

抗体産生における高生産性-高品質の株と低生産性-低品質の株との比較：培養工学的，生物物理学的，メタボローム的アプローチ

Comparison of monoclonal antibody-expressing cell lines with high productivity/high quality vs. with low productivity/low quality: approaches from fermentation engineering, biophysical chemistry, and metabolomic analysis

2014 年

平成 26 年度

学籍番号 09812101

石井要一

By Yoichi Ishii

Doctor Thesis

群馬大学 大学院 工学研究科

Gunma University

要旨

抗体医薬品はその高い抗原特異性・長い血中半減期・低い想定外副作用の発生率から広く用いられるようになった。実際に、抗体医薬の市場は世界的に年々成長を続けている。治療用抗体は高い用量の投与が必要なこと、大腸菌とは異なり培養コストの高い動物細胞で発現する必要があることから、生産性の高い製造プロセスが患者の負担軽減のために必要である。一方、培養時のタンパク質の品質は精製工程を経ることもあり、これまでは、生産性ほど重要視されてこなかった。しかし、生産性の向上に伴い、培養時のタンパク質の品質が製品の品質に与える影響も無視できなくなってきた。培養液中の抗体品質の改善は、プロセスコストの削減だけでなく、副作用などの安全性からも重要である。モノクローナル抗体の生産性と品質は使用する細胞株の性質に大きく依存することから、抗体医薬品の開発工程において、大規模生産（商業生産）に適した細胞株を選択する工程は特に重要であると考えられている。本研究では、抗体産生で最も一般的に使用されるチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）において、大規模生産に適した高い品質と高い生産性を有する細胞株の特性を明らかにすべく、種々の検討を行った。

まず第一に、高い生産性と低い凝集体含量を示す細胞を特徴づけるために、生産性の指標である抗体濃度、および凝集体含量の指標である高分子種の割合（HMWS(%)）とに密接に関係する因子を決定した。トラスツズマブ（商品名 ハークローン、ハーセプチン）を産生する 28 種の安定発現株を調製し、抗体濃度・培養液中の HMWS(%)などを分析した。抗体濃度および HMWS(%)の指標と様々な因子との関係を明らかにするために、ステップワイズ多重回帰分析を行った。その結果、高い抗体濃度は、高い比増殖速度 (μ)・高い比生産速度 (Q_p)・低い細胞内重鎖 (HC) タンパク質含量と関係していることが明らかとなった。一方、低い HMWS(%)は、低い protein disulfide isomerase の mRNA レベル・高い培養液中の低分子量種の割合・高い Q_p ・高い細胞内軽鎖 (LC) タンパク質含量・高い μ と関係していることが明らかとなった。この結果は、ER 内での正しく、効率的な抗体分子のアッセムブリーとフォールディングが、高い抗体濃度と低い凝集体含量にとって重要であることを示唆するものであった。

第二に、大規模生産に適した品質の抗体を産生する細胞の特性を明らかにするために、抗体サンプルおよび細胞の特性が、生産性および凝集体含量で対照的な細胞株間で異なるかどうかを調査し

た. 28 株の中から細胞株 A (高い生産性, 低い凝集体含量) および細胞株 B (低い生産性, 高い凝集体含量) を選択し, それぞれの細胞株を 3 回培養した. 細胞, それらの細胞によって生産された抗体分子 (モノマー), そして凝集体の主要な性質の比較を行った. その結果, 種々の差 (増殖能, 非共有結合性の凝集体含量, 細胞内および培養液中 LC 含量, 細胞内 HC および HC ダイマーの蓄積, 非フコシル化の割合等) が存在することが明らかとなった. 細胞株 B での高い凝集体含量と低い抗体濃度は LC の低い生産性, およびそれに伴う多くの HC ダイマーとモノマーの蓄積に起因すると考えられる. また, 凝集体含量だけでなく, 凝集体形成の主要なメカニズムも 2 つの細胞間で異なっていた. 細胞株 A 由来の凝集体は, 主に共有結合性の相互作用により形成されるが, 細胞株 B 由来の凝集体は, 主に疎水性の相互作用により形成されることが明らかとなった.

第三に, メタボローム解析を用いて細胞株 A および細胞株 B の比較を行った. 先に, 細胞株 A と B の間の生産性 (抗体濃度) の違いは, 主に細胞数の違い (細胞株 A > 細胞株 B) であることが観察されている. 2 つの細胞株から分泌された抗体の品質において, 抗体の抗体依存性細胞傷害活性と関連する非フコシル化されたオリゴ糖の割合に細胞株で差が存在する (細胞株 A < 細胞株 B) ことが認められている. さらに, 先の検討では, 全凝集体含量および共有結合性凝集体の割合が細胞株 A と細胞株 B とで異なることを認めている. そこで, これらの違いが細胞代謝状態と関係しているか検討を行った. その結果, 乳酸代謝シフトは高い生産性の細胞株を選択するのに有用であるが, 細胞株 A での高い抗体濃度は乳酸代謝シフトが原因ではないことが示唆された. また, 高い生産性と低い生産性の細胞株間で認められた増殖能の違いは, 増殖期における細胞内の TCA サイクル中間体レベルの違いに起因することが示唆された. フコシル化オリゴ糖の割合の違いは, GDP-フコースの細胞内プールのレベル違いによるものではなく, フコシルトランスフェラーゼの発現レベルとその局在化の違いが原因ではないかと推定された. 細胞株間での共有結合性の凝集体の割合の違いは, おそらく酸化ストレス状態の違いに起因しており, ミトコンドリアの酸化還元状態と関連している可能性が高いと推定された.

本研究の培養工学的・生物物理学的・メタボローム的アプローチにより, 高生産性-高品質の抗体発現株と低生産性-低品質の抗体発現株との間に様々な違いが存在することが明らかとなった. 本知

見は、高生産性-高品質の抗体発現株の選抜・作成だけでなく、抗体の製造工程の改善にも役立つと期待される。

Abstract

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have been widely used because of their high antigenic specificity, long serum half-life, and low incidence of undesirable side effects. In fact, the global market of therapeutic mAbs is growing annually. Because large doses of therapeutic mAbs are usually required and mAbs are commonly expressed in animal cells, which require high manufacturing cost compared with that of *E. coli*, mAb production processes with high productivity (titer) have been considered of prime importance in order to reduce expense to patients. On the other hand, since many of product-related impurities such as aggregates in culture media can be removed during purification processes, the quality of mAbs in culture media has not been regarded as an important issue compared with the productivity of host cell until recently. The influence of mAb quality in culture media on the drug product quality, however, cannot be disregarded in accordance with the recent increase in mAb productivity of host cell. The quality improvement of mAb in culture medium is important not only for process cost reduction but for the safety enhancement of the drug product. Because the productivity and quality of mAbs depend on cell lines employed, the selection of cell lines suitable for large-scale production (commercial manufacturing) is a very important step in process development for mAb production. In this study, I revealed the characteristics of the host CHO cell lines possessing high productivity and high quality, which are suitable for large-scale production.

At the first step in this study, I determined factors closely related to titer, which is a productivity indicator, and the area percentage of high molecular weight species [HMWS(%) as determined by size exclusion chromatography (SEC) analysis], which is equivalent to aggregate content and is used as a quality indicator, to

characterize cells that have high productivity and low aggregates contents. Twenty-eight stable CHO cell lines that produce trastuzumab (trade names Herclon, Herceptin) were generated, and their properties were analyzed, such as titer, HMWS(%) in culture media. To understand the relationship between various factors and titer/HMWS(%), I performed stepwise multiple linear regression analyses. I found that high titer was associated to high specific growth rate (μ), high specific production rate (Q_p), and low intracellular heavy chain (HC) protein content. Thus, the cell lines that exhibit high intracellular HC content due to their difficulties in the assembling/folding process in the endoplasmic reticulum (ER) are considered to exhibit decreased titer, and the HC protein accumulation is thought to induce unfolded protein response (UPR), which is unfavorable for the cells. On the other hand, low HMWS(%) was associated to a low PDI mRNA level, high LMWS(%), high Q_p , high intracellular LC protein content, and high μ . In addition, it was considered that the partially misfolded antibody molecules may cause aggregates in the culture medium or in the cells. Taken together, the presented results suggest that correct and efficient assembling and/or folding of an antibody molecule in the ER are important for high titer and low aggregate contents.

At the second step in this study, to identify the characteristics of cell lines that produce mAb with qualities suitable for large-scale production, I investigated whether the characteristics of antibody samples and cells differed between the two cell lines with contrasting productivities and aggregate contents. Cell line A (high titer and high quality) and cell line B (low titer and low quality) were selected from the 28 cell lines, and each cell line was cultured three times. The comparison of cell behavior and antibody samples between the two cell lines by using various analytical methods, such as SEC and electrophoresis revealed various differences (cell growth,

the contents of noncovalent aggregates, accumulation of HC dimers/monomer, and proportion of defucosylated oligosaccharides). I attribute the higher aggregate content and lower titer in cell line B to the lower production levels of LC and more extensive subsequent accumulation of HC dimers/monomers in cell line B. The major mechanisms of aggregate formation were also different between the two cell lines. The aggregates from cell line A were predominantly formed by covalent interaction, whereas those from cell line B were predominantly formed by hydrophobic interactions.

At the third step in this study, I investigated the influence of cell's metabolic states on mAb productivity/quality using metabolomic analyses. It was previously observed that the difference between cell line A and B in the productivity (titer) was attributed mainly to differences in the number of total cells (cell line A > cell line B). With respect to the qualities of mAbs secreted from the two cell lines, it was observed that there was a cell-type difference in the proportions of defucosylated oligosaccharides (cell line A < cell line B), which are related to the antibody-dependent cell cytotoxicity activity of mAbs. In addition, in the second step, I observed different proportions of covalent aggregates (cell line A > cell line B) although the total aggregate content was higher for cell line B than for cell line A. I investigated whether these differences were associated with the cell's metabolic state. My results suggest that the high mAb titer of cell line A is not accounted for by the lactate metabolism shift, although lactate metabolism shift is useful for selection of cell lines with high productivity. The differences in cell proliferation between high and low antibody-producing cell lines can be accounted for by the levels of tricarboxylic acid cycle intermediates. The difference in proportions of fucosylated oligosaccharides may be explained by the distinct levels and localization of fucosyltransferase rather

than differences in the intracellular pool of GDP-fucose. Oxidative stress is likely involved in the difference in proportions of covalent aggregates, and the difference in oxidative stress between cell lines may be associated with mitochondrial oxidative activity.

In this study, various differences between monoclonal antibody-expressing cell lines with high productivity/high quality and with low productivity/low quality were revealed by approaches from fermentation engineering, biophysical chemistry, and metabolomic analyses. The present findings will be useful not only for the selection/creation of cell lines with high productivity/high quality but also for improving manufacturing processes of mAbs.

用語集

本論文で用いた代表的な用語の定義を下記に記載した。

- ・ 宿主細胞 (host cells) :

細胞株を調製する際のもとなる細胞。

(医薬審第873号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析」より一部引用)

- ・ 細胞株 (cell line) :

選択あるいはクローニングによって, 特異的な性質を持つようになった細胞。

(生化学事典 第4版 (東京化学同人) より一部引用)

- ・ 比増殖速度 (μ) :

単位細胞量あたりの増殖速度 (1/day)。

(絵とき 生物化学工学 基礎のきそ (日刊工業新聞社) より一部引用)

- ・ 比生産速度 (Q_p) :

単位細胞あたりの生成物生成速度 (pg/cell/day)。

(絵とき 生物化学工学 基礎のきそ (日刊工業新聞社) より一部引用)

- ・ 凝集体 :

目的物質の分子が会合し, より大きな集合体を形成したもの。目的物質の二量体や多量体を含む。凝集物とも呼ばれる。

- ・ HMWS (high molecular weight species) :

ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて, 目的物質の単量体より分子量の大きな高分子量種の総称。

- ・ LMWS (low molecular weight species) :

ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて, 目的物質の単量体より分子量の小さな低分子量種 (ただし, 媒体に由来する成分は除かれる) の総称。

- ・ チャージバリエーション :

翻訳後修飾などにより、本来の分子とは異なった電荷を有する分子種.

- ・ 小胞体品質管理 (endoplasmic reticulum quality control) :

正しくフォールディングしたタンパク質を形成できない場合に、ミスフォールディングタンパク質の蓄積を回避する機構.

(キーワード: 蛋白質の一生 (共立出版) より一部引用)

- ・ 小胞体ストレス応答 (endoplasmic reticulum stress response; unfolded protein response, UPR) :

小胞体ストレス (小胞体にミスフォールディングタンパク質が蓄積した状態) に対する細胞の備え.

(キーワード: 蛋白質の一生 (共立出版) より一部引用)

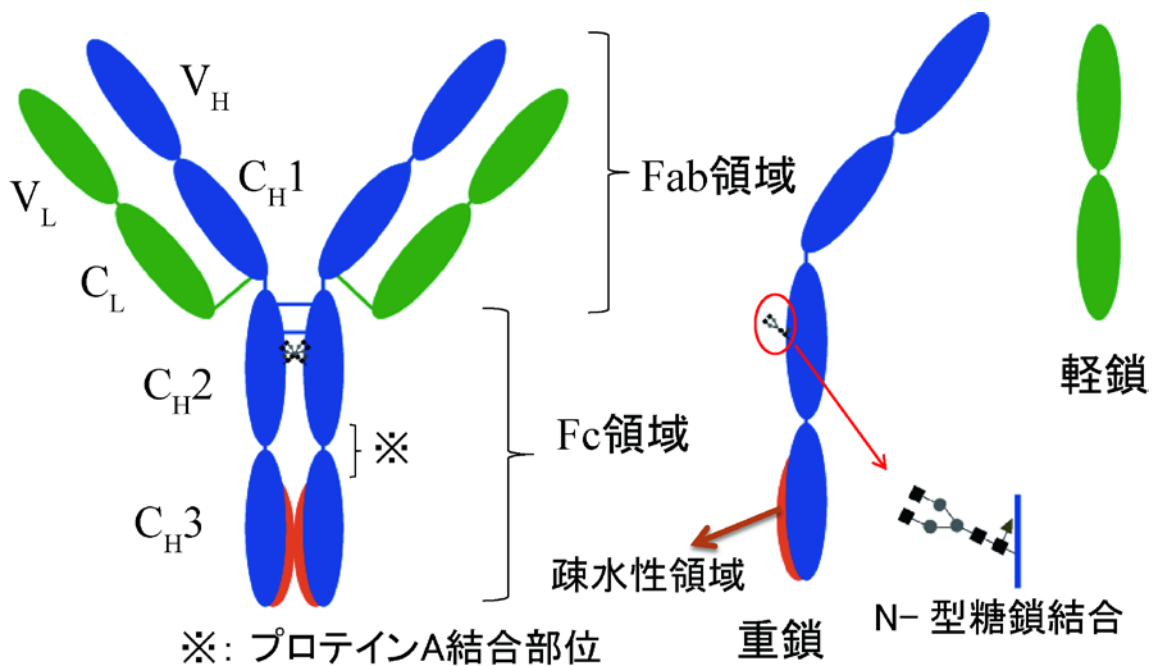
- ・ 抗体の基本構造の名称とその略称: (下図参照)

F_c 領域 (F_c (crystallizable fragment) region)

F_{ab} 領域 (F_{ab} (antigen binding fragment) region)

重鎖 (heavy chain, HC)

軽鎖 (light chain, LC)



- ・ スピアマンの順位相関係数 (γ_s) :

2変量よりなるデータを順位に直して求めた相関係数. 相関分析で最も用いられているピアソンの相関係数 (γ) を用いることができないデータ (正規分布していないデータ, 外れ値が存在するデータ) の解析にも用いることができる.

(バイオサイエンスの統計学 (南江堂) および超初心者向け SPSS 統計解析マニュアル (北大路書房) より一部引用)

目次

1. 緒論.....	1
2. 統計手法を用いた生産性（抗体濃度）および品質（凝集体含量）に影響を与える因子の検討....	4
2.1. 方法.....	4
2.2. 結果および考察.....	9
2.3. 小括.....	38
3. 対照的な生産性と凝集体含量を示す2つの細胞株の特性，および生産された抗体物性の比較...	39
3.1. 方法.....	39
3.2. 結果および考察.....	46
3.3. 小括.....	67
4. 生産性および品質に影響を与える細胞代謝状態の検討.....	70
4.1. 方法.....	70
4.2. 結果および考察.....	73
4.3. 小括.....	84
5. 結論.....	86
6. 論文および学会発表.....	89
7. 謝辞.....	91
8. 引用論文.....	92

1. 緒論

従来の技術で産生されたマウスモノクローナル抗体はヒトへの投与時に抗原性を生じるため、医薬品としてはほとんど用いられてこなかった。しかし、マウス抗体をキメラ抗体化する技術・ヒト化抗体化する技術、完全ヒト化抗体を作成・産生する技術が開発され、抗体投与時の抗原性の危険性を大きく低減させることが可能となると(1,2)、モノクローナル抗体はその優れた物性（高い抗原特異性・長い血中半減期・想定外の副作用の低い発生率）から医薬品として広く用いられるようになった。また多くのモノクローナル抗体を用いた治験が進められていることから、更なる市場の拡大が見込まれている(3,4)。

一般に、抗体医薬品は高い用量が必要なこと、抗体は糖タンパク質であることから大腸菌とは異なり培養コストの高い動物細胞で発現する必要があることから、生産性の高い製造プロセスが患者の治療費負担軽減のために必要である。これまでに、高い生産性（抗体濃度）を確保するために、宿主細胞の選択・発現ベクターの改善・遺伝子コドンの最適化・大規模生産に適した細胞の選択・培養培地の至適化などの改善が報告されている(5-8)。既に上市されている抗体医薬品の宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）・マウス骨髄腫（Sp2/0, NS0細胞）などの動物細胞が主に用いられているが、臨床での安全性と高い生産性（1-5 g/L）から、抗体医薬品の生産にはCHO細胞が最も用いられている(8-10)。

CHO細胞から生産されたモノクローナル抗体は、凝集(11, 12)および酸化(13)・断片化(14, 15)・脱アミド化(16, 17)・エピマー化(18, 19)・糖化(20, 21)・グリコシル化(22-24)などの様々な翻訳後修飾(25, 26)を受けることが知られている。凝集や上記のような修飾は、生物活性の変化や副作用を引き起こす潜在的な可能性があることから、医薬品の製造では品質の恒常性を保つことが求められている。なかでも凝集体は、ヒト血清由来の静脈注射用免疫グロブリン製剤で副作用との関連が報告されていること(27)、正常な抗体分子に比べて免疫原性が高いことが懸念されることから重要視されており、最終製品での含有量の維持・管理が求められている(11, 28-31)。また、最近制定されたガイダンス（Guidance for Industry）「治療用タンパク質生産のための免疫原性の評価」のなかで、「可能な限りタンパク質の凝集体を少なくすることが、治療用タンパク質製品の製造にとって重要である」

ことをアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) が明記したこと(32)から、凝集体の管理の重要性は更に高まると考えられる。

抗体医薬品の開発段階における最終的な到達目標は、高い品質と高生産の両立である。モノクローナル抗体の生産性と品質は、生産に用いる細胞株の性質に大きく依存することから、大規模生産に適した細胞株の選抜工程は、抗体医薬品開発における非常に重要な工程の一つとなっている。実際の細胞選抜工程では、多くの人手と時間が必要であり(33)、選抜時には生産性および品質に影響を与える様々な因子の評価が行われている。培養時に抗体の産生に影響を与える因子としては細胞増殖速度・生細胞密度 (viable cell density, VCD)・比生産速度 (Q_p) が広く知られており、大規模生産に適した細胞株は高いVCDと Q_p を有する細胞であることが報告されている(8)。また品質面では、凝集体含量と培養条件(11)・抗体の軽鎖 (LC) と重鎖 (HC) の mRNA の比(33)・培養温度(34)・培地への LC の分泌量(35)などの様々な因子が相関することが報告されている。しかし、これまでの報告における、因子と指標 (抗体濃度および凝集体) との関係 (相関) は培養期間の特定のサンプリングポイントで得られたデータを評価したものであり(33, 34)、培養期間の影響や同時に複数の因子が寄与する可能性については考慮されていない。生産性が高く、凝集体含量の少ない細胞株を得るためには、生産性や品質に影響を与える細胞内外の様々な因子 (例えば Q_p ・VCD・LC レベル・HC のレベル・タンパク質のフォールディングおよびアッセンブリーに關係するタンパク質) の影響を系統的に評価し、因子の関与やその影響を明らかにすることが必要であると考えられるが、そのような検討はこれまでのところ報告されていない。

タンパク質の凝集体は不均一であり、サイズ、可溶・不溶、共有結合・非共有結合、天然状態・変性、形成の機序など様々な特性に基づいて分類がなされている(11, 36–39)が、凝集体の形成機構については十分には解明されていない。従来から、医薬品においてその管理が求められてきた可溶性の凝集体に加えて、タンパク質に起因する微粒子 (visible particulates や subvisible particulates) の管理が新たな課題となっている(28, 31, 40)。その様な微粒子の形成段階では、可溶性の凝集体の形成が関与することから、凝集体形成機構への関心が高まっている。

また近年、細胞の状態を評価するための手法として代謝物の解析（メタボローム解析）が注目を集めている。オフタルミン酸が酸化ストレスのバイオマーカーであること(41)、フェドバッチ培養において認められる乳酸代謝シフト（乳酸の生産から乳酸消費へ切り替わる現象）が解糖系の抑制の結果であること(42)、指数増殖期における補充反応（anaplerotic replenishment）や乳酸生成時には、グルコースに比べてグルタミンが多く利用されていること(43)などが報告され、メタボローム解析の有用性が明らかとなっている。乳酸はグルコースの重要な代謝物であるが、過剰に生産されると細胞の増殖および遺伝子組換えタンパク質の生産を抑制する。しかし乳酸代謝シフトが、CHO 細胞においてタンパク質の生産性と正の相関を有すること(42)、細胞株の性質だけでなく、培地組成の影響を受けること(44)、細胞増殖と関係していること(44)が報告されるなど、乳酸の代謝状態と生産性の関係に注目が集まっている。また、生産性に影響を与える細胞代謝状態の影響検討は行われているが、現在までのところ生産性と品質の両面からの検討はほとんど行われていない。

本研究では、まず第一に、細胞株間で生産性および品質に違いがあることから、生産性（抗体濃度）および品質（凝集体含量）に影響を与える因子を系統的に明らかにすべく、トラスツズマブ（商品名ハークロン、ハーセプチン）を産生する 28 種の安定発現株を調製し、統計解析手法を用いて評価を行った。次に 28 種の細胞株の中から、抗体濃度および凝集体含量で対照的な 2 つの株を選抜し、同一の培養条件で得られた細胞、抗体、そして凝集体の特性解析を行い、その違いを検討した。そして最後に、細胞株間の生産性および品質に、細胞の代謝状態が影響を与えていないかを検討を行った。

2. 統計手法を用いた生産性（抗体濃度）および品質（凝集体含量）に影響を与える因子の検討

抗体医薬品の細胞培養工程における最終的な到達目標は、高い生産性で高品質の抗体を製造することである。モノクローナル抗体の生産性と品質は、生産に用いる細胞株の性質に大きく依存することから、大規模生産に適した細胞株の選抜工程は、抗体医薬品開発における非常に重要な工程の一つとなっている。細胞株間での抗体濃度および凝集体に影響を与える因子を系統的に明らかにし、高い生産性と高い品質を有する細胞株の特徴を明らかにするために、トラスツズマブ（商品名 ハークローン・ハーセプチン）を産生する 28 種の安定発現株を調製し、生産性と品質に関係する可能性のある種々の因子（抗体濃度・HMWS・Q_p・ μ ・LMWS・HC の mRNA レベル・LC の mRNA レベル・PDI の mRNA レベル・BiP の mRNA レベル・細胞内 HC タンパク質レベル・LC のタンパク質レベル）の測定を培養 5, 7, 10, 12, 14 日目に行った。測定を行った因子間の関連性は相関分析を用いて解析した。また、培養終了時の生産性（抗体濃度）と品質（HMWS(%)）を指標とし、測定された因子との間に存在する因果関係を明らかにするために、ステップワイズ多重回帰分析による解析をおこなった。

2.1. 方法

・細胞培養

CHO 細胞を用いて、トラスツズマブを産生する 28 種の単一クローン細胞株を作成した。クローンは限界希釈法を用いて分離を行った。細胞は 125 mL のエレンマイヤーフラスコに 0.3×10^6 cells/mL の細胞密度で 30 mL の容量となるように播種した。基礎培地とフィード培地は無血清の社内調整品を用いた。培養は 5% 炭酸ガス 95% 空気の雰囲気下で 37 °C, 100 rpm の振盪下で行った。培養 3 日後から、フラスコに残存している溶液量の 3% に相当する容量のフィードを開始した。分析のためのサンプリングは培養 5, 7, 10, 12, 14 日目に行った。

・抗体濃度（抗体濃度）の測定

培養液中の抗体の抗体濃度は、プロテイン A カラム（4.6×50 mm, Applied Biosystems）を用いて室温下で測定した。移動相 A には 300 mM の塩化ナトリウムを含むリン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 を、移動相 B には 300 mM の塩化ナトリウムを含むリン酸ナトリウム緩衝液 pH 2.8

を用いた。サンプル注入後、プロテイン A カラムは 100%の移動相 A で 0.3 分間保持した後、100%の移動相 B で溶出した。抗体の検出は紫外 (UV) 検出器で 214 nm で行い、抗体濃度は標準品を用いて計算した検量線から算定した。

・増殖および生産速度の計算

μ は次の式を用いて計算した。

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_{t_2}}{x_{t_1}}\right)}{t_2 - t_1} \quad \text{式 (1)}$$

x_{t_i} : 培養日 t_i における生細胞密度

Q_p は次の式を用いて計算した。

$$Q_p = \rho = \frac{(P_{t_2} - P_{t_1})}{\int_{t_1}^{t_2} x dt} \quad \text{式 (2)}$$

P_{t_i} : 培養日 t_i における生成物の濃度

x : 培養日 t_i における生細胞密度

積分の近似値の算定には台形則を用い、時間 t_1 から t_2 までの増殖曲線下面積は次の式を用いて算定した。

$$\int_{t_1}^{t_2} x dt \approx S = \sum \frac{(t_2 - t_1)(X_{t_2} - X_{t_1})}{2} \quad \text{式 (3)}$$

培養日数 0 から 7 日までの抗体濃度を積分生存細胞密度 (integral viable cell density, IVCD) に対してプロットし、最小自乗法の傾きを Q_p として用いた。また、培養後期における細胞死の影響を考慮するために、各サンプリングポイントでの Q_p も別途計算を行った。

• **HC, LC およびシャペロンの mRNA 分析**

1 × 10⁶ の細胞を含む培地を 1500 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去後、細胞ペレットをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で再懸濁した。その溶液をふたたび遠心し、上清を除いた後、沈殿した細胞を使用するまで -20 °C で保存した。RNA の抽出は EZY RNA Cell mini-kit (QIAGEN) を用いてメーカーのプロトコールに従っておこなった。得られた溶液中の RNA 含量は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて算定した。使用したプライマー (Table 1) および TaqMan プローブ (Table 2) の設計には Primer-Express software (Applied Biosystems) を用いた。TaqMan プローブは 5' 末端を 6-carboxy fluorescein で 3' を 6-carboxytetramethyl rhodamine でラベル化したものを用いた。測定には TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems) と TM Ribosomal RNA Control Reagent (Applied Biosystems) をメーカーのプロトコールに従って用いた。それぞれの mRNA の発現レベルはハウスキーピング遺伝子 18S rRNA によりノーマライズした。RT-PCR のサンプルは HT7900 system (Applied Biosystems) で分析をおこない、RT-PCR の反応は、48 °C で 30 分逆転写し、95 °C で 10 分変性化後、95 °C 0.25 分 60 °C 1 分の増幅を 40 サイクル行った。標的遺伝子の転写産物発現の相対的な fold change は 2^{-ΔCt} で表示した。用いた ΔCt は Ct (標的遺伝子) から Ct (ハウスキーピング遺伝子, 18S rRNA) を引いた値を用いた。

なお、細胞株 8 番および細胞株 16 番の培養 14 日目の細胞を用いた予備実験において、PDI の mRNA と BiP の mRNA に加えて、小胞体ストレス管理に関係する種々のタンパク質 (activating transcription factor 4 (ATF4) ・ C/EBP-homologous protein (CHOP) ・ X-box binding protein 1 (XBP1) ・ endoplasmic reticulum-degradation enhancing α-mannosidase-like protein 1 (EDEM1)) の mRNA をプライマー (Table 1 および Table 3) および TaqMan プローブ (Table 2 および Table 4) を用いて測定を行い、測定対象とする mRNA の絞り込みを行った。

Table 1. RT-PCR 分析のためのプライマー

	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Trastuzumab LC	TCACTTGTCGGGCGAGTCA	TGCCTGGTTTCTGCTGATACC
Trastuzumab HC	GGACAAGAAAGTTGAGCCCAA	GGTCCCCCAGGAGGAGTTCA
BiP	ACTACAGCCTGTTGCTGGACTTC	GCCACCATAGGGAACCTTCATCT
PDI	TGATGGCAACCTGAAGAGATACC	TTTCTGCTACCACAACCTTGACA

Table 2. RT-PCR 分析のための TaqMan プローブ

	Probe
Trastuzumab LC	5'-ACGTGAACACCGCCGTGGCC-3'
Trastuzumab HC	5'-TGACAAAACCTCACACATGCCCACCG-3'
BiP	5'-AGACTGCAGACGGACCGACCGC-3'
PDI	5'-CAAGTCTGAACCTATCCCAGAGACCAACGA-3'

Table 3. 予備検討で用いた RT-PCR 分析用のプライマー

	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
ATF4	TTAAGCACATTCCTCGATTCCA	AGCCAACACTTCGCTGTTC
CHOP	GGGCGACTCAGAAACAAACG	TGAGGTCCTGGCATTTCAT
XBP1	CCTGAGCCCGGAGGAGAA	CGCTCATCCGGGCTTTC
EDEM1	CGAGCTCAACCCCATCTACTG	TCAACAAGAGTCAGGGAGTAATTC

Table 4. 予備検討で用いた RT-PCR 分析用プライマー

	Probe
ATF4	5'-AGCCCTACAACATGACCGAGATGAGCTTC-3'
CHOP	5'-CAAAGGTGCTCCCCCGAGACAAGC-3'
XBP1	5'-AAAAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGCCC-3'
EDEM1	5'-CCGGACCGCGGAGACCCTTC-3'

•高感度ゲル濾過クロマトグラフィー (High sensitivity size-exclusion chromatography: HS-SEC)

培養後の培地中の凝集体, 低分子タンパク質成分, 抗体分子の割合を比較するために, HS-SEC を行った. 培地は 0.22 μ m のフィルター濾過し, 使用するまで -20 °C 以下で保存した. ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS, Thermo fisher scientific) で希釈したサンプルを用いて HMWS, LMWS, 主要部分 (抗体分子に相当する物質) の割合を算定した. HS-SEC はガードカラムを装着した TSK-gel G3000SWsuper カラム (4.6 mm i.d. \times 30 cm, 東ソー) を用いた. 移動相は 500 mM 塩化ナトリウムおよび 5% エタノールを含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0 を用い, 流速 0.175 ml/min, カラム温度 25 °C, 注入タンパク質量 5 μ g, 検出波長 215 nm で分析を行った. 相対分子量 (M_r) はゲルろ過クロマトグラフィー用スタンダード (Product No. 151-1901, Bio-Rad Laboratories) を用いて算定した.

