



Régulation automatisée du glucose



#07

Note
d'application

#08

#09

#10

#11

Auteurs :
Stuart Tindal, Sebastian Ruhl, Diana Hesse

Introduction

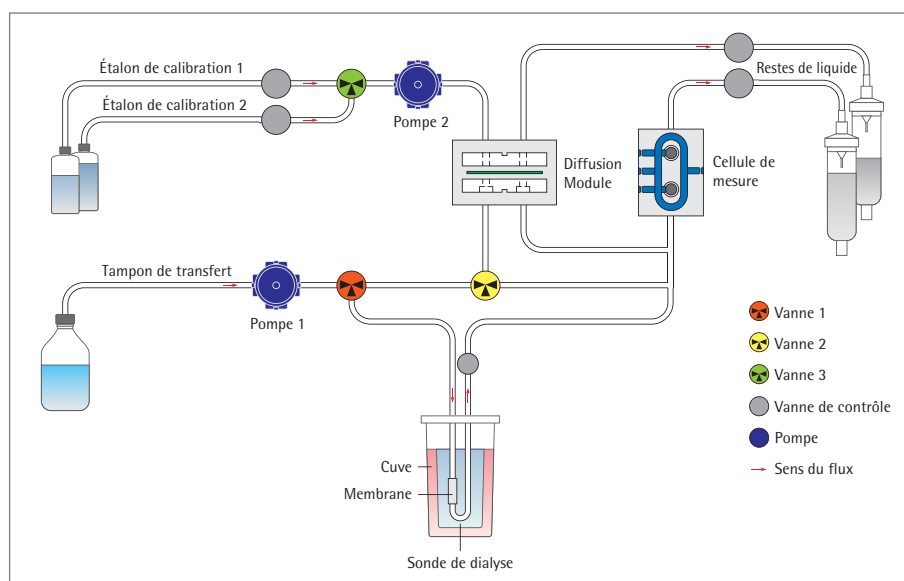
Un des objectifs du développement de bioprocédés upstream de cellules de mammifères consiste à fournir au secteur de la fabrication clinique un procédé robuste et sûr qui finalement produise assez de matière pour répondre aux besoins des études. Les équipes de développement de ces procédés sont de plus en plus appelées à faire plus mais en moins de temps. Par conséquent, les stratégies d'alimentation automatisées sont de plus en plus répandues puisqu'elles permettent de réduire les efforts de développement, mais également d'améliorer les performances des procédés et la cohérence des attributs du produit.

Le glucose est le principal composant de l'alimentation d'une culture cellulaire. Il sert de point de départ à tous les processus de croissance et d'énergie dans les cellules. En s'assurant que les cellules n'ont pas trop ou pas assez de glucose, on leur permet, de se développer rapidement et de maximiser la sécrétion du produit. Par ailleurs, il a été constaté qu'une concentration de glucose trop élevée a un effet sur le taux de glycosylation des protéines solubles secrétées. Le contrôle du glucose disponible permettrait donc d'améliorer la régularité des schémas de glycosylation sur les produits finaux et par conséquent d'améliorer la qualité.

Cette note d'application présente l'exemple détaillé d'une méthode qui permet de réguler l'alimentation du glucose. Le matériel et les méthodes montrent comment y parvenir à l'aide d'un appareil et d'un équipement de Sartorius Stedim Biotech. Nous proposons également une vue d'ensemble des résultats et un examen des données afin de souligner certains des principaux avantages qu'offre cette méthode quand on l'applique à d'autres procédés.

Matériel et méthodes

Le système de commande du bioréacteur était un BIOSTAT® B-DCU. Le BIOSTAT® B-DCU est un bioréacteur conçu pour l'optimisation et la caractérisation de procédés avancés et il est doté d'une option de régulateur de la concentration du glucose. L'intégration du BioPAT® Trace permet de contrôler le taux de glucose en temps réel en définissant une valeur de consigne du glucose dans le logiciel de commande BIOSTAT® B-DCU. Au cours des deux premiers essais, la concentration du glucose in situ a été maintenue par des alimentations intermittentes par bolus. Ensuite, le troisième essai a utilisé un régulateur de la valeur de consigne du glucose avec des réglages PID définis et une pompe péristaltique interne avec régulation de la vitesse.



