

# 使用電容直接測量 生物製程中細胞密度和 健康狀況的優勢

使用電容(Capacitance)線內(In-line)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委託開發與製造組織(CDMO)。電容測量現在是一種標準技術，用於監測和自動化研究以及製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？它與細胞密度和健康程度有何關係？

懸浮培養中的細胞具有不透離子(Impermeable to ions)且不導電(Non-conducting)的雙層外膜。細胞培養時使用的培養基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(Electric field)中時，細胞會發生極化(Polarized)(圖1)，對於活細胞而言，由於細胞膜是完整的(Intact)，因此細胞可充當電容器(Capacitor)來儲存電能(Electrical energy)。

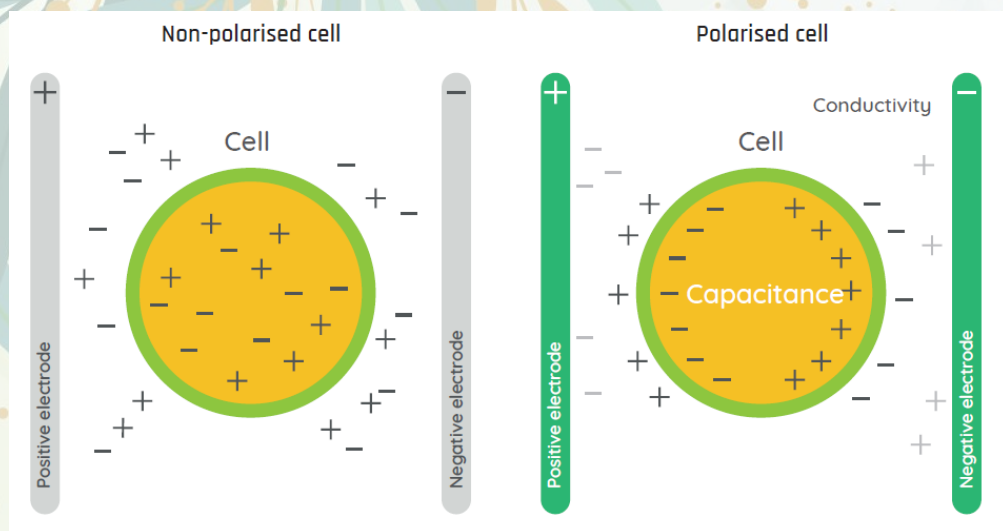


圖1. 在電場中充當電容器的活細胞。

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膜的總結合體積(Total membrane bound volume)成正比。死細胞由於有滲漏的細胞膜(Leaky cell membranes)，而培養基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，即活生物體積(Viable biovolume)，以及細胞膜的電學特性。

那麼，電容與在線(At-line)和離線(Off-line)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細胞健康狀況？

## 細胞密度的在線(At-line)和離線(Off-line)測量

在生物製程中，科學家使用在線(At-line)或離線(Off-line)方法測量細胞密度，並使用活細胞濃度(Viable cell concentration, 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	分析儀器
<b>Trypan Blue 染劑排除法</b> 按顏色分析細胞，活細胞是無色的，死細胞會被染成藍色。	Cedex Bio® Analyzer (Roche), Vi-CELL BLU Cell Viability Analyzer (Beckman-Coulter Life Sciences)
<b>粒子檢測 (Particle detection)</b> 通過電區域感應(Electrical zone sensing) 測量顆粒，無法分辨活細胞與死細胞。	Multisizer 4e Coulter Counter (Beckman- Coulter Life Sciences)
<b>流式細胞術</b> 通過螢光分析細胞，活細胞發出低波長紅色螢光，死細胞發出高波長紅色螢光。	Guava® easyCyte™ (Merck)

長期以來，**Trypan Blue染劑排除法**一直被認為是生物製程中測量VCC的黃金標準(2)。這種方法依賴於細胞膜嚴重受損的細胞，受損細胞無法經由生長或與正常代謝相關的其他功能來吸收染料，因而會變藍。然而，目前製程科學家有一些爭論，指出通過這種方法獲得的VCC值高估了實際VCC(2)。

通過**粒子檢測法(Particle Detection)**對細胞進行測量，是在粒子通過孔口時，透過電區域感應以電子方式測量粒子。這種方法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，數據還會失真，因此在生物製程中較少使用。

