



自动葡萄糖控制



应用报告

#07

#08

#09

#10

#11

作者：
Stuart Tindal, Sebastian Ruhl, Diana Hesse

简介

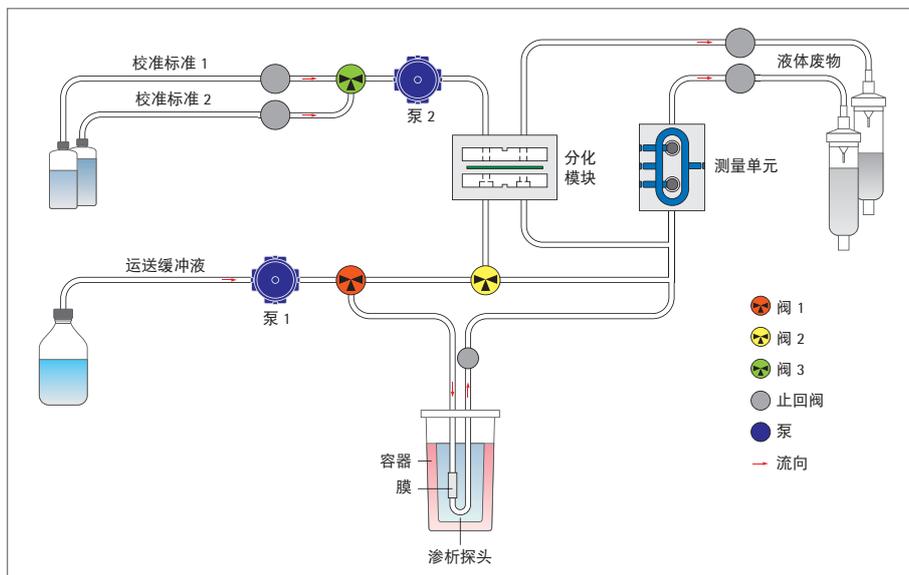
哺乳动物上游生物过程开发的目标之一是将过程转移到具有鲁棒性和安全性的临床制造，并且最终产生足够的材料以满足研究需求。这些过程开发团队越来越多地被要求在更少的时间内做更多的事情。因此，自动培养策略作为减少开发工作的方式变得越来越流行，并且其副效益已经显示出过程性能和产品属性稳定性改善。

细胞培养的主要培养组分是葡萄糖，用作细胞内所有生长和能量途径的起点。确保细胞没有太多或太少，使其能够快速生长并使产物分泌最大化。此外，已经注意到，过高的葡萄糖浓度对分泌的可溶性蛋白的糖基化速率具有影响。因此，控制可用的葡萄糖将改善最终产物上的糖基化模式的一致性并可能改善质量。

在本应用说明中，记录了如何建立葡萄糖培养控制的逐步示例方法。材料和方法展示了如何使用 Sartorius Stedim Biotech 硬件和设备来实现。数据结果和讨论的概述已给出，以强调将该方法应用于其它过程的一些关键益处。

材料与方法

BIOSTAT® B-DCU 用作生物反应器控制系统。BIOSTAT® B-DCU 是用于高级过程优化和表征的生物反应器，具有葡萄糖浓度控制器选项。BioPAT® Trace 的集成允许实时监测葡萄糖水平，从而在 BIOSTAT® B-DCU 控制软件中实现用户定义的葡萄糖设定值。前两次运行，原位葡萄糖浓度通过不连续的非连续补料维持。随后，第三次运行利用了使用限定 PID 设置的葡萄糖设定值控制器和内部速度控制的蠕动泵。



BioPAT® Trace 设置为 20 分钟的采样速率，用于透析模式葡萄糖和乳酸盐测量。作为计划选项卡功能的一部分，它被设置为完全自动化和自校准协议。每 17 天运行使用 12L 的转移缓冲液，两种校准溶液（高：10 g/L 葡萄糖；低：1 g/L 葡萄糖）和连接到管组的 10L 废物容器。准备透析探针，填充并安装到 UniVessel® Glass 5 L 中，然后连接到 BioPAT® Trace 管组，并在接种前灌注用于分析。

UniVessel® Glass 5 L 配有两个 3 叶片叶轮，用于低剪切应力和细胞肉汤的良好均质化。叶片角度为 30° 并设置为向下发送。所有试验都使用带孔的环形分布器。此外，容器装备有用于进料的若干端口、典型 pH 传感器、pO₂ 传感器、透析探针、排气冷却器和气体过滤器。

