

バイオ医薬品開発と分析化学

Analytical Chemistry for Biopharmaceutics

津本 浩平

TSUMOTO Kouhei

東京大学大学院
工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
教授

Professor

Department of Bioengineering, School of Engineering,
The University of Tokyo



抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品開発研究において、分析化学的手法の重要性が認識されている。それは、特に、抗体医薬品ではタンパク質が分子コロイドとして存在し、かつ配列に規定された立体構造を持つ生体高分子を、コロイド安定性と構造安定性の双方から精緻に解析する必要があるためである。本稿では、近年高度化が著しいコロイド安定性に関する方法論と、高濃度下における構造安定性評価におけるラマン分光の有用性を中心に現状を概観する。

In the research and development of biopharmaceutics, including antibodies, importance of analytical chemistry has become more and more recognized. In particular, the proteins in biopharmaceutics exist as molecular colloid and have unique conformations regulated by their sequences, which means that precise analyses of the drug candidates from the viewpoints of both colloidal and conformational stabilities are required for the process. This article reviews recent progresses on the methods for evaluation of colloidal stability, and of conformational stability under higher concentration of the molecules.

はじめに

医薬品開発においてモダリティ創薬というアプローチが浸透しつつある中、バイオ医薬品、特に抗体医薬品に関するモダリティも改めて注目が集まっている。既存の抗体を改良し、機能や物性を付加・向上させることでその価値を高める次世代抗体戦略への期待が大きいことがその背景にある。たとえば、抗体-薬物複合体ADC、多重特異性抗体、キメラ抗原受容体CARなどが挙げられる。これらは次世代抗体とも呼ばれている。このようなタイプの新薬開発において常に重要となるのが、標的分子に対する特異的な作用と安定な物性である。その蛋白質としての物性、安定性の評価が不可欠である。従来より熱安定性および凝集性の評価が行われ、分光学的な分析技術をベースとした様々な手法が用いられている。そして近年では、糖鎖状態に関する物性評価、また製剤化における高濃度条件下での物性評価も重要視され始めている。本稿では、蛋白質の会合凝集体検出、糖鎖改変された抗体の物性に関する分析例、そして高濃度抗体の分析技術例について紹介する。

蛋白質の会合凝集体

蛋白質の会合凝集は様々な外的ストレス、例えば熱ストレス、酸化ストレス、振動ストレス、酸性ストレス、光ストレスなどによって生じる。どのストレスも、凝集へと導かれる分子レベルでの状態変化は同じである。それは蛋白質の変性である。蛋白質はその機能を発揮するために、正確な三次元立体構造を形成する。抗体の場合は、その厳密な立体構造認識により、ある特定の抗原のみ対して高い親和性をもって結合する。このことは、立体構造を安定に保つことが必要不可欠であることを意味する。この安定化を議論する際に最も注目すべきは、蛋白質の構造形成(フォールディング)の駆動力が疎水性相互作用である点である。個々の蛋白質の立体構造は、そのアミノ酸配列の中で疎水的なアミノ酸を内部に、親水的なアミノ酸を外側に配置するように立体的に折りたたまれ安定化する。ところが蛋白質が変性してしまうと、その内部の疎水部位が外側へ露出することになる。多くの蛋白質は、その疎水部位の露出を起点に、分子間で疎水性相互作用を起こし、さらに蛋白質の変性が促進される。このような過程により蛋白質の部分変性は最終的に凝集体へと不可逆的に移行する^[1]。

凝集体は、その粒子径から主に3つの大別されている。invisible particle (IVP, <0.1 μm), subvisible particle (SVP, 0.1-100 μm), そしてvisible particle (VP, >100 μm)である。近年の不溶性微粒子試験法においては10 μm以上の微粒子について限度値が設定されている。つまり凝集体の評価にはnmレベルのinvisible領域からμmレベルのsubvisible領域まで幅広いサイズ域の凝集体を定量的に分析・評価する技術が必要になってきているのである。Figure 1には粒子径に応じた各種分析装置の位置づけ、Table 1には文献・学会等で取り上げられたバイオ医薬品の凝集体分析に用いる主な分析装置をリスト化した。