Le BioPAT® Trace a été configuré pour mesurer le glucose et le lactate en mode dialyse avec une fréquence d'échantillonnage de 20 minutes. Il était réglé sur un protocole d'autocalibration entièrement automatisé au niveau de la fonction de l'onglet de l'échéancier. Chaque essai de 17 jours a utilisé 12 L de tampon de transfert, deux solutions de calibration (niveau élevé : 10 g/L de glucose ; niveau faible : 1 g/L de glucose) et un récipient de 10 L pour les déchets raccordé au set de tubes. La sonde de dialyse a été préparée, remplie et installée dans l'UniVessel® Glass 5 L avant la stérilisation, puis connectée au set de tubes BioPAT® Trace et amorcée pour l'analyse avant l'inoculation.

L'UniVessel® Glass 5 L était équipé de deux agitateurs à hélice à 3 pales pour une faible contrainte de cisaillement et une bonne homogénéisation du bouillon de culture cellulaire. Les pales étaient installées avec un angle de 30° et réglées pour un pompage descendant. Un diffuseur de gaz annulaire avec des orifices dirigés vers le haut a été utilisé pour tous les essais. De plus, la cuve était équipée de plusieurs ports d'alimentation, d'un capteur de pH classique, d'un capteur de pO₂, d'une sonde de dialyse, d'un condenseur et de filtres de gaz.

Pour évaluer l'intégration du BioPAT® Trace dans le BIOSTAT® B-DCU, on a utilisé un procédé fed batch de cellules CHO. La culture de 17 jours comprend une phase batch de 3 jours et une phase fed batch de 14 jours. Après l'inoculation avec $0,3 \times 10^6$ cellules/mL, le pic de densité des cellules viables (VCD) est habituellement atteint le 8^e jour avec $25 - 30 \times 10^6$ cellules/mL et une viabilité de 99 %. Après la phase de coloration au cours des 9 jours qui suivent, le VCD devrait être supérieur à 10×10^6 cellules/mL avec une viabilité de plus de 50 % au point de récolte.

L'alimentation par bolus à partir du 3^e jour consiste en un milieu d'alimentation A (FMA), un milieu d'alimentation B (FMB) et une solution de glucose fortement concentrée (400 g/L). La quantité de FMA et de FMB est constante pendant toute la phase fed batch. Le 7^e jour, il est en général nécessaire d'ajouter du glucose pour maintenir une concentration de glucose d'au moins 3 g/L dans le bouillon de culture cellulaire. Le processus d'alimentation est automatisé à l'aide de balances et de pompes connectées à l'unité de commande numérique (DCU) et une recette S88 dans le logiciel SCADA BioPAT® MFCS.

Les analyses représentaient une partie essentielle de cette évaluation. Des mesures de glucose et de lactate hors ligne ont notamment été effectuées avec le radiomètre ABL 800 basic. La VCD et la viabilité ont été analysées avec un Cedex HiRes.

En tout, trois essais différents ont été réalisés à l'aide des caractéristiques suivantes :

1. Contrôle
La technologie Trace a été utilisée uniquement pour contrôler la tendance en ligne du glucose pendant toute la culture.
2. La valeur en ligne remplace la mesure hors ligne
Un échantillon est prélevé chaque jour pendant la culture de cellules CHO. La valeur hors ligne du glucose est utilisée pour obtenir une certaine concentration de glucose dans le bioréacteur. Pendant le 2^e essai, la valeur en ligne du glucose est utilisée à la place de la valeur hors ligne pour la procédure d'alimentation.
3. Régulation du glucose
Pendant le troisième essai, la régulation du glucose à 6 g/L a été activée au bout de 6 jours. L'alimentation habituelle par bolus de FMA a été modifiée en alimentation continue afin de réduire les pics de concentration du glucose.

