Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, более точно к способам отделения клеток и их частей с целью получения очищенных образцов, не содержащих клеток. Способ может быть использован при очистке протеинов, выделяемых клеточными культурами, например при очистке протеинов, выделяемых в терапевтических целях.

Уровень техники

Центрифугирование является хорошо известным методом, постоянно используемым для отделения твердых частиц от жидкостей. Суспензии бактерий и дрожжевых клеток разделяют на центрифугах в промышленном масштабе, однако, такое промышленное центрифугирование только недавно начали применять к культурам клеток млекопитающих.

Оборудование для фильтрования при центрифугировании в промышленном масштабе (например, для образцов объемом более 2200 л) громоздкое и представляет собой существенный источник эксплуатационных расходов, включая время на установку фильтра, его очистку и удаление.

При отделении клеток млекопитающих в непрерывных центрифугах в промышленном масштабе возникают три основные проблемы. Во-первых, поперечные силы (разрывающие силы) в центрифуге могут повредить клетки, что приводит к накоплению мелких частиц "клеточного мусора". Повреждение может привести также к выделению внутриклеточных компонентов (клеточных протеинов, ДНК, протеаз), что повышает содержание примесей в готовом продукте. Во-вторых, для суспензий клеток млекопитающих характерно широкое распределение частиц по размерам (от 40 мкм до субмикронных частиц). В связи с этим необходимо определить минимальный размер частиц, которые можно эффективно отделять центрифугированием. Чтобы повысить чистоту центрата до уровня, приемлемого для хроматографии, надо предусмотреть этапы последующего фильтрования (после завершения центрифигурования). В-третьих, для очистки культур клеток необходима высокая производительность (например, разумным является время работы около 3 ч).

Типичное оборудование и методы центрифугирования известны и описаны, например, в работах Kempken et al. (1995) Biotechnol Bioeng 46:132-138, Kempken et al. (1995) J. Indus Microbiol 14:52-57, Berthold et al. (1994) Cytotechnology 15:229-242, U.S. Patent No. 5451660, Builder et al. и Tebbe et al. (1996) Cytotechnology 22:119-127. Конкретно, работа Tebbe et al. содержит один из первых примеров использования центрифуги со стеком дисков и гидрогерметичной подающей системой для центрифугирования клеток гибридомы млекопитающих. Tebbe с соавторами осуществили отделение клеток при относительно низком центробежном ускорении 2200 g и 5700 g и низкой объемной производительности 90 кг/час. Авторы не указали, однако, максимальную скорость, с которой следует раскручивать клетки (количество оборотов центрифуги в минуту, создающих заданную центробежную силу - в этой работе последнюю называют g-силой) или интервал значений объемной производительности при центрифугировании, при котором удается избежать повреждения клеток млекопитающих разрывающими силами. Они ограничиваются указанием на то, что простое повышение центробежной силы при вращении суспензии клеток млекопитающих в процессе ее центрифугирования и при заданном значении объемной производительности позволяет повысить производительность объемной очистки в промышленном масштабе. Особенности культур клеток млекопитающих и необходимость учитывать ключевые составляющие закона Стокса (такие как объемная производительность и центробежная сила) приводят к тому, что при повышении g-силы (более 7000 g, что выше указанного в работе Tebbe с соавторами) возрастают разрывающие поперечные силы, что приводит к повреждению клеток. Таким образом, авторы не смогли указать пределы значений параметров в законе Стокса, описывающего вращение центрифуги

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g,$$

применимые в промышленном масштабе для очистки протеинов, секретируемых клетками млекопитающих. Это приводит к тому, что центраты клеток млекопитающих, полученные известными в настоящее время методами, содержат большие количества клеточного мусора размером до 1,5 мкм, что снижает производительность фильтрования, осуществляемого на последующих этапах очистки. Вышесказанное приводит к необходимости разработки усовершенствованных методов очистки протеинов в промышленном масштабе.

Раскрытие изобретения

Предложенная новая методология учитывает все концептуальные составляющие закона Стокса на этапе центрифугирования, что позволяет снизить повреждения клеток млекопитающих. Помимо этого, специфические фильтры при использовании совместно с центрифугированием позволяют уменьшить общую мутность отфильтрованных центратов.

Таким образом, целью настоящего изобретения является определение ключевых составляющих (например, центробежной силы для вращения смеси клеток, объемной производительности при описании непрерывного потока через стековые центрифужные роторы и размера микрофильтров) для очистки выделенных секретированных протеинов центрифугированием и фильтрованием.

Эти практические соображения решаются раскрываемыми в данном изобретении премами разделе-

ния твердых частиц и жидкостей в клеточных суспензиях больших объемов.

Настоящее изобретение направлено на методы очистки клеточных суспензий с помощью центрифугирования и пористой фильтрации. Для этого оптимизируются ключевые составляющие закона Стокса, применимого к вращению центрифуги

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g,$$

а также методы последующей фильтрации.

Эти методы применимы к промышленной очистке протеинов, выделяемых клетками млекопитающих или бактерий.

Культуры клеток млекопитающих или бактерий могут первоначально составлять суспензию или кашицу (шлам) клеток, включая культуры объемом по меньшей мере 2200 л или по меньшей мере 15000 л.

Для очистки больших клеточных культур может применяться противовспениватель.

В соответствии с раскрываемыми здесь приемами в процессе центрифугирования необходимо соблюсти баланс между гравитационной силой в диапазоне приблизительно от 8000 до 15000 g и объемной производительностью в стековых центрифужных роторах для получения предсказуемых условий центрифугирования, учитывающих неопределенность закона Стокса. Так было установлено, что при гравитационной силе в диапазоне, приблизительно от 8000 до 15000 g отношение Q/Σ (Объемного потока к сигма-фактору) должно находится в диапазоне от $0,9 \times 10^{-8}$ до $2,8 \times 10^{-8}$), после чего получаемый центрат может быть с эффективностью подвергнут пористой фильтрации.

В результате осуществления этих приемов можно по завершении этапа центрифугирования добиться эффективности разделения по меньшей мере на 95%; получаемый центрат будет очищен от клеток и мусора размером более 2 мкм. Пористая фильтрация предполагает использование одного или более фильтров, например, пористого фильтра и одного или нескольких фильтров окончательной очистки. В отдельных случаях размер пор последнего фильтра может составлять около 0,1 или 0,2 мкм.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой линейный график, отображающий скорость оседания клеток CHO разных размеров под действием силы тяжести и в центрифуге при различных центробежных силах.

Фиг. 2 представляет собой схематическое изображение сечения дисковой стековой центрифуги.

На фиг. 3 схематически изображен принцип разделения, реализованный в дисковой стековой центрифуге.

Фиг. 4 представляет собой линейный график, отображающий зависимость центробежной силы в сепараторе SC-6 от скорости вращения ротора.

Фиг. 5 представляет собой линейный график, отображающий зависимость Σ от скорости вращения ротора в сепараторе SC-6.

Фиг. 6 представляет собой линейный график, отображающий зависимость производительности, достигаемой в сепараторе SC-6 при 8000 и 16 000 g (8800 и 12 000 RPM) от минимального размера частиц, удаляемых с 50% эффективностью.

Фиг. 7 представляет собой линейный график, отображающий зависимость процента удаления твердых частиц от отношения Q/Σ и центробежной силы.

На фиг. 8 представлено распределение частиц по размерам в культуре IDEC-114, которая использовалась как исходное сырье в экспериментах по центрифугированию. Популяция клеток размером от 10 до 35 мкм соответствует живым клеткам, а популяция частиц размером меньше 4 мкм соответствует клеточному мусору. Разрешение метода 0,6 мкм; частицы меньше этого размера зарегистрированы не были (ось X соответствует логарифмической шкале).

Фиг. 9 представляет собой линейный график, отображающий зависимость мутности центрата от условий эксперимента для первой серии экспериментов по центрифугированию (пример 1).

На фиг. 10 представлено распределение частиц по размерам в центрате, полученном в результате первой серии экспериментов по центрифугированию (номера прогонов соответствуют экспериментальным условиям, описанным в примере 1).

Фиг. 11 представляет собой график, отображающий зависимость производительности фильтра ultipor 0,2 мкм (с размером пор 0,2 мкм) от мутности поступающего на фильтр раствора.

Фиг. 12 представляет собой линейный график, отображающий зависимость производительности фильтра ultipor 0,2 мкм (с размером пор 0,2 мкм) от концентрации частиц в поступающем на фильтр растворе.

Осуществление изобретения

Настоящее изобретение направлено на методы отделения твердых частиц от жидкостей с помощью центрифугирования совместно с пористым и мембранным фильтрованием. Совместный подход позволяет быстро осуществлять разделение больших объемов, что удобно для промышленного и клинического применения.

