



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104812887 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201380061861.4

(22)申请日 2013.10.25

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104812887 A

(43)申请公布日 2015.07.29

(30)优先权数据  
13306464.2 2013.10.23 EP  
61/719,085 2012.10.26 US  
61/869,118 2013.08.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.05.27

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/066845 2013.10.25

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/066781 EN 2014.05.01

(73)专利权人 麻省理工学院  
地址 美国马萨诸塞州  
专利权人 赛诺菲公司

(72)发明人 希琳·吴 拉吉夫·贾加·拉姆  
凯文·绍-官·李  
米开朗基罗·坎佐内里  
霍斯特·布卢姆

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.  
C12M 1/04(2006.01)  
C12M 1/00(2006.01)  
C12M 1/34(2006.01)  
B01J 19/00(2006.01)

审查员 穆飞航

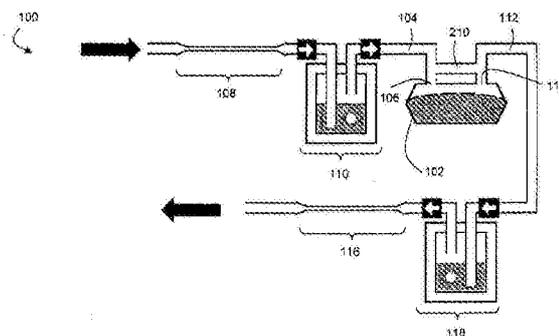
权利要求书2页 说明书13页 附图7页

## (54)发明名称

化学反应器中的湿度控制

## (57)摘要

本发明总体上描述了对化学反应器中的湿度的控制及其相关系统和方法。在某些实施方案中,输气导管内和腔室内的湿度可被控制以抑制气体输送路径中的不期望的凝结。通过抑制气体输送路径中的凝结,可限制(或消除)这样的路径的堵塞,使得可更容易并且更可控地实现气体的输送。另外,本发明还描述了用于吹扫化学反应器系统中的凝结液体的策略。



1. 一种反应器系统,包含:  
反应器腔室;  
反应器腔室进气导管,其配置成将气体通过反应器腔室进气口输送到所述反应器腔室中;  
流量控制机构,其配置成将通过所述反应器腔室进气导管的气体流量调节成等于或小于每秒1毫升的速率;以及  
增湿器,其配置成对通过所述反应器腔室进气导管输送的气体进行增湿,所述增湿器定位在所述流量控制机构与所述反应器腔室进气口之间。
2. 一种反应器系统,包含:  
反应器腔室;  
反应器腔室出气导管,其配置成将气体通过反应器腔室出气口输送出所述反应器腔室;  
流量控制机构,其配置成将通过所述反应器腔室出气导管的气体流量调节成等于或小于每秒1毫升的速率;以及  
集液器,其配置成移除反应器腔室出气导管内的气体中的液体蒸气,所述集液器定位在所述流量控制机构与所述反应器腔室出气口之间。
3. 根据权利要求2所述的反应器系统,包含:  
反应器腔室进气导管,其配置成将气体输送到所述反应器腔室中;以及  
增湿器,其配置成对通过所述反应器腔室进气导管输送的气体进行增湿。
4. 根据权利要求3所述的反应器系统,包含入口流量控制机构,所述入口流量控制机构配置成将通过所述反应器腔室进气导管的气体流量调节成等于或小于每秒1毫升的速率。
5. 根据权利要求4所述的反应器系统,其中所述增湿器定位在所述入口流量控制机构与所述反应器腔室进气口之间。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的反应器系统,其中所述反应器腔室包含液体和至少一种生物细胞。
7. 根据权利要求6所述的反应器系统,其中所述生物细胞为真核细胞。
8. 根据权利要求7所述的反应器系统,其中所述生物细胞为哺乳动物细胞。
9. 根据权利要求8所述的反应器系统,其中所述哺乳动物细胞选自:灵长动物细胞、牛细胞、马细胞、猪细胞、山羊细胞、犬细胞、猫细胞、啮齿动物细胞、以及人细胞。
10. 根据权利要求9所述的反应器系统,其中所述啮齿类动物细胞是仓鼠细胞。
11. 根据权利要求10所述的反应器系统,其中所述仓鼠细胞为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。
12. 根据权利要求8所述的反应器系统,其中所述哺乳动物细胞为心脏细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、软骨细胞、神经细胞、骨细胞、肌细胞、血细胞、内皮细胞、免疫细胞或干细胞。
13. 根据权利要求1所述的反应器系统,其中所述反应器腔室的容积小于或等于50毫升。
14. 根据权利要求1至5和13中任一项所述的反应器系统,其中所述气体包含二氧化碳和/或氧气。

15. 根据权利要求1、3至5和13中任一项所述的反应器系统,其中所述增湿器包含容纳第一液体的容器,所述第一液体的温度比液相的温度高至少1℃。

16. 根据权利要求2至5中任一项所述的反应器系统,其中所述集液器包含容纳第二液体的容器,所述第二液体的温度比液相的温度低至少1℃。

17. 根据权利要求1至5和13中任一项所述的反应器系统,其中所述流量控制机构包含供气导管,所述供气导管包含收缩部。

18. 根据权利要求17所述的反应器系统,其中所述供气导管在所述收缩部内的横截面尺寸比所述供气导管在所述收缩部的上游和下游位置处的横截面尺寸小至少10%。

19. 根据权利要求1至5和13中任一项所述的反应器系统,其中所述流量控制机构包含调压器。

20. 根据权利要求1、3至4和13中任一项所述的反应器系统,其中所述增湿器定位在所述流量控制机构的上游。

21. 根据权利要求2至5中任一项所述的反应器系统,其中所述集液器定位在所述流量控制机构的上游。

22. 根据权利要求1至5中任一项所述的反应器系统,其中所述反应器腔室配置为含有体积等于或小于50毫升并且等于或大于10微升的液体培养基。

23. 根据权利要求2所述的反应器系统,其中所述反应器腔室的容积小于或等于50毫升。

## 化学反应器中的湿度控制

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求以下申请的优先权：2012年10月26日提交的题为“Humidity Control in Chemical Reactors”的美国临时专利申请序列No.61/719,085；2013年8月23日提交的题为“Humidity Control in Chemical Reactors”的美国临时专利申请序列No.61/869,118；以及2013年10月23日提交的题为“Humidity Control in Chemical Reactors”的欧洲申请No.13306464.2，上述申请中的每个申请的全部内容通过参引并入本文以用于所有目的。

### 技术领域

[0003] 本发明总体上描述了用于控制化学反应器中的湿度的系统和方法。

### 背景技术

[0004] 目前人们对开发用于培养细胞（例如用于生物制药）的小容积生物反应器抱有巨大兴趣。控制这样的反应器中的液位会具有挑战性。例如，反应器中的液体培养基的少量蒸发可能导致体积的相对大的改变，其可能不利地影响生物反应器操作。因此期望用于控制这样的化学反应器中的湿度的改进的系统和方法。

### 发明内容

[0005] 本发明总体上描述了对化学反应器中的湿度的控制及其相关系统和方法。某些实施方案涉及对输气导管中的湿度的控制。在一些情况下，本发明的主题涉及相关产品、特定问题的备选解决方案以及/或者一个或更多个系统和/或制品的多种不同用途。

[0006] 在某些实施方案中，提供了一种反应器系统。在一些实施方案中，反应器系统包含：反应器腔室；反应器腔室进气导管，其配置成将气体通过反应器腔室进气口输送到反应器腔室中；流量控制机构，其配置成通过所述反应器腔室进气导管的气体流量调节成等于或小于约每秒1毫升的速率；以及增湿器，其配置成对通过反应器腔室进气导管输送的气体进行增湿，该增湿器定位在流量控制机构与反应器腔室进气口之间。

[0007] 在一些实施方案中，反应器系统包含：反应器腔室；反应器腔室出气导管，其配置成将气体通过反应器腔室出气口输送出反应器腔室；流量控制机构，其配置成通过所述反应器腔室出气导管的气体流量调节成等于或小于约每秒1毫升的速率；以及集液器（liquid trap），其配置成移除反应器腔室出气导管内的气体中的液体蒸气，该集液器定位在流量控制机构与反应器腔室出气口之间。

[0008] 在某些实施方案中，反应器系统包含：反应器腔室，其包括液体子腔室、气体子腔室以及透气柔性膜，所述液体子腔室配置为容纳包含至少一种生物细胞的液体生长培养基；所述气体子腔室配置为容纳液体生长培养基上方的气体顶部空间；所述透气柔性膜将液体子腔室与气体子腔室隔开。在某些实施方案中，反应器系统包含：进气导管，其配置成将气体输送到气体子腔室中；出气导管，其配置成将气体输送出气体子腔室；以及反应器腔

