

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (バイオ医薬品の高度製造技術の開発) 事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 連続生産等に適した高性能な国産細胞株の開発

(英語) Development of original made-in-Japan high-performance cell lines suitable for continuous manufacturing

研究開発実施期間: 平成30年5月28日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 上平 正道

(英語) Masamichi Kamihira

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 次世代バイオ医薬品製造技術研究組合・分科会長/国立大学法人九州大学大学院工学研究院・教授

(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Project leader

/ Kyushu University・Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

治療用抗体等のバイオ医薬品は、主に CHO(Chinese Hamster Ovary)細胞を宿主細胞として用いた細胞培養により生産されている。バイオ医薬品生産のホストとして使われている CHO 細胞は、チャイニーズハムスター卵巣組織より 1957 年に樹立された細胞株に由来するものである。動物細胞宿主として、大腸菌や酵母などの微生物宿主では生産が困難である複雑な糖鎖修飾などの翻訳後修飾を伴うタンパク質を分泌生産することができる。CHO 細胞は、バイオ医薬品の約 45%で生産宿主として使用されており、抗体医薬においては、80%以上の品目で使用されている。バイオ医薬品の豊富な生産実績からデファクトスタンダードとなっている。生産細胞の構築では、バイオ医薬品生産のための遺伝子発現ユニットを有するベクターを作製後、宿主細胞に遺伝子導入を行い、薬剤等を用いたスクリーニングにより細胞染色体に安定的に組込まれた細胞を取得し、その中から生産に適した細胞株を選択あるいは育種することによって樹立される。これまでバッチ生産を前提とした生産細胞構築が行われていたが、連続生産では、長期生産安定性、生産性及び品質制御、安全性管理といった点を考慮した生産細胞構築が必要となる。これまで、連続生産を考慮した生産細胞構築に関する方法論は確立していない。また、独自にチャイニーズハムスター卵巣組織から樹立したオリジナルな CHO 細胞を宿主としてバイオ医薬品の生産細胞開発を行う研究はこれまでに例がない。

次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (MAB 組合) ではこれまでの研究で、遺伝子導入から生産細胞構築ま

でのプロセスにおいて生産性の改善や迅速化に関して必要とされる種々の要素技術開発を行い、それらを統合することで先進的な生産細胞構築プラットフォームの開発を行い、国際的にも優位な競争力をもつと考えられる3~5 g/Lの生産レベルの細胞を10週間で構築する技術レベルを実現した。また、実験動物として飼育されていたチャイニーズハムスターの卵巣組織の初代培養から自然不死化細胞の樹立に成功した。CHO-MKと名付けたこの細胞は、従来のCHO-K1細胞と比べて、比増殖速度と到達細胞密度が約2倍高いといった特徴を持っている。これにより、これまで生産宿主として多用されてきたCHO細胞株が全て海外細胞バンクに由来するという実用化において障壁となっている重大な問題を解消し、国産オリジナル宿主細胞開発を可能にする道を開いた。その後、CHO-MK細胞を生産細胞宿主として利用するために、無血清馴化、浮遊馴化が行われ、医薬品製造用のホスト細胞として要求されるウイルス安全性試験を完全にクリアした細胞バンクを整備した。CHO-MK細胞を宿主として抗体遺伝子の導入を行って生産細胞を作製したところ、生産された抗体は従来のCHO細胞と同等の糖鎖構造等の品質を有していた。この細胞の特徴である旺盛な増殖能はバイオ医薬品の生産において従来のCHO細胞と差別化が可能であると考えられる。

本研究では、MAB組合が樹立したこの国産オリジナルなCHO細胞を用いて、長期の高密度連続培養でも安定した高発現性と高生存率を維持し、かつ生産物の物性安定性とウイルス耐性等を実現できる、堅牢性を有した高性能な生産細胞株の構築技術を開発する。最終目的として、長期の高密度連続培養でも安定した高発現性(>1 g/(L・d))、高安定(>50 days)かつ高生存率(>90%)を維持し、生産物の高品質とウイルス耐性を実現できる、堅牢性を有した高性能な生産細胞株の構築技術を開発する。そのため以下に示す4つの研究項目を設定した：(1) 連続生産に適した生産細胞構築のためのセルエンジニアリング技術開発、(2) 連続生産に適した生産細胞の構築とその活用技術の開発、(3) 連続生産に適したオリジナル細胞株の構築プロセスの統合化と実証、(4) 国産オリジナル細胞を用いた抗体製造技術の実証研究。

本課題を推進するにあたり、MAB組合に所属する5組合分室(3企業、2大学)が技術開発を行い、さらに高度化するための課題(集中研課題)を設定し実用化を目指した。これに加えて、事業課題を補完するために、当該分野で先進的な技術開発を行っている7大学・機関に再委託課題を設定して研究開発をすすめた。

