

CHO細胞培養プロセスに対する理解を高めるための加水分解物の特性評価

イントロダクション

タンパク質加水分解物が、細胞培養における細胞増殖やタンパク質産生を大幅に向上させることが確認されています。そのためバイオ医薬品の製造では、完全培地またはフェドバッチバイオリアクターシステムの一部として加水分解物を加えることは一般的です。しかしながら、加水分解物は本質的に組成不明で変動しやすい成分を含み、有益な効果をもたらすにもかかわらず、この性質が高度に制御された医薬品製造プロセスにとって望ましくないものとなります。それでもなお、titer を高く維持するために、この問題を許容せざるを得ない場合もよくあります。このホワイトペーパーでは、加水分解物を、4種類の加水分解物の成分を含むChemically definedの代替製品に置き換えることによって、加水分解物を使用した際の潜在的なリスクを軽減することに成功したSAFC Biosciences®の取り組みについて説明します。EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusionは、多くのチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞システムにおいて期待されるパフォーマンスを達成し、時にはそれを上回る効果を示しています。

加水分解物に対する現在の見解

タンパク質加水分解物は、多くの細胞培養培地添加剤およびバイオリアクターフィードサプリメントに不可欠な成分として、さまざまな機能を果たしています。主に加水分解物は、遊離アミノ酸や小さなペプチドの形で栄養源としての役割を果たしています。しばしば混入が見られる炭水化物やビタミンなどの成分も確実にプラスの影響を与えています。しかし、栄養強化にとどまらない他の利点も報告されています。Schlaegerらは、肉の加水分解物であるPrimateone RLには抗アポトーシス効果があると報告しており¹、一方Franeckらは、加水分解物中のペプチドが成長因子および生存因子を模倣できると示唆しています²。

細胞培養業界は加水分解物市場全体から見ればほんの小さなプレーヤーでしかないため、バイオ医薬品製造エンドユーザーから寄せられる加水分解物製品の一貫性を求める声は原料メーカーに聞き届けられていません。加水分解物の製造プロセスは明確に定義されておらず、バッチごとに大幅な差異がある可能性があります。また、タンパク質の原料は保管温度や採取時期などの影響を受けやすく、これがさらに問題を複雑にしています。このような要因のすべてが加水分解物のロット間のばらつきとして現れ、時間の経

過とともに製造と製品の品質に変化をもたらす可能性があります。

「加水分解物には文字通り何千もの成分が含まれており、分析調査が開始される前に大幅に簡素化する必要があります。」

課題

歴史的に加水分解物は、生産パフォーマンスの目標を維持しつつ動物由来成分を含まないシステムに移行しようとするバイオ医薬品企業のために橋渡し役を務めました。今日では、より厳しい規制要求や経済的理由により、完璧なプロセスおよび原材料の特性評価を必要とする、クオリティ・バイ・デザインおよびオペレーショナル・エクセレンスが主要なトレンドとなっています。多くの企業にとっての課題は、加水分解物がプラットフォームのプロセスに定着しており、細胞株およびアプリケーションといった製造に必要とされる独自のパフォーマンス機能が、加水分解物に依存していることです。バイオ医薬品企業が、パフォーマンスおよび品質目標も維持しつつ今後の規制およびオペレーションに対する要求を満たすためには、加水分解物に特有の成分を適切に特定し、置換するための解決策を講じる必要があります。

トレンド

- 1) クオリティ・バイ・デザイン
- 2) オペレーショナル・エクセレンス

バイオ医薬品企業にとって、主要化合物を特定することがパフォーマンスの目標を満たしつつプロセスを定義するための解決策になる場合、主に2つの課題を克服する必要があります。

何よりもまず、加水分解物の複雑性に対処する必要があります。加水分解物には文字通り何千もの成分が含まれており、分析調査が開始される前に大幅に簡素化する必要があります。次に、重要な因子を分離するための高感度細胞培養アッセイシステムを構築する必要があります。いくつかのグループがさまざまな分画法を用いて「活性」分画を分離することに成功したと報告していますが、個々の成分レベルではほとんど分離できません。SAFC Biosciences は、精緻な分析技術と組み合わせた高感度アッセイシステムを確立し、タンパク質加水分解物の機能に対する理解を深め、あらゆる課題を克服しました。

