

モノクローナル抗体の二種類の分解を軽減する方法の開発: 培養過程での酸化分解および細胞分離過程での還元分解  
Development of methods that reduce the two different degradation reactions of monoclonal antibodies: the oxidation reaction in a culture step and the reduction reaction in a cell separation step

2023 年度

令和 5 年度

学籍番号 T202A603

山口 剛

By Tsuyoshi Yamaguchi

Doctor Thesis

群馬大学 大学院理工学府

Gunma University

## 要旨

治療用モノクローナル抗体に含まれる切断体は、薬剤の有効性・安全性・薬物動態に影響する可能性があることから、重要品質特性 (Critical Quality Attributes: CQA) としてみなされる。従って、原薬や製剤において分析対象になるだけでなく、製造プロセスにおいて管理や低減が求められる。一般的な抗体製造の培養プロセスにおいては、組換えチャイニーズハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary: CHO) 細胞が発現株に用いられ、生産培養において発現した抗体が培養液中に分泌される。本研究では、生産培養工程及びハーベスト工程 (細胞分離工程) での切断体の生成メカニズムに着目し、その抑制に関する2つの改善方法を提示することができた。

### 1. 培養工程中の酸化的切断反応を抑制するカテキン類の添加

生産培養では、培養液中に所望の抗体に加えて一定量の切断体が含まれることが報告されていることから、本工程において切断体含量を制御する方法が望まれるが、産生メカニズムがほとんど理解されていないこともあり、制御する方法はほとんどなかった。

我々は、3種類の抗体発現細胞株に対して、高生産性プロセスを開発し適用したところ、生産性の向上が認められたものの、それに連動して切断体含量が増加する傾向にあることを観察した。培養液に硫酸銅を添加すると、切断体はさらに増加した。Cu<sup>2+</sup>イオンは活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の発生を促進することから、切断体の産生メカニズムにROSが関与しているとの仮説を立てた。代表的な抗酸化物質を培地に添加したところ、カテキンまたはエピガロカテキンガレートの場合では、生産性をほとんど低下させることなく、切断体の増加を防ぐことを見出した。従って、カテキン類または同等の機能を持つ抗酸化剤を培地に加えることは、高い生産性と低い切断体含量を達成する有力な方法であることが示された。

### 2. ハーベスト工程の還元的切断反応を起こしにくい細胞株の効率的スクリーニング

生産培養工程が完了すると、連続遠心機やデプスろ過処理により、不要な細胞を培養液から分離する、ハーベスト工程を行う。ここでのせん断応力により一部の細胞が破碎することで、細胞内の還元酵素が漏出し、抗体の分子間ジスルフィド結合が還元を受ける現象が、複数のグループから報告されている。これは抗体還元と呼ばれ、切断体の増加及び生産物純度の低下につながる。細胞株によって抗体還元リスクが異なることが知られていたが、ラボスケールにて効率的に抗体還元リスクの低い細胞株をスクリーニングする方法がこれまで報告されていなかった。

本研究では、48種類のCHO細胞株に由来する破碎液からそれぞれの還元リスクを同時に評価できる新しいスクリーニング法を立ち上げた。さらに、還元高リスク細胞株は、還元低リスク細胞株よりも細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) および NADP<sup>+</sup>濃度が高いことを見つけた。還元低リスク細胞株の破碎液にNADPHまたはNADP<sup>+</sup>を補充すると、液中の抗体が還元することを観察した。本研究によって立ち上げた抗体還元リスク評価法によって、還元低リスクCHO細胞株をスクリーニング及び生産株として選定することによって、実製造において、抗体還元が引き起こされるリスクを緩和または防止できると考える。

以上の研究では、培養工程における細胞及び培養液のレドックス状態を適正化することによって、抗体医薬品に含まれる切断体含量を制御する可能性が示された。本研究の成果は、抗体医薬品の製造プロセスにおける品質管理に重要な洞察をもたらし、製品の有効性・安全性の向上につながるものと期待される。

## Abstract

Fragments found in therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are considered as critical quality attributes (CQAs) because they can affect the drug product's efficacy, safety, and pharmacokinetics. They are not only subject to analysis in the drug substance or drug product but must also be controlled and reduced in the manufacturing process. In a typical mAb production, recombinant Chinese Hamster Ovary (CHO) cells are commonly used in the cell culture process, and the expressed antibodies are secreted into the cell culture fluid. This study focused on the mechanisms of mAb fragmentation during the cell culture process and harvesting process (cell separation step). Our research has successfully found two methods to prevent the fragmentation.

### **1. Addition of catechins to prevent mAb oxidative fragmentation during the cell culture process**

It has been reported that the cell culture fluid may contain some amount of mAb fragments, which can be problematic. Therefore, a method to prevent mAb fragmentation is needed. However, there are limited methods available for CHO cell culture because the mechanism underlying this issue is still not understood.

When three CHO cell lines expressing mAb were cultured in a highly productive fed-batch culture process, it was observed that the content of antibody fragments increased with the increase in titer. Addition of copper sulfate to the culture medium further increased the content of fragments, indicating that reactive oxygen species (ROS) play a role in the fragmentation process. Several antioxidants were examined, and it was observed that the addition of catechin or epigallocatechin gallate to the culture medium prevented the increase in fragmentation without significantly reducing productivity. Therefore, adding catechins or additives with similar function would be beneficial for the production of therapeutic mAbs with a balance between high titers and low fragment content.

### **2. An efficient screening method for selections of CHO cell lines unsusceptible to mAb reductive fragmentation during the harvest process**

After the production culture step is completed, a harvesting step is performed to separate the producing cells from the cell culture fluid by continuous flow centrifugation and/or depth filtration. It has been reported by several groups that some reducing enzymes are released in response to the cell lysis resulting from the shear stress generated by continuous flow centrifugation and depth filtration, which induces reducing interchain disulfide bonds in mAb. Antibody reduction lowers the yield and purity of mAb preparations, which may result in fragmented mAb. Antibody reduction susceptibility may be cell line-dependent. To the best of our knowledge, however, an efficient method of screening reduction-unsusceptible CHO cell lines has not been previously reported.

Here, we report a novel screening method that can simultaneously detect and identify mAb reduction susceptibility in lysates containing  $\leq 48$  CHO cell lines. Furthermore, we discovered that reduction-susceptible cell lines contained higher total intracellular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and  $\text{NADP}^+$  concentrations than reduction-unsusceptible cell lines. NADPH or  $\text{NADP}^+$  supplementation in the lysate of reduction-unsusceptible cells resulted in mAb reduction. Application of the innovative CHO cell line screening approach could mitigate or prevent reductions in large-scale mAb generation from CHO cells.

My research has shown that it is possible to regulate the mAb fragmentation by optimizing the redox state of CHO cells and the cell culture fluid during the cell culture process. The findings of this study offer valuable information about quality control in the mAb production process, which is expected to enhance the effectiveness and safety of the final product.

# 目次

1	緒論	7
1.1	抗体医薬品の概要	7
1.1.1	抗体の種類と構造	7
1.1.2	抗体医薬品の市場動向	8
1.2	医薬品の品質特性	9
1.2.1	抗体医薬品の代表的な品質特性	9
1.2.2	抗体医薬品の切断体が有効性・安全性・薬物動態に及ぼす影響	10
1.2.3	抗体の切断体の種類、産生メカニズム	12
1.2.4	切断体の分析法	13
1.3	抗体医薬品の生産	14
1.3.1	CHO細胞を用いた抗体医薬品の製造プロセス	14
1.3.2	培養工程における切断体産生の課題	15
1.4	本研究の内容・成果	16
1.4.1	フェドバッチ培養でのカテキン類添加による抗体切断体抑制方法	16
1.4.2	還元低リスク CHO細胞株のハイスループットスクリーニング方法	16
2	CHO細胞のフェドバッチ培養でのカテキン類添加による抗体切断体抑制方法の開発	17
2.1	緒論	17
2.2	方法	18
2.2.1	細胞株と培地	18
2.2.2	抗体発現 CHO細胞のバイオリアクター培養	18
2.2.3	抗体発現 CHO細胞のフラスコ培養	20
2.2.4	精製された抗体のインキュベーション	20
2.2.5	キャピラリーゲル電気泳動による断片解析	20
2.2.6	統計分析	20
2.3	結果	21
2.3.1	CHO細胞のフェドバッチ培養における抗体生産性と切断体含量の相関性	21
2.3.2	フェドバッチ培養における抗体の切断体産生メカニズム	23
2.3.3	カテキン類の添加によるフラスコでのフェドバッチ培養における抗体の切断体産生の抑制	26
2.3.4	カテキン類の添加によるバイオリアクターでのフェドバッチ培養における抗体の切断体産生の抑制	28
2.4	考察	32
2.4.1	CHO細胞培養における抗体の切断体産生に対する活性酸素の関与	32
2.4.2	CHO細胞培養における抗体の切断体産生及び細胞増殖に対するカテキン類の効果	33
2.5	小括	35

3	モノクローナル抗体の還元低リスク CHO 細胞株のハイスループットスクリーニング方法の開発 .....	36
3.1	緒論 .....	36
3.2	方法 .....	38
3.2.1	細胞株と培地 .....	38
3.2.2	抗体発現 CHO 細胞のバイオリクター培養 .....	38
3.2.3	抗体を発現する CHO 細胞のフラスコ培養 .....	38
3.2.4	細胞破碎された培養終了時培養液 (Lysed Harvested Cell Culture Fluid; Lysed HCCF) の調製 .....	38
3.2.5	ガラス瓶を用いた Lysed HCCF のインキュベーション .....	38
3.2.6	Ambr15 を用いた Lysed HCCF のインキュベーション .....	39
3.2.7	ジスルフィド結合還元評価 .....	39
3.2.8	TrxR 活性評価および NADPH/NADP <sup>+</sup> 定量 .....	39
3.3	結果 .....	40
3.3.1	還元リスクの細胞株依存性 .....	40
3.3.2	Ambr15 システムによる抗体還元評価法のスループット向上 .....	40
3.3.3	フラスコへの培養容器の変更によるスループット向上 .....	43
3.3.4	還元リスクと他の Performance Parameter との関係性 .....	45
3.3.5	細胞内 NADPH 及び NADP <sup>+</sup> 濃度の定量 .....	47
3.3.6	NADPH、NADP <sup>+</sup> 及び Cu <sup>2+</sup> を Lysed HCCF に添加した際の影響 .....	50
3.4	考察 .....	52
3.4.1	抗体還元リスク評価における Ambr15 システムの利点 .....	52
3.4.2	抗体還元リスクを決定する因子 .....	52
3.4.3	Ambr15 システムのその他の用途 .....	53
3.5	小括 .....	54
4	結論 .....	55
5	論文 .....	57
6	謝辞 .....	58
7	Bibliography .....	59

# 1 緒論

## 1.1 抗体医薬品の概要

### 1.1.1 抗体の種類と構造

免疫は生体防御機構として重要な役割を担っており、抗体は特に獲得免疫機構の液性免疫で積極的に働く高分子である。抗体はB細胞から分泌され、体外からの病原菌だけでなく、例えばがん化した異常な細胞に対しても結合・攻撃し、体内の恒常性維持に関与している。ヒトが持つ抗体は、その構造や機能からIgG、IgM、IgA、IgE、IgDの5種類に大別され、IgGについてはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4の4種類のサブクラスにさらに分類される（図1-1、Walsh et al. 2021）。近年、遺伝子組換え技術や細胞工学技術を組み合わせることにより、所望の抗体を生体外で大量生産する技術が確立され、抗体を医薬品として利用する産業応用が実現している。抗体医薬品としては、血中半減期が比較的長く、補体依存性細胞障害活性や抗体依存性細胞障害活性などの免疫活性が高いことから、特にIgG1が採用されている。また、免疫活性が低いものの、IgG1と近い構造を持つIgG4が、IgG1に次いで採用されている（Irani et al, 2015, Martin et al, 2023）。図1-2にIgG1の構造を示す。2本の重鎖及び2本の軽鎖から成る4本のポリペプチドがシステインを足場に共有結合しており、Y字型の分子構造をとっている（Mark et al, 2022）。抗体が抗原と結合するための領域は可変領域に含まれており、この領域は遺伝子の再編成によりアミノ酸配列に抗体毎に多様性を持つことができるため、様々な抗原に結合することが可能である。可変領域以外は定常領域と呼ばれる。重鎖の定常領域にはN型糖鎖結合サイトがあり、糖鎖は抗体の血中安定性や抗体依存性細胞障害活性などに関わる。

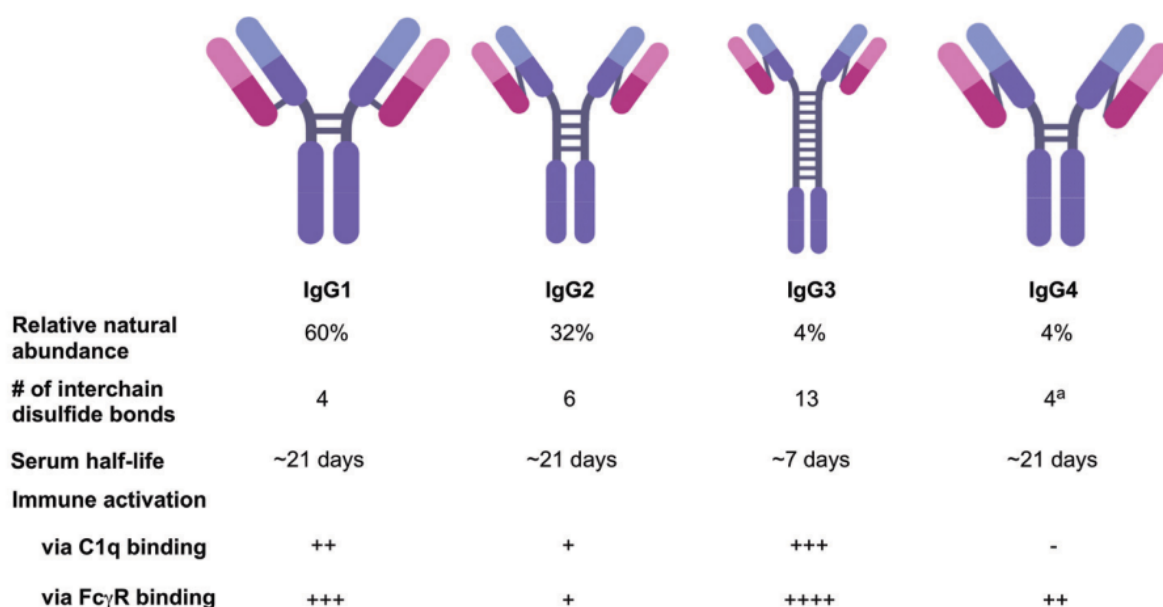


図1-1. IgG抗体サブクラスの構造（Walsh et al. 2021より抜粋）

C1q bindingは補体依存性細胞障害活性（complement dependent cytotoxicity: CDC）に影響する。FcγR bindingは抗体依存性細胞障害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC）に影響する。a: ヒンジ領域のジスルフィド結合は不安定であり、生体内で他のIgG4抗体とFab armを交換することがある。

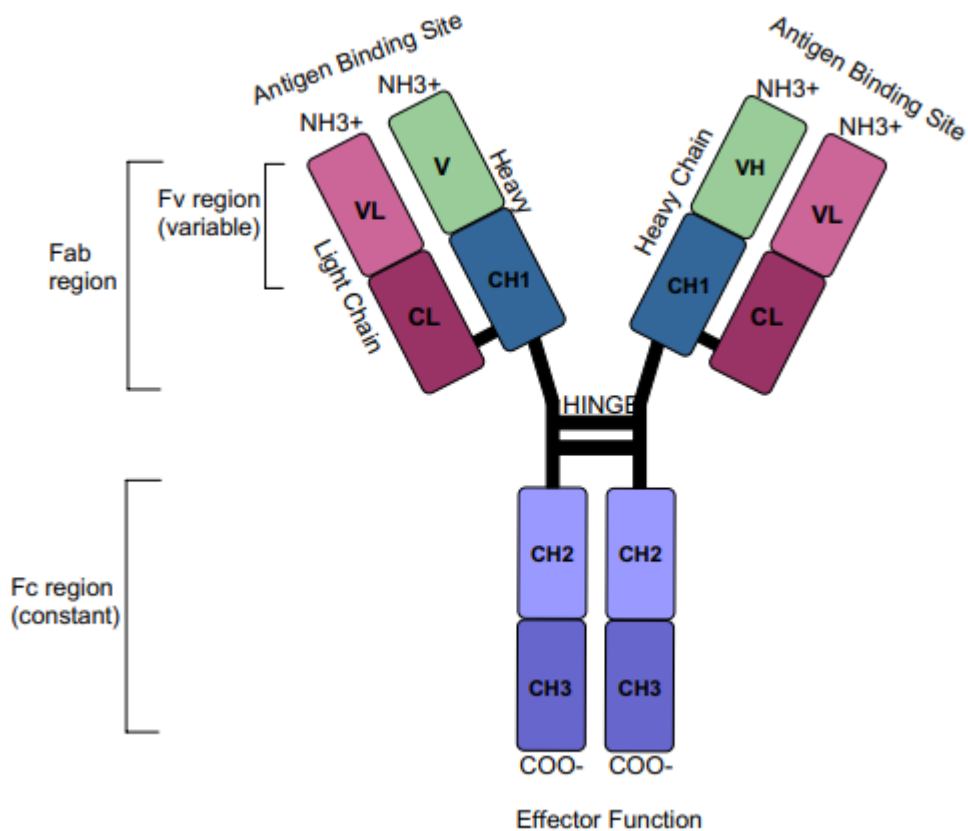


図 1-2. IgG1 抗体の模式図 (Mark et al. 2022 より抜粋)

IgG 抗体は 2 本の重鎖、2 本の軽鎖がジスルフィド結合によって連結した複合体である。VL 領域及び V 領域から成る Fv 領域は可変領域と呼ばれ、抗原結合サイトが含まれる。一方、可変領域以外は定常領域と呼ばれ、免疫活性に重要な役割を持っている。また、VL-CL 領域と V-CH1 領域はジスルフィド結合によって結合しており、Fab 領域と呼ばれる。

### 1.1.2 抗体医薬品の市場動向

抗体医薬品は、疾患に関わる分子に特異的に結合する抗体を医薬品としたものである。1986 年に CD3 受容体を標的としたムロモナブが米国食品医薬品局 (FDA) から販売承認を得たものの、抗原性の課題から後続の開発品の上市が一時的に停滞したが、1990 年代にキメラ抗体やヒト化抗体の作製技術等の出現により、現在も承認数が年々増えてきている (Walsh 2018; Martin et al. 2023) (図 1-3)。これまで開発されてきた抗体医薬品の対象疾患はがんが最も多く、次いで関節リウマチなどの免疫系疾患が挙げられる (Irani et al. 2015)。従来の低分子医薬品とは異なり、広い面で標的分子と結合できることもあり、標的特異性が高く、これまでアプローチが難航していた疾患に対して治療機会を創出している。一方で、抗体医薬品の市場における需要の増大に応じて、高い生産性と高い製品品質を両立させた生産体制を構築することが安定供給責任のある医薬品メーカーの課題になっている。



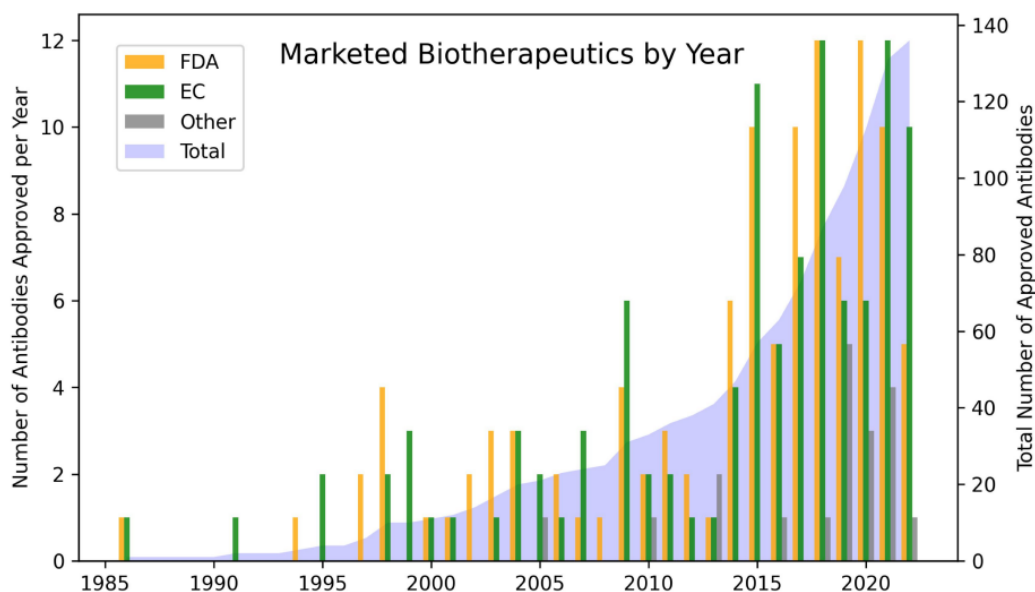


図 1-3. 抗体医薬品の販売承認申請数 (Martin et al. 2023 から抜粋)

## 1.2 医薬品の品質特性

優れた医薬品をいち早く患者や医療現場に届けることが望まれるが、医薬品の上市のためには、有効性、安全性、品質の各々に求められる基準を満たすことが医薬品メーカーによって事前に検証された上で、規制当局によって審査・承認される必要がある。ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human) は国際的な枠組みとして、承認審査の基準を国際的に統一することにより、世界各国でより良い医薬品をより早く医療現場に届けることを目的に掲げて、各種ガイドラインを作成・発表している。医薬品の重要品質特性 (Critical Quality Attributes: CQA) は、ICH Q8 (製剤開発) 及び Q11 (原薬の開発と製造) において、「物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質のうち、目的とする製品の品質を保証するために、適切な限度内、範囲内、分布にあるべき特性又は性質である」と定義され、その特定と厳密な管理が医薬品の開発において必須とされている。

### 1.2.1 抗体医薬品の代表的な品質特性

抗体医薬品は、有効成分が水溶性の高分子タンパク質であり、また、組換え発現時の翻訳後修飾などによって不均一性を有し、有効成分の構造が唯一に定められないという特徴がある (Kozlowski & Swann 2006; Liu et al. 2008; Goetze et al. 2010; Wang et al, 2007)。代表的な品質特性としては、サイズバリエーション、電荷異性体、酸化体、糖鎖バリエーション、システイン結合バリエーションに大別される。例えば、電荷異性体として、脱アミド体や異性化があるがアスパラギン残基は脱アミド化を受けて、アスパラギン酸やイソアスパラギン酸に異性化する (図 1-4)。また、サイズバリエーションとして凝集体や切断体が含まれる (表 1-1)。なお、重鎖、軽鎖は通常ジスルフィド結合によって連結されるが、システイン結合バリエーションとしては、フリーチオール、チオエーテル、トリスルフィドが知られている。抗体医薬品については、これらの品質特性に対して、特性解析データや非臨床・臨床データに加えて、既出の論文情報を基にしてアセスメントを行い、有効性・安全性・薬物動態に影響する可能性がある場合には、重要品質特性として特定し管理する必要がある。

表 1-1 抗体医薬品の代表的な品質特性 (Quality Attribute; QA)

分類	品質特性 (QA)
サイズバリエーション	凝集体、切断体
電荷異性体	脱アミド体、異性化 (Asp→ <i>iso</i> -Asp)、糖化体、C 末端異性体 (リジン欠損、アミド化プロリン)、N 末端異性体 (ピログルタミル化)
酸化体	メチオニン酸化体、トリプトファン酸化体
糖鎖バリエーション	N-糖鎖型糖鎖非結合体、糖鎖多型 (シアル化、ハイマンノース体、 <i>Afucosylation</i> 、 <i>Galactosylation</i> )
システイン結合バリエーション	フリーチオール (-SH)、チオエーテル (-S-)、トリスルフィド (-S-S-S-)

