



Title	蛋白質医薬品のマイクロフィルトレーションのろ過挙動予測
Author(s)	井上, 航太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98764
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（井上航太）	
論文題名	蛋白質医薬品のマイクロフィルトレーションのろ過挙動予測
論文内容の要旨	
第1章 序論 蛋白質医薬品の製造において、微生物汚染のリスクを低減するために、マイクロフィルトレーション (MF) が1回の製造中に何度も実施される。MFのスケールアップには、 V_{max} 試験と呼ばれる実績のある手法が用いられているが、製造では依然として、予期しないフィルター閉塞が起こることがある。本研究では、MFフィルターのろ過性を決定づける重要な要素である負荷量依存的なろ過速度低下とろ過初速度に影響する要因を特定し、ろ過試験を実施することなく、そのサンプルの状態からろ過挙動を予測することを目指した。	
第2章 MF閉塞挙動の予測モデルの構築 モデルビーズを用いて、各サイズの粒子がMFろ過速度低下に負荷量依存的にどの程度寄与するかを解析した。孔径が0.5/0.2 μm の2層構造になったポリエーテルスルホン (PES) 製のMFフィルターでは直径2 μm 以下のビーズがフィルター閉塞を引き起こすことを特定した。また、直径200 nm以下のビーズは、同一の直径でもビーズとバッファーの組み合わせに依って閉塞挙動が異なり、粒子の表面特性が影響することが示唆された。そこで、蛋白質凝集体とビーズのゼータ電位を測定し、蛋白質凝集体とできるだけ表面特性が近いビーズとバッファーの組み合わせを決定した。これらの各サイズの粒子のろ過データに閉塞モデル式をフィッティングし、得られたサイズ別の閉塞モデル式のろ過液量を閉塞挙動を予測したいサンプル中の200 nm, 500 nm, 1 μm , 2 μm の各粒子濃度から粒子負荷量として補正した。サンプルはこれらの粒子の混合物であり、各サイズについて予測された正規化した流束を掛け合わせ、MF閉塞挙動の予測とした。ビーズと蛋白質凝集体では、粒子とフィルター基材の相互作用やフィルター内部での粒子間相互作用などに違いがあるため、これら違いを補正する補正係数を閉塞モデル式に導入することで、蛋白質溶液のろ過挙動を表現できた。さらに、この方法で予測した閉塞挙動からろ過試験で得られる V_{max} の値を精度良く予測できた。このアプローチは、複数種類の抗体やFc融合蛋白質の閉塞挙動の予測に適用でき、また、孔径0.22 μm のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 製のMFフィルターでも、閉塞挙動及び V_{max} を予測することができたことから、蛋白質溶液のろ過に一般的に用いられるさまざまなMFフィルターに対して、適用できうると考えられた。	
第3章 MFろ過初速度予測法の構築 ハーゲン・ポアズイユの法則から、ろ過初速度と粘度には反比例の関係が成り立つと考えられた。そこで、異なる粘度を持つトレハロース水溶液を用いて、サンプルの粘度とろ過初速度の関係式を作成し蛋白質溶液やバッファーの粘度からサンプルのろ過初速度を予測できることを実証した。本アプローチは、第2章で用いた材質及び内部構造の異なる2種類のMFフィルターに適用できており、他のMFフィルターに対しても、適用できうると考えられた。	
第4章 総括 第2章と第3章でMFのろ過挙動を理解する上で重要な閉塞挙動とろ過初速度を予測することができた。予測には、サンプル中のサブミクロンからミクロンサイズの粒子濃度とサンプルの粘度の情報があれば、数百 μL のサンプルでこれらは測定可能であり、サンプル量が限られる製法開発の初期やMF閉塞の原因究明などに、本研究で確立した予測モデルが活用できることが期待される。また、本研究で同一のストレス条件で生じる凝集体のサイズ・量のプロファイルが抗体毎に違いがあることが示された。すなわち、抗体によって、凝集体生成の要因となるストレスへの感受性が異なるものと考えられた。この知見は、蛋白質医薬品の製法のみならず、創薬研究の段階においても有用であり、特定のストレス条件下におけるサブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体の生成傾向を基に、より製造可能性 (Manufacturability) の高い蛋白質医薬品の開発候補品の選定できる可能性も示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (井上 航太)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	内山 進
	副査 教授	大政 健史
	副査 教授	本田 孝祐

