



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월15일

(11) 등록번호 10-2032138

(24) 등록일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/08 (2006.01) *C12M 1/04* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7025818

(22) 출원일자(국제) 2013년02월20일

심사청구일자 2018년01월10일

(85) 번역문제출일자 2014년09월16일

(65) 공개번호 10-2014-0135204

(43) 공개일자 2014년11월25일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/053390

(87) 국제공개번호 WO 2013/124326

국제공개일자 2013년08월29일

(30) 우선권주장

12001121.8 2012년02월20일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

DE10223536 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이엘 악티엔게젤샤프트

독일 51373 레버쿠젠, 카이저-빌헬름-알리 1

(72) 발명자

카우링 요에르그

독일 베르기슈 글라트바흐 51427 윈거트쉬이데 66

셀레트즈키 주리

미국 캘리포니아주 94710-2428 버클리 드와이트

웨이 800

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 14 항

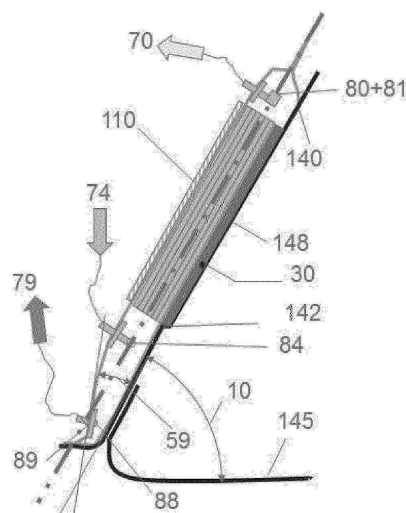
심사관 : 공성철

(54) 발명의 명칭 세포를 보유하고 재순환시키기 위한 일회용 분리기

(57) 요약

본 발명은 바람직하게는 바이오리액터의 외부에서 작동될 수 있는 연속-유동형 또는 단속-유동형 플라스틱 백 또는 병에서 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 분리기에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 바이오리액터 내부에서 또는 외부에서 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 분리기를 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

마그누스 요르겐

독일 뒤셀도르프 40225 크리스토프스트라세 27

파스토르 안드레

독일 솔링겐 42719 타이펜디커 스트라세 44

브로드 헬무트

독일 쾰른 51061 레오폴드-그멜린-스트라세 82

명세서

청구범위

청구항 1

리액터 혼합물로부터 고체를 보유하고 재순환시키기 위한 고체 분리기에 있어서,

유동을 지탱하는 살균가능한 플라스틱 백 또는 플라스틱 병(50)을 포함하되,

플라스틱 백 또는 플라스틱 병(50) 내에서:

- 상측 영역에서, 고체로부터 분리되는 수확 스트림(70)을 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터 인출하기 위한 하나 이상의 통로/내측부(80),
- 중심 영역의 상측부에서, 작동 동안에 수평에 대하여 30° 내지 80° 의 각도(10)로 경사진 분리 면적을 갖는 분리 영역(1, 501),
- 중심 영역의 하측부에서, 리액터 혼합물(74)의 유동 분포를 위한 하나 이상의 통로 또는 내측부(84),
- 하측 영역에서 중력을 이용하여 고체들을 수집하기 위한 하면에서 테이퍼진 고체 수집 영역(57)을 포함하는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

고체 수집 영역(57)은 고체를 인출하기 위한 하나 이상의 통로(89) 또는 내측부(88)를 갖는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

고체 수집 영역(57)은 원뿔형으로 또는 각뿔형으로 하측으로 테이퍼지는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 고체 분리기는,

내부에 적어도 하나의 일회용 센서를 포함하는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

분리 영역은 층상 팩(1)에서 다수의 인접하게 배열된 채널들로 이루어지는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

층상 팩(1)은 층상 팩(1)의 채널들을 형성하는, 상호 간에 적층된 복수 개의 리지플레이트들로 이루어지는 것을

특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

채널들은 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 길이(LK)의 30% 내지 95%의 채널 길이(L)를 갖는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

채널 폭에 대한 리지 높이의 비율(hs/d)은 $0.01 \leq hs/d \leq 5$ 으로 제한되는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

플라스틱 백(50)은 다면체형 또는 원뿔형이고 플라스틱 백(50)은 작동 동안에, 하면에서 테이퍼진 고체 수집 영역(57)이 원뿔 또는 다면체의 코너 또는 정점 및 플라스틱 백의 벽들에 의해 형성되도록 위치되는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

플라스틱 백(50)은 맞붙은 쉼끼, 정각뿔, 팔면체 또는 정육면체인 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

플라스틱 백 또는 플라스틱 병(50)은 직사각형 단면을 갖되,

하측으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)은 커버 또는 스톱퍼로 폐쇄된 목에서 종료되고,

커버 또는 스톱퍼는 모든 통로들(80, 84, 89)을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 고체 분리기는,

플라스틱 백(50)을 수용하기 위한 컨테이너를 포함하되,

컨테이너는: 적어도

- 플라스틱 백(50)을 수용하기 위한 내부를 포함하고,

내부는 외부로부터 범위를 정하고 내부를 에워싸며, 플라스틱 백(50)의 형상에 맞춰지는 벽들에 의해 플라스틱 백(50)의 형상에 맞춰지고, 개구는 상면으로부터 컨테이너 안으로 플라스틱 백(50)을 도입하는 것을 특징으로 하는 고체 분리기.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 고체 분리기에 연결된 바이오리액터를 포함하는 바이오리액터 시스템.

청구항 14

유동을 지탱하는 베셀 안에서, 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 방법으로서,

여기서 상기 베셀에 고체 함유 배지가 연속적으로 또는 단속적으로 공급되고, 고체가 없는 배지는 베셀로부터 제거되고,

상기 베셀은, 하측 영역에서, 중력의 도움으로 고체를 수집하기 위한 하면에서 원뿔형으로 테이퍼지고 경사진, 고체 수집 영역(57)에서 설정된 면들을 갖는, 제1항에 기재된 유동을 지탱하는 살균가능한 플라스틱 백 또는 플라스틱 병인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바람직하게는 바이오리액터(bioreactor) 외부에서 작동될 수 있는, 연속류 또는 단속류 형태 플라스틱 백 안에서 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 일회용 분리기에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 바이오리액터 내부 또는 외부에서 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 방법에 관한 것이다. 게다가, 본 발명은 본 발명에 따른 분리기를 생산하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동물 및 식물 세포 배양은 생물학적 활성 물질 및 약학적 활성 생성물의 생성에서 상당히 중요하다. 특히, 미생물에 대하여, 세포들이 양분과의 불충분한 공급 및 기계적 전단 응력에 대하여 꽤 민감하기 때문에, 흔히 현탁액없이 양분 배지에서 수행되는, 세포 배양이 요구된다.

[0003] 보통, 동물 및 식물 세포계는 회분식으로 배양된다. 이는 세포의 최적 공급이 일정하게 변하는 기질, 생성물 및 바이오매스(biomass)의 농도 때문에 간신히 달성될 수 있다는 단점을 갖는다. 또한, 발효의 마지막에는, 보통 추후의 검사에서 상당한 소비로 제거되어야만 하는, 부산물, 예를 들어, 죽은 세포의 성분들이 축적된다. 하지만 언급된 원인에 대하여, 특히 예를 들어, 단백질 분해 공격에 의해, 손상될 수 있는 불안정한 생성물의 생성의 경우에, 연속 작동되는 바이오리액터가 이에 따라 사용된다.

[0004] 연속 바이오리액터를 이용하여, 만약 다음의 필요조건들이 충족된다면 높은 세포밀도 및 관련된 높은 생산성이 달성될 수 있다:

[0005] · 기질, 특히 용존 산소를 갖는 세포들의 충분하고 저전단 공급

[0006] · 호흡으로 형성된 이산화탄소의 충분한 처분

[0007] · 높은 세포 농도를 구성하기 위한 효율적이고, 저전단이며, 폐색되지 않는 세포 보유 시스템

[0008] · 바이오리액터 및 보유 시스템의 장기 안정성(살균, 유체역학)

[0009] 연속적인 절차 이외에, 효율적인 세포 보유 시스템을 갖는 바이오리액터는 또한 예를 들어, 특히 높은 세포밀도를 갖는 종균 배양물을 배양하는 데에 사용될 수 있다. 이어서 세포 보유 시스템은 가상적으로 바이오매스 없이 세포 배양 상청액을 인출하기 위하여, 반복-회분식 모드로 불연속적인 방식으로 사용된다. 이후에, 종균 배양물 리액터는 이런 방식으로 배양물을 단순 회분식 모드에서보다 높은 세포 밀도로 이르게 하기 위하여 신선한 양분 배지로 다시 충전될 수 있다.

[0010] 높은 세포 밀도(> 밀리리터에 대한 20 백만 생세포들)가 연속 작동되는 바이오리액터에서 달성될 수 있기 위하여, 세포의 효율적인 보유가 필요하다. 요구된 보유의 정도는 이런 경우에 세포들의 성장 속도 및 관류 속도

(q/V)(바이오리액터 체적(V)에 대한 배지 처리량(q))에 따른다.

- [0011] 과거에는, 상이한 세포 보유 시스템들이 보통 바이오리액터 외부에 배열되는 연속 작동되는 바이오리액터를 위하여 제안되어 왔다. 이에 대한 원인은 유지보수 및 세정 목적을 위한 세포 보유 시스템의 손쉬운 접근가능성이다.
- [0012] 가능한 한 낮은 세포 손상을 유지하기 위하여, 특히 바이오리액터 외부에서 불충분한 산소 공급 및 이산화탄소 제거, 및 또한 효소 공격 때문에 활성 성분의 경감 때문에, 작은 작동 체적 및 관련된 세포의 짧은 잔류 시간을 갖는 세포 보유 시스템이 바람직하다.
- [0013] 멤브레인 필터 이외에, 종래 기술의 특별한 원심력 및 중력 분리기에서, 정지 및 이동 멤브레인으로의 직교류 여과의 원리에 따라 작동하는 장치들이 사용된다.
- [0014] 멤브레인 필터를 이용한 세포 보유의 경우에, 신뢰할만한 유지보수 없이 장기 작동을 방지할 수 있는, 침전 또는 소일링(soiling)이 관찰된다. 만약 멤브레인 표면을 가로지르는 유동이 현저하게 빠르다면 침전은 감소될 수 있다. 이는 정상 상태 또는 진동 작동으로 달성될 수 있다. 멤브레인 시스템을 가로지르는 진동류의 일 실시예는 리파인 테크놀로지스 인크.(Refine Technologies Inc.)로부터의 교호 점선 흐름(ATF) 시스템이다. 하지만, 멤브레인 표면을 가로지르는 신속한 유동은 저전단 세포 배양의 기본 조건에 반한다.
- [0015] 원심력장에서 세포들로부터 분리하기 위한 저전단 원심력은 유지보수 소비 없이 수주 동안에만 작동하고 원심 요소의 교체를 요구한다. 이에 의해 오염의 위험이 증가된다.
- [0016] 세포 배양에서 대부분 사용되는 중력 분리기는 정작 탱크 및 경사 채널 분리기이다. 단순 정작 탱크와 비교하여, 대규모에 대한 경사 채널 분리기는 분리 면적에 대하여 현저하게 더 작은 체적의 장점을 갖는다. 공개문헌(헨즐러, H.-J., 케미-테크닉, 1, 1992, 3)은 역류, 직교류 및 병류에서 작동될 수 있는 경사 채널 분리기에서 세포 보유를 서술한다. 유동을 지탱하는(flow-bearing) 채널 단면은 플레이트 또는 튜브를 구비할 수 있다. 특허 문헌 US 5,817,505 및 EP 0 699 101 B1은 역류 분리기에서 세포들을 보유하기 위한 경사 채널 분리기의 사용을 청구한다. 그 중에서, W02003020919 A2에는, 역류 및 직교류 분리기는 세포들의 보유, 및 또한 다양한 예비 분리기(예를 들어, 하이드로사이클론)와의 조합을 위하여 서술된다.
- [0017] 경사 채널 분리기는 외부 회로를 통해 바이오리액터에 부착된다. 이런 목적을 위하여, 플렉시블한 튜브들 및 펌프들이 요구된다.
- [0018] 중력 분리기에서 세포들의 응집 및 대사활성을 감소시키기 위하여, 중력 분리기에 대한 경로 상에서 세포 배양 브로스(broth)를 냉각시키는 것이 제안된다. 낮은 온도에서 감소된 대사활성은 바이오리액터 외부에서 세포들의 상대적으로 긴 잔류의 경우에 특히 바람직하다.
- [0019] W02009152990(A2)는 다수의 인접하게 배열된 채널들을 포함하는, 유동을 지탱하는 베셀에서 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 세포 보유 시스템을 서술하되, 채널들은 수직으로 세워진 중공 실린더를 형성하고 중공 실린더의 길이방향 축에 대하여 10° 와 60° 사이의 각도(β)로 경사진다. 유동을 지탱하는 베셀은 바이오리액터에 연결되는 세포 보유 및 재순환을 위한 베셀 또는 바이오리액터일 수 있다. 채널들은 하측 종단에서 개방된다. 상측 종단에서, 채널들은 수확 스트림(harvest stream)이 베셀로부터 통과하여 운반될 수 있는 적어도 하나의 도관을 갖는 공유된 환형 공간 안으로 유도된다. 채널들에서, 세포들 및 세포 배양액이 분리된다. 바이오리액터로부터 수확 스트림의 연속 제거 때문에, 세포 배양액 및 세포들은 흡입에 의해 채널들 안으로 뽑힌다. 따라서, 고전적인 경사 채널 분리기에서와 같이, 채널들로부터 다시 유입되는 수확 스트림에 대한 역류로, 경사로 배열되고 슬라이딩하는 채널들 내에서 세포 침전물은 베셀 안에 남게 된다. 세포들로부터 분리된 세포 배양액은 결국 베셀로부터 채널들을 통해 채널들 위의 환형 공간 안으로 운반된다.
- [0020] 상당히 조정된 약학적 조제의 경우에, 시간, 장치 및 인원에 대하여 상당한 소비는 예를 들어, 세포 보유 시스템과 같은, 정제되고 살균된 바이오리액터 및 바이오 리액터 요소들의 제공으로 할당된다. 세정 외에는, 2개의 생성물 배치(batch)들 사이 또는 다목적 식물에서 생성물 변화 동안에 신뢰할만한 교차 오염을 회피하기 위하여, 공정 적응의 경우에 반복될 필요가 있을 수 있는, 꽤 복잡한 세정 확인이 요구된다. 스테인리스 스틸로 제조된 종래의 회분식, 이송-회분식 또는 관류 발효조의 세정 및 살균을 위하여, 일반적으로 제자리 세정(cleaning-in-place)(CIP) 기술이 영구적 파이프 시스템으로 명명된 것으로 제자리 스팀(steam-in-place)(SIP) 기술과 조합하여 사용된다. 연속 공정 절차에서 충분한 장기 살균을 확보하기 위하여, 하지만, 비교적 작은 리액터 규모에서서만 적용가능하고 오토클레이브(autoclave)에 대한 리액터 또는 리액터 요소들의 힘든 운반을 요구하는, 오토클레이빙 기술이 또한 사용된다. 부정확한 살균 또는 식물 운반, 기동 또는 오토클레이빙 및 조정

