



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103415610 B

(45)授权公告日 2016.10.19

(21)申请号 201280013475.3

(22)申请日 2012.03.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103415610 A

(43)申请公布日 2013.11.27

(30)优先权数据
1150328-1 2011.04.15 SE
61/454138 2011.03.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.09.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2012/050292 2012.03.16

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/128703 EN 2012.09.27

(73)专利权人 通用电气健康护理生物科学股份
公司
地址 瑞典乌普萨拉

(72)发明人 V.乔特奥 R.迪亚纳 C.凯塞马耶

E.林德斯科格 C.罗宾森

J.L.鲁克 K.D.瓦斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 林毅斌 林森

(51)Int.Cl.
C12M 3/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101809142 A,2010.08.18,说明书第14-
15、30、45段,说明书附图11.

CN 1882681 A,2006.12.20,说明书第4页第
2段,第5页第2段.

US 2011014689 A1,2011.01.20,全文.

US 2005272146 A1,2005.12.08,全文.

US 2011020922 A1,2011.01.27,说明书第
16、30、34、38-39、43段,说明书附图1-2.

CN 101974424 A,2011.02.16,全文.

审查员 吴漾

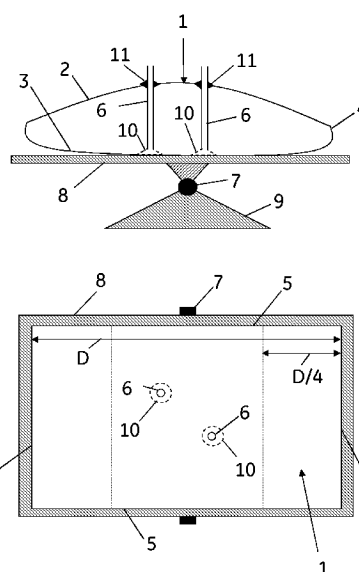
权利要求书2页 说明书13页 附图12页

(54)发明名称

用于培养细胞的弹性袋

(57)摘要

一种用于细胞培养的充气式生物反应器袋,包含弹性材料的上片和下片,它们连接在一起形成两个端部边缘和两个侧边缘,其中一个挡板或多个挡板从下片的一个区域上伸出,所述区域到两个端部边缘的任何一个的最短距离大于两个端部边缘之间的最短距离的约四分之一。



1. 用于细胞培养的充气式生物反应器袋(1), 包含弹性材料的上片(2; 22)和下片(3; 23), 它们连接在一起形成两个端部边缘(4)和两个侧边缘(5), 其中多个管状挡板(6)从所述下片的一个区域内伸出, 所述区域到所述两个端部边缘(4)的任何一个的最短距离大于所述两个端部边缘之间的最短距离的约四分之一, 其中所述管状挡板与所述下片通过每个挡板一个的细胞悬液扩散器连接, 并且与所述上片通过每个挡板一个的输入/输出接口连接, 其中细胞悬液扩散器具有开口(26; 36), 其比细胞大几个数量级。

2. 权利要求1的充气式生物反应器袋, 其中所述挡板(6)与所述下片(3; 23)相连, 并且与所述上片(2; 22)相连。

3. 权利要求1或2的充气式生物反应器袋, 其中所述挡板(6)是圆柱形的。

4. 权利要求1或2的充气式生物反应器袋, 其中所述挡板(6)具有圆形或椭圆形横截面。

5. 权利要求1或2的充气式生物反应器袋, 其中所述袋装设有无菌连接器并经辐射处理。

6. 权利要求1或2的充气式生物反应器袋, 其中至少一个挡板具有大体上S形的形状。

7. 权利要求6的充气式生物反应器袋, 其中每个挡板具有大体上S形的形状。

8. 权利要求1的充气式生物反应器袋, 其中至少一个细胞悬液扩散器(10; 20; 30)包含底圈(24; 34)或底盘、将所述底圈或底盘与管道连接器(27; 37)相连的多个支杆(25; 35)以及所述支杆之间的多个开口(26; 36)。

9. 权利要求8的充气式生物反应器袋, 其中每个细胞悬液扩散器(10; 20; 30)包含底圈(24; 34)或底盘、将所述底圈或底盘与管道连接器(27; 37)相连的多个支杆(25; 35)以及所述支杆之间的多个开口(26; 36)。

10. 权利要求1或8的充气式生物反应器袋(41; 51), 其中所述上片上的所述接口(42; 52)的至少一个还与袋(41; 51)外部的至少一个细胞分离装置相连。

11. 权利要求10的充气式生物反应器袋(41; 51), 其中所述细胞分离装置是过滤器(43; 53)。

12. 权利要求10的充气式生物反应器袋(41; 51), 其中所述细胞分离装置是重力装置。

13. 权利要求11的充气式生物反应器袋(41; 51), 其中所述过滤器(43; 53)是具有渗余侧和渗透侧的微过滤器或超滤器。

14. 权利要求13的充气式生物反应器袋(41; 51), 其中所述微过滤器或超滤器是中空纤维柱。

15. 权利要求10的充气式生物反应器袋, 其中所述细胞分离装置还与循环泵(44)相连。

16. 权利要求15的充气式生物反应器袋, 其中所述循环泵(44)是空气驱动的隔膜泵。

17. 权利要求13的充气式生物反应器袋, 其中所述上片上的所述接口(42; 52)中的两个通过泵(54)与所述过滤器(53)的渗余侧相连, 形成渗余物环路。

18. 权利要求1的充气式生物反应器袋, 其中开口(26; 36)尺寸不小于1 mm。

19. 包含前述权利要求中任一项的充气式生物反应器袋(1)的生物反应器, 其架设在支撑物(8)上, 所述支撑物围绕平行于所述端部边缘(4)的可移动轴(7)可枢转地架设在基座(9)上。

20. 一种用于细胞培养的方法, 其包含以下步骤:

a) 提供由聚合物材料的上片和下片组成的充气式生物反应器袋, 上片和下片连接在一

起形成两个端部边缘(4)和两个侧边缘(5),其中多个管状挡板(6)从所述下片的一个区域内伸出,所述区域到所述两个端部边缘的任何一个的最短距离大于所述两个端部边缘之间距离的约四分之一,

b)将所述生物反应器袋架设在支撑物上,所述支撑物围绕平行于所述端部边缘的可移动轴可枢转地架设在基座上,

c)向所述袋提供细胞培养基和细胞接种物,

d)通过围绕所述可移动轴摇动所述支撑物,振荡培养袋中的细胞,形成细胞悬液并且通过所述上片上的接口供应至少一种气体;

其中至少一个挡板通过细胞悬液扩散器与所述下片相连,并且通过输入/输出接口与所述上片相连,所述方法还包括步骤b')将所述上片上的输入/输出接口与至少一个细胞分离装置和泵连接,且在步骤d)中使所述细胞悬液通过所述细胞悬液扩散器和管状挡板循环流过所述细胞分离装置,其中细胞悬液扩散器具有开口(26;36),其比细胞大几个数量级。

21. 权利要求20的方法,其中所述细胞分离装置是过滤器。

22. 权利要求20的方法,其中开口(26;36)尺寸不小于1 mm。

23. 权利要求20的方法,其中所述细胞在培养期间表达目标生物分子。

24. 权利要求23的方法,其中所述目标生物分子是蛋白质。

25. 权利要求23的方法,其中所述细胞分离装置是过滤器,并且其中所述过滤器是微过滤器,并且步骤d)中的所述目标生物分子作为渗透物回收,而渗余物再循环至所述袋中。

26. 权利要求23的方法,其中所述细胞分离装置是过滤器,并且其中所述过滤器是超滤器,在步骤d)中所述目标生物分子保留在渗余物中,渗余物再循环至所述袋中。

27. 权利要求20-26中任一项的方法,其中所述细胞分离装置是过滤器,并且其中在步骤d)中所述细胞悬液通过循环泵的向外冲程泵送经过所述过滤器的渗余侧,然后通过所述循环泵的向内冲程经由所述细胞悬液扩散器经过所述渗余侧泵送回所述袋中。

28. 权利要求20-23中任一项的方法,其中以分批模式进行所述培养,在培养末期,通过细胞悬液扩散器、管状挡板和输出接口以及进一步通过细胞分离装置从所述袋中回收细胞悬液。

29. 权利要求20-23中任一项的方法,其中以分批进料模式进行所述培养,在培养末期,通过细胞悬液扩散器、管状挡板和输出接口以及进一步通过细胞分离装置从所述袋中回收细胞悬液。

30. 权利要求20-26中任一项的方法,其中所述细胞分离装置是过滤器,并且其中在步骤d)中所述细胞悬液在环路中通过所述上片上的接口,经过所述过滤器的渗余侧泵送回所述袋中。

31. 权利要求30的方法,其中在步骤d)中所述细胞悬液在环路中通过第二个管状挡板和第二个细胞悬液扩散器,经过所述过滤器的渗余侧泵送回所述袋中。

32. 权利要求20-26中任一项的方法,其中存活细胞的密度为至少40 MVC/mL。

33. 权利要求32的方法,其中存活细胞的密度在40和150 MVC/mL之间。

34. 权利要求20-26中任一项的方法,用权利要求1-18中任一项的袋实现。

用于培养细胞的弹性袋

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明涉及用于培养细胞的弹性袋,更特别涉及用于在摇动振荡条件下培养的充气式弹性袋。本发明还涉及在弹性袋中培养细胞的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 生物加工行业传统上在用于发酵和细胞培养物的制造工艺中使用不锈钢系统和管道。这些装置被设计成可蒸汽灭菌并再利用。然而,清洗和灭菌是昂贵且劳动密集型操作。而且,具有必要管道和设施的这些传统系统的安装费用往往高得令人生畏。另外,这些系统是为特定工艺设计的,不能易于重新组合用于新的应用。这些局限性使得在过去十年间采用了新的方法——即,使用塑料的、单次使用的一次性袋和管路来替代常用的不锈钢罐。

[0005] 具体而言,传统上用不锈钢制造的生物反应器,在许多应用中已经被替换为一次性袋,其摇动以为细胞培养提供必需的通气和混合。这些单次使用的袋通常是无菌的,消除了昂贵且耗时的清洗和灭菌步骤。这些袋被设计为在操作过程中保持无菌环境,因而使污染的风险最小化。

[0006] 常用的袋是“枕型(pillow style)”的,主要是因为它们可以通过将两个弹性塑料片接合在一起以低廉的成本制造。还描述了三维袋,其中可以使用更多的片制造壁结构。

[0007] 成功的一次性生物反应器系统之一使用摇床,生物反应器袋置于其上。这种生物反应器袋部分充满液体营养介质和所需的细胞。摇床摇动袋,使袋中的细胞持续运动,并且还通过湍流的气-液表面提供有效的气体交换。所述袋,通常具有至少一个供气管以引入空气、二氧化碳、氮气或氧气,以及至少一个排气管以排出呼出的气体。可以通过其它管道加入营养物质。

[0008] 当细胞以高密度培养时,通气可能不足以供给细胞。US 2010/0203624和US 7,195,394中描述了具有沿着边缘的挡板以改善混合的袋,但是这些袋不足以实现现今所需的细胞密度。因此,有需要在摇床式生物反应器中改善通气。

[0009] 通常,细胞培养以分批模式操作。在分批操作中,在生物反应器中接种培养基和少量细胞,不进一步供给营养物质使细胞生长到较高密度。细胞最终由于营养物质的缺乏或者有毒代谢物的积累而死亡,这最终决定了在哪一时刻收获。这种方法有几个缺点——首先,关键营养物质可能耗尽,导致低的最终细胞密度和由此导致的较低产率;其次,有毒代谢副产物的积累常常损害潜在的重组蛋白产物的形成和品质。

[0010] 另一种可选择的操作模式是分批进料。它包括在基础培养基中进行初始培养,在某个时间点开始进行特定营养物质的补充进料,否则这些营养物质会变得有限。这些营养物质可以单独加入,或者成组加入,他们可以连续补充或分批补充。这种策略能抵消早期的营养物质消耗,结果延长了培养时间,增加最大细胞密度,并由此增加例如细胞生产的重组蛋白的高产率的可能性。但是,分批进料策略通常无法阻止有毒代谢物的积累,这会导致在培养过程中条件不断改变。这些改变可能对产物的品质具有不利影响,例如在较不利的糖基化模式方面。

