

# 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 学位論文題目<br>(Dissertation Title) | 抗体の統合連続精製プロセスの開発と実証および評価<br>(Development of integrated continuous downstream process<br>for antibodies and its verification and evaluation) |
| 氏 名 (Name)                     | 鴻池 史憲   |

抗体医薬品は、宿主動物細胞に産生されたのち、精製プロセス(DownStream Process, DSP)を経て宿主細胞および細胞由来成分から分離される。この精製プロセスは、プロテイン A クロマトグラフィー (Protein A Chromatography, PAC) によるキャプチャー工程、ウイルス不活化工程、2 ～ 3 種のイオン交換や疎水性相互作用等のクロマトグラフィー工程 (ポリッシング工程)、ウイルスフィルター工程で構成され、不純物は高度に除去される。最近、DSP の効率向上のために、連続化の導入が検討されている。例えば、PAC 工程においては、複数のカラムを用いることで、連続的なサンプル負荷と回収を行う Periodic Counter Current Chromatography (PCCC) が提案されている。複数の工程を連結化するためには、各工程の特性解析が必要である。また、連続精製プロセス全体の評価方法も確立していない。このため本研究では、精製プロセスの各行程の特性を解析した上で、全工程を統合した精製プロセスの開発を試みた。さらに、医薬品製造基準 Good Manufacturing Practice (GMP) に準拠したシステムにおいて、開発したプロセスを実証し、評価方法についても検討した。

本論文において、1 章では、序論として抗体の連続精製プロセスの背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

続く 2 章では、回分式バッチプロセスと同等な収率、かつ不純物の規格値を満たせるよう各工程の連続化を行った。最初のキャプチャー工程は、2 本のカラムを用いた PCCC にて連続化した。1 本の PAC カラムでの実験データから PCCC の操作条件を決定する方法を採用した。ウイルス不活化工程については、フロー型リアクターの実験と解析によりスケールダウン・スケールアップが難しいこと、接続も容易ではないことにより回分式操作を採用した。また、このタンクがバッチプールタンクとなり、場合によってはサージタンクの機能も持たせることができる。

ポリッシング工程については、アニオン交換と疎水性相互作用クロマトグラフィーのミックスモード担体並びに、カチオン交換担体を何れもフロースルーモードで直結して精製し、さらにウイルスフィルターを直結させ、これら 3 つの工程を一気通貫で行うこととした。これにより移動相の交換操作を不要とし、プールタンクも減らすことができた。

第 3 章では、第 2 章で開発した各連続プロセスを、サージタンクを介して連結することで、統合連続精製プロセス(integrated continuous Downstream Process, icDSP)とした。開発した icDSP に対し、計 6 回の検証試験を行った結果、処理量に対応して適切なカラムサイズを選定することで、0.5-3.6 L/day の培養液を連続的に精製でき、得られた精製液の不純物含量も規格を満たした。

上記試験においては、抗体医薬品製造の上流工程となる培養工程も連続化した上で、連結し、製造プロセス全体を統合連続化することも試みた。

第4章では、第3章で開発した icDSP を用いた GMP 施設での実証試験を示した。実証試験では、連続精製プロセスと 10 L/day で培養液を産生する連続培養プロセスとをサージタンクを介して統合連続生産した。統合連続生産は、3 日間連続的に運転し、培養も精製も稼働し続けた。連続培養からの抗体流入量は変動し続けたが、開発したプロセスは、安定的に精製を行え、得られた精製液の不純物含量も規格を満たした。

第5章では、開発したプロセスの効率性を生産性と溶媒使用量の観点から評価した。PCCC と繰り返し操作とでは同じ生産性において溶媒使用量が 50% 程度削減できていた。本プロセスの PCCC では試料負荷以外の時間が短く溶媒量も少ない、2 本のカラムを用いた PCCC が最適であることが分かった。さらに、第4章までの実証検討では、カラム切り替えタイミングを体破過の 30% 前後としたが、60% とすることで、生産性はそのまま溶媒使用量をさらに 20% 削減できることが分かった。また実証検討では、終夜運転を行わず、ウイルス不活化液は 24 時間貯留する形をとったが、貯留時間を短くすることで、ポリッシュ工程におけるカラムサイズを小さくでき、溶媒使用量を低減できることも分かった。最後に結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

