

# 組換え糖タンパク質性医薬生産の工業化において 経験した課題について

横田 匡美

組換え糖タンパク質が医薬品として製造され始めてからすでに30年近くが経過しようとしている。糖タンパク質の発現系としてはおもに動物細胞が利用されてきた。糖タンパク質およびその発現系である動物細胞は大変デリケートであり、産業界においてはその工業化に多くの試行錯誤と労力の投入が必要であった。組換え糖タンパク質性医薬の工業的製造プロセスの開発は、一般的には、生産細胞株の構築、小スケールでのプロセス検討、スケールアップ検討、生産設備設計・建設、実生産の立上げの順に進むが、各フェーズで技術的に解決すべき課題がいまだに残されている。また、プロダクトの種類、性質により、その課題が異なってくる場合もある。

ここでは、血栓溶解剤の組換え型改変 tissue type plasminogen activator (t-PA) の工業化検討で経験した課題の中でも、培養プロセス開発において詰め切れなかった課題などを拾い紹介する。弊社で初めての動物細胞発現糖タンパク質だったこともあり、工業化は決して順調ではなかった。工業化には動物細胞の特性や、生産物であるタンパク質の物性理解が必要であった。いくつかの課題を解決しながら商業生産に辿り着いたが、現在から振り返れば更なる改善点や科学的に未解明な部分が多く残っている。現在は抗体医薬が盛んに研究されているが、糖タンパク質として共通する課題も見られる。それら最近の課題にも触れながら振り返ってみたい。若手研究者の今後の課題探索の一助になれば幸いである。

## 製品プロフィール

一般名パミテプラーゼ（製品名ソリナーゼ）（以下PM）は、以下のようなプロフィールを有する。

- ・薬効：血栓溶解剤
- ・適応：急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解
- ・構造：第2世代t-PA  
445個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質  
分子量約53000
- ・特徴：既存のt-PA製剤より血中濃度持続性が長い<sup>1)</sup>
- ・生産：遺伝子組換えCHO細胞

上記の製品プロフィールにあるように、PMは天然型t-PAの欠点を改良するため、遺伝子工学的に改変（クリングル1を欠失させ、275位のArgをGluに変換）した第2世代t-PAである。その一次構造（図1）が示すように、分子内にはクリングルドメインやセリンプロテアーゼドメインを含み、2か所の糖鎖結合部位、14か所のジスルフィド結合を有する。

以下、工業化において経験した課題や利用した技術について述べる。

## 宿主発現系

遺伝子組換え糖タンパク質を生産しようとする時には、まず発現系の選定が必要になる。1980年代、t-PAなどの糖タンパク質の発現系として、当初は大腸菌などの微生物による発現が試みられたが、立体構造の再構築

