

哺乳類細胞培養からのmAbsのUF/DFおよびCEX捕捉における浸透圧モニタリング

Thiago Millen¹, Laura Chinn¹, Cameron Bardiving¹, Allison Vaughan¹ and Mark Rothenberg²

1- Jefferson Institute for Bioprocessing, Lower Gwynedd Township, PA, USA

2- Advanced Instruments, Norwood, MA, USA

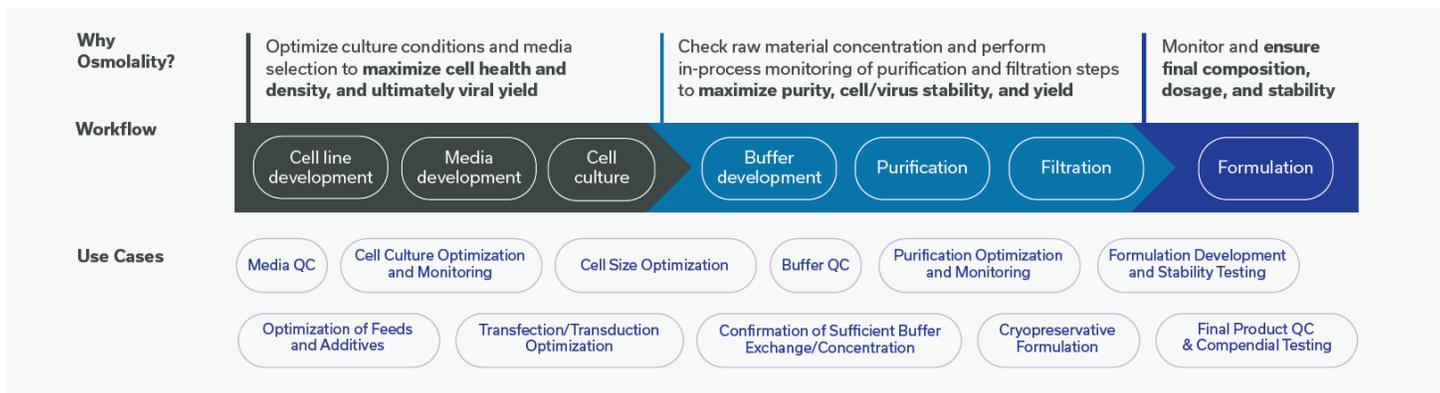
Introduction

モノクローナル抗体 (mAb)、ワクチン、その他のタンパク質種のような生物学的製剤の製造には、特定の、時には複雑な一連の作業ステップが必要です。これらのステップは、以下のようないくつかの主要なワークフローに分けることができます：

- Process Development
- Upstream Processes
- Downstream Processes
- Formulation Development
- Fill and Finish

各プロセスステップの目標は、高い収率、品質、純度、機能性を備えた一貫した製品の生産を促進することです。それぞれのステップを通して、様々なプロセス分析ツール (PAT) が、品質と生産指標が確実に維持されるように使用されます。上流プロセスでは、生細胞数、代謝物、ガス交換 (dO₂、dCO₂) のリアルタイム測定など、はるかに複雑な分析手法が必要とされる一方で、生産プロセス全体の健全性において重要であるため、pH、導電率、浸透圧も評価対象となっています。下流プロセス全体にわたるバッファの試験とリリースのための従来からの測定には、いくつか例を挙げると、浸透圧、pH、導電率が挙げられます。pHと導電率はどちらも相互に関連し、分子特異的であり、その条件下での分子の解離の程度に依存します¹。これらの測定は、タンパク質の安定性とクロマトグラフィー樹脂との適切な相互作用を保証するために非常に重要ですが、イオン化に大きく依存します^{2,3}。加えて、pH計も導電率計も温度の影響を受けます。浸透圧は、導電率に影響を与えるのと同じ特性 (分子の種類、イオン化の程度、試験溶液のpHなど) の影響を比較的受けません。

浸透圧は溶液の濃度を水1キログラム当たりのミリモル単位で表し⁴、バイオ医薬品と臨床の両分野で重要な分析測定値となっています。浸透圧は、重要品質特性（critical quality attribute：CQA）としての用途を超え、新たな研究が発表されるにつれて、その用途と評価が明らかになりつつあります。最近の研究では、アデノ随伴ウイルス1（AAV1）血清型の上流生産において浸透圧を変更することにより、細胞から放出される産物の生産と品質を向上させることができることが示されました。（<https://www.aicompanies.com/understanding-the-impact-of-osmolality-on-upstream-aav-manufacturing/#1575551287534-75d53366-51e9>）。浸透圧は、品質指標をサポートするため、製造プロセス全体で利用されます。次の図は、標準的なワークフローの各ステップにおける溶質の濃度を理解し評価するために浸透圧を使用できる主なアプリケーションを示しています。



