PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.06.2005**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.06.2004**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2004/871261**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **21.03.2007**
(Věstník č. 12/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US2005/021781**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2006/007459**

(21) Číslo dokumentu:
2006-822
(13) Druh dokumentu: **A3**
(51) Int. Cl.:
B01D 61/00 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA, US

(72) Původce:
Pham Christine, Y., San Diego, CA, US
Thömmes Jörg, San Diego, CA, US

(74) Zástupce:
TRAPLOVÁ HAKR KUBÁT Advokátní a patentová kancelář, Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob čiření kultur savčík buněk v průmyslovém měřítku

(57) Anotace:

Při způsobu čiření vzorku buněk v průmyslovém měřítku se vzorek buněk odstředí a pak se odstředěná kapalina filtruje soustavou filtrů pro hloubkovou filtraci. Způsob je zejména vhodný při průmyslové izolaci terapeutických proteinů secernovaných buněčnými kulturami.

CZ 2006 - 822 A3

24.01.07

2006-822

Způsob čiření kultur savčích buněk v průmyslovém měřítku

Předložená přihláška vynálezu požaduje prioritu z patentové přihlášky Spojených států č. 10/871,261 podané 21. června 2004, která je celá obsažena v předloženém textu.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká způsobů pro oddělení pevných látek a kapalin, například oddělení buněk a buněčného odpadu z biologického vzorku, aby se získal čirý bezbuněčný vzorek. Způsob je použitelný jako purifikační krok při izolaci proteinů secernovaných buňkami v kultuře, například secernovaných terapeutických proteinů.

Dosavadní stav techniky

Odstřeďování (centrifugace) je zavedený a neustále užívaný způsob pro oddělení (separaci) pevných látek a kapalin. Zatímco bakteriální a kvasinkové suspenze jsou v průmyslovém měřítku separovány pomocí centrifugy, kontinuální centrifugace v průmyslovém měřítku byla použita pro kultury savčích buněk teprve nedávno.

Filtrační vybavení pro centrifugaci v průmyslovém měřítku (např. pro vzorky větší než 2200 l) je objemné a představuje značné provozní náklady, které zahrnují i čas na instalaci filtru, jeho čistění a likvidaci. Existují tři hlavní problematické body týkají se separace savčích buněk v kontinuálních centrifugách v průmyslovém měřítku. Za prvé, střižné síly v centrifuze mohou poškodit buňky a vést ke vzniku malých částic buněčného odpadu či zbytků (debris).

Poškození buněk může dále vést k uvolňování intracelulárních sloučenin (proteiny hostitelské buňky, DNA, proteázy), které mohou zvýšit celkové znečištění výsledného produktu. Za druhé, suspenze savčích buněk jsou charakteristické širokým rozpětím velikosti částic (40 μm až submikronová oblast). Je potřeba určit nejmenší velikost částic, které mohou být účinně odstraněny centrifugací. Následné filtrační kroky (tj. kroky prováděné po centrifugaci) jsou potřebné k tomu, aby se zvýšila čirost odstředěné kapaliny (centrátu, tj. kapaliny získané po sedimentaci pevných složek vzorku) na úroveň vhodnou pro chromatografii. Za třetí, pro vyčiření (klarifikaci) suspenzí buněčných kultur je potřeba rychlý průběh celého procesu (např. za rozumnou dobu celého zpracování lze považovat přibližně 3 hodiny).

Reprezentativní vybavení pro centrifugaci a postupy jsou odborníkům známy, viz například Kempken et al. (1995) Biotechnol Bioeng 46:132-138, Kempken et al. (1995) J Indus Microbiol 14:52-57, Bertholda et al. (1994) Cytotechnology 15:229-242, U.S. Patent č. 5,451,660 - Builder et al. a Tebbe et al. (1996) Cytotechnology 22:119-127. Konkrétně, publikace Tebbe et al. je prvním příkladem použití centrifugy se soustavou disků („disk stack centrifuge") s hydrohermetickým plněním pro centrifugování hydridomových savčí buněk. Tebbe et al. provedli separaci buněk při relativně nízkých g silách (tj. odstředivých silách) 2200 x g a 5700 x g při nízkém objemovém (volumetrickém) toku 90 kg/hod. Torre et al. nicméně neposkytli horní hranici pro to, jak rychle stáčet buňky (otáčky za minutu, ot./min (rpm), vytvářejí konkrétní gravitační, resp. odstředivou sílu) nebo konkrétní rozsah objemového toku během centrifugace, aby se zabránilo střihovému poškození savčích buněk. Tebbe a další pouze

ukázali přímou závislost, kdy jednoduchým zvýšením gravitační síly při stáčení savčích buněk v centrifuze při konkrétním objemovém toku může být zvýšen objemový výkon purifikace v průmyslovém měřítku. Vzhledem ke zvláštnostem savčích buněčných systémů a s ohledem na nutnost vzít do úvahy základní složky Stokesova zákona (např. objemový tok a g), vyšší gravitační síla (přes 7000 g; vyšší než byla popsána v Tebbe et al.) zvyšuje střižné síly a způsobuje poškození buněk. Tudíž Tebbe et al. nedokázali určit omezení Stokesova zákona při rotujícím toku centrifugy

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

pro využití při purifikaci proteinů secernovaných kulturami savčích buněk v průmyslovém měřítku. Takže odstředěné kapaliny ze savčích buněčných kultur připravované způsoby podle dosavadního stavu techniky obsahují velké množství buněčného odpadu či zbytků velikosti menší než 1,5 μm, což snižuje průchodnost jakéhokoli následného filtračního kroku. V důsledku toho existuje stále potřeba zlepšit způsob přípravy purifikovaných proteinů v průmyslovém měřítku.

Tato nová metodologie uvažuje každou veličinu Stokesova zákona při centrifugačním kroku, aby se snížilo poškození savčích buněk střižnou silou. Kromě toho jsou v kombinaci s centrifugačním krokem použity specifické filtry, aby se snížila celková turbidita (zakalení) filtrované odstředěné kapaliny. Takže cílem předkládaného vynálezu je určení klíčových složek (jako je např. gravitační síly použitá ke stočení buněk, objemový tok použitý ke kontinuálnímu plnění soustavy rotorů a velikost mikrofiltrů) pro purifikaci izolovaných secernovaných proteinů prostřednictvím

centrifugace a filtrace. Tyto praktické úkoly byly vyřešeny způsoby separace pevných látek a kapaliny u velkoobjemových buněčných suspenzí, které popisuje předložený vynález.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje způsoby čiření (klarifikace) buněčných vzorků za použití centrifugace a hloubkové filtrace spočívající v tom, že se optimalizují klíčové složky Stokesova zákona, je-li aplikován na rotující tok v centrifuze

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

a následující filtrační prostředek, pro využití k purifikaci vzorků proteinů secernovaných ze savčích nebo bakteriálních buněčných kultur, a to v průmyslovém měřítku. Savčí nebo bakteriální buněčné kultury mohou zpočátku obsahovat buněčnou suspenzi, buněčnou kaši nebo buněčnou kulturu, včetně kultur o objemu alespoň přibližně 2200 l nebo alespoň přibližně 15 000 l. Pro vyčiření velkoobjemové buněčné kultury mohou být použita protipěnivá činidla. Podle způsobů popsaných v předložené přihlášce se provádí odstřeďování s využitím rovnováhy mezi gravitační silou v rozmezí přibližně 8000 x g až přibližně 15 000 x g a objemovým tokem v sestavách odstředivkových rotorů, čímž se připraví předvídatelný rozsah podmínek centrifugace, které zmírňují nepředvídatelnosti Stokesova zákona. Tyto metody poskytují účinnost separace alespoň přibližně 95 % následně po kroku centrifugace a odstředěnou kapalinu, která je v podstatě bez buněk a buněčného odpadu (debris) většího než přibližně 2 µm. Pro hloubkovou filtraci pak filtrační prostředek obsahuje jeden

nebo více filtrů, například hloubkový filtr a jeden nebo více dočišťovacích filtrů. Při specifickém použití má koncový filtr velikost pórů přibližně 0,1 μm nebo přibližně 0,2 μm.

Stručný popis obrázků na výkresech

Obrázek 1 je čárový graf, který ukazuje rychlost sedimentace CHO buněk různých velikostí při gravitaci a v odstředivých polích.

Obrázek 2 je schématický nákres, který ukazuje průřez centrifugou se soustavou disků.

Obrázek 3 je schématický nákres, který ukazuje princip separace v centrifuze se soustavou disků.

Obrázek 4 je čárový graf, který ukazuje relativní gravitační (g) sílu (tj. relativní odstředivou sílu) v separátoru SC-6 jako funkci rychlosti mísy.

Obrázek 5 je čárový graf, který ukazuje hodnotu Σ jako funkci rychlosti mísy u separátoru SC-6.

Obrázek 6 je čárový graf, který ukazuje dosažitelný výkon separátoru při 8000 a 15 000 x g (8800 a 12 000 ot./min (rpm)) jak funkci nejmenší velikosti částic, která je odstraněna při 50% velikostním výtěžku.

Obrázek 7 je čárový graf, který ukazuje odstranění pevné složky jako funkci Q/Σ a g síly.

Obrázek 8 je graf distribuce velikosti částic kultury IDEC-114, která byla použita jako plnění pro centrifugační experimenty. Populace mezi 10 a 35 mm reprezentuje

životaschopné buňky a populace menší než 4 mm reprezentuje buněčný odpad (debris). Rozlišení metody je 0,6 μm; žádné částice menší než tato velikost nebyly zaznamenány (osa x je v logaritmickém měřítku).

Obrázek 9 je čárový graf, který ukazuje turbiditu odstředěné kapaliny jako funkci provozních podmínky pro první soubor centrifugačních experimentů (Příklad 1).

Obrázek 10 je graf distribuce velikosti částic odstředěných kapalin získaných během prvních centrifugačních experimentů (čísla běhů odpovídají provozním podmínkám popsaným v příkladu 1).

Obrázek 11 je čárový graf, který ukazuje průchodnost filtru ultipor 0,2 μm v závislosti na turbiditě naneseného vzorku.

Obrázek 12 je čárový graf, který ukazuje průchodnost filtru ultipor 0,2 μm filtru v závislosti na koncentraci částic naneseného vzorku.

Popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje způsoby separace pevných látek od kapaliny pomocí centrifugace v kombinaci s hloubkovou a membránovou filtrací. Kombinovaný přístup umožňuje rychlou separaci vzorků v průmyslovém měřítku, což je vhodné pro průmyslové a klinické aplikace.

Hlavní problémové body, které jsou specifické pro separaci savčích buněk v kontinuální centrifugách, zahrnují porozumění omezení Stokesova zákona pro rotující tok centrifugy

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

pro využití při purifikaci proteinů secernovaných kulturami savčích buněk v průmyslovém měřítku. Za prvé, střižné síly v centrifuze mohou poškodit buňky, ať životaschopné nebo ne, a vést ke vzniku malých částic buněčného odpadu (debris). Poškození buněk může dále vést k uvolňování intracelulárních sloučenin (proteiny hostitelské buňky, DNA, proteázy), které mohou zvýšit celkové znečištění výsledného produktu. Za druhé, suspenze savčích buněk jsou charakteristické širokým rozpětím velikosti částic (40 μm až submikronová oblast). Je potřeba určit nejmenší velikost částic, které mohou být účinně odstraněny centrifugací. Následné filtrační kroky jsou potřebné pro to, aby se zvýšila čirost odstředěné kapaliny na úroveň vhodnou pro chromatografii. Za třetí, pro čiření suspenzí buněčných kultur je potřeba, aby celý proces proběhl dostatečně rychle, např. separace celého vzorku za rozumnou dobu přibližně 3 hodiny.

