

# シングルユース攪拌式およびロック式バイリアクターシステムを用いたフェドバッチ培養での効率的で高力価のモノクローナル抗体産生

このアプリケーションノートでは、シングルユース攪拌式の Xcellerex XDR-200 とロック式の ReadyToProcess WAVE 25 バイリアクターシステムを使用したフェドバッチ培養プロセスでモノクローナル抗体 (MAb) を産生する手法を紹介します。200 L の攪拌式バイリアクターに播種するために、15 L のロック式バイリアクターを使用して細胞を増殖させました。WAVE 25 の性能と XDR-200 の性能を比較するために、200 L 培養液から 7 L を並列させた WAVE 25 に移して、総培養液量を 10 L にしました。XDR-200 および WAVE 25 での MAb 収量はそれぞれ 5.0 g/L、4.9 g/L でした。両バイリアクター培養において代謝物のプロファイルは非常に類似していました。ReadyToProcess WAVE 25 および Xcellerex XDR バイリアクターシステムは共に、シングルユースフォーマットにおいて組換えタンパク質産生のために堅牢で拡張性の高いソリューションを提供します。さらに、WAVE 25 はシードトレインとプロセス開発との両方に使用できる汎用性の高いツールです。

## はじめに

XDR-200 システムは、Xcellerex バイリアクタープラットフォームの一つであり、システムプラットフォームは 10 ~ 2,000 L の最大培養液量に対応しています。このプラットフォームは、GMP 製造環境の要求を満たすために開発されたモジュール式の Ready-to-use のバイリアクターフォーマットで、シングルユース技術と攪拌槽設計に優れています。

ReadyToProcess WAVE 25 ロック式バイリアクターシステムは、迅速に設置でき、簡便に取り扱えるよう設計されており、最大 25 L のスケールで正確な性能を発揮します。このシステムは、プロセス開発、研究開発、シードトレイン、小規模生産に適しています。

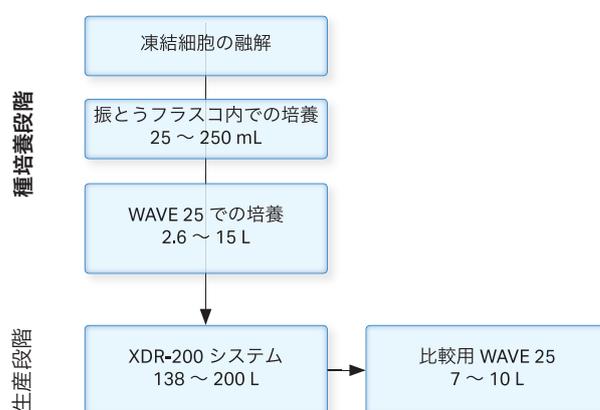


図1. 標準的な方法を用いて凍結細胞を融解しました。はじめに振とうフラスコで細胞培養を行ったあと、WAVE 25で最終種培養液量が15 Lになるまで培養しました。続いて種培養液をMAb産生用のXDR-200に移しました。XDR-200培養液の一部をWAVE 25に移し、バイリアクター培養間でのMAb産生を比較しました。

このアプリケーションノートでは、WAVE 25 をシードトレインバイリアクターとして使用し、ActiCHO で培養した CHO DG44 細胞株を使用して、MAb 産生における XDR-200 と WAVE 25 との性能を比較します。実験手順を図 1 に示しています。

## 材料および方法

### 凍結保存された細胞の融解と種培養

CHO DG44 細胞 (licensed from Celica GmbH, Laupheim, Germany) を標準プロトコールに従って凍結保存から融解し、3 ~ 4 日ごとに継代培養しました。播種した細胞を増殖させるために、WAVE 25 を、表 1 に示した操作パラメーターおよび条件で使用しました。バイリアクターを用いて最初に 2.6 L で、3 日後に新たな培地の添加により 15 L での 2 段階で拡大培養をしました。

表1. 種培養時のWAVE 25の操作パラメーターおよび条件

Medium	ActiCHO P with 6 mM L-glutamine
Culture chamber	50 L Cellbag bioreactor
Rocking	
Low-volume stage	20 rpm, 6° rocking angle
Full-volume stage	20 rpm, 8° rocking angle
Gas flow	0.3 L/min
Seed cell concentration	$0.3 \times 10^6$ viable cells/mL
pH set point	
Low-volume stage	No pH control (initial 7.5% CO <sub>2</sub> in headspace)
Full-volume stage	pH controlled at 7.0 with CO <sub>2</sub>
Dissolved oxygen (DO) set point	40%
Working volume	2.6 L for initial 3 d in shaker flasks, 15 L to target cell concentration in ReadyToProcess WAVE 25
Target cell concentration at transfer	$3.5$ to $4.5 \times 10^6$ viable cells/mL
Viability criteria at transfer	> 95%

