



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101120083 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200480032684. 8

(22) 申请日 2004. 10. 08

(30) 优先权数据

60/509, 651 2003. 10. 08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 05. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/033297 2004. 10. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02005/035728 EN 2005. 04. 21

(73) 专利权人 威尔森沃尔夫制造公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 约翰·R·威尔逊

道格拉斯·A·佩奇 丹·韦尔奇

艾莉森·罗贝克

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

公司 11127

代理人 丁香兰

(51) Int. Cl.

C12M 1/12 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 62032875 A, 1987. 02. 12,

US 5693537 A, 1997. 12. 02,

US 5693537 A, 1997. 12. 02,

US 5437998 A, 1995. 08. 01,

US 5437998 A, 1995. 08. 01,

审查员 周霞

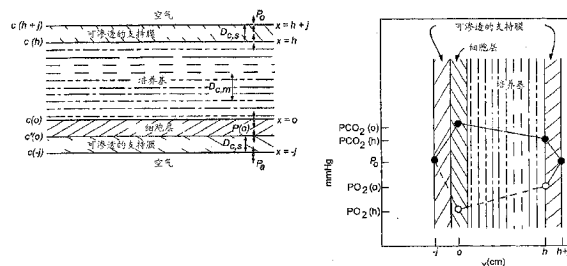
权利要求书 1 页 说明书 38 页 附图 19 页

(54) 发明名称

利用透气性材料进行细胞培养的方法及装置

(57) 摘要

本发明公开了用于细胞培养的透气装置和方法,其中包括具有较高的培养基高度和特定的透气性表面面积与培养基体积之比的细胞培养装置和方法。所述装置和方法有效地改进了细胞培养并提高了效率。



1. 静置的细胞培养装置,所述细胞培养装置包括容器,所述容器包括形成细胞培养室的侧壁和基本水平的底壁,所述细胞培养室具有入口,所述底壁由透气性材料构成,所述侧壁的至少一部分构造成具有从所述底壁起超过 2.0cm 的高度,使得细胞培养基能够驻留在从所述底壁起超过 2.0cm 的高度,

所述装置还包括透气性材料支持物,所述透气性材料支持物在所述底壁和该透气性材料支持物之间与形成气室的所述底壁接触,并起到使所述底壁保持在基本水平的位置的作用。

2. 如权利要求 1 所述的装置,其中,细胞培养基能够驻留在从所述底壁起超过 3.2cm 的高度。

3. 如权利要求 1 所述的装置,其中,细胞培养基能够驻留在从所述底壁起超过 5.09cm 的高度。

4. 如权利要求 1 所述的装置,其中,所述侧壁由透气性材料构成,并且所述侧壁从所述底壁伸展超过 2.54cm。

利用透气性材料进行细胞培养的方法及装置

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2003 年 10 月 8 日提交的美国临时申请 No. 60/509,651 的优先权,在此将其以参考的方式全部引入本文。

技术领域

[0003] 本发明的技术领域涉及提高细胞培养效率的方法及装置。所述方法和装置利用用于气体交换的透气性材料,可增加用于细胞培养的培养基的高度,降低透气装置的表面积与培养基体积容量的比例,并且整合了传统的细胞支持支架。所述方法及装置具有多种益处,包括更有效地使用了库存空间、培养箱空间、处置空间和劳力以及降低了污染风险。

背景技术

[0004] 细胞的培养是生物技术的关键因素。在研究阶段,细胞培养的量少,但当研究转向有利于人类和动物健康的目的时,培养的量通常会增加。这种数量的增加通常被称为放大。某些用于研究阶段细胞培养的装置和方法已经发展成熟,这是因为它们允许培养多种不同的细胞,因此对于大多数使用者是有用的。这些装置包括多孔组织培养板、组织培养瓶、滚瓶和细胞培养袋。令人遗憾的是,这些装置效率低,并且在放大过程中它们在劳力、污染风险以及费用方面的效率就变得更低了。这就需要开发替代的装置和方法,这类装置和方法用于研究并保持改进的放大研究和放大效率。这个讨论确定了常规技术中的许多缺陷,并且提出解决方法,所述方法随后将进行更详细的描述。

[0005] 对于研究规模的细胞培养来说一个必要的属性是低复杂性。复杂性降到最低的装置不需要辅助设备来混合或灌注用于细胞培养的培养基。它们通常是指静置装置。静置装置可以再分为两大类:1) 非透气性且通过气/液界面给细胞提供氧气的装置和 2) 透气性且通过穿过装置的室以气体交换的方式给细胞提供氧气的装置。传统的陪替氏培养皿、多孔组织培养板、组织培养瓶和多架组织培养瓶属于第一类。细胞培养袋和室化瓶(compartmentalized flask)属于第二类。由于包括静置装置中培养基驻留高度受限在内的各种原因,所有这些静置装置的效率都很低。

[0006] 由于提供气体交换的方法方面的原因,培养基在陪替氏培养皿、多孔组织培养板、组织培养瓶和多架组织培养瓶中的高度受限。为了满足细胞的需要,氧气必须从气/液界面扩散到装置中驻留有细胞的下表面。为了确保充足的氧气供应,推荐在这些装置中所采用的用于细胞培养的培养基的最高高度为约 3mm。

[0007] 培养基的高度受限会导致各种缺陷。这会形成很小的只能支持少量细胞的培养基体积。培养基需要连续地取出和添加以维持培养,由此增加了操作的频度、劳力和污染风险。在装置中培养更多细胞的唯一方式是使装置的占地面积更大,从而可以存在更多的培养基。制造占地面积大的装置从制造观点来看是个挑战,很快超过了在典型培养箱和无菌工作台中可用的空间,使装置更加难以操作。因此,可商购获得的细胞培养装置是小的。因此,放大培养需要多个装置或选择更精密、复杂而昂贵的替代方式。

[0008] 依靠气 / 液界面来发挥作用的静置装置存在一些固有的问题,组织培养瓶就是一个很好实例。组织培养瓶中允许细胞驻留表面的面积范围典型地为 25cm^2 至 225cm^2 。推荐用于组织培养瓶的培养基高度在 2mm 和 3mm 之间。例如,Corning®推荐它的 T-225 cm^2 瓶工作体积为 45ml ~ 67.5ml。因此,1000ml 的培养物需要 15 ~ 22 个 T-225 cm^2 瓶。这样不仅需要给 15 ~ 22 个装置装料,从而导致劳力和污染风险增加,而且由于培养瓶以容纳约 95% 气体和仅 5% 的培养基的方式进行设计,因此空间的利用效率非常之低。例如,典型的 T-175 瓶的占地面积约为 23cm 长 × 11cm 宽,高约 3.7cm,因此占约 936 cm^3 的空间。然而操作时所述培养瓶典型地具有不超过约 50ml 的培养基。因此,在瓶体 (50ml) 中存在的培养基相对于瓶体 (936 cm^3) 所占的空间显示出培养瓶容量几乎 95% 只不过是气体。空间的低效利用除了浪费宝贵的培养箱空间外,还增加了运输、灭菌、储存和处置的费用。

[0009] 常用于研究规模的细胞培养的装置的另一个例子是多孔组织培养板。对于传统的组织培养瓶,将气 / 液界面保持在每一个孔的底部上仅 2mm 至 3mm 的高度是标准的操作方法。当在细胞培养实验室中移动板时,为了防止溅出,典型的可商购获得的 96 孔组织培养板的每个孔约 9mm 深。对于 6 孔组织培养板,深度增加至约 18mm。在 96 孔板的情况中,气体约占每个孔的 75%,而培养基约占每个孔的 25%。在 6 孔板的情况中,气体约占每个孔的 95%,而培养基约占每个孔的 5%。这种低效的几何形状增加了装置运输、灭菌、储存和处置的费用。

[0010] 在许多应用中,需要通过取出或替换少量的培养基来经常供给培养物是会有问题的。例如,如果多孔组织培养板的目的是为了进行试验,则操作培养基可能会影响到那些试验的结果。而且,由于培养基的量如此之少,只要少量蒸发就可能会发生溶质浓度的不利变化。允许培养基以较高的高度驻留而不损害细胞培养功能的多孔组织培养板,由于使需要保持培养物存活的操作最小化并且减少因蒸发引起的浓度变化的量,因此优于那些传统的培养板。

[0011] 频繁地更换培养基不仅耗时、昂贵,并且导致污染风险的增加。通过特定的液体操作设备如多道移液枪来缓解所述问题的尝试并没有针对问题的来源,即低培养基高度。最好的解决方法是允许在每一个孔中驻留更多的培养基。遗憾地是,这种方法对于传统培养板是不可能的,这是因为传统培养板需要通过气 / 液界面的方式进行气体交换。

[0012] 需要有更好的替代传统装置的方式。如果有这样的组织培养装置:不仅仅依靠气 / 液界面来发挥作用,与使用传统培养瓶和多孔板一样容易,允许在具有同样的占地面积的装置中培养更多的细胞,并且容易地和线性地放大,这些有效的改善将使使用细胞来促进人类和动物健康所需费用的降低。本文将显示如何使用透气性材料和新的构造来达到这个目的。

[0013] 已有不采用气 / 液界面作为气体交换唯一来源的细胞培养装置的提议,并且已经使所述细胞培养装置进入市场。这种方式依赖于使用下部的透气性膜来将气体交换带到培养基的底部。与仅仅依赖于气 / 液界面的装置相反的是,这种细胞培养装置允许更多的气体交换。所述提议和可商购获得的装置包括细胞培养袋、室化的透气瓶、透气筒、透气性陪替氏培养皿、透气性多孔板和透气性滚瓶。

[0014] 令人遗憾的是,所述的每一种透气装置都存在其所固有的低效率和放大缺陷。细胞培养袋、透气筒、透气性陪替氏培养皿、透气性多孔板、室化的透气瓶和透气滚瓶的主要缺陷包括培养基高度受限、透气表面的面积与培养基体积的比例过大、和对用于培养贴壁细胞的几何形状欠佳。结果使得为放大而必需采用大量的装置、限制了装置设计的选择方

案以及随着放大的发生而增加费用和复杂性。

[0015] 对围绕着透气装置的现有技术所进行的仔细调查证明了传统观念和装置设计是如何限制培养基高度和驻留于装置中的培养基的体积的。1976 年,在题目为 Diffusion in Tissue Cultures on Gas-permeable and Impermeable Supports(Jensen 等,J.Theor. Biol. 56,443-458(1976)) 的文章中,分析了由透气膜制成的封闭容器的操作理论。Jensen 等将扩散描述为培养基中溶质运输的方式,并且该文章提到“扩散按照菲克定律(Fick's laws)进行”。Jensen 等提到“图 2[Jensen 等的]显示在由透气性材料制成的袋中培养的细胞的扩散特点”。本文中的图 1A 显示 Jensen 等的图 2,其中 D_m 是培养基的扩散常数。本文的图 1B 显示 Jensen 等的图 3,其中将透气容器中的 PO_2 和 PCO_2 的稳定态值的模型显示为基于扩散的整个培养基的线性衰减。

[0016] 在 1977 年,Jensen(Jensen, Mona D. “Mass cell culture in a controlled environment”, Cell Culture and its Applications, Academic Press 1977)描述了一种通过使用“透气无孔的塑料膜”来形成细胞培养装置的“主要创新”。本文的图 2 显示 Jensen 的图 2。如图 2 所示,该装置形成了非常低的仅 0.76mm 的培养基高度和非常高的透气表面的面积与培养基体积的比例。为了放大,该装置长达 30 英尺,并且使用常规的设备进行灌注。

[0017] 在 1981 年,Jensen(Biotechnology and Bioengineering, 第 XXIII 卷, 第 2703-2716 页 (1981)) 特别提到“培养容器设计必须体现出对于培养的所 有细胞来说是固定和恒定的小的扩散距离。该设计必须使得放大培养不改变扩散距离”。事实上,培养基不应当驻留于远离透气性膜的高度上的传统的观念一直延续到今天,如通过利用透气性材料的商业产品和与它们有关的专利就是明证。而且,透气表面的面积与培养基体积的高比例也还继续采用。

[0018] 从 1981 年起,各种透气的细胞培养装置已经进入市场,并受到了人们的推崇。然而,根据对于透气装置的发明、装置设计、装置说明和操作说明书的观察,继续依赖于将扩散作为主要设计因素的扩散似乎是理所当然的。作为设计标准,用于扩散的模型限制了培养基的高度,造成透气表面的面积与培养基体积的高比例,并且提供低效的装置几何形状。

[0019] 可商购获得的透气的细胞培养袋形装置是目前用于细胞培养的标准装置形式。如同 Jensen 的构造,这些产品允许通过透气性材料穿过培养基的上下表面进行气体交换。与 Jensen 提出的装置不同的是不需要进行灌注。典型地,它们不进行灌注,而是置于细胞培养的培养箱中。这降低了费用和复杂性,并且使它们成为市场上可接受的装置。然而,当其中驻留细胞培养基时,在透气性膜之间的有限距离对于使它们具有不适合用于有效地放大的几何形状。由于需要更多的培养基,袋子的尺寸在横向方向上必须按比例加大。于是,尺寸超过 2 升对它们来说由于会使放大需要大量的装置,因此通常是不可行的。而且,它们与用于传统装置的标准液体处理用具不匹配,从而增加了进行研究规模的培养的复杂性。

[0020] 袋子是通过将两片透气膜层压在一起而制成的。一个典型的袋子的剖面图显示在取自于美国专利 No. 5686304 的图 3 中,这种袋子已经被商化为 Si-Culture™ 袋 (Medtronic Inc.)。传统静置细胞培养装置的一个有利特征是培养基均匀地分布于驻留细胞的区域中。为确保培养基在整个装置中的高度恒定的目的,本领域技术人员特别需要注意调整培养箱水平。通过观察图 3 中袋子的剖面图,可以看出为什么不管培养箱的水平如何,培养基在整

个下部的透气性膜上并没有处于一致的高度。因为膜在周边进行接合,所以培养基被强制驻留于靠近周边而不是袋子中别的地方的不同高度。随着培养基体积的增加,袋子开始呈现出圆柱形,因此培养基分布变得更差。由于形状不一致,细胞遭遇到潜在的营养梯度。如果袋子中的培养基过多,则下表面将呈非水平状态。那样也会产生问题。驻留于袋子中的悬浮细胞将分布不均。相反,它们将由于重力作用而沉积在低点、堆积并因营养和氧气在积堆内形成梯度而死亡。在贴壁细胞的情况中,它们接种也是不均匀的,这是因为驻留于袋子每一部分的接种物的量发生变化。如果袋子过满,除了产生几何形状问题之外,培养基的重量超过 1000ml 也可能使如美国专利 No. 5686304 描述的袋子损坏。即使克服袋子的几何形状缺陷,基于当培养基驻留的高度过高时扩散障碍将阻止装置发挥作用的观念,与袋子和透气的其它装置有关的说明和专利表明仍然存在缺陷。

[0021] 细胞培养袋是从 OriGen Biomedical Group (OriGen PermaLife™ 袋)、Baxter (与美国专利 No. 4829002、4937194、5935847、6297046B1 相关的 **Lifecell® X-Fold™**)、Medtronic (Si-Culture™, 美国专利 No. 5686304)、Biovectra (VectraCell™)、和美国 Fluoroseal (VueLife™ 培养袋系统,被美国专利 No. 4847462 和 4945203 所包含) 商购的。说明书、操作说明书和 / 或专利规定了各产品的培养基的高度和透气表面的面积与培养基体积的比例。

[0022] Pattillo 等 (转让给 Baxter International Inc. 的美国专利 No. 4829002 和 4937194) 指出,一般将袋子“填充到约占总容积的四分之一至二分之一,以提供相对高的培养基的体积的内表面积与细胞的比例,使得大量的氧气可以扩散到袋子内,并且二氧化碳可以扩散到袋子外,从而有利于细胞的代谢和生长”。根据 Pattillo 等的描述,对于 Baxter **Lifecell® X-Fold™** 袋子来说,可以获得最佳培养基高度的是它们的 600cm² 袋子,该袋子获得 1.0cm 至 2.0cm 的培养基高度,并且透气表面的面积与培养基体积的比例为 2.0cm²/ml 至 1.0cm²/ml。

[0023] VectraCell™ 袋子的产品说明提到“VectraCell11L 的容器可以容纳至多达 500mL 的培养基。VectraCell13L 的容器可以容纳至多达 1500mL 的培养基”。因此,如同 Baxter 袋子那样,最大培养基体积是袋子总容量的一半。在所提供的各种尺寸的袋子中,3L 的袋子所允许的培养基高度最高,为 1.92cm,并且最小的透气表面的面积与培养基体积之比为 1.04cm²/ml。

[0024] 对于在产品说明和美国专利 5686304 中载明的 Si-Culture™ 袋,当驻留于进行物理混合培养基的定轨摇床中时,推荐的培养基高度的 1.6cm。当在混合环境中使用时,如此可获得透气表面的面积与培养基体积的比例为 1.25cm²/ml。由于混合通常用于破坏扩散梯度并且加强溶质的转移,本领域的技术人员应该明了,当袋子不放在定轨摇床中时,培养基的高度应会降低。

[0025] 在 VueLife™ 袋子的产品说明中特别推荐用高度不超过 1 厘米厚的培养基填充 VueLife™ 培养袋,这是因为“额外的培养基可能会影响营养或气体的扩散”。因此,有关扩散的因素限制了 VueLife™ 袋中的培养基高度。如此在 1.0cm 的培养基高度获得了透气表面的面积与培养基体积之比为 2.0cm²/ml。

[0026] OriGen PermaLife™ 袋的产品说明载明了在 1.0cm 的培养基高度 (与 VueLife™ 的高度相同) 的额定容量。在所提供的各种 PermaLife™ 袋中,它们的 120ml 的袋子所提供的

最小透气表面的面积与培养基体积的比例为 $1.8\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0027] 有限的培养基高度的最终结果是采用这些产品进行放大是不实用的。例如,如果放大 Lifecell X-Fold™ 袋,以使其在 2.0cm 的培养基高度能够容纳 10L 的培养基,其所需的占地面积将至少为 5000cm^2 。这不仅是难以处理的形状,使占地面积会很快超过标准的用于细胞培养的培养箱,导致需要定做的培养箱。而且,在袋子中所利用的气体交换面积比所需的面积更大,这是因为所有这些构造都依赖袋子的上下表面来进行气体交换。

[0028] 这种不实用的几何形状已经限制了可商购获得的袋子的尺寸。从各供应商获得的最大袋子在振荡时所推荐的培养基体积为:OriGenPermaLife™ 袋的 220ml、VueLife™ 袋的 730ml、Lifecell® X-Fold™ 袋的 1000ml、VectraCell™ 袋的 1500ml 以及 Si-Culture™ 袋的 2000ml。因此,放大需要用到大量的单个袋子,使该过程的效率由于包括劳力和污染风险加大等各种原因而降低。

