



(21) 申請案號：107136209 (22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 15 日

(51) Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01) C12M3/06 (2006.01)
 C12M1/00 (2006.01) C12M1/34 (2006.01)

(30) 優先權：2017/10/16 美國 62/572,918

(71) 申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
 美國

(72) 發明人：安格里尼 馬修 ANGELINI, MATTHEW (US)；威特門 阿什利 WITMER,
 ASHLEY (US)；戴比亞斯 安東尼 DEBIASE, ANTHONY (US)

(74) 代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：50 項 圖式數：21 共 52 頁

(54) 名稱

灌注生物反應器及相關使用方法

PERFUSION BIOREACTOR AND RELATED METHODS OF USE

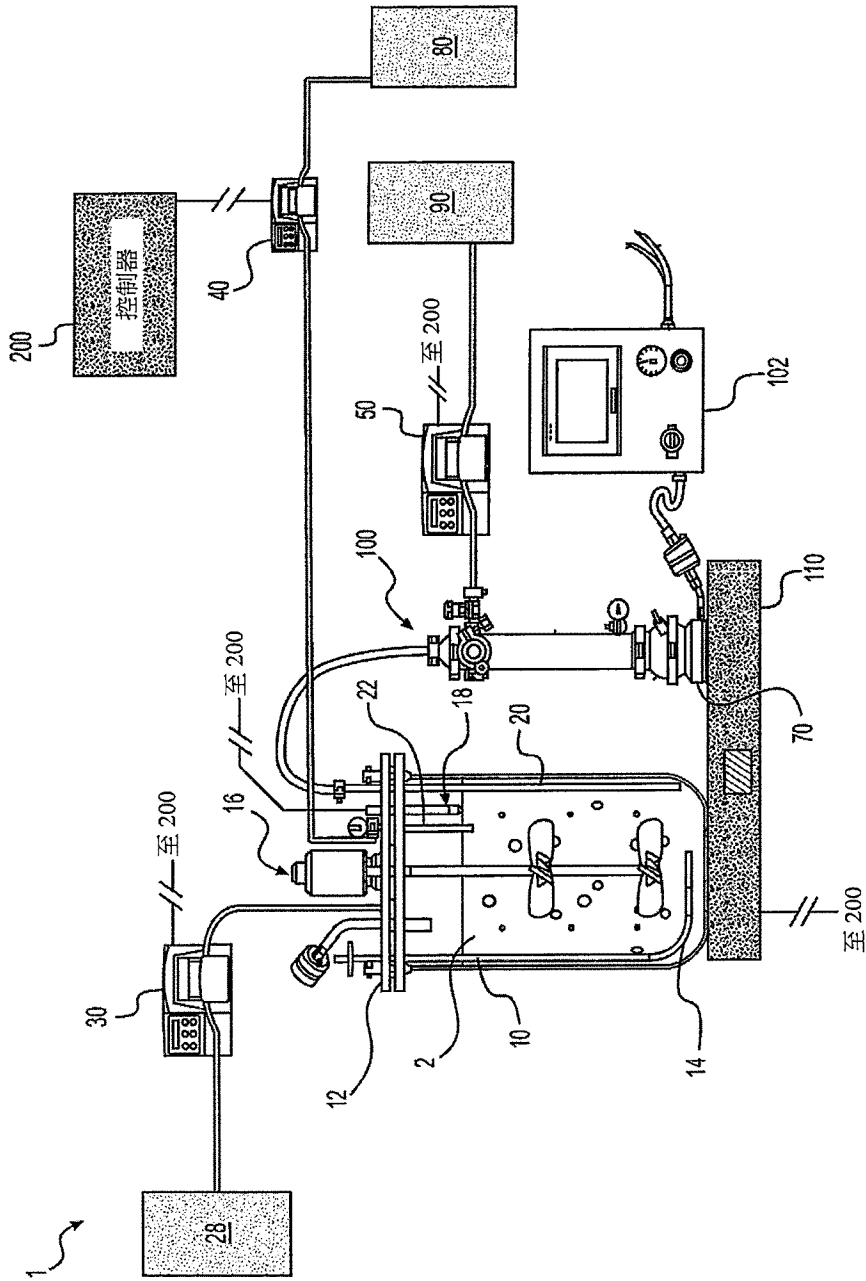
(57) 摘要

一種控制生物反應器系統之方法係包括：提供生物反應器中的細胞培養，其中反應器中的條件能讓細胞培養產生感興趣蛋白(POI)，以拉曼拉曼(RAMAN)測量反應器內培養的程序參數(PPs)，其中該程序參數係選自由營養素濃度、活細胞濃度和蛋白屬性組成之群組，測量含細胞培養的生物反應器預定重量，使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培養基，使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞，及使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中。

A method of controlling a bioreactor system includes providing a cell culture in a bioreactor, wherein conditions in the bioreactor enable the cell culture to produce a protein of interest (POI), measuring process parameters (PPs) of the culture within the bioreactor by RAMAN, wherein the process parameters are selected from the group consisting of nutrient concentration, viable cell concentration, and protein attributes, measuring a predetermined weight of the bioreactor with the cell culture, removing cell-free spent media from the cell culture using a first output conduit at a first specified rate, removing cells from the cell culture using a second output conduit at a second specified rate, and introducing one or both of fresh media or nutrients into the cell culture using an input conduit at a third specified rate.

指定代表圖：

圖 1



符號簡單說明：

- 2 . . . 細胞培養
- 10 . . . 生物反應槽
- 12 . . . 罩蓋
- 14 . . . 充氣器
- 16 . . . 攪拌器
- 18 . . . 拉曼探針
- 20 . . . 導管
- 22 . . . 導管
- 28 . . . 饋料儲槽
- 30 . . . 給料泵浦
- 40 . . . 排出泵浦
- 50 . . . 收獲泵浦
- 70 . . . ATF 泵浦
- 80 . . . 排放槽
- 90 . . . 收獲槽
- 100 . . . 過濾器
- 102 . . . 控制器
- 110 . . . 秤
- 200 . . . 控制器

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

灌注生物反應器及相關使用方法

PERFUSION BIOREACTOR AND RELATED METHODS OF USE

【技術領域】

相關申請案之交互參照

【0001】 本專利申請案係於 35 U.S.C. § 119 之下聲請 2017 年 10 月 16 日申請的美國臨時專利申請案號 62/572,918U.S 之利益，其全文係以引用的方式併入本文中。

【0002】 本揭示文係關於灌注生物反應器及相關使用方法。

【先前技術】

【0003】 生物反應器可就製造生物性產物，例如蛋白之目的，用於維持細胞培養。在一饋料批式反應器中，係在培養期間將一或多種營養素給料至生物反應中，而生物產物係留在生物反應器直到該批次結束。灌注生物反應器係應付某些與饋料批式相關的效能挑戰，並在 1990 年後期開始普及。然而，最新技術的灌注生物反應器遭逢可用的控制策略數目有限、數據空缺和費用高之苦。

【0004】 例如，當在應付泵浦漂移和程序變異性時，灌注反應器的控制解決方案係試圖校正輸入和輸出給料泵浦的體積流量。然而，由於任二個特定泵浦間的固有差別(例如製造差異)和不能達到緊密控制，無法生產運作可能導致填料過滿或生物器排空。現有的控制解決方案亦缺乏測量其他參數，例如氨、葡萄糖和蛋白屬性之能力。本揭示文之實施例係應付一或多個現有灌注生物反應器之限制和缺點。

【發明內容】

【0005】 本揭示文之實施例，除了其他事項外，係關於一種控制生物

反應器和生物反應器系統之方法，其可用於控制蛋白生產之細胞培養程序。文中所揭示的各實施例可包括一或多個與任何其他實施例有關之文中所述的特點。

【0006】 本揭示文係關於一種控制生物反應器系統之方法，其係包括提供一生物反應器中的細胞培養；藉由拉曼探針(RAMAN probe)測量細胞反應器內之細胞培養的一或多項程序參數；使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培養基；使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞；使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中；及以拉曼探針測量為基準，改變一或多項第一特定比率、第二特定比率或第三特定比率。

【0007】 本揭示文一實施例係關於一種控制生物反應器系統之方法，其包括：提供一生物反應器中的細胞培養，其中生物反應器中的條件能讓細胞培養產生感興趣蛋白(POI)，以拉曼測量生物反應器內細胞培養的程序參數(PP)，其中該程序參數係由營養素濃度、活細胞濃度和蛋白屬性組成之群中選出，測量含細胞培養內容物的生物反應器重量，使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培養基，使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞，及使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中，且其中該輸入和輸出導管係以拉曼探針測量值及生物反應器的重量測量為基準加以調整用以維持(i)一或多項程序參數在預定的範圍內，(ii)含細胞培養之生物反應器重量在預定的範圍內，及(iii)輸入導管的第三特定比率以及各輸出導管的第一和第二特定比率在個別的預定範圍內。

【0008】 在某些實施例中，以拉曼測量生物反應器內培養的一或多項程序參數係以規律的間隔進行，例如至少每小時一次。在其他的實施例中，該方法係配置為將細胞培養以穩定狀態維持在每毫升(mL)至少約 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時至少約 30 天。在一實施例中，此生物反應器具有至少 2L，至少 3L，至少 10L，至少 35L，或至少 50L，或更高的容積，且該方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的生物反應器重量之 0.1 百分比。例如此生物反應器具有至少約 10L 之容積，

