



洁维生物  
JEWELBIO

# 细胞生物反应器的放大和控制对 于生物制药生产的关键影响

BY

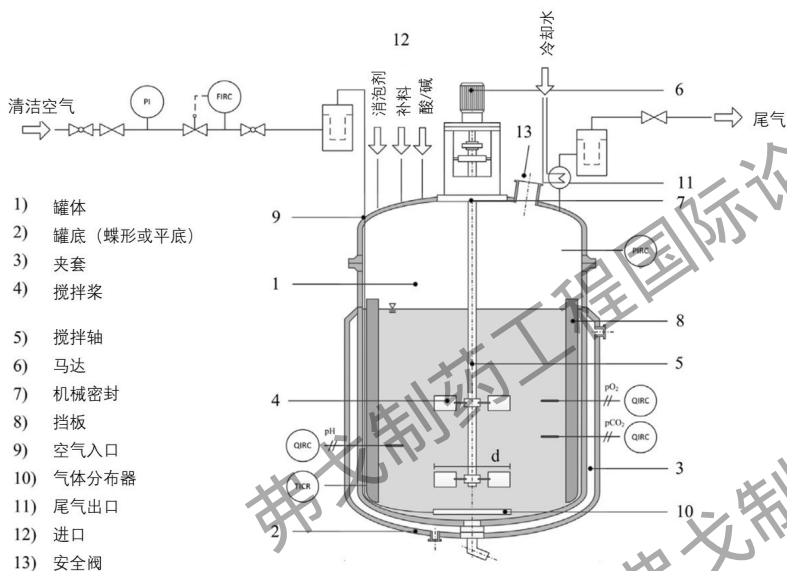
上海洁维生物工程有限公司

精工为匠 · 逐玉成器 · 守药之洁 · 臻诺以诚

## 近80年的发展，搅拌罐式生物反应器已成为传统产品

- 反应器的部件组成和几何结构已定型;
- 放大策略多样，没有出现新的放大理念;
- 反应器规模已经能够满足现代生物制药的需求;
- 一次性反应器。

# 动物细胞培养反应器的结构



图片来自: Jossen V, et al. Stirred bioreactors: current state and developments, with special emphasis on biopharmaceutical production processes. In Book: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Bioprocesses, Bioreactors and Controls 2017, Pages 179-215

| 部件           | 描述                                     |
|--------------|--|
| 罐体           | 一般为蝶形底的圆筒结构                            |
| 搅拌轴          | 顶入或底入式, 一般位于罐体的中心                      |
| 机械密封         | 密封搅拌轴与罐体                               |
| 电机           | 小体积反应器中可以采用磁力驱动                        |
| 挡板           | 体积较大的反应器一般配置4个固定在内壁并于内壁垂直的挡板           |
| <b>搅拌桨</b>   | <b>单层或多层搅拌桨, 轴向流搅拌桨, 或者轴向径向流搅拌桨的组合</b> |
| <b>气体分布器</b> | <b>安装于罐体的底部, 底层搅拌桨的下方</b>              |
| 夹套           | 罐体外周, 用于维持培养温度                         |
| 气体入口         | 无菌过滤气体                                 |
| 尾气出口         | 冷凝干燥或加热后过滤排出罐体                         |
| 电极           | 较大体积的反应器中分别配置2套温度电极, pH电极和DO电极, 1套泡沫电极 |
| 补料入口若干       | 用于调节pH, 或补加营养物                         |
| 取样口          | 反应器体积较大时一般置于罐体的底部                      |
| 重量传感器        | 便于流加操作定量补料等                            |
| 公用工程管道       | 纯净水, 蒸汽, 各种气体, 排污, 冷凝水等                |
| 控制系统         | 具有数据记录和处理的控制柜及各种执行元件 (气动阀, 质量流量计, 泵等)  |

# 动物细胞培养反应器的结构尺寸

- 高径比:  $H/D \approx 2:1$
- 搅拌桨直径 $d$ :  $d=1/3 \sim 1/2 D$
- 搅拌桨距离底部的距离:  $0.1 \sim 0.3 D$
- 搅拌桨间的距离 $d_i$ :  $d_i \approx d$
- 挡板宽度:  $1/12 \sim 1/10 D$
- 挡板距离内壁的距离:  $1.5\% D$
- 鼓泡器置于底层搅拌桨的下方, 与搅拌桨的距离取决于桨型
  - 大泡鼓泡器, 孔径 $0.5\text{mm} \sim 1\text{mm}$
  - 微泡鼓泡器, 孔径  $10\mu\text{m} \sim 150\mu\text{m}$

# 动物细胞培养反应器放大

规模的放大： 几何相似原则

工艺的放大：  
1. 试错实验。费时，成本高昂（试想 $20\text{m}^3$ 反应器的细胞培养基成本）；  
2. 基于经验方程，根据一定的放大原则，确定操作参数；

放大的方案  
1. 一步放大（小规模( $\leq 50\text{L}$ ) $\rightarrow$ 大规模( $\geq 1000\text{L}$ ))  
2. 逐级放大（ $3\text{L} \rightarrow 75\text{L} \rightarrow 300\text{L} \rightarrow 2500\text{L}$ ）

Yang JD, et al. Fed-batch bioreactor process scale up from 3L to 2500L scale for monoclonal antibody production from cell culture. Biotech Bioeng, 98:141-154, 2007.