[0029] 细胞培养袋的另一个缺点是它们不象常规培养瓶那样容易使用。液体进出都很麻烦。它们设有与注射器、针或泵管适配的管连接。这适合于封闭系统操作,但是对于研究规模的培养,使用移液枪是处理液体更容易和更常用的方法。当需要加到或取自袋子的培养基的量超过典型的大型注射器的 60ml 体积时,不能使用移液枪是非常不方便的。在该种情况下,每转移 60ml,注射器必须与导管连接又脱接。例如,包含 600ml 的袋子将需要与 60ml 注射器进行高达 10 次的连接和 10 次的脱接,增加了处理袋子的时间和污染的可能性。为了使连接的次数减到最小,可以使用泵来转移培养基。然而,这增加了小规模培养的费用和复杂性。许多利用细胞培养袋的杂交瘤核心实验室一经开始就填充它们,并且不再加入细胞,这是由于这些连接和泵的复杂性所引起的高污染风险性。

[0030] Matusmiya 等(美国专利 No. 5225346)试图通过对袋子和培养基储存室进行整合来解决液体输送的问题。将培养室和培养基储存室连接起来,当需要新鲜的培养基时,将培养基从培养基室输送到培养室。虽然这能够有助于培养基的输送,但是没有解决限制袋子放大效率的培养基高度有限和透气表面的面积与培养基体积的比例高的问题。该发明所提供的培养基高度为 0.37cm,透气表面的面积与培养基体积的比例为 $5.4\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0031] 筒式透气的细胞培养装置已被引入市场,与细胞培养袋不同的是,该装置具有侧壁。这些类型的装置利用侧壁来将透气的上下膜分开。这允许整个装置的培养基高度一致。遗憾的是,由于这些装置只含有少量的培养基,因此甚至比袋子更不适合放大,因为它们仅包含少量的培养基。培养基体积小是试图产生高的透气表面的面积与培养基体积的比例的结果。

[0032] 有一种由 BioChrystal 公司提供的产品称为 Opticell®。这种产品是一种容器,它通过透气性硅树脂膜而固定在各具有 50cm^2 表面积的上下面上。侧壁所包括的材料不是选择用于气体交换,而是提供分离上下气体膜所需要的刚性。产品说明强调了它的关键特征,“两个生长表面具有大的表面积与体积的比例”。在 Genetic Engineering News 的有关这种产品的一篇文章(2000 年 12 月第 20 卷第 21 期)中,专利申请人 Barbera-Guillem 提到“采用微滴板的占地面积,使膜面积已经得到最大化,而体积得到最小化,从而获得提供具有最大气体交换的大的生长面积”。这种确定如何使用这种产品的操作程序规定了只导入 10ml 培养基,据此限定培养基可以驻留的高度为 0.2cm。涉及这种装置的美国专利申请 No. 10/183132(2002 年 6 月 25 日申请)提到高度达到 0.5 英寸(1.27cm)是可能的,但是更优选的高度是约 0.07 英寸至约 0.08 英寸(0.18cm 至约 0.2cm)。也与这种装置有关的

W00056870 提到高度高达 20mm 是可能的,但是更优选的高度为 4mm。即使在商业装置中采用如该专利中描述的更高的高度,即 1.27mm,所述培养基高度也不会超过袋子允许的高度。此外,如此只会将透气表面的面积与培养基体积的比例降低到 $1.00\text{cm}^2/\text{ml}$,这与所述袋子是相似的。美国专利申请 No. 10/183132 显示一种结构,其中装置只有一个侧面是透气的。在未经商业化的所述结构中,在 0.5 英寸 (1.27cm) 的培养基高度获得的透气表面的面积与培养基体积的比例为 $0.79\text{cm}^2/\text{ml}$,该比例比细胞培养袋的要低一些。因此,尽管有侧壁,甚至当几何形状允许培养基达到最大高度时,相对于袋子,这种结构也没有改善放大效率。

[0033] 筒式透气的细胞培养装置也已经由 Laboratories MABIO-International® 引入市场,该装置称为 CLINICell® Culture Cassettes。与 Opticell® 一样,该装置的产品设计与操作说明均没有提及相对于袋子来说增加了的培养基高度、或降低了的透气表面的面积与培养基体积的比例。CLINICell® 25 Culture Cassettes 的操作说明提到,驻留于 25cm^2 的下部的透气性表面上的培养基不应当超过 10ml。由于下部的透气性材料的表面积仅为 25cm^2 ,因此形成的培养基高度只有 0.4cm。而且,由于装置的顶部和低部均由透气性材料构成,因此透气表面的面积与培养基体积的比例高,为 $5.0\text{cm}^2/\text{ml}$ 。CLINICell® 250 Culture Cassettes 的操作说明提到,驻留于下部 250cm^2 透气性表面上的培养基不应当超过 160ml,因此形成的培养基高度低,为 0.64cm,并且透气表面的面积与培养基体积的比例高,为 $3.125\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0034] 筒式透气的细胞培养装置最近也已经由 Celartis 引入市场,称为 Petaka™。与 Opticell® 和 CLINICell® Culture Cassettes 一样,这些装置也具有侧壁,该侧壁具有作为分离上下透气性膜的单元的作用。与那些产品不同的是,该装置与标准的移液枪和注射器是相容的,因此液体处理更加方便。然而,该装置的产品设计与操作说明均没有提及相对于袋子来说增加了的培养基高度、或降低了的透气表面的面积与培养基体积的比例。操作说明提到,驻留于透气上下表面之间的培养基不应当超过 25ml,所述上下表面的总表面积为 160cm^2 。产品说明载明“最优化的培养基 / 表面积”为 $0.156\text{ml}/\text{cm}^2$ 。因此,培养基高度仅为 0.31cm,而最优化的透气表面的面积与培养基体积的比例为 $6.4\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0035] 当回顾这些装置可获得的最大培养体积时,可商购获得的用于放大的筒式透气的细胞培养装置的缺陷就会变得清楚。Opticell® 提供的培养体积至多达 10ml,CLINICell® Culture Cassettes 提供的培养体积至多达 160ml,而 Petaka™ 提供的培养体积至多达 25ml。因此,仅为进行 1000ml 的培养,就需要 100 个 Opticell® 筒,7 个 CLINICell® Culture Cassettes,或 40 个 Petaka™ 筒。

[0036] Vivascience Sartorius Group 将称为 petriPERM 的透气性陪替氏培养皿引进市场。petriPERM35 和 petriPERM50 分别采用常规的 35mm 和 50mm 直径的陪替氏培养皿产品的形式。底部是透气性的。PetriPERM35mm 培养皿和 petriPERM50mm 培养皿的高分别为 6mm 和 12mm。Vivascience 产品说明显示 petriPERM35 的透气性膜的面积为 9.6cm^2 ,最大的液体体积为 3.5ml,得到的最大培养基高度为 0.36cm。而 petriPERM50 的透气性膜面积为 19.6cm^2 ,最大液体体积为 10ml,得到的最大培养基高度为 0.51cm。petriPERM 产品设计成具有盖子,其允许培养基的上表面与周围的气体交换,下部的透气性材料允许培养基的下表面与周围的气体交换。因此,petriPERM35 的透气表面的面积与培养基体积的比例的最小值为 $2.74\text{cm}^2/\text{ml}$,petriPERM50 的最小值为 $1.96\text{cm}^2/\text{ml}$ 。与其它的透气装置一样,petriPERM

产品用于放大的效率也很低。仅为了进行 1000ml 的培养,就需要至少 100 个装置。而且这些装置不能作为封闭系统进行操作。

[0037] Gabridge(美国专利 No. 4435508) 描述了设有与陪替氏培养皿一样的顶盖的透气的细胞培养装置,其设计用于高分辨的显微镜。孔的深度是基于“显微镜的最方便的尺寸”,即 0.25 英寸 (0.635cm)。该装置最大能够容纳 0.635cm 厚度的培养基。

[0038] Vivascience Sartorius Group 也已经将称为 Lumox Multiwell 的透气多孔组织培养板引进市场。这些产品也由 Greuner Bio-One 分销。它们采用 24 孔、96 孔和 384 孔形式。板的底部是由具有非常低的自动荧光的透气的 50 微米膜制成。就每个孔的壁高来说,24 孔类型的为 16.5mm,96 孔类型的为 10.9mm,384 孔类型的为 11.5mm。就每个孔的培养基的规定最大工作高度来说,24 孔类型的为 1.03cm,96 孔类型的为 0.97cm,384 孔类型的为 0.91cm。尽管相对于常规的多孔板培养基高度有所改善,但是它仍然落在其它静置透气装置的限制界限之内。

[0039] Fuller 等 (W001/92462A1) 提出了一种透气多孔板,该板通过构造表面,增加了底部透气性硅树脂材料的表面积。然而,壁高被限制为只有“标准微滴板”的高度,因此,相对于传统板并没有增加培养基高度。

[0040] 通常,如果静置透气的细胞培养装置可以利用比可商购获得的装置所使用的膜更厚的膜,这将是有益的。如美国专利 No. 5686304 所述,按照依赖于硅树脂的单室静置透气的细胞培养装置的常规观念规定,适当的功能需要厚度等于或小于约 0.005 英寸的透气性材料。Si-Culture™ 袋由二甲基硅树脂构成,厚约 0.0045 英寸。Barbera-Guillem 等 (美国专利申请 No. 10/183132) 和 Barbera-Guillem(W000/56870) 提到,当膜由下列合适的聚合物构成时,透气性膜的厚度可以在约小于 0.00125 英寸至约 0.005 英寸范围内,所述的聚合物包括聚苯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚烯烃、乙烯乙酸乙烯酯、聚丙烯、聚砜、聚四氟乙烯或硅氧烷共聚物。保持这样薄的膜是不利的,这是因为这种膜易于穿孔,在制备中容易形成针孔,并且除了压延之外,很难通过其它的方法制造,所述的压延法除了片状外形之外,不允许其它外形。本文将说明如何超出传统观念而增加硅树脂厚度而不会妨碍细胞培养。

[0041] 改进的静置透气装置是需要的。如果透气装置能在竖直方向上放大,效率将会提高,这是因为大量的培养能够在任何给定占地面积的装置中进行,并且可以得到更多的人机工程学的设计方案。

[0042] 室化的静置透气装置是提供了传统培养装置的替代方式的另外一种类型产品。然而,它们的放大效率也为培养基高度受限和过高的透气表面的面积与培养基体量的比例所限制。这些类型的装置对通过将细胞截留在透气性膜和半透膜之间来形成高密度的培养环境是特别有用的。尽管未经商业化,但是 Vogler(美国专利 No. 4748124) 公开了室化的装置结构,该结构将细胞置于靠近透气性材料,并含有非透气性的侧壁。这种细胞隔室由下部的透气性材料构成,并且通过上部的半透膜限定。培养基室直接并且完全地驻留于半透膜上。透气膜驻留于培养基室的顶部。培养基经限制而完全驻留于装置的透气的底部。该专利描述了这样的试验,该试验采用由 0.4cm 侧壁构成的细胞培养室、由 0.8cm 侧壁构成的培养基室、9ml 的细胞培养体积、18ml 的基础培养基体积、22cm² 的透气下膜和 22cm² 的透气上膜。这形成了 0.4cm 的细胞室培养基高度,并允许培养基驻留于培养基室中的高度为 0.8cm。此外,总透气表面的面积与总培养基体积之比高,为 1.76cm²/ml。在一篇题为“A

Compartmentalized Device for the Culture of Animal Cells” (Biomat., Art. Cells, Art. Org., 17(5), 597-610 (1989)) 的文章中, Vogler 提出使用美国专利 No. 4748124 装置的生物结果。该文章特别引用 1976 年 Jenson 等和 1981 年 Jenson 的文章作为“操作的理论基础”。测试设备的尺寸描述如下:下部的透气性膜为 28.7cm^2 、上部的透气性膜为 28.7cm^2 、高度为 0.18cm 的细胞室壁允许 5.1ml 的培养基驻留于细胞室中, 0.97cm 高度的培养基室壁允许 27.8ml 的培养基驻留于培养基室中。细胞室中培养基的总高度被限制至 0.18cm , 培养基室中的总高度被限制至 0.97cm , 透气总表面积与培养基总体积的比例高, 为 $1.74\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0043] Integra Biosciences 销售有称为 CELLline™ 室化的透气产品。如同 Vogler 的装置一样, 细胞室有下部的透气性膜与上部的半透膜限定。然而, 与 Vogler 的几何形状不同的是, 装置中所有的培养基不需要全部驻留于透气性膜上。仅需要基础培养基的一部分驻留于半透膜上。该专利包括了 Integra Biosciences 产品, 该专利与产品说明描述了在细胞室中将液体高度保持低于约 15mm 的必要性。并描述每平方厘米透气性膜的表面积 5ml 至 10ml 的营养培养基的比例对于细胞维持是适当的 (美国专利 No. 5693537 和美国专利 No. 5707869)。尽管就加料频率最小化来说, 增加培养基体积与细胞培养面积的比例是有利的, 但是实践中每平方厘米透气表面的面积上的培养基高度是有限的。这些专利包括的装置的商业设计表明, 它们与其它透气装置一样, 限制了可以驻留于细胞上的培养基的量。为了降低直接驻留于细胞上的培养基的高度, 培养基体积有一半并没有直接驻留于半透膜上面的区域中。装置的非透气性侧壁经设计使得当根据使用说明操作装置时, CELLline™ 产品中半透膜上所驻留的培养基的高度在 CL1000 中为约 3.8cm , 在 CL350 中为 2.6cm , 在 CL6Well 中为 1.9cm 。当根据使用说明操作时, 细胞培养室中所驻留的培养基的高度在 CL1000 中为 15mm , 在 CL350 中为 14mm , 在 CL6Well 中为 26mm 。该专利描述和该装置采用了在培养基上表面上的气/液界面。因此, 由于穿过装置的底部以及在培养基的顶部进行气体交换, 因而也限制了气体交换表面积与培养基体积的比例。就每一装置的气体交换表面积与培养基体积的比例来说, CL1000 的约为 $0.31\text{cm}^2/\text{ml}$, CL350 的约为 $0.32\text{cm}^2/\text{ml}$, CL6Well 的约为 $1.20\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0044] Bader (美国专利 No. 6468792) 也介绍了室化的透气装置。该装置没有侧壁, 而是采用袋子形式。利用多孔膜进行室化而将细胞与营养物分离。如同其它的室化的透气装置一样, 培养基高度也受到了限制。美国专利 No. 6468792 尽管提到在设备中可以得到 1cm 至 2cm 的培养基高度, 但是实际高度需要按“根据菲克扩散定律 (Fick's law of diffusion) 的培养基层”的功能根据 O_2 供应来调节。由于袋子的上下表面具有透气性, 因此当该设备被填充到最大容量时, 可获得的透气表面的面积的总量与培养基体积的总量的最小比例为 $1.0\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0045] 如果室化的透气装置能够提高在竖直方向的放大潜力, 随着培养量的增加, 它们将具有更有效的占地面积。能够适合于竖向放大的静置室化的透气装置是需要的。

[0046] 已经推出了相对于静置透气装置来说旨在提高效率的透气装置。该装置以与传统滚瓶相似的方式操作, 并且试图通过采用滚动作用混合培养基来改进物质的交换。然而没有取得有效的放大。一个原因是, 与静置装置一样, 设计规格限制了可以驻留的培养基与透气装置的壁的距离。这限制了装置的培养基容积。因此, 放大需要多个装置。

[0047] Spaulding (美国专利 No. 5330908) 公开了具有环形的透气壁结构的滚瓶。内圆

筒壁和外圆筒壁与周围气体进行交换。壁具有透气性质,可为细胞提供氧,所述细胞驻留于由内圆筒壁和外圆筒壁限定的室中。该细胞室被培养基完全填充,就限制细胞剪切来说,这是有利的。Spaulding 提到“氧气效率的下降是培养基中输送距离的函数,并且有效性被限制到距离氧气表面约 1 英寸或 1 英寸以下”。因此,Spaulding 提到的设计的缺陷包括为提供充足的氧气,内圆筒壁和外圆筒壁之间的距离保持在等于或小于 5.01cm。以此方式,细胞不能驻留于距离透气壁超过 2.505cm 处。那样还导致透气表面的面积与培养基体积的比例为约 $0.79\text{cm}^2/\text{ml}$ 。此外,由于需要具有中空的透气中心部分,因此浪费了空间。该装置每 5cm 长度仅具有 100ml 培养基的内部体积,相反,相同长度的传统培养瓶具有 500ml。培养基体积的受限使这种装置与传统滚瓶相比,其放大的效率更低,这是因为相等体积的培养需要更多的瓶子。该装置的另一个问题是使用了蚀刻孔,孔的直径为 90 微米,用于气体交换。这些孔足够大到可以允许气体进入,但是足够小到可以阻止液体从细胞室中排出。然而,由于大多数无菌过滤器阻止 0.45 微米的颗粒,更普遍的是阻止 0.2 微米的颗粒穿过,因此它们能够允许细菌透过细胞室。

[0048] 在 1992 年 12 月申请的一件专利中, Wolf 等(美国专利 No. 5153131)描述了一种透气的生物反应器,其具有沿着它的轴滚动的盘状结构。这种装置的几何形状试图纠正 Schwartz 等在美国专利 No. 5026650 所提出的缺陷。在美国专利 No. 5026650 中,透气的管状插入物驻留于圆筒状滚瓶内,并且外部的壳体不具有透气性。尽管它对附着在珠子上的贴壁细胞的培养是成功的,但是 Wolf 等提到该装置在悬浮细胞培养中并不成功。该装置设有一个或两个透气的平末端。为了降低离心力的影响,所述盘的直径被限制至约 6 英寸。该发明人提到“培养基中氧气的分压或分压梯度的降低是渗透性膜的距离的函数”,这与 Jensen 在 1976 年表达的思想方法相同。他们还提到“如果距离渗透性膜太远,细胞将不会生长”。因此,当盘的两端具有透气性时,宽度被限制至小于 2 英寸。这种尺寸限制意味着该装置可以容纳的大多数培养基小于 1502ml。因此,随着培养规模的放大,必须使用越来越多的装置。而且,透气表面的面积与培养基体积的比例必须至少为 $0.79\text{cm}^2/\text{cm}$,并且细胞必须驻留于与透气的壁的距离小于 1.27cm 处。此外,该装置不适合用于现有的实验室设备,并且需要特定的旋转装备和气泵。

