

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102272285 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 07

(21) 申请号 200980137776. 5

B01F 3/04(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 09. 17

B01F 11/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

102008049120. 9 2008. 09. 26 DE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 03. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/006722 2009. 09. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02010/034428 DE 2010. 04. 01

(71) 申请人 拜尔技术服务有限责任公司

地址 德国莱沃库森

(72) 发明人 H. 布罗德 B. 弗拉姆 J. 考林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 温宏艳 林森

(51) Int. Cl.

C12M 1/04(2006. 01)

C12M 1/12(2006. 01)

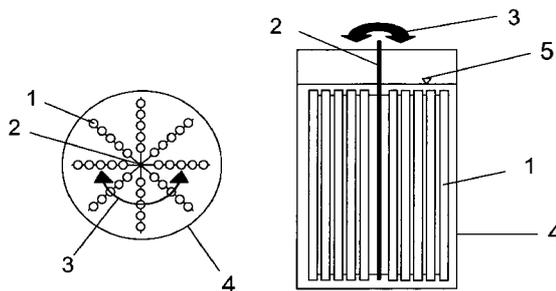
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

在生物体培养期间减少沉积数量的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种在生物体培养期间降低沉积数量的方法,特别是在细胞培养物培养期间,所述细胞培养物趋向于凝聚或粘附于生物反应器及其元件上,或细胞残渣或物质容易凝聚或粘附在生物反应器及其元件上。



1. 在细胞和生物体培养期间减少沉积数量的方法,其特征在于,用于气体转移的浸于培养基中的膜区域执行间歇运动。
2. 权利要求 1 的方法,其特征在于,所述膜区域执行具有反转运动的运动。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其特征在于,所述膜区域执行旋转振动运动。
4. 权利要求 1-3 任一项的方法,其特征在于,所述运动包括在两个运动反转点之间加速和减速的周期顺序。
5. 权利要求 1-4 任一项的方法,其特征在于,所述膜区域由一个或多个膜管形成。
6. 权利要求 5 的方法,其特征在于,以一个或多个膜管形式的膜区域附着于滚筒臂上,所述滚筒臂以星形与转轴连接,并且由于间歇运动形成切线碰撞。
7. 权利要求 1-6 任一项的方法,其特征在于,膜区域通过共用的支座连接有一个或多个探针。
8. 权利要求 1-7 任一项的方法用于培养细胞或生物体的用途。

在生物体培养期间减少沉积数量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种在细胞或生物体培养期间减少沉积数量(Ablagerungen)的方法,特别是细胞培养物培养期间,所述细胞培养物趋向于凝聚或粘附于生物反应器及它的元件上,或在培养期间这些细胞、细胞残渣或物质容易凝聚或粘附。

背景技术

[0002] 人、动物和植物衍生的细胞的培养在制备生物活性物质以及药物活性产品上具有很重要的作用。培养细胞经常在游离悬浮液形式的营养培养基中进行,并且这是一种特别要求的方法,因为不同于微生物,细胞非常容易被机械剪切力破坏,以及如果氧气和营养物供应不足也会受到破坏(参见,例如, H.-J. Henzler 2000. Particle Stress in Bioreactors. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 67:35-82 或 J.G. Aunis, H.-J. Henzler 1993. Aeration in Cell Culture Bioreactors, In: Biotechnology, Second, Completely Revised Edition, Volume 3: Bioprocessing: 219-281, VCH Wiley oder Untersuchungen zum extrazellulären und intrazellulären Sauerstofftransfer, Faculty of Natural Sciences in the University of Hannover, Oliver Schwder的博士学位论文;2006)。氧气在营养培养基中的溶解度是如此低,以致于细胞在没有连续供氧的情况下将快速遭受供氧不足;这与营养培养基中营养物的情况完全不同,营养培养基中营养物的浓度并不需要持续不断地补充。除了提供足够的氧气外,同样重要性的另一因素是除去二氧化碳。

[0003] 人、动物和植物衍生的细胞系大多分批培养。这种做法的一个缺点是,底物浓度、产品浓度和生物团块(Biomasse)浓度经常改变,使得难以实现对细胞的最佳供应。此外,发酵过程结束时,副产物浓度增加,例如死细胞裂解产物,在随后处理过程中,大量资源被主要用于消除这些副产物。因此,优选使用连续操作的生物反应器,特别是当生成不稳定的产物时的情况,实例是通过蛋白水解攻击可能被破坏的那些。当与分批培养体系相比时,连续生物反应器可以达到更高的细胞密度,以及与此有关的更高的生产率。

[0004] 某些细胞系具有优先形成凝聚物和/或附着于培养容器/生物反应器的内部区域的性质,或引起/促进细胞残渣或物质(例如蛋白)在培养容器内部区域的沉积(参见,例如,EP0242984B1)。此通常是不利的,因为生物反应器内的元件的功能有时会被大大受限或甚至取消,诸如,例如气体转移的膜或探针。

[0005] 在常规体系中,细胞残渣沉积是要求减少细胞密度的主要原因并且导致过早地结束相应细胞系的培养。此外,在常规体系中,细胞、细胞残渣和/或蛋白在探针或其它测量/分析仪器上的沉积导致设备故障或破坏,并且在生物反应器的连续操作期间,这些设备通常不太可能去修正或弥补,因此可能导致培养过程的过早结束。

[0006] 现有文献表明,(细胞培养)发酵过程中在生物反应器中存在沉积和粘附细胞和细胞残渣以及形成细胞凝聚已经是一个很长久的问题,特别是在膜管上。

[0007] 为了减少沉积的数量,在EP0242984B1中提供一种带螺旋搅拌器的双壁发酵罐,

所述搅拌刮刀几乎延伸至发酵罐内（半透性）壁。该搅拌器刮刀在内壁附近的运动产生紊流现象，其被用来抑制细胞 / 细胞残余物 / 细胞产物沉积在内壁上，并由此抑制污物的形成。所述发酵罐的缺点是细胞培养物可能被紊流现象破坏。此外还已知（例如，参见 EP0422149B1），搅拌器零件，特别是在 EP0242984B1 中描述的搅拌器刮刀，产生高的剪切力，其可能破坏细胞膜，特别是破坏没有细胞壁的细胞。

[0008] EP1935973A1 描述了一种用于水生生物体的培养装置，其不需要搅拌器部件。将气体（氧气用于供应生物体）引入到容器底部出口附近，生成一气流，其影响容器内的所有培养基，并且用来完成培养基组分的完全倒转，以及任选，游离漂浮的培养生物体。在一种具体实施方案中，所述布置在出口中心内有一个单喷嘴，以这样一种方法将分区引入容器，使得流入的气体在指定的方向上产生一种气流，营养液围绕该分区向上和向下运动。现已知（参见，例如，EP0422149B1），高剪切力在气泡的生成和崩溃期间是高度活跃的，并且这些力可能造成细胞损坏。此外，气泡还导致泡沫形成。然而，应该避免泡沫生成，因为细胞倾向于与泡沫一起漂浮，而它们在泡沫层内遭遇的培养条件是不足的。使用消泡剂在处理过程中可能导致细胞损坏或减少产率或可能导致在处理过程中提高对资源的需求。除相对低细胞密度的情形外，使用气体引入方法涉及大量的气泡，该方法的另一因素是对剪切力敏感的细胞不能保证充分的供氧（H.-J. Henzler: “Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter”, Chem. Ing. Tech. 54(1982), No. 5, pp. 461-476, H.-J. Henzler, J. Kauling: “Oxygenation of cell cultures” Bioprocess Engineering 9(1993) pp. 61-75, “Mischen und Rühren”, M. Kraume 编辑, WILEY-VCH 2003)。放大到工业规模的生物反应器，气体引入方法涉及大量的气泡是困难的。由于所述的原因，描述在 EP1935973A1 中的培养装置不适合用于培养工业规模的各式各样生物体。