本研究の目的は、モノクローナル抗体リツキシマブをCEXで回収する前の限外ろ過/透析（UF/DF）ステップにおける浸透圧モニタリングの影響を理解することです。下流のワークフローにおけるUF/DFのプロセスは、モノクローナル抗体、タンパク質（ホルモンなど）、核酸などの生物学的治療薬の製造において不可欠なものです。UF/DFステップは、サンプルの洗浄、精製、濃縮、バッファー交換、脱塩など、標的分子を調製するために別々に、あるいは組み合わせて実施することができます。pHと導電率はどちらも下流のプロセス分析で使用される標準的な測定基準であるため、これらをベースとして、UF/DFのプロセス内での浸透圧測定に関連するモデルを構築しました。

Materials and Methods

mAb production

モノクローナル抗体（リツキシマブ）をDXB-11 CHO細胞株に発現させ、誘導性プロモーターの下、フェッドバッチで稼動するバイノリアクターで培養した。作業細胞バンクのCHO細胞株アンプルを解凍後、少なくとも5継代で継代培養しました。倍化時間と生存率が正常であった時点で、シードトレインの拡張を実施しました。そのため、0日目にCHO細胞をバッフル付きシェイクフラスコで、Power CHO2培地（Lonza）で 0.25×10^6 cells/mLに継代しました。界面活性剤である0.1%プルロニック（P-F68）をCHO細胞用培地に添加し、ベースとなる0.1%P-F68を添加した後、リツキシマブのシードトレインと生産培地を合計して0.2%のシアプロテオタントを添加した。細胞培養条件は37°C、5 %CO₂、130rpmで行いました。

細胞培養の増殖後、生産フェーズでは別の培地、BalanCD growth A（Irvine Scientific社製）を使用しました。この細胞株は、2µg/mLのクミン酸（4-イソプロピル安息香酸）の添加によって誘導されるプロモーターを利用するベクターで安定的にトランスフェクトされ、この細胞株でのタンパク質発現のトリガーとなりました。

生産には、シングルユースの20L WAVEバイオリアクター（作業容積10L）を使用しました。バイオリアクターは、BalanCD培地に 0.3×10^6 cells/mLの密度で播種しました。細胞密度が $3-4 \times 10^6$ cells/mLの閾値に達したとき（通常3日目）に抗体発現が誘導されました。抗体発現誘導と同時に、3日目に温度シフト（32°C）を行いました。7.5mMのMSXを添加した誘導培地BalanCD CHO Feed 4（Irvine Scientific）を、3日目に1.5%W/Vボラスで培養に添加しました。実験期間中、細胞培養はフェッドバッチモードで操作され、バイオリアクターには5、7、9、11日目にBalanCD CHO Feed 4が1.5%W/Vボラスで添加されました。グルコースは必要に応じて2Mグルコース原液で17~35mMに維持しました。本試験で行った浸透圧測定はすべ

て、Advanced Instruments OsmoTECH® XT Single-Sample Micro-Osmometer を用いて行いました。生存率50%でバイオリアクターを回収し、500 x g で15分間遠心して細胞残渣を除去しました。無細胞物質（CFM）を0.22 µmフィルターに通しました。無菌フィルター後のCFMの濁度は15 NTUでした。導電率は18.4 mS/cm、pHは7.15でした。採取後のサンプルは、分析用MABPac Protein Aカラム（Thermo Scientific社製）を備えたVanquish UHPLCシステム（Thermo Scientific社製）を用いてテストしました。最終培養量は9.0L、最終力価は0.68g/L、総生産量は6.12gでした。

CFM conditioning for downstream (concentration and buffer exchange)

ダウンストリーム用の材料を調製するため、CFMを濃縮し、TFFとUF/DFによって適切なキャプチャーバッファーにバッファー交換しました。生成物の濃縮とバッファー交換は、50cm²のPellicon XL TFF cassette, 50 kDa MWCO (Millipore) を用いて行いました。最初の濃縮前に、フィルターは脱イオン水で洗浄し、平衡化させました。CFMは3倍に濃縮され、流速は35mL/分、膜貫通圧（TMP）は22psiに設定しました。その後、陽イオン交換捕捉樹脂平衡化バッファー（25mM酢酸ナトリウム、50mM塩化ナトリウム、pH5.0、導電率：6.4mS/cm、浸透圧：133mOsm/Kg）にバッファー交換しました。濃縮液容器と透過液容器内の物質をモニターし、浸透圧、導電率、pHを記録した。目的のバッファー・システムへの変換を達成するために、合計4ダイアボリュームを処理しました。CFMは、クロマトグラフィーカラムにロードする前に、0.22µmのメンブレンフィルターで再度ろ過しました。

mAb Purification

2カラム精製法をプランしました：陽イオン交換（CEX）樹脂（Capto S ImpAct, Cytiva）でキャプチャーし、陰イオン交換（AEX）樹脂（Q Sepharose FF, Cytiva）で宿主細胞DNAと残存宿主細胞タンパク質（HCP）をポリッシングして除去します。

