

コンパクト細胞培養培地による プロセス強化の実現

要約

コンパクト細胞培養培地 (CCM) (EZMix™カスタム CCM 製品群など) は、最新のバイオ医薬品製造プロセスの強化を実現します。コンパクト CCM は、既存の微粉末状培地と比較して、溶解時間を大幅に短縮し、包装容積を削減できます。流動性が高く、粉塵発生が最小限に抑えられるため、従業員の健康と安全性が守られ、製造容器への供給を簡素化できます。最も重要な点として、コンパクト CCM は微粉末状 CCM と同等の優れた性能と品質を提供します。以上のような既存の培地と比較した利点は、プラントの処理量と柔軟性を高め、設備設置面積を削減するとともに、アップストリームプロセスにおける作業員の安全性を向上させます。

この Technical Brief では、コンパクト CCM 顆粒の生産プロセスとともに、操作効率および細胞培養性能を評価した試験について要約します。コンパクト化の影響に関するデータは、この新技術がバイオプロセッシングに乾燥粉末 CCM を使用する際の課題の克服に役立つことを示しています。以下に記載する結果は、Cellvento® のカタログに記載している粉末およびコンパクト細胞培養培地・フィードを用いて得たものです。得られた結果は、すべての EZMix™カスタム製品に当てはまりません。

はじめに

モノクローナル抗体 (mAb) 製造のアップストリームプロセスを強化する際、パーフュージョン培養プロセスに用いる培地の調製が課題となる場合があります。バッチ培養プロセスに必要な培地量はバイオリアクター容積とほぼ同じですが、これと同程度の生産規模のパーフュージョン培養プロセスには、バイオリアクター容積の最大 4 倍の培地量が必要です。大量の培地調製は、時間、安全性および品質の点で大きなボトルネックとな

ります。そのため、運用コスト、保管場所設置面積およびアップストリームの柔軟性を評価する際は、培地の調製および消費が主な焦点となります。

乾燥粉末 CCM は、液体 CCM と比較して容積が小さく安定性が高いため、輸送および保管の点で多くの利点があります。しかし、乾燥粉末 CCM は溶解性が高く、取り扱いが容易である必要があります。これは、乾式造粒、すなわち、圧縮力を用いて微粉末状 CCM をより大きいサイズの顆粒に加工する技術によって実現できます。EZMix™ CCM 製品群は、アップストリームプロセスの効率向上や、製造におけるボトルネックの排除を検討しているバイオ医薬品製造者に利点を提供します。重要な点として、乾燥粉末 CCM と顆粒 CCM は物理的形態のみが異なり、組成に差はないため、これらの好ましい効果は、細胞培養性能に影響を及ぼしません。

造粒プロセス

ローラー圧縮は、水や添加剤を必要とせず、圧縮力により微粉末から顆粒を製造する乾式造粒技術です。

湿式造粒では顆粒の乾燥ステップに熱が必要ですが、ローラー圧縮の場合、湿式造粒ほど粉末に熱をかける必要がないため、製造される顆粒の培地組成は変化しません。

ローラー圧縮プロセスの主なパラメータは、圧縮力とミルのグリッドサイズです (図 1)。



図1. 細胞培養培地粉末に使用されるローラー圧縮技術のフローチャート。粉末を漏斗に充填します (1)。ミキサーと供給オーガーにより粉末をローラーに供給します (2)。ローラーの間で粉末が油圧により圧縮され (3)、プレート状に成形されます (4)。プレートを回転ミルで顆粒に解砕します (5)。圧縮されなかった微粒子を振動ふるいで顆粒から分離し、最終顆粒を回収します (6)。最終収率を高めるため、微粒子をリサイクルし、漏斗に再充填します (7)。

一貫した細胞培養性能および品質

コンパクション CCM は、微粉末 CCM と同じ細胞培養特性を有していなければなりません。細胞培養特性を検証するため、培地中の主な CCM 原材料の濃度を分析しました。微粉末培地・フィードとコンパクション培地・フィードを比較したとき、CHO 細胞の培養性能および重要品質特性に差はみられませんでした。

生細胞密度 (VCD)、生細胞率および生産物力価を指標として、細胞培養性能を、粉末培地・フィードとコンパクション培地・フィードの両方で評価しました (図2)。モノクローナル抗体の凝集、糖鎖付加といった重要品質特性は、いずれの培地を使用した条件でも同程度でした (図3)。pH、浸透圧および溶解性への影響は認められず (図4)、粉末培地とコンパクション培地中の原材料 (ビタミン類、アミノ酸、微量元素など) の分布も均一でした (図5)。

