

使用電容直接測量生物 工藝中的細胞密度和健康 狀況的好處

ABER

使用電容直接測量生物工藝中的細胞密度 和健康狀況的好處



阿迪亞·巴特



約翰·波普爾頓

1 巴特儀器有限公司

使用電容在線測量細胞密度並不是一個新概念。該技術最初是在 30 多年前 (1) 開發的，用於測定懸浮液中的生物量，然後由 Aber Instruments (Aber) 商業化。事實上，自 1990 年代以來，電容測量已廣泛用於全球的生物製藥公司和合同開發與製造組織 (CDMO)。它現在是一種標準技術，用於監測和自動化研究和過程開發實驗室中的細胞培養，直至用於生產生物製品和疫苗的製造規模設施。

電容測量什麼以及它與細胞密度和健康有何關係？

懸浮培養中的細胞具有由雙層組成的外膜，該雙層不透離子且不導電。該介質是由許多成分組成的複合物，其中包括懸浮離子。當處於電場中時，細胞會發生極化（圖 1）。對於活細胞，細胞膜是完整的，細胞將充當電容器來儲存電能。

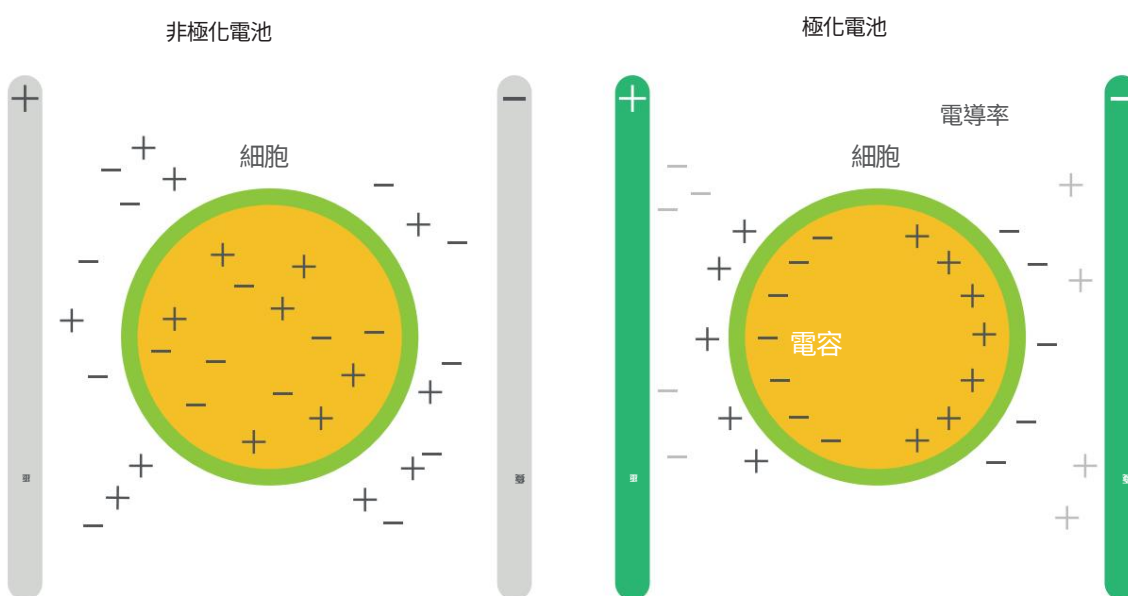


圖 1 :在電場中充當電容器的活細胞。

隨著細胞數量和體積的增加，極化細胞膜的數量也會增加，這意味著電容會增加。因此，細胞懸浮液在一個或多個頻率下的電容與細胞的總膜結合體積成正比。由於死細胞有滲漏的細胞膜和介質中的固體顆粒和氣泡沒有細胞膜，因此它們不能儲存電荷並且不會對細胞懸浮液中的電容產生貢獻。因此，電容測量反映了細胞密度和細胞大小（活生物體積），以及細胞膜的電學特性。

