

不同 Fed-batch 无血清培养基体系在 CHO 单抗表达细胞上的表现研究

Henry Yu, Wayne Xu, Danting Fang, Shanpin Chen
QuaCell Biotechnology, Co., Ltd. • Cell Culture R&D Department

介绍

近年来, CHO (Chinese Hamster Ovary) 细胞已成为生物医药产业中最重要的表达系统, 工业细胞培养工艺, 对培养基的要求主要体现在能够为抗体和重组药物的研发和生产提供高表达, 质量稳定的关键原材料; 同时在研发阶段, 种类不同, 生长情况各异的 CHO 宿主细胞, 也对商业化培养基的通用性和稳定性提出了更高的要求。

我们设计了一组实验, 通过对不同宿主细胞 (CHO-K1、CHO-S、CHO-K1 SV、CHO-DG44) 构建的表达单克隆抗体 (Monoclonal Antibody) 细胞平台在目前比较常见的一些 Fed-batch 商业化培养基组合上的表现进行对比, 希望能从中找出在细胞生长情况和单克隆抗体表达方面表现优良且通用性良好的 Fed-batch 无血清培养基组合。

材料和方法

实验材料

- CHO 宿主细胞: CHO-K1 (ATCC), CHO-S (Thermo Fisher), CHO-DG44 (Thermo Fisher), CHO-K1 SV (Lonza)。

培养基和添加剂

基础培养基: QuaCell® CHO CD04 (QuaCell Cat.# A11004), Dynamis (Gibco), Advanced (Merck), Actipro (Hyclone)。

补料培养基:

Feed 组分一: QuaCell® CHO Feed02A (QuaCell Cat.#A11902A), Feed Cell boost 7A (HyClone), Feed C (Gibco), Feed 1 (Merck), Feed 01A (QuaCell), Feed 03A (QuaCell), Feed 04A (QuaCell)。

Feed 组分二: QuaCell® CHO Feed B02 (QuaCell Cat.#A11952), Feed Cell boost 7B (HyClone)。

细胞培养方法

我们选用了 CHO-K1、CHO-S、CHO-K1 SV、CHO-DG44 等宿主细胞通过电转染的方式构建单抗表达稳定细胞株, 用基础培养基加补料的方式进行 Fed-batch 形式的细胞培养。细胞复苏后直接以 0.5×10^6 cells/mL 密度接种到体积为 30mL 的基础培养基中连续培养。Fed-batch 补料策略设计如表 1, 实验采用 125mL 细胞培养瓶 (Corning) 作为生物反应器, 培养总体积为 30mL, 培养基中葡萄糖的含量维持在 6g/L, 具体的生物反应器培养参数如表 2。

表 1. 补料策略设计

补料时间	D3	D5	D7	D9	D10	D11	D12
Feed 组分一(v/v)	4.50%	4.50%	4.50%	4.50%	1.50%	1.50%	1.50%
Feed 组分二(v/v)	0.45%	0.45%	0.45%	0.45%	-	0.45%	-

表 2. 生物反应器培养参数

生物反应器	125mL 细胞培养瓶
工作体积	30mL
摇床转速	125rpm/min
温度	37°C
CO2 浓度	5%

检测分析方法

在培养期间对培养物进行取样并分析细胞生长、活率、形态、细胞代谢和营养消耗。在摇瓶培养阶段的细胞形态取样后用显微镜观察。计数及活率测定使用细胞计数仪 (Countstar); 单抗表达量通过 Human IgG ELISA (KHB) 检测。

实验结果与分析:

实验一. 不同商业化培养基/补料组合的对比

考虑到该样本需要一定的代表性, 实验采用目前行业使用较为广泛的 CHO-K1 (ATCC) 悬浮细胞为表达平台, 在多款商业化 Fed-batch 培养基体系组合测试细胞生长情况和表达量, 培养基组合设计见表 3。本次实验选择行业比较常见的几种无血清商业化培养基+补料的组合, 其中 CD04 + Feed01, Dynamis + Feed C, Advanced + Feed1, Actipro + CB7 都是各个商业化培养基公司推出的配套无血清基础培养基加补料系统, 并且由于在过往多个

