



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102021115 A

(43) 申请公布日 2011.04.20

(21) 申请号 200910072940.0

(22) 申请日 2009.09.21

(71) 申请人 惠识瑶

地址 161000 黑龙江省齐齐哈尔市铁锋区站前街道南虹区 248 组

(72) 发明人 惠识瑶

(74) 专利代理机构 哈尔滨东方专利事务所
23118

代理人 陈晓光

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

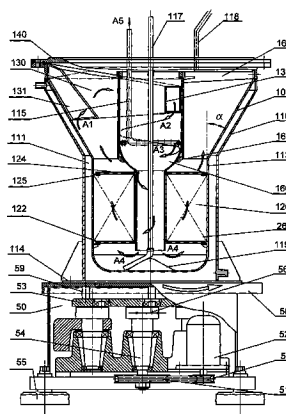
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器及培养动物细胞方法

(57) 摘要

无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器及培养动物细胞方法。面对动物细胞大规模高密度培养的要求,细胞生物反应器必须解决自身功能的放大和强化问题。本产品组成包括:反应罐罐体 (110),反应罐罐体经偏心摇盘 (58) 连接摇床 (50) 上,摇床摇动偏心摇盘使反应罐体作偏心转动。反应罐罐体上部为圆台形 (100)、下部为圆柱形 (113),圆台形的上部装有导流管 (130),导流管的进口 (131) 贴近反应罐罐体的内壁,导流管的出口 (133) 端沿中心漏斗的切线方向进入中心漏斗 (160),反应罐罐体上具有带进气口、出气口、进液口、出液口的罐盖 (140),反应罐罐体内具有填充床 (120)。本发明为动物细胞培养提供了优质环境。



1. 一种无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其组成包括：反应罐罐体，其特征是：所述的反应罐罐体底部连接摇床，所述的反应罐罐体上部为圆台形、下部为圆柱形，所述的反应罐的上部装有导流管，所述的导流管的进口连接所述的反应罐的内壁，所述的导流管的出口端沿中心漏斗的切线方向进入所述的中心漏斗，所述的反应罐罐体上具有带进出口的罐盖，所述的反应罐罐体内具有填充床。

2. 根据权利要求 1 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其特征是：所述的填充床包括空套管，所述的空套管通过下孔板连接所述的反应罐罐体，所述的空套管上端连接上孔板，片状微载体充填在所述的下孔板和所述的上孔板之间。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其特征是：所述的中心漏斗有外套，所述的中心漏斗外套内和中心漏斗固定连接，所述的中心漏斗设置于罐体的中心线位置，所述的外套有和所述的罐体连接的固定支架。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其特征是：所述的反应罐罐体上部的半锥角 α 为 25° - 55° ，所述的反应罐体外部具有保温水夹套、所述的反应罐体内侧底部有分配锥。

5. 根据权利要求 3 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其特征是：所述的反应罐罐体上部的半锥角 α 为 25° - 55° ，所述的反应罐体外部具有保温水夹套、所述的反应罐体内侧底部有分配锥。

6. 根据权利要求 1 或 2 或 3 或 4 或 5 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其特征是：进气管上端穿过所述的罐盖，所述的进气管的另一端伸到中心漏斗内，所述的进气管的中心漏斗内的一端的底部为环形并且分布有出气微孔，所述的反应罐罐盖上装有进液管和出液管，所述的反应罐罐体下部圆柱体与底面之间通过半径大于 50mm 圆弧过渡。

7. 一种利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，其特征是：

启动摇床，加培养基至反应罐工作容积后，将动物活性细胞接种到填充床的片状微载体中；被固定在圆锥内壁上的导流管将上部的培养液导至罐体中心的中心漏斗中；培养液在与填充床分离的中心漏斗中进行溶氧；经过中心漏斗的出口出来的营养液穿过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气；在摇床的离心力作用下培养液向外并向上运动进入导流管，在导流管的引导下回到中心漏斗，完成一个循环；补充氧气和营养，开始下一个循环流。

8. 根据权利要求 7 所述的利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，其特征是：所述的培养液在反应罐中的与填充床分离中心漏斗中的溶氧区进行溶氧是指在中心漏斗的液面下，由进气管把混合气由罐外输入，经进气管下部的环形管上的出气微孔，以鼓泡形式进入液体漩涡里，形成气-液相混合的溶氧过程，混合气体溶解\混合于培养液中，并随培养液做循环流动；在振荡回流的作用下中心漏斗里的培养液形成漩涡向下流动；中心漏斗下部出口流出的培养液，冲至罐内底部经分配锥并折反向上沿外环呈螺旋线轨迹运动。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，其特征是：所述的通过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气过程中，所述的填充床包括由上孔板和下孔板与空套管和罐体圆柱形内壁构成的空间，其中填满片状微载

