Einweg-Flaschenreaktortank

Gegenstand der Anmeldung ist ein als Einwegelement ausgeführter Reaktortank mit Deckel und / oder im Innenraum befestigte opto-elektronisch lesbare Sensorpatche, ein Reaktor umfassen den Reaktortank und eine Reaktortankaufnahmeperipherie umfassend eine Reaktortankhalterung und ggf. ein opto-elektronisches Messsystem zum Ablesen der Sensorpatche, wobei die Reaktortankhalterung an eine Antriebseinheit zur Erzeugung einer rotatorisch-oszillierenden Bewegung des Reaktortanks um eigene mittlere vertikale Achse gekoppelt ist, sowie die Verwendung dieser Vorrichtung zur Kultivierung von Zellen und/oder Mikroorganismen.

Bei der stark regulierten pharmazeutischen Produktion entfällt ein großer zeitlicher, technischer und personeller Aufwand auf die Bereitstellung gereinigter und sterilisierter Bioreaktoren. Um Kreuzkontaminationen bei einem Produktwechsel in einer Multi-Purpose-Anlage oder zwischen zwei Produktchargen sicher zu vermeiden, wird außer der Reinigung eine sehr aufwändige Reinigungsvalidierung benötigt, welche bei einer Prozessadaption ggf. wiederholt werden muss.

Dies gilt sowohl für das Upstream-Processing USP, d.h. die Herstellung biologischer Produkte in Fermentern als auch für das Downstream-Processing DSP, d.h. die Aufreinigung der Fermentationsprodukte.

Im USP und DSP kommen dabei häufig Kessel als Rühr- und Reaktionssysteme zum Einsatz. Gerade bei der Fermentation ist eine keimfreie Umgebung für eine erfolgreiche Kultivierung essentiell. Zur Sterilisation von Batch- oder Fed-Batch-Fermentern kommt in der Regel die SIP-Technik zum Einsatz (SIP = steam-in-place). Um bei kontinuierlicher Prozessführung eine ausreichende Langzeitsterilität zu gewährleisten wird auch die Autoklaviertechnik genutzt, die allerdings einen umständlichen Transport der Reaktoren zum Autoklaven erfordert und nur in vergleichsweise kleinen Reaktormaßstäben anwendbar ist. Die Gefahr der Kontamination während der Fermentation ist besonders kritisch bei der Probenahme und an bewegten Rührerwellen. Letztere sind in der Regel mit aufwändigen Dichtungssystemen (z.B.: Gleitringdichtungen) ausgestattet. Technologien, die ohne solche Durchdringungen der Fermentationshülle auskommen, werden wegen ihrer größeren Prozessrobustheit bevorzugt.

Der durch die Bereitstellungsprozeduren bedingte Nutzungsausfall der Standardreaktoren kann insbesondere bei kurzen Nutzungsperioden und häufigem Produktwechsel in der Größenordnung der Reaktorverfügbarkeit liegen. Betroffen sind im USP der biotechnologischen Produktion z.B. die Prozessschritte der Medienherstellung und Fermentation und im DSP das Solubilisieren, Einfrieren, Auftauen, pH-Adjustieren, Fällen, Kristallisieren, das Umpuffern und die Virusinaktivierung.

Um der Forderung an ein schnelles und flexibles Neubeschicken der Produktionsanlage unter Wahrung maximaler Sauberkeit und Sterilität gerecht zu werden, erfreuen sich auf dem Markt Konzepte für Einwegreaktoren eines ständig wachsenden Interesses.

In WO2007/121958A1 und WO2010/127689 ist ein solcher Einwegreaktor für die Kultivierung von Zellen und Mikroorganismen beschrieben. Er besteht in einer bevorzugten Ausführungsform aus einem stabilen, vorzugsweise mehrlagigen Polymerwerkstoffbeutel. Der verformbare Einwegreaktor wird von einem Behälter aufgenommen, der ihn stützt. Dabei wird er bevorzugt von vorne in den Behälter eingeführt. Der Behälter ist mit einer Antriebseinheit verbunden. Durch die Antriebseinheit wird der Behälter inklusive des Einwegreaktors in eine rotatorisch-oszillierende Bewegung um eine ortsfeste, vorzugsweise vertikale Achse des Behälters versetzt. Durch eine eckige Ausführungsform des Einwegreaktors und/oder Einbauten im Einwegreaktor kann bei der oszillatorisch rotierenden Bewegung ein hoher Leistungseintrag in den Reaktorinhalt erreicht werden, so dass der Einwegreaktor als oberflächenbegaster Fermenter zur Kultivierung von Zellen und Mikroorganismen eingesetzt werden kann. Die Einbauten zur Versorgung und Überwachung des Reaktors werden seitlich am Boden des Reaktors über eine Anschlussplatte angebracht. Diese Reaktoren werden überwiegend bei Reaktorvolumen von mehr als 10 L eingesetzt.

Für kleinere Reaktorvolumen ist die Produktion eines Reaktorbeutels samt passendem Behälter zu aufwändig.

Die Herausforderung liegt in kleinen Einwegreaktoren darin, die Sensorik, die Mischtechnik, die Temperierung und Versorgung des Reaktors in einer möglich kompakten und kostengünstigen Form zu erreichen.

Kleine gerührte Einwegreaktoren sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Sartorius Stedim Biotech bietet mit ihrem Universel® SU (http://www.sartorius-stedim.com/Biotechnology/Fermentation_Technologies/Reusable_Bioreactors/Data_Sheets/Data_UniVessel_SU_SBI2033-e.pdf) einen gerührten Einwegreaktor, bei dem der Reaktortank zylindrisch ist. Der Einwegreaktor verfügt für das Durchmischen über einen Rührer und für die Gasversorgung von unten über einen L-Sparger unter dem Rührer. Über dem Deckel wird der Antrieb des Rührers über eine von oben getriebene Antriebsachse, die Sensorik (Temperatur, pH (chem.), Sauerstoff (chem.)), die Gasver- und Gasentsorgung für den Gasraum, sowie weitere Versorgung sowie Probeentnahme über Leitungen gewährleistet. Der Deckel wird mittels Clamp-Verbindung an den Reaktortank befestigt und per O-Ring gegen den Reaktortank steril abgedichtet. Der Rührerantrieb wird mit 2 Lippendichtungen abgedichtet. Die Sensorik für die Überwachung

von pH und Sauerstoffgehalt kann auch mittels optoelektronischen Sensorpatche am Boden des Reaktortanks erreicht werden. Für den Betrieb wird der Reaktortank in einem speziellen Behälter fest positioniert, wobei dieser Behälter über einen Halterungsring und einen Fuß mit einem optoelektronischen Sensorsystem zum Ablesen der Sensorpatche verfügt.

Der Nachteil dieses bzw. ähnlicher im Markt verfügbarer Reaktorsysteme liegt darin, dass diese gerührten Systeme bewegte Einbauten sowie ein aufwändiges, steriles Dichtungssystem im Deckel erfordern und infolge der hohen Scherkräfte für die Kultivierung von sehr empfindlichen Zellen, wie z.B. Stammzellen, wenig geeignet sind.

Es stellt sich ausgehend vom Stand der Technik die Aufgabe, ein scherarmes System zur Durchführung von Prozessen mit hohen Anforderungen an Reinheit und Sterilität bereitzustellen, das den zeitlichen, technischen und personellen Aufwand auf die Bereitstellung gereinigter und sterilisierter Komponenten reduziert. Das System soll für Prozessvolumina von 10 mL bis 20 L insbesondere 50 mL bis 10 L und besonders bevorzugt 250 mL bis 3 L Arbeitsvolumen verwendbar sein. Es soll den hohen Anforderungen der pharmazeutischen Industrie gerecht werden, einfach und intuitiv handzuhaben und kostengünstig sein. Es soll Sicherheitsrisiken durch das Austreten von Stoffen aus dem Prozessraum auf ein Minimum reduzieren. Es soll eine ausreichende Durchmischung des Reaktorinhalts ermöglichen, für die Kultivierung von Mikroorganismen und Zellkulturen geeignet sein und hierbei für eine ausreichende Ver- und Entsorgung des Kulturmediums mit flüssigen Nährmedien und insbesondere gasförmigen Stoffen sorgen. Es soll für die Prozessentwicklung ebenso geeignet sein wie für die Herstellung von Zellprodukten, insbklinischer Zellprodukte wie. Z. B. menschliche oder tierische Körperzellen: Stammzellen, Blutzellen, Leukozyten wie z. B. natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Gewebezellen oder pharmazeutischer Wirkstoffe wie z.B. monoklonale Antikörper, Proteine, Enzyme in Bioreaktoren.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Verwendung einer formstabilen, eckigen Kunststoffflasche zur Abgrenzung des Reaktorinnenraums gelöst, wobei die Kunststoffflasche einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen Zugang zum Innenraum aufweist und bevorzugt einen pyramidalen, nach innen gewölbten Boden, einen breiten Hals und/oder einen oder mehrere seitlich im unteren Bereich der Flasche an einer mit Koordinaten definierten Stelle angebrachte Sensorpatche aufweist. .

Erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung einer formstabile eckige Kunststoffflasche als Bioreaktortank für die Kultivierung von Zellen, insbesondere empfindlicher Zellen und auf (Mikro)träger wachsender Zellen wie z.B. Stamm, Blut- oder Gewebezellen, wobei die Kunststoffflasche einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen verschließbaren

Zugang zum Innenraum insbesondere einen Flaschenhals aufweist. Üblicherweise sind im Innenraum der Kunststoffflasche an einer oder mehreren Wänden im unteren Bereich, an einer mit Koordinaten definierten Stelle, einen oder mehrere Sensorpatche angebracht.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reaktortank umfassend eine formstabile eckige Kunststoffflasche, die einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen verschließbaren Zugang zum Innenraum aufweist, umfassend mindestens einen Flaschenhals insb. verschließbar durch einen Deckel und/oder mindestens eine Durchführung, wobei im Innenraum, an einem oder mehreren Wänden im unteren Bereich der Kunststoffflasche, an einer mit Koordinaten definierten Stelle, ein oder mehrere Sensorpatche angebracht sind. Vorzugsweise werden Durchführungen im Deckel untergebracht.

Im Markt sind trägerfixierte, aus fluoreszierenden Farbschichten aufgebaute Sensorpatche verfügbar (z.B. Fa. Presens, Fa. YSI), die z.B. auf Flaschenwand aufgeklebt werden können. Üblicherweise werden mindestens einen pH-Sensorpatch und einen Sauerstoff-Sensorpatch verwendet.

Alternativ weist der Reaktortank bzw. Bioreaktor an einer Flaschenwand oder in dem Deckel, bevorzugt in dem Deckel, Durchführungen für elektrochemische Sensoren, bevorzugt Einwegsensoren z.B. nach US 20120067724 A1, auf.

Damit der Reaktor die Sterilitätsanforderungen der pharmazeutischen Industrie erfüllen kann, wird die Kunststoffflasche üblicherweise aus einem gamma-sterilisierbaren Kunststoffmaterial hergestellt. Der erfindungsgemäße Reaktortank ist vorzugsweise aus einem ein- oder mehrlagigen durchsichtigen Polymermaterial ausgeführt, dass Einblick in den Reaktortank während des Betriebs ermöglicht.

Kunststoffe oder Glas sind ein vergleichsweise kostengünstige Materialien, das sich auch vergleichsweise kostengünstig verarbeiten lassen. Die Entsorgung des gebrauchten Reaktortanks und die Verwendung eines neuen Einwegreaktortanks sind damit wirtschaftlicher als die Reinigung von gebrauchten Reaktortanken, insbesondere da bei der Verwendung eines neuen Einwegreaktortanks eine aufwändige Reinigung und Reinigungsvalidierung entfällt. Der erfindungsgemäße Reaktortank wird im Reinraum hergestellt oder gereinigt und ist vorzugsweise steril verpackt.

Der erfindungsgemäße Reaktortank ist formstabil. Als Materialien oder Materialkombination für den erfindungsgemäßen Reaktortank eignen sich alle zellbiologisch kompatiblen, dem Fachmann bekannte Materialien, insbesondere Glas, Polyethylen, Polypropylen, Polyetherketon (Peek), PVC, Polyethylenterephthalat und Polycarbonat. Wandstärken von 0,1mm-5mm werden bevorzugt und von 0.5 – 2mm besonders bevorzugt.

Die Flaschenmaterialien werden üblicherweise mittels aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren des Streckblasens in der gewünschten Form gebracht.

Der Querschnitt des Reaktortanks bzw. der Kunststoffflasche weist vorzugsweise die Form eines n-Ecks mit n im Bereich von 3 bis 12 auf, bevorzugt im Bereich von 3 bis 6, ganz besonders bevorzugt im Bereich 3 bis 4, am meisten bevorzugt ist n gleich 4.

Vorzugsweise sind die Seitenwände des erfindungsgemäßen Reaktortanks bzw. der Kunststoffflasche zumindest teilweise als ebene Flächen ausgebildet, die in einem Winkel von 45° bis 120° aufeinandertreffen. Bevorzugt bilden die Seitenwände des Reaktors einen Polyeder, wobei der Flaschenhals auf einer der Fläche angebracht ist.

Bevorzugt ist der Reaktortank bzw. die Kunststoffflasche quaderförmig mit Kantenlängen H, b und c, wobei H die Höhe, b die Breite und c die Tiefe der Kunststoffflasche darstellen und $b \leq c \leq H$. Der breite Hals ist typischerweise auf einer der kleinen Flächen angebracht und die dieser gegenüberliegenden Fläche dient als Boden des Reaktortanks. Der erfindungsgemäße Reaktortank bzw. die Kunststoffflasche weisen ein Verhältnis von Flaschenhöhe H zur maximalen Breite b und Tiefe c im Bereich von 0,5 bis 4, bevorzugt 1 bis 3, besonders bevorzugt 1.5 bis 2.5 auf. In der bevorzugten Ausführungsform weist der Reaktortank eine quadratische Flaschenquerschnittkantenlänge a=c=D auf.

Für eine bessere Durchmischung des Reaktors und ein verringertes Startvolumen weist der Reaktortank bzw. die Kunststoffflasche üblicherweise einen nach innen gewölbten Boden auf. Für die Gestaltung des Bodens wird die Lehre aus WO2010/127689 per Referenz integriert. Der Boden weist insbesondere die Form eines nach innen gerichteten Tetraeders, einer nach innen gerichteten Pyramide, die Form eines Paraboloids oder eine Glockenform auf.–Besonders bevorzugt ist der Boden pyramidal ausgeführt. Die Höhe h_w der Wölbung liegt im Bereich des 0,01-fachen bis 1-fachen des kreisäquivalenten Durchmessers D_k des Bodenquerschnitts. Bevorzugt liegt die Höhe h_w der Wölbung zum kreisäquivalenten Durchmesser D_k im Bereich von 3% bis 100%, besonders bevorzugt im Bereich von 5% bis 30% und ganz besonders bevorzugt im Bereich von 10% bis 20%.

Der erfindungsgemäße Reaktortank kann über seine Außenwände beheizt und/oder gekühlt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird auf der Außenseite des Bodens der Kunststoffflasche bzw. des Reaktortanks eine Einweg-Heizmatte aufgebracht, mit der wegen der formschlüssigen Verbindung von Heiz- und Mantelfläche ein sehr effizienter Wärmetransport erreicht werden kann. Auf diese Weise kann die Heizfläche auf die Bodenfläche reduziert werden. .Dazu wird diese Heizmatte üblicherweise auf die Außenseite des Bodens aufgeklebt. In der Regel bedarf der Reaktortank keiner zusätzlichen Kühlung, da ein Ausschalten der Heizmatte bei Reaktoren mit kleinem Volumen und somit großer spezifischer Wärmeaustauschfläche eine ausreichend schnelle Abkühlung herbeiführt. Eine zusätzliche Kühlung wäre z.B. bei microbiellen Anwendungen bei niedrigerer Fermentationstemperatur und höhere Respirationswärme durch Anbringung von Peltierelementen auf den Seitenflächen des Reaktortanks oder des Tankhalters im Bedarfsfall anwendbar.