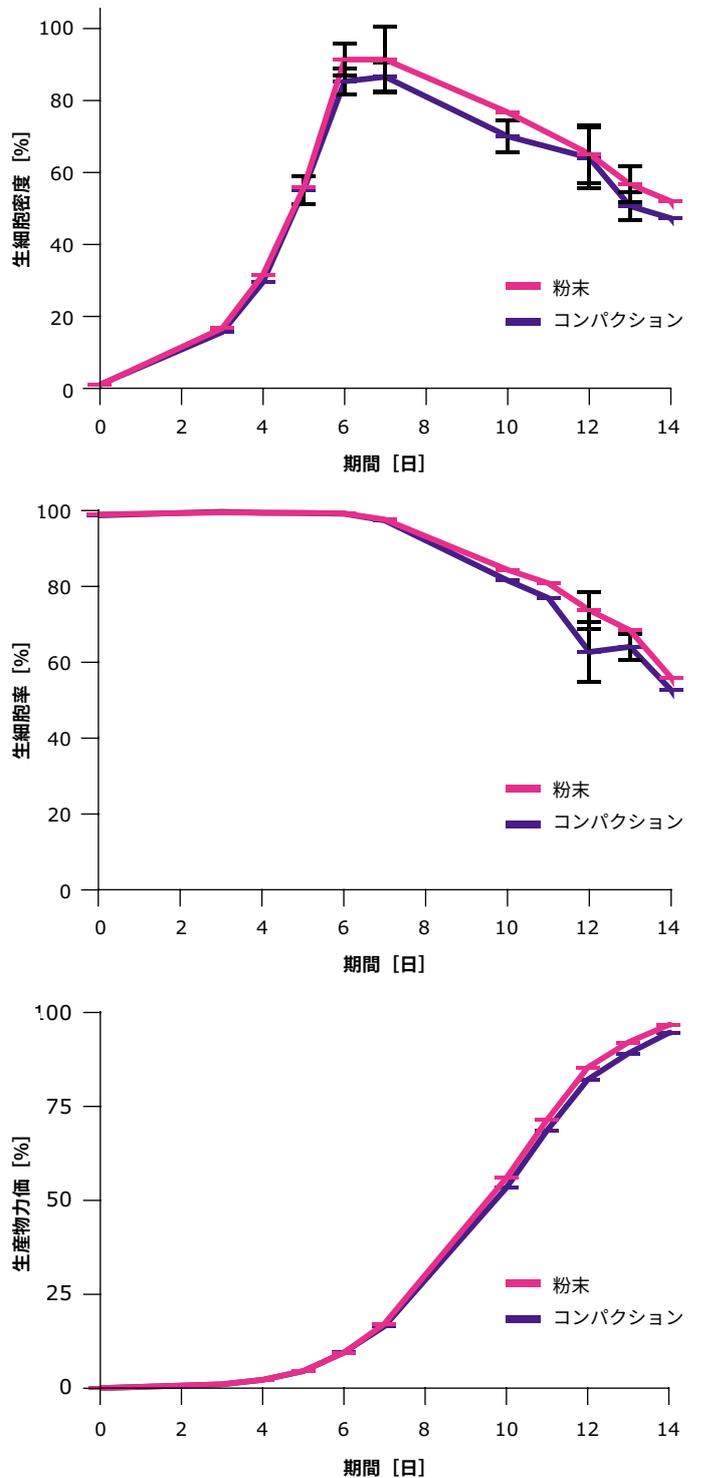


図2. 生細胞密度 (VCD)、生細胞率および生産物力価は、粉末培地・フィード使用条件とコンパクション培地・フィード使用条件で同様の傾向を示しました。1条件につき四重反復培養で評価しました。

