



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105392876 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201480036278. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 06. 24

C12M 1/00(2006. 01)

C12M 1/26(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/838,730 2013. 06. 24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/043914 2014. 06. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/210036 EN 2014. 12. 31

(71) 申请人 威尔逊沃夫制造公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 丹尼尔·P·韦尔奇

约翰·R·威尔逊

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

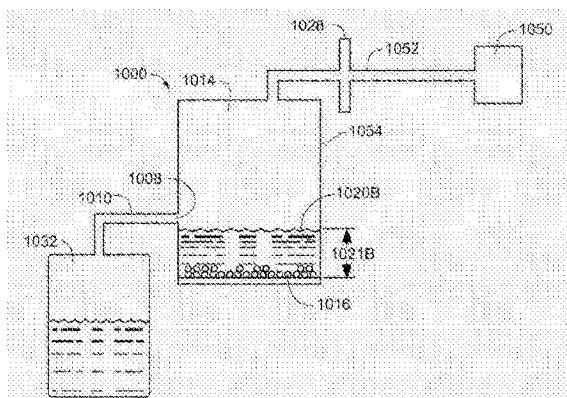
权利要求书3页 说明书19页 附图17页

(54) 发明名称

用于透气性细胞培养过程的封闭系统装置和方法

(57) 摘要

本发明公开了用于细胞培养和细胞回收的新方法和新仪器。所述方法和仪器简化了从培养基分离细胞的过程，最小化了在流体处理期间对透气性装置的潜在损害，并使得能够以封闭系统自动化进行细胞培养以及从透气性装置回收细胞。



1. 用于从细胞培养装置中移出培养基的仪器，其包括：

气体递送组件，其能够连接至与透气性细胞培养装置连接的滤器，所述气体递送组件能够通过所述滤器将气体递送到所述透气性细胞培养装置中，

第一流体检测组件，其能够确定在培养基移出导管内移动的流体何时从液体变为气体，所述培养基移出导管与所述透气性细胞培养装置连接，所述第一流体检测组件能够向第一流体流动控制组件发送信号，所述第一流体流动控制组件能够终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

2. 权利要求 1 所述的装置，所述装置包括第二流体检测组件，所述第二流体检测组件能够确定在细胞移出导管内移动的流体何时从液体变为气体，所述细胞移出导管与所述透气性细胞培养装置连接，所述第二流体检测组件能够向第二流体流动控制组件发送信号，所述第二流体流动控制组件能够终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

3. 使用权利要求 1 所述装置的方法，其包括：

如下减少含有细胞和培养基的透气性细胞培养装置中液体培养基的体积以提高每毫升培养基的细胞浓度：将所述气体递送组件连接至与所述透气性细胞培养装置连接的滤器，所述细胞培养装置包括培养基移出导管，将所述第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接，将所述第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接，起始从所述气体递送组件的气体递送，由此气体移动到所述细胞培养装置中，所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体，做出该确定之后，所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号，并且在所述第一流体流动控制组件接收所述信号之后，所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其包括收集细胞的步骤，其中在所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动后，将细胞收集容器连接至所述培养基移出导管，所述培养基移出导管具有与培养基接触的培养基移出开口，第一流动控制组件打开通过所述培养基移出导管的流体流动，从所述气体递送组件递送的气体移动到所述细胞培养装置中，培养基和细胞通过所述培养基移出导管移动到所述细胞收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体并向所述第一流体流动控制组件发送信号，并且在接收到所述信号之后，所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

5. 使用权利要求 2 所述装置的方法，其包括：

如下提高透气性细胞培养装置中每毫升培养基的细胞数目：将所述气体递送组件连接至与含有液体培养基和细胞的透气性细胞培养装置连接的滤器，所述细胞的至少一部分与所述细胞培养装置内的生长表面接触，所述细胞培养装置包括培养基移出导管和细胞移出导管，将所述第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接，将所述第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接，起始从所述气体递送组件的气体递送，由此气体移动到所述细胞培养装置中，并且所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体，做出该确定之后，所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第一流体流动控制组件终止通过所

述培养基移出导管的流体流动,以及

如下将细胞从所述透气性细胞培养装置移出:使所述第二流体检测组件连接至所述细胞移出导管,将所述第二流体流动控制组件连接至所述细胞移出导管,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中并经过所述细胞移出导管将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中,所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体,确定后,所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号,并且在接收所述信号之后,所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中在所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动后,所述细胞培养装置与大气连通,打开所述第一流动控制组件以允许通过所述培养基移出导管的流体流动,培养基通过所述培养基移出导管移动到所述细胞培养装置中,关闭所述第一流动控制组件,搅动所述培养基以使细胞移动到所述培养基中,以及

所述细胞培养装置不再与大气连通且将气体从所述气体递送组件递送到所述细胞培养装置中,并且将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中,所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体,在做出该确定之后,所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号,并且在接收所述信号之后,所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

7. 减少含有细胞和培养基的透气性细胞培养装置中培养基体积的方法,其包括:

含有第一体积的培养基和驻留于生长表面上之细胞的透气性细胞培养装置,并如下降低培养基的体积以提高每毫升培养基的细胞浓度:使气体递送组件连接至与所述细胞培养装置连接的滤器,所述细胞培养装置包括培养基移出导管,使第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接,使第一流体流动控制组件与培养基移出导管连接,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中,所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基变为气体,做出该确定之后,所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号,并且在所述第一流体流动控制组件接收所述信号之后,所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动,在所述细胞培养装置内留下残余体积的培养基和细胞,所述残余体积的培养基少于所述第一体积的培养基。

8. 根据权利要求 7 的方法,其包括收集细胞的步骤,其中在所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动后,将细胞收集容器连接至所述培养基移出导管,并且培养基与所述培养基移出导管的培养基移出开口接触,打开第一流动控制组件以允许通过所述培养基移出导管的流体流动,从所述气体递送组件递送的气体移动到所述细胞培养装置中,通过所述培养基移出导管将所述残余培养基体积和细胞置换到所述细胞收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基变为气体,并向所述第一流体流动控制组件发送信号,在接收所述信号之后,所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

9. 从透气性细胞培养装置收集细胞的方法,其包括:

如下将含有细胞的透气性细胞培养装置内的第一体积培养基减少以提高每毫升细胞浓度的第一步骤：使气体递送组件连接至与含有培养基和细胞的透气性细胞培养装置连接的滤器，所述细胞培养装置包括培养基移出导管和细胞移出导管，使第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接，使第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接，并且所述细胞的至少一部分驻留于生长表面上，起始从所述气体递送组件的气体递送，由此气体移动到所述细胞培养装置中并且气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基变为气体，在做出该确定后，所述第一流体检测组件向第一流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动，在所述细胞培养装置内留下残余体积的培养基和细胞，所述残余体积的培养基少于所述第一体积的培养基，以及

如下从所述透气性细胞培养装置移出细胞的第二步骤：使第二流体检测组件与所述细胞移出导管连接，使第二流体流动控制组件与所述细胞移出导管连接，并且细胞遍布所述残余体积的培养基，起始从气体递送组件的气体递送，由此气体移动到所述细胞培养装置中并且将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中，所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从培养基变为气体，在做出该确定时所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

10. 权利要求 9 所述的方法，其包括以下的另外步骤：

润洗所述细胞培养装置以收集在所述第二流动控制组件终止了通过所述细胞移出导管的流体流动后可能被留在所述细胞培养装置和 / 或所述细胞移出导管中的另外细胞，还包括当所述细胞培养基装置与大气连通时，起始通过所述培养基移出导管的液体流动，所述液体通过所述培养基移出导管移动到所述细胞培养装置中，搅动所述液体以将所述细胞培养装置内的细胞移动到所述液体中，以及

起始从所述气体递送组件递送到所述细胞培养装置中的气体递送，所述气体将液体和细胞经所述细胞移出导管而从所述细胞培养装置置换到所述细胞收集容器中，所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体以及在做出该确定时，所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

## 用于透气性细胞培养过程的封闭系统装置和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2013 年 6 月 24 日提交的名称为“CLOSED SYSTEM DEVICE AND METHODS FOR GAS PERMEABLE CELL CULTURE PROCESS”的美国临时专利申请 No. 61/838,730 的权益,所述申请通过引用完全并入本文。另外,共同未决的美国专利申请 No. 10/961,814(下文中的“814”)、美国专利申请 No. 11/952,848(下文中的“848”)、美国专利申请 No. 12/963,597(下文中的“597”)、美国专利申请 No. 13/475,700(下文的“700”)和美国专利申请 No. 13/493768(下文的“768”)通过引用以其整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明的技术领域涉及静态细胞培养方法和装置,其在新的透气性细胞培养装置内有效地扩增细胞并允许向所述培养系统添加或从其移出流体,具有很小的污染风险或无污染风险,很少的细胞损失或无细胞损失,以及透气性表面很少变形或无变形。

[0004] 讨论相关领域所描述的常规技术的限制

[0005] T 细胞疗法、过继免疫疗法和过继细胞疗法指用于治疗多种疾病的强大方法,其包括体外扩增免疫系统的细胞,并随后将所扩增的细胞输注到患者中以对抗疾病。为了这些形式的疗法达到社会的多个方面,扩增细胞群和收集细胞的过程需要成本有效、实用、不易损失细胞并具有最小的至没有污染的风险。

[0006] 目前为止,还没有用于制备和储存在不经受污染的 T 细胞疗法、过继免疫疗法和过继细胞疗法应用中产生之细胞并且也不需要在细胞产生后用显著量的努力使细胞从培养基分离的成本有效且实用的系统。为了 FDA 批准,使得 T 细胞产生过程实用的关键要素是最小化以及甚至消除污染的机会,同时最小化过程复杂性。在本领域的常规词典中,培养过程一般对污染是封闭的,通常称为“封闭系统”。WAVE Bioreactor<sup>TM</sup>、OriGen PermaLife<sup>TM</sup>袋和 / 或 **VueLife®** 袋是适于封闭系统 T 细胞产生的装置。袋具有能够随培养基和细胞移出而皱缩的柔性外壳,通常通过挤压袋子、依靠重力和或通过用蠕动泵吸出培养基来移出。WAVE Bioreactor<sup>TM</sup>依靠蠕动泵来移出培养基和细胞。

[0007] 最近, G-Rex<sup>TM</sup> 细胞培养装置对于 T 细胞培养变得流行,其基于相对于 WAVE Bioreactor<sup>TM</sup>、OriGen PermaLife<sup>TM</sup> 袋和 **VueLife®** 袋的多种优点。优点之一是在共同未决“570”中描述的在收集细胞之前移出绝大多数培养基以使从培养基分离细胞所需要的时间和努力最小化的能力。然而,已经发现依赖于前述方法的移出培养基和细胞的现有技术方法不适用于 G-Rex<sup>TM</sup> 培养装置。G-Rex 装置不像袋一样随培养基的移出而皱缩并且使用蠕动泵将培养基从 G-Rex 装置移出使得平面的透气性表面处于这样的状态,其中所述平面的透气性表面从其水平培养位置移动并通过在装置中形成的真空被拉到装置的内部体积中。尝试防止真空形成,通过使用越来越大表面积的通气滤器 (vent filter) 未形成能够使得透气性表面保持在平面和 / 或水平位置的可行构造。将膜拉出其平面和 / 或水平状态对产生过程是有害的并且可能造成在培养基体积减小时损失细胞或者形成可导致培养物污染和 / 或将工人暴露于生物危害的泄漏。

[0008] 因此,为了简化在封闭系统方式中的细胞回收过程(特别是对于T细胞疗法领域),需要建立用于透气性细胞培养装置的封闭系统流体处理的新方法,包括“814”、“848”、“597”、“700”和“768”中公开的那些。

## 发明内容

[0009] 公开了某些实施方案,其允许气体将培养基初始体积的一部分置换(displace)到废物容器中,之后将细胞和残余体积的培养基置换到细胞收集容器中。

[0010] 一个这样的实施方案公开了用于从细胞培养装置中移出培养基的仪器(apparatus),所述仪器包括能够连接至与透气性细胞培养装置连接之滤器的气体递送组件,所述气体递送组件能够通过所述滤器将气体递送到所述透气性细胞培养装置中;第一流体检测组件,其能够确定在培养基移出导管内移动的流体何时从液体变为气体,所述培养基移出导管与所述透气性细胞培养装置连接,所述第一流体检测组件能够向第一流体流动控制组件发送信号,其能够终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

[0011] 一个这样的实施方案公开了这样的仪器,所述仪器包括第二流体检测组件,其能够确定在细胞移出导管内移动的流体何时从液体变为气体,所述细胞移出导管与所述透气性细胞培养装置连接,所述第二检测组件能够向第二流体流动控制组件发送信号,其能够终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0012] 一个这样的实施方案公开了仪器的用途,所述仪器用于如下减少含有细胞和培养基的透气性细胞培养装置中液体培养基的体积以提高每毫升培养基的细胞浓度:将气体递送组件连接至与所述透气性细胞培养装置连接的滤器,细胞培养装置包括培养基移出导管,将所述第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接,将第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中,所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体,做出该确定之后,所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号,并且在所述第一流体流动控制组件接收所述信号之后,所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

[0013] 一个这样的实施方案公开了仪器的用途,所述仪器用于收集细胞,其中在第一流动控制组件终止通过培养基移出导管的流体流动后,将细胞收集容器连接至培养基移出导管,所述培养基移出导管具有与培养基接触的培养基移出开口,第一流动控制组件打开通过所述培养基移出导管的流体流动,从所述气体递送组件递送的气体移动到所述细胞培养装置中,培养基和细胞通过所述培养基移出导管移动到所述细胞收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体并向所述第一流体流动控制组件发送信号,并且在接收到所述信号之后,所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

[0014] 一个这样的实施方案公开了如下提高透气性细胞培养装置中每毫升培养基的细胞数目:将气体递送组件连接至与含有液体培养基和细胞的透气性细胞培养装置连接的滤器,所述细胞的至少一部分与所述细胞培养装置内的生长表面接触,所述细胞培养装置包括培养基移出导管和细胞移出导管,将所述第一流体检测组件与所述培养基移出导管连

接,将所述第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中,并且所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体,做出该确定之后,所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号,并且在接收所述信号之后,所述第一流体流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动;以及如下将细胞从所述透气性细胞培养装置移出:使所述第二流体检测组件连接至所述细胞移出导管,将所述第二流体流动控制组件连接至所述细胞移出导管,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中并经过所述细胞移出导管将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中,所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体,确定后,所述第二流体检测组件何时向所述第二流体流动控制组件发送信号,并且在接收所述信号之后,所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0015] 一个这样的实施方案公开了以下内容:从透气性细胞培养装置收集浓缩的细胞,其中在第二流动控制组件终止通过细胞移出导管的流体流动后,所述细胞培养装置与大气连通(vent),打开第一流动控制组件以允许通过所述培养基移出导管的流体流动,培养基通过所述培养基移出导管移动到所述细胞培养装置中,关闭所述第一流动控制组件,搅动所述培养基以使细胞移动到所述培养基中;以及所述细胞培养装置不再与大气连通且将气体从所述气体递送组件递送到所述细胞培养装置中,并且将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中,所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体,在做出该确定之后,所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号,并且在接收所述信号之后,所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0016] 一个这样的实施方案公开了如下通过减少培养基体积在含有第一体积的培养基和驻留于生长表面上之细胞的透气性细胞培养装置中提高每毫升培养基的细胞数目以提高每毫升培养基的细胞浓度:使气体递送组件连接至与所述细胞培养装置连接的滤器,所述细胞培养装置包括培养基移出导管,使第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接,使第一流体流动控制组件与培养基移出导管连接,起始从所述气体递送组件的气体递送,由此气体移动到所述细胞培养装置中,所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中,所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基变为气体,做出该确定之后,所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号,并且在所述第一流体流动控制组件接收所述信号之后,所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动,在所述细胞培养装置内留下残余体积的培养基和细胞,所述残余体积的培养基少于所述第一体积的培养基。

[0017] 一个这样的实施方案公开了以下内容:在透气性细胞培养装置内浓缩细胞,其中在第一流动控制组件终止通过培养基移出导管的流体流动后,将细胞收集容器连接至所述培养基移出导管,并且培养基与所述培养基移出导管的培养基移出开口接触,打开第一流动控制组件以允许通过所述培养基移出导管的流体流动,从所述气体递送组件递送的气体移动到所述细胞培养装置中,通过所述培养基移出导管将所述残余培养基体积和细胞置换

并进入所述细胞收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基变为气体，并向所述第一流体流动控制组件发送信号，在接收所述信号之后，所述第一流体流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