Der erfindungsgemäße Reaktortank stellt vorzugsweise einen nach außen abdichtbaren Raum für die Durchführung von chemischen, biologischen, biochemischen und/oder physikalischen Prozessen dar. Insbesondere dient der Reaktortank der Bereitstellung eines sterilen Raumes zur Kultivierung von Zellen und/oder Mikroorganismen. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktortanks wird hierfür der Flaschenhals des Reaktortanks mittels eines Deckels dicht verschlossen, wobei der Deckel mindestens über Durchführungen und / oder Anschlüsse für die Gas- und Flüssigkeitsversorgung und –abfuhr des Reaktortanks verfügt. Erfindungsgemäß weist der Deckel keine Durchführung für eine Antriebsachse auf [Fig. 2-5]. Der Deckel ist ein weiteres Element des erfindungsgemäßen Reaktortanks. Vorzugsweise werden die angeschlossenen Gasleitungen mit Sterilfiltern ausgestattet, wobei der Sterilfilter der Abgasleitung vorzugsweise mit einer Heizmatte ausgestattet ist, um Kondensat von den Filterflächen fernzuhalten. Alternativ kann das Abgas zur Kondensatvermeidung am Filter mit einen Abgaskühler , der z.B. über ein elektronisches Kühlelement (z.B. ein Peltierelement), das auf einer aus Folienmaterialien hergestellten Wärmeübertragungsfläche aufgebracht ist, auf einen niedrigeren Taupunkt (Kondensationstemperatur < Umgebungstemperatur) heruntergekühlt werden

Weiterhin kann der Deckel nach Bedarf weitere Durchführungen und / oder Anschlüsse für Elemente aus der Gruppe umfassend:

- einen oder mehrere elektronische, optoelektronische oder elektrochemische Sensoren, insbesondere einwegelektrochemische Sensoren aus US 2012/0067724 A1 oder PT100 – Widerständesensor zur Temperaturkontrolle und / oder kapazitive Sensoren zur Füllstandskontrolle oder zur Zelldichtemessung,
- einen internen Zellabscheider und / oder
- ein Probennahmesystem

aufweisen.

Der Reaktortank ist entsprechend je nach Anwendung mit einem oder mehreren dieser Elemente ausgestattet.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung setzt sich der Deckel aus einem Stopfen und einer Überwurfhülse zusammen. Der Stopfen wird üblicherweise aus Kunststoff ausgewählt aus der Gruppe der Polyetheretherketone, Thermoplast oder Silikon hergestellt. Üblicherweise ist der Stopfen als Einweg-Stopfen, in einer besonderen Ausführungsform auch wiederverwendbar ausgeführt.

Bevorzugt wird der Stopfen in den Hals des Reaktors zur Schließung eingeführt, mittels einer auf dem Umfang angebrachten O-Ringdichtung gegen die innere Seite des Flaschenhals gedichtet und mit einer separaten Arretiermittel wie z. B. eine verschraubbare Überwurfmutter an das Gewinde des Flaschenhals angeschraubt oder mit einem Klemmring verklemmt. Alternativ kann der in den Flaschenhals eingeführte Stopfen mittels einer auf der Flaschenöffnung aufgelegten Dichtlippe abgedichtet und mit einer separaten verschraubbaren Überwurfhülse verklemmt und an der Kunststoffflasche angeschraubt werden. Eine weitere Alternative ist ein Deckel, der die identischen Durchführungen wie der Stopfen enthält, welcher an der Kunststoffflasche angeschraubt wird und mit einem O-Ring gegen die Flaschenhals und/oder die Flaschenöffnung abgedichtet wird. Bevorzugt wird der in den Flaschenhals gesteckte Stopfen verwendet, welcher mit O-Ringdichtung am Flaschenhals gedichtet und mit einer separaten verschraubbaren Überwurfmutter an der Kunststoffflasche festgeschraubt wird [Fig. 2]. Diese Ausführungsform hat den Vorteil, dass der O-Ring mechanisch gering beansprucht wird und keine Verdrillung der Schlauchleitung auftritt, wie es bei dem Drehen eines Deckels der Fall wäre.

Der Reaktortank samt Deckel ist vorzugsweise als Einwegelement ausgeführt, d.h. es ist vorzugsweise vorgesehen, den kompletten Reaktortank nach der Verwendung nicht zu reinigen, sondern zu entsorgen. Daher umfasst der Reaktortank vorzugsweise nur die wesentlichen Elemente, die zur Bereitstellung eines sterilen Reaktionsraumes notwendig sind:
Die Kunststoffflasche wird üblicherweise als Einwegartikel produziert und verwendet.

Für die Kultivierung empfindlicher Zellen bzw. Herstellung von klinischen Zellprodukten erfolgt die Begasung vorzugsweise ausschließlich über die Oberfläche. In diesem Fall weist der Deckel keine Durchführung für ein Blasenbegasungselement auf und der erfindungsgemäße Reaktortank weist keine Einbauten für die Blasenbegasung auf. Für Anwendungen im Rahmen der Prozessentwicklung mit dem Fokus der Maßstabsübertragung auf Großfermenter, für Perfusionsverfahren mit hohen Zelldichten oder für mikrobielle Prozesse kann ein Einbau für eine zusätzliche Mikro- oder Macrobegasung (z.B. mit Schlauchleitungen von oben über den Deckel versorgte und an eine Behälterwand angeklebte Sinterkörper) vorgesehen werden.

Bevorzugter Weise lässt sich der erfindungsgemäßen Reaktor vollständig aus preiswerten Elementen herstellen und ermöglicht hiermit die Verwendung des Reaktors als Einwegsystem. Alternativ werden alle hochwertigen Elemente in einen wiederverwendbaren Deckel integriert und der lediglich der Reaktortank wird als Einwegelement verwendet.

In einer besonderen Ausführungsform des Reaktors wird zur Zellrückhaltung ein Zellabscheider in dem Reaktortank verwendet. Erfindungsgemäß wird der interne Zellabscheider gebildet durch ein zentrales vertikales Abscheiderrohr und einen Abscheiderkopf mit einem Sammler zum Absaugen von Zellen befreiter Kulturlösung, wobei der Deckel eine Durchführung für den Sammler aufweist und der Zellabscheider am Deckel entweder drehbar gelagert oder statisch befestigt ist. Das Rohr und der Abscheiderkopf können unterschiedlichen Längen, Geometrie (konisch und gerade) und Durchmessern sowie diversen Rohreinbauten (Kegel- und Ringeinbauten, Gleichrichter aufweisen. Besondere Ausführungsformen sind in Fig. 6 bis 8 dargestellt. Der Zellabscheider kann aus Stahl, Glas oder Kunststoff hergestellt sein. Vorzugsweise wird er aus Kunststoff wie z. B. Polyethylen, Polypropylen, Polyethylenterephthalat, Polyetherketon und/oder Polycarbonat hergestellt und als Einwegelement verwendet.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein interner vertikaler Zellabscheider für Bioreaktoren, gebildet durch ein zentrales vertikales Abscheiderrohr und einen Abscheiderkopf mit einem Sammler zum Absaugen von zellenbefreiten Medium, wobei der Zellabscheider am einem Deckel für einen Reaktortank befestigt oder drehbar gelagert ist und der Deckel eine Durchführung für den Sammler aufweist.

Wird ein Zellabscheider verwendet, weist der Reaktortank üblicherweise einen breiten Hals auf, damit der vorgefertigten an den Deckel befestigten Zellabscheider durch den Flaschenhals eingeführt werden kann. Ist der Zellabscheider bewegbar an den Deckel befestigt (=drehbar gelagert), wird er von der Drehbewegung des Reaktortanks aufgrund seiner Massenträgheit nur minimal beeinflusst. Dadurch lassen sich die vom Abscheider in den Sedimentationsraum übertragenen und den Sedimentationsvorgang störenden Umwälzströmungen vermeiden, und die Rückhaltung erheblich verbessern, wie in Fig. 10 gezeigt.

