

# バイオ医薬品製造におけるパラダイムシフト

## アップストリームプロセスの強化

Habib Horry, PhD, Associate Director of Marketing - Upstream Integration Next Generation Bioprocessing

Jochen Sieck, PhD, Head of Perfusion Systems R&D

Tobias Krachtus, Global Product Manager, Upstream New Capabilities

Russell Jones, Global Product Manager, Sterile Liquid Delivery Innovations

1986年に世界で初めてモノクローナル抗体医薬品が承認および上市されて以来、現在に至るまでにその世界市場は巨大化し、今も成長し続けています。この市場規模は約1,000億ドルと見積もられており、今後はCAGR 5.5%以上を保ちつつ、2023年までには1,300億ドルを超える規模まで拡大することが期待されています。<sup>1,2</sup>

mAbやその他の抗体ベースのバイオ医薬品に対する需要は、以下のような多くの要因により高まり続けています：

- がん、心血管疾患、呼吸器疾患などの加齢に伴う病気を発症する高齢者の増加
- 依然として死亡率の高いがん、糖尿病、肝疾患、腎疾患において大きな進展を遂げる機会
- バイオシミラーならびに二重特異性抗体や抗体薬物複合体などの新規治療法の利用可能性

需要が高まる中、製剤品質を維持、さらには改善しながら開発を加速し、柔軟性を高め、コストを削減するというバイオ医薬品業界へのプレッシャーも高まっています。これらの課題に対処するにはまったく新しいアプローチが必要です。

2017年、業界コンソーシアムであるBioPhorumは、変化を加速させるためにダイナミックな共同技術管理プロセスを確立する取り組みの一環として「バイオ医薬品製造技術ロードマップ」を発表しました。このロードマップは、バイオ医薬品製造コミュニティの取り組みの焦点を絞り、技術や製造の目標の特定や技術的解決策候補の優先順位付けを介して方向性を与えることを目指しています。

次世代のプロセッシングと技術を採用することで、ワークフローの効率化、製造プラント面積の縮小、そして柔軟性の向上による生産性の改善が可能になります。また、次世代プロセスの利点を認識しながら、成功に至る複数の道を検討することもできます。当社では、アップストリームとダウンストリームのプロセスを強化する技術やアプローチを開発しており、短期的改善ならびに革新的ソリューション

をご提供することで長期間にわたる大きな進歩を可能にしています。

このホワイトペーパーでは、高いスループット、柔軟性の向上、そして日数の短縮へとつながるタンパク質 Titer 向上のための複数のアップストリーム戦略をご紹介します。

取り上げるトピック：

- パーフュージョン培養とパーフェュージョン培養用培地
- 高密度での細胞凍結保存 (HCDC)
- 修飾アミノ酸 (Modified amino acid)
- 細胞培養培地のコンパクション技術
- 濃縮バッファーと濃縮培地

### パーフェュージョン培養

パーフェュージョン培養では、バイオリアクターの中で高い生細胞数を保ちながら、新たな培地の供給と使用済み培地や産生物の除去が連続的に行われます。この培養方法には、長い歴史があります。

1990年代初頭から、数々の市販分子がパーフェュージョンプロセスを用いて製造されてきました。それらの多くの分子は失活しやすく、発現量はキログラム当たりミリグラムと低く、培養には接着性細胞が使用されていました。

しかしながら、浮遊培養が改善され、バッチプロセスの収量が向上したため、パーフェュージョン培養は下火になりました。1990年代半ば、フェドバッチプロセスを用いて得られる細胞濃度は約  $5 \times 10^6$  cells/mL であり、産生物濃度は  $1 \sim 2$  g/L でした。現在、細胞濃度は  $15 \times 10^6$  cells/mL を超え、産生物濃度は最大  $10$  g/L と向上しています。

これらの改善は目覚ましいものですが、製造コスト削減のプレッシャーと柔軟性向上の必要性があるからといって、20,000 L のフェドバッチバイオリアクター施設を新たに複数建設すればよいというわけではありません。

パーフュージョン培養を利用した新しい ultra high-density cell culture processes には concentrated fed-batch や steady-state perfusion などがありますが、これらのプロセスは新しい製造環境に適しており、今ではシングルユース技術の採用増加に伴い発展してきています。パーフュージョン培養により、シードトレイン培養と生産培養のいずれでも高密度細胞培養が実現しており(図 1)、容積生産性は 3 倍になります。<sup>3</sup>

アップストリーム強化のためのパーフュージョン培養を用いたアプローチにより可能になること：

- シードトレイン培養工程の短縮
- バイオリアクター稼働率の最大化
- 施設容量と効率の最大化
- バイオリアクターの小型化と数の削減
- アップストリームプロセスのフットプリント縮小
- 容積生産性の向上
- 産生タンパク質品質の向上

