



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104870629 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201380061624. 8

代理人 郑斌 顾晋伟

(22) 申请日 2013. 10. 25

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

13306462. 6 2013. 10. 23 EP

61/719, 027 2012. 10. 26 US

61/869, 111 2013. 08. 23 US

C12M 1/00(2006. 01)

C12M 1/34(2006. 01)

B01L 3/00(2006. 01)

C12M 1/04(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/066832 2013. 10. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/066774 EN 2014. 05. 01

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 赛诺菲公司

(72) 发明人 希琳·吴 拉吉夫·贾加·拉姆

霍斯特·布卢姆

米开朗基罗·坎佐内里

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

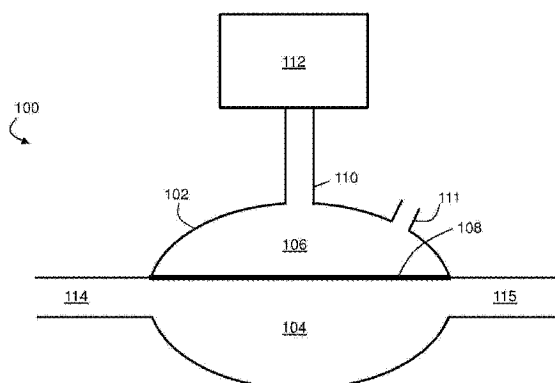
权利要求书3页 说明书21页 附图9页

(54) 发明名称

小容积反应器中二氧化碳水平和 pH 的控制

(57) 摘要

本发明总体上提供了控制小容积反应器腔室中溶解的二氧化碳 (CO_2) 浓度之水平和 / 或 pH 的策略及相关制品、系统和方法。在某些实施方案中,所述反应器腔室可被配置成包含至少一种生物细胞。



1. 生物反应器系统,其包含:

反应器腔室,其容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有缓冲剂和至少一种生物细胞的液体生长培养基以及在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间;

第一入口,所述第一入口连接二氧化碳气体源与所述气体顶部空间;以及

第二入口,所述第二入口连接碱性液体源与所述液体生长培养基。

2. 生物反应器系统,其包含:

反应器腔室,其容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有缓冲剂和至少一种生物细胞的液体生长培养基以及在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间;

第一入口,所述第一入口连接二氧化碳气体源与所述气体顶部空间;以及

反应器腔室中的传感器,其被配置成测定所述液体生长培养基中的二氧化碳浓度和 / 或 pH。

3. 权利要求 1 所述的生物反应器系统,其包含所述反应器腔室中的传感器,所述传感器被配置成测定所述液体生长培养基中的二氧化碳浓度。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述反应器腔室的长宽比小于约 10。

5. 权利要求 2 至 4 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述传感器与所述液体生长培养基直接接触。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述反应器腔室包含可移动壁。

7. 权利要求 6 所述的生物反应器系统,其中所述可移动壁将所述气体顶部空间与所述液体生长培养基隔开。

8. 权利要求 6 和 7 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述可移动壁对至少一种气体是可渗透的。

9. 权利要求 8 所述的生物反应器系统,其中所述气体是氧气和 / 或二氧化碳。

10. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞是真核细胞。

11. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞选自单细胞生物、植物细胞和动物细胞。

12. 权利要求 11 所述的生物反应器系统,其中所述单细胞生物是细菌、原生动物、锥虫、变形虫、酵母细胞或藻类。

13. 权利要求 1 至 10 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞来自多细胞生物。

14. 根据权利要求 1 至 10 和 13 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞是选自以下的哺乳动物细胞:灵长类细胞、牛细胞、马细胞、猪细胞、山羊细胞、狗细胞、猫细胞、啮齿动物细胞、人细胞和仓鼠细胞。

15. 权利要求 1 至 10 和 13 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞是心脏细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、软骨细胞、神经细胞、骨细胞、肌细胞、血细胞、内皮细胞、免疫细胞或干细胞。

16. 权利要求 1 至 15 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述生物细胞是基因工程细胞。

17. 权利要求 1 至 16 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述二氧化碳气体源包含基本上纯的二氧化碳。

18. 权利要求 1 和 3 至 17 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述碱性液体包含碳酸氢根离子。

19. 权利要求 1 和 3 至 18 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述碱性液体的 pH 大于或等于 7.5。

20. 要求 1 和 3 至 19 中任一项所述的生物反应器系统,其包含连接酸性材料源与所述液体生长培养基的第三入口。

21. 权利要求 20 所述的生物反应器系统,其中所述酸性材料的 pH 小于或等于 6.5。

22. 权利要求 1 至 21 中任一项所述的生物反应器系统,其中在所述液体培养基上方的二氧化碳的分压为约 0%至约 20%。

23. 权利要求 1 至 22 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述气体顶部空间的总压力为约 0 磅 / 平方英寸至约 15 磅 / 平方英寸。

24. 权利要求 1 至 23 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述气体顶部空间与所述液体生长培养基直接接触。

25. 权利要求 1 至 24 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述细胞包含中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

26. 权利要求 1 至 25 中任一项所述的生物反应器系统,其中所述反应器腔室被配置成包含体积等于或大于 10 微升并且小于约 50 毫升的所述液体培养基。

27. 运行生物反应器的方法,其包括:

提供反应器腔室,所述反应器腔室的容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有至少一种生物细胞的液体培养基及在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间;以及

运行所述反应器,使得所述顶部空间与所述液体培养基的主体之间的二氧化碳的 k_La 为至少约 0.1 小时^{-1} 并且小于约 15 小时^{-1} 。

28. 运行生物反应器的方法,其包括:

提供容积等于或小于约 50 毫升的反应器腔室,所述反应器腔室包含:

含有至少一种生物细胞的液体生长培养基,和

在所述液体培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间;

向所述气体顶部空间输送含有二氧化碳的气体;以及

向所述液体生长培养基输送碱性液体。

29. 权利要求 28 所述的方法,其包括运行所述反应器使得所述顶部空间与所述液体培养基的主体之间的二氧化碳的 k_La 为至少约 0.1 小时^{-1} 并且小于约 15 小时^{-1} 。

30. 权利要求 27 至 29 中任一项所述的方法,其包括向所述液体生长培养基输送酸性材料。

31. 权利要求 28 至 29 中任一项所述的方法,其中所述液体生长培养基的摩尔渗透压浓度在输送所述气体的步骤期间基本上是恒定的。

32. 权利要求 28 至 31 中任一项所述的方法,其中所述碱性液体包含碳酸氢根离子。

33. 根据权利要求 27 和 29 至 32 中任一项所述的方法,其中所述顶部空间与所述液体

培养基的主体之间的二氧化碳 k_La 小于或等于约 15 小时⁻¹。

34. 根据权利要求 27 至 33 中任一项所述的方法, 其中所述反应器腔室包含体积等于或大于 10 微升并且小于约 50 毫升的所述液体培养基。

小容积反应器中二氧化碳水平和 pH 的控制

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2012 年 10 月 26 日提交的标题为“Control of Carbon Dioxide Levels and pH in Small Volume Reactors”的美国临时专利申请序列 No. 61/719, 027、于 2013 年 8 月 23 日提交的标题为“Control of Carbon Dioxide Levels and pH in Small Volume Reactors”的美国临时专利申请序列 No. 61/869, 111 以及于 2013 年 10 月 23 日提交的标题为“Control of Carbon Dioxide Levels and pH in Small Volume Reactors”的欧洲申请 No. 13306462.6 的优先权, 其每一篇均通过引用整体并入本文用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明总体上描述了用于控制小容积反应器中二氧化碳水平和 pH 的系统和方法。

背景技术

[0004] 目前, 人们对开发用于使细胞生长例如用于生物制药的小容积生物反应器抱有很大兴趣。控制此类反应器中的二氧化碳水平和 pH 可能具有挑战性。对小规模生物反应器而言, 即使少量的酸、碱和 / 或二氧化碳也可以导致二氧化碳水平和 / 或 pH 发生大的相对变化, 从而可对生物反应器运行产生不利影响。因此, 需要用于控制此类反应器中的二氧化碳水平和 pH 的改进的系统和方法。

发明内容

[0005] 本发明总体上描述了小容积反应器中二氧化碳水平和 pH 的控制及相关系统和方法。在某些实施方案中, 描述了生物反应器 (例如被配置成培养一种或更多种类型生物细胞的反应器) 内的液体生长培养基中二氧化碳水平和 pH 的控制。在一些情况下, 本发明的主题涉及: 相关产品、特定问题的替代方案和 / 或一种或更多种系统和 / 或制品的多种不同用途。

[0006] 在一方面中, 提供了生物反应器系统。在某些实施方案中, 所述生物反应器系统包含: 反应器腔室, 其容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有缓冲剂和至少一种生物细胞的液体生长培养基和在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间 (gaseous headspace); 连接二氧化碳气体源与所述气体顶部空间的第一入口; 以及连接碱性液体源与所述液体生长培养基的第二入口。

[0007] 在一些实施方案中, 所述生物反应器包含反应器腔室, 其容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有缓冲剂和至少一种生物细胞的液体生长培养基和在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间; 连接二氧化碳气体源与所述气体顶部空间的第一入口; 以及所述反应器腔室中的传感器, 其被配置成测定所述液体生长培养基中的二氧化碳浓度和 / 或 pH。

[0008] 根据某些实施方案, 描述了运行生物反应器的方法。在一些实施方案中, 所述方法

包括：提供反应器腔室，其容积等于或小于约 50 毫升并且包含含有至少一种生物细胞的液体培养基和在所述液体生长培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间；以及运行所述反应器，使得所述顶部空间与所述液体培养基的主体之间的二氧化碳 $k_L a$ 为至少约 0.1 小时^{-1} 并小于约 15 小时^{-1} 。

[0009] 在某些实施方案中，所述方法包括提供容积等于或小于约 50 毫升的反应器腔室。在一些实施方案中，所述反应器腔室包含含有至少一种生物细胞的液体培养基和在所述液体培养基上方的含有二氧化碳的气体顶部空间。在一些实施方案中，所述方法包括向气体顶部空间输送含有二氧化碳的气体并向液体生长培养基输送碱性液体。

[0010] 当结合附图考虑时，根据以下对本发明的多个非限制性实施方案的详细描述，本发明的其他优点和新颖特征将变得明显。在本说明书和通过引用并入的文件存在矛盾和/或不一致的公开内容的情况下，应以本说明书为准。

附图说明

[0011] 将参照附图以示例的方式描述本发明的非限制性实施方案，所述附图是示意性的且并不意在按比例绘制。在附图中，所示的每个相同或基本相同的部件通常用单一附图标记表示。出于清楚的目的，没有将每幅附图中的每个部件都进行标记，并且在不需要示出就能够使本领域的普通技术人员理解本发明的情况下，也没有示出本发明每个实施方案的每个部件。在附图中：

[0012] 图 1 是根据一组实施方案的反应器系统的截面示意图；

[0013] 图 2A 至 2C 是根据某些实施方案的反应器腔室及其运行模式的截面示意图；

[0014] 图 3 是根据一些实施方案的包含多个串联布置的反应器腔室的反应器系统的底视截面示意图；

[0015] 图 4 是根据某些实施方案的反应器系统的截面示意图；

[0016] 图 5 是用于根据一组实施方案的反应器系统的气体歧管的截面示意图；

[0017] 图 6 是用于根据一些实施方案的反应器系统的气体歧管的截面示意图；

[0018] 图 7 是根据某些实施方案的反应器系统的照片；

[0019] 图 8 是根据一组实施方案的相位差相对于频率的图；

[0020] 图 9 是根据一些实施方案的相位差相对于调制频率的图；

[0021] 图 10 是根据某些实施方案的二氧化碳的校准图；

[0022] 图 11 是根据一组实施方案的使用氧传感器获得的气体传输图；

[0023] 图 12 是根据一组实施方案的使用二氧化碳传感器获得的气体传输图；以及

[0024] 图 13 是根据一组实施方案的示例性反应器系统的 pH 相对于其气体混合物中二氧化碳的百分数的图。

具体实施方式

[0025] 本发明总体上提供了控制小容积反应器腔室中溶解的二氧化碳 (CO_2) 浓度水平和/或 pH 的策略及相关制品、系统和方法。在某些实施方案中，反应器腔室可被配置成包含至少一种生物细胞。例如，所述反应器腔室可以是生物反应器，例如微生物反应器。反应器腔室中的细胞可悬于液体培养基中，例如本领域普通技术人员已知的任何常用的细胞生长培

培养基。细胞生长培养基可包含例如必需氨基酸和 / 或辅因子。在一些实施方案中,反应器腔室包含在液体生长培养基上方的气体顶部空间。

[0026] 某些实施方案涉及相对小的反应器中 pH 和 CO₂水平的控制,所述相对小的反应器包括容积小于约 50 毫升的反应器。在某些实施方案中,反应器腔室的长宽比 (aspect ratio) 小于约 10 (或小于约 8,例如为约 5 至约 8),如通过用该反应器腔室的最大截面尺寸除以该反应器腔室的最小截面尺寸所测量的。出乎意料地发现,在这样的小反应器中可控制 pH 和溶解 CO₂水平,同时实现与在较大规模反应器中观察到的性能类似的性能 (包括氧和 CO₂传质速率)。

[0027] 在某些实施方案中,液体生长培养基包含缓冲剂如碳酸氢盐缓冲液以使液体生长培养基中的 CO₂和 pH 水平保持相对恒定。在某些实施方案中,可增加气体顶部空间中的 CO₂分压,这可导致液体培养基的 pH 降低以及液体培养基中溶解 CO₂的水平增加。在某些实施方案中,可降低气体顶部空间中的 CO₂分压,这可导致液体培养基中的 pH 增加和溶解 CO₂水平降低。

[0028] 在一些实施方案中,可向液体培养基中输送碱性材料以控制液体的 pH。例如,在某些实施方案中,可向液体培养基添加碱 (例如,碱性液体),例如基于碳酸氢根的碱 (例如,碳酸氢盐溶液),这可增加液体培养基的 pH 并降低液体培养基中的溶解 CO₂浓度。在一些实施方案中 (例如,在其中希望改变液体培养基的 pH 并同时使溶解 CO₂保持相对恒定的某些实施方案中),可任选地结合添加碱性材料 (例如,液体碱) 和 / 或改变气体顶部空间中的 CO₂分压之一或两者,向液体培养基输送酸性材料 (例如,酸性液体)。

