



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114214192 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 22

(21) 申请号 202111185751.1

(22) 申请日 2013.12.11

(30) 优先权数据

61/735,841 2012.12.11 US

(62) 分案原申请数据

201380064957.6 2013.12.11

(71) 申请人 颇尔科技英国有限公司

地址 英国朴次茅斯

申请人 颇尔生命科学比利时公司

颇尔阿特利斯有限公司

(72) 发明人 苏雷什·普鲁少塔曼

何塞·安东尼奥·卡斯蒂略冈萨雷斯

让-克里斯托弗·德吕格曼

维希沃思·佩泽

德里克·彭德尔伯里

法比安·蒙考贝格

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

代理人 车文 赵晓祎

(51) Int.Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

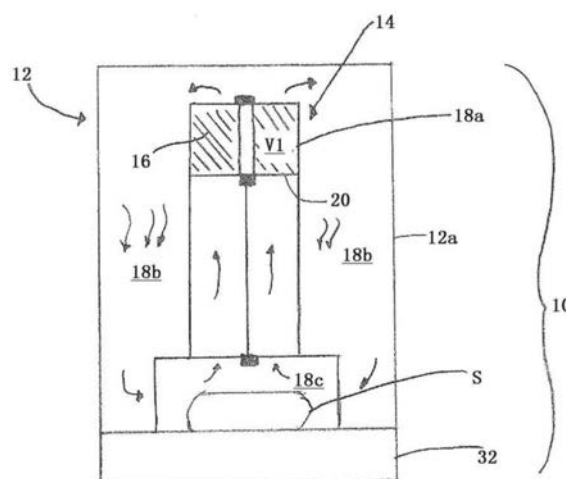
权利要求书1页 说明书9页 附图12页

(54) 发明名称

用于处理细胞的设备

(57) 摘要

公开了一种用于处理细胞的设备，其包括：用于所述细胞的固定床反应器，该固定床反应器包括能够从与固定床的压紧状态对应的第一位置移动到与固定床的松开状态对应的第二位置的可移动部分，该反应器包括排放部，该排放部用于将流体从反应器至少部分地排出，以在固定床内产生空气-液体界面；和用于振动所述固定床的振动器，由此，当所述固定床被该振动器振动时，所述可移动部分的移动使固定床扩展以便于收获细胞；并且其中，在使用期间，该反应器被从周围环境密封，以便维持用于以最佳方式生长细胞的无菌内部状态。



1. 一种用于处理细胞的设备,包括:

用于所述细胞的固定床反应器,所述固定床反应器包括能够从与所述固定床的压紧状态对应的第一位置移动到与所述固定床的松开状态对应的第二位置的可移动部分,所述反应器包括排放部,所述排放部用于将流体从所述反应器至少部分地排出,以在所述固定床内产生空气-液体界面;和

用于振动所述固定床的振动器,

由此,当所述固定床被所述振动器振动时,所述可移动部分的移动使所述固定床扩展以便于收获所述细胞;并且

其中,在使用期间,所述反应器被从周围环境密封,以便维持用于以最佳方式生长细胞的无菌内部状态。

2. 根据权利要求1所述的设备,其中所述可移动部分包括分隔部,所述分隔部被定位在所述反应器的包括所述固定床的隔间内。

3. 根据权利要求2所述的设备,其中所述分隔部为大致环形的。

4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的设备,还包括可扩展保持器,所述可扩展保持器用于在所述保持器的非扩展状态下将所述分隔部保持在所述第一位置并在所述保持器的扩展状态下将所述分隔部保持在第二状态。

5. 根据权利要求4所述的设备,其中所述可扩展保持器包括弹簧。

6. 根据权利要求1-5中的任一项所述的设备,还包括柱塞,所述柱塞用于将所述分隔部从所述第一位置移动到所述第二位置。

7. 根据权利要求6所述的设备,其中所述柱塞被连接到所述分隔部。

8. 根据权利要求4所述的设备,其中所述分隔部包括在所述反应器的包括所述固定床的隔间外的第一部分和位于所述隔间内的第二部分。

9. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,其中所述反应器包括密封的容器。

10. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,其中所述反应器包括柔性的外壁。

11. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,还包括具有所述固定床的第一隔间和用于使流体循环通过所述第一隔间的第二隔间。

12. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,其中所述反应器包括滚瓶。

13. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,还包括用于使流体在所述反应器内循环的装置。

14. 根据权利要求13所述的设备,所述装置包括磁性搅拌器。

15. 根据权利要求14所述的设备,其中所述磁性搅拌器位于所述反应器的隔间中。

16. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,还包括多个细胞。

17. 根据前述权利要求中的任一项所述的设备,还包括用于使细胞从固定位置分离的释放剂。

18. 根据权利要求1所述的设备,其中所述振动器包括用于支撑所述反应器的振动台。

19. 根据权利要求18所述的设备,其中所述空气-液体界面是在所述床的振动期间形成的移动的空气-液体界面。

20. 根据权利要求19所述的设备,其中所述移动的空气-液体界面形成在所述固定床的中间。

用于处理细胞的设备

[0001] 分案申请

[0002] 本申请是申请号为201380064957.6的中国专利申请的分案申请,上述中国专利申请的申请日为2013年12月11日,发明名称为“用于固定床反应器中的细胞分离的系统和方法”。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求美国临时专利申请No.61/735,841的优先权,其公开内容在此通过引用的方式并入。

技术领域

[0005] 本公开一般涉及生物处理技术,更特定地涉及用于固定床反应器中的细胞分离的系统和方法、用于生物处理的设备、系统和套件以及相关的方法。

背景技术

[0006] 许多生物反应器包括静止填充材料形式的载体,该填充材料形成用于促进细胞附着和生长的固定床或压紧的床。固定床的填充材料的布置影响局部流体、热和质量运输,且通常非常紧密以最大化给定空间内的细胞培养。为了从压紧的床或固定床收获细胞,可使用例如胰蛋白酶的化学剂,但单独使用此方式通常仅导致有限的细胞分离量。问题部分地源自典型的反应器中的固定床材料的紧密压紧的属性,这使得更难于使化学剂在床的各处循环且增加了所收获的细胞的产量。

[0007] 因此,认识到,对于提高从固定床反应器收获的细胞的产量的方式的需求。

发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了一种用于处理细胞的设备,其包括:

[0009] 用于所述细胞的固定床反应器,该固定床反应器包括能够从与固定床的压紧状态对应的第一位置移动到与固定床的松开状态对应的第二位置的可移动部分,该反应器包括排放部,该排放部用于将流体从反应器至少部分地排出,以在固定床内产生空气-液体界面;和

[0010] 用于振动所述固定床的振动器,

[0011] 由此,当所述固定床被该振动器振动时,所述可移动部分的移动使固定床扩展以便于收获细胞;并且

[0012] 其中,在使用期间,该反应器被从周围环境密封,以便维持用于以最佳方式生长细胞的无菌内部状态。

[0013] 在一个方面中,用于处理细胞的设备包括用于细胞的固定床反应器。该固定床反应器包括可从与固定床的压紧状态对应的第一位置移动到与固定床的松开状态对应的第二位置的部分。因此,分隔部的移动扩展了固定床,以便于从固定床收获细胞。

[0014] 在一个实施例中,可移动部分包括分隔部。该分隔部可定位在反应器的包括固定

床的隔间内。所述设备还可包括可扩展保持器,该可扩展保持器用于在保持器的非扩展状态下将分隔部保持在第一位置和在保持器的扩展状态下将分隔部保持在第二状态。

[0015] 可提供柱塞。该柱塞可适于将分隔部从第一位置移动到第二位置,柱塞可连接到分隔部。分隔部可包括在反应器的包括固定床的隔间外的第一部分和在隔间内的第二部分。反应器可包括密封的容器,且可包括柔性的外壁。反应器的第一隔间可包括固定床,且第二隔间可设置为使流体循环通过第一隔间。反应器也可包括滚瓶。

[0016] 本公开的另一方面涉及用于处理细胞的设备。该设备包括容器,该容器包括适合细胞生长的介质和与用于细胞的内部隔间相关联的分隔部,分隔部可从为该隔间提供第一体积的第一位置移动到为该隔间提供比第一体积大的第二体积的第二位置。

[0017] 介质可包括隔间内的填充材料。分隔部可在第二位置中形成隔间的下部分。容器可包括端壁,且分隔部可在第一位置比在第二位置靠近端壁。可提供可扩展保持器以在保持器的非扩展状态下将分隔部保持在第一位置且在保持器的扩展状态下将分隔部保持在第二位置。可扩展保持器可包括弹簧。可提供柱塞以将分隔部从第一位置移动到第二位置,该柱塞可连接到分隔部。分隔部可包括在反应器的包括固定床的隔间外的第一部分和位于隔间内的第二部分。也可设置外部隔间,以使流体循环通过内部隔间。分隔部可为大致环形的。

