

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) バイオ医薬品連続生産における各要素技術及びプラットフォーム技術の開発
(英語) Development of platform technologies for the continuous manufacturing of biopharmaceuticals

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) 大政 健史
(英語) Takeshi Omasa

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・統括プロジェクトリーダー/国立大学法人大阪大学大学院工学研究科・教授
(英語) Manufacturing Technology Association of Biologics (MAB)・Project leader
/ Osaka University・Professor

II 研究開発の概要

本研究全体の目的は、バイオ医薬品連続生産のプラットフォームになりうる要素技術を開発し、それらの部分組合せ実証研究を行い、連続生産プロセスを構築することにある。対象となる研究課題の内容は、連続生産に適した、①細胞を培養する、アップストリーム(USP: Upstream Process)技術の開発、②生産された抗体等を分離精製する、ダウンストリーム(DSP: Downstream Process)技術の開発、③プロセス高度化のための生産管理・品質分析(Analysis)技術の開発、④ウイルス安全管理(Virus Safety Control)技術の開発であり、それぞれの要素技術開発と、⑤それらをプラットフォーム化および部分組合せ実証研究を行い、連続生産技術を活用したバイオ医薬品連続生産システムの最適化、を実施するのに必要な技術開発を行う。本研究課題では、バイオ医薬品連続生産プロセスの構築を目的に、部分組合せ実証研究を見据え、プラットフォームになりうる要素技術を開発し、実証試験につなげる研究開発を行った。個別に開発された各項目の開発成果は以下のとおりである。

(1) アップストリーム技術開発

連続生産を見据えた研究開発を行うためには、特にアップストリーム技術開発においては、連続的に培養を行う、灌流培養(パーフュージョン培養)技術の開発および高度化が大変重要な課題となる。そこでまず、灌流培養において最もコストがかかり、かつ生産性を左右する灌流培養用培地の高性能化ならびに灌流培養の成否を握る培養条件検討に必要なスクリーニング用小型灌流培養装置用細胞分離装置を開発した。実製造での連

続生産にむけた大型細胞分離膜のリファレンスシステムとして細胞分離装置導入による条件検討を行い、さらに本研究課題での要素開発として、貫通孔フィルム試作、デッドエンドろ過による細胞通過性を評価した。また、灌流培養で高頻度に必要となるサンプリングシステム計画を検討した。連続培養系においては、培養系の制御ならびに制御を行うための様々な制御情報取得が必要となる。そこで、連続培養制御、網羅的解析にあたり、光学的培地成分検出フローセル、代謝解析および細胞画像解析の準備を行った。また、開発した技術の統合化に備え、各分室の開発範囲の調整を行った。

次に、連続生産において、我が国初のチャイニーズハムスター卵巣細胞由来のオリジナル細胞向け灌流培養用培地開発および、灌流培養における挙動を詳細に解析するために培養初期評価を行い、実証試験用に集中研に提供した。引き続き、条件検討可能な連続培養装置開発として、分離膜方式での細胞除去性能、抗体回収率評価、および細胞沈降方式での培養評価を行い、サンプリング装置実証機を用いて長期間の無菌維持性を確認した。連続生産に向けた高効率での培養プロセス運転として、増殖と抗体生産を制御可能な3因子の検討を行った。さらに最適制御を実現するための細胞密度、グルコース濃度、培養液量のインラインセンサによる適格性評価を行った。また、実験で得られた抗体を用いて酸性異性体、糖鎖等の品質分析を行った。

最終的に、培養開始時の回分（バッチ）培養ならびに、連続培養用にそれぞれ培地を最適化した。次に装置開発としてスクリーニング、生産用それぞれの灌流培養システムを最適化し、堅牢性実証を実施した。最適計測制御手法として培養制御パラメーター最適化、細胞密度調整手法確立、ならびに代謝物特性分析の連続培養方法へのフィードバックを行った。最終的に灌流培養システムとして50日の連続運転、回分操作と比較し装置小型化、培地消費量低減により総コスト20%以上削減の目途を立てた。また、品質に関してはオンライン/オフライン品質変動測定を行い制御モデル化を行った。