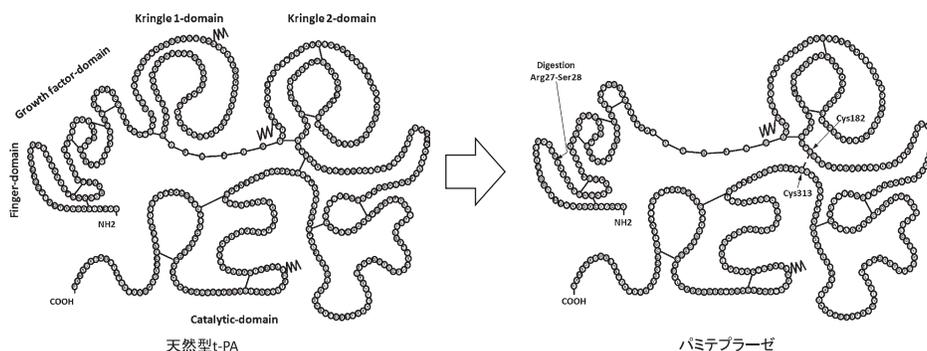


図1. 天然型t-PAとパミテプラーゼ（PM）の一次構造

著者紹介 アステラス製薬株式会社 技術本部バイオリードプロジェクト（専任理事） E-mail: masami.yokota@astellas.com

の困難さ、薬効に対する糖鎖の必要性の認識などから動物細胞発現系の研究開発と利用に移行していった。PMについても同様の経緯を辿った。種々の動物種の細胞株、接着・浮遊系、ウイルスベクターや染色体への組み込みなど、多くの選択肢があり、大学や企業の研究機関でそれぞれが試行錯誤を繰り返したが、現在の糖タンパク質性医薬品生産系としては、目的遺伝子を染色体に組み込ませたチャイニーズハムスターオーバリー（Chinese Hamster Ovary: CHO）細胞が主流となっている。CHO細胞が使用される背景としては、①古くから実験材料として使われ経験が蓄積されていたこと、②比較的大きな発現量が得られること、③接着・浮遊系のどちらにも適応可能であること、④糖鎖抗原（ $\alpha$ -Gal）の点でマウス細胞などに比べて安全性が高いこと、などがあげられるだろう。さらに、ここ20年以上に渡り、世界的に抗体を含む多くの医薬品生産への利用実績が積みあがってきたことによる、一種のデファクトスタンダードになっていると考えられる。もちろん、CHO細胞以外にも優れた宿主発現系は存在するが、医薬品の特殊性（臨床実績を優先する側面）の観点から、抗体などの臨床経験が積み上がった分野の糖タンパク質においては、今後も長期に渡りCHO細胞が利用されると考えられる。一方で、新規のジャンルのタンパク質性医薬（ワクチンなど）には積極的に他の発現系が試みられると考えられる。

### 細胞育種

PM生産細胞株の育種に関しては、ジヒドロ葉酸還元酵素（dihydrofolate reductase: DHFR）の増幅系を利用して目的遺伝子のコピー数を増加させて生産性を上げた細胞株を取得した。

細胞育種技術の開発に関しては、いまだに多くの企業が研究のリソースを割いていると考えられる。多くの企業が高生産で安定な細胞株をいかに迅速に取得するかという目的で、ハイスループットなシステムの構築に取り組んでいる。現状の細胞株を利用したシステムの構築は進んでいるが、さらに優れた特性をもつ細胞株の改良に向け中長期的な研究課題が多く残されていると考えられる。同じCHO細胞でも性質には大きなvarietyがあり、強い部類の細胞株を扱ってみると、脆弱な細胞に比較してその扱いやすさに雲泥の差を感じる。グローバルに使用されているCHO細胞ではあるが、細胞株によって工業的生産への適性は大きく異なる。CHO細胞は今後も長期に渡って抗体などの医薬品生産の基盤となってゆくと考えられ、国内の大学や企業による優れた細胞株の創出や新しい知見が見いだされることを期待したい。また、

この研究分野にオミックス的な研究が役立つ可能性があるが、有用な情報の収集と解析は今後の課題である。

### 糖鎖修飾

PMの開発においては、糖鎖のheterogeneityが課題となった。PMは分子内に2か所（102位と366位）のN結合型糖鎖の結合部位を有する。366位は常に糖鎖修飾を受けるが、102位については3割程度の分子が糖鎖修飾を受けて分泌されてきた。薬効面では102位に糖鎖付加がある場合は、フィブリンへの親和性低下が観察されたので、精製工程でこの分子種を除去する必要があった。創薬初期の分子設計の段階で、このような不要な糖鎖付加を防ぐ変異を入れておくのが理想ではあるが、現実の開発スピードを競う環境では、必ずしも理想の分子設計まで持ち込まずに、製造プロセスで対応しなければならない。糖鎖の付加に関しては種々の培養環境が影響を与えていると考えられるが、明確な制御メカニズムと制御方法は確立されていない。タンパク質の分泌経路では、タンパク質のフォールディング反応と糖鎖付加反応が競合していることから、分泌経路の酸化還元状態により糖鎖の付加割合が変化することが報告されている<sup>2)</sup>。培養環境の制御により分泌過程の酸化還元電位は変動すると考えられるが、糖鎖の付加の制御について有用な報告はされていない。

最近の抗体医薬の分野でも、糖鎖修飾は生理活性（抗体依存性細胞障害活性、補体依存性細胞障害活性、血中半減期など）に影響するため、糖鎖修飾をいかに制御するかは大きな課題である。同時に、糖鎖の分析技術も重要な研究分野になっている。