된 샘플링 이후에 연결 도관들의 부착의 경우에, 노화 마모부들, 예를 들어, 밀봉된 교반기 샤프트들이 사용될 때 오염의 위험이 특히 임계적이다.

[0021] 회분식 모드 또는 이송 회분식 모드에 사용된 CIP/SIP 시스템들의 경우에, 사용의 단주기의 관점에서, 특히 빈번한 생성 변화의 경우에, 제품 절차로 인한 리액터의 사용의 손실이 리액터 이용가능성의 크기로 존재할 수 있다.

[0022] 최대 청결 및 살균의 유지로, 생성 시스템의 신속하고 플렉시블한 신규 충전을 위한 필요조건을 수용하기 위하여, 일회용 리액터를 위한 설계가 일정하게 증가하는 시장에 대한 관심을 향유한다.

발명의 내용

[0023] 따라서, 종래 기술로부터 기인하여, 목적은 양분과 함께 세포들의 충분한 공급 및 기계적 전단 능력에 대한 세포들의 민감도를 고려하고, 이의 사용이 에러의 위험 및 복잡성을 감소시키는, 약학 산업의 유지보수, 세정 및 살균을 충족시키는, 꽤 큰 규모까지 확장가능하며, 재료의 최소 사용으로, 일회용 시스템으로서, 경제적 및 환경적으로 최적 이용(생산 및 처분)을 허용하는, 연속 또는 단속 방법으로 동물, 특히 인간 및 식물 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 효율적인 방법을 제공하는 것이다.

[0024] 상기에 언급된 목적은, 예를 들어, 감마 조사가가능하거나, 오토클레이빙가능하거나, 또는 화학적으로 살균가능한, 종래 기술에 의한 살균가능한 유동을 지탱하는 플라스틱 백(bag), 또는 다음의 내측부를 갖는 상응하게 처리가능한 플라스틱 병(bottle)을 포함하는, 바이오리액터(bioreactor) 혼합물로부터 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 일회용 세포 분리기에 의해 달성되었다:

[0025] - 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 상측 영역에서, 수확 스트림이 세포들로부터 분리되는, 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터 수확 스트림(70)(=수확물)을 인출하기 위한 하나 이상의 통로 또는 내측부(80),

[0026] - 플라스틱 백의 중심 영역의 상측부에서, 층상 팩이, 작동 동안에, 0° 내지 80° 의 각도($10 = \beta$)로 수평에 대하여 경사진, 분리 면적을 포함하는 층상 팩(1) 또는 분리 면적(500)을 포함하는 분리 영역,

[0027] - 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 중심 영역의 하측부에서, 도입 표면(510)을 가로지르는 세포 배양액(=피드(feed))(74)의 균일한 수평 유동 분포를 위하여, 수평 분배기(85)를 임의로 갖는, 하나 이상의 통로 또는 내측부(84),

[0028] - 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 하측 영역에서, 중력의 도움으로 세포들을 수집하기 위한 하면에서 원뿔형으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57). 보통, 고체 수집 영역(57)은 세포를 인출하기 위한 하나 이상의 통로(89) 또는 내측부(88)를 갖는다.

[0029] 따라서 본 발명은 플라스틱 백 또는 플라스틱 병 내에서, 유동을 지탱하는 살균 플라스틱 백 또는 플라스틱 병을 포함하는, 리액터 혼합물로부터 고체들을 보유하기 위한 고체 분리기에 관한 것이다:

[0030] - 상측 영역에서, 고체로부터 분리되는 수확 스트림(70)을 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터 인출하기 위한 하나 이상의 통로/내측부(80),

[0031] - 중심 영역의 상측부에서, 작동 동안에 수평에 대하여 0° 내지 80° 의 각도($10 = \beta$)로 경사진 분리 면적을 갖는 분리 영역(1, 501),

[0032] - 중심 영역의 하측부에서, 리액터 혼합물(74)의 균일한 수평 유동 분포를 위하여, 수평 분배기(85)를 임의로 갖는, 하나 이상의 통로 또는 내측부(84),

[0033] - 하측 영역에서, 중력을 이용하여 고체들을 수집하기 위한 하측으로 보통 원뿔형으로 또는 각뿔형으로, 테이퍼진 고체 수집 영역(57).

[0034] 보통, 고체 수집 영역(57)은 고체를 인출하기 위한 하나 이상의 통로(89) 또는 내측부(88)를 갖는다. 이에 의해 고체들은 요구된 바와 같이 리액터 안으로 재순환될 수 있다.

[0035] 바람직하게는, 하측으로 테이퍼진 고체 수집 영역은 수직에 대하여 10° 내지 60° 의 각도(58, 59)를 갖되, 각도(58, 59)는 개별적으로 선택가능하다.

[0036] 수확 스트림 수집 영역(56)의 형상은 원하는 바와 같이, 특히 평평하거나, 또는 상측으로 테이퍼질 수 있다.

[0037] 보통, 플라스틱 백 또는 플라스틱 병은 작동 동안에 장치 안으로 시선을 허용하는 단일층 또는 다중층 투명 폴

리머 재료로 구성된다.

- [0038] 플라스틱 백의 폴리머 재료는, $s < 1 \text{ mm}$ 의 보통 낮은 필름 두께에서, 상대적으로 작은 질량 분율을 갖는 장치를 허용한다. 이는 제공하고 처리하는 데에 비싸지 않고, 일회용 시스템의 구성에 꽤 상당히 적합하다. 따라서, 특히, 일회용 분리기의 사용의 경우에, 비싼 주입을 위한 물로의 세정(WFI) 및 시간 소모가 큰 세정 확인이 생략되기에, 사용된 분리기의 처분 및 새로운 일회용 분리기의 사용은 세정 사용된 분리 장치보다 경제적이다. 본 발명에 따른 분리는 바람직하게는 상응하는 살균 결합가능한 연결 요소 및 필터 요소를 갖는 플렉시블한 튜브를 통해 바이오리액터 시스템에 대한 연결에 적합하게 조립되고, 살균 패킹된다.
- [0039] 플라스틱 백에 대한 재료로서, 특히 거기서 인용된 운반 백에 대한 2번째 및 3번째 열에서 미국 특허 6,186,932 B1(사케츠)에 사용되는 재료 및 재료 조합이 적합하다. 또한, 거기서 나열된 벽 두께는 본 발명에 따른 분리 장치에 적용될 수 있다.
- [0040] 바람직한 구체예에서, 펼침 거동, 팽창 거동, 기체 확산, 안정성, 공정 호환성(세포 및 생성물의 최소 흡수) 및 용접성에 대하여 플라스틱 백의 특성을 향상시키기 위하여, 플라스틱 백의 벽들은 2개 이상의 층들(라미네이트 또는 공동-압출물)로 제조된 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 필름 복합 재료로 이루어진다.
- [0041] 폴리머 필름으로 제조된 플라스틱 백을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리는 예를 들어, 미국특허 6,186,932 B1에서 서술된 방법에 의해, 생성될 수 있되, 용접선은 맞춰질 필요가 있다. 본 발명에 따른 분리 장치의 바람직한 구체예들을 생산하기 위한 예시적인 구체예는 하기에 더 서술된다.
- [0042] 이에 의해 살균이고 강도 관련된 결합 없는 용접을 허용하기 위하여, 통로는 보통 생성물 접촉 필름을 또한 구성하는 동일한 재료로 생성된다. 바람직한 생성물 접촉 필름 재료는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 다양한 정도의 가교결합의 폴리에틸렌이다. 외부 셸 필름으로서, 적용 및 처리 필요조건에 따라, 향상된 강도 및/또는 확산 특성 및/또는 열 용접 방법의 사용을 위한 내부 필름과 비교하여 증가된 용융점을 갖는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 다양한 재료가 사용된다.
- [0043] 보통, 내측부들(80, 88, 84)은 바이오리액터 또는 다른 외부 시스템에 연결을 위한 도관, 바람직하게는 플렉시블한 튜브가 연결될 수 있는, 내부에 용접된(welded-in) 통로이다. 대안적으로, 연결 라인의 통과를 위한, 통로는 하나 이상의 연결 플레이트(들), 커버 또는 스톱퍼 안으로 도입될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 분리기의 특정한 구체예에서, 상측 영역에서, 코너(정육면체)에 또는 플라스틱 백의 벽(사면체) 상에는, 연결 라인을 통과하기 위한 통로를 포함하는, 또한 커버될 수 있는 하나 이상, 바람직하게는 하나의 연결 플레이트(90)가 위치되고, 연결의 영역에 분리기의 지지가 가능하게 이루어진다. 이는 보통 조립 동안에 분리기의 하우징에 연결된다.
- [0045] 대안적으로, 테이퍼진 고체 수집 영역(57)의 마지막에는, 목에서, 커버 또는 스톱퍼(220)가 도입될 수 있다. 커버 또는 스톱퍼는 본 구체예에서 연결 라인을 통과하기 위한 통로를 포함한다.
- [0046] 고체는 분리기의 하측 정점의 부근에서 하나 이상의 통로 또는 내측부(88)를 통해 고체 수집 영역(57)으로부터 테이크오프된다(taken off). 내측부(88)는 보통 수집된 세포들이 압력 구배 또는 펌프를 통해 안으로 재순환되는 바이오리액터에 연결된다. 바람직하게는, 내측부(88)는 흡입에 의한 고체의 중심 수직 제거에 사용된다. 이는 작동을 위한 이의 컨테이너 안에 분리기의 생성 및 배치를 단순화한다. 또한, 테이크오프(takeoff)는 커버 또는 스톱퍼 안에 도입된 통로 또는 분리기의 정점과 용접된 통로를 통해 처리될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 이하에서, 본 발명의 예시적인 구체예들이 본 발명을 제한하지 않고 도면들을 참조하여 상세하게 서술된다.
- 도 1은 층상 팩을 갖는 본 발명에 따른 일회용 고체 분리기의 개략도이다.
- 도 2는 층상 팩(1)의 개략도이다(종단면).
- 도 3은 층상 팩(1)의 개략도이다(종단면).
- 도 4는 다양한 층상 팩들의 구조의 도면이다(도 3의 단면 AA').
- 도 5는 층상 팩(1)에 대한 플라스틱 백(50)의 적용의 도면이다(도 3의 단면 AA').
- 도 6과 도 7은 층상 팩(1)에 대한 플라스틱 백(50)의 신장 및 조임이다(단면).

도 8과 도 9는 프레임(130) 및 커버(110)의 도움으로 층상 팩(1)에 대한 플라스틱 백(50)의 대안적인 신장 및 조임이다(단면).

도 10은 스탠드(140) 상에 층상 팩(1)을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리기의 측면도이다.

도 11은 스탠드(140) 상에 층상 팩(1)을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리기의 정면도이다.