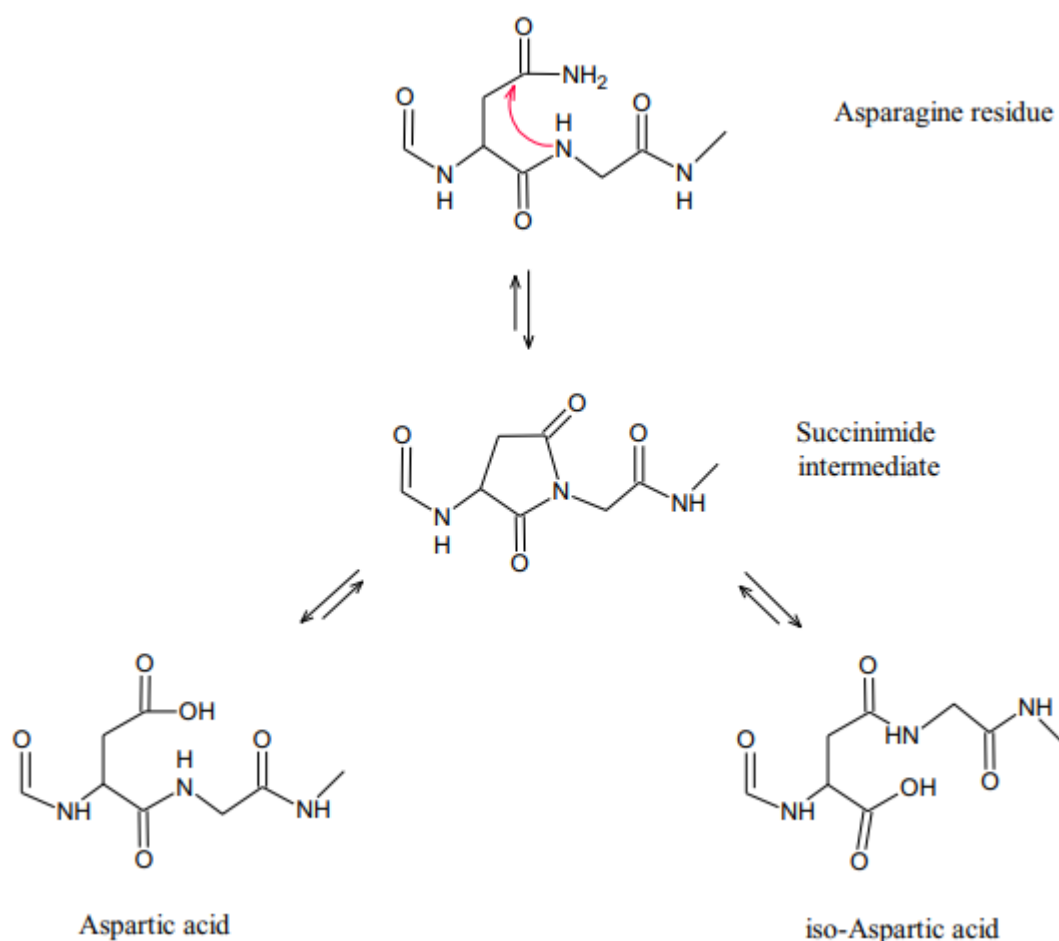


図 1-4. アスパラギンの脱アミド化及びイソアスパラギン酸への異性化 (Gupta et al. 2022 より抜粋)

### 1.2.2 抗体医薬品の切断体が有効性・安全性・薬物動態に及ぼす影響

本研究では、抗体医薬品の品質特性のうち切断体に着目した。ここでいう切断体とは、主に軽鎖 L (分子量：約 23 kDa)、重鎖 H (分子量：約 50 kDa)、重鎖 1 本と軽鎖 1 本から成る HL (分子量：約 75 kDa)、重鎖 2 本から成る HH (分子量：約 100 kDa)、重鎖 2 本と軽鎖 1 本から成る HHL (分子量：約 125 kDa)、に代表されるネイティブ抗体のサブユニットである (図 1-5)。非還元条件下での CE-SDS 法 (Capillary Electrophoresis in the presence of Sodium Dodecyl

Sulfate) にて分析した際にインタクト抗体 (分子量: 約 150 kDa) に対して、低分子量ピークとして分離されることから、LMWS (Low Molecular Weight Species) とも呼ばれる (Wagner et al. 2020) (図 1-6)。

切断体は抗体医薬品において、その有効性・安全性・薬物動態に影響する可能性があることから、重要品質特性 (CQA) の1つとされている (表 1-2)。



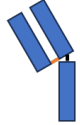
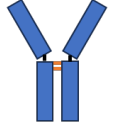
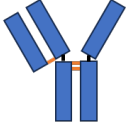
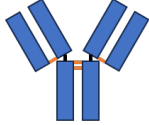
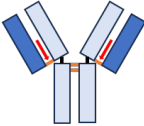
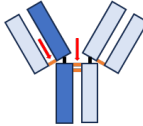
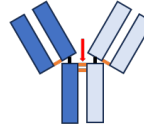
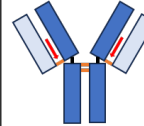
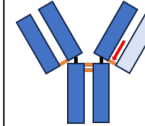
	L	H	HL	HH	HHL	Intact
切断体						
分子量 (kDa)	約23	約50	約75	約100	約125	約150
切断サイト	 H-L間のジスルフィド結合	 H-L間及びH-H間のジスルフィド結合	 H-H間のジスルフィド結合	 H-L間のジスルフィド結合	 H-L間のジスルフィド結合	

図 1-5. 抗体の切断体と切断サイト

赤矢印は切断サイトを示す。オレンジの線はジスルフィド結合を、黒の短い線はヒンジ領域を示す。

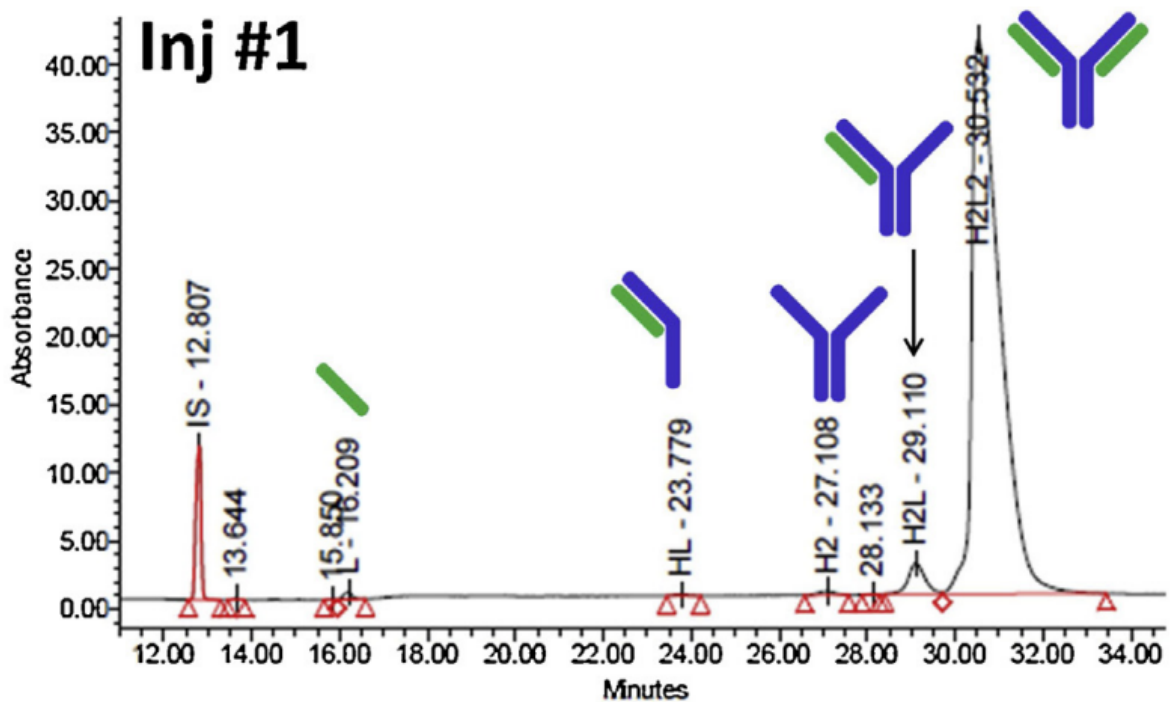


図 1-6. 非還元条件下での CE-SDS 法における代表的なモノクローナル抗体のエレクトロフォエログラム (Wagner et al. 2020 より抜粋)

表 1-2 切断体が有効性・安全性・薬物動態に及ぼす影響

分類	品質特性 (QA)
有効性・活性	静注用免疫グロブリン製剤において、切断体含量の増加により活性が低下することが報告されている (Page et al. 1995)
安全性・免疫原性	切断体がエピトープとして認識されることにより抗原性を示す可能性が報告されている (Cordoba et al. 2005)
薬物動態 (PK)	ヒンジ領域の分解で生じた Fab 断片は、PK プロファイルに影響を与えることが確認されており、血中半減期は切断部位に依存すると考察されている (Eon-Duval et al. 2012)

### 1.2.3 抗体の切断体の種類、産生メカニズム

タンパク質のペプチド結合は、生理的条件下では極めて安定であるが、酵素的または非酵素的な反応によって切断を受けることがある (Vlasak & Ionescu 2011)。非酵素的な断片化については、β脱離 (図 1-7. Cohen et al. 2007)、加水分解 (Cordoba et al. 2005; Xiang et al. 2007)、金属を介した酸化的切断 (Smith et al. 1996; Glover et al. 2015)、フリーラジカルによる切断 (Yan et al. 2011) など、様々なメカニズムで起こりえる。ペプチド結合は非酵素的な断片化に対して非常に安定であるが、標的配列、周辺アミノ酸側鎖、該当する領域の柔軟性、溶液の化学的性質 (pH、温度)、ラジカルや金属イオンの存在などの影響を受けて、不安定になることが報告されている。一例として、モノクローナル抗体における主な切断サイトの pH 依存性を図 1-8 に示す。pH6 付近では安定であるが、pH が低い場合及び高い場合の両方で、切断率が高くなる傾向がある。

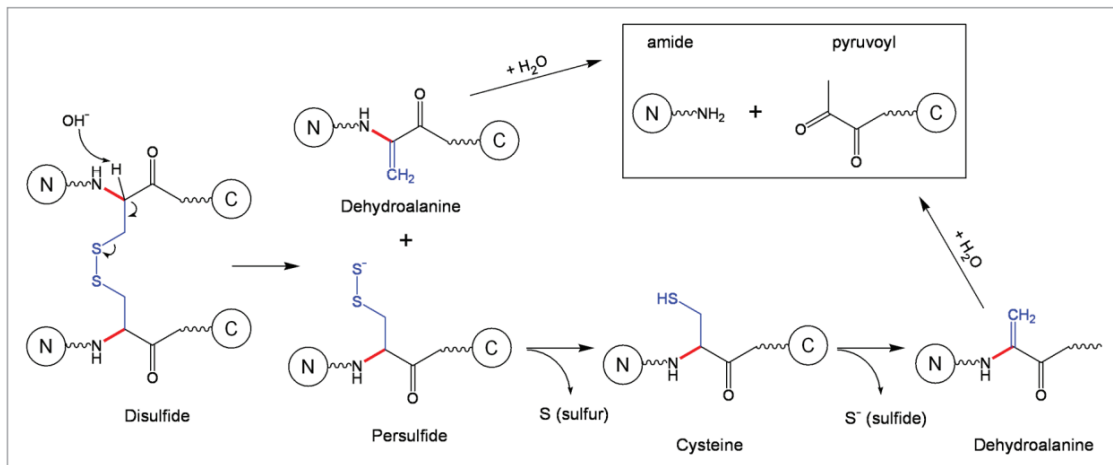


図 1-7. β脱離によるジスルフィド結合の切断 (Vlasak & Ionescu 2011 より抜粋)

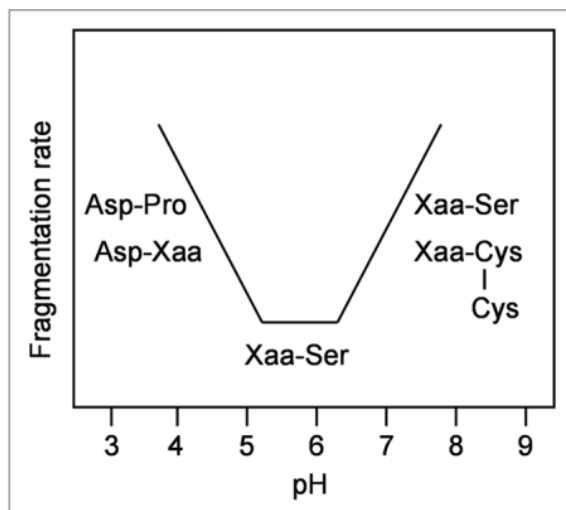


図 1-8.モノクローナル抗体における主な切断サイトの pH 依存性 (Vlasak & Ionescu 2011 より抜粋)

過酸化水素はヒドロキシラジカルの生成を介して IgG1 のヒンジ領域の断片化を引き起こすことが報告されている (Yan et al. 2009, 2011)。ヒドロキシラジカルはヒンジ領域の 2 つのシステイン間のジスルフィド結合の切断を引き起こし、中間体である Sulfuranyl radical は片方のシステイン上で Thiyl radical (例えば Cys231-S•) に、もう一方はスルホン酸に酸化される (図 1-9)。Thiyl radical はタンパク質の C-H 結合と可逆的に反応し、その結果、タンパク質骨格上の炭素中心ラジカルが、さらなる断片化の前駆体となる可能性がある (Schöneich 2019)。IgG1 を PBS 中で 37 °C、15 日間インキュベートした場合に、分子の 3.7% がヒンジ切断を起こし、FeCl<sub>3</sub> 存在下では 9.7%、SOD と FeCl<sub>3</sub> の両方が存在する場合は約 17%、SOD、FeCl<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub> の存在下では約 32% まで増加することが報告されており、金属イオンの存在によって触媒されるヒドロキシラジカルがヒンジの切断に関与していることが提唱されている (Yan et al. 2011)。また、同じ物理化学的条件下では、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> などの他の金属に比べて、Cu<sup>2+</sup> の存在下でのヒンジの切断が、より顕著に認められることが報告されている (Smith et al. 1996)。Glover らは、Cu<sup>2+</sup> の濃度が増加すると、コントロール (Cu<sup>2+</sup> を含まない条件) と比較して断片化が促進されることを示している (Glover et al. 2015)。

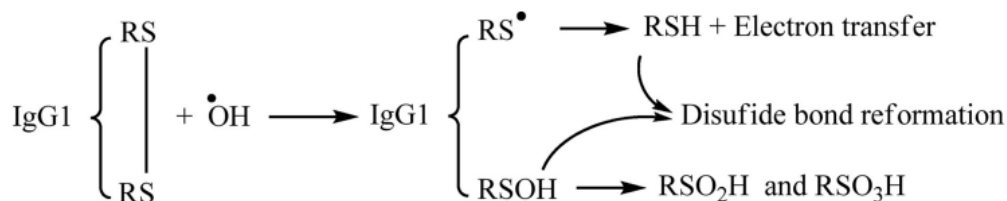


図 1-9. ヒドロキシラジカルによるモノクローナル抗体のジスルフィド結合の切断 (Yan et al. 2009 より抜粋)

#### 1.2.4 切断体の分析法

抗体分子の切断体は、一般的に、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)、

キャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulfate; CE-SDS) 等により分析される。SECは定量性が良く生理条件下での HMWS (High Molecular Weight Species) の定量に汎用されているが、LMWS との分離能はそれほど高くなく、分子サイズがインタクト抗体と大きく異なる切断体に対象が限定される (Wagner et al. 2020)。SDS-PAGE は操作が煩雑で、分離が悪く、定量性が乏しいことから、定量法としては適していない (Wagner et al. 2020)。CE-SDS は、SDS-PAGE と同様に分子ふるい効果を持つ SDS 含有ポリマーをキャピラリーに充填することでサンプルを分子サイズで分離する試験法である。変性条件下での LMWS の分離能及び定量性が高いことから、抗体医薬品における切断体の定量に適した分析法として広く用いられている (Wagner et al. 2020)。

CE-SDS について、従来機種 (例えば、PA800 Plus) では、分離の他にサンプル調製やキャピラリー流路の洗浄、ポリマーの再充填の操作が必要になり、一検体あたりの分析に約 20 分が必要である (Yagi et al. 2014)。一方、近年ではマイクロチップ技術を搭載した次世代機種が開発されており、例えば LabChip GXII であれば、一検体あたり約 40 秒で分析が完了するだけでなく、96 穴プレートや 384 穴プレートから自動でサンプルをロードすることができ、スループットが飛躍的に向上している。

### 1.3 抗体医薬品の生産

#### 1.3.1 CHO 細胞を用いた抗体医薬品の製造プロセス

抗体医薬品の製造用の細胞には CHO 細胞 (Chinese Hamster Ovary cells) が汎用的に用いられている (O'Flaherty et al. 2020; Tihanyi & Nyitray 2020; Szkodny & Lee 2022)。CHO 細胞は浮遊化が可能な点、無血清培地での増殖能力、リコンビナントタンパク質の高い生産性などの利点を有している (O'Flaherty et al. 2020)。さらに、CHO 細胞はヒトウイルスに感染しにくいいため、バイオセーフティ観点でのリスクを軽減することができる。CHO 細胞に対して抗体遺伝子を導入し、所望の抗体を発現する組換え細胞株を造成する。一般的な製造プロセスでは、バイアル融解、拡大培養、生産培養の順にスケールを大きくしていき、生産培養終了時に抗体を含む培養液を取得する (Argoud et al. 2020) (図 1-10)。生産培養では、培養の途中で不足してくる成分を補うために、特定の成分を追加で添加 (フィード) するフェドバッチ培養が一般に採用されることが多い (Ritacco et al. 2018; O'Flaherty et al. 2020)。その後、培養液は連続遠心及びフィルターろ過により、除細胞を行ったうえで、精製工程に供される (Argoud et al. 2020)。精製工程では初段に Protein A アフィニティークロマトグラフィーを行い、さらに Polishing step を経た上でウイルスろ過並びに限外ろ過/透析ろ過を行い、原薬を取得する (Aldington & Bonnerjea 2007; Chahar et al. 2020; Argoud et al. 2020)。なお、バイアル融解からハーベスト工程 (除細胞を行う工程) までは培養工程、それ以降の工程は精製工程と一般的に分類される。

拡大培養及び生産培養では、三角フラスコやプラスチックバッグの培養槽、バイオリアクターが用いられる。バイオリアクターは、攪拌翼による攪拌や空気、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> の上面通気及び下面通気、温度や溶存酸素 (DO: Dissolved Oxygen)、pH の制御及びモニタリング、フィード培地の添加が可能な装置であり、細胞に栄養や酸素を与えて、細胞が育ちやすい環境を提供する (O'Flaherty et al. 2020)。数年前までは、ステンレス鋼製のバイオリアクターしか選択肢に無かったが、最近では攪拌翼が付いたプラスチックバッグのシングルユースバイオリアクターも普及してきている (Junne & Neubauer 2018)。また、商用生産では、50 L から 20 kL スケールのバイオリアクターが使用されるが、ラボスケールとしては 1 L から 10 L スケールのステンレ



ス鋼製やガラス製のバイオリアクターが汎用されている。さらに、Ambr15をはじめとする、リキッドハンドリングシステムと小型のシングルユースバイオリアクターが連結したハイスループット培養装置が開発され、普及が進んできている (Rameez et al. 2014; Xu et al. 2017; Manahan et al. 2019; Sandner et al. 2019)。

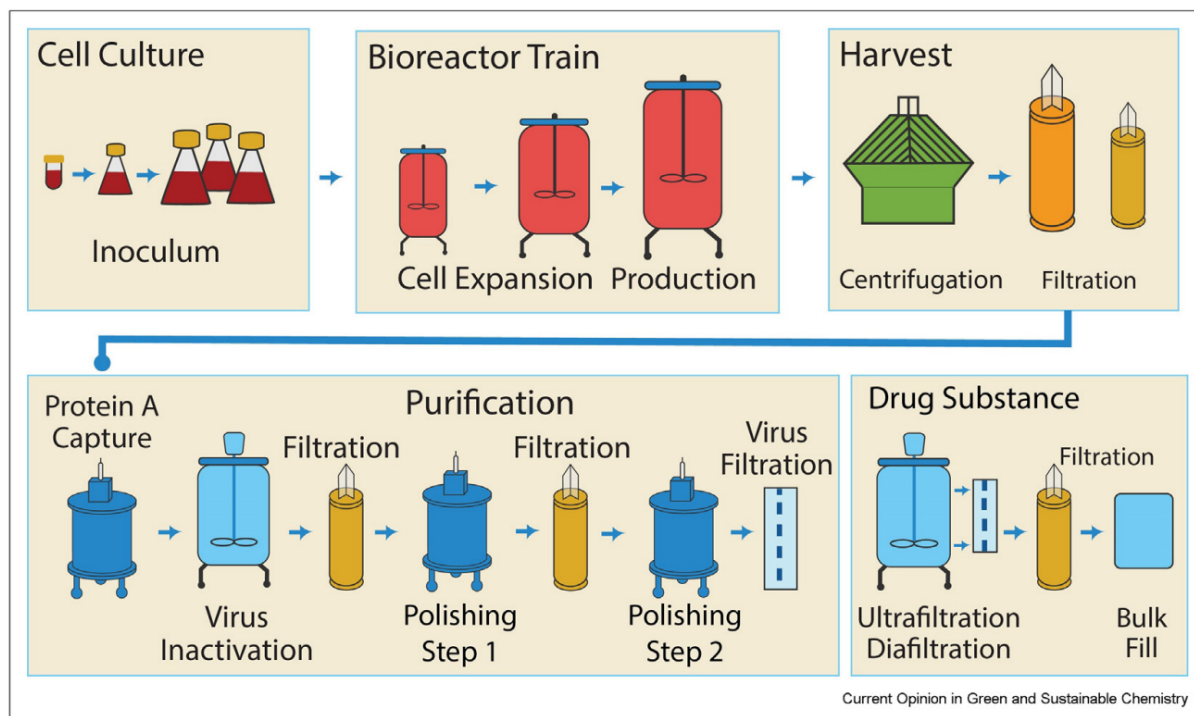


図 1-10. 抗体医薬品原薬の一般的な製造方法 (Argoud et al. 2022 より抜粋)

バイアル融解から除細胞工程までは培養工程、Protein A アフィニティークロマトグラフィーから原薬充填までは精製工程と分類される。

### 1.3.2 培養工程における切断体産生の課題

#### 1.3.2.1 課題 1：フェドバッチ培養における切断体の産生

培養工程での生産培養 (フェドバッチ培養) では、目的とする抗体が CHO 細胞から発現・分泌し、培養液中に放出される。培養液中には所望の抗体に加えて、一定量の切断体が含まれることが知られている (Seibel et al. 2017; Wilson et al. 2019)。精製抗体に対する切断体の産生メカニズムについては、精力的に研究がされている (Smith et al. 1996; Cordoba et al. 2005; Cohen et al. 2007; Xiang et al. 2007; Vlasak & Ionescu 2011; Yan et al. 2011; Glover et al. 2015) 一方で、培養工程における切断体の産生メカニズムや制御方法については、これまでほとんど報告がない。前述のとおり、切断体は有効性、安全性、動態に影響を及ぼす可能性のある重要品質特性の一つであるため、培養工程においてもその産生メカニズムの解明や制御方法の開発が望まれている。

#### 1.3.2.2 課題 2：ハーベスト工程における抗体還元

実製造スケールでのハーベスト工程において、連続遠心及びフィルターろ過によって得られた HCCF (Harvested Cell Culture Fluid) を初段の精製工程に供するまでの間に一時的に保持していると、分子間のジスルフィド結合が還元反応により切断され、切断体の著しい増加が引き

起こされる事例が報告されている (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010)。この抗体還元については、連続遠心及びフィルターろ過でのせん断応力により、培養液中の細胞が破碎されることによって、還元反応に関わる酵素群や補酵素が培養上清に放出されることが原因であるとされている (Koterba et al. 2012; Handlogten et al. 2017)。一方で、細胞株に依って、抗体還元を引き起こすリスクが異なることを示唆する報告がなされている (Handlogten et al. 2017)。また、ラボで抗体還元リスクを評価する方法がいくつか報告されている (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Koterba et al. 2012; Mun et al. 2015; Chung et al. 2017; Handlogten et al. 2017; O'Mara et al. 2019) ものの、効率的に抗体還元リスクの低い細胞株を選抜する方法についてはこれまで報告がなく、細胞選抜における人的リソースの負荷が課題であった。さらに、細胞株毎の抗体還元リスクを決定している因子についても同定されていなかった。