特性評価の課題：

- 1) 加水分解物の複雑性
- 2) 高感度細胞アッセイシステム

弊社のアプローチ

高感度細胞培養アッセイシステムは、加水分解物の謎を解明するためのキーファクターです。今回使用されたシステムでは、加水分解物に対して有意な応答を示した rIgG 抗体産生 CHO クローンに基づいています。細胞を CD 培地で増殖させた後、加水分解物、分画、化合物のスクリーニングのためにシンプルなフェドバックプロトコルが用いられました。既知の栄養成分への偏りを可能な限り除外するため、「ベース」サプリメントが開発されました。このサプリメントは、標準的な分析技術によって加水分解物に含まれていることが容易に同定可能な化合物（アミノ酸、ビタミン、塩等）を中心に設計されており、既知の化合物の影響を最小限に抑えることで未知の化合物の発見を容易にします。



加水分解物の複雑性を軽減するために逆相 HPLC 法を用いて、選択したロット（大豆、小麦グルテン、酵母エキス、動物組織）を分画しました。例として、小麦グルテン加水分解物から得られた 2 本の重なった UV トレース（280 nm）を次に示します。このデータは本システムの再現性を示すと同時に、この加水分解物の複雑性も垣間見せています。

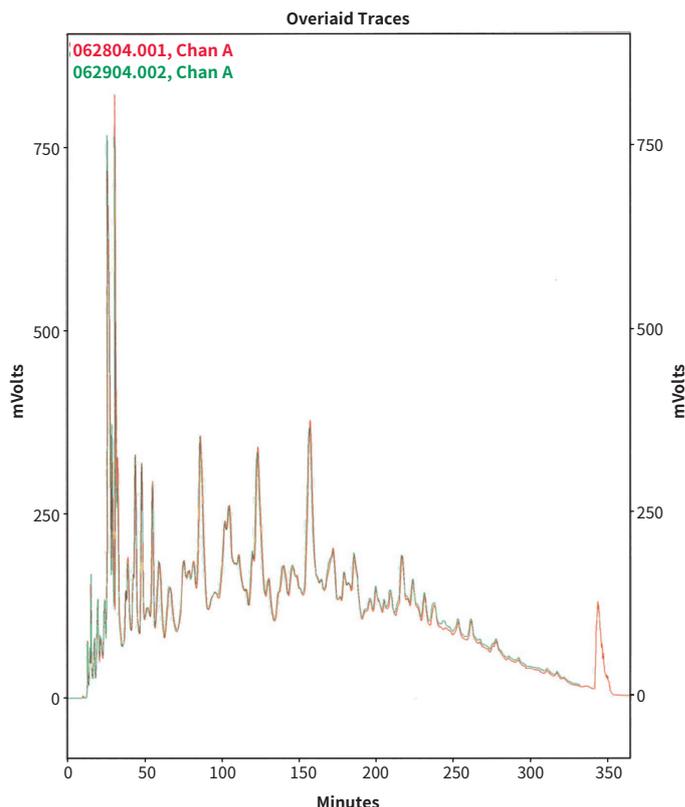


図 1. 逆相 HPLC クロマトグラム

小麦グルテン加水分解物の分画における 2 本の 280 nm トレース（赤および緑）が示されました。

330 分間にわたる分析は 5 分間ごとに区分され、その後凍結乾燥されて溶媒が除去されました。「ベース」サプリメントと組み合わせた細胞培養スクリーニングにより、細胞増殖および生産性、またはどちらか一方に対するプラスの応答を示した分画を同定しました。酵母エキスから抽出された 4 つの「陽性」分画の例を以下に示します。2 つの分画は細胞増殖に有意な改善をもたらし、4 つの分画すべてが IgG 抗体の産生を促しました（データは「ベース」サプリメントで正規化されています）。

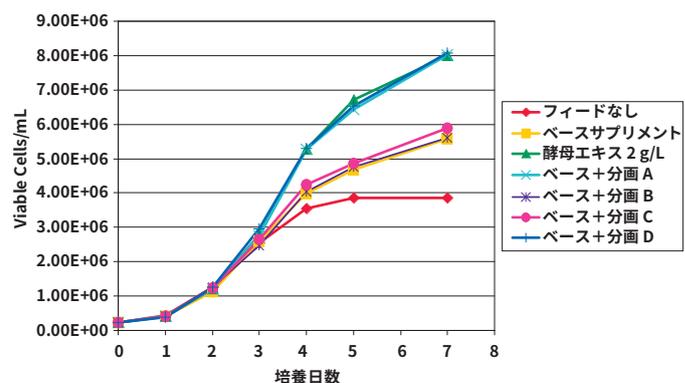


図 2. 分画スクリーニングの細胞増殖曲線

栄養剤である「ベース」サプリメントに加えて CHO-IgG1 細胞株に添加した際、(66 個中) 2 つの分画が細胞増殖に改善を示しました（分画 A および D）。