도 12는 프레임(130) 및 커버(110)를 갖는 스탠드(140) 상에 층상 팩(1)을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리기의 종단면도이다.

도 13은 프레임(130) 및 커버(110)를 갖는 스탠드(140) 상에 층상 팩(1)을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리기의 정면도이다.

도 14는 맞붙인 쉼기꼴 구체예에서 본 발명에 따른 고체 분리기의 개략 사시도이다.

도 15는 유동 인버터(81)를 갖는 맞붙인 쉼기꼴 구체예에서 본 발명에 따른 고체 분리기의 개략 종단면도이다.

도 16과 도 17은 정육면체 구체예에서 본 발명에 따른 고체 분리기의 개략도이다.

도 18은 관류 리액터의 공정도이다. 바이오리액터 순서로 셀들의 호흡 활동을 감소시키기 위하여, 온도가 테이크오프 이후에 가능한 한 빨리 냉각 장치로 더 낮은 수준으로 감소된다. 이런 방식으로, 세포 분리기에서 세포들은 생리학적으로 세포들을 손상시킬 수 있는, 산소-제한 상태에서 너무 긴 잔류를 갖는 것이 방지된다. 도시된 실시예에서, 분리기(640)는 분리 백(620) 및 일체형 냉각 장치(600)로 이루어진다. 바이오리액터(610)와 분리기(640) 사이의 액체 스트림은 저전단 펌프들(630, 631)을 통해 수립된다. 다른 전기 회로망, 예를 들어, 바이오리액터 순서로 2개의 펌프들(630, 631) 중 하나의 포지셔닝은 비슷하게 가능하다.

도 19는 분리 시스템의 비교예이다.

도 20은 단위 분리 면적에 대한 분리기 체적의 비교이다.

도 21은 분리 면적(1), 수평 유동 분배기(85) 및 스톱퍼(220)로서 트레이(tray)들을 갖는 병 분리기의 종단면도이다.

도 22는 스탠드 상에서 도 21에 따른 병 분리기의 측면도이다.

도 23은 하측 배향 주입구 유동을 갖는 유동 분배기(85) 및 칼라(230)를 갖는 스톱퍼(220)의 상세도이다.

도 24는 스탠드 상의 측면도 및 고체 분리기로서 매달린 플라스틱 백(=백 세틀러)의 정면도이다.

도 25는 변하는 유효 상승 속도($v=q/A_{eff}$) 하에서 보유 성능(R)에 대한 다양한 유도 분배기(85)들의 효과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 제 1 구체예에서, 분리 영역은 바람직하게는 층상 팩(1)의 채널들을 형성하는 상호 간에 적층된 복수 개의 리지플레이트(ridgeplate)들로부터 생성된, 층상 팩(1)에서 다수의 인접하게 배열된 채널들로 이루어진다. 바람직하게는, 플라스틱 플레이트들이 사용된다. 채널들은 하면 종단 및 상측 종단에서 개방된다. 하면 종단에서, 채널들은 공유된 하측으로, 특히 원뿔형으로 또는 각뿔형으로, 테이퍼진 고체 수집 영역(57)을 통해 도입 표면으로 유도된다. 상측 종단에서, 채널들은 수확 스트림(harvest stream)이 통과하여 베셀(vessel)로부터 운반될 수 있는 적어도 하나의 통로(80)를 갖는 공유된 수확 스트림 수집 영역(56)으로 유도된다.

[0049] 채널들에서, 세포들 및 세포 배양액이 분리된다. 바이오리액터로부터 수확 스트림의 연속 제거를 통해, 세포 배양액 및 세포들은 흡입에 의해 채널들 안으로 빨린다. 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 중심 영역의 하부에서, 하나 이상의 통로 또는 내측부(84)는 리액터 혼합물(74)의 균일한 수평 유동 분포를 위하여 도입된다. 세포 배양액(=피드(feed))(74)의 균일한 수평 유동 분포는 도입 표면(510)을 통해 모색된다. 보통, 층상 팩의 폭에 따라, 직선 포트들을 갖는 1개 내지 4개의 통로들은 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 벽에서의 동일한 높이로 도입된다. 이러한 통로들 사이의 높이 및 거리에 따라, 수평 분배기(85)는 내측부로서 바람직할 수 있다.

[0050] 경사로 배열된 채널들 내의 세포 퇴적물은 고전적인 경사진 채널 분리기에서와 같이, 채널들로부터 다시 유입되는 수확 스트림에 대한 역류로, 슬라이딩하고, 원뿔형으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)에 수집된다. 보통, 고체 수집 영역(57)은 바이오리액터 안으로 재순환 및 흡입에 의해 수집된 세포들을 제거하기 위한 바이오리액터

에 연결된, 하나 이상의 통로/내측부(88, 89)를 갖는다.

[0051] 층상 팩(1)의 채널들은 직사각형, 타원형, 원형 또는 반원형 단면을 가질 수 있다(도 4).

[0052] 채널들의 치수(개수, 직경, 길이)는 각각의 경우에 보유될 세포들의 형태, 바이오리액터의 크기 및 처리량에 따른다.

[0053] 채널 폭(d)은 채널들의 폐색을 방지하기 위하여, 바람직하게는 $d \geq 1\text{mm}$ 이다. 바람직한 구체예에서, 일차적으로 안전하게 폐색 상태를 방지하나, 부차적으로 공간시간 수율을 감소시키는 바이오리액터 공간 및 분리기의 체적비를 가능한 한 낮게 유지하기 위하여, 3mm 내지 100mm, 바람직하게는 4mm 내지 20mm, 특히 바람직하게는 5mm 내지 7mm의 채널 폭을 갖는 채널들이 사용된다.

[0054] 요구된 분리 면적(A_{erf})은 Eq. 1에 따른 침전 속도(ws), 관류량(perfusion rate)(q/V)(단위 바이오리액터 체적(V)에 대한 배지 처리량(q)) 및 바이오리액터 체적으로부터 기인한다. 효율 계수(η)는 수직 분리기와 비교하여 경사 채널 분리기의 성능에 있어 상이함 또는 성능에 있어 감소를 고려한다(Eq. 2).

[0055] 직사각형 및 실린더형 단면에 대한 이론적인 분리 면적(A_{th})은 문헌(H.-J. 바인더, 경사 층류 원형 및 사각형 튜브에서의 단일 및 멀티 그레이인 현탁액으로부터 침전, 논문 베를린, 1980)에서 공개된 접근법에 따라, Eq. 3과 Eq. 4로부터의 근사치로 결정될 수 있다:

$$A_{\text{erf}} = \frac{\text{Perfusion rate} \cdot V}{ws} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$A_{\text{th}} = \frac{A_{\text{erf}}}{\eta} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{직사각형: } A_{\text{th}} \approx Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{실린더: } A_{\text{th}} \approx \frac{3 \cdot \pi}{16} \cdot Z \cdot \sin(\beta) \cdot d \cdot L \quad (\text{Eq. 4})$$

[0056]

여기서, Z는 채널들의 개수이고, β 는 채널들이 중력의 방향에 대하여 경사진 만큼의 각도이며, d는 내경이고, L은 채널들의 길이이다. π 는 파이($\pi=3.14159\dots$)이다.

[0058] 채널 길이가 치수화될 때, 층류 조건들(레이놀즈수 $Re < 2300$)을 유지하는 것이 고려되어야만 한다. 채널 길이(L)는 이용가능한 백 내부 치수의 길이(=백의 길이(LK))에 따라 배향된다. 실시될 백 길이(LK)는 플라스틱 백에서 달성될 정수압에 대하여 플라스틱 백에서 달성될 충전 레벨에 따라 배향된다. 초과 정수압은 아마 적절하게 치수화된, 비-생성물-접촉 및 이에 따른 재사용가능한 하우징에 대하여 지나게 될 수 있다.

[0059] 수확 스트림 테이크오프 위치(= 통로/내측부(80))에서 동압은 이런 경우에 효율을 감소시키는 편재 현상을 배제하기 위하여, 채널들 안에서 압력 하락보다 적어도 5배 내지 10배 낮을 수 있다. 적절한 압력 하락은 0.1m로부터 채널 길이에 대하여 기술적으로 실현가능하게 고려되는 반면에, 바람직하게는 0.2m 내지 5m의 채널 길이, 특히 바람직하게는 0.4m 내지 2m의 채널 길이가 실시된다.

[0060] 보통, 채널 길이(L)는 플라스틱 백 또는 플라스틱 병의 길이(LK)의 30% 내지 95%, 특히 바람직하게는 60% 내지 90%이다.

[0061] 감소된 압력 하락 때문에, 짧은 채널 길이(L)는, 특히, 수확 스트림이 상측 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터 제거될 때, 테이크오프 속도를 감소시키기 위한 분배 장치를 요구할 수 있는, 분배 문제로 유도할 수 있다. 따라서, 임의로, 통로/내측부(80)는 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터의 세포들로부터 분리된 수확 스트림(70)(=수확물)의 균일한 테이크오프를 위한 유동 인버터(81)를 갖는다.

[0062] 본 발명에 따른 분리기는 보통 1 내지 10^6 개, 바람직하게는 10 내지 100,000개, 특히 바람직하게는 10 내지 10,000개의 채널들을 포함할 수 있다. 채널들은 공간 필요조건을 최적화하기 위한 층상 팩(1) 안에서 하나 이상의 리지플레이트를 가로질러 분포될 수 있다. 층상 팩(1)은 바람직하게는, 1 내지 400개의 리지플레이트들, 특히 바람직하게는 1 내지 50개 리지플레이트들을 포함한다. 본 발명을 제한하지 않는 구체예에서, 리지플레이트

들은 지지부를 제공하는, 지지 플레이트(30)에 접합될 수 있고 정확한 포지셔닝을 위한 용접 또는 접착에 의해 플라스틱 백에 접합될 수 있다.

- [0063] 지지 플레이트를 포함하는 단일 또는 다중 리지플레이트들로 이루어진 층상 팩(1)의 높이에 대한 폭 비율은 플라스틱 백의 기하학적 형상에 맞춰질 수 있다.
- [0064] 3D 백(함께 용접된 4개의 필름 웹들로 제조된 백)에서, 편의상 $0.3 < H/D < 1.5$, 바람직하게는 $0.6 < H/D < 1.2$, 특히 바람직하게는 $0.9 < H/D < 1.0$ 의 폭에 대한 높이 비율(H/D)를 갖는 사각형, 실린더형 직사각형 또는 타원형 단면을 갖는 층상 팩(1)이 사용될 수 있다.
- [0065] 더 단순하고, 더 비싸지 않는 2D 백(함께 용접된 2개의 필름 웹들로 제조된 백)에 대하여, $0.005 < H/D < 1$, 바람직하게는 $0.02 < H/D < 0.6$, 특히 바람직하게는 0.04 의 H/D 비율을 갖는 직사각형 단면을 갖는 평평한 층상 팩들이 적합하다.
- [0066] 삽입된 층상 팩을 갖는 2D 백을 함께 용접하기 위하여, $0.5 \leq X/H \leq 2$, 바람직하게는 $1 \leq X/H \leq 1.6$ 의 최소 간격비를 유지하는 것이 바람직하되, X 는 테이퍼링의 시작부와 층상 팩(1) 사이의 거리이고, H 는 층상 팩의 두께이다. 층상 팩(1)은 프로파일링된 플레이트(profiled plate)(340 또는 320)로부터 형성될 수 있다(도 4 참조). 프로파일링된 플레이트는 바람직하게는 일정한 간격으로 채널들 및 리지들의 순서를 갖는 측 및 매끄러운 측을 갖는다. 채널들은 하나 이상의 층들에서의 플레이트, 예를 들어 지지 플레이트(30) 상에 적층 형성한다. 이런 경우에, 채널들은 각각의 경우에 스테이터의 벽 또는 인접한 층의 매끄러운 측에 의해 개방측을 향하여 폐쇄된다. 또한 단일 또는 다중층 방식으로 층상 팩 또는 부분 팩을 압출성형하고 층상 팩(1)을 형성하도록 접합하는 가능성이 존재한다.
- [0067] 채널들의 기하학적 구조는 채널 폭(d)에 대한 리지 높이(h_s)의 비율에 의해 수립된다(도 4). 특성(형상화가능성, 탄성, 디프드로잉(deep-drawing) 용량)에 따른, 기술적으로 달성가능한 h_s/d 비율은, 범위 $0.01 \leq h_s/d \leq 5$ 에서 존재한다. 보통, h_s 는 1mm 이상이거나, 바람직하게는 3mm 이상이어야 한다. 바람직한 h_s/d 비율은 0.5 내지 5이다. 리지 폭(b_s)은 필름 재료의 기계적 안정성에 의해 결정된다. 리지 폭(b_s)은 분리기 체적의 단위에 대하여 높은 분리 면적을 가능하게 하기 위하여 가능한 한 작아야 한다. 동시에, 리지 폭은 형상 변화없이 하부층에 대한 마찰 연결을 허용하기 위하여, 지나치게 작도록 선택되지 않아야 한다. 압출된 층상 팩(1)들의 경우에, 또는 압출된 층상부 팩들 또는 리지플레이트들로 이루어진 층상 팩들의 경우에, 작은 리지 폭을 갖는 꽤 높은 강성도는 분리 면적의 상당한 손실 없이 달성될 수 있고, 그래서 이런 생산 형태가 바람직하다.
- [0068] 리지 플레이트들로 이루어진 층상 팩은 직육면체(도 3)(여기서, 채널 개구들의 평면은 층상 팩(1)의 접촉 표면에 대하여 직각이다), 또는 경사진 평행육면체(도 2)(여기서, 부착 상태에서 채널 개구는 수평 평면 상에 위치한다) 중 어느 하나로서 설계된다. 하부 채널 개구를 향하는 침전물에 의해 야기된 농도 구배를 방지하기 위하여 후자 해결안이 바람직하다. 채널들은 바람직하게는 수평 분배기(85)의 도움으로 안정되게 리액터 혼합물 유동을 수용한다.
- [0069] 리지플레이트들의 바람직한 연결은 접착 또는 용접을 통해 이루어진다. 층상 팩은 주로 연결에 의해 공간에서 고정되어야 한다. 게다가, 데드존(dead zone)(분리를 위하여 사용되지 않고 리지플레이트들의 외측 표면 주위에 존재하는 공간)으로 명명된 것을 가능한 한 작게 유지하는 시도들이 이루어진다. 하지만, 이런 데드존의 완전한 회피는 여기서 반드시 요구되지 않는다. 적절한 접착제는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 접착제 성분이고, 채널들의 재료 표면 및 특성에 대응된다. 특히, 바람직하게는 요구된 FDA 품질 등급으로 시장에서 이용가능한 접착제가 사용된다. 용접을 위하여, 열 접합 기술 예컨대 열, 레이저, 초음파가 사용될 수 있다. 특히 바람직한 접합 기술은 특히, 이에 적합한 장치로 층상 팩의 절단과의 조합으로, 채택될 수 있는 레이저 빔 용접이다. 용접 기술은 약학적 공정으로 도입된 플라스틱의 개수가 이런 접합 기술에 의해 증가되지 않는다는 장점을 갖는다.
- [0070] 프로파일링된 플레이트는 매끄러운 플레이트에 대한 엠보싱되고, 열간 또는 냉간 성형된 플레이트의 접합(예를 들어, 접착)을 통하거나 플레이트 생산 동안에 직접 형상화함으로써 초래할 수 있다. 엠보싱된 플레이트 및 매끄러운 플레이트의 재료 특성은 예를 들어, 적절한 표면 품질을 갖고 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 적절한 재료를 선택함으로써, 이의 상이한 기능성(엠보싱된 플레이트의 양호한 슬라이딩 특성 및 형상 안정성, 매끄러운 플레이트의 양호한 밀도 특성)에 최적으로 맞춰질 수 있다.
- [0071] 보통, 약학적 공정에 적합한 상업적으로 이용가능한, 비싸지 않는 리지플레이트들, 특히 플라스틱 리지플레이트

