(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118632923 A
(43)申请公布日 2024.09.10

(21)申请号 202280089959.X

(22)申请日 2022.12.28

(30)优先权数据
63/294,700 2021.12.29 US
63/294,703 2021.12.29 US
18/146,541 2022.12.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/082482 2022.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/129971 EN 2023.07.06

(71)申请人 阿普赛德食品公司
地址 美国加利福尼亚州伯克利亨氏大道804号

(72)发明人 康拉德·穆勒·奥弗曼
史蒂芬·K·许
卡尔·卢克扬·约翰逊 马修·梁
贾扬蒂·拉基雷迪
摩根·劳伦斯·瑞斯
杰西卡·乔斯林

(74)专利代理机构 北京恒律知识产权代理有限公司 11416
专利代理师 解辉

(51)Int.Cl.
C12N 5/07(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)

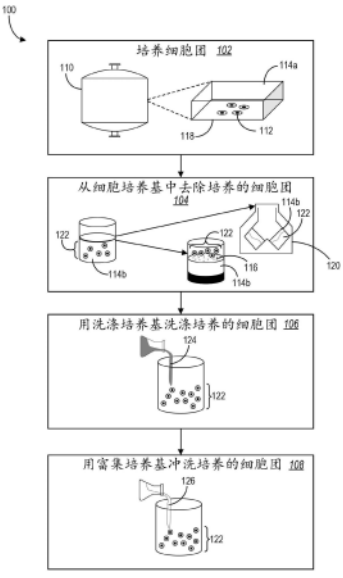
权利要求书3页 说明书20页 附图8页

(54)发明名称

培养细胞团的洗涤和终处理方法

(57)摘要

本公开涉及从培养的细胞团中洗涤细胞以除去细胞培养基并用最终培养基富集细胞的方法。所公开的方法包括在细胞培养基中培养细胞团,然后用一系列随时间变化的洗涤缓冲液或梯度洗涤缓冲液收集和洗涤培养的细胞团。虽然细胞培养基含有有益于细胞生长的营养素和成分,但在细胞培养基中培养的细胞通常具有不良风味、不良香味、颜色不佳、盐/矿物质组成不良和其他缺点。因此,所公开的方法包括使用单一或一系列洗涤培养基从培养的细胞团中去除细胞培养基残留。用终处理或富集缓冲液进一步洗涤培养的细胞团,以进一步改善培养的细胞团的感官方面和营养成分。



CN 118632923 A

1.一种富集培养肉制品的方法,所述方法包括:

在细胞培养基中培养细胞团;

从细胞培养基中去除至少一部分培养的细胞团;

用洗涤培养基洗涤所述培养的细胞团以冲洗掉剩余的细胞培养基;和

用包含营养素的富集培养基冲洗所述培养的细胞团。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述洗涤培养基和所述富集培养基不包含用于刺激所述培养的细胞团生长的生长因子。

3.根据权利要求1所述的方法,还包括通过以下步骤用所述洗涤培养基洗涤所述培养的细胞团:

搅拌培养的细胞团和洗涤培养基;

利用泵使培养的细胞团和洗涤培养基循环;和

利用气体使培养的细胞团和洗涤培养基均化。

4.根据权利要求1所述的方法,其中用所述洗涤培养基洗涤所述培养的细胞团包括使所述洗涤培养基在所述培养细胞团上流动以及使中间培养基流过,所述中间培养基包含随时间浓度增加的富集培养基。

5.根据权利要求1所述的方法,还包括基于阈值增殖阶段完成的培养的细胞团从所述细胞培养基中去除至少一部分所述培养的细胞团。

6.根据权利要求5所述的方法,其中当所述培养的细胞团达到300万个细胞/毫升的活细胞密度或1%至25%之间的红细胞压积中的至少一个时,所述阈值增殖阶段完成。

7.根据权利要求5所述的方法,还包括通过将培养的细胞团暴露于外源性调节剂来刺激阈值增殖阶段的完成。

8.根据权利要求1所述的方法,其中洗涤所述培养的细胞团还包括使所述洗涤培养基在所述培养细胞团上流动并搅拌所述洗涤培养基和所述培养的细胞团。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述洗涤培养基的温度在-5℃至45℃之间并包括-5℃和45℃。

10.一种富集培养肉制品的方法,所述方法包括:

在细胞培养基中培养细胞团;

从所述细胞培养基中去除所述培养的细胞团;和

通过随着时间降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度,用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述富集培养基包含营养素,所述营养素包含维生素、氨基酸、抗氧化剂、蛋白质、碳水化合物或脂肪中的至少一种。

12.一种富集基于细胞的可食食品的方法,所述方法包括:

在细胞培养基中培养细胞团;

用第一交换培养基冲洗所述细胞团;和

用第二交换培养基冲洗所述细胞团。

13.根据权利要求12所述的方法,其中:

用所述第一交换培养基冲洗所述细胞团导致第一组膜渗透溶质扩散出细胞团中的细胞的细胞内空间;和

用所述第二交换培养基冲洗所述细胞团导致第二组膜渗透溶质扩散到细胞的细胞内空间中。

14.根据权利要求12所述的方法,其中所述第一交换培养基相对于所述细胞培养基是低渗的。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述第一交换培养基包括递减的溶质梯度,并且其中所述第一交换培养基从具有较高浓度的溶质的溶液转变为具有较低浓度溶质的溶液。

16.根据权利要求15所述的方法,其中使包括所述降低的溶质梯度的所述第一交换培养基流过所述细胞团提供溶质浓度的逐渐变化,由此减少所述细胞团的细胞上的渗透应力。

17.根据权利要求15所述的方法,其中所述降低的溶质梯度开始于与所述细胞培养基的溶质浓度基本相似的溶质浓度。

18.根据权利要求12所述的方法,其中所述第二交换培养基相对于所述第一交换培养基是高渗的。

19.根据权利要求12所述的方法,其中所述第二交换培养基包括增加的溶质梯度,并且其中所述第二交换培养基从具有较低溶质浓度的溶液转变为具有较高溶质浓度的溶液。

20.根据权利要求19所述的方法,其中使包括所述增加的溶质梯度的所述第二交换培养基流过所述细胞团提供溶质浓度的逐渐变化,从而减少了所述细胞团的细胞上的渗透应力。

21.根据权利要求19所述的方法,其中,所述增加的溶质梯度开始于与所述第一交换培养基的溶质浓度基本相似的溶质浓度。

22.根据权利要求19所述的方法,其中所述增加的溶质梯度包括增加营养素的浓度。

23.根据权利要求22所述的方法,其中:

至少一部分营养素扩散到细胞团的细胞中;和

至少第二部分营养素粘附到细胞的外表面。

24.根据权利要求12所述的方法,其进一步包括用所述第一交换培养基冲洗所述细胞团,直到第一流出物具有与所述第一交换培养基基本相似的组成。

25.根据权利要求12所述的方法,还包括用所述第二交换培养基冲洗所述细胞团,直到第二流出物具有与所述第二交换培养基基本相似的组成。

26.根据权利要求12所述的方法,还包括在冲洗时间段内冲洗所述细胞团。

27.一种完成用于培养的肉制品的细胞团的装置,包括:

培养罐,用于在细胞培养基中培养细胞团;

分离器,用于从细胞培养基、洗涤培养基或富集培养基中的至少一种去除培养的细胞团;和

洗涤罐,用于储存所述培养的细胞团并使所述洗涤培养基或所述富集物中的至少一种在所述培养细胞团上流动。

28.根据权利要求27所述的装置,其中所述分离器包括离心机或过滤器中的至少一个。

29.根据权利要求27所述的装置,还包括热交换器,所述热交换器用于将培养的细胞团冷却到其最佳生长温度以下。

30.根据权利要求27所述的装置,还包括搅拌器,所述搅拌器用于搅拌所述培养的细胞

团和所述细胞培养基、所述洗涤培养基或所述富集培养基中的至少一种。

培养细胞团的洗涤和终处理方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年12月27日提交的题为“培养细胞团的洗涤和终处理(finishing)方法”的申请号为18/146,541的美国临时专利申请的优先权。本申请要求于2021年12月29日提交的题为“培养细胞团的洗涤和终处理方法”的申请号为63/294,703的美国临时专利申请的优先权。本申请还要求于2021年12月29日提交的题为“对在水凝胶中培养的细胞加压以诱导肥大的方法”的申请号为63/294,700的美国临时专利申请的优先权。上述申请的全部内容通过引用合并于此。

背景技术

[0003] 随着世界人口的持续增长,用于消费的细胞或培养肉制品已成为传统动物肉的一种有吸引力的替代品(或补充品)。例如,基于细胞的、培养的(cultivated)或培养的(cultured)肉类代表了一种可以满足人类特定饮食需求的技术。因为细胞肉的细胞是实验室培养的,所以实验室制备细胞肉的方法可以改变必需氨基酸和脂肪的含量,并丰富肉中的维生素、矿物质和生物活性化合物。在某些情况下,基于细胞的肉制品可以由来源于非人动物的培养的贴壁细胞和悬浮细胞的组合制备,这有助于这种改变和富集。

[0004] 除了满足饮食需求外,基于细胞的肉制品还有助于缓解与人类、牲畜和环境的传统肉制品相关的一些缺点。例如,传统肉类生产涉及与畜牧业和屠宰相关的有争议的做法。与传统肉类生产相关的其他缺点包括输入到可食用营养素的热量转化率低、产品的微生物污染、兽医和人畜共患疾病的出现和传播、相对的自然资源需求以及由此产生的工业污染物,如温室气体排放和氮废物流。

[0005] 尽管在生产细胞肉制品方面取得了进展,但现有的培养和加工细胞肉制品的方法仍面临一些缺点,例如难以模仿传统肉类的风味和营养成分。现有的方法通常会导致最终的基于细胞的肉制品具有与动物屠宰肉不同的风味、香气或颜色。作为一个示例,现有的方法可以包括在含有对肉细胞风味产生负面影响的化合物的生长培养基中培养肉细胞。生长培养基通常含有芳香族氨基酸,这些氨基酸可以降解或氧化成主要化合物和次要化合物的复杂混合物,包括醛、醇和酮。醛类、酮类和醇类会产生不理想的香气(如“湿狗味”)或风味,如酸腐气味或风味。除了不同的香气或风味外,现有的方法有时会生产出具有一致且近乎同质的粉红色的细胞肉制品,这种肉制品缺乏一些天然的红色或其他屠宰肉的色调。

[0006] 此外,与传统肉类相比,使用现有方法培养的肉细胞往往缺乏营养成分。传统肉类通常含有高度易消化的蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质。部分原因是缺乏血液提供的营养素,现有的方法通常会产生缺乏传统肉类中许多营养素的细胞肉制品。此外,浸泡在生长培养基中的基于细胞的肉制品也可能表现出过高的渗透压或盐矿物成分,这与屠宰肉不同。

[0007] 这些以及其他问题和问题存在于现有的培养基于细胞的肉制品的方法中。

发明内容

[0008] 本公开一般描述了从培养的细胞团中洗涤细胞以除去细胞培养基并用收获培养

基富集细胞的方法。具体地,所公开的方法包括在细胞培养基中培养细胞团,然后用一系列洗涤缓冲液或随时间变化的梯度洗涤缓冲液收集和洗涤培养的细胞团。一种这样的洗涤缓冲液可以取代或去除细胞培养基。另一种洗涤缓冲液可以采用收获缓冲液的形式,以改善培养细胞团的细胞的质地和营养成分。此外或可替代地,所公开的方法可以通过随着时间降低洗涤培养基的浓度和增加终处理培养基的浓度来使用梯度洗涤缓冲液。无论是单独应用还是作为梯度混合物应用,所公开的方法都可以用洗涤培养基洗涤培养的细胞团,并用收获培养基冲洗培养的细胞团,以去除或稀释细胞培养基残余物,氧化不合适的风味和香气,改善颜色,和/或用营养素增加细胞培养的细胞团的营养价值。

附图说明

[0009] 详细描述参考下面简要描述的附图。

[0010] 图1显示了根据本公开的一个或多个实施方案的使用洗涤培养基和富集培养基洗涤和富集培养的细胞团的概述图。

[0011] 图2显示了根据本公开的一个或多个实施方案的细胞阈值增殖阶段完成的示例性特征。

[0012] 图3显示了根据本公开的一个或多个实施方案的多次洗涤方法和梯度洗涤方法。

[0013] 图4显示了根据本公开的一个或多个实施方案的包括用于洗涤和富集培养的细胞团的各种组分的示例系统。

[0014] 图5显示了根据本公开的一个或多个实施方案的示例性洗涤培养基组合物和示例性富集培养基组合物。

[0015] 图6显示了根据本公开的一个或多个实施方案第一交换培养基和第二交换培养基流过细胞团的细胞。

[0016] 图7显示了根据本公开的一个或多个实施方案使用洗涤培养基和富集培养基洗涤和富集培养的细胞团的系列操作。

[0017] 图8显示了根据本公开的一个或多个实施方案使用梯度洗涤培养基洗涤和富集培养的细胞团的系列操作。

[0018] 图9显示了根据本公开的一个或多个实施方案用交换培养基冲洗细胞团的系列操作。

具体实施方式

[0019] 本公开描述了用于洗涤和制备培养的细胞团以改善基于细胞的肉制品的质地、风味和香气的方法的一个或多个实施方案。所公开的方法包括培养细胞团并在培养的细胞团完成阈值生长阶段之后收获培养的细胞团。培养的细胞团可以被收集并从细胞培养基中分离。无论是在单独的洗涤培养基中应用还是作为梯度洗涤培养基应用,所公开的方法都可以用移除残留细胞培养基的第一洗涤缓冲液组合物洗涤培养的细胞团,然后用含有营养素的终处理缓冲液漂洗培养的细胞团以富集培养的细胞。