[0011] 早已认识到灌流培养为某些工艺提供了更好的经济性。在这种操作中,细胞保留在生物反应器中,而有毒代谢副产物被连续除去。连续加入包含营养物质的进料。这种操作能获得高的细胞密度,更重要的是,细胞可以维持高产状态数周-数月。这获得更高的产率,而且减小了所需生物反应器的尺寸。它对于培养原代细胞或其它生长缓慢的细胞也是一项有用的技术。灌流操作对培养用于人细胞和基因治疗应用所需的大量细胞有着巨大的潜能。近期描述了一种新的灌流工艺,其策略是不仅将细胞而且将产物保留在生物反应器容器中,这在生物工艺界中产生了一定的影响。在这种工艺中,使用具有低截留孔径的中空纤维过滤器将高分子量颗粒例如细胞和目标蛋白(例如抗体)与低分子量废弃产物分离。高分子量颗粒保留在渗余物中,因此保留在反应器中,低分子量的部分被连续除去。这种策略不仅在反应器容器中获得了高细胞密度,而且获得了非常高的产物浓度。

[0012] 灌流培养的另一项最新进展是US 6,544,424中描述的交替式切线流(ATF)方法。

[0013] US 2011/0020922和US 6,544,788中描述了在充气袋中进行灌流培养,二者讨论了在袋内使用的过滤器以通过管路除去滤液。这种设置对过滤器结构增加了严格的限制,有过滤器堵塞的重大风险。而且,如果过滤器堵塞,那么整个培养物必须转移到新的充气袋中。因此需要改进有助于弹性袋灌流培养的结构。

[0014] 发明简述

[0015] 本发明的一个方面是提供适于高密度细胞培养的充气式生物反应器袋。这通过权利要求1中定义的袋实现。这种结构的一个优点是挡板提供了改善的混合和通气,这允许延长在高存活细胞密度下的培养。

[0016] 本发明的另一个方面是能够在充气袋中进行有效细胞培养。这通过权利要求14中定义的方法实现。

[0017] 本发明更多合适的实施方案在从属权利要求中描述。

[0018] 附图简述

[0019] 图1显示了(俯视图和侧视图)本发明的具有挡板的充气式生物反应器袋。

[0020] 图2显示了(俯视图)本发明的具有可选择的挡板排列的袋。

[0021] 图3显示了(侧视图和俯视图)本发明的袋,其架设在可旋转的支撑物上。

[0022] 图4显示了(侧视图和俯视图)本发明的袋,其架设在可旋转的支撑物上。

[0023] 图5显示了本发明的袋的上片和下片。

[0024] 图6显示了本发明的细胞悬液扩散器。

[0025] 图7显示了本发明的细胞悬液扩散器。

[0026] 图8显示了本发明用于ATF灌流培养的装置。

[0027] 图9显示了本发明用于TFF灌流培养的装置。

[0028] 图10显示了本发明使用TFF系统(A)和AFF系统(B)培养的CHO细胞生产的重组IgG的动力学。

[0029] 图11显示了本发明使用TFF系统(A)进行的29-天灌流工艺中以及本发明使用ATF系统(B)进行的27-天灌流工艺中的细胞密度、存活率和灌流速度。

[0030] 图12显示了与图10A相同的数据,其中TFF灌流培养持续共49天。

[0031] 定义

[0032] 本文所用的术语“灌流”指一种细胞培养的模式,其中不断交换细胞培养基,而细

胞保留在生物反应器容器中。细胞培养基的交换可以例如通过过滤器进行,这意味着能除去抑制性或毒性低分子量废弃产物并能不断加入营养物质。过滤器可以是微过滤器,在这种情况下可以从渗透液中回收细胞表达的目标蛋白。也可以是超滤器,其允许所表达的蛋白保留在细胞悬液中,可在分批收获操作中回收它们。

[0033] 本文所用的术语“挡板”指置于充气式生物反应器袋中的物体,其能够在袋的摇动过程中扰乱袋中的液体流动。

[0034] 本文所用的术语“接口”指充气袋上的开口,适合于将物质输入袋中或从袋中输出或者适合于安装传感器。接口通常配置有管道配件。

[0035] 实施方案详述

[0036] 在图1-5所示的一方面,本发明公开了用于细胞培养的充气式生物反应器袋1,所述袋包含弹性材料的上片2和下片3,它们连接在一起形成两个端部边缘4和两个侧边缘5,其中一个挡板6或多个挡板6在下片3上的一个区域中从下片3伸出,所述区域到两个端部边缘4的任何一个(即最近的端部边缘)的最短距离大于两个端部边缘4之间的最短距离D的约四分之一。所述袋通常可以是矩形的,在这种情况下,对于下片3上任何点来说,与端部边缘4的任何一个(最近的一个)的最短距离永远不会大于D/2。因此,挡板6可以在到端部边缘4的最短距离为端部边缘4之间的最短距离D的约四分之一和二分之一之间的区域,即在D/4和D/2之间从下片3伸出。在一些实施方案中,到端部边缘的距离可以在D/3和D/2之间。甚至可以是大约D/2,这样挡板6位于袋的中间。如图3和图4所示,袋1可以围绕通常平行于端部边缘4的可移动轴7可枢转地架设于基座9上。可移动轴7可以位于袋1下面,所述袋可以架设于支撑物8上,其中例如每个端部边缘4与可移动轴7在下片3上的投影之间的距离约等于D/2。架设在可移动轴上的合适的可枢转支撑物可以是例如WAVE Bioreactor™ Systems (GE Healthcare)。上片2和下片3的弹性材料可以是聚合物材料,例如厚度在例如50-500微米范围内的塑料膜或塑料层压板。除了一种或多种聚合物材料外,层压板还可包含例如阻挡层,其可以是聚合物或无机氧化物或金属。特别地,上片2可以是透明的以确保能看见袋内。根据袋的使用过程中的位置定义上片2和下片3,即在使用中上片2位于下片3的上方。上片和下片还可以这样区分,接口11;P1-P10;42;52优选位于上片2上,以使下片3具有光滑的外表面,适于放置在支撑物8上。侧边缘5可以比端部边缘4长。

[0037] 挡板6位于中间的优点是当袋部分充满细胞悬液,膨胀并围绕轴7摇动时,基本上所有的细胞悬液都会反复经过挡板。这增加了振荡强度并提高了气-液接触面上的气体交换,而振荡仍然是足够温和的,不会对脆弱的细胞引起任何损伤。

[0038] 在一些实施方案中,挡板6与下片3和上片2两者均连接。它的一个优点是提高了挡板6的稳定性。

[0039] 在某些实施方案中,如图1-4所示,挡板6通常是圆柱形的,例如具有圆形或通常是椭圆形的横截面。横截面的形状可以是圆形、椭圆形、点椭圆形、水翼形(翼形)或拉长的水滴形等,但是它们也可以是有棱角的,例如平行四边形、多边形等。一般圆柱几何的优点是可以提供适当增加的振荡强度。另一个优点是可以容易地由例如挤压棒材或管材制造挡板。

[0040] 在一些实施方案中,如图2-4所示,挡板6中的至少一个,例如两个挡板是管状的。它的一个优点是制造的挡板可以有足够的弹性,以使得在使用前易于包装和储存摺叠的

袋,但也有足够的硬度以在袋的操作中承受流体动力。另一个优点是管状结构使得能够通过所述挡板将物质向袋中输入或从袋中输出。管状挡板可以例如用弹性材料制备以使得在袋的包装过程中其结构摺叠,但是还有足够的弹性使得当袋被装满和/或充气时能够完全恢复成张开的管状形状。弹性材料可以是例如交联的硅橡胶或者其它硫化橡胶材料。如果使用厚壁和/或高硬度的管材,管状挡板还可以作为支柱,在给袋充气之前和充气期间保持袋的上片和下片分离。

[0041] 在某些实施方案中,如图4、5和6所示,管状挡板6;31可以与下片3;23通过细胞悬液扩散器10;20;30,例如每个挡板6;31上的一个细胞悬液扩散器连接,与上片2;22通过输入/输出接口11;P9;P10,例如每个挡板上一个输入/输出接口连接。细胞悬液扩散器10;20;30可以是允许细胞悬液(通常细胞悬浮在培养基中)从所述袋输送到管状挡板的内腔中或从所述内腔输送到所述袋中的结构。为了获得此效果同时避免细胞堵塞的风险,细胞悬液扩散器可以具有开口26;36,其比细胞大几个数量级,例如其尺寸不小于约1或2 mm。细胞悬液扩散器-管状挡板组合件可以设计为为细胞悬液提供通过扩散器和挡板的开放流动通路,而没有任何阻碍结构。这些实施方案中的管状挡板6;31还可以称为汲取管。上片上的输入/输出接口11;P9;P10可以在内部和外部包含管道配件以能够连接内部的管状挡板(导管)和外部的管路。外部还可以包含无菌连接器,其集成在接口上或者通过管路相连。无菌连接器的实例包括例如ReadyMate™连接器(GE Healthcare),其允许在正常的室温条件下将内部无菌流动通路部件例如袋、管路、传感器、泵头、阀、过滤器(例如中空纤维过滤器)等连接以创建具有无菌流动通路的完整组合件。或者所述部件也可以使用例如Sterile Tube Fuser (GE Healthcare)通过热塑性管材的无菌焊接进行连接。

[0042] 一些实施方案中,所述袋装设有无菌连接器并经过辐射处理。所有的接口都可以装设有封闭的、无菌的连接器或者无菌过滤级的过滤器,以使得微生物不能穿透进入所述袋中。所述袋然后可以用电离辐射例如 γ 射线、电子束或高能X射线进行辐射,使用的剂量取决于所述袋组合件的生物负载并确保无菌。所述剂量可以例如高于10 kGy,例如在10和50 kGy之间。所述袋、挡板、接口、连接器和过滤器可以有利地用抗辐射的材料制造,例如乙烯(共)聚合物、聚硅酮、苯乙烯(共)聚合物、聚砜等。

[0043] 在某些实施方案中,至少一个(例如每个)挡板是弯曲的,例如通常是S形的形状。它的一个优点是S形挡板会更有效地增强振荡,因为所述挡板与细胞悬液的接触长度比直形挡板更长。另一个优点是当管状挡板(汲取管)与细胞悬液扩散器和接口相连时,所述扩散器和接口可以彼此独立地定位,而仍然具有垂直于下片和上片的扩散器和接口。另一个优点是包含直形挡板的袋相比,S形的挡板形状更易于袋的制造、包装和运输。所述形状可以在通常与挡板的长轴平行的平面上弯曲。可以将挡板装设为使该平面通常平行于所述袋的端部边缘4。这样装设后,特别有效地增强了振荡。弯曲形状的管状挡板(汲取管)可以通过例如弹性体如交联聚硅酮的模塑来制造。

[0044] 在一些实施方案中,如图5-7所示,至少一个(例如每个)细胞悬液扩散器20;30包含底圈24;34或底盘38、将所述底圈或底盘与管道连接器27;37相连的多个支杆25;35以及支杆之间的多个开口26;36。开口的数量可以是例如两个、三个或四个。底圈24;34或底盘38可以用于例如通过焊接或粘接将扩散器与下片连接起来,可以在面向下片3;23的一侧基本上平坦。支杆25;35是承重的,其尺寸应当能够承担操作中的液体动力和袋的包装和处理过

程中施加的力引起的负载。如上所述,开口26;36的长度和宽度两者可以均大于约1或2 mm,例如长度为5-25 mm,宽度为2.5-10 mm,这取决于扩散器的尺寸。细胞悬液扩散器20;30的总体形状通常可以是截头圆锥形,在截头圆锥的顶部具有圆柱形管道连接器27;37。管道连接器27;37可以包含一个或多个凸出39,以使得与管状挡板(汲取管)牢固连接——在这种情况下挡板/汲取管还可以另外用带子例如捆扎带扎紧。扩散器20;30的内腔通常也可以是截头圆锥形,为细胞悬液提供光滑的流动通路。所公开的扩散器设计的一个优点是它是机械稳定的,并且使细胞悬液流畅通无阻。另一个优点是它容易与下片3;23连接。又一个优点是开口26;36紧挨着下片,这减少了袋摇动时气泡进入管状挡板(汲取管)的倾向,特别是当扩散器置于下片3;23上的枢轴7的投影附近时,例如在到两个端部边缘4的任一个的最短距离大于两个端部边缘4之间的最短距离D的四分之一或三分之一的区域中时。

