

動物細胞を用いたバイオ医薬生産 ～行きつく先はどこなのか

大政 健史^{1,2}

¹大阪大学大学院工学研究科 生物工学専攻, ²次世代バイオ医薬品製造技術研究組合

Future perspective of biologics production by mammalian cell

Takeshi Omasa^{1,2}

¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University

²Manufacturing Technology Association of Biologics

Mammalian cell lines are important host cells for the industrial production of biologics owing to their capacity for correct folding, assembly, and post-translational modification. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most dependable host cells for the industrial production of therapeutic antibodies. Growing demand for therapeutic proteins promotes the development of technologies for high quality and productivity in CHO production systems including cell engineering and cell culture engineering. The Chinese hamster ovary cell line was established by Puck in 1957. Nowadays, among the therapeutic antibodies launched in the EU, USA, and Japanese markets, CHO cells produce about more than 50 % of these. In this presentation, I will introduce and discuss about the recent development of engineering for the CHO production system.

1. はじめに

動物細胞を用いたバイオ医薬生産は、遺伝子組換え技術の発展とともに、まずは治療用サイトカイン類の生産から始まり、次に、さまざまな人工的な改造を施した抗体分子の生産へと移ってきた。バイオ医薬品そのものは、当初は医薬品としての規模は必ずしも大きくはなかったが、2005年に世界のベスト10医薬品に抗体医薬がランクインしてからは、以降の十数年で目覚ましい発展を遂げ、2017年には世界市場での医薬品売上高ベスト10の大半を占めるまでに成長している。

2. プラットフォーム化した

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO細胞)

90年代の初めまでは、さまざまな動物細胞株がバイオ医薬品生産に用いられていたが、プロセスおよびセルエンジニアリングの集約化(プラットフォーム化)が進み、現在では、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞

(CHO細胞)がバイオ医薬品生産にもっとも汎用されている宿主細胞になっている。たとえば、実際に医薬品として上市され、治療に使われている抗体医薬品においては、すでに50品目以上の生産宿主としてCHO細胞が利用されている。CHO細胞を用いた物質生産システムの特徴は、抗体での10 g/Lレベルでの高生産に代表されるように、生産細胞開発、培地、培養方法、さらにはこれに関連するダウンストリーム関連の基盤技術まで、さまざまな関連技術が統合してCHO細胞のバイオプロセスを対象として研究開発と実用化が行われている点にある。このような背景から、CHO細胞によるバイオ医薬品生産は、製薬産業におけるバイオ医薬品生産のプラットフォームとして、今後ますます世界中で利用されていくと考えられている。これらの背景を踏まえて、バイオ医薬品の製造に関わるナショナルプロジェクト「国際基準に適合した次世代抗体医薬等の製造技術(プロジェクトリーダー:大政健史)」が、経済産業省、AMEDの下、5年間にわたり実施された。このプロジェクトの成果の

詳細は、『生物工学会誌』において2か月にわたって特集として紹介されており、詳細は省くが、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合において、逐次遺伝子組込みシステム（九州大）、新規CHO細胞株開発（ちとせ研究所/組合集中研）、高機能遺伝子と迅速評価法（徳島大/chromocenter）、翻訳装置高機能化（ニッピ）、小型スクリーニング培養システム（エイブル/住友ベークライト）、糖鎖構造に基づいたアフィニティ分離システム（東ソー）、低分子抗体用新規アフィニティ担体（カネカ）、迅速糖鎖分析法（住友ベークライト）、糖鎖品質評価用標品の開発（東京化成工業）など、さまざまな成果が達成されている。また、これらの成果を統合して実証する神戸GMP集中研も設置され、実証研究を行った。

3. 行きつく先はどこなのか

現在、CHO細胞が生産して上市されている抗体医薬品は、従来の抗体だけでなく、これまで大腸菌や酵母での生産が想定されてきたFabやScFvのような小分子抗体医薬品からbispecific抗体のような複雑な分子にいたるまで幅広い。また、プロジェクトにおいて開発された非常に増殖の速いCHO細胞（倍加時間10時間以下）も

実用化に向けて開発が行われている。これにより、従来のプロセス時間が短縮され、より使いやすい、より微生物に近い物質生産系の構築が期待できる。

4. まとめ

CHO細胞を用いたプラットフォーム技術は、今後その応用範囲が広がり、ますます多方面で用いられていくと考えられる。一方、その技術は微生物に比較して、自在に生産系を構築できるものでもなく、細胞株構築からバイオプロセス全体にわたって、論理的なデザインが十分にできているとは限らない。今後も本分野の継続的な研究開発が、バイオ医薬品の産業化をさらに加速させ、一般化させることは間違いない。技術開発の詳細については参考文献を参照していただきたい。

参考文献

- 1) 大政健史：PHARM TECH JAPAN, **34**, 1441 (2018).
- 2) 大政健史：PHARM TECH JAPAN, **34**, 1857 (2018).
- 3) 大政健史：生物工学, **97**, 321 (2019).
- 4) 大政健史：生物工学, **97**, 422 (2019).