[0018] 本公开的另一方面涉及用于处理细胞的设备。该设备包括容器,该容器包括:侧壁,该侧壁形成用于接收流体的内部;和可扩展隔间,该可扩展隔间定位在包括用于细胞的固定床的容器内部。可扩展隔间可被容器内部中的外部隔间围绕,且可围绕内部隔间。侧壁可以是至少部分柔性的。

[0019] 所述设备可进一步包括振动器。所述设备可进一步包括用于使流体在反应器内循环的装置,例如磁性搅拌器。该装置或搅拌器可在反应器的隔间中。设备可包括多个细胞。设备可进一步包括用于使细胞从固定位置分离的释放剂。

[0020] 在本公开的另一方面中,使用液体来处理细胞的设备包括:反应器,该反应器包括用于生长细胞的床;振动器,该振动器用于振动所述床;和排放部,该排放部用于将流体从反应器排出,以在所述床内形成空气液体界面。在一个实施例中,振动器包括用于支撑反应器的振动台。所述床可包括固定床,且反应器可包括分隔部,该分隔部可从与固定床的压紧状态对应的第一位置移动到与固定床的松开状态对应的第二位置,由此,分隔部的移动使固定床扩展以便从固定床收获细胞。

[0021] 本公开的再一个方面涉及处理固定床反应器中的细胞的方法。该方法包括:松开固定床且在松开之后从反应器收获细胞。该收获步骤可包括:将释放剂输送到反应器、振动反应器、敲击反应器或其组合。该松开步骤可包括:使包括反应器的固定床的隔间扩展。该松开步骤可包括使支撑固定床的填充材料的分隔部移动。该松开步骤可包括降低分隔部。

[0022] 本公开的另一个方面涉及使用反应器处理细胞的方法,该反应器包括具有空气液体界面的床。该方法包括振动所述床。振动所述床的步骤可包括振动包括床的反应器。该振动步骤可包括将反应器放置在振动台上。该振动步骤可包括敲击反应器。该方法可进一步包括在振动步骤期间移动空气液体界面的步骤。该方法可进一步包括以下步骤:冲洗所述床的步骤,然后重复振动步骤。该方法可进一步包括在振动步骤期间旋转所述反应器的步骤。

[0023] 本公开的再一个方面涉及用于处理附着到流体中的载体上的细胞的系统。该系统包括：用于接收细胞、载体和流体的容器，所述容器包括用于释放流体的至少一个端口；用于振动容器的振动器；和与端口相关联的过滤器。过滤器可适于使细胞通过但不使载体通过。

[0024] 该系统可进一步包括泵，该泵用于增加或降低容器中的在流体上方的顶空间中的压力。该系统可进一步包括用于使流体从容器通过过滤器的流出管。该端口可包括多位置排放部，且过滤器可包括围绕排放部且适于允许流体通过但不允许载体通过的柔性材料。该柔性材料可包括网材料。

[0025] 本公开的再一个方面涉及适合在载体上培育细胞的设备。该设备包括器皿，该器皿包括排放部和过滤器，该排放部具有大于载体的排放部开口，该过滤器被布置为允许流体但不允许载体通过到排放部开口中。该过滤器可包括围绕排放部开口的柔性材料。该柔性材料可包括网。

[0026] 本公开进一步的方面描述了用于处理附着到流体中的载体上的细胞的方法。该方法包括：提供用于接收细胞、载体和流体的容器，所述容器包括用于移除流体的至少一个端口；振动所述容器以将细胞从载体分离；且从器皿中移除的流体过滤载体，使得分离的细胞与流体被移除而载体不与流体被移除。该过滤步骤可包括：将流体移除通过端口且使流体通过过滤器，过滤器带有小于载体且大于细胞的孔隙尺寸。该方法可进一步包括将容器加压以移除流体的步骤。加压步骤可包括：提供与容器连通的泵并且在流体上方的顶空间中施加压力。该振动步骤和加压步骤可同时执行。

[0027] 本公开的另一方面是结合生物处理使用的套件。在一个实施例中，该套件包括：消毒的第一容器，该第一容器包括第一内部；消毒的第二容器，该第二容器连接到第一容器，所述第二容器包括第二内部，所述第二容器包括在第二容器的第二内部内的用于添加到第一容器的添加剂；可移除屏障，该可移除屏障在第一容器和第二容器之间用于将添加剂限制到第二容器；和包装，该包装用于容纳第一容器和第二容器。

[0028] 屏障可包括可移除钳。添加剂不可混合在流体中。第一容器可以是生物处理器皿，例如袋（该生物处理器皿可包括混合器）。

[0029] 本公开的另一方面涉及用于结合流体处理细胞的套件。该套件包括：消毒的第一容器，该第一容器包括第一内部；消毒的第二容器，该第二容器连接到第一容器，所述第二容器包括第二内部；添加剂，该添加剂在第二容器的第二内部内，所述添加剂与流体不可混合；和可移除屏障，该可移除屏障在第一容器和第二容器之间。

[0030] 添加剂可包括适合于携带生长中的细胞的材料。混合器可设置在第二容器中。第二容器可处在第一容器外部。

[0031] 本公开的另一方面涉及用于结合流体处理细胞的套件。该套件包括：消毒的第一容器，该第一容器包括具有混合器的第一内部；消毒的第二容器，该第二容器在第一内部之外连接到第一容器，所述第二容器包括第二内部；添加剂，该添加剂在第二内部内；和可移除屏障，该可移除屏障在第一容器和第二容器之间。

[0032] 本公开也涉及用于处理附着到流体中的载体上的细胞的系统，该系统包括：本文公开的任何包括载体和流体的容器；用于振动该容器的振动器。也可提供过滤器和压力源，该过滤器的孔隙的尺寸大于细胞以从流体中过滤细胞，且该尺寸小于载体，该压力源用于

对第一容器加压。

[0033] 本公开也涉及提供与流体一起使用的生物处理系统的方法。该方法包括：将第一容器附接到第二容器，第二容器包括不可与流体混合的添加剂；将所附接的第一容器和第二容器一起消毒；且将消毒的第一容器和第二容器包装以用于运输。该包装步骤可包括：提供用于围绕所附接的第一容器和第二容器以及屏障的第三容器。该方法可进一步包括为第一容器提供混合器的步骤。该方法也可包括以下步骤：将第一容器和第二容器解包装；移除屏障以将添加剂输送到第一容器；将流体添加到第一容器；将流体混合；和回收流体。也可执行在流体中使细胞生长的步骤，且该回收步骤可包括：使流体从第一容器通过过滤器，该过滤器适于允许细胞从第一容器通过但防止添加剂从第一容器通过。该方法可进一步包括：在回收步骤期间对第一容器加压，和/或在回收步骤之前或期间振动第一容器。

附图说明

[0034] 图1是根据本公开的培养器皿的第一实施例的示意性图示；

[0035] 图2是图1实施例的示意性图示；

[0036] 图3-6是替代实施例的示意性图示；

[0037] 图7-8图示了与使用所公开的本发明方法有关的细节；

[0038] 图9图示了另一个实施例；

[0039] 图10、10A和11示出了根据本公开的另一个实施例；

[0040] 图12-14图示了根据本公开的另外的实施例；并且

[0041] 图15-16图示了根据本公开的又一些实施例。

具体实施方式

[0042] 现在参考图1，图1图示了用于处理细胞的系统10。在一个实施例中，系统10包括反应器12形式的用于生长细胞的设备。反应器12可包括被布置成接收和包含流体的刚性或柔性的容器（例如，袋），且反应器12可适合于仅被使用一次（这避免了需要清洁过程和相关的费用）。在任何情况中，在使用期间形成反应器12的容器可从周围环境密封，以便维持用于以最佳方式生长细胞的无菌内部状态。

[0043] 反应器12包括形成内部的壁12a，该内部带有压紧的或固定的床14，床14由填充材料16（例如，纤维、珠、球等）构成以促进细胞的附着和生长。材料16位于反应器12的内部内的隔间18a中，该隔间可包括中空的竖直延伸的管的上部分。第二隔间18b设置在反应器12的内部内以将流体传送到隔间18a（该隔间18a至少部分地形成固定床14）的材料16和从隔间18a的材料16传送流体。典型地，填充材料16可布置为最大化用于细胞生长的表面积，其中1000平方米被认为是表面积的有利的量（这例如可使用医疗级聚酯微纤维作为填充材料16来实现）。

[0044] 也可提供例如磁性搅拌器S的循环装置，以使流体在反应器12中移动通过固定床14，但也可使用外部泵（未示出）。搅拌器S可设置在反应器12的第三隔间18c中且与第一隔间18a和第二隔间18b流体连通。作为结果的流动可从反应器12的底部到顶部，如通过图1中的作用箭头所指示的。以此方式形成反应器12的一个可能的解决方法的细节可在美国专利No.8,137,959中找到，其公开内容在此通过引用合并。