室外部的气体旁路导管,其连接进气导管与出气导管。

[0009] 某些实施方案涉及操作反应器的方法。在某些实施方案中,该方法包括提供反应器腔室,反应器腔室包含:液体子腔室,其配置为容纳包含至少一种生物细胞的液体生长培养基;气体子腔室,其配置为容纳液体生长培养基上方的气体顶部空间;以及柔性膜,其将液体子腔室与气体子腔室隔开。在一些实施方案中,该方法包括:将气体通过进气导管从气源输送至气体子腔室以使透气柔性膜变形,使得液体至少部分地从液体子腔室中移除;减少向气体子腔室的气体供给,使得柔性膜朝着其原始位置恢复;通过连接至进气导管并且在反应器腔室外部的气体旁路输送来自气源的气体,以将来自进气导管的液体移除;以及至少第二次将来自气源的气体供给至气体子腔室以使透气柔性膜变形,使得液体至少部分地从液体子腔室中排出。

[0010] 在结合附图考虑的情况下,根据下面对本发明的各种非限制性实施方案的详细描述,本发明的其他优点和新颖特征将变得明显。在本说明书与通过引用而被并入的文献包括冲突和/或不一致的公开内容的情况下,应以本说明书为准。

## 附图说明

[0011] 将参照附图以示例的方式描述本发明的非限制性实施方案,所述附图是示意性的且并不意在按比例绘制。在附图中,所示的每个相同或几乎相同的部件通常用同一编号表示。为了清楚的目的,并未在每个附图中标记每一个部件,并且在示图对于使得本领域普通技术人员能够理解本发明不是必需的情况下,也未示出本发明的各个实施方案的每一个部件。在附图中:

[0012] 图1为根据某些实施方案的反应器系统的横截面示意图;

[0013] 图2A至图2C为根据一组实施方案的反应器腔室及其操作模式的横截面示意图;

[0014] 图3为包括串联布置的多个反应器腔室的反应器系统的底视横截面示意图;

[0015] 图4A至图4B为根据某些实施方案的A)具有长路径的反应器系统的横截面示意图,以及B)具有短路径的反应器系统的横截面示意图;

[0016] 图5为根据某些实施方案的反应器系统的横截面示意图;

[0017] 图6为根据一组实施方案的用于反应器系统的气体歧管的横截面示意图;

[0018] 图7为根据一些实施方案的用于反应器系统的气体歧管的横截面示意图;以及

[0019] 图8为根据某些实施方案的反应器系统的照片。

## 具体实施方式

[0020] 本发明总体上描述了对化学反应器中的湿度的控制及其相关系统和方法。在某些实施方案中,可以控制输气导管内和腔室内的湿度以抑制气体输送路径中的不期望的凝结。通过抑制气体输送路径中的凝结,可以限制(或消除)这样的路径的堵塞,使得可以更容易并且更可控地实现气体的输送。另外,还描述了用于吹扫来自化学反应器系统的凝结液体的策略。

[0021] 本文中所描述的一些实施方案可以用于控制蒸发并且对反应器腔室中的液体损失进行补偿。这样的控制和补偿在至少少量液体的损失也会不利地影响反应器性能的小容积反应器(例如,容积为约50毫升或更少的反应器)中会特别有用。在某些实施方案中,本文

中描述的反应器包含液相(其可以包含例如用于生物细胞的液体生长培养基,例如本领域的普通技术人员已知的包含必需的氨基酸和辅助因子的任何常见的细胞生长培养基)和气相(例如,包括二氧化碳、氧气和/或惰性气体)。如下面更加详细描述,在一些这样的实施方案中,液相和气相可以直接接触,而在另一些这样的实施方案中,液相和气相可以通过可移动壁隔开。

[0022] 在某些实施方案中,可以将增湿器直接或间接地连接至反应器腔室的进气口。增湿器可以为任何这样的容器:其中气体是通过温度等于或高于(例如,高至少约1°C、高至少约5°C、高至少约10°C、高至少约20°C、高至少约30°C、或高至少约40°C(和/或在某些实施方案中,高出达约50°C、高出达约75°C或者更多))反应器腔室中液体的温度(例如,在约30°C与约40°C之间)的液体输送(例如,起泡)。增湿器可以配置成产生液体蒸气含量大于输送到增湿器中的气体的液体蒸气含量的增湿器出气流。例如,在一些实施方案中,液体蒸气含量大于或等于增湿器温度饱和点的约70%(例如,大于或等于约80%、大于或等于约90%、约100%)。

[0023] 在一些实施方案中,可以将集液器连接至反应器腔室的出气口。集液器可以为其中气体通过温度等于或低于(例如,低至少约1°C、低至少约5°C、低至少约10°C、或低至少约20°C)反应器腔室中液体之温度的液体输送(例如,起泡)的任何容器。集液器可以配置成产生液体蒸气含量低于输送到集液器中的气体之液体蒸气含量的集液器出气流。例如,气体的液体蒸气含量可以从约0%至约10%(例如,从约0%至约5%)。

[0024] 在某些实施方案中,例如,可以通过在一段时间期间用气体冲洗管路来移除导向反应器腔室的一个或多个入口和/或出口的输气管路中的液体,其中在室的入口与出口之间存在一个或多个未堵塞的连接,或者其被设计成进入到室中或由于室的状态而暂时未堵塞。

[0025] 在某些实施方案中,通过反应器腔室的气体的流率可以通过利用导入腔室和/或导出腔室的输气导管中的收缩部(constriction)(或其他流量(flow rate)调节装置)而减少(例如,至少约80%、至少约90%、至少约95%(和/或在一些实施方案中,高达约99%或者更多))。在一些其中存在增湿器的这样的实施方案中,增湿器可以位于入口收缩部与反应器腔室的入口之间。在一些其中存在集液器的这样的实施方案中,集液器可以位于反应器腔室与出口收缩部之间。收缩部的这样的定位能够确保收缩部的液体堵塞被抑制或消除。

[0026] 图1为反应器系统100的示意图。反应器系统100可以包含反应器腔室102。反应器系统100还可以包含反应器腔室进气导管104。反应器腔室进气导管104可以被配置成将气体通过反应器腔室进气口106输送到反应器腔室102中。

[0027] 反应器系统100还可以包括流量控制机构108,其被配置为调节通过反应器腔室进气导管的气体流动。可以使用多种合适的装置作为流动控制机构。例如,在某些实施方案中,包括图1中示出的那些实施方案,流量控制机构108对应于供气导管中的收缩部。在某些实施方案中,与供气导管的上游和下游横截面直径中的较小的横截面直径相比,在收缩部内的供气导管横截面尺寸在某些实施方案中可以小至少约10%、小至少约25%、小至少约50%、小至少约80%、小至少约90%或者小至少约95%(和/或在一些实施方案中小高达约99%,或者更小)。在另一些实施方案中,流量控制机构108对应于通常在一定压力下自动地切断气体的流动的调压器。通常而言,可以使用阻碍流动的任何合适的流量控制机构,例

如,供气导管的收缩部、扩展部,供气导管中的阻抗材料(impedance material)(例如,过滤物)等。

[0028] 在某些实施方案中,流量控制机构108配置成调节气体以相对低的流率流过反应器腔室进气导管。例如,在某些实施方案中,流量控制机构108配置成将通过反应器腔室进气导管的气体流量调节成等于或小于约每秒1毫升、等于或小于约每秒100微升或者等于或小于约每秒10微升(和/或在某些实施方案中,低至约每秒0.1微升)的流率。将气体相对慢地输送通过反应器系统对于例如可能需要气体相对慢地流到反应器腔室的小规模反应器会是重要的。

[0029] 在某些实施方案中,反应器系统100包括增湿器110。增湿器110可以被配置成对通过反应器腔室进气导管104输送的气体进行增湿。增湿器可以包含例如容纳在容器中的液体。增湿器的进气导管可以具有浸入在液体中的出口,使得通过增湿器中的液体的气体起泡。随后,气体可以经由出气导管被输送出增湿器。本领域普通技术人员能够设计其他的方案来实现通过反应室进气导管104输送的气体的增湿。

[0030] 在某些实施方案中,增湿器110定位在流量控制机构108与反应器腔室进气口106之间。也就是说,增湿器110可以以流体流动的方式连接,使得气体被输送出流量控制机构108之后,接着被输送通过增湿器110,并且接着被输送至反应器腔室102。以这样的方式来定位增湿器能够降低反应器腔室进气导管104中的液体凝结的程度。在其中增湿器110被放置在流量控制机构108的上游的情况下,离开增湿器的相对潮湿的气体会更加易于凝结同时相对慢地移动通过流量控制机构108的窄的通道。另一方面,在增湿器110被放置在流量控制机构108的下游的情况下,输送通过流量控制机构108的气体相对干,并且凝结能够被抑制(或消除)。

[0031] 增湿器110可以例如用于向反应器腔室102供给液体或者维持反应器腔室102内的液位。例如,如果反应器腔室102内的液体在操作期间蒸发或者以其他方式被从反应器腔室移除,则通过反应器腔室进气导管104供给的气体中的液体可从反应器腔室102中的气体转换为反应室102中的液体(任选地,下面更加详细讨论的通过可移动壁例如膜)。如果反应器腔室102内的液位被确定在期望的水平,则通过反应器腔室进气导管104供给的气体中的液体的量可被设置(例如,使用增湿器110)成使得反应器腔室102内的液体的蒸发被抑制或者消除。

