

# 細胞培養培地におけるプロセス強化のための革新的な修飾アミノ酸

修飾アミノ酸、ホスホ - チロシンニナトリウム塩 EMPROVE® EXPERT および  
スルホ - システインナトリウム塩セスキ水和物 EMPROVE® EXPERT の  
フェドバッチプロセスにおける使用に関するプロセスガイダンス

## はじめに

L-チロシンは、細胞の代謝とタンパク質合成の両方に重要なアミノ酸です。フェドバッチプロセスにおけるL-チロシンの欠乏は、特異的生産性の低下<sup>1</sup>およびタンパク質配列変異体<sup>2</sup>と関連付けられています。

この重要なアミノ酸は、特に中性pHで溶解度が非常に低下します<sup>3,4</sup>。濃度1g/L超のチロシンニナトリウム塩をフィードに用いると沈殿が誘発され、主に他のアミノ酸の共沈により培地不安定化のリスクが増大します。

これは栄養素の供給不足による性能低下を引き起こし、最終的には低性能のプロセスにつながる可能性があります。

L-システインは含硫黄アミノ酸で、空気、酸素または銅などの触媒を含有する金属の存在下で酸化され二量体のL-シスチンになります<sup>5</sup>。

L-システインは水に自由に溶解しますが、L-シスチンの水への溶解度は低下し<sup>6</sup>、中性pHのフィードで沈殿することも少なくありません。

これらの制約を克服するため、一般的なフェドバッチプロセスでは高濃縮アルカリフィードが使用され、フィード添加時のpHスパイクを最小限に抑えるための複雑な制御方法が必要になります(図1A)。このアルカリフィードを取り除くため、チロシンおよびシステインを化学的に修飾し、それぞれホスホ-L-チロシンニナトリウム塩<sup>7</sup>およびS-スルホシステインナトリウム塩<sup>8</sup>が得られました。両修飾アミノ酸を組み合わせることで、両アミノ酸の供給源を高濃縮の中性pHフィードに統合し(図1B)、安定な中性pH主フィードの開発が可能になることでフェドバッチプロセスを簡略化する独自の方法が提供されます。

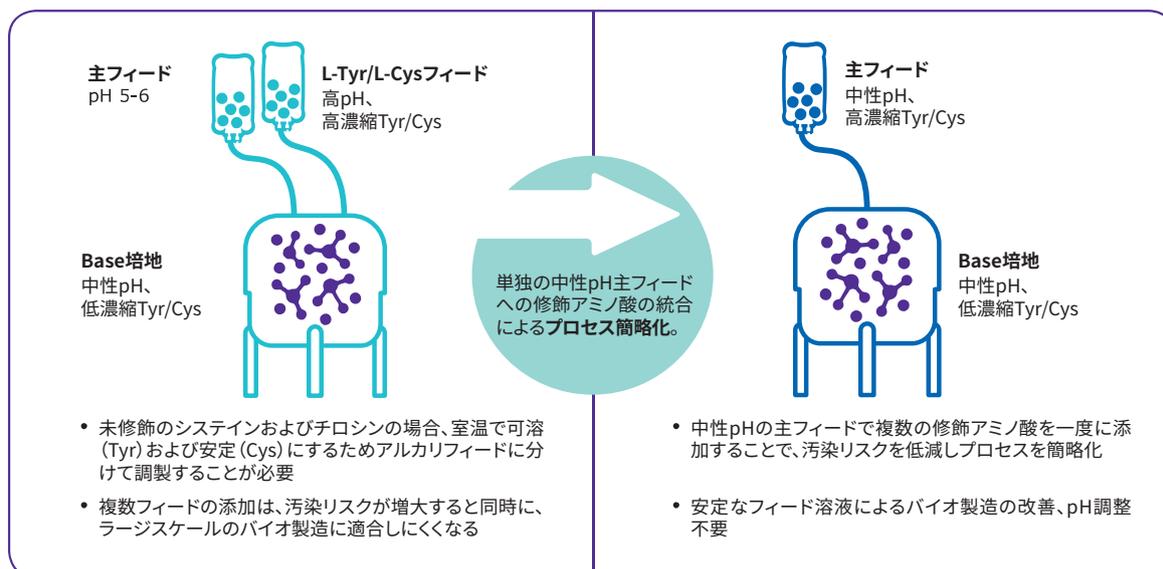


図 1. 単独の中性 pH 主フィードへの修飾アミノ酸の統合によるプロセス簡略化。

## 利点

修飾アミノ酸は、中性 pH、高濃縮および安定な細胞培養培地組成の開発を可能にします

- 容易に溶解するチロシン誘導体のホスホ - チロシン
- 安定なシステイン誘導体のスルホ - システイン
  - 組換えタンパク質断片化の低減が可能
  - トリスルフィド結合含有量の低下を実現