Der Zellabscheider wird bevorzugt so konzipiert, dass Innen- und Außenbereich des Zellabscheiders durch entsprechende Verengungen weitgehend voneinander getrennt sind. Auf diese Weise soll eine Übertragung der die Sedimentation störenden Strömungen aus dem gut durchmischten Außenraum in die Sedimentationszone vermindert werden. Mit anderen Worten soll das Innenvolumen des Zellabscheiders von Strömungen im Außenvolumen (=Kulturvolumen) so wenig wie möglich

beeinflusst werden, wobei jedoch ein Rücktransport des zurückgehaltenen Zellen in den durchmischten, versorgten Reaktorbereich gewährleistet bleiben muss

Bevorzugt weist der interne Zellabscheider für einen Reaktortank mit den Dimensionen Querschnittkantenlänge D=120 mm, H=235 mm ein Abscheiderrohr (310) mit einer Abscheiderlänge l (370) von 40 mm bis 200 mm, insbesondere von 90 bis 190 mm, bevorzugt 190 mm auf (Fig. 6 und 7). Generell wird ein Verhältnis l/H von 0,2 bis 0,9, bevorzugt 0,5 bis 0,9 insbesondere 0,8 verwendet.

Das Abscheiderrohr weist einen runden Querschnitt mit einem Rohrdurchmesser d (350) auf, wobei das Verhältnis von Rohrdurchmesser d zum Flaschenquerschnittkantenlänge D üblicherweise von 0,25 bis 0,90 insbesondere von 0,5 bis 0,85, bevorzugt 0,83 beträgt. Der Rohrdurchmesser d ist für die Zellrückhaltung wesentlich zur Realisierung der Abscheiderfläche.

Es wird bevorzugt, den Flaschenhals- und die Zellabscheiderquerschnitte so auszuwählen, dass der Zellabscheider mühelos in die Flasche eingeführt werden kann. Dies ist insbesondere dann notwendig, wenn ein wiederverwendbarer, autoklavierbarer Deckel verwendet werden soll, der unter der Cleanbench mit dem γ-steriliserten Reaktortank verbunden werden soll.

In einer ersten Ausführungsform des Bioreaktors erfolgt die Begasung ausschließlich über die Oberfläche (Fig. 6 und 7). Hierfür wird der Rohrdurchmesser d (350) des Abscheiders so ausgewählt, dass ein Verhältnis von über die Oberflächen begasten Kulturvolumen V_K definiert durch Formel (I) und Abscheidervolumen V_A definiert durch Formel (II) von 0.01 bis 10 bevorzugt von 0.2 bis 2 vorhanden ist.

$$V_K = D^2 * L - \frac{\pi}{4} d^2 (L - S) \qquad \text{(I)}$$

$$V_A = \frac{\pi}{4} d^2 l \qquad \text{(II)}$$

Weitere Parameter des Zellabscheiders sind die Abscheidefläche (=Klärfläche) A definiert als $A = \frac{\pi}{4} d^2$ (III) sowie die Klärflächenbelastung v=q/A, wobei q der Erntestrom ist.

Am Abscheiderkopf befindet sich der Sammler (320) zum Absaugen von zellenfreier Kulturlösung. Üblicherweise beträgt das Verhältnis dv/d des Sammlerdurchmessers dv (360) zum Rohrdurchmesser d 0,1 bis 0,7 bevorzugt 0.3-0.5 auf

Vorzugsweise weist der Sammler (320) eine konische Form auf. Diese Form hat den Vorteil, dass mehr Platz für die Einführung von weiteren Elementen (Sensoren, Probenaufnahmeleitung, usw.) über den Deckel verfügbar ist. Ebenfalls wird die Begasungsfläche geringfügiger reduziert.

Vorzugsweise wird der Abscheider im Reaktortank mit einem Verhältnis l/s von der Abscheiderlänge l zum Bodenabstand s des Abscheiderohres von 0,75 bis 9 verwendet.

Auf Einbauten in das Abscheiderrohr und Sammler (320) wird im Zellenabscheider bevorzugt verzichtet.

In hydrodynamischen Untersuchungen mit dem Modelpartikel PAN-X wurde ein an den Deckel statisch eingebautes Rohr mit unterschiedlichen Rohrlängen, Geometrie (konischer / gerader Kopf) und Durchmessern sowie diversen Rohreinbauten (Kegel- und Ringeinbauten, Gleichrichter usw.) untersucht. Nach den bisher vorliegenden Experimenten weist der statisch eingebaute (=mitdrehende) , interne Zellabscheider für Feststoffe im Bereich der Klärflächenbelastung v von $0{,}025 < v\ [m/h] < 0{,}2$ bei einem Leistungseintrag P/V_K von 3 W/m3 einen vergleichbaren Rückhaltegrad wie statische externe Systeme auf (z.B. Plattenabscheider, Dortmundbrunnen) auf (Fig. 13).

Insbesondere ist der erfindungsgemäße Zellenabscheider für die Kultur von gut sedimentierbaren Partikeln, wie z. B. Träger-fixierten Zellen anwendbar, die je nach Sinkgeschwindigkeit der Trägermaterialien in erheblich höheren Leistungseintragsbereichen P/V_K von > >3W/m3 einsetzbar ist.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung weist der erfindungsgemäße Reaktor außerdem ein automatisches Probennahmeelement auf.

In einer ersten Ausführungsform besteht das Probennahmeelement aus einer Aufnahmeleitung, die durch den Deckel durchgeführt wird (=Deckelprobennahmeelement, siehe Fig 10). Außerhalb des Reaktors kann die Leitung mittels Klammern und Quetschventilen abgesperrt werden. Über ein angrenzendes Y-Stück, erfolgen einerseits die vertikale Ansaugung der Probe aus dem Fermenter mittels Unterdruck und der anschließende Transport zur Probenvorbereitungsstation mittels Überdruck. Dieses Y-förmige Probenentnahmeelement ist für die Realisierung eines automatischen Probenahmemoduls bestehend aus Schlauchleitungen, Quetschventilen, Sterilfiltern, einer Über- und Unterdruckversorgung besonders vorteilhaft. Üblicherweise werden kommerziell verfügbare Leitungen, Ventile und Y-Stücke aus Kunststoff verwendet, so dass das in den Deckel integrierbare Probennahmeelement als Einwegelement bereitgestellt und eingesetzt wird. Das Grundprinzip des Y-förmige Probenentnahmeelement ist in WO 2007/121887 dargestellt, und wird per Referenz integriert, in dem zwei Büretten angesteuert werden, um den Transport und die Aliquotierung einer Probe zu gewährleisten. Nach der Probenentnahme wird das Probennahmeelement mit EtOH sterilisiert und getrocknet. Vorzugweise werden Filterelemente für Luft und EtOH eingebaut, um die Kontamination des Probenentnahmenelements zu verhindert. Vorzugsweise wird das Probennahmeelement mit der BayChromat-Platform zur automatisierten Analyse der Bayer Technology Services GmbH gekoppelt.

In einer weiteren Ausführungsform weist der Reaktortank an einer Flaschenwand insbesondere an der den Sensoren (Sensorpatch oder elektrochemische Sensoren) gegenüberliegenden Wand, eine Durchführung und/oder einen Anschluss im bodennahen Bereich für die Anbringung eines Probennahmesystems auf. Beispiele für Durchführungen und oder Einbringungen sind u.a. genormte Ingoldstutzen - oder PG13,5-Gewindestutzen. Ein geeignetes Probennahmesystem ist z. B. in DE102008033286 A1 beschrieben.

Das Durchmischen innerhalb des erfindungsgemäßen Reaktortanks erfolgt durch eine periodisch richtungswechselnde Rotation des Reaktortanks, die in Kombination mit der eckigen Form der Kunststoffflasche nach innen gerichtete wellenförmige Strömungen an die Oberfläche des Reaktorinhalts verursacht. Für die Gestaltung der Reaktorbewegung wird die Lehre aus WO2010/127689 per Referenz integriert.

Alle übrigen Elemente, die zum Betrieb eines Reaktors, insbesondere zur Kultivierung von Zellen und/oder Mikroorganismen benötigt werden, insbesondere eine Antriebseinheit zur Erzeugung der periodisch richtungswechselnde Rotation des Reaktortanks und optoelektronische Sensorsystem zum Ablesen der Sensorpatche werden durch eine Peripherie bereitgestellt und sind wiederwendbar. Der Reaktor, der im Stand der Technik üblicherweise eine zusammenhängende Einheit darstellt, wird also im vorliegenden Fall vorzugsweise in separate Teile aufgeteilt, die ihren Funktionen gemäß gestaltet sind.