项目上的经验, 我们加上了 CD04+CB7, Dynamis + CB7 这两组混合搭配的策略。生长及表达结果如图 1 所示。

表 3. 商业化 Fed batch 培养基组合设计

分组	Basic Media	Feed Media
1	CD04	Feed 01
2	CD04	Cell boost 7
3	Dynamis	Feed C
4	Dynamis	Cell boost 7
5	Advanced	Feed 1
6	Actipro	Cell boost 7

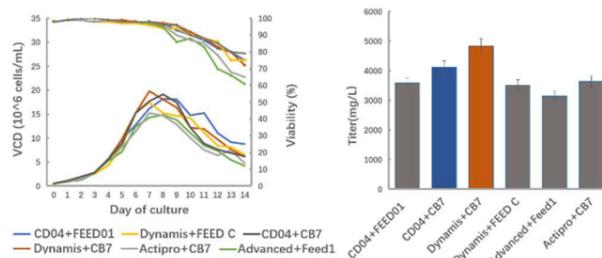


图 1. CHO-K1 在不同商业化培养基组合中的生长及 Mab 表达情况

结果分析: CD04 + CB7 和 Dynamis + CB7 这两组混合搭配的组合在细胞最高密度和活率维持方面表现于其他组合并无明显差异, 但是在单抗表达量方面表现出了一定的优势。

实验二. CD04 培养基与不同补料组合的对比

本实验采用与实验一中相同的 CHO-K1 细胞为表达平台, 以 QuaCell® CD04 培养基为 Basic media 搭配几款经过配方优化的补料, 同时以 Dynamis + CB7 这个实验一中的最优搭配组合为对照, 测试不同补料配方与相同的基础培养基 CD04 的组合效果, 培养基组合设计见表 4。生长及表达结果如图 2 所示。

表 4. CD04 搭配不同补料培养基 Fed batch 组合设计

分组	Basic Media	Feed Media
1	Dynamis	Cell boost 7
2	CD04	Cell boost 7
3	CD04	Feed 01
4	CD04	Feed 02
5	CD04	Feed 03
6	CD04	Feed 04

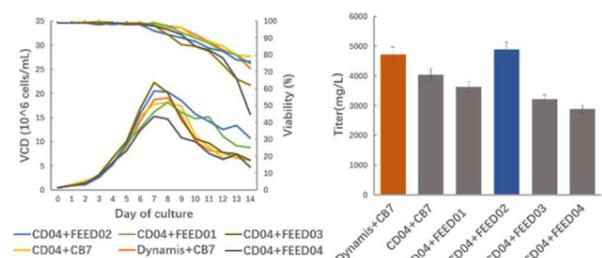


图 2. CHO-K1 在 CD04 与不同补料组合中的生长及 Mab 表达情况

结果分析: CD04+Feed02 与其他培养基体系组合相比在细胞生长最高密度和活率维持方面略有优势, 在单抗表达量方面的优势比较明显, 甚至略微超过对照培养基体系组合 Dynamis + CB7。

实验三. CD04+Feed02 组合在不同宿主细胞项目上的对比

为了测试 QuaCell® CD04+Feed02 培养基体系在不同种类的 CHO 宿主细胞上的通用性如何, 我们选取了多种 CHO 宿主细胞: CHO-K1, CHO-S, CHO-DG44, CHO-K1 SV 在 QuaCell® CD04+Feed02 培养基体系中进行 fed-batch 批培养。生长及表达结果如图 3 所示。

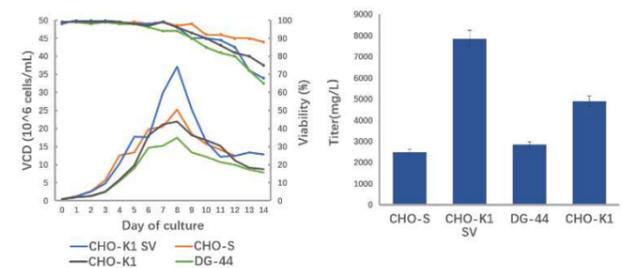


图 3. 不同 CHO 细胞在 CD04+Feed02 中的生长及 Mab 表达情况

结果分析: 我们发现 CHO-K1 系列细胞在 QuaCell®CD04+FEED02 培养基体系中的表现强势, 其中一株细胞最高密度达到 3.5×10^7 cells/mL 以上, 两株 K1 系细胞培养 14 天上清收获的单抗表达量分别达到 5.1 g/L 及 8.0 g/L。

