

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

2020 年

学籍番号 T172A007

増田 由美子

Yumiko Masuda

Doctor Thesis

群馬大学大学院理工学府

Gunma University

要旨

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。

Abstract

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.

Manufactures 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.

略語集

本論文で用いた略語を以下に記載した。

- CHO : Chinese hamster ovary
- HMWS : high-molecular-weight species
- HCP : host cell protein
- CEX : cation exchange
- AEX : anion exchange
- MLV : murine leukemia virus
- PRV : pseudorabies virus
- Reo 3 : reovirus type 3
- MMV : murine minute virus
- TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious dose
- LVP : large volume plating
- LRV : log reduction value
- CV : column volume
- RT : residence time
- HSW : high-salt wash
- HPLC : high-performance liquid chromatography
- LMWS : low-molecular-weight species
- SE-HPLC : size exclusion high-performance liquid chromatography
- ELISA : enzyme-linked immune sorbent assay
- pI : isoelectric point
- IEX : ion exchange
- MV : membrane volume
- CDR : complementarity determining region

目次

第一章 緒論.....	10
1.1 研究の背景.....	11
1.2 研究の目的.....	12
1.3 本論文の構成.....	13
1.4 オーバーロードモードに関する説明.....	16
1.5 引用論文.....	17
第二章 高効率なオーバーロードモードによる陽イオン交換クロマトグラフィー におけるウイルス除去に関する研究.....	20
2.1 序論.....	21
2.2 方法.....	22
2.3 結果および考察.....	25
2.4 小括.....	41
2.5 引用論文.....	43
第三章 非対称な電荷分布を持つ抗体の陰イオン交換クロマトグラフィーにおけ るフロースルーモードでの精製に関する研究.....	44
3.1 序論.....	45
3.2 方法.....	46
3.3 結果および考察.....	49
3.4 小括.....	67
3.5 引用論文.....	67
第四章	71
4.1 結論.....	72
4.2 論文及び学会発表.....	76
4.3 謝辞.....	78

第一章

緒論

1.1 研究の背景

世界のバイオ医薬品の市場は 1980 年代のヒトインシュリンの開発以来、着実に拡大している。1990 年代前半にリツキサシとハーセプチンが抗がん剤として開発され、上市されたことによって、バイオ医薬品の中でもモノクローナル抗体への注目・期待が著しい^{1,2}。モノクローナル抗体は、高い抗原特異性と少ない副作用が期待され、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ている。現在、50 を超える抗体が医薬品として広く用いられ、また 570 を超える抗体を用いた臨床試験が進められており、今後さらなる市場の拡大が予想されている^{3,4}。抗体医薬品の市場規模の拡大に対して、効率的な製造プロセスの開発及び開発スピードの加速化が課題となっている。

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 (HMWS)、宿主細胞由来タンパク質 (HCP)、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。これらの不純物は、適切な精製工程を経て、許容レベルまで除去する必要がある⁵。さらに、CHO 細胞のような動物細胞で産生される抗体医薬品に関しては、ウイルス安全性は極めて重要な問題である⁶。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おり⁷、このレトロウイルス様粒子及び外来性ウイルスが精製工程中で適切に除去又は不活化されることを示さなければならない⁸⁻¹⁰。

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。そのため、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¹¹。プラットフォームプロセスを用いることで、製造プロセス開発期間の短縮化を実現でき、医薬品の開発の加速化が可能となる。典型的なプラットフォームプロセスを Fig. 1 に示す。通常、抗体の精製工程は、抗体の Fc 領域に親和性を持つ Protein A をリガンドとする 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、2 つまた

は3つのポリッシング工程からなる。典型的には、ポリッシング工程は陰イオン交換 (AEX)、陽イオン交換 (CEX)、疎水性相互作用及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等の中から選択され、CEX 及び AEX クロマトグラフィーが用いられることが多い¹²。

抗体医薬品は、投与量が多いこと、また培養コストが高いと言われる動物細胞を製造に用いることから、製造方法の効率化やコスト削減が試みられている。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が60%以上を占めているという報告もあり¹³、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。また、抗体医薬品の市場規模の拡大に対して、開発スピードの加速化も望まれている。

1.2 研究の目的

コスト低減及び開発スピードの加速化といった課題に対応するため、本研究では、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。広く用いられている結合/溶出モードは、目的物質である抗体及び不純物を一旦樹脂等の媒体に結合させた後、目的物質と不純物とが分離可能な適切な条件で溶出することで分離精製する方法であるため、大量の高価な樹脂が必要となる。一方、フロースルーモードは目的物質である抗体をフロースルーさせ、わずかに混在する不純物のみを樹脂に吸着させ、抗体と分離させるため、少量の樹脂で済むことから大幅なコスト削減が可能となる。

本研究では、CEX クロマトグラフィーにおいて、フロースルーモードに類似したオーバーロードモードにおけるウイルス除去能について評価した。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、効率的な精製方法の構築につながる可能性がある。オーバーロードモードを用

いた場合でも、CEX クロマトグラフィー工程でウイルスをはじめとする主な不純物が結合/溶出モードと同等の性能で除去されるかどうかを評価することで、低コストで高効率なオーバーロードモードが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かを評価した。

また、AEX クロマトグラフィー工程で、「プラットフォームプロセス」による共通の精製方法では効率的なフロースルーモードを適用できなかつた、非対称な電荷分布をもつ抗体の溶出挙動と精製条件について検討した。このような難精製抗体に対しても効率的なフロースルーモードが適用でき、プロセス開発のタイムラインに影響を与えない標準的な条件で精製できる手法を見出すことを目的とした。

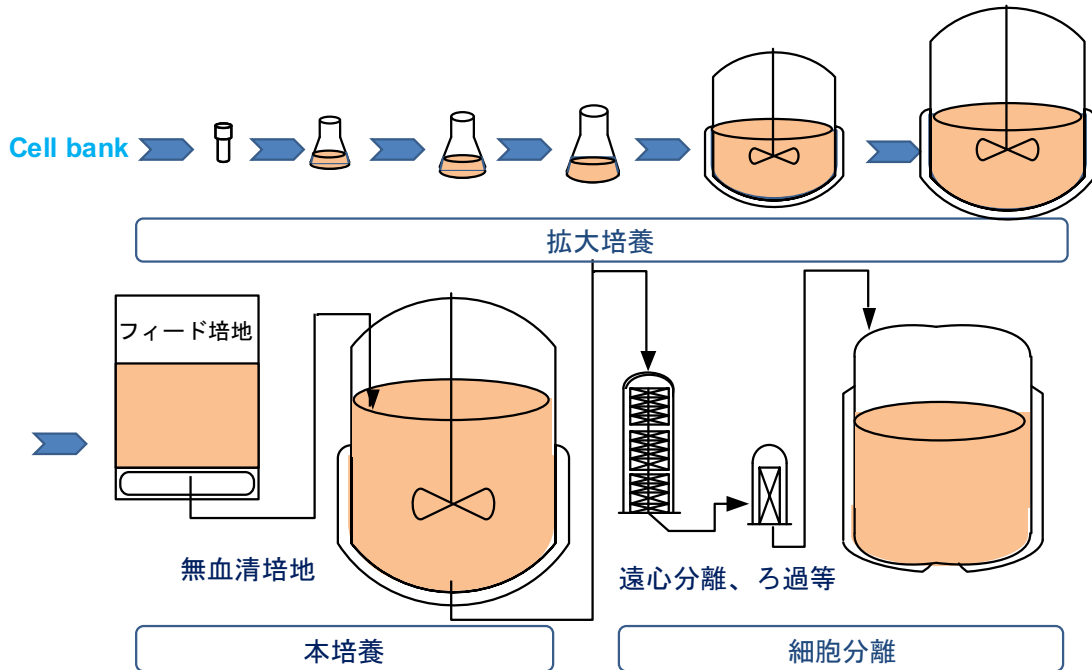
1.3 本論文の構成

第二章では、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。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、効率的な精製の構築につながる可能性がある。従来の研究において、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、HCP、DNA、HMWS 及び脱離 Protein A の除去が可能であることが報告されているが^{14,15}、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におけるウイルス除去性能について評価し、結合/溶出モードと比較するとともに、抗体種、樹脂種及び流速がウイルス除去に及ぼす影響について評価した。

第三章では、難精製抗体の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

精製条件について検討した。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^{16,17}。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。同時に膜吸着体におけるウイルス除去性能を確認するとともに、pH がウイルス除去性能に及ぼす影響についても評価した。

アップストリーム



ダウンストリーム

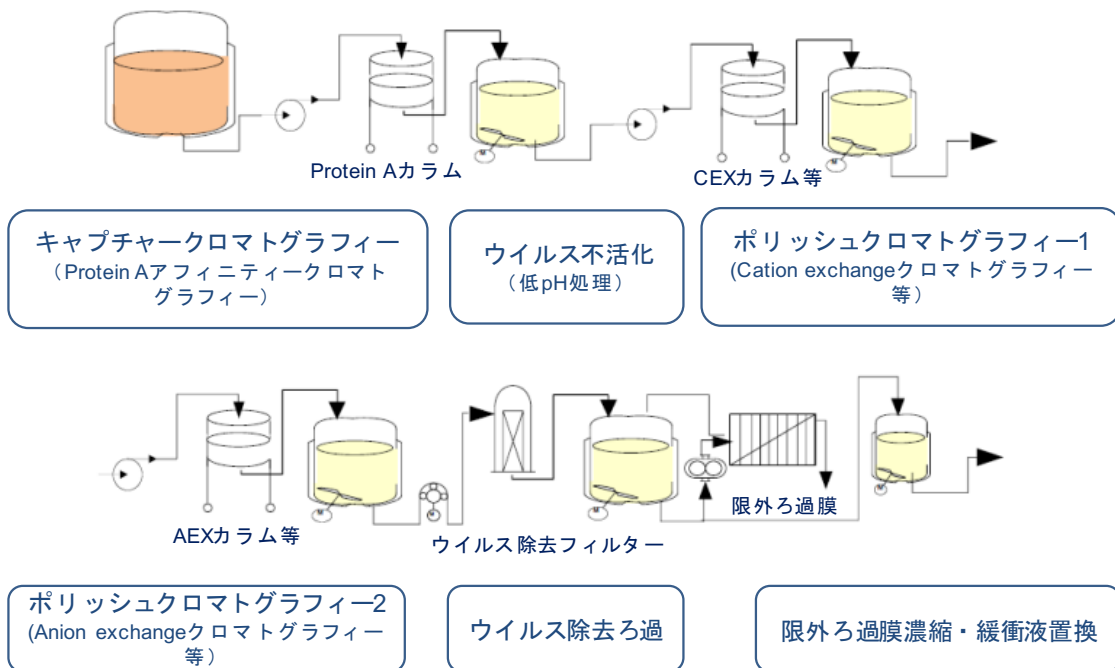


Fig.1 典型的な抗体プラットフォームプロセス

1.4 オーバーロードモードに関する説明

オーバーロードモードによる抗体と不純物の分離は以下のメカニズムによると考えられている。すなわち、抗体が樹脂に吸着する条件で負荷され、樹脂の最大吸着量を超えて負荷を続けると抗体は素通りし、負荷液中のより吸着が強い成分 (不純物) が吸着している抗体を置換する。その結果、抗体がフロースルー画分に回収される一方で、吸着が強い不純物は樹脂に吸着した状態となることにより分離除去される。抗体の精製で一般的に用いられている結合/溶出モード、フロースルーモード及びオーバーロードモードにおける不純物除去のメカニズムを Fig. 2 に示す。

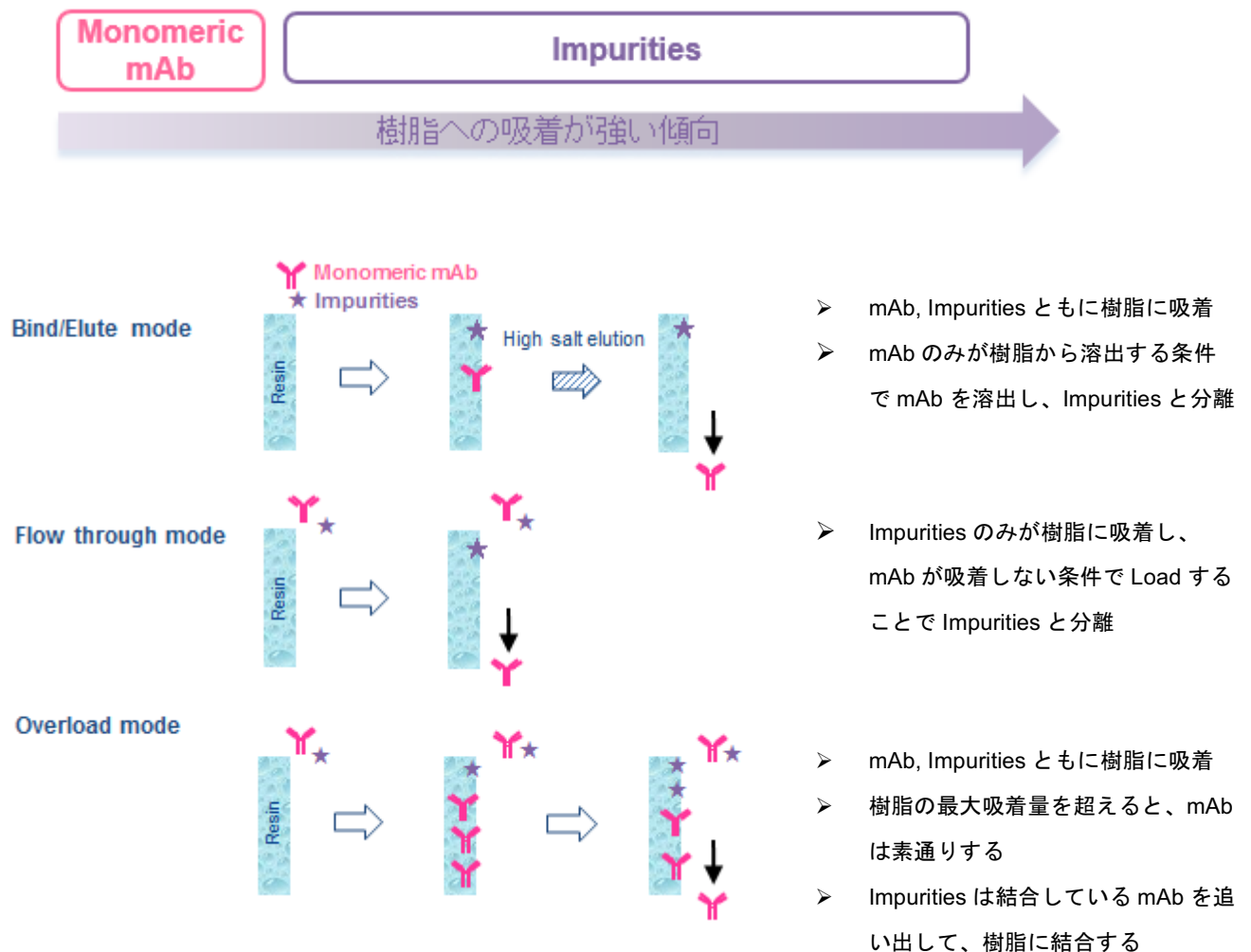


Fig. 2 結合/溶出モード、フロースルーモード及びオーバーロードモードにおける不純物除去のメカニズム

1.5 引用論文

1. Reichert JM. Antibodies to watch in 2017. *MAbs*. 2017;9:167-181.
2. Vázquez-Rey M, Lang DA. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol Bioeng*. 2011;108:1494-1508.
3. Lai Y, Wang R, Chen X, Tang D, Hu Y, Cai J, Zhang Q, Hu H. Emerging trends and new developments in monoclonal antibodies : A scientometric analysis (1980–2016). *Hum Vaccine Immunother*. 2017;13:1388-1397.
4. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. 2019;11:219-238.
5. Shukla AA, Jiang C, Ma J, Rubacha M, Flansburg L, Lee SS. Demonstration of robust host cell protein clearance in biopharmaceutical downstream processes. *Biotechnol Prog*. 2008;24:615-622.
6. Zhang M, Lute S, Norling L, et al. A novel, Q-PCR based approach to measuring endogenous retroviral clearance by capture protein A chromatography. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102:1438-1447.
7. Anderson KP, Low M-AL, Lie YS, Keller G-A, Dinowitz M. Endogenous origin of defective retroviruslike particles from a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Virology*. 1991;181:305-311.
8. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. VIRAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY PRODUCTS DERIVED FROM CELL LINES OF HUMAN OR ANIMAL ORIGIN Q5A(R1).
Available at:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1_Guideline.pdf. September, 1999.
9. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Points to Consider in the Manufacture and

Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. Available at:
www.fda.gov/media/76798/download. February 1997.

