

EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® の 両細胞培養培地の組み合わせによる フェドバッチ生産性の向上

Jonathan Kaiser, Senior Scientist, M. Sc., Innovation Cell Culture Media
Development, BioProcessing R&D

Melanie Brandl, Ph.D., Global Product Manager Proprietary Media

要旨

バイオ医薬品業界では、市場からの著しい需要増加に対応し、製造コストを削減するために、フェドバッチプロセスの更なる生産性向上に関心が集まっています。こうしたプロセスでは高い細胞密度が達成され容積生産性の向上につながりますが、栄養要求も高まります。培養中のさまざまな時点で高濃度フィードを添加することにより栄養枯渇を防ぎ、生産培養期間を維持することができます。

培地プラットフォームの多様性、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の特徴及びプロセス設定を踏まえ、プロセス最適化のため費用効果と時間効率の良いアプローチを確立することが不可欠です。

このアプリケーションノートでは、既製のカatalog製品で培養収量を改善するためのガイダンスとオプションを提供します。培地の組み合わせ、dynamic fed-batch feeding のオプション、及び多様な細胞株や製造シナリオに適したフィードスクリーニング戦略を紹介します。

序文

バイオ医薬品業界では、CHO 細胞で安定なモノクローナル抗体 (mAb) や次世代バイオ医薬品を製造するための主な手法の一つとして、フェドバッチ法があります。主に細胞株のエンジニアリング、培地の開発、プロセス管理の改善などによって比生産性 (qp) や生細胞密度ピーク (VCD) が増加し生産期間が延長されたことにより、過去 40 年間で製造力価は 1L 当たり数 10mg から 10g 単位まで着実に向上しています。容積生産性のさらなる向上が報告されており、フェドバッチ操作を用いたコスト削減の余地がまだあると思われます。

適切な培地とフィードを選択することは、フェドバッチプロセス開発における重要な段階です。各 CHO 細胞株や製造プロセス、治療タンパク質に最適な培地及びフィードを選択しなければなりません。市販されている培地及びフィードの多様性を踏まえ、異なる業者の複数オプションを検討し、特定の CHO 細胞プラットフォームにはどのようなフェドバッチシステムが最良か判断するのが一般的です。異なる業者のフェドバッチシステムをスクリーニングする他に、ある業者の培地を、その培地のコンパニオンではない別の業者のフィードと組み合わせることもあります。場合によっては、複数業者からの複数の培地やフィードを評価します。このアプローチは、CHO-S、CHO-GD44、CHO-K1 といったこれまでの細胞系譜を超えた CHO 細胞株の多様性を物語っています。バイオ医薬品業界内の既存のプラットフォーム、並びにこれらのプラットフォームで作製された個々のクローンは、栄養要求性及びパフォーマンスが大きく異なります。市販の培地及びフィードの組成開示を受けることが困難な中、スクリーニングを効率化するためには、あらゆる可能なオプションを評価して戦略を最適化しなければなりません。このアプローチが有効である可能性はありますが、培地とフィードを異なる業者から購入することになった場合、サプライチェーンに関するリスクが高まります。

CHO プラットフォーム及びクローンによって栄養要求性、培地及びフィード処方異なるため、クローンごとにフィード戦略のスクリーニング、デザイン及び最適化を行う必要があります。EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチプラットフォームは、CHO 細胞によるバイオ医薬品生産用に開発された動物由来成分不含の Chemically Defined (CD) 細胞培養培地及びコンパニオンフィードです。

独自の生産培地はそれぞれが、最初の細胞増殖と生産に適合するようデザインされており、一方、アミノ酸、ビタミン、微量金属、塩、その他の成分を独自に配合したコンパニオンフィードは、バイオ医薬品の製造において細胞機能に必要な枯渇した栄養を補充し、生産培養期間を維持するために成分配合されています。

1つのフェドバッチシステムがあらゆる CHO 細胞で最適なパフォーマンスを示すことはないため、CHOZN® GS-/-、CHO-S、CHO-DG44 及び CHO-K1 細胞発現系で使用するシステムがそれぞれ独立して開発されました。これら2つのシステムは独立して開発されたため、フェドバッチプロセスへのアプローチが異なり、組み合わせ使用においても独自の位置づけを持っています。

EX-CELL® Advanced フェドバッチプラットフォームは、枯渇栄養の補充により優れた増殖、生産性及び培養期間が得られるよう、由来の異なる複数 CHO 細胞株での長年の経験に基づきデザインされました。このプラットフォームは、細胞の要件を満たすために多様な栄養素を提供するもので、CHOZN® Expression プラットフォームの不可欠な要素です。

CHOZN® Expression プラットフォームにおける EX-CELL® Advanced 培地及びフィードの使用に関する詳細情報が、「CHOZN® Cell Line Platform Technical Bulletin」に記載されています。

CHOZN® プラットフォームはオープンクロマチン構造を誘導する UCOE® 発現技術とも併用可能で、高生産性クローンの単離効率を高めることによりバイオ医薬品開発を迅速化します。CHOZN®&UCOE® Combined Platform の能力は、ホワイトペーパー「Accelerating Cell Line and Process Development」で実証されています。

Cellvento® フェドバッチプラットフォームは、総フィード量を減らすことを意図した高濃度かつ中性 pH でのシングルフィードを可能にするようデザインされました。このシングルフィードシステムは、主フィード及び高 pH で溶解する重要アミノ酸の追加フィードからなる2パートフィードシステムを代替できます。中性 pH で培養に添加できるよう修飾された重要アミノ酸成分が主フィードに組み込まれています。Cellvento® 4Feed では、成分の溶解性及び安定性の問題が克服され、最終 pH が中性となっています。

