

Process raman analysis

MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザーおよび DynaDriveシングルユースバイオリアクターを使用したリアルタイム代謝物モニタリング

著者

Juan Villa, Matthew Zustiak, Elizabeth Amoako, David Kuntz, Lin Zhang, Kevin Broadbelt and Sue Woods (Thermo Fisher Scientific)

背景

複雑系における小さな変化を検出できるラマン分光法の能力は、バイオリアクターにおける細胞増殖のようなバイオ医薬プロセスの分析へと拡大できるのをご存じでしょうか。バイオ医薬品製造プロセスをリアルタイム、*in situ*および非破壊的にモニタリングするのに、ラマン分光計は連続プロセスアナライザーとして利用できるため、バイオリアクタープロセス中の多数の代謝産物の変化を検出するラマン分光法は、堅牢かつ確実なプロセス分析ツールです。

TouchRaman液浸テクノロジーを用いたMarqMetrixシングルユースバイオリアクター用BallProbeサンプリング・オプティック

再利用可能なラマン光学プローブは、分析実行ごとの変動要因を減らすことにより、プロセスの再現性や信頼性が向上するなどの利点をもたらします。Thermo Scientific™ MarqMetrix™ All-In-Oneプロセスラマンアナライザーには、測定領域が広範囲なプローブが利用可能です。MarqMetrixシングルユースバイオリアクター用BallProbe™サンプリング・オプティックは、バイオプロセス産業の要求事項を満たすように設計され、MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザーと共に使用できます。このプローブは、迅速かつ容易に交換および接続でき、耐久性があり、オフラインオートクレーブ処理を含む滅菌処理に対応します。

Thermo Scientific DynaDrive シングルユースバイオリアクター

最新のS.U.B.技術を持つThermo Scientific™ DynaDrive™シングルユースバイオリアクター (S.U.B.) は、大容量のバイオ医薬品製造のために最適化された性能を提供します。立方形タンクは、優れた攪拌およびマストランスファー能力ならびにスケラビリティを実現し、従来のS.U.B.では得られない、いくつかの重要な利点を提供します。

このアプリケーションノートでは、MarqMetrix All-In-OneプロセスラマンアナライザーとDynaDriveバイオリアクターを組み合わせ、重要工程パラメーター (CPP) のインライン測定を行いました。細胞培養ラン全体にわたって連続的に生成されたスペクトルデータを利用し、この統合システムを用いて、いくつかのパラメーターおよび代謝産物についての正確な予測モデルを開発しました。

材料および方法

細胞培養とフィードストラテジー

細胞培養は約320 Lの培地に 0.5×10^6 cells/mLを播種し、温度36.5 °C、pH=6.9+/-0.3、DO=50%でDynaDrive S.U.B.を用いて培養しました。

pHレベルは、必要に応じて、CO₂ガス化および炭酸ナトリウム添加によって制御しました。完全化学合成培地で培養し、3日目からデイリーの2ステップフィードプロセスを開始しました。

フィード培地1を開始培養容量に対し4%（重量比）添加し、フィード培地2を0.4%添加しました。6日目に温度を33 °Cへとシフトさせました。このランは14日後に終了しました。周囲の光から保護するためにバイオリアクターに覆いをしました。

オートクレーブ後のMarqMetrix All-In-OneプロセスラマンアナライザーおよびMarqMetrixシングルユースバイオリアクター用BallProbeサンプリング・オプティックをDynaDrive S.U.B.に挿入して、インラインでのリアルタイムラマンスペクトルデータを取得しました。



図1. 細胞培養アプリケーション仕様のDynaDrive S.U.B. (500 L)

MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザー測定

測定は、MarqMetrixシングルユースバイオリアクター用BallProbeサンプリング・オプティックをバイオリアクターに直接液浸して、MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザーを使用して行いました。各ラマンスペクトルは、3秒の積算/露光時間、および450 mWのレーザー出力設定で、平均20回の測定結果です。データスペクトル当たりの所用時間は2分であり、MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザーとモデルを構築するためのオフライン機器分析との間でタイムスタンプが一致しました。

ケモメトリックスモデル構築

複数のMarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザー、プローブ、およびバイオリアクターからの独立したデータを使用してモデルを作成しました。トレーニングデータセットは、各ケモメトリックスモデルを作成するために、バイオリアクター当たり45サンプルから収集しました。スペクトルデータをレビューし、宇宙線に起因するスペクトルスパイクを除去しました。関心スペクトル領域を選択し、ベースラインを除去し、SN比を最大化するためにスペクトルをあらかじめ処理しました。Savitzky Golay法による微分、Automatic Whitaker Smoothing、MSC、SNV、および平均センタリングなどを含む多くの前処理技術をテストし