Основные проблемы, связанные с отделением клеток млекопитающих в непрерывно работающих центрифугах, проистекают из ограничений, налагаемых законами Стокса во вращающемся потоке в ро-

торе центрифуги

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

и применимых к крупномасштабным промышленным очисткам протеинов, выделяемых культурами клеток млекопитающих. Во-первых, разрывающие силы в центрифуге могут повредить живые или неживые клетки, что приводит к накоплению мелких частиц "клеточного мусора". Повреждение может привести к выделению внутриклеточных компонентов (клеточных протеинов, ДНК, протеаз), что повышает содержание примесей в готовом продукте. Во-вторых, для суспензий клеток млекопитающих характерно широкое распределение частиц по размерам (от 40 мкм до субмикронных частиц). Необходимо определить минимальный размер частиц, которые можно эффективно отделять центрифугированием. Чтобы повысить чистоту центрата до уровня, приемлемого для хроматографии, надо предусмотреть этапы последующего фильтрования (после завершения центрифигурования). В-третьих, для очистки культур клеток необходима высокая производительность (например, разумным является время работы около 3 ч). Простое увеличение центробежной силы путем повышения скорости вращения клеток при заданной объемной производительности непрерывного потока центрифугирования приведет к повреждению клеток млекопитающих и накоплению мелких частиц клеточного мусора.

Описанный здесь способ очистки предоставляет методологию определения параметров для закона Стокса для центрифугирования культур клеток млекопитающих и бактерий (то есть, концентрацию клеток, плотность и вязкость входящего потока, жизнестойкость культуры, центробежную силу, объемную производительность культуры в центрифуге и размер фильтров), позволяющих проводить очистку протеинов в промышленном масштабе.

Термин "твердо-жидкий образец" ("смесь твердых частиц и жидкости") означает в контексте данного изобретения любой образец, содержащий разделяемые твердую и жидкую фазу, причем интересующий продукт, в основном, находится в твердой фазе или, в основном, в жидкой фазе. К числу таких образцов относятся суспензии, шламы, клеточные культуры и т.д.

В соответствии с методикой твердо-жидкий образец центрифугируют, отделяя твердую фазу от жидкой фазы, называемой также центратом.

Параметры центрифугирования задают такие, чтобы в результате получить в значительной степени фильтруемый центрат. Как правило, этап центрифугирования позволяет отделить по меньшей мере 95% твердой фазы, например более чем 96%, более чем 97%, более чем 98% или более чем 99%.

В настоящем изобретении также показано, что образец очищают, пропуская центрат через устройства для пористого фильтрования, которые удаляют частицы, оставшиеся после центрифугирования. Устройства для пористого фильтрования включают по меньшей мере один фильтр, такой как мембранный фильтр, пластинчатый фильтр, патронный фильтр, мешочный фильтр, листовой фильтр высокого давления, вращающийся барабанный фильтр или вакуумный фильтр. Например, градиентный фильтр CUNO 120M10 позволяет эффективно удалять мусор из центрата.

Описываемый здесь метод разделения может быть адаптирован для различных приложений, то есть, для различных образцов клеток, путем задания соответствующих условий эксплуатации, с учетом закона Стокса, таких как нормализованная загрузка, центробежная (гравитационная) сила, температура поступающей смеси, градиенты фильтров и объемы образцов. Например, центрифугирование клеток млекопитающих эффективно осуществляется при нормализованной загрузке 1×10^{-8} м/с и гравитационной силе около 8000 g. Разделение также будет проходить эффективно при гравитационной силе приблизительно в интервале от 8000 до 15000 g, например в интервале от 8000 до 12000 g, или от 8000 до 10000 g, или от 10000 до 15000 g или от 12000 до 15000 g, или от 10000 до 12000 g. Эффективна может быть любая нормализованная загрузка, если правильно подобрать описанные выше условия эксплуатации.

Промышленные методы ферментирования или выращивания клеток млекопитающих и бактерий хорошо известны в соответствующей области производства. Объемы таких промышленных производств колеблются в интервале от 500 до 20000 л, или от 1000 до 17000 л, или от 2000 до 15000 л, или от 4000 до 12500 л, или от 6000 до 10000 л. Для промышленных и клинических применений могут использоваться образцы больших объемов, предпочтительно включая образцы объемом 15000 и 2200 л.

Методы настоящего изобретения полезны также для очистки таких содержащих клетки образцов, как культуры клеток животных и бактерий. Так, выделяемые клеточными культурами протеины получают, очищая соответствующую культуральную среду, то есть, удаляя из нее клетки и клеточный мусор. Эти протеины могут представлять собой нативные или рекомбинантные протеины, включая, но не ограничиваясь биологические модуляторы ("интерлейкины" и "цитокины") и антитела ("иммуноглобулины"). Предпочтительными антителами, выделяемыми из клеточных культур, могут быть моноклональные или поликлональные антитела. Остальные цели, характеристики и преимущества настоящего изобретения станут очевидны для специалистов, компетентных в данной области промышленности, после изучения подробного описания предпочтительных аспектов изобретения на приводимых далее примерах.

Примеры

Следующие далее примеры включены для иллюстрации различных сторон изобретения. Определенные их аспекты описаны в терминах таких методов и процедур, которые по мнению изобретателя могут быть эффективно использованы в данном изобретении. Пример иллюстрирует стандартные лабораторные методы, имеющиеся в распоряжении изобретателя. В свете настоящего описания и общего уровня знаний в данной области компетентным специалистам должно быть понятно, что нижеприведенные примеры предназначены только для иллюстрации, и что в них могут быть внесены многочисленные изменения и модификации, не выходящие из области изобретения. Использованные в примерах сокращения приведены в табл. 1.

Таблица 1. Символы и сокращения

A	Эквивалентная область осаждения	$м^2$
D	Диаметр частицы	M
E	Степень удаления твердых частиц	
G	Гравитационная постоянная	$м/с^2$
G	Центробежное ускорение	$с^{-1}$
L	Длина ротора	M
N	Число дисков в стеке	
η	Вязкость	кг/(м·с)
PCV	Объем клеток после сжатия в центрифуге ((packed cell value, PCV)	%
Q	Объемный поток	$м^3/с$
R	Радиус ротора или диска	
Re_d	Процент извлечения частиц (size recovery) диаметра d	
ρ_l	Плотность жидкости	$кг/м^3$
ρ_s	Плотность вещества твердых частиц	$кг/м^3$
φ	Конический полуугол диска	
Σ	Сигма-фактор (эквивалент площади)	$м^2$
t	Время	C
u	Скорость потока жидкости	м/с
V_{gd}	Скорость оседания под действием силы тяжести	м/с
V_s	Предельная скорость оседания	м/с
Ω	Угловая скорость	$с^{-1}$

Пример 1. Очистка суспензии клеток CHO

Использование непрерывно работающей дисковой стековой центрифуги

Первоначальное определение пригодности метода проводилось на арендованной дисковой стековой центрифуге - сепараторе SC-6 компании Westfalia. Машина рассчитана на работу с объемным потоком от 60 до 100 л в час и поэтому хорошо подходила для очистки суспензий, производимым биореактором объемом 200 л. Было выполнено три тестовых прогона со следующими целями:

(1) Определить общую пригодность непрерывной дисковой стековой центрифуги для разделения клеточных суспензий больших объемов. Изучалось удаление твердых частиц и разрушение клеток.

(2) Определить, какое фильтрование требуется после центрифугирования, но до хроматографической очистки центрата.

(3) Разработать приемлемую последовательность действий, позволяющую оценить размер центри-

фуги, требуемый для очистки суспензии клеток в промышленном масштабе, а также рассчитать параметры установки для очистки суспензий клеток объемом 2200 и 15000 л путем совместного применения центрифугирования и фильтрования.

I. Осаждение частиц в вязкой жидкости

Если сферические частицы диаметром d оседают в вязкой жидкости под действием силы тяжести g, их предельная скорость оседания определяется балансом между плавучестью частиц и действующей на них силой тяжести в вязкой среде в соответствии с уравнением Стокса:

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g \quad (1)$$

Во вращающемся потоке центрифуги уравнение (1) дополняется "центробежной силой тяжести" $G = \Omega^2 \cdot r$, где Ω соответствует угловой скорости (равной 2π, помноженной на скорость вращения N), r - радиус ротора центрифуги, η - вязкость жидкости, а ρ - плотность твердых частиц суспензии (s) и жидкости (I).

