



洁维生物
JEWELBIO

动物细胞培养反应器的 设计与放大

BY 陈柏林

上海洁维生物工程有限公司

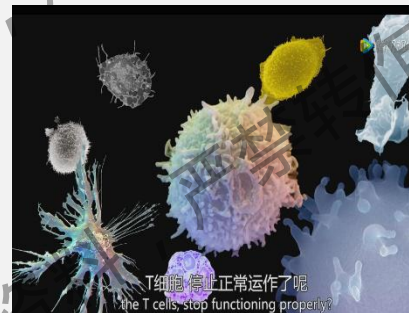
精工为匠 · 逐玉成器 · 守药之洁 · 臻诺以诚

目录

CONTENTS

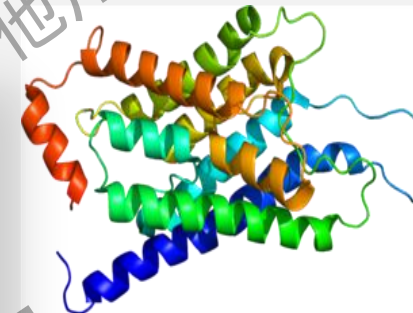
- 1 生物反应器简介及设计难点
- 2 反应器的部件组成和几何结构
- 3 放大策略（新的放大理念？）
- 4 反应器应用规模
- 5 一次性反应器

为什么要培养细胞——生命科学研究和生产的基本方法



生命科学研究

独立的完整生命体



工业生产

抗体、疫苗、蛋白等等

主要采用细胞培养生产的药物



单克隆抗体、部分重组蛋白（EPO等）——CHO细胞为主
无血清悬浮培养



病毒类疫苗生产——VERO, 二倍体、293等细胞
贴壁培养/悬浮培养



细胞治疗——溶瘤病毒、腺病毒载体；
自体细胞培养；干细胞培养等等

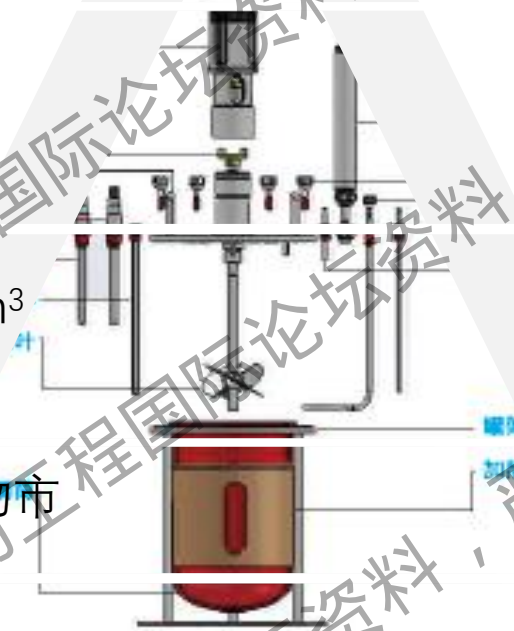


RNA药物等——细胞作为培养皿

生物反应器的应用规模

生物反应器在不同应用中规模不同;

- 不同动物细胞培养用生物反应器: 25m³
- 微生物发酵罐: 100m³
- 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



细胞治疗

较小规模: 通常<100L;
较为标准型。

疫苗生产

中等规模: 通常~几百升
~1000L: 定制化/标准型

抗体药物及重组蛋白等

大规模: 目前最大的细胞培养反应器可达25000L, 在罗氏等企业应用, 国内最大为5000L (赛多利斯); 定制化

产品背景：生物反应器是疫苗和抗体生产的核心设备

- 利用生物反应器生产的药物销售额占有所有药物销售额的50%；
- 生物药物种类占比30%，但销售额占比70%；
- 生物反应器在生产工艺中负责制造“原液”，属于核心价值的创造端；
- 目前国产设备微生物发酵罐已经成熟；动物细胞生物反应器刚刚起步；
- 依托细胞培养的制药工艺发展方兴未艾。

产品背景：生物制药（复杂注射剂）领域的市场机遇

市场机会——生物制药主要市场规模

未来5年PD1占到肿瘤市场的10%。

肿瘤Oncology是最人的细分市场
2022年将达到1927亿美元销售，占全球市场份额的17.5%。

到2022年，前五大Top5肿瘤药物将分别是
Celgene公司的免疫调节剂Revlimid、BMS公司的PD1抗体Opdivo、Merck公司的PD1抗体Keytruda、AbbVie公司的BTK抑制剂Imbruvica、Pfizer公司的CDK抑制剂Ibrance。

糖尿病Anti-diabetics是第二大细分市场

2022年将达到579亿美元销售，占全球市场份额的5.3%

风湿病Anti-rheumatics是第三大细分市场

2022年将达到554亿美元销售，占全球市场份额的5.0%。

抗病毒Anti-virus是第四大细分市场

2022年将达到428亿美元销售，占全球市场份额的3.9%，为负增长

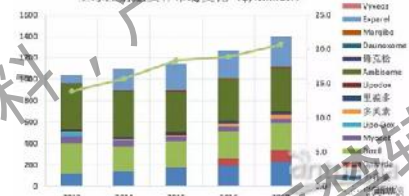
疫苗Vaccines是第五大细分市场

2022年将达到333亿美元销售，占全球市场份额的3.1%。

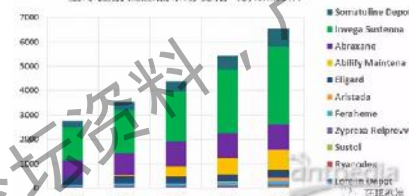
2017年到2022年预计有1940亿美元的医药市场面临专利悬崖patent cliff的挑战，主要由于生物仿制药biosimilar引起

市场机会——特殊注射剂产品仿制药仍未大量国产化

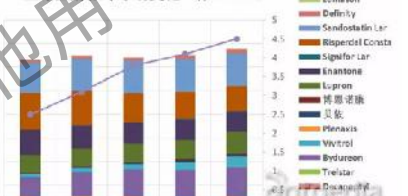
全球注射剂液体市场变化 (\$, Million)



