



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102639688 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201080045888. 0

(22) 申请日 2010. 10. 04

(30) 优先权数据

61/250, 758 2009. 10. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 04. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2010/002517 2010. 10. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/045644 EN 2011. 04. 21

(73) 专利权人 泰尔茂比司特公司

地址 美国科罗拉多

(72) 发明人 F·戴尔伯格

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘明海

(51) Int. Cl.

C12M 1/12(2006. 01)

C12M 3/06(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

B01D 67/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5369012 A, 1994. 11. 29, 说明书第 3 栏第 2 段, 第 4 栏第 2, 3, 5 段.

JP 2003245526 A, 2003. 09. 02, 说明书第 8, 9, 22 段.

CN 101203315 A, 2008. 06. 18, 全文.

CN 101549179 A, 2009. 10. 07, 全文.

US 5369012 A, 1994. 11. 29, 说明书第 3 栏第 2 段, 第 4 栏第 2, 3, 5 段.

审查员 吴漾

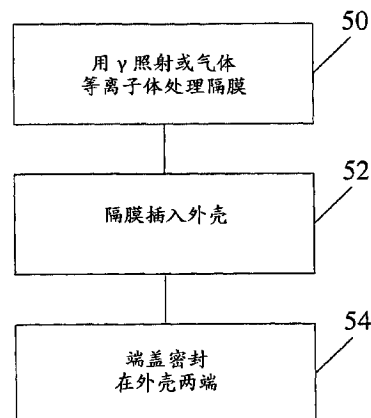
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

组装中空纤维生物反应器的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种组装细胞生长模块, 并且防止在细胞生长模块中形成可能影响细胞生长模块中细胞生长的细胞毒素化学物质的方法。在膜插入外壳前可以使用电磁辐射例如 γ 照射处理膜表面。所述细胞生长模块至少包括膜和外壳。



1. 一种组装包括合成聚合物膜和合成聚合物外壳的细胞生长模块的方法,该方法包括:

使用 γ 照射处理膜以改性膜表面,使得细胞粘附于膜上并且允许膜重新使用,其中膜包括多个中空纤维,当进行 γ 照射时,膜是干的;并且其中用 γ 照射处理膜包括用 175kGy 的 γ 照射剂量处理

在处理步骤后将膜插入外壳;

在插入步骤后将处理的膜封装和

密封外壳每端的端盖形成细胞生长模块,

不需要对膜进一步的表面处理;因此聚合物外壳或外罩不会暴露于电磁辐射,并且因此避免形成抑制细胞生长的细胞毒性产物。

2. 权利要求 1 的方法,其进一步包括在处理步骤前使中空纤维成束。

3. 权利要求 1 的方法,其进一步包括在处理步骤后使中空纤维成束。

4. 权利要求 1 的方法,其中膜由聚乙烯基吡咯烷酮和选自聚砜、聚醚砜或聚芳醚砜及其组合的聚合物组成。

5. 权利要求 1 的方法,其进一步包括:

在密封步骤后将细胞引入到细胞生长模块中;并且

在细胞生长模块中使细胞生长。

组装中空纤维生物反应器的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及在膜表面组装到生物反应器中之前处理膜表面的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在各种医学处理和ations中使用干细胞受到日益增长的关注。细胞增殖系统可用于生长干细胞,以及其它类型的细胞例如可以包括干细胞的骨髓细胞。从供体细胞增殖的干细胞可用于修复或替代损伤或有缺陷的组织,并且被考虑用于治疗广泛范围的疾病。

[0004] 作为细胞增殖系统的重要组件,生物反应器或者细胞生长室在提供用于细胞增殖的最优化环境中起到重要作用。生物反应器提供给细胞高效的营养供给并且除去代谢物,以及提供有益于细胞生长的理化环境。

[0005] 许多类型的生物反应器目前是可获得的。最常见的两种包括平板生物反应器和中空纤维生物反应器。平板生物反应器使得细胞能够在大的平面上生长,而中空纤维生物反应器使得细胞能够在中空纤维的内表面或外表面上生长。多个膜通常一起成束并且包封在外罩或外壳内。

