

博士論文

抗体製造プロセスにおける
旋光度利用による抗体濃度モニタリング

**(Antibody concentration monitoring by optical rotation
for monoclonal antibody manufacturing processes)**

2024 年 4 月

山口大学大学院創成科学研究科ライフサイエンス系専攻

稲葉 英憲

目次

学位論文要旨	3
第1章 緒言	9
第2章 タンパク質定量方法	
2-1. 緒言	14
2-2. 一般的なタンパク質の定量方法	14
2-3. HPLC 法	17
2-4. 小括	18
第3章 旋光度を用いた抗体濃度測定	
3-1. 緒言	20
3-2. 実験	20
3-3. 結果及び考察	21
3-3-1. 旋光度と A280 法の検量線比較	21
3-3-2. 抗体溶液の旋光度測定	22
3-3-3. 各種タンパク溶液の旋光度測定	24
3-3-4. クロマト工程溶出液を用いた添加回収試験	25
3-3-5. 培養液濃度測定への適用	26
3-4. 小括	29
第4章 旋光度を用いたインラインモニタリング手法の開発	
4-1. 緒言	30
4-2. 実験	30
4-3. 結果及び考察	31
4-3-1. 旋光度フローセルの検量線と滞留分布曲線の解析	31
4-3-2. UF 濃縮工程における抗体濃度の連続モニタリング	36
4-4. 小括	38

第 5 章 参考文献	39
第 6 章 総括	43
発表論文リスト	45
略語表	47
謝辞	49

学位論文要旨

抗体の製造プロセスは、細胞を用いて抗体を生産する培養工程と生産した抗体を不純物から分離・精製して高品質な医薬品として取得する精製工程で構成されている。さらに、培養工程は細胞を増加させる複数の種培養工程と細胞を増加させながら抗体を生産する生産培養工程、精製工程は細胞の除去/清澄化、複数のクロマトグラフィー工程、ウイルス不活性化工程、ウイルス濾過工程、濃縮/バッファー交換工程、最終濾過工程と多くの工程で構成されている。

この製造プロセス中における各種パラメータのモニタリングはプロセスの安定化へ非常に重要であり、オフライン、アットライン、オンライン、インラインといった各手法によりモニタリングがなされている。オフラインとアットラインは、製造プロセスから採取したサンプルを持ち運び分析する手法であり、分析機器が製造プロセスから遠隔している場合をオフライン、近接している場合をアットラインと呼ぶ。オンラインは自動的にサンプリングを行い製造プロセスに近接した機器で分析を行う手法、インラインは製造プロセス中に分析センサーを組み込み分析する手法である。

上記のような抗体の製造プロセスにおいて、生成物である抗体の濃度は非常に重要なパラメータとなっている。抗体濃度をモニタリングするための標準的な方法は 280 nm での紫外線吸収法 (A280 法) であるが、一般的な光路長 1cm のセルを用いた分光光度計では測定できる抗体濃度は 2 g/L 以下といった低濃度の範囲に限られている。

近年では細胞培養プロセスと細胞工学技術の進化により培養工程における抗体濃度は 10 g/L 程度へ上昇し、精製工程ではさらに高濃度の抗体濃度をモニタリングする必要がある。そのため、製造プロセス中の抗体濃度をインラインでモニタリングすることは容易でなく、一般的な A280 法ではオフラインでの希釈手順が必要となる。また、A280 法には紫外線を吸収する不純物による干渉を受けるといった欠点もあり、例えば、培養上清液中の抗体濃度は、宿主細胞由来のタンパク質や DNA だけでなく、紫外線を吸収する培地成分などが含まれているため、A280 法では直接測定できない。

このような欠点を克服する濃度測定法として、我々は最近、旋光度を利用した抗体濃度の測定法に着目している。旋光度は光が光学活性物質を通過するとき特定の方向に回転する現象であり、その程度は光学活性物質の量に比例する。旋光度はアミノ酸や

糖などの光学活性物質濃度を測定するために使用されているが、タンパク質定量の標準的なメソッドとしては使用されていない。そこで我々は種々の抗体サンプルの濃度測定を実施し、その実用の可能性について検証を行った。

最初に1章では、序論として上記の本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、タンパク質の定量に一般的に使用される方法についてまとめ、タンパク定量法の観点から抗体製造プロセスの濃度モニタリング法を考察した。

第3章では、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価した。その結果、上限は 80 g/L といった高い抗体濃度まで、旋光度は抗体濃度に対して良好な直線性を示した。また、下限となる定量限界は 0.30 g/L と算出され、広範囲の濃度へ適用可能であることが示された。また、各種クロマト工程液を用いた添加回収試験を行い、A280 法と回収率の比較を行った。その結果、回収率の値はいずれも 100% に近く、両者に大きな違いはない結果となった。A280 による濃度測定には適切な希釈が必要であるが、旋光度は直接測定が可能であることから、旋光度法が抗体の精製工程においてみられる高濃度サンプルを直接測定する手法として有望と考えている。

最後に、細胞培養工程中の抗体濃度をモニタリングするために旋光度を適用した。細胞培養バイオリアクターから採取したサンプルを、HPLC 法、旋光度法、および A280 法で分析した。その結果、A280 法による測定値の推移は HPLC で測定された値よりもはるかに高い結果となったが、旋光度は細胞培養液の着色といった不純物の影響を受けにくく、HPLC で測定された抗体濃度推移を良好に表現する結果が得られた。

第4章では、抗体濃度の旋光度によるインラインモニタリングについて実証検討を行った。第3章の細胞培養プロセスにおけるタンパク質濃度のモニタリングでは、サンプルを日にち単位で採取し、オフラインで旋光度の測定を行った。一方、処理時間の短い単位操作に対しては、インラインによるリアルタイムのモニタリングが重要となる。

本検討ではまず、市販の旋光度計セルをフローセルへ改造し、精製工程におけるインラインモニタリングについて実証を行った。5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L 濃度の抗体サン

プルを旋光度フローセルへ順次通液して検量線を作成した結果、旋光度と抗体濃度の間には良好な直線性が観察され、その傾きは第3章のバッチ測定の結果と同様であった。さらに、一連のプラグフロー反応器と連続攪拌タンク反応器を考慮した機構モデルを用いてフローセル系の解析を行った結果、ステップ応答のモデル計算値は実験結果を良好に表現した。さらに、当該モデル計算を用いて、線形増加、ガウス分布、指数増加の入力信号に対するシミュレーションを行い、このモデル計算は特定の単位操作プロセスに対するフローセルの適用性を評価するのに有用であることを確認した。

最後に、限外濾過膜を使用したタンジェンシャルフロー濾過によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い、旋光度のインライン測定を行った。その結果、12 g/L から 69 g/L への濃縮において、旋光度推移は抗体濃度と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度により連続的にモニタリング可能であることを示した。

第 6 章では、結論として本研究によって得られた知見をまとめ、今後の展望や課題を述べた。

Summary of the Doctoral Dissertation

The monoclonal antibody manufacturing process consists of a cell culture process in which antibody is produced and a purification process in which the produced antibody is purified from impurities to obtain high-quality pharmaceuticals. Furthermore, the cell culture process includes multiple seed culture steps to increase the number of cells and a production culture step to produce the antibody. The purification process includes cell removal/clarification, multiple chromatography, virus inactivation, virus filtration, concentration/buffer exchange, and filtration steps. Monitoring of various parameters during the processes is crucial for stable manufacturing, and it is performed by off-line, at-line, on-line, and in-line methods. Off-line and at-line are methods for carrying and analyzing samples taken from the manufacturing process. When the analytical equipment is remote from the manufacturing process, the method is called off-line, and it is called at-line when equipment is close to the manufacturing process. On-line is a method that takes samples and implements analysis automatically near the manufacturing process and in-line is a method that incorporates an analytical sensor into the manufacturing process and implements analysis automatically.

In the antibody manufacturing process as described above, the concentration of the antibody is a very important parameter. The standard method for monitoring antibody concentration is ultraviolet absorption at 280 nm (A280 method), but a spectrophotometer using a typical 1 cm path length cell can only measure low antibody concentration of up to 2 g/L. In recent years, antibody concentrations in the culture process have increased with advances of cell culture processes and cell engineering technology, and the antibody concentration of 10 g/L or higher needs to be monitored in the manufacturing process. Therefore, it is not easy to monitor antibody concentration with in-line method during the manufacturing process. In addition, the A280 method has the disadvantage of being interfered by impurities that absorb ultraviolet rays. For example, the antibody concentration in the culture fluid is affected not only by proteins and DNA derived from host cells but also by medium components that absorb ultraviolet rays.

As a concentration measurement method that overcomes these disadvantages, we recently focus on a method using optical rotation. Optical rotation is a phenomenon in which light rotates in a specific direction when passing through optically active substances. Optical rotation is utilized to measure the concentration of amino acids and sugars, but it is not a standard method for protein concentration measurement.

In Chapter 1, the background, objectives and the structure of this paper are explained.

In Chapter 2, we summarized the methods commonly used for protein concentration measurement and discussed the methods from the perspective of protein monitoring tool in the antibody production process.

In Chapter 3, we evaluated the applicability of optical rotation method to antibody concentration measurement. As a result, the optical rotation showed good linearity with respect to antibody concentration up to a high antibody concentration of 80 g/L. In addition, the lower limit of quantification was calculated to be 0.30 g/L, indicating that optical rotation method is applicable to a wide range of antibody concentration measurement. We also conducted addition/recovery test using various chromatography step samples and compared the recovery rates between optical rotation and A280 methods.

As a result, both recovery rates were close to 100% and there was no significant difference between the two methods. While A280 method requires appropriate dilution, optical rotation can measure the wide range concentration directly. Therefore, the optical rotation method could be considered as a promising method for measuring highly concentrated samples in the antibody purification process. Finally, optical rotation method was applied to the cell culture process. Samples taken from the cell culture bioreactors were analyzed by HPLC, optical rotation and A280 methods. The A280 trend was much higher than HPLC due to impurities having ultraviolet absorbance, but the optical rotation shows similar trend with antibody concentration measured by HPLC.

In Chapter 4, we modified the standard polarimeter cell into a flow cell and demonstrated the in-line monitoring of antibody concentration using optical rotation. In this study, we first confirmed response curves of the in-line flow cell experimentally by monitoring several concentration samples (5, 10, 15, 20 g/L) and created a calibration curve. As a result, good linearity was observed between the antibody concentration and the optical rotation, and the slope was similar with the batch measurements conducted in Chapter 3. Then, we analyzed the response curve by applying the in-line flow cell to a model in which a plug flow reactor and a continuous stirred tank reactor were connected in series. As a result, the numerical calculation result agreed well with the experimental result.

In addition, we verified the model applicability by using different inputs such as a linear increase, a Gaussian distribution curve and an exponential curve. Furthermore, we conduct a protein concentration experiment and tested in-line concentration monitoring with optical rotation. In this study, the optical rotation trend monitored continuously by the established flow cell matched well with the antibody concentration when concentrating the antibody solution from 12 g/L to 69 g/L. Finally, the results and discussions in this study are summarized as a conclusion.

