

学 位 論 文 の 要 旨

フロースルーモードのイオン交換クロマトグラフィーによるモノクローナル抗体の精製法に関する研究：ウイルス除去性能評価及び非対称な電荷分布を持つ抗体への対応

(Study on purification method of monoclonal antibodies by ion-exchange chromatography in a flow-through mode: evaluation of virus removal performance and application to antibodies with asymmetric charge distribution)

氏 名 増田 由美子 印

抗体医薬品は、高い抗原特異性と少ない副作用から、特にがんや自己免疫疾患の分子標的治療薬として注目され、市場規模は年々拡大している。

多くの抗体医薬品は、**Chinese Hamster Ovary (CHO)** 細胞を宿主とした生産系によって製造されている。**CHO** 細胞培養液には目的物質である抗体以外に、高分子量種、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 **DNA** 及び他の製造工程由来不純物等が含まれている。さらに、**CHO** 細胞には非感染性レトロウイルス様粒子の存在も知られているため、製造工程ではこのレトロウイルス様粒子及び外来性ウイルスを含む多くの不純物を適切に除去する性能が求められる。

多くのモノクローナル抗体は、基本的分子構造が同じであり、物理化学的性質が類似しているため、その製造工程では「プラットフォームプロセス」と呼ばれる共通の精製工程の適用が可能となる場合が多い。通常、抗体の精製工程は、**Protein A** アフィニティークロマトグラフィーを用いるキャプチャー工程、次いで、陽イオン交換 (**CEX**) 及び陰イオン交換 (**AEX**) クロマトグラフィー等のポリッシング工程からなる。

抗体医薬品は、投与量が多いこと、また培養コストが高い動物細胞を製造に用いることから、様々な製造方法の効率化やコスト削減が試みられる。特に、抗体製造の原材料費のうち、クロマトグラフィー工程で用いる樹脂等の媒体は大きな割合を占めており、コスト低減のためクロマトグラフィー工程の樹脂等の媒体を効率的に使用することが必要となる。本研究では、効率的な抗体プラットフォームプロセスを構築するため、ポリッシング工程として汎用されている **CEX** 及び **AEX** クロマトグラフィーについて、フロースルーモードによる精製工程を検討した。

まず、**CEX** クロマトグラフィーのフロースルーモードに類似したオーバーロードモードのウイルス除去性能について評価した (第二章)。**CEX** クロマトグラフィーでは一般的には結合/溶出モードが広く用いられるが、オーバーロードモードでは、結合/溶出モードの 10

倍以上の目的物質である抗体を樹脂へ負荷できるため、効率的な精製法の構築につながる可能性がある。**CEX** クロマトグラフィーにおけるオーバーロードモードでは、多くの不純物の除去が可能であることが報告されているが、実製造に採用される精製プロセスの重要な指標であるウイルス除去性能については報告されていない。既に報告されている不純物の除去に加え、オーバーロードモードが結合/溶出モードと同等の性能でウイルスを除去できれば、高コストとなることが予想される結合/溶出モードの代わりになりうる。本研究は、**CEX** クロマトグラフィーのオーバーロードモードがウイルスを除去する能力を有することを初めて示した。さらに、結合/溶出モードの 20 倍以上負荷量の多い条件でも、結合/溶出モードと同等のウイルス除去性能を有することも明らかにした。また、ウイルス除去性能は、抗体種、樹脂種により有意な影響を受けなかった。本研究により、抗体医薬品製造における低コストかつ高効率な精製プロセスの設計において、**CEX** クロマトグラフィーのオーバーロードモードが、ポリッシングステップとして有用であることを示すことができた。

次に、精製プロセス開発において直面した **AEX** クロマトグラフィーのフロースルーモードにおける非対称な電荷分布をもつ抗体の溶出挙動と精製条件の検討から、従来法では困難である非対称電荷分布を有する抗体の精製法を開発した（第三章）。一般的に **AEX** クロマトグラフィーのフロースルーモードにおけるクロマトグラフィー条件は、各抗体の等電点に基づき予測可能である。しかしながら、抗体 A は、予測した条件下で **AEX** 樹脂に吸着保持され、フロースルーしなかった。抗体 A の **AEX** クロマトグラフィーへの吸着挙動を考察するため、抗体の Fv 領域上の静電ポテンシャルを解析した結果、大きな負電荷クラスターが存在し、この抗体表面の非対称な電荷分布がフロースルーに大きく影響すると推測した。観察された異常なクロマトグラフィー挙動の影響を回避するため、**AEX** クロマトグラフィーに用いる媒体について、特に構造的な特徴から非対称の電荷分布の影響を受けにくいことが期待される膜吸着体に着目して検討した。その結果、予想通り、標準的なクロマトグラフィー条件で抗体 A は膜吸着体に吸着保持されず、効率的なフロースルーモードでの精製が可能であることを明らかにした。同時に十分なウイルス除去も達成することを示した。