[0018] 一个这样的实施方案公开了从透气性细胞培养装置收集细胞，其包括如下将含有细胞的透气性细胞培养装置内的第一体积培养基减少以提高每毫升的细胞浓度的第一步骤：使气体递送组件连接至与含有培养基和细胞的透气性细胞培养装置连接的滤器，所述细胞培养装置包括培养基移出导管和细胞移出导管，使第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接，使第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接，并且所述细胞的至少一部分驻留于生长表面上，起始从所述气体递送组件的气体递送，由此气体移动到所述细胞培养装置中并且气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从培养基成为气体，在做出该确定后，所述第一流体检测组件向第一流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动，在所述细胞培养装置内留下残余体积的培养基和细胞，所述残余体积的培养基少于所述第一体积的培养基；以及如下从所述透气性细胞培养装置移出细胞的第二步骤：使第二流体检测组件与所述细胞移出导管连接，使第二流体流动控制组件与所述细胞移出导管连接，并且细胞遍布所述残余体积的培养基，起始从气体递送组件的气体递送，由此气体移动进入到所述细胞培养装置中并且将培养基和细胞从所述细胞培养装置置换到与所述细胞移出导管连接的细胞收集容器中，所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从培养基变为气体，在做出该确定时所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0019] 一个这样的实施方案公开了收集细胞，其包括以下的另外步骤：润洗所述细胞培养装置以收集在所述第二流动控制组件终止了通过所述细胞移出导管的流体流动后可能被留在所述细胞培养装置和 / 或所述细胞移出导管中的另外细胞，还包括当所述细胞培养基装置与大气连通时，起始通过所述培养基移出导管的液体流动，所述液体通过所述培养基移出导管移动到所述细胞培养装置中，搅动所述液体以将所述细胞培养装置内的细胞移动到所述液体中；以及起始从所述气体递送组件递送到所述细胞培养装置中的气体递送，所述气体将液体和细胞经所述细胞移出导管而从所述细胞培养装置置换到所述细胞收集容器中，所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体以及在做出该确定时，所述第二流体检测组件向所述第二流体流动控制组件发送信号，并且在接收所述信号之后，所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1A 示出了透气性细胞培养装置的截面图。

[0022] 图 1B 示出了附接有废物容器的透气性细胞培养装置的截面图。

[0023] 图 1C 示出了附接有废物容器的透气性细胞培养装置的截面图，蠕动泵将培养基移动到废物容器中，并且生长表面离开水平位置。

[0024] 图 1D 示出了附接有废物容器的透气性细胞培养装置的截面图，蠕动泵将培养基

移动到废物容器中,生长表面离开水平位置并且细胞进入废物容器。

[0025] 图 2A 示出了附接有废物容器的透气性细胞培养装置的截面图。

[0026] 图 2B 示出了附接有废物容器的透气性细胞培养装置的截面图,蠕动泵将培养基移动到废物贮容器中,生长表面保持在水平位置并且初始培养基体积已经减少到细胞驻留在其中的残余培养基体积。

[0027] 图 2C 示出了在被定向到细胞回收位置以使得可移出细胞和残余培养基后,透气性细胞培养装置的截面图。

[0028] 图 2D 示出了在被定向到细胞回收位置后并且细胞和残余培养基已经被移动到细胞收集容器后,透气性细胞培养装置的截面图。

[0029] 图 3 示出了具有培养基移出导管和培养基移出导管开口之透气性细胞培养装置的截面图。

[0030] 图 4A 示出了具有培养基移出导管且培养基移出导管开口位于培养基移出位置中之透气性细胞培养装置的截面图。

[0031] 图 4B 示出了具有培养基移出导管且培养基移出导管开口位于细胞移出位置中之透气性细胞培养装置的截面图。

[0032] 图 5A 示出了具有培养基移出导管且培养基移出导管开口位于细胞移出位置中之透气性细胞培养装置的截面图。

[0033] 图 5B 示出了具有培养基移出导管且培养基移出导管开口位于细胞移出位置中之透气性细胞培养装置的截面图。

[0034] 图 5C 示出了具有培养基移出导管且培养基移出导管开口位于细胞移出位置中之透气性细胞培养装置的截面图,并且其中所述细胞移出导管位于生长表面的凹陷 (pocket) 中。

[0035] 图 6A 示出了具有培养基移出导管和细胞移出导管之透气性细胞培养装置的截面图。

[0036] 图 6B 示出了在已经将气体推送至装置中且已经将培养基通过培养基移出导管移出之后,透气性细胞培养装置的截面图。

[0037] 图 6C 示出在已经将气体推送至装置中并且已经将培养基经培养基移出导管移出且移动到废物收集容器中之后,透气性细胞培养装置的截面图。

[0038] 图 6D 示出在已经将气体推送至装置中并且已经将细胞和残余体积的培养基经细胞移出导管移出且移动到细胞收集容器中之后,透气性细胞培养装置的截面图。

[0039] 图 7 示出与设备接合 (interface with) 以使培养基和细胞的移出自动化的透气性细胞培养装置的示意图。

[0040] 图 8 示出了联锁 (interlock) 到生长表面支持物中之生长表面的截面图。

[0041] 图 9 示出了模压 (mold) 到生长表面支持物上之生长表面的截面图。

[0042] 图 10 示出了透气性细胞培养装置的截面图以及在培养基和细胞移出期间将生长表面保持在平面位置的过程。

[0043] 图 11 示出了透气性细胞培养装置的截面图以及在培养基和细胞移出期间将生长表面保持在平面位置的过程。

[0044] 图 12A 和图 12B 示出了透气性细胞培养装置的截面图以及在培养基和细胞移出期

间将生长表面保持在平面位置的过程。

[0045] 图13A、图13B和图13C示出了透气性细胞培养装置的截面图以及在培养基和细胞移出期间将生长表面保持在平面位置的过程。

[0046] 发明详述

[0047] 贯穿本公开内容,除非另有说明,否则应用以下总则。优选地,当使用本文公开的装置和方法时,驻留在透气性表面上的细胞处于均匀的分布状态。建议技术人员选择与在细胞培养领域中通常所使用的一致的透气性材料。优选地,透气性材料为液体不可渗透的材料。可使用的透气性表面类型的另外的指导可见于共同未决的“814”、“848”、“597”、“700”和“768”。当任意类型的非粘附动物细胞是待培养的目的细胞时,优选透气性表面是非多孔的、液体不可渗透的并且是疏水的。最优选地,其由硅酮构成并且厚度为0.001英寸至0.024英寸。特别是在T细胞的情况下,硅酮是一种优选的材料。此外,在培养过程中,优选透气性材料处于水平位置以使得细胞受重力作用至所述透气性材料并且遍布所述透气性材料的整个表面,并且更优选以均匀的表面密度。鼓励技术人员认识到在整个本发明中,词语“水平”包括“基本上”水平,因为在培养基的重量之下,在未直接与支持物接触的区域中透气性材料可轻微的向下移动。基本上水平的定向的目的是允许细胞遍布透气性材料。优选地,生长表面的基本上水平状态使得其离开平面不超过表面区域或生长表面的20%,更优选10%,甚至更优选5%,以及最优选2.5%。

[0048] 当待被培养的动物细胞包括粘附细胞时,优选透气性材料是亲水的并且具有附着友好的表面,例如等离子体带电的表面。贯穿本公开内容或者任意共同未决的“814”、“848”、“597”、“700”和“768”的说明书,建议技术人员认识到术语透气性膜与透气性材料同义并且是非限制性的,如进一步建议技术人员将词语膜理解成广泛限定的通常用于细胞培养装置和细胞培养方法之本领域普通技术人员已知的任意材料形式的透气性材料,所述细胞培养装置和细胞培养方法包括共同未决的“814”、“848”、“597”、“700”和“768”中所描述的那些。贯穿本公开内容,术语培养基和介质与用于培养动物细胞之含有任意多种物质和/或营养物的液体同义。优选地,可能暴露于与培养过程有关之流体的装置的所有材料均与细胞培养相容(例如USP VI、无细胞毒性、满足可接受的浸出和颗粒标准等)。另外,为了确保可以在培养基移出期间确定细胞是否正在损伤,或评估由于任何其他原因的内容时,细胞培养和细胞回收装置应当优选地允许所述内容的视觉评估,如可以通过使用光学透明的构建材料来实现。

[0049] 本发明一个实施方案的一个方面可见于共同未决的“700”及其相关的附图图22B,其在本文中作为图1A重现,用于举例说明目的并且已经将其条目编号从1000系列改成100系列。在图1A中,示出的细胞回收装置100处于这样的运行状态,其中培养已经终止并且细胞将要被回收。细胞116驻留在生长表面106上,其形成了装置的底部并且其由具有之前描述的特征性透气性材料构成。初始的培养基体积120A处于初始的培养基高度121A,其等于从最高的培养基水平到最低的培养基水平的距离,即优选地通常超过静态细胞培养袋(例如Origen PermaLife<sup>TM</sup>和VueLife<sup>®</sup>袋)1.0cm的高度。更优选地,初始的培养基高度121A为超过培养基2.0cm的高度。虽然任何高度都是可能的,最佳的高度将取决于具体的细胞培养应用。例如,如在共同未决的“700”中所述,当无需培养基更换的情况下扩增CAR T细胞时,如果寻求允许从小的细胞数目到大得多的细胞数目而无需培养基更

换的培养流程，则优选 10cm 的初始培养基高度。另外，随培养基高度提高，使得有可能在收集细胞之前移出较大体积的培养基。我们发现浸没在非常规高水平培养基之下的细胞不容易随培养基高度降低而分配到培养基中。技术人员应理解，在寻求进行培养基更换时（例如，无需从移出的培养基中分离细胞以重新引入到装置中和 / 或无需将培养物分到新的装置）或者当终止培养以回收细胞时（即，在装置中进行的从大量培养基分离细胞不同于使用笨重的离心设备），移出大体积的培养基而不扰动细胞可以是非常有用的。

[0050] 不幸的是，发现使用标准封闭系统流体处理方法来获得新能力之全部益处从而在装置中减少培养基体积（例如共同未决的“814”、“848”、“597”、“700”和“768”中所描述的那些）可导致细胞损失并且损害培养装置，这对于 T 细胞疗法、过继免疫疗法和 / 或过继细胞疗法应用可能是灾难性的。图 1B、图 1C 和图 1D 一起举例说明了我们在从 G-Rex™ 装置和其他透气性装置（例如共同未决的“814”、“848”、“597”、“700”和“768”中所描述的那些）回收细胞之前，使用传统培养基处理工具和方法来减少培养基体积的尝试中发现的问题的一个实例。图 1B 示出了在将废物容器 132 与培养基移出导管 110 附接后图 1A 中描述的装置。作为减少初始培养基体积 120A（细胞 116 必须从其回收）之量的第一步，通过将其经培养基移出导管 110 泵送到废物容器 132 中，从细胞培养物和细胞回收装置 100 抽出一部分初始培养基体积 120A。泵送培养基的常用方法是使用蠕动泵 134 来将培养基从培养装置抽出。如图 1C 所示，作为从细胞培养和细胞回收装置 100 移出的初始培养基体积的一部分，跨无菌通风滤器 128 形成压降，将内部体积 114 置于相对环境大气压更低的压力下并且通常在装置的内部体积 114 内快速形成真空。因为生长表面 106 优选由具有气体转移特征的透气性材料构成，这使得其一般非常薄和脆弱，当真空形成时，生长表面 106 从其优选的水平平面状态被非常快速地拉出以形成所示的新的非平面的位置。此外，随着蠕动泵的滚轴 136 的滚动，滚轴之间的间隙导致装置内的真空脉冲，由此脉冲膨胀 (distend) 的生长表面 106，逐出 (dislodge) 细胞 116，并将经逐出的细胞分散在整个培养基中。随后，如图 1D 所示，随着培养基持续的被抽到废物容器 132 中，细胞 116 也被抽到废物容器 132 中。在这个事件链中，显著数目的细胞被分配到废物容器中的可能性很大。因为患者的结果与治疗剂量的细胞数目有关，这些宝贵的细胞损失可能是灾难性的。另外，即使细胞不损失，生长表面有可能被吸到培养基移出导管，从而可能对生长表面造成损坏。例如，生长表面的穿孔可能污染培养物，使得其不适合用于患者用途，此外，将这些暴露在细胞制造设施中成为潜在的生物危害。即使生长表面未被培养基移出导管损坏，如果其被拉到培养基移出导管中，培养基移出导管可能被堵塞，从而阻止培养基和细胞的进一步移出。总之，将生长表面拉出其平面并且优选地，水平状态可导致细胞损失，不能移出细胞，由于其膨胀而损坏生长表面，由于与培养基移出导管的物理接触而损害生长表面，培养物的污染和 / 或生产工人暴露于生物危害。因此，需要避免这些缺陷的细胞回收方法。

[0051] 一般而言，在进行细胞培养后，细胞已经受重力作用至装置底部（其由透气性材料构成），并且在装置仍保留培养基时，如果以向该装置的内部体积加压的方式将一定体积的气体移动到细胞培养和细胞回收装置中是有利的。优选地，将第一体积的气体移动到装置中以将第一体积培养基从装置移到废物容器中。该步骤优选地用定向装置进行以使得细胞驻留在其上的生长表面定向成水平平面。当这一步骤完成时，残余体积的培养基留在装置内并且细胞也留在装置中。然后将第二体积移到装置中，从而将残余体积的培养基和细

胞从装置置换并且将残余体积的培养基和细胞移动到细胞收集容器中。以这种方式，培养基体积与细胞数目的比降低。

[0052] 图 2A 至 2E 提供了本发明的一个实施方案的示例性实例，其如下解决了图 1B 至 1D 中所示的问题：在压力下将气体推送到细胞培养和细胞回收装置以驱使来自所述装置的培养基和 / 或培养基和细胞，这与在真空下从装置抽出培养基相反。这种方案如下使细胞损失和 / 或对装置产生损坏的可能性最小：防止形成真空，防止生长表面的向上形变，和 / 或防止脉冲生长表面处于和不处于平面状态（这可导致快速逐出细胞）。在图 2A 中示出了处于细胞培养位置并且处于静态细胞培养状态的细胞培养和细胞回收装置 1000 的截面图。细胞培养和细胞回收装置 1000 包括由上挡边 (upper confine) 1012 和下生长表面 1006、通气口 1028、以及具有培养基移出开口 1008 的培养基移出导管 1010 界定的内部体积 1014。培养基移出导管夹 1009 处于关闭位置以使培养基保留在内部体积 1014 内。优选地，上挡边 1012 通过侧壁 1054 邻接生长表面 1006，并且更优选侧壁 1054 垂直于生长表面 1006 并且是刚性的以允许用重力将细胞均匀接种到生长表面 1006 上。在所述装置中存在初始培养基体积 1020A。在细胞培养和细胞回收装置 1000 的边内，初始培养基体积 1020A 处于初始培养基高度 1021A，这等于从最高的培养基水平到最低的培养基水平的距离。还存在细胞 1016，其已经受重力作用至生长表面 1006 上。生长表面 1006 优选地是平面且在培养过程中定向为水平位置，并且由非多孔的、透气的、液体不可渗透的材料构成，并且在待培养的是非粘附细胞的情况下可以是疏水的。培养基移出开口 1008 距生长表面 1006 有一定距离，并且可看出该距离也构成了残余培养基高度 1021B。在细胞培养过程中的某点，进行培养基移出过程，其使初始培养基体积 1020A 减小到更小的残余培养基体积以添加新鲜的培养基或浓缩在残余培养基体积中的细胞变得可期待。

[0053] 为了移出初始培养基体积 1020A 的一部分，将细胞培养和回收装置 1000 定向在这样的位置以使得生长表面 1006 在底部，而上挡边 1012 在顶部。换言之，将细胞培养和细胞回收装置 1000 定向在其优选的静态细胞培养位置。细胞 1016 以初始细胞密度驻留在生长表面 1006 上，该初始细胞密度是细胞 1016 的量除以初始培养基体积 1020A（例如，细胞 / ml）。细胞 1016 还以初始表面密度驻留在生长表面 1006 上，该初始表面密度是细胞 1016 的量除以细胞驻留在其上之生长表面 1006 的表面积（例如，细胞 / cm<sup>2</sup>）。气体递送组件与通气口 1028 连接，其优选地位于装置的顶部，最佳地如图 2B 中所示。然而，无论如何细胞培养和细胞回收装置的内部体积优选通过能够无菌过滤气体的  $\gamma$  辐射稳定材料（例如 0.2 微米通气滤器）来通气。在这个实例中，气体递送组件是通过气体导管 1052 与通气口 1028 连接的隔膜泵 1050。当气体递送组件主动递送气体时（即，在本实例中当隔膜泵 1050 工作时），驱使气体通过通气口 1028 进入到气体导管 1052 中并进入细胞培养和细胞回收装置 1000 中。最优秀的通气口 1028 由这样的材料构成，其能够确保移动到细胞培养和细胞回收装置 1000 中的气体无菌。还优选将通气口 1028 定向为使在其过滤表面上积累的凝聚之机会最小化的位置。在这种描述中，通气口 1028 的过滤表面不与表面 1006 平行而是定向成与生长表面 1006 垂直。随着气体被递送到培养基移出导管夹 1009 处于打开位置的细胞培养和细胞回收装置 1000 中，初始培养基体积 1020A 的一部分随着其被驱使到培养基移出开口 1008 而通过培养基移出导管 1010 被置换出细胞培养和细胞回收装置 1000，并进入废物容器中，从而留下细胞 1016 和残余的培养基体积 1020B，其位于残余的培养基高度 1021B。废