**流式細胞術(Flow Cytometry)**依賴於使用兩種螢光結合染料，第一種染料可以結合所有發出低波長紅色螢光的活細胞，第二種染料僅與死細胞中的DNA結合并發出高波長紅色螢光。與染劑排除法一樣，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會對DNA染色。生物製程科學家認為這種方法也可能高估VCC(2)。

## 離線(Off-line)和在線(At-line)測量的挑戰

在線(At-line)和離線(Off-line)測量並不永遠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(Sampling)，這會減少生物反應器中的體積，並意味著只能以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(Fingerprint)或提供及時(Real-time)的反饋數據以控制過程。這些測量技術也不是一種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的方法。這不僅需要時間和精力，若採樣由不同的操作員手動完成，或如果用於離線分析的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還可能會帶來污染風險(Contamination risk)，因為它涉及進入(Entering)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，它是一種線內(In-line)製程分析技術(Process Analytical Technology, PAT)。例如，Aber的FUTURA探針可以每隔幾秒產生一個信號。此外，它被生物製程科學家視為監測哺乳動物細胞培養中活細胞密度最準確(Accurate)和一致(Consistent)的線內(In-line)方法(2,3)。電容是線內(In-line)和無樣品的(不須額外進行取樣)，這使科學家能夠生成關鍵過程參數(Critical process parameters, CPPs)和關鍵性能指標(Key performance indicators, KPIs)的詳細指紋，這些指紋可用於自動反饋控制(Automated feedback control)，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，它可以與正在運行的(Real-time)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製程規範。這可以觸發手動或自動響應(Response)，並有助於對生產運行進行故障排除以糾正過程偏差，並在運行過程中拯救昂貴的生產批次。

另一個好處是測量電容的技術是可放大的(Scalable)(4)，並且有一系列可重複使用的電極尺寸和類型，可用於從較小的玻璃生物反應器到較大的不鏽鋼反應器。這些傳感器可用於所有主要生命科學供應商的先導(Pilot)和製造規模(Manufacturing scale)不鏽鋼生物反應器。

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整合(Integrate)到容量高達2000 L的一次性生物反應器中(圖2)(5, 6)。



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

在生物製程中，許多科學家將原始電容數據轉換為Cells/mL。這樣做有幾個原因，首先，它可以根據黃金標準方法驗證該技術。此外，許多控制策略基於Cells/mL的離線(Off-line)細胞測量，因此當使用線內(In-line)細胞測量方法(例如電容)時，許多科學家更願意轉換回Cells/mL。最後，科學家們不能在製程開發的早期就包括電容，因為它目前只能用於~1L規模。

## 將電容轉換為VCC

要將電容轉換為在線(At-line)或離線(Off-line) KPI測量值(例如VCC)，必須對每個細胞株執行校準(Calibration)。這是因為研究表明，通過測試兩個細胞株，離線(Off-line)方法生成的值可能不同於線內(In-line)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，同時使用線內(In-line)傳感器(例如Aber FUTURA傳感器)記錄以pF/cm為單位的電容測量值。使用諸如Cedex Bio<sup>®</sup> Analyzer (Roche)的離線(Off-line)系統分析樣品以生成每個數據點的Cells/mL值，然後繪製電容值對Cells/mL的曲線，以該曲線方程的斜率產生校準因子。使用這種方法，幾個團隊已經成功地將電容轉換為他們的離線(Off-line)參考方法。在少數情況下，電容和離線(Off-line)方法之間存在偏差(Deviation)，尤其是在培養運行結束時(The end of a culture run)。

### 這種偏差背後的原因是什麼？

電容與VCC的其他離線(Off-line)和在線(At-line)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(University of Manitoba, Canada)(8)的一項研究比較了離線(Off-line)和在線(At-line)粒子檢測、染劑排除和螢光流式細胞術與線內(In-line)電容，以監測CHO細胞在批培養(Batch culture)。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，但染劑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)。螢光流式細胞術給出了與電容相當的結果，額外測試證實這兩種方法比其他方法更早檢測到無法存活的凋亡細胞。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Off-line, At-line和 In-line測量VCC的方法(經 University of Manitoba許可出版公開)