[0029] 反应器腔室可包括一个或更多个传感器。传感器可用于例如帮助控制液体培养基中的 pH 和 / 或 CO₂水平。在某些实施方案中,反应器腔室包含与腔室中液体相接触的至少 CO₂传感器和 / 或 pH 传感器。

[0030] 在一些实施方案中,反应器腔室中的液体可以是经混合的和 / 或经充气的。在某些实施方案中,反应器腔室可包括液体子腔室 (液体生长培养基可包含在其中) 和气体子腔室。在某些实施方案中,所述液体子腔室和气体子腔室可被可移动壁 (例如柔性膜) 隔开。在一些实施方案中,可移动壁可对至少一种气体 (例如,氧气和 / 或二氧化碳) 是可渗透的。如下文更详细描述,在一些实施方案中,在反应器腔室中的混合和充气可通过以下来实现:将多个反应器腔室串联布置并对一个或更多个气体子腔室加压,这可导致邻近经加压力子腔室的可移动壁变形 (deflection) 并导致下方子腔室中的至少部分液体排放到串联的其他反应器腔室。此类反应器腔室中的混合和充气还可通过气体经由直接接触 (例如在气体和液体组分未被可移动壁隔开的情况下) 或通过 CO₂和 / 或其他气体可渗透的膜 (例如,在气体和液体组分被可移动壁隔开的情况下) 从气体顶部空间扩散到液体中来实现。采用此类混合和充气方法的反应器在例如 Ram 等于 2011 年 9 月 30 日提交的标题为 "Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions" 的美国专利申请序列 No. 13/249,959 和 Lee 于 2003 年 11 月 18 日提交的标题为 "Peristaltic Mixing and Oxygenation System" 的美国专利申请公开 No. 2005/0106045 中进行了描述,其每一篇均出于所有目的通过引用整体并入文本。

[0031] 在某些实施方案中,缓冲剂的使用、酸性材料注入、碱性材料注入和 / 或向气体顶部空间中输送 CO₂可用作控制液体培养基中 CO₂浓度和 / 或 pH 的方案的一部分。例如,溶

解 CO_2 和 / 或 pH 水平可通过首先测量液体培养基中的 pH 和 / 或溶解 CO_2 水平来控制。在一些实施方案中,可调节 pH 和 / 或溶解 CO_2 水平,例如,通过增加或减小气体顶部空间(与液体培养基直接接触或与液体培养基被可移动壁隔开)中的 CO_2 分压,通过向液体培养基中注入碱性材料(例如,含有碳酸氢盐的溶液或其他碱性材料,任选液体形式的碱性材料),通过向液体培养基中注入酸性材料(例如,酸性液体)和 / 或通过向液体培养基添加缓冲剂(例如,基于碳酸氢根的缓冲剂)。在某些实施方案中,液体培养基中的 pH 和 CO_2 水平可独立地使用本文所概述的策略进行调节。在某些实施方案中,液体培养基中的 pH 和 CO_2 水平可独立于液体培养基的摩尔渗透压浓度进行调节。例如,在一些实施方案中,可调节液体培养基的 pH 而不调节液体培养基的摩尔渗透压浓度。在一些实施方案中,可调节液体培养基中的溶解 CO_2 浓度而不调节液体培养基的摩尔渗透压浓度。

[0032] 图 1 是根据一组实施方案的生物反应器系统 100 的截面示意图。在图 1 中,生物反应器系统包含反应器腔室 102。反应器腔室 102 可包含液体生长培养基 104。在某些实施方案中,液体生长培养基 104 可包含至少一种生物细胞,例如,当生物反应器系统 100 用作细胞生长系统时。液体生长培养基 104 可包含任何类型的生物细胞或细胞类型(例如,原核细胞和 / 或真核细胞)。例如,所述细胞可以是细菌(例如,大肠杆菌 (*E. coli*)) 或其他单细胞生物、植物细胞或动物细胞。如果所述细胞是单细胞生物,则所述细胞可以是例如,原生动物、锥虫、变形虫、酵母细胞、藻类等。如果所述细胞是动物细胞,则所述细胞可以是例如无脊椎动物细胞(例如,来自果蝇的细胞)、鱼细胞(例如,斑马鱼细胞)、两栖动物细胞(例如,蛙细胞)、爬行动物细胞、鸟细胞或哺乳动物细胞(例如灵长类细胞、牛细胞、马细胞、猪细胞、山羊细胞、狗细胞、猫细胞或来自啮齿动物如大鼠或小鼠的细胞)。在一些实施方案中,所述细胞可以是人细胞。在一些实施方案中,所述细胞可以是仓鼠细胞,例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。如果所述细胞来自多细胞生物,则该细胞可来自所述生物的任何部分。例如,如果所述细胞来自动物,则所述细胞可以是心脏细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、软骨细胞、神经细胞、骨细胞、肌细胞、血细胞、内皮细胞、免疫细胞(例如, T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞)、干细胞等。在一些情况下,所述细胞可以是基因工程细胞。

[0033] 反应器腔室 102 可包含气体顶部空间 106。气体顶部空间 106 可位于反应器腔室 102 中的液体生长培养基 104 上方。在某些实施方案中,气体顶部空间 106 与液体生长培养基 104 可直接接触。在此类系统中,图 1 中的界面 108 可相当于气液界面。在另一些实施方案中,气体顶部空间 106 与液体生长培养基 104 可被可移动壁隔开。例如,界面 108 可相当于柔性膜。在采用这种柔性膜的一些实施方案中,所述膜可对至少一种气体是可渗透的。例如,在某些实施方案中,所述柔性膜可对氧和 / 或二氧化碳是可渗透的。

[0034] 在某些实施方案中,所述气体顶部空间可包含二氧化碳。在某些实施方案中,顶部空间中的二氧化碳浓度可以是足够高的,使得可将二氧化碳从气体顶部空间 106 输送至液体生长培养基 104。二氧化碳从气体顶部空间 106 向液体生长培养基 104 的递送速率和 / 或液体生长培养基中的二氧化碳平衡浓度和 / 或 pH 可例如通过调节气体顶部空间 106 中二氧化碳的分压来调节。这可例如通过向气体顶部空间 106 中输送比该气体顶部空间中存在气体含有更多或更少的二氧化碳的气体来实现。因此,在某些实施方案中,反应器腔室 102 包括连接二氧化碳气体源 112 与气体顶部空间 106 的第一入口 110。源 112 可以是任

何合适的源,例如气罐。在某些实施方案中,源 112 可包含基本上纯的二氧化碳(例如,至少约 80%的二氧化碳、至少约 90%的二氧化碳、至少约 95%的二氧化碳或至少约 99%的二氧化碳),而在另一些实施方案中,源 112 可包含与可与生物反应器系统 100 联合使用的一种或更多种其他气体混合的二氧化碳,所述其他气体例如氧气(可用于向液体生长培养基 104 通气)、氮气和/或惰性气体(例如氦气或氩气,其可用于驱动可移动壁 208 以引起液体生长培养基 104 中的混合,如其他部分更详细描述)。任选地,反应器腔室 102 可包括可用于将气体从气体顶部空间 106 输送出去的出口 111。在一些实施方案中,改变二氧化碳的分压可用于控制 pH。

[0035] 在某些实施方案中,液体生长培养基 104 的 pH 可通过向液体培养基中引入酸性材料和/或碱性材料来调节。因此,在一些实施方案中,反应器腔室 102 包括第二入口 114。第二入口 114 可与碱性液体(例如,包括 pH 大于或等于 7.5、大于或等于 8.5、大于或等于 9.5、大于或等于 11 或者更大的碱性液体)源连接。在某些实施方案中,碱性液体可经由入口 114 输送至液体生长培养基 104,从而可增加液体生长培养基 104 的 pH。可使用任何合适的碱性液体源。在某些实施中,碱性液体可以是基于碳酸氢根的碱性液体(即,其可包含碳酸氢根离子, HCO_3^-)。此类碱性溶液可例如通过将碳酸氢盐(例如,碳酸氢钠、碳酸氢钾等)溶于诸如水的溶剂中来形成。一般来说,任何合适的碱(例如,氢氧化物碱)均可用于碱性液体。

[0036] 在一些实施方案中,所述反应器腔室可在设定的温度范围内运行。一般来说,反应器的运行温度可以是允许原核细胞和/或真核细胞生长和增殖的任何合适温度。在某些实施方案中,反应器腔室的运行温度为约 20℃至约 45℃、约 25℃至约 45℃、约 30℃至约 45℃、约 30℃至约 40℃、约 33℃至约 38℃、约 25℃至约 40℃或约 20℃至约 40℃。例如,在反应器腔室包含真核细胞(例如,哺乳动物细胞)的某些实施方案中,反应器腔室的运行温度可为约 30℃至约 45℃(例如,约 30℃至约 40℃、约 33℃至约 38℃、约 37℃)。在另一实例中,在反应器腔室包含原核细胞(例如,细菌)的一些实施方案中,反应器腔室的运行温度可为约 20℃至约 40℃(例如,约 25℃至约 40℃、约 30℃至约 40℃、约 30℃)。

[0037] 在一些实施方案中,反应器腔室 102 包含与酸性液体(例如,包括 pH 小于或等于 6.5、小于或等于 5.5、小于或等于 4.5、小于或等于 3 或者更小的酸性液体)源连接的入口。在某些实施方案中,酸性液体可经由入口(例如,入口 114 或另一入口)输送至液体生长培养基 104,这可降低液体生长培养基 104 的 pH。可使用任何类型的酸(例如,无机酸、有机酸)。在某些实施方案中,所述酸是强酸。所述酸也可以是弱酸。例如,所述酸可包括盐酸(HCl)、硫酸(H_2SO_4)、硝酸(HNO_3)或任何其他合适的酸。在某些实施方案中,可使用单一入口(例如,入口 114)将碱和酸(例如,在不同时间)输送到液体生长培养基 104 中。在这种情况下,与入口 114 连接的导管可以是分成二枝的,使得一个上游部分与酸源连接,而另一个上游部分与碱性液体源连接。

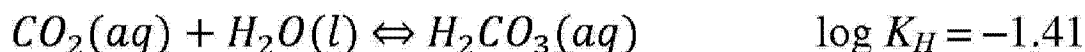
[0038] 任选地,反应器腔室 102 可包括可用于将液体培养基从室 102 中输送出去的出口 115。

[0039] 在某些实施方案中,反应器腔室 102 包括一个或更多个传感器。例如,反应器腔室 102 可包括 pH 传感器和/或二氧化碳传感器。可将一个或更多个传感器可定位成或以其他方式配置成与液体生长培养基 104 接触,以测量液体培养基的性质。一个或更多个其他类

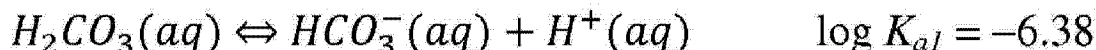
型的传感器可定位成或以其他方式配置成与气体顶部空间 106 接触以测量气体顶部空间中气体的性质。

[0040] 在某些实施方案中,液体生长培养基 104 可包含可帮助控制液体培养基 pH 的缓冲剂。可使用多种类型的缓冲液。在某些实施方案中,缓冲剂包括碳酸氢根(即, HCO_3^-)缓冲剂。与碳酸氢根缓冲剂有关的化学反应概括如下:

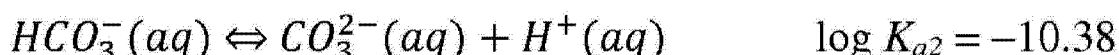
[0041]



[0042]



[0043]



[0044] 可使用的另一些缓冲剂包括例如基于硫酸根的缓冲剂、基于乙酸根的缓冲剂、基于磷酸根的缓冲剂等。

[0045] 在某些实施方案中,反应器腔室的容积可相对小。例如,反应器腔室的容积可等于或小于约 50 毫升、等于或小于约 10 毫升或者等于或小于约 2 毫升(和/或,在某些实施方案中,等于或大于 10 微升、等于或大于 100 微升或者等于或大于 1 毫升)。

[0046] 在一些实施方案中,反应器腔室可被配置成含有(和/或在反应器的运行期间含有)体积等于或小于约 50 毫升、等于或小于约 10 毫升或者等于或小于约 2 毫升(和/或,在某些实施方案中,等于或大于 10 微升、等于或大于 100 微升或者等于或大于 1 毫升)的液体培养基。

[0047] 在某些实施方案中,本文所述的反应器可被配置成使得在运行期间,顶部空间的主体与液体培养基的主体之间的二氧化碳的 $k_L a$ 类似于已成功用于大得多的反应器的 $k_L a$ 值。在某些实施方案中,可运行反应器使得顶部空间的主体与液体培养基的主体之间的二氧化碳的 $k_L a$ 为至少约 0.1 小时⁻¹或至少约 1 小时⁻¹。在某些实施方案中,可运行反应器使得顶部空间的主体与液体培养基的主体之间的二氧化碳的 $k_L a$ 小于或等于约 15 小时⁻¹、小于或等于约 10 小时⁻¹或者小于或等于约 5 小时⁻¹。参数 $k_L a$ (通常称为体积传质系数)是本领域的普通技术人员所熟知的,其用于描述反应器系统中气体的输送,例如 V. Linek、P. Benes 和 V. Vacek,“Measurement of aeration capacity of fermenters,”Chem. Eng. Technol., 1989, 第 12 卷,第 1 期,第 213-217 页中所述的。 $k_L a$ 中的“ k_L ”部分一般指传质系数,其涵盖从液体输送至气体的所有阻力。 $k_L a$ 中的“ a ”部分指液体与气体之间的界面面积。 $k_L a$ 是 k_L 乘以 a 的所得的结果。本领域的普通技术人员通过以下过程能够计算给定反应器系统在运行期间的二氧化碳的 $k_L a$ 值:重建运行条件,随后向该反应器的气体顶部空间中注入纯氮气(动态充气法)并构建作为时间酯函数的 $\ln(1-\text{DCO}_2)$ 的曲线,其中 DCO_2 定义为:

$$[0048] \quad \text{DCO}_2 = \frac{C_{\text{CO}_2}}{C_{\text{CO}_2}^*}$$

[0049] 其中 C_{CO_2} 是在给定时间点的 CO_2 浓度,并且 $C_{\text{CO}_2}^*$ 是在其饱和点时液体培养基中

的 CO_2 浓度。在构建这样的曲线之后,曲线斜率的绝对值相当于 CO_2 的 k_La 。也就是说, k_La 是当气体顶部空间中的 CO_2 分压改变时培养基中溶解 CO_2 浓度的衰减或上升的时间常数。