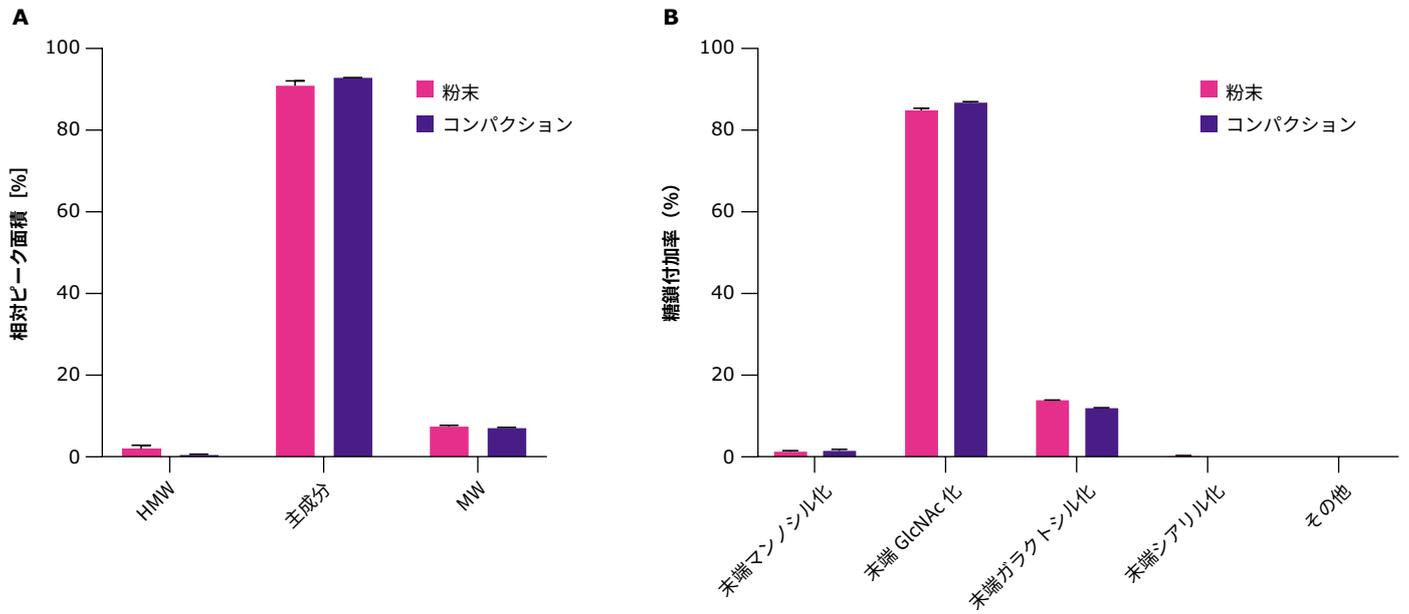


図3. 凝集および糖鎖付加のパターンは、コンパクション培地・フィード使用条件と粉末培地・フィード使用条件で同程度でした。(A) 高分子量 (HMW)、低分子量 (LMW) およびインタクトな抗体 (主成分) の比率は、粉末培地・フィード使用条件とコンパクション培地・フィード使用条件で同程度でした。(B) CHO 細胞株により生産されるモノクローナル抗体の各種糖鎖付加体 [末端にマンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、シアリル酸などが付加された抗体] の比率は、粉末培地・フィード使用条件とコンパクション培地・フィード使用条件で同程度でした。

