

アップストリームバイオプロセスにおけるグルコースを超えるパラメータに対するラマン分光に基づく高度なプロセス制御

特長

- ラマン分光法はバイオプロセス用の分析技術として第一の選択肢となっています。
- ラマン計装は専門家以外のユーザーにも使いやすくなり、プロセス開発や臨床製造における新たな用途に役立ちます。
- 最新のレポートでは、グルコースおよび乳酸、アミノ酸、細胞特性などの追加パラメータのラマン分光に基づく監視と制御が実証されています。

概要

バイオプロセスにおけるラマン分光法は、アップストリームまたはダウンストリームのバイオプロセス操作において、対象の化学種をリアルタイムで監視するための重要なツールです。ラマン分光法の有用性は、1つのプローブで複数のパラメータを非破壊的に定量化できる点にあります。ラマン分光に基づく情報により、24時間体制での経時的な、より優れたプロセス特性評価が実現します。この技術開発により、cGMP、スケールおよびプラットフォーム横断型のモデル移設、バイオプロセス制御における新しいアプリケーションが可能になりました。

最近では、データ分析、高度なプロセス制御、そしてハイスループットの自動モデリング、シングルユース、パーフュージョン、細胞・遺伝子治療、ダウンストリームなどにおける新たなラマンアプリケーションに焦点を当てた論文が数多く発表されています。アップストリームバイオプロセスにおけるラマン分光法の最新の研究では、グルコース、代謝物、アミノ酸や細胞品質特性などの追加パラメータの制御にラマン分光法を使用することが注目されています。

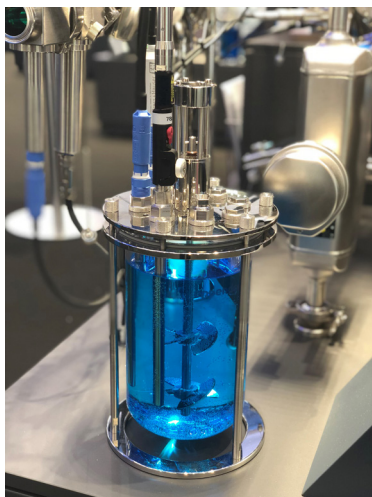
材料と方法

2020年にRaffertyらが発表した3本の論文では、インラインラマン分光法および予測モデルの機能を拡張する方法が研究されました。¹⁻³ これらの研究は、Kaiserラマンテクノロジーを搭載し、785 nmで動作するRaman Rxn2アナライザを使用して、モノクローナル抗体を産生するCHO細胞を対象に

実施されました、このアナライザにはRxn-10プローブとbIOオプティックが装備され、ラボ規模のバイオリアクタ (1~5 L) または生産規模のバイオリアクタ (2000~15,000 L) に設置することが可能でした。研究に応じて、ラマンデータはインラインおよび/またはオフラインのリファレンス測定値と比較されました。予測モデルは、SIMCA® (Sartorius) で開発されました。

結果および考察

研究の1つでは、ラマン分光法が2つのCHO細胞株において二次的なpH測定を提供できるかどうかを判断するため、インラインラマンとインラインpH、オフラインpH、オフライン乳酸、および二酸化炭素分圧 (pCO₂) との比較が行われました。¹ pHは重要なプロセスパラメータですが、インラインpH計ではドリフトにより毎日のオフライン確認が必要となり、日常的なサンプリングは汚染リスクをもたらします。著者らは、pHに影響を与える分子の変化がラマンスペクトルに潜在しており、ラマン予測された乳酸およびpCO₂ 値を用いてオフラインpHを予測できると仮説を立てました。まず、17日間の培養期間全体にわたってラマンスペクトルとオフラインpH値が比較されましたが、フルスケールのpHはモデル化するには複雑すぎる事が判明しました。全データセットのモデルの複雑さを軽減するため、著者らは培養データを初期段階と後期段階に分割し、初期モデルと後期モデルを生成しました。この手法によりモデル予測はわずかに改善されましたが、2つの細胞株間で予測誤差は一致しませんでした。たとえば、細胞株Aではモデル切り替え



