

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6953508号
(P6953508)

(45) 発行日 令和3年10月27日 (2021. 10. 27)

(24) 登録日 令和3年10月1日 (2021. 10. 1)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z
C 1 2 N 15/10 (2006. 01)	C 1 2 N 15/10 1 O O Z
C 1 2 P 1/00 (2006. 01)	C 1 2 P 1/00 Z
CO 7 K 1/16 (2006. 01)	CO 7 K 1/16
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 K
請求項の数 18 (全 51 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2019-502156 (P2019-502156)	(73) 特許権者	504135837
(86) (22) 出願日	平成29年4月4日 (2017. 4. 4)		ベーリンガー インゲルハイム エルツェーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2019-522802 (P2019-522802A)		オーストリア アー 1 1 2 1 ヴィーン
(43) 公表日	令和1年8月15日 (2019. 8. 15)		ドクトル ベーリンガー ガッセ 5-1 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/057986	(73) 特許権者	593045444
(87) 国際公開番号	W02017/174580		サンド・ゲーエムベーハー
(87) 国際公開日	平成29年10月12日 (2017. 10. 12)		オーストリア国、アー 6 2 5 0 ・ クンドル、バイオケミシュトラーセ・ 1 0
審査請求日	令和2年4月2日 (2020. 4. 2)	(74) 代理人	110001508
(31) 優先権主張番号	16163713. 7		特許業務法人 津国
(32) 優先日	平成28年4月4日 (2016. 4. 4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 製剤精製のリアルタイムモニタリング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの動作ユニットを使用することを含む、生物学的製剤の精製および／または濃縮プロセスをモニターおよび制御するためのコンピューターベースの方法であり、その方法は、

- 少なくとも2つの独立したオンラインセンサーを動作ユニットに含めるステップと、
 - 前記オンラインセンサーのそれぞれの出力に対応する多数のプロセスデータ値を得るステップと、
 - コンピューターのデータベースにプロセスデータ値をインポートするステップであって、生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のために、前記オンラインセンサーから得られたオンラインデータおよびプロセスから取り出された試料から得られたオフラインデータから得られる多変量統計解析を行うステップと、
 - 前記オンラインセンサーのそれぞれの出力および多変量プロセスデータに対応する実際のプロセスデータ値を診断するステップと、
 - 生物学的製剤の濃度、純度および／または効力をリアルタイムでモニターするステップと、
- を含む、方法。

【請求項 2】

オンラインセンサーのうち少なくとも1つが多角度光散乱センサー (M A L S)、UV

ーVIS吸収センサー、蛍光センサー、赤外吸収センサー（IR）、減衰全反射フーリエ変換赤外分光法センサー（ATR-FTIR）、屈折率（RI）センサー、pHセンサー、温度センサー、伝導率センサー、圧力センサー、小角X線散乱（SAXS）センサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択される請求項1記載の方法。

【請求項3】

オンラインセンサーのうち少なくとも1つがATR-FTIR、MALS、RIおよび蛍光センサーからなる群より選択される請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

オンラインセンサーのうち少なくとも1つが、ATR-FTIR、SAXS、温度、pH、伝導率およびレドックスセンサーからなる群より選択される非侵襲の現場センサーである請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項5】

動作ユニットが少なくとも3つの独立したオンラインセンサーを含む請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

動作ユニットが少なくとも1つのATR-FTIRセンサー、1つのMALSセンサー、1つのRIセンサーおよび1つの蛍光センサーを含む請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

動作ユニットに加えて少なくとも1つの温度センサー、少なくとも1つの伝導率センサー、少なくとも1つのpHセンサーおよび少なくとも1つの圧力センサーを含む請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項8】

センサーのうち少なくとも1つがATR-FTIRセンサー、温度センサー、SAXSセンサー、伝導率センサー、pHセンサーおよび圧力センサーからなる群より選択される非侵襲の現場センサーである請求項6または7記載の方法。

【請求項9】

動作ユニットがクロマトグラフィーユニットおよび／またはろ過ユニットを含む請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

30

クロマトグラフィーユニットがイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダル樹脂クロマトグラフィーからなる群より選択されて、結合／溶出またはフロースルーモードでアイソクラチック、リニア、セグメント化および／またはステップグラジエント溶出で動作され、ろ過ユニットが限外ろ過、精密ろ過、ナノろ過、深層ろ過からなる群より選択されて、タンジェンシャルフローろ過、デッドエンドろ過、絶対細孔サイズ膜でのろ過で動作される請求項9記載の方法。

【請求項11】

ステップe)で得られた生物学的製剤の濃度、純度および／または効力に基づいて、プロセス調節および／またはプロセス最適化を行うステップ、
をさらに含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項12】

ステップe)で得られた生物学的製剤の濃度、純度および／または効力に基づいて、パラメトリックまたはリアルタイムで生物学的製剤をリリースするステップ、
をさらに含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

ステップf)で、ピーク収集、リフォールディング、ろ過または沈殿後の生物学的製剤の正しい収集、製剤の品質およびプロセス機器メンテナンスのいずれか1つまたは組み合わせに関してプロセスが調節される請求項11記載の方法。

【請求項14】

50

生物学的製剤がバイオ医薬品、核酸分子または異種タンパク質である、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 5】

生物学的製剤が、治療用タンパク質、酵素およびペプチド、タンパク質抗生物質、融合タンパク質、炭水化物-タンパク質複合体、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質または粒子、プロセス酵素、増殖因子、ホルモンおよびサイトカイン、抗体または前記生物学的製剤の代謝産物の中から選択される、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

a) 生物学的製剤を製造することができる生物または細胞を培養するステップ；
b) ステップ a) から結果として生じる製剤を精製するステップであって、精製が少なくとも 1 つの動作ユニットを使用してモニターおよび制御され、
動作ユニットが少なくとも 2 つの独立したオンラインセンサーを含み、コンピューターのデータベースにオンラインセンサーからのプロセスデータ値がインポートされ、生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のために、前記オンラインセンサーから得られたオンラインデータおよびプロセスから取り出された試料から得られたオフラインデータから得られる多変量統計解析が行われ、
精製の制御がリアルタイムで前記オンラインセンサーのそれぞれの出力および多変量プロセスデータに対応する実際のプロセスデータ値を診断するおよび生物学的製剤の濃度、純度および／または効力をモニターするステップを含む、生物学的製剤製造方法。

【請求項 1 7】

動作ユニットが
クロマトグラフィーおよび／またはろ過ユニットを含み、
クロマトグラフィーまたはろ過ユニットが少なくとも 1 つのオンラインセンサーを含み、
センサーがコンピューターに接続され、センサーによって収集されたプロセスデータ値がデータベースにインポートされ、
生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のために、前記オンラインセンサーから得られたオンラインデータおよびプロセスから取り出された試料から得られたオフラインデータから得られる多変量統計解析が行われ、
次に、前記オンラインセンサーのそれぞれの出力および多変量プロセスデータに対応して実際のプロセスデータ値が診断される装置。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つのオンラインセンサーが、多角度光散乱センサー (MALS)、UV-VIS 吸収センサー、蛍光センサー、赤外吸収センサー (IR)、減衰全反射フーリエ変換赤外分光法センサー (ATR-FTIR)、光屈折率 (RI) センサー、pH センサー、温度センサー、伝導率センサー、圧力センサー、小角 X 線散乱 (SAXS) センサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択される、請求項 1 7 記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

説明

技術分野

本発明は、生物学的製剤の精製および／または濃縮プロセスのモニタリングおよび制御の分野ならびにこれらの方法で使用する装置に関する。具体的には、本発明は、タンパク質の濃度、純度および効力のオンラインモニタリングおよび制御ならびにパラメトリックまたはリアルタイムリリースの方法に関する。

【0002】

背景技術

下流工程中に、生物学的製剤は、それらの用途および必要性に従って精製および濃縮さ

10

20

30

40

50

れる。通例、オフラインで測定される製剤の所望の純度、濃度および効力を達成するために、一連の異なる精製プロセスステップが実施される。特に、微生物または哺乳類の細胞内での過剰発現は、例えばバイオ医薬品といった生物学的製剤の組み換え製造に使用される。そのような化合物は、例として、タンパク質（たとえば、抗体およびそのフラグメント）、核酸、炭水化物、脂質、有機小分子、非有機小分子、ウイルス、リポソームおよびそのような化合物のいずれかのハイブリッドまたは異型を含むことがある。

【0003】

そのような組み換えによって製造された細胞培養からの化合物の下流工程は、例として、ただしそれに限定はされないが、宿主細胞タンパク質（HCP）、宿主細胞DNA、ウイルス、細胞残屑、脂質、細胞培養基成分および製剤関連の不純物（例えばフラグメント、凝集体および遊離軽鎖）といった不純物が製剤の仕様書に定義されているレベルにまで減った状態に化合物を精製することが必要である。この要件は、治療用製剤では特に必須である。

10

【0004】

例えばバイオ医薬品といった可溶性分泌型の生物学的製剤の精製プロセスは、遠心分離、凝集、精密ろ過もしくはろ過または収載したこれらのプロセスの組み合わせによる細胞除去を含む。通例、精製は、クロマトグラフィーおよび膜ろ過プロセスの組み合わせによって達成される。哺乳類細胞発現系の場合、2つの直交する専用のウイルス不活性化プロセスも含まれていなければならない。一部の精製プロセスは、沈殿および結晶化のステップも使用する。

20

【0005】

もしも生物学的製剤が分泌型でないならば、細胞を破壊しなければならず、さらなる精製のためにホモジネートを浄化しなければならない。

【0006】

封入体として堆積した生物学的製剤の場合は、加えてリフォールディング／酸化プロセスを行わなければならない。

【0007】

一般的に、例えばバイオ医薬品といった生物学的製剤を製造する際には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよび混合モードクロマトグラフィーを使用して、生物学的製剤を精製および／または濃縮する。生産性が低いため、サイズ排除クロマトグラフィーが使用される程度は、より低い。クロマトグラフィーは、結合溶出またはフロースルーのどちらかのモードで行われる。移動相の高分解能グラジエントの場合は、例えば塩またはpHといったモジュレーターが適用される。クロマトグラフィーカラムの動作パラメータおよび品質の他に、フィードストックの組成物がクロマトグラフィーカラムによる分離の性能に影響を与える主要なパラメータである。

30

【0008】

フィードストックの組成物は、基の成分、発現宿主および収穫の時点を含む発酵手順によって決まる。発酵もろみ液は、水（>80%）、未使用のおよび消化された基の成分、細胞によって分泌された化合物、溶解した細胞からの全ての細胞成分、製剤および製剤の変異体、消泡オイル、細胞および細胞残屑からなる。上流工程と比較すると、クロマトグラフィーおよび／またはろ過プロセスの後、生物学的製剤を含有する溶液は、特に捕捉ステップ中にはわずかに混濁した溶液が存在していることがあるものの、ほぼ透明である。

40

【0009】

発酵もろみ液の中に存在しているいろいろな成分の生物物理学的特徴は、製剤自体とは違うまたは非常に類似していることがあるので、製剤と不純物との間を識別し、製剤および不純物を定量化し、製剤の効力を定量化することを可能にする、カラム流出液の測定をいくつか使用しなければならない。現在のところ、一つだけの解析方法では、この測定および識別を成し遂げることができない。

【0010】

50

欧州医薬品庁（E M E A）の医薬品規制調和国際会議のガイドライン（I C Hガイドライン）によると、生物学的製剤は、その物理化学的特性、生物学的活性（効力）、免疫化学的特性、純度、不純物および汚染物質によって特徴付けられる。生物学的製剤の場合は、物質にいくつかの分子実体または変異体が含まれていることがある。そのため、絶対純度および相対純度（製剤 1 mg 当たりの生物学的活性の単位）が定義されており、テスト手順だけでなく合否判定基準も、E M E A の I C H（1999 年 9 月に公表された I C H Q 6 B）によって規格化された。I C H ガイドラインによると、生物学的物質および生物学的製剤の純度は、精製プロセス実施後に測定される解析手順の組み合わせによって評価される。製剤の効力とも呼ばれる生物学的製剤の特定の活性は、プロセスまたは製剤に大きく依存している。

10

【0011】

I C H ガイドラインによると、生物学的製剤中の汚染物質は、例えば化学および生化学的物質（たとえば微生物プロテアーゼおよび／または微生物種）といった、製造プロセスの一部となるように意図されたものではない全ての偶発的に導入された物質を含む。汚染物質は、原薬または製剤の仕様のための適切な工程内の合否判定基準または処置限界で厳密に回避および／または好適に制御されるべきである。ウイルス、マイコプラズマおよびプリオン汚染の場合は、「処置限界」の概念は、有効ではない。そのような場合は、出発物質は、好ましくは薬剤が含まれていないべきであり、浄化を実証するためのスパイク実験を実施しなければならず、最終製剤を制御しなければならない。これらの処置限界は、I C H 三極調和ガイドライン：バイオテクノロジー／生物学的製剤の品質：ヒトまたは動物由来の細胞株から得られたバイオテクノロジー由来製剤のウイルス安全性評価（Q 5 A）；バイオテクノロジー／生物学的製剤の品質：バイオテクノロジー／生物学的製剤の製造に使用される細胞基材の由来および特性解析（Q 5 D）で定義されている。

20

【0012】

I C H ガイドラインでは、プロセス関連の不純物と製剤関連の不純物とを差別化している。生物学的製剤中の臨界不純物は、例えば製剤凝集体、毒素複合体の分解生成物、ツール様受容体付活剤、宿主細胞からリリースされた増殖因子またはサイトカインといった、患者に直接害を及ぼす可能性がある化合物として定義される。製剤関連の不純物は、生物学的製剤との生物物理学的特徴の高い類似性のため、プロセス関連の不純物よりも識別がより困難であることがある。通常の製剤関連の不純物は、製造および／または保管中に生じる分子変異体であり、活性、効能および安全性に関して所望の製剤のものに匹敵する特性を有していない。製剤関連の不純物の例は、前駆体、特定の分解生成物、異常な糖型または凝集体である。したがって、製剤関連の不純物は、臨界なものまたは非臨界なものであることがある。例として、異常な糖型は、製剤関連の臨界不純物代表例である〔1〕。

30

【0013】

I C H ガイドラインによる生物学的製剤のこれら全ての特性（効力、分量／濃度、純度／不純物のレベル）の測定は、今のところオフライン方法で行われており、製剤の品質が規格に準拠していることを確実なものにするために最終製剤の試料が採られる。

【0014】

概して、例えばバイオ医薬品といった生物学的製剤の下流工程および最終リリース中の製造プロセスにおける決定は、オフライン解析に基づいている。その一方で、所期の製剤に関係なくプロセスの安定性をモニターするために、多くの場合、例えば UV、pH、伝導率、圧力といったオンラインモニターが使用される。したがって、例として、実施例でのクロマトグラフィーは、装置が適切に機能していることを確実なものにするために、UV-VIS、伝導率、pH および圧力用の標準センサーを備えた Akta Pure 25 system（GE Healthcare、スウェーデン）で行われた。しかしながら、所期の製剤の濃度、純度または効力をモニターするために、カラム流出液の画分、膜濃縮水またはリフォールディング溶液からの試料を抜き取らなければならず、それから分量、純度および効力の解析がオフラインで行われる。一部の従来のオンラインモニタリングシステムでは、UV および／または IR 分光法で見た製剤の濃度および不純物が pH および／または伝導率と一緒に

40

50

にモニターされる。全ての不純物が定量化されるわけではなく、効力と呼ぶことが多い生物学的活性は、これらの従来のオンラインモニタリングシステムによって割り出されるわけではないので、そのような方法は、リアルタイムリリースに適していない〔10〕。それから、一般的には、オンラインモニタリングデータおよびオフライン解析が組み合わされて、生物学的製剤の中間体が仕様限界の範囲内であり、さらなる加工またはバイオプロセスの最終ステージでのリリースに適しているかどうか判断される。

【0015】

先に述べたように、先行技術では、クロマトグラフィーカラムの生物学的流体または流出液の組成物をモニターするために、例えばミッドレンジFTIRといった分光学的方法が使用されてきたが、純度、効力および／または分量のリアルタイム測定が考慮に入れられたことは、いまだかつてない〔2〕。これは、可能ではないと判断されている。分光法をアットラインモードで使用することもまた提案されている〔3、4〕。アットラインモニタリングでは、試料が抜き取られてさらに処理され、結果は、リアルタイムには得られない。結果は、ある程度遅延して得られる。オフライン解析では、試料は、プロセスの流れから取り出され、後で手動で解析され、その一方でプロセスは、継続するので、試料の捕捉と解析との間にタイムラグがある。これらの方法を使用することで、個々の成分を定量化することができる〔5〕または特定の不純物をモニターすることができる〔6、7〕が、プロセス中または直後の所与の時点での生物学的製剤の純度、効力および／または分量に関する全体像は、得られない〔2〕。試料が取り出され、試料抽出時と試料の解析との間にタイムラグがあるので、実は、オンラインモニタリングとして記載されてきたものは、多くの場合にはアットラインである。オンラインおよびインライン方法では、プロセスまたは物質の特性に関する情報が得られる時間は、これらの特性が変化する時間よりも短い〔8〕。試料は、さらに処理されるので、多くの場合、方法は、アットラインであるものの、オンラインと呼ばれてきた〔9〕。ゆっくりとしたプロセスの場合は、プロセス制御または実行中のプロセスでの介入には、アットラインまたは速いオフライン方法がそれでも適している可能性がある。しかしながら、速いプロセスの場合は、オンおよびインライン方法のみが適している。生物学的製剤および具体的にはバイオ医薬品製造プロセスの場合は、プロセスの流れの特性がモニタリング手順によって変わってしまわないので、インラインまたは現場モニタリングは、非侵襲でなければならない。工程中のプロセスの流れの特性の変化は、プロセスをモニターするのに適したモニタリングの速度および解析方法を決定づける。バイオ医薬品の精製の場合は、多くの場合、介入するためには非常に速い解析方法が必要である。プロセスの流れの特性は、数秒の範囲内で変化する可能性がある。

この理由のため、例えば組み換えによって製造されたバイオ医薬品といった生物学的製剤の下流工程をオンラインでモニターするためおよび／または制御するための改良された方法を提供することが望ましい。

【0016】

発明の概要

目的は、請求項に係わる主題によって取り組まれる。

【0017】

下流プロセスパラメータをモニターおよび制御するための方法および装置が提供される。

【0018】

本発明の態様は、プロセスデータを得るためにオンラインセンサーおよび好ましくは非侵襲の現場および／またはインラインセンサーを動作ユニットに適用することおよび精製および／または濃縮プロセスまたはその一部のモニタリングおよび制御のための多変量統計解析を具現化することを含む。

【0019】

具体的には、本発明は、少なくとも1つの動作ユニットを使用することを含む、生物学的製剤の精製および／または濃縮プロセスをモニターおよび制御するためのコンピュータ

ーベースの方法に関し、その方法は：

- a) 少なくとも2つの独立したオンラインセンサーを動作ユニットに含め、
 - b) 前記センサーのそれぞれの出力に対応する多数のプロセスデータ値を得て；
 - c) 生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のためにオンラインおよびオフラインデータから得られた多変量統計解析を行うためのコンピューターのデータベースにデータ値をインポートし、
 - d) 実際のプロセスデータ値を診断し；
 - e) 生物学的製剤の濃度、純度および／または効力をリアルタイムでモニターし、
 - f) 場合により、e) で得られた情報に基づいて、プロセス調節および／またはプロセス最適化を行い、
 - g) 場合により、e) で得られた情報に基づいて、パラメトリックまたはリアルタイムで生物学的製剤をリリースする、
- というステップを含む。

10

【0020】

本発明の方法の特定の態様では、オンラインセンサーのうち少なくとも1つが多角度光散乱センサー(MALS)、UV-VIS吸収センサー、蛍光センサー、減衰全反射フーリエ変換赤外分光法センサー(ATR-FTIR)、屈折率(RI)センサー、pHセンサー、温度センサー、伝導率センサー、圧力センサー、小角X線散乱(SAXS)センサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択される。1つの態様では、オンラインセンサーのうち少なくとも1つがATR-FTIR、MALS、RIおよび蛍光センサーからなる群より選択される。特定の態様では、オンラインセンサーのうち少なくとも1つが非侵襲の現場センサーであり、好ましくはATR-FTIR、SAXS、温度、pH、伝導率およびレドックスセンサーからなる群より選択される。

20

【0021】

本発明の方法では、動作ユニットは、少なくとも3つの、少なくとも4つの、少なくとも5つの、少なくとも6つの、少なくとも7つの、少なくとも8つの、少なくとも9つの、少なくとも10またはそれ以上の独立したオンラインセンサーを含んでもよい。1つの態様では、動作ユニットは、少なくとも1つのATR-FTIRセンサー、1つのMALSセンサー、1つのRIセンサーおよび1つの蛍光センサーならびに場合により少なくとも2つの温度センサー、少なくとも1つの伝導率センサー、少なくとも1つのpHセンサーおよび少なくとも1つの圧力センサーを含む。好ましいセンサーは、SAXSセンサー、ATR-FTIRセンサー、温度センサー、伝導率センサー、pHセンサーおよび圧力センサーからなる群より選択される非侵襲の現場センサーである。

