



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112041422 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(21) 申请号 201980023489.5

(22) 申请日 2019.02.08

(30) 优先权数据

62/628,011 2018.02.08 US

62/756,732 2018.11.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/017316 2019.02.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/157356 EN 2019.08.15

(71) 申请人 佛罗里达大学研究基金会公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 华莱士·格雷戈里·索耶

萨曼莎·劳伦·马歇尔

埃里克·O·麦吉

亚历山大·麦吉 凯莉·范·米特

安吉拉·雅典娜·皮特尼斯

胡安·曼努埃尔·乌鲁埃尼亚

德里克·L·胡德

迈克尔·道格堤

克里斯蒂安·乔宾

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658

代理人 黄幸兒 周婧

(51) Int.Cl.

G12M 1/12 (2006.01)

G12M 3/06 (2006.01)

G12N 5/07 (2010.01)

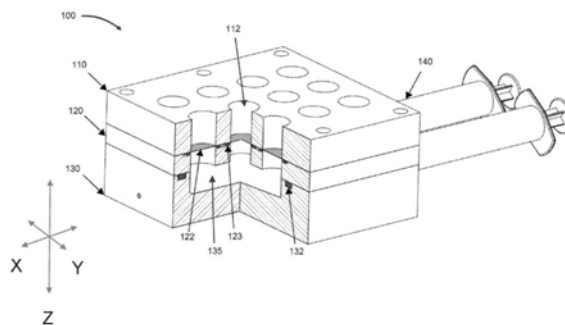
权利要求书9页 说明书35页 附图34页

(54) 发明名称

具有灌注功能的生物反应器

(57) 摘要

本文公开了一种生物反应器系统,所述生物反应器系统允许主动灌流通过多孔支持培养基,实现生物样品的3D生长。在一些实施例中,所述系统包含填充有三维(3D)细胞生长培养基的样品孔。所述系统可以进一步包含通过第一过滤材料以流体方式连接至样品孔的液体培养基贮存器。系统可以进一步包含通过第二过滤材料以流体方式连接至样品孔的培养基收集腔。在一些实施例中,施加负压压至培养基收集腔或施加正压至液体培养基贮存器从液体培养基贮存器吸取流体,通过第一过滤材料,进入样品孔中,所述流体在所述样品孔中渗透三维细胞生长培养基,通过第二过滤材料,并最终进入培养基收集腔中。



1. 一种能够进行显微镜检查的生物反应器系统,所述生物反应器系统包含:
一个或多个生物反应器单元,其中所述一个或多个生物反应器单元中的每一个包含:
样品孔,所述样品孔填充有三维(3D)细胞生长培养基,其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中所述水凝胶颗粒在所述液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶,以及
培养基收集腔,所述培养基收集腔通过第一过滤材料以流体方式连接至所述样品孔;
其中所述系统被配置成使得向所述培养基收集腔施加负压或向所述样品孔施加正压使流体主动从所述样品孔渗透,通过所述三维细胞生长培养基,通过所述第一过滤材料并且最终进入所述培养基收集腔中;
其中所述第一过滤材料具有小于所述膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。
2. 根据权利要求1所述的系统,所述系统进一步包含液体培养基贮存器,所述液体培养基贮存器通过第二过滤材料以流体方式连接至所述样品孔,其中所述系统被进一步配置成使得向所述培养基收集腔施加负压或向所述液体培养基贮存器施加正压使流体从所述液体培养基贮存器灌注,通过所述第二过滤材料,然后通过所述三维细胞生长培养基,通过所述第一过滤材料并且最终进入所述培养基收集腔中。
3. 根据权利要求1或2所述的系统,其中所述样品孔的底部为光学透明的。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的系统,所述系统进一步包含能够操作地连接至所述培养基收集腔的真空设备。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的系统,其中所述真空设备包含螺杆驱动的致动器,所述螺杆驱动的致动器包含能够在所述培养基收集腔内以旋转方式安装的固定致动螺杆,所述固定致动螺杆被配置成主动地向所述培养基收集腔提供负压。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的系统,其中所述培养基收集腔包含真空端口,所述真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的所述培养基收集腔。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的系统,所述系统包含分离的样品孔的阵列,所述分离的样品孔均以流体方式连接至相同的培养基收集腔。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的系统,其中所述阵列中的所述样品孔中的每一个均以流体方式连接至单独的液体培养基贮存器。
9. 根据权利要求1至7中任一项所述的系统,其中所述阵列中的所述样品孔中的每一个均以流体方式连接至相同的液体培养基贮存器。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的系统,其中所述系统具有环形布置,所述环形布置包含外环、中间环和中央腔,
其中所述液体培养基贮存器位于所述外环中,
其中所述样品孔位于所述中间环中,并且
其中所述中央腔为所述培养基收集腔。
11. 根据权利要求1至9中任一项所述的系统,其中所述系统具有环形布置,所述环形布置包含外环和中央腔,
其中所述样品孔位于所述中央腔中,
其中所述培养基收集腔位于所述外环中,并且
其中所述液体培养基贮存器位于所述中央腔中所述样品孔的上方。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的系统,其中所述三维细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于所述屈服应力的剪切应力时所述细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。

13. 根据权利要求12所述的系统,其中所述屈服应力为约10Pa。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的系统,其中水凝胶颗粒的浓度介于以重量计0.05%至约1.0%之间。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的系统,其中所述水凝胶颗粒当在所述液体细胞培养基下膨胀时具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的系统,其中多个细胞被安置在所述3D细胞培养基的区域中。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的系统,其中所述一个或多个生物反应器单元被配置成从所述液体培养基贮存器至所述样品孔至所述培养基收集腔的流体水平流动路径。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的系统,所述系统进一步包含移液管导引件,所述移液管导引件被配置用于接纳移液管尖端并提供从所述样品孔的底部至所述移液管尖端的远端的固定高度。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的系统,其中所述一个或多个生物反应器单元是彼此不以流体方式连通的具有从液体贮存器至样品孔至培养基收集腔的流体水平流动路径的离散单元。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的系统,所述系统进一步包含盒,所述盒被配置用于牢固地存储和输送多个离散的生物反应器单元。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的系统,其中所述离散单元中的每一个在底表面上包含三个或更多个孔口或环形截头圆锥形凹口,所述孔口或凹口被配置用于接纳朝所述离散单元的顶部延伸的突出部。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的系统,其中所述盒包含被配置用于接纳多个生物反应器单元的腔,所述腔的底表面具有多个凹口,所述多个凹口中的每个凹口均被配置用于牢固地安放单独的生物反应器单元。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的系统,其中所述底表面的所述凹口中的每一个包含三个或更多个从所述底表面朝上延伸并朝所述底表面远侧的末端逐渐变细的楔形截头圆锥形柱,所述楔形柱中的每一个被配置用于突出至所述离散生物反应器单元的所述孔口或环形截头圆锥形凹口中并牢固地与所述孔口或环形截头圆锥形凹口配合。

24. 根据权利要求19所述的系统,其中所述盒进一步包含气体端口。

25. 根据权利要求20所述的系统,其中所述盒能够操作地连接至热源。

26. 根据权利要求20至25所述的系统,所述系统进一步包含盖,所述盖被配置用于牢固地与所述盒配合。

27. 根据权利要求26所述的系统,其中所述盖具有被配置用于允许目视检查所述离散生物反应器单元的光学查看窗口。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的系统,其中所述系统进一步包含一个或多个生物反应器盖,所述一个或多个生物反应器盖中的每一个被配置用于牢固地与独特的离散生物反应器单元配合并允许所述离散单元与环境之间进行气体交换。

29. 根据权利要求1至28所述的系统,其中每个盖包含被配置用于接纳所述真空设备的孔口。

30. 根据权利要求1至29所述的系统,其中所述盖中的每一个进一步包含光学透明的查看窗口,所述查看窗口被配置用于允许用户目视检查所述样品孔、所述液体培养基贮存器或两者。

31. 根据权利要求1至30所述的系统,其中所述盖中的每一个进行色彩编码。

32. 根据权利要求1至30中任一项所述的系统,所述系统进一步包含用于药物递送的注射端口,所述注射端口与所述水平流动路径以流体方式连接,位于所述流动路径中所述液体贮存器与所述样品贮存器之间。

33. 根据权利要求32所述的系统,其中所述注射端口被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。

34. 根据权利要求32至33中任一项所述的系统,其中所述注射端口具有直径为约1mm至约50mm的能够用注射装置注入药物的孔口。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述的系统,其中所述注射端口具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的系统,其中所述第一过滤材料和所述第二材料相同,并且包含被配置用于将所述3D细胞生长培养基固定在所述样品孔中的3D水凝胶泡沫。

37. 根据权利要求5至36中任一项所述的系统,其中所述螺杆驱动的致动器进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至所述培养基收集腔。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的系统,其中所述培养基收集腔包含提供自愈性环形密封的硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳所述真空设备。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的系统,所述系统进一步包含与所述液体贮存器以流体方式连通的溢流腔。

40. 根据权利要求1至39中任一项所述的系统,所述系统进一步在所述样品孔的所述3D培养基的表面上包含塞子。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的系统,所述系统进一步包含被配置用于接纳所述3D水凝胶泡沫的通道曲径。

42. 根据权利要求41中任一项所述的系统,其中所述通道曲径被进一步配置成将所述3D水凝胶泡沫机械固定在所述通道内。

43. 一种高通量生物反应器系统,所述系统包含:

孔板,其中所述孔板包含多个孔口,所述多个孔口中的每一个均包含填充有三维(3D)细胞生长培养基的样品孔,其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中所述水凝胶颗粒在所述液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶;

过滤器;

中央板,所述中央板包含多个孔口;以及

底板,所述底板包含一个或多个培养基收集腔,所述培养基收集腔通过过滤材料以流体方式连接至所述样品孔;

其中所述孔板的底部被配置成与中央板的顶部配合并把所述过滤器夹在中间,所述中央板的底部被配置成与所述底板的顶部配合,以使得在配合时,所述孔板的所述样品孔与所述中央板通过所述过滤器以流体方式连通,所述中央板与所述一个或多个培养基收集腔以流体方式连通,从而形成具有从所述孔板,通过所述过滤器和中央板,至所述底板的竖直流体流动路径的多个生物反应器;

其中所述系统被配置成使得向所述培养基收集腔施加负压主动地从流体渗透所述三维细胞生长培养基的所述样品孔吸取流体,通过所述过滤器并且最终进入所述培养基收集腔中;以及

其中所述过滤材料具有小于所述膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。

44. 根据权利要求43所述的系统,所述系统进一步包含能够操作地连接至所述培养基收集腔的真空设备。

45. 根据权利要求44所述的系统,其中所述真空设备包含螺杆驱动的致动器,所述螺杆驱动的致动器包含能够以旋转方式操作地连接至所述培养基收集腔的固定致动螺杆,所述固定致动螺杆被配置成主动地向所述培养基收集腔提供负压。

46. 根据权利要求42至44中任一项所述的系统,其中所述培养基收集腔包含真空端口,所述真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的所述培养基收集腔。

47. 根据权利要求42至46中任一项所述的系统,其中所述第一过滤材料与所述第二过滤材料不同。

48. 根据权利要求42至47中任一项所述的系统,所述系统包含分离的样品孔的阵列,所述分离的样品孔均以流体方式连接至相同的培养基收集腔。

49. 根据权利要求42至48中任一项所述的系统,其中所述阵列中的所述样品孔中的每一个均以流体方式连接至单独的液体培养基贮存器。

50. 根据权利要求42至49中任一项所述的系统,其中所述阵列中的所述样品孔中的每一个均以流体方式连接至相同的液体培养基贮存器。

51. 根据权利要求42至50中任一项所述的系统,其中所述系统具有环形布置,所述环形布置包含外环、中间环和中央腔,

其中所述液体培养基贮存器位于所述外环中,

其中所述样品孔位于所述中间环中,并且

其中所述中央腔为所述培养基收集腔。

52. 根据权利要求42至51中任一项所述的系统,其中所述系统具有环形布置,所述环形布置包含外环和中央腔,

其中所述样品孔位于所述中央腔中,

其中所述培养基收集腔位于所述外环中,并且

其中所述液体培养基贮存器位于所述中央腔中所述样品孔的上方。

53. 根据权利要求42至52中任一项所述的系统,其中所述三维细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于所述屈服应力的剪切应力时所述细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。

54. 根据权利要求53所述的系统,其中所述屈服应力为约10Pa。

55. 根据权利要求42至54中任一项所述的系统,其中水凝胶颗粒的浓度介于以重量计0.05%至约1.0%之间。

56. 根据权利要求42至55中任一项所述的系统,其中所述水凝胶颗粒当在所述液体细胞培养基下膨胀时具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。

57. 根据权利要求42至56中任一项所述的系统,其中多个细胞被安置在所述3D细胞培养基的区域中。

58. 根据权利要求42至57所述的系统,其中所述螺杆驱动的致动器进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至所述培养基收集腔。

59. 根据权利要求42至57中任一项所述的系统,其中所述培养基收集腔包含具有自愈性环形密封的硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳所述真空设备。

60. 根据权利要求42至57中任一项所述的系统,其中所述底板包含多个培养基收集腔,每个腔包含毛细作用柱,所述毛细作用柱从所述腔的底表面朝上向所述中央板延伸,被配置用于收集液体和通过毛细作用从所述中央板的面对所述底板的表面带走液体并带入所述培养基收集腔中。

61. 根据权利要求42至60中任一项所述的系统,其中所述中央板的所述多个孔口中的每一个进一步在所述孔口的外径上包含裙缘,所述裙缘向下朝所述底板延伸并且被配置用于将液体从所述中央板的面对所述底板的表面引走。

62. 根据权利要求42至61中任一项所述的系统,其中所述裙缘由疏水性物质构建或涂有疏水性物质。

63. 根据权利要求42至62中任一项所述的系统,其中所述中央板由疏水性物质构建或涂有疏水性物质。

64. 一种双流生物反应器系统,所述系统包含:

第一液体贮存器;

样品孔,其中所述样品孔填充有三维(3D)细胞生长培养基,其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中所述水凝胶颗粒在所述液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶;

第一培养基收集腔;

第二液体贮存器;

第二培养基收集腔;

第一真空设备;

第二真空设备;

其中所述第一真空设备能够操作地连接至所述第一培养基收集腔;

其中所述第二真空设备能够操作地连接至所述第二培养基收集腔;

其中所述第一液体贮存器与所述样品孔通过第一过滤材料以流体方式连通,所述样品孔与所述第一培养基收集腔通过所述第一过滤材料以流体方式连通,由此形成第一灌注流动路径,其中所述第一过滤材料具有小于所述膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度;

其中所述第二液体贮存器与所述样品孔通过第二过滤材料以流体方式连通,所述样品孔与所述第二培养基收集腔通过所述第二过滤介质以流体方式连通,由此形成第二灌注流

动路径,其中所述第二过滤材料具有小于所述膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度;

其中所述系统被配置成使得所述第一流动路径和所述第二流动路径彼此正交并且处于所述样品孔中距离所述系统的底部不同的高度下;

其中所述系统被进一步配置成使得向所述第一培养基收集腔、第二培养基收集腔或两者施加负压主动地从流体渗透所述三维细胞生长培养基的所述第一液体贮存器、所述第二液体贮存器或两者吸取流体,通过所述第一过滤器、所述第二过滤器或两者,并且最终进入所述第一培养基收集腔、所述第二收集腔或两者中。

65. 根据权利要求4所述的双流生物反应器系统,所述系统进一步在所述样品孔中在所述第一流动路径与所述第二流动路径之间包含第三过滤材料。

66. 根据权利要求4或5所述的双流生物反应器系统,其中所述样品孔的底部为光学透明的。

67. 根据权利要求4至66中任一项所述的系统,其中所述第一真空设备包含第一螺杆驱动的致动器,所述第一螺杆驱动的致动器包含能够在所述第一培养基收集腔内以旋转方式安装的第一固定致动螺杆,所述第一固定致动螺杆被配置成主动地向所述第一培养基收集腔提供负压。

68. 根据权利要求4至67中任一项所述的系统,其中所述第二真空设备包含第二螺杆驱动的致动器,所述螺杆驱动的致动器包含能够在所述第二培养基收集腔内以旋转方式安装的第二固定致动螺杆,所述第二固定致动螺杆被配置成主动地向所述第二培养基收集腔提供负压。

69. 根据权利要求4至68中任一项所述的系统,其中所述第一培养基收集腔包含第一真空端口,所述第一真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的所述培养基收集腔,所述第一真空端口通过能够操作地连接至所述第二培养基收集腔的第一自愈性环形密封的刺穿形成。

70. 根据权利要求4至69中任一项所述的系统,其中所述第二培养基收集腔包含第二真空端口,所述第二真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的所述培养基收集腔,所述第二真空端口通过能够操作地连接至所述第二培养基收集腔的第二自愈性环形密封的刺穿形成。

71. 根据权利要求4至70中任一项所述的系统,其中所述三维细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于所述屈服应力的剪切应力时所述细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。

72. 根据权利要求4至71所述的系统,其中所述屈服应力为约10Pa。

73. 根据权利要求4至72中任一项所述的系统,其中水凝胶颗粒的浓度介于以重量计0.05%至约1.0%之间。

74. 根据权利要求4至73中任一项所述的系统,其中所述水凝胶颗粒当在所述液体细胞培养基下膨胀时具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。

75. 根据权利要求4至74中任一项所述的系统,其中多个细胞被安置在所述3D细胞培养基的区域中。

76. 根据权利要求4至75中任一项所述的系统,其中所述第一流动路径和所述第二流动路径被配置成流体水平流动路径。

77. 根据权利要求64至76中任一项所述的系统,所述系统进一步包含移液管导引件,所述移液管导引件被配置用于接纳移液管尖端并提供从所述样品孔的底部至所述移液管尖端的远端的固定高度。

78. 根据权利要求64至77中任一项所述的系统,所述系统进一步包含盒,所述盒被配置用于牢固地存储和输送多个离散的双流生物反应器单元,所述盒包含基底容器和盖。

79. 根据权利要求64至78中任一项所述的系统,其中所述离散双流生物反应器单元中的每一个在底表面上包含三个或更多个孔口或环形截头圆锥形凹口,所述孔口或凹口被配置用于接纳朝所述离散单元的顶部延伸的突出部。

80. 根据权利要求64至79中任一项所述的系统,其中所述基底容器包含被配置用于接纳多个双流生物反应器单元的腔,所述腔的底表面具有多个凹口,所述多个凹口中的每个凹口均被配置用于牢固地安放单独的生物反应器单元。

81. 根据权利要求64至80中任一项所述的系统,其中所述底表面的所述凹口中的每一个包含三个或更多个从所述底表面朝上延伸并朝所述底表面远侧的末端逐渐变细的楔形截头圆锥形柱,所述楔形柱中的每一个被配置用于突出至所述离散生物反应器单元的所述孔口或环形截头圆锥形凹口中并牢固地与所述孔口或环形截头圆锥形凹口配合。

82. 根据权利要求78至81中任一项所述的系统,其中所述盒进一步包含气体端口。

83. 根据权利要求78至82中任一项所述的系统,其中所述盒能够操作地连接至热源。

84. 根据权利要求78至83中任一项所述的系统,其中所述盖具有被配置用于允许目视检查所述离散生物反应器单元的光学查看窗口。

85. 根据权利要求64至84所述的系统,其中所述系统进一步包含一个或多个生物反应器盖,所述一个或多个生物反应器盖中的每一个被配置用于牢固地与独特的离散生物反应器单元配合并允许所述离散单元与环境之间进行气体交换。

86. 根据权利要求85所述的系统,其中每个盖包含被配置用于接纳所述真空设备的孔口。

87. 根据权利要求64至86所述的系统,其中所述盖中的每一个进一步包含光学透明的查看窗口,所述查看窗口被配置用于允许用户目视检查所述样品孔、所述液体培养基贮存器或两者。

88. 根据权利要求85至87所述的系统,其中所述盖中的每一个进行色彩编码。

89. 根据权利要求64至88中任一项所述的系统,所述系统进一步包含用于药物递送的第一注射端口,所述第一注射端口与所述第一流动路径以流体方式连接,位于所述第一流动路径中所述第一液体贮存器与所述样品孔之间。

90. 根据权利要求89中任一项所述的系统,其中所述第一注射端口被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。

91. 根据权利要求89至90中任一项所述的系统,其中所述第一注射端口具有直径为约1mm至50mm的能够用注射装置注入药物的孔口。

92. 根据权利要求89至91中任一项所述的系统,其中所述第一注射端口具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

93. 根据权利要求64至92中任一项所述的系统,所述系统进一步包含用于药物递送的第二注射端口,所述第二注射端口与所述第二流动路径以流体方式连接,位于所述第二流

动路径中所述第二液体贮存器与所述样品孔之间。

94. 根据权利要求93所述的系统,其中所述第二注射端口被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。

95. 根据权利要求93至94中任一项所述的系统,其中所述第二注射端口具有直径为约1mm至50mm的能够用注射装置注入药物的孔口。

96. 根据权利要求93至95中任一项所述的系统,其中所述第二注射端口具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

97. 根据权利要求64至96中任一项所述的系统,其中所述第一过滤材料和所述第二过滤材料相同,并且包含被配置用于将所述3D细胞生长培养基固定在所述样品孔中的3D水凝胶泡沫。

98. 根据权利要求64至97中任一项所述的系统,其中所述第一螺杆驱动的致动器进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至所述第一培养基收集腔。

99. 根据权利要求64至98中任一项所述的系统,其中所述第二螺杆驱动的致动器进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至所述第二培养基收集腔。

100. 根据权利要求64至99中任一项所述的系统,其中所述第一培养基收集腔包含提供自愈性环形密封的第一硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳所述真空设备。

101. 根据权利要求64至100中任一项所述的系统,其中所述第二培养基收集腔包含提供自愈性环形密封的第二硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳所述真空设备。

102. 根据权利要求64至101中任一项所述的系统,所述系统进一步包含与所述第一液体贮存器以流体方式连通的第一溢流腔。

103. 根据权利要求64至102中任一项所述的系统,所述系统进一步包含与所述第二液体贮存器以流体方式连通的第二溢流腔。

104. 根据权利要求64至103中任一项所述的系统,所述系统进一步在所述样品孔的所述3D培养基的表面上包含塞子。

105. 根据权利要求64至104中任一项所述的系统,所述系统进一步包含被配置用于接纳所述3D水凝胶泡沫的在所述第一流动路径、所述第二流动路径或两者中的通道曲径。

106. 根据权利要求105所述的系统,其中所述通道曲径被进一步配置成将所述3D水凝胶泡沫机械固定在所述通道内。

107. 一种使用具有灌注功能的生物反应器的方法,所述方法包含:
提供一个或多个根据权利要求1至106中任一项所述的生物反应器系统;
提供生物样品;
提供3D生长培养基;
将所述3D生长培养基放置于所述生物反应器的培养腔中;
将所述生物样品移液至所述3D生长培养基中;
将正或负表压施加至所述生物反应器,由此通过主动灌注将流体吸取至所述3D生长培养基中。

108. 根据权利要求107所述的方法,所述方法进一步包含在施加正或负表压之后将组

合物施加至所述生物反应器的所述注射端口中。

109. 一种试剂盒,所述试剂盒包含:

一个或多个如本文所述的生物反应器系统。

110. 根据权利要求109所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包含3D生长培养基。

111. 根据权利要求109至110中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包含真空设备。

112. 根据权利要求109至111中任一项所述的试剂盒,所述试剂盒进一步包含被配置用于接纳并牢固地保持所述一个或多个生物反应器的盒。

113. 一种如本文所述的方法、用途或系统,所述方法、用途或系统任选地参照附图。

具有灌注功能的生物反应器

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在2018年11月7日提出的标题为“能够进行显微镜检查的灌注式生物反应器孔板(MICROSCOPY ENABLED PERFUSION BIOREACTOR WELLPLATE)”的美国临时申请序列号62/756,732的优先权,所述临时申请以全文引入的方式并入本文中。

[0003] 本申请还要求在2018年2月8日提出的标题为“能够进行显微镜检查的灌注式生物反应器孔板(MICROSCOPY ENABLED PERFUSION BIOREACTOR WELLPLATE)”的美国临时申请序列号62/628,011的优先权,所述临时申请以全文引入的方式并入本文中。

背景技术

[0004] 与常规的2D培养相比,生物样品(例如细胞、细胞层、组织)打印或放置到3D支持培养基中能更精确地并且能再现地模拟在体内见到的细胞形态、异质性和遗传概貌。一些现有的3D细胞培养技术依赖于接种细胞并进行粘附的聚合物骨架。一旦细胞粘附到骨架上,就可以开始灌注生长培养基。这种方法具有几个缺点:(1)限制或妨碍细胞迁移;(2)细胞环境由聚合物骨架的结构界定;(3)实验设定没有时效性;以及(4)不包括用于显微镜检查的光学入口。另外,现有3D培养方法的细胞活力一般只限于几天;被动3D支持培养基无法有效地排出细胞废弃物,导致局部细胞毒性环境和随后细胞死亡。

发明内容

[0005] 本文公开了一种生物反应器系统,所述生物反应器系统允许主动灌流通过多孔支持培养基,实现生物样品的3D生长。在一些实施例中,所述系统包含填充有三维(3D)细胞生长培养基的样品孔。所述系统可以进一步包含通过第一过滤材料以流体方式连接至样品孔的液体培养基贮存器。所述系统可以进一步包含通过第二过滤材料以流体方式连接至样品孔的培养基收集腔。在一些实施例中,施加负压至培养基收集腔或施加正压至液体培养基贮存器从液体培养基贮存器吸取流体,通过第一过滤材料,进入样品孔中,渗透三维细胞生长培养基,通过第二过滤材料,并最终进入培养基收集腔中。

[0006] 在一些实施例中,多个细胞被安置在3D细胞培养基的区域中。所公开的系统的一个优点是在生物样品生长期间能够连续光学进入。因此,在一些实施例中,样品孔的底部为光学透明的。举例来说,样品孔的底部可由玻璃或塑料材料构成。

[0007] 所公开的生物反应器系统可以进一步包含能够操作地连接至培养基收集腔的真空设备。举例来说,真空设备可以包含能够在培养基收集腔内以旋转方式安装的固定螺杆。在一些情况下,培养基收集腔包含真空端口,所述真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的培养基收集腔。

[0008] 系统可含有单个样品孔。然而,在一些情况下,系统包含彼此分离的样品孔的阵列,所述分离的样品孔均以流体方式连接至相同的培养基收集腔。另外,可以分离样品培养基收集腔并允许收集每个孔的液体培养基,由此允许收集分离的分析物。在这些实施例中,阵列中的每个样品孔能够以流体方式连接至单独的液体培养基贮存器,或以流体方式连接

至相同的液体培养基贮存器。

[0009] 在一些实施例中,系统具有环形布置,所述环形布置包含外环、中间环和中央腔。举例来说,液体培养基贮存器可以位于外环中,样品孔可以位于中间环中,并且中央腔可以为培养基收集腔。在这些实施例中,例如当负压施加至中央(培养基收集)腔时培养基朝内径向流动。作为另一实例,系统可以具有环形布置,所述环形布置包含外环和中央腔,其中样品孔位于中央腔中,培养基收集腔在外环中,并且液体培养基贮存器位于中央腔中样品孔上方。在这些实施例中,例如当负压施加至外环(培养基收集腔)时培养基朝内径向流动。

[0010] 所公开的系统可以与任何3D细胞生长培养基一起使用。在优选实施例中,3D细胞生长培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中所述水凝胶颗粒在所述液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶。在一些情况下,3D细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于屈服应力的剪切应力时细胞生长培养基进行从堵塞态至松散态的转变。举例来说,屈服应力可以为约10Pa。在一些情况下,水凝胶颗粒的浓度介于以重量计0.05%至约1.0%之间。

[0011] 在一些实施例中,水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。所公开的系统的过滤材料确保在灌注期间没有水凝胶颗粒或细胞逃离样品孔。因此,在一些实施例中,第二过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。同样,在一些实施例中,基于流动方向,不存在或不需要第一过滤材料。当存在时,可以存在第一过滤材料以例如在货运期间将3D细胞生长培养基约束在样品孔中。一般来说,当存在时,第一过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。

[0012] 在一些实施例中,第二过滤材料含有一种或多种能结合和螯合废弃培养基中的生物靶,例如酶、细胞因子和趋化因子的试剂。通过这种方式,可以移出过滤器以供后续分析,以确定悬浮于灌注腔中的活生物样品的健康状态。试剂可以是例如官能化的纳米颗粒。具体来说,纳米颗粒可以在其表面上含有特异性结合生物靶的结合剂,例如抗体或适体。

[0013] 在下文的附图和描述中阐述本公开的一个或多个实施例的细节。本公开的其它特征、目标和优点将从描述和图式以及所附权利要求书中显而易见。

[0014] 本文描述了能够进行显微镜检查的生物反应器系统。如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以包含:一个或多个生物反应器单元,其中所述一个或多个生物反应器单元中的每一个可以包含:样品孔,所述样品孔填充有三维(3D)细胞生长培养基,其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中所述水凝胶颗粒在所述液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶;以及培养基收集腔,所述培养基收集腔通过第一过滤材料以流体方式连接至样品孔;其中所述系统被配置成使得向培养基收集腔施加负压或向样品孔施加正压使流体主动从样品孔渗透,通过三维细胞生长培养基,通过第一过滤材料并且最终进入培养基收集腔中;其中第一过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。

[0015] 能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步包含液体培养基贮存器,所述液体培养基贮存器通过第二过滤材料以流体方式连接至样品孔,其中所述系统可以被进一步配置成使得向培养基收集腔施加负压或向液体培养基贮存器施加正压使流体主动地从液体培养基贮存器灌注,通过第二过滤材料,然后通过三维细胞生长培养基,通过第一过

滤材料并且最终进入培养基收集腔中。

[0016] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的样品孔的底部可以为光学透明的。真空设备能够操作地连接至培养基收集腔。真空设备可以为螺杆驱动的致动器，所述螺杆驱动的致动器可以为能够在培养基收集腔内以旋转方式安装的固定致动螺杆，所述固定致动螺杆被配置成主动向培养基收集腔提供负压。培养基收集腔可以包含真空端口，所述真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的培养基收集腔。

[0017] 如本文所述的进行显微镜检查的生物反应器系统可以被配置成分离的样品孔的阵列，所述分离的样品孔均以流体方式连接至相同的培养基收集腔。阵列中的每个样品孔均以流体方式连接至单独的液体培养基贮存器。阵列中的每个样品孔均能以流体方式连接至相同的液体培养基贮存器。

[0018] 系统的方面可以具有环形布置，所述环形布置包含外环、中间环和中央腔，其中液体培养基贮存器位于外环中，其中样品孔位于中间环中并且其中中央腔为培养基收集腔。

[0019] 系统的方面可以具有环形布置，所述环形布置包含外环和中央腔，其中样品孔位于中央腔中，其中培养基收集腔位于外环中，并且其中液体培养基贮存器位于中央腔中样品孔上方。

[0020] 三维细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于屈服应力的剪切应力时细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。屈服应力可以为约10Pa。水凝胶颗粒的浓度可以介于以重量计0.05%至约1.0%之间。水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时可以具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。

[0021] 多个细胞可以安置在3D细胞培养基的区域中。

[0022] 一个或多个生物反应器单元被配置成从液体培养基贮存器至样品孔至培养基收集腔的流体水平流动路径。

[0023] 如本文所述的进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步包含移液管导引件，所述移液管导引件被配置用于接纳移液管尖端并提供从样品孔的底部至移液管尖端的远端的固定高度。

[0024] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的一个或多个生物反应器单元可以是彼此不以流体方式连通的具有从液体贮存器至样品孔至培养基收集腔的流体水平流动路径的离散单元。

[0025] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以包含盒，所述盒被配置用于牢固地存储和输送多个离散的生物反应器单元。

[0026] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的每个离散单元在底表面上可以包含三个或更多个孔口或环形截头圆锥形凹口，所述孔口或凹口被配置用于接纳朝离散单元的顶部延伸的突出部。可以使用其它几何形状以提供紧密干涉配合。

[0027] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的盒可以包含被配置用于接纳多个生物反应器单元的腔，所述腔的底表面具有多个凹口，所述多个凹口的每个凹口被配置用于牢固地安放单独的生物反应器单元。

[0028] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的生物反应器单元的底表面的每个凹口可以包含三个或更多个从底表面朝上延伸并朝底表面远侧的末端逐渐变细

的楔形截头圆锥形柱,每个楔形柱被配置用于突出至离散生物反应器单元的孔口或环形截头圆锥形凹口中并牢固地与孔口或环形截头圆锥形凹口配合。如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的盒可以具有气体端口。如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的盒能够操作地连接至热源。盖可以被配置成牢固地与如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的盒配合。盖可以具有被配置用于允许目视检查离散生物反应器单元的光学查看窗口。

[0029] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以包含一个或多个生物反应器盖,所述一个或多个生物反应器盖中的每个盖被配置用于牢固地与独特的离散生物反应器单元配合并允许离散单元与环境之间进行气体交换。每个盖可以具有被配置用于接纳真空设备的孔口。每个盖可以进一步具有光学透明的查看窗口,所述查看窗口被配置用于允许用户目视检查样品孔、液体培养基贮存器或两者。每个盖可以进行色彩编码。

[0030] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步包含用于药物递送的注射端口,所述注射端口与水平流动路径以流体方式连接,位于流动路径中液体贮存器与样品贮存器之间。注射端口可以被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。注射端口可以具有直径为约1mm至约50mm的能够用注射装置注入药物的孔口。注射端口可以具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

[0031] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的第一过滤材料和第二材料相同,并且可以包含被配置用于将3D细胞生长培养基固定在样品孔中的3D水凝胶泡沫。可使用其它纳米多孔过滤器。