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g \quad (2)$$

Чтобы добиться хорошего отделения частиц в поле центрифуги, необходимо сочетание некоторых из следующих условий: высокая скорость центрифугирования, большой размер частиц, большая разница в плотности между твердой и жидкой фазами, большой радиус ротора и маленькая вязкость. Чтобы уменьшить разрушение клеток и повысить общую эффективность очистки на последующих этапах фильтрования, необходимо правильное сочетание описанных выше условий, а также понимание допустимого диапазона, в котором может изменяться каждый из соответствующих факторов.

Что касается конкретного примера разделения суспензии клеток CHO, сразу же можно определить несколько первоначальных ограничений: клетки млекопитающих характеризуются широким распределением по размерам, кроме того, определенные процессы приводят к образованию клеток относительно низкой жизнеспособности. Таким образом, очищаемая суспензия содержит жизнеспособные (10-20 мкм диаметром) и нежизнеспособные (4-10 мкм диаметром) клетки, а также клеточный мусор (частицы диаметром от долей микрона до 4 мкм). Такое широкое распределение не позволяет отделить центрифугированием все частицы из суспензии, и необходимо определить, частицы какого минимального размера могут быть удалены при разумных условиях обработки. Визуально проблема представлена на фиг. 1. Средняя плотность клеток млекопитающих составляет 1030 кг/м^3, плотность суспензии клеток CHO составляет 1000 кг/м^3, вязкость суспензии - 1,05 мПа·с, скорость седиментации клеток различного диаметра показана линией с ромбиками. Даже очень крупные клетки диаметром 20 мкм оседают со скоростью 0,4 см/мин, скорость оседания частиц мусора размером 1 мкм составляет 0,0001 см/мин. Центрифуга с ротором диаметром 40 см при скорости вращения 10000 об./мин сильно ускоряет оседание, но частицы диаметром меньше 1 мкм оседают все еще очень медленно (показано линией с кружками). Таким образом, центрифугирование не приводит к удалению всех частиц, и для завершения процесса необходимо еще отфильтровать полученную после центрифугирования суспензию.

Как показано на фиг. 1, повышение скорости вращения центрифуги ускоряет осаждение клеток, однако, при этом к клеткам в поле центрифуги прикладывается более высокое ускорение, что может привести к их повреждению. Поврежденные клетки могут рассыпаться на мелкий клеточный мусор, что еще больше затруднит разделение из-за описанных выше проблем с удалением мелких частиц. Радиус ротора нельзя увеличивать до бесконечности, так как это (при поддерживаемых скоростях вращения центрифуги) приведет к повышению нагрузки на его стенки. Во избежание разрушения материала стенок максимальный размер ротора в высокоскоростных центрифугах ограничен. Различия в плотности и вязкость суспензий CHO может считаться благоприятным фактором при центрифугировании, потому что концентрация клеток в них относительно мала. Разделение осуществляют при температуре культуры клеток (35°C), что является положительным фактором, потому что при такой температуре понижается вязкость суспензии.

II. Дисковые центрифуги

Как показано на фиг. 2, одной из наиболее распространенных разделяющих центрифуг являются вертикально смонтированное дисковое устройство. Входящий поток поступает по оси ротора и проходит через стек (массив) близко расположенных конических дисков. Конические диски, смонтированные вдоль вертикальной оси ротора, ускоряются до требуемой скорости, часто при помощи системы радиальных лопастей. Часто конические диски располагают на расстоянии от 0,5 до 3 мм друг от друга, это делается, чтобы уменьшить расстояние, требуемое для отделения твердых частиц от жидкости. Диски наклонены на угол, обычно от 40 до 50°, что облегчает транспорт твердых частиц вдоль поверхностей дисков в предназначенную для их сбора область.

Механизм выделения из жидкости твердых частиц или клеток показан на фиг. 3. Под действием центробежной силы твердые частицы прижимаются к нижней стороне диска и скользят вниз в предназначенную для их сбора (удерживания) область. Одновременно очищаемая жидкость перемещается

вверх в канал между дисками и удаляется из центрифуги с помощью специальной центростремительной помпы. Осевшие твердые частицы удаляются либо непрерывно через форсунки, либо периодически через порты на периферии ротора.

III. Теория непрерывного осаждения в центрифуге

Настоящее изобретение содержит также описанную далее модель, позволяющую лучше предсказать производительность непрерывной работы центрифуги и основанную на варианте закона Стокса применительно к процессу седиментации. Чтобы предсказать производительность непрерывного центрифугирования, уравнение Стокса для седиментации под действием силы тяжести (уравнение 1) необходимо модифицировать, чтобы учесть вращение ротора. В таком случае скорость оседания сферической частицы диаметра d определяется в соответствии с уравнением (3)

$$V_s = \frac{dr}{dt} = crd^2 \qquad (3)$$

Если предположить равномерный характер распределения скорости жидкости в потоке вытеснения по всему объему, то средняя аксиальная скорость частицы, перемещающейся от поверхности радиуса r_p к стенке ротора r_b, определяется по уравнению (4):

$$u = \frac{dx}{dt} = \frac{Q}{\pi \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right)} \qquad (4)$$

Время, за которое частица перемещается аксиально на расстояние x вдоль ротора, жидкость в котором движется с объемной скоростью Q, определяется по уравнению (5)

$$t = \frac{\pi \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right) \cdot x}{Q} \qquad (5)$$

Разделив время оседания частицы на время движения частицы в объемном потоке Q, получаем уравнение (6)

$$\frac{r}{r_b} = \exp\left[-\frac{\pi cx \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right) \cdot d^2}{Q}\right] \qquad (6)$$

Если частица проходит по всей длине ротора L, то уравнение (6) преобразуется в уравнение (7) для x = L и r=r*:

$$\frac{r^*}{r_b} = \exp\left[-\frac{\pi cL \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right) \cdot d^2}{Q}\right] \qquad (7)$$

Процент удаления частиц диаметра d (size recovery, Re_d) определяется по уравнению (8)

$$\mathrm{Re}_d = \frac{\pi\left(r_b^2 - r^{*2}\right)}{\pi\left(r_b^2 - r_p^2\right)} \qquad (8)$$

Как следствие, максимальная объемная производительность Q, при которой происходит определенное удаление твердых частиц Re_d, если V_{gd} соответствует скорости осаждения под действием силы тяжести (1 g), определяется по уравнению (9)

$$Q = V_s \cdot A = V_{gd} \cdot \left\{\frac{2\pi\Omega^2 L}{g} \cdot \frac{r_p^2 - r_b^2}{\ln\left[1 - \mathrm{Re}_d\left(1 - r_p^2 / r_b^2\right)\right]}\right\} \qquad (9)$$

где A соответствует эквивалентной области осаждения в центрифуге в конкретных условиях эксплуатации. Она является функцией радиуса ротора, глубины осаждения, скорости вращения, а также требуемого процента удаления твердых частиц. Физические параметры суспензии, например размер частиц, плотность и вязкость, не входят в A непосредственно, однако, они нужны при расчете скорости осаждения частиц под действием силы тяжести (V_{gd}). Если процент удаления задать равным 50%, то уравнение (9) преобразуется в уравнение Амблера (Ambler, уравнение 10), где $\Sigma_{50\%}$ соответствует эквиваленту площади для 50% удаления:

$$\Sigma_{50\%} = \frac{1}{2} \cdot A_{\mathrm{Re}d=50\%} = \left\{\frac{\pi\Omega^2 L}{g} \cdot \frac{r_p^2 - r_b^2}{\ln\left[1 - \mathrm{Re}_d\left(1 - r_p^2 / r_b^2\right)\right]}\right\} \qquad (10)$$

Применив некоторые приближения, уравнение Амблера можно упростить до вида (11)

$$\Sigma_{50\%} = \frac{\pi\Omega^2 L}{g} \cdot \frac{r_b^2 - r_p^2}{2\ln\left(r_b / r_p\right)} \qquad (11)$$

Для $\Sigma_{50\%}$ дисковых стековых центрифуг также можно вывести подобное уравнение (уравнение 12)

$$\Sigma_{50\%} = \frac{2\pi\Omega^2 \cdot (N-1)\left(r_o^3 - r_i^3\right)}{3g \cdot \tan\varphi} \quad (12)$$

где N соответствует числу дисков в стеке, r_o и r_i - внешний и внутренний радиусы конических дисков, а φ - конический полуугол. Σ, фактически, отражает комбинацию размера центрифуги и условий ее эксплуатации в терминах скорости. При увеличении масштаба производства отношение Σ и объемной производительности (Q/Σ), выраженное в м/с, остается постоянным. Если известно значение объемной производительности, которую требуется увеличить, а предварительные эксперименты показали, что для получения требуемой чистоты раствора достаточно определенное значение Σ, то требуемое для крупномасштабной центрифуги Σ можно вычислить из уравнения (13). Для данного оборудования Σ можно рассчитать также и по уравнению (12), а затем определить возможную для этого оборудования производительность по уравнению (13).

$$\frac{Q_2}{\Sigma_2} = \frac{Q_1}{\Sigma_1} = 2V_g \quad (13)$$

Уравнения 12 и 13 представляют собой отправную точку для расчета производительности, которую возможно достичь для конкретной g-силы при центрифугировании культур клеток млекопитающих и бактерий в больших промышленных масштабах и за разумное время (например, менее чем за 5 ч). Тем не менее, масштабирование с использованием уравнения (13) связано с некоторыми ограничениями, поскольку при его выводе был сделан ряд допущений:

1. Поток в центрифуге может не быть простым потоком вытеснения, может существовать градиент скорости.

