



Control automatizado de glucosa



#07

Nota de la
aplicación

#08

#09

#10

#11

Autores:
Stuart Tindal, Sebastian Ruhl, Diana Hesse

Introducción

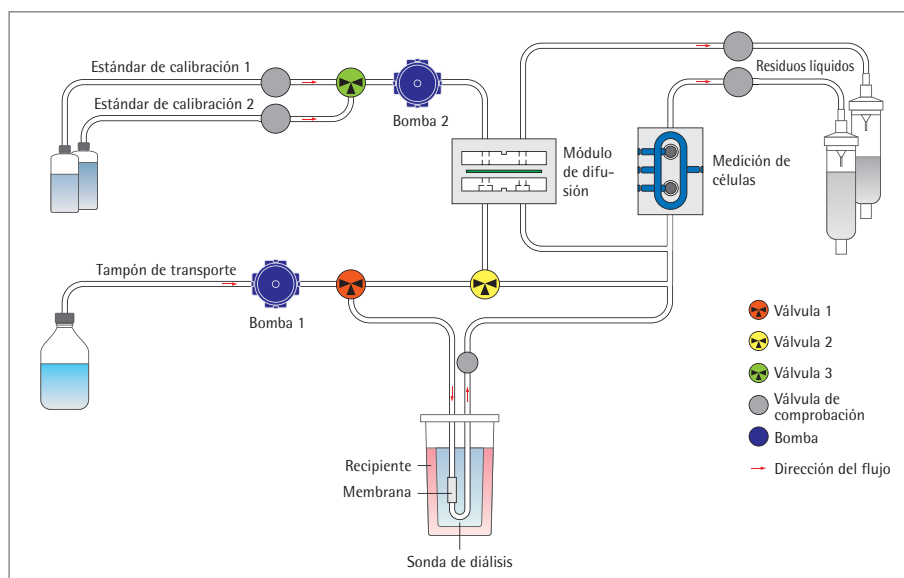
Uno de los objetivos del desarrollo de bioprocesos iniciales de mamíferos consiste en proporcionar al sector de la fabricación clínica un proceso sólido, seguro y que produzca a la postre suficiente material para satisfacer la demanda de los estudios. Estos equipos de desarrollo de procesos reciben cada vez la presión de hacer más y en menos tiempo. Así, las estrategias de alimentación automatizada están cobrando cada vez más popularidad como método para reducir las tareas de desarrollo; además, presentan la ventaja añadida de mejorar el rendimiento del proceso y la coherencia de los atributos del producto.

El componente de alimentación principal del cultivo de células es la glucosa, que se utiliza como punto de partida para cualquier ruta de crecimiento y energía que se produce en las células. Al garantizar que las células cuentan con la cantidad adecuada se acelera su crecimiento y maximiza la secreción del producto. Asimismo, se ha detectado que un exceso en la concentración de glucosa afecta al índice de glicosilación de las proteínas solubles segregadas. Por consiguiente, un control de la cantidad de glucosa mejoraría la coherencia de los patrones de glicosilación en los productos finales para mejorar así su calidad.

En esta nota de la aplicación se incluye un método de ejemplo detallado sobre cómo aplicar el control de alimentación de glucosa. Los materiales y métodos indican cómo se llevó a cabo este proceso con hardware y equipos de Sartorius Stedim Biotech. También se proporciona un resumen de los resultados y un análisis de los datos con el fin de resaltar algunas de las principales ventajas que presenta la aplicación de este método a otros procesos.

Material y métodos

Se utilizó un BIOSTAT® B-DCU como sistema de control del biorreactor. El modelo BIOSTAT® B-DCU es un biorreactor de optimización y caracterización avanzadas de procesos que incluye una opción de controlador de concentración de glucosa. La integración de BioPAT® Trace permite la supervisión en tiempo real del nivel de glucosa mediante la definición por parte del usuario de un punto de ajuste de glucosa en el software de control de BIOSTAT® B-DCU. En las dos primeras ejecuciones, la concentración de glucosa in situ se mantuvo por medio de alimentaciones por bolo intermitentes. Posteriormente, la tercera ejecución utilizó un controlador de punto de ajuste de glucosa con ajustes de PID definidos y una bomba peristáltica interna de velocidad regulada.