The human protein atlas and engineered affibody molecules

Stefan Ståhl* and Mathias Uhlén

Dept. Protein Science, Science for Life Laboratory and AlbaNova University Center,
School of Engineering Sciences in Chemistry, Biotechnology and Health,
KTH - Royal Institute of Technology, Stockholm, SWEDEN

Introduction

The research within the department has over the years focused on two main areas; (i) to engineer small affinity proteins to bind any protein, for use in various applications in biotechnology and medicine, and (ii) a program with an aim to map all human proteins in tissues, organs and cells using integration of various omics technologies, including antibody-based imaging, transcriptomics and systems biology.

The affibody technology

A unique scaffold protein named affibody (only 58 amino acids in size), was developed in the department more than 20 years ago, and has over the years been explored in various applications¹⁾, and more than 500 studies have been published.

As the affibodies have been found safe and efficacious in humans for medical imaging applications, now in late-stage clinical testing for medical imaging of breast cancer¹⁾, the affibodies are currently also being evaluated

*著者連絡先 E-mail: ssta@kth.se

as “next-generation biological drugs”, thus as an alternative to therapeutic antibodies. Several different concepts are being explored in preclinical studies in oncology, typically in bi- or multispecific formats, including payload delivery and prodrug concepts¹⁾. Due to their small size, affibodies are rapidly excreted, and for therapeutic applications extended circulation times in blood are required. Thus, another small (5 kDa), scaffold protein, a high-affinity albumin binding domain (ABD) was engineered and deimmunized to minimize immunogenicity, and found safe and suitable to prolong circulation of pharmaceutical proteins¹⁾.

In the clinically most advanced study, affibody molecules specific for IL-17, a well-known driver of psoriasis, have been formatted into a small dimeric “IL-17 trap” with sub-picomolar affinity and fused to ABD for prolonged long plasma half-life. The molecule is now in phase II clinical development in patients with moderate-to-severe psoriasis and more than 200 patients have been treated with excellent clinical effect and no reported adverse effects. Another example is an affibody molecule binding the neonatal Fc receptor (FcRn) in a pH-dependent manner, allowing for endosomal recycling. The concept has advanced into clinical evaluation for the purpose of treating autoimmune diseases by depletion of IgG.

The Human Protein Atlas (HPA)

The Human Protein Atlas (HPA) program is an international effort starting in 2003 (led from KTH), taking advantage of highly specific polyclonal affibodies for the mapping of all 20,000 proteins in cells and tissues of human origin. The current version HPA program consists of six separate publicly available parts (www.proteinatlas.org), each focusing on a particular aspect of the genome-wide analysis of the human proteins, including a *Tissue Atlas* showing the distribution of the proteins across all major cells, tissues and organs in the

human body²⁾, a *Cell Atlas* showing the subcellular localization of proteins in single cells³⁾ and the *Pathology Atlas* showing the impact of protein levels on survival of cancer patients⁴⁾. In the last year, three new additions have been launched; a *Blood Atlas* showing the proteins across the major immune cells, including also data regarding the number and concentrations of human blood proteins⁵⁾, a *Brain Atlas* showing the proteins located to different regions of the human brain as well as the brains of pig and mouse⁶⁾ and the *Metabolic Atlas* with a model of the metabolic enzymes in humans and their location to different tissues (unpublished). Considerable efforts have indeed been spent to validate the antibodies used in the program⁷⁾.

Conclusions

A majority of the best-selling pharmaceuticals today are protein drugs, and an increasing number are not traditional monoclonal antibodies, but rather engineered derivatives. It is likely that we in the near future will also see engineered scaffold proteins, such as the affibodies, among these “next-generation biological drugs”.

The HPA database has more than 300,000 visitors per month and is one of the most visited biological databases in the world. More than five peer-reviewed publications are published in average by external groups every day and the HPA program has thus so far contributed to several thousands of publications in the field of human biology and disease.

