

通过 CHO 细胞培养工艺增强，提升 IgG 单克隆抗体产量

赛默飞 Nick Kasparie、Patrick Bennett 和 Kurt Kuhne

前言

生物药领域对产量提高的需求日益增长，这就需要优化利用现有生产能力。工厂可以通过工艺增强来满足增产需求，因为它可以通过减少批次数量或缩小批次规模，在相同时间内提供等量产物。细胞培养增强方法包括：在种子扩大培养阶段或生产阶段增加灌流培养；改进生长培养基和生产培养基以达到标准补料分批培养无法达到的细胞密度。灌流培养需要使用切向流或交替切向流（TF 或 ATF）控制器等专用设备，而这需要另外进行培训，还会增加生产成本。生产厂的现有能力可能会限制这种设备的安装，需要花费巨资进行厂房扩建才能容纳和使用这种设备。对于专为补料分批培养设计的工厂而言，灌流培养无法实施或实施成本过高。另外，通过改进培养基和补料，能够大大促进细胞生长并提高生产率，在不增加设备、设施升级和培训相关成本的情况下，获得灌流培养的多项优势。

这份海报展示了通过改进培养基和补料，能够在保持细胞质量相当的前提下，大大促进细胞生长并提高产量。在这些研究中，首先对种子扩大培养增强进行了评估，以便以更高的初始细胞密度接种生产容器。进行了多项实验设计。首先，增强种子扩大培养，为生产阶段提供足够的细胞密度。其次，评估生产阶段参数在生长、生产率和细胞质量方面对增强型细胞培养工艺的影响。进行了收获研究，以确保在生产规模下处理增强细胞培养物的可行性。

目的

创建将 CHO 工艺滴度提高 20%–50% 的工艺增强 workflow，并符合以下限制条件：

- 不影响流程时间安排
- 保持产品质量属性相当
- 无需另外购买设备或进行培训
- 兼容赛默飞网络内的所有生产厂。

材料和方法

该增强 workflow 分为两步。第一步确定富集培养基成分和操作参数，确保在传代时能够达到足够的活细胞密度，从而以 $\geq 5.0 \times 10^6$ VC/mL 的接种密度接种生产生物反应器。本实验中确定的培养基成分也将作为增强型生产生物反应器的基础培养基。第二步确定增强型生产生物反应器的操作参数和补料策略。

细胞株

使用两个 CHO K1 细胞株生产两种重组人单克隆抗体，即利妥昔单抗和曲妥珠单抗。使用表达利妥昔单抗的细胞株进行增强开发。然后将使用利妥昔单抗开发的增强型工艺应用于表达曲妥珠单抗的细胞株，以展示在未优化的另一细胞株中的效果。

培养基和补料

按照供应商说明配制化学成分确定的目录培养基和补料，然后根据实验设计混合成指定配方。

N-1 DOE

使用 JMP 统计软件生成并分析定制 DOE 设计，评估以下因素：培养基中补料百分比、接种密度、培养基粉末浓度、补料起始日以及日补料百分比。在 2 个 Ambr™ 15 微型生物反应器系统（每个系统有 48 个生物反应器罐体）中并行运行各种条件（图 1）。