### プロセス簡略化

- フィード薬液の調製回数削減
- 容易なプロセス構成
- 汚染リスクの低減
- 高 pH による局所的なアルカリ性ショックの防止

## 性能

### 1. 溶解度および安定性

ホスホ - L - チロシン二ナトリウム塩 (PTyr) の水への溶解度は 53 g/L と評価されており、L - チロシンの溶解度 (0.38 g/L) の 100 倍以上です。濃縮フィードでは、PTyr2Na+ が 70 g/L の溶解度を示すのに対して、L - チロシンは不溶性であり、L - チロシン二ナトリウム塩の最大溶解度は 1 g/L 未満です。

液体フィード中で最初の 6 か月間にホスホ - チロシンの分解または沈殿は観測されませんでした。また、想定される酸化反応に由来する遊離チロシンも検出されませんでした。

S-スルホシステインナトリウム塩 (SSC) は、室温の水に 1.3 M まで可溶であり、pH 7.0 のフィードには 50 mM の SSC が可溶でした。

水中では、SSC は酸性および中性の pH で安定でしたが、アルカリ性の pH では自発的に解離し、システインの放出およびシスチンの形成が観測されました。

SSC を 15 mM で中性 pH のフィードに 3 か月間保存した際、沈殿または色変化は視認されませんでした。4°C または室温で遮光保存した場合、フィードの SSC 濃度に有意な低下はみられませんでした。

SSC は、システイン、グルタチオンまたはモノチオグリセロールのような他の含チオール分子と相互作用することが知られています。SSC の安定性を確保するため、目的フィード組成から含チオール成分を排除することが推奨されます。

### コスト削減

- 多数のフィード容器のための準備時間および作業の節約

### 効率的なプロセス

- アップストリームおよびダウンストリームで処理される液量の削減

### 供給の信頼性

- 高い製造能力により顧客への供給の信頼性を保証

### 完全な透明性

- お客様の GMP プロセスを支援する包括的な文書を当社の Emprove® dossier により提供しています。

### 2. フェドバッチプロセスにおける性能

両方の修飾アミノ酸の性能は、異なる IgG1 を生成する複数の CHO 細胞クローンを用いてフェドバッチ培養で試験されました<sup>8,9</sup>。これまでに試験された全てのプロセスで、システインとチロシンの両方について等モルの濃度がフィードの PTyr および SSC の最適な濃度であることが実証されました。ただし、特定の細胞株の要件によっては両アミノ酸について個々の最適化実験が必要な場合があります。

さらに、当社の研究では、フェドバッチプロセスで使用される培地のチロシン濃度が本質的な役割をもつことが明らかにされています<sup>7</sup>。PTyr は細胞培養培地中で細胞のホスファターゼによって脱修飾するため、Tyr 放出の速度論が細胞株間で異なる可能性があります。したがって、フェドバッチプロセス全体を通して培地上清のチロシン含有量をモニタリングすることが推奨されます。アミノ酸の細胞内への効率的な輸送を確保するためには最低 1 mM のチロシンが必要とみられるため<sup>2</sup>、プロセスの間、常にその濃度を超えるように培地のチロシン濃度を調整することが推奨されます。当社の研究で用いたプロセスでは、培地のチロシン濃度は 1 mM ~ 2.5 mM に調整されました。

最後に、当社では培地のチロシンの代用としてホスホ - チロシンを使用することができません。スルホ - システインの場合、培地のシステインと入れ換えるとクローンに応じて異なる結果が得られます。当社では、培地のシステイン濃度の変更を避けるようにお奨めします。

