

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(バイオ医薬品の高度製造技術の開発)
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) PEG 化タンパク質や ADCs などのタンパク質薬物複合体の連続的合成反応と精密分離
(英語) Development for Continuous Modification and Separation Processes of
PEGylated Proteins and Antibody Drug Conjugates

研究開発実施期間：平成30年5月21日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 吉本 則子
(英語) Noriko Yoshimoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合・事業部・主任研究員/国立大学法人山口大学・大学院創成科学研究科・准教授
(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Headquarter・Senior Scientist / Yamaguchi University・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation・Associate Professor

II 研究開発の概要

本研究では、医薬品タンパク質の分取あるいは分離精製に用いられるクロマトグラフィーカラムをタンパク質修飾反応の反応器として利用する。すなわち、タンパク質の修飾反応と分離を連続化するクロマトグラフィープロセスの開発を目的として研究を実施した。

対象とするタンパク質修飾反応は、PEG 化および ADC 化とした。PEG 化は両親媒性のポリエチレングリコール鎖をタンパク質分子に付加し、水和半径を増加させることで生体内における半減期を延長することができる。ADC 化は毒性の高い薬物を、標的指向性を有する抗体分子に付加し、目的部位のみに作用し副作用の少ない薬物とする手法である。いずれの修飾反応もタンパク質表面の lysine 残基の ϵ -アミノ基を利用し反応を進行させることができるが、タンパク質表面には複数の lysine 残基が存在するため、目的生成物に加えて副生物が多く生成することが問題となっている。一方、クロマト担体上にタンパク質を吸着させて修飾反応を進行させた場合、タンパク質の吸着面は反応剤から遮蔽され、残りの限定された箇所が修飾を受ける。このため、バルク溶液中と比べて副生物の生成が少なくなるという利点がある。また、反応後の未反応物や生成物の分離も容易に行うことができる。本研究では、これらの利点をもとに、まず PEG 化反応を例として反応操作を行い、プロセスの最適化について検討した。その後、ADC 化への応用についても検討した。

反応・分離操作は汎用性があり堅牢な手法の確立を目指し、主として医薬品タンパク質の分取あるいは分離精製用に使われるイオン交換クロマトグラフィー担体及び一部の精製操作では分析用の疎水性クロマトグラフィー担体を用いた。またクロマトの分離機構に基づき操作条件を決定し、最終的に全自動で連続操作を行うシステムの構築も目指した。タンパク質のクロマトグラフィープロセスはクロマト担体における物質移動に支配される。従来、分取に用いられる多孔性微粒子型クロマト担体は粒子サイズが $100\ \mu\text{m}$ 前後、細孔サイズは $100\ \text{nm}$ 程度であるものが多い。この場合、タンパク質サイズが $10\ \text{nm}$ を超えると細孔内における拡散抵抗が大きく粒子内部の吸着反応場を十分に利用することができない。また修飾剤となる PEG も分子量が数 1000 を超えると同様に細孔内部に浸透することは難しい。このため反応操作の最適化においては、反応時間・反応温度・タンパク質濃度・PEG 濃度について次の条件検討を行った。アミノ基の修飾反応で用いる PEG は NHS 基を活性化基として有している。中性からアルカリ性の条件では、水溶媒中で PEG-NHS が速やかに加水分解されタンパク質反応収率が低下する。このため、 4°C から 30°C における PEG-NHS の半減期を測定し、修飾反応の反応時間を設定した。タンパク質は lysozyme をモデルタンパク質として用い、イオン交換担体は粒子径が $34\ \mu\text{m}$ の陽イオン交換担体を用いた。反応溶媒条件 ($\text{pH}7$ 、 $30\ \text{mM NaCl}$) におけるカラム吸着実験より吸着密度 C_s [$\text{mg/mL}_{\text{gel}}$] を決定し、PEG の溶液濃度はモル比でその 7 倍となるように設定した。カラム内におけるタンパク質の吸着体積は供給タンパク質量を C_s で割ることで算出し、PEG 溶液のカラム通液速度はタンパク質吸着体積を反応時間で割ったものとした。PEG 溶液はカラム体積以上のものを使用し、一部がカラム出口まで到達した時点を UV 検出器で確認し、その後に流量を前述の通液速度に設定した。反応時間経過後はカラム内に残存する PEG 溶液を洗い出し、その後に生成物の分離を行った。各条件で反応を比較した結果、温度が高い方が収率は向上したが、恒温が不要という点を考慮して、反応操作条件は、温度は 25°C 、時間は 2 時間と設定した。また、いずれの条件においてもカラムにおける反応では液相反応で生成する di-PEG 体 (PEG 鎖が 2 本修飾された PEG 化タンパク質) の生成はほとんどなく、mono-PEG 体の 1 つが優先的に生成していることが確認できた。

