

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) バイオ医薬品の多品種・大量製造に適した微生物による高度生産技術の開発
(英語) Development of advanced microbial production technologies for biomanufacturing of multiproduct / mass production

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) 石井 純
(英語) Jun Ishii

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 所属機関: 高機能遺伝子デザイン技術研究組合 (TRAHED) / 国立大学法人神戸大学
部署: 神戸拠点/先端バイオ工学研究センター
役職: 副拠点長/准教授

(英語) Institution: Technology Research Association of Highly Efficient Gene Design (TRAHED) / Kobe University
Department: Kobe Hub / Engineering Biology Research Center
Position: Deputy Director / Associate Professor

II 研究開発の概要

【和文】

微生物細胞は、生育速度が早く生産株の構築にかかる時間も短いため、バイオ医薬品を生産する次世代の宿主として期待されている。実際に、世界最大のバイオ医薬品受託製造機関 (Contract Manufacturing Organism: CMO) であるロンザをはじめとしたいくつかの企業が、CHO 細胞だけでなく、大腸菌などの微生物を宿主としたバイオ医薬品の受託製造を開始している。強力なメタノール誘導発現系による高いタンパク質分泌生産能力を示す *Pichia pastoris* (以下、ピキア酵母) は、JETREA® (オクリプラスミン: ヒトプラスミン類縁体) や KALBITOR® (エカランチド: カリクレイン阻害薬)、MEDWAY® (ヒト血清アルブミン製剤) などの組換えタンパク質がバイオ医薬品として既に上市されるなど、バイオ医薬品の生産宿主として実績のある微生物宿主である。また、ピキア酵母で生産された VYEPTI® (エプチネブマブ) と呼ばれるヒト化 IgG1 モノクローナル抗体が 2020 年に承認されたことから、今後は抗体医薬品についてもピキア酵母による生産例が増えていくものと予想される。

しかし、微生物を宿主としたバイオ医薬品の生産研究は Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に比べてまだ

十分に成熟しておらず、低分子抗体等の標的遺伝子の導入方法や単純なバッチ培養方法が検討されているものの、高度な生産技術についてはまだほとんど開発が進められていない。一方で、個別化医療の進展に伴って患者数の少ない疾患への個別対応が必要になると予想されており、小ロットでの多品種製造に適した生産技術が求められている。また、米国 FDA が連続生産を **Emerging Technology** として指定したことから欧米を中心にバイオ医薬品についても連続生産技術の開発の流れが加速しており、小スケールでの大量製造が可能な連続生産技術も注目を集めている。

本研究では、世界で本格化しつつある微生物でのバイオ医薬品・抗体医薬品の生産研究について世界と伍するための技術を開発することを目的とした。バイオ医薬品の分泌生産に適した生育の速い微生物としてピキア酵母を宿主として、分担研究開発課題「高性能な国産細胞株の構築」で開発する我が国オリジナルの高性能国産微生物細胞を活用し、小ロットでの多品種製造に適した「微生物フェドバッチ生産技術」および大量製造に適した「微生物連続生産技術」の2つの研究開発を進めた。

研究開発項目 1. 「多品種製造に適した微生物フェドバッチ生産技術の開発」

多品種製造に適した微生物によるフェドバッチ生産技術を確立するために、ジャーファーメンターを用いたピキア酵母のオンライン培養制御技術を開発することを目的とした。そのために、ラボスケールのジャーファーメンターにオンラインバイオセンサー・PID 制御装置を実装した。具体的には、オンラインバイオセンサーにより経時的かつ自動で測定した炭素源（グリセロールとメタノール）濃度の測定値信号を PID 制御装置に送り、現在の培地量に対してストックボトル内の基質をどのくらい添加すれば、ジャー内の基質濃度が目的値になるかを計算して、電子天秤とペリスタポンプで流量を制御するフィードバックが可能な装置を組んだ。この制御によって、グリセロール培養時による菌体の高密度化だけでなく、これまでの研究で課題となっていた抗体発現誘導後のメタノール枯渇に対し、培養液中へのメタノール自動添加・濃度制御が可能になった。本システムを用いて培養終了時の OD 値が 500 という高密度培養が可能となった。また、メタノール誘導開始時点の最適な OD 値を詳細に検討し、最終的な抗体生産量が増加する条件を見出した。この値より低い値からの誘導開始では、最終的な OD 値・抗体生産量が伸び悩む現象が起り、逆に高すぎる OD 値からの誘導開始では、菌体増殖の伸び代が少ないために生産性の減少が観察された。さらに、誘導期間中に基質の枯渇・蓄積が起らずかつ生産性が最も高くなるメタノール添加設定値の検討を繰り返した。その結果、菌体密度とメタノールの消費・残存量をバイオセンサーで確認しながらメタノール濃度をある条件で段階的に上げて設定した場合に、培養液中ではメタノールが枯渇せずまた菌体の生育活動を死滅側に傾けるだけの過度な蓄積が起らないことを見出した。高密度菌体の基質消費速度やグリセロールからメタノールへの代謝変化は早く、また、過剰量のメタノールには菌体への生育阻害活性があるため、これらが起らないように手動で流量を調節することは非常に困難であった。しかし、今回構築した自動濃度制御装置を用いることで、それらの問題を解決することに成功した。