[0032] 在一些实施方案中,反应器系统100包括反应器腔室出气导管112。反应器腔室出气导管112可以配置成将气体通过反应器腔室出气口114输送出反应器腔室。例如,在下面参照如2A至图2C和图3更加详细讨论的,在驱动(actuate)可移动壁(例如,柔性膜)之后,气体可以被输送出反应器腔室。在将气体中的氧气和/或CO<sub>2</sub>从气体顶部空间输送至反应器腔室内的液体培养基之后,气体也可以被输送出反应器腔室。

[0033] 在某些实施方案中,反应器系统100包括被配置为调节通过反应器腔室出气导管112的气体的流量的流量控制机构116。任何合适的装置都可以用于流量控制机构116,包括以上关于流量控制机构108所概述的任何装置。在某些实施方案中,流量控制结构116配置成将通过反应器腔室进气导管的气体调节为以相对低的流率(例如,以等于或小于约每秒1毫升的速率,或者以上面提到的关于流量控制机构108的任何其他的速率)流动。

[0034] 在某些实施方案中,反应器系统100包括集液器118。集液器118可以被配置成移除

反应器腔室出气导管112中的气体中的液体蒸气。例如,集液器118可以用来测量离开反应器腔室102的液体的量(例如,通过测量容纳在集液器中的液体的量的变化)。通过确定离开反应器腔室102的液体的量,可以在不直接测量反应器腔室内的液体的量(在某些情况下可能难以进行)的情况下确定反应器腔室是否有液体损失。

[0035] 在一些实施方案中,集液器118定位在流量控制机构116与反应器腔室出气口114之间。也就是说,集液器118可以以流体流动的方式连接,使得气体被输送出反应器腔室102之后,气体接着被输送通过集液器118,并且接着被输送至流量控制机构116。以这样的方式来定位集液器能够降低反应器腔室出气导管112中的液体凝结的程度。在其中集液器118被放置在流量控制机构116的下游的情况下,离开反应器腔室的相对潮湿的气体会更加易于凝结同时相对缓慢地移动通过流量控制机构116的窄的通道。另一方面,在集液器118被放置在流量控制机构116的上游的情况下,集液器可以用来在气体被输送至流量控制结构116之前移除气体中的蒸气(使得输送通过流量控制结构116的气体相对干燥),并且凝结能够被抑制(或消除)。

[0036] 在某些实施方案中,可以使用增湿器和/或集液器来确定添加至反应器腔室或从反应器腔室失去的液体的量。这可例如通过对增湿器、反应器腔室和/或集液器称重来实现。例如,可以测量增湿器中液体的重量,测量集液器中的液体的重量,确定进入增湿器的气体流的液体蒸气量,以及确定离开集液器的气体流的液体蒸气量。经过这样的确定之后,可以执行质量平衡以确定添加至反应器腔室或从反应器腔室失去的液体的量,可选地不用对反应器腔室自身进行称重。作为一个说明性实例,如果进入增湿器的气体流中的液体蒸气的量等于离开集液器的气体流中的液体蒸气的量,则可以通过从增湿器的重量变化中减去集液器的重量变化来确定添加至反应器腔室或从反应器腔室失去的液体的量。

[0037] 在一些实施方案中,通过测量通过反应器腔室入口和出口的气体的湿度可以确定反应器腔室中的液体的增湿率和/或蒸发率。

[0038] 在一些实施方案中,可以通过测量腔室的入口和出口中的单种或多种气体的浓度来确定进入反应器腔室的单种或多种不同气体的吸收率和/或释放率。

[0039] 在某些实施方案中,上面概述的两种或更多种(或所有)策略可以彼此结合使用。

[0040] 虽然图1示出了其中存在增湿器110和集液器118两者的系统,但是某些实施方案可以仅使用增湿器或仅使用集液器。例如在某些实施方案中,反应器系统100包括增湿器110而不包括集液器118。在一些实施方案中,反应器系统100包括集液器118而不包括增湿器110。

[0041] 在某些实施方案中,反应器腔室102包含气体顶部空间和液体培养基,气体顶部空间和液体培养基直接接触。然而,在另一些实施方案中,气体顶部空间和液体培养基被可移动壁隔开。例如,在Ram等人在2011年9月30日提交的题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列No.13/249,959,和Lee在2003年11月18日提交的题为“Peristaltic Mixing and Oxygenation System”的美国专利申请公开No.2005/0106045中描述了采用这样的布置的反应器,每个申请的全部内容通过参引并入本文用于所有目的。

[0042] 图2A至图2C为概述如何可以通过偏转可移动壁使流体被输送到反应器腔室的液体子腔室中和离开反应器腔室的液体子腔室的横截面示意图。在图2A至图2C中,反应器系

统200包含反应器腔室202。在某些实施方案中,图2A至图2C中的反应器腔室202对应于图1中的反应器腔室102。反应器腔室202可以包含液体子腔室204。液体子腔室204可以配置为容纳包含至少一种生物细胞的液体生长培养基。在某些实施方案中,反应器腔室202可以包括气体子腔室206。气体子腔室206可以配置成容纳液体子腔室204中之液体培养基上方的气体顶部空间。

[0043] 反应器腔室202还可以包括可以将液体子腔室204与气体子腔室206隔开的可移动壁208。可移动壁208可以包括例如柔性膜。在某些实施方案中,可移动壁由对至少一种气体是通透性的介质(即气体可透过介质)形成。在某些实施方案中,例如可移动壁对氧气和/或二氧化碳气体是通透性的。在其中可移动壁208对气体(例如,氧气和/或二氧化碳)是通透性的这样的实施方案中,气体子腔室206中的气体可被输送至液体子腔室204,或反之亦然。例如,将氧气输送到液体子腔室204中的液体培养基中和/或通过将二氧化碳输送到液体子腔室204或输送出液体子腔室204来控制PH的此类输送是有用的。

[0044] 在某些实施方案中,反应器系统200可以包含可以配置成将气体输送到气体子腔室206中的进气导管104。在某些实施方案中,图2A至图2C中的进气导管104可以对应于图1中示出的进气导管104。输送到气体子腔室206中的气体可以来源于例如气源216。可以使用任何合适的气源作为气源216,例如气瓶。在某些实施方案中,气源216为氧气源和/或二氧化碳源。

[0045] 在一些实施方案中,反应器系统200包含配置成将气体输送出气体子腔室206的出气导管112。在某些实施方案中,图2A至图2C中出气导管112可以对应于图1中示出的出气导管112。在一些实施方案中,反应器系统200包含将进气导管104与出气导管112连接的气体旁路导管210。在某些实施方案中,气体旁路导管210可以配置为使得其在反应器腔室202外部。在图1中示出的实施方案的集合还可以包含示出为导管210的气体旁路导管。在某些实施方案中,反应器系统200还可以包含进液导管212和出液导管214。

[0046] 在某些实施方案中,可以驱动可移动壁208使得液体子腔室204和气体子腔室206的容积改变。例如,某些实施方案涉及将气体从气源216通过进气导管104输送至气体子腔室206以使可移动壁208变形。可以例如通过将反应器200配置成使得在气体被输送至气体子腔室206时气体子腔室206被施压来实现可移动壁208的变形。可以例如通过在气体被供给到气体子腔室206时限制从出气导管112出来的气体的流量(例如,使用阀门或其他合适的限流机构)来实现这样的施压。

[0047] 在某些实施方案中,使可移动壁208变形可能导致液体至少部分地从液体子腔室204中移除。例如,在图2B中,可移动壁208已经变形为使得基本上液体子腔室204中的所有液体都已经从反应器腔室202中移除。如下面更加详细描述,例如在图3中示出的,这样的操作可以用于将液体子腔室204中的液体输送至其他反应器中的其他液体子腔室。

[0048] 在某些实施方案中,在液体子腔室204中的液体中的至少一部分已经从液体子腔室204移除之后,可以减少向气体子腔室206的供气,使得可移动壁208朝着其原始位置(例如,在图2A中示出的位置)恢复。在某些实施方案中,可移动壁208将被偏转成使得气体子腔室206内的气体的至少一部分从气体子腔室中移除。如下面更加详细描述,例如,如果液体从例如来自另一上游反应器的进液口212进入液体子腔室204,则可以移除这样的气体。

[0049] 某些实施方案包括以下步骤:至少第二次(并且在某些实施方案中,至少10次、至

少100次或者更多)从气源216向气体子室206供给气体以使可移动壁208变形,使得液体至少部分地从液体子腔室204移除。当反复地执行这样的气体引入步骤时,可移动壁208可以用作将液体输送到液体子腔室204中和输送出液体子腔室204的泵送机构的一部分。在2011年9月30日由Ram等人提交的题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列No.13/249,959中详细的描述了这样的操作。在某些实施方案中,可以相对快速地(例如,在某些实施方案中,以在约0.1赫兹与约1000赫兹之间、约0.5赫兹与约10赫兹之间、或约1赫兹与约3赫兹之间的频率)进行从气源216向气体子腔室206供给气体的多个步骤。