(2) ダウンストリーム技術開発

アップストリーム側に対応するダウンストリームでの研究開発においては、特に連続化の過程の技術開発が課題となる。そこで、連続キャプチャクロマト装置を導入し、各個別課題として開発した分離剤による効率的な連続生産操作の検討を開始し、連続操作に適した分離剤の操作条件および前処理による効率向上方法を確立した。また、クロマト工程全体の最善化のために、フロースルーによるポリッシングクロマトシステムを検討し、2カラムでの不純物除去が可能であることを確認した。さらに、カラムフリー連続精製プロセス構築としてサイクロンを試作した。これらの開発をうけて、連続キャプチャーとフロースルークロマトプロセス設計モデルの一部を作成した。

次に、2本のProtein Aカラムによる連続キャプチャー、半自動バッチウイルス不活化、ミクスドモードと陰イオン交換カラムでの連続ポリッシュ・フロースルークロマトとそれに連結するウイルスフィルターにより構成される連続精製プロセスを構築し、抗体濃度2g/Lの培養液を0.5-1.5 L/dの供給量で、最長4日間の連続精製を実施し、高い回収率と精製率を達成した。また、別手法としての液体サイクロンによるカラムフリー連続精製プロセスを試作し、試運転を行った。

最終的に連結工程の確認として、2カラム連続キャプチャー、自動バッチウイルス不活化、2カラムとウイルスフィルターを連結した連続ポリッシュで構成されるプロセスにより、高回収率、精製率、高効率(>20%)を達成した。このプロセスを連続培養と接続し、濃度と流量が変動する供給液の5日間連続精製を実現した。また、液体サイクロンとスタティックミキサーによるカラムレス連続精製装置を開発し、連続運転実証に成功した。

(3) 連続生産プロセス高度化のための生産管理・品質分析技術開発

連続生産プロセスでは、高度化のための生産管理・品質分析が、とりわけ重要となる。そこで、抗体濃度管理システムとして、小型カラムプレートプロト機を開発した。バンドパスフィルタの追加実装で不要波長領域

をカットし、線形応答範囲拡大を実現した。抗体糖鎖構造モニタリング技術として、蛍光標識糖鎖回収までの全自動前処理装置を開発した。本装置にて、最大 24 サンプルの同時処理が可能となり、培養液から抗体精製、糖鎖切断、糖鎖精製、蛍光標識化、過剰試薬除去までの一連の反応を 2~3.5 時間にて処理可能にした。異種抗原糖鎖検出試薬として、コアフコース型 N 型糖鎖 (α Gal および NeuGc) 合成法を確立した。検出用抗体を調製し、特異性と感度を確認した。品質管理における分析信頼性の確保・向上として、筑波、神戸、福島 GMP 集中研の 3 拠点比較試験を実施し、残留 HCP 分析法の平準化を進めた。

次に、抗体の品質に基づいた分析が可能となる FcRIIIA カラムを用いた抗体糖鎖構造モニタリング技術を開発し、連続培養時の経時変化やロット間差を評価した。また、人工タンパク質を用いた凝集前駆体モニタリング技術を開発し、高次構造劣化条件の応答曲面作成を実証した。さらに遊離糖鎖プロファイル分析の室間再現性評価を多機関で実施し、分析法プロトコルを最適化した。

最終的に、開発を行った抗体濃度管理システム、標的核酸検出評価技術、抗体糖鎖構造や HCP モニタリング技術等の要素技術最適化を行い、生産工程／製品品質モニタリング分析プラットフォームを構築した。異種抗原糖鎖検出試薬、抗体標準物質活用技術を含む分析標準品の開発と整備を行い、品質分析・工程分析の標準化／平準化を完了した。社会実装のため、開発した複数の技術を製品化した。

(4) ウイルス安全性管理技術開発

連続生産プロセスでは、長期間にわたって連続的に生産物が提供されるため、リスク管理の観点からウイルス安全性管理技術開発が非常に重要な開発項目となる。そこでまず、連続生産のウイルス管理戦略について、管理が必要な工程について検討・抽出を行った。