10. European Medicines Agency. Evaluation of Medicines for Human Use. GUIDELINE ON VIRUS SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGICAL INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCTS. Available at:
https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-virus-safety-evaluation-biotechnological-investigational-medicinal-products_en.pdf. July, 2008.
11. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2:480-499.
12. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *J Chromatogr B*. 2007;848:28-39.
13. Pollock J, Coffman J, Ho SV, Farid SS. Integrated continuous bioprocessing: economic, operational, and environmental feasibility for clinical and commercial antibody manufacture. *Biotechnol Prog*. 2017;33:854-866.
14. Brown A, Bill J, Tully T, Radhamohan A, Dowd C. Overloading ion-exchange membranes as a purification step for monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;56:59-70.
15. Liu HF, McCooley B, Duarte T, et al. Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification. *J Chromatogr A*. 2011;1218:6943-6952.
16. Ishihara T, Kadoya T. Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic: Design and case study of chromatography processes. *J Chromatogr A*. 2007;1176:149-156.
17. Ishihara T, Kadoya T, Yoshida H, Tamada T, Yamamoto S. Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein A affinity chromatography

and cation exchange chromatography Structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. *J Chromatogr A*. 2005;1093:126-138.

第二章

高効率なオーバーロードモードによる
陽イオン交換クロマトグラフィーにおけ
るウイルス除去に関する研究

2.1 序論

CEX クロマトグラフィーは、抗体製造におけるポリッシング工程として、結合/溶出モードで広く用いられている。CEX クロマトグラフィーの結合/溶出モードでは、HCP、DNA、HMWS 及び脱離 Protein A の除去に加え^{1,2}、レトロウイルスのモデルウイルスとして広く用いられているマウス白血病ウイルス (MLV)の除去が可能であることが報告されている³。

結合/溶出モードの CEX クロマトグラフィーは、目的物質である抗体(単量体) および不純物 (HMWS、HCP、ウイルス等) を一旦樹脂に結合後、目的物質と不純物が分離可能な条件で溶出することで分離精製する方法であるため、大量の高価な樹脂が必要となる。CEX クロマトグラフィー工程のコストを低減するために、フロースルーモードに類似したオーバーロードモードが報告されている^{4,5}。CEX クロマトグラフィーでは、結合/溶出モードの場合、例えば 100 g 抗体/L 樹脂以下の動的結合容量以下の負荷条件を設定するが⁶、オーバーロードモードでは、その 10 倍もの 1,000 g 抗体/L 樹脂の負荷が可能となる⁵。

オーバーロードモードによる抗体と不純物の分離は以下のメカニズムによると考えられている。すなわち、抗体が樹脂に吸着する条件で負荷され、樹脂の最大吸着量を超えて負荷を続けると抗体は素通りし、負荷液中のより吸着が強い成分 (不純物) が吸着している抗体を置換する。その結果、抗体がフロースルー画分に回収される一方で、吸着が強い不純物は樹脂に吸着した状態となることにより分離除去される。CEX クロマトグラフィーのオーバーロードモードでは、HCP、DNA、HMWS 及び脱離 Protein A の除去が可能であることが報告されているが⁵、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。

本研究では、CEX クロマトグラフィーのオーバーロードモードにおける MLV 除

去能を、高い結合能を有する強イオン交換樹脂である POROS XS を用いて評価した。あわせて、抗体種、樹脂種及び流速が MLV 除去能に及ぼす影響を確認した。評価対象のウイルス種として、レトロウイルスのモデルウイルスとして広く用いられている MLV に加え、CHO 細胞を用いた医薬品のウイルスクリアランス試験で一般的に用いられているマウス微小ウイルス (MMV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV) 及びレオウイルス 3 型 (Reo 3) についても評価した。さらに、結合/溶出モードにおける各ウイルスの溶出プロファイルを分析することにより、オーバーロードモードにおけるウイルス除去のメカニズムを考察した。また、結合/溶出モードにおけるクロマトグラフィー条件 (pH、樹脂種、緩衝液種) がウイルス除去能に及ぼす影響を解析することで、オーバーロードモードにおけるウイルス除去能の堅牢性について評価した。

2.2 方法

・ CEX クロマトグラフィー負荷液の調製

本研究では、2 種類のヒト化モノクローナル抗体である抗体 1 および抗体 2 (ともに IgG1) を用いた。CEX クロマトグラフィーの負荷液は、CHO 細胞培養液から調製した。培養後、デプスフィルターにより細胞を除去し、Protein A アフィニティークロマトグラフィーおよび AEX クロマトグラフィーを含む標準的な方法により、抗体を精製した。AEX クロマトグラフィープール液を pH 5.0 に調整し、0.2 μm フィルターでろ過した後、CEX クロマトグラフィーの負荷まで -80°C で保存した。調製した CEX 負荷液の導電率は約 5 mS/cm であった。AKTA Explore 100 システム (GE ヘルスケア) を用いて、室温でクロマトグラフィー操作を行った。クロマトグラフィーにおける抗体の挙動は 280 nm の吸光度でモニターした。

・ ウイルス除去能評価のためのウイルススパイク試験

ウイルススパイク試験は BioReliance (Stirling、英国) で実施した。ウイルス力価

は、定量的感染性試験 (50%組織培養感染量[TCID₅₀])により、適切な指示細胞: PG-4 細胞 (MLV)、Vero 細胞 (PRV)、324K 細胞 (MMV)及び L-929 細胞 (Reo 3)を用いて測定した。Spearman-Körber 式に従いウイルス力価を算出し、95%信頼区間は標準誤差に 1.96 の定数を乗じて算出した。ウイルススパイク試験に先立ち、測定サンプルが指示細胞に対して毒性を示すか、指示細胞のウイルス性感染性に干渉するかを確認し、その結果からウイルス力価測定に影響ない希釈率を設定した。ウイルススパイク試験は、実際の製造工程のスケールダウンモデルを用いて行った。負荷液へのウイルススパイク率は、結合/溶出モードでは 5% (v/v)、オーバーロードモードでは 1% (v/v) とした。負荷液、フロースルー画分及びプロダクトプール液の力価を TCID₅₀により測定した。プール液については、検出限界値の感度を高めるために Large volume plating (LVP) を実施した。ウイルス除去能 (対数減少値[LRV]) は、負荷液およびプロダクトプール液のウイルス力価及び液量を用いて算出した。

・ CEX クロマトグラフィー法

オーバーロードモードでの HMWS および HCP の除去能の評価には、POROS XS を充填したプレパックカラム (内径 0.5 cm I.D. ×ベッド高 5 cm、カラム容量[CV]=1 mL、Repligen) を用いた。ウイルススパイク試験には、同じサイズの POROS XS、Eshmuno CPX、Capto S Impact を充填したプレパックカラム (Repligen) を使い、流速は毎時 18~30 CV (接触時間[RT]=2~3.3 分) とした。オーバーロードモードは、結合/溶出モードで一般的に用いられる結合条件を適用した。本研究における結合条件は、各樹脂メーカーから提供された樹脂の性能データを参考として設定した我々の以前の研究結果 (データは示さず) に基づき設定した。すなわち、カラムを pH 5.0 の 50 mM 酢酸緩衝液で平衡化し、続いて負荷材料を 2,000 g 抗体/L 樹脂までカラムに負荷した。負荷後、カラムに残った抗体を平衡化緩衝液で回収した。さらに、1 M の塩化ナトリウムを含む高塩濃度洗浄緩衝液 (HSW) により、カラムに吸着したすべての成分を溶出した。

結合/溶出モードは、POROS XS、Eshmuno CPX、Canto S Impact を充填したプレパックカラム (内径 0.8cm × ベッド高 20 cm、CV = 10 mL、Repligen) を用い、流速は毎時 15 CV (RT = 4 分) とした。カラムを pH 5.0 の 50 mM 酢酸緩衝液で平衡化後、負荷材料を 85g 抗体/L 樹脂でカラムに負荷し、平衡化緩衝液で洗浄した。続いて 180 mM (抗体 1) または 170 mM (抗体 2) 塩化ナトリウムを含む 50 mM 酢酸緩衝液で抗体を溶出した。

結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイルの分析は、POROS XS を充填したプレパックカラム (内径 0.8 cm × ベッド高 20 cm、CV = 10 mL、Repligen) を用い、流速は毎時 15 CV (RT = 4 分) とした。カラムを pH 5.0 の 50 mM 酢酸緩衝液で平衡化後、負荷材料 (抗体 1) を 25 g 抗体/L 樹脂でカラムに負荷した。負荷後、平衡化緩衝液で洗浄し、各ステップ 5 CV で塩化ナトリウムを用いた段階的勾配により溶出した。段階的勾配塩化ナトリウム濃度は、MLV、PRV、Reo 3 の各ウイルスについては 180、200、250、300、350、400、500、600 及び 1,000 mM、MMV については 90、180、200、250、300、350、400、500 及び 1,000 mM とした。

各樹脂の動的結合容量は、濃度既知の精製抗体 1 を毎時 15 CV の流速でカラムに負荷し、負荷した抗体濃度の 5% の漏出が見られた時点の負荷抗体量を測定に用いた樹脂量で除し、算出した。いずれの操作も室温で実施した。

・抗体濃度、サイズ変異体および宿主細胞由来タンパク質の分析

抗体濃度は、PA ID センサーカートリッジ (2.1 mm × 30 mm、Thermo Fisher Scientific) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。サイズ変異体 (HMWS、単量体及び低分子量種 (LMWS)) は、サイズ排除クロマトグラフィー (SE-HPLC) により、TSKgel G3000SW XL カラム (7.8 mm × 300 mm を直列に 2 本結合、5 µm、東ソー) 又は ACQUITY UPLC Protein BEH SEC カラム (4.6 mm × 300 mm、1.7 µm、ウォータース) を用い、pH 7.0 の 0.1 M リン酸塩緩衝液及び 0.4 M 塩化ナトリウムを含む移動相で分析した。HCP 濃度は、CHO HCP ELISA Kit, 3rd

generation (Cygnus) を用いて酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した。

2.3 結果および考察

2.3.1 オーバーロードクロマトグラフィーの条件及び代表的なクロマトグラム

抗体 1 を用いて実施したオーバーロードモードクロマトグラフィーの条件を Table 1 に、抗体 1 を 2,000 g 抗体/L 樹脂で負荷した際の代表的なクロマトグラムを Fig. 1 に示した。2,000 g 抗体/L 樹脂で負荷したオーバーロードモードにおける抗体 1 の回収率は 90%以上と良好であった。オーバーロードモードのクロマトグラムは、一般的なフロースルーモードのクロマトグラムと似ているが、樹脂の動的結合容量に達するまでは抗体が樹脂に吸着することから、ブレイクスルーカーブはその分遅延していた。

Table 1. オーバーロードモードと結合/溶出モードの実験条件の比較

Mode	Buffer conditions	Flow rate (CV/hr)	Load amount (g/L resin)
overloaded	Equilibration and wash: 50 mM acetate buffer, pH 5.0	18 (Residence time: 3.3 min.)	2000
bind/elute	Equilibration and wash: 50 mM acetate buffer, pH 5.0 Elution: 50 mM acetate buffer containing 170 mM sodium chloride, pH 5.0	15 (Residence time: 4 min.)	80–85

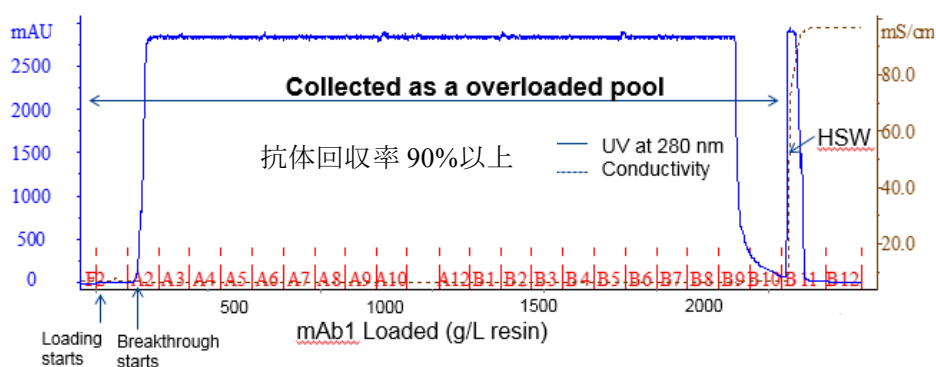


Fig. 1 オーバーロードモードにおける代表的なクロマトグラム

2.3.2 オーバーロードモードにおける HMWS 及び HCP の除去

抗体 1 および抗体 2 を 2,000g 抗体/L 樹脂まで POROS XS 樹脂に負荷したオーバーロードモードにおける負荷液中の HMWS 含量に対する通過液中の HMWS 含量の負荷量ごとの変化を示した (Fig. 2)。負荷量の増加とともに通過液中の HMWS 含量は増加したが、2,000 g 抗体/L 樹脂の高負荷条件においても、通過液中の HMWS 含量は負荷液中の含量の半分以下に減少した。その結果、プール中の HMWS 含量は負荷液中の 1.60%から 0.69% (抗体 1)、負荷液 1.83%から 0.37% (抗体 2) へと大幅に低減され、これは結合/溶出モードにより得られた結果と同等であった (Table 2)。LMWS の除去能もオーバーロードモードと結合/溶出モードで同等であった。また HCP については、負荷液中の HCP がオーバーロードモードにより HCP アッセイの定量限界付近かそれ以下まで大幅に除去されており、これは結合/溶出モードにより得られた結果と同等であった (Table 2)。

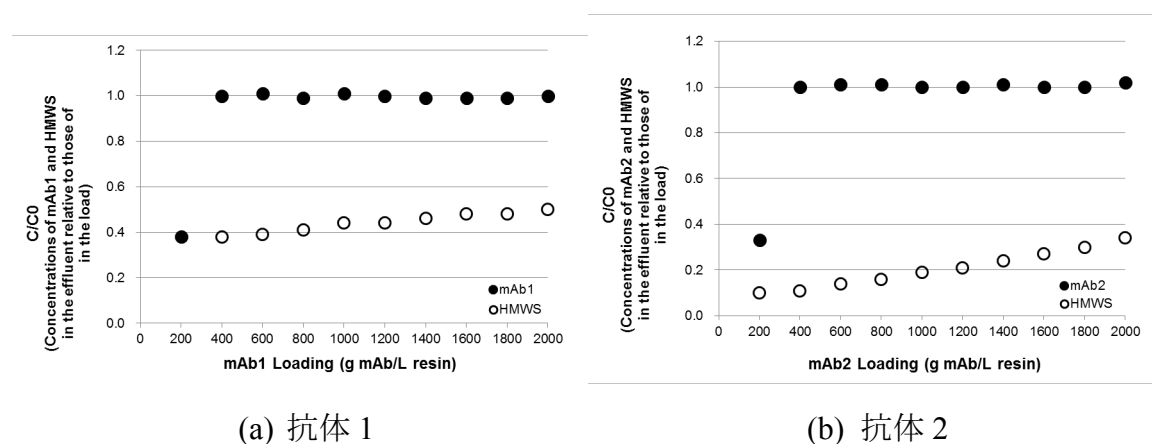


Fig. 2 オーバーロードモードにおける HMWS の除去 (a) 抗体 1, (b) 抗体 2

Table 2 オーバーロードモードと結合/溶出モードにおける不純物除去能の比較

mAb	Sample	Monomer (%)	HMWS (%)	LMWS (%)	HCP (ng/mg mAb)
	Load	97.54	1.60	0.85	2.42E+02
mAb1	Recovered pool in overloaded mode (2,000 g mAb/L resin)	98.56	0.69	0.75	1.87
	Recovered pool in bind/elute mode (80 g mAb/L resin)	98.56	0.70	0.74	<0.84 ^a
	Load	97.13	1.83	1.05	1.67E+02
mAb2	Recovered pool in overloaded mode (2,000 g mAb/L resin)	98.87	0.37	0.76	<1.08 ^a
	Recovered pool in bind/elute mode (80 g mAb/L resin)	98.79	0.44	0.76	<1.08 ^a