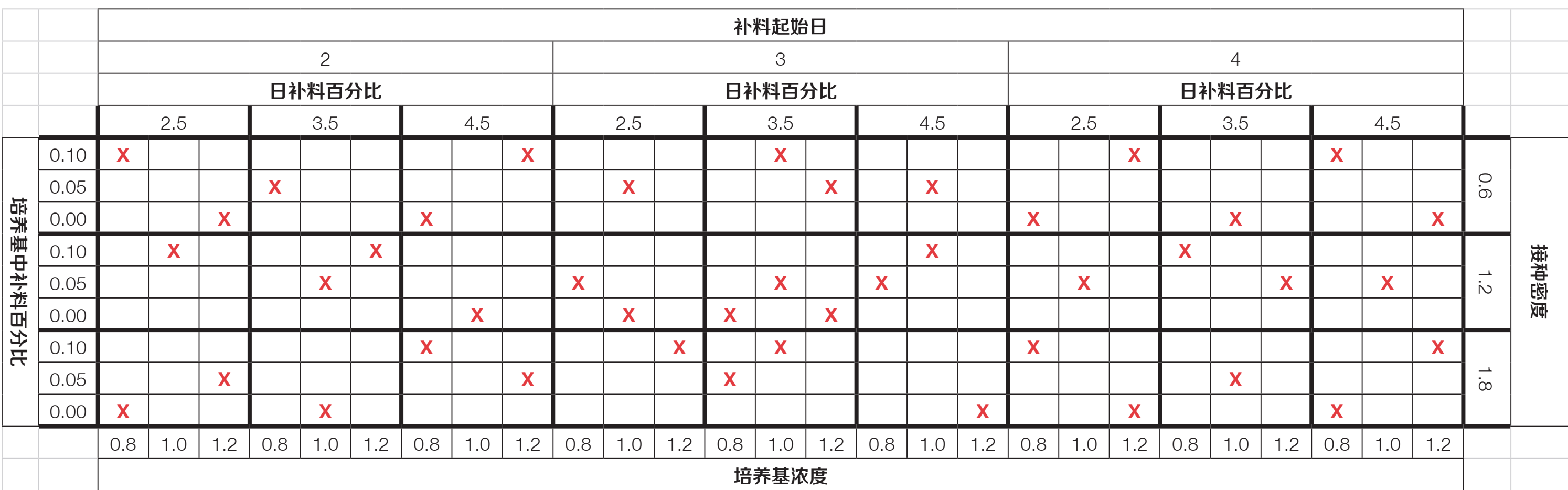


图 1.Ambr 15 系统上的 N-1 补料分批设计空间。

使用 JMP 软件构建增强型 N-1 步模型，显示使活细胞密度 (VCD) 最大化的最佳参数。该模型提供了一组可靠的参数，可在 4 天内实现 VCD $>20 \times 10^6$ VC/mL，且对活性无不利影响（图 2）。