物容器不需要是封闭的并且不需与培养基移出导管 1010 物理连接。例如,它可以被像实验室水槽一样普通的某些东西替代,但优选的废物容器是封闭的容器(例如袋)并且以密封的方式与培养基移出导管 1010 连接以通过封闭系统的方式隔离潜在的生物危害。这样的封闭容器在图 2A 和图 2B 中以封闭的废物容器 1032 示出,其附接至培养基移出导管 1010。

[0054] 优选地在该培养基移出过程中,因为气体进入细胞培养和细胞回收装置 1000 并且初始体积 1014 的压力升高,所以阻止生长表面 1006 从其优选的水平位置移动。如将在一些示例性实施方案中所描述的,这可以通过生长表面支持物实现,其将生长表面保持在水平平面以防止对生长表面造成损害。建议技术人员参考共同未决的“814”和“848”以获得与生长表面支持物设计有关的进一步指导。

[0055] 在培养基移出过程完成后,可以如下添加新鲜培养基:使通气口 1028 对环境大气打开(例如断开或连通气体导管 1052)并经培养基移出导管 1010(或者可在装置中存在并且结构适合于该目的的任何另外的端口)添加新鲜培养基。如果无需向装置中添加新鲜培养基并且培养待被终止,则可以如下移出细胞 1016:将细胞培养和细胞回收装置 1000 从其优选的静态细胞培养位置重定向到细胞移出位置(如图 2C 所示),其中培养基移出开口 1008 位于内部体积 1014 的低点。依据细胞和生长表面的具体特征,在尝试将细胞从装置中移出之前,搅动所述装置中残余的培养基以将细胞从生长表面逐出并将其悬浮在残余培养基中可能是有用的。我们已经发现非粘附细胞(例如 T 细胞)即使在生长表面是疏水透气性材料(例如硅酮)时仍具有在生长表面上维持堆叠的倾向,甚至在装置倾斜至培养基不在浸没细胞的点时也是如此。因此,为确保在移出残余培养基时不将细胞留在装置中,优选在抽出残余培养基之前搅动残余培养基以将细胞悬浮在其中。技术人员将认识到有多种在残余培养基中悬浮细胞的方法。例如,可以简单地使装置运动以使残余培养基在装置中并在生长表面之上打转(swirl),并且目视确定何时细胞已经从生长表面逐出并运动到残余培养基中。我们发现围绕圆形生长表面的圆柱状壁非常有利于这种方法。然而,这一步骤完成后,一旦细胞从生长表面逐出并分散到残余培养基中,可通过取出培养基和细胞的传统方法(例如通过使用蠕动泵)完成细胞的收集。然而,通过将培养基抽出装置来取出细胞会导致透气性材料从平面位置移动,因为当通风口包含无菌滤器时随着跨通风口发生压降在装置中形成真空。但是,只要透气性材料从其水平位置移动到新位置时不破坏透气性材料的完整性,或者细胞培养和细胞回收装置的任意其他方面的完整性不受影响,就可以完成这一过程。然而,不会使细胞培养和细胞回收装置的透气性材料或任何其他方面处于损坏之风险的一个优选方法是通过将气体递送到细胞培养和细胞回收装置中来置换残余培养基和细胞。

[0056] 图 2D 示出这是如何完成的。将细胞培养和细胞回收装置 1000 定向在细胞移出位置,优选培养基移出导管 1010 连接至细胞收集容器 1040,其替换封闭的废物容器 1032,使气体递送组件与通气口 1028 连接,例如隔膜泵 1050 通过气体导管 1052 与通气口 1028 连接。当气体递送组件主动递送气体时(即,在这个实例中为当隔膜泵 1050 启动时),气体递送到气体导管 1052 中,通过通气口 1028 并进入细胞培养和细胞回收装置 1000。随着气体被递送到细胞培养和细胞回收装置 1000 中,含有悬浮细胞 1016 的残余培养基体积 1020B 被置换,因为将其驱使到由侧壁 1054 发出的培养基移出开口 1008 中,通过培养基移出导管 1010 离开细胞培养和细胞回收装置 1000 并进入细胞收集容器 1040 中。优选地,细胞收集

容器 1040 是封闭的容器,其具有适合用于其将经受的无论何种下游处理(例如离心和 / 或冷冻保存)的设计。优选地,为了防止损坏生长表面 1006,存在生长表面支持物并在气体进入细胞培养和细胞回收装置 1000 时将生长表面 1006 保持在平面状态。

[0057] 鼓励技术人员认识到,出于多种原因(包括提高营养物来源的能力,提高细胞废物的下沉,以及允许移出更大部分的初始培养基体积而没有细胞损失),提高装置底部上方之初始培养基体积所处的高度是有利的。尽管培养基高度不受限制,优选地,在生长表面和 / 或培养基的最上表面处于水平位置时按照培养基的最低部分到培养基的最上部分确定的培养基高度优选为 1cm 至 25cm,更优选为 1cm 至 20cm,甚至更优选为 1cm 至 15cm,并且甚至更优选为 2cm 至 11cm。尽管残余培养基高度不受限制,优选残余培养基高度为 0.2cm 至 2.0cm,更优选为 0.2cm 至 1.0cm,甚至更优选为 0.2cm 至 0.5cm,如在生长表面和 / 或培养基的最上表面处于水平位置时按照培养基的最低部分到培养基的最上部分确定的。

[0058] 图 3 示出了本发明的另一个实施方案,其中细胞培养和细胞回收装置 2000 的截面图包括位于培养基移出导管 2010 内的培养基移出开口 2008。培养基移出导管不通过侧壁 2054 接近内部体积 2014 并且在这种描述中移动通过上挡边 2012。当细胞培养和细胞回收装置 2000 定向在培养基收集位置(即,细胞培养位置)时,如前所述收集培养基,其中细胞 2016 驻留在生长表面 2006 上。如图 3 所示,原始培养基体积的一部分已经由培养基移出导管 2010 移出。残余培养基 2020B 处于培养基移出开口 2008 的高度。可如前所述通过简单地将细胞培养和细胞回收装置 2000 重定向到细胞移出位置来收集细胞 2016,其中培养基移出开口 2008 处于残余培养基体积 2020B 的低点。当细胞 2016 悬浮在残余培养基 2020B 中时,可通过经培养基移出导管 2010 移出残余培养基体积 2020B 来收集它们。

[0059] 本发明的另一个实施方案允许导管的开口改变其与生长表面的距离。在图 4A 中,示出了处于细胞培养位置并且处于静态细胞培养状态的细胞培养和细胞回收装置 3000 的截面图。细胞培养和细胞回收装置 3000 包括由上挡边 3012、生长表面 3006、通气口 3028 和具有培养基移出开口 3008 的培养基移出导管 3010 界定的内部体积 3014。优选地,上挡边 3012 通过侧壁 3054 与生长表面 3006 邻接并且更优选地,在培养过程中侧壁 3054 垂直于生长表面 3006。

[0060] 可以以先前描述的方式经培养基移出开口 3008 移出培养基,优选在细胞培养和细胞回收装置 3000 处于这样的位置时,其中平面的生长表面 3006 处于水平位置且细胞驻留于生长表面上而非在培养基中悬浮(即,未分布在培养基中)。在培养基移出过程完成后,可以如下添加新鲜培养基:将通气口 3028 对环境大气打开(例如断开或连通气体导管)并经培养基移出导管 3010(或者可在装置中存在并且结构适合于该目的的任何另外的端口)添加新鲜培养基。如果无需向装置中添加新鲜培养基并且培养待被终止,则可以进行细胞移出。将细胞培养和细胞回收装置配置成包括用于改变培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间的距离的手段,可以将培养基移出开口 3008 的位置从培养基移出位置改变到细胞移出位置。这样做的话,培养基移出开口不仅可以如前所述减少培养基体积而不移出细胞,其还可以在减少培养基体积后移出残余培养基和细胞。以这种方式,仅使用一个端口就可以将细胞浓缩在残余培养基中并且还可移出浓缩的细胞。图 4B 示出了如何将此完成的一个实例。在这一实例中,侧壁 3054 提供了将细胞培养和细胞回收装置之内部体积的下边界与上挡边连接的结构。在这种描述中,生长表面 3006 是下边界。细胞培养和细胞

回收装置 3000 的侧壁 3054 包括调整培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间距离的手段。鼓励技术人员认识到有多种方式来将此完成。例如，侧壁 3054 可包含柔性材料（例如硅酮）并有波纹（bellow）以允许改变侧壁 3054 的高度。当改变侧壁 3054 的高度以将培养基移出开口 3008 从培养基移出位置移动到所示的细胞移出位置时，培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间的距离减小并且培养基移出开口 3008 被置于细胞移出位置，在其中其接近生长表面 3006 并能够允许残余培养基和细胞通过。换言之，当细胞培养和细胞回收装置 3000 在培养基移出位置时，培养基移出开口 3008 与生长表面 3006（在这种描述中，其是装置以静态细胞培养的状态运行时培养基可驻留在其上的下边界）之间的距离超过了当在细胞移出位置时培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间的距离。反之，当细胞培养和细胞回收装置 3000 在细胞回收位置时，培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间的距离小于细胞培养和细胞回收装置在培养基移出位置时培养基移出开口 3008 与生长表面 3006 之间的距离。

[0061] 向技术人员建议调整培养基移出开口与生长表面之间距离的方式是多种多样的。例如，有多种方法可以使装置的壁能够皱缩，包括将它们以柔性材料制成，以活塞样方式（其中壁的一部分以液体紧密模式滑过其他部分）等。在那些情况下，细胞培养和细胞回收装置的上挡边与生长表面之间的距离将随着培养基移出开口从培养基移出位置改变到细胞移出位置而减小。然而，建议技术人员认识到改变细胞培养和细胞回收装置的上挡边与生长表面之间的距离不是将培养基移出开口从培养基移出位置移动到细胞移出位置的唯一方法。

[0062] 图 5A 和图 5B 示出了配置成调节培养基移出开口 4008 与生长表面 4006 之间距离的细胞培养和细胞回收装置 4000 的截面图。柔性护罩（flexible shroud）4001 形成了针对培养基移出导管 4010 和上挡边 4012 的密封。培养基移出导管 4010 具有密封的接头，在这个说明性实例中其由与凸鲁尔接头（male luer fitting）4013 接合的凹鲁尔接头（female luer fitting）4011 构成，从而允许容易地将收集容器连接至培养基移出导管 4010。鼓励技术人员认识到有多种方法可进行这样的连接，包括无菌管道焊接（sterile tubing weld）。为改变培养基移出开口 4008 与生长表面 4006 之间的距离，改变柔性护罩 4001 的高度。图 5B 示出了在向其上表面施加力以减小其高度（即朝生长表面 4006 的方向压缩波纹）后柔性护罩 4001 的高度，由此朝生长表面 4006 的方向移动培养基移出开口 4008 并减小培养基移出开口 4008 与生长表面 4006 之间的距离。鼓励技术人员认识到不将细胞培养和细胞回收装置 4000 置于污染的风险的情况下，使培养基移出开口 4008 与生长表面 4006 之间的距离变得不同成为可能。优选地，在细胞回收期间，培养基移出开口 4008 临近生长表面 4006，并且细胞培养和细胞回收装置 4000 在细胞培养位置（即，生长表面 4006 处于水平位置）。这促进了以这样方式的自动化处理：不需要细胞培养和细胞回收装置由其细胞培养位置旋转以移出细胞培养和细胞回收装置的培养基和细胞内容物。

[0063] 在收集细胞之前，搅动装置以将细胞从生长表面逐出并将其悬浮在培养基中可以是有帮助的。我们已经发现非粘附细胞（例如 T 细胞）即使在生长表面是疏水性膜（例如硅酮）时仍具有在生长表面上维持堆叠的倾向（在装置倾斜时）。因此，为确保在移出残余培养基时不将细胞留在装置中，优选搅动所述装置。例如，可以简单地使残余培养基打转并且视确定细胞已经从生长表面逐出并运动到残余培养基中。一旦细胞从生长表面逐出，可

通过取出培养基和细胞的传统方法（例如通过使用蠕动泵）完成细胞的收集。通过将培养基抽出装置来取出细胞会导致透气性膜从水平位置移动，因为在装置中形成真空。只要不破坏膜的完整性，就可以完成这一过程。然而，不会使膜处于损坏之风险的一种优选方法是使用之前描述的气体置换方法来回收细胞。

[0064] 图 5C 示出了配置成如下进一步辅助自动化细胞收集的细胞培养和细胞回收装置 4000：消除需要将装置倾斜以使用于收集细胞的导管开口置于装置内的最低位置。当生长表面 4006 处于用于细胞培养的优选水平平面时，细胞收集凹陷 4007 处于生长表面 4006 的水平平面以下。培养基移出开口 4008 处于细胞收集凹陷 4007 内。在该位置，培养基移出开口 4008 处在内部体积 4014 的低点（即，当装置定向成静态细胞培养的状态时培养基的最低位置），促进培养基和细胞的回收。这个特征可存在于任意细胞培养和细胞回收装置的实施方案中。

[0065] 一般情况下，当培养基移出开口在培养基移出位置时，优选不具有将细胞培养和细胞回收装置的所有内容物移出的能力。这确保了即使气体递送组件损坏或无法停止递送气体，并且在所有可能移动通过培养基移出开口移动的培养基已经移动之后持续向装置递送气体，仍然有至少一部分培养基和大多数细胞保留在装置中。

[0066] 如果寻求避免以改变培养基移出开口与生长表面之间的距离或需要大角度旋转以收集细胞的方式来设计细胞培养和细胞回收装置，则易于建立截然不同的培养基移出开口和截然不同的细胞移出开口并应用之前所述的过程以简化下游过程而不用担心细胞损失或对生长表面和 / 或透气性材料的损坏。图 6A、图 6B、图 6C 和图 6D 提供了这样的一个实例。示出了处于静态细胞培养位置的细胞培养和细胞回收装置 5000 的截面图，其包括通过上挡边 5012、下边界（这种描述中，其是生长表面 5006）、通气口 5028、具有培养基移出开口 5008 的培养基移出导管 5010 和具有细胞移出开口 5002 的细胞移出导管 5004 界定的内部体积 5014。优选上挡边 5012 通过侧壁 5054 邻接下边界并且更优选侧边 5054 垂直于生长表面。在所述装置中存在初始培养基体积 5020A。初始培养基体积 5020A 处在初始培养基高度 5021A，其等于从最高的培养基水平到最低的培养基水平的距离。使用中，细胞 5016 驻留在细胞表面 5006 上。一般情况下，技术人员应当理解非粘附细胞（即，也称作悬浮细胞）可以不全部接触生长表面，因为它们能够相互堆叠，所以最下面的细胞实际上与生长表面物理接触。在培养过程中，生长表面 5006 优选地定向在水平位置，优选地由非多孔的液体不可渗透材料构成，并且在待培养的是非粘附细胞的情况下优选是疏水的。细胞 5016 处于初始细胞密度，其是细胞 5016 的量除以初始培养基体积 5020A（例如，细胞 / ml），并且细胞 5016 还处于初始表面密度，其是细胞 5016 的量除以细胞驻留在其上之生长表面 5006 的表面积（例如，细胞 / cm<sup>2</sup>）。此外，在非粘附细胞的情况下，这包括已经受重力作用为静息状态的细胞总数并且其防止生长表面的进一步重力作用。这包括已经在其他细胞上静息的那些细胞，其中的一些不直接与生长表面接触。培养基移出开口 5008 于生长表面 5006 有一定距离，并且可以看出，这个距离还构成了残余培养基高度 5021B。

[0067] 在细胞培养过程中的某点，进行使初始培养基体积 5020A 减少到较小的残余培养基体积的培养基移出过程以使得添加新鲜培养基或在残余培养基体积中浓缩细胞变得可期待。为了移出初始培养基体积 5020A 的一部分，将气体递送组件连接至通气口 5028，最佳地如图 6B 所示。在这一实例中，气体递送组件是隔膜泵 5050，其通过气体导管 5052 与通

