

Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた  
高品質な抗体医薬の高生産培養システムの開発

2015年5月

岸下 昇平

Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞を用いた  
高品質な抗体医薬の高生産培養システムの開発

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（農学）学位論文

岸下 昇平

## 目次

第1章 緒論.....	1
第2章 既往の研究.....	3
第3章 CHO細胞培養における抗体生産性向上のための完全合成流加培地の最適化.....	8
3-1 序.....	8
3-2 材料および方法.....	10
3-3 結果および考察.....	12
3-4 結論.....	30
第4章 酸性電荷バリエーションへの温度シフトの影響及び中心複合計画を用いたプロセス最適化.....	32
4-1 序.....	32
4-2 材料および方法.....	33
4-3 結果および考察.....	37
4-4 結論.....	57
第5章 総括.....	58
5-1 論文の成果と総括.....	58
5-2 今後の課題.....	60
引用文献.....	61
付記.....	78
謝辞.....	79

## Abbreviations

CHO	Chinese Hamster Ovary
t-PA	tissue Plasminogen Activator
FBS	Fetal Bovine Serum
TSE	Transmissible Spongiform Encephalopathy
DHFR	Dihydrofolate Reductase
MTX	Methotrexate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography
mAb	Monoclonal Antibody
VCD	Viable cell density
LDH	Lactate Dehydrogenase
FMEA	Failure Modes and Effects Analysis
RPN	Risk Priority Number
DO	Dissolved Oxygen
IVCD	Initial Viable Cell Density

## 第1章 緒論

1977年に大腸菌による最初の組換えタンパク質として Insulin (Herbert Boyer ; founder of Genentech Inc., USA)が、1987年に Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞による最初の動物細胞由来組換えタンパク質として t-PA (Genentech) が FDA に承認された。これ以降、バイオ医薬品の市場は拡大を続けており、2010年時点で200種類以上のバイオ医薬品が承認され、その規模は年間1千億\$以上ありで日本の医薬品市場に匹敵する。

バイオ医薬品は主に動物培養細胞で生産されるため、高価な培地や大規模な培養設備が必要となる。近年、バイオ医薬品の中でも画期的な治療効果から特に、抗体医薬品に注目が集まっているが、抗体もまた高分子量で、糖鎖等により修飾された複雑な構造を有するため、精製や規格分析等も複雑となり、低分子医薬品と比べて非常に製造コストがかかる。そのため、抗体医薬品は他の医薬品と比べて非常に高価となり、患者が治療を受ける上で大きな問題となっている。例えば、2001年に承認を受け、Her2陽性乳がんの1st Lineの治療薬として使用される Herceptin®トラスツズマブによる治療費は年間300万円を超え、化学療法剤による治療費の50~60万円と比べると非常に高額である。

製造コストを低減するためには抗体の生産性を向上させる事が必須であるが、同時に品質の制御も重要である。そこで本研究では、バイオ医薬品の製造に用い

る、(1) 高産生化に向けた生産用培地の改良、(2) 生産性最大化と品質向上に向けた培養法の最適化、について検討を行い、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞による高品質な抗体医薬品の実用的な高生産培養プロセスの開発を試みた。

## 第2章 既往の研究

本章では、本研究の意義、位置づけを明らかにすることを目的として、1) 動物細胞を用いた原薬製造プロセス、2) 生産性向上の取り組み、3) 品質向上の取り組み、についての代表的な研究について概観した。

### 2-1 動物細胞を用いた原薬製造プロセスとは

現在、欧州と米国で上市されているバイオ医薬品の約 1/3 が動物細胞、特に CHO 細胞によって生産されている。動物細胞を宿主として用いた組換えタンパク質や抗体医薬品の原薬製造プロセスは、概ね以下の通りである。

はじめに、製造の出発材料としてのセルバンク (MCB/WCB: Master Cell Bank/Working Cell Bank) を作製する。目的とするタンパク質 (サイトカインやターゲットとする抗原に対する抗体) の遺伝子を取得し、これを宿主細胞に導入した後、最適なクローンを選抜する。この際、単に目的とするタンパク質の産生量が高いだけでなく、産生されるタンパク質の品質 (糖鎖や会合体等の物理化学的性質や生物活性)、さらには導入遺伝子の安定性や変異の有無についても調べ、適切なクローンを選抜することが重要となる。選択されたクローンを拡大培養後、分注、凍結し、均一なセルバンクを作製して毎回の製造に用いる。次に実際の製造では、Good Manufacturing Practice (GMP) 管理された施設のもと、

液体窒素の気相中に保管した WCB を溶かし、製造用に管理された培地を用いて細胞を培養する。通常、CHO 細胞の倍加時間は 20 時間前後であるが、極端に薄い細胞密度で播種すると増殖に負の影響が出るため、複数の培養槽を用い 10 日以上かけて順次、拡大培養の後、最終的な生産培養槽（数千～25,000 L）で生産培養する。遠心分離やフィルターによって細胞を取り除いた後、培養液中に産生されたタンパク質は、種々のクロマトグラフィーやウイルス不活化／除去、濃縮等の精製工程を経て原薬となる。生産培養においては、抗体が培養液中で比較的安定であることから、培養途中に流加培地を連続的に投与する fed-batch 培養が多く用いられている。一方で、血液凝固第八因子や Protein C のように培養液中の安定性が低い組換えタンパク質の場合、連続培養の一種である perfusion 培養が用いられることがある。しかしながら、培養液の雑菌汚染やトラブル発生確率の面から、perfusion 培養はハードルが高く、また培地成分を最大限に利用できるというメリットから、抗体生産では一般的に流加培養が有利である。

バイオ医薬品は高価な培地や大規模な培養設備が必要となるため、低分子医薬品と比べて非常に製造コストがかかる。そのため、抗体医薬品は他の医薬品と比べて価格が非常に高くなる。バイオ医薬品のコスト低減のためには、生産性を向上させることが必須であるが、品質を維持することも重要である。



## 2-2 生産性向上の取り組み

これまでの生産性向上の取り組みとして、CHO 細胞のクローン選抜法、発現ベクター、遺伝子導入技術や細胞培養用培地に関して様々な研究が行われてきた (Jayapal *et al.* 2007 ; Arunakumari *et al.* 2009 ; Yu *et al.* 2011)。その中でも、細胞培養用培地の最適化は生産性の向上において大きな効果があるため、その検討に多くの時間と労力が費やされた。すべての培地成分の中で、アミノ酸は細胞増殖と生産性の両方に対して最も効果を示す成分の 1 つである。アミノ酸は生理的 pH では両性イオンとして存在するため細胞内 pH の緩衝剤として作用する可能性があり、アミノ酸の CHO 細胞への多様な効果がこれまで数多く報告されている (Gardner and Lane 1997)。例えば、deZengotita *et al.* (2002) は、threonine、glycine、betaine が培養液中の CO<sub>2</sub> および浸透圧の上昇に対して、ハイブリドーマと CHO 細胞に保護効果があることが確認されている。また、threonine、proline と glycine が CHO 細胞内の代謝を改善することで、組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) の生産性向上に寄与することが示されている (Chen and Harcum 2005)。CHO 細胞にとって有害な副生成物であるアンモニアは、培地成分を glutamine から glutamate へ変更することでその生成濃度が低減することが報告されている。また同じく有害な副生成物である乳酸は、炭素源をグルコースからガラクトースへ変更することで生成濃度が低減することが報告されている

(Altamirano *et al.* 2004)。Altamirano *et al.* (2006) によって、proline、serine や asparagine によって細胞増殖が向上することや、asparagine が t-PA の生産性や品質に影響を与えることも示している。一方で、細胞培養にとって正の効果が報告されたアミノ酸添加が、常に良い作用を示すわけではないことも示唆されており、t-PA 産生 CHO 細胞への asparagine の添加がアンモニア濃度の上昇を引き起こし、その結果、細胞内でのアミノ酸濃度の低下ならびに t-PA 生産性の減少が見られたことが報告されている (Hansen and Embrog 1994)。これらの知見を踏まえると、それぞれの細胞株に対して、どのアミノ酸が最も効果があるのかを個別に検討し、最適化することが必要であり、体系的かつ効率的な検討法の開発が求められる。

### 2-3 品質向上の取り組み

抗体の原液製造において、生産性のみならず品質も重要なポイントとなる。これまで、培養の制御パラメーターが抗体の品質に影響を与えることが、いくつかの論文で報告されている (Hawng *et al.* 2011) が、バイオシミラー対策もあっても、多くの企業が品質に関するデータを開示しない傾向にある。よって、培養パラメーターの品質への影響はブラックボックスな部分が多く、品質を十分にコントロールするには至っておらず、実用生産での課題となっている。

そこで本研究では、バイオ医薬品の製造に用いる（１）高産生化に向けた生産用培地の改良（完全合成培地の開発と最適化法の確立）、（２）生産性の最大化と品質の向上に向けた培養法の最適化、について検討を行い、CHO 細胞による高品質なバイオ医薬品の実用的な高生産培養プロセスの開発を試みた。

## 第3章 CHO 細胞培養における抗体生産性向上のための完全合成流加培地の最適化

### 3-1 序

CHO 細胞は、抗体医薬品の商用生産の宿主細胞として一般的に使用される (Dinnis *et al.* 2005)。高い薬理効果と安全性を有する抗体医薬品は、早い速度で市場規模が成長を続けている。その一方で、抗体医薬品は他のバイオ医薬品と比べ、高用量で投与する必要があるため、高効率かつ低コストの製造プロセスが求められる。

細胞培養用培地は、アミノ酸やビタミン、糖、無機塩、微量金属、緩衝剤、増殖因子等、様々な成分を含有しており、細胞増殖、抗体産生量や抗体の品質に影響を与えることが知られている (Gorfien *et al.* 2000; Crowell *et al.* 2007; Ma *et al.* 2009)。細胞培養用培地成分の最適化や新規培地成分の添加は、細胞の代謝や生存率、生産性の向上に重要である (Wurm *et al.* 2004)。

CHO 細胞用の培地としては、基礎培地に 1 ~20% (v/v) の fetal bovine serum (FBS) が添加されたものが使用されてきた。FBS は増殖因子や微量元素を豊富に含み、細胞の増殖や生産性にとって必須であったが、Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) を始めとした動物成分由来のタンパク質・ウイルス汚染のリスクが判明し、血清を医薬品製造で使用することは、薬事上大きな問題とな

った。そこで、動物成分由来のタンパク質・ウイルス汚染のリスクを軽減するため、血清の代替物として大豆やコメ、小麦、綿等の植物由来の加水分解物が広く使用されるようになった (Xie *et al.* 1997; Heidemann *et al.* 2000; Burreau *et al.* 2003; Sung *et al.* 2004)。植物由来の加水分解物は無血清下でも細胞増殖や生産性の向上に寄与することができたが、様々な大きさのペプチドや遊離アミノ酸といった分解物の集合体のため成分が複雑で特定できず、ロット間のバラツキも非常に大きく、製造の頑健性を低下させる要因となっている (Zhang *et al.* 2003; Luo and Chen 2007)。これらの加水分解物の問題を解消するため、最近の培地改良のアプローチとしては、血清や加水分解物を含まない完全合成培地の開発に注目が集まっている。これまで、マウスミエローマ由来の NS0 細胞や CHO 細胞に対していくつかの完全合成培地が開発された (Hata *et al.* 1992; Chen *et al.* 2000; Zhang and Robinson 2005; Huang *et al.* 2007)。しかしながら、植物由来の加水分解物含有の培地と比較して完全合成培地を使用した場合、CHO 細胞の増殖速度や到達細胞密度の減少、タンパク質や抗体の生産性低下など、現状では、実用化に耐えうるものは出てきていない。

本研究では、抗体の生産性向上のため、アミノ酸の spent media 分析をベースに完全合成培地の最適化法の開発を試みた。spent media 分析は細胞培養プロセス中で培地がどのように変化するかを知るための重要な分析法である。新鮮な

培地と培養中の培養液を経時的に比較することで、培地成分の枯渇と代謝物の蓄積を定量的に評価し、消費傾向にある様々なアミノ酸を選択し、添加検証を実施した。なお、本研究でアミノ酸に着目し検討を行った理由は、培地の主な成分であることと、添加操作が容易であるためである。

## 3-2 材料および方法

### 3-2-1 使用細胞株と細胞培養条件

本研究では完全抗体であるモノクローナル抗体を研究対象としたことから、組換え哺乳動物細胞を用い、各国の規制当局から多くの医薬品製造販売承認の実績を得ている CHO 細胞を宿主細胞に選択した。CHO 細胞は元来、接着細胞であるが、抗体の生産用には浮遊化された細胞が培養の効率がよく、取り扱いも容易なことから、ほとんどの場合において浮遊細胞が使用される。本研究では、CHO-S-SFM II 培地 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) に馴化した DUK-XB11 CHO 細胞 (Dr. Lawrence Chasin, Columbia University より譲受) を用いた。発現システムは DHFR (dihydrofolate reductase) の増幅をベースとしたもので (Pallavicini *et al.* 1990; Gandor *et al.* 1995)、IgG 抗体をコードしたプラスミドを遺伝子導入し、CHO-S-SFM II-CD-CHO 培地 (Life Technologies) に 50 nM MTX を添加したものを継代培地として用いた。細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37

キ、5% CO<sub>2</sub>、加湿) で 100 mL のスピナーフラスコを用いて継代培養した。CHO 細胞の生産培養については、流加培地を連続的に投与する fed-batch 培養で、モデル BCC (125 mL; ABLE, Tokyo, Japan) の培養器を用いて実施した。生産培養の制御条件は、初発細胞密度が  $2.0 \times 10^5$  cells/mL、溶存酸素濃度が 40%、培養液の pH が培養 2 日目までは 7.2 で、それ以降は 6.9 で制御した。pH の制御は CO<sub>2</sub> と 1 M NaOH と 1 M NaHCO<sub>3</sub> (50:50) の混合溶液を用いて行った。流加培地の添加は培養 3 日目から開始し、培養終了日 (14 日目) まで実施した。

