

WAVE™生物反应器灌注培养生产种子细胞的开发和应用

杨建军, 隋礼丽

通用电气 (中国) 研究开发中心有限公司 Fast Trak 中心, 上海 201203

杨建军, 隋礼丽. WAVE™生物反应器灌注培养生产种子细胞的开发和应用. 生物工程学报, 2012, 28(3): 358–367.

Yang JJ, Sui LL. Development and application of perfusion culture producing seed cells in WAVE™ bioreactor. Chin J Biotech, 2012, 28(3): 358–367.

摘 要: 近年来, 国内中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 生产罐的培养规模已达上千升, 国外已达上万升, 最终的生产罐前需要多级摇瓶、种子罐进行种子细胞扩增, 扩增效率较低, 严重影响了抗体、融合蛋白等生物制品的生产效率。文中利用 WAVE™波浪式生物反应器, 通过灌注培养的方法, 成功地实现了种子细胞的高效扩增。WAVE™波浪式生物反应器灌注培养方法制备种子细胞, CHO 细胞密度高达 2.28×10^7 cells/mL 时仍处于指数生长期且细胞活力大于 95%, 以此细胞作为种子细胞, 4×10^5 cells/mL 接种于另一个 WAVE™生物反应器进行流加培养, 最大活细胞密度仍可达 1.73×10^7 cells/mL。通过此种扩增方式, 1 台 WAVE™ 20/50 即可为 1 000 L 或 2 000 L 的生产罐提供种子细胞, 种子细胞的扩增倍数 (Split ratio) 可以达到 1:50~1:100 倍, 与传统不锈钢罐种子细胞扩增倍数 1:2~1:10 相比, 可以显著减少 2~3 级种子罐, 种子细胞的扩增时间减少 7~9 d, 极大地提高生产效率。

关键词: WAVE™波浪式生物反应器, 灌注培养, 种子罐

Development and application of perfusion culture producing seed cells in WAVE™ bioreactor

Jianjun Yang, and Lili Sui

Fast Trak Center, GE (China) Research and Development Center Co. Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: In recent years, Chinese hamster ovary (CHO) production vessel volume has reached more than 1 000 L in Chinese biopharms, and 10 000 L in foreign big biopharms, such as Lonza and Genentech. In general, there are some steps seed bioreactor

Received: September 22, 2011; **Accepted:** December 26, 2011

Corresponding author: Lili Sui. Tel: +86-21-38772988; Fax: +86-21-50806339; E-mail: lili.sui@ge.com

for seed expansion, which decreases the efficiency of production process. In this work, a perfusion-based process was developed to drastically increase the split ratio during the scale-up of CHO cell cultures. Fed-batch cultures were inoculated with cells propagated in either batch or perfusion cultures that grown in disposable Cellbags using the WAVE™ Bioreactor system. The higher cell concentration of 2×10^7 cells/mL with 95% viability allowed to increase the split ratio to about 1:50~1:100 for inoculum propagated in perfusion culture. The method described here could reduce the number of required expansion steps and eliminate two or three bioreactors. Disposable perfusion bioreactor with only a few liters working volume have the potential to directly inoculate volumes of up to 1 000 liters. This would allow to shorten process time in these bioreactors, which often are the bottleneck in plant throughput.

Keywords: WAVE™ Bioreactor, perfusion culture, seed-train

中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 表达的蛋白在分子结构和生物学功能方面最接近天然蛋白分子, 因此成为生产抗体、融合蛋白类药物的首选宿主细胞^[1]。目前, 就生产罐而言, 国内 CHO 细胞的培养规模已达上千升, 国外已达上万升^[2-4]。通常每一级种子罐的细胞密度达 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL 时即需进行扩增, 扩增倍数为 1:2~1:10^[5], 最终的生产罐前需要设置数级种子罐^[6]。由于每一级种子罐的接种密度较低 ($2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL)^[7], 细胞接种后的迟滞生长期较长, 加之需要多级种子罐, 造成生产罐前种子扩增效率很低, 需要很长时间才能达到生产罐所需的种子细胞数量, 严重影响了生产效率。