体，细胞就贴附于片状微载体之上，作为活性动物细胞的生长区域，当培养液流穿过填充床时，将营养和氧气带给细胞，并将排泄物带走，完成为细胞提供营养物质和溶解氧的过程。

无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器及培养动物细胞方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种细胞生物反应器，具体涉及一种用于动物细胞培养的无机械搅拌装置的填充床式细胞反应器培养动物细胞方法。

背景技术：

[0002] 目前世界生物技术制药产业发展迅猛，并已取得了巨大的成就。通过动物细胞体外培养表达和生产各类诊断和治疗用单克隆抗体，疫苗，生长因子等生物活性蛋白质具有十分广泛的市场应用前景。因此，用来大规模高密度培养动物细胞的细胞生物反应器，就成了生物技术制药产业中最重要的装备。它很大程度上决定了生物技术制药企业的产品成本，生产规模和产品种类。现有的反应器采用插入罐体内的机械搅拌，搅拌装置结构及其润滑物质经常带来的微生物污染的问题，搅拌润滑带入杂菌的情况发生率高，一旦杂菌污染，就会造成细胞死亡，或者由于机械搅拌的剪切造成细胞死亡，腐败物质迅速蔓延，也会造成整罐细胞死亡。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种性能独特，原理创新的无搅拌装置的填充床式细胞反应器的实现方法。

[0004] 上述的目的通过以下的技术方案实现：

[0005] 无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其组成包括：反应罐罐体，所述的反应罐罐体底部连接摇床，所述的反应罐罐体上部为圆台形、下部为圆柱形，所述的反应罐的上部装有导流管，所述的导流管的进口连接所述的反应罐的内壁，所述的导流管的出口端沿中心漏斗的切线方向进入所述的中心漏斗，所述的反应罐罐体上具有带进出口的罐盖，所述的反应罐罐体内具有填充床。

[0006] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的填充床包括空套管，所述的空套管通过下孔板连接所述的反应罐罐体，所述的空套管上端连接上孔板，片状微载体充填在所述的下孔板和所述的上孔板之间。

[0007] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的中心漏斗有外套，所述的中心漏斗外套内和中心漏斗固定连接，所述的中心漏斗设置于罐体的中心线位置，所述的外套有和所述的罐体连接的固定支架。

[0008] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的反应罐罐体上部的半锥角 α 为 25° - 55° ，所述的反应罐体外部具有保温水夹套、所述的反应罐体内侧底部有分配锥。

[0009] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，进气管上端穿过所述的罐盖，所述的进气管的另一端伸到中心漏斗内，所述的进气管的中心漏斗内的一端的底部为环形并且分布有出气微孔，所述的反应罐罐盖上装有进液管和出液管，所述的反应罐罐体

下部圆柱体与底面之间通过半径大于 50mm 圆弧过渡。

[0010] 一种利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法：

[0011] 启动摇床，加培养基至反应罐工作容积后，将动物活性细胞接种到填充床的片状微载体中；被固定在圆锥内壁上的导流管将上部的培养液导至罐体中心的中心漏斗中；培养液在与填充床分离的中心漏斗中进行溶氧；经过中心漏斗的出口出来的营养液穿过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气；在摇床的离心力作用下培养液向外并向上运动进入导流管，在导流管的引导下回到中心漏斗，完成一个循环；补充氧气和营养，开始下一个循环流。

[0012] 所述的利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，所述的培养液在反应罐中的与填充床分离中心漏斗中的溶氧区进行溶氧是指在中心漏斗的液面下，由进气管把混合气由罐外输入，经进气管下部的环形管上的出气微孔，以鼓泡形式进入液体漩涡里，形成气-液相混合的溶氧过程，混合气体溶解\混合于培养液中，并随培养液做循环流动；在振荡回流的作用下中心漏斗里的培养液形成漩涡向下流动；中心漏斗下部出口流出的培养液，冲至罐内底部经分配锥并折反向上沿外环呈螺旋线轨迹运动。