而該方法係配置為將生物反應器和細胞培養之重量維持在以最初的生物反應器和細胞培養內容物重量為基準所測定的重量範圍內，例如在約 20 ± 2 g 範圍內。在某些實施例中，當程序參數偏離個別所欲範圍內的設定值時，則控制一或多項移出無細胞培養基，移出細胞和導入新鮮培養基或營養素或二者及然後調整生物反應器，用以降低偏差。每天經由第一輸出導管移出至少二個生物反應器體積的用過培養基。每天經由第一輸出導管移出至高三個生物反應器體積的用過培養基。程序參數包括細胞培養的溫度和細胞培養的 pH，且溫度係維持在約 30 至 40°C，約 32 至約 38°C 或 34 至約 38°C，而 pH 係維持從在 6.50 至約 7.50，從約 6.60 至約 7.40，從約 6.70 至約 7.40，從約 6.80 至約 7.30，從約 6.90 至約 7.20，從約 7.00 至約 7.10，約 6.50，約 6.55，約 6.60，約 6.65，約 6.70，約 6.75，約 6.80，約 6.85，約 6.90，約 6.95，約 7.00，約 7.05，約 7.10，約 7.15，約 7.20，約 7.25，約 7.30，約 7.35，約 7.40，約 7.45，或約 7.50。程序參數包括細胞單位生產率，且該方法係配置為將細胞培養內的細胞維持在至少約 15-60 pg/細胞/天，約 15-25 pg/細胞/天，至少約 17-23 pg/細胞/天，或至少約 19-21 pg/細胞/天的細胞單位生產率歷時至少 25-37 天。程序參數包括葡萄糖濃度，且該方法係配置為將葡萄糖濃度維持在從約 5 mM 至約 85 mM，或從約 0.5 g/L 至約 15.5 g/L，從約 1 g/L 至約 15.5 g/L，從約 0.5 g/L 至約 8 g/L，從約 2 g/L 至約 6 g/L，或從約 3 g/L 至約 5 g/L。程序參數包括乳酸濃度，且該方法係配置為將乳酸濃度維持在低於約 60 mM，或低於約 6 g/L，低於約 5 g/L，低於約 4 g/L，低於約 3 g/L，低於約 2 g/L，或低於約 1 g/L。程序參數包括氨濃度，且該方法係配置為將氨濃度維持在低於約 15 mM，低於約 12 mM，低於約 10 mM，低於約 9 mM，低於約 8 mM，低於約 7 mM，低於約 6 mM。各移出無細胞用過的培養基、移出細胞和導入新鮮培養基或營養素或二者係藉由個別的泵浦來控制。此生物反應器係包括一配置用來保留細胞及讓液體通過的過濾器。

【0009】 在另外的實施例中，本揭示文係關於控制生物反應器系統之方法，其包括提供一生物反應器中的細胞培養；以拉曼探針測量一或多個

生物反應器內細胞培養的程序參數(PP)；及以拉曼探針的測量值為基準，調整一或多項生物反應器的輸入和輸出。

【0010】 根據本揭示文之方法係以包括下列步驟加以說明：提供一生物反應器中的細胞培養(302)，其中生物反應器中的條件能讓細胞培養產生感興趣蛋白(POI)，以拉曼測量生物反應器內培養的程序參數(304)，其中該程序參數係由營養素濃度、活細胞濃度和蛋白屬性組成之群中選出，測量含細胞培養的生物反應器預定重量(306)，使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞用過的培養基(308)，使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞(310)，及使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中，且其中該輸入和輸出導管係以拉曼探針測量值及生物反應器的重量測量為基準加以調整以維持(i)一或多項程序參數在預定的範圍內，(ii)含細胞培養之生物反應器重量在預定的範圍內，及(iii)輸入導管的第三特定比率以及各輸出導管的第一和第二特定比率在其個別的預定範圍內(312)。

【0011】 又在另外方面，本揭示文係關於一生物反應器系統，其係包括具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；至少一泵浦；連結此桶槽之過濾器；連接桶槽之拉曼探針；與至少一泵浦和拉曼探針連接之控制器，此控制器係配置為以拉曼探針的輸入值為基準，控制該至少一泵浦。

【0012】 至少一輸出導管係包括用來連接第二泵浦之第一輸出導管，而該第二泵浦係配置用來控制從桶槽移出液體，以及用於連接第三泵浦的第二輸出導管，而該第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞。過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽內並讓液體通過過濾器。拉曼探針係配置在桶槽內。控制器係與第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦連接。生物反應器包括配置用來測量桶槽內含有細胞培養之桶槽重量的秤；其中控制器係配置來接收秤的重量數據。此控制器係配置來比較重量設定點之桶槽重量，及以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多項輸出。控制器係配置用來接收來自拉曼探針之光譜數據；以接收的光譜數據為基準，測定細胞培養的參數；將測定出的參數與設定點的參數相比較；及以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多項輸出。調整第

一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多項輸出係降低測出的參數和設定點參數之間的偏差，或接收的重量和設定點重量之間的偏差。此方法係配置用來將細胞培養以穩定狀態維持在至少每毫升 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時 30 天。此桶槽具有至少 10L 的體積，且此方法係配置為將含細胞培養的桶槽之重量維持在 20 g 範圍內。此桶槽具有至少 10L 的體積，且此方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的桶槽重量之 0.1 百分比。控制器係配置用來以接收的光譜數據為基準，測定多數個生物反應器培養的參數；將各多數個參數與各多數個參數的個別設定點比較；及以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多項輸出，用以降低測定參數和個別設定值之間的偏差。多數個參數包括溫度、pH、營養素濃度、乳酸濃度、氨濃度和細胞單位生產率。過濾器係配置用來保留細胞並讓液體通過。生物反應器包括秤，其中該桶槽和過濾器係置於秤上。生物反應器包括秤，其中該桶槽係置於秤上。生物反應器包括秤，其中該桶槽與該秤係實體接觸。

【0013】 一生物反應器培養系統，其係包括：具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；至少一泵浦；與桶槽接觸之過濾器；連接桶槽之拉曼探針；與桶槽接觸之秤；及連結至少一泵浦、秤和 RAMAN 探針之控制器。在某些實施例中，過濾器和桶槽係與秤接觸。在另外的實施例中，過濾器係包括網類物質。在某些實施例中，過濾器係包括具有範圍從 0.2 μM 至 30 μM 之孔洞大小的網子。

【0014】 又在另外的實施例中，本揭示文係關於一生物反應器系統，其係包括：具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；至少一泵浦；連結桶槽之過濾器；和桶槽接觸之秤；連結桶槽之拉曼探針；及連結該至少一泵浦、秤和拉曼探針之控制器，而該控制器係配置為以拉曼探針之輸入和秤的輸入為基準，控制該至少一泵浦。

【0015】 在另外的實施例中，係揭示一生物反應器培養系統。此生物反應器培養系統包括：具有供連接第一泵浦之輸入導管、供連接第二泵浦之第一輸出導管，以及供連接第三泵浦之第二輸出導管的桶槽，而該第一泵浦係配置用來控制液體遞送到桶槽，第二泵浦係配置用來控制從桶槽移

出液體，第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞；連結桶槽之過濾器，其中該過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽中並讓液體通過過濾器；配置用來測量桶槽內含有細胞培養之桶槽重量的秤；配置在桶槽內的拉曼探針。此實施例係包括連結第一泵浦、第二泵浦、第三泵浦、秤和拉曼探針之控制器，其中控制器係配置用來接收秤的重量數據，將桶槽的重量與設定點的重量相比較，接收來自拉曼探針的光譜數據，以接收的光譜為基準測定細胞培養的參數，將測定地參數與設定點的參數相比，並以該比較為基準，調整一或多項第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量。

【0016】 調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量係降低所測之參數和設定點參數之間的偏差，或接收重量和設定點重量之間的偏差。此控制係配置為將細胞培養以穩定狀態維持在每毫升(mL)至少約 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時約 30 天。此桶槽具有至少 3L 的體積，且此控制器係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在 20g 範圍內。此桶槽具有至少 3L 的體積，且此控制器係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的桶槽重量之 0.1 百分比。此控制器係配置用來以接收的光譜數據為基準，測定多數個生物反應器培養的參數；將各多數個參數與各多數個參數的個別設定點比較，及以該比較為基準，調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量，用以降低測定參數和個別設定值之間的偏差。多數個參數包括溫度、pH、營養素濃度、乳酸濃度、氨濃度和細胞單位生產率。此生物反應器系統包括一過濾器係配置用來保留細胞並讓液體通過。桶槽和過濾器係置於秤上。該桶槽係置於秤上。

【0017】 在特定的實施例中，根據本揭示文之生物反應器培養系統係以包括下列元件來說明：具有一供連接第一泵浦(30)之輸入導管、一供連接第二泵浦(40)之第一輸出導管，以及一供連接第三泵浦之第三輸出導管的桶槽(10)，而該第一泵浦係配置用來控制液體遞送到桶槽，第二泵浦係配置用來控制從桶槽移出液體，第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞；一連結、連接桶槽或與桶槽液體連通之過濾器(100)，其中該過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽中並讓液體通過過濾器；一配置用來測量桶槽內含有細胞培養之桶槽重量的秤(110)；一配置在桶槽內的拉曼探針(18)；及一連結第

一泵浦(30)、第二泵浦(40)、第三泵浦(50)、秤(110)和拉曼探針(18)之控制器(200)。

【0018】 在此生物反應器培養系統中，控制器(200)係配置為：接收秤(110)的重量數據；比較桶槽(10)重量與設定點的重量；接收拉曼探針(18)的光譜數據；以所接收的光譜數據為基準，測定細胞培養參數；比較所測定的參數和設定點的參數；及以該比較為基準，調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量。

【圖式簡單說明】

【0019】 併入及構成本說明書之一部份的伴隨圖式、說明的各種實例和描述係共同用於解釋所揭示的實例和實施例之原理。

【0020】 本揭示文之態樣可結合附圖所說明之實施例來施行。這些圖式係顯示本揭示文之不同的態樣且，在適當情況下，說明如結構、組份、物質及/或元件之標號係經同樣標示。請了解，結構、組份及/或元件的各種組合，特別指出的除外，係涵蓋及在本揭示文之範圍內。

【0021】 再者，文中有許多描述和說明的實施例。本揭示文並非限制於任何單一態樣及其實施例，亦非限制於此等態樣及/或實施例的任何組合及/或排列。再者，本揭示文的各態樣及/或其實施例，可單獨或與一或多個本揭示文之其他態樣及/或其實施例組合應用。為了簡潔起見，文中並未個別論述及/或說明特定的排列和組合。請注意，描述為「例示的」之文中所述的實施例或施行不應理解為較佳的或優於，例如，其他實施例或施行，而是希望反應或指出該(等)實施例為「例示的」實施例。

【0022】 圖 1 為根據本揭示文之實例，生物反應器系統之示意圖。

【0023】 圖 2 為圖 1 之生物反應器系統的例示控制器示意圖，及其個別輸入和輸出。

【0024】 圖 3 為一根據本揭示文之例示方法的流程圖。

【0025】 圖 4 為比較一批第 37 天時灌注生物反應器中所測的活細胞濃度與一批第 6 天時饋料批式生物反應器中活細胞濃度之圖式。

【0026】 圖5為顯示有關圖4所描述之灌注生物反應器和饋料批式生物反應器間隨時間變化的正常化單位細胞生產率之圖式。

【0027】 圖6為顯示未控制活細胞濃度和葡萄糖之灌注生物反應器中隨時間變化的活細胞濃度之圖式。

【0028】 圖7為顯示圖6中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的葡萄糖濃度之圖式。

【0029】 圖8為顯示圖6中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的細胞存活率之圖式。

【0030】 圖9為顯示控制活細胞濃度之灌注生物反應器中隨時間變化的活細胞濃度之圖式。

【0031】 圖10為顯示圖9中所述之灌注生物反應器中穩定狀態的細胞存活率之圖式。

【0032】 圖11為顯示圖9中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的正常化蛋白生產(效價)之圖式。