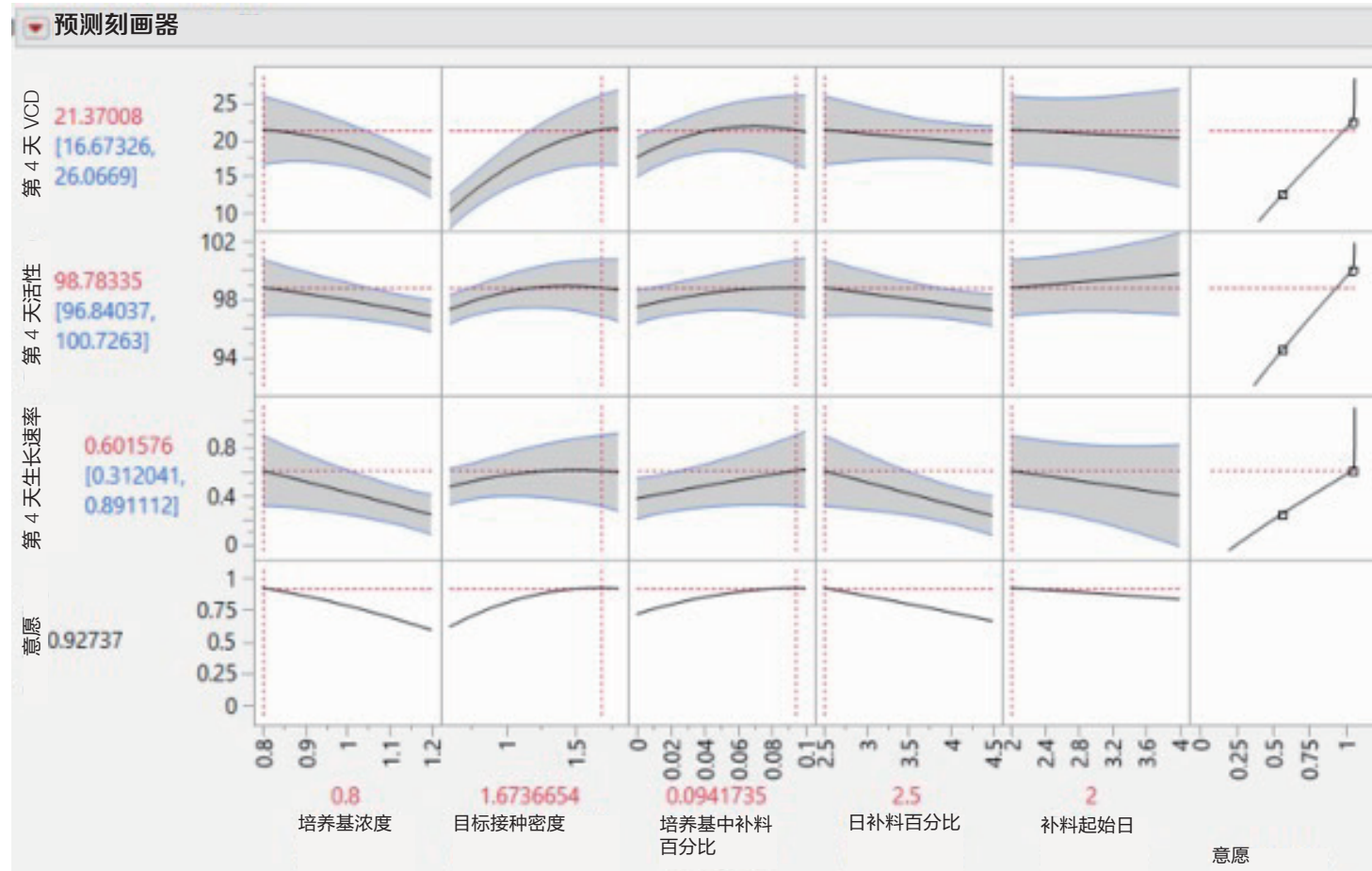


图 2.使用 JMP 软件构建的增强型 N-1 步模型。

N 步生产容器增强开发

使用 JMP 统计软件生成并分析定制 DOE 设计，评估以下因素：接种密度、补料起始日、每个细胞的补料量以及温度变换目标。在 1 个 Ambr™ 250 生物反应器系统（每个系统有 24 个生物反应器罐体）中并行运行各种条件（图 3）。



图 3.Ambr 250 系统上的 N 步生产增强设计空间。

使用 JMP 软件构建增强型生产步骤模型，显示使滴度和单位生产率最大化的最佳参数。该模型提供了一组可靠的参数，可在标准的 14 天补料分批培养中达到 7 g/L 的滴度（图 4）。