[0020] 为了说明,所公开的方法包括在细胞培养基中培养细胞团,从细胞培养基移除培养的细胞团,用洗涤培养基洗涤培养的细胞团以冲洗掉剩余的细胞培养基,以及用包含有利于人类食用的营养素的富集培养基漂洗培养的细胞团。在一些实施方案中,所公开的方

法包括通过降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团,而不是使用单独的洗涤培养基和单独的富集培养基。

[0021] 如上所述,所公开的方法包括培养细胞团。细胞可以在生长环境中生长,例如在生物反应器中生长。更具体地,悬浮细胞和/或贴壁细胞可以在细胞培养基的存在下生长。如下面进一步解释的,细胞培养基包括用于细胞生长的能量源和化合物。

[0022] 在培养细胞团之后,所公开的方法还包括当细胞已经完成阈值增殖阶段时洗涤细胞。通常,当细胞已经减缓或停止指数增殖时,细胞完成阈值增殖阶段。已经完成阈值增殖阶段的细胞可以具有不同的特征。例如,所公开的方法可以包括评估细胞密度、细胞代谢、细胞培养基中存在的化合物和其他因素,以确定细胞是否已经完成阈值增殖或阈值生长阶段并成为培养的细胞团。

[0023] 如上所述,可以使用洗涤培养基洗涤培养的细胞团。在一些实施方案中,所公开的方法包括使用一系列洗涤培养基。无论应用于单独的洗涤培养基中还是作为梯度洗涤培养基,洗涤培养基都可以通过例如使洗涤培养基在培养的细胞团上流动或将洗涤培养基喷洒在培养的细胞团上、将培养的细胞团浸入洗涤培养基中或使用一些其他合适的洗涤方法来将细胞培养基从培养的细胞团中移除或去除。在洗涤之后或作为洗涤的一部分,所公开的方法可以进一步搅拌培养的细胞团和洗涤培养基。

[0024] 在洗涤培养的细胞团之后或作为洗涤培养的细胞团的一部分,所公开的方法还可以使用富集培养基来富集培养的细胞团。通常,富集培养基含有维生素、氨基酸、抗氧化剂、脂肪(例如油或脂肪细胞)和/或其他化合物,以提高基于细胞的肉制品的质量。在某些情况下,富集培养基也会增加或改变培养细胞团的颜色。富集培养基作为培养细胞团中培养细胞的最后的或最终处理,以增加培养细胞的营养价值,同时平衡洗涤后的培养细胞团内的成分。

[0025] 当用洗涤培养基和/或富集培养基洗涤时,可以使用一系列培养基或梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团。例如,所公开的方法可以包括用洗涤培养基洗涤细胞、去除洗涤培养基和添加富集培养基。在其他实施方案中,所公开的方法包括用梯度洗涤培养基洗涤细胞,其中梯度洗涤培养基在细胞上流动设定时间,并且梯度洗涤培养基的组成随时间变化。例如,可以通过随着时间降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度来应用梯度洗涤培养基。

[0026] 相对于未加工的细胞培养物或其他现有的和未加工的基于细胞的肉类,所公开的方法提供了一些益处。通过使用洗涤培养基洗涤培养的细胞团,所公开的方法去除细胞培养基并赋予细胞风味或香气的化合物,所述风味或香气是屠宰肉的非特征性的(或不同的)。洗涤培养基还可以调节培养的细胞团内的离子和pH平衡,以制备用于富集培养基的培养细胞团。

[0027] 除了改善基于细胞的肉类的风味或香气外,相对于现有和未加工的基于细胞的肉,所公开的方法还改善了基于细胞的肉品的营养成分。特别是,所公开的方法包括在细胞已经在细胞培养基中培养并冲洗掉部分或全部细胞培养基后,用含有营养素的富集培养基冲洗培养的细胞团。在一些实施方案中,培养的细胞团从富集培养基中吸收维生素、氨基酸、抗氧化剂、脂肪和/或其他有益化合物。富集培养基的使用改善了最终的基于细胞的肉制品的营养成分。

[0028] 如以上讨论所示,本公开利用各种术语来描述所公开的方法的特征和优点。现在提供关于这些术语的含义的更多细节。例如,如本文所用,术语“细胞团”是指包括肉细胞的团。特别是,细胞团是指培养肉细胞聚集成集团。如下所述,细胞团可包括不同的细胞类型,如成肌细胞、成膜血管细胞、肌成纤维细胞、间充质干细胞、肝细胞、成纤维细胞、周细胞、脂肪细胞、上皮细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、多能干细胞、体干细胞、内皮细胞或其他类似细胞类型中的一种或多种。例如,细胞团可以包括生长在外壳(例如室、外壳、容器等)内的培养肉的细胞片。

[0029] 相关地,术语“培养的细胞团”是指包含一个或多个培养的细胞的细胞团。例如,培养的细胞团包括已经被生长培养基(例如,细胞培养基)滋养以在生长时期培养的一组细胞。在某些情况下,培养的细胞团包括已经完成生长时间段的细胞团。

[0030] 如本文进一步使用的,术语“细胞”是指肉的单个细胞。具体地,细胞可以包括不同的细胞类型,例如成肌细胞、成膜血管细胞、肌成纤维细胞、间充质干细胞、肝细胞、成纤维细胞、周细胞、脂肪细胞、上皮细胞、软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、多能干细胞、体干细胞、内皮细胞或其他类似细胞类型中的一种或多种。此外,细胞可以包括不同类型的祖细胞,包括肌源性祖细胞、脂肪源性祖细胞、间充质祖细胞或其他类型的祖细胞。

[0031] 如本文进一步使用的,术语“细胞培养基”或“生长培养基”是指包含支持细胞生长的化合物的液体或凝胶。具体地,细胞培养基包括能量源和调节细胞周期的化合物。例如,细胞培养基可以含有氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖、溶解气体、血清、生长因子、激素和附着因子。细胞培养基还有助于维持细胞生长和增殖阶段间的pH和渗透压。

[0032] 如本文所用,术语“洗涤培养基”是指在细胞生长成培养的细胞团后用于洗涤细胞的液体。特别是,洗涤培养基可用于从培养的细胞团冲洗细胞培养基。例如,洗涤培养基可以包括磷酸盐缓冲盐(PBS)、柠檬酸、柠檬酸/二钾缓冲液或其他冲洗或洗涤培养的细胞团的溶液。

[0033] 相比之下,术语“富集培养基”是指在细胞生长成培养的细胞团后用于富集细胞的液体。特别是,富集培养基含有可添加到培养的细胞团中以改善营养成分或以其他方式提高生长的细胞体质量以供食用的成分。例如,富集培养基可以包括营养素,如维生素、氨基酸、抗氧化剂、脂肪或其他对健康或营养饮食很重要的化合物。在某些情况下,富集培养基可能不包括细胞生长所需的营养素。

[0034] 如本文所用,术语“营养素”是指细胞或生物体用于生存、生长或繁殖的物质。营养素也可以指动物细胞或生物体生存、生长或繁殖所需的物质。例如,营养素可以包括添加到细胞、生物体或人类生存、生长和繁殖所需的细胞中的维生素、矿物质、氨基酸、抗氧化剂或脂肪。

[0035] 如本文所用,术语“梯度洗涤培养基”是指具有洗涤培养基和富集培养基梯度的液体。具体地,梯度洗涤培养基可以指包括动态梯度的液体,该动态梯度改变以降低洗涤培养基的浓度并增加富集培养基的浓度。例如,梯度洗涤培养基可以指在第一时间包含100%洗涤培养基、在中间时间降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度的液体,以及在稍后时间包含100%富集培养基的液体。

[0036] 如本文所用,术语“培养罐”是指用于培养细胞的容器。具体地,培养罐是指能够容纳细胞和细胞培养基的环境。例如,培养罐可以包括生物反应器系统。

[0037] 如本文进一步使用的,术语“分离器”是指用于分离材料的装备或方法。具体地,分离器是指用于将培养的细胞团与液体或凝胶分离的装置,所述液体或凝胶包括细胞培养基、洗涤培养基、富集培养基和其他培养基。例如,分离器可以包括用于沉淀的离心机、过滤器、筛网或凝结剂。

[0038] 如本文所用,术语“洗涤罐”是指用于洗涤细胞的容器。具体地,洗涤罐是指容纳培养的细胞团和洗涤培养基或富集培养基中的至少一种的容器。例如,洗涤罐可以包括具有一个或多个开口的罐,用于添加和移除洗涤或富集培养基。

[0039] 如本文进一步使用的,术语“交换培养基”是指包含刺激物质向细胞内和/或从细胞外扩散的化合物的液体或凝胶。具体地,交换培养基可以包括不同浓度的膜渗透溶质。当细胞暴露于交换培养基时,膜渗透的溶质可以从高浓度区域穿过细胞膜到达低浓度区域。例如,交换培养基可以包括高浓度的营养素以扩散到细胞的细胞内空间中。在另一个示例中,交换培养基包括低浓度的溶质,以使细胞内的物质离开细胞。

[0040] 如本文进一步使用的,术语“低渗”是指相对于另一溶液或细胞中的溶质浓度,具有相对较低溶质浓度的溶液的性质。具体地,相对于另一种溶液,低渗溶液包括较低浓度的膜渗透溶质。在一些示例中,低渗溶液包含的膜渗透溶质浓度低于在交换培养基或细胞培养基中发现的浓度。例如,第一交换培养基可以包括刺激膜渗透溶质离开细胞的低渗溶液。

[0041] 如本文进一步使用的,术语“高渗”是指相对于另一溶液或细胞中的溶质浓度,具有相对较高溶质浓度的溶液的性质。具体地,高渗溶液包含相对于细胞培养基或交换培养基更高浓度的膜渗透溶质。例如,高渗交换培养基可以包括相对高浓度的膜渗透溶质,其进入细胞团内细胞的细胞内空间。

[0042] 现在将关于描述所公开的方法的示例实施方案和实现方式的说明书附图提供关于所公开方法的附加细节。例如,图1示出了根据一个或多个实施方案的在所公开的方法中洗涤培养基中洗涤细胞和在富集培养基中漂洗细胞的操作的概述。具体地,图1示出了系列操作100,包括使细胞团培养的操作102、从细胞培养基中去除培养的细胞团的操作104、用洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作106以及用富集培养基漂洗培养的细胞团的操作108。

[0043] 如图1所示,系列操作100包括培养细胞团的操作102。在一些情况下,操作102包括在细胞培养基114a中培养细胞112。例如,在一些示例中,细胞112在生物反应器110中培养。细胞112可以包括悬浮在细胞培养基114a中的悬浮细胞。附加地或可选地,细胞112包括附着到基底118的贴壁细胞。在一些实施方案中,操作102包括使细胞生长直到其完成阈值生长或阈值增殖阶段。图2和相应段落详细描述了根据一个或多个实施方案的已经完成阈值生长阶段的细胞的特性。

[0044] 在一个示例中,培养细胞团的操作102包括用细胞和细胞培养基填充生物反应器110至20%体积。为了说明,如果生物反应器110是1千升罐,则操作102包括添加200L细胞和细胞培养基。所公开的方法可以包括在生长期开始时相对高浓度的细胞(例如15-30%)。允许细胞生长并达到指数生长。在实现指数生长之后,所公开的方法包括用细胞培养基填充生物反应器110至其体积的100%。在其他实施方案中,所公开的方法包括用不同体积的细胞和细胞培养基填充生物反应器110。

[0045] 系列操作100还包括从细胞培养基中去除培养的细胞团的操作104。具体地,操作104包括将培养的细胞122与细胞培养基114b分离。培养的细胞122可以包括来自培养的细

胞团的细胞,这些细胞聚集在一起或者分散在整个环境中。如图所示,所公开的方法可以包括使用离心机120或过滤器116。例如,操作104可以包括使用离心机120从细胞培养基114b分离培养的细胞122。在一个或多个实施方案中,通过离心从细胞培养基中去除细胞团是从细胞培养基中分离悬浮细胞的优选方法。因为悬浮细胞是在溶液中生长的,所以它们通常需要更多的离心来分离额外的液体。因此,所公开的方法可以包括基于培养的细胞是悬浮细胞而增加的离心时间或循环。类似地,团聚体的样品,或在悬浮液中生长为部分组织片的细胞,相对于贴壁细胞的样品,通常包括更高比例的细胞培养基。因此,所公开的方法可以包括基于作为团聚体的细胞增加离心时间或循环。

[0046] 如图所示,离心机120可以包括连续离心机或分批离心机。在连续流离心中,对大量的材料进行离心处理,无需分批离心那样填充和倾析大量离心管。在某些情况下,当使用离心机时,培养的细胞和细胞培养基的混合物不断流入转子,转子以选定的运行速度运行。细胞从携带细胞培养基离开细胞的流动流中沉淀出来。在优选的实施方案中,离心机在细胞裂解和细胞死亡风险低的速度下操作,由此细胞在从细胞培养基分离后基本保持完全完整。

[0047] 与连续离心相比,在某些情况下,分批离心可能具有形成具有相对较高细胞浓度的细胞沉淀的优点。例如,在没有(或几乎没有剩余的)细胞培养基的情况下,分批离心可能导致近100%的红细胞压积。然而,与连续离心相比,分批离心效率较低,因为它会消耗更多的时间。

[0048] 在一些实施方案中,从细胞培养基中去除培养的细胞团的操作104可以包括利用过滤器116将培养的细胞122与细胞培养基114b分离。具体地,过滤器116是半渗透膜,其充当保持培养的细胞122同时允许细胞培养基114b通过的屏障。在一些实施方案中,所公开的方法使用膜过滤从细胞培养基中分离悬浮细胞。

[0049] 在一些实施方案中,将从细胞培养基中去除培养的细胞团的操作104替换为用洗涤培养基稀释或移除细胞培养基的操作。例如,可以简单地用洗涤培养基淹没培养的细胞团以稀释和/或移除细胞培养基。这可以通过将细胞培养基和洗涤培养基的分离组合成单个操作而有益地减少分离(例如通过离心)操作的数量。