【0033】 圖12為顯示圖9中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的葡萄糖濃度之圖式。

【0034】 圖13為比較灌注生物反應器和饋料批式生物反應器之活細胞濃度之圖式。

【0035】 圖14為比較圖13中所述之生物反應器中達到的正常化蛋白生產(效價)之圖式。

【0036】 圖15為顯示使用拉曼探針控制活細胞濃度之灌注生物反應器隨時間變化的活細胞濃度之圖式。

【0037】 圖16為顯示圖15中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的細胞存活率之圖式。

【0038】 圖17為顯示圖15中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的正常化蛋白生產(效價)之圖式。

【0039】 圖18為顯示圖15中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的葡萄糖濃度之圖式。

【0040】 圖 19 為顯示使用拉曼探針控制活細胞濃度之灌注生物反應器中隨時間變化的活細胞濃度之圖式。

【0041】 圖 20 為顯示圖 19 中所述之灌注生物反應器中隨時間變化的正常化蛋白生產(效價)之圖式。

【0042】 圖 21 為顯示使用拉曼探針控制活細胞濃度之灌注生物反應器中隨時間變化的活細胞濃度之圖式。

【0043】 再次，文中有許多描述和說明的實施例。本揭示文並非限制於任何單一態樣及其實施例，亦非限制於此等態樣及/或實施例的任何組合及/或排列。本揭示文的各態樣及/或其實施例，可單獨或與一或多個本揭示文之其他態樣及/或其實施例組合應用。為了簡潔起見，文中並未個別論述許多的該等排列和組合。

【0044】 請注意，為了簡單和清楚說明，特定的圖示態樣係描繪各種實施例之一般結構及/或建構方式。熟知的特徵及技術之說明和詳情可能省略以避免不必要掩蓋其他特徵。圖式中的元件並不一定按照比例；某些特徵之尺寸相對於其他元件可能誇大，用以增進對示例實施例的了解。例如，本項技術之一般技術者應了解，剖視圖並非按照比例且不應視為代表不同組件間的比例關係。剖視圖係提供用來幫助說明所述組合體之各種組件，及顯示彼此的相對位置。

【實施方式】

【0045】 現在可詳細參照本揭示文之實例，其係以伴隨的圖式加以說明。當可能時，相同的參照編號將可用於全部的圖式，用來指出相同或類似的部件。在下列論述中，相關術語，例如「約」、「實質上」、「大約」等係用來指所述數值之可能的 $\pm 10\%$ 變化。再者，在申請專利範圍中，數值、限制及/或範圍係指數值、限制及/或範圍 $\pm 10\%$ 。

【0046】 術語「導管」係指渠道、管道、接頭、通道，經由該管可讓液體通過。在一實例中，導管可包括 Watson-Marlow 公司的 Bioprene 熱塑管。

【0047】 「批式培養」或「批次模式」係指一充滿細胞之單位(例如培養容器)及從未換過的最初細胞培養基之工作容積。在此一批式培養中，用於細胞培養的所有組份係在培養程序開始時供應至培養容器中。此培養可進行直到營養素耗盡或廢料產物達到有毒之程度，觸發細胞凋亡。

【0048】 「饋料批式細胞培養」或「饋料批式培養」係指一批細胞培養，其中動物細胞和培養基係在最初供應至培養容器中，並在培養終了前有或無週期性細胞及/或產物收獲下，於培養期間以連續或離散單次添加供給另外的培養營養素至培養中。饋料批式細胞培養包括「半連續饋料批式細胞培養」其中係週期性移出整個細胞培養物(可包括細胞和培養基)並置換新鮮的培養基。饋料批式培養與簡單「批式培養」之差別為在培養期間添加(或移出)組份至容器中。饋料批式培養與灌注培養之進一步區別為培養基在饋料批件作業期間並未交換，而在灌注培養中，所有或某些細胞係藉由使用過濾器或細胞滯留裝置保留在培養中，且培養基係連續或間歇性供給，而抑制生長的副產物係持續地或週期性從培養容器中移出。在一饋料批式作業中，其有別於灌注作業，該培養係持續直到決定最大或另外決定的工作容積及/或達到蛋白生產，然後收取饋料批式培養產物。

【0049】 亦考量將灌注培養作為一種生產感興趣蛋白之方法用於本揭示文之方法中。用於生產感興趣蛋白或抗體之灌注細胞培養法已為本項技術之一般技術者所知。

【0050】 術語「細胞」係包括適合表現重組核酸序列之任何細胞。細胞係包括原核生物和真核生物之細胞。真核細胞包括(但不限於)酵母菌和所有哺乳動物細胞(人類和非人類)，以及細胞融合，例如雜交瘤和四源雜交瘤。在特定的實施例中，此細胞為人類、猴子、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在其他的實施例中，此細胞係由下列細胞中選出：CHO(例如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS(例如 COS-7)、視網膜細胞、淋巴細胞、Vero、CV1、腎(例如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、腫瘤細胞和衍生自前述細胞之細胞株。在某些實施例中，此細胞包

括一或多個病毒基因，例如表現病毒基因的視網膜細胞(例如 PER.C6®細胞)。在某些實施例中，此細胞為 CHO 細胞。在其他的實施例中，此細胞為 CHO K1 細胞。

【0051】 「細胞株」係指衍生自特定世系經由細胞之連續繼代培養或次培養的細胞。術語「細胞」可與「細胞群族」交換使用。

【0052】 有鑑於目前新進技術給料策略，CHO 細胞已達到例如大於 10×10^6 個細胞/mL 的細胞數(大約 1 週後)及例如 > 2 g/L 人類 IgG 的效價(在大約 2 週後收取)，CHO 細胞饋料批式培養之典型的工業價值數目。參見 Kim, B J, et al., *Biotechnol Bioeng.* 2012 January; 109(1):137-45。甚至已有報告提出從已完整確立為重要工業哺乳動物細胞株之 CHO 細胞製造大於 10 g/L 的抗體。參見 Omasa 等人, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11: 233-240。

【0053】 術語「細胞培養基」和「培養基」係指用於生長哺乳動物細胞之營養素溶液，其典型地係提供必須營養素用以增進細胞生長，例如碳水化合物能量來源、必須胺基酸、微量元素、維生素等。細胞培養基可含有萃取物，例如血清或蛋白腴(水解物)，其係供應支持細胞生長的原料。培養基可含有酵母菌-衍生性 or 大豆萃取物取代動物衍生性萃取物。化學性界定培養基係指其中已知曉所有化學組份之細胞培養基。化學性界定培養基整體整體並無動物衍生性組份，例如血清或動物衍生性蛋白腴。培養基亦可為無蛋白質的。「新鮮培養基」為尚未導入到細胞培養中及/或尚未被細胞培養之細胞所利用之培養基。新鮮培養基一般可能包括高營養素含量和極少至無廢棄產物。「用過的培養基」可指已被細胞培養中的細胞所使用之培養基，且一般可能包括比新鮮培養基中存在的量更低的營養素含量(因營養素已被細胞培養中的細胞所利用)及更高的廢棄物含量。

【0054】 在一灌注生物培養器中，培養基可連續從細胞培養中移出並以新鮮的培養基置換。在消除廢棄產物時固定的添加新鮮培養可提供細胞培養中的細胞所需要的營養素，達到高細胞濃度。不同於批式或饋料批式培養期間持續改變條件，此灌注法提供了達到及維持穩態的培養之工具。典型地，大約每天交換 1 個培養容積且在灌注法中所達到細胞濃度典型地

為批式或饋料批式培養高峰時所達到的二至十倍以上。置換營養素及/或移出凋亡細胞能讓細胞存活率長期維持在穩定狀態。在一穩態的生產中，此批次早期所生產的蛋白(或其他感興趣組份)品質屬性可能實質上與此批次晚期所生產的蛋白(或其他感興趣組份)品質屬性相同。可以各種後轉譯修飾，例如糖型、帶電異質性、聚集作用和各種純度測量值為基準來評估蛋白。在饋料批式反應器中無法達到實質相同的蛋白品質，因為在該等反應器中細胞培養條件係不斷地改變。

【0055】 生物反應器中的培養條件能使細胞培養在提供一致性蛋白物質的目標下產生感興趣蛋白(POI)。在某些細胞培養的培養條件下，可從至少下列組成之群中選擇一或多個程序參數：營養素濃度，例如葡萄糖濃度、麩胺酸濃度和麩醯胺酸濃度；氨濃度；乳酸濃度；總細胞密度；活細胞密度；和蛋白屬性。

【0056】 生物反應器法得以設定對各種組成份之流量的控制，例如進出生物反應器之培養基(包括，例如營養素)、蛋白和細胞。生物反應器法包括使用第一輸出導管以第一特定流量從細胞培養移出無細胞之用過的培養基。此方法包括使用第二輸出導管以第二特定流量從細胞培養移出細胞。此方法包括使用輸入導管以第三特定流量將新鮮的培養基或營養素或二者導入細胞培養中。一或多個第一、第二和第三特定流量係以生物反應器的拉曼探針測量值為基準來調整。一或多個第一、第二和第三特定流量係以生物反應器的拉曼探針測量值為基準來調整，用以將一或多項程序參數維持在預定的範圍內。第一、第二和第三特定流量係以生物反應器的 RAMAN 探針測量值為基準來調整，用以將輸入導管的第三特定流量和各輸出導管的第一及第二特定流量維持在個別的預定範圍內。

【0057】 各移出的無細胞之用過培養基、移出的細胞和導入的新鮮培養基或營養素或二者，係藉由個別的泵浦來控制。生物反應器包括配置用來保留細胞並讓液體通過的過濾器。

【0058】 本揭示文之方法和系統，除了其他理由外，包括控制生物反應器的重量及其內容物之方法，應用一致的生產程序。此方法包括測量包含細胞培養內容物之生物反應器的重量。在另一實施例中，此方法係應用

結合控制如上述連接上文導管之流量，控制生物反應器的重量。此方法包括測量含細胞培養內容物之生物反應器重量，其中一或多個第一、第二和第三特定流量以所測量的重量為基準來調整。第一、第二和第三特定流量係以所測量的重量為基準來調整，用以將輸入導管的第三特定流量和各輸出導管的第一及第二特定流量維持在個別的預定範圍內。第一、第二和第三特定流量係經調整，用以將細胞培養和生物反應器的重量維持在預定範圍內。藉由拉曼探針測量生物反應器內的細胞培養之程序參數(PP)係每小時至少進行一次。此方法係配置用來將細胞培養以穩定狀態維持在每毫升(mL)至少約 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時至少約 30 天。此生物反應器具有至少 10L 的體積，且此方法係配置為將生物反應器和細胞培養的重量維持在 20 g 範圍內。此生物反應器具有至少 10L 的體積，且此方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的生物反應器重量之 0.1 百分比。當程序參數偏離個別所欲範圍內的設定值時，係調整一或多個移出的無細胞之用過培養基、移出的細胞和導入的新鮮培養基或營養素或二者，以降低此偏離。例如，每天至少經由第一輸出導管移出二個生物反應器容積的用過培養基，或每天至高經由第一輸出導管移出三個生物反應器容積的用過培養基。