高度なバイオプロセス制御で使用するRxn-10およびbIOオプティック

誤差が発生しましたが、細胞株Bでは観察されませんでした。また、細胞株Bでは9～11日目に予測値が低くなる現象が発生しましたが、細胞株Aでは確認されませんでした。別のアプローチとして、著者らは乳酸値と pCO_2 値から2つのオフラインpHモデルを生成しました。最初のモデルはオフラインの乳酸値と pCO_2 値に基づいており、2つ目のモデルはインラインのラマン分光による乳酸値と pCO_2 値に基づいています。オフラインのパラメータデータを組み込むことでモデルの複雑さが軽減されました。これら初期の結果は、サンプリング不要のバイオプロセスという全体的な目標に向けたさらなるモデル開発を支えるものとなりました。

Raffertyらによる2つ目の研究では、静電容量のオフライン測定によって評価された細胞の健康状態に基づく、ラマン分光法を用いた培養戦略が検討されました。² 静電容量により、生存細胞密度、生存率、生存細胞直径などの重要な細胞パラメータが測定されます。しかしながら、この手法は生理的条件や非生存細胞からの信号干渉の影響を受けます。この研究は、モノクローナル抗体を産生する8つのCHO細胞の生産規模培養において実施されました。13日間の培養期間を通じて、インライン静電容量法およびラマン分光法に

よってデータが収集されました。静電容量法とラマン分光法を組み合わせた手法により、複雑な培養戦略における1つの測定方法への依存度が低減され、接種プロセスなどの他のアプリケーションにも対応できるようになりました。

最後に、Raffertyらはサポートベクターマシン、ランダムフォレスト、Cubistを用いてグルコース、乳酸、アンモニアを予測する性能を評価し、PLSモデルによる結果と比較しました。³ 2つのCHO細胞株を用いて、3つのバイオリアクタスケール(1L, 2L, 2000L)からデータを収集しました。グルコース、乳酸、アンモニアについては、Cubistモデルの性能がPLSモデルをわずかに上回り、非線形ツリーベースモデルがバイオプロセスに適用可能であることが示されました。

結論

アップストリームバイオプロセスにおける最新の研究により、アミノ酸、pH、細胞生存率、細胞体積などの主要な生化学的プロセスパラメータの測定におけるラマン分光法の使用範囲がさらに拡大しています。これら一連の新しい研究結果は、非線形予測モデル、フィードバックに基づくプロセス制御、自動化、センサと機構的ノウハウの統合、効率的なモデル最適化といった高度なアプリケーションにおいて、ラマン分光法の高度な活用がますます進んでいることを示しています。このようなアップストリーム監視アプリケーションにおける最近の成功と、ラマン分光法の能力に関する深い知見が、迅速なプロセス開発と臨床製造への技術移転を支えています。

参考資料

1. Rafferty, C.; O'Mahony, J.; Burgoyne, B.; Rea, R.; Balss, K. M.; Latshaw, D. C. Raman Spectroscopy as a Method to Replace Off-Line pH during Mammalian Cell Culture Processes. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**, *117* (1), 146–156. <https://doi.org/10.1002/bit.27197>.
2. Rafferty, C.; O'Mahony, J.; Rea, R.; Burgoyne, B.; Balss, K. M.; Lyngberg, O.; O'Mahony-Hartnett, C.; Hill, D.; Schaefer, E. Raman Spectroscopic Based Chemometric Models to Support a Dynamic Capacitance Based Cell Culture Feeding Strategy. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43* (8), 1415–1429. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02336-2>.
3. Rafferty, C.; Johnson, K.; O'Mahony, J.; Burgoyne, B.; Rea, R.; Balss, K. M. Analysis of Chemometric Models Applied to Raman Spectroscopy for Monitoring Key Metabolites of Cell Culture. *Biotechnol. Prog.* **2020**, *36* (4), e2977. <https://doi.org/10.1002/btpr.2977>.