[0045] 如参考图1和图2一起最佳地理解,反应器12可适合于使得固定床14的填充材料16可从压紧状态扩展或“松开”。因此,如在图1中所示,反应器12与可扩展部分相关联,该可扩展部分可包括用于将隔间18a分为两个区段的可移动分隔部20。在图示的实施例中,此分隔部20提供了对于形成固定床14的隔间18a内的填充材料16的支撑,隔间18a又可包括中空的竖直延伸的管。分隔部20可设计为其外径小于管18a的外径,且也对于流体可渗透。

[0046] 在用于生长细胞的第一状态中,分隔部20最初定位为在包括紧密的填充材料16的对应隔间18a中形成第一体积V1,该紧密的填充材料16在这种状态中可对于流体、热、质量运输通过床14提供最佳的状态。当希望收获细胞时,分隔部20可移动以使得形成压紧床14的隔间18a的第一体积扩展到较大的第二体积V2(且可能不打开反应器12),且因此允许填充材料16扩展或松开。在材料16的此状态中,然后细胞可更容易地分离以收获,这如上所述可仅使用化学剂实现或与其它技术组合地实现,如在如下的描述中详细论述。

[0047] 图3至图6图示了用于实现松开功能的多个实施例。在图3和图4中,分隔部20连接到间隔器22,该间隔器22可定位为邻近或邻接与床14相邻的可渗透上壁14a,以限定第一或压紧状态。例如螺旋弹簧的可扩展保持器24可在分隔部20和固定结构(例如反应器12的上壁12b)之间扩展。

[0048] 当保持器24处于压缩或非扩展状态(例如,弹簧的压缩状态)时,分隔部20因此将床14的材料16保持在压紧的状态。当希望收获时,可允许保持器24扩展(例如,在弹簧的情况中通过切割或切断将相关联的固持器26分离)。如可参考图4理解,此扩展允许分隔部20移动且扩展隔间18a的体积,且因此将床14的材料16松开。

[0049] 图5和图6中的实施例实现了类似的最终结果,但分隔部20的移动方式不同。在此实施例中,分隔部20连接到柱塞28,柱塞28可通过反应器12的壁(例如,上壁12a)。激活柱塞28使分隔部20移动,使得床14从第一或压紧状态(图5)改变到松开状态(图6)。如应认识到,此实施例的一个优点是一旦收获进行,则柱塞28可返回到与压紧状态相关的位置,且然后被再激活到松开状态。为维持无菌状态,密封件30(可能包括套筒)可将柱塞28与反应器12关联。

[0050] 如上所述,在收获期间可使用例如胰蛋白酶的化学剂。在另一个实施例中,且参考图7和图8,填充材料16可受到振动以便于细胞分离。这可通过将整个反应器12放置在振动台32上或简单地通过敲击反应器12来完成。使填充材料16受到振动可单独地完成或与施加化学剂组合地完成。可在床14的扩展或非扩展状态中施加振动。在以振动和化学剂的组合进行收获的情况中,振动可在引入任何化学剂之前、期间或之后完成。

[0051] 示例

[0052] 参考图7和图8,描述了实施本发明的一个可能的方式。图7图示了在收获方法100中的步骤流程,该收获方法100包括:利用磷酸盐缓冲盐水(PBS)的冲洗步骤102,然后是可选的第二次冲洗步骤104,孕育步骤106,中性化步骤108,然后在步骤110处向反应器施加机械作用,例如通过施加振动使细胞脱落。在步骤112处再次冲洗之后,如步骤114处所指示的又再次施加机械作用。图8指示了作为在该过程中的每个步骤处完成的采样的结果所收获的细胞的不同的产量,且指示了第一机械作用步骤明显增加了产量。

[0053] 另一个示例涉及从反应器清空流体,且然后添加冲洗溶液(例如,预热到37摄氏度的PBS)。冲洗溶液循环通过固定床和清空的反应器。然后使酶分离溶液(例如,胰蛋白酶)循

环通过床。反应器然后被放置在振动台上在50Hz的频率下和大约1毫米的幅值下持续10分钟。作为回收步骤的部分,可然后排放流体,这通过停止振动同时部分地排放流体来实现,或通过在振动期间形成移动的空气液体界面(见图2中的线M,线M指示了在床的中间处的此界面)来实现。一旦反应器被清空,则可完成酶溶液的中性化。

[0054] 图9进一步图示了床14的松开可通过将未压紧的填充材料16放置在从反应器12分开的器皿200中而发生。这可通过将单独载体202(该单独载体202形成反应器12中的固定床14)放置在器皿200中和带有例如胰蛋白酶的分离剂204的溶液中且形成顶空间206(例如,空气)来实现。容器200可包括具有可移除盖200a的封闭容器,例如滚子瓶。容器200也可受到振动,以便于细胞从载体202的分离。

[0055] 现在参考图10至图11,图10至图11图示了适合于用作生物反应器的容纳器1的另外的实施例。用于细胞培养的容纳器1具有包含填充物3的内部空间2。当容纳器用于细胞培育时,填充物3应与细胞生长相容。内部空间2可具有任何形状,但在所公开的实施例中具有环形体积,该环形体积通过如下部件界定:

[0056] -外管状壁4,该外管状壁4具有第一外端41和第二外端42以及在以箭头44指示的纵向方向上延伸的纵向壁43。外管状壁4界定了环形体积在纵向方向44上的外边界;

[0057] -第一封闭件61和第二封闭件62,该第一封闭件61和第二封闭件62分别在外管状壁4的第一外端41和第二外端42处界定和封闭环形体积;

[0058] -内细长壁5,该内细长壁5具有向外管状壁的第一外端定向的第一外端51和向外管状壁4的第二外端定向的第二外端52。内细长壁5定位在外管状壁4内。内细长壁5在纵向方向44上延伸且界定了环形体积的内边界,内边界被外边界包围。

[0059] 内细长壁5的第二外端52与第二封闭件62重合。作为示例,外管状壁由柱形外管状元件40提供。内细长壁5可由例如柱形杆的实心内柱形元件50提供。外管状元件40是柱形管状元件,且具有平行于纵向方向的中心轴线45。内柱形元件50和外管状元件40可同轴安装。

[0060] 内柱形元件50的第一外端可包括联接元件53,以将内柱形元件50且借助于被固定到内柱形元件50和外管状元件40的封闭件61和62也将外管状元件40联接到驱动机构(例如生物反应器的马达)。第二封闭件62设置有连接器,该连接器适合于将容纳器联接到介质或气体源,以向和/或从内部空间2提供和/或抽取介质和/或气体。可将此连接器或替代地另外的连接器设置于第一封闭件61或第二封闭件62。

[0061] 内部空间2至少部分地填充有填充物3。作为示例,填充物可以是:例如硅酸盐、磷酸钙的矿物载体;例如多孔碳的有机复合物;例如壳聚糖的天然产品;与细胞生长相容的聚合物或生物聚合物。填充物可包括与细胞生长相容的聚合物或任何其它材料的织造或非织造的微纤维。填充物也可设置为带有孔隙和/或通道的单件材料。

[0062] 可选择地,填充物可具有在50%至98%的范围内的孔隙率P。术语孔隙率P是存在于给定材料体积中的空气的体积,且表达为给定材料体积的百分比。孔隙率可通过测量每体积多孔材料的重量 W_x 且使用如下公式来测量: $P=100-(1-W_x/W_{spec})$,其中 W_{spec} 是材料的比重。多孔材料可以是一个实心的材料单元或可以是多个单独的单元,例如颗粒物、碎屑、珠、纤维或纤维团块。

[0063] 当移动容纳器1时,填充物(特别是多孔材料)可安放在相对于容纳器的固定位置中。容纳器1应当围绕其轴线45旋转,可选择地以每分0.1至25转的转速旋转。

[0064] 如在图10A的径向横截面部分中最佳地可见,内部空间部分地填充有培养介质,例如细胞培养介质15。作为示例,液位18至少接触内细长壁5,内细长壁5部分地浸入在介质15中。定位在液位18下方的填充物3的部分被例如细胞培养介质的培养介质润湿。定位在液位18上方的填充物3与存在于内部空间2中的气体或空气接触。当容纳器在一个方向上围绕轴线45旋转时,例如如由箭头17所指示的顺时针旋转时,例如细胞培养介质15的培养介质在相反的方向上旋转,即相对于填充物3逆时针旋转(由19所指示)。例如细胞培养介质15的培养介质以塞流的方式通过整个填充物3。当容纳器旋转时,例如顺时针旋转时,例如细胞培养介质的培养介质促使在塞流的前沿20处的气体或空气16逆时针位移。在介质15的后沿21处造成了可选择地限制的凹陷,从而导致气体或空气16被向着后沿抽吸。因此,介质15和气体或空气16通过整个填充物3。