【0059】 一或多項程序參數亦包括細胞培養的溫度和細胞培養的 pH，而溫度係維持在 35 至 36°C 之間，pH 係維持在 6.85 至 7.15 之間。在其他的實施例中，pH 係維持在約 6.50 至約 7.50 之間，從約 6.60 至約 7.40，從約 6.70 至約 7.40，從約 6.80 至約 7.30，從約 6.90 至約 7.20，從約 7.00 至約 7.10，約 6.50，約 6.55，約 6.60，約 6.65，約 6.70，約 6.75，約 6.80，約 6.85，約 6.90，約 6.95，約 7.00，約 7.05，約 7.10，約 7.15，約 7.20，約 7.25，約 7.30，約 7.35，約 7.40，約 7.45 或約 7.50。

【0060】 一或多項程序參數係包括細胞單位生產率，且該方法係配置為將細胞培養內的細胞維持在至少 15-25 pg/細胞/天之細胞單位生產率歷時至少 25-37 天。

【0061】 一或多項程序參數係包括葡萄糖濃度，且該方法係配置用來將葡萄糖濃度維持在約 5 mM 至約 85 mM 之間，或 1 g/L 至約 15.5 g/L。

【0062】 一或多項程序參數係包括乳酸濃度，且該方法係配置用來將乳酸濃度維持在低於約 60 mM，或低於約 6 g/L。

【0063】 一或多項程序參數係包括氨濃度，且該方法係配置用來將氨濃度維持在低於約 15 mM。

【0064】 術語「穩定狀態」係指將係細胞培養中的營養素濃度、程序參數或品質屬性維持在不變、恆定或安定程度。請了解，不變、恆定或安定程度係指在預定設定點或預定設定範圍內之程度。因此，設定點及穩定狀態程度在操作者操作之生產細胞培養期間內可能會改變。設定點或穩定狀態程度亦可包括數值的設定範圍或閾值。

【0065】 術語「預定」可指量或設定點，其數值為固定的或由使用者或控制者根據一或多個演算法手動計算。

【0066】 在整個製造特定治療蛋白產品之製程中，須控制的產品屬性或蛋白品質屬性可以其潛在的品質影響，特別是臨床影響為基礎來鑑別。相關的蛋白品質屬性可能影響純度、安全性及/或效用。品質屬性係指所生產的藥物產品之物理、化學、生物或微生物性質或特徵，其應在適當的限制、範圍或分佈內，以確保所欲的產品(蛋白)品質。參見，例如 International Council for Harmonization (ICH) Q8 (R2) *Pharmaceutical Development* (ICH, August 2009)。蛋白產品的品質屬性可包括(但不限於)高分子量種類、聚集物、帶電變體、外觀、顏色、pH、效力、後轉譯修飾(多糖含量和分佈)、導電性、等電點、電荷異質性、雙硫鍵重組、游離半胱胺酸、宿主細胞蛋白，且可視為對產品品質具有高影響之屬性。就製造作業期間操作可靠度和一致性，在生產培養期間特定的程序參數可控制在適當的限制、範圍或分佈內。程序參數可包括最初的細胞密度、最初的細胞存活率、最終的細胞存活率、總蛋白(效價)、活細胞數(VCC)、營養素濃度(葡萄糖、磷酸鹽、胺基酸等)、氨、pH、乳酸和更多。在製造作業期間對特定程序參數敏感的藥物產品可能造成蛋白屬性改變超過或低於該特定屬性之閾值，且因此需要適當的控制。因此，程序參數亦包括其變異性可能對任何上列之品質屬性具有大於或等於定義閾值之影響的程序參數，且因此應加以監測或控制以確保該製程生產出所欲品質之物質。

【0067】 術語「細胞單位生產率(cell specific productivity)」、「細胞單位比率(cell specific rate)」及其類似詞語係指單位，例如每個細胞或每個計量單位之細胞質量或體積之產物表現率。細胞單位生產率係以，例如每個細胞每天所生產的蛋白克數來測量。

【0068】 生物反應器系統 1 可包括生物反應槽 10、饋料儲槽 28、給料泵浦、排出泵浦和收穫泵浦。生物反應器系統生物反應器系統 1 亦可包括一 ATF 泵浦 70、排放槽 80 和收穫槽 90。泵浦 30、40、50 和 70 可操作上連結一控制器 200。在某些實施例中，然而，ATF 泵浦 70 可連結和由分開的控制器 102 控制。

【0069】 生物反應槽 10 可為大小符合許多操作規模的缸盆、桶、器皿、燒瓶或其他適合的容器。例如，生物反應槽 10 的容積可從約 1L 至約 20,000L，從約 5L 至約 10,000L，從約 10L 至約 1,000L，從約 20 L 至約 100L，約 50L，至少約 1L，至少約 10L，至少約 50L，至少約 100L，至少約 200L，至少約 500L，至少約 1,000L，至少約 10,000L，低於約 20,000L，低於約 10,000L，低於約 1,000L，低於約 500L，低於約 200L，或低於約 100L。在其他的實施例中，生物反應槽 10 具有至少 2L，至少 3L，至少 10L，至少 35L，或至少 50L 或更大的容積。生物反應槽 10 可為金屬(例如鋼或不銹鋼)、金屬合金、玻璃及/或聚合物(例如拋棄式、單次使用生物反應器)所製造。

【0070】 泵浦 30、40 和 50 可包括任何適合的泵浦，例如蠕動泵、隔膜泵、活塞泵、機動泵或類似泵浦。在一實例中，泵浦 30、40 和 50 彼此實質上可為相同的。在另外的實例中，一或多個泵浦 30、40 和 50 相互可為不同的。又在另外的實例中，泵浦 70 可與任一泵浦 30、40 和 50 為相同。饋料儲槽 28 可包括任何適合用於生物反應槽 10 之營養素饋料來源，且營養素饋料可經由給料泵浦 30 經由適合的導管導向生物反應槽 10。營養素饋料(生長培養基)可包括碳源(例如葡萄糖)、水、鹽、胺基酸來源及/或其他營養素。

【0071】 罩蓋 12 可覆蓋生物反應槽 10 的頂端，及各種組件和儀器可通過罩蓋 12 延伸至生物反應槽 10 的內部。例如，充氣器 14、攪拌器 16、RAMAN 探針 18、導管 20 和導管 22 可延伸通過罩蓋 12。然而，希望任何

或所有的充氣器 14、攪拌器 16、RAMAN 探針 18、導管 20 和導管 22 可以任何其他適合的方式操作上連結生物反應槽 10，例如經由生物反應槽 10 的側面。

【0072】 充氣器 14 可為噴灑器，係配置用來提供氧氣及/或其他氣體給生物反應槽 10 內的細胞培養。充氣器 14 可與氧氣或其他氣體來源連結，且可將氣體導入細胞培養中，使得氣體通入細胞培養中，藉此使細胞培養充氣。在某些實例中，微型充氣器可與鑽孔管式充氣器組合使用。

【0073】 攪拌器 16 可為配置用來混合生物反應槽 10 內的細胞培養物之任何適合的攪拌器。攪拌器 16 可為藉由機器及/或磁力機制之頂部驅動或底部驅動。在某些情況下底部驅動的攪拌器為所希望的，因為其可空出罩蓋 12 的上方空間放置感測儀器，例如溫度、pH、溶氧、泡沫、二氧化碳和其他感測器，以及用於酸、鹼、新鮮培養基入口和出口。攪拌器 16 可包括輻射式攪拌器、軸流式攪拌器、拉西頓式攪拌器、折葉式攪拌器、螺槳攪拌器或其類似物。

【0074】 拉曼探針 18 可為，例如，不銹鋼箱中的光纖拉曼探針，並具有一透明，例如藍寶石或玻璃窗口。拉曼探針 18 可配置用於進行細胞培養物 2 之拉曼取樣。拉曼探針 18 可配置用來放射單色光源(例如至少於 785 nm 或另外適合的波長)於細胞培養物 2 上並從細胞培養物 2 偵測發散光。

【0075】 拉曼光譜為一種振動光譜形式，其係提供有關分子振動的資訊，可藉由插入一原位拉曼探針供樣本辨識及定量來使用。在某些實施例中，監測程序變數係使用原位拉曼光譜來進行。原位拉曼分析為一種在其原來的位置分析樣本的方法，在拉曼光譜儀中不需要提取一部分的樣本來進行分析。原位拉曼分析為有利的，其中拉曼光譜分析儀為非侵入性，其降低了污染的風險，且為非破壞性對細胞培養活性或蛋白品質無影響。原位拉曼分析可提供細胞培養中一或多項程序變數之即時評估。拉曼探針的製造商包括，但不限於 tech5usa、Anton Paar、InPhotonics、Kaiser Optical Systems, Inc.及 FiberTech Optica。

【0076】 生物反應槽 10 可連結在其中具有中空纖維過濾器之過濾系統 100。中空過濾膜(例如聚砜)可包括一或多個具有從約 0.3 mm 至約 6.0 mm，

從約 0.5 mm 至約 3.0 mm，從約 0.5 mm 至約 2.0 mm，大於約 0.3 mm，大於約 0.5 mm，低於約 6.0 mm，低於約 3.0 mm，或低於約 2.0 mm 之內徑的管狀膜。膜中的網狀物質可經選擇使得網中的孔洞大小接近細胞培養 2 中的細胞徑長，幫助確實保留高量細胞同時讓細胞碎片和用過的培養基通過該過濾器。在一實例中，雖然亦可涵蓋其他適合的範圍和數值，但網孔大小係從約 0.2 μm 至約 30 μm 。蛋白或其他感興趣的生物產物，以過濾器的孔徑大小(例如 0.2 μm 或 50 kD)為基礎，可經灌注或保留。