[0013] 所述的利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，所述的通过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气过程中，所述的填充床包括由上孔板和下孔板与空套管和罐体圆柱形内壁构成的空间，其中填满片状微载体，细胞就贴附于片状微载体之上，作为活性动物细胞的生长区域，当培养液流穿过填充床时，将营养和氧气带给细胞，并将排泄物带走，完成为细胞提供营养物质和溶解氧的过程。

[0014] 本发明的有益效果：

[0015] 1. 就细胞生物反应器本身而言，面对动物细胞大规模高密度培养的要求，细胞生物反应器必须解决自身功能的放大和强化问题，这些困难主要源于两方面的矛盾；一方面用于培养过程的生物反应器必须有足够的气液传质能力并能提供良好的流体混合条件和生存条件，否则就难以支持细胞的生长。尤其在大规模高密度细胞培养过程中这一要求更加苛刻，细胞生物反应器在培养细胞过程中，需要确保提供良好的传质混合能力。本产品有效的克服了现在技术的缺点和不足，通过偏心旋转将溶氧流体通过导流管输出并回流到中心漏斗，形成罐内的液体循环具有振荡环流混合的效果。由于不存在机械搅拌力，剪切力小，在延中心漏斗内壁的循环下降中，溶氧速度快、工作容积可线性放大、结构简单但有效。本产品为生存在填充床中片状微载体中的细胞赋予了仿生命特征的良好生存条件，可应用到人体活性细胞和动物活性细胞培养过程中。

[0016] 2. 另一方面，由于动物细胞的剪切力敏感性，生物反应器中因搅拌和鼓泡产生的流体剪切力和气泡破裂会无可避免的导致细胞损伤甚至死亡，造成培养失败。所以，为了实现细胞生物反应器在培养细胞过程中，既要确保提供良好的传质混合能力，又要尽可能使流体剪切力降低来减少对细胞的损伤，从而确保大规模高表达的蛋白质生产，尽可能的降低微生物的污染概率，本发明的方案中，反应器的罐体内取消了传统的机械搅拌装置，这样就彻底消除了由搅拌装置结构及其润滑物质所带来的微生物污染的问题。同时，没有机械搅拌装置，也大大降低了搅拌剪切力。

[0017] 3. 本产品的细胞生长区域-填充床和气-液混合鼓泡区域分开，也避免了气泡破

裂给细胞带来的损伤。既确保大规模高表达的蛋白质生产，又尽可能的降低了微生物的污染概率。

附图说明：

[0018] 附图 1 是本发明的结构示意图。

[0019] 附图 2 是本发明的俯视图。

具体实施方式：

[0020] 实施例 1：

[0021] 无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，其组成包括：反应罐罐体 110，所述的反应罐罐体经偏心摇盘 58 连接摇床 50 上，摇床摇动偏心摇盘使反应罐体作偏心转动。所述的反应罐罐体 110 上部为圆台形 100、下部为圆柱形 113，所述的圆台形的上部装有导流管 130，所述的导流管的进口 131 贴近所述的反应罐罐体的内壁，所述的导流管的出口 133 端沿中心漏斗的切线方向进入中心漏斗 160，所述的反应罐罐体上具有带进气口、出气口、进液口、出液口的罐盖 140，所述的反应罐罐体内具有填充床 120。

[0022] 实施例 2：

[0023] 实施例 1 所属的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的填充床包括上孔板 125、下孔板 122 和空套管 124。所述的反应罐罐体 110 内圆柱形 113 内壁连接下孔板 122 和空套管 124，所述的空套管 124 上端连接上孔板 125，所述的上孔板 125、空套管 124、下孔板 122 构成填充床 120，片状微载体 26 充填在所述的下孔板和上孔板之间。所述的填充床 120 与反应罐罐体 110 中心线一致。所述的反应罐有底座 114，所述的反应罐 110 与摇盘 58 之间通过底座 114 连接，所述的反应罐罐体 110 与罐盖 140 之间用螺栓连接。

[0024] 所述的圆台形 100 内表面连接导流管进口 131 端，所述的导流管出口 133 端法线沿中心漏斗的切线方向或者与切线平行的方向进入到中心漏斗 160，所述的反应罐罐体有罐盖 140，所述的罐盖 140 连接进气管 115 的一端，所述的进气管 115 的另一端伸到中心漏斗 160 内，所述的反应罐罐体 110 内有进液管 117 和出液管 118。