濃縮後、上記の適切な平衡化バッファーにバッファー交換し、CEXを用いてモノクローナル抗体を精製しました。HiScale 1.6 x 20 cm（Cytiva）のカラムボディにCapto S ImpAct樹脂（Cytiva）を充填しました。カラムはまず25mM酢酸ナトリウム、50mM塩化ナトリウム、pH5.0（導電率：6.4mS/cm、浸透圧：133mOsm/Kg）で平衡化しました。CFMをカラムにロードし、滞留時間を3分とりました。次に、8 CVの洗浄バッファー（25 mM酢酸ナトリウム、100 mM NaCl pH 5.0、電導度：10.9 mS/cm、浸透圧：218 mOsm/kg）でカラムを洗浄し、10~65%の溶出バッファー（25 mM酢酸ナトリウム、500 mM NaCl、pH 5.0、電導度：46 mS/cm、浸透圧：939 mOsm/kg）の20 CVのグラジエントで溶出を行いました。

ポリッシングのステップでは、HiScale 1.6 x 20 cm（Cytiva）のカラム本体にQ Sepharose FF樹脂（Cytiva）を充填しました。Capto S溶出液を0.22 µmメンブレンフィルターでろ過しました。導電率が高いため（22.79 mS/cm）、このサンプルをAEX平衡化バッファー（10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.3、条件：3.35 mS/cm、浸透圧：47 mOsm/kg）で4倍に希釈し、2分間の滞留時間を設けてカラムにロードしました。負荷浸透圧は179 mOsm/kg、導電率は10.1 mS/cm、pHは7.31でした。AEXカラムをフロースルーモードで操作し、3CVの洗浄バッファー（平衡化バッファーと同じ）でカラムを洗浄し、10mMリン酸ナトリウム、1M NaCl、pH7.3でストライピングしました（Cond.：83.9mS/cm、Osm.：1755mOsm/kg）。

サンプルの力価はMABPac Protein Aカラム（Thermo Scientific）で評価しました。

3 Advanced Instruments

Final concentration and buffer exchange

最終生成物の濃縮とバッファー交換は、50cm²のPellicon XL TFF カセット、50 kDa MWCO（ミリポア社製）を用い、上記と同じ条件で操作しました。2-カラムで精製したものを20 mg/mLまで濃縮しました。

このマテリアルをリツキシマブ製剤用バッファー（7.35 mg/mL クエン酸ナトリウム、9 mg/mL 塩化ナトリウム、0.7 mg/mL ポリソルベート80、pH 6.5、導電率 23.0mS/cm、浸透圧 403 mOsm/Kg）にバッファー交換しました。バッファー交換では、流速は30mL/分、TMPは20psiに設定しました。このUF/DFランでは、1ダイヤボリュームが20mLに相当し、8ダイヤボリュームが達成された時点でバッファー交換を完了しました。

RESULTS:

モノクローナル抗体リツキシマブを発現するCHO DUXB11細胞株を用いて、下流プロセスステップのために無細胞培地の調製を行いました。グルコース、乳酸、NH₄などの標準代謝物がアセスメントされ、細胞株と使用した培地に求められる結果と一致することが確認されました。図1に見られるように、12日目に生存率が50%以下になった時点で、細胞収穫を行いました。浸透圧、導電率、pHはすべて、上流プロセスの開始時に 並行して測定しました。導電率は18.4 mS/cm、pHは7.15と測定されました。0日目の細胞培養の浸透圧は363 mOsm/Kgで、その後3日目から12日目まで毎日測定を行いました。その結果をTable1に示しています。

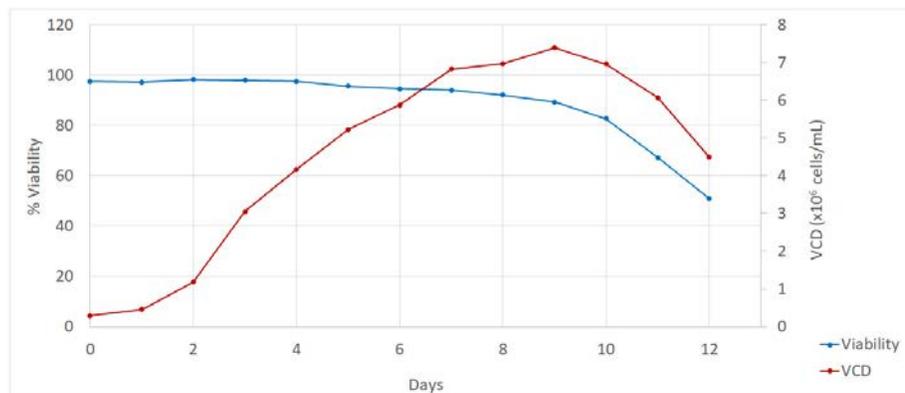


Figure 1. 培養細胞は毎日サンプリングされ、自動セルカウンターを用いて、生存細胞密度と生存率モニタリングを行った。

Cell culture day	Osmolality(mOsm/kg)
3	327
4	320
5	352
6	343
7	372
8	370
9	384
10	404
11	402
12(harvest)	405