[0009] 无气泡气体引入解决了通过浸入膜区域由使用气体转移带来的问题。这里，所述气体引入方法使用连续的表面膜或开孔膜。举例来说，所述排列在液体内具有这些，所述液体通过搅拌器运动。例如，有可能以在圆柱形笼定片上管的形式缠绕膜（H.-J. Henzler, J. Kauling: “Oxygenation of cell cultures”, Bioprocess Engineering 9(1993), pp. 61-75, EP0172478B1, EP0240560B1）。为了适应大量的氧气交换区域，所述管以尽可能小的间隔互相靠近放置。在多孔聚合物的范围内，硅氧烷作为管材料已经被广泛获得认可。为此的理由是高气体渗透性、高热稳定性和管性质，均匀分布在最高达约 70m 的管部分的长度上，这些性质在灭菌后还将保持。然而，在管之间，以及在定片和管之间，存在许多有问题的死区，沉积很容易在那里形成。物质在硅胶管上的连续沉积本身将导致气体转移恶化的增加，例如对供应细胞的氧气来说或对除去二氧化碳来说。所述硅胶管通常在单次使用后弃去。

[0010] 此外，所述膜气体引入方法的缺点是相对小的传质系数（H.-J. Henzler, J. Kauling: “Oxygenation of cell cultures” Bioprocess Engineering 9(1993) pp. 61-75）。为了达到高的质量转移率，必须在生物反应器内安装适当大的膜面积。然而，这需要大量的资源用于设计和操作（装配、灭菌、清洗、不充分混合区的产生等）并且导致死体积增加。一种选择是增加能耗。质量传递系数取决于能耗，因此，这可用来提高质量转移率。然而，潜在的增益被所得的剪切载荷在源于更高能耗的细胞上限制了。

[0011] 在 WO2007098850 (A1) 中描述了一种用于将气体引入到液体中的方法和装置,特别是用于生物技术中的液体,以及尤其是细胞培养中的液体;在这种方法和装置中,通过一个或多个任何所需类型的浸入膜区域(例如管)进行气体转移,其中所述膜区域在液体内部执行任何所需的旋转振动运动。该运动可以进行优化,按那样的方法在膜区域上得到的流是最佳的。质量传递系数取决于膜区域上的流量,因此可能实现改善供氧。膜区域的旋转振动运动的其它优点是,对分离搅拌或混合以在膜区域上产生流动没有要求。

[0012] 与描述在 EP0172478B1 和 EP0240560B1 中并且流动由搅拌器装置控制的静态膜相比,描述在 WO2007098850 (A1) 中的用于膜区域的旋转振动运动达到改善供氧和减少剪切力,但是 WO2007098850 (A1) 存在一种风险是,所述膜管通过培养基截留颗粒的运动或者被固定到膜管上或者沿着所述膜管进入膜管间的死体积,在那里它们引起沉积。

[0013] WO86/07604A1 描述了一种气提发酵罐。所述方案是在动物细胞培养期间使用絮凝剂,以便从产品流中分离细胞残渣。通过絮凝除去的重颗粒沉入气提发酵罐的无紊流区域,并且在这里它们可以被分离。使用絮凝剂可以降低沉积的数量,但是不能提供持久的沉积预防。在旋转振荡膜区域使用絮凝剂以便供氧的一个内在风险是絮凝除去的颗粒被截留和转运到死体积,在那里可以变成永久固定。此外,在所有细胞系的培养中使用絮凝剂是不适当的,因为絮凝剂对细胞的生理学有副作用,必须从所述产物中除去过量絮凝剂。

[0014] 从所述的现有技术开始,本发明的目的是提供一种在细胞或生物体培养期间降低沉积数量(Ablagerungen)的方法,特别是在细胞培养物的培养期间,其中所述细胞培养物趋向于凝聚或粘附于生物反应器及其元件上,或这些细胞、细胞残渣或物质容易凝聚或粘附在生物反应器及其元件上。理想的方法应该是确保营养素对生物体的最佳供应,特别是气体输送,例如氧气。该方法应该不需要使用额外的剪切力,所述额外的剪切力将导致细胞破坏并由此降低生产率。该理想的方法应该是不需要使用化学试剂(例如絮凝剂),以便避免在生物体上施加额外应力以及避免任何比较高的使用资源用于产物分离。该理想的方法特别是应该降低引起气体转移降低的沉积的数量,例如引起供氧减少。该理想的方法应该是简单实行并且是廉价的。

发明内容

[0015] 令人吃惊地,现已发现,细胞、细胞残渣和/或蛋白的凝聚和/或沉积,特别是在气体转移如供氧元件上的凝聚和/或沉积,并且在所有其他区域以及探针上的凝聚和/或沉积,可以被膜区域显著减少或确实预防,所述膜区域沉浸在气体供应的培养基中,并且其在培养基内实行间歇运动。

[0016] 因此,本发明的主题是提供一种在细胞和生物体的培养期间降低沉积数量(Ablagerungen)的方法,特别是在细胞培养物的培养期间,所述培养物趋向于凝聚或粘附于生物反应器及其元件上,或这些细胞、细胞残渣或物质容易凝聚或粘附于生物反应器及其元件上,其特征在于,对用于气体转移的(Gasaustausch)浸于培养基中的膜区域实行间歇运动。

[0017] 该间歇运动显著地降低或预防细胞、细胞残渣和/或蛋白的凝聚和/或沉积,特别是不仅在膜上的凝聚和/或沉积,并且在所有其它接触区域以及探针上的凝聚和/或沉积,由此可以得到更高水平的气体跨膜转移,并且此在较长的持续期间内使用。

[0018] 由此使得细胞密度增加,并因此增加产物收率,以及延长方法的最大运转时间。

[0019] 术语“运动”一般是指运动物体(这里是指膜区域)的一种方法(Vorgang),其在空间上改变其排列。在此可能是物体的整个运动(平移)或仅物体的一部分运动,例如通过物体的弯曲(振动)。该物体的运动还可能是旋转(Drehung)(旋转(Rotation))。此外,平移、振动和旋转的组合是可能的。

[0020] 术语“间歇运动”是指一种运动,其在一定时间期间内没有均匀地进行。间歇运动的一个例子是钟摆的运动。在一个周期的时间期间内,例如从钟摆的最大偏转的右侧开始,钟摆首先执行一个向左侧的加速运动,直到当钟摆达到垂直时它获得一个最大速度。然后,钟摆逐渐减速,直到达到左侧的最大偏转,它在那静止一会,然后再次钟摆加速,当达到垂直时达到最大速度,并再次减速,直到它再次达到它的起动位置(右侧的最大偏转)。与此相反,连续运动是在一定时间期间内均匀的运动。连续运动的例子是搅拌器器件的旋转,其围绕固定的旋转轴以恒定的角速度运行。