Jednoduše zvyšování g síly zvyšováním rychlosti, při které jsou buňky točeny, při konkrétním objemovém toku při kontinuální průtokové centrifugaci nakonec vede k působení střižné síly a k vytvoření malých částic buněčného odpadu ze savčích buněčných kultur. Způsob čiření popsaný v předložené přihlášce poskytuje metodologii pro určení vztahu Stokesova zákona pro centrifugaci savčích nebo bakteriálních buněčných kultur (tj. koncentrace buněk, hustota a viskozita dodávaného vzorku, životaschopnost kultury, odstředivá síla centrifugace, objemový tok kultury v centrifuze a velikost filtrů) pro účely purifikace proteinů v průmyslovém měřítku.

Termín „vzorek kapaliny s pevnou látkou" (případně „vzorek pevná látka-kapalina„) se týká jakéhokoliv vzorku obsahujícího oddělitelnou pevnou a kapalnou fázi, kde požadovaný produkt je v podstatě v pevné fázi nebo v kapalné fázi. K reprezentativním vzorkům patří suspenze, kaše („slurry"), buněčné kultury apod.

Při způsobu podle vynálezu se vzorek kapaliny s pevnou látkou odstředí, aby se oddělila pevná fáze a kapalná fáze, také nazývaná odstředěná kapalina (centrát). Centrifugační krok se provádí při použití parametrů vhodných pro dosažení v podstatě filtrovatelné odstředěné kapaliny. Typicky centrifugačním krokem se dosáhne oddělení alespoň přibližně 95 % pevná fáze, například více než přibližně 96 %, více než přibližně 97 %, více než přibližně 98 % nebo více než přibližně 99 %.

Předkládaný vynález dále umožňuje, že vyčířený vzorek je připraven následnou aplikací odstředěné kapaliny na prostředek pro hloubkovou filtraci pro odstranění částicového materiálu, který nebyl odstraněn centrifugací. Prostředek pro hloubkovou filtraci může obsahovat jeden nebo více filtrů, jako jsou membránové filtry, deskové filtry, filtry s výměnnou vložkou (cartridge), textilní filtry, tlakové listové filtry, rotační bubnové filtry nebo vakuové filtry. Jako jeden příklad lze uvést filtr CUNO třídy 120M10, který účinně odstraní veškeré buněčné zbytky z centrátu.

Popsané způsoby separace mohou být přizpůsobeny pro konkrétní aplikace, tj. různý buněčné vzorky, určením vhodných provozních podmínek nutných s ohledem na Stokesův zákon, jako je normalizovaná náplň, odstředivá (gravitační) síla, teplota plnění, kvalita filtru a objemy vzorků. Tak například centrifugace savčích buněk se účinně provádí při normalizované

rychlosti plnění přibližně 1 x 10^{-8} m/s a gravitační síle přibližně 8000 x g. Gravitační síla je také účinná v rozsahu přibližně 8000 x g až přibližně 15 000 x g, například v rozsahu přibližně 8000 x g přibližně 12 000 x g nebo v rozsahu přibližně 8000 x g přibližně 10 000 x g nebo v rozsahu přibližně 10 000 x g přibližně 15 000 x g nebo v rozsahu přibližně 12 000 x g přibližně 15 000 x g nebo v rozsahu přibližně 10 000 x g přibližně 12 000 x g. Normalizované plnění může být účinné při jakékoliv konkrétně hodnotě pohybující se v rozmezí výše uvedených provozních podmínek.

Fermentace nebo kultivace savčích nebo bakteriálních buněk v průmyslovém měřítku jsou v oboru dobře známy. Objemy těchto produkčních fermentací v průmyslovém měřítku mohou být mezi 500 l až 20 000 l, nebo v rozsahu 1000 l až přibližně 17 000 l nebo v rozsahu přibližně 2000 l až přibližně 15 000 l nebo v rozsahu 4000 l až přibližně 12 500 l nebo v rozsahu přibližně 6000 l až přibližně 10 000 l. Pro průmyslové a klinické aplikace mohou být použity velkoobjemové vzorky, výhodně včetně vzorků o objemu 15 000 l a 2 200 l.

Metody popsané v předložené přihlášce jsou užitečné také pro čiření buněčných vzorků jako jsou vzorky živočišných a bakteriálních buněk. Tak například produkty - proteiny secernované buněčnými kulturami se připravují pro purifikaci tak, že se odebírá kultivační médium, tj. že se odstraňují buňky a buněčné zbytky (debris). Produkty - secernované proteiny mohou být nativní proteiny nebo rekombinantně připravené proteiny, a to včetně, aniž by byl výčet omezující, biologických modulátorů („interleukiny„ nebo „cytokiny„) a protilátek („imunoglobuliny„). Vyčištění výhodných protilátek z buněčného vzorku může zahrnovat polyklonální nebo monoklonální protilátky. Další předměty, rysy a výhody

předkládaného vynález budou odborníkům jasné po zvážení následujícího podrobného popisu příkladů výhodných provedení předloženého vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady jsou zahrnuty do přihlášky, aby ukázaly různá provedení vynálezu. Určité aspekty následujících příkladů jsou popsány pomocí znaků technik a postupů, o kterých původci zjistili nebo uvážili, že dobře fungují při realizaci vynálezu. Příklady dokumentují standardní laboratorní praxi původců. S ohledem na předložený popis a obecnou úroveň znalostí v oboru, průměrnému odborníkovi je jasné, že následující příklady jsou zamýšleny skutečně jako ilustrativní a že mohou být užity četné změny, modifikace a alternativy bez odchýlení se od vymezeného rozsahu vynálezu.

Zkratky použité v příkladech jsou definovány v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Symboly a zkratky

A	ekvivalentní sedimentační plocha	m^2
D	průměr částic	m
E	odstranění pevných látek	
G	gravitační konstanta	m/s^2
G	odstředivé zrychlení	s^{-1}
L	délka mísy (rotoru)	m
N	počet disků v soustavě	

η	viskozita	kg/(m.s)
PCV	objem zhuštěných buněk	%
Q	objemový tok	m^3/s
R	poloměr centrifugační mísy nebo disku	
Re_d	velikostní výtěžek částic o průměru d	
ρ_l	hustota kapaliny	kg/m^3
ρ_s	hustota pevné látky	kg/m^3
φ	kuželový poloviční úhel disku	
Σ	faktor sigma (ekvivalent plochy)	m^2
t	čas	s
u	rychlost toku	m/s
V_{gd}	sedimentační rychlost v podmínkách gravitace	m/s
V_s	konečná rychlost sedimentace	m/s
Ω	úhlová rychlost	s^{-1}

Příklad 1

Čiření suspenzí buněk CHO kontinuální centrifugací užitím centrifugy se soustavou disků

Výchozí studie proveditelnosti byla provedena pomocí pronajaté centrifugy se soustavou disků, separátoru SC-6 Westfalia. Toto zařízení má takovou velikost, aby mohlo být provozováno s objemovými toky mezi 60 a 1000 l/hod, a proto je vhodné k vyčiření suspenze produkované bioreaktorem o objemu 200 l. Byly celkem provedeny tři zkušební běhy s následující hlavními cíli:

(1) Vyhodnotit obecnou slučitelnost buněčné suspenze v průmyslovém měřítku s kontinuální centrifugací užitím

centrifugy se soustavou disků, pokud jde o odstranění částic a poškození buněk;

(2) určit, jaké kroky filtrace jsou vyžadovány dále po centrifugaci před tím, než se odstředěná kapalina může nanášet na první chromatografickou kolonu, a

(3) najít vhodné okno provozních podmínek pro stanovení velikosti centrifugy požadované pro čiření buněčné suspenze v měřítku průmyslové produkce a pro nastavení kombinace centrifugace/filtrace pro čiření buněčných suspenzí o objemu 2200 a 15 000 l.

I. Sedimentace částic ve viskózních kapalinách

Když sférická částice o průměru d sedimentuje ve viskózní kapalině v podmínkách zemské přitažlivosti g, její konečná rychlost sedimentace Vs je určena při sedimentační rovnováze vznosnou sílou a viskózním odporem působícím na částici podle Stokesova zákona.

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

Při rotujícím toku v centrifuze se rovnice (1) modifikuje „odstředivou silou či gravitací„ G = $\Omega.r^2$, kde Ω představuje úhlovou rychlost (rovnající se 2π krát rychlost rotace N), r je poloměr mísy centrifugy, η je viskozita kapaliny a ρ je hustota suspenze (s) a kapaliny (l).

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

Aby bylo dosaženo dobré separace částic v odstředivém poli, je vyžadována kombinace některých z následujících podmínek: vysoká rychlost centrifugace, velký rozměr částic, velký rozdíl hustot pevná látky a kapaliny, velký poloměr mísy a malá viskozita. Souhra těchto podmínek a porozumění rozsahům každé z výše popsaných podmínek jsou potřebné pro zmenšení střižného poškození buněk a pro zvýšení celkové účinnosti čiření pro následné filtrační kroky.

Ve specifickém příkladu sběru suspenze CHO buněk mohou být identifikována některá omezení: savčí buňky vykazují značně širokou distribuci velikosti buněk, a dále některé způsoby mohou vést ke sklizení buněk při poměrně nízké životaschopnosti. Suspenze, která má být vyčířena, proto obsahuje životaschopné buňky (o průměru 10 - 20 μm) a životaneschopné buňky (o průměru 4 - 10 μm), a také buněčný odpad či zbytky (o průměru submikronové velikosti až 4 μm). Tato široký distribuce velikosti brání tomu, aby byly centrifugací odstraněny všechny částice ze suspenze, a proti je třeba rozhodnout, jaká má být nejmenší částice, která má být odstraněna za rozumných provozních podmínek. Obrázek 1 představuje tento problém v grafické podobě. Čára v grafu proložená kosočtvercovými symboly ukazuje rychlost sedimentace buněk o různém průměru při průměrné hustotě savčích buněk 1030 kg/m^3, hustotě suspenze CHO buněk 1000 kg/m^3 a viskozitě suspenze 1,05 mPa.s. Dokonce velmi velké buňky o průměru 20 mm sedimentují rychlostí pouze 0,4 cm/min, částice buněčného odpadu o velikosti 1 μm sedimentují rychlostí 0,0001 cm/min. Při použití mísy centrifugy o průměru 40 cm při 10 000 ot./min (rpm) se zvyšuje dramaticky rychlost sedimentace, ale částice menší než 1 μm stále sedimentují nesmyslně malou rychlostí (jak je ukázáno čarou procházející kruhovými symboly). Proto

centrifugace neumožňuje odstranit všechny částice a pro odstranění velmi malých částic jsou nutné filtrační kroky, které následují po centrifugaci.

Ačkoli obrázek 1 ukazuje, že s rychlostí centrifugy se zlepšuje sedimentace, ale také to vede k vysokému zrychlení buněk v odstředivém poli, což zase naopak může vést k poškození buněk. Poškozené buňky se mohou rozpadnout až na malé částice buněčného odpadu, debris, a učinit tak separaci ještě problematičtější vzhledem k omezeným možnostem separace, jak byly diskutovány výše. Poloměr mísy nemůže být zvětšován do nekonečna, protože zvětšení průměru mísy při udržení rychlosti rotace zvyšuje namáhání stěny. Z důvody stability materiálu existuje maximální poloměr mísy, který může být použit ve vysokoobrátkových centrifugách. Rozdíl hustot a viskozita suspenze CHO lze považovat za výhodné, protože koncentrace buněk v suspenzi CHO je poměrně nízká. Provádění separace při teplotě buněčné kultury (35 °C) je prospěšné, protože to snižuje viskozitu suspenze.