为了评估 BioTat® B-DCU 中的 BioPAT® Trace 集成，采用了 CHO 分批补料过程。17 天的培养包括 3 天的批阶段和 14 天的分批补料阶段。在用 0.3×10⁶ 个细胞/mL 接种后，通常在第 8 天达到 25-30×10⁶ 个细胞/mL 的峰值活细胞密度 (VCD)，存活率为 99%。在接下来的 9 天死亡阶段后，VCD 应当高于 10×10⁶ 个细胞/mL，在收获时具有超过 50% 的存活率。

从第 3 天的批式进料包括补料培养基 A (FMA)、补料培养基 B (FMB) 和高度浓缩的葡萄糖溶液 (400 g/L)。FMA 和 FMB 的进料量在整个分批补料阶段是恒定的。通常在第 7 天，需要另外的葡萄糖来维持细胞肉汤中至少 3 g/L 的葡萄糖浓度。使用连接到数字控制单元 (DCU) 的天平和泵以及 SCADA 软件 BioPAT® MFCS 的 S88 配方的天平和泵自动执行进料过程。

分析是此评估的一个重要部分。其中，离线葡萄糖和乳酸盐测量使用 Radiometer ABL 800 basic 进行。使用 Cedex HiRes 分析 VCD 和活力。

使用以下特性进行总共三个不同的试验：

1. 监控
微量技术仅用于监测整个培养期间的在线葡萄糖趋势。
2. 在线值替代离线测量
在 CHO 培养期间，每天取样。离线葡萄糖值用于填充生物反应器中的某一葡萄糖浓度。在试验 2 中，使用葡萄糖在线值代替该进料程序的离线值。
3. 葡萄糖控制
在第三次试验期间，在 6 天后激活 6g/L 的葡萄糖控制。通常将 FMA 的快速批式进料改为连续进料以降低葡萄糖浓度峰值。

试验 1 和 2 的培养方案：

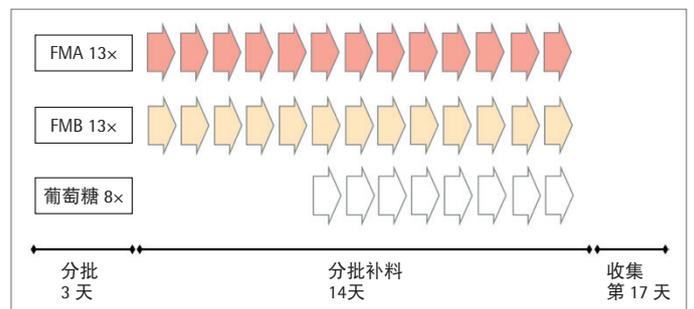


图 1：培养方案 1 和 2

对于试验 1 和 2，培养方案相同。在批阶段期间，没有将培养基进料到培养物中。在第 3 天，开始每日批式进料 FMA 和 FMB。在葡萄糖降低至低于 6 g/L 之后，开始补充葡萄糖进料 (400 g/L)。

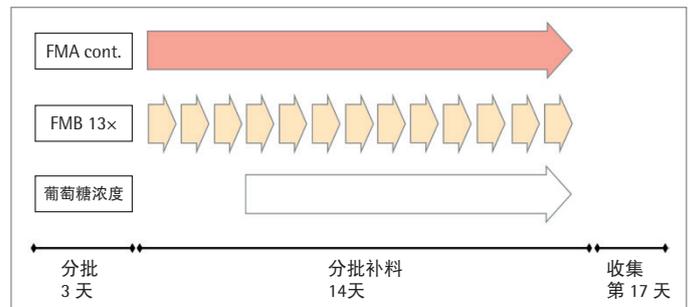


图 2：培养方案 3

在试验 3 中，将 FMA 的批式进料修改为连续进料以移除葡萄糖浓度中的每日峰值。在葡萄糖达到低于 6 g/L 的浓度之后，开始控制进料葡萄糖溶液 (400 g/L) 以将葡萄糖浓度维持在 6 g/L。

