



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108368839 B

(45)授权公告日 2020.01.07

(21)申请号 201680065697.8

蒂姆·厄兰德森

(22)申请日 2016.08.26

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108368839 A

代理人 王达佐 王艳春

(43)申请公布日 2018.08.03

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

62/253,513 2015.11.10 US

F04B 43/02(2006.01)

F04B 53/16(2006.01)

F04F 99/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.10

F15C 1/16(2006.01)

F16D 1/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/049096 2016.08.26

(56)对比文件

US 6544424 B1, 2003.04.08,

CN 1057786 A, 1992.01.15,

US 2317073 A, 1943.04.20,

CN 104174077 A, 2014.12.03,

CN 102164647 A, 2011.08.24,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/082990 EN 2017.05.18

审查员 何卿

(73)专利权人 维培骏公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 特拉维斯·R·沃德

史蒂文·R·珀尔 亚当·马龙

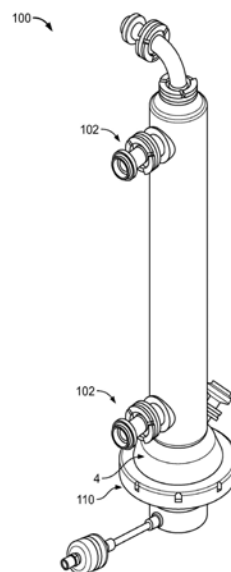
权利要求书2页 说明书13页 附图21页

(54)发明名称

一次性交替切向流过滤单元

(57)摘要

本文公开坚固的一次性交替切向流(ATF)壳体和隔膜泵单元以及制造、测试、润湿和使用它们的相关方法。



1. 一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 包括:
中空管, 由可灭菌、无毒、刚性塑料制成;
第一泵半球, 固定至所述中空管的端部, 其中, 所述第一泵半球包括第一周向凸缘; 以及其中, 所述第一泵半球中的开口使流体能够在所述第一泵半球与所述中空管之间流动;
第二泵半球, 包括第二周向凸缘, 所述第二周向凸缘配置为与所述第一周向凸缘配合, 其中, 所述第一周向凸缘或所述第二周向凸缘包括外螺纹;
柔性隔膜, 配置为布置在所述第一周向凸缘与所述第二周向凸缘之间; 以及
夹环, 具有内表面, 所述内表面包括内螺纹, 其中, 所述夹环配置为放置在不具有带螺纹的周向凸缘的泵半球上, 并且固定至带螺纹的周向凸缘。
2. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述夹环包括丙烯腈-丁二烯-苯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚砜塑料中的一种或多种。
3. 根据权利要求1或2所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述夹环包括下部和上部, 所述下部包括所述内螺纹, 所述上部包括内表面, 所述上部的内表面配置为容纳所述第一泵半球的弯曲或倾斜的外表面。
4. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 还包括一个或多个端口, 所述一个或多个端口用于通过无菌连接来附接空气储存器、渗透物冲洗袋和流体供应袋中的任何一个或多个, 以实现能够作为交替切向流运行并润湿滤膜的封闭系统。
5. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元具有能够承受高达450psi的压力而不破裂或泄漏的结构。
6. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述第一周向凸缘和所述第二周向凸缘具有配置为与所述柔性隔膜上的突起配合的凹槽。
7. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述夹环配置为在所述第一周向凸缘与所述第二周向凸缘之间压紧所述柔性隔膜。
8. 根据权利要求7所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 压紧水平能够通过应用扭矩规格来改变, 所述扭矩规格与所述柔性隔膜的充分压紧相关, 以在设计中包括处于多个安全级别的压力。
9. 根据权利要求8所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述扭矩规格为101bft至1001bft。
10. 根据权利要求9所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述扭矩规格为301bft至701bft。
11. 根据权利要求8所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述扭矩规格大于801bft。
12. 根据权利要求1所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 还包括密封特征, 所述密封特征在所述第一泵半球和所述第二泵半球之间, 以协助横跨所述柔性隔膜进行密封。
13. 根据权利要求12所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元, 其中, 所述密封特征包括能量导向器或凸起表面。
14. 一种制备完全润湿的一次性过滤装置的方法, 所述方法包括:
使用无菌连接, 将截留物流体袋和渗透流体袋连接至如权利要求1至11中的任一项所

述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元的顶部端口；

将包括媒质或其他流体的袋子附接至泵入口端口；以及

操作所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元以实现所述媒质或所述其他流体穿过所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元的所述中空管内的过滤膜的通量。

15. 根据权利要求14所述的方法，还包括：在操作所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元以实现流体通量来渗透所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元的所述中空管内的室之后，通过所述泵入口端口从所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元排出截留物流体。

16. 一种使用一次性过滤装置的方法，所述方法包括：

获得如权利要求1至11中任一项所述的一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元；

通过使用无菌连接将流体袋连接至所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元的顶部端口，将所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元设置到流体回路中，并将流体容器附接至泵入口端口，以使得所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元能够实现待过滤的媒质或其他流体穿过所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元的中空管内的过滤膜的通量；以及过滤完成时，处理所述一次性交替切向流壳体 and 隔膜泵单元。

一次性交替切向流过滤单元

技术领域

[0001] 本发明涉及一次性交替切向流过滤单元,该一次性交替切向流过滤单元包括壳体和隔膜泵以及附件,壳体和隔膜泵例如用于过滤系统,附件用于在保持无菌环境的同时润湿/冲洗过滤器。

背景技术

[0002] 通常执行过滤来分离、净化、改变和/或浓缩流体溶液、混合物或悬浮液。在生物技术、制药和医疗行业中,过滤对药物、诊断和化学品以及许多其他产品的成功生产、处理和分析至关重要。作为示例,过滤可用于对流体进行灭菌,以及将复杂的悬浮液净化成过滤的“纯净”部分和未过滤部分。类似地,可通过除去或“过滤掉”悬浮介质来浓缩悬浮液中的成分。另外,通过适当选择过滤器材料、过滤器孔径和/或其他过滤器变量,已经开发出许多其他专用过滤器用途;这些可能涉及对各种源的成分进行选择隔离,其中,该成分包括微生物培养物、血液以及可能作为溶液、混合物或悬浮液的其他流体。

[0003] 生物制造过程通过实质性的过程强化而得到发展。现在用于生产重组蛋白、病毒样颗粒(VLP,virus-like particle)、基因治疗颗粒和疫苗的真核生物和微生物细胞培养物二者均包括可实现 100×10^6 细胞/ml或更高的细胞生长技术。这使用细胞截留装置来实现,该细胞截留装置去除代谢废物,并通过额外的营养素为培养物补充给养。最常见的细胞截留手段之一是使用交替切向流(ATF,alternating tangential flow)的中空纤维过滤来灌注生物反应器培养。商业规模过程和开发规模过程二者都使用控制隔膜泵执行ATF以通过中空纤维过滤器的装置(参见例如第6,544,424号美国专利),其中,泵和过滤器封闭在不锈钢件中,并且在使用之前进行高压灭菌以保持无菌。为了经济性和灵活性,许多生产设施都在努力使用一次性产品,然而,由不锈钢ATF转换为一次性预灭菌装置具有重大挑战。

[0004] 使用ATF装置进行大规模生产需要能承受很大力并保持硅隔膜完整性的泵腔室壳体。需要将隔膜密封在一次性塑料泵的半球内的构件。另外,在用 γ 辐射或环氧乙烷对装置进行灭菌之后,干燥的过滤器必须用液体冲洗,并且使膜的纤维润湿以获得有效的灌注,因而该装置必须设计成在使用之前允许润湿过程。目前使用过滤装置的做法包括进行完整性测试,以确保该装置以膜两端的预期流体通量速率灌注液体溶液,并且纤维或装置中不存在会导致生产故障的泄漏。

[0005] 本公开描述了一次性ATF装置和使用方法,该一次性ATF装置和使用方法克服了构建和使用适用于强化细胞培养生产的一次性ATF装置的这些障碍。

发明内容

[0006] 本公开提供了适用于支持高密度细胞培养过程的一次性ATF装置。本公开还提供了用于使用一次性ATF装置在无菌环境中获得高过滤性能的方法。本公开至少部分基于如下发现:如果使用具有内螺纹的、可灭菌的(例如使用高压釜、蒸汽、 γ 辐射、环氧乙烷)塑料夹环,其中,该内螺纹专门设计成与顶部和底部半球形ATF泵室阀协同工作,顶部和底部半

球形ATF泵室阀具有顶部凸缘和底部凸缘,其中凸缘中的一个进行螺纹连接以与夹环配合,并且凸缘中的一个或多个可具有附加特征以协助密封隔膜以及专门设计的内部泵隔膜,就可简单地制造无菌坚固的一次性ATF过滤壳体和泵单元,该一次性ATF过滤壳体和泵单元可承受商用过滤系统中使用这种一次性ATF单元所固有的巨大压力和巨大压力变化。

[0007] 本公开还部分地基于端口和流体袋的配置,该端口和流体袋可在封闭式过滤器上提供液体的无菌冲洗同时保持无菌性,以便使所述装置准备用于媒质从生物反应器的交替切向流动,而不将冲洗溶液引入生物反应器。使用ATF装置从隔膜泵的交替切向流的能力提供了新颖的机构,从而在保持无菌环境的同时调节过滤器,以在灌注过程中获得最佳性能。本公开描述了使用无血清生长媒质来完成过滤器的冲洗和润湿的方法。ATF装置的这种配置还允许测试过滤装置的完整性,从而确保具有生物反应器的装置操作期间的通量率性能。

[0008] 由于这些单元的典型商业用途涉及很大的力,所以开发功能强大且坚固的一次性非金属ATF壳体和泵单元很困难。ATF泵内部的压力变化很大,并且可升高到50psi或更高,这通常需要能承受所产生的力的金属(例如,非一次性)部件。为了开发一次性ATF泵,尝试许多材料和塑料均失败。非金属材料的使用由于以下事实而变得复杂:可在许多应用中用于提高粘合力 and 强度的许多粘合剂对泵内的细胞是有毒的,因此不能在现有的新泵中使用。

[0009] 在一方面,本公开提供了一次性ATF壳体和隔膜泵单元,包括:中空管,由可灭菌的、无毒的刚性塑料制成;第一泵半球,固定至中空管的端部,其中,第一泵半球包括第一周向凸缘,以及其中,第一泵半球中的开口使流体能够在第一泵半球与中空管之间流动;第二泵半球,包括配置为与第一周向凸缘配合的第二周向凸缘,其中,第一周向凸缘或第二周向凸缘包括外螺纹;柔性隔膜,配置为布置在第一周向凸缘与第二周向凸缘之间;以及夹环,具有内表面,内表面包括内螺纹,其中,夹环配置为无需带螺纹的周向凸缘而放置在泵半球上,并且固定至带螺纹的周向凸缘。

[0010] 在各种实施方式中,夹环可包括丙烯腈-丁二烯-苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯和聚砜塑料中的一种或多种。在一些实施方式中,夹环可包括具有内螺纹的下部以及具有内表面的上部,内表面配置为容纳第一泵半球的弯曲或倾斜的外表面。

[0011] 在一些实施方式中,一次性ATF单元还可包括一个或多个端口,该一个或多个端口用于通过无菌连接来附接空气储存器、渗透物冲洗袋和流体供应袋中的任何一个或多个,以实现能够作为ATF运行并润湿滤膜的封闭系统。通常,ATF单元可加压到45psi或更高,例如10psi、15psi、20psi、25psi、30psi、35psi、40psi、45psi、50psi、55psi或60psi。

[0012] 在某些实施方式中,第一凸缘和第二凸缘具有配置为与柔性隔膜上的突起配合的凹槽。一般而言,夹环配置为在第一凸缘与第二凸缘之间压紧柔性隔膜,并且可通过施加扭矩规格来改变压紧水平,扭矩规格与隔膜的充分压紧相关联,以在设计中包括多个安全级别的压力。例如,扭矩规格可为约10到大于100lbft,例如,约10lbft到100lbft,20lbft到80lbft或30lbft到70lbft,例如10lbft、20lbft、30lbft、40lbft、50lbft、60lbft、70lbft、80lbft、90lbft或100lbft。

[0013] 另一方面,本公开提供了制备完全润湿的一次性过滤装置的方法。该方法包括:使用无菌连接,将截留物流体袋和渗透物流体袋连接至本文所述的一次性交替切向流(ATF)

单元的顶部端口；将包括媒质或其他流体的袋子附接至泵入口端口；以及操作一次性ATF单元以实现媒质或其他流体穿过一次性ATF单元的中空管内的过滤膜的通量。这些方法还可包括：在操作一次性ATF单元以实现流体通量渗透一次性ATF单元的中空管内的室之后，通过泵入口端口从一次性ATF单元排出截留物流体。

[0014] 另一方面，本公开包括执行一次性过滤装置的完整性测试的方法。这些方法包括：将用于冲洗一次性过滤装置的媒质排出到润湿流体袋中，其中气压源打开以升高过滤装置内部的隔膜；关闭气压源阀以释放隔膜上的任何压力；关闭位于润湿流体袋与过滤装置上的端口之间的阀，并关闭连接至过滤装置的截留物端口的阀；使用气压源对过滤器的一侧加压；关闭过滤器与气压源之间的阀；测量压力衰减与时间的关系；以及使测得的压力衰减与空气流量相关联。

[0015] 在这些方法中，可通过重力或通过从装置中泵送媒质来排出媒质。在某些实施方式中，气压源提供压力为约1psi-5psi的空气，例如1psi、2psi、3psi、4psi或5psi的压力。

[0016] 另一方面，本公开提供了执行一次性过滤装置的完整性测试的方法。这些方法包括：将用于冲洗一次性过滤装置的媒质排出到润湿流体袋中，其中，气压源打开以升高过滤装置内部的隔膜；关闭气压源阀以释放隔膜上的任何压力；关闭位于润湿流体袋与过滤装置上的端口之间的阀，并关闭连接至过滤装置的截留物端口的阀；使用气压源对过滤器的一侧加压；测量装置内部的压力与时间的关系；使用流量计测量气压源与装置之间的流量；以及使测得的压力与测量的空气流量相关联。

[0017] 另一方面，本公开提供了使用一次性过滤装置的方法。这些方法包括：获得如本公开的任何方面所述的一次性ATF单元，通过使用无菌连接将流体袋连接至ATF单元的顶部端口而将ATF单元设置到流体回路中，并将流体容器附接至泵入口端口，使得ATF单元可实现待过滤的媒质或其他流体穿过一次性ATF单元的中空管内的过滤膜的通量，以及当过滤完成后，处理ATF装置。