IgG1 を生成する CHO 株を用いて標準的なフェドバッチプロセスで得られた結果を図 2 に示します。

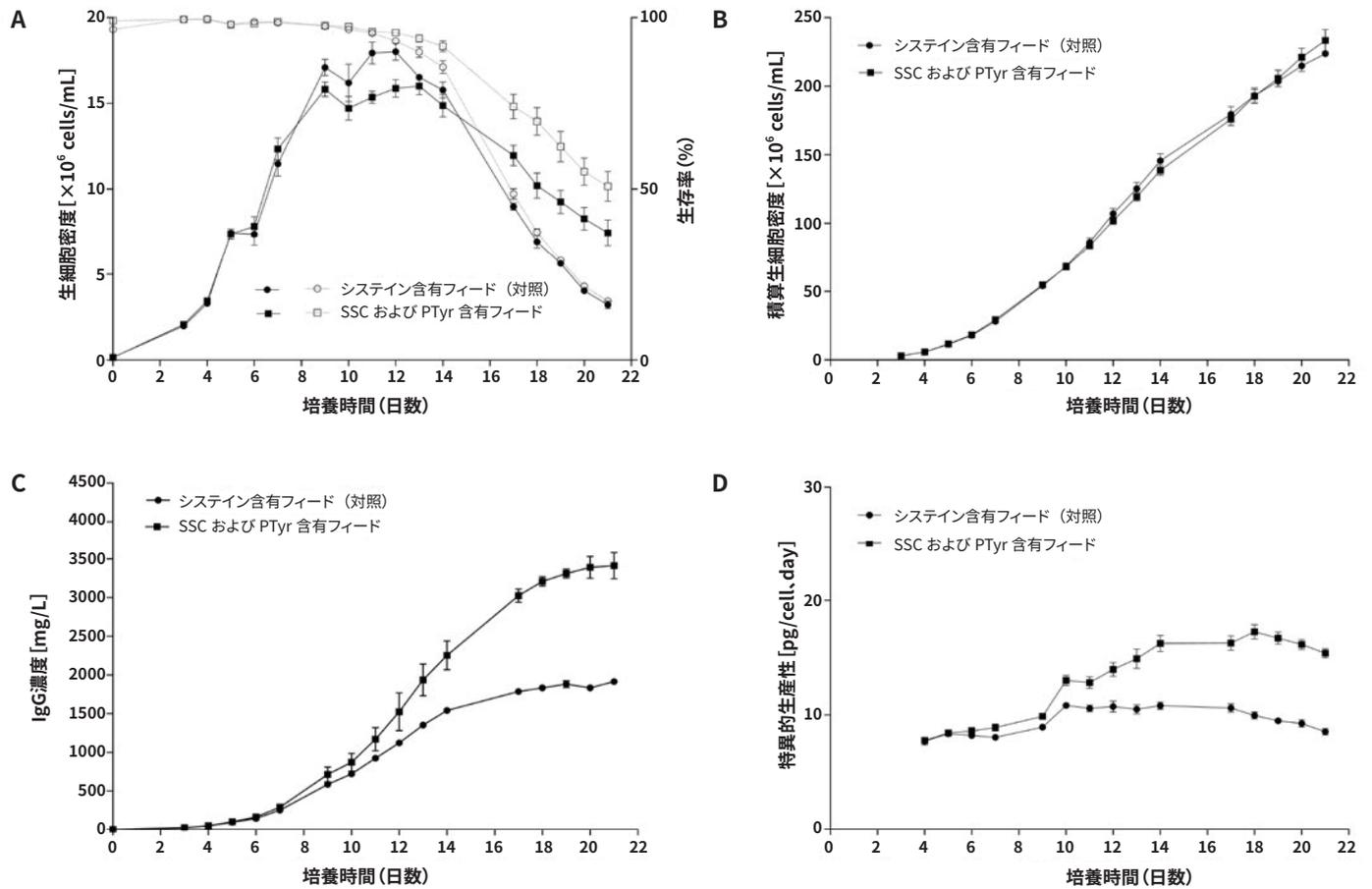


図 2. システインおよびチロシン（アルカリ性 pH）または SSC および PTyr（中性 pH）のどちらかを含有するフィードを使用した 1.2 L バイオリアクターのフェドバッチ実験。3 日目に 3% (v/v)、5、7、9 および 14 日目に 6% (v/v) のフィードを添加。 (A) 生細胞密度（実線）および生存率（点線）、 (B) 積算生細胞密度、 (C) 比濁法で測定された上清の IgG 濃度、 (D) 特異的生産性。

