

高密度での細胞凍結保存および N-1 パーフュージョン培養のために開発された Cellvento 4CHO-X Expansion Mediumを使用した シードトレイン強化

Mona Bausch, Scientist, M. Sc., BioProcessing R&D

Melanie Brandl, Ph.D., Global Product Manager Proprietary Media

Habib Horry, Ph.D., Associate Director Marketing – Upstream Process Integration

バイオ医薬品の開発および製造には、最高の品質水準を維持しながら効率と生産性を向上してコストを削減することが期待されています。主要な急務として以下が挙げられます。

- 新規投資の遅延や縮小など、需要の不安定さに対処する
- より小型のバッチサイズで小さいフットプリントでの多品種生産に対応する
- 製造までの期間を短縮し、競争力の課題を克服する

これらの急務の解決策として、開発および製造の次世代アプローチが注目されています。プロセス強化などの戦略には、リードタイムの短縮、プラントのフットプリント削減、製造の柔軟性向上によるコスト削減をもたらす可能性があります。

速度、柔軟性および信頼性の面で大幅な改善をもたらすことができるいくつかの戦略を用いて、アップストリームプロセスを強化することが可能です。本ホワイトペーパーでは、これらのアプローチの中から、高密度での細胞凍結保存 (HCDC、High Cell Density Cryopreservation) と、N-1 パーフュージョン培養のために開発された Cellvento 4CHO-X Expansion Medium を用いたパーフェュージョンシードトレインの2つについて検討します (図 1)。

BioContinuum™ Platform
Converge, Intensify and Evolve. Together.



MerckMillipore.com/BioContinuum

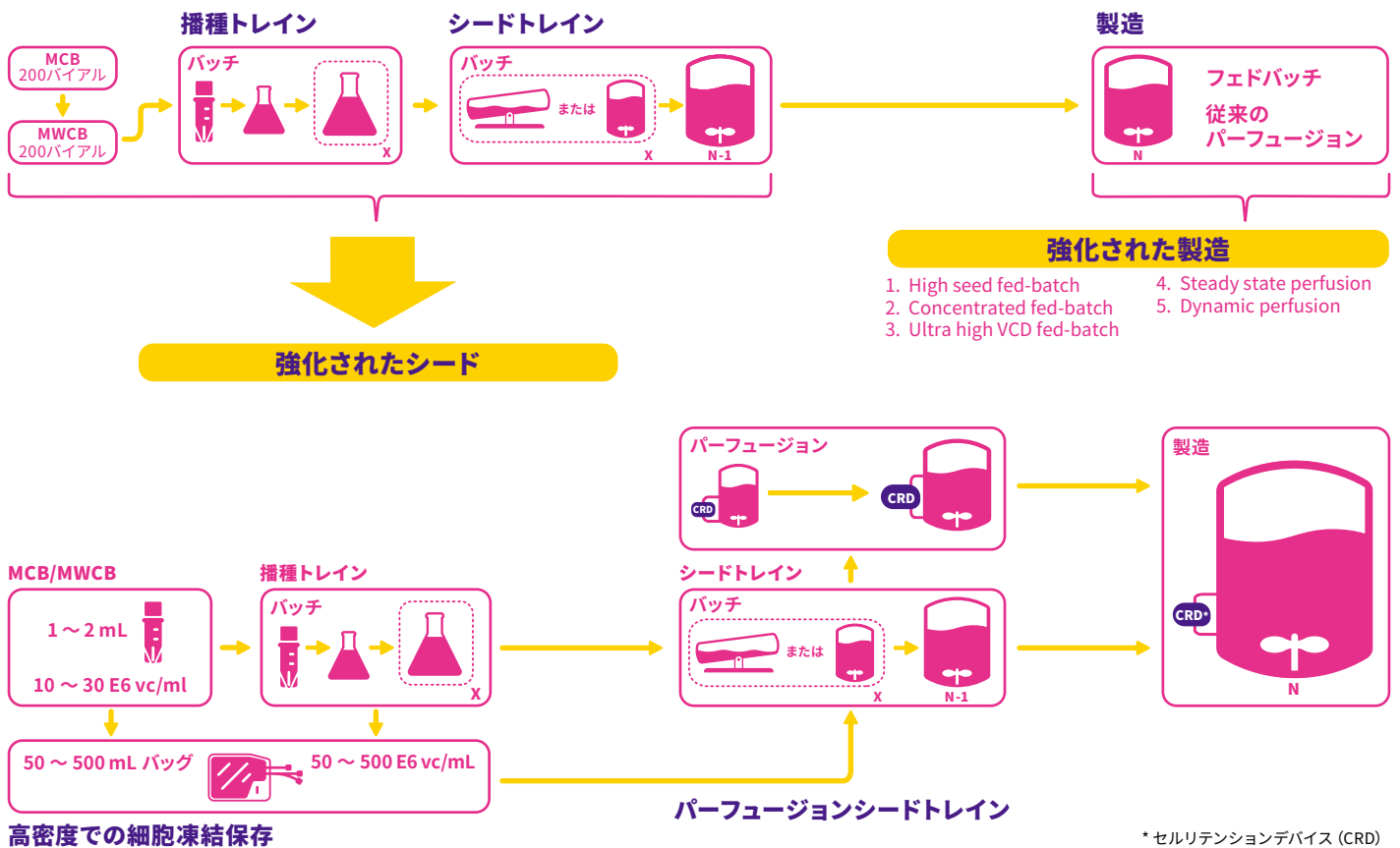


図 1：高密度での細胞凍結保存および N-1 パーフュージョン培養のために開発された Cellvento 4CHO-X Expansion Medium を用いたパーフェュージョンシードトレインを含むアップストリーム強化。