[0006] 用于修复或替代损伤的组织许多细胞是粘附细胞。在本发明的上下文中粘附细胞被定义为附着于基体上的细胞,其将被保持、增殖、区别储存等。间充质干细胞是粘附细胞。与悬浮细胞不同,粘附细胞可以生长并且只有在它们附着于表面时才分开。

[0007] 普遍用于使粘附细胞生长的膜可由天然形成的材料例如纤维素,或者人造材料例如合成聚合物制成。如果膜由合成聚合物材料制成,则在细胞引入体系前必须处理材料的表面以使得细胞能够粘附于膜上。

[0008] 蛋白质例如粘连蛋白或者在血浆中发现的那些是普遍用于涂覆膜的天然形成材料的例子。 γ 照射、电子束接枝聚合和等离子体处理是用于通过辐射化学改性膜表面用于细胞粘附的方法的例子。

[0009] 在纤维包封在外壳中之后,膜通常用蛋白质处理或者照射。如果使用辐射,则改性膜表面所需的高辐射剂量可能造成破坏生物反应器其它组件这种不希望的副作用。生物反应器外壳的破坏可能造成细胞毒性产物释放到细胞生长区域,其可以沥滤到中空纤维中,抑制细胞在生物反应器中生长。现有的实践是在细胞放入生物反应器之前用各种溶液彻底冲洗生物反应器,以除去任何毒性产物。这在使用时使用几升电解质溶液与过夜暴露于含蛋白质的介质中组合进行。

[0010] PCT 申请 PCT/EP2009/006847 (W02010/034466)教导了使用合成 PES/PVP/PA 膜用于生长粘附细胞,其中在制备后使膜在氧的存在下经受 12.5 — 175kGy 剂量的 β 或 γ 射线或者电子束照射。在该发明中,将中空纤维组装到外壳中,封装,并且在使用前作为最后的步骤将组装的生物反应器 γ 射线照射。

[0011] 在实际使用中,本发明的发明人发现,用于处理合成膜的 γ 照射工艺也会损害外壳。照射外壳产生聚合物分解产物,其对细胞有细胞毒性。因此,当使用这种生物反应器时,在细胞引入生物反应器之前必须除去细胞毒性产物。这通过在细胞引入前多次清洗生物反应器进行。

[0012] 防止由于照射膜而由生物反应器形成细胞毒性产物将使得最终使用者在使用前净化生物反应器以及减少由多次冲洗步骤和溶液带来的污染风险方面所花费的时间和材料最小化。本发明涉及防止细胞毒性产物污染生物反应器。

发明内容

[0013] 本发明的目的是用电磁辐射制备聚合物膜表面,同时防止因照射细胞生长模块的聚合物外壳造成的细胞毒性产物的形成。这通过在膜放入聚合物外罩之前用电磁辐射处理膜完成。

[0014] 附图简述

[0015] 图 1 说明了将用于中空纤维生物反应器中的未组装的一束中空纤维膜。

[0016] 图 2 是中空纤维生物反应器的聚合物外壳,包括端盖的外视图。

[0017] 图 3 是包括外壳与内部的中空纤维膜的细胞生长模块的横截面视图。

[0018] 图 4 说明了组装细胞生长模块而不产生细胞毒素的方法。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明的膜具有各种几何形状。尽管在图中示出了中空纤维膜,但本发明的方法可用于所有形式的膜,包括平板膜。在细胞生长体系中中空纤维膜已经表明有利于细胞增殖,因为在这些体系中膜允许对细胞高效的营养供给、废物除去和气体交换。并且,与膜的容积相比,中空纤维提供了大的表面积用于细胞在上面生长。

[0021] 在图中所示的实施方案中,细胞可以生长在中空纤维的内腔或毛细管内空间(IC 空间)内,而细胞生长介质沿着中空纤维的外部或者毛细管外空间(EC 空间)流动。然而,就本发明而言,细胞也可以在 EC 空间中生长,而细胞生长介质在 IC 空间中流动,只要不偏离本发明的精神和范围。