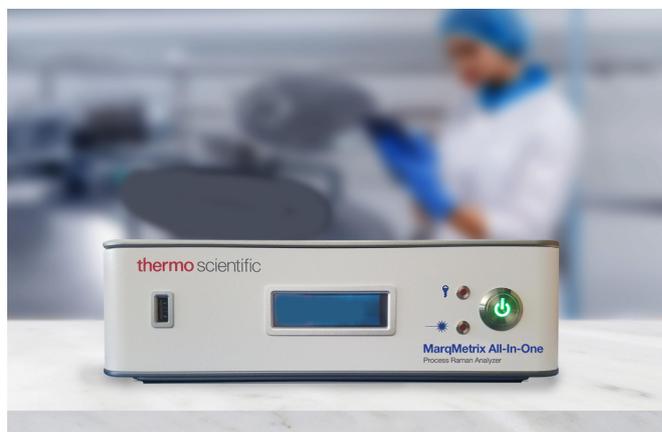


図2. Thermo Scientific MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザー

ました。最適な前処理技術は関心のある特定のパラメーターのモデル化に従って変化しました。関心のある各特性について部分最小二乗 (PLS) モデルを作成し、各モデルの最適化を試験するためにクロスバリデーションを行いました。評価特性は、グルコース、乳酸塩、グルタミン、グルタミン酸塩、TCD、VCD、およびバイオリアクター培養実行中に生成される他の一般的な代謝産物を含めました。

結果

本研究では、連続インラインラマン分光法をCHO細胞のフェドバッチ培養プロセスに適用しました。インラインでのラマンスペクトルデータは、オフライン分析データと相関させました。プロセスパラメーターをモニタリングするためにラマン分光法を使用するには、まず、外部で校正されたオフラインデータセットを有するケモメトリックスモデルの構築が必要です。MarqMetrix All-In-Oneプロセスラマンアナライザーの予測値の精度を評価するために、バイオリアクター中のサンプルを毎日収集し、比較のために分析しました。

キャリブレーションの二乗平均平方根誤差 (RMSEC)、クロスバリデーションの二乗平均平方根誤差 (RMSECV) および予測の二乗平均平方根誤差を各パラメーター (RMSEP) に対して計算しました。誤差は、モデルを構築するために使用されるRMSECVを特定するためにモデルの予測に基づいて平均化されました。RMSEPIは、モデルに入っていない「新しい」データに対してモデルをテストするために使用されます。各PLSモデルについて変動係数R²を記録しました。この値は、モデル予測子 (X変数) が説明できるY変数の変動量を決定するために使用されます。

同じCHO培養プロセスのバイオリアクターランから得られたいくつかの大規模な独立したデータセットを組み合わせることで、より正確で堅牢なケモメトリックスモデルが生成されたことに注目することが重要です。この研究のために、以前のバイオリアクター運転からの5つの独立したデータセットを組み合わせ、大規模なケモメトリックスモデルを構築しました。このDynaDrive S.U.B.のランの際に得られたスペクトルデータに校正モデルを適用しました。

データは、モデルがこの新しいデータセットを正確に予測できたこと、およびモデル予測が表1に示されるように多数の代謝産物についてオフラインで収集されたデータ測定値と高度に相関していたことを示します。

表1. モデル予測とオフラインデータ分析との相関

代謝物予測	R2 予測	RMSEC	RMSECV	RMSEP
グルコース (g/L)	0.98	0.43	0.49	0.40
乳酸 (g/L)	0.92	0.15	0.18	0.25
グルタミン (mmol/L)	0.92	0.42	0.48	0.58
力価	0.92	0.21	0.25	0.37
細胞生存率 (%)	0.94	1.72	2.29	1.83