[0021] 膜区域优选进行具有反转运动(Bewegungsumkehr)的间歇运动,即膜区域首先执行在第一次方向上的任何所需类型的第一次运动,在膜区域静止之前,然后执行在另一方向上的任何所需类型的第二次运动,优选在第一次方向相反的方向。第一次运动和第二次运动可以互相之间是完全不同的。但是,优选第二次运动与第一次运动的关系是镜像对称、点对称和/或旋转对称。

[0022] 在本发明方法的一种优选实施方案中,所述膜区域执行振动运动。术语“振动”是指有规律地和均匀地重复的运动,其意味着本发明方法的优选特征在于,存在一个时间期间,下文中称为周期,在该周期内,所述膜区域完成任何所需的第一次运动,并且随后的运动在加速度和如第一次运动所述的速度时间顺序上复制第一次运动。振动运动的一个例子是上述钟摆运动。

[0023] 所述膜区域特别优选执行旋转振动运动。在旋转振动运动中,所述膜区域首先以一个旋转方向运动(旋转),其中运动的类型可以是随意地。膜区域以一定的角加速度加速的一个例子是直到达到一个特定的角速度,然后所述膜区域运动一段时间。然后,所述膜区域以规定的速度减速,直到它成为静止为止。然后,在那里,任选,在规定的静止时间后,以另一个旋转方向进行所述运动。此运动可以是上述运动的镜面反射或可以是某些其他类型的运动。另一运动也可以被理解为旋转振动运动,其中所述膜区域首先以一个方向加速,并在此所述方向以恒定的速度旋转一段时间 t ,其大于或等于0,然后减速(在那里所述膜区域可以变成静止或者还可以以小角速度在相同方向再旋转),然后再次以相同方向加速。

[0024] 所述运动优选以这样一种方法执行,以致所述膜区域首先在一个方向旋转,并在规定的时间内,在相反方向上旋转。

[0025] 在本发明方法的一种优选实施方案中,膜区域的运动是旋转振动,以旋转换向进行并且在旋转换向点具有最小的静止时间。最小静止时间是指旋转换向发生在没有任何技术上的/可避免的延迟,即到达旋转换向点后膜区域立即以与之前方向相反的方向进行加速。优选实施方案的特征还在于,从旋转换向点开始,膜区域以恒定的角加速度加速所定义的一段时间,然后达到最大速度,膜区域反过来以恒定的角速度减速,直到膜区域到达第二个旋转换向点为止(运动阶段1)。然后,进行运动阶段2,运动阶段2是运动阶段1的镜像。优选恒定的角加速度和角减速度在数值上是相同的。本发明方法的优选实施方案的特征在

于,没有具有恒定的角速度的运动阶段。

[0026] 在本发明方法的一种优选实施方案中,由于培养基内的间歇运动的结果,物流成切线地碰撞膜区域。物流的切线碰撞保证膜区域与培养基之间有效的气体转移(供氧,排除二氧化碳)。

[0027] 术语“膜区域”(Membranfläche)是指这样一个区域,气体特别是氧气通过其可以以溶解形式或以细微气泡的形式引入到液体中,和/或气体可以从液体中除去。术语“细微气泡”是指在所使用的培养基内很少会有聚结倾向的气泡。

[0028] 适宜的膜区域的例子是特定的烧结物体,其由金属和陶瓷材料组成,滤板或激光打眼薄板,其中这些材料通常具有小于 15 μm 直径的孔隙或孔洞。膜区域优选采取空心物体的形式,例如管,气体可以通过其流动。在小的气体开口管速度小于 0.5m h^{-1} 时生成非常细微的气泡,其在细胞培养物中通常使用的介质中具有很少聚结的倾向。

[0029] 其它适宜的膜区域是膜管。膜管是柔性管形结构,其能渗透气体,例如氧气和二氧化碳。可以提及的例子是空心细丝膜,其由微孔隙聚丙烯组成,例如诸如由 H. Büntemeyer 等在 Chem.-Ing.-Tech. 62(1990), No. 5, pp. 393-395 中所述的那些。同样可能使用硅胶管,诸如例如如下面文献中所述的那样:H.-J. Henzler, J. Kauling: “Oxygenation of cell cultures” Bioprocess Engineering 9(1993) pp. 61-75, EP 1948780, W007/051551A1, W007/098850A1。

[0030] 优选使用的膜区域是无孔硅胶管(Silikonschläuche)。这些优选在内径 $\sim 1\text{mm}$ 、外径在 $\sim 1.4\text{mm}$ 直至内径 $\sim 2\text{mm}$ 、外径 $\sim 3\text{mm}$ 的范围内。应该选择这样的管直径和管总长度参数,以便保证用于应用的足够的物质传递。物质传递尤其是通过膜表面积与反应器液体体积的比值来进行测定(体积-比质量-传递面积)。对于动物细胞培养物来说,通常的数值为 25m^{-1} 至 45m^{-1} 。在本发明方法中,体积-比质量-传递面积值为 0.1m^{-1} 至 150m^{-1} ,优选 1m^{-1} 至 100m^{-1} ,特别优选 5m^{-1} 至 75m^{-1} 。

[0031] 在本发明方法的一种优选实施方案中,膜区域附着于旋转安装的滚筒(Rotor),该滚筒可在容器如生物反应器内运动。滚筒如此设计,以至在生物反应器内部,它可以负载至少一个膜区域,诸如例如管,圆筒、组件等等。优选使用滚筒以执行旋转振动运动。为此,旋转安装的滚筒例如可以从生物反应器外通过驱动器来提供旋转振动运动。通过磁耦合,所需的传动力矩可以从驱动器转移到反应器内部的滚筒上,或滚筒轴可以通过旋转密封通过生物反应器套管进行并直接与驱动器偶合。出于对灭菌技术的考虑,使用磁耦合是特别有益的,因为在没有任何旋转密封的情况下,它以相互干净的方式分离无菌的和非无菌的空间。

[0032] 虽由于滚筒和培养基的重量原因存在一定的惯性,但以驱动器形式从发动机提供的动力对发生旋转振动运动来说必须是足够的,以便滚筒以规定的运动顺序实行振动运动。因此,滚筒质量引起的惯性,以及培养基施加于滚筒的力量是设计驱动器的决定性因素。发动机给出足够的转速,齿轮箱就可能提供所需的扭矩。可以使用的驱动器构型的一个例子是偏心轮传动。偏心轮传动将常规驱动马达的均匀转动在驱动轴转化成旋转振动运动。随意可编程位置的驱动器是本发明装置的另一可能的驱动器构型,诸如例如步进马达。这些随意可编程驱动系统的优点是膜区域的旋转振动运动可以在广泛范围内适于方法的要求,而偏心轮传动通常仅具有有限的调整可能性。

[0033] 驱动参数如转速、扭矩和变速箱压缩比可根据具体应用随意进行选择并且是规模依赖性的。对于生物技术领域的应用,所述参数通常如此制定,以得到 0.01W 每 (pro) m^{-3} 直至 4000W 每 m^{-3} 液体体积的体积 - 单位功率消耗,优选约 1000W 每 (pro) m^{-3} 。