[0050] 多个参数可影响二氧化碳的 k_La 值,包括混合速率、反应器腔室的容积和顶部空间中的 CO_2 分压。出乎意料地发现,对于容积为 50 毫升或更小的反应器而言,理想的 CO_2 的 k_La 值(包括上文概述的 k_La 值)可通过使用相对慢地(例如,在约 5 秒或更长时间内)实现基本完全混合(即,约 95% 完全混合或更多)的混合速率来获得。此外,反应器顶部空间中可有利地采用以下 CO_2 分压:约 0% 至约 20%、约 1% 至约 20%、约 2% 至约 15%、约 2% 至约 10%、约 3% 至约 7% 或约 5%,例如,当相对于大气压力的总顶部空间气体压力为约 0 磅/平方英寸至约 15 磅/平方英寸、约 1 磅/平方英寸至约 15 磅/平方英寸、约 0psi 至约 10 磅/平方英寸、约 1 磅/平方英寸至约 10 磅/平方英寸、约 1 磅/平方英寸至约 5 磅/平方英寸、约 2 磅/平方英寸至约 4 磅/平方英寸、约 2.5 磅/平方英寸至约 3.5 磅/平方英寸、或约 3 磅/平方英寸时。在某些实施方案中,可有利地将反应器腔室中液体培养基的高度(即,液体顶部与反应器腔室底部之间的距离)设定为约 0.05 英寸至约 0.5 英寸。应认识到,在某些实施方案中,可采用另一些液体高度,例如约 0.05 英寸至 2 英寸、约 0.5 英寸至 2 英寸、约 0.05 英寸至 1 英寸或约 1 英寸至 2 英寸。

[0051] 如上所述,在某些实施方案中,气体顶部空间 106 和液体生长培养基 104 直接接触。在另一些实施方案中,气体顶部空间 106 和液体生长培养基 104 被可移动壁隔开。采用此类布置的反应器在例如 Ram 等于 2011 年 9 月 30 日提交的标题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列 No. 13/249,959 以及 Lee 于 2003 年 11 月 18 日提交的标题为“Peristaltic Mixing and Oxygenation System”的美国专利申请公开 No. 2005/0106045 中进行了描述,其每一篇均出于所有目的通过引用整体并入文本。

[0052] 图 2A 至 2C 是概述流体如何可通过偏转可移动壁输送进出反应器腔室之液体子腔室的横截面示意图。在图 2A 至 2C 中,反应器系统 200 包含反应器腔室 202。在某些实施方案中,图 2A 至 2C 中的反应器腔室 202 相当于图 1 中的反应器腔室 102。反应器腔室 202 可包含液体子腔室 203。液体子腔室 203 可被配置成包含含有至少一种生物细胞的液体生长培养基。在某些实施方案中,反应器腔室 202 可包含气体子腔室 206。气体子腔室 206 可被配置成包含在液体子腔室 203 中的液体生长培养基上方的气体顶部空间。

[0053] 反应器腔室 202 还可包含可将液体子腔室 203 与气体子腔室 206 隔开的可移动壁 208。可移动壁 208 可包括例如柔性膜。在某些实施方案中,所述可移动壁由对至少一种气体可渗透的介质(即,气体可渗透介质)形成。在某些实施方案中,例如,可移动壁可对氧气和/或二氧化碳气体是可渗透的。在可移动壁 208 对气体(例如,氧气和/或二氧化碳)可渗透的这种实施方案中,气体子腔室 206 中的气体可被输送至液体子腔室 203,或者反之亦然。这种输送可用于例如将氧气输送到液体子腔室 203 中和/或通过将二氧化碳输送进出液体子腔室 203 来控制 pH。

[0054] 在某些实施方案中,反应器系统 200 可包含气体入口导管 204,其可被配置成向气体子腔室 206 中输送气体。图 2A 至 2C 中的气体入口导管 204 可相当于图 1 中所示的气体入口导管 110。向气体子腔室 206 中输送的气体可来源于例如气体源 216。可使用任何合适的气体源作为气体源 216,例如气体钢瓶。在某些实施方案中,气体源 216 是氧气源和/

或二氧化碳源。

[0055] 在一些实施方案中,反应器系统 200 包含气体出口导管 212,其被配置成将气体输送出气体子腔室 206。在某些实施方案中,图 2A 至 2C 中的气体出口导管 212 可相当于图 1 中所示的气体出口导管 111。在一些实施方案中,反应器系统 200 包括连接气体入口导管 204 与气体出口导管 212 的气体旁路导管 210。在某些实施方案中,气体旁路导管 210 可被配置成使得其在反应器腔室 202 的外部。在某些实施方案中,反应器系统 200 还可包含液体入口导管 211 和液体出口导管 214。

[0056] 在某些实施方案中,可驱动可移动壁 208 使得可改变液体子腔室 203 和气体子腔室 206 的容积。例如,某些实施方案涉及将来自气体源 216 的气体通过气体入口导管 204 输送至气体子腔室 206 以使可移动壁 208 变形。可移动壁 208 的变形可例如通过以下来实现:配置反应器 200 使得当气体被输送到气体子腔室 206 中时使气体子腔室 206 加压。这种加压可通过例如在气体正被供应至气体子腔室 206 时限制气体流出气体出口导管 112(例如,使用阀或其他合适的流量限制装置)来实现。

[0057] 在某些实施方案中,变形的可移动壁 208 可导致液体至少部分从液体子腔室 203 中排出。例如,在图 2B 中,可移动壁是已变形的,使得液体子腔室 203 中基本上所有的液体都已从反应器腔室 202 中排出。这种运行可用于将液体子腔室 203 中的液体输送至其他反应器中的其他液体子腔室,例如下文更详细描述图 3 中所示的。

[0058] 在某些实施方案中,在已将液体子腔室 203 中的至少部分液体从液体子腔室 203 移除之后,可减少气体向气体子腔室 206 的气体供应使得可移动壁 208 向其初始位置返回(例如,图 2A 中所示的位置)。在某些实施方案中,使可移动壁 208 变形(deflected),使得气体子腔室 206 中的至少部分气体从该气体子腔室中移出。例如,如下文更详细描述,如果液体例如由另一上游反应器从液体入口导管 211 进入液体子腔室 203 的话,可移除此类气体。

[0059] 某些实施方案包括以下步骤:至少第二次由气体源 216 将气体供应至气体子腔室 206 以使可移动壁变形,从而使液体至少部分从液体子腔室 203 移除。当重复进行此气体引入步骤时,可移动壁 208 可充当将液体输送进出液体子腔室 203 的泵送装置的一部分。这样的运行在 Ram 等于 2011 年 9 月 30 日提交的标题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列 No. 13/249,959 中进行了详细的描述。

[0060] 在向气体子腔室 206 中多次输送气体的某些实施方案中,气体可从气体源通过气体旁路导管 210 来输送。可通过气体旁路导管 210 输送气体以从进气口导管 204 中移除液体而不将液体输送至气体子腔室 206。例如,在某些实施方案中,可将气体旁路导管 210 与气体入口 205 之间的第一阀门关闭并且可将气体旁路导管 210 与气体出口 207 之间的第二阀门关闭(并且可将气体旁路导管 210 中的任何阀门打开),使得当将气体通过气体入口导管 204 输送时,气体重新通过气体旁路管段 210 并随后从气体出口导管 212 出来。这种操作可用于将任何不想要的浓缩液排出气体入口导管,从而可提高本文其他部分所述的气体供应方法的性能。

[0061] 在一些实施方案中,可布置多组反应器腔室(例如串联)使得沿一个或更多个流体路径实现流体混合。图 3 是说明可用于在多个串联连接的反应器腔室 102A 至 102C 之间

建立混合的液体流动路径的底视截面示意图,如 Ram 等于 2011 年 9 月 30 日提交的标题为“Device and Method for Continuous Cell Culture and Other Reactions”的美国专利申请序列 No. 13/249,959 中所述的。

[0062] 在图 3 中,反应器系统 300 包括箭头 310 所示的第一流体路径。第一流体路径可包括第一反应器腔室 102A、第二反应器腔室 102B 和第三反应器腔室 102C。反应器系统 300 还包括导管 321、322 和 323,这些导管相当于反应器腔室 102A 至 102C 的液体入口导管和 / 或液体出口导管。例如,在图 3 中,导管 321 是反应器腔室 102B 的液体入口导管和反应器腔室 102A 的液体出口导管;导管 322 是反应器腔室 102C 的液体入口导管和反应器腔室 102B 的液体出口导管;并且导管 322 是反应器腔室 102A 的液体入口导管和反应器腔室 102C 的液体出口导管。当然,还可使液体的流动反向使得导管 321、322 和 323 相对于反应器腔室 102A 至 102C 中的每一个承担相反的作用。

[0063] 反应器系统 300 还可包括液体输入导管 350 和液体输出导管 351,这些导管可用于将液体输送进出反应器腔室 102A、102B 和 102C 中的液体子腔室。阀门 352 可位于液体输入导管 350 中,并且阀门 353 可位于液体输出导管 351 中以抑制或防止在运行期间液体从混合系统中流出。

[0064] 在某些实施方案中,可驱动反应器腔室 102A 至 102C 的可移动壁以使沿流体路径 310 输送(和 / 或沿与路径 310 相反方向的流体路径)液体。这可例如通过依次驱动反应器腔室 102A 至 102C 中的可移动壁使得液体沿受控方向输送来实现。在一些实施方案中,可将反应器腔室 102A 至 102C 中的每一个配置成使得其各自能够采取关闭位置,其中可移动壁 208 是变形的(strained),从而减小液体子腔室的体积,例如,如图 2B 中所示。蠕动混合可通过例如驱动反应器腔室 102A 至 102C 使得其运行状态在打开(图 2A 或 2C)与关闭(图 2B)配置之间交替来实现。在一些实施方案中,可采用三种模式来实现蠕动泵送:第一种模式,其中关闭反应器腔室 102A 的液体子腔室并打开反应器腔室 102B 和 102C 中的液体子腔室;第二种模式,其中关闭反应器腔室 102B 的液体子腔室并打开反应器腔室 102A 和 102C 中的液体子腔室;和第三种模式,其中关闭反应器腔室 102C 的液体子腔室并打开反应器腔室 102A 和 102B 中的液体子腔室。通过在这三种模式之间转换(例如,从第一种模式变成第二种模式、从第二种模式变成第三种模式并从第三种模式变成第一种模式等),可沿顺时针方向在反应器腔室 102A 至 102C 之间输送液体(如图 2A 至 2B 中所示)。当然,通过重新排列这三种模式发生的顺序(例如,通过从第一种模式变成第三种模式、从第三种模式变成第二种模式并从第二种模式变成第一种模式等),还可沿逆时针方向输送液体。

[0065] 下列实施例旨在说明本发明的某些实施方案,而并不举例说明本发明的全部范围。

[0066] 实施例

[0067] 该实施例描述了整合了本发明的二氧化碳浓度和 pH 控制方法的反应器系统的设计和运行。

[0068] 生物制剂(例如单克隆抗体、重组蛋白和基于核酸的蛋白质)在制药业中的用途在过去十年里已被普遍认可。因为治疗性单克隆抗体一般比传统的细胞毒性药物具有更少的副作用,所以其使多种肿瘤学治疗发生了革命性改变。在 2007 年,市场上有 22 种治疗性单克隆抗体,价值超过 170 亿美元,并且预期到 2013 年,全球市场将增加至约 490 亿美元。

一些公知经批准的单克隆抗体治疗为用于癌症的 Rituxan、用于关节炎的 Remicade、用于肺病的 Synagis 和用于乳腺癌的 Herceptin。目前,多于 50%的制药行业投资管线由重组蛋白和单克隆抗体组成,并且每年开发超过 600 种的新生物制剂。治疗性重组蛋白和单克隆抗体由经基因改良成过量产生治疗性蛋白质的重组哺乳动物细胞产生。在很多情况下,哺乳动物细胞系可以是优选的,因为其含有可合成、折叠和化学修饰蛋白质以形成三级结构(例如糖基化)的细胞器和酶,这对于蛋白质的治疗功能是重要的。后面的过程被称为翻译后修饰。在无需对蛋白质进行翻译后修饰的一些情况下,一些重组蛋白(例如胰岛素)可在更健壮且生长更快的细胞(例如大肠杆菌(*Escherichia Coli*))中产生。然而,目前,生产中的大多数治疗性蛋白质需要进行仅可在真核细胞中发现的翻译后糖基化,其中的约 70%使用中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)细胞系来生产。

[0069] 尽管生物制剂市场在快速增长,但是生物制药公司不断面临着卫生保健提供者要降低成本的压力。此外,从生物制剂的发现到市场化的长时间经常导致早期专利期满和利润损失。来自仿制药的竞争也驱使生物制药公司寻找降低研发和制备成本的路径。此外,制药公司还迫切地需要研发大量新药物的产品组合以领先于对手生物制药公司。通常,新药物需要约 6 至 9 年的时间来经历开发、制备、临床试验和 FDA 批准,之后才能在市场上出售。缩短市场化的时间具有很多益处,包括在药物投放市场时专利具有较长的有效性,同时测试并开发更多种生物制剂以增加发现重磅炸弹(blockbuster)药物之机会和降低总药物成本的能力。目前,用于产生重组蛋白的上游开发工艺是非常复杂和耗时的。对于待经 FDA 批准的药物蛋白,所产生的重组药物的质量必须具有一致性,特别地,治疗性蛋白质的糖基化和有效性必须保持相同的质量,即使是不同的培养批次。由于重组蛋白糖基化的质量可受工艺条件影响,因此对生物反应器中工艺参数的控制和监测就变得非常重要。此外,由于治疗性单克隆抗体长期以高剂量使用,因此,为了满足市场需求,如果细胞培养物能够产生高产物效价并同时保持相同的产品质量,则是有利的。在生产批次的放大和缩小期间,都应维持所有的这些要求。