高密度での細胞凍結保存 (HCDC)

GMP 製造バッチにおいて、細胞増殖を1つのバイアルから融解し開始する従来のプロセスは時間がかかるうえ、非閉鎖系での細胞培養操作が必要なため、汚染リスクが増加します。高密度で大量に保存した細胞をシードトレインの最初のバイオリアクターに用いることで、プロセス全体を高率化することが可能です。

従来のシードトレイン拡大培養では、製造バイオリアクターの播種までに最大 20 ~ 30 日かかる場合があります。表 1 の例では、 10×10^6 cells/mL の 1 mL バイアルで開始する場合と比較して、 50×10^6 cells/mL の 150 mL バッグにより標準的プロセスが 10 日間短縮されています。この日数の短縮は、拡大培養を N-3 において開始することで実現します。

独自設計の凍結バッグにより、非閉鎖系での細胞培養操作工程が不要となり、シードトレイン拡大培養の再現性が向上します。また、細胞播種からの初期の拡大培養とバッチ製造を分離することで、バイアル中で密度を増加させるだけの場合は異なり、中核の拡大培養施設から世界中の製造施設へ細胞を分配することが可能になります。

製造に使用されるセルバンクは、複数の規制要件を満たし、厳正な試験を受けなければなりません。これに対して、プロセス開発におけるプロセス中間体は規制要求が比較的少なくなります。HCDC はセルバンク作製よりもプロセス中間体としての導入に最適であり、導入が比較的容易になります。

ただし、これらの利点は両方のアプリケーションにおいて重要です。

	[10^6 VC/mL]		標準バイアル	バッグ
播種 VCD	0.5	VCD [10^6 VC/L]	10,000	50,000
VCD - バッチ最終部	6	容積 [L]	0.001	0.15
		細胞数 [10^6 VC]	10	7,500

		容積 [L]	播種の細胞数 [10^6 VC]	運転時間 (Lag Phase を含まない) [日]
バイオリアクター	N (製造バイオリアクター)	15,000	7,500,000	3.5
	N-1	1,250	625,000	6.9
	N-2	105	52,083	10.4
	N-3	8.70	4,340	13.8
	N-4	0.72	361	17.3
	N-5	0.06	30	20.7
	N-6	0.005	2.5	24.2

10.4 日

表 1：バイアルまたはバッグによる播種を使用したプロセスの比較。高密度で凍結保存された細胞を使用することで、プロセス時間が大幅に短縮されます。

時間の節約に加えて、HCDC には以下の利点があります。

- 閉鎖系状態でのプロセッシング - 製造中に非閉鎖系での細胞培養操作工程がないため、汚染リスクを大幅に低減できる。

- シードトレイン拡大培養の再現性向上 - バイオリアクターの確認運転を比較可能な同等の出発点から開始できる。
- 細胞播種からの初期の拡大培養とバッチ製造の分離 - 中核の拡大培養施設から分散型の製造施設へ細胞をグローバルに分配できる (図 2)。