分析法は、培養液中に分泌される目的抗体以外のタンパク質の影響を受ける可能性があることから、HMWSに関しては、トラスツズマブとは異なるIgG1を用いた検討で培養後の培地のプロテインA精製前後でHS-SECを用いて比較を行うことで、本測定方法の妥当性の検証を行った。LMWSに関しては、27.5%のLMWSを含む培養後の培地を用いて検討を行った。培地をDPBSで希釈し、抗ヒトカッパー軽鎖抗体（Abcam, Product No. ab19977）に対するトラスツズマブの質量比を0:50から5552:50に変化させて添加し、2-8℃で一晩放置後、15000×gで遠心分離した溶液の上清をHS-SECを用いて分析することで、抗ヒトカッパー軽鎖抗体添加濃度を決定した。次に、種々のLMWSを含む14日間培養を用いて検討を行った。決定した添加量（抗ヒトカッパー軽鎖抗体：トラスツズマブ抗体=70:1）で、培養液のDPBS希釈液にヒトカッパー軽鎖抗体を添加し、一晩放置した。これらの溶液を15000×gで遠心分離した、その溶液上清を分析用サンプル（サンプル1）とした。同時に、ヒトカッパー軽鎖抗体未添加のサンプル（サンプル2）とヒトカッパー軽鎖抗体のみを添加したサンプル（サンプル3）を同時に調製し分析を行った。得られたサンプル間の比較およびクロマトグラム間の差（サンプル1-サンプル3）を算定することにより、本分析系のLMWS評価の妥当性の検証を行った。

なお、培養液中の抗体の精製は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いて次の様な操作により行った。抗体を選択的に吸着させるために、培地を洗浄液（10mMリン酸ナトリウム,pH6.0）で平衡化したProtein A（MabSelect SuRe）column（1×5cm; GE Healthcare Life Sciences）に添加し、カラム容量の5倍の洗浄液で洗浄後、10mMクエン酸ナトリウム（pH3.4）を含む緩衝液で吸着した抗体を溶出し、溶出液を1.5MトリスでpH5.5に調整した。調製したものをプロテインA精製サンプルとして検討に用いた。

• ウェスタンブロッティング（Western blotting）

細胞内のHCおよびLC含量を測定するために、ウェスタンブロッティングを行った。1×10⁶個の細胞を含む培地を1500rpmで1分間遠心し、上清を除去後、細胞ペレットをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で再懸濁した。その溶液を再び遠心し、上清を除いた後、沈殿した細胞を使用するまで-80℃で保存した。調製したペレット中のタンパク質は、メーカーのマニュアルに従ってQproteome Mammalian Protein kit（Qiagen）を用いて可溶化した。1011μLの可溶化溶液は1000μLのLysis buffer, 1μLの1U/mL Benzonase Nucleaseを含むLysis buffer, 10μL protease

inhibitor から調製した。得られた溶解物は半定量用のウエスタンブロッティングサンプルとして使用した。13 μ L のサンプルに 20 μ L NuPAGE LDS Sample buffer ($\times 4$, Invitrogen), 8 μ L Reducing Agent ($\times 10$, Invitrogen), 39 μ L 精製水を加え, 65 $^{\circ}$ C で 10 min 間処理した。これらのサンプルを NuPAGE 4%–12% Bis–Tris Gel (1.0 mm \times 17 well, Invitrogen) に負荷し, NuPAGE Antioxidant の存在下, MOPOS SDS Running Buffer (Invitrogen) を用いて, 200 V 45 分で分離した。分離したタンパク質はマニュアルに従って iBlot Transfer Stacks Regular (Invitrogen) を用いて, ニトロセルロース膜に転写した。トラスツズマブの LC および HC は iBlot Transfer Stacks, Regular (Invitrogen) を用いて抗ヒトカッパー軽鎖ウサギ抗体 (SIGMA-ALDRICH, Product No.K1255) と抗ヒトガンマー鎖特異的ウサギ抗体 (Sigma-Aldrich, Product No.I9764) によりそれぞれ検出した。化学発光は LAS-1000 plus Luminoimage Analyzer (富士フィルム) で測定し, 簡易定量の解析は MultiGauge, Ver. 2.2 (富士フィルム) を用いて行った。

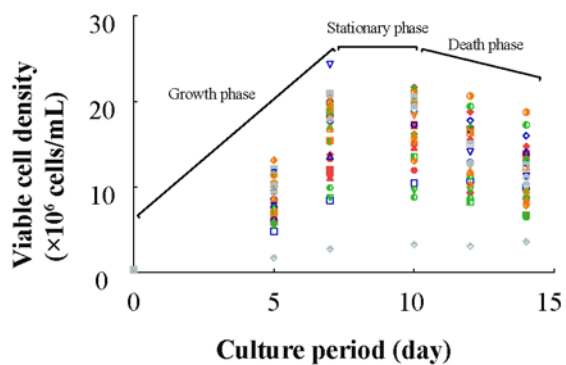
・統計解析

スピアマン (Spearman) の順位相関分析およびステップワイズ多重回帰分析は SPSS (IBM Corporation) を用いて解析を行った。 $P < 0.05$ の場合を有意と判断した。

2.2. 結果および考察

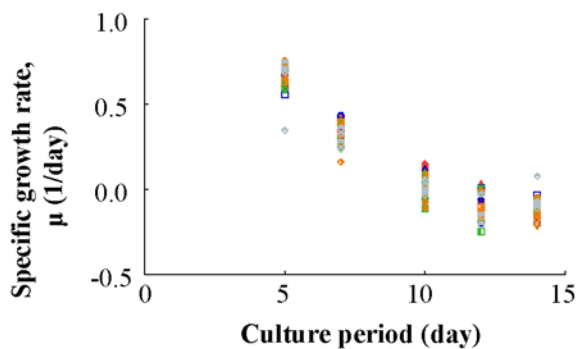
2.2.1. 細胞株の培養時の特性

トラスツズマブを産生する 28 種の細胞株は, 同一の CHO 細胞から作成されたものであるが, 分析された特性 (VCD \cdot μ \cdot 抗体濃度 \cdot Q_p) は細胞株内で幅広い多様性を示した (Figs. 1–4)。細胞の増殖プロファイルは, (a) 増殖期, (b) 定常期, (c) 死滅期で構成されており (Fig. 1), μ の培養に伴う変化はこれを裏付けるものであった。死滅期の培養 14 日目で培養を終了したところ, 得られた最終的な抗体濃度は 1.67–5.30 g/L と幅広いものであった (Fig. 3)。また低い抗体濃度を示した細胞を除いて, 死滅期には抗体濃度の増加が抑制された。 Q_p は培養期間の増加に伴い個体間の変動幅が大きくなるが, 培養 14 日目にはいずれの細胞においても急激な低下が認められた (Fig. 4)。統計解析時の信頼性を高めるために, 増殖, 生産性の低い細胞株も含めて 28 種におよぶ細胞株の特性解析を行った。



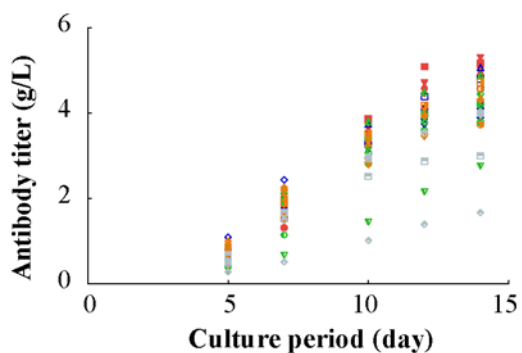
- Cell line 1 ● Cell line 6 ● Cell line 11 ▼ Cell line 16 ▲ Cell line 21 □ Cell line 26
- Cell line 2 ● Cell line 7 ● Cell line 12 ▼ Cell line 17 ▼ Cell line 22 □ Cell line 27
- ▲ Cell line 3 □ Cell line 8 ● Cell line 13 ● Cell line 18 ● Cell line 23 ● Cell line 28
- ▼ Cell line 4 ▲ Cell line 9 ● Cell line 14 ● Cell line 19 ● Cell line 24
- Cell line 5 ▼ Cell line 10 ▲ Cell line 15 ● Cell line 20 ● Cell line 25

Fig. 1. 生細胞密度



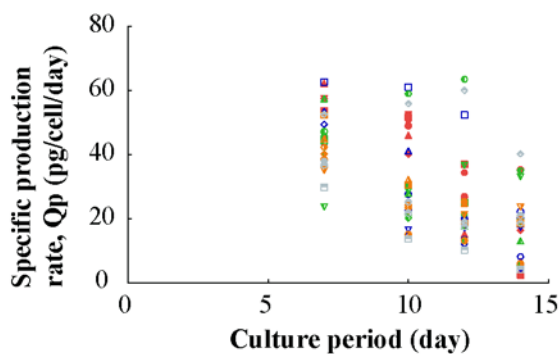
- Cell line 1 ● Cell line 6 ● Cell line 11 ▼ Cell line 16 ▲ Cell line 21 □ Cell line 26
- Cell line 2 ● Cell line 7 ● Cell line 12 ▼ Cell line 17 ▼ Cell line 22 □ Cell line 27
- ▲ Cell line 3 □ Cell line 8 ● Cell line 13 ● Cell line 18 ● Cell line 23 ● Cell line 28
- ▼ Cell line 4 ▲ Cell line 9 ● Cell line 14 ● Cell line 19 ● Cell line 24
- Cell line 5 ▼ Cell line 10 ▲ Cell line 15 ● Cell line 20 ● Cell line 25

Fig. 2. 比増殖速度



- Cell line 1 ● Cell line 6 ● Cell line 11 ▼ Cell line 16 ▲ Cell line 21 □ Cell line 26
- Cell line 2 ● Cell line 7 ● Cell line 12 ▼ Cell line 17 ▼ Cell line 22 □ Cell line 27
- ▲ Cell line 3 □ Cell line 8 ● Cell line 13 ● Cell line 18 ● Cell line 23 ● Cell line 28
- ▼ Cell line 4 ▲ Cell line 9 ● Cell line 14 ● Cell line 19 ● Cell line 24
- Cell line 5 ▼ Cell line 10 ▲ Cell line 15 ● Cell line 20 ● Cell line 25

Fig. 3. 抗体濃度



- Cell line 1 ● Cell line 6 ● Cell line 11 ▼ Cell line 16 ▲ Cell line 21 □ Cell line 26
- Cell line 2 ● Cell line 7 ● Cell line 12 ▼ Cell line 17 ▼ Cell line 22 □ Cell line 27
- ▲ Cell line 3 □ Cell line 8 ● Cell line 13 ● Cell line 18 ● Cell line 23 ● Cell line 28
- ▼ Cell line 4 ▲ Cell line 9 ● Cell line 14 ● Cell line 19 ● Cell line 24
- Cell line 5 ▼ Cell line 10 ▲ Cell line 15 ● Cell line 20 ● Cell line 25

Fig. 4. 比生産速度

2.2.2. HMWS(%)およびLMWS(%)と抗体濃度との関係

高い抗体濃度と低い凝集体含量を示す細胞を特徴づけるために、HS-SECを用いてHMWS(%)とLMWS(%)の分析を行った。培養5, 7, 10, 12目の細胞培養上清を分析した際の、典型的なHS-SECのクロマトグラムをFig. 5Aに示した。予備検討から、24分より遅れて溶検出されるピークは培地成分であることが明らかとなっているため (Fig. 5B), ピーク面積の割合の計算からは除外した。

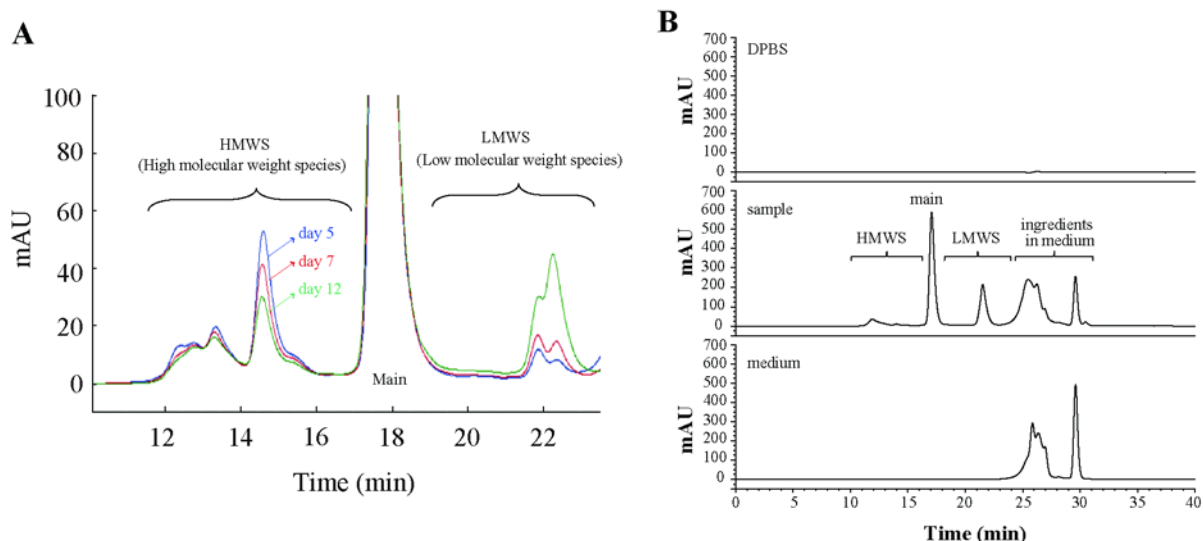


Fig. 5. (A) 培養上清の代表的なHS-SECの典型的なクロマトグラム
 培養5日目 (青のライン), 培養7日目 (赤のライン), 培養12日目 (緑のライン)
 (B) DPBS, サンプルおよび培地のHS-SECの典型的なクロマトグラム
 DPBS:ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水

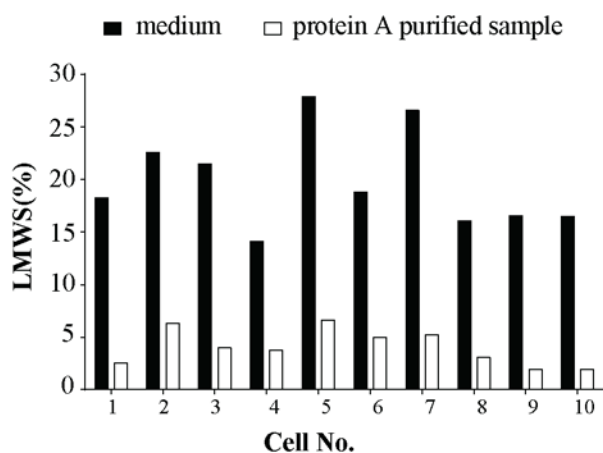


Fig. 6. 培地中及びプロテインA精製サンプル中のLMWS(%)

本検討に先だって行ったトラスツズマブとは異なるIgG1を用いた予備実験で、培養後の培地およびそれをプロテインA精製した後のサンプルをHS-SECを用いて分析を行ったところ、精製後のLMWS(%)は非常に低かった (Fig. 6). これに対し、HMWS(%)では精製前後のHMWS(%)の値の間で有意な正の相関 (スピアマンの順位相関係数 $\gamma_s = 0.965, P < 0.001$) が認められ (Fig. 7), プロテインAと結合可能なIgG1のFc領域を有する凝集体がか

りの割合で (46.2% ± 9.3%) 含まれていることが明らかとなった。

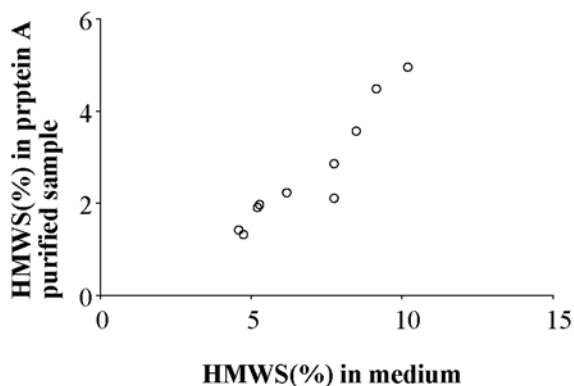


Fig. 7. 培地中HMWS(%)とプロテインA精製サンプル中のHMWS(%)との相関

27.5%のLMWSを含むサンプルにおいて、抗ヒトカッパー軽鎖抗体の添加量に依存しての主要なLMWSピーク (Fig. 8Aにおいて矢印で示したピーク) の減少が認められ、抗ヒトカッパー軽鎖抗体で主要なLMWSピークをかなり減少させることができた (Fig. 8A)。しかし抗ヒトカッパー軽鎖抗体に対するトラスツズマブの質量比が1388:50 (200 μ Lのサンプル中に50 μ gのトラスツズマブおよび抗ヒトカッパー軽鎖抗体を1388 μ g含有)より高くなると、クロマトグラムにおいて再びLMWSの溶出部位でピークの増加が認められた (Fig. 8A)。この原因を明らかにするために、トラスツズマブを含まないサンプルに抗ヒトカッパー軽鎖抗体を加えたものを同時に分析したところ、抗ヒトカッパー軽鎖抗体の添加量増加に伴い、LMWSが検出される保持時間においてカッパー軽鎖抗体由来のピークの検出が認められた (Fig. 8B)。このため、LMWSの溶出部位で抗ヒトカッパー軽鎖抗体に対するトラスツズマブの質量比が1388:50を越えるとピークの増加に転じる原因は、抗ヒトカッパー軽鎖抗体中の不純物のためであることが明らかとなった。そこで、次の様々な濃度のLMWS (4.6–37.8%) を含むサンプル (培養液) を用いた添加実験では、それぞれのサンプルのHS-SECのクロマトグラムから、トラスツズマブを含まないサンプルに抗ヒトカッパー軽鎖抗体を加えたもののクロマトグラムの減算を行うこととした。また、培養液中のLMWSの含有量は最大でもおよそ40%程度であることから、サンプルへの抗ヒトカッパー軽鎖抗体の添加量を抗ヒトカッパー軽鎖抗体:トラスツズマブ抗体=70:1とした。この検討によって、細胞株が異なっても、LMWSはそのほとんどがLCを有する抗体由来の物質であることが明らかとなった (Fig. 9)。15種のサンプルから計算された主要なLMWSピークの相対分子量 (M_r) は27.8–31.3 $\times 10^3$ であった。しかし、LMWS(%)

が低い値を示すサンプルにおいて主要な LMWS ピークで肩が認められること (Fig. 5 の a, b, d, h, l, j, k, m, o および Fig. 9), LMWS 1 の開始点 (20.3 分) と終点 (22.7 分) から M_r を計算すると, M_r の範囲は 19.7×10^3 から 47.7×10^3 であったことから, 主要な LMWS ピークは主に LC モノマー (理論分子量 23.4×10^3) および LC ダイマー (理論分子量 46.9×10^3) により構成されていると推定された. 次章で行った検討結果 (3.2.3 参照) も本推定の確からしさを裏付けるものであり, LMWS は主に LC および LC ダイマーで形成されていると考えられた. HS-SEC で算定される HMWS(%) や LMWS(%) の値は, 抗体以外の細胞分泌物や, LC モノマーおよび LC ダイマー以外の抗体分解物の影響を受けている可能性は完全には否定することは出来ないが, 培養液中の抗体の HMWS および LMWS の簡便な評価方法として有要であることが確認された.

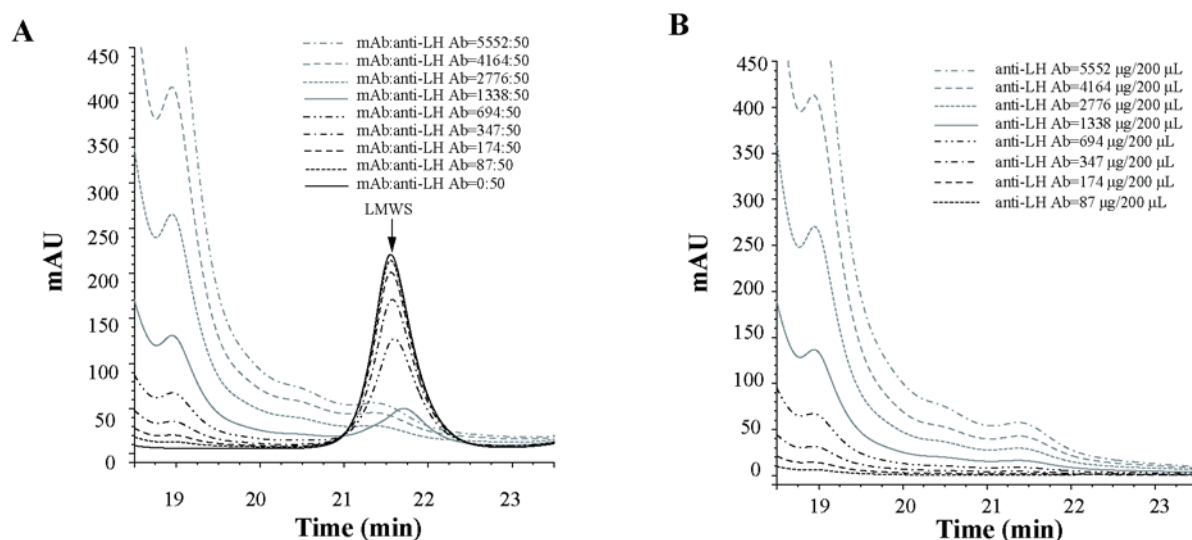


Fig. 8. 抗ヒトカッパー軽鎖抗体の添加量増加に伴う, HS-SEC のクロマトグラムの変化
 (A) ラスツズマブ含有サンプルにおけるヒトカッパー軽鎖抗体の添加量増加に伴うクロマトグラムの変化
 (B) トラスツズマブ未添加時のヒトカッパー軽鎖抗体の添加量増加に伴うクロマトグラムの変化
 anti-LH Ab, anti-Kappa light chain antibody

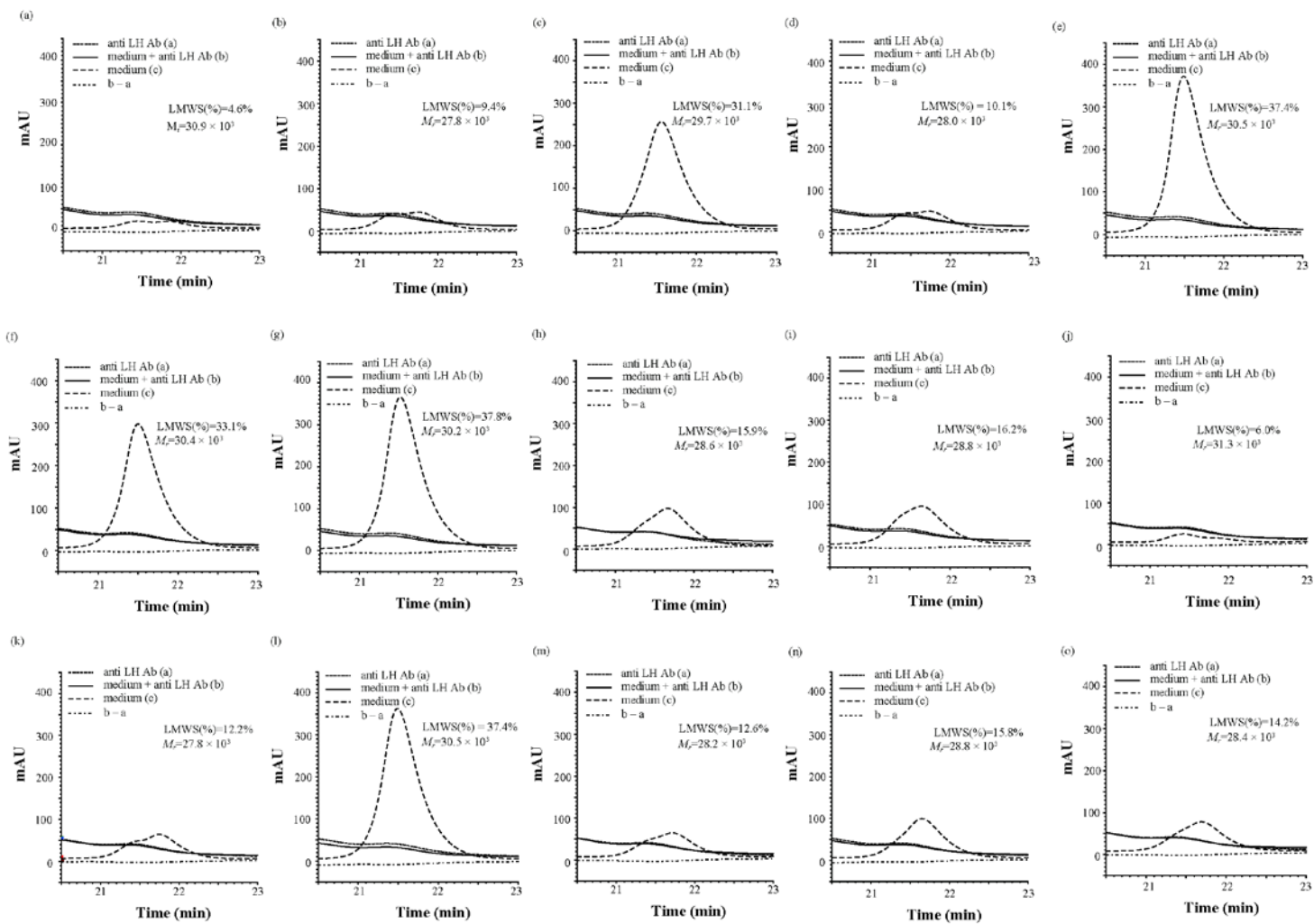
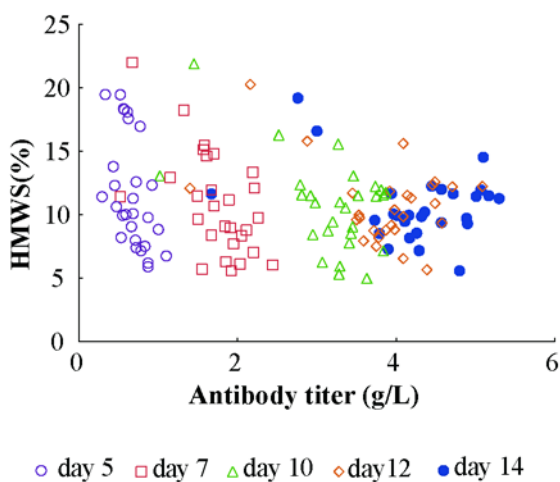


Fig.9. 抗ヒトカッパー軽鎖抗体添加による培地中のLMWSの含量変化

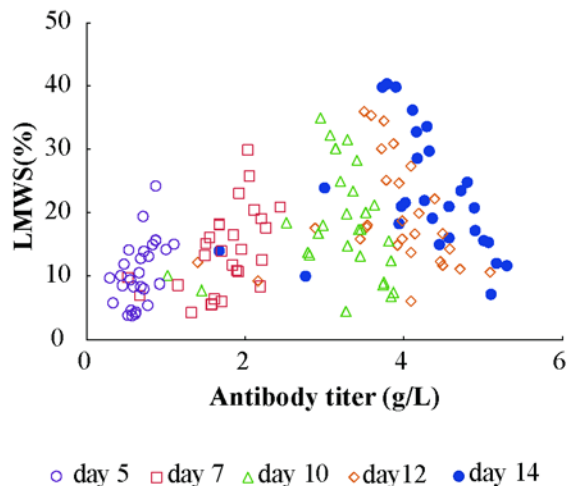
LC は、抗体のフォールディングとアッセンブリーにとって重要であり、多くの LC を分泌する細胞株ほど高い生産性を示すこと(35, 45–47)、凝集体の存在が治療用タンパク質での免疫原性応答に関与している可能性が報告されている(27, 48, 49). そこで、培養期間に伴って変化する培養液中の HMWS(%)と LMWS(%)を評価するために、HS-SEC による分析を行った。培養液中の抗体の抗体濃度と HMWS(%)との相関および抗体の抗体濃度と LMWS(%)との相関は、それぞれFig. 10およびFig. 11に示されている様に、培養期間とともに変化した。多くの細胞株で、LMWS(%)の値は培養期間の増加に伴って増加したが、HMWS(%)は一定の範囲内に留まった。培養5日目と7日目の抗体の抗体濃度と HMWS(%)の間には有意な負の相関が認められた(培養5日目 $\gamma_s = -0.590, P = 0.001$; 培養7日目 $\gamma_s = -0.498, P = 0.007$)。しかし、培養10, 12, 14日目の抗体濃度と HMWS(%)の間に有意な差は認められなかった (Table 5)。

培養5日目と7日目の抗体濃度と LMWS(%)の間には有意な正の相関が認められた(培養5日目 $\gamma_s = 0.520, P = 0.001$; 培養7日目 $\gamma_s = 0.561, P = 0.002$) が、培養10日目と12日目には抗体濃度と LMWS(%)の間で有意な差は認められなくなった (Fig. 11)。これに対して、培養14日目には抗体濃度と LMWS(%)の間では、有意な正の相関が認められた ($\gamma_s = -0.455, P = 0.015$)。



○ day 5 □ day 7 △ day 10 ◇ day 12 ● day 14

Fig. 10. 抗体濃度と HMWS(%)との相関



○ day 5 □ day 7 △ day 10 ◇ day 12 ● day 14

Fig. 11. 抗体濃度と LMWS(%)との相関

Table 5. 抗体濃度と HMWS(%), 抗体濃度と LMWS(%)におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Antibody titer	HMWS(%)	Day 5	-0.590	<0.001
		Day 7	-0.498	0.007
		Day 10	-0.228	0.244
		Day 12	0.054	0.784
		Day 14	0.061	0.759
Antibody titer	LMWS(%)	Day 5	0.561	0.005
		Day 7	0.561	0.002
		Day 10	-0.228	0.243
		Day 12	-0.319	0.098
		Day 14	-0.455	0.015

2.2.3. LMWS(%)と Q_p との相関

成熟した抗体は、2つの HC および2つの LC からなるヘテロテトラマーとして細胞外に分泌されるが、それ以外にも LC モノマーおよび LC ホモダイマーも細胞外に分泌されることが知られている。これに対して、HC のモノマーおよびダイマーは分泌されないとされている。これは、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) 内で生成した HC ポリペプチドは BiP と強固に結合するため、LC ポリペプチドが十分に存在しない時には、部分的に構造が保持されていない状態で ER に残存し、ER から分泌されることはないためである(6, 45, 47)。また LC ポリペプチドの場合にも、HC ポリペプチドと同様に BiP と相互作用するが、ER で HC と結合できなかった LC ポリペプチドは HC ポリペプチドとは異なり細胞外に分泌されることが明らかとなっている(6, 35, 45, 46)。このような機構を介して抗体産生は制御されていることから、これまでの報告で、多量の LC を分泌する細胞株は高い生産性を有すると考えられていた(6, 35, 45, 46)。しかし、Fig. 12 は、培養 14 日目の Q_p と LMWS(%) の間の関係を示したものであり、強い負の相関 ($\gamma_s = -0.567, P = 0.002$) が認められており、同様な結果が培養 10 日目以降で認められた (Table 6)。以上の結果から、高い Q_p には十分な LC ポリペプチドが必要であるが、あまりに過剰な LC 産生はむしろ Q_p には不利に働くと考えられた。

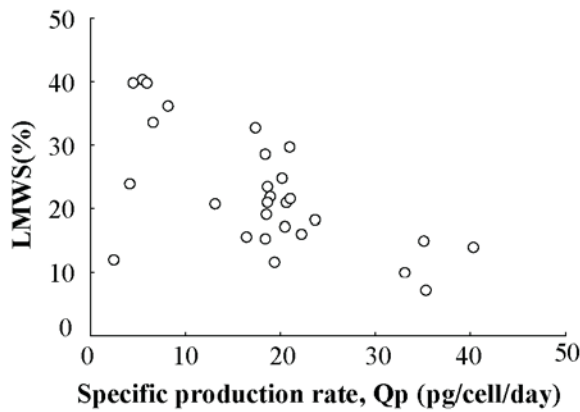


Fig. 12. 抗体濃度と LMWS(%)との相関

Table 6. 比生産速度と LMWS(%)におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Specific production rate (Q_p)	LMWS(%)	Day 7	-0.366	0.055
		Day 10	-0.681	<0.001
		Day 12	-0.625	<0.001
		Day 14	-0.567	0.002

2.2.4. HC および LC の mRNA

培養期間での 28 種の細胞株における HC および LC の mRNA の変化を, Fig.13 および Fig. 14 に示した. HC の mRNA レベルは株細胞間で大きな差は無かったのに対して, LC の mRNA では細胞株間で大きな差を認めた.

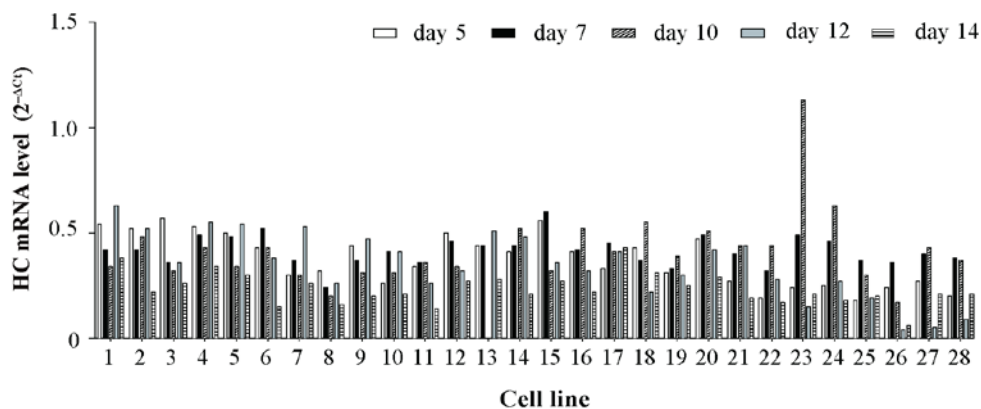


Fig.13. 細胞間及びサンプリングポイント間での HC の mRNA レベルの違い

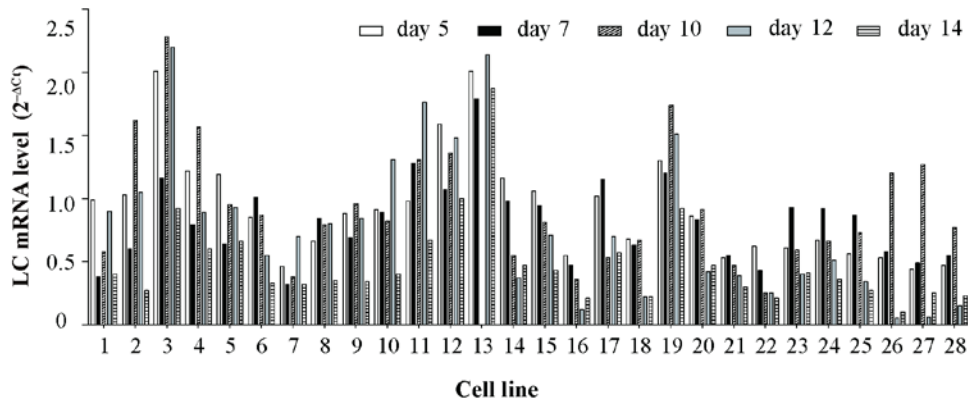


Fig. 14. 細胞間及びサンプリングポイント間での LC の mRNA レベル

LC の mRNA と HC の mRNA の比 (LC/HC mRNA) を算定し、抗体の不純物 (HMWS と LMWS) との関係を検討した。培養 14 日目の LC/HC mRNA と HMWS(%) の間に強い負の相関 ($\gamma_s = -0.622$, $P < 0.001$) を認め (Fig.15), 培養 10 日目を除き培養期間内で同様な傾向を認めた (Table 7)。LC と HC の mRNA のバランスがモノクローナル抗体の発現や分泌だけでなく、凝集体形成にも影響を与えると考えられた。凝集体 (HMWS) をあまり生成しない細胞株の方が、精製工程において有利であることから、高い生産性を有するが凝集体をあまり生成しない細胞株が大規模の生産には適していると考えられる。一方で、培養 14 日目の LMWS(%) は LC/HC mRNA との間で強い正の相関 ($\gamma_s = 0.718$, $P < 0.001$) を示し (Fig.16), 培養 10 日目を除く培養期間内で同様な傾向を認めた (Table 7)。

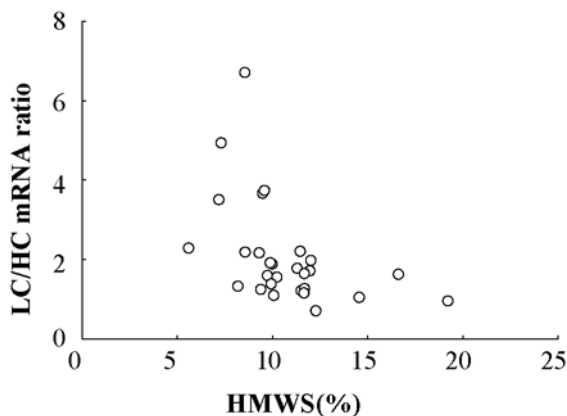


Fig. 15. 培養 14 日目における HMWS(%) と LC/HC mRNA 比の関係

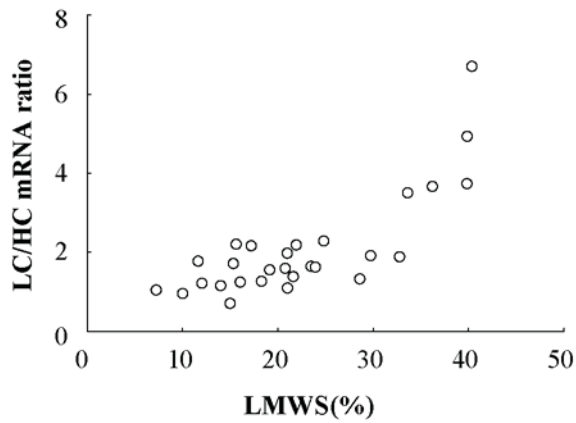


Fig. 16. 培養 14 日目における LMWS(%)と LC/HC mRNA 比の関係

Table 7. HMWS(%)と LC/HC mRNA ratio, LMWS(%)と LC/HC mRNA ratio におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
HMWS(%)	LC/HC mRNA ratio	Day 5	-0.671	< 0.001
		Day 7	-0.781	< 0.001
		Day 10	-0.354	0.064
		Day 12	-0.566	0.002
		Day 14	-0.622	< 0.001
LMWS(%)	LC/HC mRNA ratio	Day 5	0.661	< 0.001
		Day 7	0.729	< 0.001
		Day 10	0.287	0.138
		Day 12	0.612	< 0.001
		Day 14	0.718	< 0.001
Antibody titer	LC/HC mRNA ratio	Day 5	0.536	0.003
		Day 7	0.601	< 0.001
		Day 10	0.119	0.548
		Day 12	0.127	0.520
		Day 14	-0.043	0.827
Specific production rate (Q_p)	LC/HC mRNA ratio	Day 7	0.135	0.494
		Day 10	-0.035	0.860
		Day 12	-0.508	0.006
		Day 14	-0.567	0.002