OsmoTECH® XT
Single-Sample Micro-Osmometer

Table 1. 毎日の細胞培養の浸透圧テストの結果。

下流のワークフローを通して浸透圧の影響を理解するために、Figure 2に示すように、浸透圧、pH、および導電率の測定を行いました。

mAb Downstream Strategy

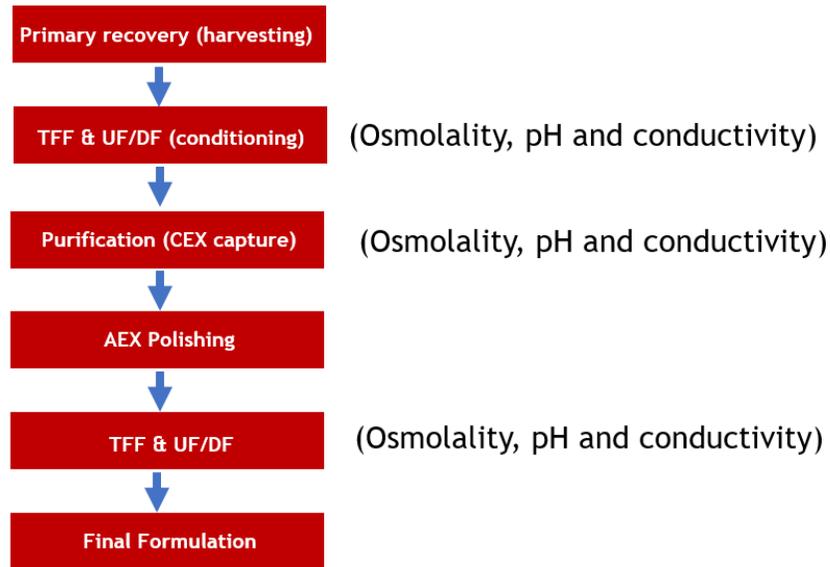


Figure 2. 下流プロセスの戦略開発のための実験計画。

CEX カラムの調製における濃縮およびバッファー交換ステップで、浸透圧、導電率、pH を評価しました。濃縮液と透過液の両サンプルについて、それぞれTable 2とTable 3に示すデータを得ました。予想されるように、浸透圧、導電率、pHの値はDVのプロセスステップごとに減少しており、これはバッファーの組成が変化していることを示しています。

Sample	Osmolality (mOsm/kg)	Conductivity (mS/cm)	pH
Cell-free media (CFM)	403	12.9	7.22
Concentrate (3x concentration)	400	12.43	7.28
Concentrate (0.25 DV)	390	12.19	7.36
Concentrate (0.5 DV)	351	12.06	7.19
Concentrate (0.75 DV)	247	9.21	6.12
Concentrate (1 DV)	223	8.64	5.74
Concentrate (2 DV)	180	7.91	5.23
Concentrate (3 DV)	175	7.83	5.15
Concentrate (4 DV)	161	7.49	5.07

Table 2. CEXカラムにロードする前にサンプルをコンディショニングするために、濃縮とバッファー交換の間にサンプルを濃縮した。

このプロセス中、浸透圧、導電率、pHをすべてモニターした。

Sample	Osmolality (mOsm/kg)	Conductivity (mS/cm)	pH
Cell-free media (CFM)	403	12.9	7.22
Concentrate (3x concentration)	400	12.43	7.28
Permeate (during concentration)	388	12.89	7.28
Permeate (0.25 diavolume)	373	12.51	7.29
Permeate (0.5 diavolume)	351	12.06	7.19
Permeate (0.75 diavolume)	324	11.48	7.06
Permeate (1 st diavolume)	305	11.07	6.88
Permeate (2 nd diavolume)	233	9.64	6.02
Permeate (3 rd diavolume)	175	7.85	5.27

Table 3. 濃縮およびバッファー交換中にサンプルを透過させ、CEXカラムにロードする前にサンプルをコンディショニング。このプロセス中、浸透圧、導電率、pHをすべてモニターした。

濃縮ステップと同様、サンプルは分取用CEXカラムを用いてランしました。Figure3とFigure4は、このランの結果を示しています。SDS-PAGEゲル (Figure4) は、プロセスのさまざまなステップによって溶出されたタンパク質全体を示します。レーン7と8は、それぞれ非還元と還元で、分取用CEXカラムから溶出したサンプルの全体的な純度を示しています。Table4は、CEXカラムラン後の浸透圧、pH、導電率の測定結果を示しています。CEXカラムの収率92%という数値は、アフィニティークロマトグラフィーをベースとしたキャプチャーのステップの予測値とほぼ一致していると考えられます。