第1章 緒言

抗体は、免疫グロブリン(immunoglobulin)とも呼ばれる、生体防御に寄与するタンパク質である。抗体医薬品は、当該抗体を遺伝子組換え技術や細胞培養技術等を応用して作製し、医薬品としたものである。抗体医薬品はその応用範囲が広いとため、治療や診断などのさまざまな用途に対して世界中で使用されている [1]。

抗体の製造プロセスは、細胞を用いて抗体を生産する培養工程と生産した抗体を不純物から分離・精製して高品質な医薬品として取得する精製工程で構成されている。さらに、培養工程は細胞を増加させる複数の種培養工程と細胞を増加させながら抗体を生産する生産培養工程、精製工程は細胞の除去/清澄化、複数のクロマトグラフィー工程、ウイルス不活性化工程、ウイルス濾過工程、濃縮/バッファー交換工程、最終濾過工程と多くの工程で構成されている。代表的な製造プロセスを図 1-1 に示した。近年、遺伝子組み換え技術や培地・培養条件の発展により、培養工程中の抗体濃度は 3-5 g/L が日常的に達成されており、Fed-batch 培養により 10 g/L 付近の生産性も達成されている [1]。精製工程では抗体はさらに濃縮され、10 g/L を超え、50 g/L 以上の濃度に至ることがある。

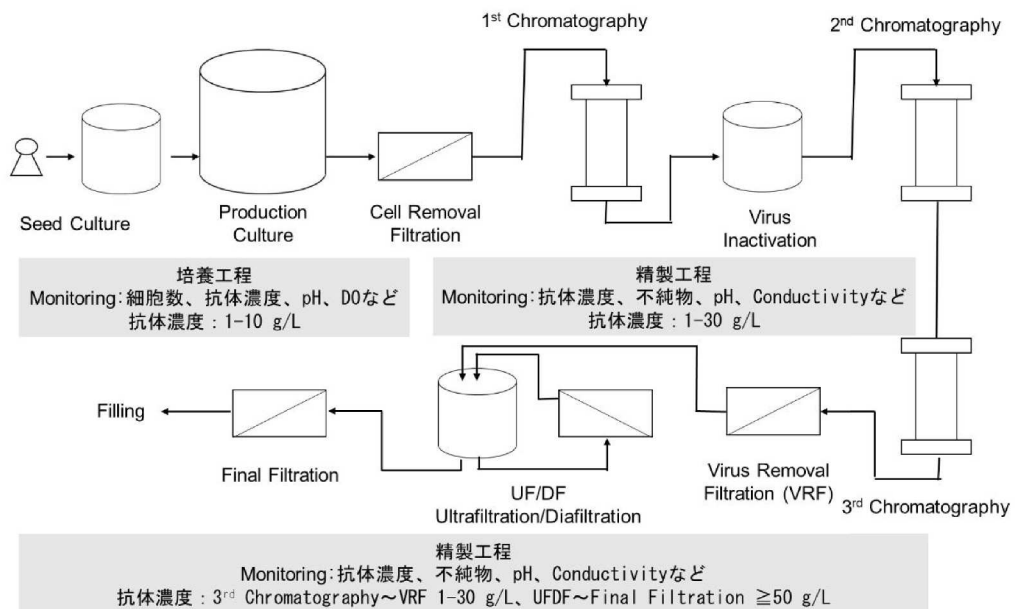


図 1-1 代表的な抗体製造プロセスの概略図

製造工程中における各種パラメータのモニタリングは製造プロセスの安定化へ非常に重要であり、オフライン、アットライン、オンライン、インラインといった各手法によりモニタリングがなされている [2-10]。オフラインとアットラインは、製造プロセスから採取したサンプルを持ち運び分析する手法であり、分析機器が製造プロセスから遠隔している場合をオフライン、近接している場合をアットラインとよぶ。オンラインは自動的にサンプリングを行い製造プロセスに近接した機器で分析を行う手法、インラインは製造プロセス中に分析センサーを組み込み分析する手法である。製造プロセス管理の観点からは、即時に測定結果が得られるオンラインやインラインの手法によるモニタリングが好ましく、特にインラインはその簡便さから好ましいモニタリング方法である。

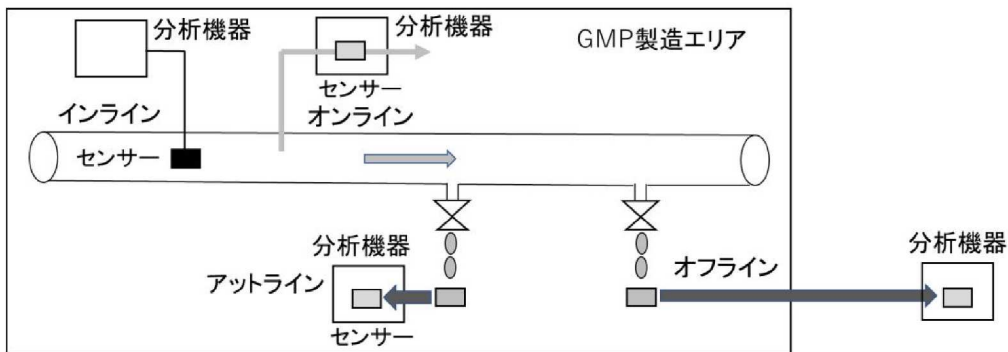


図 1-2 GMP 製造工程におけるモニタリング手法

一般的な抗体製造プロセスでモニタリングされる項目を表 1-1 に示した [4-10]。培養工程では、生産に用いる細胞の細胞数・生存率、培養工程として制御する pH・溶存酸素濃度 (DO)・攪拌数・温度、培養液中に存在する抗体濃度・栄養素や代謝物の濃度、濁度などがモニタリング対象である。従来、pH・DO・攪拌数・温度などの重要なプロセスパラメータがインラインによりモニタリングされてきた。一方、精製工程では、抗体が含まれる工程液、精製に用いるバッファの pH や Conductivity、工程溶液中に含まれる抗体濃度や不純物の量がモニタリング対象である。不純物には、製品に関連する不純物とプロセスに関連する不純物が含まれている。製品関連不純物には、抗体の凝集体 (Aggregate) や切断体 (Fragment)、電荷類縁体 (Charge variant) などが含まれる。プロセス関連不純物には、生産に用いた細胞由来のタンパク質 (Host cell protein、HCP) やデオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid、DNA) などが含まれる。培養液中の不純物として、例えば HCP は約 100 mg-HCP/L といった混入量が報告されている [11]。抗体医薬品の精製工程では、図 1-1 に示した各工程を通し、Aggregate や Fragment は抗体に対して数%、

HCP や DNA はそれぞれ ng/mg や pg/mg といったオーダーで管理を行い、これらの不純物を適切なレベルまで低減して高純度な医薬品を取得している [12-14]。

表 1-1 培養・精製工程におけるモニタリング項目

培養工程におけるモニタリング項目例	精製工程におけるモニタリング項目例
抗体濃度、細胞数、細胞生存率、pH、DO、温度、攪拌数、栄養素・代謝物濃度、濁度	抗体濃度、pH、Conductivity、不純物（HCP、DNA、Charge variant、Aggregate、Fragment など）

培養工程と精製工程を通してモニタリングされる要素に抗体の濃度が挙げられている。生成物である抗体濃度の測定は製造管理上で必要不可欠な要素であり、非常に重要なプロセスパラメータとなっていることが分かる。

培養工程では、抗体の濃度はその製造工程においてどれだけ抗体が生産されているかを把握するために重要である。抗体の濃度測定には、一般的に抗体が 280nm の紫外線 (UV) 光を吸収する性質を利用した A280 法が使用されている。しかしながら A280 法にはその測定濃度範囲が比較的低濃度の範囲に限られており、UV 吸収をもつ不純物の影響を受けるという欠点がある。そこで培養液中の抗体濃度を測定するためには、サンプルを製造エリアで採取した後に分析室へ運搬し、High Performance Liquid Chromatography (HPLC)を用いて測定することが一般的となっている。HPLC のカラムには、抗体を特異的に吸着する Protein A カラムが用いられ、不純物の影響を排除しつつ、注入量や事前の希釈操作によって適切な濃度の測定ができるように分析法を確立している。

精製工程では、各工程における抗体の収率を把握することに加え、工程を適切に管理するためにも抗体量の測定が重量となる。例えばクロマト工程においては、クロマト Resin に負荷する抗体量は、その工程収率や不純物除去効果を均質にするために評価すべき項目となっている。各精製工程液中の抗体濃度の測定には、上述の A280 法を用いることが一般的となっている。精製工程サンプルの測定では、初段のクロマトグラフィ工程で Protein A 工程が用いられることが多いため、培養液のような UV 吸収をもつ不純物の影響を受けることは少ない。しかしながら測定濃度範囲が比較的低濃度に限られるという欠点は残っており、精製工程サンプルも製造エリアで採取した後に分析

室へ運搬し、適切な希釈操作を実施後に分光光度計を用いて A280 法による濃度測定を行うのが一般的である。

上記の通り、製造プロセスにおける抗体濃度の測定は、培養工程と精製工程ともに、製造プロセスから採取したサンプルを製造エリアから分析室へ持ち運び分析するオフラインの手法で実施されるのが一般的な状況である。一方、この抗体濃度を製造プロセス中に分析センサーを組み込むインラインの手法で分析できれば、下記のような複数のメリットが期待される。

- ✧ 希釈といった煩雑な操作を省略することによる分析結果の安定化
- ✧ サンプルの運搬や希釈を省略することによる製造時間の短縮
- ✧ 人的介入がなくなることによる製造工程の自動連処理

近年、Process Analytical Technology (PAT)によるリアルタイムモニタリングの研究がなされている。抗体濃度については、Raman 分光法や近赤外(NIR)分光法などの活用により、培養工程や精製工程の濃度などをインラインでモニタリングできることが示されている。しかしながら、これらの手法は多変量データの解析といった複雑な処理や高価な機器の購入が必要な状況である[15-19]。また、ランベルトベールの法則によれば、UV 吸収は光路長に反比例する。したがって、短い光路長を使用すると希釈せずに高いタンパク質濃度を測定でき、UV 強度に応じて光路長を自動調整する特殊な装置が開発されている[20-21]。しかしながら、この手法においても、高価な機器の購入が必要であり、培養液のような UV 吸収をもつ不純物が含まれるサンプルの濃度測定には適さないという欠点が残されている。

ここで我々は、旋光度を利用した抗体濃度の測定法に着目した。旋光度は光が光学活性物質を通過するときに特定の方向に回転する現象であり、サンプル中の目的物質の濃度に応じて回転する角度が比例的に増加するため、濃度の測定へ提供可能である。また、旋光度測定は抗体濃度測定に用いられている A280 法と同様、非破壊的に濃度を測定できる光学的な手法である[22-24]。産業プロセスの観点からみると、この旋光度はアミノ酸や糖などの光学活性物質濃度を測定するために使用されているが、タンパク質量の標準的なメソッドとしては使用されていない。そこで我々は、この旋光度のタンパク質、特に抗体濃度の測定への活用を目指し、各種抗体サンプルに対してその適用性を評価し、A280 法と比べて高濃度の抗体濃度の測定へ適用可能であることや抗体培養液

中に含まれる不純物の影響を受けにくいことを検証した。

以下、本研究で行った検討内容とともに本学位論文の構成を示す

第1章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、一般的なタンパク質濃度の測定法についてその特徴を整理し、抗体プロセスの濃度モニタリングへの適用の観点から考察を行った。

第3章では、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価した。その結果、80 g/L といった高い抗体濃度までの直線性の確認や定量限界の算出を行い、旋光度は広範囲の濃度範囲へ適用可能であることを示した。また、各種クロマト工程液を用いた添加回収試験を行い、抗体の濃度測定へ一般的に用いられる A280 法と同等の結果を得た。A280 による濃度測定には適切な希釈が必要であるが、旋光度は直接測定が可能であることから、旋光度法が抗体の精製工程においてみられる高濃度サンプルの測定に有望なことを示したと考えられる。さらに、細胞培養プロセス中の抗体濃度モニタリングへ旋光度を適用した結果、細胞培養液の着色といった不純物の影響を受けにくく、HPLC による濃度推移を良好に表現する結果が得ることができた。

第4章では、旋光度計をフローセルへ改造し、精製工程中における旋光度のインラインモニタリングについて実証を行った。最初に、開発したフローセルを用いた場合の滞留分布曲線と検量線を実験的に確認し、当該フローセルをプラグフロー反応器と連続攪拌タンク反応器を一連に繋げたモデルへあてはめて解析を行った。検量線は第3章にて確認したバッチ式測定と同様の結果であり、解析モデルは実験結果を良好に表現した。次に、限外濾過膜を使用したタンジェンシャルフロー濾過によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い、12 g/L の抗体溶液を 69 g/L へ濃縮した際の旋光度をインライン測定した。その結果、旋光度の推移は抗体濃度と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度により連続的にモニタリング可能であることが確認された。

第2章. タンパク質定量方法

2-1. 緒言

抗体製造工程中における各種パラメータのモニタリングは製造プロセスの安定化へ非常に重要であり、生成物である抗体濃度の測定は製造管理上で必要不可欠な要素である。本章では、タンパク質の定量に一般的に使用される方法をまとめ、タンパク定量法の観点から抗体製造プロセスの濃度モニタリング法を考察する。

