

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) 細胞ファイバーを利用した抗体製造のための高密度連続生産技術の開発  
(英語) Development of cell-fiber based high-density continuous production technology for antibody manufacturing

研究開発実施期間：平成30年5月21日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 柳沢 佑  
(英語) Yu Yanagisawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 株式会社セルファイバ 経営管理部・代表取締役・社長  
(英語) CellFiber Co.,Ltd. Representative Director

## II 研究開発の概要

### 【背景】

連続生産において細胞と培地の分離は沈殿またはフィルタろ過が一般的である。沈殿は遠心分離または重力による自然沈降で行われ、比較的高い細胞密度を処理できる利点があるが、分離には長時間を要する。一方、フィルタろ過は処理速度に優れるが膜の目詰まりが起きやすいため連続培養に用いる場合は、洗浄処理や膜交換が必要となる。既存の分離技術は一長一短で改善の余地が大きい。当研究開発課題の中空ハイドロゲルファイバは上記の問題を一挙に解決するポテンシャルがある。細胞の周囲を包むゲルは、半透性の物質で、高い親水性から目詰まりしにくい利点がある。しかしながら細胞を単にゲル包埋する古典的技術は、細胞増殖と共に容易に漏出が起きてしまう。一方、中空構造を持つファイバ内への封入は、細胞を含まないゲル層が存在するため、細胞漏出が起きにくい。当研究課題は高い細胞密度で高速培地交換可能、かつ目詰まりしない理想的な分離を実現できる可能性を秘めている。

### 【開発計画】

本研究開発は少規模試験 (A)、装置開発 (B)、(A) (B) の成果を統合した実証試験 (C) の3つに分類される。(A) はゲル素材の開発 (A-1)、長期培養技術 (A-2)、抗体産生システムとしての評価 (A-3) の3項目からなる。以下詳細である。

(A-1) 長期安定性に優れた抗体透過性アルギン酸ファイバの開発：細胞ファイバではアルギン酸カルシウムゲルもしくはアルギン酸バリウムゲルを用いる。これらのゲルは二価陽イオンでの架橋により形成されるため、培地交換のたびにイオンが奪われて強度が低下し、結果として漏出のリスクが高まる。抗体透過性 90%以上で、90 日間以上の連続培養可能な高耐久性アルギン酸ファイバを開発する（令和 2 年度に目標培養期間を 90 日から 50 日に変更）。

(A-2) 抗体産生細胞ファイバの長期培養技術の開発：開発した高耐久性アルギン酸ファイバに CHO 細胞を封入して抗体産生を行う。コア内の細胞密度を  $10^8$ - $10^9$  cell/mL と高密度にして 90 日培養後の生存率 80%を達成する培養条件を構築する十分な抗体透過性があることを確認する。得られた抗体の品質に問題がないことを確認する（令和 2 年度に目標培養期間を 90 日から 50 日に変更）。

(A-3) 抗体生産システムの安定性と品質評価：(A-1) 及び(A-2) で検討した基本条件に基づいて培養条件の最適化を行い、生産性向上及に取り組む。

(B) 装置開発：細胞ファイバの高速作製方法を検討しコア体積換算で 2.5 mL/min を実現する。

(C) 1L スケールの実証実験：(A)、(B) の成果を統合して 1L 規模の試験で 90 日間 2 g/L/day を実現する。令和 2 年度の開始時点で、最終目標を 90 日間 2 g/L/day から 50 日間 2 g/L/day に変更した。これは事業化可能性調査から 90 日間の連続運転は必ずしも求められておらず、培地使用量の低減やダウンストリーム負担軽減が評価されていたためである。

## 【実施体制】

本研究開発は研究開発代表者の株式会社セルフファイバに加えて、持田製薬株式会社、東京大学が研究開発分担者として参加している。3 社の参加する月例会議を行い、研究の進捗状況の共有及びその後の方針について議論して、綿密な連携のもと研究開発に取り組んだ。

## 【成果】

本開発課題全体の最終目標は 1L 規模の培養試験で 50 日間、2 g/L/day を実現することである。研究開発 1 年目にはアルギン酸ゲルファイバで生産された抗体のうち 90%以上が当該ゲルファイバ外に放出されること、30 日間の長期培養を行っても細胞漏出の起こらない高耐久性アルギン酸ゲルファイバを開発した。またアルギン酸ゲルファイバで得られた抗体の品質についても純度、電荷特性、糖鎖の評価を行い懸濁培養と同等の品質であることを実証した。2 年目には小規模の擬似的なかん流培養試験に集中的に取り組み、0.3 g/L/day を 30 日間維持することで、10 g/L を実現できることを示した。

装置開発については、複数のポンプの検討をおこない、なおかつ作製ノズルを従来の手製品から樹脂製の規格品に切り替えることに成功した。その結果、目標であった 2.5 mL/min の作製速度を大きく上回る 5 mL/min（従来の 200 倍）において連続的な作製を実現した。これはスケールアップ時の作製装置台数や規模を大きく削減できることを示しており、設備投資や人件費などのコストを低減するものである。

小規模試験の検討の結果、0.3 g/L/day からさらに生産性を向上させるには、培地成分調整が必要であることが示唆されたため、3 年目の令和 2 年度からはバイオリアクターを用いた検討に移行した。まず 200mL 規模の培養リアクターでかん流培養を行い 60 日間以上に渡って持続的に抗体が産生されること、及び産生した抗体も長期にわたり市販の医薬品抗体と同等の品質であることを確認した。続いて 1L 規模の培養リアクターでかん流培養を行い 50 日間に渡って持続的に抗体が産生されることを確認した。ただし、スケールアップ時には培養条件が小規模試験の際とは様々な点で異なることから、1L 規模の培養では、培養における安定性の高い、細胞密度の低い条件から検討を開始したために、比生産速度は 0.12 g/L/day であった。培養開始後 30 日目に培地の一部から分離・精製した抗体について各種解析を行い、電荷異性体割合及び糖鎖構造を除いて、標品である市販医薬品抗体と同等の品質であることを確認した。次に、細胞密度を上げ pH のフィードバック制御を行うことで、0.68

g/L/day まで生産速度を改善できることを確認した。最終的に目標の 2 g/L/day は未達であったが、振盪条件、DO 制御、ファイバ直径の最適化による中心壊死の回避などでさらなる改善が可能と見込まれる。

