

單株抗體(mAb)生產 CHO 細胞系的分批饋料培養製程建立及優化

饋料批次培養製程在目前利用哺乳動物細胞培養進行重組蛋白及抗體生產中占主導地位，可以在生理條件下提供關鍵營養成份，從而使細胞性能達到最佳狀態。基礎培養基與補充物搭配建立饋料策略，通過饋料批次培養製程可以獲得數 g/L 級的抗體產量。對於特定細胞系，基礎培養基與補充物的匹配程度是饋料批次培養製程建立的關鍵。

本文將介紹一種廣泛適用的高效工作流程，旨在發現最優基礎培養基和補充物組合，建立性能優異的饋料製程。



圖 1.實現高效批次饋料製程的工作流程模型

材料與方法

細胞株和培養基

本實驗採用表達抗腫瘤壞死因子(TNF- α) IgG1 抗體的 CHO-DG44 細胞株。首先將細胞株馴化至 CDM4NS0 基礎培養基(第0步驟)。選擇 8 種 Cell Boost 營養補充物(1、2、3、4、5、6、7a、7b)作為饋料以獲得最佳培養性能表現。由於這些營養補充物的營養成分和濃度均不相同(表 1)，因此我們將 Cell Boost 1 的氨基酸莫耳濃度設置為 100%，對其他營養補充物總氨基酸含量進行標準化，以排除由於營養補充物中氨基酸含量不同引起的培養表現的差異。

表 1.Cell Boost 營養補充物儲備溶液中的氨基酸莫耳比

Cell Boost 營養補充物	儲存濃度(%)	總胺基酸莫耳濃度 (mM)	氨基酸莫耳比
1	10	208.0	1.00
2	10	351.6	0.59
3	5	115.6	1.80
4	10	365.5	0.57

備註: Cell Boost 7b 用量為 Cell Boost 7a 的十分之一。

01 篩選饋料營養補充物

採用 DoE 方法篩選基礎培養基與 Cell Boost 營養補充物的最優組合(圖 2)。在 MODDE™ 12 套裝軟體 (Umetrics AB) 中，使用指定為 -1、0 和 +1 的低、中和高 DoE 等級，將所有八種 Cell Boost 營養補充物作為量化因數輸入。按照表 1，將 1 mL Cell Boost 1 分別與 0.59 mL、1.8 mL、0.57 mL、1.58 mL、1.53 mL、0.34 mL 和 0.03 mL 的 Cell Boost 2、3、4、5、6、7a 和 7b 混合，製備 “Cell Boost 饋料混合物”。隨後將該平衡 Cell Boost 饋料混合物分別加到基礎 CDM4NS0 培養基中，使最大滲透壓莫爾濃度達到 400 mOsm/kg，以定義最大 DoE 等級 +1，不添加任何營養補充物為-1，添加量為最大添加量的 1/2 定義為 0。