### 分子内自己消化

培養中にPM分子が分解してゆく現象が観察された。これはPMが分子内にセリンプロテアーゼドメインを有しており、それがArg27-Ser28結合を切断する分子内自己消化を生じているためであった。弊社では、最初に種々のプロテアーゼ阻害剤を試みて有効な阻害剤を見いだしたが、工業的製造には価格の面から適さなかった。そこで、フェッドバッチ方式のような長時間滞留型培養法を用いず、自己消化を低く抑えながら高生産を達成できる培養法を検討し、最終的にはcell reused repeated batch culture法を採用した（図2）。数日間隔で培養上清をハーベストするとともに細胞を回収し、次のバッチ培養のシードに利用することで、PMの自己消化を抑えつつ生産性を向上させることができた。また、種培養の時間損失、工数増加を回避することができた。この培養法の延

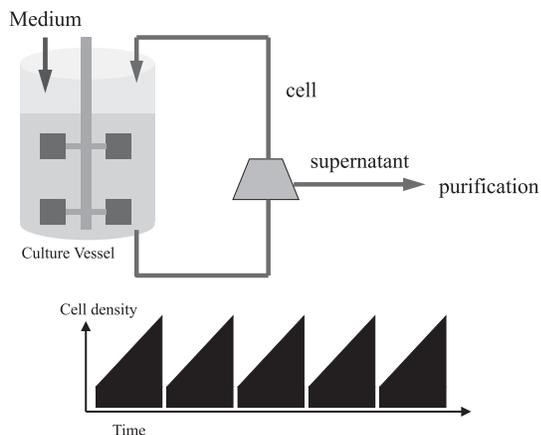


図2. Cell reused repeated batch culture

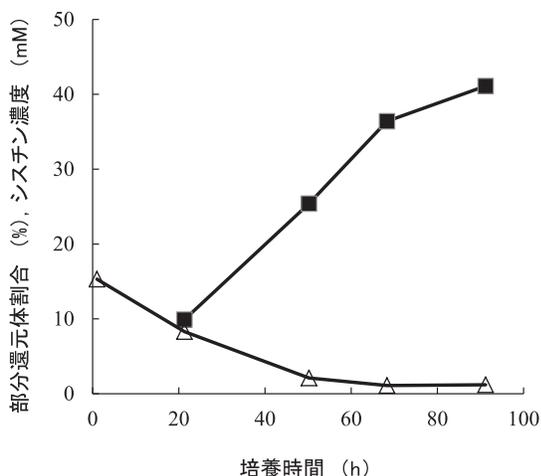


図3. 培養中のt-PA還元体割合. ■: 部分還元体割合, △: シスチン濃度.

長線上には連続還流培養法がある. 1990年代には細胞の連続培養系を工業的生産の場にもってゆくには, 設備の面などでリスクが大きかった. しかし, 近年の新たなコンセプトによるバイオ関連機器の開発状況を考えると, 今後は連続系の適用場面は増えていくと考えられる.

### 部分還元体の生成

PMの培養過程において, 培養後期に14か所のジスルフィド結合のうち1か所(Cys182-Cys313)が還元された部分還元体の割合が増加することが観察された(図3). 部分還元体が増加する原因として, PMが培養液中で還元されるのか, すでに還元されたものが分泌されてくるのか明らかではなかった. 培地に含まれる濃度のシステイン, シスチンを一定割合で溶解させたバッファーにPMを溶解させると, その割合に応じて部分還元体割合が可逆的に変化することから, 培地中において

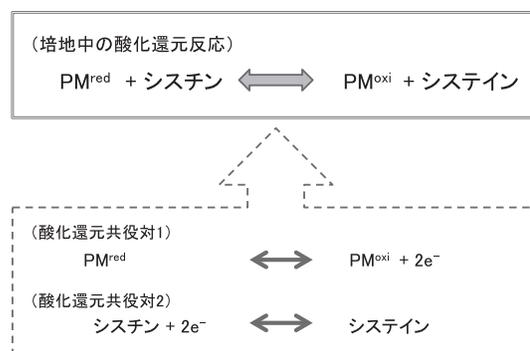


図4. PMの培地中での酸化還元反応.  $\text{PM}^{\text{red}}$ : PM部分還元体,  $\text{PM}^{\text{oxi}}$ : PM酸化体.