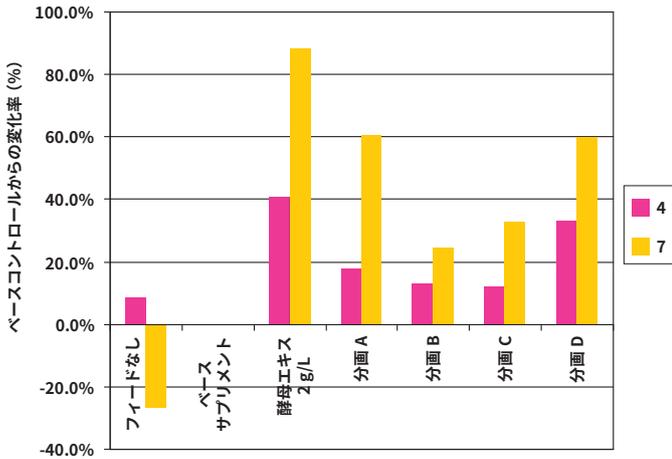


図 3. 分画スクリーニングによる標準化された IgG 抗体生産性

栄養剤である「ベース」サプリメントに加えて CHO-IgG1 細胞株に添加した際、(66 個中) 4 つの分画が IgG 抗体生産性に改善を示しました。データは「ベース」サプリメントで標準化されています。



写真 1. SAFC Biosciences の親会社 Sigma-Aldrich の分析ラボ

活性分画を同定、分析し、含有化合物を同定しました。この作業は、分画にまだ含まれている多くの成分をさらに分離するために開発された直交分離技術が基盤となっています（データおよび方法は示されていません）。質量分析ツールを同定に用いました。成分を同定し、合成物を作成して、前ページで使用されたフェドバック法でスクリーニングしました。結果を右に示します。同定された化合物は、細胞増殖および抗体生産性の両方を大幅に改善しました。

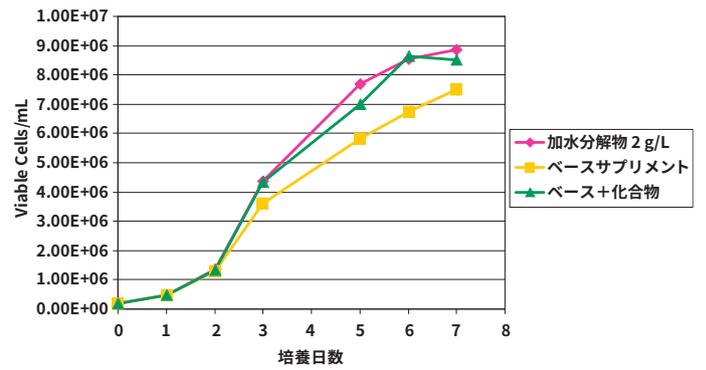


図 4. 化合物スクリーニングの細胞増殖曲線

この例では、添加剤である「ベース」サプリメントに加えて、CHO-IgG1 細胞株に添加した際、加水分解物分画から同定された 1 つの化合物が、細胞増殖に改善を示しました。

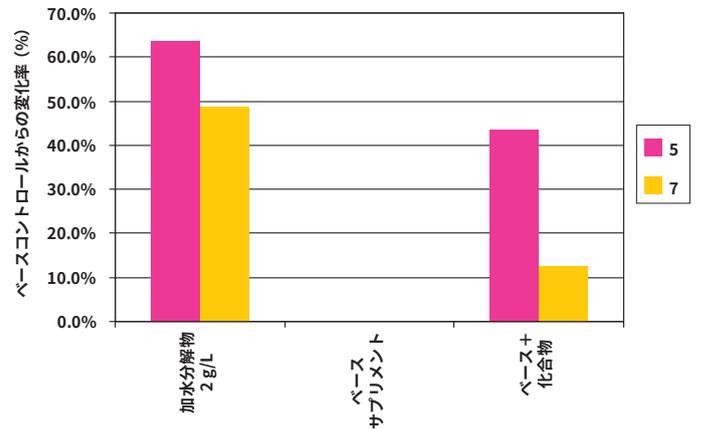


図 5. 化合物スクリーニングによる標準化された IgG 抗体生産性

この例では、添加剤である「ベース」サプリメントに加えて、CHO-IgG1 細胞株に添加した際、加水分解物分画から同定された 1 つの化合物が、IgG 抗体生産性に改善を示しました。データは「ベース」サプリメントで標準化されています。