들은 예를 들어, 폴리카보네이트로 압출되고, 층상 부분 팩들로서, 층상 팩(1)을 생산하기 위하여, 적절한 길이로 함께 절단되거나 또는 생산되고 조여진다.

- [0072] 또한, 분리기를 생산하기 위하여, 플라스틱 필름에서, 통로 및 추가적인 내측부가 마련되고 임의로 적절한 위치에 설치된다.
- [0073] 이어서 플라스틱 백(50)은 용접선(55)을 갖는 플라스틱 백(50)으로 층상 팩(1)을 에워싸는 플라스틱 필름으로부터 함께 용접된다(도 5).
- [0074] 이어서 지지 플레이트를 포함하는 층상 팩(1)은 보통 층상 팩(1)과 플라스틱 백(50) 사이에 세포들의 침투를 방지하고 이에 따른 파울링(fouling)을 방지하기 위하여 플라스틱 백(50)의 내측 표면에 대하여 가압된다.
- [0075] 생산 방법의 제 1 구체예에서, 플라스틱 백(50)은 층상 팩(1)으로 신장되고(도 5) 형성된 접힘부(52)는 하나 이상의 조임 스트립(strip)(60)에 의해 평평하게 가압되고 조여진다(도 6). 백 및 층상 팩 둘리 견고하게 감기는 적절한 조임 스트립은 또한 플라스틱 필름이다. 적절한 신장 특성들은 예를 들어, 실리콘으로 제조된 플렉시블한 얇은 필름 또는 가정용 필름에 의해 지닌다. 또한, 백 벽에 대한 층상 팩(1)의 용접은 백과 층상 팩 사이의 견고한 연결을 생성하는 데에 적합할 수 있다.
- [0076] 서술된 방법은 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 본 발명에 따른 고체 분리기의 단순하고 비싸지 않는 생산을 허용한다. 폭넓은 제한에 있어 가변적인 층상 팩의 구성을 통해, 후자 장치의 기하학적 구조는 단순하고 정확하게 수립되고, 스테인리스스틸로 제조된 시스템에 비해서, 또한 꽤 큰 바이오리액터를 제공한다. 특히 서술된 방법은 일회용 요소의 비싸지 않는 생산을 허용하고, 이의 사용은 약학적 원리에 따라 정제된 보유 시스템의 제공을 위한 소비의 최소치로 감소시킬 수 있다.
- [0077] 작동을 위하여, 본 발명에 따른 장치는 수평에 대한 각도($10 = \beta$)로 배향된다. 각도(β)는 세포/고체의 정착 및 슬라이딩 거동에 따르고, 작동 동안에, 수평에 대하여 $30^\circ \leq \beta \leq 80^\circ$ 이다. 바람직한 구체예에서, 각도(β)는 수평에 대하여 35° 내지 75° , 특히 바람직하게는 45° 내지 60° 이다.
- [0078] 작동 동안에 각도(β)를 확보하기 위하여, 본 발명에 따른 고체 분리기는, 작동을 위하여, 스탠드(140)에 조여진다(도 11 내지 도 13).
- [0079] 보통, 스탠드(140)는 스탠드 발(145) 및 셋업 면적에 대하여 소정의 각도($10(=\beta)$)를 갖는 지지부(148)를 포함한다. 수확 스트림 수집 영역(56)(상면) 및 고체 수집 영역(57) 모두가 작동 동안에 접힘 없이 가능한 한 멀리 지지부를 지지할 수 있기 위하여, 지지부(148) 상에는, 지지 플레이트(30)를 포함하는 층상 팩(1)은 돌기(142) 및/또는 커버(110)를 이용하여 소정의 높이에서 고정된다. 이에 의해 데드스페이스 및 상응하는 파울링이 감소된다.
- [0080] 바람직한 구체예에서, 스탠드(140)는 층상 팩(1)을 수용하기 위한 커버(110) 및 하우징(100)을 갖는다.
- [0081] 이런 경우에, 신장 공정은 또한 특히 임의로 조임 스트립(60)을 이용한 코일링 없이 하우징(100) 및 커버(110)(도 6과 도 7)에서 스탠드(140)에 대하여 본 발명에 따른 고체 분리기의 병합 동안에 발생할 수 있다. 이런 경우에, 플라스틱 백(50)은 하우징(100)의 도움으로 지지 플레이트(30) 및 층상 팩(1)으로 제자리에 홀딩되고, 접힘부(52)는 커버(110)의 도움으로 층상 팩(1)으로 가압된다. 바람직하게는, 커버(110)는 예를 들어 힌지에 의해 일측, 및 하나 이상의 개폐가능한 조임 요소(115)에 의해 타측에서 하우징(130) 상에 고정된다. 이에 의해 스탠드(140)는 본 발명에 따른 고체 분리를 기동시키기 위하여 구동하도록 더 간단하다.
- [0082] 바람직한 구체예에서, 커버(110)는 일정하게 형상 특히, 각도(59)에 있어 하측으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)을 유지하고 작동 동안에 충전된 상태에서 이의 연장을 방지하는 프레임(130) 및/또는 연장부(112)를 갖는다. 이러한 형상 맞춤 컨테이너는, 큰 바이오리액터에 부착에 대하여 예상될 수 있기에, 상대적으로 큰 정수력 하중 하에서 시스템을 작동시키기 위하여, 그 중에서도, 바람직하다.
- [0083] 하측으로, 특히 원뿔형으로 또는 각뿔형으로, 테이퍼진 고체 수집 영역의 내측벽 상에서 층상 팩의 채널에서 세포들의 슬라이딩 거동을 향상시키기 위하여, 장치는 적절한 수단, 예를 들어 공압 또는 전기 진동기를 이용하여 진동시키도록 이루어질 수 있다.
- [0084] 요구된 분리 면적은 세포의 침전 특성 및 또한 인기있는 관류량 및 세포 농도에 따라 배향된다. 바람직한 관류량은 0.1 내지 $40 \ell/\text{일}$, 특히 바람직하게는 0.5 내지 $20 \ell/\text{일}$ 범위에서 존재한다. (세포들의 농도, 크기 및 응집 경향성에 따른) 세포들의 침전 특성에 따른 단위 바이오리액터 체적에 대한 바람직한 분리 면적은 0.1 내

지 100 m²/m³, 특히 바람직하게는 2 내지 20 m²/m³ 범위에서 존재한다.

- [0085] 플라스틱 백에 대하여 대안적으로, 층상 팩(1)은 다각형 단면을 갖는 플라스틱 병(50) 안에 설치될 수 있되(도 21), 플라스틱 병은 병목에서 종료되는 하측으로 테이퍼진 영역을 갖고 하측으로 테이퍼진 영역은 중력의 도움으로 고체를 수집하기 위한 고체 수집 영역을 형성한다. 작동을 위하여, 플라스틱 병목은 연결 라인을 통과하기 위한 통로를 갖는, 커버(220)를 이용하여 폐쇄된다. 대안적인 구체예에서, 층상 팩(1)은 플라스틱 병(50)의 벽에 조여진 하나 이상의 베이스에 의한 분리 영역으로서 대체된다.
- [0086] 플라스틱 병을 위한 적절한 재료는, 예를 들어, (<http://www.millipore.com/catalogue/module/c85149>)로부터의 머크 밀리포어로부터의 상업적으로 이용가능한 Millicell® 배양 병으로부터의 재료이다.
- [0087] 본 발명에 따른 고체 분리기는 바람직하게는 세정 문제를 회피하도록 일회용 물품으로서 설계된다.
- [0088] 보통, 본 발명에 따른 세포 분리기는 바이오리액터, 예를 들어, US 2009-0180933에서 서술된 바와 같은 일회용 바이오리액터에 플렉시블한 튜브에 의해 외부에서 결합된다. 본 발명에 따른 분리기의 공급은 적어도 2개의 펌프들, 바람직하게는 저전단 연동 펌프들을 통해 확보된다(도 18). 펌프는 바이오리액터 공간으로부터의 세포 배양액의 인출, 분리 장치로의, 열교환기를 통한 냉각 이후의, 이의 공급, 분리 장치로부터의 수확 스트림의 제거 및 바이오리액터로의 고체 스트림의 리턴 운반(=리턴(70))을 허용한다.
- [0089] 본 발명에 따른 고체 분리기의 저장은 고체 분리기들이 문제없이 상호 간에 적층될 수 있고 시작 작동에 대하여 적절한 각도로만 설정되기에, 공간을 절약한다. 이어서 이것들은 간단히 바이오리액터 외부에 연결될 수 있고 작동될 수 있다. 이것들은 안전 작동 벤치 내부 또는 외부에서, 플렉시블한 튜브들의 종단에서 조여지는 다양한 제조업자들(폴, 사토리우스, 코올더)로부터의 살균 커플러에 의하나, 바람직하게는 플렉시블한 튜브형 용접에 의해 발효조에 연결된다. 따라서 본 발명에 따른 고체 분리기에 조여진 플렉시블한 튜브들은 바람직하게는 - 적어도 부분적으로 - 플렉시블한 튜브형 용접에 적합한 플렉시블한 튜브 요소를 탑재한다. 또한, 현탁액을 운반하기 위한, 플렉시블한 튜브는 보통 분리기의 살균성을 위협에 빠뜨리지 않고, 연동 펌프로의 비침투성으로 위치될 수 있는, (예를 들어, 베르더로부터의 탄성중합체 플렉시블한 튜브 베르더프렌으로 제조된) 높은 기계적 하중을 견딜 수 있는 적어도 2개의 특별한 튜브형 요소들을 포함한다. 연결, 작동 및 유지보수는 문제 없다. 일회용 요소로서 본 발명에 따른 장치의 부품들 또는 본 발명에 따른 장치의 설계는 세정 문제를 제거한다.
- [0090] 따라서 본 발명의 추가적인 아이템은 플라스틱 백에서 층상 팩을 갖는 본 발명에 따른 고체 분리 장치를 마련하기 위한 방법이다.
- [0091] 가스 처리를 위하여 요구된 기체 거품이 흡입 개구로부터 원격으로 유지될 수 있을 때 유산소 바이오리액터로의 층상 팩(1)의 직접적인 삽입은 가능하다. 이런 경우에, 플라스틱 백의 원뿔형 수집부는 환류를 펌핑할 수 있게, 생략될 수 있다. 하지만, 바람직하게는, 본 발명에 따른 분리기는 바이오리액터 외부에서 사용을 위하여 제공된다.
- [0092] 본 발명에 따른 세포 분리기의 제 2 구체예에서, 플라스틱 백은 다면체 또는 원뿔형이되, 작동 동안에 플라스틱 백은, 하면에서 원뿔형으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)이 다면체 또는 원뿔의 코너 또는 정점 및 플라스틱 백의 벽에 의해 형성되도록 위치된다. 플라스틱 백 내에서, 분리 면적(500)의 각도(10)는 종래의 수직 분리기에서와 같이, 수평에 대하여 0° 이다.
- [0093] 분리기의 체적은 예를 들어, 0.1 ℓ 내지 1000 ℓ 의 값을 가질 수 있다.
- [0094] 특히, 본 발명에 따른 분리기의 다면체 형태는 맞붙은 췌기꼴(disphenoid)(=도 14와 도 15에 도시된 바와 같이, 4개의 크기와 형태가 동일한 삼각형들에 의해 바인딩된 다면체), 특히, 사면체, 정각뿔(= 도시되지 않는, 4개의 크기와 형태가 동일한 삼각형들 및 사각형에 의해 바인딩된 다면체), 팔면체 및 (도 16과 도 17에 도시된) 정육면체로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0095] 원뿔(= 원뿔형 쉘 및 원형 블랭크 시트(blank sheet)로 구성됨)들이 동일하게 적절하다.
- [0096] 플라스틱 필름으로부터 단순한 생산을 위하여, 맞붙인 췌기꼴, 특히, 사면체, 원뿔 및 정육면체가 바람직하다. 본 발명에 따른 세포 분리기는 보통 0.2 내지 3, 바람직하게는 0.5 내지 2, 특히 바람직하게는 0.7 내지 1.5의 범위에서 최대 폭에 대한 높이의 비율을 갖는다.
- [0097] 본 발명에 따른 세포 분리기는 바람직하게는 분리기의 상면에서 연결 라인들 및 포트들을 통해 바이오리액터 또는 다른 외부 시스템에 연결된다. 이는 컨테이너가 통로 없이, 즉 누설 없이 분리 기기를 수용하기 위하여 설계