### 3-2-2 基礎培地と流加培地、ペプチド

継代培地と生産培養の初発培地として CHO-S-SFMII-CD-CHO 培地を使用した。流加培地には初発培地の 3 倍濃度のものを用いた。合成ジペプチドおよびトリペプチドは、すべて Life Technologies 社より購入した。

### 3-2-3 分析方法

Cedex model AS20 (Roche Innovatis, Bielefeld, Germany) を用いて、トリパンブルー染色による生細胞密度、生存率の測定を行った。Cedex System 専用のサンプルカップに 1 mL の培養液を入れ、機器による自動測定を行った。培養液中のアミノ酸はニンヒドリン法で amino acid analyzer L-8500 (Hitachi, Tokyo, Japan) を

用いて測定した (Tabuchi *et al.* 2010)。グルコースおよび乳酸の濃度測定は、サンプリングした培養液を遠心分離 (140 x g, 5 min) し、得られた上清を試料溶液として、Biochemistry analyzer model YSI 2300 (YSI Life Sciences, Yellow Springs, Ohio, USA) を用いて行った。抗体濃度は、サンプリングした培養液を遠心分離 (140 x g, 5 min) し、得られた上清を試料溶液として Protein-A HPLC を用いて測定した。Protein A カラムは POROS (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を使用し、移動相 A (80 mmol/L sodium citrate, 20 mmol/L citric acid, 300 mmol/L NaCl) で抗体をカラムに結合させ、移動相 B (10 mmol/L sodium citrate, 90 mmol/L citric acid, 300 mmol/L NaCl) で抗体を溶出し、クロマトグラムのピーク面積から抗体濃度を算出した。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 培地へのアミノ酸添加が抗体産生量、細胞の生存率、培養液中の乳酸やアンモニア濃度に及ぼす影響

コントロール培養の spent media 分析を実施した結果、5 つのアミノ酸 (asparagine、glutamine、serine、cysteine および tyrosine) が顕著な減少傾向にあることが明らかになった (Fig. 3-1)。5 つ以外のアミノ酸については、培養液中の濃度が一定もしくは上昇する傾向にあった (data not shown)。そこで5つのア



ミノ酸を流加培地にサプリメントとして添加し、抗体産生への影響を検証した。流加培地に 5 つのアミノ酸すべてを添加したものを group 1、3 つのアミノ酸 (serine、cysteine および tyrosine) のみを添加したものを group 2 とした。Asparagine と glutamine については、培地中で分解してアンモニアを蓄積させる可能性があるため、group 2 から除いた。流加培地に添加した asparagine、glutamine、serine、cysteine および tyrosine の濃度は、spent media 分析の結果を基に、培養期間を通して培地中に十分量が維持できる濃度を計算し、それぞれ添加濃度を 35.0、84.0、50.0、1.8 および 14.5 mM に設定した。

生細胞密度と細胞の生存率のプロファイルを **Fig. 3-2A** に示した。コントロール培養の到達生細胞密度は培養 5 日目の  $5.1 \times 10^6$  cells/mL だったのに対して、group 1 と 2 の到達生細胞密度はそれぞれ  $4.3 \times 10^6$  cells/mL と  $4.5 \times 10^6$  cells/mL で若干の増殖阻害が見られた。細胞の生存率については、group 1 において培養 10 日目以降に急激な減少が見られ、コントロール培養よりも低下したのに対して、group 2 ではコントロール培養よりも高い生存率が維持された。抗体産生量のプロファイルについては、培養 7 日目まではすべての条件で同じ挙動を示したが、培養 7 日目以降、group 1 は殆ど抗体産生量が伸びず、それに対しコントロール培養と group 2 は培養 12 日目まで抗体産生量が増加した。培養 12 日目の抗体産生量は、コントロール培養に対して group 1 では 30%低下したが、group 2 で

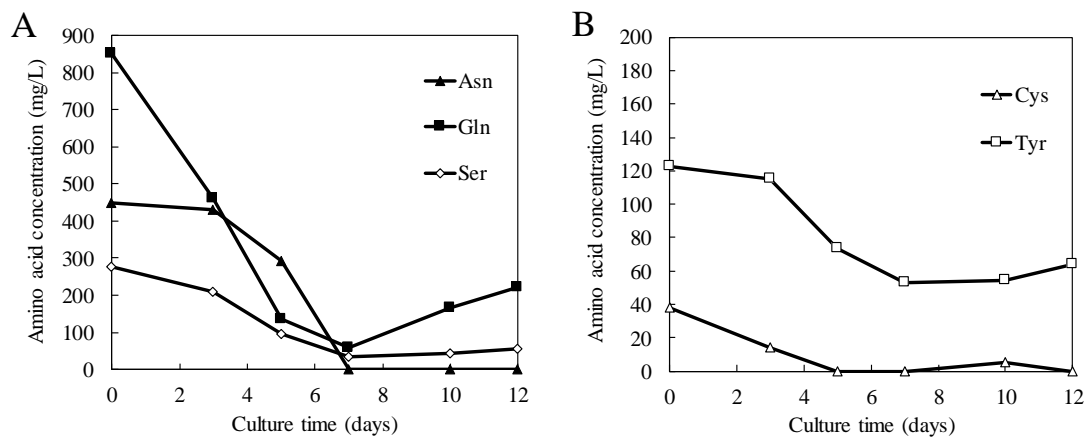
は 20%向上した (**Fig. 3-2B**)。group 1 と 2 の抗体産生量の差については、1 細胞当たりの抗体産生能 (比抗体産生能) の差に起因すると考えられる。コントロール培養の比抗体産生能を 1 としたとき、group 1 の比抗体産生能は 0.54 で 46%低下したのに対して、group 2 の比抗体産生能は 1.39 で 39%向上した (**Fig. 3-2C**)。培養液中の乳酸濃度はコントロール培養と group 1 が同じ挙動で、培養 12 日目で 3 g/L まで蓄積したのに対して、group 2 のみ 1.5 g/L 以下と低く維持されていた (**Fig. 3-2D**)。培養液中のアンモニア濃度は、asparagine と glutamine の分解のため、group 1 では培養 12 日目に 540 mg/L まで蓄積した (**Fig. 3-2E**)。培養液の浸透圧は、コントロール培養と比較して group 1 が 250 mOsm/kg、group 2 が 105 mOsm/kg 上昇した (**Fig. 3-2F**)。

アンモニア蓄積の影響として、細胞増殖阻害、比抗体産生能と生存率の低下、抗体産生量の減少が報告されている。今回の検討において、アンモニアが蓄積した group 1 では報告されている結果 (Ito and McLimans 1981; Canning and Fields 1983; Reuveny *et al.* 1986; Hassell *et al.* 1991; McQueen *et al.* 1991; Singh *et al.* 1994; Gawlitzek *et al.* 1999; Yang *et al.* 2000; Schneider *et al.* 2012; Ha *et al.* 2014) と同様に、細胞増殖阻害、比抗体産生能と生存率の低下、抗体産生量の減少が見られた。

流加培養において、細胞が対数増殖期から定常期に入ったとき、乳酸を消費する方向へ代謝シフトすることが報告されている (Zhou *et al.* 1997; Pascoe *et al.*

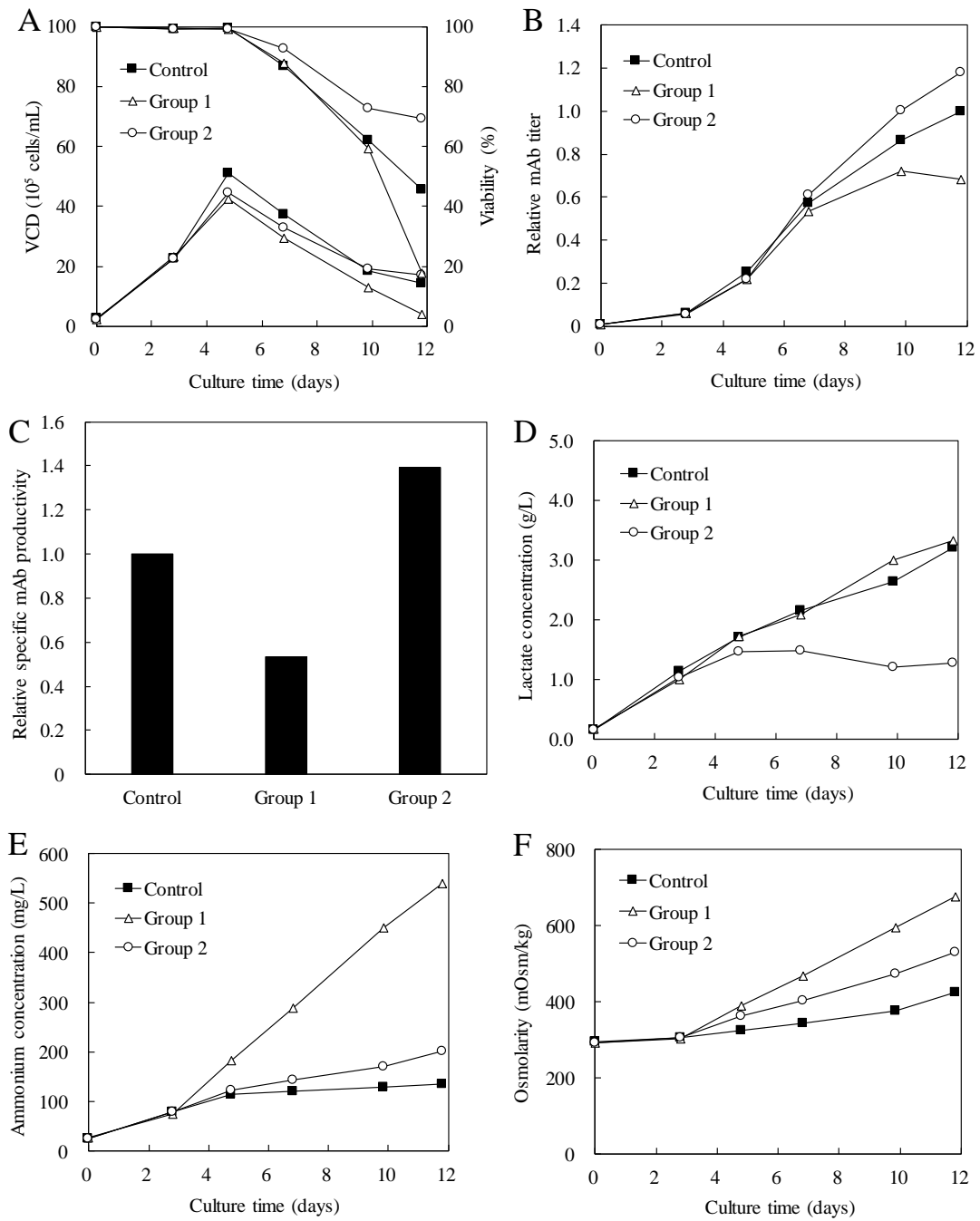
2007; Khoo and Al-Rubeai 2009)。乳酸が消費されることで、乳酸による生存率低下の影響を防ぐことができる (Seth *et al.* 2006)。また、Le *et al.* (2012) は、培養後期に乳酸蓄積から乳酸消費にシフトすることで、タンパク質生産が大幅に向上することも報告している。本研究の group 2 で得られた結果も、Le *et al.* (2012) の報告と同様な挙動となった。

培養液中で枯渇傾向にあるアミノ酸をサプリメントとして流加培地に添加する方法は、抗体産生量の向上に効果的であったが、一方で CHO 細胞に阻害作用を示すアンモニアや乳酸などの副生成物の蓄積にも配慮する必要があることが示唆された。



**Fig. 3-1.** Culture-time dependence of amino acid concentrations in the control culture:

(A) asparagine (Asn), glutamine (Gln), and serine (Ser) and (B) cysteine (Cys) and tyrosine (Tyr).



**Fig. 3-2.** Effects of amino acid supplementation in a chemically defined medium on the culture-time dependence of (A) viable cell density (VCD) and viability, (B) relative mAb titer, (C) relative specific mAb productivity, (D) lactate concentration, (E) ammonium concentration, and (F) osmolality.