30

【0022】

本発明の方法で使用される動作ユニットは、少なくとも1つのクロマトグラフィーユニットおよび／またはろ過ユニットを含んでもよい。クロマトグラフィーユニットがイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダル樹脂クロマトグラフィーからなる群より選択され、結合／溶出またはフロースルーモードでアイソクラチック、リニア、セグメント化および／またはステップグラジエント溶出で動作されてもよく、ろ過ユニットが限外ろ過、精密ろ過、ナノろ過、深層ろ過からなる群より選択され、タンジェンシャルフローろ過、デッドエンドろ過、絶対細孔サイズ膜でのろ過で動作される。

40

【0023】

本発明の方法は、ピーク収集、リフォールディング、ろ過または沈殿後の生物学的製剤の正しい収集、製剤の品質、経済、環境側面、エネルギー消費およびプロセス機器メンテナンスのいずれか1つまたは組み合わせに関して、ただしそれに限定はされないが、精製および／または濃縮プロセスが調節されることを可能にする。

【0024】

本発明の方法は、例えばバイオ医薬品（たとえば核酸分子または異種タンパク質）とい

50

った任意の生物学的製剤の精製および／または濃縮に使用することができる。好ましいタンパク質は、治療用タンパク質、酵素およびペプチド、タンパク質抗生物質、融合タンパク質、炭水化物タンパク質複合体、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質または粒子、プロセス酵素、増殖因子、ホルモンおよびサイトカインまたは抗体である。

【0025】

本発明の方法の好ましい態様では、生物学的製剤の濃度、純度および効力は、方法のステップc)で予測され、ステップe)でモニターされる。

【0026】

本発明は、生物学的製剤を製造ことができる生物または細胞を培養し、結果として得られた製剤を精製する、というステップを含む生物学的製剤製造方法にも関し、精製は、少なくとも1つの動作ユニットを使用してモニターおよび制御され、動作ユニットは、少なくとも2つの独立したオンラインセンサーを含み、生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のために、オンラインおよびオフラインデータから得られた多変量統計解析を行うためのコンピューターのデータベースにオンラインセンサーからのデータ値がインポートされ、精製の制御は、リアルタイムで実際のプロセスデータ値を診断することおよび生物学的製剤の濃度、純度および／または効力をモニターすることを含む。

【0027】

本発明は、生物学的製剤の精製および／または濃縮のための動作ユニットを含む装置もまた提供し、動作ユニットが

- a) クロマトグラフィーおよび／またはろ過ユニットを含み、
- b) クロマトグラフィーまたはろ過ユニットが少なくとも1つのインラインおよび1つの非侵襲の現場センサーを含み、
- c) センサーがコンピューターに接続され、そこで収集されたデータ値をデータベースに保管および／または診断することができる。

【0028】

本発明の装置に使用される好ましい非侵襲の現場センサーは、温度センサー、SAXSセンサー、pHセンサー、伝導率センサー、ATR-FTIRセンサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択することができる。好ましい態様では、装置は、多角度光散乱センサー(MALS)、UV-VIS吸収センサー、蛍光センサー、赤外吸収センサー(IR)、減衰全反射フーリエ変換赤外分光法センサー(ATR-FTIR)、光屈折率(RI)センサー、pHセンサー、温度センサー、伝導率センサー、圧力センサー、SAXSセンサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択された、少なくともさらに1つのオンラインセンサーを含む。

本発明のさらなる態様、フィーチャおよび効果だけでなく、いろいろな態様の構造および動作も、以下に詳述する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1：リアルタイムにモニターされた下流プロセスのツールおよび原理の概略的な概観。

【図2】図2：直列に接続された、UV-VIS検出器、伝導率プローブ、ATR-FTIRプローブ、蛍光、光散乱および屈折率検出器だけでなくpHプローブも備えたクロマトグラフィーシステムのフロー図。クロマトグラフィーシステムは、モジュール(システム/試料ポンプ、バルブ、画分コレクターカラム、センサー(pH、伝導率、UV))からなり、加えて、先に述べた検出器を備える。

【図3】図3：ポンプ、バルブ、画分コレクターおよびセンサーが付いているクロマトグラフィーカラムだけでなくデータ保管、多変量データ解析、リアルタイムモニタリングおよび制御のためのコンピューターも含むオンラインモニタリング装置の模式図。センサーは、精製ユニット(クロマトグラフィーカラム)の標準検出器である圧力センサー、UV-VISセンサー、伝導率センサーおよびpHセンサーだけでなく、インライン測定用の

10

20

30

40

50

A T R - F T I R センサー、蛍光センサー、M A L S センサーおよびR I センサーならびに非侵襲の現場測定用に設置された温度センサー、レドックスセンサー、A T R - F T I R センサーおよびS A X S センサーもある。破線矢印は、統計モデルに基づくプロセスの可能なリアルタイム制御を指示する。

【図4】図4：例示的には、2つの温度センサー、S A X S センサー、A T R - F T I R センサーおよびレドックスセンサーといった、非侵襲の現場センサーを備えたクロマトグラフィーカラムの模式図。A) 外部およびB) 内部の図。

【図5】図5：リアルタイムでモニターされた下流プロセスの一連の動作。この図では、リリース前のさらなる制御としてオフラインデータも使用されている。

【図6】図6：mAb Select SuRe（登録商標）カラム（C V：21.9 ml）の適用による抗体捕捉のクロマトグラム。10 C Vのろ過された上清がロードされた。10 C Vについて、pH 3.5でステップグラジエントで溶出が行われた。

10

【図7】図7：CM Sepharose（登録商標）Fast Flowカラム（C V：12.3 ml）の適用によるクロマトグラム F G F - 2 精製。10 C Vの浄化された上清がロードされた。5 C Vについて、0~1 M N a C l グラジエントによって行われたF G F - 2の溶出。

【図8】図8：オンラインモニターが一体化された限外ろ過／透析ろ過（U F / D F）プロセスの概略図。

【図9】図9：時間／溶出液の容積についてU V 280および静的光散乱センサー（S L S）によってモニターされたCM Sepharose（登録商標）Fast Flowカラム（C V：12.3 ml）の適用によるF G F - 2 精製のクロマトグラム（クロマトグラフィー）。

20

【図10】図10：溶出液サンプリングによってオフラインで測定された効力、純度および分量との相関関係においてU V 280および静的光散乱センサー（S L S）によってモニターされた図9のF G F - 2 精製のクロマトグラムの溶出ピーク。

【図11】図11：F G F - 2 精製ラン（クロマトグラフィー）の時間／溶出液の容積についてのA T R - F T I R スペクトル：3 Dクロマトグラムは、時間／溶出液の容積についてのA T R - F T I R スペクトルの変化を示している。

【図12】図12：図11のF G F - 2 精製ランの3 Dクロマトグラムの拡大表示：3 Dクロマトグラムは、時間／溶出液の容積についてのA T R - F T I R スペクトルの変化を示している。

【図13】図13：精製ラン（クロマトグラフィー）の間の2つの波長（1528 cm^{-1} および1622 cm^{-1} ）の強度のA T R - F T I R スペクトル変化。信号は、M I R スペクトルのアミドバンドの範囲内に位置している。

30

【図14】図14：F G F - 2 精製ラン（クロマトグラフィー）の示差屈折率（d R I）信号。クロマトグラフィープロセスのプロセス相をはっきりと区別することができる。溶出相では、R I 信号に対する溶出タンパク質の寄与を見ることができる。

【図15】図15：時間についてのF G F - 2 精製（クロマトグラフィー）プロセスの溶出ピークの蛍光スペクトル。7つの異なる励起波長が使用され、236~795 nmの放出スペクトルが記録された。蛍光スペクトルA：溶出バッファー0%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。タンパク質が溶出していないので、蛍光信号は、検出されず。蛍光スペクトルB：溶出バッファー25%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。標的タンパク質が溶出し始めるので、蛍光信号の増加が検出される。蛍光スペクトルC：溶出バッファー35%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。蛍光信号のピーク最大値が検出される。溶出液中の標的タンパク質の最も高い濃度。蛍光スペクトルD：溶出バッファー45%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。蛍光信号がわずかに減少し始める。溶出液の中にある標的タンパク質の濃度が低くなる。蛍光スペクトルE：溶出バッファー55%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。標的タンパク質が宿主細胞タンパク質と一緒に溶出しているので、スペクトルA~Dと比較して、蛍光信号は、信号強度の変化およびピーク最大値を示す。蛍光スペクトルF：溶出バッファー70%（100 mM N a - リン酸、1 M N a C l、pH 7.0）。溶出している宿主細胞タンパク質によって

40

50

引き起こされた蛍光信号。蛍光信号最大値は、純標的タンパク質の蛍光スペクトルと比較してより高い波長への変化を示す。

【図16】図16：FGF-2上清を10 ml Heparin-SFFカラムにロードするための多変量解析を使用して計算された漏出曲線。漏出(C/CO) > 10%になると、カラムのロードが停止する。Cは、フロースルーでの標的タンパク質FGF-2の濃度、COは、フィードロードでのFGF-2の濃度である。FGF-2の10%は、樹脂によって保たれているのではなく、フロースルーの中に存在している。

【図17】図17：生物学的製剤の分量のための予測モデルの性能。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定された分量の値(影付きの棒)と比較することができ、その結果として生じる誤差は、0.25 mg/mlである。

10

【図18】図18：ラン3で誤差がRMSE = 44 ng/mlの場合を視覚化した宿主細胞タンパク質(HCP、単位：ng/ml)予測モデルの予測性能。画分が1つだけ(5~6分)の場合は、入手可能なオフラインデータがない。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定されたHCPの値(影付きの棒)と比較することができ、その結果として生じる誤差は、44 ng/mlである。

【図19】図19：モデル化されたHCPの割合および分量の曲線によって割り出されたタンパク質の分量(単位：ppm=ng、タンパク質1 mg当たりのHCP)に対する宿主細胞タンパク質(HCP)の濃度。分量の推定値が(ほとんど)ゼロまたは負の画分は、除外しなければならない。1秒の時間グリッド上で組み合わせられたタンパク質の分量およびHCPの両方のモデルの相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定された値(影付きの棒)と比較することができる。

20

【図20】図20：ラン3でおよそ41 ng/mlの予測誤差をもたらしている、dsDNA(二本鎖DNA)モデルの適用結果。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定されたdsDNAの値(影付きの棒)と比較することができる。

【図21】図21：モデル化されたdsDNAの割合および分量の曲線によって割り出されたタンパク質の分量(単位：ppm=ng、タンパク質1 mg当たりのdsDNA)に対するラン3の場合の単位がngでタンパク質1 mg当たりのdsDNA(ppmに相当)でのdsDNA予測モデルの性能。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフライン値(影付きの棒)と比較することができる。

30

【図22】図22：ラン3(RMSE = 0.08、平均RMSE = 0.055)の場合を描写した、単量体予測モデルの結果。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定された単量体の値(影付きの棒)と比較することができる。

【図23】図23：ラン3の場合の統計モデルによって予測された高分子量(HMW)不純物。性能値は、単量体画分のもものと同一であり、これらの2つのターゲットを合計すると常に1になる。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定されたHMWの値(影付きの棒)と比較することができる。

40

【図24】図24：いくつかのオンライン信号(UV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALS、RI、蛍光およびATR-FTIR)を使用した効力予測モデルの性能。1秒の時間グリッド上の相互検証されたモデル予測値(曲線)およびそれらの画分ごとの平均値(横線)をオフラインで測定された効力(KD)の値(影付きの棒)と比較することができる。

【0030】

定義

別段の言明がない限り、説明および特許請求の範囲を含むこの文書で使用する下記の

50

用語は、下記の定義を有する。当業者は、せいぜい日常の実験を使用して、本明細書に記載する本発明の特定の態様と同等の数多くのものを認識するもしくは解明することができる。そのような同等のものは、本発明によって包含されることが意図される。

【0031】

本明細書で使用されている用語「生物学的製剤」は、例えば本発明の方法を使用してさらに加工される微生物発酵もろみ液または細胞培養といった、生物学的プロセスの結果として生じる製剤のことを指す。生物学的製剤は、バイオ医薬品であってもよい。生物学的製剤の例は：核酸分子または異種タンパク質であり、好ましくは、治療用タンパク質、酵素およびペプチド、タンパク質抗生物質、融合タンパク質、炭水化物-タンパク質複合体、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質または粒子、プロセス酵素、増殖因子、ホルモンおよびサイトカイン、抗体または前記生物学的製剤の代謝産物の中から選択される。生物学的製剤は、下流プロセス（精製および／または濃縮プロセス）の異なるステージ／ステップで、プロセスステップが初期か後期かに応じて異なる基質を有する流体または懸濁液などの中に存在する。基質は、プロセス、細胞および製剤関連の不純物、例えば宿主細胞タンパク質（HCP）、ゲノムDNA、RNA、高分子量（HMW）不純物、エンドトキシン、脂質、細胞残屑、沈殿したタンパク質、製剤の変異体などを含む。さらに、生物学的流体は、プロセスの異なるステージ／ステップで異なる濃度で存在しており、異なる効力を有することがある。

10

【0032】

生物学的製剤に関する用語「濃度」は、用語「分量」と同義で使用される。濃度は、mg/mlの単位で測定される。

20

【0033】

本明細書で使用されている用語「純度」は、本不純物に関する生物学的製剤の中に存在する製剤の量のことを指す。純度は、生物学的製剤の全ての変異体の合計のうち、生物学的製剤の所望の変異体（たとえば：プラスミドDNAの超螺旋型またはアミノ酸配列のタンパク質および天然に存在するタンパク質のN末端）の％または生物学的製剤の全形態の合計のうちの単量体型の％として表すことができる。純度は、生物学的製剤を含む流体もしくは懸濁液1ミリリットル当たりの不純物のmgもしくはμgもしくはng（mgもしくはμgもしくはng/mL）としてまたは流体もしくは懸濁液の中の生物学的製剤1ミリグラム当たりのmgもしくはμgもしくはng（mgもしくはμgもしくはng/mL）としても表すことができ、ppmもしくはppb（100万分の1、10億分の1）としても表される。絶対純度および相対純度（製剤1 mg当たりの生物学的活性の単位）が定義されており、テスト手順だけでなく合否判定基準も、EMEAのICH（1999年9月公表のICH Q6B）によって規格化された。先に述べたように、ICHガイドラインでは、プロセス関連の不純物と製剤関連の不純物とを差別化している。実施例に関連して、製剤の純度は、単量体製剤の濃度として割り出され、宿主細胞タンパク質濃度（HCP）またはDNA濃度および高分子量（HMW）不純物と関連している。不純物は、宿主／細胞関連の不純物（例えば、ただしそれに限定はされないが、宿主細胞タンパク質（HCP）、ゲノムDNA、RNA、高分子量（HMW）不純物、エンドトキシン、脂質、細胞残屑、沈殿したタンパク質など）、プロセス関連の不純物（例えば、ただしそれに限定はされないが、消泡、抗生物質、Tween、洗剤、シクロデキストリンおよびプロセスに加えられる任意の他の化合物など）および製剤関連の不純物（例えば、製剤の変異体、製剤の凝集体、製剤の切断型など）を含む。

30

40

【0034】

用語「効力」は、生物学的製剤の生物学的活性のことを指し、受容体または生物学的活性の引き金となるもう一つの分子との特定の生物学的製剤の結合の平衡解離定数KD値として測定される。平衡結合定数は、バイオセンサー、放射性標識蛍光標識リガンドでの受容体結合アッセイまたは例えば等温滴定熱量計といったカロリメトリックアッセイで、結合反応速度を測定することによって得ることができる。効力を得るためのもう一つの手段は、細胞培養アッセイで生物学的製剤の有効濃度の50％（EC₅₀）または細胞培養で

50

50%の抑制が観測される抑制濃度（ IC_{50} ）を測定することである。

【0035】

本明細書で使用されている「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって実質的にまたは部分的にエンコードされた1つ以上のポリペプチドを含む（1つ以上の結合ドメイン、好ましくは抗原結合ドメインを含む）タンパク質である。用語「免疫グロブリン」（Ig）は、本明細書において「抗体」と同義で使用する。本明細書で使用されている用語「抗体」は、免疫グロブリン（または無傷抗体）のみならず、そのフラグメントのことも指し、抗原結合フラグメントまたは抗原結合ドメインを含む任意のポリペプチドを包含する。好ましくは、例えばFab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb、VHHおよび抗原結合機能を保つ他の抗体フラグメントといったフラグメント。

10

【0036】

用語「下流プロセス」または精製および／または濃縮プロセスは、生物学的製剤の実際の製造プロセスの後に来るプロセスと関連している。通例、生物学的製剤は、宿主細胞を使用して製造され、宿主細胞の発酵を介して生物学的製剤が製造される。生物学的製剤は、宿主細胞から培養培地に分泌されるまたは宿主細胞の細胞質ゾルの中で可溶性もしくは封入体（IB）の形態のままでいてもよい。それから、生物学的製剤は、異なる精製および／または濃縮ステップを含む精製および／または濃縮プロセスである下流プロセスで精製される。通常、精製および／または濃縮ステップは、細胞分解（高圧ホモジナイザーまたは微粒子または逆浸透などを使用）、IB分離、IB可溶化、リフォールディング、ろ過（デッドエンドろ過、深層ろ過、膜ろ過、タンジェンシャルフローろ過、限外ろ過／透析ろ過（UF/DF）など）、透析、クロマトグラフィー、結晶化、沈殿（たとえば、硫酸アンモニウム、塩化カリウム、熱などを使用）、pH調整、加塩、抽出（例えば水性二相抽出）、タンパク質分解切断（化学的または酵素的または自己タンパク質分解）、RNA分解酵素を使用したRNAの消化、限外ろ過、ナノ膜を使用したナノろ過および当技術分野において公知の任意の他の精製および／または濃縮ステップである。

20

【0037】

本明細書で使用されている用語「動作ユニット」は、生物学的製剤の精製および／または濃縮のためのシステムである。本発明に関連して、語句「動作ユニット」は、少なくとも1つの精製ユニットおよび／または濃縮ユニットを含む。動作ユニットは、1つまたはいくつかのクロマトグラフィーユニットおよび／またはろ過ユニット含んでもよい。具体的には、動作ユニットが実験用および工業用規模のユニットを含むことが意図される。実験用規模の動作ユニットで使用されるカラムは、1 ml～100 mlの規模を有していてもよい。試験的および工業用規模の動作ユニットは、およそ100 mlからおよそ2000リットルまでの規模を有していてもよい。さらなる動作ユニットは、細胞分解（たとえば：微粒子または逆浸透などを使用するための、高圧ホモジナイザーまたはかくはん槽型反応器）、IB分離（たとえば：かくはん槽型反応器および遠心分離機を含むユニット）、IB可溶化（たとえば：かくはん槽型反応器、ポンプおよび静的ミキサーを含むユニット）、リフォールディング（たとえば：かくはん槽型反応器、ポンプおよび静的ミキサーを含むユニット）、ろ過（たとえば：図8に示すようなまたはフィルタードームを含むユニット）、透析、クロマトグラフィー（たとえば：図3に示すようなクロマトグラフィーカラムまたはユニットを含む）、結晶化（たとえば：かくはん槽型反応器およびヌッチェフィルターを含むユニット）、沈殿（たとえば：熱交換器および／またはかくはん槽型反応器を含むユニット）、pH調整（たとえば：かくはん槽型反応器を含むユニット）、加塩（たとえば：かくはん槽型反応器を含むユニット）、抽出（たとえば：向流抽出器を含むユニット）、タンパク質分解切断（たとえば：かくはん槽型反応器またはたとえばカラムの中に固定化酵素がある酵素反応器を含むユニット）、RNA分解酵素を使用したRNAの消化（たとえば：かくはん槽型反応器またはたとえばカラムの中に固定化酵素がある酵素反応器を含むユニット）、限外ろ過、ナノ膜を使用するナノろ過（両方ともたとえば：図8に示すようなユニット）および当技術分野において公知の任意の他の精製および

30

40

50

／または濃縮ステップのためのユニットであってもよい。

【0038】

本発明の方法に関して本明細書で使用されている用語「オンライン」は、リアルタイムでのプロセスの直接的なコンピューター制御のことを指す。オンラインモニタリングおよび制御は、現場に、インラインでまたは特定のケースではゆっくりとしたプロセス、アットラインおよびそれぞれの測定のために設置されたセンサーによってもたらしすることができる。これらのセンサーは、オンラインセンサーと呼ばれる。測定が「オンライン」であると考えられるためには、プロセスまたは物質の特性に関する情報を得て解析する時間がこれらの特性が変化する時間よりも短くなければならない。