生成物の分離は、塩濃度勾配溶出法により行い、PEG 化タンパク質を用いて分離操作条件の決定を行った。塩濃度勾配溶出法では、吸着タンパク質の溶出保持体積は吸着サイト数 B に規定される分配係数 $K (=A \cdot I_R^{-B})$ (相互作用の強さ)、 A は比例定数、 I_R は移動相塩濃度) によって決まる。PEG 化タンパク質の吸着サイト数の値は未修飾のタンパク質と変わらない。このため、未反応のタンパク質の吸着サイト数を決定する実験を事前に行い、その値を利用することで PEG 化タンパク質の分配係数を決定しピーク溶出体積を求めた。また、溶出ピークの幅は、多孔性粒子の場合は細孔内における拡散係数の関数となり、さらに拡散係数は溶質の分子種によらず水和半径に依存する。このため、PEG 化タンパク質と未修飾タンパク質の水和半径を動的光散乱法により決定し、多孔性担体における未修飾のタンパク質の溶出ピークをもとに PEG 化タンパク質の溶出ピークの幅を決定した。カラム出口に回収バルブを設け、決定した溶出体積と溶出ピークの幅をもとにバルブ切り替え時間を決定し、それぞれの PEG 化生成物、未反応タンパク質の回収を全自動で行った。

さらに、反応収率を向上される方法として、未反応のタンパク質を次の反応にリサイクルする操作を追加した。未反応タンパク質は回収段階において塩とともに溶出している。PEG 化反応では塩は反応収率を低下させ、吸着を阻害するため、リサイクルしたタンパク質を利用するためには塩の除去操作が必須となる。このため、予め大量の溶媒を貯めたカラムにリサイクルタンパク質を回収し、その中で塩の希釈操作を行う方法と、脱塩カラムを通過させタンパク質のみを回収する方法の 2 つの方法を検討した。いずれの方法でも塩の除去は可能であり、 2 サイクル目の反応を 1 サイクル目の反応と同じ収率で実施できることを確認した。これに基づき、このリサイクル操作と、上記で設定した反応分離操作条件を連続化し積算として反応収率を向上するプロセスを実施した。プロセスの全操作時間は PEG の 4°C での半減期である約 10 時間に設定し、 2 時間の反応分離操作サイクルを 4 回全自動で連続化した。PEG は反応器であるカラムに到達するまでに 25°C で恒温するように設定した。その結果、連続サイクルでの反応分離操作により最終的な積算収率は 70% まで

向上し、選択性も 80% の高い値を維持することが可能であった。従来の液相反応では副生物が多く PEG 鎖修飾数の少ない修飾体を高い収率で得ることが困難であったが、カラム反応操作を連続化することにより収率の高い選択的修飾反応操作を達成することができた。また、以上のクロマトグラフィーカラムを用いたタンパク質修飾反応と分離プロセスは、全ての操作を流通型の操作方法としており単一のクロマトグラフィーシステムのみで全自動で連続的に実施され、反応開始後の手動操作が不要である。

ADC 化の反応の検討では、修飾薬剤として NHS 基あるいはマレイミド基を活性化基として有するピレン、クマリン、FITC をモデルとして用いた。また、被修飾タンパク質として lysozyme、BSA、ヒト化モノクローナル抗体を用いた。Lysozyme や BSA をモデル薬物で修飾した修飾体を分取用の粒子径が $34\ \mu\text{m}$ の陽イオン交換担体あるいは陰イオン交換担体で分離した場合、修飾薬物の数が多いほど溶出は早くなった。ただし、BSA についてはカラムに強く保持される修飾体の存在が確認され、修飾剤を核としたタンパク質の二量化が起こっている可能性が示唆された。また、カラムを用いた修飾反応操作を、lysozyme と陽イオン交換担体を用いて実施したところ、修飾数の少ない修飾体が選択的に生成することを確認することができた。