### 3-3-2 Serine、cysteine、tyrosine の組合せ添加による抗体産生量、浸透圧、グルコースおよび乳酸濃度への影響

Serine、cysteine、tyrosine の 3 つの組合せで抗体産生量の向上に効果が見られたが、この中でどのアミノ酸に産生量の向上効果があるかを明らかにするため、3 つのアミノ酸をすべて添加した場合と、2 つのアミノ酸を組合せた場合の添加効果を比較した。流加培地への serine、cysteine、tyrosine の添加濃度は、前節の実験と同様にそれぞれ 50.0、1.8、14.5 mM に設定した。

コントロール培養の到達細胞密度は培養 6 日目の  $6.5 \times 10^6$  cells/mL であったが、アミノ酸を添加したすべての条件でコントロール培養の到達細胞密度を下回った (**Fig. 3-3A**)。最も高い抗体産生量が得られた条件は、serine、cysteine、tyrosine の 3 つアミノ酸を添加した条件で、コントロール培養に対して 60%向上した (**Fig. 3-3B**)。また、3 つのアミノ酸添加の条件では、1 細胞当たりの抗体産生量がコントロール培養に対して 44%向上した (**Fig. 3-3C**)。

アミノ酸を添加したすべての条件で、培養 14 日目の浸透圧がコントロール培養よりも約 200 mOsm/kg 高い結果となった (**Fig. 3-3D**)。この理由として、難溶性の tyrosine を溶解するために、流加培地の pH を 2.0 付近まで低下させたため、培養系に流加培地が滴下されると、培養液中の pH が低下し、低下した pH を調整するためのアルカリが投入されることにより、浸透圧が上昇したことが考え

られた（コントロール培養の流加培地は中性のため、培養液中の pH の変動は起こらず、アルカリの投与が無い場合大幅な浸透圧上昇は生じなかった）。

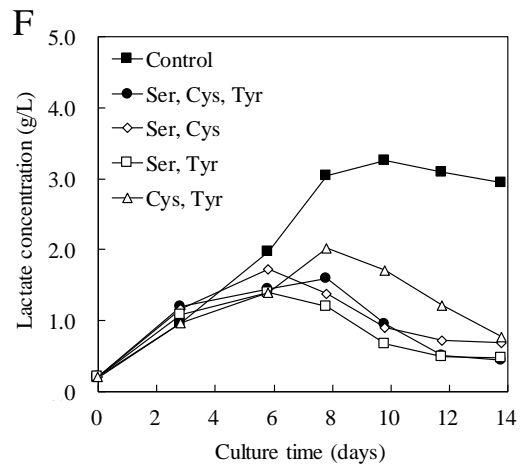
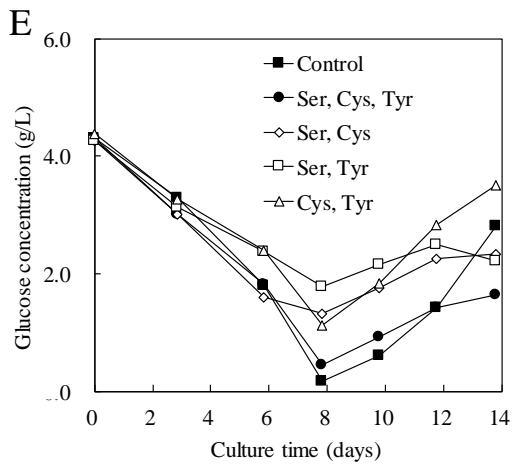
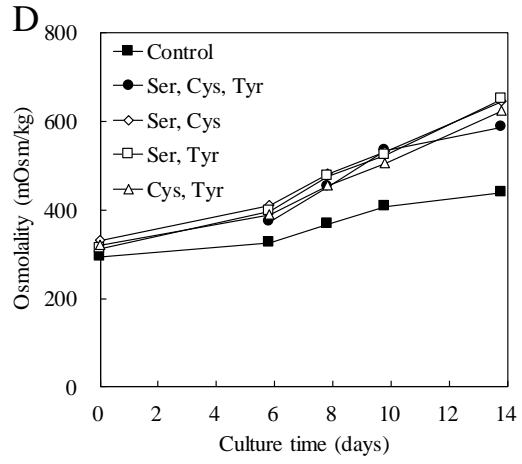
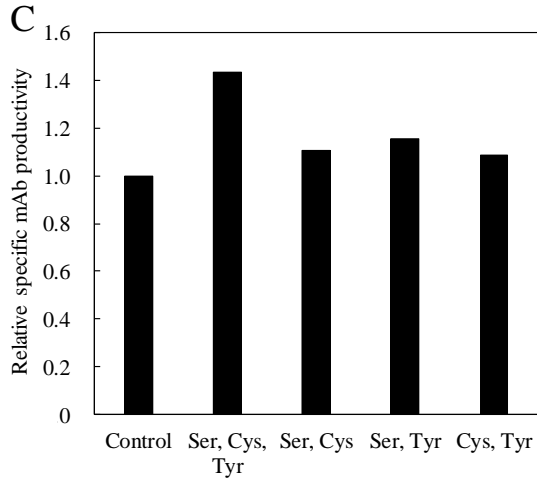
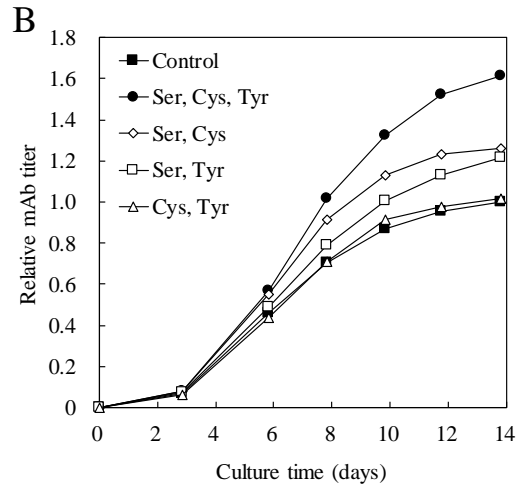
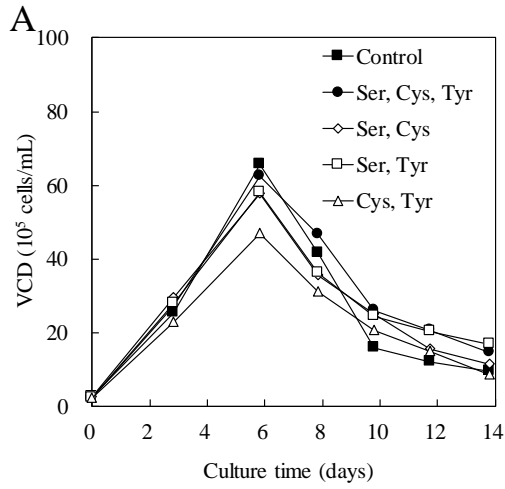
コントロール培養とアミノ酸添加条件では、グルコースの挙動は同等であったが（**Fig. 3-3E**）、乳酸の挙動については差が見られた（**Fig. 3-3F**）。アミノ酸を添加したすべての条件で、培養 6 日目もしくは 8 日目から乳酸の消費に代謝がシフトし、培養期間を通して乳酸濃度が 2.0 g/L 以下に維持された。一方、コントロール培養では乳酸濃度が培養 10 日目まで上昇し、培養終了時には 3 g/L 以上蓄積された。細胞培養において、乳酸を低く維持する、もしくは乳酸代謝を促進する方法はいくつか報告されている。細胞工学的なアプローチとしては、乳酸脱水素酵素遺伝子のダウンレギュレート（Chen *et al.* 2001; Kim and Lee 2007a; Zhou *et al.* 2011）、ピルビン酸カルボキシラーゼやリンゴ酸脱水素酵素の過剰発現（Irani *et al.* 1999; Fogolin *et al.* 2004; Kim and Lee 2007; Chong *et al.* 2010）、が用いられている。また、培地中に含まれるグルコースを代謝により時間を要するガラクトースやフルクトース等の炭素源に変更することで、乳酸の蓄積を抑えることも知られている（Altamirano *et al.* 2000; 2006; Wlaschin *et al.* 2007）。その他、流加するグルコース量を調整する方法も報告されている（Gagnon *et al.* 2011）。本研究では、serine、cysteine、tyrosine の添加によって、乳酸消費に代謝をシフトすることに成功した。この代謝シフトのメカニズムについては未解明であるが、

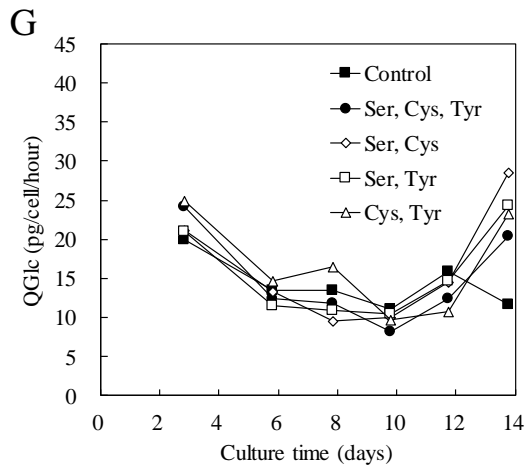
Mulukutla *et al.* (2011) は AKT1 の活性が、乳酸消費に関係しているデータを示している。AKT1 は細胞へのグルコースの取り込みや解糖系を促進するシグナル伝達物質であることが知られているが (Rathmell *et al.* 2003)、Mulukutla *et al.* (2011) の報告では、AKT1 の活性が低下することでグルコースの取り込み及び解糖系のフラックスが低下し、その結果、乳酸消費が起こっている。Serine と cysteine は解糖系の中間体であるため (Lunt and Vander Heiden 2011)、グルコースの代わりに serine と cysteine が細胞に取り込まれたとするならば、AKT1 と同様に解糖系のフラックスに影響を与えた可能性が考えられる。しかしながら今回の実験結果では、コントロール培養と比較してアミノ酸を添加した条件でも、1 細胞当たりのグルコース消費量 (比グルコース消費能) に変化はなかった (Fig. 3-3G)。一方、アミノ酸を添加した条件では培養液中の浸透圧がコントロール培養よりも上昇した。なお、浸透圧上昇が比グルコース消費能を上昇させることが Zhu *et al.* (2005) より報告されている。アミノ酸添加による比グルコース消費能の低下効果と、浸透圧上昇に伴う比グルコース消費能の上昇効果を分離することは難しいため、今回の結果からは serine、cysteine、tyrosine の解糖系への影響を確認することは出来なかった。

今回は、serine、cysteine、tyrosine を流加培地に加えたため、培養期間中に一定量を添加した場合の結果であったが、細胞の増殖段階に応じて添加量を変え



てみる条件についても、今後、更なる生産性向上のために検討する価値がある  
ものと思われる。





**Fig. 3-3.** Effects of combinations of supplemental serine (Ser), cysteine (Cys), and tyrosine (Tyr) in a chemically defined medium on the culture-time dependence of (A) viable cell density (VCD), (B) relative mAb titer, (C) relative specific mAb productivity, (D) osmolality, (E) glucose concentration, (F) lactate concentration and (G) QGlc.

### 3-3-3 トリペプチド添加による抗体産生量、浸透圧、グルコース及び乳酸濃度への影響

これまでの実験結果から serine、cysteine、tyrosine の流加培地への添加が抗体産生量の増大に有効であることが示された。しかしながら、流加培地に tyrosine を溶解するためには pH を 2 付近まで低下させる必要があり、強酸性の流加培地を商用生産での培養に用いるのは困難である。そこで、アミノ酸添加法として、合成ペプチドの使用を検討した。

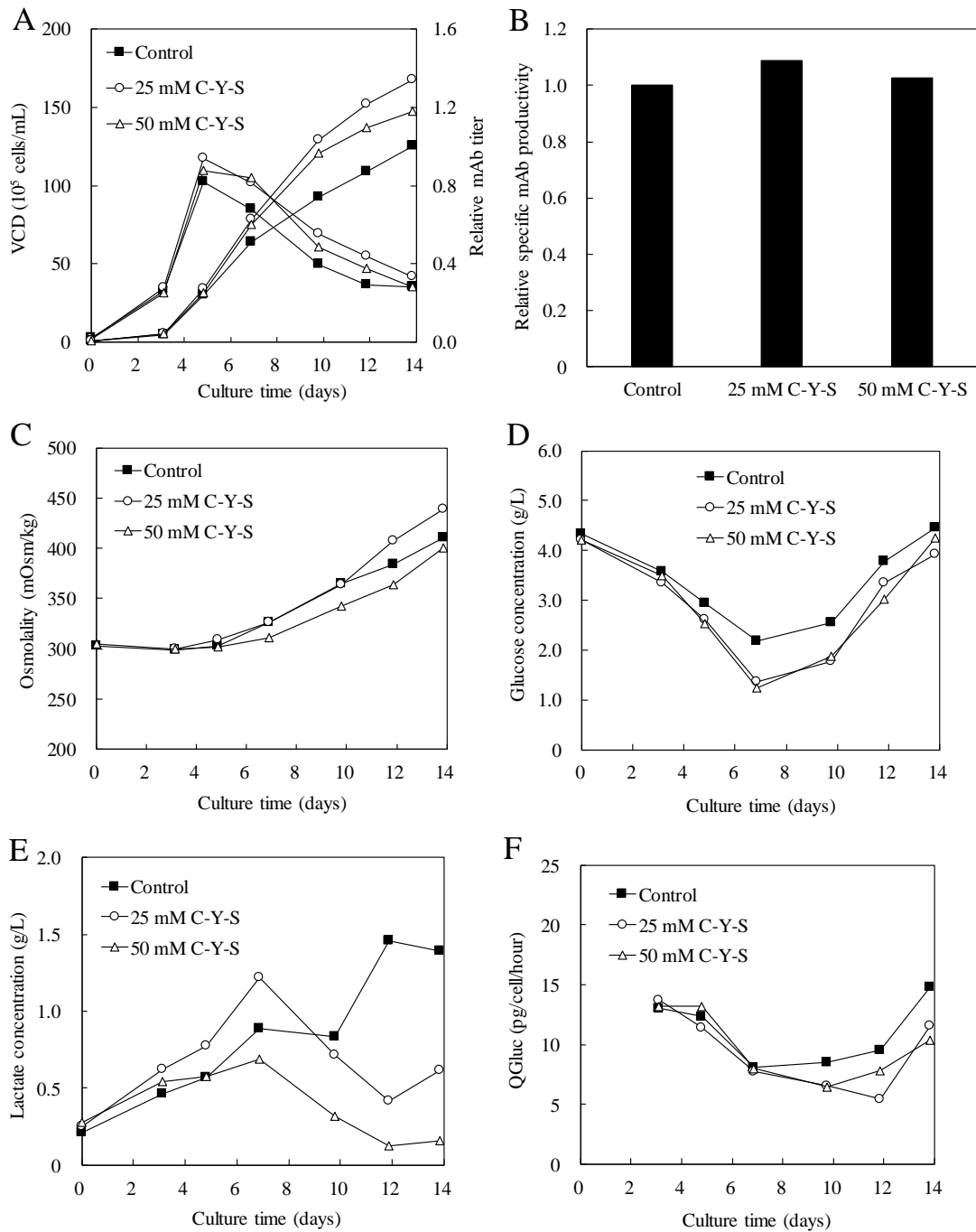
Cysteine-tyrosine-serine (Cys-Tyr-Ser) のトリペプチドの溶解性を検証したところ、50 mM の濃度まで pH を低下させることなく pH 7.0 の流加培地に溶解できることを確認した。Serine-tyrosine-cysteine の配列でのトリペプチドの合成も試みたが、cysteine のラセミ化のため合成することができなかった。Cys-Tyr-Ser のトリペプチドについては、25 と 50 mM の濃度を添加した流加培地を用いて培養を実施したところ、Cys-Tyr-Ser のトリペプチド添加の条件で細胞増殖および抗体産生量の向上が見られた (**Fig. 3-4A**)。最も高い抗体産生量が得られた条件は、25 mM の Cys-Tyr-Ser のトリペプチド添加で、コントロール培養と比較して抗体産生量が 35%増加した。1 細胞当たりの比抗体産生能は、25 と 50 mM の Cys-Tyr-Ser のトリペプチド添加で、コントロール培養と比較してそれぞれ 9%と 3%の増加を示した (**Fig. 3-4B**)。比抗体産生能が増加した理由として、トリペプチ