本文将在 WAVE™ 生物反应器中灌注培养 CHO 细胞获得高密度培养物, 将其接种于生产罐, 以探讨 WAVE™ 生物反应器灌注培养方式用作种子罐的可行性。

1 材料与方法

1.1 WAVE™ 波浪式生物反应器和细胞培养袋

随着生物技术的发展及 GMP 对生物制药工艺要求的不断提高, 可抛弃式产品凭借免清洗、

免灭菌及免验证, 避免交叉污染, 显著提高生产效率等优势, 正在逐渐成为生物制药行业发展的重要趋势^[8-10]。WAVE™ 波浪生物反应器是一种全新概念设计的可抛弃生物反应器 (图 1), 采用无菌塑料袋 (Cellbag) 替代传统的不锈钢发酵罐的罐体, 即开即用, 无需清洗、灭菌及验证等工作; 同时温和有效的摇动避免了细胞沉降并提供了很高的传氧系数 ($K_{La} > 50 \text{ h}^{-1}$) 和极低的剪切力, 非常适合悬浮细胞和微载体贴壁细胞的高密度培养^[11-13]。

WAVE™ 波浪式生物反应器可以非常方便地实现悬浮细胞灌注培养进程^[14]。灌注用 Cellbag 中预置了浮漂式细胞截留装置, 浮漂的下表面为 $7 \mu\text{m}$ 孔径的滤膜, 通过外接蠕动泵可将代谢过的细胞培养上清液泵出细胞培养袋 (细胞被截留在 Cellbag 内)。灌注培养用细胞培养袋的规格包括 2 L、10 L、20 L 及 50 L。WAVEPOD 控制器用于自动控制培养液中的 DO (溶解氧) 及 pH; WAVE™ 波浪式生物反应器自带的“LOADCELL”称重模块可测定细胞培养液的重量, 并控制补料泵和收获泵自动运行, 实现灌注培养的补料和收获进程。图 2 为 WAVE™ Bioreactor 灌注培养结构示意图。



图1 WAVE™ 20/50EHT 波浪式生物反应器

Fig. 1 WAVE™ 20/50EHT bioreactor.

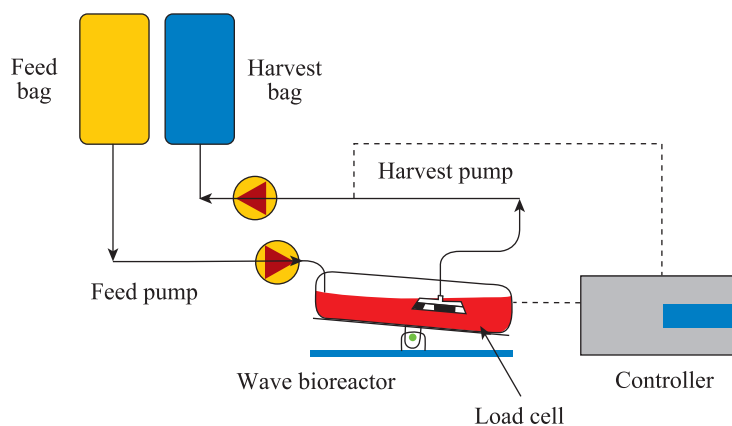


图2 WAVE™ Bioreactor 灌注培养结构示意图

Fig. 2 Setup of WAVE™ bioreactor for perfusion culture.

WAVE™ 波浪式生物反应器和细胞培养袋均为 GE 公司产品。信息如下: WAVE™ 波浪式生物反应器 BASE 20/50 EHT-L (GE, 28-9413-44), WAVEPOD 控制器 (GE, 28-4115-96), 流加培养用细胞袋 (GE, CB0010L10-03), 灌注培养用细胞袋 (GE, CB0002L10-04)。

1.2 细胞株和培养基

CHO 细胞 (Chinese hamster ovary cells, 中国仓鼠卵巢细胞) 购自 Invitrogen 公司, 货号

11619-012。CHO 无血清培养基购自上海瀚康生物医药科技有限公司, 基础培养基货号为 T13; 流加用浓缩培养基货号为 T13-F。

1.3 培养方法及路线图

1.3.1 传统种子细胞扩增方法 (批培养, 扩增倍数 1:2~1:10)

摇瓶扩增的 1 L CHO 细胞接种于 10 L 的细胞培养袋, 工作体积为 4 L, 初始接种密度约为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL^[15]。摇动速度设定为

25 r/min, 摇动角度为 6° , 通气流速为 0.2 L/min, pH 设定为 7.10, DO 设定为 40%, DO 和 pH 通过 WAVEPOD 在线监测并自动控制。每天取样检测细胞密度、细胞活力、葡萄糖浓度和乳酸浓度。

细胞密度达 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL 且细胞活力大于 95% 时, 取约 800 mL 细胞接种于 10 L 的细胞培养袋进行流加培养, 接种密度为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL, 扩增倍数为 1:5, 细胞培养参数设定同上。细胞活力低于 60% 时终止细胞培养进程。