## 生産段階の細胞培養

ペリスタリックポンプ (600 シリーズポンプ、Watson-Marlow) を使用して、15 L の種培養液全量を WAVE 25 から XDR-200 に無菌的に移しました。総容量 145 L まで培地を満たした後、培養液 7 L を WAVE 25 に移し、比較用の MAb 産生バイオリアクターとして稼働させました。Mab 産生用バイオリアクターの操作パラメーターおよび条件を表 2 に示しています。

表2. 生産段階時のXDR-200およびWAVE 25の操作パラメーターおよび条件

	XDR-200	WAVE 25
Medium	ActiCHO P with 6 mM L-glutamine	ActiCHO P with 6 mM L-glutamine
Culture chamber	Standard bag assembly: Development	20 L Cellbag bioreactor with DO and pH sensors
Starting viable cell concentration	$0.35$ to $0.45 \times 10^6$ viable cells/mL	$0.35$ to $0.45 \times 10^6$ viable cells/mL
Inoculum volume	15 L	7.0 L transferred from XDR-200
Medium fill volume	130 L	N/A
Starting operating volume	145 L 138 L after transfer to satellite bioreactor	7.0 L
Impeller/rocker speed	150 rpm	20 to 30 rpm, 8° rocking angle, 30% rocking motion
pH set point	7.1	7.1
pH PID* settings	P: 0.5 I: 1.0 D: 0	Factory settings (automatically computed by the system)
Base for pH control	7.5% w/v NaHCO <sub>3</sub>	7.5% w/v NaHCO <sub>3</sub>
DO set point	40%	40%
DO PID* settings	P: 0.254 I: 4.083 D: 0	Factory settings (automatically computed by the system)
Air gassing	2 L/min head-space gassing DO-controlled gassing administered through 1 mm sparger Controller output: 0% to 20%: 1 to 5 L/min (sparged) 20% to 100%: 5 L/min (sparged)	On demand (from DO and pH control) 0.2 L/min total gas flow
Oxygen flow	On demand (from DO PID control) administered through 20 μm sparger Controller output: 0% to 20%: 0 L/min 20% to 100%: 0 to 5 L/min (sparged)	On demand (from DO PID control) max. 50% 0.2 L/min total gas flow
Antifoam	Medical antifoam C (Sigma-Aldrich) (added as required)	Medical antifoam C (Sigma-Aldrich) (added as required)
Feeds	ActiCHO Feed-A ActiCHO Feed-B 400 g/L D-glucose	ActiCHO Feed-A ActiCHO Feed-B 400 g/L D-glucose
Feed starting point	Day 2	Day 2
Daily feed volumes	ActiCHO Feed-A: 5.915 L ActiCHO Feed-B: 0.592 L Glucose: as required with target of 6 g/L excluding ActiCHO Feed-A	ActiCHO Feed-A: 0.295 L ActiCHO Feed-B: 0.0295 L Glucose: as required with target of 6 g/L excluding ActiCHO Feed-A
Harvest criteria	13 elapsed days and/or when culture viability was < 60%	13 elapsed days and/or when culture viability was < 60%

\* PID=Proportional-integral-derivative (P: 比例、I: 積分、D: 微分)

## 分析方法

用いた分析方法を表 3 に示しています。

表 3. 分析方法

Measured parameter	Assay type	Type of sample
Cell concentration and viability	Bioprofile FLEX analyzer (Nova Biomedical Corp.)	Cell suspension
Glucose	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Lactate	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Ammonium	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Glutamine	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Glutamate	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Osmolality	Bioprofile FLEX analyzer	Cell suspension
Product concentration	CEDEX Bio analyzer (Roche)	Clarified cell culture supernatant