システイン/シスチンを酸化還元共役対として, 可逆的な酸化還元反応が生じていると考えられた(図4). 一方で, 培養後半においては培地中のシステイン, シスチンがほぼ枯渇状態になり, システイン/シスチンを共役対とするPMの酸化還元反応はほとんど進まないことも判明した. 数種類の濃度のシステイン, シスチンを含む培地中で酸化還元反応速度を測定し, その値をもとにシミュレーションを行ったところ, 細胞が分泌するPMの酸化還元状態は, 培地中のシステイン, シスチンの濃度に依存して変化していると考えられた. 培養後期に分泌されるPMの大部分は部分還元体であると推測された. 培地中のシステイン, シスチンの濃度が細胞内分泌過程の酸化還元状態に影響を与え, 結果的に分泌タンパクのジスルフィド結合に影響を与えていると推察された.

PMの部分還元体を低含量に制御する方法としては, 培地中に若干のシステインを増量するとともに, 銅イオン濃度を触媒能が発揮される濃度にまで増強し, 培地を酸化状態に維持することで, 部分還元体含量を低レベルに制御することが可能となった.

PM分子の立体構造予測では(図5), 酸化還元を受けるとジスルフィド結合は分子の表面に露出していると推測され, 培地中のシステイン, シスチンと容易に接近できることも, 酸化還元を受けやすい一因と考えられた.

最近の修飾抗体(Antibody Drug Conjugate: ADCやPEG化抗体など)においてはジスルフィド結合を介した修飾手段が使われているケースもあり, 培養 → 精製 → 修飾反応 → 精製 → 保存の各工程における酸化還元状態の制御は重要であり, また大変デリケートな制御が必要とされる.

### 生産性

PMの研究開発過程では数十種類の改変体を検討したが, 僅か1塩基の変異でもタンパク質の発現が大きく低

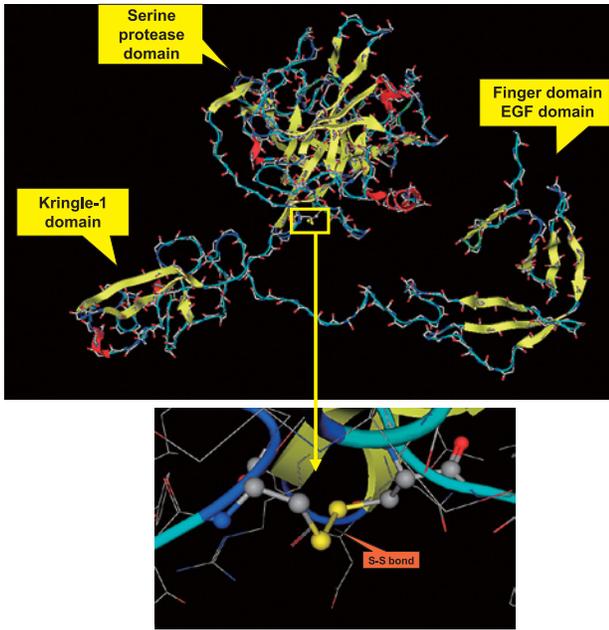


図5. PMの立体構造予測

下することがあった。このような現象は抗体やフュージオンタンパク質でも見られる。最近では抗体生産においては10 g/L以上の高い生産性が報告されるようになったが、抗体やフュージオンタンパク質の種類によっては必ずしもそのような高い生産性がでないこともある。そのメカニズムについては研究課題の一つと考えられる。近年の抗体などでの高い生産性はおもに培地の改良と精密な培養制御で達成されてきたと考えられる。生産性は(1)式に示す単位容積当たりの日生産速度(P/T)を最大化することが望ましい。比生産速度 $\eta$ は培養期間中に一定ではなく大きく変動するのが一般的である。臨床サンプルなどのサンプル供給と並行して生産性向上を検討する場合、糖鎖構造など重要な品質項目に変化を生じさせないことが望ましい。

$$P/T = (f\eta \cdot Xdt)/T \quad \dots \quad (1)$$

P:生産物濃度 (g/L),  $\eta$ :比生産速度 (g/cell/day), X:細胞密度 (cells/L), t:培養期間 (days), T:バッチ当たり培養期間 (days)

(1) 式のどの項目に重点を置くかは、各研究者の培養プロセス構築の戦略によって異なってくる。

水および培地の品質

動物細胞が研究され始めた初期には、同じ細胞株、培地を使用しても、各国の研究室により同じ増殖特性や性質を示さないことがあった。それは培地溶解に使用する純水中の微量成分の差異が影響している場合があった。