[0034] 对于细胞培养物,所述体积 - 单位功率消耗通常为 0.01 至 100W 每 m^{-3} 。

[0035] 对于细胞培养物应用,所述参数制定还应该在滚筒与培养基之间得到 1 m s^{-1} 的最大相对速度。

[0036] 为了吸收变速器与滚筒连接的压力,变速器通常通过任何所需的扭转硬的 (torsionssteife) 偶合连接到连接到滚筒,所述偶合吸收细微的轴失调或少量的轴的非调准。

[0037] 以有利的方式,连接一个或多个膜区域的该装置在其设计中可以容易地适应于在细胞培养物中的具体的比例 (Verhältnissen),例如细胞凝聚。例如,这可以通过膜区域的性质和排列实现。

[0038] 所述滚筒优选可以具有 1 至 64 个滚筒臂,优选 2 至 32 个以及特别优选 4 至 16 个滚筒臂,在所述滚筒臂上可以连接一个或多个膜区域。

[0039] 在装置的一种具体设计中,滚筒臂通过两个缠绕臂形成。膜区域,优选膜管,水平地或垂直地以规则的或不规则的距离缠绕在所述缠绕臂上。

[0040] 如果所述滚筒现在旋转,那么膜管通过反应器内的培养基运动,并由此被物流进行切线碰撞。令人吃惊地,现已发现,如本领域熟练技术人员将假定的那样,通过流动的碰撞没有引起溶液中的颗粒被膜区域截留并固定或转运到(其)死体积中,以便其沉积。令人吃惊地,现已发现,与静止排列的膜区域比较,间歇运动,优选旋转振动运动,减少了沉积的数量,其中任选,另外的搅拌器装置引起培养基流动到物质上。

[0041] 关于流动到膜管上,人们注意到,在相同的角速度下,这种流动通常以膜管位置的函数得以改善,因为离滚筒轴的径向距离增加了。对此的理由是圆周速度增加至相同的程度。优选在离中心尽可能远的距离安装尽可能多的膜管,具有物质上良好的流动性。符合这种要求的一种可能性是增加围绕轴的滚筒臂的数目。但是,臂数目的增加不仅对混合过程而且对流到膜上的流量都具有副作用(在臂之间的较差混合的间隔产生)。另一因素是,在管缠绕和展开期间,以及在安装和拆除期间,增加臂的数量使得滚筒操作变得更困难。随着由于空间原因,臂的数目变得更大,臂和轴之间的固定变得更困难。

[0042] 间歇运动的膜区域以引入和驱散气体优选在不运动的环境下进行,例如从反应器的顶板,使用借助于柔性管的转动密封。转动密封在细胞培养技术中大部分是不希望的,因为它们可能会造成清洗和灭菌困难。具有反转运动的本发明的方法,与没有运动方向反转的方法相比,具有明显的优点:当旋转增加时,管的运动方向没有反转将始终遭遇扭力增加,并最终将撕破。在具有反转运动的运动中,例如在旋转摆动的膜区域中,由于来回运动,柔性管没有网扭力存在。事先条件是自然的,来回运动以这样一种方式设计,一个运动周期结束后,膜区域的位置处在运动的开始点。

[0043] 具有缠绕的膜管的装置的另一个优点是膜区域例如膜管的张力可以被改变。最佳的张力尤其是产生下列参数:流入膜区域内的空间的气体或气体混合物的压力,流出膜区域内空间的气体或气体混合物的压力,以及膜区域内的空间的几何形状、流动阻力和空间变形(在膜管的情况下,例如是流入压力、流出压力、内径、数目以及膜管的曲面分段的

几何形状,以及曲面分段的变形)(H. N. Qi, C. T. Goudar, J. D. Michaels, H.-J. Henzler, G.N. Jovanovic, K.B. Konstantinov: “Experimental and Theoretical Analysis of Tubular Membrane Aeration for Mammalian Cell Bioreactors” Biotechnology Progress 19(2003) pp. 1183-1189)。在膜管的情况中,管张力的减少导致在运动期间管挠曲增加。管的更大挠曲改善了围绕这些的流动,由此改善了质量传递系数。所述张力以应用性质的函数进行选择,这样一方面膜管长时间稳定地固定,但另一方面所述管优选在流动内运动并且可以挠曲例如若干毫米。

[0044] 由管张力的减少而产生膜管固定在缠绕臂上的问题。在管张力是低的情况下,作用于膜管上的大的力量将可能造成膜管从缠绕臂脱离。为了抵消此问题,例如,缠绕臂的表面具有外螺纹。例如,还可能在外部提供缠绕臂棒,其抑制管从臂上向外部滑动。这里必须注意,螺纹的任何未修整的边不会破坏缠绕的膜管。此外,星形支座的缠绕臂的外螺纹还提供改变管缠绕的可能性。例如,当缠绕管时,有可能仅使用每隔一个或每隔两个螺纹凹。这允许在各个膜管之间确立所规定的距离。

[0045] 申请 W02007098850 (A1) 给出了膜区域的其它实施方案,所述膜区域以管的形式,其与滚筒臂固定并且设计成能执行间歇运动。

[0046] 执行间歇运动的膜区域可完全或部分地浸于培养基中。在间歇运动期间,还可能改变浸入深度。

[0047] 本发明的方法可以是通用的,例如在生物体、人、动物或植物衍生的细胞的培养中、在废水处理中、或在任何可能形成沉积的其它方法中。优选在细胞培养物的培养中使用,所述细胞培养物趋向于凝聚或粘附于生物反应器及其元件上,或者在那里细胞、细胞残渣或物质容易凝聚或粘附。这里没有不利的效果,例如对于细胞生物学,例如相对于细胞调亡和细胞周期。细胞培养物的例子是用于获得凝血因子的 BHK 细胞(幼仓鼠肾)或用于获得治疗用抗体的 CHO 细胞(中国仓鼠卵巢)。

[0048] 培养基内的膜区域,使用间歇的、特别是旋转振动运动,相互合并了三种功能:

1. 膜区域提供必要的气体转移,因此必须提供例如氧气给生物体,以及必须除去生物体的气体形式的代谢产物(特别是二氧化碳)。

[0049] 2. 与静止排列的流动通过额外搅拌器装置控制的膜区域相比,该振动运动显著地改善了物质传递。不需要任何额外的搅拌器装置。

[0050] 3. 令人吃惊地,所述振动运动减少沉积和凝聚的形成,这不仅适用于与生物反应器内膜区域固定的沉积和凝聚,而且可适用于与生物反应器内的其它元件/区域固定的沉积和凝聚。

[0051] 除膜区域的间歇运动外,在生物反应器中还可能执行一个或多个探针(pH 探针、温度计、氧气含量测定电极和类似探针)的间歇运动。这里优选一个或多个探针与膜区域连接,任选通过共用的支座连接,以便膜区域和探针(诸探针)进行共用的/耦合的运动。以这种方式,可以有效地避免在探针上的沉积。

