

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

【題 名】 : Gram Scale Antibody Production Using CHO Cell Transient Gene Expression (TGE) via Flow Electroporation

【要 約】: 近年、抗体医薬の研究開発者は開発初期段階において CHO 細胞の安定発現系による抗体産生から一過性発現系での産生に切り替える傾向にある。(1,2)

トランスフェクション法および培養最適化技術の進歩にかかわらず、CHO-TGE 法による抗体産生レベルは数十 mg/L に留まり未だ不十分である。(3-8)

MaxCyte の電気穿孔法は、特別な試薬・発現ベクターあるいは遺伝子改変細胞株なしにグラム単位の抗体産生を実現している。これにより、開発初期の標的抗体分子の選定並びにそれに続く薬理学・安定性試験および生産性試験に必要とされるグラム単位の抗体産生を可能としている。

本テクニカルノートでは、MaxCyte 電気穿孔法の再現性、規模拡張性そして抗体産生能に関する具体的データを提示する。分泌抗体の濃度は通常の試験で 400mg/L を超え、最適化により 1g/L 以上になり得るため、一回のトランスフェクションで数グラムの抗体産生が可能となる。

さらに、抗体医薬開発の前臨床から臨床へのシームレスな原料供給を可能ならしめる本法を用いた安定発現細胞株の迅速な樹立に関するデータも開示する。

【背 景】

哺乳動物細胞、特に CHO 細胞は、臨床用治療薬の生物学的製造における重要な選択肢として位置づけられている。しかしながら、生物製剤の開発初期段階において数百の候補分子を評価し、それぞれの安定発現系細胞を樹立することは多大な費用と時間を開発者に強いられます。それ故、有望な開発候補抗体分子あるいは抗体類似分子を選別・特定するため工業的には TGE に関心が向けられている(1,2)。

薬業界における初期の CHO を用いた TGE の活用は、低いトランスフェクション効率と細胞生存率さらに産生効率の低さから限定されていた。このため、より TGE に適していることが知られていた HEK 細胞が多用されてきた。しかしながら、CHO 安定発現系で調製した抗体と HEK で作った抗体の間に、生産性、親和性そして有効性に関して差があることが多く報告された(3)。このため、初期評価から生産までシームレスに同一細胞系による産生を可能とするレベルの CHO-TGE の大幅な改善が望まれていた。

CHO の TGE については、多くの試みがなされてきた ; 1) 遺伝子改変した CHO の利用。 2) 発現プラスミッドの工夫。 3) 専用の試薬の開発。 4) 独占所有権のある技術を用いた受託サービス(1,3-8)。高度に最適化された脂質や PEI 技術のプロトコールと同様これらの技術は、再現性、規模拡張性、そして費用対効果において様々な改善レベルを示しているが、生産性においては代表的な IgG に関して 10-100mg/L の範囲にある。また、難発現性と知られる bi-specific 抗体については低い発現効率に留まっている。

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

MaxCyte 専有技術であるフロー型電気穿孔法は、特別な発現プラスミッドや順応させた CHO を必要とせず、2E11 個の細胞の電気穿孔処理を 30 分以内に行える汎用のトランスフェクションプラットフォームである。以下に具体的実験例を含めその性能に関して詳述する。

【MaxCyte 一過性発現系】

MaxCyte 社は、MaxCyte STX®および MaxCyte VLX® のフロー型電気穿孔技術に基づいた二つのベンチトップ型電気穿孔装置を提供しております。両装置とも CHO、HEK、NS0、Vero そして昆虫細胞など通常タンパク生産に用いられる細胞をはじめとした多くの細胞のトランスフェクションを簡単な操作で行うためのプレインストールされたプロトコルを標準装備している。MaxCyte STX®は 4 種類の処理モジュールの交換で 5E5 から 1E10 個の細胞に対応しており、MaxCyte VLX® は 2E11 個の細胞までの大量の細胞を 30 分でトランスフェクト処理できる能力を持っている；

CHO への高効率の DNA 導入

CHO 細胞へのトランスフェクション効率はこれまで HEK などのタンパク生産用細胞に比べ低いことが知られていた。MaxCyte 電気穿孔法は、同細胞に対して高価格なトランスフェクション試薬なしに高効率、高生存率の一過性トランスフェクションを可能としている。Fig1 に GFP 遺伝子の導入を例に、そのトランスフェクション効率と処理細胞の生存率を測定したところ、トランスフェクト後 24 時間時点で、それぞれの指標につき 96%の数値を得ている。CHO-S に加え、CHO-K1 や CHO-DG44 などの接着性細胞株や浮遊細胞株への試験も行っている(data not shown)。