^a Quantitation limit

2.3.3 オーバーロードモードにおける MLV の除去

強陽イオン交換樹脂であるフラクトゲル SO₃⁻を用いた CEX クロマトグラフィーの結合/溶出モード (pH 5.0) は、効果的な MLV クリアランス (>4 log₁₀) をもたらしことが報告されている^{3,7}。

本研究では、オーバーロードモードにおける MLV の除去能を強陽イオン交換樹脂である POROS XS を用いて評価した。抗体 1 および抗体 2 を含む負荷液へ MLV を 1% (v/v) でスパイクし、pH 5.0 の条件下で POROS XS カラムに流速毎時 18 CV、最大 2,000 g 抗体/L 樹脂まで負荷した。500 g 抗体/L 樹脂の負荷毎にフロースルー画分を採取し、本画分及びそれらをプールした液について、TCID₅₀により MLV の力価を測定した。最初の画分 (500 g 抗体/L 樹脂) から最後の画分 (2,000 g 抗体/L 樹脂) まで、MLV は全く検出されず (Fig. 3)、2,000 g 抗体/L 樹脂まで負荷した際の MLV 除去能は、抗体 1 で 6.09 log₁₀、抗体 2 で 4.51 log₁₀ 以上と算出された (Table 3)。抗体 2 について MLV は全く検出されなかったが、LRV が抗体 1 よりも低い理由は、抗体 2 が指示細胞に対して毒性があったため、ウイルス力価測定の際、適切

な希釈がされたことによる。2,000 g 抗体/L 樹脂の高負荷条件下でも、オーバーロードモードは高い MLV 除去能を有することが明らかとなった。

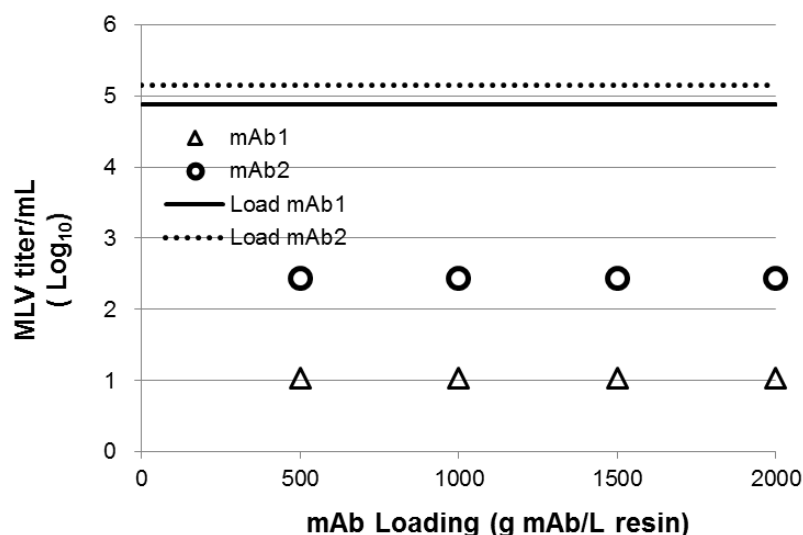


Fig. 3 オーバーロードモードにおける MLV の除去
Open symbol は、ウイルスが検出以下であることを示す

Table 3. オーバーロードモードにおける MLV の除去能
(2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷量)

mAb	MLV clearance (log reduction value) ^a
mAb1	6.09 ± 0.89
mAb2	≥4.51 ± 0.25

^a 95% 信頼区間

‘≥’は、2,000 g mAb/L樹脂までの負荷量におけるプロダクトプール液中のウイルスレベルが定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

2.3.4 MLV の除去に及ぼす流速の影響

POROS HS 樹脂を用いたオーバーロードモードでは、流速 (毎時 18~36 CV) は DNA、HMWS 及び HCP の除去に有意に影響しなかったことが報告されている⁵。オーバーロードモードにおける抗体 1 からの MLV 除去に対する流速の影響を評価し

た。流速は、クロマトグラフィーのプロセス時間を考慮して毎時 18 CV (RT = 3.3 分) または毎時 30 CV (RT = 2 分) に設定した。2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷においては、流速が MLV の除去能に影響を及ぼす結果となった (Fig. 4)。流速毎時 18 CV では、最大 2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷をした場合でも MLV は完全に除去されたが、毎時 30 CV の高流速条件では、1,500 g 抗体/L 樹脂以上の負荷条件では、通過液中に MLV が検出され、LRV は 2.89 に低下した (Table 4)。

MLV 除去のメカニズムは、HMWS 及び HCP 除去のメカニズムと同じと考えられる。しかしながら、HMWS と HCP の除去は流速の影響を受けなかったが、MLV 除去能は流速の影響をわずかに受けた。流速が遅い方が MLV の除去が良好な理由は、MLV のサイズに関係する可能性があると考えられる。すなわち、MLV の直径は 100~120 nm⁸ と、他の不純物と比較して大きく、POROS XS 樹脂 (100~360 nm) の孔径に近い。したがって、高流速では、MLV のウイルス粒子は立体障害のために内部の細孔に存在するスルホプロピルリガンドにアクセスしにくい可能性があると考えられる。POROS XS の樹脂の取扱説明書によれば、目標流速は適宜設定できるが、3 分を超える接触時間において最適な結合容量が得られることから接触時間 3 分以上の流速が推奨されている。したがって、樹脂メーカー推奨の条件内である毎時 18 CV (RT = 3.3 分) と設定することが、オーバーロードモードによる抗体精製に妥当であると考えられる。

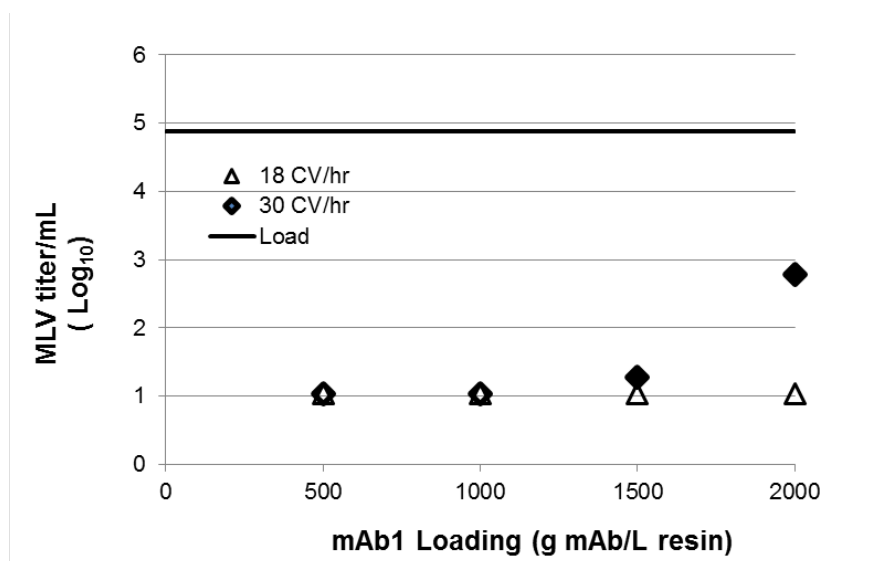


Fig. 4 オーバーロードモードにおける MLV の除去能に及ぼす流速の影響
Open symbol は、ウイルスが検出されなかったことを示す

Table 4. オーバーロードモードにおける MLV の除去能に及ぼす流速の影響
(2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷量における LRV)

Flow rate (CV/hr)	MLV clearance (log reduction value) ^a
18	6.09 ± 0.89
30	2.89 ± 0.33

^a 95% 信頼区間

2.3.5 MLV の除去に及ぼす樹脂種の影響

2.3.5.1 各樹脂の動的結合容量の評価

オーバーロードモードでの MLV 除去に対する CEX 樹脂種の影響を調べるために、種々の CEX 樹脂の性能を評価した。結合/溶出モードでは、高い結合容量を持つ樹脂が負荷量の設定の点から有利であり、POROS XS、Eshmuno CPX、Capto S Impact 及び SP Sepharose Fast Flow の強陽イオンリガンドを有する市販樹脂について、pH 5.0、RT = 4 分の条件で動的結合容量を評価した。動的結合容量の評価に用いた各樹脂の特性及び動的結合容量 (5%ブレイクスルー) の測定結果を Table 4 に、抗体 1 についての各樹脂のブレイクスルーカーブを Fig. 5 に示した。1995 年に発売され、バイオ医薬品製造に用いられてきた SP Sepharose Fast Flow 樹脂の動的結合容

量は 57 g 抗体/L 樹脂であったが、それ以降に開発・発売された 3 種の樹脂の動的結合容量は、いずれも 100 g 抗体/L 樹脂を超えた。そこで、動的結合容量が高かった Eshmuno CPX 及び Capto S ImpAct について、MLV の除去能を POROS XS と比較することとした。

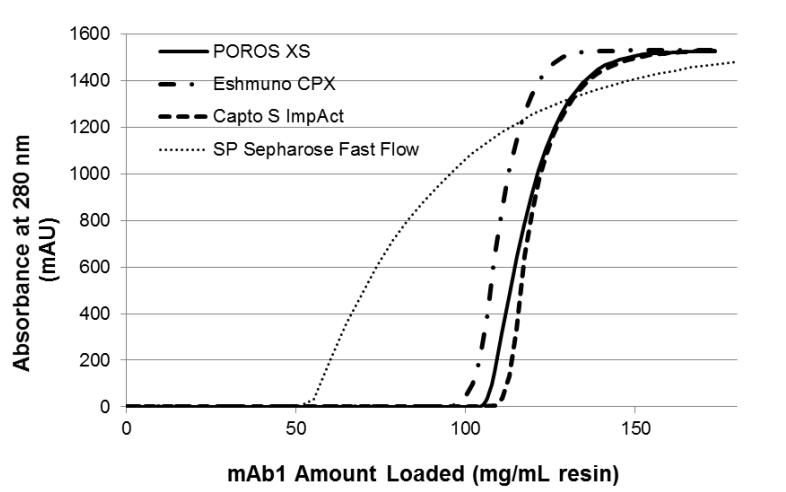


Fig. 5 各樹脂のブレイクスルーカーブ

Table 4. 動的結合容量を評価した各樹脂の仕様と動的結合容量測定結果

Resin	Support matrix	Surface functionality	Average particle size	Dynamic binding capacity
			(μm)	(g mAb1/L resin)
POROS XS	Cross-linked polystyrene-divinylbenzene	Sulfopropyl	50	107
Eshmuno CPX	Surface-grafted rigid hydrophilic-polyvinylether polymer	Sulfoisobutyl	50	101
Capto S ImpAct	High-flow agarose	Sulfopropyl	50	112
SP Sepharose Fast Flow	6% highly cross-linked agarose	Sulfopropyl	90	57

2.3.5.2 結合/溶出 モードにおける MLV の除去

オーバーロードモードでの MLV 除去能に及ぼす 3 種類の樹脂の評価に先立ち、pH 5.0 の結合/溶出モードでの MLV 除去に対する CEX 樹脂種の影響を調べた。抗体 1 溶液に MLV を 5% (v/v) でスパイクした負荷液を、毎時 15 CV の流速 (RT = 4 分)

で最大 85g 抗体/L 樹脂の負荷条件で各カラムに負荷した。溶出条件は、抗体回収率及び Monomer 含量を指標として、最適な pH (pH 5.0) 及び塩化ナトリウム濃度 (180 mM) を設定した。全ての樹脂の結合/溶出モードにおいて、 $4 \log_{10}$ を超える高い LRV が得られた。特に POROS XS 樹脂は $>6 \log_{10}$ のウイルス除去能を有していたものの、結合/溶出モードにおいては、3 樹脂間で MLV 除去能に大きな差はなかった (Table 5)。

Table 5. 各樹脂の MLV 除去能の比較

Resin	MLV clearance in bind/elute mode (log reduction value) ^a	MLV clearance in overloaded mode (log reduction value) ^a
POROS XS	$\geq 6.06 \pm 0.32$	2.89 ± 0.33
Eshmuno CPX	5.80 ± 0.24	2.93 ± 0.31
Capto S ImpAct	4.98 ± 0.42	$\geq 2.80 \pm 0.40$

^a 95% 信頼区間

‘ \geq ’は、85 g/L樹脂 (結合/溶出モード) 或いは2,000 g/L樹脂 (オーバーロードモード) の負荷量におけるプロダクトプール液中のウイルスレベルが、定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

2.3.5.3 オーバーロードモードにおける MLV の除去

抗体 1 溶液に MLV を 1% (v/v) でスパイクした負荷液を、毎時 30 CV の流速 (RT = 2 分) で最大 2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷条件で各カラムに負荷した。高流速条件のため、 $4 \log_{10}$ 以上のような高い LRV は得られなかったが (Table 5)、結合/溶出モードの場合と同様に、オーバーロードモードにおいてもマトリックスの異なる強陽イオンリガンドを有する 3 樹脂間で MLV 除去能に大きな差はなかった。これは、樹脂への MLV 吸着競合サイトが陽イオンリガンドであり、マトリックスの寄与を無視できることを示唆する。

2.3.6 オーバーロードモードにおける他のウイルスの除去

臨床試験の初期段階 (第 I 相及び第 II 相臨床試験) におけるウイルススパイク試験では、通常 2 種類のウイルスが用いられる。一方、臨床試験の後期段階 (第 III 相および承認申請) では、ゲノム (DNA、RNA)、エンベロープの有無、サイズ及び抵抗性等の性質を考慮したウイルスの選択が必要である。

本研究の評価対象ウイルスとしては、ウイルス安全性評価の際、投与量当たりの推定ウイルス粒子数の算出で用いられ、CHO 細胞を宿主とした生産系によって製造されている抗体医薬品の特異的モデルウイルスとして用いられる MLV に加えて、MMV、PRV、Reo 3 の除去能をオーバーロードモードで評価した。ウイルススパイク試験では、流速を毎時 18 CV (RT = 3.3 分)、負荷量を 2,000 g 抗体/L 樹脂に設定した。オーバーロードモードでは MMV は低減されたが、他のウイルスほど LRV は高くなかった。一方、PRV 及び Reo 3 は、オーバーロードモードで MLV と同様に効果的に除去されることが明らかとなった (Table 6)。

Table 6. オーバーロードモードにおける各ウイルスの除去能
(2,000 g 抗体/L 樹脂の負荷量)

Viral clearance (log reduction value) ^a			
MLV	MMV	PRV	Reo 3
6.09 ± 0.89	2.62 ± 0.39	≥5.71 ± 0.38	8.03 ± 0.93

^a 95% 信頼区間

‘≥’は、2,000 g/L樹脂の負荷量におけるプロダクトプール液中のウイルスレベルが、定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

2.3.7 結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイル

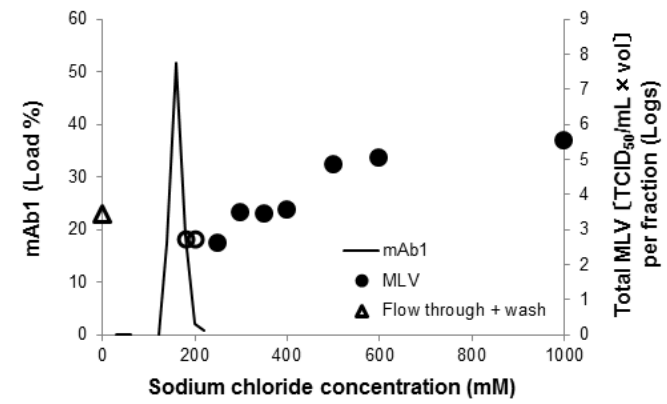
2.3.7.1 標準的な結合/溶出モード条件 (酢酸緩衝液、pH 5.0、POROS XS) におけるウイルス溶出プロファイル