Schéma d'alimentation des essais 1 et 2 :

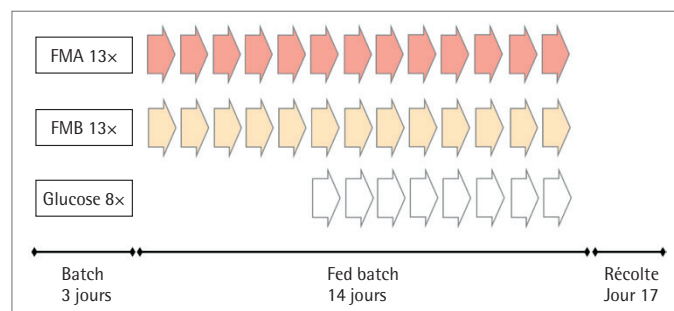


Illustration 1 : Schéma d'alimentation des essais 1 et 2

Le schéma d'alimentation était identique pour les essais 1 et 2. Aucun milieu n'a été ajouté à la culture pendant la phase batch. Le 3^e jour, une alimentation quotidienne par bolus de FMA et FMB a démarré. Une alimentation supplémentaire de glucose (400 g/L) a été démarrée quand le glucose est passé sous 6 g/L.

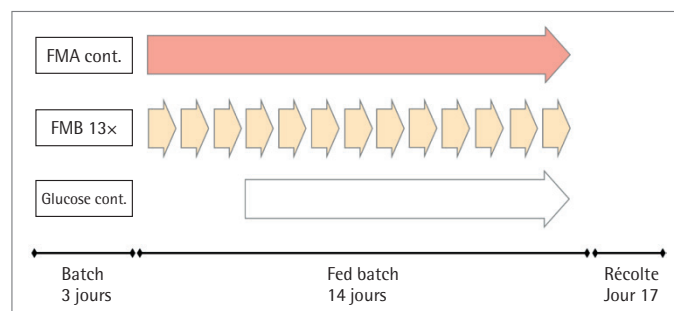


Illustration 2 : Schéma d'alimentation 3

Dans le 3^e essai, l'alimentation par bolus de FMA a été modifiée en alimentation continue pour supprimer les pics quotidiens de la concentration de glucose. Une fois que le glucose a atteint une concentration inférieure à 6 g/L, une alimentation régulée de solution de glucose (400 g/L) a été démarrée pour maintenir la concentration de glucose à 6 g/L.

Résultats et discussion

Les lots se sont déroulés de façon séquentielle sur les mêmes systèmes BIOSTAT® B-DCU et BioPAT® Trace. Les résultats sont indiqués sur les illustrations 3 et 4 pour démontrer la reproductibilité et la conformité des lots du processus (en comparaison avec le lot de référence historique). Le contrôle du glucose effectué par le BioPAT® Trace et la régulation de glucose en aval sont indiqués sur les illustrations 5-7.

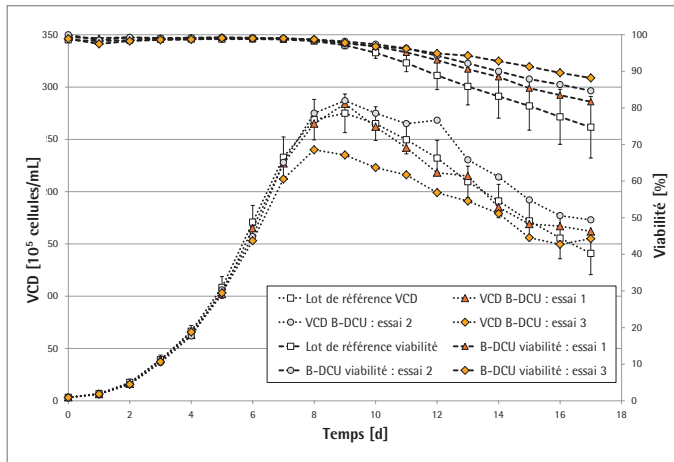


Illustration 3 : Essai de tendance VCD 1-3

Les essais 1 et 2 correspondent parfaitement à la tendance du lot de référence. En raison d'une modification générale du procédé (alimentation FMA continue), la tendance VCD de l'essai 3 présente un pic de VCD légèrement réduit. La VCD et la viabilité finales correspondent parfaitement aux valeurs du lot de référence pour tous les essais ou sont supérieures.