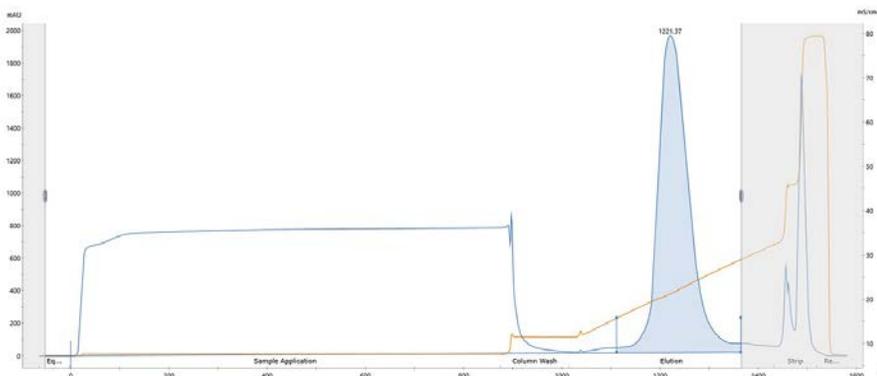
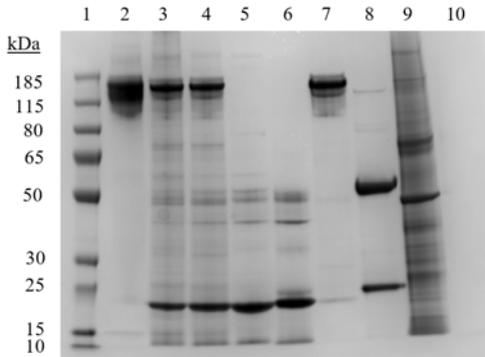


Figure 3. AKTA CEX分取のクロマトグラム。UV280nm (青線) シグナルと導電率 (オレンジ線) をモニター。フロースルー画分 (FT) を示す。溶出ピークは青でハイライトされている。

Sample	Osmolality (mOsm/kg)	Conductivity (mS/cm)	pH
Load	161	7.49	5.07
Flow-through	171	7.73	5.03
Wash	227	11.48	5.01
Elution	442	22.79	5.01
Strip	928	47.1	5.01

Table 4. SCEX精製中に採取されたサンプル。浸透圧、導電率、pH値を高頻度でモニターした。



1. MW Marker
2. IgG standard (non-reduced)
3. Cell-free media
4. Capto S Load (conditioned)
5. Capto S Flow-through
6. Capto S Wash
7. Capto S elution (non-reduced)
8. Capto S elution (reduced)
9. Capto S Strip
10. -

Figure 4. 分取用CEXからの精製フラクションのSDS-PAGE測定。すべてのサンプルを10分間煮沸し、等量 (20 μ L) をゲルにロードした。ゲルはMOPSランニングバッファー中、200Vで50分間泳動し、クマシーブルーで染色した。

Table 5とTable 6は、製剤バッファー中への最終交換中の、濃縮液と透過液それぞれの浸透圧、導電率、pHの測定値を示しています。上記と同様、結果は試験された各指標について類似の予測された傾向を示しており、この最終濾過工程が成功したことを示しています。

Sample	Diavolume (DV)	Osmolality (mOsm/kg)	Conductivity (mS/cm)	pH
AEX Flow-through	-	192	10.32	7.3
Concentrate (26-fold)	-	204	11.4	7.3
Concentrate (2 DV)	2	315	17.59	6.95
Concentrate (4 DV)	4	376	21.1	6.67
Concentrate (6 DV)	6	394	21.94	6.52
Concentrate (8 DV)	8	401	22.84	6.49
Formulation buffer	-	403	23	6.5

Table 5. 濃縮液サンプルは、最終濃縮時および製剤用バッファーへのバッファー交換時に、浸透圧、導電率、pH値を測定した。

Sample	Diavolume (DV)	Osmolality (mOsm/kg)	Conductivity (mS/cm)	pH
Permeate (TFF)	-	194	10.88	7.29
Permeate (1 DV)	1	235	13.74	7.18
Permeate (2 DV)	2	270	15.4	7.11
Permeate (4 DV)	4	300	17.84	6.92
Permeate (6 DV)	6	328	19.37	6.81
Permeate (8 DV)	8	341	20.77	6.76

Table 6. 透過液サンプルは、最終濃縮と製剤用バッファーへのバッファー交換の際に、浸透圧、導電率、pH値を測定した。

Figure 5 と Figure 6 は、濃縮液サンプルと透過液サンプルの、CEX キャプチャステップ前の CFM をコンディショニングするためのバッファー交換中の浸透圧と導電率の相対データと正規化データを示しています。下流プロセス中のサンプルの浸透率と導電率データに基づき、CFMのニアライン浸透率テストの利用と実用性を、CEXキャプチャーへの影響の関数として理解するモデルの開発を開始しました。濃縮サンプルのデータから、UF/DFプロセスに沿った導電率と浸透圧の変化 (ダイアボリューム単位) を相関させたプロットを作成し、CFMをCEXカラムにロードするための条件設定を行いました。データポイントは正規化され、1.0(初期値)から0.0(最終値)の範囲にある導電率と浸透圧測定値の合計変化に基づいて、対数フィットによってアジャストされました。これは Figure 5のGraph Bで見ることができます。