Cellvento® 4CHO 及び EX-CELL® Advanced 培地はすべての CHO 細胞株にご使用いただけます。これらの製品並びに他のカタログ製品の使用に関する追加ガイダンスが、「CHO Cell Culture Media & Feeds Selecting the Right Media to Enable Your Next Breakthrough」に記載されています。

培地及びフィードの評価

培地とフィードの複数の組合せをスクリーニングすることは、特定細胞株に対する最適なフェドバッチの組み合わせを見つける最良の方法の1つです。EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチプラットフォームはそれぞれが優れた製品ですが、これらのプラットフォームを組み合わせることで、培地とフィードの最適な組み合わせを見つける可能性が広がります。EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチプラットフォーム内での比較的少数の培地とフィードの組み合わせをスクリーニングすることにより、より良いフェドバッチの組み合わせを見つけることができます。Design space が限定されている場合は、表1に示した Study 1 で使用する試験条件の最小セットで、2つのシステムを単独及び組み合わせで評価します。

表1：Study 1 で評価する培地とフィードの組み合わせ

培地	フィード
EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch Medium	EX-CELL® Advanced CHO Feed 1
EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch Medium	Cellvento® 4Feed
EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch Medium	EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合
Cellvento® 4CHO	Cellvento® 4Feed
Cellvento® 4CHO	EX-CELL® Advanced CHO Feed 1
Cellvento® 4CHO	Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の 50 : 50 混合

表2：14日間フェドバッチプロセスでの50：50フィード戦略の例

フィード	3日目	5日目	7日目	10日目	12日目	合計
EX-CELL® Advanced CHO Feed 1	2.5%	2.5%	3.75%	3.75%	2.5%	15%
Cellvento® 4Feed	2.5%	2.5%	3.75%	3.75%	2.5%	15%
総フィード量	5%	5%	7.5%	7.5%	5%	30%

表 1 に示す 50 : 50 の混合フィードは、個々のフィード液を組み合わせた混合液として添加するか又は個々に添加することができます。混合液にすれば、単一フィードの操作が可能です。表 2 に、各フィードを単独で使用した場合の代表的な 50 : 50 フィード戦略の例を示します。フィードの特徴の違い並びに細胞株ごとの栄養要求性と挙動の多様性を踏まえ、Design space が許す場合は、又はフォローアップ試験として、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の他の混合比を検討すべきです。検討する混合比は 75 : 25 及び 25 : 75、必要であれば 67 : 33 及び 33 : 67 などです。これらのフィード比率の単一混合液は、遮光下に 2 ~ 8° C で 30 日間保存できます。

表 3 : 推奨されるフィード量及び頻度の範囲

フィード	推奨フィード量	推奨フィード頻度
EX-CELL® Advanced CHO Feed 1	5-10% v/v	48 ~ 72 時間
Cellvento® 4Feed	1-6% v/v	48 ~ 72 時間
EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合	3-10% v/v	48 ~ 72 時間

典型的なフィード量及び頻度の範囲を表 3 に示しますが、各細胞株のニーズを経験的に決めることが推奨されます。EX-CELL® Advanced CHO フェドバッチプラットフォームの製品情報シート及び Cellvento® 4CHO フェドバッチプラットフォームのプロセスガイダンスに、最初のフィード添加パラメータが記載されています。培地とフィードの最初の評価に続いて、特定細胞株での最適なフィード量とタイミングを決めるためフォローアップ試験を実施すべきです。

ケーススタディー：EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® の培地とフィードを使用した mAb 発現 CHOK1 及び CHOZN® 細胞株の評価

以下のケーススタディーでは、独自の mAb を発現する CHOK1 細胞株及び CHOZN® 細胞株を用いて、EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチシステムの組み合わせにより相乗効果が得られるかどうかを評価しました。試験では、細胞増殖、培養期間、及び可能であれば生産性が向上するかどうかを確認しました。

Study 1 は、処理量が高くバイオリアクターへのスケールアップが可能な 50 mL スピンチューブで実施しました。これにより、複数の実験条件をほぼ同時に解析することも可能です。振とうフラスコ、ディープウェルプレート及びマイクロバイオリアクターも、評価試験に適したプラットフォームです。最後の試験は Mobius® 50L シングルユースバイオリアクターで実施しました。

Study 1 では、EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチシステムをそれぞれ単独で、及び両方を組み合わせて検討しました (表 1)。Study 2 は、Study 1 で特定した EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合を用いて得られたデータに基づき、両フィードの他の比率を検討しました。50 : 50 混合アプローチのスケラビリティを Study 3 で確認しました。

材料

1. 独自の mAb (CHOK1 mAb1) を発現する CHOK1 宿主細胞及び別の独自の mAb (CHOZN® mAb2) を発現する CHOZN® ZFN-modified GS-/- CHO 細胞株。CHOZN® mAb2 細胞株は、高い容積生産性を得るため、mAb2 と並んで UCOE® エレメントを含むプラスミドを利用。
2. EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium pH 7.2 (カタログ番号 24366C)
3. EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 pH 8.5 (without glucose) (カタログ番号 24368C)
4. Cellvento® 4CHO pH 7.0 (カタログ番号 103795)
5. Cellvento® 4Feed pH 7.0 (カタログ番号 103796)
6. グルコース原液 (400 又は 450 g/L)
7. Climo-Shaker ISF1-XC - 320 rpm、25 mm オービタル、37° C、5% CO₂、相対湿度 80%
8. TubeSpin® バイオリアクター 50
9. ViCell™ XR カウンター - 生細胞密度及び生細胞率測定
10. ForetBio Octet® QKe システム - スモールスケール実験の mAb 定量
11. Mobius® 50L シングルユースバイオリアクター