结论和讨论

目前行业中市场占有率比较高的各个培养基供应商提供的产品中, 单独供应商提供的配套基础培养基 basic media+补料 feed 的组合不完全是 CHO 细胞培养的最优选择, Dynamis + CB7 这个组合在 CHO-K1 细胞上的表现相比 Dynamis + Feed C 和 Actipro + CB7 这样的供应商推荐配套组合有一定的优势。

QuaCell® CD04+Feed02 Fed-batch 培养基体系是由 CHO-K1、CHO-S、CHO-DG44 等由多种 CHO 宿主细胞构建完成的单抗表达细胞上的通用性表现良好, 特别是在 CHO-K1 系列细胞上的细胞生长情况以及产物表达量有比较明显的优势, 与 Fed-batch 培养基组合 Dynamis +CB7 的对比表现接近甚至在某些项目上的细胞生长情况和表达量都超过了 Dynamis +CB7。

目前中国的生物药特别是单抗药物的研发处于爆发性的增长阶段, 可以推断单抗药物后续的市场竞争会非常激烈, 选择一款质量稳定, 表现优秀的培养基对保证单抗药物产品的市场竞争力有非常重要的影响, QuaCell 公司从生物制药企业的角度出发, 致力于提供更高效、稳定易操作的细胞培养解决方案, 我们的使命是与制药企业一起, 为中国乃至全球市场提供更安全、有效、经济的生物制品产品。

参考文献

- Ellis, S. Biotech booms in China. *Nature* (2018). doi:10.1038/d41586-018-00542-3
- Greenwood, J. C. Biotech in China. *EBR - Eur. Biopharm. Rev.* (2013).
- Lundh, E. Assessing the impact of China's Thousand Talents Program on life sciences innovation. *Nat. Biotechnol.* (2011). doi:10.1038/nbt.1894
- Yang, B. Innovation The Big Winner As China Joins ICH: Pink Sheet. *Informa Pharma Intelligence* (2017).
- Hu, X. et al. Biopharmaceuticals in China. *Biotechnology Journal* (2006). doi:10.1002/biot.200600083
- Chen, C. & Yin, S. *China: the Next Frontier for Biologics*. (2016).
- Yuan, J. et al. Scientific Strategy in China: Starting with Biosimilar Platforms. in *Advances in Biopharmaceutical Technology in China, 2nd ed.* 51-64.
- Le, H., Vishwanathan et al. Cell line development for biomanufacturing processes: recent advances and an outlook. *Biotechnology Letters* 37, 1553-1564 (2015).
- Yuan, J. et al. Cell Culture Technologies in Successful Biosimilar Development. *Bioequivalence Bioavailab. Int. J.* 2, 1-7 (2018).
- Barnes, L. M. et al. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 81, 631-639 (2003).
- Kirchhoff, C. F. et al. Biosimilars: Key regulatory considerations and similarity assessment tools. *Biotechnology and Bioengineering* 114, 2696-2705 (2017).
- Shire, S. J. Monoclonal Antibodies: Meeting the Challenges in Manufacturing, Formulation, Delivery and Stability of Final Drug Product. (2015). doi:10.1016/B978-0-12-639380-4.50001-4
- Challener, C. A. Platform technologies improve protein expression. *BioPharm Int.* (2017).
- Sinclair, A. & Monge, M. Implementing disposables technology, delivering innovation, and transforming an organization. *BioPharm Int.* (2010).
- Langer. On the Horizon: New Expression Systems to Become Common Industry Platforms. *BioPharm Int.* (2009).
- ICH-8-R2-quality. 0042-Pharmaceutical Development Q8. ICH Harmon. Tripart. Guidel. (2009).
- De Wilde, D. et al. Superior scalability of single-use bioreactors. *Bioprocess Int.* (2014).
- FDA. Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices. Guid. Ind. (2011).
- Tsang, V. L., Wang, A. X., Yusuf-Makgiansar, H. & Ryll, T. Development of a scale down cell culture model using multivariate analysis as a qualification tool. *Biotechnol. Prog.* (2014). doi:10.1002/btpr.1819
- Eriksson L, Byrne T, Johansson E, Trygg J, V. C. Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications. *Technometrics* (2013). doi:10.1198/tech.2003.s162