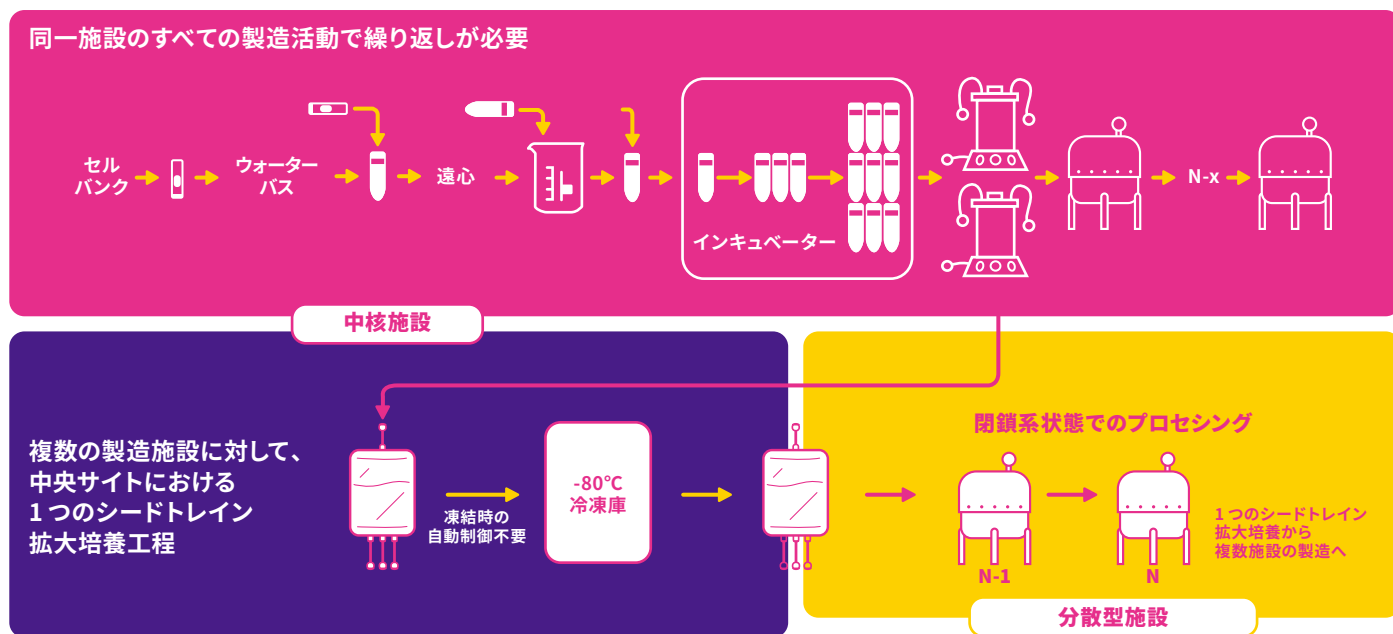


図 2: HCDC がもたらす中核施設における 1 つのシードトレイン拡大培養工程で分散型製造施設を含む複数施設での製造の可能性。

HCDC のプロセス開発では、凍結融解のための凍結保存用培地、バッグアセンブリー部品ならびに培地およびアセンブリーを試験するプロセスが開発されました (図 3)。凍結保存用培地は、細胞へのダメージを抑えながら凍結および融解を可能にする必要があります。さらに、その前後の増殖用の培地に適合している必要があり、以下が保証されなければなりません。

- 凍結および融解時の細胞へのダメージを抑制
- 融解後、最小限のLag phaseまたはLag phaseなしでの速やかな増殖
- 融解、増殖および製造にわたって一定の増殖速度および明確な生産性

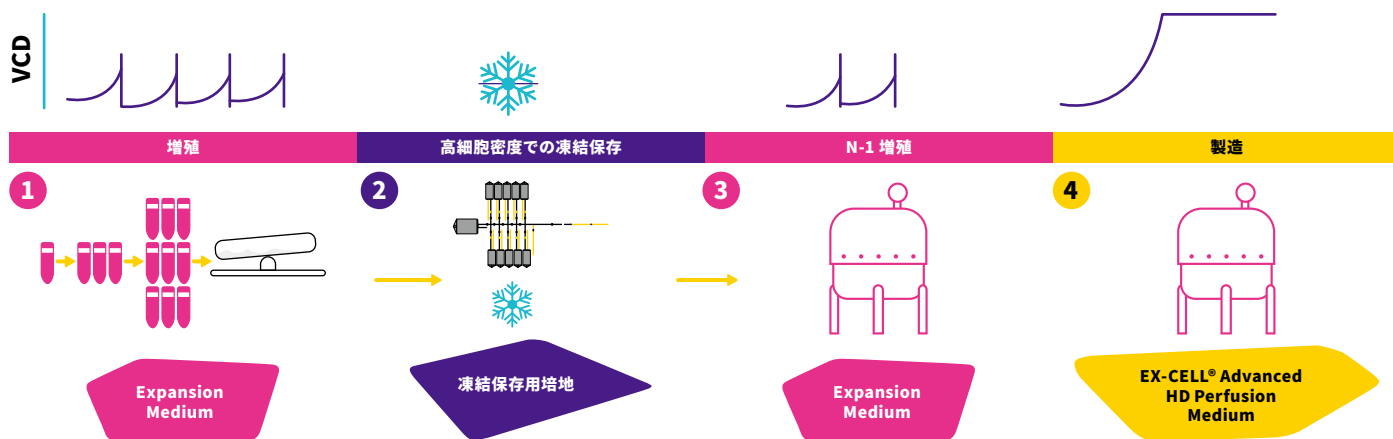


図 3: HCDC 凍結保存用培地は全体的なアップストリームプロセスに統合。

図4にバッグ組立の主な構成要素(A)および充填プロセス(B)を示します。この例では、10個の250 mL凍結バッグを示しています。1つのバッグが充填されたらすぐに、NovaSeal™ クリンピングツール

