

氏 名	らくとんどらづあう はいんぐまうり みしえる
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1 0 5 7 号
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学 位 論 文 題 目	Study on mass transfer and binding characteristics of therapeutic proteins on polymer-based chromatographic resins (ポリマー系クロマトグラフィ担体におけるバイオ医薬品の物質移動および吸着特性に関する研究)
審 査 委 員	(主査)准教授 熊田陽一 教授 堀内淳一 教授 亀井加恵子 教授 麻生祐司

論文内容の要旨

クロマトグラフィは、温和な条件で高効率な分離が可能であり、抗体医薬を始めとした多様なバイオ医薬品の分離精製プロセスにおいて広く利用されている。特に、タンパク質医薬品の製造プロセスでは、プロセスの効率化のためにクロマトグラフィ担体の高い吸着容量、選択性、液流動性が要求される。

従来、タンパク質を分離対象とした各種クロマトグラフィには、アガロースなどの多糖類を基本骨格としたクロマト担体が利用されてきた。これらの天然高分子材料は、耐圧性に乏しく、細孔径もタンパク質の分子サイズに対して最適化されておらず、特に高流速域での分離操作において、十分な動的吸着容量ならびに分離度を得ることは困難であった。本研究では、上記課題を克服するために 2 種類の合成高分子由来クロマトグラフィ担体のタンパク質吸着特性、物質移動特性、ならびに高流速域におけるクロマトグラフィ分離特性を明らかにするとともに、当該クロマト担体のバイオ医薬品製造プロセスにおける利用可能性についてまとめている。本論文は、6 章で構成されている。

第 1 章では、抗体医薬をはじめとしたバイオ医薬品の物理化学的特徴、製造プロセス（上流プロセスならびに下流プロセス）、さらには下流プロセスにおけるクロマトグラフィ操作の役割について記述している。また、クロマトグラフィ担体の物理化学的特性を研究する意義、最近の研究動向、それに対する学位申請者の着目点と本研究の目的について記述している。

第 2 章では、タンパク質クロマトグラフィの理論について記述している。クロマトグラフィ担体の機械的強度、吸着特性、液流動性、細孔径、空隙率などの物理化学的特性を評価するための手法ならびにそれらの理論についてまとめている。さらに、動的吸着容量、分離度、HETP などクロマトグラフィ担体の性能を評価するための手法ならびに理論についてまとめられている。

第 3 章では、貫通孔を有する新規エポキシ系クロマトグラフィ担体 MPR のイオン交換クロマトグラフィへの利用可能性についてまとめている。陰イオン交換担体 MPR-Q は、ポリマーモノリ

ス由来の粒子内貫通孔を有することから、従来のクロマトグラフィ担体と比較して、高流速域における圧力損失が十分に低く、バイオ医薬品的高速分離が可能であることを明らかにした。さらに、iSEC 解析の結果、MPR-Q の平均細孔径は、従来のクロマトグラフィ担体と比較して 2 倍以上大きく、粒子内における物質移動抵抗が極めて小さいことを実証した。さらに、ヒト IgG をターゲットとした MPR-Q の静的吸着容量は、市販のクロマトグラフィ担体と比較して低い一方で、高流速域における HETP、動的吸着容量、分離度は、いずれも市販クロマトグラフィ担体を大きく凌駕する結果が得られた。以上の結果より、上述の MPR 担体ならびに陰イオン交換体 MPR-Q は、ヒト抗体を始めとしたバイオ医薬品的高速分離に有用であることを明らかにした。

第 4 章では、メタクリル系クロマトグラフィ担体 BP の静的吸着容量と物質移動抵抗の関係について詳細に研究を行った。特に、当該担体の表面をデキストランで修飾するとともに、導入したデキストランの分子量と吸着容量および物質移動抵抗の関係を明らかにした。BP の粒子表面をデキストランで修飾することで、ヒト IgG の静的吸着容量を市販のクロマトグラフィ担体と同等レベル、もしくはそれ以上まで向上させることに成功した。さらに、デキストランの分子量を調節することで、静的吸着容量のみならず、細孔径、比表面積、物質移動抵抗などのパラメータを制御可能であることを見出した。その結果、分子量 60kDa のデキストランを導入した BP60-Q は、市販のクロマト担体と同等の静的吸着容量を保持しつつ、幅広い流速域において物質移動抵抗を大幅に低減できることを見出した。以上の結果より、メタクリル系クロマトグラフィ担体の吸着容量ならびに物質移動特性を制御可能な方法論を示すとともに、当該クロマトグラフィ担体のバイオプロセスにおける有用性を明らかにした。