实验方法见图 3。

1.3.2 新型种子细胞扩增方法 (WAVE™ 生物反应器灌注培养, 扩增倍数 1:50~1:100)

摇瓶扩增的 200 mL CHO 细胞接种于 2 L 的灌注用细胞培养袋, 工作体积为 1 L, 初始接种密度约为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL。摇动速度设定为 25 r/min, 摇动角度为 6° , 通气流速为 0.15 L/min, pH 设定为 7.10, DO 设定为 40%, DO 和 pH 通过 WAVEPOD 在线检测并自动控制。细胞密度达 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ cells/mL 时开始灌注进程, 葡萄糖浓度维持在 0.5~2 g/L, 并以此决定灌注速率。每天取样检测细胞密度、细胞活力、葡萄糖浓度和乳酸浓度。

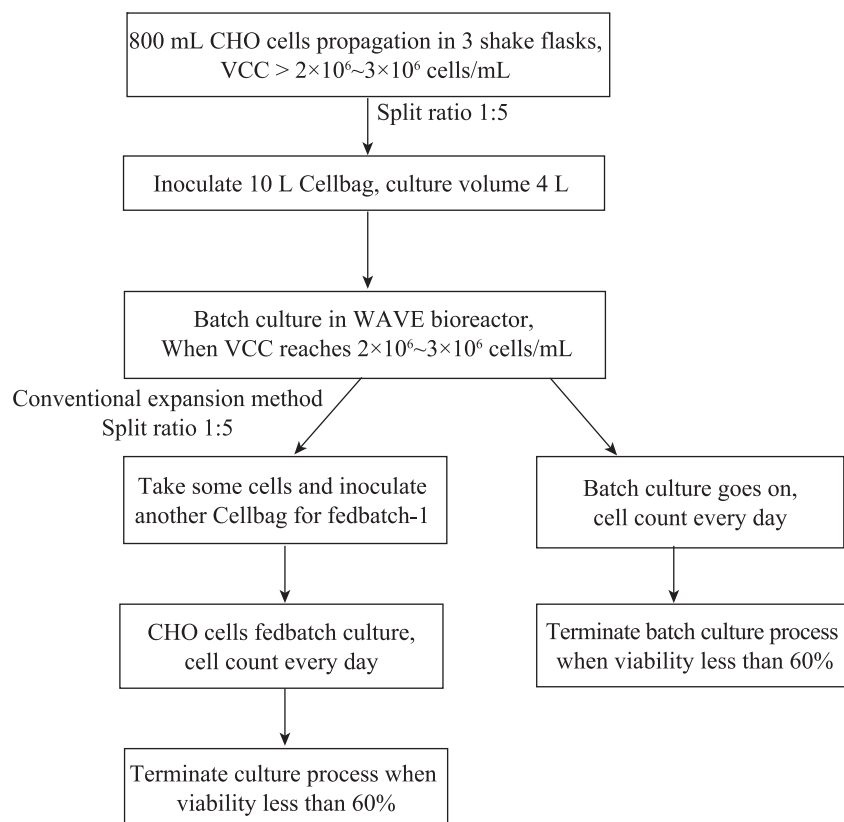


图 3 CHO 细胞种子罐传统扩增工艺

Fig. 3 Conventional expansion method of CHO cell seed trains. VCC: viable cell concentration.

细胞密度达约 2×10^7 cells/mL 且细胞活力大于 95% 时, 取出约 90 mL 细胞接种于另一个细胞培养袋进行流加培养, 接种密度为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL, 扩增倍数为 1:50~1:100, 细胞培养参数设定同上。细胞活力低于 60% 时终止细胞培养进程。

实验方法见图 4。

2 结果与分析

2.1 传统种子细胞扩增方法及流加培养结果

摇瓶扩增的 800 mL CHO 细胞接种于 10 L

的细胞培养袋进行批培养, 工作体积为 4 L, 初始接种密度为 4.5×10^5 cells/mL, 扩增倍数为 1:5。第 2 天细胞密度达 2.1×10^6 cells/mL, 细胞活力为 97.9%, 无菌取出 800 mL 细胞培养物接种于 10 L 细胞培养袋开始流加培养-1, 其他细胞继续进行批培养。第 6 天时细胞密度达峰值 6.88×10^6 cells/mL, 细胞活力为 95.1%, 第 7 天时细胞密度为 5.13×10^6 cells/mL, 细胞活力降至 82%, 细胞培养上清中葡萄糖的浓度为 0.02 g/L, 终止细胞培养进程。批培养细胞密度、细胞活力、葡萄糖及乳酸浓度曲线如图 5 所示。