このように、基質濃度・基質添加速度の自動調整や DO・pH スタット等のフィードバック制御を行うシステムを確立し、ピキア酵母の高密度培養および低分子抗体高生産が可能なフェドバッチ培養プロセスを開発した。開発したフェドバッチ培養システムを用いて様々な低分子抗体を産生する菌株の培養評価を行うことで様々な低分子抗体について試験管培養とジャー培養での生産特性の違いを抽出し、多品種の抗体において目標値である 5 g/L 以上の生産性を達成した。生産性の高い低分子抗体だと、培養液当たりで 10 g/L 以上、初期培地当たりでは 20 g/L 以上の生産が可能なることを見出した。

研究開発項目 2. 「大量製造に適した微生物連続生産技術の開発」

連続生産に必須となる定常状態を作り出すためには、ケモスタットにより増殖制限基質の供給を定流量で制御するのか、タービドスタットにより菌体密度を一定に保つようにフィードバック制御するのかなど、定

常状態に適した制御方法を確立する必要がある。さらに、高い希釈（培養液の抜き出し）率での制御を実現して安定かつ高効率な連続生産プロセスを確立するためには、菌体循環方式に関する検討も必要である。これらの検討を介して、低分子抗体を分泌生産するピキア酵母株を用いた小スケールでの連続生産技術を確立することを目的とした。本研究では、連続培養の生産性を高める上で重要な、比較的高い菌体濃度と希釈率で組換えピキア酵母の連続培養系を確立し、その検討を通じて低分子抗体の生産性指標にも留意した計測・制御方法を考案することを目指した。

初年度は、通気攪拌や培養液の抜き出し機能を備えたジャーフェンターを使用して、連続生産に必須となる定常状態を作り出すための基盤的な培養制御システムを構築した。定常状態の維持方法としてケモスタットを採用して、培養槽内で生じる複雑な微生物反応の制御指標となる重要なパラメータ（比増殖速度・菌体収率・希釈率など）が培養条件および培養成績とどのように関係するのかを明らかにした。このように、培地の供給方法がピキア酵母の連続培養に及ぼす影響を調査することで、ピキア酵母の菌体収率を 0.5 以上かつ高菌体濃度で連続培養することに成功した。

2 年目は、1 年目に検討した培養方法を用いて定常状態に適した制御方法を確立し、各株の培養データを取得した。また、動的平衡状態における抗体の比生産速度に着目した解析を進め、よりコントrollableに高効率連続生産が行えるような条件を検討した。希釈率を人為的に制御する連続培養法を組換えピキア酵母に応用する中で、高菌体濃度での動的定常状態における除熱および酸素供給に係る課題解決に目途を立てた。その結果、低分子抗体を構成的に発現する組換えピキア酵母の連続培養に成功し、既報の数値と比べて高いタンパク質生産性を得られることを示した。さらに、今後の多様なピキア酵母株による高生産性の獲得を視野に入れ、ピキア酵母の動的平衡状態における抗体の比生産速度に着目した解析を進めた。これにより、従来は培養上清の各種パラメーターから経験的に調整せざるを得なかった連続培養が、明確な制御指針のもと所望の細胞活性を得られるようになり、プロトタイプ株を使用して約 10 日間の連続培養が可能であることを示すことができた。

最終年度は、組換えピキア酵母のタンパク質発現系の変更や、高菌体濃度での最大比増殖速度の制約等を考慮して、連続培養における培養液の抜き出し方法と菌体循環方式の導入を検討した。菌体分離方式の検討では、培養液の流量比を調整して比増殖速度と菌体濃度を任意の値に設定できた。この方式で、構成発現株に続いて最適比増殖速度が低範囲にあるメタノール誘導発現株の連続培養系を構築したところ、菌体量あたりのタンパク質収率を大幅に改善でき、高いタンパク質生産性を達成した。また、タンパク質生産能力が向上するよう育種された菌株を使用することで、連続培養における生産性をさらに高められることも示唆された。このように、組換えピキア酵母の増殖特性や遺伝的特性に応じた技術指針を通して、微生物によるバイオ医薬品の連続生産に必要な基盤的培養技術を開発した。