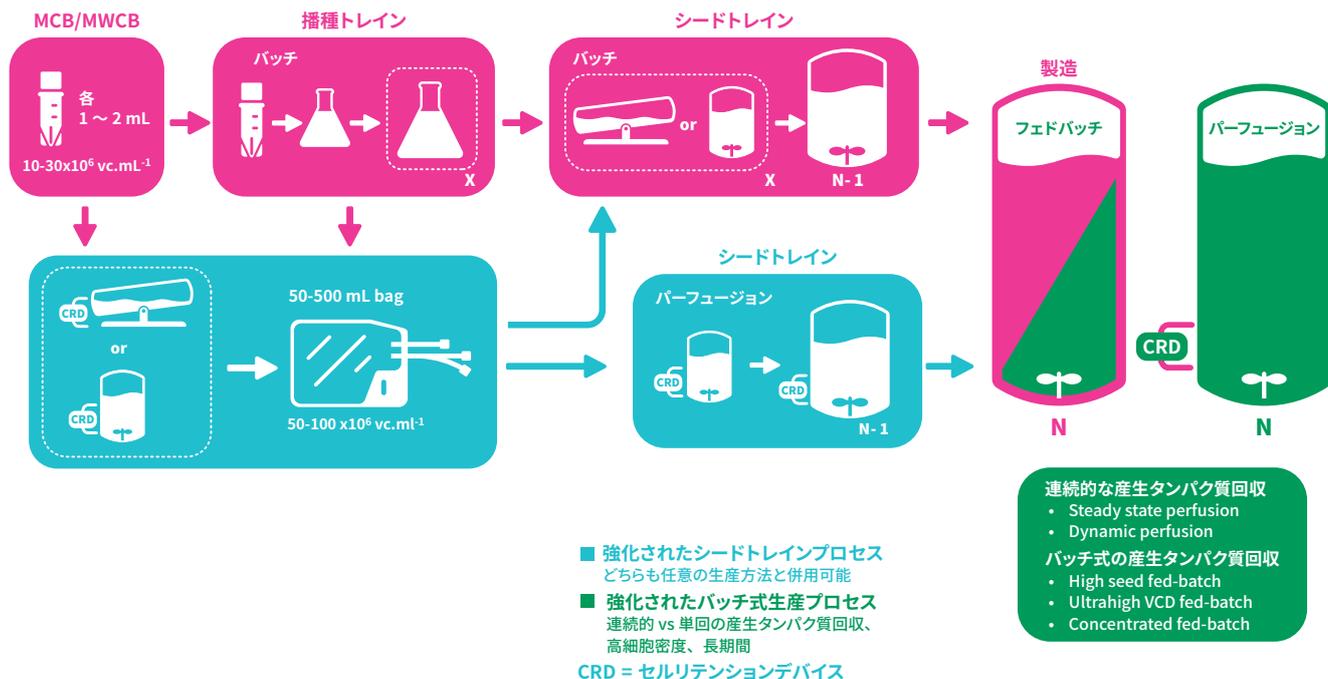


図 1. パーフュージョン培養により、生細胞密度を増大。また、シードトレインにパーフュージョン培養を取り入れることで、より高い細胞密度で製造バイオリアクターへの播種が可能。

パーフュージョンバイオリアクターでは、培地の連続交換とタンパク質の合計滞留時間の短縮により、シードトレインや製造におけるプロセス条件をより厳密に制御できます。これらの要因が組み合わされて、産生タンパク質の品質が改善されます。またパーフュージョン培養ではチャージバリエーションの発生、糖鎖付加の不均一性、タンパク質の凝集が抑えられるため、より純度の高い産生タンパク質を回収することができ、ダウンストリームプロセスの円滑化につながります。

N-1 バイオリアクターにおける細胞密度を高めることで、製造バイオリアクターに播種できる細胞数が増大し、目的のタンパク質産生レベルに到達するまでの所要時間が短縮できます(図 2)。パーフュージョン培養の N-1 バイオリアクターから複数の製造バイオリアクターへの播種が可能のため、さらなる生産性の向上と従来のボトルネックが解決できます。

製造プロセスでは、より小さい設備面積で生産能力を高めることができます。例えば、15,000 L のフェドバッチバイオリアクターと同じ

量のタンパク質を 2,000 L のパーフュージョンバイオリアクターで生産できます。他にシングルユースバイオリアクターでパーフュージョン培養を採用する利点としては、洗浄バリデーション不要、高いプラント柔軟性、高い設備稼働率などがあります。

パーフュージョン培養のさらなる利点は高い細胞密度のプロセス中間体を生成できることであり、これにより日数を短縮できます。250 mL または 500 mL の高細胞密度シングルユースバッグは、必要に応じて作製、凍結、保存し、アップストリームプロセスの播種に使用できるため、製造における柔軟性が高まります。これは、細胞増殖を1つのバイアルから融解し開始する従来の時間がかかる煩雑でリスクを伴うプロセスと比べると、非常に効率的なアプローチです。



図 2. パーフュージョン培養により、N-1 バイオリアクターの細胞密度を増大させ、製造プロセスを加速することで効率を向上。細胞密度を高めるためにパーフュージョン培養をシードトレインに導入することで、バイオリアクター数を削減でき、産生タンパク質の目標 Titer に到達する時間を短縮。