气口 5028 连接。当隔膜泵 5050 启动时,其将驱使气体进入气体导管 5052 中,通过通气口 5028 并进入细胞培养和细胞回收装置 5000 中。由于驱使气体进入到细胞培养和细胞回收装置 5000 的内部体积 5014 中,初始培养基体积 5020A 的一部分被置换并且被驱使到培养基移出开口 5008 中,通过培养基移出导管 5010,离开细胞培养和细胞回收装置 5000 进入废物容器,留下残余培养基体积 5020B 和细胞 5016,如图 6C 所示。残余培养基体积 5020B 处于残余培养基高度 5021B,将其限定为最上的残余培养基位置与最下的残余培养基位置之间的距离。细胞 5016 处于残余细胞密度,其是细胞 5016 的量除以残余培养基体积 5020B(例如,细胞 /ml),并且细胞 5016 还处于残余表面密度 5017B,其是细胞 5016 的量除以细胞驻留在其上之生长表面 5006 的表面积(例如,细胞 /cm<sup>2</sup>)。废物容器不需要是封闭的并且不需要与培养基移出导管 5010 物理连接。例如,其可以被像实验室水槽一样普通的某些东西替代,但优选废物容器是封闭的容器(例如袋或离心管)并且以密封的方式与培养基移出导管 5010 连接以通过封闭系统的方式隔离潜在的生物危害和 / 或维持无菌性。这样的封闭的容器在图 6C 中以封闭的废物容器 5032 示出,其附接至培养基移出导管 5010。由于初始培养基体积 5020A 的一部分被从细胞培养和细胞回收装置 5000 移出,因此废物容器 5032 中的培养基体积为初始培养基体积 5020A 减去培养基移出导管 5010 内的一部分初始培养基体积 5020A(如果有的话)。优选地,在这个培养基移出过程中,防止生长表面 5006 因为气体进入细胞培养和细胞回收装置 5000 且内部体积 5014 的压力升高而不受约束的以与上挡边 5012 相反的方向移动。如图 6C 中所示,这是通过生长表面支持物 5018 完成的,其与生长表面 5006 接触并将生长表面 5006 保持在基本上平面的位置以防止对生长表面的损坏。术语“基本上”以其与水平位置相关已经在之前描述过并且这还应用于平面的位置。建议技术人员参考共同未决的“814”和“848”以获得与生长表面支持物设计有关的进一步指导。

[0068] 参考图 6D,为了回收细胞 5016,进行另一步骤,其中将细胞收集容器 5040 连接至细胞培养和细胞回收装置 5000 的细胞移出导管 5004,并且通过关闭的培养基移出导管夹 5009 阻断培养基移出导管 5010 的流体流动。可以简单地使用止血器来阻断培养基移出导管 5010 的流体流动,或者可以按照将进一步描述在本公开内容中的内容自动化进行。如之前所述,在收集细胞之前,搅动装置内的残余培养基以将细胞从生长表面逐出并将其悬浮在残余培养基中可以是有帮助的。虽然可通过取出培养基和细胞的传统方法(例如通过使用蠕动泵)完成细胞的收集,但是优选的方法是通过使用气体置换方法提供的正压在这个过程中防止生长表面和 / 或透气性材料朝上挡边移动和形状上的变形。如图 6D 所示,气体递送组件通过气体导管 5052 与通气口 5028 连接。在这个实例中,气体递送组件是隔膜泵 5050。当隔膜泵 5050 启动时,其驱使气体进入到气体导管 5020 中,通过通气口 5028 并进入细胞培养和细胞回收装置 5000 中。随着驱使气体进入细胞培养和细胞回收装置 5000 中,残余培养基 5020B 和细胞 5016 被置换并被驱使到细胞移出开口 5002 中,通过细胞移出导管 5004 并进入细胞收集容器 5040 中。然后为了细胞 5016 的后续处理,可将细胞收集容器 5040 移出(优选以无菌的方式,例如通过无菌管道焊接)。

[0069] 可能期望润洗细胞培养和细胞回收装置的一部分内部体积以收集在初始细胞移出步骤后可能保留在装置中的任何细胞。例如,这无需添加在细胞移出过程开始时不存在于装置中的液体来源就可完成。通过简单使用驻留在封闭废物容器中的培养基作为润洗物质就可做到这一点。为此,打开培养基移出夹,打开通气孔,并且对废物容器加压(例如简

单地通过将其升高到使得培养基流回到装置中所需的高度)。如果废物容器是柔性的(例如袋),可以通过对其挤压来协助这一过程以起始流动到装置中。当使用者确定适量的培养基已经返回装置时,可将培养基移出导管夹关闭并可重复细胞移出过程。

[0070] 尽管所描述的使用空气置换培养基和/或细胞的过程可以以简单的方式进行,例如通过用止血器打开和关闭导管并通过该过程的目视评估打开和关闭气体递送组件,在期望多种细胞制备物的情况下,自动化进行该过程的某些方面可以是有益的。要考虑的因素之一是在驱使培养基和/或细胞已经进入其各自的容器后持续将气体递送到装置的气体递送组件的预期。在这种情况下,驱使气体到容器中并且可以对容器加压,有可能导致它们破坏其密封。此外,由于气泡的表面张力和气体/细胞接触可能破坏细胞膜的完整性,因此气体可引起对细胞的损伤。要考虑的另一个因素是当驱使培养基和/或细胞至其各自的容器后气体递送组件没有关闭时,可在细胞培养和细胞回收装置内自身建立压力。

[0071] 图7示出了设计来解决这些问题之系统的一个示例性实施方案的示意图。鼓励技术人员认识到这个示例性实施方案与例如图3中所示出的配置有仅一个培养基移出导管的细胞培养和细胞回收装置,可调整的培养基移出导管,或单独的培养基移出导管和细胞移出导管兼容。一般情况下,优选自动化系统识别该过程中这样的时间点:存在于细胞培养和细胞回收装置的培养基经培养基移出导管或细胞移出导管被气体替换。再参考图7,流体检测组件6044A和6044B能够识别过程中这样的时间点:存在于细胞培养和细胞回收装置的培养基经培养基移出导管或细胞移出导管被气体替换并且流体检测组件6044A和6044B接近培养基移出导管6010和细胞移出导管6004。换言之,流体检测组件能够确定流体或气体是否驻留在导管中。第一流动控制组件6046A起到打开或关闭培养基移出导管6010的作用,而第二流动控制组件6046B起到打开或关闭细胞移出导管6004的作用。在这个实例中,电子致动的弹簧夹(electronically actuated pinch clamp)充当流动控制组件并且导管由柔性管制成。优选地,细胞培养和细胞回收装置6000为处于其细胞培养位置的静态细胞培养装置(即,培养基不受力混合并且生长表面上挡边之下并优选的在水平位置)。培养基6020处在细胞培养和细胞回收装置6000内的第一培养基体积和第一培养基高度,并且由于重力,细胞6016已经沉降在生长表面6006上。优选地,生长表面6006通过生长表面支持物6018保持在水平平面。培养基移出开口6008到生长表面6006的距离超过从细胞移出开口6002到生长表面6006的距离。优选地,细胞移出导管与侧壁接触,与生长表面接触,沿侧壁6054与生长表面接合的缘定位,或者如先前所述在生长表面内的凹陷中,由此将细胞移出开口定位以最大限度的回收细胞。气体导管6052将通气口6028连接至气体递送组件6050。培养基移出导管6010连接至废物容器6032并且细胞移出导管6004附接至细胞收集容器6040。软件算法能够递送所需的电子信号来进行所需的多种任务以收集高度浓缩状态的细胞。为减少培养基6020的体积,将流动控制组件6046A置于允许流体流动通过培养基移出导管6010的状态并且将流动控制组件6046B置于不允许流体流动通过细胞移出导管6004的状态,启动气体递送组件并且气体经通气口6028进入细胞培养和细胞回收装置6000,对内部体积6014加压并驱使培养基6020进入培养基移出开口6008,通过培养基移出导管6010并进入废物容器6032。当培养基6020的高度已经达到刚好比培养基移出开口6008的高度低很小距离时,气体进入培养基移出开口6008,被驱使通过培养基移出导管6010,并且被流体检测组件6044A检测。流体检测组件6044A发送信号,通知流动

控制组件 6046A 终止流体流向废物容器 6032。优选地，气体递送组件 6038 同时终止气体递送和 / 或打开压力释放阀 6056。尽管这个步骤是任选的，优点是最小化细胞培养和细胞回收装置 6000 中建立的压力并且鼓励技术人员认识到有多种方式来实现该目的，包括使用在达到特定压力阈值后不能递送气体的气体递送组件，使用压力释放阀等。一旦终止培养基 6020 流向废物容器 6032，操作人员可决定是否搅动残余量的培养基以将细胞 6016 从生长表面 6006 逐出。鼓励技术人员认识到稳健的系统将允许操作人员覆盖 (override) 自动化并按照指令使培养基停止流向废物溶器（例如，如果细胞损失进入到废物容器中，则可能需要）。

[0072] 一旦操作人员已经确定细胞 6016 在残余量的培养基 6020 中处于合适的悬浮状态和 / 或细胞回收过程应当开始，使用者按下按钮并且继续过程。内部体积 6014 被加压并且启动流动控制组件 6046B 以允许流体流向细胞收集容器 6040。细胞培养和细胞回收装置 6000 可以定向或可以不定向至允许所有培养基和细胞在这一时间在最低点被收集的位置，取决于操作人员的偏好以及是否将细胞培养装置设计成在装置定向于静态细胞培养位置时将细胞移出导管置于最大限度的回收细胞的位置。技术人员将认识到搅动以逐出细胞并将装置定向至最大限度的回收细胞的位置的步骤也可自动化进行。处于静态细胞培养位置时，当细胞移出开口 6002 定位在生长表面 6006 的高度之下时，可获得最大限度的细胞回收。例如，通过如前所述的在生长表面中的凹槽，沟 (moat)（例如围绕生长表面周长的释放区域，其中沟的底部低于生长表面），或者可以实现允许培养基所处的高度低于生长表面并且变为用于细胞移出开口之收集位置的任何部件。在自动化进行细胞移出过程的某点，气体进入细胞移出开口 6002，穿过细胞移出导管 6004，并被流体检测组件 6044B 检测到。在该点，流体检测组件 6044B 发出信号，导致流动控制组件 6046B 终止流体流向细胞收集容器 6040。在该点，可移除容器 6040，优选以通过使用无菌管道焊接的无菌方式。然而，如果操作人员确定对生长膜的另外润洗可有助于收集更多细胞（例如可留在装置内的任何细胞）的，则该过程变得易行。流动控制组件 6046A 可以处于这样的状态，其中通过培养基移出导管 6010 的流体流动未被阻断，而是打开的，并且废物容器 6032 被简单地升高或挤压（优选废物容器是袋）以驱使培养基 6020 从废物容器 6032 进入细胞培养和细胞回收装置 6000 中。优选地，在这一步骤中通气口 6028 对大气是打开的。一旦将适当体积的培养基 6020 递送回细胞培养和细胞回收装置 6000，可重复细胞回收过程。可根据需要重复添加和移出培养基的这个步骤以收集尽可能多的细胞，只要操作人员认为合适。

[0073] 使用如图 7 中所示实施方案之装置的方法将是这样的，将气体递送组件连接至与含有培养基和细胞的透气性细胞培养和细胞回收装置连接的滤器，其中所述细胞培养装置包括细胞移出导管，将第一流体检测组件与所述培养基移出导管连接，将第一流体流动控制组件与所述培养基移出导管连接，起始从气体递送组件的气体递送，其中起始可使用导致气体移动到细胞培养装置中的任何方法或设备，并且其中所述气体将培养基从所述细胞培养装置置换到与所述培养基移出导管连接的培养基收集容器中。所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体，所述第一流体检测组件向所述第一流体流动控制组件发送信号并且在接收所述信号之后，所述第一流体流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。在所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动后，可采取的一个选择是进行培养基的搅动以将细胞从生长表面逐

出到残余培养基中。还可以将细胞培养装置定向到新位置中，其中培养基与所述细胞移出导管连接。然而，如果生长表面维持在水平位置并且所述细胞移出导管的细胞移出开口与所述生长表面接触或与其相邻，不需要进行这样的使装置重定向的步骤。细胞收集容器连接至所述细胞移出导管，第二流动控制组件打开通过所述细胞移出导管的流体流动，气体从所述气体递送组件移动到所述细胞培养装置中，培养基和细胞通过所述细胞移出导管移动到细胞收集容器中，所述第二流体检测组件确定通过所述细胞移出导管移动的流体何时从液体变为气体，并向第二流体流动控制组件发送信号。接受所述信号之后，所述第二流动控制组件终止通过所述细胞移出导管的流体流动。

[0074] 鼓励技术人员认识到如果其与仅具有一个培养基导管的细胞培养和细胞回收装置类型接合，在图 7 的示例性实施方案中所描述的装置可以被简化，所述培养基导管起到减少培养基体积的作用并且起到移出残余培养基体积和细胞的作用。这样的装置在例如图 2A-2D、3、4A-4B、5A-5B 和相关正文中进一步详述。因此，所述装置可被简化成包括能够连接至与透气性细胞培养装置连接之滤器的气体递送组件，所述气体递送组件能够通过所述滤器将气体递送到所述透气性细胞培养装置中；第一流体检测组件，其能够确定在与透气性细胞培养装置连接的培养基移出导管内移动的流体类型何时从液体变为气体，能够向第一流体流动控制组件发送信号的组件，所述第一流体流动控制组件能够终止通过所述培养基移出导管的流体流动。在所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动后，如果需要细胞培养装置定向到新位置中，其中培养基与所述培养基移出导管接触，细胞收集容器与所述培养基移出导管连接，第一流动控制组件打开通过所述培养基移出导管的流体流动，气体从所述气体递送组件移动到所述细胞培养装置中，培养基和细胞通过所述培养基移出导管移动到所述细胞收集容器中，所述第一流体检测组件确定通过所述培养基移出导管移动的流体何时从液体变为气体并向所述第一流体流动控制组件发送信号。在接收所述信号之后，所述第一流动控制组件终止通过所述培养基移出导管的流体流动。

[0075] 技术人员将认识到，最大程度的实现使细胞离开细胞移出导管并进入细胞收集容器是有益的。因此，当以图 7 所示的方式使用自动化时，通过将流体检测组件定位在流动控制机构的下游并且尽可能靠近所述容器，在所述流动控制机构终止流动时，导管中培养基的量将被限制在所述流体检测组件与所述细胞收集容器之间。此外，使管内径最小化可进一步减少在导管中的细胞数目。或者，在导管中检测到气体后，可以驱使少量另外的气体通过导管以确保完成该过程时液体不被截留在导管中。这可用于确保所有细胞移动到细胞收集容器中和 / 或允许无菌管道拼接而在导管中没有液体。或者，可驱使气体通过导管以确保完成该过程时液体不被截留在导管中。

[0076] 鼓励技术人员认识到使用流动控制组件和流体检测组件是方便的，但可以手动进行细胞回收过程。在手动的细胞回收过程中，操作人员用夹关闭 (cold) 通过细胞移出导管的流动，打开通过培养基移出导管的流动，然后可以使用注射器将气体注射到装置中直到气体移动到所述培养基移出导管中。然后按照需要可以搅动培养基使其不处于静止状态以将细胞从生长表面逐出。随着所述培养基移出导管关闭且所述细胞移出导管打开，向所述装置添加气体，由此驱使细胞和残余培养基离开所述装置。

[0077] 尽管使用气体置换培养基以防止破坏生长表面和 / 或透气性材料是一种简洁的方法，如果期望与之前所述的通过气体置换相反的从装置取出培养基和 / 或细胞，则可以

将所述装置设置成最小化生长表面和 / 或透气性材料的形变。在装置内部体积的压力小于装置外压力的情况下可以采用这样的方法，从而产生跨装置之壁的压力差。在这样的情况下防止生长表面形变离开平面状态的一种方法是将透气性材料物理附接至组件（例如生长表面支持组件）。图 8 和图 9 提供了两个这样的实例。为了简单，未示出整个细胞培养和细胞回收装置。在图 8 中，生长表面 6006 包括从其下表面发出的突出部 (tab) 6058。突出部 6058 与生长表面支持物 6018 上的配对部件 (mating feature) 联锁。垂直的支持物 6018A 从生长表面支持物 6018 的基底上突出以在静态细胞培养期间将生长表面 6006 保持在水平位置。优选地，生长表面 6006 由透气性材料构成。在硅酮的情况下，可通过液体注射模塑制造膜并且突出部 6058 可以被模压到膜中。图 9 示出了在生长表面外部的压力超过了细胞培养和细胞回收装置之内部体积的压力时，将所述生长表面维持在基本上平面状态的另一个实例。在这个示例性实例中，生长表面 7006 由硅酮构成，其被过模压到附接至生长表面支持物 7018 的格网 (grid) 7060 上（即附接至格网）。气体进入开口 7018B 允许培养物的被动气体交换。换言之，周围气体与生长表面接触而无需强迫才这样。因此，生长表面 7006 通过与生长表面 7018 的接触点保持位置，甚至在生长表面的外部压力超过了细胞培养和细胞回收装置之内部体积的压力时。