【0077】 來自生物反應槽 10 之液流可經由導管 20 和泵浦 70 遞送到過濾系統 100。泵浦 70 可為雙向的能讓液流從過濾系統 100 流回生物反應槽 10。過濾系統 100 可在交替切向流之下操作。在一實例中，交替切向流可指與(例如正切的)中空纖維的膜表面方向相同的液流，其係向後或向前流，且有另一液流方向實質上係與該過濾器表面垂直。交替切向流可使用一泵浦(例如泵浦 70)來進行，使細胞培養物流通到包括中空纖維和另一泵浦(例如泵浦 50)之過濾器模組中，用以在過濾器分離之前移出具有較低細胞密度的液體。交替切向流可幫助防止其他細胞滯留機制中典型的結垢和切斷問題。

【0078】 另一種選擇，可利用其他過濾機制(包括膜過濾機制)，例如超過濾、微量過濾和切向流過濾。

【0079】 排出泵浦 40 可配置為從生物反應槽 10 經由導管 22 移出細胞。導管 22 可為一液浸管，其係經挑選用以避免細胞聚集及堵塞(其，例如若導管 22 相對於培養物 2 的黏度為太狹窄時，可能會產生)。導管 22 可包括熱塑彈性管(例如 bioprene)。排出泵浦 40 可經由，例如處理器 200 來控制。經由排出泵浦 40 排出細胞可從生物反應槽 10 內的細胞培養 2 移出細胞。細胞排出率(藉由排出泵浦 40 和控制器 200 的輸出來控制)可以細胞培養 2 中的細胞生長率來決定。為了維持細胞培養 2 中穩定的細胞密度，可能希望具有大約或實質上彼此相等的排出率和細胞生長率。在某些實例中，若有顯著的細胞量從含有價值產物之細胞排出移出，則可收集排出物並處理以回收產物。

【0080】 生物反應槽 10 可置於配置用來測量生物反應槽 10 和細胞培養 2 之重量的秤 110 上。秤 110 可與控制器 200 相連結，且可連續將生物反應槽 10 和細胞培養 2 的重量傳送到控制器 200。在某些實施例中，至少一部份的過濾系統 100，包括過濾器外罩和其內的中空膜過濾器，亦可置於秤 110 上。秤 110 可為配置用來測量置於秤上之組份重量之任何適合的秤或測力器(load cell)。

【0081】 有關圖 1 和 2，控制器 200 可配置用來接收來自拉曼探針 10、秤 110 和其他感測器之數據，且可配置用來以該數據為基準，控制液體流經一或多個給料泵浦 30、排出泵浦 40 和收穫泵浦 50 之比率。

【0082】 控制器 200 可配置用來接收來自拉曼探針 18 之原始光譜數據，用以測定程序參數，例如葡萄糖濃度、麩胺酸濃度、麩醯胺酸濃度、氨濃度、乳酸濃度、總細胞密度、效價和活細胞密度。控制器 200 可使用這些測定的程序參數來建立回饋迴路，用以調整一或多個流經給料泵浦 30、排出泵浦 40 和收穫泵浦 50 之液流。亦即，控制器 200 可建立一或多個葡萄糖濃度(例如，從約 5 mM 至約 85 mM，或從約 0.5 g/L 至約 15.5 g/L，從約 1 g/L 至約 15.5 g/L，從約 0.5 g/L 至約 8 g/L，從約 2 g/L 至約 6 g/L，或從約 3 g/L 至約 5 g/L)、麩胺酸濃度(例如，低於約 8 mM，低於約 7 mM，低於約 6 mM，低於約 5 mM，或低於約 4 mM)、麩醯胺酸濃度(例如，低於約 5 mM，低於約 4 mM，低於約 3 mM，低於約 2 mM，或低於約 1 mM)、胺濃度(例如，低於約 15 mM，低於約 12 mM，低於約 10 mM，低於約 9 mM，低於約 8 mM，低於約 7 mM，低於約 6 mM)、乳酸濃度(例如，低於約 6 g/L，低於約 5 g/L，低於約 4 g/L，低於約 3 g/L，低於約 2 g/L，或低於約 1 g/L)、總細胞密度(例如，大於約 30 MM，大於約 35 MM，大於約 40 MM，大於約 45 MM，大於約 50 MM，大於約 55 MM，大於約 60 MM，或大於約 65 MM)和活細胞密度(例如，每毫升至少 3 千萬個細胞，每毫升至少 3 千 5 百萬個細胞，每毫升至少 5 千萬個細胞，或每毫升至少 7 千 5 百萬個細胞)之設定點，並將所測定的值(以來自拉曼探針 18 之拉曼光譜為基準)與其個別的設定點相比較。

【0083】 控制器 200 可利用一負回饋迴路來校正任何設定值(或一設定範圍內的值)和測定值之間的差異。例如，當一測定的葡萄糖濃度大於設定的葡萄糖濃度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，降低給排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低葡萄糖濃度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的麩醯胺酸濃度大於設定的麩醯胺酸濃度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，降低給排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低麩醯胺酸濃度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的麩胺酸濃度大於設定的麩胺酸濃度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，降低給排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低麩胺酸濃度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的氨濃度大於設定的氨濃度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，增加排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低氨濃度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的乳酸濃度大於設定的乳酸濃度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，降低排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低乳酸濃度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的總細胞密度大於設定的總細胞密度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，增加排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低總細胞密度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。例如，當一測定的活細胞密度大於設定的活細胞密度，控制器 200 可，例如降低給料泵浦 30 的輸出，增加排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助降低活細胞密度；或控制器 200 可降低給料泵浦 30 之輸出和降低收穫泵浦 50 之輸出。

【0084】 例如，當測定的葡萄糖濃度低於設定的葡萄糖濃度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，增加給排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加葡萄糖濃度；或控制器 200 可增

加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當測定的麩醯胺酸濃度低於設定的麩醯胺酸濃度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，增加給排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加麩醯胺酸濃度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當測定的麩胺酸濃度低於設定的麩胺酸濃度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，增加給排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加麩胺酸濃度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當測定的乳酸濃度低於設定的乳酸濃度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，增加排出泵浦 40 的輸出，及/或降低收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加乳酸濃度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當測定的總細胞密度低於設定的總細胞密度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，降低排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加總細胞密度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。例如，當測定的活細胞密度低於設定的活細胞密度，控制器 200 可，例如增加給料泵浦 30 的輸出，降低排出泵浦 40 的輸出，及/或增加收穫泵浦 50 之輸出，以便於幫助增加活細胞密度；或控制器 200 可增加給料泵浦 30 之輸出和增加收穫泵浦 50 之輸出。

【0085】 然而，通過系統的總灌注係維持在一特定的設定量(灌注率將以反應器內的濃度為基準而不同)。控制器 200 可同樣地使用負回饋迴路控制生物反應器重量(和細胞培養 2 的重量)。

【0086】 應注意，添加或減少各種輸入反應器內的營養素可結合對應其他輸入的改變，以確保輸入反應器中的物質總質量及/或體積仍為相同的。亦即，因為灌注率維持恆定，營養素的增加，例如葡萄糖溶液、麩醯胺酸、麩胺酸等，可能伴隨最初營養素給料流之對應質量或體積下降。

【0087】 在一實施例中，此系統可包括至少二個回饋迴路-一個係用於重量控制而另一個係用於控制程序參數(例如 VCC、葡萄糖、麩醯胺酸、麩胺酸、氨、乳酸等)。在一實施例中，各種輸入和輸出泵浦並非由競爭迴路來控制。例如，灌注率可經設定(例如 20 L/天)，之後拉曼探針 18 測量一

或多個培養值，及以來自拉曼探針 18 的測量值為基準，進行控制器 200 評估步驟。若控制器 200 測定出，例如 VCC 太高，則控制器 200 可開始經由排出泵浦 40 移出細胞，而收穫泵浦 50 的流速可同時降低，使得通過系統的總體積仍為恆定的。當感測到其他的程序參數太高或太低時(例如葡萄糖、麩醯胺酸、麩胺酸、氨、乳酸和總細胞密度)，控制器 200 會如上述採取額外的步驟。

【0088】 可加入第二給料泵浦用以添加葡萄糖、乳糖、麩醯胺酸、麩胺酸等。在一替代的實施例中或另外的，可調整排出量，同樣藉由移出細胞來回應，增加氨。

【0089】 控制器 200 可配置在無頭電腦系統中(例如無監測器、鍵盤和滑鼠之系統)。因此，控制器 200 可位於伺服器內，其係經由網路連接或其某些連接，例如序列連接來控制。控制器 200 可複製在一或多個多餘的伺服器上，以防止一或多個伺服器失效。

【0090】 控制器 200 可配置用來應用卡爾曼濾波(Kalman filtering)，例如來自拉曼探針 18 之拉曼光譜數據的線性二次估算(LQE)。卡爾曼濾波可包括將一演算應用於光譜數據，其係於一段時間內使用一連串的測定，產生未知變數之估算，希望該估算比該等以單獨的單一測量為基礎之估算更精確。因此，所測定的程序參數可以過濾模型為基準。預期其他類型的濾波亦可為控制器 200 所用，用以處理來自拉曼探針 18 之光譜數據。

【0091】 控制器 200 可包括或可另外與 PI(過程資訊)儲庫結合。PI 儲庫(PI historian)可為帶有時間序列資料庫之應用，其可記錄來自程序控制系統的數據。PI 儲庫能讓使用者記錄、分析和監測即時的資訊。控制器 200 可將，例如來自秤 110 之重量數值、來自拉曼探針 18 之光譜數據和給料泵浦 30、排出泵浦 40 和收穫泵浦 50 之泵浦比率儲存在 PI 儲庫中。

【0092】 圖 3 係說明本揭示文之方法 300。方法 300 之一或多個步驟可不按順序來進行，同時與其他步驟一起進行，或一起省略。方法 300 可由步驟 302 開始，其中可組裝生物反應器系統 1，並在生物反應槽 10 內提供細胞培養物 2 及以細胞株培養。然後方法 300 可進行到步驟 304，其中細胞培養 2 的程序參數係在生物反應器內藉由拉曼探針 18 及/或藉由另外或其

他的感測器來測量。程序參數可包括由拉曼探針 18 得來的光譜數據所測定之任何前述參數。方法 300 可進行到步驟 306，其中生物反應槽 10 的重量(包括細胞培養 2 在內)係藉由秤 110 所測並提供給處理器 200。

【0093】 從步驟 306，方法 300 可進行到步驟 308，其中係藉由啟動泵浦 70 以第一特定比率從生物反應槽 10 經由導管 20 抽取細胞培養物(培養基加上細胞)，以及亦藉由啟動收獲泵浦 50 從過濾系統 100 抽取溶液，將細胞培養 2 之無細胞用過的培養基移出。從步驟 308，方法 300 可進行到步驟 310，其中可使用輸出導管 22 藉由排出泵浦 40 以第二特定比率從細胞培養中移出細胞。從步驟 310，方法 300 可進行到步驟 312，其中新鮮的培養基或營養素或二者可使用輸入導管和給料泵浦 30 以第三特定比率，以使得總輸入的培養基和營養素等於排出泵浦 40 和收獲泵浦 50 之組合輸出量的方式，導入到細胞培養中。特定的比率可為一設定比率或比率範圍，在該比率時泵浦係啟動及/或保持原狀。特定比率可藉由控制器 200 來測定。

