

XDR 200 MO 在大肠 杆菌质粒发酵中的应用



基于大肠杆菌在 5L 玻璃反应器中的发酵经验，以此在 XDR 200 MO 一次性反应器中进行 80 升以及 160 升的放大培养。在此我们使用 DH5 α 大肠杆菌来生产用于慢病毒包装的大小为 4180bp 的 pLP2 质粒。不同体积的发酵结果通过 OD₆₀₀、质粒产量、SC 比例来进行对比。

放大培养过程中使用 Setpoint Table 对补料流速进行程序化自动控制，使用 Lookup Table 将 DO 与搅拌、空气、氧气全自动关联。另外，XDR 200 MO 反应器的桨叶设计（上层Pitch轴流桨、下层Rushton桨）也为高密度菌体发酵培养提供有效的支持。我们的研究成果证实了XDR 200 MO 反应器对上游大肠杆菌培养的适用性，为基因治疗等行业的质粒生产提供有效手段。

介绍

基因治疗包括 mRNA 和 DNA 疫苗这些新兴疗法都会使用到质粒，这些质粒基本都是通过大肠杆菌发酵而得。一般而言，病毒载体和 mRNA 所需要的质粒生产规模为百升级别。一次性反应器快速的批间切换能力以及降低交叉污染风险的特性，更适用于多种质粒的快速放大生产。这篇文章的主要目的是建立质粒放大生产工艺，考察 XDR 200 MO 反应器在 160L 规模下质粒的放大生产性能，确认 XDR 200 与 5L 玻璃罐在质粒产量和 SC 比例方面是否具有可比性。

结果与讨论

5L 玻璃发酵罐中大肠杆菌发酵过程开发

5L 玻璃发酵罐的初始接种密度 OD₆₀₀ 为 0.02，初始培养体积 2.5L。在接种 8.7h 后，DO 值降低至设定值 30%，之后开启级联溶氧的空气和氧气的自动调节控制。初始的补料速率为 0.2 mL/min，之后每 1.5-2h 调节补料速率以维持菌体比生长速率在 0.06-0.08 h⁻¹。

生长曲线如图1所示，培养后期最高 OD₆₀₀ 达到 89.2。

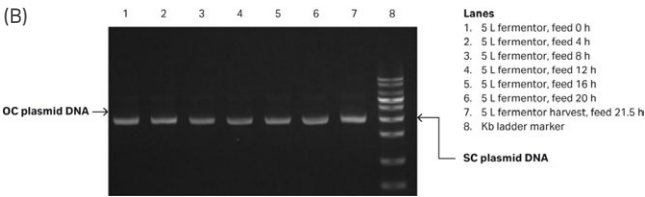
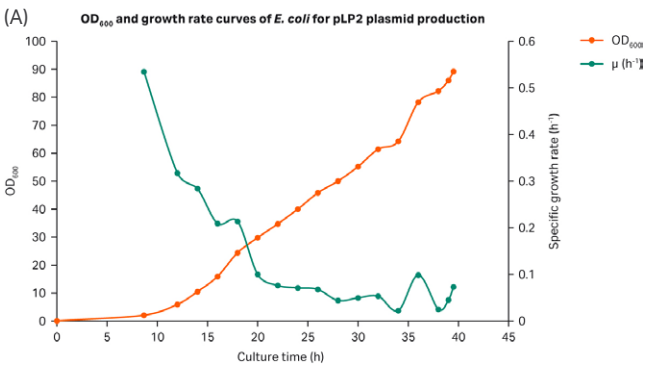


图1. (A) 5L 玻璃反应器的菌体生长 OD₆₀₀ 和比生长速率/h⁻¹。(B) 5L 玻璃反应器质粒的琼脂糖凝胶电泳结果

每4小时留样一次，并且储存于 -20℃ 冰箱中。样品检测之前先解冻，并且稀释至 1.0 至 1.5 OD 之间，通过分光光度法和琼脂糖凝胶电泳（见图1B）分析质粒产量和SC超螺旋比例。在琼脂糖凝胶电泳图片中，SC质粒为 3000 bp 标记物迁移，而开环环（OC）质粒为 4000 bp 标记物迁移，SC 比例为 92.2%。

大肠杆菌发酵放大至 XDR 200 MO 发酵罐，80L 体积

发酵过程放大至200L规模所使用的通气策略与5L反应器保持一致，采用相同的VVM，即每分钟通气量与培养体积的比例保持一致，最高VVM控制在0.2-0.3之间。初始接种密度为0.02 OD₆₀₀，初始体积为68 L。DO设定值30%，级联空气与氧气流速。当氧气流速达到9-10 Lpm，提高转速15rpm以维持DO。