[0022] 图 1 说明了可用于生物反应器的一束聚合物中空纤维膜 12,其包含单个中空纤维 30。可用于制备中空纤维的聚合物材料的例子在下面描述。多个中空纤维被统称为“膜”。术语“生物反应器”和“细胞生长室”可互换使用。

[0023] 在细胞生长室中可以使用任何数目的中空纤维,条件是中空纤维可与细胞生长室的入口孔和出口孔流体连接。

[0024] 中空纤维可由半渗透性的生物相容聚合物材料制成。半渗透性膜允许营养物、废物和溶解的气体通过膜在 EC 空间与 IC 空间之间转移。在多个实施方案中,选择中空纤维膜的分子转移特性以使细胞生长必需的昂贵试剂例如生长因子、细胞因子等从中空纤维的细胞生长侧损失最小化,同时允许代谢的废物通过膜扩散到将除去的非细胞侧。

[0025] 中空纤维 30 可由至少一种憎水聚合物和至少一种亲水聚合物组成。合适的憎水聚合物包括聚醚砜、聚酰胺、聚芳酰胺、聚芳醚砜、聚醚砜、聚砜、聚芳砜、聚碳酸酯、聚醚、聚氨酯、聚醚酰亚胺(polyetherimide)的共混物,和这些聚合物的共聚物。合适的亲水聚合物包括聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙二醇、聚乙二醇单酯、水溶性纤维素衍生物、聚山梨酸酯和聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物。

[0026] 在某些变型中,每一中空纤维的外层特征在于在内层或细胞粘附侧上面具有光滑或低的表面粗糙度的均匀且开孔结构。孔的开口为 $0.5 - 3 \mu\text{m}$ 尺寸范围,并且纤维外表面上的孔数目为 $10,000 - 150,000$ 个孔/ mm^2 。该外层具有约 $1 - 10 \mu\text{m}$ 的厚度。每一中空

纤维中下一层是第二层,其具有海绵结构的形式,并且在本发明另一个实施方案的优选实施方案中,具有约 1 — 15 μm 的厚度。该第二层充当外层的支承。紧接第二层的第三层具有手指状结构的形式。该第三层提供了机械稳定性和高空隙体积,这赋予膜非常低的将分子传输通过膜的阻力。在使用期间,手指状的空隙充满流体并且流体赋予与具有较低空隙体积的海绵填充结构的基质相比较低的扩散和对流阻力。该第三层具有 20 — 60 μm 的厚度。

[0027] 膜例如上述那些可从公司例如 Gambro Dialysatoren GmbH (Hechingen, DE) 和 Membrana GmbH (Wuppertal, DE) 商购获得。

[0028] 如上所述,如果粘附细胞例如间充质干细胞将在细胞生长室中增殖,则该室中的聚合物纤维必须表面改性以增强细胞生长和 / 或细胞对膜的粘附。普遍进行使用天然形成的物质例如纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原的表面改性,然而这种表面处理通常阻碍了生物反应器的重新使用。因此,希望使用 γ -照射或等离子体处理的表面改性,以改性膜表面并且允许膜重新使用。

[0029] 用于处理纤维的 γ 辐射的剂量为 12.5 — 175 kGy。辐射剂量应该足够高以改性膜表面,但不能高至使膜本身分解。 γ 照射可以使用 Co-60 源进行。当进行 γ 照射时,膜可以是湿的或干的,包括从完全没有水到全部浸入水中。尽管施加希望的剂量必需的照射时间的量将随着因素例如照射源的强度而变化,但膜对于 25 千戈瑞剂量可能将需要 6 — 7 小时照射,对于 75 千戈瑞剂量将需要 17 — 20 小时。对于用水饱和的膜,可能需要更高的辐射剂量。膜可以在未改性的空气或者在具有增加的氧的空气中 γ 照射。照射后,膜表面随时可用于直接的细胞附着和生长,没有进一步处理。