オーバーロードモードにおけるウイルス除去のメカニズムを考察するために、POROS XS 樹脂を用いた pH 5.0 の結合/溶出モードにおける MLV、MMV、PRV 及び Reo 3 溶出プロファイルを分析した (Fig. 6)。MLV、PRV 及び Reo 3 については、フ

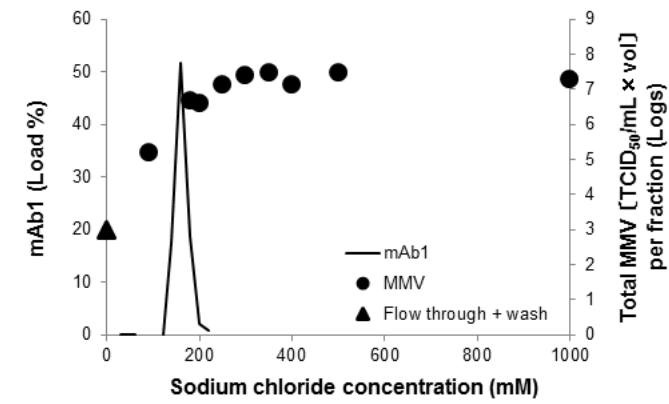
フロースルー画分及び洗浄画分にウイルスは検出されず、樹脂に吸着していた。塩化ナトリウムによる段階的溶出において、抗体1のピークトップは160 mMであったが、ウイルスが最初に検出された塩濃度は、250 mM (MLV)、400 mM (PRV)、及び250 mM (Reo 3)であり、いずれのウイルスも抗体1より高塩濃度で溶出し、抗体1と各ウイルスの溶出塩濃度には十分な差があった。オーバーロードモードによる分離は以下のメカニズムによると考えられている。すなわち、抗体が樹脂に吸着する条件で負荷され、樹脂の最大吸着量を超えると負荷液中のより吸着が強い成分(不純物)が吸着している抗体を置換し、その結果、抗体がフロースルー画分に回収される。一方で、吸着が強い成分は樹脂に吸着した状態となることにより分離除去される。MLV、PRV及びReo 3については、結合/溶出モードでのウイルスの溶出プロファイル分析において、これらのウイルスの樹脂への吸着が抗体1よりも強い結果となり、そのためオーバーロードモードで除去されたと考えられた。一方、MMVは、結合/溶出モードでのウイルスの溶出プロファイル分析において、フロースルー画分および洗浄画分を含むすべての画分で検出され、MMVは抗体よりも樹脂への吸着が弱い結果となった。オーバーロードモードにおいてMMVの除去能が他のウイルスと比較して低かったが (Table 6)、これは、MMVが樹脂に吸着していないことが原因と考えられた。MMVの等電点6.2に対し、MLVの等電点は5.8との報告があり⁹、pH 5.0において等電点がより低いMLVがMMVよりもCEX樹脂に強固に結合するのは驚くべきことである。MLVとMMVのpH 5.0におけるCEXクロマトグラフィー溶出プロファイルの違いは、MLVが正のチャージクラスターを含むエンベロープを有していることから、pH 5.0でCEX樹脂と強く相互作用していることが原因である可能性がある³と報告されている。CEXクロマトグラフィーにおけるウイルス溶出プロファイルを深く考察するためには、ウイルスの表面電荷分布を決定するなど、さらなる研究が必要であると考えられる。

以上の結果から、オーバーロードモードのウイルス除去能は、結合/溶出モードの溶出プロファイルから予測できると考えられる。結合/溶出モードにおけるMLVの

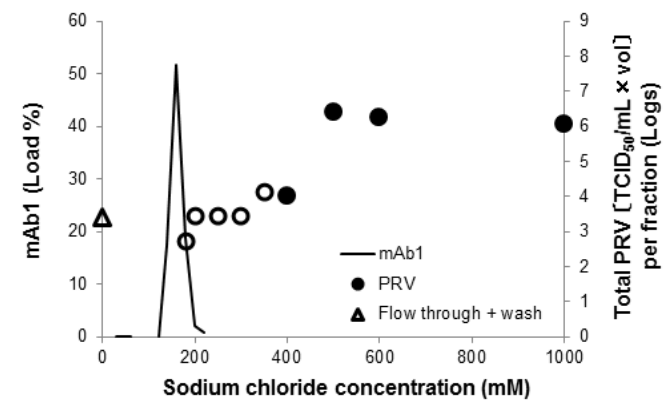
溶出塩濃度は、pH、イオン強度及び樹脂のリガンドの性質に影響を受ける可能性があることが報告されている³。また、混在する不純物の量及び目的物質である抗体の負荷量に影響を受ける可能性がある。オーバーロードモードでのウイルス除去能に関する条件を設定するためには、これら報告されている結合/溶出モードのデータは有用であり、結合/溶出モードの条件をオーバーロードモードに適用することが可能である。



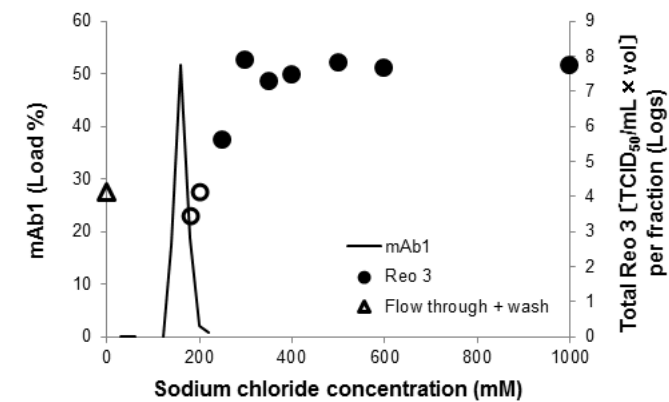
(a) MLV



(b) MMV



(c) PRV

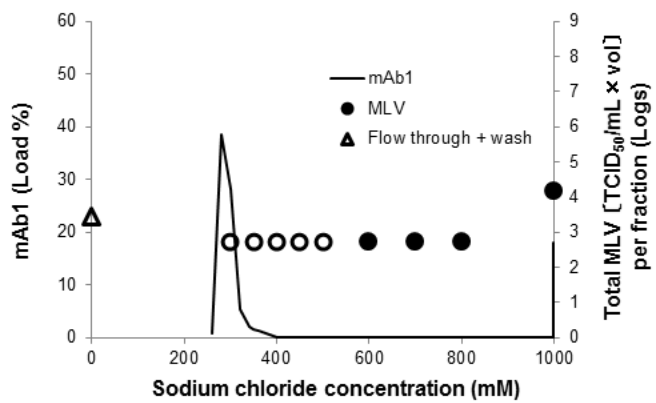


(d) Reo 3

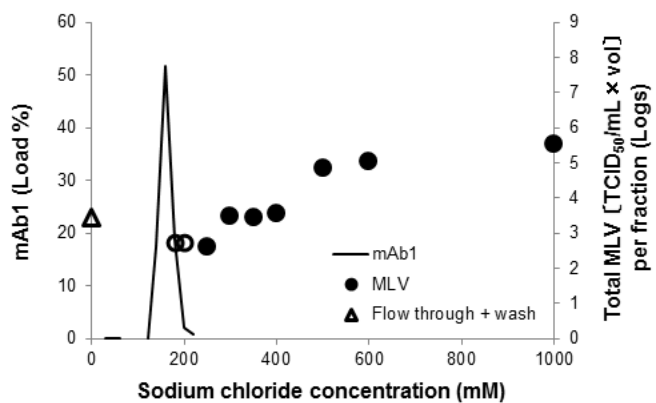
Fig. 6 結合/溶出モードにおけるウイルスの溶出プロファイル (pH 5.0, POROS XS)
Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

2.3.7.2 結合/溶出モードにおける MLV 溶出プロファイル及び MLV 除去能に及ぼす pH の影響 (酢酸緩衝液、pH 4.5, 5.0, 及び 5.4)

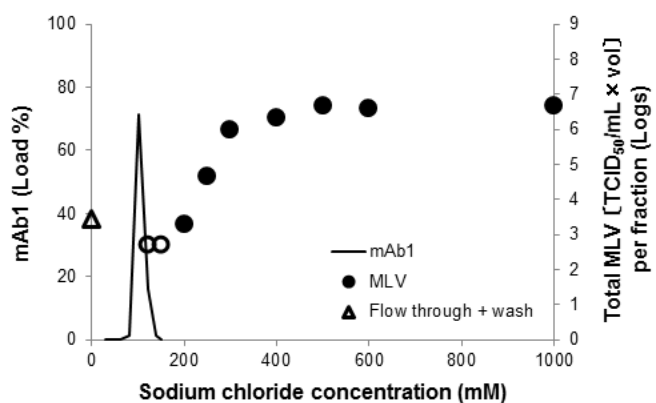
2.3.7.1 に記載した検討において、オーバーロードモードにおけるウイルス除去能は、結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイルから予測できることが明らかとなった。オーバーロードモードで pH が変化した場合のウイルス除去の堅牢性を推測するため、イオン交換クロマトグラフィーの重要なパラメータである pH が、結合/溶出モードにおける MLV 溶出プロファイル及び MLV 除去能に及ぼす影響を確認した(Fig. 7, Table 7)。なお、CEX クロマトグラフィーにおいて効果的な MLV クリアランス ($>4 \log_{10}$) が得られる条件は pH が低い場合 (pH 5.5 以下) であるという報告³を参照し、用いる酢酸緩衝液の緩衝能も考慮し、pH は 4.5, 5.0 及び 5.4 と設定した。結合/溶出モードにおける抗体 1 のピークトップの溶出塩濃度は、280 mM (pH 4.5)、160 mM (pH 5.0)、100 mM (pH 5.4) と変化し、pH の上昇とともに低い塩濃度で溶出した。それに対し、MLV はいずれの pH においても抗体 1 よりも高い塩濃度で溶出した。抗体 1 と MLV との溶出塩濃度の差が最も大きかった pH は 4.5 であり、pH 4.5 条件のプロダクトプール液のみが LVP においてウイルスが検出されなかった。しかしながら、pH 4.5、5.0 及び 5.4 における MLV 除去能はいずれも $6 \log_{10}$ 以上と高く、この範囲で pH は MLV の除去能に影響しないことが分かった。以上の各 pH についての結合/溶出モードにおける MLV 溶出プロファイル及び MLV 除去能の結果から、オーバーロードモードにおける MLV 除去能は pH に影響を受けず、堅牢であることが推測された。



(a) pH 4.5



(b) pH 5.0



(c) pH 5.4

Fig. 7 結合/溶出モードにおける MLV の溶出プロファイルに及ぼす pH の影響
Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

Table 7. 結合/溶出モードにおける MLV の除去能に及ぼす pH の影響
(85 g 抗体/L 樹脂の負荷量)

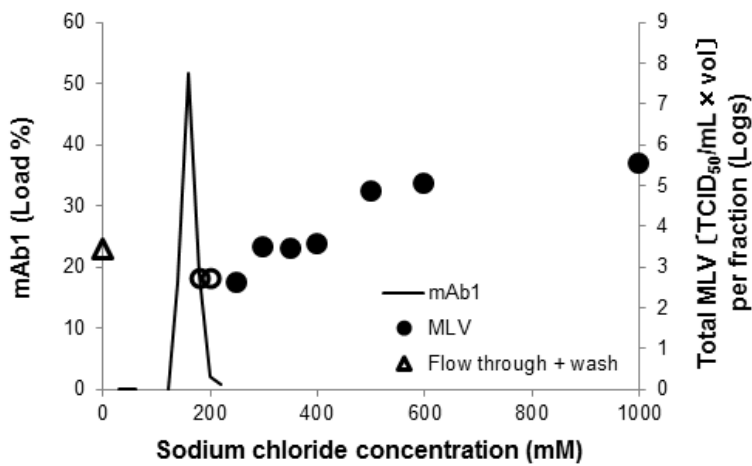
pH	MLV clearance (log reduction value) ^a
4.5	$\geq 6.05 \pm 0.28$
5.0	6.19 ± 0.47
5.4	6.28 ± 0.34

^a 95% 信頼区間

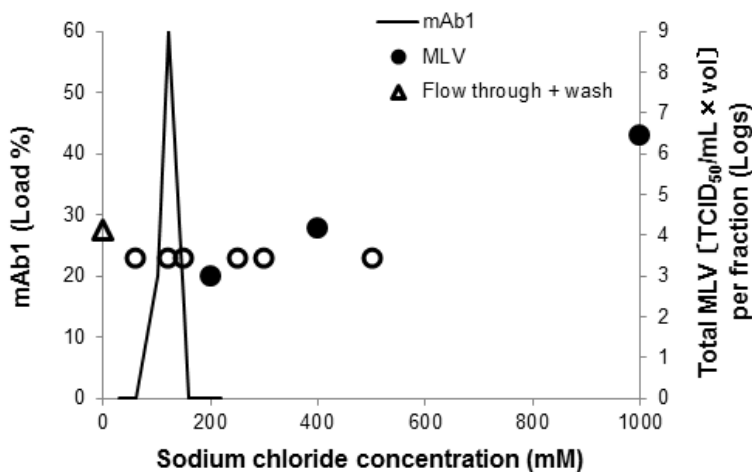
‘ \geq ’は、85 g/L樹脂の負荷量におけるプロダクトプール液中のウイルスレベルが、定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

2.3.7.3 結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイル及びウイルス除去能に及ぼす緩衝液種の影響 (クエン酸緩衝液、pH 5.0)

2.3.7.2 の検討において、pH 4.5 から 5.4 の範囲で、pH は MLV の除去能に影響しないことが明らかとなった。2.3.7.2 の検討は、酢酸緩衝液を用いて実施したが、この pH 範囲で緩衝能があり、抗体精製で広く使用されているクエン酸緩衝液 (50 mM、pH 5.0) を用いた場合の MLV の溶出プロファイル及び MLV の除去能を確認した (Fig. 8, Table 8)。結合/溶出モードにおける抗体 1 のピークトップの溶出塩濃度は、酢酸緩衝液の場合が 160 mM (pH 5.0) であるのに対し、クエン酸緩衝液を用いた場合は 120 mM と変化した。その理由は、同じ緩衝液濃度においてはクエン酸緩衝液の方が酢酸緩衝液よりもイオン強度が高いためと考えられる。それに対し、MLV はいずれの pH においても抗体 1 よりも高い塩濃度で溶出された。酢酸緩衝液及びクエン酸緩衝液を用いた結合/溶出クロマトグラフィーにおける MLV 除去能はいずれも約 $6 \log_{10}$ と高く、緩衝液種は MLV の除去能に影響しないことが分かった。以上の各緩衝液を用いた場合の結合/溶出モードにおける MLV 溶出プロファイル及び除去能の結果から、オーバーロードモードにおける MLV 除去能は緩衝液種に影響を受けないことが推測された。



(a) Acetate buffer (50 mM, pH 5.0)



(b) Citrate buffer (50 mM, pH 5.0)

Fig. 8 結合/溶出モードにおける MLV の溶出プロファイルに及ぼす緩衝液種の影響
Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

Table 8. 結合/溶出モードにおける MLV の除去能に及ぼす緩衝液種の影響
(85 g 抗体/L 樹脂の負荷量)

Buffer	MLV clearance (log reduction value) ^a
Acetate	6.19 ± 0.47
Citrate	5.90 ± 0.55

^a 95% 信頼区間

2.3.8 オーバーロードモード及び結合/溶出モードにおけるウイルス除去能の比較

抗体 1 溶液からの MLV、MMV、PRV 及び Reo 3 の除去能をオーバーロードモードと結合/溶出モードで比較した (Table 9)。オーバーロードモードの負荷量は、結合/溶出モードの負荷量よりも 20 倍以上多いにもかかわらず、同等のウイルス除去能を有することが明らかとなった。