ヒト化モノクローナル抗体のモデル薬物修飾体の分離も同様に分取用の陽イオン交換担体、陰イオン交換担体を用いて実施したが分離は不可能であった。また $10\ \mu\text{m}$ の分析用イオン交換担体を用いたが分離は不可能であった。このため、静電的相互作用の違いで分離を実施するのは不可能と判断し、 $10\ \mu\text{m}$ の分析用疎水クロマト担体を用いて分離を実施した。その結果、疎水クロマト担体では未反応の抗体が一番初めに溶出され、薬物の種類や修飾部位によらず薬物修飾数の多いものほど担体に強く保持されるため薬物修飾数に応じてカラムから溶出し、修飾体の分離が可能となることを明らかにした。

疎水クロマト担体における分配係数は溶媒中の塩濃度に依存した溶解度で記述することが可能であり、修飾タンパク質は一連の塩濃度勾配溶出実験において規則的な溶出挙動を示すことを見出した。これらの規則性を基に分配係数を塩濃度の関数として設定できれば、さまざまな塩濃度勾配条件あるいは一定の塩濃度条件での溶出時間(体積)を算出することができ、算出結果に基づき分離操作条件を合理的に決定することが可能となる。

さらに、カラムを用いたヒト化モノクローナル抗体の修飾反応も検討した。疎水担体では修飾剤の吸着が起こるため陽イオン交換担体を利用して修飾反応を実施し、反応物の分析は疎水担体を用いて行った。このため、反応後に分析用の移動相溶媒に置換し、さらに濃縮する前処理操作を行っている。反応操作時の pH を 5.5 から 6.5 で検討した結果、いずれも反応収率がバルク溶液中よりも低下したが、pH 5.5 の条件で修飾体の数が僅かに減少する傾向が示唆された。今後、修飾反応前後の前処理操作の最適化と修飾体の分取が可能な疎水担体の探索等の詳細な検討が必要ではあるが、本研究で得られた結果は、イオン交換担体と関連のモデル解析を応用することにより、選択性が高く連続操作が可能な抗体-薬物修飾反応プロセスを構築できることを実証するものである。

The purpose of this study was the development of continuous chromatography processes consisting of the modification and purification steps for biopharmaceutical proteins with chromatography columns.

In the present work, PEGylation reactions and antibody drug conjugation (ADC) were examined. PEGylation, which can cause the increase in the hydrodynamic radius of biomolecules, is one of the promising methods for achieving prolonged half-life of the biomolecules in vivo. ADC means the conjugation reaction of a highly toxic drug to an antibody to induce its effect only on a target site with few side effects. Both modification reactions utilize ϵ -amino groups of the lysine residues being distributed on the protein surface. However, these reactions yield several by-products because multiple lysine residues on the protein surface are

accessible to the reactants in bulk phase. On the other hand, in the case of the proteins adsorbed on the chromatographic resin, their molecular surface is partly shielded from the reactants in bulk phase, which may be favorable to induce the site-specific modification of proteins. Therefore, this solid phase reaction has an advantage that can reduce the by-product. In addition, unreacted products can be easily separated by the flow-through separation of the chromatography. Based on these advantages, we first examined the process optimization with respect to the PEGylation reaction of model proteins. Furthermore, the application of the chromatographic operation to ADC conversion was also examined.

We also aimed to establish a versatile and robust process for the continuous reaction and separation operation producing modified proteins with high purity. Therefore, the chromatographic resin used was mainly an ion exchange chromatography carrier being widely used in the downstream process of pharmaceuticals. A hydrophobic chromatography column for analysis was used in the separation of ADCs. These processes were designed based on the chromatographic separation mechanism to perform continuous and automated operation.

The chromatography process is governed by mass transfer in the stationary phase. In the conventional porous chromatographic resins with a diameter of about 100 μm and a pore size of about 100 nm, the diffusion resistance of a protein in the pores can become too large to utilize the inner surface area of the particles. Further, PEG as a modifier also has difficulty in penetrating into the pores when its molecular weight exceeds several thousand. Therefore, in optimizing the reaction operation, the following conditions were examined; time, temperature, concentrations and ratio of protein and PEG. The PEG possessing an NHS group as an activating group can be conjugated to the amino groups of proteins. Under neutral to alkaline conditions, PEG-NHS is rapidly hydrolyzed in an aqueous solvent, causing the reduction in the protein reaction yield. Therefore, the reaction time of the modification was set at the half-life of PEG-NHS at 4 to 30 ° C. As a model protein, lysozyme was used. As a chromatography resin, a cation exchange carrier having a particle size of 34 μm was used. The adsorption density C_s [mg / mL_{gel}] was determined on the basis of a column adsorption experiment under reaction solvent conditions (pH 7, 30 mM NaCl). The concentration of PEG was set to be 7 times larger than that of protein. The protein adsorption volume in the column was calculated by dividing the amount of protein supplied by C_s . The flow rate of the PEG solution was calculated by dividing the protein adsorption volume by the reaction time. A PEG solution having a volume larger than the column volume was used. When the top of the solution reached the outlet of the column being monitored by a UV detector, the flow rate was set to the above-mentioned flow rate to start the column reaction. After the reaction, the PEG solution remaining in the column was washed out, and then the product was separated by the linear salt gradient method. The reaction yield improved at high temperatures. However, the room temperature was employed because of the easiness of temperature control for the reaction. The reaction time was set as 2 hours. In addition, under any conditions in the column, there was almost no formation of di-PEG (PEGylated protein in which two PEG chains were modified), whereas di-PEG was formed in the bulk solution. Furthermore, the selectivity for the formation of one of the mono-PEG forms was high in the solid phase reaction.