LC/HC mRNA と抗体濃度の間で、培養 5 日および 7 日目で正の相関（培養 5 日目 $\gamma_s=0.536, P=0.003$; 培養 7 日目 $\gamma_s=0.601, P<0.001$ ）が認められたが（Fig.17）、培養 10, 12, 14 日目では有意な相関は認められなかった（Table 8）。LC/HC mRNA と Q_p の間で、培養 12 日および 14 日目で正の相関（培養 12 日目 $\gamma_s=-0.508, P=0.006$; 培養 14 日目 $\gamma_s=-0.567, P=0.002$ ）が認められたが（Fig.18）、培養 7, 10 日目では有意な相関は認められなかった（Table 8）。これらの結果から、因子間の相関はサンプリングポイントで変化することが明らかとなった。増殖期には高い LC/HC mRNA を有する細胞株が高い抗体濃度を示したが、定常期以降はその様な相関は認められなかった（Table 8）。

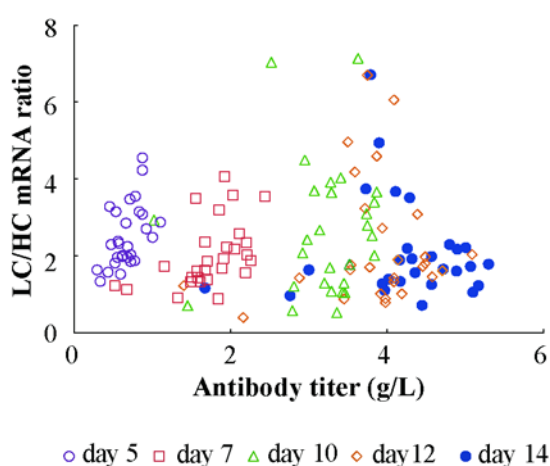


Fig. 17. 抗体濃度と LC/HC mRNA の相関

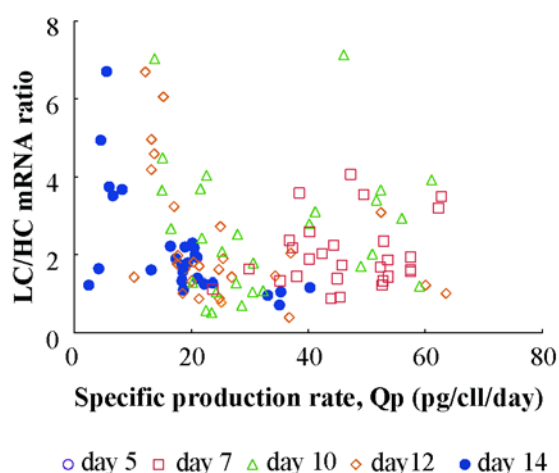


Fig. 18. 比生産速度 (Q_p) と LC/HC mRNA 比の相関

2.2.5. PDI の mRNA および BiP の mRNA

対照的な細胞株 8 番 (HMWS(%); 5.6, LMWS(%); 24.8, titer; 4.8 g/L) および細胞株 16 番 (HMWS(%); 19.2, LMWS(%); 10.0, titer; 2.8 g/L) の培養 14 日目の細胞を用いて、PDI・BiP・ATF4・CHO・XBP1・EDEM1 の様な小胞体ストレス管理に関係する種々のタンパク質 (Fig.19: Kadowaki および Nishitoh の論文(50)から改変して引用) の mRNA を測定する予備検討を行った。測定した mRNA の中で、細胞株間で明らかな差を示した mRNA は PDI と BiP の mRNA だけであったことから (Figs.20 および 21)、その後の検討では PDI の mRNA と BiP の mRNA 測定を行った。HMWS(%)が、ER でのフォールディングとアッセンブリーに関連する PDI および BiP の mRNA レベルと正の相関を示した。PDI の mRNA と HMWS(%)との間で、培養 5, 7, 10 日目で非常に強い正の相関(培養 5 日目 $\gamma_s=0.742$,

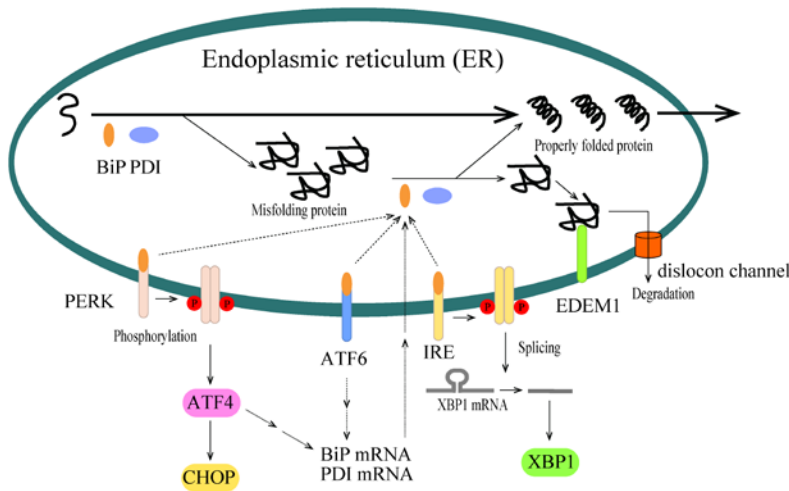


Fig. 19. 小胞体品質管理 [Kadowaki 及び Nishitoh の論文 (50) より改変して引用]

PERK, double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; IRE1, inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1; ATF6, activating transcription factor-6, eIF2 α ; eukaryotic translation initiation factor 2 α ; EDEM1, endoplasmic reticulum-degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1

$P < 0.001$; 培養7日目 $\gamma_s = 0.867, P < 0.001$; 培養10日目 $\gamma_s = 0.463, P = 0.036$) を認め た (Fig.22, Table 8). BiP の mRNA と HMWS(%)との間でも, 培養5, 7, 10, 12日目でも強い相関 (培養5日目 $\gamma_s = 0.823, P < 0.001$; 培養7日目 $\gamma_s = 0.692, P < 0.001$; 培養10日目 $\gamma_s = 0.399, P = 0.036$; 培養12日目 $\gamma_s = 0.397, P = 0.037$) を認め

た (Fig.23 および Table 8). これらの結果 と一致して, 培養5, 7, 10日目で PDI の mRNA と BiP の mRNA で正の相関を認め た (Fig.24, Table 8). 小胞体ストレス (小胞体にミスフォールディングタンパク質

が蓄積した状態) により, UPR が誘導されることで, 一般的にはミスフォールディングタンパク質は細胞外へは分泌されないと考えられている. しかし, 培養細胞を用いた抗体産生では, 2分子の half-antibody (1つの HC と1つの LC から構成) が疎水的に結合した分子が分泌されること(6), 細胞の酸化還元状態の変化によって, 正常な Fab に比べて疎水性の高い Fab を有する抗体分子が分泌されること(51), 低い培養温度条件では細胞内で生成された凝集体が分泌されること(34)が報告されており, ミスフォールディングタンパク質も分泌されていることが明らかとなっている. このため, 本検討で得られた結果は, 培養液中だけでなく, ER の環境も凝集体形成に関与していることを示唆している. もし抗体の凝集体が, 細胞から分泌された抗体モノマー (正しいフォールディングの抗体分子) から培養液中で形成されるならば(11), 高い抗体濃度を示す培養液ほど常に高い HMWS(%)を示すと考えられる. しかし, 本研究では, 抗体濃度の高い細胞株ほど HMWS(%)が高くなる傾向は認められていない. また培養の5日目および7日目の結果ではあるが, 抗体濃度の高い細胞株ほど低い HMWS(%)を示す傾向が認められている. これらのことから, ヘテロテトラマーのタンパク質である抗体分子は, 4つのポリペプチドが正しく, そして効率的に細胞内で組み立てられることは容易ではなく, LC 供給が不十分な細胞, すなわち HC が蓄積している細胞で, 部分的にミスフォールド状態の抗体分子がより多く培養液中に分泌されると推定された.

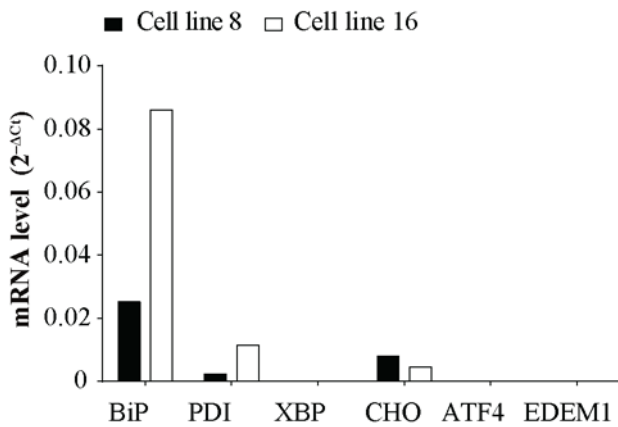


Fig. 20. 細胞株間での小胞体ストレス管理に関するタンパク質の mRNA レベルの比較

ER ストレス, すなわち ER での未フォールド (変性) タンパク質の蓄積は, 小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) を活性化し, X-box binding protein-1 および activating transcription factor 6 の様な転写因子の活性化を介して BiP や PDI の様な UPR 遺伝子の発現を誘導することが報告されている(52-54). このため, 抗体分子を効率良く, 正しくフォールドできない細胞では UPR が誘導されると考えられるが, 本研究において, 培養液中の凝集体量と細胞内の BiP の mRNA, そして凝集体量と PDI の mRNA と間で, 相関が認め

られることが初めて明らかとなった. HMWS(%)が高い細胞株では BiP の mRNA レベルと PDI の mRNA レベルが高いが, BiP と PDI の高い mRNA が HMWS 生成の原因ではなく, HMWS を生成する様な細胞の状態, すなわち小胞体ストレス応答が mRNA レベルの上昇を引き起こしているものと考えられた. 一方で, UPR が, B 細胞において抗体分泌の効率を至適化することも報告されている(55)ことから, 本研究では, 2つの細胞株の細胞内 HC 濃度および LC 濃度の測定を行った.

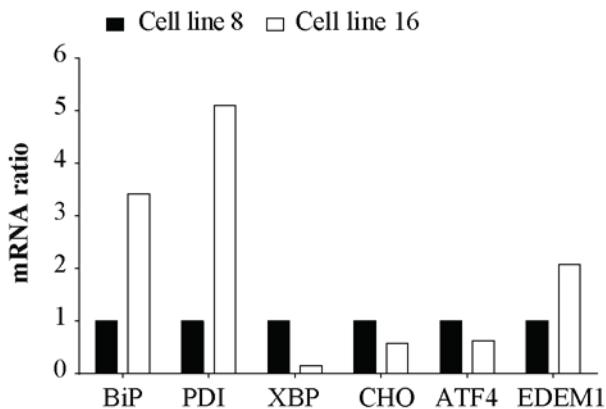


Fig. 21. 細胞株間での小胞体ストレス管理に関するタンパク質の mRNA レベルの相対比較 (細胞株 8 での測定結果を 1 として算定).

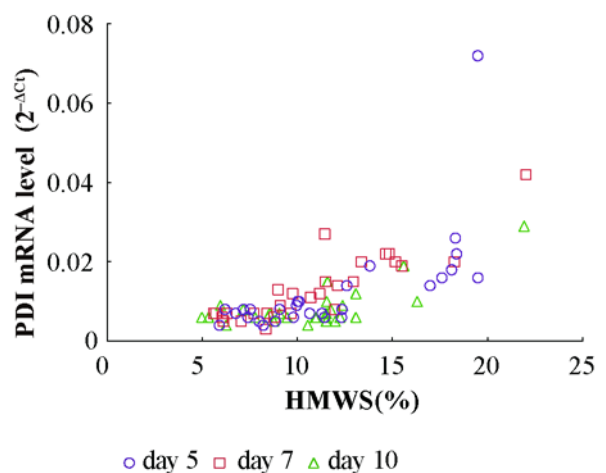


Fig. 22. PDI の mRNA レベルと HMWS(%)との相関

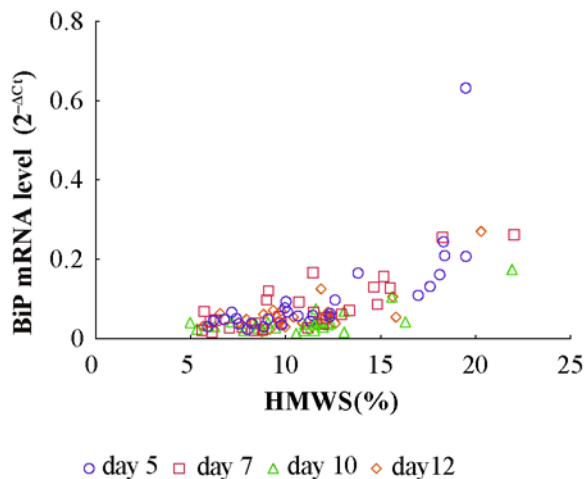


Fig. 23. BiP の mRNA レベルと HMWS(%)との相関

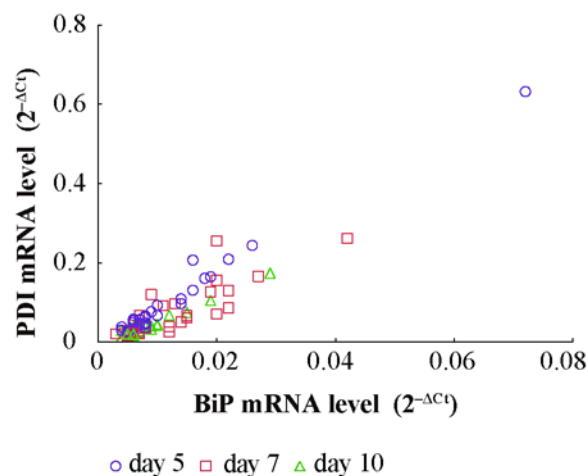


Fig. 24. BiP の mRNA レベルと PDI の mRNA との相関

Table 8. HMWS(%)と PDI mRNA level, HMWS(%)と BiP mRNA level, BiP mRNA level と PDI mRNA level におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
HMWS(%)	PDI mRNA level	Day 5	0.742	<0.001
		Day 7	0.867	<0.001
		Day 10	0.463	0.013
		Day 12	0.241	0.217
		Day 14	0.126	0.538
HMWS(%)	BiP mRNA level	Day 5	0.823	<0.001
		Day 7	0.692	<0.001
		Day 10	0.399	0.036
		Day 12	0.397	0.037
		Day 14	0.027	0.893
BiP mRNA level	PDI mRNA level	Day 5	0.914	<0.001
		Day 7	0.818	<0.001
		Day 10	0.805	<0.001
		Day 12	0.354	0.037
		Day 14	0.809	0.893

2.2.6. 細胞内の LC タンパク質と HC タンパク質の質量比 (LC/HC protein ratio) と HC 分解物との相関

細胞内 LC および HC のウエスタンブロッティングの結果を、それぞれ Fig. 25 および 26 に示した。HC と LC の簡易定量は同一ゲル内の標準品 (Fig. 25 および Fig. 26 に典型的な結果を表示) を用いて検量線を作成し、その式に基づいて細胞内の LC および HC 含量の算定を行った。

HC 分解物は、レーン上に認められた HC 以下の分子量のバンドの検出強度の合計値を、すべてのバンドの検出強度の総計で割り、それに 100 を掛けることで算定した。培養 10, 12, 14 日目では、LC/HC protein ratio と HC 分解物の間に相関を認めないのに対して (Table 9), 培養 5 および 7 日目では負の相関 (培養 5 日目 $\gamma_s = -0.609, P < 0.001$; 培養 7 日目 $\gamma_s = -0.548, P = 0.003$) を認めた (Fig. 27)。これらの結果は、サンプリングポイント間で相関性が変化することを示している (Table 9)。

Cell lysate; Reducing conditions; IB: anti-HC(γ)

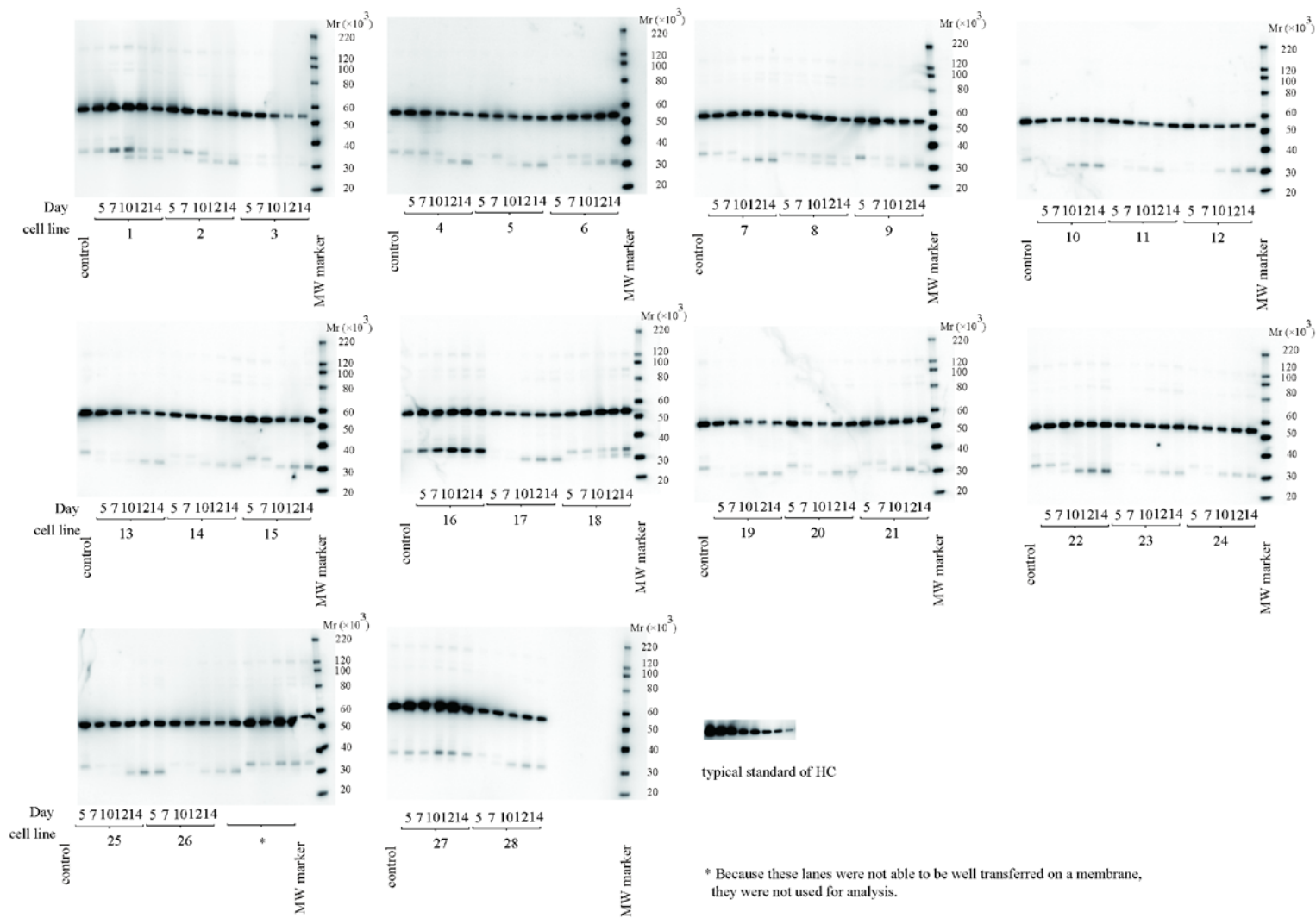


Fig. 26. 抗ヒトガンマー鎖特異的抗体を用いた還元条件下における細胞融解物のウェスタンブロット分析

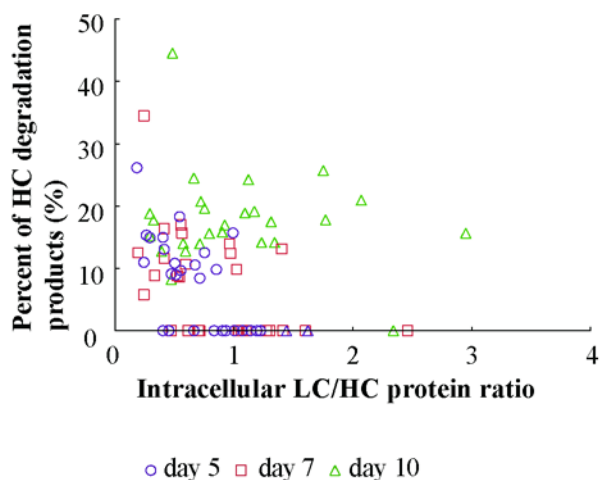


Fig. 27. LC/HC protein ratio と HC 分解物 (%) との相関

Table 9. 細胞内の LC タンパク質と HC タンパク質の質量比 (LC/HC protein ratio) と HC 分解物 (%) におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Intracellular LC/HC protein ratio	Percent of HC degradation products	Day 5	-0.609	< 0.001
		Day 7	-0.548	0.003
		Day 10	-0.015	0.940
		Day 12	0.247	0.206
		Day 14	0.122	0.538

2.2.7. HMWS(%)と細胞内 HC タンパク質含量との相関

培養 5, 7, 10, 12 日目で, 細胞内 HC タンパク質含量と培養液中の HMWS(%)との間で正の相関(培養 5 日目 $\gamma_s=0.612, P<0.001$; 培養 7 日目 $\gamma_s=0.594, P<0.001$; 培養 10 日目 $\gamma_s=0.470, P=0.012$; 培養 12 日目 $\gamma_s=0.512, P<0.001$) を認めた (Fig.28, Table 10). この結果は, LC 供給が不十分な細胞, すなわち HC が蓄積している細胞において, 部分的にミスフォールド状態の抗体分子が培養液中に分泌されるという推定と一致していた. 実際に, 抗体の凝集体が低い培養温度条件で細胞内で形成されることが報告されている(34)ことから, その様なミスフォールド部分を有する抗体分子は, 培養液中で凝集体を形成するだけでなく, 細胞中において凝集体を生じている可能性も考えられる.

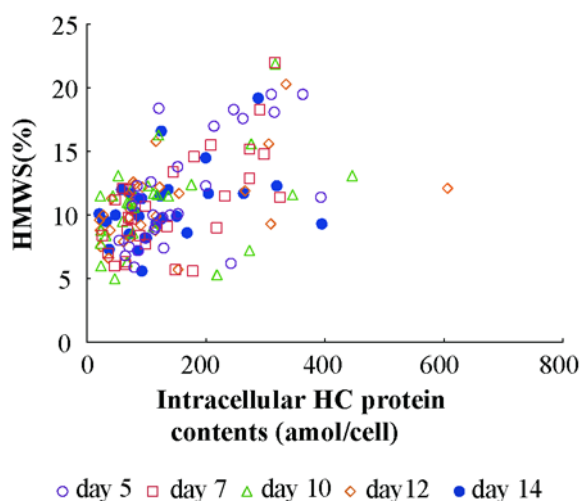


Fig. 28 細胞内 HC タンパク質濃度と HMWS(%)の相関.

Table 10. 細胞内 HC タンパク質濃度と HMWS(%)におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Intracellular HC protein contents	HMWS(%)	Day 5	0.612	<0.001
		Day 7	0.594	<0.001
		Day 10	0.470	0.012
		Day 12	0.512	0.005
		Day 14	0.344	0.073

2.2.8. LMWS(%)と細胞内 HC および LC タンパク質含量との相関

培養 5, 7, 10, 12, 14 日目で, 細胞内 HC タンパク質含量は培養液中の LMWS(%)と負の相関 (培養 5 日目 $\gamma_s = -0.650, P < 0.001$; 培養 7 日目 $\gamma_s = -0.742, P < 0.001$; 培養 10 日目 $\gamma_s = -0.730, P < 0.001$; 培養 12 日目 $\gamma_s = -0.749, P < 0.001$; 培養 14 日目 $\gamma_s = -0.567, P < 0.001$) を認めた (Fig. 29, Table 11). この結果は, LMWS が主に LC ポリペプチドで構成されているという結果と一致するものであった.

培養 10 および 12 日目の細胞内 LC タンパク質含量は培養液中の LMWS(%)と負の相関 (培養 10 日目 $\gamma_s = -0.494, P = 0.008$; 培養 12 日目 $\gamma_s = -0.466, P = 0.012$) を示したが, 培養 5, 7, 14 日目では相関は認められなかった (Fig.30, Table 11). これらの結果は, 細胞内で生成された過剰な LC が LMWS として分泌されることを示唆している. しかし, 細胞内 LC タンパク質含量と培養液中の LMWS(%)の間の相関が, サンプリングポイント間で変化していることから, これらの違いは, 細胞状態と関連した他の因子が影響を及ぼしていると考えられた.

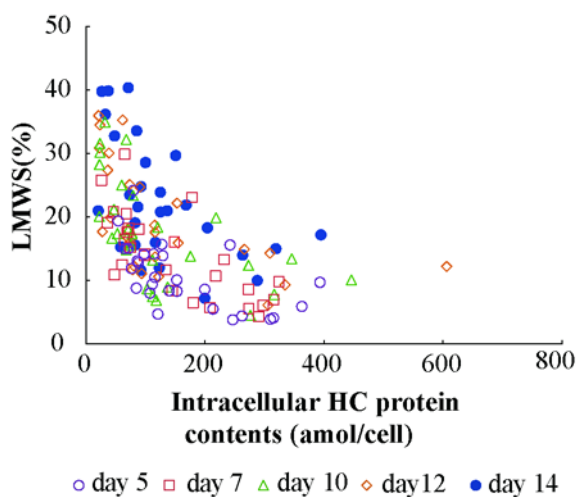


Fig. 29. 細胞内HCタンパク質濃度とLMWS(%)との相関

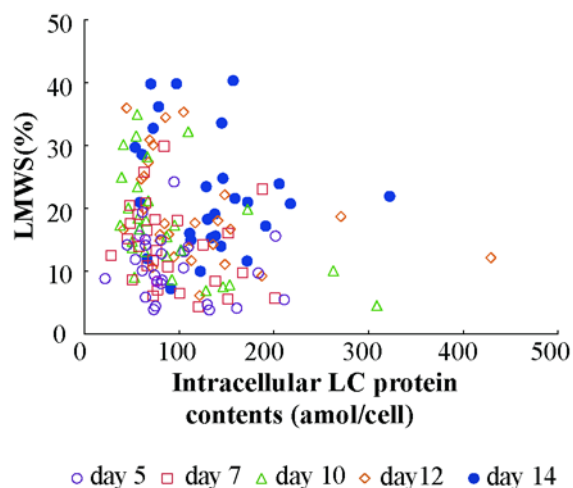


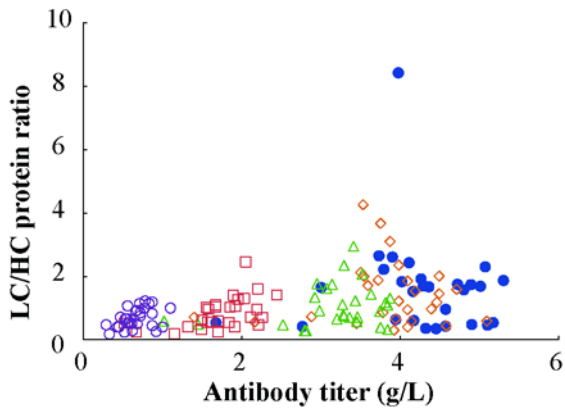
Fig. 30. 細胞内LCタンパク質濃度とLMWS(%)との相関

Table 11. 細胞内HCタンパク質濃度とLMWS(%), 細胞内LCタンパク質濃度とLMWS(%)におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

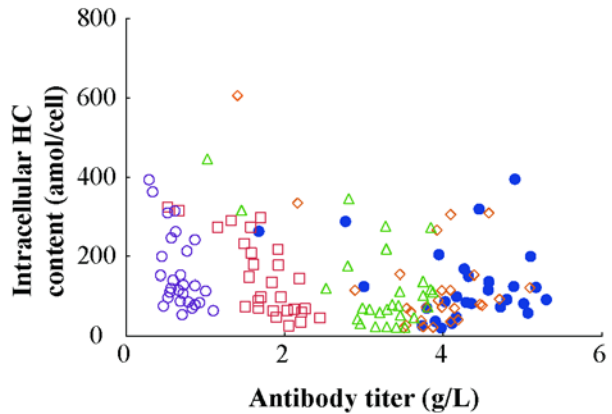
Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Intracellular HC protein contents	LMWS(%)	Day 5	-0.650	<0.001
		Day 7	-0.742	<0.001
		Day 10	-0.730	<0.001
		Day 12	-0.749	<0.001
		Day 14	-0.567	0.002
Intracellular LC protein contents	LMWS(%)	Day 5	-0.264	0.174
		Day 7	-0.344	0.073
		Day 10	-0.494	0.008
		Day 12	-0.466	0.012
		Day 14	-0.097	0.624

2.2.9. 抗体濃度とLC/HC protein ratio および細胞内HC含量との相関

増殖期にLC/HC protein ratioは抗体濃度と正の相関(培養5日目 $\gamma_s = 0.402, P = 0.034$; 培養10日目 $\gamma_s = 0.564, P = 0.002$) (Fig.31, Table 12) を認めた。培養5および7日目の細胞内HC含量は抗体濃度と正の相関(培養5日目 $\gamma_s = -0.498, P = 0.007$; 培養7日目 $\gamma_s = -0.748, P < 0.001$) を認めたが、培養10, 12, 14日目では細胞内HC含量と抗体濃度との相関は認められなかった (Fig.32, Table 12)。増殖期に素早く分裂している細胞は、効率的に抗体を分泌するには、過剰なHCに起因するストレスへの感受性が高すぎるのではないかと考えられた。



○ day 5 □ day 7 △ day 10 ◇ day 12 ● day 14



○ day 5 □ day 7 △ day 10 ◇ day 12 ● day 14

Fig. 31. 抗体濃度と LC/HC protein ratio の相関

Fig. 32. 抗体濃度と細胞内 HC 含量の相関

Table 12. 抗体濃度と LC/HC protein ratio, 抗体濃度と細胞内 HC 含量におけるサンプリングポイント間での統計的に有意な相関性の変化

Factor	Factor	Sampling point	r_s	P value
Antibody titer	LC/HC protein ratio	Day 5	0.402	0.034
		Day 7	0.564	0.002
		Day 10	0.197	0.315
		Day 12	-0.100	0.613
		Day 14	-0.181	0.358
Antibody titer	Intracellular HC protein contents	Day 5	-0.497	0.007
		Day 7	-0.748	<0.001
		Day 10	-0.170	0.387
		Day 12	0.095	0.631
		Day 14	0.111	0.573

2.2.10. ステップワイズ多重回帰分析のための指標および因子

生産性の指標として抗体濃度を、品質の指標として HMWS(%) を選択し、これらの指標とこれらの指標に影響を与える可能性のある因子 ($Q_p \cdot \mu \cdot LMWS(\%) \cdot HC$ の mRNA レベル $\cdot LC$ の mRNA レベル $\cdot PDI$ の mRNA レベル $\cdot BiP$ の mRNA レベル \cdot 細胞内 HC タンパク質含量 \cdot 細胞内 LC タ

ンパク質含量等)との関連性の評価を行うこととした。また死滅期に相当する最終的な抗体濃度およびHMWS(%)が生産においては最も重要であることから、培養終了時で評価を行った。例えば、LMWS(%)と抗体濃度との相関は増殖期には認められるが、その後のサンプリングポイントでは認められていない。このような結果は、指標に対して様々な因子が影響していることを強く示唆しているものと考えられ、ステップワイズ多重回帰分析を用いて評価を行うこととした。 μ および Q_p の値は、培養0から7日までのデータを用いて最小二乗法により解析を行った。

2.2.11. 抗体濃度のステップワイズ多重回帰分析

高い μ 、高い Q_p 、低い細胞内HCタンパク質含量を示す細胞株が高い抗体濃度を示すことが明らかとなった。13の因子($\mu \cdot Q_p \cdot \text{LMWS}(\%) \cdot \text{HCのmRNAレベル} \cdot \text{LCのmRNAレベル} \cdot \text{LC/HC mRNA比} \cdot \text{PDIのmRNAレベル} \cdot \text{BiPのmRNAレベル} \cdot \text{細胞内HCタンパク質含量} \cdot \text{細胞内LCタンパク質含量} \cdot \text{HCポリペプチドの分解生成物の存在割合}(\%) \cdot \text{LC/HC protein ratio} \cdot \text{HMWS}(\%)$)を独立因子として、ステップワイズ法により得られた、培養14日目(死滅期)での抗体濃度の多重回帰モデル(モデルA)をTable 13に示した。

次の様な多重回帰モデルの式が得られた：

$$\text{抗体濃度} = 13.126 x_1 + 0.084 x_2 - 0.003 x_3 - 5.337 \quad (\text{モデル A})$$

x_1, μ ;

x_2, Q_p ;

$x_3, \text{培養14日目の細胞内HCタンパク質含量}$

決定係数($R^2 = 0.603$)が十分大きく、自由度調整済み決定係数(adjusted R^2)との差が小さいことから、サンプル数は十分であることが示唆された。モデルAにおける多重共線性は、VIF (variance inflation factor)の値が小さい(4未満)であることから、無視できるものと考えられた。推定されたモデルAからの予測値は、実測値と比較的良く一致していた(Table 14)。

それぞれの因子の抗体濃度への寄与は標準化係数(Standardized coefficient)で示されており、その大きさは $Q_p > \mu > \text{細胞内HCタンパク質含量}$ の順であった。細胞株の培養工程で抗体の生産性に影

響を与える因子が VCD と Q_p であるという先の報告 (8) と一致していた。しかし Q_p と μ の抗体濃度への正の効果に加えて、細胞内 HC の蓄積が負の効果をもつことがステップワイズ多重回帰分析により、はじめて明らかとなった。細胞内 HC 含量が高い細胞株は、ER でのアッセンブリーとフォールディング工程の違いに起因しており、これによって抗体濃度の低下を生じると考えらる。

2.2.12. HMWS(%)のステップワイズ多重回帰分析

低い PDI の mRNA レベル、高い LMWS(%), 高い Q_p , 高い細胞内 LC タンパク質含量, 高い μ を示す細胞株が低い HMWS(%)を示すことが明らかとなった。13 の因子 ($\mu \cdot Q_p \cdot LMWS(\%) \cdot HC$ の mRNA レベル $\cdot LC$ の mRNA レベル $\cdot LC/HC$ mRNA 比 $\cdot PDI$ の mRNA レベル $\cdot BiP$ の mRNA レベル \cdot 細胞内 HC タンパク質含量 \cdot 細胞内 LC タンパク質含量 \cdot HC ポリペプチドの分解生成物の存在割合 (%) $\cdot LC/HC$ protein ratio \cdot 抗体濃度) を独立因子として、ステップワイズ法により得られた、培養 14 日目 (死滅期) での HMWS(%) の多重回帰モデル (モデル A) を Table 13 に示した。次の様な多重回帰モデルの式が得られた：

$$HMWS = 109.597 x_4 - 0.217 x_5 - 0.145 x_2 - 0.010 x_6 - 11.878 x_1 + 26.557 \quad (\text{モデル B})$$

x_4 , PDI の mRNA レベル;

x_5 , LMWS(%);

x_2 , Q_p ;

x_6 , 培養 14 日目の細胞内 LC タンパク質含量;

x_1 : μ

決定係数 ($R^2=0.863$) が十分大きく、自由度調整済み決定係数との差が小さいことから、サンプル数は十分であることが示唆された。モデル A における多重共線性は、VIF の値が小さい (4 未満) であることから、無視できるものと考えられた。推定されたモデル B からの予測値は、実測値と比較的良く一致していた (Table 15)。このモデルは抗体濃度とは対照的に、HMWS の形成には多くの因子が寄与している事を示しており、低い PDI の mRNA レベル、高い LMWS(%), 高い Q_p , 高い μ , そして高い細胞内 LC タンパク質含量を示す細胞株が低い HMWS(%)を示した。そのような新しい知見は、モノクローナル抗体の製造工程で形成される凝集体抑制に非常に有要だろう (Fig. 33)。最

近, Bhoskar ら(35)がモノクローナル抗体の培養液中に分泌される LC が, モノクローナル抗体の生産性と品質 (凝集体) と関係することを報告した. しかし, 本研究は, より網羅的であり, 細胞内に存在する抗体タンパク質, そして細胞内でのタンパク質凝集が予想される UPR に関係したタンパク質の mRNA の測定も行っている. さらに, 彼らは生産性および凝集体含量への培地の影響を検討しているが, 本研究では大規模生産に適した培養条件を用いて, 細胞株間で生産性と凝集体含量の違いに関する因子を明らかにした.