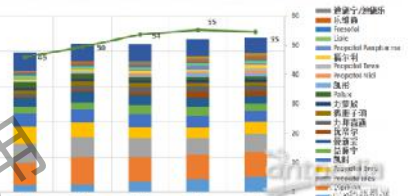
全球注射剂混悬液市场变化 (\$, Million)



全球注射剂微球市场变化 (\$, Million)



全球注射剂微球市场变化 (\$, Million)



市场机会——注射剂一致性评价

5月14日，国家药监局发布开展化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价工作的公告，CDE也配套发布了《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》、《化学药品注射剂（特殊注射剂）仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》、《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价申报资料要求》，这标志着**注射剂一致性评价**正式启动。

对于配液系统的要求会进一步提高。

市场机会——中国制药机械的发展风口



“推动制造业高质量发展”

根据2019年七大重点工作的部署，“推动制造业高质量发展”这一项被列为关键任务。

在此背景下，我国制药机械设备行业也亟待从制药机械大同走向制药机械强国，增强制药机械设备技术的创新能力，打破依赖进口设备、进口技术的高而，龙头企业可以采取校企、企业和企业合作的形式进行技术探讨和交流，推动设备创新和工艺升级，中小型企业可以抓住政策支持机遇，从单纯的仿制、重复、低水平生产转向高质量生产。

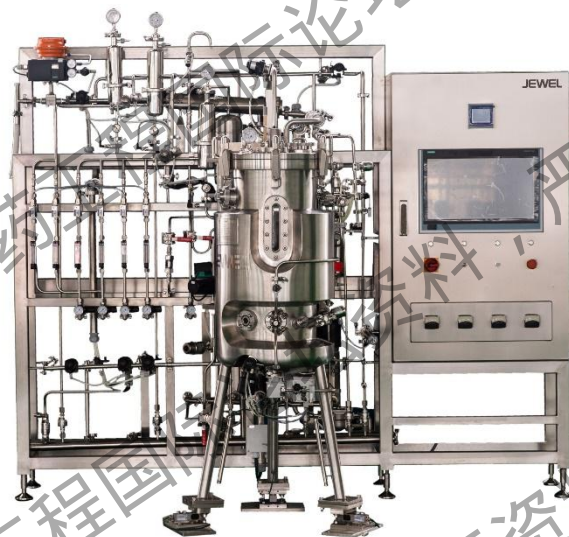
技术难点之一：工艺放大

工艺放大-将工艺从实验室规模转移至大规模反应器

实验室规模
摇瓶,
转瓶,
1-20L反应器

中试规模
50L,
200L,
2000L

生产规模
5000L,
20000L



技术难点：工艺和工程的结合；实际放大无法线性；

- 几十个工艺参数互相影响；合格工艺窗口狭窄且难于找到；
- 细胞的分裂扩增导致工艺条件是无法恒定的；对应的设备工作参数的调节需要精确到秒；
- 实验室数据和中试放大数据差异巨大；指导意义不强；
- 工艺必须自始至终精确控制，稍有闪失就会导致培养失败；
- 培养物料昂贵；
- 培养成功后预期销售金额巨大；一旦失败，预期市场损失也巨大。
- 必须是优秀且完整的硬件软件结合，持续精确和高度敏捷的控制响应。



目标状态：需要通过设备硬件及自控，实现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。



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。这是生产者最担心的因素。



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；这是生产者追求的目标。



规模放大：基于几何相似原则；
工艺放大：一是试错成本，费时且成本高昂，二是难点在于根据何种放大原则来确定工艺参数？

如何实现工艺放大

如何实现工艺放大：

- 工艺放大定义及目标
- 工艺放大参数
- 反应器硬件设计需求及控制参数设计空间

设备相关
确认和控制主要的参数
以及操作空间

制剂相关
确认和控制主要的
成分以及变量

生产和工艺相关
开发、评估和验证
工艺步骤和控制手段

GMP相关
文件相关
根据法规要求记录和报告

摘自徐卫涛老师课件

如何实现工艺放大

生物因素	化学因素	物理因素
传代次数	pH调节试剂	罐体外形
突变概率	培养基质量	通气
易污染	工艺水质量	搅拌
易聚集	碳水化合物（糖）浓度	培养基状态
筛选压力	氮源浓度	温度控制
	磷酸盐浓度	混合
		表面张力引起的泡沫