在接种后的6.5小时，DO值第一次降低至30%，此时空气和氧气开启级联，以自动控制溶氧至30%。发酵18小时，DO突然上升至115%，这意味着反应器内营养物质的耗竭。此时开启补料，初始速率为5.6 mL/min，之后每1.5-2h调节补料速率，以维持菌体比生长速率在 0.06-0.08 h⁻¹。(图2)

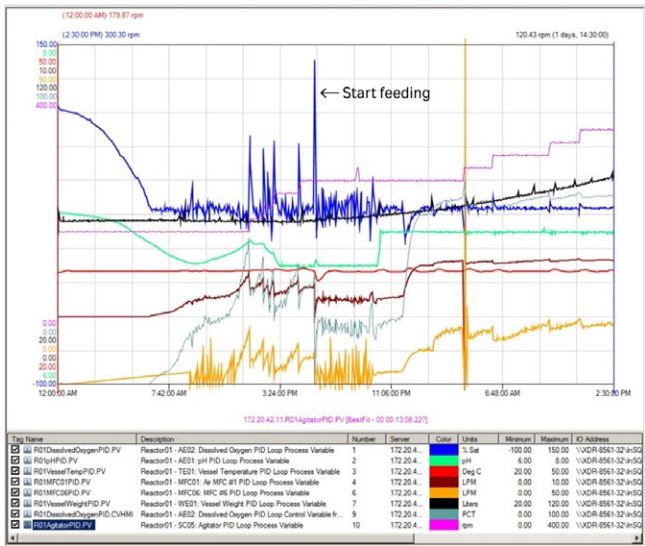


图2. XDR 200 MO 80L 体积培养参数，蓝色曲线为溶氧，紫色为搅拌速率

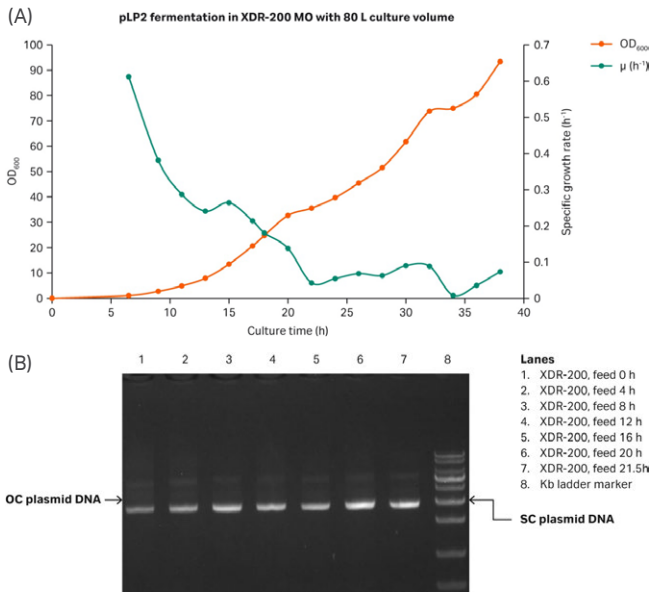


图3. XDR200 MO 装液 80L 体积 (A) 菌体生长 OD₆₀₀ 和比生长速率 μ h⁻¹。(B) 质粒的琼脂糖凝胶电泳结果

大肠杆菌发酵放大至 XDR 200 MO 发酵罐，160L 体积

160L 培养体积下的搅拌以及补料控制都与之前批次相同。XDR-200 MO 反应器采用先进的 DO 控制模式。在 DO 控制回路中，您可以根据 DO 值不同的 CV（控制变量）级联到空气流速、O₂ 流速和搅拌速率（图 4A）。这种终端用户可根据工艺需求自我灵活配置的策略不仅能稳定 DO，还能有效控制泡沫以及袋压。

