

# 細胞培養のクロススケール *in situ* ラマン監視



図1: バイオプロセス条件のために最適化されたリアルタイムの*in situ*プローブにより、分析モデルの移設が容易になり、ラボ (左) と製造現場 (右) での測定が実現します。

## 特長

- 1つのプローブで同時に栄養分、代謝物、細胞特性のプロセス内監視が可能
- ラマン測定によりプロセスの理解が向上
- リアルタイムのラマン分光に基づくプロセス制御とモデルの移設性
- 特異的かつ定量的なプロセス情報
- 米国食品医薬品局 (FDA) のプロセス分析技術 (PAT) およびクオリティ・バイ・デザイン (QbD) イニシアチブに対応

## 概要

動物細胞ベースのバイオプロセスにおいて、最も一般的な重要プロセスパラメータ (CPP) には、物理的パラメータ (温度、攪拌速度、溶存酸素 (DO))、化学的特性 (pH、栄養分、老廃物濃度)、生化学的特性 (細胞数、生存率) が含まれます。プロセス品質を確保し、cGMP製造において米国食品医薬品局 (FDA) が要求する製品のばらつきに関する厳格なパラメータを維持するためには、これらのCPPを慎重に管理する必要があります。

CPPの*in situ*監視は、一般的に、温度、圧力、pH、DOに限定されてきました。それは、これらの特性を測定できるセンサが存在するためです。化学的特性および生化学的特性は、通常、オフラインまたはアトラインで測定されます。ただし、オフラインまたはアトライン分析は本質的に時間がかかるため、リアルタイムのプロセス制御には対応できません。

## ラマンの利点

ラマン分光法の技術革新により、化学情報や生化学情報を容易に取得できるようになりました。ラマンは、バイオ医薬品を含むさまざまな産業において、非侵襲型、非破壊的なプロセス監視に広く使用されており、リアルタイムのプロセス制御を可能にします。<sup>1,2</sup>

バイオプロセスの監視と制御におけるラマンの利点には、スペクトル内の非常に特異的な情報、モデル間の拡張性、複数の化学パラメータや生化学パラメータの同時測定に対応できることなどがあります。ラマンは、サンプリングや追加の試薬を必要とせず、非侵襲型で非破壊的な分析を提供します。さらに、測定と制御に関する工学的・科学的進歩により、高度なプロセス制御戦略が可能になりました。リアルタイムのラマン分光に基づく供給制御は現在、ラボからcGMPまでバイオ医薬品企業で広く使用されています。本研究は、プロセス開発、ならびにベンチトップから製造規模への移行が成功したことを示しています。

① このアプリケーションノートに記載されているラマン分光計とプローブはすべて、Kaiserラマンテクノロジーを搭載したEndress+Hauser製品です。

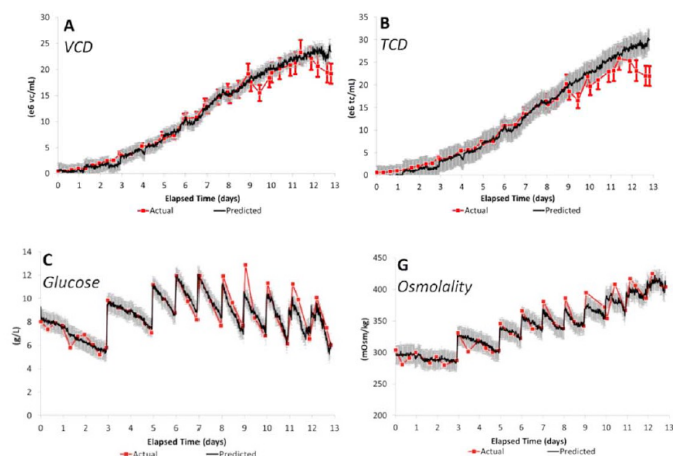


図2: 主要なCPPのPLSモデル予測結果。製造規模 (2000 L) におけるバッチの結果を予測するために、3つすべての規模 (3 L, 200 L, 2000 L) のバッチから得られたキャリブレーションデータを使用しました。許可を得て参考資料1より転載 © 2014 American Institute of Chemical Engineers (米国化学工学会)

## 実験

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株を使用したフェッドバッチバイオプロセスにおいて、ラマン分光計により、総細胞密度 (TCD)、生細胞密度 (VCD)、グルコース、乳酸、グルタミン酸、アンモニア、浸透圧の各CPPが同時に *in situ* で定量化されました。プロセス開発規模 (3 L)、パイロット規模 (200 L)、製造規模 (2000 L) のパイリアクタを *in situ* で調査し、スペクトル前処理と部分最小二乗 (PLS) 回帰の両方を用いて、スペクトルデータをオフラインのリファレンスデータと相関させました。

本研究では、ステンレス製浸漬オプティックと組み合わされた Rxn-10 プローブ (ベンチトップ分析用) およびバイオプロセスプローブ (パイロット規模または製造規模での運転用) を備えたラマン分光計 ( $\lambda=785\text{ nm}$ ) が使用されました (図1)。

## 結果

調査対象の各CPPに対してキャリブレーションモデルが作成されました (VCD、TCD、グルコース、乳酸、グルタミン酸、アンモニア、浸透圧)。PLSモデル予測は、プロセス開発規模 (3 L)、パイロット規模 (200 L)、製造規模 (2000 L) のバッチから生成され、製造規模のバッチの結果を予測するために使用されました。図2は、ラマン予測結果が測定値と密接に一致していることを示しています。

## 結論

この研究結果は、ラマン分光法を用いて複数のCPPに関する定量的情報を同時に生成できることを示しています。バイオプロセスに対応するラマン分光計は、複数のパラメータの同時測定、そして、複数の栄養分に関する定量的情報のリアルタイムでの *in situ* 測定を実現します。

さらに本研究は、ラマンがベンチトップ規模、パイロット規模、製造規模で信頼性の高い結果を生み出し、これらの結果を用いて製造環境に適用するための頑健なプロセスモデルの開発が可能であることを実証しています。ラマン分光法によって生成される豊富なバイオプロセス情報は、バイオプロセスを理解するための有望な新しい道を開き、QbDを可能にし、バイオプロセスのリアルタイムでの制御から細胞生存率や力価の最適化まで可能にします。

## 参考資料

1. Berry et al. Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biotechnol. Prog.* **2015**; 31(2), 566–577.
2. Abu-Absi et al. Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe [Communication to the editor]. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**; 108(5), 1215–1221.