[0049] 在 1996 年 2 月提交的一件专利中, Schwarz(美国专利 No. 5702941)描述了具有以与滚瓶相似的方式滚动的透气末端的透气盘状生物反应器。令人遗憾的是,和美国专利 No. 5153131 一样,所述生物反应器的长度被限制至等于或小于 2.54cm。除非生物反应器的所有的表面都具有透气性,否则距离甚至变得更小。最大的装置的直径为 15.24cm。因此,透气表面的面积与培养基体积的比例必须至少为 $0.79\text{ml}/\text{cm}^2$,并且细胞绝不会驻留于与透气的壁的距离大于 1.27cm 处。即使具有滚动作用,但是相对于传统静置培养袋,这也不会使透气表面的面积与培养基体积的比例发生实质性的下降,并且随着培养规模的放大,将需要越来越多的装置。

[0050] 来自 Synthecon Incorporated 的可商购获得的称为 Rotary Cell Culture System™ 的产品系列,该产品结合了 Spaulding、Schwarz 和 Wolf 等的专利的各个方面。所得产品的培养基容积小,为 10ml 至 500ml,该产品需要通常的滚动装备,与标准实验室移液枪不相容,并且与能容纳相同体积的培养基的传统装置的费用相比,费用非常昂贵。因此它们由于没有满足在单个装置形式提高效率的需要,在市场上几乎没有什么影响。

[0051] Falkenberg 等（美国专利 No. 5449617 和美国专利 No. 5576211）描述了采用透析膜室化的透气滚瓶。该瓶可以容纳的培养基的体积为 360ml，其中 60ml 驻留于细胞室中，而 300ml 驻留于营养室中。在一个实施方式中，瓶的端部均具有渗透性。美国专利 No. 5576211 提到，当瓶的端部具有透气性时，“具有至少 50cm^2 的表面积的气体交换膜已证明适用于 35ml 的细胞培养”。因此，透气表面的面积与体积的最小比例为 $1.43\text{cm}^2/\text{ml}$ 。在另一个实施方式中，瓶体具有透气性，其表面积为 240cm^2 。该透气表面可为驻留于该容器中的全部 360ml 体积的培养基提供氧气。因此，透气表面的面积与体积的最小比例为 $0.67\text{cm}^2/\text{ml}$ 。瓶子的直径约 5cm，瓶子的长度约 15cm。因此，瓶子比传统滚瓶要小得多，传统滚瓶的直径约 11.5cm，长度至多达约 33cm。尽管这种装置可用于高密度悬浮细胞培养，但其受限的培养基容量不能减少放大所需要的装置的数量。因此，该装置由于不能提供附着的表面积，因此不适合于贴壁培养。

[0052] Falkenberg 等（美国专利 No. 5686301）描述了在美国专利 No. 5449617 和美国专利 No. 5576211 所详细说明了装置的改进类型。该专利公开了形式为防止内部压力造成损害的活动外壳 (collapsible sheathing) 的特征。气体由瓶子端部提供，并且可以通过透气外壳“扩散进供应室”中。令人遗憾的是，由于瓶子的尺寸没有变，因此不能降低放大所需装置的数量。而且所改进的类型仍然不适合于贴壁培养。

[0053] Vivasience Sartorius Group 销售了一种称为 miniPERM 的产品，该产品与 Falkenberg 等的专利有关。细胞室的最大单元为 50ml，最大营养单元为 400ml。因此，可以驻留于该商业装置中的培养基的最大体积为 450ml。商业装置的尺寸小，并且需要常规滚动设备，使其成为无效的解决放大问题的方案。

[0054] 存在改进滚动的透气装置，以便使它们能为每个装置提供更多的培养基，由此减少了放大所需装置的数量。如果存在降低的透气表面的面积与培养基体积的比例，则可以达到上述效果。另一个问题是需要非标准的实验室设备来对现有装置进行操作。标准实验室设备的使用还会允许更多的使用者使用这种技术。

[0055] 先前的讨论集中在限制现有和所建议的细胞培养装置中的放大效率的设计缺陷上。除了前面描述的限制外，当目的是进行贴壁细胞培养时，另外还有限制放大效率的问题。

[0056] 对于依赖于气 / 液界面来提供氧气的传统的静置装置来说，贴壁细胞培养效率低是由每个装置的附着表面积受限所造成的。例如，对于陪替氏培养皿、多孔板和组织培养瓶来说，只有装置的底部适合用于细胞附着。传统培养瓶提供了这个问题的一个很好的实例。如前面描述的那样，典型 T-175 瓶约占 936cm^3 。然而，它只提供 175cm^2 用于贴壁细胞附着的表面积。因此，占据空间与生长表面的比例为 $5.35\text{cm}^3/\text{cm}^2$ ，效率非常之低。

[0057] 试图解决传统培养瓶表面积缺陷的产品是存在的。多架组织培养瓶如 NUNC™ Cell Factory（美国专利 No. 5310676）和 Corning CellStack™（美国专利 No. 6569675）通过在竖直方向堆积聚苯乙烯架来增加表面积。这种装置设计成允许培养基和气体驻留于架子之间。当培养细胞的数量增加时，相对于传统培养瓶，这降低了装置的占地面积。多架培养瓶的外形也比传统培养瓶具有更高的空间效率。例如，NUNC™ Cell Factory 的隔板之间的空间约 1.4cm，相反，典型 T-175 培养瓶底部和顶部之间的距离为 3.7cm。就灭菌、运输、储存、培养箱空间和装置处置来说，空间使用减少节省了资金。这种类型的装置也降低了在放大时的处理量，这是因为不同于对多个组织培养瓶进行加料，这种类型的装置允许对一

个多架装置进行加料。此外,传统的聚苯乙烯的使用是很容易解决的。遗憾的是,该装置在效率方面并不是最理想的,因为它的每一个架子都需要气 / 液界面来提供氧气。

[0058] **CellCube®**是一种可由 Coming Life Sciences 获得的贴壁细胞培养装置。它采用与多架组织培养瓶相似的方式构造,但是它淘汰了气 / 液界面。由于不存在气体,在竖向堆积的细胞附着架子之间的距离减小了。这减少了装置所占的空间的量。然而,为了提供气体交换,需要连续灌注经氧气处理的培养基。相对于 Coming CellStack™ 来说,这样会造成极高水平的花费和复杂性,使该装置不适用于研究规模的培养。

[0059] 静置透气装置没有提供比 NUNC™Cell Factory、Corning CellStack™ 或 **CellCube®**更好的替代品。细胞培养袋和透气筒可以提供比传统组织培养瓶更大的附着面积。这是因为它们能够允许在装置的上下表面上培养细胞。然而,适于细胞附着的透气性材料比传统的聚苯乙烯要贵得多。而且,即使透气装置的上下两个表面均允许细胞生长,但是相对于占据同样占地面积的传统的气 / 液界面类型的装置来说,表面积也只是增加了两倍。此外,仍然存在已在前文描述过的放大缺陷的限制。

[0060] Fuller 等(国际公开号 W001/92462A1)提出一种构造透气性材料的表面以允许更多的表面积用于气体交换和细胞附着的新袋子。然而,培养基高度也被限制到可商购获得袋子的高度。这是因为这种袋子以与其它袋子相同方式制造。透气表面的面积与培养基体积的比例甚至变得比其它袋子的比例更高,并且还出现培养基的不均匀分布。

[0061] Basehowski 等(美国专利 No. 4939151)提出一种透气袋,所述袋子通过使底部透气、光滑以及为使细胞附着而带电(charged)因而适合用于贴壁培养。袋子顶部的内表面经构造可防止粘到底部的透气表面上。这种袋子仅利用下表面来使细胞附着,使得它具有与传统培养瓶相同的表面积与占地面积的比例的效率。

[0062] 到目前为止,关于如何制造一种消除对气 / 液界面的依赖并且可以整合多层瓶的支架而不需要灌注的装置的教导是不充分的。静置透气装置只允许通过装置的底部和顶部来进行气体交换。因此,如果包括传统的支架,如多架组织培养瓶中所提供的苯乙烯架子,它们将具有抑制细胞位置上的气体交换的作用。透气性材料应当以附着的支架不会妨碍充足的氧气交换的方式设置。在本发明的详细描述中将进一步阐述如此会有利的原因。

[0063] 在放大中提供更有效的细胞培养装置,这样的需要并不限于静置细胞培养装置,滚瓶也一样需要。传统的滚瓶通过使用气 / 液界面而发挥作用。几何形状是提供更大的表面积和培养基体积同时占据比培养瓶和培养袋更小的占地面积的明智方式。它们的普遍使用为市场需要提供更有效的几何形状的装置提供了证据,即,因为如此可减少库存空间、培养箱空间、劳力和生物危险性处置空间。

[0064] 当使用培养瓶来进行贴壁培养时,细胞附着到瓶子的内壁上。当滚动的瓶子使附着的细胞周期地移动通过培养基和气体空间时,细胞获取营养并实现气体交换。滚瓶并不限于在贴壁细胞中使用。它们也常用于培养悬浮细胞。例如,用于制造单克隆抗体的鼠杂交瘤培养通常在滚瓶中进行。在典型的悬浮细胞培养应用中,可以提高相对于瓶子的与占地面积和大小有关的效率,滚瓶操作的简易性也优于细胞培养袋,并且费用少、复杂程度低,这均优于转瓶。滚瓶的主要供应者 **Corning®**推荐 850cm² 瓶子的培养基体积在 170ml 和 255ml 之间。瓶子的实际容积约为 2200ml。因此,尽管滚瓶在贴壁细胞培养和悬浮细胞培养中具有优势,但是由于在培养过程中滚瓶的大部分(约 88%)是由气体组成的,因此它在

几何形状方面效率依然很低。由于需要辅助的滚动机构,因此滚瓶也不具有静置装置的简易性。此外,它们使细胞受到剪切力的作用。所述剪切力可以损害或杀死对剪切敏感的细胞,因而它们不存在于传统的静置装置中。

[0065] McAleer 等(美国专利 No. 3839155)描述了一种滚瓶装置,该装置的构造允许细胞附着到沿瓶子长度方向向下取向的多个平行盘的两个侧面。与在横向位置滚动的传统培养瓶子不同,这种装置从一端滚动到另一端,使盘子通过培养基然后通过气体。它根本没有减少存在于培养瓶中的气体的体积。相反,该发明提到“本发明的另一个优点是可以使用非常少量的流体体积”。它完全依赖于大量气体的存在,所述的气体必须被灌注到瓶子中来发挥作用。在传统培养瓶中仍然存在妨碍空间有效利用的过量气体。而且,剪切力也没有降低。

[0066] Spielmann(美国专利 No. 5650325)描述了用于提供增大的液/气交换表面的滚瓶装置。盘子平行布置在培养瓶中。所述的盘子允许增大用于培养的面积,并且设计成当瓶子滚动时允许液体从盘上流过。在贴壁细胞的情况中,有更多可用于附着的表面积。在悬浮细胞的情况中,它们通过盘子进行搅动而“与气相和液相接触”。剪切力仍然存在。尽管这种设备提供了改进的表面积,但是它完全依赖于瓶子中气体的存在来进行气体交换。因此,它没有解决在空间效率方面的根本限制,即必须驻留于培养瓶中的过量气体。

[0067] 如果滚瓶可以制成允许显著提高培养基体积与气体的比例,其将提供一种更为经济的方案,这是因为降低了用于放大所需装置的数量。由于 850cm^2 瓶子的典型培养基体积为 170ml 至 255ml,但容积为 2200ml,因此通过用培养基填充瓶子,营养物容量可以提高 9 至 13 倍。为了保持简易性,需要有独立于气/液界面的不复杂的为培养物提供氧气的方法。而且,对于贴壁培养,表面积应当随着培养基体积的增加而成比例地增加。具有这些特征的透气装置可以使灭菌、运输、储存、培养箱空间的使用、劳力和处置方面的费用降低 9 倍至 13 倍。也可以降低作用于细胞的剪切力。

[0068] 对于贴壁培养,所提议的和可商购获得的滚动的透气装置由于没有整合传统的附着表面,因此未提供比传统培养瓶更好的替代方式。相反,它们依赖于小部分的附着区域或珠子。珠子给那些进行贴壁培养带来了一系列新的问题。它们难以进行均匀接种,不能用显微镜来评价细胞的汇合或形状,如果需要回收细胞,它们必须与附着到它们上面的细胞分离。

[0069] 人们已经试图在透气滚瓶中消除珠子的使用。Nagel 等(美国专利 No. 5702945)试图使 Falkenberg 等的装置无需珠子而能够培养贴壁细胞。在气体膜内表面的细胞培养室中提供细胞附着的基质。尽管贴壁培养是可能的,但是瓶子的尺寸没有变,并且它由于尺寸小,因此不能减少放大所需装置的数量。而且,氧气首先必须输送通过透气性膜,然后穿过细胞附着基质而到达细胞。此外,与 NUNC™ Cell factory 和 Corning CellStack™ 的多层不同的是,可用的细胞附着基质只有一层。另外,细胞的汇合和形状的显微评价也没有提供。

[0070] 改进的透气滚瓶是需要的。该改进的滚瓶应当能用培养基来填充,在标准的滚瓶架中使用,可使细胞附着面积与培养基体积按比例增加,并且保留了传统培养瓶的易用性。本文将显示所述改进的滚瓶是如何实现的。

[0071] Singh(美国专利 No. 6190913)提到“依赖于透气表面的面积的所有装置,其放大均受到限制”。该专利公开了一种用于解决透气装置的放大缺陷的袋子。非透气性的袋子以近相等的比例结合了培养基和气体。将该袋子放在振荡器的板上,振荡运动在培养基中产生波动,从而促进了气体交换。该专利包含了可从 Wave Biotech 获得的称为 Wave

Bioreactor 的商业产品。遗憾的是,必须为所述装置购买普通振荡装备和温度控制装备,并且该袋子基本上不改变容纳培养基的容积。如同透气袋那样,WaveBioreactor 袋用培养基填充到不超过它们承载容量的一半。因此,它们限制了培养基的高度并且存在与透气袋相似的放大缺陷。

[0072] 总之,存在改进的细胞培养的装置和方法的需要,所述改进的方法和装置能够为研究规模的细胞培养带来更高的效率,并且在放大期间不降低效率。依赖于气/液界面发挥作用的传统装置在劳力、灭菌费用、运输费用、储存费用、培养箱空间的使用、处置费用和污染风险方面的效率低。所述装置包括陪替氏培养皿、多孔组织培养板、组织培养瓶、多架组织培养瓶和滚瓶。透气装置的效率也很低,在很多情况下失去了需要气/液界面发挥作用的装置的简易性。petriPERM 和 Lumox 多孔板透气装置采用它们传统的同类装置的形式,并且继承了传统装置的低效率。透气袋由于培养基高度受限、培养基分布不均匀、所使用的透气性材料的表面积与培养基体积的比例高、以及在加料期间存在污染风险,因此是低效的。透气筒由于培养基高度低、所使用的透气性材料的表面积与培养基体积的比例高、容纳的培养基的量少,并且在放大期间需要大量的单元来维持,因此是低效的。滚动的透气装置由于受到几何形状的约束,即限制了可以彼此分离的壁的距离,在放大期间由于培养基体积有限而需要大量的单元,并且通常需要常用的滚动装备,因此在用于放大时是低效的。当需要进行贴壁培养时,传统装置的装置体积与附着表面积的比例的效率极低,因此浪费了空间。静置、混合和滚动的透气装置在贴壁培养时效率甚至变得更低,其原因包括表面积受限、采用了用于增加表面积的珠子、缺少传统的片状苯乙烯表面以及存在不能进行显微评价的缺点。

[0073] 本文公开的一些实施方式提供了更有效率的细胞培养的装置和方法,其通过制造可以整合很多新属性的透气装置,克服了现有装置和方法的缺陷。这些不同的属性包括不依赖气/液界面的气体交换、增加的培养基高度、降低的透气表面的面积与培养基体积的比例、通过装置的侧壁进行的气体交换、由传统材料构成的细胞维持支架和增加的透气性材料的厚度。

发明内容

[0074] 已经发现,对于具有下部透气性材料的透气装置,有利的是,增加培养基的高度,使其高于现有知识所提及的高度或在市售装置中所允许的高度。本发明人认识到,在细胞培养基中基质的传送所起的作用要超过先前所认识的程度。看来以前对物质转移扩散的依赖低估了传送所作出的贡献。如此会低估了细胞培养基中诸如葡萄糖和乳糖等基质的输送速率,因而不能认识到存在于与细胞的距离远于传统所允许的距离的培养基对于细胞是有用的。如果低估了培养基中基质的运输速率,则会错误地认为,培养基驻留于被认为与细胞距离过远的区域是一种浪费。其逻辑性后果将是:为了减少装置所占的空间,使灭菌、运输、储存和处置更为经济,而不必要地设置一种透气装置以容纳比细胞可用的培养基更少的培养基。

[0075] 无论如何,作为驻留于背离常规观念的距离的培养基如何是有利的例子,进行了这样的试验,其中将培养基厚度增加到远高于以前建议的高度,或甚至远高于在市售的静置透气装置中可能达到的高度。利用鼠杂交瘤对一般细胞培养应用进行的评价证明,通过增加(相对于传统观念)培养基高度,可以在给定的装置的占地面积中存在更多的细胞。这

种从前没有认识到的益处促使形成了这样一些细胞培养装置结构,这种结构提供更有效的细胞培养和处理放大。

[0076] 本发明的装置和方法表明,当装置的壁具有渗透性,存在支架,并且装置是在静置模式下操作时,气/液界面对于充分的气体交换是不必要的。这就排除了在传统装置中因存在气体而需要过大的装置尺寸的必要性,并且允许透气装置整合传统的支架。这使得多种细胞培养装置结构所占的空间比先前的装置更少,并且使它们在用于放大时效率更高。而且,本发明者预期到,传送的作用可能也是一种有利的因素。

[0077] 而且还发现,与传统观念的教导相反的用于透气滚瓶的几何结构可以成功地培养细胞。这种新的几何结构允许该装置包含多于从前所能包含的培养基,因此所得的几何形状提高了放大效率。这就允许存在这样的细胞培养装置结构,该结构消除了传统培养瓶为供应氧气而包含气体的无用空间,并且在放大效率方面优于透气瓶。

[0078] 而且还发现,细胞可以采用比传统观念提倡的厚度更大的透气性硅树脂材料来进行有效的培养。

[0079] 这些发现使制造用于培养细胞的新装置和方法成为可能,所述装置和方法可以提供显著高于现有装置的效率和放大改善程度,所述现有装置例如陪替氏培养皿、多孔组织培养板、组织培养瓶、多架组织培养瓶、滚瓶、透气陪替氏培养皿、透气多孔板、透气细胞培养袋、室化的透气装置和透气滚动装置。

[0080] 本文公开的一些实施方式通过增加壁的高度以允许增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了优异的透气的细胞培养装置。

[0081] 本文公开的一些实施方式通过增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了优异的使用透气的细胞培养装置的细胞培养方法。