될 수 있다는 장점을 갖는다. 이에 의해, 추가적인 안전 설비 없이, 유전자 변형 생성 세포의 이탈이 방지될 수 있다.

[0098] 바이오리액터 혼합물은 보통 작동을 위하여 배열된 플라스틱 백의 수직축을 따라 바이오리액터 혼합물을 도입하기 위한 내측부(84)를 통해 도입된다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 세포 분리기에는, 내부 요소(84)의 주입구 개구에서, 수평 분배기(85)는 리액터 혼합물(74)의 균일한 수평 유동 분포를 위하여 사용된다. 피드는 이런 경우에 바람직하게는 주입구 표면(510)의 코너들의 방향으로, 주입구 표면(510)에 걸쳐 수평으로 배향된 내측부, 예컨대 예를 들어, T형관 또는 하측으로 배향된 내측부 예컨대, 예를 들어 Y형관의 2개 이상의 배출구 개구들에 의하거나, 또는 환형 노즐들에 의해 분포된다. 도 25는 단일 T 또는 Y 분배기, 및 이중 T 또는 Y 분배기를 갖는 바이오리액터 혼합물을 도입하기 위한 내측부(84) 사이의 비교를 도시한다. Y 분배기의 경우에, 주입구 스트림은 하측으로 배향된다. 작은 정화 표면 하중($v \leq 0.1 \text{ m/h}$)의 경우에 분배기의 효과는 낮다. 더 양호한 보유는 이중 T 또는 Y 분배기를 이용하기보다 단일 T 또는 Y 분배기를 이용하여 달성되었다. 높은 표면 하중($v \geq 0.1 \text{ m/h}$)에서, 하측으로 배향된 주입구 스트림을 갖는 Y 분배기는 T 분배기보다 우월하고 상응하게 바람직하다.

[0099] 보통, 2개 내지 8개, 바람직하게는 2개 내지 4개의 수평으로 또는 하측으로 배향된 개구들을 갖는 분배기들이 사용되되, $0.03 \leq c/D \leq 0.25$, 바람직하게는 $0.04 \leq c/D \leq 0.15$ 인 플라스틱 백의 엷지 길이(D)에 대한 폭(c)(= 2개의 개구들 사이의 거리)이 보통 사용된다. 원뿔형 분리기의 경우에, D는 원형 블랭크 시트의 직경이다.

[0100] 고체들은 보통 분리기의 하측 정점의 부근에서 하나 이상의 통로 또는 내측부(88)를 통해 고체 수집 영역(57)으로부터 제거된다. 내측부(88)는 수집된 세포들이 압력 구배 또는 펌프를 통해 안으로 리턴되는 바이오리액터에 연결된다. 바람직하게는, 내측부(88)는 고체들의 흡입에 의해 중심, 수직 제거에 사용된다(도 14, 도 15, 도 16, 도 17). 이는 작동을 위한 이의 컨테이너에서 분리기의 생산 및 배치를 단순화한다. 추가적인 바람직한 구체예에서, 또한 테이크오프(takeoff)는 분리기의 정점과 용접된 통로를 통해 테이크오프될 수 있다. 하우징의 누설없는 설계를 위하여, 이런 경우에, 플렉시블한 연결 튜브는 (즉, 하우징벽과 플라스틱 백 사이의) 분리기를 수용하기 위한 하우징의 내부에 위치되어야 한다.

[0101] 수확 스트림은 보통 분리 면적(500) 위의 수확 스트림 수집 영역(56) 안의 플라스틱 백 내에 위치되는 내측부(80)를 통해 테이크오프된다. 바람직한 구체예에서, 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터의 세포(=수확물)로부터 분리된 수확 스트림(70)의 통일된 테이크오프를 위한 유동 인버터(81)는 내측부(80)에 연결되는, 수확 스트림 수집 영역(56) 안에 설치된다(도 15). 이런 내측부(80)는 보통 엷지 길이 또는 직경(a)을 갖는, (사면체의 경우에, 삼각형 내측부가 사용되는) 수확 스트림 수집 영역(56)의 외부 윤곽을 갖는 역 우산의 형태를 갖되, $0.25 \leq a/D \leq 0.75$, 바람직하게는 $0.4 \leq a/D \leq 0.6$, 특히 바람직하게는 0.5일 수 있다.

[0102] 보통, 내측부들(80, 88, 84)은 바람직하게는 바이오리액터 또는 다른 외부 시스템에 연결하기 위한 도관, 특히 플렉시블한 튜브가, 연결될 수 있는, 내부에 용접된 통로이다.

[0103] 본 발명에 따른 분리기의 바람직한 구체예에서, 상측 영역에서, 연결 라인들을 통과하기 위한 통로들을 포함하는, 또한 커버일 수 있는, 하나 이상, 바람직하게는 하나의 연결 플레이트(90)가 플라스틱 백(사면체)의 벽 상에 또는 코너(육면체)에 위치되고, 연결의 영역에서, 분리기의 지지부가 가능하게 이루어진다. 이는 보통 조립 동안에 분리기의 하우징에 연결된다.

[0104] 최대 분리 면적(500)은 주입구 표면(510) 위에 위치된다. 세포들의 분리는 수확 스트림 수집 영역(56)으로부터 수확 스트림의 연속적인 테이크오프의 결과로서 수직 유입과 중력 사이의 양의 힘 차이에 따른, 분리 면적(510)의 최대 단면까지 원뿔형으로 상측으로 연장하는 컨테이너 단면에서 도 14 내지 도 17에 따른 수직 분리기 안에 기인한다.

[0105] 침전 분리기의 치수화는 보유될 세포의 형태, 바이오리액터의 크기 및 처리량에 따른다.

[0106] 본 발명의 제 1 구체예에서와 같이, 요구된 분리 면적(A_{eff})은 Eq. 1에 따른 침전 속도(w_s), 관류량(perfusion rate)(q/V)(단위 바이오리액터 체적(V)에 대한 배지 처리량(q)) 및 바이오리액터 체적으로부터 기인한다. 효율 계수(η)는 분리를 위한 조건을 충족하기 위하여, 낙하 속도(w_s)가, 유입 속도 = 관류량 $\times V/A_{\text{eff}}$ 보다 약간 커야만 하는, 다음으로부터 유동에 노출된 개별 입자의 이상적인 고려사항과 비교하여 기술적인 분리기의 성능에 있어 감소를 고려한다(Eq. 2).

[0107] 이미 논의된 바와 같이:

$$A_{eff} = \frac{Perfusionrate \cdot V}{WS} \quad (Eq. 1)$$

[0108]

$$A_{th} = \frac{A_{eff}}{\eta} \quad (Eq. 2)$$

[0109] 다면체 플라스틱 백 분리기를 위한 이론적인 분리 면적은 Eq. 5 또는 Eq. 6으로부터의 근사치로 결정된다:

[0110] 제 1 근사치에 대하여, 최대 분리 면적을 결정하기 위한, 엣지 길이(D)를 갖는 사면체에 대하여, 하기가 적용된다:

$$A_{rh} = \frac{1}{4} D^2 \sqrt{3} \quad (Eq. 5)$$

[0112] 테이크오프 지점이 구조적으로 사면체의 엣지 길이에 의해 부여된 최대 단면 약간 아래에 존재하기 때문에, 효율 계수(η)는 1보다 약간 적다.

[0113] 동일한 것이 원뿔형 분리기에 적용되고, 이의 최대 분리 면적은 원형 블랭크 시트 직경(D)에 의해 부여된다:

$$A_{rh} = \frac{\pi}{4} D^2 \quad (Eq. 6)$$

[0115] 엣지 길이(D)를 갖는 정육면체를 위하여, $\eta = 1$ 에서 최대 분리 면적으로서 다음의 단면적을 갖는 육각형을 발생시킨다:

$$A_{rh} = \frac{3}{4} D^2 \sqrt{3} \quad (Eq. 7)$$

[0116]

[0117] 본 발명에 따른 분리기의 제 2 구체예의 치수화 동안에, 또한 층류 조건을 유지하는 것이 고려되어야만 한다. 플라스틱 백(50)의 치수화 동안에, 달성될 백의 길이(LK) 및 엣지 길이(D)는 플라스틱 백에서 달성될 충전 레벨에 따라 배향된다. 초과 정수압은 아마 상응하게 치수화되고, 비-생성-접촉 및 이에 따른 재사용가능한 하우스징으로 지날 수 있다.

[0118] 보통, 주입구 표면(510)은 $0.3 \leq h/HK \leq 0.7$, 바람직하게는 0.4 내지 0.6의 플라스틱 백의 높이(HK)에 기초한 높이(h)에 위치된다. 도 26은 정육면체 분리기 안에서 보유에 대한 주입구 표면의 높이의 영향을 도시한다.

[0119] 의도된 바와 같은 사용을 위하여, 분리는 분리기가 가득할 때 플라스틱 백의 플렉시블한 벽을 지지하는 컨테이너 안으로 도입된다. 따라서, 분리기 및 컨테이너의 형상은 바람직하게는 상호 간에 대응된다.

[0120] 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 고체 분리기 및 고체 분리기를 수용하기 위한 컨테이너를 포함하는 고체 분리 장치에 관한 것이되, 컨테이너는: 적어도

[0121] - 고체 분리기를 수용하기 위하여, 고체 분리기의 형상에 맞춰지고 내부를 에워싸며 외부로부터 범위를 정하는 벽들에 의해 고체 분리기의 형상에 맞춰지는 내부

[0122] - 상면으로부터 컨테이너 안으로 고체 분리기를 도입하기 위한 개구를 포함한다.

[0123] 바람직하게는, 특히 분리 장치의 제 2 구체예를 위하여, 컨테이너는 플렉시블한 튜브 및/또는 채널 및/또는 측정 프로브가 통해 세포 분리 장치까지 유도될 수 있는 채널을 갖는다.

[0124] 세포 분리 장치를 도입하기 위한 개구는 바람직하게는 개폐가능하다.

[0125] 본 발명에 따른 컨테이너는, 폐쇄된 상태에서, 바람직하게는 액체밀봉하기 위하여 구성되고, 즉 이는 어떠한 액체도 컨테이너의 내부로부터 외부로 의도치않게 지나가지 않는 방식으로 외부로부터 밀봉될 수 있다.