2. Поступающая в центрифугу смесь не ускоряется до g моментально в точке входа, это ведет к уменьшению центробежной силы и снижению эффективности разделения.

3. Σ соответствует только 50% снижению содержания частиц.

4. Поступающая на входе смесь не распределена там равномерно и

5. Осаждение частиц в суспензии может быть затруднено при высокой концентрации частиц, что ведет к снижению эффективности разделения.

Для учета указанных ограничений при масштабировании вводят специальные корректирующие факторы. Для больших центрифуг корректирующий фактор, используемый для оценки производительности по уравнению (9), находится в интервале от 0,4 до 0,7, то есть реальная производительность установки составляет от 40 до 70% от предсказанной по уравнению (9). IV. Технические спецификации арендованного сепаратора SC-6

Далее приведены технические характеристики арендованного сепаратора SC-6:

Общий объем ротора	1.8 л
Объем накапливаемого осадка	0.7 л
Максимальная скорость ротора	12 000 об/мин
Число дисков в стеке	75
Дисковый угол	40 градусов
Внешний диаметр диска	0.068 м
Внутренний диаметр диска	0.0125 м

В соответствии с этой информацией можно рассчитать центробежное ускорение G (выраженное как множитель g) как функцию скорости вращения ротора по уравнению (14)

$$G = \frac{r \cdot \Omega^2}{g}, \quad (14)$$

где $\Omega = 2\pi$ (скорость вращения) (c^{-1}).

G для дисковой стековой центрифуги можно рассчитать, зная внешний радиус стека дисков (0,068 м) или радиус области, в которой накапливается осадок (0,093 м). На фиг. 4 показано изменение g-силы как функция от скорости вращения ротора в обоих случаях. Линия с кружками описывает изменение g-силы как функцию от скорости вращения ротора при использовании радиуса дискового стека. Линия с квадратиками соответствует использованию радиуса области, в которой накапливается осадок (0,093 м). Как показано при анализе фиг. 4, g-силу можно рассчитать, зная радиус области, в которой накапливается осадок, для максимальной скорости вращения ротора 12000 об./мин она равна приблизительно 15000 g.

V. Работа арендованного сепаратора SC-6

V.A. Теоретические соображения

Перед тем, как выполнить тестовые прогоны на сепараторе SC-6, производительность установки оценил и для условий эксплуатации, показанных на фиг. 5. На ней показана зависимость Σ от скорости вращения ротора (об./мин) для сепаратора SC-6. С помощью уравнения (13), используя $\Sigma_{50\%}$ и скорость осаждения под действием силы тяжести V_{gd} можно рассчитать производительность, при которой частицы определенного диаметра удаляются на 50%. Для дисковой стековой центрифуги Q_{max} рассчитывается по уравнению (15)

(15)
$$Q_{max} = \frac{d^2 \cdot (\rho_s - \rho_l) \cdot g}{18\eta} \cdot \left\{ \frac{2\pi\Omega^2}{g} \cdot \frac{(N-1)(r_o^3 - r_i^3)}{3\tan(\varphi)} \right\}$$

Если воспользоваться корректирующим фактором 0,5, который учитывает предпочтительное отделение всех частиц из группы определенных размеров, то можно схематически изобразить максимальную производительность сепаратора SC-6 как функцию от минимального размера удаляемых частиц. На фиг. 6 представлен соответствующий график для скоростей ротора 8800 и 12000 об./мин в широком интервале размеров частиц (скорость 8800 об./мин соответствует линии с кружками, а скорость 12000 об./мин - линии с квадратиками). Очевидно, что попытки удалить частицы размером менее 1 мкм приведут к слишком низкой объемной производительности. Целью центрифугирования является не удаление всех частиц из клеточной суспензии, а удаление большей части частиц с последующим использованием небольшого пористого фильтра для заключительной обработки раствора перед его абсолютным фильтрованием. Если предположить, что удаление всех частиц размерами больше 2 мкм достаточно для существенного снижения области, требующей заключительного фильтрования, то в результате расчетов получим, что при центробежной силе 8000 g (8800 об./мин) возможно добиться производительности 4,9 л/мин. Запуск сепаратора на максимальной возможной для него скорости 12000 об./мин (15000 g) позволяет повысить производительность до 9 л/мин. В таких условиях отношение Q/Σ для сепаратора составляет $2,5\times10^{-8}$ м/с. Поскольку Q/Σ является существенным фактором при определении условий эксплуатации, экспериментальная оценка сепаратора проводилась так, чтобы протестировать интервал значений этого параметра от 0,9 до $2,8\times10^{-8}$ м/с. Поскольку клетки млекопитающих могут реагировать на изменения g-силы в сепараторе, Q/Σ меняли с помощью изменения либо g-силы, либо объемного потока. В соответствии с общей теорией седиментации повышение g-силы приводит к увеличению Σ, что, в свою очередь, ведет к улучшению сепарации. В случае чувствительных к повреждениям клеток, таких как клетки млекопитающих, увеличение центробежной силы может привести к их более интенсивному разрушению и накоплению мелких частиц, которые не могут быть отделены при выбранных условиях.

V.B. Эксперимент 1

Первоначальная оценка производительности работы сепаратора SC-6 проводилась в условиях, описанных в табл. 2. Для разделения было взято 280 л суспензии клеток культуры IDEC-114, в каждой из восьми экспериментальных точек использовали приблизительно по 30 л смеси. Поскольку объем ротора сепаратора SC-6 составляет 1,8 л, то для достижения квазистационарного состояния достаточно подать на вход 18 л смеси (время обработки этого объема в 10 раз превышает время обработки одной загрузки). Оседающие клетки накапливаются в области для хранения осадка (0,7 л), и эту область надо периодически частично или полностью очищать сбрасывающими импульсами (shots). Импульсы нарушают равновесие системы, и важно отслеживать изменение условий эксперимента после нескольких таких сбросов. Поскольку содержание клеток в смеси (PCV) составляет приблизительно 3% по объему (30 г/л), то, если предположить, что в области для хранения осадка клетки уплотняются до 50%, получается, что до осуществления сброса в этой области можно накопить 350 г клеток, что соответствует приблизительно 12 л поступившей на вход смеси. Осадок частично удалялся через каждые 10 л поступающей смеси, для чего осуществлялись 400 мл сбросы, так что можно было наблюдать за состоянием системы после трех сбросов. Образцы из поступающей смеси и из центрата анализировались, в них определялось содержание клеток и распределение частиц по размерам. Измерялась также температура поступающей смеси и центрата, чтобы определить, не превышает ли тепловыделение в центрифуге возможностей охлаждающей системы ротора сепаратора. Во всех экспериментах температура на выходе из системы не превышала температуру на входе более чем на 1°C.

Таблица 2. Первоначальные тестовые условия

Прогон	1	2	3	4	5	6	7	8
Центробежная сила (в тысячах g)	12	15	15	8	8	9.6	9.6	9.6
Q (л/мин)	5.3	10.3	3.3	1.8	5.1	6.4	4.3	2.1
Σ (м2)	4950	6172	6172	3400	3400	3960	3960	3960
Q/Σ (10^{-8} м/с)	1.8	2.8	0.9	0.9	2.6	2.7	1.8	0.9

Результаты восьми испытаний представлены на фиг. 7. Производительность системы разделения твердых частиц и жидкости, обычно, характеризуется ее способностьюудалять твердые частицы. Удаление твердых частиц E описывается уравнением (16)

$$E = \frac{\left(PCV_{feed} - PCV_{centrate}\right)}{PCV_{feed}} \cdot 100 \qquad (16)$$

где PCV соответствует объему клеток в среде после сжатия (%). Как показано на фиг. 7, эффективность удаления твердых частиц снижается с повышением требований к Q/Σ центрифуги, то есть, если производительность центрифуги в данной эквивалентной области возрастает, эффективность разделения снижается. Это ожидаемое поведение, предсказываемое теорией седиментации (уравнение (15)). Особенности поведения систем клеток млекопитающих становятся объяснимыми, если рассмотреть прикладываемую центробежную силу. При невысокой производительности g-сила несущественно влияет на эффективность разделения (см. отношение процента удаления твердых частиц к Q/Σ для центробежной силы, соответствующей 8000 об./мин - линия с треугольниками). Однако при повышении g-силы эффективность сильно снижается (см. отношение процента удаления твердых частиц к Q/Σ для центробежной силы, соответствующей 15 000 об./мин - линия с ромбиками). Это можно объяснить более интенсивным повреждением клеток при высоком значении g, что ведет к накоплению мусора и одновременно ухудшает отделение мелких частиц. Таким образом, данные фиг. 7 показывают, что предпочтительным режимом работы сепаратора SC-6 является центробежная сила 8000 g, поскольку такой режим позволяет добиться более эффективного разделения.

