

番 号: Selexis_2014_June_BioPrc. Int.

分 野: Case study; Selexis 社と後工程特化の会社とのバイオシミラー医薬の共同開発

添付8

題名	Rapid Development and Scale-Up through Strategic Partnership
雑誌	BioProcess International 12(6)s June 2014
著者	Kumar Dhanasekharan* Claudia Berdugo-Davis* Xiaoming Liu* Carl Richey* Zaneer Segu* Victor Vinci* David Calabrese**, Valerie LeFourn**, and Pierre-Alain Girod**
組織 機関	* are with Cook Pharmica LLC, 1300 South Patterson Drive, Bloomington, IN, 47402. David ** are with Selexis SA, 18 chemin des Aulx, 1228 Plan-les-Ouates, Switzerland.

【全文訳】

過去 10 年にわたり、抗体ベースの治療薬は、自己免疫疾患からがんまで広範な生命を脅かす疾病に対して主流の座を占めるようになってきた。この抗体に対する市場の成熟度の一端として、製薬会社が新しい分子を市場投入するにかかる時間とコストへの締め付けが増大している。(1, 2)。これに加え、製薬企業は、新しい分子の開発を次の段階に進める前に開発可能性や易製造性などの検討を、そのような候補化合物探索の一環として通常業務として行っている。それゆえ、細胞株開発と初期探索および工程開発に対して統合的なアプローチを採用するのは必須要件となっている。これにより初めて企業は、治療薬候補物質を前臨床、臨床試験に進めるべきか否かにつき、時機に合った適切な判断を下すことが出来る。

Cook Pharmica LLC と Selexis SA は、お互いの強みを統合しこのような業界ニーズを満たすべく提携関係を結んだ: Selexis 社における安定的導入細胞株の創出と高性能細胞株の樹立から、Cook Pharmica における迅速な工程開発、スケールアップ、細胞培養生産、後工程の開発、そして包装した無菌製剤最終製品の製造まで、この提携により顧客のための全体スケジュールの短縮化が図れた。目標は、抗体治療薬を臨床での研究用に、そして最終的には販売のため医療機関に速やかに提供することである。ここで概要報告する大変な労力のいる POC プログラムにおいて、両者は、市販されている一つの抗体医薬バイオシミラーの開発、技術移転、スケールアップを成功裡に遂行した。Selexis 社は高性能 SURE CHO-M 細胞株を樹立し、それを用い Cook 社はインディアナ州ブルーミントンの最新の生物製剤用 cGMP 施設において迅速なスケールアップのための工程開発を行った。この計画から得られたデータによると、製造試作抗体が先発メーカ品との同等性を示し、開発した製造工程は商用生産に必要な力価、2-4g/L の生産性を達成した。

工程の共同開発

開発プラットフォームは、最初に目的たんぱく質、このケースでは trastuzumab を発現する CHO 高産株の開発から始まった。バイオ医薬開発の最重要工程は適切な生産株を得るための、細胞改変工程、細胞の選別探索、そして最終的選択であり、細胞生産性、細胞株安定性そして最終産物の品質を確認しながら遂行する。我々は、cGMP 適合宿主細胞株を ATCC 由来の CHO-K1 株を、合成培地 (Irvine Scientific, BalanCD Growth A) に順応させることから始めた。

ほとんどの細胞において遺伝子の80%以上が転写停止あるいは核内の蜜に詰め込まれたクロマチン構造により遺伝子抑制を受けている。そこで、組換えたんぱく質発現の主な挑戦は、組換え遺伝子を転写に対して許容性のあるクロマチン領域に首尾よく組み込むこととエピゲネティックな遺伝子抑制を阻止することにある。Selexis Genetic Elements (SGEs) エLEMENTは、哺乳動物細胞クロマチンの動的な組織化を調節し、組換えたんぱく質の高い生産性と安定発現性を担保する。SGEsは周辺

添付8

クロマチン領域の遺伝子抑制効果から導入遺伝子を隔離するインシュレータとして機能し、コピー数依存で、位置には依存しない発現を実現している。SGEsを使い、我々は転写レベルを最大に維持できた。DNAの導入は導入効率を高めるため電気穿孔法を用いた。

我々は、IgG力価を評価基準にクローンのスクリーニングを行ない、振とうフラスコに移行、そしてさらに流加培養法でスケールアップした評価基準クリアの10クローンを得た。これらのクローンの組み込まれた導入遺伝子の構成をqPCRで分析し、最終的に1クローンを選別し更なる工程開発に供した。