Table 9. オーバーロードモード及び結合/溶出モードにおけるウイルス除去能の比較

Mode	Load amount (g mAb1/L POROS XS resin)	Viral clearance (log reduction value) ^a			
		MLV	MMV	PRV	Reo 3
Overloaded	2,000	6.09 ± 0.89	2.62 ± 0.39	≥5.71 ± 0.38	8.03 ± 0.93
Bind/elute	85	6.19 ± 0.47	2.17 ± 0.51	7.43 ± 0.42	6.03 ± 0.29

^a 95% 信頼区間

‘≥’は、2,000 g/L樹脂の負荷量におけるプロダクトプール液中のウイルスレベルが、定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

2.4 小括

抗体精製において重要な役割を担っている CEX クロマトグラフィー工程で一般的に用いられている結合/溶出モードのコストを低減し、効率的な精製方法を構築するために、オーバーロードモードを検討した。従来の研究において、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、HMWS、HCP 及びその他の不純物の除去が可能であることが報告されているものの、ウイルスの除去能については報告されていない。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。2,000 g 抗体/L 樹脂という結合/溶出モードの 20 倍以上の高負荷条件下でも、オーバーロードモードは MLV、PRV 及び Reo 3 のウイルス除去能を有していた。また、ウイルス除去能は、抗体種、樹脂種により有意な影響を受けなかった。

オーバーロードモードにおけるウイルス除去は、結合/溶出モードにおけるウイル

ス溶出プロファイルから予測できた。結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイルの測定結果から、オーバーロードモードにおけるウイルス除去能は、pHに影響を受けず、堅牢であること、また緩衝液種に影響を受けないことが推測された。

オーバーロードモードでは、結合/溶出モードの20倍以上負荷量が多いにもかかわらず、結合/溶出モードと同等のウイルス除去能を有していた。本研究において、CEXクロマトグラフィーのオーバーロードモードにおけるウイルス除去能力が示されたため、HMWS、HCP及びウイルスを含む抗体中の主な不純物は全てオーバーロードモードでのCEXクロマトグラフィーの単一工程で除去できる可能性が示された。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。

2.5 引用論文

1. Zhou JX, Tressel T, Yang X, Seewoester T. Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production. *Biotechnol J*. 2008;3:1185-1200.
2. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies—Application of platform approaches. *J Chromatogr B*. 2007;848:28-39.
3. Connell-Crowley L, Nguyen T, Bach J, et al. Cation exchange chromatography provides effective retrovirus clearance for antibody purification processes. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109:157-165.
4. Brown A, Bill J, Tully T, Radhamohan A, Dowd C. Overloading ion-exchange membranes as a purification step for monoclonal antibodies. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010;56:59-70.
5. Liu HF, McCooley B, Duarte T, et al. Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification. *J Chromatogr A*. 2011;1218:6943-6952.
6. Pabst TM, Suda EJ, Thomas KE, et al. Binding and elution behavior of proteins on strong cation exchangers. *J Chromatogr A*. 2009;1216:7950-7956.
7. Miesegaes GR, Lute S, Strauss DM, et al. Monoclonal antibody capture and viral clearance by cation exchange chromatography. *Biotechnol Bioeng*. 2012;109:2048-2058.
8. Asper M, Hanrieder T, Quellmalz A, Mihranyan A. Removal of xenotropic murine leukemia virus by nanocellulose based filter paper. *Biologicals*. 2015;43:452-456.
9. Strauss DM, Lute S, Tebaykina Z, et al. Understanding the mechanism of virus removal by Q sepharose fast flow chromatography during the purification of CHO-cell derived biotherapeutics. *Biotechnol Bioeng*. 2009;104:371-380.

第三章

非対称な電荷分布を持つ抗体の陰イオン
交換クロマトグラフィーにおけるフロー
スルーモードでの精製に関する研究

3.1 序論

多くのモノクローナル抗体は、基本的分子構造が同じで、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¹。AEX クロマトグラフィーは、モノクローナル抗体の精製における重要なポリッシング工程であり、宿主細胞由来 DNA、HCP、HMWS 及び外来性/内在性ウイルスを除去するために広く使用されている²⁻⁶。

市販されている 30 種の抗体医薬品の等電点 (pI) は 6.4~9.1 であり⁷、大部分のヒト化 IgG 1 および IgG 2 の pI は 7.5 以上であることが報告されている¹。この特性により、AEX 樹脂等の媒体に不純物が結合する一方で、抗体分子が AEX 媒体を素通りする、フロースルーモードで分離精製を行うことができる^{1,8}。フロースルーモードでは、AEX の樹脂等の媒体に大量の抗体 (例えば 300g 抗体/L 樹脂) を負荷することができ³、樹脂の必要量を結合/溶出モードのほぼ 1/10 に低減することができる。樹脂を充填したカラムの小型化により、樹脂コスト及び用いるバッファー調製にかかるコストを大幅に低減することが可能となる。また、フロースルーモードにおいては、主要パラメータがロード条件のみであるため、精製工程が単純化でき、精製工程の連続化 (連続プロセス) が可能となることから、低コストと高生産性につながる⁹⁻¹¹。さらに、AEX クロマトグラフィーのフロースルーモードにおけるレトロウイルスの除去能は、結合/溶出モードよりも高いことが報告されている¹²。以上のようにコスト、操作性、生産性及びウイルス除去能の点から、AEX クロマトグラフィーのフロースルーモードは、結合/溶出モードと比較し有利であり、抗体医薬品製造の AEX クロマトグラフィーではフロースルーモードが汎用されている。

抗体医薬品の開発は加速されており、それに応じて精製プロセス開発期間も短縮する必要がある。抗体精製のプラットフォームプロセスとして汎用されている AEX クロマトグラフィーの条件は、各抗体の pI に基づき予測でき、これによりプロセス開発期間の短縮が可能となっている^{13,14}。すなわち、AEX クロマトグラフィーの主

要パラメータである移動相の pH は、各抗体の pI 以下、通常は (pI - 0.5) 以下に設定され、イオン強度は低く保たれる。この標準条件により、フロースルーモードでの抗体の回収と不純物の除去の両方が可能となる。

しかし我々は最近、AEX クロマトグラフィーにおける挙動が、その抗体の pI から予測される挙動と大きく異なる抗体 (抗体 A) に遭遇した。すなわち、抗体 A は、AEX クロマトグラフィーのフロースルーモードの標準条件下で AEX 樹脂に吸着保持され、フロースルーしなかった。このクロマトグラフィー上の異常な挙動を考察するため、抗体の Fv 領域上の抗体表面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。非対称な電荷分布がイオン交換 (IEX) クロマトグラフィーにおいて異常な溶出挙動を生じる例として、IEX 樹脂と同じ電荷を有するタンパク質がこれまで報告されている¹⁵⁻²⁰。

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、樹脂ではなく膜吸着体に着目して検討した。その理由は、膜吸着体の支持マトリックスはネットワーク構造を有しており、非対称な電荷分布を有する抗体との相互作用の影響を受けにくいことが期待されるためである。本研究では、AEX 膜吸着体である NatriFlo HD-Q を非対称な電荷分布を持つ抗体 A に適用した。その結果、予想通り、抗体 A は標準的なクロマトグラフィー条件で膜吸着体に吸着保持されず、フロースルーモードでの精製が可能となった。同時に MLV の十分な除去も達成した。

3.2 方法

・ AEX クロマトグラフィー負荷液の調製

本研究では、3 種類のヒト化モノクローナル抗体である抗体 A、抗体 B 及び抗体 C (ともに IgG 1) を用いた。画像化キャピラリー等電点電気泳動 (imaged capillary isoelectric focusing) による各抗体の pI は、抗体 A : 8.1, 抗体 B : 8.2, 抗体 C : 8.8 で

あった。本研究のための負荷材料は CHO 細胞培養液から調製した。培養後、デプスフィルターにより細胞を除去し、Protein A アフィニティークロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーを含む標準的な方法により抗体を精製した。希釈または限外ろ過/透析ろ過により、目的とする pH 及び抗体濃度に調整し、0.2 μm フィルターで濾過した後、AEX クロマトグラフィーの負荷まで -80°C で保存した。調製した AEX 負荷液の導電率は $2\sim 4\text{mS/cm}$ であった。室温で AKTA Explorer 100 または AKTA avant 25 システム (GE Healthcare) を用いて室温でクロマトグラフィー操作を行った。クロマトグラフィーにおける抗体の挙動は 280 nm の吸光度でモニターした。

- ・ ウイルス除去能評価のためのウイルススパイク試験

ウイルススパイク試験は、ViSpot Inc. (神戸) で実施した。ウイルス力価は、PG-4 細胞 (MLV) 及び A9 細胞 (MMV) を用いて、TCID₅₀ により測定した。Spearman-Körber 式に従いウイルス力価を算出し、95%信頼区間は標準誤差に 1.96 の定数を乗じて算出した。ウイルススパイク試験に先立ち、測定サンプルが指示細胞に対して毒性を示すか、指示細胞のウイルス感染性に干渉するかを確認し、その結果からウイルス力価測定に影響ない希釈率を設定した。ウイルススパイク試験は、実際の製造工程のスケールダウンモデルを用いて行った。負荷液への各ウイルスのスパイク率は 1% (v/w) とした。負荷液、フロースルー画分、プロダクトプール液の力価を、TCID₅₀ により決定した。プロダクトプール液については、検出限界値の感度を高めるために LVP を実施した。ウイルス除去能 (LRV) は、負荷液及びプロダクトプール液のウイルス力価及び液量を用いて算出した。

- ・ AEX クロマトグラフィー法

AEX クロマトグラフィーは、Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)、POROS 50 HQ (Thermo Scientific) 及び DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を充填したプレパ

ックカラムを用いた。それぞれのカラムサイズは、Q Sepharose Fast Flow : 内径 0.77 cm I.D. × ベッド高 10 cm、CV = 4.7 mL、POROS 50 HQ : 内径 0.5 cm × ベッド高 5 cm、CV = 1.0 mL、DEAE Sepharose Fast Flow : 内径 0.77 cm × ベッド高 10cm、 CV = 4.7 mL とした。流速は各樹脂メーカーから提供された性能データに基づいて設定した。AEX カラムは 25 mM の Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 で平衡化し、続いて負荷材料を、200 g 抗体/L 樹脂までカラムに負荷した。負荷後、カラムに残った抗体を平衡緩衝液で回収した。さらに、1 M の塩化ナトリウムを含む HSW により、カラムに吸着したすべての成分を溶出した。

ウイルススパイク試験は、Q Sepharose Fast Flow を充填したプレパックカラム(内径 0.77 cm I.D. × ベッド高 10 cm を 2 本連結)及び AEX 膜吸着体である NatriFlo HD-Q Recon Mini (Merck Millipore、膜容量[MV] = 0.2 mL) を用いて実施した。流速は AEX 媒体メーカーから提供された性能データに基づき、Q Sepharose Fast Flow : 毎時 200 cm (RT = 3 分)、NatriFlo HD-Q : 毎分 15 MV (RT = 4 秒) に設定した。AEX 媒体は特に指定のない限り、25 mM の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した。次いで、ウイルスをスパイクした負荷材料を 10 g 抗体/L 樹脂 (Q Sepharose Fast Flow) 及び 8,000 g 抗体/L 膜吸着体 (NatriFlo HD-Q) で各 AEX 媒体に負荷した。平衡緩衝液で洗浄後、Q Sepharose Fast Flow については各ステップ 5 CV、NatriFlo HD-Q については各ステップ 150 MV の塩化ナトリウムによる段階的勾配により溶出した。段階的勾配塩化ナトリウム濃度は、25、50、100、200、300、400、500 及び 1,000 mM に設定した。

Q Sepharose Fast Flow 及び POROS 50 HQ の動的結合容量は、濃度既知の精製抗体 A を RT = 3 分の流速でカラムに負荷し、負荷した液の 5% の漏出が見られた時点での負荷抗体量を測定に用いた樹脂量で除し、算出した。いずれの操作も室温で実施した。

・抗体表面の静電ポテンシャルのマッピング

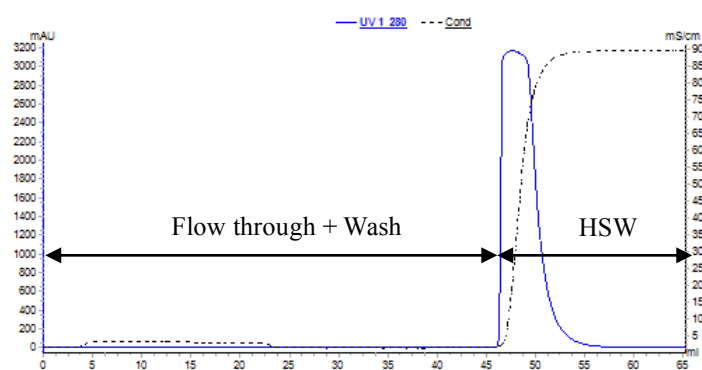
抗体の Fv 領域構造と表面静電ポテンシャルは、Discovery Studio version 2017R2 (Dassault Systems Biovia K.K. Japan) を用いて作製した。各抗体 Fv 領域のフレームワークとして最適なテンプレートを選択した。表面静電ポテンシャルは、pH 7.5 でポアソン - ボルツマン式により決定した。 $+1$ 及び $-1 k_B T/e$ isovalue surface をモデル構造上にマッピングした。ここで k_B はボルツマン定数である。

3.3 結果および考察

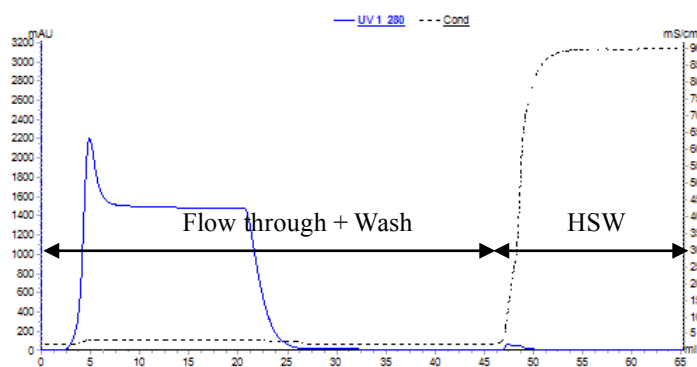
3.3.1 AEX クロマトグラフィーにおける抗体 A の溶出プロファイル

3.3.1.1 AEX クロマトグラフィーにおける 3 抗体の溶出プロファイル

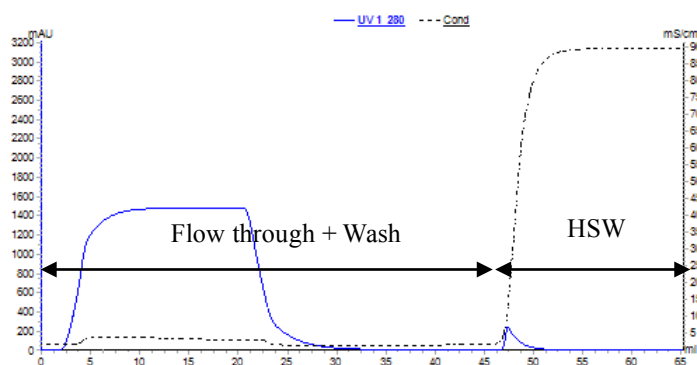
3 抗体の pI はそれぞれ、抗体 A : 8.1, 抗体 B : 8.2, 抗体 C : 8.8 であるため、いずれも pH 7.5 では正荷電を有しており、正に荷電した AEX 樹脂を素通りすることが予測された。pH 7.5 での Q Sepharose Fast Flow カラムにおける 3 抗体の溶出プロファイルを Fig. 1 に示した。抗体 B 及び抗体 C は予測通り、カラムをフロースルーしたが、抗体 A はフロースルーせずカラムに吸着保持され、HSW により溶出された。