【0039】

本明細書で使用されている用語「アットライン」は、手動または自動のサンプリング、続いて不連続な試料調整、測定および評価を行うことによって特徴付けられる解析のことを指す。物質の特性は、サンプリングと結果入手可能との間の時間中に変化することがあるので、直接的なプロセス制御は、ゆっくりとしたプロセスの場合にのみ可能である。アットライン解析は、プロセスの流れに物理的および時間的にごく近接して行われ、それからプロセス制御に使用される。

【0040】

本明細書で使用されている用語「インライン」は、プロセスの流れの特性の推論を可能にするプロセスパラメータの直接的割り出しのことを指す。通例、インライン方法は、非破壊的である。測定は、プロセスの流れの中で行われ、プロセスの流れ全体または分流のどちらかが解析される。

【0041】

本明細書で使用されている用語「オフライン」は、プロセスの流れから取り出されて時間的および物理的に離散的なやり方で解析される試料の解析のことを指す。

【0042】

本明細書で使用されている用語「現場」は、精製および／または濃縮プロセスが行われる動作ユニットで行われる測定／解析のことを指し、例としては、クロマトグラフィーまたはろ過ユニットの中である。

【0043】

用語「非侵襲の」は、方法または装置がプロセスの流れを変化または妨げないことを意味する。したがって、例として、カラム自体の中の製剤の流れに干渉せずに測定を行うために、非侵襲の現場センサーがクロマトグラフィーカラムの壁に取り付けまたは組み込まれるであろう。

【0044】

用語「非破壊的」は、生物学的製剤または測定する試料の特性を変化させないサンプリング方法のことを指す。したがって、例として、タンパク質の分量の測定は、タンパク質を破壊せず、その構造を変えない。

【0045】

用語「センサー」は、例えば製剤の立体配座、折り畳みおよび／または変形または事象といった製剤の物理化学的および／または生物物理学の特徴を含む1つ以上の物質の存在または量を感知、検出、測定、モニター、割り出しまたは定量化することができる装置を意味し、機械センサー、力および質量センサー、音響センサー、化学センサー、バイオセンサー、電気化学センサー、光学センサー、電磁センサー、電気センサー、電子センサー、光電センサーおよび光検出器を非限定的に含む。本発明に関連して、センサーは、UV-VIS吸収センサー、蛍光センサー、赤外吸収センサー、光屈折センサー、（光学センサーおよび／または蛍光分析センサー）光散乱センサー（静的および／または動的）、温度センサー、SAXSセンサーおよび／またはpH、伝導率センサーからなる群より選択してもよい。用語「センサー」は、具体的には、減衰全反射（ATR）フーリエ変換赤外分光法（FTIR）、蛍光検出、多角度光散乱（MALS）および／または屈折率検出器（RI）のことを指すことがある。これに関しては、例えば蛍光センサーといったセン

10

20

30

40

50

サーは、所期の特性を測定するユニット全般のことを指す、ということに留意することが重要である。したがって、蛍光センサーという用語は、製剤の蛍光を測定するのに必要な全ての放出および励起センサーを含む。オンラインセンサーは、例として、UV-Vis 検出器用のフロースルー細胞または直接製剤の流れの中で測定するための最新式のクロマトグラフィーシステムで使用される pH センサーまたはたとえばくはん槽型反応器の中のリフォールディング溶液の中といった測定する流体の中に直接設置された ATR プロブを使用する FTIR 検出器である。例えば ATR-FTIR センサー用のフロースルー細胞といったオンラインセンサーをクロマトグラフィーユニットのロードおよび溶出液の流れの中に含めてもよい。

【0046】

10

本明細書で使用されている用語「リアルタイム」は、精製または濃縮が発生している間に精製または濃縮ステップのパラメータを測定することを指す。オフライン解析とは対照的に、リアルタイム測定は、モニター、測定または観測された精製事象と同時に行われる。例として、リアルタイム測定は、基質に結合された製剤の量の増加または減少率の割り出しを含んでもよい。「リアルタイム」測定は、モニターする特性の変化が解析の応答よりもゆっくりであるプロセスもまた包含する。本明細書で使用されている「リアルタイム」は、関連事象の発生時、所定のデータの測定および収集時、データ処理時ならびに事象および環境に対するシステム応答時のうち少なくとも 1 つが同時であることを指す。本明細書に記載する態様では、これらの活動および事象は、実質的に即座に発生する。それは、関連事象がデータの測定および収集から 10 秒、9 秒、8 秒、7 秒、6 秒、5 秒、4 秒、3 秒、2 秒または 1 秒以内に発生する、ということの意味する。

20

【0047】

「リアルタイムリリース」は、最終製剤テストを実施せずに、製造プロセスで得られた原材料および／またはデータの結果をテストして、品質が許容範囲であることを確実なものにすることによって、工程内の製剤、中間体および／または最終製剤の品質を評価することができるテスト方法のことを指す。

【0048】

用語「パラメトリックリリース」は、例えば濃度、純度および／または効力といった特定の予め設定されたパラメータに製剤が合致していることを実証するために、製造プロセス中に収集されたデータに基づいて製剤をリリースすることを指す。加えて、製剤の所望の品質を確実なものにするために、製造中に実施されるプロセスモニタリングに基づいて所望の製剤の製造プロセスを成功裏に検証することができる。得られたデータに基づいて、さらなる所期の使用のために製剤を即時にリリースすることができる。

30

【0049】

したがって、パラメトリックまたはリアルタイムリリースは、製剤の品質に影響を与える製造プロセス中に得られたデータに基づいて、得られる製剤の品質を確実なものにする品質テストのことを指す。リアルタイムリリーステストを使用することで、出荷前品質テストの必要性がなくなり、そのため、製造後の即時出荷を有利に可能にする。リアルタイムリリースでは、もしも製造プロセス中に得られたデータが定義された仕様範囲内に収まるならば、最終的に得られる製剤は、目標とする品質を満足させるものと判断される。

40

【0050】

本発明の精製および／または濃縮プロセスをモニターおよび制御する方法に関連する用語「制御」は、オンラインセンサーからのデータを診断することだけでなく、モニターしているプロセスを調節および最適化することを含む。制御は、処置が必要ない場合にはプロセスを調節または最適化しないことを選択することも指すことがある。1 つの局面では、制御は、例として生物学的製剤のリアルタイム純度制御を含むことがある。制御は、実際のプロセスデータ値を診断することおよび場合により精製および／または濃縮プロセスの調節を意味する。

【0051】

用語「調節」または精製および／または濃縮プロセスを「調節すること」は、1 つの特

50

定の出力プロセスパラメータの／複数の特定の出力プロセスパラメータ（例えば生物学的製剤の濃度、純度および／または効力または生物学的製剤の特定の不純物）の1つの値／複数の値を測定し、もしも出力パラメータが既定の動作値または範囲から外れているならば、再び1つの既定の動作値／複数の既定の動作値またはその範囲の値または範囲内で動作するために、1つ以上の入力パラメータを変化させることによって、1つの既定の動作値／複数の既定の動作値またはその範囲に対する1つの測定された出力パラメータ／複数のパラメータの差を評価することによって、プロセスを操作することを意味する。調節は、例えば、プロセスを中断、プロセスを放棄、プロセスステップを停止、次のプロセスステップから開始、クロマトグラフィープロセス中に溶出液収集を開始および停止、クロマトグラフィープロセス中にクロマトグラフィーカラムをロードするのを停止、例えばタンパク質分解または自己タンパク質分解ステップといった酵素的プロセスを停止、透析ろ過プロセス中にさらなる量の透析ろ過バッファーを追加、リフォールディングプロセス中の温度の変化、I B再可溶化ステップを停止などといった、1つの特定の出力プロセスパラメータ／複数の特定の出力プロセスパラメータ（例えば生物学的製剤の濃度、純度および／または効力または生物学的製剤の特定の不純物）の1つの値／複数の値に応じたプロセスまたはプロセスステップの操作ということも意味する。

【0052】

用語「診断すること」または「診断」は、前記実際の値／データを同じプロセスの他のバッチと比較するためおよび／または前記実際の値／データが既定の仕様の範囲内であるかどうかを確認するためおよび／または精製および／または濃縮のプロセスおよび／またはプロセスステップの（所望の）目的に合致するかどうかを評価するため（たとえば：ただしそれに限定はされないが、特定の不純物が特定のクロマトグラフィーステップによって適宜に／所望の通りに分離されているかどうかまたは限外ろ過ステップ中に生物学的製剤が所望の濃度に達しているかどうかまたはリフォールディングステップ中にどの程度まで生物学的製剤が非活性立体配座から天然の活性立体配座にリフォールディングされているかまたはリフォールディングプロセスのエンドポイント（たとえば：生物学的製剤の60%がリフォールディングされている）を検出するためまたは結晶化、沈殿、加塩、タンパク質分解もしくは自己タンパク質分解プロセスのエンドポイントを検出するためまたは生物学的製剤の特徴が保持時間中に変化しているかどうかを評価するためなど）および／または変異の特別な原因を確認および／または除去するためおよび／または精製および／または濃縮プロセスを最適化するためおよび／または最終的な結果として生物学的製剤をリリースするために、センサーのそれぞれの出力および／または多変量プロセスデータおよび／または生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の実際の予測値に対応する得られた実際のプロセスデータ値を評価および判断することを指す。そのようなプロセス診断は、変異のよくある原因の除去に、ひいてはプロセスの改良につながる。

【0053】

本明細書で使用されている単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上ははっきりと別段の指示がない限り、複数形の指示対象を含む、ということに留意すること。したがって、例として、「a reagent」の指示対象は、1つ以上のそのような異なる試薬を含み、「the method」の指示対象は、本明細書に記載されている方法に修正または置き換えることができる、当業者には公知である同等のステップおよび方法の指示対象を含む。

【0054】

別段の指示がない限り、一連の要素の前に付く用語「少なくとも」は、その一連の要素全部のことを指すものと理解される。当業者は、本明細書に記載する方法および使い方の特定の態様と同等の数多くのものをせいぜい日常の実験を使用して認識するもしくは解明することができる。そのような同等のものは、本発明によって包含されることが意図される。

【0055】

この明細書およびそれに続く特許請求の範囲の至るところで、文脈上別段の必要がない限り、単語「comprise」ならびに例えば「comprises」および「comprising」といったバ

10

20

30

40

50

リエーションが意味するのは、言明された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群が含まれるということであり、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群が排除されるということではない、と理解される。本明細書で使用されている用語「comprising」は、用語「containing」にまたは時には本明細書で使用されている用語「having」に置き換えることができる。

【0056】

本明細書で使用されている「consisting of」は、特許請求の範囲の要素で指定されていないいかなる要素、ステップまたは素材も排除する。本明細書で使用されている「consisting essentially of」は、特許請求の範囲の基本的および新規な特徴に重大な影響を与えない物質またはステップを排除しない。本明細書における各例では、用語「consisting」、

10

【0057】

本明細書で使用されている、複数の列挙された要素の間にある接続詞の用語「および／または」は、個々および組み合わせられた選択肢の両方を包含するものと理解される。例として、2つの要素が「および／または」で結合されている場合は、一番目の選択肢は、二番目なしに一番目の要素を適用できることを表す。二番目の選択肢は、一番目なしに二番目の要素を適用できることを表す。三番目の選択肢は、一番目および二番目の要素と一緒に適用できることを表す。これらの選択肢のいずれか1つが意味の範囲内に収まり、そのため、本明細書で使用されている用語「および／または」の要件を満足させるものと理解される。選択肢のうちの複数を同時に適用できるということもまた、意味の範囲内に収まり、そのため、本明細書で使用されている用語「および／または」の要件を満足させるものと理解される。

20

【0058】

本明細書に記載されている「好ましい態様」は、「本発明の好ましい態様」を意味する。同様に、本明細書に記載されている「いろいろな態様」および「もう一つの態様」は、「本発明のいろいろな態様」および「本発明のもう一つの態様」を意味する。

【0059】

本明細書で使用されている単語「およそ」は、値が当業者の1人によって割り出されたその特定の値の許容範囲の誤差範囲内であることを表し、その値がどのように測定または割り出さるか、すなわち、測定システムの限界に一部依存している。例として、「およそ」は、当技術分野における慣例に従って、1以内または1を超える標準偏差を意味することがある。用語「およそ」は、問題の量または値が指定された値またはある他の約同じ値である可能性があることを指示するのに使用される。その言い回しは、本発明によって類似値が同等の結果または効果を促進する、ということを伝えることを意図したものである。この文脈において、「およそ」は、10%まで上および／または下の範囲のことを指すことがある。一部の態様では、単語「およそ」は、特定の値よりも5%まで上および下の、例えばその値よりも2%まで、1%までまたは0.5%まで上または下の範囲を指す。1つの態様では、「およそ」は、所与の値よりも0.1%まで上および下の範囲のことを指す。

30

40

【0060】

この開示内容の文章の至るところで、いくつかの文書が引用されている。本明細書において引用されている各文書（全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造業者の仕様書、取扱説明書などを含む）は、上記であれ下記であれ、全体として参照により本明細書に組み入れられる。参照により組み入れられている資料がこの明細書と矛盾するまたは不整合である範囲では、明細書は、いかなるそのような資料にも優先する。本明細書における何物も、先行発明であるという理由で本発明がそのような開示内容に先行する権利を与えられないことを承認するものであると解釈されることはない。

【0061】

下記の詳細な説明は、本発明を理解するのに有効である可能性がある情報を含む。本明

50

細書において提供されるいかなる情報も、先行技術であるもしくは現在主張している発明と関連があるまたは具体的もしくは暗示的に参照されたいずれかの刊行物が先行技術である、ということを承認するものではない。

【発明を実施するための形態】

【0062】

本発明は、リアルタイムで生物学的製剤の精製および／または濃縮プロセスをモニターおよび制御するためのコンピューターベースの方法に関する。その方法は、少なくとも2つのオンラインセンサーからのデータを診断してこのデータをオンラインおよびオフラインデータから前もって得られた予測モデルに入力することによって、リアルタイムで生物学的製剤の濃度、純度および／または効力に関する情報を提供するのに、多変量統計解析を使用することに頼っている。加えて、本発明は、これらの方法に使用する装置を提供する。

10

【0063】

最初に、例えば濃度、純度または効力といった製剤の特定の特性のための予測モデルを得るために、オンラインおよびオフラインデータの両方が所期の生物学的製剤のために収集された。図1のプロセス概観から見てとれるように、モデル生成およびトレーニングのために、オフラインデータに関連して、オンラインおよび現場モニターのデータを評価することができる。統計的方法を介して統計モデルが確立され、純度、効力および分量の予測を可能にする。名前を挙げた属性の予測は、パラメトリックまたはリアルタイムリリース、プロセス最適化およびプロセス制御を可能にする。

20

【0064】

予測モデルの構築

実施例7で詳述されているように、実施例で使用される予測モデルのために、UV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALSおよびRI装置（ $p = 14$ 個の変数）、ATRF TIRスペクトル（分解能約 2 cm^{-1} の結果として $p = 1427$ 個の予測因子が生じる）だけでなく、計14366個の蛍光変数を与える7つの励起波長での蛍光放出スペクトル（分解能およそ 0.3 nm ）からのオンラインデータが収集された。予測因子セットおよび応答に応じて、7～14回のクロマトグラフィーランの変数データがモデル構築のために使用された。この後、時間整合ステップが行われたいくつかの装置の間の既知の時間の遅延を考慮しながら、各オフライン画分の期間に対応する各オンライン変数の平均値が計算された。それから、変数選択手法としてのブースティング（Rパッケージ mboost）と組み合わせて、STAR（構造化加法回帰）モデルによって結果が得られた。相互検証（各ランからのデータを一旦除外し、いくつかの他のランのデータに基づいたモデルで予測）を介して、自動スケールされたデータ（すなわち、各予測因子から平均値が引かれ、その標準偏差で割られる）のパラメータ最適化およびモデル選択が行われた。相互検証された二乗平均平方根誤差（RMSE）で、モデルの品質が測定された。このようにして、所期の生物学的製剤の異なる特性のためのモデルを確立することができる。

30

【0065】

実施例7では、分量（濃度）、純度（宿主細胞タンパク質（HCP）、二本鎖DNA（dsDNA）、単量体および高分子量HMWの不純物濃度）および効力（KD値）用のモデルが生物学的製剤FGF2のために確立された。

40

【0066】

例示的なモデル化の結果およびその後の目標変数のための対応するオフライン値との比較を下記の図に示す：

1. タンパク質の分量（濃度）（単位：mg/ml）（図17）
2. 宿主細胞タンパク質の濃度（単位：ng/ml）およびタンパク質の推定分量に対して（単位：ppm）（図18および19）
3. 二本鎖DNA（dsDNA）の濃度（単位：ng/ml）およびタンパク質の推定分量に対して（単位：ppm）（図20および21）
4. 単量体および高分子量不純物（単位：%）（図22および23）

50

5. K D値で表した効力（図24）

これらの図では、実際に測定されたターゲットのオフライン値がバーで示され、1秒の時間グリッド上のオンラインデータに基づくモデル予測値が曲線として描写され、これらの予測値を各オフライン画分で平均化したものが横線として示されている。結果は、一回のクロマトグラフィーランのものが示されており、予測誤差は、総合的な予測誤差（全てのランの平均）と類似している。横軸は、時間（単位：分）を表し、原点が最初のオフライン画分の開始に配置されている。

【0067】

モデル構築／多変量統計には、オフライン解析が使用されてきた。これに関しては、生物学的製剤の濃度、純度および効力を測定するためのいかなるオフライン方法でも使用することができる。例として、濃度（分量）の測定には、逆相HPLC、アフィニティーHPLCおよびELISAを使用することができる。具体的には、例の中で開発された予測モデルでの分量／濃度の割り出しには、FGF2の濃度を割り出すために逆相HPLCが使用された。抗体濃度の割り出しには、総抗体濃度を明らかにするために結合溶出モードでタンパク質Aカラムが使用された。純度の解析には、単量体含有量ならびに高および低分子量不純物を割り出すためのサイズ排除クロマトグラフィー、LALエンドトキシントテスト、宿主細胞タンパク質ELISAおよびPicogreenアッセイを介したdsDNA定量化を使用することができる。効力の解析には、表面プラズモン共鳴に基づくバイオセンサー、生物学的製剤の生物活性をテストするための増殖アッセイおよび細胞培養効力アッセイを使用することができる。

【0068】

加えて、所与の生物学的製剤のための個々の各ランでオンラインセンサーから得られたオンラインデータは、多変量統計解析を使用して濃度、純度および効力を組み合わせた予測をするためにオフラインデータに関連して評価される。多変量解析（MVA）は、同時に複数の統計的変数の観測および解析を行うことを伴う、多変量統計の統計的原理に基づいている。

【0069】

本発明の1つの態様では、予測モデルの構築に使用される多変量統計解析は、機械学習技術に基づいている。

【0070】

機械学習は、解析モデルの構築を自動化するデータ解析方法である。機械学習は、人工知能におけるパターン認識および計算論的学習理論の研究から進化したコンピューターサイエンスのサブフィールドである。機械学習は、データから学習して予測を行うことができるアルゴリズムの研究および構成を探索する。そのようなアルゴリズムは、静的プログラムの指示に厳密に従うよりはむしろデータ駆動型の予測または決定を行うために、実例入力からモデルを構築することによって動作する。機械学習は、コンピューター統計学と密接に関連しており、数値最適化と強い結び付きを有する。

【0071】

機械学習は、統計と密接に関連しており、多くの場合同じ方法を採用して有意に重複している。下記に、多変量データ解析および機械学習の異なる方法を簡潔にまとめる。ランダムフォレスト（RF）とも呼ばれる決定木アンサンブルは、有効な分類子であるのに加えて特徴選択に有効である。次元削減への1つの手法は、ターゲット属性に対して注意深く構成された大きいツリーのセットを生成し、それから各属性使用統計を使用して最も参考になる特徴のサブセットを見つけることである。

【0072】

通例「ニューラルネットワーク」（NN）と呼ばれる人工ニューラルネットワーク（ANN）学習アルゴリズムは、生物学的ニューラルネットワークの構造および機能側面に触発された学習アルゴリズムである。相互接続された人工ニューロンの群に関して計算が構造化され、計算へのコネクショニストアプローチを使用して情報が処理される。

【0073】

サポートベクターマシン (SVM) は、分類および回帰に使用される、一連の関連のある管理された学習方法である。各々が2つのカテゴリーのうち1つに属するとしてマークを付けられた一連のトレーニング例を与えられると、SVMトレーニングアルゴリズムは、新しい例が一方のカテゴリーに収まるかまたは他方かを予測するモデルを構築する。

【0074】

多変量適応回帰スプライン (MARS) は、例えば定数、ヒンジ関数または2つもしくはそれ以上のヒンジ関数の積といった基底関数の加重合計として回帰モデルを構築するノンパラメトリック回帰手法である。後者は、予測因子変数間の相互作用のモデル化を可能にする。