H. Diskové centrifugy

Jak je znázorněno na obrázku 2, jedním z nejčastějších typů centrifugy pro čiření je centrifuga s vertikálně upevněnými disky. Plnění je zavedeno do osy mísy (rotoru) a tok pak prochází soustavou těsně u sebe uložených kónických disků. Vertikálně upevněné konické disky s vertikální osou mísy jsou ještě zrychlovány, často pomocí sestavy radiálních lopatek. Rozestup kónických disků je často mezi 0,5 až 3 mm, aby se zmenšila vzdálenost vyžadovaná pro separaci sedimentovaných částic z kapaliny. Úhel disku je často mezi 40 a 50 stupni, aby byl usnadněn transport pevných látek dolů po povrchu disku

do prostoru pro zachytávání pevných látek. Mechanismus separace částic pevné látky nebo buněk je takový, jak je ukázán na obrázku 3. Pevné látky sedimentují pod vlivem odstředivé síly směrem ke spodní straně disků a sklouzávají dolů po disku do prostoru pro zachytávání pevných látek. Současně vyčířená kapalina stoupá kanálkem mezi disky a opouští centrifugu prostřednictvím soustavy dostředivé pumpy. Usazené pevné látky jsou odstraňovány buďto kontinuálně výtokovými tryskami nebo občasně pomocí otvorů na okraji mísy.

III. Teorie kontinuální odstředivé sedimentace

Předkládaný vynález také poskytuje níže popsaný model pro lepší predikci chování kontinuální centrifugace založený na odvozenině Stokesova zákona pro sedimentaci. Aby bylo možné předvídat chování kontinuální centrifugace, Stokesův vztah pro sedimentaci v podmínkách gravitace (rovnice 1) musí být modifikován pro sedimentaci v rotujícím objemu kapaliny. Rychlost sedimentace sférických částic o průměru d je pak dána podle rovnice (3):

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

Za předpokladu toku s uniformním rozložením rychlostí kapaliny v celém objemu kapaliny, průměrná axiální rychlost částice putující z povrchu o poloměru r_p ke stěně mísy r_b je vypočtena podle rovnice (4):

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

Doba zdržení částice putující na axiální vzdálenost x uvnitř mísy s kapalinou pohybující se s objemovým tokem Q je podle rovnice (5):

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

Vztažení času, který je potřebný k tomu, aby částice sedimentovala, k času, který potřebuje k pohybu s hromadným tokem Q, vede k rovnici (6):

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

Pro částici putující po celé délce L bubnu, rovnice (6) je upravena na rovnici (7) pro x = L a r = r*:

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

Velikostní výtěžek („size recovery") částic o průměru d (Re_d) je dán rovnicí (8):

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

tudíž maximální objemový tok Q, který ještě umožňuje určitý velikostní výtěžek Re_d, kde V_{gd} představuje rychlost sedimentace v podmínkách gravitace (1 g), je dán podle rovnice (9):

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

kde A představuje ekvivalentní sedimentační plochu centrifugy za konkrétních provozních podmínek. To je funkcí poloměru mísy, hloubky sedimentace, provozní rychlosti, a také toho, jaký velikostní výtěžek je vyžadován. Fyzikální parametry suspenze, tj. velikost částic, hustota a viskozita, nejsou obsaženy v A, ale tyto parametry jsou zachyceny rychlostí sedimentace částic v podmínkách gravitace (V_{gd}). Když je velikostní zisk nastaven na 50 %, z rovnice (9) se stane Amblerova rovnicí (rovnice (10)), kde $\Sigma_{50\%}$ představuje ekvivalent plochy pro 50% velikostní výtěžek.

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

Při aproximaci se Amblerova rovnice zjednoduší na rovnici (11):

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

Pro centrifugy se soustavou disků může být pro $\Sigma_{50\%}$ odvozena podobná rovnice (rovnice (12)):

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

kde N je počet disků v soustavě, r_o a r_i jsou vnější a vnitřní poloměr kónických disků a φ je kuželový poloviční úhel. Σ v podstatě představuje kombinaci velikosti centrifugy a provozních podmínek pokud jde o rychlost. Pro zvětšování měřítka separace je poměr Σ a objemového toku (Q/Σ), který je měřen v m/s, udržován konstantní. Jestliže objemový tok, který je vyžadován ve zvětšeném měřítku, je znám, a experimenty

v malém měřítku prokázaly, že jistá hodnota Σ je dostatečná pro dosažení požadovaného vyčiření, pak Σ potřebná pro centrifugaci ve velkém měřítku může být vypočtena použitím rovnice (13). Alternativně Σ může být vypočítána pro daný typ zařízení podle rovnice (12) a dosažitelný tok může být vypočítán pro toto zařízení pomocí rovnice (13).

(13) $$\frac{Q_2}{\Sigma_2} = \frac{Q_1}{\Sigma_1} = 2V_{gd}$$

Rovnice 12 a 13 poskytují výchozí bod pro určení dosažitelného toku při konkrétní g síle pro centrifugaci savčí nebo bakteriální buněčné kultury ve velkoobjemovém průmyslovém měřítku za rozumnou dobu (to je za méně než 5 hodin). Nicméně zvětšování měřítka separace pomocí rovnice (13) má některá omezení, protože byla učiněna řada předpokladů při odvozování rovnice toku:

1. Tok v centrifuze nemusí být hromadný tok, mohou existovat rychlostní gradienty;

2. přitékající vzorek není ihned zrychlován na plnou odstředivou sílu v plnícím otvoru, což vede ke snížení odstředivé síly, které jsou částice vystaveny, a ke snížení separační účinnosti;

3. Σ odpovídá pouze 50% velikostnímu výtěžku;

4. neuniformní rozdělení přítoku na vstupu; a

5. sedimentace částic v suspenzi může být ztížena vysokou koncentrací částic, což vede ke snížení účinnosti separace .

Během zvětšování měřítka tato omezení jsou obvykle zohledněna použitím určitých opravných faktorů. Pro centrifugace

v průmyslovém měřítku je korekční faktor použitý k určení toku podle rovnice (9) mezi 0,4 a 0,7, to znamená, že skutečný výkon zařízení je tak odhadován na 40 % až 70 % predikovaného výkonu podle idealizované rovnice (9).

IV. Technický popis pronajatého separátoru SC-6

Technická data pro pronajatý separátor SC-6 byla následující:

Celkový objem mísy (rotoru)	1,8 l
Objem pro zadržení sedimentu	0,7 l
Max. rychlost mísy	12 000 ot./min (rpm)
Počet disků v soustavě	75
Diskový úhel	40 °
Vnější průměr disku	0,068 m
Vnitřní průměr disku	0,0125 m

Z těchto dat může být vypočteno odstředivé zrychlení G (v násobcích g) jako funkce rychlosti mísy podle rovnice (14):

$$(14) \quad G = \frac{r \cdot \Omega^2}{g} \quad \text{kde} \quad \Omega = 2\pi \cdot \text{rychlost mísy} \ \left(s^{-1}\right)$$

Pro centrifugu se soustavou disků může být G vypočteno na základě vnějšího poloměru soustavou disků (0,068 m) nebo užitím poloměru prostoru pro zachycení pevné fáze (0,093 m). Obrázek 4 ukazuje vývoj g síly jako funkce rychlosti mísy pro oba případy. Čára procházející kruhovými symboly představuje vývoj g síly jako funkci rychlosti mísy založenou na použití poloměru soustavy disků. Čára procházející čtvercovými symboly představuje vývoj G jako funkce rychlosti mísy

založenou na použití poloměru prostoru pro zachycení pevné fáze. Jak ukazují výsledky z obrázku 4, g síla může být vypočtena použitím poloměru prostoru pro zachycení pevné fáze, a je tedy přibližně 15 000 x g pro nejvyšší rychlost mísy 12 000 ot./min (rpm).

V. Provoz pronajatého separátoru SC-6

V.A. Teoretické předpoklady

Před zkušebními běhy separátoru SC-6 byl výkon tohoto zařízení určen pro rozsah provozních podmínek, jak je to ukázáno na obrázku 5. Obrázek 5 ukazuje vztah Σ jako funkci rychlosti mísy (rpm) pro separátor SC-6. Z rovnice (13) může být vypočten tok, při kterém jsou částice o určitém průměru separovány s 50% velikostním výtěžkem, a sice z hodnot $\Sigma_{50\%}$ a rychlosti sedimentace v podmínkách gravitace V_{gd}. Pro centrifugu se soustavou disků se tedy Q_{max} vypočte podle rovnice (15):

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

Použitím korekčního faktoru 0,5, který bere do úvahu přednostní separaci všech částic z určité velikostní skupiny, může být vynesen do grafu maximální výkon separátoru SC-6 jako funkce nejmenší velikosti částice, která má být separována. Obrázek 6 ukazuje graf pro rychlosti mísy 8800 a 12 000 ot./min (rpm) a pro široký rozsah velikostí částic (8800 ot./min je znázorněna čárou s kruhovými symboly a 12 000 ot./min je znázorněna čárou se čtvercovými symboly). Je jasné, že pokusy odstranit částice menší než 1 μm vedou k

nesmyslně nízkému objemovému toku. Cílem činnosti centrifugy ale není odstranit všechny částice z buněčná suspenze, ale odstranit většinu částic, a pak použít malou sestavu hloubkových filtrů pro konečné dočištění ještě před absolutní filtrací. Za předpokladu, že odstranění všech částic větších než 2 μm je dostatečné k tomu, aby byla podstatně zredukována plocha potřebná pro konečné dočištění na filtru, bylo vypočteno, že při 8000 x g (8800 ot./min (rpm)) je možný tok 4,9 l/min. Pokud by separátor běžel s plnou rychlostí mísy 12 000 ot./min (rpm) (15 000 x g), tok by se mohl zvýšit až na 9 l/min. Za těchto podmínek může být separátor provozován při Q/Σ $2,5.10^{-8}$ m/s. Protože Q/Σ je významným faktorem pro určení provozních podmínek, experimentální hodnocení separátoru SC-6 bylo připraveno tak, že se testoval rozsah faktoru Q/Σ mezi 0,9 a $2,8.10^{-8}$ m/s. Vzhledem k tomu, že savčí buňky by mohly reagovat na variace v g síle použité v separátoru, hodnota faktoru Q/Σ byla měněna nastavením objemového toku nebo nastavením g síly. Obecná teorie sedimentace předpovídá, že zvyšováním g síly se zvyšuje Σ, což zas vede ke zlepšené separaci. V případě částic citlivých na poškození střihem, jako jsou savčí buňky, může zvyšování g síly vést ke zvýšenému poškození střihem a ke vzniku menších částic, které již nemohou být separovány za zvolených provozních podmínek.