(a) 抗体 A



(b) 抗体 B



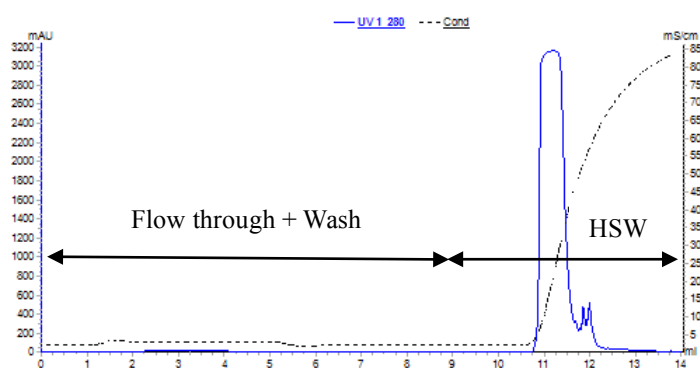
(c) 抗体 C

Fig. 1 AEXクロマトグラフィーにおける3抗体の溶出プロファイル (Q Sepharose Fast Flow)

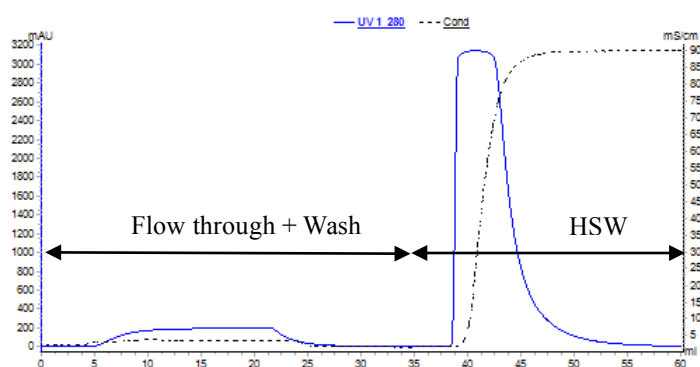
3.3.1.2 他の AEX 樹脂における抗体 A の溶出プロファイル

pH 7.5 における AEX カラムへの抗体 A の吸着が、用いた Q Sepharose Fast Flow 樹脂 (強塩基性陰イオン樹脂) 特有の現象であるか否かを、他の樹脂である POROS 50 HQ (強塩基性陰イオン樹脂) および DEAE Sepharose Fast Flow (弱塩基性陰イオン樹脂) を用いて調べた (Fig. 2)。DEAE Sepharose Fast Flow カラムのフロースルー画分にはわずかに抗体 A が検出されたが、抗体 A の 95%以上はカラムに吸着し、HSW 画分に回収された。DEAE Sepharose Fast Flow カラムにおけるフロースルー画分への抗体のわずかな溶出は、抗体の電荷不均一性に起因すると考えられる²¹。一方、POROS 50 HQ カラムのフロースルー画分では抗体 A は検出されず、HSW 画分で回

収された。したがって、抗体 A の pH 7.5 での AEX 樹脂への吸着は、陰イオン交換樹脂の種類に関係なく起こると考えられた。



(a) POROS 50 HQ



(b) DEAE Sepharose Fast Flow

Fig. 2 他のAEX樹脂における抗体Aの溶出プロファイル (POROS 50 HQ, DEAE Sepharose Fast Flow)

3.3.1.3 各樹脂の動的結合容量の評価

pH 7.5 で抗体 A が AEX カラムへ吸着したことにより、抗体 A の AEX クロマトグラフィーにおける精製は、フロースルーモードではなく、結合/溶出モードを用いる可能性が高まった。そこで、結合/溶出モードのカラムへの負荷量を設定するために、Q Sepharose Fast Flow 及び POROS 50 HQ 樹脂での抗体 A の動的結合容量を測定

した。各樹脂の特性と動的結合容量の測定結果を Table 1 に示した。AEX 樹脂の動的結合容量は、Q Sepharose Fast Flow で 67 g 抗体/L 樹脂、POROS 50 HQ で 31 g 抗体/L 樹脂であった。以上の結果から、結合/溶出モードの負荷量は、報告されているフロースルーモードの負荷量³の 1/4 (Q Sepharose Fast Flow の場合) または 1/10 (POROS 50 HQ の場合) 以下となり、結合/溶出モードの適用はコストの点で大幅に不利となる。

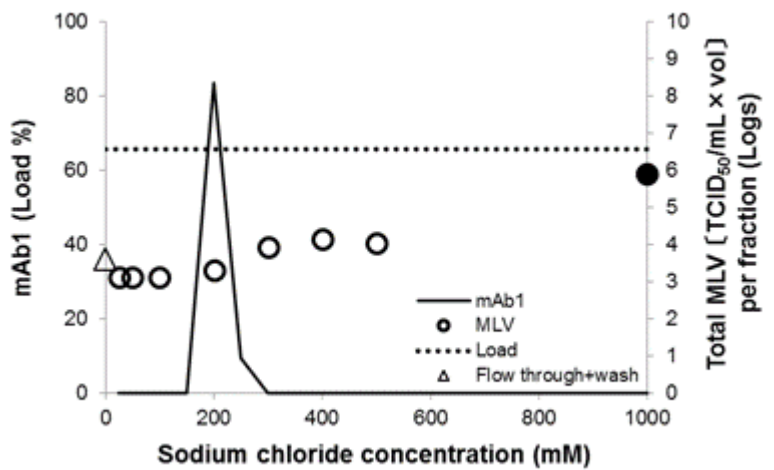
Table 1. 各樹脂の特性と動的結合容量の測定結果(5% breakthrough)

Resin	Support matrix	Particle size (μm)	Pore size (\AA)	Ion exchange type	Ligand	Dynamic binding capacity (g mAb1/L resin)
Q Sepharose Fast Flow	Cross-linked, 6% agarose	90	Not published by the manufacturer	Strong anion	Quaternary ammonium	67
POROS 50 HQ	Cross-linked polystyrene divinylbenzene	50	1,000–3,600	Strong anion	Quaternized polyethylenei mine	31

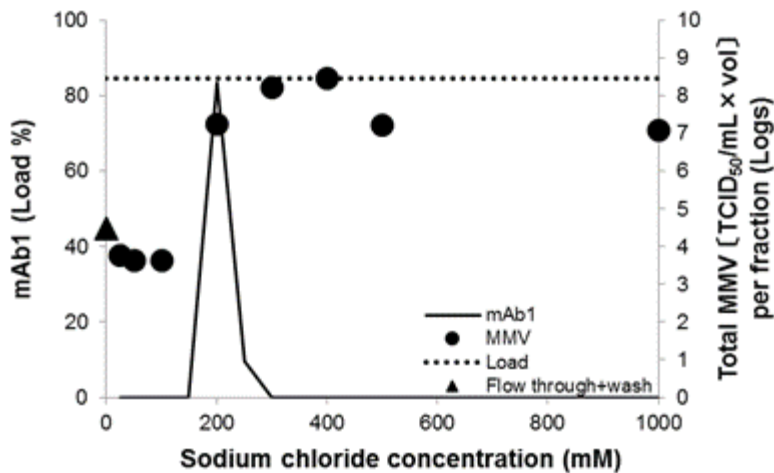
3.3.1.4 AEX クロマトグラフィーにおける抗体 A とウイルスの溶出プロファイル

AEX クロマトグラフィー工程へ期待される機能としてウイルス除去があげられる。Fig. 3 は、pH 7.5 における結合/溶出モードでのウイルス除去能を示す。抗体 A はフロースルー画分では検出されず、200 mM 塩化ナトリウムによる溶出画分で回収された。対照的に、MLV はフロースルー画分から 500 mM 塩化ナトリウムによる溶出画分まで検出されず、1,000 mM 塩化ナトリウム溶出画分でのみ検出され、抗体 A と MLV が良好に分離されていることが確認された。一方、MMV はフロースルー画分及び洗浄画分、さらに塩化ナトリウム濃度が最も低い溶出画分 (25 mM) 以降で検出された。MMV は抗体 A が溶出する 200 mM 塩化ナトリウム画分で、MMV の負荷濃度とほぼ同濃度で溶出した。その結果、抗体 A (200mM 塩化ナトリウム溶出画分) の AEX クロマトグラフィーのウイルス除去能は、MLV で 3.90 log₁₀、MMV

で $1.20 \log_{10}$ と算出された (Table 2)。結合/溶出モードの AEX クロマトグラフィーにおいて、MLV は十分に除去されたが、MMV の除去能は低い結果となった。



(a) MLV



(b) MMV

Fig. 3 AEX クロマトグラフィーにおける抗体 A とウイルスの溶出プロファイル (Q Sepharose Fast Flow)

Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

Table 2. Q Sepharose Fast Flow 樹脂を用いた結合/溶出モードにおけるウイルス除去能 (200 mM 塩化ナトリウム溶出画分)

Virus	Viral clearance (log reduction value) ^a
MLV	3.90 ± 0.25
MMV	1.20 ± 0.37

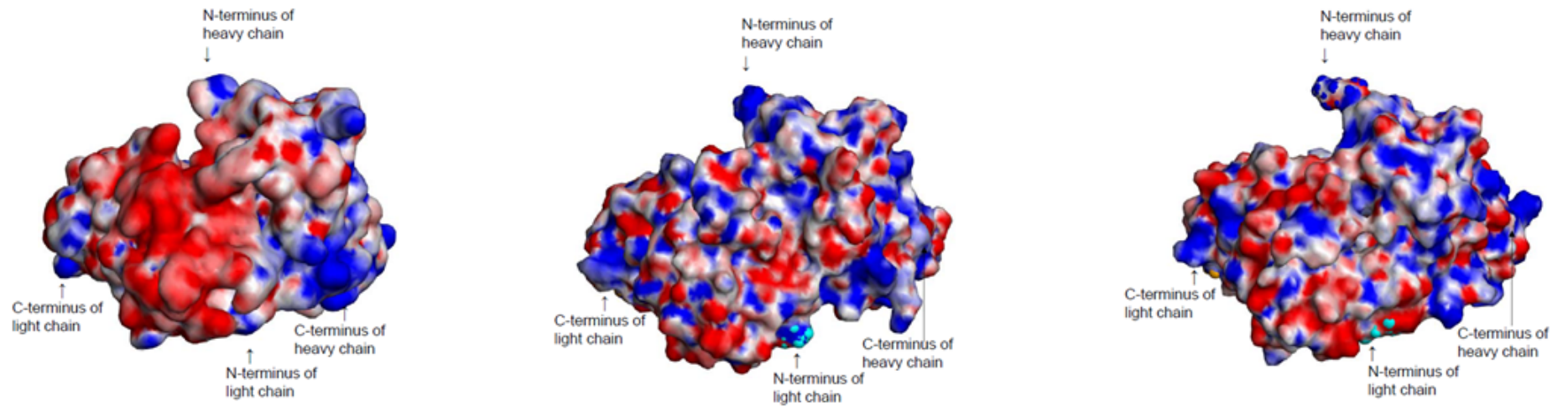
^a 95% 信頼区間

3.3.2 各抗体の静電ポテンシャルマッピング

AEX クロマトグラフィーにおける抗体 A の特徴的な溶出挙動の原因を考察するために、抗体 A、抗体 B 及び抗体 C の Fv について、pH 7.5 における静電ポテンシャルを解析した。抗体 B 及び抗体 C とは異なり、抗体 A は非常に不均一な非対称の電荷分布を示した (Fig. 4A)。抗体 A の isovalue surface は、正に荷電した表面と負に荷電した表面とがはっきりと分離していることを示した (Fig. 4B)。

ネット電荷がゼロのタンパク質の IEX 樹脂への吸着や IEX 樹脂と同じ電荷をもつタンパク質の吸着など、非対称の電荷分布は、IEX クロマトグラフィーにおける異常な溶出プロファイルをもたらすことが報告されている¹⁸⁻²⁰。これらの現象は蛋白質精製のガイドブック¹⁵や蛋白質の IEX クロマトグラフィーのレビュー¹⁶に記載されている。さらに、非対称の電荷分布によるこの異常な溶出プロファイルの機序は、Lesins と Ruckenstein によって説明されている¹⁷。正電荷をもつ蛋白質の表面に存在する負電荷クラスターが、"steering effect" (Fig. 6) によって正電荷をもつ AEX 樹脂に向かい、AEX 樹脂と結合する²²。実際、Fig. 4B に示された isovalue surface は、抗体 A の Fv が N 末端に位置する負に荷電した領域の電気双極子として扱えることを示唆している (Fig. 4B, Fig. 5)。

A



(a) 抗体 A

(b) 抗体 B

(c) 抗体 C

B

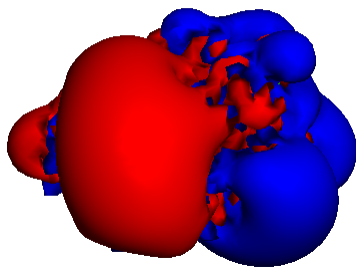
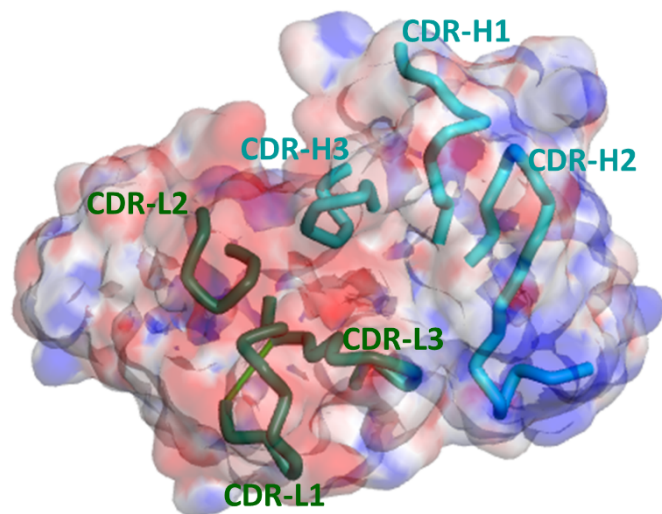


Fig. 4 pH 7.5 における抗体の Fv の静電ポテンシャル

A 抗体のコノリー表面：赤色および青色はそれぞれ負電荷と正電荷を示す

B 抗体 A の静電ポテンシャルの等値面：赤色と青色の輪郭はそれぞれ -1 および $+1 k_B T/e$ の等電位ポテンシャルを示す

A



B

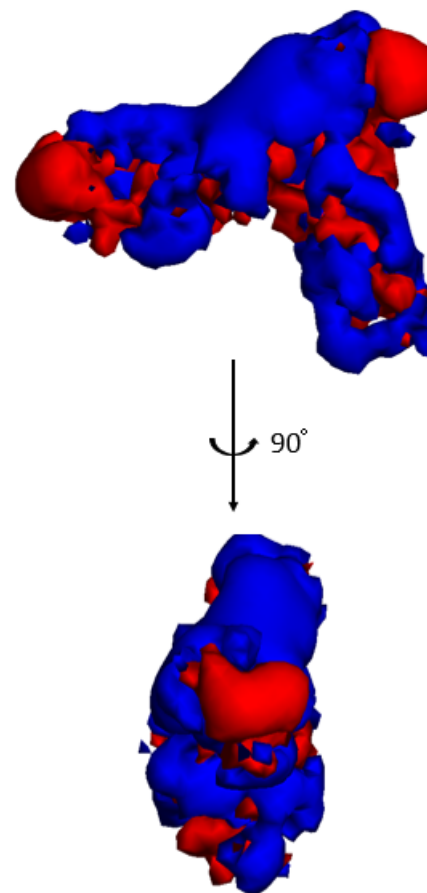


Fig. 5 抗体 A の Fv における complementarity determining region (CDR) の位置と抗体 A 全長の静電ポテンシャル