Ein weiteres Element des erfindungsgemäßen Reaktors stellt daher die Peripherie dar. Insbesondere wird als Peripherie eine Reaktortankaufnahmeperipherie eingesetzt, die eine oder mehrere Reaktortankhalterungen aufweist, wobei der Reaktortank und die Reaktortankhalterung als separate Teile eines Gesamtsystems dabei so aufeinander angepasst sind, dass der Reaktortank in die Reaktortankhalterung eingebracht bzw. insbesondere dort eingeklemmt werden kann und von dieser im flüssigkeitsgefüllten Zustand gestützt wird.

Die Reaktortankaufnahmeperipherie zur Aufnahme eines erfindungsgemäßen Reaktortanks ist ein weiteres Element des erfindungsgemäßen Reaktors und umfasst mindestens:

- Ein oder mehrere Reaktortankhalterungen zur Aufnahme jeweils eines Reaktortanks umfassend eine auf dem Reaktortank angepasste Stellfläche und ein oder mehrere seitliche Befestigungselemente. Beispielsweise weist die Reaktortankhalterung eine Stellplatte und seitliche Klemmarme bzw. –flächen auf.
- Verbunden mit dem Reaktortankhalterungen, insbesondere mit der Stellfläche der Reaktortankhalterungen, ist eine Antriebseinheit zur Durchführung einer periodisch richtungswechselnde Rotationsbewegung, wie Z. B ein Schrittmotor. Vorzugsweise

wird ein Schrittmotor ohne Getriebe mit direkter Kopplung des Motors und des Antriebes eingesetzt. Durch die Antriebseinheit kann der Reaktortank um seine ortsfeste, vertikale Achse in einer periodisch richtungswechselnde Rotationsbewegung versetzt werden, so dass eine direkte Koppelung der Antriebseinheit mit dem Reaktortank selbst nicht erforderlich ist. Vorzugsweise wird für die Realisierung der Reaktorbewegung ein Schrittmotor ohne Getriebe verwendet. Eine solche Anordnung besitzt den Vorteil sehr geräuscharm zu sein Vorzugsweise ist die Antriebseinheit mittels einer Steuereinheit steuerbar. Üblicherweise ist die Steuerung Teil der Antriebeinheit.

- Einem oder mehreren an der Reaktortankhalterung , insbesondere an einem der seitlichen Befestigungselemente installierten opto-elektronischen Sensorsysteme zum Ablesen der seitlich an einer mit Koordinaten definierten Stelle des Reaktortanks angebrachten Sensorpatche, insbesondere ein pH-Transmitter und /oder ein Sauerstoffgehalttransmitter. Durch die direkte Ankopplung der Lichtanregungs- und Detektionseinheiten an die Sensoren lassen sich die Lichtintensitäten zur Erzeugung auswertbarer Messsignale und somit die Erzeugung von Radikalen erheblich verringern, was einer verlängerten Lebensdauer der Sensorpatche zugutekommt.

Erfindungsgemäß erfolgt die Datenübertragung leitungsgebunden über differentielle, serielle Schnittstellen und / oder leistungsungebunden über Funk wie beispielsweise Bluetooth oder WLAN. Vorzugsweise verfügt das opto-elektronisches Sensorsystem über die differentielle, serielle Schnittstelle zur symmetrischen Signalübertragung Typ EIA485/RS485 aufgrund der robusten Datenübertragung und eine hohe Toleranz gegenüber elektromagnetischen Störungen. Für eine verbesserte Datenübertragung wurde ein Schrittmotor ohne Getriebe mit direkter Kopplung des Motors und des Antriebes als besonders vorteilhaft identifiziert, weil das eine besonders störungsfreie Datenübertragung ermöglicht.

Fig. 11 zeigt eine besondere Ausführungsform des Reaktors samt Reaktortankaufnahmeperipherie.

Bevorzugt ist die auf dem Reaktor angepasst Stellfläche austauschbar bzw. anpassbar, so dass das Reaktorgestell mit Reaktoren verschiedener Größen anwendbar ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktors und Reaktortanks sowie ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen und/oder Mikroorganismen.

Im Reaktortank liegt während des Betriebs ein Verhältnis von Flüssigkeitsspiegel zur Reaktortankbreite von bevorzugt 0.05 bis 2 und besonders bevorzugt 0,1 bis 1 vor, wobei der Flüssigkeitsspiegel sich infolge Nachfütterung mit dem Wachstum der Zellen ändern kann. Außerdem wird der Reaktortank unter Wahrung seiner bevorzugten hydrodynamischen und prozesstechnischen Eigenschaften mit einem ausreichenden Kopfraum zwischen Reaktortankkopf und Flüssigkeitsspiegel (=Füllstand 180, H_L)von mindestens 5% bis 50 % Flüssigkeitshöhe bevorzugt mindestens 25% Flüssigkeitshöhe betrieben, um bei Schaumbildung einen ausreichenden Abständen zur mit einem Sterilfilter ausgestatteten Gasaustragsleitung zu gewährleisten. Zur Kontrolle des Füllstands wird üblicherweise durch den Deckel oder an einer der Behälterwände ein kapazitiver Sensor zur Füllstandskontrolle eingesetzt.

Es hat sich überraschend herausgestellt, dass eine vergleichsweise kleine Winkelamplitude für die rotatorisch-oszillierende Bewegung des Reaktors ausreicht, um eine gute Durchmischung und/oder eine hinreichende Intensivierung von Transportprozessen zu erreichen. Insbesondere ist es kaum erforderlich, 3600°-Umdrehungen (das entspricht 10 Umdrehungen) des Reaktors zu realisieren, so dass keine konstruktiv aufwändige Lösungen für die Anbindung des oszillatorisch rotierenden Reaktors an die ruhende Umgebung (z.B. zur Zu- und Abfuhr von Medien und Gasen, von elektrischer Energie und von elektrischen Signalen) erforderlich sind.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung wird der Reaktortank mit einer Winkelamplitude α im Bereich von $2° \leq |\alpha| \leq 3600°$, bevorzugt $20° \leq |\alpha| \leq 180°$, besonders bevorzugt $45° \leq |\alpha| \leq 90°$ rotatorisch-oszillierend bewegt, wobei Abweichungen von $\pm 5°$ vorhanden sein können. Insbesondere gilt $|\alpha| = 60°$ als ganz besonders bevorzugt bei der Verwendung von besonders scherarmen oberflächenbegasten Bioreaktoren. In Summe überstreicht damit die oszillierende Bewegung einen Winkel von $2\,|\alpha|$.

Versuche haben gezeigt, dass sich bei Erhöhung des Leistungseintrags Bewegungszustände in dem Reaktor einstellen können, bei denen Gasblasen in das Reaktormedium eingetragen werden. Gasblasen werden ab einem Leistungseintrag von $P/V_K > 10 W/m^3$ eingezogen, Für Zellen und/oder Mikroorganismen, die durch eine Blasenbegasung nicht geschädigt werden, kann auf diese Weise eine sehr einfache Steigerung der Gasversorgung realisiert werden. Durch eine zusätzliche Blasenbegasung über ein bevorzugt seitlich im Bodenbereich installiertes Sinterohr kann der Stofftransport erheblich verbessert werden. Die durch die rotatorische Oszillation erzeugte Strömung sorgt für einen schonenden Abriss der Mikroblasen vom Sparger und somit für eine große Phasengrenzfläche a bzw. einen großen Stoffübergangskoeffizient k_La.

Die Erfindung wird nachstehend anhand von Figuren näher erläutert, ohne sie jedoch auf die gezeigten Ausführungsformen zu beschränken.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1 zeigt schematisch den seitlichen Längsschnitt einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktortanks und Reaktortankhalterung in der Seitenansicht. Figur 2 zeigt eine schematische Ansicht einer Stopfen-Thermoplastausführung von oben.

Figur 3 zeigt ein schematischer Schnitt einer Stopfen-Silikonausführung mit Schlauchtüllen (135) befestigt mit Überwurfhülse (120) und O-Ring-Dichtung (140).