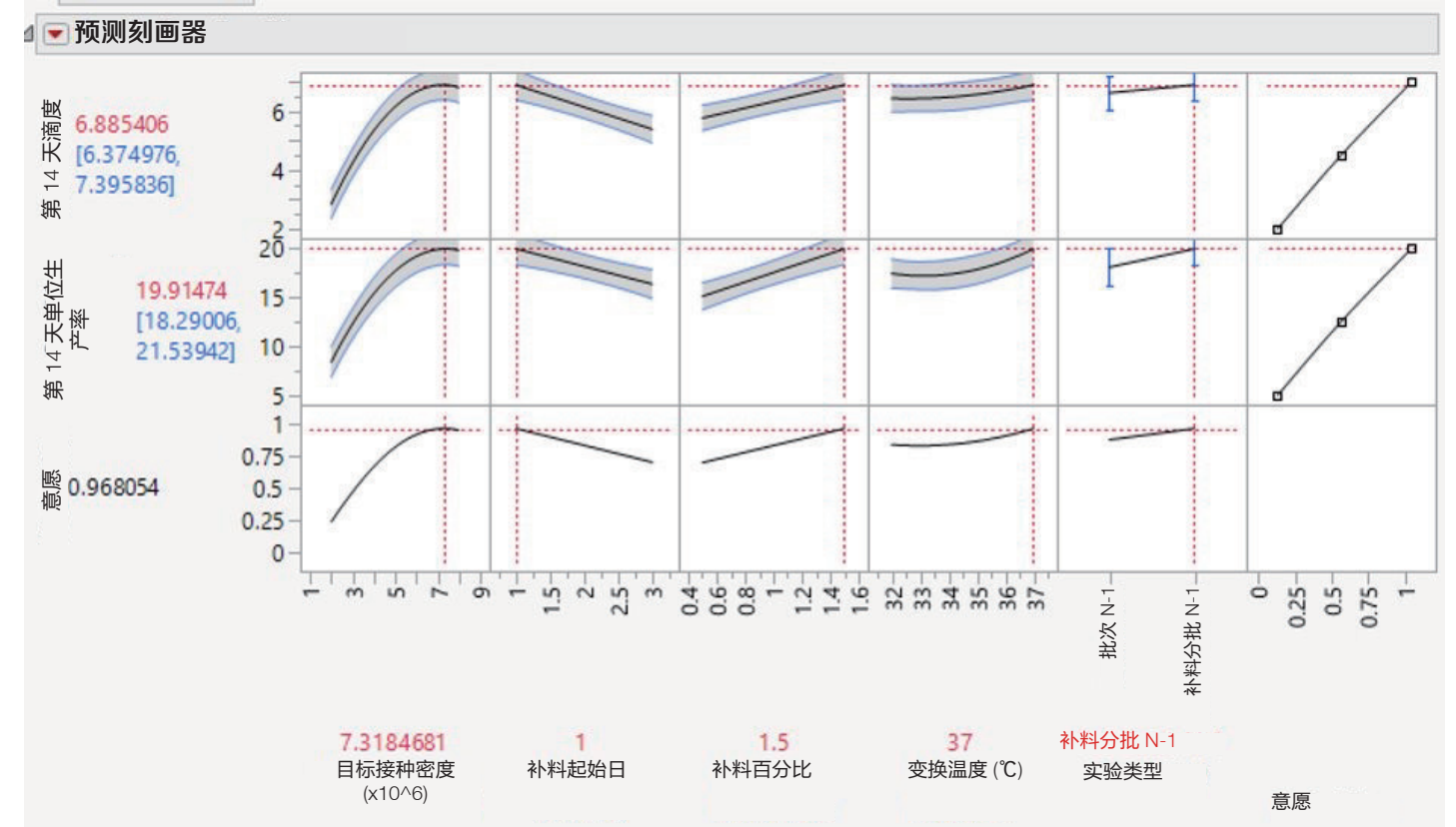


图 4.使用 JMP 软件构建的增强型生产步骤模型。

结果和讨论

N-1 DOE

图 5 展示了通过标准平台（蓝色）和增强工艺（红色）进行放大的表达利妥昔单抗的细胞株。采用增强型 N-1 步工艺生成的接种生产容器用细胞是采用标准平台工艺时的 4 倍以上。