V.B. Experiment 1

V počátečním hodnocení výkonu separátoru SC-6 byly užity testovací podmínky uvedené v tabulce 2. Pro separaci bylo k dispozici 280 l suspenze buněčné kultury IDEC-114 a vždy přibližně po 30 l bylo použito pro osm experimentálních bodů. Jestliže objem mísy separátoru SC-6 je 1,8 l, aplikace náplně

o objemu 18 l (10násobek rezidenčního objemu) by měla být dostatečné k dosažení ustáleného stavu. Avšak sedimentované buňky se hromadí v prostoru pro zachycení pevných látek (0,7 l), který tudíž musí být částečně nebo úplně vyprazdňován vyprazdňovacími dávkami. Tyto dávky naruší rovnováhu a je proto důležité pozorovat experimentální podmínky při několika vyprazdňovacích dávkách. Při odhadovaném objemu zhuštěných buněk 3 % (30 g/l) a za předpokladu, že buňky jsou zhuštěny přibližně na 50 % mokrého objemu v prostoru pro zachycení pevné látky, před vyprázdněním může být zadrženo 350 g buněk, což odpovídá přibližně naplnění vzorku o objemu 12 l. Pevné látky byly částečně vyprázdněny po aplikaci 10 l vzorku užitím 400 ml dávek, což umožnilo pozorovat systém pro tři vyprázdnění pevných látek. Vzorky přiváděné kultury a odstředěné kapaliny byly odebrány a analyzovány z hlediska objemu zhuštěných buněk a stejně tak z hlediska distribuce velikosti částic. Dále byla měřena teplota suspenze přiváděné do centrifugy a odstředěné kapaliny, aby se zkontrolovalo, zda teplo vznikající v centrifuze nepřesahuje chladicí kapacitu systému pro ochlazování mísy separátoru. Ve všech experimentech se teplota vytékající kapaliny nikdy nezvýšila o více než jeden °C nad teplotu vzorku přiváděného do separátoru.

Tabulka 2

Počáteční podmínky testu

běh č.	1	2	3	4	5	6	7	8
G-síla (x 1000g)	12	15	15	8	8	9,6	9,6	9,6
Q (l/min)	5,3	10,3	3,3	1,5	5,1	6,4	4,3	2,1
Σ (m^2)	4950	6172	6172	3400	3400	3960	3960	3960
$Q/\Sigma(10^{-8}$ m/s)	1,8	2,8	0,9	0,9	2,6	2,7	1,8	0,9

Výsledky z osmi zkušebních podmínek jsou shrnuty na obrázku 7. Výkon či účinnost separace pevných látek z kapaliny se obvykle charakterizuje schopností odstranit pevné látky. Extrakce pevné látky E je definována v rovnici (16):

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

kde PCV představuje procento objemu zhuštěných buněk, index „feed" označuje přiváděnou suspenzi, index „centrate" označuje odstředěnou kapalinu. Obrázek 7 demonstruje, že účinnost separace se snižuje se zvyšujícím se „challenge" faktorem centrifugy (Q/Σ), tj. jestliže tok v centrifuze je zvýšen za daného ekvivalentu plochy, separační účinnost bude klesat. Toto chování je očekáváno a predikováno teorií sedimentace (Rovnice (15)). Zvláštností savčího buněčného systému se stanou evidentními, když se začne uvažovat o použité hodnotě g. Při nízké hodnotě „challenge" faktoru, g síla významně neovlivňuje účinnost separace (viz vztah mezi odstraněním pevné látky vs. Q/Σ pro g sílu při 8000 ot./min (rpm) - čára s trojúhelníkovými symboly). Avšak účinnost je podstatě

snížena při vysoké g síle (viz vztah mezi odstraněním pevné látky vs. Q/Σ pro g sílu při 15 000 ot./min (rpm) - čára s kosočtverci). To lze vysvětlit zvýšeným střižným poškozením buněk při vysokém g, které vede k vytváření velmi jemných částic a současně zhoršuje separaci malých částic. Tudíž data na obrázku 7 ukazují, že provoz SC-6 při 8 000 x g je výhodná volba, protože umožňuje provoz separátoru při vyšším „challenge" faktoru.

Kvůli uvážení alternativního měření účinnosti separace, byla turbidita odstředěné kapaliny měřena pro různé provozní podmínky. Na obrázku 9 je vynesena turbidita odstředěné kapaliny jako funkce g síly a „challenge" faktoru (Q/Σ). Turbidita poskytla mnohem přesnější obraz o účinnosti centrifugace, protože zákal je způsoben všemi částicemi v suspenzi a proto reprezentuje celkovou populaci částic v odstředěné kapalině. Obrázek 9 ukazuje, že dokonce při nízkém „challenge" faktoru zvyšování g síly vede k vytváření velmi jemných částic (zbytky buněk, debris, vzniklé střižnými silami během centrifugace nebo zacházení s buňkami), které nejsou odstraněny se stejnou účinností jako větší částice. Toto snížení separační účinnosti způsobené narušením buněk indukovaným střižnými silami není detekováno, jestliže se jako kritérium účinnosti použije hustota zhuštěných buněk.

To je potvrzeno výsledky distribuce velikosti částic v různých odstředěných kapalinách, což je ukázáno na obrázku 10. Pro zjednodušení jsou ukázány pouze částice menší než 4 µm. Přiváděná suspenze obsahuje částice všech velikostí, přičemž centrifugace úspěšně odstraní všechny částice větší než 2 µm. Jemné rozdíly v distribuci velikosti částic mohou být detekovány pro různé provozní podmínky. Běh 4, který probíhal při 8000 g a nízkém „challenge" faktoru ukazoval podstatnou

extrakci částic mezi 1 a 2 µm, zatímco centrifugace při vysoké g síle a vysokém „challenge" faktoru (běh 1 a 2) vedla k významném posunu v distribuci směrem k větším částicím. Takže tato data také ukazují na to, že centrifugace při nízké g síle (výhodně 8000 x g) a nízkém „challenge" faktoru (0,9 x 10^{-8} m/s) je výhodná pro optimální účinnost separace. Je zajímavé porovnat tyto výsledky s predikcemi vytvořenými výše. Využitím teorie sedimentace původci předpověděli, že 50 % všech částic větších než 2 µm bude odstraněno při „challenge" faktoru 2 x 10^{-8} m/s a 8000 ot./min (rpm) (odpovídá přibližně 8000 x g). Při Q/Σ 1 x 10^{-8} m/s byly odstraněny všechny částice větší než 2 µm, což potvrzuje odhady založené na teorii vysvětlené výše v tomto textu. Teorie dokonce předpověděla lepší účinnost při vysoké g síle, což v praxi nebylo dosaženo. Účinnost spíše klesala s g sílou. Tato nepredikovatelnost odráží právě zvláštnosti systémů savčích buněk, kde střihem indukované poškození buněk vede ke změně distribuce velikosti částic, což není dostatečně přesně vystiženo zjednodušenou teorií.

Protože centrifugací nelze získat odstředěný roztok zcela bez částic, je potřeba dále za centrifugaci instalovat dočišťovací a absolutní filtry. Byla zkoumána filtrační sestava obsahující ve sledu hloubkový filtr CUNO 60SP a dále filtry Pall Ultipor 0,2 µm a 0,1 µm, a to z hlediska filtrační průchodnosti pro odstředěné kapaliny připravené v různých experimentálních podmínkách. Výsledky studie jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Výsledky experimentů pro testování filtrační sestavy

G-síla	15 000	15 000	8000	9600
Q/Σ (m/s)	$2,8 \times 10^{-8}$	$0,9 \times 10^{-8}$	$0,9 \times 10^{-8}$	$0,9 \times 10^{-8}$
Turbidita po hloubkovém filtru CUNO 60SP (NTU)	22	11,5	11,8	18
Ultipor s průchodností 0,2 µm (l/m^2)	116	438	265	159
Ultipor s průchodností 0,1 µm (l/m^2)	197	178	195	110

Nejdůležitějším zjištěním plynoucím z těchto experimentů bylo to, že průchodnosti absolutních filtrů jsou velmi nízké, obzvláště pro 0,2µm filtry. Hloubkový filtr CUNO 60SP zjevně neposkytoval dostatečnou ochranu pro následné absolutní filtry. To je podepřeno značným zakalením filtrátu za hloubkovým filtrem. Absolutní zlepšení průchodnosti filtrů by vyžadovalo instalaci obrovských filtračních prvků po směru separace za centrifugačním krokem. Na základě těchto dat lze odhadovat, že kultura o objemu 15 000 l by vyžadovala instalaci 65 prvků s 0,2µm filtrem o průměru přibližně 25,4 cm (10 palců) a 150 prvků s 0,1µm filtrem o průměru přibližně 25,4 cm (10 palců) za krokem centrifugace. Ve smyslu ovlivnění provozních podmínek (Q/Σ, g síla), nebyl zde žádný přesvědčivý vliv na účinnost filtrace.

Souběžně s filtračními experimenty byl proveden kontrolní experiment s použitím stejné buněčná suspenze IDEC-114, která byl vyčiřena pomocí obvyklé soustavy s hloubkovým filtrem (CUNO 10 SP, CUNO 60 SP, Pall Ultipor 0,2 µm, Pall Ultipor 0,1 µm). Průchodnosti dvou absolutních filtrů byly srovnatelné

s průchodností odstředěné kapaliny centrifugy za nejlepších provozních podmínek. Průchodnost 0,2μm filtru v kontrole byla 497 l/m^2 a 0,1μm filtru byla 182 l/m^2. Toto dokazuje, že suspenze buněčné kultury IDEC-114 jako taková má nízkou filtrovatelnost a že díky centrifugaci pak absolutní filtrace není tak složitý a zdlouhavý úkol.

V. B. Experiment 2

Na základě zjištění z experimentu 1 byla provedena druhá řada centrifugačních experimentů, aby byla identifikována filtrační sestava se zlepšenou kvalitou filtrování. Experimentální podmínky a odpovídající účinnost separace jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4

Výsledky experimentů pro testování různých filtračních sestav

Běh č.	9	10	11
G síla	8000	8000	15 000
Q (l/min)	1,8	5,1	10,3
Σ (m^2)	3400	3400	6174
Q/Σ (m/s)	0,9	2,5	2,8
Výtěžek pevných částic (%)	99,4	99,7	99,6
Turbidita odstředěné kapaliny (%)	63	111	344

Znovu se jeví výtěžek pevné fáze vynikající v celé tabulce, nicméně turbidita odstředěné kapaliny odhalí rozdíly v účinnosti separace. Tak jako v prvním souboru experimentů, provoz centrifugy při nízké g síle a redukovaném Q/Σ brání vytvoření jemných částic v důsledku střižného poškození a umožňuje dobré snížení celkové turbidity. Kapaliny po odstředění byly pak filtrovány použitím různých hloubkových filtrů, které byly jemnějšího stupně než původní filtry CUNO 60SP. Celkový záměr byl, aby se dosáhlo lepší ochrany absolutních filtrů. Turbidity (v NTU) příslušných filtrátů jsou ukázány v tabulce 5.

Tabulka 5

Turbidity filtrátů

Běh č.	9	10	11
CUNO 60-120 SP	9,2	8,1	21,3
CUNO 90 SP ZA	14,2	10,6	
CUNO 120M stupně 10	8,6		7,5
Millipore 75DE	20,5		
Millipore 60DE-75DE-RW01	8,3	6,6	14,5

Majíce na mysli, že turbidita původních filtrátů CUNO 60SP byla vyšší než 10 NTU, použitím filtrů jemnějšího stupně se zredukovala turbidita přicházející na absolutní filtry. Bez ohledu na tento účinek, provozní podmínky centrifugace měly rozhodující vliv na výkon hloubkových filtrů. Z filtrátů po hloubkové filtraci v různých provozních podmínkách

centrifugace je jasné, že výhodný je právě provoz při nízké hodnotě g a nízkém faktoru Q/Σ.