【0075】

リッジ回帰、Lasso (最小絶対値縮小選択演算子) およびエラスティックネットは、解釈可能性をそして数多くの場合は予測モデルの予測性能もまた増加させる、自動変数選択および正則化 (パラメータ収縮) を行う回帰手法である。

【0076】

最小角度回帰 (LARS) は、特に高次元データに適していてステップワイズ回帰と類似している回帰法である。

【0077】

構造化加法回帰 (STAR) モデルは、線形モデルの拡張であり、共変量の平滑効果だけでなく予測因子間の相互作用効果も組み込まれている。

【0078】

主成分解析 (PCA) は、一連の (潜在的に数多くの) 変数をより小さい一連の、主成分 (PCs) と呼ばれる無相関な変数に変換する非管理多変量統計法である。この変換は、いくつかの先の PCs に対して直交である一方で、各 PC の方向がデータセットの中で可能な限り高い分散を占めるように行われる。通例、最初の少数の PCs がオリジナルデータセットの大量の全変動 (情報) をカバーし、それ故に有意なデータ削減につながる。

【0079】

部分最小二乗法 (PLS) 回帰は、独立および応答変数のシステムの解析のための多変量回帰手法である。PLS は、一連の独立変数を一連の複数の従属 (応答) 変数に関連付けることもできる。部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) は、Y がカテゴリカルである時に使用される変異体である。

【0080】

多変量曲線分解 (MCR) は、例えばクロマトグラフィーデータといった時間発展データを純粋なスペクトルおよび対応する濃度、純度および効力プロファイルに分解する。

【0081】

予測モデル構築に使用される機械学習技術は、先に記載したように、部分最小二乗回帰、主成分回帰、ランダムフォレスト、ニューラルネットワーク、構造化加法回帰、多変量適応回帰スプライン、リッジ回帰、Lasso、エラスティックネット、最小角度回帰またはサポートベクターマシンから選択される。

【0082】

加えて、モデル構築のために得られたデータと組み合わせて、エンジニアリング/機械論的モデルを使用することができる。例として、多孔質ビーズで充填されたクロマトグラフィーカラムのロードをいくつかの数理モデルで予測することができる。例えばかくはん槽方法、シャローベッドまたは小規模クロマトグラフィー実験といったいくつかの方法によって平衡結合容量を推定することができる。結合反応速度および例えば有効拡散係数といった他のパラメータもまた、これらの実験から得ることができる。これらのパラメータを推定した後、漏出曲線および/またはロードの程度を予測するために、球状吸着剤粒子中の物質移動を記述するための速度式を使用した数理モデルを適用することができる。そのような数理モデルは、細孔拡散、固体拡散、平行細孔および固体拡散、薄膜拡散、平行薄膜および細孔拡散または拡散二元分散粒子である。カラム長さおよび時間の関数としてのロードからの製剤の移動がこれらのモデルを使用して計算される。同じことをクロマト

10

20

30

40

50

グラフィーカラムからのピークの溶出に対して行うことができる。もしも必要であれば、予測されたロードフロントまたは溶出プロファイルをカラムの前および後に起こるゾーンスプレッディングと絡み合わせることができる。

【0083】

上の例から見てとれるように、エンジニアリング／機械論的モデルを統計解析と組み合わせることによって、予測が研ぎ澄まされる。

【0084】

モデル構築のさらなる選択肢では、物理的な現実と合致させるために、統計的方法は、例えば細孔拡散モデル／固体拡散モデル、薄膜拡散モデルといった機械論的モデルをエキストラカラムバンドスプレッディングと組み合わせることができる。パラメータ予測のための、たくさんの実験を要する多成分状況は、モデルトレーニングによって解決されてきた。モデルは、使用される特定の動作ユニットに基づいて、カラム、流れの均一性および吸着／脱着機構によるバンドスプレッディングを考慮に入れている。細孔拡散が主流のプロセスである場合には、解析解および単純な数値解を使用してプロセスの流れの組成物を予測してきた。これは、速度を高め、動作範囲のコンピューター支援探求を可能にする。

【0085】

本発明の重要な局面として、モデルトレーニング実施後は、生物学的製剤に関するさらなる較正ステップをセンサーが必要としないので、装備の変更なしで本発明の方法を所期の生物学的製剤に適用することができる。

【0086】

一旦所与の生物学的製剤のためにモデルが確立されると、さらに予測モデルを調整することなくそしてオフラインデータを得ることなく、本発明の方法を使用することができる。加えて、先に述べたように、予測モデルの構築に使用されたオンラインセンサーは、本発明のプロセスをモニターおよび制御するためのデータ値を得るためにも使用され、生物学的製剤に関して較正する必要がない。これは、生物学的製剤の精製および／または濃縮プロセスをリアルタイムでモニターおよび制御することだけでなく、製剤のリアルタイムまたはパラメトリックリリースをモニターおよび制御することも可能にする。

【0087】

精製および／または濃縮プロセスを制御およびモニターする方法

一旦生物学的製剤のために予測モデルが確立されたら、本発明の方法を使用して生物学的製剤の精製および／または濃縮をモニターおよび制御することができる。したがって、本発明は、すぐにでも使用または商品化することができる対象の製剤を得るために、任意の従来の／当技術分野において公知の発現技術を介して前記製剤を発現させ、これもまた原理上は当技術分野において公知である方法によって発現産物を精製するが、加えて本発明の方法のいずれかを適用し、場合により精製された発現産物を仕上げる、たとえば調合する、というステップを含む、対象の生物学的製剤を製造するための改良された方法にも関する。

【0088】

リアルタイム純度制御を具現化する時に、たとえば：クロマトグラフ分離、タンパク質リフォールディングステップまたは膜分離を装備および動作させることは、確立されたシステムにオンライン検出器を設置することのみを意味するので、従来の装備と比較して実質的には異ならない。可能な装備の例を図3に示す。図5から見てとれるように、センサー／クロマトグラフィーシステムの前処理、準備から始めて、クロマトグラフィーランを開始する。予測モデルは、純度、効力および濃度（分量）の予測を可能にし、したがって即時の製剤リリースを可能にする。

【0089】

リアルタイムでモニターされた下流プロセスの一連の動作は、図5に見ることができる。ここで見てとれるように、発酵プロセスまたは先行下流ユニット動作から標的タンパク質が得られる。発現宿主に応じて、標的タンパク質を含有するプロセス溶液が前処理される（たとえば、クロマトグラフステップの前の0.2 μmデッドエンドろ過、例えばロー

ドステップのためのpH値または伝導率といったフィード調整、封入体の可溶化)。以下の本例では、UV-VIS、伝導率、pHおよび圧力用の標準センサーを備えたAkta Pure 25 system (GE Healthcare、スウェーデン) でクロマトグラフィーランが行われた。具体的には、Akta Pure 25 systemは、多波長UV検出器U9-M (UV-VIS、280 nm、260 nm、214 nm-190~700 nmの範囲で同時に最大で3波長)、伝導率プローブC9およびpHプローブV9-pH (pH 0~14) を含む。システムは、UNICORNソフトウェアバージョン6.4によって制御される。図2で見てとれるように、例の中で使用されている動作ユニットの中で、クロマトグラフィーカラムの後にオンラインセンサーが一体化されている。追加のオンラインセンサーを備えたクロマトグラフィーシステムのフロー図を図2に示す。この図の装備では、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) スペクトルを記録するために、減衰全反射 (ATR) に基づく中間赤外分光器MATRIX-FM (Bruker、アメリカ) が選択された。蛍光検出のために、レーザー励起キセノンランプEQ-99XFC LDLS (Energetiq、アメリカ)、光ファイバマルチプレクサ (Avantes、オランダ)、フローセル (FIALab Instruments、アメリカ) および600 L/mmのグレーティングの分光器Ava Spec-ULS-TEC (Avantes、オランダ) を含む装備が組み立てられた。この蛍光装置は、7つの異なる波長 (Pos. 1-リファレンス、Pos. 2-265 nm±10 nm、Pos. 3-280 nm±10 nm、Pos. 4-300 nm±40 nm、Pos. 5-340 nm±10 nm、Pos. 6-289 nm±10 nm、Pos. 7-300 nm±10 nm、Pos. 8-400 nm±10 nm) の励起光および全放出スペクトル (236~795 nm) の測定を可能にした。また、多角度光散乱 (MALS) 検出器miniDAWN TREOS (Wyatt、アメリカ) だけでなく示差屈折率検出器Optilab T-rEX (Wyatt)、-0.0047~+0.0047 RIUの範囲の示差RIも適用された。ピーク遅延だけでなくバンドの広がり効果も考慮に入れて、全ての検出器が直列に接続された。

【0090】

発明によると、

- a) 少なくとも2つの独立したオンラインセンサーを前記動作ユニットに適用し、
- b) プロセスデータをリアルタイムでモニターし、
- c) および/または現場測定もしくは解析からデータを得て、
- d) 前記センサーのそれぞれの出力に対応する多数のプロセスデータ値を得て；
- e) 生物学的製剤の濃度、純度および/または効力の予測のために、前記プロセスデータ値に対してモデルベースの多変量統計解析を行い；
- f) 実際のプロセスデータ値を診断し；
- g) 場合によりプロセス制御および/またはプロセス最適化を行い、
- h) 場合により工程内、中間体および/または最終製剤として生物学的製剤をパラメトリックまたはリアルタイムリリースする、

というステップを含む、少なくとも1つの動作ユニットを含む、生物学的に製造された製剤の精製および/または濃縮プロセスまたはその一部をモニターおよび制御するためのコンピューターベースの方法が提供される。

【0091】

本発明の1つの態様では、動作ユニットが精製ユニットであり、クロマトグラフィーユニットおよび/またはろ過ユニットを含む。

【0092】

本発明の態様は、本明細書に記載する方法を任意のタイプの精製または濃縮方法、好ましくは動作ユニットがクロマトグラフィーまたはろ過ユニットであるクロマトグラフィーおよびろ過方法に適用することを含む。

【0093】

好適なクロマトグラフィー方法は：例えば高速液体クロマトグラフィー；アフィニティークロマトグラフィー；超臨界流体クロマトグラフィー；イオン交換クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー；逆相クロマトグラフィー；二次元クロマトグラフィー；高速タンパク質 (FPLC) クロマトグラフィー；向流クロマトグラフィー；キラ

ルクロマトグラフィー；水性順相（A N P）クロマトグラフィー；混合モードクロマトグラフィー；擬似アフィニティークロマトグラフィー；疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびマルチモーダル樹脂クロマトグラフィーといった液体クロマトグラフィーを例として含むが、それに限定されるわけではない。

【0094】

クロマトグラフィーユニットは、結合／溶出またはフロースルーモードで、アイソクラチック、リニア、セグメント化および／またはステップグラジエント溶出で動作させてもよい。

【0095】

ろ過方法では、動作ユニットがろ過ユニットであり、限外ろ過、精密ろ過、ナノろ過、深層ろ過からなる群より選択することができる。ろ過ユニットがタンジェンシャルフローろ過、デッドエンドろ過または絶対細孔サイズ膜でのろ過として動作させられてもよい。

【0096】

リアルタイムでプロセスデータをモニターするおよび／または多数のプロセスデータ値を得るために、多数のオンラインセンサーが動作ユニットの中で具現化されている。

【0097】

本発明の1つの態様では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12またはそれ以上のオンラインセンサーが動作ユニットの中で具現化されている。センサーは、製剤の流れの中に直接設置されてもよくまたは上で定義された非侵襲の現場センサーであってもよい。

【0098】

センサーは、物理的な分量を取得して、それを処理（たとえば、光学的、電気、機械、熱）に好適な信号に変換する。上で定義されているように、センサーは、電気センサー、電子機械センサー、電子センサー、トランスデューサー、抵抗センサー、容量センサー、電磁センサー、スイッチ、光学センサー、磁気センサーおよび／または誘導センサー、温度センサーであってもよい。好適な感知方法は、蛍光、UV吸着、赤外、電気または電気化学的インピーダンス、pH、伝導率、静的動的散乱、動的散乱屈折率、温度の測定を含む。

【0099】

本発明の1つの態様では、例えば多角度光散乱（MALS）、UV-VIS吸収センサー、蛍光励起および放出センサーといった光散乱センサー、例えば減衰全反射フーリエ変換赤外分光法（ATR-FTIR）といった赤外吸着センサー、例えば屈折率センサー（RI）（光学センサーおよび／または蛍光分析センサー）といった光屈折センサーおよび小角X線散乱センサー（SAXS）、伝導率センサー、温度センサーおよび／またはpHからなる群よりセンサーが選択される。

【0100】

本発明の1つの態様では、図1および3で見てとれるように、センサーが直列に接続されている。代替態様では、センサーが動作ユニットに一体化されていて、プロセスの流れの中で測定する非侵襲の現場センサーである。

【0101】

本発明の1つの態様では、UV-VIS吸収、伝導率データ、pH値、圧力データ、蛍光励起および放出、赤外吸着（ATR-FTIR）、光屈折（RI）および静的散乱（MALS）がプロセスの流れから同時に取得される。

【0102】

加えて、温度、SAXS、ATR-FTIR、pH、伝導率および酸化還元（レドックス）を例えばクロマトグラフィーおよび／または任意の他の精製ステップといった精製ステップ中にその場で測定することができる。温度変化は、取るに足らない程度である可能性があり、それは、10分の1度の範囲内を意味する。

【0103】

以下に解説するように、センサーから得られたデータ値に対して、特別なアルゴリズム

10

20

30

40

50

によって製剤の分量、純度および／または効力が推測される。その方法は、とても速いので、バイオ医薬品製造での治療用製剤の、下流工程での工程内制御およびリアルタイムまたはパラメトリックリリースに適している。

【0104】

データの変量統計解析

本発明の方法で使用される変量統計解析のために、所与の生物学的製剤のための個々の各ランに対してオンラインセンサーから得られたオンラインデータがコンピューターのデータベースにインポートされ、先に記載したように予測モデルによって評価され、生物学的製剤の濃度、純度および／または効力のリアルタイムモニタリングを可能にするために診断される。

10

【0105】

多数のプロセスデータがオンラインセンサーから得られてデータベースに保管される。データは、統計的および数学的に評価される。生物学的に製造された化合物のデータセットが選択、抽出および統計的計算環境にインポートされ、そこで予測モデルのために先に記載した変量解析を使用して評価される。

【0106】

本発明の装置

生物学的製剤の精製および／または濃縮のための動作ユニットを含む装置もまた提供され、動作ユニットは、クロマトグラフィーおよび／またはろ過ユニットを含み、クロマトグラフィーまたはろ過ユニットは、少なくとも1つの非侵襲の現場センサーを含み、センサーは、コンピューターに接続され、そこで収集されたデータ値をデータベースに保管および／または診断することができる。

20

【0107】

所期の装置の概略的な概観を図3に示す。模式図は、精製ユニットの標準検出器である圧力センサー、UV-VISセンサー、伝導率センサーおよびpHセンサーだけでなく、インライン測定用のATR-FTIRセンサー、蛍光センサー、MALSセンサーおよびRIセンサーならびに非侵襲の現場測定用に設置された温度センサー、レドックスセンサー、ATR-FTIRセンサーおよび小角X線散乱(SAXS)センサーも含む、オンラインモニタリング装置を示す。破線矢印は、統計モデルに基づくプロセスの可能なリアルタイム制御を指示する。

30

【0108】

本発明の装置では、非侵襲の現場センサーは、温度センサー、SAXS、pHセンサー、伝導率センサー、ATR-FTIRセンサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択することができる。図4のより詳細な図から見てとれるように、1つまたはいくつかの現場オンラインセンサーがクロマトグラフィーまたはろ過ユニットに一体化されている。この模式図では、クロマトグラフィーカラムは、例示的には、2つの温度センサー、SAXSセンサー、ATR-FTIRセンサーおよびレドックスセンサーといった、非侵襲の現場センサーを備えている。A) 外部およびB) 内部の図。

【0109】

加えて、図3から見てとれるように、多角度光散乱センサー(MALS)、UV-VIS吸収センサー、蛍光センサー、赤外吸収センサー(IR)、減衰全反射フーリエ変換赤外分光法センサー(ATR-FTIR)、光屈折率(RI)センサー、pHセンサー、温度センサー、伝導率センサー、圧力センサー、小角X線散乱(SAXS)センサーおよびレドックスセンサーからなる群より選択された、少なくとも1つのオンラインセンサーを装置がさらに含んでもよい。オンラインセンサーは、示されているように直列に接続されていてもよい。

40

【0110】

好ましい装置では、装置のクロマトグラフィーまたは精製ユニットがSAXS、ATR-FTIR、温度およびレドックス用の非侵襲の現場センサーだけでなく蛍光、RI、MALSおよびUV-VIS用の追加のオンラインセンサーも含む。

50

【0111】

装置の精製またはろ過ユニットは、実験用または工業用規模であってもよい。実験用規模の装置で使用するカラムは、1 ml～100 mlの規模を有していてもよい。試験的および工業用規模の装置は、およそ100 mlからおよそ2000リットルまでの規模を有していてもよい。

【0112】

本発明の方法および装置の適用

本発明は、下流プロセスの実質的な経済的改良を提供する。例として、発酵製剤の最後から例えばバイオ医薬品といった最終精製生物学的製剤までのバイオプロセスシステムの全てのステージにおける異なるバッチの比較を可能にする。

10

【0113】

そのため、本発明のさらなる態様は、本明細書に記載する方法に関し、データの中の偏差パターンを観測することで精製ステップの不具合が指示される。そのような偏差パターンが検出されると、それに応じてプロセスパラメータを調節することができるか、プロセスが中断される。そのような偏差は、製剤凝集または標的タンパク質の不溶出、タンパク質切断、タンパク質および宿主細胞不純物の錯体形成、標的タンパク質の沈殿、宿主細胞タンパク質の沈殿およびその組み合わせである可能性がある。

【0114】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載する方法に関し、モデル予測と目標値または範囲との間にある程度の相違が検出されると、前記測定および評価の結果に基づいて精製ステップの調整が実行される。例として、タンパク質がクロマトグラフィーカラムから溶出すると、純度、効力および／または濃度が目標値または範囲に達した時にのみ、製剤の収集が開始される。目標値に合致しないと、収集が停止する。結果に基づいて、さらなる下流のユニット動作を適応させることができる。例として、透析ろ過ステップで、もしも目標濃度に達していないならば、より大きな容積を使用して宿主細胞タンパク質（HCP）または二本鎖DNA（dsDNA）をもっと取り除くことができるもしくは濃縮ステップを行うことができる。

20

【0115】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載する方法に関し、ピーク収集、リフォールディング、ろ過または沈殿後の生物学的製剤の正しい収集、製剤の品質、経済、環境側面、エネルギー消費およびプロセス機器メンテナンスのいずれか1つまたは組み合わせに関して精製プロセスまたはその一部が最適化される。したがって、生物学的製剤に関して、純度、分量および効力に関する溶出したピークの組成物が分かる。次の実験で、プロセスパラメータが修正され、目標値が得られるまでプロセスが繰り返される。

30

【0116】

本発明は、リアルタイムで生物学的製剤の濃度、純度および／または効力をモニターおよび制御することを提供する。例として、最終精製製剤の濃度、純度および／または効力の割り出しを可能にする。得られたデータおよびリリース基準に基づいて、最終製剤の製造のために製剤を原薬としてさらに使用することができる。

【0117】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載する方法に関し、生物学的製剤は、例として、ただしそれに限定はされないが、アンチセンス核酸、プラスミドDNA、mRNA、マイクロRNA、dsRNA、siRNA、異種タンパク質といった核酸分子であり、好ましくは、治療用タンパク質、酵素およびペプチド、タンパク質抗生物質、融合タンパク質、炭水化物タンパク質複合体、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質または粒子、プロセス酵素、増殖因子、ホルモンおよびサイトカインまたは前記生物学的製剤の代謝産物の中から選択される。あるいは、生物学的に製造された製剤は、炭水化物、脂質、有機小分子、非有機小分子、ウイルス、リボソーム、抗体および任意のそのような化合物のハイブリッドまたは異型である。

40

【0118】

50

本発明のさらなる態様は、特定の生物学的製剤のための制御またはリリースアルゴリズムを確立するための、本明細書に記載する方法の使用に関する。得られたデータは、生物学的製剤をいつリリースするかを割り出すために、多変量統計解析に供される。

【0119】

本発明は、先発品、バイオ後続品またはバイオベター化合物の製造のためのバイオプロセスをより良く理解するのに役立つ。とりわけ、最終精製製剤のステージで、生物学的製剤に関する追加情報をリアルタイムで得ることができる。

【0120】

生物学的製剤のためのモデルベースの制御／リリースアルゴリズムに基づいて、先発品の治療用製剤とバイオ後続品またはバイオベターとの間の比較方法もまた提供される。

10

【0121】

もう一つの局面では、例えばクロマトグラフィーおよび膜ろ過方法といった重要なプロセスステップのために、本発明は、物質の性能および表面特性を予測するのに役立つ。例として不完全な再生または保管による、物質の経年劣化をモニターすることができ、場合によっては分解が予測される。そのため、本発明のさらなる態様は、プロセス物質の寿命を予測することに関する。