[0045] 在某些实施方案中,如图8和9所示,上片上接口42;52的至少一个还与袋41;51外部的一个(或至少一个)细胞分离装置相连,所述细胞分离装置例如一个(或至少一个)过滤器43;53和/或至少一个重力装置。细胞分离装置可以是能够将细胞悬液分离为细胞富集级分和细胞清除级分的任何装置。其可以是过滤器或例如重力装置如重力沉降器、离心机或旋液分离器。连接细胞分离装置的优点是所述袋可以用于细胞灌流培养。

[0046] 在一些实施方案中,如图8和9所示,过滤器43;53是具有渗余侧和渗透侧的微过滤器(通常孔径为0.1-10微米)或超滤器(通常分子量截留值为1-1000 kDa)。这种过滤器可以具有多种形式,例如中空纤维柱、平板盒、螺旋组件、折叠过滤器、旋转过滤器等。微过滤器会将细胞保留在渗余侧,而让悬液的全部或几乎全部的溶解组分穿过至渗透侧。它的优点是目标物例如细胞表达的蛋白可以从渗透物中连续回收。超滤器会保留细胞且可以选择分子量截留值使得大分子的目标物质也保留在渗余侧,而任何小分子的毒性或细胞抑制性的代谢物穿过至渗透侧并可被连续除去。它的优点是可以获得有效的细胞培养并且其后可以在明确的批次中将目标物质回收。

[0047] 在某些实施方案中,如图8所示,细胞分离装置还与循环泵44,例如空气驱动的隔膜泵(从例如Refine Technology, USA获得)相连。在ATF(交替式切线流)的灌流培养方法中可以使用这种设置,其中在向外冲程中由泵驱动细胞悬液通过细胞分离装置,例如过滤器43如中空纤维柱,并进入泵室。然后得到细胞清除级分,例如渗透物,并在泵的向内冲程中使细胞悬液再次通过细胞分离装置,随后将细胞富集悬液通过管状挡板(汲取管)和细胞悬液扩散器递送回袋41中。

[0048] 在一些实施方案中,如图9所示,上片上的两个接口52通过泵54与细胞分离装置的渗余侧相连,形成渗余物循环。在这种情况下,驱动细胞悬液经一个细胞悬液扩散器和一个管状挡板(汲取管)通过第一个接口穿过细胞分离装置的渗余侧,并通过上片上的第二个接口返回袋51。第二个接口可以与管状挡板(汲取管)和细胞悬液扩散器连接,但它也可以仅与袋内部的一根管道连接,因为细胞悬液的返回递送不必然需要扩散器。这些实施方案适合于例如通过切线流过滤(TFF)的灌流培养。在这种情况下,细胞分离装置是过滤器53例如中空纤维柱、平板盒或螺旋组件,当细胞悬液通过过滤器的渗余侧时,细胞清除级分作为渗透物被回收。可以使用第二个泵55从过滤器中回收渗透物。

[0049] 在一个方面,如图3、4和10所示,本发明公开了用于细胞培养的方法,包括下述步骤:

[0050] a)提供充气式生物反应器袋1,其由弹性材料的上片2和下片3组成,它们连接在一起形成两个端部边缘4和两个侧边缘5,其中一个挡板6或多个挡板6从所述下片的一个区域伸出,所述区域到所述两个端部边缘4的任何一个(最近的一个)的最短距离大于所述两个端部边缘4之间距离的约四分之一,

[0051] b)所述生物反应器袋架设于支撑物8上,所述支撑物可枢转地架设于围绕通常平行于所述端部边缘4的可移动轴7的基座9上,

[0052] c)向所述袋1提供细胞培养基和细胞接种物,

[0053] d)通过围绕所述可移动轴7摇动所述支撑物8,振荡培养袋1中的细胞,形成细胞悬液并通过所述上片2上的接口供应至少一种气体。

[0054] 本方法的优点是中心放置的挡板的存在为细胞悬液提供了有效的气体输入和输出,创造了良好的细胞培养条件以及达到高存活细胞密度的可能性。所述方法可以用任何一个上文所述的袋的实施方案来实现。

[0055] 在某些实施方案中,细胞在培养中表达目标生物分子,例如蛋白质。目标生物分子可以是蛋白质例如单克隆抗体,也可以是核酸例如质粒,或病毒颗粒例如其用作疫苗或用于基因治疗。所述细胞可以是哺乳动物细胞例如CHO或MDCK细胞,但它们也可以是例如昆虫细胞、细菌细胞例如大肠杆菌(E Coli)或真菌细胞例如毕赤酵母(P Pastoris)。所述细胞可以在悬液中自由生长,也可以在支持颗粒例如微载体如Cytodex™ (GE Healthcare)上生长。

[0056] 在一些实施方案中,如图4-9所示,至少一个挡板6;31是管状的,与所述下片3;23通过细胞悬液扩散器10;20;30连接,与所述上片2;22通过输入/输出接口11;P9,P10连接,所述方法还包括步骤b')将所述上片上的输入/输出接口42;52与至少一个细胞分离装置例如过滤器43;53和泵44;54相连,并且在步骤d)中使所述细胞悬液通过所述细胞悬液扩散器和管状挡板循环流过所述细胞分离装置或过滤器。其优点是有可能用外部细胞分离装置进行有效的灌流培养。还有可能在需要控制培养中的细胞密度的任何时候使用该方法,例如对于培养中生物量减少或者与病毒感染宿主细胞有关的体积减少的情况。在这些实施方案中管状挡板也被称为汲取管。

[0057] 在某些实施方案中,过滤器43;53是微过滤器,并且步骤d)中的目标生物分子作为渗透物回收,同时细胞富集的渗余物再循环至袋41;51中。其优点是可实现连续回收目标生物分子。

[0058] 在一些实施方案中,过滤器43;53是超滤器,并且步骤d)中的目标生物分子保留在细胞富集的渗余物中,其再循环至袋41;51中。其优点是可以在明确的批次中将目标生物分子回收。

[0059] 在某些实施方案中,步骤d)中的细胞悬液通过循环泵44的向外冲程泵送经过过滤器43的渗余侧,然后通过所述循环泵的向内冲程经过渗余侧经细胞悬液扩散器泵送回袋41中。循环泵44可以是空气驱动隔膜泵,其可以直接安装于过滤器上,所述过滤器可以是中空纤维柱。

[0060] 在一些实施方案中,在步骤e)中细胞悬液在一个环路中泵送经过过滤器53的渗余侧通过上片上的接口52(例如通过第二管状挡板(汲取管)和第二细胞悬液扩散器)返回袋51中。泵54可以是例如蠕动泵、隔膜泵或离心泵,还有可能添加第二个泵55从过滤器53回收

渗透物。

[0061] 在某些实施方案中,存活细胞密度为至少40或至少150 MVC/mL(百万存活细胞/mL),例如在40和210 MVC/mL之间或在100和210 MVC/mL之间。使用本发明的方法有可能以令人惊讶的高存活细胞密度进行细胞培养。

[0062] 在一些实施方案中,袋的体积为至少200 mL,例如在200 mL和500 L之间。袋中细胞悬液的体积可以是袋体积的至少40%,例如在40和50%之间。其优点是如果悬液体积相对高的话,细胞悬液扩散器中携带的空气会进一步减少。摇动速度可以是例如每分钟20-30次摇动(rpm),摇动角度可以是例如6-8度。

[0063] 在某些实施方案中,以分批或分批进料模式进行培养,并且在培养周期的末期,通过细胞悬液扩散器、管状挡板(汲取管)和输出接口并进一步通过细胞分离装置例如过滤器从袋中回收细胞悬液,从而使得可以回收细胞清除级分、包含目标生物分子的过滤物或渗透物。过滤器可以是横向流/切向流过滤器例如中空纤维柱、平板盒或螺旋组件或常规流动过滤器,例如折叠过滤器或深层过滤器。以这种方式使用带有横向流过滤器的所公开的袋的优点是袋本身可以用作用于过滤器渗余物环路的容器,而无需转移到任何其它容器中。由于从袋底部回收细胞悬液,还容易从袋中除去所有细胞悬液,这在从大袋中通过常规流动过滤回收目标生物分子的过程中特别重要,当大袋充满悬液时很难操作。

实施例

[0064] 细胞系

[0065] 在所有的实验中使用产生IgG的DHFR-CHO细胞系。在摇瓶中扩大培养时,在甲氨蝶呤选择压力下进行。

[0066] 细胞培养基和添加物

[0067] 细胞在添加有4-5 mM谷氨酰胺的IS CHO-CD XP培养基(Irvine Scientific)中培养。对于使用TFF系统进行首次培养的第一部分,该培养基包含45 mM葡萄糖。对于该培养的最后部分和使用TFF系统进行的二次培养以及使用ATF系统进行的培养,葡萄糖的初始浓度比之前低,接近于20-25 mM。此外,对于后者的培养,将3%的IS CHO Feed-CD XP添加物(Irvine Scientific, ref. 91122)加入到培养基中。也使用添加有3%进料添加物(Sigma-Aldrich, ref. C1615)的Hyclone培养基PF-CHO Liquid Soy (Hyclone, ref. SH30359.02)。主要的碳源和能量源例如葡萄糖和谷氨酰胺的初始浓度分别为约20-25 mM和4 mM。培养基进一步添加包含两种抗生素(链霉素和青霉素G)和一种抗真菌药(两性霉素)(Sigma-Aldrich)的抗生素溶液。IS培养基以粉末形式提供,需要进行培养基复溶。将pH和摩尔渗透压浓度分别调节至7 (± 0.1)和300-330 mM。然后将培养基在0.2 μm的膜(ULTA-XX, GE Healthcare)上过滤。根据管状挡板/汲取管中的泡沫的出现,通过推注向反应器中加入最多50 ppm浓度的医用抗泡沫剂C (Dow Corning, cat. 1811070-0705)。根据细胞需要,分批补充葡萄糖(Sigma-Aldrich, cat. G6152)或谷氨酰胺(Irvine Scientific, cat. 96700)。

[0068] 细胞培养

[0069] 在向生物反应器接种之前,细胞在摇瓶中使用IS培养基培养(至少4代)。除了文中所提到的,对于所有的实验以0.5 MVC/mL(百万存活细胞/mL)的接种密度接种CHO细胞。对

于所有的培养,使用配置有标准10 L WAVE Bioreactor Cellbags(上片22和下片23为33 x 56 cm,如图5所示,用7.5 cm的 S形聚硅酮热成型橡胶管将P9和P10接口与在下片23上相应的具有两个5 x 20 mm开口的细胞悬液扩散器20连接)的WAVE Bioreactor™ System 20/50。表1描述了图5中袋上输入和输出的不同接口的用途。

[0070] 表1:图5袋上的输入接口和输出接口

[0071] P4 溶解氧(DO)探针

[0072] P5 pH探针

[0073] P6 过滤器进气口

[0074] P7 过滤器上的加热器出气口

[0075] P3 用于注射器插入的隔板和取样口

[0076] P1 用于培养基和添加物(Glc、Gln、抗泡沫剂)的加入管

[0077] P10 用于细胞悬液流出(向ATF和TFF)和进入(TFF)的管状挡板/汲取管

[0078] P8 用于碱加入的管

[0079] P2 接种管

[0080] P9 用于细胞悬液进入(自TFF)的管状挡板/汲取管。

[0081] 通过加入0.5 M Na₂CO₃(滴在液面上方)上调以及通过液面上空间的CO₂脉冲(在液面上空间的空气混合物中为0-5%)下调控制pH。通过O₂脉冲(0-100%)和/或增加摇动速度上调以及通过降低摇动速度下调控制溶解氧(DO)。在灌流过程中通过设置重量设定值(4kg)和该设定值的最小和最大偏差(±0.3 kg)控制生物反应器的重量。培养物的设定值如表2所示。