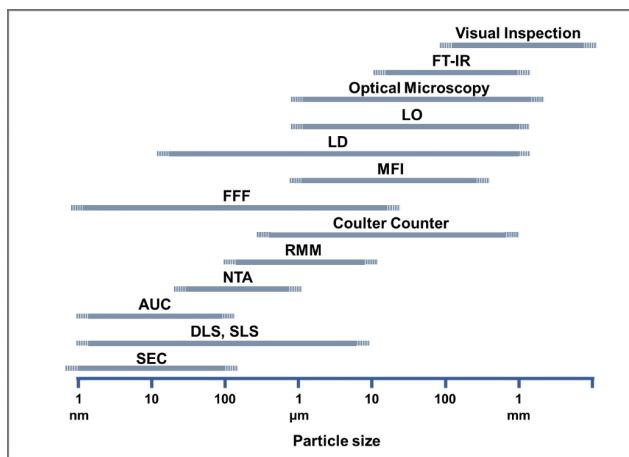


Figure 1 凝集体を検出する代表的な分析装置とそのサイズ域

Table 1 文献・学会・記事等で取り上げられている主な凝集体分析装置

	Company A	News A	Center A	News B	Conference A	Paper A	Paper B
SEC	✓	✓	✓		✓	✓	✓
DLS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SLS	✓		✓			✓	✓
AUC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Nano Tracking Analysis (NTA)	✓	✓	✓		✓		✓
Resonant Mass Measurement (RMM)	✓	✓	✓		✓		
Coulter Counter	✓		✓			✓	✓
Field-Flow Fractionation (FFF)	✓				✓	✓	✓
Micro-Flow Imaging (MFI)	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Laser Diffraction (LD)		✓		✓			
Light Obscuration (LO)	✓	✓				✓	✓
Optical Microscopy	✓	✓	✓			✓	✓
Infrared Microscopy/FT-IR	✓		✓				✓
Visual Inspection	✓	✓	✓			✓	✓

[Company A] <http://www.coriolis-pharma.com/service-and-key-expertise/aggregate-and-particle-analysis/protein-aggregation-analysis/>

[Center A] <https://mvsc.ku.edu/content/particle-characterization-submicron-subvisible-and-visible-particles>

[News A] <http://www.biopharminternational.com/analyzing-protein-aggregation-biopharmaceuticals-0>

[News B] <http://www.chemengonline.com/particle-sizing-technology-selection/?printmode=1>

[Conference A] <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/158757-Protein-Aggregation-at-PepTalk-2014/>

[Paper A] J. Pharm. Sci. (2010) 99, 3302-3321.

[Paper B] J. Pharm. Sci. (2012) 101, 914-935.

凝集分析

Figure 1のように、会合凝集体の分析手法には、それぞれ特色のある原理に基づいた様々な装置が利用されている。ここでは全ての装置を解説することはできないため、従来より用いられてきた代表的な手法(SEC法, DLS法)とSVPにも対応できる分析技術(MFI法, quantitative LD法)について概説する。

Size-Exclusion Chromatography (SEC)

凝集体の評価において長年用いられている分析手法としてサイズ排除カラムクロマトグラフィー (SEC)がある。従来の製剤においても、会合体・凝集体に関する定量試験法としてSEC分析法が設定されている。SECにおいては、一定のポアサイズの粒子で充填されたカラムの中に高分子を流し入れ、分子ふるいの原理に従って、大きいサイズの高分子は早く移動し、小さいサイズの高分子はポア内に入り込むことにより遅く移動する差を利用して、凝集体を分離・検出する。少量の試料(数十から数百μL)で解析が可能である。検出は主にUV検出であるため、少なくとも数百μg/mLの濃度は必要となる。分析できるサイズ範囲は10 kDaから約500 kDaである^[2]。多角度光散乱検出器(MALS)装置を検出に導入することで、正確な分子量も算出可能である。500 kDa以上のサイズが分離できないため、数十から数百nmサイズとμmサイズの粒子を分離できない。凝集体の安定性によってはカラム内で解離してしまうこともある。またカラム粒子は密に充填されているため、大きい粒子径の凝集体は詰まることがあり、0.2 μmのフィルターを通した試料による分析となってしまう、SVPの分析は困難

である。さらに抗体の種類によってはカラムに非特異的に吸着し、分離能の低下、分子量の概算が容易ではなくなる場合も多く、SECでは実際の凝集体のサイズ・量を低く見積もってしまう場合がある。このような場合、溶出溶媒への添加剤としてL-アルギニン塩酸塩を一定濃度加えることで改善される。Figure 2にモノクローナル抗体のSEC分析例を示す。酸性条件にて精製されたモノクローナル抗体は単量体以外にも、二量体と多量体に相当するピークが観察される。