[0082] 本文公开的一些实施方式通过允许通过至少部分由透气材料构成的侧壁进行气体交换,提供了优异的细胞培养装置。

[0083] 本文公开的一些实施方式通过允许通过至少部分由透气性材料构成的侧壁进行气体交换,提供了优异的使用透气装置的细胞培养方法。

[0084] 本文公开的一些实施方式通过增加壁的高度以允许增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了透气多孔组织培养板的优异的替代品。

[0085] 本文公开的一些实施方式通过增加壁的高度以允许增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了透气的陪替氏培养皿的优异的替代品。

[0086] 本文公开的一些实施方式通过增加培养基的高度以提供更多的营养物支持物并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了优异的在透气的细胞培养袋中进行细胞培养的替代方法。

[0087] 本文公开的一些实施方式通过增加壁的高度以允许增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了透气筒的优异的替代品。

[0088] 本文公开的一些实施方式通过形成允许培养基驻留于与透气性材料的距离超出以前可能的距离的位置的几何结构,提供了透气滚瓶的优异的替代品。

[0089] 本文公开的一些实施方式提供了优异的透气的细胞培养装置,该装置可以在横向和竖向位置操作。

[0090] 本文公开的一些实施方式通过增加壁的高度以允许增加培养基的高度并降低透

气表面的面积与培养基体积的比例,提供了室化的透气装置的优异的替代品。

[0091] 本文公开的一些实施方式通过增加培养基的高度并降低透气表面的面积与培养基体积的比例,提供了优异的使用室化的透气装置进行细胞培养的方法。

[0092] 本文公开的一些实施方式提供了优异的透气的细胞培养装置,该装置利用硅树脂材料进行气体交换,并采用厚度大于 0.005 英寸的硅树脂来制造。

[0093] 本文公开的一些实施方式提供了改进的细胞培养袋,其中透气性材料是厚度大于 0.005 英寸的硅树脂。

附图说明

[0094] 图 1A 和图 1B 从 Jensen 等 (“Diffusion in Tissue Cultures on Gas-permeable and Impermeable Supports”, J. Theor. Biol. 56, 443-458 (1976)) 获得,图 1A 显示 Jensen 等的文章的图 2,图 1B 显示 Jensen 等的文章的图 3,在该文章中 D_m 是培养基的扩散常数, PO_2 和 PCO_2 的稳定状态值模型显示在透气容器中。

[0095] 图 2 是来自 Jensen (“Mass cell culture in a controlled environment”, Cell Culture and its Applications, Academic Press 1977) 的图 2 的副本,该图显示具有低培养基高度容量的透气的细胞培养装置。

[0096] 图 3 是美国专利 No. 5686304 的图 2 的副本,该专利经商业化后称为 Si-Culture™ 袋 (Medtronic Inc.),该图显示典型的细胞培养袋的剖面图。

[0097] 图 4A 是具有由下部的透气性材料构成的室的细胞培养装置的实施方式,所述装置构造成允许大量的培养基存在于下部的透气性材料上。一个可拆卸的盖子可防止其受到污染。图 4B 是具有由下部的透气性材料构成的室的细胞培养装置的实施方式,所述装置构造成允许大量的培养基驻留于下部的透气性材料上。可通过隔膜进入该容器。图 4C 是具有透气性材料构成的壁的细胞培养装置的实施方式,使得该装置可以在其侧面放置并在非滚动或滚动位置操作。

[0098] 图 5 是具有采用下部的透气性材料的透气的细胞培养装置的实施方式,该材料构造成允许细胞均匀分布在它的下表面,将气体提供到下部的透气性材料的下侧。

[0099] 图 6 是透气的细胞培养装置的实施方式,该装置构造成将培养基保持在没有直接位于细胞培养区域上的区域,以提供额外的营养支持物而不进一步增大装置的外形。

[0100] 图 7A 和图 7B 是透气的细胞培养装置的实施方式的两个视图,该装置构造成可根据其中培养基的体积的变化而对高度进行调节,因此在培养过程的每个阶段使所占空间尽可能少,并且具有这样的性能,即在最小体积状态中进行灭菌、运输、储存和处置,从而降低该过程的费用。

[0101] 图 8 是透气的细胞培养装置的实施方式,所述装置构造成多孔形式,每个孔能够容纳体积增加了 (相对于传统多孔组织培养装置来说) 的培养基,据此通过增加每个孔所存在的细胞数量,降低加料频率,从而使研究规模的培养更加有效,并允许提高菌落选择概率。

[0102] 图 9A 和图 9B 是多孔形式的透气的细胞培养装置的实施方式的视图,所述装置构造成具有透气的侧壁。该装置各个孔的下表面可以由与传统组织培养瓶完全相同的材料构成。消除了气体交换所必需的气 / 液界面,从而增加了每个孔的细胞数量和 / 或减少了加料的频率,更好地利用了培养箱的空间,以及降低了灭菌、运输、储存和处置的费用。

[0103] 图 10A 和图 10B 显示透气的细胞培养装置的实施方式,所述装置设有用于培养贴壁细胞的支架而不需要气/液界面。该装置可在横向和竖直方向上进行线性放大,具有相对于传统贴壁培养装置更高的效率。能够在支架的一侧或两侧进行培养。既可以在滚动状态下操作,也可以在非滚动状态下操作。

[0104] 图 11 是设有支架的透气的细胞培养装置的实施方式,所述支架至少有一个适合于进行光学显微细胞评估。

[0105] 图 12A、图 12B、图 12C 和图 12D 显示支架的实施方式。该支架构造成使表面积得以进一步增加,为透气的细胞培养装置带来更高的效率。

[0106] 图 13 是透气的细胞培养装置的实施方式,所述装置具有支架和至少一面由透气性材料构成的侧壁。该装置消除了将气/液界面作为气体交换的手段的必要性,导致空间的利用效率和灭菌、运输、储存、培养箱空间的使用和处置方面的有关成本效益更高。

[0107] 图 14A、图 14B、图 14C 和图 14D 显示透气的细胞培养装置的实施方式的视图,所述装置设有支架,该支架位置可以调节的优点包括:使胰蛋白酶的使用量减至最低,改变培养基与培养面积的比例,运输、库存和处置的空间减至最小。图 14E 显示相邻支架间的距离保持相等的支架。

[0108] 图 15A、图 15B 和图 15C 显示支架的实施方式,该支架构造成各支架之间的距离可以改变,同时装置的主体可以保持在固定高度。这一实施方式可以提供的优点包括:胰蛋白酶的使用量减至最低,或者可以改变培养基与培养面积的比例而无需使装置的主体形状发生变化。

[0109] 图 16 是用于评估培养基高度对细胞生长和抗体制备的影响的管状测试装置的剖面图。使用这种测试装置进行的生物评价证明了将培养基高度增加至超出传统观念界限的优点和降低现有装置的透气表面的面积与培养基体积的比例的能力。这些令人意外的结果允许装置的结构不按以前预期的那样存在。

[0110] 图 17 是用于评估培养贴壁细胞能力的测试装置的剖面图,所述培养是通过允许气体穿过所述测试装置的侧壁进行交换而没有气/液界面的情况下进行的。采用这种测试装置进行的生物评价证明在没有气/液界面的情况下培养细胞的能力。这些令人意外的结果允许装置的结构不按以前预期的那样存在。

[0111] 图 18 是用以评估培养贴壁细胞能力的测试设备的剖面图,所述培养是在通过允许气体穿过测试装置的侧壁进行交换而没有气/液界面的情况下进行的。在测试设备中整合有多个支架。采用这种测试装置进行的生物评价证明在没有气/液界面的情况下培养细胞的能力。这些令人意外的结果允许装置的结构不按以前预期的那样存在。

[0112] 图 19A 是用以评估将细胞接种到支架的上下表面的能力的测试装置的剖面图。图 19B 显示图 19A 的测试装置的一个支架。采用这种测试装置进行的生物评价证明当气体交换通过装置侧壁进行时,在没有气/液界面的情况下培养细胞的能力,下部的透气性材料的表面积与附着表面积具有函数关系,下部的透气性材料的表面积与培养基体积具有函数关系,当装置在非滚动状态或滚动状态时可以进行细胞培养。

[0113] 图 20 是如在实施例 4 描述的细胞分布的模式。

具体实施方式

[0114] 通过将透气装置构造成能够容纳其高度在现有细胞培养装置或方法中没有预期

到的培养基,所产生的优点包括降低了处理的频率、劳力、灭菌费用、运输费用、储存费用、培养箱空间的使用、处置费用和污染风险性。将透气表面的面积与培养基体积的比例降低到现有细胞培养装置或方法没有预期到的比例也可以提高培养的效率。这允许增加培养基的高度但没有相应地增加装置的长度或宽度。在优选的实施方式中,制造的装置允许增加培养基的高度或降低透气表面的面积与培养基体积的比例。制造的装置也可以既允许增加培养基的高度又降低透气表面的面积与培养基体积的比例。

[0115] 允许培养基驻留于超出传统观念的高度的透气装置和方法的各种不同的实施方式是可能的。它们可以采用现有装置的形式或全新形式。如果该形式是直径至多达 50mm 的透气陪替氏培养皿,那么培养基高度应当优选超过 0.36cm。优选壁的高度超过 6mm。如果该形式是直径大于 50mm 的透气陪替氏培养皿,那么培养基高度应当优选超过 0.51cm。优选壁的高度超过 12mm。如果该形式是具有 384 孔或 384 孔以上的多孔组织培养板,那么培养基的高度应当优选超过 0.91cm,并且优选孔深大于 11.5mm;如果是小于 24 孔至小于 384 孔,则培养基的高度应当优选大于 0.97cm,并且优选孔深大于 10.9mm;如果是 24 孔或小于 24 孔,则培养基的高度应当优选大于 1.03cm,并且优选孔深大于 16.5mm。如果该形式是透气筒,那么培养基的高度和壁的高度应当优选大于 1.27mm。如果采用细胞培养袋的形式,那么培养基高度应当优选驻留于最高点处的高度超过 2.0cm。如果该形式是室化装置,那么装置中的全部培养基完全驻留于半透膜上,营养室中的培养基驻留于半透膜上的高度应当优选 1.0cm。如果该形式是室化的透气装置,那么营养室中培养基驻留于半透膜上的高度应当优选 3.8mm。

[0116] 如果设计的目标是为了降低(相对于传统观念)透气表面的面积与培养基体积的比例,那么用于透气装置和方法的各种不同的实施方式都是可能的。它们可以采用现有装置的形式或全新形式。如果该形式是直径至多小于 50mm 的透气陪替氏培养皿,那么透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $2.74\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果该形式是直径为 50mm 或 50mm 以上的透气的陪替氏培养皿,那么透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $1.96\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果该形式是具有 384 孔或 384 孔以上的多孔组织培养板,那么透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $1.10\text{cm}^2/\text{ml}$;如果是小于 24 孔至小于 384 孔,则透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $1.03\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果是 24 孔或 24 孔以下,则透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $0.97\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果该形式是其中两侧均具有透气性的透气筒,那么表面积与培养基体积的比例应当优选小于 $0.79\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果采用细胞培养袋形式,则透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $1.0\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果该形式是室化装置,在该装置中的全部培养基完全驻留于半透膜上,透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $1.74\text{cm}^2/\text{ml}$ 。如果该形式是室化装置,并且在该装置中的全部培养基完全驻留于半透膜上,则透气表面的面积与培养基体积的比例应当优选小于 $0.31\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0117] 图 4A 显示了本发明的实施方式的剖面图。透气的细胞培养装置 10 构造成允许细胞 20 驻留于下部的透气性材料 30 上。尽管图 4A 显示透气的细胞培养装置 10 的结构采用陪替氏培养皿的形式,但是允许培养基驻留于超出传统观念的高度的任意形状和任意尺寸的装置都是可能的。

[0118] 可以移走顶盖 55,以允许通过倾倒或用移液管在透气的细胞培养装置 10 中方便地加入或取出培养基 50。然而,也可以以细胞培养装置常用的任意数目的方式制造用于培

培养基 50 的入口,包括通过盖子、隔膜和管子。在需要封闭系统的情况中,透气的细胞培养装置 10 可以构造成使用如 Terumo Medical Corp. (Somerset,NJ) 制造的装备,通过无菌管道连接而具有可连接到培养基源和废物袋的入口管和出口管。隔膜结构或本领域技术人员已知的其它任何技术也可以用来制造封闭的容器。例如,如图 4B 所示,透气的细胞培养装置 10 作为替代可以构造成具有隔膜 65 的封闭容器。

[0119] 在透气的细胞培养装置 10 将完全被培养基 50 所填充的情况中,细胞因重力而易于从培养基 50 中沉下,透气的细胞培养装置 10 的顶部的外形优选允许培养基 50 驻留于透气性材料 30 上的高度一致。这样当细胞因重力而在培养基 50 内的悬浮液中沉积下来时,将允许细胞均匀沉淀到下部的透气性材料 30 上。图 4B 的结构达到了这一目的。

[0120] 下部的透气性材料,如材料 30 可以是任意的膜、薄膜或用于透气的细胞培养装置的材料,如硅树脂、氟代乙烯聚丙烯、聚烯烃和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物。大量的用于学习有关透气性材料和它们在细胞培养中的用途的原始资料都可以用于额外的指导,包括全部在此引入的共同审理中的美国专利申请 No. 10/460850。所用的词语薄膜或膜意味着跨过透气性材料的距离非常短,并且本发明人已经发现,当所描述装置和方法的透气性材料超过了与薄膜和膜有关的厚度时,本发明的实施方式会发挥作用。因此,本文将有助于培养物的气体交换的装置部分称为透气性材料。

[0121] 本领域技术人员应该认识到,透气性材料应当根据各种特性进行选择,所述的特性包括透气性、湿气透过性、随所需的与细胞的相互作用而改变的能力、光学清晰度、物理强度等。存在描述说已被成功用于细胞培养的透气性材料的各种不同的类型的信息。硅树脂通常是一个不错的选择。它具有优异的氧气透过性,可以进行光学检测,不容易穿孔,一般其上不会结合有细胞,并且易于制成多种形状。如果使用硅树脂,它在需要进行气体交换的区域可以小于约 0.2 英寸、约 0.1 英寸、约 0.05 英寸或约 0.030 英寸。根据用途选择最佳材料。例如,在将暴露于深低温保藏的用途中,Teflon®可以是优选的。对于其中细胞附着到透气性材料上的贴壁培养,在许多提供指导的信息来源中有 W001/92462、美国专利 No. 4939151、美国专利 No. 6297046 和美国专利申请 No. 10/183132。

[0122] 如果将硅树脂用作透气性材料,将厚度增加到超出传统观念,可以扩展设计的选择,降低制造过程的费用,将穿孔的可能性减到最低。例如,对于表面积大的部分,在该部分必须是非常薄时进行模压是困难的,这是因为材料也许不能流进在模体和型芯之间非常小的空隙中。加厚所述部分(其加宽了空隙)可以使模压过程较为容易。除了可能模压的优点外,透气性材料越厚,越不容易被穿孔或显示出针眼。

[0123] 壁(如壁 40)的高度在装置的放大效率方面起到非常重要的作用。现有的静置透气装置限制了培养基的高度。例如,袋子没有提供壁,并且说明书限制了培养基的高度,而筒式装置只提供非常低的壁高度(如 Opticell®筒,CLINicell® Culture Cassettes 和 Petaka™筒)。本发明的目的是为了提供增加了的培养基高度,因而提高了装置的效率。壁的高度可以规定多少培养基允许驻留于装置中。增加的培养基提供了更多来源的基质和更大的废品用槽。当在放大过程中需要更多的培养基时,通过增加壁的高度,装置的几何结构与培养箱、无菌工作台和生物危险性处置袋更加相容。此外,相对于其上驻留有细胞的表面积来说,体积的增加可以允许每个细胞存在更多的培养基。这可以具有减少加料频率的作用,因而减少了劳力和污染风险。而且还具有增加每平方厘米装置占地面积所存在的细

胞数量的作用。

[0124] 构造允许增加培养基体积的壁,也可以具有减少培养基的蒸发作用的有利效果。培养基蒸发是细胞培养中的一个问题,这是因为它改变了存在于培养基中的溶质的浓度。由于现有的透气装置的透气表面的面积与培养基体积的比例高,因此它们容易发生这种情况。防止发生这种情况的尝试描述在例如美国专利申请 No. 10/216554 和美国专利 No. 5693537 中。不过,简单地允许装置中的培养基体积增加可以减少蒸发的影响。如果现有的静置透气装置允许培养基体积与透气表面的面积的比例增加,则当存在蒸发时,溶质浓度改变的速率将成比例下降。

[0125] 在一个优选的实施方式中,壁应当能够允许培养基驻留于超过依赖于气/液界面的装置的高度,并且更优选超过典型的静置透气装置的高度。例如,壁 40 的高度超过 3mm,更优选超过 2.0cm,并将因此而提供优点。通过向装置的使用者提供将比现有的透气装置更多的培养基加入到装置中的方案,可带来许多优点,包括每个装置具有能够容纳更多的细胞的能力、减少向装置加料的频率和不增加占地面积而进行放大装置。壁可以由任何生物相容性材料构成,并且应当以形成液密的方式与下部的透气性材料相匹配。将下部的透气性材料与壁相匹配的方法包括粘合、热封接、挤压、和通常在各部件之间用以产生密封的其它任何方法。作为选择,壁和下部的透气性材料可以由相同的材料形成,并且构造成一个整体。例如,如果使用硅树脂,壁和下部的透气性材料可以是液体喷射模压、浸渍模压为单独的透气片。当透气的细胞培养装置如图 4B 所示竖向放置,或如图 4C 所示(该图显示其上驻留细胞 20 的透气的壁 41)的侧面放置时,该装置具有形成其上驻留有细胞的透气表面的优点。

[0126] 侧面放置的一些透气的细胞培养装置可以有利于有效地利用培养箱的空间,这是因为当该装置相对于狭窄的培养箱架子来说过高时,可以降低装置的外形。在需要侧面放置透气的细胞培养装置的情况下,将装置制成正方形或长方形,而不是圆形,侧面放置时将产生一个用于让细胞驻留其上的平面。这是有利的,因为该装置防止了局部区域细胞的彼此堆积而潜在地引起不利的梯度。在装置的深度和宽度尺寸不一样的情况中,可以有在其上驻留有细胞的三个可替代的表面积,并且存在三个可替代的最大培养基高度,这取决于透气的细胞培养装置的放置方式。当装置构造成在这些可替代位置进行操作时,装置安放的面优选由透气性材料构成。这样可允许因重力沉积到这一表面上的细胞靠近气体交换最佳的位置。