### パーフュージョン培養用培地

パーフュージョン培養用に開発された培地は、コスト低減、および容積生産性向上を実現します。<sup>4</sup> プロセス強化には、高い細胞密度 ( $\geq 50 \times 10^6$  vc/mL) を維持でき、かつ可能な限り低 CSPR (Cell specific perfusion rate) で生産性を最大化できる培地が必要です。

フェドバッチ用培地 (パーフュージョン培養に使用方法を最適化したもの) と比べて、パーフュージョン用培地は使用量を 40% 削減しながら、定常状態までの所要時間の短縮ならびに容積生産性を向上できました (図 3)。

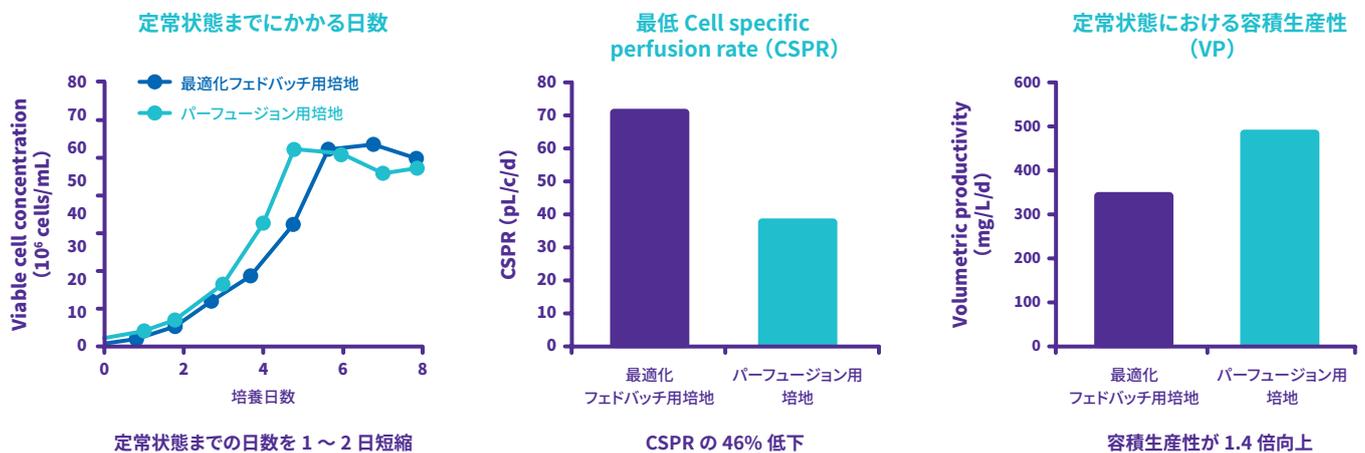


図 3. フェドバッチ用培地 (パーフュージョン培養に使用方法を最適化したもの) とパーフュージョン用培地との比較。パーフュージョン用培地は、培地使用量を 40% 以上削減しながら定常状態までの日数の短縮と 1.4 倍の容積生産性の向上をもたらした。

