

動物細胞培養の分析

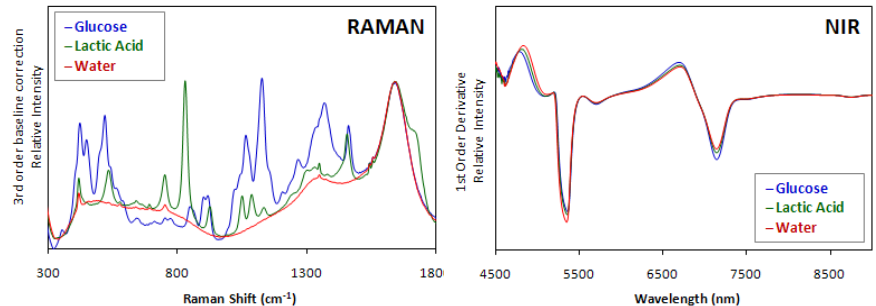


図1: ラマンはCHO細胞培養中にグルコースと乳酸の識別を可能にします。
ラマンの特異性により、拠点間およびクロススケールのモデル移設が容易になります。

特長

- 米国食品医薬品局(FDA)のプロセス分析技術(PAT)イニシアチブに準拠するリアルタイムでのプロセス内分析
- 1つのプローブを使用して複数の成分を定量的に監視するための特異性のある技術
- グルコース、乳酸、グルタミンの定量化
- ラマンは実証済みのプロセス分析技術(PAT)
- リアルタイムでのプロセスおよび製品品質の保証

概要

動物細胞による抗体医薬品の生産は、組換えタンパク質を適切に生産して折り畳むことができるため、最も広く普及しているバイオプロセスであり、バイオ医薬品の60~70%でこのバイオプロセスが採用されています。^{1,2} 1986年以降、細胞生物学、遺伝子導入メカニズム、培地組成、プロセス制御に関する理解が深まり、細胞生存率と力価が大幅に向上しました。²

ほとんどの細胞培養バイオプロセスでは、グルコースを栄養源とするチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が使用されます。CHO細胞は通常、バッチ中に流加液を供給されるフェドバッチ方式で培養され、設定されたタイミングでグルコースがバイオリアクタにポーラス供給されます。この時点は、事前のプロセス情報とオフライン分析に基づきます。しかし、この方法はいくつかの理由から理想的とは言えません。これは多大な労力とリソースを必要とするものであり、汚染のリスクを高め、細胞培養バイオリアクタ内のグルコースと乳酸を適切に制御できません。非侵襲型のリアルタイムPAT測定と比例積分微分制御(PID)または閉ループフィードバック制御を組み合わせることで、供給戦略を最適化し、収率と力価を向上させることが可能です。³

ラマンの利点

本書では、クオリティ・バイ・デザイン(QbD)の目的、ならびに米国食品医薬品局(FDA)のPATおよびQbDイニシアチブに従った、ラマン分光に基づくプロセス内分析の開発と応用に関する研究について説明します。

ラマン分光法と近赤外(NIR)は、有機分子や生体分子の特徴的な「指紋」のようなスペクトルを提供できるため、特定のピークを選択して定量分析に使用することが可能です。ラマンとNIRは、短時間でデータを取得でき、サンプル調製をまったく、またはほとんど必要とせず、1つのin situプローブで複数の成分を定量化できるため、バイオプロセスで使用されます。

ラマンかNIRかの選択は、多くの場合、特異性によって決まります。⁴ 図1は、水中のグルコースと乳酸のラマンスペクトルおよびNIRスペクトルを純水のスペクトルに重ねて示したものです。ラマンスペクトルは化学的特異性が高く、水による干渉がほとんどないのに対して、NIRスペクトルは水の影響を受けます。

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。

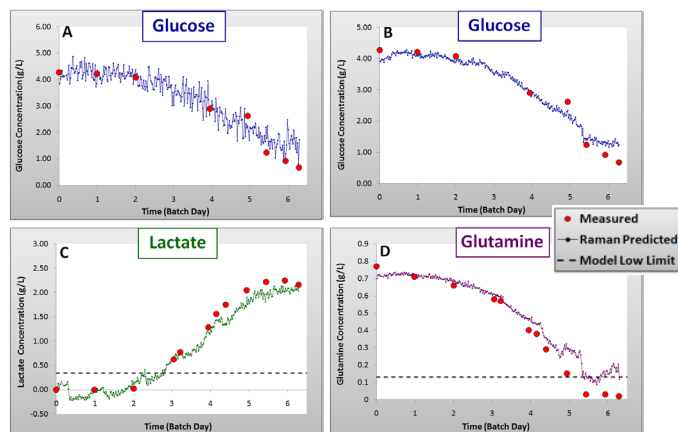


図2: ラマンは、オフラインのラボ分析と同様にプロセス成分の定量化を実現します (ただし、リアルタイムかつインプロセスで)。

実験

本研究の目的は、CHO細胞培養プロセスの重要なプロセスパラメータに対するラマンの特異性を解明することでした。グルコース、乳酸、グルタミンの水溶液系ラボサンプルを標準液として調製しました。4つのCHO細胞培養プロセスがパイオリアクタ (2L) で実行されました。2x10⁵ 細胞/mLの密度で播種され、工業用フェドバッチプロセスを模倣した条件下で行われました。どちらの一連の実験でも、リアルタイムのプロセス内測定を実施するために、バイオプロセス浸漬プローブを備えたラマン分光計 (λ=785 nm) が使用されました。プロセス内ラマン測定は、BioProfile® Basic 100を用いた採取サンプルのオフライン生化学的測定と関連付けられました。プロセス内ラマンデータは、目視検査、グルコース濃度の単変量モデリング、グルコース、乳酸、グルタミン酸の多変量部分最小二乗法 (PLS) モデリングによって調査されました。各成分に対してバッチ1〜3で収集されたリファレンス測定値は、PLS (各成分につき1モデル) を使用してラマンスペクトルの大きな領域と関連付けられました。次に、単変量モデルとPLSモデルを使用してバッチ4 (検証バッチ) の濃度を予測しました。

結果

バッチ1〜3を使用して開発されたキャリブレーションモデルは、バッチ4の成分濃度の予測に非常に有効であり、各成分のR² 値は0.99でした。図2は、バッチ4のラマン予測値の経時的トレンドを示しています。

結論

本研究により、ラマンが従来のオフライン生化学測定と同様のデータを提供することが実証されました。ラマン測定には、オフライン測定にはない、以下のような重要な利点があります。

- 1つのin situプローブで複数の特性を24時間体制で監視可能
- プロセスの一貫性を保証
- 汚染のリスクを軽減
- 高度なプロセス制御戦略を実現

さらなる研究により、パイロット規模や製造規模での実現可能性も実証されました。³ これらの研究を総合することで、アップストリームでの細胞培養の監視と制御におけるラマンの利点が明確に示されました。

参考資料

1. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* **2004**; 22(11):1393–8.
2. Lim Y, et al.. Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives. *Biotechnol Appl Biochem.* **2010**; 55(4):175–89.
3. Berry BN, et. al. Quick generation of Raman spectroscopy based in-process glucose control to influence biopharmaceutical protein product quality during mammalian cell culture. *Biotechnol Prog.* **2016**; 32(1):224–34.
4. Kozma, B. et. al. On-Line Prediction of the Glucose Concentration of CHO Cell Cultivations by NIR and Raman Spectroscopy: Comparative Scalability Test with a Shake Flask Model System. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2017**; 145: 346–55.