The operation conditions of the linear salt gradient elution method were determined by the

partition coefficient K ($= A \cdot I_R^{-B}$ (strength of interaction), A is a proportionality constant, I_R is a mobile phase salt concentration, which is defined by the number of adsorption sites B). The value of the number of adsorption sites of the protein was practically unchanged by the PEGylation reaction, which was used to determine the value of K . The elution volume of each solute was determined on the basis of the diffusion characteristics of PEGylated proteins within the resin. The electronic valve was introduced at the end of the column to fractionate the PEGylated proteins and unreacted proteins automatically based on K and the elution volume.

Furthermore, recycling unreacted proteins in the next reaction was performed to improve the overall reaction yield. The salt in the elution of unreacted protein was diluted by a tank or by the desalting column with the flow-through method. The conditions for the recycling, reaction and separation operation were integrated to improve the reaction yield and overall processing time. The integrated process consisting of the reaction, purification and recycle steps mentioned above was set to about 10 hours in the total operating time, which corresponded to the half-life of PEG at 4 ° C in order to perform the 4 cycles of 2-hour reaction/separation operation continuously and fully automatically. The PEG was pre-incubated at a constant temperature (25 ° C) before reaching the reactor column. As a result, the final integrated yield was improved to 70% with the above automated operation, and the selectivity of the reaction could be maintained at a high value of 80%.

In the ADC reaction, pyrene, coumarin and FITC having an NHS group or a maleimide group as activating sites were used as models of payload. Lysozyme, BSA, and humanized monoclonal antibody were used as model proteins. The drug conjugate of lysozyme or BSA could be separated by a cation exchange carrier or an anion exchange one possessing a particle size of 34 μ m for preparative use. The elution volume of modified proteins became smaller with increasing the number of the drugs being conjugated to a protein molecule. However, for BSA, aggregates of conjugates strongly retained in the column, suggesting that protein dimerization occurred with the modifier as the nucleus. Moreover, when the modification reaction operation using the column was carried out with respect to lysozyme with a cation exchange column, one of the conjugates was selectively formed. Separation of the humanized monoclonal antibody conjugate could not be achieved by the ion exchange column. Therefore, the hydrophobic chromatographic column was used to separate them, where the unreacted antibody was eluted first, and then, the conjugates were eluted depending on the number of drugs conjugated.

The partition coefficient of these conjugates in the hydrophobic chromatography column can be described by the solubility depending on the salt concentration in the solvent. The modified proteins exhibited the salt gradient-dependent elution behavior in a series of elution experiments. If the partition coefficient can be set as a function of salinity based on these regularities, the elution time (volume) under various salinity gradient conditions or constant salinity conditions can be predicted by calculation, and the separation operation is performed based on the calculation results. This means that the separation conditions could be optimized based on the above theoretical calculation.

The column reaction of the ADC using the cation exchange column was also examined. The reaction product was analyzed using the hydrophobic carrier. After the reaction, therefore, the solvent needed to be replaced with a mobile phase for the analysis, and a pretreatment

operation was also necessary to concentrate the products. Based on the results of the reactions at the pH values from 5.5 to 6.5, although the reaction yield was lower than that in the bulk solution, the number of modified products tended to decrease slightly at the pH value of 5.5. Although the further detailed studies such as optimizing the pretreatment operation before and after the modification reaction are required, all of the results obtained in this work demonstrate that the highly selective and continuous process for the production of antibody-drug conjugates can be developed using the ion-exchange chromatography columns and on the basis of the relevant model analysis.