那麼，電容與在線和離線測量相比如何？是否有必要使用原始電容數據代替這些方法來監測細胞密度和健康狀況？

細胞密度的在線和離線測量

在生物工藝中，科學家使用在線或離線方法測量細胞密度，使用活細胞濃度 (VCC) 作為關鍵績效指標 (KPI)。表 1 列出了最常用的方法。

表 1 : 在線和離線監測 VCC 的方法

方法	用於分析的技術示例
台盼藍染料排除 - 按顏色分析細胞 - 活細胞是無色的，死細胞被染成藍色	Cedex Bio® 分析儀 (羅氏) · Vi-CELL BLUE 細胞活力分析儀 (Beckman-Coulter Life 科學)
粒子檢測 - 通過電區域感應測量顆粒。 不分生死 細胞。	Multisizer 4e 庫爾特計數器 (貝克曼 庫爾特生命科學)
流式細胞儀 - 通過熒 光分析細胞。活細胞發出低波長紅色熒光，死細胞發出高波 長紅色熒光。	Guava® easyCyte™ (默克)

長期以來，台盼藍染料排除法一直被認為是生物工藝中測量 VCC 的黃金標準 (2)。這種方法依賴於細胞膜嚴重受損的細胞，這些細胞膜無法生長或與正常代謝相關的其他功能吸收染料並變藍。然而，目前工藝專家有一些爭論，指出通過這種方法獲得的 VCC 值高估了 VCC (2)。

通過粒子檢測對細胞進行測量在粒子通過孔口時通過電區域感應以電子方式測量粒子。這種方法不區分活細胞和死細胞。除了不能區分活細胞和死細胞外，如果樣本中含有大量細胞碎片或細胞聚集體，這種方法在生物加工中使用較少時，還會顯示一些數據失真。

流式細胞術方法依賴於使用兩種熒光結合染料。一種染料可以結合所有發出低波長紅色熒光的活細胞。第二種染料僅與死細胞中的 DNA 結合併發出高波長紅色熒光。與染料排除方法一樣，這也取決於細胞膜的完整性，因為第二種染料只會在進入細胞膜受損的細胞後才對 DNA 染色。生物過程專家也認為這種方法也可能高估 VCC (2)。

離線和在線測量的挑戰

在線和離線測量並不總是監測細胞健康和密度的最佳選擇。一個原因是它們涉及採樣，這會減少生物反應器中的體積，這意味著只能以 12-24 小時的間隔進行採樣。因此，這些方法無法生成過程的詳細指紋或有助於提供及時的反饋數據以控制過程。這些測量技術也不是理想的自動液體處理程序或科學家物理地從生物反應器中取出樣品。這不僅需要時間和精力，而且如果採樣由不同的操作員手動完成，或者如果用於離線分析的不同或相同設備之間因校準問題而存在差異，則還可能在測量中引入潛在誤差。此外，從生物反應器中取出樣品可能會帶來污染風險，因為它涉及進入生物反應器和細胞培養物進行採樣。

使用電容監測細胞密度和健康狀況的優勢

使用電容測量來監測細胞密度和健康狀況的主要好處是它是一種在線過程分析技術 (PAT) 技術。例如，Aber 的 FUTURA 探針可以每隔幾秒產生一個信號。此外，它被生物過程專家視為監測哺乳動物細胞培養中活細胞密度的最準確和一致的在線方法 (2,3)。電容是在線和無樣品的，這使科學家能夠生成關鍵過程參數 (CPP) 和關鍵性能指標 (KPI) 的詳細指紋，這些指紋可用於自動反饋控制，而無需任何細胞培養取樣。

為“黃金”批次開發電容指紋的一個優勢是，它可以與正在進行的運行的電容趨勢進行比較，以更快地確定 CPP 和 KPI 何時開始表現出可接受的工藝規範。這可以觸發手動或自動響應，並有助於對生產運行進行故障排除以糾正過程偏差並在運行過程中節省昂貴的生產批次。

另一個好處是測量電容的技術是可擴展的 (4)，並且有一系列可重複使用的尺寸和類型，可用於從較小的玻璃生物反應器到較大的不銹鋼容器。這些傳感器可用於所有主要生命科學供應商的中試和製造規模不銹鋼生物反應器。此外，自 2013 年以來，通過與 Aber 的合作，被稱為 BioPAT® Viamass (Sartorius) 和 Futura neotf (Thermo Scientific) 的一次性傳感器已完全集成到容量高達 2000 L 的一次性生物反應器中 (圖 2) (5) 和 2021 (6) 分別。