[0018] 如本文所用，术语“密封的”、“密封”等指的是两个室或其他系统部件的接合处或接合部不允许流体在高达50psi的压力下通过接合处或接合部泄漏。

[0019] “冲洗”是指在中空纤维过滤器上使用溶液并穿过中空纤维过滤器。

[0020] “润湿”是指以其中纤维膜孔现在含有液体（润湿）并且在低压力和高流体通量率下显示低空气通道的方式冲洗中空纤维过滤器。

[0021] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可使用与本文描述的方法和材料类似或等同的方法和材料，但是下面描述合适的方法和材料。本文提及的所有公开、专利申请、专利和其他参考文献的全部内容通过引用并入本文。如有冲突，以本说明书为准，包括限定。另外，这些材料、方法和示例仅仅是说明性的，而不是限制性的。

[0022] 从下面的详细描述和权利要求中，本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0023] 图1A至图1C是本文所述的一次性ATF壳体和泵单元的第一实施方式的立体图、前视图和剖视图。

[0024] 图2A至图2C是本文所述的一次性ATF壳体和泵单元的第二实施方式的立体图、前

视图和剖视图。

[0025] 图3A至图3C是本文所述的一次性ATF壳体和泵单元的第三实施方式的立体图、前视图和剖视图。

[0026] 图4A至图4E是隔膜泵的详细视图,示出了液体侧半球(顶部)、空气侧半球(底部)、隔膜(密封在半球之间)和锁环,锁环用于将半球保持在一起并跨过整个隔膜强制压紧,并添加密封特征以协助密封直径更大的泵。

[0027] 图5A至图5C是专门设计用于本文所述的具有外螺纹凸缘的ATF隔膜泵组件的内螺纹塑料夹环的立体图、剖视图和俯视图。

[0028] 图6A是连接至控制器和生物反应器的一次性ATF泵壳体的系统级表示。

[0029] 图6B是连接至控制器、生物反应器、流体袋和端口的一次性ATF泵壳体的系统级表示,流体袋和端口用于在细胞培养生产之前冲洗和调节过滤器。

[0030] 图7是在本文所述的示例中描述的测试中使用的泵半球测试装置的图示。

[0031] 图8和图9是使用本公开的ATF泵壳体进行的细胞培养的图形结果。

[0032] 在各附图中,相似的附图标记表示相似的元件。

具体实施方式

[0033] 本公开描述了新型一次性ATF壳体和泵单元,其可通过常规做法(例如 γ 辐射和环氧乙烷)进行灭菌,并且设计为一次性和/或单次使用或有限次使用。该单元包括塑料壳体,塑料壳体直接连接至包括两个半球形阀的球形ATF泵组件。鉴于具体结构,该新型单元可出乎意料地承受使用过程中产生的严酷和巨大压力。一个半球具有外螺纹凸缘,并且夹环或锁环同心地围绕一个半球,并且螺纹连接至相对的半球上,从而挤压/密封由例如硅树脂或其他弹性体制成的整个内部泵隔膜。在该实施方式中,夹环是内螺纹。夹环或锁环也可由两个单元构成,这两个单元跨过半球从底部和顶部螺纹连接在一起。

[0034] 这些新型单元是可灭菌的、坚固的但是是一次性的,并且可用来代替目前使用的金属壳体和泵单元的任何ATF过滤系统。尽管它们具有一次性特性,但是该新型一次性ATF壳体和泵单元可承受这种ATF系统的商用中固有的巨大压力的循环。一次性ATF设计包括流体路径配置,其允许保持无菌性的同时冲洗和润湿过滤器。该配置还允许测试ATF装置的过滤器完整性,该测试会确保过滤装置的适当性能。

[0035] 随着近年来新材料和制造方法的进步,越来越接受建造和使用一次性设备。这种一次性系统能够以最少的操作进行设置,并且不需要用户进行清洁或灭菌。它们以无菌方式提供,并且能够以最少的准备和装配即可使用。由于减少了用户的劳动和操作连同消除了长时间的高压灭菌循环,所以节省了成本。另外,在使用结束时,可容易地丢弃该系统而不需要拆卸或清洁。这些系统降低了操作人员污染和装配的风险。他们不需要冗长的操作/灭菌的验证过程。与不锈钢单元或玻璃单元相比,这些单元更轻、更易于运输,并且更廉价,且占用的存储空间更小。这也消除了繁琐且容易出问题的高压灭菌。对设备进行灭菌的另一选择是原位蒸汽灭菌(SIP, Steam In Place);该产品会消除对大型蒸汽发生器和管道的需求。该新系统还可减少液体废液的数量,这是因为它们不需要清洗部件和部件清洗验证。这些系统的便利性会极大地缩短制造商现场的实施时间。

[0036] 然而,产生压力梯度的显著压力循环和相对于纤维膜表面的轴向和径向的流动在

ATF过程中是固有的,并且对所有ATF过滤和泵送系统施加相当大的内力。在“压力循环”期间,泵内的压力大于截留物储存器中的压力,并且可升高至25psi(磅/平方英寸)或更高。液体从隔膜泵沿轴向方向“向前”流动,即通过过滤器元件流向截留物储存器。另外,一些液体被迫通过过滤膜进入滤液室。因此,通过封闭的滤液室,由于渗透物出口(泵)的限制,在循环过程中,滤液的流入可将滤液室加压至显著水平。

[0037] 这些循环压力使得难以建立坚固的、有商业价值的ATF过滤系统,该过滤系统也是可灭菌的,并且由一次性材料制成。以简单、容易、稳健、有成本效益且友好制造的方式构造、组装和粘附这些材料具有挑战性,并且由于高压、可提取物/可浸出物轮廓、要求的医疗级别认证、透明度、成本、灭菌性和可用性等原因,可如本文所述使用的材料的选择受到限制。由于几何形状和较大的表面积,半球组件中的力被放大。其结果是,泵(空气/液体侧)和过滤模块进料渗透和外部环境的密封是困难的设计挑战。在这种设计中克服的另一挑战是创建可封装和密封来自不同供应商的各种尺寸的滤芯的组件。

[0038] 一次性ATF壳体和泵

[0039] 如本文所述,图1A至图1C、图2A至图2C和图3A至图3C分别示出了一次性ATF壳体和泵单元100、200和300的三个不同实施方式的立体图、前视图和剖视图。

[0040] 通常,新型ATF壳体和泵单元的壳体、隔膜泵、内部隔膜、阀、过滤器和其他组件可由符合具体要求的材料建造。具体地,这些材料必须承受典型流体过滤系统运行过程中产生的压力,不含可能伤害或杀死细胞或微生物的毒素,易于模制成期望形状,重量轻且相对廉价,以及必须能够进行环氧乙烷(E0)或 γ 辐射。例如,有用的材料包括聚碳酸酯(PC)(例如,来自Sabic的HPS等级)、聚砜(PS)、不含BPA的塑料共聚酯(例如,来自Eastman Chemical Co.的TRITAN®)、聚丙烯(PP)、尼龙、玻璃填充聚合物、超高分子量聚乙烯(UHMWPE)、聚醚醚酮(PEEK)和复合材料(例如,玻璃/PC、玻璃/PS和玻璃/尼龙)。这些材料的其他期望特征包括它们适用于本文所述的各种制造技术、包装和存储的可行性、可运输性、生物相容性以及它们防止处理中的内容物的损坏或污染。

[0041] 图1A至图1C是一次性ATF壳体和泵单元100的实施方式的各视图,该一次性ATF壳体和泵单元100包括一次性夹环110,并且可用在图1C所示的ATF过滤系统中(在下面进一步进行详细描述)。在该实施方式中,除了图6A所示的过滤器壳体5的入口端42和空气入口端口23之外,还包括在过滤器壳体5(如图6A所示)的上端和下端的渗透物端口102。如本文所述,夹环可由刚性的、可加工或可模制的塑料制成,例如,丙烯腈丁二烯苯乙烯(ABS)、聚乙烯(PE)、PP、PC、PS、尼龙、玻璃填充聚合物或复合材料。

[0042] 图2A至图2C是同样包括一次性夹环110的一次性ATF壳体和泵单元200的第二实施方式的各视图,以及图3A至图3C是同样包括夹环110的过滤器组件300的第三实施方式的各视图。如图所示,本公开的一次性夹环110可与各种过滤器组件布置一起使用。图中所示的尺寸旨在示出具体示例,而并不旨在进行限制。

[0043] 图4A至图4E示出了图1C、图2C和图2C中所示的一次性ATF壳体和泵单元100、200、300的底部ATF泵部分,并且该底部ATF泵部分包括具有一次性夹环110的隔膜泵4,夹环110用于通过防泄漏连接,在液体接收室7与空气侧室8之间固定柔性内部泵隔膜6的隔膜外凸缘47。ATF泵的顶部半球和底部半球各自分别包括凸缘26和凸缘27,当组装两个半球时,ATF泵隔膜6夹在凸缘26与凸缘27之间。ATF泵的下半部的凸缘27包括外螺纹,该外螺纹用于接

合一次性夹环,并横跨整个隔膜压紧两个凸缘。图4E显示了添加的特征的细节,该添加的特征用于协助横跨整个较大直径的泵几何形状的隔膜进行密封。

[0044] 同样参照图5A,一次性夹环110是圆柱形夹具,其通过在凸缘外周上围绕外围凸缘26和凸缘27以及凸缘26的顶部,在两个泵半腔的外围凸缘26与凸缘27之间封闭并密封内部隔膜6。如所述的,至少下凸缘27(在这些实施方式中)的外部径向接触表面49是带螺纹的,即,外围凸缘27的径向圆周在径向接触表面49处具有与一次性夹环110的下部内表面112上的螺纹接触并配合的螺纹。在一些实施方式中,另一凸缘26(这些实施方式中的顶部凸缘)可包括或可不包括外螺纹。其他实施方式示出了具有底部环的两件式锁环设置,所述底部环在内部或外部螺纹旋入顶部环以横跨凸缘进行压紧。

[0045] 外围凸缘26和凸缘27与一次性夹环一起工作,以分别将隔膜外凸缘47固定在凸缘26和凸缘27的上表面与下表面之间。在一些实施方式中,隔膜泵外围凸缘26和凸缘27彼此间隔开一段距离,该距离略小于内部隔膜外凸缘47的相应厚度,使得当两个面对的外围凸缘26和凸缘27通过螺纹接合到一次性夹环110上而强压在一起时,它们压紧以在两个外围凸缘26与凸缘27之间挤压隔膜外凸缘47。在该设计中,横跨隔膜的10%-30%压紧足以密封半球的空气侧和液体侧二者。

[0046] 不同的ATF系统尺寸需要不同的压紧水平,其中,较大的ATF尺寸需要较高的压紧来容纳它们的隔膜并生成牢固的密封。可替代地,可增加额外特征来增加和/或解开密封并在高压下容纳隔膜(图4E)。这些特征的示例是能量导向器突起28,能量导向器突起28是作用于一个或两个内凸缘中的附加突起和/或凹槽,以横跨隔膜提供额外的压紧和/或密封。如图4C至图4D具体所示,凸缘26和凸缘27可包括凹槽,该凹槽设计成接收内部隔膜6对应的O形环44部分或突起。一旦接触,外围凸缘26和凸缘27的周边可沿着它们相对面的接触表面彼此密封。在该过程中,内部隔膜6牢固地密封在两个外围凸缘26与凸缘27之间。

[0047] 新方法允许通过控制相应和相邻泵凸缘部分之间的压紧距离来设定内部隔膜外凸缘47上的压紧大小。可替代地,可测量扭矩规格,该规格与隔膜的充分压紧相关,以便包括设计中的若干安全等级的压力。密封每个ATF系统所需的扭矩规格是不同的。ATF系统越大,锁环上压紧隔膜所需的扭矩就越大。例如,ATF2系统100系列只需要10lbf·ft-20lbf·ft,而ATF10 300系列则需要80+1lbf·ft。尺寸在这两个示例之间的ATF系统需要20lbf·ft-90lbf·ft之间的扭矩。

[0048] 同样参照图5A至图5C,一次性夹环110具有上部120和下部122。上部120具有比下部122更小的内半径。下部122的内(例如,径向最靠近中心线)表面在本文中称为下部内表面112,其具有螺纹,并且与ATF泵驱动室8的外围凸缘27的径向周边外表面接合。上部120的内表面是上部内表面114,其与下部内表面112相比径向上更靠近中心线。

[0049] 上部内表面114与液体接收室7的外外表面接合。如图所示,液体接收室7是半球体,并因而具有曲率,而不是平坦表面。为了适应液体接收室7的外表面并与其密封地接合,上部内表面114与水平面倾斜成一定角度 α 。角度 α 可是 0° 至 5° ,例如 1.0° 、 1.5° 、 2.0° 、 2.5° 、 3.0° 、 3.5° 、 4.0° 或 4.5° ,但是根据需要进行调节,以适应不同尺寸的ATF隔膜泵4的不同尺寸半球的曲率。该配合表面在高压条件下增强上半球。上半球和下半球在装配过程中不接触,它们被强压在一起,但由压紧的隔膜隔开。

[0050] 用于一次性ATF泵的系统 and 过程

[0051] 通常,新型一次性ATF泵可与采用截留物室和滤液室的封闭过滤系统一起使用,例如,如图6A所示并在下面进一步详细描述。这种ATF过滤系统和ATF泵已经在Shevitz的第6,544,424号美国专利中进行了描述。

[0052] 在新型一次性ATF泵中生成截留物室和滤液室的便利方法是使用中空纤维滤芯。这样的过滤器被制成为包括多个中空纤维(HF,hollow fiber)的滤芯,该中空纤维(HF)沿着滤芯的长度平行延伸,并且嵌入在滤芯的每个端部(优选地通过灌封剂)处;HF端部处的腔保持敞开,从而形成从滤芯的一端到另一端(即从滤芯入口端到滤芯出口端)穿过每个腔的连续通道。中空纤维被滤芯的外壁(即滤芯壁)和纤维端部处的灌封层封闭。其结果是,存在由滤芯壁和HF的外壁限定的室。该室可用作滤液室。HF的内部腔(内部)空间被认为共同构成本系统中的每个的截留物室的部分。