[0032] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的螺杆驱动的致动器可以进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至培养基收集腔。

[0033] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统的培养基收集腔可以包含提供自愈性环形密封的硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳真空设备。

[0034] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步包含与液体贮存器以流体方式连通的溢流腔。

[0035] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步在样品孔的3D培养基的表面上包含塞子。

[0036] 如本文所述的能够进行显微镜检查的生物反应器系统可以进一步包含被配置用于接纳3D水凝胶泡沫或其它纳米多孔过滤器的通道曲径。通道曲径可以被进一步配置成将3D水凝胶泡沫机械固定在通道内。

[0037] 本文描述了高通量生物反应器系统。如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含孔板,其中所述孔板包含多个孔口,所述多个孔口中的每一个均包含填充有三维(3D)细胞生长培养基的样品孔,其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基,其中水凝胶颗粒在液体细胞培养基下膨胀,形成颗粒凝胶;过滤器;中央板,所述中央板包含多个孔口;以及底板,所述底板包含一个或多个培养基收集腔,所述培养基收集腔通过过滤材料以流体方式连接至样品孔;其中孔板的底部被配置成与中央板的顶部配合并把过滤器夹在中间,中央板的底部被配置成与底板的顶部配合,以使得在配合时,孔板的样品孔与中央板通过过滤器以流体方式连通,中央板与一个或多个培养基收集腔以流体方式连通,

从而形成具有从孔板,通过过滤器和中央板,至底板的竖直流体流动路径的多个生物反应器;其中系统被配置成使得向培养基收集腔施加负压主动地从样品孔吸取流体,渗透三维细胞生长培养基,通过过滤器并且最终进入培养基收集腔中;并且其中过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度。

[0038] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以进一步包含能够操作地连接至培养基收集腔的真空设备。真空设备可以包含螺杆驱动的致动器,所述螺杆驱动的致动器包含能够以旋转方式操作地连接至培养基收集腔的固定致动螺杆,所述固定致动螺杆被配置成主动向培养基收集腔提供负压。

[0039] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含一个或多个培养基收集腔,所述培养基收集腔包含真空端口,所述真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的培养基收集腔。

[0040] 如本文所述的高通量生物反应器系统的第一和第二过滤材料可以不同。

[0041] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含分离的样品孔的阵列,所述分离的样品孔均以流体方式连接至相同的培养基收集腔。

[0042] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以被配置成阵列中的每个样品孔均以流体方式连接至单独的液体培养基贮存器。阵列中的每个样品孔均能以流体方式连接至相同的液体培养基贮存器。

[0043] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含环形布置,所述环形布置包含外环、中间环和中央腔,其中液体培养基贮存器位于外环中,其中样品孔位于中间环中并且其中中央腔为培养基收集腔。

[0044] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含环形布置,所述环形布置包含外环和中央腔,其中样品孔位于中央腔中,其中培养基收集腔位于外环中,并且其中液体培养基贮存器位于中央腔中样品孔上方。

[0045] 如本文所述的高通量生物反应器系统可以包含三维细胞生长培养基,所述三维细胞生长培养基所具有的屈服应力使得在施加大于屈服应力的剪切应力时细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。屈服应力可以为约10Pa。水凝胶颗粒的浓度可以介于以重量计0.05%至约1.0%之间。水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时可以具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。

[0046] 多个细胞(即,生物样品)被安置在如本文所述的高通量生物反应器系统的3D细胞培养基的区域中。

[0047] 如本文所述的高通量生物反应器系统的螺杆驱动的致动器可以包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至培养基收集腔。

[0048] 如本文所述的高通量生物反应器系统的培养基收集腔可以包含具有自愈性环形密封的硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳真空设备。

[0049] 如本文所述的高通量生物反应器系统的底板可以包含多个培养基收集腔,每个腔包含毛细作用柱,所述毛细作用柱从所述腔的底表面朝上向中央板延伸,被配置用于收集液体和通过毛细作用从中央板的面对底板的表面带走液体并带入培养基收集腔中。

[0050] 如本文所述的高通量生物反应器系统的中央板的多个孔口中的每一个可以在孔口的外径上包含裙缘,所述裙缘向下朝底板延伸并且被配置用于将液体从中央板的面对底

板的表面引走。裙缘可以由疏水性物质构建或涂有疏水性物质。中央板可以由疏水性物质构建或涂有疏水性物质。

[0051] 本文描述了双流生物反应器系统。如本文所述的双流生物反应器系统可以包含：第一液体贮存器；样品孔，其中所述样品孔填充有三维(3D)细胞生长培养基，其中所述3D细胞培养基包含多个水凝胶颗粒和液体细胞培养基，其中水凝胶颗粒在液体细胞培养基下膨胀，形成颗粒凝胶；第一培养基收集腔；第二液体贮存器；第二培养基收集腔；第一真空设备；第二真空设备；其中第一真空设备能够操作地连接至第一培养基收集腔；其中第二真空设备能够操作地连接至第二培养基收集腔；其中第一液体贮存器与样品孔通过第一过滤材料以流体方式连通，所述样品孔与第一培养基收集腔通过第一过滤材料以流体方式连通，由此形成第一灌注流动路径，其中第一过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度；其中第二液体贮存器与样品孔通过第二过滤材料以流体方式连通，所述样品孔与第二培养基收集腔通过第二过滤介质以流体方式连通，由此形成第二灌注流动路径，其中第二过滤材料具有小于膨胀的水凝胶颗粒的尺寸的孔隙度；其中所述系统被配置成使得第一流动路径和第二流动路径彼此正交并且处于样品孔中距离系统底部不同的高度下；其中所述系统被进一步配置成使得向第一培养基收集腔、第二培养基收集腔或两者施加负压主动地从第一液体贮存器、第二液体贮存器或两者吸取流体，渗透三维细胞生长培养基，通过第一过滤器、第二过滤器或两者，并且最终进入第一培养基收集腔、第二收集腔或两者中。

[0052] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步在样品孔中在第一流动路径与第二流动路径之间包含第三过滤材料。

[0053] 如本文所述的双流生物反应器系统可以在培养腔下方进一步包含光学透明底部。

[0054] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一真空设备可以包含第一螺杆驱动的致动器，所述第一螺杆驱动的致动器包含能够在第一培养基收集腔内以旋转方式安装的第一固定致动螺杆，所述第一固定致动螺杆被配置成主动向第一培养基收集腔提供负压。

[0055] 如本文所述的双流生物反应器系统的第二真空设备可以包含第二螺杆驱动的致动器，所述螺杆驱动的致动器包含能够在第二培养基收集腔内以旋转方式安装的第二固定致动螺杆，所述第二固定致动螺杆被配置成主动地向第二培养基收集腔提供负压。

[0056] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一培养基收集腔可以包含第一真空端口，所述第一真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的培养基收集腔，所述第一真空端口通过能够操作地连接至第二培养基收集腔的第一自愈性环形密封的刺穿形成。

[0057] 如本文所述的双流生物反应器系统的第二培养基收集腔可以包含第二真空端口，所述第二真空端口以流体方式连接至能够以能释放的方式连接至真空设备的培养基收集腔，所述第二真空端口通过能够操作地连接至第二培养基收集腔的第二自愈性环形密封的刺穿形成。

[0058] 如本文所述的双流生物反应器系统的三维细胞生长培养基所具有的屈服应力可以使得在施加大于屈服应力的剪切应力时细胞生长培养基经历从第一固相至第二液相的相变。屈服应力可以为约10Pa。水凝胶颗粒的浓度可以介于以重量计0.05%至约1.0%之间。水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时可以具有介于约0.1 μm 至约100 μm 之间的尺寸。多个细胞被安置在如本文所述的双流生物反应器系统的3D细胞培养基的区域中。

[0059] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一流动路径和第二流动路径可以被配置成流体水平流动路径。在某些方面,流动路径可以彼此正交,但是可以实现除约90°以外的其它角配置。

[0060] 如本文所述的双流生物反应器系统的可以进一步包含移液管导引件,所述移液管导引件被配置用于接纳移液管尖端并提供从样品孔的底部至移液管尖端的远端的固定高度。

[0061] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步包含盒,所述盒被配置用于牢固地存储和输送多个离散的双流生物反应器单元,所述盒包含基底容器和盖。

[0062] 双流生物反应器系统的每个盒在底表面上可以包含三个或更多个孔口或环形截头圆锥形凹口,所述孔口或凹口被配置用于接纳朝离散单元的顶部延伸的突出部。

[0063] 双流生物反应器系统的盒的基底容器可以包含被配置用于接纳多个双流生物反应器单元的腔,所述腔的底表面具有多个凹口,所述多个凹口中的每个凹口均被配置用于牢固地安放单独的生物反应器单元。

[0064] 双流生物反应器系统的盒的底表面的每个凹口可以包含三个或更多个从底表面朝上延伸并朝底表面远侧的末端逐渐变细的楔形截头圆锥形柱,每个楔形柱被配置用于突出至离散生物反应器单元的孔口或环形截头圆锥形凹口中并牢固地与孔口或环形截头圆锥形凹口配合。

[0065] 如本文所述的双流生物反应器系统的每个盒可以进一步包含气体端口。如本文所述的双流生物反应器系统的盒能够操作地连接至热源。盒盖可以具有被配置用于允许目视检查离散生物反应器单元的光学查看窗口。

[0066] 如本文所述的双流生物反应器系统可以包含一个或多个生物反应器盖,所述一个或多个生物反应器盖中的每个盖被配置用于牢固地与独特的离散生物反应器单元配合并允许离散单元与环境之间进行气体交换。每个盖包含被配置用于接纳真空设备的孔口。每个盖进一步包含光学透明的查看窗口,所述查看窗口被配置用于允许用户目视检查样品孔、液体培养基贮存器或两者。每个盖可以进行色彩编码。

[0067] 如本文所述的双流生物反应器系统可以包含用于药物递送的第一注射端口,所述注射端口与第一流动路径以流体方式连接,位于第一流动路径中第一液体贮存器与样品孔之间。第一注射端口可以被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。第一注射端口可以具有直径为约1mm至50mm的能够用注射装置注入药物的孔口。

[0068] 第一注射端口可以具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

[0069] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步包含用于药物递送的第二注射端口,所述注射端口与第二流动路径以流体方式连接,位于第二流动路径中第二液体贮存器与样品孔之间。第二注射端口可以被配置用于接纳约1 μ L至约1mL的体积。第二注射端口可以具有直径为约1mm至50mm的孔口,药物能够用注射装置注射至孔口中。第二注射端口可以具有直径被配置成将毛细作用降到最低的孔口。

[0070] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一过滤材料和第二过滤材料可以相同,并且包含被配置用于将3D细胞生长培养基固定在样品孔中的3D水凝胶泡沫。可以使用其它纳米多孔过滤材料。

[0071] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一螺杆驱动的致动器可以进一步包含卸

压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至第一培养基收集腔。

[0072] 如本文所述的双流生物反应器系统的第二螺杆驱动的致动器可以进一步包含卸压固定螺杆,所述卸压固定螺杆能够操作地连接至第二培养基收集腔。

[0073] 如本文所述的双流生物反应器系统的第一培养基收集腔可以包含提供自愈性环形密封的第一硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳真空设备。

[0074] 如本文所述的双流生物反应器系统的第二培养基收集腔可以包含提供自愈性环形密封的第二硅塞,所述自愈性环形密封被配置用于将所述腔进行气密密封并接纳真空设备。

[0075] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步包含与第一液体贮存器以流体方式连通的第一溢流腔。

[0076] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步包含与第二液体贮存器以流体方式连通的第二溢流腔。

[0077] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步在样品孔的3D培养基的表面上包含塞子。

[0078] 如本文所述的双流生物反应器系统可以进一步包含被配置用于接纳3D水凝胶泡沫的在第一流动路径、第二流动路径或两者中的通道曲径。通道曲径被进一步配置成将3D水凝胶泡沫机械固定在通道内。

[0079] 本文描述了使用如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统的方法。使用具有灌注功能的生物反应器的方法可以包含:提供如本文所述的生物反应器系统;提供生物样品;提供3D生长培养基;将3D生长培养基放置于生物反应器的培养腔中;将生物样品移液至3D生长培养基中;将正或负压施加至生物反应器,由此通过主动灌注将流体吸取至3D生长培养基中。如本文所述的方法可以进一步包含在施加正或负压之后将组合物施加至生物反应器的所述注射端口中。

[0080] 本文描述了试剂盒。如本文所述的试剂盒可以包含一个或多个如本文所述的生物反应器。如本文所述的试剂盒可以进一步包含3D生长培养基。如本文所述的试剂盒可以进一步包含一个或多个移液管导引件。

[0081] 如本文所述的试剂盒可以进一步包含真空设备和/或压力表。压力表能够操作地连接至真空设备并与真空设备以流体方式连通。如本文所述的试剂盒可以进一步包含被配置用于接纳并牢固地保持一个或多个生物反应器的盒。

[0082] 如本文所述的方法、用途或系统任选地参附图。

附图说明

[0083] 图1为根据本发明视图的生物反应器系统的实施例的透视图,其中切口展示出内部环境的方面。

[0084] 图2A-2C为如本文所述的生物反应器系统的分解视图。

[0085] 图3为本文公开的生物反应器系统的一实施例的俯视图。

[0086] 图4为本文公开的生物反应器系统的一实施例的横截面视图。

[0087] 图5为本文公开的生物反应器系统的一实施例的横截面视图。

- [0088] 图6为本文公开的生物反应器系统的一实施例的横截面视图。
- [0089] 图7为本文公开的生物反应器系统的一实施例的横截面视图。
- [0090] 图8为展示高通量多孔配置的本文公开的生物反应器系统的一实施例的剖视图。
- [0091] 图9为本文公开的生物反应器系统的一实施例的分解视图。
- [0092] 图10展示用于如本文所公开的生物反应器系统的机械移液导引件的一实施例,所述机械移液导引件是为了精确并可重复地将特征放置在如本文所述的生物反应器系统内。
- [0093] 图11为如本文所述的基于盒的多孔生物反应器系统的一实施例,所述系统被配置成多个(六个)离散的生物反应器单元。
- [0094] 图12为图11的基于盒的多孔生物反应器系统的分解视图。
- [0095] 图13A-13B为如本文所述的生物反应器系统的特征的一实施例,所述特征赋予离散的生物反应器单元稳定并且可重复的定位。
- [0096] 图14A-14B描绘了如本文所述的生物反应器系统的方面的盖子的一实施例。此类盖子可以具有光学查看窗口并且可进行色彩编码。
- [0097] 图15A-15B描绘了如本文所述的生物反应器系统的一方面的一实施例的分解(图15A)和装配(图15B)视图。
- [0098] 图16示出如本文所述的生物反应器系统的一方面的一实施例的横截面视图。具体来说,图16的横截面描绘了任选的注射端口,所述注射端口可以用于可控而准确地递送药物(小分子、蛋白质、聚合物、核酸等等)至生物反应器的流动路径,由此递送药物至在生物反应器内培养的细胞。
- [0099] 图17描绘了如本文所述的生物反应器系统的一方面的一实施例,尤其示出在液体贮存器周围并邻接液体贮存器外径并且被配置成从液体贮存器捕获和盛放过量液体的任选的培养基溢流孔。
- [0100] 图18描绘了如本文所述的生物反应器系统的一方面的一实施例。如从图18的实施例中可见,在系统中可以使用自愈性环形密封来代替如本文所述的其它压力递送设备(例如螺杆驱动的致动器)。
- [0101] 图19A-19B描绘了如本文所述的生物反应器系统的一方面的另一实施例。图19A为俯视图,图19B为横截面侧视图,并且图19C为仰视图。
- [0102] 图20为如本文所述的生物反应器系统的一方面的另一实施例,说明特征在于在流动路径之间共享并位于每个流动路径中间的共同培养腔的两个正交相对的流动路径。
- [0103] 图21为具有双重流动路径的生物反应器系统的方面的实施例的培养腔(LLS腔)的横截面视图。
- [0104] 图22为具有双重流动路径的生物反应器系统的方面的实施例的培养腔(LLS腔)的另一横截面图。
- [0105] 图23A-23D为具有双重流动路径的如本文所述的生物反应器系统的一方面的一实施例。图23A展示透视图,图23B展示俯视图;图23C展示侧视图;并且图23D展示仰视图。
- [0106] 图24A-24C为图23A-23D的实施例的另一图示。图24A中示出俯视图,并且图24B和24C中示出横截面侧视图。
- [0107] 图25为图23的实施例的另一横截面视图。
- [0108] 图26为以多孔高通量设置配置的具有灌注功能的生物反应器的阵列的一实施例

2000的照片。

[0109] 图27为图26的实施例2000的分解视图。

[0110] 图28A-28B为实施例2000的结构配置的一实施例的放大视图,所述配置有助于将分析物收集至单独的流出物收集腔中,同时使交叉污染减到最少。

[0111] 图29A-29B。图29A为图26的实施例2000的横截面透视图,示出在板孔的自愈性环形密封中插入的真空来源设备。图29B为29A的放大视图。

[0112] 图30为如本文所述的具有灌注功能的生物反应器3000的一实施例。

具体实施方式

[0113] 为了对抗3D培养中停滞的毒性环境,可以通过支持培养基诱发灌流,由此流入营养液并流出废产物。本文公开了实现此的系统和方法。所公开的系统和方法通过引入专门的堵塞微凝胶系统而大大地改善当前标准,所述堵塞微凝胶系统允许细胞迁移和灌注并且一旦细胞放置在内实验即准备就绪。容纳此凝胶的装置包括过滤器和真空系统,其在不干扰细胞环境下使营养培养基灌注通过所述系统。因为灌注依赖于真空,所以容易实现会影响细胞行为的脉冲式流动。这类脉冲式流动可以是主动脉冲式流动。此外,这一系统允许在生物样品生长期间连续光学进入。

[0114] 本文公开了一种生物反应器系统,其可以涉及单孔、多孔或连续孔平台,具有任选的用于在生物反应器单元中直接观测生物样品的一体化光学路径。这类单孔平台可以为被容纳在盒中的离散单元,并且多孔平台可以类似于多孔板。使用灌流,其通过生物反应器中独特的多孔支持培养基,实现生物样品的3D生长。光学路径能够实现在不中断灌注下对生物样品进行显微镜检查,并且允许在不干扰环境下研究长期生长和行为。

[0115] 如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统允许生物样品在3D生长培养基(在本文中又称为液体样固体或LLS)中进行3D组织培养。

[0116] 如本文所述的生物反应器系统可以包含压力产生构件、馈送培养基来源、具有3D生长培养基(在本文中又称为液体样固体或LLS)的培养腔、过滤器和培养基收集腔(在本文中又称为流出物腔、流出物收集腔、分析物腔、分析物收集腔、废弃物腔或废弃物收集腔)。在根据本公开的某些实施例中,馈送培养基来源是培养腔中的培养基,而在其它实施例中,其是作为与培养腔不同的结构组件的物理上分开的液体贮存器。如本文所述的生物反应器系统还可以包含药物递送端口,用于研究药物(小分子、蛋白质、核酸、糖等)精确并有效地递送至所关注细胞的应用。

[0117] 从压力产生构件施加正压或负压驱动流体从馈送培养基来源灌注至3D生长培养基,通过过滤器,并进入培养基收集腔中。在某些方面,如本文所述的系统被配置成水平流体灌注路径以允许系统进行显微镜检查,在其它方面中,系统被配置成竖直流体灌注路径,用于具有高通量功能的系统。

[0118] 过滤器可为3D水凝胶材料或其它过滤器。

[0119] 如本文所述的生物反应器系统可以由例如通过研磨的单片材料构建,或可以由固定或另外胶合在一起的多片构建。

[0120] 如本文所述的培养腔被配置成盛放可以培养生物样品的体积的3D生长培养基。

[0121] 过滤材料

[0122] 所公开的生物反应器系统包含一个或多个过滤器,所述过滤器允许液体培养基在不干扰细胞环境下灌注通过系统。

[0123] 过滤材料可以为生物相容性或惰性材料的任何组合,所述材料可以形成固体并保留等于或小于3D支持基质聚合物的尺寸的孔隙度。主要实例包括聚合至进行亚稳相分解的程度的pHEMA,产生近似3D支持基质聚合物的孔隙度;烧结微米粒子,包括聚醚醚酮(PEEK)、硼硅酸盐、钢或多种陶瓷。

[0124] 在例如如图1中的设计中,过滤材料可以由材料聚碳酸酯、尼龙或产生相同作用同时保持生物相容性或惰性的多种其它材料的纳米多孔片膜构成。

[0125] 在某些实施例中,例如本文描述和图4-7和10-25中所示的实施例中,过滤材料可以为3D水凝胶。3D水凝胶为交联水凝胶泡沫。其充当过滤器以防LLS移动通过其,但允许例如生长培养基等液体流过。其不是“液体样固体”。与LLS相比,其孔径相对较大,大约10 μm ,但可以在5 μm -20 μm 范围内。其结构性比LLS高得多,并且行为不像液体。其可以由例如丙烯酰胺或聚甲基丙烯酸羟乙酯等多种物质制成。3D水凝胶可以被配置成使得其如本文进一步所述保持和固定3D生长培养基,由此防止因施加真空或正压而干扰或扰动生长培养基。

[0126] 过滤材料可以具有小于3D生长培养基组分的孔隙度,在下文中详细描述。

[0127] 真空来源

[0128] 所公开的生物反应器系统可以使用正或负压的任何来源将流体引出系统。这类压力可以由真空来源产生,在本文中又称为压力产生装置或设备。在一些情况下,施加真空。可以使用多种已知的构件形成负压和正压。在一些情况下,使用机械构件,包括(但不限于)蠕动泵、注射器、活塞或螺杆产生压力。还已知用于产生压力的被动系统,并且包括渗透梯度和毛细管力。举例来说,可以通过将未膨胀的聚合物粉末放置于收集腔中来产生渗透梯度。

[0129] 在本公开的实施例中,真空来源为螺杆驱动的致动器,其被配置成使得螺杆的转动为系统提供负压或正压,这取决于螺杆如何转动。

[0130] 在本公开的实施例中,真空来源通过用例如针等装置对自愈性环形密封进行刺穿来操作性地连接至系统,自愈性环形密封是提供真空的装置,例如如上所述的装置的一部分并且操作性地连接至所述装置。这类实施例任选地包括压力计,用于监测系统内的压力以便通知用户压力。

[0131] 如本文所述的真空来源通过例如鲁尔锁(Luer lock)和自愈性环形密封等接头以能释放的方式连接至系统。如本文所述的自愈性环形密封的实例包括橡皮塞,例如在医学专业中普遍存在的血液收集管中使用的橡皮塞。

[0132] 3D培养基

[0133] 用于所公开的生物反应器系统的液体样固体(LLS)三维(3D)细胞生长培养基(在本文中又称为“液体样固体”、“LLS”、“3D生长培养基”或“3D细胞生长培养基”)在Sawyer等人的W02016182969A1中公开,所述专利以全文引用的方式并入,描述了如何制备和使用此LLS培养基。

[0134] 液体样固体(LLS)具有提供输送、弹性和屈服特性的组合的特性,这可以用于设计用于在三维培养中维持活细胞的支持材料。这些材料可以主要由溶剂构成,溶剂自由扩散并且可以占到其体积的超过99%,但是这些材料在固态时又具有有限模量和极其低的屈服

应力。在屈服时,这些材料剪切和行为像经典流体一样。填充的颗粒微凝胶是一类液体样固体,近来采用其作为稳固培养基以供脆弱材料的精确三维制造。营养物、小分子和蛋白质不受限制的扩散可以支持细胞的代谢需求并提供一种发展组合筛选方法的简易途径。不会扰动的LLS材料可以为细胞和细胞部件提供支持和稳定性,并促进精密多细胞结构的发育和维持

[0135] 简单来说,3D细胞生长培养基可以包含分散于液体细胞生长培养基中的水凝胶颗粒。可以使用任何合适的液体细胞生长培养基;如本领域的技术人员将了解,具体液体细胞生长培养基可以取决于有待放在3D细胞生长培养基内的细胞类型来选择。举例来说,合适的细胞生长培养基可以是人类细胞生长培养基、鼠类细胞生长培养基、牛细胞生长培养基或任何其它合适的细胞生长培养基。取决于具体实施例,水凝胶颗粒和液体细胞生长培养基可以呈任何合适的组合进行组合。举例来说,在一些实施例中,3D细胞生长培养基包含以重量计大约0.5%至1%水凝胶颗粒。在一些实施例中,水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时可以具有在约0.1 μm 至约100 μm 范围内的尺寸。在一些实施例中,水凝胶颗粒当在液体细胞培养基下膨胀时可以具有在约1 μm 至约10 μm 范围内的尺寸。

[0136] 根据一些实施例,水凝胶颗粒可以由生物相容性聚合物制成。

[0137] 水凝胶颗粒可以用液体生长培养基进行膨胀,形成颗粒凝胶材料。取决于具体实施例,膨胀的水凝胶颗粒可以具有在微米或次微米级的特征性尺寸。举例来说,在一些实施例中,膨胀的水凝胶颗粒可以具有介于约0.1 μm 与100 μm 之间的尺寸。此外,3D细胞生长培养基可以具有任何合适的机械特性组合,并且在一些实施例中,机械特性可以经由水凝胶颗粒和液体细胞生长培养基的相对浓度调整。举例来说,较高浓度的水凝胶颗粒可以产生具有较高弹性模量和/或较高屈服应力的3D生长培养基。

[0138] 根据一些实施例,3D细胞生长培养基可以由因施加应力而使颗粒凝胶材料经历暂时相变的材料(例如触变或“屈服应力”材料)制成。这类材料可以是固体,或处于在施加低于屈服应力的水平的应力下材料保留形状的一些其它相中。在施加超出屈服应力的应力下,这些材料可以变成流体或处于材料可以改变形状的一些其它更有延展性的相中。当去除所施加的应力时,屈服应力材料可以再次变成固体。应力可以用任何合适的方式施加至这类材料。举例来说,能量可以加入到这类材料以产生相变。能量可以是任何合适的形式,包括机械、电、辐射或光子等。

[0139] 无论细胞如何放在培养基中,屈服应力材料的屈服应力都可以足够大,以防止因细胞施加的重力和/或扩散力屈服,使得细胞在3D生长培养基内的位置可以随着时间推移保持基本上恒定。如下文更详细地描述,可以手动或自动放置和/或取出细胞群组。

[0140] 如本文所述的屈服应力材料可以具有任何合适的机械特性。举例来说,在一些实施例中,屈服应力材料在处于固相或在施加低于屈服应力的水平的应力下材料保留形状的一些其它相中时可以具有介于大约1Pa与1000Pa之间的弹性模量。在一些实施例中,屈服应力材料转变成流体样相所需要的屈服应力可以介于大约1Pa与1000Pa之间。在一些实施例中,屈服应力可以为约10Pa,例如10Pa+/-25%。当转变成流体样相时,屈服应力材料可以具有介于大约1Pa s与10,000Pa s之间的粘度。然而,应理解,屈服应力材料的弹性模量、屈服应力和/或粘度的其它值也是可能的,因为本公开不受此限制。

[0141] 一组细胞可以放在经由任何合适的方法由屈服应力材料制成的3D生长培养基中。

举例来说,在一些实施例中,可以用注射器、移液管或例如自动化液体处置器等其它合适的放置或注射装置将细胞注射或以其它方式放在3D生长培养基内的具体位置。在一些实施例中,自动化细胞分配器的阵列可以用于注射多种细胞样品至3D生长培养基的容器中。将放置装置的尖端移过3D生长培养基可以赋予足够量的能量至尖端周围的区域中,以引起屈服,使得放置工具容易移至3D生长培养基内的任何位置。在一些情况下,通过放置工具施加以使一组细胞在3D生长培养基内沉积的压力也足够引起屈服,使得3D生长培养基流动以容纳这组细胞。放置工具的移动可以手动进行(例如“用手”),或可以通过机械或任何其它合适的机构进行。

[0142] 在一些实施例中,多组独立的细胞可以放置在单个体积的3D细胞生长培养基内。举例来说,3D细胞生长培养基的体积可以大至足以容纳至少2组、至少5组、至少10组、至少20组、至少50组、至少100组、至少1000组或任何其它合适数目的独立的细胞。可替代地,3D细胞生长培养基的体积可以仅仅具有一组细胞。此外,应了解,一组细胞可以包含任何合适数目的细胞,并且细胞可以具有一个或多个不同类型。

[0143] 取决于具体实施例,细胞群组可以根据任何合适的形状、几何形状和/或图案放置在3D细胞生长培养基内。举例来说,独立的细胞群组可以沉积成球体,并且球体可以呈3D网格或任何其它合适的3D图案布置。独立的球体可以包含大致相同数目的细胞并且为大致相同的尺寸,或可替代地,不同球体可以具有不同数目的细胞和不同的尺寸。在一些实施例中,细胞可以布置成例如胚状体或类器官体、管、圆柱体、环面、分层分支血管网、高纵横比物件、薄封闭壳或其它可以与组织、血管或其它生物学结构的几何结构相对应的复杂形状。

[0144] 根据一些实施例,由屈服应力材料制成的3D细胞生长培养基能够实现细胞的3D打印,以呈三维形式形成所需图案。举例来说,电脑控制的注射器尖端可以在3D细胞生长培养基内描绘出空间路径,并在沿着所述路径的位置处注射细胞以形成期望的3D图案或形状。注射器尖端移过3D细胞生长培养基可以赋予足够机械能以引起注射器尖端周围区域的屈服,从而使注射器尖端容易移过3D细胞生长培养基以及适应细胞的注射。在注射后,3D细胞生长培养基可以转变回固体样相,以支持打印的细胞并维持打印的几何形状。然而,应了解,3D打印技术不需要使用如本文所述的3D生长培养基。

[0145] 根据一些实施例,3D细胞生长培养基可以通过将水凝胶颗粒分散在液体细胞生长培养基中来制备。可以使用离心混合器、振荡器或任何其它合适的混合装置将水凝胶颗粒与液体细胞生长培养基混合。在混合期间,水凝胶颗粒可以用液体细胞生长培养基进行膨胀以形成如上文所论述,当施加的剪切应力低于屈服应力时基本上为固体的材料。在混合后,可以经由离心、搅动或任何其它合适的从3D细胞生长培养基去除气泡的方法去除在混合过程期间引入的夹带空气或气泡。

[0146] 在一些实施例中,3D细胞生长培养基的制备还可能涉及缓冲以调整水凝胶粒子和液体细胞生长培养基混合物的pH值至期望值。举例来说,一些水凝胶颗粒可以由具有主要负电荷的聚合物制成,这可能引起细胞生长培养基为过度酸性(pH值低于期望值)。可以通过加入强碱以中和酸并升高pH值以达到期望值来调整细胞生长培养基的pH值。可替代地,混合物可以具有高于期望值的pH值;可以通过加入强酸来降低这类混合物的pH值。根据一些实施例,期望pH值可以在约7.0至7.4,或在一些实施例中,7.2至7.6的范围内,或可能与体内条件对应或可不对应的任何其它合适的pH值。pH值例如可以为约7.4。在一些实施例

中,一旦溶解的CO₂含量调整至期望值,例如大约5%,就可以调整pH值。

[0147] 可以通过进行应变速率扫描来测量屈服应力,其中在许多恒定应变速率下测量应力。可以通过将这些数据拟合成经典赫舍尔-巴尔克利模型(Herschel-Bulkley model)来确定屈服应力: $(\sigma = \sigma_y + k\dot{\gamma}^n)$ (b)。为了确定非屈服LLS培养基的弹性和粘性模量,可以进行1%应变下频率扫描。在广泛频率下弹性和粘性模量保持平坦和分开,行为像阻尼下的开尔文-福格特线性固体(Kelvin-Voigt linear solid)。总之,这些流变特性证实,在颗粒微凝胶下发生固体与液相之间的平稳转变,这有助于其用作细胞打印、培养和测定的3D支持基质。

[0148] 一些实施例可以操作的水凝胶的一实例为卡波姆聚合物(carbomer polymer),例如Carbopol®。卡波姆聚合物可以是聚电解质,并且可以包含可变形的微凝胶颗粒。卡波姆聚合物是分子量为至多3-40亿道尔顿(Dalton)的丙烯酸的颗粒状高分子量交联聚合物。卡波姆聚合物还可以包含丙烯酸与其它水性单体和例如聚乙二醇等聚合物的共聚物。

[0149] 虽然丙烯酸是用于形成聚丙烯酸的常见主要单体,但所述术语不限于此,而是一般包括具有羧酸侧基的所有 α - β 不饱和单体或二羧酸酐和加工助剂,如美国专利第5,349,030号中所述。其它适用的含有羧基的聚合物描述于美国专利第3,940,351号,所述专利是针对不饱和羧酸与至少一种烷基丙烯酸或甲基丙烯酸酯的聚合物,其中烷基含有10至30个碳原子;以及美国专利第5,034,486号、第5,034,487号和第5,034,488号,所述专利是针对顺丁烯二酸酐与乙烯基醚的共聚物。其它类型的这类共聚物描述于美国专利第4,062,817号,其中美国专利第3,940,351号中所述的聚合物另外含有另一烷基丙烯酸或甲基丙烯酸酯并且烷基含有1至8个碳原子。羧酸聚合物和共聚物,例如丙烯酸和甲基丙烯酸的聚合物和共聚物,还可以与如二乙烯基苯、不饱和二酯等多官能物质交联,如美国专利第2,340,110号、第2,340,111号和第2,533,635号中所公开。所有这些美国专利的公开内容中关于羧酸聚合物和共聚物的讨论部分以引用的方式由此并入本文中,所述羧酸聚合物和共聚物在用于聚丙烯酸中时形成屈服应力材料,如本文另外所公开。特定类型的交联聚丙烯酸包括《美国药典(U.S.Pharmacopia)》23NR 18中卡波姆均聚物、卡波姆共聚物和卡波姆互聚物专论,以及如《PCPC国际化妆品成分词典和手册(PCPC International Cosmetic Ingredient Dictionary&Handbook),第12版(2008)中所述的卡波姆和C10-30丙烯酸烷基酯交联聚合物、丙烯酸酯交联聚合物。