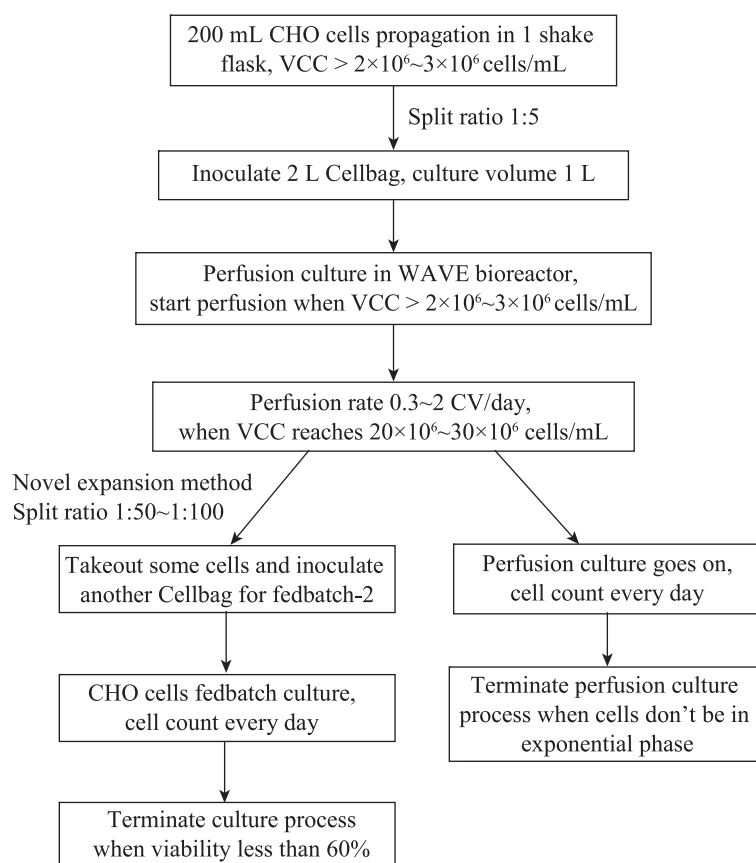


图 4 CHO 细胞 WAVE™ 生物反应器灌注培养高效种子扩增工艺

Fig. 4 Highly efficient inoculum propagation of CHO seed cells in WAVE™ perfusion bioreactor. VCC: viable cell concentration.

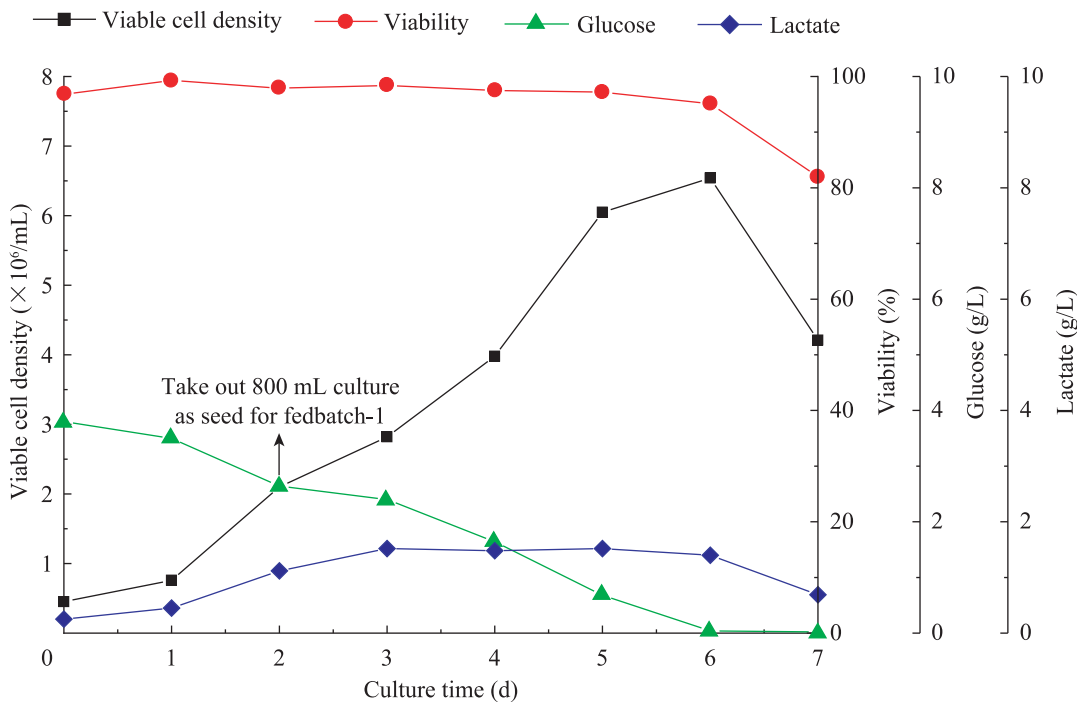


图 5 批培养中 CHO 细胞生长情况

Fig.5 Growth of CHO cells in batch culture.