Table 13. ステップワイズ多重回帰分析

	R ²	Adjusted R ²	Coefficient	SE	Standardized coefficient	P
Dependent variable: Titer	0.603	0.549				
Independent variables						
Specific growth rate (μ)			13.126	2.408	1.139	< 0.001
Specific production rate (Q_p)			0.084	0.018	1.170	< 0.001
Intracellular HC content on day 14			-0.004	0.001	-0.449	0.020
Constant			-5.337	1.761		0.006
Titer of antibody (g/L) = 13.126x ₁ + 0.0840x ₂ - 0.004x ₃ - 5.337 (Model A)						
Dependent variable: HMWS(%)	0.863	0.829				
Independent variables						
PDI m RNA level on day 14			109.597	20.877	0.474	< 0.001
LMWS(%) on day 14			-0.217	0.031	-0.793	< 0.001
Specific production rate (Q_p)			-0.145	0.037	-0.590	0.001
Intracellular LC content on day 14			-0.010	0.004	-0.223	0.019
Specific growth rate (μ)			-11.878	5.204	-0.300	0.034
Constant			26.557	4.243		< 0.001
HMWS(%) = 109.597x ₄ - 0.217x ₅ - 0.145x ₂ - 0.010x ₆ - 11.878x ₁ + 26.557 (Model B)						

R: correlation coefficient, SE: standard error, P: significance probability

Table 14. 培養 14 日目におけるモデル A を用いた値と測定値の比較

Titer (g/L)		
Predicted value	Measured value	Predicted value/ Measured value
4.30	5.10	0.84
4.54	5.17	0.88
3.90	4.29	0.91
4.58	5.30	0.86
4.21	5.01	0.84
4.41	4.90	0.90
4.61	4.57	1.01
5.05	4.80	1.05
4.48	5.07	0.88
4.70	4.16	1.13
3.86	3.90	0.99
4.25	4.11	1.03
3.53	3.79	0.93
4.74	4.26	1.11
4.18	4.89	0.85
2.81	2.76	1.02
4.48	4.17	1.07
4.91	4.45	1.10
4.04	3.73	1.08
4.29	4.72	0.91
4.76	4.36	1.09
4.10	3.94	1.04
4.51	4.32	1.05
4.60	4.57	1.00
4.50	4.02	1.12
3.71	3.00	1.24
2.45	1.67	1.46

Table 15. 培養 14 日目におけるモデル B を用いた値と測定値の比較

HMWS(%)		
Predicted value	Measured value	Predicted value/ Measured value
13.49	14.55	0.93
11.31	11.50	0.98
11.31	11.50	0.98
11.39	11.29	1.01
11.58	11.45	1.01
8.92	9.30	0.96
11.63	9.38	1.24
7.27	5.59	1.30
11.19	11.96	0.94
8.87	9.97	0.89
8.26	7.30	1.13
8.90	9.48	0.94
7.72	8.54	0.90
8.19	8.56	0.96
9.74	9.73	1.00
19.51	19.21	1.02
10.02	8.18	1.23
11.36	12.27	0.93
8.85	9.57	0.93
9.91	11.67	0.85
10.58	10.23	1.03
11.35	11.68	0.97
9.12	9.88	0.92
12.12	12.01	1.01
10.28	9.93	1.04
9.72	16.61	0.59
11.49	11.65	0.99

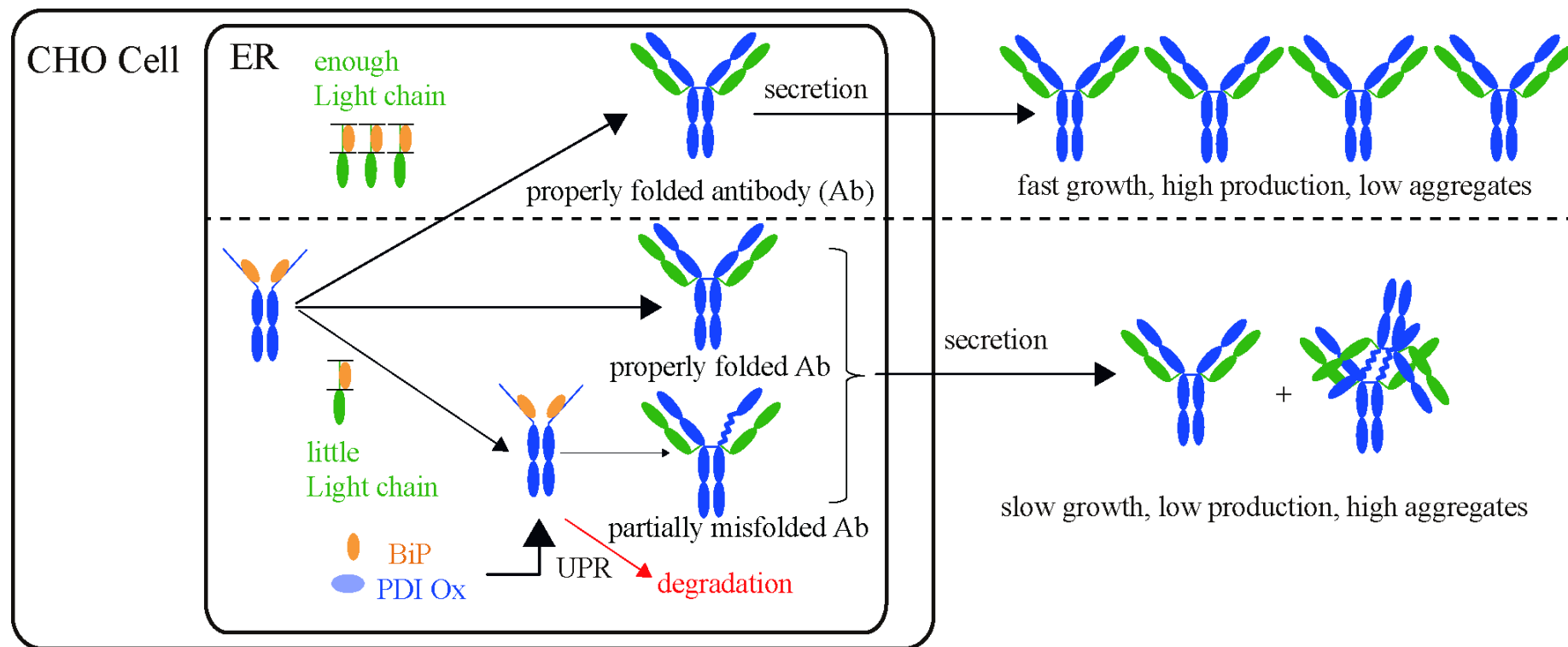


Fig. 33. 完全な構造の抗体，部分的にミスフォールドした抗体，そして凝集した抗体の分泌に関する LC 量及び UPR の関与の可能性
 BiP, heavy chain-binding protein; PDI Ox, protein disulfide isomerase in an oxidized state; ER, endoplasmic reticulum; UPR, unfolded protein response.

2.3. 小括

細胞株間での抗体濃度および凝集体に影響を与える因子を系統的に検討し、高い生産性と高い品質を有する細胞株の特徴を明らかにするために、生産性と品質の異なるトラスツズマブ（商品名 ハークローン、ハーセプチン）を産生する 28 種の安定発現株を調製し、HMWS(%)・ Q_p ・ μ ・培養液 LMWS(%)・HC の mRNA レベル・LC の mRNA レベル・PDI の mRNA レベル・BiP の mRNA レベル・HC の細胞内含量・LC の細胞内含量を分析した。初めに、因子間の相関性を調べたところ、サンプリングポイント間で変化し、常に一定の傾向を示すものではないことが明らかとなった。この結果は、一つの因子に対して一つの因子のみが関係しているのではなく、1つの因子に様々な因子が影響していると考えられた。そこで、ハーベスト時の生産性（抗体濃度）と品質（HMWS(%)）を指標として、指標と複数の因子の関係性を明らかにするためにステップワイズ多重解析法による解析を行った。その結果、高い抗体濃度は、高い μ ・高い Q_p ・低い細胞内 HC タンパク質含量と関係していることが明らかとなった。高い細胞内 HC タンパク質含量が生産性を低下させるのは、HC タンパク質が多すぎると ER でのアッセンブリーとフォールディングが円滑に進まず、HC タンパク質の蓄積が UPR を誘導するからと考えられる。一方、低い HMWS(%)は、低い PDI の mRNA レベル・高い LMWS(%)・高い Q_p ・高い細胞内 LC タンパク質含量・高い μ と関係していることが明らかとなった。さらに、部分的にミスフォールドされた状態の抗体分子も分泌されることで、凝集体の増加を生じる可能性が考えられた。得られた様々な結果から、ER 内での正しく・効率的な抗体分子のアッセンブリーとフォールディングが、高い抗体濃度と低い凝集体含量にとって重要であると考えられた。

本検討により得られた結果およびモデルは、抗体濃度を高め、抗体の凝集体形成を抑制する取り組みや、大規模の生産に適した低い凝集体含量の抗体を産生する高生産細胞株選択の際に有用な知見を与えるものであると考えられる。

3. 対照的な生産性と凝集体含量を示す2つの細胞株の特性、および生産された抗体物性の比較

抗体医薬品の副作用のリスクを下げ、患者の方々の経済的負担を軽減するためには、抗体の細胞培養工程において、高い生産性（抗体濃度）と高い品質（低い凝集体含量）を達成することが重要である。抗体の生産性や品質は、産生する細胞株の性質に大きく依存することから、生産性および凝集体含量に差のある細胞株において、細胞の特性の違い、細胞から得られた抗体の物性の違いを明らかにすることは、今後の生産性、品質改善の取り組みにとって重要であると考えられた。そこで、先の実験（2.1）で作成した28種の細胞株の中から生産性および凝集体含量で対照的な2株、細胞株A（高い生産性と低い凝集体含量、cell line 17）およびB（低い生産性と高い凝集体含量、cell line 27）を選抜し、リアクターを用いてそれぞれ3回の培養を実施し、細胞株間およびバッチ間での差の比較を行った。

3.1. 方法

・細胞培養

先の検討（2.1）で用いた28種の細胞株から、2つの単一クローン細胞株（細胞株AおよびB）を選択した。細胞は、2Lのガラス製バイオリアクター（エイブル株式会社）に800mLの容量で 0.3×10^6 cells/mLとなるように播種した。8.6 g/L グルコースおよび4 mM グルタミンを含む無血清基礎培地（pH7.5）、そして60 g/L グルコースおよび34 mM グルタミンを含む、無血清フィード培地は社内で調製したものをを用いた。培養は、5% 炭酸ガス95%空気の雰囲気下、37°C、85 rpmの攪拌条件で14日間行った。フィードは、培養3日後から、フラスコに残存している溶液量の3%に相当する容量を添加した。分析のためのサンプリングは毎日行った。総細胞および生細胞数はVi-Cell XR（Bekman Coulter）を用いて測定を行った。サンプルの一部は分析が終了するまで-20°Cで保存した。14日目の培養終了時に、培養上清を分取し、さらに分析、精製されるまで-20°Cで保存した。細胞は培養4日および12日目に採取し、遠心分離機を用いてリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、ウエスタンブロッティングのためのサンプルとして、-80°Cで保存した。培養液中の抗体濃度測定は、2.1に記載した方法と同様の方法で測定を行った。

・抗体の精製

培養液中の抗体はプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製を行った。抗体を選択的に吸着させるために、培地を洗浄液（10 mM リン酸ナトリウム, pH 6.0）で平衡化した Protein A（MabSelect SuRe）column（1 × 5 cm; GE Healthcare Life Sciences）に添加し、カラム容量の 5 倍の洗浄液で洗浄後、10 mM クエン酸ナトリウム（pH 3.4）を含む緩衝液で吸着した抗体を溶出し、溶出液を 1.5 M トリスで pH 5.5 に調整した。この溶液を Amicon Ultra 10K（Millipore）遠心フィルターユニットを用いて、製剤処方溶液（262 mM ソルビトールを含む 10 mM グルタミン酸溶液 pH 5.5）に交換、濃縮を行った。それぞれのサンプル濃度は、Mach et al. (56)の式を用いて算定した吸光係数 $1.48 \text{ (mg/mL)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ に基づいて 280 nm の波長での吸収から算定した。

・ゲル濾過クロマトグラフィー（Size-exclusion chromatography; regular-SEC）

regular-SEC（ドデシル硫酸ナトリウムを含まない SEC）には、TSKgel G3000SWXL columns（7.8 mm i.d. × 30 cm; 東ソー）を直列に 2 本接続し、ガードカラムを装着したものをを用いた。移動相は 50 mM リン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウムおよび 5% (v/v) エタノール（pH 7.0）を含む溶液を用い、分析は、流速 0.5 mL/min、カラム温度 25 °C、注入タンパク質量 20 μg、検出波長 215 nm で行った。それぞれの分析は 3 回実施した。精製した抗体サンプルは、製剤処方溶液で希釈を行った。 M_r はゲルろ過クロマトグラフィー用スタンダード（Product No. 151-1901, Bio-Rad Laboratories）を用いて算定した。別途実施した分子量の測定時には、光散乱検出器 DAWNEOS（Wyatt Technology）および示差屈折率計 Optilab rEX（Wyatt Technology）を備えた装置を用いて測定を行った。

・LDS 含有ゲル濾過クロマトグラフィー（SEC with lithium dodecyl sulfate; LDS-SEC）

LDS-SEC には、TSKgel G3000SW_{XL} column（7.8 mm i.d. × 30 cm; 東ソー）と TSKgel G4000SW_{XL} column（7.8 mm i.d. × 30 cm; 東ソー）の 2 つのカラムを直列に接続し、ガードカラムを装着したものをを用いた。移動相は 50 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウムおよび 0.1% (w/v) LDS（pH 7.0）を含む溶液を用い、分析は、流速 0.5 mL/min、カラム温度 25 °C、注入タンパク質量 20 μg、検出波長 215 nm で行った。それぞれの分析は 3 回実施した。精製した抗体サン

ルは、分析前に LDS を加えた製剤処方溶液で希釈を行い、それぞれのサンプル中の最終 LDS 濃度は移動相と同じになるように調整した。M_r はゲルろ過クロマトグラフィー用スタンダード (Product No. 151-1901, Bio-Rad Laboratories) を用いて算定した。

・スルフヒドリル基の定量

スルフヒドリル基の定量には、精製抗体サンプルを製剤処方溶液で 8.9 mg/mL の濃度に希釈したものをを用いた。それぞれのサンプル 200 μ L に 500 μ L の変性緩衝液 (150 mM 塩化ナトリウム, 7 M 塩酸グアニジンおよび 1 mM EDTA ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)) を加え、さらに 15 μ L の 4,4'-dithiodipyridine 溶液 (50 mM メタノール溶解液) を加え、攪拌後に 37 $^{\circ}$ C で 60 分間加温した。反応終了後のサンプルの吸光度は、U-3310 分光光度計 (日立) を用いて 343 nm で測定した。検量線を作成するために 0 μ M から 30 μ M までの N-acetyl-L-cysteine 溶液を調製し、サンプルと同じ処理を行った。それぞれの分析は 3 回実施した。

・ペプチドマップ (Peptide mapping)

細胞株間での翻訳後修飾の違い (酸化, 脱アミド等) や共有結合性の凝集体形成の可能性を探るべく、LC-MS を用いたペプチドマッピングを行った。精製したサンプルを製剤処方溶液で 5 mg/mL に希釈し、その溶液 10 μ L に 39 μ L の変性溶液 (7.69 M 尿素を含む 128 mM Tris buffer pH7.75) および 1 μ L の 1.25 M DTT 水溶液を加え、攪拌後 60 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。放冷後、7 μ L の 0.5 M ヨウドアセトアミド水溶液を加え、37 $^{\circ}$ C の遮光下で 30 分間反応させた。この溶液に 1.5 μ L の 1.25 M DTT 水溶液を加えた後、293 μ L の消化液 (128 mM Tris buffer pH7.75) を添加した。この溶液に 10 μ L のトリプシン (プロメガ, Product NO.V5111) 溶液 (0.5 μ g/ μ L 消化液) あるいはエンドプロテイナーゼ Lys-C (Lys-C, ロシュ・ダイアグノスティックス, Product NO.10476986001) 溶液 (0.25 μ g/ μ L 消化液) を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、さらに 10 μ L のトリプシン溶液 (0.5 μ g/ μ L 消化液) あるいは Lys-C 溶液 (0.25 μ g/ μ L 消化液) を加え、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。これに、5.9 μ L の 10% TFA 水溶液を添加したものをペプチドマップサンプルとした。ブランクは、10 μ L の製剤処方溶液を用いて同様な操作を行った。

逆相での分離は ACQUITY UPLC CSH C18 column (2.1 mm i.d. \times 15 cm; Waters) を備えた ACQUITY UPLC system (Waters) を用いて行った。カラムは 100% 移動相 A (0.1% ギ酸水溶液),

5%移動相 B (0.1% ギ酸を含むアセトニトリル) で平衡化し, 分析を通して 40 °C で維持した. サンプルをカラムに注入後, 平衡化条件の組成 (0%移動相 B) で流速 0.3 mL/min で 0.5 分間 維持し, 移動相 B の割合を 58 分間で 0%から 40%まで直線的に増加させることで溶出を行った. MS 分析は Xevo TQ mass spectrometer (Waters) で行った. 分析条件は, エレクトロスプレー・イオン化 (ESI) ポジティブモード, 3.2 KV のキャピラリ-電圧, 1000 L/h の乾燥ガス流量, 400 °C の気化温度, 50 L/h のコーンガス流量, 150 °C のイオン源温度, 25 V のコーン電圧で, MS^E法を用いた. 解析は, BiopharmaLynx software (Waters) および MassLynx software (Waters) を用いて分析を行った.

- ウェスタンブロットティング

- サンプル調製

凍結細胞 (1×10^7) を融解し, メーカーのマニュアルに従って Qproteome Mammalian Protein kit (Qiagen) を用いて可溶化した. 還元条件では, 8.2 μ L のサンプル (8.2×10^3 cells に相当) に 10 μ L NuPAGE LDS sample buffer (4 \times ; Invitrogen), 4 μ L reducing agent (10 \times ; Invitrogen) および 17.8 μ L 精製水を添加した. 非還元条件では, 還元剤を除く代わりに 4 μ L の 25 μ M N-ethylmaleimide 溶液を加えた. 培地および精製した抗体は, 製剤処方溶液で 0.2 mg/mL の濃度に希釈し, 最終抗体濃度 3 μ g/mL で, 凍結細胞と同様の方法で処理を行った.

- SDS-PAGE および転写

サンプルを 65 °C で 10 分間加熱後, NuPAGE 4%–12% Bis-Tris gel (1.0 mm \times 17 well, Invitrogen) に負荷し, NuPAGE antioxidant (Invitrogen) の存在下, あるいは非存在下の MOPS SDS running buffer (Invitrogen) を用いて, 200 V で 45 分間泳動した. 転写以降の操作は 2.1.に記載した方法と同様の方法で測定を行った.

- 高感度濾過クロマトグラフィー (High-sensitivity SEC; HS-SEC)

2.1.に記載した方法と同様の方法で測定を行った. それぞれの分析は 3 回実施した.

・イオン交換クロマトグラフィー (Cation-exchange chromatography; CEX)

CEX は, ProPacWCX-10 column (4.0 mm i.d. × 25 cm; Dionex) を用いて, 先に報告されているクロマトフォーカシング法(57)の条件を一部変更して行った. 移動相 A は 60 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸二水素ナトリウムの溶液を, 移動相 B は 60 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸水素二ナトリウムの溶液を用い, カラムは 80% 移動相 A, 20% 移動相 B の組成で平衡化した. カラムは注入後, 20% 移動相 B で 5 分間一定濃度で維持し, 溶出溶媒 (移動相 B) の割合を 5 分から 55 分の間で 75% まで直線的に増加させた. 分析は, 流速 0.8 mL/min, カラム温度 37 °C, 注入タンパク質量 25 µg, 検出波長 214 nm で行った. それぞれの分析は 3 回実施した.

・液体クロマトグラフィー質量分析 (Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS)

サンプル中の抗体の翻訳後修飾の状態を明らかにするために LC-MS を用いて分析を実施した. PNGase (New England Biolabs.) を最終濃度 19.2 units/µL となるように精製抗体に加え, 混合物を 37 °C で一晩インキュベートしたもの, PNGase 処理を除いて処理を行ったもの (糖鎖付加状態) を調製した. 逆相は, カラムに MassPREP Micro desalting column (4.0 mm i.d. × 2.5 cm; Waters) を使い, ACQUITY UPLC system (Waters) を用いて行った. カラムは 95% 移動相 A (0.1% ギ酸水溶液), 5% 移動相 B (0.1% ギ酸を含むアセトニトリル) で平衡化し, 分析を通して 80 °C で維持した. 5 µg のタンパク質サンプルをカラムに注入後, 平衡化条件の組成 (5% 移動相 B) で流速 0.5 mL/min で 0.5 分間維持し, この後, 流速を 0.2 mL/min に変更し移動相 B の割合を 10 分間で 5% から 90% まで直線的に増加させることで溶出させた. MS 分析は Xevo TQ mass spectrometer (Waters) で行った. 分析条件は, エレクトロスプレー・イオン化 (ESI) ポジティブモード, 2.5 KV のキャピラリー-電圧, 1000 L/h の乾燥ガス流量, 350 °C の気化温度, 50 L/h のコーンガス流量, 120 °C のイオン源温度で行った. マススペクトルのデコンボリューションは, 先の報告 (58) に基づいて BiopharmaLynx software (Waters) を用いて条件を設定し, 解析を行った. 精製抗体のそれぞれのピークの割合は, BiopharmaLynx software を用いて算定した.

• N-結合型オリゴ糖の分析

この研究で生産された抗体を修飾する N-結合型オリゴ糖は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) を用いて分析を行った。サンプルは、精製水で 85 μL に希釈した 25 μg の精製抗体を含む溶液に 1.7 μL の 2-mercaptoethanol 加えることで調製し、そして、その混合物を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベートした。それに、1 unit/ μL の Protein N-glycosidase F 水溶液 (Roche) を 4.5 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 12–15 時間インキュベートした。あらかじめ -20°C に冷却したメタノールを 150 μL を添加後、サンプルを 15,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。上清は遠心エバポレーターを用いて乾固するまで留去させた。2-aminobenzoic acid (2-AA) での誘導体化は先の報告(59)の方法を一部変更した次の様な手法で行った。乾燥させたサンプルに 20 μL の精製水を加えた。反応試薬の溶液は、使用する直前に、4% 酢酸ナトリム 3 水和物および 2% ホウ酸を含むメタノール溶液に 30 mg の 2-AA および 20 mg のシアノ水素化ホウ素ナトリウム (sodium cyanoborohydride) を溶解することで調製した。サンプル溶液に 100 μL の反応試薬の溶液を加え、混合物を 80 $^{\circ}\text{C}$ で 50 分間インキュベートした。放冷後、混合物を遠心し、30 μL の精製水を加えた。さらに洗浄液 (95:5(v/v)の精製水 : アセトニトリル溶液) を 1 mL 加え、1 mL の洗浄液で洗浄した 1 cc Oasis HLB cartridge (Waters) に負荷した。1 mL の洗浄液で cartridge を 2 回洗浄後、2-AA で誘導体化したオリゴ糖を溶出液 (20:80 (v/v)の精製水 : アセトニトリル溶液) で溶出させた。溶出液を遠心エバポレーターを用いて乾固するまで留去させ、50 μL の精製水で再溶解した。

50% メタノール水溶液に 10 mg/mL の 2,5-dihydroxybenzoic acid を含むマトリックス溶液を調製した。そのマトリックス溶液 4 μL に 1 μL のサンプル溶液を混ぜ、混合物の 1 μL を標準のターゲット (Bruker Daltonik) にスポットした。サンプルが乾燥後、Autflex II (Bruker Daltonik) MALDI-TOF MS を用いてサンプルの分析を行った。測定は、19.0 KV のイオンソース電圧、8.5 KV のレンズ電圧、100 ns のパルスイオン抽出の条件で行った。

• 疎水性表面の分析

精製抗体を 1.565 mg/mL の濃度に製剤処方溶液で希釈し、2,320 μL の溶液の蛍光は amicroLAB 500 series diluter dispenser (オートインジェクタ, Hamilton) を備えた Fluorolog-3 Spectrofluorometer

(Horiba Jobin Yvon) で測定した。サンプルは 25 °C で 5 分間インキュベート後、蛍光は励起波長 373 nm, 発光波長 480 nm, 2.2 nm のスリット幅で測定した。次に、2.08 mM の 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) を含む製剤処方液を攪拌しながら 20 μ L 添加し、25 °C で 2 分間保持し、その後蛍光強度を測定した。この ANS を添加する手順を自動的に 9 回繰り返し、測定を行った。

・統計解析

統計解析は、SPSS (IBM Corporation) を用いて行った。スチューデントの t -test は2つのグループ間の分散に有意差が無かった場合 (F 検定が $P > 0.05$ の場合) に使用し、ウエルチの t -test は2つのグループ間の分散に有意差が認められた時に用いた。多重比較の際に、テューキーの HSD 検定 (Tukey's honestly significant difference test) は3つのグループ間で分散に有意差が無かった場合に使用し、Games-Howell の検定はグループ間の分散に有意差が認められた時に用いた。いずれの場合も、 $P < 0.05$ の時に有意であると判定した。

3.2. 結果および考察

3.2.1. 抗体凝集体の特性

細胞株 B は、細胞株 A より抗体濃度 (およそ3分の1) および細胞増殖活性が明らかに低かった (Fig.34 および Table 16)。細胞株 A と B の抗体濃度の比 (2.8) が、細胞株 A と B の最大生細胞密度の比 (3.7) に近く、2つの細胞間で比抗体生産速度に差がない (39.3 pg/cell/day 対 43.9 pg/cell/day, Table 16) ことから、細胞株間の抗体濃度の違いは主に細胞の増殖の違いに起因することが明らかとなった。細胞株 B の3つのバッチ内で、抗体濃度及および細胞増殖において際立った相対標準偏差が認められた (Table 16)。細胞株 B の3の精製抗体サンプルすべてで (バッチ

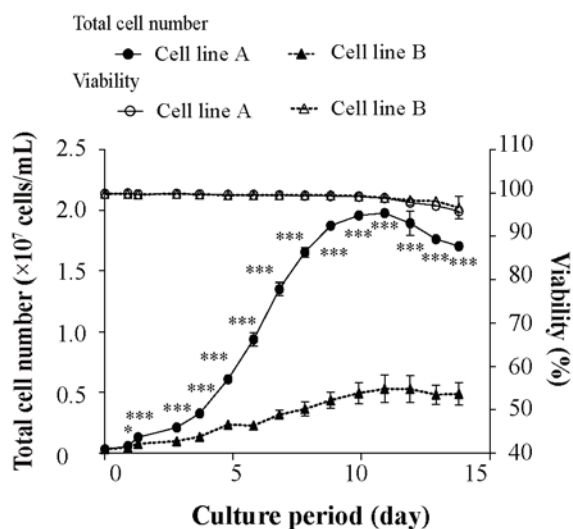


Fig. 34. 2つの細胞株間での総細胞数と生細胞数の比較 $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

4-6)、細胞株 A (バッチ 1-3) の精製抗体サンプルより高い量 (約3倍) の HMWS(%)を示した (Fig.35 の regular-SEC のクロマトグラムおよび Fig.36 の相対面積値を参照)。しかし、細胞株間の HMWS(%)の違いは、細胞株 B で認められる大きな変動 (Fig.30 の矢印で示した 27.4 分の HMWS ピーク) のために有意な差は認められなかった。量的な違いに加えて、2つの細胞株の HMWS の溶出パターンで質的な違いが認められ、25分から27.4分のピークは細胞株 A より、細胞株 B で非常

に多いのに対して、ボイド容量 (void volume) 付近の明確なピークは細胞株 A でのみ認められた。これらの観察結果は、いくつかの異なった HMWS が存在し、それらの分布が2つの細胞株間で異なる可能性を示唆している。

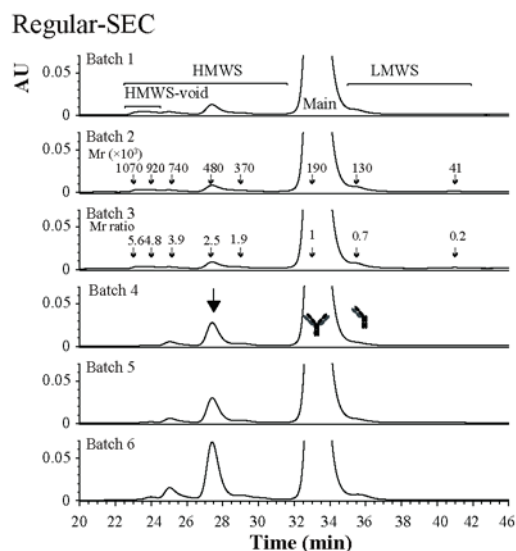


Fig. 35. 精製した抗体サンプルの regular-SEC のクロマトグラム
AU, absorbance unit

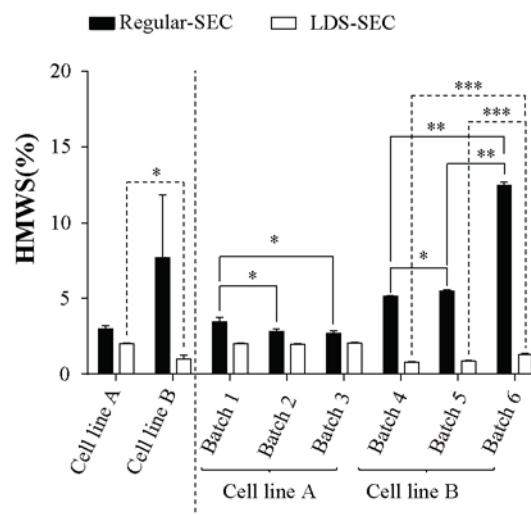


Fig. 36. regular-SEC と LDS-SEC.により算定された HMWS(%)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 16. 細胞株の特徴

Cell line	Batch	Titer (g/L)	Maximum viable cell density ($\times 10^6$ cells/mL) (Proliferation)	Specific antibody production rate (pg/cell/day) *
Cell line A	Batch 1	4.37	19.64	40.86
	Batch 2	4.00	19.77	37.72
	Batch 3	4.21	19.16	39.30
	Average \pm SD	4.2 ± 0.2	19.5 ± 0.3	39.3 ± 1.6
	RSD**	4.5%	1.7%	4.0%
Cell line B	Batch 4	1.70	6.02	45.80
	Batch 5	1.69	6.04	44.70
	Batch 6	1.17	3.95	41.19
	Average \pm SD	1.5 ± 0.3	5.3 ± 1.2	43.9 ± 2.4
	RSD**	19.7%	22.5%	5.5%

*: Product concentration was plotted against the integral viable cell density from Day 0 to 10, and specific antibody production rate was determined as the slope calculated by a least-square method.

** : Abbreviation used: RSD, relative standard deviation.

タンパク質凝集体の分類の基準の1つが結合様式（共有結合と非共有結合）である。2つの細胞株間の共有結合性と非共有結合性 HMWS の割合を比較するために、それぞれの細胞株から得られた精製抗体サンプルを非共有結合性の凝集体が解離する LDS-SEC により分析した (Fig. 37)。regular-SEC での分析における細胞株 B の高い凝集体含量とは対照的に、LDS-SEC での分析では、細胞株 A よりも細胞株 B において有意に HMWS(%)が有意に低いことが明らかとなった (Fig. 36)。regular-SEC 分析 (Fig. 35) と LDS-SEC 分析 (Fig. 37) で得られた HMWS(%)の値を比較することで、HMWS 内の非共有結合性の含量を算定した (Table 17)。細胞株 B から精製した抗体サンプル (サンプルグループ B) 中の HMWS の大部分は非共有結合性の凝集体 ($86.1\% \pm 3.0\%$) から構成されていた (Table 17)。これとは対照的に、細胞株 A から精製した抗体サンプル (サンプルグループ A) 中の HMWS は、非共有結合性の凝集体含量は $32.0\% \pm 8.9\%$ のみであり、HMWS は主に共有結合性の凝集体から構成されていた。LDS の添加により、細胞株 B において HMWS (%) の減少が認められ、それに伴って主ピーク (%) と LMWS(%)の明らかな増加を生じることから、細胞株 B において認められた非共有結合性の凝集体は、主に全長のモノマー抗体と抗体の断片の様な LMWS を含むことが明らかとなった。regular-SEC の分析 (Fig.35) における主要な HMWS のピーク (27.4 分) は抗体のダイマーであることが、光散乱分析装置を用いた検討で明らかとなっている (Fig. 38 および Table 18)。対照的に、細胞株 B の LMWS(%)は、LDS-SEC 分析において細胞株 A の値より有意に高いことが明らかとなった (Fig.39)。これらの結果は、主な非共有結合性の凝集体 (ダイマーに相当) は2つのタイプに分類され、1つは2つのモノマー抗体から、もう一方はモノマー抗体と LMWS から構成されていることを示唆している。2つのモノマー抗体間の会合は、ER ストレスを発現した ER で生じた部分的にミスフォールドされたモノマーの疎水的相互作用により生じていると考えられた。LMWS の候補は、 M_r が約 1×10^5 の Fab ドメインの1つが失われた抗体である des-Fab (15)である。そのピークの保持時間は LDS-SEC で M_r が 1.1×10^5 となる 32分に認められた。des-Fab は以下 (3.2.3 参照) で述べているように、ウエスタンブロッティングでも認められている。

細胞株 A の精製抗体で認められる HMWS の大部分は共有結合であるが、regular-SEC のボイド容量付近で認められる HMWS (HMWS-void; Fig. 28) は、それらのピークが LDS の存在下で解離することから (Fig. 32)、非共有結合であった。細胞株 A の HMWS-void で認められる凝集体は、

光散乱の結果からも不均一であるが明らかとなっている (Fig.38). したがって認められる HMWS の大きさ, 相互作用の様式, 構成成分, そして分布は細胞株に依存して変化すると推定された.