7 Advanced Instruments

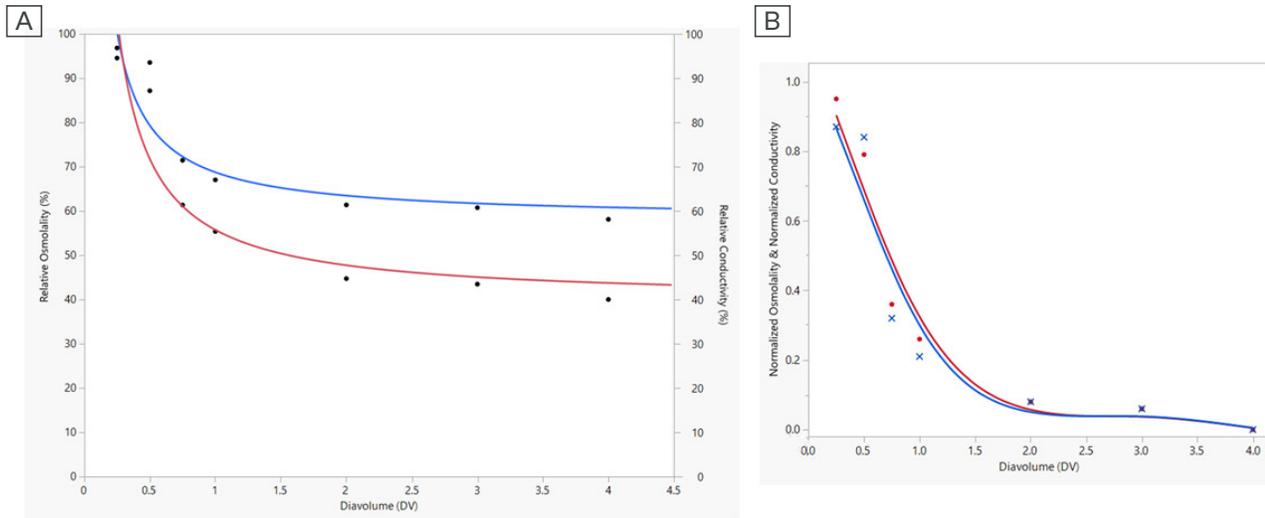


Figure 5. バッファ交換中にサンプルを濃縮し、CEXカラムにロードする前にサンプルをコンディショニング。相対浸透圧のデータは赤で、導電率のデータは青で示してある（グラフA）。正規化されたデータは対数フィットでアジャストされ、Graph Bに表示されている。