## 高密度での細胞凍結保存 (HCDC)

### なぜプロセス強化が必要か？

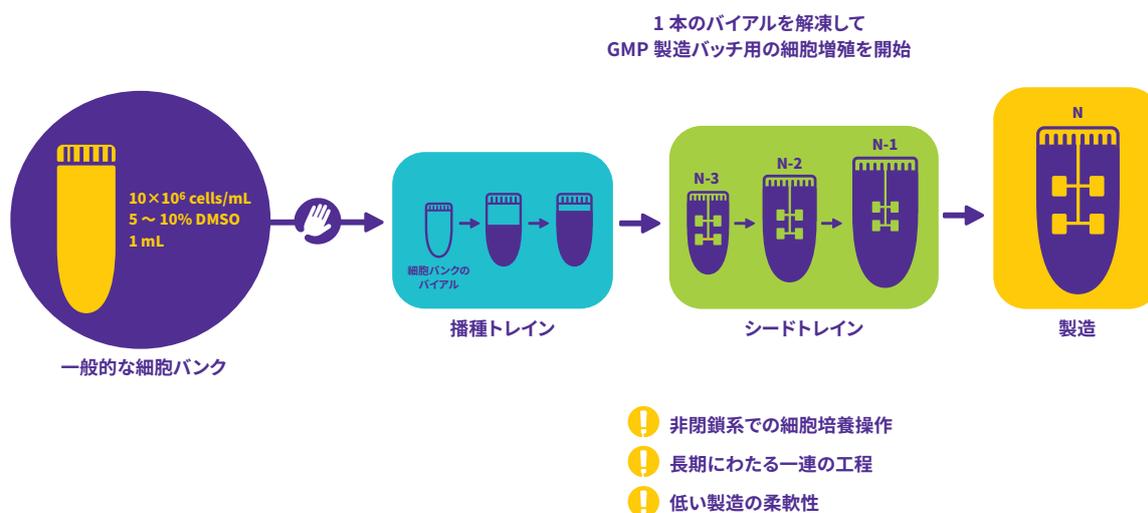


図 4. 細胞増殖を1つのバイアルから融解し開始する従来のプロセスは時間がかかる。

細胞増殖を1つのバイアルから融解し開始する従来のプロセスは、多大な時間と非閉鎖系での細胞培養操作のリスクが伴います (図 4)。

高密度で大量に保存した細胞をシードトレインの最初のバイオリアクターに用いることで、プロセス全体を効率化することが可能です。<sup>5</sup> 従来のプロセスでは通常、製造バイオリアクターの播種前の拡大培養に 20 ~ 30 日必要になります。

表 1 に示す例では、細胞密度  $50 \times 10^6$  cells/mL の 150 mL バッグを使用することで、細胞密度  $10 \times 10^6$  cells/mL の 1 mL バイアルから開始した場合と比べてプロセスを 10 日間短縮できました。これは、N-3 バイオリアクターから細胞増殖を開始することで実現しました。

	10 <sup>6</sup> cells/mL
播種時 VCD	0.5
バッチ終了時 VCD	6

	標準バイアル	バッグ
VCD [10 <sup>6</sup> cells/mL]	10	50
容量 [mL]	1	150
細胞数 [10 <sup>6</sup> cells/mL]	10	7500

バイオリアクター	容量 [L]	10 <sup>6</sup> VC を播種した場合の	
		細胞数	稼働時間 (Lag phase を除く) [日]
n (製造バイオリアクター)	15000	7500000	3.5
n-1	1250	625000	6.9
n-2	105	52083	10.4
n-3	8.7	4340	13.8
n-4	0.72	361	17.3
n-5	0.06	30	20.7
n-6	0.005	2.5	24.2

10.4 日間

表 1. 播種におけるバイアルとバッグの比較。高密度で凍結保存した細胞を使用することで、プロセス時間が大幅に短縮。

独自設計の凍結バッグにより、非閉鎖系での細胞培養操作工程が不要となり、シードトレイン拡大培養の再現性が向上します。また、細胞播種からの初期の拡大培養とバッチ製造を分離することで、中核の拡大培養施設から世界中の製造施設へ細胞を分配することが可能になります。

N-1 パーフュージョン培養のために開発された培地 (Cellvento 4CHO-X Expansion Medium) も高細胞密度凍結保存に重要です。主要要件は以下のとおりです：

- 凍結保存からパーフュージョン培地への馴化培養が不要
- 凍結および融解時の細胞へのダメージを抑制
- 融解後、最小限の Lag phase または Lag phase なしでの速やかな増殖
- 融解、増殖および製造にわたって一定の増殖速度および比生産性

## 修飾アミノ酸

フェドバッチ培養アプローチは通常、濃縮フィード培地によって栄養素の枯渇を予防して培養期間を延長し、細胞増殖、生存率、および Titer を向上させます。

培養 pH はフィード培地添加後でも安定していなければならないため、中性 pH のフィード培地が好まれます。しかし、中性 pH では L-チロシンの溶解性が極端に低く、L-システインの安定性が低いため、弱酸性のメインフィード培地を添加するプロセスとこれらの必須アミノ酸を含む別途のアルカリ性フィードを添加するプロセスが必要になります。

異なる pH の 2 種類のフィードを使用するため、フィード添加中の pH の急激な変化を最小限に抑える複雑な制御が必要となります。バイオリアクターでは、pH を連続モニタリングし、PID (Proportional-integral-derivative) 制御により、pH の急激な変化に応じて発生する CO<sub>2</sub> 拡散を抑えながら、アルカリ性フィードをゆっくりと添加します。しかし大規模製造では、フィードをいくらゆっくりと添加しても、特に気泡が残留している場合には、中性 pH の培地との接触後に沈殿が発生しやすくなってしまいます。

この問題に対処するために、当社は高溶解性ホスホチロシンナトリウム塩 (PTyr) と新しい誘導体 S-スルホシステインナトリウム塩 (SSC) を中性 pH の高濃度フィード培地で使用することにより、大規模製造における簡単なフェドバッチプロセス法を開発しました (図 5)。