【0094】 預期各步驟 302 至 312 可以任何順序進行，且在某些情況下，可即時經由多個由控制 200 所操縱的回饋迴路同時進行。

【0095】 步驟 308、310 和 312 可以步驟 304 中從拉曼探針 18 和步驟 304 從秤 110 所接收的數據為基準，藉由控制器 200 來控制。生物反應槽 10 的重量(加上包含在其內的細胞培養 2)可經由 PID(比例-積分-微分)迴路控制。另外，控制器 200 可配置用來分析從拉曼探針 18 所得到的拉曼光譜，用以測定一或多個程序參數，包括葡萄糖濃度、麩醯胺濃度酸、麩胺酸濃度、乳酸濃度、總細胞密度和活細胞密度。各個這些變數亦可藉由負回饋迴路來控制。

【0096】 本揭示文之實例可就現有的控制解決方案提供優雅、彈性和低廉的解決方案，且可能僅有極少的數據空缺。本揭示文之控制策略可展現一致的生物反應器量級控制。例如，使用本揭示文之控制系統，量級變動從 ± 0.5 L/天降至 ± 0.01 L/天。亦達到重量變動改善，例如從使用其他系統，例如容積校正之 5-10%的重量變動降至使用文中所揭示的控制系統之 0.1-0.5%誤差。此項改善可能至少係由於將系統從泵浦的容積校正變更到以重量和其他參數為基準的軟體控制版本。再者，本揭示文之控制系統

可充份整合程序資訊(PI)警告(例如,電子郵件提醒),並可遠端評估和關閉。再者,本揭示文之系統和方法可提供比先前系統和方法更可複驗的及更可靠的結果。

【0097】 實例 1 (圖 4 和 5)

【0098】 實例 1 中所述的實驗係比較灌注生物反應器與饋料批式生物反應器,並顯示在灌注生物反應器中比饋料批式生物反應器得到較高的活細胞濃度和細胞單位生產率。

【0099】 在一實驗中,使用細胞株和培養基以 15L 容量的生物反應器培養。生物反應器的設定點包括溫度(35.5°C),攪拌(250RPM),pH(使用 CO₂ 和碳酸氫鈉控制)(從 6.85 至 7.15)以及工作容積(11L)。將配置有 0.2 μm 中空纖維過濾器之 ATF4 細胞滯留裝置與生物反應器相連結。中空纖維過濾器係保留細胞但讓蛋白和營養素通過。每 24 小時讓二個反應器容積(或 22L 的培養基)通過過濾器。

【0100】 將生物反應器和 ATF 二者放置在秤上。經由乙太網路(Ethernet)連接一電腦運作控制軟體,傳送生物反應器、細胞培養和 ATF 的重量。將此重量與設定點相比(11.0 kg,例如生物反應器的工作容積),及以 PID 控制器(以 MATLAB 設計,但經由控制軟體 SynTQ 執行)測定是否與給料泵浦接合。收獲泵浦設定在與所欲灌注率相等之固定比率(每天二個反應器容積)。給料泵浦和灌注泵浦係使用傳送 OPC 訊號至 Kepware 伺服器之 SynTQ 軟體自動控制。Kepware 伺服器將此訊號通過乙太網路連接傳送到 MODBUS 類比輸出模組(Analog Output Module),其係將此數位值轉變為介於 4 至 20 mA 間的實質(physical)毫安培輸出。

【0101】 使用此系統,生物反應器重量可控制在最初 11 kg 重的 10 g 內(0.09%)。在此系統施行之前,在生物反應器中,不可能將生物反應器重量控制在超過 0.5 kg (4.54%)之內一整夜。在相同的系統內,使用 Kaiser 光學拉曼探針從細胞培養捕捉拉曼光譜。此控制器係利用先前批次中所發展的模型來預測細胞數、葡萄糖、乳酸、氨和其他營養素濃度。拉曼探針捕捉數千個不同的光譜,然後將其以電腦程式,例如 SIMCA 分析。使用多數個組成份分析,及特定參數的離線數據,此程式創造出一跨越所有探針讀

數的模型。然後將此 SIMCA 模型上傳至 SynTQ 並即時評估，每次該探針係採用一個讀數(例如每 15 min 至 45 min)。

【0102】 以拉曼探針控制各種營養素能得到較高的細胞株生產率，在長期的細胞培養中增加存活率，及增進蛋白多方面之品質。

【0103】 圖 4 係說明根據本揭示文之灌注生物反應器在一批次的第 37 天的最大活細胞濃度(顯示為“Ex.”1)，其約略為同樣大小的饋料批式生物反應器在一批件的第 7 天之最大活細胞濃度的 2 倍(Ex.2)。在第 37 天達到最大活細胞濃度之事實(而不是在灌注生物反應器的第 6 天)，顯示灌注生物反應器製程之穩健性和長壽性。

【0104】 圖 5 係顯示灌注批式製程(Ex.1)之第 12-25 天的細胞單位生產率(cSP)與饋料批式製程(Ex. 2)之第 1-12 天的 cSP。灌注批式法在第 25-37 天達到類似的生產率。

【0105】 每天需要三個反應器容積的灌注率使灌注批件中 VCC 增加超過 50×10^6 個細胞/mL，其可能在商業上於許多情況下為禁止的。

【0106】 使用「推低(push-to-low)」策略之培養基最佳化應能降低所需的灌注率。例如，細胞可生長至 20×10^6 個細胞/mL，並保持在穩定狀態。灌注率可設定在 2 個反應器容積/天持續 5 天。在第 5 天。灌注率可降至 1.5 個反應器容積/天。若細胞持續生存，則 5 天後灌注率可降至 1 個反應器容積/天。一旦細胞開始死亡，可使用胺基酸分析和其他分析來測定如何強化培養基，例如在培養基中補充營養素或調整營養素濃度。在一非限定實例中，此策略係描述於 Bayer 等人之“The Push to Low Approach for Optimization of High Density Perfusion Cultures of Animal Cells”, Adv. BioChem. Engin./Biotechnol. 2006, 101: 75-98 中。

【0107】 可得到 NOVA Flex 數據，其中分析樣本係採離線讀數。使用先前的 NOVA 數據，可建立一拉曼模型及，在此點，可將探針置入反應器中且該模型可每 15 至 45 分鐘，每秒、每分鐘、每 2 分鐘，每 3 分鐘，每 4 分鐘，每 5 分鐘，每 10 分鐘，每 15 分鐘，每 20 分鐘，每 25 分鐘，每 30 分鐘，每 35 分鐘，每 40 分鐘，每 45 分鐘，每 50 分鐘，每 55 分鐘，每小時，每 2 小時，每 3 小時，每 4 小時，每 5 小時，或每 6 小時提供 VCC

數據，取代每天一次需要像以 NOVA 人工取樣。圖 5 係顯示特定一回操作的第 20 天。使用該回操作的前 20 天收集 NOVA 數據，其係用來產生一拉曼模型供用於該回操作的後面部分。

【0108】 在下列實例中，下列為特定程序參數之一般範圍：pH：6.85-7.40，溶氧：30-60%、35-55%、40-50%或 45%，溫度：34-37.5 °C，及攪拌：在台上 150-300 RPM、175-275 RPM、200-250 RPM 或 225 RPM。

【0109】 實例 2 (圖 6-8)

【0110】 實例 2 中所述的實驗係顯示對 VCC 生長或葡萄糖不進行控制之灌注生物反應器的數據。觀察到 VCC 在第 7 天達到高峰因細胞快速生長到大量細胞密度，然後快速衰減到第 11 天因為其耗盡了培養基內的營養素(圖 6)。僅控制重量不足以達到穩態的 VCC。

【0111】 在灌注操作期間亦未控制葡萄糖。因為在灌注操作期間培養係依賴培養基中的葡萄糖供給細胞，此項後續導致了細胞在培養期間死亡。雖然持續的供給培養基，但因為生長，葡萄糖穩定地遞減(圖 7)。當監測細胞存活率時可看到，如圖 8 中所示，在第 10 天後偵查到大量的葡萄糖係由於細胞完全死亡而因此無葡萄糖消耗。

【0112】 在此實驗中，係以 15L 檯式生物培養器培養製造 mAb1 之特定濃度的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。將此細胞以特定的溶氧、溫度、攪拌和 pH 培養，其在操作期間係保持恆定。亦以灌注給料的形式，以每天 2 倍的反應器容積之比率，提供細胞新鮮的培養基和營養素。藉由於反應器中添加與使用 Repligen XCell ATF4 系統移出的灌注液相同量的饋料，保持反應器容積恆定。此項係藉由監測生物反應器系統的重量和使用電腦輔助回饋迴路控制系統使重量保持在特定目標重量的 0.05 kg 之內來達成。在此灌注生產操作期間並未提供拉曼控制和排出控制來控制 VCC 或任何其他生物反應器參數。

【0113】 在一類似的實驗中(未描繪於圖式中)，其中流量亦設定為每天二個生物反應器的培養基給料，並未監測重量，所以無法適當地控制泵浦變異。

【0114】 在此類似的灌注實驗中，給料泵浦和灌注液泵浦係設定為相同流量(以泵浦的容積校正來測定)。此方法無法提供彼此相配之足夠精確的流量，且隔夜(例如，一段時間未積極監測生物反應)，給料泵浦添加了多於灌注泵浦能移出的培養基到反應器中。此舉造成的反應器溢滿及後續流失培養物。

【0115】 實例 3 (圖 9-12)

【0116】 實例 3 中所述的實驗係顯示具有 VCC 控制之灌注生物反應器。VCC 控制(圖 9)使得存活率(圖 10)、蛋白生產(圖 11)和營養素(圖 12)持續穩定。

【0117】 在此實驗中，係以 15L 檯式生物培養器培養製造 mAb2 之特定濃度的 CHO 細胞。將此細胞係以在操作期間保持恆定的特定溶氧、溫度、攪拌和 pH 培養。亦以灌注給料的形式，以每天 2 倍的反應器容積之比率，提供細胞新鮮的培養基和營養素。藉由於反應器中添加與使用 ATF4 系統移出的灌注液相同量的饋料，保持反應器容積恆定。此項係藉由監測系統的重量和使用電腦控制系統使重量保持在特定目標重量的 ± 0.05 kg 之內來達成。在此操作期間並未使用拉曼控制，且泵浦的排出比率係在 VCC 取樣後以人工設定。此製程需要多個樣本且一天必須調整排出比率多次。