[0050] 除了过滤器或作为过滤器的实施方案,操作104可以包括使用筛分和/或沉淀。筛分就像过滤,因为太大而无法通过筛网孔的细胞会被保留下来。所公开的方法可以包括使用直线筛和/或振动筛。所公开的方法可以进一步包括若干层筛以分离组织和微粒。

[0051] 此外,或者作为过滤的替代,操作104可以进一步包括絮凝或沉淀。絮凝或沉淀可能是从细胞培养基中分离细胞团聚体或簇的优选方法。在絮凝/沉淀过程中,加入混凝剂将细胞收集成团聚体。例如,所公开的方法可以包括添加聚合物、多价阳离子、金属盐或其他化合物以使培养的细胞122聚集。在聚集细胞之后或同时,所公开的方法可以排出或滤出细胞培养基。

[0052] 在一个或多个实施方案中,所公开的方法利用一种或多种上述方法从细胞培养基中去除细胞团。例如,所公开的方法可以通过利用絮凝、离心和/或过滤的组合来执行操作104,以从细胞培养基中分离培养的细胞122。

[0053] 在一些实施方案中,操作104是任选的,并且所公开的方法不包括从细胞培养基中去除细胞团的操作。例如,在一些实施方案中,培养的细胞团包括生长为薄片的组织或细

胞。组织可以包括在培养过程中附着在基质上的贴壁细胞。在这种情况下,在增殖阶段之后,可以简单地将细胞培养基从罐中排出,使细胞组织以相对干燥的形式附着在基质上,然后准备洗涤。因此,所公开的方法可以从培养细胞团的操作102进行到用洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作106。在这样的实施方案中,所公开的方法可以包括对培养的细胞团和洗涤培养基的额外搅拌(例如,混合或倒置),以确保细胞组织不形成容纳捕获的细胞培养基的袋。

[0054] 如图1所示,系列操作100还包括用洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作106。具体地,洗涤培养基124在培养的细胞122上流动或喷洒。洗涤培养基124从培养的细胞122中移除或去除细胞培养基114b的残留培养基。下面参照图5描述了洗涤培养基124的示例组成。

[0055] 在一些实施方案中,操作106包括将洗涤培养基124倒在培养的细胞122上,并搅拌洗涤培养基124和培养的细胞。在一些示例中,通过轻轻地旋转可容纳培养的细胞122和洗涤培养基124的离心机或容器来搅拌洗涤培养基124和培养的细胞122。在一些实施方案中,通过利用混合器来搅拌洗涤培养基124和培养的细胞122。示例性混合器可以包括电动搅拌器或叶轮。在一些实施方案中,所公开的方法包括使用细胞保持过滤器来保持培养的细胞122,同时用洗涤培养基124洗涤它们。

[0056] 如上所述,操作106包括各种洗涤方法。例如,操作106可以包括多次洗涤方法或梯度洗涤方法。图3和相应段落描述了根据一个或多个实施方案的示例性多次洗涤方法和示例性梯度洗涤方法。

[0057] 如图1进一步所示,系列操作100包括用富集培养基冲洗培养的细胞团的操作108。如图所示,操作108包括用富集培养基126洗涤培养的细胞122。富集培养基126可以降低培养的细胞122的盐度。富集培养基126还可以用作富集培养的细胞122的最终处理。为了富集培养的细胞122,例如,富集培养基126可以包括营养素,例如维生素、氨基酸、抗氧化剂或脂肪。营养素改善了作为可食用食品的培养细胞122的营养成分。下面参照图5进行描述了富集培养基126的示例组成。

[0058] 如上所述,所公开的方法包括在阈值增殖阶段完成后洗涤培养的细胞团。图2和相应的段落描述了用于完成阈值增殖阶段202的示例特性。图2示出了基于包括细胞密度204、红细胞压积206、时间208、细胞代谢210和蛋白质含量212的各种特性来确定阈值增殖阶段已经完成。附加地,或者可选地,在一些实施方案中,所公开的方法包括诱导完成214。

[0059] 如图2所示,指示阈值增殖阶段完成的一个特征是细胞密度204。图2示出了与细胞第一次被注射到生物反应器中时相对应的起始细胞密度216。随着细胞的生长和增殖,细胞密度增加。例如,当达到目标细胞密度218时,可以认为细胞已经完成了增殖阶段。在一些实施方案中,目标细胞密度218是200万个细胞/毫升、300万个细胞/毫升,或者是介于这些值之间的某一密度。在一些实施方案中,细胞密度204特性适用于悬浮细胞而非贴壁细胞。

[0060] 指示阈值增殖阶段完成的另一个特征是红细胞压积(PCV)206。通常,PCV是指样品中细胞的体积。图2示出了起始PCV 220和目标PCV 222。起始PCV 220反映生长阶段开始时样品中细胞的体积。目标PCV 222指示细胞已经增殖并占据更大的体积。在一些实施方案中,目标PCV 222等于至少1%PCV。在其他实施方案中,目标PCV 222等于1%-25%PCV范围内的任何值。在一些实施方案中,红细胞压积206特性适用于评估悬浮细胞而非贴壁细胞。

[0061] 除PCV外或作为PCV的替代方案,在一些实施方案中,基于时间208,细胞被认为已

经完成了阈值增殖阶段。例如,所公开的方法可以在细胞已经生长了一段生长期之后继续洗涤培养的细胞。生长期可以包括任何长度的时间。在一些实施方案中,例如,生长期在6天和140天之间。

[0062] 如图2进一步所示,细胞还可以通过细胞代谢210指示阈值增殖阶段的完成。一般来说,随着细胞的生长,它们共同消耗更多的葡萄糖和氧气。在指数增长期间,预计葡萄糖和氧气消耗量也将呈指数级增长。在细胞退出阈值生长阶段后,葡萄糖和氧气消耗将缓慢增加,从而表明生长正在放缓。因此,在一些实施方案中,所公开的方法包括分析葡萄糖吸收和/或O_2利用率,以确定细胞是否已经完成阈值增殖阶段。在一个示例中,氧消耗稳定,例如,氧消耗不随时间变化或最低限度地改变,表明细胞已准备好进行收获并因此进行洗涤和终处理。

[0063] 此外,在一些实施方案中,所公开的方法基于蛋白质含量212来确定阈值增殖阶段的完成。通常,细胞培养基和细胞混合物中不同蛋白质的浓度可以表明增殖的减缓。例如,细胞培养基中乳酸脱氢酶(LDH)含量的增加表明细胞死亡。具体地,LDH是一种细胞质酶,当细胞膜破裂时,它会迅速释放到细胞培养基中。因此,LDH含量的增加可以标志着阈值增殖阶段的完成。在另一个示例中,二辛可宁酸(BCA)可用于分析细胞培养基中蛋白质的总水平。具体地,BCA测定法可用于测定细胞培养基中的蛋白质含量。蛋白质水平的峰值和平稳期可以表明细胞已经完成了阈值增殖阶段。

[0064] 所公开的方法可以进一步诱导阈值增殖阶段的完成。如图2所示,所公开的方法可以通过将细胞暴露于外源性调节剂来诱导完成214。外源性调节因子可引起或促进细胞的反式分化,使细胞从阈值增殖阶段过渡到形成成熟肌纤维(如肌纤维和肌球蛋白重链)的阶段。例如,外源性调节因子可以包括减缓细胞增殖和/或刺激反式分化的反式分化因子。

[0065] 除了外源性调节剂或作为外源性调节剂的替代,在另一个示例中,所公开的方法包括通过从细胞培养基中去除细胞来诱导完成214。通常,当细胞从培养器中移除时,它们停止或减缓增殖,因为它们是从提供持续培养所需营养的细胞培养基中移除的。

[0066] 如上所述,所公开的方法包括用洗涤培养基洗涤培养的细胞团以冲洗掉剩余的细胞培养基。通常,洗涤培养基从培养的细胞团中移除或去除细胞培养基。图3和相应的讨论详细说明了根据一个或多个实施方案的洗涤培养的细胞团的两种不同方法。图3示出了多次洗涤方法302和梯度洗涤方法304。

[0067] 通常,多次洗涤方法302包括使用单独和不同的培养基洗涤培养的细胞团。作为概述,在一个实施方案中,所公开的方法包括培养细胞、收集培养的细胞团、冷却细胞、去除细胞培养基,以及应用第一洗涤培养基,提供细胞培养基的大量稀释并且包括等渗盐溶液以限制细胞因渗透应力而破裂。第一洗涤培养基可以离心或以其他方式从培养的细胞团中去除。第二富集培养基用于去除残留的洗涤培养基,同时降低盐浓度。第二富集培养基可以进一步离心或以其他方式从培养的细胞团中去除。如图3所示,多次洗涤方法302包括使洗涤培养基在培养的细胞团上流动的操作306、去除洗涤培养基的操作308和使富集培养基在培养的细胞团上流动的操作310。虽然图3示出了使洗涤培养基流动在培养的细胞团上的一个循环,但在一些实施方案中,所公开的方法包括使洗涤培养基在培养的细胞团上流动的几个循环。

[0068] 多次洗涤方法302包括使洗涤培养基在培养的细胞团上流动的操作306。如图3所

示,将洗涤培养基316添加到培养的细胞314中。培养的细胞314包括任选地通过离心机或过滤器从细胞培养基分离后的浓缩细胞。在一些实施方案中,用洗涤培养基316以细胞与洗涤培养基的比例为1:1至1:4洗涤培养的细胞314。例如,如果培养的细胞314的体积为40L,则所公开的方法包括添加40L至160L的洗涤培养基316。此外,在一些实施方案中,将洗涤培养基316添加到洗涤罐318中培养的细胞314中。洗涤罐318可以被加压以降低污染的风险。

[0069] 可以优化添加到培养的细胞314的洗涤培养基316的量,以有效地从培养的细胞中去除细胞培养基残留。例如,如果添加过多的洗涤培养基316,则处理时间增加,并且处理培养的细胞314所需的材料增加。如果使用的洗涤培养基316太少,则培养的细胞314可能没有被洗涤培养基316充分包被,并且残留的细胞培养基可能保留在培养的细胞中。

[0070] 洗涤培养基316可以在培养的细胞314上流动或暴露于培养的细胞314至洗涤期。洗涤时间可以持续5分钟到8小时。如果洗涤时间过长并且渗透压过高,则培养的细胞314可能破裂。如果洗涤时间太短,则洗涤培养基316可能没有平衡和进行必要的离子交换所需的时间。

[0071] 所公开的方法还可以包括控制洗涤培养基316的温度。具体地,洗涤培养基316可以在-5℃和45℃之间。更高的温度有利于更快的细胞膜传质,而更低的温度对应着更好的细胞存活。

[0072] 在一些实施方案中,操作306还包括搅拌洗涤培养基316和培养的细胞314的混合物。通常,搅拌洗涤培养基316和培养的细胞314的混合物最大限度地使培养细胞314暴露于洗涤培养基316。增加的暴露增强了培养的细胞314和洗涤培养基316之间的转移和平衡过程。为了实现这一点,可以在洗涤罐318中搅拌混合物。可以通过泵循环或者使用空气或气体进行均化以搅拌细胞。为了保存细胞,搅拌的强度和时间可能会受到限制。过多或过于剧烈的搅拌可通过剪切力干扰培养的细胞314并导致细胞损伤。

[0073] 如图3所示,多次洗涤方法302还包括去除洗涤培养基的操作308。具体地,所公开的方法包括从洗涤培养基316分离洗涤的培养细胞322。在一个或多个实施方案中,操作106利用用于将培养的细胞团与细胞培养基分离的方法,以将洗涤的培养的细胞322与洗涤培养基316分离。例如,操作308可以包括利用离心机320、过滤、筛分或絮凝/沉淀将洗涤的培养细胞322与洗涤培养基316分离。

[0074] 如图3中进一步所示,多次洗涤方法302包括使富集培养基在培养的细胞团上流动的操作310。具体地,所公开的方法包括将富集培养基324在洗涤的培养的细胞322上流动。使富集培养基在培养的细胞团上流动的方法类似于使洗涤培养基在培养细胞团上流动的方法。更具体地,洗涤程序、细胞与富集培养基的比率、温度、浓度、搅拌和时间与以上关于使洗涤培养基流过培养细胞团的操作306所述的相同或相似。

[0075] 为了说明,富集培养基可以在培养的细胞团上流动并搅拌。例如,培养的细胞团和富集培养基可以被搅拌、通过泵循环或用空气/气体均质。在一些实施方案中,以细胞与富集培养基的比例为1:1至1:4,用富集培养基324覆盖培养的细胞团。在一些实施方案中,富集培养基324的温度在1℃和40℃之间。更具体地,富集培养基324可以处于4℃的温度。所公开的方法可以进一步包括将洗涤的培养的细胞322暴露于富集培养基324至富集期。富集期可以与洗涤期相同,或者比洗涤期更长或更短。具体地,富集期可以是5分钟至8小时。

[0076] 在一些实施方案中,多次洗涤方法302还包括去除富集培养基的附加操作。具体

地,富集的洗涤培养的细胞可以与富集培养基324分离以去除过量的富集培养基。在一些实施方案中,所公开的方法包括离心培养的细胞团和富集培养基的混合物324。附加地,或者可选地,细胞可以被絮凝。

[0077] 此外,多次洗涤方法302可以包括干燥培养的细胞团的附加操作。通常,可以通过例如改善基于细胞的肉制品的质地来干燥培养的细胞团,以促进培养的细胞团转变为可供食用的基于细胞的肉制品。例如,可以干燥培养的细胞团至含水量在50%和80%之间,以模仿传统肉的含水量。例如,可以在真空、喷雾或强制干燥系统下干燥培养的细胞团。

[0078] 在多次洗涤方法302的替代方案中,所公开的方法可以使用梯度洗涤方法洗涤培养的细胞团。通常,梯度洗涤培养基在培养的细胞团上流动。梯度洗涤培养基的组成随时间变化。例如,洗涤培养基可以在培养的细胞团上流动一段设定的时间,并逐渐过渡到富集培养基。