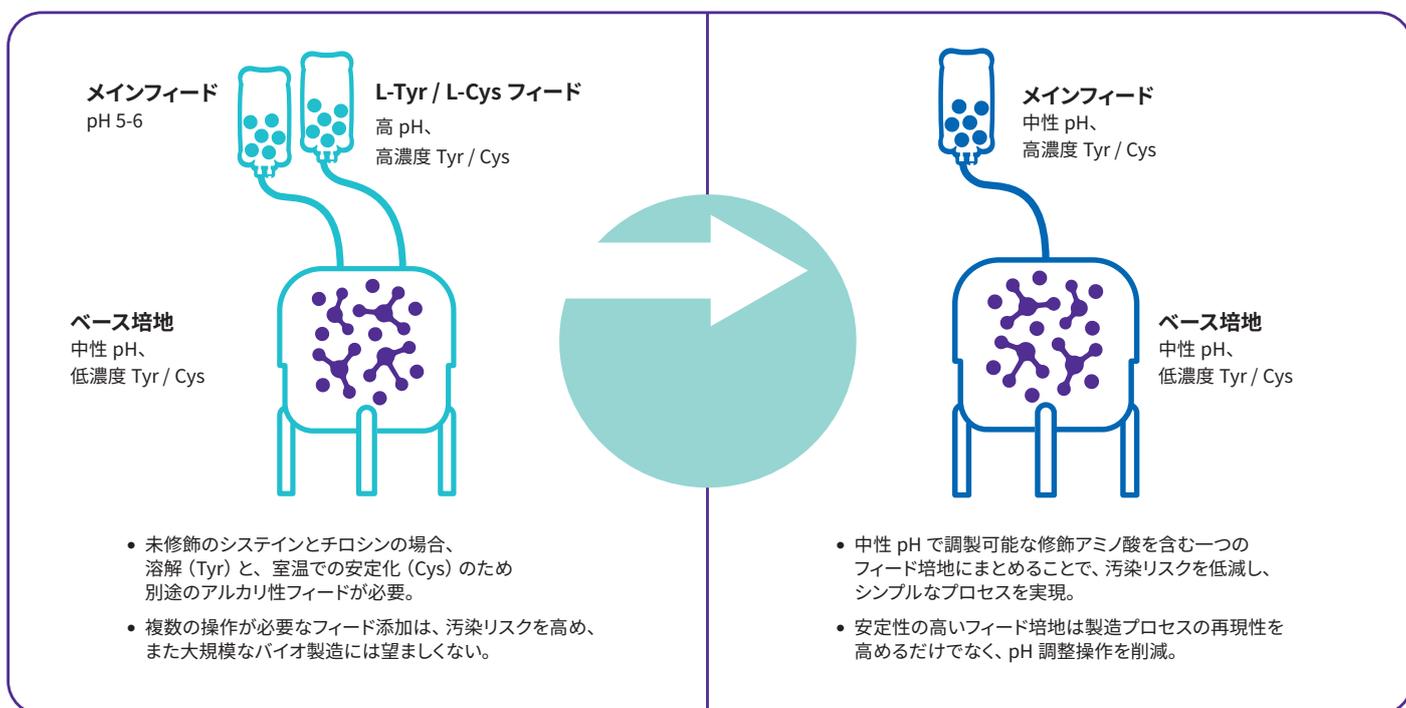


図 5. 修飾アミノ酸を含む 1 つの中性 pH メインフィード培地にまとめることによるプロセスのシンプル化。

Chemically defined の中性 pH の高濃度フィード培地と修飾アミノ酸をまとめたシングルフィードにすることで、従来、別途添加が必要だった Cys/Tyr 含有アルカリ性フィードに代わる方法となります。

このアプローチの利点は、既存の戦略に取り入れて大規模製造のフェドバッチプロセスを簡略化し、全体的なプロセスを改善できる点です (図 6)。

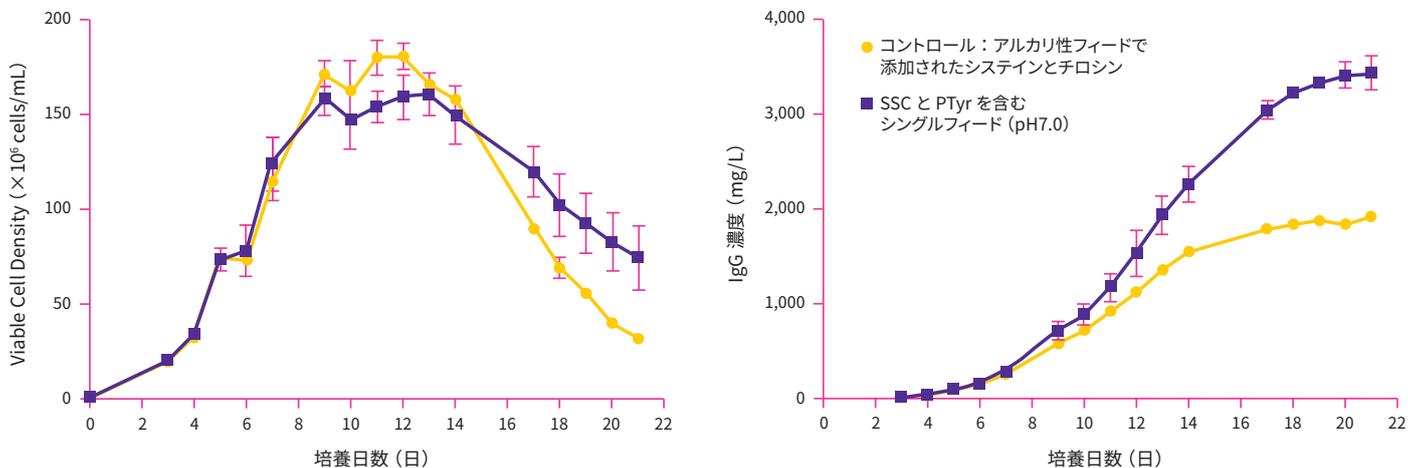


図 6. PTyr と SSC を含むシングルフィードを用いた場合と別途のシステイン／チロシン含有アルカリ性フィード (pH 11) を用いた場合の培養日数と Titer の比較。データは平均値± SEM で表示 (各条件での再現数 n=4)。