## 1.4 本研究の内容・成果

### 1.4.1 フェドバッチ培養でのカテキン類添加による抗体切断体抑制方法

本研究において我々は、フェドバッチ培養の高生産性プロセスにおいて、生産性の向上に伴い、切断体含量が増加する傾向を観察した。また、切断体のプロファイルを糸口に、ROS が切断体産生を引き起こしているとの仮説を立てて、抗酸化剤であるカテキン類 (カテキン及びエピガロカテキンガレート) を培地に添加して培養を行ったところ、コントロールと同等以上の生産性を維持しつつ、切断体含量を低減させることに成功した。本成果は、カテキン添加による具体的な切断体制御方法を提示するだけでなく、抗酸化剤の添加による切断体制御の可能性を示し、高生産性で高品質な抗体医薬品の製造への寄与が期待される。

### 1.4.2 還元低リスク CHO 細胞株のハイスループットスクリーニング方法

本研究では、抗体還元リスク評価のスループットを向上するために、小型シングルユースバイオリアクターの Ambr15 を用いることを検討した。検討の結果、従来のガラス瓶を用いた方法と同様の評価結果を得ることができた。フラスコ培養と組み合わせることにより、スループットの観点では、従来法では 10 条件を上限としていたが、48 条件まで引き上げることができた。また、抗体還元高リスク細胞株は低リスク細胞株に対して、細胞内の NADPH 濃度や NADP<sup>+</sup>濃度が高いことを見つけた。Ambr15 を用いたハイスループットスクリーニング方法によって、還元低リスク細胞株を効率的に選抜することにより、実製造で抗体還元を引き起すリスクの回避及び低減につながることを期待される。



## 2 CHO 細胞のフェドバッチ培養でのカテキン類添加による抗体切断体抑制方法の開発

### 2.1 緒論

チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary: CHO) 細胞は、治療用モノクローナル抗体 (Monoclonal Antibody: mAb) を生産するための宿主細胞として広く用いられてきた (Kunert & Reinhart 2016; O'Flaherty et al. 2020)。臨床試験や商業市場における需要の増大に対応するためには、治療用モノクローナル抗体を大量に生産するプロセスの構築が不可欠である。また、製造 1 バッチあたりの抗体収量は製造コストに直結するため、その観点でも抗体製造プロセスに対して高い生産性が求められる。1980 年代、動物細胞を用いた生産プロセスの抗体発現量は約 0.1 g/L であった (Kunert & Reinhart 2016)。その後、宿主細胞の改変と培地改良により、フェドバッチ培養での生産性は 1~10 g/L にまで向上した。ただし、CHO 細胞で発現させた抗体は、様々な翻訳後修飾を受けることにより不均一性が生じるため、有効性と安全性の観点からその品質を管理することが極めて重要である (Eon-Duval et al. 2012; Brühlmann et al. 2015)。すなわち、抗体の製造プロセス開発においては、生産性と品質の両方に焦点を当てて改善を図る必要がある。

抗体の切断体は安全性の観点から重要な品質特性の一つとされている (Eon-Duval et al. 2012; Wagner et al. 2020)。精製された抗体の溶液中の分解メカニズムについては、これまで様々な研究がなされてきた (Cordoba et al. 2005; Cohen et al. 2007; Yan et al. 2009; Yates et al. 2010; Yan & Boyd 2011; Kamerzell et al. 2011; Dorai & Ganguly 2014; Yang et al. 2019)。抗体のヒンジ領域 (ジスルフィド結合及びペプチド結合) に対して起こる非酵素的な切断メカニズムのうち、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) を介したラジカル連鎖反応が報告されている (Cohen et al. 2007; Yan et al. 2009; Yan & Boyd 2011; Vlasak & Ionescu 2011)。CHO 細胞の培養プロセスにおいては、フェドバッチ培養の期間を延ばした場合に抗体切断体が増加することが報告されているものの (Wilson et al. 2019)、そのメカニズムは未解明のままである。

生産性及び品質を向上するために、CHO 細胞の培養プロセスで使用する培地に添加物を添加する方法が、有力なアプローチの一つである (Brühlmann et al. 2015; Ha et al. 2022; Zhang et al. 2023)。中でもカテキン類は、以下のユニークな特性から大きな注目を集めている。カテキン類は茶葉に含まれるフラボノイド系ポリフェノールであり、スーパーオキシドやヒドロキシラジカルから細胞を保護する作用があり、レスベラトロールやビタミン C と同等かそれ以上の抗酸化作用を有する (Tsujimura 1930; Tsujimura 1934; Wen et al. 2022; Grzesik et al. 2018)。(-)エピガロカテキンガレート (EGCG) は、茶葉に含まれるカテキン類のうちの主要な成分である (Wen et al. 2022; Grzesik et al. 2018)。EGCG の安全性と費用対効果は、臨床応用の観点でも注目されている (Singh et al. 2011; Aggarwal et al. 2022)。CHO 細胞培養プロセスにおけるケーススタディとして、培地への EGCG の添加により抗体生産性が向上すること (Toronjo-Urquiza et al. 2020; Yamano & Omasa 2018; Hossler et al. 2015)、培地へのカテキンの添加により電荷異性体の不均一性が減少すること (Toronjo-Urquiza et al. 2020; Hossler et al. 2015) が報告されている。

我々は、CHO 細胞のフェドバッチ培養において、最近の技術を活用することにより生産性の向上を果たしたが、同時に切断体の増加に直面した。我々は、特に CHO 細胞を用いた高生産性培養プロセスにおいて、抗体の分解における活性酸素の関与を調査した。最後に、抗酸化物質としてよく知られているカテキンが、細胞培養中の切断体産生に及ぼす影響を明らかにした。

我々の研究成果によって培養プロセスにおける生産性及び品質の向上が果たされ、治療用抗体の生産能力の水準が高まることは、ヘルスケアおよびバイオ医薬品業界に利益をもたらすと考える。

## 2.2 方法

### 2.2.1 細胞株と培地

mAb A (IgG1)、mAb B (IgG1)、mAb C (IgG4) の3種類の抗体それぞれを、安定的に発現する細胞株は、既報のように (Lalonde & Durocher 2017; Ritacco et al. 2018) CHO-K1 宿主細胞 (Kao & Puck 1968) に目的遺伝子をトランスフェクションすることにより作製した。既報のように (Seibel et al. 2017) 一般的な組成から成る基礎培地 (協和キリン社用カスタム品) およびフィード培地 (協和キリン社用カスタム品) を、フェドバッチ培養に使用した。

### 2.2.2 抗体発現 CHO 細胞のバイオリアクター培養

基礎培地を入れた 2 L または 3 L のガラス製バイオリアクター (Biott 社製) に、抗体を発現する CHO 細胞を播種することで培養を開始し、所定の日にフィード培地を添加するフェドバッチ培養を行った。基礎培地、フィード培地、播種細胞密度、温度、培養日数などの培養条件を表 2-1 に示す。フィード培地は、EGCG (ナカライテスク社製; 図 2-1) または (+)-カテキン水和物 (カテキンと称する。東京化成工業社製; 図 2-1) を添加または無添加で利用した。添加濃度については、既報 (Hossler et al. 2015) を参考にした。pH、溶存酸素 (Dissolved Oxygen: DO)、炭酸ガス分圧 ( $p\text{CO}_2$ )、代謝物濃度 (グルコース、乳酸、アンモニア) は、Bioprofile 400 を用いてオフラインで測定した。生細胞密度と生存率は Vi-CELL-XR (ベックマン・コールター社製) を用いてモニターし、培養液中の抗体濃度は Protein A アフィニティークロマトグラフィー (POROS 50A, 4.6 mm diameter×50 mm length, Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて測定した。

表 2-1. 2 L及び3 Lバイオリアクターを用いたフェドバッチ培養におけるプロセスパラメーター及び性能パラメーターのまとめ

Cell line		Cell line #1			Cell line #2		Cell line #3	
Expressed antibody		mAb A (IgG1)			mAb B (IgG1)		mAb C (IgG4)	
Process		Process 1 (Conventional)	Process 2	Process 3	Process 1 (Conventional)	Process 4	Process 1 (Conventional)	Process 5
Process parameters	Basal Medium	Medium A	Medium B	Medium C	Medium A	Medium D	Medium A	Medium D
	Feed Medium	Feed W	Feed X	Feed Y	Feed W	Feed Z	Feed W	Feed Z
	Seeding Cell Density ( $\times 10^5$ cells/mL)	3	8	8	3	20	3	10
	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	37	37	37	37	37	37	36
	Culturing Days	13	13	13	13	14	13	13
Performance parameters at the end of fed-batch culture	Titer (g/L)	3.3	5.4	5.5	3.6	6.2	2.2	4.0
	LMWS (%)	3.7	5.9	4.1	2.4	5.3	1.6	4.4
	Viability (%)	99.3	99.7	99.8	98.9	85.3	77.1	85.9
	pH	7.2	7.1	7.1	7.1	6.7	7.2	7.0

略語: Ig, immunoglobulin; LMWS, low-molecular-weight species; mAb, monoclonal antibody.

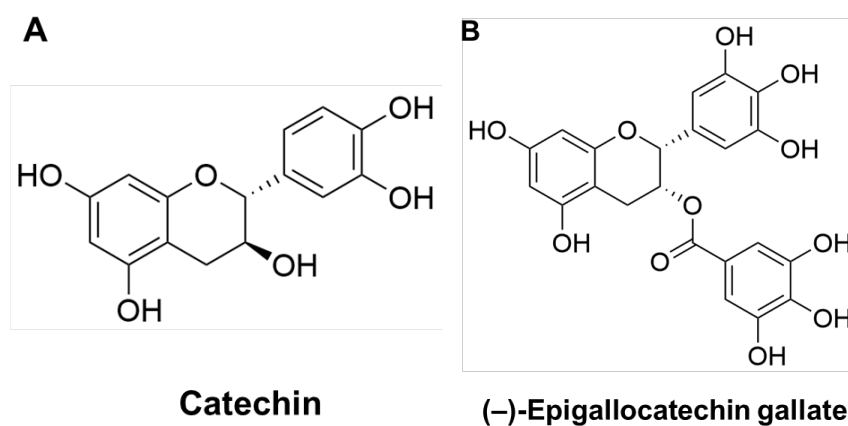


図 2-1. カテキン類の構造: カテキン及び(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG)

カテキンは2つのベンゼン環とジヒドロピランヘテロ環から成る(A)。EGCGは(-)-エピガロカテキンと没食子酸 (gallic acid) のエステルである(B)。

### 2.2.3 抗体発現 CHO 細胞のフラスコ培養

基礎培地を 80 mL 張り込んだ 250 mL のバッフル付きフラスコに、抗体を発現する CHO 細胞を播種することで培養を開始し、所定の日にフィード培地を添加するフェドバッチ培養を行った。基礎培地、フィード培地、播種細胞密度、温度、培養日数などの培養条件を表 2-1 に示す。基礎培地は、CuSO<sub>4</sub>（富士フイルム和光純薬社製）を添加したものと添加しないものの両方を用いた。フィード培地としては、EGCG またはカテキンを添加または無添加のものを使用した。pH および代謝物濃度（グルコース、乳酸、アンモニア）のオフライン測定は、Bioprofile 400（Nova Biomedical 社製）を用いた。生細胞密度、生存率、抗体発現量は、バイオリアクター培養と同じ方法で測定した。

### 2.2.4 精製された抗体のインキュベーション

Protein A のカラムで精製した mAb A をダルベッコリン酸緩衝液（DPBS; Thermo Fisher Scientific 社製）を用いて 10 mg/mL に希釈した。その後、20 mM または 50 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>（富士フイルム和光純薬社製）または 20 mM EDTA（ナカライテスク社製）を添加または無添加の条件で、mAb A を 37 °C で 17 日間インキュベートした。なお、インキュベーション条件及び時間は既報（Yan et al. 2009; Yan et al. 2011）を参考にした。インキュベーション後、DPBS への緩衝液交換を行い、キャピラリーゲル電気泳動で分析するまでは、サンプルを -80 °C で保存した。

### 2.2.5 キャピラリーゲル電気泳動による断片解析

培養液中の抗体を Protein A HP MultiTrap Plates（Cytiva 社製）または Protein A HP SpinTrap（Cytiva 社製）を用いて、簡易的に精製した。抗体の切断体は、LIF 検出器を備えた PA800 Plus（AB SCIEX 社製）または LabChip GXII Touch HT System（PerkinElmer 社製）を用いて、非還元（Non Reducing: NR）条件下で定量した。PA800 Plus を使用する場合の前処理および測定の詳細条件は、既報の通りである（Atsumi et al. 2021）。LabChip GXII Touch HT System を使用した場合の前処理および測定条件の詳細は既報のとおりである（Yagi et al. 2014）。エレクトロフェログラムでは、抗体切断体は LMWS（Low Molecular Weight Species）として示した。LMWS には、L、H、HL、HH、HHL が含まれる。

### 2.2.6 統計分析

Student の t 検定は JMP14.1.0（SAS Institute 社製）を用いて行った。（\*\*\*）は  $p < 0.001$ 、（\*\*）は  $p < 0.01$  を示す。

## 2.3 結果

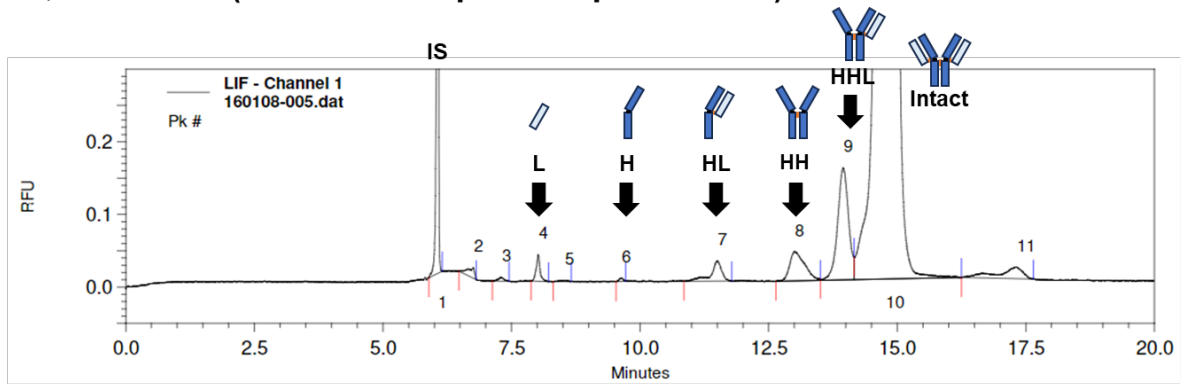
### 2.3.1 CHO 細胞のフェドバッチ培養における抗体生産性と切断体含量の相関性

CHO 細胞のフェドバッチ培養における抗体生産性と切断体含量との関係を調べるため、2 L または 3 L のバイオリアクターで、様々なプロセスパラメーター下で抗体を発現する 3 種類の細胞株 (Cell line#1~3) に対して、フェドバッチ培養終了時の抗体発現量と切断体含量を比較した。IgG1 (mAb A) を発現する Cell line#1 を、従来のプロセスパラメーター (Process 1) で 13 日間培養した結果、抗体発現量は 3.3 g/L であった(表 2-1)。一方、基礎培地とフィード培地を変更し、播種生細胞密度を最適化した生産性の高いプロセスパラメーター (Process 2) のもとで培養したところ、抗体発現量は 5.4 g/L まで上昇した(表 2-1)。注目すべき点として、非還元条件でのキャピラリー電気泳動 (NR-CE-SDS) によって、Process 2 の切断体含量 (5.9%) が Process 1 (3.7%) より高いことが明らかになり、切断体産生が進んでいることが示唆された。NR-CE-SDS エレクトロフェログラムを比較したところ、切断体として検出された分子種のうち、L、HL、HHL の含量について、Process 2 の方が Process 1 よりも高いことが明らかになった (図 2-2A、2-2B、2-2C)。Process 2 とは異なる培地を使用した Process 3 では、抗体発現量も Process 2 と同様の 5.5 g/L まで上昇した(表 2-1)。その一方で、フラグメントレベルは 4.1% となり Process 1 より高かったが、Process 2 ほどではなかった(表 2-1)。

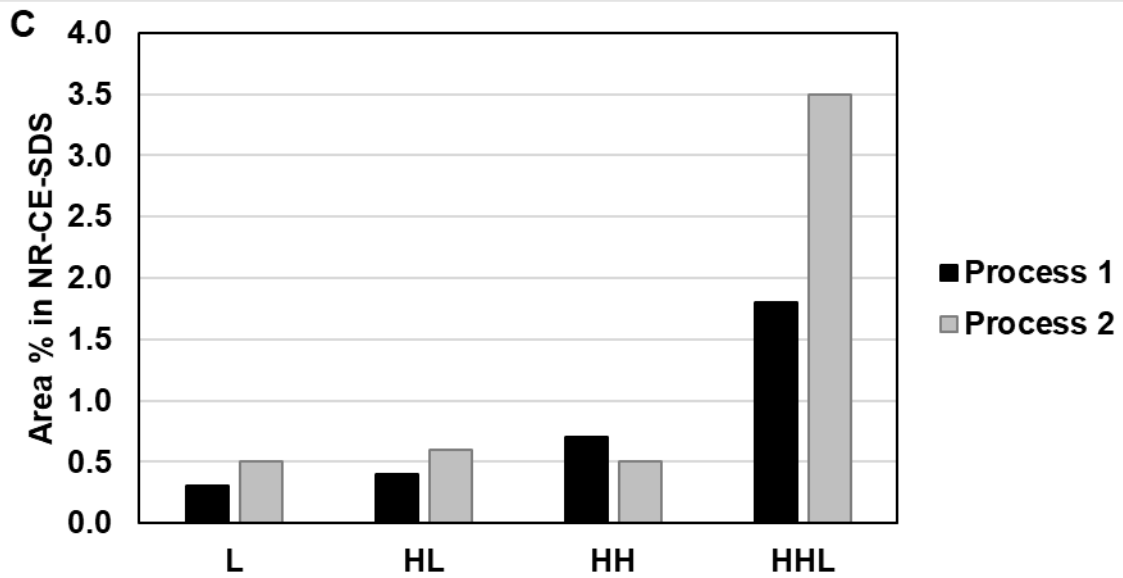
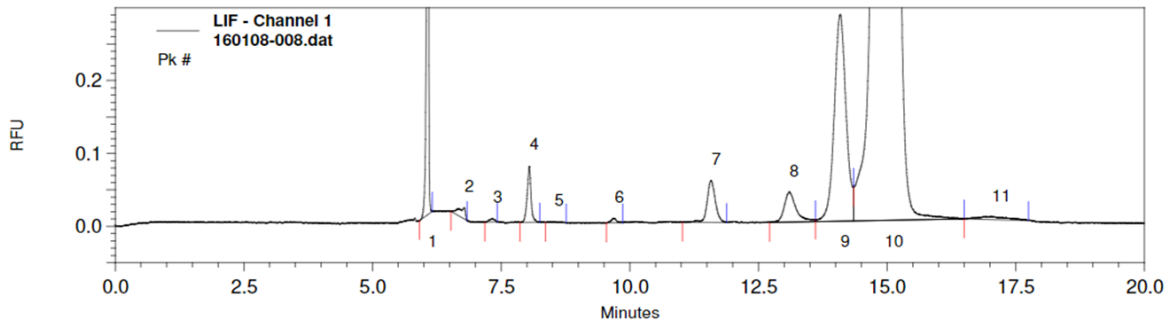
抗体生産性と切断体含量の間の正の相関性を検証するために、別の IgG1 (mAb B) を発現する Cell line#2 に対して、抗体発現量と切断体含量を比較した。生産性の高いプロセスパラメーターでは、抗体発現量が 3.6 g/L (Process 1) から 6.2 g/L (Process 4) に増加した(表 2-1)。これに対応して、切断体含量は、2.4% (Process 1) から 5.3% (Process 4) に増加した(表 2-1)。IgG4 (mAb C) を発現する Cell line#3 では、生産性の高い条件下で、抗体発現量は 2.2 g/L (Process 1) から 4.0 g/L (Process 5) に上昇し、切断体含量は 1.6% (Process 1) から 4.4% (Process 5) に上昇した (表 2-1)。

これらの観察結果を総合すると、これら 3 種類の CHO 細胞株において、抗体生産性と切断体含量の間に正の相関関係があることが示唆された (図 2-2D)。注目すべきことに、培養終了時の生存率と pH は、切断体含量と明確な相関関係を示すことはなく、その程度を十分に説明するものではなかった (表 2-1)。従って、ジスルフィド結合の切断をもたらす $\beta$ -脱離反応は切断体産生に関与していない可能性が示唆された。なぜなら、pH 7 付近では $\beta$ -脱離反応は pH が高いほど促進されるが (図 1-8, Vlasak & Ionescu 2011)、高生産プロセスでの pH は、従来プロセスでの pH と同じかそれ以下であったためである。

**A, Process 1 (conventional process parameters)**



**B, Process 2 (highly productive process parameters)**



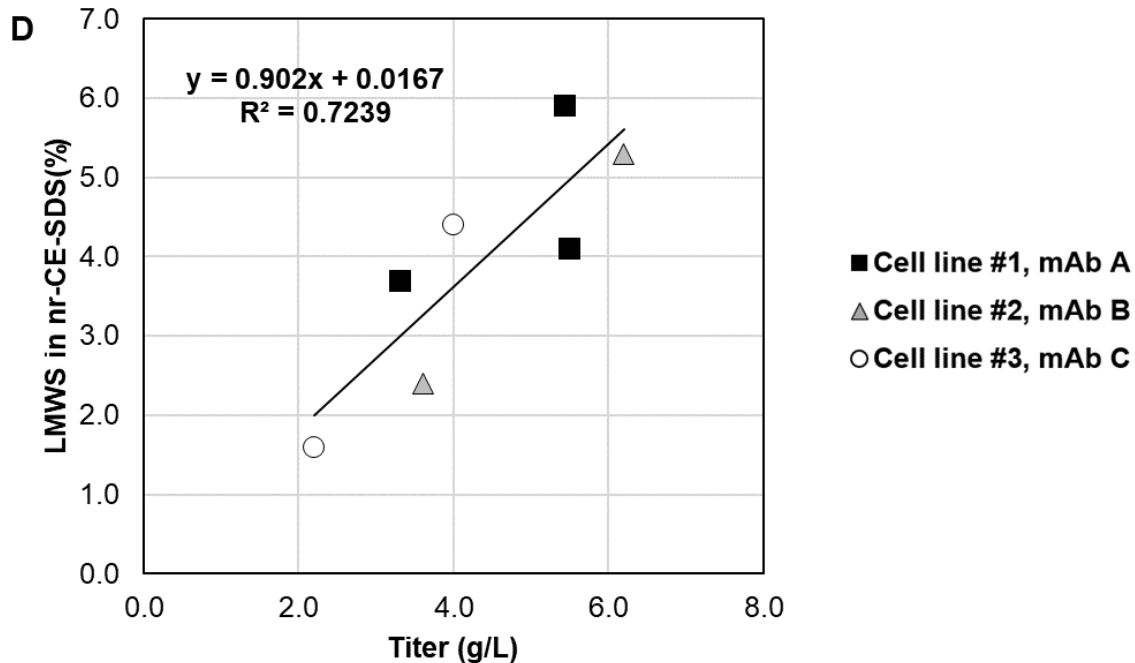


図 2-2. Cell line #1 (IgG1: mAb A)、cell line #2 (IgG1: mAb B)、cell line #3 (IgG4: mAb C)から発現したモノクローナル抗体 (mAb) の生産性と切断体の関係

Cell lines #1-3は2 Lまたは3 Lのバイオリアクターで培養し、発現した抗体はProtein Aレジンで精製した。Cell line#1の培養液から得られたmAb Aを非還元条件下でのCE-SDS分析 (Capillary Electrophoresis in the presence of Sodium Dodecyl Sulfate) をした際のエレクトロフェログラムのうち、Process 1 (従来プロセス) のもの (A) 及びProcess 2 (高生産性プロセス) のもの (B)。ピーク#4はL、ピーク#7はHL、ピーク#8はHH、ピーク#9はHHL、ピーク#10はインタクト抗体を含む。非還元条件下でのCE-SDS分析における各種切断体の面積% (C)。Cell lines #1-3をフェドバッチ培養した際の生産性と切断体含量の相関図 (D)。IS: Internal Standard