2-2. 一般的なタンパク質の定量法

タンパク質の定量方法は、侵襲的な分析方法と非侵襲的な分析方法へ大きく分かれる。侵襲的な分析法には、Biuret method、Lowry method、Bradford method が挙げられる [26-29]。これらは、タンパク質とリガンド間の化学反応を用いた比色法である。比色法はその反応特異性により、サンプル夾雑物の影響を受けにくいという性質がある。詳細を、以下 2-2-1 から 2-2-3 にまとめた。非侵襲的な分析法には、Ultraviolet absorption method、Refractive Index method、Optical rotation method が挙げられる。これらは光学的測定法である。Ultraviolet adsorption は抗体濃度測定に A280 法として一般的に用いられている方法であり、Refractive Index method は近年評価がなされている方法である。一方、Optical rotation method はタンパク質定量の標準的な方法ではなく、当該方法を抗体濃度のモニタリングに適用した例は報告されていない。詳細を 2-2-4 から 2-2-6 にまとめた。

2-2-1. Biuret method

タンパク質と Cu(II)溶液をアルカリ条件下で混合すると、Cu(II)が Cu(I)に還元され、溶液の色が赤紫に変化する。この現象を利用し、540nm での吸光度を測定することでタンパク質濃度を定量するメソッドである。一般的な濃度の測定レンジは、1 - 5 g/L である。比色法の中で、この方法は低濃度の測定には適しておらず、いくつかの物質が定量に影響を与えることが知られている [28-29]。

2-2-2. Lowry method

Biuret 法の反応を Folin - Ciocalteu 試薬の反応と組み合わせることで、溶液の色が強い濃い青色に変化する。この現象を利用し、660 nm での吸光度を測定することでタンパク質を定量するメソッドである。一般的な濃度の測定レンジは 0.05 – 0.5 g/L である。

2-2-3. Bradford method

トリフェニルメタン色素であるクーマシー G-250 を酸性条件下でタンパク質溶液に添加すると、クーマシー G-250 はタンパク質に結合し、サンプル溶液の色がマゼンタから青色に変化する。この現象を利用し、595 nm での吸光度を測定することでタンパク質濃度を定量するメソッドである。一般的な濃度の測定レンジは 0.1 – 1.5 g/L であり、マイクロアッセイを行った際のレンジは 0.01 – 0.025 g/L である [29-27、 29]。

2-2-4. Ultraviolet absorption method

タンパク質は、保有するチロシンおよびトリプトファン残基等の存在により、280nm の UV 光を吸収する。この方法は侵襲的で瞬時に測定できるため、タンパク質濃度の測定に最も広く使用されている [25-27]。

この手法の欠点は、従来の装置では定量範囲が狭いことであり、その標準的な濃度測定レンジは 0.02 – 2 g/L である。近年、UV 強度に応じてセルの光路長を自動的に短くすることで高濃度の測定を可能とする手法も開発されており [20-21]、その測定レンジは 0.15 – 240 g/L である。しかし、試料溶液中に紫外線を吸収する物質が含まれている場合には、正確な濃度を測定できないという問題が残されている。

2-2-5. Refractive Index method

屈折率 (RI) を測定することで溶液中物質の濃度を測定することは可能である [31]。ただし、RI 検出器はタンパク質濃度を測定するための特殊な方法ではなく感度も低いため、タンパク質濃度をモニタリングするための標準的な方法ではない。RI 検出器は HPLC の汎用検出器として使用されており [32]、近年、2 - 220 g/L の範囲でタンパク質

濃度を測定するための RI 装置が開発されている [33]。一方、培養液の着色といった成分への影響は不明である。

2-2-6. Optical rotation method

旋光度(OR)は光が光学活性物質を通過するときに特定の方向に回転する現象である [22-24、34-35]。旋光度は通常ナトリウムの D 線(589.6nm と 589.0nm とに鋭く強い輝線を持ち、他の波長の発光を持たない単色光源)を用いて測定されるが、光学フィルターによりいろいろの波長での測定も可能である。

旋光度は測定波長に応じて変化し[34]、旋光分散といわれる。可視および近紫外領域ではタンパク質の旋光分散はDrudeの単項式とよばれる次式によく従う。

$$[\alpha] = K/(\lambda^2 - \lambda_c^2) \quad (2-1)$$

λ_c は旋光分散定数とよばれ、タンパク質二次構造と関係のある定数である。

旋光度 OR は、濃度 c 、測定セル光路長 l と比旋光度 $[\alpha]$ に比例する。

$$OR = [\alpha]cl \quad (2-2)$$

旋光度の適用例としては、アミノ酸や糖などの光学活性物質 (キラル物質)の濃度測定への活用が挙げられる [22-23]。また、黒く不透明なシュガーシロップ中の糖濃度測定に活用した例も報告されている [23]。このことは、細胞培養液のような粗製不透明溶液中の抗体濃度を旋光度によりモニタリングできる可能性を示唆していると考えられる。

タンパク質に関する知見を以下にまとめる [35]。タンパク質を構成しているグリシン以外のアミノ酸は光学活性であることにより旋光性をもつことが知られており、タンパク質の比旋光度の符号と大きさは構成アミノ酸の種類と数および配列に当然依存するほか、分子の空間構造にも依存する。タンパク質の比旋光度はナトリウムの D 線を用いて測定すると 0-70°でわずかに左旋性である。表 2-1 に代表的なタンパク質の旋光度を示した。旋光性はあまり温度の影響をうけないが、側鎖のカルボキシル基などの解離や分子内水素結合の切断などで分子構造の変化は旋光度に反映される。それゆえ旋光度を、pH を変えて測定すると酸性あるいはアルカリ性の強いところでは旋光度が変化する。タンパ

ク質が変性すると一般には左旋性が增大する。

表 2-1 タンパク質の旋光度

タンパク質	溶媒	旋光度 $[\alpha]_D$
ウシ血清アルブミン(BSA)	pH5	-63
ウシ血清アルブミン(BSA)	水	-63
ヒト血清アルブミン(HSA)	pH5	-63
α -キモトリプシン	0.1MNaCl pH3	-66
キモトリプシノーゲン	pH7.7	-87.4
フィブリノーゲン	pH6.3	-48.6
インシュリン	水	-38
β -ラクトグロブリン	pH5.5	-28.3
リゾチーム	2MNaCl	-47.1
卵白アルブミン	水	-31.4
トリプシン	pH7.2	-40
ペプシン	-	-69
γ -グロブリン	-	-44~-55

タンパク質の定量法としての旋光度の利用は少なく、上述の旋光度の変化を利用してタンパク質の変性(構造変化)を追跡する研究報告が多い。また、高濃度の測定例はみあたらない。

2-3. HPLC 法

HPLC(high performance liquid chromatography)は、高度分析手法として広く利用されているが、目的成分を選択的に定量する手法としても利用できる。一般的には HPLC カラムで分離された目的成分のピーク面積と注入された目的成分の濃度(質量)との検量線を作成しておき、測定ピーク面積から濃度を定める。

目的成分を分離できる条件の設定や、溶媒等の検討が必要となる。また、分離時間は、カラムと分離条件の選択により決まる。カラムの劣化の確認も重要である。

本研究で対象としている抗体については、抗体に強い生物学的親和性を有する Protein A を固定化した HPLC カラムを用いて、サンプル添加・洗浄・溶出・再生を実施し、

280nm における UV 検出器の溶出ピーク面積で濃度決定する方法が標準法として使用されている(図 2-1)。この方法では培養液中の他の成分の影響を受けずに抗体濃度を測定することができるが、検量線の範囲での測定のため注入量や事前の希釈操作によって適切な濃度でオフライン測定を行っているのが一般的となっている。本方法は不純物の影響を排除できる一方、1回の測定に時間を要する。また、カラム性能の劣化が生じるため、Standard サンプルを用いて定量性の確認を行う必要がある。

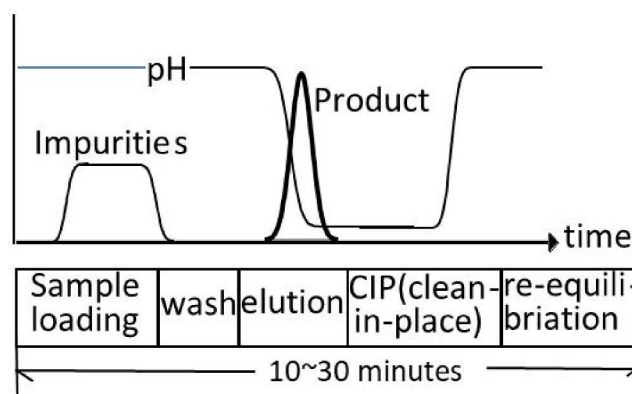


図 2-1 HPLC 操作 (Protein A クロマトグラフィー)

2-4. 小括

第 2 章では、一般的なタンパク質の定量方法とその特徴をまとめた。その結果を表 2-2 に示す。タンパク質の定量方法は、侵襲的な分析方法と非侵襲的な分析方法へ大きく分かれる。

Biuret method、Lowry method、Bradford method は浸食的な分析方法であり、タンパク質とリガンド間の化学反应用いた比色法である。これらの方法の測定レンジは、抗体製造プロセスでモニタリングすべき値に対して低く、かなり狭い範囲に限られている。また、モニタリング手法としては、反応が速い場合にはフローインジェクション分析 (FIA) 法を使用してオンラインによるモニタリング法を開発することも可能となるが [27]、標準的な手順はオフラインとなる。

一方、Ultraviolet absorption method、Refractive Index method、Optical rotation method は非浸食的な光学的分析法であり、製造プロセス中に分析センサーを組み込むことによ

り、インラインでのモニタリングに活用できる手法となる。抗体製造プロセスの濃度モニタリングへ一般的に用いられているのは Ultraviolet adsorption metho (A280 法)であるが UV 吸収をもつ不純物の影響を受ける欠点があり、Refractive index method の評価は近年に研究されている状況である。一方、Optical rotation method については、アミノ酸や糖の濃度測定に使用されており、黒く不透明なシュガーシロップ中の糖濃度測定に活用した例も報告されている。タンパク質も旋光性を持つことは知られているが、その変化を利用してタンパク質の変性(構造変化)を追跡する研究報告が多く、高濃度の測定例は見当たらない。旋光度により高濃度の抗体濃度が測定できれば、インラインによる新たな濃度モニタリングツールとして期待される。また、黒く不透明なシュガーシロップ中の糖濃度測定へは適用できていることから、細胞培養液のような粗製不透明溶液中の抗体濃度を旋光度によりモニタリングできる可能性を示唆していると考えられた。

表 2-2 タンパク質濃度の測定方法

Method	Invasive	Off-line or in-line	Concentration range	Comments
Biuret	Invasive	Off-line	1–5 mg ^{b)}	Rapid chemical reaction
Lowry	Invasive	Off-line	0.05–0.5 mg ^{b)}	Slow chemical reaction
Bradford	Invasive	Off-line	0.1–1.5 mg ^{b)}	Rapid chemical reaction
Ultraviolet absorption at 280 nm	non-invasive	Off-line in-line ^{a)}	0.02–2 g/L 0.15–240 g/L ^{c)}	Interferences by UV absorbing substances
Refractive index (RI)	non-invasive	Off-line in-line ^{a)}	2–200 g/L ^{d)}	Substances having refractive index
Optical rotation (OR)	non-invasive	Off-line in-line ^{a)}	Unknown	Substances having optical rotation

^{a)} In-line monitoring is possible by using a flow-cell.

^{b)} The values may change when a micro-plate format is used.

^{c)} Higher concentrations can be measured by using a special device allowing a very short optical path length.

^{d)} Higher concentrations can be measured by using a special RI device.