无论何种放大方案，都需要在小规模反应器中充分研究细胞生长、代谢和产物表达的规律和操作变量的影响，探索剪切耐受范围和传质（ $K_La$ ）要求，用于指导大规模操作，减少大规模反应器的试验次数，提高放大效率。

# 动物细胞培养反应器放大

- **理想状态：**所有的流体微元或细胞任何时间任何空间具有相同的营养供给和能量作用；
- **实际状态：**培养体积内不仅仅存在质量梯度同时还存在能量梯度；
- **目标状态：**实际存在的梯度不足以影响细胞的生长代谢和产物的表达。

**前提：探索细胞的各种参数的耐受范围或需求范围，这往往是细胞株特异的。**

# 放大参数

| 参数         | 说明        | 经验公式   |
|------------|-----------|--|
| $P/V$      | 单位体积的功率输入 | $P/V = \frac{(M - M_d) \cdot 2 \cdot \pi \cdot N}{V}$  |
| $U_{tip}$  | 搅拌桨的叶尖速度  | $u_{tip} = \pi \cdot d \cdot N$  |
| $K_L a$    | 氧气传质系数    | $\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})$  |
| $\theta_m$ | 循环时间      | $\theta_m \propto \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/3} \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{-1/3} \cdot \left(\frac{H}{D}\right)^{2.43} \cdot D^{2/3}$ |
| Re         | 雷诺数       | $Re = \frac{N \cdot d^2 \cdot \rho}{\eta}$   |
| $Q_g$      | 单位体积通气流量  | $Q_g = V_{gas}/V$ (vvm)  |
| $V_{apG}$  | 表观通气速率    | $V_{apG} = V_{gas}/H$  |



搅拌转速



通气流量

搅拌转速和通气流量是除了培养基供给之外的最重要的工艺操作参数，不仅仅给细胞生长提供必要氧和传质条件，也会因为剪切和气泡作用导致细胞损伤。

# 放大参数

气体流量  $V_{\text{gas}}$  (L/min)

最大值

最小值

最优  
区间

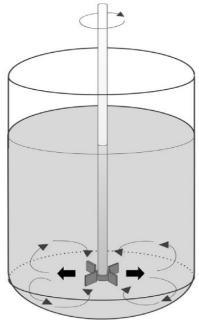
最小值

最大值

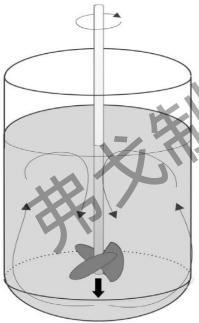
搅拌转速  $N$  (RPM)



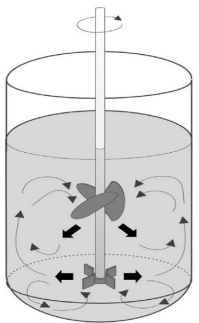
# 生物反应器中的混合和剪切



**径向流搅拌桨（涡轮搅拌桨, RT）**：能量输入高，传质效果好，剪切力大；桨区局部混合好，远离桨区混合弱



**轴向流（三斜叶桨, SBI）**：能量耗散低，剪切力小，体相混合好



**组合（RT/SBI）**：综合RT和SBI，实现较好的体相混合。

图片来自： Jossen V, et al. Stirred bioreactors: current state and developments, with special emphasis on biopharmaceutical production processes. In Book: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Bioprocesses, Bioreactors and Controls 2017, Pages 179-215

# 生物反应器中的混合和剪切

## 体积功率输入：P/V

- 广泛采用的放大参数；宏观的平均参数，可以直接测定；
- 太低导致混合不足，太高导致过量剪切；
- 台式反应器中平均P/V为50~200W/m<sup>3</sup>，规模越大，P/V越趋向于低值区；
- 需要注意在Fed-batch培养中，培养体积的变化。

## 桨尖速度：U<sub>tip</sub>

- 可以直接计算的参数；
- 小规模反应器U<sub>tip</sub>介于0.8~1.2m/s，大规模反应器U<sub>tip</sub>可增加~1.8 m/s；
- 搅拌桨尖区域剪切力最大，确保传质（如氧传质系数）的条件下，越小越好。

# 生物反应器中的混合和剪切

## 混合时间： $\theta_m$

- 可以直接测定，也可以经验公式计算；
- 小规模反应器 $\theta_m$ 介于8~12s，大规模反应器可达到100s；
- 确保无剪切损伤的条件下，越小越好，利于传质。