Для получения альтернативной характеристики эффективности процесса разделения в различных условиях эксплуатации измеряли мутность центрата.

На фиг. 9 показана зависимость мутности центрата от g-силы и Q/Σ. Мутность позволяет получить более четкую картину эффективности работы центрифуги, поскольку определяется всеми частицами суспензии и, таким образом, является характеристикой всей популяции частиц в центрате. Как видно из фиг. 9, даже при низком значении Q/Σ повышение g-силы ведет к накоплению тонких частиц (клеточного мусора, связанного с разрушением клеток при центрифугировании и ручной обработке), которые не удаляются так эффективно, как крупные частицы. Такое снижение эффективности разделения, связанное с повреждением клеток разрывающими силами, не обнаруживается, если критерием эффективности считать процентное содержание клеток.

Приведенные данные подтверждаются распределением частиц по размерам в различных центратах, что показано на фиг. 10. Для простоты показаны только частицы, размеры которых меньше 4 мкм. Входной поток содержит частицы всех размеров, в процессе центрифугирования удаляются все частицы размерами больше 2 мкм. Для различных условий эксплуатации можно отметить небольшие различия в распределении частиц по размерам. Пробег 4, выполненный при 8000 g и низком Q/Σ, приводит к значительному удалению частиц размерами от 1 до 2 мкм, более высокая g-сила и Q/Σ (пробеги 1 и 2) приводит к заметному сдвигу в распределении в сторону более крупных частиц. Таким образом, эти данные также показывают, что для оптимальной эффективности разделения необходимо создать низкую центробежную силу (предпочтительно 8000 g) и низкое значение Q/Σ ($0{,}9 \cdot 10^{-8}$ м/с).

Интересно сравнить полученные результаты со сделанными ранее прогнозами. На основании теории седиментации мы предсказали, что при Q/Σ $2{,}10^{-8}$ м/с и 8000 об./мин (соответствует приблизительно 8000 g) будет удалено 50% всех частиц крупнее 2 мкм. При значении Q/Σ $1{,}10^{-8}$ м/с удалось удалить все частицы крупнее 2 мкм, что подтверждает описанные ранее теоретические расчеты. Теория предсказывает более высокую эффективность при большем g, но на практике это не подтвердилось. Напротив, эффективность разделения снижалась при повышении g-силы. Такая непредсказуемость отражает особенности систем клеток млекопитающих - вызванные центробежными силами разрушения клеток ведут к

изменению распределения частиц по размерам, что не может быть точно учтено упрощенной теорией.

Поскольку центрифугирование не позволяет получить центрат, полностью очищенный от осадка, после прохождения центрифуги необходимо установить фильтры окончательной и абсолютной очистки. Способность фильтров обрабатывать центраты, полученные в разных экспериментальных условиях, была исследована на примере набора из пористого фильтра CUNO 60SP и фильтров Pall Ultipor 0,2 и 0,1 мкм. Результаты исследования приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты исследования набора фильтров

Центробежная сила	15,000	15,000	8,000	9600
Q/Σ (м/с)	$2.8 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$
Центробежная сила	15,000	15,000	8,000	9600
Мутность после прохождения пористого фильтра (NTU)	22	11.5	11.8	18
Производительность (пропускная способность) фильтра Ultipor 0.2 мкм (л/м^2)	116	438	265	159
Производительность (пропускная способность) фильтра Ultipor 0.1 мкм (л/м^2)	197	178	195	110

Самым важным результатом этих экспериментов является чрезвычайно низкая пропускная способность абсолютных фильтров, особенно с размером пор 0,2 мкм. Вероятно, пористые фильтры CUNO 60SP не обеспечивают достаточной защиты, требуемой для работы расположенных после них абсолютных фильтров. Это предположение подтверждается значительной мутностью фильтрата после прохождения пористого фильтра. Такая низкая абсолютная производительность фильтров приводит к необходимости установки на выходе из центрифуги огромных фильтровальных элементов. На основании полученной информации можно сделать вывод, что для очистки культуры клеток объемом 15000 л на выходе из центрифуги придется установить 65 0,2 мкм фильтровальных элементов диаметром 10 дюймов и 150 0,1 мкм элементов того же диаметра. Существенного влияния условий эксплуатации центрифуги (g-сила, Q/Σ) на производительность фильтров обнаружено не было.

Параллельно с экспериментами по фильтрованию поставили контрольный эксперимент, в ходе которого ту же суспензию клеток IDEC-114 очистили "традиционным" набором пористых фильтров (CUNO 10 SP, CUNO 60 SP, Pall Ultipor 0,2мкм, Pall Ultipor 0,1 мкм). Пропускную способность двух абсолютных фильтров в этих условиях сравнили с производительностью очистки центрифужных центратов, полученных в наилучших условиях. В случае контроля производительность 0,2 мкм фильтра составляла 497 л/м^2, для 0,1 мкм фильтра этот параметр составил 182 л/м^2. Полученные результаты показывают, что суспензия культуры клеток IDEC-114 как таковая характеризуется низкой фильтруемостью, и предварительное центрифугирование не усложняет задачу.

V.B. Эксперимент 2

На основании результатов эксперимента 1 во второй серии экспериментов была предпринята попытка обнаружить набор фильтров с повышенной фильтруемостью. Условия эксперимента и соответствующая им производительность процесса разделения представлена в табл. 4.

Таблица 4. Результаты экспериментов по тестированию различных наборовь фильтров

Прогон	9	10	11
Центробежная сила	8,000	8,000	15,000
Q (л/мин)	1.8	5.1	10.3

Прогон	9	10	11
Σ ($м^2$)	3400	3400	6174
Q/Σ (10^{-8} м/с)	0.9	2.5	2.8
Процент удаления твердых частиц (%)	99.4	99.7	99.6
Мутность центрата (NTU)	63	111	344

Как и раньше, твердые частицы удалялись чрезвычайно эффективно, однако, мутность центрата показала различия в эффективности разделения. Как и в предыдущих экспериментах, снижение g-силы центрифуги и уменьшение отношения Q/Σ позволяет избежать появления мелких частичек в результате разрушения клеток центробежными силами и существенно снизить общую мутность. Центраты затем фильтровали через различные пористые фильтры более высокой категории, чем первоначальные фильтры CUNO 60SP. Целью этой работы был поиск более эффективной защиты для абсолютных фильтров. Мутность (в NTU) полученных в результате фильтратов показана в табл. 5.

Таблица 5. Мутность фильтратов

Прогон	9	10	11
CUNO 60-120 SP	9.2	8.1	21.3

Прогон	9	10	11
CUNO 90 SP ZA	14.2	10.6	
CUNO 120M10 grade	8.6		7.5
Millipore 75 DE	20.5		
Millipore 60DE-75DE-RW01	8.3	6.6	14.5

Если учитывать, что мутность первоначальных фильтратов CUNO 60 SP больше 10 NTU, то использование фильтров более высокого качества приводит к снижению мутности раствора, поступающего на абсолютный фильтр. Несмотря на это, решающее влияние на производительность пористого фильтра оказывают условия работы центрифуги. Анализ прошедших через пористый фильтр фильтратов, полученных из центратов, которые были выделены на центрифугах с разными условиями работы, показывает, что более эффективны центрифуги, работающие при низкой центробежной силе и невысоком Q/Σ.

Производительность фильтров Ultipor 0,2 мкм и 0,1 мкм при очистке фильтратов, полученных на различных пористых фильтрах, представлена в табл. 6. Пористые фильтры более высокой категории обеспечивают улучшенную защиту для фильтров 0,2 мкм. В лучшем случае производительность повысилась более чем в пять раз. Тем не менее, производительность фильтров 0,1 мкм осталась низкой. Для контроля профильтровали такую же суспензию клеток IDEC-114, используя традиционные методы. Низкая производительность фильтров 0,1 мкм была обнаружена и в этом случае. Полученные результаты показывают, что источником проблем при 0,1 мкм фильтровании является именно суспензия культу-

ральной среды, то есть правильно настроенное центрифугирование не снижает производительность абсолютного фильтра по сравнению с контролем.