附图说明

[0052] 附图

图 1:在容器中通过膜区域给液体供应气体以及从液体中除去气体的旋转振动运动

图。

[0053] 图 2 :膜区域可以使用的装置的照片 :膜管已经缠绕在以星形布置的滚筒臂上。

[0054] 图 3 :在第一细胞培养过程中 (a) 在 DMA- 法中以及 (b) 在参比法中活细胞密度生长对时间的函数图。在每种情况下,活细胞的密度 cd , 单位为 $[10^6 \text{ 个细胞 mL}^{-1}]$, 对时间 t , 单位为 [天], 绘制。

[0055] 图 4 :在第二细胞培养过程中 (a) 在 DMA- 法中以及 (b) 在参比法中活细胞密度生长对时间的函数图。在每种情况下,活细胞的密度 cd , 单位为 $[10^6 \text{ 个细胞 mL}^{-1}]$, 对时间 t , 单位为 [天], 绘制。

[0056] **答案:**

- 1 膜管
- 2 转轴
- 3 旋转方向
- 4 生物反应器
- 5 液面水平。

具体实施方式

实施例

[0057] 本发明通过使用下面的实施例进行更详细地解释,但是本发明并不受实施例的限制。

[0058] **实施例 1 :进行本发明方法的装置**

在图 1 中是进行本发明方法的装置的一个例子的图示。所述膜区域通过膜管 (1) 形成,所述膜管 (1) 已经垂直地布置在转轴 (2) 上,并且与旋转方向 (3) 垂直。含氧气体可以泵入膜管以供应生物体。所述装置优选在生物反应器 (4) 内操作。优选将膜区域完全浸渍到培养基中,也就是在操作期间,液体表面 (5) 位于膜区域的上面。所述装置可以围绕转轴 (2) 执行转动运动。优选执行旋转振动运动。首先,所述运动引起生物反应器内生物体的供应改善,其次,显著减少沉积形成和凝聚的趋势 (与流动由搅拌器装置控制的静态膜区域相比)。

[0059] 图 2 是用于接受膜管的装置的照片。该装置的上部包括两个同中心的分配器环,用于输入和放出气体。外部环主要被用来输入气体,以便富氧气体首先进入最远离转轴的管部分中,这些是流动最有效朝向的那些。在本实施例中,每个分配器环具有 16 个喷嘴,其使得可以提供给膜管片段最高达 16 根滚筒臂。这幅照片表明,该滚筒仅安装了 8 根滚筒臂,其中 8 根剩余的可能的滚筒臂中的每一根在目前存在的那些之间安装。在本实施例中,长度 57m 的膜管片段缠绕到每个转动臂上。如果所述滚筒现在旋转,那么膜管通过反应器内的液体运动,并由此物质切线流到其上。

[0060] 在图 2 中所示的用于进行本发明方法的装置用于向细胞培养 - 生物反应器供应气体,直至其液体体积为约 200 L,其中反应器的内径是 510 mm,高度对直径之比是 2:1。中心转轴的直径是 20 mm,滚筒外径是 409 mm。在膜管已经实施的凹区域中滚筒臂的半径是 7.7 mm。已经产生平行凹陷区,其具有 3.65 mm 的距离,以便抑制硅氧烷膜管的滑移,其内

径是 1.98 mm、外径是 3.18 mm。3.65 mm 与 3.18 mm 之间的差异的原因是希望保持膜管的体积膨胀的空间(“胀起”),即使当它们在压力的状态下(直至表压为 1.5 巴),因此使得管转向处的压力损失最小。

[0061] 作为滚筒驱动器例如可以使用具有最大转速为 2500 min^{-1} 、5.8 Nm 的静止扭矩和 1:12 的变速箱压缩比的步进马达。

[0062] 在表 1 中列出了举例说明具有所述构型的三种尺寸的实施例,表明角加速度和最大角速度,以及转动臂终端的最大速度,即滚筒的最快速运动点。

		15 L 细胞培养体系	20 L 细胞培养体系	200 L 细胞培养体系
填充体积 (Füllvolumen)	[L]	12	20	200
角加速度	$[\text{rad s}^{-2}]$	4,3	3,7	0,75
角减速	$[\text{rad s}^{-2}]$	4,3	3,7	0,75
对于一次由起点至终点的运动的时间	[ms]	1250	2000	4000
überstrichener 角	[°]	90	180	180
最大角速度	$[\text{rad s}^{-1}]$	2,7	3,7	1,5
滚筒直径	[m]	0,2	0,2	0,41
滚筒末端的最大速度	$[\text{m s}^{-1}]$	0,27	0,37	0,31
管长	[m]	65	105	755
膜区域每填充体积	$[\text{m}^2 \text{ m}^{-3}]$	54,1	52,5	37,7
约功率消耗每填充体积	$[\text{W m}^{-3}]$	12	11,1	~10*

* 在几何形状类似的模型体系中测定

表1

[0063] 实施例 2:使用本发明的方法用于培养一种趋向于粘附的人杂交细胞系 HKB-11

本发明的方法例如在培养人细胞系 HKB-11 期间使用,所述人细胞系 HKB-11 用于生产抗血友病因子 VIII (Mei, Baisong 等, “Expression of Human Coagulation Factor VIII in a Human Hybrid Cell Line”, HKB11, Molecular Biotechnology. 34(2):165-178, October 2006)。这种细胞系具有非常高的形成凝聚体的倾向。

[0064] 为了进行方法的对照,以参考方法(不是本发明的方法)培养相同的细胞系。

[0065] 本发明的方法在 Applikon 公司的 15L 生物反应器中进行。该生物反应器具有一滚筒,在滚筒上有以硅胶管形式的膜区域 (SILASTIC RX 50 Medical Grade Tubing Special, 0.078 in. (1.98 mm) ID x 0.125 in. (3.18 mm) OD (500 ft roll, Dow Corning))。膜管与滚筒的 8 个臂固定,所述臂以星形与转轴连接。膜管总长度是 58.7m (对于 12 L 填充体积的反应器,每 m^3 反应器体积 48.8 m^2 膜表面),其中在滚筒臂的最内两排上没有缠绕。全部缠绕将达到 65 m 膜管的总长 (对于 12 L 填充体积的反应器, 54.1 m^2 膜表面每 m^3 反应器体积)。具有与行星传动法兰接头、变速箱压缩比为 1:12 且静止扭矩为 0.9 Nm 的伺服马达 (型号 Nr. 23S21, Jenaer Antriebstechnik, 耶拿, 德国) 可以用来为滚筒提供间歇运动。下列参考文献给出了所使用的人 HKB 细胞系的有关信息: Mei, Baisong 等人, “Expression of Human Coagulation Factor VIII in a Human Hybrid Cell Line”, HKB11, Molecular Biotechnology. 34(2):165-178, October 2006。

[0066] 通过膜区域(膜管),给细胞供应氧气并放出二氧化碳。气体通过量是每小时 1

标准升。流过 8 个滚筒臂的膜管的气体在膜管末端再次收集,并通过柔性管进入到生物反应器的顶盖,在出气口的反压力在 5 到 15 psig 之间变化。这可以控制气体转移性质。在培养期间,将每通风喷嘴和换气喷嘴每小时 1 标准升的空气流量连续通过发酵罐的顶部空间。有关连续细胞培养操作的装置的结构的信息可在 W02003/020919A1 中找到。