[0082] 表2:灌流培养过程中使用的设定值(SP)

[0083]

参数	设定点/值
DO SP (%)	30或35
pH SP	7.0
摇动速度(rpm)和角度(度)	20-28 rpm和5°-8°
温度SP (°C)	37.0
液面上空间空气流(L/min)	0.1-0.6
接种存活细胞密度(MVC/mL)	0.5
工作体积(L)	4
灌流速度(RV/day)	1或更高
培养过程中葡萄糖浓度指标(mM)	>3.9 (>0.7 g/L)和<45 (<8 g/L)
培养过程中谷氨酰胺浓度指标(mM)	>0.05 (和<5)
碱	0.5 M Na ₂ CO ₃
从种子容器向生产生物反应器的接种细胞发酵液的稀释度大于	3

[0084] ATF设置

[0085] 将WAVE生物反应器和与ATF-2泵(Refine Technology, USA)偶联的中空纤维柱通过袋上的管状挡板/汲取管(P10接口)无菌连接(图5和8)。生物反应器和中空纤维组件之间的外部管道(c-flex, 内径8 mm)设计的尽可能短。这样,管状挡板/汲取管(从袋底部的锚定点到ATF的连接处,即P10接口)到中空纤维柱的总长度为41-47 cm。用压缩空气和真空泵

(Ilmvac)进行系统设置。中空纤维过滤器(GE Healthcare, Sweden)的孔径为0.2 μm ,过滤面积为850 cm^2 。

[0086] 图7描述了ATF生物反应器设置的总体框架。碱和添加物瓶通过焊接(welding)连接,因此可以分离、再装满并重新焊接到系统上。使用两种注射器(一种10ml和一种50ml)注射葡萄糖和谷氨酰胺。

[0087] TFF设置

[0088] 通过将P10管状挡板/汲取管与过滤器相连(用ReadyMate™连接器)并将P9管状挡板/汲取管与过滤器的另一末端相连,将生物反应器与中空纤维柱(与上述ATF部分相同的技术参数,但是为ReadyToProcess RTPCFP-2-E-4X2MS)连接起来(图5和9)。细胞悬液用Watson Marlow 620S泵经过过滤器从生物反应泵出。然后将保留的细胞经过接口P9转运回生物反应器。还可以在过滤器之前和之后以及在渗透侧连接一次性压力传感器(SciLog, USA)(使用ReadyMate™连接器)。

[0089] 分析检测

[0090] 每天从生物反应器和收获线采集一次或两次样品。立即将来自生物反应器(摇动中)的样品在BioProfile Flex (Nova Biomedical, USA)中进行分析,对活细胞数量(存活细胞密度,以每mL百万存活细胞(MVC/mL)表示)和细胞总数量(总细胞密度,以每mL百万细胞表示)进行计数以监测细胞生长,测定平均细胞直径。还在BioProfile Flex中测定样品中的谷氨酰胺、氨、葡萄糖、乳酸盐、pO₂和pCO₂的浓度。然后将来自生物反应器的样品在3300 rpm离心5分钟,上清等分至Eppendorf管,并置于-20℃和-70℃用于LDH分析。然后将来自生物反应器的样品在3300 rpm离心5分钟,等分至Eppendorf管,置于-20℃。用Protein A HPLC方法分析样品中mAb浓度。

[0091] 实施例1 - ATF和TFF灌流

[0092] CHO细胞生长

[0093] CHO细胞在两种过滤系统(即ATF或TFF系统)中培养。图10显示了TFF灌流培养(图10A)和ATF灌流培养(图10B)期间获得的细胞密度、存活率和灌流速度。在其工艺中使用两种不同类型的培养基(Hyclone PF-CHO Liquid Soy和IS CHO-CD XP)。为了使剪切应力最小化,TFF系统外部环路的循环流速设置为0.3 L/min,即大约1000 s⁻¹。这个参数还使得细胞在反应器外,即在室温的停留时间小于1分钟。ATF系统中全过程的平均流速为1 L/min。对于TFF系统,在4L IS CHO-CD XP培养基中以0.4 MVC/mL接种生物反应器,对于ATF系统,在Hyclone培养基中以5 MVC/mL接种生物反应器。为了快速达到更高的细胞密度且随后能够平行比较两种培养,选择更高的接种量。因此为了比较两种工艺,培养11天后将TFF系统中使用的IS培养基更换为Hyclone培养基。使用IS培养基,有可能在天内比较两种培养;对于ATF和TFF培养分别为第3-6天和第11-18天。

[0094] 在工艺的初始阶段,使用TFF系统的培养显示出细胞生长欠佳,这是由于接种物是从静止期的分批培养物获得的。在第三天,当细胞密度达到约2 MVC/mL时,开始灌流并保持在大约1.2-1.5 L/d。在第5-6天灌流速度降低到低于1 wv/天,在第18天由于对培养基进行处理,停止灌流8小时。然后在第18天将Hyclone培养基更换为新的IS CHO-CDXP培养基。

[0095] 培养8天后,进行第一次排液以保持细胞密度为大约20 MVC/mL。在第9-11、13-15、17-18、和20-21天另外每天排液。当计算每天灌流速度时将排液体积考虑进去。

[0096] 对于ATF培养,在生物反应器接种后直接开始灌流。对TFF系统,灌流速度保持在大约1.5 wv/天,当计算速度时考虑排液。此外,在该工艺中还通过在第4、6、7、9和10天进行培养物排液实现将细胞密度保持在大约20 MVC/mL。

[0097] 振荡速度的增加

[0098] 在两种培养中,通过摇动速度进行DO控制。通过先前的实验确定了当CHO细胞浓度保持在大约20 MVC/mL时,维持接近SP值(35%)的DO所需的振荡速度(22-26 rpm, 7°)。当需要的时候通过使进气富含O₂进一步增加可用于细胞的氧量(表3和4)。在ATF和TFF系统中都证实这些参数的使用可达到DO SP值并保持高存活率(≥ 95%)。

[0099] 表3:ATF灌流培养中使用的摇动速度和倾角。

[0100]

天	摇动rpm和角度	O ₂ 加入量(%)
0-0.2	20 rpm @ 6°	21
0.2-1.9	20-24 rpm @ 6°	21
1.9-4.7	20-26 rpm @ 6°	30-50
4.7-6.8	20-26 rpm @ 7°	20-40
6.8-7	20-28 rpm @ 7°	30
7-7.8	26 rpm @ 7°	20-50
7.8-8.9	22-26 rpm @ 7°	30-40
8.9-10.7	22-26 rpm @ 7°	40

[0101] 表4:TFF灌流培养中使用的摇动速度和倾角。

[0102]

天	摇动rpm和角度	O ₂ 加入量(%)
0-3	20 rpm @ 6°	21
3-6.8	20-24 rpm @ 6°	20-50
6.8-7.7	23-26 rpm @ 6°	30-50
7.7-8	23 rpm @ 6°	20-40
8-12.3	23-26 rpm @ 6°	40-50
12.3-18	23-26 rpm @ 7°	20-30
18-18.1	20-28 rpm @ 7°	30
18.1-18.9	26 rpm @ 7°	20-50
18.9-20	22-26 rpm @ 7°	30-40
20-21.8	22-26 rpm @ 8°	30-40

[0103] 细胞代谢

[0104] 对于TFF系统,直到第11天,IS培养基中的葡萄糖初始浓度高于Hyclone培养基中和在Hyclone培养基后使用IS培养基中的浓度(约20 mM)。后两者中葡萄糖的初始浓度降低到20 mM减少了培养基中乳酸盐的积累(20-25 mM vs. 35 mM)。在这些条件下,剩余葡萄糖浓度保持低下,接近3-5 mM,两个系统中每天的葡萄糖注射从15 mM增加至22 mM。尽管在TFF系统中,剩余葡萄糖浓度增加,但是在ATF系统中,葡萄糖注射的增加不足以达到较高的剩余葡萄糖浓度。两种培养基中存在的谷氨酰胺的初始浓度大约为4 mM。在两个系统中,虽

然每天注射谷氨酰胺达到2 mM,但注射后每天谷氨酰胺完全耗尽。氨的积累接近4-5 mM,这通常不被认为是有毒的。因此,为了避免谷氨酰胺的限制,决定在培养的最后4天中将谷氨酰胺的指标从2 mM增加至4 mM。其结果是剩余的谷氨酰胺浓度保持在大于至少0.2 mM。

[0105] 在ATF和TFF两个系统中获得的重组IgG的最大比率均为10-15 pg/天/d,并且体积产率均接近于200 mg/L/d。

[0106] 结论

[0107] 在ATF和TFF两个灌流系统中,所述袋很好地支持了细胞生长。在WAVE生物反应器中氧传递是充分的,且没有发现在系统设置上有限制。使用不同的摇动/角度设置并检测了不同的培养基;结果证明了所述系统的稳健性(robustness)。在该初始研究阶段利用每天排液以避免过高的细胞密度。

[0108] 无论使用IS培养基还是Hyclone培养基,ATF和TFF两个系统对于细胞生长和存活率表现出相同的性能。对于TFF系统,在大约20-30 MVC/mL的高细胞密度下,高存活率($\geq 95\%$)保持了18天。有趣的是,在培养的最后几天中将摇动角度增加到 8° 不影响存活率,其保持在如前所述的高于90%。

[0109] 实施例2 - 高密度ATF和TFF灌流

[0110] CHO细胞生长

[0111] 在TFF和ATF两个系统中用IS培养基分别培养CHO细胞49天和27天(图11和12)。尽管使用ATF系统进行的培养在培养27天后停止,但使用TFF的培养继续进行了另外22天。如先前的培养,如果需要的话,最通常每3天或7天加入抗泡沫剂C。在两种工艺中,培养2天后,实施1 wv/d的灌流速度直到第7天。在CHO细胞的生长和存活率方面再次获得了相似的结果。实际上,观察到CHO细胞的浓度为大约20-30 MVC/mL,存活率大于95%。22-26 rpm的搅拌速度和 7° 的角度可以保持DO接近于SP值并保持高存活率($\geq 95\%$)。决定将ATF系统中的流速增加到先前的培养中使用的值,即1 L/min。为了在相同的条件下评估两个过滤装置,TFF的外部环路的流速也增加至1 L/min,相当于剪切应力值为 3400 s^{-1} 。此外,为了在ATF系统中保持高存活率,将灌流速度增加至1.5 L/min。

[0112] 关于TFF系统,将再循环流速从0.7 L/min增加至1 L/min不影响CHO细胞的生长和存活率。因此,使用这种流速使得能够获得高细胞存活率。对于ATF和TFF培养,在培养末期将灌流速度渐进地从1.5 wv/d分别增加至4和5 wv/d。在使用ATF的最后3天,虽然灌流速度增加至4 wv/d,存活率没有增加(接近于88-90%)并观察到细胞生长不佳。这个结果与细胞的平均细胞直径从16.5-17.5微米增加到18-18.5微米有关。因此,由于在两种过滤系统之间细胞的状态似乎不再具有可比性,决定停止ATF培养。

[0113] 令人惊讶的是,在TFF系统中,灌流速度增加至5 wv/d导致非常高的细胞密度,即大约100 MVC/mL。从第23天开始,每天进行排液以将这种高细胞密度保持在80到105 MVC/mL之间。这样,这种高细胞密度(大约100 MVC/mL)保持了一周,并具有高存活率(92-95%)。这之后,细胞密度可增加到120-130 MVC/mL,并通过每天排液又保持一周,同时保持细胞存活率大于94%。换句话说,在细胞密度大于100 MVC/mL并且细胞存活率大于94%的条件下保持稳定培养超过两周。然后进一步将灌流速度增加达到10 RV/天,令人惊讶地观察到大于200 MVC/mL的细胞密度,其最大值为214 MVC/mL,同时细胞存活率大于94%。这种极高的细胞密度保持了两天,然后再次降低灌流速度。使用灌流袋总共进行了49天的TFF培养。

[0114] 表5:ATF和TFF灌流培养期间使用的摇动速度、倾角、O₂供应和气流。

[0115]