【0118】 在灌注生產培養期間，以 42.5×10^6 個細胞/mL ($40-45 \times 10^6$ 個細胞/mL)之目標控制 VCC。因此，若 VCC 升高到目標以上，則增加排出比率，而若 VCC 落在目標以下，則降低排出比率。

【0119】 實例 4 (圖 13 和 14)

【0120】 本實例之實驗係比較灌注培養法(圖 14)與饋料批式培養法(圖 13)。相較於饋料批式培養法，就相同的蛋白於類似的條件下，灌注培養法能達到大約 4 倍細胞數(圖 13)。饋料批式培養法係在試驗性規模(pilot scale)下進行，而灌注實驗則以實驗室規模(bench scale)(15L)進行。攪拌和充氣策略係縮小規模至實驗室規模，攪拌係使用每單位體積能量法及充氣係以體積對體積匹配法。

【0121】 相較於饋料批式反應器內所產生的蛋白量，在相同的時間下，灌注培養法能產生 3.5 倍的蛋白量(圖 14)。

【0122】 灌注培養法係藉由提供一 15L 檯式生物反應器培養生產 mAb2 之特定濃度的 CHO 細胞來進行(Ex.5 和 7)。此細胞係以在操作期間保持恆定的特定溶氧、溫度、攪拌和 pH 培養。亦以灌注給料的形式，以每天 2 倍的反應器容積之比率，提供細胞新鮮的培養基和營養素。相較於先前的實驗，在此回操作中培養基係補充遞增濃度的重要營養素，使得細胞能在灌注運作期間推高細胞密度。藉由使用重量控制系統將反應器體積保持恆定，將重量維持在特定目標的 0.05 kg 內。在此灌注生產操作期間並未提供拉曼控制和排出控制。

【0123】 饋料批式細胞培養法(Ex.6 和 8)係於類似的條件(溶氧、溫度、攪拌和 pH)下進行。

【0124】 實例 5 (圖 15-18)

【0125】 圖 15-18 中所述的實驗係顯示有關此灌注系統之活性、葡萄糖和效價以及 VCC 維持在穩定狀態長達 30 天以上的有利結果(參見，例如圖 15-18)。

【0126】 具有拉曼、排出和重量控制之灌注培養法係藉由提供一 15L 檯式生物反應器培養生產 mAb2 之特定濃度的 CHO 細胞來進行。此細胞係以在操作期間保持恆定的特定溶氧、溫度、攪拌和 pH 範圍培養。亦以灌注給料的形式，以每天 2 倍的反應器容積之比率，提供細胞新鮮的培養基和營養素。亦以灌注給料的形式，以每天 2 倍的反應器容積之比率，提供細胞新鮮的培養基和營養素。在此回操作中培養基係補充遞增濃度的重要營養素(相較於實例 2 和 3)，使得細胞能推高細胞密度。藉由使用重量控制系統添加與使用 ATF4 系統移出的灌注液相同量的饋料，保持反應器容積恆定，藉由監測系統重量和使用電腦回饋控制系統將重量維持在特定目標值的 \pm 0.05 kg。

【0127】 在此回操作中係使用以拉曼回饋為基準的拉曼控制和自動排出控制來控制 VCC(圖 15)。在一第一實驗中(Ex. 9)，拉曼排出策略係經設定，維持 40×10^6 個細胞/mL 之 VCC。VCC 的範圍為 $35-45 \times 10^6$ 個細胞/mL，其係些微比先前實驗中手動排出的目標值更廣(實例 3)。然而，此系統一天

僅採樣一次且在此次灌注作業中並不需要調整(相較於實例 3 中所述的一天多次調整以手動排出)。

【0128】 在一第二實驗中(Ex. 10)，條件係類似第一實驗，但 VCC 係設定在 10×10^6 個細胞/mL，每天 1 個反應器容積的灌注率。

【0129】 實例 6 (圖 19 和 20)

【0130】 在一實驗中，使用細胞株和培養基培養三個不同生物反應器。生物反應器的容量為：3L (Ex. 11)，15L (Ex. 12)及 50L (Ex. 13)(單次使用的生物反應器)。生物反應器設定點包括溫度(35.5°C)，攪拌(250RPM)，pH (使用 CO_2 和碳酸氫鈉控制)(從 6.85 至 7.15)以及工作容積(分別為 2L、10L、35L)。所有的這些參數在操作期間皆保持恆定。各生物反應器係連結一配置有 0.2 微米過濾器之細胞滯留裝置的 ATF(分別為 ATF2、ATF4、ATF6)。24 小時之後，中空纖維過濾器留住細胞但讓蛋白通過。

【0131】 灌注培養係在各系統中使用拉曼、排出和重量控制以全部三種規模來進行。如同實例 5，此實驗中的培養基係補充額外的營養素。各系統內的重量係控制在：ATF4 和 ATF6 中 $\pm 0.05 \text{ kg}$ ，及特定目標值 $\pm 1 \text{ kg}$ (由於規模本身的設備限制)。

【0132】 在此回操作中係使用以拉曼回饋為基準的拉曼控制和自動排出控制將 VCC(圖 19)設定為 40×10^6 個細胞/mL。在 50L ATF6 系統中觀察到拉曼探針的變異性，其為預期的，因為拉曼控制模型尚未針對較大規模進行最適化。

【0133】 在全部這三個操作中，灌注率係設定在 1.8 至 2 RV/天之間，且所有放大規模的參數係使用傳統方法來設定。

【0134】 此實驗的結果為：在全部三個系統中歷時 5 天的期間，達到相當的蛋白生產率(圖 20)。

【0135】 實例 7 (圖 21)

【0136】 在一實驗中，使用細胞株和培養基培養一單一生物反應器。生物反應器的容量為 15L(Ex.14)。生物反應器設定點包括溫度(35.5°C)，攪拌(250RPM)，pH (使用 CO_2 和碳酸氫鈉控制)(從 6.85 至 7.15)。所有的這些參數在操作期間皆保持恆定。生物反應器係連結配置有 0.2 微米過濾器之細

胞滯留裝置的 ATF4，。24 小時之後，中空纖維過濾器留住細胞但讓蛋白通過。

【0137】 灌注培養係在此系統中使用拉曼、排出和重量控制來進行。如同實例 5，此實驗中的培養基係補充額外的營養素。各系統內的重量係控制在：在 ATF4 中特定目標值之 ± 0.05 kg 。

【0138】 在此回操作中係使用以拉曼回饋為基準的拉曼控制和自動排出控制將 VCC(參見圖 21)設定為 70×10^6 個細胞/mL。

【0139】 在此回操作中灌注率係設定在 2.5 RV/天，用以補充培養中的額外細胞，並確保不會發生培養基耗盡。

【0140】 此反應器能在設備失效而造成該批次結束之前，將 VCC 維持在 70×10^6 個細胞/mL 以上歷時 7 天。在此期間，存活率係維持在 90% 以上，其顯示了健康的培養。在執行本揭示文之控制系統之前，此等高密度的持久性生產應是不可能的。

【0141】 請注意，有關文中「一實施例」係指與該實施例有關的所述特別內容、結構或特徵可包括、應用及/或併入一、一些或所有的本發明之實施例。在本說明書中使用或出現詞語「在一實施例中」或「在另外的實施例中」並非指相同的實施例，亦非個別或替代的實施例必須相互排除一或多個其他實施例，亦非限制在單一排除的實施例中。同樣適用於術語「施行」和「實例」。本揭示文不限於任何單一此等態樣及其實施例，亦不限於此等態樣及/或實施例之任何組合及/或排列。再者，本揭示文之各態樣，及/或其實施例可單獨或與一或多個本揭示文之其他態樣及/或其實施例組合應用。為了簡潔起見，文中並未個別論述及/或說明特定的排列和組合。

【0142】 另外，如上所示，文中描述為「例示的」之實施例或施行不應理解為較佳的或優於，例如，其他實施例或施行，而是希望反應或指出該(等)實施例為「例示的」實施例。

【符號說明】

2	細胞培養	
10		生物反應槽
12		罩蓋
14		充氣器
16		攪拌器
18		拉曼探針
20		導管
22		導管
28		饋料儲槽
30		給料泵浦
40		排出泵浦
50		收獲泵浦
70		ATF 泵浦
80		排放槽
90		收獲槽
100		過濾器
102		控制器
110		秤
200		控制器

【生物材料寄存】

無

【序列表】 (請換頁單獨記載)

無

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

灌注生物反應器及相關使用方法

PERFUSION BIOREACTOR AND RELATED METHODS OF USE

【中文】

一種控制生物反應器系統之方法係包括：提供生物反應器中的細胞培養，其中反應器中的條件能讓細胞培養產生感興趣蛋白(POI)，以拉曼拉曼(RAMAN)測量反應器內培養的程序參數(PPs)，其中該程序參數係選自由營養素濃度、活細胞濃度和蛋白屬性組成之群組，測量含細胞培養的生物反應器預定重量，使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培養基，使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞，及使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中。

【英文】

A method of controlling a bioreactor system includes providing a cell culture in a bioreactor, wherein conditions in the bioreactor enable the cell culture to produce a protein of interest (POI), measuring process parameters (PPs) of the culture within the bioreactor by RAMAN, wherein the process parameters are selected from the group consisting of nutrient concentration, viable cell concentration, and protein attributes, measuring a predetermined weight of the bioreactor with the cell culture, removing cell-free spent media from the cell culture using a first output conduit at a first specified rate, removing cells from the cell culture using a second output conduit at a second specified rate, and introducing one or both of fresh media or nutrients into the cell culture using an input conduit at a third specified rate.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

2	細胞培養
10	生物反應槽
12	罩蓋
14	充氣器
16	攪拌器
18	拉曼探針
20	導管
22	導管
28	饋料儲槽
30	給料泵浦
40	排出泵浦
50	收獲泵浦
70	ATF 泵浦
80	排放槽
90	收獲槽
100	過濾器
102	控制器
110	秤
200	控制器