## 結果と考察

### 種培養段階の細胞増殖

融解後の CHO DG44 細胞株を、振とうフラスコで拡大培養させ、培養液を WAVE 25 の 50 L Cellbag に移しました。バイオリアクターを 7.5% CO<sub>2</sub> 混合空気で膨張させ、総容量 2.56 L 中、細胞密度  $0.3 \times 10^6$  cells/mL で播種しました。約 72 時間後、ReadyToProcess Pump 25 と WAVE 25 のフィード添加機能を利用して、培地をポンプ添加し、培養液を 15 L に増量しました。ガスおよび pH 制御は、設定点 7.0 (塩基制御なし) で開始しました。細胞増殖および生存率を図 2 に示しています。バイオリアクターの重量、DO、pH のオンライン測定値を図 3 および 4 に示しています。さらに 48 時間後、種培養液全量を生細胞密度  $3.25 \times 10^6$  cells/mL で XDR-200 に移しました。

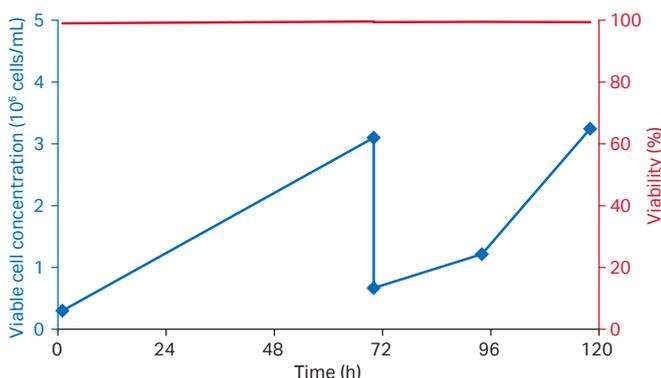


図2. WAVE 25における種培養の細胞増殖と生存率。培養容量が72時間で2.56 Lから15 Lに増えました。

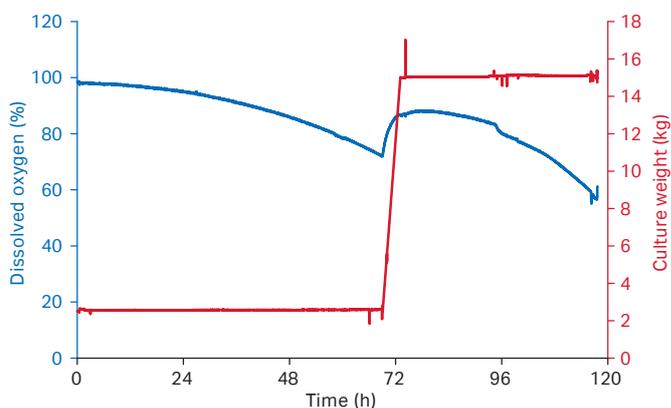


図3. WAVE 25の種培養液量と溶存酸素(DO)のオンライン測定値。

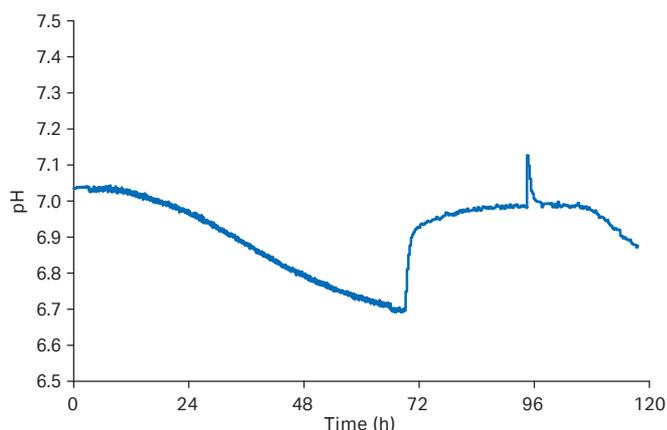


図4. 種培養時のWAVE 25のオンラインpH測定値。オフラインキャリブレーションは約96時間時点で行われ、96時間以前の実際のpHは、測定されたpHよりも約0.1 pH高いことを示しました。

### XDR-200 バイオリアクター培養

播種の1日前に、XDR-200を130 Lの生産培地で満たし、37°C、pH 7.1に平衡化させました。このバイオリアクターに、WAVE 25の種培養液全量(15 L)を最終細胞密度が  $0.38 \times 10^6$  cells/mLになるまで播種しました。播種後のXDR-200中の容量は145 Lであり、種培養液の約10倍に拡大しました。

平衡化後、培養液7 LをXDR-200からWAVE 25に移すことで、138 LをXDR-200で培養しました。連日のフィード添加後、回収時の最終液量はXDR-200では約200 L、WAVE 25では約10 Lでした。