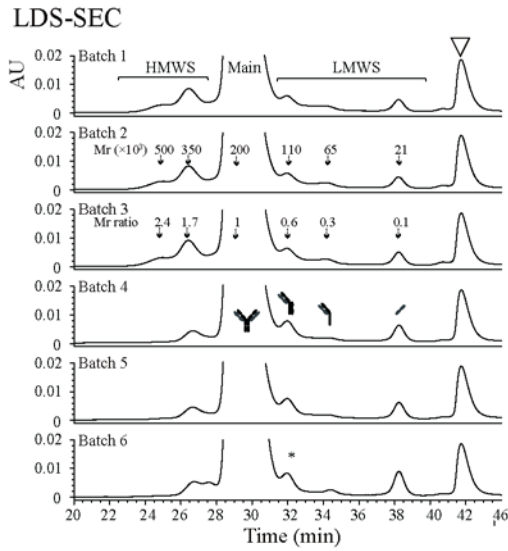


Fig. 37. 精製した抗体サンプルの LDS-SEC のクロマトグラム

▽: 媒体由来のピーク

AU, absorbance unit

Regular-SEC-MALS

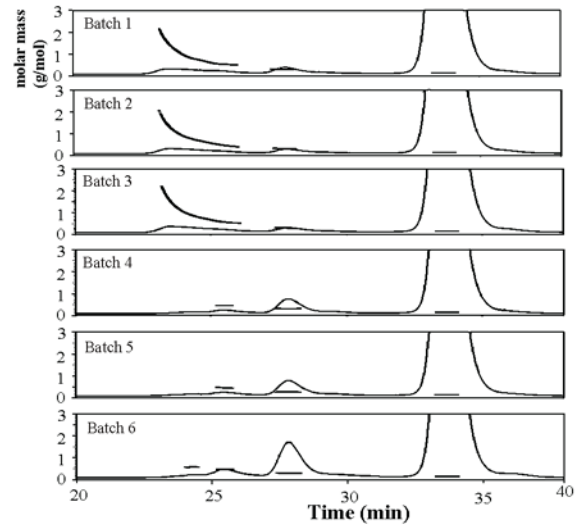


Fig. 38. 精製した抗体サンプルの regular-SEC-MALS のクロマトグラム

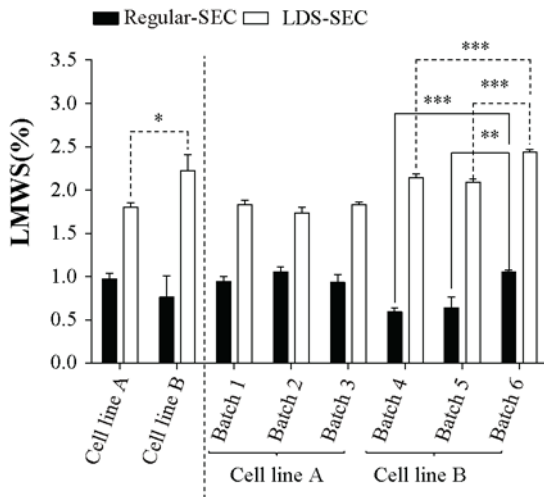


Fig. 39. regular-SEC と LDS-SEC により算定された LMWS (%)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 17. regular-SEC と LDS-SEC 分析間での HMW (%), 主ピーク (%), LMWS(%)における差と非共有結合性凝集体の割合 (%)

Cell line	Batch	Δ HMWS(%)	Δ Main(%)	Δ LMWS(%)	Fraction (%) of noncovalent aggregates
Cell line A	Batch 1	-1.44	0.55	0.89	41.60
	Batch 2	-0.86	0.17	0.69	30.42
	Batch 3	-0.64	-0.26	0.91	23.92
	Average \pm SD	-1.0 \pm 0.	0.2 \pm 0.4	0.8 \pm 0.1	32.0 \pm 8.9
Cell line B	Batch 4	-4.36	2.82	1.54	84.58
	Batch 5	-4.62	3.17	1.45	84.24
	Batch 6	-11.18	9.79	1.39	89.61
	Average \pm SD	-6.7 \pm 3.9	5.3 \pm 3.9	1.5 \pm 0.1	86.1 \pm 3.0

Table 18. regular-SEC-MALS による分子量の算定

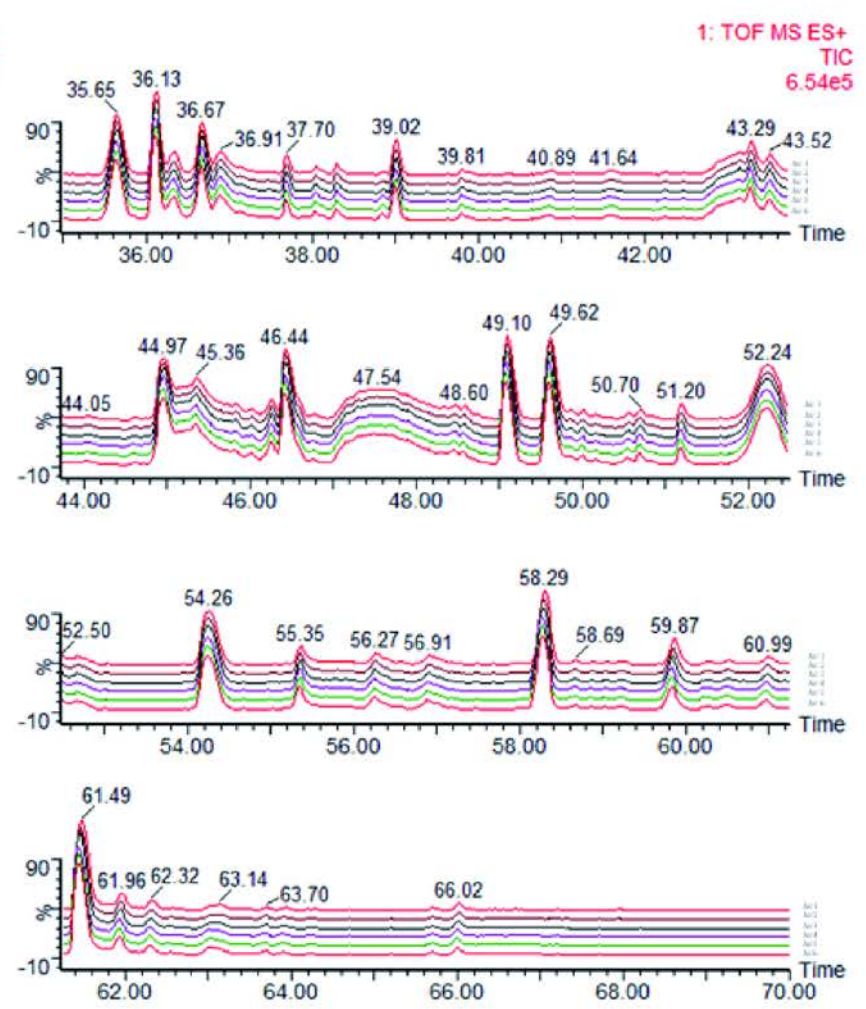
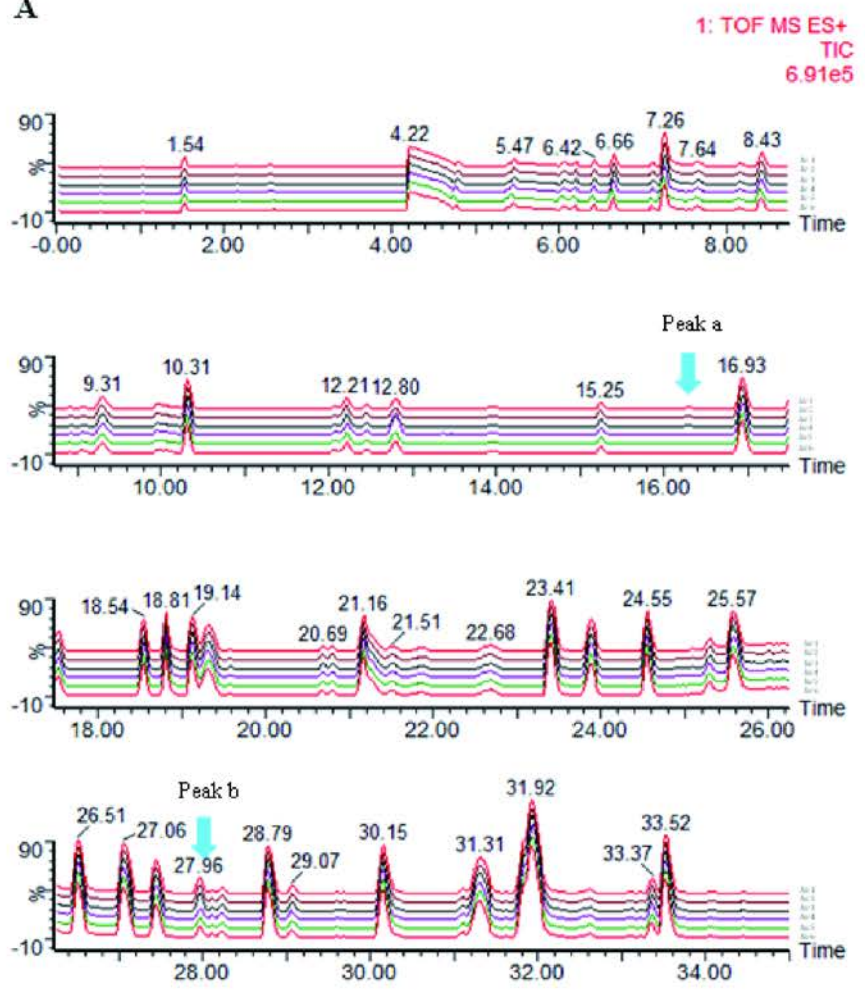
Cell line	Batch	Mw ($\times 10^5$)		
		monomer	dimer	tetramer
Cell line A	Batch 1	1.459	3.003	-
	Batch 2	1.467	3.179	-
	Batch 3	1.464	2.930	-
Cell line B	Batch 4	1.467	3.069	4.428
	Batch 5	1.465	2.742	4.566
	Batch 6	1.460	2.965	4.627

3.2.2. 抗体分子中の遊離のスルフヒドリル (SH) 基の定量

共有結合のタンパク質凝集体は、ジスルフィド結合、ジチロシン結合あるいはチオエーテル結合の形成に起因することが報告されている(11, 14, 60, 61). 細胞株 A の HMWS 中の共有結合性の画分が、細胞株 B に比べて非常に高いことから、2つの細胞株から得られたサンプル中の共有結合性の凝集体の割合の違いが、抗体分子当たりの遊離の SH 基の違いに起因するのかどうかを明らかにするために、変性条件下で抗体分子当たりの SH 基の数を調査した. サンプルグループ A の抗体当たりの遊離の SH 基の数 (0.47 ± 0.01 mol/mol) が、サンプルグループ B での SH 基の数 (0.51 ± 0.01 mol/mol) より有意に低かった ($P < 0.001$) ことから、共有結合性の凝集体形成に遊

離の SH 基は影響を与えていないと考えられた。そこで、ジチロシン残基やチオエーテル結合の有無を確認すべく、トリプシンおよび Lys-C を用いたペプチドマップを LC-MS を用いて行った (Figs. 40 および 41)。その結果, Peak a (未同定), b (LC 25Ala-42Lys, Fig. 42 参照), c (未同定), d (LC 46Leu-103Lys, Fig. 42 参照) などのピークで細胞株間の差を認めたが, それらのピークと凝集体との関連性を明らかにすることは出来なかった。

A



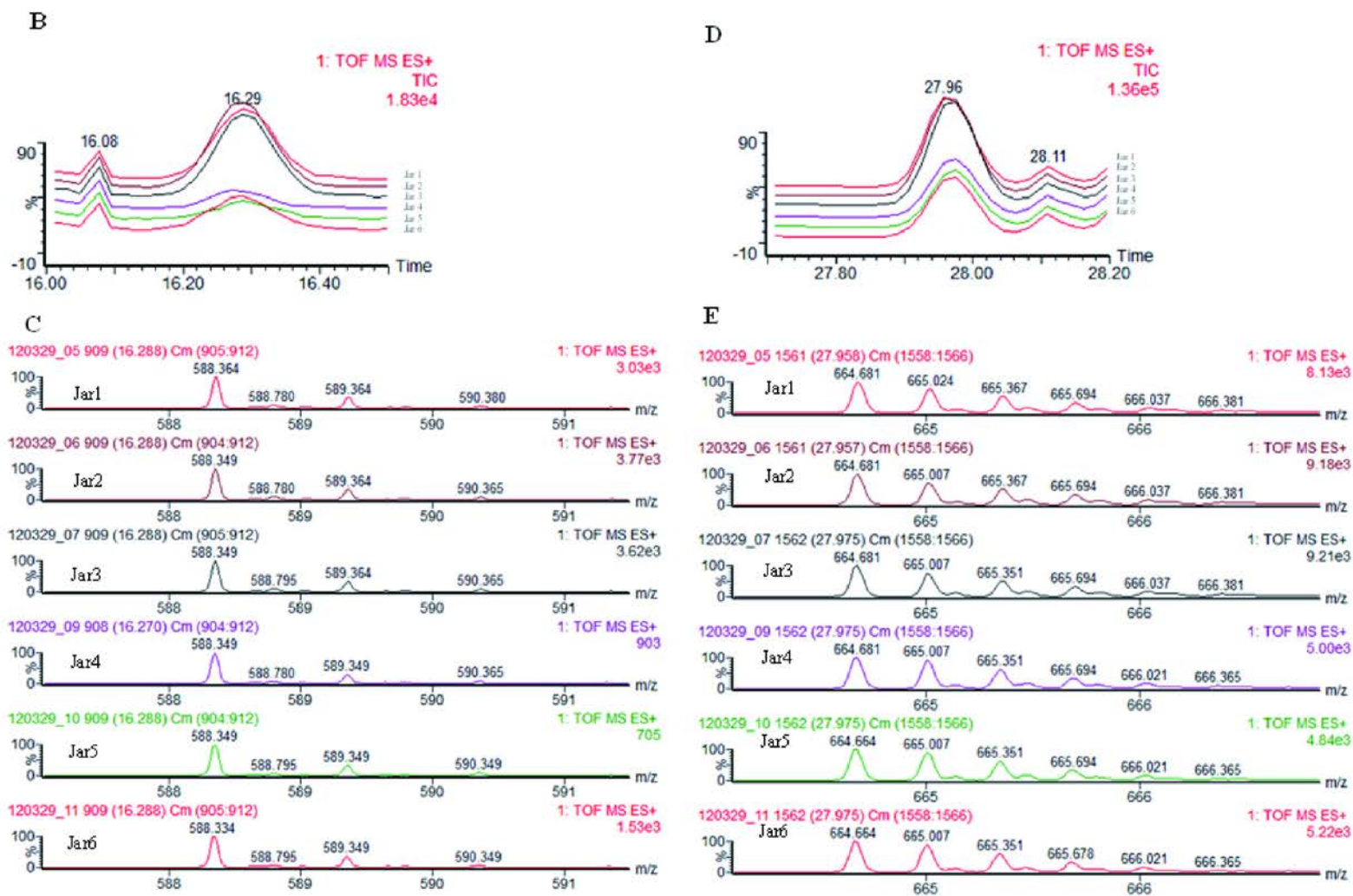
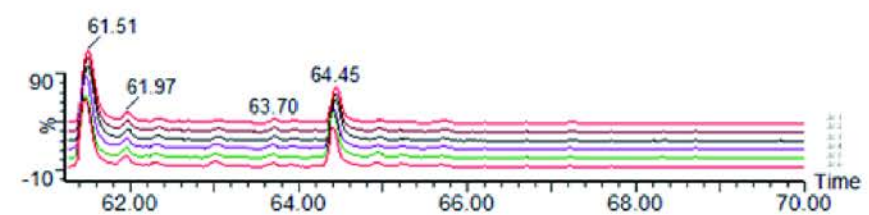
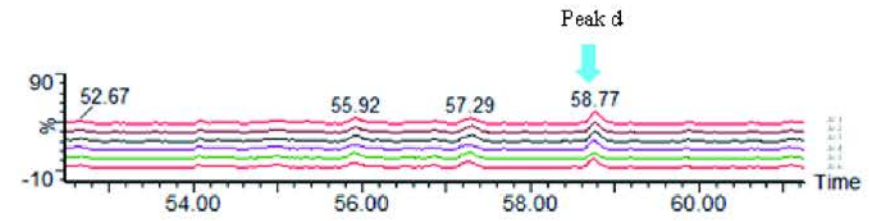
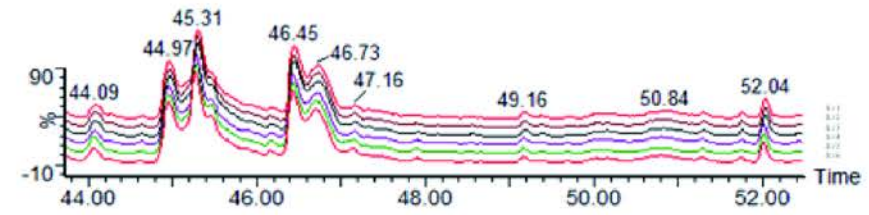
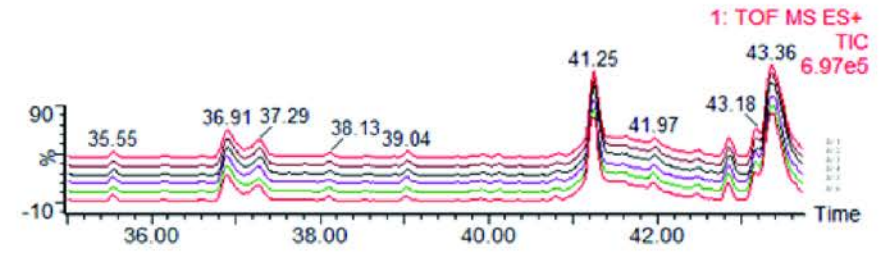
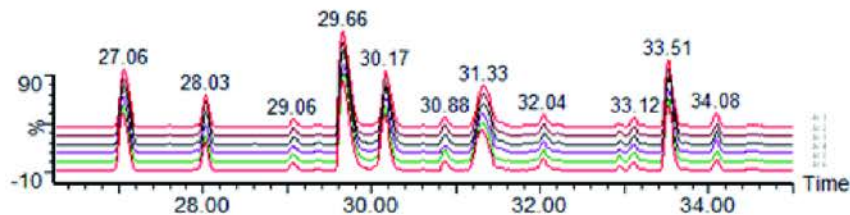
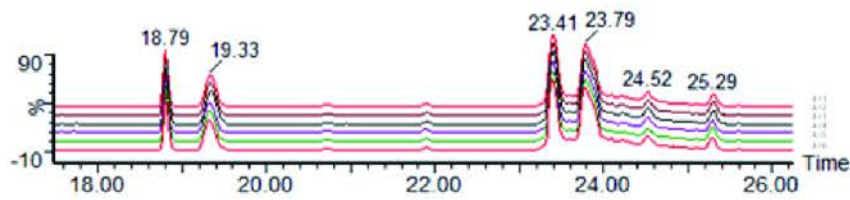
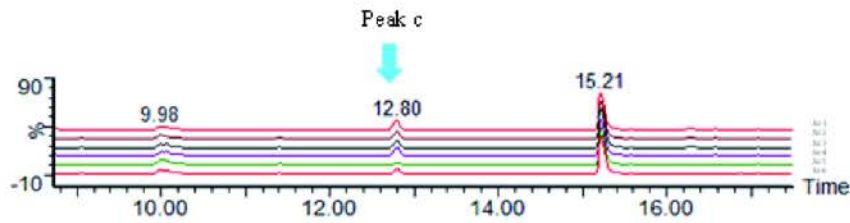
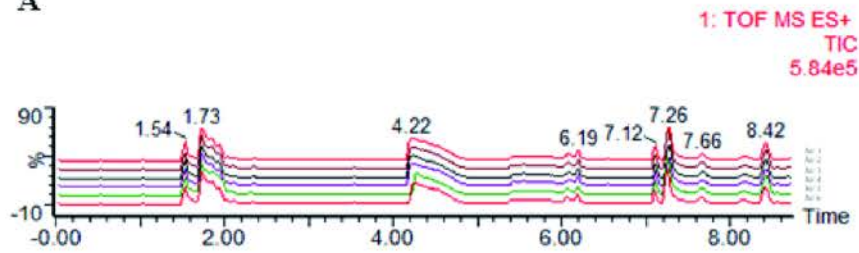


Fig. 40. トリプシンを用いたペプチドマップ
 (A) 全イオンクロマトグラム(Total ion chromatogram (TIC))
 (C) Peak a のマススペクトル
 (E) Peak b のマススペクトル

(B) Peak a の拡大 TIC
 (D) Peak b の拡大 TIC

A



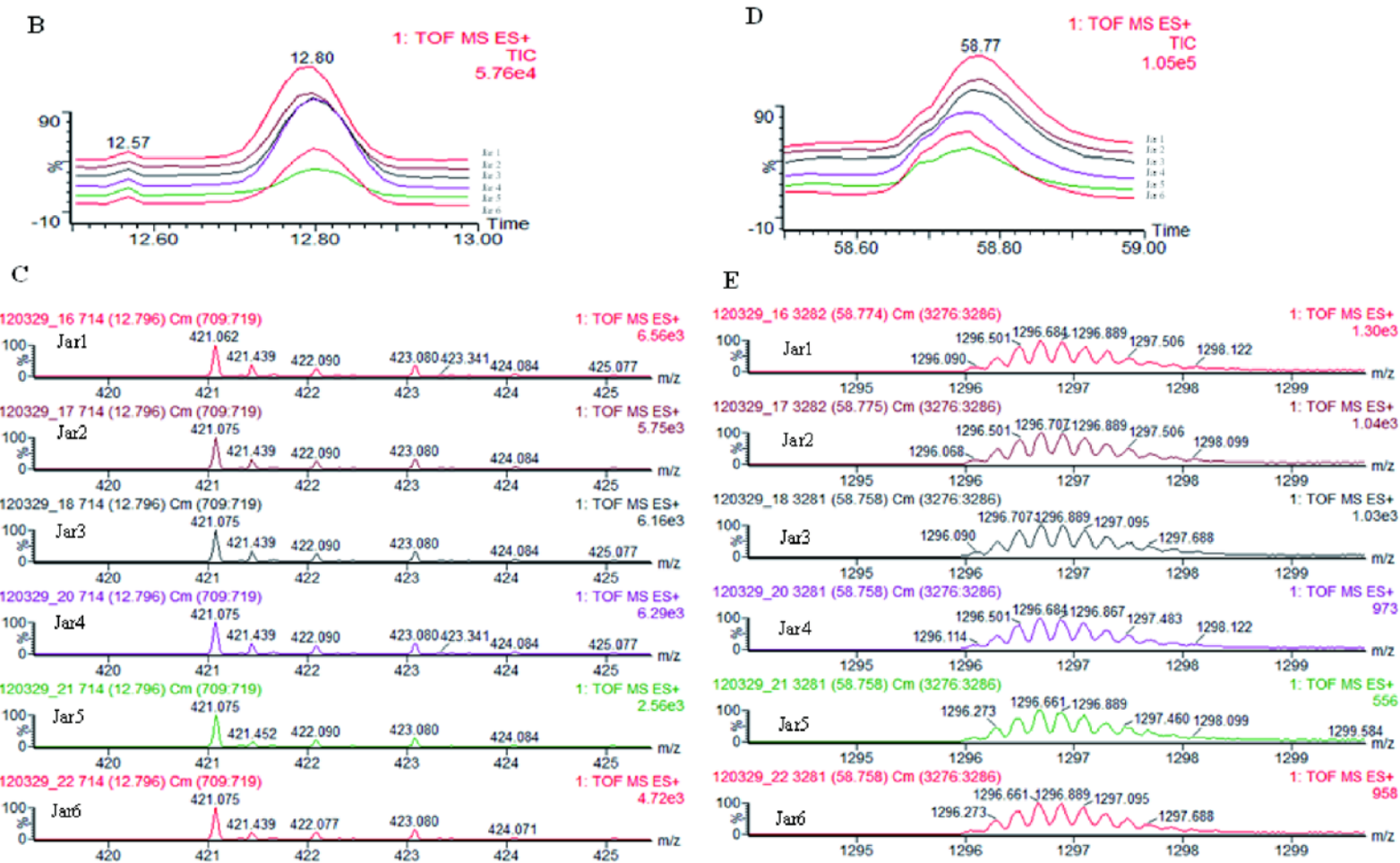


Fig. 41. Lys-C を用いたペプチドマップ
 (A) 全イオンクロマトグラム(Total ion chromatogram (TIC))
 (C) Peak c のマススペクトル
 (E) Peak d のマススペクトル

(B) Peak c の拡大 TIC
 (D) Peak d の拡大 TIC

A Heavy chain

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S
 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
 G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E W V A R
 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S
 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
 K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G
 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125
 G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G
 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K
 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175
 D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A
 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200
 V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P
 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275
 K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E
 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300
 V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K
 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350
 V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q
 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375
 V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F
 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400
 Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

B Light chain

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A
 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
 S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S
 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
 A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I
 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q
 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125
 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L
 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150
 K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V
 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175
 D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200
 S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214
 L S S P V T K S F N R G E C

Fig. 42. トラスツズマブのアミノ酸配列
 (A) 重鎖 (B) 軽鎖

3.2.3. 精製抗体, 細胞, 培養液中の LC および HC およびその関連物質

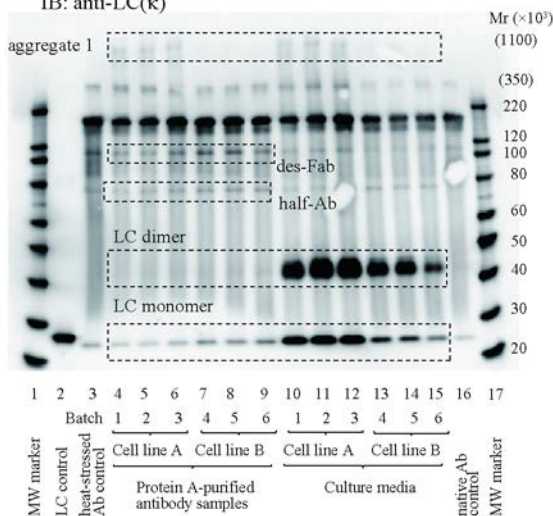
非共有結合のタンパク質の相互作用や凝集は, 正しく折りたたまれた天然構造からの逸脱, タンパク質分子の広い疎水性領域, タンパク質分子間の斥力の減少 (すなわち, 低いコロイド安定性) の様な因子に起因する(62). LC は ER での HC の正しいフォールディングに重要であり, 培養液中の遊離の LC 量が, 生産性(6, 45, 47, 63–65)に関係している. LC の生産性がモノクローナル抗体の品質 (凝集体含量) に関係することが報告されている(35, 66) が, これらの研究では, 生産性が意図的に低い条件で行われていた. これらの条件は治療用抗体が生される条件とは異なることから, 実際に細胞選抜が行われる条件下で品質に及ぼす LC の影響を解析することが重要であると考えた.

細胞内の LC の生産性が細胞株間で認められた凝集体形成の違いに影響を与えているのか, また同じ細胞株でのモノクローナル抗体生産の変動に影響しているかを明らかにするために, プロテイン A 精製した抗体サンプル, 培地, 細胞溶解物のウエスタンブロッティングを行った (Figs. 43A–H). 細胞融解物のウエスタンブロッティングは, 培養 4 日目 (抗体産生の少ない増殖期) および培養 12 日目 (常に抗体産生が高い定常期) のサンプルで行い, それぞれのバンドの強度は細胞株 A と B の間で比較を行った (Figs. 44A–E).

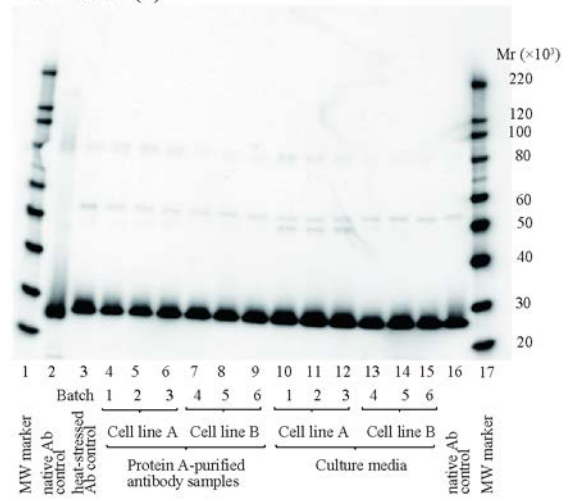
細胞株 B の細胞株 A との比較では, 細胞株 B によって培養液中に分泌された LC ダイマーおよびモノマーの量は細胞株 A よりも低く (Figs. 43A および 44B), 細胞株 B の細胞に残存する LC ダイマーおよびモノマーの量は細胞株 A よりも少ない (Figs. 43C および 44D) 傾向が認められた. 細胞株 B は細胞株 A より HC ダイマー (Figs. 43G および 44C) および HC モノマー (Figs. 43H および 44C) が多く蓄積しており, 細胞株 B で細胞株 A よりも LC の生産性が低いことと一致していた. 十分な量の LC が存在しない状況下で, ER において HC が生産されると, BiP が強固に結合しているために, LC とタイミング良く結合できない HC はフォールドされていない状態で ER 中に残存し, ER から分泌されることは無い(6, 45, 47). ER での HC の蓄積は, ER ストレスを引き起こすと考えられている. さらに, 本研究 (2.2.12 参照) において, すでに多重回帰分析により PDI と BiP の mRNA レベルが HMWS(%) と正の関係性があることが明らかとなっている. そのため, 2 つの細胞株間での品質および生産性 (抗体濃度) の違いは, LC の生産性の違いが原

因ではないかと考えられる。細胞株 B におけるバッチ間の差も、この解釈と一致した結果を示した。最も高い HMWS 含量 (Figs.35 および 36) と最も低い抗体濃度を示す (Table 16) バッチ 6 (細胞株 B) は、非還元条件下で培養液中 (Figs. 43A および 44B) および細胞融解物 (Figs. 43C および 44D) で LC ダイマーおよびモノマー量が最も少く。さらに、バッチ 6 は、すべてのバッチの中で、HC ダイマーの蓄積量が最も高かった (Figs. 43G および 44C)。

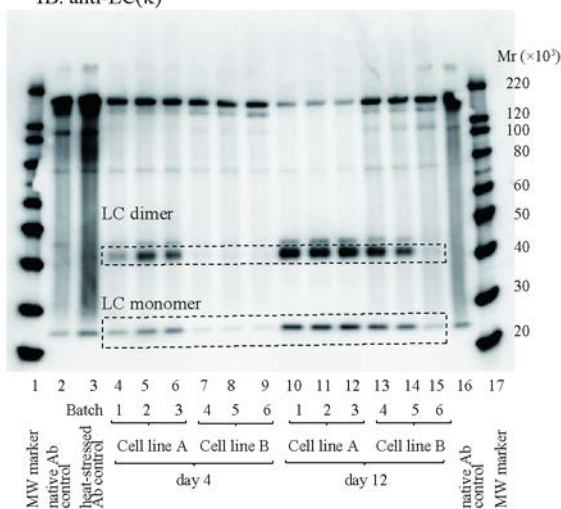
A Purified Ab and Culture media; Non-reducing conditions;
IB: anti-LC(κ)



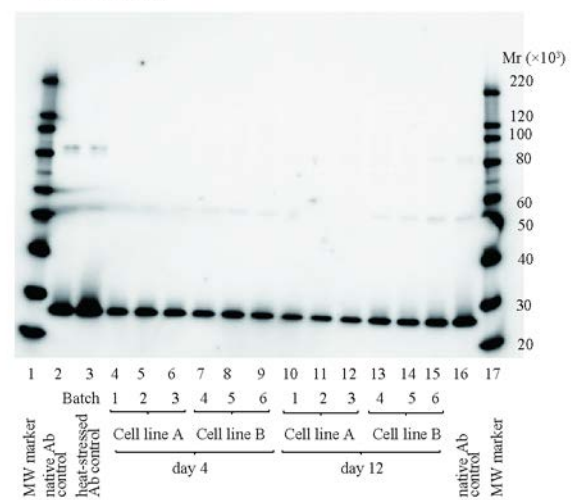
B Purified Ab and Culture media; Reducing conditions;
IB: anti-LC(κ)



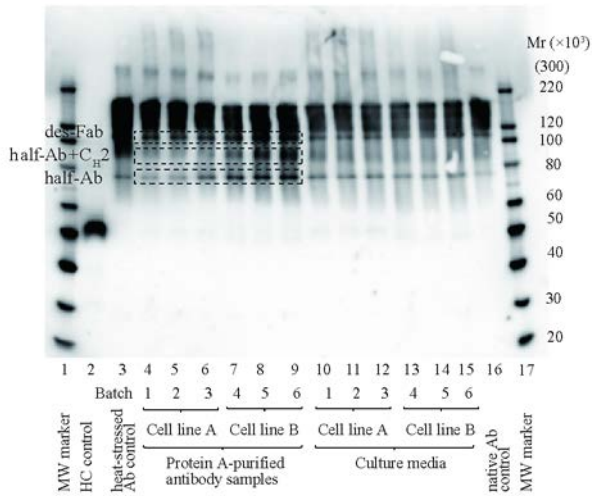
C Cell lysate; Non-reducing conditions;
IB: anti-LC(κ)



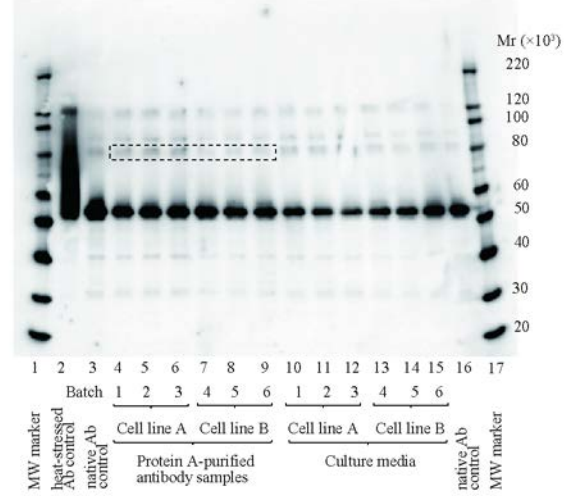
D Cell lysate; Reducing conditions;
IB: anti-LC(κ)



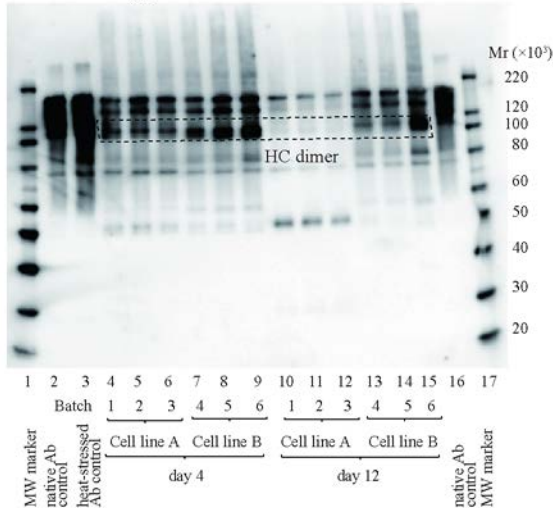
E Purified Ab and Culture media; Non-reducing conditions;
IB: anti-HC(γ)



F Purified Ab and Culture media; Reducing conditions;
IB: anti-HC(γ)



G Cell lysate; Non-reducing conditions;
IB: anti-HC(γ)



H Cell lysate; Reducing conditions;
IB: anti-HC(γ)