BioPAT® Trace se configuró para la medición de glucosa y lactato del modo de diálisis con una frecuencia de muestreo de 20 minutos. Se estableció así un protocolo de autorregulación completamente automatizado como parte de la función de la opción de programación. Para cada ejecución de 17 días se utilizaron 12 l de tampón de transporte, dos soluciones de calibración (nivel alto: 10 g/l de glucosa; nivel bajo: 1 g/l de glucosa) y un recipiente de residuos de 10 l incluido con el conjunto de tubos. La sonda de diálisis se preparó, llenó e instaló en el recipiente UniVessel® de 5 l antes de esterilizarla; a continuación, se conectó al conjunto de tubos de BioPAT® Trace y se cebó para el análisis antes de la inoculación.

El recipiente UniVessel® de 5 l estaba equipado con dos impulsores de segmentos de 3 cuchillas para rebajar el esfuerzo de cizallamiento y optimizar la homogeneización del caldo celular. El ángulo de la cuchilla era de 30° y se ajustó para el bombeo en dirección descendente. Se utilizó un rociador tórico con perforaciones en la cara superior para todos los ensayos. El recipiente, además, estaba equipado con diversos puertos de alimentación, un sensor de pH clásico, un sensor de pO₂, una sonda de diálisis, un refrigerador de gases de escape y filtros de gas.

Para evaluar la integración de BioPAT® Trace con BIOSTAT® B-DCU, se utilizó un proceso de lote alimentado de CHO. El cultivo de 17 días consta de una fase de lote de 3 días y otra de lote alimentado de 14 días. Tras la inoculación con $0,3 \times 10^6$ células/ml se alcanza por lo general la densidad celular viable (VCD) máxima el día 8 con $25 - 30 \times 10^6$ células/ml y una viabilidad del 99 %. Tras la fase de muerte siguiente de 9 días, la VCD deberá situarse por encima de 10×10^6 células/ml con una viabilidad superior al 50 % en el punto de cosecha.

La alimentación por bolo del día 3 consta del medio de alimentación A (FMA), el medio de alimentación B (FMB) y una solución de glucosa altamente concentrada (400 g/l). La cantidad alimentada de FMA y FMB es constante durante toda la fase de lote alimentado. El día 7, por lo general, se necesita más glucosa para mantener una concentración de glucosa de al menos 3 g/l en el caldo celular. El proceso de alimentación se automatiza mediante balanzas y bombas conectadas a la unidad de control digital (DCU) y la receta S88 en el software de SCADA BioPAT® MFCS.

La analítica constituyó una parte esencial de esta evaluación. Entre otros aspectos, las mediciones de glucosa y lactato fuera de línea se realizaron con el radiómetro básico ABL 800. La VCD y la viabilidad se analizaron con un dispositivo Cedex HiRes.

Se realizaron un total de tres ensayos distintos con las siguientes características:

1. Supervisión
La tecnología de Trace únicamente se utilizó para supervisar la tendencia de glucosa en línea a lo largo del cultivo.
2. El valor en línea sustituye a la medición fuera de línea
Durante el cultivo de CHO se extrae una muestra diaria. El valor de glucosa fuera de línea se utiliza para completar una concentración de glucosa determinada en el biorreactor. En el ensayo 2, el valor de glucosa en línea se utiliza en lugar del valor fuera de línea para el procedimiento de alimentación.
3. Control de glucosa
Durante el tercer ensayo, se activó el control de glucosa a 6 g/l al cabo de 6 días. La alimentación por bolo habitual de FMA se modificó a alimentación continua para reducir los picos de concentración de glucosa.

Esquema de alimentación de los ensayos 1 y 2:

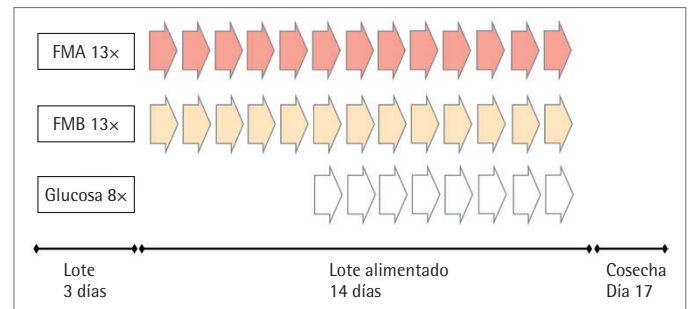


Figura 1: Esquema de alimentación 1 y 2

El esquema de alimentación para los ensayos 1 y 2 fue idéntico. Durante la fase de lote, no se alimentó ningún medio en el cultivo. El día 3, se inició la alimentación por bolo diaria de FMA y FMB. Cuando el nivel de glucosa cayó por debajo de los 6 g/l, se inició una alimentación adicional de glucosa (400 g/l).