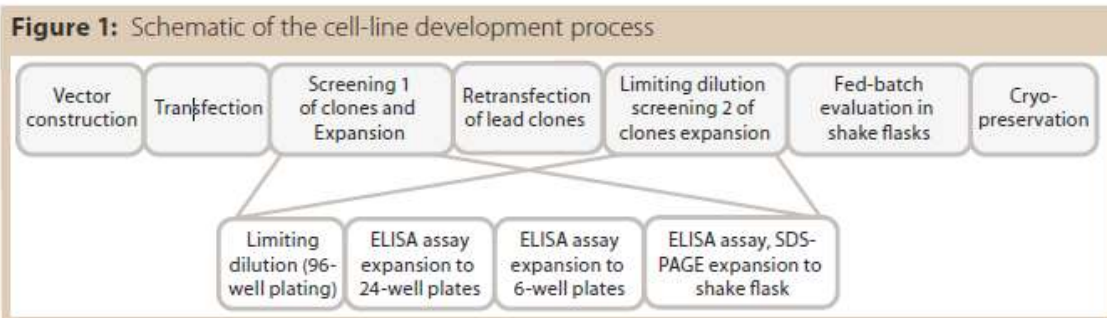
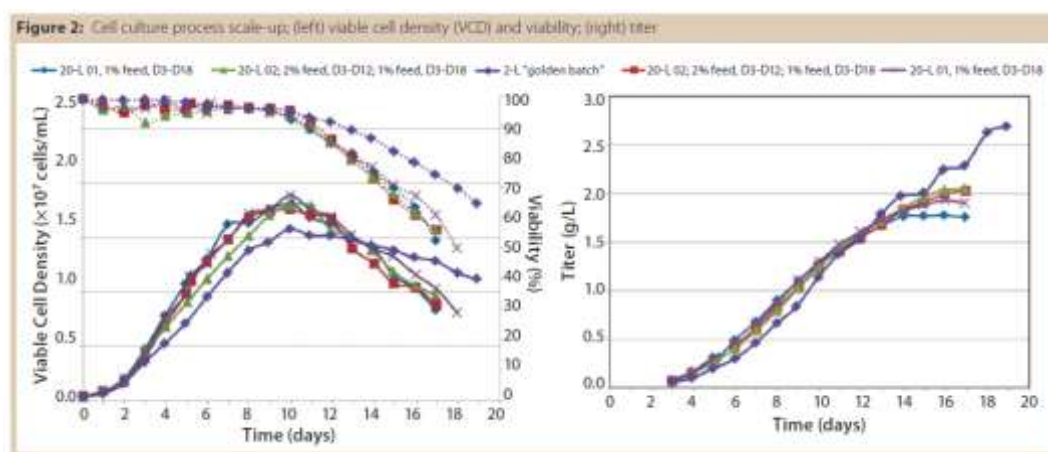


図1に細胞株開発過程を図式化した。工程開発の手始めに、基本培地のスクリーニングを、異なる栄養素補給培地と市販基本培地の広範な組み合わせを評価することにより行った。培地のタイプを14の振とうフラスコ試験で評価した。作業容量は基本培地および補給培地ともに100mL用い、全補給量、補給期間および温度シフトなどを検討した。次に、2L規模のバイオリアクター試験をニセット実施し、温度シフト、pH、グルコース濃度などの工程パラメータの取得を行った。後に2L培養をスケールアップして、規模拡大性を評価するためステンレス製Sartorius Biotech BB30を用いた20Lバイオリアクターでの培養を行なった。20Lの培養工程は、その代謝プロフィールは2L培養と匹敵したが、力価は2g/Lで頭打ちとなり、一方2L培養工程では、細胞生存率は徐々に減少するが抗体力価は上昇を続け2.5g/Lに至った(図2)。