Figur 4 zeigt schematisch in Vorderansicht einen Schnitt durch eine Stopfen-Silikonausführung befestigt mit Überwurfhülse (120) und abgedichtet mittels Dichtlippe (140b).

Figur 5 zeigt schematisch in Vorderansicht einen Schnitt durch einen verschraubbaren Kunststoffdeckels mit Schlauchtüllen (135).

Fig. 6 zeigt schematisch in Vorderansicht einen geraden Rohrabscheiders mit geraden Kopf (= sprunghafter Querschnittsverengung) im Längsschnitt.

Fig. 7 zeigt schematisch in der Draufsicht einen geraden Rohrabscheider mit geradem Kopf.

Fig. 8 zeigt schematisch in der Vorderansicht einen geraden Rohrabscheiders mit geraden Kopf (= sprunghafter Querschnittsverengung) und Strömungsinverter.

Fig. 9 zeigt schematisch den Versuchsaufbau samt Leitungen, wobei ein Reaktor mit einem im Deckel statisch befestigten geraden Rohrabscheider mit konischem Kopf exemplarisch dargestellt ist.

Fig. 10 zeigt den schematischen Aufbau eines automatisierten Deckelprobennahmeelements mit einer durch den Deckel durchgeführten Probeeinsaugleitung (1110), die über Y-Stücke (1170) mit einer Probenleitung (1120) an eine Automatisierungsplattform (1190) zur vollautomatisierten Entnahme und zum pfropfenförmigen Transport von Flüssigkeiten angeschlossenen ist sowie an weitere Leitungen für die Luftzufuhr und die ETOH-Reinigung bzw. Sterilisation (1210).

Fig. 11 zeigt eine besondere Ausführungsform des Reaktortanks samt Reaktortankaufnahmeperipherie.

Fig. 12 zeigt Versuchsergebnisse R = f(P/V) beim Vergleich des statischen und mitrotierenden Abscheiders nach Fig. 6 und 7 und belegt die höchst überraschende Notwendigkeit eines drehbar gelagerten Sedimentationsrohres, das im Gegensatz zur mitbewegten Variante auch bei höheren Leistungseinträgen $P/V_K > 3$ W/m3 eine gute Partikelrückhaltung gewährleistet.

Fig. 13 zeigt Vergleichsversuche zu anderen Sedimentationsabscheidern.

Bezugszeichen:

8, 9 Port (ID 2mm, OD 3mm, Portlänge: 15mm)
10 bis 15 Port (ID 3mm, OD 4mm, Portlänge: 15mm, Port 10 mit beidseitiger Schlauchtülle)
16, 17 PG13,5-Port
18 baugleicher Port zu PG13,5 mit ID4mm
100 Container
101 Rotationsachsen
110 Flaschenhals
120 Überwurfmutter / Überwurfhülse
120b verschraubbarer Deckel
130 Stopfen
135 Schlauchtülle
136 Silikonschlauch
140 O-Ring
140b Dichtlippe
140c Dichtung
150 Stutzen
160 Boden
170 Gasverteiler
180 Füllstand H_L
185 Flaschenhöhe H
186 Flaschenquerschnitt D
190 Flaschenwand
198 Kulturvolumen V_B

200 Gaszufuhr
210 Sterilfilter
220 Gasabfuhr
230 Sterilfilter
240 Medium

250 Stellmittel
260 Harvest
261 PG13,5-Stutzen (Deckeleinbringung)
270 Filterheizung (19Jan12)
280 seitliche Probenahme (19Jan12)
290 Sensorport (chem.)(19.Jan12)

300 Settler/Zellabscheider
310 Abscheiderrohr / -zylinder
320 Sammler / Konus
330 Sammlereinbau / Strömungsinverter
331 Öffnung
332 Spalt
333 Sedimentabzug
340 Ablauf / Absaugrohr
350 Rohrdurchmesser d
360 Sammlerdurchmesser d_V
370 Abscheiderlänge l
380 Bodenabstand s
390 Füllstand
395 Abscheidervolumen V_A

400 Halter
410 Wärmeleitelement
420 Oszillation
430 Heizmatte

610 pH-Messung
611 pH-Spot
620 pO2-Messung
621 pO2-Spot
630 Temperaturmessung
640 Füllstandmessung

700 Antriebseinheit mit Motor
710 opto-elektronisches Messsystem

720 Schaltschrank
730 Temperaturmessung
740 Drehknopf
750 Display
760 Reaktorgestell

900 Probenventil
910 Überwurfmutter
911 Dichtung
912 Rohr
921 Rückschlagventil
922 Rückschlagventil
923 Membran
930 Probenleitung
931 Probe
950 Spülleitung
951 Sterilfilter
952 Gas
953 Wasserdampf
960 Probenverteilung
970 Druckleitung
971 Unterdruck
972 Überdruck
980 pH-Messung
981 pH-Sensor
982 Puffer
983 Abfall
990 Koppler (Luer-Lock)
1100 Deckelprobenahmeelement
1110 Probeeinsaugleitung
1120 Probeleitung
1130 Klemme
1140 Flüssigkeitsfilter
1150 Luftfilter
1160 Druckminderer
1170 Y-Stück
1180 Quetschventile

1190 Automatisierungsplattform zur vollautomatisierten Entnahme von Flüssigkeiten, Transport, Probenvorbereitung und anschließender Analytik wie z.B. aus der EP-1439472A1 und der EP-2013328A2 bekannt (BaychroMAT®)

1200 Zufuhr Reinigsungslösung

1210 Luftzufuhr

Beispiel:

Bioreaktorflasche

Als Container 100 diente eine Einweg-Kunststoffflasche mit quadratischem Querschnitt und Querschnittskantenlänge D=120 mm, eine Höhe H=235 mm und einen runden Flaschenhals 110 mit einem Halsquerschnittdurchmesser von 105 mm. Der Container wies abgerundete Kanten auf (Fig. 6 und 7); dies beeinflusste die Charakteristik des Systems jedoch kaum. Der Antrieb erfolgte mit einem Schrittmotor, der direkt auf die Flaschenhalterung einwirkte (Fig. 11).

In den Container 100 wurde ein Zellabscheider 300 eingebaut, um den Bioreaktor als Perfusionssystem zu betreiben (Fig. 9). Der Zellabscheider 300 umfasste ein durch den Deckel 120b durchgeführtes Absaugrohr 340 senkrecht verbunden mit einem zylindrischen Abscheiderrohr 310 mit einem Rohrdurchmesser d (=350) von 70 mm, wobei der Übergangsbereich zwischen dem Absaugrohr 340 und dem oberen Bereich des Abscheiderrohrs 310 den Erntestromsammler 320 bildete und den nach unten offenen unteren Teil des Abscheiderrohrs 310 das Abscheidervolumen V_A bildete (fig. 7).

Um auf bewegte Dichtungen zu verzichten, wurde das Absaugrohr 340 fest in den Deckel 120b integriert und folgte daher der periodisch richtungswechselnden Rotationsbewegung (auch Oszillationsbewegung genannt) um die ortsfeste Achse 101 des Bioreaktors (mitdrehende Ausführungsform). Für Vergleichsversuche wurde alternativ der Absaugrohr 340 auf einen Stativ befestigt; in diesen Versuchen wurde dann der Zellabscheider 300 statisch verwendet.

Im Perfusionsbetrieb ragte das Abscheiderrohr 310 in die im Behälter befindliche Suspension (Füllgrad 390 > Bodenabstand s, 380) hinein.

Durch eine am Erntestromsammler 320 angeschlossene Perfusionspumpe (Schlauchpumpe von Watsen & Marlow) wurde die Suspension von unten in das Abscheidervolumen V_A des Abscheiderrohrs 310 gesaugt. Innerhalb des Abscheiderrohrs 310 stieg die Suspension auf und wurde durch Sedimentation der Zellen / Partikeln geklärt (Vertikalabscheidung). Die Partikel fielen entgegen der Strömungsrichtung unten aus dem Abscheidervolumen heraus in das Kulturvolumen V_K zurück (Fig. 7). Die geklärte Lösung wurde aus dem Erntestromsammler 320 des Abscheiderrohres 310 gesammelt und durch das Absaugrohr 340 abgeführt.