[0079] 图3示出了根据一个或多个实施方案的梯度洗涤方法304。概括地说,梯度洗涤方法304可以包括培养细胞、收集培养的细胞团、离心或以其他方式从培养的细胞团中去除细胞培养基、冷却细胞以及用梯度洗涤培养基洗涤细胞。梯度洗涤方法304可以使用两个罐——一个容纳洗涤培养基326,另一个容纳富集培养基328。这两个罐各自连接到洗涤罐332,洗涤罐332存储培养的细胞团330。梯度洗涤培养基的浓度可以从100%的洗涤培养基326开始,并且缓慢地包括更多的富集培养基328。梯度洗涤培养基继续转变,直到其100%(或接近100%)由富集培养基328组成。随着梯度洗涤培养基随时间变化,所公开的方法可以包括从洗涤罐332排出培养基。例如,洗涤罐332可以以与培养基流入洗涤罐332的速率相同的速率排出培养基。梯度洗涤方法304相对于多次洗涤方法302的优点包括通过消除去除洗涤培养基的需要而提高效率。

[0080] 所公开的方法可以包括调整洗涤培养基326和/或富集培养基328暴露于培养细胞团330的时间。例如,如图3所示,在24小时时间段内进行梯度洗涤方法304。在前3小时(或在5分钟至8小时的最佳洗涤时间段内的任何时间),梯度洗涤培养基的流入的特征在于100%(或几乎100%)由洗涤培养基326组成。在从第3小时到第21小时的中间时间段内,梯度洗涤培养基从具有更高浓度洗涤培养基326的流入逐渐转变为具有更高浓度的富集培养基328的流入。在最后3小时内(或在5分钟至8小时的最佳富集期内的任何时间),梯度洗涤培养基流入是100%(或几乎100%)由富集培养基328组成。在替代实施方案中,流入从小于100%的洗涤培养基(例如,95%洗涤培养基和5%富集培养基的起始比率)转变为小于100%的富集培养基(例如5%洗涤培养基和95%富集培养基的终止比率)。

[0081] 在梯度洗涤方法304的一个示例中,洗涤培养基326包括含有高浓度盐、糖等的高渗溶液。洗涤培养基326还可以包括柠檬酸盐以从培养的细胞团330中去除离子。此外,洗涤培养基326可以进一步改变培养的细胞团330的pH。如上所述,在一些情况下,梯度洗涤方法304还包括逐渐改变到具有较低盐浓度、很少或没有柠檬酸盐以及额外营养素如B族维生素的富集培养基328。在一些实施方案中,所公开的方法从洗涤培养基326和富集培养基328中排除有蛋白质变性风险并导致糊状质地的酸(如柠檬酸盐)。

[0082] 图4显示了根据一个或多个实施方案的用于执行所公开的方法的示例系统。通常,图4包括可以是用于洗涤培养的细胞团的系统的一部分的各种组件。例如,图4示出了系统400,其包括培养罐402、缓冲罐406、洗涤罐408和各种其他组件。所公开的方法可以包括使

用比图4中所示更多或更少的部件。此外,在一些实施方案中,图4中的组件以不同的顺序组织。

[0083] 如图4所示,系统400包括培养罐402。培养罐402提供了一种环境,在该环境中,细胞可以增殖并完成阈值生长阶段,从而成为培养的细胞团。更具体地说,培养罐402包含具有促进细胞生长的营养素的细胞培养基。在一些实施方案中,培养罐402包括生物反应器系统。将培养罐402中的细胞410保持在培养温度下。例如,对于哺乳动物细胞,细胞培养基和细胞410可以保持在40℃,而对于水生物种,可以保持在较低的温度。在一些实施方案中,培养罐402还包括搅拌器412。搅拌器412混合或以其他方式搅拌细胞以增加细胞410在细胞培养基的暴露。

[0084] 如图4中进一步所示,可以收获培养的细胞团和细胞培养基414并将其转移到缓冲罐406中。在一些示例中,从培养罐402收获或排出一部分培养的细胞团,并将另一部分留在培养罐402中用于下一批培养。例如,可以从培养罐402中提取80%的培养的细胞团用于洗涤,这将20%的培养的细胞团留在培养罐402(例如,用于随后的生长和增殖阶段)。

[0085] 如上所述,将培养的细胞团和细胞培养基414转移到作为中间罐的缓冲罐406中,以在排放期间和洗涤之前储存培养的细胞。缓冲罐406是在分离之前存储细胞的无菌容器。缓冲罐406可以提供效率的益处。更具体地说,在多个培养罐同步操作的情况下,培养罐定期排放。在8个生物反应器同步运行的一个示例中,其中一个通常每2小时排放一次。在一些实施方案中,当下游过程赶上排放时间表时,缓冲罐406为来自培养罐的培养细胞提供存储空间。

[0086] 如图4中进一步所示,系统400还包括热交换器404a。在一些实施方案中,作为洗涤细胞的一部分,所公开的方法冷却培养的细胞团。对于哺乳动物细胞,将细胞从36℃-42℃的培养温度冷却到1℃-20℃。在一些情况下,将培养的细胞团冷却到尽可能低的温度,而不杀死或冷冻培养的细胞。

[0087] 冷却细胞有几个好处。例如,冷却细胞会减缓细胞内的代谢过程,以减缓裂解和其他形式的细胞死亡。冷却的细胞活性也较低,这延长了可能进行额外处理的时间。此外,冷却培养的细胞团增加了流体粘度并可以增强细胞膜,这使得培养的细胞能够更好地承受以下操作中的搅拌和离心力。

[0088] 热交换器404a冷却培养的细胞团。在图4所示的示例中,在培养的细胞团和细胞培养基414被分离器422分离之前,热交换器404b冷却培养的细胞团和细胞培养基414。将培养的细胞团和细胞培养基414一起冷却可以在细胞膜被离心或以其他方式与细胞培养基分离之前增强细胞膜。然而,冷却培养的细胞团和细胞培养基414两者需要额外的能量,而不是仅冷却较小体积的培养的细胞团。

[0089] 在一些实施方案中,热交换器404a在通过分离器422将培养的细胞团与细胞培养基分离之后冷却培养的细胞团。在这样的实施方案中,系统400节省了能量,因为细胞培养基没有被冷却。然而,因为培养的细胞团中的细胞在分离之前没有冷却,所以细胞可能更敏感。因此,在培养温度下从细胞培养基中分离培养的细胞团可能需要以较慢的速度离心以防止细胞死亡。

[0090] 如图4中进一步所示,分离器422从细胞培养基424移除培养的细胞团426(如先前关于图1中的操作104所述)。分离器422包括连续离心机,所述连续离心机将培养的细胞团

和细胞培养基414分离成离心的重相和轻相。重相包含或收集培养的细胞团426,轻相包含或收集细胞培养基424。在一些实施方案中,连续离心机以每分钟转数(RPM)或相对离心力(G)操作,以确保在离心过程中保持细胞壁结构完整性。在过高的RPM或G下,细胞可能会破裂。在较低的RPM和G下,分离不足,并且重相含有过量的生长培养基。

[0091] 如图4中进一步所示,可将培养的细胞团426转移到洗涤罐408中,并且细胞培养基424可以流到热交换器404b。热交换器404a-404b与储能罐420协同工作以提高系统400的能量效率。通常,热交换器404a-404b回收用于冷却培养的细胞团的能量。

[0092] 如图4中所述和进一步描述的,热交换器404a将培养的细胞团(以及在一些实施方案中,细胞培养基)从培养温度(例如,40℃)冷却到冷却温度(例如1℃)。在一些实施方案中,冷却的温度包括低于培养的细胞团中细胞最佳培养温度的任何温度。在热交换器404a中冷却细胞利用冷却流入418(例如1℃)并导致加温流出416(例如36℃)。

[0093] 为了便于加热和冷却,系统400可选地包括储能罐420。具体地,储能罐420有助于在冷却温度下的细胞培养基424和在培养温度下的培养的细胞团之间的能量的有效交换。更具体地,在一些实施例中,储能罐420包含冷却的液体和温热的液体,冷却的液体下沉到储能罐的底部,温热的液体上升到储能罐420的顶部。在一个示例中,储能罐420是雪茄形状的储能罐。如流出和流入储能罐420的不同线路图案所示,加温流出416对液体进行加温,并且来自热交换器404b的冷却流出438冷却培养罐402内的液体。

[0094] 如上所述,将培养的细胞团426转移到洗涤罐408中。在洗涤罐408中,系统400使洗涤培养基428和/或富集培养基430在培养的细胞团426上流动、喷射或浸入。洗涤罐408还可以包括搅拌器440,用于在洗涤过程中搅拌或以其他方式搅拌培养的细胞团。搅拌器440搅拌培养的细胞团和洗涤培养基或富集培养基。虽然图4示出了搅拌器440,但是细胞可以在洗涤罐408中被搅拌,通过泵循环,或者用空气/气体均匀化。

[0095] 如图4中进一步所示,所公开的方法可以在系统400中利用上述多次洗涤方法。具体地,洗涤培养基428可以在洗涤罐408中的培养的细胞团上流动。通过离心机432将洗涤培养基从培养的细胞团中去除。更具体地,可以使用(i)第二离心机或(ii)用于分离细胞培养基424和培养的细胞团426的分离器422来去除洗涤培养基。

[0096] 所公开的方法还可以包括通过絮凝434从培养的细胞团中去除洗涤培养基。在絮凝434中,通过添加多价阳离子、金属盐或聚合物将培养的细胞团收集成团聚体。絮凝可能更适合于可接受高水分含量的基于细胞的肉制品。无论去除方法如何,当已经去除洗涤培养基时,系统400留下洗涤的细胞团436。

[0097] 如上所述,当使用多次洗涤方法时,将富集培养基添加到洗涤的细胞团436中、使其流过或浸入。在一些实施方案中,将富集培养基添加到洗涤罐408中洗涤的细胞团436中。在其他实施方案中,在单独的富集罐中将富集培养基添加到洗涤的细胞团436中。

[0098] 除了多次洗涤方法之外,图4还显示了系统400中的上述梯度洗涤方法。具体地,洗涤罐408连接到洗涤培养基428和富集培养基430。如上所述,所公开的方法可以包括通过随时间改变洗涤培养基428和富集培养基430的浓度来流动(或浸入)梯度洗涤培养基。在梯度洗涤培养基已经流过洗涤罐408中培养的细胞团之后,细胞可以形成最终的基于细胞的肉制品。

[0099] 如上所述,洗涤培养基和富集培养基去除了不理想的香气、味道和质地,同时还改

善了基于细胞的肉制品的营养成分。图5提供了根据一个或多个实施方案的洗涤培养基和富集培养基的组合物的概述,以提供质地、风味、芳香和营养益处。

[0100] 如上所述,洗涤培养基移除/去除细胞培养基,洗涤培养的细胞团,和/或减少细胞裂解。富集培养基为培养的细胞团增加了营养素、防腐剂(例如抗氧化剂)、调味剂、香气、颜色和/或质地改良剂。但是洗涤培养基和富集培养基都不是细胞培养基。例如,在一些实施方案中,洗涤培养基和富集培养基都不包含导致细胞生长的生长因子—细胞培养基可以包括的生长因子。图5显示了洗涤培养基组合物502的示例和富集培养基组合物504的示例。在洗涤培养基组合物502的一个这样的示例中,洗涤培养基是稀释的磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)和柠檬酸。柠檬酸可以有利于降低胆固醇。在另一个示例中,洗涤培养基是柠檬酸/二元酸钾缓冲液。由等渗盐溶液制成的洗涤培养基也具有限制细胞破裂的渗透压,并提供经济有效的大容量稀释。

[0101] 相反,在富集培养基组合物504的示例中,富集培养基包括具有低盐含量的低渗盐溶液。富集培养基还可以含有将被培养的细胞团吸收的化合物。特别是,富集培养基可以含有蛋白质/氨基酸、抗氧化剂、脂肪、脂肪酸、油和维生素。在一些实施方案中,富集培养基包含可食用的化合物。富集培养基还可以含有抗氧化剂,如B-维生素、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT),或来自具有抗氧化特性的植物的其他天然提取物,如樱桃、α-生育酚和其他提取物。这些抗氧化剂可以防止脂肪在干燥过程中氧化。

[0102] 此外,在一些实施方案中,对培养的细胞团进行处理以提高细胞对来自富集培养基的营养素的吸收。例如,可以对细胞团进行热激或电穿孔,从而增加通过细胞壁的传质。所公开的方法可以在热激或电穿孔后随后用富集培养基冲洗培养的细胞团。

[0103] 洗涤培养基和/或富集培养基可以包含控制基于细胞的肉制品的感官方面的材料。感官方面包括香气、味道、外观、口感和质地。具体地,洗涤培养基和/或富集培养基可以促进去除与不合适的香气相关的挥发性物质。例如,许多脂质氧化产物是挥发性的,并导致形成包括醛、酮和醇在内的主要和次要化合物,这些化合物在基于细胞的肉制品中产生不合适的香味和不合适的风味,而这些香味和风味与屠宰肉不符。更具体地说,潜在的不期望的细胞培养基成分和降解物可以包括酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、胆碱、铵离子等。特别是,甲硫氨酸在未分解时会赋予最终产品煮卷心菜般的气味和风味。异亮氨酸在未分解时甲硫氨酸闻起来和尝起来都像饼干。半胱氨酸在未分解时会赋予最终产品臭鸡蛋般的气味和味道。培养基中的氨会散发出类似尿液或汗液的气味。洗涤和/或富集培养基还可以去除铁和铁络合物,这可能是异味的来源。

[0104] 此外,在富集培养基中添加B族维生素抗氧化剂可最大限度地减少导致异味的氧化途径。特别是,脂质过氧化会使传统肉类和肉制品变质,并给肉制品带来不良气味和质地。通常,亚油酸等多不饱和脂肪酸会通过活性氧(ROS)进行过氧化。在富集培养基中添加B族维生素可抑制ROS,从而防止脂质过氧化。