表4および図5に示すように、両培養液は、3段階の特徴的な増殖期をもつ非常に類似した増殖曲線を示しました。すなわち、最初の約72時間の初期急速増殖期、それに続くよりゆるやかな増殖期、そして約144時間後から回収までの生存率低下を伴う増殖停止および死滅期がありました。65.3～73.0%の生存率で培養液を回収しました。両培養液は類似した生産性を示しました(図6および表4)。

両培養液において、乳酸濃度は培養初期の指数増殖期に急速な増加を示し、その後よりゆるやかな増殖期で減少し、そして最大生細胞密度に達した後、採取するまで一定の低い濃度を示しました(図7)。

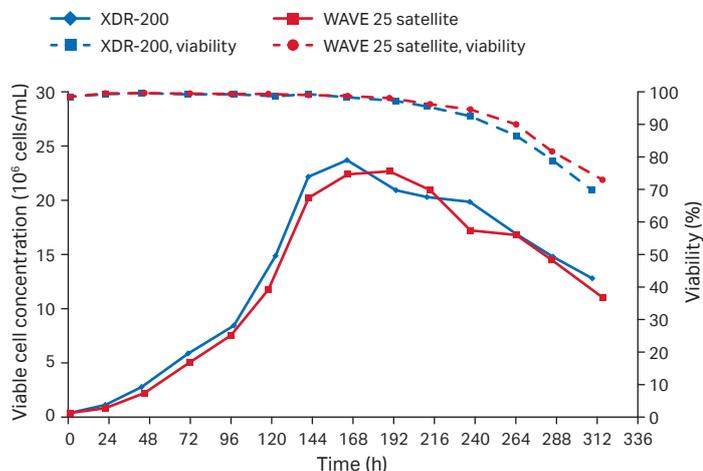


図5. 生産培養液中の生細胞密度と生存率の比較。両培養液が類似した増殖および生存率曲線を示しました。測定用の各サンプルはフィード直前に回収しました。

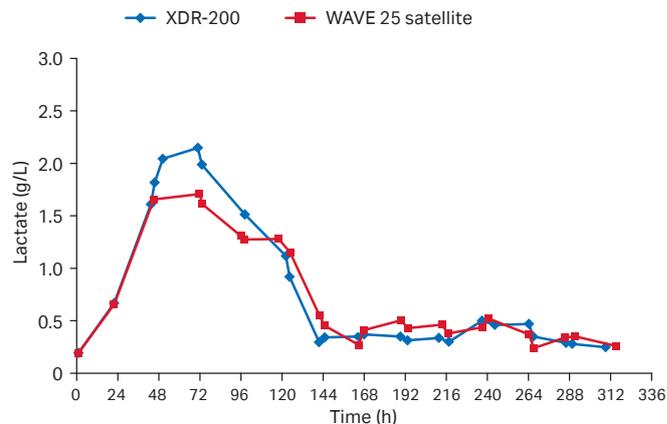


図7. 生産培養における乳酸濃度の比較。測定用の各サンプルはフィード直前および直後に回収しました。

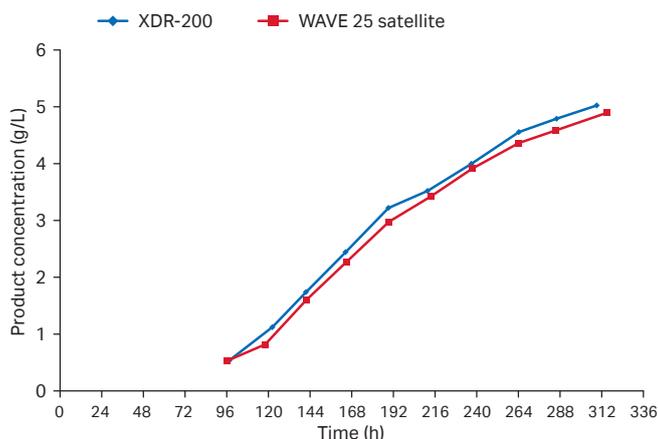


図6. 生産培養におけるMAb濃度の比較。測定用の各サンプルはフィード直前に回収しました。

両培養液のアンモニウム濃度曲線を示しました(図8)。アンモニウム濃度は、培養初期の約48時間に急速な増加を示し、その後、培養約120時間まで徐々に減少した後、回収するまでに再び増加しました。培養中の異なる時点でのアンモニウム産生および消費の変動は、グルタミン合成酵素活性に関連するとともに、細胞周期中のグルタミンや他のアミノ酸のさまざまな代謝速度にも関連しています。たとえば、乳酸生成速度が低下してグルタミン生成速度が上昇する約72時間の時点では、明らかな代謝のシフトが見られます。