### 3. モノクローナル抗体に対する影響

濃縮フィードで PTyr および SSC を使用した場合、モデルの IgG1 のアミノ酸配列<sup>7,8</sup> または糖鎖修飾もしくは電荷変異体プロファイルの変化は検出されませんでした（図 3A および B）。

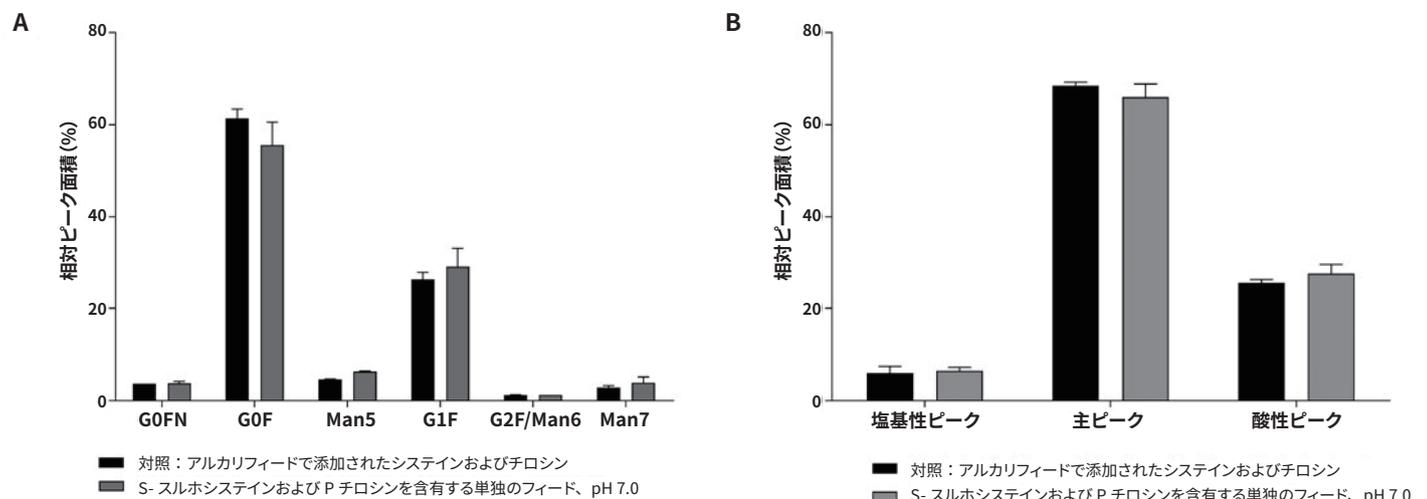


図 3. モノクローナル抗体の品質特性および配列に対する含 SSC フィードの影響。 (A) 2-AB 標識化法を用いて決定された糖鎖修飾のパターン。 (B) IEF を用いて得られた電荷変異体分布

抗体の徹底的な分析により、このプロセスに SSC を使用すると IgG の不均一性が減少することを示すことができました<sup>9</sup>。実際に、この修飾アミノ酸を使用することで複数の IgG1 の断片化が減少し、mAb のヘビーチェーンとライトチェーン間のトリスルフィド結合形成が減少しました (図 4)。