圖 2 :ABER FUTURA neotf 生物電容傳感器

如何使用電容監測細胞密度和健康狀況

在生物加工中，許多科學家將原始電容數據轉換為細胞數/mL。這樣做有幾個原因。首先，它可以幫助根據參考金標準方法驗證該技術。此外，許多控制策略基於細胞/mL 的離線細胞測量，因此當使用在線細胞測量方法（例如電容）時，許多科學家更願意轉換回細胞/mL。最後，科學家們不能在工藝開發的早期就包括電容，因為它目前只能用於 ~1 L 規模。

將電容轉換為 VCC 要將電容轉換為在線

或離線 KPI 測量值（例如 VCC），必須對每條電池線執行校準。這是因為研究表明，通過測試兩個細胞系，離線方法生成的值可能不同於在線電容測量值 (7)。常用的校準方法要求科學家每 24 小時取樣一次以進行 VCC 測量，同時使用在線傳感器（例如 FUTURA 傳感器 (Aber)）記錄以 pF/cm 為單位的電容測量值。使用諸如 Cedex Bio® Analyzer (Roche) 的離線系統分析樣品以生成每個數據點的細胞/ml 值。然後繪製電容值對細胞數/ml 的曲線，該曲線方程的斜率產生校準因子。使用這種方法，幾個小組已經成功地將電容轉換為他們的參考離線方法。在少數情況下，電容和離線方法之間存在偏差，尤其是在培養運行結束時。

這種偏差背後的原因是什麼？

電容與 VCC 的其他離線和在線測量之間存在差異的一個原因被認為是每種方法對活細胞和死細胞的定義不同。

例如，馬尼托巴大學 (8) 的一項研究比較了離線和在線粒子檢測、染料排除和熒光流式細胞術與在線電容，以監測在批培養。研究表明，這些技術在指數生長期（培養 80 小時）期間產生了相似的結果，但染料排除和粒子檢測方法在 80 小時至 120 小時後產生了更高的 VCC 估計值（圖 3）。熒光流式細胞術給出了與電容相當的結果，另外的測定證實這兩種方法檢測的凋亡細胞比其他方法更早變得無法存活。這項研究表明，測量 VCC 的不同方法正在監測細胞死亡的不同點。