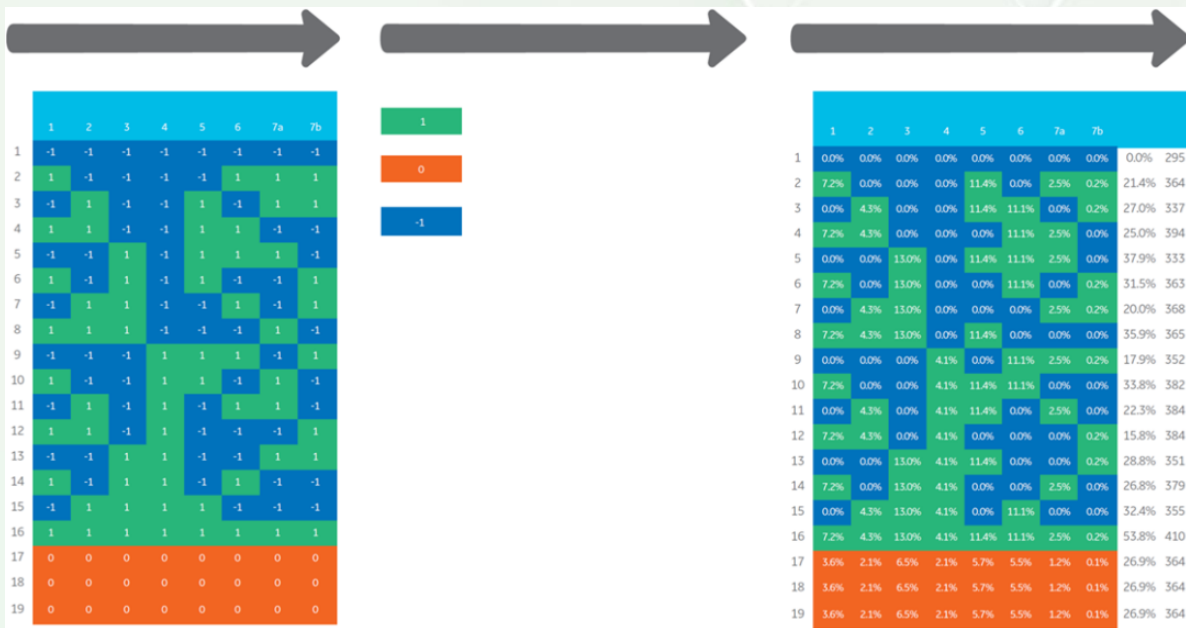


圖 2.在 CDM4NS0 培養基中生長的 mAb 生產 CHO 細胞系的 Cell Boost 分批饋料培養實驗設計基質和 DoE 等級定義(第 1 步)。每種 Cell Boost 營養補充物具有 10 mM 的總氨基酸。

培養基準備好之後，將添加不同 Cell Boost 的 CDM4NS0 培養基用於前述單抗表達細胞系的單純批次培養，培養體積為 30 mL，接種密度 0.3×10^6 cells/mL。接種後第三天開始每天採樣測試細胞密度、存活率、抗體濃度和代謝物(即葡萄糖、乳酸、穀氨醯胺、谷氨酸和氨)，直至細胞活率降至 60%以下時終止培養。

02 確定饋料營養補充物添加比例

使用第 1 步中確定的最優 Cell Boost 組合，進行下一輪 DoE 饋料批次培養測試(圖 3)。將選定的 Cell Boost 營養補充物加到 CDM4NS0 中，以達到對應於 1、0 和+1 級 DoE 的 400、500 和 600 mOsm/kg 滲透壓莫爾濃度。將細胞以 0.3×10^6 cells/mL 的濃度接種於添加了 6 mM L-穀氨醯胺的 CDM4NS0 中進行培養。自第 3 天起，根據圖 3 所示每天添加一次補料。

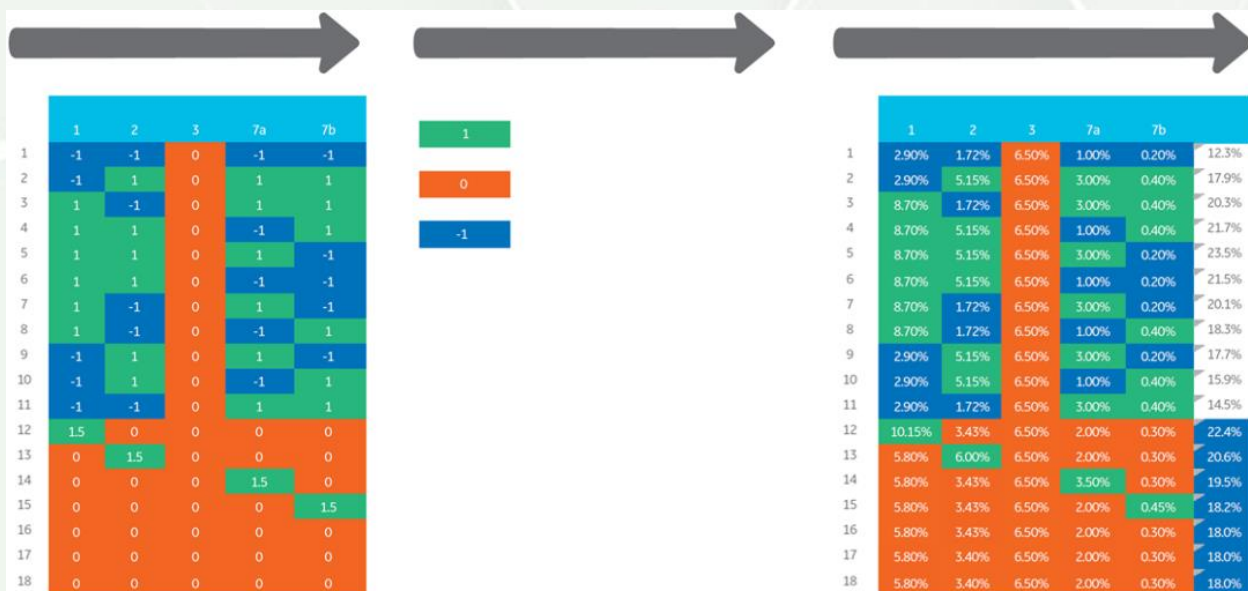


圖 3.在 CDM4NS0 培養基中生長的 mAb 生產 CHO 細胞系的批次饋料培養實驗設計基質和 DoE 等級定義(第 2 步)。

03 生物反應器驗證

將培養於 CDM4NS0 基礎培養基中的 mAb5 細胞系，在 500 mL 反應器中進行批次饋料培養，以驗證所開發的 Cell Boost 混合物和補充物策略(表 2)。