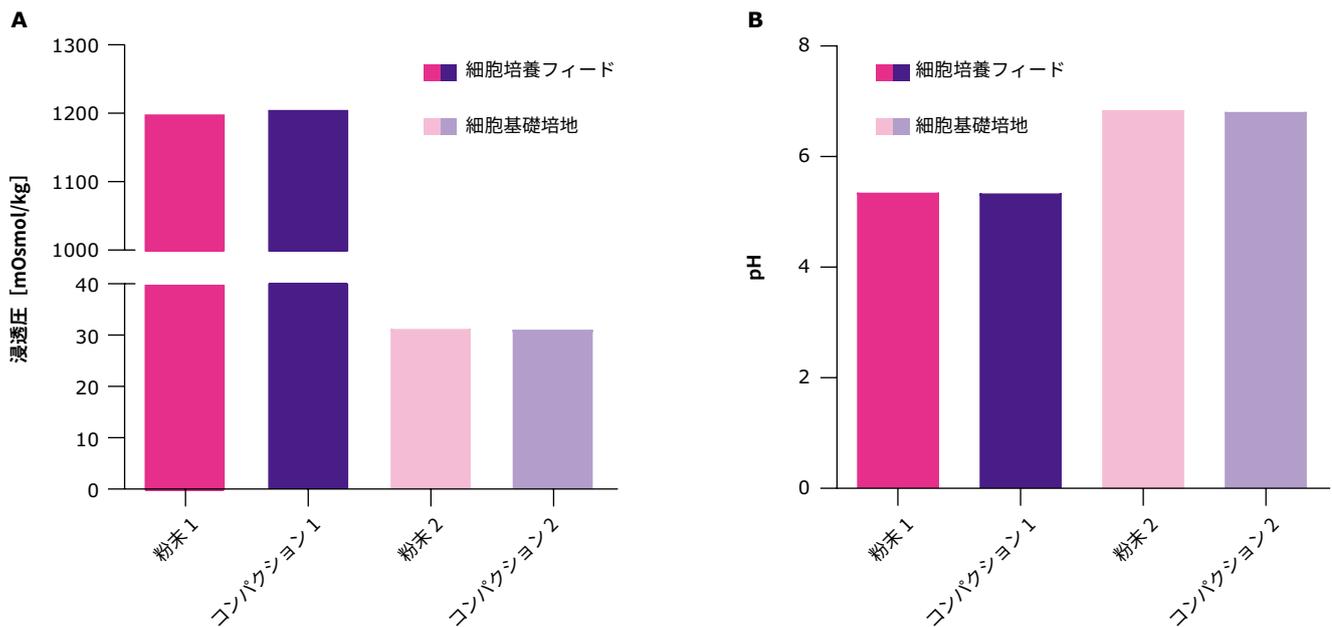


図4. 浸透圧 (A) および pH (B) には、粉末培地・フィード使用条件とコンパクション培地・フィード使用条件で差はみられませんでした。

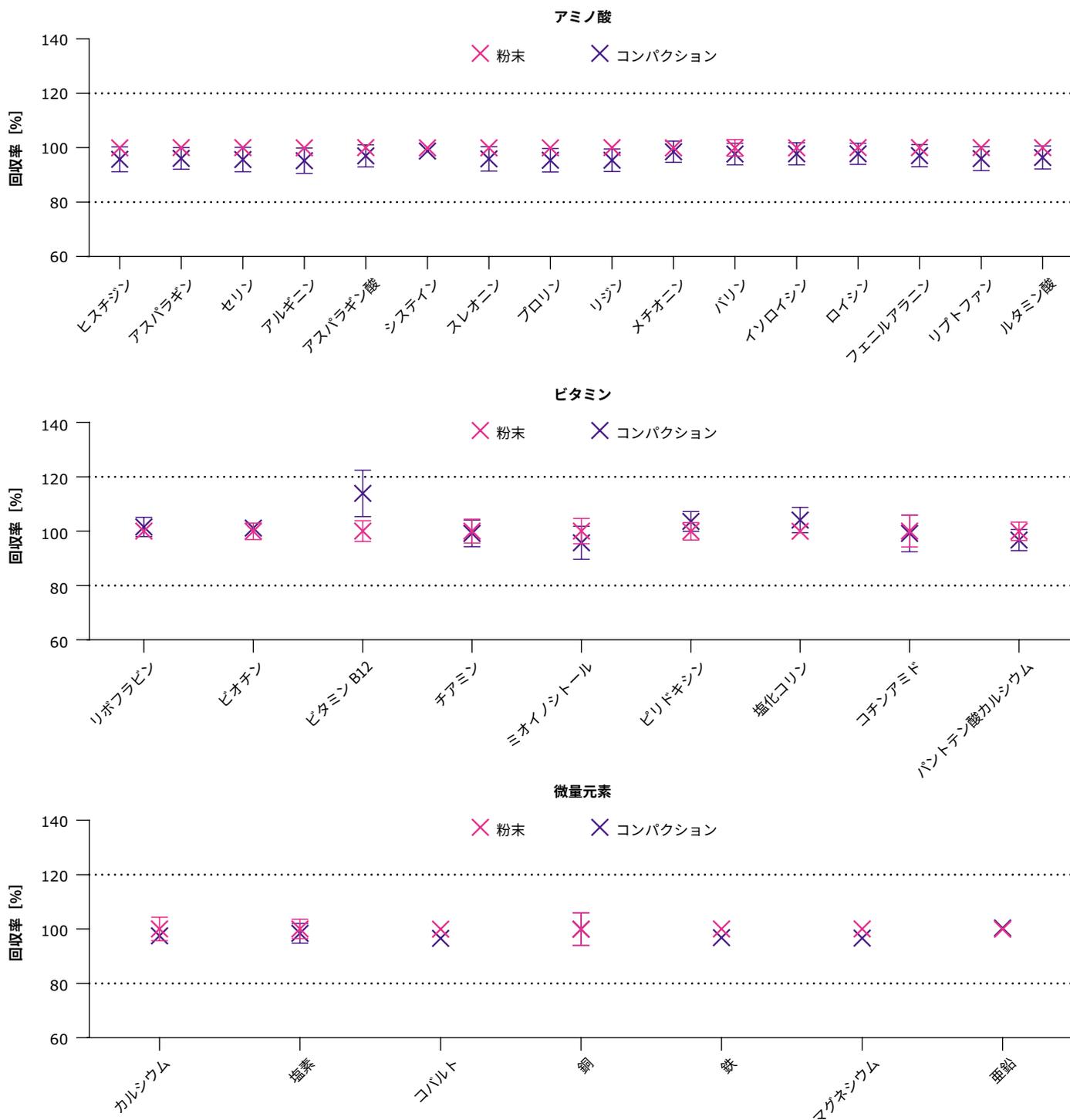


図 5. アミノ酸、ビタミンおよび微量元素レベルは、粉末フィードとコンパクションフィードで同程度でした。粉末フィードおよびコンパクションフィードの生産開始時、生産中および生産終了時に採取したサンプル中の回収率を平均 ± 標準偏差で示しています。いずれの成分の回収率も 80 ~ 120% の範囲内であり、コンパクションにより成分の減少や分解が生じなかったことを示しています。

最適化された溶解動態

特にパーフェュージョンプロセスに大量の培地が必要な場合や、溶解度が低く濃縮倍率が高い培地を取り扱う場合は、溶解時間の最適化により、培地調製を簡素化・合理化できます。コンパクション CCM およびフィードを用いると、表 1、図 6 および図 7 に示すように、水への溶解に要する時間が大幅に短縮します。容器サイズや、容器への供給手段 [例：粉末移動用バッグ

とシヨベルによる添加との比較] によっても異なりますが、コンパクション CCM を用いることで、水への溶解に要する時間を 2～6 倍短縮できます。ただし、溶解時間の短縮の程度は培地の種類によっても異なり、培地の種類の影響は、細胞基礎培地よりも細胞培養フィードでより顕著です。

表 1. 1000 L シングルユースミキサーにおける水への溶解時間のコンパクション細胞培養フィードの使用による短縮

	粉末	コンパクション	粉末フィード使用時の所要時間/コンパクションフィード使用時の所要時間 (t 粉末 / t コンパクション) *
最初の 12.93 kg の添加 (粉末移動用バッグを使用) に要した時間	120 秒	20 秒	6 倍
残りの 112.93 kg の添加 (容器からシヨベルを用いて添加) に要した時間	50 分	23 分	2 倍
添加終了から混濁度が 3 NTU 未満となるまでの時間	33 分	18 分	2 倍
水への溶解に要した合計時間 [添加に要した時間+混濁度が 3 NTU 未満となるまで溶解するのに要した時間]	83 分	42 分	2 倍