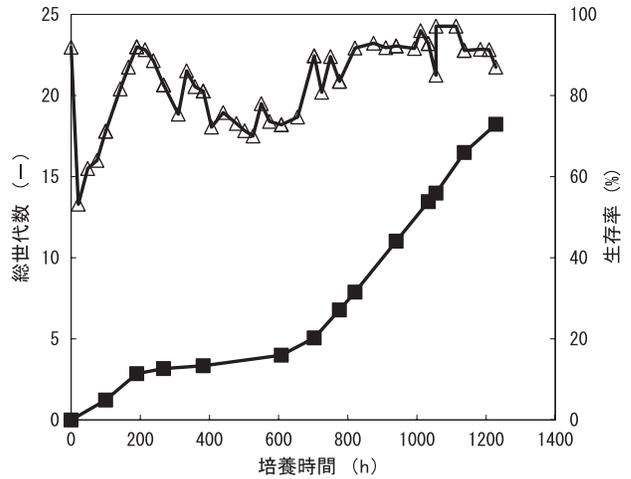


図6. 完全無タンパク培地へのadaptation. ■: 無タンパクadaptation開始後の総世代数, △: 生存率.

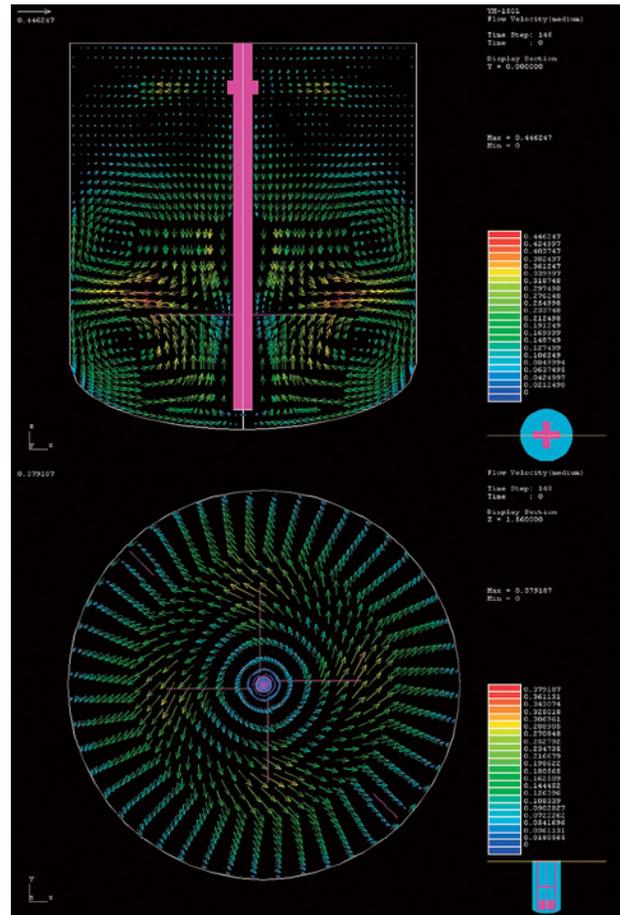


図7. CFDによる解析例

現在は培地調製には十分な精製レベルの純水が使用されているのでトラブルは少ないが、原水の水質も含めて注意が必要である。特にサイト変更を行う場合は注意が必

要である。

ペプトンなどのunknown成分を含む天然物由来原料が含まれている培地では、培地原料のロット間差が大きい場合があり、その原因を探るのは困難な場合が多い。一方、完全無タンパク質のchemically defined培地にした場合でも、培地メーカーにより培養のパフォーマンスが異なったり、培地のロット間差が生じたりすることがある。通常、培地メーカーは複数のベンダーから培地成分を購入しており、注意が必要である。動物細胞培養においては成分レベルでの品質コントロールが必要であり、この部分は培地メーカーに蓄積された経験も重要である。