### 細胞培養培地のコンパクション技術

乾燥粉末培地の使用には、以下のような課題があります：

- 低い溶解性／長い溶解時間
- 粉塵の発生と作業員への曝露
- 不正確な計量、調製を困難にする固化
- 膨大な保管スペースと取扱いを困難にする低いかさ密度

乾燥粉末培地のコンパクションは、溶解性を改善し、安全かつ容易な取り扱いを可能にします (図 7)。

当社のコンパクション技術では、水分や添加物をまったく使用せずに均一な乾燥粉末培地に圧縮力を印加することで、均一性を保ったまま数ミリサイズの顆粒にします。

このプロセスでは培地のアミノ酸やビタミンの組成が変化することなく、溶解後の培地やフィードの物理化学的パラメーターに影響を与えないため、細胞の成長と増殖を支える培地としての働きが保たれます。

縦線は、目視ですべての粒子が溶解した時点を表示

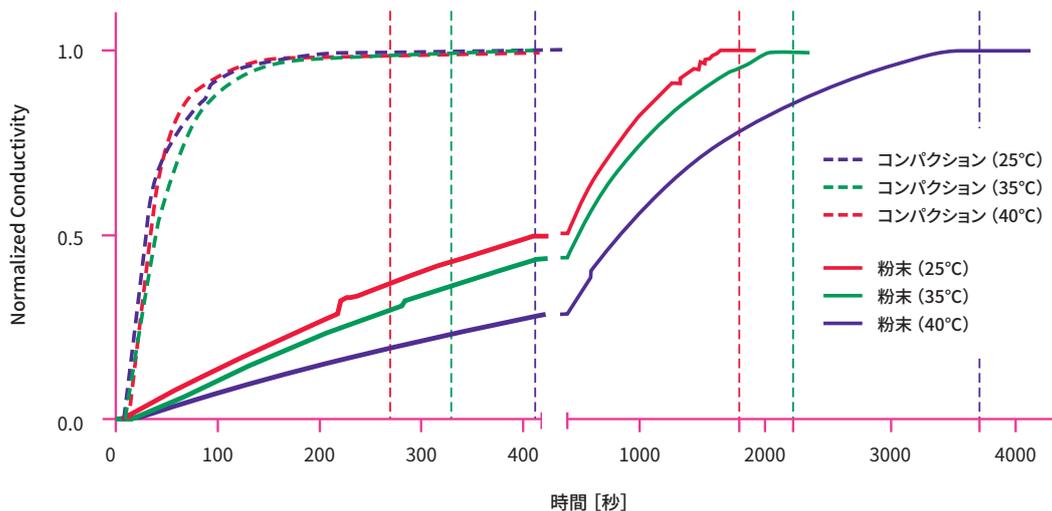


図 7. Cellvento® 4Feed のコンパクションと粉末との溶解動態の比較。40°Cで粉末を溶解するには、25°Cでコンパクションを溶解する時間の 4.4 倍かかった。

速やかな溶解の他にも、コンパクト細胞培養培地の利点には以下のようなものがあります：

- 粉塵の発生が最小限に抑えられるため、取り扱いやすくなり、作業員の安全性を確保
- 固化を抑制するため流動性が改善
- 計量や混合における取り扱いの簡便化
- かさ容積減少による保管スペースの節約

当社のコンパクト培地をユーザーが評価した結果を図8に示します。一般に、1×培地の調製には11時間かかり、これには乾燥粉末培地溶解にかかる5～7時間と滅菌グレードろ過やウイルスろ過にかかる時間が含まれます。合計150kgのコンパクト培地を2,500Lの水に溶解するのにかかった時間は50分未満で、これは85～90%の時間短縮になります。