新たな化合物が同定されると、それらを複数の CHO 細胞株でテストし、「ベース」サプリメントに対する濃度の条件検討を行いました。プロジェクトの過程で加水分解物の作用に関する知見が得られる度に、このサプリメントに改善が施されました。このプロセスは、最終製品の目標が達成され、加水分解物と同等の性能を有する製品が開発されるまで継続されました。

解決策

S AFC Biosciences は、現在バイオ医薬品企業が加水分解物を使用することによって実現している生産性および品質を再現する理想的な方法は、加水分解物に含まれる成分の特性評価を行い、特定することであると判断しました。その結果開発された EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、動物由来成分不含で Chemically defined の組成となっており、成分不明の加水分解物の代替品として CHO バイオ医薬品の製造プロセスで使用することができます。液体製品（カタログ番号 14700C）は、添加後の pH と浸透圧への影響を最小限に抑えるように設計された 20 倍濃縮サプリメントです。培地調製の柔軟性を高めるために、易溶性の乾燥粉末製品（カタログ番号 24700C）もご提供しています。この製品は、従来の加水分解物粉末と同様、濃縮フィードサプリメントの調製や、培地の調製中に直接添加することで使用できます。EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、1 倍程度の濃度で使用するように設計されていますが、最適な濃度を見つけるための条件検討をお勧めします。EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を加水分解物の代わりに使用した際の CHO 細胞のバッチおよびフェドバッチ培養試験の結果を以下に示します。最初の試験では、加水分解物を使用したバッチ培養培地での結果を詳しく説明します。

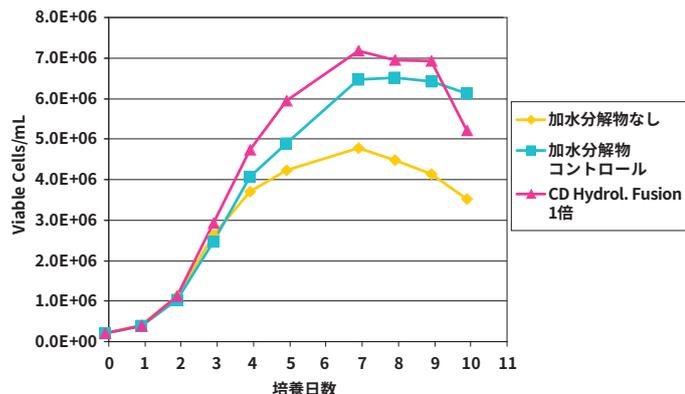


図 6. バッチ培養培地を使用した際の細胞増殖曲線

CHO-IgG1 細胞株を用いたこの例では、加水分解物の添加を必要とする培地に、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を加えることで CD 培地を調製しました。この培地の使用により、細胞増殖が若干増加しました。

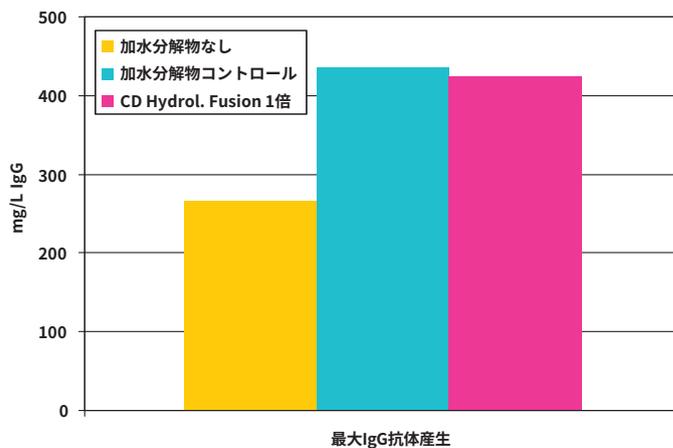


図 7. バッチ培養での最大 IgG 抗体産生量

CHO-IgG1 細胞株を用いたこの例では、加水分解物の添加を必要とする培地に、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を加えることで CD 培地を調製しました。IgG 抗体の生産性は、組成不明の加水分解物コントロールと実質的に同等でした。