[0030] 等离子体处理,特别是气体等离子体处理也可用于改性膜表面。射频辉光放电是气体等离子体处理的一个特定例子。为了开始这种气体等离子体处理,将膜放入真空室并且在低压施加气体。通过使气体经受电感或电容性射频放电产生电磁场或气体等离子体。气体吸收来自电磁场的能量并且发生电离,产生用于改性膜表面的高能粒子。气体等离子体中的带能量粒子包括离子、电子、自由基和短波紫外线范围内的光子,提供了从等离子体到膜表面转移的能量。合适的气体包括无机气体例如氦气、氩气和氧气,以及有机气体例如乙炔和吡啶,或者无机和有机气体两者的混合物。一般而言,10 瓦 — 3000 瓦的功率水平是可接受的,射频频率可以为 1 kHz — 100 MHz,曝光时间为 5 秒 — 12 小时,并且气压可以为 0.001 — 100 托。

[0031] 也可以使用辐射和气体等离子体的组合。

[0032] 图 2 说明了其中可以插入一束处理的中空纤维膜 12 的外壳或外罩 14。外壳 14 包括端盖 16 和 18、入口孔 20 和 24、出口孔 22 和 26,以及套管 15。

[0033] 尽管细胞生长室外壳 14 被描述为圆柱形,但其可以具有本领域已知的任何形状。细胞生长室外壳 14 可以由本领域已知的任何类型的生物相容聚合物材料,例如聚氯乙烯或聚碳酸酯制成。套管 15 和各个组件例如端盖 16、18 和孔 24、26 也通常由生物相容聚合物材料制成。

[0034] 图 3 说明了组装的细胞生长模块 10 的横截面。细胞生长模块 10 包括外壳 14 和一束中空纤维膜 12。中空纤维膜 12 位于细胞生长模块 10 的外壳 14 内部。

[0035] 在组装细胞生长模块 10 中,将单个中空纤维 30 一起成束并且通过连接材料(在此

也称为“封装”或“封装材料”)粘附于细胞生长室的末端。封装可以为任何合适的生物相容材料,条件是不阻碍介质和细胞从入口孔流入中空纤维并且介质和细胞仅流入中空纤维。例举的封装材料包括,但不限于,聚氨酯。在各种实施方案中,中空纤维和封装可以在每一端垂直于中空纤维的中心轴切开,以允许流体流入和流出纤维的内腔。端盖 16 和 18 布置在细胞生长室的每端。

[0036] 图 4 说明了组装细胞生长模块 10 的方法,该方法没有因为外壳 14 暴露于电磁辐射而导致细胞毒素生成。首先,用 γ 照射和 / 或等离子体处理处理纤维 50。随后,将处理的膜 12 插入外壳并且封装 52。最后,将端盖 16 和 18 放在套管 15 的每端并且紧密密封 54。应该注意,在纤维形成用于插入外壳的纤维束之前或之后,可以处理纤维。