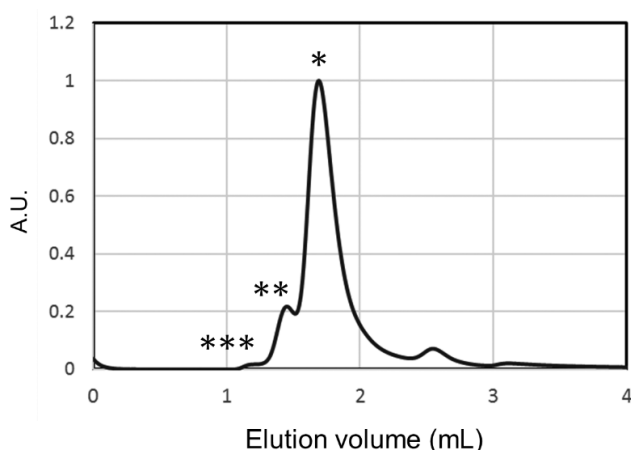


Figure 2 モノクローナル抗体のSEC分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(*)単量体ピーク, (**)二量体ピーク, (***)多量体ピーク。

Dynamic Light Scattering (DLS)

先述のSECと並んで簡便かつ迅速に解析できる分析機器の1つである動的光散乱分析(DLS)も広く活用されている。液中の分子や粒子のブラウン運動は、レーザー光を照射するとその分子・粒子サイズに応じて異なる強度で散乱を引き起こす。DLSはこれらの強度の変化を解析することでブラウン運動の速度を算出し、ストークス・アインシュタインの式から粒子径を求める装置である。少量の試料(数十から数百μL)で測定可能で、フィルターを通さなくても測定可能である。分析できるサイズ範囲はサブnmから数十μmである。継時的な変化や温度変化におけるサイズ変化を追うこともできる。一方でSECのようにサイズを細かく

分離することはできず、大まかな粒子径分布として計測され、定量的な解析も適さない。また散乱強度の大きい粒子径の大きな分子が共存している場合、小さい分子が検出、またはずれる場合がある。Figure 3にモノクローナル抗体のDLS分析例を示す。モノクローナル抗体を酸性条件で分析すると、数百nmレベルの大きな粒子径をもつ粒子の存在が観察される。

Field Flow Fractionation (FFF)

FFF法はメンブレン(薄層, 厚みは100~500 μm)中で粒子を分離・分析する手法である。

薄層はフロー系となっており、その中では流れが放物線上に層流している。そこに垂直な圧力を加えると粒子は薄層の端に向かって移動する。その結果、拡散速度が低い大きな粒子ほどこの力に押されて移動速度は低下し、SECとは逆に小さい分子サイズが先に溶出し、大きな分子サイズをもつ分子種は後に溶出される。試料量や濃度などはSECと同程度でよく、MALS装置の併用も可能である。FFF法ではSECのような固定相との接触がないため、弱い会合体の分解が起きにくく、またサイズ範囲がより大きいSVP領域も、SECに比べて分離し分析することができるとされており、近年注目されている^[3]。FFF法の分析例をFigure 4に示す。モノクローナル抗体の単量体ピークが先に、より大きい分子サイズが後に溶出される。

Micro-Flow Imaging (MFI)

SECやDLSではInvisible領域、大きくてもサブμmまでの分子径しか評価できない。それ以上の分子径をもつ、subvisible領域の会合凝集体を測定できる分析機器の1つとしてmicro-flow imaging (MFI)がある。たとえばEli Lilly社は不溶性微粒子検出に対するMFIの有用性を議論している^[4]。MFIはマイクロ流路内を流れる試料に対して、直接デジタルカメラによる撮影を行い、その画像処理から粒子のサイズ個数、さらに画像も観察することができる。したがってその粒子が、蛋白質の凝集体なのか、気泡なのか、その他の混入物なのかを正確に知ることができる^[5]。試料の量は数百μLから1 mL必要であるが、数百μg/mL以下の

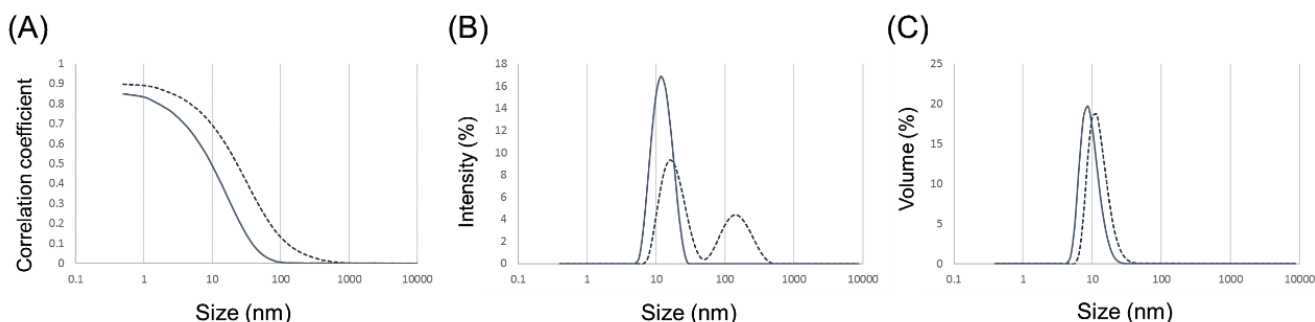


Figure 3 モノクローナル抗体のDLS分析例。点線はプロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。実線はSEC精製後の単量体画分の試料。(A) Correllograms, (B) intensity分布グラフ, (C) Volume分布グラフ。