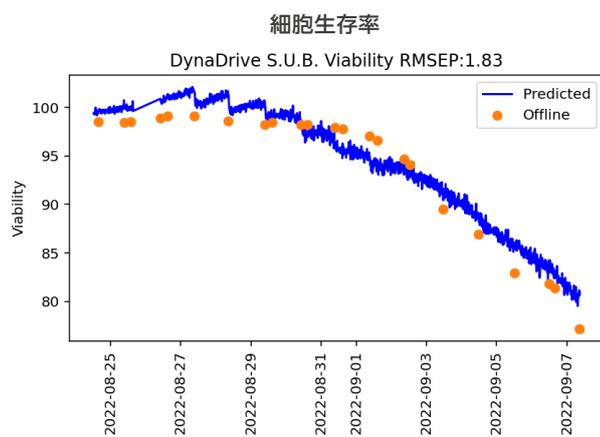
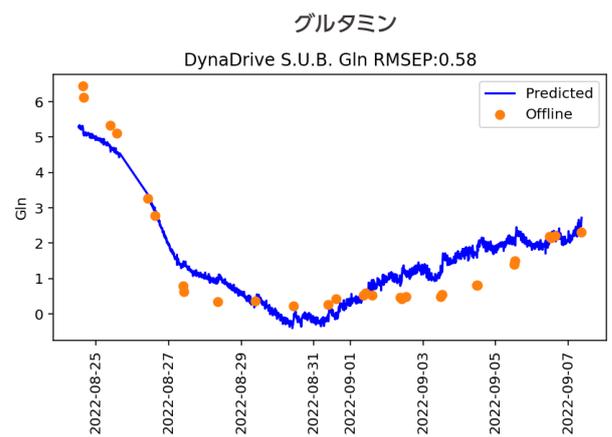
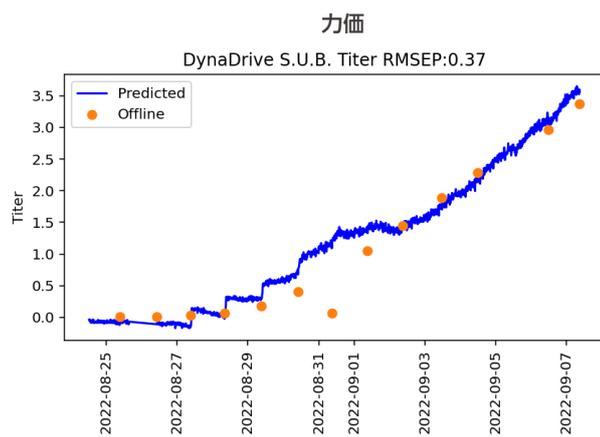
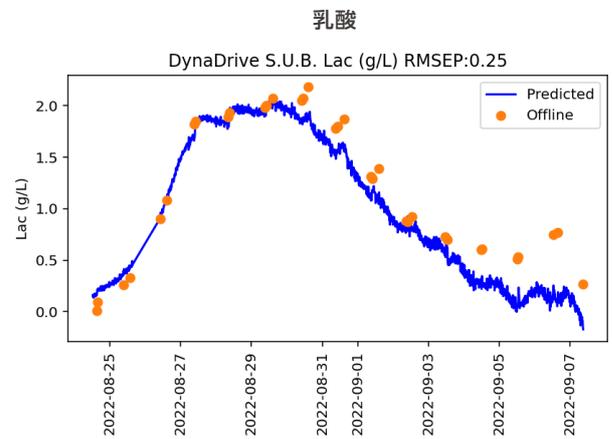
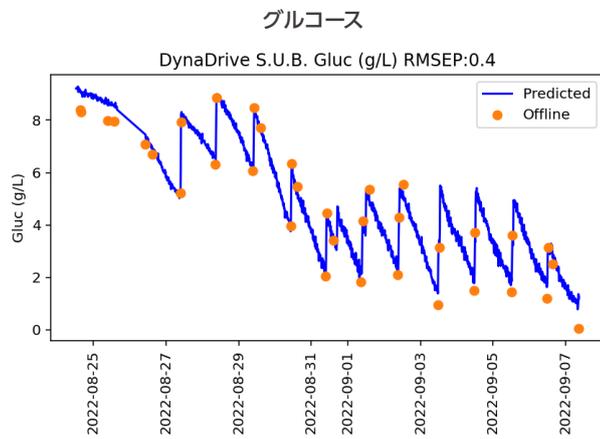


図3. DynaDrive S.U.B.ケモメトリックスモデルプロット
重要なバイオリクターパラメーターについてのランダムモデル対オフライン分析データの比較

結論

MarqMetrix All-In-OneプロセスラマンアナライザーとTouchRaman™液浸テクノロジーを用いた再利用可能なMarqMetrixシングルユースバイオリアクター用BallProbeサンプリング・オプティックを使用することで、DynaDrive S.U.B.における重要なプロセスパラメーターであるグルコース、グルタミン、および乳酸、ならびに総細胞密度および生存細胞密度の正確なインラインリアルタイム測定を提供することを示しました。相関分析は、モデル予測データとオフライン分析データとの間の優れた一致を示し、表1に示されるパラメーターに適用されるモデルの堅牢性を示しています。

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/marqmetrixAIO

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。
© 2023, 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc **FTIR212-B24030B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

thermofisher.com