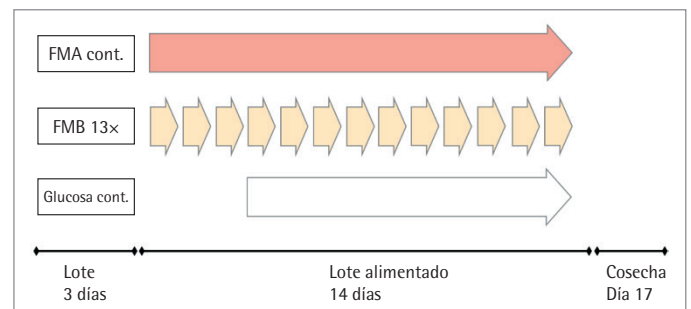


Figura 2: Esquema de alimentación 3

En el ensayo 3, la alimentación por bolo de FMA se modificó a alimentación continua para eliminar los picos diarios en la concentración de glucosa. Una vez que la glucosa alcanzó un nivel de concentración por debajo de los 6 g/l, se inició una alimentación controlada de solución de glucosa (400 g/l) con el fin de mantener la concentración de glucosa en 6 g/l.

Resultados y análisis

Los lotes se ejecutaron en secuencia en los mismos sistemas BIOSTAT® B-DCU y BioPAT® Trace. Los resultados se muestran en la figura 3 y 4 para demostrar la reproducibilidad y conformidad de los lotes del proceso (en comparación con el lote dorado histórico). La supervisión del nivel de glucosa de BioPAT® Trace y del posterior controlador de glucosa se muestran de la figura 5 a la 7.

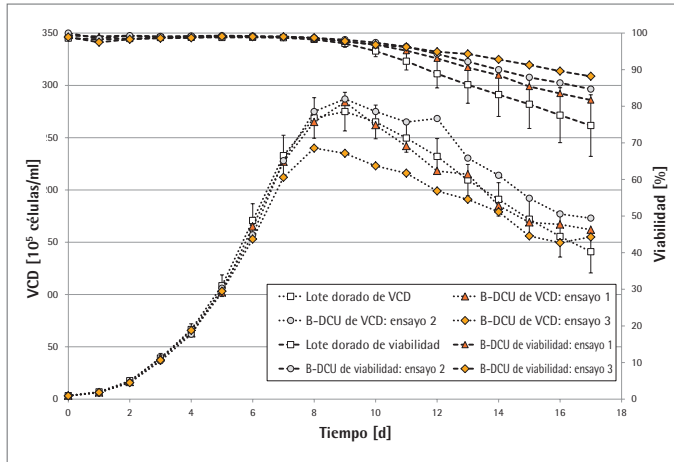


Figura 3: Ensayos de tendencia de VCD 1 a 3

Los ensayos 1 y 2 se ajustaron correctamente a la tendencia del lote dorado. A causa de una modificación general del proceso (alimentación de FMA continua), la tendencia de la VCD del ensayo 3 presenta una VCD pico ligeramente inferior. La VCD y viabilidad finales se ajustan correctamente o superan los valores del lote dorado en todos los ensayos.

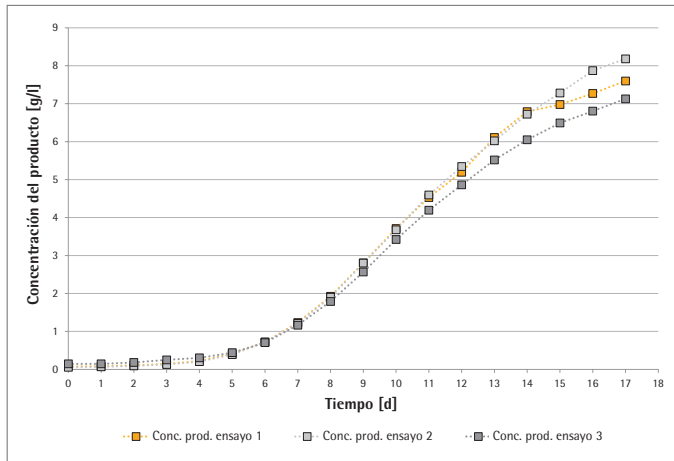


Figura 4: Tendencia de IgG

La comparación de productividad en los tres ensayos se ha demostrado por medio de mediciones diarias de la concentración del producto (concentración de IgG, figura 4). A causa de un crecimiento celular inferior en el ensayo tres, se obtuvo una concentración del producto ligeramente inferior en esta ejecución.