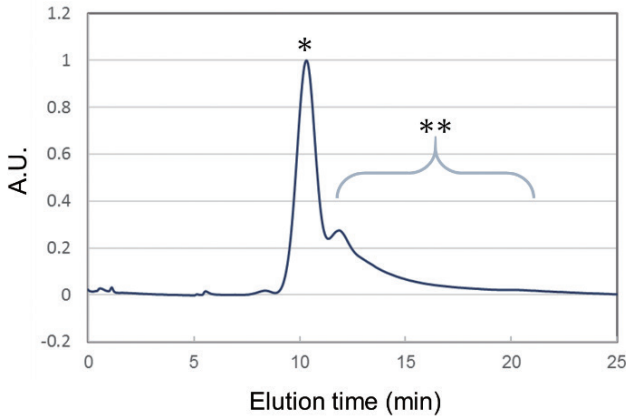


Figure 4 モノクローナル抗体のFFF分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(*)単量体ピーク、(**)二量体以上の会合体・凝集体画分。

濃度でも解析可能である。分析できるサイズ範囲は1-100 μmであり、10 μm間隔で粒子を分類し、その個数と代表的な画像を残す。比較的多量の試料を分析するため、データの定性的な再現性は高い。その一例をFigure 5に示す。抗体は酸性条件下でμmサイズの粒子(SVP)を形成しやすく、時間と共に増加することが分かる。さらに画像データからは、数十nmサイズにおいて糸くずの塊のような形状をした粒子が観察される。

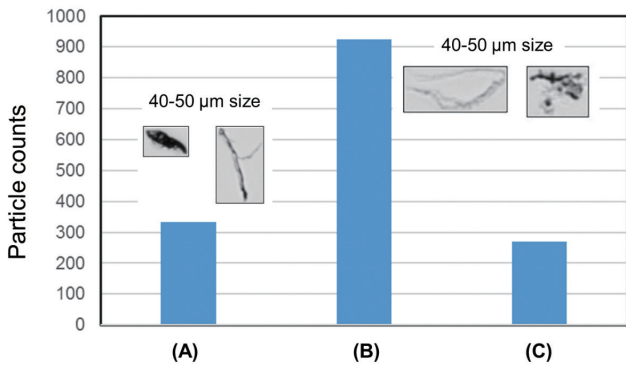


Figure 5 モノクローナル抗体のMFI分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した30分後(A)と2時間後(B)の試料。(C)SEC精製後の単量体画分の試料。

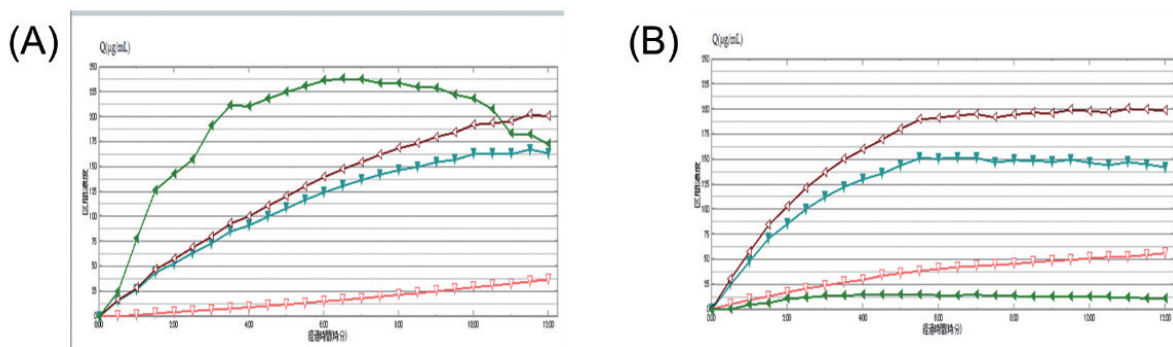


Figure 6 モノクローナル抗体のqLD分析例。(A)プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(B)SEC精製後の単量体画分の試料。(緑)10 μm以上、(赤)0.2-1.0 μm、(青)1.0-10 μm、(茶)0.1-10 μm。