第 5 章では、クロマトグラフィ担体に固定化するアフィニティリガンドのスクリーニング方法論について研究を行った。特に、オンデマンドなアフィニティクロマトグラフィプロセスの開発を目指し、任意のターゲット分子に利用可能なウサギ単鎖抗体 (scFv) のスクリーニング戦略、さらには、クロマトグラフィ担体への高密度固定について詳細に研究を行い、ウサギ scFv 固定化カラムの利用可能性について検証した。その結果、分離対象となるターゲットタンパク質に対して高い選択性・親和性・残存活性を有するウサギ scFv を単離することに成功し、更に、これをクロマトグラフィ担体に固定化することでアフィニティクロマトグラフィの実施が可能であった。特に、10%ウシ胎児血清を含む培地中からも選択的にターゲット分子を回収可能であった。以上のことから、ウサギ scFv をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィのバイオプロセスにおける利用可能性を明らかにした。

第 6 章は総括であり、第 3 章～第 5 章で得られた成果を基に、本学位論文がバイオ医薬品生産におけるクロマトグラフィ分離プロセスの課題解決ならびに利用範囲の拡大に大きく貢献したことを述べるとともに、今後の課題についても記述している。

論文審査の結果の要旨

クロマトグラフィは、抗体医薬を始めとした多様なバイオ医薬品の分離精製プロセスにおいて広く利用されている。特に、プロセスの更なる効率化のためにクロマトグラフィ担体の高い吸着容量、選択性、液流動性への要求が高く要求されている。

本学位論文では、2 種類の新規合成高分子由来クロマトグラフィ担体に対し、抗体医薬の吸着特

性、物質移動特性、クロマトグラフィ分離特性を明らかにするとともに、細孔径と操作条件を最適化することで高流速域における精密かつ高効率な分離が可能であることを明らかにした。また、新規アフィニティリガンドとして期待されるウサギ scFv のスクリーニング方法論を確立するとともに、本リガンドのアフィニティクロマトグラフィへの利用を明らかにした。本学位論文では、バイオ医薬品製造におけるクロマトグラフィ分離の重要性ならびに最近の研究動向（第 1 章）、タンパク質のクロマトグラフィ分離の理論（第 2 章）、ヒト IgG の分離精製を目指したエポキシ系クロマト粒子の吸着特性解析（第 3 章）、デキストラン導入によるメタクリル系クロマトグラフィ担体の比表面積制御（第 4 章）、ヒト IgG のアフィニティ精製を目指したウサギ単鎖抗体の開発（第 5 章）について述べている。これらの成果に基づき、以下の点において研究の独自性・新規性という観点から大きな意義があると判断した。

第 1 に、貫通孔を有する新規エポキシ系クロマトグラフィ担体の吸着特性を明らかにするとともに、高流速域において高効率なヒト IgG の分離が可能であることを明らかにした。

第 2 に、メタクリル系クロマトグラフィ担体にデキストランを修飾することで、細孔内における物質移動速度を制御可能であり、デキストラン鎖長と操作条件と最適化によってヒト抗体の分離に最適なクロマトグラフィプロセスを構築可能であることを明らかにした。

第 3 に、ウサギ単鎖抗体の高効率かつ実践的なスクリーニング方法論を確立し、単鎖抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィによるバイオ医薬品の分離が可能であることを証明した。

なお、本学位論文は、査読制度のある学術雑誌に掲載済みおよび掲載予定の以下の論文 3 編を基礎としており、2 報は申請者が筆頭著者、1 報は申請者が第二著者である。

学位論文の基礎となった学術論文

[1] **Haingomaholy Michelle RAKOTONDRAVAO**, Norio ISHIZUKA, Keita SAKAKIBARA, Ryota WADA, Emi ICHIHASHI, Ryosuke TAKAHASHI, Takatomo TAKAI, Jun-Ichi HORIUCHI, Yoichi KUMADA, Characterization of a macroporous epoxy polymer-based resin for ion-exchange chromatography of therapeutic proteins, *Journal of Chromatography A*, 1656, 462503-462510 (2021)

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462503>

[2] **Haingomaholy Michelle RAKOTONDRAVAO**, Ryosuke TAKAHASHI, Takatomo TAKAI, Yumiko SAKODA, Jun-Ichi HORIUCHI, Yoichi KUMADA, Control of accessible surface area and height equivalent to a theoretical plate by grafted dextran during anion-exchange chromatography of therapeutic proteins, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, in press

[3] Yoichi KUMADA, **Haingomaholy Michelle RAKOTONDRAVAO**, Yuya HASEGAWA, Yuki IWASHITA, Hiromichi OKURA, Seiichi UCHIMURA, Jun-Ichi HORIUCHI, Strategies for selection and identification of rabbit single-chain Fv antibodies as ligand in affinity chromatography, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.06.002>