本研究において、組換えピキア酵母の増殖特性や遺伝的特性に対応した低分子抗体の連続生産技術の基盤が構築された。本研究成果の連続培養技術は、恒常発現系および誘導発現系のいずれにも対応できることを示しているため、新規なプロモーターの導入によりタンパク質生産能力を高めた菌株への適用が期待される。ただし、培養工程で使用する培地について、現段階では主要な増殖制限基質の濃度のみを考慮した検討を行っているため、今後は菌体の構成成分を踏まえた供給培地の各成分の物質収支に検討を加える必要がある。また、本研究で使用した組換えピキア酵母は高いタンパク質生産性を示すことから、比較的小スケールの培養容積での生産が期待されるものの、より確実な技術とするためには培養装置の設計を含めたさらなる実験が必要である。

【英文】

Microbial cells are expected to be the next-generation host organism for producing biologics such as antibody because of their rapid growth and short duration required to construct a production strain. In fact, several companies, including

Ronza, the world's largest contract manufacturing organization (CMO), have started contract manufacturing of biologics using microorganisms such as *Escherichia coli* as hosts as well as Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Pichia pastoris* (methanol-assimilating yeast), which exhibits high protein secretory production capacity by a strong methanol-inducible expression system, is a microbial cell with a proven track record as a biologics production host. In fact, several recombinant proteins such as JETREA® (ocriplasmin: human plasmin analog), KALBITOR® (ecalantid: kallikrein inhibitor), and MEDWAY® (human serum albumin preparation) are produced by this yeast, and are already on the market as biologics. In addition, because the humanized IgG1 monoclonal antibody called VYEPTI® (eptinebumab) produced in *P. pastoris* was approved in 2020, it is expected that the number of antibody drugs produced by this yeast will increase in near future.

However, research on the production of biologics using microorganisms as a host is not yet sufficiently matured compared to CHO cells. Actually, little development has been made on advanced production technologies for biologics using microorganisms, although methods for introducing target genes such as small antibodies and simple batch culture methods are being studied. On the other hand, with the progress of personalized medicine, expectedly it will be necessary to deal with diseases with a small number of patients individually, and along with this, production technologies suitable for production of multiproduct in small lots will be also required. In addition, since the US FDA has designated continuous production as Emerging Technology, the flow of continuous production technology development is accelerating mainly in Europe and the United States for biologics. For this reason, the continuous production technology for antibodies that can be mass-produced on a small scale is also attracting attention.

The purpose of this research was to develop a technology to compete with the world in the production research of biologics and antibody drugs using microorganisms. Using *P. pastoris* as a host as a fast-growing microorganism suitable for the secretory production of recombinant proteins, we proceeded with two research developments, "microbial fed-batch production technology" and "microbial continuous production technology" which are suitable for multiproduct production and for mass production on a small scale, respectively.

1. Development of microbial fed-batch production technology for biomanufacturing of multiproduct production

This study was to develop an online culture control technology for *P. pastoris* using a jar fermenter with the aim to establish a microbial fed-batch production technology suitable for multiproduct production. To accomplish this, we implemented an online biosensor and a PID controller in a lab-scale jar fermenter. In brief, the system was configured to send the value signal of the carbon source concentrations (glycerol and methanol) measured over time and automatically by the online biosensor to the PID controller. A device was constructed for enabling to calculate how much substrate should be added to the current amount of culture medium in the jar and to execute the feedback control of feeding volume during the fed-batch cultivation. Thus, we established the system that can conduct the automatic feedback controls such as substrate concentration, substrate addition rate, and DO and pH stats, enabling the fed-batch process for high-density cultivation and high production of small antibody using *P. pastoris*.

2. Development of microbial fed-batch production technology for biomanufacturing of mass production

In this study, we constructed a continuous culture system for recombinant *P. pastoris* with a relatively high cell concentration and dilution rate, which is important for increasing the performance of continuous production. To do this, a basic culture control system was established to create a steady state using the jar fermenter equipped with the

functions for aeration stirring and culture medium extraction. In addition, a cell separation method was constructed in which the specific growth rate and the cell concentration could be set to arbitrary values by adjusting the dilution rate of culture medium. Thus, we have developed the basic culture system required for microbial continuous production of biologics using *P. pastoris*.