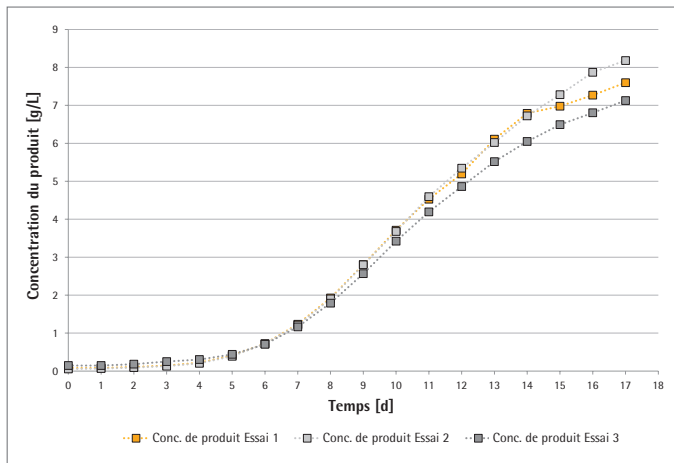


Illustration 4 : Tendance IgG

Une productivité comparable dans les trois essais a été démontrée par des mesures quotidiennes de la concentration du produit (concentration IgG, illustration 4). En raison d'une croissance cellulaire plus faible dans le troisième essai, on a obtenu une concentration de produit légèrement plus faible dans cet essai.

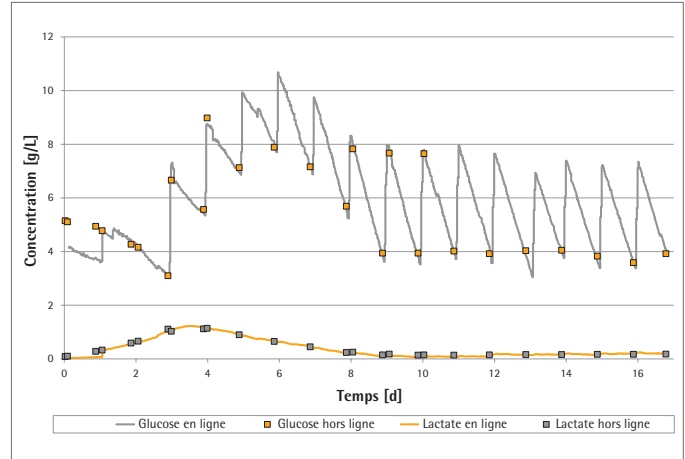


Illustration 5 : Tendance du glucose et du lactate, essai 1

Malgré un petit décalage au cours des 24 premières heures, les mesures en ligne et hors ligne du glucose et du lactate correspondent parfaitement pendant la culture.

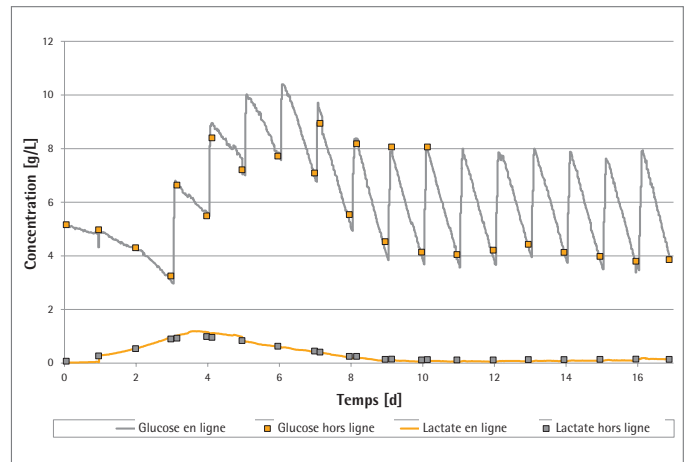


Illustration 6 : Tendance du glucose et du lactate, essai 2

Pour l'essai 2, les mesures en ligne et hors ligne du glucose et du lactate ont montré une bonne comparabilité.