次に、各工程について基礎的なデータを取得し、プロトタイプ装置を開発し、培地中のウイルス・病原菌の不活化装置や UV による連続不活化装置及びスイッチングによるウイルス除去膜に関して、プロセス組込みの目途をつけた。さらに連続操作を志向したウイルス不活化用チューブリアクター内での粒子の滞留時間分布測定値のモデル化を行った。

最終的に、初期設定課題をすべて解決し、社会実装できる形の成果を得た。すなわち、培地中のウイルス・病原菌の不活化装置や UV による連続不活化装置の製品試作機を完成させ、特許出願を行った。チューブリアクター内での粒子の滞留時間分布の理論モデルを構築し、連続生産ではチューブリアクターは不向きであることを明確にした。ウイルス安全性試験に用いるウイルスを高品質・大量に取得する手法も確立した。

(5) 品質管理戦略ならびにシステムの最適化

プラットフォーム化および部分組合せ実証研究を行うためには、全体を含めた品質管理戦略ならびにシステムの最適化に向けた検討が必要になる。そこで、品質管理戦略手順、分析項目を設定し、PMDA 主催連続生産 WG にて検討に必要なデータ提供について協議した。

次に、部分組合せ実証として、集中研内で複数の開発要素技術を集約したプロセスを構築し、検証試験を行った。培養プロセスでは細胞株の特性に合わせ運転条件を検討し、30 日以上連続灌流運転を達成した。精製プロセスでは各単位操作を接続した統合運転試験を実施した。また培養と精製を連結した連続運転条件についても検討した。

最後に、開発要素技術の集約プロセスを構築検証し、培養では長期安定型および短期高生産型の灌流培養運転を実現し、精製では収率や品質を満足できる連続統合試験条件を確認した。培養と精製を連結した連動運転実験を行い、プロセス全体の統合運転条件を検討した。さらにリアルタイムプロセス制御技術として、ラマン分光システム等の導入検証、および PP 等変数と CQA の関係性を評価した。

The overall purpose of this study is to develop individual technologies to contribute as platform technologies for the continuous production of biopharmaceuticals and to construct a continuous production process by a partial combination of these technologies. The research topics are (1) Development of the upstream process (USP) for cell culture, (2) Development of downstream process (DSP) technology for separation and purification, (3) Development of quality control and analysis technologies for the advanced production process, (4) Development of virus safety control technology, and (5) Optimization of quality control strategy and system. In this project, we developed the technologies necessary to optimize the continuous production system. We also developed individual technologies that could contribute platform technologies to construct continuous biopharmaceutical manufacturing.

(1) USP development: The suitable serum-free medium for CHO-MK cell perfusion culture was developed. A cell separation device for a small-scale perfusion culture system was developed. Finally, a total cost reduction of more than 20% was achieved through the continuous operation of the perfusion culture system for 50 days, by the downsizing of equipment and reduction of medium consumption compared to batch operation.

(2) DSP development: By the combination of developed processes, we achieved a high recovery and purification ratio, and high efficiency (>20%).

(3) Development of quality control and analysis: The fully automated pretreatment device for collecting fluorescent-labeled glycans and using this system sample preparation could be performed in 2 to 3.5 hours. Antibody glycan structure monitoring technology using FcRIIIA columns was developed to enable analysis based on antibody quality. Finally, we constructed a production process/product quality monitoring analysis platform by optimizing individual technologies.

(4) Development of virus safety management system: In the continuous production process, the development of virus safety management is very important from the viewpoint of risk management because the products are provided continuously for a long period. A product prototype device for virus inactivation in culture media and continuous inactivation system by UV irradiation were developed. Based on the constructed theoretical model, tube reactors are not suitable for the continuous system.

(5) Optimization of quality control strategy and system: To conduct the platform and partial combination of developed systems, it is necessary to study the quality control strategy and system optimization. The quality control strategy procedures were constructed, and the data necessary for the Continuous Production WG by PMDA was discussed. We constructed and verified an integrated process of the developed individual technologies, and performed long-term stable and short-term high-production perfusion culture operations, and confirmed continuously integrated test conditions. In the case of purification, we confirmed the continuously integrated test conditions giving the suitable yield and quality.