次に、異なる CHO クローンを使用したフェドバッチ培養試験の結果を示します。

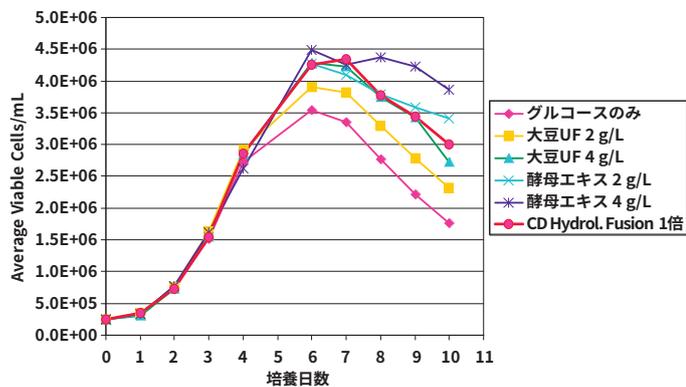


図 8. フェドバッチ培養での細胞増殖曲線

EX-CELL™ CD CHO Fusion (カタログ番号 14365C) を用いて、CHO-IgG2 細胞のフェドバッチ試験を実施しました。CD Hydrolysate Fusion での最大細胞密度は、加水分解物コントロールと非常に近似しています。

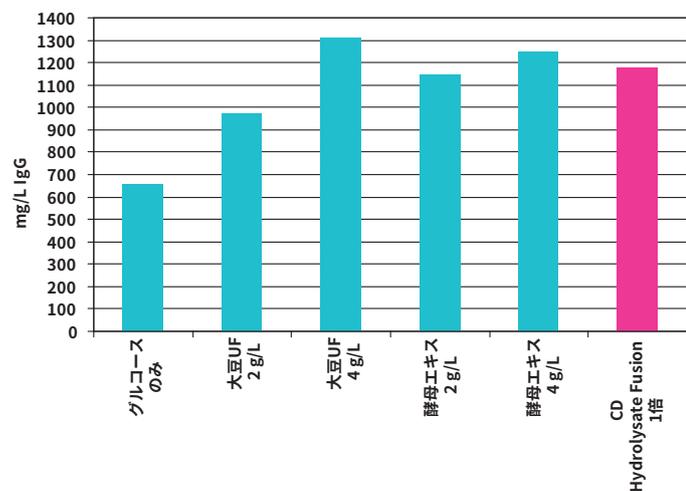


図 9. フェドバッチを使用した際の最大 IgG 抗体産生

EX-CELL™ CD CHO Fusion (カタログ番号 14365C) を用いて、CHO-IgG2 細胞のフェドバッチ試験を実施しました。CD Hydrolysate Fusion の条件下における最大 IgG 抗体生産性は、2 g/L の加水分解物コントロールよりも高く、4 g/L 加水分解物コントロールの 10%以内でした。

いずれの場合も、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を使用した際のパフォーマンスは加水分解物コントロールと非常に近似していました。

産生タンパク質の品質も、バイオ医薬品の製造プロセスにおける主要な関心事です。以下のデータは、組成不明の加水分解物を添加したシステムでの産生タンパク質の品質が、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を用いた Chemically defined のシステムの場合と著しい差がないことを示しています。

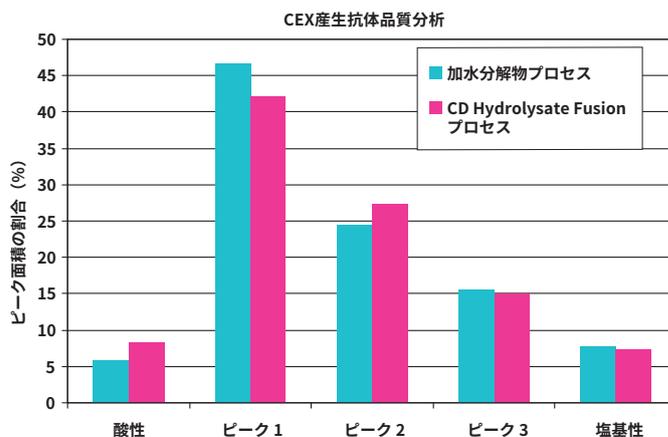


図 12. CHO-IgG1 細胞の IgG 抗体産生による品質分析

CEX-HPLC 法を使用して、加水分解物を使用するプロセスで産生された IgG 抗体と CD Hydrolysate Fusion を使用するプロセスで産生された IgG 抗体を比較し、産生抗体の品質の違いを調べました。プロファイルは全体的に非常に近似しています。

主要な焦点は CHO 細胞でしたが、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion との適合性について他の細胞株も評価を行いました。現在までに、NS0 細胞および Sp2/0 細胞で良好な結果が得られています。NS0 細胞を用いたフェドバッチ試験のデータは次のとおりです。