また本技術の検討は持田製薬の保有する CHO 細胞株を中心に検討を行ってきたが、MAB 組合から供与された別種の抗体産生細胞についても封入・培養試験を行い、ファイバ封入条件において長期生産培養が可能であることを確認できた。これは本技術の汎用性を示すものであり、今後の MAB 組合との連携・事業化の促進に資するものである。

更に、本技術の優位性を高めるため、アルギン酸ゲルの凍結保護性に着目し、当初の目標にはなかったアルギン酸由来のアルギン酸ゲルを使用し CHO 細胞を封入した細胞ファイバの凍結保存技術を検討した。その結果 1.5 ヶ月の凍結保存が可能であること及び解凍後 2-3 日で凍結直前と同等の培養状態に復帰できることを示した。従来 CHO 細胞をもちいた抗体生産においては前培養や比生産速度が向上するまでの期間があり、しかもノンストップで培養するため、機器の専有期間が長く、少量多品種への対応が難しい側面もあった。アルギン酸の性質を応用した本技術は、他手法で模倣が難しく、解凍後数日でトップスピードの抗体産生速度で培養を可能にするため、国際競争力を高める新たな付加価値となりえる。

2020 年 12 月に本事業を行う三者共同で抗体産生技術の特許出願（PCT 出願）をした。研究開発の傍ら市場調査も活発に行い、顧客がかん流培養技術を利用する際のペインポイントは何なのか、製薬企業等にヒアリングを行った。ほとんどの顧客の共通ニーズが、細胞と培地の分離膜が目詰まりの解決方法であった。また次に多くの課題が指摘されたのは培地使用量である。例えばかん流培養に取り組むある海外 CMO では懸濁培養で 4 g/L 程度の細胞を用いても、20 g/L 程度の titer が得られるものの培地使用量は単純に 5 倍ではなくより多くを消費しているようである。ファイバ培養は、従来のなかん流培養とは異なり、bleeding を伴わないため、培地使用量を低減できる。この特徴を活かして、データを蓄積していけば当該分野での重大な課題とされている目詰まりの問題及び培地使用量の問題を一挙にクリアすることが可能であると考えられる。

**Background** Sedimentation or filtration is commonly used to separate cells from the culture medium in continuous production. Sedimentation is performed by centrifugation or spontaneous sedimentation by gravity and has the advantage of being able to process relatively high cell densities, though requires a long time for separation. On the other hand, filtration is superior in processing speed, but the membranes are prone to clogging, so cleaning and membrane replacement are necessary when used for continuous culture. Existing separation technologies have different advantages and disadvantages, and there is much room for improvement. The hollow hydrogel fiber, our technology has the potential to solve all the above problems at the same time. The gel that surrounds the cells is a semi-permeable material, which has the advantage of not being easily clogged due to its high hydrophilicity. However, the classical technique that simply encapsulate cells in gel can easily leak as the cells grow. Cell leakage is less likely to occur when cells are encapsulated in a fiber with a hollow structure, because the gel layer serves as the barrier that mechanically inhibit cells to grow. Our technology has the potential to realize an ideal separation with high cell density, fast media exchange, and no clogging.

**Approach** This project can be divided into three sections: small-scale test (A), machine development (B), and proof of concept work (C) that integrates the results of (A) and (B). (A) consists of three items: development of gel material (A-1), long-term culture technology (A-2), and evaluation as an antibody production system (A-3). In addition to CellFiber, the principal investigator, Mochida pharmaceutical and the University of Tokyo participated in this research and development as subcontractors.

**Outcome:** The final goal of the project was to achieve 2 g/L/day for 50 days in a 1L-scale test. In the first year, we developed a highly durable alginate gel with no cell leakage even after 30 days of long-term culture and confirmed that more than 90% of the antibody produced was released outside the fiber. In the second year, we intensively conducted a small-scale pseudo-perfusion culture test and showed that 10 g/L could be achieved by maintaining 0.3 g/L/day for 30 days. For the development of the machine, we tried several pumps and succeeded in switching from conventional hand-made nozzles to standardized resin ones. As a result, we achieved a continuous fabrication speed of 5 mL/min (200 times faster than the conventional speed), which was much faster than our target of 2.5 mL/min. The results of the small-scale experiment suggested that the pH/DO control system was necessary to further improve the productivity from 0.3 g/L/day, thus we shifted to the study using a bioreactor in the third year. First, we confirmed steady antibody production under nutrient control system for more than 60 days using 200 mL bioreactor and the antibody produced had the same quality as the antibody on market. Next, we scaled up to 1L bioreactor and started from the low cell density conditions to ensure experiment reproducibility, resulting in the production rate was 0.12 g/L/day. The antibodies isolated and purified from a portion of the culture medium on days 30 were analyzed and confirmed to be of the same quality as the antibody on market, except for the glycan structure. Then, the production rate was confirmed to be improved to 0.68 g/L/day by increasing the cell density under pH feedback-controlled conditions. Although the final target of 2 g/L/day was not achieved, further improvement could be possible by optimizing the shaking conditions, DO control, and fiber diameter to avoid central necrosis.