[0126] 직사각형 단면을 갖는 플라스틱 백 또는 플라스틱 병이 또한 가능하고, 하측 영역에서, 하측으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)은 중력의 도움으로 고체를 수집하기 위하여 형성된다(도 24). 내측부 및 통로(80, 88, 84)는 플라스틱 백 또는 플라스틱 병과 용접될 수 있다. 대안적으로, 하측으로 테이퍼진 고체 수집 영역(57)은 목에서 종료된다. 이어서 플라스틱 백 목 및 플라스틱 병목 모두는 모든 필요한 통로들이 병합되는 커버 또는 스톱퍼로

폐쇄된다. 모든 구체예에서, 수확 스트림 수집 영역(56)의 형상은 원하는 바와 같을 수 있다. 이런 플라스틱 백들 또는 플라스틱 병들은 0.02 내지 2.1의 작은 발효조 체적을 위하여 특히 바람직하다. 작동을 위하여, 하나 이상의 플라스틱 백 또는 플라스틱 병은 스탠드 상에 매달린다(suspended). 평행한 복수 개의 분리기들의 공간을 절약하는 적용을 위하여, 도 24의 매달린 플라스틱 백 또는 플라스틱 병이 바람직하다.

[0127] 추가로 본 발명은 본 발명에 따른 서술된 세포 분리 장치 중 하나 및 바이오리액터로 이루어진 바이오리액터 시스템에 관한 것이다. 바람직하게는, 바이오리액터는 일회용 리액터, 특히 US 2009-0180933에 서술된 바와 같은 리액터이다.

[0128] 바이오리액터 시스템은 예를 들어, 알려진 방식으로 작동될 수 있는 관류 리액터이다. 양분 배지는 연속적으로 바이오리액터로 공급되고, 세포에서 낮은 세포 배양 상청액은 연속적으로 제거된다. 관류 리액터는 만약 생물학적으로 의미있다면, 높은 관류량(q/V)(단위 바이오리액터 체적(V)에 대한 배지 처리량(q))으로 작동될 수 있고, 충분한 분리 면적이 제공된다. 이런 경우에, 분리기를 통한 유동은 연속적이다.

[0129] 또한, 관류 리액터는 배양물이 초기에 회분식으로 성장될 수 있는 방식으로 작동될 수 있다. 배지가 외부 세포 분리기를 통해, 바이오매스의 어떠한 현저한 구축도 더 이상 가능하지 않는 한도까지 소비될 때, 사실상 바이오매스가 없는 배양 상청액은 테이크오프된다. 이어서 바이오리액터에서 획득된 공간은 추가적인 성장 및 이에 따른 더 높은 총 바이오매스 생산성이 가능하게 이루어지는(반복되는 회분식 모드) 것의 결과로서, 신선한 양분 배지를 공급하는 데에 사용될 수 있다. 이런 경우에, 세포 분리기를 통한 유동은 회분식이다. 이런 방법은 예를 들어, 현존하는 시작 배양 리액터의 생산성을 증가시킬 수 있기에, 꽤 큰 바이오리액터가 집중될, 시작 배양에 적합하다.

[0130] 바이오리액터를 작동시키기 위하여, 본 발명에 따른 세포 분리기를 통한 연속적인 유동은 바람직하다.

[0131] 바이오리액터 또는 관류 리액터는 마이크로지지부에 대하여 매달리지 않고 체외에서 성장하는 세포들을 배양하는 데에 사용될 수 있다. 바람직한 세포는 원생동물 및 또한 예를 들어, 유전자 변형을 통해, 특수 약학적 유효 성분 예컨대, 바이러스, 단백질, 효소, 항체, 뉴린, 조직 세포 또는 진단 구조체를 생산할 수 있는, 인간(신경, 혈액 또는 조직 세포, 및 또한 유아 또는 성인 유래의 줄기 세포), 동물 또는 식물 유래의 접착성 또는 비접착성 진핵 세포를 포함할 수 있다. 특히 바람직하게는, 약학적 고성능 생산을 위하여, 적절한 세포들, 예를 들어, 섬모충, 곤충 세포, 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, (인간 버킷펄프종 세포주 2B8과 함께 인간 HEK 293 세포주의 융합으로부터 기인한) HKB 세포, 혼성 세포 및 또는 줄기 세포가 사용된다.

[0132] 시스템의 대안적인 구체예에서, 본 발명에 따른 서술된 세포 분리기들 중 하나는, 회분식 모드로, 발효의 중단 이후에, 세포 제거 이전에, 필터에 적용될 세포 질량을 감소시키고 이에 따라 요구된 필터 면적을 감소시키는 것을 목표로 하는 수확 탱크 또는 추가적인 바이오리액터에 부착된다.

[0133] 본 발명은 추가로 유동을 지탱하는 베셀(flow-bearing vessel) 안에서, 고체들, 특히 세포들을 보유하고 재순환시키기 위한 방법에 관한 것이되, 고체 함유 배지는 베셀에 연속적으로 또는 단속적으로 공급되고, 고체가 없는 배지는 베셀로부터 제거되며, 베셀이 하측 영역에서, 중량의 도움으로 고체를 수집하기 위하여, 특히 원뿔형으로 또는 각뿔형으로, 하면에서 테이퍼지고, 경사진 고체 수집 영역(57)에서 설정된 면들을 갖는, 유동을 지탱하는 감마-살균가능한 플라스틱 백 또는 플라스틱 병인 것을 특징으로 한다. 방법의 특정한 구체예에서, 분리 면적은 경사 채널들에 의해 형성되고, 바람직하게는 지구 중력장에 대하여 침전된 세포들의 효율을 저하시키는 재현탁을 회피하는, $Re < 2300$ 에 따른 층류 조건의 유지를 허용하는, 유동 속도가 우세하다.

[0134] 레이놀즈수(Re)는 단면 평균 유동 속도(w), 유동 배지의 동적 점성도(ν) 및 채널의 내경(d)으로부터의 Eq. 7에 따라 계산될 수 있다:

[0135]
$$Re = (w \cdot d / \nu) \quad (Eq. 7)$$

[0136] 경사 채널에서, 채널 내벽들에서, 하한 유동 속도는 채널 중심에서보다 우세하다. 세포들은 채널들 안에서 침전하고 하측 채널 중단들을 향하는 유동의 방향에 반하여 채널들의 하부측 상에서 슬라이딩한다. 세포들이 없는 세포 배양액은 채널들 위에 배열되고 결국 베셀로부터 운반되는 수확 스트림 수집 영역(56) 안으로 채널들에 의해 전달된다.

[0137] 다면체 또는 원뿔형 분리기에서, d 는 최대 분리 면적의 단면의 폭 또는 직경이다. 플라스틱 벽에서, 하한 유동 속도는 채널 중심에서보다 우세하다. 세포들은 고체 수집 영역(57)을 향하는 유동의 방향에 반하여 슬라이딩한다. 세포들이 없는 세포 배양액은 분리 면적 위에 배열되고 결국 베셀로부터 운반되는 수확 스트림 수집 영역

(56) 안에서 상승한다.

[0138] 본 발명에 따른 방법은 바람직하게는 바이오리액터 외부에서 수행될 수 있다. 이런 목적을 위하여, 세포들을 함유한 세포 배양액은 바이오리액터로부터 본 발명에 따른 세포 분리기로 운반된다. 바람직하게는, 분리기 안으로 투입 이전에, 세포들은, 물질 대사를 지연하고 이에 따라 세포의 생산성 감소 공급 부족을 대응하기 위하여, 외부 베셀 안에서 냉각된다. 냉각된 현탁물에서, 침전된 세포로 산소 공급은 필요하지 않다. 대부분의 경우에, 분리기의 주변 온도로 세포 배양액을 냉각하는 것은 완전히 충분하고, 그래서 원하는 물질대사 효과 이외에, 대류 유동은 안전하게 회피된다. 세포들의 적절한 공급을 감시하기 위하여, 분리기는 예를 들어, 산소 농도 및/또는 pH를 측정하기 위한, 적어도 하나의 일회용 센서를 구비할 수 있다. 센서들의 수용은 벽들뿐 아니라, 바이오리액터 또는 수확 베셀에 대한 연결 라인에서 가능하다.

[0139] 본 발명에 따른 방법은 연속 유동 살균 플라스틱 백에서 세포들의 효율적인 보유 및 재순환을 허용한다. 보유 및 재순환 동안에, 중간 전단력만이 대부분에 대하여 세포들에 의해 잘 견디는 세포들에 작용한다. 분리 장치에서 세포들은 관류 온도 또는 낮아진 온도 레벨로 유지되고 양분과의 공급이 제공된다.

[0140] 이하에서, 거기에 제한하지 않고 본 발명에 따른 장치들의 적용가능성에 대한 연구가 서술된다.

[0141] 입자 시스템

[0142] 세포들의 모의실험을 위하여, 입자 시스템 폴리아크릴로니트릴 X 폴리머 "PAN-X"가 사용된다. 불수용성 폴리머는 원칙적으로 섬유를 생산하기 위한 의류 산업에서 사용된다. 이하에서 도마젠, 제조업자 드랄론 GmbH의 제품 데이터 시트로부터의 발체물이다.

품명	PAN-X
화학식	$[C_3H_5N]_n$
투여 형태	분말
입자 형태	구형
색상	백색
밀도	1.18 g/m ³
입자 크기 분포	97 vol% ≤ 50 μm
수용성	불용성
점화 온도	485°C

[0143]

[0144] 입자 크기 분포는 대략 진핵 세포들(CHO, BHK)에 상응하는, 맬번으로부터 Mastersizer 레이저 회절 측정 장비를 이용하여 측정된 15μm와 30μm 사이의 가장 빈번한 입자 직경을 나타낸다.

[0145] 분리 시스템들

[0146] 경사 채널 분리기

[0147] 비교하기 위하여, 도 2에 따른 본 발명에 따른 분리기의 모델로서 $A_{th} = 0.027 \text{ m}^2$ 및 $A_{th} = 1.42 \text{ m}^2$ 의 이론적인 분리 면적을 갖는 WO 03/020919에 따른 스테인리스스틸로 제조된 대형 및 소형 플레이트 분리기에 대한 연구가 이루어졌다. 대형 분리기는 17.41의 분리기 체적에 수용되는 20개의 플레이트들을 갖는다. 소형 층상 분리기는 0.31의 분리기 체적에 4개의 플레이트들로 이루어진다.

[0148] 정육면체 분리기

[0149] 2개의 정육면체들은 플렉시글라스 플레이트로부터의 엷지 길이 $D = 200 \text{ mm}$ 및 $D = 400 \text{ mm}$ 를 갖는 유체역학적 모델로서 생산되었다. 정육면체의 상측 코너는 플렉시블한 튜브의 통로를 위한 개구를 가졌다. 플렉시블한 튜브에 조여진 T형관 또는 Y형관(각각의 경우에 2개의 주입구들)의 형태로 입자 현탁물의 유동 분포를 위한 하나의 내측부(또한 (유동) 분배기(85)로 명명됨)는 플라스틱 모델의 중심($h = 50\% \text{ HK}$)까지 삽입되었다. 분배기의 폭(c)은 변경되었다. 하측 원뿔 정점까지 연장되는 추가적인 플렉시블한 튜브(또한 고체 수집 영역(57) 수집기)를 통

해, 침전물은 유동 인버팅 방식으로 수직방향으로 상측으로 테이크오프되었다. 추가적인 통로를 통해, 플라스틱 튜브는 클리어 페이즈(clear phase)(= 수확 스트림(70))가 유동 인버팅 방식으로 하측으로 배향된 표면(U 튜브)으로부터 테이크오프되는 방식으로 클리어 페이즈를 수집하기 위하여 조여졌다(= 통로(80)). 하측 및 상측 분리기 정점을 향하는 점진적인 단면 팽창은 양호한 유동 조화를 허용하고, 이에 의해 또한 유동 인버팅 내측부 없이 충분히 잘 기능하여야 하는, 유동 수집기(하면에서 고체 수집 영역(57), 상면에서 수확 스트림 수집 영역(56))로서 이미 기능한다.

[0150] **사면체 분리기**

[0151] 사면체는 엷지 길이 $D = 400\text{mm}$ 를 갖는 정삼각형으로부터 플렉시글라스 모델로서 생산되었다. 원뿔형 고체 수집 영역(57)으로서 선택되었던, 코너 반대편에, 고체 분리가 상면에서 개방되었다. 개구들을 통해, 현탁물(=피드(74)), 침전물 및 클리어 런(clear run)(=수확 스트림(70))의 도입 및 테이크오프를 위한 다양한 통로들이 설치될 수 있었다. 통로에서, 일반적으로 플렉시블한 튜브, 분배기 및 클리어 페이즈를 수집하기 위한 플라스틱 튜브(=통로(80))는 정육면체와 유사한 방식으로 구성되었고 위치되었다.

[0152] 사면체는 유동에 맞는 테이퍼링만이 리턴 수집기에 대하여 하측으로 존재하고 클리어 페이즈는 가장 큰 표면적의 지점에서 수집된다는 점에서 주로 정육면체와 비교하여 유동 특성에 있어 상이하다. 따라서, 균일한 테이크오프를 위하여, 사면체에서, 최대 분리 면적에 위치한 유동 분배기(85)가 사용된다.

[0153] 연구된 단위에서 분리 면적(A_{th})은 7.61 의 체적에서 0.069 m^3 였다.