まとめ

粉末移動用バッグで添加した場合は 6 倍の差があったのに対し、シヨベルで添加した場合は差が 2 倍でした。

* 粉末フィード使用時の所要時間の倍率

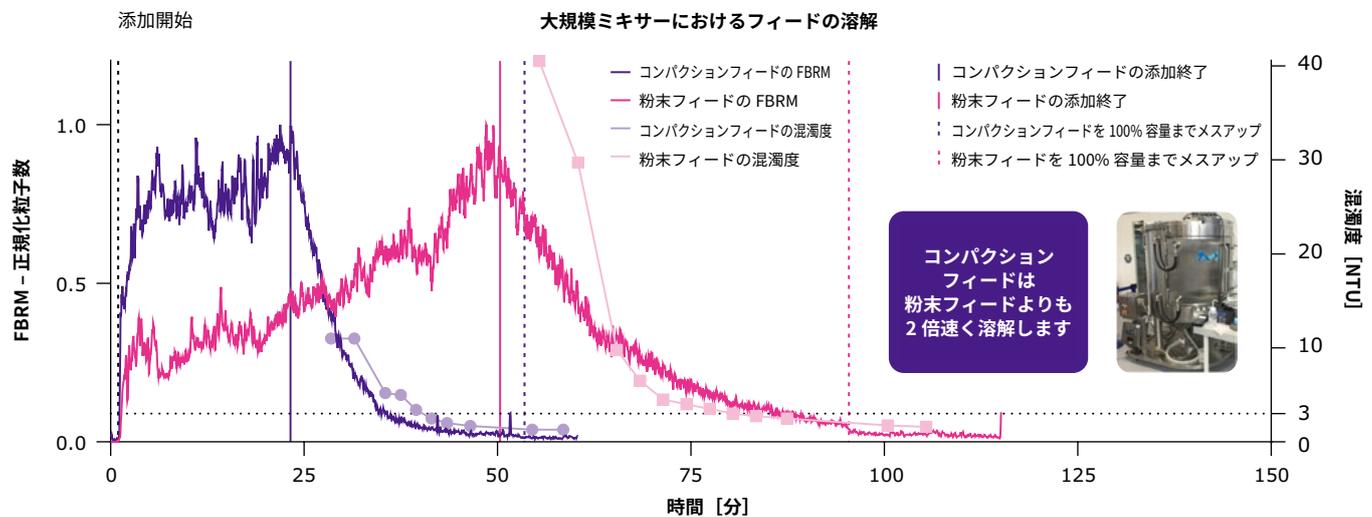


図 6. 大規模ミキサーでは、コンパクションフィード使用条件で粉末フィード使用条件と比較して水への溶解に要する時間が 2 倍短縮し、プロセスが強化されました。Mobius® Power MIX 1000 L ミキサーに、粉末フィードとコンパクションフィードを同じ濃度になるよう添加しました。収束ビーム反射測定法 (FBRM) を用いて、溶液中の粒子数をカウントしました。粒子が少ないほど、完全に溶解した溶液であることを示します。混濁度は、ミキサーから採取したサンプルを用いて、ミキサー外で測定しました。混濁度が低いほど、粒子が溶解していることを示し、3 NTU 未満を完全な溶解の指標としています。

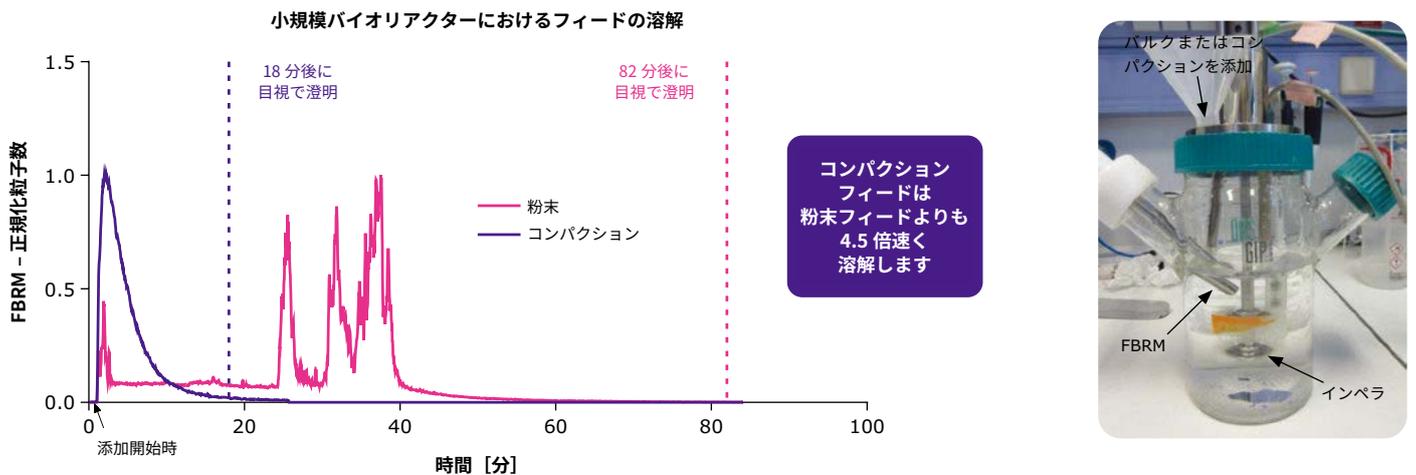


図 7. 小規模バイオリアクターでは、コンパクションフィード使用条件で粉末フィード使用条件と比較して水への溶解に要する時間が 4.5 倍短縮し、プロセスが強化されました。800 mL バイオリアクターに、粉末フィードとコンパクションフィードを同じ濃度になるよう添加しました。収束ビーム反射測定法 (FBRM) を用いて溶液中の粒子数をカウントしました。粒子が少ないほど、完全に溶解した溶液であることを示します。混濁度は、バイオリアクターから採取したサンプルを用いて、バイオリアクター外で測定しました。粉末培地およびコンパクション培地の最終的な混濁度 (それぞれ 1.46 NTU および 1.88 NTU) は 3 NTU 未満であり、完全に溶解したことが示されました。

かさ容積の減少

乾燥粉末 CCM と比較したとき、コンパクション CCM は、輸送効率を向上できる利点を有するほか、培地調製プロセス中のリスクを低減します。

コンパクション CCM 使用時には、微粉末培地の使用時よりも必要なスペースを最大 46% 節減できることが、弊社のデータから示唆されています (図 8)。かさ容積減少の程度は培地の種類によって異なり、細胞基礎培地 (粉末 2、コンパクション 2) よりも細胞培養フィード (粉末 1、コンパクション 1) でより大きな影響がみられます。したがって、微粉末 CCM と比較してコンパクション CCM のかさ容積が小さいことは、製造プラントに必要な輸送・保管面積を大幅に削減できることを意味します。