[0150] 卡波姆聚合物分散液为酸性的,pH值为大约3。当中和至6-10的pH值时,颗粒显著膨胀。盐加入膨胀的卡波姆可以减小粒度并强烈影响其流变特性。膨胀的卡波姆的折射率几乎与如水和乙醇等溶剂匹配,使得其为光学透明的。原始合成的粉末状卡波姆商标为Carbopol®并且在1958年由BF Goodrich(现称为Lubrizol)商业化,不过可购得在众多不同调配物中的卡波姆。

[0151] 水凝胶可以包括填充的微凝胶-显微镜凝胶颗粒,直径为约5 μ m,由交联聚合物制成。Carbopol®的屈服应力由水含量控制。Carbopol®屈服应力可以在大致1-1000Pa之间变化。因此,两种材料可以微调成跨越细胞通常产生的应力水平。如上文所论述,虽然材料可以具有在1-1000Pa范围内的屈服应力,但在一些实施例中,宜使用具有在1-100Pa或10-100Pa范围内的屈服应力的屈服应力材料。另外,一些这类材料可以具有小于2.5秒、小于

1.5秒、小于1秒或小于0.5秒并大于0.25秒或大于0.1秒的触变时间,和/或小于7、小于6.5或小于5并大于4或大于2或大于1的触变指数。

[0152] 在一个非限制性实例中,3D细胞生长培养基包含以质量计大约0.2%至约0.7%的Carbopol®颗粒(Lubrizol)。Carbopo®I颗粒与如上所述的任何合适的液体细胞生长培养基混合并用其进行膨胀,以形成包含以质量计大约99.3%至约99.8%细胞生长培养基的3D细胞生长培养基。在膨胀后,颗粒具有约1 μ m至约10 μ m的特征尺寸。通过加入例如NaOH等强碱,将混合物的pH值调整至约7.4的值。所得3D细胞生长培养基是具有大约100-300Pa的模量和大约20Pa的屈服应力的固体。当超出此屈服应力的应力施加至此3D细胞生长培养基时,细胞生长培养基转变成粘度为大约1Pa·s至约1000Pa·s的液体样相。如上所述,可以通过变化Carbopo®I的浓度来调整或微调特定机械特性。举例来说,具有较高浓度Carbopol®的3D细胞生长培养基可以更硬和/或具有较大屈服应力。

[0153] 在一实施例中,LLS可以通过在无菌条件下0.9% (w/v) Carbopol®ETD 2020聚合物(Lubrizol公司)分散于细胞生长培养基中来制备。在37°C和5%CO₂的培育条件下通过加入NaOH直至达到pH 7.4,调整培养基的pH值,并在高速离心混合器中将完全配制的材料均质化。Carbopol®ETD 2020在此pH值下最大限度地膨胀,使得其适合于细胞培养应用。将凝胶培养基在37°C和5%CO₂下培育。

[0154] LLS的水凝胶可以依多种浓度分散于溶液(例如具有细胞生长培养基的溶液)中以形成LLS。浓度的一个实例低于以重量计2%。另一浓度实例为以重量计大约0.5%至1%水凝胶颗粒,并且另一浓度实例为以质量计大约0.2%至约0.7%。

[0155] 水凝胶可以包括填充的微凝胶-显微镜凝胶颗粒,直径为约5 μ m,由交联聚合物制成。Carbopol®的屈服应力由水含量控制。Carbopol®屈服应力可以在大致1-1000Pa之间变化。因此,两种材料可以微调成跨越细胞通常产生的应力水平。如上文所论述,虽然材料可以具有在1-1000Pa范围内的屈服应力,但在一些实施例中,宜使用具有在1-100Pa或10-100Pa范围内的屈服应力的屈服应力材料。另外,一些这类材料可以具有小于2.5秒、小于1.5秒、小于1秒或小于0.5秒并大于0.25秒或大于0.1秒的触变时间,和/或小于7、小于6.5或小于5并大于4或大于2或大于1的触变指数。

[0156] 本领域的技术人员将了解具有屈服应力的材料将具有某些触变特性,例如触变时间和触变的指数。如本文所用,触变时间是在去除剪切来源后剪切应力到平台期的时间。本发明人认识到可以用不同方式测量触变时间。如本文所用,除非另外规定,否则触变时间通过将等于材料屈服应力10倍的应力施加于材料几秒,接着将应力降低至屈服应力的0.1倍来测定。在降低应力后剪切速率到平台期的时间量是触变时间。

[0157] 如本文所用,触变指数(对于屈服应力材料)被定义为2s⁻¹的应变速率下的粘度与20s⁻¹的应变速率下的粘度的比率。

[0158] 具有理想屈服应力的屈服应力材料还可以具有理想的触变特性,例如理想的触变指数或触变时间。举例来说,理想屈服应力材料(包括屈服应力低于100帕斯卡(Pascal)的水凝胶材料,下文详细描述其中一些,例如Carbopol®材料)可以具有小于2.5秒、小于1.5秒、小于1秒或小于0.5秒并大于0.25秒或大于0.1秒的触变时间。一种示例性Carbopol®溶

液可以展现低于100帕斯卡(并且在一些实施例中低于25帕斯卡)的屈服应力以及低触变时间。具有低于100帕斯卡的屈服应力的Carbopol®溶液的触变时间可以小于2.5秒、小于1.5秒、小于1秒或小于0.5秒并大于0.25秒或大于0.1秒。

[0159] 在一些实施例中,对于屈服应力低于100帕斯卡的水凝胶屈服应力材料(包括在下文详细论述的材料,如Carbopol®溶液),触变指数小于7、小于6.5或小于5并大于4或大于2或大于1。

[0160] 理想的屈服应力材料,如水凝胶,例如本文描述的Carbopol®溶液,因此可以具有小于2.5秒、小于1.5秒、小于1秒或小于0.5秒并大于0.25秒或大于0.1秒的触变时间,和/或小于7、小于6.5或小于5并大于4或大于2或大于1的触变指数。

[0161] 因为屈服应力材料的屈服应力行为,所以沉积至屈服应力材料中的材料(例如通过本文中所描述的3D打印技术)可以保持固定在屈服应力材料中的适当位置,屈服应力材料或沉积材料不需要固化或以其它方式处理来逆转相变(例如在打印后通过加热至交联)。确切地说,屈服应力材料在材料沉积在屈服应力材料内,包括细胞集群打印在屈服应力材料内时允许无限的工作时间。

[0162] 在另一非限制性实施例中,描述一种用于制备3D细胞生长培养基的方法。所述方法开始于水凝胶颗粒与液体细胞培养基混合时。可以用机械混合器,例如离心混合器、振荡器或任何其它合适的混合装置进行混合,以帮助水凝胶颗粒分散在液体细胞培养基中。在混合期间,水凝胶颗粒可以用液体细胞培养基进行膨胀,形成颗粒凝胶,如上文所论述。在一些情况下,混合动作可能引入空气泡或可能被夹带在凝胶中的其它气泡。这类夹带的气泡经由离心、缓缓搅动或任何其它合适的技术来去除。接着可以调整混合物的pH值;可以加入碱以升高pH值,或可替代地,可以加入酸以降低pH值,直至混合物的pH值达到期望值。在一些实施例中,调整之后的最终pH值为约7.4。

[0163] 系统

[0164] 现在转向图,更详细地描述生物反应器系统的特定非限制性实施例。

[0165] 图1、图2A、图2B和图2C描绘生物反应器系统100的第一实施例,所述生物反应器系统包含多个用于在3D细胞生长培养基中培养细胞(例如肿瘤样品)的样品孔,其在不干扰细胞环境下使营养培养基主动地灌注通过系统。灌注还可以用于产生脉冲式流动,这会影

响细胞行为。

[0166] 生物反应器系统100的实施例的孔优选呈列和行排列,如图1和图2A-2C中所描绘。生物反应器系统100的所描绘实施例使用注射器140产生真空,以从样品孔112吸取培养基,通过过滤材料122并进入培养基收集腔135。在此实施例中,在垂直方向上培养基随着重力行进,并且主动灌流为竖直流动。如图2A至2C的分解视图最佳理解,生物反应器系统100的所描绘实施例由三个水平板-孔板110、中央板120和底板130装配而成。

[0167] 所描绘的孔板110为具有顶表面、底表面和与期望孔高度对应的厚度的平面材料。样品孔112由从孔板110的顶表面延伸至底表面的小孔111和位于孔板110下方的过滤材料122界定。因此,每个孔112的底部由压缩在孔板110与中央板120之间的过滤材料122界定。在一些情况下,如图2A中所示,存在多个过滤器122,例如每个孔112一个。在一些情况下,如图2B和2C中所示,存在单一过滤材料122,充当所有孔112的底部。任选地,孔板的孔可以呈

楔形,以使得孔顶部的直径不同于孔底部的直径。在某些方面,孔顶部的直径可以大于孔底部的直径。平面材料可以为惰性材料。平面材料可以为delrin和/或peek。此组件还可以使用例如聚苯乙烯等材料注射成型。平面材料为展现出低液体吸收和低热膨胀的材料。

[0168] 所描绘的中央板120可以包含多个孔口121,所述孔口被配置成在板堆叠在一起、配合、邻接或以其它方式可操作地装配时与小孔111对准。为了提供密封,一个或多个垫圈123可以定位于中央板120与过滤材料122之间。因此,中央板120可以含有一个或多个用于安放一个或多个垫圈123的凹槽124。如图2A和2C中所示,这些凹槽124可以定位在每个孔口121的周界周围,或如图2B中所描绘,当使用过滤材料122时这些凹槽124可以定位在孔口121的阵列周界周围。如本领域的技术人员将了解,凹槽124和过滤材料122的尺寸和位置应该设定成在垫圈123安放在凹槽124中时提供密封。形成的密封可以是适合于产生真空的密封。中央板可以由疏水性材料制成。这可以帮助在过滤器底部和裙缘(如果存在)上形成小液滴,以及促使小液滴向下至亲水性底座中。中央板可以由聚四氟乙烯(PTFE)制成。此组件还可以注射成型。

[0169] 所描绘的底板130是具有顶表面、底表面和一定厚度的平面材料,其在顶表面中具有空腔131,当板堆叠在一起时所述空腔将培养基收集腔135界定在中央板120下方。空腔131的大小设定成当将板堆叠时与所有小孔111和孔口121以流体方式连通。为了提供密封,第二垫圈132可以定位于底板130与中央板120之间。因此,底板130可以含有用于安放第二垫圈132的沟槽133,所述沟槽位于空腔131的周界周围。底板可以为亲水性的,以优先从中间板吸取流出物至流出物收集腔中。材料可以为聚醚醚酮(PEEK),并且还可以使用delrin。此组件还可以注射成型。

[0170] 生物反应器系统100通过在培养基收集腔135中建立真空来起作用,这产生负压,从孔112中吸取培养基,通过过滤材料122,并进入培养基收集腔135中。因此,如图1、2A、2B和2C中所示,一个或多个真空来源,例如注射器140,可以在一个或多个与空腔131以流体方式连通的开口134处连接或以可释放方式连接至底板130。例如鲁尔锁连接器等连接器141可以用于促成此连接。

[0171] 图3和4描绘生物反应器系统200的第二实施例,其允许在生物样品生长期间连续光学进入。此实施例具有三个同心壁,外壁220、中间壁230和内壁240,都附连至底板260。还描绘了多个外部辐条226,所述外部辐条将外壁220连接至中间壁230。还存在多个内部辐条236,所述内部辐条将中间壁230连接至内壁240。总之,这些壁、辐条和板界定多个外部(培养基)腔221、多个中间(培养)腔232和中央(培养基收集)腔252,其中液体培养基222从外部腔221朝内径向流动,通过中间腔232,并进入中央腔252中。注意,在一些实施例中,省略外部辐条,并且存在将培养基222馈送所有中间腔的单一外部腔。壁附连至底板。过滤材料在环周围不连续。每个分开的孔存在通道切口(图中示出),只允许流过每个单独的孔。这可以优先引导流至生物样品位置,而不是建立一个大的向内的流动前峰。它又保证过滤器在适当位置,确保其不脱离或漂移。

[0172] 外壁220、中间壁230和内壁240每一个都具有顶表面和底表面,以及外表面和内表面。如果存在外部辐条,那么其附连至外壁的内表面、中间壁的外表面和底板,以提供密封。内部辐条附连至中间壁的内表面、内壁的外表面和底板,以提供密封。外壁220的底表面附连至底板260,提供密封。中间壁230的底表面附连至第一过滤材料231,第一过滤材料附连

至底板260。内壁240的底表面附连至第二过滤材料241,第二过滤材料附连至底板260。此过滤器由与先前描述的3D水凝胶泡沫相同的材料制成。

[0173] 外部腔221大小设计并且被配置成盛放适合于所关注的期望细胞类型生长的新鲜液体培养基222。中间(培养)腔232大小设计并且被配置成盛放也用于细胞培养的3D细胞生长培养基。当在中央(培养基收集)腔252中产生负压时,从外部腔221中牵引液体培养基222,通过第一过滤器231,并进入中间(培养)腔232。同时从中间(培养)腔牵引旧的液体培养基,穿过第二过滤器241并进入中央(培养基收集)腔252,在所述中央腔中其作为被吸取的细胞培养基253采集。

[0174] 可以在中央腔252中使用多种构件产生负压。如图4中所描绘,一种选择是使用固定螺杆250,其充当螺杆驱动的致动器。举例来说,内壁240的内表面可以带有螺纹以接纳固定螺杆250。如果此螺纹是气密的并且螺杆正确塞住251,那么螺杆250的拧紧和松脱改变中央腔252中的气压。适用于塞子的材料包括(但不限于)硅酮或不会不利地与生物材料相互作用的任何类型的硬橡胶材料。在某些实施例中,使用聚二甲基硅氧烷(PDMS)或momentiv。

[0175] 如图4中所示,培养样品的中间腔232可以用盖子234遮蔽以控制气氛并防止污染。盖子234允许气体交换,并且例如可以使用高度透氧的材料制造盖子。在一些情况下,盖子234由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制造。在一些情况下,盖子234由Comfilcon A、Lotrafilcon B或其组合制造。在一些实施例中,盖子234为单一环形结构。在一些情况下,然而,每个中间腔232使用单独的盖子。盖子234可以是光学透明的,以便允许在不去除盖子下目视检查下面的腔。

[0176] 在优选实施例中,底板260是光学透明的。因此,底板260可以由生物相容的任何光学透明材料,例如玻璃或聚碳酸酯制造。

[0177] 在生物反应器系统的一些实施例中,培养基径向向外流动而不是向内。如本领域的技术人员将了解,除将在外部腔中产生负压并将新鲜培养基加入至中央腔中外,这一系统可以用与第一实施例相同的方式制造。同样,可以使用正压,而不是负压。

[0178] 图5和6描绘生物反应器系统300的第三实施例,其具有径向向外的流动,其中培养基333从培养基腔331流至放在下方的培养腔341中并进入含有生物样品343的3D生长培养基(LLS)342中,并接着从培养腔341径向向外流至培养基收集腔321中。所描绘的系统300是由顶部器皿310、底部器皿320和培养基插入物330装配而成。培养基插入物是可去除的。其可以具有单孔洞或多孔洞,取决于期望的流动。

[0179] 所描绘的顶部器皿310包含竖直环形壁,所述竖直环形壁具有内表面、外表面、底表面、厚度和在顶部径向延伸的平面唇缘。此环形壁的底表面附连至过滤材料323,过滤材料附连至底板340以形成密封。因此,顶部器皿310的竖直壁的内表面与底板340的顶表面形成界定具有内径和高度的培养腔341的圆柱体。

[0180] 所描绘的底部器皿320具有平面部分和竖直延伸的环形壁,所述平面部分具有厚度、顶表面和底表面,所述环形壁具有外表面、内表面和顶表面。环形壁的至少一个表面被配置成使顶部器皿310的唇缘与气密密封件啮合。如图5中所示,底部器皿320环形壁的顶表面可以被配置成接纳垫圈322,所述垫圈在底部器皿320环形壁的顶表面与顶部器皿310唇缘的底表面之间形成密封。如图6中所示,顶部器皿310唇缘可以进一步向下延伸至具有外

表面和内表面的边缘中,使得边缘的外表面与底部器皿320环形壁的内表面啮合。此连接也可以用垫圈密封。然而,如图6所示,这些表面还可以带有螺纹或呈脊状422。在这些实施例中,例如真空润滑脂等材料可以用于改善密封。涵盖用于器皿与气密密封件啮合的任何其它配置用于所公开的系统。

[0181] 当这些器皿啮合(或以其它方式配合或可操作地装配)时,培养基收集腔321由顶部器皿310环形壁的外表面、顶部器皿310唇缘的底表面、底部器皿320平面部分的顶表面和底部器皿320环形壁的内表面界定。如图5和6中所示,真空端口311可以在顶部器皿310或底部器皿320中的任何地方连接至开口312,只要其以流体方式连接至培养基收集腔321即可。

[0182] 液体培养基333可以直接加入至培养腔341中。然而,在所描绘的实施例中,培养基插入物330定位于培养腔341上方以界定单独的培养基腔331,所述培养基腔可以填充有液体培养基333。此插入物330可以是圆柱体,外径小于培养腔341的内径并且高度小于培养腔341的高度。培养腔341的高度小于培养基插入物330的高度界定了可用于细胞培养的区域,其中容纳3D生长培养基。为了保持培养基插入物330超过培养区,插入物330可以具有径向延伸的唇缘,因此其将搁置于顶部器皿310唇缘的顶表面上。培养基插入物330可以在底部中具有开口332,以使得培养基腔331与培养腔341以流体方式连通。

[0183] 可以通过施加真空至真空端口311来产生负压。如熟练技术人员所了解,此端口的定位不限于图5中描绘的内容。这将从培养基腔331吸取液体培养基333,通过培养基插入物330中的开口332,进入培养腔341中。同时从培养腔341牵引旧的培养基,通过过滤材料323,进入收集所吸取的细胞培养基324的培养基收集腔321中。

[0184] 图7描绘生物反应器系统400的第四实施例,其与第三实施例的不同之处为毛细管力用于径向向外吸取培养基。因此,生物反应器系统400的第四实施例具有径向向外的流动,其中培养基433从培养基腔431流至放在下方的培养腔441中并接着从培养腔441径向向外流至培养基收集腔421中。所描绘的系统400由底部器皿420、培养基插入物430和与培养腔441以流体方式连通的毛细管装置410装配而成。

[0185] 毛细管装置410可以包含microradius玻璃小管。毛细管装置410可以包含烧结微米粒子,所述烧结微米粒子具有与液体培养基的固有接触角,这产生显著润湿并且因此产生大毛细管力。合适的实例包括硼硅酸盐玻璃、钢和多种陶瓷;然而,材料可以工程化以产生特定压力梯度并诱发特定流速。

[0186] 所描绘的底部器皿420包含竖直环形壁,所述竖直环形壁具有内表面、外表面、底表面和厚度。此环形壁的底表面附连至过滤材料423,过滤材料附连至底板440以形成密封。因此,底部器皿420的竖直壁的内表面与底板440的顶表面形成界定具有内径和高度的培养腔441的圆柱体(容纳3D生长培养基)。

[0187] 在这些实施例中,例如真空润滑脂等材料可以用于改善密封。涵盖用于器皿与气密密封件啮合的任何其它配置用于所公开的系统。

[0188] 液体培养基433可以直接加入至培养腔441中。然而,在所描绘的实施例中,培养基插入物430定位于培养腔341上方以界定单独的培养基腔431,所述培养基腔可以填充有液体培养基433。此插入物430可以是圆柱体,外径小于培养腔341的内径并且高度小于培养腔441的高度。培养腔441的高度小于培养基插入物430的高度界定了可用于细胞培养的区域(其中容纳3D生长培养基)。为了保持培养基插入物430超过培养区,插入物430可以具有径

向延伸的唇缘,因此其将搁置于底部器皿420的顶表面上。培养基插入物430可以在底部中具有开口432,以使得培养基腔431与培养腔441以流体方式连通。

[0189] 图8和9描绘生物反应器系统500的第五实施例,其与第一实施例的不同之处在于如何产生负压。如同第一实施例一样,生物反应器系统500的孔优选呈列和行排列。所描绘的生物反应器系统500使用能在底板530内以旋转方式安装的固定螺杆540产生真空,以从样品孔511吸取培养基,通过过滤材料522,并进入培养基收集腔531。如图9的分解视图中最佳理解,所描绘的生物反应器系统500由三个水平板-孔板510、中央板520和底板530装配而成。

[0190] 如图8和9中所描绘,可以使用能在底板530内以旋转方式安装的固定螺杆540(即,螺杆驱动的致动器)产生负压。举例来说,以流体方式连接至培养基收集腔531的真空室534可以带有螺纹以接纳固定螺杆540。如果真空室534和螺纹是气密的,那么螺杆540的拧紧和松脱改变培养基收集腔531中的气压。

[0191] 所描绘的孔板510为具有顶表面、底表面和与期望孔高度对应的厚度的平面材料。样品孔由从孔板510的顶表面延伸至底表面的小孔511和位于孔板510下方的过滤材料522界定。因此,每个孔的底部由压缩在孔板510与中央板520之间的过滤材料522界定。在一些情况下,存在多个过滤器522,例如每个孔一个。在一些情况下,如图8和9中所示,存在单一过滤材料522,充当所有孔的底部。

[0192] 所描绘的中央板520可以包含多个孔口521,所述孔口被配置成在板堆叠在一起时与小孔511对准。为了提供密封,一个或多个垫圈523可以定位于中央板520与过滤材料522之间。因此,中央板520可以含有一个或多个用于安放一个或多个垫圈523的凹槽524。如图8和9中所示,这些凹槽524可以定位于每个孔口521的周界周围,或这些凹槽524可以定位于孔口521的阵列周界周围。如本领域的技术人员将了解,凹槽524和过滤材料522的尺寸和位置应该设计成在垫圈523安放在凹槽524中时提供密封。

[0193] 所描绘的底板530为具有顶表面、底表面和厚度的平面材料,当板堆叠在一起时其在中央板520下方形成一个或多个培养基收集腔531。为了提供密封,第二垫圈532可以定位于底板530与中央板520之间。因此,底板530可以含有用于安放第二垫圈532的沟槽533,所述沟槽位于培养基收集腔531的周围。

[0194] 如上所述,以上描绘的每种系统的3D细胞生长培养基(在本文中又称为LLS)可以包括触变或屈服应力材料,或适合于暂时相变的任何材料。在一些实例中,触变或屈服应力材料可以包括软颗粒凝胶。软颗粒凝胶可以由用液体细胞培养基膨胀的聚合物水凝胶颗粒制成。取决于具体实施例,当膨胀时,水凝胶颗粒的直径可以介于 $0.5\mu\text{m}$ 与 $50\mu\text{m}$ 之间,直径介于约 $1\mu\text{m}$ 与 $10\mu\text{m}$ 之间,或直径为约 $5\mu\text{m}$ 。

[0195] 传感器可以用于检测压力、pH值、氧含量、例如葡萄糖等特定代谢物的变化、存在或不存在的例如病毒蛋白等指示分子或对生物反应器内的组织或暴露于组织的材料的作用的任何其它标志。

[0196] 液体培养基

[0197] 必须从两个视角考虑液体培养基组成:基础营养物(糖、氨基酸)和生长因子/细胞因子。用于系统的液体培养基的组成将取决于有待如本文所述的生物反应器系统培养的细胞。液体培养基的选择对于本领域中熟练技术人员来说是常规的。由于细胞自身产生调控

性大分子,细胞的共培养常常从培养基中减少或消除血清。能够以生理方式供应这类大分子调控因子是使用3D灌注共培养物的主要原因。已经测试补充有适合于长期培养原代分化肝细胞的若干生长因子的无血清培养基,并发现其支持肝细胞与内皮细胞共培养。通常在活化gp130信号传导通路的白血病抑制因子(LIF)存在下以全能状态维持ES细胞。若干种培养基配制物可以支持ES细胞的分化,其中不同细胞因子混合物产生不同分化模式。培养基更换速率可以通过测量关键糖和氨基酸以及关键生长因子/细胞因子的消耗速率来确定。如果使用具有碳酸氢钠的细胞培养基,那么可以通过例如将具有生物反应器/贮存器对的模组放入CO₂培育箱中来控制环境。

[0198] 细胞

[0199] 可以将多种不同的细胞施加到所公开的系统的3D生长培养基中。在一些实施例中,这些是正常人类细胞或人类肿瘤细胞。细胞可以是均质悬浮液或细胞类型的混合物。不同细胞类型可以相继、一起或在使初始悬浮液粘附和增殖(例如内皮细胞、接着肝细胞)后接种至培养基上和/或中。可以从细胞培养或活检获得细胞。细胞可以是一个或多个类型,例如内皮细胞或实质细胞等分化细胞,包括神经细胞,或例如干细胞或胚胎细胞等未分化细胞。在一个实施例中,将培养基用包括内皮细胞在内的细胞混合物或用可以分化成包括将形成“血管”的内皮细胞的细胞在内的全能/多能干细胞和例如肝细胞、胰腺细胞或其它器官细胞等至少一种类型实质细胞接种。

[0200] 最初可以培养细胞并接着用于筛选化合物的毒性。细胞还可以是用于筛选具有期望作用的化合物。例如内皮细胞可以用于筛选抑制血管生成的化合物。肿瘤细胞可以用于针对抗肿瘤活性筛选化合物。表达某些配体或受体的细胞可以用于筛选结合于所述配体或活化所述受体的化合物。干细胞可以单独或与其它类型细胞一起接种。最初可以将细胞接种,接着在建立初始生物反应器组织后引入第二组细胞,例如在肝脏组织环境中生长的肿瘤细胞。可以针对肿瘤细胞行为研究肿瘤细胞或可以在肿瘤细胞生长期间目测分子事件。在引入到设备中之前或之后可以对细胞进行修饰。细胞可以是来自患者的原代肿瘤细胞,进行诊断和预后测试。可以评估肿瘤细胞对药剂或基因疗法的敏感性。肿瘤细胞对药剂或基因疗法的敏感性可以与肝脏对固定药剂或基因疗法的代谢相关联。细胞可以是干细胞或祖细胞,并且通过成熟组织诱发干细胞或祖细胞分化。可以通过操纵系统中的流速或培养基组分来诱发成熟细胞进行复制。

[0201] 细胞在如本文所述的生物反应器系统中在3D生长培养基中培养。可以通过本领域中的多种技术,例如用户手动移液、机器人液体处理系统、3D打印机等将细胞放(或“涂铺”)在生长培养基中。

[0202] 应用

[0203] 系统具有许多不同的应用,例如鉴定疾病标志物;评估抗癌治疗剂的功效;测试基因疗法载体;药物研发;筛选;研究细胞、尤其干细胞;研究异生物的生物转化、清除、代谢和活化;研究化学剂跨越上皮层的生物可用性和输送;研究生物制剂跨越上皮层的生物可用性和输送;研究生物或化学剂跨越血脑屏障的输送;研究化学剂的急性基础毒性;研究化学剂的急性局部或急性器官特异性毒性;研究化学剂的慢性基础毒性;研究化学剂的慢性局部或慢性器官特异性毒性;研究化学剂的畸形学;研究化学剂的基因毒性、致癌性和诱变性;检测感染性生物制剂和生物武器;检测有害化学剂和化学武器;研究感染性疾病;研究

化学剂治疗疾病的功效;研究生物剂治疗疾病的功效;研究药剂治疗疾病的最佳剂量范围;预测体内器官对生物剂的反应;预测化学或生物剂的药物动力学;预测化学或生物剂的药效学;研究遗传内容对于对药剂的的影响;可以选择或构建在微米级组织下的过滤或多孔材料,以便结合变性的单链DNA;研究响应于化学或生物剂的基因转录;研究响应于化学或生物剂的蛋白质表达;研究响应于化学或生物剂的代谢变化;通过数据库系统和相关模型预测药剂影响;通过专家系统预测药剂影响;以及通过基于结构的模型预测药剂影响。

[0204] 方法

[0205] 本文描述了使用如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统的方法。使用方法可以包含提供如本文所述的生物反应器系统。使用方法可以包含提供和制备如本文所述的生物反应器系统,提供和制备如本文所述的生物反应器系统的LLS,将LLS放至生物反应器系统中,提供一个或多个生物样品,以及将一个或多个生物样品移液至生物反应器系统的LLS中。使用方法可以进一步包含向系统提供正或负表压以提供通过系统的一个或多个流动路径的主动灌流。使用方法可以进一步包括向如本文所述的系统提供一种或多种药物(例如小分子、蛋白质、核酸等等)。使用方法可以进一步包括向如本文所述的系统提供一种或多种药物,使生物样品成像,并分析生物样品的图像。

[0206] 试剂盒

[0207] 本文描述了试剂盒。如本文所述的试剂盒可以包含如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统。试剂盒可以包含被配置成一个或多个离散成像舱的一个或多个具有灌注功能的生物反应器系统。试剂盒可以包含被配置成一个或多个离散成像舱的一个或多个具有灌注功能的生物反应器系统和具有基底容器和盖的盒。试剂盒可以包含被配置成高通量的基于多孔板的阵列的一个或多个具有灌注功能的生物反应器系统。如本文所述的试剂盒可以进一步包含压力产生构件,例如具有被配置用于刺穿自愈性环形密封的针的注射器。如本文所述的试剂盒可以进一步包含压力表。如本文所述的试剂盒可以进一步包含一种用于启动如本文所述的生物反应器系统的螺杆驱动的致动器的装置,例如螺杆刀。除制造和使用LLS所需的组件外,如本文所述的试剂盒还可以包含如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统所需要的物理硬件。除制造和使用LLS和3D水凝胶过滤器所需的组件外,如本文所述的试剂盒还可以包含如本文所述的具有灌注功能的生物反应器系统所需要的物理硬件。

[0208] 用于精确放置特征的机械移液导引件

[0209] 生物材料的3D打印在技术上常常是复杂的,也是昂贵的。对于希望观测3D生物构建体的研究人员来说,在不使用3D打印机或机器人技术下精确地放置那些构建体被证明是极其困难的。如本文所述的生物反应器系统可以包括机械移液导引件,例如本文所述的机械移液导引件。这类机械移液导引件将允许使用者使用标准移液管精确地“3D打印”生物材料,并且不需要使用其无法接近的昂贵设备。

[0210] 如本文所述用于3D精确放置特征的机械移液导引件可以是能够使用机械移液管将材料分散在生物反应器板或任何孔板的孔内的精确位置的装置。装置在三维上限定移液管尖端的位置,允许使用者将移液管以已知的高度和已知的x和y位置插入孔中。这可以用在不使用电子装置或机器人技术下在基于凝胶的培养基(即,3D生长培养基或LLS)中手动“3D打印”材料的方式。在具有成像能力的生物反应器板中,这允许以精密和可重复的高

度放置材料,其中由于特征精确放置在相对于显微镜的成像光学件相同的焦平面内,所以高放大率显微镜检查是可能的。这类导引件又允许产生不同形状阵列,其中多种材料构建体可以在3D中以精确方式相对于彼此放置。

[0211] 本公开的方面包括在变化孔板类型和变化孔内的XYZ座标时允许使用者“打印”。导引件模拟通过高精度3D打印机实现的结果,却不使用打印机或没有与这种水平的自动化相关联的时间和成本。使用者可以使用单一导引件迅速和重复打印构建体至具有成像功能的板中以进行实验。使用者还可以具有各种导引件,每种指定构建体形状和可以用于构建体成像的最大放大程度。导引件可以打印多种构建体,允许使用者有效地将构建体形状和成像放大程度进行无限的组合。

[0212] 如本领域的技术人员将了解,这类导引件还可以形成阵列,能够实现同时使用多个移液管尖端,例如标准实验室多通道微量移液管。

[0213] 因为导引件可以允许使用者在孔内任何期望的高度或位置下“3D打印”,所以使用者可以将一种生物材料类型放在孔中或可能研究3D中的共培养。不需要昂贵的设备,这种产品可能降低希望模拟生物材料3D打印的研究实验室的费用。导引件将允许使用者以极其精确的方式将材料在3D中放置。导引件的设置和使用是对使用者非常友好的并且也是具有极大时效性的,并且可以简化3D打印生物样品的工艺。

[0214] 如本文所述的这类机械移液管导引件可以进行调整以便适应多种具有不同大小和来自不同制造商的移液管尖端。导引件可以进行调整以便在一维上具有变化的孔口,并且可以对在其它维上的高度进行调整。

[0215] 在图10的横截面视图中示出如本文所述的机械移液管导引件600的一实施例。如图10中所描绘,机械移液管导引件600可以被配置成邻接生物反应器系统614的一个方面的一个或多个顶表面612,其中使用者希望将例如细胞640等特征移液至培养腔617中所含的3D生长培养基中。机械移液管导引件600还可以配置有在装置600外围周围的向下延伸的唇缘614,所述唇缘被配置成邻接将进行移液的结构610的一个或多个外侧。

[0216] 图10示出根据本公开的一实施例600。如从图10的横截面视图中可见,移液管620(也是一次性移液管尖端)在若干维(例如Z和X和Y)上进行限定。这允许在相对于培养腔616、培养基收集腔或液体贮存器的底部已知和可重复的高度630下精确放置例如细胞640等特征至生物反应器系统610中。

[0217] 基于盒的多孔板:

[0218] 成像灌注舱(在本文中又称为离散生物反应器单元)允许在3D环境中培养生物样品(例如细胞),寿命比其它培养方法长。当场成像可以在生物样品上进行,允许使用者追踪长时间内相同样品内的生长和变化。为进行成像,每个舱必须单独地输送至显微镜并放至显微镜上预先存在的固定装置中。通过使用基于盒的多孔系统,若干成像舱可以固定至相同容器以更容易地输送和成像。

[0219] 本公开的方面包括一种基于盒的多孔系统,其包括基底容器和盖。盒可以盛放多个成像舱,所述成像舱可以牢固地固定至基底。每个成像舱固定至大量楔形柱(例如六个楔形柱-舱的每一侧上三个),所述楔形柱经由过度约束的干涉配合将成像舱安放在盒内。盒的基底具有查看端口,允许通过每个成像舱的玻璃查看窗口成像。盒盖允许接近查看舱的孔。此盖还提供了供充分气体交换、空气流动的气隙,并且可以提供盒内的栖息条件。可以

去除盖并用可以将整个盒转换成培育箱的不同盖替换。这种转换像以下一样简单：将新盖放至盒，并连接任何必需的气体管线（通过位于盒上任何地方的一个或多个气体端口）和热源。这在显微镜检查期间尤其适用，因为长时间离开培育箱环境会改变实验结果。

[0220] 本公开的方面包括能够在同一个系统内存储、输送和成像。可以培育整个系统并且成像舱在馈送和输送期间经历最低程度的单独处置。盒提供了板的XYZ位置的精确可重复性。盒还允许接近板底部上的查看端口以进行成像。整个盒可以放置在显微镜上以伴随标准孔板一起方便地研究实验。可以记录每个孔的XYZ位置并用于随后成像以维持相同取向。盒特征是滑动的盖以在处置期间保护板。盖的特征是足以允许培育箱中板周围的气体、湿度和空气流动的间隙。

[0221] 本公开的方面能够实现使用者以更精确的方式将成像舱成像，同时也允许更佳地处置、输送和存储成像舱。本公开的方面将产生一种盒，其可以结合成像舱和此产品的其它变化形式使用。当追踪生物样品中的变化时，由于固定在盒内和显微镜上的高度可重复性，使用者可以在相同位置重复成像。成像舱的任何使用者又想要购买此以帮助成像、存储和处置。

[0222] 图11中描绘了基于盒的多壁板700的一实施例，其处于封闭或装配的位置。如图11中可看出，盒700的实施例包含基底容器712，所述基底容器具有被配置用于接纳离散成像灌注舱718（在本文中又称为离散生物反应器单元）的腔714，和被配置成牢固地盖住基底容器712的盖716。在图11的实施例中，盖固定设备是楔形榫720，其允许盖716滑动至基底容器712上，使得其在不滑动下无法轻易撬开。图11的实施例700是正方形并且被配置用于盛放6成像舱718，但是如本领域的技术人员将了解，盒700可以被配置成任何合理的尺寸或形状或任何合理数目的离散成像舱718，取决于使用者的需求。

[0223] 如先前所提及，盒可以通过可定位在盒或盒盖的任何表面上的多个气体端口中的一个，能够操作地连接至一个或多个气体源（例如氧气、氮气和二氧化碳）。

[0224] 盒还可以能够操作地连接至热源，以例如通过加热板、水浴或其它常用加热装置提供热至成像舱。

[0225] 盒或盒盖可以由塑料或例如金属等其它材料构建。

[0226] 盒盖可以含有任何尺寸的光学透明的查看窗口，其包含例如玻璃或塑料等光学透明材料。在某些方面，盒盖可能不是光学透明的。

[0227] 图12的分解视图中说明基于盒的系统700的实施例和其它方面。如分解视图中可见，盒700可以包含光学透明的查看窗口716a（由玻璃、塑料或其它透明材料制成），并且本领域的技术人员将了解光学透明部分准确的尺寸和形状可以根据使用者的需求来变化。

[0228] 盒盖716可以被配置成牢固地与基底容器712配合或一起装配。图12的实施例描绘了燕尾结构720，其中在盖716的一个或多个外边缘上的唇缘720a被配置成放在基底容器712的一个或多个外部顶部区域上的凹槽720b中，不过如本领域的技术人员将了解，可以使用其它固定装置（例如干涉配合柱和门闩）。

[0229] 如从图12的分解视图可见，基底容器的面对盖的表面730可以具有凹口732，所述凹口为离散成像舱718的底表面的形状，以使得离散成像舱718可以固定到凹口。凹口可以具有光学透明的成像窗口734或孔洞以允许光路照射盒700整个所述位置处的竖直柱。

[0230] 凹口还可以具有一个或多个舱固定机构734。下文描述舱固定机构的一实施例。在

所述实施例中,一个或多个截头圆锥形的楔形环形柱734从基底容器732的面对盖的凹口的表面延伸至盖,其中柱734呈楔形,以使得基底具有比柱的尖端大的直径。离散成像舱718可以在底部或环形截头圆锥形凹口上具有接纳孔洞,所述接纳孔被配置用于接纳柱以提供紧密干涉配合,由此将成像舱718固定在盒700内X、Y或Z轴中的一个或多个中。盒700还可以被配置成使得从盖的面对基底容器的底表面至基底容器的面对盖730的表面的盒高度与离散成像舱718的高度近乎相同,由此以所述方式固定舱。

[0231] 使用楔形柱固定的可重复定位方法:

[0232] 传统的动态安装解决方案是精确并且可重复的。然而,在需要制造的特征的能力和多种设计中其如何执行中发现一些缺点。本公开描述了一种容易制造并且应用广泛的固定配置。

[0233] 此方面在一实施例中描述了一种固定配置,其由在装配件的组件一上的与第二组件上的楔形对准孔洞配合的三个或更多个楔形柱构成。使用多个楔形柱允许过度约束的干涉配合以促使未固定组件对准。楔形啮合楔形对准孔洞的内壁,集中每个柱和对准孔洞对。一旦固定组件一,就将其稳固地保持在适当位置。接着容易从楔形柱去除组件,并且可以在可重复的精确度下放回至楔形柱上。

[0234] 本公开的方面包括楔形柱和其楔形对准孔洞对应物简单而有效的几何形状。此几何形状可以用大量设计来执行,并且比传统的动态安装解决方案容易制造得多。本公开的方面的利用也是简单的,因为用很少的垂直力就可以放置和去除组件来啮合或脱离对准孔洞的壁上的楔形柱。然而,将系统移位花费巨大的侧向力,使得组件稳固地固定住,在大部分应用中不会产生问题。

[0235] 这种固定方法的特定应用包括生物样品的重复显微镜检查和在生物材料3D打印期间孔板的可重复放置。使用这种方法可以将能够进行显微镜检查的灌注板或任何能够进行显微镜检查的孔板固定至显微镜。显微镜可以具有接纳板,所述接纳板包括此固定系统的楔形柱组件,而能够进行显微镜检查的板含有对准孔洞组件。样品可以放置在显微镜上,成像,并且接着可以去除。此样品可以在几天和几周内的不同时间点在同孔内的相同位置成像,因为其每次可以精确地固定在相同地点。这允许精确追踪流动的细胞和组织的生长。在生物样品3D打印期间可以使用类似的系统。孔板可以被固定用于打印、打印成型并接着存储以使生物样品成熟。接着其可以在稍后的时间点返回到打印机,并且可以再次打印成型,这在尝试3D共培养时是非常适用的。

[0236] 本公开的方面可以应用于各种产品,包括(但不限于)孔板、显微镜和生物3D打印固定装置。举例来说,孔板和显微镜板插入物可以利用这种固定方法,允许使用者可重复地将孔板精确地放置在显微镜上。对于3D打印,可以在打印过程期间精确而牢固地固定孔板。

[0237] 本公开的方面允许容易、可重复和精确地放置组件。使用者施加极少的垂直力,就可以轻易地放置或去除物品,允许使用者平缓地固定物品,如孔板,而不干扰其内含物。对于制造来说,楔形柱和对准孔洞加工并合并到设计中简单得多。本公开的方面还可以增加生物样品显微镜检查期间的准确度,允许孔板成像、从显微镜去除以及在稍后的时间点在相同区域中再次成像。

[0238] 上文描述了这类可重复定位系统的方面并在图13A-13B中更仔细地说明。图13A示出如本文所述的可重复定位系统的放大横截面视图,其一实施例又在图12的盒中示出。图

13A的横截面视图示出衬底804(第一组件),所述衬底与可拆卸的试样808(第二组件)通过这类楔形柱固定系统802啮合。如图13A中可见,楔形凸状柱802存在于衬底上,向上朝可拆卸的试样808延伸,并啮合凹口806中的可拆卸的试样808,所述凹口被配置成接纳柱802并与柱802的几何形状互补。在一实施例中,柱802为环形截头圆锥形柱,并且凹口806被配置成接纳所述柱,但如本领域的技术人员将了解,本公开不意图特别限于所述几何形状。

[0239] 图13B示出图13A中描绘的横截面视图900的放大分解视图。如从图13B可见,可拆卸的试样908(例如类似于如图12或本公开的其它图中所示的离散成像舱或离散生物反应器单元)可以与衬底904(或衬底内的凹口)啮合并通过楔形柱固定系统固定至所述衬底。如从本公开显而易见,衬底904可以被配置用于单一可拆卸的试样908(或离散成像舱),或衬底904可以是如本文所述的生物反应器系统的另一方面的表面,例如上述基于盒的多孔系统的基底容器的表面,其一实施例描绘于图11和12中并且进一步在上文描述。柱902可以从被配置用于接纳可拆卸的试样908的表面903向上延伸。

[0240] 用于能够进行显微镜检查的灌注板的盖子

[0241] 标准多孔板使用透明盖以便保持碎片在孔外并允许在培育或无菌空间外面输送板。

[0242] 如本文所述的生物反应器系统的培养物成像板需要相同类型的系统,但是由于板的几何形状和其用途,其必须作出改变。在如本文所述的生物反应器系统的成像板上使用的盖子可以含有光学透明(例如澄清光学透明)窗口,用于查看系统的各方面,例如进料孔和成像孔。这个开口还能允许光穿过主要孔,用于在标准显微镜上查看。

[0243] 如本文所述的盖子还可以在培养基收集腔上含有用于压力致动螺杆或其它真空来源的开口,以便在不去除盖子下能够接近和利用螺杆。盖子还可以在板与盖子之间具有空间,所述空间使盖子无法抵靠板密封。这确保在培育环境中时足够的气体交换、空气流动和湿度。盖子显著减少成像板中可能经历的蒸发。

[0244] 盖子可以进行标记以容易鉴定实验。盖还可以进行色泽编码以指示板的内含物。例如白色盖可以指示无生物材料的板。例如黑色盖指示含有生物材料的板。例如红色盖可以指示已经给与药物或其它致癌物质的板。本领域的技术人员将了解任何色彩或色彩的组合可以用于根据使用者的需求和要求对盖进行色彩编码。

[0245] 图14A和14B说明如本文所述的生物反应器系统的一方面,例如如至少图11-13中所示的离散成像舱的盖子1000的一实施例的俯视图和仰视图。图14A描绘如本文所述的生物反应器系统的一方面的盖子1000的俯视图。如从俯视图可见,盖子1000含有孔洞1002,所述孔洞充当例如致动螺杆的真空来源的进出源。还如图14A中所示,盖子1000具有光学透明的查看窗口1004,允许使用者观察系统内部的各方面,例如培养腔、液体贮存器或两者。

[0246] 图14B中示出如本文所述的盖子1000的一实施例的底部。如图14B的仰视图中可见,存在供使用者接近真空来源的孔洞1002,以及光学透明的查看窗口1004。盖子1000的底部可以具有凹口,所述凹口被配置用于安装和盛放查看窗口的光学透明材料1006,例如玻璃显微镜盖玻片。查看窗口1004的光学透明材料1006可以附连至盖子表面。

[0247] 不意图限制,光学透明材料或装置可以为例如尺寸0或1的玻璃盖玻片,并且可为9mm×22mm,但是如本领域的技术人员将了解,设计的不同实施例可以使用不同外部尺寸。光学透明材料可以非常薄以维持合适的图像清晰度。

[0248] 其使用边缘周围的光学胶附连以密封其并将其保持在适当位置。

[0249] 如图14B的仰视图中可见,盖子1000还可以含有从底部向下延伸的唇缘1008,所述唇缘被配置成邻接如本文所述的生物反应器系统的各方面,例如如图11-13中所示和如上所述的离散成像舱的外表面。

[0250] 图15A和15B中示出如本文所述的生物反应器系统的盖子和成像方面的实施例的额外方面。图15A描绘被配置成彼此配合的离散成像舱1010和盖子1000的一实施例的分解视图。

[0251] 如图15B的分解视图中可见,盖子1000具有窗口1002、光学查看窗口1004和唇缘1008。唇缘被配置成与成像舱1010配合,以使得在装配时培养基收集孔1012的真空设备装配件装到盖子1000的窗口1002中。盖子1000的查看窗口1004允许目视检查液体贮存器1016、注射端口1018和/或成像舱1010的培养孔1014。盖子1000的唇缘1008被配置成紧密地邻接成像舱的侧面,以使得当与成像舱1010一起装配或配合时盖子1000在x轴、y轴或两者中被唇缘1008约束。

[0252] 图15B描绘与图15A的离散成像舱一起装配的盖子,并且示出根据本公开的已装配的离散成像舱1020的一实施例。

[0253] 药物递送的注射端口

[0254] 当在标准培养条件下在生物样品上测试药物(对生物样品具有生物效应的某物,其可以具有已知的结构,例如小分子、蛋白质、核酸等)时,将已知量的药物加入至已知体积的液体中,因此给药可为并控制。在孔板灌注系统中,因为细胞生长培养基不断地循环,因此在一时间点每孔生长培养基的量也未知。另外,必须使用较大体积的药物在孔内实现正确的浓度。因此,将已知量的药物加入至未知量的生长培养基可能引起不一致的给药并且是昂贵的。

[0255] 本公开的方面提出一种解决方案,其通过药物注射端口直接供应少量的已知浓度的药物至被给药的生物样品。注射端口定位于从液体贮存器至培养腔至培养基收集腔的流动路径中液体贮存器与培养腔之间,以便确保培养腔中的样品直接接受期望剂量,并且接受药物的唯一样品是径直在注射端口下游的样品。

[0256] 本公开的方面描述一种小端口,其连接至流动通道,液体通过所述流动通道灌注穿过所述系统。这个端口为可以注射已知浓度的药物的已知体积。接着允许期望药物剂量递送到生物样品。可以另外塞住系统的馈送孔(在本文中又称为液体贮存器),使得注射端口成为供应液体至灌注系统的唯一孔。

[0257] 新元素包括通过去除与药物加入至未知体积的灌注培养基相关的不确定性,更准确地给与生物样品。本公开的方面又允许药物更快速地递送至生物样品,取决于端口相对于灌注通道的放置。本公开的方面还允许使用较小体积的药物,因为其是直接施加,而不是较大体积加入至馈送孔中。

[0258] 本公开的方面将允许使用者更准确和有效地在灌注系统内给与生物样品。本公开的方面还具成本效益,允许使用者使用较小体积的药物,虽然实现期望的结果。

[0259] 图16示出合并有如本文所述的注射端口的离散成像或生物反应器舱的横截面。在某些方面,注射端口可以被配置成约40至约80 μ L的体积。在某些方面,注射端口可以具有用于注射药物的孔口,直径为约1至约3mm,以对抗毛细作用的不良作用。

[0260] 如图16的横截面视图中所示,注射端口1150在流动方向上径直在上游,其中培养腔1120中的生物样品1126在通过水凝胶过滤介质1160的培养基1112的水平灌注流动路径中,所述流动路径包含从液体贮存器1110至注射端口1150至培养腔1120至培养基收集贮存器1130的灌注。

[0261] 可以在图16的实施例的横截面视图中看到如本文所述的生物反应器系统的额外方面。基本上环形的溢流贮存器1114可以包围液体贮存器1110的上部部分,用于培养基1112的溢流。光学透明材料1140可以形成生物反应器系统的底部,以使系统能够进行显微镜检查。培养腔1120容纳培养生物样品1126的3D生长培养基(又称液体样固体或LLS) 1124。培养基1122还可以放在培养腔1120中。

[0262] 培养基收集腔1130可以容纳真空来源设备,或在整个系统中产生正或负压的设备。在图16中示出的实施例中,压力由螺杆驱动的致动器产生。如所示的螺杆驱动的致动器的实施例包含产生驱动流体流过整个系统的压力的外部螺杆1134,和充当卸压螺杆的内部螺杆1138。真空来源设备通过螺杆1134外表面和培养基收集腔表面上的螺纹和例如如所示的外部垫圈1132和内部垫圈1136等一系列垫圈的组合能够操作地连接至培养基收集腔。

[0263] 图16的实施例示出具有水平流动路径的生物反应器系统的一实施例。在图16的实施例中,转动螺杆,以在系统中产生负压。负压从液体贮存器1110吸取培养基1112至水凝胶过滤介质1160中,至培养腔1120的3D生长培养基1124中的生物样品1126中。任何放在注射端口1150中的药物或物质将在从液体培养基贮存器1110至生物样品1126的路上进入灌注物流。接着从培养腔1120吸取流出物废弃物1131,通过水凝胶培养基1160,并进入培养基收集腔1130中,在这里可以通过真空抽吸或手动移液去除流出物废弃物(在拆卸真空来源设备后)。

[0264] 本文中描述了能够进行显微镜检查的生物反应器系统的另外的方面。这类另外的方面可以允许液体水平灌注通过单一成像孔系统,所述系统由进料孔(在本文中又称为液体贮存器)、具有用于成像的检视区的打印孔(在本文中又称为培养孔)和流出物收集腔(在本文中又称为培养基收集腔)构成。这些组件中的每一个可以使用多孔凝胶过滤系统连接,其中所述凝胶的渗透性和孔径比打印孔中使用的LLS高。这允许液体灌注通过凝胶过滤器并通过LLS,而不允许LLS的较大颗粒穿过过滤器。

[0265] 如本文所述的一些另外的方面包括LLS“架”和丙烯酰胺塞,用于更大的气体交换。此架加入至打印孔内部,其中LLS填充架并在顶部加入塞。在先前设计中,LLS必须几乎填充至打印孔的顶部,以确保系统将采用具有最小流动阻力的路径,所述路径来自培养基孔,不是来自LLS上方。这个高的LLS柱对于气体交换来说是不希望的。此塞子实现相同功能性方面,允许负压腔在来自培养基孔的LLS中引起灌注,不影响LLS高度并允许系统中更大的气体交换。通过加入塞子,打印孔中的压力将达成平衡并且液体将沿着期望路径流动。

[0266] 其它另外的方面包括负压腔中致动方法的改变。在一实施例中,启动固定螺杆以产生负压,并且螺纹用作机械致动和密封的一种方法。此功能性设计包括如下螺杆,所述螺杆具有用于机械致动方法的螺纹,但是嵌入充当密封机构的o形环。o形环允许活塞样密封,沿着负压腔的壁来回移动。此螺杆还具有镶嵌在内六角扳手(allen key)界面内的卸压螺杆,其也合并有o形环作为密封机构。在主要螺杆复位之前去除此卸压螺杆以避免系统中的背压和阻力。其还可以用作从流出物腔去除液体流出物的端口。板还包括靠近螺杆的记号,

以允许使用者追踪螺杆进行的旋转或部分旋转的数目。其它实施例可以包括使用自愈性环形密封(例如常用血液收集管的密封件)代替螺杆,其可以用钝头针刺穿,抽吸真空,并接着从系统去除针。在去除针之后,系统自身再次密封。在系统使用期间,可以根据需要多次使用这种方法抽吸真空。

[0267] 关于馈送孔,孔可以包括层级记号,以允许使用者查看孔中剩余的培养基体积。这个孔能够被塞住以允许从其它腔流动。在所述孔周围的是溢流贮存器。这采集在馈送孔被塞住时从其溢出的培养基。所述设计还可以合并以上进一步详述的药物端口。药物端口连接至馈送孔所连接的同一凝胶过滤器通道。当馈送孔被塞住时,系统开始从药物端口牵引液体。这个药物端口允许少量的药物或标记独立于馈送孔灌注通过系统。这降低被递送穿过系统所需的药物量,因为其不必在馈送孔中稀释。

[0268] 关于凝胶过滤器通道,通道中的曲径可以延长液体在灌注期间必须移动的总长度,并帮助将凝胶过滤器锚定在适当位置并保持其移动。通过延长液体必须流动的距离,LLS颗粒更可能被捕获在过滤器中而不能灌注,由此只允许液体灌注通过系统。

[0269] 本公开能够对3D生长的活生物组织进行实时、无创、当场成像,现场存活的寿命大于先前所见。

[0270] 现有的3D细胞阵列当场成像呈静态环境存在;这引起早期细胞死亡和有限的细胞寿命分析。通过使用本公开的实施例,研究人员不仅能够如先前一样直接观测正在进行任何过程的细胞,其还将能够以比之前更大的时间尺度观测细胞,这些在细胞放在其生长环境之后都不曾接触细胞。

[0271] 可以在图中看到这类另外的方面。图17描绘如本文所述的生物反应器系统1200的一方面的透视图,它可以是离散成像舱或生物反应器单元。如可见,螺杆驱动的致动的端口可以含有含刻度标记1240,为使用者指示螺杆转动至什么程度。还可以在顶部看到注射端口1250,也可以看到液体贮存器的溢流孔1214(或进料孔),所述溢流孔环绕液体贮存器1210的外径并且被配置成捕获和盛放溢流,尤其是在进料孔被塞住时。培养腔1220也是可见的。

[0272] 图18描绘根据本公开的一实施例的横截面视图,说明代替螺杆驱动的致动器的自愈性环形密封1334。这类自愈性环形密封1334可以用针,例如在位置1336处刺穿,因此从系统抽取或向系统施加压力。像图16的实施例一样,图18的实施例示出液体贮存器1310(具有溢流孔1314)、注射端口1350、培养腔1320和培养基收集腔1330。

[0273] 负压的施加从液体贮存器1310吸取水平灌注流动路径中的流体1312,通过水凝胶培养基1360,并朝着容纳生物样品的3D生长培养基或LLS 1324。注射端口1350中的任何物质将又被吸至灌注物流中。接着可以从培养腔1320和生长培养基1324吸取液体流出物废弃物,通过水凝胶过滤器1360,并进入培养基收集腔1330中。

[0274] 图18的实施例又描绘了一种水凝胶“架”,其中3D生长培养基在其涂铺至水凝胶过滤器1360的空隙中时坚定地保持在原位。塞子1326还可以填塞与3D生长培养基1324以流体方式连通的培养腔1320的至少一部分。

[0275] 图19A-19C描绘了如本文所述的系统的另外方面。图19A描绘图17的实施例的俯视图。除用于从液体进料孔1410溢出的培养基的溢流孔1414之外,还可以看到用于螺杆驱动的致动器的旋转刻度标记1440。除容纳3D生长培养基1424的培养腔1420之外,还可以从此

图目测注射端口1450。

[0276] 图19B为如本文所述的一实施例的横截面视图。如图19B的实施例中可见,螺杆驱动的致动器可以进一步包含位于致动螺杆1444中央的卸压固定螺杆1448以释放压力(通过垫圈1442和1446能够操作地连接至培养基收集腔)。塞子1422可以为丙烯酰胺塞子,能够填塞培养腔1420并邻接位于系统1400中的3D培养基1424,以改进如上所述的系统的功能特性。还可以在孔内表面上看到体积刻度标记1414,为使用者提供孔内液体体积的简单容易的视觉指示。在图19B中可以看到系统的所述实施例的另外方面。示出被配置用于接纳可重复定位系统的柱的凹口1470,还示出包含用于将底部1440固定至系统的胶的胶通道1461(底部1440可以为光学透明的底部)。

[0277] 还示出水平灌注流动路径。负压的施加从液体贮存器1410吸取水平灌注流动路径中的流体1314,通过水凝胶培养基1460,并朝着容纳生物样品的3D生长培养基或LLS1424。注射端口1450中的任何物质将又被吸至灌注物流中。接着可以从培养腔1420和生长培养基1424吸取液体流出物废弃物1431,通过水凝胶过滤器1340,并进入培养基收集腔1430中。

[0278] 图19C说明根据本公开的一实施例的仰视图。在图19C的实施例中,光学透明的玻璃盖玻片1440(虽然可以使用其它材料)通过通道1461中的胶附连至底部以允许经由显微镜检查进行成像。可以使用的胶的实例可以为光学胶(UV固化)。生物相容性环氧化物。能够抵抗住水和轻度热的任何胶,以及不为杀生物剂。存在机械固定器1462,其包含在整个水凝胶体积1460中间隔开的竖直柱,类似于混凝土中的钢筋。除液体贮存器1410、注射端口1450、3D生长培养基1424和培养基收集腔1430之外,还可以看到用于可重复定位系统的柱的凹口1470。还示出胶表面1466。

[0279] 能够进行显微镜检查的双流生物反应器板

[0280] 在传统的2D细胞培养中,细胞行为常常与其在人体内不同。已经开发不同的3D培养方法,以更紧密地模拟细胞通常经历的条件。大部分这些系统涉及基质胶的使用,基质胶将细胞在3D上锁在适当位置且不允许细胞或营养物质在系统内移动太多。这会阻碍长期研究,因为这些系统中缺乏长期活力。为了使细胞在3D培养系统中存活很长一段时间,必须置换营养物质并且必须去除细胞所产生的废弃物。以下方面提供了一种促进3D培养中长期细胞活力的方式以及一种在高通量系统中研究其的方式。

[0281] 本发明的实施例的方面描述了一种能够进行显微镜检查的双流生物反应器系统,其中两个单独的灌注用于供应营养物质至细胞和其周围环境并从细胞和其周围环境去除废弃物。灌注是垂直的(彼此正交)并且在高度上彼此分开以确保成像孔(又称培养孔)内没有任何错流。这允许共培养两种细胞类型,每个培养用细胞自身的不同生长培养基。将每种细胞类型放在其对应的培养基的物流中以确保营养物质递送,同时不处于其它细胞培养基的流动中。这允许两种不同细胞类型彼此紧靠着长期持续地生长。

[0282] 流灌注通过“液体样固体”或LLS,LLS是一种可以培养细胞的多孔支持培养基。这个LLS允许例如细胞生长培养基等液体灌注通过系统以便馈送细胞和去除其废弃物。使用被动负压系统迫使液体灌注,牵引液体通过LLS和整个系统本身。对比在其它细胞培养系统中的几天或几周,在这一系统中,细胞存活率延伸至几个月。

[0283] 本发明的实施例的方面可以包括主板、两个压力致动螺杆和两个伴有o形环的卸压螺杆。具有一微米孔径的水凝胶过滤器可以用作过滤器以防止LLS在LLS腔内移动。这能

够使LLS停留在适当位置,允许液体生长培养基流过LLS颗粒,为细胞供应营养物并去除废弃物。孔隙小于LLS颗粒的尺寸,这允许过滤器支持LLS在孔板中,而允许液体经过其,进入流出物收集腔中。板还包括在每个馈送孔周围的溢流贮存器和每个细胞类型的单独注射端口。注射端口用于快速灌注少量的贵重试剂。体积比馈送孔低得多,但是在灌注的直接路径中。为了确保注射端口的流动,将馈送孔塞住以迫使灌注促进注射端口液体。在塞住馈送孔时,预期会有一些溢流,因此将溢流贮存器加入至每个馈送孔以防污染和最大限度地减少净化。

[0284] 每个馈送孔可以含有沿着孔的长度机械加工的阶梯,用作生长培养基量的视觉参考。每个阶梯可以相当于100微升体积。板利用机械水凝胶锁闭系统以防在真空施加至系统时水凝胶压缩或移动。机械水凝胶锁闭系统包括一系列被机械加工成流动行进的通道的障碍物。

[0285] 能够进行显微镜检查的双流生物反应器系统的特征在于六个被机械加工至板的底部中的凹状楔形柱。凹口与匹配凸状柱配合,机械上过度约束系统对准。这允许高度可重复地放置板。这证明非常有利于长期显微镜检查。使用者可以对板成像并将其返回至培育箱,并接着在稍后的时间对板重新成像且具有极少的放置误差。这允许使用者在数天内搜集多个图像,不必花费连续时间。放置足够精确,从而容易定位相同构建体并调整成复合图像或视频。

[0286] 最初,可以启动固定螺杆以产生负压,并且螺纹用作机械致动和密封的一种方法。此设计包括如下螺杆,所述螺杆具有用于机械致动方法的螺纹,但是嵌入充当密封机构的o形环。o形环允许活塞样密封,沿着负压腔的壁来回移动。此螺杆还具有镶嵌在梅花扳手(torx key)界面内的卸压螺杆,其也合并有o形环作为密封机构。在主要螺杆复位之前去除此卸压螺杆以避免系统中的背压和阻力。其还可以用作从流出物腔去除液体流出物的端口。板还包括靠近螺杆的记号,以允许使用者追踪螺杆进行的旋转或部分旋转的数目。

[0287] 板还可以包括自愈性环形密封。自愈性环形密封用注射器上的钝头针刺穿,在注射器中抽吸真空,并去除针。密封件“自愈”并保持在真空中。注射器可以被改成接纳真空计。这将允许使用者精确地启动期望压力。所述真空计还充当检漏器,因为当注射器再插入时,真空计将读取板中存在的真空压力。单独的注射器还可以用于收集累积的流出物以供分析。在测试中,已经证实自愈性环形密封是比螺杆装配件更符合人体工程学的针对真空产生的解决方案。

[0288] 本公开的方面包括能够使两种不同细胞类型在更像生命的环境中生长并保持其存活的时间段比先前可能的存活时间段长得多。在这个板中,向每种细胞类型供应其特定的生长培养基,并且每种细胞类型的灌注递送是独立的。这允许进行长期实验以及分析3D中两种细胞类型的相互作用。这个过程容易记录在显微镜或其它光学分析形式上。

[0289] 本公开的方面包括一种在灌注下3D培养2种不同细胞类型,并能够在显微镜上查看所有阶段的方法。这对于希望使用这种方法完成实验的任何使用者来说是有利的。本公开的方面建立了一种在灌注下3D培养2种不同细胞类型,并能够在显微镜上查看所有阶段的方法。这允许使用者在整个实验生活中追踪单个细胞。使用者可以加入两种不同细胞类型,并使用独立的生长培养基,查看两种细胞类型之间的相互作用,同时仍保持细胞类型为活的。不仅板允许这两种不同细胞类型3D成像,而且还允许细胞类型存活时间长得多,而不

需要传代。

[0290] 已经描述本公开的多个实施例,其可以包括以下各项中的一个或多个的功能:

- [0291] • 在不同水平下的两个通道提供独立的灌注;
- [0292] • 在LLS腔中在不同高度下打印不同细胞类型;
- [0293] • 可以使用单独的培养基和流速;
- [0294] • 所有细胞构建体都放在2mm玻璃内。

[0295] 图20示出如本文所述的双流系统1500的实施例的各方面的俯视图。系统1500可以包含两个流动路径,第一流动路径1582(1型)和第二流动路径1584(2型)。两个流动路径垂直或彼此正交,并共享共同的培养腔1520(在本文中又称为培养腔、成像腔或LLS腔)。这个共同的培养腔也是流动路径的相交点。流动路径1582和1584各自在不同的高度下,以使得不会发生物理相交或流动组合。这允许细胞在LLS培养基的柱内相互作用,并且前往一种细胞类型的流与前往另一细胞类型的流不相交,这可以用适当的操作参数(例如约10nm/s至约1mm/s的流速)来实现。

[0296] 如图20中所展示,第一流动路径1582的灌注流动路径包含流体从液体贮存器1510a流动,通过通道1580,进入培养腔1520,并进入培养基收集腔1530a。第二流动路径1584的灌注流动路径包含流体从液体贮存器1510b流动,通过通道1590,进入培养腔1520(与第一流动路径相同)并进入培养基收集腔1530b。

[0297] 图21为本文所述和如图20中所示的双流系统的培养腔1520的透视图1600的横截面。如横截面视图1600中可见,两个正交灌注物流(1582和1584)在相对于腔1540的底部不同的高度Z下流过固定在培养腔1520的水凝胶过滤器1560(3D水凝胶)中的LLS柱1524,馈送两个不同细胞群体1526和1527。虽然示出流动路径彼此正交,但本领域的技术人员将认识到可以采用其它角度。

[0298] 图22为如图21和22中所示的LLS腔的LLS柱的放大横截面视图。如图22中可见,两个正交灌注物流在不同高度下灌注通过LLS柱,馈送两个不同细胞群体,所述两个细胞群体在双流系统的LLS腔的LLS柱中在不同高度下打印。

[0299] 图23A-23D说明如本文所述的双反应器流动系统的一实施例。图23A为透视图,图23B为俯视图,图23C为侧视图,并且图23D为仰视图。

[0300] 如在如本文所述的双流生物反应器系统的实施例中可见,两个流动路径彼此正交安置。一个流动路径包含液体贮存器1710a、溢流孔1714a、培养腔1720、药物注射端口1750和培养基收集腔1730a。第二流动路径包含液体贮存器1710b、溢流孔1714b、培养腔1720、药物注射端口1750和培养基收集腔1730b。两个流动路径共享同一个培养腔,并且每个流动路径的细胞(可以是不同类型的细胞,即一个流动路径一种类型,另一个流动路径另一种类型)可以安置在培养腔中,如图21和22中所示。

[0301] 图23B为如图23A中所示的双流生物反应器1700的俯视图。图23C为如图23A中所示的双流生物反应器1700的侧视图。图23D为如图23A中所示的双流生物反应器1700的仰视图。如在仰视图中可见,双流生物反应器的实施例可以含有与图19C中的单流生物反应器的实施例中所示类似的特征。示出凹口1770,其帮助锚定泡沫过滤器。