在该批次中，DO 完全自动控制，并使用 Lookup Table 级联到空气流速、O₂ 流速和搅拌转速（图 4B）。

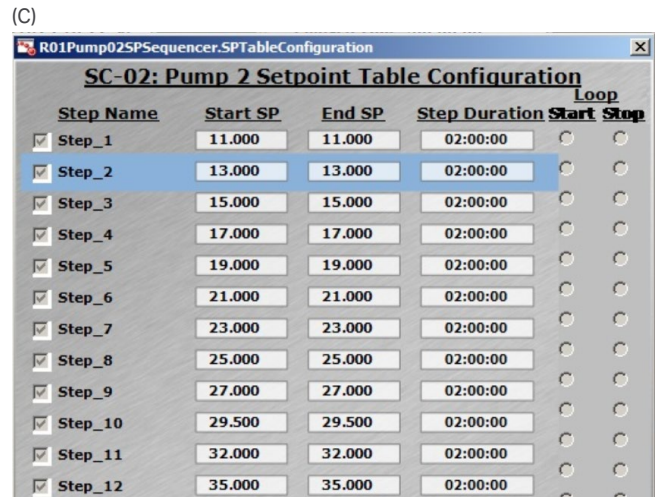
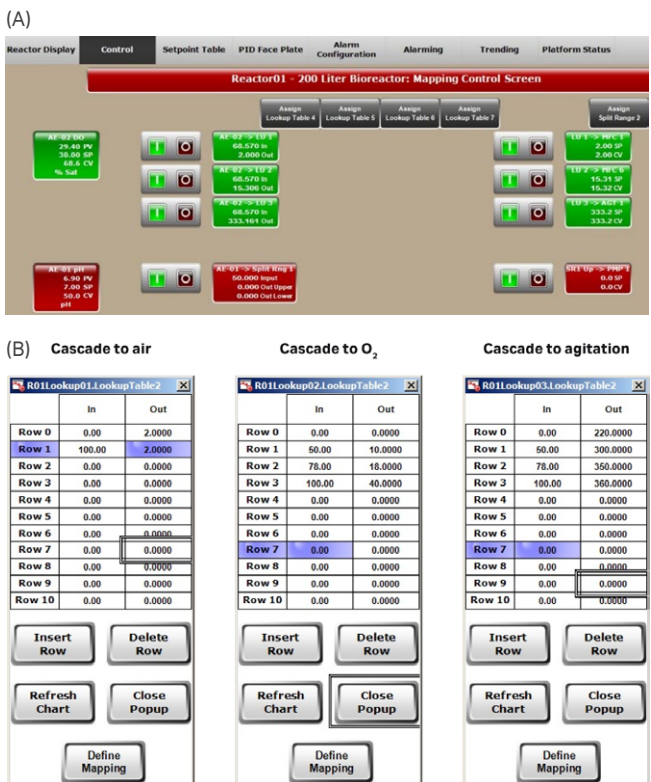


图4. XDR 200 MO 160L 装液量的设置 (A) DO 控制策略，(B) DO 与 MFC1（空气）、MFC6（氧气）、AGT1（转速）相级联，(C) 补料速率的序列化设定

此次实验中，使用 Setpoint Table 对补料速率进行程序化自动控制（图 4C），培养中的最大补料速率为 35 mL/min（Step₁₂），整个过程中的补料速率都自动调整并记录在控制软件中，降低了人为操作的风险并且满足生产法规需求。溶氧的控制采用自动化级联模式（图 4A、图 4B），以维持稳定的溶氧状态。

发酵过程中的关键工艺参数如图 5 所示，这些工艺参数（DO-蓝线、pH-绿线、温度-红线）在整个过程中非常稳定，且波动很小。在该体积培养下，这些参数都能得到很好的控制，以此体现 XDR 200 MO 稳定且高效的参数控制性能。

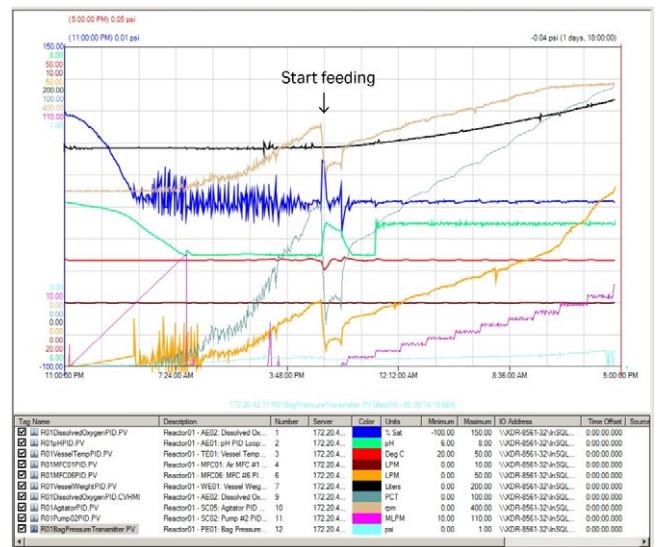


图5. XDR 200 MO 160L 装液量的关键工艺参数曲线（DO-蓝线、pH-绿线、温度-红线）

整个培养过程中，通过自动调节补料速率控制菌体比生长速率在 0.06-0.08 h⁻¹，最终收获液为 167kg，OD₆₀₀ 达到 95.8（图 6A），SC 比例为 91.75%。