[0053] 截留物室通过安装至滤芯每个端部的适配器延伸超出HF的内部空间。与滤芯的端部连接的每个适配器均限定作为截留物室的部分的空间。根据流体流经纤维的方向,该空间用于(1)当流体离开纤维时收集流体;或(2)允许来自外部源的流体与HF的敞开端部接触,并将流体分布在这些HF中,以继续其路径朝向滤芯的另一端。每个适配器均会有两个端部,一个端部安装至滤芯,另一端部带有可连接至容器或泵的开口。通常如图6A至6B所示,容器通过允许流体流动的管线连接至适配器,但是如果需要,容器可直接连接至适配器,或者适配器可形成容器的部分,其中容器的部分或全部内容物可容纳在适配器内。通常,适配器直接连接至一次性ATF泵,但如果需要,泵可经由允许流体流动的管线连接至泵。

[0054] 当连接管线添加到适配器时,截留物室延伸,从而还包括该连接管线内的空间。当连接管线的一端连接至适配器而另一端连接至容器(例如,包括悬浮在生长媒质中的细胞的容器)时,可认为容器的内部是截留物室的进一步延伸,但为了在此描述和讨论的目的,容器和截留物室被称为分离的实体。

[0055] 中空纤维过滤器的腔壁是可渗透的,从而方便地提供完全可渗透或选择性可渗透的屏障。选择性可渗透的中空纤维壁的选择性范围可在整个膜孔径范围内,该整个膜孔径通常分类为渗透膜,以及范围可从超滤微滤到粗过滤以及微载体过滤,其中例如,孔径范围大约是10kD-500kDa和0.2微米-100微米。约0.2微米的孔径通常用于截留细胞,并允许代谢物和其他分子或分子复合物穿过孔隙。另一方面,10kDa至500kDa范围内的超滤孔径优选地不仅用于截留细胞,还用于截留例如由细胞产生的、大于孔径的分子和分子复合物。粗滤膜的范围从7微米到100微米,并且用于截留微载体或更大的细胞。这些选择性可渗透的中空纤维必须通过与过滤的流体物质相容的液体润湿。例如,在细胞培养中,膜必须通过与细胞培养物生长相容的水基溶液润湿。许多膜需要含有酒精的溶液来初始润湿孔隙,并在操作期间实现过滤过程所需的通量率。图6B示出了可用于将流体添加到ATF装置的端口和流体袋。然后,可使用ATF装置的交替泵送作用,在无菌环境中用无血清媒质冲洗。然后,可从端口排出冲洗液,并且所述装置准备好在细胞培养过程中操作,同时保持无菌环境。

[0056] 例如用于在新型一次性ATF壳体和泵单元中使用的滤芯的外壁通常是不可渗透的,并且通常具有可排出和/或替换滤液的端口。然而,对于封闭式过滤系统的一些实施方式而言,滤芯可包括构成可为非选择性(完全可渗透)的屏障但优选为半渗透性(不允许大于屏障中的孔径的溶解物质(例如,分子和分子复合物)穿过屏障并且不允许大于孔径的颗粒物穿过屏障)的外壁。为了仅截留大于孔径的分子和分子复合物,10kDa至500kDa范围内

的孔径是优选的。然而,孔径可制得足够小或足够大,以使得屏障分别是高度限制性,从而仅允许小的盐及其组分通过,或允许大于500kDa的分子或颗粒穿过膜。这种膜选择性不仅限于孔径,而且还限于其他膜属性,包括:电荷、疏水性、膜结构、膜表面、孔极性等。

[0057] 在典型的封闭式过滤器制备过程中,这些步骤通常包括:

[0058] (1) 经由流体连接器,将流体从截留物室排出到容器(诸如存储容器)中,使得在排出期间,一部分所述流体经由半渗透性屏障引导入滤液室,然后经由选择性屏障引导到反应室中,其中,所述排出是由通过在远离流体连接器的位置处连接至截留物室的隔膜泵施加的力引起的;

[0059] (2) 使由隔膜泵施加的力的方向反向,使得来自容器的至少一些流体回流到截留物室中,并且来自截留物室的至少一些流体流入滤液室(并且优选地来自滤液室的一些流体流入反应室);以及

[0060] (3) 重复步骤(1)和(2)至少一次,其中,从截留物室排出的流体最佳地为能够润湿膜孔的、诸如无血清媒质的溶液,并且其中,截留物室、滤液室、反应室和隔膜泵是同一封闭式过滤系统的一部分(优选地,其中,封闭式过滤系统在上文的一般方面或第二方面中进行描述)。

[0061] 在前述和随后的过程描述中,流体沿一个方向穿过屏障的一部分并不排除在屏障的另一部分处沿相反方向的流体流动,实际上经常与其有关。通过这个作用,膜孔被完全润湿,并获得指定的过滤器通量率。一旦膜通过ATF作用润湿后,可从泵端口丢弃流体,并且在连接至生物反应器时,该装置准备好执行ATF。

[0062] 在封闭式过滤系统过程的变体中,其适用于包括滤液储存器的系统,该过程包括以下步骤:

[0063] (1) 经由流体连接器,将流体从截留物室排出到容器中,使得在排出期间,一部分流体经由选择性可渗透屏障从截留物室引导到滤液室中,使得被引导到滤液室中的一部分所述流体经由滤液室壁中的开口引导到滤液储存器中,并且使得引导到滤液室中的一部分所述流体经由选择性屏障引导到反应室中,其中,排出由通过在远离流体连接器的位置处连接至截留物室的隔膜泵施加的力引起的;以及

[0064] (2) 使由隔膜泵施加的力的方向反向,使得来自容器的至少一些流体回流到截留物室中,来自截留物室的至少一些流体流入滤液室中,来自滤液室的至少一些流体流入滤液储存器。

[0065] (3) 重复步骤(1)和(2)至少一次,其中,从截留室排出的流体从包括悬浮液和溶液的组中选择,并且其中,截留物室、滤液室、反应室和隔膜泵是同一滤液储存器系统的一部分(优选地,其中滤液储存器系统如上)。

[0066] 图6A示出了封闭式流体过滤系统1,封闭式流体过滤系统1经由流体连接器3连接至包括待处理的流体材料或截留物9的处理或细胞培养容器2。流体过滤系统1包括至少两个室:截留物室45,将未过滤材料限制在纤维腔的内侧上;以及滤液室10,位于过滤器壳体5内。

[0067] 流体过滤系统1是新型一次性ATF壳体和泵单元。总体来说,这些单元通过过滤器壳体5封闭,过滤器壳体5的形状、尺寸或定向可根据需要而变化以封闭系统。过滤器壳体5可由多种材料构成,包括诸如聚碳酸酯或聚砜的固体聚合物、柔性或弹性材料、玻璃填充聚

合物或满足本文强度、非毒性和灭菌性要求的任何其他材料或复合材料。流体过滤系统经由流体连接器导管3连接至过程或细胞培养容器2。

[0068] 过程容器2可为用于待处理流体的任何合适容器。例如,过程容器2可为生物反应器、循环系统(例如,用于人或动物患者或受试者)或任何其他容器,非排他性地包括可容纳液体的罐、袋、烧瓶等。过程容器2可包括任何合适的材料或材料组合,包括合成聚合物、惰性金属,如不锈钢、玻璃等;也不排除刚性、柔性或弹性材料或其组合;也不应限制这些材料的形状、尺寸或构造,只要产生过程容器即可。过程容器2的可接近性不受限制:可对其进行修改,以允许添加或减少容器的内容物。例如,管线或管36和39可用于实现对过程容器2的内容物的添加或减少,例如,使用泵14来控制这种添加或减少。这样的过程容器能够以各种尺寸和配置商购获得,并且为本领域的人员所熟知。

[0069] 流体连接器3用于将来自过程容器2的流体经由流体交换端口35引导至过滤器元件11的入口端42,入口端42也对应于截留物室45的入口端。入口端42用作截留物室45的入口的同时也可用作截留物的储存器;入口端42的形状和位置可根据需要而变化;入口端42的体积可近似等于或小于隔膜泵排量,从而有利于在入口端42(储存器)和泵之间,并进一步促进更大的截留物浓度水平和最终浓缩物的回收。

[0070] 流体流动进一步引导通过过滤器通道17,如果过滤器元件11对应于中空纤维过滤器,则通道17会对应于中空纤维过滤器的一个或多个腔的内部。过滤器通道共同对应于流体过滤系统1的截留物室45。在一个方向上,流体流行进至过滤器元件11的出口端43并且从过滤器元件11的出口端43流出。过滤器元件11和截留物室45二者的出口端43直接连接至隔膜泵4的液体接收室7。可替代地,过滤器出口端43可通过导管(这里未示出)连接至隔膜泵4。

[0071] 如本文所述的ATF隔膜泵4产生在过程容器2与泵之间通过过滤器元件11并回到泵的流动。如上所述,ATF隔膜泵4优选地包括通过内部隔膜6分隔成驱动室8(第一内部室)和液体接收室7(第二内部室)的泵壳体。泵壳体由两个壳体部件(第一泵壳体部件25和第二泵壳体部件24)制成。这些部件分别包括外围凸缘26和凸缘27。驱动室8内的压力驱动隔膜泵4内的隔膜,而不会污染液体接收室7中的流体内容物。

[0072] 例如,泵可为气动泵。控制器54引导压缩空气通过管线(管)21至驱动室8,优选地,通过灭菌过滤器22和空气入口端口23。相对于过程容器2增加驱动室8中的空气压力驱动柔性内部隔膜6进入液体接收室7,从而驱动该室中的液体通过过滤器元件11到达容器2。从过程容器2到隔膜泵4的反向流动通过减小驱动室8中相对于容器2的压力而产生。重复该循环。这种泵产生的交替流动已在第6,544,424号美国专利中进行描述。

[0073] 过滤器元件11被制成为包括多个中空纤维(HF)的滤芯,中空纤维平行于滤芯的长度,从滤芯入口端延伸到滤芯出口端。中空纤维的部分通过中空纤维滤芯制造商通用的方法从外部灌封在滤芯的两端;中空纤维通过多孔壁19封闭,然后通过O形环或其他构件将多孔壁19密封到外壳。灌封化合物的示例是环氧树脂和聚氨酯。其结果是,存在由多孔滤芯壁19灌封的端部和HF的过滤器通道17限定的室。该室是本发明滤液室的部分。然而,为了描述的目的,在本系统中的每个系统中共同考虑了内腔空间构成截留物室。可替代地,可将纤维膜直接灌封在外部过滤器壳体5中。

[0074] 来自系统1的收获物通过连接至收获口12的管线13收集,收获口12允许流体从过

滤器壳体5和该管线流动,以允许流体经由泵14离开系统1。

[0075] 对应于所示中空纤维过滤器的腔(中空纤维)的壁的过滤通道17是选择性渗透的,从而方便地提供在系统的描述中提及的选择性渗透壁。滤芯的外壁19(滤芯壁)进行穿孔,以允许流体流动至收获口12。

[0076] 示例

[0077] 在以下示例中进一步描述本发明,这些示例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0078] 需要各种测试和实验程序来生产能够承受流体过滤系统1的隔膜泵6内的压力的一次性夹具。

[0079] 示例1-泵半球压力测试

[0080] 泵半球测试装置55的设计在图7中示出。关于用于保持硅酮泵隔膜压紧的方法,该设计与不锈钢标准泵不同。在泵的任一半上的硅酮隔膜的外部添加了平坦的凸缘,以使得可使用各种附接方法将它们固定在一起,并且在泵的一半上包括小“搁架”特征,以防止过度压紧。该组件还有多个孔,以允许附接大型钢制眼钩和钢制固定钩,以便能够使用 Instron® 机器进行故障测试(用于不同连接方法的强度分析)。

[0081] 在使用诸如溶剂焊接、UV固化粘合剂和使用螺钉、夹紧件或本文的圆环夹具进行机械固定的不同附接方法将泵半球组装之后,对空气侧半球加压,直到隔膜密封件泄漏。为了正确压紧隔膜并获得良好的胶水附着力,需要定位来自OPUS包装架线性执行器的力。这通过使用用于泵的上半部分和下半部分的大直径丙烯酸管来实现。使用多个虎钳夹将两个泵粘在一起,以在外边缘提供局部力。另外,对于一个单元,对其进行UV粘合的同时,在泵的外部使用了8个均匀间隔开的 $1/4$ "-20聚碳酸酯螺钉,对于另一单元,除了UV粘合,还使用了16个这样的螺钉。这些单元每隔几分钟就会被增加5PSI,以逐步进入故障点。

[0082] 泵半球压力测试向我们揭示了,我们正在处理的力比我们最初预期的要大得多。例如,在45PSI下运行的ATF10系统必须承受高达13,500lbf。通过紫外线固化粘合剂进行粘合并通过16个聚碳酸酯紧固件螺栓连接在一起的半球在45PSI时极其剧烈地发生故障。它跳到空中3英尺,实际上使得取代一个剥离的聚碳酸酯螺钉的不锈钢螺栓弯曲。破裂压力结果在下面的表1中描述。

[0083] 表1:泵半球压力测试结果

[0084]

组件号	组件描述	破裂压力
1	在具有 5 % 掺杂二氯甲烷的力导向 丙烯酸管的直线执行器下的 7650 磅力	25 PSI
2	在具有 5 % 掺杂二氯甲烷的力导向 丙烯酸管的直线执行器下的 7900 磅力	10 PSI
3	具有 5 % 掺杂二氯甲烷的 8 个虎钳夹	5 PSI
4	UV 固化粘合剂和 8 个聚碳酸酯螺钉	20 PSI
5	UV 固化粘合剂和 16 个聚碳酸酯螺钉	45 PSI
6	夹环	55 PSI

[0085] 因而,在将顶部和底部半球形泵室固定在一起的所有这些不同附接方法中,只有本文所述的夹环系统成功地保持高达55PSI的防泄漏密封。尽管夹环承受的压力最大,但我们甚至可施加更大的扭矩,从而提供更大的耐压性,因而我们开发了具体的扳手设计以获得最大的杠杆作用

[0086] 示例2-使用无血清媒质作为冲洗溶液制备一次性ATF装置和操作ATF装置以达到膜润湿

[0087] 参照图6B,以下是设计成使用ATF技术快速而有效地冲洗中空纤维膜的程序。通过用一种方法润湿、调节、降低内毒素并从膜上除去总有机化合物(TOC),这种冲洗有益于使用者。使用ATF比其他方法具有优势,因为AT需要较少的体积,并且可在封闭的无菌系统内轻松进行,而无需使用与细胞培养物生长不兼容的溶液。提供了各种尺寸的一次性ATF装置的ATF运行速率。