## 雷诺数：Re

- 经验公式计算，反映流体流动状态的无因次数；
- 综合了流体（培养基）的物理性质、操作参数（搅拌转速）和结构参数（搅拌桨的直径）。

## 生物反应器中氧传质系数 $K_La$

- 氧是细胞培养中最重要的限制性营养物
- 测量 $K_La$ 是反应器的设计和放大关键，动物细胞的 $K_La$ 可以达到 $80h^{-1}$ ，微生物细胞发酵则达到 $1000h^{-1}$
- 氧的利用经过：
  - 气相→液相的传递
  - 液相→胞内转运
  - 胞内利用（生长、维持和产物合成）
- 气液传质的影响因素
  - 能量输入及耗散（搅拌速度）
  - 培养液理化特征（粘度，密度）
  - 反应器的几何结构（搅拌桨型、数量和尺寸，鼓泡器的孔径）
  - 生物量（OUR随生长而增加）

## 气泡损伤

- 细胞比预期更耐受剪切力（如无鼓泡下700 RPM也不能导致细胞损伤），一旦鼓泡，损伤明显；
- 能量耗散对汽包损伤的

能量耗散增加，气泡直径下降，气泡的聚并下降，将更多的细胞带入液面上方的泡沫层；但也能增加气泡碰撞的几率，有利于气泡的聚并。

直径 $d_B < 1\text{mm}$ 的气泡趋向于具有稳定的界面，增加能量输入不能促进聚并。

- 高气体流速的过度鼓泡产生高剪切力，可在液相主体（如鼓泡器附近）导致细胞损伤；
- 需要根据细胞株的特点选择合适孔径的气体分布器和气体流量；
- 高耗氧，剪切敏感的细胞高密度培养过程尤其要注意气泡的损伤作用，如昆虫细胞培养。

## 生物反应器中CO<sub>2</sub>浓度控制

- CO<sub>2</sub>是合成DNA组份的原料，也是耗氧代谢的副产物，太低或太高对生长都不利；
- 气相中，高CO<sub>2</sub>分压（220mbar）降低细胞生长33~52% 和产物表达40~56%，最合适的pCO<sub>2</sub>为53~67mbar；
- 气相CO<sub>2</sub>分压影响培养液的pH和渗透压；
- CO<sub>2</sub>的溶解度高于O<sub>2</sub>，需要选择合理的罐压。

# 总体上

- 反应器的设计、放大和操作需要综合考虑到多个参数；基于单一参数的放大很难达到理想预期，多参数的整合寻求综合的最优区间是成功的关键；
- 这些参数的计算及放大原则已应用多年，最近几十年来没有出现新的放大理念；实践表明，目前的放大策略已能满足动物细胞大规模要求（up to 25m<sup>3</sup>）；
- 近年来报道的计算流体力学应用于反应器设计和放大，或许能够提升反应器放大效率和效能，但是尚需不少工作；

## 生物反应器的应用规模

- 动物细胞培养用生物反应器：25m<sup>3</sup>
- 微生物发酵罐：100m<sup>3</sup>
- 利用生物反应器生产的药物占有所有药物市场销售额的50%左右



# 一次性生物反应器

最近20年出现，常用于R&D。

## 刚性的一次性反应器

聚碳酸酯或聚苯乙烯为材质；

体积规模相对较小，8mL~75L；

小规模矩阵式反应器可以应用于细胞株的克隆筛选和评估。

## 柔性的一次性反应器

三层结构：聚乙烯或乙烯醋酸乙烯酯的内层、阻气性膜的中间层和外层；

规模较大：4.5L~2000L。

反应器的结构与传统的生物反应器并无本质区别，也遵循一般的放大理念。

# 一次性反应器的结构和性能特征

- H/D介于1.5:1~2.2:1
- 通气量为0.01~0.2vvm时Kla 为3~80h<sup>-1</sup>
- 平均功率输入为310W/m<sup>3</sup>
- 双层夹套控制温度
- 尾气使用过滤加热器，而不是冷凝
- 刚性的一次性反应器与传统的搅拌罐反应器非常接近
- Smart Vessel一次性反应器中采用了轴向和径向流组合的搅拌桨。其他的一次性刚性反应器则采用了上搅拌的轴向流桨叶
- 搅拌轴可以中心垂直安装，也可以在底部偏心安装。

# 国内生物反应器市场的发展现状

- 进步显著，成绩斐然；
- 仍有较大的提升和发展空间；
  - “适用性”向“合规性+适用性”发展
  - “经济性”向“性能+稳定性”发展
  - “重在硬件”向“注重软件”发展
- 细节决定成败
  - 执行标准 材料要符合FDA的规定，内表面包括管道等必须抛光，粗糙度不得超过0.8um
  - 严格的配件评估和选择
  - 长周期的稳定性评价
- 良性有序的竞争有助于整个行业的发展和进步



感谢您的聆听!

精工为匠 · 逐玉成器 · 守药之洁 · 循诺以诚