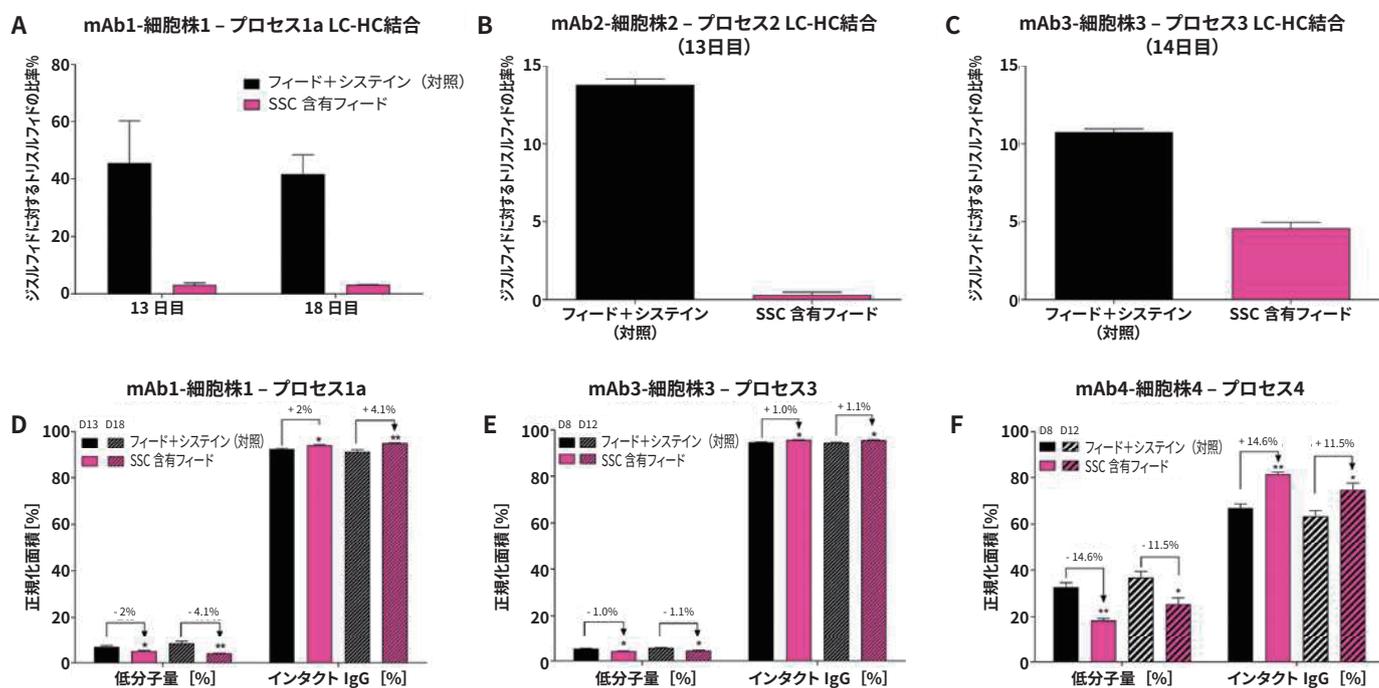


図 4.3 つの異なる mAb のトリスルフィド結合量および低分子量形態の相対的な定量化。  
A ~ C : LC-MS を用いた 4 つの IgG のヘビーチェーンとライトチェーン間のトリスルフィド結合とジスルフィド結合の比較および定量化。  
D ~ F : CE-SDS を用いて非還元条件下でサイズに基づいて分離された断片化。Kruskal-Wallis および Dunn 多重比較検定により統計的差異が評価され、0.05 未満 (\*) および 0.01 未満 (\*\*) の p 値が統計的有意とみなされた。

## Emprove® プログラム

スルホ - システイナトリウム塩およびホスホ - チロシンナトリウム塩は、卓越した品質と包括的な文書および優れたサービスを組み合わせた当社の Emprove® プログラムの一部として販売されています。

本ポートフォリオの各製品には、適格性判断、リスクアセスメントおよびプロセス最適化に関するお客様の業務を容易にする以下の 3 種類のドシエが付属しています。Material Qualification Dossier、Quality Management Dossier および Operational Excellence Dossier。製造プロセス、安定性データ、元素不純物情報、製品品質報告書、分析方法などに関する情報を 3 種類のドシエで提供します。Emprove® プログラムは、400 品目の医薬品原料および出発物質と、選ばれたろ過製品およびシングルユース製品を対象としています。

ドシエは当社の Emprove® Suite からオンラインでアクセス可能です。Emprove® Suite の全契約者は 2 年間にわたり、Emprove® ポートフォリオ全体の全ドシエに 24 時間年中無休でアクセスでき、1 社につき 5 アカウントが提供されます。Material Qualification Dossier は引き続き [MerckMillipore.com](https://www.MerckMillipore.com) から無料で入手可能です。