# 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

|   |  |
|---|--|
| 学位論文題目<br>(Dissertation Title)  | 抗体の統合連続精製プロセスの開発と実証および評価<br>(Development of integrated continuous downstream process for antibodies and its verification and evaluation) |
| 氏 名 (Name)  | 鴻池 史憲  |
| <p>Antibody pharmaceuticals are produced in host animal cells and then separated from host cells and cell-derived components through a purification process (DownStream Process, DSP). This purification process consists of a capture step using Protein A Chromatography (PAC), a virus inactivation step, 2-3 types of chromatography steps such as ion exchange and hydrophobic interaction (polishing steps), and a virus filter step, which highly removes impurities. Recently, the introduction of continuous processing has been considered to improve the efficiency of DSP. For example, in the PAC step, Periodic Counter Current Chromatography (PCCC) has been proposed, which performs continuous sample loading and recovery using multiple columns. To connect multiple steps, it is necessary to analyze the characteristics of each step. Moreover, the evaluation method for the entire continuous purification process has not been established. Therefore, in this study, we attempted to develop an integrated purification process by analyzing the characteristics of each step of the purification process. Furthermore, we demonstrated the developed process in a system compliant with Good Manufacturing Practice (GMP) for pharmaceuticals and examined the evaluation method.</p> <p>In Chapter 1, the background and purpose of this study are described as an introduction, and the structure of this article is shown.</p> <p>In Chapter 2, each step was changed to a continuous operation, achieving high yields of target antibody while meeting impurity content criteria. The first capture step was replaced batch chromatography with a PCCC using two columns. A method was adopted to determine the operating conditions of PCCC from experimental data with a single PAC column. For the virus inactivation step, batch operation was adopted due to difficulties in scaling down and up and connection, as determined through experiments and analysis of a flow-type reactor. This tank also served as a batch pool tank and could function as a surge tank if necessary.</p> <p>For the polishing steps, a mixed-mode anion exchange and hydrophobic interaction chromatography column, as well as a cation exchange column, were directly connected in flow-through mode. A virus filter was also directly connected to them, allowing these three steps to be performed as a single step. This eliminated the need for mobile phase exchange operations and reduced the number of pool tanks.</p> <p>In Chapter 3, the continuous processes developed in Chapter 2 were connected via a surge tank to create an integrated continuous Downstream Process (icDSP). As a result of six verification tests on the developed icDSP, it was found that by selecting appropriate column sizes corresponding to the processing volume, culture fluid of 0.5-3.6 L/day could be continuously purified, and the impurity content of the purified fluid meeting the criteria.</p> <p>In one of these verification tests, the culture process, which is the upstream process of antibody pharmaceutical production, was also changed to a continuous process to integrate the entire manufacturing process continuously.</p> |  |

In Chapter 4, demonstration tests of the icDSP developed in Chapter 3 were performed in a GMP facility. In the demonstration tests, the continuous purification process and the continuous culture process producing 10 L/day of culture fluid were integrated via a surge tank for continuous production. The integrated continuous production was operated continuously for three days, with both culture and purification running continuously in parallel. Although the inflow rate from continuous culture fluctuated, the developed process could stably purify the product, and the impurity content of the purified fluid met the criteria.

In Chapter 5, the efficiency of the developed process was evaluated from the perspectives of productivity and solvent usage. It was found that solvent usage could be reduced by about 50% at the same productivity with PCCC compared to repeated cycle operations. In this study, the switching timing of the columns was set at around 30% antibody breakthrough, but it was found that by setting it at 60%, solvent usage could be further reduced by 20% while maintaining the same productivity. Additionally, in this study, overnight operation was not performed, and the virus inactivation solution was stored for 24 hours. However, it was confirmed that shortening the storage time in this process could reduce the column size in the polishing step and decrease solvent usage.

Finally, the conclusions summarize the findings obtained from this study and discuss future prospects and challenges.