ドを添加した条件では、培養液中の乳酸の蓄積量が低減していたことが大きな要因として推察される (**Fig. 3-4E**)。Cys-Tyr-Ser のトリペプチドを添加した流加培地は中性のため、培養液へのアルカリ添加が不要となり、浸透圧の挙動はすべての条件で同じ結果が得られた (**Fig. 3-4C**)。グルコースの挙動に関しては、Cys-Tyr-Ser を添加した条件のほうがコントロール培養よりも少し低く推移する傾向となった (**Fig. 3-4D**)。1細胞当たりの比グルコース消費能は、コントロール培養と比較して Cys-Tyr-Ser を添加したほうが低くなった (**Fig. 3-4F**)。Cysteine-tyrosine (Cys-Tyr) のジペプチドについても同様に検討を行った結果、流加培地に 50 mM 添加することで抗体産生量が 10%向上した。以上の結果より、トリペプチド、ジペプチドとアミノ酸をどの形態で流加培地に溶解したとしても、乳酸蓄積量の低下および抗体産生量の向上については同じ効果が得られることが示された。また、ペプチドの形で添加することで、培養液中の浸透圧上昇を抑制することができた (**Fig. 3-4C**)。Zhu *et al.* (2005) は、高浸透圧によって細胞増殖の低下と比グルコース消費能の上昇が生じたことを報告している。Cys-Tyr-Ser のトリペプチドを用いることで、高浸透圧による細胞増殖の阻害はなくなり、細胞増殖が向上した (**Fig. 3-4A**)。比グルコース消費能はコントロール培養と比較すると、Cys-Tyr-Ser を添加した系では低下した (**Fig. 3-4F**)。これは、Cys-Tyr-Ser のトリペプチドがグルコースの代わりに解糖系の中間体として利用された可能

性を示唆している。詳細なメカニズムの解明のためには、代謝フラックス分析等の手法を用いて、Cys-Tyr-Ser のトリペプチドがどのように細胞内で代謝され、解糖系に活用されているかを明らかにしていく必要があると考える。

Franek *et al.* (2003) は大豆や小麦の加水分解物の分画の一部が、ハイブリドーマ細胞の増殖や抗体産生量の向上に寄与することを報告している。培養に効果の見られた加水分解物の分画には、3~6 個のアミノ酸から成るオリゴペプチドが含有されていることも述べられている (Frank and Katinger 2002; Frank and Fussenegger 2005)。Kang *et al.* (2012) は、tyrosine を含むジペプチド (tyrosine-histidine、tyrosine-lysine) が高い溶解性を有することと、生存率の維持及び抗体産生量の向上に効果的であることを示している。本研究では、(A) Cys-Tyr-Ser のトリペプチドが高い溶解性を示すこと、(B) 抗体産生量向上に効果があること、が見出された。難溶性のアミノ酸をペプチドの形で添加することは簡便であり、アミノ酸での添加と同等の効果が得られることが明らかとなった。

ペプチドによる溶解性向上については、ジペプチドでの報告はあるが、今回トリペプチドでも同様の効果があり、今後の応用範囲を広める可能性を示唆した結果であると考えられる。アミノ酸のみでは溶解可能な量に限界があることから、今後、更に完全合成培地の添加物としてペプチドが大きな役割を果たしていくと考えられる。

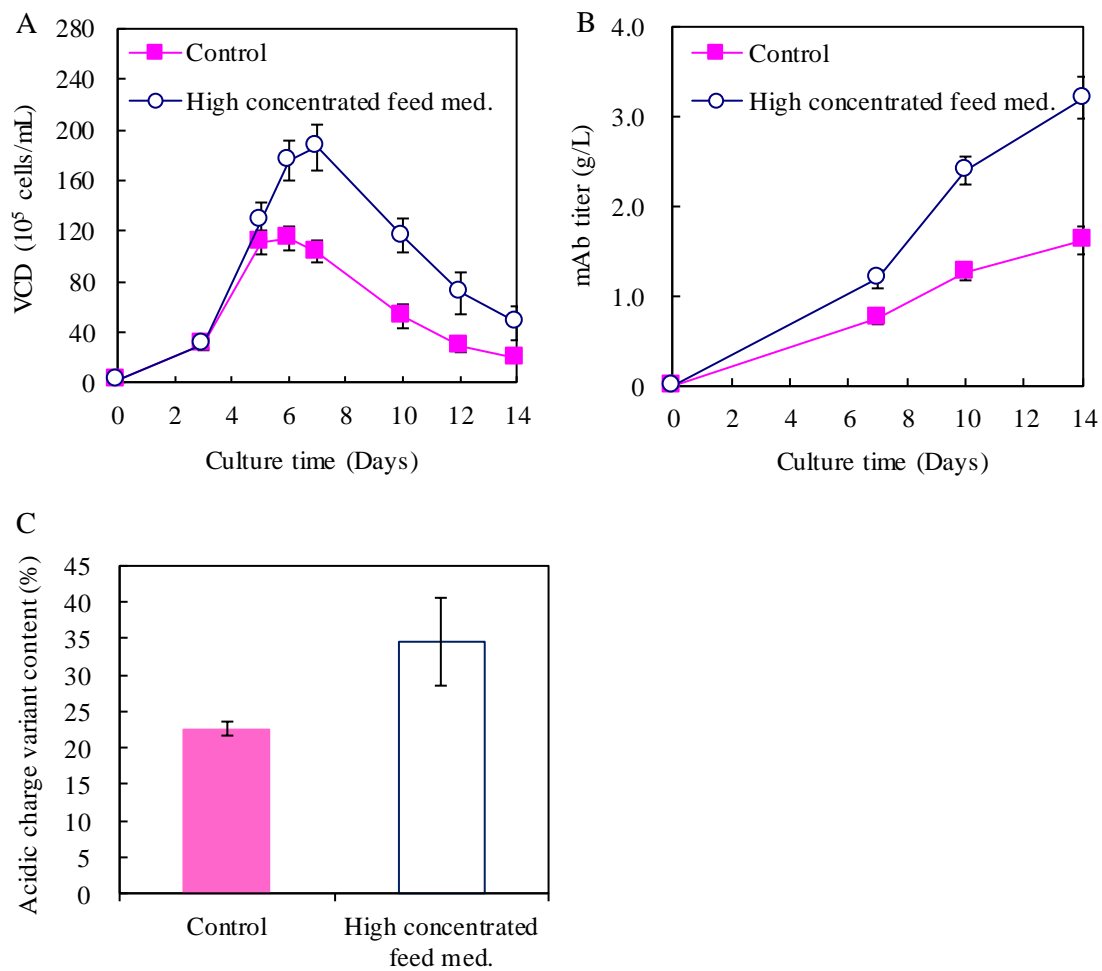


**Fig. 3-4.** Effects of cysteine-tyrosine-serine (C-Y-S) tripeptide supplementation in a chemically defined medium on the culture-time dependence of (A) viable cell density (VCD) and relative mAb titer, (B) relative specific mAb productivity, (C) osmolality, (D) glucose concentration, (E) lactate concentration, and (F) QGluc.

### 3-3-4 チロシン塩を用いた高濃度流加培地の作製

ペプチドによるアミノ酸添加は効率的な手法であることが証明されたが、現状、医薬品製造グレードのペプチドを合成するためには非常に費用がかかり、培地コストが割高となるため、商用製造での使用は困難であった。そこで、tyrosine の溶解量を増やすために溶解性の高いチロシン塩での添加を試みると共に、現行の流加培地に含まれる不要と思われる成分（無機塩、不溶性成分や緩衝剤、等）を低減する培地を作製した。チロシン塩での溶解にも限界があったため、tyrosine、serine、cysteine の代謝に関わるアミノ酸の添加も行った（培地メーカーと中外製薬（株）の秘密保持契約のため成分の詳細については非開示）。作製された高濃度流加培地を用いることで、コントロール培養に対し到達細胞密度は 63%増加し（**Fig. 3-5A**）、抗体産生量も 98%増加した（**Fig. 3-5B**）。高濃度流加培地の実製造への使用に向けて品質への影響を検証したところ、糖鎖や会合体等のプロファイルには全く影響がなかったが、目的物質由来不純物の 1 つとして考えられている酸性電荷バリエーション量については、コントロール培養に対して 53%の増加が見られた（**Fig. 3-5C**）。





**Fig. 3-5.** Effects of the new feed medium on the culture-time dependence of (A) viable cell density (VCD), (B) mAb titer and (C) acidic charge variant content.

### 3-4 結論

培養期間中に不足する serine、cysteine、tyrosine 濃度を一定量以上に維持することで、代謝シフトによる乳酸の取り込みが起こり、抗体産生量が向上することを見出した。Asparagine、glutamine の添加は、アンモニア濃度の上昇を引き起こし、CHO 細胞の生存率および抗体産生量が低下した。アミノ酸の添加は、アンモニアや乳酸といった細胞培養に有害な代謝物の産生を配慮する必要がある。

抗体産生量を増大させるためには、serine、cysteine、tyrosine の添加が必要であったが、2種類のアミノ酸の添加でも乳酸低下の効果は見られたが、抗体産生量最大化のためには3種類のアミノ酸の添加が必要であった。生産培地への serine、cysteine、tyrosine 添加による乳酸の低減効果は、本研究が初めての報告である。一方、チロシンを溶解するために流加培地の pH を低下させたことで、pH 調整用のアルカリが培養期間を通じて添加され、培養液の浸透圧が上昇した。

酸性の流加培地は商用生産に使用できないため、serine、cysteine、tyrosine のペプチド化を試みた。ペプチド化により溶解性が向上し、中性でも溶解可能となった。3種類のアミノ酸の添加で見られた培養液中の乳酸濃度の低下効果および抗体産生量の向上が、ペプチドでも同様に生じた。

現状、医薬品製造グレードのペプチドを合成するためには非常に費用がかかるため培地コストが割高となり、商用製造での使用は困難であった。そこで、チロシン塩での添加およびその他のアミノ酸を高濃度化した流加培地（高濃度流加培地）を作製した結果、抗体産生量が増加した。しかしながら、高濃度流加培地の使用により抗体の品質低下（酸性電荷バリエーション量増加）も見られた。実製造で高濃度流加培地を使用するためには、製法変更前後での品質の同等性/同質性（comparability）を保証する必要があるため、酸性電荷バリエーションの制御が今後の課題として残った。

## 第4章 培養温度のシフトが酸性電荷バリエーションへ及ぼす影響の解析と中心複

### 合計画を用いたプロセス最適化

#### 4-1 序

抗体医薬品製造のプロセス開発において、抗体の産生量の向上だけでなく、抗体の品質制御も重要な項目である。CHO 細胞が産生した抗体は、有効性や安全性に影響を及ぼす可能性のある不均一性 (heterogeneity) を有している。抗体における不均一性は、会合体、電荷バリエーション、酸化体、脱アミド体、グリコシル化、糖化、異性化、スクシンイミド化、N 末端のピログルタミル化や C 末端リジンの欠損等が知られている (Liu *et al.* 2008; Vlasak and Ionescu 2008 ; Harris *et al.* 2001)。その中でも、電荷バリエーションは最も重要な品質特性の 1 つとして考えられている。化学的に合成した抗体の電荷バリエーションでは、ターゲットタンパク質や膜への結合活性が変化し、細胞への透過性や分布、薬物動態に影響を及ぼすことが報告されている (Rodwell *et al.* 1986; Triguero *et al.* 1989; Gangopadhyay *et al.* 1996; Pardridge *et al.* 1996; Hong *et al.* 1999; Khawli *et al.* 2002; Lee and Pardridge *et al.* 2003; Perera *et al.* 2007)。そのため、抗体の電荷バリエーションは厳密に制御すべきであるが、有効的な制御パラメーターおよび制御方法はこれまでに全く報告されていない。

第3章において、流加培地へのアミノ酸の適切な添加によって抗体産生量の

向上に成功したが、それに伴い酸性電荷バリエーションの増加が認められ、抗体の品質制御に課題が残された。製法変更前後で抗体の物性のコンパラビリティ (comparability) を維持することは、医薬品の安全性や有効性 (薬理効果) の観点から必須である。そこで、酸性電荷バリエーションに影響する培養制御パラメーターを解析した。初期の制御パラメーターのスクリーニング法として、実験計画法の 1 つである Plackett–Burman 計画を用いた。さらにスクリーニングで選抜された制御パラメーターに関して、詳細な検討を行い、その効果を検証した。

## 4-2 材料および方法

### 4-2-1 使用細胞株と細胞培養条件

第 3 章と同じ CHO 細胞株を使用した (p. 9 参照)。CHO 細胞の培養条件は第 3 章と同じ条件 (p. 9~10 参照) を用いたが、生産培養に使用した培養器は、125 mL のモデル BCC の他に 1 L のモデル BCP (ABLE, Tokyo, Japan) を用いた。

### 4-2-2 基礎培地 (継代培地、初発培地) と流加培地

継代培地と生産培養の初発培地として第 3 章と同様に CHO-S-SFMII-CD-CHO 培地を使用した (p. 10 参照)。流加培地として、第 3 章で開発した、チロシン塩添加培地 (p. 27 参照) を用いた。