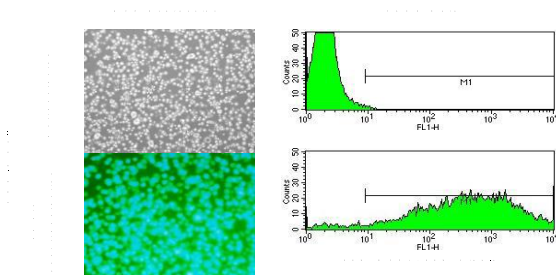


Figure 1. Greater than 95% CHO Cell Transfection Efficiency using MaxCyte Transient Transfection. CHOs cells were transfected by static, small scale electroporation (EP) in an OC-400 processing assembly with a plasmid encoding green fluorescent protein (2µg DNA/1E6 cells). GFP expression and viability were measured by flow cytometry (FACS) 24 hrs post EP.

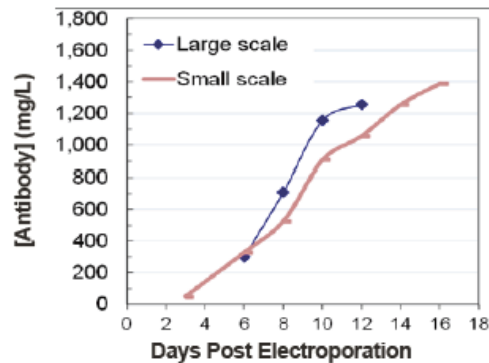
【CHO の高産生系】

抗体医薬の開発過程における各試験に必要なとされる量は、ミリグラムからグラム単位まで様々である。理想的には、一過性発現系で必要とされる量に対処できることが望まれる。PEI や脂質ベースのトランスフェクション試薬による調製では最適化後においても 2 から 150mg/L であることが報告されている(3-8)。また、これらの方法は再現性、実験規模の拡張性など不安定要因が多く実用性に難がある。対照的に、MaxCyte 法は、トランスフェクト後二週間以内に 400mg/L 以上の生産効率で数グラムの抗体産生を可能とする。

フロー型電気穿孔法による抗体産生

MaxCyte STX®による実施例を図 2 に示した。試験は、静止型（少量処理）およびフロー型（大量処理）モジュールを用いそれぞれ 8E7 および 1E10 個の CHO-S 細胞に 2 μ g/1E6 個 Cells の割合で抗体発現プラスミッドをトランスフェクトした。その後、Na-butyrate の添加と 24 時間の低温(32C)処理を行い、培養を行った結果、培養 14 日目にそれぞれが 1.2g/L の抗体産生を実現している。大量処理では 3L 以下の培養規模で 3g 以上の抗体産生が出来た(図 2)。さらに MaxCyte VLX®を用いれば、2E11 個の細胞処理が可能であるため、一回のトランスフェクションで 50g の抗体産生が期待できる。

Rapid, Gram Scale Antibody Production



	Culture Volume	EP Volume	# of Cells	[IgG]	Total IgG Produced
Small Scale	20mL	0.4mL	8E7	1.40 g/L	28mg
Large Scale	2.8L	50mL	1E10	1.22 g/L	3.42 g

Figure 2: High Titer Antibody Production with Seamless Scalability.

8E7 or 1E10 CHO-S cells were transfected with an antibody expression plasmid (2 μ g DNA per 1E6 cells) via small scale (static), or large scale (flow) electroporation on the MaxCyte STX. Cells were plated at 6E6 cells/mL post electroporation. 1mM sodium butyrate was added to cultures and the temperature lowered to 32° C 24 hours post electroporation. Cultures were fed daily with a media optimized for antibody production. Total IgG was measured using ELISA on various days post transfection.