天	摇动速度(rpm)	摇动角度(度)	O ₂ 供应(%)	气流(ppm)
0-2	20	6	20	0.1
3	20	6	30	0.1
4	20	6	40	0.1
5	20-24	6	40	0.1
5 (1 h 后)	20-26	6	40	0.1
6	22-26	7	50	0.1
7	22-26	7	40	0.2
7	24-28 (步骤1)	7	30	0.2
7 (30 min 后)	24-28 (步骤1)	7	40	0.2
8	22-28	7	40	
8 (3 h 后)	22-26	7	50	
10	22-26	7	40	0.2(TFF),0.2-0.05(ATF)
10 (起泡效果研究)	22-28 (步骤3)	7	40	0.2(TFF),0.2-0.05(ATF)
11	22-26	7	40	0.2(TFF),0.2-0.05(ATF)
12	22-26	8	50	0.2(TFF),0.2-0.05(ATF)
13-18	22-26	7	50	0.2(TFF),0.2-0.05(ATF)
19	26 (在ATF中)	6	50	0.2
20	22-26	8(TFF),7(ATF)	75(TFF)	0.2
21	24-26(TFF),22-26(ATF)	8	75(TFF),50(ATF)	0.2
22	24-26(TFF),22-26(ATF)	8	95(TFF),40(ATF)	0.2
23	24-26(TFF),22-26(ATF)	9(TFF),7(ATF)	100(TFF),40(ATF)	0.2
24	24-26(TFF),22-26(ATF)	9(TFF),7(ATF)	100(TFF),40(ATF)	0.2
25	24-26(TFF),22-26(ATF)	9(TFF),7(ATF)	95(TFF),44(ATF)	0.3-0.2(TFF),0.2(ATF)
26	24-26(TFF),22-26(ATF)	9(TFF),7(ATF)	100(TFF),44(ATF)	
27	24-26(TFF),22-26(ATF)	9(TFF),7(ATF)	100(TFF),44(ATF)	0.2
28	24-26	8	63-95	0.2
29	24-26	8	63-84	0.2
30	24-26	8	80-100	0.16-0.3
31	24-26	8	78	0.27
32-36	24-26	8	80	0.3
37	24-26	8	80	0.41
38	24-26	8	80	0.43
39-42	24-26	8	80	0.36
43	24-26	8	95	0.36
44-45	24-28	8	100	0.58
46	25-27	8	88	0.33
47	25-28	8	100	0.5
48	24-26 26-27	7-8	30-50	0.2
49	24-26	7	50	0.2
50-52	24-26	8	100	0.2

[0116] 细胞代谢

[0117] 在两个系统中,当达到较高细胞密度时,每天增加葡萄糖的注射以避免葡萄糖的限制。乳酸盐的积累不超过35-40 mM;这种浓度不被认为是对细胞有毒的。两种培养基中存在的谷氨酰胺的初始浓度为大约4 mM。虽然增加了谷氨酰胺的注射,但在培养期间出现了一定的谷氨酰胺限制。在培养的最后几天期间,足够地增加注射以避免限制。在两种培养中氨的积累接近于4 mM,对于TFF培养当大约100 MVC/mL的细胞密度需要增加谷氨酰胺的加入量时,甚至更高(大约7 mM)。

[0118] IgG产生

[0119] 获得的重组IgG的最大比率为10-15 pg/细胞/d,以及体积产率接近于200 mg/L/d。直到第20天,用TFF系统获得相似的结果。

[0120] 结论

[0121] 图5的具有两个S形管状挡板/汲取管的袋多次显示,通过使用ATF和TFF的细胞分离策略在WAVE生物反应器系统中支持外部灌流。而且,已表明在TFF系统中能达到极大的细胞密度,而没有任何起泡或过滤堵塞问题。

[0122] 使用ATF进行两轮培养并使用TFF进行两轮培养。在这四次首轮培养(ATF和TFF)中,通过每天细胞排液将细胞密度保持在20和30 MVC/mL之间。为了在这种细胞密度进行健康的细胞生长,需要1.5 wv/天的灌流速度。使用来自Irvine Scientific, IS(使用时加入或不加浓缩给料添加剂)和来自Hyclone的两种商品化培养基,获得了类似的细胞生长和存活率,表明所述系统对于培养基的更换是稳健的。

[0123] 使用TFF系统,在5 wv/天的条件下获得了超过100 MVC/mL的细胞密度。这种细胞密度保持了超过两周并通过每天细胞排液维持。此外,将灌流速度增加到10 wv/天导致>200 MVC/mL的极高的细胞密度,最高达214 MVC/mL。这种结果是出人意料的,不用带有挡板的袋则不能达到。在这种TFF系统中,在四周期间使用一个中空纤维柱并且无堵塞。中空纤维柱的长寿命可能归因于培养物持续生长并具有保持了三周的很好的存活率($\geq 94\%$)。平行进行了使用ATF系统的实验。使用该系统获得了46 MVC/mL的最大细胞密度。

[0124] 本书面描述使用实施例公开本发明,包括最佳方式,并且还使本领域的任何技术人员能够实施本发明,包括制造和使用任何装置和系统以及进行任何所包含的方法。本发明的可专利保护的范围由权利要求限定,且可以包括本领域的技术人员想到的其他实施例。如果所述其他实施例具有的结构要素与权利要求的字面语言并无不同,或者它们包括与权利要求的字面语言没有实质性不同的相同的结构要素,则它们意旨在权利要求的范围内。应当注意的是,单个实施方案和/或方面的要素和特征可以组合形成其它实施方案。