A 抗体 A の Fv における CDR の位置

B 抗体 A 全長の静電ポテンシャルの等値面：赤色と青色の輪郭はそれぞれ -1 および $+1 k_B T/e$ の等電位ポテンシャルを示す

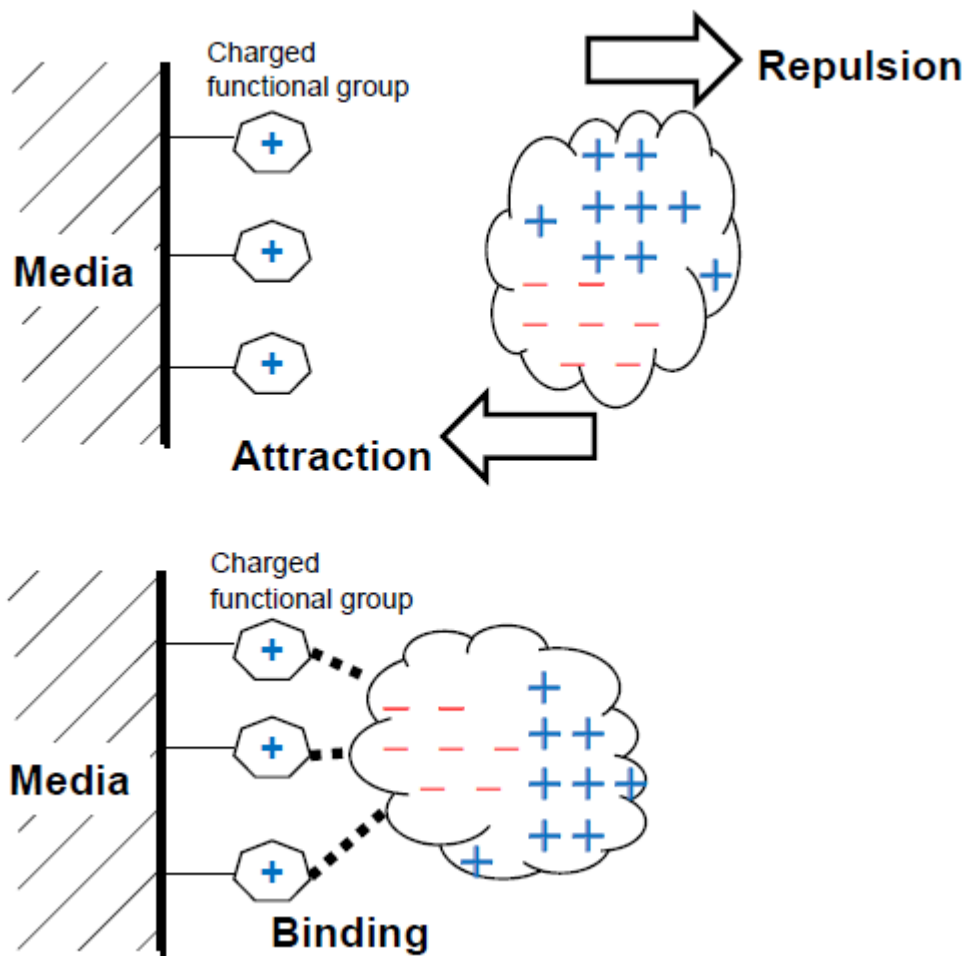


Fig. 6 "steering effect"

正電荷をもつタンパク質の表面に存在する負電荷クラスターが、"steering effect"によって正電荷をもつ AEX に向かい、AEX 樹脂に結合する

3.3.3 AEX 膜吸着体 NatriFlo HD-Q を用いた抗体 A の精製

Kopaciewicz らによれば、蛋白質表面の非対称の電荷分布による IEX 溶出の影響の受けやすさは、電荷をもった樹脂を取り囲む ion-exclusion layer である "double layer" の厚さに依存する²²。この double layer は、電荷をもった表面から外部媒体に伸びるイオンの電荷をもった層からなる。この層が薄い場合には、タンパク質と接触する領域が限られることから、タンパク質の表面上の静電ポテンシャルが大きい領域が、反対に荷電した媒体に向かうことになり、上述した抗体 A で観察された異常な溶出挙動につながると考えられる。反対に、層が厚い場合には、タンパク質分子全体の電荷が寄与することになり、タンパク質の表面上のほぼすべての静電ポテンシャルが引力/反発に寄与し、タンパク質の pI を反映する溶出挙動をもたらすと考えられる。"実効的"な double layer の厚さは、イオン交換膜吸着体の特徴であるネットワーク構造によって、イオン交換樹脂より厚い可能性があるとして推測した。膜吸着体はタンパク質分子を取り囲むため、タンパク質分子表面上の静電ポテンシャルがイオン交換体の荷電した官能基と相互作用する確率は、イオン交換樹脂に比べて膜吸着体の方が高くと考えられた。この理由から、我々は抗体 A の精製において、NatriFlo HD-Q 膜吸着体 (基材、多孔性ポリアクリルアミド ; 孔径 0.40 μm ; リガンド、アミドプロピルトリメチルアンモニウムクロリド) を評価した。予想通り、膜吸着体に結合する抗体 A の割合は負荷量の 5%未満であり、抗体 A が pH 7.5 で NatriFlo HD-Q 膜吸着体をフロースルーする結果となった (Fig. 7)。

膜吸着体は、流路が樹脂と比べて大きいため、樹脂と比較し圧倒的に流速が早く、短時間でのクロマトグラフィーを可能にする。本研究においても、樹脂と NatriFlo HD-Q 膜吸着体のクロマトグラフィー操作においては流速 (接触時間) が異なっており、樹脂では RT = 3 分、NatriFlo HD-Q 膜吸着体では RT = 4 秒である。そのため、NatriFlo HD-Q の高流速条件が影響し、抗体 A がフロースルーした可能性があるかを検証した。Fig. 8 に示すように、抗体 A は、接触時間が短い場合 (4 秒、NatriFlo HD-Q) または接触時間が長い場合 (3 分、AEX 樹脂の接触時間と同条件に

設定) のいずれの条件下でも NatriFlo HD-Q 膜吸着体に結合しなかった。フロースルー一画分における抗体 A の回収率は、RT = 4 秒で 96.8%、RT = 3 分で 96.7%であり、接触時間は抗体の回収率に影響していなかった。抗体 A が NatriFlo HD-Q をフロースルーしたのは、高流速条件によるものではないことが確認された。

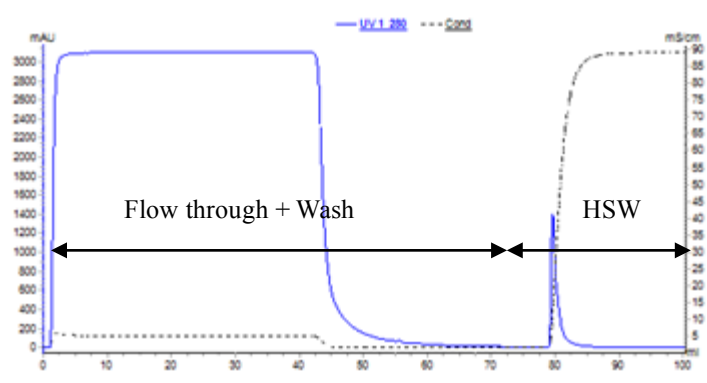
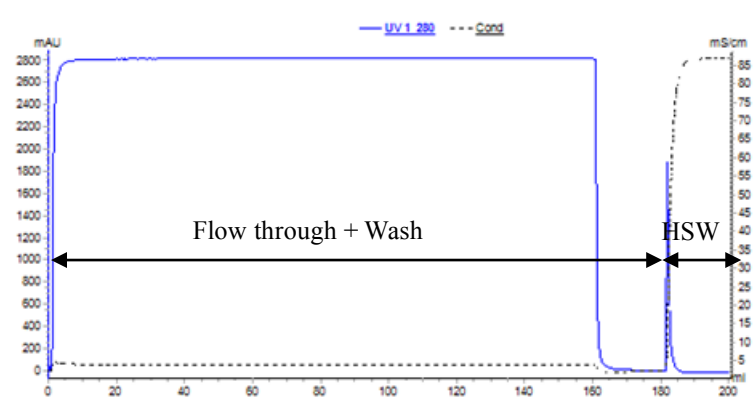
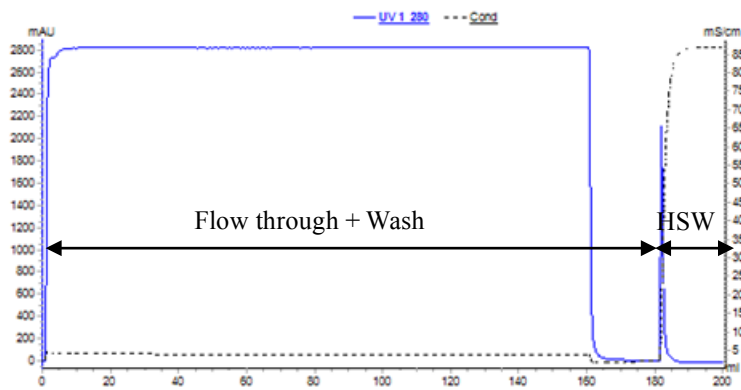


Fig. 7 NatriFlo HD-Q 膜吸着体における抗体 A の溶出プロファイル



(a) Residence time 4 sec

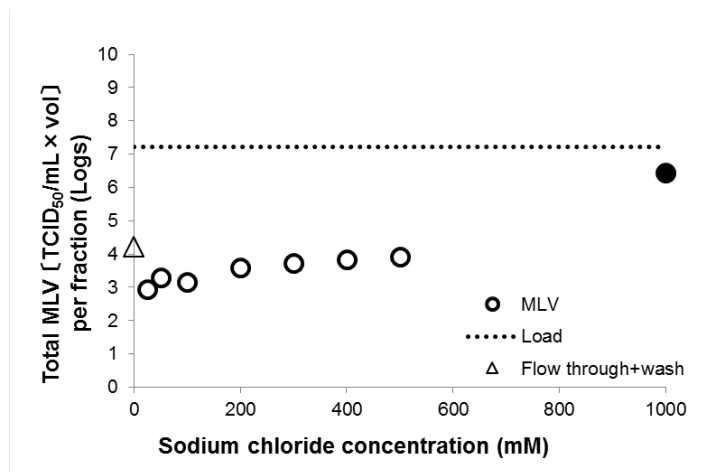


(b) Residence time 3 min

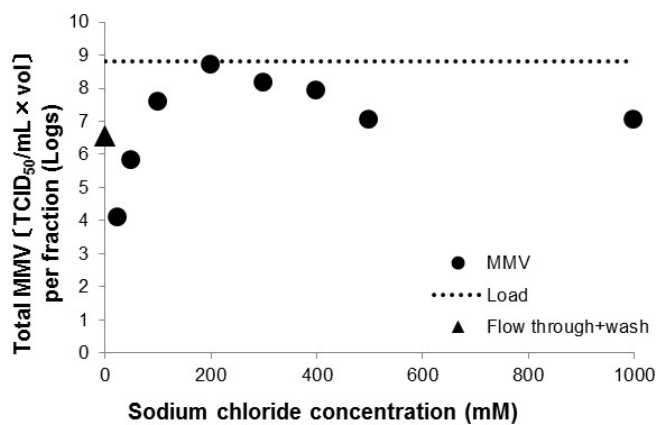
Fig. 8 NatriFlo HD-Q 膜吸着体における抗体 A の溶出プロファイルに及ぼす流速の影響

3.3.4 NatriFlo HD-Q を用いたフロースルーモードでのウイルス除去能

抗体 A が pH 7.5 で NatriFlo HD-Q をフロースルーしたことによって、膜吸着体は抗体 A と結合する他の媒体 (樹脂等) よりも製造コストの点で大幅に有利であることが示唆された。AEX クロマトグラフィー工程へ期待される機能としてウイルス除去があげられることから、NatriFlo HD-Q を用いたフロースルーモードでのウイルス除去能を評価した(Fig. 9)。抗体 A は NatriFlo HD-Q をフロースルーし、対照的に、MLV はフロースルー画分から 500 mM 塩化ナトリウムによる溶出画分まで検出されず、1,000 mM 塩化ナトリウム溶出画分でのみ検出された。すなわち、NatriFlo HD-Q を用いたフロースルーモードでの AEX クロマトグラフィーにおいて、MLV と抗体 A とが十分に分離された。一方、MMV はフロースルー画分及び洗浄画分、さらに塩化ナトリウム濃度が最も低い溶出画分 (25 mM) 以降で検出された。NatriFlo HD-Q を用いたウイルス除去能は、MLV で $3.31 \log_{10}$ 、MMV で $2.26 \log_{10}$ であった (Table 3)。NatriFlo HD-Q を用いたフロースルーモードで MMV はフロースルー画分に検出されたが、結合/溶出モードでの樹脂を用いた場合よりも高い LRV が得られた。



(a) MLV



(b) MMV

Fig. 9 AEX クロマトグラフィーにおける抗体 A とウイルスの溶出プロファイル (NatriFlo HD-Q)

Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

Table 3. NatriFlo HD-Q 膜吸着体を用いたフロースルーモードにおけるウイルス除去能

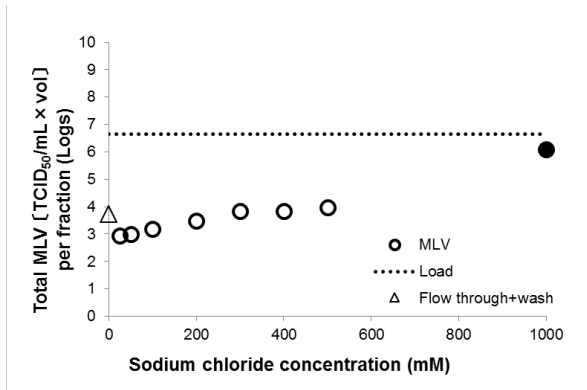
Virus	Viral clearance (log reduction value) ^a
MLV	3.31 ± 0.25
MMV	2.26 ± 0.37

^a 95% 信頼区間

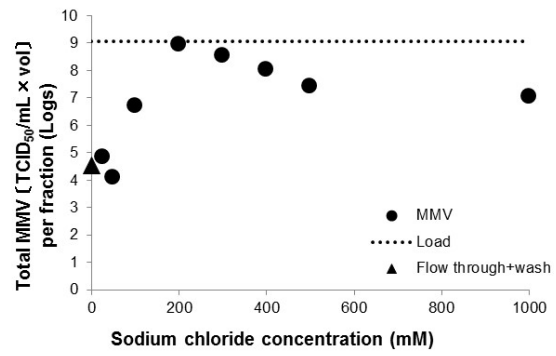
3.3.5 NatriFlo HD-Q のウイルス除去に及ぼす pH の影響

NatriFlo HD-Q 膜吸着体を用いることにより、抗体 A のフロースルーモードによる精製が可能となり、同時にウイルス除去が達成された。この NatriFlo HD-Q 膜吸着体は AEX クロマトグラフィーにおいて比較的新しい媒体である。HCP 及び DNA の除去に関するデータは報告されているが、ウイルス除去能に対する pH の影響を検討した報告は少ないため^{23,24}、NatriFlo HD-Q のウイルス除去に及ぼす pH の影響を確認した。負荷液の調製ごとに変動する可能性がある抗体及び混入不純物の影響を避けるために、抗体 A の非存在下でのウイルス溶出プロファイル进行分析した。すなわち、pH 7.0、7.5 及び 8.0 の Tris 緩衝液にウイルスをスパイクした負荷液を用いた。各 pH における MLV 及び MMV 溶出プロファイルを Fig. 10 に、ウイルス除去能を Table 4 に示した。MLV はいずれの pH においても、フロースルー画分から 500 mM 塩化ナトリウムによる溶出画分まで検出されず、1,000 mM 塩化ナトリウム溶出画分でのみ検出された。MLV の溶出プロファイルは各 pH 条件で類似しており、pH は NatriFlo HD-Q における MLV の除去に影響せず、NatriFlo HD-Q は MLV 除去に関して広い pH 操作範囲を有することが示された。対照的に、MMV の溶出プロファイルは pH でわずかに異なった。すなわち、pH 7.0 および 7.5 では、わずかな量の MMV がフロースルー画分に検出され、25 mM から 1,000 mM の塩化ナトリウムを含む画分にも検出された。一方、pH 8.0 では、フロースルー画分及び 400 mM 以上の塩化ナトリウムを含む画分に MMV は検出されなかった。MMV の溶出プロファイルは pH によりわずかに異なったが、pH 7.0 から pH 8.5 の間で同等で良好なウイルス除去が達成された。しかしながら、pH 7.5 でのウイルス除去能は、抗体 A の存在下 (MLV : 3.31、MMV : 2.26、Table 3) と抗体 A の非存在下 (MLV : 5.08、MMV : 4.71、Table 4) でわずかに異なっていた。抗体の存在下では、非存在下と比較した場合、ウイルス除去能が有意に低下したという同様の報告がある⁶。負荷液の調製に伴い混在する HCP や DNA 等の他の不純物が影響している可能性があり²⁵、NatriFlo HD-Q 膜吸着体がウイルス除去に関して十分に広い pH 操作範囲を有することを確認