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

上記表およびグラフは、大小の実験スケールでほぼ同様な性能を示すことを表している。この結果は、MaxCyte 技術が特別の最適化なしに実験のスケールアップ可能な方法であることを際立たせている。また、追跡試験では 21 日間にわたり高い生産性が維持されることが観察された(data not shown)。

産生された抗体の特徴

図 3 に一過性産生系と安定発現系で調製した抗体の比較結果を示した。一過性発現で調製した抗体試料 (S) と安定発現系で調製した試料 (R) を SDS 電気泳動と等電点電気泳動法で比較したところ以前の報告と同じく、差は認められなかった (6,7)。 開発初期の多くの試験の検討に CHO 細胞を用いた一過性発現系で産生した抗体を使えば、安定系発現株樹立が開発の律速段階にならず迅速かつシームレスな抗体医薬開発が期待できる。

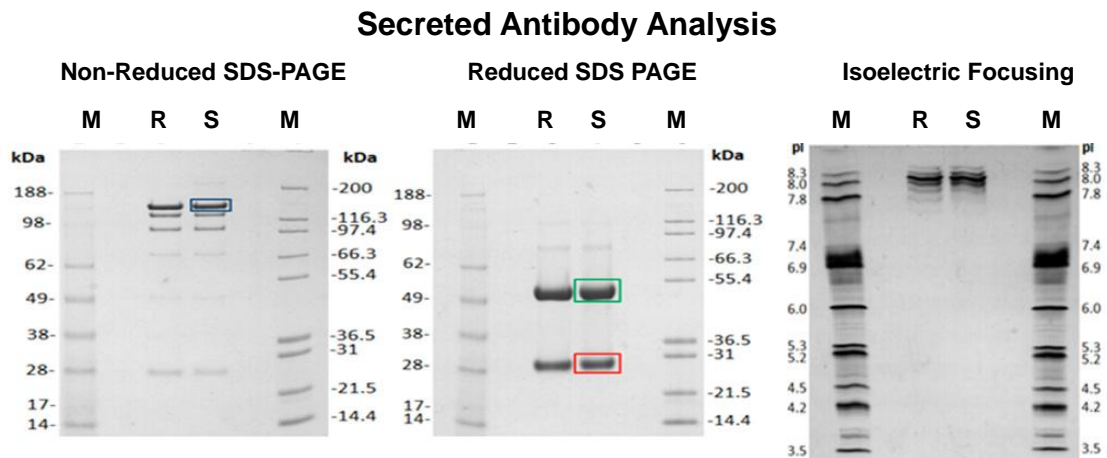


Figure 3: Similarity of Antibodies Produced from Stably and Transiently Transfected CHO Cells. CHO suspension cells were transfected by static electroporation with a plasmid encoding IgG heavy and light chain sequences. Secreted antibodies from electroporated cells (S) and a reference stable cell line (R) were examined by reducing and non-reducing SDS PAGE and Isoelectric Focusing.
Data courtesy of NovImmune.

【生産効率の向上】

CHO 細胞を用いた抗体の生産効率の向上に関しては一過性発現系および安定発現系で多くの努力が傾注されてきた。 特殊な CHO 株の利用ならびに細胞密度、栄養補給プロトコール、培地添加物および培養温度等の培養条件など様々な要因が抗体生産効率に関わることがわかってきた(2,3,5,7-9)。 我々は、トランスフェクション後のいくつかの処理条件を検討し、低温シフト、sodium butyrate 処理および栄養素の補給条件が飛躍的に抗体産生を増大させることを見出した。以下に実施例を報告する(Figure 4, 5 and data not shown)。

培地組成と栄養素補給プロトコールの効果

細胞増殖性、栄養素欠乏および分泌蛋白量は相互に関係しており培地組成に影響される。(9)。これらの効果を検証するため、トランスフェクトした CHO を 2 種類の培地 (Media 1 or Media 2) に浮遊し 2 種類の栄養素補給プロトコール (Feed1 or 2) で培養した。双方のパラメーターともに抗体産生に有意に影響を及ぼすことが明らかになった (図 4)。Media 2 は Media 1 に比べ、補給プロトコールによっては 3 倍から 6 倍量の高い抗体産生をもたらした。Media 2 を用いた培養で栄養素の補給をより高頻度で行う Feed 2 のプロトコールは Feed1 に比べ約 2 倍の抗体産生を示した。培地組成と栄養補給プロトコールの最適化により 1.2 g/L の抗体産生を達成している。尚、最適化しないときでも 200mg/L 以上の産生が認められている。