Quantitative Laser Diffraction (qLD)

従来より、粒子からの散乱角度に依存した光強度分布の空間的なパターンに基づくレーザー回折・散乱法(LD法)が相対粒子量(全体を100%とした際の割合)を求める際に用いられてきた。近年、粒子の個数や濃度を精密に評価する重要性がでてきたことを踏まえて、標準粒子による校正とMie散乱理論に基づく補正を加えることにより、個数濃度や体積濃度を求めることを可能にした定量レーザー回折・散乱法(qLD法)が開発されている。本分析手法は主にSVPを定量的に分析することができる。このqLD法を搭載した分析装置としてSHIMADZUのAggregate Sizerがある^[6]。この装置の特徴は、攪拌ストレスによる凝集体形成を追跡し、継時変化におけるSVPの変化量を観察することができる。その一例をFigure 6に示す。時間変化と共にSVPの量が増加しており、特に酸性条件下ではその量も多く、SVPの生成速度も速くなっている。

糖鎖状態を指向した物性評価

抗体医薬品のほとんどはIgG型であり、その重鎖Fc領域のアスパラギン(N297)にはN型糖鎖が付加している。抗体のN型糖鎖パターンは抗体の安定性、生物活性および免疫原性等に影響を与えることが知られている。中でも、抗体医薬の主要な作用機序の一つである抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)は、糖鎖構造の影響を大きく受けるため、臨床効果を高めるための糖鎖改変がなされた抗体医薬の開発が盛んに行われている。その一方で、中和抗体やアゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体を用いた抗体医薬においてはADCC活性が不要あるいは望ましくない場合があり、糖鎖を欠如あるいは改変させることでADCC活性を消失させた抗体の利用が検討されている。しかしながら、糖鎖が付加しないアミノ酸変異体や酵素処理により糖鎖を完全に除去した抗体では、熱安定性の顕著な低下や凝集性の上昇がみられる。以上のように糖鎖構造は抗体医薬の性能に大きな影響を与えることから、高機能、高品質な医薬品用抗体を開発するためには、抗体の糖鎖構造の最適化が重要であると考えられる。ここでは、糖鎖構造最適化のための技術開発として熱測定を活用した研究例を紹介する。

モノクローナル抗体の糖鎖構造は均一ではない。その不均一な糖鎖を分離する技術の1つとして、Fc受容体FcγRIIIAをベースとして設計されたりガンドを固定化したアフィニティーカラム (FcRカラム)が、モノクローナル抗体のN-グリカン分析、分離する非常に有効な手段であると考えられる。医薬品リツキサンをFcRカラムに通すと、リツキサンは主に3つピークに分離された^[7] (Figure 7A)。またExpi293 (HEK293)やExpiCHO (CHO)細胞で発現された組換え抗体においても同様の傾向が観察され、さらにそれらの分離ピーク強度が異なることも明らかとなった^[8]。これらのピーク分離やその強度の違いは、N-グリカンの末端糖鎖(ガラクトース残基)の含有率の違いによることが明らかとなった。興味深いことに、この糖鎖構造の相違がADCC活性にも影響を及ぼす可能性が示唆された。これらの熱安定性をDSCで評価したところ、CH2ドメインの変性温度(Tm1)が僅かであるが異なる可能性が示唆された。このことは、抗体産生における糖鎖修飾反応は細胞株によって差異があるだけでなく、現在使用されている抗体医薬品の糖鎖構造には分布があり、抗体の蛋白質の物性(熱安定性)に影響を与えていることを示すものである。

これまで医薬品用抗体の産生にはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が最も多く用いられてきたが、コストの面

から、酵母、植物および昆虫細胞等を用いた抗体の産生が検討されている。動物、ヒト、植物、昆虫はそれぞれ特有の糖鎖プロセッシング機構を持ち、異なる糖鎖パターンの蛋白質を産生する。そこで、糖転移酵素の共感染により簡便に糖鎖改変体を産生できるカイコバキュロウイルス発現系を用いることによって、カイコで発現させる蛋白質の糖鎖修飾パターンをヒト型、動物型に改変する研究が進められている。著者らは抗Her2抗体をモデルに、カイコバキュロウイルス発現系をベースとした糖鎖パターンの異なる抗体の機能と熱測定を行った^[9] (Figure 7B)。カイコバキュロウイルス発現系由来抗体では、昆虫型として知られる少マンノース型、CHO細胞由来抗体では、動物型として知られるN-アセチルグルコサミン型糖鎖が主に検出された。また、カイコバキュロウイルス発現系においてN-アセチルグルコサミン転移酵素を共感染させることにより取得した糖鎖改変抗体では、動物型として知られるN-アセチルグルコサミン結合型糖鎖の割合が増加していた (Figure 7B)。DSCによる熱安定性解析を行ったところ、CH2の変性温度(Tm1)がCHO細胞発現系、糖鎖改変カイコバキュロウイルス発現系、カイコバキュロウイルス発現系の順に高く、少マンノース型の非還元末端にNアセチルグルコサミンが付加することより安定性が向上することが示唆された。レポーターアッセイ法によりADCC活性を評価した結果、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体とCHO細胞由来抗体の