摘自徐卫涛老师课件

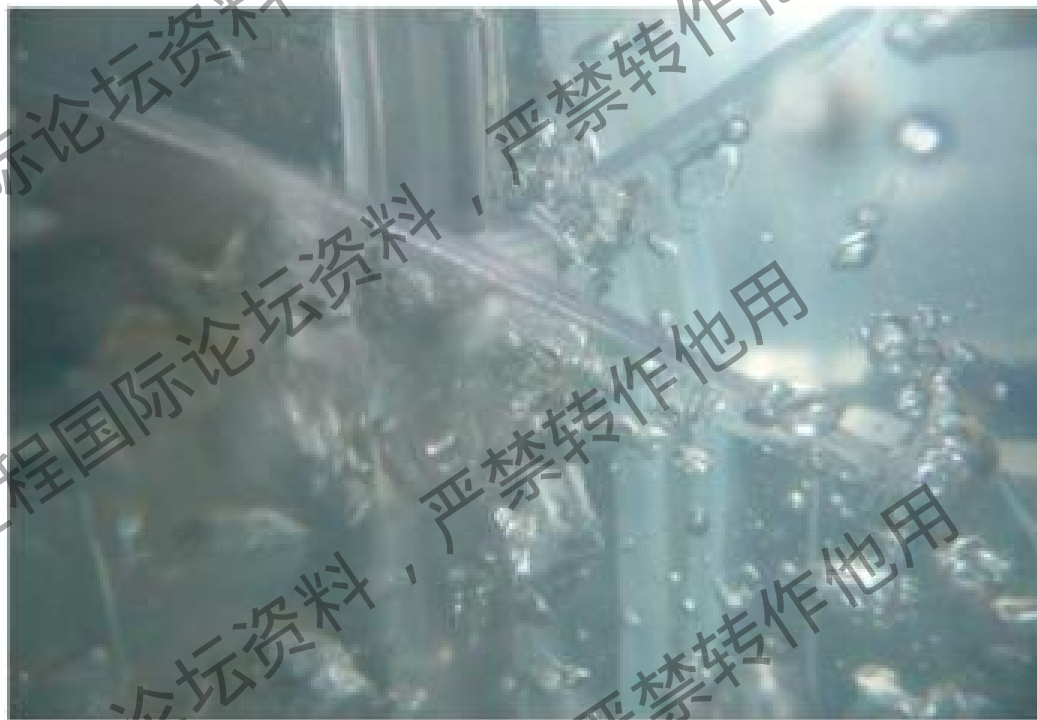
工艺放大过程的主要工艺参数

通气相关

- ▶ O₂供应
- ▶ CO₂去除
- ▶ H₂O蒸发
- ▶ 泡沫控制

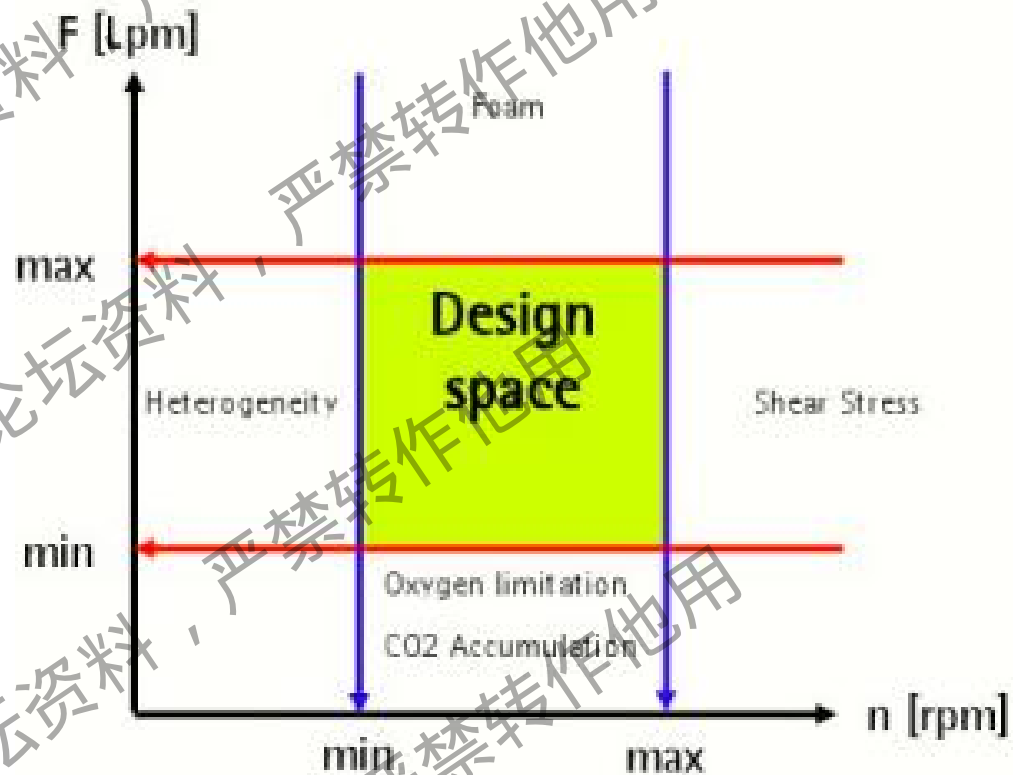
搅拌相关

- ▶ 分散
- ▶ 均质
- ▶ 剪切力
- ▶ 悬浮
- ▶ P/V



对应工艺参数的控制参数设计空间

- 搅拌 n [rpm]
 - 叶尖速率 u [m/s]
 - 非通气条件下单位体积的输入功率 P/V [W/m³]
 - 剪切率 γ [1/s]
- 通气速率 F [L/min]
 - 气体体积流速 v_{vm} [Lpm/L]
 - 表观通气速率 v_s [m/s]
 - 氧气传质系数 k_{La} -value[1/h]



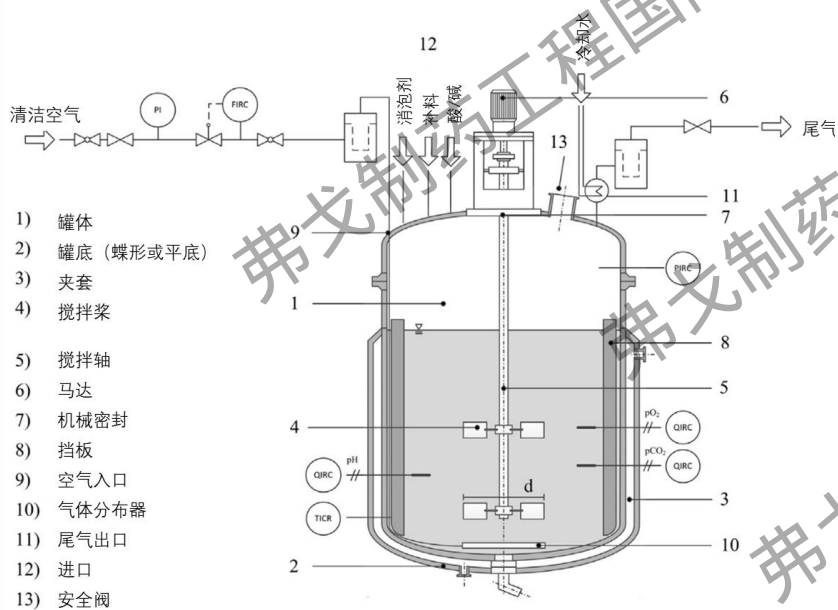
摘自徐卫涛老师课件

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。

反应器的部件组成和几何结构

动物细胞培养反应器的常见结构



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
搅拌桨	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
气体分布器	安装于罐体的底部，底层搅拌桨的下方
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）

反应器的部件组成和几何结构

动物细胞培养反应器的结构尺寸

高径比: $H/D \sim 2:1$

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 20m^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；

放大策略

- **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。

放大策略

放大原则

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	$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})$
θ _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	$Q_g = V_{gas}/V \text{ (vvm)}$
V _{apG}	表观通气速率	$V_{apG} = V_{gas}/H$