[0050] 在其中气体被多次输送到气体子腔室206中的某些实施方案中,可以通过气体旁路导管210从气源输送气体。可以执行通过气体旁路导管210输送气体以移除来自进气导管104的液体而不将液体输送至气体子腔室206。例如,在某些实施方案中,可以关闭在气体旁路导管210与进气口106之间的第一阀门并且关闭气体旁路导管210与出气口114之间的第二阀门(并且气体旁路导管210中的任何阀门可以是打开的),使得在气体在通过进气导管104输送时,气体改道通过气体旁路导管210,并且接着从出气导管112出来。这样的操作可以用于将任何不期望的凝结液体冲出进气导管,这可以改进本文其他部分描述的供气方法的性能。在某些实施方案中,可以在如上所述的相对快速地执行将气体输送至气体子腔室206的步骤(例如,如下所述,驱动可移动壁)之间使气体通过旁路导管210(例如,如上所述)输送。

[0051] 在一些实施方案中,可以布置(例如,串联)多组反应器腔室,使得实现沿着一个或更多个流体路径的流体混合。图3为示出如Ram等人在2011年9月30日提交的题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列No.13/249,959中所描述的可以用于建立串联连接的多个反应器腔室102A至102C之间的混合的液体流动路径的底视横截面示意图。

[0052] 在图3中,反应器系统300包括通过箭头310指示的第一流体路径。第一流体路径可以包括第一反应器腔室102A、第二反应器腔室102B和第三反应器腔室102C。反应器系统300还包括导管321、导管322和导管323,其对应于反应器腔室102A至反应器腔室102C的进液导管和/或出液导管。例如,在图3中,导管321为反应器腔室102B的进液导管和反应器腔室102A的出液导管;导管322为反应器腔室102C的进液导管和反应器腔室102B的出液导管;以及导管323为反应器腔室102A的进液导管和反应器腔室102C的出液导管。当然,液体的流动也可以反转,使得导管321、导管322和导管323能够充当关于反应器腔室102A至反应器腔室102C的相反的角色。

[0053] 反应器系统300还可以包括液体输入导管350和液体输出导管351,其可以用于将液体输送到反应器腔室102A、反应器腔室102B和反应器腔室102C中的液体子腔室中或者输送出反应器腔室102A、反应器腔室102B和反应器腔室102C中的液体子腔室。阀门352可以位于液体输入导管350中,并且阀门353可以位于液体输出导管351中以抑制或阻止液体在操作期间流出混合系统。

[0054] 在某些实施方案中,可驱动反应器腔室102A至反应器腔室102C的可移动壁以使液体沿着流体路径310(和/或沿着与路径310方向相反的流体路径)输送。这可以例如通过随后使反应器腔室102A至反应器腔室102C中的可移动壁变形来实现使得液体在受控的方向

上输送。在一些实施方案中,反应器腔室102A至反应器腔室102C中的每个反应器腔室可以配置成使得它们各自能够采取这样的关闭位置:其中可移动壁208应变使得例如如图2B中示出的液体子腔室的容积减少。可以例如通过使反应器腔室102A至反应器腔室102C变形使得他们的操作状态在开启配置(图2A或图2C)与关闭(图2B)配置之间交替来实现蠕动混合。在一些实施方案中,可以使用三个模式来实现蠕动泵送:第一模式,其中反应器腔室102A的液体子腔室是关闭的并且反应器腔室102B和反应器腔室102C中的液体子腔室是开启的;第二模式,其中反应器腔室102B的液体子腔室是关闭的并且反应器腔室102A和反应器腔室102C中的液体子腔室是开启的;以及第三模式,其中反应器腔室102C的液体子腔室是关闭的并且反应器腔室102A和反应器腔室102B中的液体子腔室是开启的。通过在这三种模式之间转换(例如,从第一模式改变至第二模式,从第二模式改变至第三模式,以及从第三模式改变至第一模式等),液体能够沿着顺时针方向(如在图2A至图2B中示出的)在反应器腔室102A至102C之间输送。当然,通过重新安排模式发生的顺序(例如,通过从第一模式改变至第三模式,从第三模式改变至第二模式,以及从第二模式改变至第一模式等),液体也能够沿着逆时针方向输送。

[0055] 在某些实施方案中,本文所描述的反应器系统可以用作生物反应器。例如,反应器系统可以配置为培养生物细胞。在一些这样的实施方案中,包含至少一种细胞的液体生长培养基容纳在反应器腔室中以实现细胞生长。液体生长培养基可以包含任意类型的生物细胞或细胞类型。例如,细胞可以为细菌(例如,大肠杆菌)或其他单细胞生物、植物细胞或动物细胞。在一些实施方案中,细胞可以为真核细胞。如果细胞为单细胞生物,则细胞可以为例如原生动物、锥虫、变形虫、酵母细胞、藻类等。如果细胞为动物细胞,则细胞可以为例如无脊椎动物细胞(例如,来自果蝇的细胞)、鱼细胞(例如,斑马鱼细胞)、两栖动物细胞(例如,蛙细胞)、爬行动物细胞、鸟细胞或哺乳动物细胞(例如,灵长动物细胞、牛细胞、马细胞、猪细胞、山羊细胞、犬细胞、猫细胞、啮齿动物(例如,大鼠或小鼠)细胞)。在一些实施方案中,细胞可以为人细胞。在一些实施方案中,细胞可以为仓鼠细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。如果细胞来自多细胞生物,则细胞可以来自生物体的任意部分。例如,如果细胞来自动物,则细胞可以为心脏细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、软骨细胞、神经细胞、骨细胞、肌细胞、血细胞、内皮细胞、免疫细胞(例如,T细胞、B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞)、干细胞等。在一些情况下,细胞可以为基因改造的细胞。

[0056] 在一些实施方案中,反应器腔室可以配置为容纳(和/或可以在反应器操作期间容纳)体积等于或小于约50毫升、等于或小于约10毫升、或等于或小于约2毫升(和/或在某些实施方案中,等于或大于10微升、等于或大于100微升、或等于或大于1毫升)的液体培养基。在某些实施方案中,根据通过用室的最大横截面尺寸除以室的最小横截面尺寸所测量的,反应器腔室具有小于约10(或少于约8、例如在约5与约8之间)的纵横比。

[0057] 下面的实施例旨在示出本发明的某些实施方案,而未例证本发明的全部范围。

[0058] 实施例

[0059] 本实施例描述了结合发明的湿度控制方法的设计和操作。

[0060] 在许多生物反应器系统中,当微型生物反应器(micro-bioreactor)用于长期(10天至14天)培养时出现问题。例如,对于长期培养,蒸发变成较大的问题。蒸发可能导致相对

小的反应器每天损失反应器中的工作液容积的20%或者更多。甚至在进气管路被增湿之后,液体培养基蒸发出反应器仍然会是问题。理论上,如果反应器中的液体培养基上方的空气被增湿并且在37°C下完全饱和,则对于给定压力和温度由于上方的空气是水蒸气饱和的而不应该存在蒸发。然而,即使空气在进入进气管路时在80°C下是饱和的,但是如果输气导管足够长则一旦空气到达反应器腔室也可能不再饱和。

[0061] 即使在增湿时,也通常必须采取措施以抑制液体损失并且防止培养基变成高摩尔渗透压浓度。例如,对于长期培养可以通过注入无菌水补偿蒸发。这可以例如通过用无菌水补充反应器腔室(例如,每隔几个小时)实现。这样的方法能够很好地用于固定工作容积的培养,例如恒化培养。然而,对于许多其他的培养,包括某些CHO培养,培养基的体积在整个培养期间因脱机取样和进料而可能是不同的。在这样的培养中,一直实施针对蒸发的闭环补偿会非常具有挑战性(或不可能),并且通常而言,蒸发率需要事先通过单独的实验确定。蒸发补偿的其他方法是公知的,但是大多数需要微型生物反应器的容积在整个培养中保持恒定。

[0062] 用于闭环蒸发补偿而不需要使工作容积保持恒定的一种可能的替选方法可以是实时称量本地增湿器和集水器并且针对任何的重量增加通过向生长室中注入等量的水来进行补偿。

[0063] 在许多CHO培养中,用于培养CHO细胞的慢的混合速率可能引起水在进气管路内凝结,在许多细菌培养中到当空气流动较快时可更多的观察到的问题。当使用如图4A中示出的远程增湿器的情况下凝结会特别有问题,原因是增湿器与微型生物反应器之间未加热的长路径。在存在空气阻力管路例如配置成减小生长室中的剪切应力的空气阻力管路的情况下,这个问题会进一步加剧。在窄的阻力通道中水的粘性与空气的粘性相比高两个数量级。因此,当水堵住空气通道时,水的流率很慢使得在混合器起动期间膜根本不偏转。此外,据认为存在与增湿空气接触的不锈钢部件(例如,其可能存在于气体管路中的电磁阀中)因金属较高的热导率发生更多的凝结。电磁阀上的水的凝结除了减少增湿的有效性以外还能够使得电磁阀随时间失效。