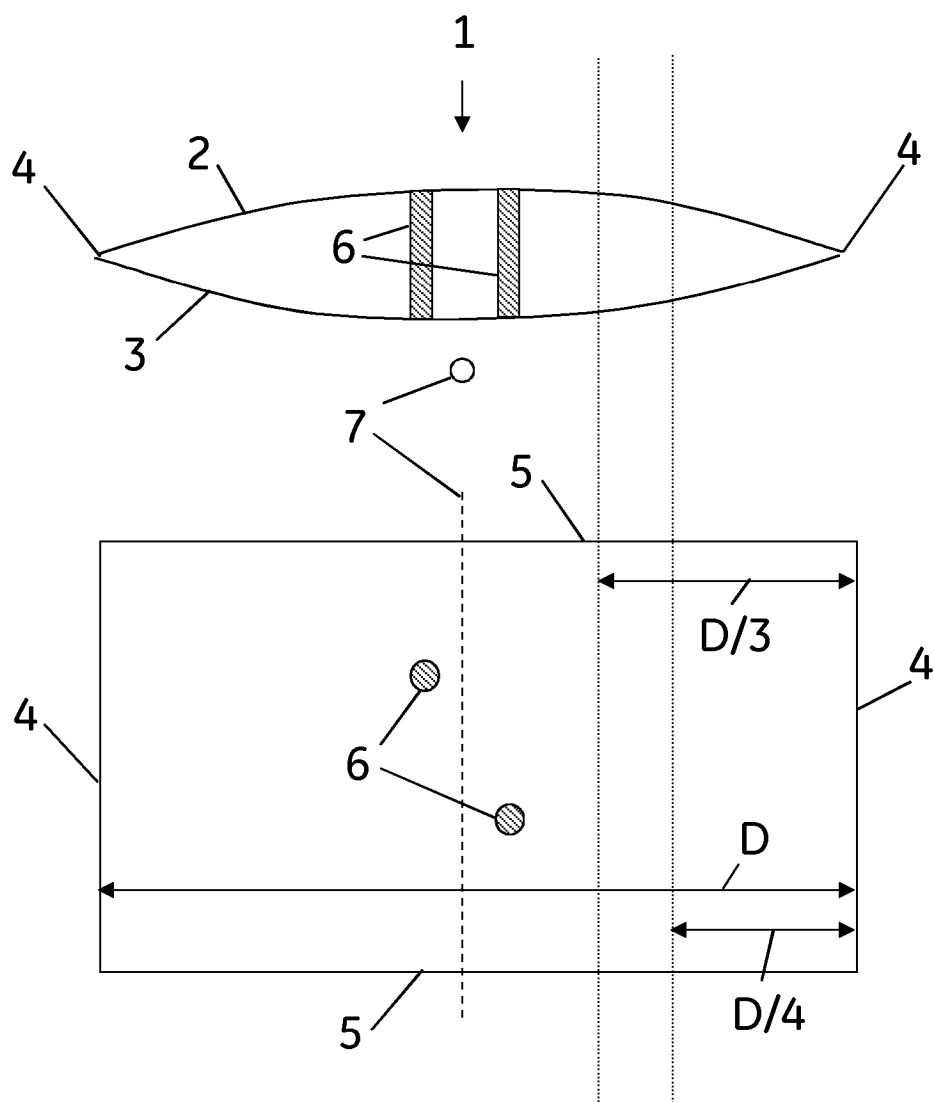


图 1

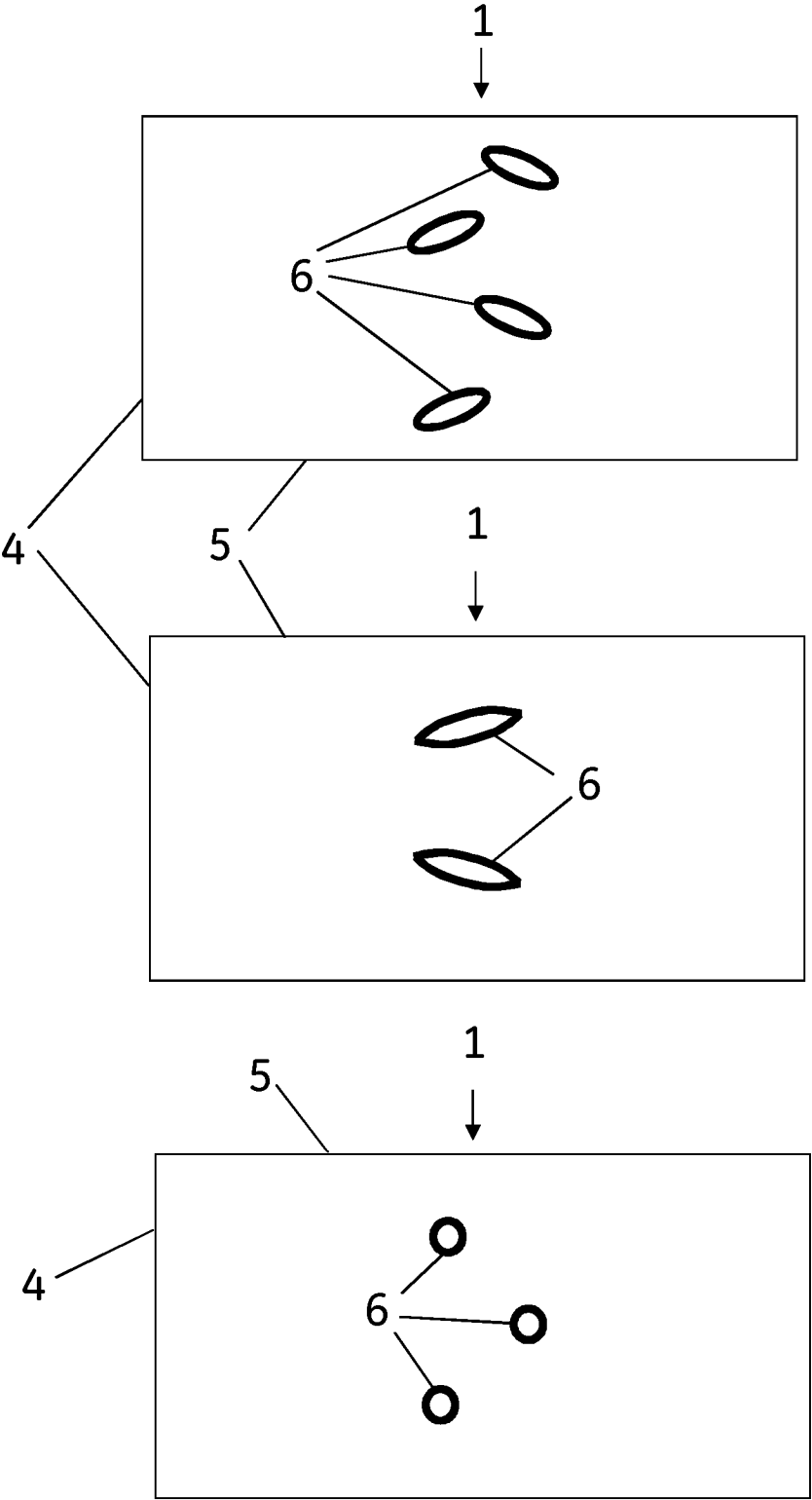


图 2

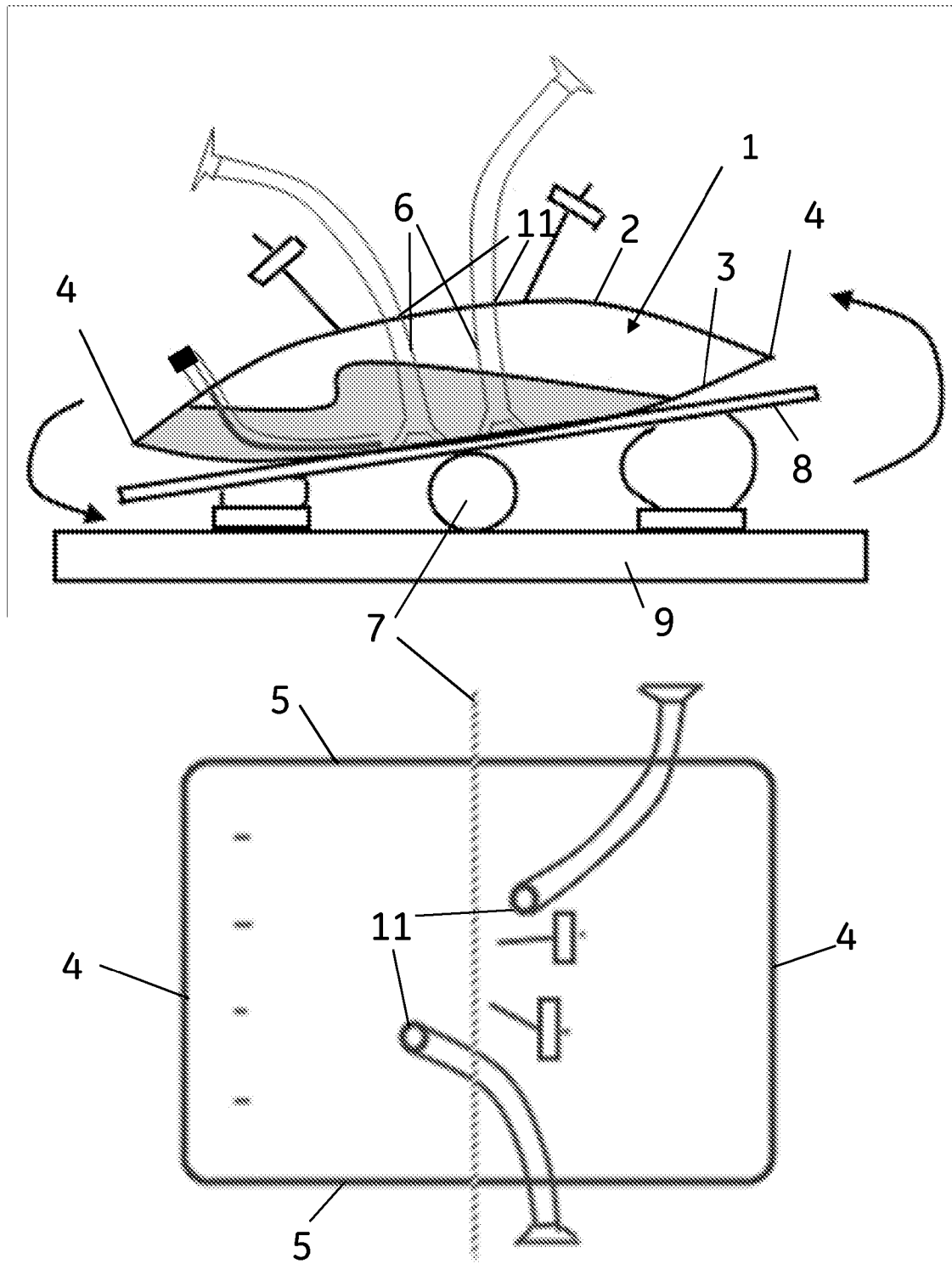


图 3

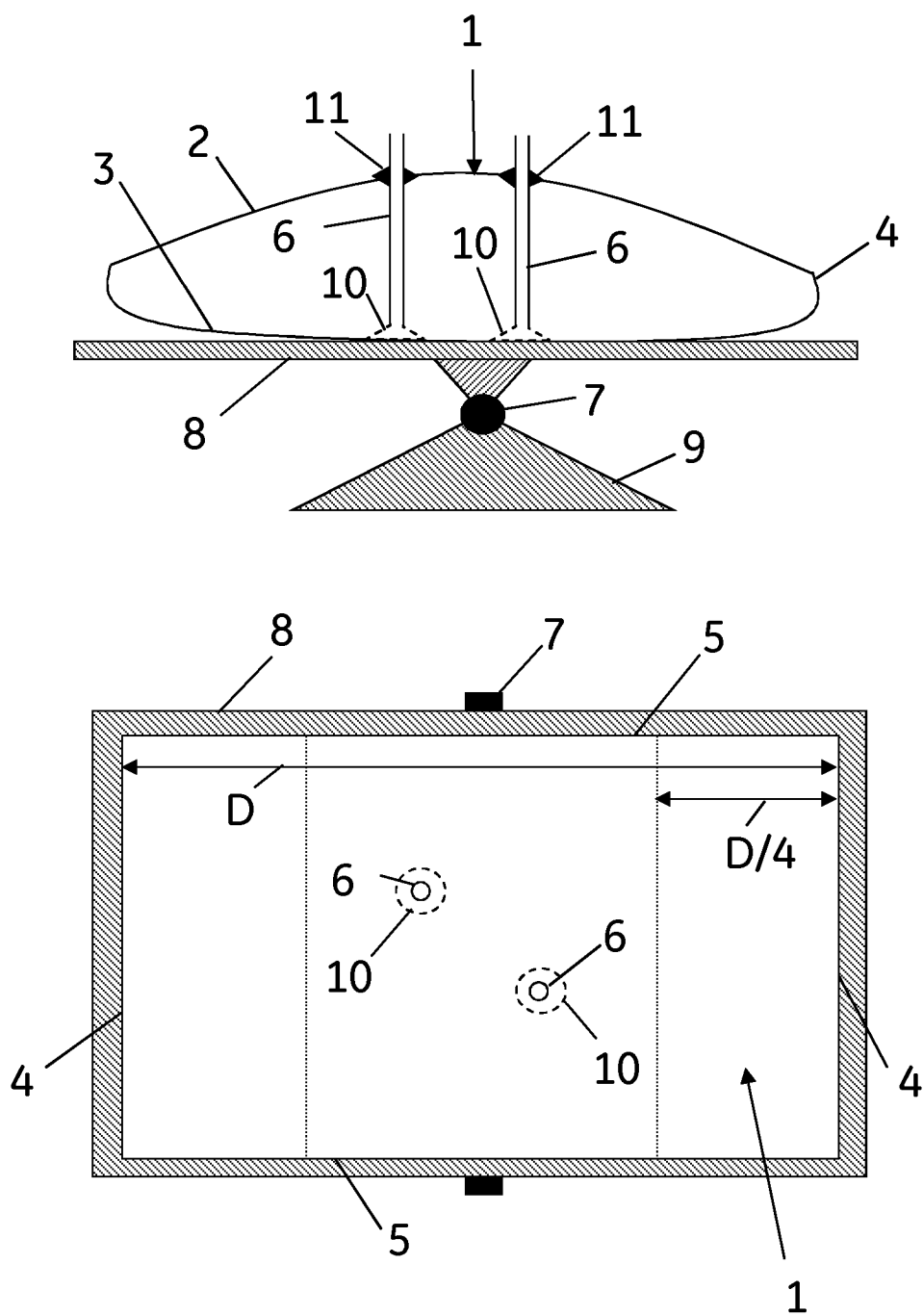


图 4