抗体製造における高効率・低コスト精製プロセス開発に向けたフロースルーモードの活用に関する本研究は、クロマトグラフィー工程に使用する媒体の効率的な使用を可能にし、低コストを実現できる精製プロセスの提案につながった。また、表面電荷に特徴をもつ難精製抗体についても、標準的な条件で精製できる手法となる膜クロマトグラフィーメディアである **NatriFlo HD-Q** を見出したことから、本研究の成果は、確実な抗体医薬品の供給を実現できるプラットフォーム精製プロセスを提供し、精製プロセス開発期間の短縮化の実現による抗体医薬品開発の加速化に貢献するものと考えられる。

学 位 論 文 の 要 旨

Study on purification method of monoclonal antibodies by ion-exchange chromatography in a flow-through mode: evaluation of virus removal performance and application to antibodies with asymmetric charge distribution

(フロースルーモードのイオン交換クロマトグラフィーによるモノクローナル抗体の精製法に関する研究：ウイルス除去性能評価及び非対称な電荷分布を持つ抗体への対応)

氏 名 増田 由美子 印

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have been widely focused as molecular targeted drug for cancer and autoimmune disease, because of their higher antigen specificity and lower side effects. Their worldwide market is year-by-year expanding.

Many therapeutic mAbs are produced by mammalian cell expression system with Chinese hamster ovary (CHO) cells as a host. Culture broth of CHO cells contains not only mAbs but also product and process related impurities such as high-molecular-weight species, host cell protein, and host cell DNA. In addition, it is well-known that retrovirus-like particles which show non-infectious features are included in CHO cells and often released from them. A performance to remove most impurities including retrovirus-like particles and adventitious viruses are required to meet an acceptable level in an appropriate purification process.

Many of the humanized mAbs, which possess a common framework, have similar physicochemical properties. Consequently, similar purification processes, so-called “platform processes,” are often applied as general manufacturing protocols with minimal alterations. Protein A chromatography is used as the first capture step in a downstream platform process, followed by two or three polishing steps. Cation exchange (CEX) and anion exchange (AEX) chromatographies are typically used as a polishing step.

Manufacturers have often tried to streamline the manufacturing process and reduce the production cost as far as possible because of higher dose of therapeutic mAbs in clinical and medical fields and higher production cost depending on a manufacturing process using mammalian expression system. In particular, some resin and/or the other media in the chromatography steps account for a large proportion in the raw material costs for mAb manufacturing. In this study, performance of purification steps by CEX and AEX chromatographies under flow-through mode conditions was investigated in order to develop an efficient platform process for mAb manufacturing.

First, a virus removal performance in the overload mode, similar to a flow-through mode, on CEX chromatography was evaluated (Chapter 2). Although CEX chromatography is commonly used in bind/elute mode, the tested overloaded mode could be done under more than 10-times loading condition compared with bind/elute mode as efficient and alternative purification method. It has been further reported that CEX chromatography in overloaded mode is effective in removing many impurities. However, the viral clearance performance in overloaded mode has not yet been reported. If the overloaded mode can remove viruses with the same efficiency as the bind/elute mode, then the overloaded mode can take the place of the bind/elute mode on CEX chromatography step, which requires large amount of media and buffer. The present study showed successful virus removal in overloaded mode on CEX chromatography as the first example. Even though the load amount in the overloaded mode was 20-times larger than that in the bind/elute mode, the overload mode showed the almost same viral clearance performance as a bind/elute mode. This viral clearance ability was not significantly affected by mAb features or used resins. This study showed the overloaded mode is effective to remove impurities as a polishing step for therapeutic mAbs with cost effective features.

Second, we developed the efficient purification process for the mAb having asymmetric charge distribution in flow through mode (Chapter 3). The pH of the mobile phase for AEX chromatography is typically set based on the isoelectric point (pI) of each mAb. However, we recently encountered a tight binding of mAb A to AEX resins under conditions set by its pI value. This anomalous adsorption behavior was suspected to be an effect of the asymmetric charge distribution on the surface of the mAb A. We predicted that the use of membrane adsorbers might provide effective mAb A purification, since the supporting matrix has a network structure that would be less susceptible to interactions with the asymmetric charge distribution on the protein surface. We tested membrane adsorber under standard chromatographic conditions and found that mAb A flowed through the membrane adsorber, resulting in successful separation from virus together.

In current studies on the purification of mAbs with flow-through mode, the media such as the chromatographic resin can be efficiently used and the production cost would be reduced. In addition, it was found that mAbs can be purified under similar standard chromatographic conditions regardless of their charge distributions using specific membrane adsorber, NatriFlo HD-Q. The present outstanding findings are expected to provide universal platform process for mAb manufacturing/purification, achieving the steady supply of therapeutic mAbs, and to contribute the acceleration by becoming shorten a period for process development of mAb purification.