Die Klärfläche A des Abscheiderrohres entspricht seinem Kreisförmigen Querschnitt und wird nach Gl. III berechnet.

PAN-X Untersuchungen:

Als Modelpartikel für die Untersuchung der Abscheideleistung der erfindungsgemäßen Reaktorflasche mit integrierten Zellenabscheider bei Zellenkultur wurde das Partikelsytem PAN-X (Polyacrylnitril, sphärische Partikel der Firma Dralon GmbH) verwendet.

Zur Prüfung der Identität der physikalischen Eigenschaften wurden die Partikelgrößenverteilung und die Partikelsinkgeschwindigkeit verglichen, da dies die bestimmenden Faktoren für die Sedimentation sind.

Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung erfolgte über das Laserbeugungsverfahren (Mastersizer 2000, nach Bedienungsanleitung gemessen). Die Auftragung der Ergebnisse erfolgt als Partikelvolumen in %, bezogen auf das Gesamtvolumen, als Funktion über der Partikelgröße in µm. Der Modalwert X_{Mod} sagt aus, welche Partikelgröße volumenmäßig am häufigsten vertreten ist und betrug ca. 21 µm.

Die Analyse der Sinkgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe einer Sedimentationswaage. Dazu wurde eine Suspension hergestellt, welche die gleiche Konzentration besitzt, wie die im Versuch verwendete. Das PAN-X wurde in entsalztem Wasser (= VE-Wasser) suspendiert und hatte eine Massenkonzentration von ca. 3 g/ℓ bzw. eine Volumenkonzentration von 0,88 Vol-%. Für die Analyse wurde eine Temperatur von 20 °C gewählt. . Unter diesen Versuchsbedingungen gemessenen Sinkgeschwindigkeiten v_s, von 0,129 m/h bis 0,137 m/h wurden an verschiedenen PAN-X Chargen ermittelt und entsprechen den Bedindungen der nicht-behinderten Sedimentation.

CHO-Zellen weisen beispielsweise eine Sedimentationsgeschwindigkeit von 0,0145 m/h auf [Searles J A, Todd P, Kompala D S, Biotechnol Prog (1994) 10: 198-206] und sind hiermit relativ langsam sedimentierende Zellen. Die Hybridoma-Zelllinie AB2-143.2 weist eine Sedimentationsgeschwindigkeit von 0,029 m/h auf [Wang Z, Belovich J M (2010) Biotechnol Prog 26 (5): 1361-1366].

Für die Herstellung der Modellsuspension wurden 3 g PAN-X abgewogen und in 1000 mℓ VE-Wasser unter Verwendung eines Magnetrührers suspendiert. Zur Probenahme wurde der Erntestrom in einem Messzylinder aufgefangen, während entnommenes Volumen mittels einer zweiten Schlauchpumpe durch VE-Wasser bis zu einem Füllstand H/D = 1 ersetzt wurde.
Wenn nicht abweichend angegeben, wurden alle Versuche mit folgenden Standardparametern durchgeführt:

Beschleunigung a = 1000 °/s² (P/V = 11,12 W/m³)
Abscheider mitdrehend

Klärflächenbelastung v = 0,1 m/h
Bodenabstand s = 70 mm

Gravimetrische Bestimmung der Partikelkonzentration: Die Bestimmung der Partikelkonzentration im Erntestrom erfolgte durch Abfiltrieren (Saugfiltration) eines definierten Volumens Erntestroms und anschließendes Trocknen und Wiegen des Filters mittels einer Trocknungswaage.

Der Einfluss der Beschleunigung bzw. des Leistungseintrages auf den Rückhaltegrad bei verschiedenen Abscheiderlängen l (=370) wurde ermittelt. Hierfür werden Versuche mit statischem Abscheider und mitdrehendem Abscheider verglichen (Ergebnisse siehe Fig. 12). An ein Abscheiderrohr mit einem Durchmesser d = 70 mm wurde der Erntestromsammler mit sprunghaften Querschnittsverengung nach Fig. 6 und 7 angebaut. Länge L des Abscheiders von 90 mm und 170 mm bei Beschleunigungen von 600 bis 2000 °/s² wurden untersucht.

Der Leistungsvergleich bei der Rückhaltung der PAN–Modellpartikel bei verschiedenen Leitungseinträgen P/V von bis zu P/V = 50 W/m³ und Klärflächenbelastung v = 0,1 m/h zeigte, dass der Rückhaltegrad R mit zunehmendem Leistungseintrag in den Bioreaktor bei einer mitrotierender Installation des Abscheiderrohres abfällt, wobei der Rückhaltegrad durch erhöhte Länge L des Abscheiders erheblich positiv beeinflusst wird.

In weiteren Experimente wurde der Einfluss verschiedener Erntestromsammler bei einer Abscheiderlänge l = 108 mm und einem Leistungseintrag von P/V = 11,12 W/m³ (a = 1000 °/s²) und v = 0,1 m/h untersucht. Der Erntestromsammler mit sprunghafter Querschnittsverengung nach Fig. 6 und 7 mit dem Durchmesserverhältnis d_v/d = 5/70 (auch einfacher Sammler genannt) oder ein Erntestromsammler mit konischer Querschnittsverengung nach Fig. 8 mit einem Öffnungswinkel von 54 ° und einer Abscheiderlänge l = 58 mm wurden mitdrehend in den Deckel 120b des Bioreaktors eingebaut. Die Ergebnisse zeigten den deutlichen Vorteil des konischen Erntestromsammlers. Die Rückhalteleistung dieses Abscheiders war überraschenderweise bei Abscheiderlängen l von 90 bis 143mm im gesamten Untersuchungsbereich beinahe konstant. Beim Erntestromsammler mit sprunghafter Erweiterung stieg die Abscheideleistung mit zunehmender Abscheiderlängen l von 90 bis 170 mm an, jedoch ohne die Leistungsfähigkeit der konischen Querschnittsverengung völlig zu erreichen.

<u>Einfluss des Bodenabstandes:</u>

Zur Untersuchung des Bodenabstandes wurde ein Abscheiderrohr mit einfachem Erntestromsammler nach Fig. 6 und 7 und Abscheiderlänge l = 90 mm verwendet. Es wurde mit Bodenabständen s von 10 bis 90 mm eingestellt. Unter Standardversuchsbedingungen von *P/V*

= 11 W/m³ und v = 0,1 m/h konnte mit dem Abscheiderrohr d = 70 mm und l = 90 mm im Bereich der Bodenabstände von 10 < s [mm] < 70 kein Einfluss des Bodenabstandes festgestellt werden. Erst oberhalb von s > 70 mm wird ein Einfluss des Bodenabstandes sichtbar.

Einfluss der Klärflächenbelastung:

Die Klärflächenbelastung v des Abscheiderrohres entspricht der Geschwindigkeit des vertikal aufsteigenden Mediums und hat nach Gl. IV direkten Einfluss auf die Partikelrückhaltung. Der Einfluss der Klärflächenbelastung wurde am Abscheiderrohr nach Fig 6 und 7 (d = 70 mm, l = 170 mm) untersucht. Das Abscheiderrohr wurde mit Bodenabstand s = 70 mm mitdrehend in den Flaschendeckel fixiert. Der Reaktor wurde bei einem Leistungseintrag von 3,43 W/m³ (a = 600 °/s²) und einer Klärflächenbelastungen von v = 0,025 m/h bis v = 0,2 m/h betrieben. Im untersuchten Belastungsbereich von 0,025 < v [m/h] < 0,2 nimmt der Rückhaltegrad R mit zunehmender Flächenbelastung bzw. Steiggeschwindigkeit v des Abscheiders nahezu linear ab. Dieses Ergebnis ist sowohl bedingt durch die Charakteristik des Abscheiders, als auch durch die Sedimentationseigenschaften der verwendeten Modellsuspension. PAN-X-Partikel liegen als polydisperse Suspension mit breit verteilter Partikelgröße und Sinkgeschwindigkeit vor. Es ist daher davon auszugehen, dass die Rückhaltecharakteristik in den nahezu monodispersen Zellsuspensionen einen steileren und zu kleineren Aufstiegsgeschwindigkeiten hin verschobenen Verlauf aufweist.