上述批培养过程中的 800 mL CHO 细胞接种于 10 L 的流加培养用细胞袋，工作体积为 4 L，初始接种密度为 4×10^5 cells/mL。第 0 天接种后细胞培养液中的葡萄糖浓度为 3.7 g/L，第 3 天葡萄糖浓度降至 2.16 g/L 时开始流加补充浓缩培养液，葡萄糖浓度控制在 0.5~2 g/L，第 8 天时达最高细胞密度 14.19×10^6 cells/mL。第 14 天时细胞密度为 6.31×10^6 cells/mL，细胞活力降为 65%，终止细胞培养进程。流加培养-1 细胞密度、细胞活力、葡萄糖及乳酸浓度曲线如图 6 所示。

2.2 新型种子细胞扩增方法及流加培养结果

摇瓶扩增的 200 mL CHO 细胞接种于 2 L 的灌注用细胞培养袋进行灌注培养，工作体积为 1 L，初始接种密度为 4.7×10^5 cells/mL。第 2 天细胞密度达 2.6×10^6 cells/mL 时开始灌注进程，灌注体积为 0.5~2 CV/d (culture volume per day)，葡萄糖浓度

维持在 0.5~2 g/L。第 5 天细胞密度达 22.8×10^6 cells/mL，细胞活力为 96.5%，通过转移瓶无菌取出 90 mL 细胞培养物，将其接种于流加用细胞培养袋开始流加培养-2。灌注培养细胞密度、细胞活力、葡萄糖和乳酸日变化曲线如图 7 所示。

灌注培养扩增的 CHO 细胞接种于 10 L 的流加培养用细胞袋进行流加培养-2，工作体积为 4 L，初始接种密度为 4×10^5 cells/mL。第 0 天接种后细胞培养液中的葡萄糖浓度为 4.3 g/L，第 3 天葡萄糖浓度降至 2.3 g/L 时开始流加补充浓缩培养液，浓缩培养液的补加量为 50~200 mL/day，第 7 天时达最高细胞密度 17.28×10^6 cells/mL。第 14 天时细胞密度为 6.52×10^6 cells/mL，细胞活力降为 63%，终止细胞培养进程。流加培养-2 细胞密度、细胞活力、葡萄糖和乳酸日变化曲线如图 8 所示。