### 2.3.2 フェドバッチ培養における抗体の切断体産生メカニズム

我々は、高生産性プロセスにおいて切断体が増加するメカニズムの調査を行った。高生産性プロセスにおいて、L、HL、HHLの含量が従来のプロセスよりも増加することが、NR-CE-SDSの結果から明らかであった。このことから、高生産性プロセスにおいて、重鎖-軽鎖間のジスルフィド結合近傍の共有結合が切断されることが示唆された。精製された抗体に対して、緩衝液中の過酸化水素から発生するヒドロキシラジカルによって、ジスルフィド結合及びその近傍のペプチド結合が切断されることが報告されている (Yan et al. 2009; Yan & Boyd 2011; Kamerzell et al. 2011)。そこで、精製した mAb A に対して、過酸化水素を添加してインキュベートした場合にも、既報と同様の切断が起こるかどうかを調べた。精製 mAb A に 20 mM の過酸化水素を添加し、37°C で 17 日間インキュベートした。NR-CE-SDS 分析の結果、インタクト体は 30% 未満となり、その代わりに、L、HL、HH、HHL を含む抗体断片が切断体として増加していた (図 2-3A および 2-3B)。50 mM 過酸化水素を添加した条件では、インタクト体がほぼ完全に分解されて消失し、L と HH が著しく増加した。これらの結果は、軽鎖-重鎖間及び重鎖-重鎖間のジスルフィド結合が過酸化水素存在下で分解を受けることを示唆する (図 2-3A および 2-3B)。EDTA は、過酸化水素からのヒドロキシラジカル発生を触媒する金属イオンをキレートすることで、精製抗体の切断

体を防ぐ作用のあることが知られている (Yan et al. 2009; Kamerzell et al. 2011)。過酸化水素と同時に EDTA を添加すると、精製された mAb A はインタクト体の構造を維持し、切断体の産生が抑制されることを確認した (図 2-3A および 2-3B)。生産性の高いフェドバッチ培養と過酸化水素スパイク条件下で観察された切断体パターンが同様であったことから、活性酸素によって誘導されるラジカル連鎖反応が、高生産性プロセスでの切断体産生に寄与している可能性が示唆された。

高生産性プロセスでのフェドバッチ培養において、活性酸素によるラジカル連鎖反応が切断体産生を引き起こすかどうかを調べるため、CuSO<sub>4</sub> を添加した基礎培地と用いて、Cell line#1 を Process 2 のプロセスパラメーターで培養した。銅イオンは鉄イオンと同様に、フェントン様反応を介してヒドロキシラジカルの発生を促進する (Bokare & Choi 2014; Graham et al. 2019)。NR-CE-SDS 分析の結果、切断体含量は、19.1 μM と 38.1 μM の銅イオン存在下ではそれぞれ 7.1% と 7.4%であったのに対し、0.2 μM の銅イオンを含むコントロール条件下では 5.4%であった (図 2-4)。さらに、これらの条件下での抗体発現量は、CuSO<sub>4</sub> の添加による影響を受けなかった。これらの結果は、高生産性プロセスでのフェドバッチ培養において観察される切断体産生の一因が、活性酸素によって誘発されるラジカル連鎖反応であるという仮説を支持する。



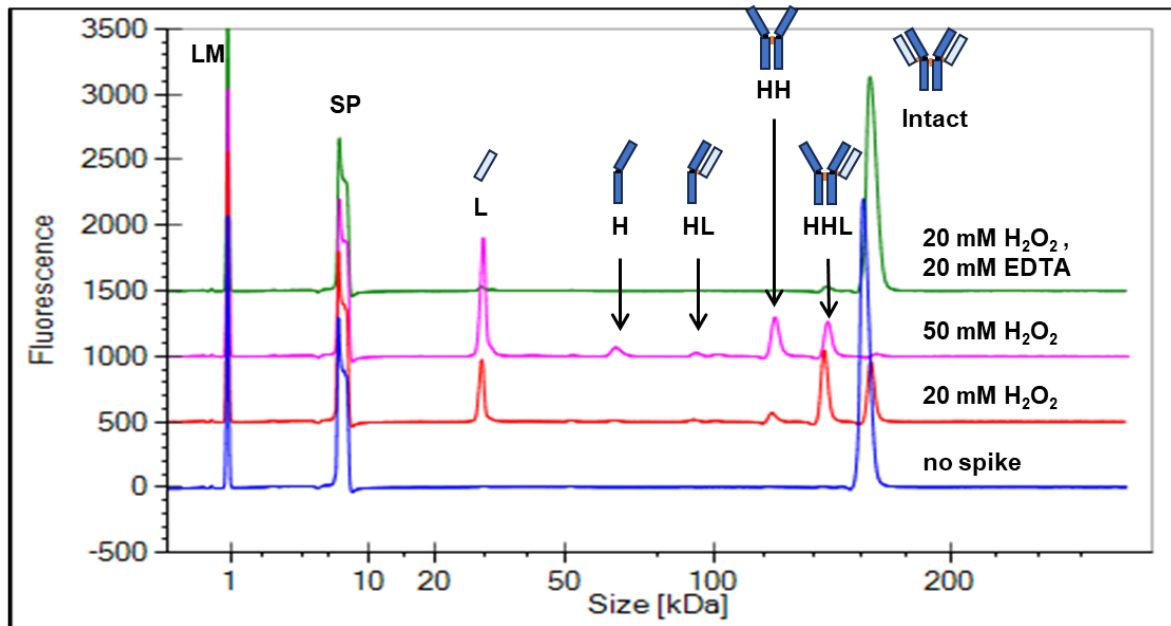
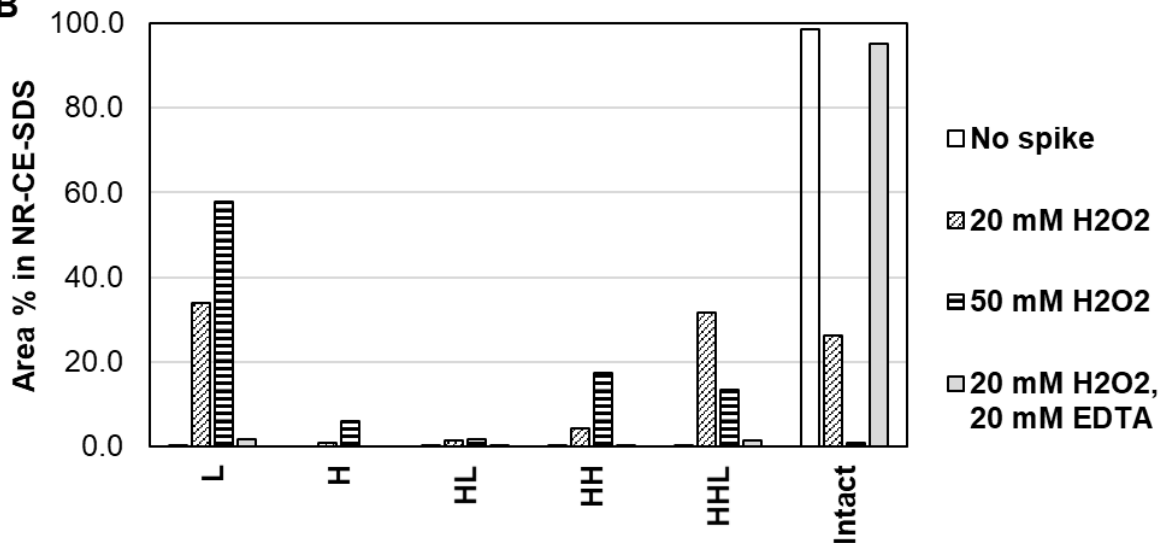
**A****B**

図 2-3. 精製モノクローナル抗体 (mAb A) に対して、過酸化水素及びEDTAを添加して37°Cで17日間インキュベートした際の切断体産生

20 mM過酸化水素 (赤)、50 mM過酸化水素 (ピンク)、20 mM過酸化水素および20 mM EDTA (緑)、またはスパイクなし (青) でインキュベートした後のmAb Aの非還元キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (NR-CE-SDS) 分析のエレクトロフェログラム (A)。NR-CE-SDS における各切断体種とインタクト体の面積% (B)。LM: Lower Marker, SP: System Peaks

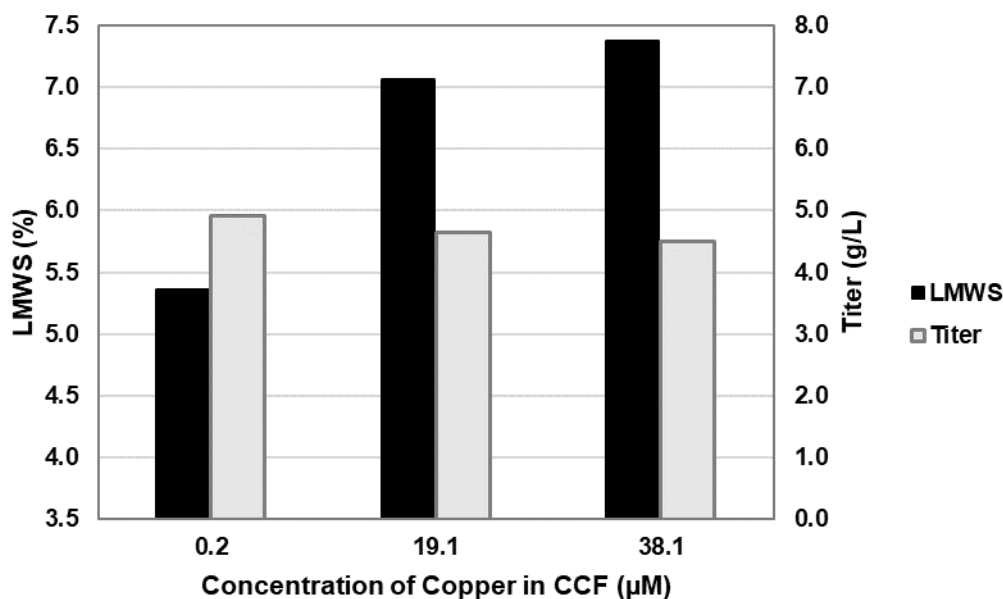


図 2-4. 硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>) を添加した基礎培地を用いたフラスコフェドバッチ培養におけるモノクローナル抗体 (mAb A) のLMWS及び力価

Cell line#1を、CuSO<sub>4</sub>を添加したフィード培地を用い、高生産性プロセス (プロセス2) の条件でフラスコ培養した。発現した抗体は、培養液 (CCF) からProtein Aレジンを用いて精製した。LMWSは非還元キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (NR-CE-SDS) 分析を用いて定量し、力価はプロテインA高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した。LMWS量は黒色で、力価は灰色で示した。

### 2.3.3 カテキン類の添加によるフラスコでのフェドバッチ培養における抗体の切断体産生の抑制

高生産性プロセスでのフェドバッチ培養で抗体の切断体産生を防ぐために、ビタミンをはじめとする抗酸化物質など様々な添加物を培地に添加して効果を調べた。その結果、抗酸化作用を持つ化合物の一群であるカテキン類が切断体産生を抑制することが確認された。具体的には、強力な抗酸化作用を持つ EGCG を添加したフィード培地を用いて、高生産性プロセス (Process 2) の下で mAb A を発現する Cell line#1 をフラスコ培養したところ、切断体含量が、77.5 μM および 193.7 μM の EGCG 存在下ではそれぞれ 3.0% および 2.7% と、濃度依存的に減少し、コントロール条件 (EGCG 非添加) の 4.0% を下回った (図 2-5A)。さらに、抗体発現量は EGCG の添加によりわずかに上昇し、非存在下では 5.0 g/L であったのが、77.5 および 193.7 μM EGCG 存在下ではそれぞれ 5.1 および 5.2 g/L となった (図 2-5A)。これらの結果から、EGCG によって活性酸素を介した抗体の切断体産生を防ぐことができることが示唆された。

さらに、カテキン類の他の化合物として、カテキンの効果を調べた (図 2-1)。カテキンを添加したフィード培地を用いて、高生産性プロセス (Process 2) で Cell line#1 をフラスコ培養したところ、122.3 μM および 305.9 μM のカテキン存在下で切断体含量はそれぞれ 3.5% および 3.3% となり、コントロールの 4.0% よりも低くなった (図 2-5B)。さらに、抗体発現量はコントロールの 5.0 g/L から、122.3 μM および 305.9 μM カテキン存在下ではそれぞれ 5.2 g/L および 5.3 g/L となり、わずかに増加した (図 2-5B)。これらの結果から、高生産性プロセスでのフェドバッチ培

養において、カテキンは抗酸化剤として作用して、抗体の切断体産生を抑制する能力を有することが示唆された。

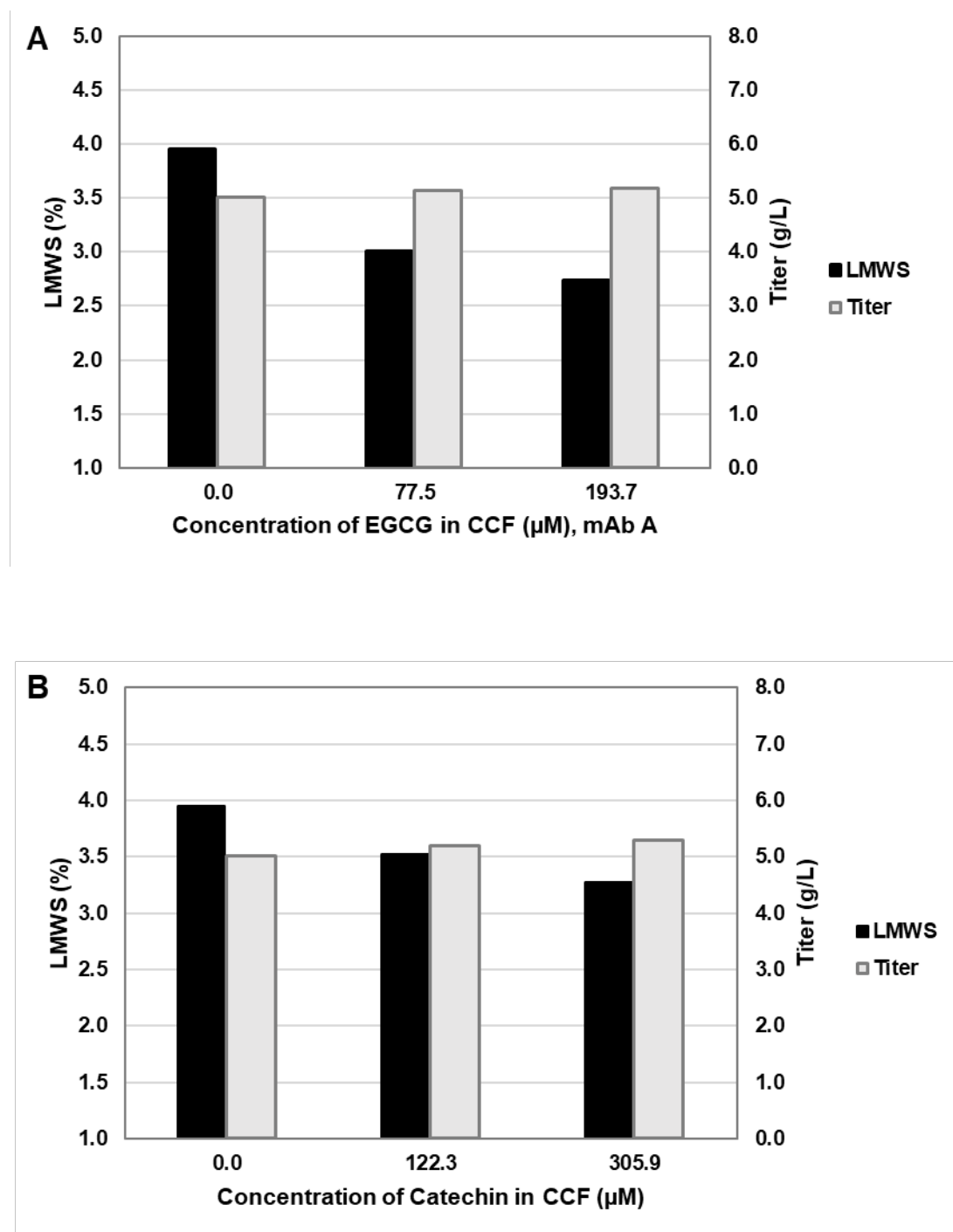
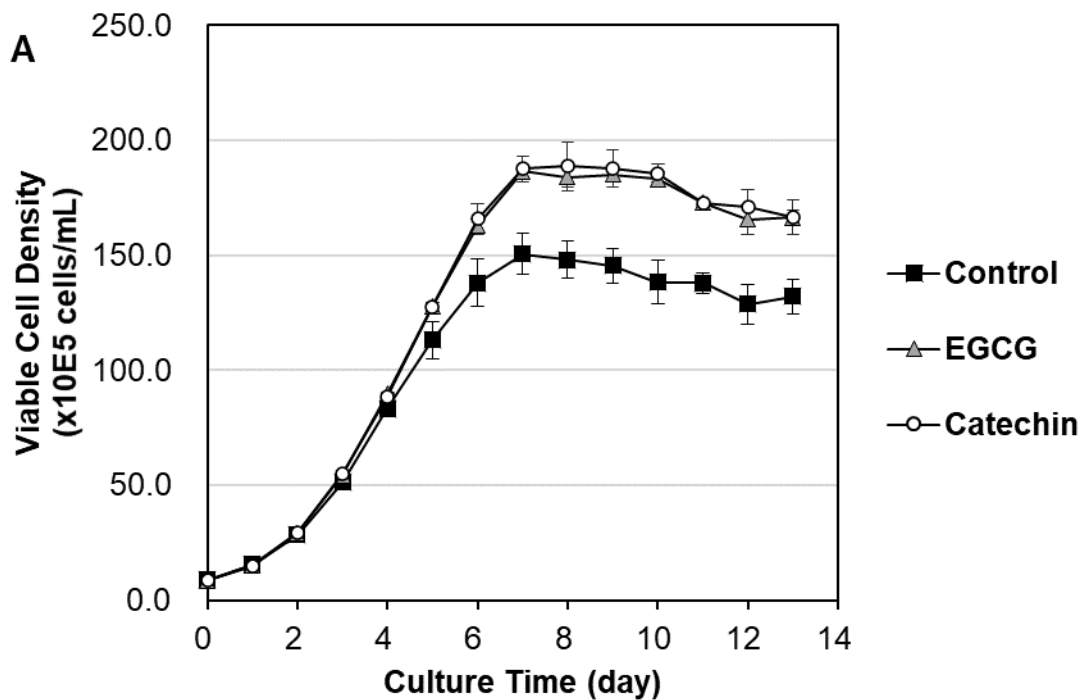


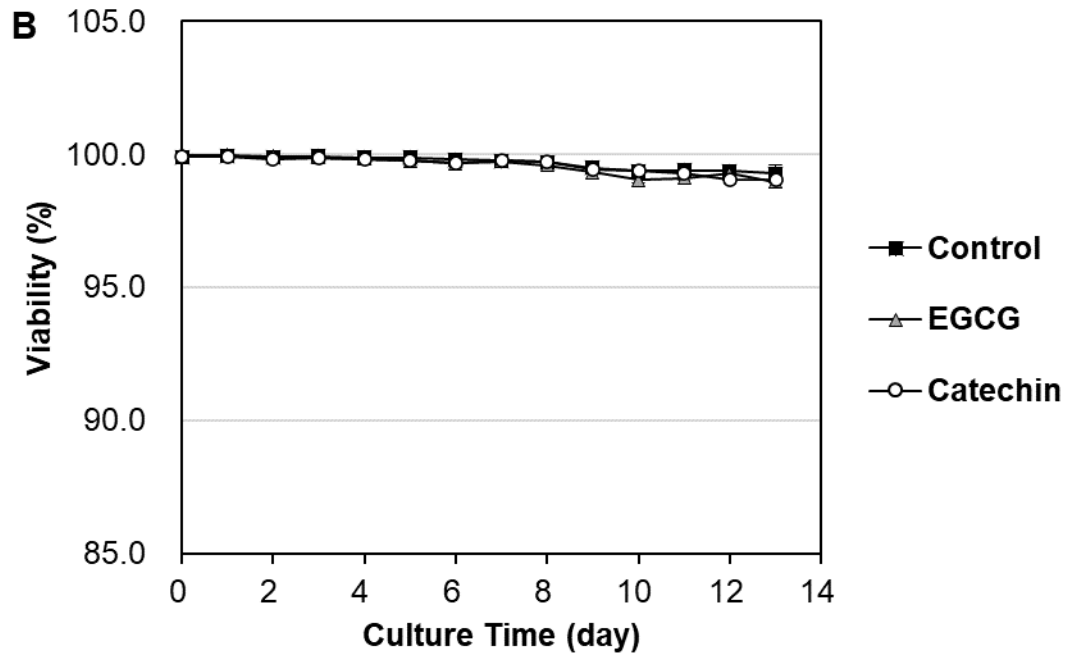
図 2-5. (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) またはカテキンを添加したフィード培地を用いたフラスコ培養におけるLMWSと力価

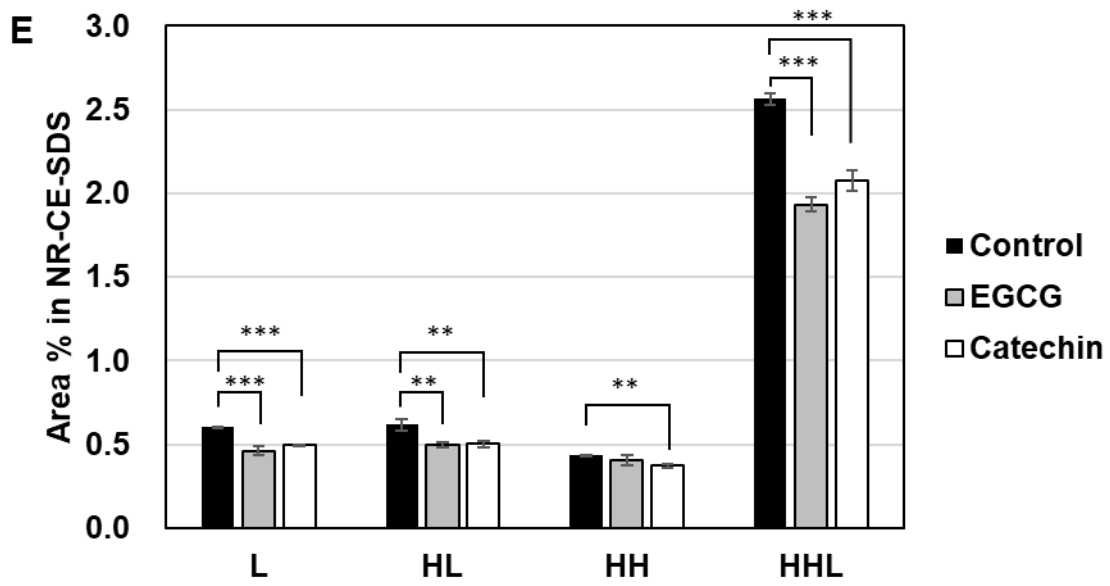
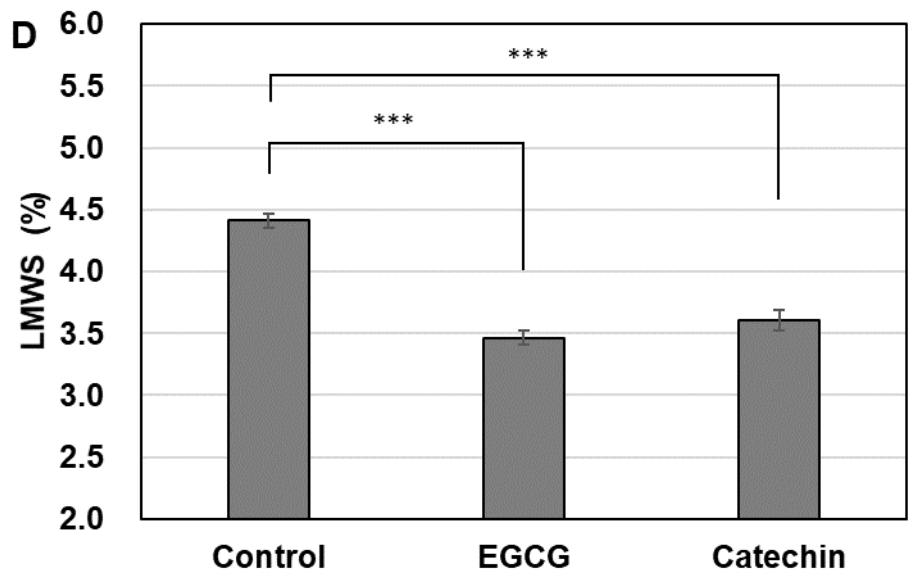
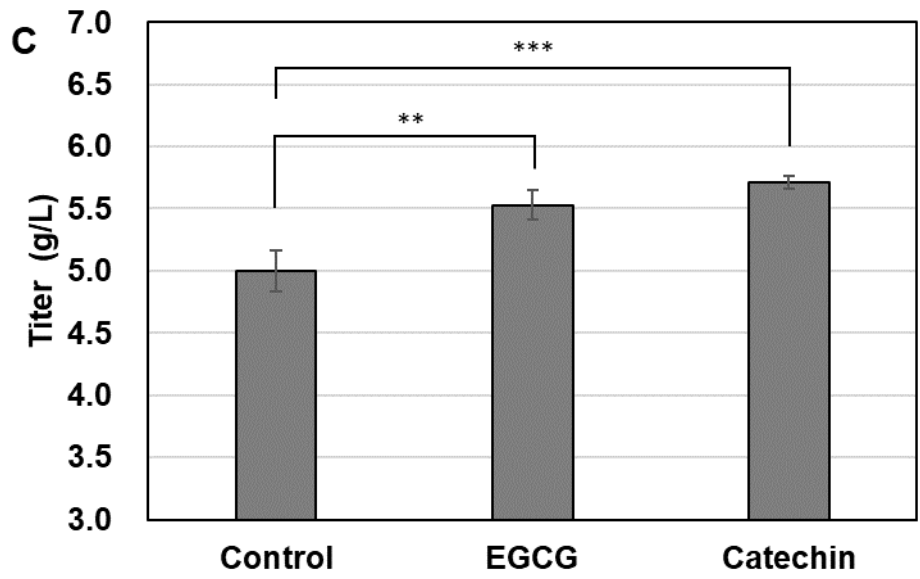
Cell line#1をEGCG (A) またはカテキン (B) を添加したフィード培地を用いて、高生産プロセス (Process 2) 条件でフラスコ培養した。LMWSは黒色で、力価は灰色で示した。