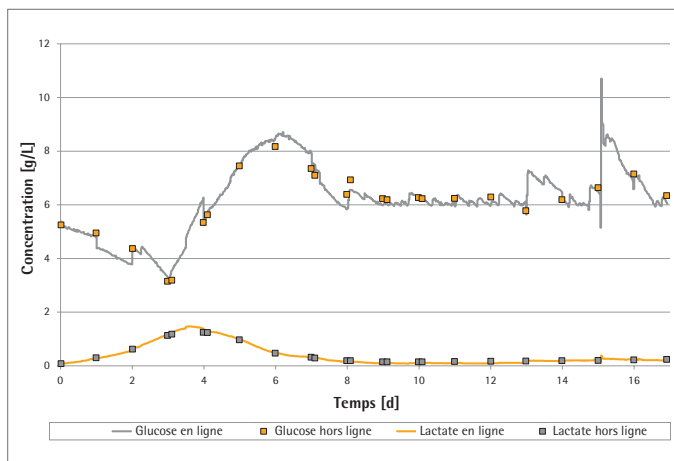


Illustration 7 : Tendence du glucose et du lactate, essai 3

Dans l'essai 3, les tendances en ligne et hors ligne du glucose et du lactate présentent une excellente comparabilité. Une recalibration qui n'était pas nécessaire (erreur opérationnelle) a été effectuée les jours 13 et 15.

Le passage du contrôle du glucose à la régulation du glucose exige un changement dans le procédé. Les effets d'une régulation plus stricte du glucose sont connus pour être bénéfiques pour les performances du procédé et la qualité du produit (référence An Zhang et al). Par conséquent, il n'était pas souhaitable de modifier un processus utilisant une technologie qui n'avait pas été testée et vérifiée.

Avant d'effectuer des modifications, il est donc en général nécessaire de se familiariser avec le système, d'avoir confiance dans les résultats de mesure (en comparaison avec le prélèvement hors ligne) et d'assurer la robustesse du dispositif. Les deux premiers essais du procédé montrent les capacités de contrôle à haute résolution du BIOSTAT® B-DCU et du BioPAT® Trace intégrés tandis que le troisième essai fait intervenir le régulateur de glucose. Les interactions générales de l'utilisateur avec le bioréacteur concernant le prélèvement de glucose sont supprimées. Cela signifie que le nombre d'heures de travail habituelles et le nombre d'heures de travail supplémentaires nécessaires pour maintenir le système BIOSTAT® B-DCU avec un taux de glucose régulé sont réduits et plus faciles à gérer. Le tableau 1 présente un résumé du gain de temps. De plus, toutes les opérations d'interaction de l'utilisateur avec le système ont été réalisées au cours des phases initiales de la configuration du BIOSTAT® B-DCU.

Tableau 1 : Relation des ressources de FTE par lot lors de l'utilisation de BioPAT® Trace pour glucose

Étapes du procédé	Heures
Configuration de la sonde et du système électronique Trace	2
Gain de temps pour le prélèvement d'échantillons	9 (18 × 0,5)
Gain de temps	7

Résumé et conclusion

L'intégration étape par étape de la technologie de régulation du glucose dans un procédé fed batch de cellules CHO a permis de maintenir une concentration de glucose continue de 6 (+/- 0,25) g/L dans le procédé.

L'intégration directe de la technologie BioPAT® Trace dans le BIOSTAT® B-DCU est totalement fonctionnelle et l'utilisation était conviviale, facile à déterminer et dynamiquement variable si nécessaire. Étant donné que Sartorius Stedim Biotech fournit la totalité du pack du système, la société gère le cycle de vie du régulateur de glucose à toutes les échelles du développement et de la fabrication commerciale. Cela garantit que les avantages découverts pendant le développement peuvent être transférés dans l'ensemble du cycle de vie du produit.

Perspectives

Des essais supplémentaires avec différentes concentrations de glucose automatiquement régulées seront effectués afin d'améliorer la concentration et les attributs de qualité du produit. De plus, le gain de temps pour l'opérateur (7 heures par lot) et le travail clair et faisable sont une étape importante permettant d'obtenir un bioréacteur qui n'exige pas d'interaction.

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