[0025] 实施例 3：

[0026] 实施例 1 或 2 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的中心漏斗有外套 164，所述的中心漏斗外套 164 内将中心漏斗用压环 165 和压环顶丝 166 压紧，所述的中心漏斗设置于罐体的中心线位置，中心漏斗外套通过图 2 中的 3 个中心漏斗外套支架 168 固定。

[0027] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的反应罐罐体上部圆台形的圆锥表面的半锥角 α 为 25° 到 55° ，例如 30° 或者 35° 、 40° 、 45° 或者 50° ，可以根据需要的营养液的浓度和要求循环的速度通过实验确定，一般在 $30-42^{\circ}$ 之间都是比较好的，所述的反应罐体外部有保温水夹套 111。

[0028] 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的反应罐罐体与摇盘之间用螺栓固定；所述的罐体与罐盖之间用“O”形胶圈来密封；所述的反应罐罐体下部是有大圆角底部的圆柱形，所述的反应罐体内侧底部有分配锥 119。

[0029] 实施例 4：

[0030] 以上实施例所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的摇床 50 设置在地面上，所述的反应罐 110 放在摇床 50 的摇盘 58 上，用螺栓紧固连接，所述的摇床是底部有四个接触地面支撑盘 55 的动力装置，所述的摇床有主动偏心轴 54，所述的主动偏心轴 54 有偏心距 56，所述的摇床的偏心摇动的工作方法，所述的摇床底部安装有电机 52，所述的电机 52 转动带动小皮带轮 57，所述的小皮带轮 57 带动大皮带轮 51，所述的大皮带轮 51 带动主动偏心轴 54 转动，所述的主动偏心轴 54 带动上摇动盘 53，所述的上摇动盘 53 和摇盘 58 通过连接立柱 59 连接固定为一体并同步摇动；当摇盘摇动时，把振荡运动传给偏心运动的罐体，罐内培养液产生圆周振荡运动而没有中线死角，培养液的静态液面变为振荡液面，并绕罐体中心线转动；同时反应罐体内的培养液产生脉冲式的圆周振荡运动，加上罐内循环结构的作用，实现了罐体培养液的循环流动。

[0031] 实施例 5：

[0032] 实施例 1 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的导流管，其导流管进口的一侧连接在罐体内侧圆锥表面上，导流管出口连接中心漏斗外套，圆周振荡运动的液体流按 A1 方向流进导流管进口，按 A2 方向进入中心漏斗的液流在中心漏斗内按 A3 方向成漩涡状向下流动。然后在中心漏斗的下端口，按 A4 方向流出，冲底折返后向上流动，穿过填充床，然后继续向上做圆周振荡流动，到达导管进口处，再次按 A1 方向进入导流管内，如此循环往复，形成罐内的培养液循环流。

[0033] 实施例 6：

[0034] 实施例 1 所述的无搅拌装置的填充床式细胞生物反应器，所述的填充床的上部是上孔板连接到空套管的上端，下部是下孔板与空套管，向内至空套管 124 的外壁，向外至罐体的圆柱内壁 113，形成填充床的空间，并由片状微载体充满。

[0035] 进气管底部为环形并且分布有出气的微孔，混合气从管内按 A5 方向进入，到达进气管下端后，再由环状管上的微孔进入按 A3 方向做漩涡状流动的培养液中，开始气-液相混合，溶混合气进入培养液中，剩余气体上升到液面逸出。同时溶入混合气体的培养液流出中心漏斗的下端，按 A4 方向进入填充床。供给营养物质和溶解氧给在填充床内片状微载体上贴附的细胞。

[0036] 实施例 7：

[0037] 一种利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，启动摇床，加培养基至反应罐工作容积后，将动物活性细胞接种到填充床的片状微载体中；被固定在圆锥内壁上的导流管将上部的培养液导至罐体中心的中心漏斗中；培养液在与填充床分离的中心漏斗中进行溶氧；经过中心漏斗的出口出来的营养液穿过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气；在摇床的离心力作用下培养液向外并向上运动进入导流管，在导流管的引导下回到中心漏斗，完成一个循环；补充氧气和营养，开始下一个循环流。

[0038] 实施例 8：

[0039] 实施例 1 所述的利用无搅拌装置的填充床式细胞反应器培养活性细胞的方法，所述的培养液在反应罐中的与填充床分离中心漏斗中的溶氧区进行溶氧是指在中心漏斗的液面下，由进气管把混合气由罐外输入，经进气管下部的环形管上的出气微孔，以鼓泡形式进入液体漩涡里，形成气-液相混合的溶氧过程，混合气体溶解\混合于培养液