[0078] 在培养基和 / 或流体从装置取出时将生长表面维持在基本上平面状态的另一种方法是使生长表面的外部压力与细胞培养和细胞回收装置之内部体积的压力保持平衡。图 10 示出了如何进行的一个示例性实例。细胞生长和细胞回收装置 8000 包括生长表面支持物 8018。生长表面支持物 8018 包括气体进入开口 8021。气体进入开口允许周围气体向生长表面 8006 被动移动和从生长表面 8006 被动移动，生长表面 8006 优选液体不可渗透的，透气的、非多孔的且在细胞培养期间处于基本上水平的平面。换言之，通过被动运动，周围气体与透气性生长表面接触而没有任何机构在物理上迫使气体与透气性材料接触。将培养基移出导管 8010 附接至废物容器 8032 并且以这样的方式与蠕动泵 8030 接合，以使得蠕动泵 8030 能够将培养基 8020 从细胞生长和细胞回收装置 8000 抽出。在培养基移出期间，最小化气体进入开口 8021 与周围气体流通的能力并且优选消除所述能力。在这一描述中，液体移出接头 (adapter) 8027 在培养基体积减少时暂时附接，与生长表面支持物 8018 配对，并且包括压力平衡导管 8033A，其还包括压力平衡导管接口 8029，例如可以是鲁尔接口。压力平衡导管 8033A 可与压力平衡导管 8033B 配对。压力平衡导管 8033B 还可以附接至培养基移出导管 8010 以使得在蠕动泵 8030 启动时可将气体从液体移出接头 8027 和生长表面支持物 8018 之间的空间抽出，实际上使气体空间 8019 相对于周围气体置于降低的压力下。优选地，如果压力平衡导管 8033B 附接至培养基移出导管 8010，则压力平衡导管 8033B 任选地包括单向阀 (check valve) 8034 和 / 或压力平衡导管滤器 8035，能够允许气体移动到废物容器并防止培养基 8020 移动到其中，同时维持装置的无菌性及其流体连通。鼓励技术人员认识到压力平衡导管 8033B 不需要附接至培养基移出导管 8010，但可以替换为与蠕动泵接合的单独导管。在这种情况下，优选使用与培养基移出导管和压力平衡导管连接的多通道蠕动泵。在这样的构造中，蠕动泵 8030 将气体从生长表面 8006 之下抽出，在生长表面 8006 上抽出真空，其抵消在细胞生长和细胞回收装置 8000 内产生的真空，由此将生长表面 8006 维持在基本上水平的状态，或者尽量减小生长表面 8006 经历的形变。鼓励技术人员认识到将气体抽出压力平衡导管的任何仪器均可实现以下目的：防止随培养基移出对生长表

面造成的潜在破坏性形变。

[0079] 将生长表面支持物 8018 设计成与液体移出接头 8027 接合，并将生长表面支持物 8018 设计成以这样的方式与细胞培养和细胞回收装置 8000 接合，所述方式允许气体以一定速率从气体空间 8019 移出，这使得生长表面相邻和外部的压力等于或小于内部体积 8014 的压力。建议技术人员认识到接合不需要气密密封，只要其对气体空间 8019 压力施加控制即可。然而，优选提供密闭。还应当建议技术人员，不需要液体移出接头 8027 来实现在培养基被从细胞培养和细胞回收装置抽出时将生长表面维持在基本上水平状态的目标。例如压力平衡导管 8033B 可与气体进入开口 8021 直接接合。在任何情况下，如果使用，优选液体移出接头容易地与生长表面支持物连接或者断开，以使得当断开时，周围气体可与生长表面进行被动接触而无需任何机构或处理来迫使气体。技术人员应当理解生长表面支持物不需要永久性与细胞培养和细胞回收装置附接。

[0080] 图 11 示出了细胞培养和细胞回收装置的另一个实施方案，其适于允许将培养基从装置抽出同时生长表面基本没有形变。细胞生长和细胞回收装置 9000 包括生长表面支持物 9018。生长表面支持物 9018 包括气体进入开口 9021。气体进入开口 9021 使得周围气体被动移动至生长表面 9006 和从生长表面 9006 被动移动，生长表面 9006 优选透气的、液体不可渗透的且在细胞培养期间处于水平平面。气体进入开口滤器 9036 防止来自气体进入开口 9021 的污染。建议技术人员，为气体进入开口滤器选择的材料可以为任何材料，以使得其充当无菌屏障并且气体以一定速率被动接近生长表面，所述速率允许培养物的充分氧合。优选地，其为孔径小于 0.45 微米并且更优选小于 0.22 微米的多孔材料。培养基移出导管 9010 附接至废物容器 9032 并且以这样的方式与蠕动泵 9030 接合，所述方式使得蠕动泵 9030 能够将培养基 9020 抽出细胞生长和细胞回收装置 9000。压力平衡导管 9033 将培养基移出导管 9010 与气体空间 9019 连起来，并且可任选的含单向阀 9034（以防止培养基潜在的进入气体空间）和 / 或压力平衡导管滤器 9036（以防止污染物或生物危害潜在的进入气体空间然后潜在的穿过气体进入开口滤器）。在培养基移出期间，蠕动泵的速率是这样的，其使得气体空间 9019（即，生长表面 9006 与气体进入开口滤器 9036 之间的空间）中的压力小于或等于内部体积 9014 的压力，由此使生长表面 9006 朝上挡边 9012 的移动最小化或被阻止。优选地，压力平衡导管是柔性管，其与从进入开口向气体空间发出的管配对，并且使用无菌管道焊接来建立配对。

[0081] 细胞培养和细胞回收装置以及过程的又一个实施方案在图 12A 和 12B 中示出。在这个实施方案中，由于培养基被从细胞培养和细胞回收装置中抽出，因此细胞培养和细胞回收装置的内部体积处在小于周围环境之压力的压力下。图 12A 示出处在静态细胞培养状态下的细胞培养和细胞回收装置 10000。细胞 10016 已经重力沉降在透气性、液体不可渗透的生长表面 10006 上。在图 12B 中，周围气体限流器 10018 与细胞培养和细胞回收装置 10000 接触。在液体从细胞培养和细胞回收装置 10000 抽出时，周围气体限流器 10018 发挥限制周围气体与生长表面 10006 接触的作用以限制跨生长表面 10006 的压力不平衡。在这一实例中，蠕动泵 10030 发挥将培养基 10020 从培养基移出导管 10010 抽出的作用。由于把培养基从细胞培养和细胞回收装置抽出，当气体被通气口滤器 10028 限制进入装置时出现了压降。尽管细胞培养和细胞回收装置 10000 之内部体积的压力已经相对于周围环境降低，防止生长表面 10006 经历由周围气体限流器 10100 造成的相对压力不平衡。周围气体

限制器 10100 不必与细胞培养和细胞回收装置 10000 气密连接,但如果希望基本上限制生长表面朝上挡边 10012 的运动,则气密连接是优选的。可以如前所述使用一个或更多个导管在细胞回收前进行减少培养基体积的过程。优选地,如果存在的话,设计生长表面支持物 10018 以最小化其中的气体。

[0082] 细胞培养和细胞回收装置以及过程的又一个实施方案在图 13A、13B 和 13C 中示出。在这种方法中,将固定且预定体积的体积注射到细胞培养和细胞回收装置中。尽管所注射气体的来源在这个示例性实施方案中是一个位置,鼓励技术人员认识到来源可以是能够分配已知体积气体的任何机构,例如波纹。如图 13A 所示,示出细胞培养和细胞回收装置 11000 处于静态细胞培养的状态并且包含初始培养基体积 11020A 和细胞 11016。活塞 11100 通过通气口滤器 11028 连接至细胞培养和细胞回收装置 11000。如图 3B 所示,当移出废培养基时,活塞头 11150 运动第一预定距离以驱使气体体积进入细胞培养和细胞回收装置 11000 中。气体体积驱使相同体积的培养基离开培养基移出导管 11010,其对于废物容器(清楚起见未示出)是打开的。完成该步骤后,培养基移出导管 11010 对于废物容器是关闭的并且残余培养基体积 11020B 以及细胞 11016 保持在细胞培养和细胞回收装置 11000 中。如图 13C 所示,当移出细胞 11016 和残余培养基 11020B 时,活塞 11100 运动第二预定距离以将另外体积的气体分配到细胞培养和细胞回收装置 11000 中,从而驱使细胞 11016 和残余培养基体积 11020B 通过打开的细胞移出导管 11004 并进入细胞收集容器(清楚起见未示出)中。

[0083] 本领域技术人员将认识到,可以不背离本发明的精神对其进行多种修改。因此,不旨在将本发明的范围限制到所举例说明和描述的实施方案。相反,本发明的范围由所附权利要求及其等同方案解释。本文所引用的各个出版物、专利、专利申请和参考文献通过引用并入本文。