[0070] 用于生产重组蛋白的生物工艺的上游研发一般包括以下四个阶段:1. 克隆选择、2. 克隆稳定性测试、3. 工艺开发和 4. 放大实验。首先,使 1000 个克隆在静止的 96 孔板中生长,根据酶联免疫吸附测定(ELISA)结果找到最快生长者和最高产生者克隆。然后,使选择的克隆(通常约 50 至 100 个克隆)在摇瓶中生长,其搅动环境与生物反应器类似,但不进行任何 pH、温度、溶解氧(DO)或进料速率控制。在该阶段中还可进行稳定性测试以确保克隆在经历很多代后没有突变。从摇瓶实验仅选出 4 至 6 个克隆,并将其转移至实验台规模实验,之后放大至大规模工业生物反应器。在此阶段存在决定所选择克隆的数目的成本限制因素,因为实验规模的(bench top)生物反应器和放大实验运行的成本非常高。这种选择工艺具有风险,原因是有证据证明仅通过在 96 孔板中测量生长和生产力作为单一终点的克隆选择不是选择稳定细胞的预测因子(predictor)。此外,不对 pH、DO 或进料进行仪器检测或控制的摇瓶可能不能选择具有稳定糖基化特征谱的最有生产力的克隆,因为产物效价和质量可受实际工艺条件影响。

[0071] 因此,常规上游开发方案中缺失的重要技术是具有在线传感器的微型化高通量和仪器化二代克隆选择系统,其几乎刚好就是工业生物反应器的缩小模型,其容积足以用于线下(offline)表征产品效价、糖基化特征谱和其他重要工艺条件。

[0072] 在不久的将来,生物制药公司将研究建立帮助阐明进料速率、物理和化学胁迫对细胞代谢状态的影响的细胞功能模型。通过采用质量源于设计 (Quality by Design, QbD) 的方法,具有预测制备条件对工业上相关细胞系之影响的模型将大大加速上游工艺的优化。通常,重组蛋白的过表达受动力学尚未充分了解的酶限制了速率。了解影响细胞生产力的速率限制步骤将大大减少发现用于重组细胞系的最佳加工条件所需的实验。形成完整细胞功能模型所需的大数据库需要这样的高通量平台,其可以以比实验台规模生物反应器低得多的运行成本但使用同一组仪器来运行。这种微型化生物技术平台将必须是自动化的并且平行进行至少 20 个实验,从而在合理的时间范围中完成实验。

[0073] 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系是用于生产重组蛋白治疗剂的一种重要细胞系,其占生物治疗市场的约 70%,远超过其他常用的哺乳动物细胞系,例如 3T3、BTK、HeLa 和 HepG2。在 2006 年,仅使用 CHO 细胞生产的生物制剂产品的全球销售额就超过 300 亿美元。随着在扩大由 CHO 细胞生产的生物制剂之范围方面的兴趣迅速增长,越来越需要在高通量微型生物反应器 (例如微流体装置和孔板),特别用于重组 CHO 细胞研究和生物技术工艺优化的高通量微型生物反应器中的上游研发。近年来,已出现用于微生物细胞系之上游研发的微流体装置和孔板形式的微型生物反应器。用于哺乳动物细胞系 (例如 CHO 细胞系) 的微型生物反应器的研发还未获得足够的动力,这主要是因为当尝试使这些微生物微型生物反应器适用于更敏感的哺乳动物细胞系时复杂性增加。表 1 中列出了为哺乳动物细胞系以及酵母和大肠杆菌 (细菌细胞系) 而设计的微型生物反应器的设计标准。

[0074] 表 1 :基于当前工业工艺所获得的参数的微型生物反应器的标准。

[0075]

参数	哺乳动物细胞	酵母	大肠杆菌
生长速率	0.041-0.075 小时 ⁻¹	0.5-4 小时 ⁻¹	0.1-4 小时 ⁻¹

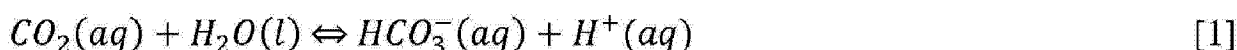
[0076]

倍增时间	15-24 小时	0.5-5 小时	0.1-4 小时
细胞密度	10^6 - 10^7 个细胞/mL	200-500 g/L wew*	200-500 g/L wew*
OUR	<5 mmol/Lh	<300 mmol/Lh	<300 mmol/Lh
k_La	1-15 小时 ⁻¹	200-400 小时 ⁻¹	200-400 小时 ⁻¹
DO	>20%	>20%	>20%
搅动	50-150 rpm	100-3000 rpm	100-3000 rpm
溶解 CO ₂	35-80 mmHg	<5%	<5%
温度	32-38°C	18-30°C	18-37°C
pH	6.5-7.15	4-8	6-7.5
pH 控制	添加苛性碱或 CO ₂	添加酸或苛性碱	
周期时间	20 天	<7 天	<4 天

[0077] 与细菌或酵母细胞不同,中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的生长和生产力对工艺条件非常敏感。与大多数哺乳动物细胞一样,CHO 细胞在物理和化学胁迫下可容易地经历坏死细胞或凋亡细胞死亡。为了给出其对剪切应力的敏感性的认识:CHO 细胞的剪切应力耐受性比生物技术中常用的细菌类型大肠杆菌 (E. Coli) 细胞的剪切应力耐受性低约 3 个数量级。高于 0.005Nm^{-2} 的剪切应力显示出因内质网 (负责蛋白质折叠和糖基化的细胞器) 发生形态变形而影响 CHO 细胞中的蛋白质糖基化。因此,应将微型生物反应器设计成具有产生低剪切应力但仍提供快到足以防止可导致营养饥饿或毒性之大梯度的混合的混合器。此外,与因其短得多的倍增时间 (约 1 小时) 而可仅持续多至 4 天的大肠杆菌培养相比,因为 CHO 细胞的长倍增时间 (22 至 24 小时),对于 CHO 细胞一般需要长得多的培养时间,通常 2 至 3 周长。对于长期培养而言,蒸发因为小工作体积的微型生物反应器的高表面 / 体积比而变成主要问题。水分损失也可导致培养基的摩尔渗透压浓度在 5 天内增加至毒性水平。对于进行长期培养物 (例如 CHO 细胞培养物) 的微型生物反应器而言,一般需要采用蒸发补偿策略。CHO 细胞较长的倍增时间还使得培养物更容易被污染,因为 CHO 细胞可轻易被生长更快的酵母和细菌细胞取代。因此,微型生物反应器应能够在整个 10 至 14 天的培养持续时间中保持无菌,并且所有的过程 (包括样品移除和孵育) 必须在不损坏生长腔室之无菌性的情况下来进行。

[0078] 自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞被广泛用于制备治疗性蛋白质以来,其已得到了非常广泛的研究并且其最佳生长条件也已进行了充分报道。CHO 细胞培养的一个重要工艺参数是培养基中的二氧化碳分压 $p\text{CO}_2$ 。 $p\text{CO}_2$ 还影响培养基的 pH 和摩尔渗透压浓度,如方程 1 所示

[0079]



[0080]



[0081] 移除 CO_2 可增加培养基的 pH 并降低其摩尔渗透压浓度。培养基中的高 pCO_2 还可导致细胞的内部 pH—— pH_i 降低, 原因是 CO_2 是非极性的并因此自由扩散通过细胞膜。 pH_i 降低可改变细胞代谢并影响胞质酶的性能。此外, 细胞质 pH 的改变还可改变内质网中的 pH, 从而影响蛋白质的翻译后加工, 例如糖基化和分泌。由于 CO_2 是细胞代谢的副产物, 因此有效的 CHO 细胞生物反应器中应包括 CO_2 的有效去除。 CO_2 气体还可用于控制 pH, 并且其相对于液体酸添加是优选策略, 原因是其不会使培养基的摩尔渗透压浓度增加得与添加液体一样多。然而, 当 CHO 细胞达到高浓度时, CO_2 气体去除可变得更加困难, 而添加液体碱将更有效地中和由培养基中 CO_2 气体累积而导致的酸性。出于这些原因, pCO_2 控制对 CHO 细胞微型生物反应器来说是非常重要的, 原因是其影响 CHO 细胞的摩尔渗透压浓度、pH 和糖基化。 pCO_2 的最佳范围为 31mmHg 至 75mmHg (0.04 大气压至 0.10 大气压), 如果其超过 99mmHg (0.13 大气压), 则其可能对 CHO 细胞的生长、生产力和产物质量有害。

[0082] 另外要注意的是, 已显示出轻度缺氧导致细胞耗氧量下降而不影响细胞生长速率、最大细胞密度、重组蛋白生产速率或重组蛋白活性。CHO 细胞系在 pH 为 7.0 至 7.6 的培养基中还显示出增强的生长。如果 pH 超过 8.2 或下降至 6.9 以下, 则蛋白质糖基化一般会受到影响, 原因是未质子化的 NH_3 在高 pH 下 (参见方程 2) 和 CO_2 在低 pH 下 (参见方程 1) 扩散通过细胞膜可改变高尔基体的内部 pH。如文献中所报道的, CHO 细胞的葡萄糖摄取速率 q_{GLC} 为 $1.0\text{mMol}/10^{10}$ 个细胞 / 小时至 $1.5\text{mMol}/10^{10}$ 个细胞 / 小时, 氧消耗速率 q_{GLC} 为 $1.25\text{mMol}/10^{10}$ 个细胞 / 小时至 $1.5\text{mMol}/10^{10}$ 个细胞 / 小时, 并且乳糖产生速率与葡萄糖消耗速率之比 $Y_{\text{LAC, GLC}}$ 为 1.1 至 1.2。通常, 对 CHO 细胞培养而言, 期望的摩尔渗透压浓度为 260mOsm/kg 至 320mOsm/kg, 与 290mOsm/kg 下的血清类似。随着摩尔渗透压浓度从 320mOsm/kg 增加至 375mOsm/kg 和 435mOsm/kg, 哺乳动物细胞的死亡专率 (specific death rate) 显示出稳定增加。

[0083] 实验室规模生物反应器是规模为工业生物反应器之 1/1000 至 1/10,000 的工业生物反应器之缩小模型的标准。由于体积和表面积的尺寸与长度不同, 因此细胞经历的物理和化学环境是不同的, 即使是在与工业生物反应器几何学上相同的实验室规模生物反应器中也是如此。细胞的物理和化学环境可严重影响细胞的生理学和生产力, 因此在放大期间应使其保持恒定或者使其保持在临界值界限内。首先, O_2 和 CO_2 的气体传输速率应足够高使得溶解氧水平保持在细胞的氧摄取速率之上, 并且有效去除诸如二氧化碳的废气。其次, 细胞经历的最高剪切速率应保持与在放大期间影响生产力的临界值相同或者比其低。因为其剪切敏感性, 所以这可能对哺乳动物细胞 (例如 CHO) 尤其重要。循环时间也是一个重要参数, 因为其影响细胞经历高剪切的频率。据报道, 内质网的反复变形影响蛋白质糖基化。在细胞循环返回到叶轮顶端之前, 具有不同腔室容积的生物反应器具有很不同的循环时间, 并因此一些实验室规模生物反应器配备有循环管路, 从而使细胞的物理环境能够模拟大工业规模生物反应器中所见到的循环时间。另一方面, 微型生物反应器的混合速率必须足够快且均匀, 使得培养物中不存在细胞营养饥饿或具有大浓度梯度的区域。当设计生物反应器的缩小模型时, 应使能量耗散率保持基本恒定, 使得内部能量向细胞的转移保持基本恒定。

[0084] 已开发了图 4 中所示的新反应器设计来用于培养细胞 (包括 CHO 细胞), 该新反

应器设计在本实施例中称为防蒸发补偿驱动器 (Resistive Evaporation Compensated Actuator, RECA) 微型生物反应器。该反应器包括 5 个注入用的储存器, 包括用于蒸发补偿的包含无菌水的储存器。另外四个储存器可用于碳酸氢钠 (NaHCO_3) 碱注入、进料和其他必需补充。注入可通过经 PDMS 膜驱动的蠕动泵依次将流体塞推进生长腔室中进行。在该实施例中, 生长腔室的容积为 2 毫升。均匀混合可通过将流体推动通过连接 3 个生长腔室的小通道获得, 每个生长室的容积均为 1 毫升。在生长室之后还定位有取样用的 10 微升储存器。取样可通过蠕动泵送 10 微升样品 (plug) 来进行。除与生长腔室连接之外, 样品储存器还经由通道与无菌水管路和干净空气管路连接。可通过样品储存器注射空气以将任何剩余的样品排入到取样容器 (例如 Eppendorf 管), 并且在此之后可注入水来清洗样品储存器并移除剩余的任何细胞培养物或细胞。然后, 可通过存储器传送干净的空气以干燥这些室, 使得没有任何水留下稀释下一样品。可在每个取样步骤之后重复该过程。

[0085] RECA 微型生物反应器与气体歧管的连接示于图 5 中。所有的储存器输入阀可共用同一气体管路, 因为不必对各输入阀进行单独控制。可将储存器的压力设定为 1.5 磅 / 平方英寸 ($1.03 \times 10^5 \text{Pa}$), 其低于混合压力 3 磅 / 平方英寸 ($2.06 \times 10^5 \text{Pa}$)。储存器压力可用于确保向蠕动泵输入看起来相同的压力并且不受外部流体静压影响, 从而确保一致的泵送体积。储存器的输出 (即注入阀) 可受单独的气体管路独立控制, 因为这些是决定哪个进料管路注入生长腔室中的阀门。接下来是控制蠕动泵的气体管路。混合器可具有单独的输入管路和输出管路, 从而能够冲掉混合器管路中的冷凝水, 因此进入混合器中的空气可以是湿润的以减少生长培养基的蒸发。微型生物反应器腔室中的生长腔室具有大的表面 / 容积比, 因此, 蒸发速率一般要大于较大生物反应器的蒸发速率。此外, 全部的三个混合器气体管路可被设计成具有相同阻力, 以确保 3 个生长腔室中均匀的混合速率。可将混合器气体管路制得比其余管路宽, 因为空气是湿润的并且在阻力太大时任何冷凝都可能堵塞这些管路。最后的空气管路控制朝向取样口的阀门。取样口由 10 微升样品储存器及控制取样和取样口自动化清洗的阀门组成。左上角的孔可用聚碳酸酯盖密封并用双面胶带粘贴。可将空气管路通过位于芯片左下角的 20 个羽支 (barb) 的组与气体歧管连接。