[0065] 如在图11中所示,外管状壁4可由外管状元件240提供。内细长壁5可由细长的柱形管状元件250提供。外管状元件240和细长的柱形管状元件250固定到两个可移除封闭件261和262。第一封闭件261设置有联接元件253,该联接元件253用于将容纳器联接到驱动装置,该驱动装置用于使得容纳器沿着在纵向方向44上的轴线旋转。第一封闭件261进一步包括连接器263,该连接器263用于将内部空间2连接到例如柔性管。

[0066] 作为示例,外管状元件可以是玻璃管,其具有例如110mm的长度L和例如135mm的内径 D_o 。内细长元件可以是聚偏二氟乙烯(PVDF)管,其具有88.9mm的外径 D_i 。内细长元件的外端因此内细长壁的外端与封闭件261和262重合。封闭件可以是不锈钢或PVDF环形盘,该环形盘可使用硅胶而附接到内和外元件。可设置有连接器263的第一封闭件261具有联接元件253,该联接元件253的外径 D_{ce} 例如为大约35mm。

[0067] 如上所述,内部空间2至少部分地填充有填充物3。作为示例,填充物可与图10的实施例中的填充物相同或类似。参考图11,可理解的是填充物可以被固定且容纳在由分隔部270限定的隔间内,分隔部270在图示的实施例中可以是环形的。分隔部270可布置为在空间2内在压紧状态(如所示)和松开状态(未示出)之间移动以便于细胞回收。该移动可由例如柱塞280的促动器导致。容纳器1也可以与处于松开状态的填充物3一起旋转以使得合适的释放剂循环通过材料,且容纳器1也可以被振动以便于细胞分离。

[0068] 转到图12,公开了用于分离细胞的系统的另一个实施例。在此实施例中,设置器皿300以保持可悬浮在流体F中的与细胞生长相容的材料16。器皿300可以是细胞培育器皿或生物处理器皿,或可以是如下的储存容器,该储存容器用于接收使用之后的细胞培育器皿或生物处理器皿的内含物。器皿300内的流体F可以是用于细胞生长的介质、水或其它冲洗流体、例如胰蛋白酶的化学剂或其组合。

[0069] 材料16可呈例如粉末、颗粒、碎屑、珠或纤维的微载体的形式。此材料16可形成团块,或可在流体F中悬浮。在一个实施例中,待收获的细胞至少部分地附着到材料16。

[0070] 器皿300可受到振动以从填充材料16移除细胞。振动可以是低幅值和高频率振动以最大化效率。如前所述,此振动可通过将器皿300放置在振动台302上来完成,或可通过手动振动器皿300来完成。当填充材料16被振动时,细胞开始变得从材料16脱离。细胞然后可以变得悬浮在流体F中而独立于材料16。

[0071] 器皿300可进一步包括过滤器304,过滤器304可与流出管E一起使用。过滤器可定尺寸为允许细胞(包括从材料16分离的细胞)通过,但防止材料16通过。在此情况中,过滤器

304下游的流出管E将包括从材料16分开的收获的细胞。

[0072] 另外,器皿300可以包括例如泵306的加压装置。此泵306可以增加在器皿300中的在流体F的液位上方的顶空间308中的压力。流体F上方的此压力增加可导致流体通过流出管E离开器皿且因此将流体液位降低。此加压和流体液位降低可与施加振动独立地或同时地发生,但如上所述可以有利的是如果可能使得振动集中在空气液体界面处。

[0073] 参考图13,公开了系统400,该系统可用于将材料从一个容器以无菌的方式传输到另一个容器。在一个实施例中,该系统可包括第一容器402,该第一容器402可以呈生物处理容器的形式,例如是柔性袋,或至少部分地刚性的器皿。第一容器可包括例如叶轮、桨412等的混合器,且可进一步包括用于添加流体的端口414。在一个实施例中,第一容器402可以具有在美国专利申请公开No.2010/0015696或美国专利No.7,384,027中所述的类型,其公开内容在此通过引用合并。

[0074] 系统400可进一步包括第二容器404,该第二容器404可永久地或临时地附接到第一容器402。第二容器404的体积可大体上小于第一容器402的体积,且可以是第一容器的体积的大约10%或更小。

[0075] 第二容器404可包括可添加到第一容器402的添加剂416。添加剂416可以是可以在无菌方式添加到第一容器402的任何材料,例如用于细胞生长的营养剂、化学添加剂或用于促进附着的细胞生长的材料。在添加剂416是细胞附着材料的情况下,添加剂可呈任何前述形式,例如呈粉末、颗粒、碎屑、珠、纤维或纤维团块的形式的载体或微载体。添加剂416可以与第一容器402中的流体不可混合,且可以与例如液体培养介质的任何水性流体不可混合。

[0076] 在一个实施例中,系统400进一步包括在第一容器402和第二容器404之间的屏障或密封件。屏障可以是可移除的,以便允许添加剂416从第二容器404通到第一容器402。如在图13中所图示,屏障可呈可移除保持器例如钳或夹406的形式,该可移除保持器防止添加剂416从第二容器404漏出。

[0077] 第一容器402和第二容器404可永久地连接,例如通过连接两个容器的无缝材料来连接。替代地,系统可包括用于将第一容器402连接到第二容器404的连接配合件408。连接配合件408可呈现的形式是用于保持第一容器402或第二容器404上的一个或多个延伸部的夹板或者在第一容器和第二容器之间的阀。一个或多个过滤器(未示出)可与连接配合件或接近系统400任何部分的任何其它端口一起使用。

[0078] 在实践中,第二容器404可填充有添加剂416且如以任何前述方式地连接到第一容器402。这些部件可被单独地消毒且然后以无菌方式连接,或可连接整个系统400且然后同时消毒整个系统400(包括任何添加剂)。在任何情况中,连接的第一容器402和第二容器404造成了被消毒的封闭的系统。此封闭的系统可然后在无论是否无菌的任何环境中使用,而不影响系统400内的无菌性。

[0079] 已消毒的系统400可作为如在图14中所图示的单个单元或作为套件被运输。第一容器402和第二容器404中的一个或多个可被覆盖在例如垫420的保护层中以受到防破坏保护。系统400也可被例如袋422的包装层围绕,以作为单个单元被运输。

[0080] 现在参考图15和16,可认识到的是系统500可包括具有多位置排放部504的器皿502,所述多个位置包括用于防止流动且将器皿502的内部隔间密封的封闭位置和用于允许流动进行的打开位置(如所图示)。可手动或自动调整这些位置,且这对于此公开的目的不

是重要的。这样的排放部的示例可参见美国专利申请公开No.2012/0260608,其公开内容在此通过引用合并。

[0081] 当存在用于促进附着的细胞生长的载体例如珠516时,希望使得此材料在流体F被回收时(包括任何细胞)维持在容器或器皿的隔间中。如果排放部504用于此目的,则应认识到的是珠516或其它材料可能堵塞用作出口的排放部开口且阻碍以希望的方式进行流动。取决于材料的并非完美的相对尺寸和形状,珠516可能也随排出而漏出且导致必需的不希望的进一步的过滤步骤。

[0082] 因此,本公开的一个方面是将排放部与预过滤元件520相关联,该预过滤元件520适合于允许流体F通过但将任何附着材料等保持在器皿502的隔间中。在图示的实施例中,此元件520包括呈网522的形式的柔性材料,网522具有的开口定尺寸为允许流体通过而防止珠516通过。如应认识到,网522的此布置造成了可渗透袋状结构,该可渗透袋状结构形成了与容器的内部隔间相关联的排放部开口和隔间自身之间的缓冲区,且因此用于促进流体的自由流动。网522的柔性属性也允许容易地从容器502的外部例如通过震动或振动来操纵网522。当器皿502包括柔性混合袋且该柔性混合袋可包括用于接收凸缘504a(凸缘504a形成排放部504的部分)的开口时,特别地简化该操纵。

[0083] 在此为阐述和描述的目的给出了根据一定的发明原理的公开而完成的数个实施例的前述描述。所述的实施例不意图于是详尽的或将本发明限制为所公开的精确形式,而是事实上构思了所公开的实施例的部件的任何组合。如在此在反应器的上下文中所使用的术语“柔性”涉及如下结构,即所述结构在不存在辅助支撑的情况下可顺应于反应器中容纳的流体的形状,这与“刚性”结构形成对比,所述刚性结构当流体处于反应器中时保持了预先确定的形状。根据以上教示能够作出修改或变体。例如,虽然分隔部20示出为形成床14的下部分,但可移动部分也可以是顶板或侧壁。所述的实施例选择为提供对于本发明的原理及其实际应用的最佳阐述,以因此使得本领域一般技术人员能以多种实施例考虑为适合于特定使用的多种修改利用本发明。当根据公正地、合法地且等同地赋予权利的宽度解释时,所有这些修改和变体处于本发明的范围内。