論文審査の結果の要旨

蛋白質医薬品の製造において、微生物汚染のリスクを低減するために、マイクロフィルトレーション (MF) が1回の製造中に何度も実施される。MFのスケールアップには、 V_{max} 試験と呼ばれる実績のある手法が用いられているが、製造では依然として、予期しないフィルター閉塞が起こることがしばしばある。そこで本博士論文の研究は、MFフィルターのろ過性を決定づける重要な要素である負荷量依存的なろ過速度低下とろ過初速度に影響する要因を特定し、ろ過試験を実施することなく、そのサンプルの状態からろ過挙動を予測することを目的としている。本研究では、はじめにモデルビーズを用いて、各サイズの粒子がMFのろ過速度低下に負荷量依存的にどの程度寄与するのか解析を行っている。孔径が0.5/0.2 μmの2層構造になったポリエーテルスルホン (PES) 製のMFフィルターでは、直径2 μm以下のビーズがフィルター閉塞を引き起こすことを特定している。また、直径200 nm以下のビーズは、同一の直径でも、ビーズとバッファーの組み合わせに依って閉塞挙動が異なり、粒子の表面特性が影響することが示唆されている。そこで、蛋白質凝集体とビーズのゼータ電位を測定し、蛋白質凝集体とできるだけ表面特性が近いビーズとバッファーの組み合わせを決定している。これらの各サイズの粒子のろ過データに閉塞モデル式をフィッティングし、得られたサイズ別の閉塞モデル式のろ過液量を、閉塞挙動を予測したいサンプルに実際に含まれている200 nm, 500 nm, 1 μm, 2 μmの各粒子濃度を用いて、粒子負荷量として補正することで、各サイズの粒子が粒子負荷量に応じて、どのようにろ過速度を低下されるかを計算している。実際の蛋白質溶液はこれらの粒子の混合物であるため、本研究では、先の方法で予測されるサイズ毎の正規化された流束を掛け合わせることで、これらの混合物であるサンプルのMF閉塞挙動の予測できないかと仮説を立て、検証している。ビーズと蛋白質凝集体では、粒子とフィルター基材の相互作用やフィルター内部での粒子間相互作用などに違いがあるため、これら違いを補正する補正係数を閉塞モデル式に導入することで、蛋白質溶液のろ過挙動を表現することに成功している。さらに、この方法で予測される閉塞挙動から、ろ過試験の結果から外挿することで得られる単位フィルター面積当たりの最大ろ過液量である V_{max} (L/m²) 値も精度良く予測することに成功している。このアプローチは、複数種類の抗体やFc融合蛋白質の閉塞挙動の予測に適用できており、また、孔径0.22 μmのポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 製のMFフィルターでも同様に閉塞挙動及び V_{max} の予測できることから、蛋白質溶液のろ過に一般的に用いられるさまざまなMFフィルターに対して、広く適用できる方法論であると考えられる。

次に、本研究はろ過初速度の予測についても方法論の検証を行っている。円管内の層流について成り立つハーゲン・ボアズイユの法則をろ過試験の条件に適用すると、ろ過初速度と粘度には反比例の関係が成り立つと考えられる。そこで、異なる粘度を持つトレハロース水溶液を用いて、サンプルの粘度とろ過初速度の関係式を作成し、蛋白質溶液やバッファーの粘度からサンプルのろ過初速度を予測できることを実証している。これについても、材質及び内部構造の異なる2種類のMFフィルターに適用可能なことを確認しており、前述の閉塞挙動と V_{max} の予測方法と同様に、蛋白質溶液のろ過に一般的に用いられるさまざまなMFフィルターに対して、広く適用できる方法論であると考えられる。

以上より、本博士論文の成果から、蛋白質医薬品の製造において重要であるMF工程のろ過挙動を理解する上で重要な閉塞挙動とろ過初速度を予測することが可能になる。これらの予測には、予測対象の蛋白質溶液中のサブミク

ロンからミクロンサイズの粒子濃度とその溶液の粘度の情報が必要であるが、両者は合計で数百 μL 程度のサンプルがあれば、測定可能であり、サンプル量が限られる製法開発の初期や予期しない MF の閉塞が起きた場合の原因究明などに、本研究で確立された予測モデルが活用できることが期待される。また、本研究での評価で、同一のストレス条件で生じる凝集体のサイズ・量のプロファイルが抗体毎に違いがあることが示されている。すなわち、抗体によって、凝集体生成の要因となるストレスへの感受性が異なるものと考えられる。この知見は、蛋白質医薬品の製造のみならず、創薬研究の段階における開発可能性の評価にも有用であり、たとえば、ストレス条件下におけるサブミクロンからミクロンサイズの蛋白質凝集体の生成傾向を指標に、製造可能性 (Manufacturability) の高い蛋白質医薬品候補の選定が可能となることから、将来的な更なる活用の展開が期待される。以上より本論文は博士論文として価値あるものと認める。