#### 4-2-3 分析方法

Cedex model AS20 (Roche Innovatis, Bielefeld, Germany) を用いて、トリパンブルー染色による生細胞密度、生存率の測定を行った。Cedex System 専用のサンプルカップに 1 mL の培養液を入れ、機器による自動測定を行った。抗体濃度については、サンプリングした培養液を遠心分離 (140 x g, 5 min) し、得られた上清を試料溶液として Protein-A HPLC を用いて測定した。Protein A カラムは POROS (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を使用し、移動相 A (80 mmol/L sodium citrate, 20 mmol/L citric acid, 300 mmol/L NaCl) で抗体をカラムに結合させ、移動相 B (10 mmol/L sodium citrate, 90 mmol/L citric acid, 300 mmol/L NaCl) で抗体を溶出し、クロマトグラムのピーク面積から抗体濃度を算出した。陽イオン交換 (CEX) のカラムについては、ProPac WCX-10 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) を使用した。CEX の分析に用いたサンプルは、抗体濃度の定量と同様に、サンプリングした培養液を遠心分離 (140 x g, 5 min) し、得られた上清をさらに POROS A20 Protein A カラム (Life Technologies) で精製したものを使用した。CEX での分析で、メインピークよりも早く溶出される幾つかのピークを纏めて酸性電荷バリエーションとして分析、定量を行った。

#### 4-2-4 Plackett-Burman 計画によるプロセスパラメーターのスクリーニング

Plackett-Burman 計画は、多くの因子の主効果を評価する方法として知られており、プロセスパラメーターの 1 次スクリーニングに有用である (Plackett *et al.* 1946)。Plackett-Burman 計画で評価する因子として、初発細胞密度 (initial viable cell density)、pH、温度シフト (temperature shift)、流加速度 (feed rate)、流加開始時期 (feed timing)、初発培地濃度 (initial medium concentration)、浸透圧 (osmolality) と溶存酸素濃度 (dissolved oxygen) を Failure Modes and Effects Analysis (FMEA) を用いて選抜した (Table 4-1)。FMEA は医薬品の製造プロセス開発のリスク分析において、有用な手法であることが広く知られている (Abu-Absi *et al.* 2010; Looby *et al.* 2011; Rouiller *et al.* 2012)。FMEA の評価指標は、重大性、頻度、検出可能性の 3 つで、それぞれのスコアの定義は著者のグループが独自に開発したものを使用した (Nagashima *et al.* 2013)。Risk Priority Number (RPN) は、重大性、頻度、検出可能性の 3 つの数値の積で算出した。RPN の閾値は、培養および分析の専門家の意見から 20 に設定した。Table 4-2 に検討した因子とその水準、Table 4-3 に実験マトリックスを示した。すべての培養はモデル BCC の培養器 (125 mL) を用いて実施した。

#### 4-2-5 中心複合計画を用いたプロセスパラメーターの最適化

FMEA のリスク分析および実験結果を参考に、特に重要と判断された、培養温度シフトのシフト温度とシフトタイミング、pH、初発細胞密度、抗体産生量に影響する可能性が高い基礎培地ロットの合計 5 つを重要なプロセスパラメーターとして選抜した (Table 4-4)。

プロセスパラメーターの最適化手法として、応答曲面法を採用した。応答曲面法では、応答と因子の関数を求めそれを積極的に活用し、よりよい水準を求めることができる。応答曲面の解析に際し、応答と因子の関係は最少 2 乗法で求めた。2 次モデルを用いることができ、応答と因子の関係の近似は、応答曲面の評価、応答の最大化等、より精密な解析に役立つ。応答曲面法の実験計画として、中心複合計画を用いた (Table 4-5)。

#### 4-2-6 統計解析

統計的検定および実験計画法の分析は JMP 9.0 のソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。必要に応じて統計的有意性を検証するために、スチューデントの t 分布を用いた両側検討を実施した。P 値が 0.05 以下の場合に有意差ありと定義した。



### 4-3 結果および考察

#### 4-3-1 Plackett-Burman 計画を用いたプロセスパラメーターのスクリーニング

本研究では、すべてのプロセスパラメーターについて、抗体の生産性と品質に対するリスク分析を、FMEA を用いて実施した。各プロセスパラメーターは、重大性、頻度、検出可能性の3つの項目に対して、これまで報告された知見や著者と共同研究者の実験データを基に評価した (Table 4-1)。RPN が 20 を超えたパラメーターは、初発細胞密度、pH、温度シフト、流加速度、流加開始時期、初発培地濃度、浸透圧と溶存酸素濃度の計 8 つで、実験で評価する因子として選抜した。FMEA のリスク分析を用いることにより、RPN が低く評価された因子については検討を省略することができ、プロセス開発の効率化に繋がった。

初回のスクリーニング方法として、Plackett-Burman 計画を用いた。実験数 12 回の Plackett-Burman 計画は、検討できる水準数は 2 つだが、一度に 8 因子の主効果を評価することが可能である。酸性電荷バリエーションへの影響を検討した 8 つのパラメーターとその水準を Table 4-2 に示した。12 回の実験における各水準 (-1、+1) の組合せと、培養終了後に測定した酸性電荷バリエーションの結果を Table 4-3 に示した。JMP による解析を実施した結果、酸性電荷バリエーションに影響を与える因子として、温度シフトのみが有意な効果を持つことが分かった ( $P < 0.05$ ) (Table 4-4)。

この結果、Plackett-Burman 計画が細胞培養のプロセスパラメーターの初回のスクリーニング方法として、効率的かつ有用な方法であることが示された。Plackett-Burman 計画を用いた検討の結果、培養温度シフトが酸性電荷バリエーションに影響を与えることが示唆された (Table 4-4)。González-Leal *et al.* (2011) は、CHO 細胞培養に使用する培地の最適化に Plackett-Burman 計画が有用であったことを報告している。これらの結果から、FMEA および Plackett-Burman 計画は、培養プロセス開発に要する時間とリソース (Resource) を省略できる合理的なアプローチであることが示された。

以上の結果を踏まえ、以降の節では、培養温度シフトの酸性電荷バリエーションへ及ぼす影響について検討を行った。

**Table 4-1.** Results of failure mode and effects analysis of the production culture step

DO, dissolved oxygen; IVCD, initial viable cell density; S, severity of impact score; O, probability of occurrence score; D, likelihood of detection score; RPN, risk priority number

Process parameter (unit)	Set point (current process)	Characterization range	S	O	D	RPN
IVCD ( $\times 10^5$ cells/mL)	2.0	1.0–3.0	7	2	5	70
pH (–)	$6.9 \pm 0.02$	6.8–7.0	7	2	3	42
Temperature shift (–)	Not conducted	Not conducted– 33°C, day5	7	2	3	42
Feed rate (mL/L)	24.0	12.0–36.0	4	2	5	40
Feed timing (day)	3	2–4	4	2	5	40
Initial medium concentration (–)	1.0	0.5–1.5	4	2	3	24
Feed medium osmolality (mOsm/kg)	$1000 \pm 30$	>1000	4	2	3	24
DO (%)	$40 \pm 2$	10–60	4	2	3	24
Temperature (°C)	$37.0 \pm 0.1$	36.5–37.5	7	2	1	14
Cell age (day)	–	<120	2	1	5	10
Initial glucose concentration (g/L)	4.6	4.0–6.0	4	2	1	8
Agitation speed of 1-L scale (rpm)	80	60–100	2	2	1	4
Working volume (–)	1.0	0.8–1.2	2	2	1	4

**Table 4-2.** Details of factors selected for the experimental design

Factor	Units	Level	
		-1	+1
pH	–	6.8	6.9
IVCD	$\times 10^5$ cells/mL	2.0	3.0
Temperature shift	–	33°C, day5	Not conducted
Feed rate	mL/h	0.1	0.15
Feed timing	Day	2.0	3.0
Initial medium concentration	–	1 $\times$	1.5 $\times$
Feed medium osmolality	mOsm/kg	1000	1200
DO	%	40	60

DO, dissolved oxygen

IVCD, initial viable cell density

**Table 4-3.** Plackett–Burman design and resulting contents of acidic charge variants

No.	pH	IVCD	Temperature shift	Feed rate	Feed timing	Initial medium concentration	Osmolality of feed medium	DO	Acidic charge variants [%]
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	33.9
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	25.4
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	30.7
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	22.5
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	22.3
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	32.4
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	18.7
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	21.6
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	22.1
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	31.6
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	31.7
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	31.7

DO, dissolved oxygen

IVCD, initial viable cell density

**Table 4-4.** Statistical analysis results for Plackett–Burman design

Factors	Estimate	<i>t</i> - ratio	Probability >   <i>t</i>
Intercept	27.050	70.08	<0.0001*
pH	0.183	0.47	0.6672
IVCD	0.783	2.03	0.1354
Temperature shift	4.950	12.82	0.001*
Feed rate	0.267	0.69	0.5393
Feed timing	0.550	1.42	0.2494
Initial medium concentration	0.783	2.03	0.1354
Osmolality	-0.493	-1.12	0.3433
DO	0.350	0.91	0.4314

\* Statistically significant (P<0.05)

DO, dissolved oxygen

IVCD, initial viable cell density

#### 4-3-2 培養温度シフト（シフト温度・シフトタイミング）が酸性電荷バリエーションへ及ぼす影響の解析

はじめに、シフト温度が酸性電荷バリエーションへ及ぼす影響について解析した。1 L の培養器に  $2.0 \times 10^5$  cells/mL の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C}$  で培養を開始した。コントロール培養については、培養開始から終了まで  $37^\circ\text{C}$  で培養し、培養温度シフトの条件は、培養 5 日目に  $37^\circ\text{C}$  から  $33^\circ\text{C}$  あるいは  $35^\circ\text{C}$  に温度を低下させ、細胞増殖、抗体産生量および酸性電荷バリエーション量への影響を解析した。温度をシフトした後は、シフトした温度で最終日まで培養を行った。通常、CHO 細胞は温度に対しての反応性が高いため、培養温度は厳密に制御され、本研究における管理幅も設定値に対して  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  以内で実施した。

細胞増殖は、培養 10 日目以降、培養温度シフトした条件のほうがコントロール条件よりも生細胞数が高く維持されていた (**Fig. 4-1A**)。培養 14 日目の生細胞数は、コントロール培養で  $6.5 \times 10^6$  cells/mL であったのに対して、 $35^\circ\text{C}$  のシフト条件が  $9.8 \times 10^6$  cells/mL、 $33^\circ\text{C}$  のシフト条件が  $1.18 \times 10^7$  cells/mL で、シフト温度が低いほど生細胞密度が維持される傾向が見られた。抗体産生量に関しては、培養 14 日目においてコントロールの条件が 3.5 g/L、 $35^\circ\text{C}$  のシフト条件が 3.1 g/L、 $33^\circ\text{C}$  のシフト条件が 2.8 g/L であった (**Fig. 4-1B**)。培養温度シフトによる抗体産生量の増加は認められなかった。酸性電荷バリエーション量は、培養 14 日目におい

てコントロール条件で 40%、35°C のシフト条件で 30%、33°C のシフト条件で 22% を示した (**Fig. 4-1C**)。コントロール条件に比べて 35°C、33°C へ温度シフトした条件で 14 日目の酸性電荷バリエーション量に統計的な有意差が認められた ( $P < 0.05$ , two-tailed Student's t-test)。最も低い酸性電荷バリエーション量は、33°C に温度シフトした条件で、コントロール条件と比べて 46% の低下効果が認められた。この結果、Plackett-Burman 計画の実験結果で予測された、培養温度シフトによる酸性電荷バリエーション低下効果を確認することができた。

次に、シフトタイミングが酸性電荷バリエーションへ及ぼす影響について解析した。初発細胞密度および培養開始温度は、先述の実験と同様に、 $2.0 \times 10^5$  cells/mL、37°C で設定し、1 L の培養器を用いた。シフト温度は 33°C で、培養 3 日目あるいは 5 日目で培養温度シフトを実施し、細胞増殖、抗体産生量および酸性電荷バリエーション量へ及ぼす影響を解析した。培養温度をシフトした後は、シフトした培養温度で最終日まで培養を行った。

CHO 細胞の増殖経過を **Fig. 4-2A** に示した。到達細胞密度は、コントロール条件が  $1.67 \times 10^7$  cells/mL で、培養 5 日目の培養温度シフトでは、 $1.68 \times 10^7$  cells/mL とコントロール条件と同等の結果となった。一方、培養 3 日目の培養温度シフトでは、 $9.1 \times 10^6$  cells/mL と細胞増殖が抑制された。しかしながら、培養 3 日目の培養温度シフトの条件のほうが、コントロール培養、培養 5 日目の温度シフト



トよりも培養後期において生細胞密度が維持される傾向があった (**Fig. 4-2A**)。抗体産生量は、コントロール条件が培養 14 日目で 3.5 g/L であったの対して、培養 5 日目の温度シフトが 2.8 g/L、培養 3 日目の培養温度シフトが 1.8 g/L と、シフトタイミングが早いほど抗体産生量は低下した (**Fig. 4-2B**)。酸性電荷バリエーション量については、コントロール条件が 40%であったのに対して 3 日目、5 日目のシフトタイミングの条件では、それぞれ 20%、22%であった (**Fig. 4-3C**)。培養温度シフトのタイミングを 5 日目から 3 日目に変更しても、酸性電荷バリエーション量の低下効果は限定的であった。培養 14 日目での酸性電荷バリエーション量は、コントロール条件と比較してシフトタイミング 3 日目、5 日目の条件で、統計的に有意な差が認められた ( $P < 0.05$ , two-tailed Student's t-test)。

温度シフトは、糖鎖付加や会合体形成といったタンパク質の品質に影響を与えることが報告されている (Borys *et al.* 2010; Gomez *et al.* 2012)。本研究では、温度シフトが酸性電荷バリエーションの生成を強力に抑制することを見出した (**Figs. 4-1C, 4-2C**)。