を用いた無菌プロセスでそのバッグを取り外すことが可能です。各凍結バッグに付いているラインにより、融解後に播種のためバイオリアクターへ接続することができます。

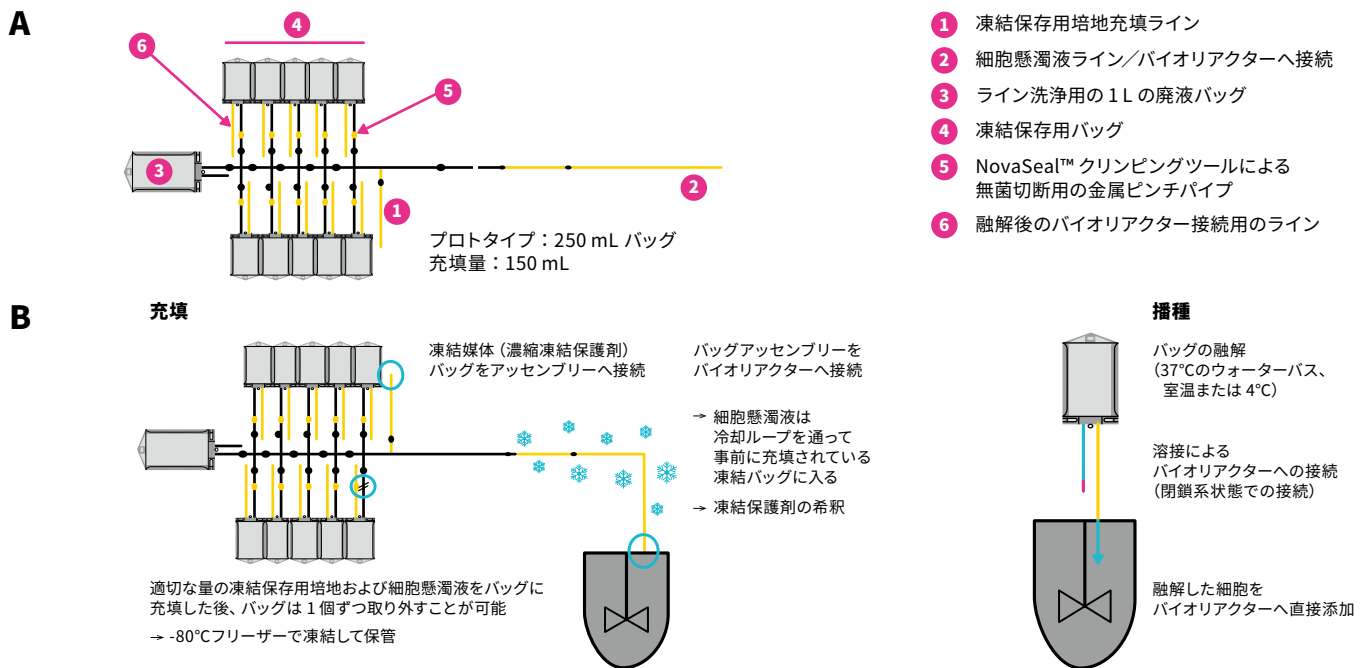


図4：HCDC バッグアセンブリの主な構成要素 (A) ならびに充填および播種のプロセス

バッグアセンブリに充填するため、濃縮凍結保護剤を含む凍結培地が入った容器をアセンブリへ接続します。凍結保護剤は細胞懸濁液をバッグへ添加することで希釈されます。バッグ毎に、充填後直に取り外して冷凍庫に保存できます。播種する時は、バッグを冷凍庫から取り出して融解し、バイオリアクターへ接続するだけです。図5に示しているのは、細胞増殖および Titer について、HCDC バッグを用いて播種したバイオリアクターと、バイアル

からの標準的な拡大培養のための細胞を播種した別のバイオリアクターを比較した実験の結果です。両バイオリアクターともにパーフュージョン下で運用されました。その後、追加のバイオリアクター2基に最初の2基からの細胞を播種し、再びパーフュージョン下で運転した後、 5×10^7 VC/mL で定常状態にしました。同等の結果が得られ、細胞増殖能および IgG 産生能に悪影響を与えることなく HCDC アプリケーションを適用できる可能性が示唆されました。

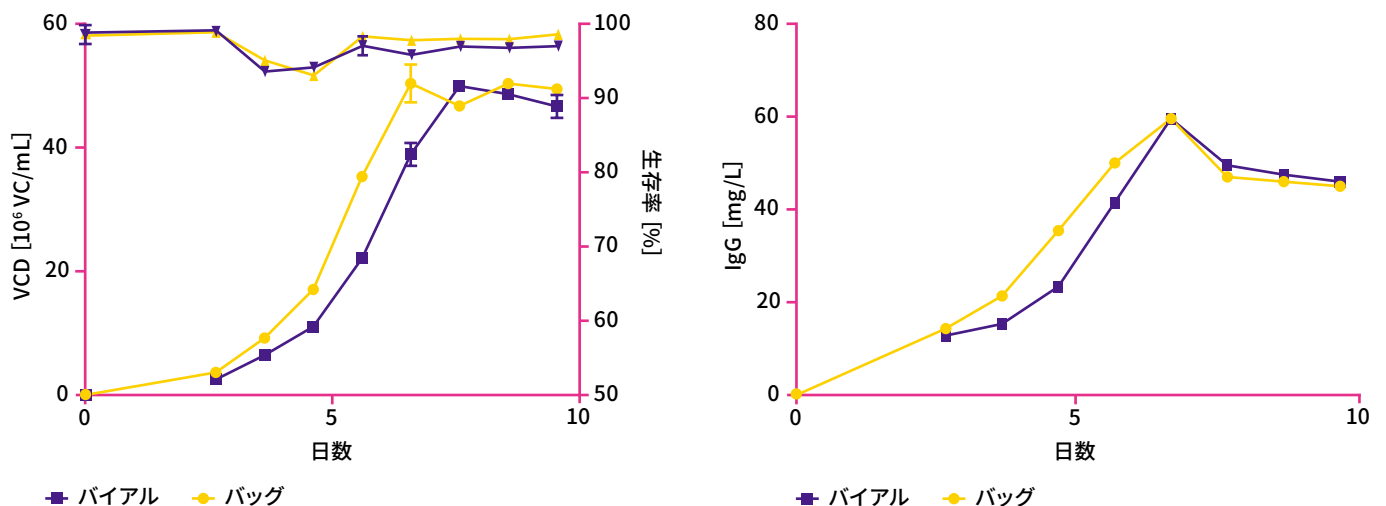


図5：CHO-K1を用いた製造バイオリアクターを想定した培養での Titer と細胞増殖。定常状態で両バイオリアクターの増殖および Titer は同等であった。

シードトレイン拡大培養

通常、シードトレイン拡大培養はラボスケールから N-1 までの製造バイオリアクターのスケールでバッチモードで行われます。ただし、バッチモードを用いた場合、次の段階の播種のために再現性のある良好な細胞増殖を維持する必要があるため、パーフュージョンシードトレインで達成可能な濃度よりも、播種する細胞濃度が低くなります。細胞密度を増加させるためにパーフュージョン培養をシードトレイン内に導入することで、必要なバイオリアクターの数を削減でき、より高い細胞密度での製造バイオリアクターへの播種が可能です。通常、シードトレイン拡大培養は製造段階に使用される培地と同じ培地で行われます。ただし、パーフュージョンを利用する場合、高い細胞密度の維持が可能な培地が必要となり、毒性のある副生成物を最小限に抑え、高い細胞密度のために十分な栄養レベルを確保するため、細胞の代謝プロファイルを制御する培地である必要があります。増殖した細胞は、製造バイオリアクター内へアダプテーションなしに直接移せることが望ましいため、これらの培地は Lag Phase を回避できることが求められます。