[0154] **원뿔형 피드(feed) - 도르트문트 탱크 타입을 갖는 수직 분리기**

[0155] 이런 수직 분리는 흔히 폐수 산업에 사용된다. 연구된 분리는 상측 영역에서, 51mm 의 단면을 갖는 중심으로 위치한 원뿔형 피드를 갖고, 하측 영역에서 수집 깔대기를 형성하는 145mm 의 단면을 갖는 실린더형 셸로 이루어졌다. 모든 요소들은 유리로 가공되었다. 정화되지 않는 액체가 원뿔형 피드를 통해 상면으로부터 실린더 영역(수직 분리 영역) 안으로 도입되었고 분리 영역 안으로 상승되었던 반면에, 현탁된 물질은 수집 깔대기 안에서 침전되었다. 분리 영역의 상면 종단에서, 클리어 페이즈는 4개의 지점들에서 수집되었다. 연구된 수직 분리는 0.014 m^3 의 분리 면적(A_{th})의 1.71 의 체적을 가졌다.

[0156] **방법**

[0157] **분석적인 방법**

[0158] 샘플은 흡인 여과기(포어 크기 $< 2 \mu\text{m}$)를 통해 여과되며, 여과지는 140°C 에서 건조되고 무게 측정된다. 건조 밸런스(사토리우스 MA45)는 이를 위하여 사용되었다.

[0159] **실험 절차**

[0160] PAN-X $3\text{g}/\ell$ 가 저장 탱크 안에 제공되었고, 연동 펌프(왓슨 말로우 Du 323)에 의해 각각의 분리기 안으로 도입되었다. 원하는 상승 속도(v)($v=q/A_{th}$, q 는 분리기가 함께 주어진 관류량 및 바이오리액터 체적(V)에 대하여 하중이 가해진 수확 스트림이다)는 연동 펌프의 펌프량(q)을 통해 설정되었다.

[0161] 입자 현탁물은 우선 순환으로 펌핑된다. 2개의 유체역학적 잔류 시간의 대기 시간 이후에, 정지된 조건을 수립하기 위하여, 수확 스트림으로부터의 샘플링이 시작되었다.

[0162] 샘플 체적은 필터에 대한 입자 질량에 따라 배향된다. 이는 측정 정확도의 한도 내에서 대략 $100\text{mg} \pm 25\text{mg}$ 이어야 한다. 샘플 체적은 3중으로 측정되었던, 입자 농도를 결정하기 위하여 40 내지 800mL 의 샘플로부터 기인한다.

[0163] 결과

분리기	기하학적 구조			$R=1-cn/c$ 1	$w=q/Ath$ m/h	$w_{eff}=w/\eta Do$ m/h
사면체	A	m ²	0.0692	0.91	0.03	0.0294
	d	mm	400	0.82	0.05	0.0588
	VS	L	6.42	0.74	0.10	0.1176
	ηDo	-	0.8	0.51	0.20	0.2353
정육면체 1	A	m ²	0.052	0.96	0.03	0.0208
	d	mm	200	0.92	0.05	0.0417
	VS	L	8.00	0.83	0.10	0.0833
	ηDo	-	1.2	0.63	0.20	0.1667
정육면체 2	A	m ²	0.208	0.95	0.03	0.0208
	d	mm	400	0.91	0.05	0.0417
	VS	L	64	0.81	0.10	0.0833
	ηDo	-	1.2	0.61	0.20	0.1667
PLA 1	A	m ²	0.0274	0.95	0.03	0.0227
	Z	1	4	0.90	0.05	0.0455
	VS	L	0.375	0.76	0.10	0.0909
	ηDo	-	1.1	0.61	0.20	0.1818
PLA 2	A	m ²	1.42	0.96	0.03	0.0227
	Z	-	21	0.92	0.05	0.0455
	VS	L	18	0.79	0.10	0.0909
	ηDo	-	1.1	0.59	0.20	0.1818
도르트문트 탱크	A	m ²	0.0142	0.93	0.03	0.9286
	d	mm	145	0.87	0.05	0.8704
	VS	L	1.7	0.75	0.10	0.7506
	ηDo	-	1	0.56	0.20	0.5617

[0164]

[0165] 표 1

[0166] 분리 시스템들의 비교는 증가하는 배지 스트림 또는 수확 스트림(q) 또는 유효 상승 속도($v=q/A_{eff}$)에 따라 보유의 정도(R)에 있어 예상된 하락을 나타낸다(도 19). 유효 상승 속도는 도르트문트 탱크와 비교하여 분리기들의 사용된 최대 면적의 상이한 보유 성능을 확인하는, 효율 계수(η)를 도입함으로써 초래한다. 도 19는 분리기가, 이런 효율 계수의 추가 이후에, 최상의 핏(fit)의 조인트 라인에 의해 서술될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0167] 분리기의 성능은 도 20에서 비교된다. 이런 표시는 몇 개의 분리기 체적들이 유효 분리 면적을 수용하기 위하여 필요한가를 나타낸다. 소형 분리기 체적은 공급된 발효 공간 외부에서 잔류 시간을 최소화하기 위하여 세포 배양에 있어 바람직하다. 이런 비교에서, 50 l/m보다 큰 단위 분리기 체적에 대한 꽤 큰 분리 면적을 갖는, 규모와 상관없이, 작동될 수 있는, 경사 채널 분리기가 알맞게 나타난다. 이런 실시예는 이런 분리 시스템의 두드러진 확장성을 명백하게 한다. 이에 비해서, 수직 분리기들의 경우에, 현저하게 더 큰 체적이 수평 분리 면적을 그 안에서 성장시키기 위하여 요구된다. 또한, 규모 확대에 있어 수용의 효율은 $V = A^{3/2}$ 를 포함한다. 의외로, 일회용 모델, 정육면체 및 사면체의 효율은 도르트문트 탱크의 표준 시스템보다 현저하게 우월하고, 그래서 이런 꽤 단순하고 비싸지 않는 시스템은 도르트문트 탱크보다 현저하게(대략 6배까지) 큰 바이오리액터에 사용될 수 있다.

[0168] 수확 스트림 수집기 및 피드 분배기의 추가적인 적응(기하학적 구조 및/또는 위치)이 보유의 정도(R)의 최적화로 유도할 수 있다.

[0169] 이런 적용으로 유도되는 작업은 유럽 지역 발전 기금(ERDF) 하에서 재정 지원 협약 "Bio.NRW: MoBiDik - 모듈식 생물 생성 - 일회용 및 연속"(기금 규칙 w1004ht022a)에 따라 기금 지원되었다.

부호의 설명

[0170] 1 층상 팩/분리 면적

2 리지 폭

8 플레이트 분리부

- 10 각도
- 13 길이
- 15 폭
- 18 높이
- 30 지지 플레이트
- 50 플라스틱 백 또는 플라스틱 병
- 51 목
- 52 초과부/접힘부
- 55 용접선
- 56 수확 스트립 수집 영역
- 57 고체 수집 영역
- 58 각도
- 59 각도
- 60 조임 스트립
- 70 수확 스트립(수확물)
- 74 바이오리액터 혼합물/원료
- 79 재순환
- 80 통로
- 81 유동 인버터
- 84 통로
- 85 유동 분배기 특히 수평 분배기 또는 하측 배향 주입구 유동을 갖는 유동 분배기
- 86 주입구 유동
- 88 흡입에 위한 중심 제거
- 89 통로
- 90 연결 플레이트
- 100 하우징
- 110 커버
- 112 연장부
- 115 조임 요소
- 130 프레임
- 140 스탠드
- 142 돌기
- 145 스탠드 발
- 148 지지부
- 200 진동기
- 210 조립 플레이트

