

Title	Modeling of a CVA6 virus-like particle vaccine production process using CHO cell culture
Author(s)	Xing, Zhou
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96025">https://doi.org/10.18910/96025</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## Abstract of Thesis

Name ( XING ZHOU )

Title

Modeling of a CVA6 virus-like particle vaccine production process using CHO cell culture (CHO細胞培養を用いたCVA6ウイルス様粒子ワクチン生産のモデル化)

## Abstract of Thesis

Chapter 1 Introduction: The increased incidence of hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6 (CVA6) has been gaining attention recently. A virus-like particle (VLP) vaccine targeting CVA6 was developed as a prevention measure. To produce this vaccine, Chinese hamster ovary (CHO) cells were selected for their advantages including the ability to perform post-translational modification. Modeling is a versatile tool for bioprocess development. Bioprocess can benefit from models in many aspects such as optimization. However, current models cannot simulate the behavior observed in the CVA6 VLP production process which was different from other production processes of recombinant proteins. So, a kinetic model was developed to facilitate the process development of the CVA6 VLP vaccine production.

Chapter 2 Deterministic modeling of a CVA6 VLP vaccine production process using CHO cell culture: Cell lysis quantification protocol using double-stranded DNA as the indicator was developed firstly because cell lysis was important for the product release. Then, CVA6 VLP-producing CHO cells were cultivated using two bioreactors in fed-batch mode. Two pH shift strategies were applied to investigate the impact of pH shift. After that, a kinetic model was built and a new equation correlating VLP concentration with dead and lysed cell densities was proposed. This model could simulate experimental data with high accuracy. Then, sensitivity analysis was conducted to investigate the impact of initial culture conditions and model parameters on the VLP yield. Besides, based on model prediction, pH shift on day 8 would give the highest yield of VLPs. But a tradeoff between product yield and quality was found. Desirability methodology was applied to perform multicriteria optimization. Cell culture without pH shift at 311 h was predicted to be the optimal operating condition balancing product yield and quality. Therefore, the proposed kinetic model can facilitate in silico process development. However, deterministic models cannot provide information about batch-to-batch variations of the process. Batch-to-batch variations commonly exist in bioprocess and are important for process validation. Therefore, they need to be quantified.

Chapter 3 Probabilistic modeling of a CVA6 VLP vaccine production process using CHO cell culture: To overcome the aforementioned limitation, probabilistic modeling was performed to quantify batch-to-batch variations in the CVA6 VLP production process. The kinetic model constructed before was updated and used as the basis of subsequent work. Batch cultures of CVA6 VLP-producing CHO cells were performed using 4 flasks in parallel for model training and testing. For computational work, frequentist and Bayesian approaches were applied. The frequentist approach was based on the Monte Carlo sampling technique and it could simulate both means and prediction intervals of the process providing information on the batch-to-batch variations. 95% prediction intervals were able to contain experimental data points by the end of cell culture when most VLPs were released. Nevertheless, these intervals failed to contain most of the experimental data points because the model accuracy of the updated kinetic model is not high enough. In addition, covariance between data points was found to be important when using sampling techniques. In terms of the Bayesian approach, the computation cannot run as expected due to the low accuracy of the kinetic model. To summarize, compared with the frequentist approach, the Bayesian approach is unsuitable for performing probabilistic modeling when high-quality models are deficient.

Chapter 4: Conclusions and future perspectives: A kinetic model was built simulating the production process of a CVA6 VLP vaccine in CHO cells. Deterministic modeling was conducted to enable in silico process development. Besides, batch-to-batch variations of the process were quantified by probabilistic modeling. Further efforts are needed to improve model accuracy. The generality of this model needs to be tested for other production processes.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( XING ZHOU )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	清水 浩

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、バイオ医薬品の汎用宿主として用いられているチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いたウイルス様粒子 (Virus-like particle: VLP) 生産のモデル化に関する研究を行っており、以下の4章から構成されている。

第1章「序論」においては、近年増加している coxsackie virus(コクサッキーウイルス)A6 (CVA6) による手足口病の予防対策として、CVA6 を標的とした VLP ワクチン開発の状況ならびに、このワクチンの生産方法として CHO 細胞を用いた動物細胞培養系の有効性について述べている。次に、CHO 細胞を用いたバイオプロセスのモデリングの状況ならびに、CVA6 VLP ワクチン生産のモデル化における課題について述べている。

第2章「CHO 細胞培養を用いた CVA6 VLP ワクチン製造プロセスの決定論的モデリング」においては、CHO 細胞培養を用いた CVA6 VLP ワクチン製造プロセスの決定論的モデリングに焦点を当てて、まず、二本鎖 DNA を指標とした培養後期 (死滅期) における生産細胞分解プロセスの定量的な解析を行っている。次に、バイオリクターを用いた CVA6 VLP 産生 CHO 細胞を流加培養において、培養中の pH シフトが生産性に及ぼす影響を検討している。その後、実験結果に基づいて速度論モデルを構築し、VLP 濃度と死滅細胞密度および溶解細胞密度を相関させる新しい式を提案し、このモデルが実験データを高い精度でシミュレートできることを示している。また、構築したモデルに基づき、感度分析を行い、初期培養条件とモデルパラメータが VLP 収量に与える影響を検討し、モデルの予測に基づき、8 日目の pH シフトが最も高い VLP 収量を与えること、さらに製品の収量と品質の間にはトレードオフの関係があることを示している。

第3章「CHO 細胞培養を用いた CVA6 VLP ワクチン製造プロセスの確率論的モデリング」においては、CVA6 VLP 生産プロセスのバッチ間変動を定量化する確率論的モデリングを行っている。第2章で示した決定論的モデルだけではプロセスのバッチ間変動に関する情報を提供することはできないが、バッチ間変動はバイオプロセスでは一般的に存在し、プロセスのバリデーションにとっては重要な項目である。そこで、CVA6 VLP 産生 CHO 細胞の4つの並行した培養結果を用いて、モデルのトレーニングとテストを行っている。Frequentist アプローチと Bayesian アプローチを適用し、プロセスの平均と予測区間の両方をシミュレートし、バッチ間のばらつきに関する情報を提供した結果、ベイズアプローチに関しては、運動モデルの精度が低いため、計算が期待通りに実行できず、高品質なモデルが不足している場合、ベイズ的アプローチは確率論的モデリングの実行には不向きであることを示している。

第4章「結論と今後の展望」においては、CHO 細胞における CVA6 VLP ワクチン生産プロセスのモデル化について総括している。以上のように、本論文は CHO 細胞を用いた VLP 生産について新しいモデルを構築し、その汎用性について検証している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。