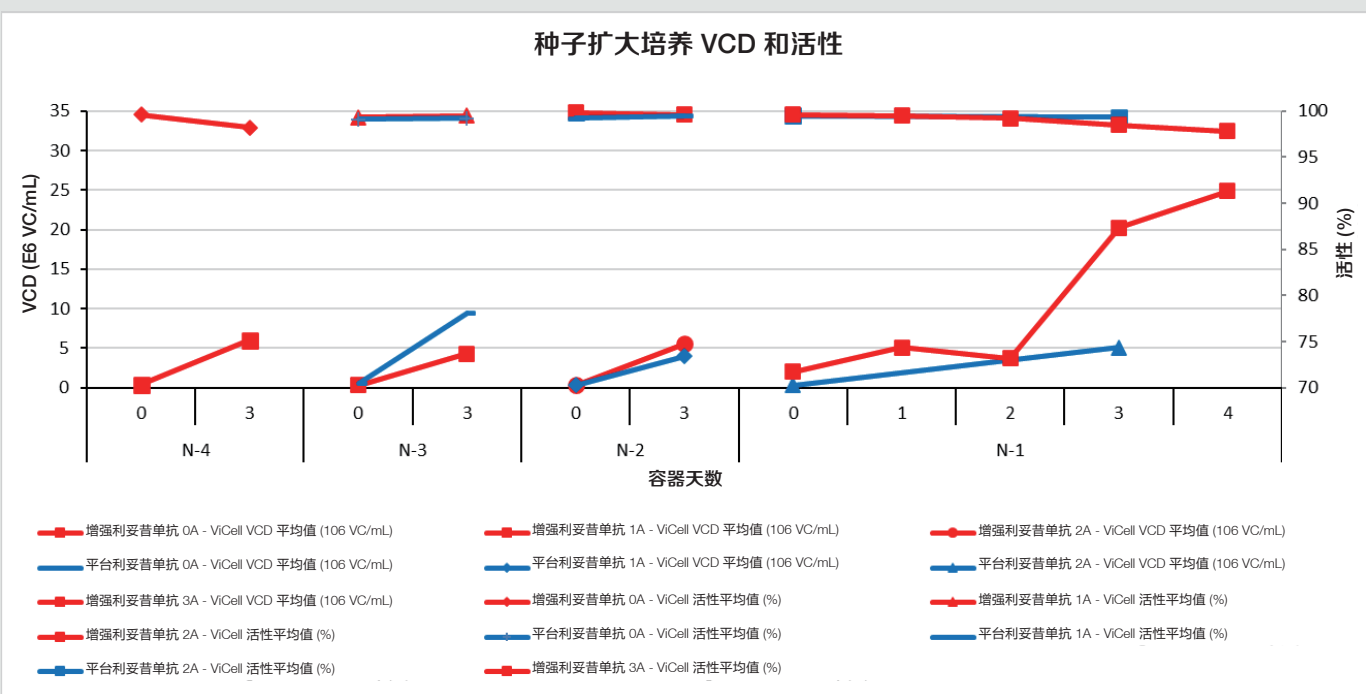


图 5.标准平台与增强工艺对表达利妥昔单抗的细胞株的 VCD 和活性的影响。

N 步生产容器增强开发

利妥昔单抗

图 7 显示了使用标准平台工艺（蓝色）和增强型补料分批工艺（红色）生产的表达利妥昔单抗的细胞株的 VCD、活性、滴度和单位生产率。

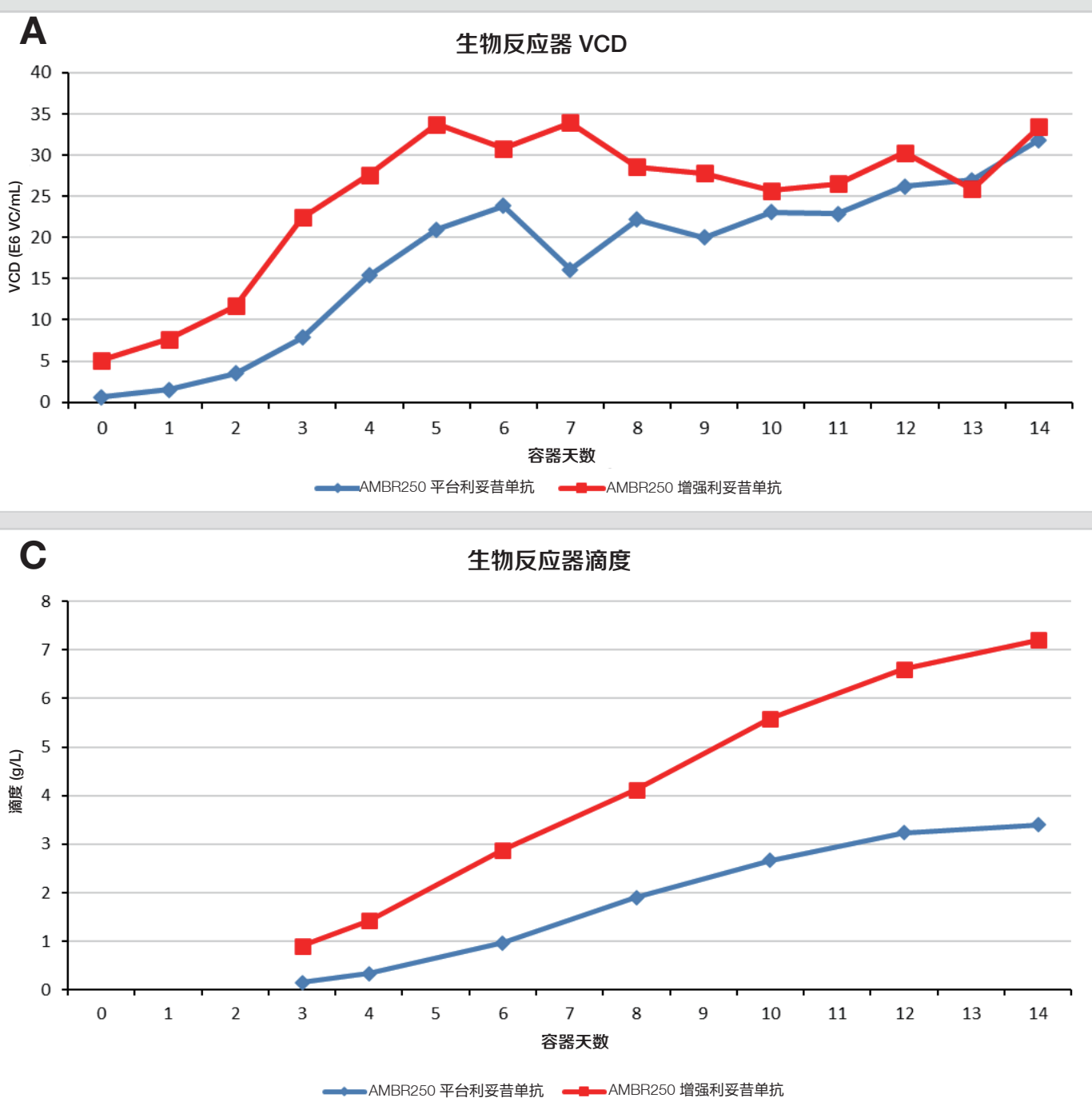


图 7.标准平台与增强工艺对表达利妥昔单抗的细胞株的影响。(A) VCD、(B) 活性、(C) 滴度和 (D) 单位生产率。

表 1 显示，使用增强型工艺生产的表达利妥昔单抗的细胞与使用标准平台工艺生产的表达利妥昔单抗的细胞，两者质量相当。

表 1.使用增强型工艺与标准平台工艺生产的表达利妥昔单抗的细胞的产品质量属性对比。

工艺	SEC HMW (%)	SEC 单体 (%)	SEC LMW (%)	NR-CGE 峰 (%)	NR-CGE 片段 (%)	iCE 酸性峰 (%)	iCE 主峰 (%)	iCE 碱性峰 (%)	唾液酸化聚糖 (%)	甘露聚糖 (%)	岩藻糖基化聚糖 (%)
平台利妥昔单抗	2.5	97.5	0	97.1	2.9	53.3	43.4	3.3	0.3	0.6	94.2
增强利妥昔单抗	2.2	97.8	0	96.2	3.8	56.6	41.1	2.2	0.2	2.8	88.9