スモールスケール実験では、ViCell™ XR カウンター及び ForetBio Octet® QKe システムを用いて特定の日に細胞数、生細胞率及び容積生産性を測定しました。生産性は代表的な mAb で作成した検量線を用いて求めました。個々の条件を 14 日目まで維持し（いずれの条件でも生細胞率は 70% 以上）、そこで実験を終了しました。提示するスモールスケールのデータ点はデュプリケートサンプルの平均値です。バイオリアクター実験では、HPLC を用いた方法で容積生産性を測定し、単一データ点を提示しています。

細胞増殖及び生産には同一の培地もしくは互換性を持つことが知られている培地を使用しました。この場合、細胞株をそれぞれの培地で少なくとも 3 継代適応させ、細胞増殖とフェドバッチを同じ培地で実施しました。EX-CELL® Advanced CHO フェドバッチプラットフォームの製品情報シート及び Cellvento® 4CHO フェドバッチプラットフォームのプロセスガイダンスを参照ください。

Study 1 : EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の組み合わせの有効性を確立

Study 1 は表 4 に記載する条件を用いて実施しました。具体的には、独自の mAb を発現する CHOK1 mAb1 細胞株を 50 mL スピンチューブで増殖させ、複数の培地とフィードの組み合わせを評価しました。EX-CELL® Advanced 製品と Cellvento® 製品の組み合わせにより、50 : 50 混合フィードの有用性を評価し、個々のフェドバッチ制御を維持しました。50:50 混合のフィード添加スケジュールは使用培地によって決定し、各システムのフィードに使用されるスケジュールに合わせました。

表 4 : Study 1 で使用した実験条件及び操作パラメータ

実験条件	操作パラメータ
培養容器	TubeSpin® バイオリアクター 50
開始培養液量	30 mL
播種密度	3×10^5 viable cells/mL
ハーベスト基準	14 日後又は生細胞率が 70% を下回った時点で培養終了
サンプル採取点	試験 3、5、7、10、12、14 日目
サンプル採取量	≤ 1800 µL/日（必要な分析による）
グルコース添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加
フィード添加スケジュール 1 (EX-CELL® Advanced CHO Feed 1)	3 日目に 5%、5、7、10 日目に 10%、12 日目に 5%
フィード添加スケジュール 2 (EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合) 培地 = EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium	3 日目に 5%、5、7、10 日目に 10%、12 日目に 5% (各フィードを 1 日合計の半分ずつ単独で添加、両フィードの混合液とはせず)
フィード添加スケジュール 3 (Cellvento® 4Feed)	3、5 日目に 3%、7 日目に 6%、10、12 日目に 3%
フィード添加スケジュール 4 (Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の 50 : 50 混合) 培地 = Cellvento® 4CHO	3、5 日目に 3%、7 日目に 6%、10、12 日目に 3% (各フィードを 1 日合計の半分ずつ単独で添加、両フィードの混合液とはせず)