[0064] 在图4B的示意图中示出了新的增湿策略。新的策略使用本地增湿器(例如,设置在45°C)和集水器(例如,设置在25°C)。该配置防止了增湿空气与电磁阀发生接触,这将确保阀门较长的寿命。此外,在该配置中,阻力管路放置在增湿器之前并在集水器之后;因此,仅干燥空气穿过阻力管路以防止阻力管路任何潜在地被凝结的水堵塞。虽然增湿器中的空气将在较短的时间段(相对于放置在进气管路的开始处时实现平衡所需要的时间量)达到平衡,但是据认为将水直接注入生长室将足以补偿所损失的液体。此外,附加的集水器可以用作关于混合器阻力的电容器的水压等效,其允许膜的偏转时间增加,这是因为高的电容能够增加偏转的时间常数。这意味着阻力通道可以变得更宽并且如果在通道中存在任何残留的水,则液滴将能够在较宽的通道中更快地移动。此外,混合器现在具有单独的输入气体管路和输出气体管路以使得在进气管路的任何部分堵塞的情况下能够对管路进行冲洗。在整个实验中将定期地执行该冲洗过程并且该冲洗穿过如在图4B中示出的混合器上部的旁路导管。

[0065] 为了进行开环蒸发补偿,在进行细胞培养实验之前应该对RECA微型生物反应器的蒸发速率进行表征。注入生长腔室的绿色食品染料的浓度增加量被用作计算蒸发速率的

参数。对于这种测量,强度变量测量将比广度变量(例如,容积或质量)测量更准确,这是因为对于广度变量误差更大并且表征将非常依赖于实验程序。因为RECA微型生物反应器将光学密度(OD)传感器一体化,所以使用OD传感器测量由染料散射/吸收的光是获得蒸发速率 $\alpha$ 的准确方法。作为时间的函数的染料浓度的提高量将满足以下关系:

$$[0066] \quad C(t) = \frac{C_0}{1 - (\alpha/V)t}$$

[0067] 其中,C(t)为作为时间的函数的食品染料的浓度, $C_0$ 为食品染料的初始浓度,并且V为生长腔室中的液体的体积(2mL)。由于预计蒸发速率不会非常高,通常具有 $1\mu\text{L/hr}$ - $10\mu\text{L/hr}$ 的数量级,所以整晚(7小时至8小时)进行该实验以获得高的准确度。在连接有 $45^\circ\text{C}$ 的本地增湿器的情况下测量的蒸发速率为 $4.7\mu\text{L/hr}$ 。如果该蒸发未被补偿,则微型生物反应器的容积的75%将在14天实验结束时被蒸发掉。这会显著地增加培养基的摩尔渗透压浓度并且抑制生长。

[0068] 上面概述的策略可以与如图5中示出的新的反应器设计一起使用,该新的反应器在本实施例中被称为抗蒸发补偿驱动器(Resistive Evaporation Compensated Actuator, RECA)微型生物反应器。该反应器包括五个用于注入的储存器,其中包括一个容纳用于蒸发补偿的无菌水的储存器。其他四个储存器可以用于碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )碱注入、进料以及其他必要的补充。可以通过驱动蠕动泵来进行注入,通过PDMS膜依次将流体塞推到生长腔室中。在该实施例中,生长室的容积为2毫升。可以通过推动流体通过连接三个生长室的小通道来获得均匀的混合,每个生长室的容积为1毫升。还存在位于生长室之后的用于采样的10微升的储存器。可以经由10微升的塞的蠕动泵送来进行采样。除了连接至生长室,采样储存器还经由通道连接至无菌水管路和清洁空气管路。可以将空气通过采样储存器注入以将任何剩余的样品喷射到采样容器(例如,Eppendorf管)中,并且在这之后可以注入水以清洗采样储存器并且将任何细胞培养物或剩余的细胞去除。然后将清洁空气通过储存器释放出以使室干燥,使得将不会有水剩余来稀释下一样品。可以在每个采样步骤之后重复该过程。

[0069] 在图6中示出了从RECA微型生物反应器至气体歧管的连接。所有的储存器输入阀可以共享同一气体管路,这是因为无须单独控制各个输入阀。储存器的压力可以设置为 $1.5\text{psi}$  ( $1.03 \times 10^5\text{Pa}$ ),其低于混合压力 $3\text{psi}$  ( $2.06 \times 10^5\text{Pa}$ )。储存器压力可以用于确保向蠕动泵的输入经受相同的压力并且不被外部流体静压影响以确保一致的泵送容积。储存器的输出端(即,注入阀)可以由单独的气体管路来独立控制,这是因为这些阀门是确定哪些进料管路被注入到生长室中的阀门。接着是控制蠕动泵的气体管路。混合器可以具有单独的输入管路和输出管路,以使得能够对混合器管路上的水的凝结进行冲洗,这是因为进入混合器的空气可能被增湿以减少生长培养物的蒸发。微型生物反应器的生长室具有大的表面容积比,并且因此,蒸发率通常比更大的微型生物反应器的蒸发率大。此外,全部三个混合器气体管路均可以被设计为具有相同的阻力,以确保在3个生长室中具有相等的混合率。因为空气被增湿,所以可以使混合器气体管路比其余管路宽,并且如果阻力太高则任何凝结都可能堵塞管路。最后的空气管路控制到采样端口的阀门。采样端口由10微升的样品储存器和阀门组成,以控制采样端口的采样和自动清洗。在左上角中的孔可以用聚碳酸酯覆盖物密封并且用双面胶贴封。空气管路可以通过位于基片的左下角上的20个羽枝(barb)的集

合连接至气体歧管。

[0070] 气体歧管可以用于将电磁阀连接至微型生物反应器的空气管路。在图7中示出了气体歧管的设计。在该实施例中歧管具有3层。微型生物反应器的羽支连接器 (barb connector) 位于歧管的顶层的中心。中间层将电磁阀的输出端引导至羽支连接器, 羽支连接器将歧管连接至微型生物反应器。底层将主空气管路导向至电磁阀的输入端。为了更容易的参考, 表1A至表1C列出了其编号如图7中示出的所有阀门和气体连接。

[0071] 用于阀门1至阀门8的表1A

[0072]

阀门	名称	NO	NC
1	气体混合1	气体混合2 (3Psi)	气体混合2 (3Psi)
2	储存器输入	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
3	注入1	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)

[0073]

4	注入2	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
5	注入3	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
6	注入4	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
7	注入5 (水)	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
8	泵1	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)

[0074] 用于阀门9至阀门16的表1B

[0075]

阀门	名称	NO	NC
9	气体混合2	氮气 (3Psi)	氧气 (3Psi)
10	泵2	阀门关闭 (Atm)	阀门开启 (15Psi)
11	泵3	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
12	样品储存器	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
13	样品入口	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
14	样品出口	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
15	样品空气入口	阀门开启 (15Psi)	阀门关闭 (Atm)
16	气体混合3	氮气 (3Psi)	CO <sub>2</sub> (3Psi)

[0076] 用于阀门17至阀门24的表1C

[0077]

阀门	名称	NO	NC
17	混合器底部出口	混合器关闭 (Atm)	阻断
18	混合器底部入口	阻断	混合器开启 (3 Psi)
19	混合器左侧出口	混合器关闭 (Atm)	阻断
20	混合器左侧入口	阻断	混合器开启 (3 Psi)
21	混合器顶部出口	混合器关闭 (Atm)	阻断
22	混合器顶部入口	阻断	混合器开启 (3 Psi)
23	储存器压力	储存器关闭 (Atm)	储存器开启 (1.5

[0078]

			Psi)
24	气体混合 4	可利用的	可利用的

[0079] 在表1A至表1C中,NO代表常开,并且NC代表常关。对气体管路是常开或常关的选择可以被选为阀门最常见的状态,使得阀门往往是不活动的以节约能耗。特别地,阀门10(泵2)通常可以被设置为常“关”而所以其余的阀门通常被设置为常“开”。在微型生物反应器上除了对于混合和调阀所需的电磁阀以外还存在4个气体混合器电磁阀。可以通过改变气体混合3电磁阀的占空比来实现对二氧化碳(CO<sub>2</sub>)气体浓度与氮气(N<sub>2</sub>)浓度的控制。可以经由相同的策略通过气体混合2来控制氧气(O<sub>2</sub>)的气体浓度。然后利用气体混合1以50-50的占空比来将两个输出混合在一起。如果需要任何额外的调阀则可使用气体混合4。

[0080] 在图8中示出了完整的设置。可以使用便携式电脑来控制现场可编程门阵列(FPGA)板,其可以控制电磁板、加热器板和光电探测器板。可以在将空气管路连接至调压器,之后连接至气体歧管。阀门管路可以从气体歧管直接连接至微型生物反应器。混合器的入口管路可以首先连接通过空气阻力管路,接着通过45℃的本地增湿器,之后到达微型生物反应器。将混合器出口管路从微型生物反应器连接至集水器,然后连接至空气阻力管路并且然后仅连接至气体歧管。