[0302] 图24A-24C说明双流生物反应器系统1800的一实施例的其它方面,例如视觉刻度标记和致动和卸压螺杆。图24A为俯视图,且图24B和24C为从彼此不同的侧面的侧视横截面

图。

[0303] 图24A为示出彼此正交的流动路径A和流动路径B的一实施例1800的透视图。每个流动路径具有液体贮存器(1810a和1810b)、共享的培养腔1820和培养基收集腔1830a和1830b。液体贮存器1830还具有与孔以流体方式连通的溢流孔1814a,不过这类溢流孔是任选的。

[0304] 图24B和24C示出实施例1800的流动路径A和B的横截面视图。实施例的两个流动路径利用具有卸压螺杆的螺杆驱动的致动器产生压力,以驱动流体在整个系统中流动。1832a/b、1836a/b和1838a/b示出螺杆驱动的致动器的各方面。1820为共享的培养腔。1870示出可重复固定定位系统的柱的接纳凹口。1850a/b示出药物注射端口,1810a/b示出液体贮存器,并且1830a/b示出能够操作地连接至真空来源设备(在此实施例中螺杆驱动的致动器)的培养基收集腔。体积刻度标记也可以存在于任何液体孔中,并且液体孔可以从开口至基底依次逐渐变细,以最大限度地减少所需要的液体并改进流动,或提供其它视觉指示物(例如一个逐渐变细,一个不逐渐变细,指示不同流动路径)。

[0305] 图25为图23A-23D的双流系统的放大透视图1900。示出流动路径A和B,还示出共享的培养腔1920、液体贮存器1910a/b和培养基收集腔1930a/b。

[0306] 用于3D细胞培养的具有灌注功能的多孔生物反应器板

[0307] 在传统的2D细胞培养中,细胞行为常常与其在人体内不同。已经开发不同的3D培养方法,以更紧密地模拟细胞通常经历的条件。大部分这些系统涉及基质胶的使用,基质胶将细胞在3D上锁在适当位置且不允许细胞或营养物在系统内移动太多。这会阻碍长期研究,因为这些系统中缺乏长期活力。为了使细胞在3D培养系统中存活很长一段时间,必须置换营养物并且必须去除细胞所产生的废弃物。以下方面提供了一种促进3D培养中长期细胞活力的方式以及一种在高通量系统中研究其的方式。

[0308] 本公开的方面描述了一种多孔生物反应器系统,其中灌注用于供应营养物至细胞和其周围环境并从细胞和其周围环境去除废弃物。流灌注通过“液体样固体”或LLS,LLS是一种可以培养细胞的多孔支持培养基。这个LLS允许例如细胞生长培养基等液体灌注通过系统以便馈送细胞和去除其废弃物。使用被动负压系统迫使液体灌注,牵引液体通过LLS和整个系统本身。对比在其它细胞培养系统中的几天或几周,在这一系统中,细胞存活率延伸至几个月。

[0309] 本公开的方面自身包括:顶板,其充当孔板部分;中间板,其充当界面之间的密封表面;和底板,其容纳牵引液体通过系统并进入流出物收集腔中的所需负压。微孔过滤器密封在顶板与中间板之间。孔隙小于LLS颗粒的尺寸,这允许过滤器支持LLS在孔板中,而允许液体移过其,进入流出物收集腔中。几种方法可以用于在系统中产生负压,但是在这个系统中使用的两个是容纳o形环的螺杆和自愈性环形密封。螺杆的螺纹用作机械致动方法并且o形环密封致动螺杆的“活塞”部分。这个螺杆退出,在底板中产生负压,接着产生真空,将液体牵引通过LLS。自愈性环形密封用注射器上的钝头针刺穿,在注射器中抽吸真空,并去除针。密封件“自愈”并保持在真空中。

[0310] 本公开的方面包括能够使细胞在更像生命的环境中生长并保持其存活的时间段比先前可能的存活时间段长得多。板的布局被设置成允许使用平板读数器,因为板被设计成适合孔板的标准尺寸。这一系统还可以是高通量的,允许许多实验同时在同一个板内进

行。

[0311] 本公开的方面可以产生例如孔板等能够进行灌注的产品。板可以被设计成具有许多不同的布局,具有更高或更低的通量,取决于应用。寄望于在细胞上进行长期研究的实验室和研究机构将能够使用本公开的方面进行此。在板中使用灌注,通过使这些物质流过系统,研究人员可以研究药物的作用和对细胞环境的其它改变。

[0312] 在本公开的一个实施例中,提供一种具有灌注功能的多壁板,其中由通过自愈性环形密封以可拆卸方式能够操作地连接至系统的真空来源提供压力。这类机制不仅去除了螺杆驱动的致动器,而且在物理上占据更小的空间并允许更多的样品涂铺在孔中。

[0313] 用于3D细胞培养的具有灌注功能的多孔生物反应器板的另外的方面

[0314] 具有灌注功能的多壁板的另外的方面如下。第一个另外的方面包括去除了将上面两个板夹至底板以沿着o形环密封的紧固件。可以通过使用在孔板中诱发的内部真空压力作为将板夹在一起的力来省略这些紧固件。上面两个板可以照常使用紧固件密封两片之间的过滤器来装配在一起,或过滤器可以热密封至板自身,消除了所有紧固件。接着上面这两个板放在底板顶部上,以制成装配件。将板压缩在一起,压缩底板中的o形环,形成密封。接着如上所述使用针在板内产生负压。在产生此真空之后,产生足够的力,保持密封的板在一起。随着时间推移,因为内部真空因流出物收集而减小,所以板最终将彼此松开。此时,灌注停止并且可以重复所述过程,继续实验。为了分开板同时仍存在内部负压,用于产生真空的相同针可以用于引入更多的空气至系统中。这将降低真空压力并允许板分开。

[0315] 第二个另外的方面是确保流出物腔之间不存在交叉污染的机制。这可能涉及两个组件:从孔向下延伸至流出物收集腔中的空心圆柱体和向上凸出至圆柱体中,靠近过滤器的柱。圆柱体可以朝下延伸至收集孔之间的隔板的高度以下。这使得流出物难以在收集孔之间移动。另一特征,即柱,从底板朝上延伸至恰好过滤器下方。当灌注进行时,液体流出物将收集在过滤器的底部上并形成小液滴。接着这个小液滴将触碰至柱上,并通过毛细作用带至流出物收集腔中。这两个特征可以一起或分开使用以确保液体流出物的单独收集,无交叉污染。

[0316] 以上机制的方面可以包括板、柱或裙缘中的一个或多个由疏水性材料或亲水性材料构成或涂布,取决于如何选择流出物流进入腔中。

[0317] 图26、27、28a以及28b、29a和29b说明如本文所述的生物反应器系统的这类另外的方面。

[0318] 图26为如本文所述的多孔高通量生物反应器系统2000的一实施例的照片。

[0319] 图27为图26的实施例2000的分解视图。这类高通量设置由顶板2020、滤板2050和流出物(即,培养基)收集腔2070构成。当装配时,板形成“夹心”配置,其中顶板2020在顶部,滤板2050在顶板2020下面,过滤器2040和垫圈(或o形环)2030在顶板2020与滤板2050之间形成密封。流出物收集腔2070在滤板2050下面,在滤板2050与流出物腔2070之间具有一个或多个垫圈或o形环2060。2010是配合在顶板2020的每个孔的可以接纳例如针等真空来源设备的上部开口中的自愈性环形密封。

[0320] 图28A及28B说明促进分析物有效收集至流出物腔2070的单一孔中同时防止多孔高通量生物反应器系统2000中的孔交叉污染的结构配置的一实施例。毛细作用柱2072可以从流出物腔2070的表面向上朝着滤板2050延伸,以帮助从顶板2020的孔收集被推动通过过

滤器2040和滤板2050的分析物。裙缘2052可有助于这一收集,所述裙缘是在滤板2050的孔的直径周围的环形唇缘,其从滤板2050向下朝着流出物腔2070延伸。滤板2050和/或裙缘2052可以由疏水性材料构成或涂布。其也可以任选地由亲水性材料构建或涂布。图28A示出当分析物从过滤器2040的底部落下时,被滤板2050支撑,进入流出物腔2070的流出物孔2072中。图28B示出孔2072中所收集的分析物。裙缘2052和柱2072的布置是一实施例,并且本领域的技术人员将了解仅仅裙缘或仅仅柱的配置也似乎合理。

[0321] 图29A是实施例2000的横截面透视图,其中压力产生设备2080插入至自愈性环形密封2010中。压力产生设备2080具有用于监测压力的压力表,并且包含针和注射器,通过所述针和注射器,可以产生负压或正压以驱动流体流过由板装配建立的生物反应器柱。图29B是实施例2000的来自压力产生设备2080的针插入至自愈性环形密封2010中的放大视图。

[0322] 图30中示出如本文所述的生物反应器系统3000的一种替代实施例。图30的生物反应器系统3000涉及三片式设计,其中过滤机构是纳米多孔聚碳酸酯过滤膜3060a和3060b而非例如3D水凝胶等另一种材料。右侧的第一片由放有液体生长培养基3012的馈送孔3010构成。中央的第二片是培养孔3020,在所述培养孔中除培养基3022外,LLS3024和生物样品3026还定位在此。液体生长培养基3012从馈送孔3010流动,通过过滤膜3060a,进入培养孔3020中。这个过滤膜3060a使用一个或多个O形环3062密封。在液体生长培养基3012流过LLS3024后,其流过左侧第二个膜3060b,所述第二个膜可以用与第一过滤器3060a相同的方式3062密封。接着液体流出物3031收集在流出物腔3030中,流出物腔展示在左侧。所有三片都可以使用紧固件或胶(未示)夹持和压缩在一起。单一腔将馈送孔3010连接至培养腔3020,连接至流出物腔3030,其中液体生长培养基3012从一个孔流动至下一个。在装配后,玻璃盖玻片3040附连至板的底部以允许对培养孔3020的查看和显微镜检查。可以通过自愈性塞子3038或先前描述的螺杆机构在流出物收集孔3030的腔3038中产生真空压力。这种配置的变化形式还可能涉及较高通量设计,在一个板中含有多个培养孔。

[0323] 然而,应了解,在不背离本公开的精神和范围的情况下,可进行各种修改。因此,其它实施例在以下权利要求书的范围内。

[0324] 除非另外定义,否则本文中所有的技术和科学术语具有与所公开的本公开所属领域的技术人员通常所了解相同的含义。本文所引用的公开案和引用所述公开案所针对的材料专门以引用的方式并入。

[0325] 本领域的技术人员将认识到,或顶多使用常规实验即能够确定本文所述的本公开的特定实施例的许多同等物。希望所附权利要求书涵盖这类同等物。

[0326] 另外,以下实施例和特征可以并入到如本文所提供的一个或多个方面或实施例中。提供以下是为了说明可以与以上和本文中提供的实施例一起并入以及与彼此中的一个或多个一起并入的另外的特征。本公开不限于独立的每个特征,而是涵盖这些特征中的一个或多个与以上和本文中公开的特征中的一个或多个的多种组合。