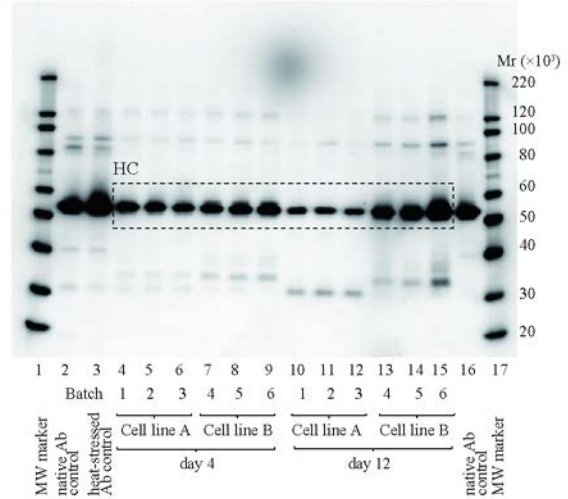


Fig. 43. プロテイン A 精製抗体サンプル, 培地, 細胞融解物のウエスタンブロッティング

- (A) 精製抗体サンプル及び培地を非還元下で分離し, 抗ヒトカッパー-LC 抗体で検出
- (B) 精製抗体サンプル及び培地を還元条件下で分離し, 抗ヒトカッパー-LC 抗体で検出
- (C) 培養 4 日目及び 12 日目の細胞融解物を非還元条件下で分離し, 抗ヒトカッパー-LC 抗体で検出
- (D) 培養 4 日目及び 12 日目の細胞融解物を還元下で分離し, 抗ヒトカッパー-LC 抗体で検出
- (E) 精製抗体サンプル及び培地を非還元下で分離し, 抗ヒトガンマー鎖 (HC) 抗体で検出
- (F) 精製抗体サンプル及び培地を還元条件下で分離し, 抗ヒトガンマー鎖 (HC) 抗体で検出
- (G) 培養 4 日目及び 12 日目の細胞融解物を非還元条件下で分離し, 抗ヒトガンマー鎖 (HC) 抗体で検出
- (H) 培養 4 日目及び 12 日目の細胞融解物を還元下で分離し, 抗ヒトガンマー鎖 (HC) 抗体で検出

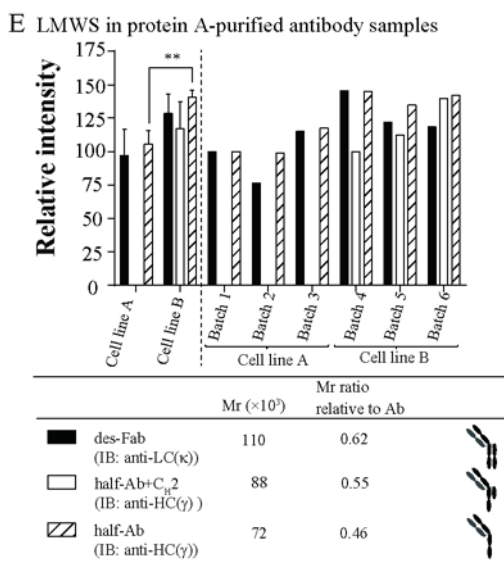
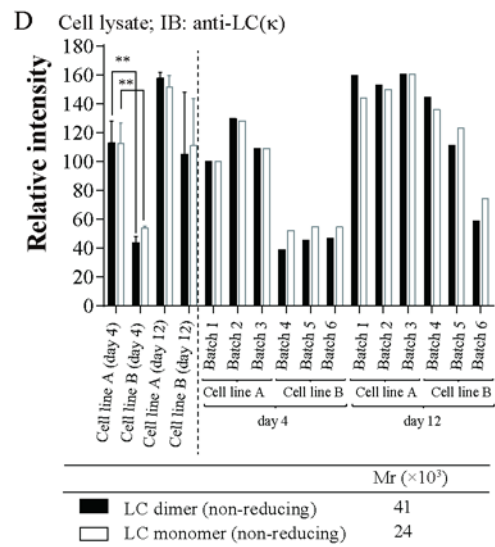
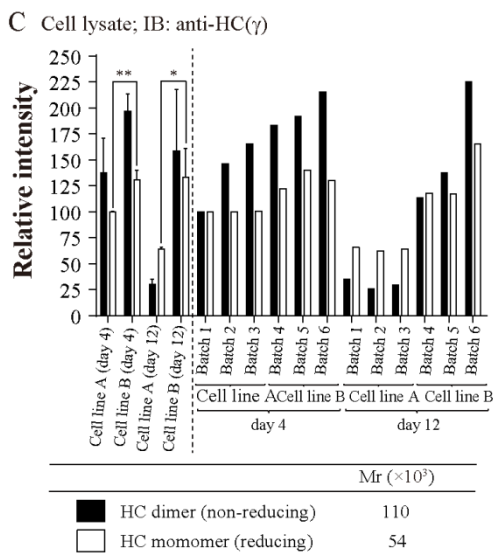
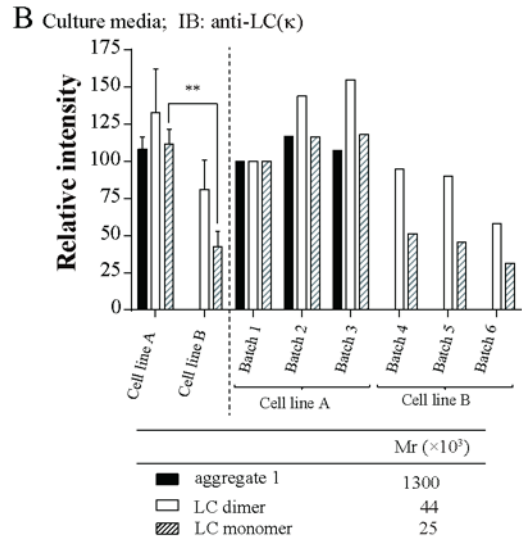
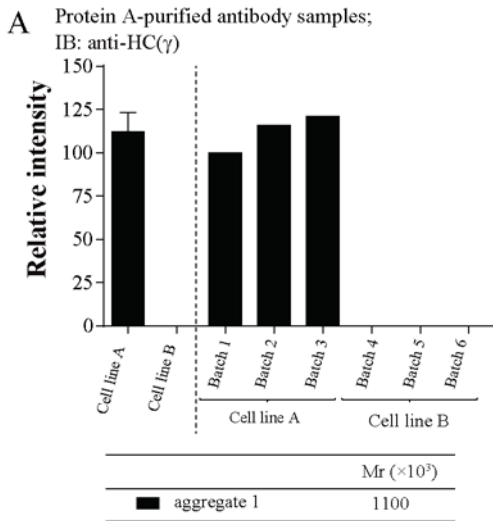


Fig. 44. 細胞株 A 及び B のサンプルのウェスタンブロッティングにより認められた種々のバンドの相対強度

- (A) プロテイン A 精製した抗体サンプル中の aggregate 1
それぞれのバンドの強度は、バッチ 1 のバンドの相対強度比として示した。
- (B) 培地中の aggregate 1, LC ダイマー, LC モノマー
それぞれのバンドの強度は、バッチ 1 のバンドの相対強度比として示した。
- (C) 細胞融解物中の HC ダイマー, HC モノマー
それぞれのバンドの強度は、バッチ 1 のバンドの相対強度比として示した。
- (D) 細胞融解物中の LC ダイマー, LC モノマー
それぞれのバンドの強度は、バッチ 1 のバンドの相対強度比として示した。
- (E) プロテイン A 精製した抗体サンプル中の LMWS des-Fab 及び half-Ab のバンドの強度は、バッチ 1 のバンドの相対強度比として、half-Ab+C₁₂ のバンドの強度は、バッチ 3 のバンドの相対強度比として示した。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

HS-SECによる培地の分析 (Figs. 45–47) でも、バッチ6のHMWS(%)は同じ細胞株B他のバッチに比べて有意 ($P < 0.001$) に高く (Figs. 45 および 46), バッチ6のLMWS(%)は同じ細胞株Bの他のバッチに比べて有意 ($P < 0.001$) に低い (Figs. 45 および 47) ことが明らかとなった。また、2つの細胞間において、HMWS(%)は細胞株Bでのばらつきのため有意な差は認められなかったが、細胞株Bで細胞株Aに比べて高い傾向が認められ、LMWS(%)は、細胞株Bで細胞株Aに比べて有意 ($P < 0.001$) に低かった。これらの結果は、先のウエスタンブロッティングの結果を裏付けるものであった。

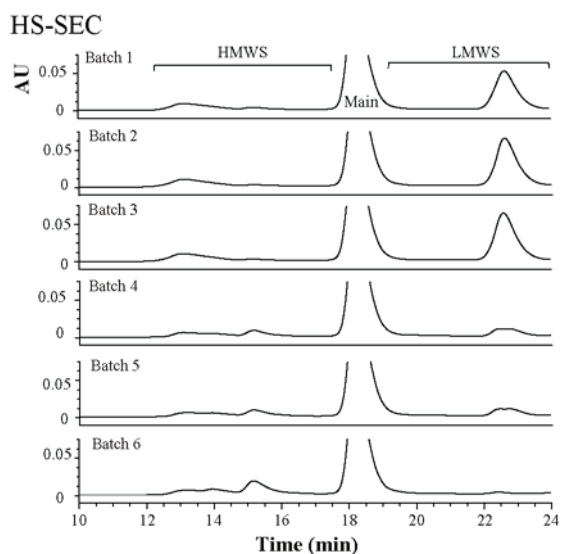


Fig. 45. 培地の HS-SEC のクロマトグラム
AU, absorbance unit

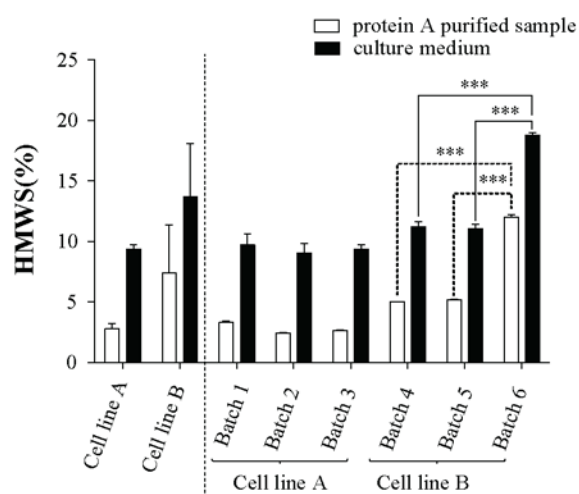


Fig. 46. HS-SECにより算定された HMWS(%)
*** $P < 0.001$.

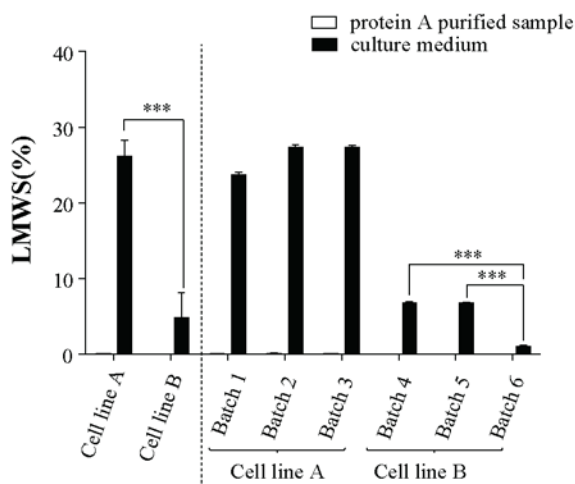


Fig. 47. HS-SECにより算定された LMWS(%)
*** $P < 0.001$.

まとめると、細胞株 B の低い抗体濃度と高い凝集体含量は、細胞内での LC の生産速度に起因しており、培養液中にミスフォールドされた抗体分子が一部分泌されることで、凝集体形成が誘導されることを、得られた結果は示唆している。培養 4 日目に細胞株 B において HC ダイマーの蓄積が高いレベルを示し (Figs. 43G および 44C), 先の検討で増殖期に細胞 B の BiP の mRNA (培養 5 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.058$; 7 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.166$; 10 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.068$; 12 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.055$; 14 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.081$) が、いずれのサンプリングポイントでも細胞株 A (培養 5 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.034$; 7 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.022$; 10 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.027$; 14 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.054$) よりも高く、そして細胞 B の PDI の mRNA レベル (培養 5 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.006$; 7 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.027$; 10 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.012$; 12 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.006$; 14 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.009$) が増殖の比較的初期 (培養 5, 7, 10 日目) で細胞 A (培養 5 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.006$; 7 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.006$; 10 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.006$; 12 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.008$; 14 日目, $2^{-\Delta Ct} = 0.010$) よりも高いか同等であることが明らかとなっている。このため、細胞株 B は細胞培養の早い段階で ER ストレスを誘導しており、この ER ストレスが、さらに細胞株 B での増殖を抑制していると推定される。細胞株 B の 3 つのバッチ間においても、抗体濃度および細胞増殖の明らかな変動が認められており (Figs. 48 および 49), この結果もこの推定を支持するものであった。

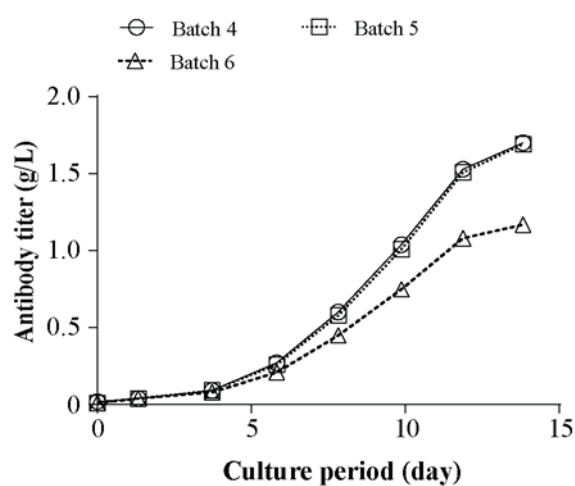
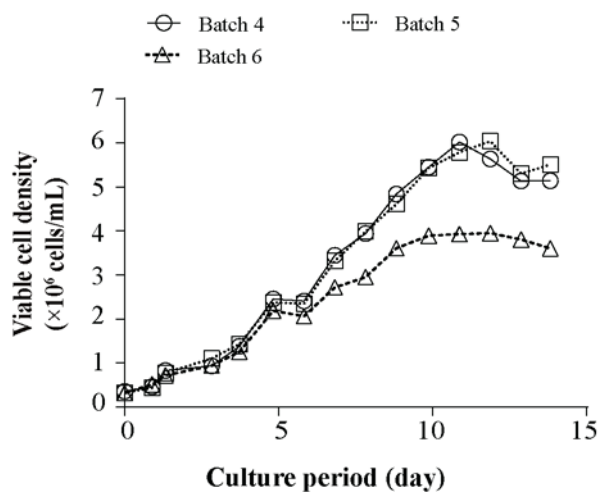


Fig. 48. 細胞株 B の 3 つのバッチ間での生細胞数の比較 Fig. 49. 細胞株 B の 3 つのバッチ間での抗体濃度の比較

先に、本研究においてプロテイン A で精製した抗体サンプル中に des-Fab ($M_r 1.1 \times 10^5$) の存在を示唆したが、des-Fab に相当するバンドは Fig. 43A (anti-kappa) と Fig. 43E (anti-gamma)

で認められた。Fig.43Eには、 M_r が 7.2×10^4 と 8.8×10^4 のバンドも認められ、その強度は細胞株 A より細胞株 B で高かった。それらの M_r 値から、これらの2つのバンドが half-antibody (1つの HC と1つの LC からなる) と C_{H2} ドメインと共有結合した half-antibody (本報告では half-antibody + C_{H2} と呼ぶ) に相当するものであることを示唆している。また、half-antibody も Fig.43A において、細胞株 A より細胞株 B で高い強度で認められている。これらの検出された分解物を Fig.44E に示した。抗体分内の2つの HC は、ヒンジドメインでのジスルフィド結合に加えて、 C_{H3} ドメインにおいて疎水的および電荷相互作用により会合していることから(67-70)、half-antibody と half-antibody + C_{H2} における C_{H3} ドメインの露出は、他の抗体分子種との会合を高め、凝集体の核の役割をしていると考えられる。Asn-Xaa (Xaa, アミノ酸) のペプチド結合は非酵素的開裂を受けやすいことが知られており(71)、half-antibody + C_{H2} (M_r 8.8×10^4 で認められる) は、 C_{H2} および C_{H3} ドメインに存在する Asn328-Lys329 (計算された分子量 8.7×10^4 の断片を生じる) あるいは Asn364-Lys365 (計算された分子量 9.1×10^4 の断片を生じる) の開裂により生じていると推定された (Fig. 42)。抗体において Asn274-Pro275 部分の開裂と開裂により生じた生成物の凝集が報告されている(71)。しかし、抗体中に存在する Asn274-Pro275 部分の開裂は、 C_{H2} ドメインのドメイン内にジスルフィド結合が存在することから、非還元状態下では断片を生じることは無い。

抗体凝集体の特性 (3.2.1) の検討において、LDS-SEC によって共有結合性の凝集体は細胞株 B より細胞株 A で高いことが明らかとなっている。この知見は、ウエスタンブロッティングでも次の様に確認された。(i) 非還元条件下で、細胞株 A 由来のプロテイン A 精製サンプルには、細胞株 B 由来のものには無い、 1.1×10^6 と外挿された M_r の高分子量のバンドが認められた (Fig.42A)。(ii) 還元条件下の SDS-PAGE で、細胞株 A 由来のプロテイン A 精製サンプルでは、細胞株 B 由来のものには無い、 M_r がおよそ 8.1×10^4 の高い強度のバンドが認められ (Fig.42F)、ジスルフィド結合による結合ではない共有結合の存在が示された。

3.2.4. 抗体のチャージバリエーション分析

分子の自己会合は、分子間の静電反発力の影響を受けるとされており(72)、抗体分子内には多くの異なったチャージバリエーションが存在する(73)。細胞株 B での高い HMWS 含量が、細胞から分泌された抗体分子間の静電反発力の弱さに起因しているのかどうかを確かめるために、2つの

細胞から分泌された精製抗体を用いて、CEX クロマトグラフィーによる電荷の違い、リジンの糖化（グリケーション）、シアル酸含量の比較を行った。トラスツズマブの等電点（isoelectric point; pI）は9.2であり(74)、CEX クロマトグラフィーの開始時の移動相組成（10 mM リン酸二水素ナトリウムおよび60 mM 塩化ナトリウム）では陽イオン体として存在し、CEX クロマトグラフィーの中央のピーク（約25.8分；Fig.50）より前に溶出するタンパク質は陽イオンの電荷が少なく、おそらく抗体分子間の静電反発力は弱くなることが示唆される。細胞株Bのサンプルの前ピークの相対的面積（%）は、細胞株Aのサンプルの前ピークよりも有意に（ $P < 0.001$ ）小さかったことから（Fig.51）、CEX クロマトグラフィーにより分離されるチャージバリエーション（サンプルの前ピーク）は細胞株Bの高い凝集体含量の原因ではないと考えられる。また、カルボキシペプチダーゼBを用いC末端リジンを切断したサンプルの評価も行ったが、未処理のサンプルと同様な結果であった（Fig.52, 53）。

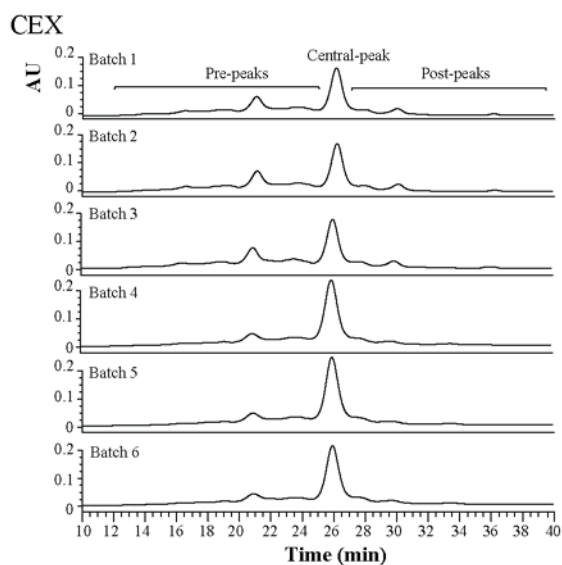


Fig. 50. CEX のクロマトグラム
AU, absorbance unit

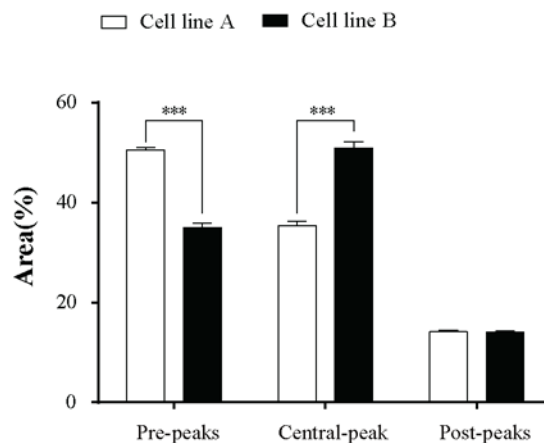


Fig. 51. CEX により算定されたそれぞれのピークグループの面積（%）
値は3つのバッチの平均 ± 標準偏差を示した。
*** $P < 0.001$.

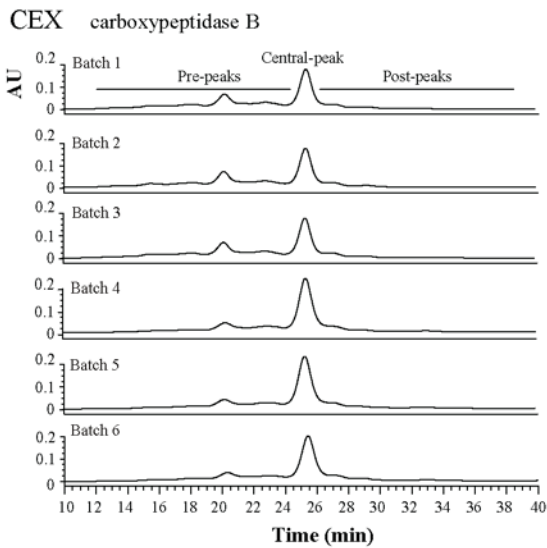


Fig. 52. カルボキシペプチダーゼ B で処理した抗体サンプルの CEX のクロマトグラム
AU, absorbance unit

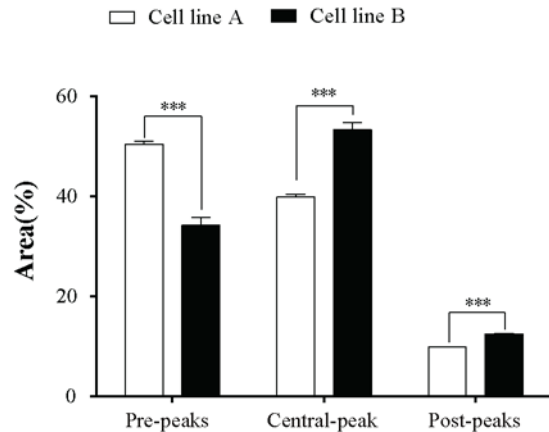


Fig. 53. カルボキシペプチダーゼ B で処理した抗体サンプルにおいて CEX により算定されたそれぞれのピークグループの面積 (%)
値は 3 つのバッチの平均 ± 標準偏差を示した.
*** $P < 0.001$.

リジンのグリケーションも酸性 (すなわち陽イオンが少ない) チャージバリエーションの増加をもたらす(20, 21)ことが知られている. そこで, サンプル中のグリケーションの程度の違いを明らかにするために, PNGase 処理 (N-型糖鎖を除去) を行ったサンプルを LC-MS を用いて分析した. 哺乳動物細胞由来の細胞で調製したモノクローナル抗体において, HC の C 末端のリジン残基は, 部分的あるいは完全に除去されることが報告されている(75). 分析を行ったサンプル中のトラスツズマブのリジン残基は細胞株間で顕著な差は無く, 抗体分子の大部分で失われていることが明らかとなった. HC の C 末端のリジン残基を持たない抗体分子において, グリケーションの明らかな違いは 2 つの細胞株由来のサンプル間で認められなかった (Fig. 54).

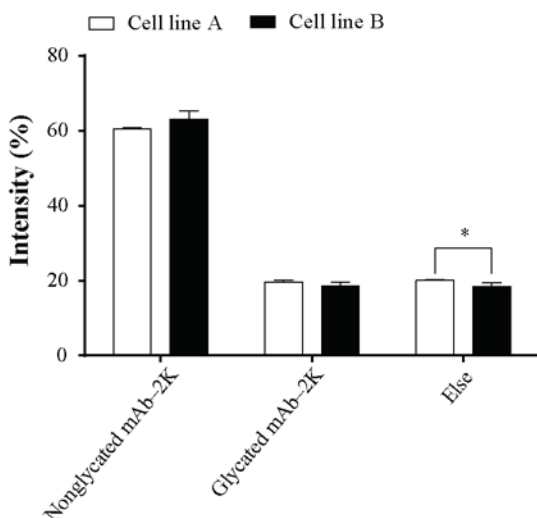


Fig. 54. 非グリコシル化及びグリコシル化抗体の強度比較
Ab-2K, HC の末端リジン残基を欠損
値は 3 つのバッチの平均 ± 標準偏差
* $P < 0.05$.

シアリル化されたオリゴ糖の増加も、酸性チャージバリエーションの増加を生じ、抗体分子間の静電反発力を弱める可能性がある。そこで、LC-MS を用いて抗体への糖鎖の結合状態の確認をおこなった (Fig. 55) ところ、非フコシル化に差が認められたが、抗体の電荷に影響を及ぼすような糖鎖付加の違いを検出することはできなかった。そこで、MALDI-TOF MS により抗体分子の N-結合型オリゴ糖の評価をおこなった。検出されたシアル酸を含むオリゴ糖は、SG1F1 および SG2F1 であった (Fig.56)。SG1F1 含量は、サンプルグループ A よりもサンプルグループ B で有意に低かった (Fig.56)。含有量の差で抗体分子間の荷電斥力に差を生じると考えた場合、細胞株 B からの抗体分子間での荷電斥力は、細胞株 A のものよりも強いことを示唆している。従って、SG1F1 含量は細胞株 B の高い凝集体含量の原因ではないと考えられた。SG2F1 含量に関しては、2つの細胞株のサンプル間で有意な差は認められなかった。

上記のような異なった種々の手法を用いて評価を行ったところ、抗体分子のチャージバリエーションの違いは、細胞株 B の抗体中の高い凝集体含有量の原因では無いことが明らかとなった。

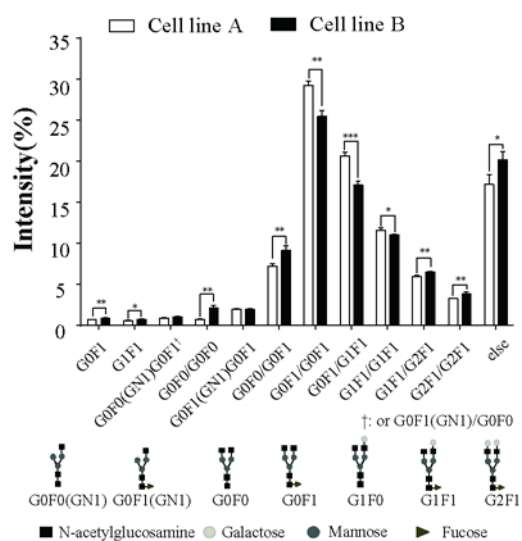


Fig. 55. 抗体に結合した2つのオリゴ糖組成値は3つのバッチの平均 ± 標準
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

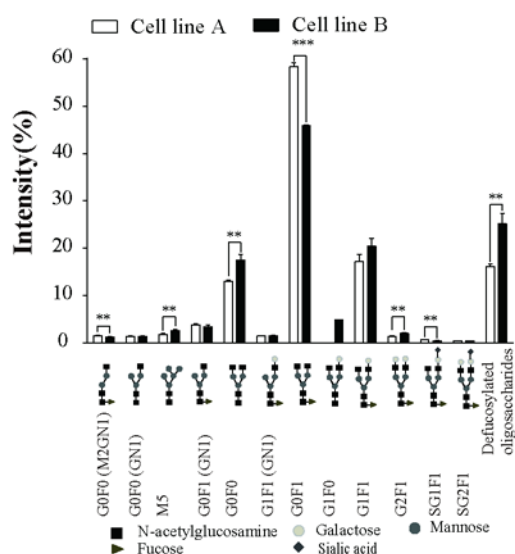


Fig. 56. MALDI-TOF MS による N-型糖鎖の組成値は3つのバッチの平均 ± 標準
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.2.5. 抗体分子の疎水性表面の評価

プロテイン A 精製した抗体分子の疎水性表面 (自己会合する可能性のある部位) は、疎水性プローブの ANS (76) を用いて蛍光定量的に分析した。疎水性表面の領域を反映する蛍光強度は、

ANS と抗体の比にかかわらず，細胞株 A 由来のサンプルに比べて，細胞株 B 由来のサンプルにおいて有意に低かった (Fig.57)．この測定結果は，細胞株 B 由来のサンプルにおいて疎水性の高い表面が自己会合により遮られていることを示唆している．この解釈は，細胞株 B の HMWS が LDS の存在下で解離する結果 (Table 17) と一致していた．

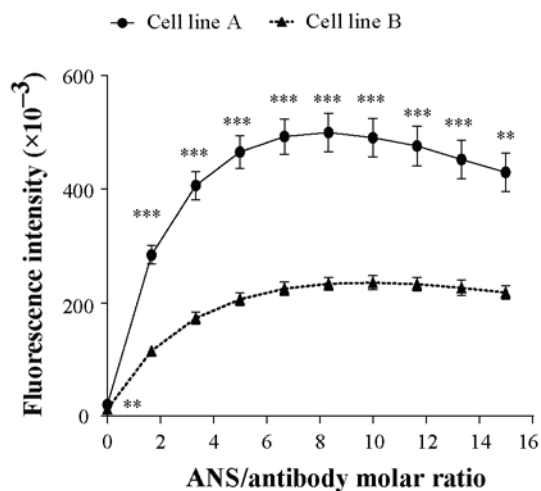


Fig. 57. ANS を用いた蛍光滴定による精製抗体分子表面の疎水性表面の分析
 値は3つのバッチの平均±標準
 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.3 小括

対照的な細胞株 A (高い生産性，低い凝集体含量) および細胞株 B (低い生産性，高い凝集体含量) の細胞，それらの細胞によって生産された抗体分子 (モノマー)，そして凝集体の主要な性質の比較を行った．その結果，種々の差 (増殖能，非共有結合性の凝集体含量，遊離の SH 基の含量，細胞内および培養液中 LC 含量，細胞内 HC および HC ダイマーの蓄積，チャージバリアントのレベル，疎水性表面の領域の状態，非フコシル化の割合等) が存在することが明らかとなった．

細胞株 B での高い凝集体含量と低い抗体濃度は，LC の生産性の低さ，続く HC ダイマーおよびモノマーの蓄積が原因であった．本結果は，先の 2.1 章の結果 (小胞体ストレス誘導との関連) を裏付けるものであった．また，凝集体形成の主要なメカニズムも 2 つの細胞株間で異なっていた．細胞株 A 由来の凝集体は，主に共有結合性の相互作用により形成されているが，細胞株 B 由来の凝集体は，主に疎水性の相互作用により形成されていることが明らかとなった．そして，非共有結合性の凝集体は，全長のモノマー抗体と抗体断片のような LMWS を含むことを見いだし

た. 本研究において, プロテイン A で精製したサンプル中に **half-antibody**+C_{H2} が存在していることが示唆され, その予想される物性から, 凝集体の核として働いている可能性が示唆された.

得られた結果および先の報告(6, 36, 37)から, モノクローナル抗体における凝集体形成機構を Fig.58 に示した. 得られた知見は, 大規模生産に適した細胞株選抜, 品質の改善に有用であると考えられる.