これらの要件に基づいて、多くの試作培地を評価するためのモデ

ルが開発されました。細胞を小スケールで培養し、プロトタイプ
の培地でアダプテーションして増殖させました。次に、凍結保護剤
としてジメチルスルホキシド (DMSO) を添加して、これらの培地中
で細胞を凍結しました。融解後、再びプロトタイプ培地を用いて
2 回継代し、細胞を培養しました。その後、製造工程を想定して
EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium を用いてバッチモード
での培養を開始しました。

図 6 に、両方の条件で EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium
の中で行われた最終バッチの VCD (Viable Cell Density、生細胞
密度) を示します。黄色で示されているコントロールは EX-CELL®
Advanced HD Perfusion Medium で拡大培養および生産培養され
ています。青色の条件は、プロトタイプの Expansion Medium で
培養し、製造のために EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium
へ移したものです。試験した 4 つの CHO 細胞株で増殖をある程
度向上させることができましたが、生産培養全体にわたって一種
類の培地を使用することが最適ではない可能性が示されました。

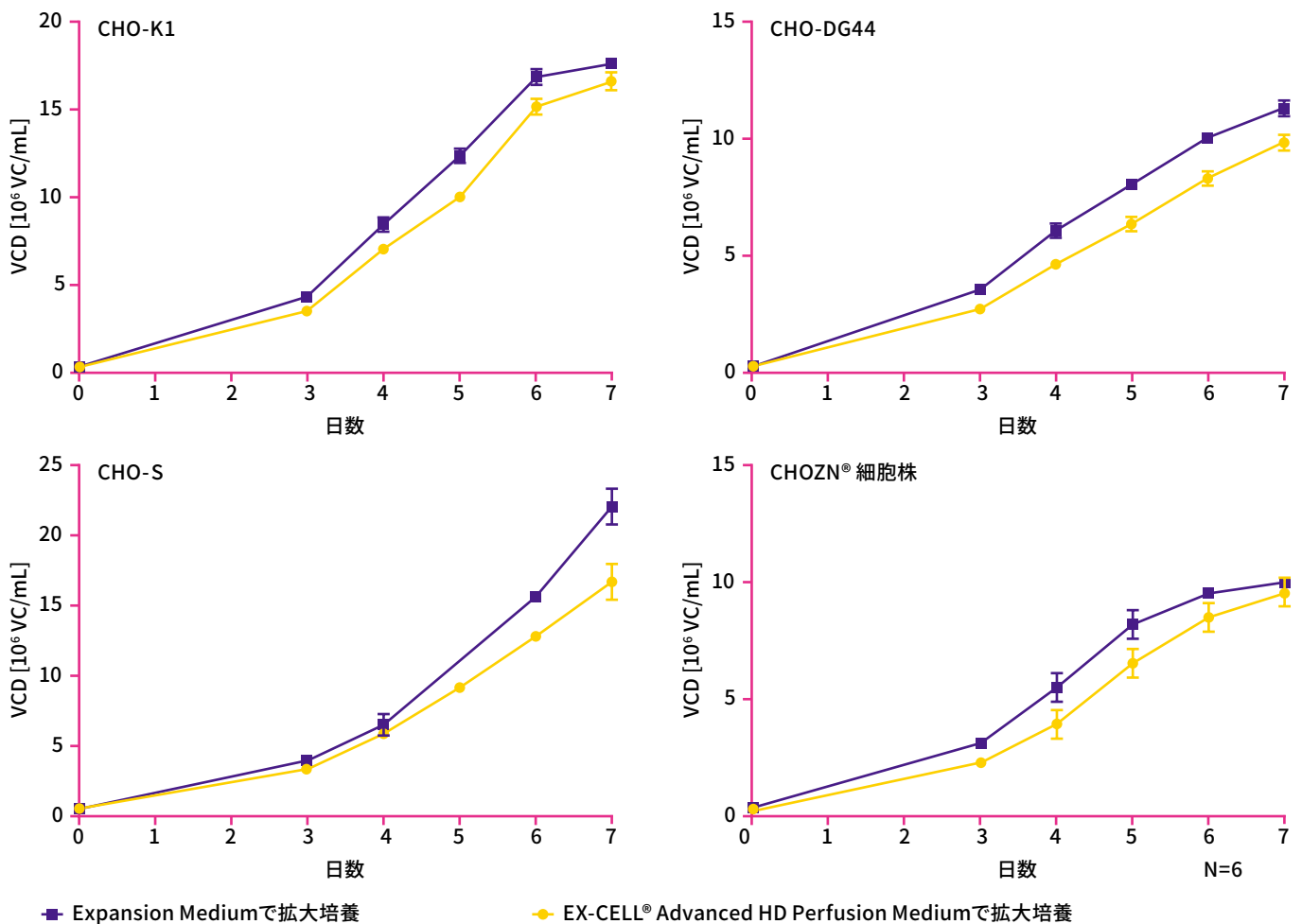


図 6：製造バッチを想定した培養評価での細胞増殖。生産培養全体にわたって一種類の培地を使用することは最適ではないことが示唆された。

図7に示すように、Expansion Medium は拡大培養での細胞増殖だけでなく、生産培養でのIgG 産生量にも影響することが確認されました。EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium と併せ