[0067] 按照本发明,培养基内的膜区域进行旋转振动运动。运动顺序如下所示:从旋转方向的反转点之一开始,膜区域以 11rad s^{-2} 的恒定角加速度加速 400 ms 的期间,然后以数值上相同的角加速度减速相同的时间期间,以便在 800ms 后再次变为静止。位移角是 90° 。能耗相当于约 56W m^{-3} 。滚筒末端的最大速度约为 0.44m s^{-1} 。

[0068] 本发明的方法在下文被称为 DMA 法 (Dynamic Membrane Aeration), 实施本发明方法的相应装置被称为 DMA 反应器。

[0069] 参比方法同样在 Applikon 公司的结构相同的 15 L 生物反应器 (参比反应器) 中进行。这种参比反应器具有一个静态膜区域和一个锚式搅拌器。该静态膜区域包括 49.6 m 的上述硅胶管的管长 (相当于每 m^3 反应器填充体积 41.3m^2 的膜表面积) (用于 DMA 体系和用于参比体系的硅胶管构造相同)。通过膜管的流速是 0.5 标准升每小时。设计在内部的锚式搅拌器用来控制流到膜区域上的物料,以便改善物质转移 (氧气供应,二氧化碳排除)。锚式搅拌器以 150 rpm 的恒定转速 (相当于约 165W m^{-3}) 运行。由于细胞损坏和不希望的副产物生成的原因,这种高的搅拌器转速或这种高的能耗通常应该是避免的,但是为了避免 / 限制细胞凝聚和沉积,其又是必须的。

[0070] 有关连续细胞培养操作的装置的结构的信息以及有关细胞分离器的信息同样可在 W02003/020919A1 中找到。

[0071] 将用于接种参比体系的足够量的细胞接种物预先在摇瓶中生长。15 L DMA 反应器用来自 15 L 参比体系的细胞接种,由此得到可比较的两个体系,除轻微的时间差外,它们共享细胞源以及相同的菌龄。接种细胞密度的例子可以在图 3 和图 4 中找到。

[0072] 从 DMA 法和参比法的生物反应器和采集的物流中每日采样,对样品进行细胞密度、生命力、聚集速率、脱线 pH 值、溶解的氧浓度和溶解的二氧化碳浓度、葡萄糖浓度、乳酸盐浓度、谷氨酰胺浓度、谷氨酸盐浓度、铵浓度、LDH 和滴定度 (抗血友病因子 VIII (rFVIII)) 进行分析。

[0073] 图 3 表示在第一细胞培养过程中 (a) 在 DMA 法中以及 (b) 在参比法中活细胞密度生长对时间的函数。在每种情况下,活细胞密度 cd , 单位为 $[10^6 \text{个细胞 mL}^{-1}]$, 对时间 t , 单位为 [天], 绘制。细胞密度测定使用 CEDEX 体系 (Innovatis GmbH, 比勒费尔德, 德国)。以便细胞凝聚的影响最小化并尽可能代表性的测定细胞密度, 事先使用移液方法, 由于移液管中的剪切力基本上破坏了细胞凝聚物。在图 3 (b) 中观察到 53 天后细胞密度减少至约 $10 \times 10^6 \text{个细胞 mL}^{-1}$ 。在膜管上的沉积造成这种现象, 并且看起来似乎减少了氧气进入。这些沉积在 DMA 法中没有观察到; 并且在整个观察周期内可以维持高的细胞密度。

[0074] 第一细胞培养过程后, DMA 方法的生物反应器仅用培养基 (培养基配制是秘密的) 洗涤。沉积残留在传感器和膜区域上。然后, 用新鲜投入的细胞进行第二细胞培养过程。该步骤用来模拟长期培养过程。

[0075] 图 4 表示第二细胞培养过程中 (a) 在 DMA 法中以及 (b) 在参比法中活细胞密度生长对时间的函数。在每种情况下, 活细胞密度 cd , 单位为 $[10^6 \text{个细胞 mL}^{-1}]$, 对时间 t , 单位

为 [天], 绘制。

[0076] 在 DMA 方法中, 仅 7 天培养后, 实现大于 15×10^6 个细胞 mL^{-1} 的细胞密度并且得以维持。在参比法中没有获得这样的细胞密度; 因此生产效率也相应地降低。应注意。

[0077] 在两种细胞培养方法中, DMA 法表现出更高的细胞密度, 因此其比参比方法具有更高的生产效率。原因已经表明, 相比参比方法, 在 DMA 法中减少了形成沉积的趋势。

[0078] 总之, 与所述的参比方法相比, 在所述实施例中表现出本发明方法的下列优点:

- 氧气进入增加; 在整个培养时间的期间, DMA 法比参比方法具有平均更高的细胞密度。

[0079] - DMA 法中观察到的沉积数量较少, 不仅在膜管上而且在生物反应器的非运动部分上以及在探针上都如此。

[0080] - 在可比较的流动条件下 (基于剪切速率), DMA 法的能耗可以仅约为参比体系的三分之一。

[0081] - DMA 法对细胞生物学 (细胞调亡和细胞周期) 没有副作用。

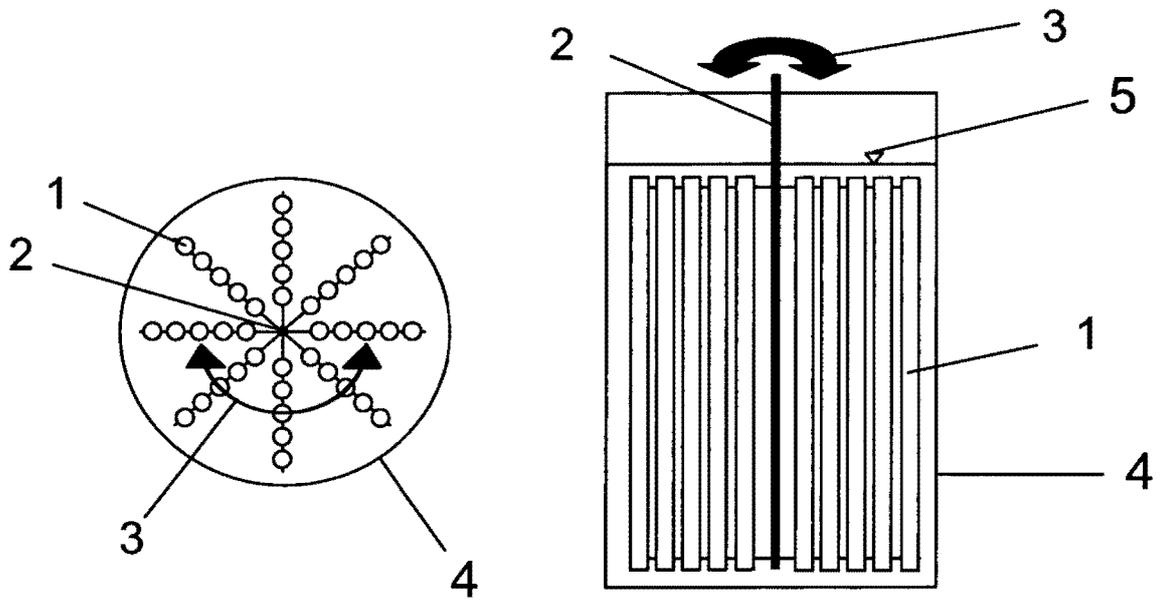


图 1

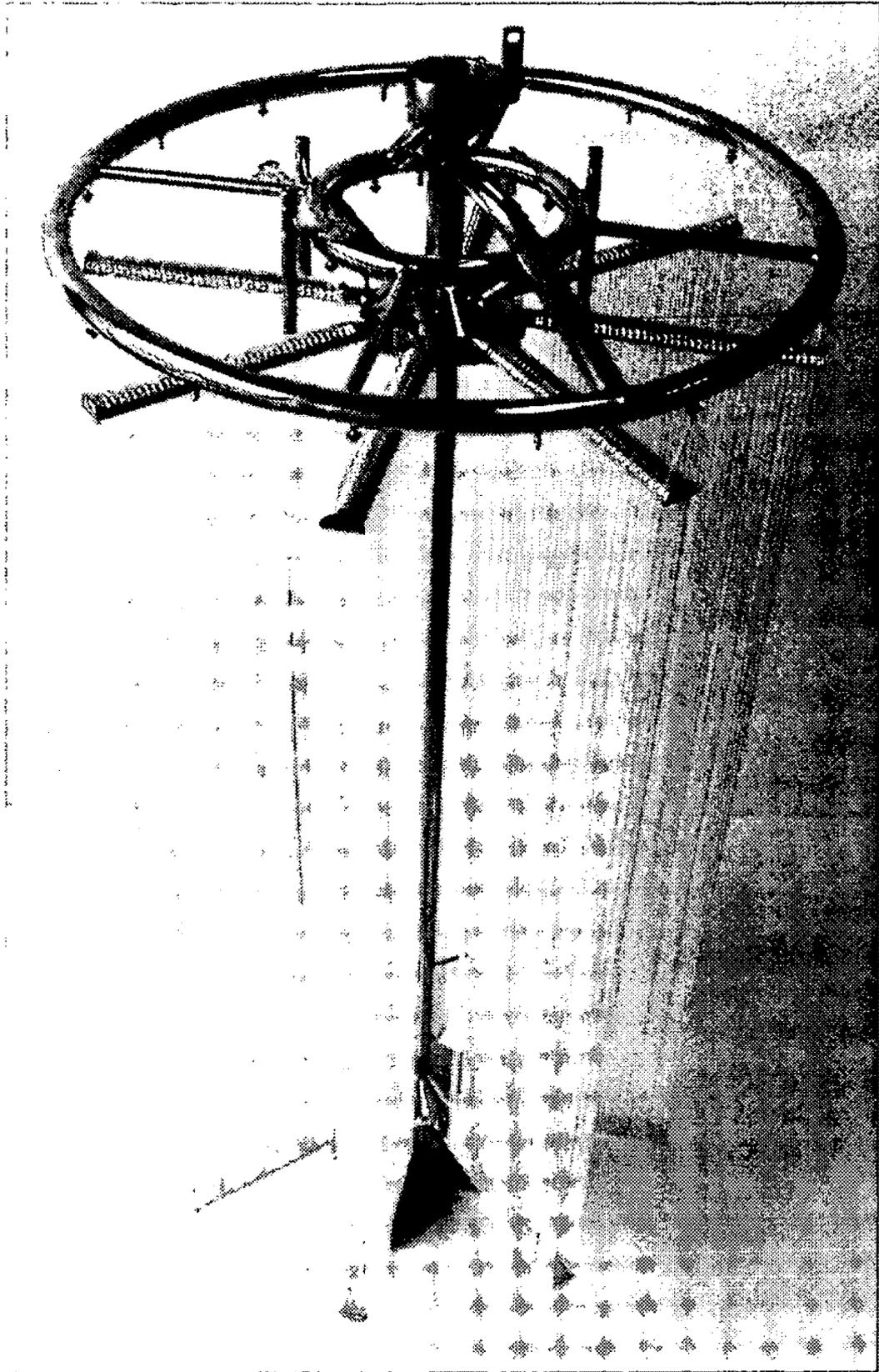
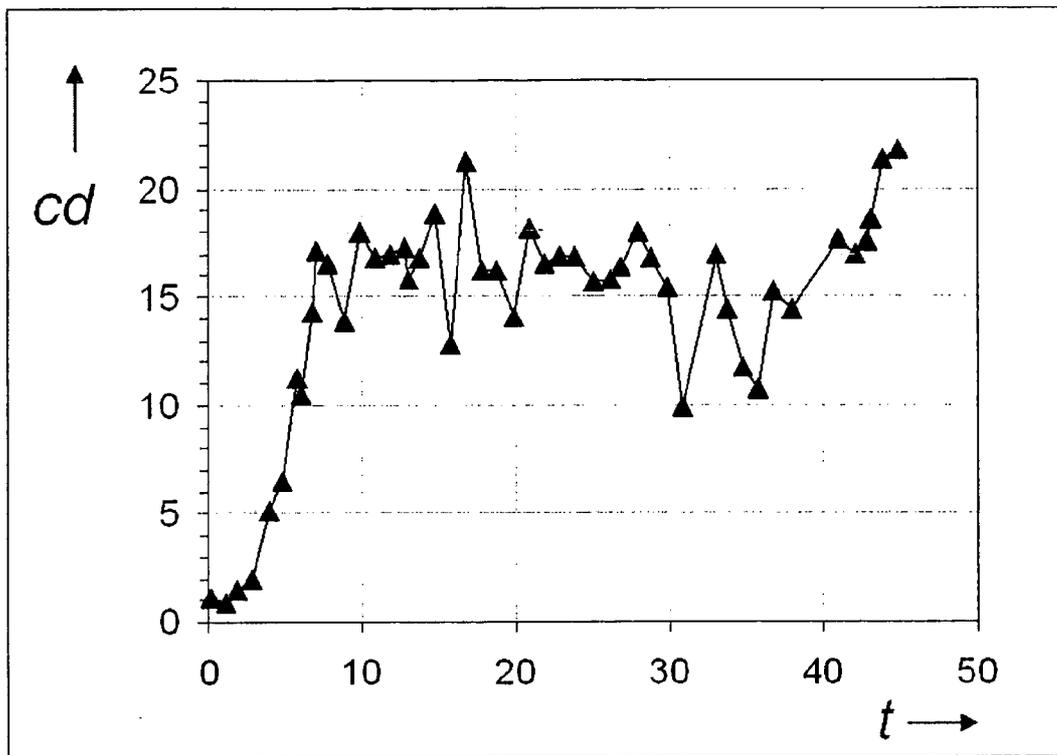


图 2

(a)



(b)