[0127] 壁优选构造成具有足够的结构强度,使得培养基在透气性材料上保持相对对称的形状,以使实验室的空间获得最大的利用效率,使培养基内形成的梯度减到最小,并且在接种过程中允许细胞均匀地沉积在下部的透气性材料上。如果壁允许在培养基中进行颜色变化的可视评估,以测定 pH 值或污染状况,这也是一个优点。壁也可以以这样的方式构造,即允许透气的细胞培养装置容易地用手举起来。当需要壁具有透气性时,并且如果一个单独的实体被放在壁的周围来使它们保持在一个固定的位置,优选不会妨碍气体与大部分的壁接触。

[0128] 透气的细胞培养装置可以构造成既可以在静止状态也可以在滚动状态发挥作用。为此,透气的细胞培养装置应当优选为圆筒状。当该装置被放在标准的滚动架子上时,圆筒状的主体提供了比正方形或长方形的主体更大的体积。然而,非圆筒状主体仍然可以通过在该主体的周围附着一个圆形的套子而在滚动架子上发挥作用。如果需要为使用者提供在竖向、横向或滚动状态发挥作用的装置的方案,则透气的细胞培养装置的底部和侧壁应当

由透气性材料构成。如果该装置只在横向、滚动或非滚动状态进行操作时,如果装置的末端不是由透气性材料构成,成本效益可能更高,并且使蒸发的表面积减到最小。

[0129] 如果透气的细胞培养装置采用具有下部的透气性材料构造成圆柱体形状,并且壁由透气性材料构成,该装置可以竖向放置或滚动,这取决于使用者的选择。当最充分的混合有利于应用时,滚动透气的细胞培养装置是有利的,例如这可以是在寻求减少抗体制备时间时的情况。如果需要这种方案,应当以对下部的透气性材料描述那样的方式使透气的细胞培养装置的壁具有渗透性。对瓶的长度或直径尽管没有限制,但是如果壁与标准滚瓶的直径一致,使得透气的细胞培养装置可以在标准的滚动架子上发挥作用,这会是有利的。

[0130] 如果需要降低细胞剪切,用培养基将装置完全填充,可从装置中排除气体,使得气体不能影响到细胞剪切。可以采用任意数目的方式来设计入口,使得当用培养基将装置完全填充时,减少污染风险。而且,当该装置将被滚动或侧面放置时,只有侧面需要由透气性材料构成。

[0131] 根据本文显示生物学结果的实施例,允许培养基驻留于超出传统观念的高度的装置所提供的放大优点对于本领域技术人员来说应该是显而易见的。作为放大效率的例子,当透气的细胞培养装置为圆筒状、在竖向位置进行操作并且由底部提供气体交换时,高度保持恒定时直径增大 2 倍可使体积增大 4 倍。例如,直径约 4.5 英寸,高约 7.7 英寸的装置可以容纳约 2L 的培养基。通过使直径变为 9.0 英寸,该装置将可以容纳 8L 的培养基。通过使直径变为 18.0 英寸,该装置将可以容纳 32L 的培养基。因此,当将主要参数如培养基高度和透气表面的面积与培养基体积的比例保持恒定时,培养体积可以容易地放大。通过将这些参数保持恒定,当装置的体积增加时,有希望使在小体积装置中所建立的方案保持不变。

[0132] 当透气性的细胞培养装置在竖向位置进行操作,并进行悬浮细胞的培养时,如果可以使周围的气体相对来说不妨碍与下部的透气性材料的下侧接触,这会是有利的。例如,在其中架子为非孔性的培养箱中,如果下部的透气性材料与培养箱架子接触,进出培养物的气体交换可能会受到限制。在图 5 的剖面图所示的实施方式中,下部的透气性材料的支持物 80 的作用是,通过保持气室 90 而确保下部的透气性材料 30 与周围气体接触。在优选的实施方式中,通过允许下部的透气性材料的支持物 80 以不减少支持培养物所需要的气体交换的量的方式与下部的透气性材料 30 部分接触,而使气室 90 得以保持。除了允许暴露在周围气体中之外,下部的透气性材料的支持物 80 还将下部的透气性材料 30 保持在基本水平的状态,使得细胞 20 在任何低点都不会堆积。所述堆积会造成扩散梯度并且限制(相对于细胞 20 均匀地分布在下部的透气性材料 30 上的条件)细胞的生长。因此,对于下部的透气性材料的支持物 80 的设计目标可以是:在所需要的许多位置与下部的透气性材料 30 接触,使其保持基本水平,同时还允许足够的气体与下部的透气性材料 30 的下表面接触。本领域技术人员应该认识到,实现这个目标的方式有许多种。如图 5 所示,凸出部分 110 实现了这个目标。

[0133] “钉床”结构是在允许足够的气体交换时保持下部的透气性材料 30 处于基本水平的位置的一种方式。例如,1mm×1mm 的正方形(均匀分布并且从下部的透气性材料的支持物凸出 1mm)可以使下部的透气性材料基本保持在水平位置。当如图 5 所示的凸出部分 110 占下部的透气性材料的支持物 80 表面的 50% 时,这种结构在约 0.004 英寸厚的硅树脂膜上每平方厘米可提供充足的气体交换,以培养约一千万至一千五百万鼠杂交瘤细胞。如图 5 所示,底部气体入口 100 允许气体通过被动扩散进出下部的透气性材料的支持物 80 的气室 90。这

允许透气的细胞培养装置 10B 在周围环境条件下发挥作用而无需辅助的泵输送机构。脚 95 支起下部的透气性材料的支持物 80, 允许底部气体入口 100 可以利用周围气体。当装置如描述的既可以以滚动方式也可以以非滚动方式于侧面发挥作用时, 所述知识同样适用于保持气室在侧壁周围。可以采用允许充足的气体进入的透气性材料中的其它可能方式。例如, 来自 Integra BiosciencesAG 的 CELLLine™ 产品采用通过脚从下部塑料支持物支起的带有开口的网使气体进入透气膜。美国专利 No. 5693537 也提供了这一特征的另外教导。

[0134] 在图 5 所示的结构中, 盖 70 覆盖培养基入口 60 以防止污染。O 形环 75 确保培养基 50 不从透气的细胞培养装置 10B 中漏出, 例如当它处于横向位置、完全被填充或意外掉下时。

[0135] 在一些实施方式中, 培养基不需要完全驻留于下部的透气性材料上。一部分培养基可以驻留于不直接在下部的透气性材料上的区域, 以减小竖式细胞培养装置的外形, 其也许需要用于架子间的距离受限的培养箱中。图 6 的剖面图显示构造用于悬浮细胞培养的实施方式, 其中壁 40C 在下部的透气性材料 30 处形成凹陷, 以在竖向位置操作时减小透气的细胞培养装置 10C 的外形。在这种结构中, 培养基体积与其上驻留有细胞的表面的面积的比例可以保持恒定, 同时通过简单地增加透气的细胞培养装置 10C 的宽度或直径来减小装置的外形尺寸。在接种、加料和处理期间应当注意确保细胞 20 继续驻留于下部的透气性材料 30 上。内壁 42 可以通过允许重力使细胞 20 保持在下部的透气性材料 30 上的区域来达到这个目的。在优选的实施方式中, 壁应当能够允许培养基驻留于下部的透气性材料 30 上大于 3mm 的高度。

[0136] 图 7A 和图 7B 显示用于透气的细胞培养装置的优选的实施方式的剖面图, 所述装置可以根据其中驻留的培养基的体积来升高或降低它的高度。在图 7A 中, 培养基 50 被加入到透气的细胞培养装置 10D 中, 并且与浮肩 (buoyant shoulder) 25 接触。在图 7B 中, 培养基 50 对浮肩 25 施加向上的力, 导致透气的细胞培养装置 10D 的高度因培养基 50 的体积的增加而上升。在所显示的结构中, 壁 40D 为波纹形, 允许透气的细胞培养装置 10D 的高度伸缩, 浮肩 25 可以是任何密度低于培养基 50 的生物相容性材料。它也可以是壁 40 的组成部分。它的尺寸应当可以置换适量的培养基 50 以施加足够的力而使透气的细胞培养装置 10D 向上延伸。在这种结构中, 透气的细胞培养装置 10D 只占培养所需的空間, 并且一种产品可以具有用于多种用途的最佳尺寸。例如, 适合于培养杂交瘤的培养基的体积可以不同于适合于维持胰岛的培养基的量。在这种情况下, 透气的细胞培养装置 10D 只需要占据每种用途所需的空間。而且, 它允许在最小体积状态进行灭菌、运输、储存、培养和处置, 因此降低了培养过程的费用。本领域技术人员应该认识到, 除了浮力之外, 还有许多可以改变装置外形的其它方式, 包括诸如在共同审理中的美国专利申请 No. 10/460850 中描述的机构等各种机构。

[0137] 图 8 显示透气多孔板 15 的实施方式, 其中每个孔的底部具有透气性。下部的透气性材料 30A 的特性与图 4A 的实施方式所述的材料相同。尽管显示的是 6 孔板, 但是可以存在任何数量的单独的孔 45, 包括传统的 6 孔、24 孔、48 孔和 96 孔。壁 40E 的结构允许培养基在下部的透气性材料 30A 上驻留的高度超过传统多孔板的壁的高度, 因此, 在减少相对于传统多孔板的占地面积的同时, 增加了每个孔可以驻留的细胞的数量。例如, 鼠杂交瘤细胞典型地可以驻留的密度为每毫升培养基中 1×10^6 个细胞。当孔的直径为 8.6mm、培养基高度为 2mm 时, 存在 0.12ml 的培养基, 每个孔中可以驻留约 0.12×10^6 个细胞。然而, 如

果通加高壁而使孔中可以驻留 1ml 的培养基,在每个孔中可以驻留足以支持近 5 倍的细胞(即每毫升 1×10^6 个细胞)的培养基,条件是细胞可以驻留于表面积为 0.58cm^2 (即 8.6mm 直径)的透气性材料上。实施例 1 表明在所述尺寸的表面区域上可以驻留远多于 1×10^6 个鼠杂交瘤细胞,这取决于培养基的体积。更多的培养基不仅支持更多的细胞,而且还可以使加料的频率降低,并降低因蒸发而使培养基组成发生改变的速率。

[0138] 壁可以由任何生物相容性材料构成,并且应当以形成液密的方式与下部的透气性材料相匹配。将下部的透气性材料 30A 与壁 40E 相匹配的方法与图 4A 中的实施方式所述的方法相同。而且,如图 4A 中的实施方式所述,壁 40E 和下部的透气性材料 30A 可以由相同的材料构成,并制成一体。下部的透气性材料 30A 可以被支持成如图 5 所示的基本水平的状态,其中下部的透气性材料的支持物 80 设有与气室 90 相联系的底部气体入口 100。在孔 45 底部的跨度较小的情况中,由于下部的透气性材料 30A 的物理强度可以使其保持在足够的水平状态中,也许不需要支持物,这取决于透气性材料的厚度和物理特性。在这种情况下,脚 95A 可以用于支起透气多孔板 15,使具有非孔性架子的培养箱中的气体交换不成为问题。顶盖 55A 防止污染并将蒸发减到最低。

[0139] 图 9A 显示立体图的剖开立体图,并且图 9B 的孔 45A 显示了透气多孔板 16 的优选实施方式的 A-A 剖面图。在这个实施方式中,壁和孔均具有透气性。尽管显示的是 6 孔板,但是可以存在任何数量的单独的孔 45A,包括传统形式的 6 孔、24 孔、48 孔和 96 孔。当需要保留传统多孔组织培养板的显微的、附着表面或光学可见特性时,这种结构是有用的。然而,通过将每个孔 45A 制成深度比用于细胞培养的传统多孔板的最大深度还大,使培养可以利用更多的培养基,并且壁的透气特性允许培养物进行适当的气体交换,使得气/液界面的位置变得无关紧要。非透气性底部 31 以液密方式与透气的壁 41 相匹配。有许多方法可以达到这个目的。例如,非透气性底部 31 的直径可以略微大于透气的壁 41 的直径,使透气的壁 41 将力施加于非透气性底部 31,据此形成液密。透气的壁 41 可以具有图 4A 的透气性材料所述的任何特性。然而,在优选的实施方式中,透气的壁 41 由硅树脂构成,这是因为硅树脂具有容易通过液体注模法进行制造的能力、伸展能力、以及在非透气性底部 31 上提供了液密的能力。非透气性底部 31 可以是在传统多孔组织培养板中常用的任何塑料,或本领域技术人员已知的其它细胞附着材料。

[0140] 用透气性材料来制造透气多孔板 16 的每个孔(孔底部)的费用较低,据此排除了密封接头。如果需要进行贴壁培养,合适的支架可以放在孔的底部。如果需要进行显微评价,应当注意确保光学清晰度。细胞培养领域技术人员已知的任何细胞附着表面都可以放在孔中。如果细胞附着表面具有浮力,经适当挤压而进入孔中可以使其保持在需要的位置。也可以使用许多其它的方法使所述细胞附着表面保持在适当的位置上。

[0141] 图 10A 和图 10B 显示出透气的细胞培养装置的实施方式的剖面图,当培养贴壁细胞时,所述装置的空间利用率更高。支架 120 存在于透气的细胞培养装置 10E 内。侧壁 40F 由透气性材料构成,因此允许通过该装置的侧壁进行气体交换。采用这种方式,由于支架 120 随着高度的增加而被均匀地放大,对透气的细胞培养装置的高度没有限制。要允许培养更多的细胞是非常简单的事情:加高该装置,加入更多的支架 120。在优选的实施方式中,各支架 120 间的距离在放大过程中保持恒定。例如,通过使支架 120 具有间隔物 135,它们可以保持相同的间隔距离,并且与透气的细胞培养装置 10E 的底部保持平行,使其在竖直

方向线性放大。移液枪入口 125 允许移液枪穿过透气的细胞培养装置 10E 进入,并且提供在添加培养基时用以排气的开孔。移液枪入口虽然在中心显示,但是也可以位于任何位置,或借助于其它液体处理形式如针和隔膜而完全将移液枪入口予以排除。在图 10A 中,由于在每一个支架 120 上的接种物 130 的体积是相等的,因此细胞 20A 充分悬浮在接种物 130 中,并且均匀地分布在每一个支架 120 的上表面上。如图 10A 所示,如果支架 120 的两侧都要培养贴壁细胞,可以首先通过在支架 120 的一侧接种而分两步进行接种。在细胞因重力而沉积并且附着到支架 120 的表面上之后,然后对透气的细胞培养装置 10E 进行再次接种,旋转 180 度以暴露支架 120 的相反一侧,并允许细胞 20A 如图 10B 所示沉积并且附着到支架 120 的暴露表面上。

[0142] 在细胞附着后,典型地少于 24 小时,以对支架的一侧进行接种,装置可以以任何方便的静止位置如竖向、反转的或侧放进行操作。如果需要,如果使用者需要一种更类似于滚瓶的形式,可以将其滚动。与传统装置不同的是,该装置可以完全用培养基填充,通过透气的壁进行气体交换,并且不需要存在气/液界面。采用这种方式,该装置具有比传统装置更高的空间利用效率,这是因为在该装置中不需要为了培养物的气体交换而存在气体。可在该装置中培养的细胞的数量限制因素包括支架表面积的量、存在的培养基的体积、该装置孔所用的材料的透气性和厚度、细胞存在的位置与装置的透气的壁的距离以及所培养的细胞的类型。

[0143] 当设计透气的细胞培养装置时理解了培养基体积与支架面积的比例的重要性可以帮助预见装置的产率。例如,如果以前在滚瓶中培养过,那么该滚瓶培养的培养基体积与支架面积的比例可以在透气的细胞培养装置中重现。例如,如果现有培养已经在使用 150ml 培养基的传统 850cm² 的滚瓶中进行过,并且透气的细胞培养装置具有与传统培养瓶相同的外形,那么培养基体积与支架面积的比例可以保持不变。以传统的 850cm² 的滚瓶的形状构造的透气的细胞培养装置可以容纳约 2200ml 的培养基。培养基的体积相对于传统滚瓶 150ml 的培养基体积增加了 14.67 倍。因此,需要增加了 14.67 倍表面积 (12470cm²) 来保持培养基体积与支架面积的比例相等。于是,当透气的细胞培养装置包含 2200ml 的培养基并且具有 12470cm² 支架表面积时,可以预期培养细胞的数量大致与用 15 个每瓶 150ml 进行正常操作的传统 850cm² 滚瓶的细胞数量相同,并且加料的频率也应当是大致相同的。

[0144] 显微镜评估细胞汇合的能力对于很多用途都是有用的。如果最低支架包含透气的细胞培养装置的底部,则它可以用于评估细胞的汇合。当在接种期间驻留于每个支架上的培养基的体积相等时,在整个培养过程中驻留于任何支架上的细胞的数量相对来说是相等的。因此,一个支架可以代表其它的支架。对于一些显微镜,将最低支架物理移动到允许通过反相显微镜 (inverted scope) 进行显微观察的位置的能力可以允许更好地对汇合和形态进行评价。在图 11 的剖面图所示的结构显示这是如何实现的。如果壁 40G 是可移动的(如在所述壁是由许多例如硅树脂等透气性材料制成时的情况那样),它可以打褶以允许最低的支架 120 相对于透气的细胞培养装置 10F 移动。也可以通过如图 11 所示的在固定的位置制造透气的细胞培养装置 10F,使显微评价成为可能,由此排除最低的支架 120 相对于透气的细胞培养装置 10F 移动的必要性。

[0145] 尽管在图 10A、图 10B 和图 11 显示的支架是平的,但是它们可以是允许细胞附着的任何几何形状。例如,对表面进行波纹化可以使该表面具有相对于平面更大的表面积,据此

增加可驻留于特定支架上的贴壁细胞的量。图 12A 显示圆形波纹支架 120A 的立体图,该支架在线性方向上进行波纹化,图 12B 显示 A-A 剖面图。图 12C 显示圆形波纹支架 120B,该支架在圆形方向上进行波纹化,而图 12D 显示出 B-B 剖面图。对于一些需要进行高速率的气体交换以支持高活性的细胞的应用,图 12A 的结构也许更为优异,这是因为气体交换通道由于支架的边缘而没有受到堵塞,这如同图 12C 的结构的情况。对于使透气的细胞培养装置滚动的其它应用,图 12C 的结构也许更为优异,这是因为该形状可使能引起细胞剪切的涡流减至最低。

[0146] 可以将如图 10A、图 11 和图 12 所述的结构、显微观察方法和增加支架面积的方法整合到多孔形式中。这些结构的尺寸完全可以放大。图 9B 显示高表面积孔 46,该孔设有多孔支架 120 的结构,各支架通过间隔物 135 保持预定的距离。使它们具有典型的传统多孔组织培养板的大小,可以允许每个孔存在的贴壁细胞的数量显著增加。壁 41A 优选为透气的壁。