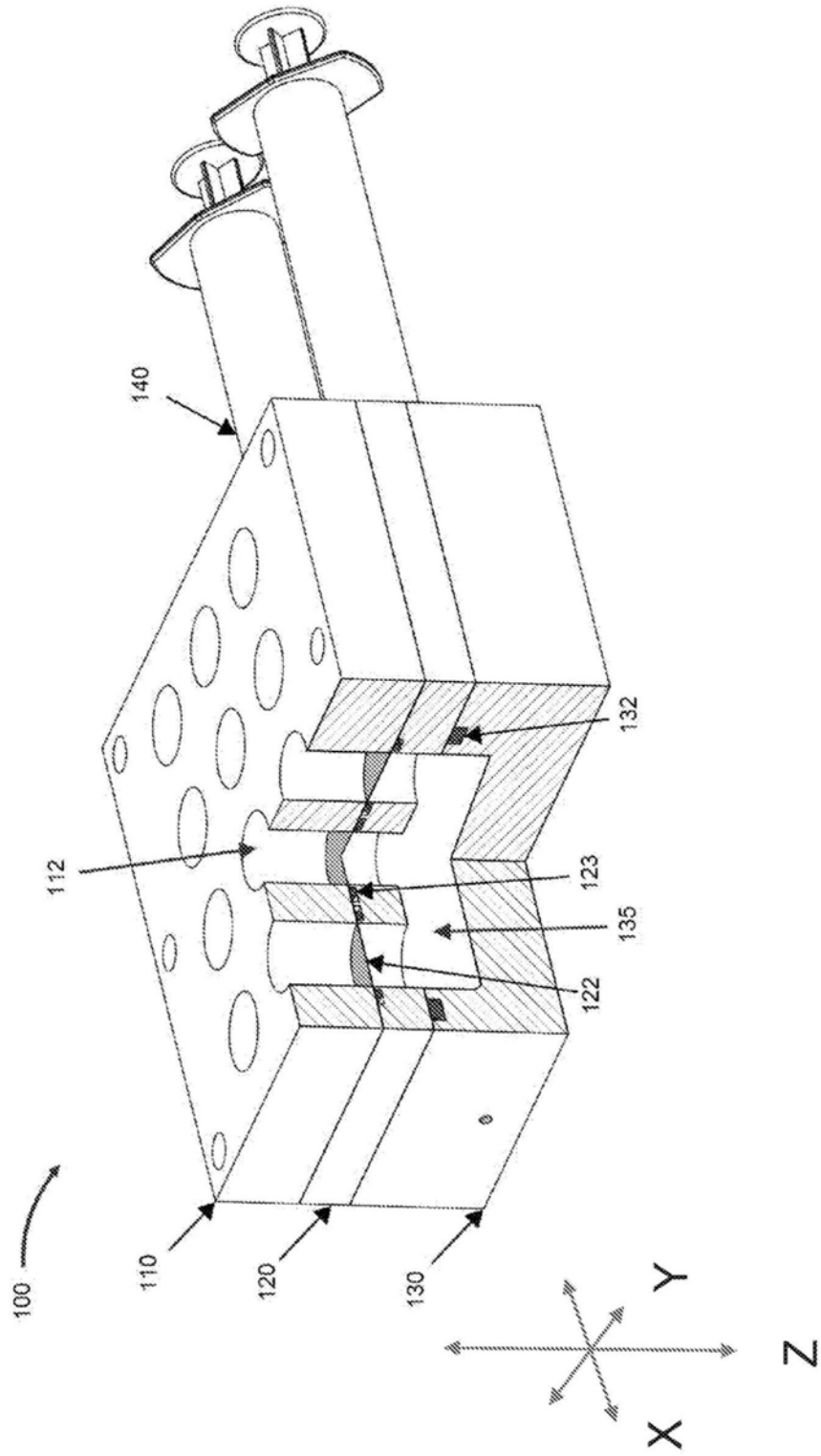


图1

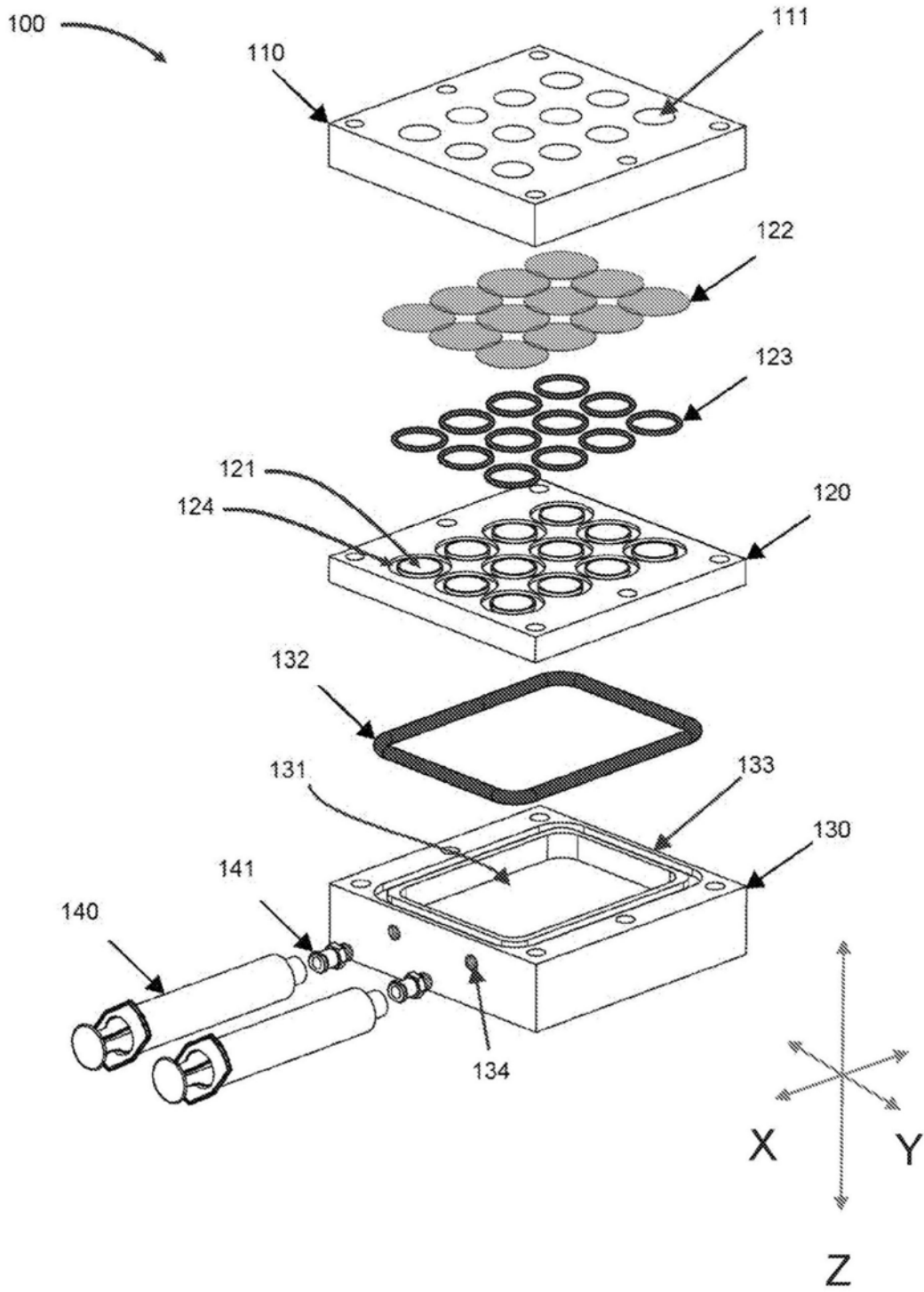


图2A

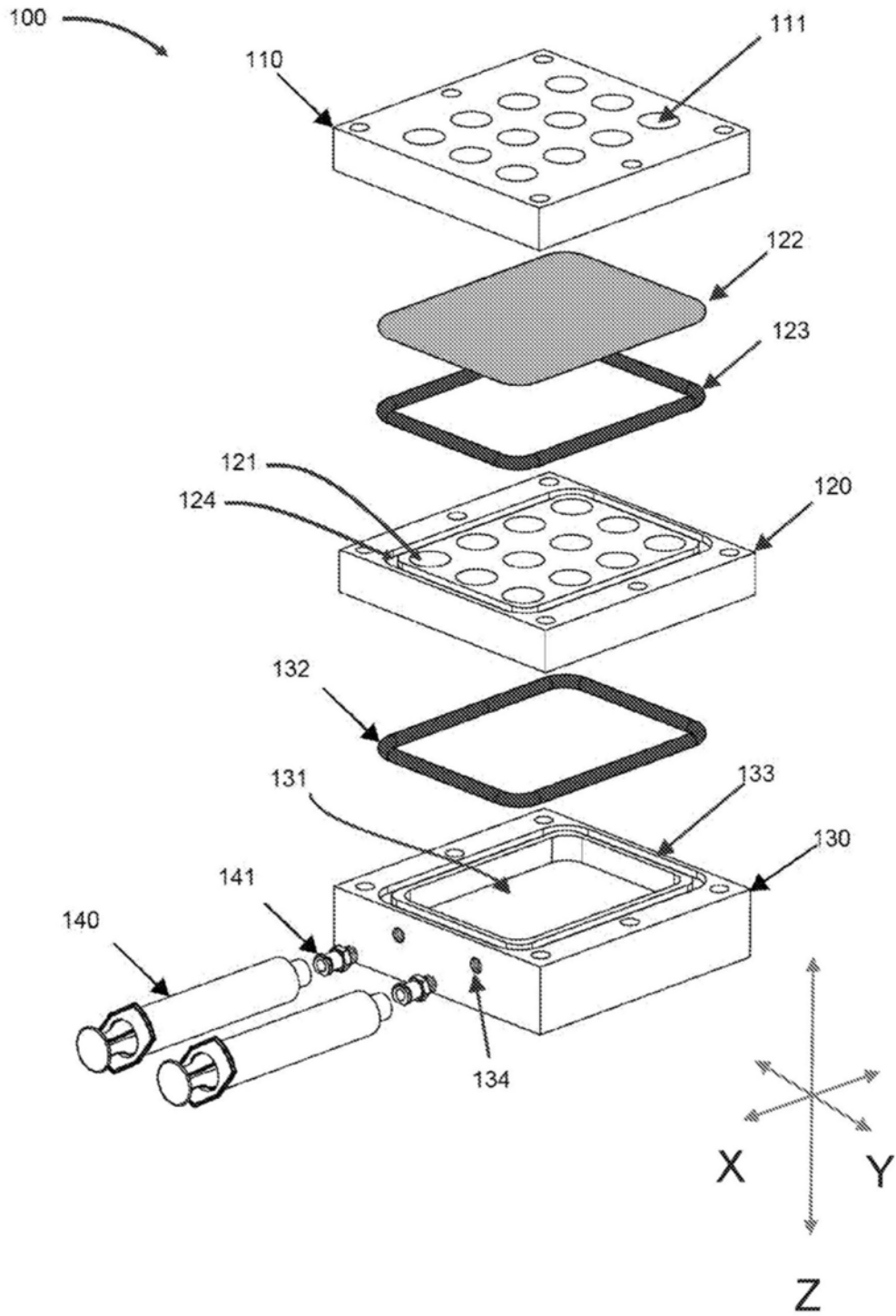


图2B

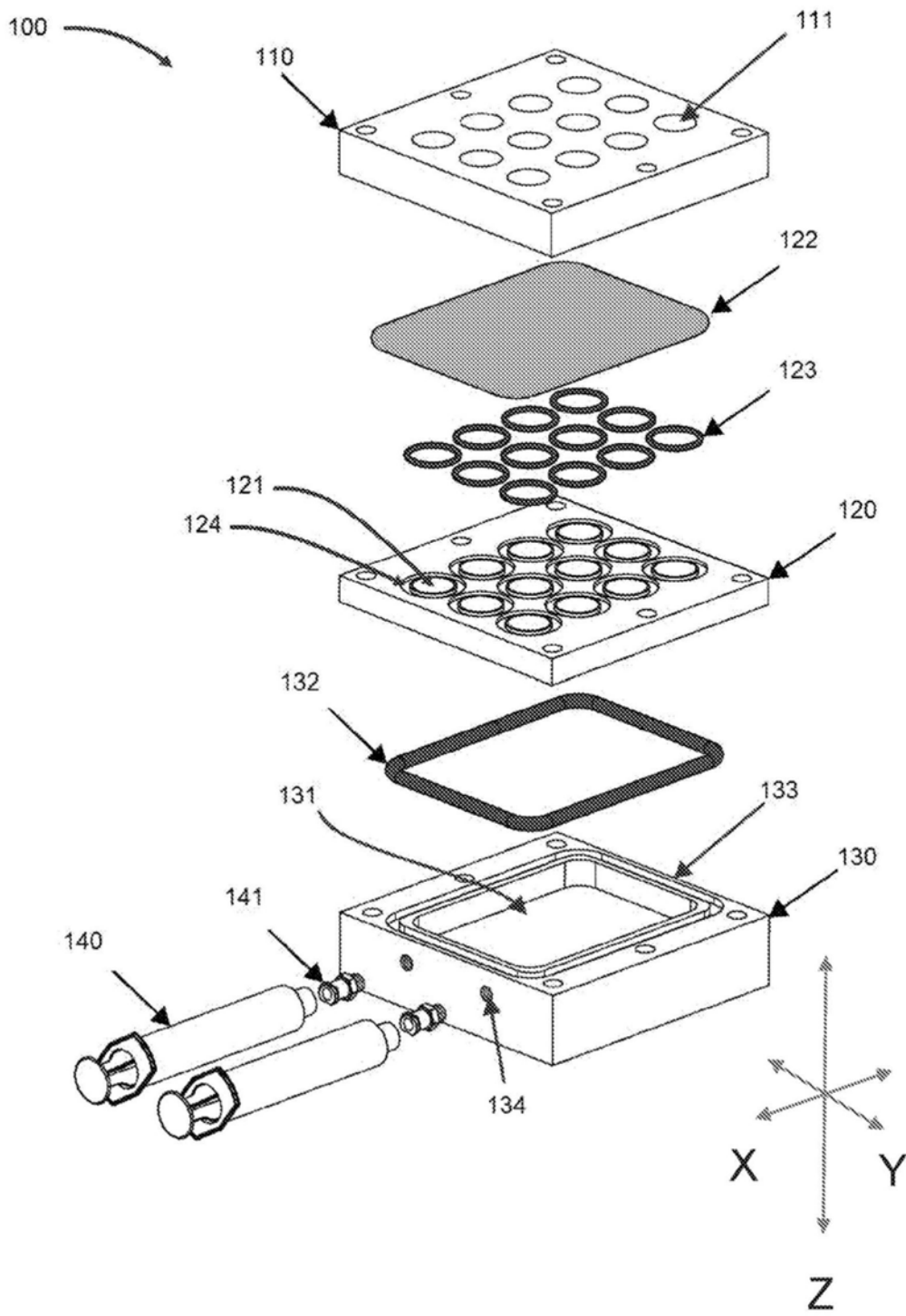


图2C

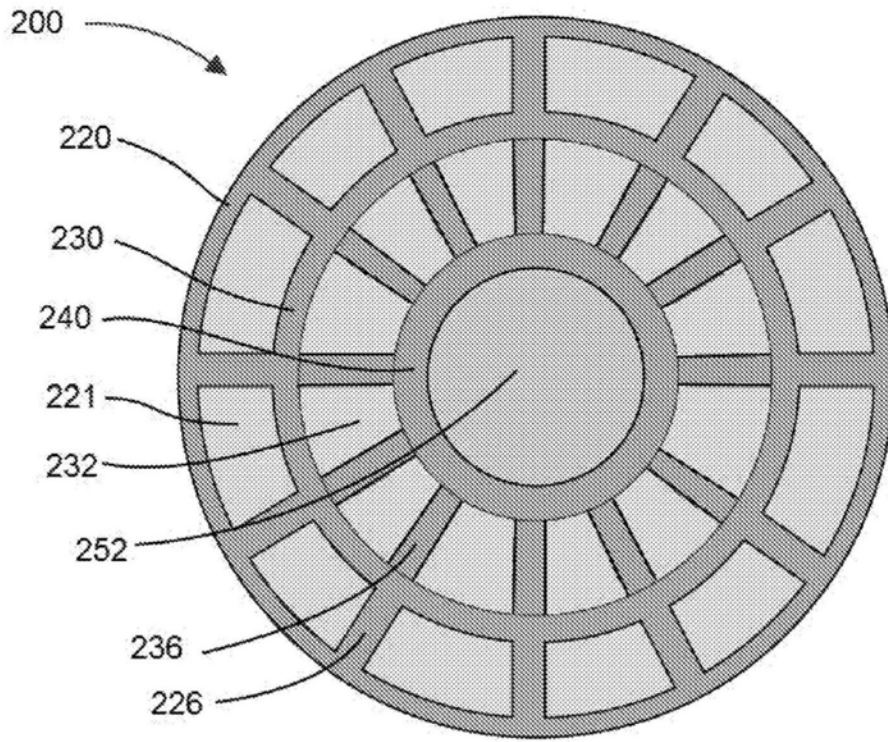


图3

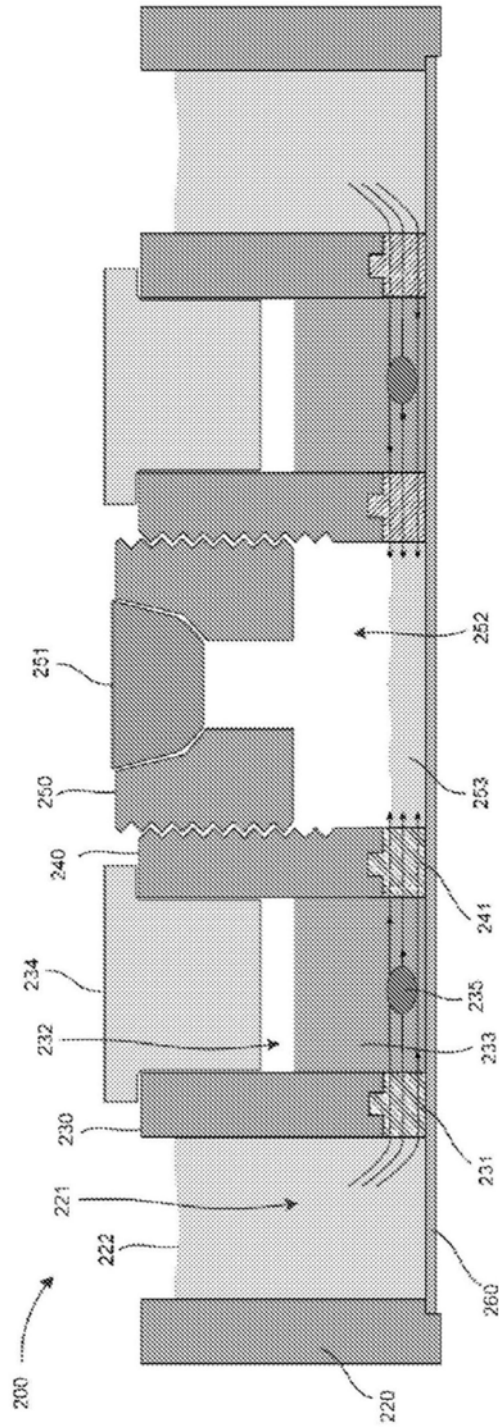


图4

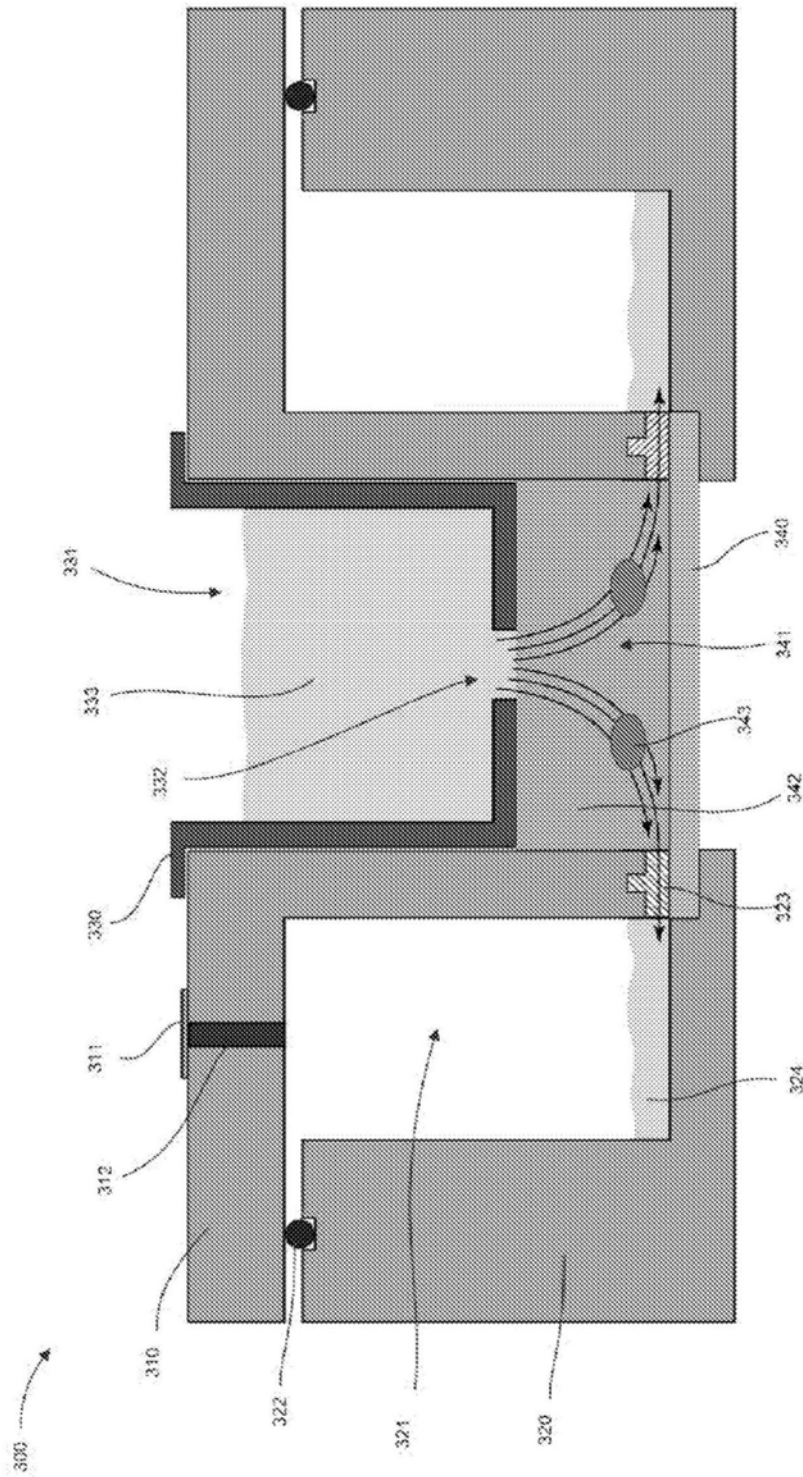


图5

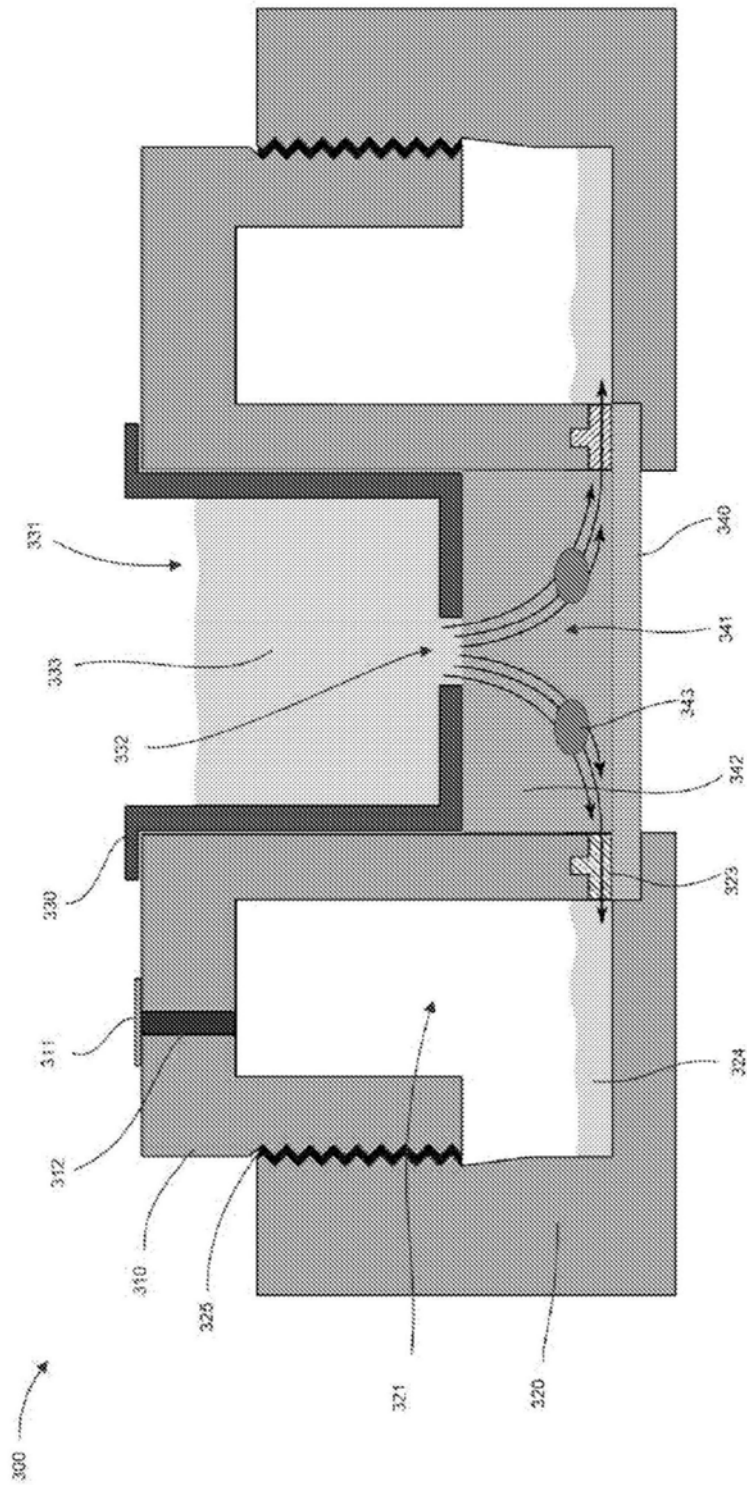


图6

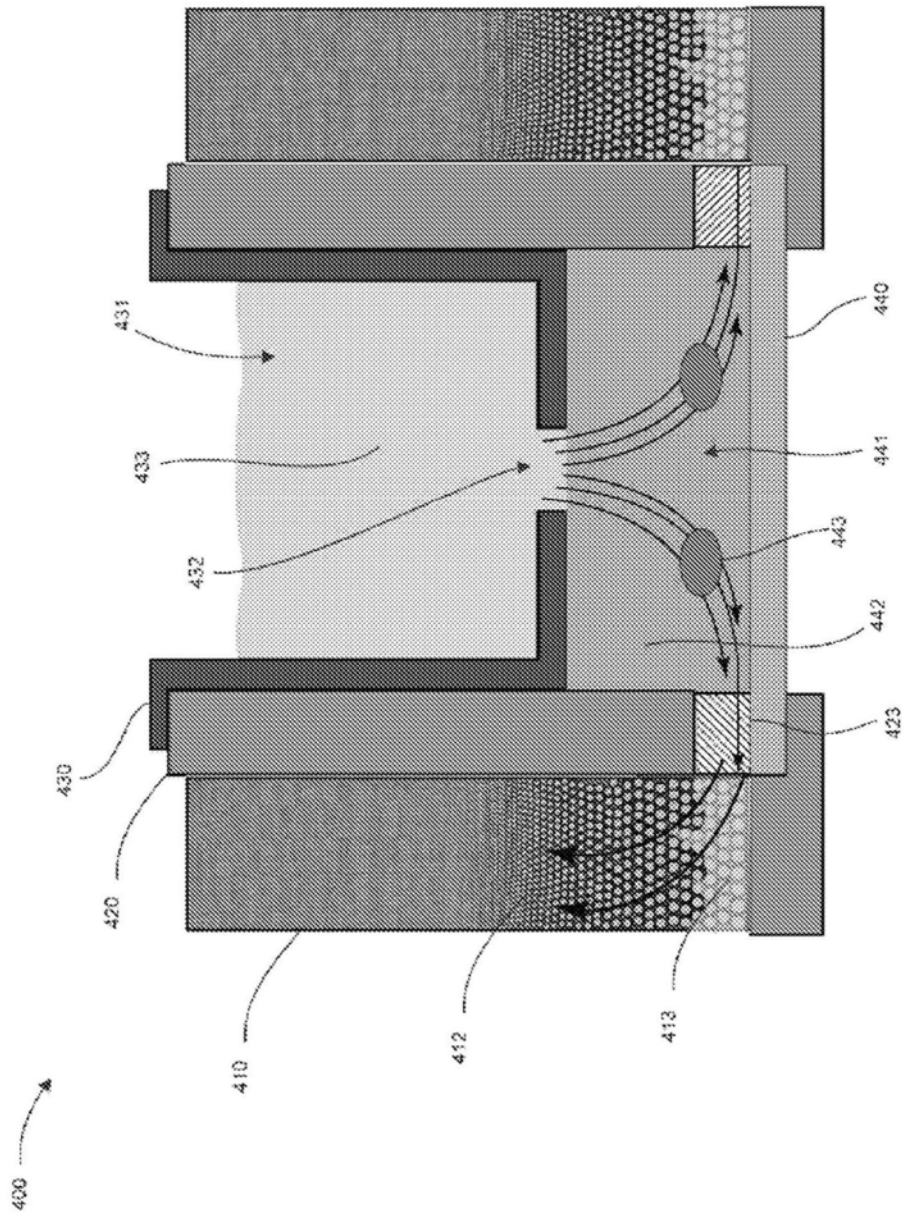


图7

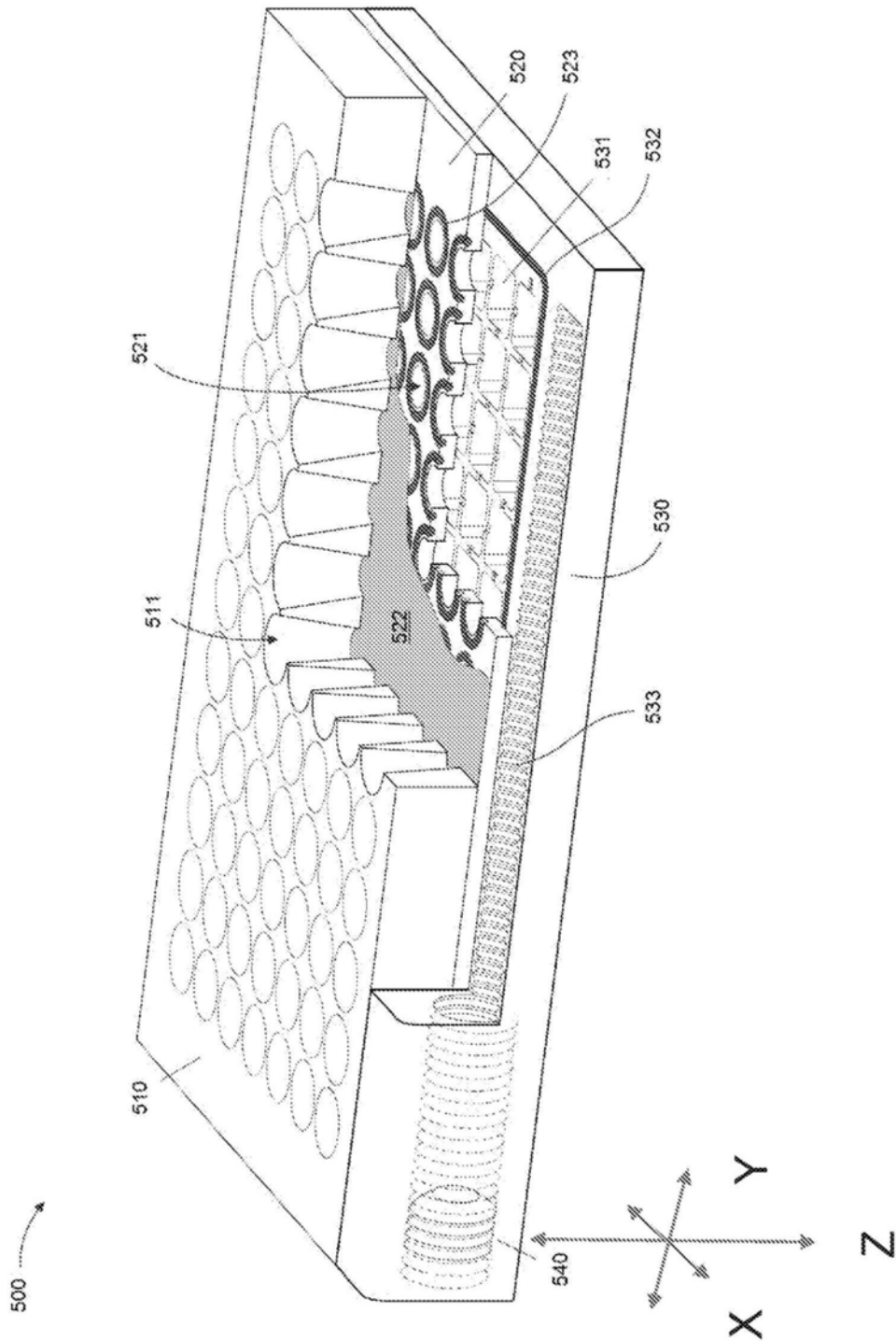


图8

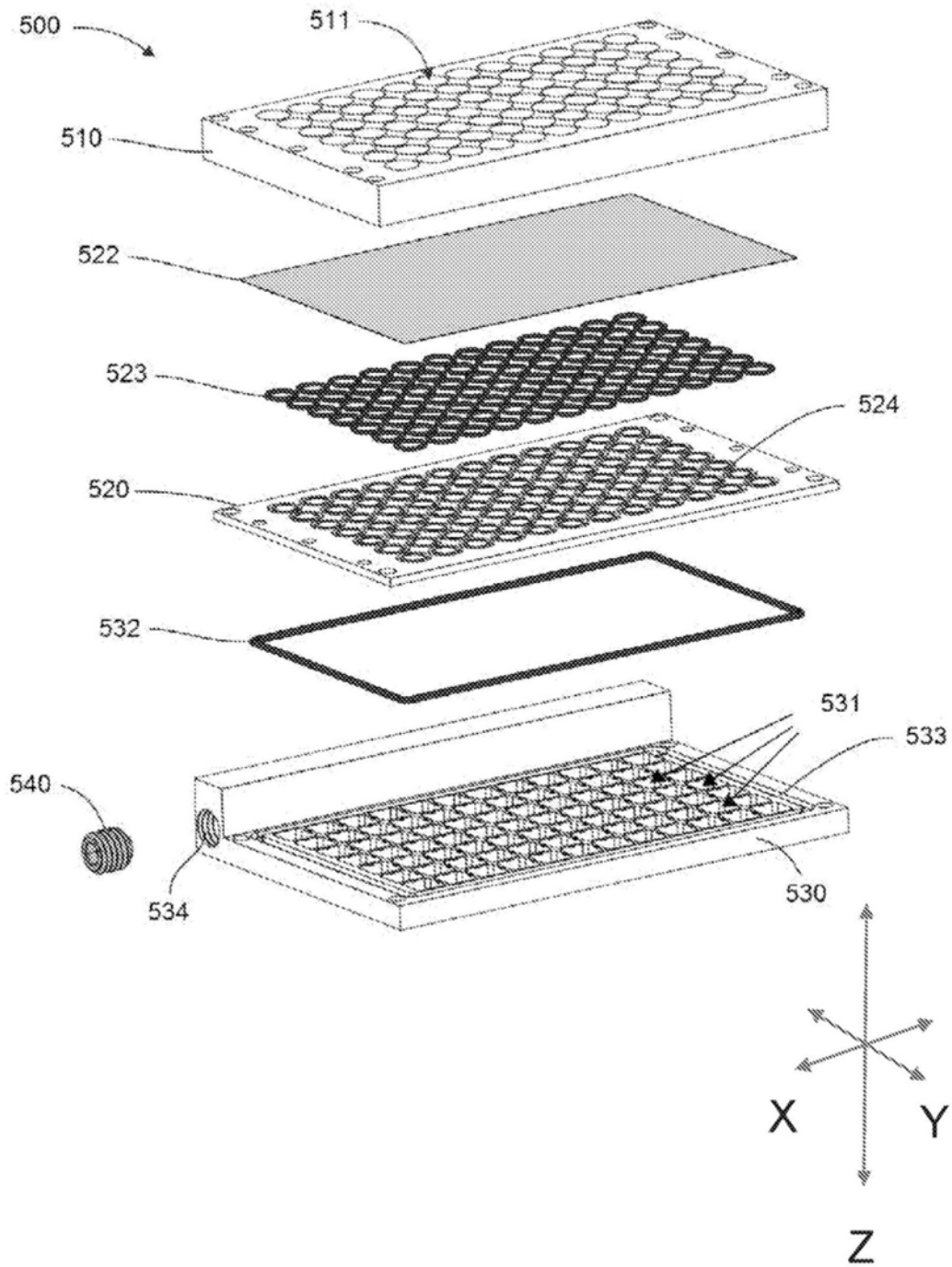


图9

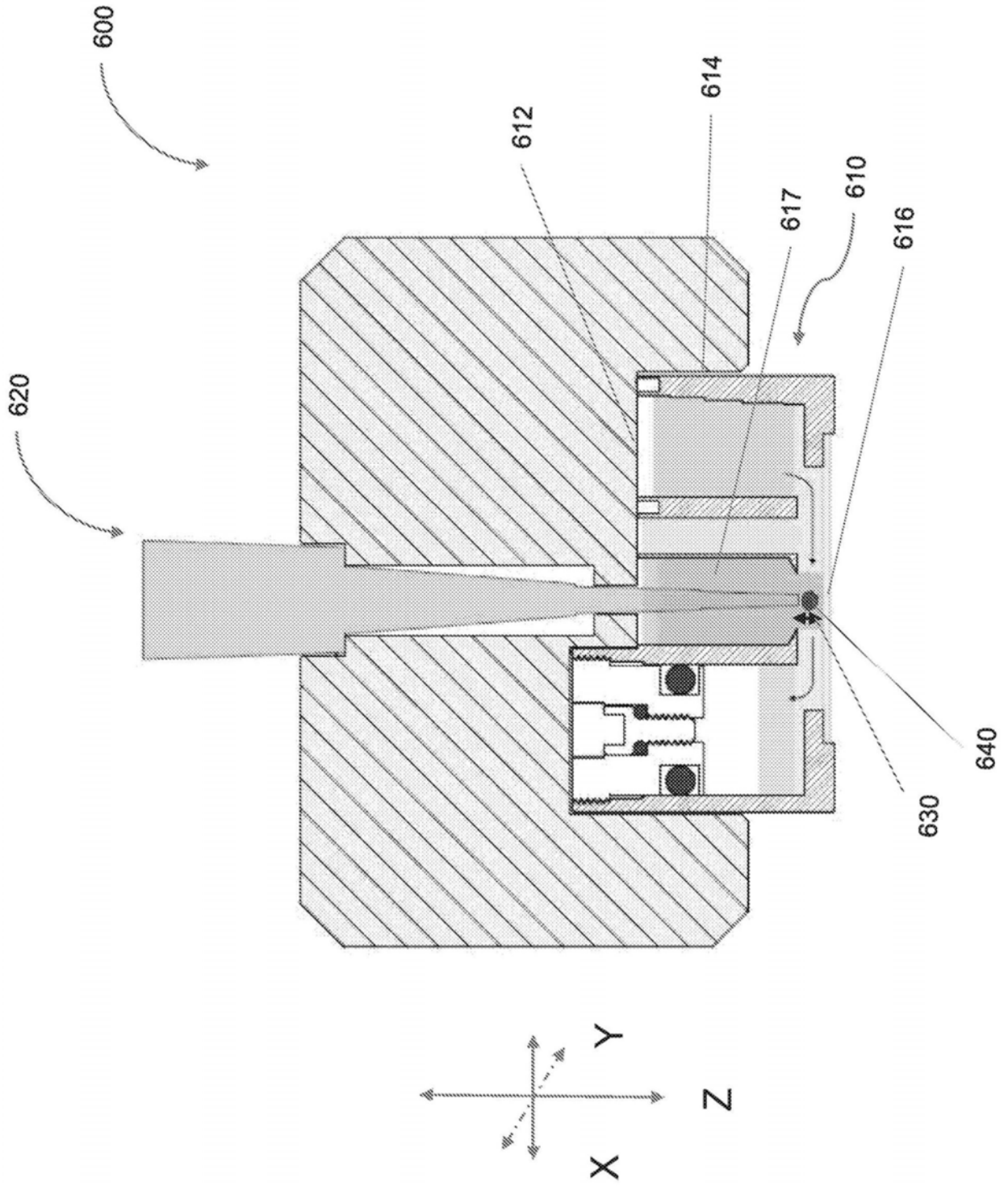


图10

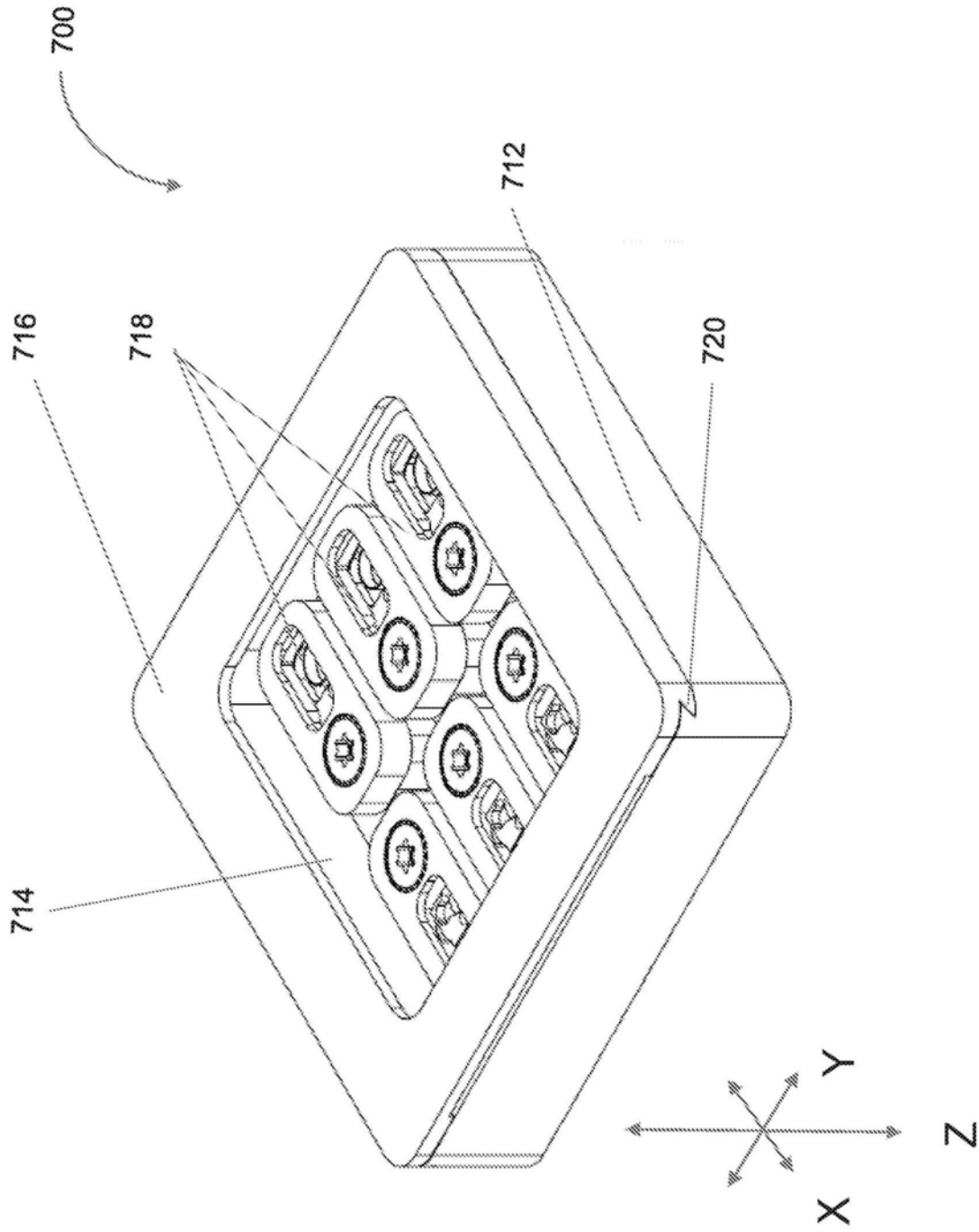


图11

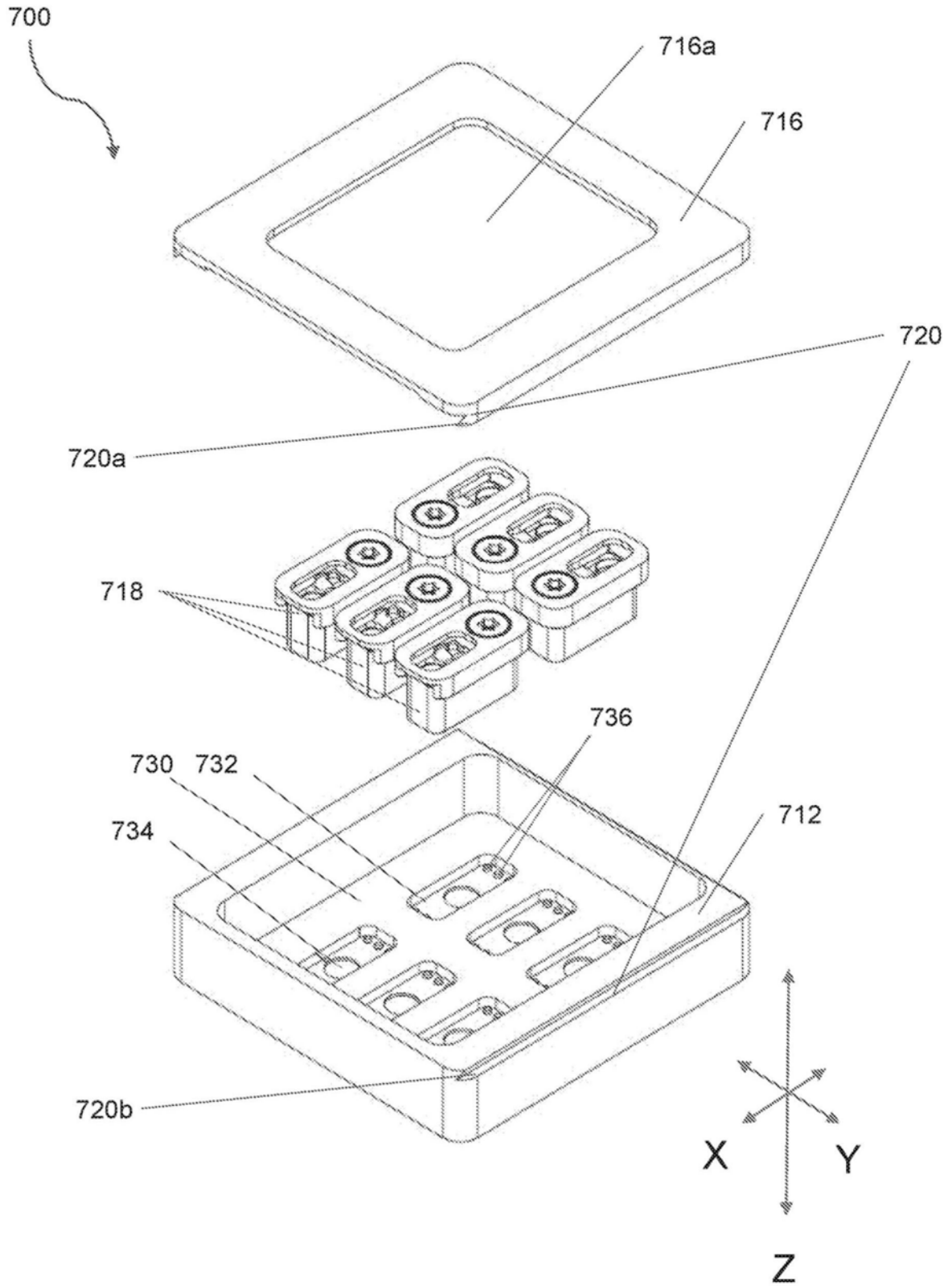


图12

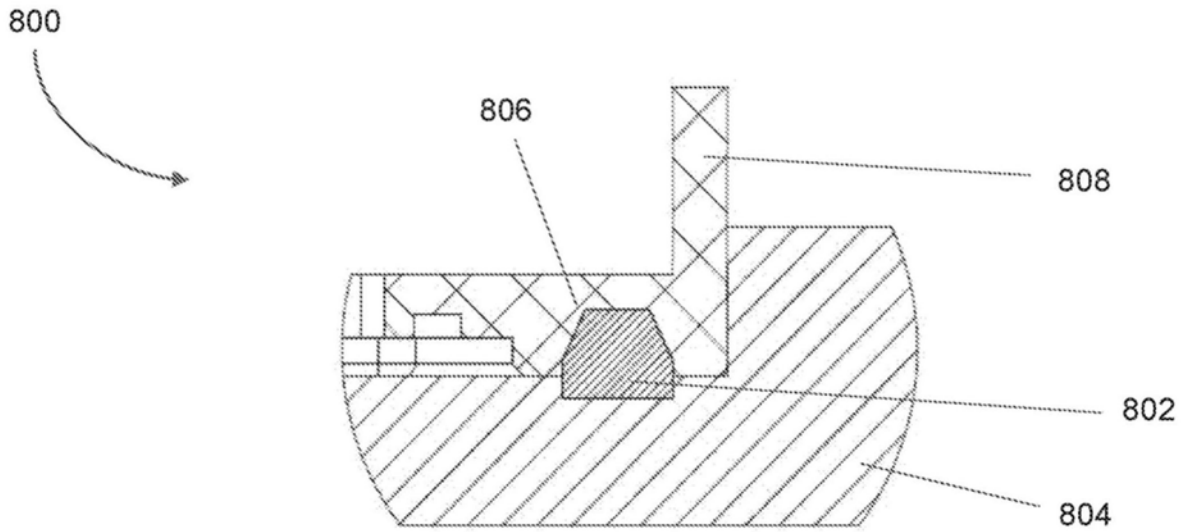