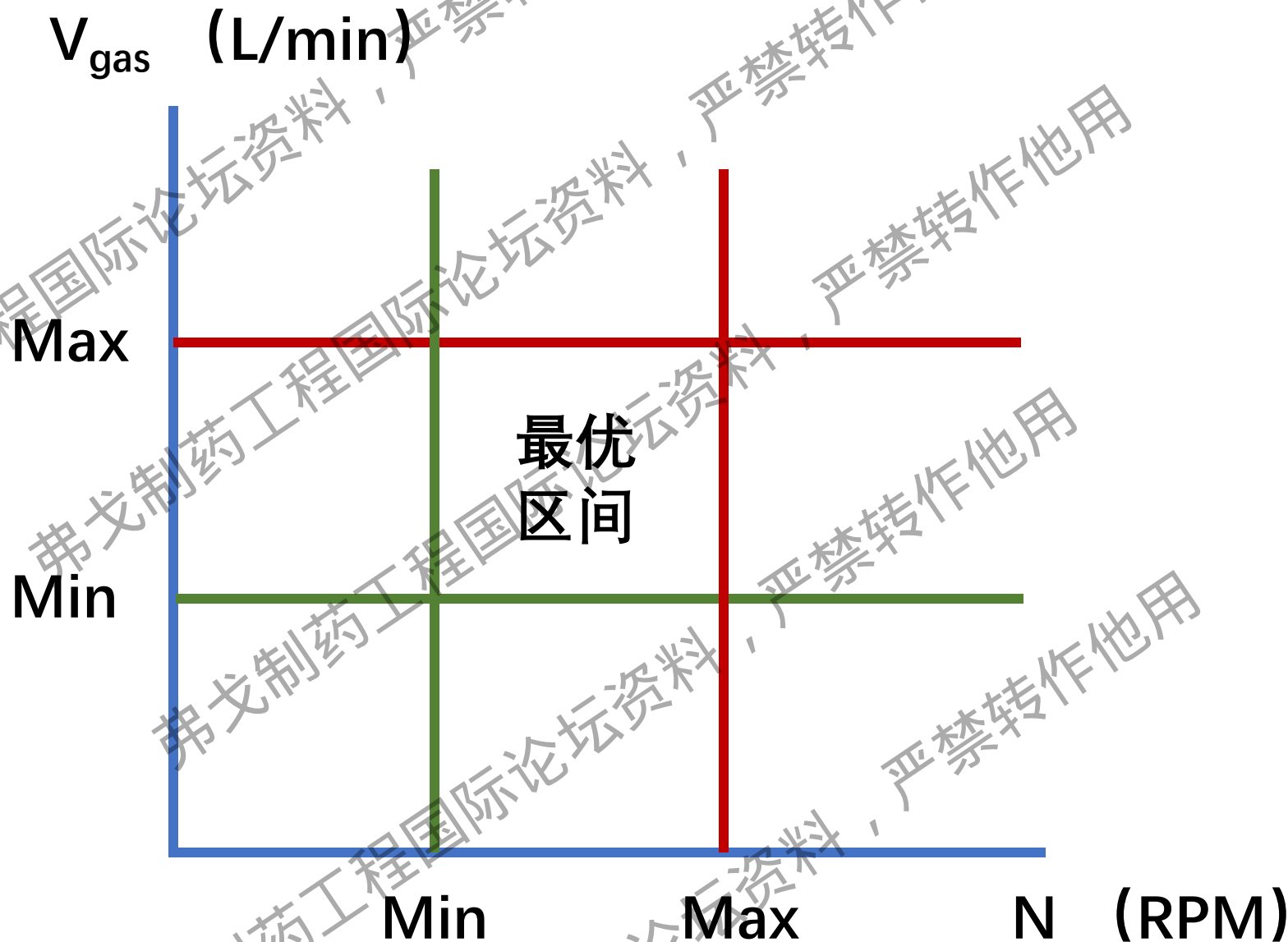


搅拌转速

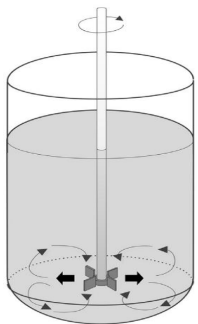


通气流量

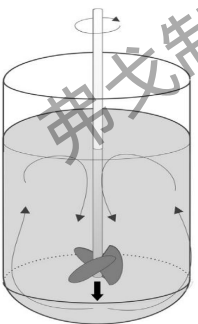
放大策略



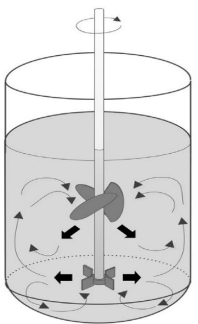
生物反应器中的混合和剪切



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。

放大策略

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/m³，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_{tip}

- 可以直接计算的参数；
- 小规模反应器U_{tip}介于0.8~1.2m/s，大规模反应器U_{tip}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。

放大策略

混合时间： θ_m

- 可以直接测定，也可以经验公式计算；
- 小规模反应器 θ_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）。

- 氧溶解度低是细胞培养中最重要的限制性营养物
- 测量和预测反应器的 K_La 是反应器的设计操作和放大关键
- 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）

放大策略

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \text{OTR} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2})$$

- ▶ 界面面积 a 依赖于体积分数 α_g 和气泡大小，受能量耗散鼓泡器孔径大小的影响

能量耗散增加，气泡直径下降，气泡的聚并下降；

能量耗散增加，气泡碰撞的几率增加则有利于气泡的聚并。

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

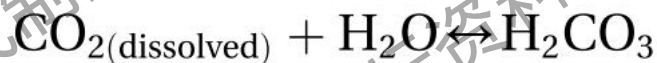
- ▶ 过度鼓泡（大气泡直径和高气体流速）产生高剪切力，破碎产生的剪切力导致细胞损伤，影响细胞的生长和降低产物表达
- ▶ 高耗氧，剪切敏感的细胞高密度培养过程尤其要注意气泡的损伤作用，如昆虫细胞培养
- ▶ 动物细胞的最高 $K_L a$ 可以达到 80h^{-1} ，微生物细胞发酵则可以达到 1000h^{-1}

生物反应器中CO₂浓度控制

- CO₂是合成DNA组份嘌呤和嘧啶的原料，耗氧代谢的副产物，太低或太高对生长都不利；
- 动物细胞培养基采用CO₂/HCO₃作为缓冲系统，该缓冲系统取决于培养基中dCO₂；