[0147] 图 13 显示可用于以与组织培养瓶相似的形式培养细胞的透气的细胞培养装置的结构剖开立体图。在这个实施方式中,所述装置至少有一面壁可提供气体交换。这种装置是有利的,因为它允许透气的细胞培养装置保留了与传统组织培养瓶相同的属性,同时实现更为紧凑的空间利用。所期望的属性包括,易于通过倾倒或用移液方式转移或取出培养基,具有显微观察性能,易于观察可以指示污染或 pH 变化的培养基的颜色变化的能力,以及堆积装置以最有效地利用运输、储存和培养箱的空间的能力。然而,它比组织培养瓶更加优异,这是因为淘汰了组织培养瓶操作所需的气/液界面,并且可以存在一个或多个支架。在所示的实施方式中,透气的细胞培养装置 12 是由具有至少一面透气的壁 200 的液密壳体构成。培养基入口 60A 由盖 70A 覆盖。支架 120D 彼此平行定位,在它们之间所带有的孔隙允许接种物和培养基驻留于每个支架 120D 之间。优选各支架 120D 之间等距放置,以允许等体积的接种物或培养基驻留于各支架上。透气的壁 200 的透气性材料具有与图 4A 所示实施方式的下部的透气性材料所述的相同属性。在优选的实施方式中,支架 120D 具有与在传统组织培养瓶中所存在的材料相同的特性。顶壁 201 和底部最低支架 120D 是透明的,允许进行培养基颜色的可视评估以及底部支架 120D 的显微评价。使背面或其它壁可透过气体以获得更多的气体交换量。那样将具有有可能使透气的细胞培养装置 12 的占地面积增加的作用。例如,如果透气的壁 200 的气体交换量可支持驻留于 5 英寸宽的支架 120D 上的细胞,那么当支架 120D 为 10 英寸宽时,使相反侧壁透气将提供足够的气体交换量。透气的细胞培养装置 12 在竖直方向上放大的能力是不受限制的。

[0148] 图 14A 至图 14E 显示在培养细胞时空间利用更加有效的另一种方法。在该结构中,支架 120F 置于透气的细胞培养装置 10G 中,随着培养基 50 的加入,该装置的体积可以膨大。在图 14A 中,透气的细胞培养装置 10G 在其自身重量下处于折叠状态。如此在使用前允许有效地利用用于运输、灭菌和储存的空间。支架 120F 彼此尽可能地靠近。每个支架 120F 造有向较低相邻支架 120F 施加力的弹簧臂 145。弹簧臂 145 在压缩状态,欲伸展而不能,这是由于透气的细胞培养装置 10G 上面部分的重量超过了弹力。在图 14B 中,透气的细胞培养装置 10G 由于通过添加接种物 130A 而对浮肩 25A 施加作用力,其高度已经增加。由浮肩 25A 对接接种物 130A 进行置换而施加向上的力,当与弹簧臂 145 的弹力结合时,所述向上的力超过了透气的细胞培养装置 10G 的上部分的重量。由于通过弹簧臂 145 向它们较低相邻支架 120F 所施加的力,支架 120F 分开并且彼此保持相等的距离。当直接驻留于每个支架 120F 上的接种

物 130A 的体积规定了将被沉积到每个支架 120F 上的细胞的数量时,在接种期间彼此保持相等的距离是特别有利的。通过允许沉积到每个支架 120F 上的接种物 130A 的体积相等,等量的细胞可以驻留于每个支架 120F 上。在图 14C 中,由于随着细胞数目的增加和所需营养的增加而添加培养基 50,透气的细胞培养装置 10G 相对于图 14B,其高度又加大了。由于通过弹簧臂 145 向它们较低相邻支架 120F 所施加的力,支架 120F 进一步分开并且彼此保持相等的距离。在每个支架 120F 之间的恒定距离确保了在所有细胞位置培养基 50 的体积与表面积的比例恒定,减少了形成梯度的可能性。在图 14D 中,由于取出培养基 50 和浮肩 25A 向上的力消失,透气的细胞培养装置 10G 已经折叠。此时对于处置其尺寸是有效率的。在需要回收贴壁细胞的情况中,当取出培养基 50 并添加胰蛋白酶时,允许透气的细胞培养装置 10G 折叠是有利的。采用这种方式,回收细胞仅需要少量的胰蛋白酶。本领域技术人员应该认识到,可以采用许多其它方法来改变透气的细胞培养装置 10G 的高度。

[0149] 如图 14E 的立体图所示,弹簧臂 145 可以直接成型于支架 120F 上。弹簧臂 145 (优选至少设置在三个位置) 确保支架 120F 保持在平面上并与它的相邻支架 120F 平行。尽管有助于细胞附着的任何材料是可以接受的,但是优选用于支架 120F 的材料为非常具有脆性的聚苯乙烯。因此,应当注意确保弹簧臂 145 按优良的模塑部件构造,以防止在压力下开裂。用于低压力部件设计的技术是塑料部件设计领域的技术人员已知的。

[0150] 独立于透气的细胞培养装置的高度而移动支架的位置也许是需要。例如,当构造具有非伸展的壁的透气的细胞培养装置更为经济时,这也许是实际的,但是,通过改变在培养期间每个支架上的培养基体积与表面积的比例,这种应用仍然是有利的。图 15A 至图 15C 显示达到这一目的的实施方式。为清楚目的,只显示透气的细胞培养装置的一部分。在图 15A 所显示的透气的细胞培养装置部分的俯视图中,设置三个升降杆 160,使其沿着 3 个坡道 150 的各个坡道爬升,以改变各支架之间的距离。

[0151] 通过观察图 15B 和图 15C 可以更好地理解改变支架之间距离的方法。图 15B 显示图 15A 的 A-A 剖面图。如图 15B 所示,显示两个支架 120G 在它们之间的距离最小的状态。坡道 150 从支架 120G 的顶部发出,而升降杆 160 从支架定位螺杆 170 发出。升降杆 160 还没有开始沿着坡道 150 爬升。可以看出,在支架之间的最小距离由坡道 150 的高度规定,所述坡道与其上所存在的支架 120G 的底侧接触。参照图 15C,支架 120G 处于它们之间距离最大的状态。支架定位螺杆 170 已经被旋转到旋转箭头 180 的方向上,导致升降杆 160 沿着坡道 150 提升,并且使其上所存在的支架 120G 升高。当升降杆 160 存在于坡道 150 的最高点时,在支架 120G 之间获得最大距离,该距离等于坡道 150 的高度加上升降杆 160 的高度。当旋转支架定位螺杆 170 时应当防止支架 120G 旋转,据此允许坡道 150 保持在固定的位置,同时使升降杆 160 沿着该坡道爬升。这可以通过采用舌状物和槽的方式使支架 120G 与透气的细胞培养装置壁的内部相匹配而实现。如在图 15A 的支架的俯视图中得以很好显示的那样,舌状物 212 从透气的壁 40H 发出,并且在每一个支架 120G 中与槽 215 匹配。这样不仅可以在定位螺杆 170 旋转期间防止支架 120G 的旋转,而且可以防止透气的壁 40H 从支架 120G 拔出。通过这种方式,保持了透气的细胞培养装置的形状。定位螺杆 170 构造成可以允许灭菌的移液枪的枪头使其旋转,因此防止了装置的污染并允许使用标准的实验室工具来重新调整支架之间的距离。

[0152] 本发明将参考下面的非限制性实施例进行进一步的描述。

[0153] 实施例

[0154] 实施例 1

[0155] 培养基高度对细胞培养和抗体制备的影响

[0156] 为了评价在由下部的透气性材料构成的装置中改变培养基高度对细胞培养和抗体制备的影响而进行评价。还评价了改变透气性材料表面积与培养基体积的比例所产生的影响。比较构造具有下部的透气性材料和能容纳超出传统观念的高度的培养基的单室测试设备和能容纳传统观念范围内的高度的培养基的单室对照测试设备。比较是相对于 Si-Culture 袋 (美国专利 No. 5686304) 所标的 1.6cm 培养基高度界限进行的。对照测试设备构造可容纳高度为 1.6cm 的培养基, 并且所有测试设备使用的透气性材料均由获自现行的 Si-Culture™ 袋的透气性材料构成。

[0157] 管状测试设备 105 的构造如图 16 所示。壁 40I 是利用 Ultem1000 (高温聚碳酸酯) 圆筒状原料经机器加工而制成的, 得到内径为 1.00 英寸和外径为 1.50 英寸的管。壁的厚度确保穿过壁的气体交换对培养没有帮助。下部的透气性材料 30A 是从取自 Si-Culture™ 袋的硅树脂的 0.045 厚的片制成的, 并且通过液密方式将其固定到经机器加工的管的底部, 获得 5.07cm² 的其上用于驻留细胞 20B 的生长面积。下部的透气性材料的支持物 80M 也是由 Ultem1000 经机器加工制成的。下部的透气性材料 30A 被维持气室 90A 的筛网 115 固定在横向位置。筛网 115 是由直径为 0.020 英寸的线构成, 每英寸有 16 根线。底部气体入口 100A 允许与 5% CO₂ 于 95% R.H. (相对湿度) 和 37℃ 的周围环境进行气体交换。在驻留于测试装置中的培养基 50A 的量不同时, 对用以生长细胞 20B 的装置的性能进行了比较。盖 70B 紧紧地固定到壁 40I 上, 防止管状测试设备 105 受到污染。试验比较了当培养基 50A 存在于细胞上约 1.6cm、3.2cm、5.6cm、10.2cm、15.3cm 和 20.4cm 的高度时的结果。培养基 50A 由添加有 10% 的 Hyclone FBS 的 Hyclone HyQSFM4MAb-Utility 组成。细胞 20B 是分泌 IgG 的鼠杂交瘤细胞, 以 0.76×10⁶ 个细胞/cm² 的接种密度接种在下部的透气性材料 30A 上。环境条件为 5% CO₂、95% R.H. 和 37℃。采用 ELISA 来测定周期细胞计数和单克隆抗体的产率。结果在表 1 中显示。

[0158] 表 1: 培养基高度对细胞生长和抗体制备的影响

[0159]

培养基体积 (ml)	培养基在透气性材料上的高度 (cm)	透气表面的面积与培养基体积的比例 (cm ² /ml)	每个装置存活细胞的最大量 (×10 ⁶)	每平方厘米透气性材料的存活细胞的最大量 (×10 ⁶)	每测试设备制备的单克隆抗体 (μg)	所制备的单克隆抗体到达最大量的时间 (天)	培养基每消耗 1 毫升的单克隆抗体 (μg/ml)
8.1	1.60	0.63	29.7	5.85	2742	9	339
16.2	3.20	0.31	51.0	10.05	7395	12	457
25.8	5.09	0.20	59.1	11.65	10673	18	374
51.7	10.20	0.10	61.1	12.05	15252	15	295
77.6	15.31	0.07	67.2	13.25	23044	22	299
103.4	20.39	0.05	86.4	17.04	32881	25	318

[0160] 用在任何给定的测试设备中所测量的每个参数除以代表传统观念 (即 1.6cm) 的测试设备的相应参数, 清楚地表明了允许培养基驻留于超出传统观念的高度的优势。透气表面的面积与培养基体积的比例的测定如下: 用测试设备的比例除以当包含 1.6cm 高度的培养基时 Si-Culture™ 袋的比例 (即 1.25cm²/ml)。表 2 表示这种方式的表 1 数据。

[0161] 表 2 标准化数据

[0162]

由透气性膜上培养基的高度标准化	由每个装置存活细胞的最大量标准化	由透气表面的面积与培养基体积的比例相对于 Si-Culture™ 袋标准化	由每测试设备制备的单克隆抗体标准化	由消耗每毫升培养基的单克隆抗体标准化	由到达获得单克隆抗体最大量的时间标准化	由所占空间的占地面积标准化
-----------------	------------------	---------------------------------------	-------------------	--------------------	---------------------	---------------

[0163]

1.00	1.00	50%	1.00	1.00	1.00	1.00
2.00	1.72	25%	2.70	1.35	1.50	0.50
3.18	1.99	16%	3.89	1.11	2.00	0.28
6.38	2.06	8%	5.56	0.87	1.67	0.16
9.57	2.26	6%	8.40	0.88	2.50	0.10
12.75	2.91	4%	11.99	0.94	2.83	0.08

[0164] 表 2 的数据清楚地表明了改变透气的细胞培养装置的几何形状以允许更多的培养基驻留于细胞之上的优势。例如,最后一行表明,当允许装置容纳的培养基的高度为传统细胞培养袋的 12.75 倍时,它能够在每平方厘米的占地面积多培养 2.91 倍的细胞,多制备 11.99 倍的单克隆抗体 (Mab),完成制备的时间仅增加了 2.83 倍。而且,当将透气性材料的表面积与培养基体积的比例与 Si-Culture™ 袋的比例比较时,所述比例显著下降是可能的。即使当该比例仅为 Si-Culture™ 袋所使用的 4% 时,培养物也可以有效地生长。如此可允许各种不同结构的装置存在,包括允许装置的占地面积保持不变而培养基高度增加。由于每平方厘米的透气表面的面积存在更多的培养基,因此还可以使蒸发作用减至最低。

[0165] 重要的是,这一数据说明,可以增加培养物而使装置的占地面积保持很小。表 3 显示容纳驻留于测试设备中的培养基体积所需的装置占地表面积。第一行显示在测试设备中的培养基体积。第二行显示测试设备的占地表面积,随着加入的培养基越来越多,所述占地表面积保持不变。第三行显示在典型袋子中容纳驻留于测试设备中的培养基体积所需的占地表面积。在这种情况下,显示了当 Si-Culture™ 袋在制造商推荐的 1.6cm 培养基高度包含第 1 行的体积的培养基时的占地面积。第 4 行显示占地面积的差异。例如,当测试设备包含 103.4ml 的培养基时,在根据制造商推荐进行操作时 Si-Culture™ 袋应当具有 64.6cm² 的占地面积,但是测试设备只具有 5.1cm² 的占地面积。因此,允许培养基驻留于 20.39cm 高度的测试设备只需要 Si-Culture™ 袋制备基本相同数量的单克隆抗体所需的占地面积的 8%。

[0166] 表 3 :占地面积的高效利用

[0167]

装置中培养基的体积 (ml)	8.1	16.2	25.8	51.7	77.6	103.4
测试设备的占地面积 (cm ²)	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
具有 1.6cm 的培养基高度的袋子的占地面积 (cm ²)	5.1	10.1	16.1	32.3	48.5	64.6
测试设备的占地面积与袋子占地面积的比例 (%)	100%	50%	32%	16%	11%	8%

[0168] 相对于所有传统结构的优点有很多。可以允许产生的各种不同优点出现而避免传统细胞培养袋的不实用的形状,所述优点涉及更有效地利用培养箱的空间、更容易地输送和取出培养基和减少污染风险。可以通过加高透气筒、降低透气性膜与培养基体积的比例来使存在于在所述筒中的少量的培养基显著增加。它具有这样的作用,即在放大过程中允许需要更少单元。对于陪替氏培养皿和多孔板的透气的传统类型来说,每个单元可以存在更多的细胞,而无需增加装置的占地面积或所需装置的数量,并且可以减少加料的频率。由于可以显著降低透气表面的面积与培养基体积的比例,因此在所有构造中可以实现蒸发作用最小化。

[0169] 实施例 2

[0170] 透气性硅树脂的厚度对细胞生长的影响

[0171] 传统的观念(如美国专利 No. 5686304 和美国专利申请 10/183132 所规定)和可商购获得的使用硅树脂的透气产品设计规定不应当使用大于 0.005 英寸的硅树脂厚度。然而,从制造和产品的可靠性角度来看,增加厚度是有利的。因此,为评价可气体渗透性低的硅树脂材料的厚度对细胞生长的影响而进行了各种评估。对传统观念厚度的材料与厚度增加了的同样材料进行了比较。

[0172] 管状测试设备的结构如图 16 所示。壁由 Ultem1000(高温聚碳酸酯)圆筒状材料经机器加工制成,得到具有内径为 1.00 英寸和外径为 1.50 英寸的管。下部的透气性材料的四种厚度结构由取自 Si-Culture™ 袋的硅树脂片制成。下部的透气性材料 30A 按以下方法制成双层、三层和四层:采用 UV(紫外线)固化硅树脂胶均匀散布在表面上而将硅树脂片粘合在一起,将各片层压在一起,在它们之间不留有空气的空隙而制成。在固化后,层压片和单片对照以液密方式固定到经机器加工的管子的底部,获得 5.07cm² 的其上用于驻留细胞的生长面积。测试重复进行三次。如实施例 1 所述进行构造,下部的透气性材料 30A 由下部的透气性材料的支持物 80 固定在横向位置。实验比较了当培养基驻留于细胞上 20.4cm 高度时的结果。培养基由添加有 10% 的 Hyclone FBS 的 HycloneHyQSFM4MAb-Utility 组成。鼠杂交瘤细胞以 4.3×10^6 个活细胞/cm² 的接种密度接种在下部的透气性材料上。环境条件为 5% CO₂、95% R.H. 和 37℃。进行周期细胞计数和葡萄糖测定。结果显示在表 4 中。

[0173] 表 4:透气性硅树脂的厚度对细胞生长的影响

[0174]

膜厚度 (英寸)	每平方厘米存活细胞数的最大值 ($\times 10^6$)	标准化:膜厚度	标准化:每平方厘米存活细胞数的最大值
0.0045	15.2	1.00	1.00
0.016	15.5	3.56	1.02
0.024	13.49	5.33	0.89
0.033	12.0	7.33	0.79

[0175] 通过参考相对于针对代表传统观念的 0.0045 英寸厚度的单片所收集的数据而将数据进行标准化。可以清楚地看出,显著增加厚度的效果不会对支持细胞生长的性能产生明显的负面影响。当材料的厚度增加约 4 倍 (从 0.0045 英寸至 0.016 英寸) 时,对细胞生长没有影响。当硅树脂膜的厚度增加 5.33 倍 (从 0.0045 英寸至 0.024 英寸) 时,生长性能仅下降了 11%。同样,厚度增加 7.33 倍 (超出传统观念) 所具有的生长性能仅下降了

21%。在许多细胞培养用途中,如用于单克隆抗体制备的杂交瘤培养,79%的存活率通常是可以接受的。例如,在 CELLline™ 产品中,杂交瘤的存活率按操作说明所述一般为 50%。因此,装置设计可以采用更厚的硅树脂壁,而其性能不会显著下降。增加厚度可以使制造和功能得以改进,如简化液体注模法或减少了穿孔的可能性。总之,设计具有比以前所相信的可能厚度更厚的壁的高性能的细胞培养装置是可能的。