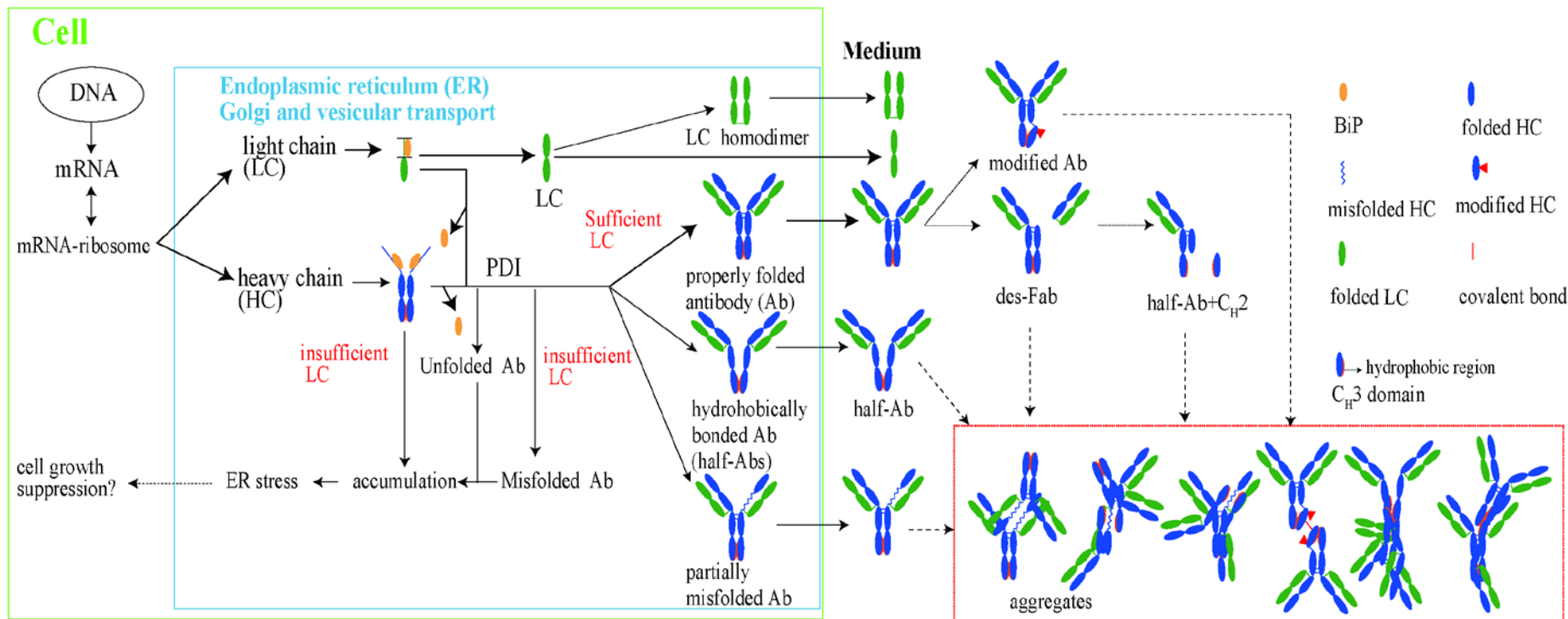


Fig. 58. モノクローナル抗体における凝集体形成機構
 BiP, heavy chain-binding protein; PDI, protein disulfide isomerase

4. 生産性および品質に影響を与える細胞代謝状態の検討

抗体の生産性や品質は、抗体発現に使用する細胞株の性質に大きく依存することが知られている。すでに本研究では、2つの対照的な細胞株（高い生産性と低い凝集体含量の細胞株 A と低い生産性と高い凝集体含量の細胞株 B）を用いて、細胞およびそれらの細胞株から産生された抗体の特性比較を行ない、種々な差（増殖能、非共有結合性の凝集体含量、遊離の SH 基含量、細胞内および培養液中 LC 含量、細胞内 HC および HC ダイマの蓄積、チャージバリエーションのレベル、疎水性表面の領域の状態、非フコシル化の割合等）の存在を明らかにした（3.2 参照）。それらの違いの中から、細胞増殖能（細胞株 A > 細胞株 B）、非フコシル化されたオリゴ糖の割合（細胞株 A < 細胞株 B）、有結合性の凝集体の割合（細胞株 A > 細胞株 B）に注目し、これらの違いに細胞の代謝状態が関与しているか検討を行った。

先の検討（3.2.1 参照）において、2つの細胞間での生産性（抗体濃度）の違いは、主に総細胞数の違い、すなわち増殖能の違いに起因することが明らかとなっている。乳酸が生成から消費に切り替わる乳酸代謝シフトが、細胞の増殖能や抗体生産性に寄与していることが報告されている（42, 44）ことから、まずはじめに乳酸代謝シフトが、高い増殖能と生産性に影響を与えているのかどうか検討を行った。次に、非フコシル化されたオリゴ糖の割合の違いは、モノクローナル抗体の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性と関係することから（22, 23）、細胞内の代謝状態が関与していないか検討を行った。細胞株 B では細胞株 A に比べて凝集体含量は高いにも関わらず、共有結合性の凝集体の割合は細胞株 A の方が高いことが明らかとなっている。この差が遊離の SH 基によるものではないことが明らかとなっていることから（3.2.2 参照）、この違いが細胞の代謝状態、特に酸化還元状態と関係していないか検討を行った。

4.1. 方法

・細胞培養

本検討では、2.2.1 で行った培養時に取得したサンプルを用いて検討を行った。細胞培養工程のモニタリングのための分析はサンプリングを行った日に実施した。生細胞数は Vi-Cell XR（Beckman）を用いて、グルタミン、乳酸、アンモニアの測定は Bioprofile 400（Nova Biomedical）を用いて測定を行った。細胞は培養 4 日および 12 日目に採取し、遠心分離によりリン酸緩衝生

理食塩水で2回洗浄し、メタボローム解析のためのサンプルとして、 -80°C で保存した。培養液中の抗体濃度の測定結果は、2.2.1を実施する際に取得した値を用いた。

・抗体の精製

2.2.1で行った精製サンプルを用いた。

・メタボローム解析

・メタボローム解析のためのサンプル調製

2つの異なった分離方法を用いた HPLC (逆相クロマトグラフィーおよび親水性相互作用クロマトグラフィー) で分析を行うために、細胞から代謝物を抽出した。 -80°C で保存しておいた 1.0×10^7 の細胞に、 -20°C で保存しておいた $992 \mu\text{L}$ の 50% (v/v) メタノール水溶液、 $4 \mu\text{L}$ の 2.5 mM methylsuccinic acid、 $4 \mu\text{L}$ の 2.5 mM L-methionine sulfone を加え、攪拌後、細胞を破壊するために -80°C で凍結・融解を行った。この溶液に $250 \mu\text{L}$ のクロロホルムを溶液に加え、激しく攪拌後、 $2280 \times g$ で 15 分間遠心分離を行い、水相を新たなチューブに移した。得られた水相を $6000 \times g$ で 15 分間遠心を行った後、上清を精製水で洗浄した Amicon Ultra 10K (Millipore) に移し、 $14000 \times g$ で 15 分間遠心を行った。溶液を凍結乾燥し、分析まで -80°C で保存した。

・逆相クロマトグラフィーを用いた LC-MS による代謝物分析

トリカルボン酸 (TCA) サイクル中間体、リボキシリボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、抗酸化関連物質の様な主要の代謝物を算定するために、逆相クロマトグラフィー (RP-LC) を用いた LC-MS を行った。分離は、Sunniest RP-AQUA column ($2.0 \text{ mm i.d.} \times 15.0 \text{ cm}$, $3 \mu\text{m}$ particle size; ChromaNik) を装着した AQUITY UPLC (Waters) を用い、カラム温度 37°C 、流速 0.2 mL/min で行った。分析用サンプルは、凍結乾燥したサンプルを $100 \mu\text{L}$ 精製水で再溶解したものを用いた。カラムを 100% 移動相 A (10 mM ギ酸アンモニウム水溶液) で平衡化し、サンプル注入後、25 分間で移動相 B (移動相 A:アセトニトリル; 70:30, v/v) を 0%から 42%まで直線的に増加させる条件で分析を行った。質量分析 (MS 分析) は、Xevo TQ MS (Waters) を用いて、エレクトロスプレー・イオン化 (ESI)、ネガティブモード、 2.7 KV のキャピラリー電圧、 800 L/h の乾燥ガス流量、 350°C の気化温度、 50 L/h のコーンガス流量、 120°C のイオン源温度の条件で行った。RP-LC で分析を行った対象物質の測定時のコーン電圧は Table 19 に記

載した。標準溶液は、それぞれの代謝物から調製し、succinic acid と L-methionine sulfone をサンプルと最終濃度が同じになる様に添加した。代謝物の細胞内濃度は、検量線から算定を行った。

Table 19. RP-HPLC-MS cone voltage

Compound	Cone voltage (V)	Compound	Cone voltage (V)
Citrate	20	Malate	25
Succinate	25	Fumarate	15
Pyruvate	15	Isocitrate	20
Lactate	15	AMP	40
ADP	40	ATP	40
NADH	40	NAD ⁺	20
NADPH	40	NADP ⁺	25
GSH	30	Ophthalmic Acid	35
UDP-Gal	40	CMP-NANA	25
UDP-GlcNAc	40	GDP-Fuc	40
D-Erythrose 4-phosphate	40	Fructose 1,6-bis-phosphate	30
3-Posphoglycerate	40	Phosphoenolpyruvate	30
L-Asparagine	20	L-Arginine	40
L-Histidine	30		

・親水性相互作用クロマトグラフィーを用いた LC-MS による代謝物分析

アミノ酸や単糖の様な主要の代謝物濃度を算定するために、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC-LC) を用いた LC-MS を行った。分離は、ZIC-HILIC column (2.0 mm i.d. × 15.0 cm, Merck, Darmstadt, Germany) を装着した AQUITY UPLC (Waters) を用い、カラム温度 37 °C, 流速 0.1 mL/min で行った。分析用サンプルは、凍結乾燥したサンプルを 100 μL 精製水で再溶解し、その溶液を 200 μM の methyl succinic acid と 200 μM の L-methionine sulfone を含んだ 100 μL のアセトニトリル : 水精製水 (50:50, v/v) で 2 倍希釈したものを用いた。カラムは、83% 移動相 A (アセトニトリル) と 17% 移動相 B (5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 pH 6.8) で平衡化し、サンプル注入後、移動相 B の 25 分間での 17% から 45% まで直線的に増加させる条件で分析を行った。MS 分析は Xevo TQ MS (Waters) を用いて、エレクトロスプレー・イオン化 (ESI) ネガティブモード、2.7 KV のキャピラリ電圧、800 L/h の乾燥ガス流量、350 °C の気

化温度, 50 L/h のコーンガス流量, 120 °C のイオン源温度で行った. HILIC-LC で分析を行った対象物質の測定時のコーン電圧は Table 20 に記載した. 標準溶液は, それぞれの代謝物から調製し, succinic acid と L-methionine sulfone をサンプルと最終濃度が同じになる様に添加した. 代謝物の細胞内濃度は, 検量線から算定を行った.

Table 20. HILIC-MS cone voltage

Compound (V)	Cone voltage (V)	Compound	Cone voltage
Glycine	15	L-Alanine	15
L-Valine	15	L-Leucine	15
L-Isoleucine	15	L-Serine	20
L-Threonine	15	L-Cysteine	15
L-Methionine	15	L-Aspartic acid	15
L-Glutamic acid	20	L-Glutamine	25
L-Phenylalanine	25	L-Tyrosine	35
L-Tryptophan	35	L-Proline	20
L-Cystine	20	Glucose	15
Sorbitol	25		

・統計解析

統計解析は SPSS (IBM) を用いて行った. スチューデントの t -test は 2 つのグループ間の分散に有意差が無かった場合 (F 検定が $P > 0.05$ の場合) に対応の無いサンプルの解析に使用し, ウェルチの t -test は 2 つのグループ間の分散に有意差が認められた時に用いた. 対応のあるサンプルのための t -test は同じ細胞株から得られた差を比較するのに用いた. $P < 0.05$ の時に有意であると判定した.

4.2. 結果および考察

4.2.1. 抗体濃度への乳酸代謝シフトおよびアンモニアイオンの影響

2 つの細胞株は異なった抗体濃度と生細胞密度を示した (Figs. 59 および 60). 先の検討 (3.2.1 の Table 16 参照) では最小二乗法を用いて Q_p の算定を行ったが, 培養期間内での変化を明らかにするために, 2.1 で示した式 (2) を用いて算定を行った. 細胞株 B の比抗体生産速度は, 培養 7

日以降で細胞株 A の比生産速度よりわずかに高いのに対して (Fig. 61), 細胞株 B の抗体濃度は, 細胞株 A の抗体濃度の 3 分の 1 と低かった. このため, 細胞株間の抗体濃度の違いは細胞数, すなわち増殖能の違いに起因していることが明らかとなった. 本検討において得られた結果は, 先の検討結果 (3.2.1 参照) と同様の結果であった.

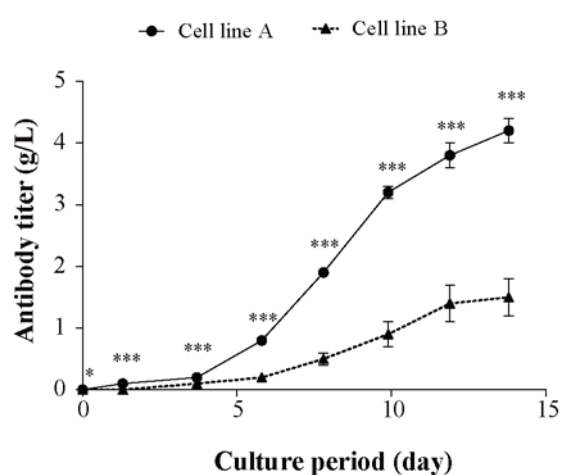


Fig. 59. 抗体濃度の比較
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

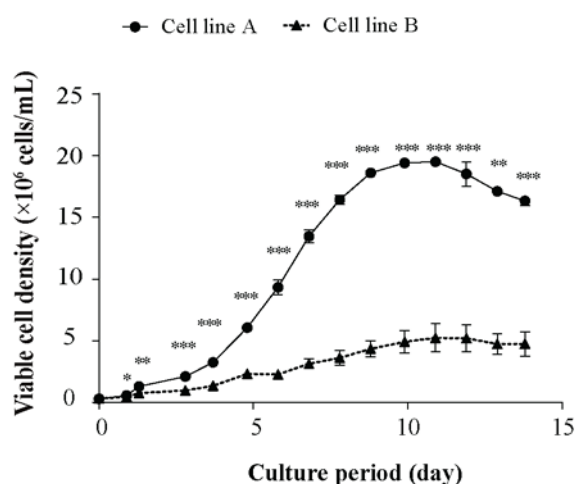


Fig. 60. 生細胞密度の比較
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

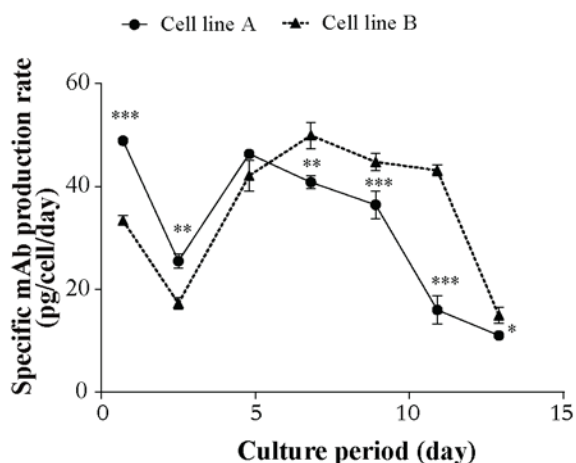


Fig. 61. 比抗体生産速度の比較
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

細胞の増殖と抗体の生産性には乳酸代謝シフトが関係していると考えられており(44), CHO 細胞で乳酸代謝シフトと組換タンパク質の生産性との間に正の相関が認められることが報告されている(42). そこで, 2つの細胞間で乳酸の代謝状態に違いがあるかどうかを調べるために, 培養液中の乳酸レベルを測定した. 先の研究(42, 44)と一致して, 乳酸代謝シフトは, 生産性と細胞増殖

能が高い細胞株 A で認められた (Fig. 60). 細胞株 B での乳酸レベルは培養初期から増加し、培養 7 日目以降もわずかに増加傾向を示すのに対して、細胞株 A での培養液中乳酸レベルは、培養 6 日目までは増加するが、それ以降は明らかな減少を認めた. . . 細胞株 A での乳酸代謝シフトは培養 7 日目に起こるのに (Fig. 62), 2 つの細胞株間の生細胞密度の違いはすでに培養開始翌日から認められている (Fig. 60). 従って、乳酸代謝シフトが細胞株 A の高い増殖能の直接的な原因であるとは考えられなかった.

細胞株 A の培地 pH は培養 6 日目まで減少し、その後増加するのに対して、細胞株 B の培地 pH は培養期間を通して減少を示した (Fig. 63). それぞれの培養での pH 変化は乳酸のレベルの変化と一致していた (Fig. 62).

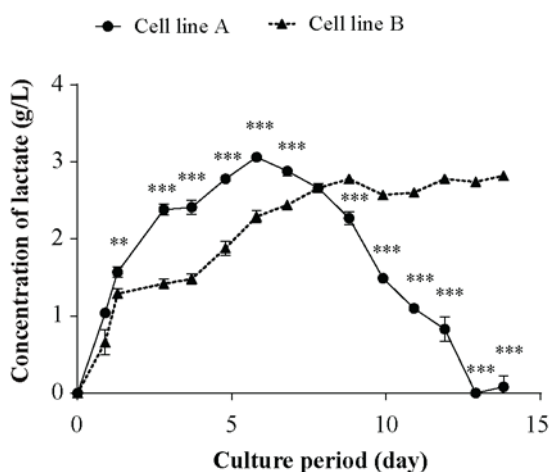


Fig. 62. 培地中の乳酸濃度の比較

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

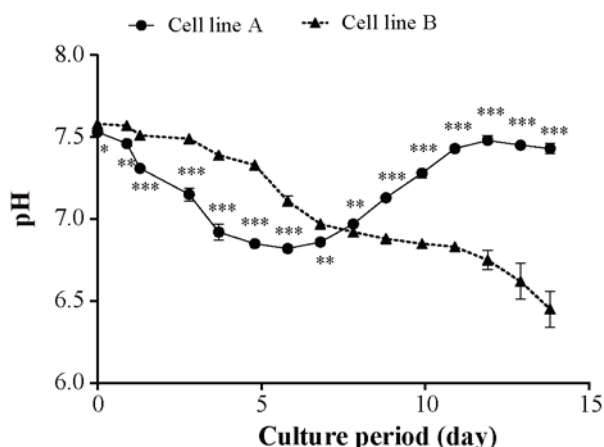


Fig. 63. 培地の pH の比較

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

アンモニアとアンモニウムの総濃度は、比較的低濃度 (<2–10 mM) で増殖速度や最大細胞密度の抑制のような細胞毒性を誘導する(77)が、次の理由から、細胞株 B の低い増殖速度は、高いアンモニウムイオン濃度が原因では無いと考えられた. 培養 7 日目まで細胞株 A の培養液中のアンモニウムイオンのレベルは、細胞株 B より高いのに対して (Fig. 64), 細胞株 A の抗体濃度は培養期間を通して細胞株 B の抗体濃度より高く (Fig. 59), 細胞株 A の生細胞密度は培養 1 日目から細胞株 B の生細胞密度より高かった (Fig. 60). さらに、乳酸フィードの効果の研究から、培

養の後期のアンモニウムイオン濃度の増加は、抗体濃度および生細胞密度に影響しないことが報告されている(78). このため、アンモニウムイオンレベルは2つの細胞株間での増殖能および抗体濃度の原因ではないと考えられた.

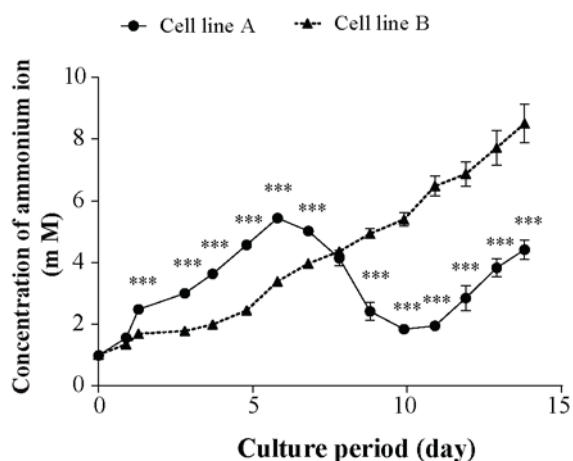


Fig. 64. 培地中のアンモニウムイオン濃度の比較
*** $P < 0.001$.

4.2.2. 抗体濃度に及ぼす細胞内代謝の影響

本検討では、乳酸代謝シフトが高い抗体濃度（細胞増殖能）を誘導しているとは考え難いことから、2つの細胞株間での細胞増殖能の違いが、(a) グルコースの代謝、(b) TCA サイクル中間体のレベル、(c) アミノ酸代謝と関係していないかを調査した。培養4日目の2つの細胞間で細胞内グルコースレベルの間に有意な差が認められなかったが、細胞株Bでの細胞内ピルビン酸および乳酸レベルは、細胞株Aよりも有意に低かった (Fig. 50)。これらの結果は、培養4日目の細胞株Bで解糖系を介したグルコースからの乳酸およびピルビン酸の生成が、細胞株Aよりも低いことを示唆している。解糖系機能が損なわれた時に、ソルビートルレベルの上昇を生じることが知られているが(44, 79), 培養4日目で両細胞株の細胞内ソルビートルレベルに有意な差は認められなかった (Fig. 65)。このため、細胞株Bでの乳酸とピルビン酸の生成が細胞株Aに比べて低い原因は、解糖系機能が損なわれたためでは無なかった。2つの細胞株間で、培養12日目の細胞内グルコースレベルに有意な差は無かったが、細胞株Bの細胞内ピルビン酸と乳酸のレベルは、細胞株Aより有意に高かった。さらに、培養4および12日目の細胞株Bの細胞内ピルビン酸と

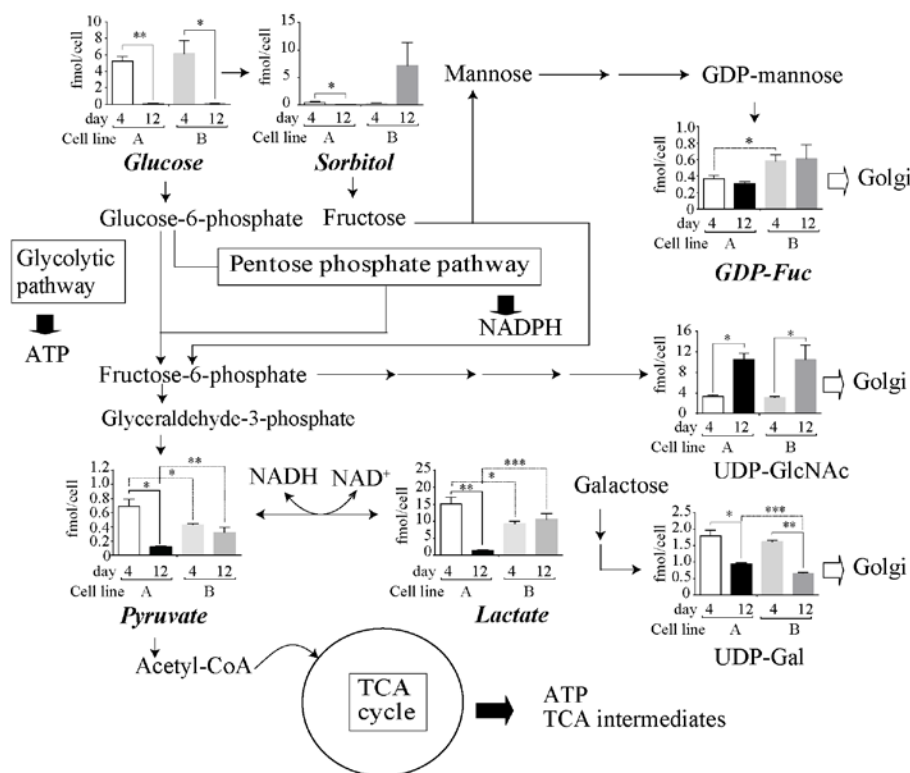


Fig. 65. グルコース、ソルビトール、糖スクレオチドを含む代謝物の比較
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

討を行った。細胞内 ATP レベルは2つの細胞間で有意な差が無かったが (Fig. 66)、培養4日目の細胞株 B における細胞内の TCA サイクル中間体であるクエン酸・イソクエン酸・コハク酸・リンゴ酸のレベルが、細胞株 A よりも有意に低かった (Fig. 67)。TCA サイクルは細胞増殖のために必要なエネルギーおよび代謝物を供給する主要な代謝経路である。細胞増殖の間に、TCA サイクルに入る炭素の多くが、ATP の生産よりも代謝物の合成のために利用され、そして細胞は TCA サイクルで合成されるクエン酸を脂質合成のために利用する(43, 80)。従って、細胞株間の TCA サイクルの活性が細胞の増殖能力を反映しているものと考えられる。また一方で、培養12日目の細胞株 B での細胞内 ATP と ADP は細胞株 A に比べて有意に高かった。培養12日目の細胞内クエン酸およびイソクエン酸レベルは2つの細胞株間で有意な差は無かったが、細胞株 B でのコハク酸およびリンゴ酸の細胞レベルは細胞株 A に比べて有意に高かった。2つの細胞株間での ATP と ADP の違いの原因は明らかではないが、これらの結果は、培養12日目の細胞株 B において、ピルビン酸に加えてアミノ酸からも TCA サイクル中間体が供給されていることを示

乳酸のレベルの間に有意な差はなかった (Fig. 65)。細胞株 B では乳酸代謝シフトが認められないことから、培養12日目でも解糖系を介した、グルコースからの乳酸およびピルビン酸の持続的な生成が、細胞機能維持に必要なエネルギー供給のために必要であると考えられた。

さらに、TCA サイクルの活性が、増殖の違いと関係していないか検

唆していた. さらに, 両細胞株において培養4日目と12目の細胞内グルコースレベルの間に有意な違いが存在した.

TCA サイクル中間体は, グルコースと同様にアミノ酸からも生成され, 実際にグルタミンがグルコースよりも, より効率的に利用されることが報告されている(43). そこで, 2つの細胞株間で, アミノ酸からTCA サイクル中間体が作られる5つの経路, (A) グルタミン・ヒスチジン・プロリン・アルギニンからグルタミン酸を経て α -ケトグルタル酸を生成する経路, (B) アラニンから直接-ケトグルタル酸を生成する経路, (C) メチオニン・トレオニン・バリンからスクシニル-CoA を生成する経路, (D) フェニルアラニンからチロシンを経てフマル酸を生成する経路, (E) アスパラギンからアスパラギン酸を経てオキサロ酢酸とリンゴ酸を生成する経路に違いが無いか検討を行った. 経路(A)における培養4日目の細胞株Bの細胞内ヒスチジン・プロリン・アルギニンレベルは, 細胞株Aよりも有意に高かった(それぞれ $P < 0.05$, 0.05 , 0.01) が, 細胞内のグルタミンおよびグルタミン酸レベルでは細胞間で有意な差は認められなかった. 経路(B), (C), (D)における, 培養4日目の細胞内アラニン・メチオニン・トレオニン・バリン・フェニルアラニン・チロシンレベルは細胞株間で有意な差は認められなかった. 経路(E)における4日目の細胞株Bの細胞内アスパラギンレベルは, 細胞株Aより有意に($P < 0.01$)高かったが, 細胞内アスパラギン酸レベルでは細胞間で有意な差は認められなかった. 以上の様に, 培養4日目の細胞株AとBの間でいくつかの細胞内アミノ酸レベルに違いが認められたが, その様なアミノ酸の細胞内レベルの違いが細胞株間の増殖能の違いの主要な原因ではないと考えられた. 一方, 経路(A)において, 培養12日目の細胞株Bでの細胞内グルタミン酸・ヒスチジン・アルギニンレベルは細胞株Aに比べて有意に低かった(それぞれ $P < 0.05$, 0.01 , 0.001) が, 細胞内プロリンレベルは細胞間で有意な差が無く, 細胞内グルタミンレベルは細胞株Aに比べて有意に高かった($P < 0.001$). 経路(B)において, 培養12日目の細胞株Bでの細胞内のアラニンレベルは細胞株Aに比べて有意に高かった($P < 0.01$). 経路(C)において, 培養12日目の細胞株Bでの細胞内のトレオニンとバリンレベルは細胞株Aに比べて有意に高かった(それぞれ $P < 0.05$, 0.01) が, 細胞内メチオニンレベルに細胞間で有意な差は無かった. 経路(D)において, 培養12日目の細胞株Bでの細胞内のフェニルアラニンレベルは細胞株Aに比べて有意に高かった($P < 0.01$) が, 細胞内チロシンレベルに2つの細胞間で有意な差は無かった. 経路(E)において, 培養12

日目の細胞株Bでの細胞内のアスパラギンレベルは細胞株Aに比べて有意に高かった($P < 0.01$)が、一方で、細胞株Bの細胞内アスパラギン酸レベルは細胞株Aに比べて有意に低かった($P < 0.01$)。これらの結果は、培養12日目の細胞株BにおいてTCAサイクル中間体が、細胞株Aと比べてピルビン酸からよりも、アミノ酸(例えば、アラニン・トレオニン・バリン)から生じることを示唆するものであった。細胞株Bは培養後期に乳酸を利用することが出来ないために、TCAサイクルからエネルギーを得るためにアミノ酸の利用が必要なのではないかと考えられる。細胞間でのコハク酸とリンゴ酸レベルの違い(細胞株A < 細胞株B)は、このような考えを支持するものであった。

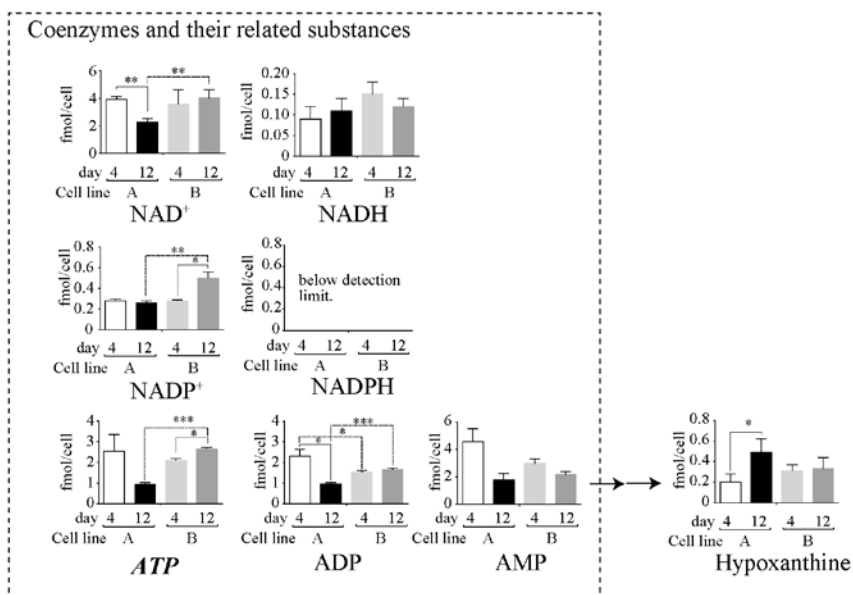


Fig. 66. 細胞内補酵素およびそれらの関連物質の比較
 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

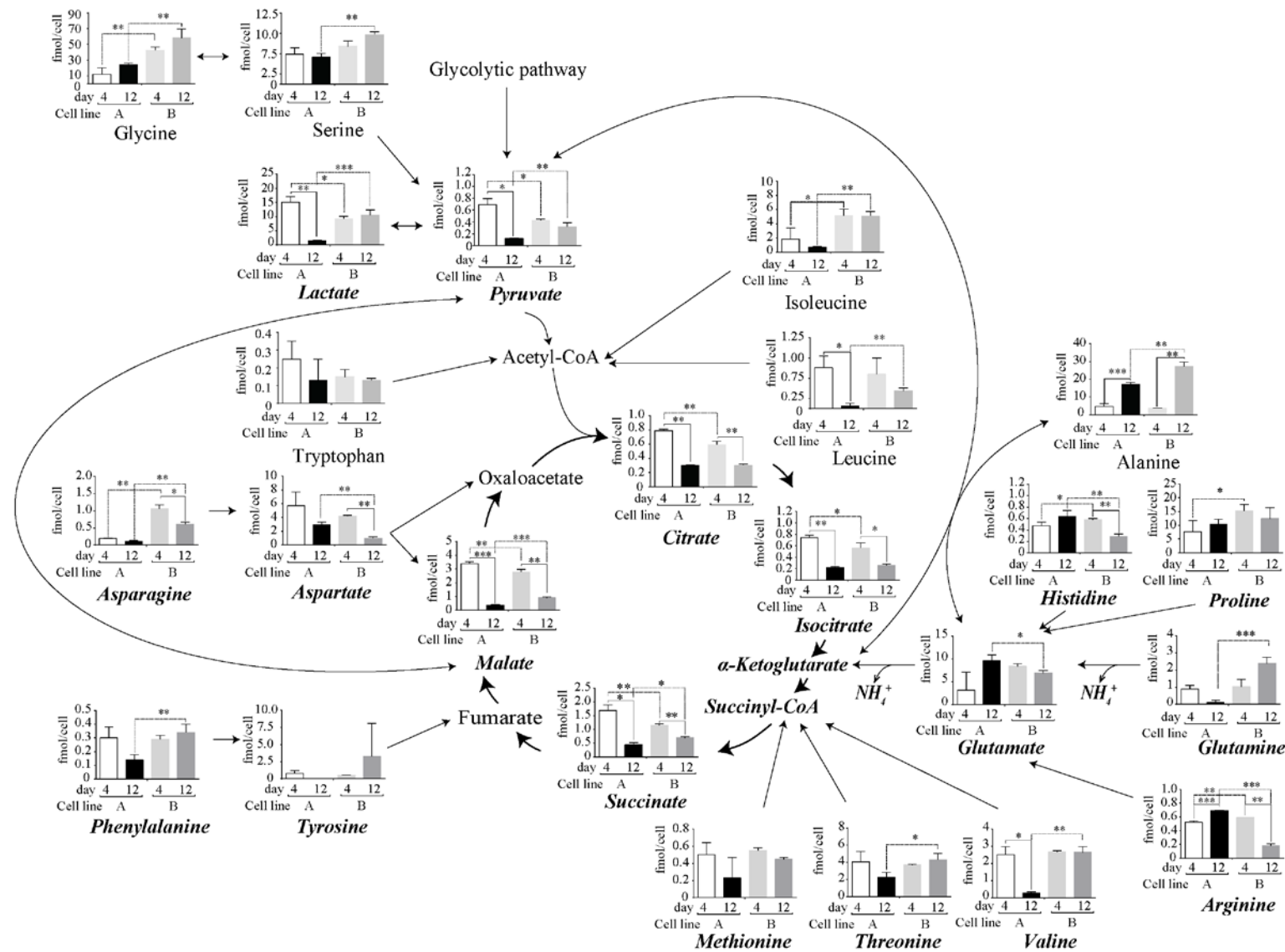


Fig. 67. 細胞内アミノ酸およびTCA サイクル中間体レベルの比較
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

細胞株 B の培地の pO_2 は培養期間を通してわずかな変化であるが、細胞株 A の培地において培養 9 日目まで pO_2 の減少傾向が認められた (Fig. 68). 培地の pO_2 の違いは、主要な代謝状態の違い (細胞株 A の好気性、細胞株 B の嫌気性) を示唆していると考えられた.

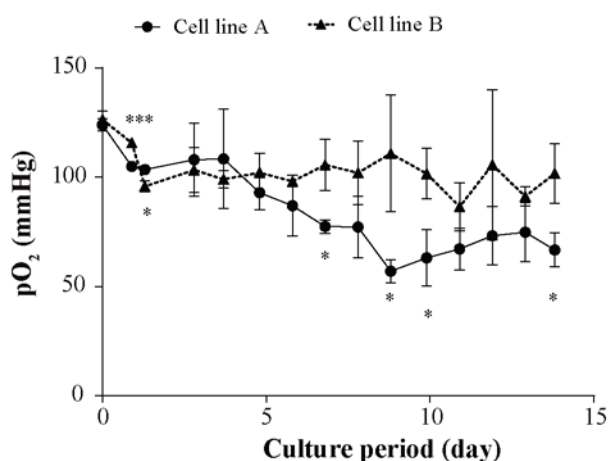


Fig. 68. 培地の pO_2 の比較
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

4.2.3. 抗体のグリコシル化に及ぼす細胞内代謝の影響

抗体の ADCC 活性は、抗体に結合しているオリゴ糖のフコシル化含量に依存することが報告されており(22, 23), オリゴ糖の組成は抗体の品質管理上重要である. 先に示した様に, LC-MS を用いて 2 つの細胞株を用いて, 精製した抗体に結合しているオリゴ糖の組成比較を行った結果 (Fig. 55) から, 細胞株 A 由来のものに比べて非フコシル化されたオリゴ糖 (G0F0/G0F0 と G0F0/G0F1) の割合が高く, フコシル化されたオリゴ糖 (G0F1/G0F1 と G0F0/G1F1) の割合が低いことが明らかとなっている. また MALDI-TOF MS による N-結合型オリゴ糖の組成の比較の結果検討 (Fig. 56) においても, LC-MS の結果と一致する結果が得られており, 細胞株 B から精製したサンプル中の非フコシル化されたオリゴ糖の割合 ($25.1\% \pm 2.1\%$) が, 細胞株 A ($16.1\% \pm 0.6\%$) より有意に高いことが明らかとなっている.