電容以及離線(Off-line)和在線(At-line)測量所見VCC差異的另一個原因，是因為細胞尺寸變化會影響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(Rocking motion single-use bioreactor)中培養15天的CHO細胞進行的一項研究中，將使用Sartorius BioPAT® Viamass傳感器的電容與使用Cedex Bio® Analyzer之Trypan blue染劑排除法測量的VCC和細胞濕重(Wet cell weight)進行了比較。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(Viable cell volume, 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可行的生物質(Biomass)監測方法。



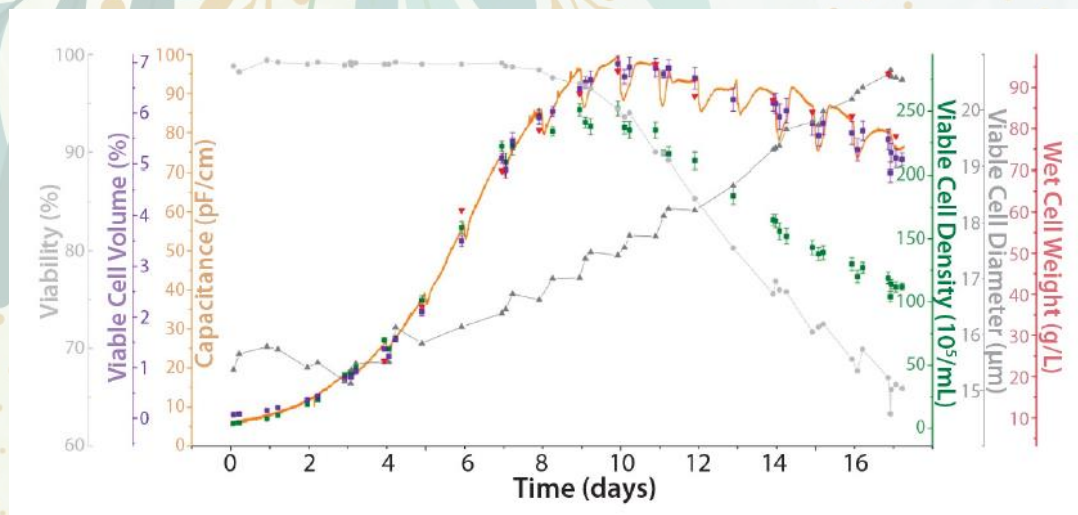


圖4. 使用活細胞體積測量VCC的At-line和In-line方法的比較  
(在Sartorius的許可下發佈數據)

## 使用原始電容監測細胞培養

馬尼托巴大學(University of Manitoba, Canada)和Sartorius的科學家進行的這些研究表明，在線(At-line)和離線(Off-line)方法取決於測量細胞死亡的不同，這在死亡階段(Death phase)尤其如此。因此，說一種偵測細胞健康和密度的方法比另一種更準確是不正確的，它們只是提供了不同的原理和偵測數據。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，並有可能拯救整個培養批次。例如，Biogen(9)的科學家已經表明使用電容偵測方法，可以根據實時電容信息來逆轉細胞凋亡；若使用離線方法測量VCC，則會因為無法及早檢測到細胞凋亡，導致無法即時逆轉細胞凋亡。

因此，基於原始電容數據制定餵養策略(Feed strategies)是有意義的，因為這意味著科學家可以根據活生物量(Viable biovolume)而不是細胞數量(Cell number)餵養細胞，因為較大顆的細胞(Larger cell)需要更多的營養，而使用VCC作為KPI將無法考慮到這一點。

舉例來說，Biogen自2016年以來一直致力於電容測量，並將其與在線(At-line)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)設施中製程控制(Process control)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(Seed train cultures)，並作為預測葡萄糖需求的方法(10)。

Biogen使用原始電容作為KPI，其在(10,11)使用電容監測5L小試規模(Bench scale)、200 L和315 L先導規模(Pilot scale)和15000 L生產規模(Manufacturing scale)生物反應器中的CHO培養物的研究中，表明電容能提供一致的數據，包括在不同傳感器間的數據，且適用於所有生物反應器類型和各種規模的傳感器。在指數增長階段，電容的R平方係數接近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，使用原始電容數據還可以提供靈活的進料策略(Flexible feed strategy)，因為細胞培養時可以正確進料，而不用管是否具有無意的過程錯誤(例如接種不足)。