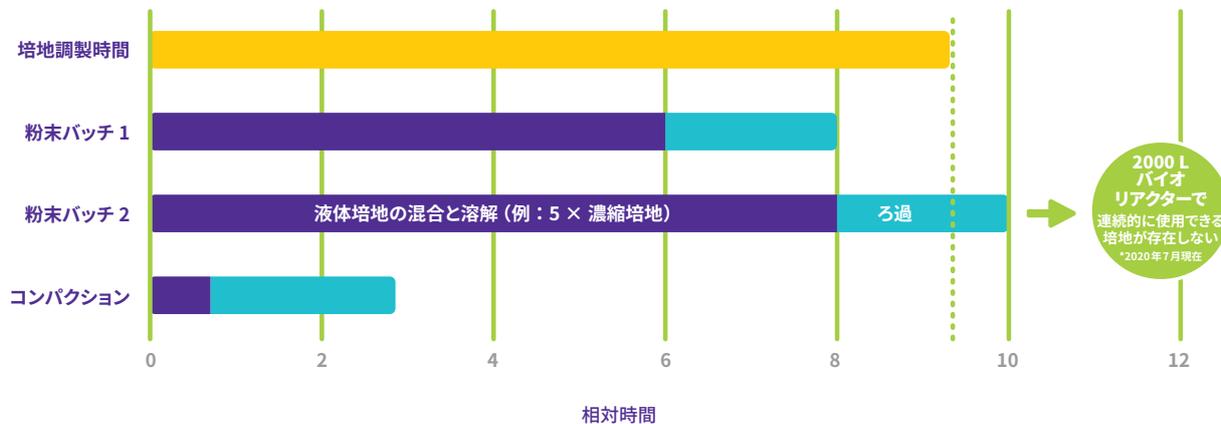


図8. コンパクト培地を使用することで大幅な時間短縮を達成。

### 濃縮バッファーと濃縮培地

5 g/L で稼働する2,000L バイオリアクターでは、ダウンストリームで10,000Lを超えるバッファーが必要であると概算されます。このような大量のバッファーを作製、保管、分配するのに必要な時間とスペースは膨大なものとなるため、濃縮バッファーはプロセスの効率化、設備フットプリントの縮小、生産ライン切り替えの高い柔軟性をもたらします。

現在、濃縮バッファーの希釈方法には、インライン・コンディショニングとインライン希釈があります。

インライン・コンディショニングでは、少なくとも1つの酸、1つの塩基、1つの塩の濃縮溶液が含まれる一連の原液を使用して必要なダウンストリームバッファーのほとんどが調製されます(図9)。これらの原液とWFIとを異なる量と組み合わせで混合し、pHと導電率を調整することで、すべてではないにしてもほとんどのダウンストリームバッファーを調製することができます。

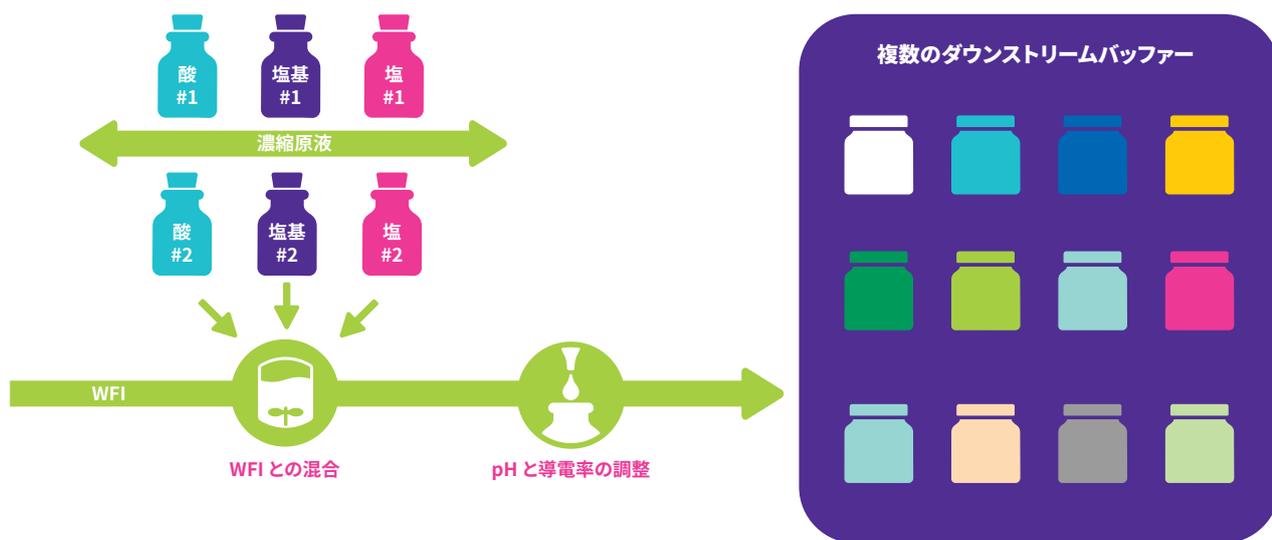


図9. 多成分バッファーのインライン・コンディショニング

インライン希釈では、各最終バッファーの濃縮液が作製されます（図 10）。随時、各濃縮液が希釈され、必要に応じて pH と導電率が微調整されます。このアプローチでは、比較的簡単かつシンプルに濃縮液の使用を開始することができるかもしれません。しかしながら、必要なダウンストリームバッファーすべてに対応するには、少なくとも 12 種類の出発濃縮液が必要になるため、6 ~ 7 種類の濃縮原液を使用するインライン・コンディショニングの場合と比べて大きな保管スペースが必要となります。