表 2.基於當前工作容積 (WV) 的不同優化補料溶液配方及每日濃度

補充物溶液	包含營養補充物	單次饋料量	備註
參考補充物	Cell Boost 1、2、3、7a、7b	8.77% WV	Cell Boost 營養補充物可單獨製備，亦可混合為液體。
饋料混合物	Cell Boost 1、2、3、7a	8.70% WV	Cell Boost 7b 以 0.07% WV 單獨添加。

實驗結果與討論

從而最大限度地減少培養基消耗，同時最大限度地提高活細胞天數和生產力。以低 CSPR (cell-specific perfusion rates) 優化流程可顯著降低設備成本、實驗室空間和產品稀釋度。通過在 ReadyToProcess WAVE 25 生物反應器中以恆定體積灌注速率達到 200×10^6 cells/mL，確定最小 CSPR 為 10 pL/cell/day，且可以產生超過 200×10^6 細胞/mL 的最高 VCD。ActiPro + Cell Boost 1/3 通過使用 15 到 30 pL/cell/d 的恆定 CSPR 來減少培養基消耗，達到了類似的高 VCD。並且，成功地將穩定生產灌注運行放大到 Xcellerex XDR 50 L 生物反應器。在相似 CSPR 下，饋料小規模培養和灌注生物反應器之間的關鍵培養參數也非常相似。在生物反應器灌注運行中，半乳糖化成分的糖基化是增加的，但在半連續模型中則是降低，可能是由於氨積累量增

加。灌注運行的生物反應器可以有效延長產物生成的時間與提高生成量(更多詳細結果請洽岑祥公司)。

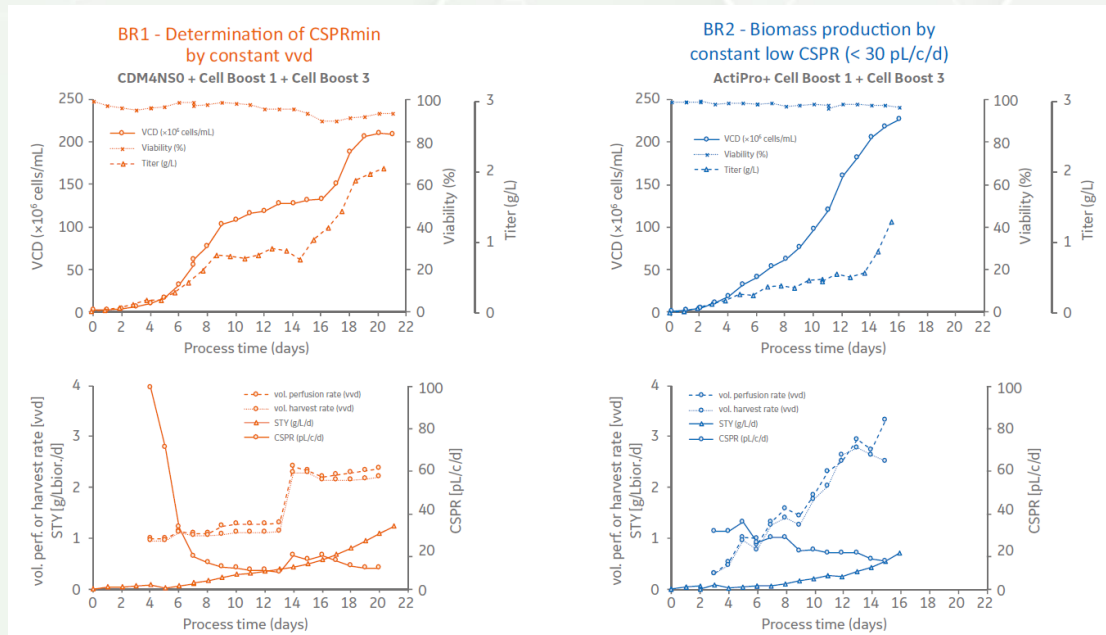


圖 4.以 CDM4NS0 及 ActiPro 為基底進行優化後的 500 mL 灌注培養結果(VCD = viable cell density; vvd = media volume per bioreactor volume per day)。

結論

此次測試開發了基於 DoE 的工作流程，以利用已建立的營養補充物來定義新型、高性能的灌注培養液。也驗證半連續灌注模式下的小規模模型，適用於作為篩選單一測試內的不同條件。

更多訊息請點選[岑祥產品頁面](#)