[0037] 不需要对膜 12 进一步的表面处理;因此聚合物外壳或外罩 14 不会暴露于电磁辐射,并且因此避免形成抑制细胞生长的细胞毒性产物。

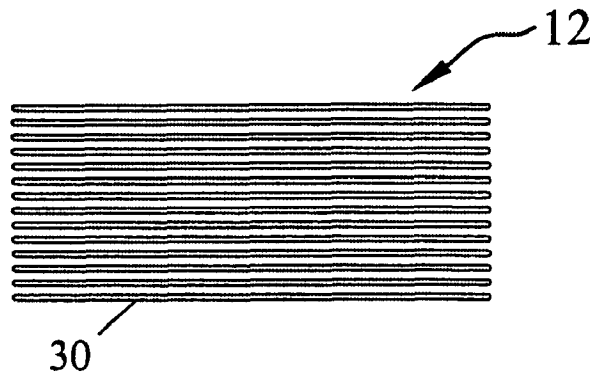


图 1

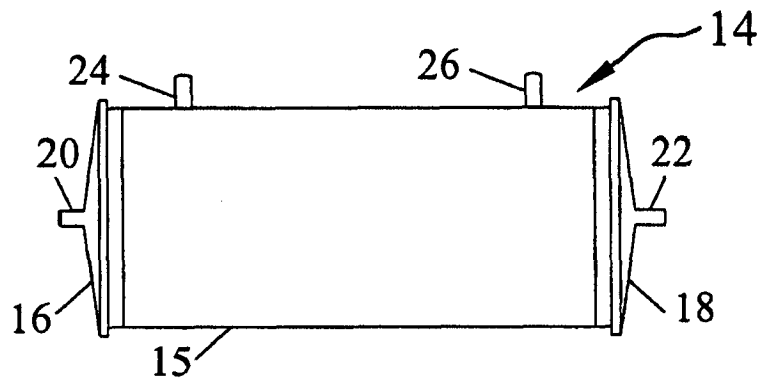


图 2

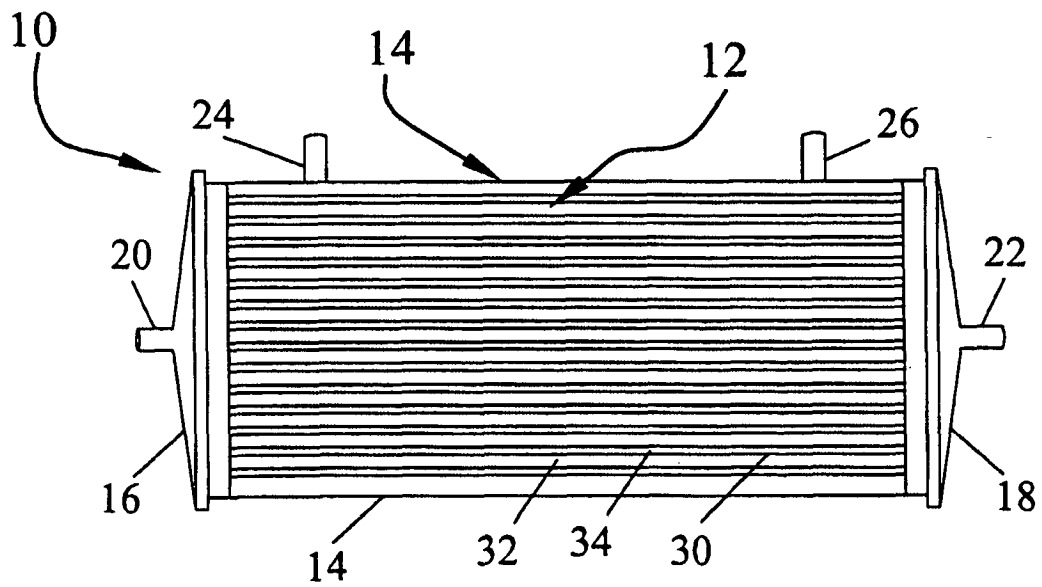


图 3

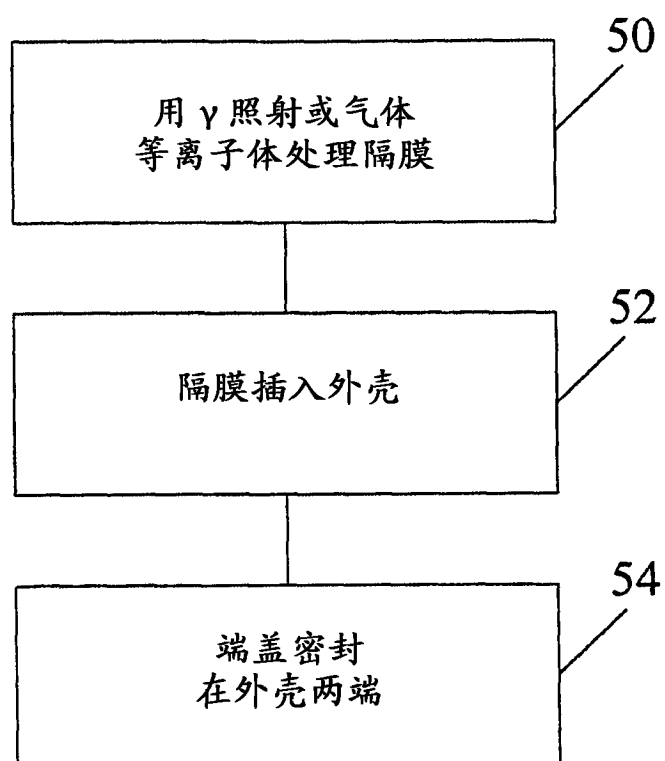


图 4