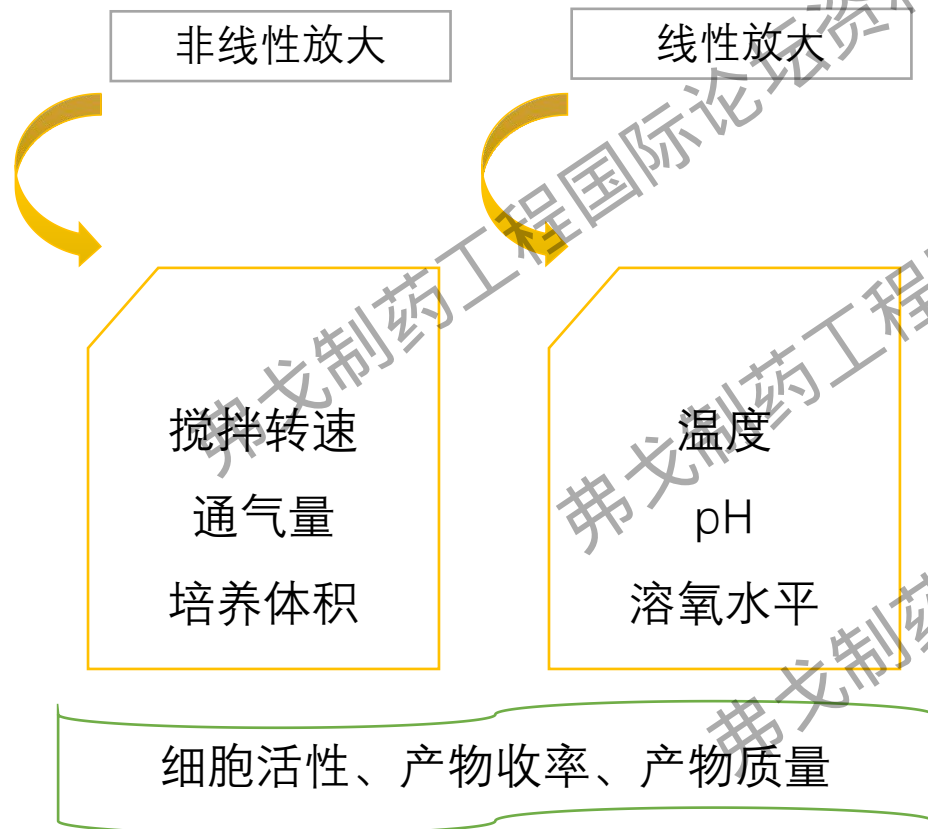


$$[\text{CO}_2]_{\text{dissolved}} = \frac{p\text{CO}_2}{k_{\text{H}}}$$



- 气相CO₂分压影响培养液的pH和渗透压；
- 高CO₂分压（220mbar）降低细胞生长33~52% 和产物表达40~56%，最合适的pCO₂为53~67mbar；
- 合理的罐压选择。

放大策略



摘自徐卫涛老师课件

动物细胞培养反应器放大原则

放大原则	参数	经验公式
搅拌相关	氧气传质系数 (KLa)	$KLa = C(P_g / V)^{\alpha}(v_s)^{\beta}$ $N_2 = N_1(d_1 / d_2)^{1/4}$ $P / V \approx N^3 / d^2$
	混合时间	
	非通气条件下单位体积的输入功率 (P/V)	
通气相关	叶尖速率	$N_2 = N_1(d_1 / d_2)$ $N_2 = N_1(d_1 / d_2)^2$
	雷诺数 (N_{RE})	
	气体体积流速 (VVM)	
尺寸相关	表观通气速率 (v_s)	$N_2 = N_1(d_1 / d_2)^2$
	高径比	

注: C、 α 、 β : 常数; P_g : 通气条件下功率输入; P: 非通气条件下功率输入; V: 工作体积; v_s : 表观通气速率; N_1 : 放大前搅拌转速; N_2 : 放大后搅拌转速; d_1 : 放大前桨叶直径; d_2 : 放大后桨叶直径; N : 搅拌转速; d: 桨叶直径; Q_{gas} : 气体体积流速; A_v : 反应器横截面积。

参数	定义	放大因子	重要性
混合时间	反应器内物料及介质形成均匀环境所需的总时间	$N_2 = N_1 (D_1/D_2)^{1/4}$ N ₂ 放大后搅拌速度 N ₁ 放大前搅拌速度 D ₁ 放大前桨叶直径 D ₂ 放大后桨叶直径	为保证反应器内部能在可控的时间内被搅拌均匀
非通气条件下单位体积的输入功率 (P/V)	通过搅拌轴和叶轮传递到单位体积细胞培养物中的能量	$\frac{P}{V} = \frac{\rho \cdot n^3 \cdot d^5}{V}$ P-输入功率; V-反应器体积 n-搅拌转速; d-桨叶直径 ρ-密度	哺乳动物的细胞无法承受培养液中大量的能量, 因为会产生小漩涡, 从而剪切脆弱的细胞膜。
叶尖速率	与叶轮通过细胞培养液时产生的剪切速率有关	$N_2 = N_1 (D_1/D_2)$ N ₂ 放大后搅拌速度 N ₁ 放大前搅拌速度 D ₁ 放大前桨叶直径 D ₂ 放大后桨叶直径	高剪切率会导致细胞膜撕裂和细胞死亡。如果尝试按照恒定的叶尖速率放大, P/V和混合时间将会减小。
气体体积流速 (VVM)	指在反应器的单位体积内每分钟的气流量 (通常以标准升每分钟计算)	气流的体积/时间	必须确保有足够的氧气供应给细胞
表观通气速率(Vs)	罐内单位横截面积的VVM	$V_s = Q_{gas}/A_v$ V _s -表观通气速率 Q _{gas} -气体体积流速 A _v -罐内水平截面的面积	提升V _s 将会增加泡沫的产生, 降低P/V, 提高氧气的传输
k _L a	氧气传质系数	$k_L a = \frac{P}{V} \times v_s^c$ v _s -表观通气速率, P-功率 v-体积; a,b,c-因子系数	可提高氧气的传输