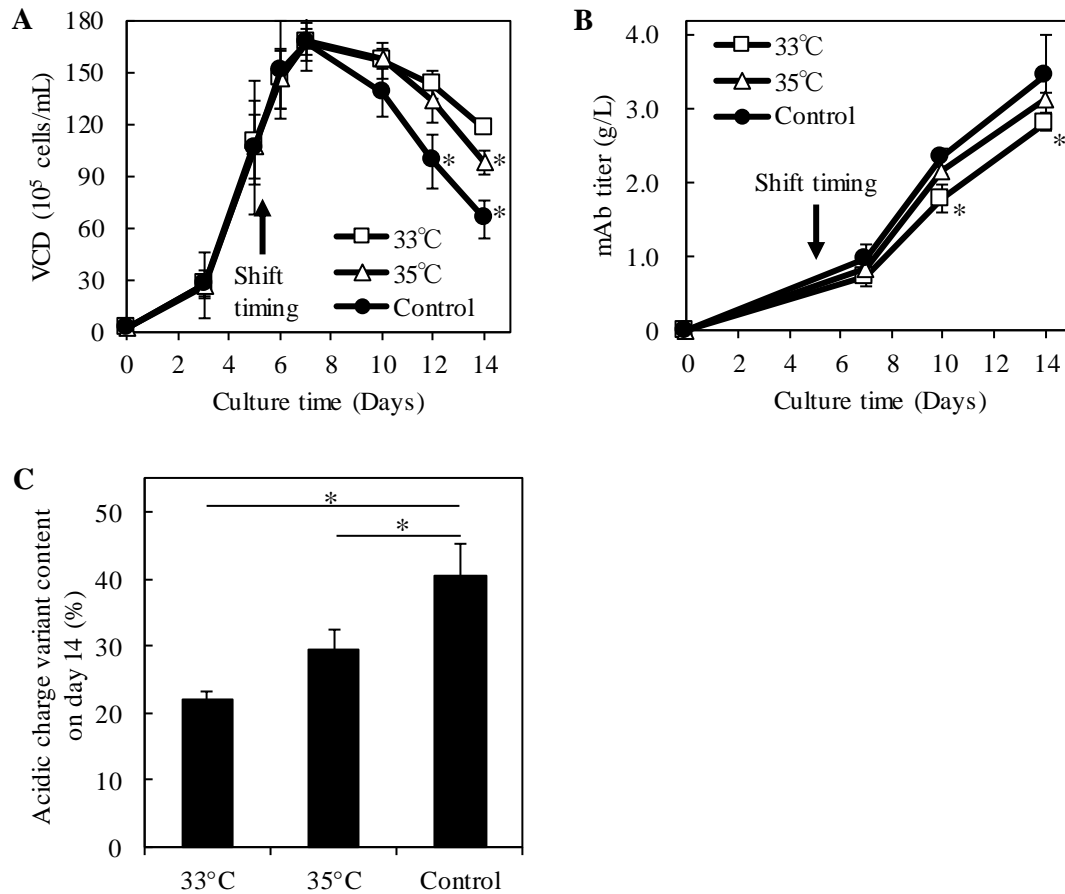
電荷バリエーションは重要な品質特性の 1 つとして考えているが、その制御方法として培養温度シフトが効率的な方法であることが明らかとなった。なお、本研究で見出した温度シフトの効果は 1,000 L スケールにおいても確認することができた (data not shown)。現在、商用スケール (10,000 L) での製造プロセスへの適

切な培養温度シフトの適用についても検討中である。

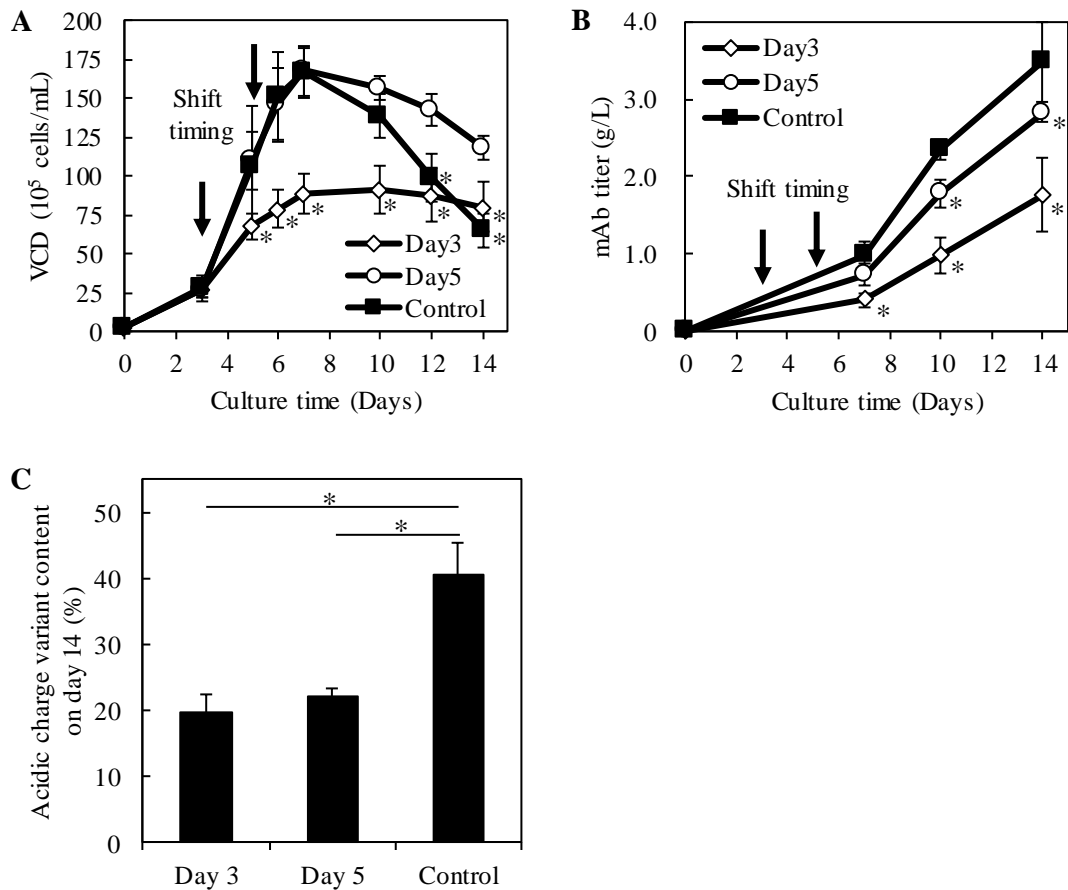
本研究では、培養温度シフトにより抗体産生量も低下しが、これまで多くの研究者が、培養温度シフトが生細胞密度の維持およびタンパク質生産量の向上に効果のあることを報告している (Furukawa and Ohsuye 1999; Kaufmann *et al.* 1999; Hendrick *et al.* 2001; Chen 2004; Fox *et al.* 2004; Trummer *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2007)。培養温度シフトの優位点として、細胞の生存率を維持することで、培養期間を延ばすことができ、1細胞当たりのタンパク質産生能を向上させることができる。本研究では、生細胞密度は維持されたが、抗体産生量は低下した。この原因は不明であるが、培養温度シフトによる酸性電荷バリエーション量の低下効果が、汎用性の高いものであることを証明するためには、培養温度シフトにより抗体産生量が向上する細胞株を用いても同様に、酸性電荷バリエーション量の低下が見られるのかを検証する必要がある。

また、培養温度シフトによる酸性電荷バリエーション量の低下メカニズムについても現状は未解明である。酸性電荷バリエーションはシアル酸付加、糖化、非還元ジスルフィド結合と Fc 領域の脱アミド体といった翻訳後修飾を受けたものにより生成される (Khawli *et al.* 2010; Miller *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011; Gandhi *et al.* 2012)。培養温度シフトによる酸性電荷バリエーション量の低下メカニズムを解明するためには、まず、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) により、どの

ような翻訳後修飾体が影響を受けるのかを明らかにする必要がある。



**Fig. 4-1.** Effects of different shift temperatures on cell growth, mAb titer, and acidic charge variant content. (A) Viable cell density (VCD). (B) mAb titer. (C) Content of acidic charge variants on day 14. All data points in (A) to (C) correspond to the averages of biological triplicates  $\pm$  standard deviation. \* $P < 0.05$  (two-tailed Student's t-test).



**Fig. 4-2.** Effects of changes in the timing of temperature shift on cell growth, mAb titer, and acidic charge variant content. (A) Viable cell density (VCD). (B) mAb titer. (C) Content of acidic charge variants on day 14. All data points in (A) to (C) correspond to the averages of biological triplicates  $\pm$  standard deviation. \* $P < 0.05$  (two-tailed Student's t-test).

### 4-3-3 中心複合計画を用いた培養パラメーターの最適化

培養温度のシフトにより酸性電荷バリエーションの低減効果は確認されたが、同時に抗体産生量の低下も見られた。したがって、抗体産生量と酸性電荷バリエーションの両方の応答に対してプロセスを最適化する必要がある。商用生産の必要条件としては、高産生、高品質の他にプロセスの高い頑健性（Robustness）も要求されている。そこで、中心複合計画を用いてプロセスの最適化とともに頑健性の評価も実施した。

FMEA のリスクアセスメントによって選抜されたプロセスパラメーターは 5 つであったため（**Table 4-5**）、5 因子複合計画を用いた。また、1 回で実験することが困難であったため、2 回に分けて実験を実施した。局所管理は不可能なので、軸点と頂点の区別なく完全無作為化して 2 ブロックに分けた。ブロック間誤差と純粋誤差を考慮するために、各ブロックに中心点を 2 つ加えて試験を実施した。実験条件と抗体産生量、酸性電荷バリエーション量の実験結果を **Table 4-6** に示した。

培養温度シフトのシフト温度とシフトタイミング、pH、初発細胞密度の主効果と 2 次のべき乗効果、および因子間の 2 次交互作用を変数として重回帰分析を行った。変数選択は  $p=0.25$  の増減法とした。抗体産生量および酸性電荷バリエーション量の予測重回帰モデルに組み込まれた変数を **Table 4-7** に示した。すべて

の効果が、抗体産生量及び酸性電荷バリエーション量に及ぼす結果となり、複雑な相互作用の存在が示唆された。残差分析を行ったところ、全体として確立した予測モデルに偏った傾向は観察されず、異常が無いことを確認した。pH を 6.9、初発細胞密度を  $2.0 \times 10^5$  cells/mL に固定したときのシフト温度とシフトタイミングが与える抗体産生量と酸性電荷バリエーションへの影響を **Fig. 4-3** に示した。シフト温度が高くなれば抗体産生量は増加するが、酸性電荷バリエーションも増加する結果となっており、これまでの実験結果と同じ傾向が確認できた。

解析結果から、パラメーターの最適値は、シフト温度が 33°C、シフトタイミングが培養 5 日目、pH が 6.9、初発細胞密度が  $2.0 \times 10^5$  cells/mL という結果になった。この条件で抗体生産培養を実施したところ、コントロール条件と比べてパラメーターの最適化条件では、到達細胞密度が 63%増加 (**Fig. 4-4A**) した。また、抗体産生量も 71%向上 (**Fig. 4-4B**) し、酸性電荷バリエーション量は同等のレベルとなった (**Fig. 4-4C**)。この結果から、中心複合計画による培養パラメーターの最適化は、製法開発において非常に有効な手法であることが示唆された。本研究で得られた成果は、癌やアトピー性皮膚炎、血友病の臨床試験で使用する原液製造で活用されている。

**Table 4-5.** Details of factors selected for the central composite design.

Factor	Units	Level		
		1	2	3
Shift temperature (S Te)	°C	32	33	34
Shift timing (S Ti)	hour	96	120	144
pH	-	6.8	6.9	7.0
IVCD	$\times 10^5$ cells/mL	1	2	3
Basal medium lot	-	Lot 1	Lot 2	Lot 3

IVCD, initial viable cell density



**Table 4-6.** Central composite design and results of mAb titers and contents of acidic charge variants.

No.	pattern	Shift temperature	Feed timing	pH	IVCD	Basal medium lot	mAb titer [g/L]	Acidic charge variants [%]
1	0a000	33	96	6.9	2	Lot 3	3.42	18.1
2	----++	32	96	6.8	3	Lot 2	2.91	13
3	+---+-	34	96	6.8	3	Lot 1	3.25	17.5
4	0A000	33	144	6.9	2	Lot 3	3.57	18.5
5	000a0	33	120	6.9	1	Lot 3	2.3	14.8
6	-+---+	32	144	6.8	1	Lot 2	1.53	12.2
7	A0000	34	120	6.9	2	Lot 3	3.05	18.7
8	a0000	32	120	6.9	2	Lot 3	3.21	14.7
9	0	33	120	6.9	2	Lot 3	2.94	16.8
10	+--+++	34	96	7	3	Lot 2	2.58	38
11	+--+--	34	96	7	1	Lot 1	2.8	16.8
12	++++--	34	144	7	3	Lot 1	2.61	37.6
13	00a00	33	120	6.8	2	Lot 3	3.03	12.8
14	00A00	33	120	7	2	Lot 3	3.03	21.9
15	0	33	120	6.9	2	Lot 3	2.97	20.3
16	++----	34	144	6.8	1	Lot 1	2.44	17
17	0000A	33	120	6.9	2	Lot 2	2.79	18.9
18	0	33	120	6.9	2	Lot 3	2.9	19.6
19	0	33	120	6.9	2	Lot 3	2.74	19.3
20	---+--+	32	96	7	1	Lot 2	1.09	15.5
21	-+----	32	144	7	1	Lot 1	2.52	17.9
22	-+++++	32	144	7	3	Lot 2	2.74	18.9
23	---++-	32	96	7	3	Lot 1	2.43	19.1
24	0000a	33	120	6.9	2	Lot 1	2.69	19.7
25	-+--+	32	144	6.8	3	Lot 1	2.62	18.5
26	+----+	34	96	6.8	1	Lot 2	1.97	14
27	000A0	33	120	6.9	3	Lot 3	2.6	19.1
28	++-++	34	144	6.8	3	Lot 2	2.94	21.1
29	-----	32	96	6.8	1	Lot 1	0.74	14.3
30	+++--+	34	144	7	1	Lot 2	2.92	24.5

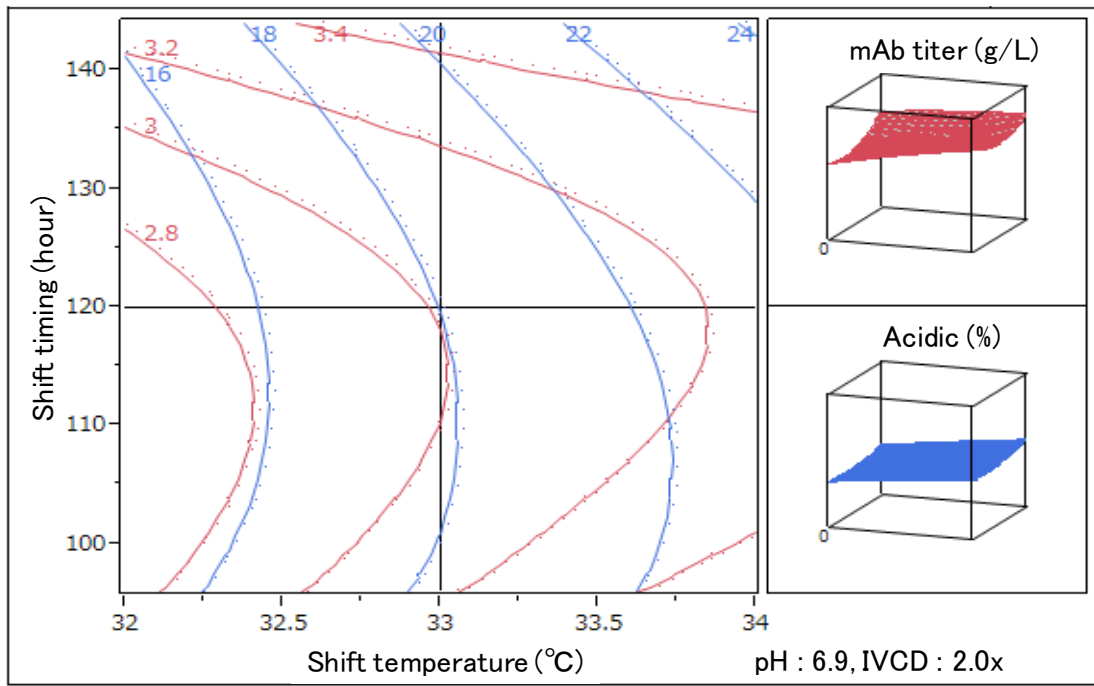
**Table 4-7.** Result of multiple regression analysis.