Eine Gegenüberstellung der Leistungsfähigkeit verschiedener Abscheidesysteme zeigt Fig. 13 in der Form der Rückhaltegrade R über der Klärflächenbelastung. Verglichen werden 2 bei Leistungseinträgern von $P/V_K \approx 3$ W/m³ mitdrehend in den Reaktortank eingebaute Vertikalabscheider mit Abscheiderflächen von 8 cm² und 39 cm² (Innenrohre 1 und 2) mit den ruhenden externen Schwerkraftabscheidervarianten, wie dem klassischen Dortmundbrunnen, einem Schägkanalabscheider gemäß EP1451290 und einem würfelförmigen Abscheider gemäß EP12001121.8. Die Versuchsergebnisse belegen eine nahezu gleichwertige Rückhalteleistung aller Abscheider über den gesamten Bereiche der untersuchen Klärflächenbelastung von 0.025 bis 0.2 m/h mit leichten Vorteilen für den Würfelabscheider.

Die Arbeiten, die zu dieser Erfindung geführt haben, wurden gemäß der Finanzhilfevereinbarung „Bio.NRW: ProCell – Innovative Plattformtechnologien für die integrierte Prozessentwicklung mit Zellkulturen“ im Rahmen des Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) gefördert.

Patentansprüche

1. Verwendung einer formstabilen eckigen Kunststoffflasche, die einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen Zugang zum Innenraum aufweist als Bioreaktortank für die Kultur von Zellen.

2. Reaktortank umfassend eine formstabile eckige Kunststoffflasche, die einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen verschließbaren Zugang zum Innenraum aufweist, wobei der verschließbare Zugang aus mindestens einem Flaschenhals und / oder mindestens einer Durchführung besteht, und wobei im Innenraum, an einem oder mehreren Wänden im unteren Bereich der Kunststoffflasche, an einer mit Koordinaten definierten Stelle, ein oder mehrere Sensorpatche angebracht sind.

3. Reaktortank umfassend eine formstabile eckige Kunststoffflasche, die einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen verschließbaren Zugang zum Innenraum aufweist, wobei der verschließbare Zugang aus mindestens einem Flaschenhals besteht, und wobei der Flaschenhals mit einem Deckel verschlossen ist, der Durchführungen und / oder Anschlüsse für die Gas- und Flüssigkeitsversorgung und –abfuhr in den und aus dem Reaktortank und keine Durchführung für eine Antriebsachse aufweist.

4. Reaktortank nach Anspruch 3, wobei für die Gasabfuhr eine mit einem Sterilfilter mit einer Heizmatte ausgestattete Gasaustragsleitung durch den Deckel durchgeführt ist.

5. Reaktortank nach einem der Ansprüche 3 bis 4, wobei einen oder mehrere elektronische, optoelektronische oder elektrochemische Sensoren durch den Deckel durchgeführt sind.

6. Reaktortank nach einem der Ansprüche 3 bis 5, weiterhin umfassend einen internen vertikaler Zellabscheider, selber umfassend:
   a. ein zentrales vertikales Abscheiderrohr mit einem runden Querschnitt mit einem Rohrdurchmessers d, wobei das Verhältnis von Rohrdurchmesser d zur Flaschenquerschnittkantenlänge D von 0,25 bis 0,90 beträgt, und
   b. einen Abscheiderkopf mit einem Sammler zum Absaugen von zellenbefreiter Kulturlösung,
   wobei der Zellabscheider am dem Deckel des Reaktortanks statisch oder drehbar gelagert befestigt ist und der Sammler durch den Deckel durchgeführt ist.

7. Reaktortank nach einem der Ansprüche 3 bis 6 weiterhin umfassend ein Einweg-Probennahmeelement, wobei das Einweg-Probennahmeelement eine an der Wand oder am

Deckel des Reaktortanks installierte Probeeinsaugleitung (1110) aufweist , die mit Hilfe eines Y-Stückes (1170) an eine Probentransportleitung (1120) angeschlossen ist, mit der die Probennahmeleitung an eine Automatisierungsplattform zur vollautomatisierten sterilen Entnahme von Flüssigkeiten (1190), verbunden wird, wobei der Probentreagsport mittels einer an das Y-Stück angeschlossenen eine Luftzufuhr (1210) unterstütz wird.

8. Reaktor umfassend:
   - einen Reaktortank gebildet durch eine formstabile eckige Kunststoffflasche, die einen Boden, Wände, einen Innenraum und mindestens einen verschließbaren Zugang zum Innenraum aufweist, wobei der verschließbare Zugang aus mindestens einem Flaschenhals und / oder mindestens einer Durchführung besteht, und
   - eine Reaktortankaufnahmeperipherie zur Aufnahme des Reaktortanks umfasst, wobei die Reaktortankaufnahmeperipherie besteht aus:
   - Mindestens einer Reaktortankhalterung zur Aufnahme jeweils eines Reaktortanks mit einer auf dem Reaktortank angepasste Stellfläche und einem oder mehrerer seitlicher Befestigungselemente,
   - einer mit der Reaktortankhalterung verbundenen Antriebseinheit zur Durchführung einer periodisch richtungswechselnden Rotationsbewegung.

9. Reaktor gemäß Anspruch 8, wobei im Innenraum des Reaktortanks, an einem oder mehreren Wänden im unteren Bereich der Kunststoffflasche, an einer mit Koordinaten definierten Stelle, ein oder mehrere Sensorpatche angebracht sind und wobei an der Reaktortankhalterung direkt oder mittels Lichtwellenleiter ein oder mehrere opto-elektronische Sensorsysteme zur Anregung und Auslesung der Sensorpatche befestigt sind.

10. Reaktor gemäß Anspruch 9, wobei das opto-elektronisches Sensorsystem gesammelte Daten leitungsgebunden über differentielle, serielle Schnittstellen und / oder leistungsungebunden über Funk überträgt.

11. Reaktor gemäß Anspruch 10, wobei die Antriebeinheit ein Schrittmotor ohne Getriebe mit direkter Kopplung des Motors und des Antriebes ist.

12. Reaktor gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei der verschließbare Zugang des Reaktortanks ein Flaschenhals ist und mit einem Deckel verschlossen ist, der Durchführungen und / oder Anschlüsse für die Gas- und Flüssigkeitsversorgung des Reaktortanks und keine Durchführung für eine Antriebsachse aufweist.

13. Reaktortankaufnahmeperipherie zur Aufnahme eines Reaktortanks, wobei die Reaktortankaufnahmeperipherie umfasst:
    - Mindestens eine Reaktortankhalterung zur Aufnahme jeweils eines Reaktortanks mit einer auf dem Reaktortank angepasste Stellfläche und einem oder mehreren seitlichen Befestigungselementen,
    - ein oder mehrere an der Reaktortankhalterung befestigte opto-elektronische Sensorsysteme zum Ablesen von seitlich an einer mit Koordinaten definierten Stelle des Reaktortanks angebrachten Sensorpatchen,
    - Verbunden mit der Reaktortankhalterung, eine Antriebseinheit zur Durchführung einer periodisch richtungswechselnden Rotationsbewegung, wobei die Antriebeinheit ein Schrittmotor ohne Getriebe mit direkter Kopplung des Motors und des Antriebes ist.

14. Verfahren zur Kultur von Zellen in einem Reaktor gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei der Reaktortank mit einer Winkelamplitude α im Bereich von $2° \leq |\alpha| \leq 3600°$ mit einem Leistungseintrag >10 W/m3 um seine ortsfeste, vertikale Achse in einer periodisch richtungswechselnde Rotationsbewegung versetzt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14 zur Kultur von Zellen gekennzeichnet durch eine Sinkgeschwindigkeit von 0.01 bis 100 cm / h , wobei der Reaktortank einen internen vertikalen Zellabscheider aufweist, der durch ein zentrales vertikales Abscheiderrohr und einen Abscheiderkopf mit einem Sammler zum Absaugen von zellenbefreiten Medium gebildet ist, wobei der Zellabscheider am einem Deckel für einen Reaktortank statisch oder drehbar gelagert befestigt ist und der Sammler durch den Deckel durchgeführt ist,, wobei eine von Zellen mit Hilfe des Zellabscheiders abgetrennte Kulturlösung aus dem Reaktortank abgesaugt wird.