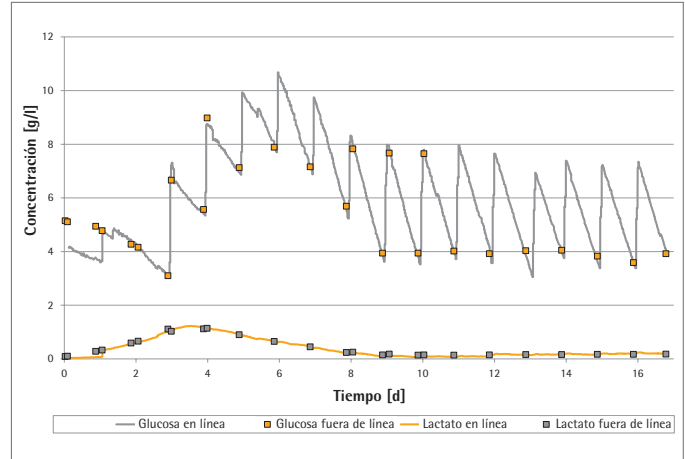


Figura 5: Ensayo 1 de tendencia de glucosa y lactato

A pesar de una pequeña compensación en las primeras 24 horas, las mediciones en línea y fuera de línea de glucosa y lactato se ajustaron correctamente durante el cultivo.

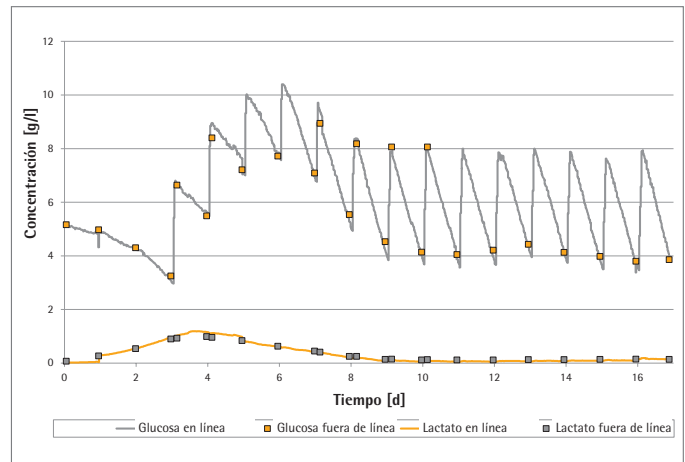


Figura 6: Ensayo 2 de tendencia de glucosa y lactato

En el ensayo 2, las mediciones de glucosa y lactato en línea y fuera de línea mostraron una excelente comparabilidad.

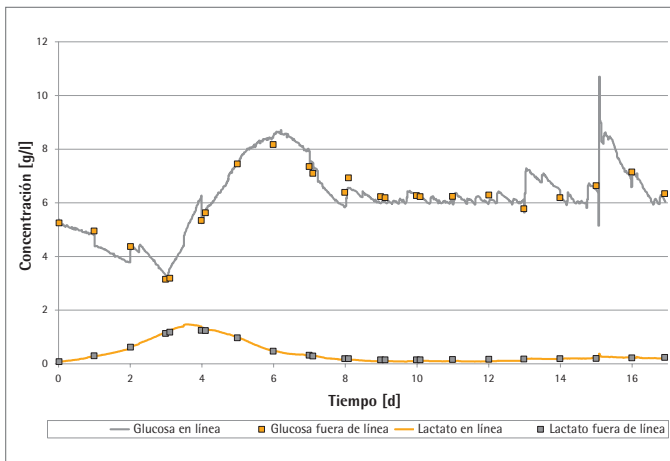


Figura 7: Ensayo 3 de tendencia de glucosa y lactato

En el ensayo 3, las mediciones de glucosa y lactato en línea y fuera de línea mostraron también una excelente comparabilidad. Los días 13 y 15 se realizó una recalibración innecesaria (error operativo).