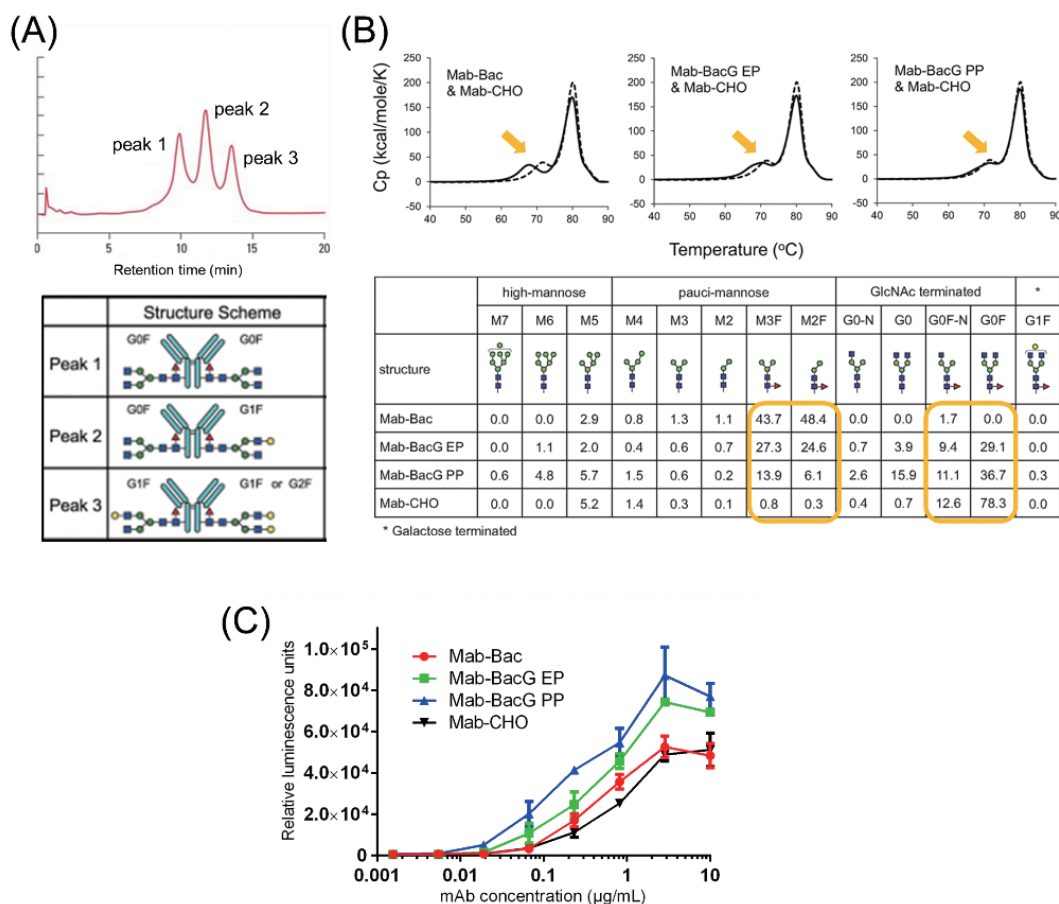


Figure 7 (A) FcRカラムによるリツキサンのピーク分離と糖鎖構造の違い、(B) 発現細胞の違いによる糖鎖構造変化とDSC測定による熱安定性変化、(C) ADCC活性 (Mab-Bac: 昆虫細胞, Mab-BacG EPおよびPP: N-アセチルグルコサミン転移酵素導入細胞, Mab-CHO: CHO細胞)

活性は同程度であったが、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の活性はカイコバキュロウイルス発現系由来抗体よりも上昇していた。フコース残基をもたない糖鎖では、N-アセチルグルコサミン結合型糖鎖を持つ抗体は、少マンノース型糖鎖をもつ抗体よりもADCC活性がわずかに高いことが報告されていることから、Nアセチルグルコサミン結合型への糖鎖改変と、糖鎖改変に伴うフコシル化糖鎖の減少により、ADCC活性が向上したと考えられる^[9] (Figure 7C)。実際にカイコバキュロウイルス発現系由来抗体の安定性を動物細胞由来抗体と同等以上に向上させるためには、糖鎖修飾以外に安定性に影響を与える因子を明らかにすることが必要である。また、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の糖鎖改変が抗体クローンにより大きく異なることから、糖鎖改変効率をコントロールする方法の開発が望まれる。