第3章. 旋光度を用いた抗体濃度測定

3-1. 緒言

抗体製造プロセスにおける抗体濃度の測定へ一般的に用いられている方法は Ultraviolet absorption method である A280 法であるが、濃度測定範囲が狭く、紫外線吸収のある不純物の影響により培養上澄の抗体濃度測定を直接測定できないデメリットがある。そのため、測定に際しては適切な濃度範囲へ希釈する必要があり、培養液中の抗体濃度を測定するには Protein A カラムを用いた HPLC を用いて培養液中の妨害物の影響を除く必要があるのが一般的である。

非破壊的な光学測定法のうち、Optical Rotation Method すなわち旋光度による濃度測定法はアミノ酸や糖などの光学活性物質濃度を測定するために使用されているが、タンパク質定量の標準的なメソッドとしては使用されていない。しかしながら、タンパク質の変性(構造変化)を追跡する研究へは使用されており、黒く不透明なシュガーシロップ中の糖濃度測定へは適用できていることから、細胞培養液のような粗製不透明溶液中の抗体濃度を旋光度によりモニタリングできる可能性を示唆している。本章では、この旋光度による濃度測定方法を抗体濃度測定へ適用した結果を報告する。

3-2. 実験

280nm の UV 吸収の測定は株式会社島津製作所製の分光光度計 UV-1800 を用いて行った。測定用セルには光路長 1cm の標準石英セルを用いている。抗体濃度への換算にはアミノ酸配列から決定される各抗体の吸光係数を用いた [26]。

旋光度の測定には日本分光株式会社の旋光計 P-2200 を用いた。この装置の仕様は、応答速度 6°/秒、分解能 0.0001°、ダイナミックレンジ 0.001° ~ ±90°、精度 ±0.002° (~1°)、±0.2%(1° ~)、繰返し精度(再現性) ±0.002° である。測定用セルには直径 1cm、長さ 10cm の標準ガラスセルを用いている。ランプは標準ナトリウムランプ、波長は 589nm である。測定の温度は 22°C、ブランクは純水とし、測定結果の値は 5 秒平均値を用いている。検量線作成時には各濃度サンプルの旋光度を 5 回測定した。また、定量限界を決定する際にはブランクサンプルの測定を 10 回行った、その他サンプルについては、旋光度の測定はそれぞれ1回とした。

HPLC 測定は Applied Biosystems 製の POROS A20 prepaced protein A column (2.1 mm id × 30 mm length)を用いた標準的な方法により実施した。

本章の検討で用いた抗体は CHO 細胞による Fed-batch 培養で生産後に精製したサンプルである。抗体のサブクラスは IgG1 であり、分子量は約 150,000 Da、等電点 pI は約 8 である。ヒト血清アルブミン(Human serum albumin、HSA)やウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin (BSA))は Sigma-Aldrich から購入した標準品である。

3-3. 結果及び考察

3-3-1. 旋光度と A280 法の検量線比較

一般的な光路長 1cm の標準石英セルを用いた分光光度計で抗体の A280 を測定した結果を図 3-1 に示す。抗体濃度に対する A280 の値は低濃度の限られた範囲でのみ線形であることが分かる。

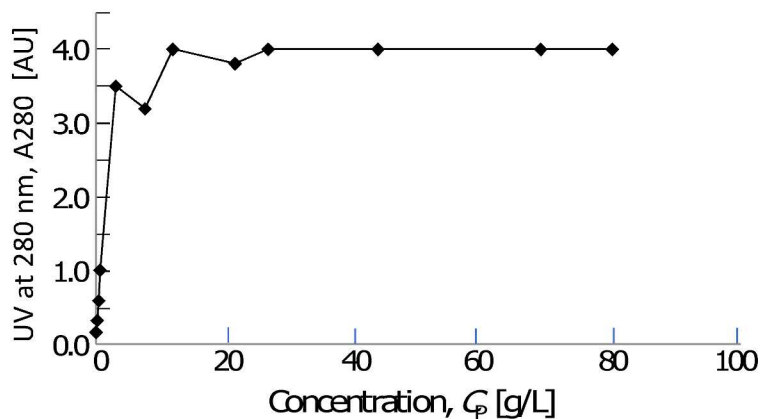


図 3-1 抗体濃度と A280 の関係

抗体濃度が 0.22~64.86 g / L の範囲で旋光度を測定した結果を図 3-2 に示す。当該濃度範囲において良好な直線性が示されることが分かる。図 3-1 で示した A280 法と比較して、旋光度は高い抗体濃度まで線形を保持した。

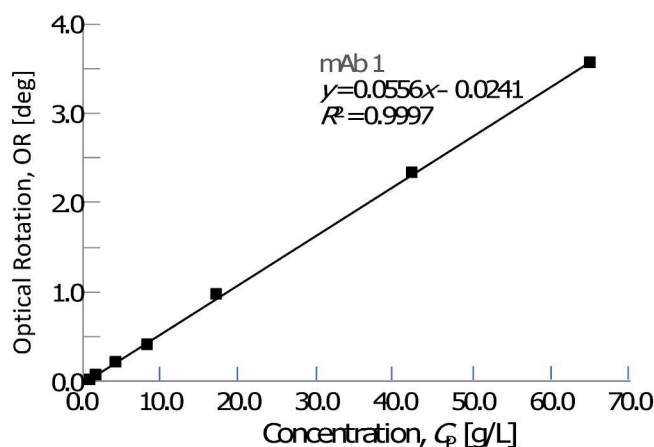


図 3-2 抗体濃度と旋光度の関係

近年、細胞培養プロセスと細胞工学技術の進化によって培養工程における抗体濃度は 10 g/L 程度へ高まり、精製工程ではさらに高濃度化されている。一般的な A280 法では製造工程中の抗体濃度をオフラインで希釈してから測定する必要があり、インラインでモニタリングを行えないという欠点があることが確認された。これに対して旋光度は希釈せずに高濃度のサンプル濃度測定が行え、製造工程のインラインモニタリングに向けた有用な手法と考えられる。

3-3-2. 抗体溶液の旋光度測定

抗体濃度が 0.22～64.86 g / L の範囲で旋光度を測定した際の測定値、平均、標準偏差(SD)、変動係数(CV)を表 3-1にまとめた。

検出限界(LOD)は、ブランクの SD [= 3SD / (検量線の傾き)]に基づき 0.09g/L、定量限界(LOQ)は 0.30 g / L (= 10/3×LOD)と算出できる [35]。比較的低濃度の測定まで可能であることが示された。

表 3-1 旋光度を用いた濃度測定における並行精度

		mAb concentration C_p [g/L]				
		0	0.22	1.69	17.12	64.86
OR [deg]	Minimum	-0.0009	0.0093	0.070	0.969	3.565
	Maximum	0.00450	0.0180	0.074	0.982	3.585
	Average	0.00094	0.0129	0.072	0.975	3.575
	SD	0.00166	0.0033	0.001	0.005	0.008
	CV	176.5	25.6	2.1	0.526	0.226

R2 相関係数は、特に線形ダイナミックレンジが大きい場合の適合度(GOF)の適切な尺度ではなく、式(3-1)によって計算された実験変数と予測変数の間の相対誤差に基づく MAPE(平均絶対パーセント誤差)が適切であると主張されている [37]。当該計算式を用いて LOQ 以上の範囲における MAPE を計算した結果、2.8%と算出された。これより、旋光度による濃度測定は、ここで評価した 64.86 g/L までの範囲において高い直線性を示したことが確かめられた。

$$MAPE = \frac{100\%}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{y_{i,exp} - y_{i,pred}}{y_{i,exp}} \right| \quad (3-1)$$

N : データ数、 $y_{i,exp}$: 実験測定濃度、 $y_{i,pred}$: 直線相関式から求めた計算濃度

図 3-3 は、2 つの異なる抗体(mAb)の旋光度と前述した mAb1 の回帰曲線を示している。3 つの mAb のスロープ値は類似した値を示した(0.05593±2%)。わずかな違いは、mAb 構造の小さな変化または濃度決定における変動が原因である可能性がある。また、80 g/L のような高濃度になるまで線形関係が確認できた。80g/L でも直線性は保たれており、さらなる研究により、より高濃度の濃度測定に適用できる可能性が含まれている。

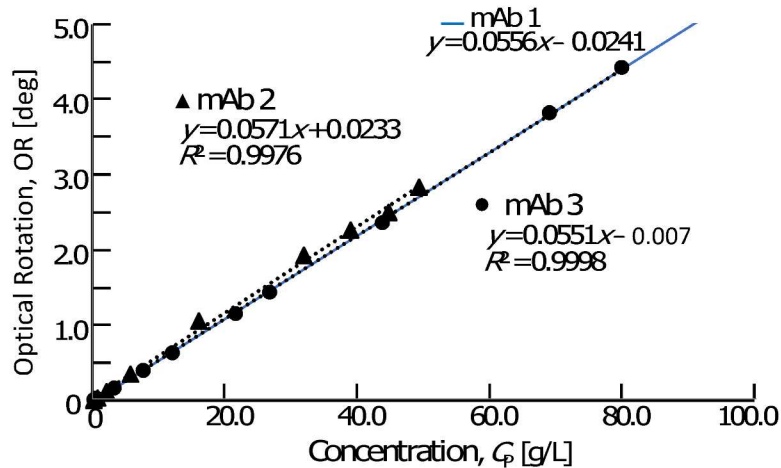


図 3-3 複数の抗体に対する抗体濃度と旋光度の関係

3-3-3. 各種タンパク溶液の旋光度測定

旋光度値がタンパク質の特性によってどのように影響を受けるかを調査した。旋光度の違いを確認するために、ヒト血清アルブミンやウシ血清アルブミンなどのいくつかのタンパク質の検量線を 0.02~2.0 g/L の範囲で測定した結果を図 3-4 に示す。それぞれのタンパク質で勾配が異なり、いずれも旋光度と濃度の間に線形関係が観察された。また、Whole 抗体と Fc 領域のない Fragment 抗体((Fab)₂)の旋光度測定結果を図 3-5 に示す。旋光度の原理によれば抗体の Fc 領域の糖鎖が旋光度に影響を与える可能性はあるが、Whole 抗体と同様に Fragment 抗体でも同様の直線性が得られ、傾きに有意差はなかった。抗体の旋光度値は糖鎖の影響よりも、抗体タンパク質の性質による影響が大きいと考えた。

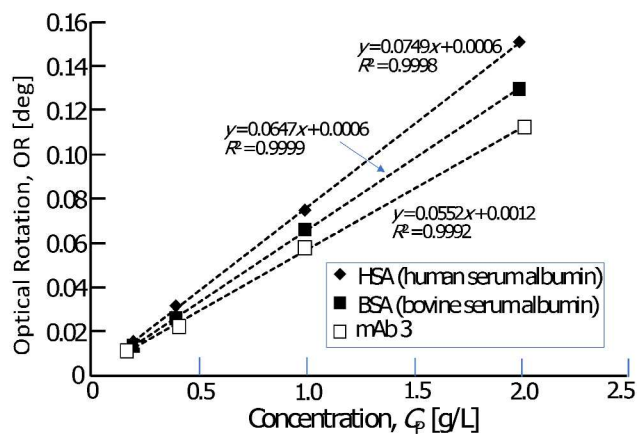


図 3-4 抗体とアルブミンの旋光度比較

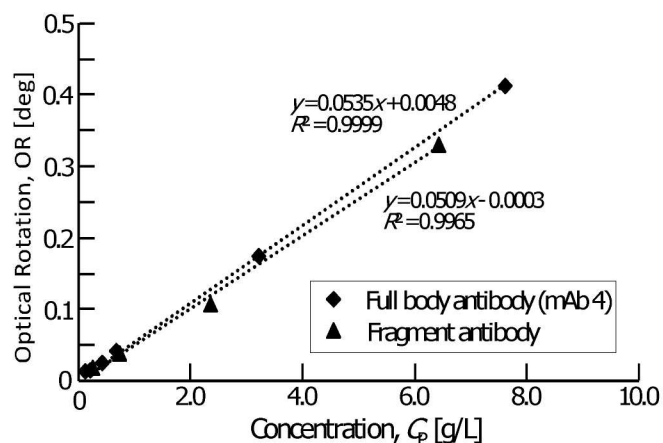


図 3-5 Whole 抗体と Fragment 抗体の旋光度比較

3-3-4. クロマト工程溶出液を用いた添加回収試験

次に、添加回収試験を行った結果を示す。図 1-1 に示したように、細胞培養上清から抗体を精製するには、通常 3 つのクロマトグラフィーステップが必要である。添加回収試験は、これらクロマトグラフィーステップで得られた溶出液を使用して実施した。サンプル A は最初のキャプチャークロマトグラフィーステップの溶液液、サンプル B と C はそれぞれ 2 番目と 3 番目のポリッシングクロマトグラフィーステップの溶液液である。

添加回収試験は各クロマト溶出液へスパイクサンプルを添加することで実施した。添加量 M_S は添加したサンプルの濃度 C_S ・旋光度 OR_S と添加液量 V_S の積として、式 3-2 により計算した。

$$M_S = C_S \times V_S \quad \text{or} \quad M_S = OR_S \times V_S \quad (3-2)$$

回収量 M_R は添加後の濃度 C_I ・旋光度 OR_I と添加後の液量 V_I の積から、添加前の濃度 C_0 ・旋光度 OR_0 と添加前の液量 V_0 の積をそれぞれ引くことで算出した。

$$M_R = C_I \times V_I - C_0 \times V_0 \quad \text{or} \quad M_R = OR_I \times V_I - OR_0 \times V_0 \quad (3-3)$$