### リスク対策

医薬品製造の観点から外来性感染物質の汚染対策は重要である。特に1990年代から大きな社会問題となったBovine Spongiform Encephalopathy (BSE)の問題は、動物由来の原料使用を極力回避する方向へ技術開発を促すきっかけとなった。PMの開発当初は、培地にウシ血清を添加していたが、数回にわたりリスク対策を行った。最終的な改良製法では完全無タンパク質培地に適応させたCHO細胞株を樹立し、古くから使われているMEMなどの基礎培地のみで生育するCHO細胞による製造を可能とした(図6)。

上記のようにBSE対策を通じて動物由来原料の使用は回避することが可能となった。しかし、商業生産の現場における細胞への外来性ウイルス汚染に関しては、世界的にかなりの数の報告がある<sup>3)</sup>。汚染対策としては、原料の厳格な保管管理はもちろん重要であるが、ペプトンなどの天然物由来原料使用の回避、培地のウイルス不活化処理などが有効と考えられる<sup>4)</sup>。実際の製造現場では、現実的な対応が求められる<sup>5)</sup>。また、今後はゲノム情報やセルエンジニアリングの技術により、細胞にウイルスへの感染抵抗性を持たせることも検討分野となろう。

### スケールアップ

工業的生産を行うには培養のスケールアップを行う必要がある。PM生産細胞株のスケールアップは血清由来成分を含む培地を使用している時は大きな問題はなかった。しかし、完全無タンパク質培地適応株を使用した時には剪断力への感受性が高まり、スケールアップに課題が生じた。スケールアップ検討においては、微生物醗酵で用いられてきた攪拌翼の先端速度や単位体積当たりの攪拌動力などの化学工学的パラメーターの利用とともに、Computational Fluid Dynamics (CFD)は有用な情

報を提供してくれる(図7)。細胞が受ける剪断力や酸素、二酸化炭素の濃度予測が可能である。しかし、必ずしも正確で十分な情報ではない。特に発泡に関しては消泡に影響する流動パターンの把握などには有用であるが、液特性が培養の経過とともに変化し、CFDによる発泡状態の予測は困難である。また、スパージングによる細胞へのダメージも、脆弱な細胞の時には大きな問題となるが、十分な解析手法が確立されているとは言えない。

スケールアップ検討あるいは大スケールでの課題検討を行う手段として、スケールダウン実験系をどのように構築するかも重要である。この分野は実験装置メーカーも含めて現在も研究開発が活発な分野である。大容量の通気攪拌系に適した細胞株を効率よく選定したり、培地・培養条件を検討する上でも、スケールダウンモデルを構築することは重要である。

### シングルユース技術

PMの工業化検討時はガラス製のスピナーやステンレス製のジャーをおもに使用し、商用生産もステンレス製タンクおよび配管を用いた。しかし、近年はシングルユース技術が発達し、ラボスケールの段階から治験薬製造、場合によっては商用生産までシングルユースバイオリアクター (Single Use Bioreactor : SUB) が使われるようになった。また、チューブの無菌溶着技術や光学式センサーとセットになることで大変利用しやすい培養装置となった。SUBは初期投資が小さいこと、使用のための準備時間が短いこと、ロット間あるいは製品間の洗浄が不要であること、使用場所がフレキシブルに可動できること、などの利点がある。しかし、便利な一面、細胞の増殖不良が起きたりするトラブルがしばしば報告されている。いくつかのメーカーが新しい素材を使用して製品開発を進めている上に、外来物質への感受性は各企業や研究機関で使用している細胞株に依存して差がある。さらに、蛍光灯などの照明が当たることで有害物質が発生するというケースや、倉庫に保管している間に有害物質が揮発放散するという報告もある。原因物質やその発生メカニズムは必ずしも明確にされていない。有害物質の特定や細胞への作用メカニズムの解明を期待するが、このような現象があることを念頭においてSUBの利用を進める必要がある。

### 製造設備の設計

製造設備の設計においては、非常に多岐に渡る配慮が必要である。建屋、設備、制御機器を含めたトータルのコンセプトデザインが大変重要である。そこには、バイ

オ医薬品のGMP製造設備としての最新のレギュレーションやガイドラインへの対応, 先進的な設備の組入れ, 将来展開へのフレキシビリティ, 省エネ, 環境への配慮といった多方面の検討が必要である。また, 培養設備では細胞という生物を制御するという点で, 材質, 配管などへの配慮とともにソフトウェアの設計は重要である。培養プロセスを理解した上でプログラムを設計しないと非常に使い難く, また, 目的とする制御精度がでないことになる。設備面では, サニタリー設計が必要であり, 滅菌性能, 洗浄, メンテナンスを考慮した設計が必要である。生産においてもっとも被害の大きい雑菌汚染への対応としては, 設備のハード, ソフトの設計とともに, 稼働後のチェック体制の構築が重要である。特に, 純水や純水蒸気を多用するのでhungry waterとしての腐食性を念頭において設備の溶接部分などへの注意が重要である。ピンホールによる雑菌汚染はもっとも原因の特定が難しく厄介である。