Таблица 6. Производительность фильтров

Прогон	9	10	11	контроль
Производительность фильтра CUNO 60-120 0.2 мкм	1996		339	2251
Производительность фильтра CUNO 90 SP ZA 0.2 мкм	600	706		
Производительность фильтра CUNO 120M10 grade 0.2 мкм	2649		1364	
Производительность фильтра Millipore 75 DE 0.2 мкм	157			
Производительность фильтра Millipore 60DE-75DE-RW01 0.2 мкм		1154	218	
Производительность фильтра CUNO 60-120 0.1 мкм	140		173	291

Прогон	9	10	11	контроль
Производительность фильтра CUNO 90 SP ZA 0.1 мкм	78	96		
Производительность фильтра CUNO 120M10 grade 0.1 мкм	164		178	
Производительность фильтра Millipore 75 DE 0.1 мкм	168			
Производительность фильтра Millipore 60DE-75DE-RW01 0.1 мкм		212		

V. D. Эксперимент 3

Третью серию экспериментов выполнили, чтобы понять, как можно снизить требования, предъявляемые фильтром с размером пор 0,1 мкм. Исследовали два возможных пути решения проблемы. Во-первых, возможно, что фильтры 0,1 мкм засоряются волокнами, которые образуются в центрифуге либо при разрушении клеток на входе в нее, либо при действии центробежных сил на сжатые клетки в области ротора, предназначенной для накопления отделяемых твердых частиц. Последнюю возможность разрушения клеток исследовали с помощью двух различных роторов с объемом сброса 400 и 250 мл. Меньший объем требует более частых сбросов, что приводит к уменьшению времени нахождения осажденных клеток в предназначенной для них области ротора и снижает время действия на клетки стресса сжатия. Если сжатие вызывает повреждение клеток, то уменьшение сбрасываемого объема должно ослабить генерацию волокон и улучшить фильтруемость на фильтрах 0,1 мкм. Кроме того, в одном из прогонов посту-

пающую смесь охладили до 10°C. Как известно, понижение температуры уменьшает восприимчивость клеток к центробежному повреждению, и поэтому в таких условиях можно надеяться избежать накопления волокон. Все прогоны проводили при центробежной силе 8000 g и $Q/\Sigma = 9{,}10^{-8}$ м/с, при этом процент удаления твердых частиц во всех случаях составлял 99,8%, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами. При 37°C мутность центрата составляла 32 NTU, независимо от объема сброса; это означает, что время нахождения клеток в области ротора, предназначенной для твердых частиц, не влияет на накопление волокон. Мутность центрата, полученного при 10°C, составляет только 24 NTU, это может говорить о меньшем образовании волокон из-за повышенной стабильности клеток при более низкой температуре. Производительность пористого фильтра CUNO 90-120SP для центрата определена как 441 л/м^2. В традиционном наборе фильтров, когда для обработки культуры клеток IDEC-114 фильтры CUNO 1-10SP устанавливают перед 90-120SP, производительность последних составила 400 л/м^2. Таким образом, центрифугирование делает ненужной предварительную пористую фильтрацию, а требования к вторичным пористым фильтрам углубленной очистки уменьшаются на 10%. Результаты исследования фильтруемости для абсолютных фильтров показаны в табл. 7.

Таблица 7. Проверка производительности фильтров

Прогон	12	13	14	контроль
G-сила	8,000	8,000	8,000	
Q(л/мин)	1.8	1.8	1.8	
Q/Σ (10-8 м/с)	0.9	0.9	0.9	
Отбрасываемый объем (мл)	250	400	400	
Температура (°C)	37	37	10	
Мутность фильтрат после прохождения фильтра CUNO 120M10 grade (NTU)	5.8	5.9	6.2	
Производительность фильтра Ultipor 0.2 мкм (л/м^2)	2751	2021	889	>2800
Производительность фильтра Ultipor 0.1 мкм (л/м^2)	157	141	16	217

Ни одна модификация не позволила улучшить производительность фильтра 0,1 мкм, которая всегда оставалась сравнимой с контролем, отфильтрованным традиционными методами. Вероятно, проблема связана с клеточной культурой IDEC-114, а не с центрифугированием как новой операцией по ее очистке. Уменьшение температуры, напротив, существенно улучшало фильтруемость.

На основании приводимой здесь информации имеется возможность оценить фильтруемость через 0,2 мкм фильтр, используя либо мутность, либо концентрацию частиц в растворе (определяемую из данных по распределению частиц по размерам). Для достижения разумной производительности фильтра предпочтительно, чтобы мутность была меньше 10 NTU или концентрация частиц меньше $5 \cdot 10^6$ частиц на мл. См. фиг. 11 и 12.

Полученные экспериментальные результаты позволяют сделать вывод о предпочтительности работы дисковой стековой центрифуги с низким центробежным ускорением (8000 g), Q/Σ должна быть приблизительно равна $0{,}9 \cdot 10^{-8}$ м/с. Можно также оценить размер центрифуги, требуемой для NIMO (объем клеточной суспензии 15 000 л) и NICO (объем клеточной суспензии 2200 л). Чтобы можно было сравнивать данные, использовали только результаты, полученные на оборудовании компании Westfalia. Для масштаба NIMO предпочтительной является установка CSD 130, эквивалент максимальной площади Σ которой равен 130000 м^2 при 8000 g. В соответствии с уравнением (13) производительность такой машины приблизительно равна $0{,}9 \cdot 10^{-8}$ м/с, что соответствует объемной производительности 4200 л/ч и приблизительно четырехчасовой загрузке. Для масштаба NICO подходит установка CSC 20. При максималь-

ной скорости вращения ротора 8300 об./мин он создает центробежное ускорение 8400 g и эквивалент площади 22000 м^2. Уравнение (13) позволяет предсказать объемную производительность 710 л/ч, время загрузки в оптимальных условиях составляет три часа. Эти расчеты показывают, что условия центрифугирования, определенные в ходе предварительной оценки, соответствуют требованиям производства масштабов NIMO и NICO.

Интересно также сравнить, позволит ли включение центрифугирования в состав крупномасштабных очистных процедур снизить общую стоимость разделения твердых частиц и жидкости по сравнению с использованием одного только фильтрования. На первом этапе такой оценки необходимо определить стоимость фильтрования для обоих вариантов очистки. Организация IDEC Purification Process Sciences выполнила предварительный анализ требований к фильтрам при очистке IDEC-114. Полученный в результате такого анализа набор фильтров приведен в табл. 8.

Таблица 8. Набор фильтров

Фильтр	Производительность (л/м^2)	Площадь фильтра для NIMO (м^2)	Площадь фильтра для NICO (м^2)
CUNO 01-10 SP	80	187.5	27.5
CUNO 60-120 SP	400	37.4	5.5
Pall Ultipor 0.2 мкм	2000	7.5	1.1
Pall Ultipor 0.1 мкм	217	68	10

Требования к фильтрам при использовании центрифуги в оптимальных условиях представлены в табл. 9.

Таблица 9. Требования к фильтрам

Фильтр	Производительность (л/м^2)	Площадь фильтра для NIMO (м^2)	Площадь фильтра для NICO (м^2)
CUNO 90-120 SP	441	34	5
Pall Ultipor 0.2 мкм	2000	7.5	1.1
Pall Ultipor 0.1 мкм	160	93.8	13.8

Предлагаемый набор фильтров значительно снижает общую площадь фильтрования. Для сравнения стоимости сделаны следующие предположения: стоимость пористых фильтров оценивается в 86 долларов за м^2, независимо от его категории, цена 0,2 мкм фильтров предполагается равной 320 долларов/м^2, а цена 0,1 мкм фильтров - 340 долларов/м^2. Сделанные с учетом этого оценки стоимости приведены в табл. 10.

Таблица 10. Оценка стоимости при использовании 0,1 мкм заключительного фильтра

	С центрифугированием		Только фильтрование	
Стоимость фильтра	NIMO	NICO	NIMO	NICO
CUNO 01-10 SP	-	-	16125	2365

	С центрифугированием		Только фильтрование	
CUNO 60-120 SP (только фильтрование) CUNO 90-120 SP (центрифугирование)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0.2 мкм	2400	352	2400	352
Pall Ultipor 0.1 мкм	31875	4675	23181	3400
Общая стоимость фильтров	37200	5457	44923	6589
Экономия, связанная с использованием центрифуги	17%			

Значительный вклад в стоимость фильтрования вносят 0,1 мкм абсолютные фильтры, их предлагается исключить из набора. Для защиты первой хроматографической колонки такие фильтры не требуются. Более того, существует множество компаний, не использующих 0,1 мкм фильтрование для очистки клеточных культур. Для иллюстрации экономических преимуществ такого решения расчеты стоимости повторили для ситуации, когда заключительным является 0,2 мкм фильтр.

