

# 増殖および一過性トランスフェクション用培地を使用した、バッチ培養での CHO 細胞を用いた高力価タンパク質の発現

Kalle Johnson, Christopher B. Bitner, Gerald D. McEwen, and Mark E. Wight

GE Healthcare Life Sciences, 925 West 1800 South, Logan, Utah 84321, USA

## 要約

ヒト胎児腎 (HEK293) 細胞における前臨床生産からチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における安定生産への移行時に生じるタンパク質の品質の差異などの問題を避けるために、増殖およびトランスフェクション用の培地を用いることで、一過性トランスフェクトされた CHO 細胞において、十分な量の組換えタンパク質を生産することができます。ここでは、HyCell TransFxC 培地中で増殖およびトランスフェクトされた CHO 細胞で、高い細胞密度、トランスフェクション効率、およびタンパク質力価を達成できることを示します。実際では、バイオ医薬品産業で適応されている従来の方法 (バッチ/振とうフラスコ) および試薬 (PEI およびリポソーム) を使用しました。

## はじめに

一過性遺伝子発現 (TGE) は、前臨床試験における構造的および機能的特徴付けなどのさまざまな特性の評価を目的として、組換えタンパク質を迅速に生産するために幅広く使用されている技術です。CHO 細胞の安定発現株は、組換えタンパク質の大規模生産に日常的に使用されていますが、従来、CHO 細胞の TGE で生産される評価用の組換えタンパク質は、極めて少量でした。そのため、CHO 細胞の安定発現株の作成に先立って標的タンパク質を評価するために、より高い収量のヒト胎児腎細胞 (HEK293) で TGE が行われてきました。しかしながら、CHO 細胞株と HEK293 細胞株との間の代謝経路の違いは、2つの細胞株で生産されるタンパク質の特性の差につながる可能性があります。TGE の過程で複数の培地を用いること、たとえば 1 つ目の培地を一過性トランスフェクション用に、2 つ目の培地をタンパク質生産用に用いることは、プロセスを複雑なものにします。本実験は、安定生産に使用されるのと同じ CHO 細胞株で最小限の培地交換により一過性発現の作業を完了することができることを示しています。HyCell TransFxC の組成は、トランスフェクション、増殖、および生産用の無血清培地であり、CHO 細胞の TGE バッチ培養で高いトランスフェクション効率および組換えタンパク質の高収量を可能にします。

## 方法

### 従来の細胞培養

浮遊 CHO 細胞を HyCell TransFxC を使用し 125 mL 振とうフラスコで培養しました。オービタルシェーカー (回転半径 19 mm) で約 120 rpm で一定に攪拌しながら、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養しました。細胞数および生存率は、Vi-Cell アナライザーを用いて毎日評価しました。

### 培地

無血清かつ動物由来成分不含の HyCell TransFxC をトランスフェクションおよび細胞増殖に使用しました。比較対象の培地として、一般的に使用されている一過性トランスフェクション培地 (Life Technologies, FreeStyle CHO) を使用しました。

### トランスフェクションのための細胞増殖

振とうフラスコに培地 35 mL を添加し、約  $0.5 \times 10^6$  cells/mL で対数増殖する細胞を播種し、トランスフェクション前に、約 120 rpm で一定に攪拌しながら 37°C、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養しました。この方法で、トランスフェクション時に培養液中の細胞が対数増殖期で約  $1.0 \times 10^6$  cells/mL になるようにしました。

### ポリエチレンイミン (PEI) トランスフェクション

分子量 25,000 の線状 PEI (Polysciences, コード番号 23966) の懸濁液を、GFP 発現ベクター (Genlantis, コード番号 040400) または  $\beta$  gal (Genlantis, コード番号 010200) を含むプラスミド DNA と 3 : 1 (w/w) の比で混合しました。試薬/DNA ポリプレックスを形成するために、PEI および DNA を室温 (約 22°C) で 20 分間インキュベートしました。ポリプレックスを細胞培養液に滴下して添加しました。

### リポソームトランスフェクション

Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬 (Life Technologies, コード番号 11668019) を、GFP 発現ベクター (Genlantis, コード番号 040400) または  $\beta$  gal (Genlantis, コード番号 010200) を含むプラスミド DNA と 3 : 1 (w/w) の比で混合しました。試薬/DNA リポプレックスを形成するために、PEI および DNA を室温 (約 22°C) で 20 分間インキュベートしました。リポプレックスを細胞培養液に滴下して添加しました。

### サンプリングと解析

トランスフェクションの 24 時間後および 48 時間後にサンプルを採取して、BD Accuri C6 フローサイトメーターを用いて GFP 発現効率を評価しました。 $\beta$  gal 分析のため、培養終了 (<80% 生存) まで 24 時間ごとにサンプルを採取しました。

### スケールアップ

5 L の培養量 (総容量約 6.5 L) をもつ Applikon ez バイオリアクターシステム (Applikon Biotechnology) で 4.4 L の培養を行いました (DO = 50%, pH = 7, 温度 = 37°C, 攪拌 = 350 rpm)。50 L の HyPerforma S.U.B. TK システム (Thermo Scientific) で 44 L の培養を行いました (DO = 50%, pH = 7, 温度 = 37°C, 攪拌 = 170 rpm)。消泡剤 C をトランスフェクションの 48 時間後に使用しました。1 L の PBS に 6.5 mL の消泡剤 C を添加することによって PBS と消泡剤 C の混合溶液を調整しました。消泡剤溶液をオートクレーブし、はじめのうちは 24 時間ごとに 0.5 mL/L 培養液量でバイオリアクターに添加しました。培養が進むにつれて、消泡剤溶液を 12 時間ごとに最大で 2 mL/L 培養液量まで増量しました。