【0122】

本発明は、臨界プロセスパラメータへのより速いアクセスを提供するのに役立つ。実験データおよび統計モデルの組み合わせによって、プロセスパラメータが変動し、濃度、純度および／または効力がオンラインモニタリングによって間接的に得られる。好ましい態様では、モニタリングは、少なくとも部分的にその場で行われる。なので、関連がある動作範囲をよりずっと速く開発することができ、よりずっと詳細に探求することができる。原理上は、少なくとも1つのステップが範囲外である時に、ユニット動作の順序を変えてユニット動作の直列接続の効果を見ることが可能である。理論上および実際には、一つだけのユニット動作が範囲外である時には、配列全体は、それでも許容範囲の製剤につながるかもしれない可能性がある。そのような場合は、動作スペースおよびプロセスの柔軟性が広げられる。

20

【0123】

したがって、本発明のさらなる態様は、製剤品質に関する臨界プロセスパラメータおよびストレスパラメータへのより速いアクセスに関する。得られたデータを解析すると、不具合を訂正するためにオペレーターがプロセスに介入することができる。

30

【0124】

本発明の1つの態様では、製剤の濃度、純度および／または効力をリアルタイムで制御するためのモデルおよびソフトウェアパッケージが提供される。

【0125】

本明細書に記載する方法は、ピーク画分をより正確に収集し、リフォールディング、ろ過または沈殿後の物質を正確に収集することによって、下流工程での生産量を改良するのに役立つ。そのようにしっかり制御された下流プロセスは、バッファー消費の削減、ひいては商品のコスト削減につながる。

【0126】

1つのさらなる経済的改良は、バッチ失敗の削減によって達成される。バッチの失敗は、非常に初期のステージで認識することができ、もしも指示されていればプロセスを終了することができ、したがって失敗したバッチを処理および解析する不必要な支出が回避される。概して、オンラインモニタリング手法を使用すると、プロセスがよりロバストになる。

40

【0127】

経済的改良の有意な部分は、工程内制御および終了制御のための支出の抜本的な削減から来る。

【0128】

フィードの流れが特徴付けられ、手法を一般的に調整することができるので、経済的恩

50

恵は、現場モニタリングおよび制御を通じて加速することによって達成される。

【0129】

本明細書に記載する方法は、発酵プロセスの最後から最終精製生物学的製剤のリリースまでのバイオプロセスシステムの全てのステージにおける、異なるバッチの比較もまた可能にする。

【0130】

既存のプロセスおよび製剤でも、開発された方法は、全てのステージにおけるフィードの流れ、中間体および製剤の直接比較を可能にする。この概念は、例えば無菌テストといったリリース後に行われる他のオフライン方法と関連したリアルタイムリリースまたはパラメトリックリリースの基礎である。バッチ間の変動は、簡単に観測され、文書化および検証の改良を増加させる。

10

【0131】

方法は、プロセスの偏差が生物学的製剤の品質に影響を与えなかったことを文書で立証するのに役立ち、検証の努力およびプロセスパラメータの開発を楽にする。

【0132】

下記の項目は、開示内容の特定の側面および本明細書において提供される教えを实践するための特定の態様をさらに提供する：

【0133】

1. 少なくとも1つの精製ユニットを含む、生物学的製剤の精製プロセスまたはその一部をモニターおよび／または制御するためのコンピューターベースの方法であって、

20

- a) 少なくとも2つの独立したオンラインセンサーを前記精製ユニットに適用し、
- b) プロセスデータをリアルタイムでモニターし、
- c) 前記センサーのそれぞれの出力に対応する多数のプロセスデータ値を得て；
- d) 生物学的製剤の濃度、純度および／または効力の予測のために、前記プロセスデータ値に対してモデルベースの多変量統計解析および数理モデルを行い；
- e) 実際のプロセスデータ値を診断し；
- f) 場合によりプロセス制御および／またはプロセス最適化を行い、
- g) 場合により生物学的製剤をパラメトリックまたはリアルタイムリリースする、というステップを含む。

【0134】

30

2. 精製ユニットがクロマトグラフィーユニットおよび／またはろ過ユニットを含む、項目1記載の方法。

【0135】

3. クロマトグラフィーユニットがイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモーダル樹脂クロマトグラフィーからなる群より選択されて、結合／溶出またはフロースルーモードでアイソクラチック、リニア、セグメント化および／またはステップグラジエント溶出で動作され、ろ過ユニットが限外ろ過、精密ろ過、ナノろ過、深層ろ過からなる群より選択されて、タンジェンシャルフローろ過、デッドエンドろ過、絶対細孔サイズ膜でのろ過で動作される、項目2記載の方法。

40

【0136】

4. オンラインセンサーが光散乱センサー、UV吸着センサー、蛍光励起および放出センサー、赤外吸着センサー、光屈折センサー（光学センサーおよび／または蛍光分析センサー）および／またはpH、UV-VIS、伝導率センサーの群より選択される、項目1～3のいずれか一項目記載の方法。

【0137】

5. センサーが直列に接続されている、項目1～4のいずれか一項目記載の方法。

【0138】

6. 精製プロセス中にその場で温度変化が測定される、項目1～5のいずれか一項目記載の方法。

50

【0139】

7. 多数のプロセスデータ値がデータベースに保管される、項目1～6のいずれか一項目記載の方法。

【0140】

8. 生物学的製剤のためのデータセットが選択、抽出されて統計的または技術的計算環境にインポートされる、項目1～7のいずれか一項目記載の方法。

【0141】

9. 行われる多変量統計解析が機械学習技術に基づいている、項目1～8のいずれか一項目記載の方法。

【0142】

10. 機械学習技術が部分最小二乗回帰、主成分回帰、ランダムフォレスト、ニューラルネットワーク、構造化加法回帰、多変量適応回帰スプライン、リッジ回帰、Lasso、エラスティックネット、最小角度回帰、サポートベクターマシンまたは他から選択される、項目9記載の方法。

【0143】

11. オンラインパラメータがオフラインパラメータに関連して評価される、項目1～10のいずれか一項目記載の方法。

【0144】

12. 偏差パターンを観測することで精製ステップの不具合が指示される、項目1～11のいずれか一項目記載の方法。

【0145】

13. モデル予測と目標値または範囲との間にある程度の相違が検出されると、測定および評価の結果に基づいて精製ステップの調整が実行される、項目12記載の方法。

【0146】

14. ピーク収集、リフォールディング、ろ過または沈殿後の生物学的製剤の正しい収集、製剤の品質、経済、環境側面、エネルギー消費およびプロセス機器メンテナンスのいずれか1つまたは組み合わせに関してプロセスが最適化される、項目1～13のいずれか一項目記載の方法。

【0147】

15. 生物学的製剤の濃度、純度および効力がリアルタイムでモニターおよび制御される、項目1～14のいずれか一項目記載の方法。

【0148】

16. プロセスが連続、半連続プロセスまたはバッチプロセスである、項目1～15のいずれか一項目記載の方法。

【0149】

17. オンラインセンサーに較正ステップの必要がない、項目1～16のいずれか一項目記載の方法。

【0150】

18. 生物学的製剤が核酸分子、異種タンパク質であり、好ましくは、治療用タンパク質、酵素およびペプチド、タンパク質抗生物質、融合タンパク質、炭水化物-タンパク質複合体、構造タンパク質、調節タンパク質、ワクチンおよびワクチン様タンパク質または粒子、プロセス酵素、増殖因子、ホルモンおよびサイトカインまたは前記生物学的製剤の代謝産物の中から選択される、項目1～17のいずれか一項目記載の方法。

【0151】

19. 生物学的製剤のためのモデルベースの制御／リリースアルゴリズムを確立するための、項目1～18のいずれか一項目記載の方法の使用。

【0152】

20. 生物学的製剤の濃度、純度および効力をリアルタイムでモニターするための、項目1～18のいずれか一項目記載の方法の使用。

【0153】

10

20

30

40

50

21. 対象製剤を製造することができる生物を培養し；それによって得られた前記対象製剤を精製する、というステップを含み、前記対象製剤の精製が項目1～18のいずれか一項目記載の方法によってモニターされ、場合によりさらに得られた対象製剤を加工、殺菌、仕上げ、調合などしてすぐにでも使用または商品化することができる製剤をもたらす、対象の生物学的製剤を製造する方法。

【0154】

実施例におけるリアルタイムでモニターされた精製プロセスのためのオンラインセンサーの一般的な設定／仕様

リアルタイムでモニターされた下流プロセスの一連の動作は、図1に見ることができる。

10

【0155】

発酵プロセスまたは先行下流ユニット動作から標的タンパク質が得られる。発現宿主に応じて、標的タンパク質を含有するプロセス溶液が前処理される（たとえば、クロマトグラフステップの前の0.2 μmデッドエンドろ過、例えばロードステップのためのpH値または伝導率といったフィード調整、封入体の可溶化）。

【0156】

標準センサーを備えたAkta Pure 25 system (GE Healthcare、スウェーデン) でクロマトグラフィーランが行われる。追加のオンラインセンサーを備えたクロマトグラフィーシステムのフロー図を図2に収載する。

【0157】

これは、多波長UV検出器U9-M (UV-VIS、280 nm、260 nm、214 nm～190～700 nmの範囲で同時に最大で3波長)、伝導率プローブC9およびpHプローブV9-pH (pH 0～14) を含む。システムは、UNICORNソフトウェアバージョン6.4によって制御される。フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) スペクトルを記録するために、減衰全反射 (ATR) に基づく中間赤外分光器MATRIX-FM (Bruker、アメリカ) が選択されている。蛍光検出のために、レーザー励起キセノンランプEQ-99XFC LDLS (Energetiq、アメリカ)、光ファイバマルチプレクサ (Avantes、オランダ)、フローセル (FIALab Instruments、アメリカ) および600 L/mmのグレーティングの分光器AvaSpec-ULS-TEC (Avantes、オランダ) を含む装備が組み立てられている。この蛍光装置は、7つの異なる波長 (Pos. 1-リファレンス、Pos. 2-265 nm±10 nm、Pos. 3-280 nm±10 nm、Pos. 4-300 nm±40 nm、Pos. 5-340 nm±10 nm、Pos. 6-289 nm±10 nm、Pos. 7-300 nm±10 nm、Pos. 8-400 nm±10 nm) の励起光および全放出スペクトル (236～795 nm) の測定を可能にする。また、多角度光散乱 (MALS) 検出器miniDAWN TREOS (Wyatt、アメリカ) だけでなく示差屈折率検出器Optilab T-rEX (Wyatt)、-0.0047～+0.0047 RIUの範囲の示差RIも適用されている。ピーク遅延だけでなくバンドの広がり効果も考慮に入れて、全ての検出器が直列に接続されている。

20

30

【0158】

クロマトグラフィープロセスの実行に先行して、Akta systemおよびセンサーを準備する必要がある。Aktaポンプを洗い流し、システムの中の全てのラインをそれぞれのバッファーでプライミングする。RI検出器のリファレンスセルをランニングバッファーで満たし、ATR-FTIRバックグラウンドスペクトルを測定し、一体化されたCOMETシステムでMALSフローセルを掃除し、レーザー駆動の蛍光光源を少なくとも15分間ウォームアップさせておく。準備作業が完了すると、EVON制御ソフトウェア (evon GmbH) を通じて、クロマトグラフィーランだけでなくいろいろな信号の記録も開始する。3500～7500 cm⁻¹のFTIRスペクトルが4 cm⁻¹の分解能で記録される。1回の測定当たり16回のFTIRスキャンが行われる。蛍光スペクトルは、1励起波長当たり1秒の積分時間で、236～795 nmの範囲にわたって検出される。光散乱信号は、3つの一体化された検出器から43.6°、90°および136.4°の角度で得られる。

40

【0159】

50

クロマトグラフィープロセスの中の捕捉ステップは、下記の段階を含む：カラム平衡化、標的タンパク質を含有する上清をロード、弱く結合している不純物を捨てるためにカラムを洗浄、続いて溶出。標的タンパク質が溶出したら、すぐにでも次のランができるようにカラムを掃除および再平衡化する。

【0160】

トレーニング目的のため、ある程度の数の画分が溶出中に収集され、その後、解析される。いろいろな異なる解析方法（たとえば、分量：逆相HPLC、アフィニティーHPLC、ELISA、効力：表面プラズモン共鳴アッセイ、細胞培養ベースのアッセイ、純度：サイズ排除クロマトグラフィー、LALエンドトキシンテスト、宿主細胞タンパク質ELISA、Picogreenアッセイを介したdsDNA定量化）で、濃度、純度および効力が

10

【0161】

実施例の中でモデルの構築でおよび制御として使用される、分量、純度および効力を測定するためのオフライン方法

【0162】

分量

FGF-2濃度割り出し

逆相HPLCにTSK-GEL Superoctylカラムを使用して、この方法は、ヒト線維芽細胞増殖因子2（FGF2）の定量化を可能にする。それは、タンパク質とRP-HPLCカラムの固相との間の疎水性相互作用に基づいている。FGF2は、特定のアセトニトリル（ACN）濃度で溶出する。214および280 nmでの検出に二波長吸光度が使用される。

20

【0163】

方法は、総FGF2濃度を割り出すために開発されてきた。定量限界0.16 µgおよび検出限界0.05 µgで、1.25 µg（0.06 mg/mL）～30 µg（1.50 mg/mL）の測定範囲が統計的に割り出されてきた。

【0164】

MAb濃度割り出し

タンパク質Aをリガンドとするモノリスカラムを使用して、この方法は、抗体の高速定量化を可能にする。タンパク質Aは、抗体のFc領域に強く結合し、したがって全抗体（モノクローナルおよびポリクローナル両方）または抗体のFc部を含有する他の巨大分子の定量化に使用することができる。結合溶出モードで解析が行われ、塩酸溶液でpH値を下げることによって溶出が達成される。280 nmの波長で吸光度が検出される。

30

【0165】

その方法は、総MAb濃度を割り出すために開発されてきた。0.06～0.85 mg/mlの測定範囲が統計的に裏付けられ、成功裏に検証されてきた。

【0166】

純度

解析的サイズ排除クロマトグラフィー—単量体含有量ならびに高および低分子量不純物の割り出し

40

サイズ排除クロマトグラフィーは、サイズによる分子の分離を可能にする。この技術は、溶液の中に存在するかもしれない、活性単量体標的タンパク質とより高いまたはより低い分子量の不純物との間を区別するのに使用することができる。

【0167】

分子と相互に作用しない固定相を通してタンパク質混合物を流しながら、アイソクラチックモードでSEC解析が行われる。より大きい分子は、固定相の細孔に入ることができないのに対して、より小さいものはでき、したがってカラムを通過するのに、より時間が必要である。それ故に分子は、サイズによって分離され、UV吸光度（それぞれ280 nmおよび214 nm）によって検出される。

50

【0168】

F G F-2 単量体含有量は、ACQUITY UPLC BEH125 SEC 1.7 μ m、4.6 $\times$ 150 mm (Waters) カラムを使用して割り出される。その方法は、100 mMリン酸ナトリウム、500 mM NaCl、pH 7.4を含むバッファーで、流速0.3 ml/分で実行される(15分のラン)。注入量は、10 μ lに設定されている。

【0169】

mAb単量体含有量は、TSKgel G3000 SWxlサイズ排除カラム(東ソー バイオサイエンス)を使用して割り出される。その方法は、150 mMリン酸カリウム、pH 6.5をランニングバッファーとして流速0.4 ml/分で使用する(1回のラン当たり40分)。注入量は、20 μ lに設定されている。

10

【0170】

Picogreenアッセイを介したdsDNAの割り出し

Quant-iT (商標) PicoGreen (登録商標) dsDNA試薬は、溶液中の二本鎖DNA (dsDNA) を定量化するための超高感度な蛍光核酸染色である。PicoGreenアッセイの線形検出範囲は、一つだけの染料濃度で、1 ng/mLから1000 ng/mLまでのDNAである。

【0171】

その方法は、PicoGreen (登録商標) 染料によるdsDNAの染色および形成された複合体の蛍光定量に基づいている。標準だけでなく試料溶液も96ウェルプレートの中で希釈され、その後発色試薬で2分間インキュベートされる。それから、480 nmの励起および520 nmの放出フィルターを使用して、プレートリーダーで信号の強度が記録される。

20

【0172】

ELISAを介した宿主細胞タンパク質の割り出し

E. coli HCP ELISAキット

このキットは、組み換え発現によって製造された製剤の中のE. coli 宿主細胞タンパク質汚染の存在を割り出すために、広く反応するポリクローナル抗体を使用して開発された。Cygnusのアッセイ検証は、このキットのLODが $\sim$ 0.2 ng/mLであることを割り出している。

使用された抗体および標準：

30

- 捕捉抗体：抗E. coli HCP-、抗E. coli HCP、アフィニティー精製 (Cygnus AP117)
- 検出抗体：抗E. coli :HRP複合体濃縮物；1 mg/mL (Cygnus F411C)
- 標準：E. coli HCP抗原濃縮物 (Cygnus F413H)

【0173】

CHO HCP ELISAキット

CHO ELISAは、CHOで発現されるさまざまな抗体および他の治療用タンパク質に対して、10億分の100の範囲でHCPsを検出することができる。

使用された抗体および標準：

- 捕捉抗体：抗CHO HCPアフィニティー精製 (Cygnus 3G-0016-AF)
- 検出抗体：抗CHO HCP HRP複合体濃縮物 (Cygnus F551C)
- 標準：CHO HCP標準 (20 μ g/ml) (Cygnus F553H)

40

【0174】

NUNC MaxiSorpプレートは、「抗HCP (アフィニティー精製) 抗体」でコーティングされている。第一の特定の反応ステップ中に、固定化された「抗HCP抗体」に異なるHCPsが結合する。第二の反応ステップ中に、二次抗体「抗HCP HRP複合体濃縮物」が吸着体に結合する。

【0175】

過酸化水素 (H_2O_2) 存在下で、TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) が西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) によって酸化し、青色になる。30分後

50

、3 M硫酸での酵素の変性によって反応が停止する。それから色が黄色に変化し、450 nmで測定することができる。染色の強度は、結合されたHCPSの量と相関関係にあることがある。

【0176】

効力

細胞培養アッセイを介したFGF-2抗原結合の割り出し

FGF-2の生物活性テストのための増殖アッセイ

FGF-2効力は、NIH-3T3細胞でのFGF-2誘導増殖の原理を使用してアッセイによって測定される。この線維芽細胞株は、FGF-2と組み合わせると増殖の増加を示す。細胞は、全ての推奨される成分（DMEM培地、10%仔ウシ血清、2 mMピルビン酸ナトリウム）と一緒に培地の中に播種される。24時間後、仔ウシ血清の濃度が10%から0.5%に下がる。それから、精製されたFGF-2（10～100 ng/mL）の濃度を増加させながら、細胞が処理される。ポジティブコントロールとして市販のFGF-2が、ネガティブコントロールとして抗HER-2 mAbが使用される。較正には、市販のFGF-2が使用される（Sinobiological）。

10

【0177】

96ウェルプレートへのNIH-3T3播種および仔ウシ血清の低下

NIH-3T3細胞が25個のTフラスコの中でダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、10%仔ウシ血清、2 mMピルビン酸ナトリウムを含有する培地の中で37℃、5%CO₂、95%空気および完全湿度で培養される。細胞は、一旦～95%の密集度に達したら、0.05%トリプシン／EDTAを使用してはがされ、トリパンブルーを用いて血球計で数えられる。それから、これらの細胞は、5×10⁵細胞/mLの濃度で再懸濁され、96ウェルプレートに（すなわち、200 μL/ウェルで、結果として1ウェル当たり細胞が1.0×10⁵個になる）8チャンネルピペットで加えられる。

20

【0178】

24時間後、96ウェルプレート中の血清濃度を下げるために、0.5%仔ウシ血清のみを補充した200 μLのDMEMが加えられる。血清は、いくつかの増殖因子を含有している。0%仔ウシ血清の濃度は、細胞の凝集につながるであろう。

【0179】

異なるFGF-2濃度で細胞を処理

播種から36時間後に、20 μlまたは80 μlの培地が交換される。それから、培養された細胞は、選択された試料（1ウェル当たり20 μl試料）で処理される。DMEM培地で試料の事前希釈が行われる。

30

【0180】

細胞の生存率および増殖を評価するためのMTTアッセイ

試料追加から24時間後に、MTTアッセイが行われる—先行実験で、24時間のインキュベーションが最も良い結果につながる。この目的のため、MTT溶液がPBSの中に1 mg/mLで調整され、0.2 μmフィルターでろ過される。それから、20 μLのMTTがウェルに加えられる。セルは、1時間の間、37℃、5%CO₂、95%空気および完全湿度でインキュベートされる。インキュベーション後、MTT含有培地が取り除かれ、100 μLのDMSOに取り替えられる。プレートは、さらに30分間室温でインキュベートされ、ウェルの光学密度（OD）がプレートリーダーを使用してテスト波長570 nmおよびリファレンス波長690 nmで割り出される。