て Expansion Medium を使用したときに、1つの CHO 細胞株で IgG 産生量が最大 54% 増加することが観測されました。

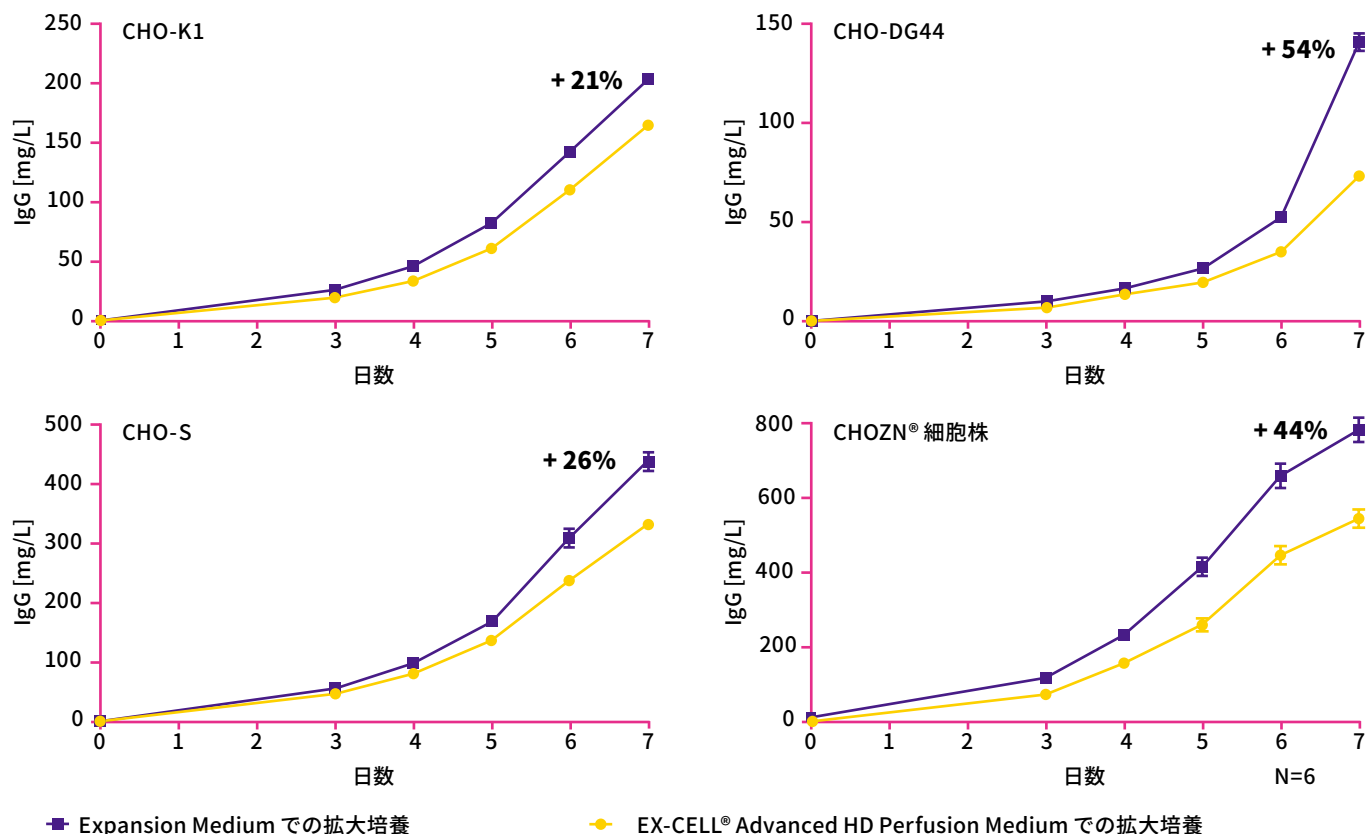
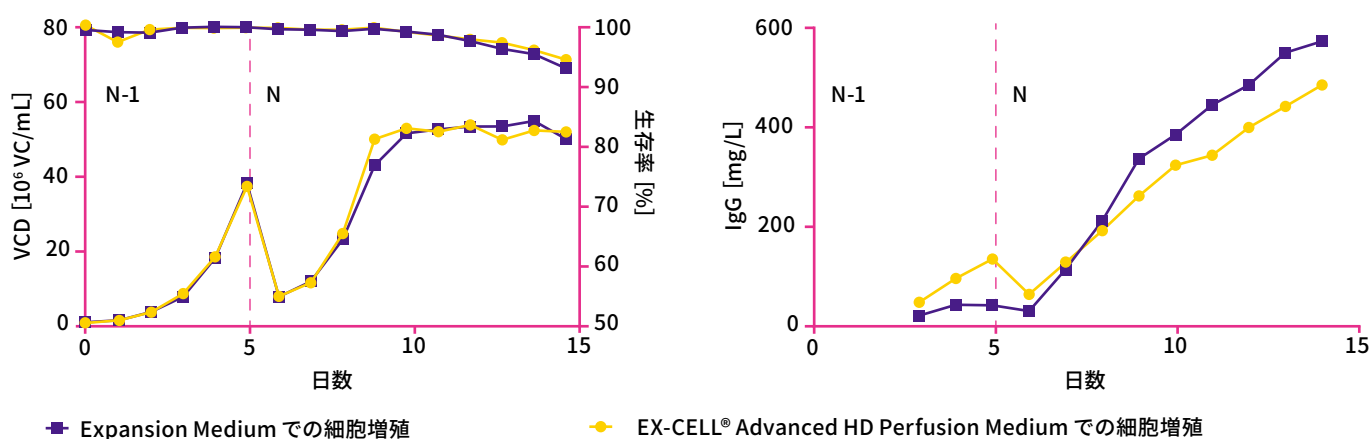