最後に、回収率 R は、添加量 M_S を回収量 M_R で割ることで算出している。

$$R = M_S / M_R \times 100 \quad (3-4)$$

旋光度と A280 を用いて試験した結果をそれぞれ表 3-2 と表 3-3 に示す。回収率の値はいずれも 100% に近く、両者に大きな違いはない。ここで、旋光度は直接測定が可能であり、A280 による濃度測定には適切な希釈が必要であることに注意する必要がある。旋光度では希釈することなく、抗体濃度を安定的に測定可能であることが示され、添加回収の観点からも旋光度法が抗体の精製工程においてみられる高濃度サンプルを直接測定する方法として有望と考えられた。

表 3-2 A280 による濃度を用いた添加回収試験

	Concentration, C_0 [g/L]	Spiked Concentration, C_I [g/L]	Recovery, R [%]
Sample A	7.76	12.73	102.1
Sample B	7.19	12.27	101.1
Sample C	5.95	11.06	102.2

表 3-3 旋光度を用いた添加回収試験

	Optical Rotation, OR_0 [-]	Spiked Optical Rotation, OR_I [-]	Recovery, R [%]
Sample A	0.422	0.718	98.7
Sample B	0.387	0.686	98.7
Sample C	0.313	0.616	99.0

3-3-5. 培養液濃度測定への適用

実験室スケールにて培養実験を行い、培養工程中の抗体濃度を旋光度でモニタリングした結果を報告する。ここでは、CHO 細胞を用いて2種類の抗体を培養し、培養中にバイオリアクターから採取したサンプルを、HPLC、旋光度、および A280 で分析した。

それぞれの結果を図 3-6 および図 3-7 に示す。X 軸は抗体濃度が最大になった時間 t_{\max} で正規化した時間、Y 軸は抗体濃度の最大値 $C_{p,\max}$ で正規化した濃度を表している。ここで、 $t_{\max} = 10-14$ days、 $C_{p,\max} = 5-10$ g/L である。図 3-6 に示すように、A280 の推移は、HPLC で測定された値よりもはるかに高い推移となった。これは培養液中に UV 吸収をもつ着色成分が含まれているためであったと考えられる。一方、旋光度の推移は図 3-6 および図 3-7 に示すように HPLC とよく一致する結果であった。抗体に比べて旋光性をもつ不純物量が少なく、抗体の推移をモニタリングできたと考えている。

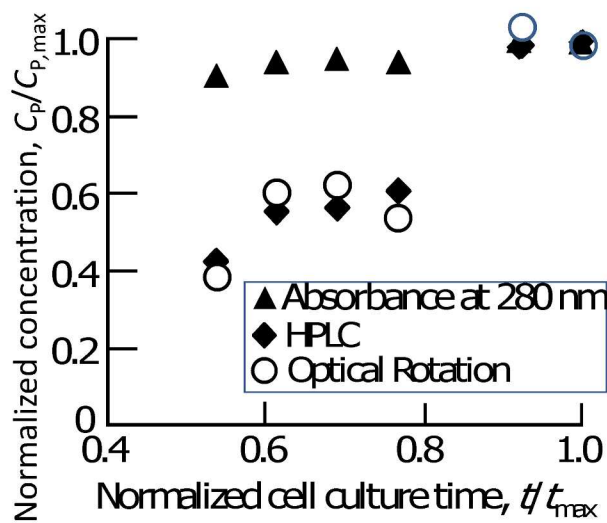


図 3-6 培養工程中の抗体濃度推移(抗体 X)

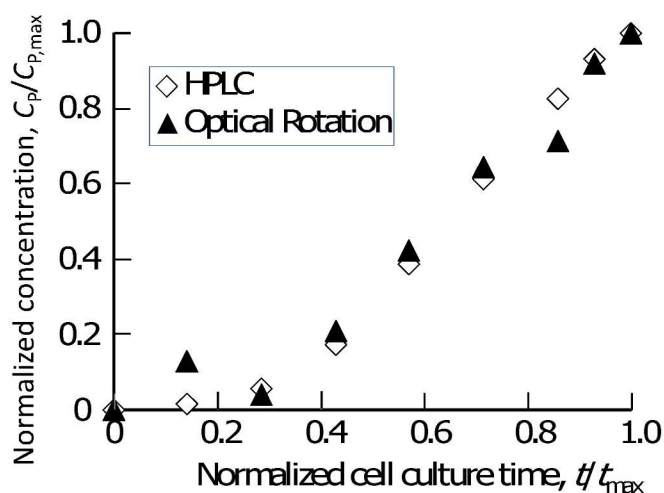


図 3-7 培養工程中の抗体濃度推移(抗体 Y)

旋光度測定は細胞培養液の着色の影響を受けにくく、培養中の抗体濃度を良好に表現する結果がえられた。今後は培地や代謝物成分など詳細な評価も必要であるが、当該旋光度による培養濃度モニタリングを、繰り返し製造時のバッチ間比較(製造の一貫性評価)に用いることができると考えられる。繰り返し製造を行う場合、培養中は抗体のみでなく不純物量も同様の推移になることが期待される。したがって、わずかながら不純物の影響が生じたとしても、繰り返し製造の中で旋光度を継続してモニタリングすることで、バッチ間で異なる傾向が生じた場合にその異常を検出する効果も期待される。

近年、バイオ医薬品の連続製造が大きな注目を集め、広く研究されている [38-43]。抗体精製の第1クロマトグラフィーに負荷する培養液量の判定には抗体濃度を測定する必要があるが、前述の通り A280 では直接濃度を測定できず、HPLC 測定はオフラインで測定する必要があり時間を要しているのが一般的である。一方、抗体精製の第1クロマトグラフィーステップが連続灌流細胞培養プロセスに接続して連続処理する場合、細胞培養上清の抗体濃度をリアルタイムでモニタリングして、第1クロマトグラフィーステップへの負荷量を決定する必要がある。図 3-8 は、第1クロマトグラフィーに接続されている連続灌流細胞培養システムのフローシートを示している。このシステムでは、灌流培養上清がサージタンクに収集され、連続的に第1クロマトグラフィーへ負荷されている。第1クロマトグラフィーカラムへ負荷する抗体量 M_F は抗体濃度 C_P と負荷液量 V_F の積算で表され($M_F=C_P V_F$)、負荷する時間 t_F は流速 Q_F を用いて式 3-5 により算出される。

$$t_F = V_F/Q_F = (M_F/C_P)/Q_F \quad (3-5)$$

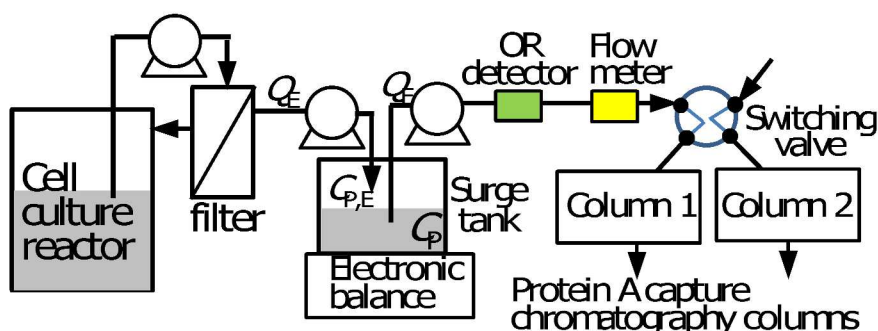


図 3-8 培養-第1クロマト連続製造システムのフローシート

本研究により、旋光度は培養中の抗体濃度を良好に表現でき、測定原理も非侵食的な光学的な手法であるため、インラインモニタリングへ応用可能な系であることが確認された。上記のような連続製造システムを構築する際、有用な手法となることが期待される。

3-4. 小括

第3章では、複数の抗体サンプルを用い、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価した。その結果、80 g/L といった高い抗体濃度までの直線性が保たれることが確認でき、抗体濃度の測定へ一般的に利用される A280 法と比べて高濃度のサンプルを希釈することなく測定できることが示された。また、定量限界は 0.30 g/L と算出され、旋光度は広範囲の濃度範囲へ適用可能であった。

旋光度を抗体濃度の分析法として検証するため、直線性や精製工程中のクロマト工程液を用いた添加回収試験を実施した。その結果、R² 相関係数に加えて MAPE による検証でも高い直線性が確認され、添加回収試験の結果は A280 法と同等でほぼ 100% の結果を得ることができた。

最後に、細胞培養プロセス中の抗体濃度モニタリングへ旋光度を適用した。その結果、A280 法による結果は一般的に用いられる HPLC による濃度推移に対してはるかに高い値を示したが、旋光度による推移は HPLC による濃度を良好に表現することができた。旋光度は A280 法と比べて培養液の着色の影響を受けにくく、培養工程の継続的な抗体濃度モニタリングへ適用できる可能性を示すことができた。

第4章. 旋光度を用いたインラインモニタリング手法の開発

4-1. 緒言

製造工程中における各種パラメータのモニタリングは製造プロセスの安定化へ非常に重要であり、オフライン、アットライン、オンライン、インラインといった各手法によりモニタリングがなされている。その中で、インラインは製造プロセス中に分析センサーを組み込み分析する手法であり、製造プロセス管理の観点からは、即時に測定結果が得られ、その簡便さから好ましいモニタリング方法である。

第3章で行った細胞培養プロセスにおける抗体濃度のモニタリングでは、サンプルを培養槽から採取してオフラインで旋光度の測定を行った。細胞培養工程はプロセス時間が長く、数時間あるいは日にち単位で測定を行うためオフライン測定でも評価可能であった。一方、処理時間の短い単位操作に対しては、インライン測定によるリアルタイムの連続 Monitoring が重要となる。

我々の調査では、旋光度装置用のフローセルは1つしか市販されておらず、HPLCの旋光度検出器用に設計されている。一方、製造工程への適用する場合は体積流量が大きくなり、圧力損失が大きくなるため、このタイプのフローセルは実製造工程の旋光度モニタリングへ直接使用することは難しい。そこで本章では、日本分光株式会社から市販されている P-2200 旋光度計の標準セルを実験室で旋光度フローセルへ改良し、検証を行った。

4-2. 実験

280nm の UV 吸収の測定は株式会社島津製作所製の分光光度計 UV-1800 を用いた。測定用セルには光路長 1cm の標準石英セルを用いた。抗体濃度への換算にはアミノ酸配列から決定される各抗体の吸光係数を用いた。

旋光度の測定には日本分光株式会社の旋光計 P-2200 を用いた。第2章と同一の機器を使用しており、その仕様は、応答速度 $6^\circ/\text{秒}$ 、分解能 0.0001° 、ダイナミックレンジ $0.001^\circ \sim \pm 90^\circ$ 、精度 $\pm 0.002^\circ (\sim 1^\circ)$ 、 $\pm 0.2\% (1^\circ \sim)$ 、繰返し精度(再現性) $\pm 0.002^\circ$ である。

測定用セルには直径 1cm、長さ 10cm の標準ガラスセルを用いている。ランプは標準ナトリウムランプ、波長は 589nm である。測定の温度は 22℃、ブランクは純水とした。

本研究で用いるフローセルを図 4-1 に示す。上記の直径 1cm、長さ 10cm の標準ガラスセルの入口と出口へ、内径 5mm×外径 9mm のシリコンチューブを接続することで作成した。

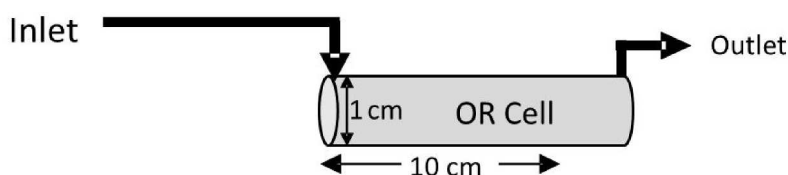


図 4-1 フローセルの概略図

Tangential flow filtration (TFF) unit を用いた UF 濃縮実験は、Merck 社製の再生セルロース膜(カタログ番号 P3C030C00)を用いて実施した。膜の分子量分画サイズは 30 kDa であり、面積は 88 cm² である。また、循環流速は 44 mL/min、Transmembrane pressure は 100 kPa の一定値とし、実験は室温にて実施した。