结果与讨论

批次在相同的 BIOSTAT® B-DCU 和 BioPAT® Trace 系统上顺序运行。结果显示在图 3 和图 4 中，显示了过程批的重现性和一致性（与历史上的黄金批相比）。BioPAT® Trace 和随后的葡萄糖控制器的葡萄糖监测如图 5-7 所示。

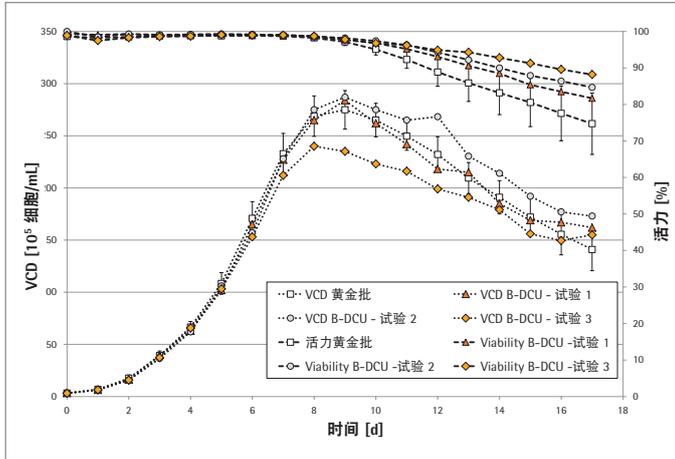


图 3: VCD 趋势试验 1-3

试验 1 和 2 适合黄金批趋势。由于一般过程修改（连续 FMA 进料），试验 3 的 VCD 趋势具有略微减小的峰值 VCD。最终的 VCD 和活力良好，超过所有试验的黄金批次值。