Průchodnosti filtrů Ultipor 0,2 a 0,1 µm pro různé filtráty po hloubkové filtraci jsou ukázány v tabulce 6. Jemnější stupeň hloubkové filtru poskytuje lepší ochranu pro 0,2µm filtry. V nejlepším případě byla průchodnost zvýšena více než pětkrát. Průchodnost 0,1µm filtru nicméně zůstala nízká. Jakožto kontrola byla suspenze IDEC-114 také filtrována užitím obvyklého postupu a stejné vstupní suspenze. Nízká průchodnost 0,1µm filtru byla však pozorována pro kontrolu také. Tyto výsledky ukazují na to, že je to právě suspenze buněčné kultury, co činí z 0,1µm filtrace tak náročný proces, tj. dobře provozovaná centrifuga nezhoršuje průchodnost absolutních filtrů ve srovnání s kontrolou.

Tabulka 6

Průchodnosti filtru

Běh č.	9	10	11	Kontrola
CUNO-16-120 SP 0,2 µm	1996		339	2251
CUNO 90 SP ZA 0,2 µm	600	706		
CUNO 120M10 0,2 µm	2649		1364	
Millipore 75 DE 0,2 µm	157			
Millipore 60DE-75DE-RW01 0,2 µm		1154	218	
CUNO-16-120 SP 0,1 µm	140		173	291
CUNO 90 SP ZA 0,1 µm	78	96		
CUNO 120M10 0,1 µm	164		178	
Millipore 75 DE 0,1 µm	168			
Millipore 60DE-75DE-RW01 0,1 µm		212		

V.D. Experiment 3

Třetí série experimentů byla provedena kvůli redukci požadavků na filtr 0,1 µm. Byly sledovány dvě myšlenkové linie. Za prvé, byla užita hypotéza, že 0,1µm filtry byly zablokovány jemnými zbytky buněk, které vznikají v centrifuze, buďto střižnými silami na vstupu nebo střižnými silami působícími na zhuštěné buňky v prostoru pro zadržení pevné fáze. Druhá možnost poškození buněk byla zkoumána pomocí dvou různých pevných látek s vyprazdňovacími objemy 400 a 250 ml. Menší vyprazdňovací objemy vyžadoval častější vypuštění, což zase naopak snižuje dobu zdržení sedimentovaných buněk v prostoru pro zachycení pevné fáze a snižuje celkovou expozici zahuštěné hmoty stresovým podmínkám. Jestliže zahuštění hmoty způsobuje poškození buněk, pak by bylo možno předpovědět, že zmenšené objemy vyprazdňování by mohly redukovat vytváření jemných zbytků buněk a zlepšit tak 0,1µm filtrovatelnost. Navíc v jednom souboru provozních podmínek byla teplota přiváděné suspenze snížena na 10 °C. Je známo, že za snížené teploty jsou savčí buňky méně náchylné ke střižnému poškození. Proto se čekalo, že za snížené teploty se zabrání vzniku jemných buněčných zbytků. Všechny běhy byly provozovány při 8000 x g a Q/µm 0,9 x 10^{-8} m/s, přičemž odstranění pevné látky bylo 99,8% ve všech případech, což dobře odpovídá i předchozím výsledkům. Turbidita odstředěné kapaliny byla 32 NTU pro běhy v 37 °C, bez ohledu na vyprazdňovací objem, což ukazuje, že doba zadržení v prostoru pro zachycení pevné fáze neovlivňuje vytváření jemných zbytků buněk. Turbidita odstředěné kapaliny po odstředění v 10 °C byla pouze 24 NTU, což by mohlo ukazovat, že se při nízké teplotě díky zvýšené stabilitě buněk tvořilo méně jemných buněčných zbytků. Pro odstředěné roztoky

průchodnost hloubkového filtru CUNO 90-120SP byla určena na 441 l/m^2. V obvyklé soustavě pro hloubkovou filtraci, kde byl použit hloubkový filtr CUNO 1-10SP před filtrem 90-120SP pro stejnou kulturu IDEC-114, byla zjištěna průchodnost 90-120SP 400 l/m^2. Takže díky centrifugaci je počáteční hloubková filtrace již překonaná stejně tak jako redukce požadavků na sekundární dočišťovací filtr o 10 %. Výsledky studie filtrovatelnosti pro absolutní filtry jsou ukázány v tabulce 7.

Tabulka 7

Testy filtrovatelnosti

Běh č.	12	13	14	Kontrola
G síla	8000	8000	8000	
Q (l/min)	1,8	1,8	1,8	
Q/Σ (m/s)	0,9	0,9	0,9	
vyprazdňovací objem (ml)	250	400	400	
teplota (°C)	37	37	10	
Turbidita filtrátu po CUNO 120M10 (NTU)	5,8	5,9	6,2	
Průchodnost Ultipor 0,2 µm (l/m^2)	2751	2021	889	>2800
Průchodnost Ultipor 0,1 µm (l/m^2)	157	141	16	217

Žádná modifikace nebyla schopná zlepšit 0,1µm filtrovatelnost, což bylo srovnatelné s konvenčně filtrovanou kontrolou. Tyto problémy mohou být specifické pro zpracování buněčné kultury IDEC-114 a nikoliv pro centrifugaci jako alternativní jednotku

zpracování. Nižší teplota naproti tomu podstatně snížila filtrovatelnost.

Na základě předloženého vynálezu je možné určovat 0,2μm filtrovatelnost buď na základě turbidity nebo koncentrace částic (jak je zjištěna z distribuce velikosti částic). Aby byla umožněna rozumná průchodnost filtru, je turbidita výhodně menší než 10 NTU nebo je koncentrace částic výhodně menší než 5×10^6 částic na jeden ml. Viz obrázky 11 a 12.

Tyto experimentální výsledky ukazují na provoz centrifugy se soustavou disků při nízké g síle (8000 x g) a Q/Σ přibližně $0,9 \times 10^8$ m/s. Na základě těchto dat jsou původci schopni odhadnout velikost centrifugy pro NIMO (objem kultury 15 000 l) a NICO (objem kultury 2200 l). Pro srovnání byly užity pouze výsledky získané za použití vybavení dostupného od Westfalia. Pro měřítko NIMO je vhodné zařízení pro čiření CSD 130, které má maximální ekvivalent plochy Σ 130 000 m^2 při 8000 x g. Použitím rovnice (13) byl tok v tomto zařízení stanoven na $0,9 \times 10^8$ m/s, což poskytuje objemový tok 4200 l/h a celkovou dobu zpracování přibližně čtyři hodiny. Podobně zařízení pro čiření CSC20 může být použito v měřítku NICO. Při jeho maximální rychlosti mísy 8300 ot./min (rpm) pracuje přibližně s 8400 x g a má ekvivalent plochy 22 000 m^2. Rovnice (13) predikuje objemový tok 710 l/h a dobu zpracování tři hodiny pro optimální provozní podmínky se separátorem SC-6. Tyto výpočty ukazují, že podmínky pro centrifugaci stanovené v počátečním vyhodnocení vyhovují plánovaným požadavkům produkce v měřítku NIMO a NICO.

Další zajímavým bodem je to, zda implementace centrifugace do postupu zpracování vzorku v průmyslovém měřítku je schopna snížit celkové náklady separace kapalina-pevná fáze ve

srovnání s postupem, který je založen na samotné filtraci. Prvním krokem k provedení takové analýzy je určení ceny filtrace zahrnuté v obou scénářích. IDEC Purification Process Sciences provedla výchozí analýzu požadavků na filtraci pro vyčiření IDEC-114. Filtrační sestava byl stanovena tak, jak je ukázána v tabulce 8.

Tabulka 8

Filtrační sestava

Filtr	Průchodnost (l/m^2)	Plocha filtrů při NIMO (m^2)	Plocha filtrů při NICO(m^2)
CUNO 01-10 SP	80	187,5	27,5
CUNO 60-120 SP	400	37,4	5,5
Pall Ultipor 0,2 µm	2000	7,5	1,1
Pall Ultipor 0,1 µm	217	68	10

Optimální provozní podmínky pro centrifugaci vedly k požadavku na filtraci, jak je uveden v tabulce 9.

Tabulka 9

Požadavky na filtraci

Filtr	Průchodnost (l/m^2)	Plocha filtrů při NIMO (m^2)	Plocha filtrů při NICO(m^2)
CUNO 60-120 SP	441	34	5
Pall Ultipor 0,2 µm	2000	7,5	1,1
Pall Ultipor 0,1 µm	160	93,8	13,8

Celková plocha filtrů je podstatně snížena, když se použije navrhovaná filtrační soustava. Pro srovnání nákladů byly použity následující předpoklady: předpokládaná cena hloubkového filtru byla 86 $/m^2$, bez ohledu na použitý stupeň, cena 0,2µm filtru byla odhadnuta na 320 $/m^2$ a 0,1µm filtru byla stanovena na 340 $/m^2$. Při použití těchto odhadů byly celkové náklady vypočteny, jak je ukázáno v tabulce 10.

Tabulka 10

Stanovení ceny filtrace pro koncový 0,1µm filtr

	S centrifugací		Samotná filtrace	
Náklady na filtraci ($)	NIMO	NICO	NIMO	NICO
CUNO 01-10 SP	-	-	16 125	2365
CUNO 60-120 SP (jen filtrace) CUNO 90-120 SP (centrifuga)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0,2 µm	2400	352	2400	352
Pall Ultipor 0,1 µm	31 875	4675	23 181	3400
Filtry celkem	37 200	5457	44 923	6589
Úspora díky centrifugaci	17 %			

Velký podíl nákladů na filtraci připadá na 0,1µm absolutní filtry, u kterých bylo navrženo, aby byly z filtrační sestavy vynechány. Použití tak jemného stupně filtru ani nemusí být nutné k tomu, aby byla chráněna první chromatografická kolona. Ve skutečnosti v průmyslu existuje řada společností, které nepoužívají 0,1µm filtrace během zpracování vzorku. Aby byl ukázán ekonomický přínos takového rozhodnutí, určení nákladů bylo zopakováno pro případ, kdy je posledním stupněm 0,1µm filtrace.

Tabulka 11

Stanovení ceny filtrace pro koncový 0,2µm filtr

	S centrifugací		Samotná filtrace	
Náklady na filtraci ($)	NIMO	NICO	NIMO	NICO
CUNO 01-10 SP	-	-	16 125	2365
CUNO 60-120 SP (jen filtrace) CUNO 90-120 SP (centrifuga)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0,2 µm	2400	352	2400	352
Filtry celkem	5325	782	21742	3189
Úspora díky centrifugaci	76 %			

Vynecháním 0,1µm koncového filtru se podstatně snížily náklady na filtraci a tím se zvýšila komparativní výhodu centrifugace.

Příklad 2

Čiření buněčných kultur NSO pro purifikaci secernovaných protilátek

Pro čiření buněčných kultur NSO byla použita centrifugace ve spojení s hloubkovými filtry. Buňky z buněčné kultury secernují požadovanou protilátku, takže postup čiření může být použit jako výchozí krok purifikace protilátky. Čiření zahrnuje použití centrifugy, po kterém následuje série hloubkových filtrů, pre-filtrů a membránových filtrů, takže

dojde k odstranění nerozpustného materiálu (včetně buněk, buněčných zbytků a dalšího nerozpustného materiálu z buněčných kultur) a kapalina po centrifugaci a filtraci obsahující protilátky je v podstatě čirá. Čirost kapaliny se typicky popisuje jako 0,2µm čirost, což se týká velikosti pórů v posledním filtru z filtrační soustavy.