### 製造システムの自動化

従来の微生物発酵の最先端の工業的自動化設備<sup>6)</sup>に比較すると, 動物細胞の製造システムは省力化, 省人化という点で, そのレベルまで至っていないと考えられる。その背景には,

1. 細胞株の不安定性・脆弱性
2. 培養システムの外来性因子による汚染に対する脆弱性
3. 培養パラメーターの精密制御の要求度の高さ
4. 細胞のパフォーマンス, 生産物の品質に対する培地微量成分の影響度の大きさ
5. 生産物がタンパク質であるためデリケートな性質を有すること
6. 微生物では一般的に成り立つMonodの式<sup>7)</sup>の關係のように, 単一制限基質濃度と増殖速度を安定に関連させるようなシンプルな制御系に持ち込むことが困難であること

などが考えられる。たとえば, 抗体を生産する細胞株によっては, pHが0.05異なるだけでglycoformの割合が大きく変化するケースもある。その他, 浸透圧, 溶存酸素濃度, 溶存炭酸ガス濃度, 酸化還元電位, 微量金属イオン濃度など, 多くの環境因子の変動に, 細胞の増殖特性や生産物の品質が大きな影響を受ける。pHセンサー

などの精度・安定性向上と, 細胞の育種開発, 製造プロセス開発における革新的な研究が, 更なる自動化には必要と考えられる。

### 最後に

第二世代t-PAの製造の工業化において経験した課題を中心に, 最近の抗体生産における課題にも触れてきた。動物細胞による糖タンパク質の製造は, 従来の微生物醗酵の感覚を持って行うと思わぬ失敗をしてしまうことが多かった。それは, 微生物 vs. 動物細胞, 低分子化合物 vs. 高分子タンパク質, という扱う対象の特性の違いに対する理解不足に起因するものであった。ここでは触れなかったが, 精製技術や分析技術においても多くの課題がある。培養工程での生産性が大きく上昇したことから, 相対的に精製コストの低減が求められている。新たなクロマトグラフィー担体の開発や従来と異なるコンセプトの研究も進められている。分析技術は創薬の初期から上市後に至るまで, プロセス開発, 製品の品質管理と深く関連しており, 分析法の進展に伴って新たな品質上の課題が生じてきているのが現状である<sup>8,9)</sup>。

今後のバイオ医薬品生産技術の発展には, アカデミアによる基礎研究, 医薬品企業による工業化研究, 装置・素材・試薬メーカーなどによる製造関連機器, 測定装置, センサー, 有用試薬・培地の開発が一体となって進展する必要がある。各セクター間の緊密なコラボレーションを通じたイノベーションが必須と考えられる<sup>10)</sup>。このような背景のもと, 若手研究者には広い視野をもって, ますますの活躍を期待したい。

### 文 献

- 1) Katoh, M. *et al.*: *Thromb. Haemost.*, **62**, 542 (1989).
- 2) Simon, A. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **270**, 4797 (1995).
- 3) Garnick, R. L.: *Dev. Biol. Stand.* **93**, 21 (1998).
- 4) Murphy, M. *et al.*: *Biologicals* **39**, 438 (2011).
- 5) Rosenberg, A. S. *et al.*: *PDA J. Pharm. Sci. Tech.*, **65**, 563 (2011).
- 6) Eiki, H. *et al.*: *Harnessing Biotechnology for the 21st Century, ACS Conference Proceedings*, 223 (1992).
- 7) Monod, J.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 371 (1949).
- 8) Dillon, T. M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 16260 (2008).
- 9) Feeney, L. *et al.*: *Biotech. Bioeng.*, **110**, 1087 (2013).
- 10) Chesbrough, H.: *Open Innovation, Oxford Univ. Press* (2006).