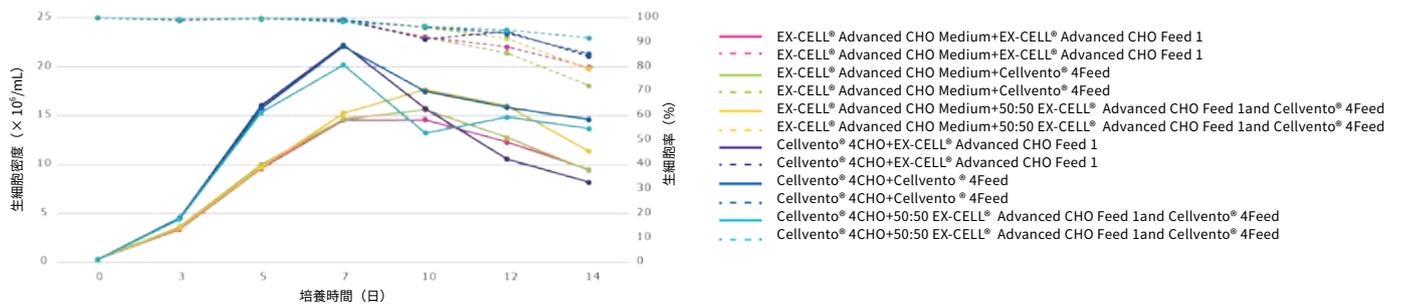


図 1A

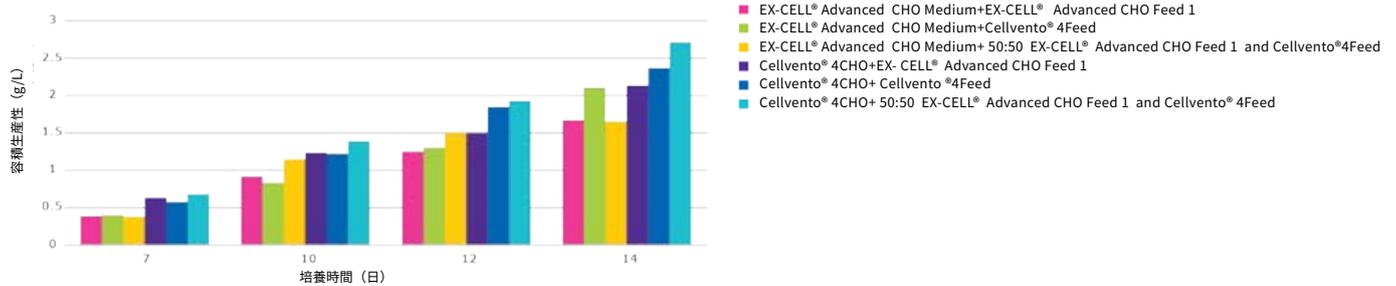


図 1B

図 1 : Cellvento® 4CHO 及び EX-CELL® Advanced CHO Medium と単一フィード又は 50 : 50 混合フィードにより CHOK1 mAb1 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (1A 実線)、生細胞率 (1A 破線) 及び容積生産性 (1B)

増殖曲線 (図 1A) は使用培地によって 2 群に分けられました。EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium を使用した条件では増殖が遅くピーク生細胞密度が 10 日目の $14.5 \sim 17.5 \times 10^6$ cells/mL でした。Cellvento® 4CHO 培地を使用した条件では増殖が速くピーク生細胞密度が 7 日目の $20 \sim 22 \times 10^6$ cells/mL でした。増殖に対するフィードの影響は培地に依存し、このクローンに普遍的なパターンはみられませんでした。生細胞率曲線 (図 1A) は生細胞密度と同じような細胞株の嗜好性が認められます。

CHOK1 mAb1 は Cellvento® 4CHO を使用した条件で大抵生存が延長しました。容積生産性 (図 1B) は実験条件により大きく変動しました。CHOK1 mAb1 に関して、Cellvento® 4CHO では Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 を 50 : 50 で添加したとき生産性が最大となり、EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium では Cellvento® 4Feed を添加したとき生産性が最大となりました。最高の生産性が得られたこの 2 つの組み合わせはピーク生細胞密度が最大ではなく (図 1A)、細胞の増殖ではなく生産に必要な栄養がフィードで供給されたことを示しています。14 日後、生産性が最大であった Cellvento® 4CHO に Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の 50 : 50 混合を添加した組み合わせでは、生産性が最低であった EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium に EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 を添加した組み合わせと比べて、45% 以上高い収量が得られました。

このケーススタディーの結果から、当該細胞株では Cellvento® 4CHO に Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の 50 : 50 混合を組み合わせるのが最良であることが判明しました。この組み合わせにより、個々のフェドバッチシステムをそれぞれの製品情報 / プロセスガイダンスの指示に従って使用するよりも高い容積生産性が得られました。このアプローチが、培地とフィードのユニークな組み合わせにより優れたパフォーマンスを得る方法として有効であることが確認されました。この試験では、Cellvento® 4CHO に Cellvento® 4Feed と EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の 50 : 50 混合を添加する組み合わせが最良のパフォーマンスを示しましたが、フィード比率、フィード量、添加のタイミングなどを変動させることで、さらに培地とフィードのパフォーマンスを最適化できる可能性があります。

Study 2 : EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の比率の変動がパフォーマンスに及ぼす影響の評価

Study 2 は表 5 に記載する条件を用いました。Study 1 で使用した CHOK1 mAb1 細胞株及び異なる独自の mAb を発現する高生産性の CHOZN® mAb2 細胞株の両方を、50 mL スピンチューブで培養しました。試験デザインは Study 1 の内容に基づき、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed に共通する最適比率があるのか、あるいは最適比率は使用する細胞株に依存するのかを確認するため、他のフィード比率を評価しました。EX-CELL® Advanced CHO Feed-Batch Medium 及び Cellvento® 4CHO を引き続き使用して、培地の影響もさらに評価しました。

表 5 : Study 2 で使用した実験条件及び操作パラメータ

実験条件	操作パラメータ
培養容器	TubeSpin® バイオリアクター 50
開始培養液量	30 mL
播種密度	3×10^5 viable cells/mL
ハーベスト基準	14 日後又は生細胞率が 70% を下回った時点で培養終了
サンプル採取点	試験 3、5、7、10、12、14 日目
サンプル採取量	≤ 2300 µL/日 (必要な分析による)
グルコース添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加
フィード添加スケジュール 1 (Cellvento® 4Feed)	3、5 日目に 3%、7 日目に 6%、10、12 日目に 3%
フィード添加スケジュール 2 (EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed を各種比率で混合)	3、5 日目に 5%、7、10 日目に 7.5%、12 日目に 5% (フィード液を添加前に混合)
フィード添加スケジュール 3 (EX-CELL® Advanced CHO Feed 1)	3 日目に 5%、5、7、10 日目に 10%、12 日目に 5%