La transición de la supervisión de glucosa al control de glucosa requiere un cambio en el proceso. Se ha demostrado que un control más estricto de la glucosa tiene un efecto positivo en el rendimiento del proceso y la calidad del producto (consulte An Zhang et al.). Si tenemos en cuenta esta circunstancia, no es deseable modificar un proceso con tecnología que no haya sido probada ni verificada. En consecuencia, antes de aplicar un cambio de este tipo, es necesario por lo general familiarizarse con el sistema y generar confianza respecto a los resultados de las mediciones (en comparación con el muestreo fuera de línea), así como comprobar la solidez del dispositivo. Las dos primeras ejecuciones del proceso muestran las capacidades de supervisión de alta resolución de la integración de BIOSTAT® B-DCU con BioPAT® Trace, mientras que la tercera ejecución activa el controlador de glucosa. Desaparecen las interacciones de uso generales por parte del usuario con el biorreactor relacionadas con la glucosa de muestreo. Esto significa que se reduce la cantidad de horas habitual y también fuera del horario laboral necesaria para mantener el sistema BIOSTAT® B-DCU con el nivel de glucosa controlado. Además, aumenta la posibilidad de gestionar dichas horas. En la tabla 1 se muestra un resumen del tiempo ahorrado; asimismo, todas las tareas de interacción con el sistema se realizaron en las etapas iniciales de la configuración del sistema BIOSTAT® B-DCU.

Tabla 1: Relación de recursos de FTE por lote al utilizar el sistema BioPAT® Trace para la glucosa

Paso del proceso	Horas
Instalación de la sonda y del sistema electrónico de Trace	2
Tiempo ahorrado para muestreo	9 (18 × 0,5)
Tiempo ahorrado	7

Resumen y conclusión

La integración paso a paso de la tecnología de control de glucosa en un proceso de lote alimentado de CHO resultó satisfactoria, ya que mantuvo una concentración de glucosa continua durante el proceso de 6 (+/- 0,25) g/l.

La integración directa de la tecnología de BioPAT® Trace con el sistema BIOSTAT® B-DCU permitió seguir utilizando todas las prestaciones; su uso, además, resultó intuitivo, fácil de determinar y dinámicamente variable cuando era necesario. Puesto que el paquete del sistema proviene en su totalidad de Sartorius Stedim Biotech, este administrará el ciclo de vida del controlador de glucosa en todos sus aspectos de desarrollo y fabricación comercial. De este modo se garantiza que los beneficios que no quedan cubiertos en la fase de desarrollo pueden transferirse a la división de producción comercial para todo el ciclo de vida del producto.

Perspectivas

Se llevarán a cabo otros ensayos con concentraciones de glucosa diferentes y controladas automáticamente con el fin de mejorar los atributos de concentración y calidad del producto. Asimismo, el ahorro de tiempo para el operador (7 horas por lote) y la posibilidad de administrar las horas de trabajo son avances de cara a conseguir un biorreactor que no precise interacción.

Sales and Service Contacts

For further contacts, visit www.sartorius-stedim.com

Europe

Germany

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen

Phone +49.551.308.0
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Stedim Systems GmbH
Robert-Bosch-Strasse 5 – 7
34302 Guxhagen

Phone +49.5665.407.0
Fax +49.5665.407.2200

France

Sartorius Stedim FMT S.A.S.
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 91051
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France SAS
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 71058
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.846545

Austria

Sartorius Stedim Austria GmbH
Modcenterstrasse 22
1030 Vienna

Phone +43.1.7965763.18
Fax +43.1.796576344

Belgium

Sartorius Stedim Belgium N.V.
Rue Colonel Bourg 105
1030 Bruxelles

Phone +32.2.756.06.80
Fax +32.2.756.06.81

Hungary

Sartorius Stedim Hungária Kft.
Kagyló u. 5
2092 Budakeszi

Phone +36.23.457.227
Fax +36.23.457.147

Italy

Sartorius Stedim Italy S.r.l.
Via dell'Antella, 76/A
50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)

Phone +39.055.63.40.41
Fax +39.055.63.40.526

Netherlands

Sartorius Stedim Netherlands B.V.