高濃度分析技術

承認されている抗体医薬品は注射剤が多く、そのため蛋白質濃度は数10 mg/mLから100 mg/mLと非常に高い。蛋白質の高濃度化は、凝集体の形成を促進させ、抗体の不活化、さらには沈殿物として不可逆的な状態で堆積することがある。そのため高濃度溶液の物性評価は品質管理の観点から非常に重要なステップの1つとなっている。しかし蛋白質溶液の分析は一般的に数mg/mL前後で実施することが多いため、高濃度の蛋白質溶液をそのまま分析する技術には限りがある。その主な原因は、高濃度による粘性や吸光度の増大である。そのために多くの分析技術は分析のためのサンプル調製や検出が困難になる。そこでここでは高濃度における詳細な分子レベルでの(特にコンフォメーション)知見を得るために、近年注目されている分析技術、ラマン分光法について紹介する。

ラマン分光法は、その検出原理より10 mg/mL以上の高濃度条件を必要とすることから、抗体医薬品をそのまま解析することができる。得られるラマンスペクトルより、蛋白質主鎖の二次構造、水素結合の状態、コンフォメーション、蛋白質表面の側鎖の局所環境変化などを議論することができ、蛋白質間相互作用に関する情報を得ることも可能である^[10-13]。特に威力を発揮する分析技術として使われる情報

に、各種のアミノ酸側鎖に関する官能基レベルでの分子状態、相互作用状態がある。このような特色から、近年では抗体医薬の品質管理技術の1つとしてのラマン分光の位置づけが高まってきている^[14-16]。

我々はラマン分光法を用いて、低濃度から高濃度へと抗体溶液が変化する際に、3段階の相互作用変化が少なくとも起きていることを明らかにしている (Figure 8)^[12]。まず1段階目は抗体表面を覆う水和水が蛋白質濃度の上昇と共に脱水する変化である。これは2800 cm^{-1} からの4000 cm^{-1} 間のIgGに由来するC-H伸縮と水分子に由来するO-H伸縮のスペクトル変化から観察された。そして2段階目として、抗体1分子間の距離が近づくことによる双極子-双極子相互作用が強くなり、抗体同士が分子間で相互作用する様子が1856/1830のスペクトル強度比より観察された。その際に表面の水和水がさらに解離する様子も観察されている。そしてさらに高濃度領域になると、3段階目として1856/1830のスペクトル強度比から抗体分子間の相互作用はさらに強まり、CH- π 相互作用が大きな役割を果たす可能性が示唆された。

このようにラマン分光を用いて高濃度製剤に対する抗体の分子特性を明らかにできることが分かりつつある。抗体の品質管理に関する最新の総説においても、ラマン分光は重要な位置づけにあることがうかがえる^[17]。最近の研究では、凝集抑制のために用いられる添加剤に関するラマンスペクトルへの影響についての報告がなされた^[18]。高濃度下において凝集抑制剤の添加は必要不可欠であるため、実際の製剤サンプルに対しては、ラマンスペクトルのより正確な分析が必要となる。さらにラマン分光を活用した抗体評価に関する別の研究例として、培養条件の違いにおける抗体の糖鎖修飾モニタリングや^[19]、また抗体の劣化(化学修飾など)に対してラマン分光を活用する例も報告されている^[20]。このような分析が高濃度サンプルにおいてどのような議論が可能かなど、今後もラマン分光分析による新たな評価項目の拡張が期待される。