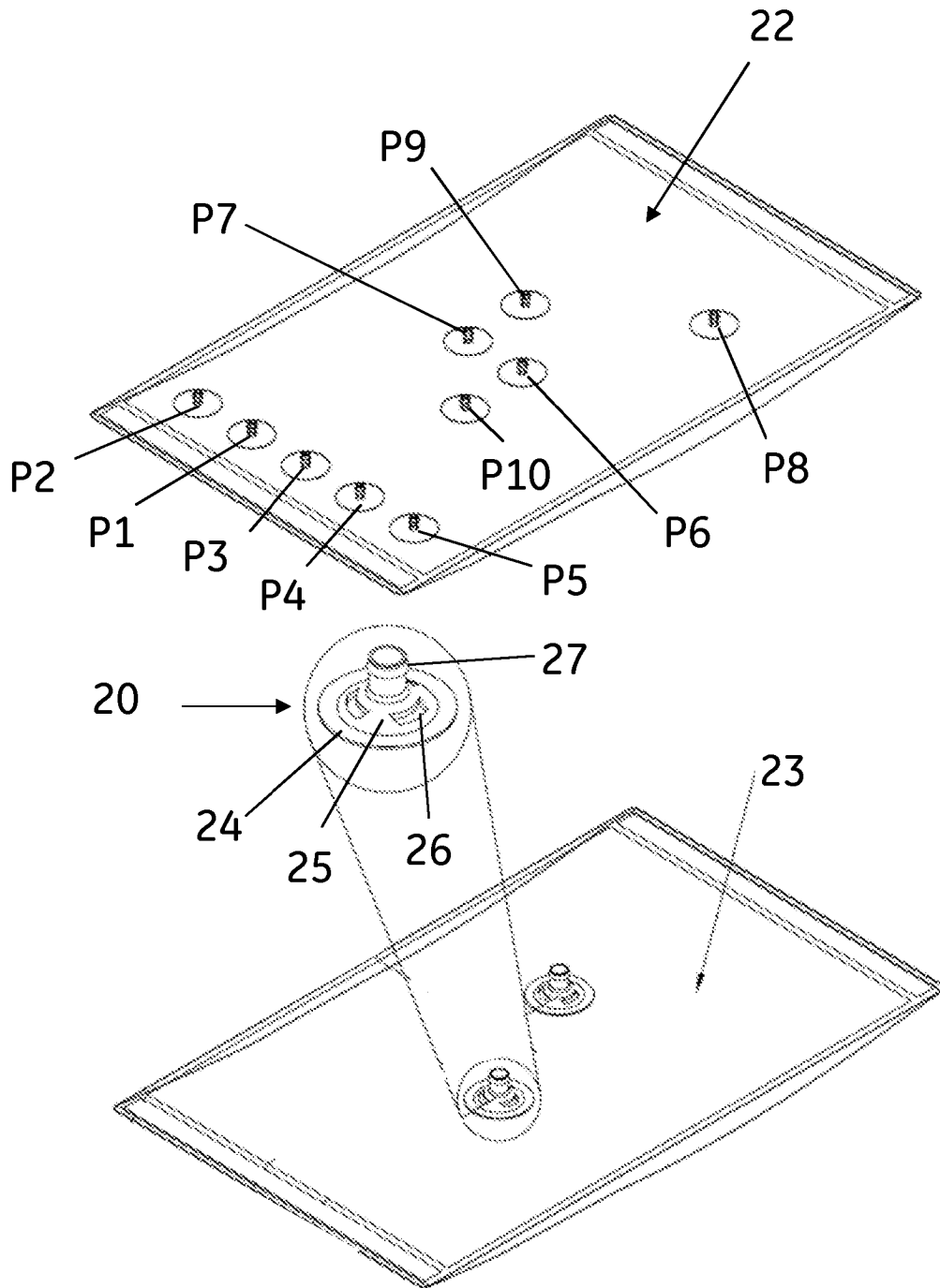


图 5

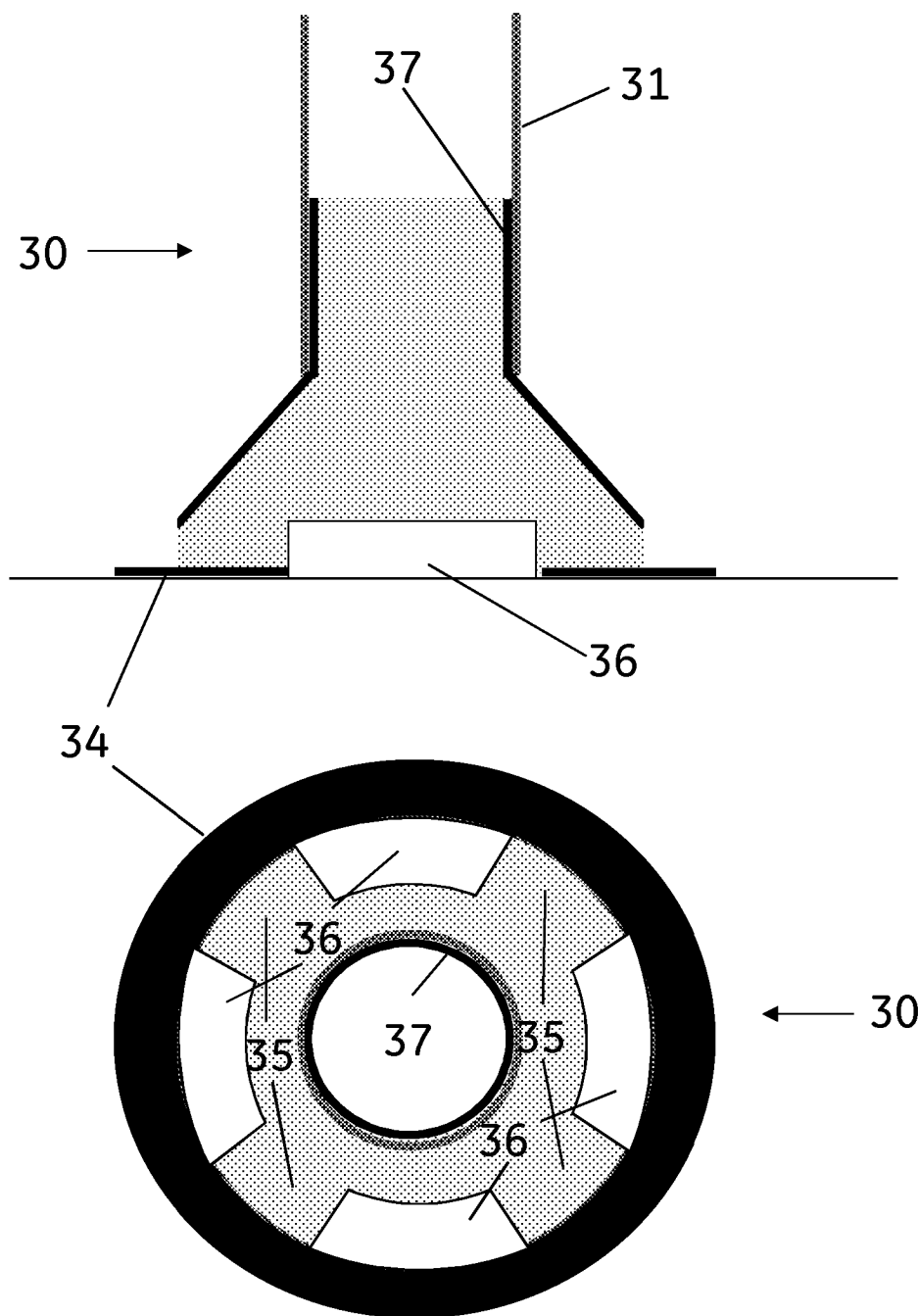


图 6

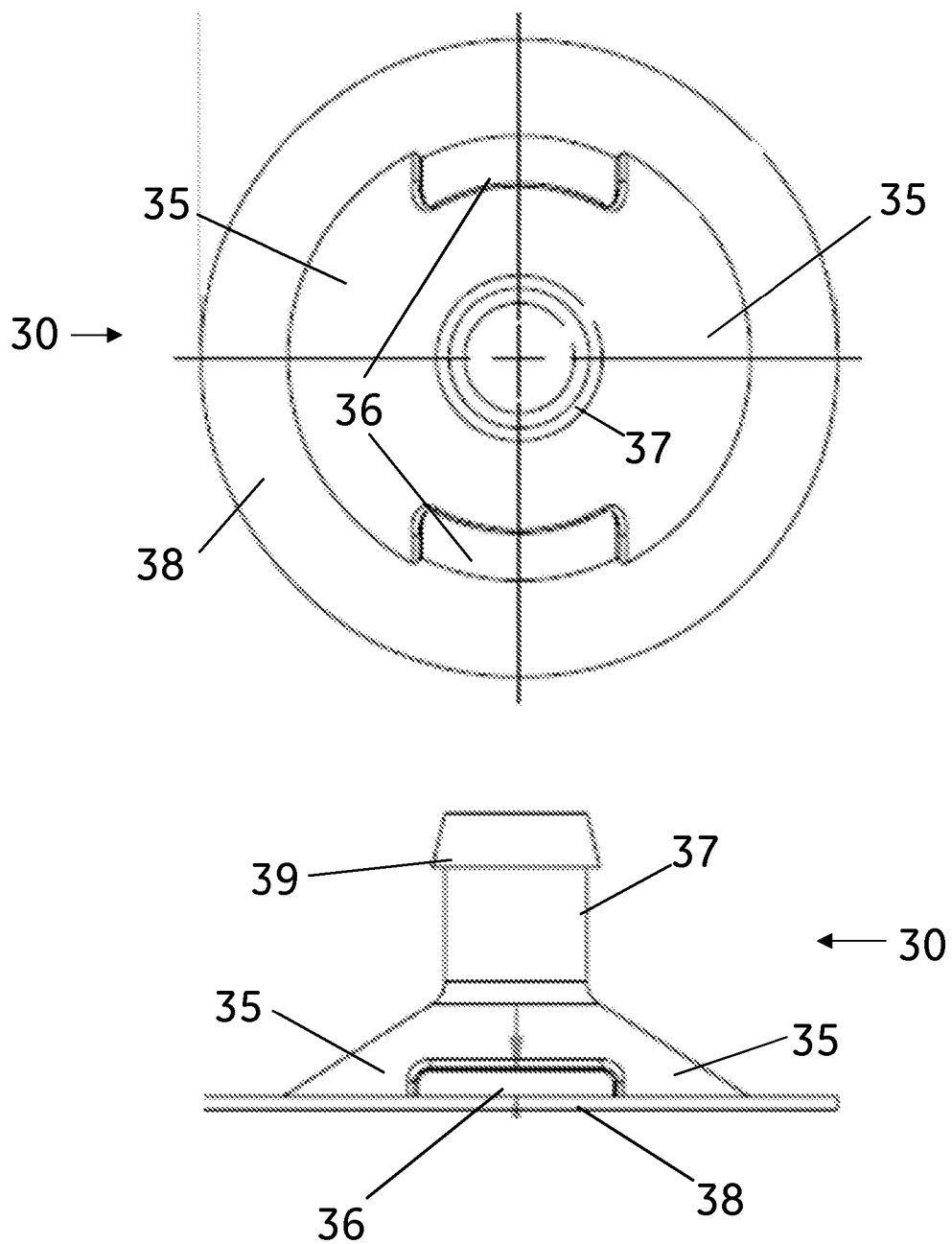


图 7

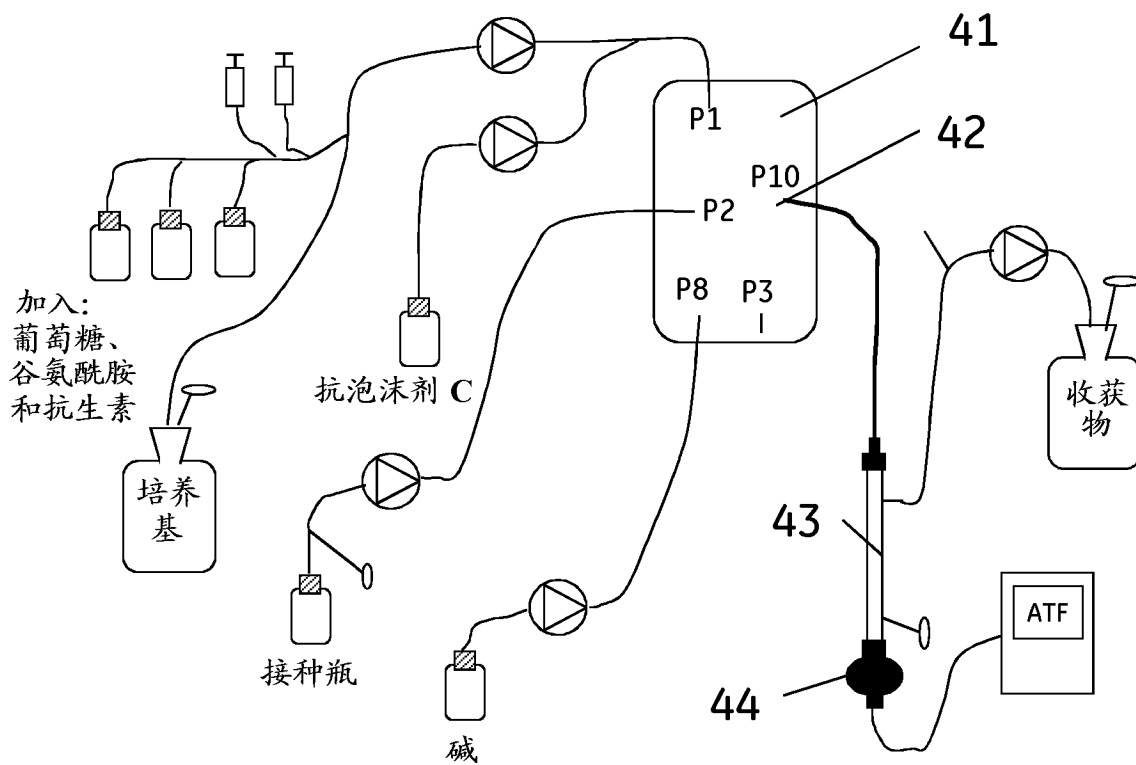


图 8