[0086] 气体歧管可用于将电磁阀与微型生物反应器的空气管路连接。气体歧管的设计示于图 6 中。该实施例中的歧管具有 3 层。微型生物反应器的羽支连接器位于歧管顶层的中心。中间层将电磁阀的输出通向连接歧管与微生物反应器的羽支连接器。底层将主空气管路通向电磁阀的输入。为了便于参考, 表 2A 至 2C 列出了如图 6 所示的具有其编号的所有阀门, 以及气体连接。

[0087] 表 2A 针对阀门 1 至 8

[0088]

阀门	名称	NO	NC
1	气体混合 1	气体混合 2 (3 磅 / 平方英寸)	气体混合 2 (3 磅 / 平方英寸)
2	储存器输入	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
3	注入 1	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)

4	注入 2	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
5	注入 3	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
6	注入 4	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
7	注入 5 (水)	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
8	泵 1	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)

[0089]

[0090] 表 2B 针对阀门 9 至 16

[0091]

阀门	名称	NO	NC
9	气体混合 2	氮气 (3 磅 / 平方英寸)	氧气 (3 磅 / 平方英寸)
10	泵 2	阀门关 (Atm)	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)
11	泵 3	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
12	样品储存器	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
13	进样	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
14	出样	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
15	样品空气进入	阀门开 (15 磅 / 平方英寸)	阀门关 (Atm)
16	气体混合 3	氮气 (3 磅 / 平方英寸)	CO ₂ (3 磅 / 平方英寸)

[0092] 图 2C 针对阀门 17 至 24

[0093]

阀门	名称	NO	NC
17	混合器底部出去	混合器关 (Atm)	堵塞
18	混合器底部进入	堵塞	混合器开 (3 磅 / 平方英寸)
19	混合器左侧出去	混合器关 (Atm)	堵塞
20	混合器左边进入	堵塞	混合器开 (3 磅 / 平方英寸)
21	混合器顶部出去	混合器关 (Atm)	堵塞
22	混合器顶部进入	堵塞	混合器开 (3 磅 / 平方英寸)

23	储存器压力	储存器关 (Atm)	储存器开 (1.5 磅 / 平方英寸)
24	气体混合 4	可用	可用

[0094] 在表 2A 至 2C 中, NO 表示常开而 NC 表示常闭。可选择气体管路常开或常闭的选择作为阀门的最通常状态,更通常的是通常使得该阀门是不活动的以节省能量消耗。特别地,可将阀门 10(泵 2) 设置为常“闭”,同时可将其余的所有阀门设置成常“开”。除在微型生物反应器上进行混合和阀门打开所需的电磁阀之外,还有 4 个气体混合器电磁阀。二氧化碳 (CO₂) 气体浓度相对于氮气 (N₂) 的控制可通过改变气体混合 (Gas Mix) 3 电磁阀的占空比来实现。氧气 (O₂) 浓度可经由气体混合 2 通过相同的策略来控制。然后,可使用气体混合 1 将两种输出以 50-50 的占空比混合在一起。如果需要任何额外的阀门的话,可使用气体混合 4。

[0095] 完整设置示于图 7 中所示。可用便携式电脑控制现场可编程门阵列 (Field-programmable Gate Array, FPGA) 板,该 FPGA 板可控制电磁板、加热板和光电探测器板。空气管路在与气体歧管连接之前可与压力调节器连接。阀门管路可从气体歧管出发,直接与微型生物反应器连接。这样连接管路中的混合器,首先通过空气阻力管路,然后通过 45℃ 的局部加湿器,之后到达微型生物反应器。微型生物反应器发出的混合器出去管路与脱水器 (water trap) 连接,之后与空气阻力管路连接,然后仅与气体歧管连接。

[0096] 将二氧化碳传感器 (配置用以检测 pCO₂) 与 RECA 反应器整合在一起。所述传感器为来自 PreSens GmbH 的传感器点。这些传感器包括气体可渗透膜,其中寿命短的 pH 敏感性发光染料 (羟基芘三磺酸 (HPTS)) 与缓冲液和寿命长的惰性参照发光染料固定在一起。湿润的 CO₂ 气体渗透到膜中改变了缓冲液的内部 pH 和 HPTS 的发光。这两种荧光体具有重叠的激发和发射光谱,使得其可用同一光源激发并用同一光电探测器检测。将激发源调制为与长寿命荧光体相容的频率 f_{mod} 。具有不同寿命 τ 的荧光体以相位滞后 Φ 滞后于经调制的源,如方程 3 所给出的

$$[0097] \quad \tan \Phi = 2 \pi f_{\text{mod}} \tau \quad [3]$$

[0098] 参照荧光体具有恒定的相位滞后,其由 Φ_{ref} 给出。由于 HPLS 具有非常短的寿命,因此相位滞后约是零,即 $\Phi_{\text{ind}} \sim 0$ 。由参照和指示染料产生的发射荧光的实部和虚部列于以下方程中,其中振幅为 A_m ,并且相位为 Φ_m :

$$[0099] \quad A_m \cos \Phi_m = A_{\text{ref}} \cos \Phi_{\text{ref}} + A_{\text{ind}} \quad [4]$$

$$[0100] \quad A_m \sin \Phi_m = A_{\text{ref}} \sin \Phi_{\text{ref}} + A_{\text{ind}} \quad [5]$$

[0101] 这些方程简化地给出了所产生荧光的相位滞后的余切 $\cot(\Phi_m)$ 之间的线性关系,以及指示荧光与参考荧光振幅之比 $A_{\text{ind}}/A_{\text{ref}}$,因为 $\cot(\Phi_{\text{ref}})$ 和 $\sin(\Phi_{\text{ref}})$ 两者都是常数。

$$[0102] \quad \cot \phi_m = \cot \phi_{\text{ref}} + \left(\frac{1}{\sin \phi_{\text{ref}}} \right) \left(\frac{A_{\text{ind}}}{A_{\text{ref}}} \right) \quad [6]$$

[0103] 根据下面 3 个化学方程,CO₂ 增加将导致缓冲液区域中的质子成比例增加。给出了 20℃ 下的平衡常数。

[0104]



[0105]



[0106]



[0107] 指示染料发光是因为未质子化 HPTS 的存在, 因此 pCO_2 增加导致了指示染料的荧光强度降低。将振幅之比 $A_{\text{ind}}/A_{\text{ref}}$ 与 pCO_2 联系起来的方程示于方程 10 中, 其中 K 由 HPLS 的 pK_a 和缓冲液的 pH 推导出来。

$$[0108] \quad \left(\frac{A_{\text{ind}}}{A_{\text{ref}}} \right) = \left(\frac{1}{1 + K_p \text{CO}_2} \right) \quad [10]$$

[0109] 然后, 可将得到的相位滞后 Φ_m 与液体中的二氧化碳分压 pCO_2 联系起来, 其中 Φ_0 为在零 pCO_2 下的相位滞后, 而 ϕ_{max} 为饱和时 pCO_2 的相位滞后。

$$[0110] \quad \cot \phi_m = \cot \phi_{\text{max}} + \left(\frac{\cot \phi_0 - \cot \phi_{\text{max}}}{1 + K_p \text{CO}_2} \right) \quad [11]$$

[0111] 首先, 应确定在 430nm 下的激发光的最佳调制频率 f_{mod} 。在 517nm 波长下检测传感器的发射。由于指示物具有纳秒级的衰变时间, 而参照具有微秒级的衰变时间, 因此 f_{mod} 在 500Hz 与 30MHz 之间扫频以找到最佳频率。不含 CO_2 的氢氧化钠 (NaOH) 溶液通过将 NaOH 颗粒溶于在沸腾后经两次蒸馏的水中并用氮气 (N_2) 净化来制备。对于高 pCO_2 浓度的溶液, 使用 1M NaHCO_3 溶液。在整个频率范围内, 对 1M NaHCO_3 溶液的相位滞后进行测量, 然后与不含 CO_2 的溶液相减。将相位差 $\Delta \Phi$ 最大的频率选定为最佳调制频率 f_{mod} 。如果假设参照染料的响应时间为 50 微秒并且指示物的响应时间为 50 纳秒, 然后假设在零点时 $A_{\text{ind}} \sim A_{\text{ref}}$ 并且在饱和时 $A_{\text{ind}} \ll A_{\text{ref}}$, 则可用方程 12 在理论上建立相位差 $\Delta \Phi$ 作为调至频率 f_{mod} 之函数的模型。结果绘制于图 8 中。

$$[0112] \quad \Delta \phi_m = \phi_{\text{ref}}(f_{\text{mod}}) - \cot^{-1} \left(\frac{\cos \phi_{\text{ref}}(f_{\text{mod}}) + \cos \phi_{\text{ind}}(f_{\text{mod}})}{\sin \phi_{\text{ref}}(f_{\text{mod}}) + \sin \phi_{\text{ind}}(f_{\text{mod}})} \right) \quad [12]$$

[0113] 在获得最佳调制频率后, 在此频率下在 37℃ 运行温度下用具有不同 pCO_2 浓度的溶液校准传感器。为了校准, 使用前文所述的不含 CO_2 的溶液和 1M NaHCO_3 溶液的稀释液。可用方程 14 至 16 来计算每个标准溶液中的 pCO_2 。方程中列出的平衡常数对 20℃ 的温度有效。可根据下列方程来计算反应的吉布斯自由能, 以转换成 37℃ 的平衡常数。

$$[0114] \quad \Delta G_0 = -RT \ln K_{\text{eq}} \quad [13]$$

[0115] 由方程 13 可知, $T_1 \ln K_{\text{eq}}(T_1) = T_2 \ln K_{\text{eq}}(T_2)$ 。因此, 可将这三个化学平衡方程式用 37℃ 下的新平衡常数改写。

[0116]



[0117]



[0118]



[0119] 根据这些方程,可使用 Muller,等,“Fluorescence Optical Sensor for Low Concentrations of Dissolved Carbon Dioxide,”Analyst,121(March):339-343,1996 中所概述的方法计算 pCO_2 。不同浓度的 NaHCO_3 溶液的二氧化碳分压 pCO_2 列于表 3 中。

[0120] 表 3. 由 NaHCO_3 的所测量 pH 值和已知浓度计算的 NaHCO_3 溶液在 25°C 溶解的二氧化碳浓度。

[0121]

NaHCO_3 (M)	pH	H_2CO_3^* (M)	pCO_2 (atm)
0.001	7.51	6.89×10^{-5}	0.0018
0.003	8.02	6.69×10^{-5}	0.0017
0.01	8.35	1.05×10^{-4}	0.0027
0.03	8.34	3.22×10^{-4}	0.0083
0.1	8.38	9.80×10^{-4}	0.0252
0.3	8.31	3.50×10^{-3}	0.0888

[0122] 在测量之前和在测量期间,将溶液新鲜混合并储存于密封小瓶中,将该小瓶保持密封并搅拌以减小传感器的响应时间。传感器用可不含 CO_2 的 NaOH 标准溶液和剩余的浓度递增的 NaHCO_3 溶液校准,同时在前面实验中所测量的最佳频率下对 LED 进行调制。校准曲线可与方程 11 拟合。 Φ_0 值可通过不含 CO_2 的测量获得。 $\Phi_{\max}$ 和 K 可从最佳拟合参数获得。

[0123] CO_2 传感器可通过经在 1kHz 至 100kHz 频率下调制的 LED (430nm) 照射以获得最佳调制频率。由于电路中存在截止 100kHz 频率的电子低通滤波器,因此该系统可使用的最高调制频率为 93kHz。然后,将从光电二极管获得的信号与参照信号进行比较并得到两个信号之间的相位滞后。该测量在 1mM NaHCO_3 溶液上进行,然后用 1M NaHCO_3 溶液进行重复。然后,将两个测量之间的相位差作为频率的函数作图,并示于图 9 中。可将得到的数据拟合成方程式 6,以获得参照染料和指示染料的寿命。根据拟合结果,参照染料的寿命测量为 2.5 微秒(与文献值~5 微秒接近),指示染料的寿命测量为 312 纳秒,与文献值 173-293 纳秒类似。根据测量结果,提供最高灵敏性的最佳调制频率是电子系统的最高调制频率,约 93kHz。将选择用于该扫频的调制频率选定为素数,以避免测量中因背景中的电子噪声源谐波而引起的噪声。

[0124] 将 CO_2 传感器用不同浓度的碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶液校准,不同浓度的碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶液表示具有不同溶解 CO_2 水平的溶液,如图 E8 中所列出的。将溶液新鲜混合,然后密封。在即将测量之前,测量溶液的 pH 以确定溶解 CO_2 的浓度。一旦将溶液注入到具有 CO_2 传感器的微型生物反应器中,就允许相位测量达到稳定状态。结果绘制于图 10 中。将数据拟合成方程 11,其中 K 值 = 3.43×10^3 。测量的最大相位滞后 $\Phi_{\max}$ 为 147° ,零溶解 CO_2 浓度下的相位滞后 Φ_0 为 149° 。

[0125] 为了使微型生物反应器具有与大规模生物反应器相同的通气速率,表征了新 RECA

微型生物反应器对氧气和二氧化碳两者的气体传输率 (k_La)。该表征在确定了每个阻力管路的最佳混合时间之后进行,因为气体传输率 k_La 是时间常数,其与通过 PDMS 膜和液体的气体种类的扩散性以及液体中的混合速率均有关。扩散性和混合速率越高,气体种类向传感器所在室的底部传输得越快。足够的氧气气体传输率对于确保细胞具有充足的氧并且不会进入缺氧状态所必需的。使用提供二氧化碳适当的气体传输率的参数,可确保将 pH 控制为与在大规模生物反应器中观察到的类似。