[0081] 虽然在本文中已经描述和示出了本发明的数个实施方案,但是本领域的普通技术人员将容易地设想各种其他的方法和/或结构用于执行本文中所述的功能和/或获得本文中所述的结果和/或一个或多个优点,并且这样的变化方案和/或修改方案中的每个方案被认为在本发明的范围内。更一般地,本领域技术人员将容易理解本文中所描述的所有参数、尺寸、材料和构造均是示例性的,并且实际参数、尺寸、材料和/或构造将取决于具体应用或者本发明的教导所用于的应用。本领域的技术人员将认识到或使用不超过常规试验就

能够确定本文所描述的本发明具体实施方案的许多等效实施方案。因此,应该理解,前述实施方案仅作为示例示出,并且在所附权利要求书及其等价方案的范围内,本发明可以以不同于具体描述和要求的其他方式实践。本发明涉及本文所描述的每个单个的特征、系统、制品、材料、组件和/或方法。此外,如果这样的特征、系统、制品、材料、套装和/或方法并非相互抵触,则两个或更多个这样的特征、系统、制品、材料、套装和/或方法的任意组合包括在本发明的范围内。

[0082] 除非明确相反地指出,否则在本说明书和权利要求书中所使用的没有数量词修饰的名词应该被理解为意指“至少一个”。

[0083] 在本文中用在说明书和权利要求书中的短语“和/或”应被理解为意指元件中的“任一个或二者”这样结合:即元件在一些情况下以结合方式呈现而在另一些情况下以分离方式呈现。除非明确相反地指出,否则无论与具体确定的元件相关或不相关,都可以可选地存在与通过“和/或”子句所具体确定的元件不同的其他元件。因此,作为非限制性实施例,当与开放式用语例如“包括/包含”结合使用时,对“A和/或B”的引用在一个实施方案中可表示A但没有B(任选地包括除了B以外的元件);在另一个实施方案中,可表示B但没有A(任选地包括除了A以外的元件);在又一个实施方案中,可表示A和B二者(任选地包括其它的元件)等。

[0084] 如本文中用在说明书和权利要求书中的,“或”应该被理解为具有与如上定义的“和/或”相同的意思。例如,当在列表中分列项目时,“或”或“和/或”应该解释为是包括性的,即包括元件和可选地附加的未列出的项目的数目或列表中的至少一个,但也包括多于一个。仅明确相反地指出的表述,如“仅一个”或“正好一个”或用在权利要求书中的“由...组成”,将指包括元件的数目或列表中的正好一个元件。通常而言,当前面有排它性术语如“两者之一”、“其一”、“仅有其一”或“正好其一”时,本文所使用的表述“或”应该仅被解释为表示排它的可选方案(即“一个或另一,而非两者”)。当用在权利要求中时,“基本上由...组成”将具有在专利法领域中所使用的通常的意义。

[0085] 如在本文中用在说明书和权利要求书中的,在涉及一个或更多元件的列表时所使用的短语“至少一个”应该理解为意指选自元件列表中任意一个或更多个元件的至少一个元件,但是不一定包括元件列表内具体列出的各个和每个元件中的至少一个,并且不排除元件列表中的元件的任意组合。此定义还允许,可以任选地存在除了短语“至少一个”所涉及的元件列表中具体限定的元件之外的元件,而不论其与具体限定的元件是否相关。因此,作为非限制性的实施例,“A和B中的至少一个”(或等同地,“A或B中的至少一个”,或等同地,“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可指至少一个A,可选地包含多于一个A,但不存在B(并且任选地包含除了B以外的元件);在另一个实施方案中,可表示至少一个B,任选地包含多于一个B,但不存在A(并且任选地包含除了A以外的元件);在又一个实施方案中,可表示至少一个A,任选地包含多于一个A,以及至少一个B,任选地包含多于一个B(并且任选地包括其它的元件)等。

[0086] 在权利要求以及以上说明书中,所有的过渡性短语例如“包括为”、“包含为”、“载有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“保持”等应该理解为开放式的,即指的是包括但不局限于。如美国专利局专利审查程序手册第2111.03部分所陈述的,仅连接短语“由.....组成”和“基本由.....组成”分别为封闭式或半封闭式的连接短语。