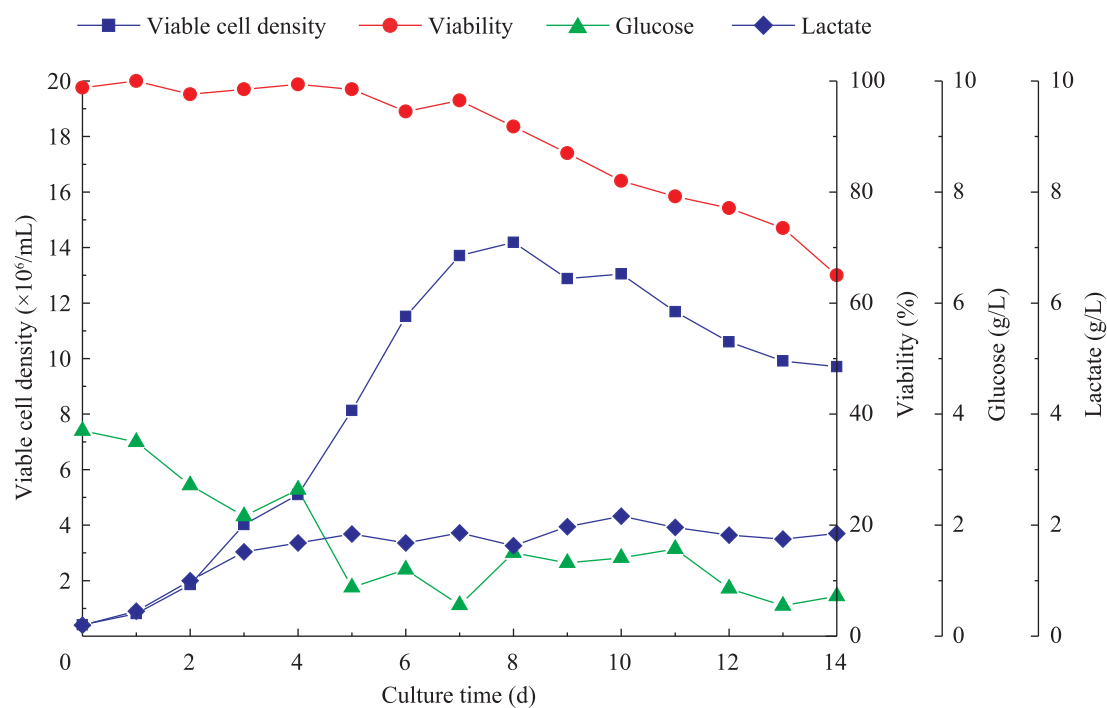


图 6 流加培养-1 中 CHO 细胞生长情况

Fig. 6 Growth of CHO cells in fedbatch-1 (Traditional method producing seed cells).

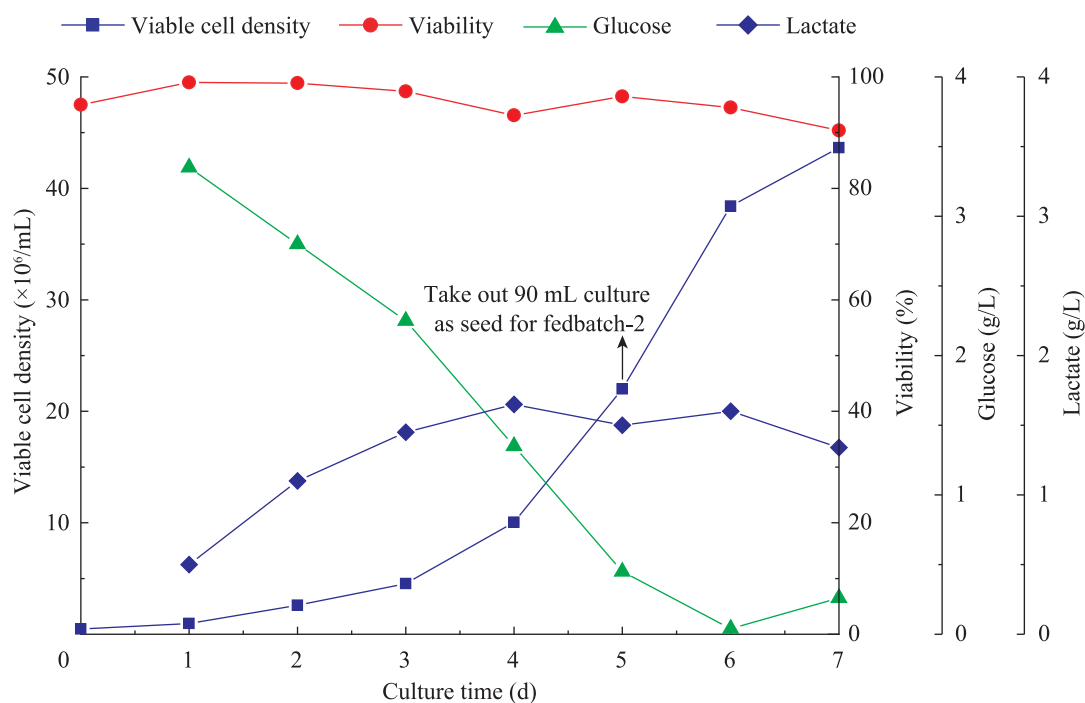


图 7 灌注培养中 CHO 种子细胞生长情况

Fig. 7 Growth of CHO seed cells in WAVE™ perfusion culture.