[0126] 为了确定氧的 k_La ,使用动态气体方法进行实验,因为对聚结液体(例如我们的系统)而言, k_La 的稳态和动态放气值是相当的,如 V. Linek, P. Benes, 和 V. Vacek, “Measurement of aeration capacity of fermenters,” Chem. Eng. Technol., 1989, 第 12 卷, 第 1 期, 第 213-217 页中所述。在该实施例中所描述的实验中,将混合器顶部空间中的气体从医用气体混合物 (21% O_2 、5% CO_2 , 剩余部分为 N_2) 转换成纯氮气 (100% N_2)。描述氧气的气体传输关系的微分方程由方程 17 给出,其中 C 表示液体中的溶解氧浓度。 C^* 是液体中的氧饱和浓度,并且 OUR 指液体中的氧摄取速率(例如,液体中吸收氧的生物细胞或分子的氧摄取速率)。

$$[0127] \quad \frac{dC}{dt} = k_La(C^* - C) - OUR \quad [17]$$

[0128] 求解上述微分方程,得到了溶解氧浓度 C 作为时间函数的指数关系,其中 $OUR = 0$ 。

$$[0129] \quad C(t) = C^*(1 - e^{-k_Lat}) \quad [18]$$

[0130] 图 11 中示出了对于最佳混合循环时间为 12 秒的阻力管路 1,通过利用动态放气方法之氧传感器测量的结果。根据测量结果,在氧气从顶部空间通过膜扩散到液体中时(即,在医用气体混合物在顶部空间中时)获得的 k_La 为 6.9 ± 0.1 小时⁻¹。当将气体转换成纯氮气时,用顶部空间中的低浓度氧气将氧气从系统清除(purging),并测量净化的气体传输率为 1.37 ± 0.04 小时⁻¹。作为比较,对于 15,000L 生物反应器,氧气的气体传输率为 2 至 3 小时⁻¹,而对于 2L 生物反应器为 15 小时⁻¹。

[0131] 在相同试验中,还测量了 CO_2 的气体传输率,因为医用气体混合物还包含 CO_2 气体。阻力管路 1 的结果示于图 12 中。将两个指数图与数据拟合以获得为 k_La 倒数的时间常数。根据数据的指数拟合,来自医用气体混合物的 CO_2 的气体传输率 k_La 为 2.14 ± 0.07 小时⁻¹,并且从液体到纯氮气气体顶部空间的气体传输速率为 4.93 ± 0.04 小时⁻¹。作为比较,对于 15,000L 生物反应器, CO_2 气体传输率为 0.2 至 0.4 小时⁻¹,而对于 2L 生物反应器为 5 至 6 小时⁻¹。

[0132] 示出使用顶部空间中通过 PDMS 膜的 CO_2 气体变化来控制 pH 的实验结果(三角形)示于图 12 中。线表示出数据的最佳拟合。使用 CD CHO (Invitrogen) 作为液体培养基进行实验。使用 70 μm 厚的 PDMS 膜作为气体可渗透壁。通过调节电磁阀的占空比使气体顶部空间中的 CO_2 与 O_2 和 He 混合,从而使每种气体在顶部空间中的比例不同。用位于液体室底部的光学 pH 传感器 (PreSens) 测量 pH。pH 传感器用 pH 缓冲液预先校准并将 pH 测量结果与标准 pH 探头进行比较。液体培养基通过使膜弯曲进行搅动,以帮助气体传输。作为比较,也在顶部空间中使用医用气体混合物 (75% N_2 、20% O_2 和 5% CO_2)。图 12 中,医用气体混合物的数据点以圆圈示出。

[0133] 尽管本文中已对本发明的几个实施方案进行了描述和说明,但是本领域中的普通

技术人员将容易想到多种的其他方法和 / 或结构来实现本文所述功能和 / 或获得本文所述结果和 / 或一个或更多个优点, 并且认为这些变化或改变中的每一个均在本发明的范围内。更一般地, 本领域技术人员将容易认识到, 本文所述的所有参数、尺寸、材料和结构均仅是示例性的, 并且实际的参数、尺寸、材料和 / 或结构将取决于采用本发明教导的一种或更多种特定应用。本领域技术人员仅使用常规实验将认识到或者将能够确定许多与本文所描述的本发明特定实施方案等同的方案。因此, 应理解, 前述实施方案仅作为示例示出, 并且在所述权利要求及其等价方案的范围内, 本发明可以以不同于已具体描述并要求保护的其他方式进行实践。本发明涉及本文所述的每一个单独的特征、系统、制品、材料和 / 或方法。此外, 如果这些特征、系统、制品、材料和 / 或方法不相互矛盾, 则两个或更多个的这些特征、系统、制品、材料和 / 或方法的任意组合均包括在本发明的范围内。

[0134] 除非明确地相反指示, 否则本文说明书和权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词应理解为指“至少一个”。

[0135] 本文说明书和权利要求书中使用的短语“和 / 或”应理解为指以此要素中的“两者之一或两者”这样结合, 即要素在一些情况下共同存在而其他情况下分开存在。除非明确地相反指示, 否则除“和 / 或”表述具体指示的要素之外, 还可任选地存在另一些要素, 无论与这些要素是否与具体指示的要素相关。因此, 作为非限制性实例, 提及“A 和 / 或 B”, 当与开放式语言例如“包含 / 包括”结合使用时: 在一个实施方案中, 可指 A 而无 B (任选地包括除 B 之外的要素); 在另一个实施方案中, 可指 B 而无 A (任选地包括除 A 之外的要素); 在又一个实施方案中, 可指 A 和 B 两者 (任选地包括另一些要素) 等。

[0136] 本文说明书和权利要求书中使用的“或”应理解为与以上定义的“和 / 或”相同的含义。例如, 当在列表中分列项目时, “或”或“和 / 或”应解释为包括在内, 即包括大量要素或要素列表中的至少一个, 但是也包括其中的多于一个, 并任选地包括另外的未列出项目。只有明确指出相反的术语, 如“仅之一”或“正好之一”或当在权利要求中使用的“由 组成”, 将指包括大量要素或要素列表中的正好一个要素。一般而言, 当前面有排他性术语, 例如: “两者之一”、“一个”、“仅其一”或“恰好其一”时, 本文使用的术语“或”仅应解释为指排他性替代 (即“一个或另一个而非两者”)。“基本由 . . . 组成”当在权利要求书使用中时应具有其在专利法领域中所使用的一般含义。

[0137] 在提及一个或更多个要素的列表时。本文说明书和权利要求书中使用的短语“至少一个”应理解为选自要素列表中的任何一个或更多个要素的至少一个要素, 但并不一定包括元素列表中具体列出的每个和各个要素中的至少一个要素, 并且不排除要素列表中要素的任意组合。该定义还允许除了短语“至少一个”所指的要素列表内的具体表示的要素之外, 可任选地存在另一些要素, 无论与具体表示指定的那些要素是否相关。因此, 作为非限制性实例, “A 和 B 中的至少一个” (或者等价地, “A 或 B 中的至少一个”, 或者等价地, “A 和 / 或 B 中的至少一个”) 可以是这样的: 在一个实施方案中, 指至少一个, 任选地包括多于一个的 A, 但不存在 B (并且任选地包括除 B 之外的要素); 在另一个实施方案中, 指包括至少一个, 任选地包括多于一个的 B, 但不存在 A (并且任选地包括除 A 之外的要素); 在又一个实施方案中, 指至少一个, 任选地包括多于一个的 A 和至少一个 (任选地包括多于一个的) B (并且任选地包括其他要素) 等。

[0138] 在权利要求书及以上的说明书中, 所有过渡性短语例如“包含”、“包括”、“携带”、

“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”等应理解为开放式的,即指包括但不限于。仅过渡性短语“由... 组成”和“基本由... 组成”分别应是封闭式的或半封闭式的过渡性短语,如 United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures,第2111.03章中所述。