关键技术：基于实验数据和工程计算的设计



低剪切VS高密度培养的营养搅拌需求——使用流场计算等工具解决



二氧化碳代谢及pH中和在大规模反应器中的调节技术，例如dCO₂分压控制。



懂得细胞的密度升高时，及时补充营养并保持均匀性。例如如何测量和预测反应器的K_{la}系数。

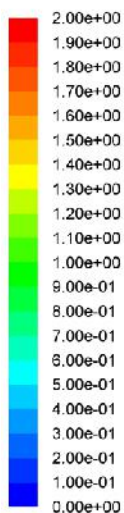
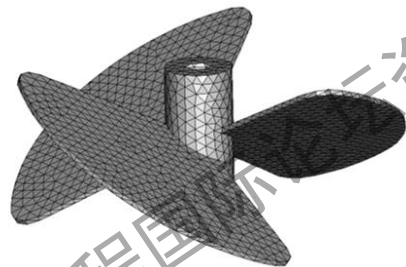
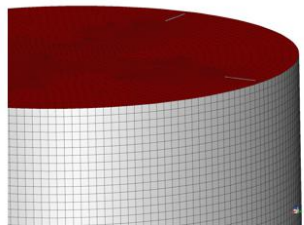


如何在大规模的反应器中持续保持细胞活性。例如鼓泡器的设计应用。

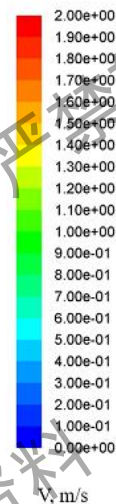
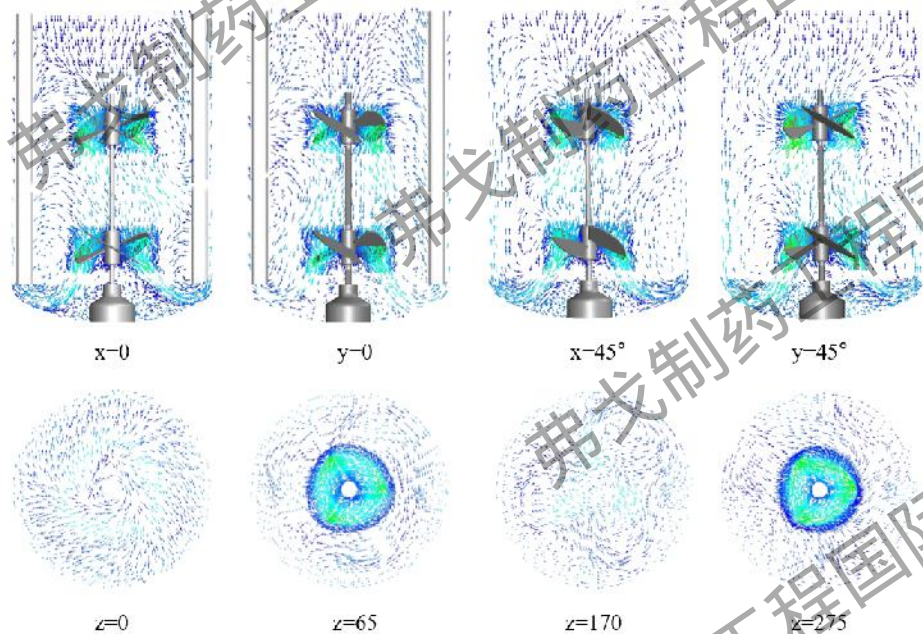
关键技术：

- 对客户工艺的深刻理解；
- 流场分析和基于数据的搅拌选型；
- 精密繁琐的计算基础上的工艺参数确定；
- 严格苛刻的配件评估和选择；
- 特殊且敏捷高效的自控程序编程。

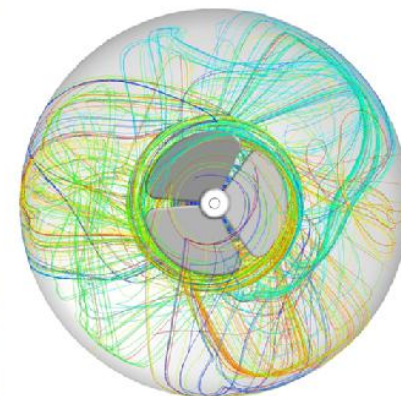
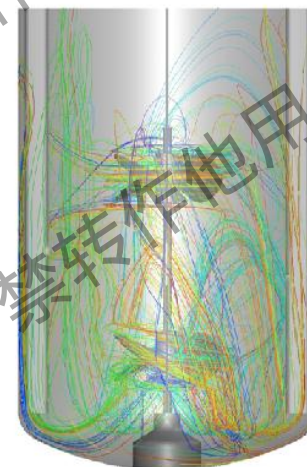
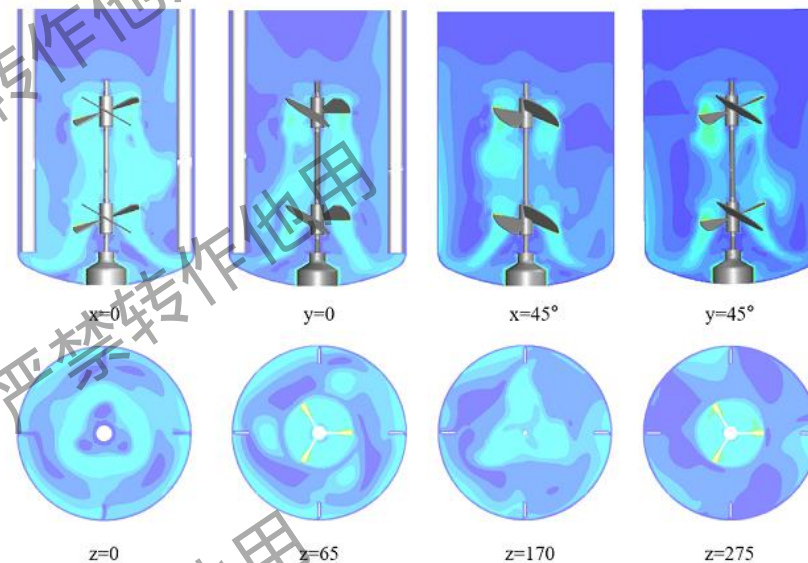
关键技术示例：流场分析