[0105] 如上所述,洗涤培养基和/或富集培养基中的添加剂也可以改善基于细胞的肉制品的味道。具体地,洗涤培养基去除了不期望的细胞培养基成分和降解物,这些成分和降解剂赋予基于细胞的肉制品异味。在一个示例中,甲硫氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸和氨都是细胞培养基的组分,其可以使用洗涤培养基从培养的细胞团洗涤。异味在本质上可能是金属的,并且是由生长的细胞中存在的特定种类的铁引起的。金属组分可以通过洗涤培养基中

结合铁的组分去除,或者用具有更有利风味和/或香气的不同铁物种代替现有的铁类(例如铁结合蛋白)。如上所述,洗涤培养基和富集培养基中的B-维生素抗氧化剂可以最大限度地减少导致不合适口味的氧化途径。

[0106] 洗涤培养基和/或富集培养基的成分也改善了最终基于细胞的肉制品的外观。例如,颜色可以由具有颜色促进或颜色抑制特性的成分引入。此类成分的示例包括甜菜汁、胡萝卜汁、其他植物性汁液、水解产物或其他蛋白胨以及其他着色剂。可以通过添加铁或通过洗涤和富集操作防止氧化来保持颜色以防止变灰。此外,可以通过具有螯合特性的组分来去除颜色。此类组分的示例包括葡萄糖酸钠、柠檬酸盐、乙二胺四乙酸(EDTA)和其它化合物。

[0107] 洗涤培养基和/或富集培养基还可以包括改善基于细胞的肉制品质地的组分。具体地,富集培养基可以包括酶,例如交联剂,以改善质地。例如,富集培养基可以包括用于交联的谷氨酰胺转胺酶。此外,洗涤培养基和富集培养基可以包括平衡浓度的NaCl盐缓冲液,其稳定蛋白质以获得更丰富的质地。

[0108] 除了控制基于细胞的肉制品的感官方面外,可用洗涤培养基和富集培养基控制渗透压。通常,细胞生长培养基的渗透压非常高(例如,细胞通常在含盐条件下生长良好),并且必须考虑各种因素来选择洗涤培养基和富集培养基的适当渗透压。如果培养基具有比细胞更高的渗透压,则细胞可能更快地吸收培养基成分。然而,可能需要首先用洗涤培养基降低细胞的渗透压(例如,降低到更适口的盐含量),以随后利用依赖于高渗透压的富集培养基来增加细胞摄取。通常,所公开的方法可以包括调节盐,包括氯化钠(NaCl)、钾(K)、钙(Ca)、镁(Mg)、铁(Fe)和其他元素,以达到渗透压的目标阈值,从而促进营养吸收。

[0109] 洗涤培养基和富集培养基也可用于改变培养细胞内的化学成分。特别是,传统肉蛋白的等电点(pI)往往在5-5.5左右。所公开的方法可以包括基于pH改变pI(反之亦然)以调节培养的细胞团的行为,例如离子保留和水分含量。更具体地说,如果pH低于pI,那么蛋白质将具有总的正净电荷,并且($R-NH_3^+$和R-COOH)基团将大量存在。如果pH大于pI,则蛋白质将具有总体负电荷,并且($R-NH_2$和COO^-)基团将大量存在。如果pH等于pI,那么培养的细胞团的蛋白质将具有总体中性电荷。

[0110] 此外,所公开的方法可以包括优化洗涤培养基和/或富集培养基内的盐浓度。可以选择盐浓度以获得最佳的蛋白质稳定性。适当范围内的盐浓度将稳定蛋白质,也有助于获得更理想的肉质。例如,可以通过增加洗涤培养基和/或富集培养基中钠阳离子(Na^+)和/或氯阴离子(Cl^-)的量来改变培养基的盐含量。洗涤培养基和富集培养基中的盐含量可以按比例计算,以在最终的基于细胞的肉制品中达到所需的比例。例如,达到合适的盐浓度的方法包括洗涤和/或富集培养基中Na^+或Cl^-的浓度,这将导致最终产品中的Na^+或Cl^-值在传统肉类的范围内,或者至少导致更积极的感官体验。为了增加暴露以最大限度地吸收NaCl到细胞中,可以使用更高的洗涤培养基/富集培养基与细胞的比率。此外,搅拌可以增加吸收。

[0111] 此外,洗涤培养基和/或富集培养基的钾含量可以通过增加或减少培养基中钾阳离子(K^+)的量来改变。就像调节细胞肉制品中Na^+和Cl^-含量的方法一样。具体地,对洗涤培养基和富集培养基中的阳离子进行比例化,以在最终产物中实现所需比例。再次,为了增加暴露以最大限度地吸收,可以使用更高的洗涤培养基/富集培养基与细胞的比率或搅拌。

[0112] 在一些实施方案中,洗涤培养基和/或富集培养基是基于细胞的种类来指定的。例

如,培养基可以包括螯合剂、颜色、风味和抗氧化剂,以保持与牛肉、鸡肉、鸭子、猪肉、鱼和其他物种相对应的不同感官品质。富集培养基还可以调节基于细胞的肉制品的总体宏量营养素含量(例如,蛋白质、脂肪、水分、碳水化合物等)和pH,以模仿传统肉的常量营养成分和pH。

[0113] 如上所述,在一些情况下,所公开的方法使一系列培养基和缓冲液流动,以改善培养的细胞团的感官方面和营养成分。在一些实施方案中,所述方法用于洗涤细胞团内的细胞间空间并向其添加营养素。此外,在一些实施方案中,所公开方法使用交换培养基来改变细胞团内细胞内的细胞内空间中的膜渗透溶质的浓度。根据一个或多个实施方案,图6和相应段落描述了利用交换培养基去除和/或添加细胞内溶质的方法。

[0114] 在一些示例中,所公开的方法包括使具有不同浓度的溶质和营养素的交换培养基流动,以刺激这些溶质和营养素向单个细胞和/或从单个细胞中扩散。在扩散过程中,粒子从较高浓度的区域移动到较低浓度的区域,直到达到平衡。具有高颗粒浓度的交换培养基将导致细胞吸收颗粒。相对于细胞具有较低颗粒浓度的交换培养基将导致膜渗透颗粒离开细胞。通过使用这种交换培养基,所公开的方法可以改变细胞内各种溶质和营养素的浓度。除了改变细胞内颗粒的浓度外,还可以使用交换培养基将颗粒从细胞表面洗掉或将颗粒粘附到细胞表面。

[0115] 图6示出了根据本公开的一个或多个实施方案的交换培养基的示例系列。作为概述,在细胞培养基中培养细胞。移除细胞培养基,并将第一交换培养基添加到细胞中。在一些示例中,第一交换培养基相对于细胞培养基是低渗的。更具体地,第一交换培养基包含相对于细胞培养基较低浓度的溶质。将第二交换培养基添加到细胞中。第二交换培养基可以是高渗的并且包括随着时间扩散到细胞中的更高浓度的溶质。

[0116] 如图6所示,在细胞培养基中培养细胞。例如,细胞602a表示贴壁细胞或在悬浮液中生长的细胞。在任一种情况下,细胞602a在与细胞培养基604接触的情况下生长。如上所述,细胞培养基604包括刺激细胞生长的各种溶质或组分。细胞培养基604内的一些膜渗透溶质进入细胞602a以达到平衡。如上所述,这些膜渗透溶质中的一些刺激细胞生长,但也对细胞的感觉方面或营养产生负面影响。所公开的方法可以包括从细胞602a内去除不期望的膜渗透溶质的操作。

[0117] 如图6进一步所示,所公开的方法可以包括用第一交换培养基冲洗细胞606。在一些实施方案中,第一交换培养基606相对于细胞培养基是低渗的。因此,在一些实施方案中,第一交换培养基包含相对于细胞培养基较低浓度的溶质。随着时间,膜渗透溶质从细胞602b内的细胞内空间移动到细胞602c外以达到平衡。如图所示,细胞602b包含膜渗透溶质608。在一些示例中,膜渗透溶质608包括在细胞培养阶段期间通过扩散进入细胞的溶质。膜渗透溶质608可包含不期望的细胞培养基组分或不期望浓度的细胞培养基组分,例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、胆碱、铵离子、盐等。

[0118] 在用第一交换培养基606洗涤的过程中,至少一些膜渗透溶质608离开细胞以与第一交换培养基606达到平衡。如图6所示,相对于细胞602b和细胞培养基604,细胞602c具有较低浓度的膜渗透溶质608。在一些示例中,第一交换培养基606包括不同的组分以减少细胞上的渗透应力。

[0119] 在一些示例中,第一交换培养基包括降低的溶质梯度,以减少细胞团内细胞的渗

透应力。更具体地说,降低的溶质梯度可以从与细胞培养基604的溶质浓度相似的溶质浓度开始。溶质浓度随着时间而降低,以使细胞的渗透冲击最小化。溶质浓度逐渐降低,直到达到目标浓度。在一些实施方案中,所公开的方法包括用一系列具有降低的溶质浓度的中间第一交换培养基冲洗细胞。

[0120] 如图6中进一步所示,所公开的方法可以利用第二交换培养基610。在一些示例中,第二交换培养基相对于第一交换培养基是高渗的。在其它示例中,第二交换培养基相对于细胞培养基是高渗的。在一些实施方案中,第二交换培养基610包括膜渗透溶质,所述溶质包括用于扩散到细胞中的营养素或其它溶质。图6示出了暴露于第二交换培养基610的细胞602d。随着时间,来自第二交换培养基610的营养素612通过扩散进入细胞602e。营养素612可以包括膜渗透物质或膜不可渗透物质。在一些示例中,营养素612包含维生素、氨基酸、抗氧化剂、蛋白质、碳水化合物或脂肪。此外,在一些示例中,营养素612的至少一部分粘附到细胞602e的外表面。

[0121] 在一些示例中,为了保护细胞团中的细胞免受渗透应力的影响,所公开的方法包括通过利用增加的溶质梯度用第二交换培养基610冲洗细胞团。具体地,第二交换培养基610从具有较低浓度溶质的溶液转变为具有较高浓度溶质的溶剂。例如,具有较低溶质浓度的溶液可以具有与先前溶液(例如,第一交换培养基606或细胞培养基604)的溶质浓度相似的溶质浓度。添加具有增加的溶质浓度的一系列第二交换培养基,直到达到目标第二溶质浓度。在一些示例中,所公开的方法用一系列具有逐渐更高溶质浓度的中间第二交换培养基冲洗细胞团。

[0122] 所公开的方法可以利用不同的方法来确定何时停止交换培养基在细胞上流动。例如,所公开的方法可以使第一交换培养基(和/或降低的溶质梯度)在细胞团上流动冲洗一段时间。在冲洗时间段之后移除第一交换培养基,并且将第二交换培养基添加到细胞中。第二交换培养基(和/或增加的溶质梯度)可以在细胞上流动相同的冲洗时间段。在一些示例中,第二交换培养基在细胞上流动不同的第二冲洗时间段。

[0123] 此外,或可选地,所公开的方法包括基于流出物组成在交换培养基之间转换。具体地,流出物的组成通常指示已经进入或离开细胞的溶质。例如,最初暴露于第一交换培养基的细胞可以将更高体积的溶质排出到第一交换培养基中。来自该初始暴露的流出物可能具有更高浓度的溶质。第一交换培养基可以在细胞上流动,直到流出物组成基本上类似于第一交换培养基的组成。所公开的方法可以包括使第一交换培养基流动,直到第一流出物基本上类似于第一交换培养基的组成。类似地,当第二流出物具有与第二交换培养基基本相似的组成时,所公开的方法可以停止第二交换培养基的流动。

[0124] 在一些实施方案中,所公开的方法包括使用单个交换培养基。具体地,交换培养基可以包括低浓度的不期望的细胞可渗透溶质和高浓度的营养素。低浓度的不期望的细胞可渗透溶质导致溶质扩散出细胞,而高浓度的营养素同时导致营养素扩散到细胞中。与第一交换培养基和第二交换培养基一样,所公开的方法可以利用单一梯度交换培养基,其从类似于细胞培养基的组成缓慢过渡到目标组成。

[0125] 在一些实施方案中,除了利用洗涤培养基和富集培养基之外,所公开的方法还包括用交换培养基冲洗细胞。例如,所公开的方法可以包括用洗涤培养基、富集培养基、第一交换培养基和第二交换培养基冲洗细胞。在另一实施方案中,洗涤培养基和富集培养基分

别包括第一交换培养基和第二交换培养基。更具体地,洗涤培养基可以包括低浓度的颗粒以从细胞内抽出不期望的溶质。富集培养基可以含有进入细胞的高浓度的膜渗透营养素。

[0126] 图1-6、相应的文本和实施例提供了根据一个或多个实施方案的与洗涤和富集培养的细胞团有关的几种不同的系统、方法、技术、组件和/或装置。除了上述描述之外,还可以根据包括用于实现特定结果的操作的流程图来描述一个或多个实施例。图7-8示出了这样的操作的流程图。本文所描述的操作可以彼此并行地重复或执行,或者与相同或相似操作的不同示例并行地执行。

[0127] 图7示出了系列操作700的流程图。概括而言,系列操作700包括在细胞培养基中培养细胞团的操作702、从细胞培养基移除培养的细胞团的操作704、用洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作706以及用富集培养基漂洗培养的细胞团的操作708。

[0128] 该系列操作700包括在细胞培养基中培养细胞团的操作702。

[0129] 如图7所示,系列操作700包括从细胞培养基中去除培养的细胞团的操作704。具体地,操作704包括从细胞培养基中去除至少一部分培养的细胞团。在一些实施方案中,操作704还包括基于完成阈值增殖阶段的培养的细胞团从细胞培养基中去除至少一部分培养的细胞团。在一些实施方案中,当培养的细胞团达到300万个细胞/毫升的活细胞密度或1%至25%之间的红细胞压积中的至少一个时,阈值增殖阶段完成。此外,在一些实施方案中,操作704还包括通过将培养的细胞团暴露于外源性调节剂来刺激阈值增殖阶段的完成。