曲妥珠单抗

将为表达利妥昔单抗的细胞株而开发的增强型工艺应用于表达曲妥珠单抗的细胞株。在保持产品质量属性相当的同时达到了更高的滴度（图 8）。

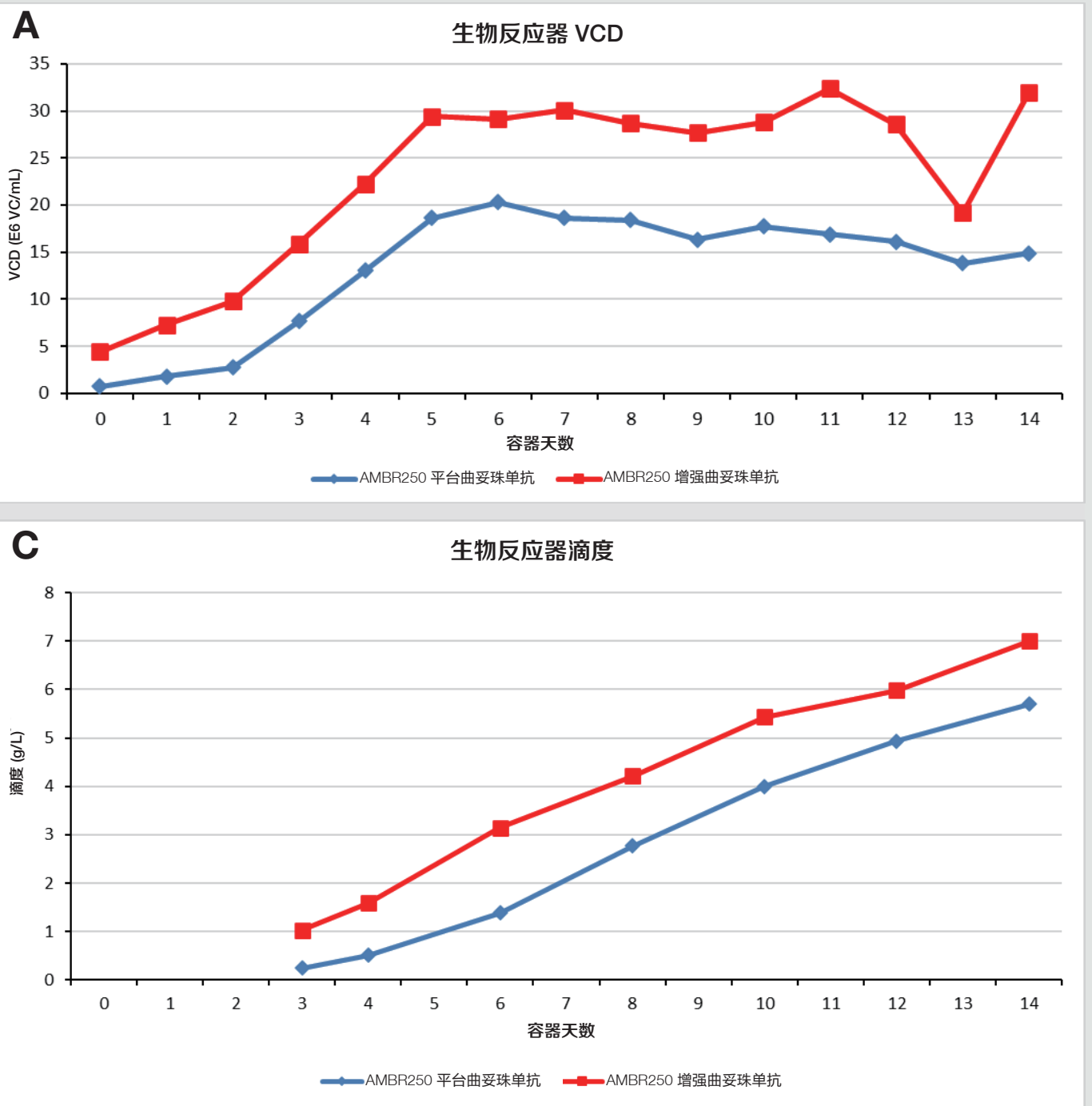


图 8.标准平台与增强工艺对表达曲妥珠单抗的细胞株的影响。(A) VCD、(B) 活性、(C) 滴度和 (D) 单位生产率。

表 2 显示，使用增强型工艺生产的表达曲妥珠单抗的细胞与使用标准平台工艺生产的表达曲妥珠单抗的细胞，两者质量相当。

表 2.使用增强型工艺与标准平台工艺生产的表达曲妥珠单抗的细胞的产品质量属性对比。

工艺	SEC HMW (%)	SEC 单体 (%)	SEC LMW (%)	NR-CGE 峰 (%)	NR-CGE 片段 (%)	iCE 酸性峰 (%)	iCE 主峰 (%)	iCE 碱性峰 (%)	唾液酸化聚糖 (%)	甘露聚糖 (%)	岩藻糖基化聚糖 (%)
平台曲妥珠单抗	2.2	96.5	1.4	97.8	2.2	55.0	39.8	5.2	0.2	1.6	89.3
增强曲妥珠单抗	1.6	98.5	0	97.2	2.8	62.5	34.1	3.4	0.2	7.6	84.1

结论

我们成功开发了 CHO 工艺增强 workflow，在保持产品质量属性相当的前提下将滴度提升 20% 至 100%。该增强型工艺可在我们现有的生产平台和生产厂中执行。如利妥昔单抗案例所示，经过专门优化的增强型工艺将滴度提升了 100%。应用通用增强型工艺后，表达曲妥珠单抗的细胞株的滴度提升了 20%。无需另外的设备、培训、原料或耗材投入。