本章の検討で用いた抗体は CHO 細胞による Fed-batch 培養で生産後に複数のクロマト工程により精製したサンプルである。抗体のサブクラスは IgG1 であり、分子量は約 150,000 Da、等電点 pI は約 8 である。サンプルは酢酸系 Buffer (pH5) へ溶解させている。

4-3. 結果及び考察

4-3-1. 旋光度フローセルの検量線と滞留分布曲線の解析

日本分光株式会社から市販されている P-2200 旋光度計の標準セルを改良したフローセルを用い、検量線の測定を行った。セットアップした実験系を図 4-2 に示す。ここでは、抗体濃度サンプルを 5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L と段階的に高めながら、ペリスタポンプを用いてフローセルへ通液し、継続的に旋光度を測定した。通液速度は 25 mL/min と 75 mL/min の2種類とした。なお、音叉型振動式粘度計(SV-1A、A&D)で測定した試料溶液の粘度は、5 g/L では 0.94 mPa·s、20 g/L では 0.97 mPa·s (純水では 0.93 mPa·s)であった。

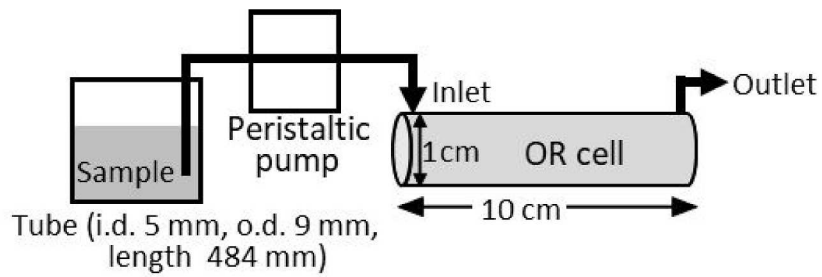


図 4-2 ステップ入力実験のためのフローセル系セットアップ

5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L 濃度の抗体サンプルを旋光度フローセルへ順次通液した際の滞留時間分布曲線を図 4-3 に示す。また、旋光度推移が一定となった値を用いて作成した検量線を図 4-4 に示す。旋光度と抗体濃度の間には良好な直線性が観察され、その傾きは前の前章のバッチ測定の数値(傾きの平均値 0.0559)と同様であった[44]。

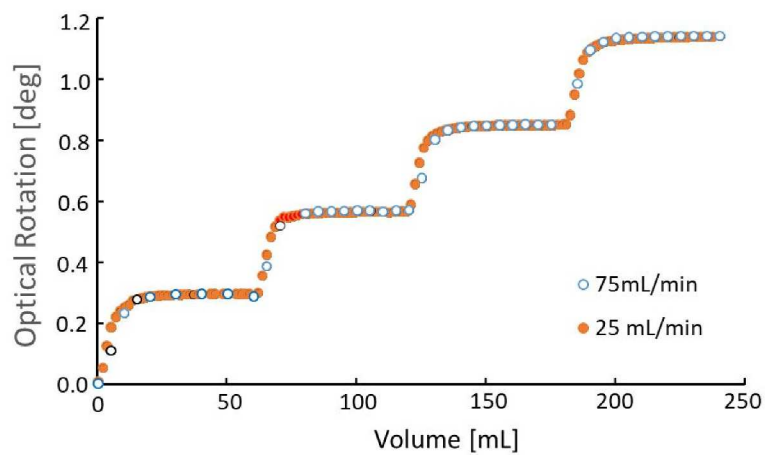


図 4-3 マルチステップ入力応答曲線

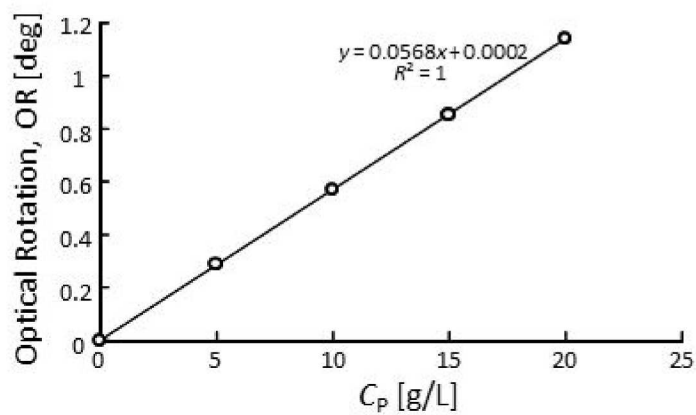


図 4-4 マルチステップ入力応答曲線から算出した検量線

5 g/L 濃度の抗体サンプルを旋光度フローセルへ順次通液した際の滞留時間分布曲線を図 4-5 に示す。多くの液体クロマトグラフィー (LC) システムの UV フローセルは、値の急激な変化に迅速に応答するため、セル容積とデッドボリュームが最小限に抑えられている。一方、今回構築した旋光度フローセルの体積は製造プロセスへの実用化を目指して比較的に大きいセルを用いたため、サンプルがセルへ到着後に濃度が垂直に立ち上がり、指数関数曲線的に緩やかに上昇する結果となっていた。以上の結果より、正確な測定が可能な条件を知るためには、滞留時間分布の解析が必要と考えた。

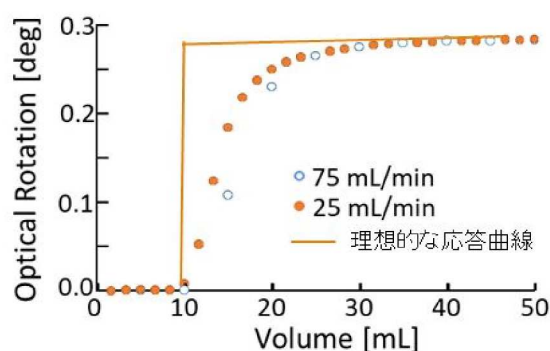


図 4-5 5 g/L サンプル通液時の応答曲線

ここでは、当該応答曲線の観察結果に基づき、リザーバータンクからペリスタポンプを介してフローセルに到達するまでのチューブをプラグフローリアクター (PFR) として、フローセル自体を連続攪拌タンクリアクター (CSTR) とみなしてモデル化・解析を行う方針とした。このモデルは主に応答曲線の観察に基づいているが、リザーバータンクからペリスタポンプを介してフローセルに達するまでは、内径 5mm のシリコンチューブの円筒形をしているため、PFR と仮定している。また、フローセルについては、フローセルの入口でパイプエルボと同様に流れ方向が突然直角に変化しており、これによりセル内で強い混合が生じていると考え、セルを CSTR と仮定した。同様のモデリングアプローチはタンパク質の Downstream 処理において報告されている [45-46]。

なお、当該システム内で反応は生じていないが、標準的な専門用語として PRF と CSTR という用語を使用することにした。また、PFR と CSTR の体積はそれぞれ 9.5 mL (チューブ体積) と 7.85mL (セル体積) であった。

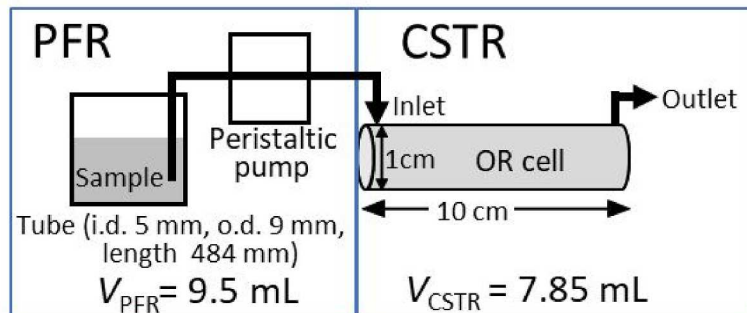


図 4-6 ステップ入力実験のためのフローセル系セットアップ

Model 計算には下記式を用いた。ステップ入力に対する CSTR の濃度変化は次式で表される。ここで、 V_{CSTR} は CSTR Tank Volume、 F_v は体積流量、 C_i は Inlet 濃度である。

$$V_{\text{CSTR}}(dC/dt) = F_v(C_i - C) \quad (4-1)$$

次に、 $C_i = C_0 = \text{constant}$ (step input)、PFR tank 容積を V_{PFR} とすると、下記解析解が得られる。なお、通液量 V は体積流量 F_v と時間 t の積で表している ($V = F_v t$)。

$$C/C_0 = \exp [-(V - V_{\text{PFR}})/V_{\text{CSTR}}] = \exp [-(F_v t - V_{\text{PFR}})/V_{\text{CSTR}}] \quad \text{for } V > V_{\text{PFR}} \quad (4-2)$$

$$C/C_0 = 0 \quad \text{for } 0 < V < V_{\text{PFR}} \quad (4-3)$$

5g/L サンプルを通液した際の応答曲線と式 4-2 と式 4-3 から算出したモデル計算結果を図 4-7 に示す。モデル計算による結果は実験結果を良好に表現し、式 4-1 はフローセルへの入口濃度変化に対する出口側の応答曲線を予測するのに適切であると考えられた。ここで、高流速条件の方がモデル計算とより一致している。今回設定したモデルの仮定に基づくと、高流速の方がフローセル内の混合が激しく、完全混合に近い状態になっていたと考えられる。

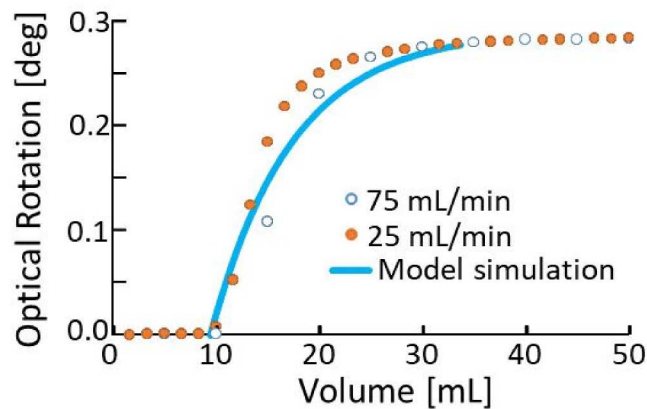


図 4-7 5 g/L サンプル通液時の入力応答曲線

次に、A)線形増加、B)ガウス分布曲線、C)指数曲線といったさまざまな異なる入力に対する出力応答曲線を式 4-1 によって数値的に計算した。 t^* は tF_v/V_{CSTR} で表わされる無次元時間(体積)である($t^* = tF_v/V_{CSTR}$)。

Case A) Linear increase $C_i/C_0 = gt^*$ (4-4)
 g :濃度勾配

Case B) Gaussian curve $C_i/C_0 = \exp[-(t^*-t^*_{max})^2/(2\sigma^2)]$ (4-5)
 t^*_{max} :ピーク最大値における t^* 、 σ^2 : 曲線の分散

Case C) Concave up exponential $C_i/C_0 = \exp(at^*) - 1$ (4-6)
 a : 曲線の形状を決定するパラメータ

上記3種類の入力に対する出力応答曲線の計算結果を図 4-8 に示す。 V_{PPR} は応答曲線の形状に影響を及ぼさないため、当該計算では 0 に設定している。図中の点線は入力信号を x 軸に対して 1.0 だけシフト($t^*_{shifted}=t^*+1.0$)しており、入力信号をフローセルの容積分だけシフトした曲線である。

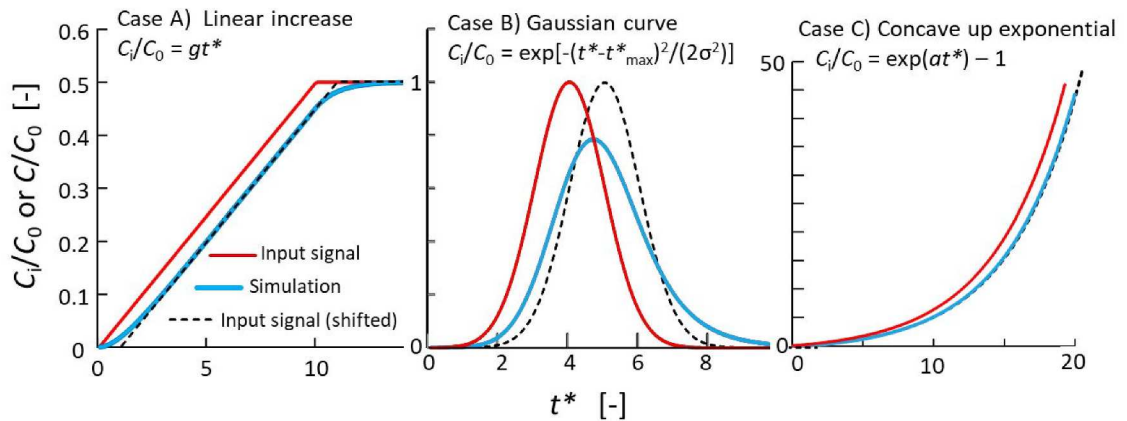


図 4-8 出力信号のシミュレーション結果

Case A) $g = 0.05$, After $C_i/C_0=0.5$, it remained constant.