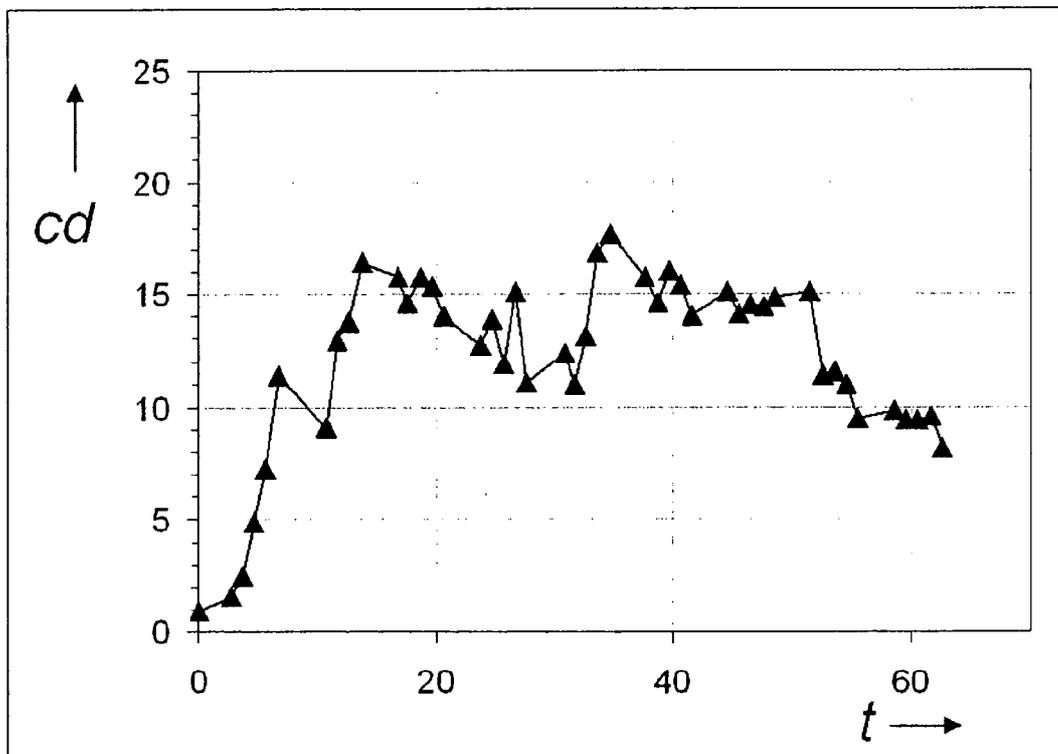
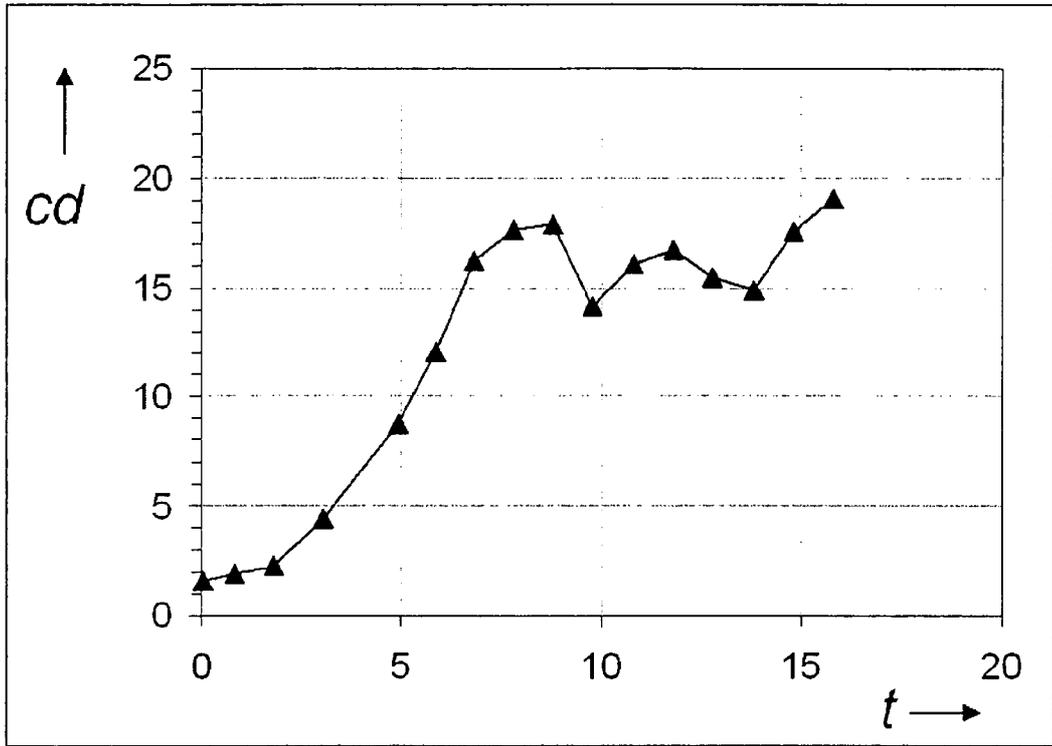


图 3

(a)



(b)

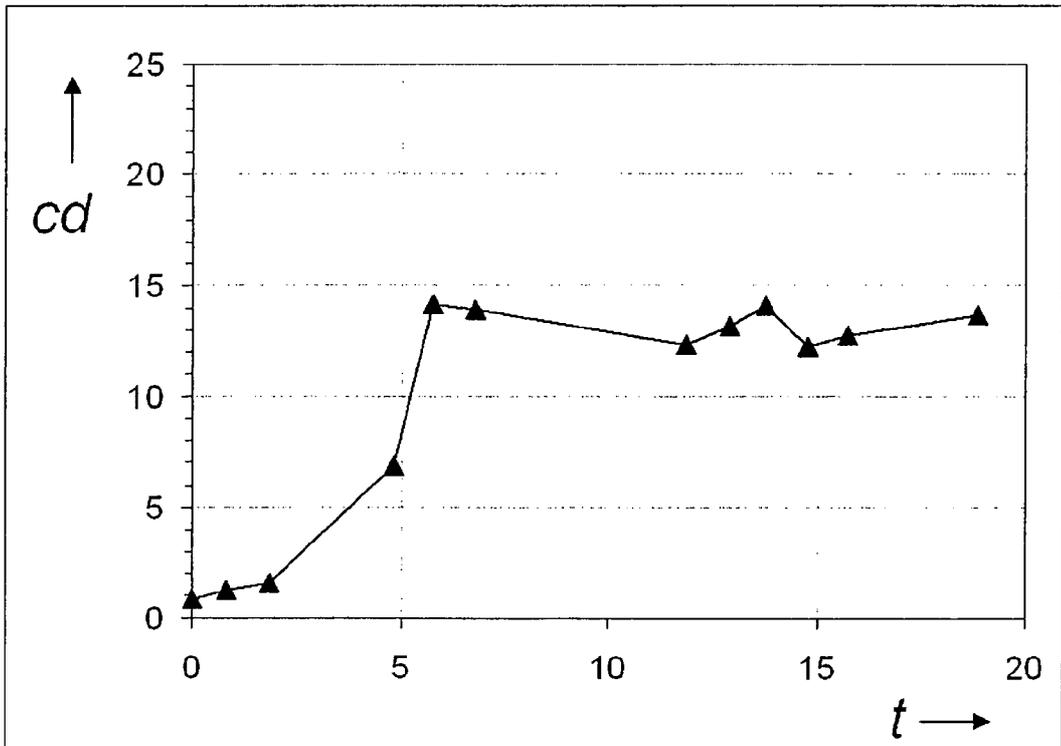


图 4