[0088] 程序

[0089] 1.将“T”管组连接至进料401端口、截留物402端口和上渗透403端口。上渗透端口可为例如图1中所示的上端口102。

[0090] 2.将带有润湿剂的储存器连接至端口401的“T”出口。

[0091] 3.将容器连接至端口402的“T”出口。

[0092] 4.将收集袋从端口402的“T”取下。

[0093] 5.用泵向端口401填充ATF,直至端口402处的袋子出现润湿剂

[0094] 6.按表1所示速率开始运行ATF。

[0095]

suATF 尺寸	ATF 速率范围	推荐速率
2	0.5-1.5 LPM (升/分钟)	0.9 LPM
6	8-20 LPM	17.2 LPM
10	40-100 LPM	80 LPM

[0096] 7. 以5.7升每平方米每小时 (LMH) 通过从端口403收获和从端口401进料而冲洗1小时

[0097] 8. 如果与生物反应器媒质相同, 可将截留液保留在装置中, 或者可在细胞培养生产操作之前从端口401排出并用来自生物反应器的媒质再填充。

[0098] 示例3-使用调节的ATF一次性装置进行过滤器完整性测试

[0099] 还参照图6B, 过滤完整性测试是确保中空纤维膜完整且膜孔完全润湿的手段。在ATF模式下冲洗后, 通过重力或通过使泵P2反向而将空气源打开至1psi-2psi以升高隔膜并打开所有其他阀以将润湿流体 (媒质) 排回湿润流体袋中。袋子的位置应允许排出。

[0100] 在排出后, 关闭气源阀并释放隔膜上的任何压力。然后, 关闭位于润湿剂袋与端口401之间的阀门, 并关闭沿着管线连接至截留物端口402的阀, 并从泵P1上取下管道。使用气压源缓慢加压过滤器的进料侧。关闭过滤器与空气压力源之间的阀, 并确定压力衰减与时间的关系。使此与空气流量相关联。在衰减测试期间, 打开通过端口403连接至收集袋的阀。可选地, 可在管线上添加流量计, 在这种情况下, 压力源会保持打开, 并且会测量气流完整性。

[0101] 为了保持无菌状态, 通过使用管道焊接机或阀/夹具或其他方式断开冲洗/完整性袋的设置。

[0102] 示例4-使用C410控制器操作SU-ATF进行隔膜寿命测试

[0103] 带有0.2 μ m Spectrum PES过滤器的一次性ATF6连接至Repligen C410控制器。将A2B连接器连接至40℃的水浴, 并以17.2升/分钟 (LPM) 的ATF速率运行500,000次压力和500,000次排气循环。渗透物被拉至5.7LMH, 因为它将用于灌注过程以保持操作尽可能类似于生物反应器条件。这导致每天大约10,000次压力和10,000次排气循环。ATF运行50天, 同时监测隔膜排量。排量在整个50天的运行过程中保持不变, 如预期的那样保持恒定的流量。

[0104] 示例5-在具有SU-ATF2的CHO灌注生物反应器中生产单克隆抗体

[0105] 测试了使用本公开的ATF过滤器培养的细胞, 并且结果显示在图8和图9中。在产生单克隆抗体的CHO细胞灌注过程中, 测试 γ 照射的无菌suATF2过滤器 (具有0.13m²表面积的0.2 μ m聚醚砜微过滤器)。在 γ 灭菌过程之后, 使用无菌的GE **Readymate**®连接器将suATF2过滤器连接至5.0L台式生物反应器 (在1.5L工作体积下)。使用C24Uv2.5ATF控制器来操作suATF2过滤器。在接种之前, 将suATF2过滤器用1.5L在生物反应器中包括的CDoptiCHO®生长媒质 (Thermo Fisher) 冲洗1小时, ATF速率为0.9LPM, 渗透速率为12.4LPM (通量5.7LMH), 以在生物反应器中再循环。过滤器用媒质冲洗以润湿过滤器, 并将内毒素水平降

低至低于0.25EU/mL。

[0106] 在该过程之后,ATF泵暂时停止,冲洗介质以无菌方式从生物反应器和suATF2过滤器中被丢弃。将A2B(ATF与生物反应器)连接器夹紧并将1.5L补充有4mM GlutaMAX®(Thermo Fisher)和100ng/mL LONG[®]R³IGF-I(Repligen)的新鲜CDOptiCHO®生长媒质(Thermo Fisher)添加至生物反应器。将媒质加温至37℃后,以5.5E5细胞/mL的接种密度接种CHO DP-12克隆#1934LR3适应细胞(来自ATCC,表达重组人抗-IL-8)。

[0107] 在整个运行过程中,生物反应器保持在37℃。使用0.1N NaOH和CO₂将pH控制在7.2±0.4死区直至第4天控制在6.8±0.1死区。使用纯氧或通过L型喷雾器或微米喷雾器将DO维持在40%。使用L型喷射器持续喷射空气进行曝气和汽提CO₂。根据需要添加消泡剂C和葡萄糖饲料以控制发泡并将葡萄糖水平保持在1g/L以上。生物反应器以分批模式运行直至第4天,并且在第4天以1容积血管每天或WD(1.5L/天灌注速率)开始灌注。在第5天手动增加灌注速率至2VVD(3L/天),并在第6天增加至2.5VVD(3.75L/天)直至灌注运行结束。下面显示的ATF2灌注生物反应器数据是从第0天到第10天(生物反应器过程仍在进行中)。

[0108] 图8中显示了数天内产生的活细胞浓度和百分比生存力。(分别在实心 and 空心方块中)。图9中显示数天内收获品系的蛋白质浓度曲线和总蛋白质浓度。

[0109] 其他实施方式

[0110] 应理解的是,虽然已经结合其详细描述描述了本发明,但是前述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