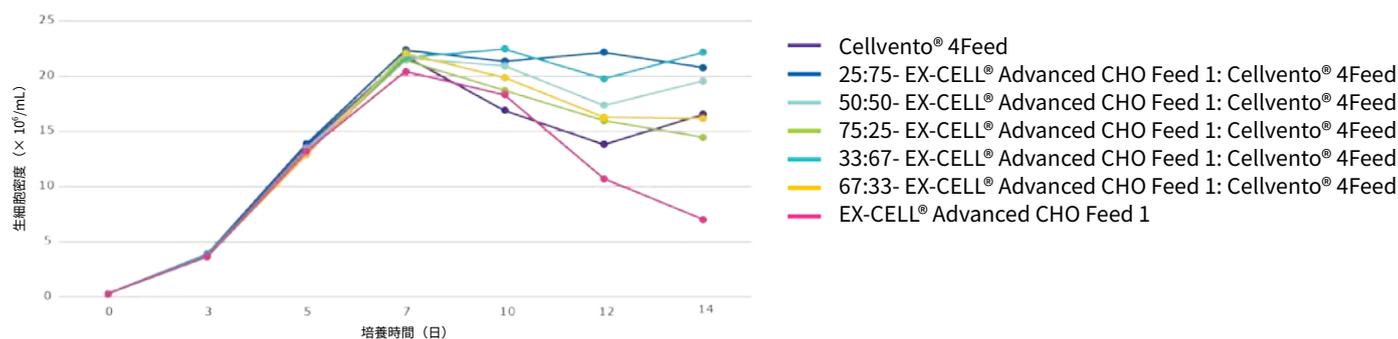


図 2A

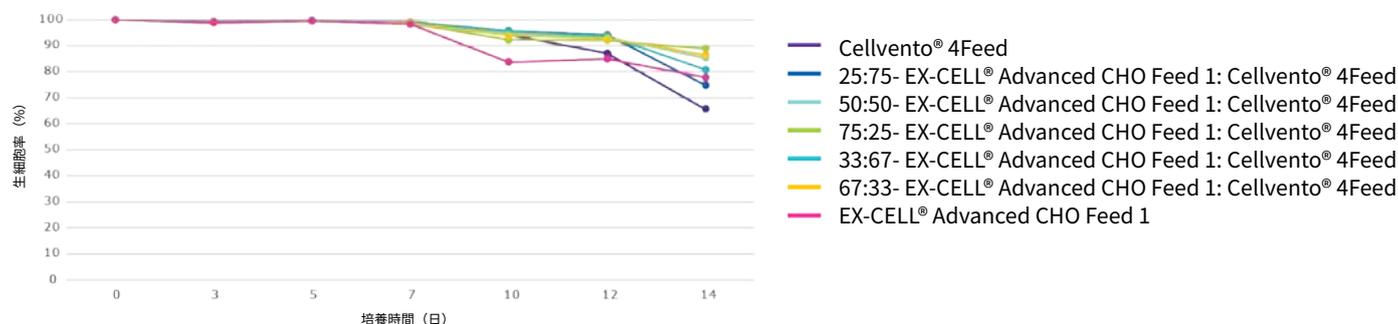


図 2B

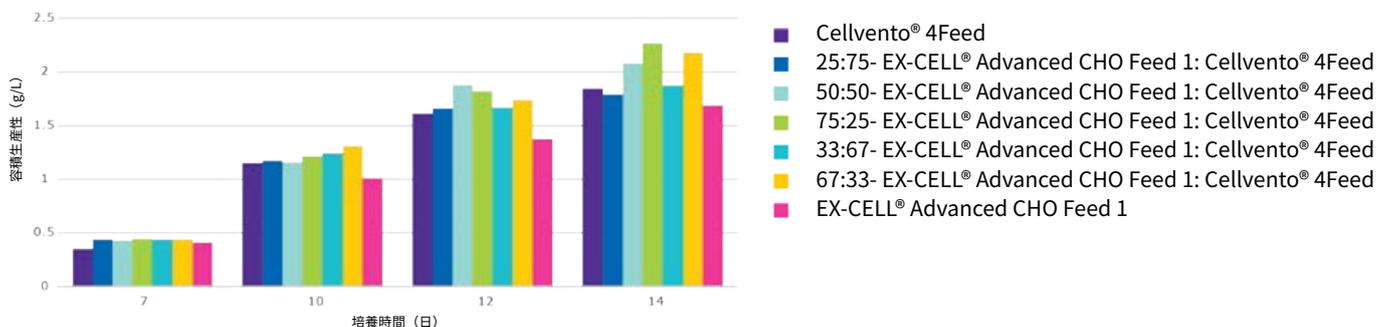


図 2C

図 2：Cellvento® 4CHO で CHOK1 mAb1 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (A)、生細胞率 (B) 及び容積生産性 (C)

Cellvento® 4CHO で培養した CHOK1 mAb1 は、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の比率が高い混合フィードへの嗜好性を示しました。EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の比率が高い混合フィードを添加した培養では、Cellvento® 4Feed の比率が高い混合フィードと比べて培養期間がやや延長し、生産性が向上しました。EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 単独では生細胞率が早めに低下し (図 2B)、よって少なくとも一部の Cellvento® 4Feed 混合フィードよりも生産性が低くなりました。ピーク生細胞密度はどの混合フィードでも同様でした (図 2A)。Cellvento® 4Feed の比率が高い混合フィードでは高い生細胞密度がより長く維持されましたが、必ずしも生産性は高くありませんでした (図 2C)。EX-CELL® Advanced CHO Fed-Batch Medium で培養した CHOK1 mAb1 でも同様に、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の比率が高い混合フィードへの嗜好性を示しました (データ未掲載)。