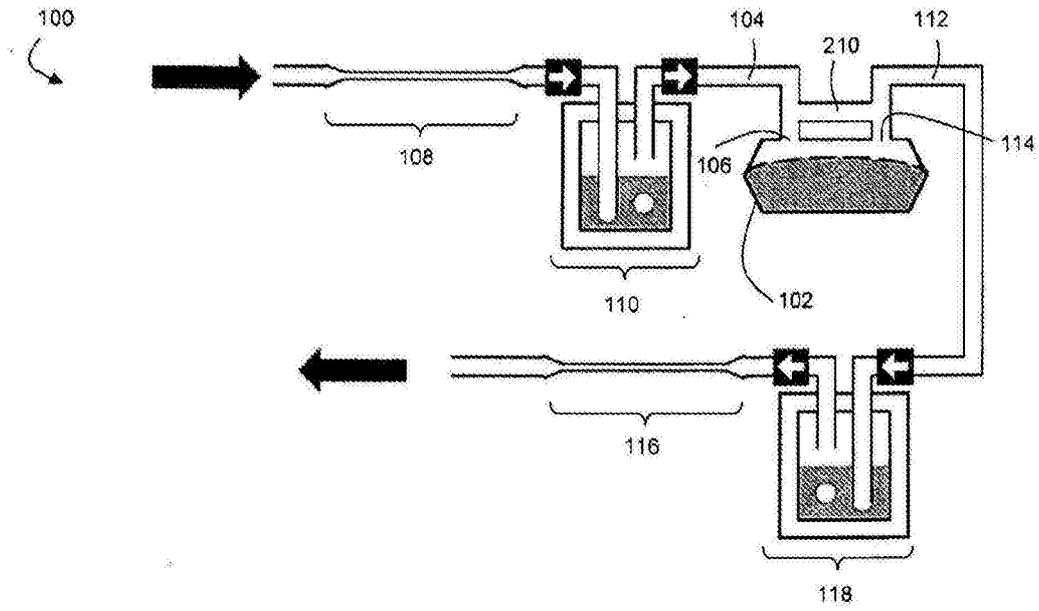


图1

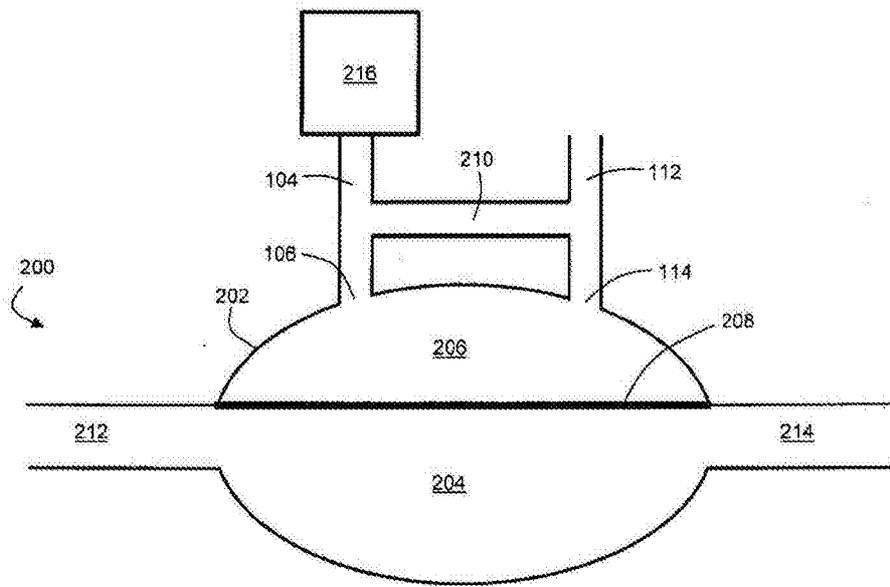


图2A

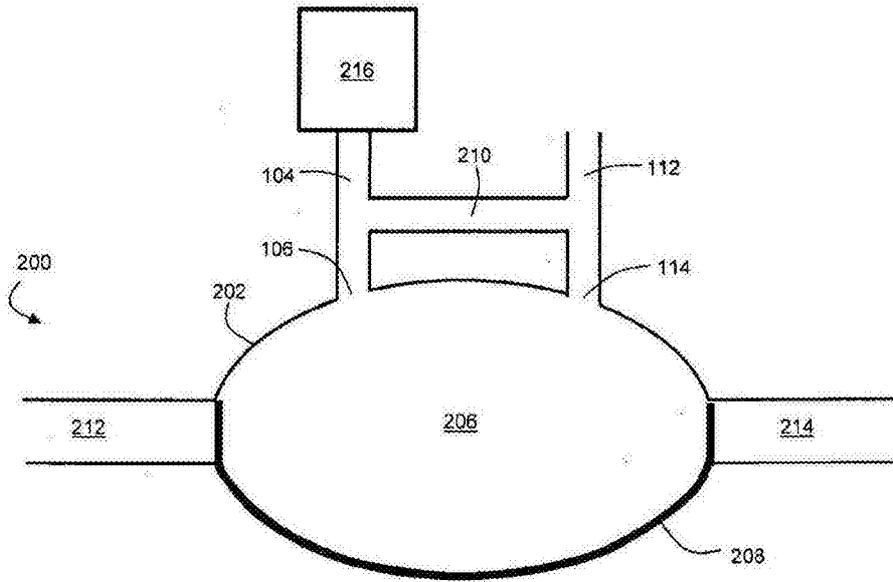


图2B

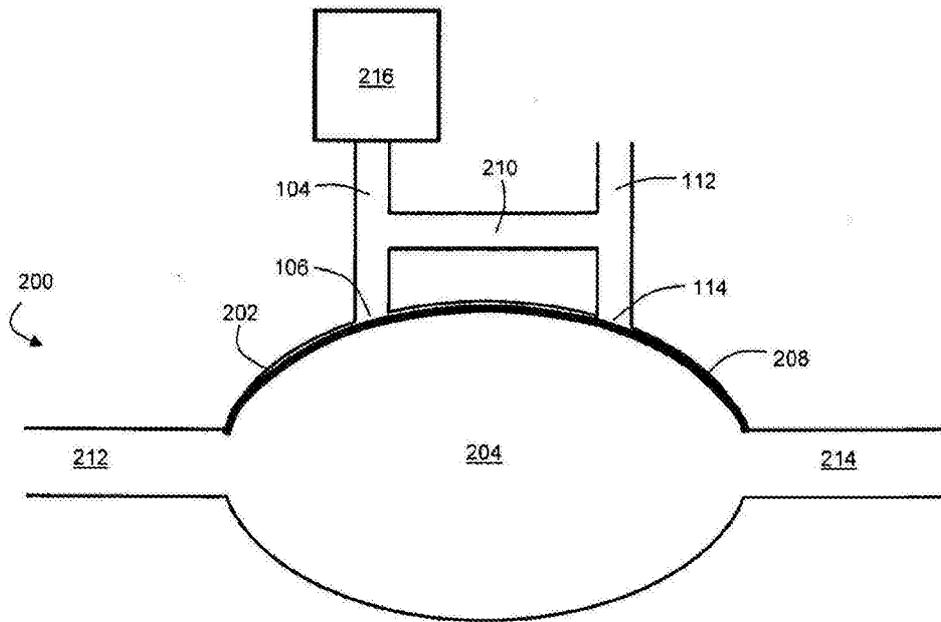


图2C

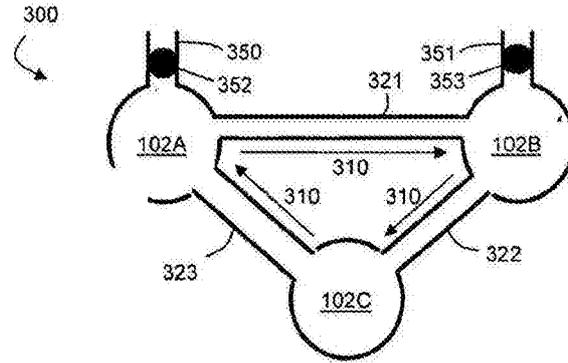


图3

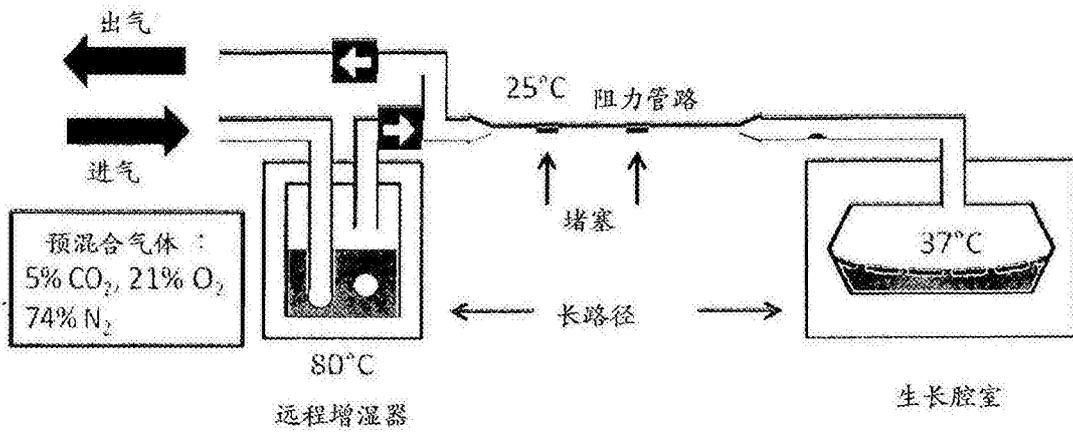