Proces čiření byl vypracován tak, aby vyhovoval čiření buněčné kultury NSO, která má obsah pevného materiálu přibližně 1 % ([redacted] hmotnost/objem) a životnost v rozmezí 3 % až 100 %. Centrifugace byla prováděna v rozsahu 8000 x g až 15 000 x g (g = gravitační zrychlení) včetně, což poskytlo odstředěnou kapalinu s turbiditou ≥ 25 NTU. Při této úrovni turbidity byla průchodnost hloubkového filtru v rozsahu přibližně 40 l/m^2 až více než 400 l/m^2. Turbidita filtrátu po hloubkové filtraci byla v rozsahu přibližně 1 až 15 NTU, což vedlo dále na prefiltrech a membránových filtrech k výsledné zátěži filtru v rozsahu 10 l/m^2 až 14 000 l/m^2.

Odborníci jsou si dále vědomi, že předkládaný vynález může být realizován i v jiných specifických provedeních, aniž by došlo k odchýlení od myšlenky a základních znaků předloženého vynálezu. V předcházejícím popisu je předkládaný vynález popsán pomocí pouze některých příkladů provedení, a je třeba si uvědomit, že připadají v úvahy i jiné možnosti, které spadají do rozsahu předkládaného vynálezu. Tudíž předkládaný vynález není omezen na ta konkrétní provedení, která byla popsána podrobně v tomto textu. Tedy rozsah a obsah vynálezu je patrný z připojených patentových nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob čiření vzorku buněk v průmyslovém měřítku vyznačující se tím, že zahrnuje kroky:
(a) odstředění vzorku buněk a použití gravitační síly v rozsahu 8000 x g až 15 000 x g, přičemž pevná fáze obsahující buňky a buněčné zbytky se oddělí od kapalné fáze obsahující odstředěnou kapalinu; a
(b) nanesení odstředěné kapaliny na prostředek pro hloubkovou filtraci.

2. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že vzorek buněk obsahuje bakteriální buňky.

3. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že vzorek buněk obsahuje savčí buňky.

4. Způsob podle nároku 3 vyznačující se tím, že savčí buňky jsou CHO buňky .

5. Způsob podle nároku 3 vyznačující se tím, že savčí buňky jsou NSO buňky .

6. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že vzorek buněk obsahuje buněčnou suspenzi, buněčnou kaši nebo buněčnou kulturu.

7. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že vzorek buněk má objem alespoň 2200 l.

8. Způsob podle nároku 1 vyznačující se tím, že vzorek buněk má objem alespoň 15 000 l.

9. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že vzorek buněk dále obsahuje protipěnivé činidlo.

10. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že odstřeďování se provádí při použití gravitační síly v rozsahu 8000 x g až 10 000 x g.

11. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že separační účinnost po kroku odstřeďování je alespoň 95 %.

12. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že odstředěná kapalina je v podstatě bez buněk a zbytků buněk větších než 2 μm.

13. Způsob podle nároku 1 v v y z n a č u j í c í s e t í m, že prostředek pro hloubkovou filtraci obsahuje jeden nebo více filtrů.

14. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že prostředek pro hloubkovou obsahuje hloubkový filtr a dočišťovací filtry.

15. Způsob podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že buďto hloubkový filtr nebo dočišťovací filtry se mohou použít jako koncový filtr v kroku (b).

16. Způsob podle nároku 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncový filtr má velikost pórů 0,1 μm až 0,2 μm.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že koncový filtr má velikost pórů alespoň 0,2 μm.

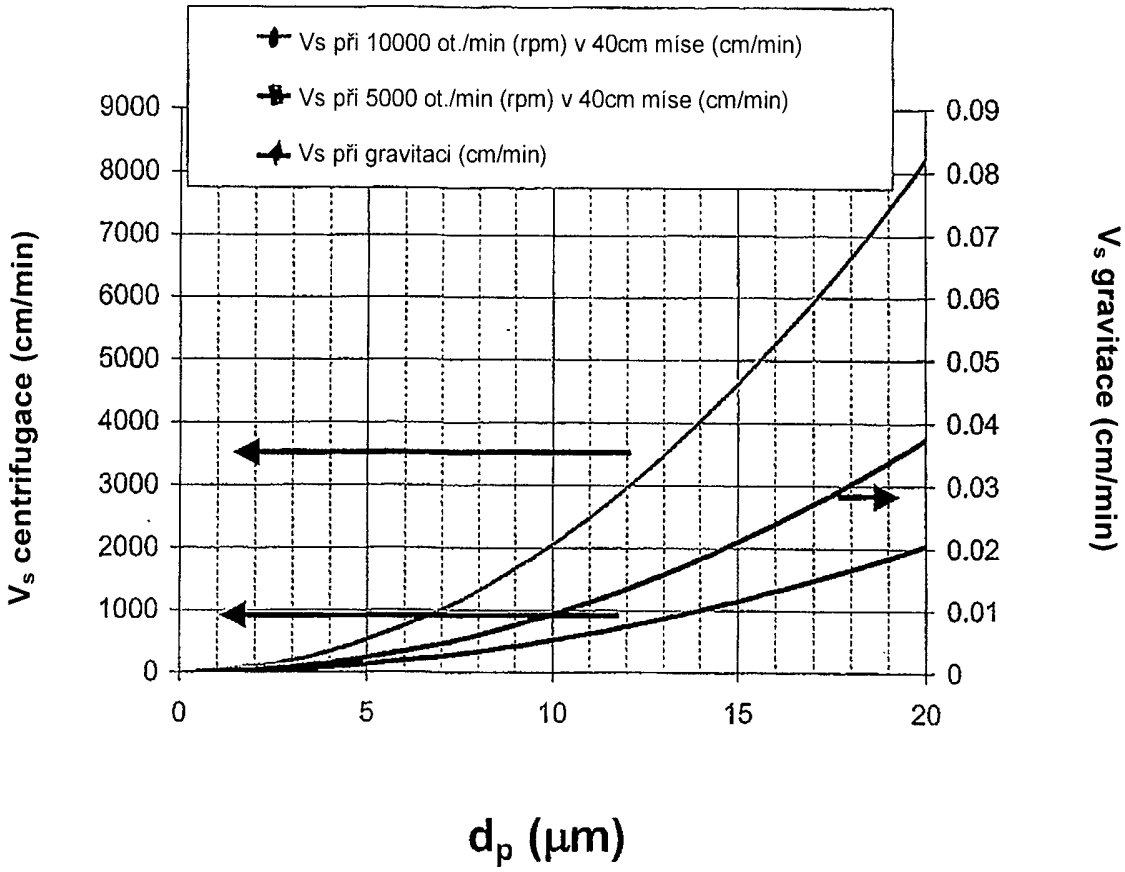
18. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m , že koncový filtr má velikost pórů alespoň 0,1 µm.

19. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje plnění vzorku buněk při hodnotě Q/Σ rovnající se 1 x 10^{-8} m/s.

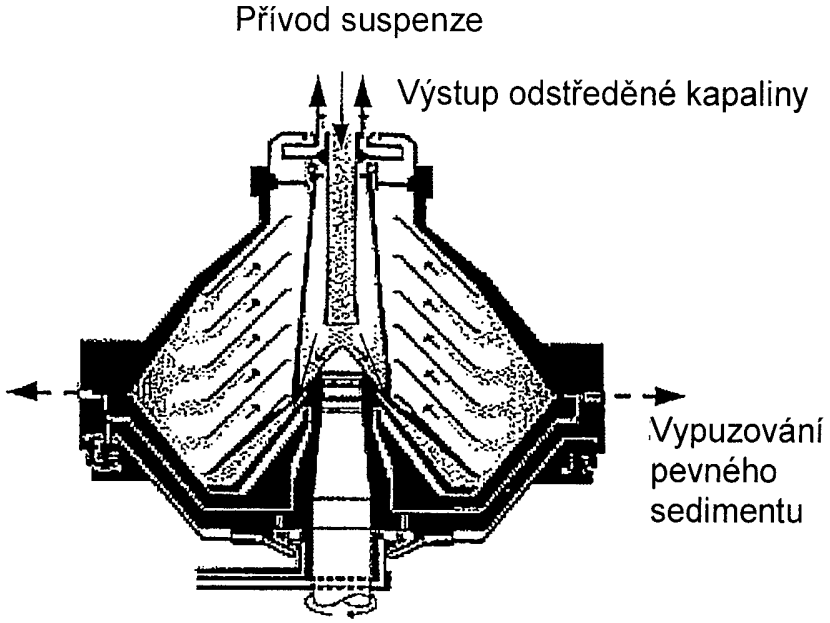
20.Způsob čiření vzorku buněk v průmyslovém měřítku v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kroky:
(a) odstředění vzorku buněk a použití gravitační síly v rozsahu 8000 x g až 15 000 x g pro produkci terapeutických proteinů v průmyslovém měřítku, přičemž se užije vzorec

$$\frac{Q_2}{\Sigma_2} = \frac{Q_1}{\Sigma_1} = 2V_{gd}$$

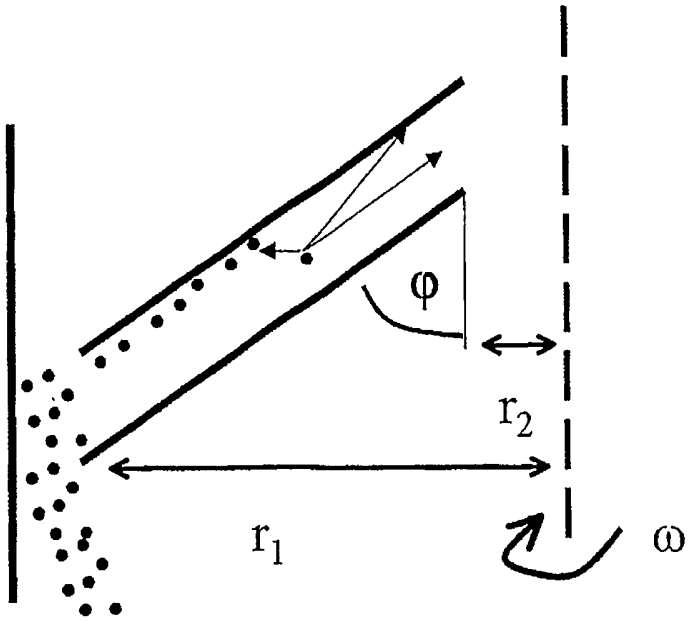
pro záměrné snížení poškození buněk střižnými silami, čímž se oddělí buňky a buněčné zbytky od kapalné fáze obsahující odstředěnou kapalinu; a
(b) nanesení odstředěné kapaliny na prostředek pro hloubkovou filtraci.