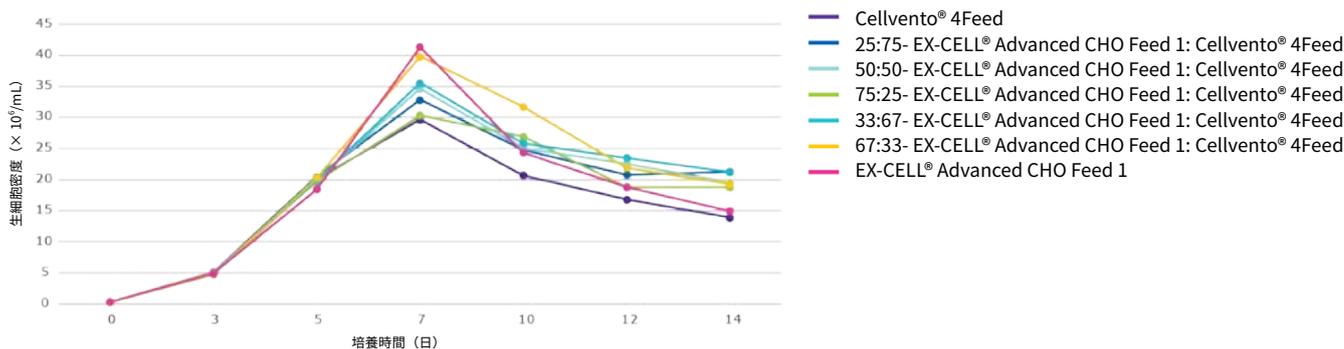


図 3A

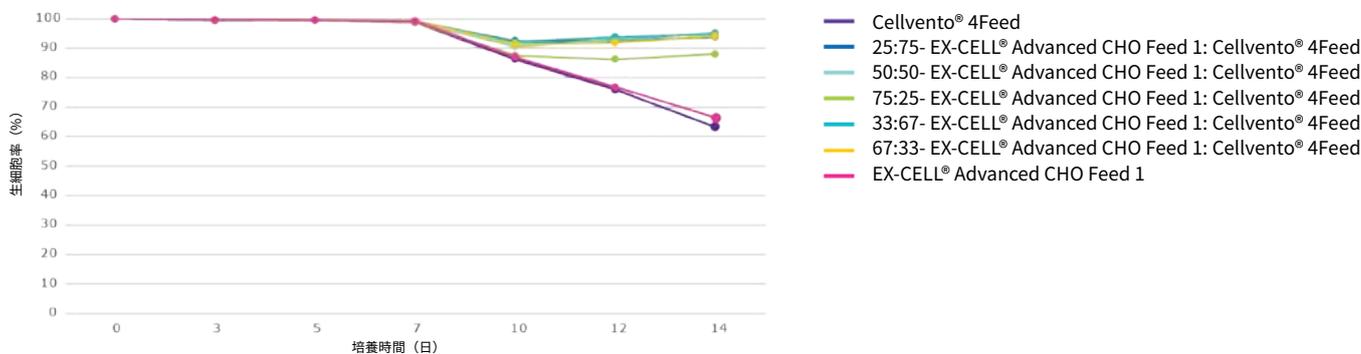


図 3B

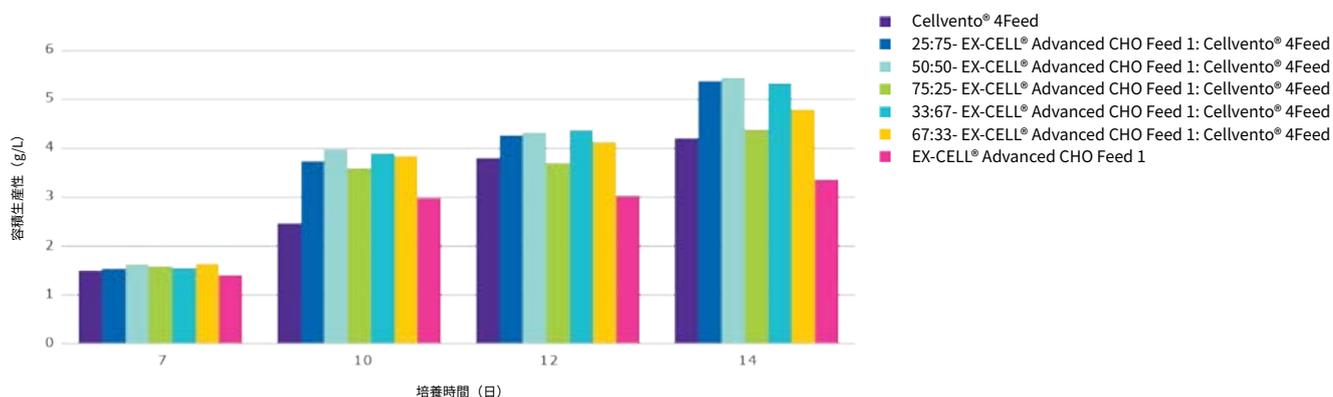


図 3C

図 3：EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch medium で CHOZN® mAb2 を 14 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (A)、生細胞率 (B) 及び容積生産性 (C)

EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch medium で培養した CHOZN® mAb2 は、Cellvento® 4Feed の比率が高い混合フィードへの嗜好性を示しました。Cellvento® 4Feed を 50% 以上含有する混合フィードはすべてピーク容積生産性が同等でした (図 3C)。ピーク生細胞密度は混合フィード間で最高 9.5×10^6 cells/mL まで変動がみられました (図 3A)。Cellvento® 4Feed 又は EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 単独とは対照的に、すべての混合フィードでフェドバッチ培養を通じて高い生細胞率が維持されました (図 3B)。Cellvento® 4Feed は高パフォーマンス混合フィードの重要な成分ですが、単独で使用するとピーク生細胞密度が最低となり、したがってピーク容積生産性も最低でした。Cellvento® 4CHO で培養した CHOZN® mAb2 も同様に Cellvento® 4Feed を 67% 以上含有する混合フィードへの嗜好性を示し、ピーク容積生産性が同等でした (データ未掲載)。