[0130] 系列操作700还包括用洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作706。具体地,操作706包括用洗涤培养基洗涤培养的细胞团以冲洗掉剩余的细胞培养基。在一些实施方案中,洗涤培养基不包括用于刺激培养的细胞团生长的生长因子。此外,在一些实施方案中,操作706还包括通过以下方式用洗涤培养基洗涤培养的细胞团:搅拌培养的细胞团和洗涤培养基,利用泵使培养的细胞团和洗涤培养基循环,以及利用气体使培养的细胞团和洗涤培养基均化。在一些实施方案中,用洗涤培养基洗涤培养的细胞团包括使洗涤培养基在培养的细胞团上流动,并且使中间培养基流动,该中间培养基包括随着时间增加富集培养基的浓度。在一些实施方案中,洗涤培养的细胞团进一步包括使洗涤培养基在培养的细胞团上流动,并搅拌洗涤培养基和培养的细胞团。在一些实施方案中,洗涤培养基的温度在-5℃至45℃之间(包括-5℃至45℃)。

[0131] 图7所示的系列操作700还包括用富集培养基漂洗培养的细胞团的操作708。具体地,操作708包括用包含营养素的富集培养基冲洗培养的细胞团。在一些实施方案中,富集培养基不包括用于刺激培养的细胞团生长的生长因子。

[0132] 在一些实施方案中,系列操作700包括对漂洗的培养细胞团进行干燥的附加操作。

[0133] 图8示出了系列操作800。概括而言,系列操作800包括在培养基中培养细胞团的操作802、从培养基中去除培养的细胞团的操作804以及用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作806。

[0134] 系列操作800包括在培养基中培养细胞团的操作802。具体地,操作802包括在细胞培养基中培养细胞团。

[0135] 如图8所示,系列操作800包括从培养基中去除培养的细胞团的操作804。操作804包括从细胞培养基中移除培养的细胞团。在一些实施方案中,从细胞培养基中去除培养的细胞团包括通过离心从细胞培养基中分离培养的细胞团。

[0136] 如图8中进一步所示,系列操作800包括用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团的操作806。操作806包括通过随着时间降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度,用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团。在一些实施方案中,富集培养基包括营养素,所述营养素包含维生素、氨基酸、抗氧化剂或脂肪中的至少一种。此外,在一些实施方案中,营养素包括常量营养素,所述常量营养素包括蛋白质、脂肪、水分或碳水化合物中的至少一种。在一些实施方案中,富集培养基改变培养的细胞团的pH。

[0137] 在一些实施方案中,系列操作800还包括在从细胞培养基中去除培养的细胞团之前或之后冷却培养的细胞团。

[0138] 图9示出了根据一个或多个实施方案的用于用第一和第二交换培养基冲洗细胞团的系列操作900。具体地,系列操作900包括在细胞培养基中培养细胞团的操作902。

[0139] 图9进一步示出了用第一交换培养基冲洗细胞团的操作904。在一些实施方案中,用第一交换培养基冲洗细胞团会导致第一组可渗透膜的溶质扩散出细胞团中细胞的细胞内空间。在一些实施方案中,第一交换培养基相对于细胞培养基是低渗的。在一些实施方案中,相对于细胞培养基,第一交换培养基具有较低浓度的膜渗透溶质。此外,在一些示例中,第一交换培养基包括递减的溶质梯度,并且第一交换培养基从具有较高溶质浓度的溶液转变为具有较低溶质浓度的溶液。此外,在一些情况下,使包括降低的溶质梯度的第一交换培养基流过细胞团提供了溶质浓度的逐渐变化,从而降低了细胞团的细胞上的渗透应力。在一些实施方案中,降低的溶质梯度在基本上类似于细胞培养基的溶质浓度的溶质浓度处开始。

[0140] 系列操作900包括用第二交换培养基冲洗细胞团的操作906。在一些实施方案中,用第二交换培养基冲洗细胞团导致第二组可渗透膜的溶质扩散到细胞的细胞内空间中。在一些实施方案中,第二交换培养基相对于第一交换培养基是高渗的。在一些示例中,第二交换培养基相对于第一交换培养基具有更高浓度的膜渗透溶质。此外,第二交换培养基可以包括增加的溶质梯度,其中第二交换培养基从具有较低溶质浓度的溶液转变为具有较高溶质浓度的溶液。此外,在一些实施方案中,使包括增加的溶质梯度的第二交换培养基流过细胞团提供了溶质浓度的逐渐变化,从而降低了细胞团的细胞上的渗透应力。此外,在一些情况下,增加的溶质梯度开始于基本上类似于第一交换培养基的溶质浓度的溶质浓度。在一些实施方案中,增加的溶质梯度包括增加的营养素浓度。在一些实施方案中,至少一部分营养素扩散到细胞团的细胞中,并且至少第二部分营养素粘附到细胞的外表面。

[0141] 在一些实施方案中,系列操作900包括用第一交换培养基冲洗细胞团直到第一流出物具有与第一交换培养基基本相似的组成的操作。在一些示例中,系列操作900包括用第二交换培养基冲洗细胞物质直到第二流出物具有与第二交换培养基基本相似的组成的操作。此外,在一些示例中,系列操作900包括在冲洗时间段内冲洗所述细胞团。

[0142] 除了图7-9中所示的系列操作之外,或者作为替代,本公开包括一组附加的操作。在一些实施方案中,附加的一组操作包括用于富集培养的肉制品的方法,该方法包括:在细胞培养基中培养细胞团;从所述细胞培养基中移除所述培养的细胞团;以及通过随着时间降低洗涤培养基的浓度和增加富集培养基的浓度,用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团。在一些实施方案中,富集培养基包括营养素,所述营养素包括维生素、氨基酸、抗氧化剂、蛋白质、碳水化合物或脂肪中的至少一种。

[0143] 此外,除了图7-9所示的系列操作之外,或作为替代,本公开包括一种用于完成培养肉制备的细胞团的装置。在一些实施方案中,所述装置包括培养罐,用于在细胞培养基中培养细胞团;分离器,用于从细胞培养基、洗涤培养基或富集培养基中的至少一种去除培养的细胞团;以及洗涤罐,用于储存培养的细胞团,并使洗涤培养基或富集培养基中的至少一种在培养的细胞团上流动。在一些实施方案中,分离器包括离心机或过滤器中的至少之一。在一些示例中,该设备还包括用于将培养的细胞团冷却到其最佳培养温度以下的热交换器。在一些实施方案中,该设备还包括用于搅拌培养的细胞团和细胞培养基、洗涤基或富集基中的至少一种的搅拌器。

[0144] 根据通常的实践,附图中所示的各种特征可以不按比例绘制。本公开中呈现的图示并不意味着是任何特定装置(例如,设备、系统等)或方法的实际视图,而仅仅是用于描述本公开的各种实施方案的理想化表示。因此,为了清楚起见,可以任意扩展或减小各种特征的尺寸。此外,为了清楚起见,可以简化一些附图。因此,附图可能没有描绘特定装置(例如,设备)的所有组件或特定方法的所有操作。

[0145] 此处使用的术语,尤其是在所附权利要求中使用的术语(例如,所附权利权利要求的主体)通常旨在作为“开放”术语(例如术语“包括(including)”应解释为“包括但不限于”,术语“具有”应解释为“至少具有”,术语“包括(includes)”应解释为”包括但不局限于”等)。

[0146] 此外,如果引入特定数量的权利要求陈述,则该权利要求将明确列举该意图,并且在没有该陈述的情况下,不存在该意图。例如,作为对理解的帮助,以下所附权利要求可以包含介绍性短语“至少一种”和“一种或多种”的用法来介绍权利要求陈述。然而,这些短语的使用不应被解释为暗示通过不定冠词“一个(a)”或“一种(an)”引入权利要求陈述将包含这些引入的权利要求陈述的任何特定权利要求限制为仅包含一个这样的陈述的实施方案,即使当同一权利要求包括介绍性短语“一种或多种”或“至少一种”以及诸如“一个(a)”和“一种(an)”之类的不定冠语时(例如,“一个(a)”、“一种(an)”应解释为“至少一个”或“一种以上”);用于介绍权利要求陈述的定冠词的使用也是如此。

[0147] 此外,即使明确地陈述了特定数量的引入的权利要求,本领域技术人员也将认识到,这种陈述应解释为至少指所陈述的数量(例如,不带其他修饰语的“两次陈述”的最少陈述指的是至少两次陈述,或两次或两次以上陈述)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一个”或“A、B和C等中的一个或多个”的约定的情况下,通常这种构造旨在包括A单独使用、B单独使用、C单独使用、A和B一起使用、A和C一起使用、B和C使用或A、B、C一起使用等。例如,术语“和/或”的使用旨在以这种方式解释。

[0148] 此外,无论是在说明书、权利要求书还是附图中,任何呈现两个或多个替代术语的析取词或短语都应理解为考虑包括其中一个术语、其中一个或两个术语的可能性。例如,短语“A或B”应理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0149] 然而,这些短语的使用不应被解释为暗示通过不定冠词“一个(a)”或“一种(an)”引入权利要求陈述将包含这些引入的权利要求陈述的任何特定权利要求限制为仅包含一个这样的陈述的实施方案,即使当同一权利要求包括介绍性短语“一个或多个”或“至少一个”以及不定冠语如“一个(a)”和“一种(an)”时(例如,“一个(a)”、“一种(an)”应解释为“至少一个”或“一种以上”);用于介绍权利要求陈述的定冠词的使用也是如此。

[0150] 此外,术语“第一”、“第二”和“第三”等在本文中不一定用于表示元素的特定顺序或数量。通常,术语“第一”、“第二”、“第三”等用于区分作为通用标识符的不同元素。如果未表明“第一、第二、第三”等术语意味着特定的顺序,则不应将这些术语理解为意味着特定顺序。此外,如果未表明术语“第一”、“第二”和“第三”等意味着特定数量的元素,则不应将这些术语理解为意味着特定数量的元素。例如,第一小部件可以被描述为具有第一侧,第二小部件可以描述为具有第二侧。相对于第二小部件使用术语“第二侧”可以是将第二小部件的这一侧与第一小部件的“第一侧”区分开来,而不是意味着第二小部件具有两侧。

[0151] 本文所列举的所有示例和条件语言旨在用于教学目的,以帮助读者理解本发明以及发明人为进一步推进本领域所贡献的概念,并且应被解释为不限于这些具体列举的示例和条件。尽管已经详细描述了本公开的实施方案,但是应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对其进行各种改变、替换和变更。

[0152] 在不偏离其精神或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。事实上,所描述的实施方案在所有方面仅被认为是说明性的而非限制性的。例如,本文所述的方法可以用更少或更多的步骤/操作来执行,或者这些步骤/操作可以以不同的顺序来执行。此外,本文所述的步骤/操作可以彼此并行地重复或执行,或者与相同或相似步骤/操作的不同示例并行地重复和执行。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是由前述描述来指示。在权利要求的含义和等效范围内的所有变化都应包含在其范围内。

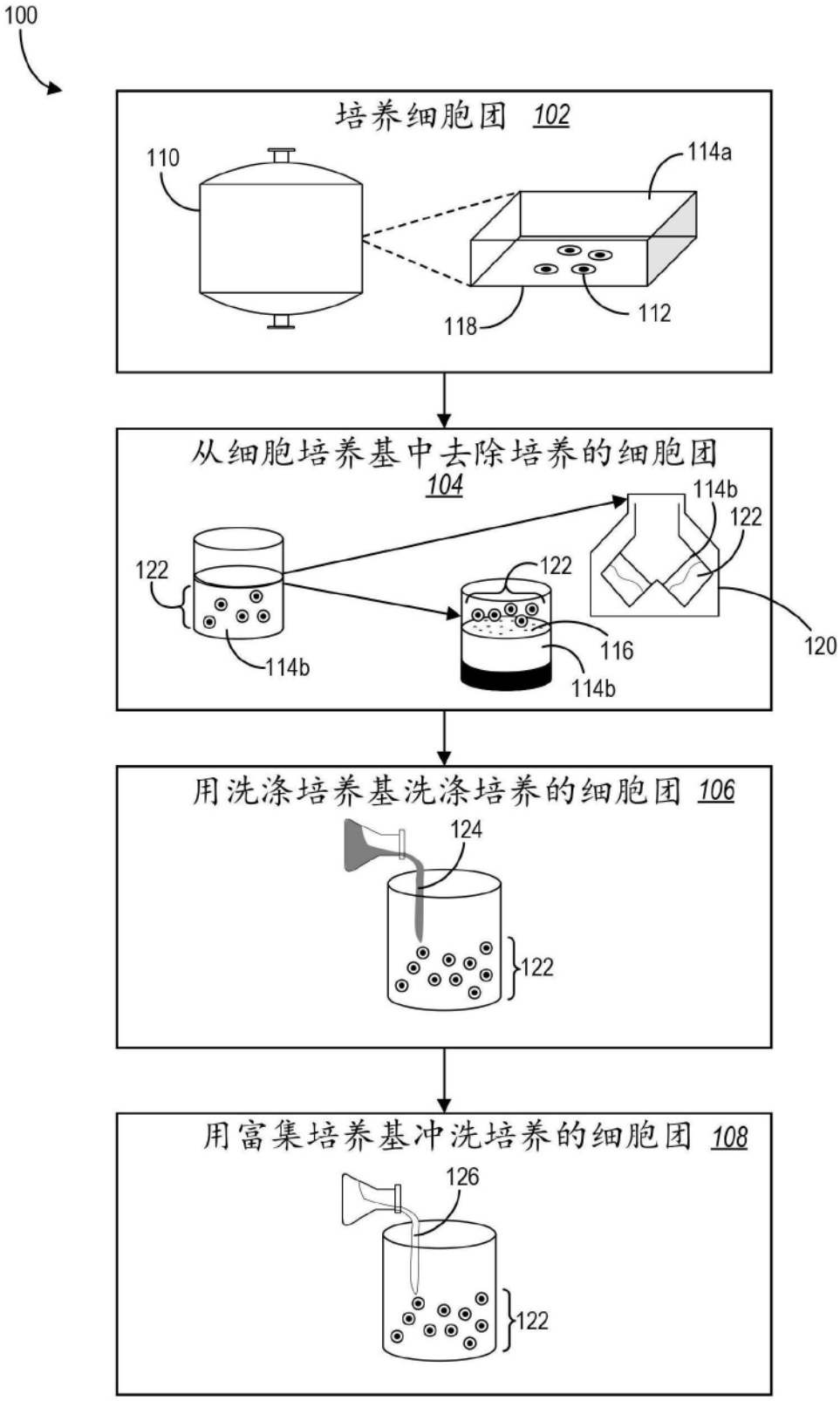

100
培养细胞团 102
110
114a
118
112
从细胞培养基中去除培养的细胞团
104
114b
122
122
116
114b
120
用洗涤培养基洗涤培养的细胞团 106
124
122
用富集培养基冲洗培养的细胞团 108
126
122