図7：Expansion Medium と EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium の併用時に IgG 産生量の増加が認められた。

バイオリアクターの振とう管モデルにおける効果がパーフュージョンモードでも再現可能かどうかを確認するため、パーフュージョン下の N-1 バイオリアクターを、一方の条件では Expansion Medium で、もう一方の条件では EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium で運用しました。両 N-1 培養から培養液を採取し、N 生産培養への

播種とパーフュージョンでの連続培養に用いました。ただし、両方のバイオリアクターで EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium が使用されています。プロセス全体で同一の培地を使用した場合と比較して、Expansion Medium 中での細胞増殖では生産性が 18% 増加しました (図 8)。



N-1：Expansion Medium または EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium N：N 培養では EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium を両方の培養に使用

図8：バイオリアクターでの EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium との適合性の確認。

また、N 生産培養としてフェドバッチを用いるときも N-1 パーフュージョンを用いることに利点があります。したがって、フェドバッチプラットフォームの Cellvento® 4CHO/4Feed および EX-CELL® Advanced fed-batch と本培地の適合性を検討しました。Expansion Medium

をこれら 2 つのプラットフォームと併用したときにも良好な結果が得られるか確認するため、フェドバッチを行う前に、これらプラットフォームに対する通常の培地または新しく開発された Expansion Medium を用いて 2 種類の CHO 株にて評価しました (図 9)。

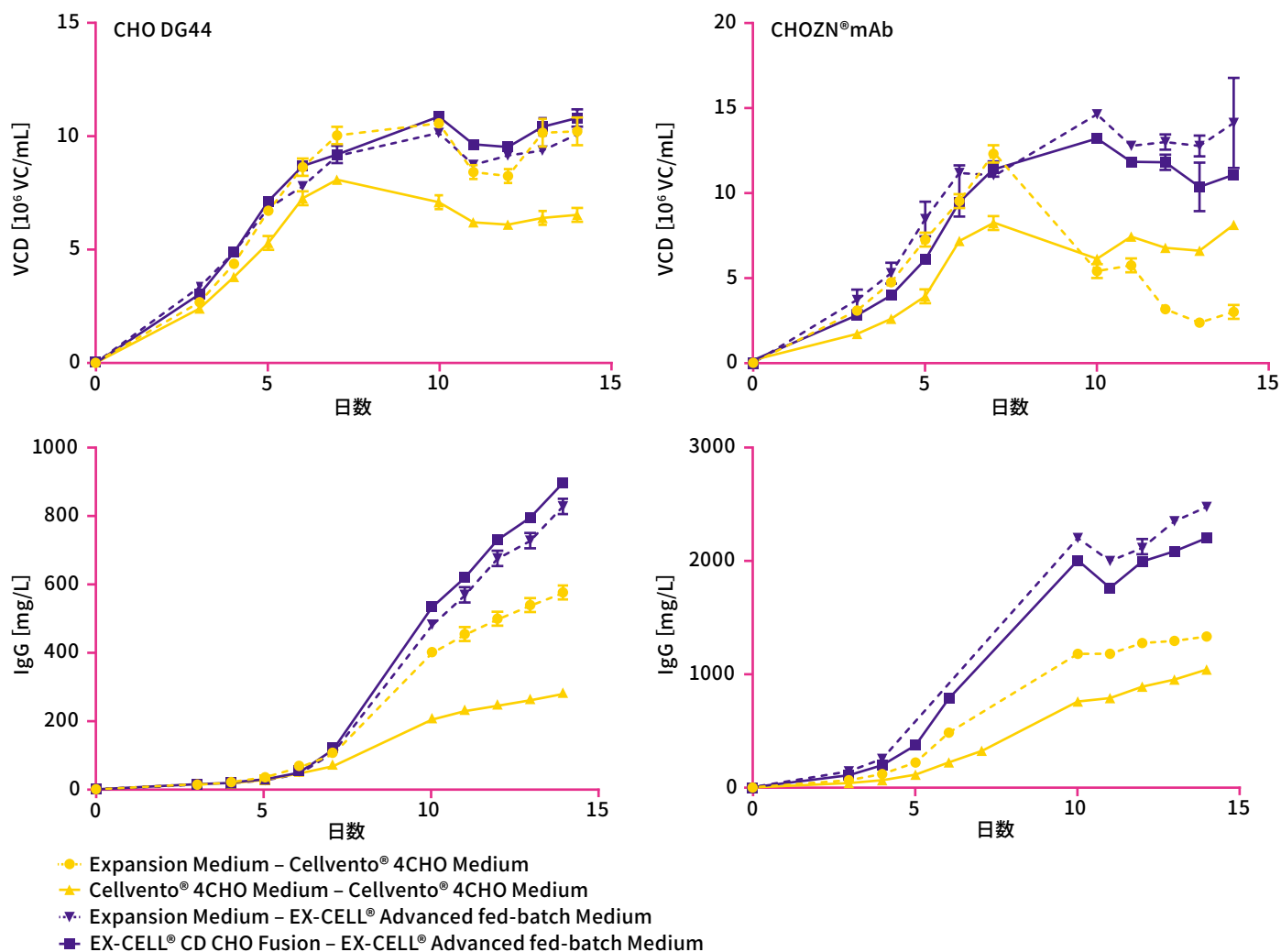


図 9：フェドバッチ用 Cellvento® 4CHO Medium および EX-CELL® Advanced CHO fed-batch Medium と Expansion Medium の適合性。