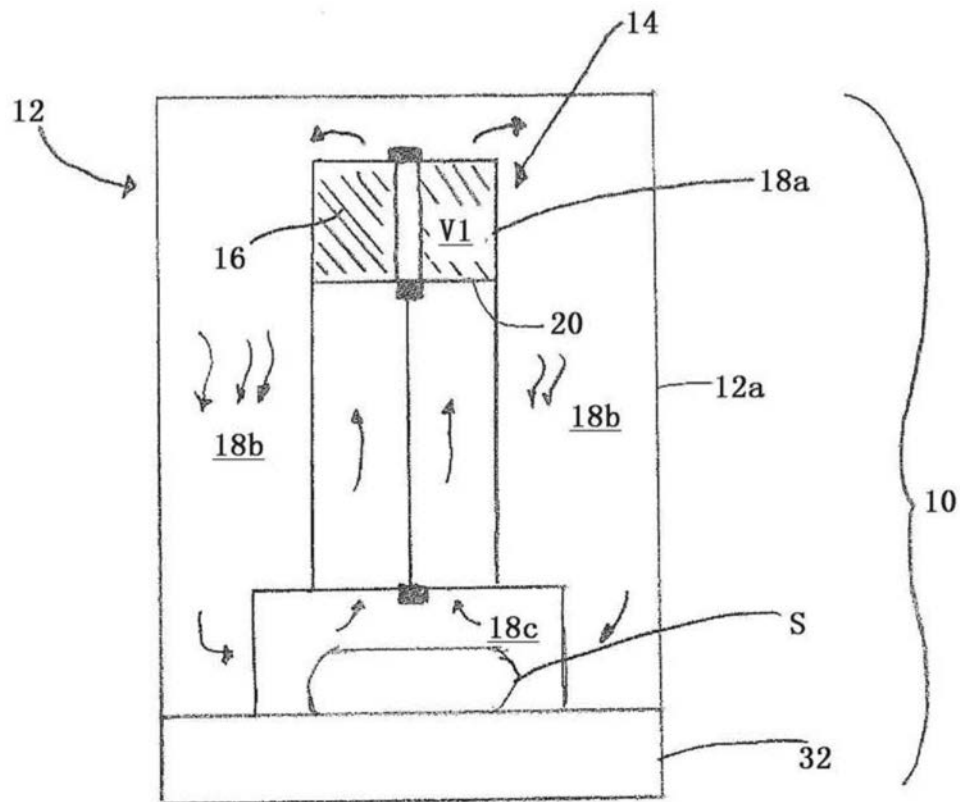


图1

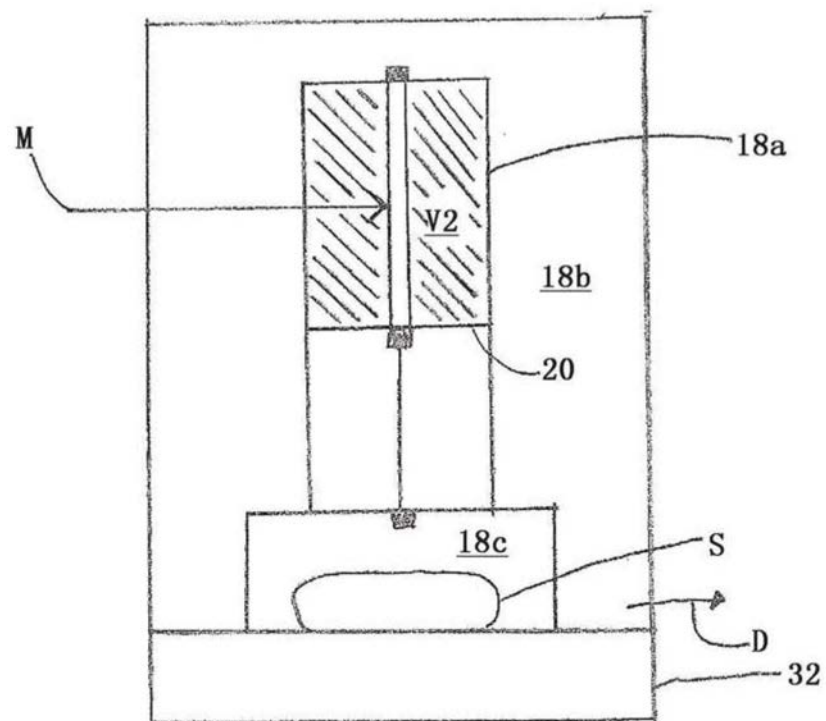


图2

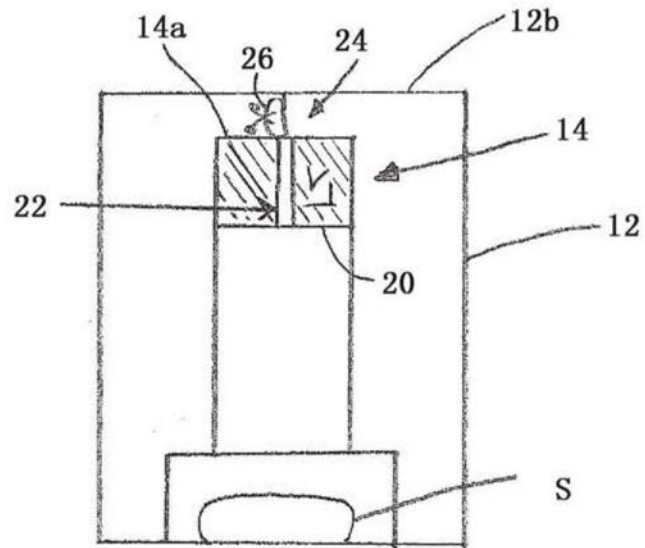


图3

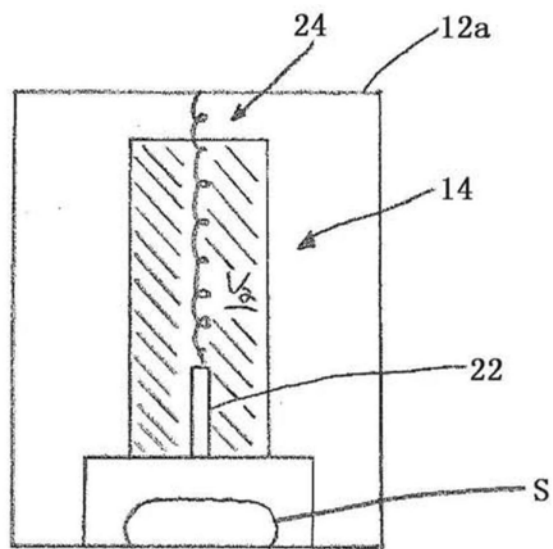


图4

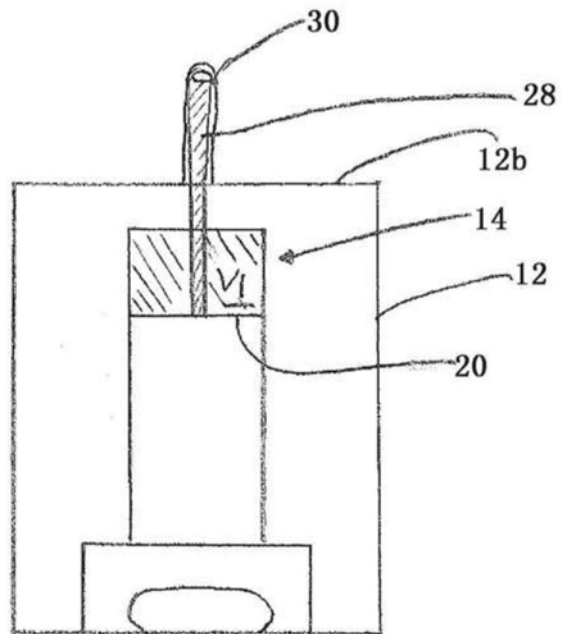


图5

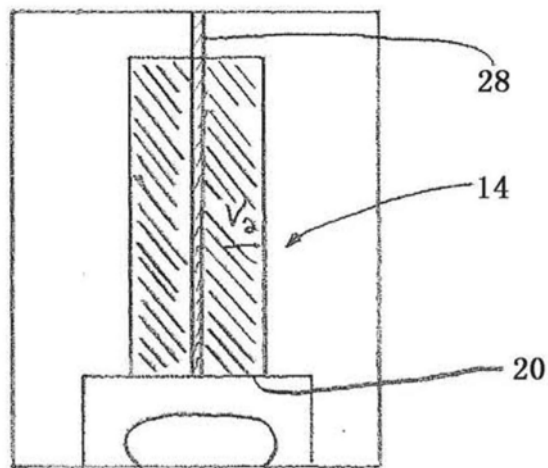


图6

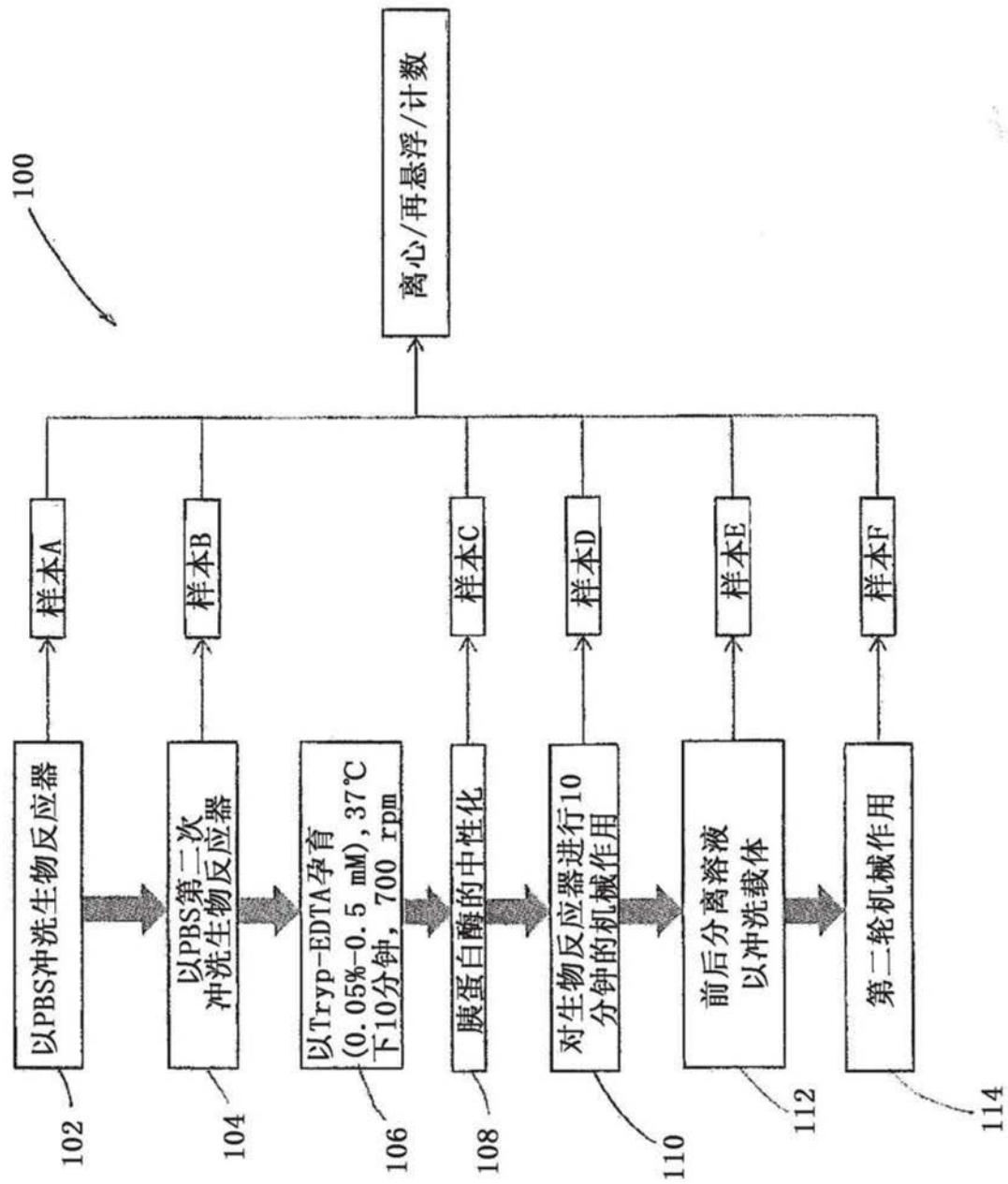


图7

载体上的细胞	分离溶液中的细胞					
	第一次冲洗后 A	第二次冲洗后 B	胰蛋白酶后 C	机械作用后 D	前后三次后 E	第二次机械作用后 F
载体上的细胞 (来自单个载体上的胰蛋白酶测试)						