40

【0181】

細胞培養アッセイを介したmAb抗原結合の割り出し

rhTNF-αを用いたWEHI-164細胞毒性アッセイ

抗TNF-α scFvおよびmAb効力は、WEHI-164細胞でのTNF-α誘導アポトーシスの原理を使用して、アッセイによって測定される。WEHI-164細胞でのアポトーシスを誘導するためのTNF-αのIC50値を割り出さなければならない。それから、細胞は、精製された抗TNF-α mAbの濃度を増加させながら、TNF

50

— α のIC50濃度で処理される。市販の抗TNF— α モノクローナル抗体がポジティブコントロールとして、非特異的scFvがネガティブコントロールとして使用される。IC50を割り出すために、市販のTNF— α が使用される (Sinobiological)。

【0182】

96ウェルプレートへのWEHI 164播種およびアクチノマイシンD処理

WEHI 164細胞が25個のTフラスコの中でロズウェルパーク記念研究所培地 (RPMI)、10% FBSを含有する培地の中で37℃、5% CO₂、95% 空気および完全湿度で培養された。細胞は、一旦～95%の密集度に達したら、0.05%トリプシン/EDTAを使用してはがされ、トリパンプルを用いて血球計の中で数えられた。それから、これらの細胞は、 7.5×10^5 細胞/mLの濃度で再懸濁され、96ウェルプレートに (すなわち、150 μ L/ウェルで、結果として1ウェル当たり細胞が 1.0×10^6 個になる) 8チャンネルピペットで加えられた。先行実験で、細胞密度が最適化された。

10

【0183】

24時間後、96ウェルプレート中のアクチノマイシンDの最終濃度100 ng/mLに達するために、400 ng/mLアクチノマイシンDを補充した50 μ LのRPMIが加えられた。先行実験で、TNF— α に対するWEHI 164の感受性を増加させるためのアクチノマイシンDの最適濃度が割り出された—データ図示せず。

【0184】

IC50を割り出すために異なるTNF— α 濃度で細胞を処理

20

【0185】

播種から36時間後に、培地が取り除かれ、100 ng/mLアクチノマイシンDを補充した180 μ Lの新しい培地に取り替えられた。それから、培養された細胞は、選択された試料 (1ウェル当たり20 μ L試料) で処理された。RPMI培地で試料の事前希釈が行われる。

【0186】

細胞の生存率を評価するためのMTTアッセイ

試料追加から24時間後に、MTTアッセイが行われた—先行実験で、24時間のインキュベーションが最も良い結果につながった。この目的のため、MTT溶液がPBSの中に1 mg/mLで調整され、0.2 μ mフィルターでろ過された。それから、20 μ LのMTTがウェルに加えられた。セルは、1時間の間、37℃、5% CO₂、95% 空気および完全湿度でインキュベートされた。インキュベーション後、MTT含有培地が取り除かれ、100 μ LのDMSOに取り替えられた。プレートは、さらに30分間室温でインキュベートされ、ウェルの光学密度 (OD) がプレートリーダーを使用してテスト波長570 nmおよびリファレンス波長690 nmで割り出された。

30

【0187】

表面プラズモン共鳴分光法を介した抗原結合の割り出し

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分光法は、リガンド結合相互作用を測定するために使用される方法である。それは、センサー表面に固定された相互作用パートナーを持つ異なる分子の結合アフィニティーおよび反応速度を研究するための無標識技術である。それは、光学測定方法に基づいており、センサー表面上の屈折率の小さい変化を検出する。

40

例えば下記のように、記載する方法でタンパク質の生物活性を割り出すことができる：

- FcyRIIIa (CD16) — 抗体
- TNF—アルファ — 抗TNF α 抗体
- FGFR2 — FGF—2

【0188】

表面プラズモン共鳴は、薄い (金の) 金属層で覆われたプリズムに偏光が当たる時に発生する。特定の波長および入射角で、バイオチップの表面の自由電子が光量子を吸収して、それらを表面プラズモン波に変換する [1]。固定されたリガンドとバイオチップの金表面の分析対象物との間の相互作用は、反射性の変化として見られて測定することができ

50

る共鳴条件の変更を誘導する。

【0189】

表面とその上を流れる溶液との間の界面での屈折率が変化するにつれて、反射した偏光の角度が変わる。センサー表面からの分子の結合または解離によって引き起こされる角度の変化は、結合された物質の質量に比例し、センサーグラムに記録される。

【0190】

最も幅広く適用されているCM5チップが固定化化学としてのアミンカップリングと組み合わされてセンサー表面として選択されている。アミンカップリングは、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）およびN-エチル-N'-（ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）を形成することによって効く。これらのエステルは、リ

ガンド分子上のアミン基と共有結合を形成する[2]。全てのアッセイで、ランニングバッファーとしてM HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Tween 20、pH 7.4が使用される。それぞれのアッセイのための特定の方法パラメータを表1に示す。

【表1】

表1 SPR結合アッセイのための方法パラメータ

方法	パラメータ	FcyRIIIa	TNFα	FGFR2 / CD332
固定化	バッファー:	10 mM 酢酸 ナトリウム、 pH 5.5	10 mM 酢酸 ナトリウム、 pH 5.0	10 mM 酢酸 ナトリウム、 pH 5.5
	受容体 濃度:	10 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
	流速:	5 µL/分	5 µL/分	5 µL/分
	固定化 目標:	約 100 RU	約 100 RU	約 300 RU
反応速度	流速:	20 µL/分		
	注入 量:	12 µL (=6 分接触時間)		
	解離 時間:	600 秒	600 秒	500 秒
	試料:	10 / 25 / 50 / 75 / 100 nM		1/2/5 /10/20 nM
	再生:	H ₂ O 中に SDS 0.05% 流速 30 µL/分で 30 µL (1 分接触時間)		1M MgCl ₂ ·6H ₂ O 流速 20 µL/分で 40 µL(2 分接触時間)

【0191】

実施例

下記の実施例は、本発明の理解を助けるために示されているが、いかなる形であっても本発明の範囲を限定することを意図するものでも解釈されるべきでもない。実施例は、従来の方法の詳細な説明を含まない：そのような方法は、当業者にとっては周知である。オフライン方法に関する一般的な設定および情報は、先にまとめられている。リアルタイムにモニターされた下流プロセスのためのツールおよび原理の概略的な概観を図1に示す。

【0192】

実施例1—アフィニティークロマトグラフィーによる抗体精製のモニタリング

1つは、トラスツズマブの重鎖遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子を運び、他方は、トラスツズマブの軽鎖および活性が低下したDHFR遺伝子を運ぶ、という2つのプラスミドの組み合わせをCHO-S細胞（Invitrogen）に形質導入した。細胞は、エレクトロポレーションによって形質導入され、ネオマイシン耐性のために選別され、最も高い生産性のために選別された。その結果として生じたプールは、MTX選択に供された（400 nM）。細胞は、再び生産性のために選別され、それから3ヶ月間培養の中で維持され、安定したプロデューサーに選別出すために2回再選別された。最終選別中に、細胞は、1細胞/ウェルで選別することによってサブクローンされた。最終クローンは、~20 pg/細胞/日の比生産性を有する。

【0193】

培地およびフィード：

標準培地は、8 mMグルタミンおよび400 nM MTXが含まれたCD-CHO（Invitrogen）だった。2×10⁵細胞/mlを播種し、振とうフラスコの中で140 rpm、37 °Cおよび7% CO₂で培養することによって、バッチ培養が行われた。培養は、生存率が70%未満に落ち込んだ時、通常10日目に、終了した。フィード時にバッチ量10%でCHO CD高効率フィードBを、それにプラスして3.3%でFunction Max Titer Enhancerを使用して、振とうフラスコの中で同じ条件下でフェッドバッチ培養が行われた。

【0194】

クロマトグラフィープロセス：

内径16 mmのXKカラム（GE Healthcare）を総量21.9 mlまでタンパク質Aアフィニティ培地mAb Select SuRe（GE Healthcare）で充填した。プロセス全体が流速75 cm/時で行われた。カラムは、20 mM Na-リン酸、150 mM NaCl、pH 7.4を含有するランニングバッファーで、5カラム容積（CV）に対して平衡化された。細胞培養上清は、10 CVに対して、無菌の0.22 μmフィルターユニット（Nalgene）でろ過され、試料ポンプS9（GE Healthcare）を通してカラムにロードされた。ロードの後には、5 CVに対して20 mM Na-リン酸、2 M NaCl、pH 7.4での洗浄ステップおよび5 CVに対して20 mM Na-リン酸、150 mM NaCl、pH 7.4でのもう一つの洗浄ステップが続く。標的タンパク質の溶出は、10 CVに対して、平衡化バッファー中のpH 3.5の100% glycine-HClでのステップグラジエントで達成された。溶出画分は、0.5 M Na-リン酸pH 8.0（画分容積の10%）が含まれた中和バッファーが入っている容器に収集された。カラムは、0.1 M NaOHで30分間低流速で消毒された。

【0195】

データ収集のために、オンラインセンサー（MALS、RI、ATR-FTIR、蛍光分光）が準備された—「上のリアルタイムでモニターされた精製プロセスのためのオンラインセンサーの一般的な設定/仕様」を参照。

【0196】

mAbの捕捉ステップのクロマトグラムを図6に示す。

【0197】

実施例2—組換え大腸菌からの塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の精製のモニタリング

組換え大腸菌の原核細胞培養からの塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）のクロマ

10

20

30

40

50

トグラフィー精製のための捕捉ステップは、一連のオンラインセンサーによって記載およびモニターされる。

【0198】

F G F-2 の高い等電点 (pI 9.4) は、多数の宿主細胞由来の不純物が陽イオン交換クロマトグラフィーによって有効に除去される可能性を提供する。

【0199】

可溶性細胞画分からの F G F-2 の捕捉ステップでの吸着剤として、材料としてのカルボキシメチル (CM) sepharose fast flow (弱陽イオン交換樹脂) が使用された。このワンステップのイオン交換クロマトグラフィーの手順の溶出画分がオフライン方法によって解析された。オフラインデータは、純度、分量および効力を予測するためにオンライン信号に関連して評価される。

10

【0200】

B L 2 1 (D E 3) _ p E T 3 0 a (c e r) _ F G F 2 _ 1 5 5 (s e r 7 8, 9 6) の低細胞密度 (L C D) 発酵。バッチは、30 ml 0.9% NaCl 中の 1 ml のマスター細胞バンクを接種された。バッチ培養は、細胞乾燥質量 (C D M) が 5.63 g/l に達するまで、37 °C で実施された。理論 C D M 34 g/l に達するために、フェッドバッチ培養が 30 °C で指数関数的供給率 $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ で 4 世代の間実施された。2 世代後、1 パルス誘導当たり 0.9 mM イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (I P T G) でタンパク質産生が誘導された。この発酵条件を使用して、封入体としてではなく可溶性タンパク質としてのみ、F G F-2 が製造される。細胞は、誘導から 14 時間後に遠心分離 (15 分、4000 g) によって収穫された。細胞は、均質化バッファー (50 mM トリス-HCl、100 mM NaCl、0.02% (v/v) TWEEN 20、pH 8.0) の中で最終濃度 40 g/l 乾燥細胞質量に再懸濁された。細胞は、高圧ホモジナイザーを通して細胞懸濁液を 2 回通過させることによって分解された。細胞残屑および不溶性タンパク質は、30 分間および 10,000 g および 4 °C で遠心分離によって取り除かれた。遠心分離ステップの後にそれでも上清が混濁していたので、デッドエンドろ過 (0.22 μm) が行われた。可溶性 F G F-2 を含有する浄化された上清が 70 °C で保管された。

20

【0201】

データ収集のために、オンラインセンサー (M A L S、R I、A T R-F T I R、蛍光分光) が準備された。「上のリアルタイムでモニターされた精製プロセスのためのオンラインセンサーの一般的な設定/仕様」を参照。

30

【0202】

細胞の上清画分を解凍後、溶解物がクロマトグラフィーカラムに適用された。下記の方法 (表 1) を採用して、CM Sepharose (登録商標) Fast Flow 樹脂 (サプライヤー: GE Healthcare) で充填された実験用カラム (Tricorn, i.d. 1 cm、カラム充填容積 12.3 ml) が使用された。図 7 は、精製ランの通常のクロマトグラムを示す。

【0203】

表 1: CM Sepharose (登録商標) Fast Flow 樹脂の適用による F G F-2 精製のためのクロマトグラフ法

40

【表 2】

平衡化	100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0	5 CV
ロード	0.22 μ m ろ過上清	10 CV
洗浄	100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0	5 CV
溶出	溶出バッファーB: 100 mM リン酸ナトリウム、1 M NaCl、pH7.0 0~100% B グラジエント 100% B ステップ	5 CV 5CV
再平衡化	100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0	5 CV
流速: 150 cm/時		

10

【0204】

吸着剤は、5 CV を使用して 100 mM Na-リン酸バッファー (pH 7.0) で室温で平衡化された。流速は、150 cm/時 (1.93 ml/分) だった。試料ポンプを介して注入が実施された。10 CV の浄化された上清 (123 ml) がカラムにロードされた。タンパク質溶液をロードした後、UV₂₈₀ 信号の安定したベースラインに達するまで、カラムは、5 CV で、100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で洗浄された。100 mM リン酸ナトリウムバッファー pH (7.0) 中の 0~1 M NaCl のリニアグラジエント (5 CV) を使用して、FGF-2 が溶出された。溶出液が 1 ml アリコートずつ収集され、オフライン解析が行われて純度 (dsDNA 含有量-Picogreen、宿主細胞タンパク質含有量-E. coli HCP ELISA Cygnus)、効力 (Biacore アッセイ、細胞培養生物活性アッセイ) および分量 (RP-HPLC) が割り出された。結合した不純物を取り除くために、カラムは、5 CV の 100 mM リン酸ナトリウムバッファー中の 1 M NaCl で処理された。10 CV の 0.5 M NaOH 溶液で CIP が行われた。カラムは、100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で再平衡化された。20% エタノールの中および 4 °C でカラムの長時間保管が行われる。

20

【0205】

実施例 3 一塩基性線維芽細胞増殖因子の限外ろ過 (UFDF) のモニタリング-TFF 限外ろ過を使用した透析ろ過および濃縮

30

限外ろ過が使用されるのは、例としてクロマトグラフィーステップの前といった他のプロセスステップの前にタンパク質を濃縮するためか、精製の後で調合のために必要な濃度に達するためのどちらかである。さらなる用途は、バッファー交換または不純物の除去である。タンジェンシャルフローろ過は、膜の上のタンジェンシャルフローが連続的にろ過ケーキを取り除いて膜の目詰まりを防止することによって、膜を通った高流量に達する。溶液は、所望の濃度に達するまで膜モジュールを通して再循環するが、凝集による膜ファウリングまたは標的タンパク質の生物活性喪失のために膜の性能が低下するため、プロセスステップを設計する時には注意しなければならない。そのため、TFF ユニット動作の膜 (濃縮水流) の後に、一連のオンラインセンサー (多角度光散乱、屈折率、蛍光および ATR-FTIR 装置) が具現化されている。

40

【0206】

クロマトグラフィー捕捉ステップ後の FGF-2 溶出液の透析ろ過および濃縮には、実験室規模のタンジェンシャルフローろ過ユニット (Lab-scale TFF System Millipore) が使用される。実験室規模の TFF は、ポンプおよび圧力センサーを備えている。濃縮容量および流量対時間に関する膜の性能が測定される。濃縮中の FGF-2 の凝集レベルおよび透析ろ過中のバッファー交換に対する効果が一連のオンラインセンサーによってモニターされる。バッファーが通過する間、FGF-2 が膜によって保たれることを確実なものにするために、濃縮および透析ろ過は、10 kDa のカットオフ膜を使用して行われる。

50

【0207】

CM-Sepharose Fast Flowクロマトグラフィー捕捉ステップ後の精製されたFGF-2溶出画分は、5容積の50 mMトリス、150 mM NaClバッファー（pH 7.4）に対してプールおよび透析ろ過される。10 kDaカットオフよりも小さい不純物は、取り除かれる。最終的に、濃縮水を10倍に濃縮するために、限外ろ過ステップが行われる。

【0208】

10 kDaのカットオフ付きの膜カセットKvick start (GE Healthcare) がシステムに接続される。システムが開始され、膜差圧が膜にかかるが、TFE膜の仕様（10 psi）を上回るべきではない。水を用いた限外ろ過が行われ、正規化された水透過性を割り出すために、透過水の量が毎分記録される。システムは、透析ろ過バッファー（50 mMトリス、150 mM NaCl、pH 7.4）で満たされ、バッファーの再循環が行われる。標的タンパク質は、貯留部に注がれ、真空がかけられる。バッファーを5倍交換するために透析ろ過が行われる。真空のため、透過水がシステムから出て行くと、同量のバッファーがシステムに導入される。

10

【0209】

透析ろ過がオンラインセンサー（屈折率）によってモニターされる。残っている製剤は、限外ろ過マニホールドを介して濃縮される。濃縮は、収載されたオンラインセンサー（多角度光散乱、蛍光およびATR-FTIR装置）を介してモニターされ、濃縮プロセスは、目標の濃度に達するまたは凝集の形成が検出されると停止する。膜が水および0.5 M NaOHで洗い流される。20%エタノールの中で長時間保管が行われる。

20

【0210】

TFEユニットの概略的な概観を図8に示す。

【0211】

実施例4—データ処理

オンラインセンサーシステムおよびオフライン測定に由来する全ての入手可能なデータは、EVONデータベースに保管される。所与のタンパク質および株のための選択されたデータセットは、コンマ区切り値ファイルに抽出され、統計計算環境R（R Core Team、2015年）にインポートされ、そこで全てのデータ処理が行われる。初期のステップとして、荷重繰返しメジアンフィルター[18]を使用してオンライン信号の信号平滑化が実施され、スペクトルデータのバックグラウンド補正が行われる。最終的に、オンラインデータがオフライン時間軸に対して時間整合される。

30

【0212】

タンパク質の濃度、純度および効力の予測のために、例えば部分最小二乗回帰（PLS[19]）、主成分回帰（PCR、たとえば[14]）、ランダムフォレスト（RF[11]）、ニューラルネットワーク（NN、たとえば[17]）および構造化加法回帰（STAR、たとえば[13]）といったいくつかの機械学習技術が適用されるが、その全ては、潜在的に多数の予測因子を扱うことができる。RF、NNおよびSTARは、特に非線形プロセスに適している。

【0213】

ランダムフォレストは、大きなデータベースで効率的に実行され、事前の変数選択なしに何千もの入力変数を取り扱うことができ、回帰問題の中でどの変数が重要であるかという推定を示す。RFは、フォレスト構築が進むにつれて、一般化誤差の内部不偏推定を生成する。それは、欠けているデータを推定するのに有効な方法であり、もしもデータの比較的大きな割合が欠けていたとしても正確さを維持し、変数の相互作用を検出するための実験的方法を提供する。

40

【0214】

構造化加法回帰モデルは、たとえばノンパラメトリック平滑効果または予測因子間の相互作用を含めることを可能にする線形モデルの強力な拡張として見ることができる。変数選択ツールとしてのブースティングは、損失関数を最小にしてモデル構造の加法性を保つことによって、ステップワイズプロセスに最終モデルを構成し、予測因子選択頻度を介し

50

て変数重要度測定を提供する。一般的に、変数選択ステップは、応答（タンパク質の濃度、純度および効力）のリアルタイム予測のための入力に関連サブセットを提供する必要があるため、非常に重大である。それ故に、応答の予測のための追加情報を提供しない変数は、最終モデルに含まれるべきではなく、そのため、変数選択中に取り除かれるべきである。

【0215】

上流プロセス [15、16] の分野における最近の研究から、変数選択ツールとしての RF およびモデル化技術としての NN だけでなくブースティング [12] と組み合わせた STAR モデルも、非常に良好な予測の正確さをもたらす、ということが分かっている。全ての記載されているアルゴリズムは、下流プロセスでタンパク質の濃度、純度および効力をリアルタイムでモニターするための最も好適な機械学習技術を見つけるためにテストされている。方法の検証は、将来の実験での予測誤差の推定を可能にする独立したテストセットに基づいて行われている。

10

【0216】

モデルベースの制御／リリースアルゴリズムの確立のためには、プロセスに関するさらなる情報が使用され、例えば保持時間およびクロマトグラムの一般的形状といった先験的情報を考慮に入れて、機械論的モデルが生成される。

【0217】

ロードおよび再生のためには、モデルは、タンパク質または塩の容量、例えば平衡分散モデル（非機械論的）、細孔拡散モデルまたは薄膜および細孔拡散組み合わせモデルといった漏出曲線のための平衡モデルを考慮に入れる。溶出のためには、同じモデルを適用することができるが、移動相調整剤による条件の変化の入力が必要である。