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

|  |  |
|--|--|
| 氏 名  | 鴻池 史憲  |
| 審 査 委 員  | 主 査：吉本 則子  |
|  | 副 査：赤田 倫治  |
|  | 副 査：星田 尚司  |
|  | 副 査：通阪 栄一  |
|  | 副 査：吉本 誠   |
| 論 文 題 目  | 抗体の統合連続精製プロセスの開発と実証および評価<br>(Development of integrated continuous downstream process for antibodies and its verification and evaluation) |
| <p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>近年、医薬品開発はバイオ医薬品を中心とする方向へと進んでおり、中でも抗体医薬品の需要は著しく拡大している。抗体医薬品は高い特異性と薬効を有する一方で、他のバイオ医薬品と比較して投与量が多く、製造コストやスケールアップに課題を抱えている。そこで本研究では、抗体医薬品の各製造工程を連続製造に適合させ、これらを統合した連続製造プロセスの構築を試みた。</p> <p>第1章では、抗体医薬品製造における連続化の意義と、研究動向を概説した。</p> <p>第2章では、精製工程を構成するキャプチャー、ウイルス不活化、ポリッシングの各操作について、連続化への適用可能性を検討した結果を示した。キャプチャー工程では、マルチカラムを用いた疑似移動相クロマトグラフィーを採用し、カラムの物質移動特性に基づいてサンプル供給量を最適化することで、洗浄および平衡化時間を短縮し、抗体の処理効率を最大化した。ウイルス不活化工程については、現時点では連続化せず、バッチ方式を採用した。一方、ポリッシング工程では、イオン交換および疎水相互作用を組み合わせたマルチモード担体を用い、さらにフロースルーモードによる操作により、各種クロマトグラフィーおよび膜分離工程の連続化を実現した。</p> <p>第3章および第4章では、第2章で確立した各单位操作を統合し、研究室スケールおよびGMPに準拠した製造スケールでの実証結果を報告した。研究室スケールでは、1日あたり0.5～3.6 Lの培養液から、品質基準を満たす抗体溶液を3日間連続で製造できることを確認した。製造スケールにおいても、10 Lの培養液から同様の連続製造が可能であることを示した。</p> <p>第5章では、操作変数、生産量、ならびに緩衝液使用量に基づくプロセス解析の結果を示した。カラム本数を増やすことで処理量の向上が見られたが、3本を超えるとその効果は限定的であり、むしろ緩衝液の使用量が増加する傾向が明らかとなった。改良点として、カラム体積の縮小やウイルス不活化工程の短時間化を挙げた。</p> |  |

本研究で構築した、バッチ操作と連続精製を組み合わせた抗体製造プロセスは、従来法では困難であった柔軟な対応と高い処理効率を両立させるものであり、連続製造プロセスの設計に新たな視点を提供するとともに、担体当たりや緩衝液当たりの生産効率の高さを通じて、実用性と有効性の両面において優れた製造手法であることが示された。

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、担体や抗体の特性が生産性に与える影響、カラム本数と生産性の関係、実製造における操作上の問題点や維持・管理方法についてであった。

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、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士(生命科学)の論文に十分値するものと判断した。

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)

- (1) 著者氏名: Chyi-Shin Chen、Fuminori Konoike、Noriko Yoshimoto、Shuichi Yamamoto

論文題目: A regressive approach to the design of continuous capture process with multi-column chromatography for monoclonal antibodies

学術雑誌名: Journal of Chromatography A

巻・号・頁: Vol. 16582、462604

DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462604

発行年月: 2021 年 11 月

- (2) 著者氏名: Hironobu Shirataki、Yoshihiro Matsumoto、Fuminori Konoike、Shuichi Yamamoto

論文題目: Viral clearance in end-to-end integrated continuous process for mAb purification: Total flow-through integrated polishing on two columns connected to virus filtration

学術雑誌名: Biotechnology and Bioengineering

巻・号・頁: Vol. 120, Page 2977-2988

DOI: 10.1002/bit.28464

発行年月: 2023 年 6 月

- (3) 著者氏名: Fuminori Konoike、Masatoshi Taniguchi、Shuichi Yamamoto

論文題目: Integrated continuous downstream process of monoclonal antibody developed by converting the batch platform process based on the process characterization

学術雑誌名: Biotechnology and Bioengineering

巻・号・頁: Vol. 121, Page 2269-2277

DOI: 10.1002/bit.28537

発行年月: 2023 年 9 月