### 2.3.4 カテキン類の添加によるバイオリアクターでのフェドバッチ培養における抗体の切断体産生の抑制

EGCG およびカテキンの切断体産生抑制作用が生産用設備で再現するかを調べるため、EGCG またはカテキンを添加したフィード培地を用いて、高生産性プロセス (Process 2) の下、Cell line#1 を 2 L バイオリアクターで培養した。その結果、培養 7 日目の最大生細胞密度は、コントロールに対して 77.5  $\mu\text{M}$  の EGCG または 122.3  $\mu\text{M}$  のカテキン存在下で 20% 以上増加し、この差はフェドバッチ培養の終了時まで持続した (図 2-6A)。生存率はカテキン類添加群とコントロールとの間に差はなかった (図 2-6B)。フェドバッチ培養終了時の抗体発現量は、コントロールの 5.0 g/L から、EGCG およびカテキン存在下ではそれぞれ 5.5 g/L および 5.7 g/L に増加した (図 2-6C)。さらに、切断体含量はコントロールの 4.4% から、EGCG およびカテキン存在下ではそれぞれ 3.5% および 3.6% へと有意に減少した (図 2-6D)。EGCG の存在下では、L と HHL がコントロールよりもそれぞれ 23%、25% 低下した (図 2-6E)。HL についてもコントロールよりも 19% 低下したが、HH に対する効果は限定的であった。一方、カテキンの存在下においても、L と HHL がコントロールよりもそれぞれ 17%、19% 低下した。HL 及び HH に対しても、それぞれ 19% 及び 14% 低下した。したがって、EGCG とカテキンの切断体産生抑制作用は、250 mL フラスコ培養だけでなく、2 L バイオリアクター培養でも再現した。







**図 2-6. 77.5  $\mu\text{M}$  (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) あるいは122.3  $\mu\text{M}$  カテキンを添加した  
フィード培地を用いたリアクター培養**

Cell line#1を、77.5  $\mu\text{M}$  (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) あるいは122.3  $\mu\text{M}$  カテキンを添加したフィード培地を用い、高生産性プロセス (プロセス2) の条件でリアクター培養した。培養中は、生細胞密度 (n=3, A)、生存率 (n=3, B) をVi-Cell XRを用いて測定した。培養終了時の力価はProtein A HPLCを用いて定量した (n=3, C)。LMWSは非還元キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム (NR-CE-SDS) 分析を用いて定量した (n=3, D)。LMWS量は黒色で、力価は灰色で示した。NR-CE-SDSにおける各切断体種の面積% (n=3, E)。グラフのエラーバーは3回の独立した培養試験結果からのSDを示す。コントロール条件との比較のために、Studentのt検定を行った。p値として、(\*\*\*)は $< 0.001$ 、(\*\*)は $< 0.01$ を示す。

## 2.4 考察

### 2.4.1 CHO 細胞培養における抗体の切断体産生に対する活性酸素の関与

本研究では、抗体を発現させた CHO 細胞のフェドバッチ培養において、切断体含量と抗体発現量との間に正の相関が認められたことに着目した（表 2-1 および図 2-2D）。切断体種としては、複数の細胞株の高生産プロセスにおいて、L、HL、HHL の増加が共通して認められたが、HH についてはケースバイケースであった（Data Not Shown）。実際に、Cell line#1 の Process 1 と Process 2 を比較したところ、切断体種のうちで HH は減少していた（図 2-2C）。精製抗体に過酸化水素をスパイクしてインキュベートすると、高生産プロセスの培養終了時に観察された切断体種と、同じ切断体種が増加することが観察された（図 2-3）。HH の量は高濃度（50 mM）の過酸化水素存在下で増加したことから、L、HL、HHL は比較的緩やかな酸化ストレス条件下で産生され、HH はより激しい条件下で産生されることが示唆された。培養液に  $\text{CuSO}_4$  を添加すると、切断体含量がさらに増加したことから、切断体産生に活性酸素が関与していることが推察された。 $\text{Fe}^{3+}$  や  $\text{Cu}^{2+}$  などの金属イオンは、溶液中で活性酸素を発生させることで精製した抗体の切断体産生を誘導することが知られている（Graham et al. 2019）。

Yang らは、CHO 細胞の宿主細胞由来のプロテアーゼによる切断体産生について報告している（Yang et al. 2019）が、そこで生じる切断体は F(ab')<sub>2</sub> 断片であり、我々の研究で観察したものと異なっている。宿主細胞タンパク質は死細胞から放出されるため、生存率の低下により宿主細胞タンパク質が増加することが予想されるが、生存率と切断体含量の間に明確な相関関係がないことから（表 2-1）、宿主細胞タンパク質は細胞培養における切断体産生の原因ではないと考えられる。また、高生産性プロセスで観察された切断体種は、精製抗体を低 pH 条件下でインキュベーションした場合に生成される切断体種と類似していた（Cordoba et al. 2005; Dada et al. 2017）。しかし、本研究で採用した全てのプロセスにおける培養終了時の pH は中性付近であり（表 2-1）、切断体含量との明確な相関関係は認められなかった。したがって、低 pH が細胞培養における切断体産生の引き金になるとは考えにくい。

CHO 細胞のフェドバッチ培養中に、活性酸素が細胞の外部と内部で発生することが報告されている（Chevallier et al. 2020; Sinharoy et al. 2021）。培養液の成分は酸素、光あるいはその他の成分と反応し、細胞外に活性酸素を発生させる。 $\text{CuSO}_4$  を培地に添加して培養したところ切断体含量が増加したが、これは培地中の銅イオンによって発生した活性酸素が原因であると考えられる（図 2-4）。銅イオンの酸化還元サイクルは、活性酸素の産生を触媒する（Bokare & Choi 2014; Graham et al. 2019）。細胞内では、小胞体（Endoplasmic Reticulum: ER）でのタンパク質分子の折り畳み反応やミトコンドリアでの電子伝達経路において、活性酸素が発生する。ER における抗体分子の適切なフォールディングに不可欠な因子に、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼがあるが、これは目的分子のジスルフィド結合形成の副反応として活性酸素を放出する（Tu & Weissman 2004）。さらに、タンパク質の折り畳み速度とジスルフィド結合形成速度のバランスが崩れると、活性酸素が発生することが知られている（Tyo et al. 2012）。したがって、生産性の向上は細胞内活性酸素の産生を促し、その結果、抗体分子が酸化ストレスにさらされるリスクが増加するという仮説は妥当であると考えられる。Handlogten らは、CHO 細胞の高生産性フェドバッチ培養において細胞内過酸化水素濃度が高いことを示しており（Handlogten et al. 2018）、これは我々の仮説と矛盾しない。これらの考察から、CHO 細胞のフェドバッチ培養での特に生産性の高いプロセスにおいて、活性酸素が抗体の切断体産生を引き起こすことが示唆される。



## 2.4.2 CHO 細胞培養における抗体の切断体産生及び細胞増殖に対するカテキン類の効果

CHO 細胞のフェドバッチ培養中の切断体産生に活性酸素が関与しているとの仮説に基づき代表的な抗酸化物質の添加実験を行ったところ、カテキンや EGCG などのカテキン類をフィード培地に添加することで、切断体産生が抑制されることが明らかになった (図 2-5、2-6)。カテキン類は茶葉に含まれる一群のポリフェノールである。カテキンと EGCG はフェノール性水酸基を含む共通の化学構造を持っている (図 2-1)。分子内のフェノール性水酸基の数は、活性酸素のスキャベンジャー作用の強さと正に相関するだけでなく (Bernatoniene & Kopustinskiene 2018)、隣接する水酸基が金属イオンのキレート作用を持つ。さらに、カテキン類には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) などの抗酸化酵素の発現亢進や酸化ストレス関連経路の抑制など、間接的な抗酸化活性がある (Bernatoniene & Kopustinskiene 2018; Zwolak 2021)。カテキン類のこうした抗酸化特性は、細胞培養における ROS による抗体の断片化を防ぐことを示唆している。カテキン類が抗体の断片化、特に L、HL、HHL の増加を抑制したという結果は、カテキン類の抗酸化作用がこの抑制効果に関与しているという仮説を支持するものであった。HH の生成に対するカテキン類の抑制効果は限定的であったが、その効果はより深刻な酸化ストレスを伴う培養工程では観察されるかもしれない。

抗酸化作用に加えて、カテキン類には細胞周期阻害作用がある (Toronjo-Urquiza et al. 2020; Ahmad et al. 2000; Bae et al. 2009; Gupta et al. 2003; Ma et al. 2014)。CHO 細胞培養液にカテキン類を添加すると、1 細胞あたりの抗体発現量 ( $q_p$ ) は上昇するものの、S 期および G2/M 期の細胞数が増加し、生細胞密度及び生存率の低下を引き起こすことが報告されている (Toronjo-Urquiza et al. 2020; Yamano & Omasa 2018)。コントロールに対する力価の増減は、カテキン類濃度の適否や添加タイミングによって異なることが報告されている。Hossler らは、EGCG を添加したフィード培地を用いたフェドバッチ培養において、広い濃度範囲で EGCG が細胞全体のパフォーマンスや生産性に悪影響を及ぼすことはなかったと報告している (Hossler et al. 2015)。また、彼らはこれらのカテキンに対する反応は細胞株によって異なることを報告している。すなわち、カテキン類の添加が CHO 細胞培養の生産性に及ぼす影響は、条件によって大きく異なる可能性がある。本研究では、Hossler らの報告 (Hossler et al. 2015) と同様に、カテキン類をフィード培地に添加し、培養液に徐々に添加した。その結果、コントロールよりも生細胞密度は 30%、力価は 10% 増加した。生細胞密度および生産性に対するカテキンの効果は、細胞株、細胞培養培地、プロセスパラメーター、カテキン濃度、カテキン添加のタイミングによって異なる可能性があり、さらなる調査が必要である。

将来的に、抗体の切断体産生を抑制するカテキン以外の抗酸化物質を探索することは、有用であろう。細胞培養のパフォーマンスを向上させるために、培養液に抗酸化物質を添加することは、以前にも研究されている (Brühlmann et al. 2015; Ha et al. 2022) が、我々の知る限り、S-スルホシステイン (Seibel et al. 2017) 以外の抗酸化物質について、抗体の切断体産生に及ぼす影響を調べた研究はない。一方で、いくつかの抗酸化物質については CHO 細胞にとって毒性を示すことが報告されている (Toronjo-Urquiza et al. 2019)。本研究において代表的な抗酸化物質を用いて影響評価を行ったところ、細胞毒性を引き起こす化合物もあった。例えば、抗酸化作用を持つポリフェノール・フラボノイド化合物であるルチンを培養液に添加したところ、細胞増殖が強く阻害され、抗体発現量がかなり低下した (Data not shown)。したがって、抗酸化

物質スクリーニングのスループットを向上させるだけでなく、バイオリクターを用いて候補物質の細胞毒性を評価することは極めて重要である。この探索的アプローチは、医療用抗体製造プロセスに直接適用できる添加剤の実用的なスクリーニング方法として有用であろう。

## 2.5 小括

本研究では、生産性の高いフェッドバッチ培養プロセスにおいて、抗体を発現する3種類のCHO細胞株で、生産性の増加に伴って、切断体含量の増加が観察された。切断体のうち具体的な分子種として、L、HL、HHLの含量が増加していたことから、生産性の高いフェッドバッチ培養における切断体産生には活性酸素が関与していると考えられた。フラスコ培養にて抗酸化物質の添加試験を行ったところ、フィード培地にカテキン類（カテキン、EGCG）を添加すると、切断体含量が低下することが観察された。さらにバイオリアクターを用いて検討したところ、カテキン類を添加した群ではコントロールに比べて切断体含量が有意に低下した。一方、抗体発現量はコントロールと比較して同等以上であった。これらの結果は、切断体産生における活性酸素の関与を示唆するだけでなく、カテキン類の添加がバイオ医薬品製造における切断体含量の低減に有用な方法であることを示している。結論として、CHO細胞の培養プロセスにおいて培地に天然抗酸化物質を添加することにより、生産性と品質の両方を向上させる可能性があることが示された。

### 3 モノクローナル抗体の還元低リスク CHO 細胞株のハイスループットスクリーニング方法の開発

#### 3.1 緒論

治療用の組換えモノクローナル抗体の多くは CHO 細胞発現系を用いて生産され、培養プロセスでは培養液に分泌される。抗体はその後精製プロセスに供されて高純度の原薬となるが、培養液中の細胞は精製プロセスでは不要となるために、一般的には培養プロセスの最後に、連続遠心分離や精密ろ過によって培養液から分離される (Zhou et al. 2008; Shukla & Thömmes 2010)。この工程はハーベスト工程 (細胞分離工程) と呼ばれる。

ハーベスト工程における品質課題として、抗体還元がある。大スケールでの製造のハーベスト工程において、培養液中の抗体に対して鎖間ジスルフィド結合の還元を認めたという論文が、2010年に初めて報告されて以来 (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010)、他のグループからも同様の報告が相次ぎ、現在においても、この問題はバイオテクノロジー産業における共通の課題となっている (Liu et al. 2016; Ren et al. 2021)。鎖間ジスルフィド結合の還元は、目的物である抗体の収量を低下すると同時に、重要品質特性 (CQA: Critical Quality Attribute) の一つである切断体含量を増加させる (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010)。その他にも、原薬の赤色の着色度合い (Derfus et al. 2014) や、低 pH でのウイルス不活性化工程での凝集 (Chung et al. 2017)、原薬の安定性 (Chung et al. 2017) に影響することが報告されている。抗体還元は、チオレドキシシン (Trx)、チオレドキシシン還元酵素 (TrxR)、グルタチオン還元酵素 (GR) (Trexler-Schmidt et al. 2012; Handlogten et al. 2017)、グルタレドキシシン (O'Mara et al. 2019)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)、グルタチオン (GSH) が関与している (図 3-1)。これらの酵素と補因子の多くは細胞内に含まれるが、ハーベスト工程での連続遠心分離 (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010) および/または精密ろ過 (O'Mara et al. 2019) でのせん断応力から生じる細胞破碎によって培養液 (Harvested Cell Culture Fluid: HCCF) 中に放出され、培養液中の抗体を還元すると言われている。抗体還元は、ハーベスト工程における HCCF の溶存酸素 (DO)、pH、酸化還元電位に依存する (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Handlogten et al. 2020)。この反応は嫌気的環境下でのみ起こるため、なかでも DO は抗体還元における最も重要なパラメータであると言われている (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Mullan et al. 2011)。HCCF を製造中にシングルユースバッグ (O'Mara et al. 2019) またはヘッドスペースの小さいステンレス製タンク (Mun et al. 2015) に一時保管した際に、DO が低下しやすく、抗体還元のリスクが高まる。

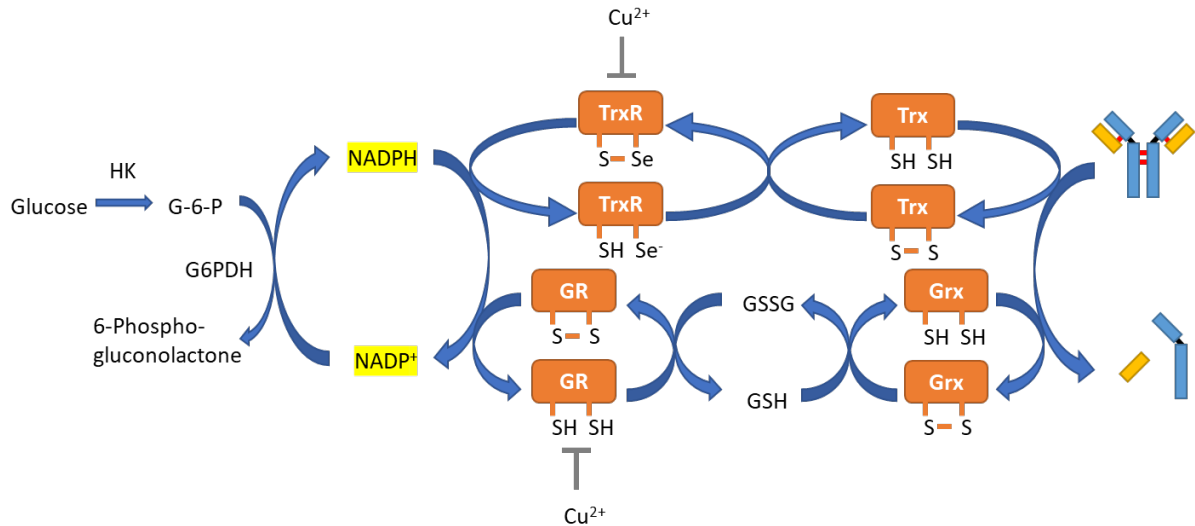


図 3-1.TrxR と GR の両システムが抗体還元に参加していることを示す抗体還元スキーム。銅イオン (Cu<sup>2+</sup>) は TrxR と GR を阻害することで抗体還元を阻害する。HK、ヘキソキナーゼ；G-6-P、グルコース-6-リン酸；G6PDH、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ；NADPH、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（還元型）；NADP<sup>+</sup>、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（酸化型）；TrxR、チオレドキシシン還元酵素；Trx、チオレドキシシン；GR、グルタチオン還元酵素；Grx、グルタレドキシシン；GSH、還元型グルタチオン；GSSG、酸化型グルタチオン。

HCCF への酵素阻害剤 (CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の添加、低 pH でのホールド、空気スパーキングなど、抗体還元を防ぐ方法がいくつか開発されている (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Du et al. 2018)。また、抗体還元のリスクは細胞株に依存する可能性があること (Hutterer et al. 2013; Liu et al. 2016; Cura et al. 2020)、還元メカニズムは株によって若干異なることが報告されている (Handlogten et al. 2017)。しかしながら、我々の知る限り、抗体還元の低リスク細胞株を効率的にスクリーニングする方法は報告されていない。ここでは、複数の HCCF を同時に嫌気条件下でインキュベーションし、細胞株毎の抗体還元リスクを一度に評価する効果的な手法を提案する。

## 3.2 方法

### 3.2.1 細胞株と培地

mAb A (IgG1)、mAb B (IgG1)、mAb C (IgG4) の3種類の抗体それぞれを、安定的に発現する細胞株は、既報のように CHO-K1 宿主細胞に目的遺伝子をトランスフェクションすることにより作製した (Kao & Puck 1968; Lalonde & Durocher 2017)。既報のように (Ritacco et al. 2018) 一般的な組成から成る基礎培地 (協和キリン社用カスタム品) およびフィード培地 (協和キリン社用カスタム品) を、フェドバッチ培養に使用した。

### 3.2.2 抗体発現 CHO 細胞のバイオリアクター培養

基礎培地を 1.2 L 張り込んだ 3 L のステンレス製バイオリアクター (Biott 社製) に、抗体を発現する CHO 細胞を播種することで培養を開始し、所定の日にフィード培地を添加するフェドバッチ培養を行った。培養温度、溶存酸素 (Dissolved Oxygen: DO)、攪拌を連続的に制御した。pH、DO、炭酸ガス分圧 (pCO<sub>2</sub>)、代謝物 (グルコース、乳酸、アンモニア) 濃度のオフライン測定は、Bioprofile 400 (Nova Biomedical 社製) を用いて行った。生細胞密度と生存率は、Vi-CELL-XR (ベックマン・コールター社製) を用いて分析した。培養液中の抗体濃度は、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー (POROS 50A, 4.6 mm diameter×50 mm length, Thermo Fisher Scientific 社製) により測定した。CHO 細胞は、1,000 L のステンレス製バイオリアクターでも培養した。

### 3.2.3 抗体を発現する CHO 細胞のフラスコ培養

基礎培地を 80 mL 入れた 250 mL バッフル付きフラスコに、抗体を発現する CHO 細胞を播種することで培養を開始し、所定の日にフィード培地を添加するフェドバッチ培養を行った。培養温度と攪拌を連続的に制御した。pH と代謝物濃度のオフライン測定は、Bioprofile 400 を用いて行った。細胞の増殖と生存率は Vi-CELL-XR を用いて分析した。培養液中の抗体濃度はプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーで測定した。

### 3.2.4 細胞破碎された培養終了時培養液 (Lysed Harvested Cell Culture Fluid; Lysed HCCF) の調製

培養終了時の培養液中に含まれる細胞を破碎するために、培養液 (Harvested Cell Culture Fluid; HCCF) を VP-300 (TAITEC 社製) で超音波処理した。超音波処理前後の生細胞密度を比較することで、95%以上の細胞が破碎されていることを確認した。懸濁液を 6,400×g、室温で 10 分間遠心し、上清を 0.2 μm フィルター (Sartolab P20 (Sartorius Stedim 社製) または Stericup-GP (Merck 社製)) でろ過処理を行い、Lysed HCCF とした。

### 3.2.5 ガラス瓶を用いた Lysed HCCF のインキュベーション

40 mL の Lysed HCCF を 125 mL のガラス瓶に移して、約 25 °C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション中は、気相 (ヘッドスペース) には 93:7 (v/v) N<sub>2</sub> /CO<sub>2</sub> 混合ガスを 40 mL/分で通気しつつ、液相をスターラーで攪拌した。インキュベーションの開始直前 (0 時間) と 24 時間後に、無菌的にサンプル 200 μL を回収し、200 μL の 250 mM 2-ヨードアセトアミドと混合した。2-ヨードアセトアミドはチオール基を不可逆的に修飾し、ジスルフィド結合の形成を阻害するために混合した。サンプルは分析まで -70 °C 以下で保存した。

### 3.2.6 Ambr15 を用いた Lysed HCCF のインキュベーション

11.4 mL の Lysed HCCF を、Ambr15 システム (Sartorius Stedim 社製) の小型バイオリアクター容器に移して、約 25 °C で 24 時間インキュベートした。インキュベーション中は、各容器の気相 (ヘッドスペース) に N<sub>2</sub> 及び CO<sub>2</sub> をそれぞれ 1.050、0.079 mL/分 で通気し、攪拌速度は 300 rpm とした。DO、pH、温度を自動でモニターした。通常、0、3、6、9、24 時間後に、各ベッセルから 200 µL を自動的にサンプリングして、200 µL の 250 mM 2-ヨードアセトアミドを含む 2 mL スクリューキャップチューブに無菌的に移して混合した。2-ヨードアセトアミドの添加は free の SH 基をアルキル化して反応性を消失させるためである。サンプルは分析まで 70 °C 以下で保存した。