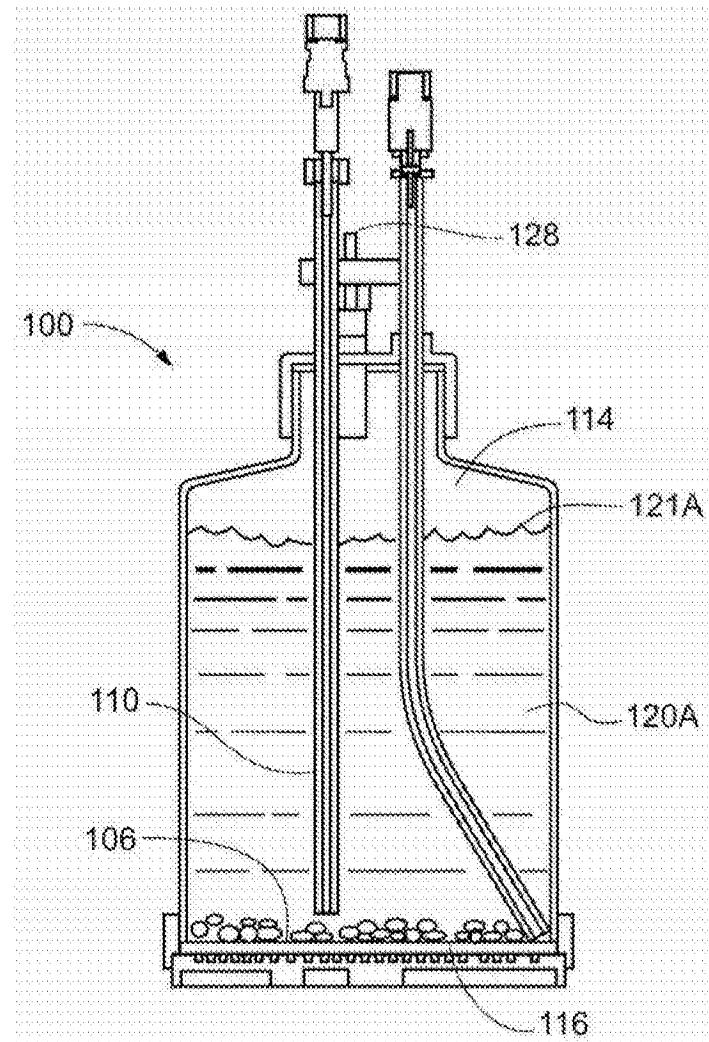


图 1A

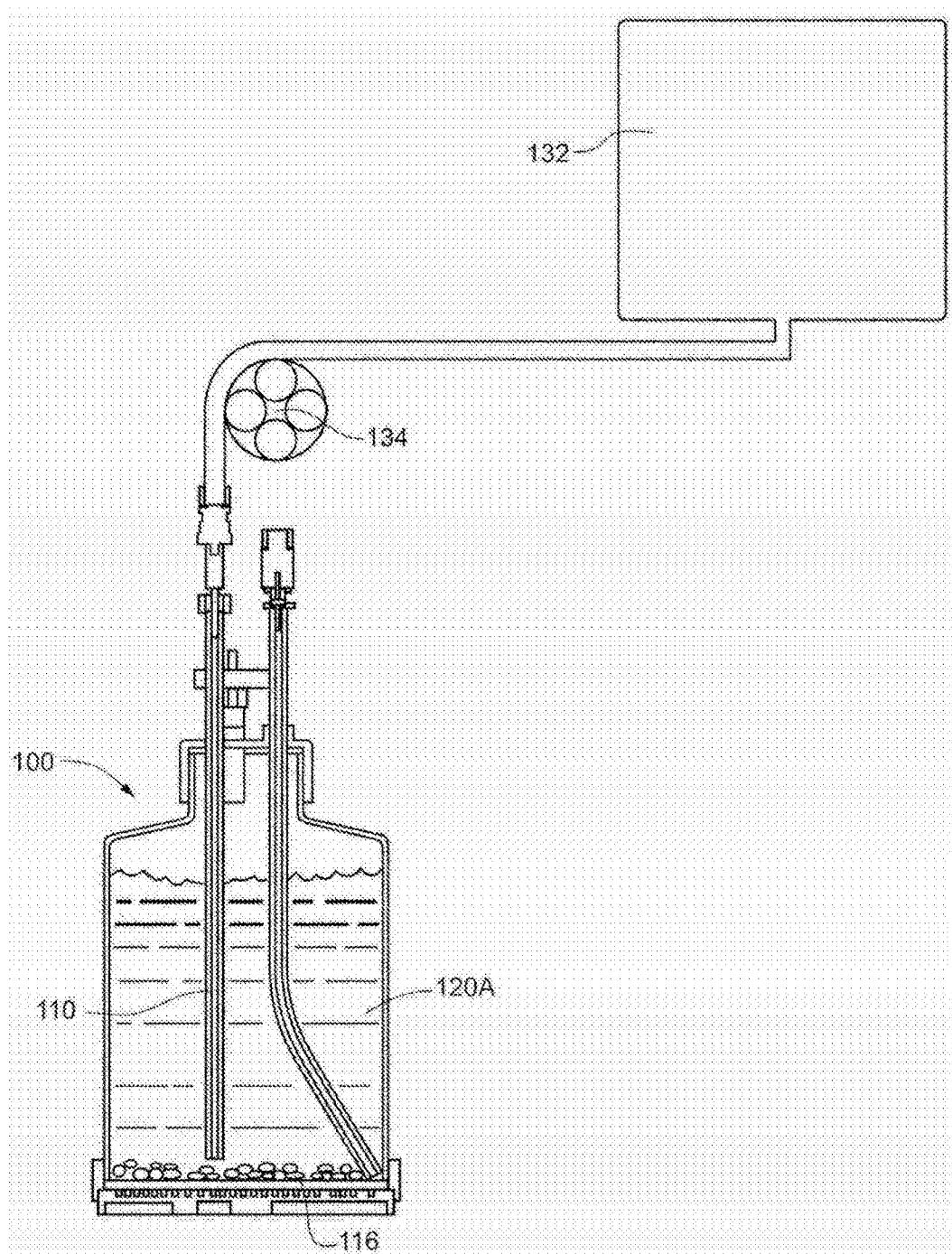


图 1B

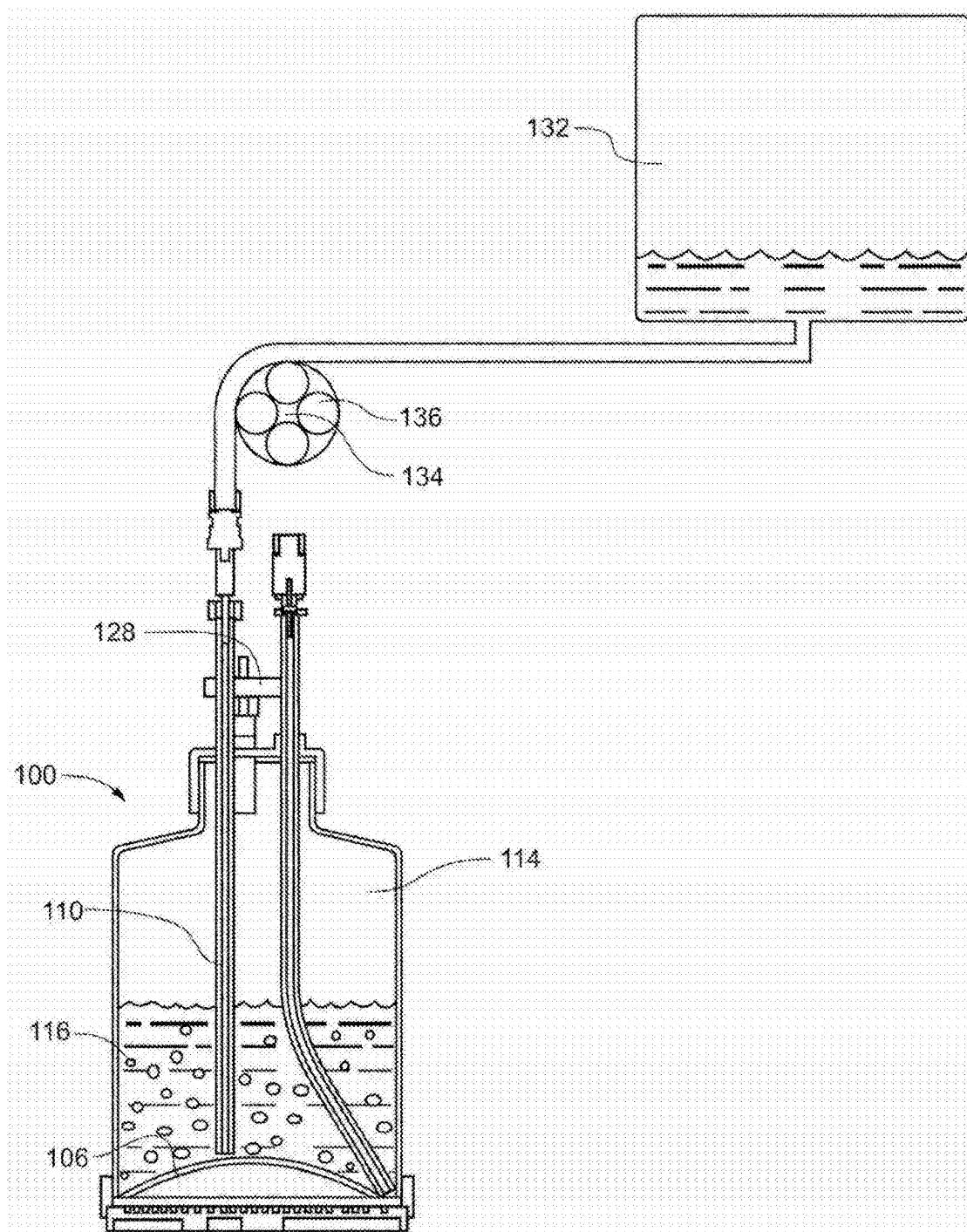


图 1C

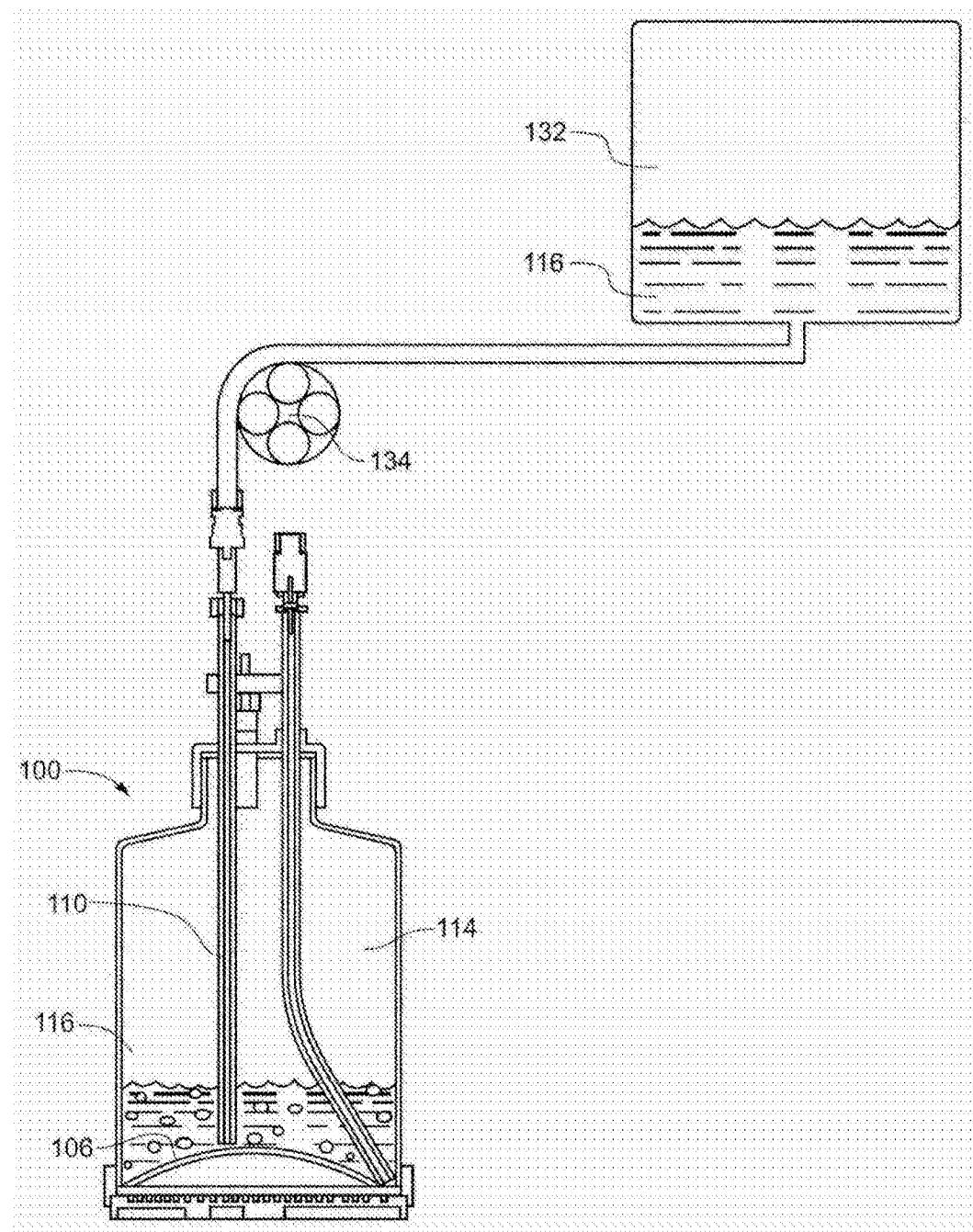


图 1D

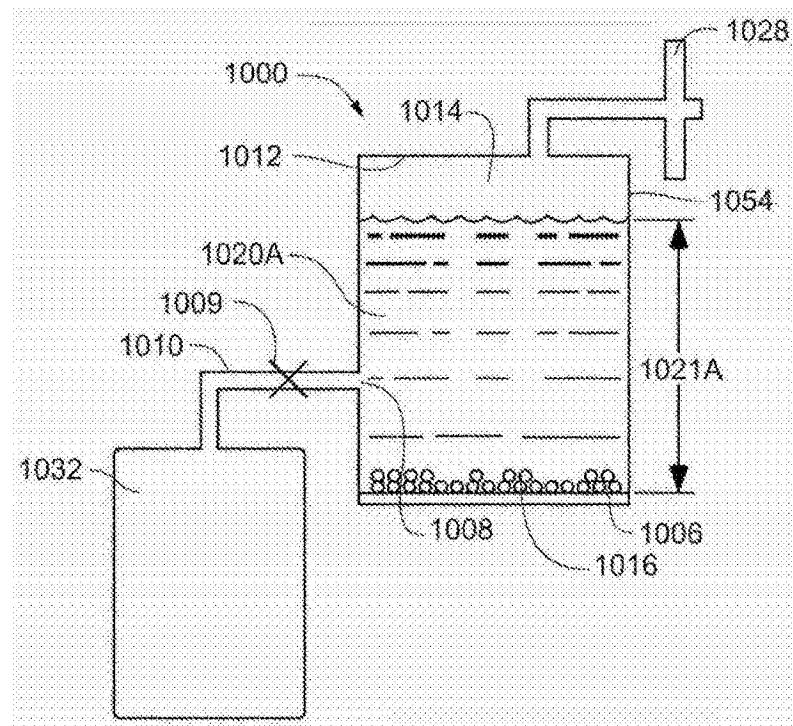


图 2A

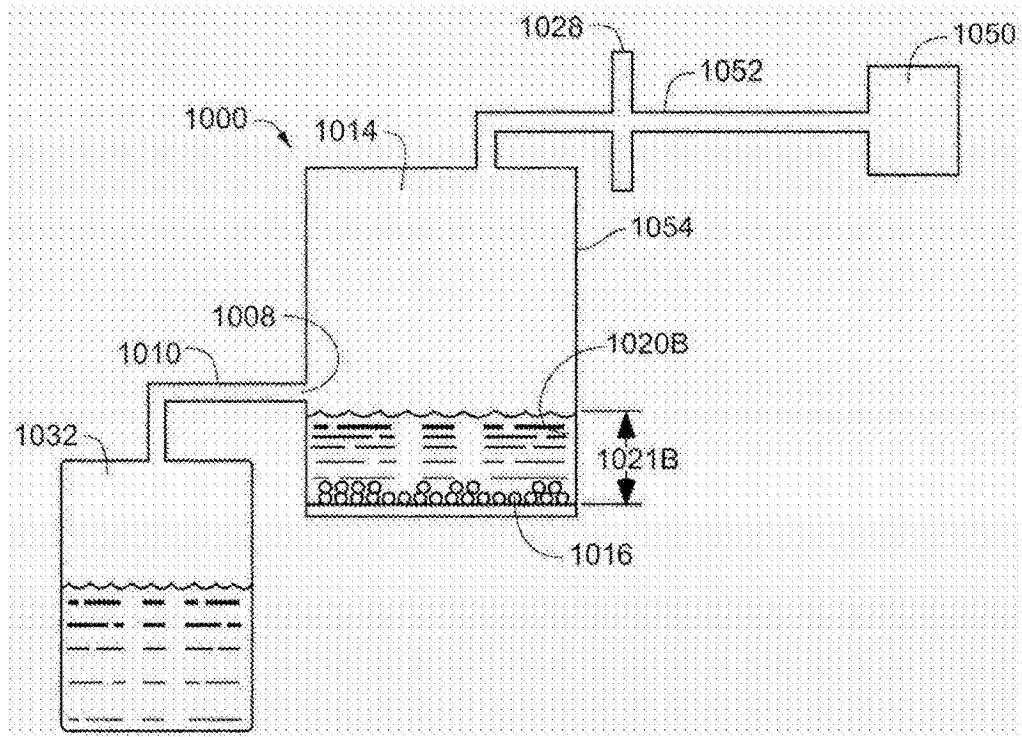


图 2B

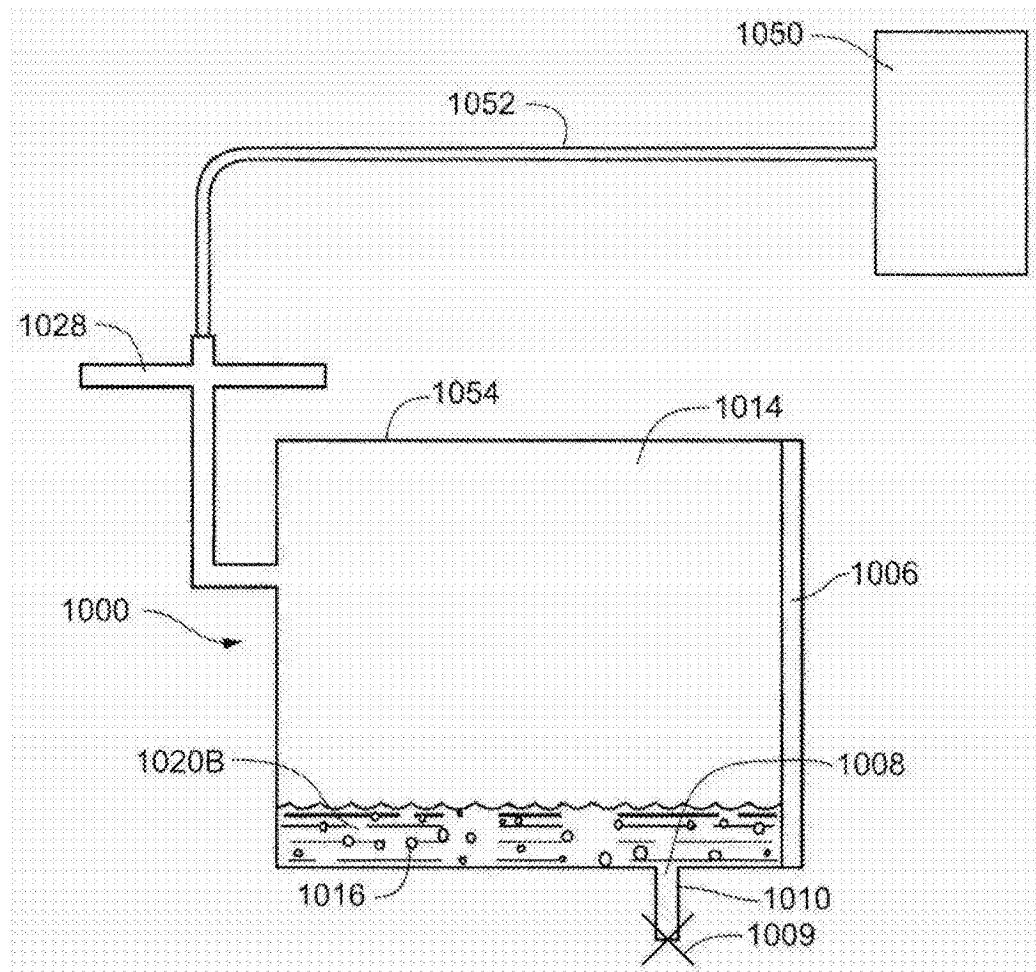