Biogen的兩項研究顯示了這方面的證據，一項研究採用基於線內(In-line)電容測量的自動進料策略(Automated feed strategy)(12)，另一項研究依據實時連續電容數據，將進料頻率增加到每4小時(而不是24小時)一次(10)。在第二項研究中，使用電容偵測使得產物效價(Titer)增加21%，減少了培養物中的谷氨酸(Glutamate)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。

## 使用原始電導率及早檢測出細胞污染

Aber電容探針除了電容，還可以用mS/cm為單位測量電導率(Conductivity)。電導率與細胞懸浮液中帶電離子的濃度(Concentration of charged ions)相關。使用電導率的一個有趣應用是品質保證(Quality assurance)，馬薩諸塞大學(University of Massachusetts)和美國食品藥物管理局(US FDA)最近的一項研究(13)表明，在CHO細胞培養中，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，線內(In-line)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問題排除(Real-time troubleshooting)，以通過添加抗生素來控制污染物，或停止製程來節省批次成本。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，這在製造規模的環境中尤其重要。

## 未來展望

使用電容在幾年內可能還無法完全取代離線和在線(At-line) VCC測量。例如，在使用體積小於1 L生物反應器的製程開發中，雖然可以使用重複使用電容傳感器，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，尤其是那些開發和製程放大(Scaling-up)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，尤其是用於控制進料策略。總之，使用電容可以減少或消除與離線和在線(At-line)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成本。使用電容作為KPI的所有這些特性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。

文章來源：The benefits of using capacitance as a direct measurement of cell density and health in bioprocessing (ABER)



## References

- [1.Kell D B. DETERMINATION OF BIOMASS World Patent WO1988002114 \(1988\)](#)
- [2.Butler M, et al. Cell Viability in Bioprocesses Making a Case for Reevaluation. BioProcess International. 2018: 17 \(11–12\): 42-49](#)
- [3.Carvell J P, Dowd J E. On-Line Measurement and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes Using Radio-Frequency Impedance. Cytotechnol. 2006: 50 \(1–3\): 35–48.](#)
- [4.Metze, S et al. Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors. Bioprocess and biosystems engineering. 2020: 43 \(2\): 193-205.](#)
- [5.Carvell J, et al. Monitoring Live Biomass in Disposable Bioreactors. BioProcess International 2016: 14\(3\)s: 40-48.](#)
- [6.Madsen B, et al. Measuring Cell Density in HyPerforma S.U.B.s with ABER Futura neotf. Bioprocess International 2021 special report:](#)
- [7.Fernandes J, et al. Development of capacitance tools: at-line method for assessing biomass of mammalian cell culture and fixed cell calibration standard. Biotechnol J. 2018: 14 \(4\): e1800283.](#)
- [8.Braasch K, et al. The changing dielectric properties of CHO cells can be used to determine early apoptotic events in a bioprocess. Biotechnol Bioeng. 2013:110 \(11\):2902-2914.](#)
- [9.Ma F et al. Real-time monitoring and control of CHO cell apoptosis by in situ multifrequency scanning dielectric spectroscopy. Process Biochemistry, 2019: 80: 138-145.](#)
- [10.Moore, B. et al. Case study: The characterization and implementation of dielectric spectroscopy \(biocapitance\) for process control in a commercial GMP CHO manufacturing process. Biotechnol. Prog. 2019:35\(3\): e2782.](#)
- [11.Bro, C. Kwiatkowski, C and Tolstrup, A. Use of biocapitance probes for optimized process control at large-scale manufacturing in Cell Culture Engineering XVI, A. Robinson, PhD, Tulane University R. Venkat, PhD, MedImmune E. Schaefer, ScD, J&J Janssen Eds, ECI SymposiumSeries, \(2018\).](#)
- [12.Zhang, A., et al. Advanced process monitoring and feedback control to enhance cell culture process production and robustness. Biotechnol. Bioeng. 2015: 112: 2495-2504.](#)
- [13.Morris, C et al. Single in-line biomass probe detects CHO cell growth by capacitance and bacterial contamination by conductivity in bioreactor. Biotechnol J. 2021 S30: e2100126.](#)