载体上的细胞 (细胞/cm ²)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
离心的体积 (ml)	20	20	20	20	20	20
最终体积 (ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
平均计数 (活细胞)	0	0	10	74	62	72
分离溶液中的 细胞浓度 (细胞/ml)	0	0	7 000	51 800	43 400	50 400
分离溶液(或生物反应器)中的总细胞	0	0	6.72	48.7	40.8	45.4
生物反应器中的 总细胞的百分比	0	0	14.8	107.5	90.1	100.1

图8

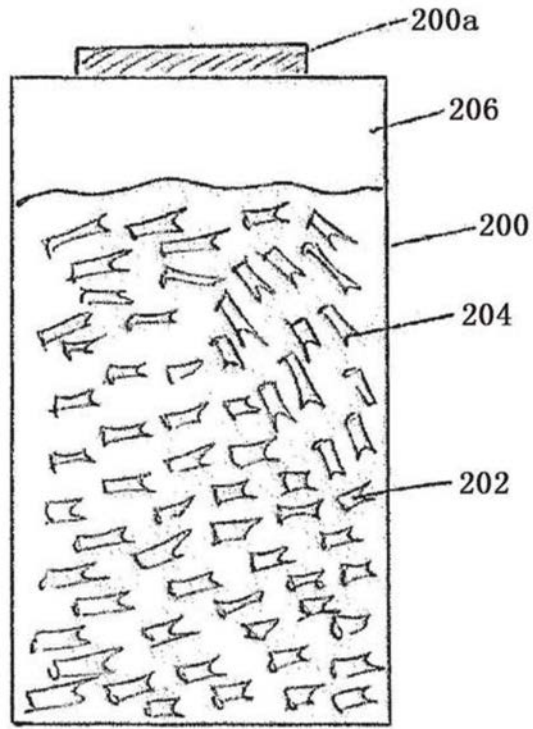
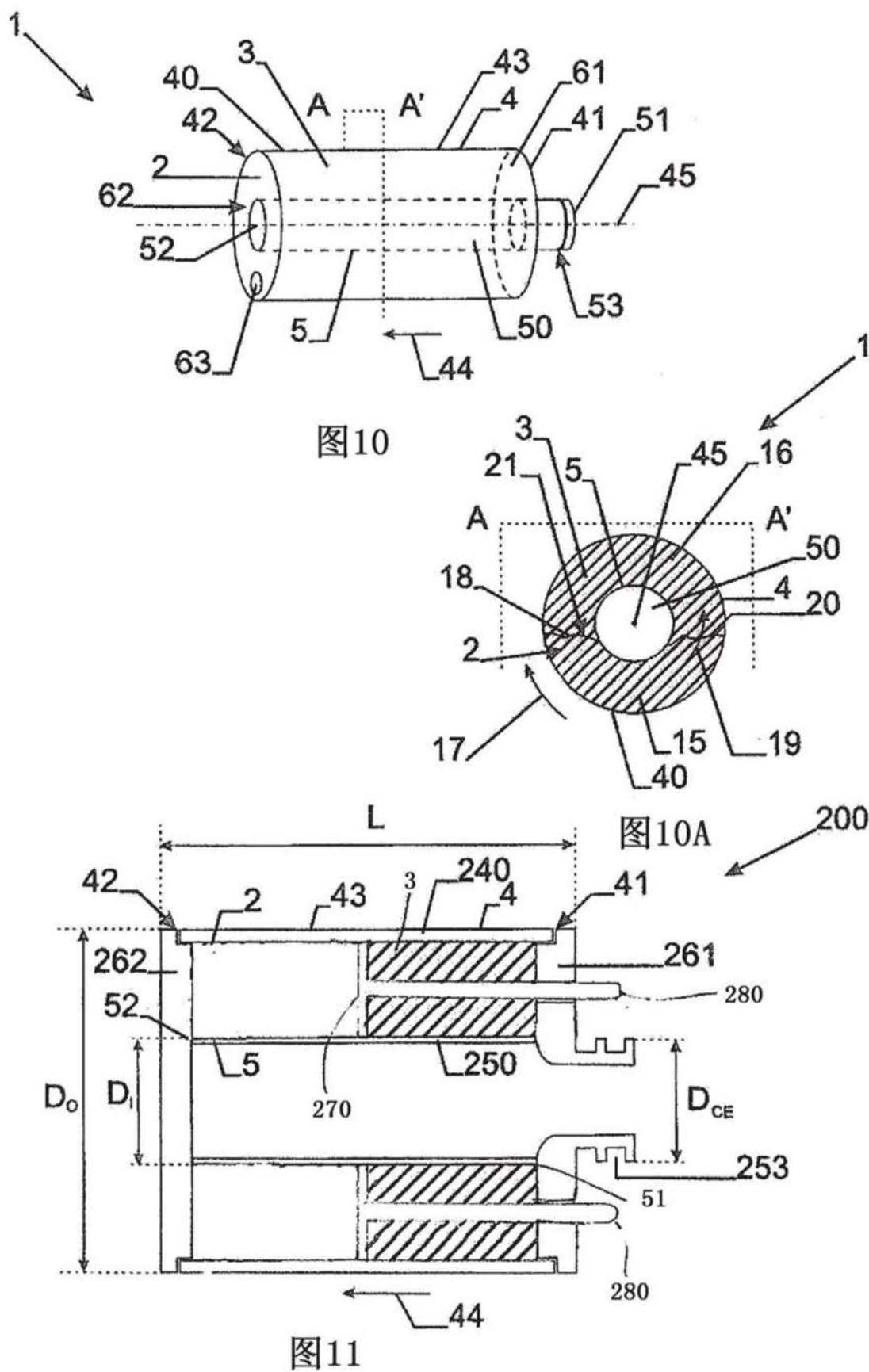