### 3.2.7 ジスルフィド結合還元評価

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社製) または LabChip GXII Touch HT System (PerkinElmer 社製) を用いて、メーカー推奨の非還元 (NR) 条件下でドデシル硫酸ナトリウム-キャピラリー電気泳動 (CE-SDS) による分析を行った。1,000 L バイオリアクターから取得したサンプルについては、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に続いて銀染色を行い、ジスルフィド結合の還元状態を評価した。

### 3.2.8 TrxR 活性評価および NADPH/NADP<sup>+</sup> 定量

生産培養終了時の生細胞密度の分析結果から、 $50 \times 10^6$  cells の生細胞が含まれる培養液量を計算し、その液量分の培養液サンプル (細胞を含む) を遠心分離 (1,000 × g、4 °C、5 分間) することにより細胞を回収した。さらに、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、10 mM EDTA を含む M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific 社製) を加えることにより、細胞を溶解させた。細胞溶解液を 14,000 × g、4 °C で 15 分間遠心し、上清を得た。チオレドキシン還元酵素活性は、Thioredoxin Reductase Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical 社製)、上清中の NADPH および NADP<sup>+</sup> 濃度は、Fluorescent NADP/NADPH Detection Kit (Cell Technology 社製) を用いて、サプライヤーのマニュアルに従って使用した。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 還元リスクの細胞株依存性

IgG4 (mAb A) を発現する CHO 細胞株における還元リスクを調べるため、まず発現量の観点で最も優れた Cell line#1 と 2 番目に優れた Cell line#2 を 3 L バイオリアクターで 13 日間フェドバッチ培養した。細胞を含む HCCF を超音波処理することで Lysed HCCF を調製し、一般的な従来法としてガラス瓶を用いて Lysed HCCF を 2-3 日間嫌気条件下でインキュベーションした。インキュベーションで得たサンプルに対して非還元条件下で CE-SDS 分析を行い、mAb A の鎖間ジスルフィド結合の状態を調べた。その結果、Cell line#1 では、mAb A はほぼ完全に還元され、L、H、HL の 3 種になり、インタクト抗体は検出されなかった (表 1)。しかし、Cell line#2 では、インキュベーション後もインタクト抗体のみが認められ、還元による切断体は観察されなかった (表 3-1)。

Cell line#1 及び#2 については、同じ培地組成とプロセス条件の下で 1,000 L の製造スケールで培養した際に、ハーベスト工程で得られた HCCF に対して、嫌気条件下でインキュベーションを行ったところ、3 L バイオリアクターで培養した場合と同様の結果が認められた (表 3-1)。従って、還元リスクについてはバイオリアクターのスケールに依らず、細胞株への依存性を示した。

表 3-1. 3 L および 1,000 L バイオリアクター培養における各種細胞株の Performance Parameter と抗体還元リスク

Expressed antibody	Cell line #	3 L						1,000 L		
		Viable cell density (x 10 <sup>6</sup> cells/mL)	Viability (%)	Titer (g/L)	Glucose (g/L)	TrxR activity (μmol/min/10 <sup>7</sup> cells <sup>b</sup> )	Antibody reduction of lysed HCCF under anaerobic conditions <sup>a</sup>		HCCF antibody reduction <sup>c</sup>	
							Glass Bottle	Ambr15		
mAb (IgG4)	A	1	12.4	97.6	2.9	6.31	0.015	Positive	Positive	Positive
		2	10.1	72.9	2.3	4.94	0.014	Negative	Negative	Negative
mAb (IgG1)	B	3	15.8	97.7	3.1	3.66	NT	Positive	Positive	NT
		4	16.6	92.5	3.0	3.44	NT	Negative	Negative	Negative
mAb (IgG1)	C	5	7.6	82.2	3.5	2.64	NT	Positive	Positive	NT
		6	6.8	67.9	3.1	6.37	NT	Negative	Negative	NT
		7	5.5	58.1	2.7	4.70	NT	Positive	Positive	NT
		8	16.3	92.7	2.4	3.01	NT	Negative	Negative	NT

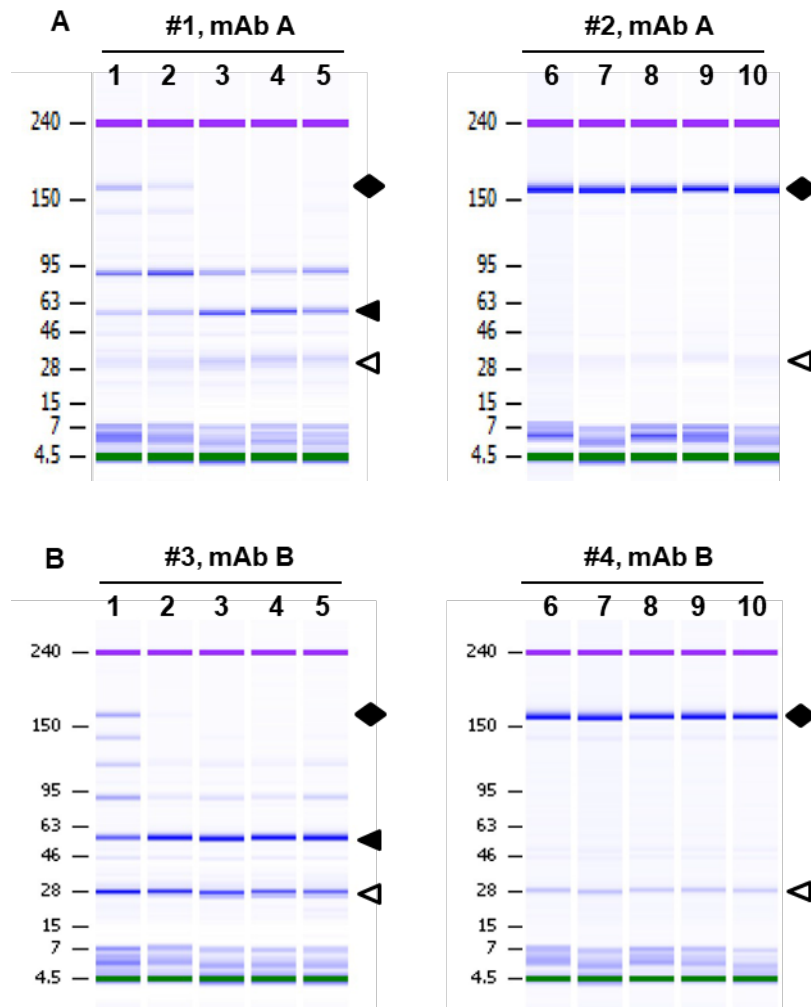
NT = Not tested. <sup>a</sup>各細胞株の溶解した HCCF を嫌気条件下で 24 時間以上インキュベートした。抗体還元は CE-SDS で評価した。<sup>b</sup>各細胞株の HCCF を SDS-PAGE で分析し、抗体還元を評価した。

#### 3.3.2 Ambr15 システムによる抗体還元評価法のスループット向上

3.3.1 項での各細胞株に対する抗体還元のリスク評価は、125 mL のガラス瓶に 40 mL の Lysed HCCF を分注し、Lysed HCCF を嫌気条件下でインキュベートすることによって行った。この方法では嫌気的環境をセットアップするのに約 1 日を要し、実験室で分析できるのは最大でも 10 種類の条件のみであった。抗体還元のリスクが低い CHO 細胞株を選抜するためには、より効率的なスクリーニング方法が必要であった。



ハイスループット化のために、シングルユースの小型バイオリアクター（最大容量 15 mL）で構成され、気相制御と 48 種類の HCCF もしくは Lysed HCCF のインキュベーションが可能な Ambr15 システムを採用することにした。作業としては、Lysed HCCF を小型バイオリアクターに分注して Ambr15 システムに組付けた後に、N<sub>2</sub> 及び CO<sub>2</sub> を 93:7 (v/v) の比率で混合したガスを上面通気することで嫌気条件にした。Cell line#1 及び Cell line#2 の評価結果を図 3-2 に示す。Cell line#1 では嫌気条件下でのインキュベート開始前から、HL（～90 kDa）、H（～50 kDa）、L（～30 kDa）、インタクト抗体（～160 kDa；菱形で注釈）が認められ、インキュベーション 24 時間後にはインタクト抗体のバンドが消失していた。（図 3-2A；表 3-1）。対照的に、Cell line#2 の Lysed HCCF からは、24 時間のインキュベーションを通してインタクト抗体に相当するバンドのみを観察した（図 3-2A；表 3-1）。



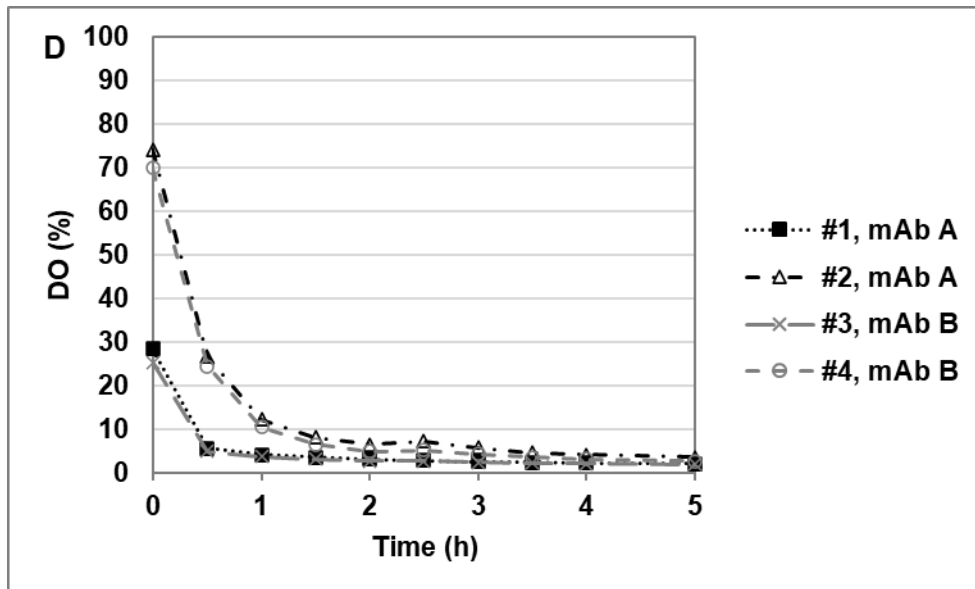
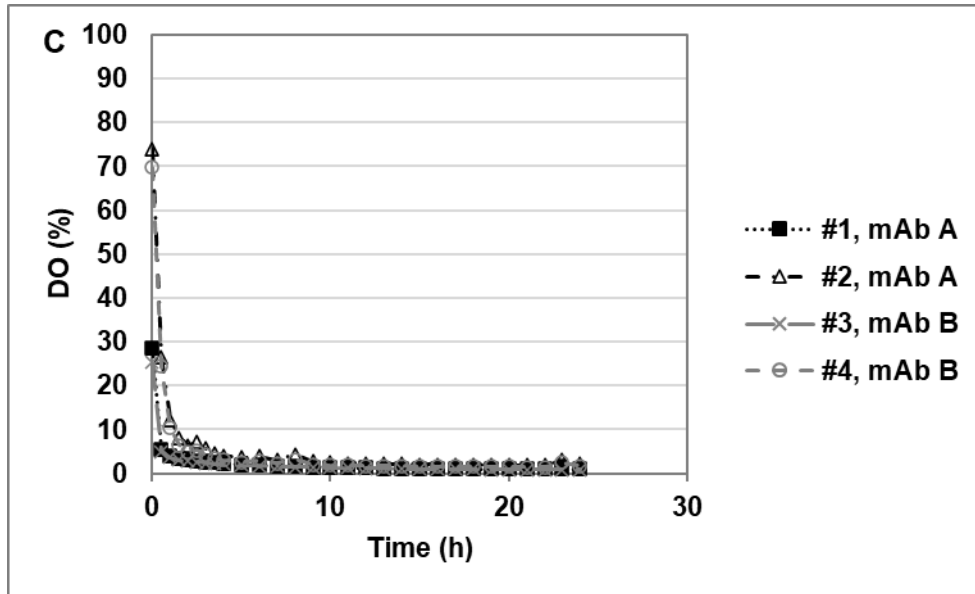


図3-2. 3 Lバイオリアクター培養した各種細胞株の抗体還元リスク評価結果及び DO の経時的変化

還元リスクが高い Cell line#1 (mAb A) 及び Cell line#3 (mAb B) と、還元リスクが低い Cell line#2 (mAb A) 及び Cell line#4 (mAb B) をそれぞれ 3 Lバイオリアクターで培養し、Lysed HCCF を Ambr15 システムで 24 時間嫌気条件下でインキュベートした。A および B : NR-CE-SDS エレクトロフェログラム (デジタルゲル状画像)。A: mAb A; B: mAb B。各レーンは、レーン 1-5 (還元高リスク細胞株) およびレーン 6-10 (還元低リスク細胞株) は、それぞれインキュベーション 0、3、6、9、および 24 時間後のサンプルを表す。塗りつぶした菱形はインタクトな抗体を示す。白矢頭と黒矢頭はそれぞれ L と H に対応する。C と D : Cell line#1-4 の DO。還元高リスク細胞株の Lysed HCCF は、還元低リスク細胞株の Lysed HCCF よりも DO の低下が速かった。D: 0-5 時間の拡大図。

Cell line#1 および#2 の DO 値は、培養開始から時間とともに急速に低下し、1.5 時間後には 10%未満まで低下した (図 3-2C、3-2D)。DO の低下率は、Cell line#1 よりも Cell line#2 の方が低かった。したがって、Cell line#2 の方が Cell line#1 よりも O<sub>2</sub> の消費率が低かった。

Ambr15 システムの汎用性を検証するために、IgG1 (mAb B) を発現する 2 種類の CHO 細胞株 (Cell line#3, #4) に対しても同様の評価を行うこととした。まずはガラス瓶を用いた従来法の評価結果について述べる。3 L バイオリアクターを用いてフェドバッチ培養した際に最も高い発現量を示した Cell line #3 について、ガラス瓶を用いた方法で還元リスク評価を行ったところ、インキュベーションから 24 時間後に抗体還元が認められた (表 3-1)。対照的に、2 番目に生産性の高かった Cell line#4 は 24 時間後にもインタクト抗体のままであり、抗体還元が認められなかった。なお、Cell line#4 は、同じ培地組成とプロセス条件の下で 1,000 L の製造スケールで培養した際に、ハーベスト工程で得られた HCCF に対して、嫌気条件下でインキュベーションを行ったところ、3 L バイオリアクターで培養した場合と同様に、還元を示さなかった (表 3-1)。

一方、Cell line#3 および Cell line#4 の Lysed HCCF を、Ambr15 システムでインキュベートし、非還元条件で CE-SDS で分析したところ、24 時間後のサンプルにおいて、Cell line#3 では抗体還元が認められた (図 3-2B)。特に、Cell line#3 については、インキュベーション直前のサンプルでも H と L のバンドが認められ (レーン 1)、そのバンドの強度はインキュベーション直前の Cell line#1 のサンプルよりも高かった (図 3-2A、レーン 1)。さらに、インキュベーション 3 時間後に、インタクト抗体のバンドが消失していた (図 3-2B、レーン 2)。Cell line#4 では、24 時間後までに、還元による切断体のバンドは観察されず (図 3-2B、レーン 10)、インタクト抗体のバンドの強度が 0 時間のサンプルから変わらなかった (図 3-2B、レーン 6-10)。なお、遊離軽鎖 L (~28 kDa) は、mAb 分子の還元に関係なく CHO 細胞から分泌されることが報告されている (Trexler-Schmidt ら 2010; Kao ら 2010)。

Ambr15 システムの汎用性をさらに確認するため、IgG1 (mAb C) を発現する 4 種類の細胞株 (Cell line#5-8) について、還元リスクを Ambr15 システムで評価し、従来法で得られた結果と比較した (表 3-1)。Ambr15 システムでの評価の結果、Cell line#5 及び#7 については、還元が認められたが、Cell line#6 及び#8 は還元が認められなかった。一方で、従来法でのこれらの評価結果は完全に一致した。以上の結果は、セットアップが容易で多くのサンプルを扱うことができる Ambr15 システムは従来法に対して代替可能であることを示唆する。

### 3.3.3 フラスコへの培養容器の変更によるスループット向上

細胞培養のスループットを向上させるため、3 L バイオリアクター (初期培地体積 1.2 L) から 250 mL フラスコ (初期培地体積 80 mL) に縮小することを検討した。3 L バイオリアクターの際と同じ培地とプロセス条件下で、250 mL フラスコを用いて Cell line#1-4 をフェドバッチ培養した。培養後に Lysed HCCF を調製し、Ambr15 システムで分析を行った。フェドバッチ培養終了時の生細胞密度、生存率、グルコース濃度は培養スケールによって変化したが、発現量は変化しなかった (表 3-1 および 3-2)。還元リスク評価は、いずれの培養スケールでも、また全ての細胞株で同じであった。Cell line#1 は、インキュベーション開始前に HL 体 (~90 kDa) のバンドが検出され (図 3-3A、レーン 1)、6 時間後にはインタクト抗体は消失していた (図 3-3A、レーン 3)。一方、Cell line#2 では、24 時間培養後でも還元による切断体は見られなかった (図 3-3A、レーン 6-10)。Cell line#3 は、インキュベーション開始前に H と L が認められ (図 3-3B、レーン 1)、3 時間後にはインタクト抗体が消失した (図 3-3B、レーン 2)。細胞

株#4 は、インキュベーション 24 時間後も還元による切断体を認めなかった（図 3-3B、レーン 6-10）。以上より、フラスコ培養と 3 L バイオリアクターの培養容器の差による、還元評価の結果は同等であった（表 3-1、3-2；図 3-2、3-3）。通気と攪拌は、バイオリアクター培養とフラスコ培養で大きく異なっていたのにもかかわらず、還元リスクはどちらの培養スケールでも同じであった。

**表 3-2. 250 mL フラスコ培養における各種細胞株の Performance Parameter と抗体還元リスク**

Expressed antibody	Cell line #	Viable cell density (x 10 <sup>6</sup> cells/mL)	Viability (%)	Titer (g/L)	Glucose (g/L)	Antibody reduction in lysed HCCF under anaerobic conditions <sup>a</sup>
						Ambr15
mAb A (IgG4)	1	9.1	89.2	2.9	3.32	Positive
	2	15.1	83.4	2.4	2.08	Negative
mAb B (IgG1)	3	9.5	86.6	3.5	0.62	Positive
	4	11.6	81.7	2.8	1.28	Negative

<sup>a</sup>抗体還元は CE-SDS で評価した。

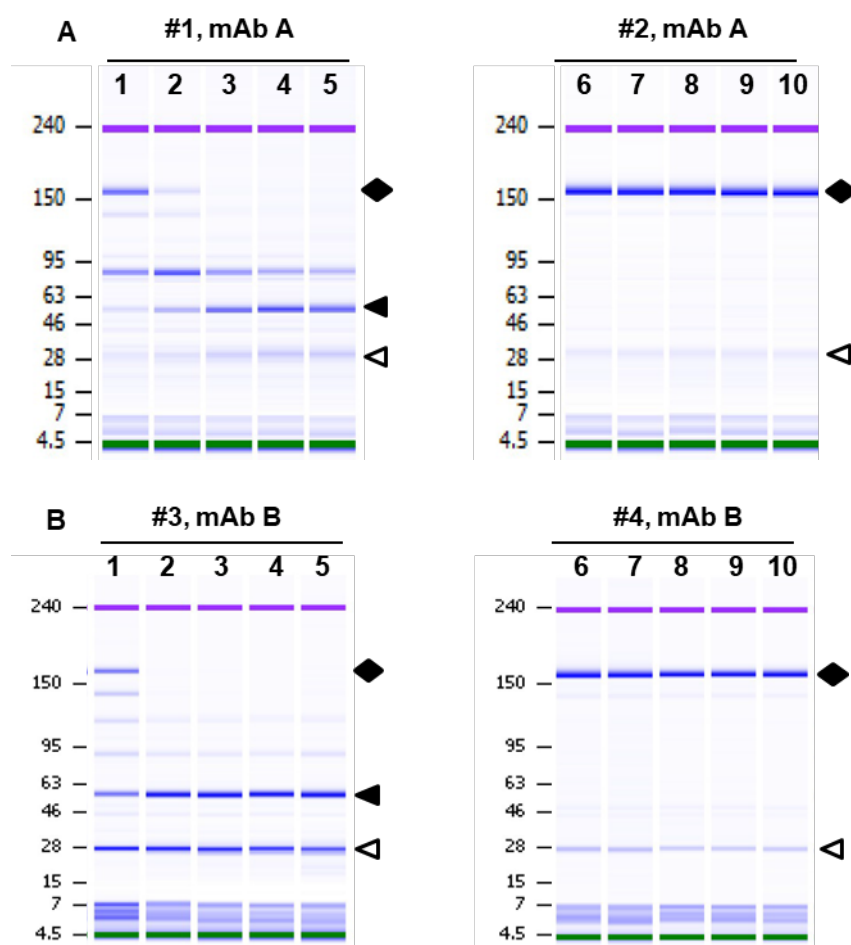
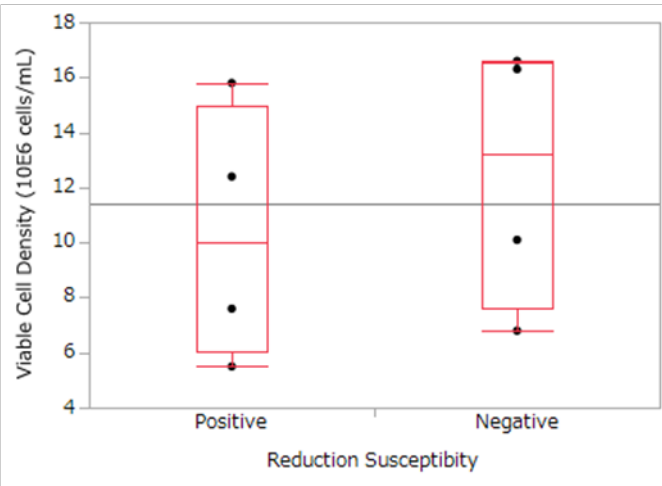


図 3-3. 250 mL フラスコ培養した各種細胞株の抗体還元リスク評価結果. 還元リスクが高い Cell line#1 (mAb A) 及び Cell line#3 (mAb B) と、還元リスクが低い Cell line#2 (mAb A) 及び Cell line#4 (mAb B) をそれぞれ 250 mL フラスコで培養し、Lysed HCCF を Ambr15 システムで 24 時間嫌気条件下でインキュベートした。A および B : NR-CE-SDS エレクトロフェログラム (デジタルゲル状画像)。A: mAb A; B: mAb B。各レーンは、レーン 1-5 (還元高リスク細胞株) およびレーン 6-10 (還元低リスク細胞株) は、それぞれインキュベーション 0、3、6、9、および 24 時間後のサンプルを表す。塗りつぶした菱形はインタクトな抗体を示す。白矢頭と黒矢頭はそれぞれ L と H に対応する。

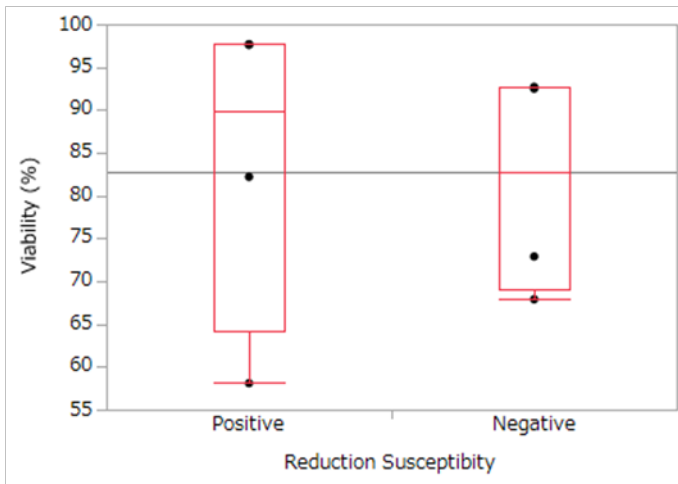
### 3.3.4 還元リスクと他の Performance Parameter との関係性

これまで見てきたように抗体還元リスクは細胞株に依存し、細胞株によって大きく異なる。我々は、細胞株毎の抗体還元リスクがフェドバッチ培養終了時の生細胞密度、生存率、抗体発現量、あるいは HCCF 中のグルコース濃度との関係性を調べた。Cell line#1-8 を、抗体還元リスクに基づいて 2 つのグループに分け、その Performance Parameter をプロットした (図 3-4)。その結果、各細胞株の抗体還元リスクは、どの Performance Parameter とも有意な相関関係を示さなかった ( $p > 0.05$ )。なお、Cell line#1 と #2 の TrxR 活性を測定したところ、活性値は同等であった (表 1)。従って、TrxR 活性と還元リスクの間にも相関は認められなかった。