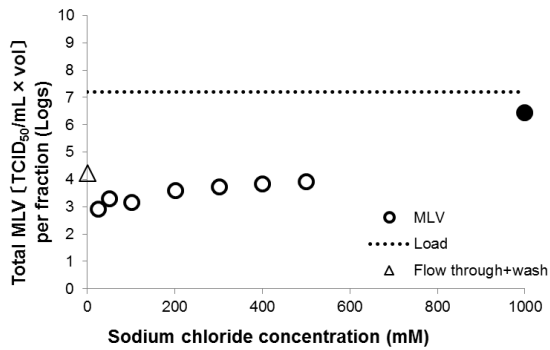
するために、さらなる検討が必要である。



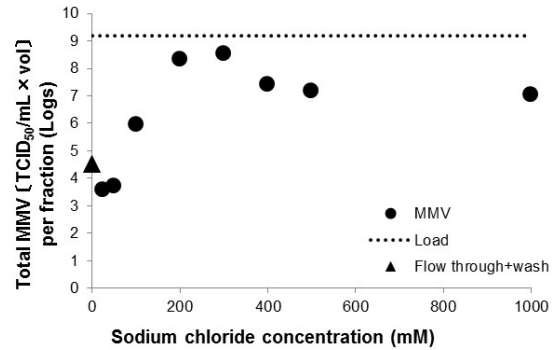
(a) MLV, pH 7.0



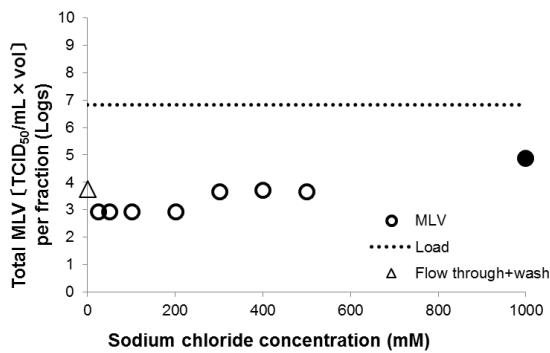
(b) MMV, pH 7.0



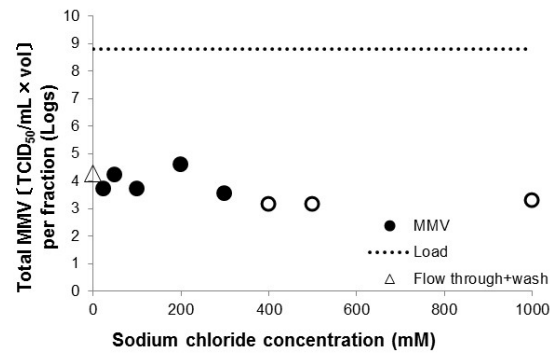
(c) MLV, pH 7.5



(d) MMV, pH 7.5



(e) MLV, pH 8.0



(f) MMV, pH 8.0

Fig. 10 NatriFlo HD-Qにおけるウイルスの溶出プロフィールに及ぼす pH の影響
Open symbol はウイルスが検出されなかったことを示す

Table 4. NatriFlo HD-Q におけるウイルス除去能に及ぼす pH の影響

Virus	Viral clearance (log reduction value) ^a		
	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
MLV	$\geq 5.20 \pm 0.25$	5.08 ± 0.25	4.90 ± 0.25
MMV	4.85 ± 0.25	4.71 ± 0.25	$\geq 4.53 \pm 0.25$

^a 95% 信頼区間

‘ \geq ’は、プロダクトプール液相当画分（フロースルー画分）中のウイルスレベルが定量法の感度を高めるためのLVPにおける検出限界以下であったことを示す

3.3.6 今後の検討課題

NatroFlo HD-Q 膜吸着体は、陰イオン交換樹脂と比較した場合、抗体 A の電荷の非対称性の影響を受けにくいことを見いだしたが、イオン交換膜吸着体が一般的にこの特性を有するかどうかを確認するための検討が必要である。さらに、膜吸着体が樹脂より厚い"実効的"な double layer を有していると予測したが、これを実験的に検証する必要がある。

3.4 小括

抗体表面に非対称の電荷分布を持つ抗体 A は、各種の AEX 樹脂を用いた標準的なクロマトグラフィー条件において、樹脂に結合、保持され、フロースルーモードで精製することは困難であった。AEX 膜吸着体は、ネットワーク構造を有するため、支持マトリックスがタンパク質表面の非対称性の電荷分布との相互作用を受けにくく、このような非対称の電荷分布を持つ抗体 A を精製するのに適していると予測した。標準的なクロマトグラフィー条件下で NatriFlo HD-Q 膜吸着体を用いて抗体 A を精製したところ、予想通り、抗体 A はフロースルーすることを見出した。さらに十分なウイルス除去能を有していた。表面電荷に特徴を持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。

3.5 引用論文

1. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs*. 2010;2:480-499.
2. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies-Application of platform approaches. *J Chromatogr B*.

2007;848:28-39.

3. CMC biotech working group. A-Mab: a case study in bioprocess development. Version 2.1 30th October 2009. Available at:
https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab_case_study_Version_2-1.pdf
4. Miesegaes G, Lute S, Brorson K. Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106:238-246.
5. Strauss DM, Gorrell J, Plancarte M, Blank GS, Chen Q, Yang B. Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102:168-175.
6. Weaver J, Husson SM, 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;110:500-510.
7. Goyon A, D'Atri V, Colas O, Fekete S, Beck A, Guillarme D. Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography : Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation. *J Chromatogr B.* 2017;1066:35-43.
8. Miesegaes GR, Lute SC, Read EK, Brorson KA. Viral clearance by flow-through mode ion exchange columns and membrane adsorbers. *Biotechnol Prog.* 2014;30:124-131.
9. Somasundaram B, Pleitt K, Shave E, Baker K, Lua LHL. Progression of continuous downstream processing of monoclonal antibodies : Current trends and challenges. *Biotechnol Bioeng.* 2018;115:2893-2907.
10. Ichihara T, Ito T, Kurisu Y, Galipeau K, Gillespie C. Integrated flow-through purification for therapeutic monoclonal antibodies processing. *MAbs.* 2018;10:325-334.
11. Ichihara T, Ito T, Gillespie C. Polishing approach with fully connected flow-through purification for therapeutic monoclonal antibody. *Eng Life Sci.* 2019;19:31-36.

12. Miesegaes G, Lute S, Brorson K. Analysis of viral clearance unit operations for monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng.* 2010;106:238-246.
13. Ishihara T, Kadoya T. Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic: Design and case study of chromatography processes. *J Chromatogr A.* 2007;1176:149-156.
14. Ishihara T, Kadoya T, Yoshida H, Tamada T, Yamamoto S. Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein A affinity chromatography and cation exchange chromatography Structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. *J Chromatogr A.* 2005;1093:126-138.
15. Janson JC, Ryden L. Ion-exchange chromatography. In: Protein purification: Principles, high-resolution methods, and applications (2nd edition). New York: Wiley-VCH, Inc., 1998;145-205.
16. Regnier FE. The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science.* 1987;238: 319-323.
17. Lesins V, Ruckenstein E. Chromatographic probing of protein-sorbent interactions. *J. Colloid Interface Sci.* 1989;132:566-577.
18. Chicz RM, Regnier FE. Single amino acid contributions to protein retention in cation-exchange chromatography: Resolution of genetically engineered subtilisin variants. *Anal Chem.* 1989;61:2059-2066.
19. Gill DS, Roush DJ, Willson RC. Presence of a preferred anion-exchange binding site on cytochrome b5: structural and thermodynamic considerations. *J Chromatogr A.* 1994;684:55-63.
20. Chung WK, Hou Y, Freed A, Holstein M, Makhatadze GI, Cramer SM. Investigation of protein binding affinity and preferred orientations in ion exchange systems using a homologous protein library. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102:869-881
21. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing

- comparability following manufacturing changes: *Nat Biotechnol.* 2004;22:1383-1391.
22. Kopaciewicz W, Rounds MA, Fausnaugh J, Regnier FE. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *J Chromatogr.* 1983;266:3-21.
 23. Hou Y, Brower M, Pollard D, Kanani D, Jacquemart R, Kachuik B, Stout J. Advective hydrogel membrane chromatography for monoclonal antibody purification in bioprocessing. *Biotechnol Prog.* 2015;31:974-982.
 24. Merck KGaA, NatriFlo® HD-Q Membrane Adsorber - Application Note. Lit. No. MK_AN1719EN Ver. 1.0. 2018/07
 25. Roush D. Viral clearance using traditional, well-understood unit operations: Session 1.2. Anion exchange chromatography; and Session 1.3. Protein A chromatography. *PDA J Pharm Sci and Tech.* 2015;69:154-162

第四章

4.1 結論

モノクローナル抗体は、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ている。現在、50 を超える抗体が医薬品として広く用いられ、また 570 を超える抗体を用いた臨床試験が進められており、今後さらなる市場の拡大が予想されている。抗体医薬品の市場規模の拡大に対して、効率的な製造プロセスの開発及び開発スピードの加速化が課題となっている。

多くの抗体医薬品は、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、HMWS、HCP、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。これらの不純物は、適切な精製工程を経て、許容レベルまで除去する必要がある。さらに、CHO 細胞のような動物細胞で産生される抗体医薬品に関しては、ウイルス安全性は極めて重要な問題である。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、このレトロウイルス様粒子及び外来性ウイルスが精製工程中で適切に除去又は不活性化されることを示さなければならない。

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、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。プラットフォームプロセスを用いることで、製造プロセス開発期間が短縮でき、抗体医薬品開発の加速化が可能となる。通常、抗体の精製工程は、抗体の Fc 領域に親和性を持つ Protein A をリガンドとする 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、2 つまたは 3 つのポリッシング工程からなる。典型的には、ポリッシング工程は陰イオン交換 (AEX)、陽イオン交換 (CEX)、疎水性相互作用及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー等の中から選択され、CEX 及び AEX クロマトグラフィーが用いられることが多い。

抗体医薬品は、投与量が多いこと、また培養コストが高いと言われる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。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オーバーロードモードにおけるウイルス除去性能について評価した。次に、AEX クロマトグラフィーのフロースルーモードにおける、非対称な電荷分布をもつ抗体の溶出挙動と精製条件について検討した。

抗体精製において重要なポリッシング工程である CEX クロマトグラフィーでは、一般的に結合/溶出モードが使用されている。クロマトグラフィーに用いる樹脂等の媒体の効率的な使用及びコスト低減のために、フロースルーモードに類似したオーバーロードモードを検討した。オーバーロードモードでは HMWS、HCP 及びその他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となるウイルス除去能については報告されていない。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。オーバーロードモードでは、2,000 g 抗体/L 樹脂という高負荷条件下でも、MLV、PRV 及び Reo 3 のウイルス除去能を有していた。また、ウイルス除去能は、抗体種、樹脂種により有意な影響を受けなかった。

オーバーロードモードにおけるウイルス除去は、結合/溶出モードにおけるウイルス溶出プロファイルから予測できた。結合/溶出モードにおける測定結果から、オーバーロードモードにおけるウイルス除去能は、pH に影響を受けず、堅牢であること、また緩衝液種に影響を受けないことが推測された。

オーバーロードモードは、結合/溶出モードよりも 20 倍以上負荷量が多いにもかかわらず、結合/溶出モードと同等のウイルス除去能を有していた。本研究において、CEX クロマトグラフィーのオーバーロードモードがウイルス除去能を有するこ

とが明らかとなったことから、HMWS、HCP 及びウイルスを含む抗体中の主な不純物は全てオーバーロードモードでの CEX クロマトグラフィーの単一工程で除去できる可能性が示された。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。

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について検討した。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 領域上の抗体表面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と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。この AEX 膜吸着体は、抗体の表面電荷分布にかかわらず同じ標準的なクロマトグラフィー条件下で精製できるため、プロセス開発に有用であると期待される。

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樹脂等の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

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。

4.2 論文および学会発表

関連論文

Masuda Y, Tsuda M, Hashikawa-Muto C, Takahashi Y, Nonaka K, Wakamatsu K, “Cation exchange chromatography performed in overloaded mode is effective in removing viruses during the manufacturing of monoclonal antibodies”, *Biotechnology Progress*, 35, e2858 (2019).

Masuda Y, Ogino Y, Yamaichi K, Takahashi Y, Nonaka K, Wakamatsu K, “The prevention of an anomalous chromatographic behavior and the resulting successful removal of viruses from monoclonal antibody with an asymmetric charge distribution by using a membrane adsorber in highly efficient, anion-exchange chromatography in flow-through mode”, *Biotechnology Progress* (DOI 10.1002/btpr.2955)

参考論文

Furukawa K, Okuno K, Onai S, Sugimura K, Yoko-o Y, Ishibashi-Masuda Y, Oshima T, Tsuruoka N, Magota K, Tanaka S, Ohsuye K, “Production of an α -amidating enzyme (α -AE) in recombinant CHO cells”, *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 5, 493-499 (1993)

特許

「遺伝子組換えポリペプチドの生産における副生成物の生成を抑制する方法」、
特許第 4143300 号、登録日 平成 20 年 6 月 20 日、籾田 雅之、澤野 俊博、
増田 由美子、大末 和廣

刊行物

CTD-第2部 (モジュール2) : 品質に関する概括資料のモックアップ (記載例)
—抗体医薬品を対象としたモジュール2.3 モックアップ (記載例)—及びその英
訳版、公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団 バイオ医薬検討ワーキ
ンググループ、赤津 裕一、五十嵐 柳子、石田 誠司、大内 和枝、大村
武史、久保寺 美典、瀬川 雅司、高塚 慎也、田中 祥吾、永岩 耕太、中
澤 秀夫、野沢 由子、増田 由美子、三上 忠、村上 公基、柳田 哲博、
2018年5月

学会発表 (口頭発表)

“Meeting Planova™ and Selecting BioEX for Our Monoclonal Antibody Manufacturing
Process” (Asahi Kasei Bioprocess)

- The 21st PLANOVA™ WORKSHOP, 2018/10/11-12, San Francisco
- PLANOVA™ SEMINAR 2019 CHINA, 2019/4/11-12, Hangzhou
- PLANOVA™ SEMINAR in TOKYO, 2019/7/2, Tokyo

「抗体医薬品のウイルスクリアランス」(招待講演)

特別公開セミナー 医薬品のウイルス安全性評価 (ViSpot 株式会社)、2019年7
月26日、神戸

4.3 謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、終始御指導御鞭撻賜りました群馬大学大学院理工学府 若松馨教授に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、貴重な通学の機会をくださり、終始多大なご支援をいただきました第一三共株式会社 バイオロジクス本部 簗田雅之本部長、同社バイオ医薬研究所 野中浩一所長に深謝いたします。

本研究を行うにあたり、常に適確なご助言とご指導をいただきました同社、松岡達司博士、矢田友一博士に心から感謝いたします。

適確な助言と多くの激励をいただきました同社バイオ医薬研究所第三グループ 高橋裕介グループ長をはじめとする一緒に研究を行った第三グループの皆様に感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり終始私を支えてくれた家族に心から感謝いたします。