20

【0218】

実施例 5－リアルタイムでモニターされた FGF-2 精製

組換え大腸菌の原核細胞培養からの塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）のクロマトグラフィー精製は、オンラインセンサー（静的光散乱、示差屈折率、UV 280 nm 吸光度、ATR-FTIR および蛍光分光）によって記載およびモニターされる。リアルタイムでモニターされたデータに基づいて、画分収集が行われる。そのため、オンライン信号は、多変量統計解析で評価される。独立したトレーニングデータセットに構築される統計モデルがオンライン信号に適用され、純度、効力および濃度を予測するのに使用される。システムは、EVON のソフトウェアによって制御される。

30

【0219】

前もって割り出されたプロセス基準（純度 > 80 %、効力 100 % および可能な限り高い生産量）に基づいて、オンラインセンサーの予測されたプロセス値に従って、このワンステップのイオン交換クロマトグラフィーの手順の画分が収集される。純度は、下記の定義のことを指す：100 % 純度は、試料中の dsDNA が 1 ppm (1 ng/mg FGF-2) よりも少なく E. coli HCP が 1 ppm よりも少ない含有量として定義される。そのため、この例では、80 % 純度の基準は、dsDNA および宿主細胞タンパク質（HCP）の不純物含有量が 20 ppm よりも少ない、ということの意味する。100 % の効力は、標的タンパク質の生物活性として定義される。生理活性タンパク質は、正しい立体配座でなければならず、凝集してはならない。効力は、表面プラズモン共鳴法（Biacore）および細胞培養ベースの増殖アッセイを介して割り出される。

40

【0220】

データ収集のために、事前オンラインセンサー（MALS、RI、ATR-FTIR、蛍光分光）が準備される－「上のリアルタイムでモニターされた精製プロセスのためのオンラインセンサーの一般的な設定／仕様」を参照。

【0221】

解凍後、可溶性 FGF-2 を含有する上清は、0.22 μm をろ過される。上清画分は、クロマトグラフィーカラムに適用される。表 1 に記載の方法を採用して、CM Sepharose（登録商標）Fast Flow 樹脂（サプライヤー：GE Healthcare）で充填された実験用カラム

50

(Tricorn, i.d. 1 cm、容積 12.3 ml) が使用される。

【0222】

吸着剤は、5 CV を使用して 100 mM ナーリン酸バッファー (pH 7.0) で室温で平衡化される。流速は、150 cm/時 (1.93 ml/分) である。試料ポンプを介して注入が実施される。10 CV の浄化された上清 (123 ml) がカラムにロードされる。タンパク質溶液をロードした後、UV 280 信号の安定したベースラインに達するまで、カラムは、5 CV で、100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で洗浄される。100 mM リン酸ナトリウムバッファー pH (7.0) 中の 0~1 M NaCl のリニアグラジエント (5 CV) を使用して、FGF-2 が溶出される。

【0223】

プロセス基準が満足されると、アルゴリズムが画分収集を開始する。芳香族アミノ酸が含まれている全てのタンパク質が検出されるので、吸光度スペクトル (UV_{280nm}) は、非特異である。静的光散乱信号は、溶出ピークの始めに肩を示す。この追加の信号ピークは、UV_{280nm} 信号では検出されない (図 9)。SLS クロマトグラム内の 115 ml でのピークは、標的製剤 FGF-2 の凝集体および二量体によるものである (図 9)。これらのタンパク質粒子は、より大きいサイズを有する。より大きいサイズの粒子は、光の強い散乱につながり、したがってそれらの物理化学的特性の情報を与える。標的タンパク質の効力は、Biacore 法を介して割り出される。このオフラインデータは、生物活性の予測のためのモデルをトレーニングするのに使用される。タンパク質の構造および折り畳みが生物活性の主要な問題である。FGF-2 の二量体は、生理活性がなく、効力は、SLS データからアルゴリズムを介して割り出されない。モデルは、FGF-2 の生理活性のない二重体がカラムから溶出するのを認識する (図 10)。蛍光パターンの変化は、標的タンパク質の立体配座の割り出しを可能にする。生物活性において立体配座が主要な役割を果たすので、これらの蛍光データは、オフラインデータに関連して評価される。二量体画分は、さらなる加工のために収集されない。宿主細胞タンパク質含有量を、ひいては溶出液の純度をモニターするために、ATR-FTIR 信号が印加される (図 10)。タンパク質は、指紋領域と呼ばれるアミド領域に一意の AFT-FTIR スペクトルを有する (1500~500 cm⁻¹)。ATR-FTIR パターンの変化は、宿主細胞タンパク質と標的タンパク質との間を区別することを可能にする。溶出ピークの開始および終了は、主要な宿主細胞不純物を含有する。初めに弱く結合した不純物が取り除かれ、溶出テールでは強く結合した不純物が塩グラジエントによって取り除かれる。少なくとも 80 % の純度は、さらなる加工の収集基準として定義される。標的タンパク質 FGF-2 の標的タンパク質含有量は、UV_{280nm} および ATR-FTIR 信号を介して定量化される。分量が 2 つの直交法で割り出されるのに対して、ATR-FTIR は、より明確である。UV_{280nm} は、芳香族アミノ酸を定量化し、そのため宿主細胞タンパク質もまた同時に定量化される。

【0224】

異なる方法のブロックは、図 11 および図 12 に示すように、ATR-FTIR スペクトルではっきりと差別化することができる。アミド I I バンドとして公知の 1500~1600 cm⁻¹ の範囲で、ロード中に信号が高くなっているのを見ることができる。これは、上清に含有される大量の宿主細胞タンパク質によって引き起こされる。>3000 cm⁻¹ の領域で、非常に目立つバンドによって洗浄ブロックが指示されている。だが溶出ブロックもまた、標的タンパク質 FGF-2 のことを指すはっきりしたプロファイルを示している。1528 cm⁻¹ で、溶出タンパク質がピークを引き起こしている。溶出相によって引き起こされた ATR-FTIR 信号の拡大表示は、図 12 に見ることができる。ここでもまた、1500~1600 cm⁻¹ の範囲で、グラジエントもまた ATR-FTIR スペクトルの中に見えている。スペクトルのこの部分のみならず、モデル化のための貴重な情報が含まれている。濃度および宿主細胞タンパク質含有量を割り出すために、オフライン分量データに関連してピークが評価される。

【0225】

図13は、クロマトグラフィーランの間のアミドバンドの2つの波数 (1528 cm^{-1} および 1622 cm^{-1}) を例示し、ここでもまた異なる方法のブロックを区別することができる。平衡化バッファーは、 1622 cm^{-1} でのみ顕著であるのに対して、溶出ピークは、両方の線で類似して見える。

【0226】

屈折率検出器の信号は、図14に表示されている。ここでもまた、個々の方法のブロックをはっきりと差別化することができる。溶出ピークで、溶出している標的タンパク質のRI信号への追加の寄与を検出することができる。タンパク質の内部蛍光は、主に芳香族アミノ酸（トリプトファンおよびチロシン）によって引き起こされる。励起波長が295 nmの時に、最も高い放出は、350 nmあたりで発生する。蛍光パターンの変化および形状に基づいて、溶出タンパク質の生物活性を割り出すことができる。

【0227】

実施例6-FGF-2をHeparin Sepharose Fast flowカラムにロードするステップの漏出を割り出すためのリアルタイムモニタリング

組換え大腸菌の原核細胞培養からの塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）のクロマトグラフィー精製は、オンラインセンサー（静的光散乱、示差屈折率、UV280 nm吸光度、ATR-FTIRおよび蛍光分光）によって記載およびモニターされる。リアルタイムでモニターされたデータに基づいて、カラムにロードするステップが行われる。オンライン信号は、多変量統計解析を用いて評価される。独立したトレーニングデータセットに構築される統計モデルがオンライン信号に適用され、標的タンパク質の漏出を予測するのに使用される。システムは、EVONのソフトウェアによって制御される。

【0228】

プロセス停止基準の定義は、：フロースルー内のFGF-2濃度： $C/C_0 < 10\%$ と定義される—図16参照。ただし、 C_0 は、上清フィード中のFGF-2の濃度、 C は、フロースルー中のFGF-2の濃度である。フロースルー中の標的タンパク質の増加を割り出すために、オンラインセンサーが適用される。カラムの容量に達したら、ロードするプロセスがEVONソフトウェアを介して停止する。プロセス基準が満足されると、アルゴリズムがロードを停止する。芳香族アミノ酸が含まれている全てのタンパク質が検出されるので、吸光度スペクトル（UV_{280 nm}）は、非特異である。UV、ATR-FTIR、MALS、RIおよび蛍光装置を組み合わせることで、HCPと標的タンパク質との間を区別することが可能になる。特にATR-FTIRは、宿主細胞タンパク質と標的タンパク質FGF-2との間を区別することを可能にする。もしもフロースルーの組成物が変化したら、信号パターンおよび変化が情報を提供する。もしも標的タンパク質がフロースルーで特定の濃度に達したら、制御ソフトウェアを介して洗浄ステップが始まり、精製プロセスは、継続する。この手段によって樹脂のロード条件を制御することで、経済的な手段で結合容量を利用することが可能になる。

【0229】

オンラインセンサー（MALS、RI、ATR-FTIR、蛍光分光）がデータ収集のために準備される。解凍後、可溶性FGF-2を含有する上清は、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ろ過される。上清画分は、クロマトグラフィーカラムに適用される。Heparin Sepharose（登録商標）Fast Flow樹脂（サプライヤー：GE Healthcare）で充填された実験用カラム（Tricorn, i.d. 1 cm、容積12.0 ml）が使用される。

【0230】

吸着剤は、5CVを使用して20 mMトリス-HClバッファー、400 mM NaCl（pH 7.4）で室温で平衡化される。流速は、 150 cm/時 （ 1.93 ml/分 ）である。試料ポンプを介して注入が実施される。漏出基準が満足されない限り、浄化された上清がカラムにロードされる。タンパク質溶液をロードした後、UV_{280 nm}信号の安定したベースラインに達するまで、カラムは、5CVで、20 mMトリス-HClバッファー、400 mM NaCl（pH 7.4）で洗浄される。20 mMリン酸ナトリウムバッファーpH（7.4）中の0.4~2 M NaClのリニアグラジエント（5CV）を使用

して、FGF-2が溶出される。

【0231】

実施例7-1回のランでのデータ処理、統計モデル化および検証

モデル化のために入手可能なオンラインデータは、UV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALSおよびRI装置（ p =計14変数）、ATR-FTIRスペクトル（分解能約2 cm⁻¹の結果として p =1427予測因子が生じる）だけでなく、計14366蛍光変数を与える7つの励起波長での蛍光放出スペクトル（分解能約0.3 nm）からの信号を含む。予測因子セットおよび応答変数（濃度と同じことを意味する分量）、宿主細胞タンパク質（HCP）、二本鎖DNA（dsDNA）、単量体および高分子量HMW不純物濃度または受容体生物学的製剤相互作用のKD値として表される効力に応じて、7~14回のクロマトグラフィーランからのデータがモデル構築のために入手可能である。

10

【0232】

赤外および蛍光スペクトルは、Savitzky-Golayフィルターを使用して平滑化され、前者は、Rパッケージ信号およびベースラインで具現化されるような二次導関数制約付き加重回帰を使用して修正されるベースラインでもある。

【0233】

最終的に、時間整合ステップが行われるいくつかの装置の間の既知の時間の遅延を考慮しながら、各オフライン画分の期間に対応する各オンライン変数の平均値が計算される。

【0234】

このセクションに示す結果は、変数選択手法としてのブースティング（Rパッケージ m boost）と組み合わせて、STAR（構造化加法回帰）モデルによって得られる。相互検証（各ランからのデータを一旦除外し、いくつかの他のランのデータに基づいたモデルで予測）を介して、自動スケールされたデータ（すなわち、各予測因子から平均値が引かれ、その標準偏差で割られる）のパラメータ最適化およびモデル選択が行われる。相互検証された二乗平均平方根誤差（RMSE）で、モデルの品質が測定される。例示的なモデル化の結果およびその後の目標変数のための対応するオフライン値との比較が示されている：

20

1. タンパク質の分量（濃度）（単位：mg/ml）（図17）
2. 宿主細胞タンパク質の濃度（単位：ng/ml）およびタンパク質の推定分量に対して（単位：ppm）（図18および19）
3. 二本鎖DNA（dsDNA）の濃度（単位：ng/ml）およびタンパク質の推定分量に対して（単位：ppm）（図20および21）
4. 単量体および高分子量不純物（単位：%）（図22および23）
5. 受容体FGF2相互作用のKD値で表したFGF2効力（図24）

30

対応する結果は、図17（分量）、18~19（宿主細胞タンパク質、単位：それぞれng/mlおよびppm）、20~21（dsDNA、単位：ng/mlおよびppm）、22~23（単量体および高分子量不純物画分）および24（効力KD値）に示されている。これらの図では、実際に測定されたターゲットのオフライン値がバーで示され、1秒の時間グリッド上のオンラインデータに基づくモデル予測値が曲線として描写され、これらの予測値を各オフライン画分で平均化したものが横線として示されている。

40

結果は、一回のクロマトグラフィーランのものが示されており、予測誤差は、総合的な予測誤差（全てのランの平均）と類似している。横軸は、時間（単位：分）を表し、原点が最初のオフライン画分の開始に配置されている。

【0235】

- a) タンパク質量：RMSEの総合的な予測誤差=0.44 mg/ml（全てのランの平均）一例として、ラン3からの結果は、RMSEの性能=0.25 mg/ml（図17）を示している；モデルは、UV-VIS、圧力、伝導率、pH、MALSおよびRI装置の予測因子に基づいており、0.23~0.86 mg/mlの正確さで予測された14回のランのデータを使用している；STARモデルは、インターセプト、線形およびノンパラメトリック平滑ベースラーナーを使用している。

50

【0236】

- b) 宿主細胞タンパク質 (HCP) : RMSE の平均予測誤差 = 46.4 ng/ml (例として示されているラン3は、およそ43 ng/mlの誤差を提示している、図18)。モデルは、UV-VIS、圧力、伝導率、MALS、RIおよび蛍光信号に基づいている (後者は、励起波長280および400 nm)。インターセプト、線形および平滑予測関数関数の他に、UV-VIS、圧力、伝導率、pH、MALSおよびRI予測因子の間の製剤相互作用が使用されている。相互検証の中で、24.0~63.2 ng/mlの誤差でランが予測されている。HCPおよび分量予測モデルの両方とも、図19に示すように、タンパク質1 mg当たりのngの単位 (ppm) で宿主細胞タンパク質を予測するのに使用することができる。

10

【0237】

- c) 二本鎖DNA (dsDNA) : このターゲットの結果は、図20 (単位: ng/ml) および21 (単位: ppm、すなわち、推定されたタンパク質量に対して) に示されている。平均誤差77.2 ng/mlでランが予測されている。一回のランは、およそ41~99 ng/mlの相互検証された予測誤差を提示している。ここで考慮されているモデルは、pH、MALS、RIおよび蛍光装置からの予測因子を使用している。先のモデルと類似して、インターセプト、線形、平滑ベースラーナーおよびそれらの製剤相互作用がpH、MALSおよびRI変数に使用されているのに対して、蛍光予測因子の平滑関数のみがモデルに入っている。

20

【0238】

- d) タンパク質単量体および高分子量不純物 (HMW) : 図22および23は、ラン3の単量体および高分子量不純物画分 (両方とも1の画分として、すなわち、それらの値を合計すると1になる) のモデル化の結果を示している。モデルは、UV-VIS、pH、伝導率、MALS、RIおよび蛍光装置の情報を使用し、RMSE = 0.056 (値は、いろいろなランで0.025~0.08の範囲) の平均性能をもたらしている。この場合は、dsDNAモデルと同じ関数タイプのベースラーナーが使用されている。

【0239】

- e) 効力 (KD値) : 効力応答の平均予測誤差 (そのKD値を介して測定) は、RMSE = 0.97 (図24に示すラン3のために割り出された予測性能は、RMSE = 1.38) である。いくつかの装置 (UV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALS、RI、蛍光およびATR-FTIR) からの予測因子が使用されている。いくつかの予測因子の線形関数の他に、UV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALS、RIおよび蛍光信号の平滑関数だけでなくUV-VIS、伝導率、圧力、pH、MALSおよびRI信号間の製剤相互作用も予測モデルに組み込まれている。

30

【0240】

引用文献

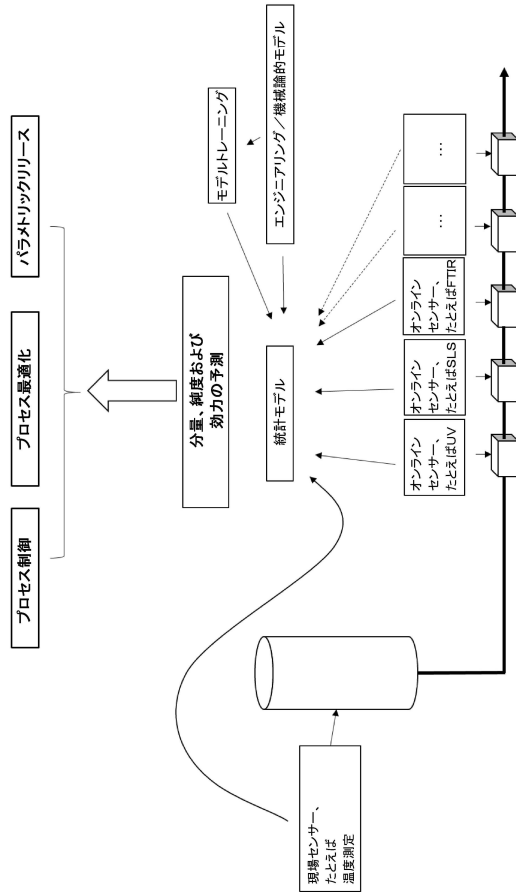
【0241】

【表 3】

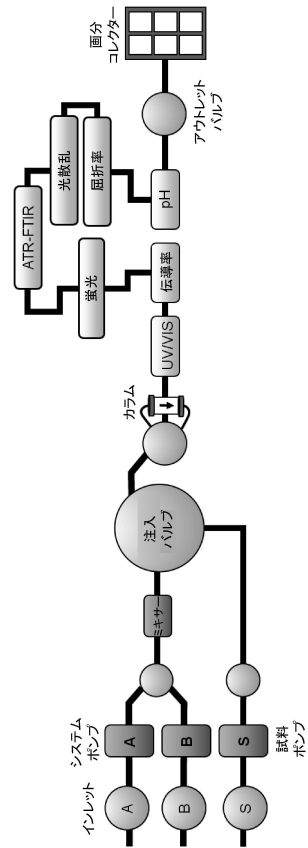
- [1] M.M.C. Van Beers, M. Bardor, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnology Journal*, 7 (2012) 1473-1484.
- [2] F. Capito, R. Skudas, Applications and limitations of FT-MIR for monitoring critical process parameters during downstream processing of therapeutic proteins, in: *Infrared Spectroscopy: Theory, Developments and Applications*, 2014, pp. 205-246.
- [3] F. Capito, R. Skudas, H. Kolmar, C. Hunzinger, At-line mid infrared spectroscopy for monitoring downstream processing unit operations, *Process Biochemistry*, 50 (2015) 997-1005.
- [4] F. Capito, A. Zimmer, R. Skudas, Mid-infrared spectroscopy-based analysis of mammalian cell culture Parameters, *Biotechnology Progress*, 31 (2015) 578-584.
- [5] I. Strug, C. Utzat, A. Cappione, S. Gutierrez, R. Amara, J. Lento, F. Capito, R. Skudas, E. Chernokalskaya, T. Nadler, Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014 (2014).
- [6] F. Capito, R. Skudas, H. Kolmar, B. Stanislawski, Host cell protein quantification by fourier transform mid infrared spectroscopy (FT-MIR), *Biotechnology and Bioengineering*, 110 (2013) 252-259.
- [7] F. Capito, R. Skudas, B. Stanislawski, H. Kolmar, Matrix effects during monitoring of antibody and host cell proteins using attenuated total reflection spectroscopy, *Biotechnology Progress*, 29 (2013) 265-274.
- [8] L. Dagge, K. Harr, M. Paul, G. Schnedl, Classification of process analysis: Offline, atline, online, inline, *Cement International*, 7 (2009) 72-81.
- [9] R.H. Clemmitt, L.J. Bruce, H.A. Chase, On-line monitoring of the purification of GST-(His)6 from an unclarified *Escherichia coli* homogenate within an immobilised metal affinity expanded bed, *Bioseparation*, 8 (1999) 53-67.
- [10] Klockewitz, K., Riechel, P., Hagedorn, J., Scheper, T., Noe, W., Howaldt, M., Vorlop, J. Fast FIA-immunoanalysis systems for the monitoring of downstream processes (2000) *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 14 (2), pp. 43-46.
- [11] Breiman, L. (2001). Random forests. *Mach. Learn.*, 45, 5-32.
- [12] Bühlmann, P., Hothorn, T. (2007). Boosting Algorithms: Regularization, Prediction and Model Fitting. *Statistical Science* 22:477-505.