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種控制生物反應器系統之方法，係包括：
提供生物反應器中的細胞培養，其中生物反應器中的條件能讓細胞培養產生感興趣蛋白(POI)，
以拉曼(RAMAN)探針測量生物反應器內細胞培養的一或多個程序參數(PP)，其中該程序參數係選自由營養素濃度、活細胞濃度和蛋白屬性組成之群組，
測量含細胞培養內容物的生物反應器重量，
使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培養基，
使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞，
使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中，且
其中該輸入和輸出導管係以拉曼探針測量值及生物反應器的重量測量為基準加以調整用以維持(i)一或多項程序參數在預定的範圍內，(ii)含細胞培養之生物反應器重量在預定的範圍內，及(iii)輸入導管的第三特定比率以及各輸出導管的第一和第二特定比率在其個別的預定範圍內。
2. 如請求項 1 之方法，其中以拉曼測量生物反應器內培養的一或多項程序參數係至少每小時進行一次。
3. 如前述請求項任一項中之方法，其中該方法係配置為將細胞培養以穩定狀態維持在每毫升(mL)至少約 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時 30 天。
4. 如前述請求項任一項中之方法，其中該生物反應器具有至少約 10L 之容積，而該方法係配置為將生物反應器和細胞培養之重量維持在 20 g 的範圍內。
5. 如前述請求項任一項中之方法，其中該生物反應器具有至少 10L 的容積，且該方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的生物反應器重量之 0.1 百分比內。

6. 如前述請求項任一項中之方法，其中，當程序參數偏離個別所欲範圍內的設定值時，則調整一或多個移出無細胞之培養基，移出細胞和導入新鮮培養基或營養素或二者，用以降低偏差。
7. 如前述請求項任一項中之方法，其中每天經由第一輸出導管移出至少二個生物反應器體積的用過培養基。
8. 如前述請求項任一項中之方法，其中每天經由第一輸出導管移出至高三個生物反應器體積的用過培養基。
9. 如前述請求項任一項中之方法，其中該程序參數包括細胞培養的溫度和細胞培養的 pH，且溫度係維持在約 35 至 36°C 之間，而 pH 係維持在 6.85 至 7.15 之間。
10. 如前述請求項任一項中之方法，其中該程序參數係包括細胞單位生產率，且該方法係配置為將細胞培養內的細胞維持在至少約 15-25 pg/細胞/天的細胞單位生產率歷時至少 25-37 天。
11. 如前述請求項任一項中之方法，其中該程序參數係包括葡萄糖濃度，且該方法係配置為將葡萄糖濃度維持在約 5 mM 至約 85 mM，或約 1 g/L 至約 15.5 g/L。
12. 如前述請求項任一項中之方法，其中該程序參數包括乳酸濃度，且該方法係配置為將乳酸濃度維持在低於約 60 mM，或低於約 6 g/L。
13. 如前述請求項任一項中之方法，其中該程序參數包括氨濃度，且該方法係配置為將氨濃度維持在低於約 15 mM。
14. 如前述請求項任一項中之方法，其中各移出無細胞之用過的培養基、移出細胞和導入新鮮培養基或營養素或二者係藉由個別的泵浦來控制。
15. 如前述請求項任一項中之方法，其中該生物反應器係包括配置用來保留細胞及讓液體通過的過濾器。
16. 一種控制生物反應器系統之方法，係包括
提供生物反應器中的細胞培養；
以拉曼探針測量生物反應器內細胞培養的一或多個程序參數；
使用第一輸出導管以第一特定比率從細胞培養移出無細胞之用過的培

養基；

使用第二輸出導管以第二特定比率從細胞培養移出細胞；

使用輸入導管以第三比率將新鮮培養基或營養素或二者導入細胞培養中；及

以拉曼探針的測量值為基準改變一或多項第一特定比率、第二特定比率和第三特定比率。

17. 一種生物反應器系統，係包括：
 - 具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；
 - 至少一泵浦；
 - 連結桶槽之過濾器；
 - 連接桶槽之拉曼探針；及
 - 連接至少一泵浦和拉曼探針之控制器，該控制器係配置為以拉曼探針的輸入值為基準，控制該至少一泵浦。
18. 如請求項 17 之生物反應器培養系統，其中該至少一輸出導管係包括用來連接第二泵浦之第一輸出導管，而該第二泵浦係配置用來控制從桶槽移出液體，以及用於連接第三泵浦的第二輸出導管，而該第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞。
19. 如請求項 17 或 18 之生物反應器培養系統，其中該過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽內並讓液體通過該過濾器。
20. 如請求項 17-19 任一項中之生物反應器培養系統，其中拉曼探針係配置在桶槽內。
21. 如請求項 17-20 任一項中之生物反應器培養系統，其中該控制器係與第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦相連結。
22. 如請求項 17-21 任一項中之生物反應器培養系統，進一步係包括秤，其係配置用來測量在桶槽內含細胞培養之桶槽的重量；其中該控制器係配置用來接收秤的重量數據。
23. 如請求項 22 之生物反應器培養系統，其中該控制器係配置用來比較桶槽的重量和設定點的重量，及以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多個輸出。

24. 如請求項 17-23 任一項中之生物反應器培養系統，其中該控制器係配置用來接收來自拉曼探針之光譜數據；以接收的光譜數據為基準，測定細胞培養的參數；將測定出的參數與設定點的參數相比較；及以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多個輸出。
25. 如請求項 24 之生物反應器培養系統，其中調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多個輸出係降低測出的參數和設定點參數之間的偏差，或接收的重量和設定點重量之間的偏差。
26. 如請求項 17-25 任一項中之生物反應器培養系統，其中該方法係配置用來將細胞培養以穩定狀態維持在至少每毫升 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時 30 天。
27. 如請求項 17-26 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽具有至少 10L 之容積，且該方法係配置為將含細胞培養的桶槽之重量維持在 20 g 範圍內。
28. 如請求項 17-27 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽具有至少 10L 之容積，且該方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的桶槽重量之 0.1 百分比。
29. 如請求項 28 之生物反應器培養系統，其中該控制器係配置用來：
以接收的光譜數據為基準，測定多數個生物反應器培養的參數；
將各多數個參數與各多數個參數的個別設定點比較；及
以該比較為基準，調整第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的一或多個輸出，用以降低測出的參數和個別設定值之間的偏差。
30. 如請求項 29 之生物反應器培養系統，其中該多數個參數係包括溫度、pH、營養素濃度、乳酸濃度、氨濃度和細胞單位生產率。
31. 如請求項 17-30 任一項中之生物反應器培養系統，其中該過濾器係配置用來保留細胞並讓液體通過。
32. 如請求項 17-31 任一項中之生物反應器培養系統，進一步係包括秤，其中該桶槽和過濾器係置於秤上。
33. 如請求項 17-31 任一項中之生物反應器培養系統，進一步係包括秤，其中該桶槽係置於秤上。

34. 如請求項 17-31 任一項中之生物反應器培養系統，進一步係包括秤，其中該桶槽係與該秤實體接觸。
35. 一種生物反應器培養系統，係包括：
具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；
至少一泵浦；
連結桶槽之過濾器；
接觸桶槽之秤；
連結桶槽之拉曼探針；及
與至少一泵浦、秤和拉曼探針連結之控制器，
該控制器係配置為以拉曼探針之輸入和秤的輸入為基準，控制該至少一泵浦。
36. 一種生物反應器培養系統，其係包括：
具有供連接第一泵浦之輸入導管、供連接第二泵浦之第一輸出導管，以及供連接第三泵浦之第三輸出導管的桶槽，而該第一泵浦係配置用來控制將液體遞送到桶槽，第二泵浦係配置用來控制從桶槽移出液體，第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞；
連結桶槽之過濾器，其中該過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽中並讓液體通過該過濾器；
配置用來測量桶槽內含有細胞培養之桶槽重量的秤；
配置在桶槽內的拉探針；及
連結第一泵浦、第二泵浦、第三泵浦、秤和拉曼探針之控制器，其中控制器係配置用來：
接收秤的重量數據；
將桶槽的重量與設定點的重量相比較；
接收來自拉曼探針的光譜數據；
以接收的光譜為基準測定細胞培養的參數；
將測定的參數與設定點的參數相比；及
以該比較為基準，調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量。

37. 如請求項 36 之生物反應器培養系統，其中調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量係降低所測之參數和設定點參數之間的偏差，或接收重量和設定點重量之間的偏差。
38. 如請求項 36 和 37 任一項中之生物反應器培養系統，其中該方法係配置為將細胞培養以穩定狀態維持在每毫升(mL)至少約 3 千萬個細胞之平均活細胞濃度歷時 30 天。
39. 如請求項 36-38 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽具有至少 10L 的容積，且該方法係配置為將含細胞培養的桶槽重量維持在 20g 範圍內。
40. 如請求項 36-39 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽具有至少 10L 的體積，且該方法係配置為將含細胞培養的生物反應器重量維持在最初含細胞培養的桶槽重量之 0.1 百分比內。
41. 如請求項 36-40 任一項中之生物反應器培養系統，其中該控制器係配置為：
以接收的光譜數據為基準，測定多數個生物反應器培養的參數；
將各多數個參數與各多數個參數的個別設定點比較；及
以該比較為基準，調整一或多個第一泵浦、第二泵浦和第三泵浦的流通量，用以降低測定參數和個別設定值之間的偏差。
42. 如請求項 41 之生物反應器培養系統，其中該多數個參數係包括溫度、pH、營養素濃度、乳酸濃度、氨濃度和細胞單位生產率。
43. 如請求項 36-42 任一項中之生物反應器培養系統，進一步係包括配置用來保留細胞並讓液體通過的過濾器。
44. 如請求項 43 之生物反應器培養系統，其中該桶槽和過濾器係置於秤上。
45. 如請求項 36-44 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽係置於秤上。
46. 如請求項 36-45 任一項中之生物反應器培養系統，其中該桶槽係實體與該秤接觸。

47. 一種生物反應器培養系統，係包括：
 - 具有輸入導管和至少一輸出導管之桶槽；
 - 至少一泵浦；
 - 連結桶槽之過濾器；
 - 連結桶槽之拉曼探針；及
 - 與至少一泵浦和拉曼探針連結之控制器，該控制器係配置為以拉曼探針之輸入為基準，控制該至少一泵浦。
48. 一種生物反應器培養系統，係包括：
 - 具有供連接第一泵浦之輸入導管、供連接第二泵浦之第一輸出導管，以及供連接第三泵浦之第二輸出導管的桶槽，而該第一泵浦係配置用來控制液體遞送到桶槽，第二泵浦係配置用來控制從桶槽移出液體，第三泵浦係配置用來控制從桶槽移出細胞；
 - 連結桶槽之過濾器，其中該過濾器係配置用來將細胞保留在桶槽中並讓液體通過過濾器；
 - 配置用來測量桶槽內含有細胞培養之桶槽重量的秤；
 - 配置在桶槽內的拉曼探針；及
 - 連結第一泵浦、第二泵浦、第三泵浦、秤之控制器。
49. 一種如本揭示文之圖 1 和 2 中所示之生物反應器系統。
50. 一種如本揭示文之圖 3 中所示之控制生物反應器系統的方法。