Vs při 10000 ot./min (rpm) v 40cm mise (cm/min)
Vs při 5000 ot./min (rpm) v 40cm mise (cm/min)
Vs při gravitaci (cm/min)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
Vs centrifugace (cm/min)
Vs gravitace (cm/min)
dp (μm)

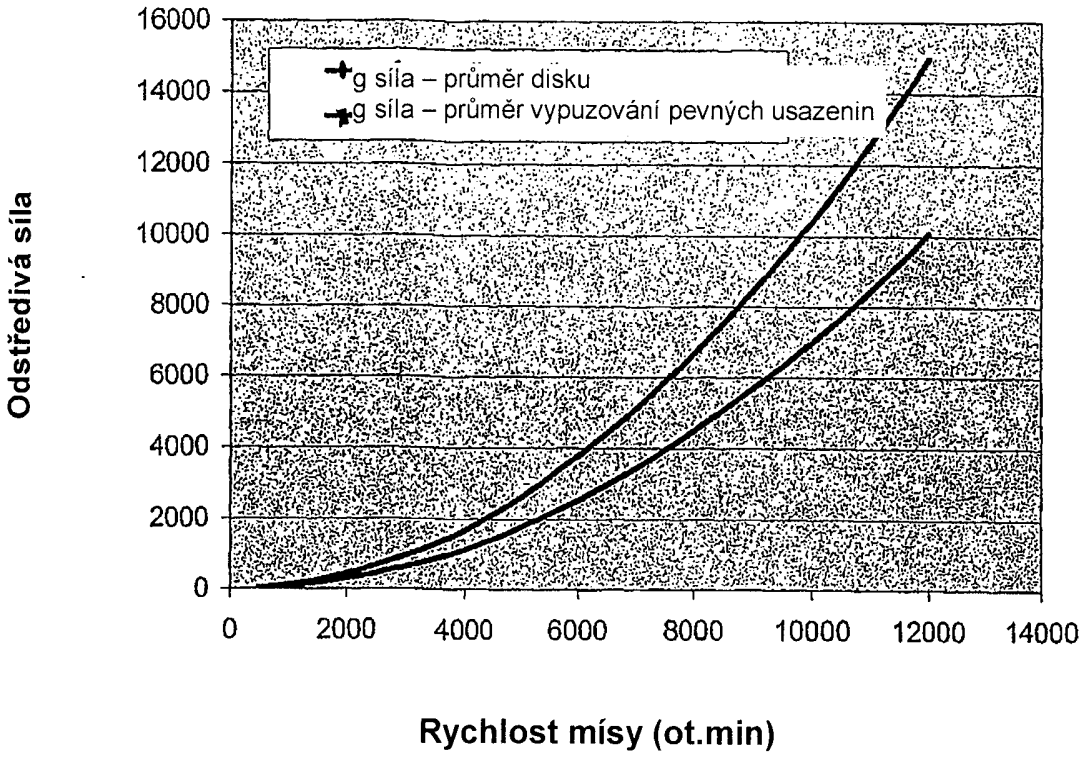
Obr. 1


Přívod suspenze
Výstup odstředěné kapaliny
Vypuzování pevného sedimentu

Obr. 2

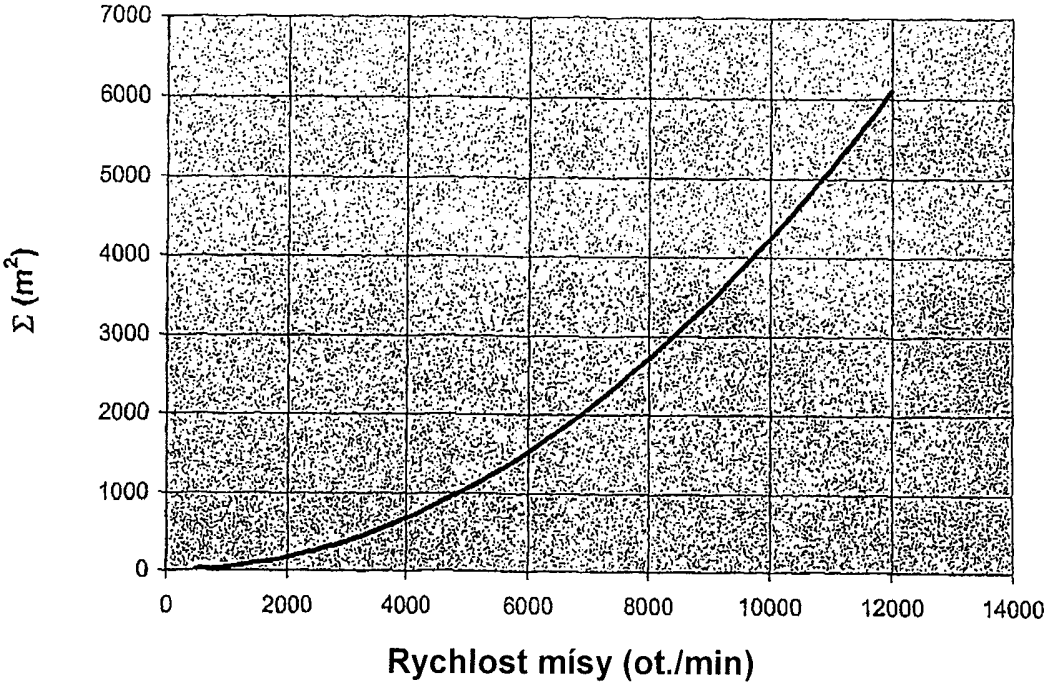


Obr. 3


16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
g síla – průměr disku
g síla – průměr vypuzování pevných usazenin
Odstředivá síla
Rychlost mísy (ot.min)