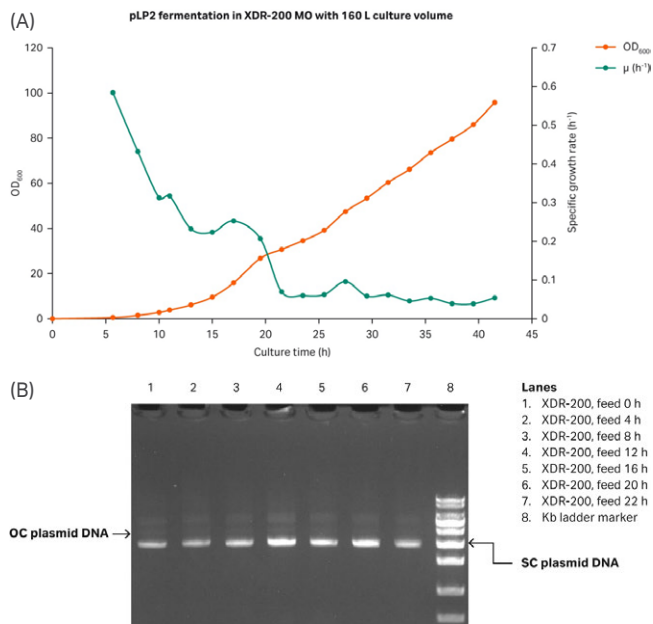


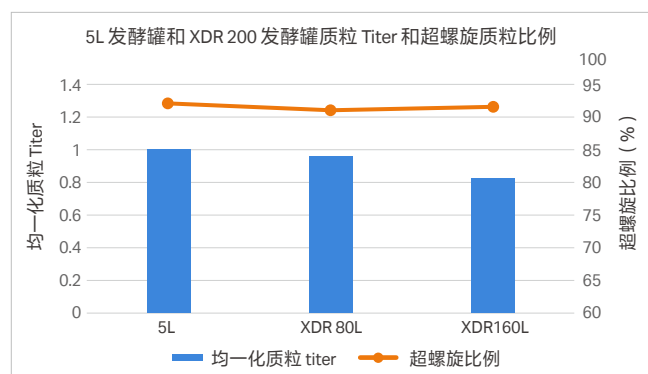
图6. XDR200 MO 装液 160L 体积 (A) 菌体生长 OD₆₀₀ 和比生长速率/h⁻¹。(B) 质粒的琼脂糖凝胶电泳结果

5 L 玻璃罐和 XDR 200 MO 反应器的结果比较

5L 玻璃反应器和 XDR 200 MO 反应器（装液量 80L、160L）能达到的最高 OD₆₀₀ 分别是 89.2、93.4、95.8。质粒均一化产量和SC比例如图 7 所示。

图7. 5L 发酵罐和 XDR200 MO 反应器（装液量80L、160L）的质粒均一化产量和SC比例

发酵体积	质粒titer	sc%
5L	1	92.24
XDR 80L	0.96	91.49
XDR 160L	0.82	91.75



总结

- 1.XDR 200 MO 反应器能提供高 kLa，支持大肠杆菌的高密度发酵，本实验中最高 OD₆₀₀ 可达到 95。
- 2.XDR 200 MO 能重现 5L 规模的发酵结果，达到具有可比性的 OD₆₀₀、质粒产量和超螺旋质粒比例（SC%），具有好的放大重现性。
- 3.XDR 200 MO 在培养过程中能保持溶氧、pH、温度等重要工艺参数稳定，满足培养需求。

*所有数据均源于Cytiva，数据均在试验条件下取得，仅供参考，实际效果因试验条件而异。

关于 Cytiva 思拓凡

Cytiva 思拓凡是全球生命科学领域的先行者，在全球 40 余个国家和地区拥有 10000 名员工，致力于推动未见技术，加速非凡疗法。作为客户可信赖的合作伙伴，Cytiva 专注于生命科学和生物技术的研发，用以开发创新型疫苗、生物药物以及新型细胞和基因疗法。通过提升药物研发和生物工艺的速度、效率和能力，为惠及全球患者开发和生产变革性药物和疗法。请访问 cytiva.com.cn 获取更多信息。

智荟专线: 400 810 9118

官微订阅号: Cytiva

官微服务号: CytivaChina

cytiva.com.cn

Cytiva 和 Drop 标识是 Global Life Sciences IP Holdco LLC 或其附属公司的注册商标。

©2023 Cytiva

所有商品和服务的销售需遵守在 Cytiva 运营之供应商公司的销售条款和条件。

如需查看当地办公室的联系信息，请访问 cytiva.com.cn/contact。

CY36125-27Mar23-AN