Titers of 1.2 grams/L Upon Culture Feeding Optimization

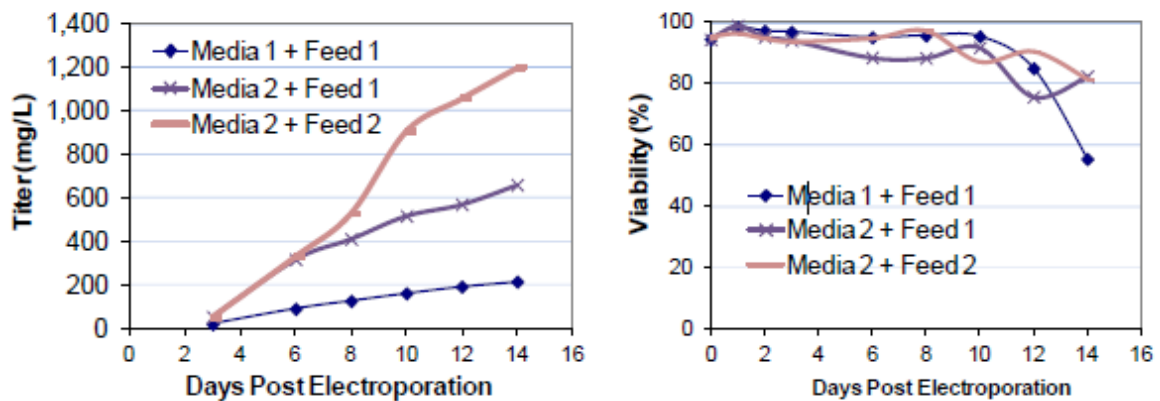


Figure 4: Substantially Higher Antibody Titers with Optimized Media Composition and Feeding Schedule.

8E7 CHO-S cells were resuspended at 2E8 cells/mL and transiently transfected with a human antibody expression plasmid (2µg DNA/1E6 cells) via static electroporation. Post electroporation cells were seeded at 5.6E6 cells/mL in Media 1 or Media 2. Cells were fed on two different schedules. Antibody titers were determined on days 3-14 post electroporation using an ELISA.

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

トランスフェクション後の培養の細胞密度と抗体産生

実験室での生産性の向上は、収率の最大化と処理労力および必要試薬の最小化の組み合わせで決まる。培養後処理を簡素化し、かつ培地使用量を最小化することを目的に、トランスフェクトした CHO の培養細胞密度と抗体産生能を検討した。1E7 cells/mL と 6E6 cells/mL の播種密度の比較では、高密度の方が有意に高い抗体産生能を示した (図 5)。

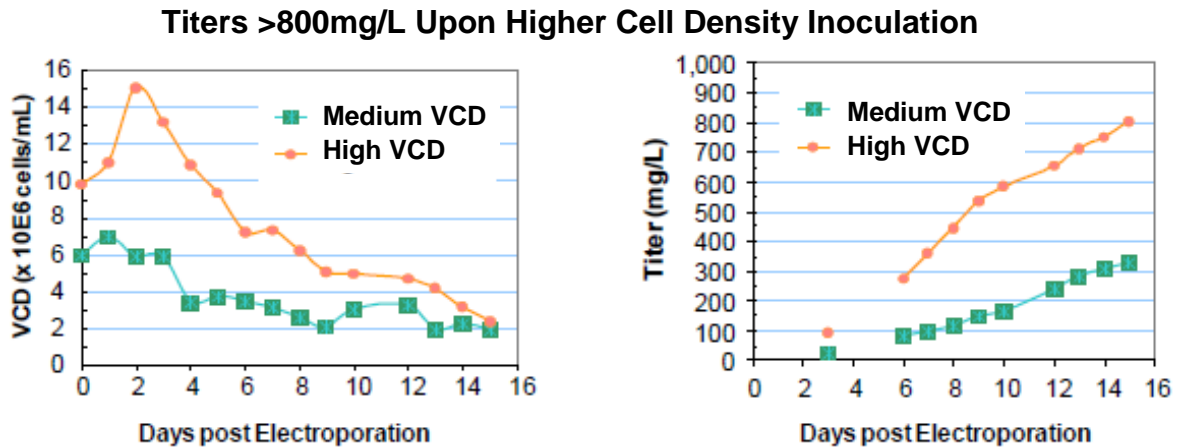


Figure 5: Post Transfection Inoculation at Higher Cell Densities Increases Antibody Titers.

1E10 CHO-S cells were transiently transfected with an antibody expression plasmid (1 μ g DNA/1E6 cells) via flow electroporation. Post electroporation, cells were inoculated into two shake flasks at densities of 6E6 or 1E7 cells per mL.