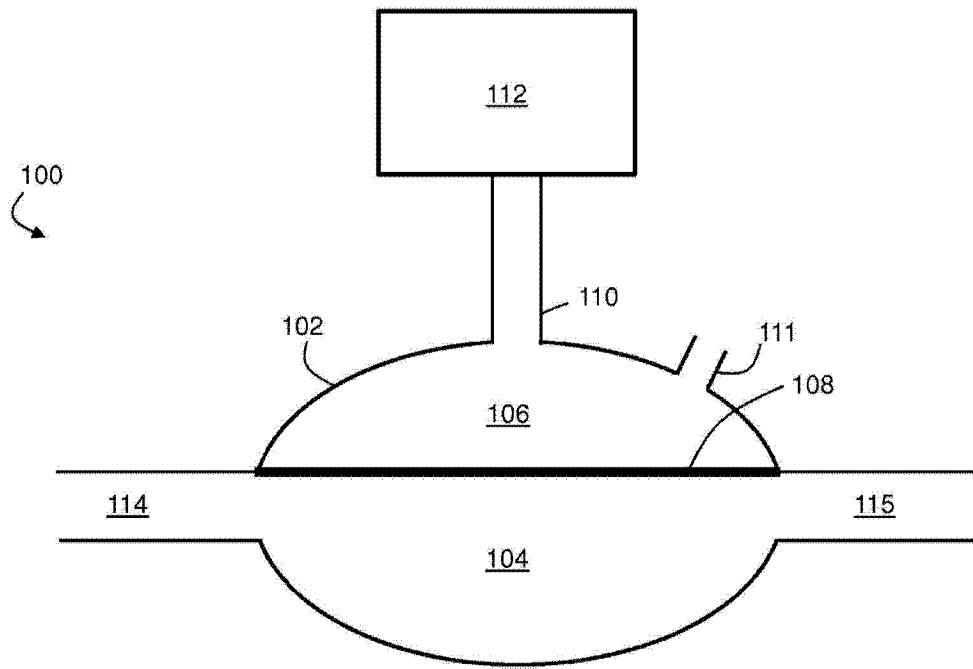


图 1

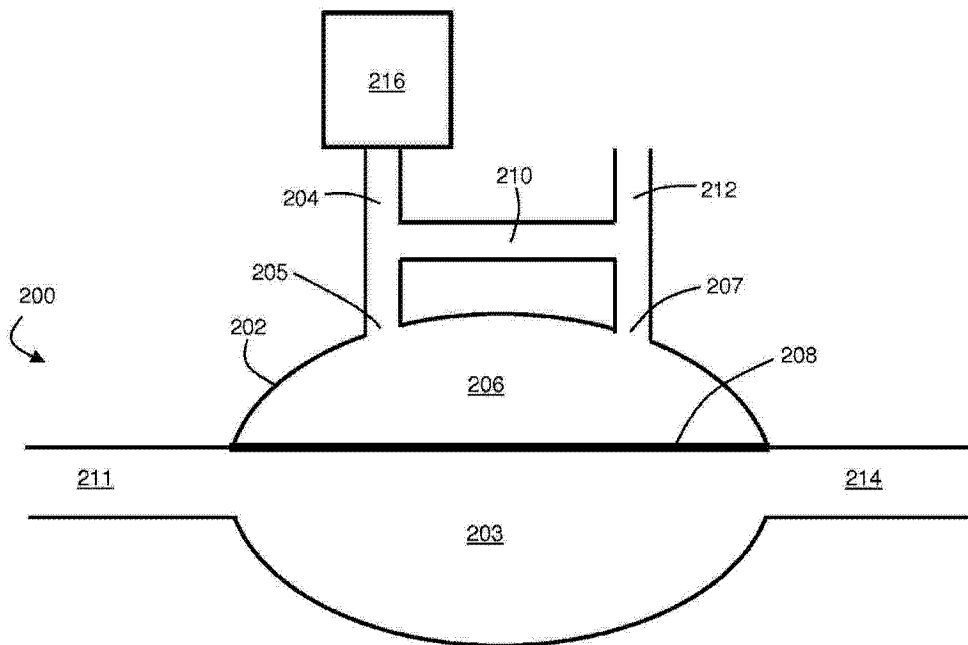


图 2A

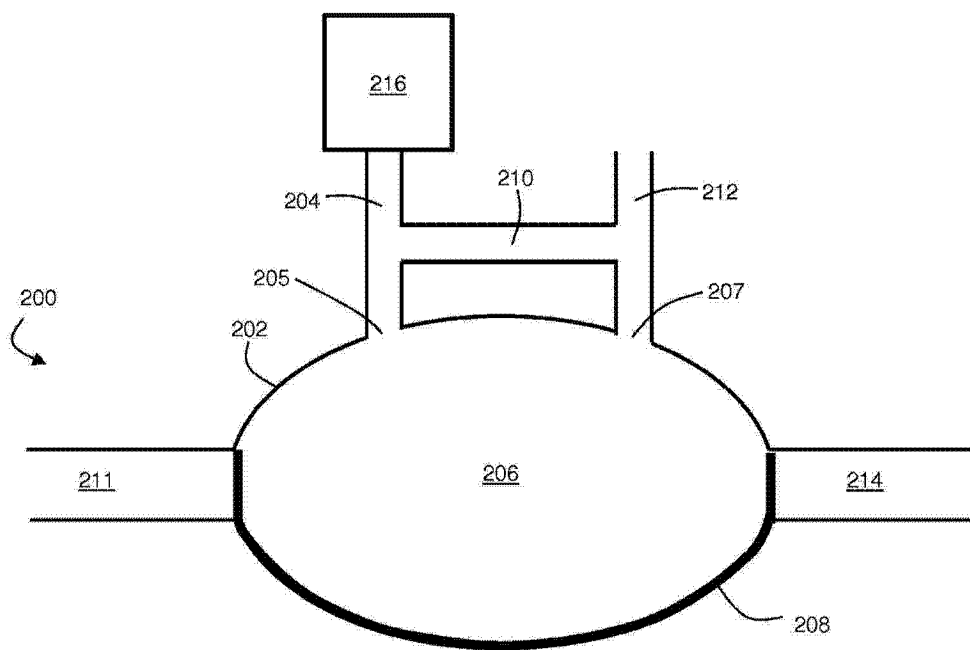


图 2B

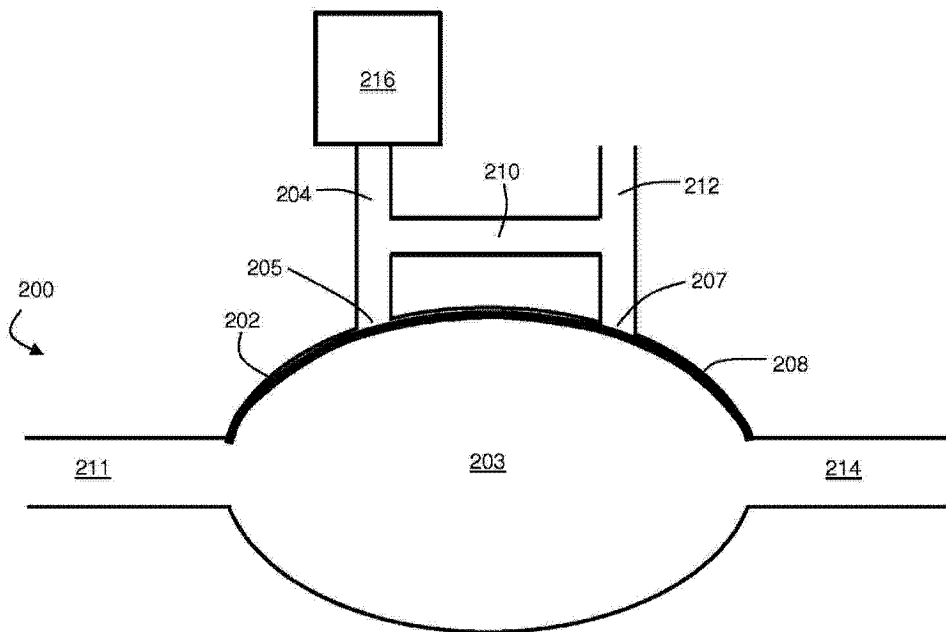


图 2C

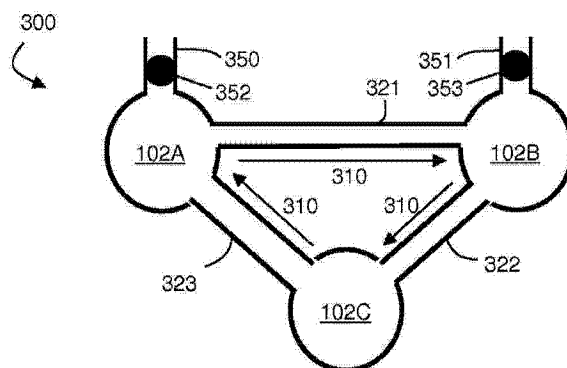


图 3

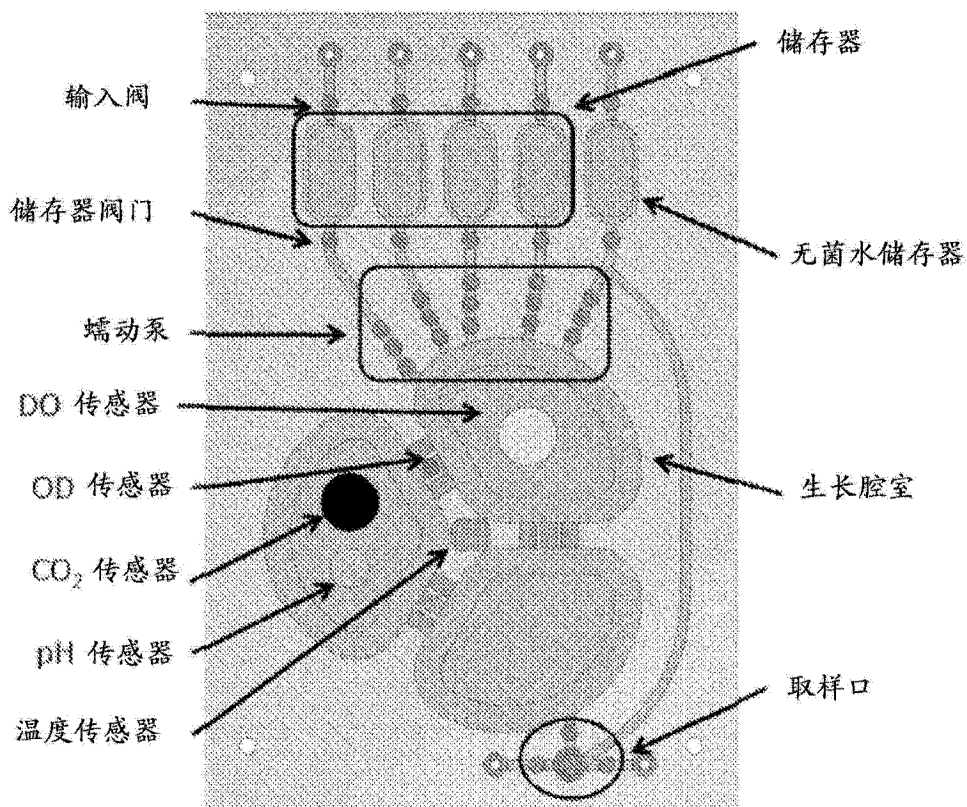


图 4

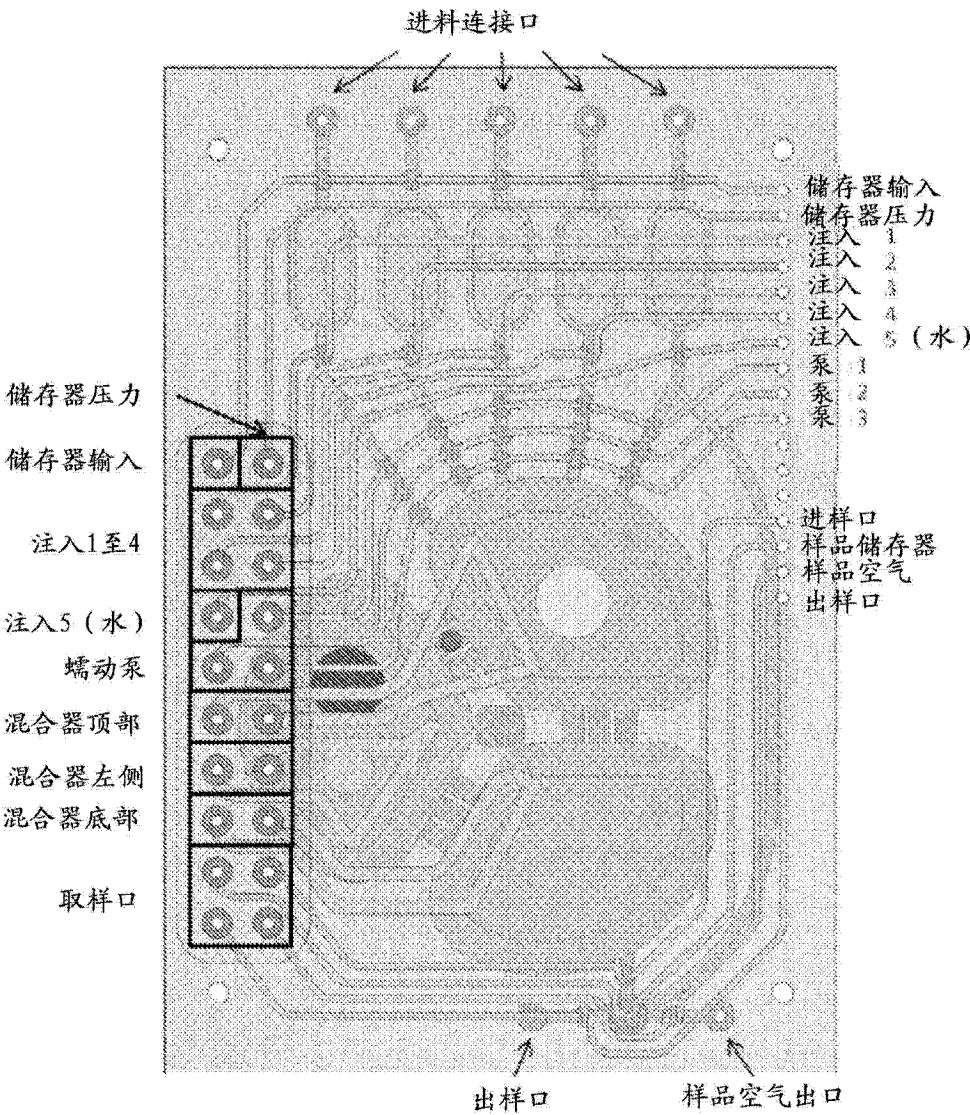


图 5

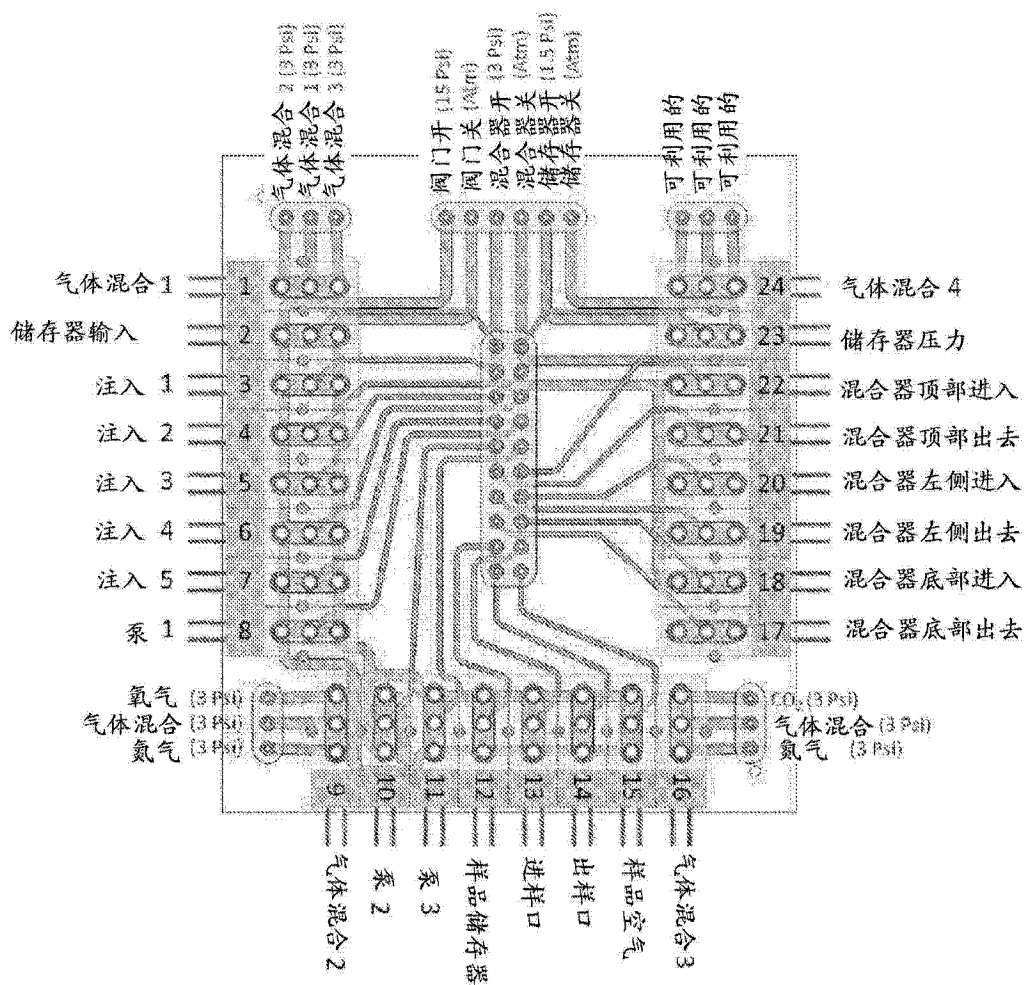