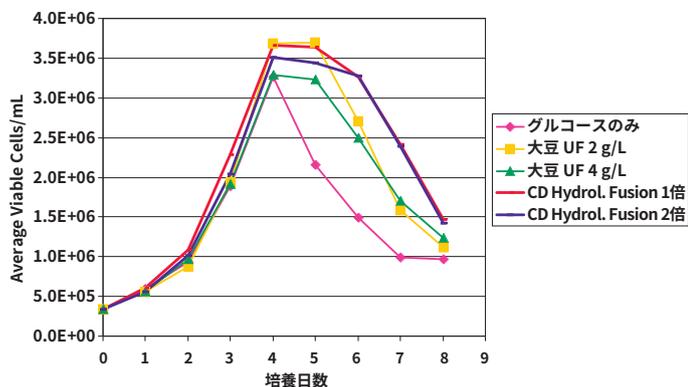


図 10. フェドバッチを使用した際の NS0 細胞増殖曲線

EX-CELL™ NS0 (カタログ番号 14650C) で培養した NS0 細胞を用いてフェドバッチ試験を実施しました。CD Hydrolysate Fusion での最大細胞密度は、加水分解物コントロールと非常に近似しています。

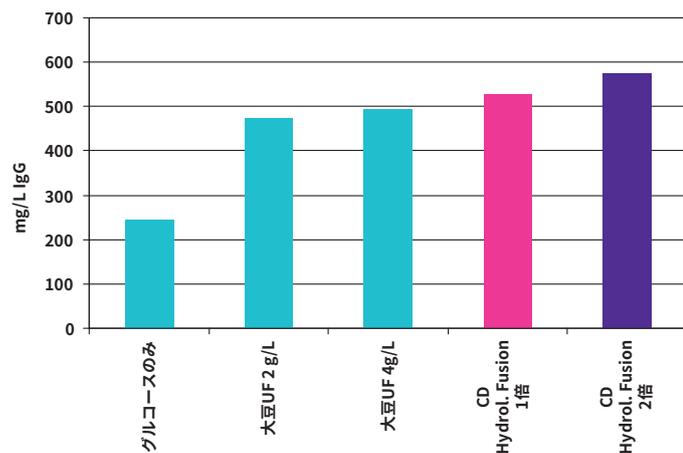


図 11. フェドバッチを使用した際の最大 IgG 抗体産生

EX-CELL™ NS0 (カタログ番号 14650C) で培養した NS0 細胞を用いてフェドバッチ試験を実施しました。CD Hydrolysate Fusion の最大 IgG 抗体産生は、加水分解物コントロールよりもわずかに優れています。

プロセスにおけるパフォーマンスに加えて、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は加水分解物の使用に関連する多くのリスクを軽減します。GMP で製造され完全に組成が明らかな製品は、ロットの一貫性がより明確になります。各成分は特定されており、パフォーマンスを確保するために独自の原材料仕様があります。加水分解物の原材料仕様は、原材料としての完成品である組成不明の製品についてのみとなります。EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、組成が明確でダウンストリームにおけるすべての成分の除去の証明がはるかに容易なため、規制対応にも適しています。

遺伝子発現制御および成分に対する理解

EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は細胞培養におけるパフォーマンスについて非常に良い結果を示しましたが、遺伝子発現制御について加水分解物と比較した場合にどのような効果がみられるのでしょうか？従来の CHO プラットフォームを使用した DNA マイクロアレイ試験を実施し、遺伝子発現制御の観点から加水分解物および EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion の機能を評価しました。右のベン図は、加水分解物または EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion の添加に対し、発現を促進または抑制へ制御された遺伝子の数を示しています。

この図を見ると、加水分解物および EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion 両方に共通して発現制御された遺伝子が多いことがわかりますが、それぞれが特定の遺伝子発現を促進または抑制へ制御していることもわかります。EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、4 種類の加水分解物（大豆、小麦グルテン、酵母エキス、動物組織）から同定され最適化された化合物で作られています。このことが、データに見られる違いに影響を与えている可能性もあります。また、このデータは製品の今後の改善に役立つパスウェイの同定に使うこともできます。以下のグラフでは、制御された遺伝子の機能を分析し、標準的な大豆加水分解物の機能と比較しています。細胞周期や細胞増殖など、推察された一般的なパスウェイが同定されています。