## 結果

HyCell TransFxC および比較対象の培地における CHO 細胞株 A、B の増殖、生存率を図 1、2 に示しています。生産性を図 3、4 に示しています。これらの結果より、HyCell TransFxC において増殖およびトランスフェクトされた細胞は、比較対象の培地で増殖およびトランスフェクトされた細胞よりも細胞密度、力価が非常に高いことが明らかになりました。

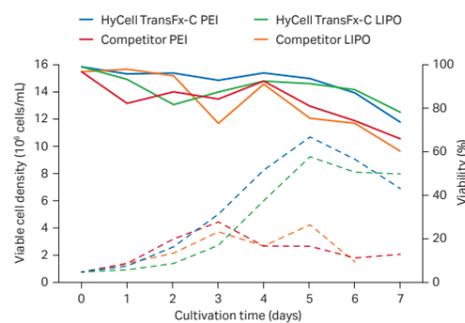


図1. Growth (solid lines) and viability (dotted lines) of CHO cell clone A.

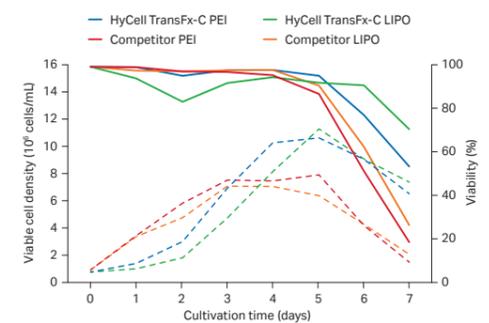


図2. Growth (solid lines) and viability (dotted lines) of CHO cell clone B.

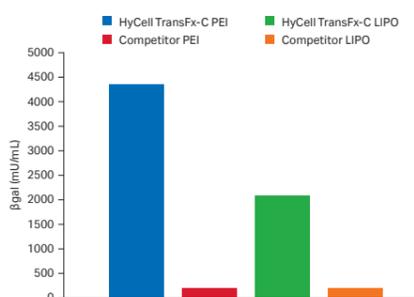


図3.  $\beta$  gal titer of CHO cell clone A.

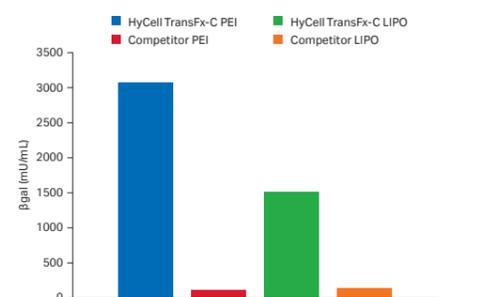


図4.  $\beta$  gal titer of CHO cell clone B.

トランスフェクション効率 (GFP を発現する細胞の割合) の分析より、HyCell TransFxC において増殖およびトランスフェクトされた細胞は、比較対象の培地で増殖およびトランスフェクトされた細胞よりも効率が非常に高いことが明らかになりました (図 5)。

比較対象の培地での生産性を 100% (コントロール) とした場合、HyCell TransFxC における一過性発現の Mab 生産量がコントロールに対して 400% を超えることを示しています (図 6)。HyCell TransFxC での実際の力価は 171 mg/L でした。

コントロールと比較した  $\beta$  gal 発現は、スケールアップしても結果に一貫性があることを示しています (図 7)。

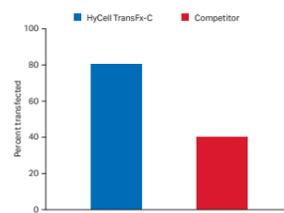


図5. Transfection efficiency of CHO cell clone A.

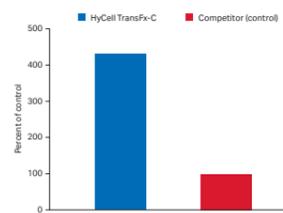


図6. Peak MAb titer of CHO cell clone B.

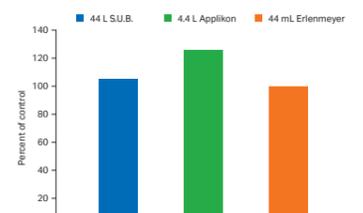


図7.  $\beta$  gal expression of CHO cell clone B.

## 結論

- 他の市販のトランスフェクション培地と比べて、HyCell TransFxC 中ではトランスフェクション後の生細胞密度が高くなります。これは、PEI およびリポソームの両方を用いる複数の CHO 細胞株において明らかです。
- 組換えタンパク質 ( $\beta$  gal) の一過性発現の生産量は、他の市販のトランスフェクション培地と比べると、HyCell TransFxC では非常に高くなります。これは、PEI およびリポソームの両方を用いる複数の CHO 細胞株において明らかです。
- 他の市販のトランスフェクション培地と比べると、HyCell TransFxC では、PEI を用いた GFP の一過性発現の効率が非常に高くなります。
- 従来の試薬およびプロセスを用いて力価 (約 170 mg/L) の一過性発現 Mab が得られることから、CHO 細胞における前臨床用組換えタンパク質の生産が可能になります。さらに、この結果により、HEK 細胞 (一過性株) から CHO 細胞 (安定株) へタンパク質生産を移行することで生じるタンパク質の品質に関する懸念を払拭できます。

※記載されている所属は、執筆/取材当時のものです。

Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジー株式会社  
〒169-0073  
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング  
お問合せ: バイオダイレクトライン  
TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370  
e-mail: Tech-JP@cytiva.com



掲載されている内容および価格は 2019 年 2 月現在のものです。価格は希望小売価格 (消費税は含まれておりません) であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。