图 2C

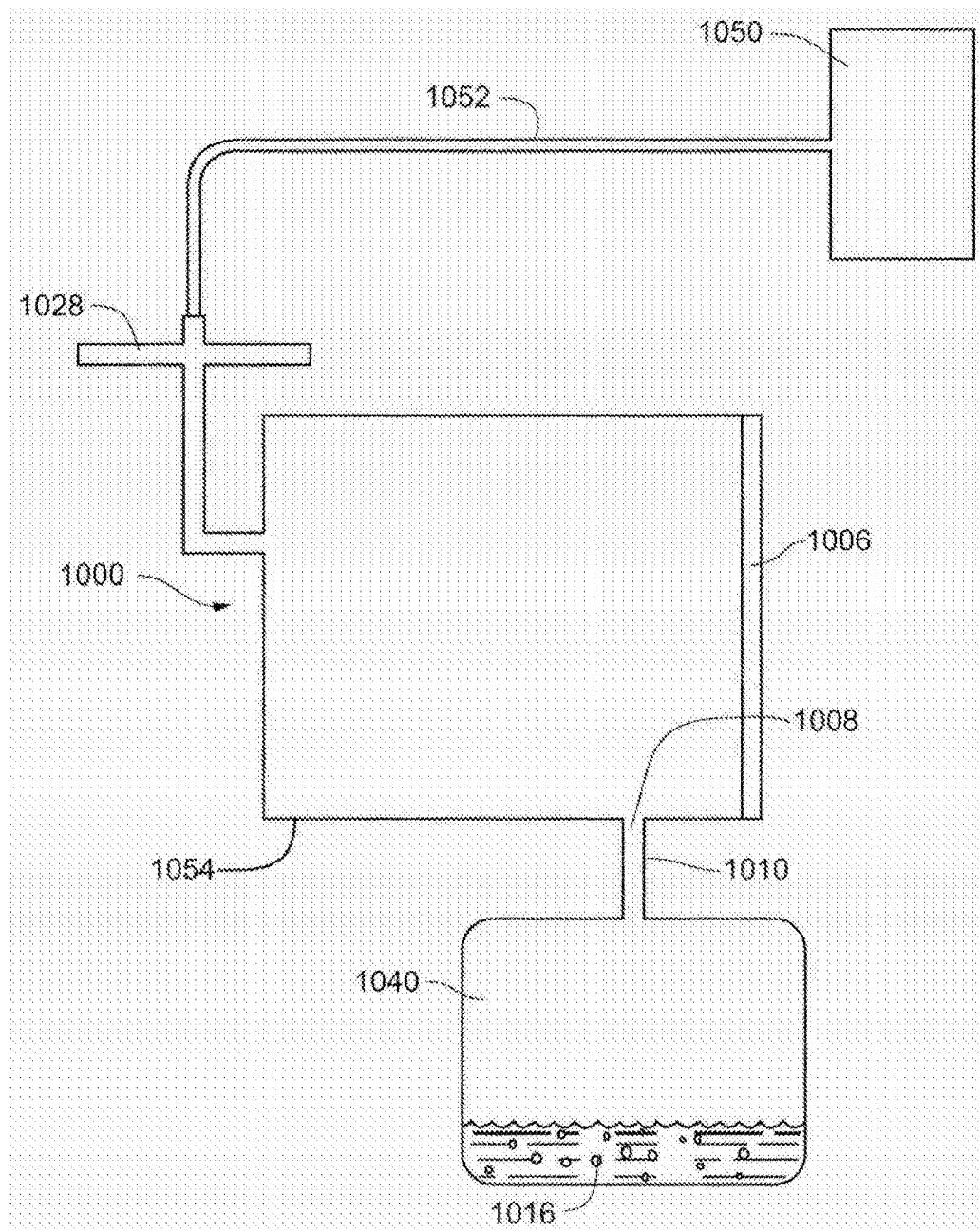


图 2D

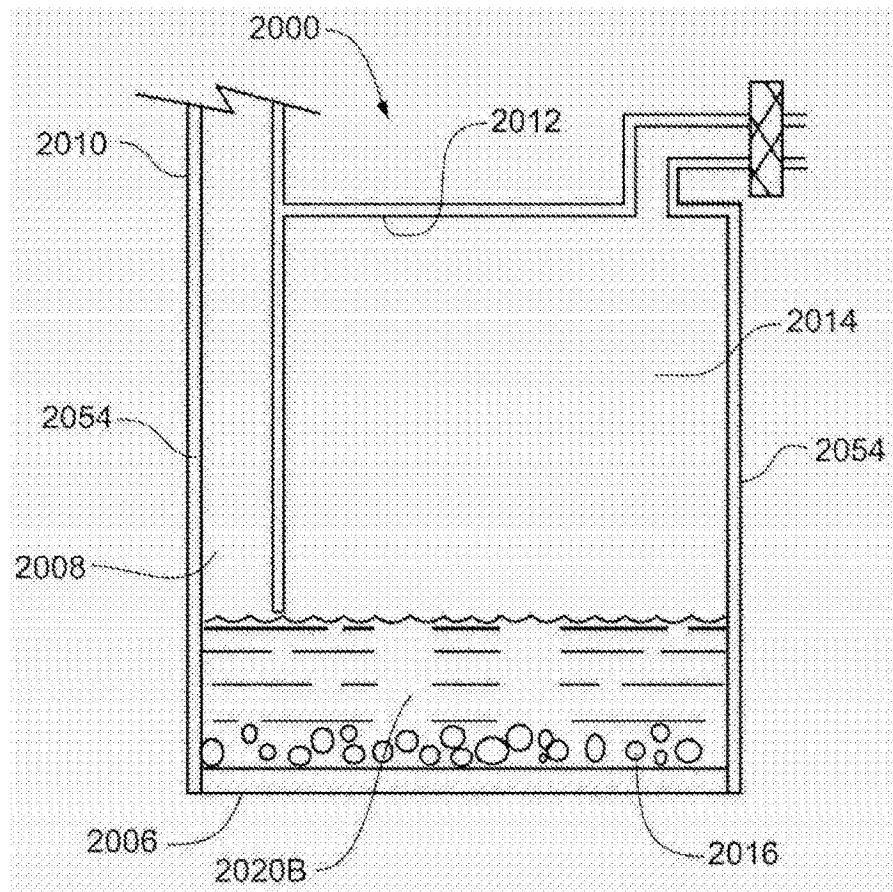


图 3

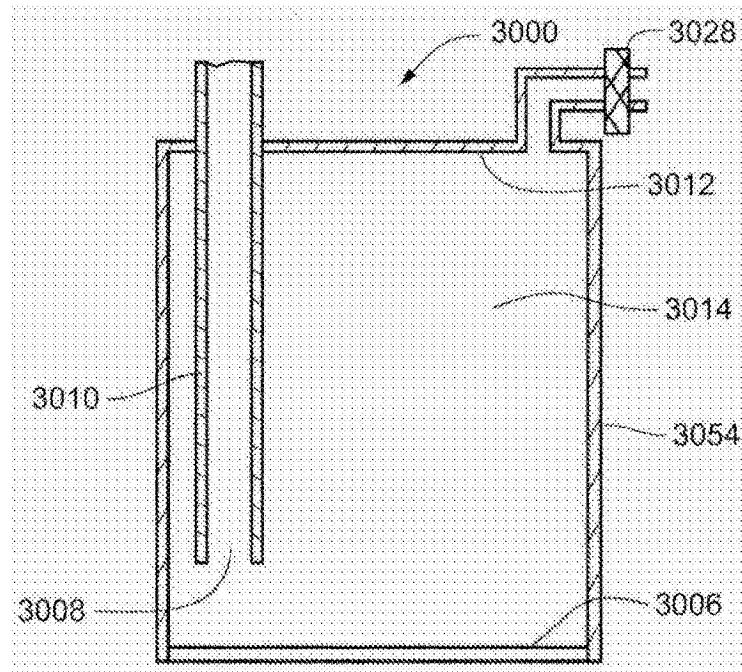


图 4A

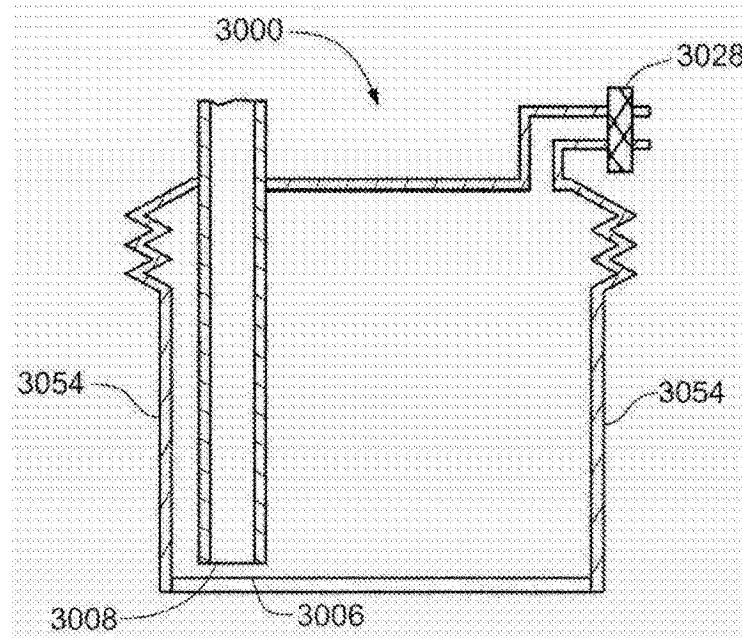


图 4B

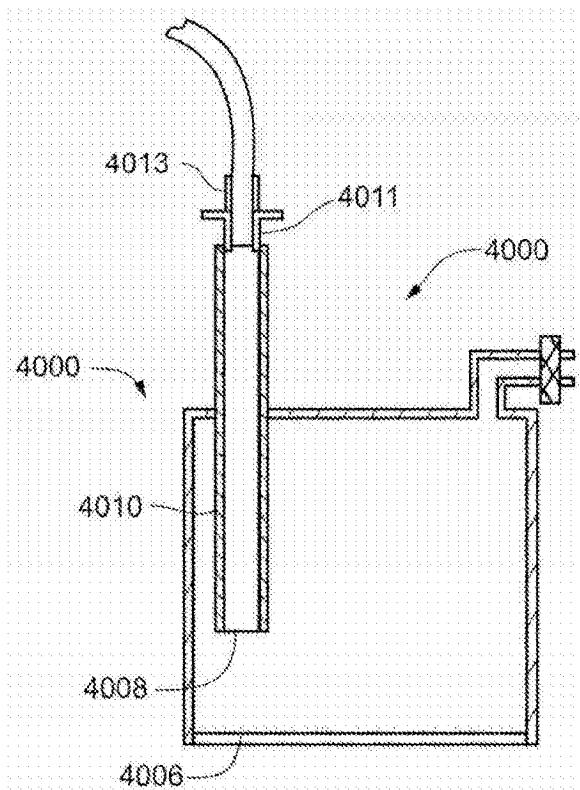


图 5A

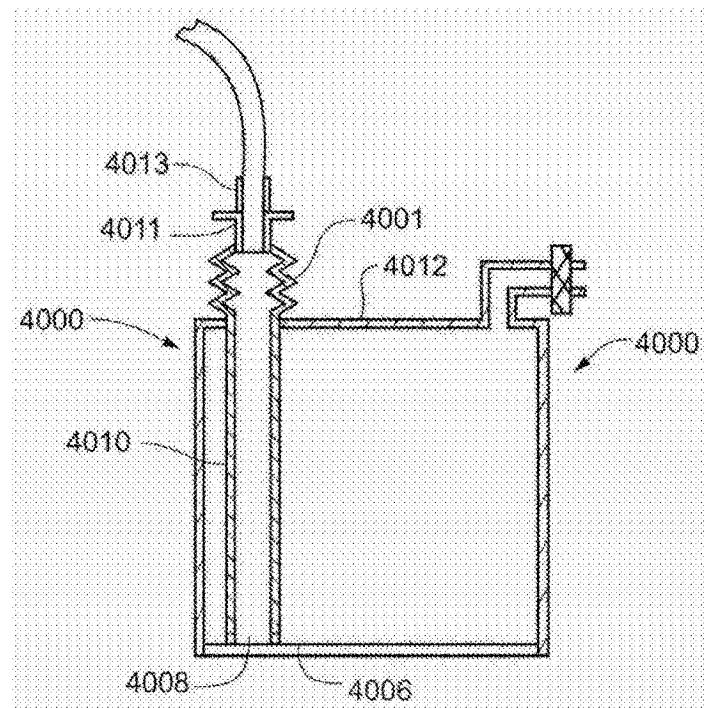
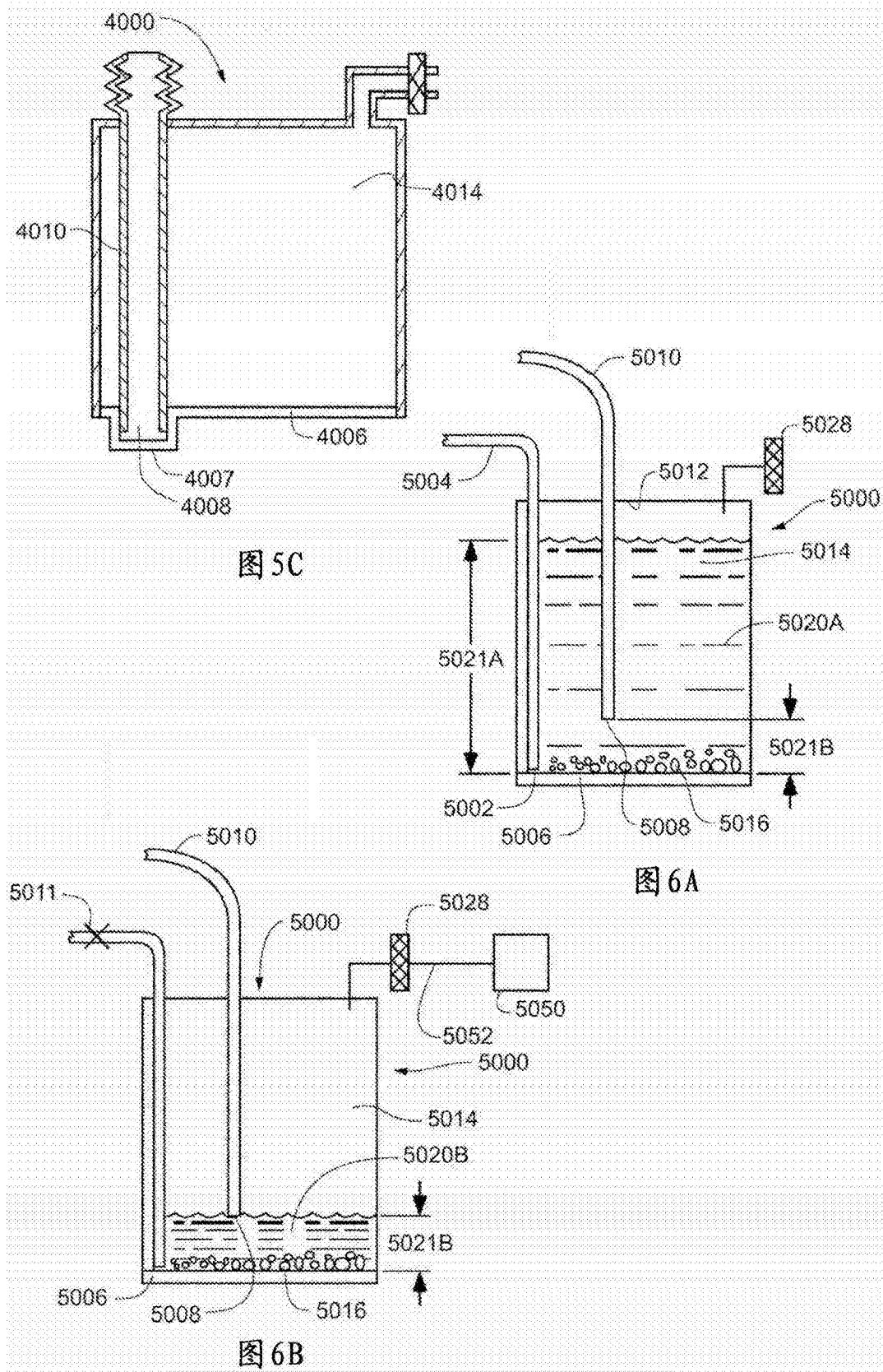