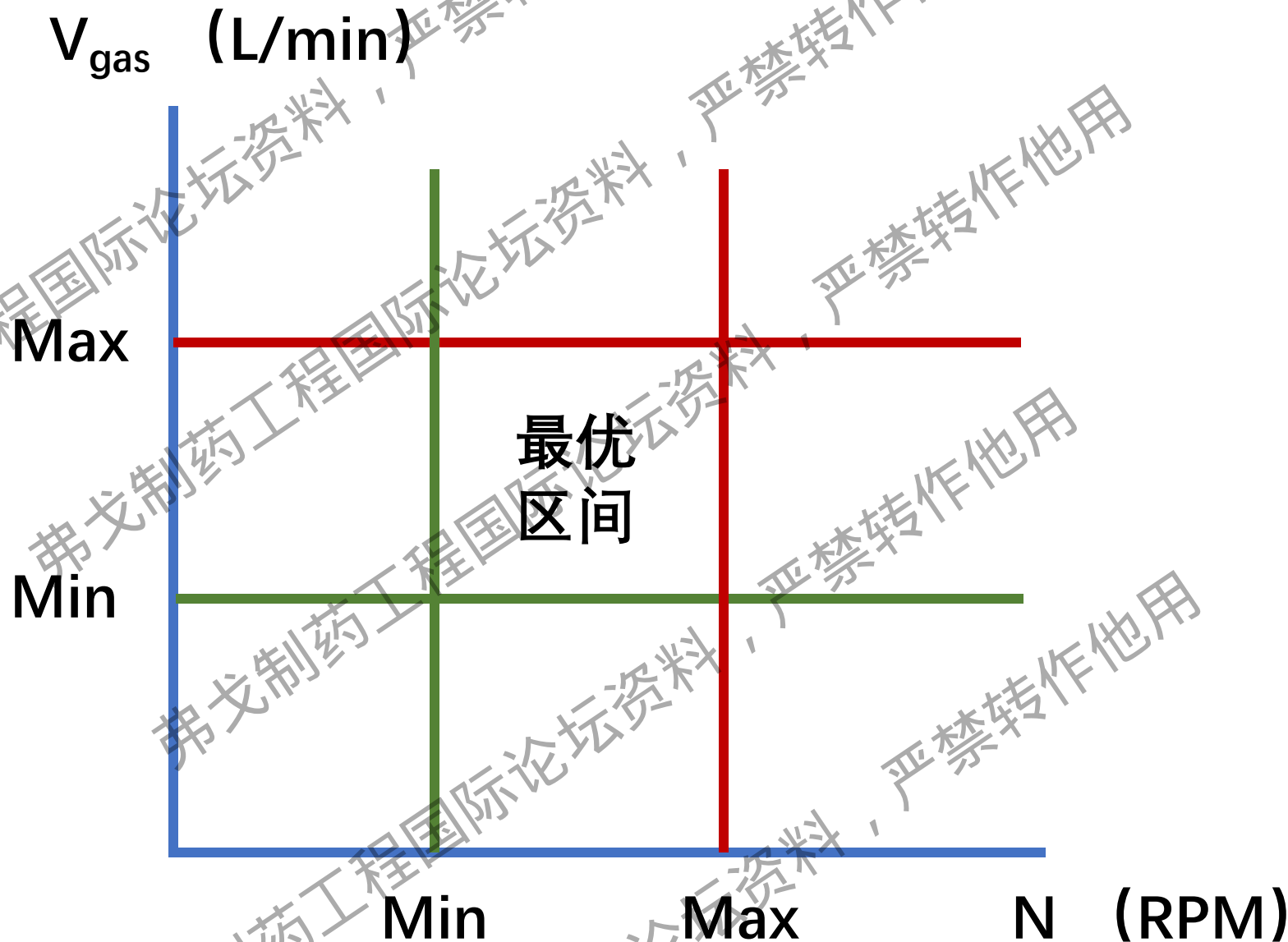
V, m/s



V, m/s



放大策略



放大策略

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则是成功的关键；
- 这些参数的计算及放大原则已应用多年，总体上并没有出现更新的放大理念；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 25m³）；
- 近年来，计算流体力学能够提升反应器放大效率和效能，但是试验和数据计算、及其统计分析尚需不少工作。

反应器应用规模

生物反应器的应用规模

- ▶ 动物细胞培养用生物反应器：25m³
- ▶ 微生物发酵罐：100m³
- ▶ 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

一次性反应器

一次性生物反应器

最近20年出现，总体结构与传统的生物反应器没有本质的差别

罐体种类	品牌	工作体积 (L)	应用	制造商
刚性	CellVessel 21 &23	0.25-75	哺乳动物细胞, 昆虫细胞	CerCell
	CellVessel 21 &23	0.25-1.0	微生物细胞	CerCell
	BactoVessel 25	2-75	微生物细胞	CerCell
	CelliGen BLU 1c,5c,14c,50c	0.25-40	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 干细胞	Eppendorf
	CelliGen BLU 1f	0.25-1.25	微生物细胞	Eppendorf
	DASGIP parallel (BLU1c)	0.32-1.25	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 干细胞	Eppendorf
	DASGIP parallel (BLU1f)	0.32-1.25	微生物细胞	Eppendorf
	Hexascreen	0.01-0.015	哺乳动物细胞	HexaScreen
	Univessel 5U 2L	0.6-2.0	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 植物细胞	Sartorius
	Ambr 15	0.01-0.015	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 微生物细胞	Sartorius
	Ambr 250	0.1-0.25	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 微生物细胞	Sartorius
	2 mag bioREACTOR	0.008-0.015	微生物细胞	2mag
	Mobius CellReady 3 L	1-2.4	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 干细胞	Merck Millipore
	Smart Vessel	0.5-2.2	哺乳动物、昆虫、微生物和植物细胞	Finesse Solutions

聚碳酸酯或聚苯乙烯为材质 药之洁·维诺以诚

一次性反应器

罐体种类	品牌	工作体积 (L)	应用	制造商
柔性袋子	X cellerex XDR	4.5-2000	哺乳动物细胞和昆虫细胞	GE
	X cellerex XDR-MO	10-500	微生物细胞	GE
	Mobius CellReady	10-2000	哺乳动物细胞和昆虫细胞	Merck Millipore
	Allergro STR	60-2000	哺乳动物细胞和昆虫细胞	Pall Life
	RadReactor	8-960	哺乳动物细胞和昆虫细胞	Pall life
	Biostat STR	12.5-2000	哺乳动物细胞, 昆虫细胞, 干细胞	Sartorius
	Hypeforma S.U.B	25-2000	哺乳动物细胞和昆虫细胞	Thermo
	Hyperforma S.U.F	6-300	微生物细胞	Thermo