Case B) $t^*_{\max} = 4.0$, $\sigma^2=1.0$, Case C) $a = 0.2$.

Case C の指数凸曲線では、応答曲線が上記の通り V_{CSTR} を考慮した曲線(点線)に良好に重なった。Case A の線形増加では、濃度変化開始時と終了時に若干の分散がみられたが、濃度が線形に増加している間は良好に一致する結果となった。一方、Case B のガウス分布曲線では大きな偏差が見られた。これより、比較的短い時間で変化する濃度変化をモニタリングする場合への適用へ留意が必要なが分かった。

上記の通り、当該モデル計算を用い、異なる入力に対する応答を予測できることが示された。抗体サンプルは高価であり、初期検討時はサンプル量も限られている。シミュレーションを活用することで、貴重なサンプルを使用することなく短時間にて、様々な入力に対するフローセルの適用性を評価可能となる。モデル計算は特定の単位操作プロセスに対するフローセルの適用性を評価するのに有用であると考えられた。

4-3-2. UF 濃縮工程における抗体濃度の連続モニタリング

抗体精製工程への適用例として、限外濾過 (UF) 膜を使用した接線流濾過 (TFF) によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い(図 4-9)、旋光度による抗体濃度のインラインモニタリングを行った。実験章で記載した通り、限外ろ過膜は再生セルローズ膜(30 kDa、88 cm²)を用い、12 g/L 溶液を 69 g/L まで濃縮した。循環流速は 44 mL/min である。

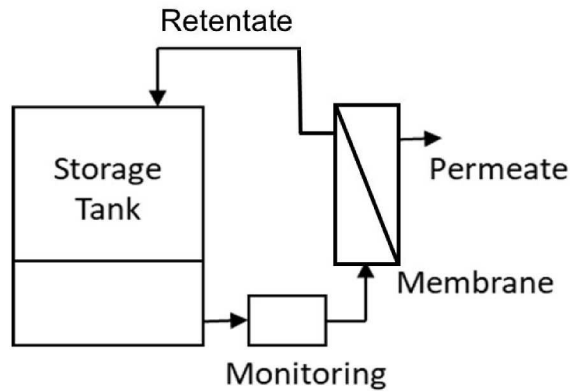


図 4-9 TFF 濃縮操作のリアルタイム連続モニタリング

濃縮中の旋光度ならびに A280 法により測定した抗体濃度の推移を図 4-10 に示す。旋光度は連続モニタリングを行った結果であり、A280 法はサンプルを採取後に希釈を行って測定した結果である。図 4-10 に示される通り、旋光度推移は抗体濃度と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度測定によりモニタリング可能であることを実証できた。

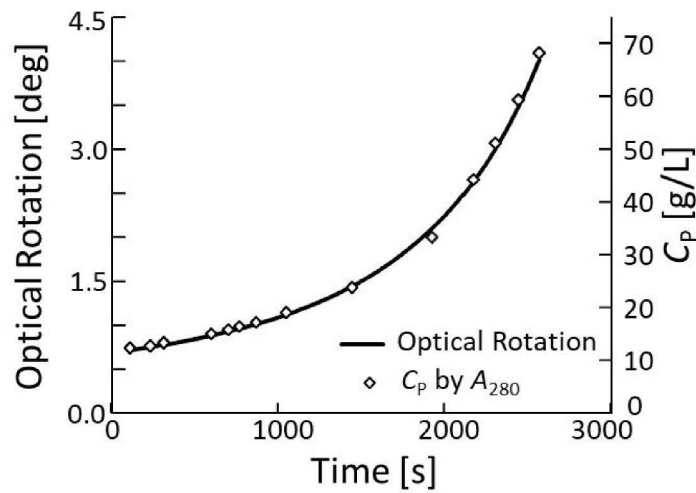


図 4-10 TFF 濃縮中の OR ならびにタンパク質濃度推移

濃縮中の抗体濃度は質量収支から予測可能であるが、適切な濃縮終了時点の決定に対してより信頼性の高い手法と考えられる。また、製造管理の観点からは、膜やタンクからのリークが発生した際などの逸脱が発生した際に期待した濃度になっていないことを継続的に監視できるというメリットがあり、そのような異常現象の検出に対しても有用な手法と考えられた。

4-4. 小括

第4章では、旋光度計の標準セルを実験室でフローセルへ改造し、抗体濃度の旋光度によるインラインモニタリングについて実証を行った。

5g/L、10g/L、15g/L、20g/L 濃度の抗体サンプルを旋光度フローセルへ順次通液した結果を用いて検量線を作成した結果、旋光度と抗体濃度の間には良好な直線性が観察され、その傾きは第3章のバッチ測定と同様の結果であった。

さらに、一連のプラグフロー反応器と連続攪拌タンク反応器を考慮した機構モデルを用いてフローセル系の解析を行った結果、ステップ応答のモデル計算値は実験結果を良好に表現した。当該モデル計算を用いて、線形増加、ガウス分布、指数増加の入力信号に対するシミュレーションを行い、このモデル計算は特定の単位操作プロセスに対するフローセルの適用性を評価するのに有用であることを確認した。

最後に、インライン測定によるリアルタイムのモニタリングが重要となる限外濾過膜を使用した接線流濾過によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い、旋光度のインライン測定を行った。その結果、12 g/L から 69 g/L への濃縮において、旋光度推移は抗体濃度と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度により連続的にモニタリング可能であることを示した。実製造へ適用する際はステンレスラインを用いて製造設備へ組み込むと想定されるが、旋光度計本体ではなくフローセルのみの改良であるため、比較的容易に製造設備へ反映できると考えられる。今後の実用化が期待される。

第5章 参考文献

1. Petra, G.; Reinhard, D.; Jochen, S. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioeng.*, 2014, 1, 118-212.
2. Holzberg, T.R.; Watson, V.; Brown, S.; Andar, A.; Ge, X.; Kostov, Y.; Tolosa, L.; Rao, G. Sensors for biomanufacturing process development: facilitating the shift from batch to continuous manufacturing. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2018, 22, 115-127.
3. Frans van den B.; Christian. B. L.; Klavs M. S.; Søren B. Engelsen; Process analytical technology in the food industry. *Trends Food Sci.*, 2013, 31, 27-35.
4. Wasalathanthri, D.P.; Rehmann, M.S.; Song, Y.; Gu, Y.; Mi, L.; Shao, C.; Chemmalil, L.; Lee, J.; Ghose, S.; Borys, M.C.; Ding, J.; Li, Z.J. Technology outlook for real-time quality attribute and process parameter monitoring in biopharmaceutical development- A review. *Biotechnol. Bioeng.*, 2020, 117(10), 3182-3198.
5. Roch, P.; Mandenius, C.F. On-line monitoring of downstream bioprocesses. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2016, 14, 112-120.
6. Christopher, G.; Dhanuka, P. W.; Diana, B. R.; George, Z. Keith, A. D.; Thomas, W.; Nadine, H. Systematic assessment of process analytical technologies for biologics. *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, 119, 423-434
7. Mariana, N. S. P.; Marieke, E. K.; Michel, H. E.; Marcel, O. Process analytical technique miniaturization for monoclonal antibody aggregate detection in continuous downstream processing. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* , 2022, 97(9), 2347-2364
8. Anamika, T.; Vishnu, S. M.; Anshul, A.; Anurag, S. R. Digital twin of a continuous chromatography process for mAb purification: Design and model-base control. *Biotechnol. Bioeng.*, 2022, 120, 748-766.
9. Brian, O.; Zhong-Hua, G.; Manju, K.; Robert, M.; Gautam, N.; Laura, S.; Jeffrey, D. M.; Jon, T.; Cameron, M.; John, C.; John, F. Impact of depth filtration on disulfide bond reduction during downstream processing of monoclonal antibodies from CHO cell culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116, 1669-1683.
10. Maruthamuthu, M.K.; Rudge, S.R.; Ardekani, A.M.; Ladisch, M.R.; Verma, M.S. Process analytical technologies and data analytics for the manufacture of monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol.*, 2020, 38(10), 1169-1186.
11. A.S. Tait, C.E.M. Hogwood, C.M. Smales, D.G. Bracewell; Host Cell Protein Dynamics in the Supernatant of amAb Producing CHO Cell Line. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109(4), 971-982.

12. Felicia, A. S. W.; Yamin, F.; Wai, K. C.; Amit, D.; Erik, F.; Ulrich, H.; Jamie, P.; Ralf, K. Evaluation of mild pH elution protein A resins for antibodies and Fc-fusion proteins. *J. Chromatogr. A*, 2024, 1713, 464523.
13. Takamitsu, I.; Takao I.; Yasuhiko, K.; Kevin, G.; Christopher, G. Integrated flow-through purification for therapeutic monoclonal antibodies processing. *mAbs*, 2018, 10(2), 325-334.
14. Takamitsu, I.; Takao, I.; Christopher, G. Polishing approach with fully connected flow-through purification for therapeutic monoclonal antibody. *Eng. Life Sci.*, 2019, 19(1), 31-36.
15. Denizhan, Y.; Hamidreza, M.; Dunie, N.; Amar, S.; Micheal, O.; Philip, M. Application of Raman spectroscopy in monoclonal antibody producing continuous systems for downstream process intensification, *Biotechnol. Prog.*, 2020, 36, e2947.
16. Alexander, G.; Angus, W.; Micheal, N.; Douglas, D. R.; Steven, M. S.; Mark, B.; Marek, H. Automated Data Generation for Raman Spectroscopy Calibrations in Multi-Parallel Mini Bioreactors. *Sens.*, 2022, 22, 3397.
17. Garima, T.; Vishwanath, H.; Anurag, S. R. An NIR-based PAT approach for real-time control of loading in Protein A chromatography in continuous manufacturing of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 117, 673-686.
18. Garima, T.; Vishnu, M.; Amey, K.; Anurag, S. R. Process Analytical Technology (PAT) Implementation for Membrane Operation in Continuous Manufacturing of mAbs: Model-Based Control of Single-Pass Tangential Flow Ultrafiltration. *AAPS J.*, 2022, 24, 83.
19. Garima, T.; Vishwanath, H.; Anurag, S. R. Near Infrared Spectroscopy as a PAT tool for monitoring and control of protein and excipient concentration in ultrafiltration of highly concentrated antibody formulations. *Int. J. Pharm.*, 2021, 600, 120456.
20. Heinz, A.; Alfrad, W. Variable pathlength fiber-optic spectrophotometry for protein determination in immunoglobulin concentrates. *Biopharm Int.*, 2015, 28(12), 42-50.
21. William, S.M.; Nihal, T.; Sunitha, K. Accurate and rapid protein concentration measurement of in-process, high concentration protein pools. *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34, 1234-1241.
22. Hayashi, K.; Fujiim, Y.; Saito, R.; Kanaom, H.; Hino, T. The influence of measurement parameters on the specific rotation of amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, 1966, 30, 1221-1232.