おわりに

本稿では、次世代抗体医薬品の開発に重要な最先端の分析

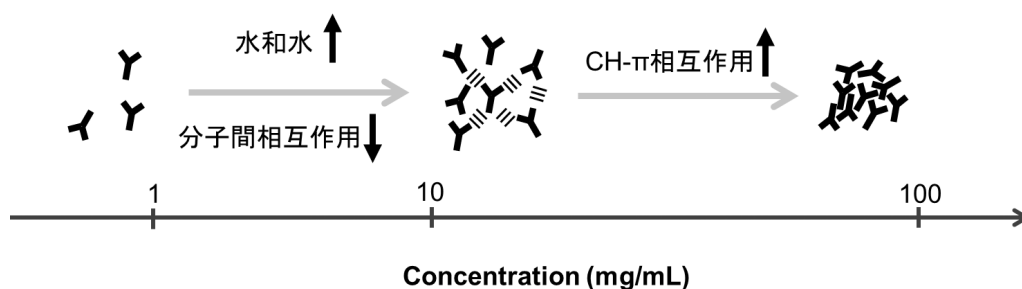


Figure 8 ラマン分光法より観察された抗体の濃度変化に伴う蛋白質間相互作用と水和水の変化

技術に関する研究例を紹介した。抗体の分子設計、抗原の分子情報には、分子動力学計算が威力を発揮し始めている。またさらに品質管理においては、多様性を有する糖鎖構造が重要な機能を示すために、その発現系の選択とコントロールを、簡便かつ迅速に分析することが必須になっている。今まで不可能とされてきた、修飾糖鎖を化学的に加工する技術の開発が進んでいることも指摘しておくべきである。さらには高濃度の抗体医薬品をコロイダルおよびコンフォメーションな観点より分析することができる技術が着実に確立しつつある。AIをフル活用した各種分析もはや遠い未来の話ではなくなっていることを付記しておきたい。

*編集局注：本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年時点での自社調査に基づいて記載しています。

参考文献

- [1] A.L. Fink, Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, *Fold. Des.* 3, R9-23(1998).
- [2] T. Ito, K. Tsumoto. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress, *Protein Sci.* 22, 1542-1551 (2013).
- [3] W. Fraunhofer, G. Winter, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceutics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 369-383(2004).
- [4] D.K. Sharma, P. Oma, M.J. Pollo, and M. Sukumar, *J. Pharm. Sci.* 99, 2628-2642(2010).
- [5] E. Krayukhina, K. Tsumoto, S. Uchiyama, K. Fukui. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins, *J. Pharm. Sci.* 104, 527-535(2015).
- [6] S. Totoki, G. Yamamoto, K. Tsumoto, S. Uchiyama, K. Fukui, Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles, *J. Pharm. Sci.* 104, 618-626(2015).
- [7] Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tada M, Tamura H, Tanaka T, Terao Y, Morante K, Harazono A, Hashii N, Shibata H, Kuroda D, Nagatoishi S, Oe S, Ide T, Tsumoto K, Ishii-Watabe A. *Sci. Rep.* 8, 3955(2018)
- [8] Kosuge H, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tanaka T, Terao Y, Oe S, Ide T, Tsumoto K. *Biotechnol. Prog.* e3016 (2020).
- [9] Egashira Y, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tsumoto K. *J. Biochem.* 163, 481-488(2018).
- [10] Z. Q. Wen, Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals, *J. Pharm. Sci.* 96, 2861-2878(2007).
- [11] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* 44, 1061-1076(2013).
- [12] C. Ota, S. Noguchi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy, *Pharm. Res.* 33, 956-969(2016).
- [13] C. Ota, S. Noguchi, K. Tsumoto, The molecular interaction of a protein in highly concentrated solution investigated by Raman spectroscopy, *Biopolymers* 103, 237-246(2015).
- [14] Rolinger L, Rüdert M, Hubbuch J, A critical review of recent trends, and a future perspective of optical spectroscopy as PAT in biopharmaceutical downstream processing, *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 2047-2064(2020).
- [15] Murali K. Maruthamuthu, Scott R. Rudge, Arezoo M. Ardekani, Michael R. Ladisch, Mohit S. Verma, Process analytical technologies and data analytics for the manufacture of monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol.* 38, 1169-1186(2020)
- [16] Yoann Le Basle, Philip Chennell, Nicolas Tokhadze, Alain Astier, Valérie Sautou, Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A review, *J. Pharm. Sci.* 109, 169-190 (2020)
- [17] Anurag S Rathore, Saxena Nikita, Garima Thakur, Navnath Deore, Challenges in process control for continuous processing for production of monoclonal antibody products, *Curr. Opin. Chem. Engineer.* 31, 100671(2021).
- [18] Alaa A. Makki, Victor Massot, Hugh J. Byrne, Renaud Respaud, Dominique Bertrand, Elhadi Mohammed, Igor Chourpa, Franck Bonniera, Understanding the discrimination and quantification of monoclonal antibodies preparations using Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 194, 113734(2021)
- [19] Meng-Yao Li, Bruno Ebel, Cédric Paris, Fabien Chauchard, Emmanuel Guedon, Annie Marc, Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures, *Biotechnol. Prog.* 34, 486-493(2018).
- [20] Bethan S McAvan, Leo A Bowsher, Thomas Powell, John F O'Hara, Mariangela Spitali, Royston Goodacre, Andrew J Doig, Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics, *Anal. Chem.* 92, 10381-10389(2020).