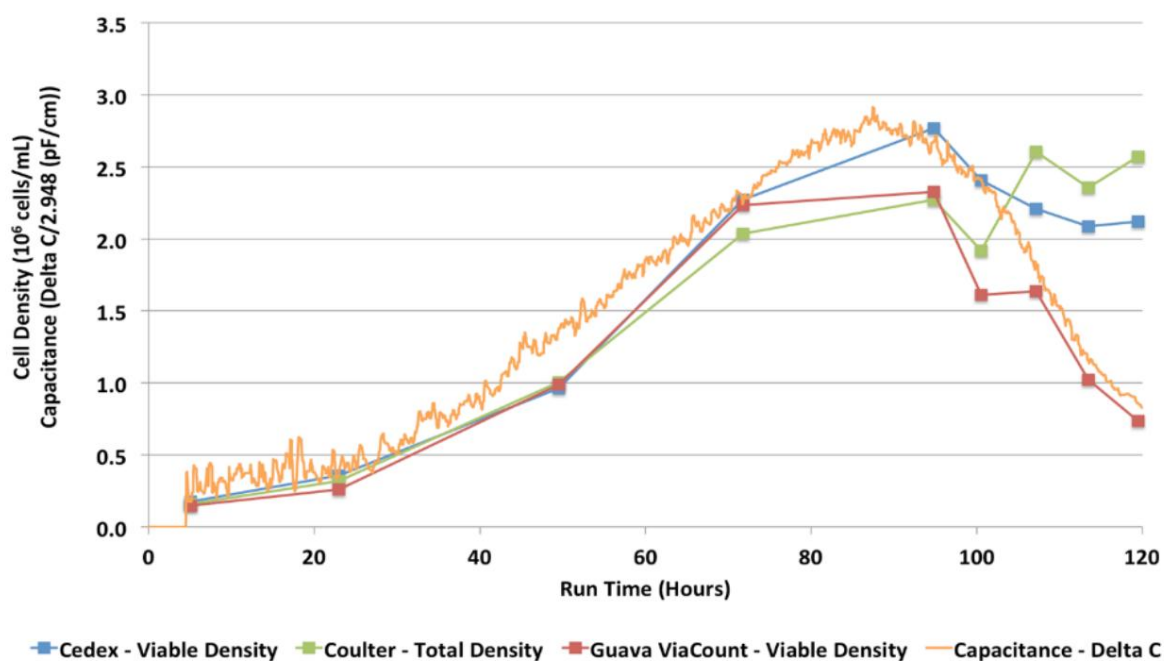


圖 3 :比較離線、在線和在線測量 VCC 的方法，（經曼尼托巴大學許可出版）

電容以及離線和在線測量所見的 VCC 差異的另一個原因也是因為電池尺寸變化會影響 VCC 測量。在賽多利斯 (Sartorius) 的科學家 (5) 對在搖擺運動一次性生物反應器中培養 15 天的 CHO 細胞進行的一項研究中，將使用 BioPAT® Viamass 傳感器 (Sartorius) 的電容與使用台盼藍染料排除法 (Cedex) 測量的 VCC 進行了比較 (Bio® Analyzer) 和細胞濕重。結果 (圖 4) 表明，在指數階段 (6 天) 電容

測量值與 VCC 和活細胞體積 (VCV) 密切相關。然而，當平均細胞直徑增加，VCC 測量值不同，但與計算的生物量體積的相關性保持到運行結束。這表明電容與活細胞膜的體積成正比，並顯示了培養運行期間的每一個生物量變化。這些結果表明電容是一種準確的監測方法

可行的生物質。

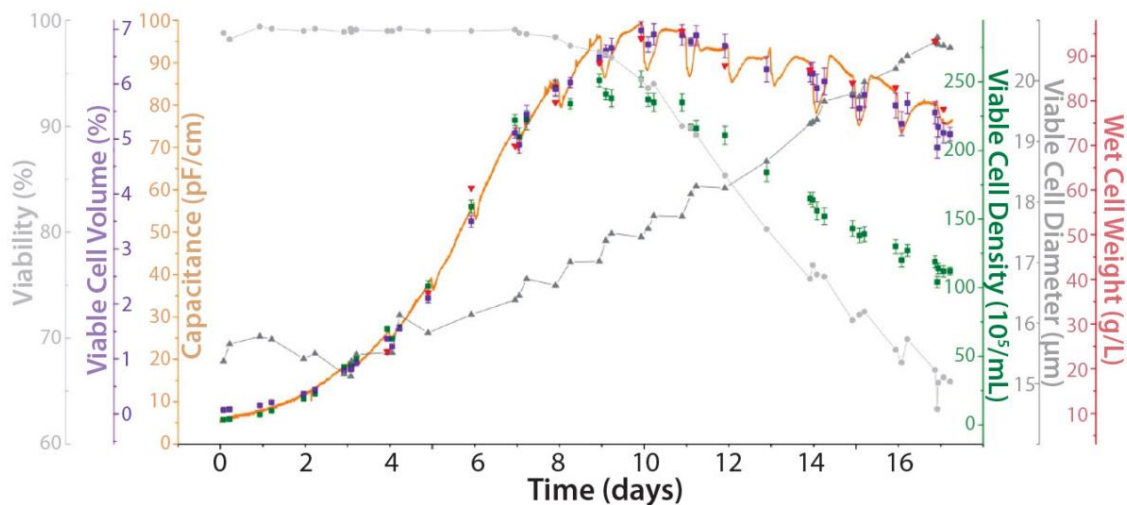


圖 4 :使用活細胞體積測量 VCC 的在線和在線方法的比較 (在 Sartorius 的許可下發布)