图1

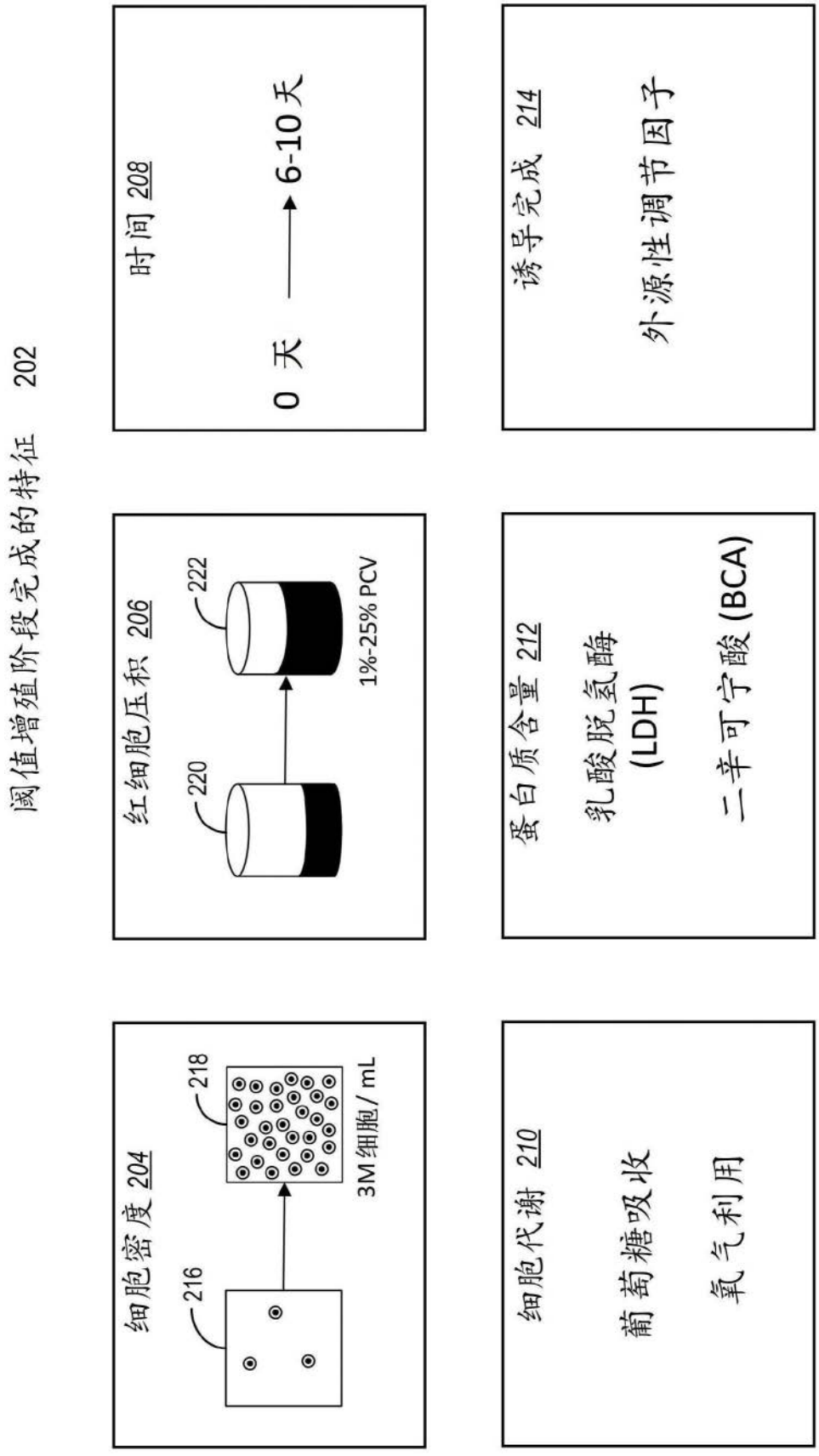

阈值增殖阶段完成的特征 202
细胞密度 204
216
218
3M细胞/mL
红细胞压积 206
220
222
1%-25% PCV
时间 208
0 天
6-10 天
细胞代谢 210
葡萄糖吸收
氧气利用
蛋白质含量 212
乳酸脱氢酶
(LDH)
二辛可宁酸 (BCA)
诱导完成 214
外源性调节因子

图2

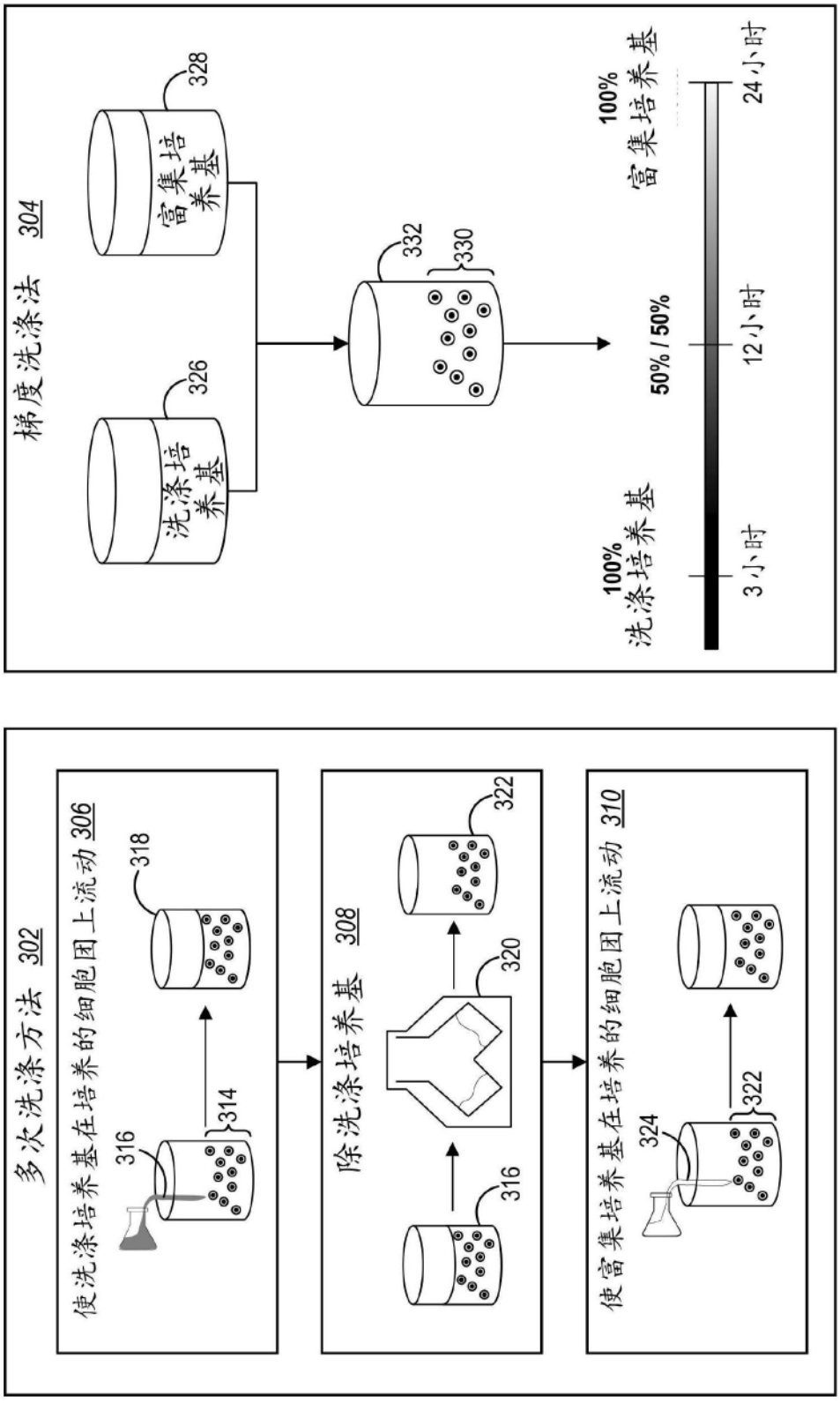

梯度洗涤法 304
洗涤培养基
326
富集培养基
328
332
330
100%
富集培养基
50% / 50%
100%
洗涤培养基
3小时
12小时
24小时
多次洗涤方法 302
使洗涤培养基在培养的细胞团上流动 306
318
316
314
除洗涤培养基 308
322
320
316
使富集培养基在培养的细胞团上流动 310
324
322

图3

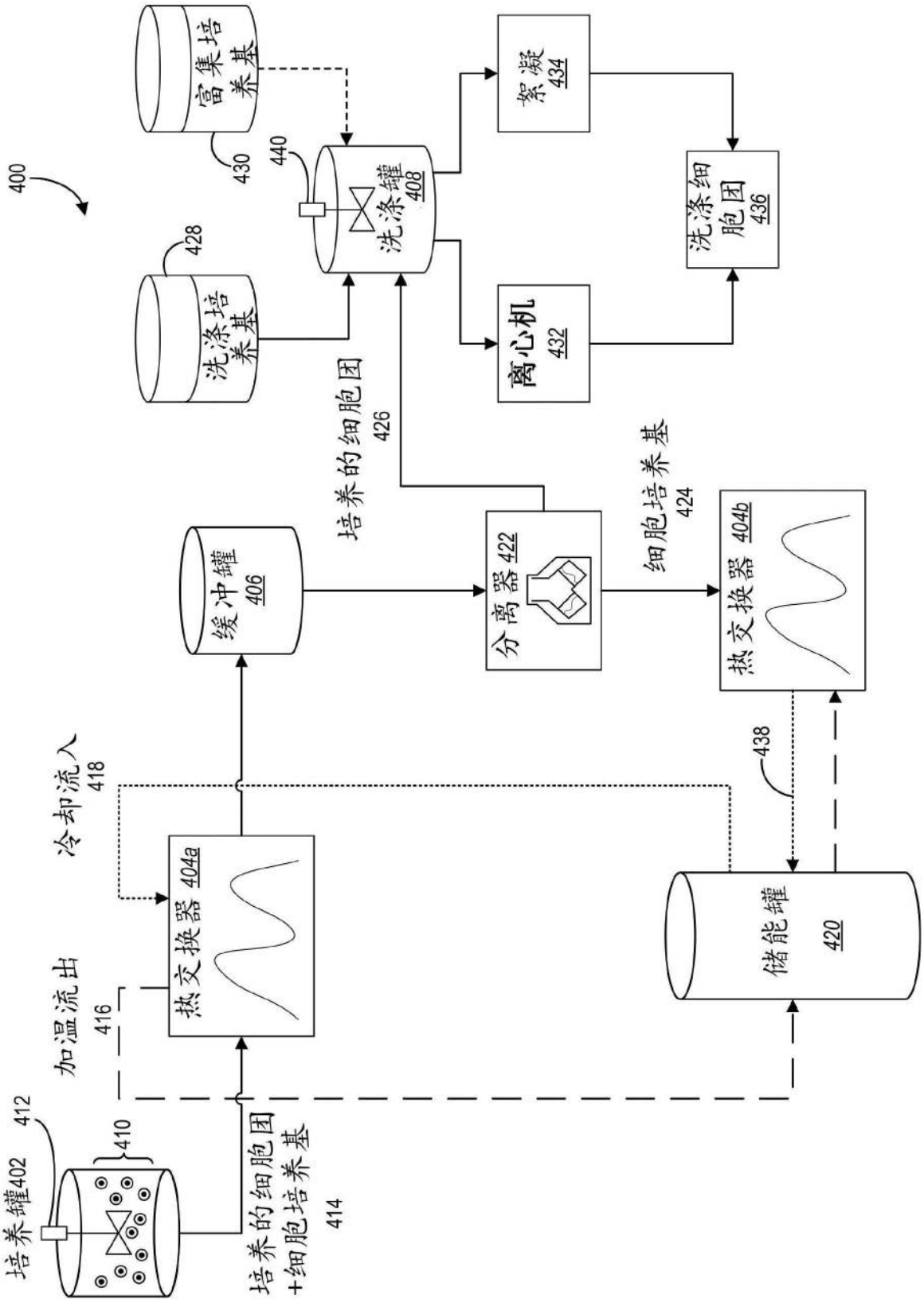

400
富集培养基
430
440
洗涤罐 408
絮凝 434
洗涤细胞团 436
428
洗涤培养基
离心机 432
培养的细胞团 426
缓冲罐 406
分离器 422
细胞培养基 424
热交换器 404b
冷却流入 418
438
热交换器 404a
储能罐 420
加温流出 416
412
410
培养罐402
培养的细胞团+细胞培养基 414