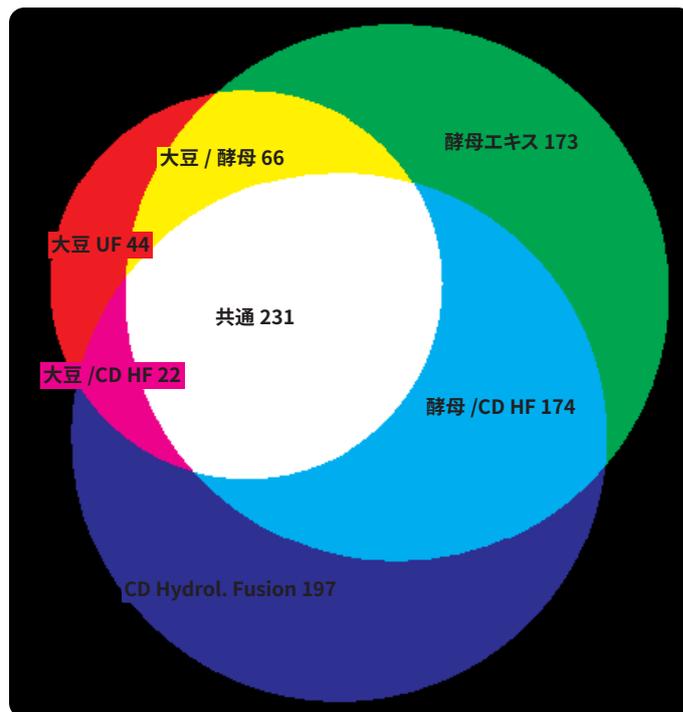


図 13. 特異的に発現制御された遺伝子のベン図
<http://theory.cs.uvic.ca/venn/EulerianCircles/> より作成

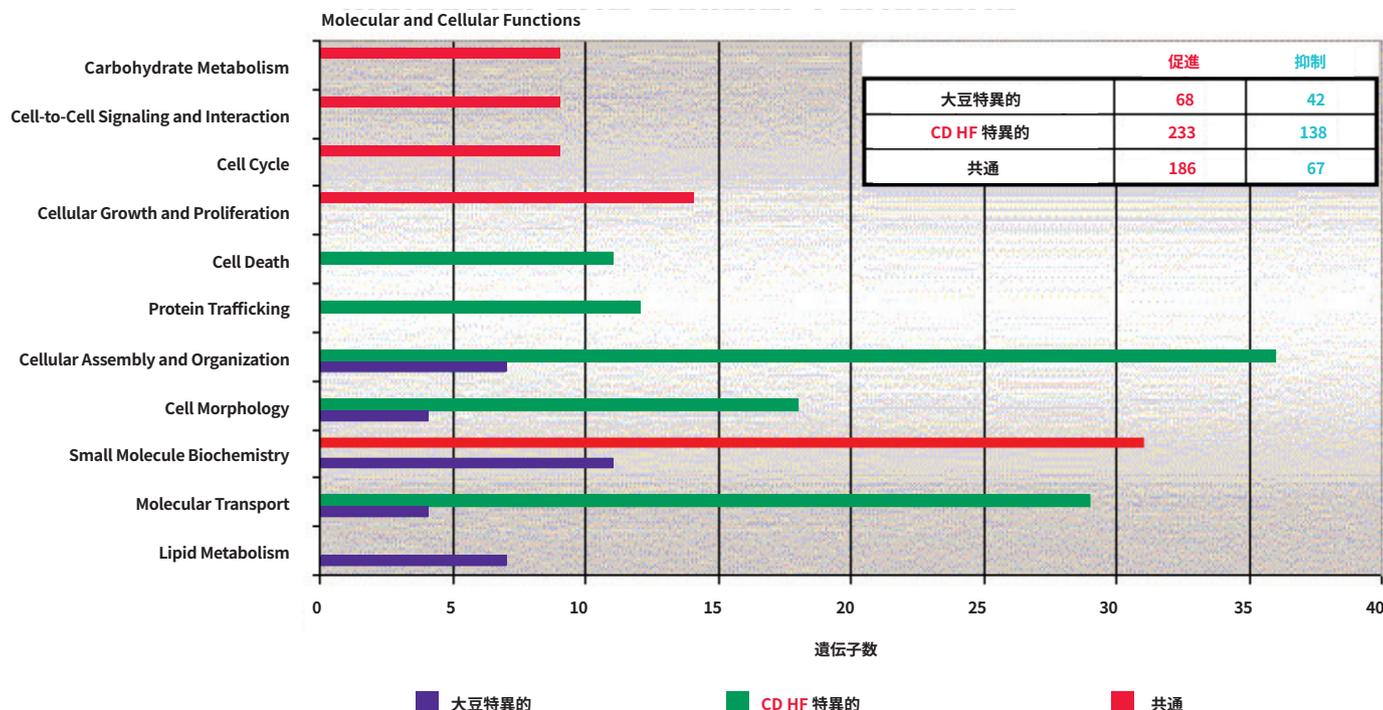


図 14. 特異的な発現を示した遺伝子の分子機能および細胞機能の分析

商用生産への適用

EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion の開発中、上市済みのバイオ医薬品を有する某グローバル企業に、ベータサイト評価プログラムでプロトタイプ製品をテストするよう要請がありました。このプログラムの目的は、新たに開発される製品が商業利用に際して市場の要望を確実に満たすようにすることでした。このホワイトペーパーの作成時点で、2つの肯定的なベータサイトレポートを受けており、別のサイトではフェドバッチシステムにおいて酵母エキスと置き換えることに早期に成功したことが報告されています。これらのレポートの1つは、商用生産アプリケーションに関するものでした。こうした目的の達成に向けて、EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、商業製造における大豆加水分解物および酵母エキスの両方の置換に成功しました。プラットフォームにおいて Chemically defined のプロセスを確立するための迅速な解決策として EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion を利用するという顧客の目標を掲げ、さらなる商業的評価が進行中です。

結論

- いくつかのタンパク質加水分解物に含まれるアミノ酸、ビタミン、および金属成分を分析し、その後最適化することにより、加水分解物の「ベース」サプリメントは、加水分解物の栄養機能の多くを網羅できるように設計されました。
- 4種類の加水分解物の逆相 HPLC 分画、またそれに続く CHO 細胞を用いたスクリーニングにより、活性分画が同定されました。これらの分画のさらなる分析は、加水分解物で見られる効果に寄与する重要な要因の発見につながりました。
- 上記の作業に基づいて、新たなサプリメントである EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion が開発されました。20倍液体（カタログ番号 14700C）または乾燥粉末（カタログ番号 24700C）として提供されています。これは、動物由来成分不含で Chemically defined の添加剤であり、従来の加水分解物の代替品として CHO 細胞培養プロセスのあらゆる段階で使用できます。NS0 や Sp2/0 等、他の細胞株にも適用できます。
- EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、加水分解物中に存在することが確認されたもの、または細胞培養培地に一般的に見られるもので、Chemically defined の成分のみから作られています。
- EX-CELL™ CD Hydrolysate Fusion は、組成不明な従来の加水分解物と同等のパフォーマンスを発揮するように設計されています。ほとんどの場合、同等または上回ることが確認されています。

この報告書は SAFC Biosciences、Cell Sciences & Development、シニア R & D サイエントリストの Zachary W. Deeds 氏によって執筆されました。

References

1. Schlaeger, E. J. et al., The Protein Hydrolysate, Primatone RL, is a Cost-Effective Multiple Growth Promoter of Mammalian Cell Culture in Serum-Containing and Serum-Free Media and Displays Anti-Apoptotic Properties. *J. Immunol. Methods*. 194, 191-199 (1996).
2. Franek F. et al., Plant Protein Hydrolysates: Preparation of Defined Peptide Fractions Promoting Growth and Production in Animal Cells Cultures. *Biotechnol. Prog.* 16, 688-692 (2000).