	S Te	S Ti	pH	IVCD	S Te x S Ti	S Te x pH	S Te x IVCD	S Ti x pH	S Ti x IVCD	pH x IVCD
Titer	⊙	○2		⊙2	○			○	○	⊙
Acidic	⊙	○2	⊙	⊙		○	○			○

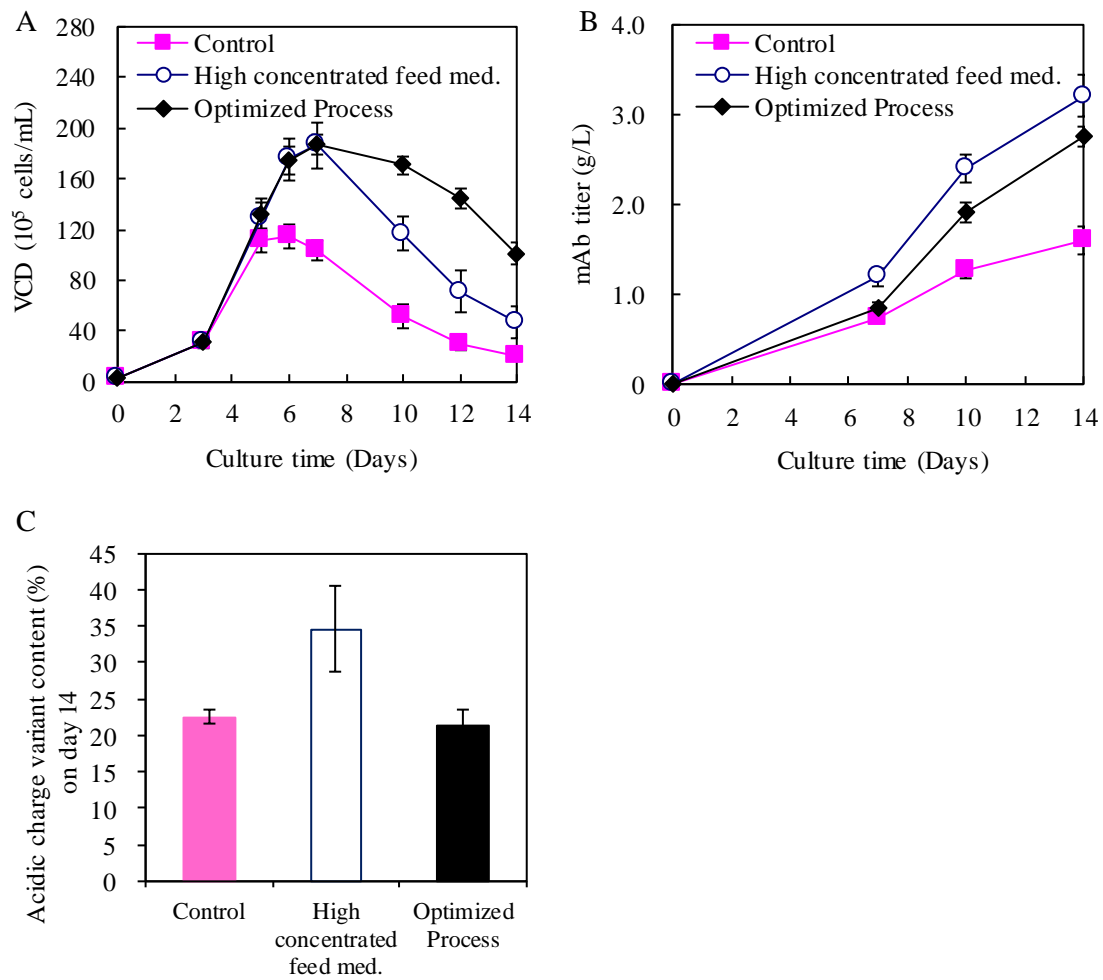
⊙, significant effect (top3)

○, significant effect

2, quadratic effect



**Fig 4-3.** Understanding the design space in terms of contour plots.



**Fig. 4-4.** Effects of the optimized process on the culture-time dependence of (A) viable cell density (VCD), (B) mAb titer and (C) acidic charge variant content.

#### 4-4 結論

Plackett–Burman 計画が培養パラメーターのスクリーニング方法として有用であること、培養温度シフトが酸性電荷バリエーション量に影響を及ぼすことが示された。また、シフト温度依存的に酸性電荷バリエーション量が大きく変化することも明らかとなった。今回の検討では、培養温度シフトにより抗体産生量の低減が見られたが、多くの報告では培養温度シフトにより抗体産生量は向上することが示されている。培養温度シフトによる酸性電荷バリエーション量の低減効果がより汎用的な技術であることを示すためには、培養温度シフトにより抗体産生量が向上する細胞株で、同様の効果があることを示す必要がある。

培養温度シフトの導入により、酸性電荷バリエーション量を低減することが可能となったが、抗体産生量の低下も見られた。そこで、中心複合計画を用いて培養パラメーターの最適化を実施し、各パラメーターのセットポイントを決定した。その結果、酸性電荷バリエーション量を目標値まで低減させるとともに、高い抗体産生量を得ることができるシステムの構築に成功した。

## 第5章 総括

### 5-1 論文の成果と総括

近年、高純度で特異性が高いモノクローナル抗体（抗体医薬）は様々な診断や治療に幅広く使用され、高い薬効と安全性が立証されている。しかしながら、抗体医薬は低分子医薬品と比べて製造コストが高いため、薬価が高額となる点が使用上の大きな問題となっている。製造コストを低減するためには抗体の生産性を向上させる事が必須であるが、同時に品質の制御も重要である。

本研究では、まず抗体産生量向上のための培地改良を行い、次に、抗体の重要な品質評価項目である酸性電荷バリエーション量と抗体産生量を指標に、培養パラメーターの最適化を実施した。そして、CHO 細胞による抗体医薬品の高品質、高効率生産システムの開発に成功した。

第1章では、本研究の背景について述べた。

第2章では、動物細胞を宿主として用いた、組換えタンパク質や抗体医薬品の代表的な原薬製造プロセスとその問題点を概説し、抗体生産性向上に関する代表的な既往の研究を述べることによって、本研究の位置づけと目的を明らかにした。

第3章では、「CHO 細胞培養における抗体生産性向上のための完全合成流加培地の最適化」と題し、Spent media のアミノ酸分析により低下傾向にあった serine、

cysteine、tyrosine に、抗体生産性を向上させる効果があることを見出した。

Tyrosine の低い溶解性については、ペプチド化することで改善することができたが、今後の商用製造でのペプチドの使用に関しては、価格面に対する検討が必要である。ペプチド添加の代替法として、チロシン塩での添加およびその他のアミノ酸を高濃度化した流加培地を作製することで、serine、cysteine、tyrosine 添加と同等以上の抗体の産生量を増加させることに成功した。

第4章では、「酸性電荷バリエーションへの温度シフトの影響及び中心複合計画を用いたプロセス最適化」と題し、高濃度流加培地を使用することで生じた、酸性電荷バリエーション量の増加に対して、低減効果のある培養パラメーターのスクリーニングを実施した。Plackett-Burman 計画から、酸性電荷バリエーションの生成を抑制するプロセスパラメーターとして、温度シフトを見出した。また、中心複合計画を用いてプロセスパラメーターの最適化を実施し、頑健性の高い製法を完成することができた。

Spent media のアミノ酸分析による培地の改良、Plackett-Burman 計画や中心複合計画を用いた培養法の最適化の一連のプロセスは、今後の培養製法開発のプラットフォームとして活用できると考える。また、本研究で得られた成果は、癌やアトピー性皮膚炎、血友病の臨床試験で使用する原液製造で活用され、実際に下記2項目の貢献がなされた。① 高濃度化流加培地の開発

により抗体の生産性を向上させることに成功し、抗体をより安く恒常的に生産し供給することが可能となった、② 酸性電荷バリエーション生成を抑制するプロセスパラメーターとして培養温度シフトを見出したこと、中心複合計画でプロセスパラメーターを最適化したことで、CHO 細胞による高品質なバイオ医薬品の実用的な高生産培養プロセスの構築に成功した。

## 5-2 今後の課題

今後の課題としては、培養温度シフトによる酸性電荷バリエーションの抑制効果が、より汎用的な技術であることを証明する必要がある。培養温度シフトにより生産性が向上する細胞株を用いて同様の効果が得られるかを確認していく予定である。ペプチドのコストについては、ペプチド合成メーカーとも相談し、医薬品製造に使用できる品質のものをいかに安く入手できるかを検討していきたい。



引用文献

**Abu-Absi, S. F., Yang, L., Thompson, P., Jiang, C., Kandula, S., Schilling, B., and**

**Shukla, A. A.:** Defining process design space for monoclonal antibody cell culture.

*Biotechnol. Bioeng.*, **106**, 894–905 (2010).

**Altamirano, C., Paredes, C., Cairó, J. J. and Gòdia, F.:** Improvement of CHO cell

culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine.

*Biotechnol. Prog.*, **16**, 69-75 (2000).

**Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairo, J. and Godia, F.:** Strategies for fed-

batch cultivation of t-PA producing CHO CELS: substitution of glucose and glutamine

and rational design of culture medium. *J. Biotechnol.*, **110**, 171–179 (2004).

**Altamirano, C., Illanes, A., Becerra, S., Cairó, J. J. and Gòdia, F.:** Considerations

on the lactate consumption by CHO cells in the presence of galactose. *J. Biotechnol.*,

**125**, 547-556 (2006).

**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).

**Borys, M. C., Dalal, N. G., Abu-Absi, N. R., Khattak, S. F., Jing, Y., Xing, Z., and Li, Z. J.:** Effects of culture conditions on N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) content of a recombinant fusion protein produced in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 1048–1057 (2010).

**Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J., Ballez, J. S., Agathos, S. N. and Schneider, Y. J.:** Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon-gamma-producing CHO cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **39**, 291-296 (2003).

**Canning, W. M. and Fields, B. N.:** Ammonium chloride prevents lytic growth of reovirus and helps to establish persistent infection in mouse L cells. *Science*, **219**, 987-988 (1983).

**Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P. A. and Wang, D. I.:** Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 55-61 (2001).

**Chen, P. and Harcum, S. W.:** Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J. Biotechnol.*, **117**, 277-286 (2005).

**Chen, P. and Harcum, S. W.:** Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J. Biotechnol.*, **117**, 277–286 (2005).

**Chen, Z., Iding, K., Lütkemeyer, D. and Lehmann, J.:** A low-cost chemically defined protein free medium for a recombinant CHO cell line producing prothrombin. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 837-841 (2000).

**Chen, Z.:** Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture. *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 239–243 (2004).

**Chong, W. P., Reddy, S. G., Yusufi, F. N., Lee, D. Y., Wong, N. S., Heng, C. K., Yap, M. G. and Ho, Y. S.:** Metabolomics-driven approach for the improvement of Chinese hamster ovary cell growth: overexpression of malate dehydrogenase II. *J. Biotechnol.*, **147**, 116-121 (2010).

**Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency, London:** Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products (reference number: CPMP/BWP/1793/02), (2013).

**Crowell, C. K., Grampp, G. E., Rogers, G. N., Miller, J., and Scheinman, R. I.:** Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol. Bioeng.*, **96**, 538-549 (2007).

**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).

**Fogolín, M. B., Wagner, R., Etcheverrigaray, M. and Kratje, R.:** Impact of temperature reduction and expression of yeast pyruvate carboxylase on hGM-CSF-producing CHO cells. *J. Biotechnol.*, **109**, 179-191 (2004).

**Fox, S. R., Patel, U. A., Yap, M. G., and Wang, D. I.:** Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 177–184 (2004).

**Franek, F. and Fussenegger, M.:** Survival factor-like activity of small peptides in hybridoma and CHO cells cultures. *Biotechnol Prog.*, **21**, 96-98 (2005).

**Franek, F. and Katinger, H.:** Specific effects of synthetic oligopeptides on cultured animal cells. *Biotechnol Prog.*, **18**, 155-158 (2002).

**Franek, F., Eckschlager, T. and Katinger, H.:** Enhancement of monoclonal antibody production by lysine-containing peptides. *Biotechnol. Prog.*, **19**, 169-174 (2003).