Phone +31.30.60.25.080
Fax +31.30.60.25.099

filtratie.nederland@sartorius-stedim.com

Poland

Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.
ul. Wrzesinska 70
62-025 Kostrzyn

Phone +48.61.647.38.40
Fax +48.61.879.25.04

Russian Federation

LLC "Sartorius Stedim RUS"
Vasilyevsky Island
5th line 70, Lit. A
199178 St. Petersburg

Phone +7.812.327.53.27
Fax +7.812.327.53.23

Spain

Sartorius Stedim Spain, S.A.U.
Avda. de la Industria, 32
Edificio PAYMA
28108 Alcobendas (Madrid)

Phone +34.913.586.098
Fax +34.913.589.623

Switzerland

Sartorius Stedim Switzerland AG
Ringstrasse 24 a
8317 Tagelswangen

Phone +41.52.354.36.36
Fax +41.52.354.36.46

U.K.

Sartorius Stedim UK Ltd.
Longmead Business Centre
Blenheim Road, Epsom
Surrey KT19 9 QQ

Phone +44.1372.737159
Fax +44.1372.726171

Ukraine

LLC "Sartorius Stedim RUS"
Post Box 440 "B"
01001 Kiev, Ukraine

Phone +380.44.411.4918
Fax +380.50.623.3162

Americas

USA

Sartorius Stedim North America Inc.
5 Orville Drive, Suite 200
Bohemia, NY 11716

Toll-Free +1.800.368.7178
Fax +1.631.254.4253

Argentina

Sartorius Argentina S.A.
Int. A. Avalos 4251
B1605ECS Munro
Buenos Aires

Phone +54.11.4721.0505
Fax +54.11.4762.2333

Brazil

Sartorius do Brasil Ltda
Avenida Senador Vergueiro 2962
São Bernardo do Campo
CEP 09600-000 - SP- Brasil

Phone +55.11.4362.8900
Fax +55.11.4362.8901

Mexico

Sartorius de México, S.A. de C.V.
Libramiento Norte de Tepotzotlan s/n,
Colonia Barrio Tlacateco,
Municipio de Tepotzotlan,
Estado de México,
C.P. 54605

Phone +52.55.5562.1102
Fax +52.55.5562.2942

leadsmex@sartorius.com

Peru

Sartorius Peru S.A.C.
Avenue Alberto del Campo 411
Floor 12 – The Office
15076 – San Isidro, Lima

Phone +51.1.441 0158
Fax +51.1.422 6100

Asia | Pacific

Australia

Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.
Unit 5, 7-11 Rodeo Drive
Dandenong South Vic 3175

Phone +61.3.8762.1800
Fax +61.3.8762.1828

China

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
No. 33 Yu'an Road
Airport Industrial Park Zone B
Shunyi District, Beijing 101300

Phone +86.10.80426516
Fax +86.10.80426580

Sartorius Stedim (Shanghai)
Trading Co., Ltd.
3rd Floor, North Wing, Tower 1
No. 4560 Jinke Road
Zhangjiang Hi-Tech Park
Pudong District
Shanghai 201210, P.R. China

Phone +86.21.6878.2300
Fax +86.21.6878.2882

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
Guangzhou Representative Office
Unit K, Building 23
Huihua Commerce & Trade Building
No. 80 Xianlie Middle Road
Guangzhou 510070

Phone +86.20.37618687 | 37618651
Fax +86.20.37619051

India

Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.
#69/2-69/3, NH 48, Jakkasandra
Nelamangala Tq
562 123 Bangalore, India

Phone +91.80.4350.5250
Fax +91.80.4350.5253

Japan

Sartorius Stedim Japan K.K.
4th Fl., Daiwa Shinagawa North Bldg.
8-11, Kita-Shinagawa 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo, 140-0001 Japan

Phone +81.3.4331.4300
Fax +81.3.4331.4301

Malaysia

Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.
Lot L3-E-3B, Enterprise 4
Technology Park Malaysia
Bukit Jalil
57000 Kuala Lumpur, Malaysia

Phone +60.3.8996.0622
Fax +60.3.8996.0755

Singapore

Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.
10 Science Park Rd
The Alpha #02-13/14
Singapore Science Park II
Singapore 117684

Phone +65.6872.3966
Fax +65.6778.2494

South Korea

Sartorius Korea Biotech Co., Ltd.
8th Floor, Solid Space B/D,
PanGyoYeok-Ro 220, BunDang-Gu
SeongNam-Si, GyeongGi-Do, 463-400

Phone +82.31.622.5700
Fax +82.31.622.5799



▶ www.sartorius-stedim.com