图13A

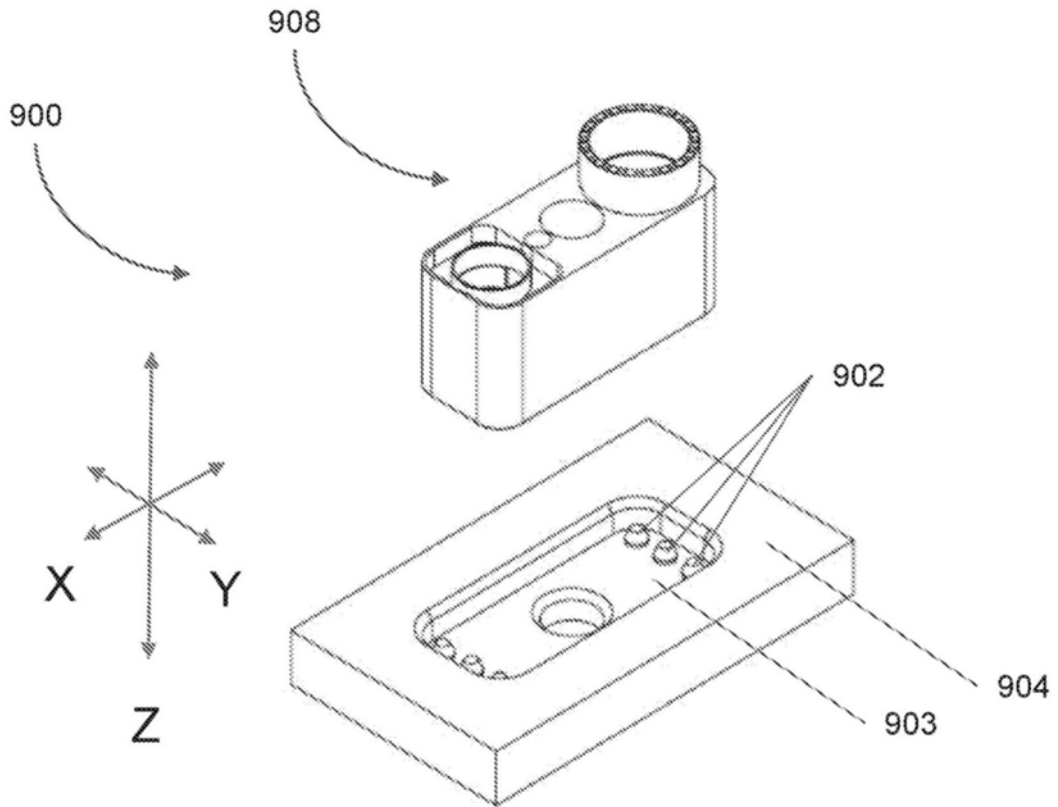


图13B

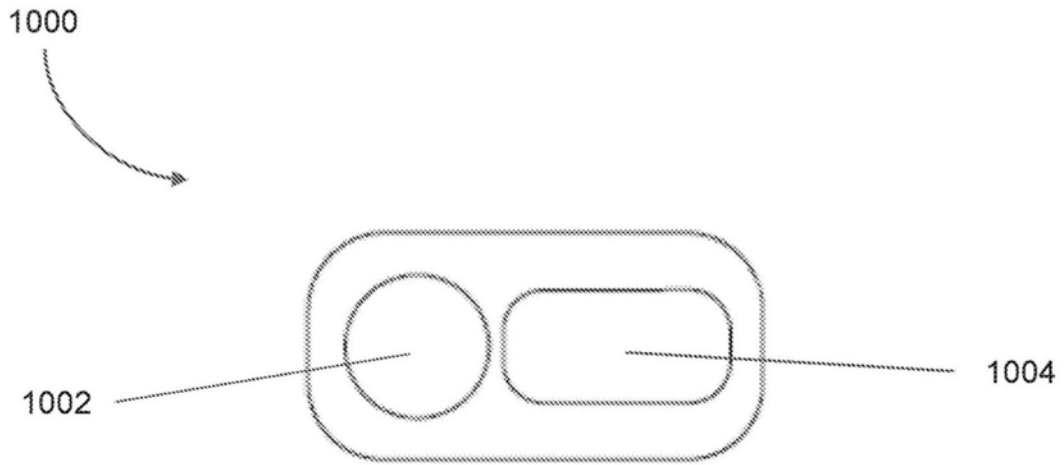


图14A

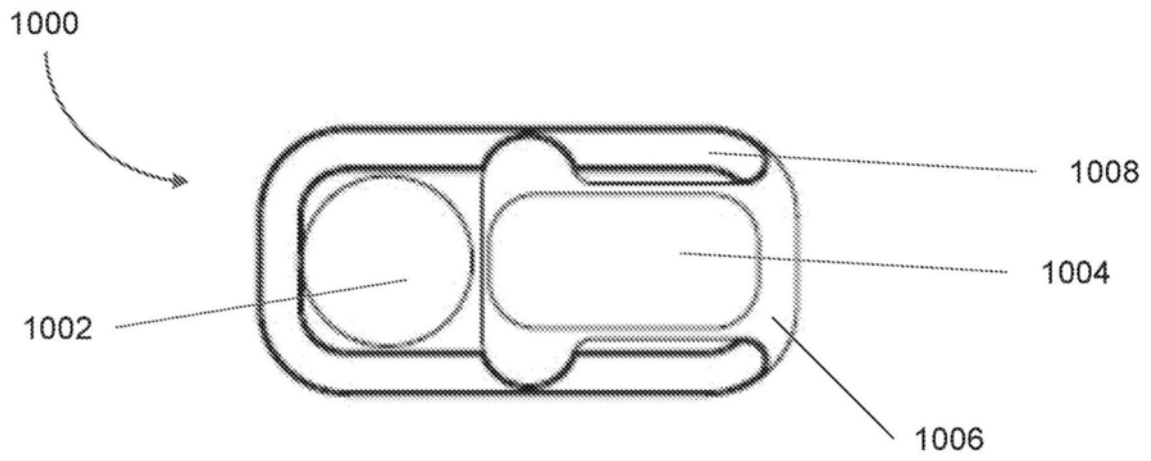


图14B

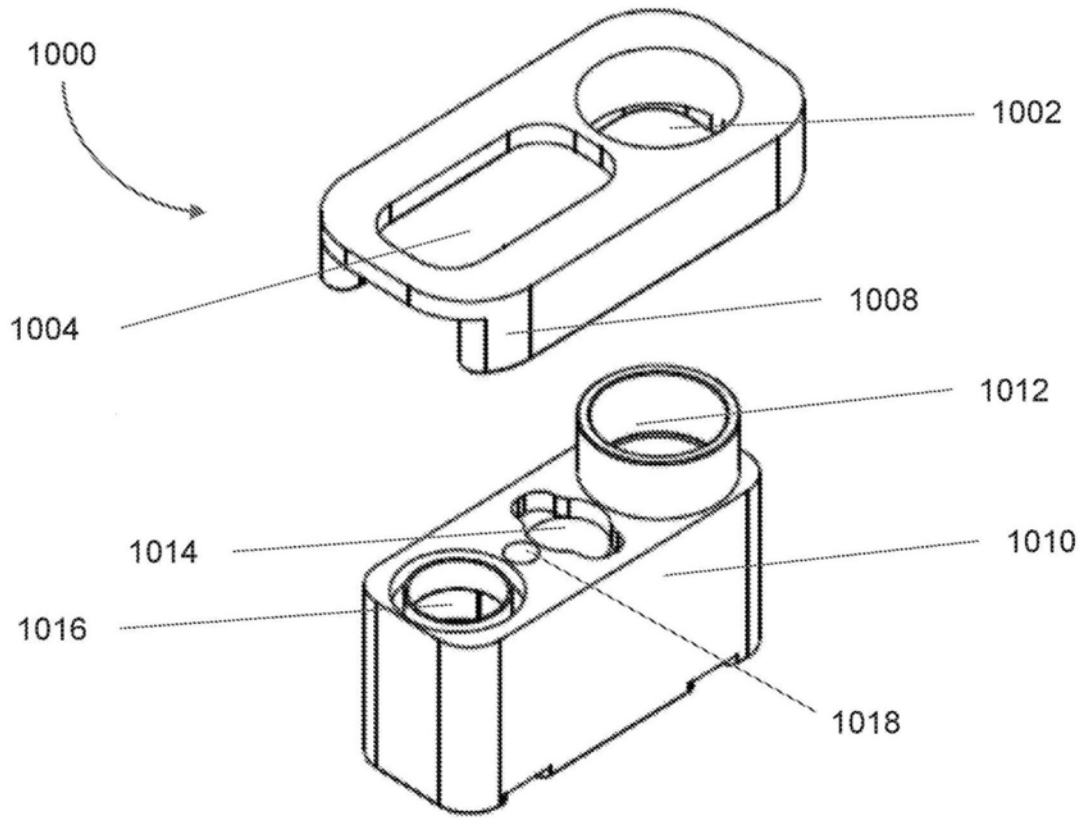


图15A

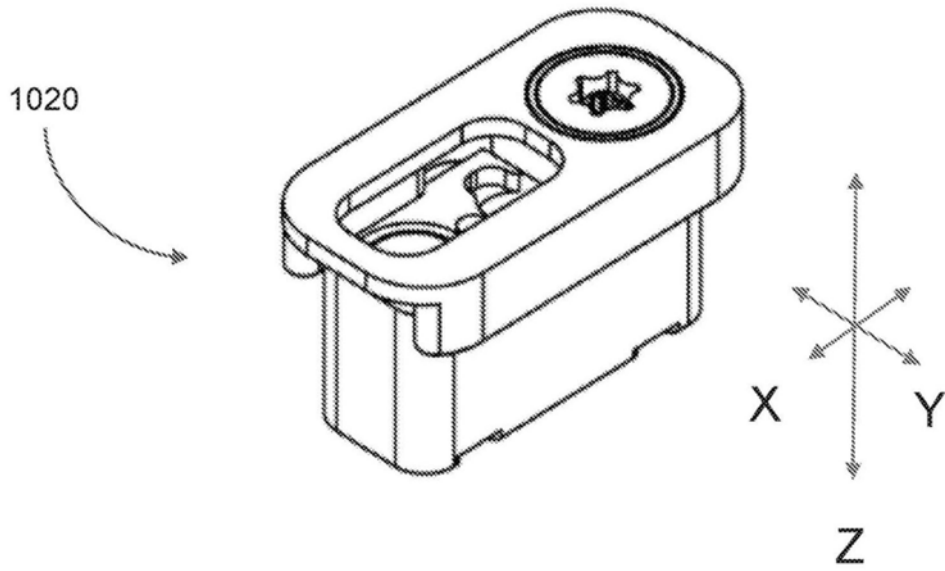


图15B

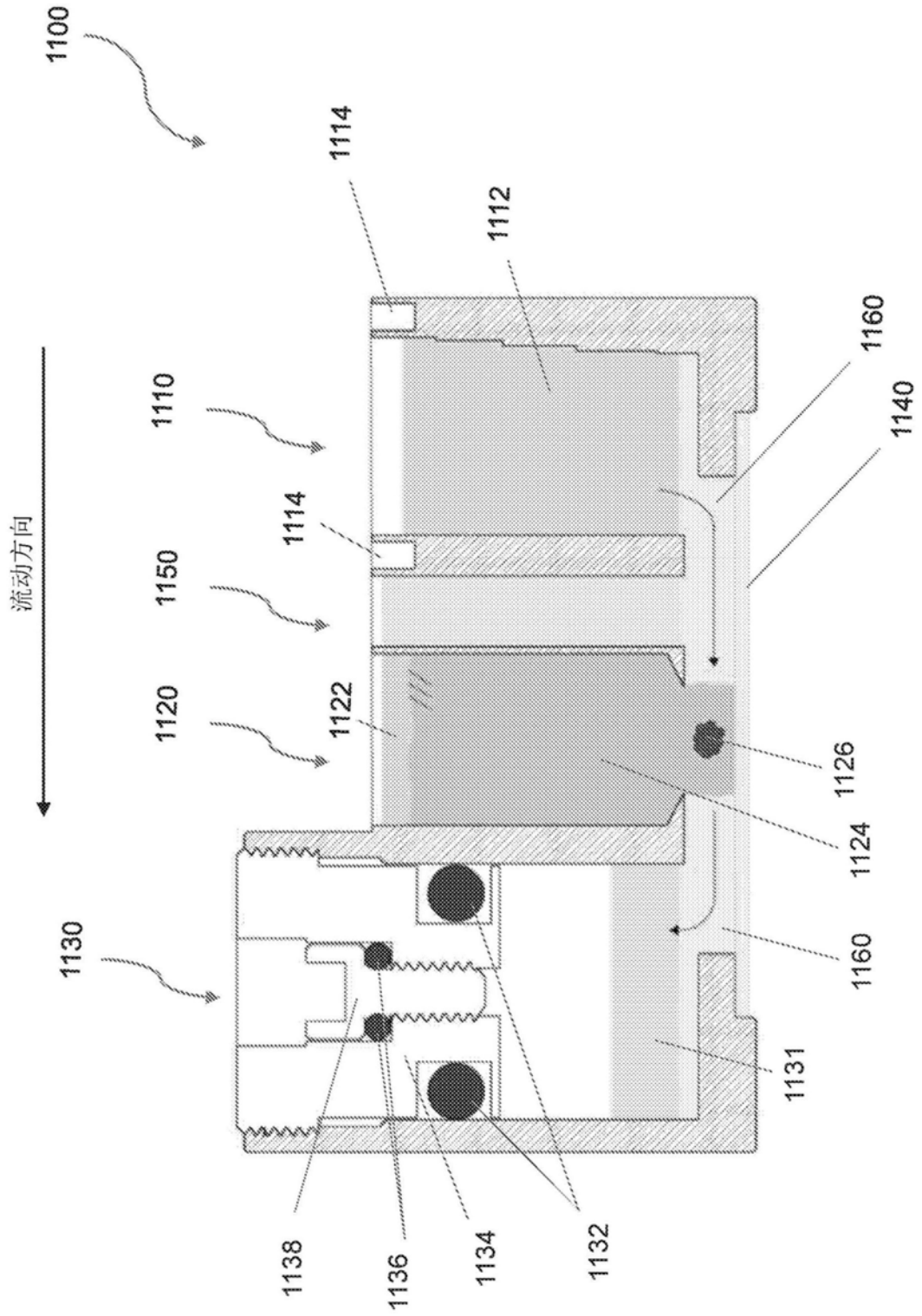


图16

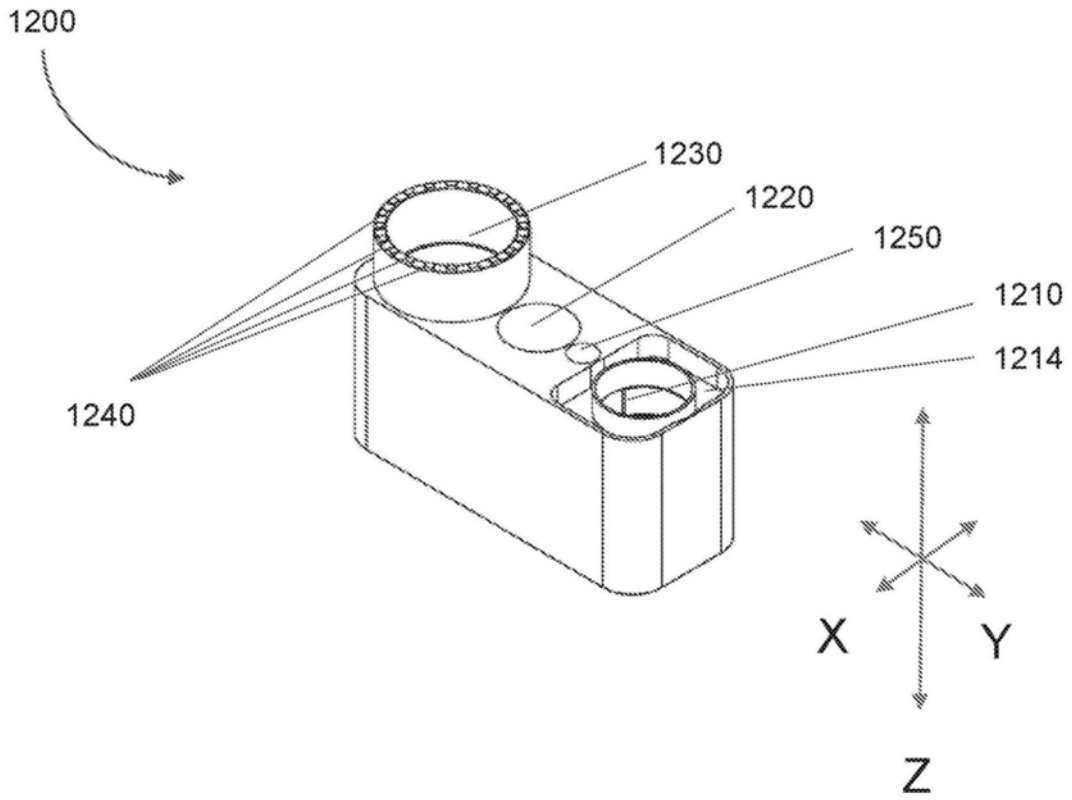


图17

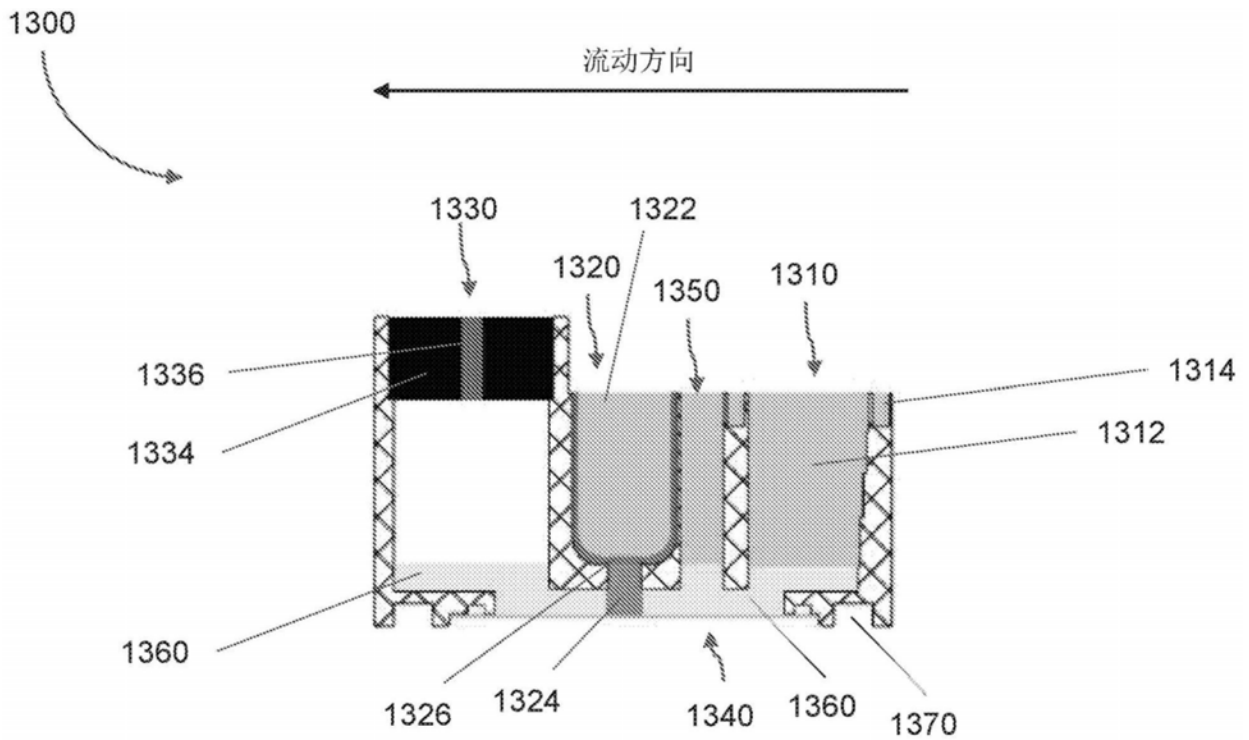


图18

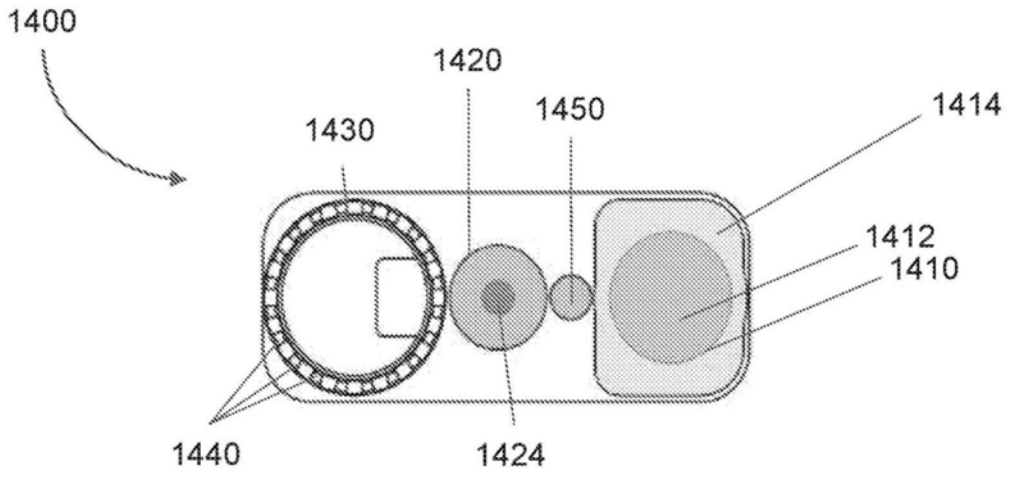


图19A

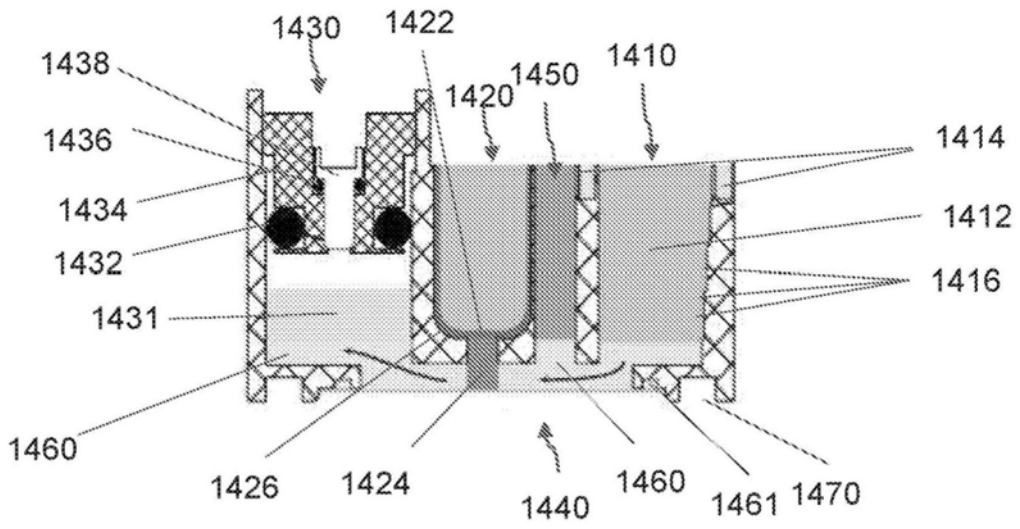


图19B

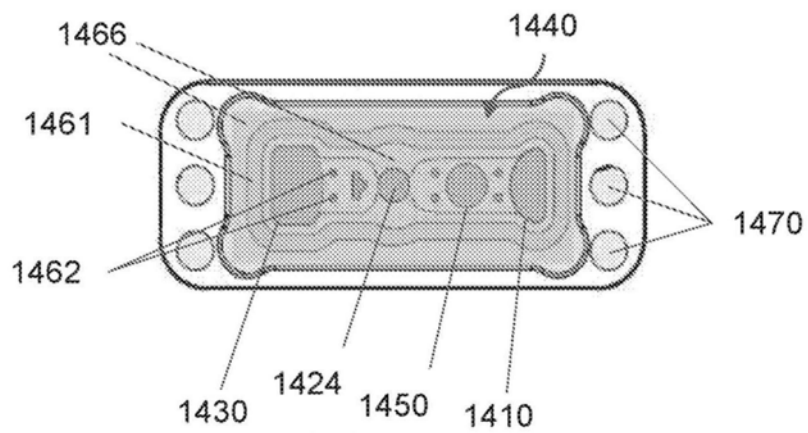


图19C

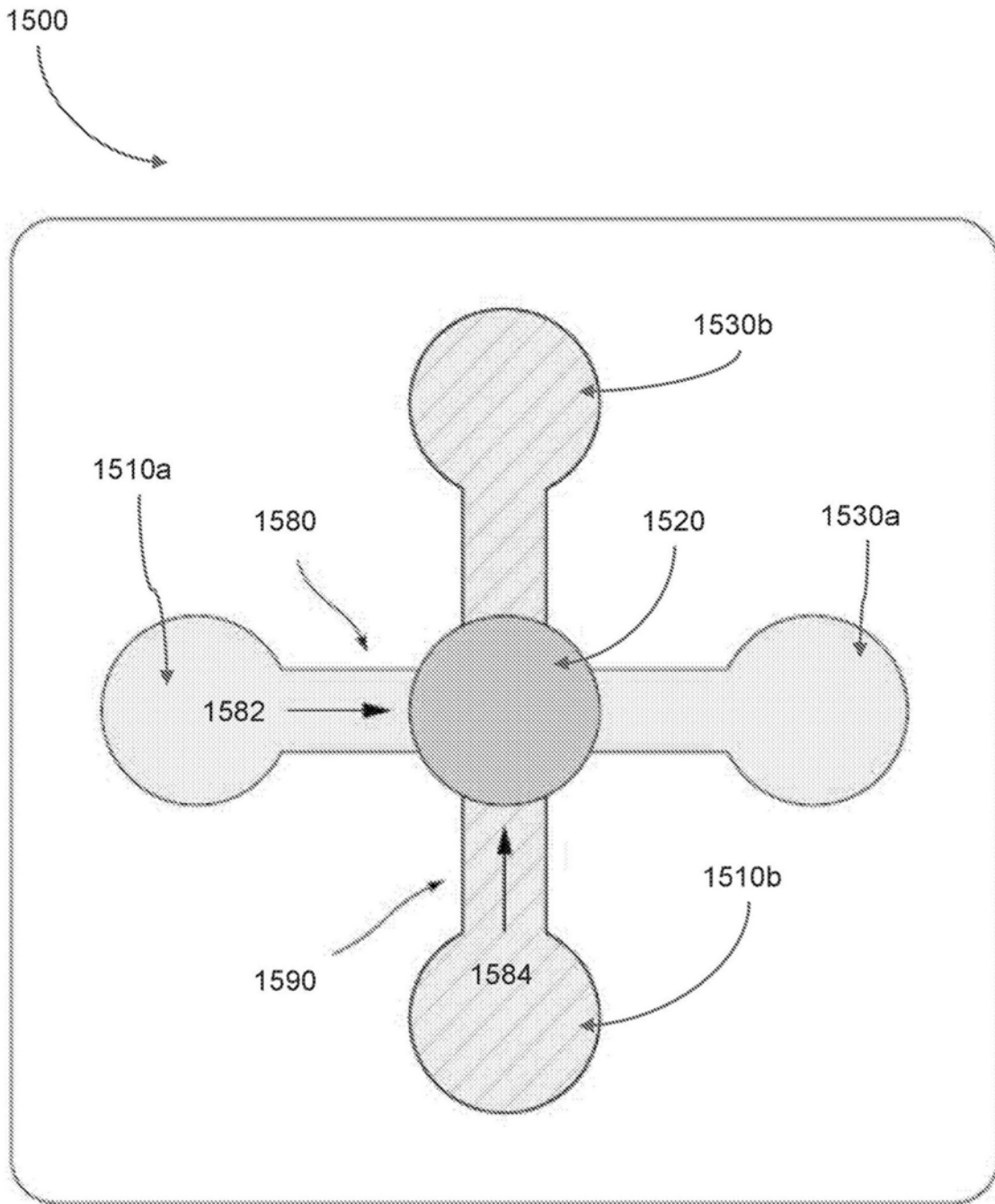


图20

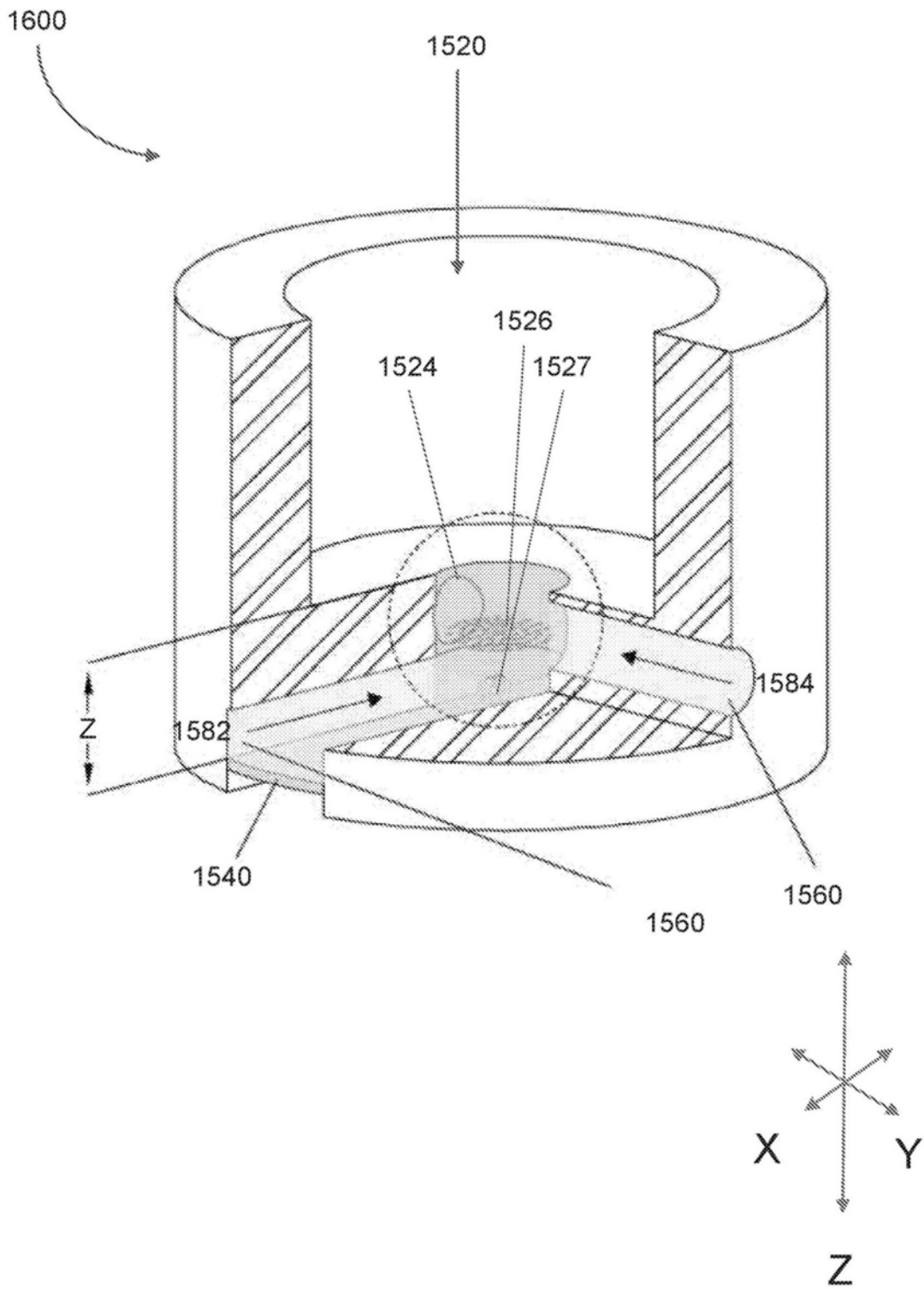


图21

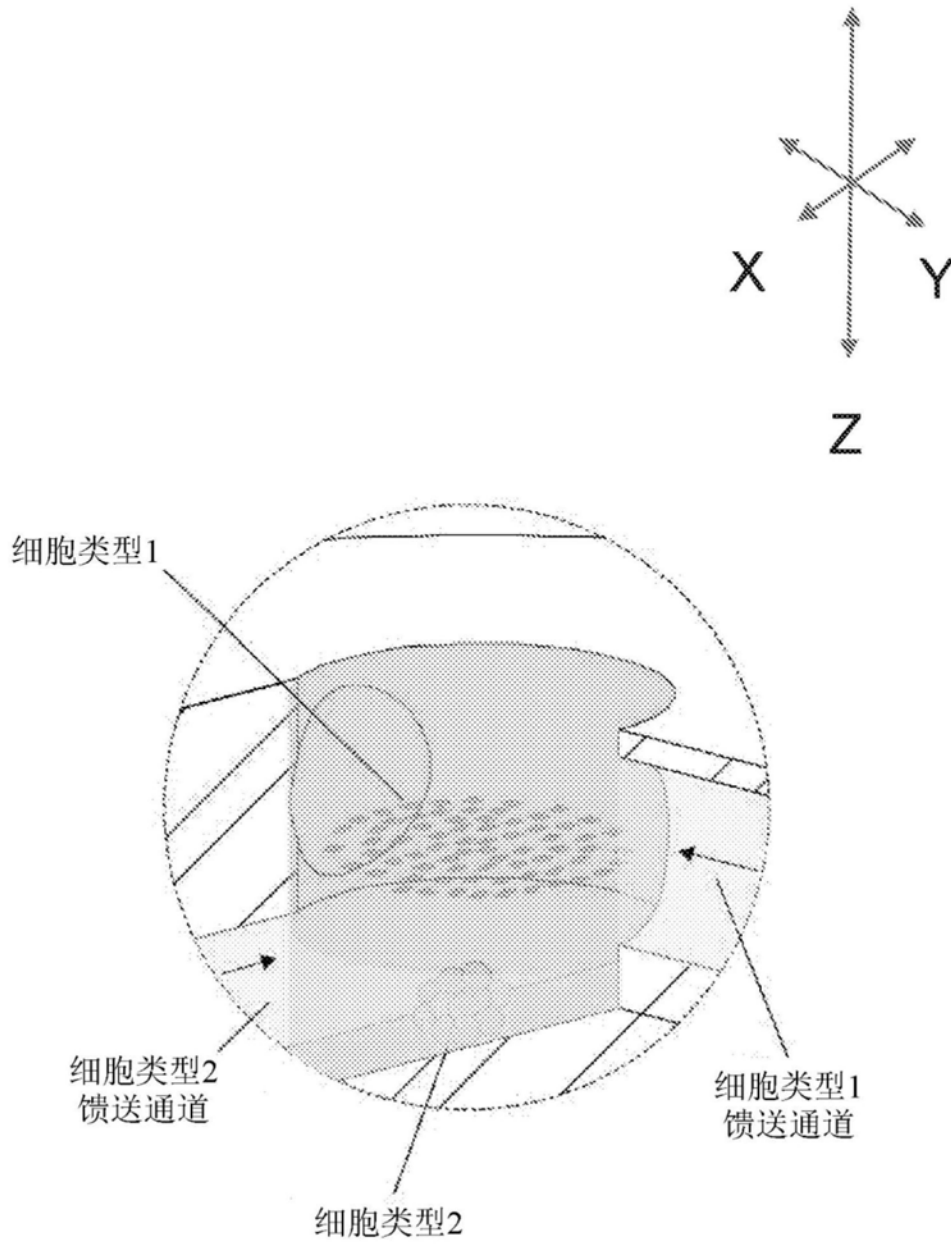


图22