細胞培養培地の濃縮液を使うことでも作業スペースを削減できます。濃縮レベルは、バッファーでは 30 × にもなる可能性があるのに対して、培地では 3 ~ 4 × であることがより一般的です。このように培地の濃縮レベルが低いのは一部の培地成分の複雑さと安定性が原因です。ただし 4 × 濃縮であっても、特にバイオリクターがパーフュージョンモードで稼働している場合には、かなりのスペースとリソースを節約することができます。60 日間にわたり 1 日当たり 2 倍の容量の培地を使用する 2000 L のバイオリクターは、25 万 L 近くの培地を消費することになります。4 倍濃縮培地は 7 万 L に相当し、これはスペースとリソースを大幅に縮小できる量です。

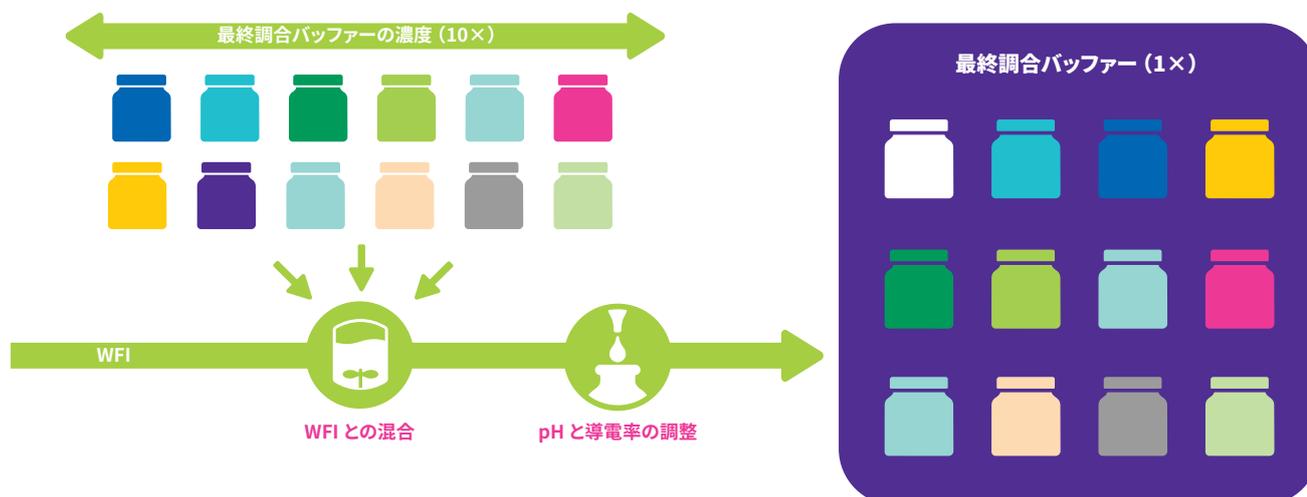


図 10. 多成分バッファーのインライン希釈。

## 結論

バイオ医薬品業界は、持続的な成長と革新に欠かせない生産性促進、即応性向上、コスト削減という 3 つすべての目標を実現するために次世代アプローチを利用しています。

これらのアプローチの 1 つに、mAb の生産性向上、製造フットプリントの縮小、施設稼働率の改善、スケジュールの加速化を可能にするアップストリームプロセスの強化があります。パーフュージョン培養を使用することで高品質の産生タンパク質が得られ、ダウンストリームプロセスの円滑化に繋がりますが、ワークフロー全体にも同様の新しい技術が適用されていないと、アップストリームの強化とそこから得られる高い産生タンパク質 Titer によりダウンストリームのボトルネックが発生してしまいます。

この問題に対処するため、濃縮バッファー、シングルパス・タンジェンシャルフロー・フィルトレーション (SPTFF)、フロースルーポリッシュの使用といったダウンストリーム強化技術が採用されています。

## References

- [https://www.researchandmarkets.com/research/mmpjv5/global\\_131\\_33?w=4](https://www.researchandmarkets.com/research/mmpjv5/global_131_33?w=4)
- <https://www.kaloramainformation.com/about/release.asp?id=4307>
- Bausch, M., Schultheiss, C. and Sieck, J.B., 2018. Recommendations for Comparison of Productivity Between Fed-Batch and Perfusion Processes. *Biotechnology journal*, p.1700721
- Sieck, J.B. Schild, C. and von Hagen, J., 2017. Perfusion Formats and Their Specific Medium Requirements. *Continuous Biomanufacturing: Innovative Technologies and Methods*
- [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General\\_Information/1/medicine-maker-freezing-down-time-in-bioprocessing.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/medicine-maker-freezing-down-time-in-bioprocessing.pdf)

Facebookもチェック

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ



本紙記載の製品構成は諸船の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2020 年 8 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, millipore and SAFC are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK\_WP3673EN Ver. 1.0

## メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.jp](http://www.merckmillipore.jp)

製品・技術に関するお問合せ: PStechservice\_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ: PScommercialservice\_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143