图 5B



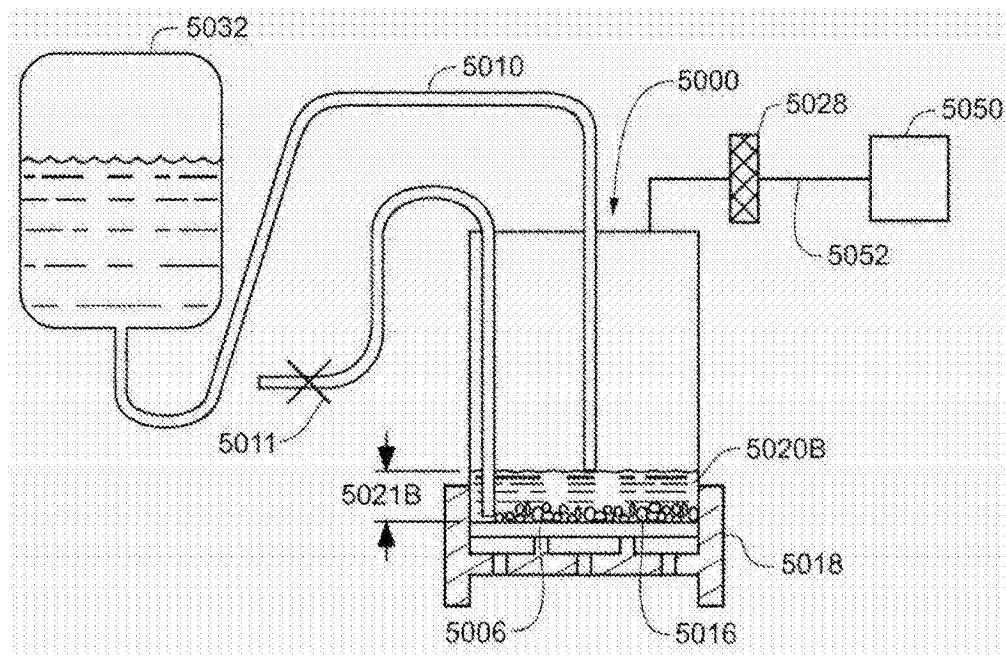


图 6C

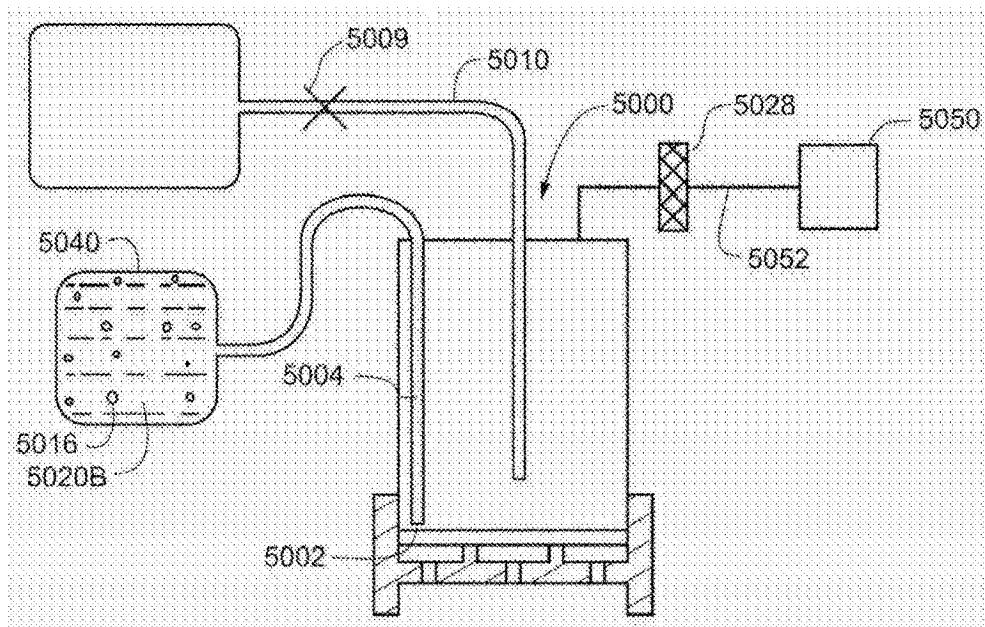


图 6D

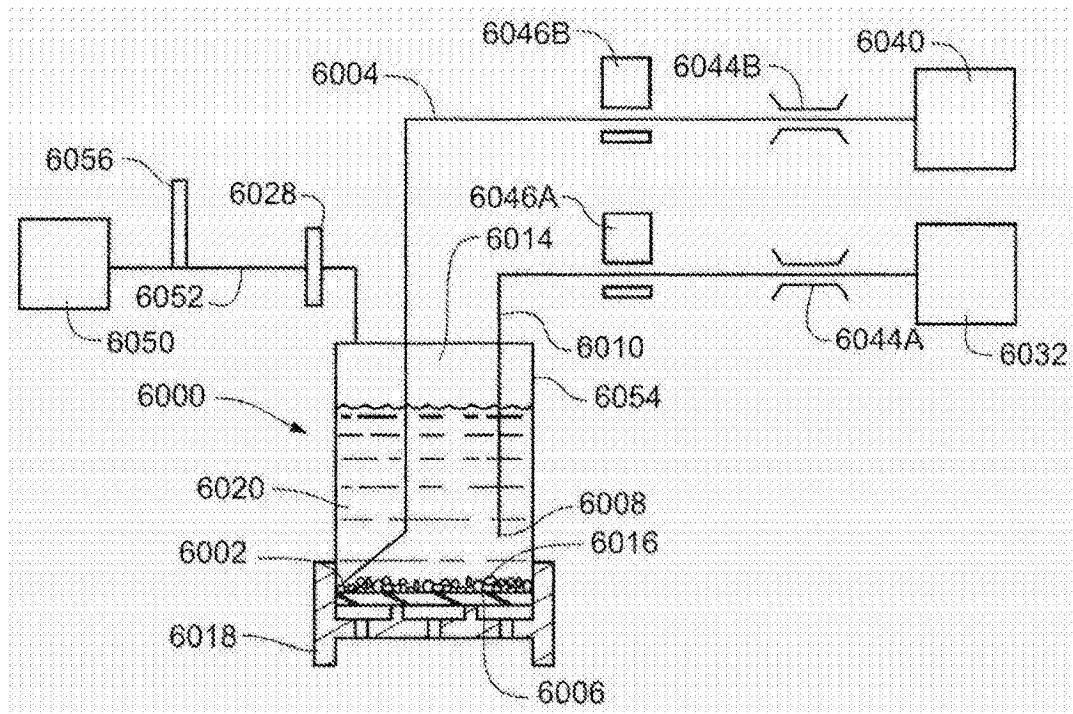


图 7

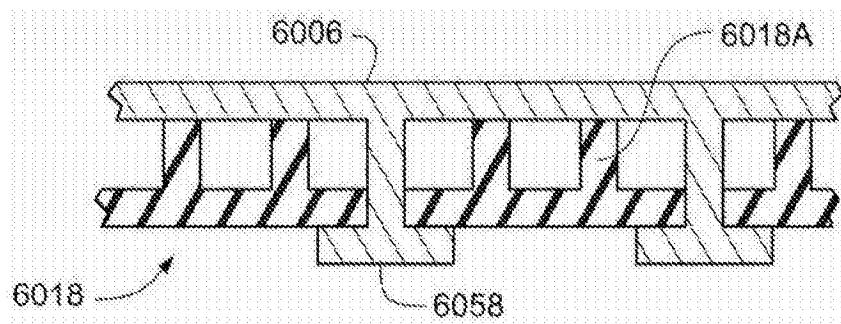


图 8

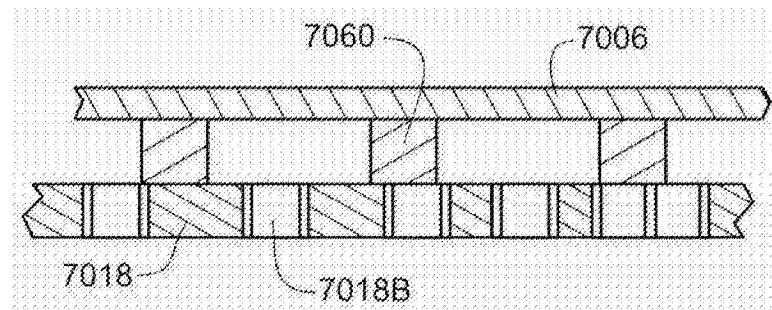


图 9

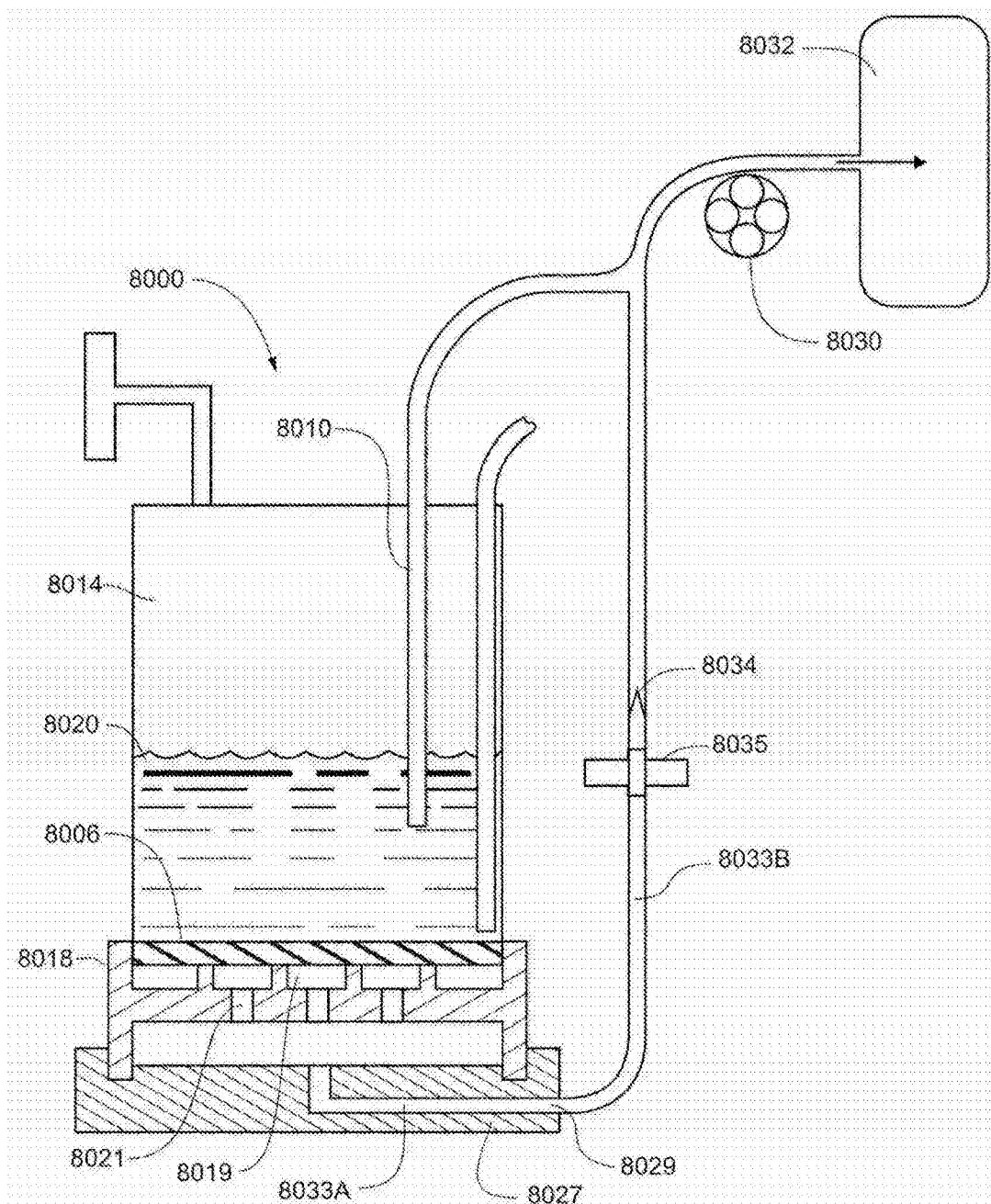


图 10

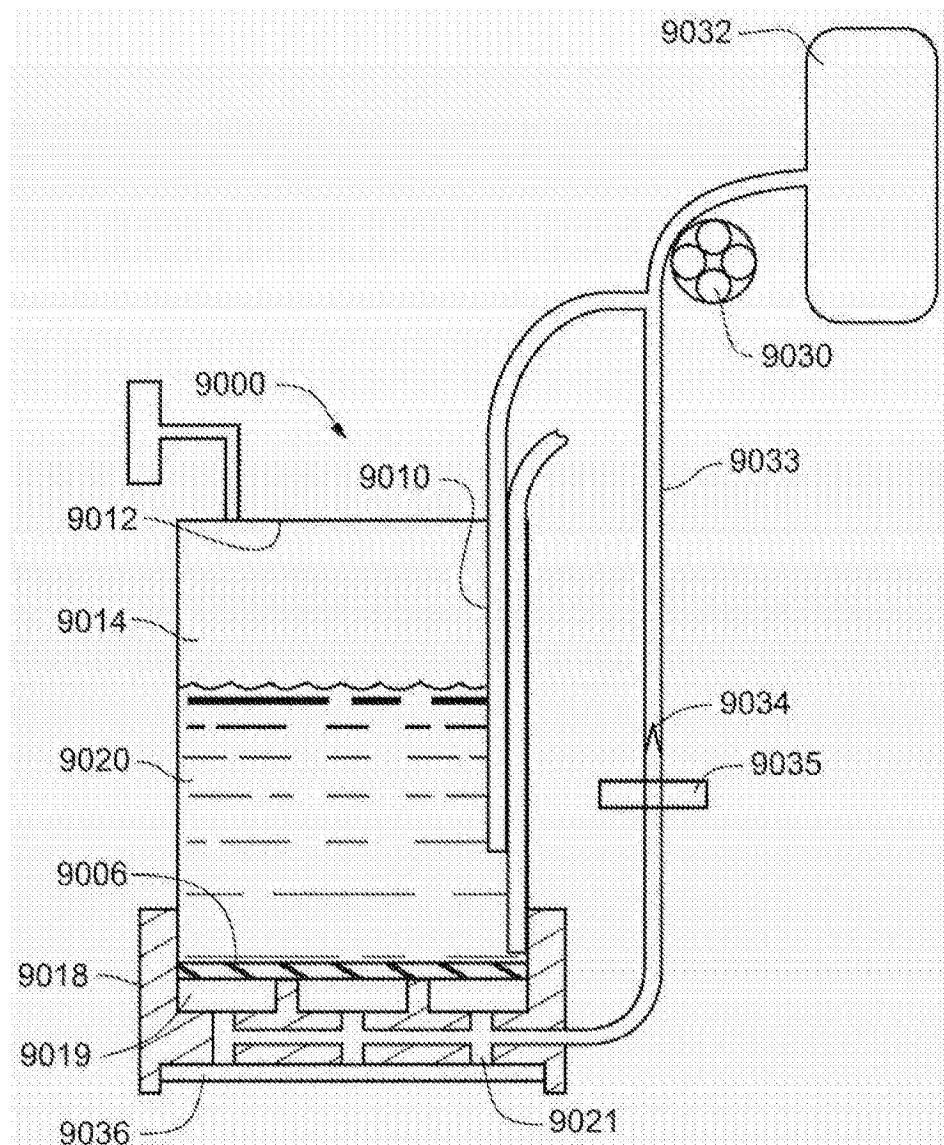


图 11

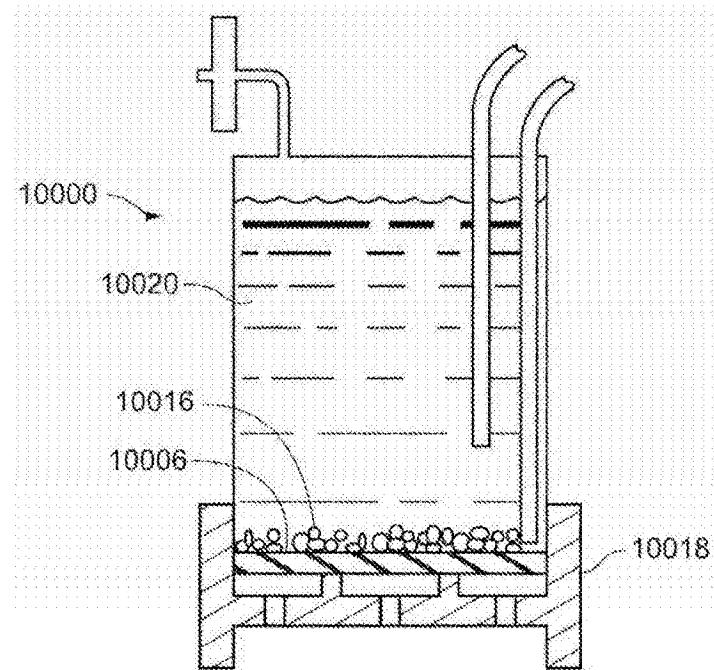


图 12A

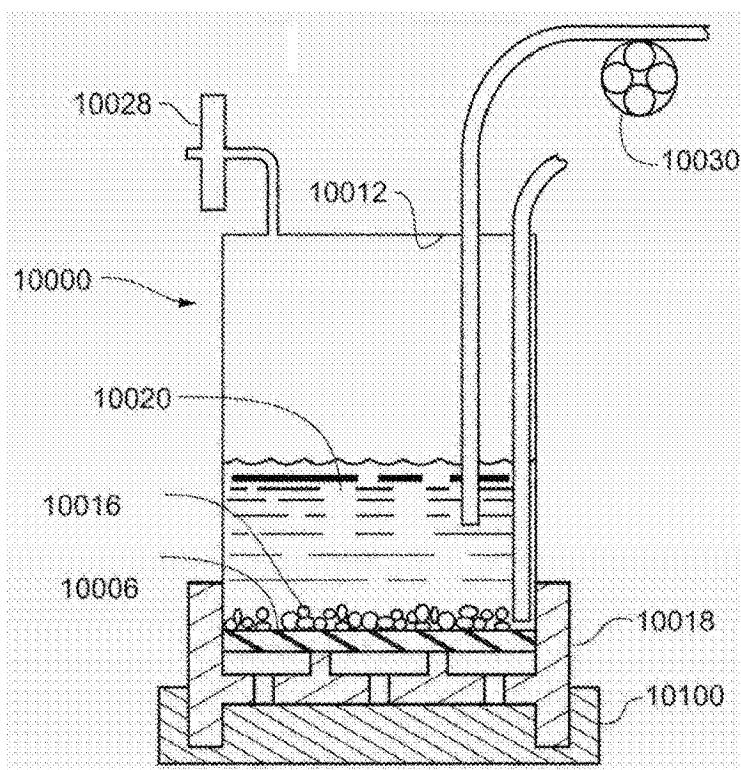


图 12B

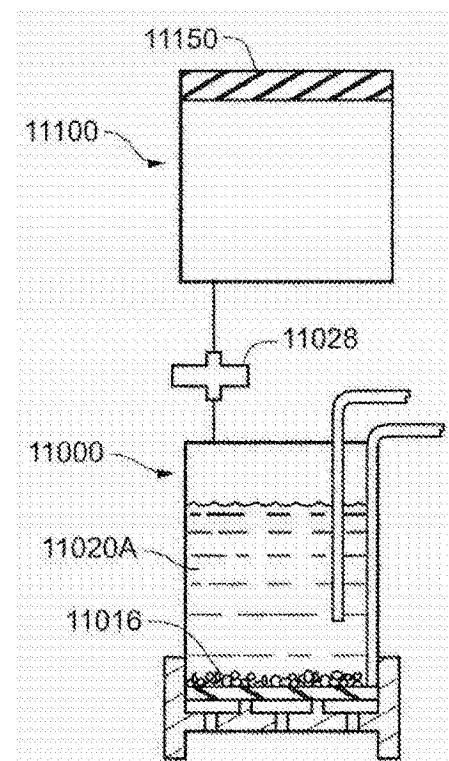


图 13A

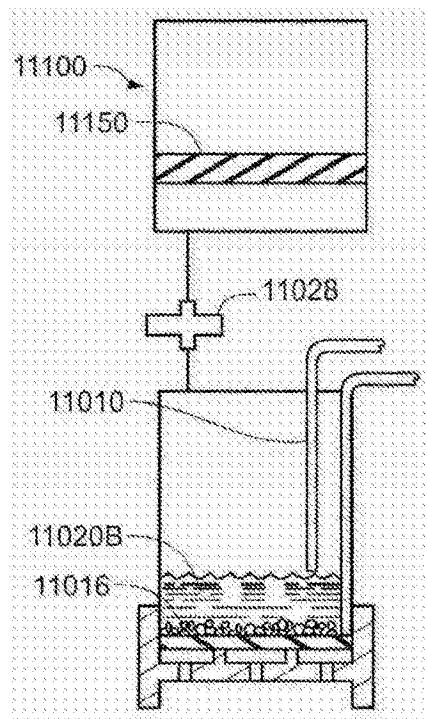


图 13B

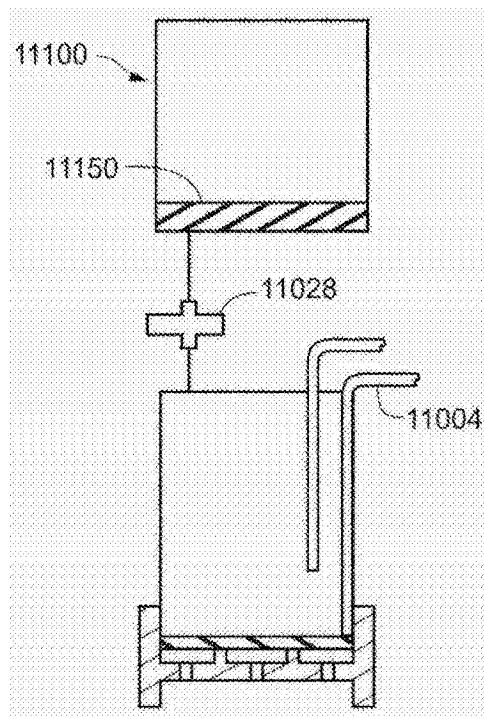


图 13C