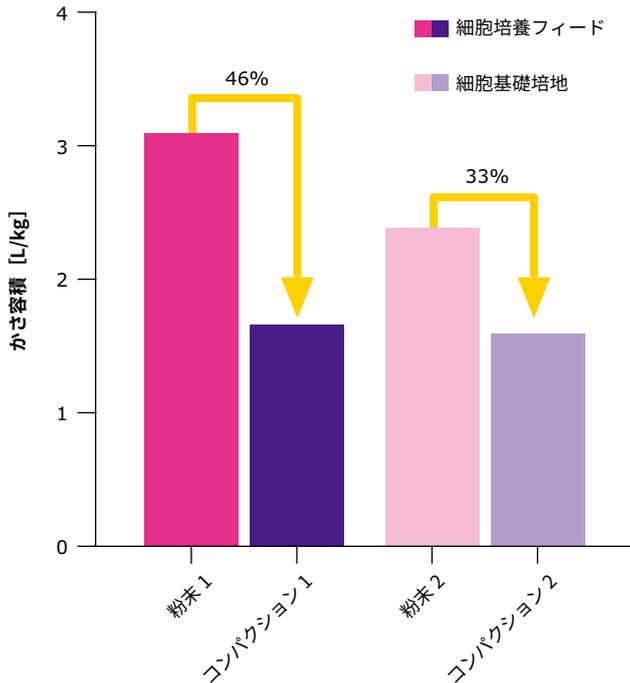


図 8. 細胞培養培地およびフィードのかさ容積のコンパクションによる減少。かさ容積は、メスシリンダーに 20 g の粉末培地およびコンパクション培地を添加後に測定しました。

粉塵の減少

粉末 CCM の取り扱いおよび使用によって粉塵が発生する可能性があります。粉塵発生は健康および安全上の重大な懸念であり、防護手段を必要とします。粉塵は汚染源となる可能性もあります。

コンパクション CCM を使用することで、取り扱い中の粉塵発生が減少します (図 9)。粉塵が減少すると、バイオバーデン汚染のリスクが低減し、必要な洗浄回数が減少します。さらに重要な点として、発生する粉塵の吸入量減少および爆発性粉塵空気が発生する可能性の低下によって、従業員の安全性が向上します。

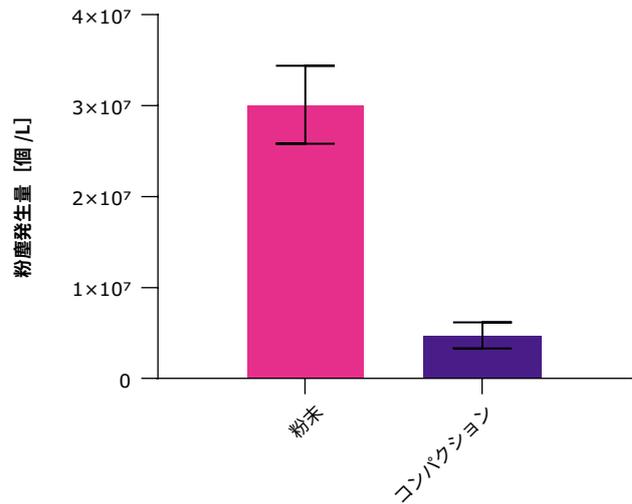


図 9. 細胞培養培地およびフィードからの粉塵発生量のコンパクションによる大幅な減少。水への溶解に用いる容器に粉末またはコンパクション培地を注入した際の粉塵分画 (0.265 ~ 34 μm) を、エアロゾルスpektロメーターで 3 回反復測定しました。

流動性の向上

コンパクト培地は優れた流動性を有するため、秤量および水への溶解に用いる容器への注入時の操作性が向上します（図10）。流動性が向上すると、粉体が一定の方向に流れるため、粉塵の発生も減少します。コンパクト CCM は微粉末のように積み上がらないため、容器への落下の挙動を制御できます。