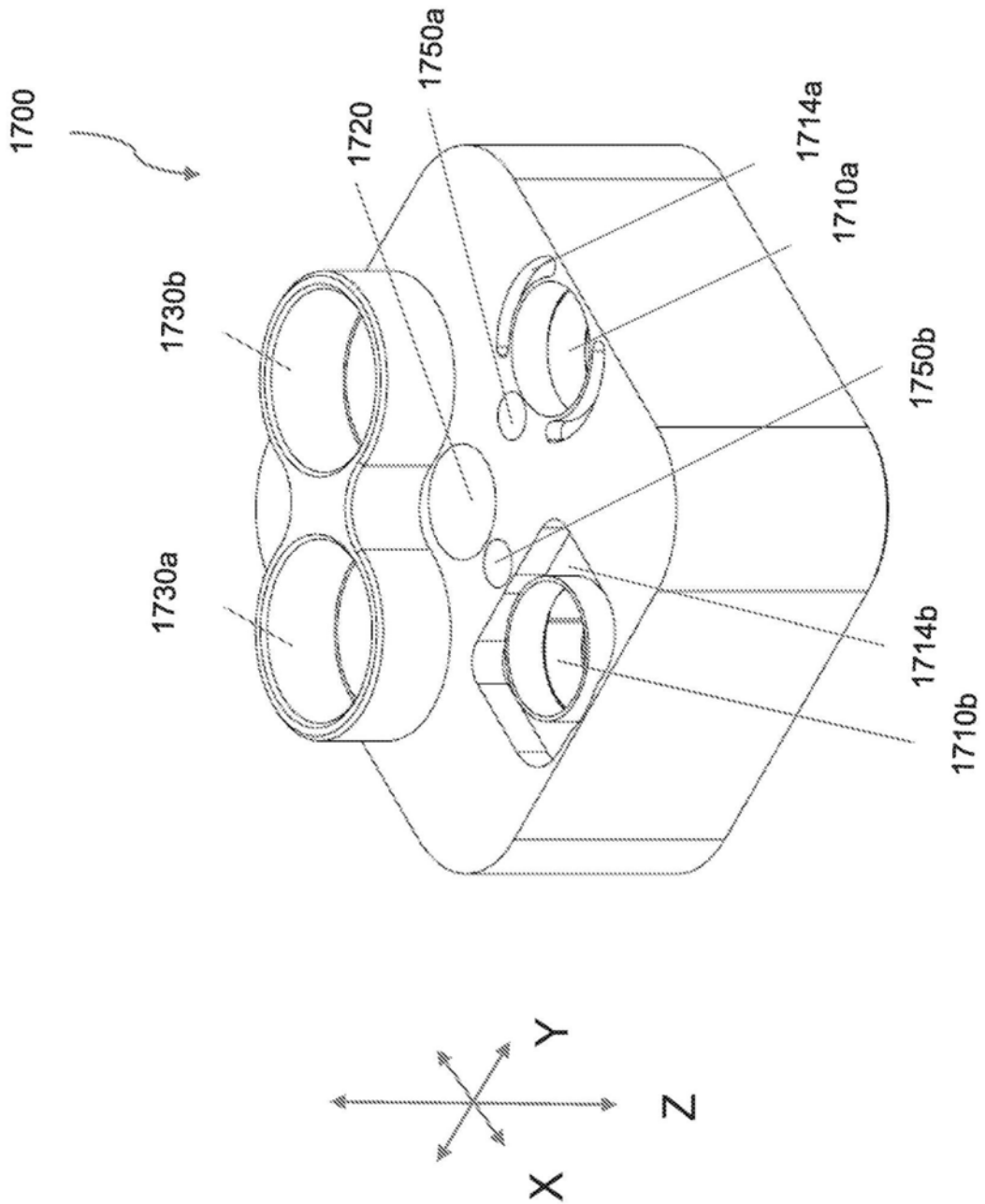


图23A

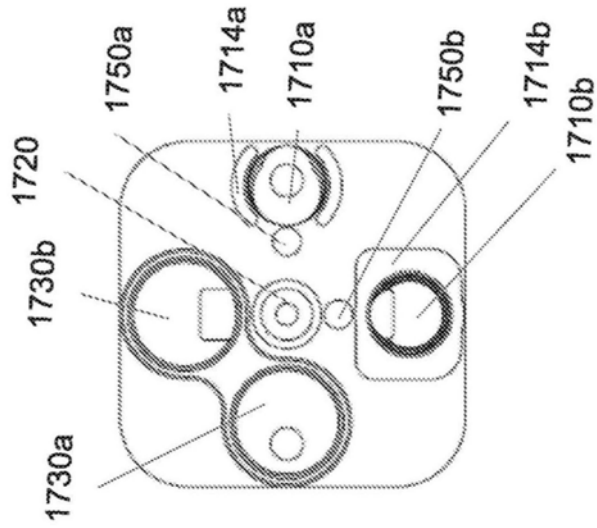


图23B

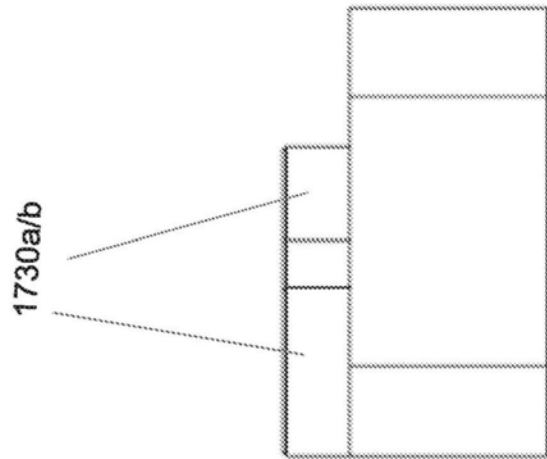


图23C

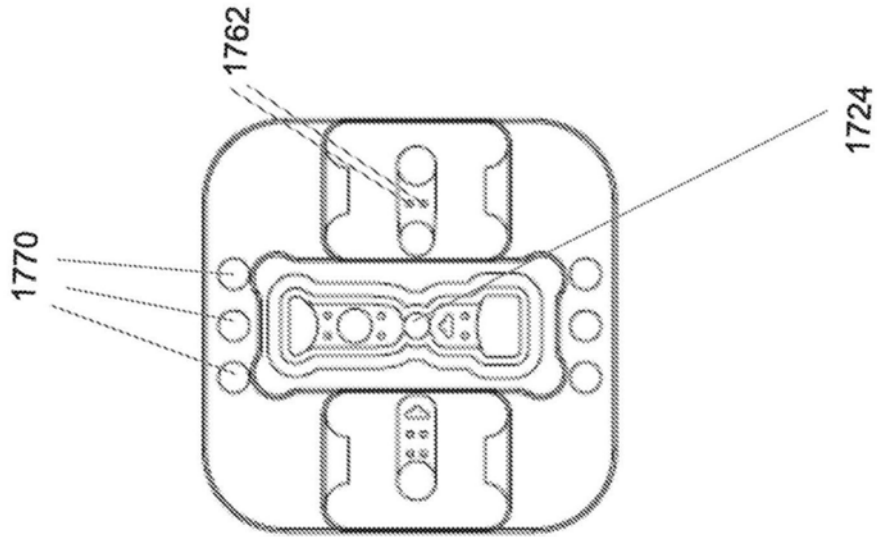


图23D

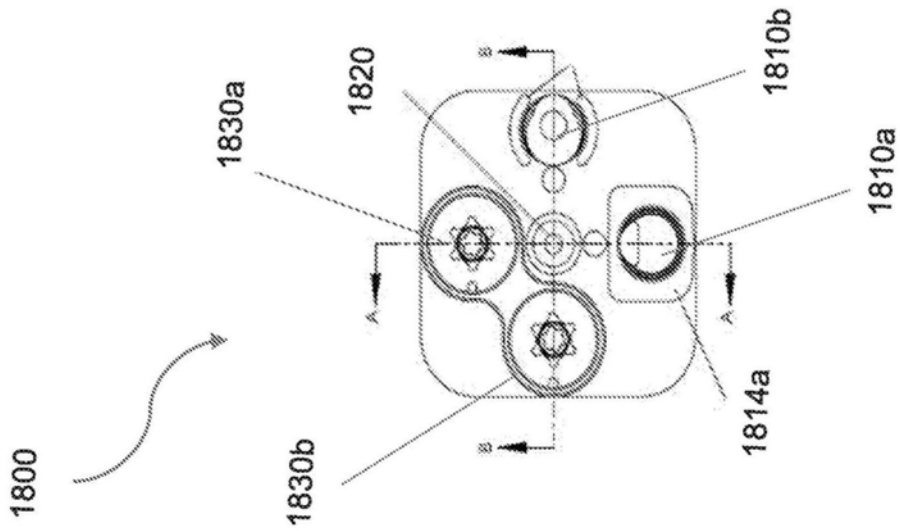
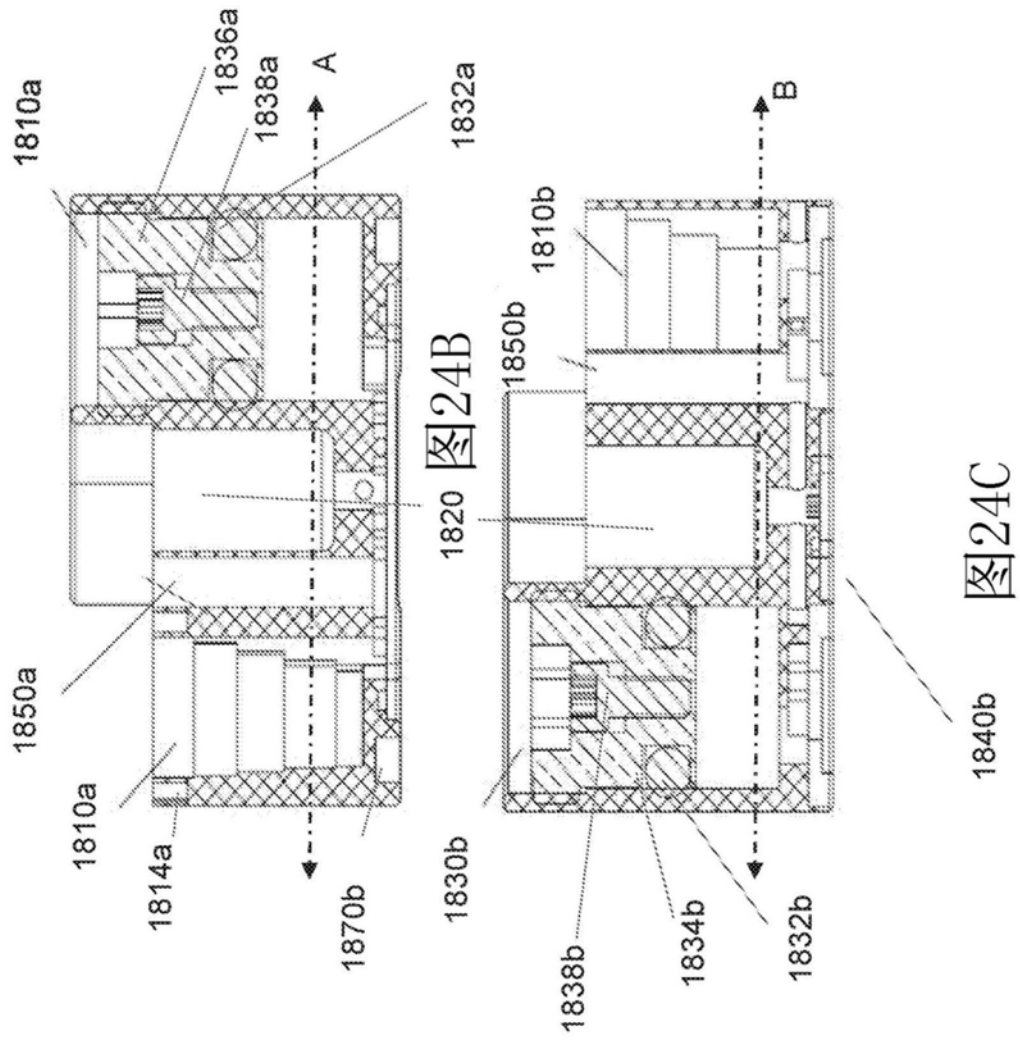


图24A



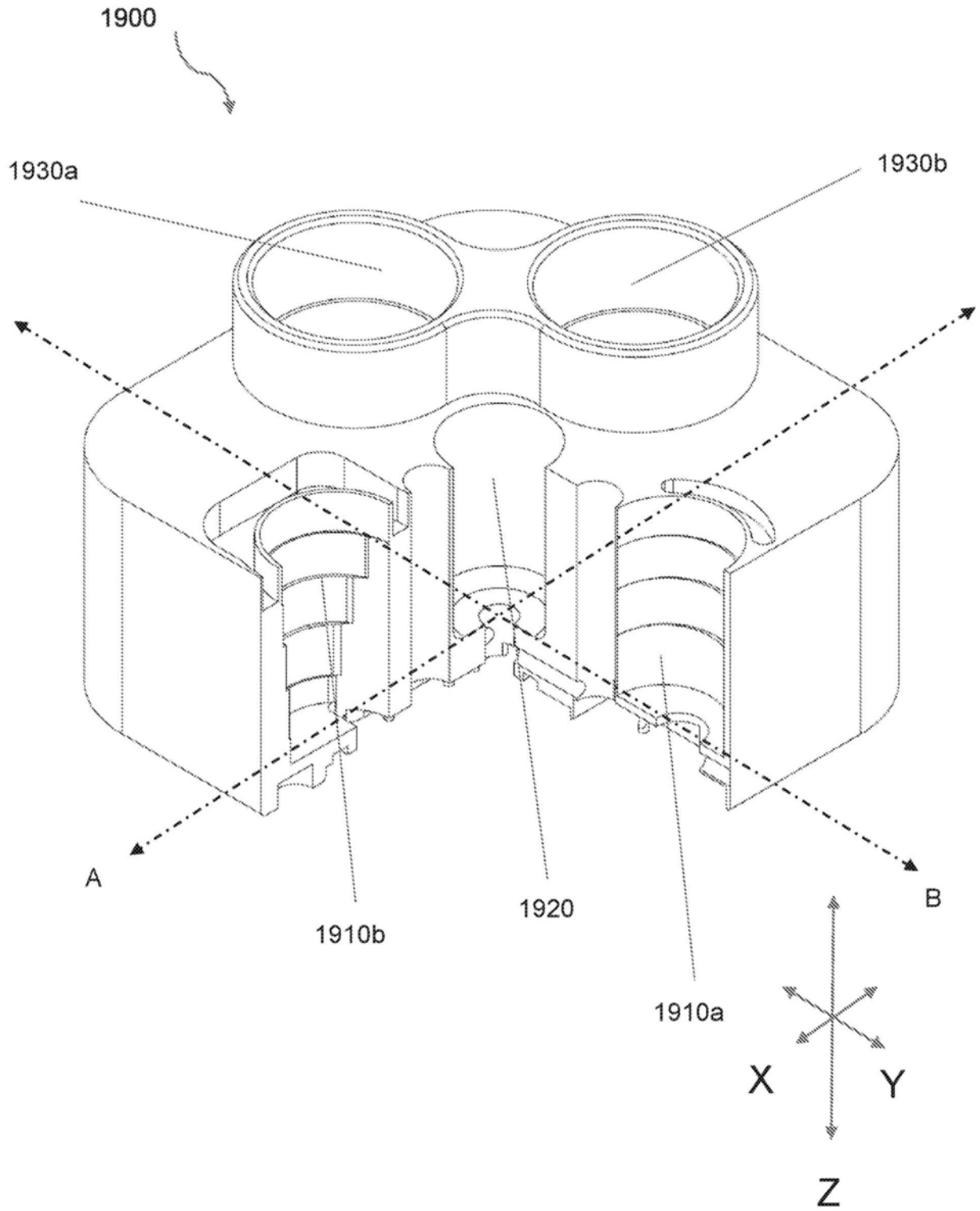


图25

2000

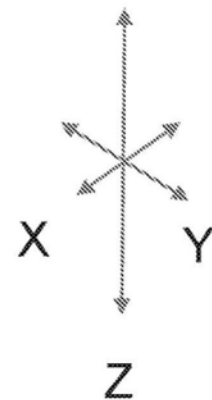
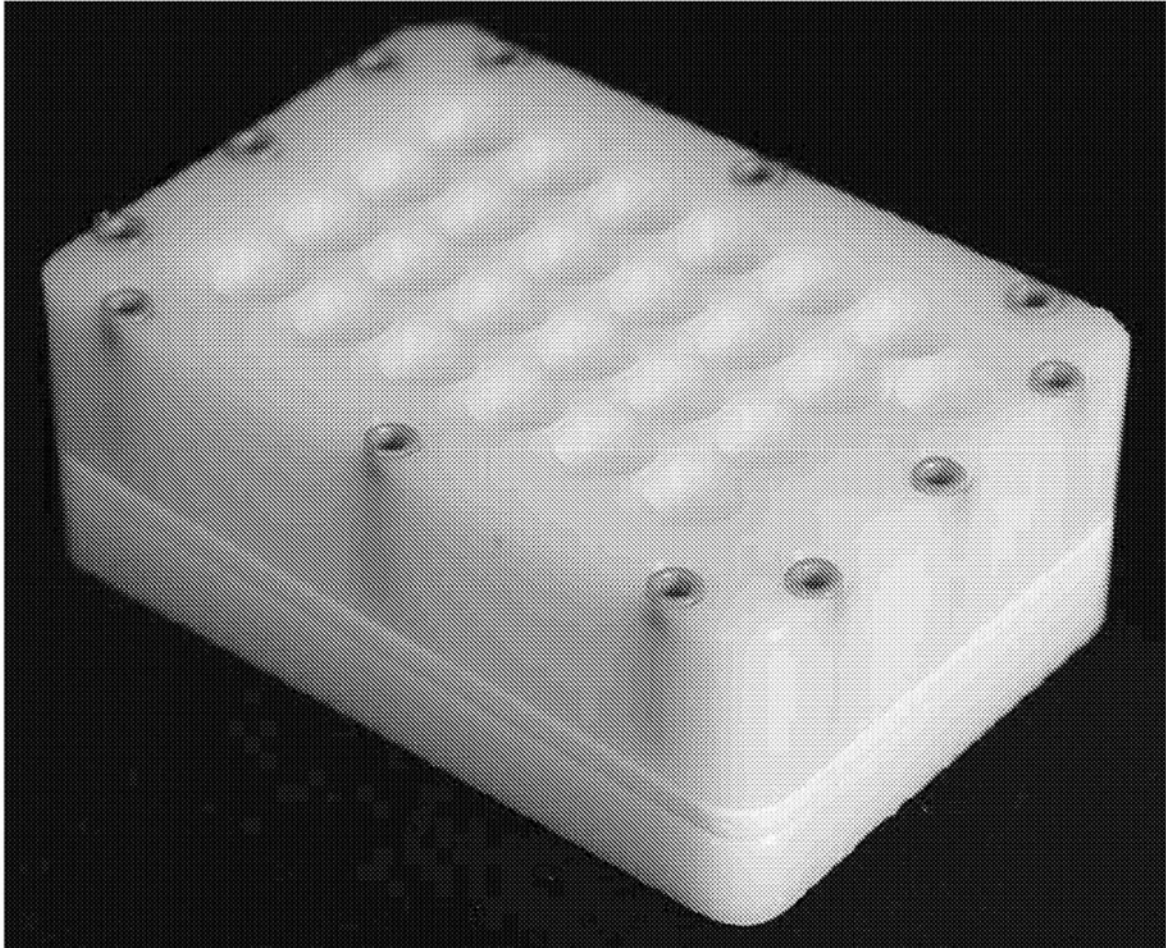


图26

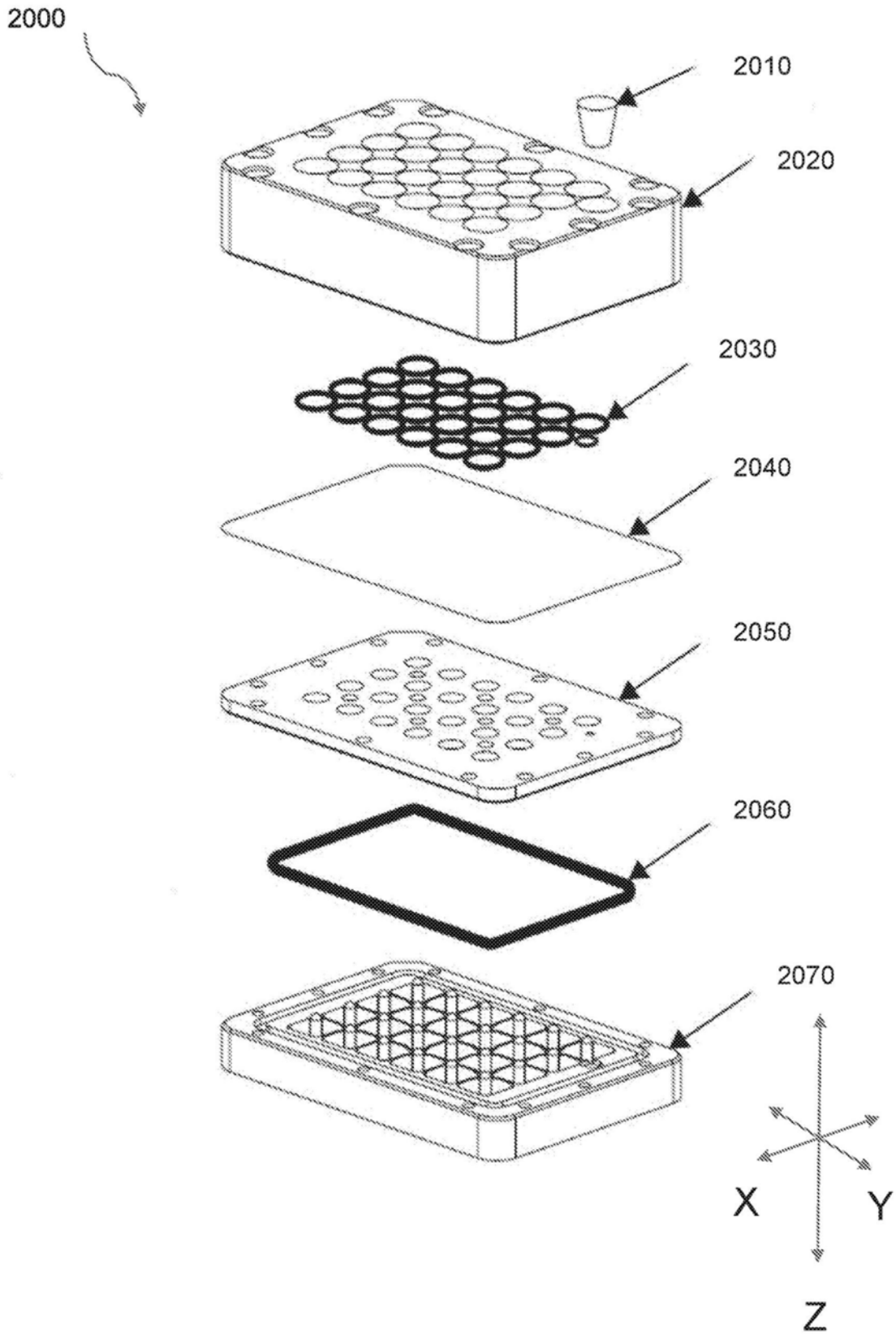


图27

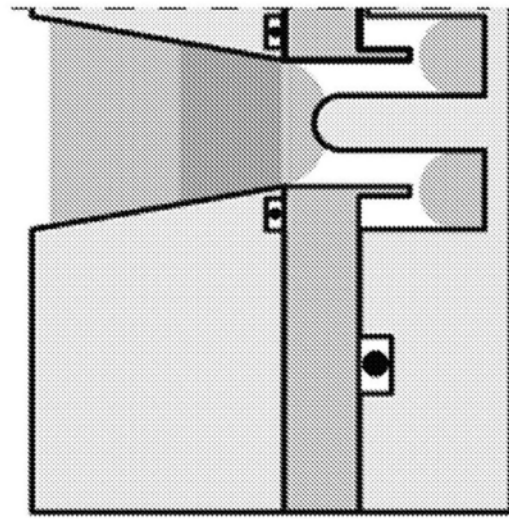


图28B

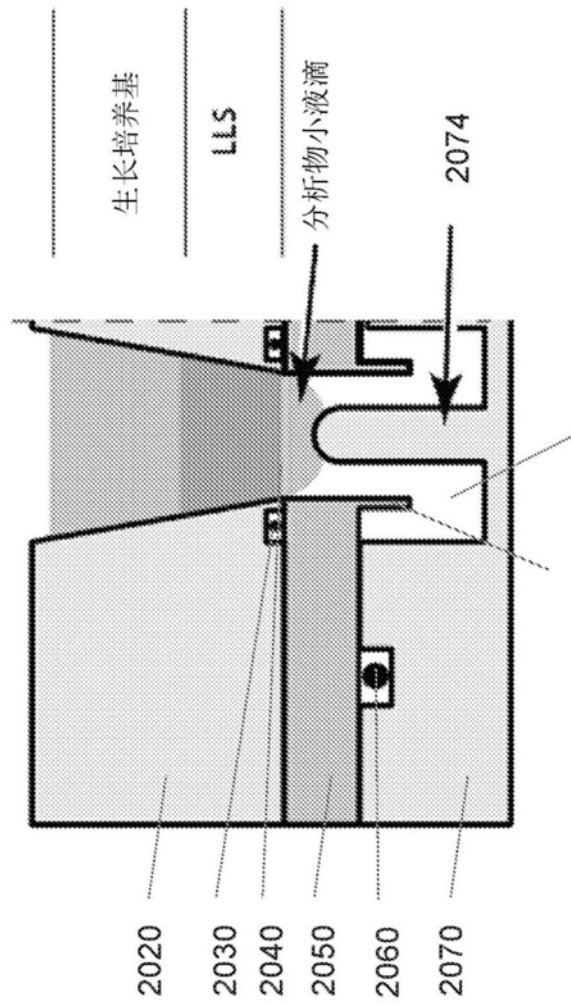


图28A

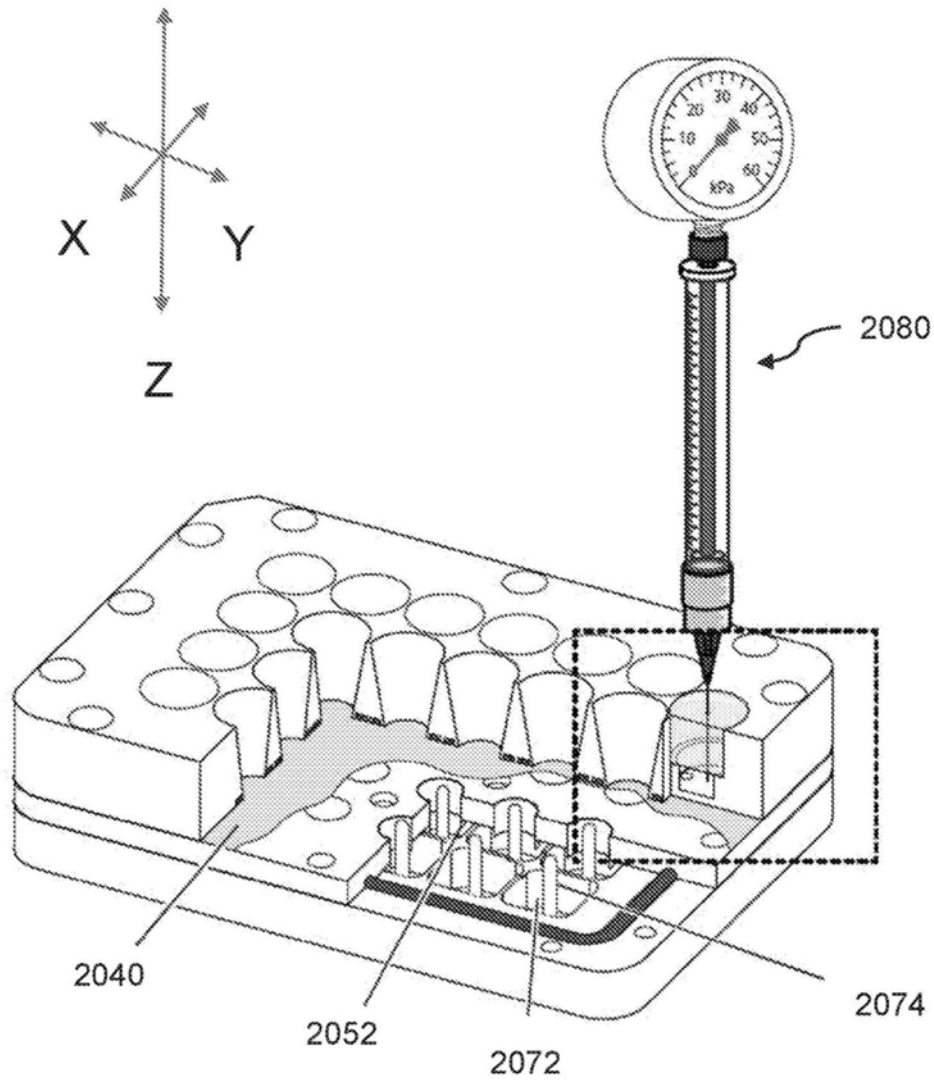


图29A

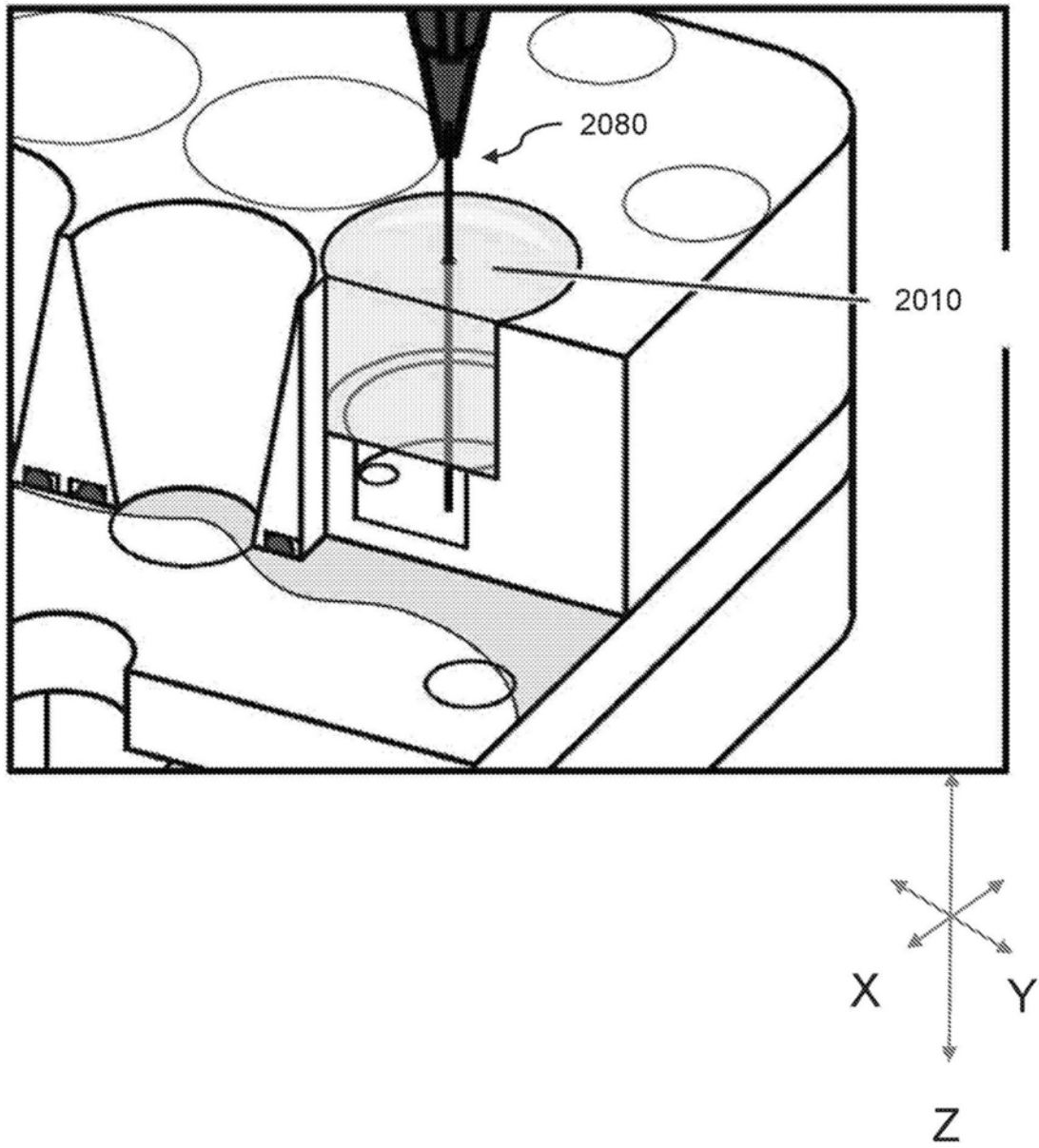


图29B

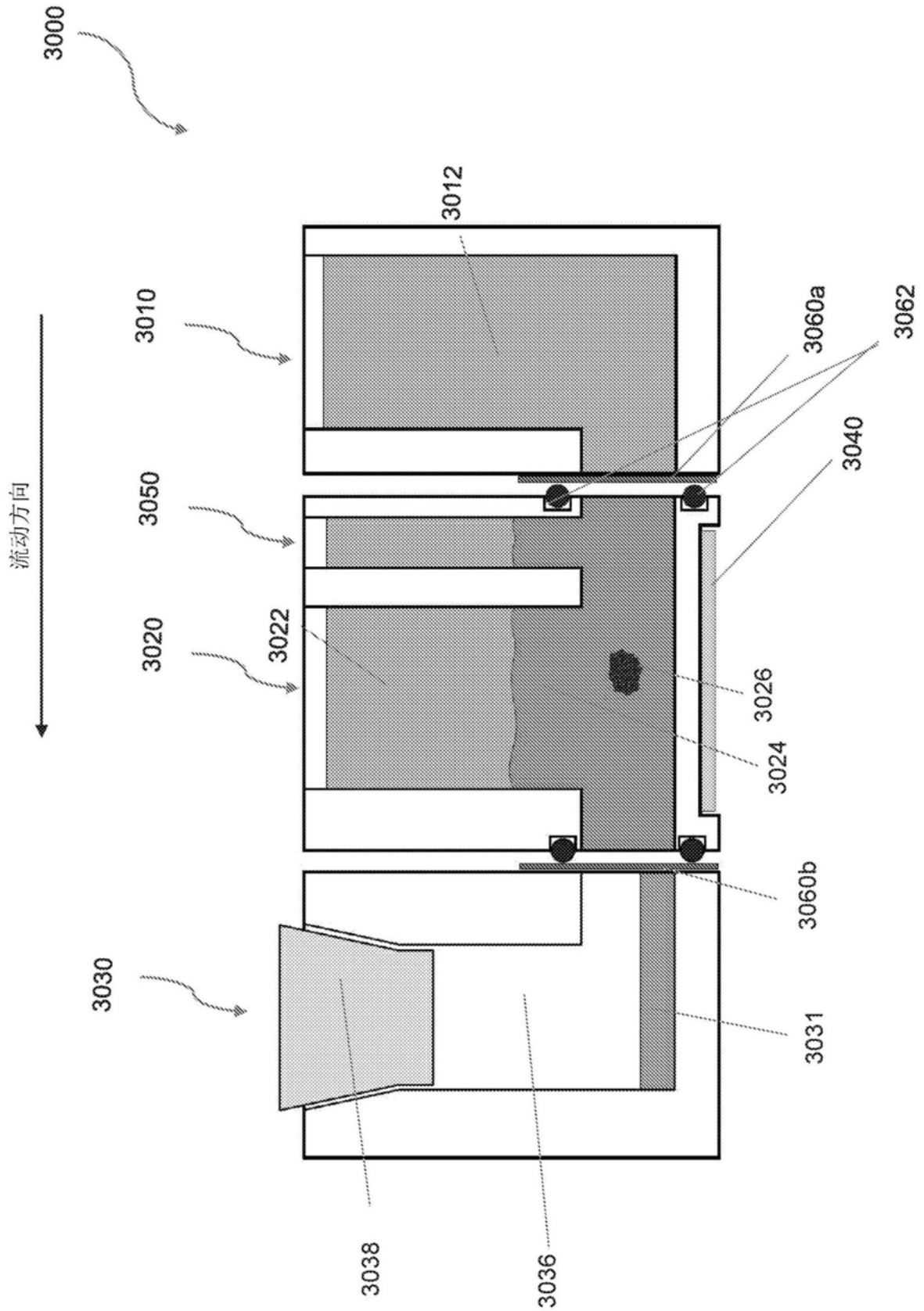


图30