Emprove® プログラムに関する追加情報については、[MerckMillipore.com/emprove](https://www.MerckMillipore.com/emprove) をご覧いただくか、お近くの販売代理店までお問い合わせください。

## 仕様

完全な製品仕様は **SigmaAldrich.com** でご覧になれます。

## 安全データシート

最新の安全データシートは、ウェブサイト **SigmaAldrich.com** から検索可能です。

## 梱包、保管およびご注文情報

### L-Cysteine-S-sulfate Sodium Salt Sesquihydrate EMPROVE® EXPERT

| カタログ番号       | 梱包単位  | 梱包材             |
|--------------|-------|-----------------|
| 1.37116.0100 | 100 g | 0.25 L PE 広口ボトル |
| 1.37116.1000 | 1 kg  | 1.8 L PE 広口ボトル  |
| 1.37116.5000 | 5 kg  | 8 L PE 広口ボトル    |

製品は +15 °C ~ +25 °C で保管してください。この方法で未開封の元の箱の中で保管した場合の保存期間は 24 か月以上です。

### Phospho-L-Tyrosine Disodium Salt EMPROVE® EXPERT

| カタログ番号       | 梱包単位  | 梱包材                             |
|--------------|-------|---------------------------------|
| 1.37119.0100 | 100 g | 外側 HDPE タブ、内側ガラス瓶               |
| 1.37119.1000 | 1 kg  | 外側 HDPE ドラム、内側 LDPE ライナー<br>2 層 |
| 1.37119.9010 | 10 kg | 外側 HDPE ドラム、内側 LDPE ライナー<br>2 層 |

製品は +2 °C ~ +8 °C で保管してください。この方法で未開封の元の箱の中で保管した場合の保存期間は 12 か月以上です。

## References

1. Yu, M., et al., *Understanding the intracellular effect of enhanced nutrient feeding toward high titer antibody production process*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(5): p. 1078-88.
2. Feeney, L., et al., *Eliminating tyrosine sequence variants in CHO cell lines producing recombinant monoclonal antibodies*. Biotechnol Bioeng, 2013. **110**(4): p. 1087-97.
3. Carta, R. and G. Tola, *Solubilities of L-Cystine, L-Tyrosine, L-Leucine, and Glycine in Aqueous Solutions at Various pHs and NaCl Concentrations*. Journal of Chemical & Engineering Data, 1996. **41**(3): p. 414-417.
4. Hitchcock, D.I., *The Solubility of Tyrosine in Acid and in Alkali*. J Gen Physiol, 1924. **6**(6): p. 747-57.
5. Rigo, A., et al., *Interaction of copper with cysteine: stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(9): p. 1495-501.
6. O'Neil, M.J., et al., *The Merck Index*. 2006, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, USA. p. 467-468.
7. Zimmer, A., et al., *Improvement and simplification of fed-batch bioprocesses with a highly soluble phosphotyrosine sodium salt*. J Biotechnol, 2014. **186**: p. 110-118.
8. Hecklau, C., et al., *S-Sulfocysteine simplifies fed-batch processes and increases the CHO specific productivity via anti-oxidant activity*. J Biotechnol, 2016. **218**: p. 53-63.
9. Seibel, R., et al., *Impact of S-sulfocysteine on fragments and trisulfide bond linkages in monoclonal antibodies*. MAbs, 2017. **9**(6): p. 889-897.

当社は、アプリケーション技術および規制事項に関する情報とアドバイスを、当社の知識と能力を最大限に提供しますが、義務または責任を負いません。既存の法令は、お客様が遵守する必要があります。これは、第三者の権利に関しても適用されます。当社の情報とアドバイスは、想定された目的のために当社の製品の適合性をチェックするお客様自身の責任を軽減しません。

**【ご注意】本データシートに掲載されている製品は、食品衛生法への適合を確認していないため、食品製造用途には使用できません。**

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 2020 年 7 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. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK\_TB2564EN 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](mailto:PStechservice_JP@merckgroup.com)

注文に関するお問合せ : [PScommercialservice\\_JP@merckgroup.com](mailto:PScommercialservice_JP@merckgroup.com)

Tel: 03-4531-1143