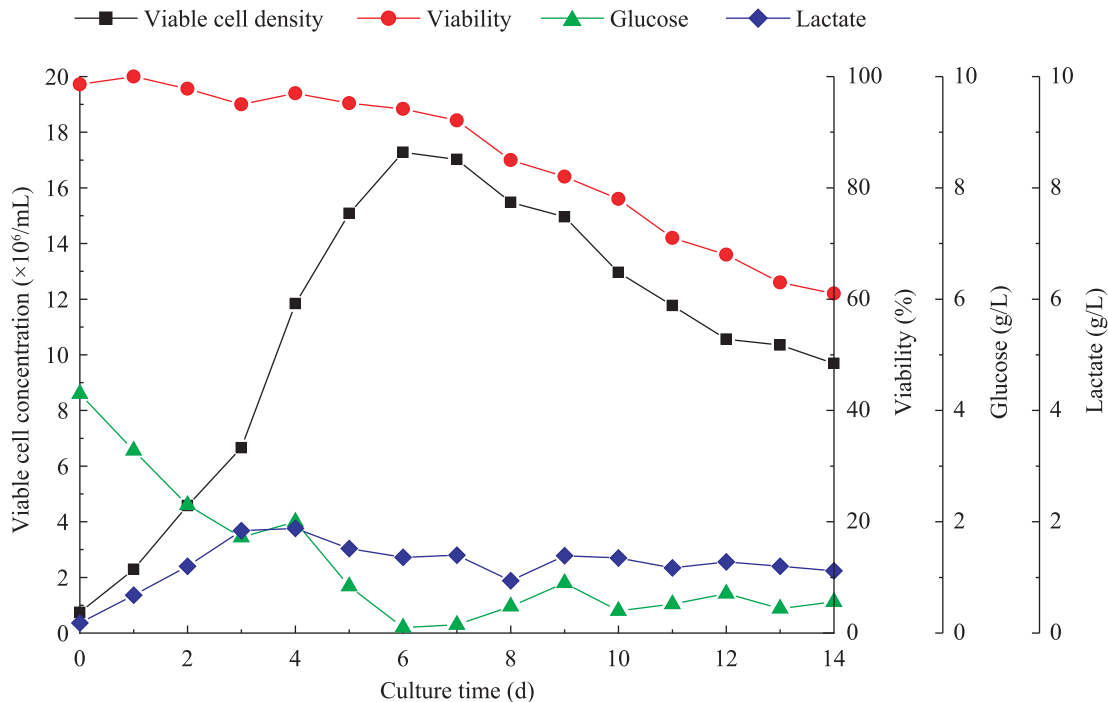


图 8 流加培养-2 细胞生长情况

Fig.8 Growth of CHO cells in fedbatch-2 (WAVE™ perfusion producing seed cells).

3 讨论

灌注培养提供种子细胞的流加培养-2 所获得的最高细胞密度与传统种子扩增方式的流加培养-1 基本相似，均达到了 $14 \times 10^6 \sim 17 \times 10^6$ cells/mL，较批培养提高 1 倍以上；培养周期均为 14 d，较批培养提高 1 倍。灌注培养密度达 22.8×10^6 cells/mL 时，细胞仍然处在指数生长期，以此细胞作为种子细胞扩增并进行流加培养，种子扩增倍数达 1:57，较传统的种子扩增方式（细胞密度生长至 2×10^6 cells/mL 左右时进行 1:5 扩增）提高 10 倍以上（表 1）。如此高

的种子细胞扩增倍数意味着在种子细胞扩增的过程中，可减少 2~3 级种子罐（图 9），并将种子扩增的时间减少 7~9 d，显著提高种子细胞的扩增效率；同时该扩增方式可显著减少生物制药企业种子罐的购买投入、运行成本和维护成本。

WAVE™ 20/50EHT 生物反应器的最大培养体积为 25 L，结合灌注培养方式，一个 WAVE 20/50 EHT 生物反应器可直接为下列生物反应器提供种子细胞：

- 1) 2 个 1 000 L 的 WAVE™ 生物反应器；
- 2) 2 个 1 000 L 的不锈钢生产罐；
- 3) 1 个 2 000 L 的不锈钢生产罐。

表 1 不同种子扩增方式对流加培养结果的影响

Table 1 Comparison of different seed expansion methods for batch and fed-batch cultures

	Seed conc. before inoculation ($\times 10^6$ cells/mL)	Inoculum ($\times 10^5$ cells/mL)	Split ratio	Culture time (d)	Max TCC ($\times 10^6$ cells/mL)	T _{max}
Batch (Seed from flasks)	2.25	4.50	1:5	7	6.88	Day 6
Fed-batch-1 (Seed from batch culture)	2.00	4.00	1:5	14	14.19	Day 8
Fed-batch-2 (Seed from WAVE perfusion)	22.8	4.00	1:57	14	17.28	Day 7