References

- 1) Ståhl, S. *et al.*: *Trends Biotechnol.*, **35**, 691 (2017).
- 2) Uhlen, M. *et al.*: *Science*, **347**, 1260419 (2015).
- 3) Thul, P. J. *et al.*: *Science*, **356**, eaal3321 (2017).
- 4) Uhlen, M. *et al.*: *Science*, **357**, eaan2507 (2017).
- 5) Uhlen, M. *et al.*: *Science*, **366**, eaax9198 (2019).
- 6) Sjöstedt, E. *et al.*: *Science*, **367**, eaay5947 (2020).
- 7) Uhlen, M. *et al.*: *Nat. Methods*, **13**, 823 (2016).

治療・創薬を指向した機能性細胞創製技術の現状

河原 正浩

医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチン・アジュバント研究センター

Current status of functional cell design technologies directed toward therapy and drug discovery

Masahiro Kawahara

Center for Vaccine and Adjuvant Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

As cancer therapy using chimeric antigen receptor (CAR)-T cells has become practical in recent years, many researchers now try to investigate approaches aiming at therapeutic applications by creating functional cells with artificial targeting and reactivity by gene transfer. In addition, drug discovery that targets intracellular protein-protein interactions attracts much attention, and the development of functional cells capable of screening various protein-protein interactions in an intracellular environment has been demanded. In order to create these functional cells, a technique for arbitrarily controlling cell fates is essential. Therefore, we created artificial receptors in which the ligand-recognition and signaling properties of the wild-type receptor were designed and modified by genetic engineering. Utilizing such artificial receptors, we developed a platform technology for arbitrarily controlling cell fate. In this presentation, part of our technological development is introduced.

1. はじめに

近年, chimeric antigen receptor (CAR)-T細胞によるがん治療が実用化されたように, 生体内にない標的指向性や反応性を持った機能性細胞を遺伝子導入によって創製し, 治療応用を目指すアプローチが盛んになってきた. また, 細胞内タンパク質間相互作用を標的とした創薬が注目されており, 細胞内環境にて種々のタンパク質間相互作用をスクリーニング可能な系の開発が求められている. これらの実現に供する機能性細胞を創製するためには, 細胞運命を自在に制御する技術が肝要である. そこで我々は, 遺伝子工学的に受容体のリガンド受容能やシグナル伝達特性を設計・改変した人工受容体を創製し, 細胞運命を自在に制御するためのプラットフォーム技術を開発してきた. 本講演では, 我々の技術開発の一端を紹介する.

2. 種々の運命を制御する

cell fate-inducing CAR 発現機能性細胞の創製

細胞運命を制御するサイトカイン受容体の細胞外ドメインに存在するリガンド認識部位を抗体可変領域に置換した種々のCARをデザインした. これらのCARをそれぞれ遺伝子導入して発現させた細胞では, 用いた受容体のシグナル特性に応じて増殖・分化・遊走・死といった細胞運命を特異的抗原の添加により制御できた¹⁾. 標的細胞も, T細胞のみならず造血幹細胞を含む血球細胞全般, 上皮細胞, iPS細胞, がん細胞など, 幅広い種類の細胞に適用できた. このことは, CARはいわゆるCAR-Tとしてのがん治療分野での実用化のみならず, 種々の運命を制御するcell fate-inducing CARとして, 今後幅広い疾患に対する有効な治療用分子ツールとなる可能性を示している.

3. CARの概念を応用した タンパク質間相互作用検出法

サイトカイン受容体は二量体以上の多量体を形成して活性化される。そこで、前項のCARのうち、増殖誘導型CARのリガンド認識ドメインを任意の二種類の標的タンパク質に置換し、標的タンパク質間相互作用を細胞増殖の有無で簡便に検出できる系をデザインした。また、増殖誘導型CARは本来の受容体発現部位である細胞膜上だけでなく、細胞内でも機能することを見いだした。以上を組み合わせて、細胞外のみならず細胞内での抗体・ペプチドのライブラリースクリーニングや親和性成熟を実証した^{2,3)}。本系では化合物ライブラリーを扱うことも可能であり、タンパク質間相互作用に着目した創薬への応用が期待される。

4. まとめ

以上で紹介したアプローチ以外にも、リガンド認識ドメインとして合成小分子や青色光に応答するタンパク質ドメインを組み込んだ人工受容体も機能させることに成功した。また、人工受容体のシグナル伝達ドメインとして、シグナル伝達分子の結合特性に関わるチロシンモチーフ配列をボトムアップ的に配置し、天然にないシグナル伝達特性を持つ人工受容体を創製することにも成功した。このように、任意の特性を持つ人工受容体をデザインすることで、細胞機能自体を創り込み、治療・創薬へとつなげていきたい。

文 献

- 1) Tsukamoto, T. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **15**, 1900052 (2020).
- 2) Eguchi, A. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **116**, 1742 (2019).
- 3) Nguyen, T. D. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **14**, 1800350 (2019).