CHO 細胞では, GDP-fucose transporter に比べて, GDP-mannose 4,6-dehydratase (GDP-フコースの前駆体を生成する) およびフコシルトランスフェラーゼ (fucosyltransferase) の発現が, 主に抗

体のフコシル化に寄与することが報告されている(81)ことから、細胞内の GDP-フコースレベルの測定を行った。培養 4 日目における細胞株 B の GDP-フコースレベルは、細胞株 A よりも有意 ($P < 0.05$) に高く、培養 12 日目においては細胞間で有意な差は認められなかった (Fig. 65)。このため、細胞間での非フコシル化のレベルの違いは、GDP-フコースの生成が原因では無いことが明らかとなった。

一方、次の様な理由から、ゴルジ装置でアンモニウムイオンにより誘導される pH の乱れによって、フコシルトランスフェラーゼの発現レベルとその局在化に違いを生じることが、非フコシル化の違いの原因ではないかと考えられる。アンモニアとアンモニウムイオンはグリコシル化に影響する(77, 82-84)こと、ゴルジ装置での pH 変化は、オリゴ糖のシアリル化やガラクトシル化、グリコシルトランスフェラーゼの局在化の変化を誘導する(85, 86)ことが報告されている。また嚢胞性繊維症の患者由来の細胞では、ゴルジ装置において pH 変化を認め、これによってタンパク質に結合するオリゴ糖のフコシル化およびシアリル化が影響を受ける(87)ことが報告されている。両細胞株の抗体濃度は培養 6 日目から増加し (Fig. 59)、細胞株 B における培養液中のアンモニウムイオン濃度は、培養 8 日目以降で細胞株 B より高くなる (Fig. 64) ことが認められている。このため、直接的な証拠を明らかにすることは出来ていないが、細胞株 B の抗体での高い脱フコシルオリゴ糖の割合は、高いアンモニウムイオンが原因となって、フコシルトランスフェラーゼの発現レベルとその局在化に影響するためであると推定される。

4.2.4. 共有結合性のタンパク質凝集体の形成に及ぼす細胞内代謝の影響

タンパク質の凝集体は凝集体の特性に基づいて、共有結合性、非共有結合性のいずれかに分類することができる(88)。先の検討 (3.2.1) において、凝集体が共有結合性、非共有結合性の凝集体から形成され、凝集体の総含量 (共有結合性に非共有結合性を加えたもの) は細胞株 A より細胞株 B で高かったが、細胞株 A 由来のプロテイン A 精製サンプルで共有結合性の凝集体の割合 ($68.0\% \pm 8.9\%$) が、細胞株 B のもの ($13.9\% \pm 3.0\%$) に比べて有意に高いことを示した。Cromwell ら(11)は、共有結合性の凝集体形成は、対を形成していない遊離の SH 基の反応を介して形成されることを報告しているが、先の検討 (3.2.2) では、ジスルフィド結合による結合ではない共有結合性の重合体の存在が示されている。特に、タンパク質分子が *in vivo* および *in vitro* でフリーラ

ジカルにさらされた時に生じる、ジチロシンの形成も共有結合性の凝集体形成に寄与していること(89-92)が知られている。そこで、細胞株間の共有結合性の凝集体の割合の違いに、細胞の酸化ストレス状態の違いが関係していると考えられた。

そこで、細胞の酸化還元状態を反映する、細胞内のオフタルミン酸とグルタチオン (GSH) を測定した。GSH 涸渴の潜在指標であるオフタルミン酸は(41)は、培養 4 日目の細胞株 B では検出されなかったが、細胞株 A には有意な量のオフタルミン酸が存在し、培養 12 日にその細胞内レベルは増加した (Fig. 69)。オフタルミン酸レベルは、活性酸素種のような酸化ストレスから細胞機能を守るために必要な GSH の涸渴を反映していると考えられる。これらの結果は、細胞株 A が培養の初期段階から酸化ストレスにさらされ、このような状態が共有結合性の凝集体の蓄積を促進することを示唆しており、細胞株 A で共有結合性凝集体が高い割合であるという結果と一致していた。対照的に、細胞株 B は、培養 12 日目でかなりのレベルで検出されることから、細胞株 B は培養後期でのみ酸化ストレスにさらされていると考えられた。細胞株 B の培養 12 日目の細胞内 GSH レベルは、培養 4 日目のレベルに比べて有意 ($P < 0.01$) に低い値であり (Fig. 69)、オフタルミン酸の検出結果を裏付けるものであった。

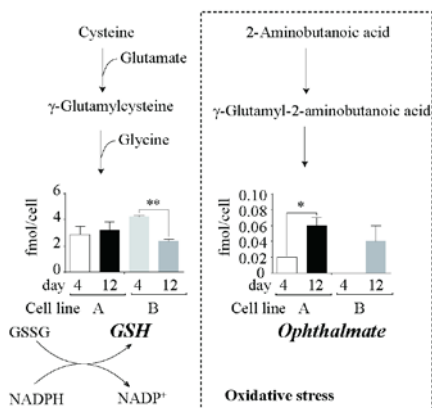


Fig. 69. 細胞内オフタルミン酸及びグルタチオンの比較
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ミトコンドリアは酸素消費の主な細胞部位であり、活性酸素種の主な発生源である、そして GSH はミトコンドリアで重要な役割を担っている(93)。最近、ミトコンドリアが、乳酸代謝において重要な役割を担っていることが認められている(44, 94)。さらに、ミトコンドリアの酸化還元電位と乳酸代謝シフトの間には正の相関が存在することが報告されている(95)。これらの報告は、

培養の初期から酸化ストレスにさらされた細胞株 A は乳酸代謝シフトを示すが、初期から酸化ストレスを受けない細胞株 B では乳酸代謝シフトを生じないという本研究での結果と一致するものであった。

4.3. 小括

乳酸代謝シフトは高い生産性を有する細胞の選択の指標としては有用であるが、細胞株 A の高い生産性（抗体濃度）は乳酸代謝シフトが原因ではないことが示唆された。高い生産性と低い生産性の細胞株間で認められた増殖能の違いは、増殖期における細胞内の TCA サイクル中間体レベルの違いに起因することが示唆された。細胞株間で生じるフコシル化オリゴ糖の割合の違いは、GDP-フコースの細胞内プールレベルの違いによるものではなく、フコシルトランスフェラーゼの発現レベルとその局在化の違いであると推定された。細胞株間での共有結合性の凝集体の割合の違いには、GSH およびオフタルミン酸の測定結果などから、おそらく酸化ストレス状態の違いが影響しており、ミトコンドリアの酸化活性状態と関連している可能性が高いと考えられた。本検討結果および先の報告(41, 43, 77, 85, 86, 94, 96-99)に基づいて、品質に影響を与える可能性のある代謝機構を Fig.70 に示した。本研究で得られたモデルは、高い生産性で高い品質の抗体を産生する細胞株の選択、そしてその改善に有用な知見を与えるものと考えられる。

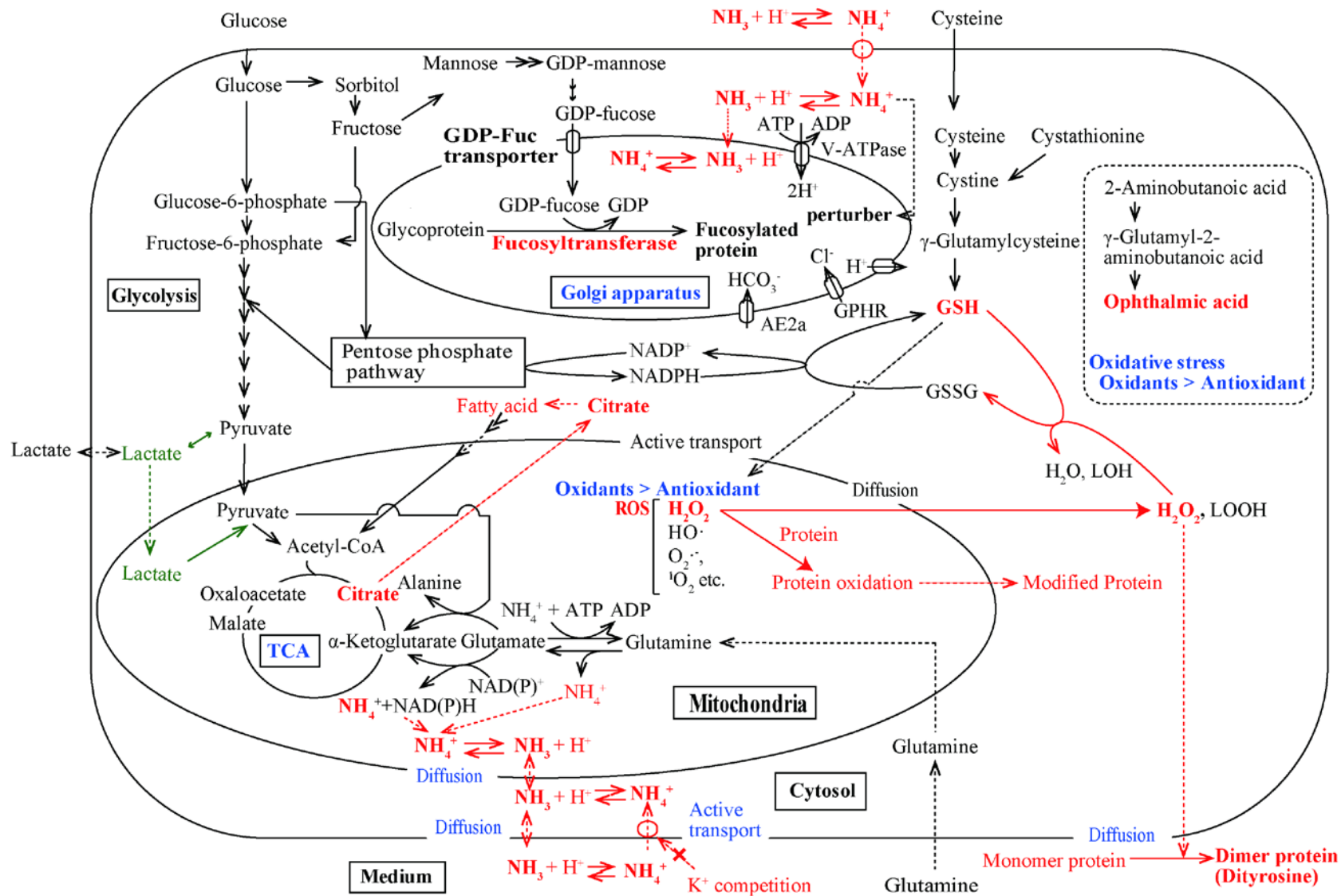


Fig. 70. 抗体品質に影響を与える代謝機構

V-ATPase, vacuolar H^+ -ATPase; GPHR, Golgi pH regulator; AE2a, AE2a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, ROS; reactive oxygen species.

5. 結論

抗体医薬品はその高い抗原特異性・長い血中半減期・低い想定外副作用の発生率から広く用いられるようになった。実際に、抗体医薬の市場は世界的に年々成長を続けている。治療用抗体は高い用量の投与が必要なこと、大腸菌とは異なり培養コストの高い動物細胞で発現する必要があることから、生産性の高い製造プロセスが患者の治療費負担軽減のために必要である。このため、生産性を上げるための様々な取り組みがなされ、生産性は20年前の50倍以上にまで達している。培養時のタンパク質の品質は精製工程を経ることもあり、これまでは、生産性ほど重要視されてこなかった。しかし、生産性の向上に伴い、培養時のタンパク質の品質が精製工程に与える影響も無視できなくなっている。培養の時点から、凝集体などの不純物を低減し品質を高める取り組みは、副作用などの安全性の面だけでなく、コストの面からも重要であると考えられる。モノクローナル抗体の生産性と品質は細胞株の性質に大きく依存することから、抗体医薬品の開発工程において、大規模生産に適した細胞株を選択する工程は特に重要な工程であると考えられる。

細胞株間での抗体濃度および凝集体に影響を与える因子を系統的に検討し、高い生産性と高い品質を有する細胞株の特徴を明らかにするために、生産性と品質の異なるトラスツズマブ（商品名 ハークローン、ハーセプチン）を産生する28種の安定発現株を調製し、HMWS(%)・ Q_p ・ μ ・培養液LMWS(%)・HCのmRNAレベル・LCのmRNAレベル・PDIのmRNAレベル・BiPのmRNAレベル・HCの細胞内含量・LCの細胞内含量を分析した。初めに、因子間の相関性を調べたところ、サンプリングポイント間で変化し、常に一定の傾向を示すものではないことが明らかとなった。この結果は、一つの因子に対して一つの因子のみが関係しているのではなく、1つの因子に様々な因子が影響していると考えられた。そこで、ハーベスト時の生産性（抗体濃度）と品質（HMWS(%)）を指標として、指標と複数の因子の関係性を明らかにするためにステップワイズ多重解析法による解析を行った。その結果、高い抗体濃度は、高い μ ・高い Q_p ・低い細胞内HCタンパク質含量と関係していることが明らかとなった。高い細胞内HCタンパク質含量が生産性を低下させるのは、HCタンパク質が多すぎるとERでのアッセンブリーとフォールディングが円滑に進まず、HCタンパク質の蓄積がUPRを誘導するからと考えられる。一方、低いHMWS(%)は、低いPDIのmRNAレベル・高いLMWS(%)・高い Q_p ・高い細胞内LCタンパク質含量・高い μ と関係していることが明らかとなった。さらに、部分的にミスフォールドされた状態の抗体分子も分泌されることで、凝集体

の増加を生じる可能性が考えられた。得られた様々な結果から、ER 内での正しく・効率的な抗体分子のアッセンブリーとフォールディングが、高い生産性（抗体濃度）と低い凝集体含量にとって重要であると考えられた。得られた結果や推定されたメカニズムは、生産性（抗体濃度）を高め、抗体の凝集体形成を抑制する取り組みや、大規模の生産に適した低い凝集体含量の抗体を産生する高生産細胞株選択の際に有用な知見を与えるものであると考えられる。

次に、抗体の細胞培養工程において、高い生産性（抗体濃度）と高い品質（低い凝集体含量）を達成するために、対照的な細胞株 A（高い生産性、低い凝集体含量）および細胞株 B（低い生産性、高い凝集体含量）の細胞、それらの細胞によって生産された抗体分子（モノマー）、そして凝集体の主要な性質の比較を行った。その結果、種々の差（増殖能、非共有結合性の凝集体含量、遊離の SH 基の含量、細胞内および培養液中 LC 含量、細胞内 HC および HC ダイマーの蓄積、チャージバリアントのレベル、疎水性表面の領域の状態、非フコシル化の割合等）が存在することが明らかとなった。細胞株 B での高い凝集体含量と低い抗体濃度は、LC の生産性の低さ、続く HC ダイマーおよびモノマーの蓄積が原因であると考えられ、本結果は、先の第 2 章で推定された小胞体ストレス誘導との関連を裏付けるものであった。また、凝集体形成の主要なメカニズムも 2 つの細胞株間で異なっていた。細胞株 A 由来の凝集体は、主に共有結合性の相互作用により形成されているが、細胞株 B 由来の凝集体は、主に疎水性の相互作用により形成されていることが明らかとなった。そして、非共有結合性の凝集体は、全長のモノマー抗体と抗体断片のような LMWS を含むことが見いだされた。これは、部分的にミスフォールドされた状態の抗体分子も分泌されることで、凝集体の増加を生じるという推定を裏付ける結果であった。本研究において、はじめてプロテイン A で精製したサンプル中に half-antibody + C_{H2} が存在していることが示唆され、その予想される物性から、凝集体の核として働いている可能性が示唆された。得られた知見は、大規模生産に適した細胞株選抜、品質の改善に有用であると考えられる。

本検討の中で明らかとなった、生産性および品質に影響を及ぼす可能性のある細胞増殖能（細胞株 A > 細胞株 B）、非フコシル化されたオリゴ糖の割合（細胞株 A < 細胞株 B）、共有結合性の凝集体の割合（細胞株 A > 細胞株 B）に注目し、これらの違いに細胞の代謝状態が関与しているか検討を行った。乳酸代謝シフトは高い生産性を有する細胞の選択の指標としては有用であるが、細胞株 A の高い抗体の生産性（抗体濃度）は乳酸代謝シフトが原因ではないことが示唆された。高い生産

性と低い生産性の細胞株間で認められた増殖能の違いは、増殖期における細胞内の TCA サイクル中間体レベルの違いによるものと考えられた。細胞株間で生じるフコシル化オリゴ糖の割合の違いは、GDP-フコースの細胞内プールレベルの違いによるものでは無く、フコシルトランスフェラーゼの発現レベルとその局在化の違いであると推定された。細胞株間での共有結合性の凝集体の割合の違いには、GSH およびオフタルミン酸の測定結果などから、おそらく酸化ストレス状態の違いが影響しており、ミトコンドリアの酸化活性状態と関連している可能性が高いと考えられた。本研究で得られたモデルは、高い生産性で高い品質の抗体を産生する細胞株の選択、そしてその改善に有用な知見を与えるものと考えられる。

本研究では、培養工学的、生物物理学的、メタボローム的アプローチにより、抗体産生における高生産性-高品質の株と低生産性-低品質の株の様々な違いが明らかとなった。中でも生産性および品質に影響を与える因子の結果から、抗体医薬品生産株のスクリーニング（細胞選抜の初期）の段階で培養液中の LMWS を測定することで、容易に品質的に優れた抗体を産生する細胞株を選択することが可能となった。また得られた知見から、より医薬品抗体の産生に適した細胞株の作成を行う上での手掛かりを得ることができた。将来的に高生産性と高品質の両立の必要性は更に高まり、より優れた医薬品抗体の産生株を得るためには、宿主細胞の改変が必要不可欠になると考えられる。本研究で得られた CHO 細胞に関する様々な知見は、宿主細胞改変の有用な指針を提供するものであり、将来的にその発展に貢献すると考えている。

6. 論文および学会発表

関連論文

Yoichi Ishii, Junko Murakami, Kazue Sasaki, Masayoshi Tsukahara, and Kaori Wakamatsu: Efficient folding/assembly in Chinese hamster ovary cells is critical for high quality (low aggregate content) of secreted trastuzumab as well as for high production: stepwise multivariate regression analyses. J. Biosci. Bioeng. 118, 223-230 (2014).

Yoichi Ishii, Yasufumi Imamoto, Rie Yamamoto, Masayoshi Tsukahara and Kaori Wakamatsu: Comparison of antibody molecules produced from two cell lines with contrasting productivities and aggregate contents. Biol. Pharm. Bull. (in press)

Yoichi Ishii, Yasufumi Imamoto, Rie Yamamoto, Masayoshi Tsukahara, and Kaori Wakamatsu: Titer of trastuzumab produced by a Chinese hamster ovary cell line is associated with tricarboxylic acid cycle activity rather than lactate metabolism. J. Biosci. Bioeng. (in press)

参考論文

Yoichi Ishii, Yukihiro Aramaki, Toshihumi Hara, Seishi Tsuchiya, and Toru Fuwa: Preparation of EGF labeled liposomes and their uptake by hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 160, 732-736 (1989).

Yukihiro Aramaki, Masayuki Takahashi, Asaichi Inaba, Yoichi Ishii, and Seishi Tsuchiya. : Uptake of aminoglycoside antibiotics into brush-border membrane vesicles and inhibition of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity of basolateral membrane. Biochim. Biophys. Acta 862, 111-118 (1986).

学会発表

「抗体製造工程における実験計画法利用の可能性を探る - 培養条件が品質に及ぼす影響 -」

日本動物細胞工学会 2007 年度大会 シンポジウム 1「バイオ医薬品製造におけるプロセスと品質
-1」 2007 年 7 月 3-4 日

7. 謝辞

本研究全般にわたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました群馬大学 理工学研究院 分子科学部門 若松馨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いただきました行木信一准教授、井上祐介准教授に感謝申し上げます。

社会人学生生活においてサポートして頂きました飯塚靖子博士に感謝申し上げます。

通学の機会を賜り、ご指導いただきました協和発酵キリン株式会社、山谷純バイオ生産技術研究所所長（当時）、新井仁バイオ生産技術研究所所長、塚原正義マネージャー、森田真弘マネージャーをはじめ皆様に深く感謝申し上げます。

実験遂行にあたりご尽力いただいた、細野眞礼登主任研究員、今本康文氏、山本理恵氏、小川梨沙氏、山口恵奈氏、黒田康介氏、森垣亘善氏、福田潤氏、村上淳子氏、藤生和美氏、小松崎典子氏、佐々木和枝氏をはじめ皆様にこの場を借りて、お礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究を実施するにあたり私を支えてくれた家族 晴子、孝和、伸和、そして両親に感謝致します。

8. 引用論文

1. **Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J., and DuBridge, R. B.:** The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*. **2**, 256–265 (2010).
2. **Kim, S. J., Park, Y., and Hong, H. J.:** Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*. **20**, 17–29 (2005).
3. **Elvin, J. G., Couston, R. G., and van der Walle, C. F.:** Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int. J. Pharm.* **440**, 83–98 (2013).
4. **Val, I. J. d., Kyriakopoulos, S., Kontoravdi, C., Jedrzejewski, P. M., Exley, K., Sou, S. N., and Polizzi, M.:** Application of Quality by Design Paradigm to the Manufacture of Protein Therapeutics. *Glycosylation* (2012).
5. **Chusainow, J., Yang, Y. S., Yeo, Y. H. M., Toh, P. C., Asvadi, P., Wong, N. S. C., and Yap, M. G. S.:** A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer? *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1182–1196 (2009).
6. **Davies, S. and James, D.:** Engineering mammalian cells for recombinant monoclonal antibody production. In: Al-Rubeai, M. (Ed.), *Cell Line Development*. Springer Netherlands, pp 153–173 (2009).
7. **Kalwy, S., Rance, J., and Young, R.:** Toward more efficient protein expression. *Mol. Biotechnol.* **34**, 151–156 (2006).
8. **Yu, M., Hu, Z. L., Pacis, E., Vijayasankaran, N., Shen, A., and Li, F.:** Understanding the Intracellular Effect of Enhanced Nutrient Feeding Toward High Titer Antibody Production Process. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1078–1088 (2011).
9. **Arunakumari, A., Dai, X. P., Goldstein, J., Kloth, C., Ghebremariam, H., Macisaac, G., and Wagner, M.:** The Impact of Cell Culture Medium on Cell Line and Process Development Timelines and Strategies. *BioPharm Int., Suppl.*, 2 June 2009 (2009).
10. **Jayapal, K. R., Wlaschin, K. F., Hu, W. S., and Yap, M. G. S.:** Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* **103**, 40–47 (2007).

11. **Cromwell, M. E., Hilario, E., and Jacobson, F.:** Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS Journal*. **8**, E572–579 (2006).
12. **Pan, H., Chen, K., Pulisic, M., Apostol, I., and Huang, G.:** Quantitation of soluble aggregates in recombinant monoclonal antibody cell culture by pH-gradient protein A chromatography. *Anal. Biochem.* **388**, 273–278 (2009).
13. **Gaza-Bulseco, G., Faidu, S., Hurkmans, K., Chumsae, C., and Liu, H. C.:** Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **870**, 55–62 (2008).
14. **Cohen, S. L., Price, C., and Vlasak, J.:** β -Elimination and peptide bond hydrolysis: two distinct mechanisms of human IgG1 hinge fragmentation upon storage. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6976–6977 (2007).
15. **Cordoba, A. J., Shyong, B. J., Breen, D., and Harris, R. J.:** Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **818**, 115–121 (2005).
16. **Chelius, D., Rehder, D. S., and Bondarenko, P. V.:** Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human Immunoglobulin Gamma antibodies. *Anal. Chem.* **77**, 6004–6011 (2005).
17. **Li, X. J., Cournoyer, J. J., Lin, C., and O'Cormora, P. B.:** Use of O-18 labels to monitor deamidation during protein and peptide sample processing. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 855–864 (2008).
18. **Hambly, D. M., Banks, D. D., Scavezze, J. L., Siska, C. C., and Gadgil, H. S.:** Detection and Quantitation of IgG 1 Hinge Aspartate Isomerization A Rapid Degradation in Stressed Stability Studies. *Anal. Chem.* **81**, 7454–7459 (2009).
19. **Wakankar, A. A., Borchardt, R. T., Eigenbrot, C., Shia, S., Wang, Y. J., Shire, S. J., and Liu, J. L.:** Aspartate isomerization in the complementarity-determining regions of two closely related monoclonal antibodies. *Biochemistry*. **46**, 1534–1544 (2007).

20. **Brady, L. J., Martinez, T., and Balland, A.:** Characterization of nonenzymatic glycation on a monoclonal antibody. *Anal. Chem.* **79**, 9403–9413 (2007).
21. **Quan, C., Alcalá, E., Petkovska, I., Matthews, D., Canova-Davis, E., Taticek, R., and Ma, S.:** A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior. *Anal. Biochem.* **373**, 179–191 (2008).
22. **Huhn, C., Selman, M. H. J., Ruhaak, L. R., Deelder, A. M., and Wuhrer, M.:** IgG glycosylation analysis. *Proteomics.* **9**, 882–913 (2009).
23. **Li, H. J. and d'Anjou, M.:** Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 678–684 (2009).
24. **Read, E. K., Park, J. T., and Brorson, K. A.:** Industry and regulatory experience of the glycosylation of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **58**, 213–219 (2011).
25. **Harris, R. J.:** Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function. *Dev Biol (Basel).* **122**, 117–127 (2005).
26. **Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., and Nema, S.:** Antibody structure, instability, and formulation. *J. Pharm. Sci.* **96**, 1–26 (2007).
27. **Knezevic-Maramica, I. and Kruskall, M. S.:** Intravenous immune globulins: an update for clinicians. *Transfusion.* **43**, 1460–1480 (2003).
28. **Carpenter, J., Cherney, B., Lubinecki, A., Ma, S., Marszal, E., Mire-Sluis, A., Nikolai, T., Novak, J., Ragheb, J., and Simak, J.:** Meeting report on protein particles and immunogenicity of therapeutic proteins: filling in the gaps in risk evaluation and mitigation. *Biologicals.* **38**, 602–611 (2010).
29. **den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., and Jiskoot, W.:** Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharm. Res.* **28**, 920–933 (2011).
30. **Hermeling, S., Crommelin, D. J. A., Schellekens, H., and Jiskoot, W.:** Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm. Res.* **21**, 897–903 (2004).
31. **Cordoba-Rodriguez, R. V.:** Aggregates in MAbs and Recombinant Therapeutic Proteins: A Regulatory Perspective. *BioPharm Int.* **21**, 44 (2008).

32. **U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER),** Guidance for industry; Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. (2014).
33. **Lee, C. J., Seth, G., Tsukuda, J., and Hamilton, R. W.:** A Clone Screening Method Using mRNA Levels to Determine Specific Productivity and Product Quality for Monoclonal Antibodies. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1107–1118 (2009).
34. **Gomez, N., Subramanian, J., Ouyang, J., Nguyen, M. D., Hutchinson, M., Sharma, V. K., Lin, A. A., and Yuk, I. H.:** Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 125–136 (2012).
35. **Bhoskar, P., Belongia, B., Smith, R., Yoon, S., Carter, T., and Xu, J.:** Free light chain content in culture media reflects recombinant monoclonal antibody productivity and quality. *Biotechnol. Prog.* **29**, 1131–1139 (2013).
36. **Philo, J. S. and Arakawa, T.:** Mechanisms of protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 348–351 (2009).
37. **Seshadri, S., Oberg, K. A., and Uversky, V. N.:** Mechanisms and consequences of protein aggregation: the role of folding intermediates. *Curr. Protein Peptide Sci.* **10**, 456–463 (2009).
38. **Wang, W.:** Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.* **289**, 1–30 (2005).
39. **Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D.:** Protein aggregation—pathways and influencing factors. *Int. J. Pharm.* **390**, 89–99 (2010).
40. **Wang, W., Singh, S. K., Li, N., Toler, M. R., King, K. R., and Nema, S.:** Immunogenicity of protein aggregates—concerns and realities. *Int. J. Pharm.* **431**, 1–11 (2012).
41. **Soga, T., Baran, R., Suematsu, M., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Kakazu, Y., Ishikawa, T., Robert, M., Nishioka, T., and Tomita, M.:** Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* **281**, 16768–16776 (2006).
42. **Mulukutla, B. C., Gramer, M., and Hu, W. S.:** On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. *Metab. Eng.* **14**, 138–149 (2012).

43. **Dean, J. and Reddy, P.:** Metabolic analysis of antibody producing CHO cells in fed-batch production. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1735–1747 (2013).
44. **Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., and Li, F.:** Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 146–156 (2012).
45. **Dinnis, D. M. and James, D. C.:** Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: Lessons from nature? *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 180–189 (2005).
46. **Dul, J. L., Aviel, S., Melnick, J., and Argon, Y.:** Ig light chains are secreted predominantly as monomers. *J. Immunol.* **157**, 2969–2975 (1996).
47. **Strutzenberger, K., Borth, N., Kunert, R., Steinfeldner, W., and Katinger, H.:** Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells. *J. Biotechnol.* **69**, 215–226 (1999).
48. **Berkowitz, S. A., Engen, J. R., Mazzeo, J. R., and Jones, G. B.:** Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 527–540 (2012).
49. **Tovey, M. G., Legrand, J., and Lallemand, C.:** Overcoming immunogenicity associated with the use of biopharmaceuticals. *Expert review of clinical pharmacology.* **4**, 623–631 (2011).
50. **Kadowaki, H. and Nishitoh, H.:** Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel).* **4**, 306–333 (2013).
51. **Chaderjian, W. B., Chin, E. T., Harris, R. J., and Etcheverry, T. M.:** Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed. *Biotechnol. Prog.* **21**, 550–553 (2005).
52. **Lee, J. H., Won, S. M., Suh, J., Son, S. J., Moon, G. J., Park, U. J., and Gwag, B. J.:** Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med.* **42**, 386–394 (2010).
53. **Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K.:** XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell.* **107**, 881–891 (2001).

54. **Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K.:** ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6755–6767 (2000).
55. **Gunn, K. E., Gifford, N. M., Mori, K., and Brewer, J. W.:** A role for the unfolded protein response in optimizing antibody secretion. *Mol. Immunol.* **41**, 919–927 (2004).
56. **Pace, C. N. and Schmid, F. X.:** How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In: Creighton, T. E. (Ed.), *Protein structure, a practical approach*, . Oxford University Press, New York, pp 253–259 (1997).
57. **Rozhkova, A.:** Quantitative analysis of monoclonal antibodies by cation-exchange chromatofocusing. *J. Chromatogr.* **1216**, 5989–5994 (2009).
58. **Gadgil, H. S., Pipes, G. D., Dillon, T. M., Treuheit, M. J., and Bondarenko, P. V.:** Improving mass accuracy of high performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry of intact antibodies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 867–872 (2006).
59. **Kamoda, S., Ishikawa, R., and Kakehi, K.:** Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J. Chromatogr.* **1133**, 332–339 (2006).
60. **Andya, J. D., Hsu, C. C., and Shire, S. J.:** Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations. *AAPS PharmSci.* **5**, 21–31 (2003).
61. **Malencik, D. A. and Anderson, S. R.:** Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids.* **25**, 233–247 (2003).
62. **Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., and Carpenter, J. F.:** Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm. Res.* **20**, 1325–1336 (2003).
63. **Dick, L. W., Jr., Qiu, D., Mahon, D., Adamo, M., and Cheng, K. C.:** C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 1132–1143 (2008).

64. **Jiang, Z., Huang, Y., and Sharfstein, S. T.:** Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnol. Prog.* **22**, 313–318 (2006).
65. **Schlatter, S., Stansfield, S. H., Dinnis, D. M., Racher, A. J., Birch, J. R., and James, D. C.:** On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **21**, 122–133 (2005).
66. **Ho, S. C., Koh, E. Y., van Beers, M., Mueller, M., Wan, C., Teo, G., Song, Z., Tong, Y. W., Bardor, M., and Yang, Y.:** Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability. *J. Biotechnol.* **165**, 157–166 (2013).
67. **Brinda, K. V., Kannan, N., and Vishveshwara, S.:** Analysis of homodimeric protein interfaces by graph-spectral methods. *Protein. Eng.* **15**, 265–277 (2002).
68. **Dall'Acqua, W., Simon, A. L., Mulkerrin, M. G., and Carter, P.:** Contribution of domain interface residues to the stability of antibody CH3 domain homodimers. *Biochemistry.* **37**, 9266–9273 (1998).
69. **Diaz, M. A. A. A., Padlan, E. A., and Santos, A. D.:** Effects of engineering charged amino acids in the CH3 domains on antibody heavy chain dimerization. *Philippine Science Letter.* **4**, 48–55 (2011).
70. **Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matsushima, M., and Palm, W.:** Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature.* **264**, 415–420 (1976).
71. **Vlasak, J. and Ionescu, R.:** Fragmentation of monoclonal antibodies. *MAbs.* **3**, 253–263 (2011).
72. **Goswami, S., Wang, W., Arakawa, T., and Ohtake, S.:** Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics. *Antibodies.* **2**, 452–500 (2013).
73. **Vlasak, J. and Ionescu, R.:** Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**, 468–481 (2008).
74. **Wiig, H., Gyenge, C. C., and Tenstad, O.:** The interstitial distribution of macromolecules in rat tumours is influenced by the negatively charged matrix components. *The Journal of physiology.* **567**, 557–567 (2005).

75. **Luo, J., Zhang, J., Ren, D., Tsai, W. L., Li, F., Amanullah, A., and Hudson, T.:** Probing of C-terminal lysine variation in a recombinant monoclonal antibody production using Chinese hamster ovary cells with chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2306–2315 (2012).
76. **Rispens, T., Lakemond, C. M., Derksen, N. I., and Aalberse, R. C.:** Detection of conformational changes in immunoglobulin G using isothermal titration calorimetry with low-molecular-weight probes. *Anal. Biochem.* **380**, 303–309 (2008).
77. **Schneider, M., Marison, I. W., and von Stockar, U.:** The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* **46**, 161–185 (1996).
78. **Li, J., Wong, C. L., Vijayasankaran, N., Hudson, T., and Amanullah, A.:** Feeding lactate for CHO cell culture processes: impact on culture metabolism and performance. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 1173–1186 (2012).
79. **Milburn, M.:** Using Metabolic Profiling Technology to Advance Cell Culture Development. *BioPharm Int.*, June: 28–40 (2009).
80. **DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B.:** The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism.* **7**, 11–20 (2008).
81. **Kanda, Y., Imai-Nishiya, H., Kuni-Kamochi, R., Mori, K., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Okazaki, A., Iida, S., Shitara, K., and Satoh, M.:** Establishment of a GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) knockout host cell line: a new strategy for generating completely non-fucosylated recombinant therapeutics. *J. Biotechnol.* **130**, 300–310 (2007).
82. **Borys, M. C., Linzer, D. I., and Papoutsakis, E. T.:** Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 505–514 (1994).
83. **Yang, M. and Butler, M.:** Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 370–380 (2000).
84. **Yang, M. and Butler, M.:** Effects of ammonia and glucosamine on the heterogeneity of erythropoietin glycoforms. *Biotechnol. Prog.* **18**, 129–138 (2002).
85. **Chen, P. and Harcum, S. W.:** Effects of elevated ammonium on glycosylation gene expression in CHO cells. *Metab. Eng.* **8**, 123–132 (2006).

86. **Rivinoja, A., Pujol, F. M., Hassinen, A., and Kellokumpu, S.:** Golgi pH, its regulation and roles in human disease. *Ann. Med.* **44**, 542–554 (2012).
87. **Barasch, J., Kiss, B., Prince, A., Saiman, L., Gruenert, D., and al-Awqati, Q.:** Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature.* **352**, 70–73 (1991).
88. **Mahler, H. C., Friess, W., Grauschopf, U., and Kiese, S.:** Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* **98**, 2909–2934 (2009).
89. **Dubinina, E. E., Gavrovskaya, S. V., Kuzmich, E. V., Leonova, N. V., Morozova, M. G., Kovrugina, S. V., and Smirnova, T. A.:** Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system. *Biochemistry (Mosc).* **67**, 343–350 (2002).
90. **Giulivi, C. and Davies, K. J.:** Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods Enzymol.* **233**, 363–371 (1994).
91. **Giulivi, C., Traaseth, N. J., and Davies, K. J.:** Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids.* **25**, 227–232 (2003).
92. **Kato, Y., Kitamoto, N., Kawai, Y., and Osawa, T.:** The hydrogen peroxide/copper ion system, but not other metal-catalyzed oxidation systems, produces protein-bound dityrosine. *Free Radical Biol. Med.* **31**, 624–632 (2001).
93. **Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J. C.:** Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2685–2700 (2009).
94. **Passarella, S., de Bari, L., Valenti, D., Pizzuto, R., Paventi, G., and Atlante, A.:** Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Lett.* **582**, 3569–3576 (2008).
95. **Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., and Wurm, F. M.:** Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *N Biotechnol.* **30**, 238–245 (2013).
96. **Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., and Jahn, T. P.:** Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 994–1003 (2006).
97. **Čolák, E.:** New Markers of Oxidative Damage to Macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry.* **27**, 1 (2008).

98. **Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C., and Oldiges, M.:** Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1147**, 153–164 (2007).
99. **Zhang, F., Sun, X., Yi, X., and Zhang, Y.:** Metabolic characteristics of recombinant Chinese hamster ovary cells expressing glutamine synthetase in presence and absence of glutamine. *Cytotechnology.* **51**, 21–28 (2006).