ホストセルバンクとして整備したCHO-MK細胞に対してさらに育種を行うとともに、新しく開発した抗体発現ベクターを導入してモデル抗体の発現クローンを選抜した。短時間で高い生産性を示す発現クローンのスクリーニングを行ったところ、4~7日間の培養期間で4~6 g/Lの生産性を示すクローンを作製する技術を確立した。得られた高発現株は宿主細胞が有している旺盛な増殖能力を維持していた。令和元年8月から、細胞株の樹立から生産細胞構築技術開発を行ってきた、ちとせ研究所をMAB組合の認定事業者として、CHO-MK細胞をホストとした生産細胞株構築の受託事業を開始している。構築した生産細胞を用いて、10 mLの小スケールでの長期生産試験としてスピンドウンパーフュージョンによる連続生産を行ったところ、50日以上の特長期間、 10^7 cells/mLレベルの高い生細胞密度と95%以上の生存率を維持して培養可能であった。生産性も1.5 g/L/day程度を維持しており、期間中の細胞の生産性は40 pcd (pg/cell/day)であった。生産物の品質においても50日間の期間中安定していた。さらに、高生産な細胞株構築のために、発現系の改良や発現系に合わせた宿主最適化育種を行い、フェッドバッチ培養において10日間で11 g/Lもの高濃度で生産する株を作製できた。得られた高生産株で小スケールでの長期生産試験を行ったところ、 8×10^7 cells/mLまで細胞増殖が見られ、10日以上安定して培養できた。この培養では4 g/L/dayで抗体生産を行うことができ、細胞生産性は90 pcdに達した。CHO-MK細胞での生産の汎用性を示すために、6種類のバイオシミラー候補となる抗体について生産細胞の作製を行い、6種類のいずれの場合も2~6.5 g/Lの高い生産性を示す安定生産細胞プールが作製できた。さらに、アカデミアシーズ抗体のCHO-MK細胞による生産細胞株構築の実証試験を行い、7種類の抗体シーズに対して生産細胞構築に成功している。また、長期的な連続生産に必要な各種要素技術の開発においては、染色体解析をベースとした細胞の品質評価法、環境応答型の遺伝子発現システム、ウイルス非感受性宿主細胞構築技術、染色体不安定性解析技術などの開発を行った。これらによって、長期連続生産のための細胞構築において将来的に有用であると考えられる新

しい技術の開発に成功した。

Biopharmaceutical proteins such as therapeutic antibodies are produced by cell culture using Chinese hamster ovary (CHO) cells as host cells. As animal cell hosts, CHO cells can secrete and produce proteins with proper post-translational modifications, difficult to produce by microbial hosts such as *Escherichia coli* and yeast. CHO cells are used as production hosts for about 45% of biopharmaceuticals and for more than 80% of therapeutic antibodies. Thus, it has become the *de facto* standard due to its abundant production records of biopharmaceutical proteins. Usually, producer cells have been constructed for batch production. For continuous production, it is required to construct producer cells in consideration of long-term production stability, high productivity and quality and safety control. So far, a methodology for constructing producer cells for continuous production has not been established.

In the Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB), spontaneously immortalized cells derived from primary culture of Chinese hamster ovary tissues have been newly established. The cell line, named CHO-MK, has the characteristics of high specific growth rate, about twice as high as that of the conventional CHO-K1 cells. Using this original CHO cell line, this study aims to develop a robust technology for constructing high-performance producer cell lines with stable high productivity and viability even in long-term high-density continuous culture, good quality of product and virus resistance, etc. The ultimate goal is to maintain high productivity ($> 1 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$), high stability (> 50 days) and high survival rate ($> 90\%$) even in long-term high-density continuous culture. A technology for constructing a robust, high-performance producer cell line that can achieve high quality and virus resistance were developed. To this end, the following four research subjects were set: (1) Development of cell engineering technology for construction of producer cells suitable for continuous production, (2) Development of producer cells suitable for continuous production and development of utilization technology. (3) Integration and demonstration of the process of constructing the original cell line suitable for continuous production, (4) Demonstration of antibody production technology using the original cells.

The host cell bank of CHO-MK cells was further improved, and a newly developed antibody expression vector was used to construct producer cells of a model antibody. By screening of producer cell clones with high productivity, a technique for constructing producer cell clones with the productivity of 4 to 6 g/L in a culture period of 4 to 7 days could be established. The high producer cells obtained maintained the good proliferative capacity of the host cell. Using the producer cells, continuous production by a spin-down perfusion culture with a small scale of 10 mL was performed as a feasibility test for long-term production of antibody. As a result, a high viable cell density of more than 10^7 cells/mL with 95% cell viability was possible for the culture period of more than 50 days. The antibody productivity was maintained at about 1.5 g/L/day, and cell productivity during the period reached 40 pg/cell/day (pcd). The quality of the product was also stable during the 50-day period. Furthermore, in order to construct higher producer cells, the transgene expression system was improved, and the breeding procedure was optimized according to the expression system. By this change, recombinant cell lines that produced as high as 11 g/L within 10 days in fed-batch culture were obtained. When a long-term production test was conducted using the high-producer cell line, cell proliferation was observed up to 8×10^7 cells/mL, and stable culture was possible for more than 10 days. The antibody productivity was maintained at 4 g/L/day in this culture, and cell productivity reached 90 pcd. In order to show the versatility of production using CHO-MK cells as hosts, producer cell lines for 6 types of antibodies recognized as biosimilar candidates were constructed. Producer cell pools with high productivity of 2 to 6.5 g/L could be constructed for all antibodies. Additionally, producer cell lines using CHO-MK cells were

successfully constructed for 7 types of academia-derived antibody seeds. Furthermore, various elemental technologies required for long-term continuous production were developed: a cell quality evaluation method based on chromosome analysis, environment-responsive gene expression systems, virus-insensitive host cell construction technology, and chromosome instability analysis. These technologies are expected to be introduced into the continuous production systems for therapeutic antibodies in the future.