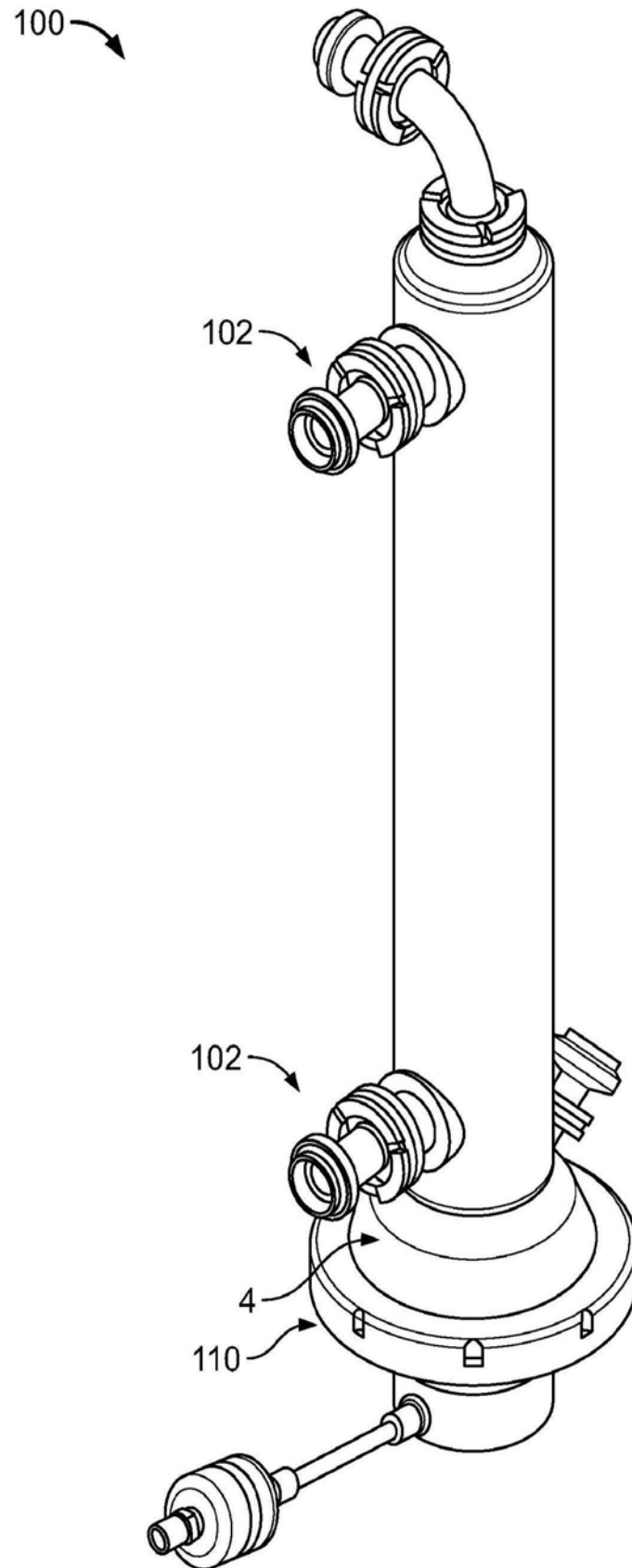


图1A

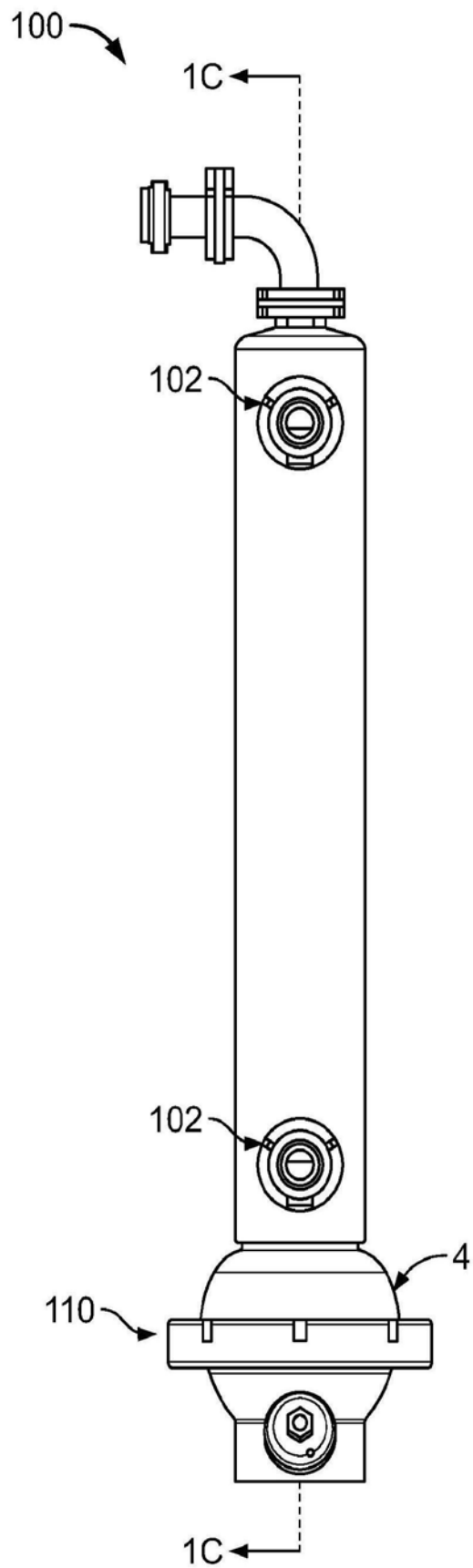


图1B

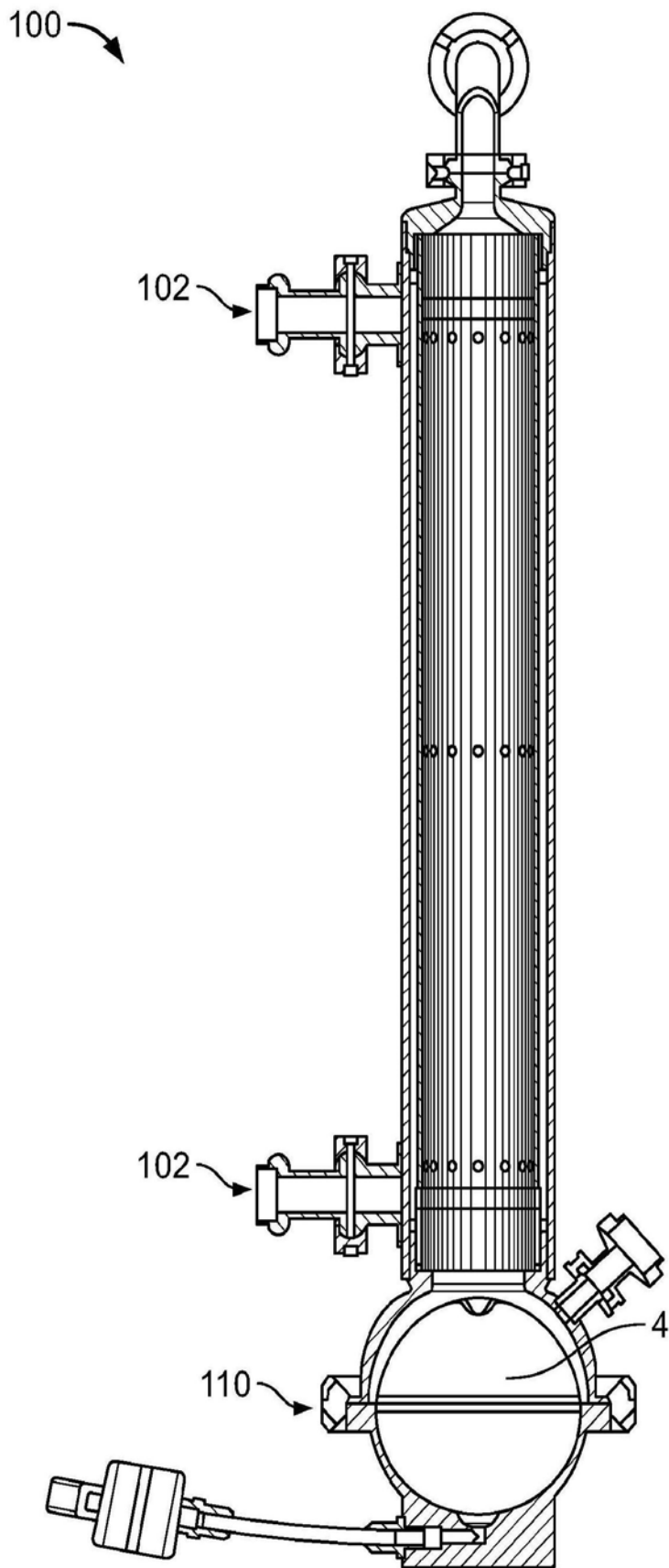


图1C

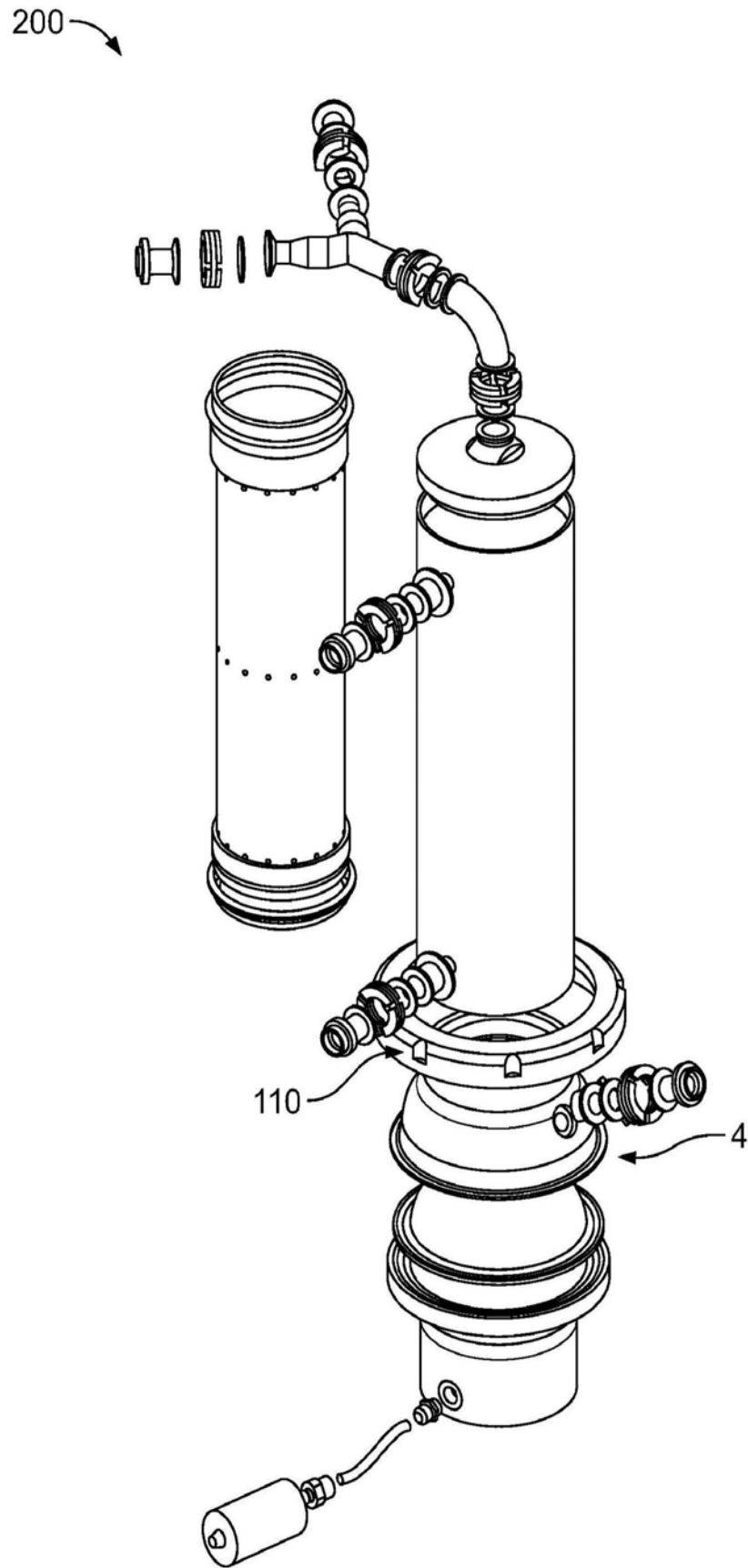


图2A

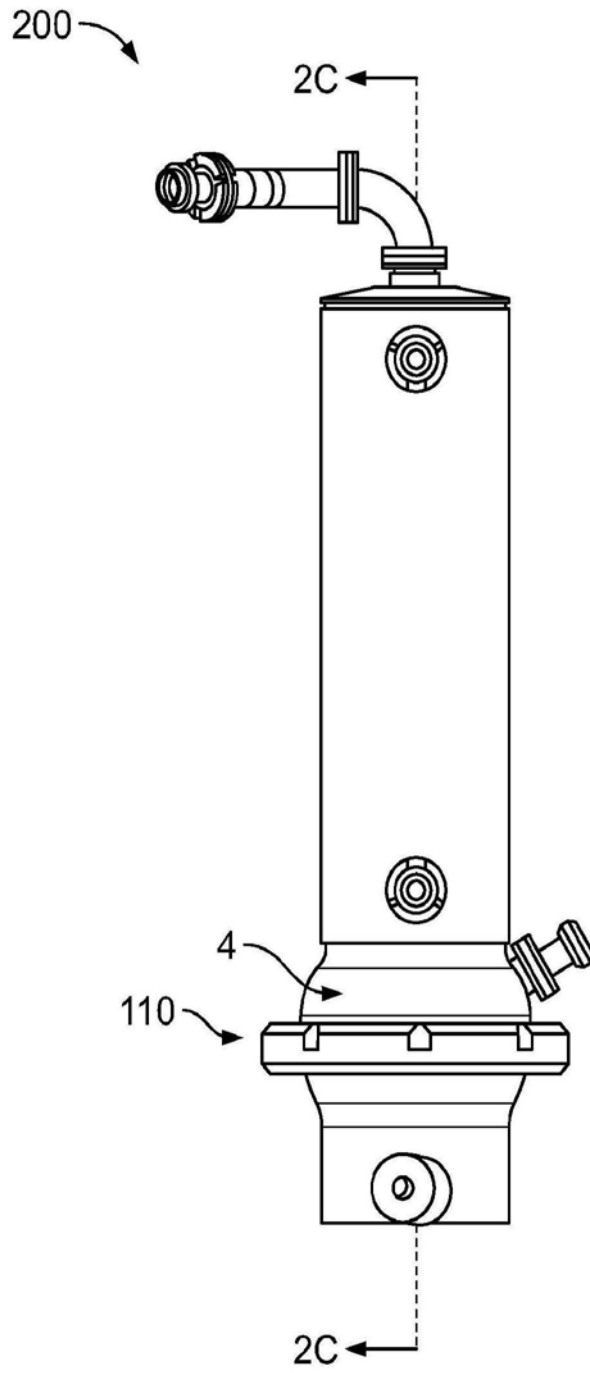


图2B

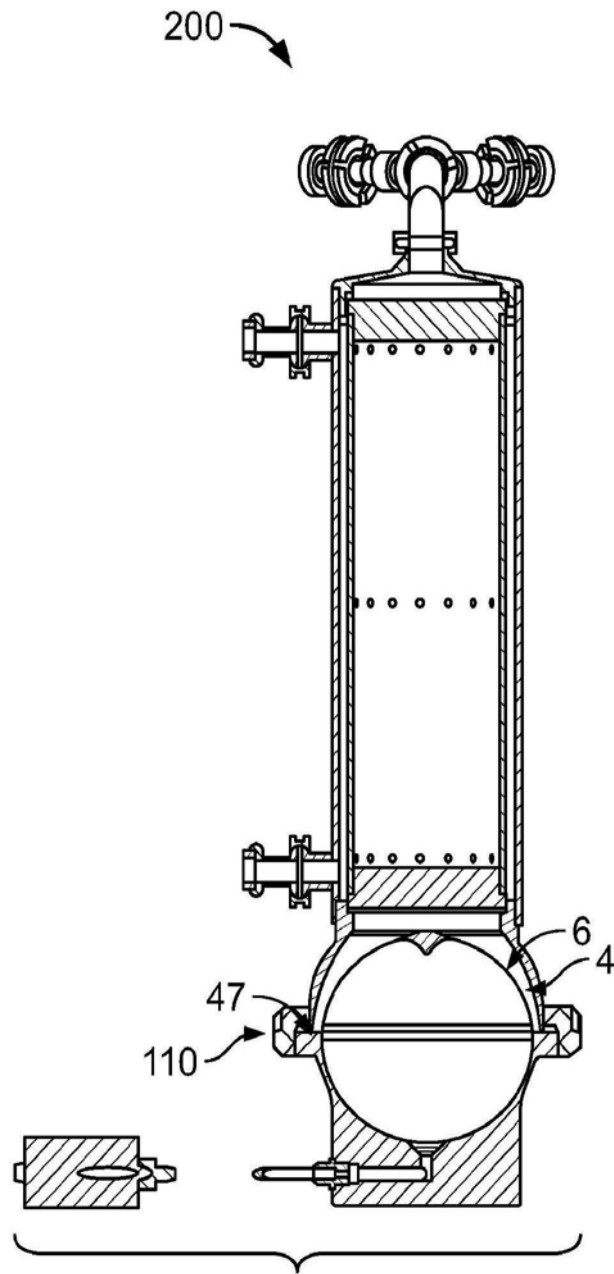