この時点では、高レベルの解糖と高いグルタミン消費を伴う速い成長速度から、トリカルボン酸(TCA)サイクルにおけるより低い成長速度でより高いエネルギー産生へ細胞がシフトします。グルタミンはグルタミン合成酵素によってグルタミン酸とアンモニウムから生成されるので、図9および10にも反映されるように、これらの3つの化合物は密接に関連しています。グルタミン酸がフィード培地中で供給される一方で、グルタミンはベース培地でのみ供給されました。

表4. バイオリアクターによるMAb産生培養からの結果

培養方法 (スケール)	培養液中最大生細胞数 (10 <sup>6</sup> cells/mL)	回収細胞生存率 (%)	回収抗体産生濃度 (g/L)	細胞特異的生成物体積 (pg/細胞/d)
XDR-200	23.7	65.3	5.0	27
WAVE 25 satellite	22.7	73.0	4.9	28

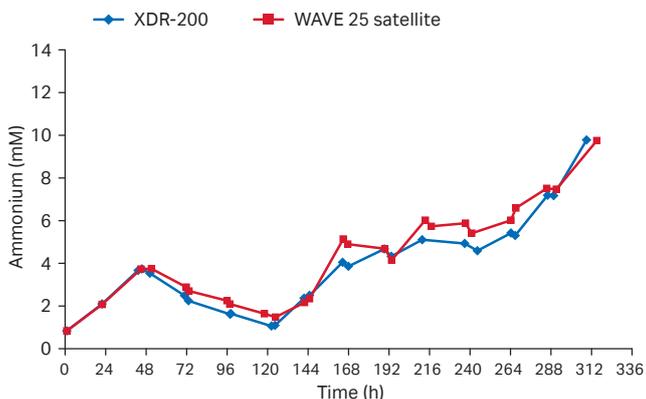


図8. 生産培養におけるアンモニウム濃度の比較。測定用の各サンプルはフィード直前および直後に回収しました。

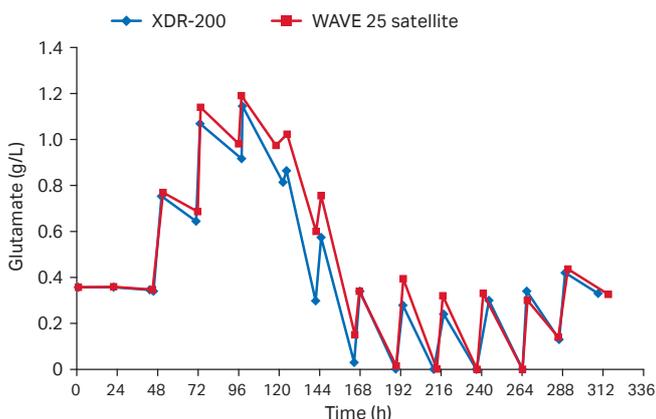


図9. 生産培養におけるグルタミン酸濃度の比較。測定用の各サンプルはフィード直前および直後に回収しました。

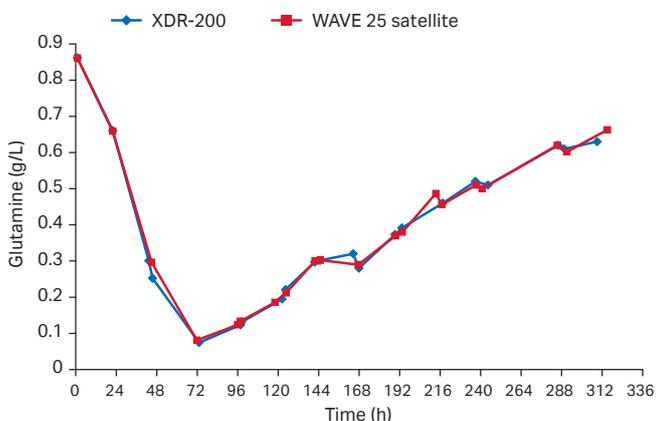


図10. 生産培養におけるグルタミン濃度の比較。

各フィード培地添加の前後で浸透圧を測定しました。主にアミノ酸濃度の増加に起因するため、各フィード培地添加によって浸透圧が増加しました(図11)。アミノ酸が消費されるにつれて、浸透圧も低下しました。しかし、フィード培地および pH 調製において塩類も供給されるので、培養中の浸透圧は徐々に増加しました。さらに、消費されていない栄養素も浸透圧の増加に影響します。