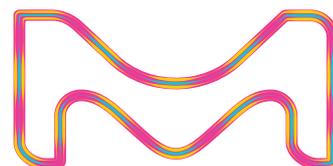
About SAFC Biosciences: SAFC Biosciences is a leading provider of cell culture materials and development services for upstream and downstream processes in the biopharmaceutical industry. Providing an integrated services package in mammalian cell culture media development, along with analytical and regulatory support, SAFC Biosciences employs a wealth of industry experience and scientific know-how to deliver reliable, consistent solutions that accelerate customer success – from development through to commercialization. The unit has a 35-year history as a manufacturing partner providing leading biopharmaceutical companies with the broadest range of highly customized products and services possible.

About SAFC: SAFC is the custom manufacturing and services group within Sigma-Aldrich that focuses on high-purity inorganics for high technology applications, cell culture products and services for biopharmaceutical manufacturing, biochemical production and the manufacturing of complex, multi-step organic synthesis of APIs and key intermediates. SAFC has manufacturing facilities around the world dedicated to providing manufacturing services for companies requiring a reliable partner to produce their custom manufactured materials. SAFC has four focus areas – SAFC Pharma®, SAFC Supply Solutions®, SAFC Biosciences®, and SAFC Hitech® – and had annual sales of \$624 million in 2008. SAFC is one of the world's 10 largest fine chemical businesses. For more information about SAFC, visit www.safglobal.com.

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般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 2021 年 1 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, 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. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. Issued May 2009 WP01

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

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