23. Lloyd, D.K.; Goodall, D.M.; Scrivener, H. Diode-laser-based optical rotation detector for high-performance liquid chromatography and on-line polarimetric analysis. *Anal. Chem.*, 1989, 61, 1238- 1243.
24. Driffield, M.; Bergström, E.T.; Goodall, D.M.; Klute, A.S.; Smith, D.K. High-performance liquid chromatography applications of optical rotation detection with compensation for scattering and absorbance at the laser wavelength. *J. Chromatogr. A*, 2001, 939(1-2), 41-48.
25. Maity, H.; Wei, A.; Chen, E.; Haidar, J.N.; Srivastava, A.; Goldstein, J. Comparison of predicted extinction coefficients of monoclonal antibodies with experimental values as measured by the Edelhoch method. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 77, 260-265.
26. Sapan, C.V.; Lundblad, R.L.; Price, N.C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, 29(2), 99-108. PMID: 10075906.
27. Noble, J.E.; Bailey, M.J. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.*, 2009, 463, 73-9
28. Trojanowicz, M.; Kołacińska, K. Recent advances in flow injection analysis. *Analyst (Lond.)*, 2016, 141(7), 2085-2139.
29. Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook, 2010.
30. Satzer, P.; Jungbauer, A. High-capacity protein A affinity chromatography for the fast quantification of antibodies: Two-wavelength detection expands linear range. *J. Sep. Sci.*, 2018, 41(8), 1791-1797.
31. Oliva, A.; Llabrés, M.; Fariña, J.B. Estimation of uncertainty in size-exclusion chromatography with a double detection system (light-scattering and refractive index). *Talanta*, 2009, 78(3), 781- 789.
32. Zhang, B.; Li, X.; Yan, B. Advances in HPLC detection--towards universal detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390(1), 299-301.
33. Harris, S.A.; Patel, B.A.; Gospodarek, A.; Desai, J.; de Janon Gutiérrez, A.; Botonjic-Sehic, E.; Brower, M.; Pinto, N.D.S. Determination of protein concentration in downstream biomanufacturing processes by in-line index of refraction. *Biotechnol. Prog.*, 2021, 37(5), e3187.
34. Soetedjo, H.; Rätty, J. Use of a modified Drude's equation to investigate the optical rotation property of sugars. *Optik (Stuttg.)*, 2014, 125, 7162-7165.

35. 伊勢村寿三, タンパク質化学2, 第6章タンパク質総論 6.5.5旋光性, 共立出版
1979.
36. Uhrovčík, J. Strategy for determination of LOD and LOQ values-- some basic aspects.
Talanta, 2014, 119, 178-180.
37. Logue, B.A.; Manandhar, E. Percent residual accuracy for quantifying goodness-of-fit
of linear calibration curves. *Talanta*, 2018, 189, 527-533.
38. Arnold, L.; Lee, K.; Rucker-Pezzini, J.; Lee, J.H. Implementation of fully integrated
continuous antibody processing: effects on productivity and COGm. *Biotechnol. J.*, 2018,
2, 1800061.
39. Ötes, O.; Flato, H.; Vazquez Ramirez, D.; Badertscher, B.; Bisschops, M.; Capito, F.
Scale-up of continuous multicolumn chromatography for the protein a capture step:
From bench to clinical manufacturing. *J. Biotechnol.*, 2018, 281, 168-174.
40. Vogg, S.; Müller-Späth, T.; Morbidelli, M. Current status and future challenges in
continuous bi chromatography. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2018, 22, 138-144.
41. Fisher, A.C.; Kamga, M.H.; Agarabi, C.; Brorson, K.; Lee, S.L.; Yoon, S. The current
scientific and regulatory landscape in advancing integrated continuous
biopharmaceutical manufacturing. *Trends Biotechnol.*, 2019, 37(3), 253-267.
42. Xhorxhi, G.; Rene, G.; Mark, S. Transfer of a three step mAb chromatography process
from batch to continuous: Optimization productivity to minimize consumable
requirements. *J. Biotechnol.*, 2017, 242, 11-18.
43. Nikhil, K.; Anamika, T.; Garima, T.; Anurag, S. R. Complete or periodic continuity in
continuous manufacturing platforms for production of monoclonal antibodies?.
Biotechnol. J., 2021, 16(7), 2000524.
44. Hidenori, I.; Kosuke, W.; Ikuo, T.; Noriko, Y.; Shuichi, Y. Measurement of high protein
concentrations by optical rotation: A case study for monitoring of monoclonal antibody
drug downstream processes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2021, 22, 898-904.
45. Heewon, Y.; Matthias, B.; Mark, R. E. Analysis of protein purification using ion-
exchange membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1999, 38, 4044-4050.
46. Lalita, K. S.; Apurva, P. M.; Anurag, S. R. Enablers for QbD implementation:
Mechanistic modeling for ion-exchange membrane chromatography. *J. Membr. Sci.*,
2016, 500, 86-98.

第6章 総括

本論文では、タンパク質定量の標準的なメソッドとしては使用されていない光学的測定である旋光度について、抗体製造プロセスにおける濃度モニタリングへの適用性を評価した。製造工程中における各種パラメータのモニタリングは製造プロセスの安定化へ非常に重要である。その中において、生成物である抗体の濃度測定は製造管理上で必要不可欠な要素であり、非常に重要なプロセスパラメータとなっている。旋光度は光が光学活性物質を通過するときに特定の方向に回転する現象であり、サンプル中の目的物質濃度を非破壊的に測定できる光学的な手法である。産業プロセスの観点からみると、この旋光度はアミノ酸や糖などの光学活性物質濃度を測定するために使用されているが、タンパク質については主にその変性(構造変化)を追跡する研究へ使用されており、タンパク質の定量へ一般的に使用される方法ではない。そこで我々は、当該旋光度の抗体濃度測定への適用性ならびにインラインによるモニタリング方法としての実用性を評価した。

第1章では、抗体製造プロセスの概要と製造パラメータのモニタリング手法についてまとめ、本論文の目的と構成を述べた。

第2章では、タンパク質の定量に一般的に使用される方法についてまとめ、タンパク定量法の観点から抗体製造プロセスの濃度モニタリング法を考察した。

第3章では、複数の抗体サンプルを用い、旋光度の抗体濃度測定への適用性を評価した。その結果、80 g/L といった高い抗体濃度までの直線性が保たれることが確認できた。また、定量限界は 0.30 g/L と算出され、旋光度は A280 法と比べ、広範囲の濃度範囲へ適用可能であることが示された。また、細胞培養プロセス中の抗体濃度モニタリングへ旋光度を適用した結果、A280 法は培養液中の抗体濃度を直接測定できないのに対し、旋光度は培養液の着色の影響を受けにくく、培養工程の抗体濃度の推移を良好に表現する結果が得られた。

第4章では、旋光度計をフローセルへ改造し、抗体濃度の旋光度によるインラインモニタリングについて実証を行った。5g/L、10g/L、15g/L、20g/L 濃度の抗体サンプルを旋光度フローセルへ順次通液した結果を用いて検量線を作成した結果、旋光度と抗体濃度の間には良好な直線性が観察され、その傾きは第3章のバッチ測定の結果と同様であっ

た。さらに、一連のプラグフロー反応器と連続攪拌タンク反応器を考慮した機構モデルを用いてフローセル系の解析を行った結果、ステップ応答のモデル計算値は実験結果を良好に表現した。当該モデル計算を用いて、線形増加、ガウス分布、指数増加の入力信号に対するシミュレーションを行い、このモデル計算は特定の単位操作プロセスに対するフローセルの適用性を評価するのに有用であることを確認した。最後に、インライン測定によるリアルタイムのモニタリングが重要となる限外濾過膜を使用した接線流濾過によるタンパク質の濃縮工程の実験を行い、旋光度のインライン測定を行った。その結果、12 g/L から 69 g/L への濃縮において、旋光度推移は抗体濃度と良好に一致し、濃縮中の濃度推移をインラインの旋光度により連続的にモニタリング可能であることを示した。

非侵襲的な光学的測定法には UV 法 (A280 法)、屈折率法、旋光度法があることを第 2 章で述べた。UV 法は一般的な 1cm 光路長セルを用いると低濃度の狭い濃度範囲のみに適用可能となる。近年は光路長を短くすることで高濃度まで測定可能な分析機器が発売されているが高価であり、着色の影響をうけるデメリットがある。HPLC で抗体を特異的に吸脱着し、溶出ピークを UV 法で濃度測定することは可能だが、インラインは不可であり、数分以上の時間をかけて測定する必要がある。屈折率法は HPLC 検出器としては広く用いられているが、タンパク質には使用されていない。最近、高濃度タンパク質モニタリング用の装置が開発・市販されているが、着色の影響は不明である。一方、旋光度法は本研究により広範囲の濃度が測定可能であることが示され、高濃度化している抗体精製プロセスの濃度モニタリングに有用であることがわかった。また、培養液のような着色をもつサンプルに対してもモニタリングできる可能性が示され、抗体製造プロセスにおいてインラインモニタリングへ活用可能であることも実証された。現在、市販セルはないが旋光度計本体ではなくフローセルのみの改良であるため、容易に製造設備へ反映できると考えられ、今後の実用化が期待される。

発表論文リスト

査読のある雑誌等

- (1) 著者氏名: Hidenori Inaba, Kosuke Wakabayashi, Ikuo Tsujimoto, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Measurement of High Protein Concentrations by Optical Rotation: A Case Study for Monitoring of Monoclonal Antibody Drug Downstream Processes

学術雑誌名: Current Protein and Peptide Science

巻、号、頁: Volume 22, Issue 12, Page 898-904

DOI: <https://doi.org/10.2174/1389203722666211210121258>

発行年月: 2021 年 12 月発行

本文との関係: 主に本論文の第 2 章と第 3 章へ関連

- (2) 著者氏名: Hidenori Inaba, Tomoki Sugiyama, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Continuous monitoring of high protein concentrations by optical rotation – A case study for continuous monitoring of monoclonal antibody concentrations during ultrafiltration

学術雑誌名: Japan Journal of Food Engineering

巻、号、頁: 24 巻、4 号、113-117 頁 DOI : 10.11301/jsfe.23635

発行年月: 2023 年 12 月発行

本文との関係: 主に本論文の第 4 章へ関連

査読のある国際学会の会議録等

- (1) 著者氏名: Hidenori INABA, Kosuke WAKABAYASHI, Ikuo TSUJIMOTO, Noriko YOSHIMOTO, Shuichi YAMAMOTO

論文題目: Antibody Concentration Measurement Using Optical Rotation: Toward Process Analytical Technology

学術雑誌名: MATEC Web of Conferences, The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCChE 2019)

巻、号、頁: Volume 333, Article Number 15002, Number of Page(s) 4

DOI : <https://doi.org/10.1051/mateconf/202133315002>

発行年月: 2021 年 1 月発行

本文との関係: 主に本論文の第 2 章と第3章へ関連

その他

(1) 著者氏名: 稲葉 英憲

論文題目: 旋光度利用による抗体濃度モニタリング

学術雑誌名: 化学工学会バイオ部会 News Letter

巻、号、頁: Volume 55, Page 4-9

発行年月: 2022 年 6 月発行

本文との関係: 主に本論文の第1章と第3章へ関連

略語表

BSA:	bovine serum albumin, 牛血清アルブミン
CHO:	Chinese hamster ovary, チャイニーズハムスター卵巣
Cp:	protein concentration, タンパク質濃度
CSTR:	continuous stirred tank reactor, 連続攪拌タンクリアクター
CV:	coefficient of variation, 変動係数,
DF:	Diafiltration
DNA:	deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸,
DO:	dissolved oxygen, 溶存酸素濃度
FIA:	flow injection analysis, フローインジェクション分析
GMP:	Good Manufacturing Practice
GOF:	goodness of fit, 適合度
HPLC:	high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
HSA:	Human serum albumin, ヒト血清アルブミン
IgG:	immunoglobulin G, イムノグロブリン G
LOD:	limit of detection, 検出限界

LOQ: limit of quantification, 定量限界

mAb: monoclonal antibody, モノクローナル抗体

MAPE: mean absolute percentage error, 平均絶対パーセント誤差

NIR: near-infrared, 近赤外

OR: optical rotation, 旋光度

PAT: process analytical technology, プロセス解析工学

PFR: plug flow reactor, プラグフローリアクター

RI: refractive index, 屈折率

RSD: relative standard deviation, 相対標準偏差

SD: standard deviation, 標準偏差

TFF: Tangential flow filtration, 接線流濾過

UF: Ultrafiltration, 限外濾過

UV: ultraviolet, 紫外線

謝辞

本研究に対して終始懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、山本修一教授に心より感謝申し上げます。また、本研究に対してご討論とご指導を賜りました吉本則子准教授に感謝の意を表します。

さらに、本研究に協力いただきました、アステラス製薬株式会社 研究所の関係諸氏に深く感謝いたします。

最後に、このような研究の機会を与えてくださると共に、多大なるご支援をいただきました、アステラス製薬株式会社 原薬研究所 山口秀人所長、ならびに松浦光高室長に深く感謝いたします。

2024年4月

稲葉 英憲