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

トランスフェクションと細胞処理工程の規模拡大

MaxCyte 法は実験のスケールアップが容易でトランスフェクション条件の再最適化を必要としない。大量処理を可能とする MaxCyte の電気穿孔技術は、トランスフェクション後の抗体精製工程のスケールアップも容易にする。静電的あるいはフロー型電気穿孔でトランスフェクトした CHO 細胞を 250mL 振盪フラスコで培養したところ最適化していない栄養補給プロトコールにおいてもトランスフェクション後 14 日目に約 400mg/L の抗体産生が得られた(図 6)。さらに、フロー型電気穿孔法で処理した CHO 細胞を 3L 振盪フラスコで培養したところ同じような生存率と抗体産生能を示した。プラスチック培養チャンバー (wave bag) を用いた試験でも製造目的のスケールアップが可能であることが確認している(data not shown)。

Antibody Titers Maintained During Process Scale Up

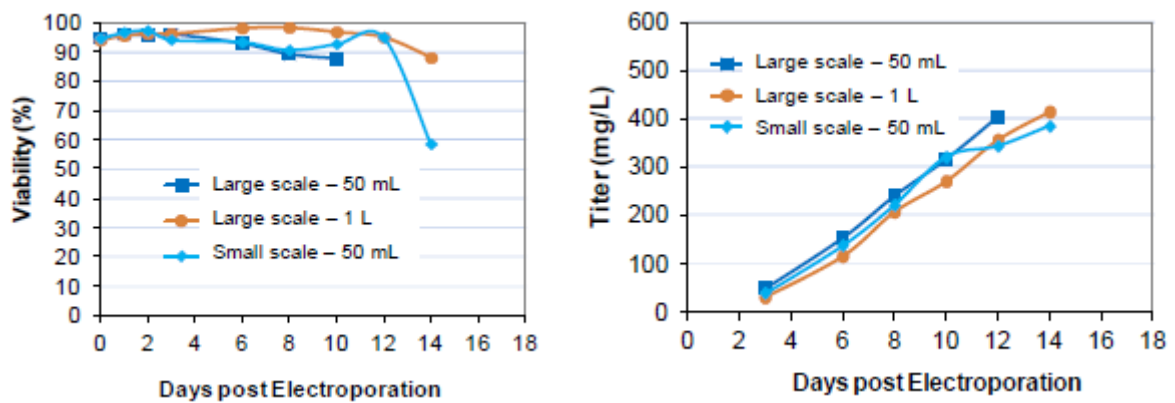


Figure 6: Titers Maintained Upon Transfection and Culture Vessel Scale Up.

1E10 or 2.4E8 CHO-S cells were transfected with an antibody expression plasmid (1 μ g DNA/1E6 cells) using flow or static electroporation, respectively. Cells transfected via static EP were inoculated into 50mL of media in a 250mL shake flask. Cells transfected via flow EP were split and inoculated into 1L of media in a 3L shake flask or into 50mL of media in a 250mL shake flask. Starting cell densities were identical in all three flasks.

【安定発現系の生産規模の拡大】

グラム単位の抗体調製が可能な TGE 技術はその応用範囲を格段に広げる。一方、CHO 細胞の安定発現系は臨床グレードのバイオ医薬品製造の薬事規制に適合した標準細胞基質として今後も地位を保ち続けられると思われる。このため抗体医薬開発の初期段階以降では安定発現系の樹立が必須である。近年、研究者は抗体開発と抗体製造のギャップを埋めるため CHO の安定プール作成に期待を寄せている(1,10) 。一過性発現系作成と同時に、MaxCyte 電気穿孔法は、迅速な高産生安定発現株樹立と安定プール作成に理想的な手段である。

安定発現株の創出

安定発現株樹立のため MaxCyte 電気穿孔法を用いて CHO 細胞に抗体遺伝子をトランスフェクトし、安定発現プールの作成を行った。最初の一過性トランスフェクション後 6 週以内に 500 の CHO クローンが得られた。Clone 17 を最高の活性を示すクローンとして分離した。21 日間の培養期間にわたり 27 pg/細胞/日の生産性を示し、最終的には 3.4grams/L (図 7)の産生能が得られた。