图9



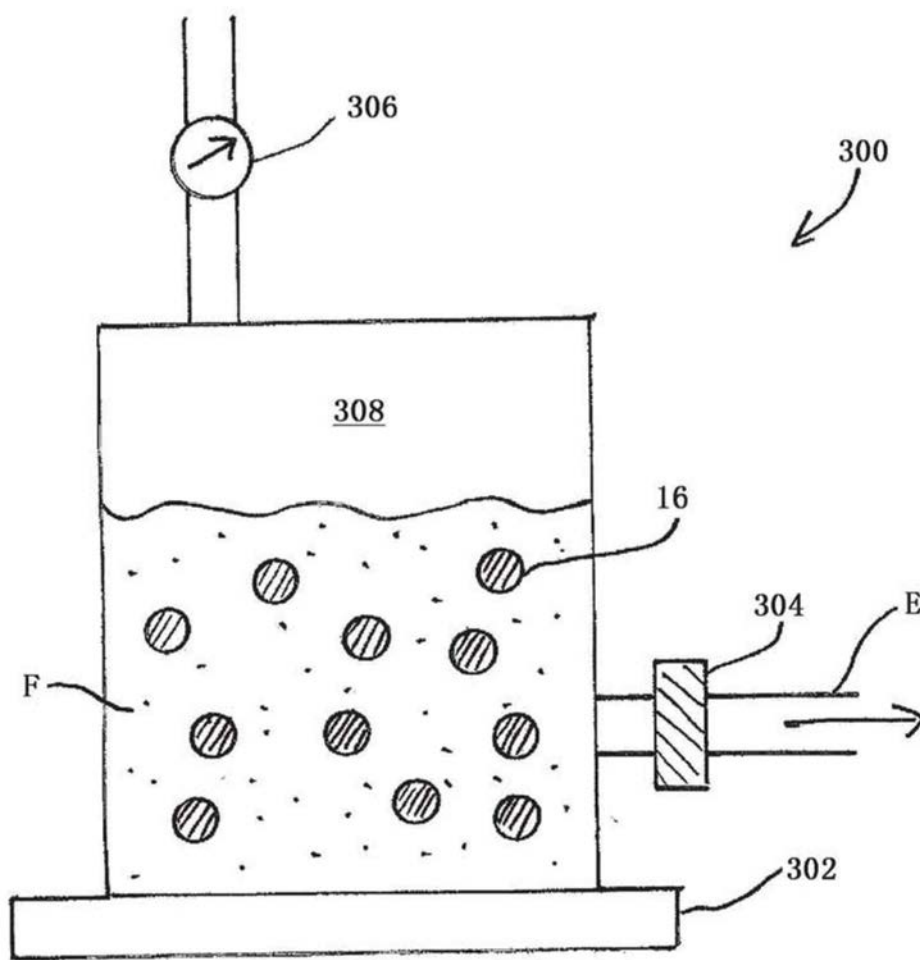


图12

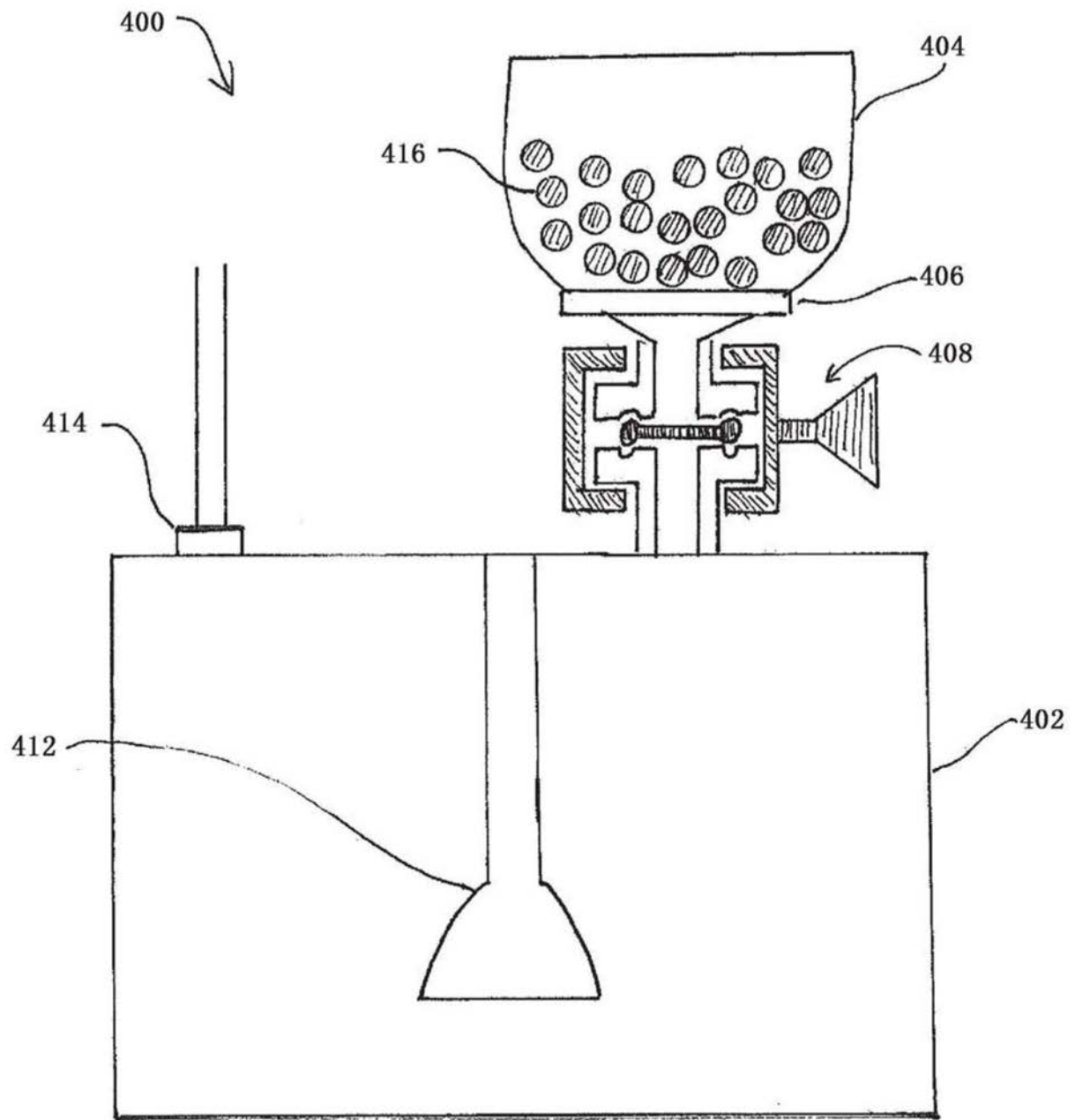


图13