图 2C

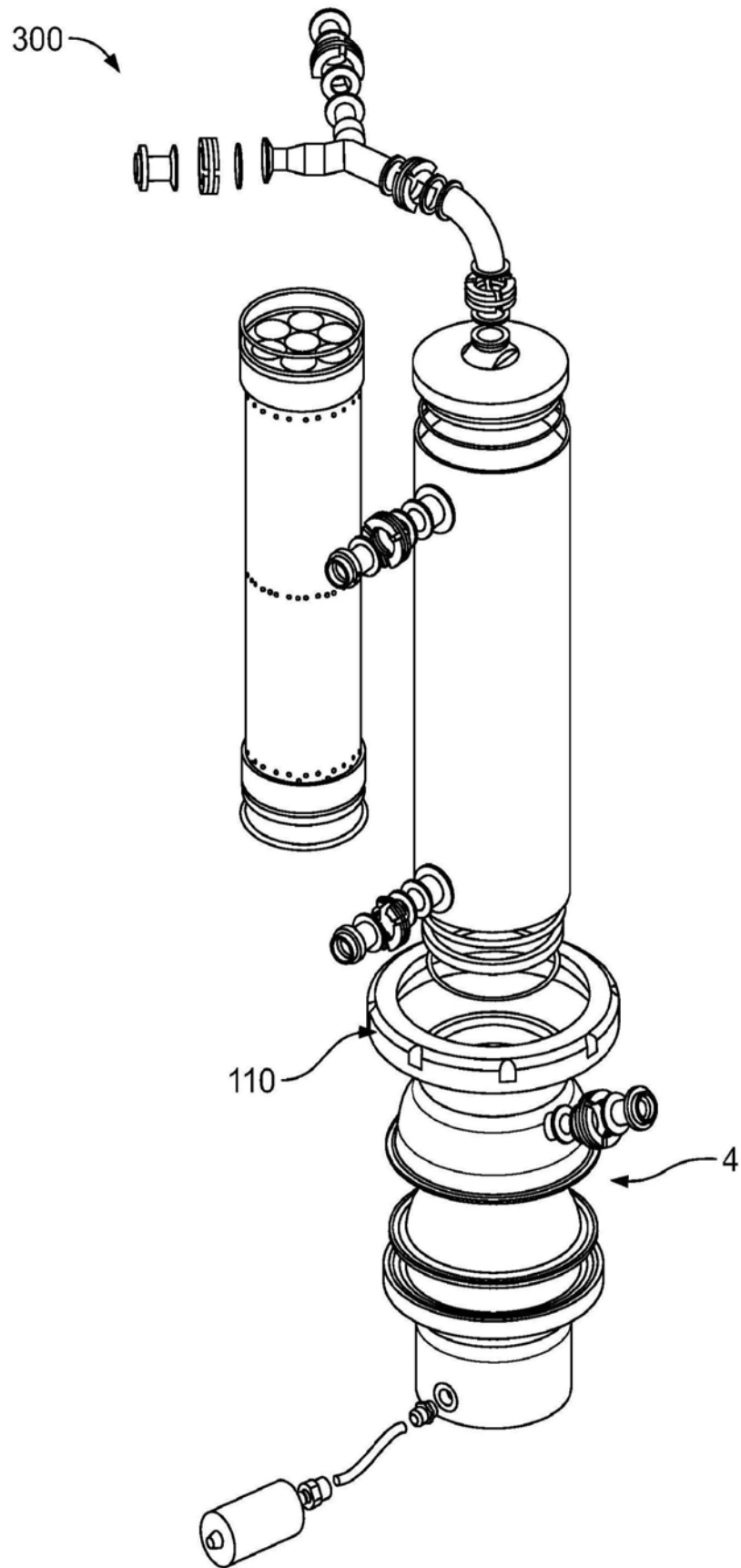


图3A

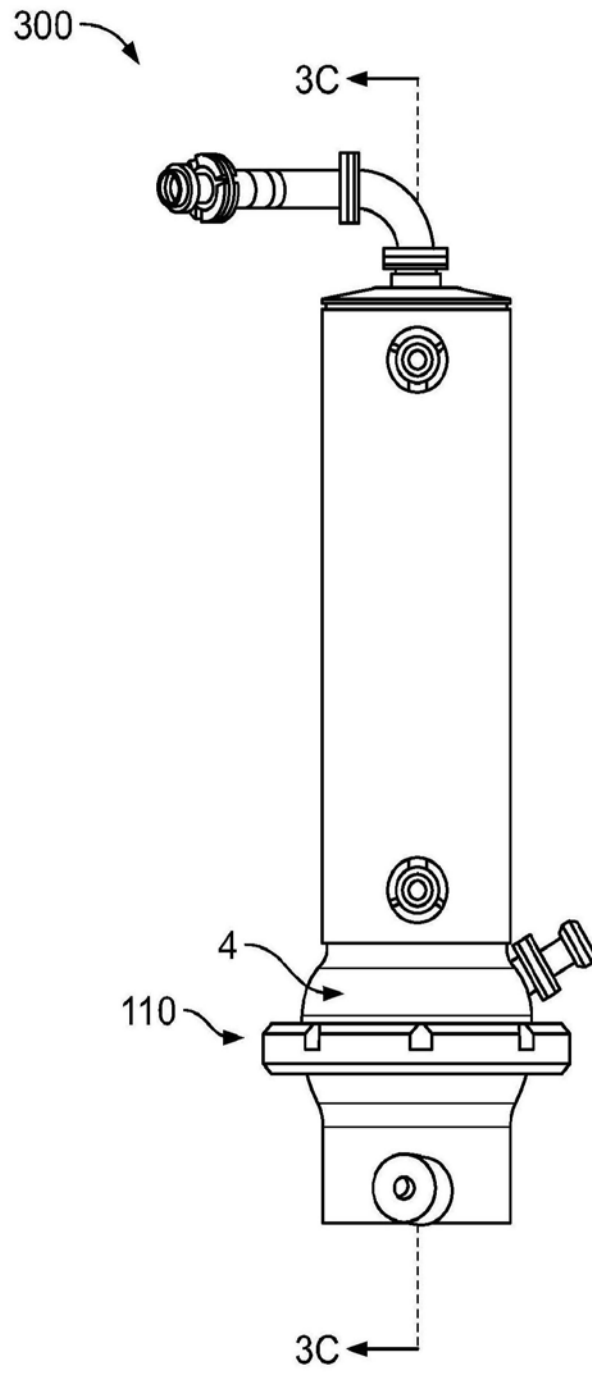


图3B

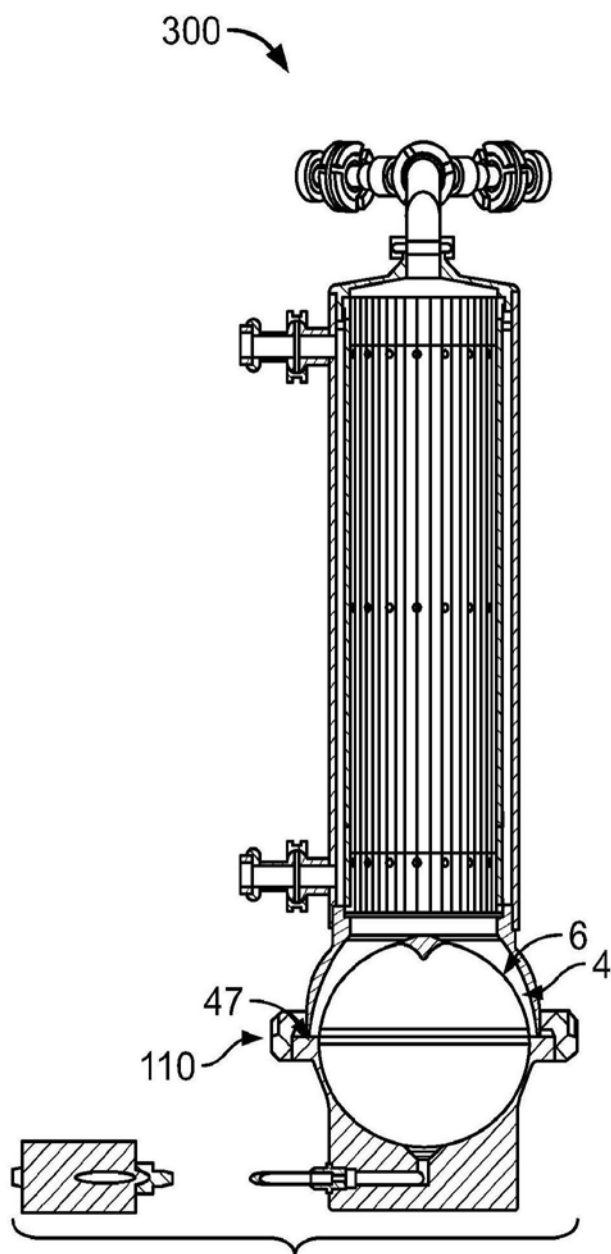


图 3C

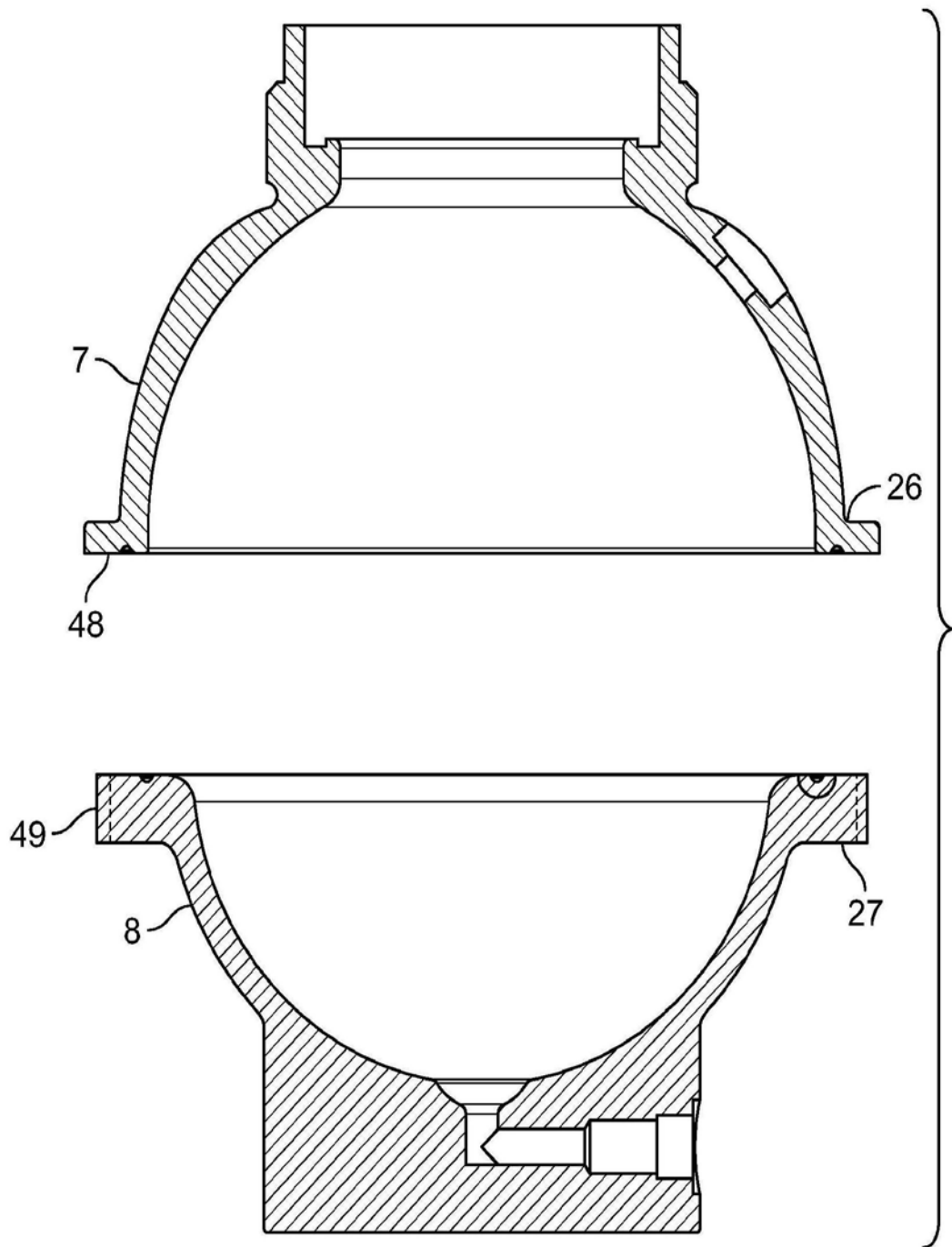


图4A

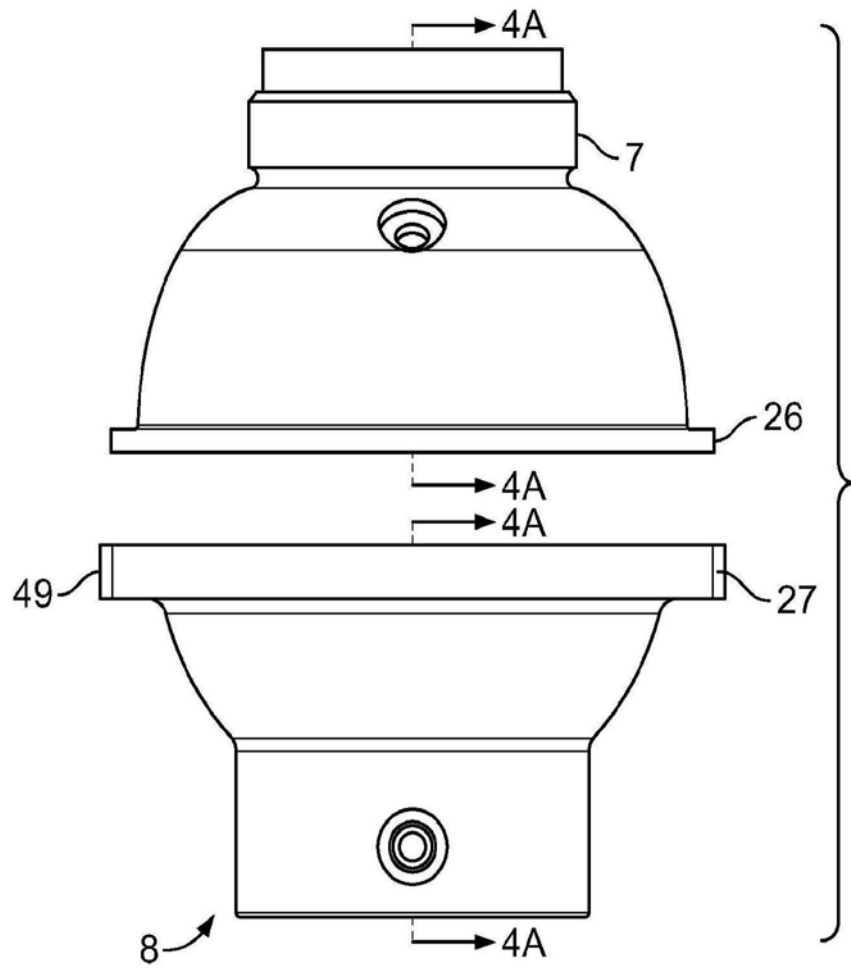