[0176] 实施例 3

[0177] 在滚动和非滚动装置中于高液体高度培养细胞的能力

[0178] 为评价采用不同于传统观念的方式构造的透气的细胞培养装置获得的优点而进行了各种评估。被评估的主要类型有两种:1) 非滚动的透气装置和 2) 滚动的透气装置。在非滚动的透气装置结构中,培养基高度远远超过了传统观念强加的界限。透气表面的面积与培养基体积的比例被降低到远低于传统观念的比例。在滚动的透气装置结构中,允许培养基驻留于远离透气的壁的地方,每个装置允许驻留比现有技术的透气滚瓶更多的培养基。

[0179] 单克隆抗体的制备在细胞培养袋和滚瓶中是一种常规用途。使用传统 850cm² 的滚瓶作为对照。测试设备根据图 4 所示的实施方式构造。在尺寸上制造成与传统 850cm² 的 Corning® 滚瓶具有同样的尺寸。透气性材料与 Si-Culture™ 袋的材料相同,如同美国专利 5686304 进一步规定的那样。非滚动的测试设备的透气表面的面积被限制到该设备的底部面积,为 98cm²。侧壁不具有透气性。滚动的测试设备的透气表面的面积被限制到该设备的全部圆筒状侧壁表面,为 850cm²,并且末端不具有透气性。培养基由添加有 2.5% Hyclone FBS 的 Hyclone SFM4MAb 组成。每个测试设备均以每毫升所用培养基 0.04×10⁶ 个鼠杂交瘤细胞的细胞密度进行接种。每个测试设备加有 2050ml 的培养基。环境条件为 5% CO₂、95% R.H. 和 37℃。

[0180] 传统滚瓶加有 255ml 的培养基,该体积为滚瓶推荐使用的培养基的最大量。通过 ELISA 测定抗体的存在。结果显示在表 5 中。

[0181] 表 5:滚动与静止对抗体制备时间的影响

[0182]

测试设备的类型	制备的抗体的最大量 (mg)	达到最大产率的时间 (天)
非滚动的新型装置	289	16
滚动的新型装置	302	13
传统的滚瓶	33	13

[0183] 表 5 显示出滚动的和非滚动的透气测试设备是如何在占据与传统滚瓶对照相同的空间时制备出约 9 倍的抗体的。表 5 还证明滚动的透气类型如何可以用以减少相对于静止透气的同类装置产生抗体所需的时间。实现了时间减少 20%,即 3 天。重要的是,滚动和非滚动的类型就空间几何形状而言可以实现至少 9 倍的改进,从而在与传统滚瓶相比较时,降低了灭菌、运输、储存、劳力、培养箱空间和处置的费用。

[0184] 上述结果还清楚地表明了通过以偏离传统观念的方式制造的透气装置而实现的优点。在非滚动的测试设备中,培养基的高度为约 20.9cm,超出传统细胞培养袋推荐的最高高度的 10 倍。如果将装置构造成具有 2.0cm 的培养基高度,将需要 1025cm² 占地面积以容纳等量的培养基,所述占地面积超过非滚动的测试设备的占地面积的 10 倍。

[0185] 滚动的透气装置的几何形状的益处有很多。滚动的测试设备所包含培养基的体积

几乎 8 倍于传统滚瓶 (225ml) 推荐的最大的培养基体积, 超过 Synthecon Inc. 的 Rotary Cell Culture System™ 的培养基体积的 4 倍, 几乎 5 倍于 MiniPERM 的培养基, 远远超过 Spaudling、Schwarz、Wolf 等和 Falkenberg 等的专利申请所允许的量。而且, 培养基驻留于距离测试设备的透气的壁任何部分多达 5.6cm 的地方, 超过了 Spaudling、Schwarz 和 Wolf 等的专利申请所限定的界限的 2 倍。滚动的测试设备可以在标准滚动架上发挥作用, 这与可从 Synthecon™ Inc. 商购获得的 Rotary Cell Culture System™ 和来自 Vivascience Sartorius Group 的 MiniPERM™ 相反, 所述 Rotary Cell Culture System™ 和 MiniPERM™ 都需要定做的装备来滚动。因此, 所述滚动的透气装置的放大效率远远优越于其它装置和方法。

[0186] 实施例 4

[0187] 在没有气 / 液界面时培养贴壁细胞的能力

[0188] 为评价采用没有气 / 液界面存在而允许通过透气的壁进行气体交换来培养贴壁细胞的能力而进行各种评估。以如图 17 所示的方式构造测试设备, 该测试设备消除了通过气 / 液界面进行气体交换的可能性。具有透气的壁的测试设备 12 包含长方形液密壳体 241, 设有 1 面透气的壁 200A 和 5 面非透气性壁 210。透气的壁 200A 由硅树脂膜构成, 所述硅树脂膜厚约 0.0045 英寸, 购自 Medtronic Inc. (Minneapolis)。该膜被 Medtronic 用来制造 Si-Culture™ 袋。液体输送口 220 和液体取出口 230 允许进行接种和加料。底部附着支架 240 由取自 Falcon™ 组织培养瓶的塑料部分构成, 以提供与对照 Falcon™ T-175 组织培养瓶相等的附着表面。壳体 241 的内部尺寸为: 深 6cm、宽 10cm 和高 0.635cm。因此, 透气的壁 200A 为 10cm 宽和 0.635cm 高, 形成 6.35cm² 的表面积。底部附着支架 240 为 10cm 宽和 6cm 深, 具有 60cm³ 的附着表面。具有透气的壁的测试设备 12 在接种期间完全由培养基填充, 据此消除了任何气 / 液界面。因此, 气体交换只能通过与透气的壁 200A 竖直方向上的扩散的方式来进行。接种物包含悬浮在 38.1ml 的添加有 10% Hyclone FBS 和 1% L-谷氨酰胺的 EMEM 培养基上的 60000 个活的 BHK (幼仓鼠肾细胞) 细胞 (98% 的存活率)。因此, 接种密度为在每平方厘米的可用附着支架 240 区域内有 10000 个活细胞。透气膜的表面积与培养基体积的比例为 0.167cm²/ml。透气膜的表面积与附着支架的表面积的比例为 0.106cm²/cm²。对照 T-175 组织培养瓶用同样的细胞以相等的接种密度和存活率进行接种。具有透气的壁的测试设备 12 和 T-175 对照被放在标准的在 5% CO₂、95% R. H. 和 37℃ 的用于细胞培养的培养箱中。

[0189] 细胞由于重力而沉积到底部附着支架 240 和对照 T-175 瓶上, 一直维持培养, 直到达到汇合为止。测试设备和对照在全部附着支架上都展现出汇合的单层。通过可视显微比较, 透气测试设备 12 和 T-175 对照瓶看上去几乎相同。对 T-175 瓶进行胰蛋白酶化, 进行细胞计数, 并且经测定细胞达到了约 190000 个细胞 / cm² 的密度。测试设备用 Wright Giemsa 染色, 以测定细胞在底部附着支架 240 上的分布。图 20 显示出分布模式, “前面” 靠近透气的壁, “中间” 大致在透气的壁 200 和相对的非透气性壁 210 之间的中间的位置, “后面” 靠近对面的非透气性壁 210 的位置。

[0190] 图 20 清楚表明, 细胞在缺乏气 / 液界面、机械混合或灌注, 在装置具有透气性时, 于支架上生长至汇合。因此, 通过壁进行气体交换足以使这里描述的细胞培养装置类型完全发挥其功能, 所述类型包括在图 9A、图 9B、图 10A、图 10B、图 11 以及图 14A 至图 14E 所示

的类型。实施例 4 还表明,透气的细胞培养装置只有一面壁需要由透气性材料构成,据此扩展了一大批的装置设计方案。例如,透气装置可以通过使侧壁透气而构造成传统 T- 瓶类型。通过这种方式,可以使更多的培养基能够被用于培养,或者由于不需要气 / 液界面,因此可以使装置的外形变小。

[0191] 实施例 5

[0192] 在没有气 / 液界面的多附着支架上培养细胞的能力。

[0193] 为评价在没有气 / 液界面的多附着支架上培养细胞的能力而进行了各种评估。气体交换通过透气装置的壁进行。透气测试设备以如图 18 所示的方式制造,该装置消除了通过气 / 液界面的方式进行气体交换的可能性。多支架测试设备 14 包含长方形的液密壳体,该壳体设有 1 面透气的壁 200B 和 5 面非透气性壁 210A。透气的壁 200B 由模塑硅树脂材料构成,该材料厚 0.015 英寸,液体输送口 220A 和液体取出口 230A 允许进行接种和加料。附着支架 240A 由取自 NUNC™Cell Factory 的细胞培养装置的塑料构成。多支架测试设备 14 的内部尺寸为:长 15.24cm、宽 7.62cm、和高 2.54cm。因此,透气的壁 200B 为:宽 7.62cm 和高 2.54cm,形成 19.35cm^2 透气性材料的表面积。每个附着支架 240A 为 6.6cm 宽、15.03cm 长,使每个附着支架 240A 具有 99cm^2 的附着表面积。

[0194] 在多支架测试设备 14 的一个测试组中,4 个附着支架 240A 竖向排列,一个在另一个的上面,在各支架之间具有 5.08mm 的空隙,使得每个装置的总附着表面积为 396cm^2 。在这种类型的多支架测试设备 14 中的培养基体积为 195ml。透气性膜的表面积与培养基体积的比例为 $0.099\text{cm}^2/\text{ml}$ 。透气性膜的表面积与附着支架 240A 的总表面积的比例为 $0.049\text{cm}^2/\text{cm}^2$ 。

[0195] 在多支架测试设备 14 的另一个测试组中,5 个附着支架 240A 竖向排列,一个在另一个上面,在各支架之间具有 2.54mm 的空隙,使得每个装置的总附着表面积为 495cm^2 。在各多支架测试设备 14 中的培养基体积为 170ml。透气性膜的表面积与培养基体积的比例为 $0.114\text{cm}^2/\text{ml}$ 。透气性膜的表面积与附着支架 240A 的总表面积的比例为 $0.039\text{cm}^2/\text{cm}^2$ 。

[0196] 在接种期间,多支架透气测试设备 14 完全由培养基填充,因此消除了任何的气 / 液界面。因此,气体交换只能通过在与透气的壁垂直的方向上借助扩散来进行。接种密度为在每平方厘米的可用附着支架区域内有 15000 个活的 BHK 细胞。培养基由添加有 10% 的 Hyclone FBS 和 1% Gibco 青霉素链霉素 (Penicillin Streptomycin) 的 Gibco GMEM 组成。对照 T-175 组织培养瓶也用 BHK 细胞以相等的接种密度和存活率在 30ml 相同的培养基混合物中接种。多支架透气测试设备 14 和 T-175 对照被放在标准的在 5% CO_2 、95% R. H. 和 37°C 的用于细胞培养的培养箱中。

[0197] 细胞由于重力而沉积到每个附着支架 240A 和对照 T-175 瓶上,一直维持培养,直到达到汇合为止。在 4 天内终止培养。将所有附着支架 240A 从多支架透气测试设备 14 中取出。通过可视显微比较,多支架透气测试设备 14 的两个测试组与 T-175 对照瓶的细胞密度看上去几乎相同,为约 95% 的汇合。

[0198] 这证明通过消除了培养装置中保留顶部空间的必要性而使空间利用效率得到显著提高的能力。由于该装置只容纳需要支持培养的培养基,因此可以显著地减小它的外形。这种新型的装置比传统 T- 瓶、NUNC™Cell Factory 和 Corning CellStack™ 更为紧凑。这导致灭菌、运输、储存和处置费用的节省。此外,可以更加有效地使用培养箱的空间和无

菌工作台的空間。

[0199] 实施例 6

[0200] 用于在竖向位置接种的贴壁细胞培养的透气非滚动的细胞培养装置

[0201] 构造测试设备以评价非滚动的具有一个支架以上的透气的细胞培养装置相对于传统培养瓶的培养细胞的性能。图 19A 显示透气测试设备 260 的剖面图。支架 120H 竖向排列,通过间隔物 135B 使各支架 120H 之间的空隙保持一致。壁 40J 具有透气性,由购自 Medtronic Inc. (Minneapolis) 的硅树脂构成,厚约 0.0045。接缝 270 向透气的壁 40J 施加力,将其对着隔板垫片 280 挤压,以在透气的壁 40J 和上部的隔板 290 和下部的隔板 300 之间形成液密封接。培养基入口 60B 允许液体输入和取自透气测试装置 260。盖 70 可防止污染,并且在操作中盖紧。图 19B 显示出支架 120H 的立体图。它由组织培养处理的聚苯乙烯构成,其厚 0.040 英寸。移液枪入口 125A,直径为 0.75 英寸,允许移液枪进入,并且防止气体被截留在支架 120H 之间。4 个排气槽 190 允许额外的区域用于放出被截留的气体,确保除去全部的气/液界面。各支架 120H 每个面的表面积约 86cm^2 。透气测试设备 260 的内径为 4.4 英寸,内部高度从下部隔板 300 的内表面至上部隔板 290 的内表面进行测量,为 2.25 英寸。因此,透气性材料的表面积是 561cm^2 。8 个支架 120H 竖向堆积,并用间隔物 135B 使各支架之间保持约 0.25 英寸的间隙。8 个支架 120H 的顶部的总表面积为 695cm^2 。透气测试设备 260 的内部体积为约 500ml。因此,透气性材料与培养基体积的比例是 $561\text{cm}^2/500\text{ml}$,或 $1.12\text{cm}^2/\text{ml}$ 。

[0202] 悬浮在 500ml 添加有 1% Gibco 氨基酸溶液和 10% Hyclone FBS 的 Gibco GMEM 培养基中的 10.425×10^6 个 BHK 细胞被接种到透气测试设备 260,形成的接种密度为每平方厘米附着表面积 15000 个细胞。对照 T-175 瓶也在 30ml 的等量培养基中以每平方厘米附着表面积 15000 个细胞进行接种。

[0203] 在约 96 小时后,培养终止。拆开透气测试设备 260,对每个支架 120H 进行显微测定,表明在 8 个支架 120H 的每一个的上表面上存在细胞的汇合模式。通过显微评价进行测定,对照 T-175 瓶也是汇合的。对 T-175 瓶和透气测试设备 260 进行胰蛋白酶化,并用标准的细胞计数技术来测定存在细胞的数量。结果总结在表 6 中。

[0204] 表 6:透气的细胞培养装置与 T- 瓶

[0205]

装置	全部细胞 ($\times 10^6$)	存活率 (%)	存在的培养基 (ml)	细胞上培养基的高度 (cm^2)
透气细胞测试设备 260	220.8	98	500	0.72
对照 T- 瓶	26.3	95	30	0.17

[0206] 表 6 表明,尽管没有气/液界面,但是细胞在新的透气测试设备 260 上可以增殖并且保持健康。

[0207] 值得一提的是每个装置所占的空间的体积。透气测试设备 260 具有 100cm^2 的占地面积以及 7.6cm 的高度(包括颈部在内)。因此,所占空间为约 760cm^3 。T-175 瓶(包括颈部在内)的占地面积大致为:23cm 长 $\times$ 11cm 宽,主体的高度为约 3.7cm。因此,所占空间为约 936cm^3 。由于透气测试设备 260 培养了比 T-175 瓶多约 8.4 倍的细胞,所以在相同的时间内制备等量的细胞将需要 8.4 个 T-175 瓶。表 7 显示基于表 6 的实验结果,如果用 T-175 瓶来制备与透气测试设备 260 所培养的相同数量的细胞其所占空间的差异。

[0208] 表 7

[0209]

装置	每个装置所占空间的体积 (cm ³)	在 3 天中制备 221×10 ⁶ 个细胞的装置	所需空间的体积 (cm ³)
一种新的透气的细胞培养装置 260	760	1	760
对照 T- 瓶	936	8.4	7862

[0210] 消除气/液界面的优点是显而易见的。通过透气测试设备 260 可以使空间减少 10 倍以上。这节省了灭菌、运输、储存、培养箱空间使用和废物处置的费用。此外,还显著减少了需要处理的装置的数量,从而显著降低了劳力和污染风险。

[0211] 实施例 7

[0212] 用于在竖向和反向位置接种的贴壁细胞培养的透气非滚动的细胞培养装置

[0213] 使用图 19A 所示的测试设备(如前面实施例 6 所限定),通过试验测定细胞是否都附着到支架的顶部和底部表面上。该试验可以由两步接种来完成。在第一步,将第一接种物放在透气测试设备中,只不过该设备是在直立位置定位。允许细胞在 24 小时沉降并且附着到支架顶部表面上。在第二步,将第二接种物放进透气测试设备中。翻转透气测试设备以允许第二接种物的细胞沉降并且附着到各支架的底部表面上。

[0214] 这个过程用是用包含足够的 BHK 细胞的各接种物接种到支架的暴露的表面上而进行的,密度为 15000 个细胞/cm²。培养基组合物与实施例 6 所述的相同。在第一接种和第二次接种之间的时间间隔为 24 小时。在第二次接种后 72 小时终止培养。拆开装置,对每个支架进行显微镜评估。细胞均匀分布在每个支架的顶部和底部表面上。随后,用胰蛋白酶将细胞取出,并进行计数。每平方厘米表面积的活细胞的平均数量为 144×10^5 ,存活率大于 99%。

[0215] 因此,细胞可以在支架 120 的顶部和底部附着并增殖。因此,将新的透气测试设备相对于传统装置进一步减小其尺寸是可能的。对于贴壁细胞培养,可以存在各种不同几何形状的在任意平面上具有细胞附着区域的支架。

[0216] 实施例 8

[0217] 用于在竖向和反向位置的支架之间具有有限距离的接种贴壁细胞培养的透气非滚动的细胞培养装置

[0218] 通过试验测定向装置中插入更多的支架面积是否可以减小装置的尺寸。为了节省额外的空间,使用每个支架的上下表面来培养细胞。实施例 7 的透气测试设备制造有补充的支架。对支架的数量和各支架之间的距离进行选择,以使体积与表面积的比例与传统组织培养瓶基本相等。传统的 T-175 瓶推荐的培养基体积变化范围为约 16ml ~ 32ml(InvitrogenLife Technologies)。这规定所驻留的培养基从附着表面起约 0.09cm ~ 0.18cm。这个实施例的测试装置将分两步进行接种,允许细胞驻留于每个支架的上下表面。因此,为了获得对透气的细胞培养装置在空间和劳力方面可以带来的节约的保守评价,在各支架之间允许培养基驻留于 0.34cm 高度。采用这种方式,培养基与表面积的比例相对于 T-175 瓶保持恒定。实际上,每个支架表面可以利用其间一半的培养基,而与之相邻的支架可以利用另一半。因此,支架每一侧可利用的培养基与每平方厘米生长表面 0.17cm 高度的传统的组织培养瓶是一致的。