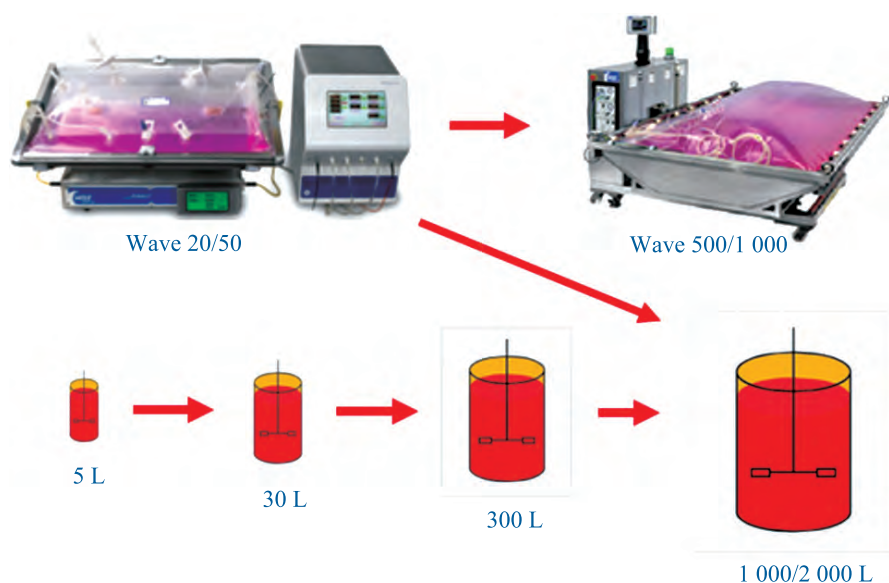
T_{max}: the day of peak cell concentration.

图 9 WAVE™ 生物反应器灌注培养显著减少种子罐级数

Fig. 9 WAVE™ Bioreactor perfusion culture prominently decreases seed-train expansion steps.

4 结论

WAVE™ 生物反应器灌注培养 CHO 细胞，密度高达 2×10^7 cells/mL 时细胞仍处于指数生长期，可为生产罐 (N 罐) 提供种子细胞，扩增倍数可达 1:50~1:100。通过本扩增方式，可显著减少种子罐的级数 (N-3、N-2、N-1 种子罐)，减

少生物制药企业种子罐的购买投入、运行成本和维护成本；同时可以显著减少种子细胞的扩增时间，极大地提高生产效率。该扩增方式同样适用于杂交瘤 NS0 细胞和昆虫细胞 S2、SF9 等悬浮培养方式的种子细胞的扩增。本研究为生物制药企业的生产罐提供了一个切实可行的、高效的种子细胞扩增方法，具有极大的市场应用前景。

REFERENCES

- [1] Birch JR, Racher AJ. Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(5/6): 671–685.
- [2] Wei MW, Zhang SX. Mainstream technology in large-scale animal cell culture. *Biotechnol & Bioeng*, 2009, 4(7): 85–89.
魏明旺, 张淑香. 动物细胞大规模培养的主流技术. *生物产业技术*, 2009, 4(7): 85–89.
- [3] Kelley B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *MAbs*, 2009, 1(5): 443–452.
- [4] Nienow AW. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 2006 (50): 9–33.
- [5] Kloth C, MacIsaac G, Ghebremariam H, et al. Inoculum expansion methods, recombinant mammalian cell lines// *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. New Jersey: Wiley Online Library, 2010: 1–30.
- [6] Chartrain M, Chu L. Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(6): 447–467.
- [7] Jennie PM, David B. Animal cell culture methods. *Method Cell Biol*, 1998, (57): 225–226.
- [8] Angelo D. Disposable bioreactors enter mainstream. *Genetic Eng & Biotechnol News*, 2010, 30(19): 1–2.
- [9] James B, Thomas R, Howard LL. Monoclonal antibody manufacturing strategies for the 21 st century. *Biopharm Mfg*, 2010(7/8): 28–35.
- [10] Pierre F. Boosting bioprocessing efficiency with single-use technologies. *Genopole Symposium*, 2008.
- [11] Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 1999, 30(1/3): 149–158.
- [12] Namdev PK, Lio P. Assessing a disposable bioreactor for attachment dependent cell cultures. *BioPharm Int*, 2000, 13(2): 44–50.
- [13] Tong F, Wang H. Application of WAVE bioreactor to production of biologics. *Chin J Biologicals*, 2009, 22(12): 1254–1262.
佟芳, 王辉. WAVE 生物反应器在生物制品生产中的应用. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(12): 1254–1262.
- [14] Tang YJ, Ohashi R, Hamel JFP. Perfusion culture of hybridoma cells for hyperproduction of IgG(2a) monoclonal antibody in a wave bioreactor-perfusion culture system. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(1): 255–264.
- [15] Liu XM, Liu H, Ye LL, et al. Serum-free medium for suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary (11G-S) cells. *Chin J Biotech*, 2010, 26(8): 1116–1122.
刘兴茂, 刘红, 叶玲玲. CHO 工程细胞无血清悬浮分批培养的生长代谢特征及动力学模型. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1116–1122.