三层，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。

一次性反应器主要应用于R&D，生产则多用传统的生物反应器

一次性反应器

一次性反应器的结构和性能特征

- 材质：三层不同的塑料组成
- H/D介于1.5:1~2.2:1
- 通气量为0.01~0.2vvm时Kla 为3~80h⁻¹
- 平均功率输入为310W/m³
- 双层夹套控制温度
- 尾气多见使用过滤加热器，少量冷凝；或同时采用这两种方式
- 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

案例

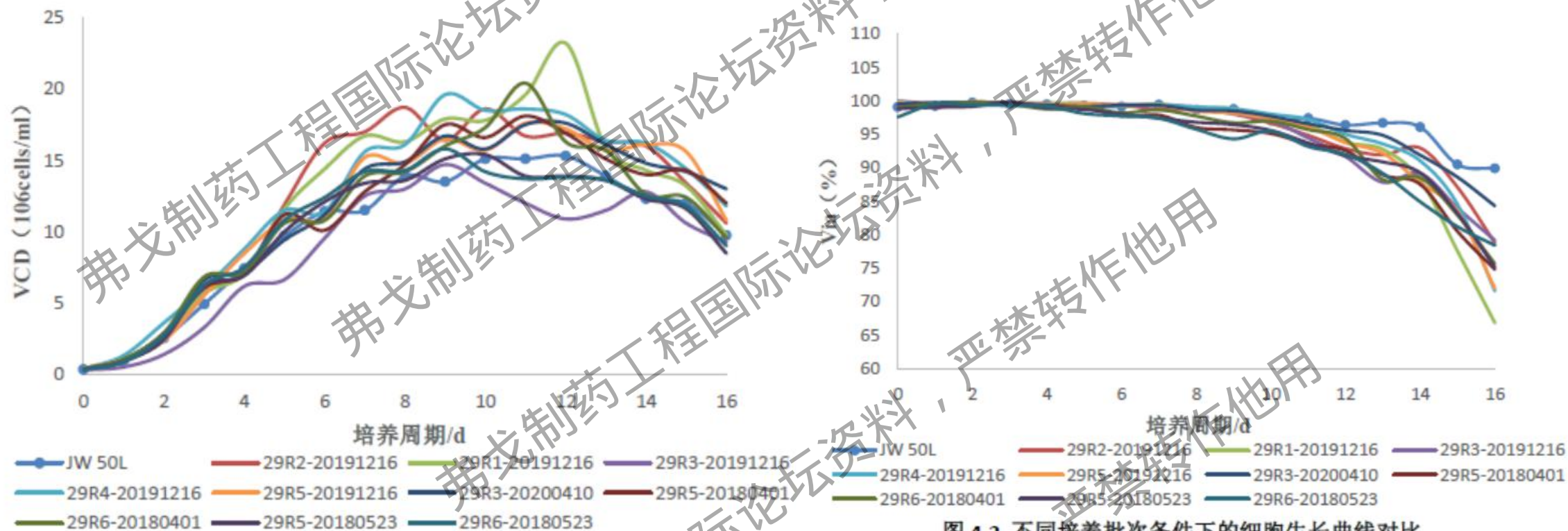


图 4-2 不同培养批次条件下的细胞生长曲线对比

案例

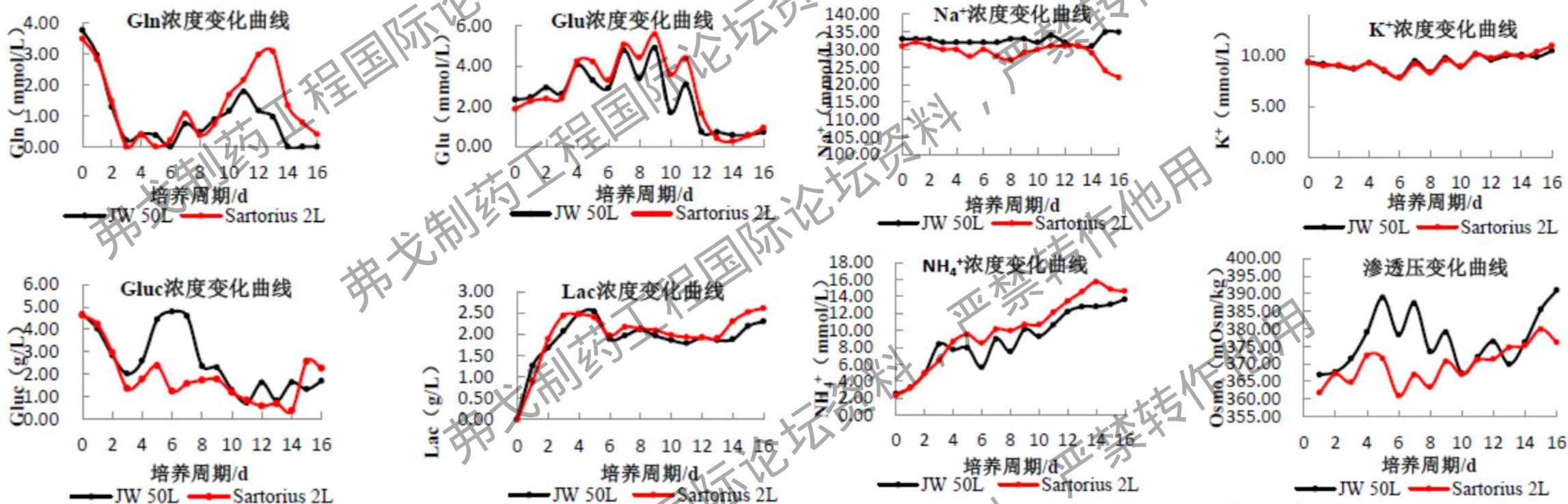


图 4-3 中试放大过程细胞代谢生化参数变化曲线对比

THANKS

精工为匠 · 逐玉成器 · 守药之洁 · 臻诺以诚