と比較して開発・製造コストが高額であることが問題となっている。バイオ医薬品はバイオテクノロジー技術を活用して細胞に目的タンパク質を生産させ精製して製造される。培養工程は、発現細胞株、培地、培養条件の改善により培養液中における目的タンパク質の発現量を向上させることにより製造コストの削減が試みられている。一方、細胞培養液から目的タンパク質を精製する精製工程では、クロマトグラフィード担体の開発による改善が試みられているが、培養工程での高発現量に対応できるほどの改善は見られておらず、バイオ医薬品製造における精製工程の効率化は重要な課題である。</p> <p>近年バイオ医薬品製造の効率化の一つの手段として連続製造が注目されており、精製工程では複数のカラムを周期的に切り替えて運転する連続クロマトグラフィーや、複数の工程を連結して連続的に実施する手法などが検討されている。抗体タンパク質(mAb)医薬品精製では、通常複数のクロマトグラフィーが逐次実施される。最初のステップはキャプチャーといい、mAb に強い親和性を持つプロテイン A クロマトグラフィー(PAC)が通常用いられる。培養中に生成される培養細胞(ホストセル)由来不純物[ホストセルタンパク質(HCP)、ホストセル DNA、ウイルス]、および生産物(mAb)由来不純物(重合体や断片)を非常に低レベルまで除去しなければならないので、さらにクロマトグラフィー精製プロセスが必要となる。これらのステップはポリッシュと呼ばれる。ポリッシュプロセスには、吸着・脱着操作以外にも、フロースルークロマトグラフィー(FTC)操作も利用される。FTC では、試料をクロマトグラフィークラムに連続的に供給し、不純物は担体へ吸着し、目的タンパク質は吸着せずに通過し連続的に回収される。負荷と同時に目的タンパク質の回収が生じるため擬似的に連続的なプロセスと捉えることもできる。シングルユース化も可能であることから、精製工程の効率化に対する一つの解決策と考えられている。FTC 工程における至適条件は、経験論を基に検討されることが多く系統立てた手法はあまり開発されていない。</p> <p>本論文はFTCによるタンパク質の分離機構の解析と簡単なプロセス設計方法および最適方法を構築することを目的とし、イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質のモノマーとダイマーの分離をモデル系として選択し、構築したモデルを実験により検証している。本論文の第一章では、現在の抗体精製プロセスについてレビューしている。続いて第二章において、FTC のモデルを説明している。本モデルでは、塩濃度 <math>I</math> の関数として得られる分配係数 <math>K</math>、および細孔内拡散係数 <math>D_p</math> により計算される理論段数 <math>N</math> により溶出曲線を計算し、目的成分が不純物と完全に分離する試料負荷量 <math>V_F</math> を算出する。<math>K</math> は塩濃</p>			

度勾配溶出実験(LGE)を異なる勾配で実施することにより作成される  $GH-I_R$  曲線( $GH$ :規格化した勾配、 $I_R$ :溶出ピークの塩濃度)から  $I$  の関数として求めることができる。このモデルにより、任意のカラムサイズに対して滞留時間  $RT$  と分離可能な最大試料負荷量  $V_F$  の関係を推定することが可能となる。 $K$  は  $I$  に強く依存するので、FTC では  $I$  の適切な設定が重要であることと、分離挙動がわずかな  $I$  の変動で大きく変化することがモデルシミュレーションから判明した。モデルおよびモデルシミュレーションは、モデルタンパク質モノマーのダイマーからの陰イオン交換クロマトグラフィー分離実験で検証された。

第3章においては、生産性に着目した FTC プロセス最適化方法を開発し、操作条件と生産性の関係について検討している。生産性は粒子径を小さくする、あるいは滞留時間  $RT$  を短くすることにより増加するが、粒子径が大きいと十分な分離が達成できないことがある。 $d_p$  と  $RT$  には、( $d_p^2 \times RT = \text{constant}$ ) という関係が成立することが明らかとなり、これにより適切な粒子径と滞留時間を選択することができる。イオン交換クロマトグラフィーのタンパク質分離は移動相 pH にも強く依存する。モデル系の分離において直線勾配溶出(LGE)では、移動相 pH が 6 から 7 になると保持が強くなるとともに分離がよくなるが、FTC では、適切な移動相塩濃度を選ぶと同じ分離性能を得ることができると結論している。

公聴会には、本学の教員・学生以外に製薬会社や化学会社から多数の研究者が参加し、多くの質問があった。主な質問は以下である。

1. 様々な不純物が混入している場合についてはどのように適用するのか。
2. プロセス開発から製造管理などどのような場面での適用を考えているのか。
3. 連続プロセスに対しても適用可能か。
4. スケールアップした場合に、モデルは対応できるのか。
5. 不純物が目的物質より早く溶出する場合には FTC の場合にはどうなるか。
6. モデルの溶出液量を基に回収すると回収率が低下するが改善方法はないか。

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: Sumiko Hasegawa, Chyi-Shin Chen, Noriko Yoshimoto, and Shuichi Yamamoto  
論文題目: Accelerated Method for Designing Flow-Through Chromatography of Proteins  
学術雑誌名: Journal of Chemical Engineering of Japan  
巻、号、頁: Vol.53, No.5, 2020. DOI <https://doi.org/10.1252/jcej.20we002>  
発行年月: 2020 年 5 月発行
- (2) 著者氏名: Sumiko Hasegawa, Chyi-Shin Chen, Noriko Yoshimoto, and Shuichi Yamamoto  
論文題目: Optimization of Flow-Through Chromatography of Proteins  
学術雑誌名: Journal of Chemical Engineering of Japan  
巻、号、頁: Vol.53, No.5, 2020. DOI <https://doi.org/10.1252/jcej.20we003>  
発行年月: 2020 年 5 月発行
- (3) 著者氏名: Noriko Yoshimoto, Sumiko Hasegawa, Shuichi Yamamoto  
論文題目: A method for designing flow-through chromatography processes  
学術雑誌名: Proceedings of 25th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2018)  
巻、号、頁: Volume 268, 2019. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201926801004>  
発行年月: 2019 年 2 月発行