**A**



**B**



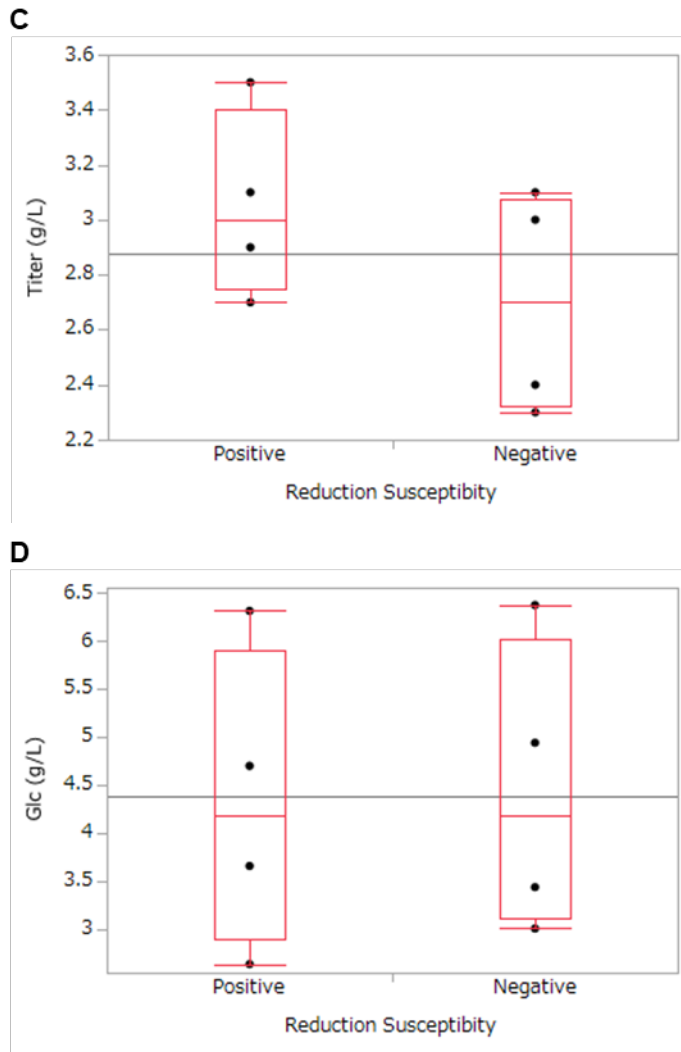
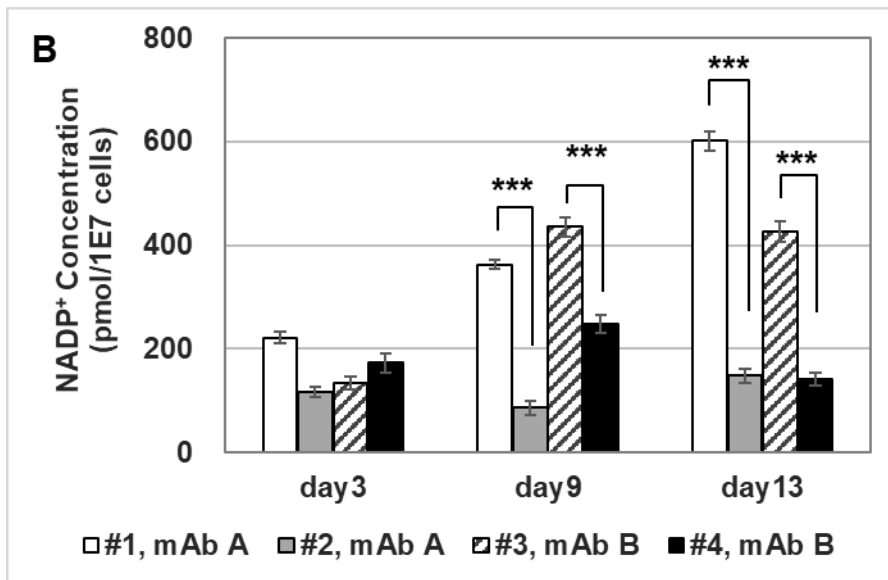
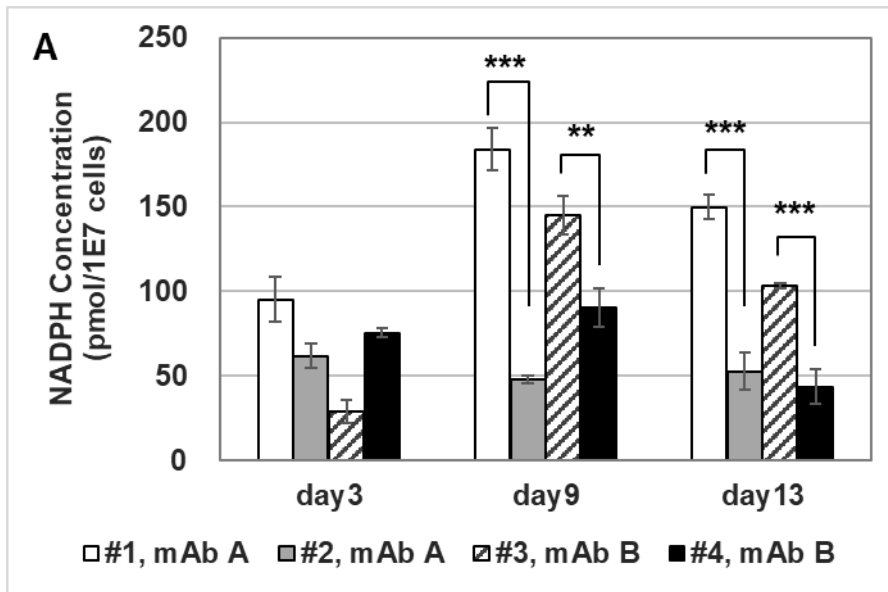


図 3-4. フェドバッチ培養終了時の還元リスクと Performance parameter との関係性。抗体還元リスクに対する生細胞密度 (A)、生存率 (B)、抗体発現量 (C)、グルコース濃度 (D) の箱ひげ図。枠内の中央の線は中央値を表す。箱の下底は第一四分位数、上程は第三四分位数。上下のひげの末端はそれぞれ最大値及び最小値を示す。

### 3.3.5 細胞内 NADPH 及び NADP<sup>+</sup>濃度の定量

TrxR および GR の補酵素である NADPH および NADP<sup>+</sup>の細胞内濃度が、mAb 還元感受性と相関しているかどうかを調べた。その結果、還元高リスクな Cell line#1 および#3 は、還元低いリスクな Cell line#2 および#4 よりも、フェドバッチ培養終了時（培養 13 日目）の細胞内 NADPH 濃度が有意に高かった（図 3-5A）（ $p < 0.001$ ）。細胞内 NADP<sup>+</sup>および細胞内総 NADPH および NADP<sup>+</sup>濃度もまた、細胞株の還元リスクと相関していた（図 3-5B および 3-5C）。





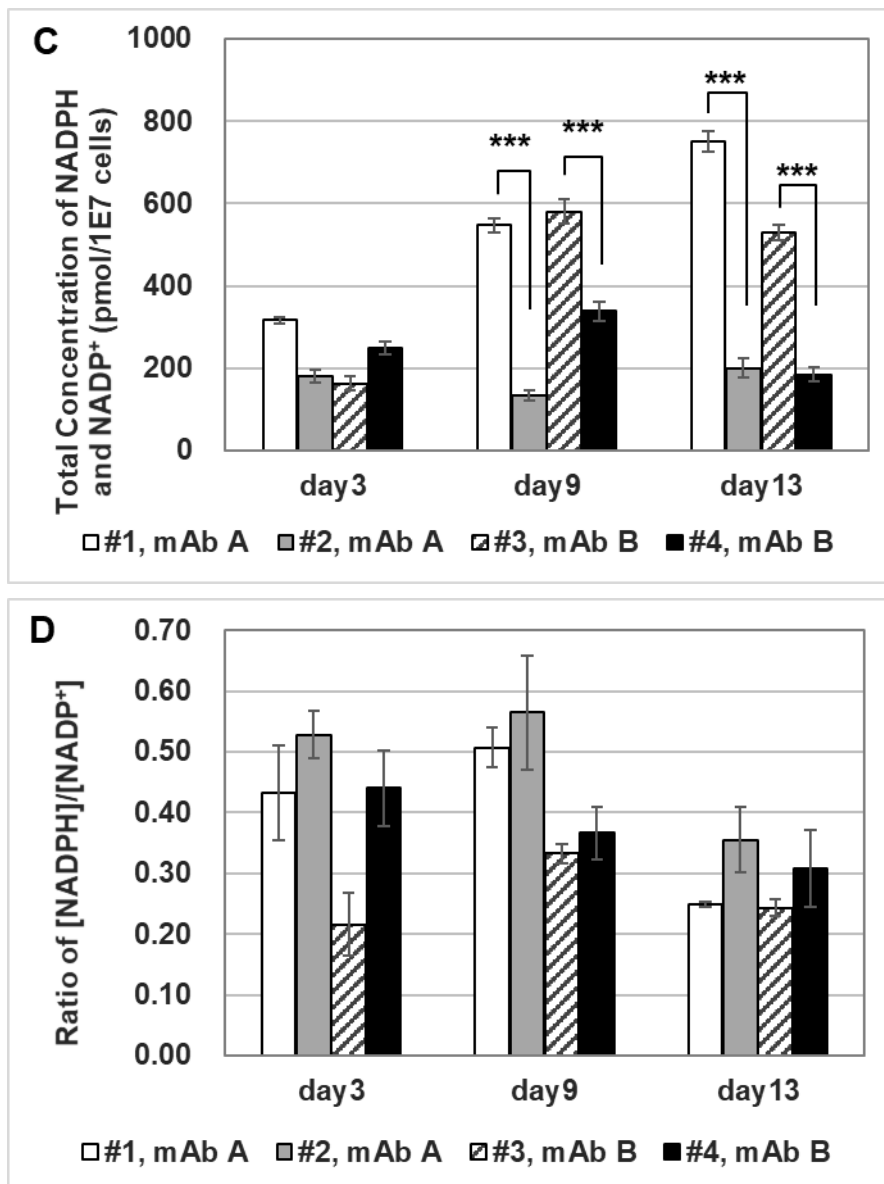


図 3-5. mAb A または mAb B を発現する細胞株におけるフェドバッチ培養中の細胞内 NADPH および NADP<sup>+</sup> 濃度。3 日目、9 日目、13 日目の細胞内 NADPH 濃度 (A)、NADP<sup>+</sup> 濃度 (B)、および総 NADPH および NADP<sup>+</sup> 濃度 (C) を定量キットを用いて測定した。[NADPH]/[NADP<sup>+</sup>] 比は NADPH と NADP<sup>+</sup> 濃度に基づいて計算した (D)。データは n=3 での平均±SD である。細胞株を比較するために Student の t 検定を行った。\*\* および \*\*\* は、それぞれ p<0.01 および p<0.001 を示す。

[NADPH]/[NADP<sup>+</sup>] 比は細胞内酸化還元状態を示す汎用的な指標であるが、今回の評価では、還元高リスク Cell line#1 および #3 は、還元低リスク Cell line#2 および #4 よりも高い [NADPH]/[NADP<sup>+</sup>] 比を示さなかった (図 3-5D)。従って、還元リスクとの相関は見られなかった。

次に、還元高リスク細胞株の細胞内 NADPH と NADP<sup>+</sup> の総濃度を培養 3 日目と 9 日目に測定し、その濃度が培養初期からすでに高かったのか、培養後半になって初めて上昇したのかを調べた。その結果、総 NADPH および NADP<sup>+</sup> 濃度は、9 日目には還元リスクと相関していたが、3 日目時点では相関していなかった (図 3-5C)。

### 3.3.6 NADPH、NADP<sup>+</sup>及びCu<sup>2+</sup>を Lysed HCCF に添加した際の影響

細胞内の NADPH と NADP<sup>+</sup>濃度は細胞株毎の抗体還元リスクと相関していた。NADPH 及び NADP<sup>+</sup>濃度あるいはその他の未知の因子が抗体還元直接影响到するかどうかを調べるため、Cell line#2（還元低リスク）の Lysed HCCF に NADPH と NADP<sup>+</sup>を添加し、mAb A に対する還元反応の有無を評価した（図 3-6）。まず、NADPH 及び NADP<sup>+</sup>を添加しなかったコントロールにおいては、インキュベーション 24 時間後まで抗体還元は認められなかった。対照的に、50 mM の NADPH を添加した条件では、6 時間後に抗体還元によってインタクト抗体含量が 30% に低下し、24 時間後にはほぼ 0% になった。50 mM の NADP<sup>+</sup>を添加したサンプルのインタクト抗体含量は、6 時間後にはコントロールと同程度であったが、24 時間後にはほぼ 0% になり還元が認められた。したがって、添加した NADP<sup>+</sup>は 6 時間後に NADPH に変換され、mAb A の還元反応における TrxR あるいは GR の補酵素として使われたと推察された。CuSO<sub>4</sub> (Cu<sup>2+</sup>) は、チオレドキシニンシステムおよびグルタチオンシステムを抑制することにより、抗体還元を阻害することが知られている（Gromer et al. 2004; Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Handlogten et al. 2017）（図 3-1）。今回、CuSO<sub>4</sub> を NADPH とともに添加した場合、抗体還元はインキュベーション 6 時間後に抑制されていたが、この抑制効果は 24 時間後では観察されなかった。なお、CuSO<sub>4</sub> を単独で添加した場合、インタクト抗体含量はコントロールと同じであった。

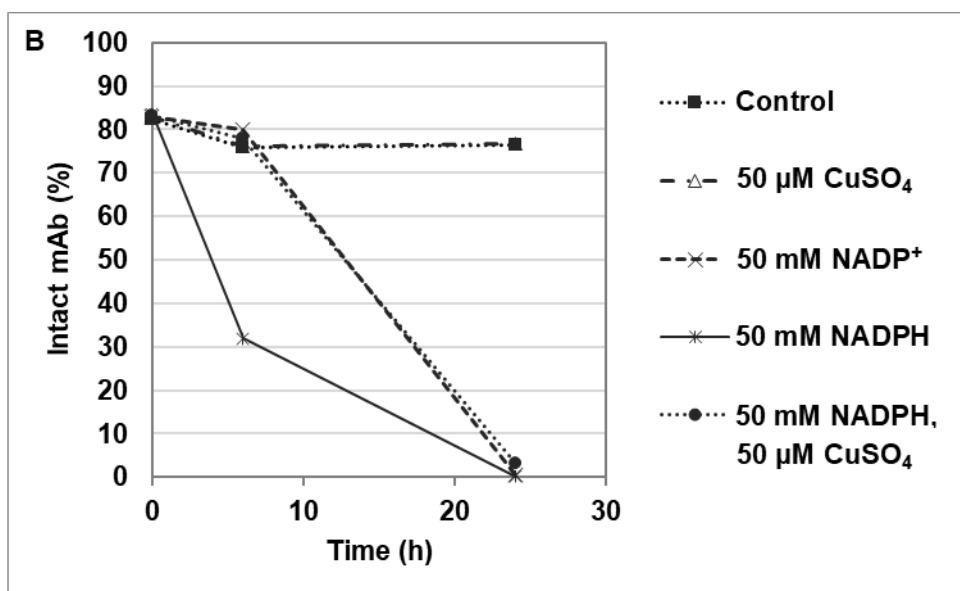
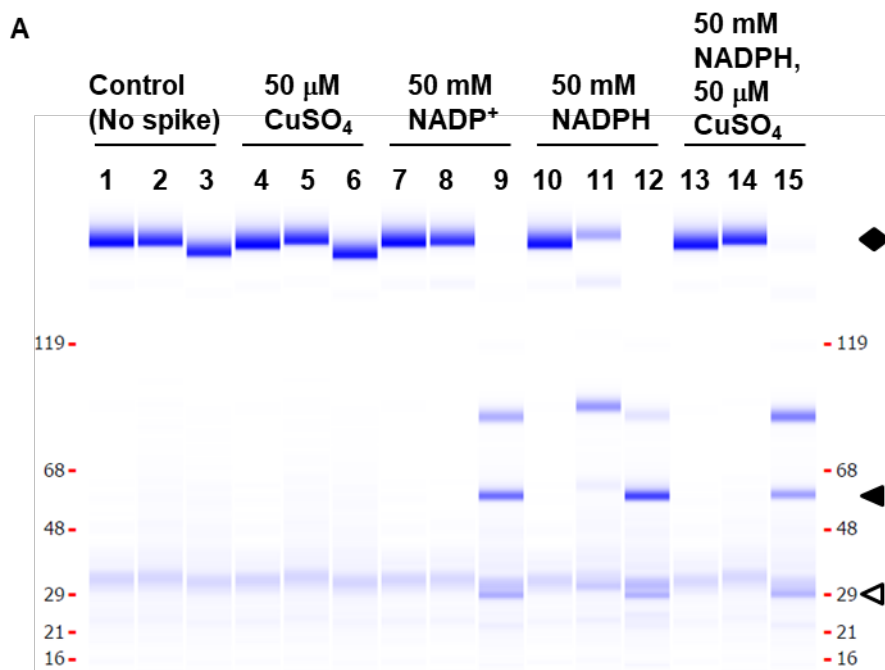


図 3-6. NADPH、NADP<sup>+</sup>、および Cu<sup>2+</sup>の添加が、還元低リスク細胞由来 Lysed HCCF の抗体還元能に及ぼす影響

mAb A を発現する Cell line#2 から Lysed HCCF を調製し、NADPH、NADP<sup>+</sup>、または CuSO<sub>4</sub> を添加した上でインキュベーションした。NR-CE-SDS 分析から得られたデジタルゲル状画像 (A)。各レーンはいンキュベーション後のサンプリング時点を表す：レーン 1-3、4-6、7-9、10-12、13-15 は 0、6、24 時間。塗りつぶされた菱形はインタクト抗体を示す。空と塗りつぶしの矢頭はそれぞれ L と H に対応する。各化合物を添加した Lysed HCCF 中のインタクト抗体含量 (%) の時間経過 (B)。空の三角形は塗りつぶした長方形と完全に重なっている。

## 3.4 考察

### 3.4.1 抗体還元リスク評価における Ambr15 システムの利点

抗体還元は嫌氣的条件下でのみ引き起こされるため (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Mullan et al. 2011)、HCCF を  $N_2$  でスパージングすることで、実験室スケールで再現する方法が報告されていた (Trexler-Schmidt et al. 2010; Hutterer et al. 2013; Mun et al. 2015)。別の方法として、 $N_2$  のスパージングやヘッドスペースへの上面通気がない条件で、Lysed HCCF をインキュベートして抗体還元を評価する方法が報告されていた (Trexler-Schmidt et al. 2010; Kao et al. 2010; Koterba et al. 2012; Mun et al. 2015; Chung et al. 2017; Handlogten et al. 2017; O'Mara et al. 2019)。後者の評価系では、ある種の酸素消費酵素が Lysed HCCF 中で働くことにより DO が低下し、抗体還元に必要な嫌氣的条件を作り出したと考えられている (Mun et al. 2015)。実験におけるスループットの観点からは、後者の方法は明らかに実用的であると考えられたが、我々が検討したところ、この方法では再現性のある結果を得ることができなかった。考えられる説明のひとつは、この方法ではヘッドスペース中の酸素が完全に除去されなかったことである (Mun et al. 2015; O'Mara et al. 2019)。さらに、酸素消費活性は CHO 細胞株によって異なる可能性がある。一方、我々が立ち上げた Ambr15 システムでは、制御された  $N_2$  通気により安定した評価結果の取得が期待される。

また、Ambr15 システムでは必要とするサンプルが少量である。そこで、培養容器を 3L バイオリアクターから 250 mL フラスコにダウンサイズした。どちらの培養容器を用いた場合でも同等の還元リスク評価結果が得られた (表 3-1 および 3-2; 図 3-2 および 3-3)。培養スケールを小さくしたことで、一度に抗体還元リスク評価ができるサンプル数を 10 から 48 に増やすことができた。

### 3.4.2 抗体還元リスクを決定する因子

各細胞株の抗体還元リスクと、フェドバッチ培養終了時の生細胞密度、生存率、抗体発現量、グルコース濃度、TrxR 活性を比較したところ、有意な相関関係は認められなかった。これは既報と同様の結果であった (Hutterer et al. 2013; Liu et al. 2016; Handlogten et al. 2017; Cura et al. 2020)。なお、抗体還元リスクが TrxR 活性に依存しないことは、以前に報告されている (Hutterer et al. 2013)。

細胞内の NADPH と  $NADP^+$  濃度は、フェドバッチ培養 9 日目と 13 日目に、還元高リスク細胞株の方が還元低リスク細胞株よりも高かった (図 3-5)。しかし、3 日目にはそのような差は検出されなかった。CHO 細胞は、フェドバッチ培養の中期と後期で酸化ストレスにさらされることが知られている (Templeton et al. 2013; Gao et al. 2016; Chevallier et al. 2020; Henry et al. 2020)。酸化ストレスに対する細胞応答には、 $NADP^+$  が NADPH に還元されるリサイクル経路と、 $NAD^+$  から  $NADP^+$  が生成される de novo 経路がある (Xiao et al. 2018)。前述の観察結果は、還元高リスク細胞株では de novo  $NADP^+$  合成が亢進していることを強く示唆している。実際、NADPH と  $NADP^+$  の添加により、還元低リスク細胞株の Lysed HCCF 中で抗体還元が引き起こされた。還元高リスクの HCCF には、NADPH 合成、タンパク質還元、抗酸化防御に関与する酵素の量が、還元低リスクの HCCF よりも有意に多いことが観察されており (Cura et al. 2020; Park et al. 2021)、我々の仮説と矛盾しないものと考えられる。

### 3.4.3 Ambr15 システムのその他の用途

本研究では、培地とプロセス条件がすべての培養スケールで同じである場合、抗体還元反応の有無が同じ傾向になることが観察された。しかし、同じ細胞株を用いた場合でも、培養液やプロセスパラメーターが異なると、抗体還元の有無や程度が異なる事例があることが報告されている。(Cura et al. 2020; Handlogten et al. 2020; Park et al. 2021)。我々も、予備試験において抗体還元の有無が培養液組成によって異なることを観察している (Data Not Shown)。Ambr15 システムの多検体処理能は、還元リスクの低い細胞培養培地条件やプロセスパラメーターの探索にも有用であると期待される。

### 3.5 小括

モノクローナル抗体の鎖間ジスルフィド結合は、CHO 細胞を用いた大規模な抗体生産において、その製造工程の途中で還元を受ける可能性がある。この反応は最終的に取得される抗体の収量と純度を低下させるが、抗体還元を受けにくい細胞株をスクリーニングし、抗体産生に使用することで防ぐことができる。還元リスクは細胞株によってそれぞれ固有である可能性が過去の研究から示唆されている。しかしながら、我々の知る限り、還元リスクが低い CHO 細胞株を効率的にスクリーニングする方法はこれまで報告されていなかった。今回我々は、48 種類の CHO 細胞株に由来する破砕液からそれぞれの抗体の還元リスクを同時に評価できる新しいスクリーニング法を立ち上げた。さらに、還元高リスク細胞株は、免疫グロブリン (Ig) G4 または IgG1 の発現の有無にかかわらず、還元低リスク細胞株よりも細胞内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) および  $\text{NADP}^+$ 濃度が高いことを見つけた。還元低リスク細胞株の破砕液に NADPH または  $\text{NADP}^+$ を補充すると、液中の抗体が還元することを観察した。本研究によって立ち上げた革新的な CHO 細胞株のスクリーニング方法を適用することで、大規模製造において、抗体還元が引き起こされるリスクを緩和または防止できる可能性がある。

## 4 結論

抗体医薬品において、切断体は、有効性・安全性・薬物動態に影響する可能性があることから、重要品質特性（CQA）の1つとされており、製造プロセスにおいてモニタリングや低減が求められる。

培養工程での生産培養（フェドバッチ培養）では、目的とする抗体が CHO 細胞から発現・分泌し、培養液中に放出される。培養液中には所望の抗体に加えて、一定量の切断体が含まれることが知られている。精製抗体に対する切断体の産生メカニズムについては、精力的に研究がされている一方で、培養工程における切断体の産生メカニズムや制御方法については、これまでほとんど報告がなかった。