图4


洗涤培养基成分
502
• 盐溶液
• 稀释的PBS
• 柠檬酸
富集培养基成分
504
• 蛋白质/氨基酸
• 抗氧化剂
• 脂肪酸
• 维生素

图5

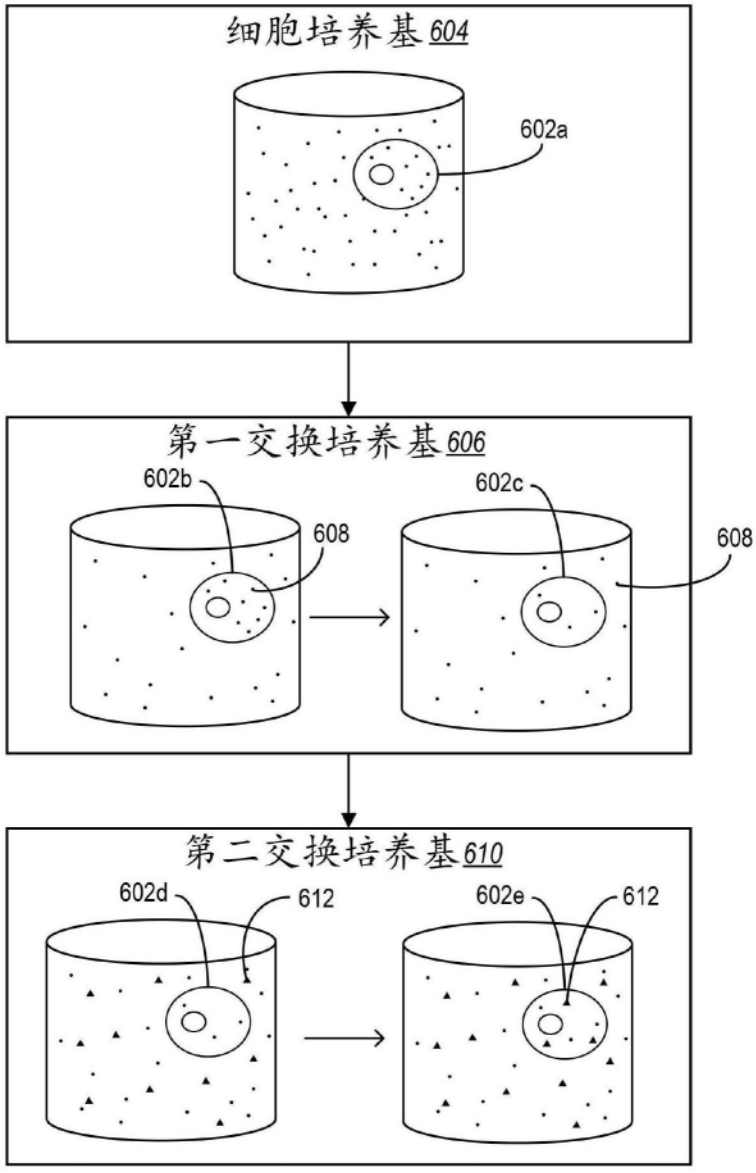

细胞培养基604
602a
第一交换培养基606
602b
608
602c
608
第二交换培养基610
602d
612
602e
612

图6

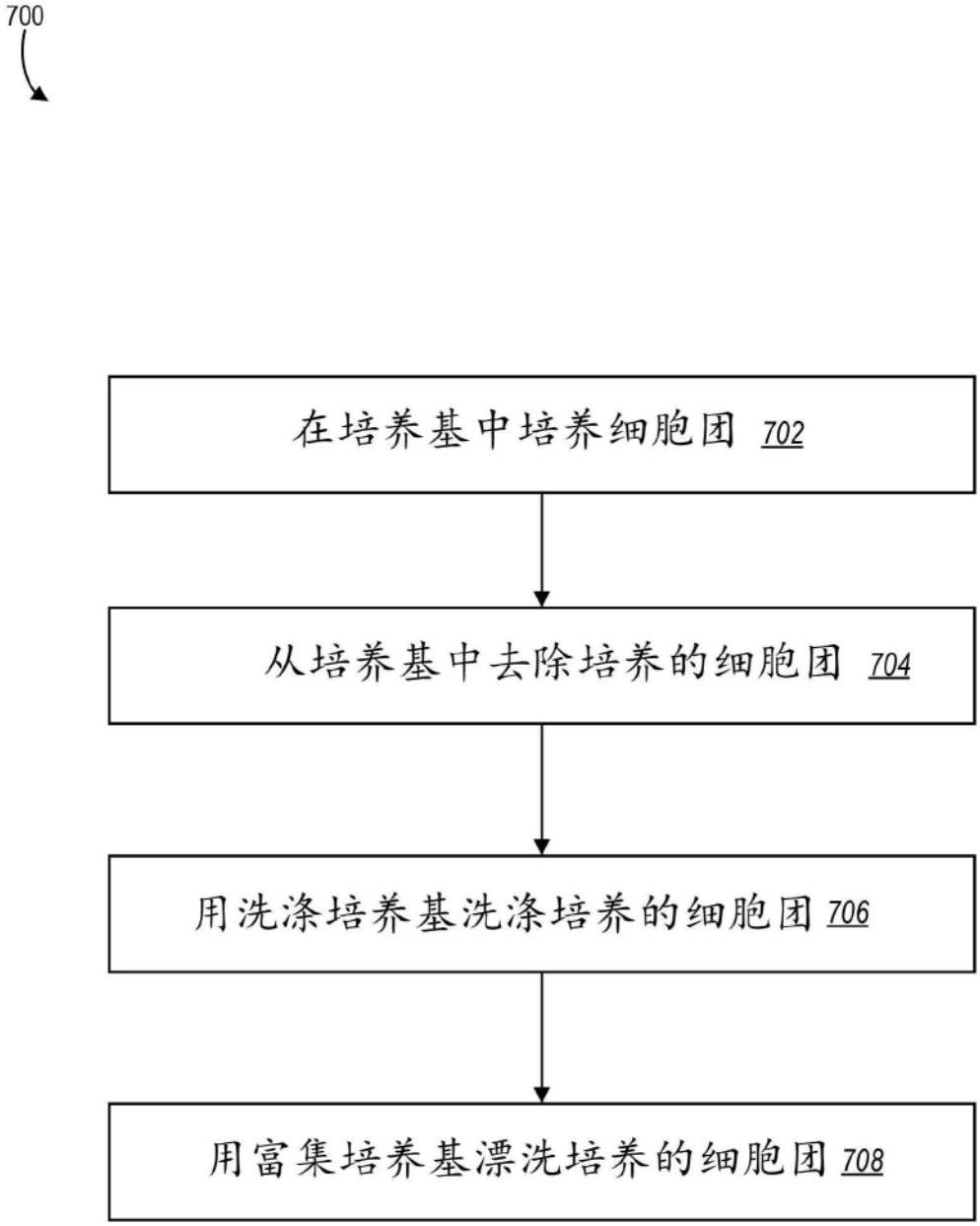

700
在培养基中培养细胞团 702
从培养基中去除培养的细胞团 704
用洗涤培养基洗涤培养的细胞团 706
用富集培养基漂洗培养的细胞团 708

图7

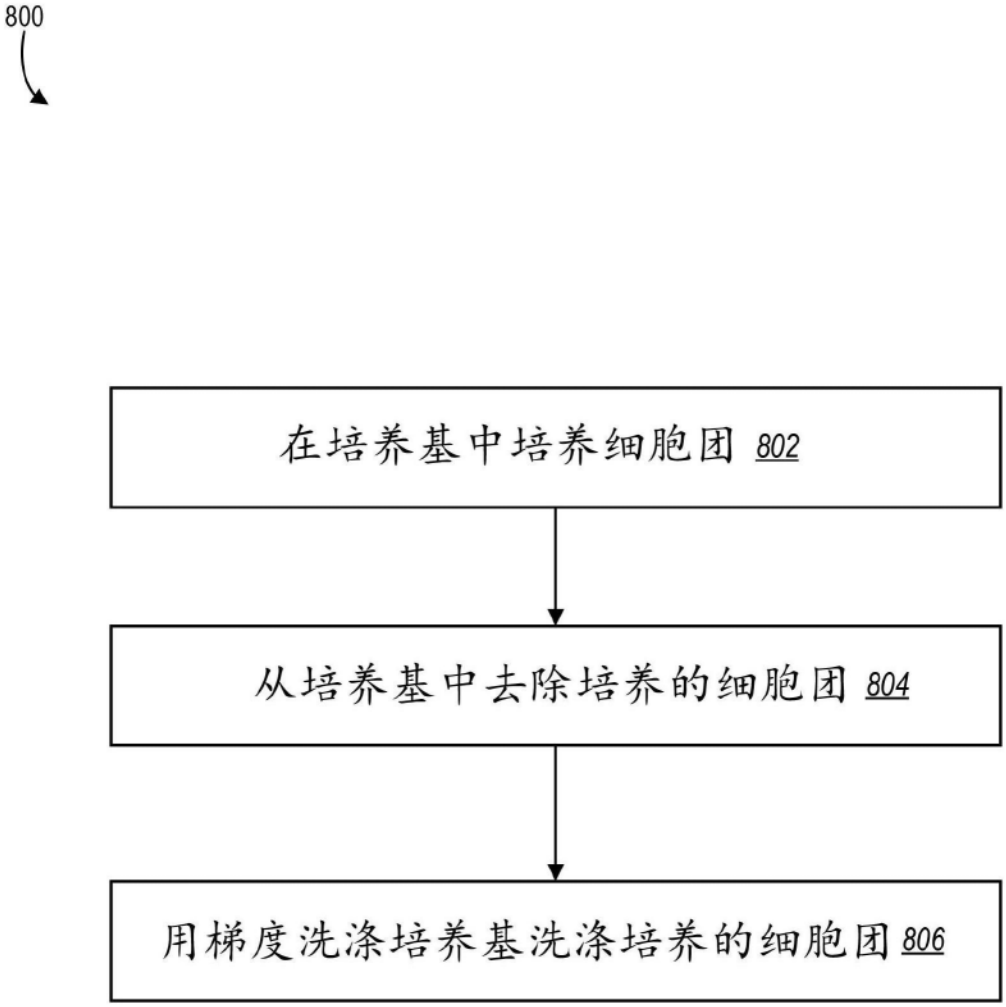

800
在培养基中培养细胞团 802
从培养基中去除培养的细胞团 804
用梯度洗涤培养基洗涤培养的细胞团 806

图8

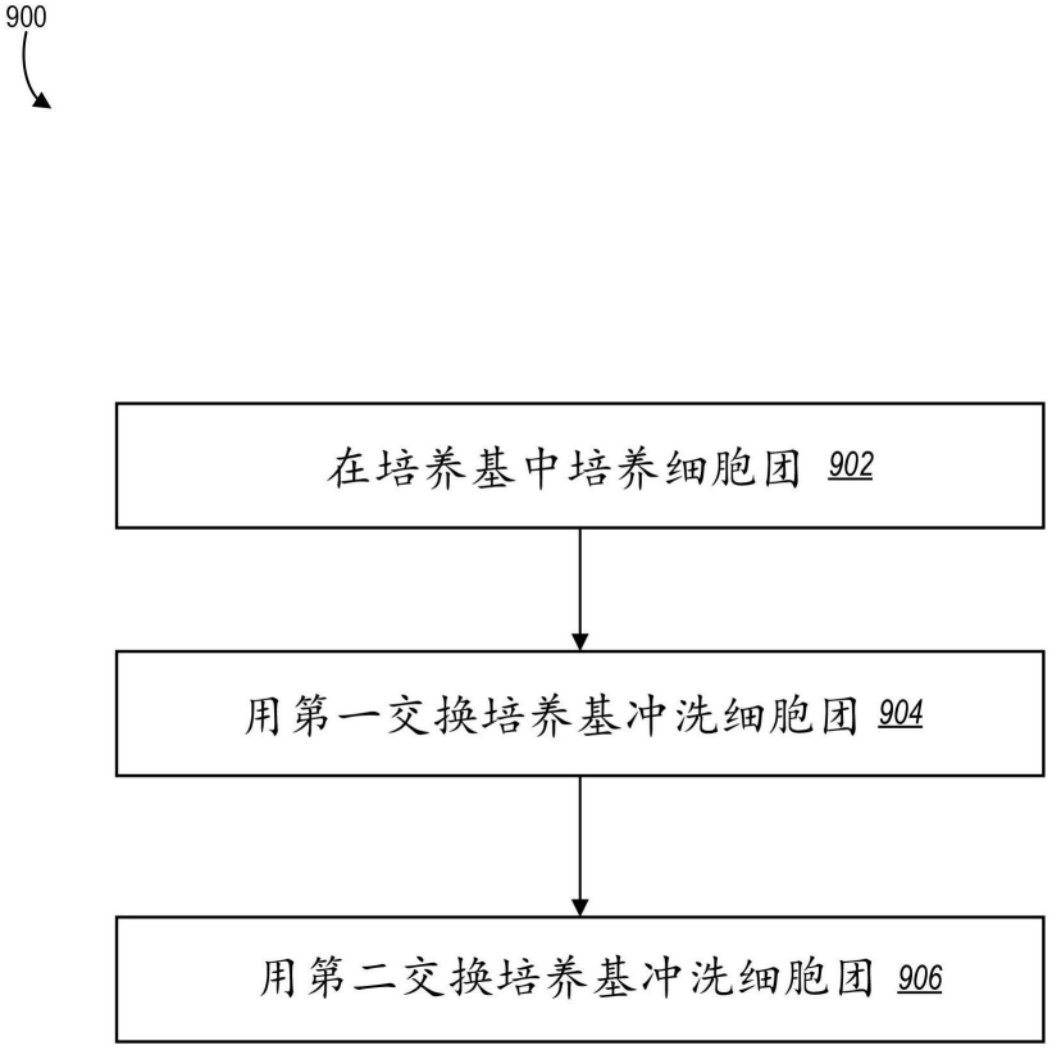


图9