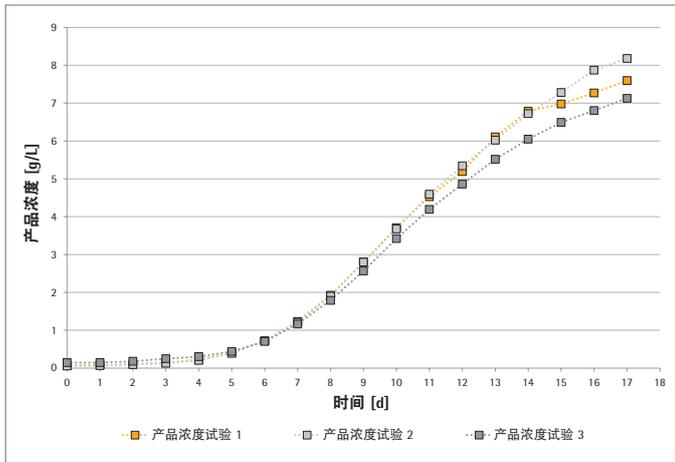


图 4: IgG 趋势

通过每日测量产物浓度（IgG 浓度，图 4）证明了所有三个试验中的可比生产能力。由于试验三中较低的细胞生长，在该运行中获得略低的产物浓度。

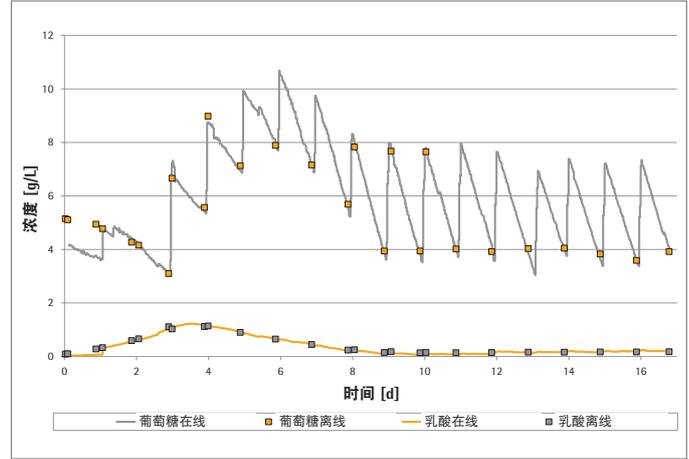


图 5: 葡萄糖和乳酸盐趋势试验 1

尽管在最初的 24 小时有小偏差，在线和离线测量的葡萄糖和乳酸盐在培养期间表现良好。

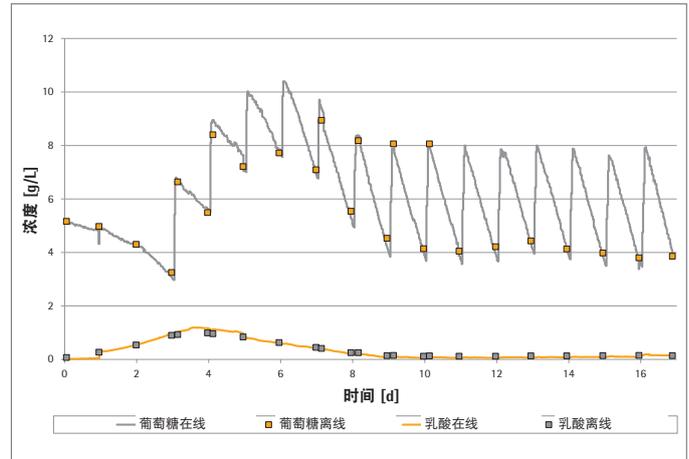


图 6: 葡萄糖和乳酸盐趋势试验 2

对于试验 2，在线和离线葡萄糖和乳酸盐测量显示良好的可比性。

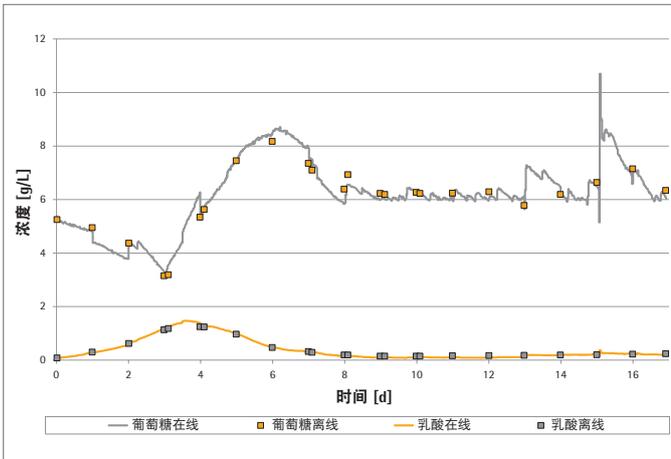


图 7: 葡萄糖和乳酸盐趋势试验 3

在试验3中，在线和离线趋势符合葡萄糖和乳酸盐。在第 13 天和第 15 天进行了不必要的重新校准（操作错误）。

从葡萄糖监测到葡萄糖控制的转变需要过程的变化。我们已经了解，更严格的葡萄糖控制有益于过程性能和产品质量（参考 An Zhang 等）。考虑到这一点，尽量不要使用未试验和测试的技术改变过程。

因此，在进行这种改变之前，通常需要研究系统并在测量输出附近建立置信度（与离线采样相比）并确保设备的鲁棒性。前两个过程运行显示集成 BIOSTAT® B-DCU 和 BioPAT® Trace 的高分辨率监测功能，而第三个运行涉及葡萄糖控制器。移除了与采样葡萄糖有关的生物反应器相关的总体用户操作互动。这意味着将 BIOSTAT® B-DCU 系统维持在葡萄糖控制状态所需的正常工作时间和非正常工作时间减少，更易于管理。在表 1 中，给出了节省时间的概要，此外，在 BIOSTAT® B-DCU 设置的初始阶段，用户与系统的所有互动都已完成。

表 1: 当使用 BioPAT® Trace 进行葡萄糖测量时每批次的 FTE 资源平衡

过程步骤	小时
跟踪探头和电子设备的设置	2
节省的采样时间	9 (18 × 0.5)
节省的时间	7

概要和结论

葡萄糖控制技术与 CHO 分批补料过程的逐步整合是成功的，并且将过程稳态葡萄糖浓度维持在 6 (+/-0.25) g/L。

BioPAT® Trace 技术与 BIOSTAT® B-DCU 的直接集成功能正常、用户友好、容易实现且在需要时可动态变化。由于系统包完全来自 Sartorius Stedim Biotech，葡萄糖控制器的生命周期由我们通过各级开发和商业制造来管理。这确保开发中发现的益处可以转移到商业生产，用于整个产品生命周期。

外观

将进行自动控制的不同葡萄糖浓度的进一步试验，以提高产品浓度和产品质量属性。此外，操作员时间节省（每批 7 小时）和可管理的工作时间不断接近全自动生物反应器。

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