220 커버 또는 스톱퍼

230 칼라 너트

240 오링

층상 팩의 프로파일

311 층상 팩

320 정사각형 프로파일

321 층상 팩

330 원형 프로파일

331 층상 팩

340 원형 프로파일

341 층상 팩

350 육각형 프로파일

351 층상 팩

500 이론적 최대 분리 면적

501 분리 영역

510 주입구 표면

600 냉각 장치

610 바이오리액터

620 분리 장치

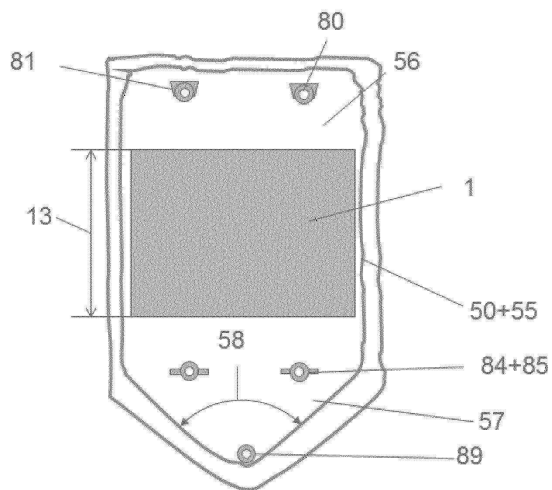
630, 631 펌프

640 분리기 = 분리 백 + 스탠드 또는 컨테이너에 선택적으로 일체화된 냉각 장치

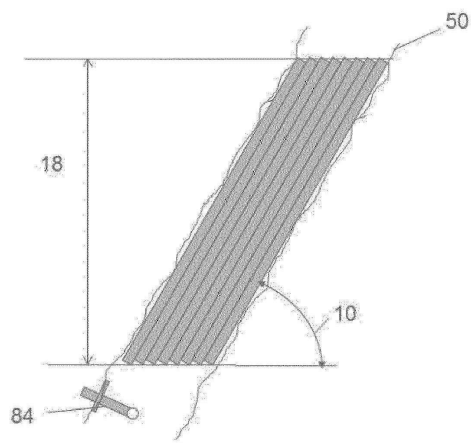
650 배양 배지

도면

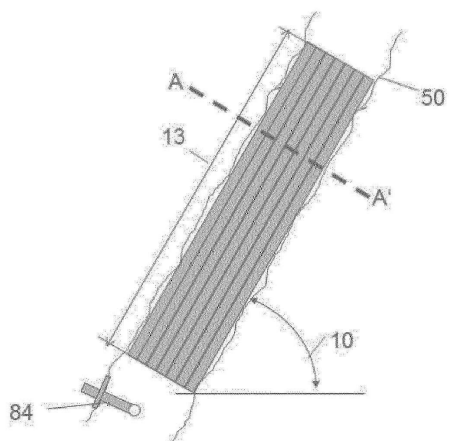
도면1



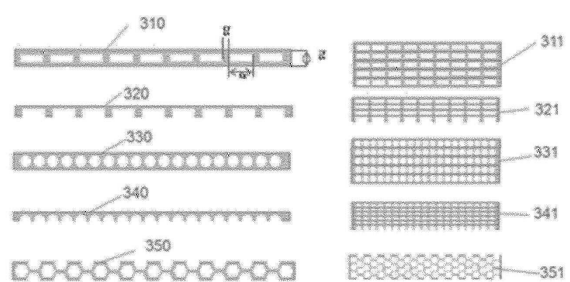
도면2



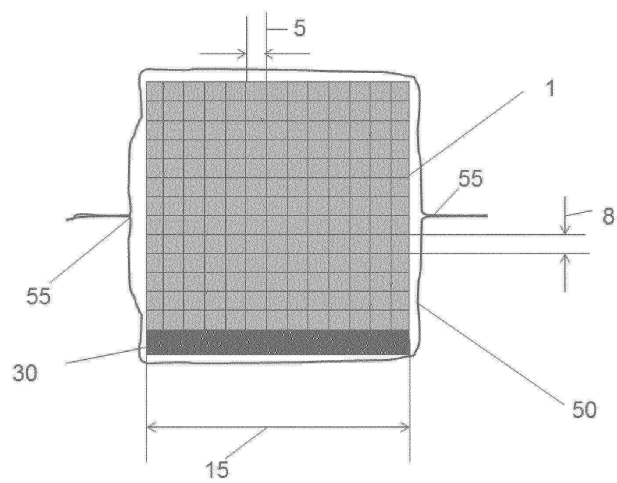
도면3



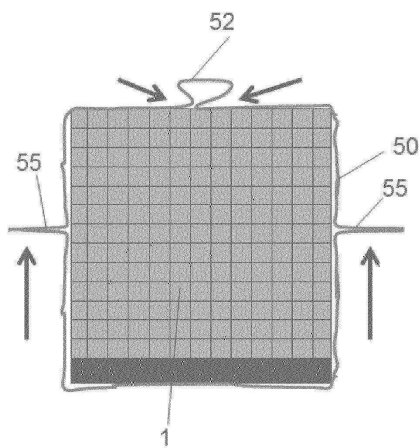
도면4



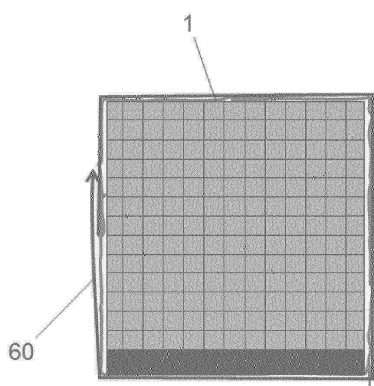
도면5



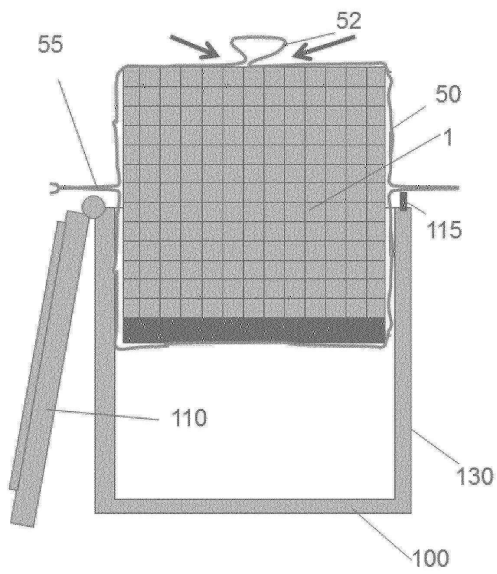
도면6



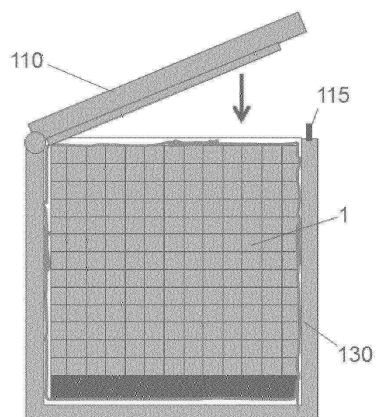
도면7



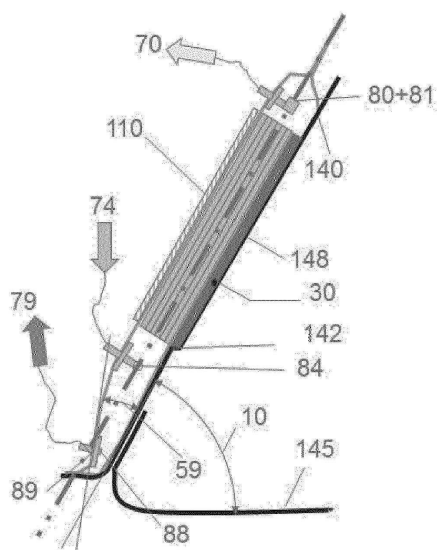
도면8



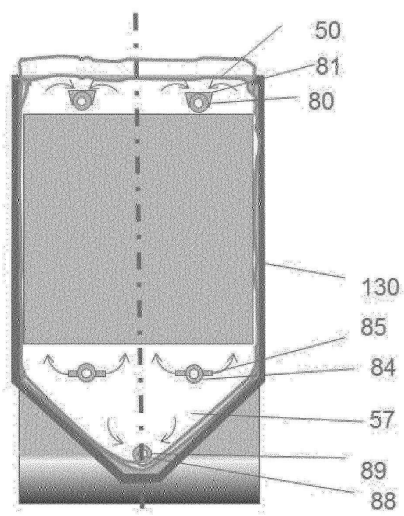
도면9



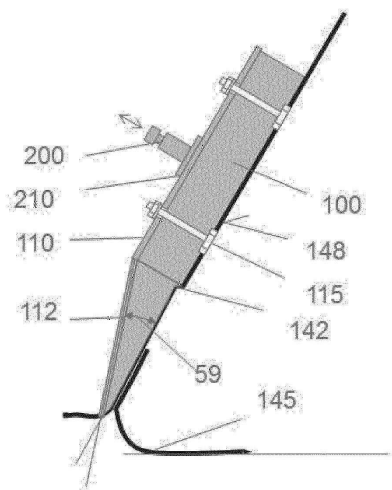
도면10



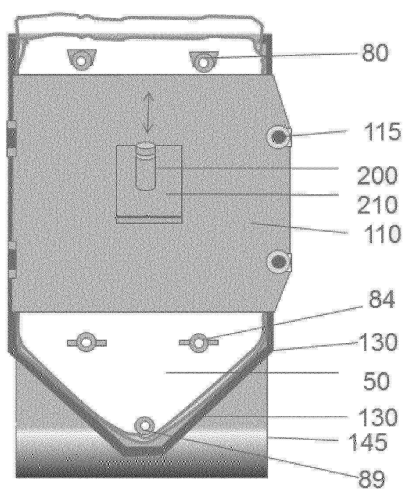
도면11



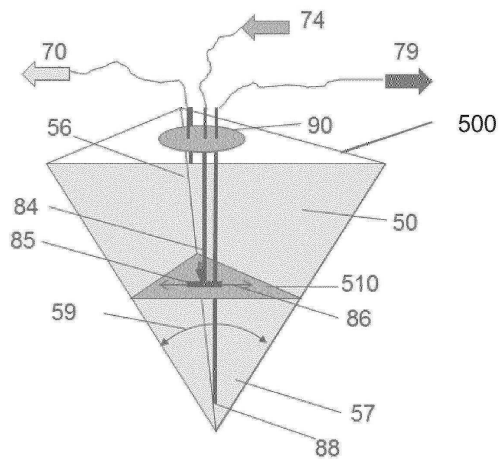
도면12



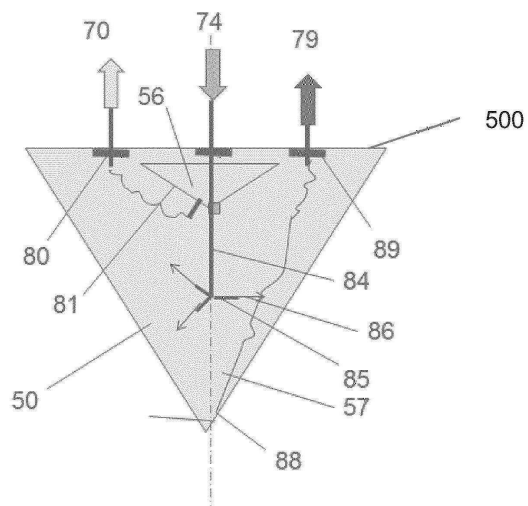
도면13



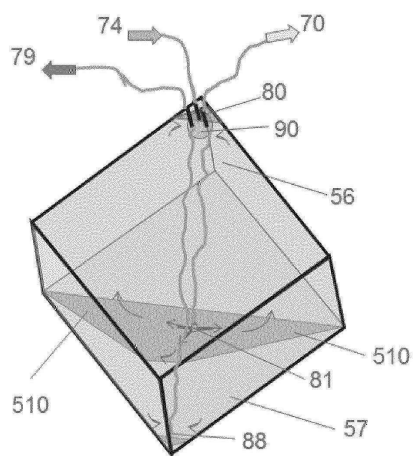
도면14



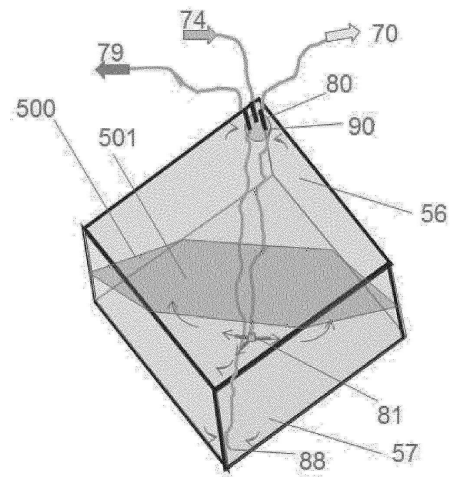
도면15



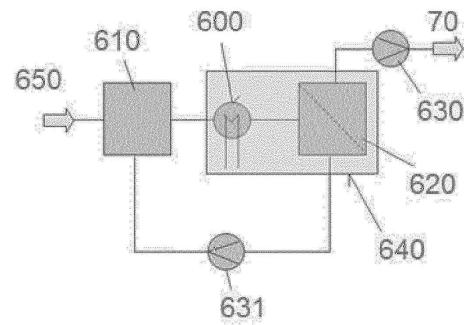
도면16



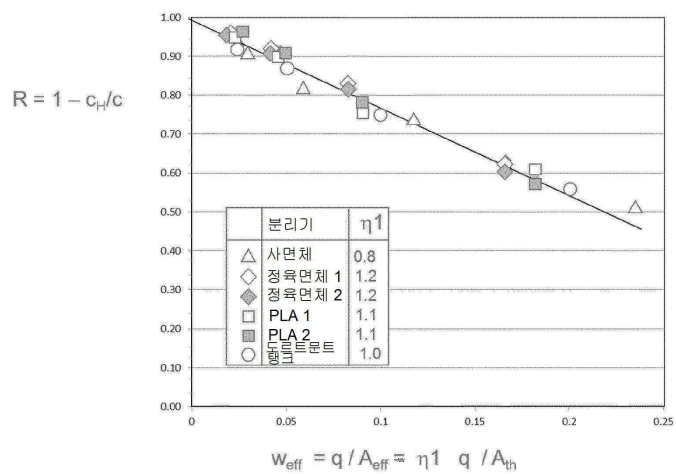
도면17



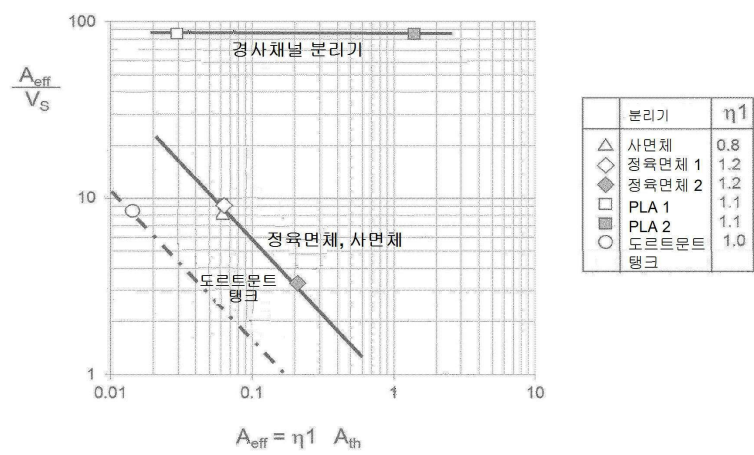
도면18



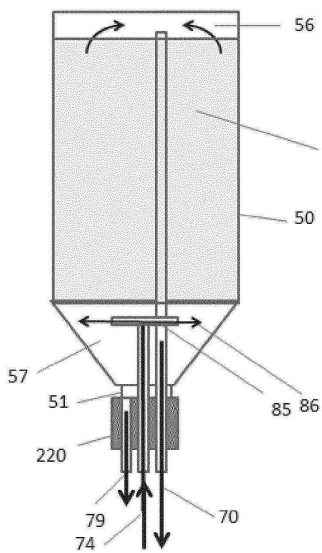
도면19



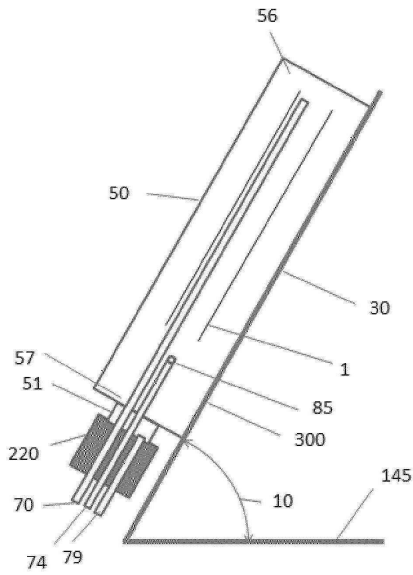
도면20



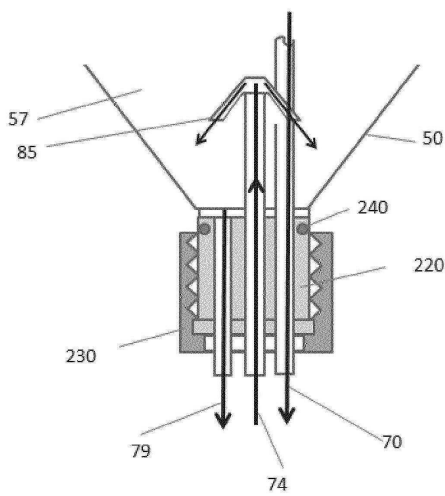
도면21



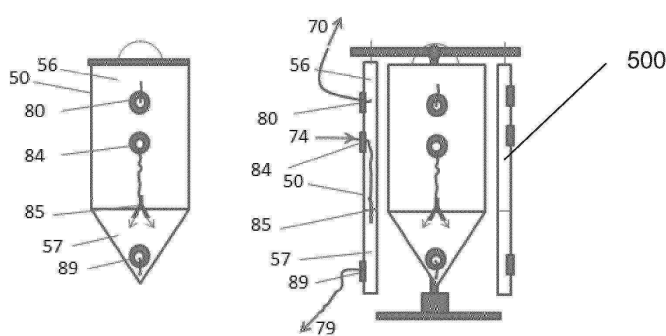
도면22



도면23



도면24



도면25