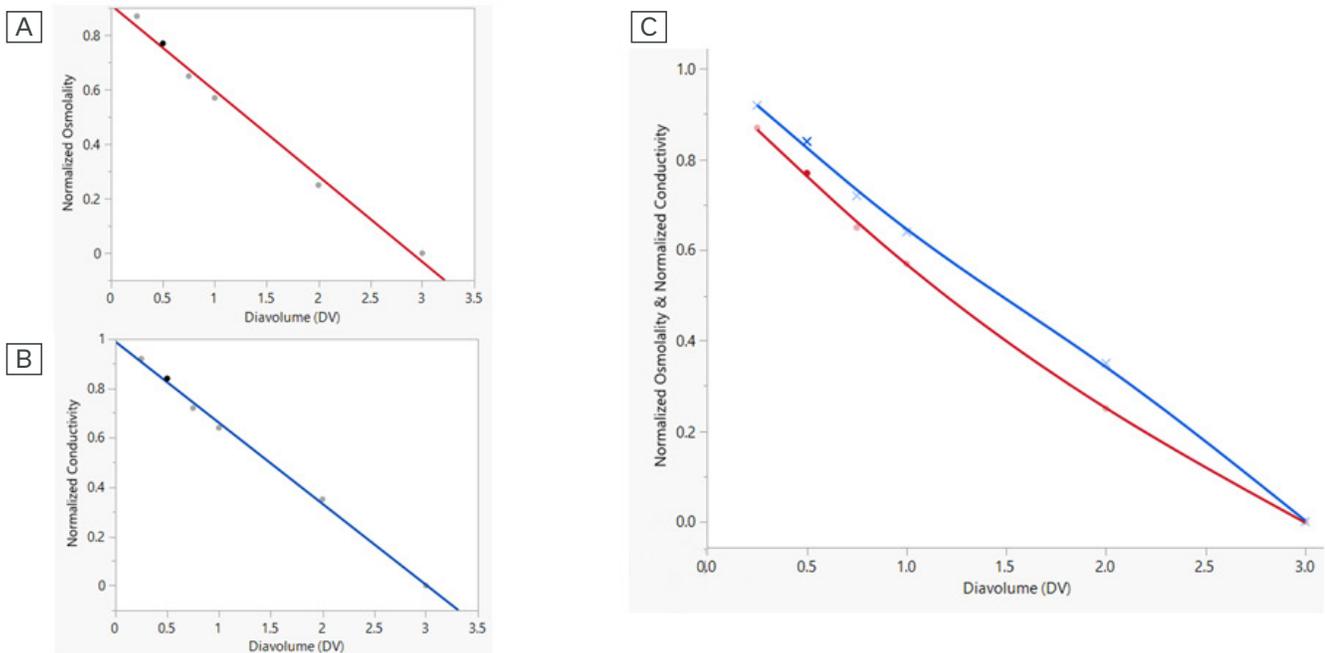


Figure 6. CEXカラムにロードする前にサンプルをコンディショニングするため、バッファ交換中にサンプルを透過させる。正規化された浸透圧データは赤で、導電率データは青で示されている（Graph AとB）。スムーズ・リニア・フィットでアジャストした正規化データをGraph Cに示す。

Figure 7とFigure 8は、それぞれ濃縮液と透過液の両サンプルについて、最終製剤バッファーへの最終投入時の浸透圧と導電率測定の相対データと正規化データを示しています。前回と同様、対数フィットによってアジャストされた正規化データポイントは、1.0（初期値）から0.0（最終値）までの導電率と浸透圧の総変化に基づいています。導電率と浸透圧の測定値はいずれも、最終製剤では初期サンプルと比較して増加していました。

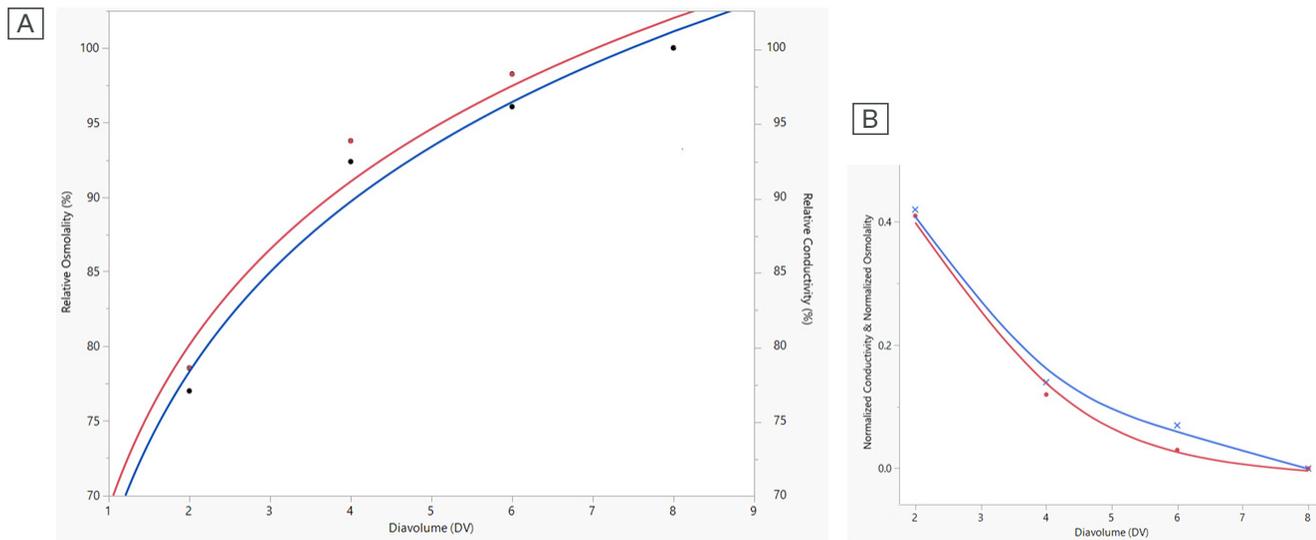


Figure 7. 最終製品の濃縮および製剤バッファーへのバッファー交換時にサンプルを濃縮。 相対浸透圧のデータは赤で、導電率のデータは青で示されている（Graph A）。正規化されたデータは、対数フィットによってアジャストされ、Graph Bに示されている。