Flow Electroporation for Stable Cell Line Generation

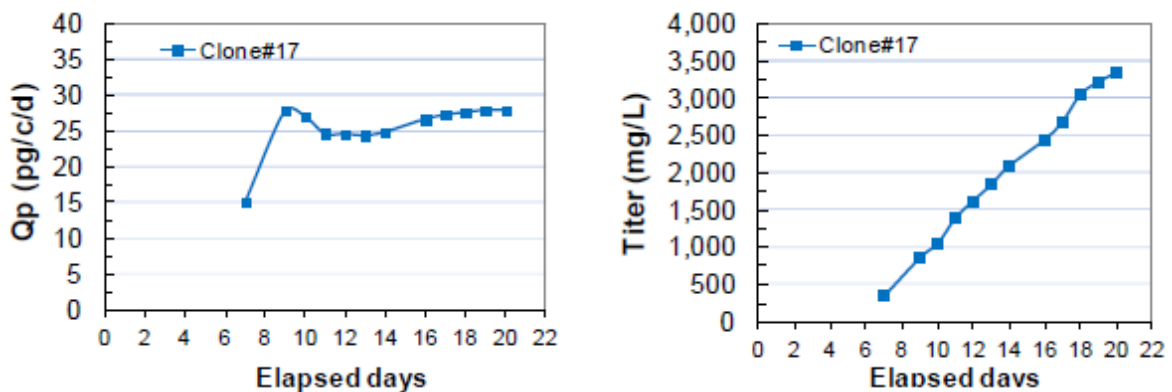


Figure 7: Rapid Stable Cell Development Using MaxCyte Electroporation.

A humanized mAb DNA plasmid was transfected into CHO-S cells using the CHO2 electroporation protocol on the MaxCyte STX. Limiting dilution cloning was carried out from the stable pool in G418 selection media. Cell lines were generated at week 6 and scaled up for production and accession cell bank. Productivity of the selected clone was > 3g/L as a fed batch.

MaxCyte テクニカルノート ; CHO 細胞による抗体産生

【結 語】

MaxCyte 電気穿孔法による TGE は、高品質の抗体医薬品候補の創出と前臨床試験の迅速な進行を可能とするばかりでなく、臨床グレードのバイオ医薬品製造のための高産生性 CHO 株樹立を簡素化させる。フロー型電気穿孔法は確立された高速・高性能の CHO 細胞のトランスフェクションを可能にする方法です。本法の高いトランスフェクション効率と生存率の高さは、トランスフェクション後 2 週間で 400mg/L 以上そして最適化したときは 1gram/L を超える分泌抗体量を可能とする。この一過性発現系の同一工程は、別々にあるいは一緒に実施するかは別にして、安定発現系プールの作成とそれに続く高産生性クローンの樹立に使用できる。このように、MaxCyte 一過性発現系は高品質、柔軟性、そしてグラム単位の産生を可能とする拡張性を持ち、バイオ医薬開発の全ての段階に有用な電気穿孔法です。

【文 献】

1. Strategies for Rapid Production of Therapeutic Proteins in Mammalian Cells. *BioProcess Int.* 10(4), 2012, p32-48.
2. Recombinant Protein Production by Large-scale Transient Gene Expression in Mammalian Cells: State of the Art and Future Perspectives. *Biotechnol. Lett.* 29(5), 2007, p677-684.
3. High-level Protein Expression in Scalable CHO Transient Transfection. *Biotechnol. Bioeng.* 103(3), 2009, p542-551.
4. Transient Transfection Factors for High-Level Recombinant Protein Production in Suspension Cultured Mammalian Cells. *Mol. Biotechnol.* 39(2), 2008, p141-153.
5. A High-Yielding, CHO-K1-Based Transient Transfection System. *BioProcess Int.* 11(1), 2013, p28-35.
6. Scalable Transient Gene Expression in Chinese Hamster Ovary Cells in Instrumented and Non-instrumented Cultivation Systems. *Biotechnol. Lett.* 29(5), 2007, p703-711.
7. Control of Culture Environment for Improved Polyethylenimine-Mediated Transient Production of Recombinant Monoclonal Antibodies by CHO Cells. *Biotechnol. Progr.* 22(3), 2006, p753-762.
8. Design of Experiment in CHO and HEK Transient Transfection Condition Optimization. *Prot. Expr. and Purif.* 78(1), 2011, p61-68.
9. Mild Hypothermia Improves Transient Gene Expression Yields Several Fold in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol. Prog.* 24(2), 2008, p458-465.
10. Rapid Protein Production Using CHO Stable Transfection Pools. *Biotechnol. Progr.* 26(5), 2010, p1431-1437.