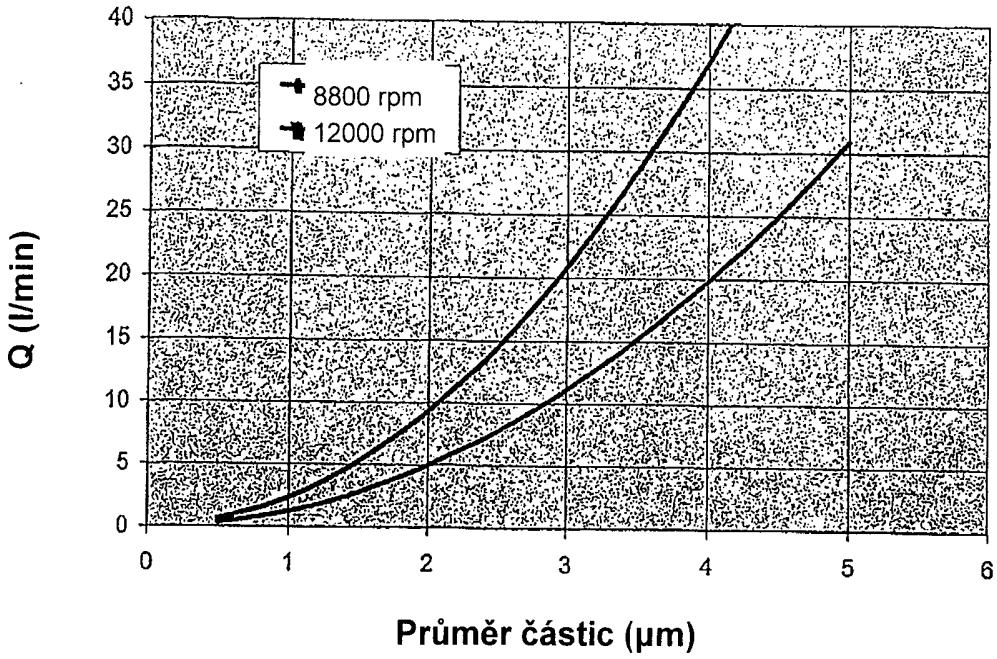
Obr. 4

2006-822

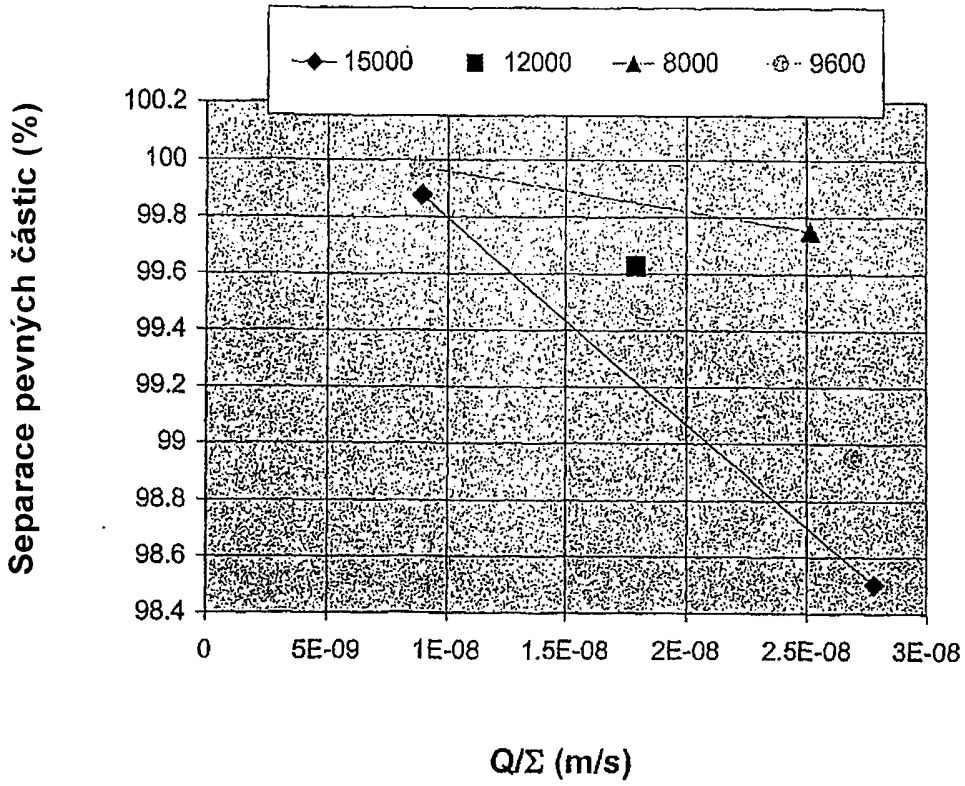


Obr. 5

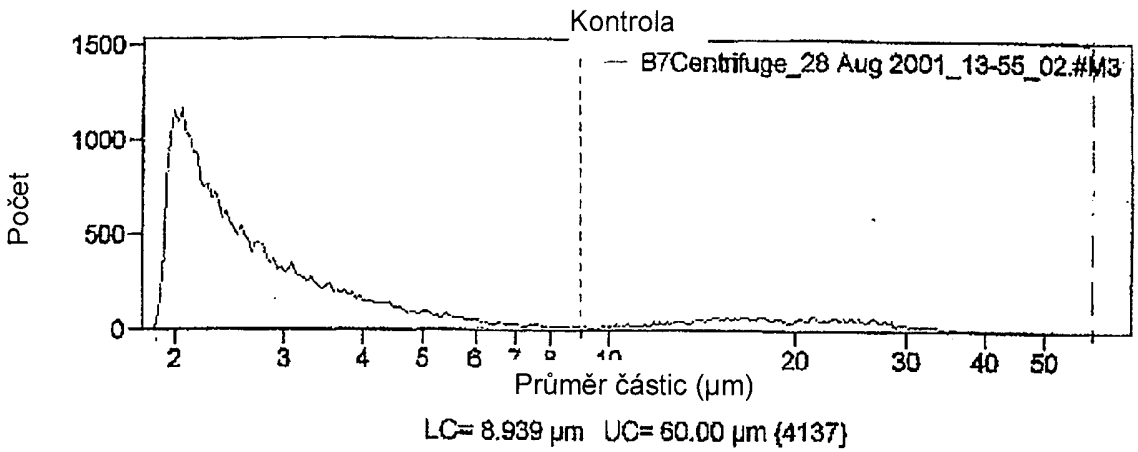
2006-822



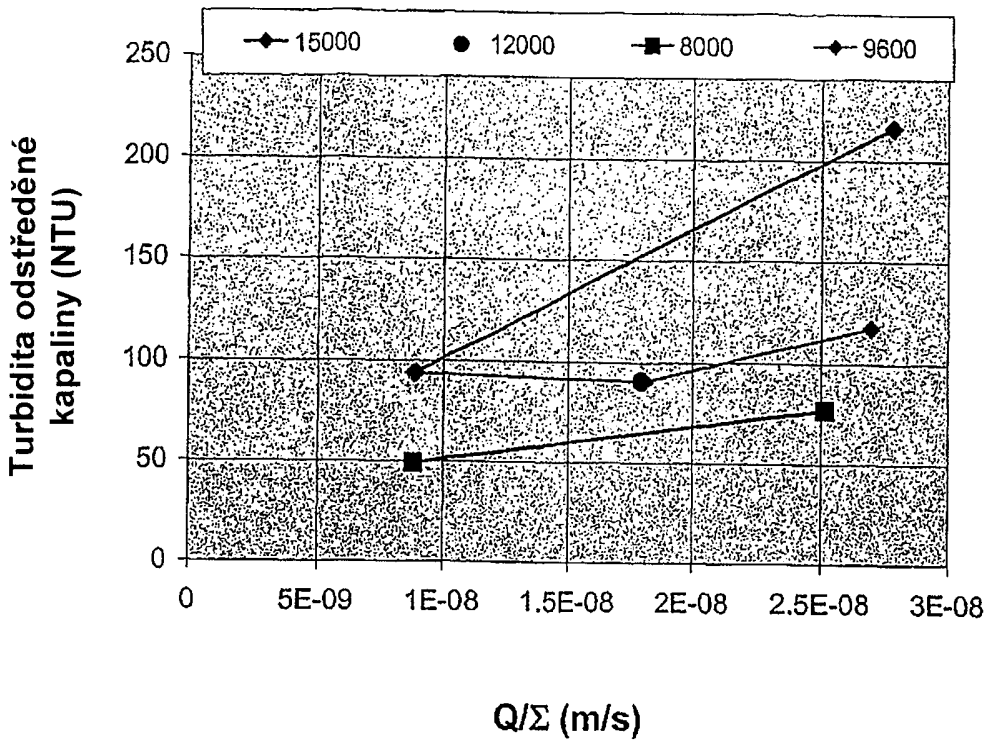
Obr. 6


15000
12000
8000
9600
100.2
100
99.8
99.6
99.4
99.2
99
98.8
98.6
98.4
0
5E-09
1E-08
1.5E-08
2E-08
2.5E-08
3E-08
Separace pevných částic (%)
Q/Σ (m/s)

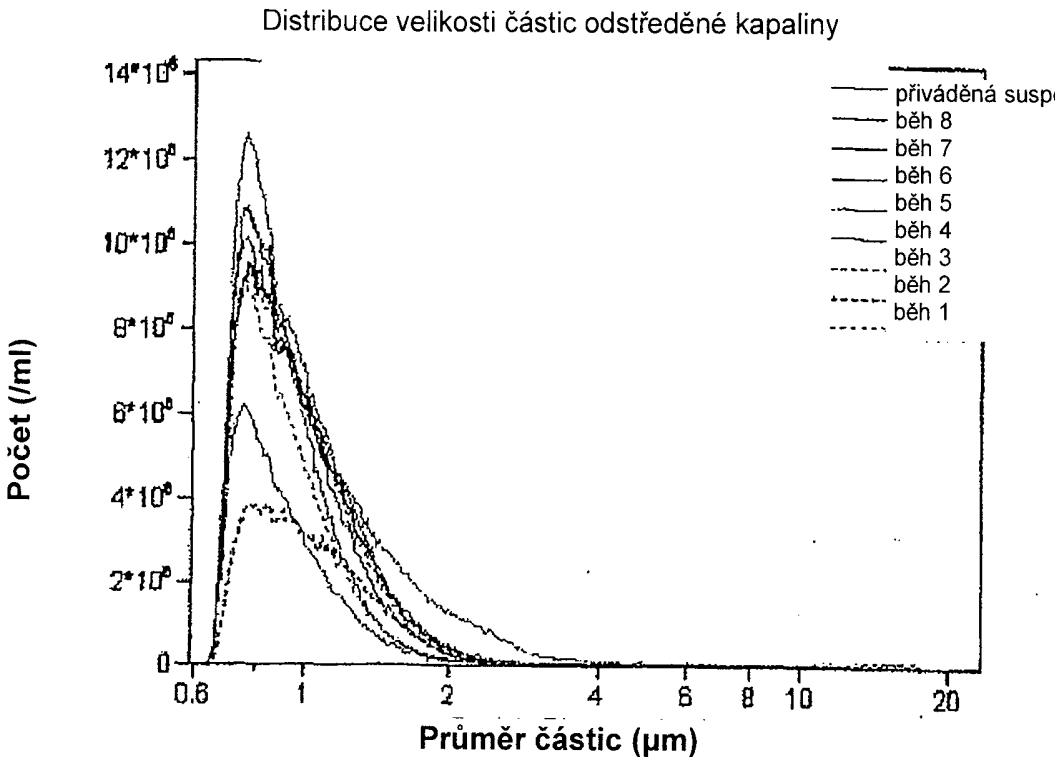
Obr. 7


Kontrola
B7Centrifuge_28 Aug 2001_13-55_02.#M3
1500
1000
500
0
Počet
2
3
4
5
6
20
30
40
50
Průměr částic (µm)
LC= 8.939 µm UC= 60.00 µm (4137)

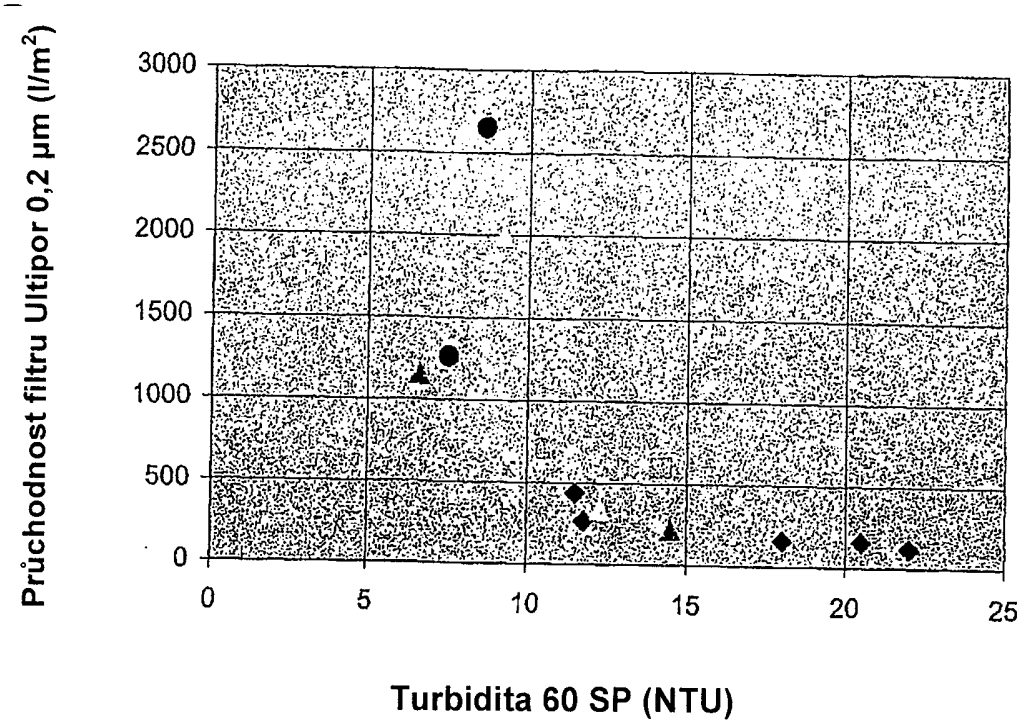
Obr. 8


15000
12000
8000
9600
250
200
150
100
50
0
Turbidita odstředěné kapaliny (NTU)
0
5E-09
1E-08
1.5E-08
2E-08
2.5E-08
3E-08
Q/Σ (m/s)

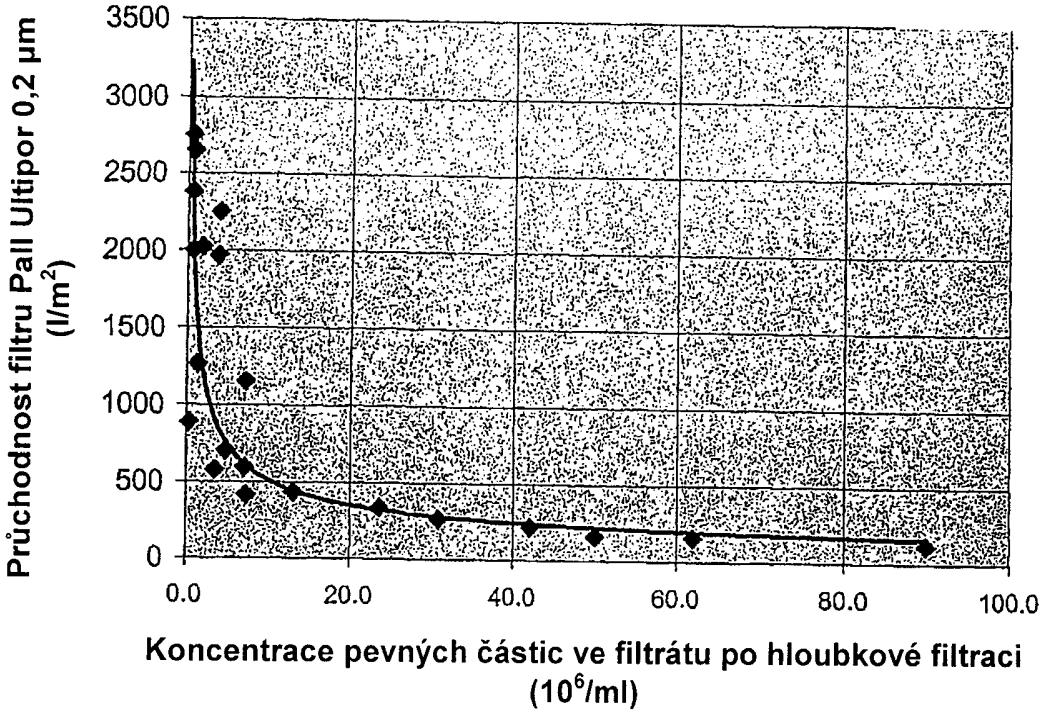
Obr. 9


Distribuce velikosti částic odstředěné kapaliny
14*10⁶
12*10⁶
10*10⁶
8*10⁶
6*10⁶
4*10⁶
2*10⁶
0
Počet (/ml)
0.6
1
2
4
6
8
10
20
Průměr částic (µm)
přiváděná suspenze
běh 8
běh 7
běh 6
běh 5
běh 4
běh 3
běh 2
běh 1

Obr. 10


Průchodnost filtru Ultipor 0,2 µm (l/m²)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
Turbidita 60 SP (NTU)

Obr. 11


Průchodnost filtru Pall Ultipor 0,2 µm (l/m²)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
Koncentrace pevných částic ve filtrátu po hloubkové filtraci (10⁶/ml)

Obr. 12