新しい Expansion Medium で増殖した条件を破線、通常の Base 培地で増殖した条件を実線で示しています。Cellvento® 4CHO プラットフォームと併用したときに Expansion Medium は Titer を著しく増加する効果がありました。EX-CELL® Advanced fed-batch

Media プラットフォームの併用培地としても機能しましたが、Titer は同程度でした。これらの結果は、N 生産培養でフェドバッチを用いたときにも Expansion Medium を使用できることを示しています。

バイオリアクターでの検討でも同様の結果が確認されています (図 10)。適合性について Cellvento® 4CHO プラットフォームを試験し、それぞれ 2 回の再現実験を行いました。紫色の条件は、Cellvento® 4CHO の Base 培地、黄色の条件は Expansion Medium で拡大培養しました。拡大培養後、Cellvento® 4CHO フェドバッチプラットフォームを用いてフェドバッチ下で運用するバイオリアクターの播種に使用しました。

バイオリアクターへの拡大培養に Expansion Medium を使用することで、Cellvento® 4CHO プラットフォームと Expansion Medium を併用したときに、フェドバッチ下でも生産性を向上する効果があることが確認されました。

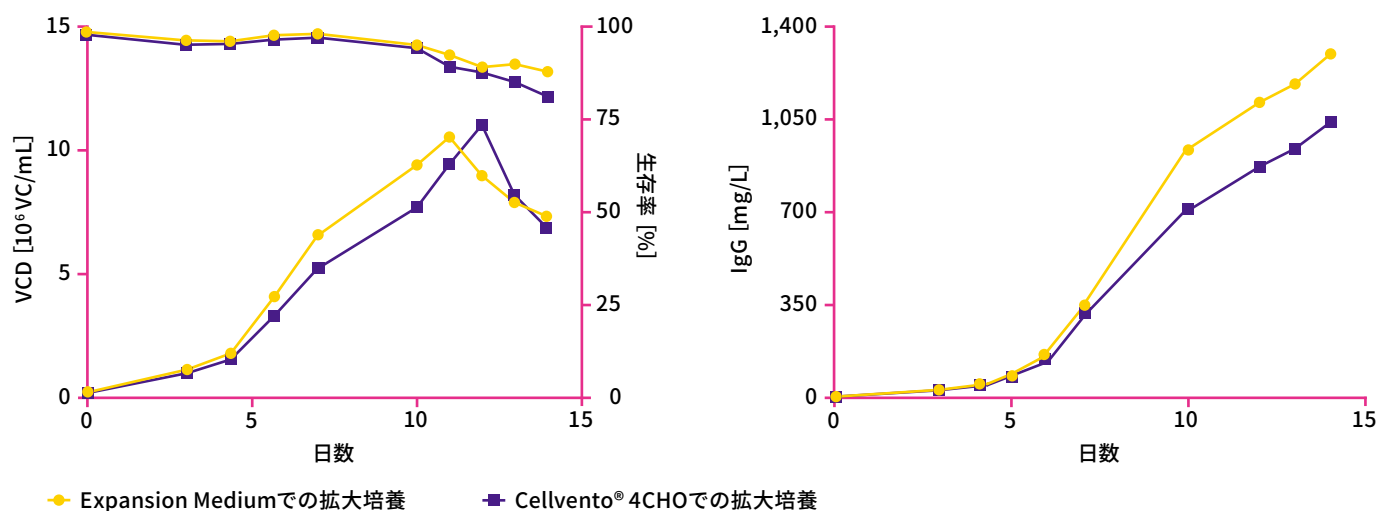


図 10 : バイオリアクターでの Cellvento® 4CHO フェドバッチプラットフォームとの適合性の確認。

医薬品製造者が効率および生産性を向上してコストを削減する新しい方法を探る中で、プロセス強化を図る動きが活発化しています。本ホワイトペーパーで示したように、HCDC および N-1 パーフュージョン培養のために開発された Cellvento 4CHO-X Expansion Medium はアップストリームプロセスに大きな影響を与えることができる 2 つのアプローチです。Cellvento 4CHO-X Expansion Medium を使用することで細胞増殖と生産性の両方を向上させることができます。一方、HCDC は以下を可能にします。

- シードトレインの短縮および製造バイオリアクターに到達するまでの時間短縮
- 各生産バッチを短時間で開始することによる施設の柔軟性の拡大、プロセス不良が発生した際のより短時間での復旧
- MWCb を管理する 1 つの中核サイトによる細胞培養インフラの縮小
- 非閉鎖系空間で細胞を操作する場合と比較して閉鎖系使用による汚染リスクの低減

結論

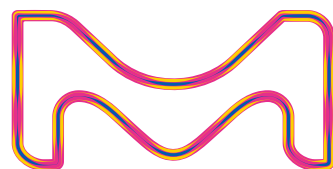
N-1 パーフュージョン培養のために開発された Cellvento 4CHO-X Expansion Medium は、細胞増殖と生産性の両方を向上させることができます。Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株を用いたパーフェュージョンシードトレインのために独自に開発されました。製造 CoG の低減、

プラントの柔軟性向上、生産力増大、および製造のフットプリント削減など、シードトレインプロセスの効率向上のため、低 CSPR で高い細胞密度に到達できるように、高濃度の栄養素が配合されています。本培地はパーフェュージョンおよびフェドバッチ製造プロセスに適用できます。

Facebookもチェック

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2020 年 6 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and SAFC are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK_WP5751EN ver 2.0

メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp

製品・技術に関するお問合せ : PStechservice_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ : PScommercialservice_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143