このケーススタディーの結果から、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の混合フィードに対するクローン嗜好性が判明しました。少なくとも 75 : 25、50 : 50 及び 25 : 75 の混合比率を評価することが望ましく、CHOK1 mAb1 は EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 75 : 25 混合フィードを使用したときに、CHOZN® mAb2 は 50 : 50 又は 25 : 75 混合フィードを使用したときに最大の生産性が示されました。使用する培地が EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch medium か Cellvento® 4CHO にかかわらず、CHOK1 mAb1 細胞株は EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 の比率が高い混合フィードを好み、CHOZN® mAb2 は Cellvento® 4Feed の比率が高い混合フィードを好みました。いずれの場合も、より好ましい混合フィードにより 14 日間のプロセスを通じて 85% を上回る生細胞率が維持され、ピーク生細胞密度は 7 日目の $20 \sim 35 \times 10^6$ cells/mL でした。

Study 3 : EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合フィードのスケラビリティの評価

Study 3 では、EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch medium を入れた Mobius® 50L シングルユースバイオリアクターで高生産性の CHOZN® mAb2 細胞株を培養しました (表 6)。Study 2 で判明した CHOZN® mAb2 で高い生産性が得られるフェドバッチ条件のうち 1 つを用いて、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50:50 混合フィードのスケラビリティを確認しました。

表 6 : Study 3 で使用した実験条件及び操作パラメータ

実験条件	操作パラメータ
培養容器	Mobius® 50L シングルユースバイオリアクター
開始培養液量	35.86 L
播種密度	5×10^5 viable cells/mL
攪拌	~ 14W / m ³
DO 設定点	50%
スパージ戦略	開放パイプから O ₂ 供給
pH 設定点/範囲	6.9 (+ 0.10 / - 0.15)
pH 制御	CO ₂ 及び Na ₂ CO ₃
ハーベスト基準	13 日後に培養終了
サンプル採取点	試験 3、4、5、6、7、10、12、13 日目
サンプル採取量	10 ~ 35 mL / 日 (必要な分析による)
グルコース添加	サンプル採取日に 6 g/L 以上となるよう添加
フィード添加スケジュール (EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合)	3、5 日目に 5%、7、10 日目に 7.5%、12 日目に 5% (フィード液を添加前に混合)

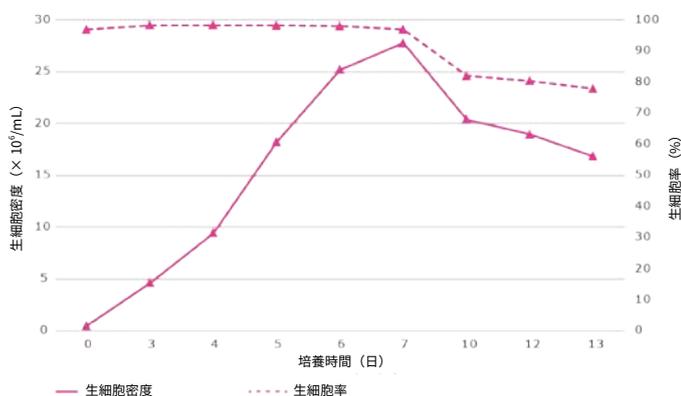


図 4A

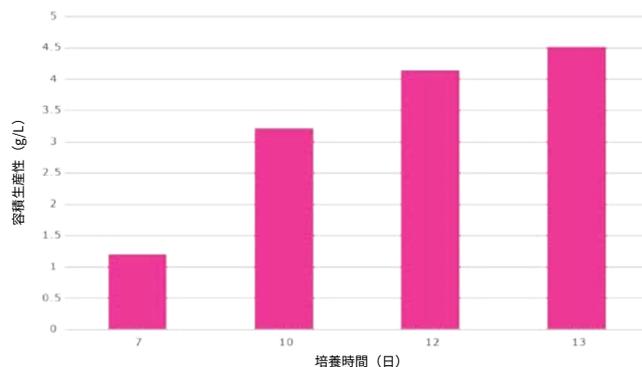


図 4B

図 4 : EX-CELL® Advanced CHO Fed-batch Medium に EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合フィードを添加し Mobius® 50 L シングルユースバイオリアクターで CHOZN® mAb2 を 13 日間フェドバッチ培養したときの生細胞密度 (4A 実線)、生細胞率 (4A 破線) 及び容積生産性 (4B)