細胞治療・再生医療における製造の課題，解決に向けて

仲 崇宏

テルモBCT株式会社

Scaling cell therapy/regenerative medicine, bridging the gap —Challenges in cell product manufacturing—

Takahiro Naka

TerumoBCT Japan. Inc.

Cellular therapies and regenerative medicines have vast potential to treat a multitude of diseases and conditions and offer the promise to revolutionize medicine. To bring cellular therapies to patients successfully, cell therapy developers will require a way to easy and cost-effective scale production. It also will require compliance to regulations, current Good Manufacturing Practices (cGMP), and safeguarding the quality of the product. The gap between research and development, and commercialization remains wide and poses one of the biggest challenges for the industry at the moment. Today, we shall discuss considerations and solutions to bridge the gap.

1. はじめに

細胞治療や再生医療は医療を変える可能性を有しており、社会的にも大きな期待を持たれている。しかしながら、細胞を医療に使うことを実現するためには、さまざまな課題がある。たとえば、製造に関しては処理スケール、規制対応、コスト、作業者の確保と教育など、数多くの課題が存在する。現在の多くの再生医療等製品に関しては、手作業を主体とする製法が一般的であり、生産技術の今後の発展に大きな期待が寄せられている。

このような状況で、テルモBCTでは実生産のさまざまな課題を解決するために、いくつかのソリューションを提供しており、事例も含めて紹介する。

2. 生産に向けた主な課題とその解決へ向けて

研究から生産へ移行するためには、品質とコストのバランスを取る事が非常に重要であるが、難しいのが現実である。課題の一例としては以下のような点である。

- ・処理量の拡大（スケールの拡大）
- ・再現性の向上
- ・効率的な細胞処理工程の構築（作業負荷の低減）
- ・品質検査の適正化
- ・全体フローの最適化

このような課題が存在するなかで、生産戦略として多く見られるのは、研究で採用していた方法をそのまま生産へ向けても採用するケースである。これは一見すると変化が少なく、確認事項も少なくなり、特にスケールの拡大に伴う再現性の低下回避などに良さそうに見えるが、将来の事業化を見据えた場合は、必ずしも良い戦略とは言えない場合も存在する。

これらの状況を鑑み、弊社ではフレキシビリティと無菌性を高めながら自動化を目指すことが一つの方向性であると考えている。具体的には、既存工程の一部を装置などに置き換え、作業者の介入を減らし、閉鎖系ディ

スポーザブルを活用した製造である。

たとえば、細胞自動増殖システムQuantumなどは、機能的閉鎖系ディスプレイを用いて、培養工程における作業者の介入を最小化することができ、実際に、さまざまな種類の細胞にて使用されている¹⁻⁶⁾。使用による効果として、開放系作業の低減や必要な人員と作業負荷の低減などによるトータルコストの低減などが確認されている^{2,7)}。

また、細胞を最終調製する際に使用する小分けシステムFINIAなどで、細胞を製造する際の多くの工程にて、自動化や作業者の負担軽減、環境の維持、作業記録の自動取得など、細胞の生産が効率良く実施することを手助けする機器類を提供している。

このような装置を導入することで、すべての課題が解決できるということではないが、製造工程全体を俯瞰し、課題解決に向けた打ち手、リスクとコストをマネジメントしながら生産の戦略を検討することが必要不可欠であると考ええる。

3. まとめ

細胞治療・再生医療における細胞製造は、製品特性に起因する特有の難しさに加え、品質とコストのバランスを埋める戦略を取る必要がある。

文 献

- 1) Kastrup, J. *et al.*: *Stem Cells Transl. Med.*, **6**, 1963 (2017).
- 2) Russell, A. L. *et al.*: *Transfusion*, **58**, 2374 (2018).
- 3) Coeshott, C. *et al.*: *J. Transl. Med.*, **17**, 258 (2019).
- 4) Mesquita, F. C. P. *et al.*: *Stem Cells Int.*, **2019**, 9704945 (2019).
- 5) Tirughana, R. *et al.*: *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **10**, 48 (2018).
- 6) Sheu, J. *et al.*: *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **2**, 15020 (2015).
- 7) Hanley, P. J. *et al.*: *Cytotherapy*, **16**, 1048 (2014).