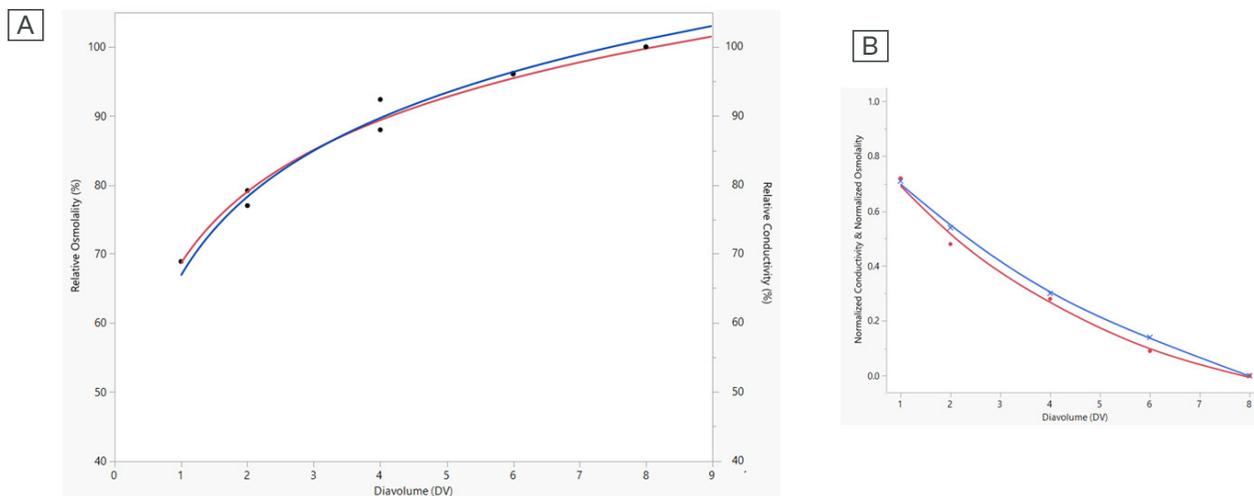
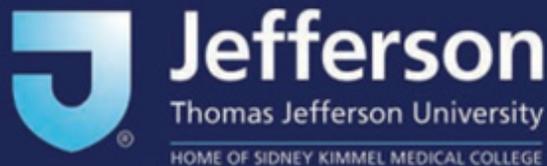


Figure 8. 最終製品濃縮時および製剤バッファーへのバッファー交換時の透過サンプル。 相対浸透圧のデータは赤で、導電率のデータは青で示されている（Graph A）。正規化されたデータは、対数フィットによってアジャストされ、Graph Bに示されている。

Conclusion:

今回の研究では、下流のUF/DFコンディショニングおよびCEX精製ステップにおける浸透圧と導電率を比較した結果、適合した正規化データモデルで観察されたように、良好な相関が示されました。この結果は、ここで示したTFFおよびUF/DF操作条件下での浸透圧測定値の感度が高いことを示唆しています。また、生成されたデータに基づいて、浸透圧は、わずかなプロセス偏差を識別する能力により、導電率よりも強力なツールになる可能性があると言えます。これらの知見は、Edith Felfödiらによる、浸透圧がUV260およびUV280とともにタンパク質濃度を予測するために使用できることを決定的に示した研究⁵で見出された知見とともに、浸透圧が下流のプロセスパラメーターにおいて高感度で重要な技術になりうることを示しています。

要約すると、浸透圧は生物学的製剤製造のワークフロー全体を通して、頑健で効率的な分析ツールとして使用することができるということです。培養中の細胞の健康状態の評価⁶から、培地やバッファー調製における品質評価指標、そして現在ではUF/DFプロセス工程の評価まで、浸透圧は生物学的製剤製造のワークフロー全体を通して、頑健で効率的な分析ツールとして使用することができます。今後、さらに重要なプロセスパラメーターとして、浸透圧を下流プロセスでどのように利用できるかを真に理解し、活用するためには、さらなる研究と調査が必要です。Felfödi、Edithらによる研究、英国C> CatapultとAdvanced Instruments⁷による最近の共同研究、そして今回発表された研究から得られた結果は、浸透圧がバイオプロセッシングのワークフローのあらゆる側面において真剣に考慮されるべき重要な指標であるという強力な証拠を示しています。



Evaluation performed by Jefferson Institute for Bioprocessing

References

1. Wright, Kristeena. 8 Ways that Osmolality Testing Improves Cell and Gene Therapy Process Development and Manufacturing. 2020, Advanced Instruments LLC.
2. West, Jonathan, et al. "PH Measurement." Visual Encyclopedia of Chemical Engineering, University of Michigan College of Engineering, 2018, encyclopedia. che.engin.umich.edu/Pages/ProcessParameters/pHMeasurement/pHMeasurement.html.
3. Manns, Reinhard and Jurgen Schleicher. Information on Conductivity Measurement. JUMO GmbH & Co. KG FAS 624 04.07(2007).
4. United States Pharmacopoeia 42. General Chapters: 785 Osmolality and Osmolarity. Rockville, Maryland, USA: 2016.
5. Felfödi, Edith et al., Osmolality is a predictor for model-based real time monitoring of concentration in protein chromatography. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2019 wileyonlinelibrary.com/jctb
6. Alhuthali, Sakhr., et al., Osmolality Effects on CHO Cell Growth, Cell Volume, Antibody Productivity and Glycosylation. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 3290.
7. Soula, Adrien, Studd, Kendal. Improving Titer, Quality and Efficiency of AAV Manufacturing and Production by Optimizing Osmolality. 2022 Advanced Instruments LLC.

輸入販売元

 **KIKO·TECH**
キコーテック株式会社 事業開発部

本社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795
東京支社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>