- [13] Fahrmeir, L., Kneib, T., Lang, S. (2009). Regression - Modelle, Methoden und Anwendungen. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer. 502 p.
- [14] Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. (2009). The Elements of Statistical Learning: Prediction, Inference and Data Mining, Second Edition, Springer Verlag.
- [15] Melcher, M., Scharl, T., Spangl, B., Luchner, M., Cserjan, M., Bayer, K., Leisch, F., Striedner, G. (2015). The potential of random forest and neural networks for biomass and recombinant protein modeling in *Escherichia coli* fed-batch fermentations. *Biotechnol J* 10:1770-1782. 10
- [16] Melcher, M., Scharl, T., Luchner, M., Striedner, G., Leisch, F. (2016). Boosted structured additive regression models in *Escherichia coli* fed-batch fermentation modeling. In Preparation.
- [17] Ripley, B. D. (1996). Pattern Recognition and Neural Networks, University Press, Cambridge.
- [18] Schettlinger, K., Fried, R., Gather, U. (2010). Real Time Signal Processing by Adaptive Repeated Median Filters, *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, 2010, 24(5), 346-362. 20
- [19] Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometric. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 58, 109–130.
- [20] Software: R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

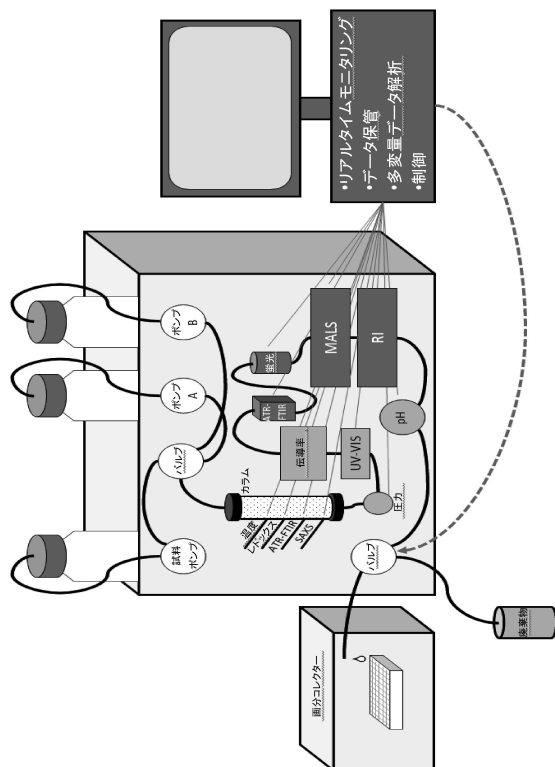
【図 1】



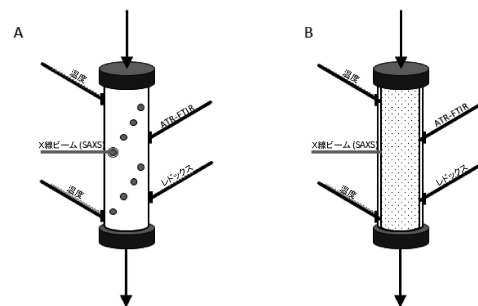
【図 2】



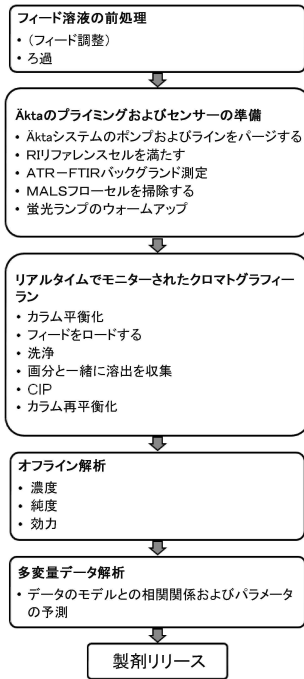
【図 3】



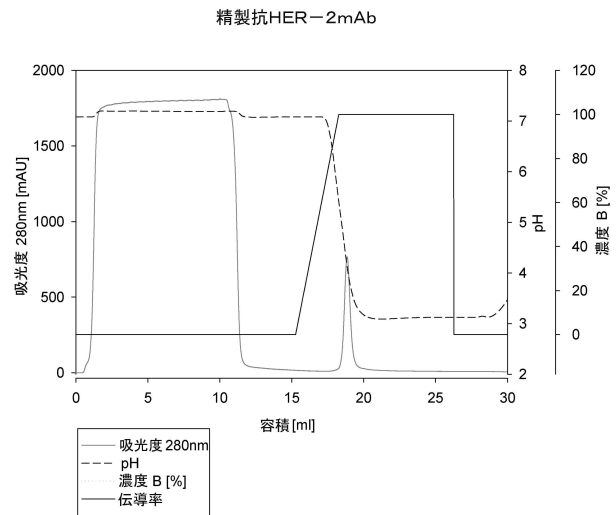
【图 4】



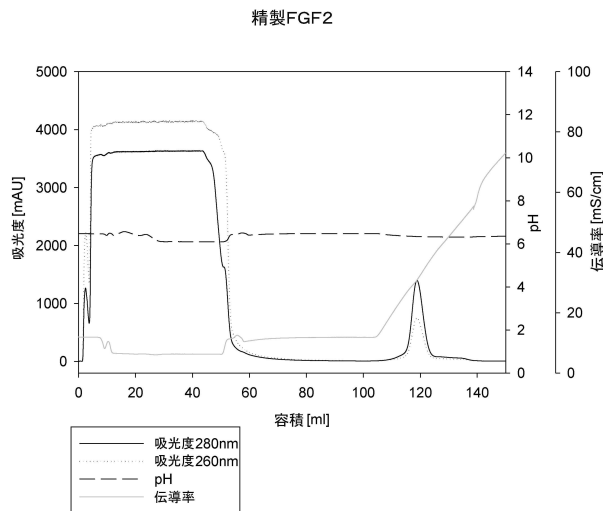
【図 5】



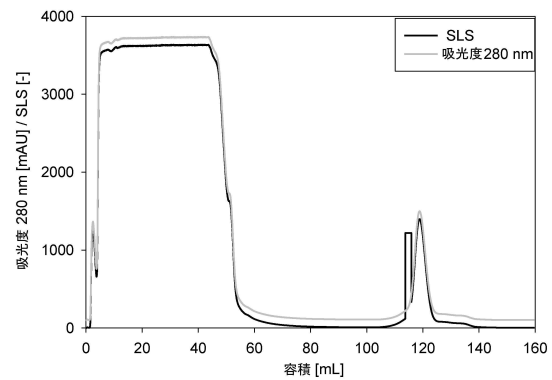
【図 6】



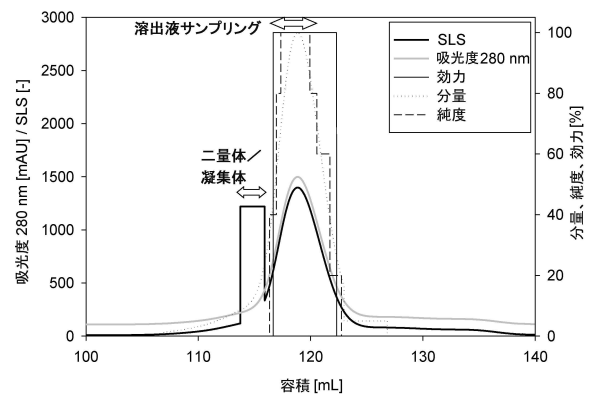
【図 7】



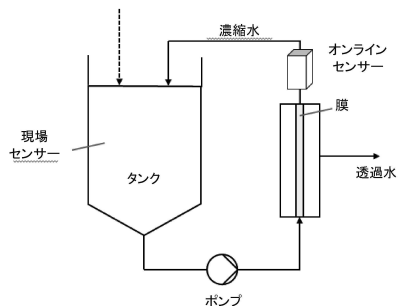
【図 9】



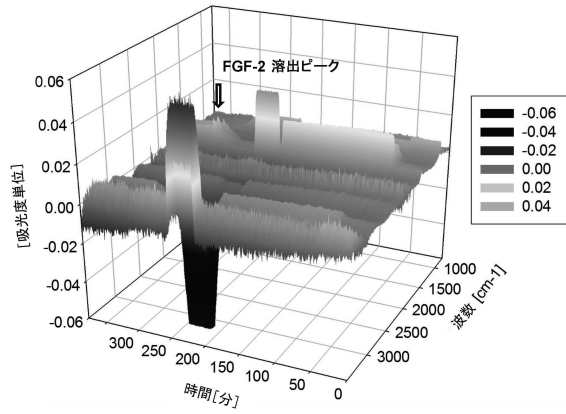
【図 10】



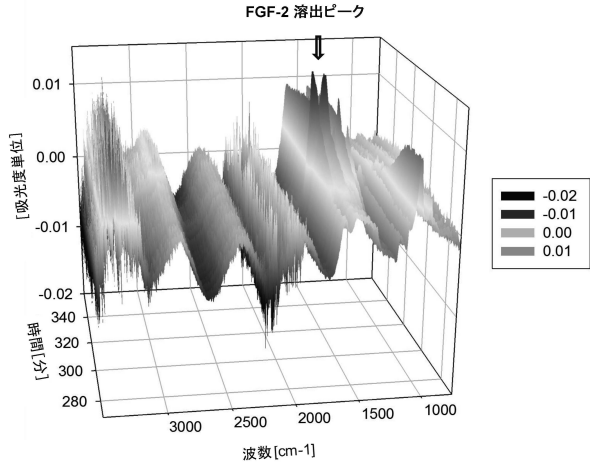
【図 8】



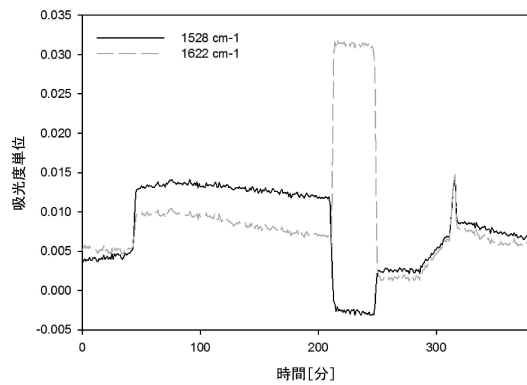
【図 1 1】



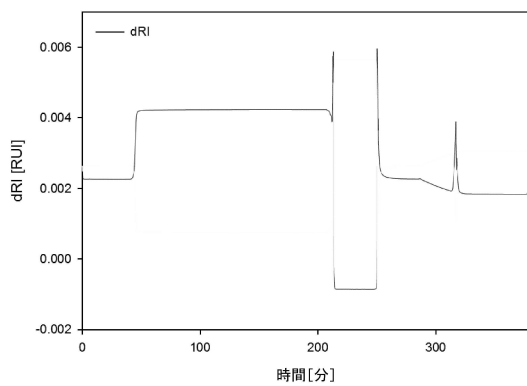
【図 1 2】



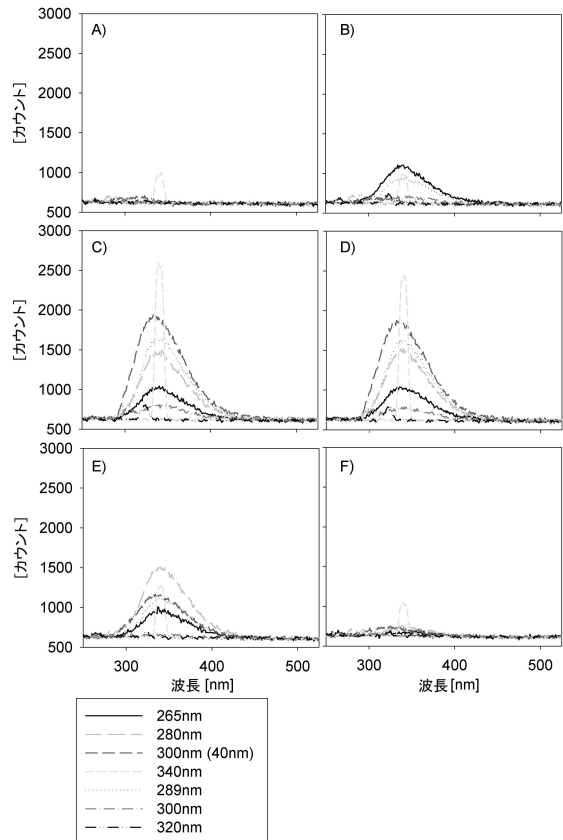
【図 1 3】



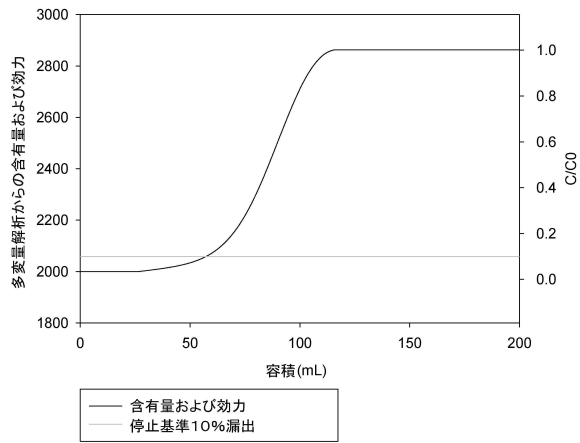
【図 1 4】



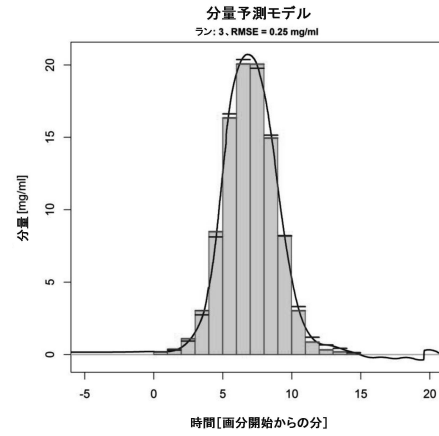
【図 1 5】



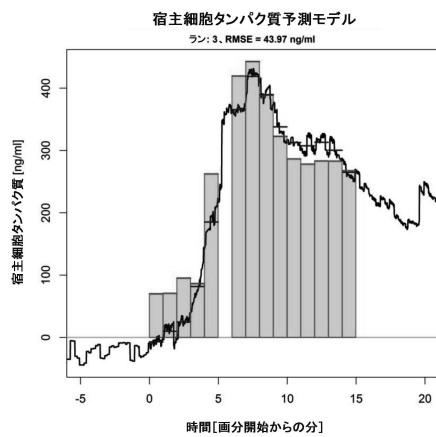
【図 16】



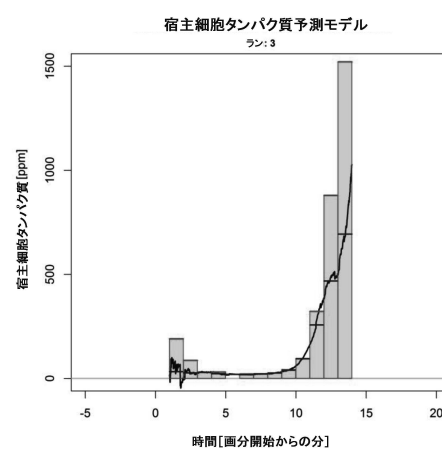
【図 17】



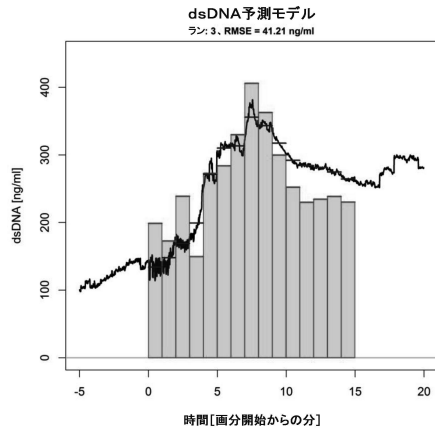
【図 18】



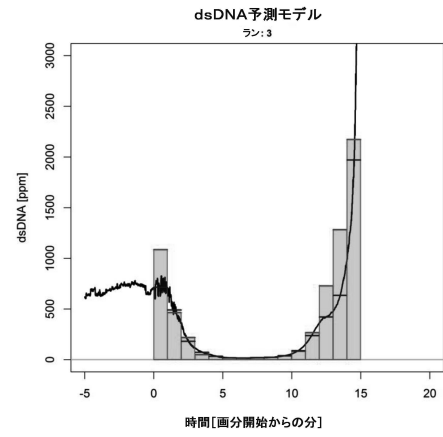
【図 19】



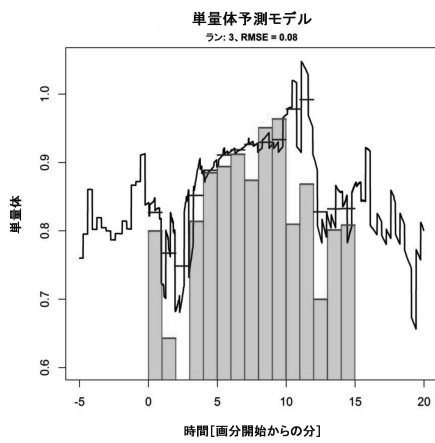
【図 20】



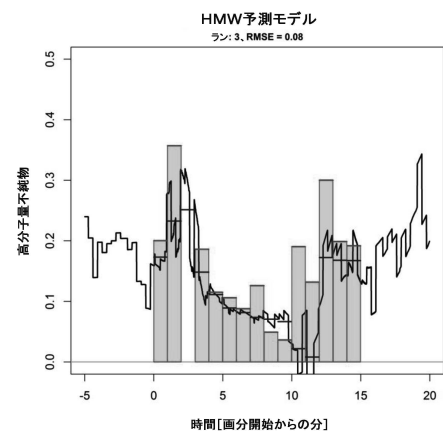
【図 21】



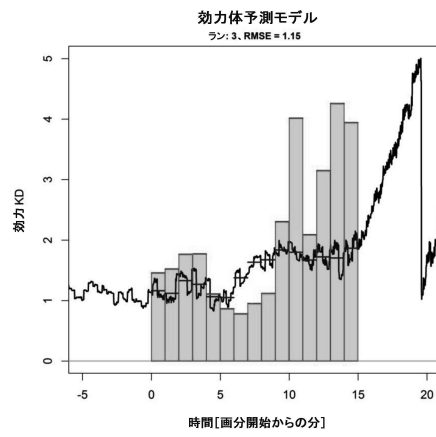
【図 22】



【図 23】



【図 2 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/18 (2006.01)	A 6 1 K 38/18		
G 0 1 N 21/35 (2014.01)	A 6 1 K 39/395	J	
G 0 1 N 21/47 (2006.01)	G 0 1 N 21/35		
G 0 1 N 21/552 (2014.01)	G 0 1 N 21/47	E	
G 0 1 N 21/01 (2006.01)	G 0 1 N 21/552		
G 0 1 N 30/02 (2006.01)	G 0 1 N 21/01	Z	
	G 0 1 N 30/02	Z	

- (72)発明者 ユングバウアー, アロイス
オーストリア国、1190 ウィーン、ムートガッセ 18
- (72)発明者 デューラウアー, アストリド
オーストリア国、1190 ウィーン、ムートガッセ 18
- (72)発明者 ヴァルヒ, ニコル
オーストリア国、1190 ウィーン、ムートガッセ 18
- (72)発明者 ザウアー, ドミニク
オーストリア国、1190 ウィーン、ムートガッセ 18
- (72)発明者 スカールーヒルシュ, テレーザ
オーストリア国、1190 ウィーン、ムートガッセ 18
- (72)発明者 メルヒャー, ミヒャエル
オーストリア国、1190 ウィーン、ペーター・ヨルダン・シュトラーセ 82
- (72)発明者 ライッシュ, フリードリッヒ
オーストリア国、1190 ウィーン、ペーター・ヨルダン・シュトラーセ 82

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0312851 (US, A1)
特表2012-515984 (JP, A)
米国特許出願公開第2013/0303732 (US, A1)
特表2012-500390 (JP, A)
特表2013-537235 (JP, A)
国際公開第2015/158776 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|---------|--------|
| G 0 1 N | 33/15 |
| C 1 2 N | 15/10 |
| C 1 2 P | 1/00 |
| C 0 7 K | 1/16 |
| A 6 1 K | 39/395 |
| A 6 1 K | 38/18 |
| G 0 1 N | 21/35 |
| G 0 1 N | 21/47 |
| G 0 1 N | 21/552 |
| G 0 1 N | 21/01 |
| G 0 1 N | 30/02 |