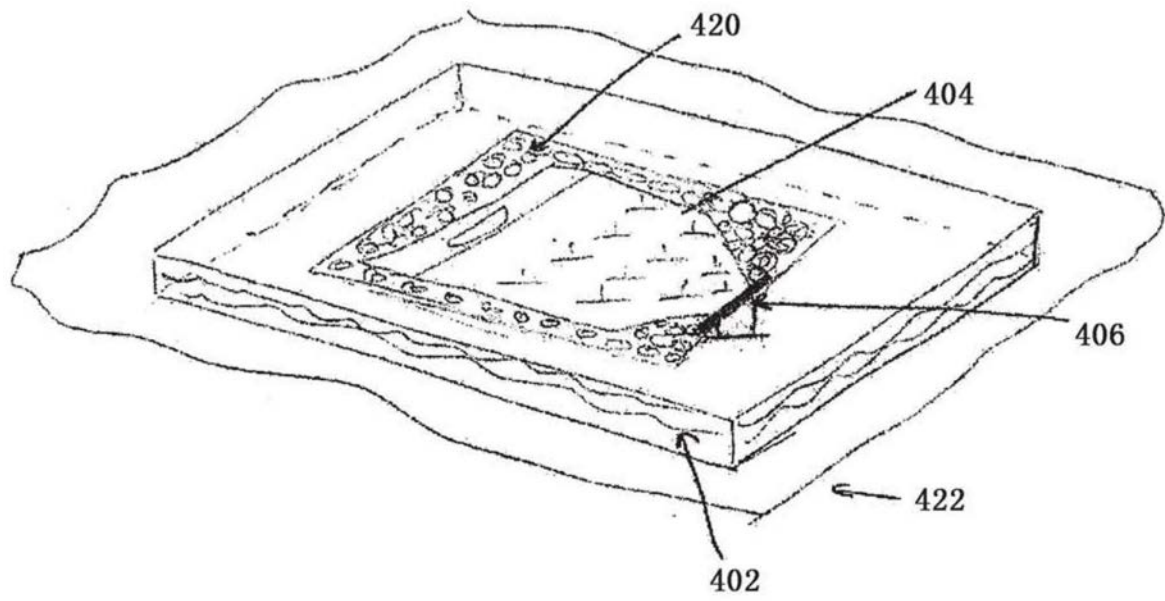


图14

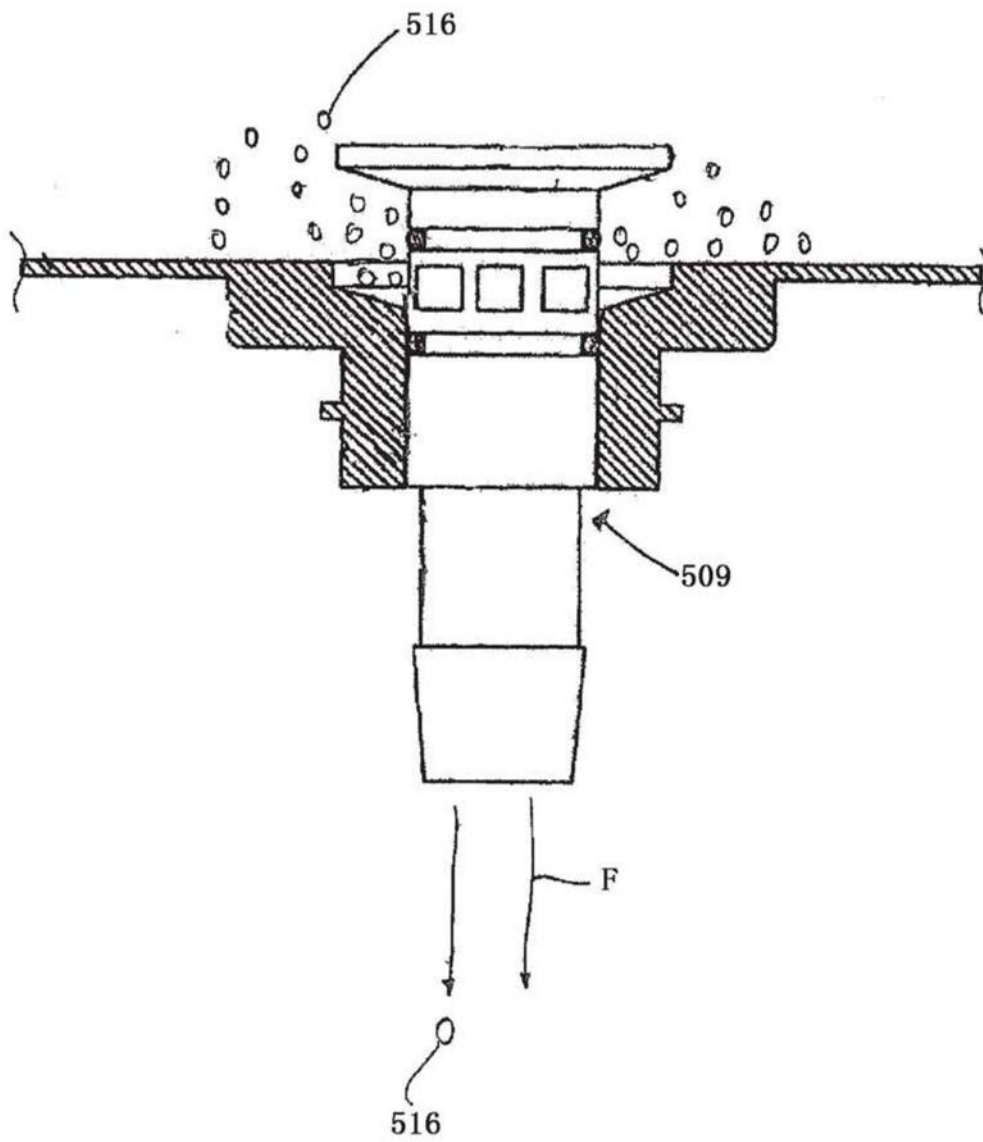


图15

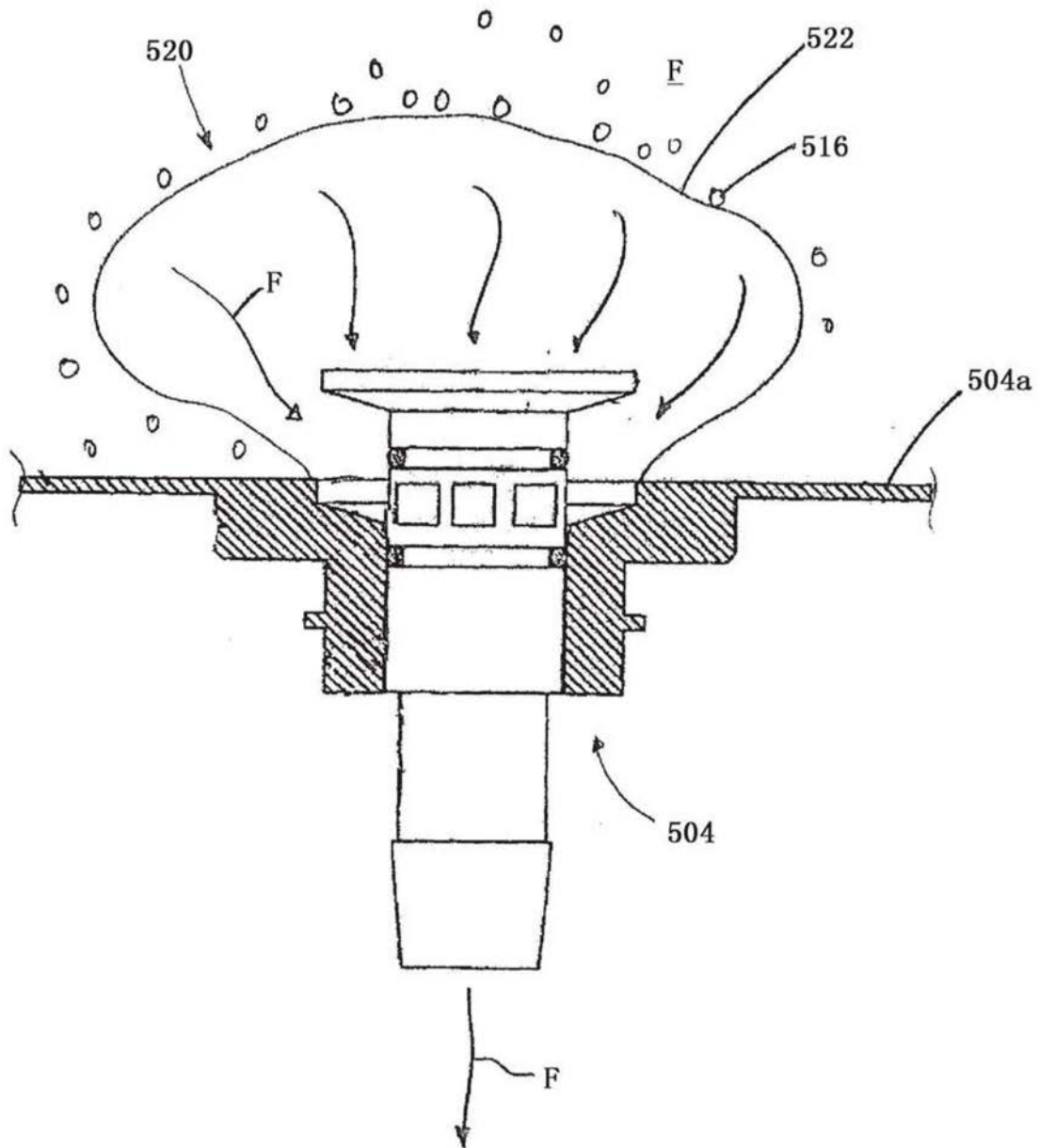


图16