图4B

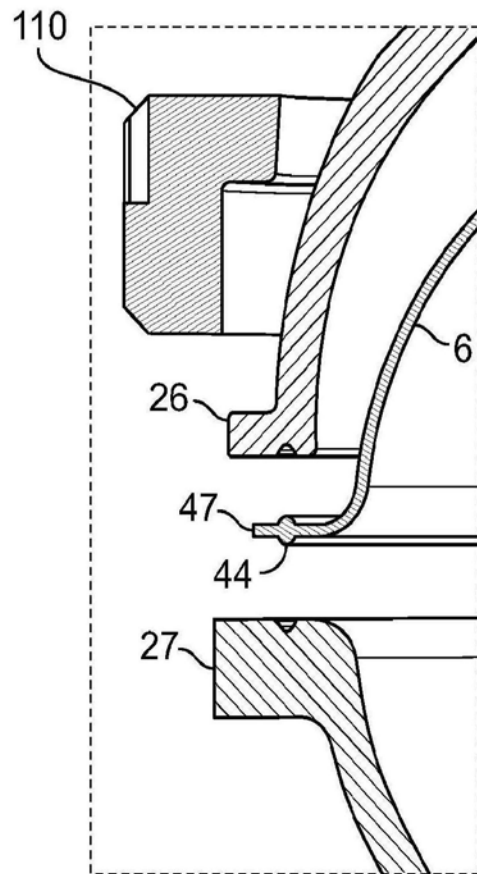


图4C

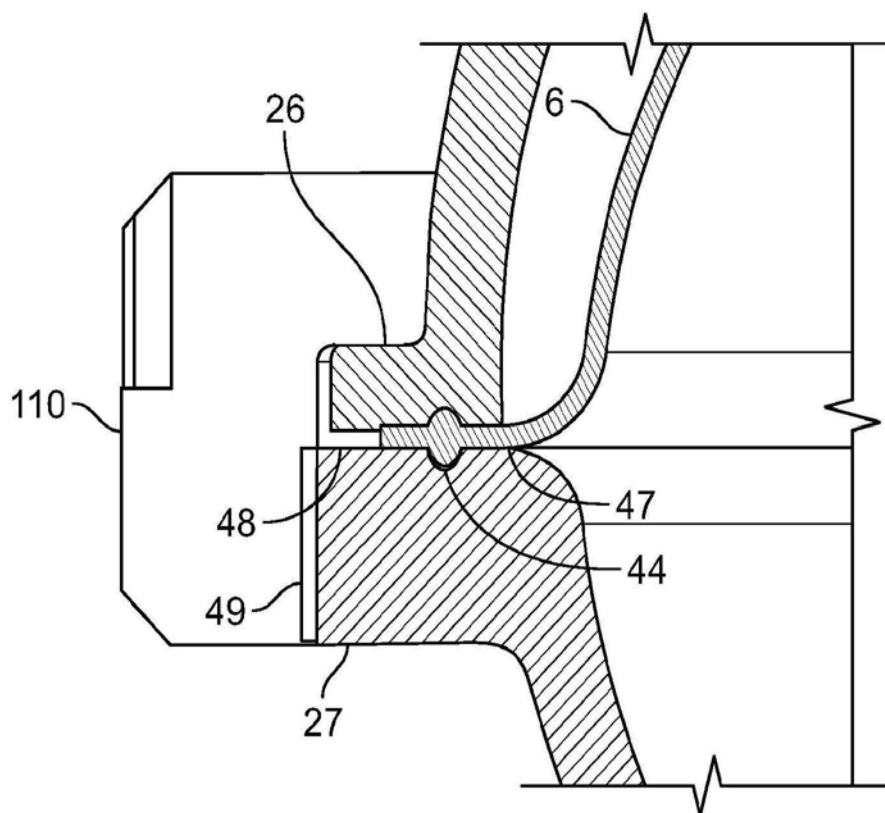


图4D

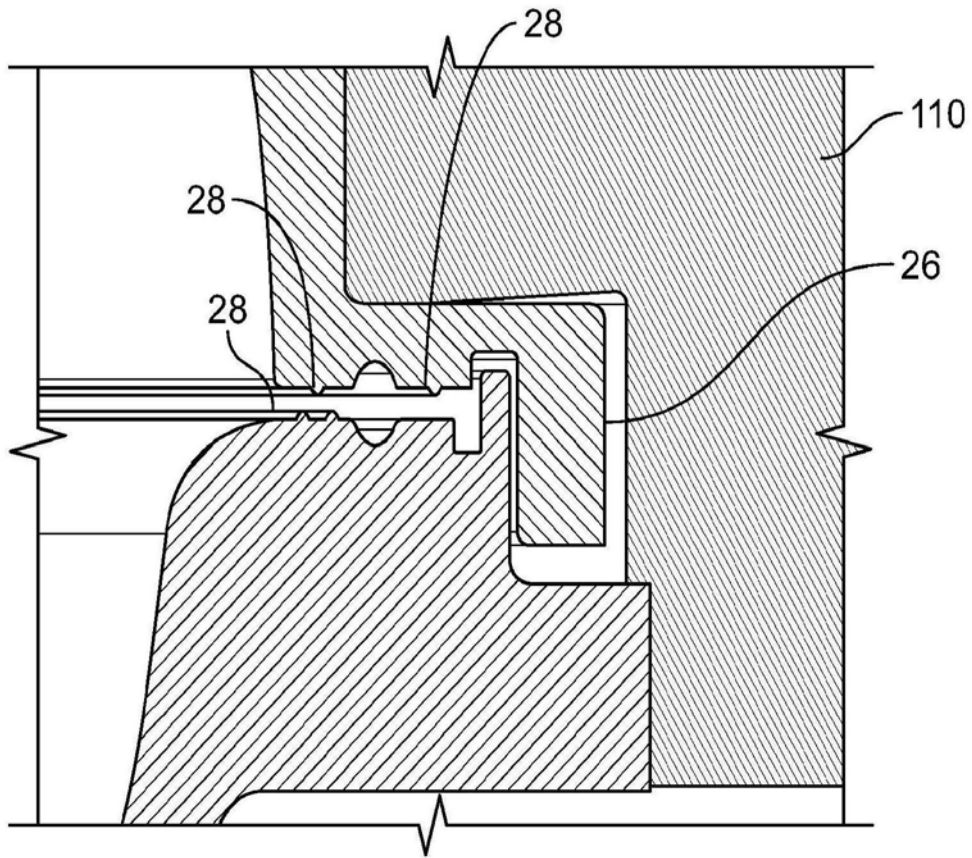


图4E

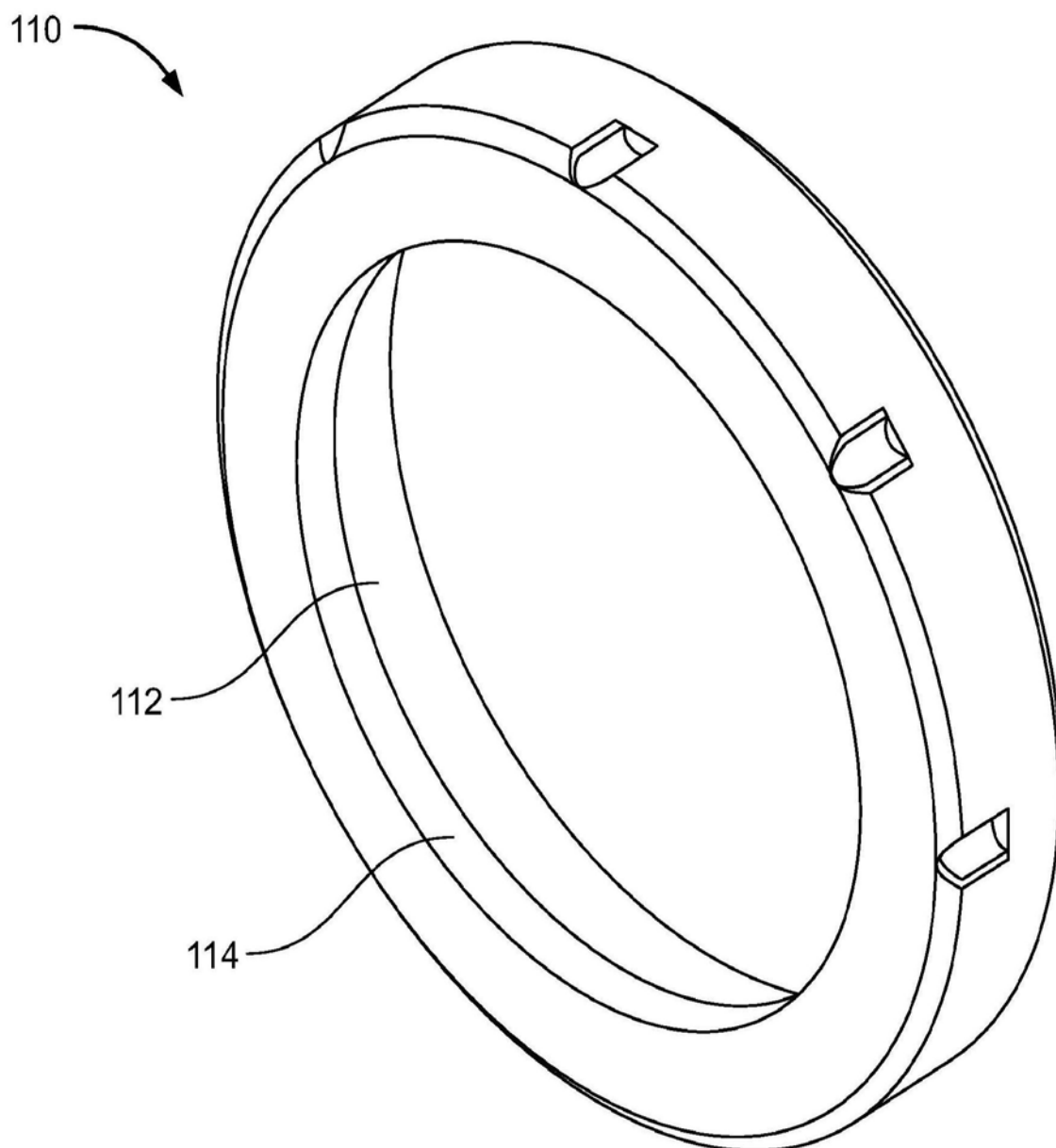


图5A

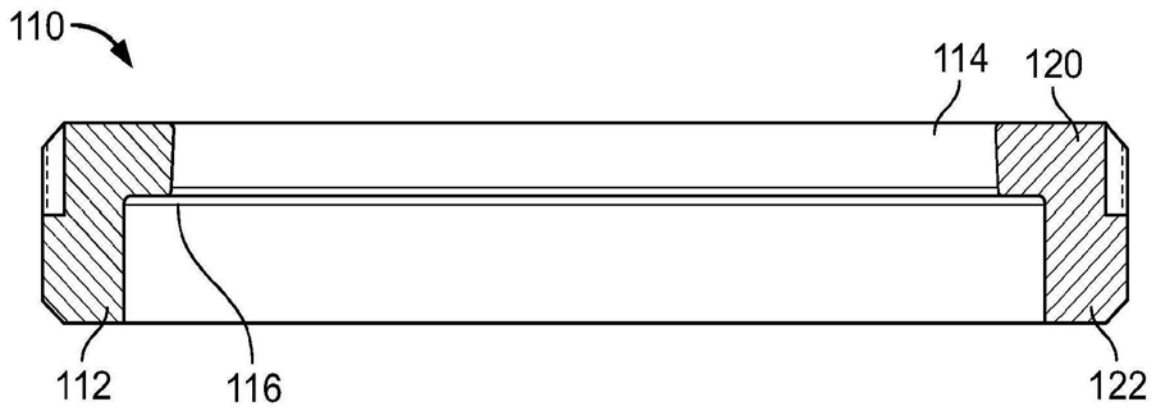


图5B