Таблица 11. Оценка стоимости при использовании 0,2 мкм заключительного фильтра

	С центрифугированием		Только фильтрование	
Стоимость фильтра	NIMO	NICO	NIMO	NIMO
CUNO 01-10 SP	-	-	16125	2365
CUNO 60-120 SP (только фильтрование) CUNO 90-120 SP (центрифугирование)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0.2 мкм	2400	352	2400	352
Общая стоимость фильтров	5325	782	21742	3189
Экономия, связанная с использованием центрифуги	76%			

Отсутствие 0,1 мкм фильтра значительно снижает стоимость фильтрования и, таким образом, увеличивает сравнительные преимущества центрифугирования.

Пример 2. Очистка клеточной культуры NSO с целью очистки выделенных антител

Центрифугу совместно с пористыми фильтрами использовали для эффективной очистки клеточной культуры NSO. Клетки этой культуры секретируют некоторые антитела, так что такую очистку можно рассматривать как предварительный этап при их выделении. В ходе очистки используется центрифуга и затем последовательность пористых фильтров, пре-фильтров и мембранных фильтров, так что удаляются нерастворимые частицы (в том числе, клетки, клеточный мусор и остальные нерастворимые компоненты клеточной культуры), и содержащий антитела жидкий центрат становится чистым. Чистоту обычно описывают как 0,2 мкм чистоту, подразумевая размер пор последнего фильтра в наборе.

Процесс очистки был разработан для очистки клеточной культуры NSO, содержащей приблизительно 1% (сырой вес/на объем) твердых частиц, жизнеспособность которой колеблется в интервале от 3

до 100%. Центрифугирование выполнялось в интервале от 8000 до 15000 g, включительно (g = ускорение свободного падения), мутность полученных центратов была не меньше 25 NTU. При такой мутности производительность пористых фильтров колебалась в диапазоне от 40 до более чем 400 л/м^2. Мутность прошедшего через пористый фильтр фильтрата была в интервале от 1 до 15 NTU, что соответствует нагрузке на расположенные далее префильтры и мембранные фильтры в диапазоне от 10 до 14000 л/м^2.

Компетентные в данной области специалисты легко поймут, что настоящее изобретение может быть реализовано в других специфических формах, не утрачивая своего духа и своих основных атрибутов. Приводимое выше описание содержит только примеры реализации изобретения; необходимо понимать, что другие вариации также относятся к области его действия. Соответственно, настоящее изобретение не ограничено описанными здесь конкретными аспектами. Область действия и содержание изобретения описывается в приводимой далее патентной формуле.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ промышленной очистки образцов клеток для получения терапевтических протеинов, отличающийся тем, что осуществляют центрифугирование образцов клеток с центробежным ускорением от 8000 до 15000 g и отношения Q/Σ (объемного потока к сигма-фактору) от $0{,}9\cdot10^{-8}$ до $2{,}8\cdot10^{-8}$ м/с, с получением твердой фазы, содержащей клетки и клеточный мусор, и центрата, который подвергают пористой фильтрации.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец клеток содержит бактериальные клетки.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец клеток содержит клетки млекопитающих.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что клетки млекопитающих относятся к линии CHO.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что клетки млекопитающих относятся к линии NSO.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец клеток содержит клеточную суспензию, клеточный шлам или клеточную культуру.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что объем образца клеток составляет по меньшей мере 2200 л.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что объем образца клеток составляет по меньшей мере 15000 л.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что образец клеток содержит противовспенивающие добавки.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что центрифугирование осуществляют с использованием центробежного ускорения от 8000 до 10000 g.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что эффективность разделения центрифугированием составляет по меньшей мере 95%.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что центрат очищен от клеток и клеточного мусора размером более чем 2 мкм.

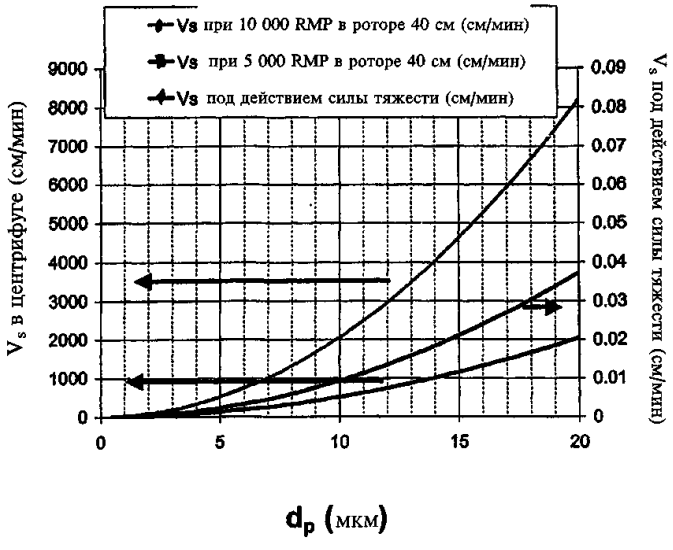
13. Способ по п.1, отличающийся тем, что пористую фильтрацию осуществляют через фильтрующее средство, содержащее по меньшей мере один фильтр.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что пористую фильтрацию осуществляют через фильтрующее средство, содержащее пористый фильтр или фильтр окончательной очистки.

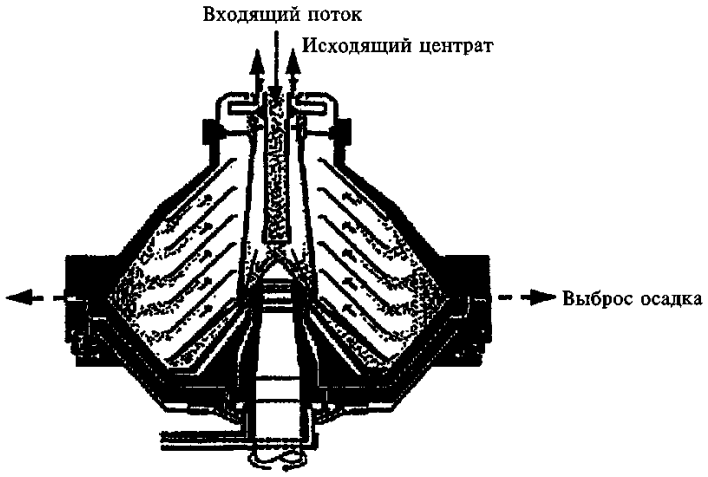
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что размер пор заключительного фильтра в средстве для пористой фильтрации составляет от 0,1 до 0,2 мкм.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что размер пор заключительного фильтра составляет по меньшей мере 0,2 мкм.

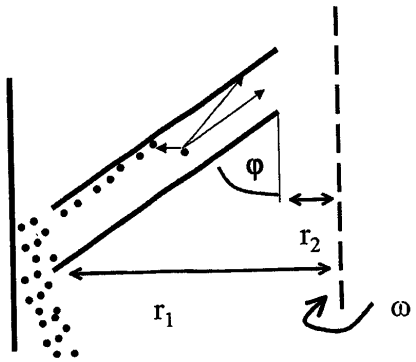
17. Способ по п.15, отличающийся тем, что размер пор заключительного фильтра составляет по меньшей мере 0,1 мкм.