中，并随培养液做循环流动；在振荡回流的作用下中心漏斗里的培养液形成漩涡向下流动；中心漏斗下部出口流出的培养液，冲至罐内底部经分配锥并折反向上沿外环呈螺旋线轨迹运动。

[0040] 所述的通过填充床给活性动物细胞输送营养和氧气过程中，所述的填充床包括由上孔板和下孔板与空套管和罐体圆柱形内壁构成的空间，其中填满片状微载体，细胞就贴附于片状微载体之上，作为活性动物细胞的生长区域，当培养液流穿过填充床时，将营养和氧气带给细胞，并将排泄物带走，完成为细胞提供营养物质和溶解氧的过程。

[0041] 本申请中与设备结构相关的大部分内容同日申请了实用新型。

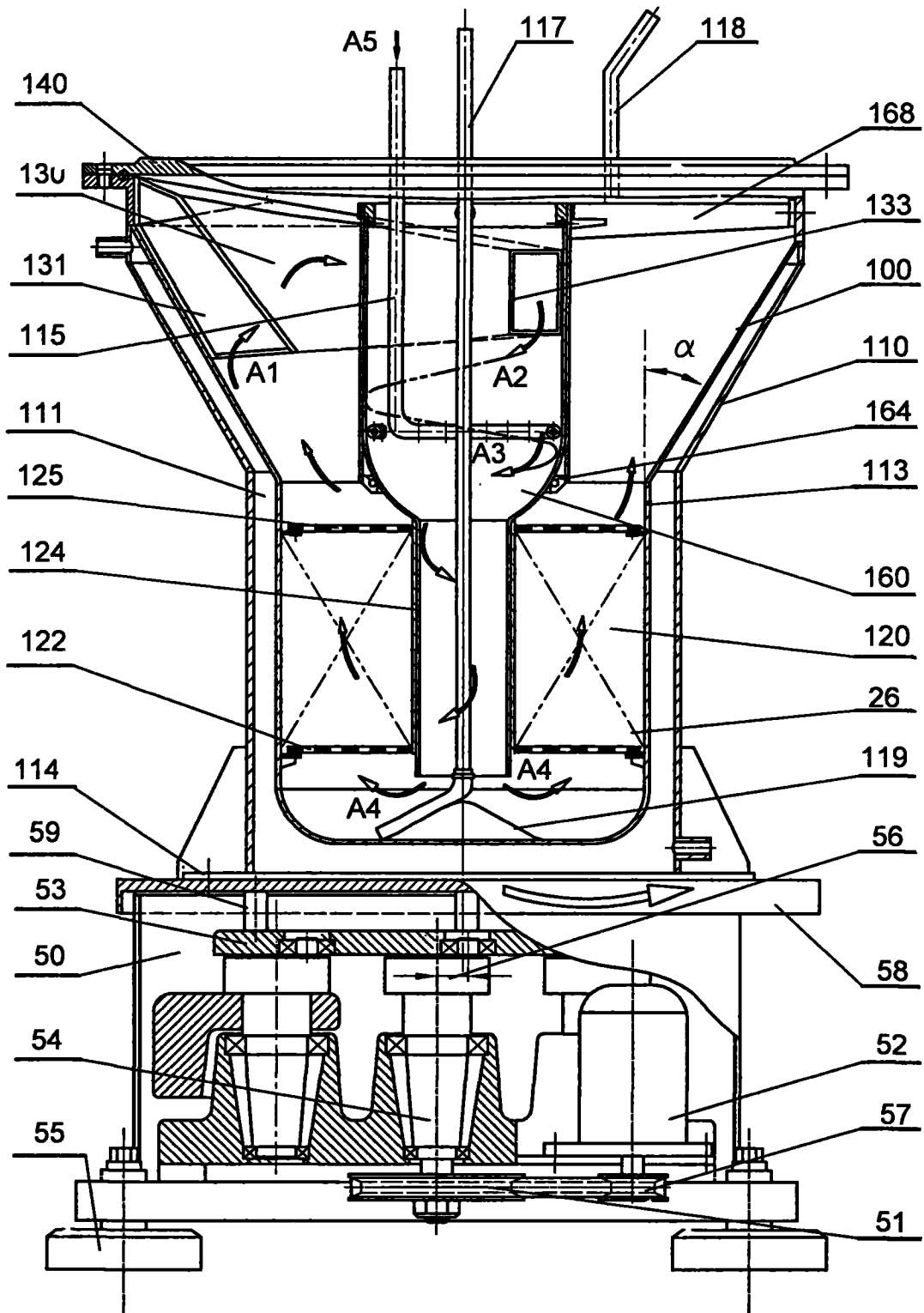


图 1

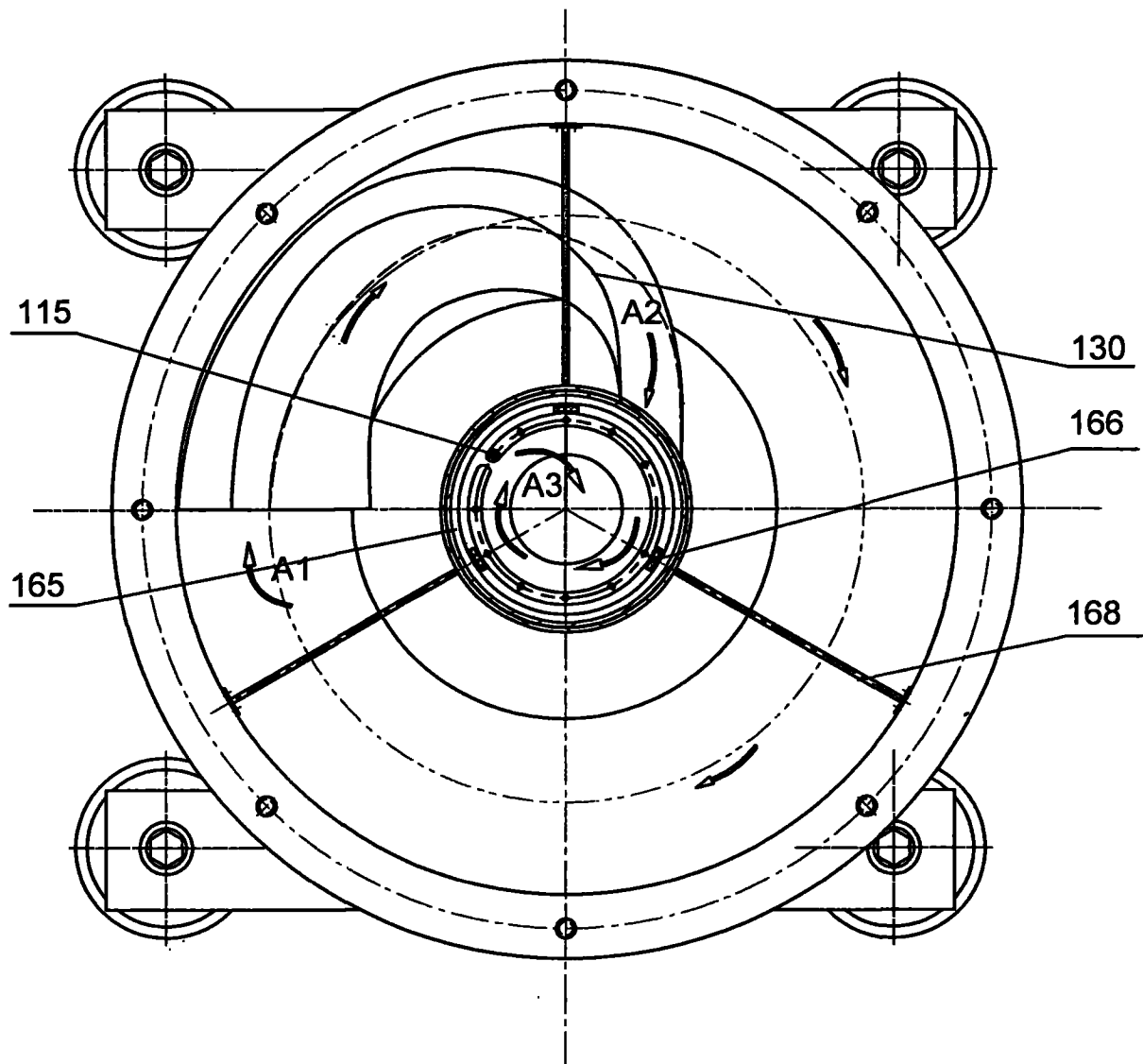


图 2