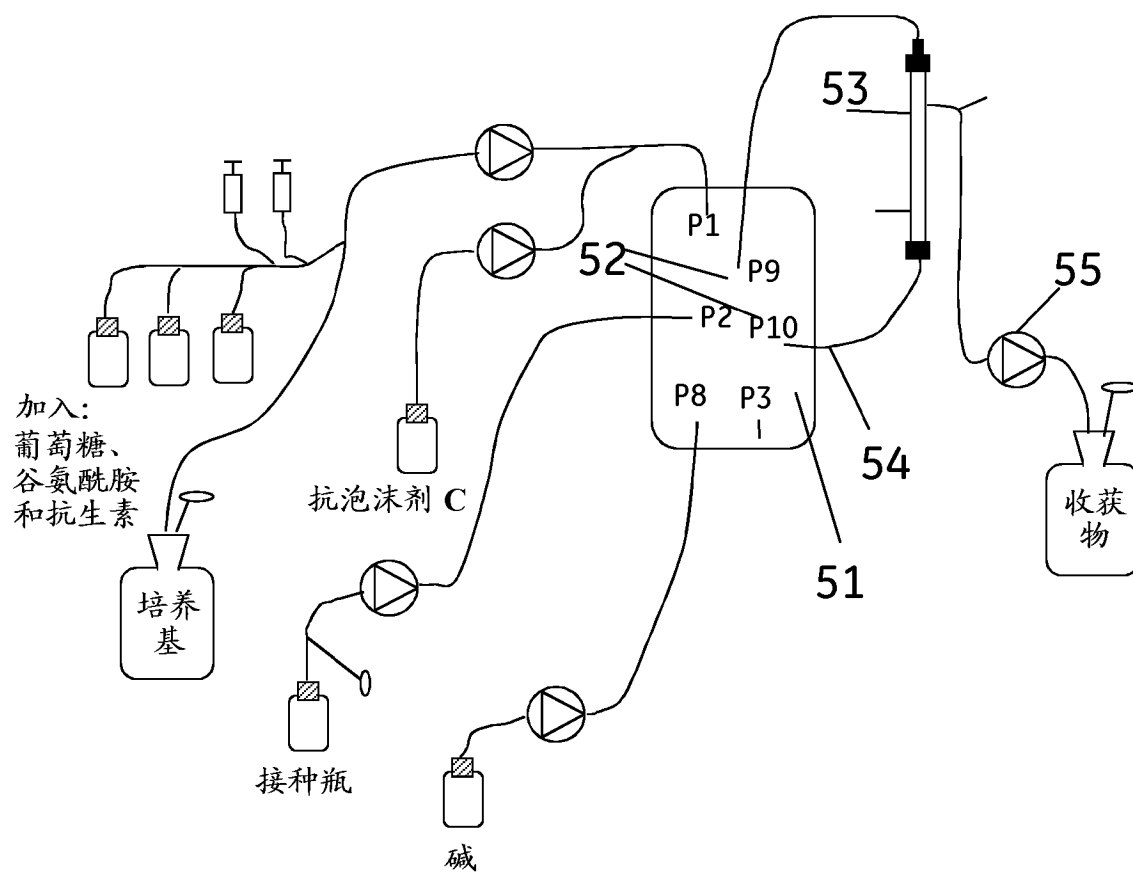


图 9

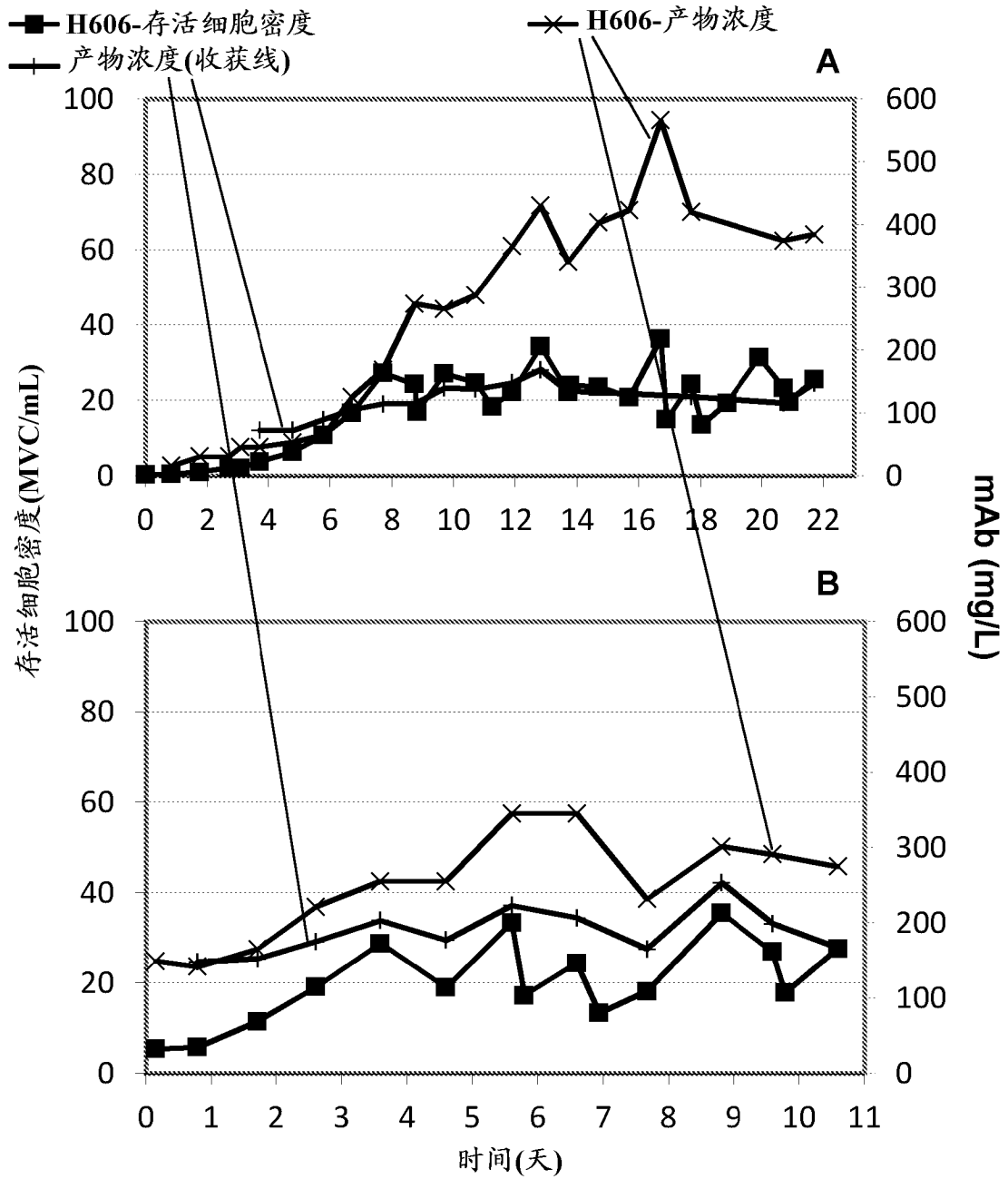


图 10

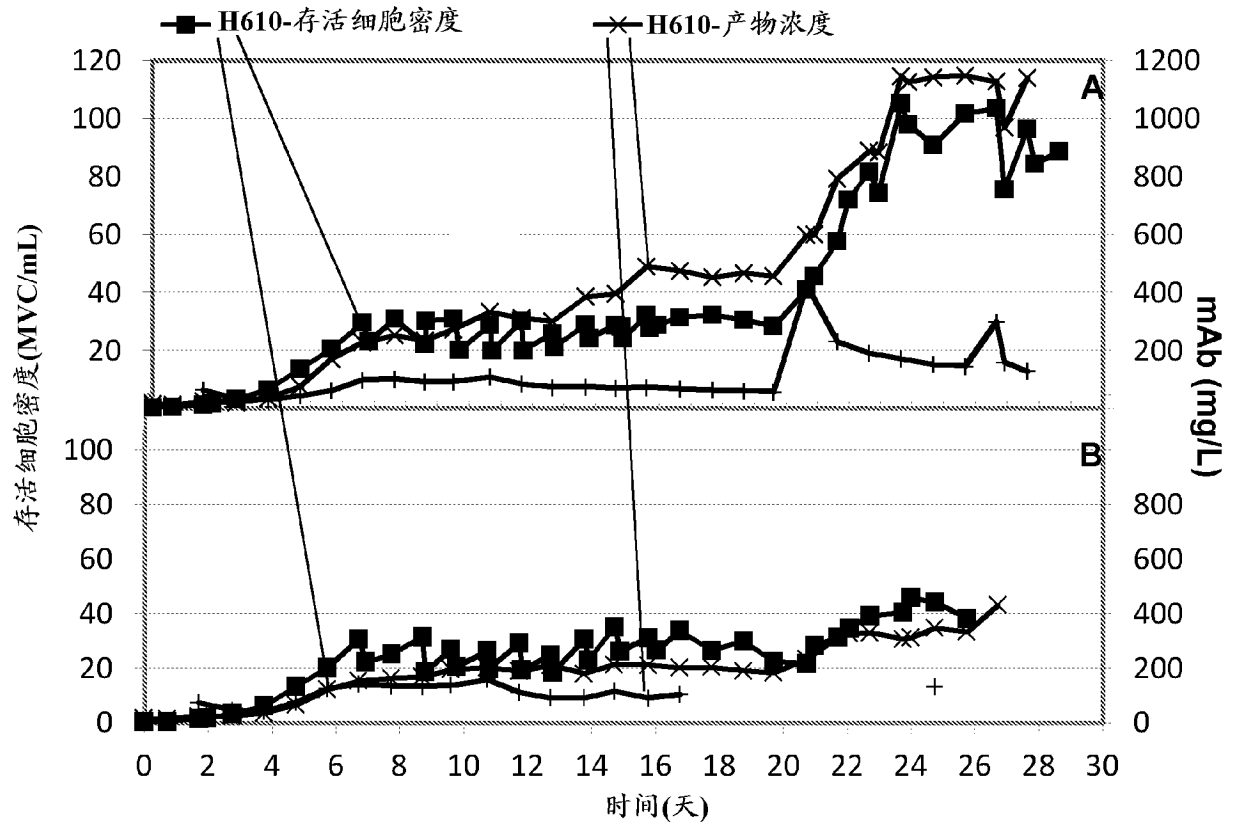


图 11

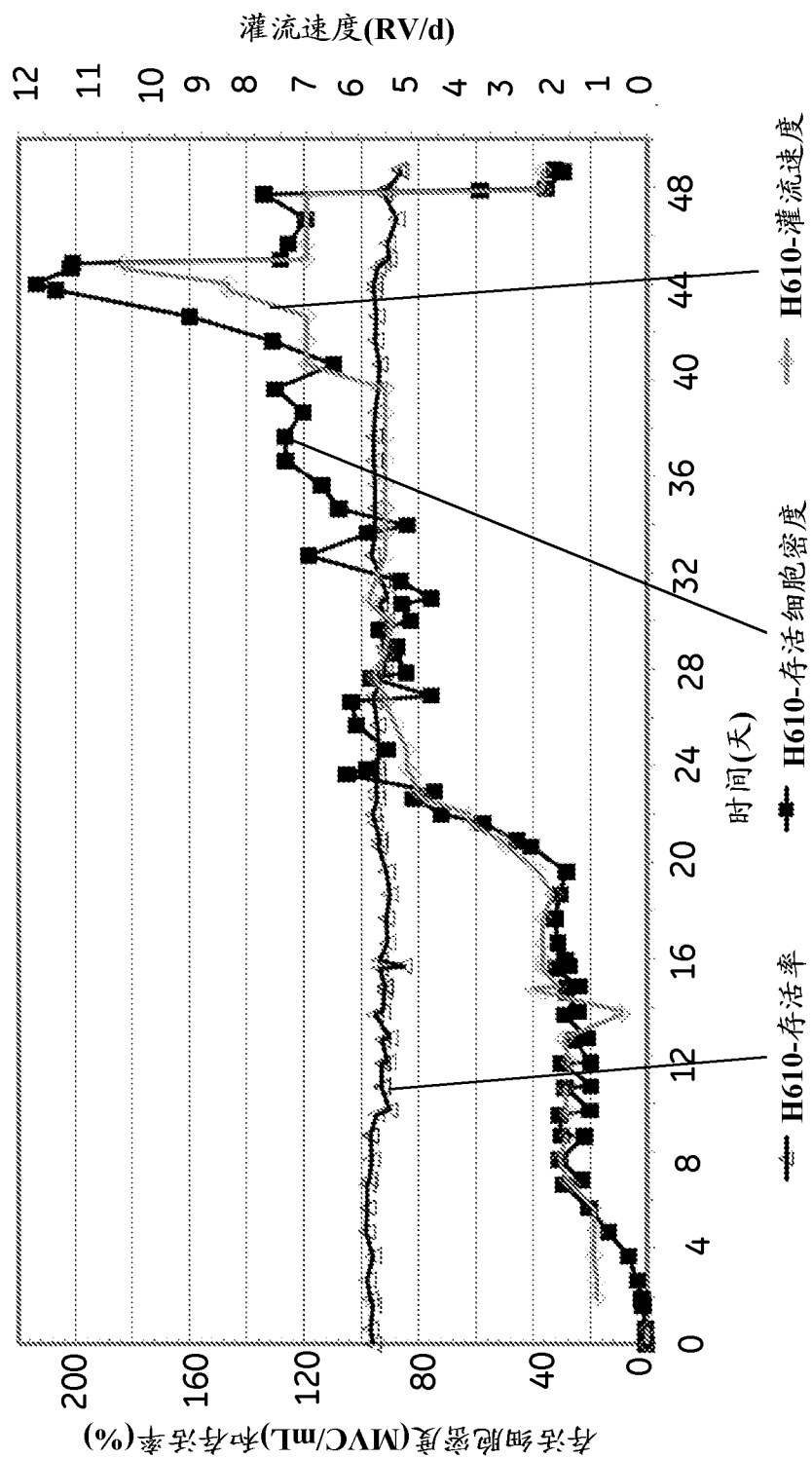


图 12