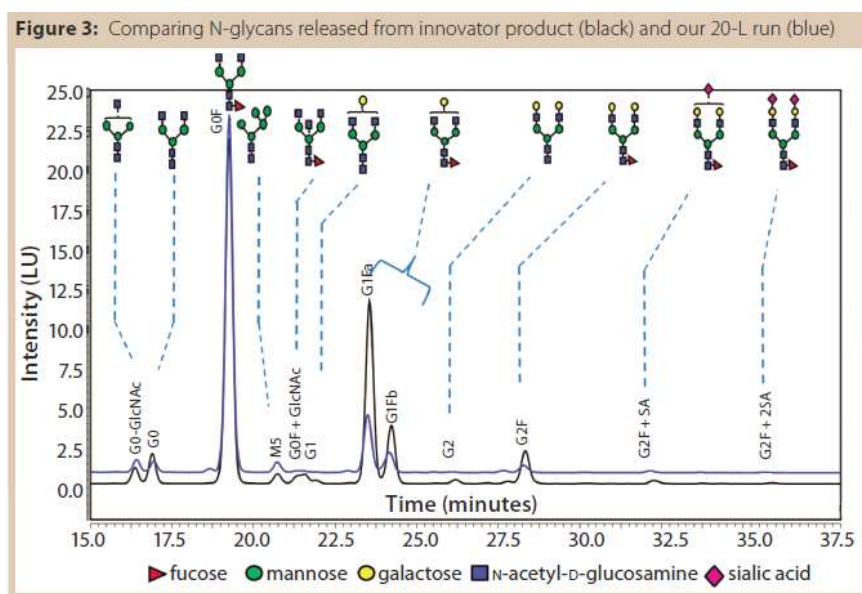
次に、3種類のカラムクロマトグラフィーを連続的に行う精製工程を開発した。最初にプロテインAのアフィニティークロマト法による捕捉精製、陽イオン交換クロマトグラフィーでの結合-溶出モードを経て、最後に、陰イオン交換クロマトグラフィーflow-throughモードの精製スキームである。各段階の精製度の評価には、N-glycan分析による糖鎖修飾の同等性と品質確認、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)とキャピラリー等電点電気泳動法(cIEF)を用い分子量および電荷に関する変異体プロフィール

添付8

の確認を行った。3種カラムによる精製後の抗体精製度は99.8%に達し、宿主細胞由来たんぱく質(HCPs)は0.05ng/mg以下となった。全工程での抗体収率は77%であった。

この分子はバイオシミラーに範疇に属するため、糖鎖修飾は quality-by-design (クオリティバイデザインQbD) の枠組みのなかで重要品質特性(critical quality attribute; CQA) の一つとなる。

図3は先発メーカ品(黒)と我々の20L工程試作品のN-glycanの比較を示している。先発品に存在する糖鎖は本研究で得た我々の試作品にも存在した。特に、相対的脱フコース化レベルが双方のサンプルで高度な同等性を示した。脱フコース化は、エフェクター細胞のFc γ 受容体と抗体Fcの結合において重要であり、従ってADCC活性発現を左右するため、抗体の重要なCQA項目となっている。



良好な提携関係

要約すると、9か月間にわたる初期段階の抗体開発を促進した成功事例として、製造工程開発とスケールアップをまとめたひとつの統合的細胞株開発を例示した。このアプローチは、科学的、系統的な実験デザイン手法と矛盾しないが、しかし、むしろ品質要求項目と工程スケールアップの必要項目に見合うように目標を絞った一連の試験を主体としている。Selexis SA と Cook Pharmica LLC は共同で、このアプローチの有効性を、市販抗体をモデル分子として、2Lの実験室レベルの培養から、さらに臨床用GMPでの製造工程へのスケールアップの基礎となる20Lのパイロットスケール工程までの試験で実証した。投稿中論文(3)に詳述しているが、得られたデータは、この価値提案(value proposition)が、最小限の開発で商用生産に必要な力価を生み出すひとつの技術プラットフォームを通じて、高度発現のクローン性安定細胞株の移転とスケールアップのための信頼性のある作業過程を創出することを裏付けるものであった。このような協力関係が将来的には、新規な治療法を患者に速やかかつ安全に届けるに当って、重要な役割を演じるであろう。

References

- 1 Ross JS, et al. Targeted Therapies for Cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 2004: 598– 609.
- 2 Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody Therapy of Cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 12, April 2012: 278–287.
- 3 Dhanasekharan K, et al. Rapid Development and Scale-Up of a Therapeutic Antibody: A Case

番 号: Selexis_2014_June_BioPrc. Int.

分 野: Case study; Selexis 社と後工程特化の会社とのバイオシミラー医薬の共同開発

添付8

Study of Integrated Cell- Line Development with Early Stage Process Development for Biosimilar Trastuzumab *BioProcess Int.* 12, 2014: in review..