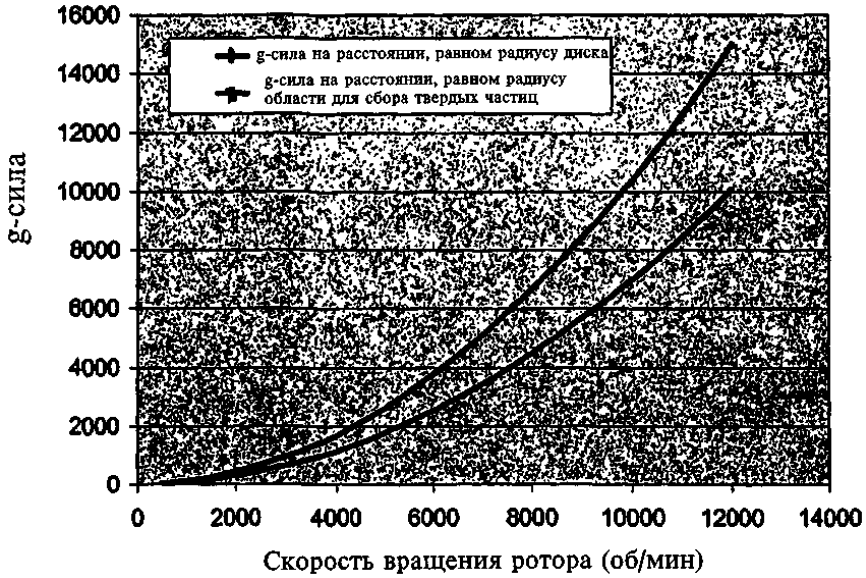
Фиг. 1



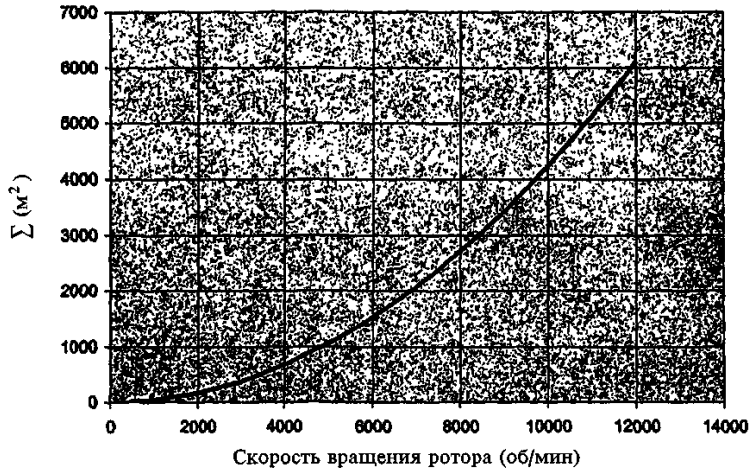
Фиг. 2



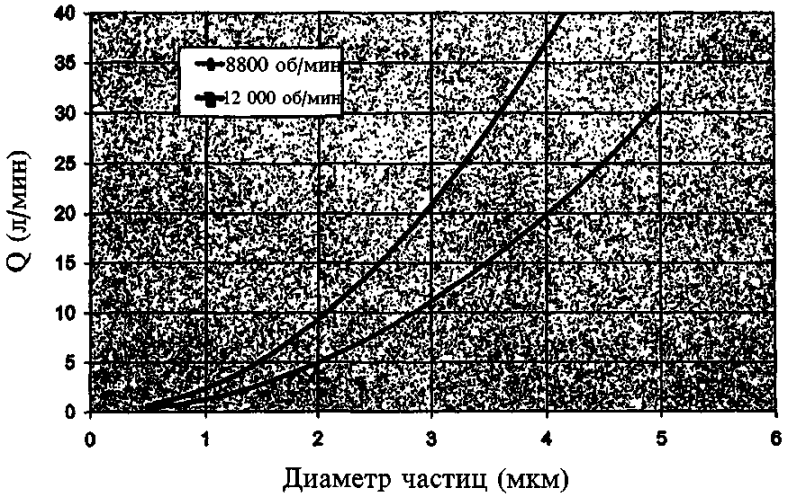
Фиг. 3



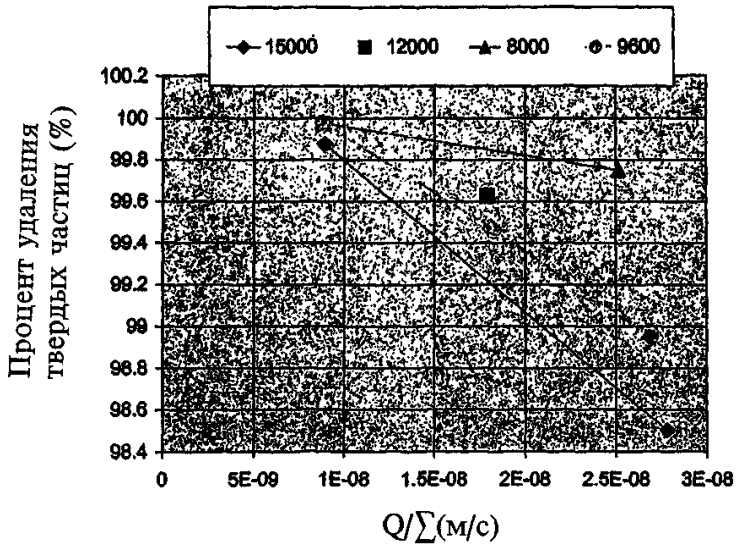
Фиг. 4



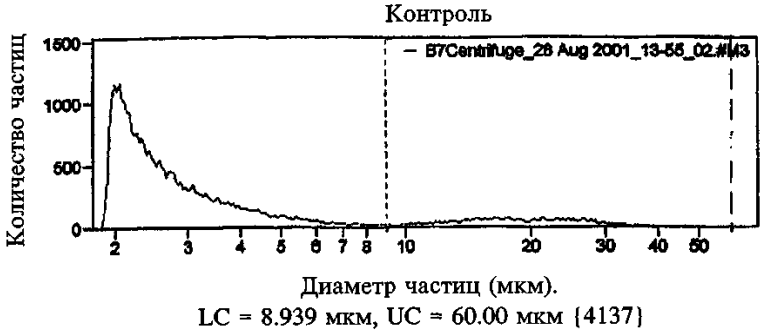
Фиг. 5



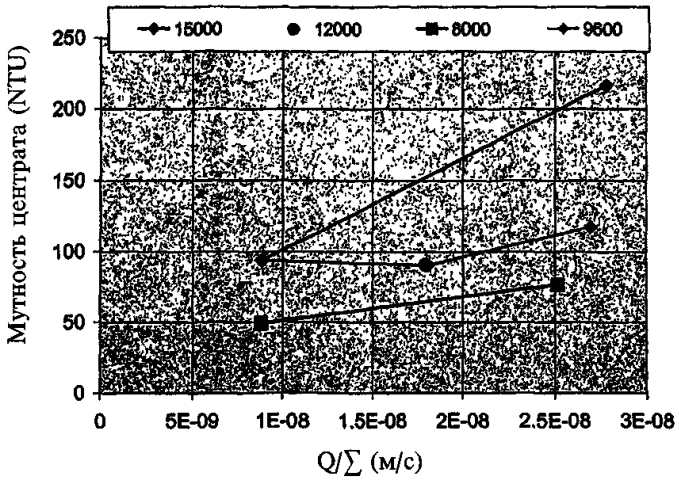
Фиг. 6



Фиг. 7



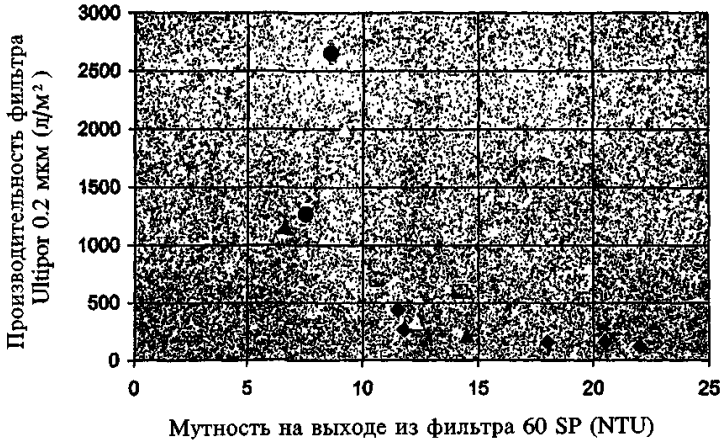
Фиг. 8



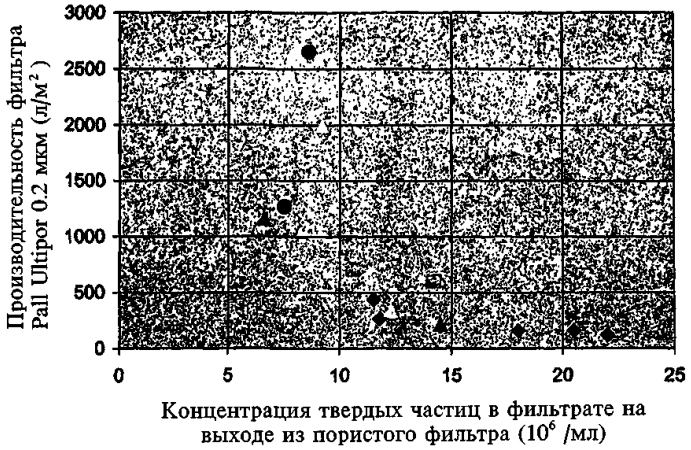
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2