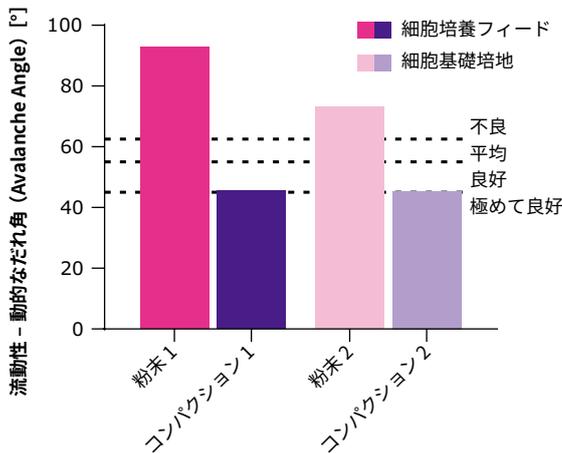
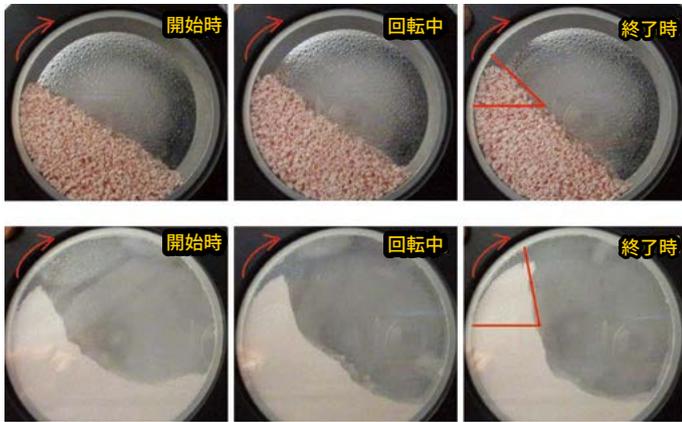


図10. コンパクトによる細胞培養培地およびフィードの流動性向上。粉末またはコンパクト CCM を入れたドラムを回転させ、回転中の粉体の挙動を撮影したビデオを解析しました。回転時の粉体の avalanche angle (動的なだれ角) をドラム左上で測定しました。avalanche angle が小さいほど CCM の流動性が高いことを示します。コンパクトの影響は、細胞基礎培地（粉末2、コンパクト2）よりも細胞培養フィード（粉末1、コンパクト1）で顕著に認められました。

プロセスの経済性

溶解動態、かさ容積、粉塵発生および流動性の面での改善により、プロセスのコストを削減でき、作業者の安全性が向上します。溶解時間の短縮により作業時間が軽減し、作業者は付加価値をもたらす作業に集中できます。さらに、かさ密度の増加は、同量の培地の包装に必要な容器の数を節減できること、入荷品の受入検査に要するコストを削減できること、また、貴重な冷凍保存設備の占有面積を削減できることを意味します。最後に、粉塵発生の減少および流動性の向上は、作業環境の安全性向上に役立ち、従業員の健康・安全に多大な損害をもたらすインシデントのリスクを低減します。

さらに重要な点として、コンパクト CCM はシングルコースミキシング、培地濃縮といった変革的な技術を可能にします。これらの技術は、あらゆるプロセスに付加価値を与えますが、パーフュージョン培養、高密度バッチ培養といった大量の培地を必要とする製造プロセスには、特に大きな影響をもたらします。コンパクト CCM によって溶解動態が向上することで、シングルコースミキサーの流体力学上の限界を克服できる可能性があり、柔軟性の向上と時間の節約につながります。さらに、コンパクトにより濃縮培地の溶解に要する時間が短縮されることで、コンパクト不使用時に混合時間の長さやバイオバーデンの懸念によって除外されていた選択肢をプロセスに採用することが可能になります。同様に、濃縮培地は、シングルコースのプレフィルターや保存バッグのサイズを縮小できることによっても、コストを削減できます。以上のことから、これらの技術は各製造運転に伴うコストを大幅に削減でき、このことは所有モデルの総コストにより証明できます。

結論

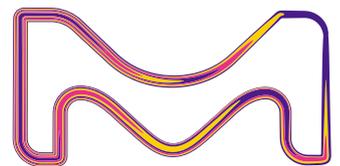
コンパクト CCM は、粉末 CCM と同程度の性能を示し、アップストリームプロセス強化に際して、以下のような重要な利点を提供します。

- プロセス強化によるオペレーションの柔軟性・効率の向上を目指すバイオ医薬品製造者では、**溶解に要する時間の短縮**によりアップストリームワークフローが加速します。
- **流動性の向上**により取り扱いが簡素化するとともに、**粉塵発生の減少**により、従業員の安全性が向上し汚染リスクが低減します。
- **かさ容積の減少**により、保管に必要な設備や輸送に必要なスペースを削減できます。

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2022年11月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore 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. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK_PB9283EN Ver 1.0

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

PSM295-2211-PDF-MA