使用原始電容監測文化

曼尼托巴大學和 Sartorius 的科學家進行的這些研究表明，在線和離線方法取決於不同地測量細胞死亡，這在死亡階段尤其如此。因此，說一種確定細胞健康和密度的方法比另一種更準確是不正確的，它們只是不同，並提供了使用原始電容測量來跟踪細胞生長和活力的基本原理。一個原因是電容更真實地代表了培養的進展情況，因為它可以更快地檢測到細胞死亡。使用電容策略，科學家可以根據培養物的行為方式實時調整培養參數，並有可能節省一批。例如，Biogen (9) 的科學家已經表明，可以根據使用實時電容信息來逆轉細胞凋亡，而他們無法及早檢測到細胞凋亡，無法使用離線方法來逆轉細胞凋亡。

VCC 測量。

因此，基於原始電容數據制定餵養策略是有意義的，因為這意味著科學家可以根據活生物量而不是細胞數量餵養細胞，因為較大的細胞需要更多的營養，而使用 VCC 作為 KPI 無法考慮這一點。

例如，Biogen 自 2016 年以來一直致力於電容測量，並將其與在線和離線測量進行比較，並於 2019 年轉而使用電容測量作為其當前良好生產規範 (cGMP) 設施中過程控制的黃金標準方法。他們還在探索使用電容數據在放大過程中自動稀釋種子培養物，並作為預測葡萄糖需求的方法 (10)。

他們使用原始電容作為 KPI，因為他們的研究 (10,11) 使用電容監測小試規模 (5L)、中試規模 (200 L 和 315 L) 和生產規模 (15000 L) 生物反應器中的 CHO 培養物表明電容提供從傳感器到一致的數據

適用於所有生物反應器類型和規模的傳感器。在指數增長階段，R2 方差係數接近 1，與此階段的離線 VCC 測量相比，電容具有良好的相關性。

此外，使用原始電容數據可以提供靈活的進料策略，因為細胞可以正確進料，而不管無意的過程錯誤（例如接種不足）。Biogen 的兩項研究顯示了這方面的證據，一項採用基於在線電容測量的自動進料策略 (12)，另一項使用實時進料頻率增加到每 4 小時（而不是 24 小時）一次連續電容數據 (10)。第二項研究導致產物效價增加 21%，減少了培養物中的谷氨酸消耗並改善了細胞生長。由於他們的工作使用電容測量，Biogen 目前使用電容作為 KPI，而不是將其轉換為 VCC 來監控他們的

cGMP 流程。

使用原始電導率更早地檢測污染

Aber 電容探頭還以 mS/cm 為單位測量電導率。電導率與細胞懸浮液中帶電離子的濃度相關。使用電導率的一個有趣應用是質量保證，馬薩諸塞大學和美國食品和藥物管理局 (FDA) 的研究人員最近的一項研究 (13) 表明，在 CHO 池中，使用電容探針測量的電導率異常增加與細菌污染有關。這一發現表明，在線電導率測量可用於細菌污染的早期檢測，並允許科學家進行實時故障排除，以通過添加抗生素來控制污染物或停止該過程來節省他們的批次。早期檢測細菌污染的能力可以防止它影響下游純化過程以及滅菌/清潔程序，並可以節省時間和資源，這在製造環境中尤其如此。

未來展望

使用電容可能無法在幾年內完全取代離線和在線 VCC 測量（如果有的話）。例如，在使用體積小於 1 L 的生物反應器的過程開發中，雖然可以使用多用途電容傳感器，但還沒有一次性傳感器可用。這意味著有理由開發在 250 mL 容量下性能良好的一次性電容傳感器，這也是 Aber Instruments 積極開展工作的領域。在無法利用原始電容的情況下，將實時電容測量轉換為離線方法並使用這種連續測量來監測和控制過程仍然有很大的好處。

然而，這篇文章有詳細的專家意見和來自幾項研究的證據，這應該鼓勵科學家，尤其是那些開發和擴大新生物過程的科學家，使用電容作為 KPI，因為它提供了一種更準確的方法來測量他們的細胞健康，尤其是用於控制飼料策略。總之，使用電容可以減少或消除與離線和在線測量相關的採樣挑戰和生物量分析變化，以及實現過程性能的實時監控，例如幫助節省昂貴的生產批次。使用電容作為 KPI 的所有這些特性可能有助於降低成本和縮短生產時間，從而有可能快速提供更實惠的生物製劑和疫苗。