图4A

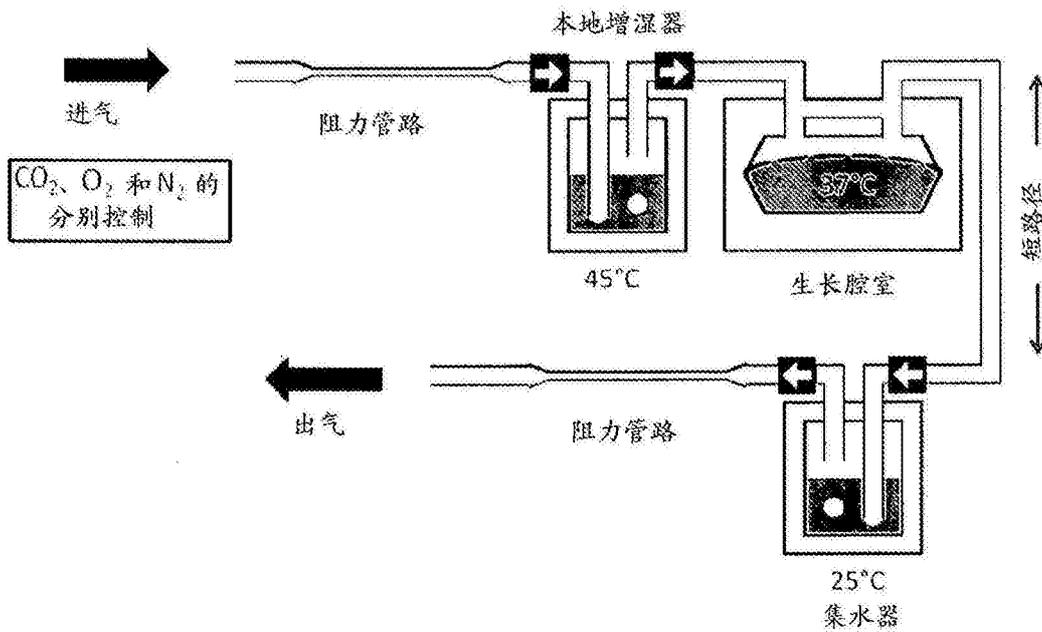


图4B

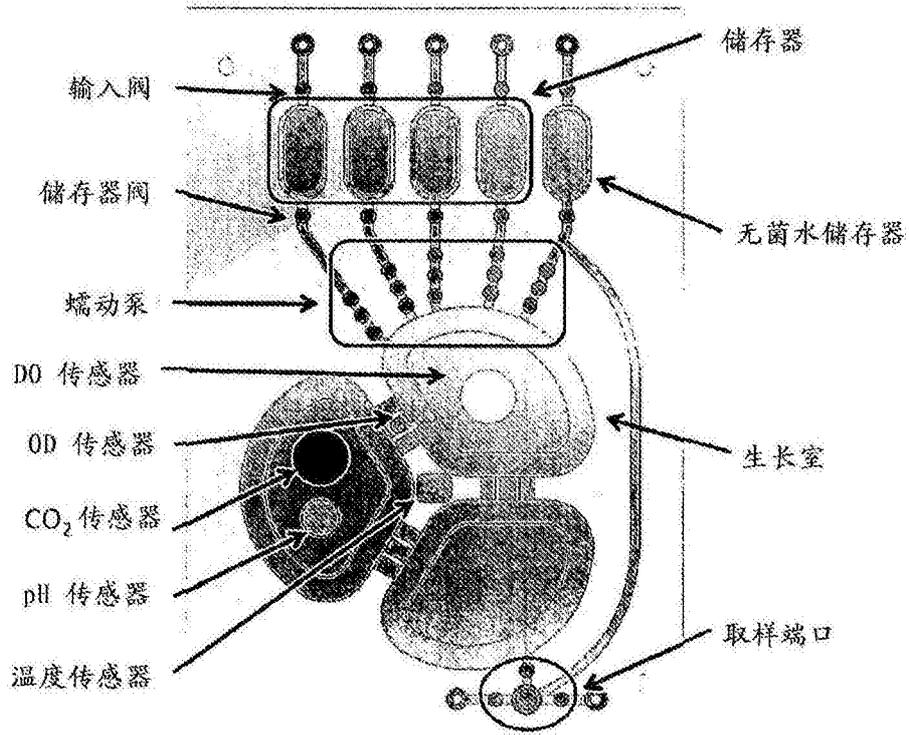


图5

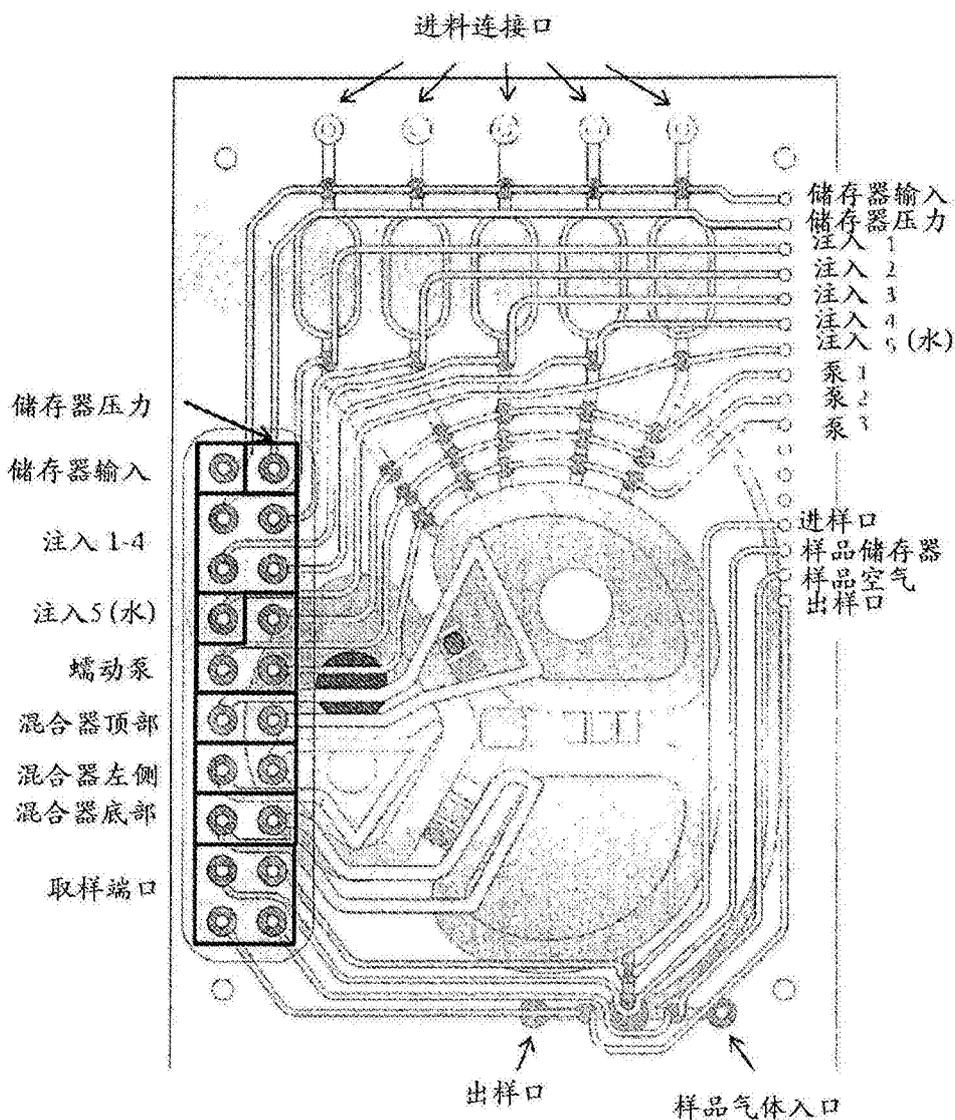


图6

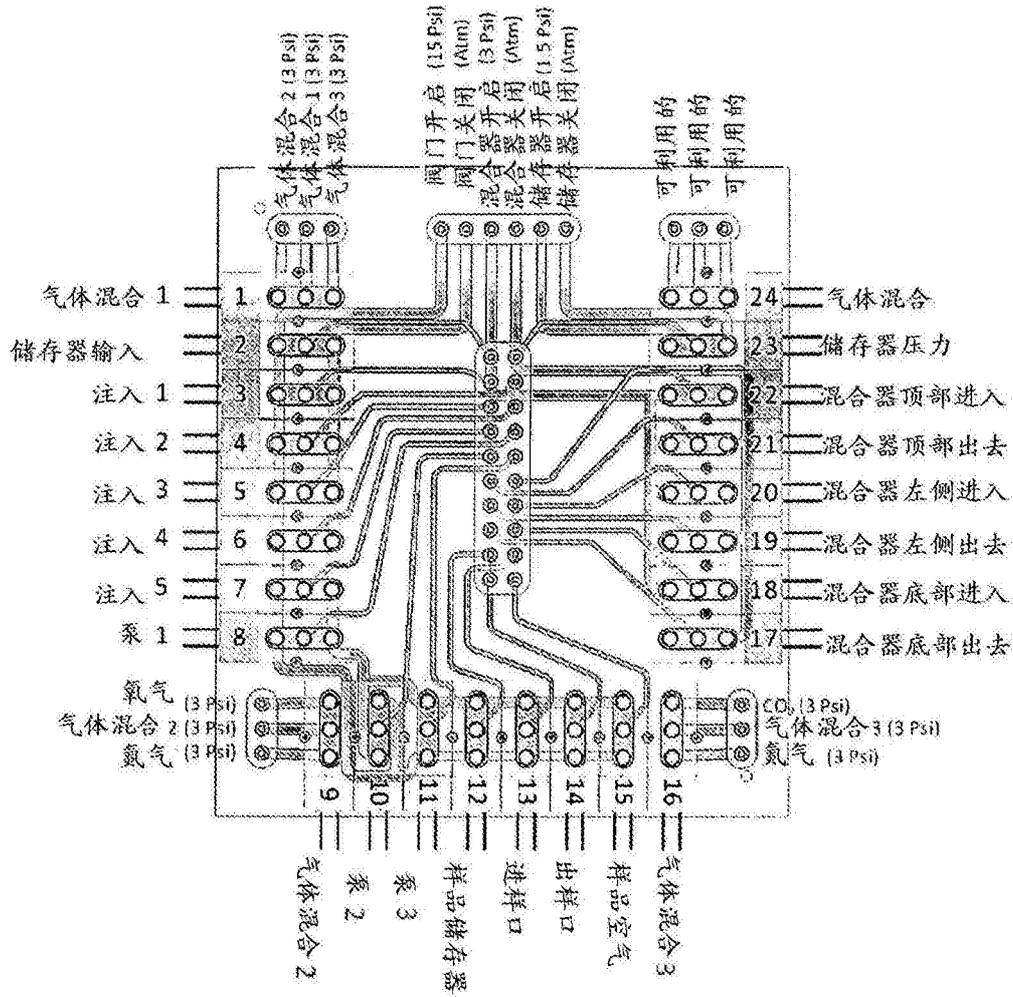


图7

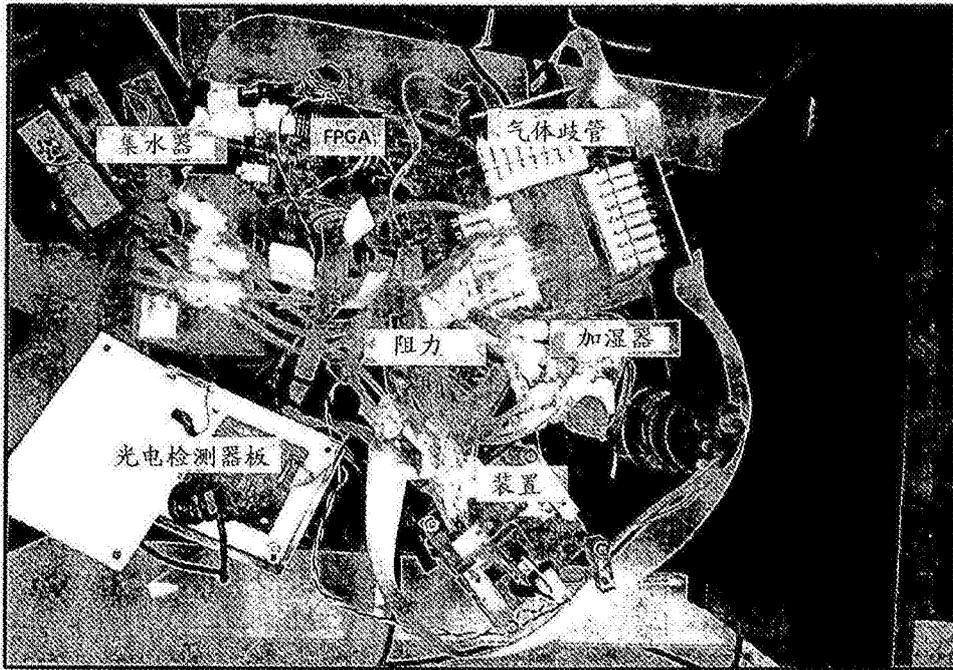


图8