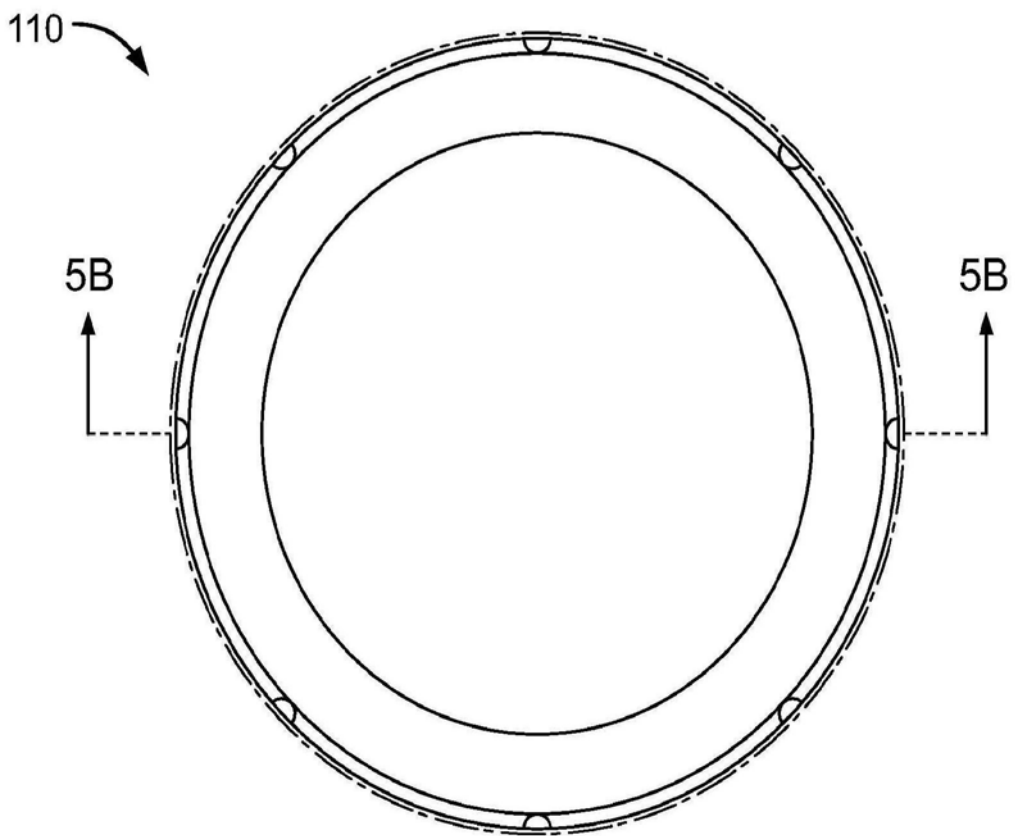


图5C

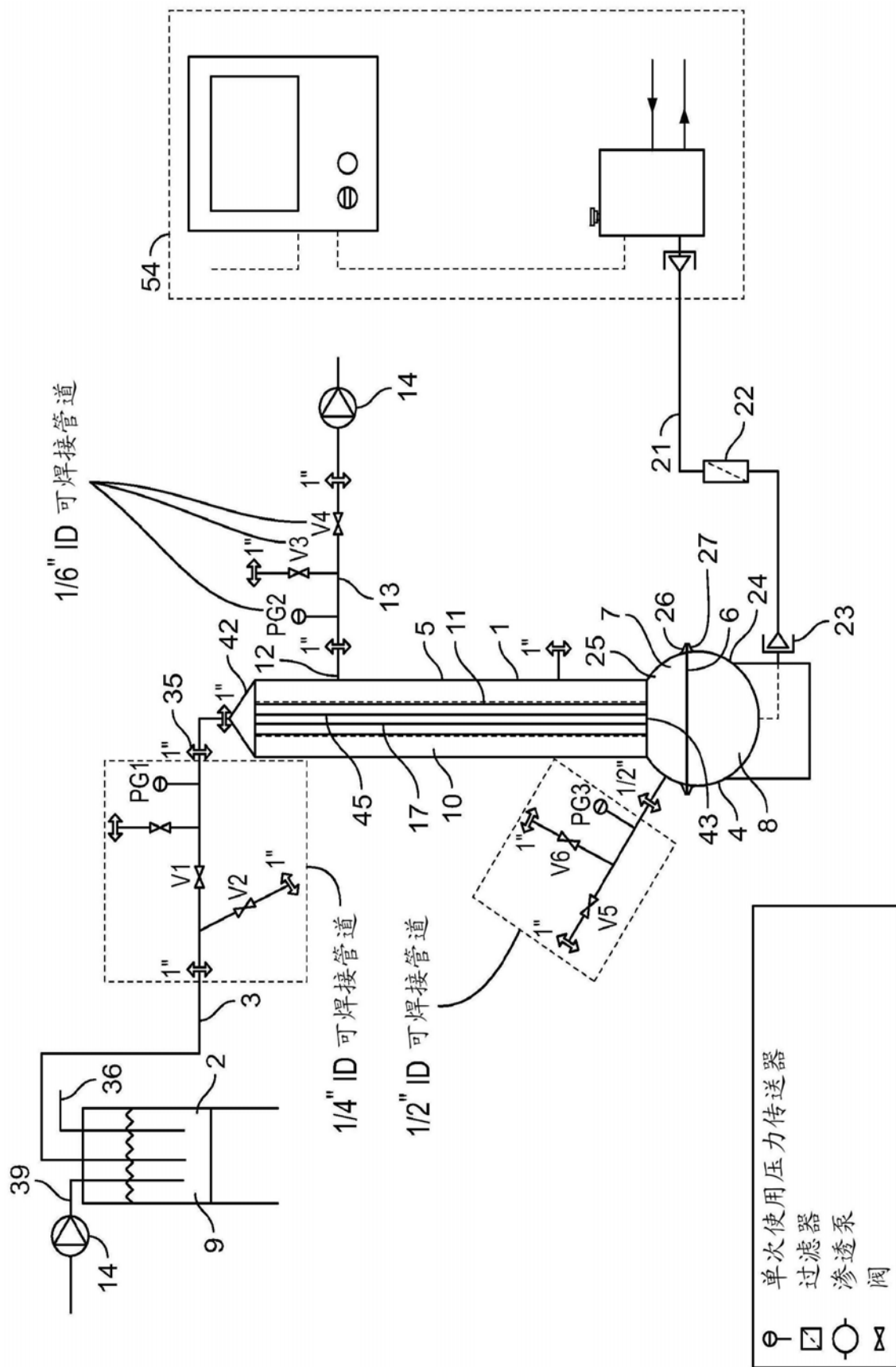


图6A

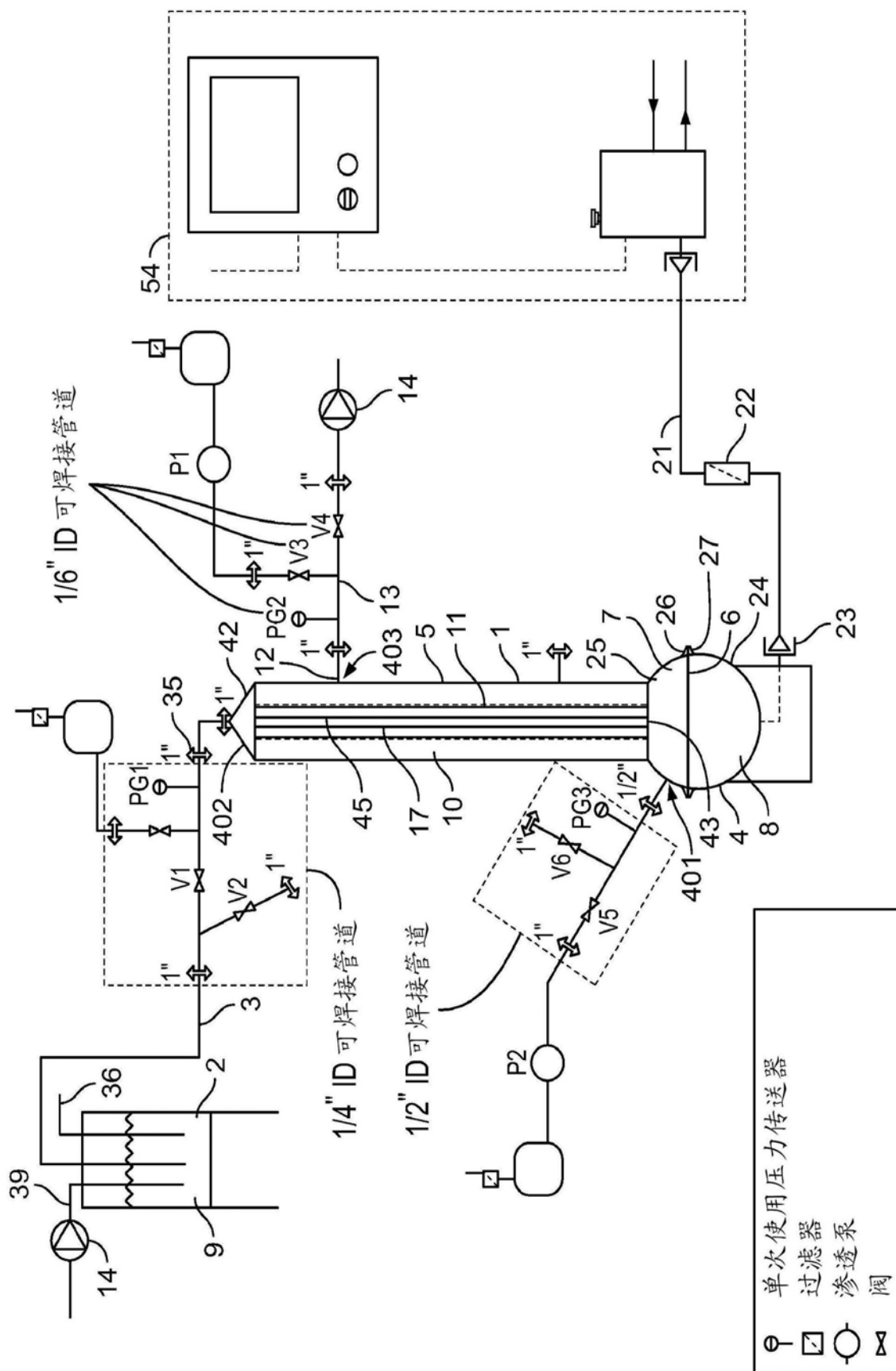


图6B

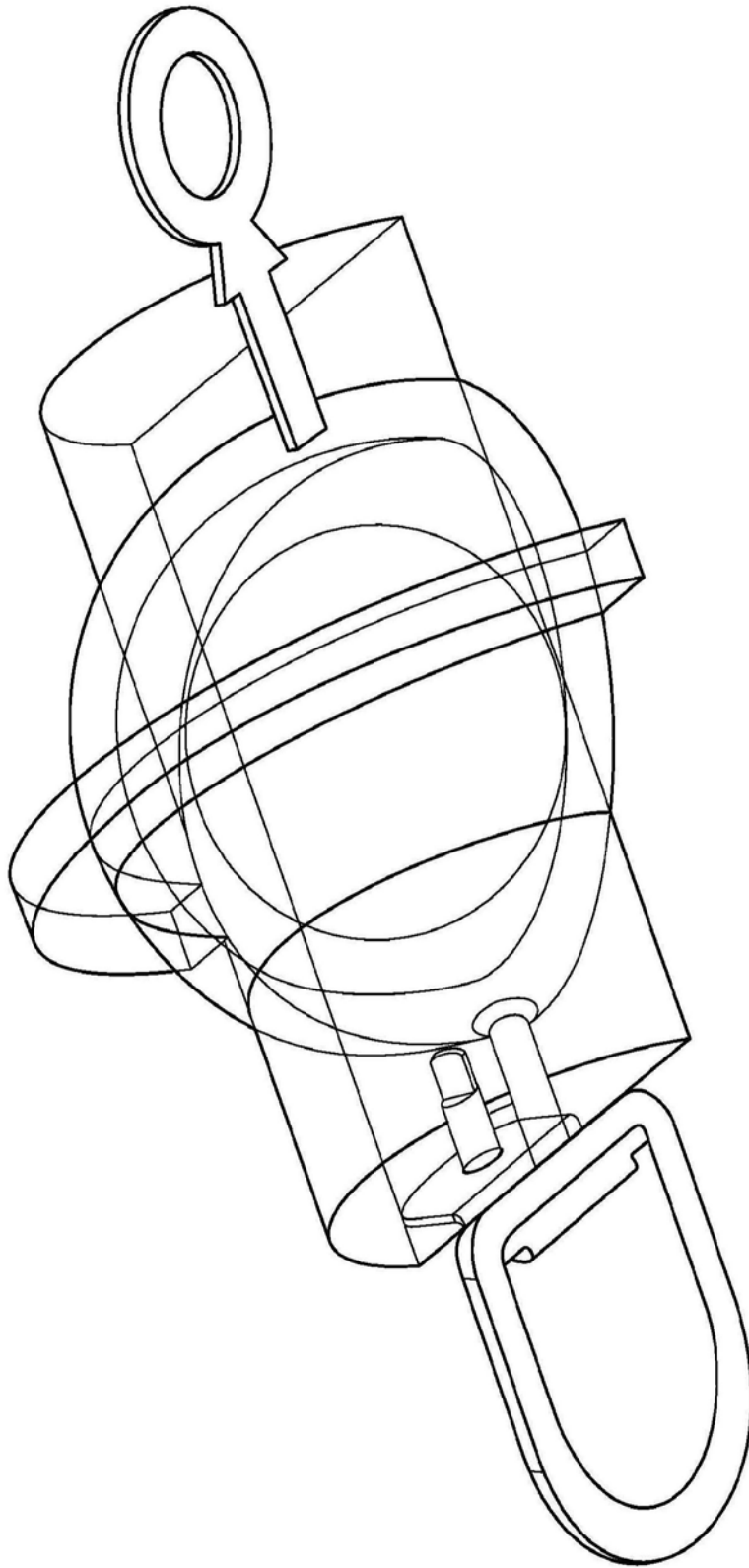


图7

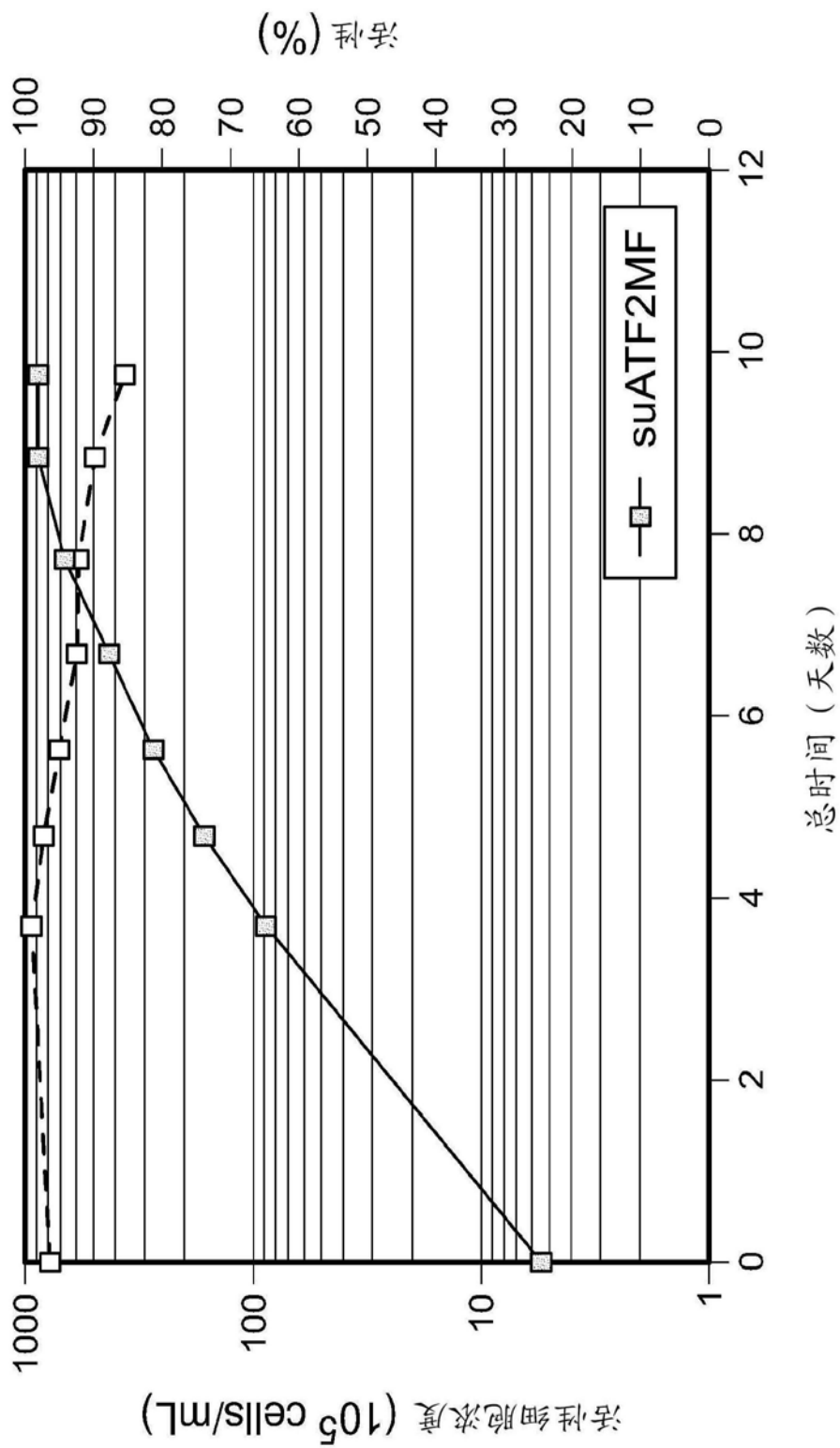


图8

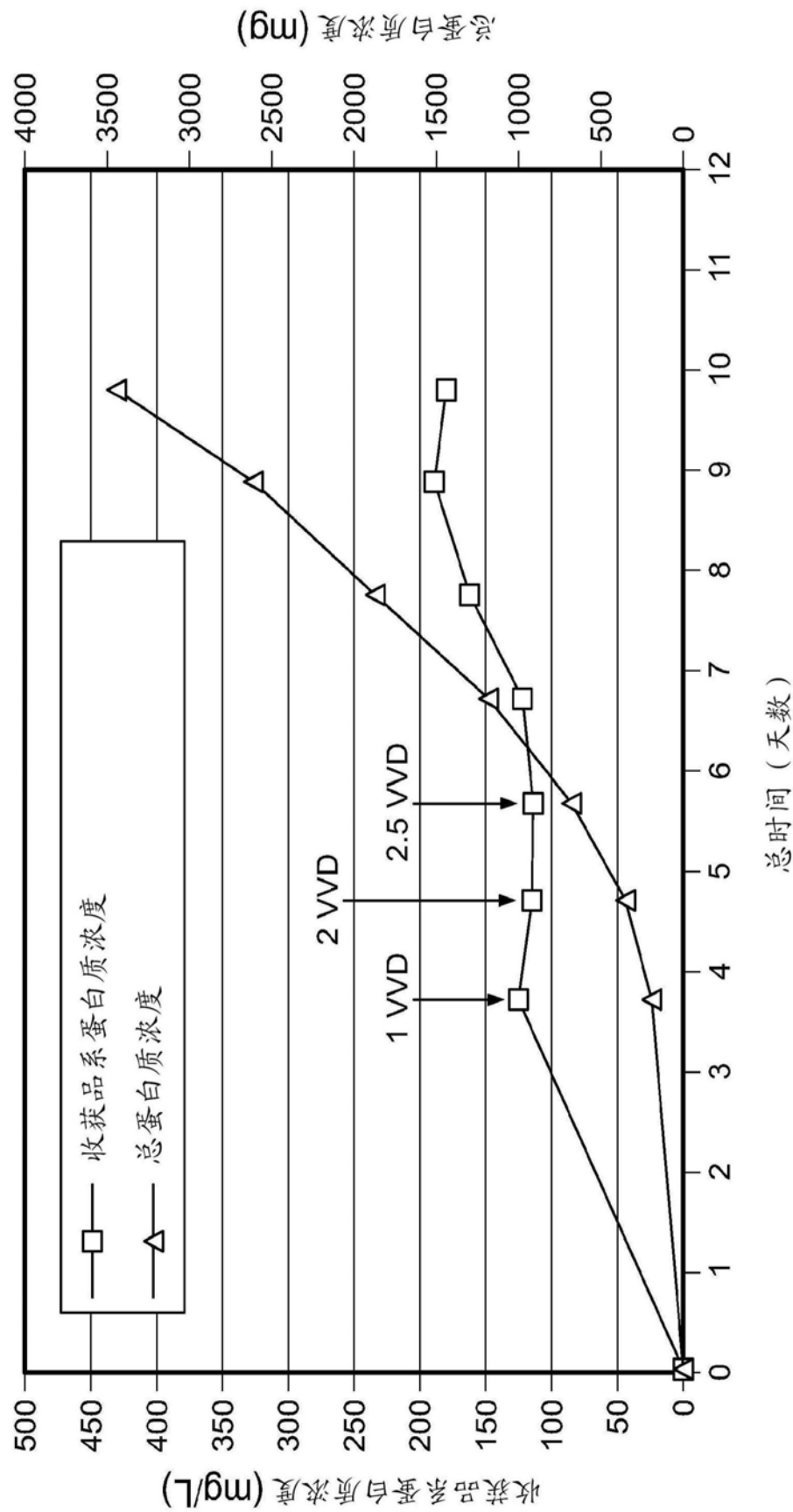


图9