图 6

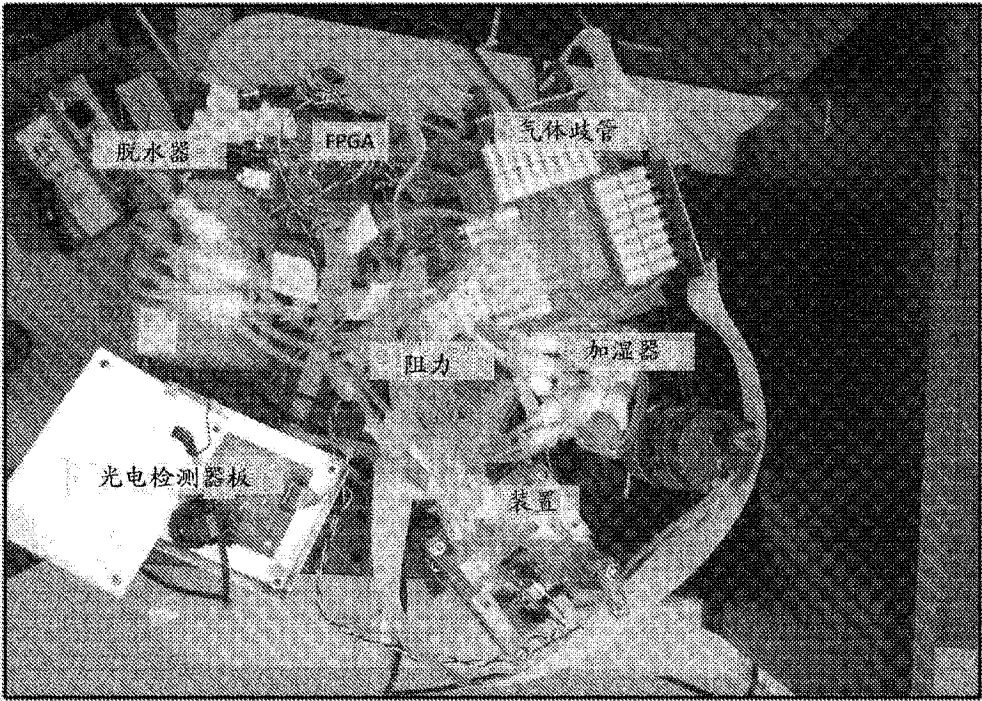


图 7

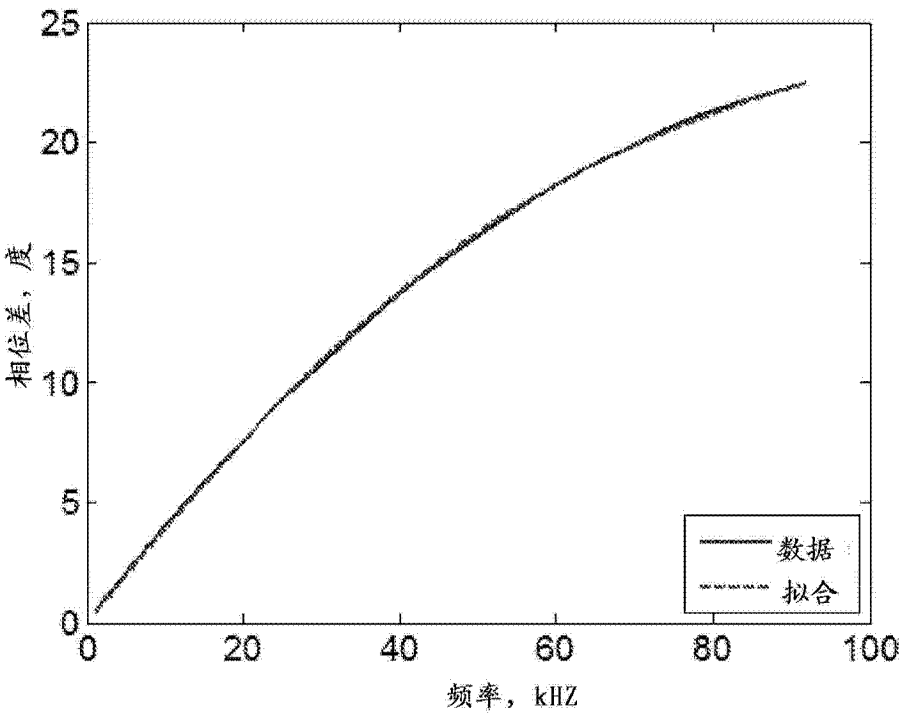


图 8

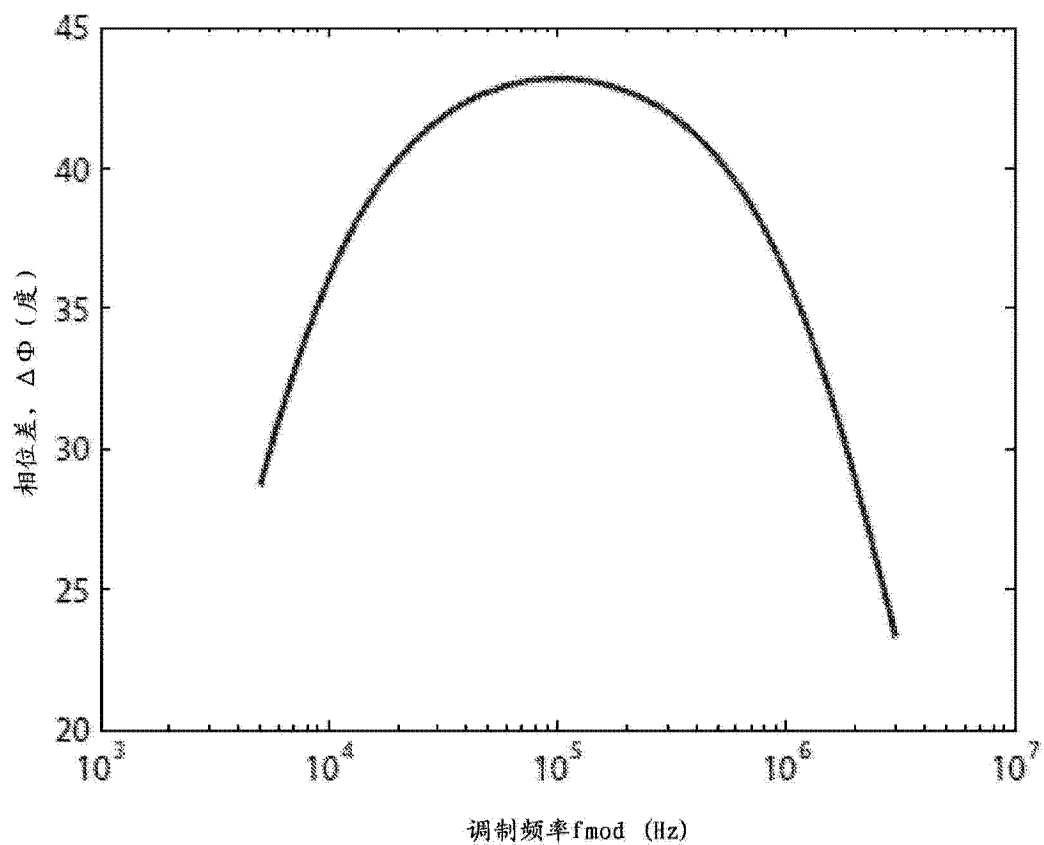


图 9

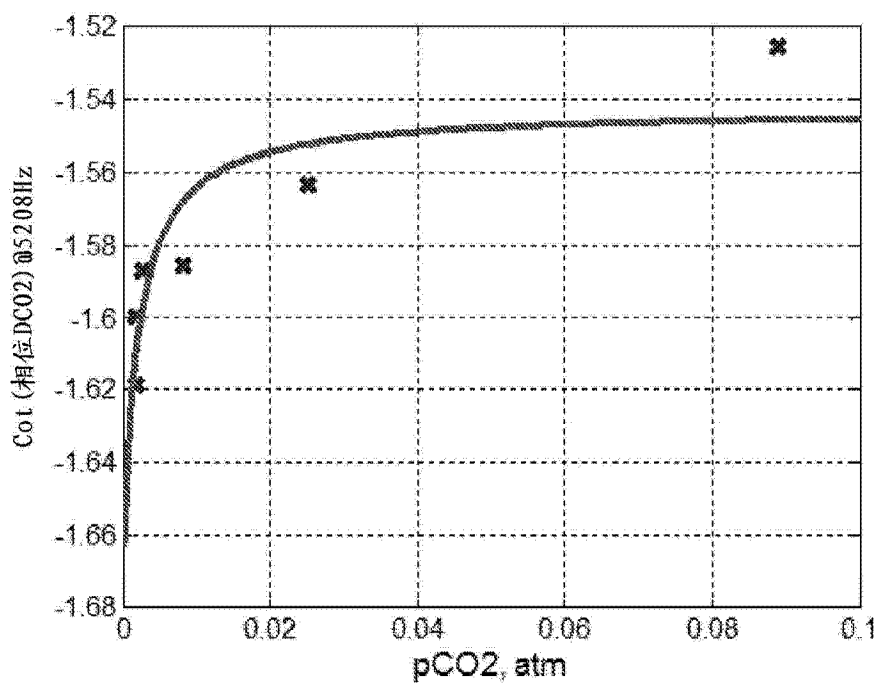


图 10

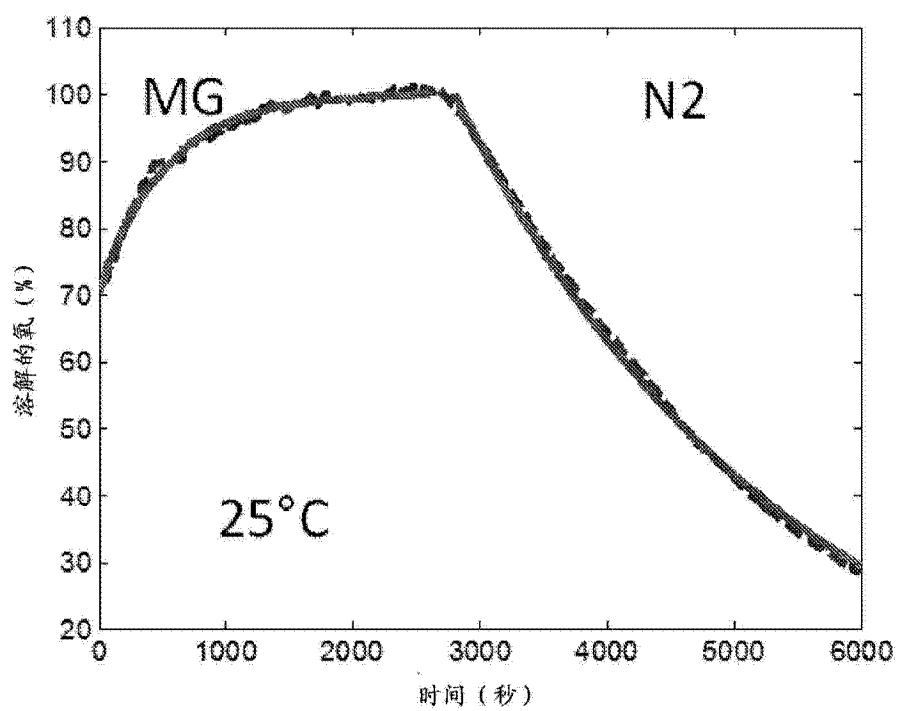


图 11

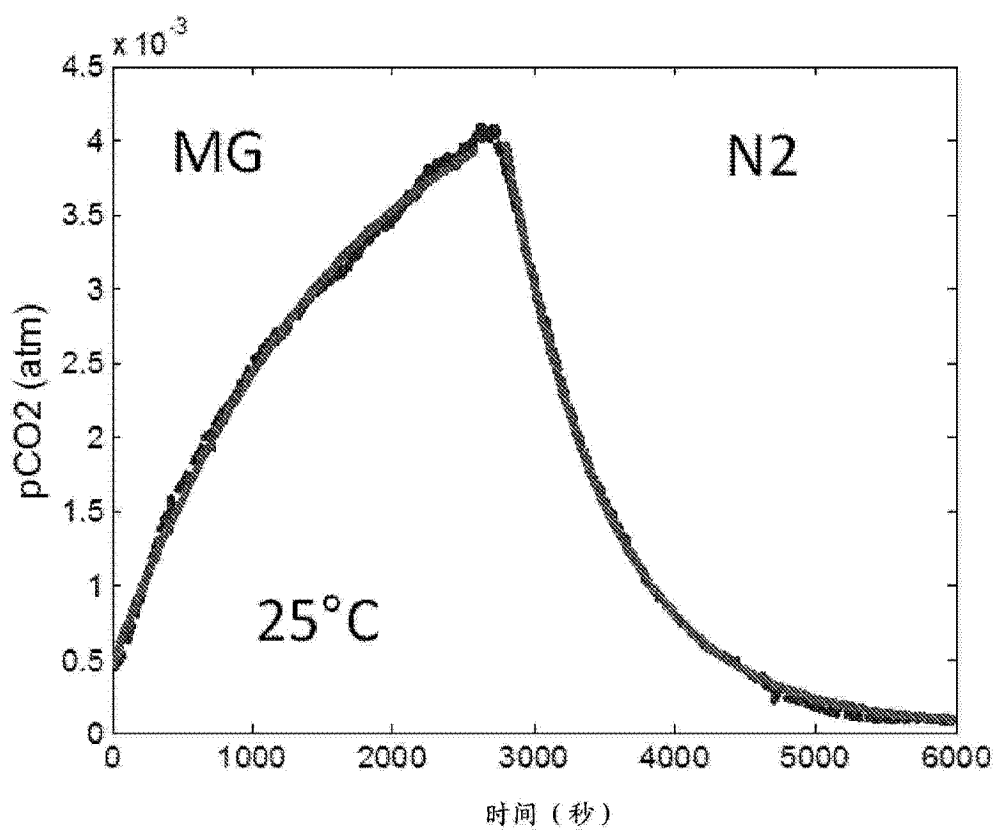


图 12

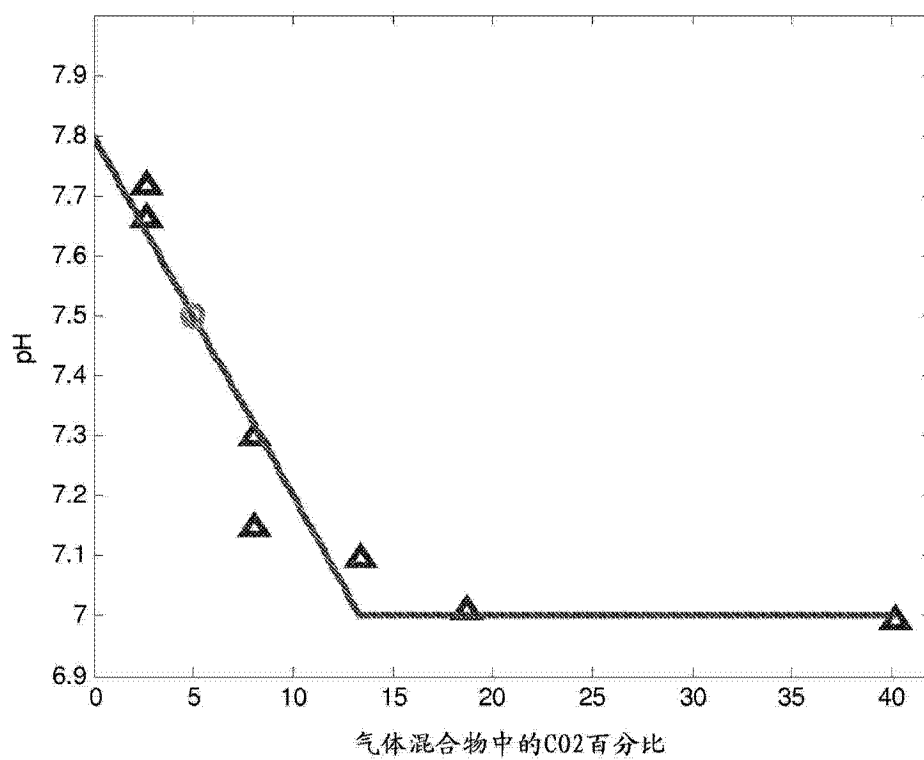


图 13