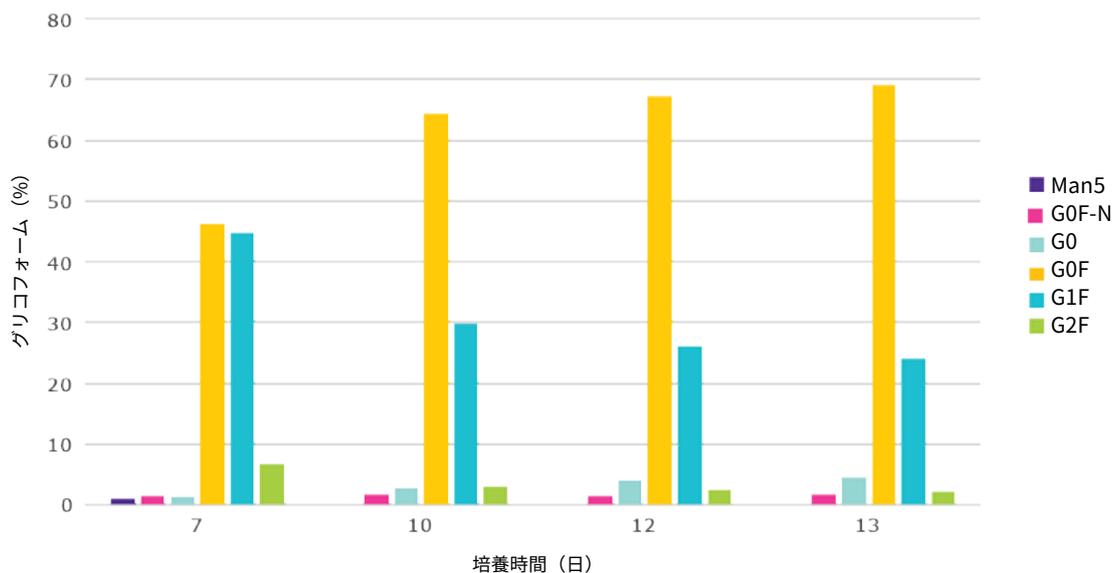


図 5 : EX-CELL® Advanced CHO フェドバッチ培地に EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50 : 50 混合フィードを添加し Mobius® 50 L シングルユースバイオリアクターで CHOZN® mAb2 を 13 日間フェドバッチ培養したときの N-グリコシル化プロファイル

CHOZN® mAb2 を Mobius® 50L シングルユースバイオリアクターで培養したとき、生細胞密度は 7 日目に 27×10^6 cells/mL を上回るピークに達し、生細胞率は 96% を超えていました (図 4A)。容積生産性は 13 日目に 4.5 g/L を超えました (図 4B)。EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50:50 混合フィードにより、スピントチューブ (図 3C) と Mobius® 50L シングルユースバイオリアクター (図 4B) とで同等のパフォーマンスが得られました。バイオリアクターでは 7 日目以降、糖鎖プロファイルにわずかな変化が認められました。13 日目、G0F の割合が高く、G1F も大きな割合を占め、G0F-N、G0 及び G2F は 5% 未満、Man5 は検出されませんでした (図 5)。

結論：

あらゆるクローン及び状況に適用できる単一のフェドバッチシステムはありませんが、上述したケーススタディーにおいて、EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチプラットフォームを組み合わせて培地とフィードの最適な組み合わせを見つけるアプローチの有効性が確認されています。これらの製品をうまく組み合わせることにより、より多様な細胞の嗜好性を効率的に検討できます。EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed を各種比率で混合することにより、各フィード単独よりも高いパフォーマンスが得られることが裏付けられました。したがってプロセスのパフォーマンスを改良する際には、ここに紹介したケーススタディーで示されたように単一フィードだけではなく混合フィードも併せて検討すべきです。2種類のフィードの混合使用に関する追加ガイダンスが、「Cellvento® 4Feed and EX-CELL® Advanced Feed Mixing Protocol」に記載されています。

重要な点として、これらの培地とフィードの組み合わせがすべての細胞株に適しているわけではありません。とはいえ上述のケーススタディーでは、特定の細胞株で EX-CELL® Advanced 及び Cellvento® フェドバッチプラットフォームを使用することにより何が達成できるかが示されています。フィードの各種比率、フィード量及びタイミングをスクリーニングすることにより、初めて最適なパフォーマンスが達成できます。またそうした場合も、フィード量とタイミングを単独で、もしくはフィード比率の変動と組み合わせるさらに操作すれば、パフォーマンスがいっそう向上した可能性があります。完全に最適化するためには追加実験でフェドバッチパフォーマンスを微調整する必要があります。

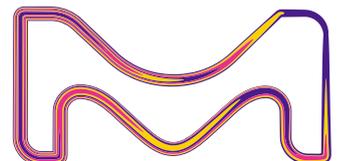
パフォーマンスは総栄養供給量とは必ずしも直接関係しません。ある細胞株には特定の栄養素が重要である可能性があり、したがって一見予想外にパフォーマンスが向上することもあります。Cellvento® 4Feed を総フィード量 18% で添加すると、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の 50：50 混合を総フィード量 30% で添加した場合とほぼ同等の総栄養量が供給されます。もしパフォーマンスが最小限の量で最大限の栄養を供給することにのみ基づくのであれば、Cellvento® 4Feed が常に最良のパフォーマンスを示すと予想されます。対照的に、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 と Cellvento® 4Feed の混合を高いフィード量で添加する方が、これらの細胞株には有益であることが上述の試験で示されています。この場合、Cellvento® 4Feed はアミノ酸などの主要栄養素をより高濃度で供給するのに対し、EX-CELL® Advanced CHO Feed 1 は多様な栄養素をより低濃度で供給します。

細胞株はそれぞれ応答が異なるため、フィードを単独及び組み合わせて評価するアプローチは、高濃度で多様な最適混合フィードの供給によってパフォーマンスを最大化できる可能性が最も高いと考えられます。培地とフィードの総合評価により、高い細胞密度が得られ、それにより容積生産性向上と重要なコスト効率を実現されます。

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2022年3月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore 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. MK_WP8492EN 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

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

PSM273-2203-PDF-MA