本研究において我々は、フェドバッチ培養の高生産性プロセスにおいて、生産性の向上に伴い、切断体含量が増加する傾向を観察した。また、切断体のプロファイルを糸口に、ROS が切断体産生を引き起こしているとの仮説を立てて、抗酸化剤であるカテキン類（カテキン及びエピガロカテキンガレート）を培地に添加して培養を行ったところ、コントロールと同等以上の生産性を維持しつつ、切断体含量を低減させることに成功した。本成果は、カテキン添加による具体的な切断体制御方法を提示するだけでなく、抗酸化剤の添加による切断体制御の可能性を示したので、高生産性で高品質な抗体医薬品の製造へ寄与すると期待される。

また、実製造スケールでのハーベスト工程において、連続遠心及びフィルターろ過によって得られた HCCF を精製工程 1 に供するまでの間に一時的に保持していると、抗体分子間のジスルフィド結合が還元反応により切断され、切断体の著しい増加が引き起こされる事例が複数のグループから報告されている。この抗体還元については、連続遠心及びフィルターろ過でのせん断応力により、培養液中の細胞が破砕されることによって、還元反応に関わる酵素群や補酵素が培養上清に放出されることに加えて、一時的な保持時間が原因であることが分かっている。一方で、細胞株によって、抗体還元を引き起こすリスクが異なることを示唆する報告がなされている。ラボで抗体還元リスクを評価する方法がいくつか報告されているものの、効率的に抗体還元リスクの低い細胞株を選抜する方法についてはこれまで報告がなく、細胞選抜における人的リソースの負荷が課題であった。さらに、細胞株毎の抗体還元リスクを決定している因子についても同定されていなかった。

本研究において、抗体還元リスク評価のスループットを向上するために、小型シングルユースバイオリアクターの Ambr15 を用いることを検討した。検討の結果、従来のガラス瓶を用いた方法と同様の評価結果を得ることができた。フラスコ培養と組み合わせることにより、スループットの観点では、従来法では 10 条件を上限としていたが、48 条件まで引き上げることができた。また、抗体還元高リスク細胞株は低リスク細胞株に対して、細胞内の NADPH 濃度や NADP<sup>+</sup>濃度が高いことを見いだした。Ambr15 を用いたハイスループットスクリーニング方法によって、還元低リスク細胞株を効率的に選抜することにより、実製造で抗体還元が引き起こるリスクの回避及び低減につながることを期待される。

以上のとおり、抗体医薬品生産の培養工程において、切断体含量を低減する 2 つの方法を開発した。フェドバッチ培養にカテキン類を添加する方法は抗酸化活性を増強するアプローチであり、対照的に、還元低リスク細胞株のスクリーニング法は抗酸化活性が強すぎる細胞株を選抜時に排除するアプローチである。従って、抗酸化活性の極端な増強や抑制は切断体の増加リスク、さらには細胞増殖や生産性への悪影響につながることを予想され、細胞及び培養液のレドックス状態の適正化が目指すべきゴールであると考えられる。本研究の成果は、抗体医薬品

の製造プロセスにおける品質管理に重要な洞察をもたらし、製品の有効性・安全性の向上につながるものと期待される。



## 5 論文

### 関連論文

1. Yamaguchi T, Fukuda M, Matsumoto Y, Mori T, Kikuchi S, Nagano R, Yamamoto K, Wakamatsu K. New high-throughput screening method for Chinese hamster ovary cell lines expressing low reduced monoclonal antibody levels: application of a system controlling the gas phase over cell lysates in miniature bioreactors and facilitating multiple sample setup. *Cytotechnology*. 2023;75:421-433.
2. Yamaguchi T, Ishikawa H, Fukuda M, Sugita Y, Furuie M, Nagano R, Suzawa T, Yamamoto K, Wakamatsu K. Catechins prevent monoclonal antibody fragmentation during production via fed-batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology Progress* (in press).

## 6 謝辞

本研究全般に渡り、ご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学 大学院理工学府 物質・生命理工学領域 若松馨名誉教授に心より厚く御礼申し上げます。

論文の作成にあたり有益なご助言とご指導を頂きました園山正史教授、井上裕介教授、森口朋尚准教授、武野宏之准教授に感謝申し上げます。

ご指導頂きました協和キリン株式会社 山崎勝由バイオ生産技術研究所所長、山本耕一原薬 1 グループ長、永野竜馬主任研究員をはじめ皆様に深く感謝申し上げます。

実験遂行及び論文作成にあたりご尽力頂いた、福田美絵研究員、松本悠一研究員、森貴昭研究員、菊池信介研究員、石川寛子研究員、杉田弓美研究員、古家美咲研究員をはじめ皆様にこの場を借りてお礼申し上げます。

## 7 Bibliography

1. Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275:328–334. doi: 10.1006/bbrc.2000.3297
2. Aggarwal V, Tuli H S, Tania M, Srivastava S, Ritzer EE, Pandey A, Aggarwal D, Barwal TS, Jain A, Kaur G, Sak K, Varol M, Bishayee A. Molecular mechanisms of action of epigallocatechin gallate in cancer: Recent trends and advancement. *Semin Cancer Biol.* 2022; 80:256–275. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.05.011
3. Aldington S, Bonnerjea J. Scale-up of monoclonal antibody purification processes. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007;848:64–78). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.032>
4. Argoud, S., Budzinski, K., D'Aquila, D., Madabhushi, S. R., & Smith, P. Green metrics for biologics. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022;35:100614. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100614>
5. Atsumi Y, Sakurai N, Nishimura K, Yamazaki K, Wakamatsu K. Identification and Characterization of a Monoclonal Antibody Variant Species with a Clipping in the Complementarity Determining Region Isolated by Size Exclusion Chromatography Under Native Conditions. *J Pharm Sci.* 2021;110:3367–3374. doi: 10.1016/j.xphs.2021.05.023
6. Bae JY, Kanamune J, Han DW, Matsumura K, Hyon SH. Reversible regulation of cell cycle-related genes by epigallocatechin gallate for hibernation of neonatal human tarsal fibroblasts. *Cell Transplant.* 2009;18:459–469. doi: 10.3727/0963689097888097
7. Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules.* 2018;23:965. doi: 10.3390/molecules23040965
8. Bokare AD, Choi W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. *J Hazard Mater.* 2014;275:121–135. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.04.054
9. Brühlmann D, Jordan M, Hemberger J, Sauer M, Stettler M, Broly H. Tailoring recombinant protein quality by rational media design. *Biotechnol Prog.* 2015;31:615–629. doi: 10.1002/btpr.2089
10. Chahar DS, Ravindran S, Pisal SS. Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals* 2020;63:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.007>

11. Chevallier V, Andersen MR, Malphettes L. Oxidative stress-alleviating strategies to improve recombinant protein production in CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117:1172–1186. doi: 10.1002/bit.27247
12. Chung WK, Russell B, Yang Y, Handlogten M, Hudak S, Cao M, Wang J, Robbins D, Ahuja S, Zhu M. Effects of antibody disulfide bond reduction on purification process performance and final drug substance stability; Effects of antibody disulfide bond reduction on purification process performance and final drug substance stability. *Biotechnol. Bioeng*. 2017;114:1264–1274. <https://doi.org/10.1002/bit.26265/abstract>
13. Cohen SL, Price C, Vlasak J.  $\beta$ -elimination and peptide bond hydrolysis: Two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129: 6976–6977. <https://doi.org/10.1021/ja0705994>
14. Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, Harris RJ. Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;818:115–121.
15. Cura AJ, Xu X, Egan S, Aron K, Jenkins L, Hageman T, Huang Y, Chollangi S, Borys M, Ghose S, Li ZJ Metabolic understanding of disulfide reduction during monoclonal antibody production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104:9655–9669. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10916-1>
16. Dada OO, Rao R, Jones N, Jaya N, Salas-Solano O. Comparison of SEC and CE-SDS methods for monitoring hinge fragmentation in IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:91–97. doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.006
17. Derfus GE, Dizon-Maspat J, Broddrick JT, Velayo AC, Toschi JD, Santuray RT, Hsu SK, Winter CM, Krishnan R, Amanullah A. Red colored IgG4 caused by vitamin B12 from cell culture media combined with disulfide reduction at harvest. *mAbs* 2014;6:679–688. <https://doi.org/10.4161/mabs.28257>
18. Dorai H, Ganguly S. Mammalian cell-produced therapeutic proteins: Heterogeneity derived from protein degradation. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;30:198–204. doi: 10.1016/j.copbio.2014.07.007
19. Du C, Huang Y, Borwankar A, Tan Z, Cura A, Yee JC, Singh N, Ludwig R, Borys M, Ghose S, Mussa N, Li ZJ. Using hydrogen peroxide to prevent antibody disulfide bond reduction during manufacturing process. *mAbs* 2018;10:500–510. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1424609>
20. Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol Prog*. 2012;28:608–622.

21. Gao Y, Ray S, Dai S, Ivanov AR, Abu-Absi NR, Lewis AM, Huang Z, Xing Z, Borys MC, Li ZJ, Karger BL. Combined metabolomics and proteomics reveals hypoxia as a cause of lower productivity on scale-up to a 5000-liter CHO bioprocess. *Biotechnol J*. 2016;11:1190–1200. <https://doi.org/10.1002/biot.201600030>
22. Glover ZK, Basa L, Moore B, Laurence JS, Sreedhara A. Metal ion interactions with mAbs: Part 1 pH and conformation modulate copper-mediated site-specific fragmentation of the IgG1 hinge region. *MAbs*. 2015;7: 901–911. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1062193>
23. Goetze AM, Schenauer MR, Flynn GC. Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies. *MAbs*. 2010;2:500–507.
24. Graham RJ, Bhatia H, Yoon S. Consequences of trace metal variability and supplementation on Chinese hamster ovary (CHO) cell culture performance: A review of key mechanisms and considerations. *Biotechnol Bioeng*. 2019;116:3446–3456. doi: 10.1002/bit.27140
25. Gromer S, Urig S, Becker K (2004) The thioredoxin system--From science to clinic. *Med Res Rev*. 2004;24:40–89. <https://doi.org/10.1002/med.10051>
26. Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (–)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;410: 177–185. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00668-9
27. Gupta S, Jiskoot W, Schöneich C, Rathore AS. Oxidation and Deamidation of Monoclonal Antibody Products: Potential Impact on Stability, Biological Activity, and Efficacy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022;111: 903–918. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.11.024>
28. Ha TK, Kim D, Kim CL, Grav LM, Lee GM. Factors affecting the quality of therapeutic proteins in recombinant Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnol Adv*. 2022;54: 107831. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107831
29. Handlogten MW, Zhu M, Ahuja S. Glutathione and Thioredoxin Systems Contribute to Recombinant Monoclonal Antibody Interchain Disulfide Bond Reduction During Bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng*, 2017;114: 1469–1477. <https://doi.org/10.1002/bit.26278/abstract>
30. Handlogten MW, Lee-O'Brien A, Roy G, Levitskaya SV, Venkat R, Singh S, Ahuja S. Intracellular response to process optimization and impact on productivity and product aggregates for a high-titer CHO cell process. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115:126–138. doi: 10.1002/bit.26460
31. Handlogten MW, Wang J, Ahuja S. Online control of cell culture redox potential prevents antibody interchain disulfide bond reduction. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117:1329–1336. <https://doi.org/10.1002/bit.27281>

32. Henry MN, MacDonald MA, Orellana CA, Gray PP, Gillard M, Baker K, Nielsen LK, Marcellin E, Mahler S, Martínez VS. Attenuating apoptosis in Chinese hamster ovary cells for improved biopharmaceutical production. *Biotechnol Bioeng* 2020;117:1187–1203. <https://doi.org/10.1002/bit.27269>
33. Hossler, P., Wang, M., Mcdermott, S., Racicot, C., Chemfe, K., Zhang, Y., Chumsae, C., Manuilov, A. Cell culture media supplementation of bioflavonoids for the targeted reduction of acidic species charge variants on recombinant therapeutic proteins. *Biotechnol Prog.* 2015;31:1039–1052. <https://doi.org/10.1002/btpr.2095>
34. Hutterer KM, Hong RW, Lull J, Zhao X, Wang T, Pei R, Le ME, Borisov O, Piper R, Liu YD, Petty K, Apostol I, Flynn GC. Monoclonal antibody disulfide reduction during manufacturing: Untangling process effects from product effects. *mAbs* 2013;5:608–613. <https://doi.org/10.4161/mabs.24725>
35. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development Q8 (R2), August 2009.
36. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities Q11, May 2012.
37. Irani V, Guy AJ, Andrew D, Beeson JG, Ramsland PA, Richards JS. (2015). Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Molecular Immunology* 2015;67:171–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.255>
38. Junne S, Neubauer P. How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Current Opinion in Biotechnology* 2018;53:240–247. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.04.003>
39. Kamerzell TJ, Li M, Arora S, Ji JA, Wang YJ. The relative rate of immunoglobulin gamma 1 fragmentation. *J Pharm Sci.* 2011;100:1341–1349. doi: 10.1002/jps.22389
40. Kao FT, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60:1275–1281. doi: 10.1073/pnas.60.4.1275

41. Kao YH, Hewitt DP, Trexler-Schmidt M, Laird MW (2010) Mechanism of antibody reduction in cell culture production processes. *Biotechnol Bioeng* 107:622–632. <https://doi.org/10.1002/bit.22848>
42. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *mAbs* 2021;12:1703531. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1703531>
43. Koterba KL, Borgschulte T, Laird MW. Thioredoxin 1 is responsible for antibody disulfide reduction in CHO cell culture. *Journal of Biotechnology*. 2012;157:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.009>
44. Kozlowski S, Swann P. Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:707–722.
45. Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:3451–3461. doi: 10.1007/s00253-016-7388-9
46. Lalonde ME, Durocher Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol*. 2017;251:128–140. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028
47. Li ZM, Fan ZL, Wang XY, Wang TY. Factors Affecting the Expression of Recombinant Protein and Improvement Strategies in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2022 ;10: 880155. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.880155>
48. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci*. 2008;97:2426–2447.
49. Liu H, Nowak C, Shao M, Ponniah G, Neill A. Impact of cell culture on recombinant monoclonal antibody product heterogeneity. *Biotechnol Prog*. 2016;32:1103–1112. <https://doi.org/10.1002/btpr.2327>
50. Ma YC, Li C, Gao F, Xu Y, Jiang ZB, Liu JX, Jin LY. Epigallocatechin gallate inhibits the growth of human lung cancer by directly targeting the EGFR signaling pathway. *Oncol Rep*. 2014;31:1343–1349. doi: 10.3892/or.2013.2933
51. Manahan M, Nelson M, Cacciatore JJ, Weng J, Xu S, Pollard J. Scale-down model qualification of ambr® 250 high-throughput mini-bioreactor system for two commercial-scale mAb processes. *Biotechnology Progress*, 2019;35:e2870. <https://doi.org/10.1002/btpr.2870>
52. Mark JKK, Lim CSY, Nordin F, Tye GJ. Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. *Molecular Biology Reports* 2022;49:10593–10608. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07651-3>

53. Martin KP, Grimaldi C, Grempler R, Hansel S, Kumar S. Trends in industrialization of biotherapeutics: a survey of product characteristics of 89 antibody-based biotherapeutics. *mAbs* 2023;15:2191301. <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2191301>
54. Mullan B, Dravis B, Lim A, Clarke A, Janes S, Lambooy P, Olson D, O’Riordan T, Ricart B, Tulloch AG. Disulphide bond reduction of a therapeutic monoclonal antibody during cell culture manufacturing operations. *BMC Proc* 2011;5:110. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P110>
55. Mun M, Khoo S, Minh AD, Dvornicky J, Trexler-Schmidt M, Kao YH, Laird MW. Air Sparging for Prevention of Antibody Disulfide Bond Reduction in Harvested CHO Cell Culture Fluid. *Biotechnol. Bioeng.* 2015;112:734–742. <https://doi.org/10.1002/bit.25495/abstract>
56. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:767-774. <https://doi.org/10.1038/nrd3229>
57. O’Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, Mota LM, Obaidi I, Quigley A, Xie Y, Butler M. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances* 2020;43: 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
58. O’Mara B, Gao ZH, Kuruganti M, Mallett R, Nayar G, Smith L, Meyer JD, Therriault J, Miller C, Cisney J, Fann J. Impact of depth filtration on disulfide bond reduction during downstream processing of monoclonal antibodies from CHO cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 2019;116:1669–1683. <https://doi.org/10.1002/bit.26964>
59. Page M, Ling C, Dilger P, Bentley M, Forsey T, Longstaff C, Thorpe R. Fragmentation of therapeutic human immunoglobulin preparations. *Vox Sang.* 1995;69:183–194.
60. Park SY, Egan S, Cura AJ, Aron KL, Xu X, Zheng M, Borys M, Ghose S, Li Z, Lee K. Untargeted proteomics reveals upregulation of stress response pathways during CHO-based monoclonal antibody manufacturing process leading to disulfide bond reduction. *mAbs* 2021;13:1963094. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1963094>
61. Rameez S, Mostafa SS, Miller C, Shukla AA. High-throughput miniaturized bioreactors for cell culture process development: Reproducibility, scalability, and control. *Biotechnology Progress,* 2014;30:718–727. <https://doi.org/10.1002/btpr.1874>
62. Ren T, Tan Z, Ehamparanathan V, Lewandowski A, Ghose S, Li ZJ. Antibody disulfide bond reduction and recovery during biopharmaceutical process development – A review. *Biotechnol Bioeng.* 2021;118:2829–2844. <https://doi.org/10.1002/bit.27790>



63. Ritacco F, Wu Y, Khetan A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Prog.* 2018;34:1407–1426. doi: 10.1002/btpr.2706
64. Sandner V, Pybus LP, McCreath G, Glassey J. Scale-Down Model Development in ambr systems: An Industrial Perspective. *Biotechnology Journal* 2019;14: e1700766. <https://doi.org/10.1002/biot.201700766>
65. Schöneich C. Thiyl radical reactions in the chemical degradation of pharmaceutical proteins. *Molecules* 2019;24:4357 <https://doi.org/10.3390/molecules24234357>
66. Seibel R., Maier S, Schnellbaecher A, Bohl S, Wehsling M, Zeck A, Zimmer A. Impact of S-sulfocysteine on fragments and trisulfide bond linkages in monoclonal antibodies. *MAbs* 2017;9:889–897. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1333212>
67. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2011;82:1807–1821. doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.093
68. Sinharoy P., McFarland KS, Majewska NI, Betenbaugh MJ, Handlogten MW. Redox as a bioprocess parameter: analytical redox quantification in biological therapeutic production. *Curr Opin Biotechnol.* 2021;71:49–54. doi: 10.1016/j.copbio.2021.06.017
69. Shukla AA, Thömmes J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 2010;28:253–261. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001>
70. Smith MA, Easton M, Everett P, Lewis G, Payne M, Riveros-Moreno V, Allen G. Specific cleavage of immunoglobulin G by copper ions. *International Journal of Peptide and Protein Research.* 1996;48:48–55. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1996.tb01105.x>
71. Szkodny AC, Lee KH. Biopharmaceutical Manufacturing: Historical Perspectives and Future Directions. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2022; 10:141-165. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-092220-125832
72. Templeton N, Dean J, Reddy P, Young JD. Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2013;110:2013–2024. <https://doi.org/10.1002/bit.24858>
73. Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies* 2020;38:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>

74. Toronjo-Urquiza LT, James DC, Nagy T, Falconer RJ. Screening naturally occurring phenolic antioxidants for their suitability as additives to CHO cell culture media used to produce monoclonal antibodies. *Antioxidants*. 2019;8:159. doi: 10.3390/antiox8060159
75. Toronjo-Urquiza L, Acosta-Martin AE, James DC, Nagy T, Falconer RJ. The use of catechins in Chinese hamster ovary cell media for the improvement of monoclonal antibody yields and a reduction of acidic species. *Biotechnol Prog*. 2020;36:e2980. doi: 10.1002/btpr.2980
76. Trexler-Schmidt M, Sargis S, Chiu J, Sze-Khoo S, Mun M, Kao YH, Laird MW. Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010;106:452–461. <https://doi.org/10.1002/bit.22699>
77. Tsujimura M. On tea catechin isolated from green tea. *J Agric Chem Soc Jpn*. 1930;6:62–69. doi: 10.1080/03758397.1930.10856939
78. Tsujimura M. Isolation of a new catechin, tea catechin II or gallo-catechin from green tea. *J Agric Chem Soc Jpn*. 1934;10:140–147. doi: 10.1271/bbb1924.10.140
79. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *J Cell Biol*. 2004;164:341–346. doi: 10.1083/jcb.200311055
80. Tyo KEJ, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J. Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation rates yields runaway oxidative stress. *BMC Biol*. 2012;10:1–14. doi: 10.1186/1741-7007-10-16
81. Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies. *mAbs* 2011;3:253–263. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15608>
82. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol*. 2018;36:1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
83. Walsh SJ, Bargh JD, Dannheim FM, Hanby AR, Seki H, Counsell AJ, Ou X, Fowler E, Ashman N, Takada Y, Isidro-Llobet A, Parker JS, Carroll JS, Spring DR. Site-selective modification strategies in antibody-drug conjugates. *Chemical Society Reviews* 2021;50:1305–1353. <https://doi.org/10.1039/d0cs00310g>
84. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci*. 2007;96:1–26.
85. Wagner E, Colas O, Chenu S, Goyon A, Murisier A, Cianferani S, François Y, Fekete S, Guillaume D, D’Atri V, Beck A. Determination of size variants by CE-SDS for approved therapeutic

antibodies: Key implications of subclasses and light chain specificities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020;184:113166. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113166>

86. Wen L, Wu D, Tan X, Zhong M, Xing J, Li W, Li D, Cao F. The role of catechins in regulating diabetes: An update review. *Nutrients*. 2022;14:4681. doi: 10.3390/nu14214681
87. Wilson LJ, Lewis W, Kucia-Tran R, Bracewell DG. Identification of upstream culture conditions and harvest time parameters that affect host cell protein clearance. *Biotechnology Progress* 2019;35: e2805 . <https://doi.org/10.1002/btpr.2805>
88. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) redox couples and cellular energy metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28:251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>
89. Xiang T, Lundell E, Sun Z, Liu H. Structural effect of a recombinant monoclonal antibody on hinge region peptide bond hydrolysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007;858:254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.08.043>
90. Xu P, Clark C, Ryder T, Sparks C, Zhou J, Wang M, Russell R, Scott C. Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development. *Biotechnology Progress* 2017;33:478–489. <https://doi.org/10.1002/btpr.2417>
91. Yagi Y, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Application of microchip electrophoresis sodium dodecyl sulfate for the evaluation of change of degradation species of therapeutic antibodies in stability testing. *Anal Sci*. 2014;30:483–488. doi: 10.2116/analsci.30.483
92. Yamano N, Omasa T. EGCG improves recombinant protein productivity in Chinese hamster ovary cell cultures via cell proliferation control. *Cytotechnology*. 2018;70:1697–1706. doi: 10.1007/s10616-018-0243-3
93. Yan B, Yates Z, Balland A, Kleemann GR. Human IgG1 hinge fragmentation as the result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated radical cleavage. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:35390–35402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064147>
94. Yan B, Boyd D. Breaking the light and heavy chain linkage of human immunoglobulin G1 (IgG1) by radical reactions. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286:24674–24684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255026>
95. Yang B, Li W, Zhao H, Wang A, Lei Y, Xie Q, Xiong S. Discovery and characterization of CHO host cell protease-induced fragmentation of a recombinant monoclonal antibody during production process development. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1112:1–10. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.02.020

96. Yates Z, Gunasekaran K, Zhou H, Hu Z, Liu Z, Ketchem RR, Yan B. Histidine residue mediates radical-induced hinge cleavage of human IgG1. *J Biol Chem.* 2010;285:18662–18671. doi: 10.1074/jbc.M110.108597
97. Zhang Q, Mi C, Wang T. Effects and mechanism of small molecule additives on recombinant protein in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2023;107:2771–2781. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12486-4>
98. Zhou JX, Tressel T, Yang X, Seewoester T. Implementation of advanced technologies in commercial monoclonal antibody production. *Biotechnol J* 2008;3:1185–1200. <https://doi.org/10.1002/biot.200800117>
99. Zwolak I. Epigallocatechin gallate for management of heavy metal-induced oxidative stress: Mechanisms of action, efficacy, and concerns. *Int J Mol Sci.* 2021;22:4027. doi: 10.3390/ijms22084027