參考

1. Kell D B. DETERMINATION OF BIOMASS 世界專利 WO1988002114 (1988) <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1988002114>
2. 巴特勒 M 等人。生物過程中的細胞活力為重新評估提供了理由。生物工藝國際。2018; 17 (11-12): 42-49 <https://bioprocessintl.com/analytical/cell-line-development/cell-viability-in-bioprocesses-making-a-case-for-reevaluation/>
3. Carvell JP、Dowd J E. 使用射頻阻抗在線測量和控制細胞培養製造過程中的活細胞密度。細胞技術。2006 :50 (1-3) :35-48。 <https://doi.org/10.1007/s10616-005-3974-x>
4. Metze, S 等人。在一次性生物反應器中放大工業相關 CHO 細胞培養補料分批過程期間，使用電容傳感器監測在線生物量。生物過程和生物系統工程。2020 :43 (2) :193-205。 <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02216-4>
5. Carvell J 等人。監測一次性生物反應器中的活生物質。國際生物過程 2016 :14(3)s :40-48。 <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/monitoring-live-biomass-in-disposable-bioreactors/>
6. Madsen B 等人。使用 ABER Futura neotf 測量 HyPerforma SUB 中的細胞密度。Bioprocess International 2021 特別報告：<https://bioprocessintl.com/sponsored-content/measuring-cell-density-in-hyperforma-single-use-bioreactor-with-aber-futura-neotf-single-use-biocapacitance-sensors/>
7. 費爾南德斯 J 等人。電容工具的開發：用於評估哺乳動物細胞培養物和固定細胞校準標準的生物量的在線方法。生物技術雜誌 2018; 14 (4): e1800283。 <https://doi.org/10.1002/biot.201800283>
8. Braasch K 等人。CHO 細胞不斷變化的介電特性可用於確定生物過程中的早期凋亡事件。生物技術生物工程。2013;110 (11):2902-2914。 <https://doi.org/10.1002/bit.24976>
9. 馬飛等。通過原位多頻掃描介電譜實時監測和控制 CHO 細胞凋亡。過程生物化學，2019 :80 :138-145。 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.017>

10. Moore, B. 等人。案例研究：用於商業 GMP CHO 製造過程中過程控制的介電光譜（生物電容）的表徵和實施。生物技術。編程。2019:35(3): e2782。 <https://doi.org/10.1002/btpr.2782>
11. Bro, C. Kwiatkowski, C 和 Tolstrup, A. 使用生物電容探針優化細胞培養工程大規模製造過程控制 XVI, A. Robinson, PhD, Tulane University R. Venkat, PhD, MedImmune E. Schaefer, ScD, J&J Janssen Eds。ECI 研討會系列，(2018)。 <https://dc.engconfintl.org/ccexvi/100>
12. Zhang, A., 等人。先進的過程監控和反饋控制，以提高細胞培養過程的產量和穩健性。生物技術。生物工程。2015：112：2495-2504。 <https://doi.org/10.1002/bit.25684>
13. Morris, C 等人。單個在線生物量探針通過電容檢測 CHO 細胞生長，通過生物反應器中的電導率檢測細菌污染。生物技術雜誌 2021 S30：e2100126。 <https://doi.org/10.1002/biot.202100126>

作者詳情

*Aditya Bhat B.Sc.、M.Sc.、Ph.D. 是技術副總裁，John Poppleton 是銷售和營銷總監，他們都在美國 Aber Instruments Inc。

網址：www.aberinstruments.com

*Aditya Bhat 為通訊作者

電話：+1 540 676 8113

電子郵件：aditya@aberinstruments.com

30 多年來，ABER 一直引領介電光譜學的發展。
其中 27 年，我們為生物技術行業提供了世界領先的生物製藥公司所依賴的儀器。

www.aberinstruments.com

歐洲和世界其他地區 :+44 (0)1970 636
300

我們：

+1 925 683 3673

sales@aberinstruments.com

ABER