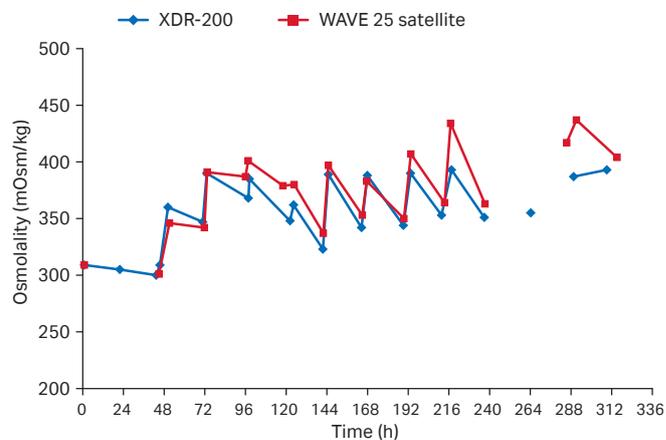


図11. 生産培養における浸透圧の比較。測定用の各サンプルはフィード直前および直後に回収しました。

培養中の二酸化炭素圧 (pCO<sub>2</sub>) 曲線を図12に示しています。乳酸が培養初期に産生されると、pCO<sub>2</sub> は減少して pH を維持し、逆にフィード培地と炭酸水素ナトリウムが追加されると、乳酸濃度が低下し pCO<sub>2</sub> は増加します。

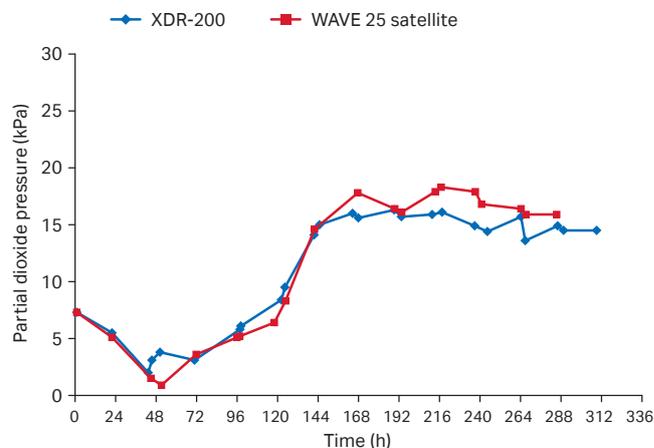


図12. 生産培養における培養液中の二酸化炭素圧の比較。

## 結論

本結果は、種培養とプロセス開発の両方の目的に WAVE 25 を使用できることを示しています。また、生産培養の比較結果より、WAVE 25 と XDR-200 は同等であることが示されました。両方のバイオリアクターでの培養では、類似した細胞増殖および生存率、代謝産物含量、MAb 生産性を示し、XDR-200 および WAVE 25 において収量はそれぞれ 5.0 g/L、4.9 g/L でした。リアクターの幾何学的形状は異なりますが、WAVE 25 での培養結果は、XDR-200 を使用したより大スケールな培養プロセスを反映するものでした。結論として、ReadyToProcess WAVE 25 と Xcellerex バイオリアクターシステムの組合せは、最大 2,000 L スケールまでの組換えタンパク質産生における信頼性と拡張性の高いソリューションとなります。

## 注文情報

Product	Code number
ReadyToProcess WAVE 25, rocker	28-9880-00
ReadyToProcess CBCU Full	29-0440-81
ReadyToProcess Pump 25	29-0320-03
Tray 50	29-0444-74
Lid 50	29-0444-77
UNICORN 6.3.2 WrkStn-pure-BP	29-0469-18
Cellbag 20 L	29-0152-14
Cellbag 50 L	29-0152-16
Standard bag assembly: Development	29-0410-66
ActiCHO Level 1 CD Pwd Kit	29-0925-41

Related literature	Code number
ReadyToProcess WAVE 25, data file	29-0566-95
Disposable Cellbag bioreactors for WAVE Bioreactor systems, data file	28-9511-36
Xcellerex XDR cell culture bioreactor systems, data file	29-0929-25
UNICORN 6 control software, data file	28-9573-46

For more information on the XDR-200 bioreactor system, please contact your local sales representative.

## 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ズジャパン株式会社  
〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

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。