**Furukawa, K., and Ohsuye, K.:** Enhancement of productivity of recombinant alpha-amidating enzyme by low temperature culture. *Cytotechnology*, **31**, 85–94 (1999).

**Gagnon, M., Hiller, G., Luan, Y. T., Kittredge, A., DeFelice, J. and Drapeau, D.:**

High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 1328-1337 (2011).

**Gandhi, S., Ren, D., Xiao, G., Bondarenko, P., Sloey, C., Ricci, M. S., and**

**Krishnan, S.:** Elucidation of degradants in acidic peak of cation exchange chromatography in an IgG1 monoclonal antibody formed on long-term storage in a liquid formulation. *Pharm. Res.*, **29**, 209–224 (2012).

**Gandor, C., Leist, C., Fiechter, A., and Asselbergs, F. A.:** Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.*, **377**, 290–294 (1995).

**Gangopadhyay, A., Petrick, A. T., and Thomas, P.:** Modification of antibody isoelectric point affects biodistribution of 111-indium-labeled antibody. *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 257–261 (1996).

**Gawlitsek, M., Papac, D. I., Sliwkowski, M. B. and Ryll, T.:** Incorporation of <sup>15</sup>N from ammonium into the N-linked oligosaccharides of an immunoadhesin glycoprotein expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*, **9**, 125-131 (1999).

**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).

**González-Leal, I. J., Carrillo-Cocom, L. M., Ramírez-Medrano, A., López-Pacheco, F., Bulnes-Abundis, D., Webb-Vargas, Y., and Alvarez, M. M.:** Use of a Plackett-Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnol. Prog.*, **27**, 1709–1717 (2011).

**Gorfien, S., Paul, B., Walowitz, J., Keem, R., Biddle, W., and Jayme, D.:** Growth of NS0 cells in protein-free, chemically defined medium. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 682-687 (2000).

**Ha, T. K. and Lee, G. M.:** Effect of glutamine substitution by TCA cycle intermediates on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture. *J. Biotechnol.*, **180**, 23-29 (2014).

**Hansen, H. A. and Emborg, C.:** Extra-and intracellular amino acid concentrations in continuous Chinese hamster ovary cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 560–564 (1994).

**Harris, R. J., Kabakoff, B., Macchi, F. D., Shen, F. J., Kwong, M., Andya, J. D., Shire, S. J., Bjork, N., Totpal, K., and Chen, A. B.:** Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **752**, 233–245 (2001).

**Hassell, T., Gleave, S. and Butler, M.:** Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **30**, 29-41 (1991).

**Hata, J., Tamura, T., Yokoshima, S., Yamashita, S., Kabeno, S., Matsumoto, K. and Onodera, K.:** Chemically defined medium for the production of biologically active substances of CHO cells. *Cytotechnology*, **10**, 9-14 (1992).

**Heidemann, R., Zhang, C., Qi, H., Rule, J. L., Rozales, C., Park, S., Chuppa, S., Ray, M., Michaels, J., Konstantinov, K. and Naveh, D.:** The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, **32**, 157-167 (2000).

**Hendrick, V., Winnepenninckx, P., Abdelkafi, C., Vandeputte, O., Cherlet, M., Marique, T., Renemann, G., Loa, A., Kretzmer, G., and Werenne, J.:** Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis. *Cytotechnology*, **36**, 71–83 (2001).

**Hong, G., Bazin-Redureau, M. I., and Scherrmann, J. M.:** Pharmacokinetics and organ distribution of cationized colchicine-specific IgG and Fab fragments in rat. *J Pharm. Sci.*, **88**, 147–153 (1999).

**Huang, E. P., Marquis, C. P. and Gray, P. P.:** Development of Super-CHO protein-free medium based on a statistical design. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**, 431-441 (2007).

**Hwang, S. J., Yoon, S. K., Koh, G. Y. and Lee, G. M.:** Effects of culture temperature and pH on flag-tagged COMP angiopoietin-1 (FCA1) production from recombinant CHO cells: FCA1 aggregation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 305-315 (2011).

**Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J. and Wagner, R.:** Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, **66**, 238-246 (1999).

**Ito, M. and McLimans, W. F.:** Ammonia inhibition of interferon synthesis. *Cell Biol Int Rep.*, **5**, 661-666 (1981).

**Kang, S., Mullen, J., Miranda, L. P. and Deshpande, R.:** Utilization of tyrosine- and histidine-containing dipeptides to enhance productivity and culture viability. *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 2286-2294 (2012).



**Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., and Bailey, J. E.:** Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 573–582 (1999).

**Khawli, L. A., Mizokami, M. M., Sharifi, J., Hu, P., and Epstein, A. L.:** Pharmacokinetic characteristics and biodistribution of radioiodinated chimeric TNT-1, -2, and -3 monoclonal antibodies after chemical modification with biotin. *Cancer Biother Radiopharm.*, **17**, 359–370 (2002).

**Khawli, L. A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z. W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., and other 8 authors:** Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *MAbs.*, **2**, 613–624 (2010).

**Khoo, S. H. and Al-Rubeai, M.:** Metabolic characterization of a hyper-productive state in an antibody producing NS0 myeloma cell line. *Metab. Eng.*, **11**, 199-211 (2009).

**Kim, S. H. and Lee, G. M.:** Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 152–159 (2007a).

**Kim, S. H. and Lee, G. M.:** Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 659-665 (2007b).

**Lee, H., Kabbur, S., Pollastrini, L., Sun, Z., Mills, K., Johnson, K., Karypis, G. and Hu, W. S.:** Multivariate analysis of cell culture bioprocess data—lactate consumption as process indicator. *J. Biotechnol.*, **162**, 210–223 (2012).

**Lee, H. J., and Pardridge, W. M.:** Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics, and tumor imaging. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 546–553 (2003).

**Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C., and Sun, J.:** Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2426–2447 (2008).

**Looby, M., Ibarra, N., Pierce, J. J., Buckley, K., O'Donovan, E., Heenan, M.,**

**Moran, E., Farid, S. S., and Baganz, F.:** Application of quality by design principles to the development and technology transfer of a major process improvement for the manufacture of a recombinant protein. *Biotechnol. Prog.*, **27**, 1718–1729 (2011).

**Lunt, S.Y. and Vander Heiden, M. G.:** Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-446 (2011).

**Luo, Y. and Chen, G.:** Combined approach of NMR and chemometrics for screening peptones used in the cell culture medium for the production of a recombinant therapeutic protein. *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 1654–1659 (2007).

**Ma, N., Ellet, J., Okediadi, C., Hermes, P., McCormick, E. and Casnocha, S.:** A single nutrient feed supports both chemically defined NS0 and CHO fed-batch processes: Improved productivity and lactate metabolism, *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1353–1363 (2009).

**McQueen, A. and Bailey, J. E.:** Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH. *Bioproc. Eng.*, **6**, 49–61 (1991).

**Miller, A. K., Hambly, D. M., Kerwin, B. A., Treuheit, M. J., and Gadgil, H. S.:** Characterization of site-specific glycation during process development of a human therapeutic monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2543–2550 (2011).

**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 (2011).

**Nagashima, H., Watari, A., Shinoda, Y., Okamoto, H., and Takuma, S.:** Application of a quality by design approach to the cell culture process of monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a design space. *J. Pharm. Sci.*, **102**, 4274–4283 (2013).

**Pallavicini, M. G., DeTeresa, P. S., Rosette, C., Gray, J. W., and Wurm, F. M.:**

Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 401-404 (1990).

**Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Diagne, A., and Zack, J. A.:** Cationized

hyperimmune immunoglobulins: pharmacokinetics, toxicity evaluation and treatment of human immunodeficiency virus-infected human-peripheral blood lymphocytes-severe combined immune deficiency mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 246–252 (1996).

**Pascoe, D. E., Arnott, D., Papoutsakis, E. T., Miller, W. M. and Andersen, D. C.:**

Proteome analysis of antibody-producing CHO cell lines with different metabolic profiles. *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 391–410 (2007).

**Perera, R. M., Zoncu, R., Johns, T. G., Pypaert, M., Lee, F. T., Mellman, I., Old, L.**

**J., Toomre, D. K., and Scott, A. M.:** Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Neoplasia.*, **9**, 1099–1110 (2007).

**Plackett, R. L., and Burman, J. P.:** The design of optimum multifactorial

experiments. *Biometrics*, **33**, 305–325 (1946).

- Rathmell, J. C., Fox, C. J., Plas, D. R., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M. and Thompson, C. B.:** Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 7315-7328 (2003).
- Reuveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. and Miller, L.:** Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *J. Immunol. Methods*, **86**, 53-59 (1986).
- Rodwell, J. D., Alvarez, V. L., Lee, C., Lopes, A. D., Goers, J. W., King, H. D., Powsner, H. J., and McKearn, T. J.:** Site-specific covalent modification of monoclonal antibodies: in vitro and in vivo evaluations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **83**, 2632–2636 (1986).
- Rouiller, Y., Solacroup, T., Deparis, V., Barbaferi, M., Gleixner, R., Broly, H., and Eon-Duval, A.:** Application of Quality by Design to the characterization of the cell culture process of an Fc-Fusion protein. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 426–437 (2012).
- Schneider, M., ElAlaoui, M., vonStockar, U. and Marison, I.W.:** Batch cultures of a hybridoma cell line performed with in situ ammonia removal. *Enzym. Microb. Technol.*, **20**, 268–276 (2012).

**Seth, G., Hossler, P., Yee, J. C. and Hu, W. S.:** Engineering cells for cell culture bioprocessing — physiological fundamentals. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **101**, 119-164 (2006).

**Singh, R. P., Al-Rubeai, M., Gregory, C. D. and Emery, A. N.:** Cell death in bioreactors: a role for apoptosis. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 720-726 (1994).

**Sung, Y. H., Lim, S. W., Chung, J. Y. and Lee, G. M.:** Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 527-536 (2004).

**Tabuchi, H., Sugiyama, T., Tanaka, S. and Tainaka, S.:** Overexpression of taurine transporter in Chinese hamster ovary cells can enhance cell viability and product yield, while promoting glutamine consumption. *Biotechnol. Bioeng.*, **107**, 998–1003 (2010).

**Triguero, D., Buciak, J. B., Yang, J., and Pardridge, W. M.:** Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 4761–4765 (1989).

**Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, K., Weik, R., Borth, N., Katinger, H., and Müller, D.:** Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation—a tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **94**, 1045–1052 (2006).

**Vlasak, J., and Ionescu, R.:** Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 468–481 (2008).

**Wlaschin, K. F. and Hu, W. S.:** Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. *J. Biotechnol.*, **131**, 168-176 (2007).

**Wurm, F. M.:** Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1393-1398 (2004).

**Xie, L., Nyberg, G., Gu, X., Li, H., Möllborn, F. and Wang, D.I.:** Gamma-interferon production and quality in stoichiometric fed-batch cultures of Chinese hamster ovary (CHO) cells under serum-free conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 577-582 (1997).

**Yang, M., Butler, M.:** Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 751-759 (2000).

**Yoon, S. K., Ahn, Y.-H., and Jeong, M. H.:** Effect of culture temperature on follicle-stimulating hormone production by Chinese hamster ovary cells in a perfusion bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 83–89 (2007).

**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).

**Zhang, J., Reddy, J., Buckland, B. and Greasham, R.:** Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*, **82**, 640-652 (2003).

**Zhang, J. and Robinson, D.:** Development of Animal-free, Protein-Free and Chemically-Defined Media for NS0 Cell Culture. *Cytotechnology*, **48**, 59-74 (2005).

**Zhang, T., Bourret, J., and Cano, T.:** Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5079–86 (2011).

**Zhu, M. M., Goyal, A., Rank, D. L., Gupta, S. K., Vanden, Boom T. and Lee, S. S.:** Effects of elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: a case study. *Biotechnol. Prog.*, **21**, 70-77 (2005).



**Zhou, M., Crawford, Y., Ng, D., Tung, J., Pynn, A. F., Meier, A., Yuk, I. H.,**

**Vijayasankaran, N., Leach, K., Joly, J., Snedecor, B. and Shen, A.:** Decreasing

lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO)

by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase

kinases. *J. Biotechnol.*, **153**, 27–34 (2011).

**Zhou, W., Chen, C. C., Buckland, B. and Aunins, J.:** Fed-batch culture of

recombinant NS0 myeloma cells with high monoclonal antibody production.

*Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 783–792 (1997).

**deZengotita, V. M., Abston, L.R., Schmelzer, A. E., Shaw, S. and Miller, W. M.:**

Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide

and osmolality. *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 741-52 (2002).

## 付記

本論文は下記の誌上および学会発表した研究報告の内容を中心にまとめたものである。

## 報文

1. **Kishishita, S., Nishikawa, T., Shinoda, Y., Nagashima, H., Okamoto, H., Takuma, S. and Aoyagi, H.:** Effect of temperature shift on levels of acidic charge variants in IgG monoclonal antibody in CHO cells culture. *J. Biosci. Bioeng.* (2014). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.028
2. **Kishishita, S., Katayama, S., Kodaira, K., Takagi, Y., Matsuda, H., Okamoto, H., Takuma, S., Hirashima, C. and Aoyagi, H.:** Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.* (2014). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.11.022

## 学会発表

1. 培養温度シフトを用いたChinese Hamster Ovary細胞による抗体医薬品の高品質、高効率生産、岸下昇平, 西川友子, 篠田康晴, 長島弘明, 田熊晋也, 青柳秀紀、第66回日本生物工学会大会 (2014)

## 謝辞

本博士論文は筑波大学大学院、生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 青柳 秀紀 教授の研究指導ならびに、同研究科 生命産業科学専攻 王 碧昭 教授、同研究科 生物機能科学専攻 市川 創作 教授、同研究科 生物機能科学専攻 柏原 真一 准教授の副指導のもとに作成されたものであります。先生方の多大なるご指導・ご鞭撻に心より、感謝の意を表します。

また、本研究をサポートして頂いた中外製薬株式会社のすべての研究チームと常に支えてくれた家族に感謝の意を表します。