[0219] 将 14 个支架插入到测试装置中,均匀间隔,使间距为约 0.34cm。使用具有驻留于 0.17cm 高度的 30ml 的培养基的 T-175 瓶作为对照。如实施例 7 所详述,接种采用 BHK 细胞,分两步进行。培养基组合物与在实施例 6 中所描述的相同。在第二次接种后 72 小时,终止培养。拆开装置,对每个支架上下表面上的细胞分布进行显微评估。各支架均显示出,上下表面上的分布模式均与 T-175 瓶的大致相同。表 7 显示当与传统 T-175 瓶比较时,增加新的透气的细胞培养装置的表面积是如何减少培养给定数量细胞所需空间的一个实施例。

例如,当新的透气的细胞培养装置包含 2432cm^2 的支架表面积时,要提供相同的表面积则需要 14 个 T-175 瓶。如果每平方厘米的支架表面积想要利用 1.7mm 的培养基,新的透气的细胞培养装置所占空间的体积是可以测定的。表 8 显示,在这种情况下,每个类型的装置所占空间的体积显著不同。

[0220] 表 8:表面积增加的透气装置的产率

[0221]

装置	细胞附着可利用的表面积 (cm^2)	所需装置的数量	所需培养基的体积 (cm^3)	每个装置所占空间的体积 (cm^3)
一种新的透气的细胞培养装置	2432	1	420	760
T-175 瓶	2432	14	420	12,292

[0222] 可以看出,当将透气的细胞培养装置设计成培养基与表面积的比例与传统培养瓶相等时,结果使空间利用效率得到了显著提高。当需要培养等量的细胞时,透气的细胞培养装置所占空间的体积只有 T-175 瓶所占空间的体积的 1/16。它直接使得用于灭菌、运输、储存和处置的费用的降低。

[0223] 应该理解,本发明并不限于上述的实施方式,上述的实施方式的目的是为了说明和描述上述内容,相反,本发明包括落在附加的权利要求范围内的任何修改形式和改变形式。

[0224] 实施例 9

[0225] 用于在直立位置上接种的贴壁细胞培养的透气滚动的细胞培养装置

[0226] 如图 19A 的剖面图所示以及进一步在实施例 5 中所限定的那样,构造透气测试设备 260,以评价用设有一个以上支架结构的滚动的透气的细胞培养装置的容量。

[0227] 使透气测试设备 260 处于直立、非滚动状态,将悬浮在 500ml 的添加有 1% Gibco 氨基酸溶液和 1% Hyclone FBS 的 Gibco GMEM 培养基上 10.425×10^6 个 BHK 细胞接种到透气测试设备 260 中,形成每平方厘米附着面积 15000 个细胞的接种密度。对照 T-175 瓶也在 30ml 的等量培养基中以每平方厘米附着面积 15000 个细胞进行接种。

[0228] 在约 24 小时之后,将透气测试设备放在以 1RPM(转/分钟)转动的标准滚架上。在滚动开始后 3 天,拆开透气测试设备,对每个支架进行显微测定,表明在 8 个支架的每一个支架的上表面上都存在细胞汇合模式。通过显微评价,对照 T-175 瓶也发生了汇合。

[0229] 这表明细胞的增殖并没有因滚动新的透气的细胞培养装置而受到抑制。因此,滚动的或非滚动的装置的制造可以让使用者在建立方案时有了更多的选择。

[0230] 附图标记的说明

[0231] 10 透气的细胞培养装置

[0232] 12 具有透气的壁的测试设备

[0233] 14 多支架测试设备

[0234] 15 透气多孔板

[0235] 16 具有透气的壁多孔板

[0236] 20 细胞

[0237] 25 浮肩

[0238] 30 下部透气性材料

[0239] 31 非透气性底部

[0240] 40 壁

- [0241] 41 透气的壁
- [0242] 42 内壁
- [0243] 45 单独的孔
- [0244] 46 高表面积孔
- [0245] 50 培养基
- [0246] 55 顶盖
- [0247] 60 培养基入口
- [0248] 70 盖
- [0249] 750 形环
- [0250] 80 透气性低的材料的支持物
- [0251] 90 气室
- [0252] 95 脚
- [0253] 100 底部的气体入口
- [0254] 105 管状测试设备
- [0255] 110 凸出部分
- [0256] 115 筛网
- [0257] 120 支架
- [0258] 125 移液枪入口
- [0259] 130 接种物
- [0260] 135 间隔物
- [0261] 145 弹簧臂
- [0262] 150 坡道
- [0263] 160 升降杆
- [0264] 170 支架定位螺杆
- [0265] 180 旋转箭头
- [0266] 190 排气槽
- [0267] 200 透气的壁
- [0268] 201 顶壁
- [0269] 210 非透气性壁
- [0270] 212 舌状物
- [0271] 215 槽
- [0272] 220 液体输送口
- [0273] 230 液体取出口
- [0274] 240 附着支架
- [0275] 241 壳体
- [0276] 260 透气测试设备
- [0277] 270 接缝
- [0278] 280 隔板垫片
- [0279] 290 上隔板

[0280] 300 下隔板

[0281] 本领域技术人员应该认识到,可以对本公开内容进行大量的修改而不背离这里描述的本发明的精神。因此,本发明并不是要将其范围限于所说明和所描述的实施方式。相反,本发明的范围是由附加的权利要求及其等同内容所解释。在此以参考的方式将本文所引用的所有出版物、专利、专利申请书和参考资料引入本文。

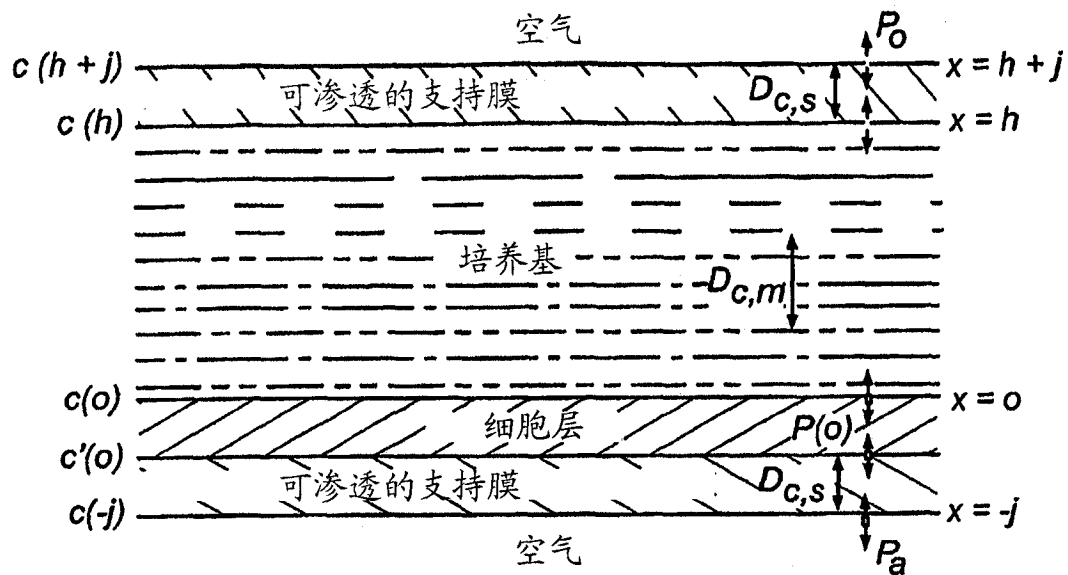


图 1A

现有技术

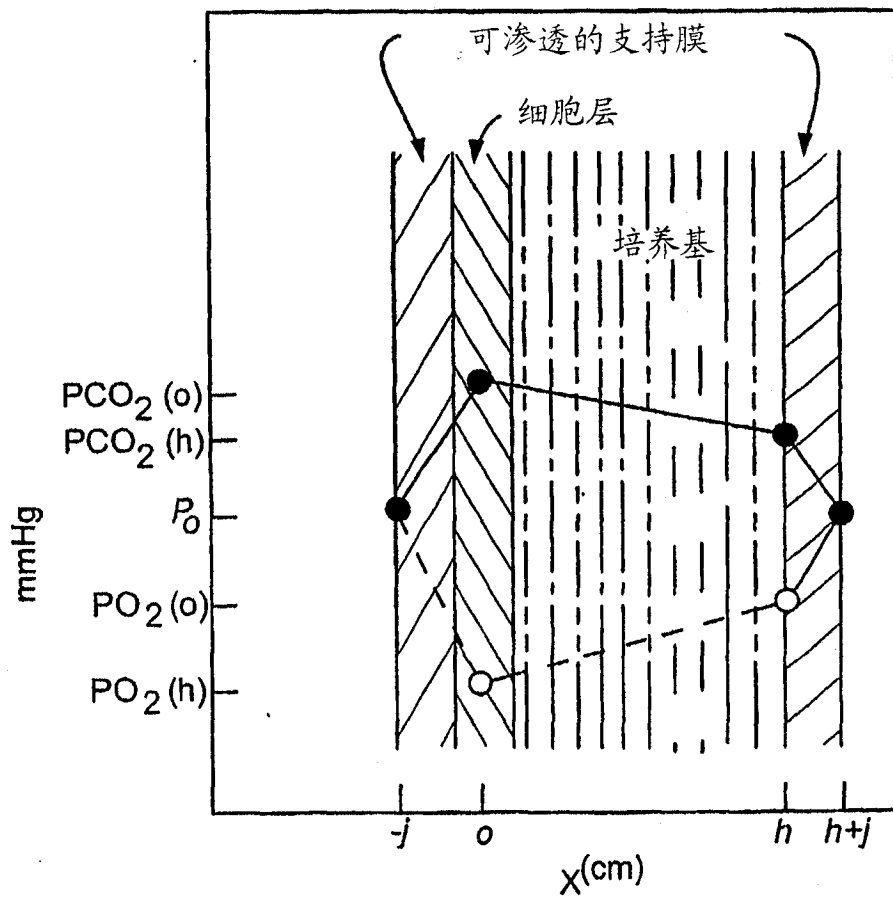


图 1B

现有技术

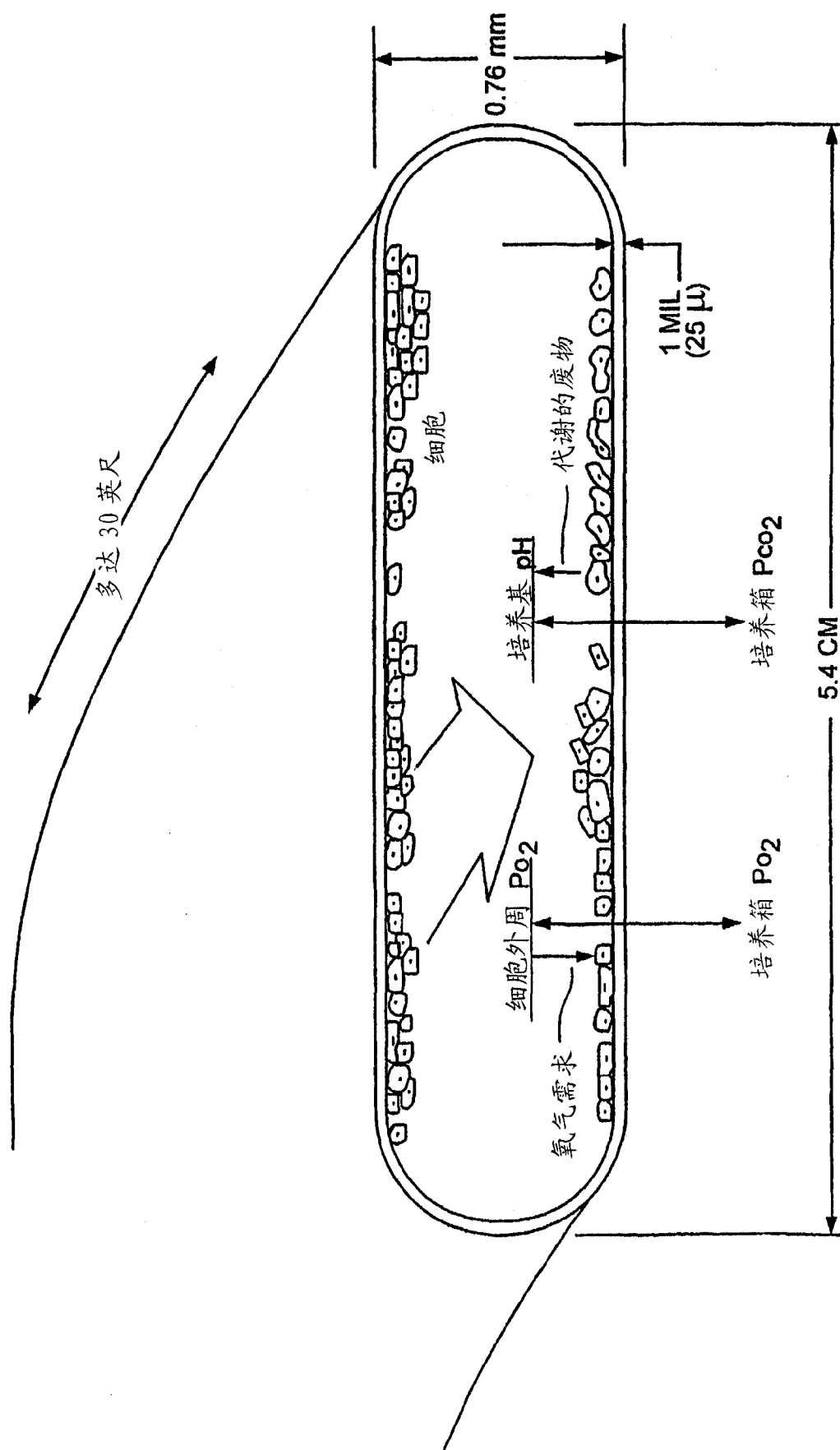


图 2
现有技术

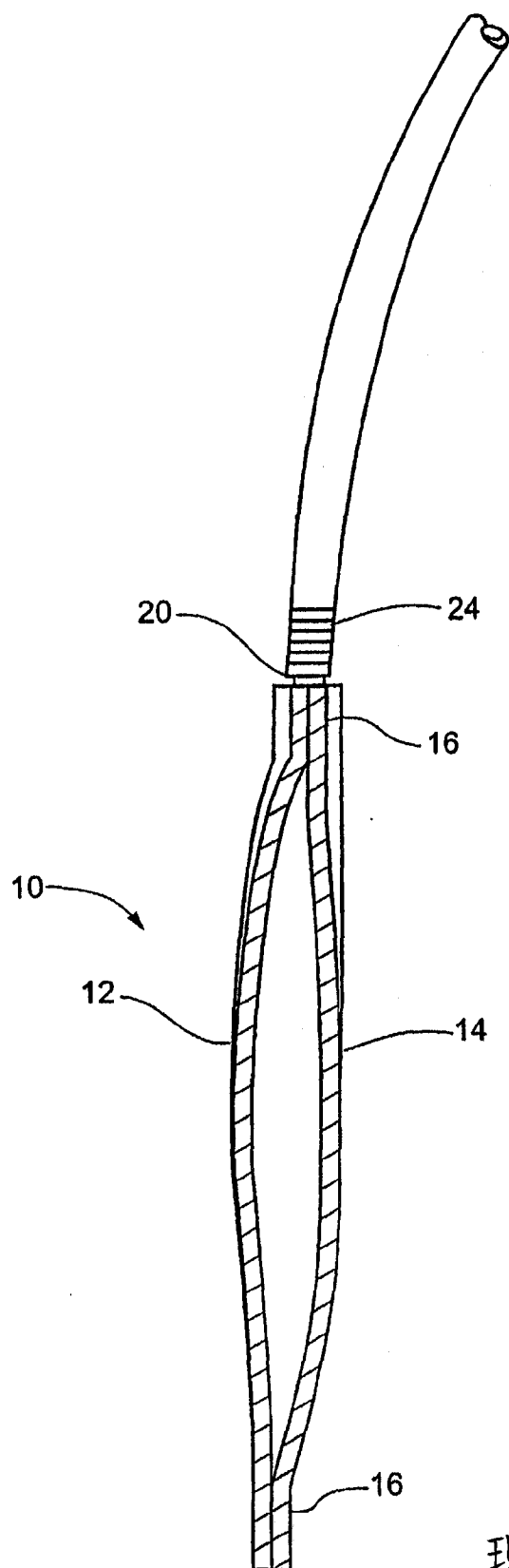


图 3
现有技术

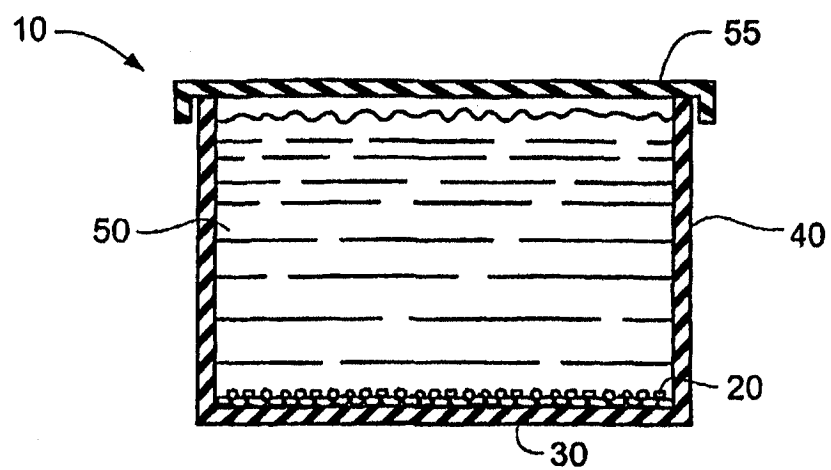


图 4A

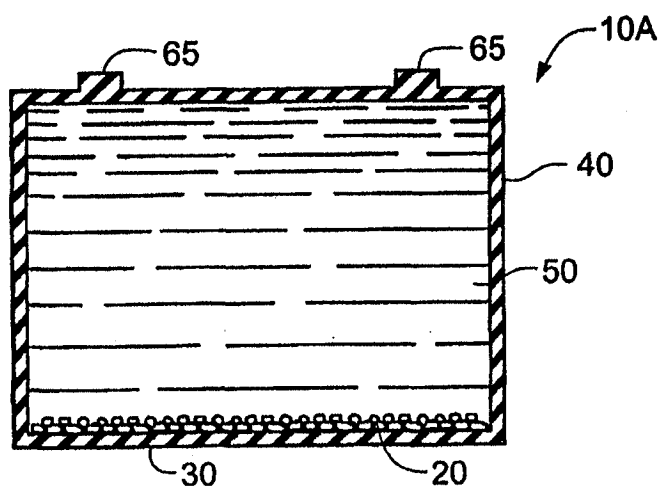


图 4B

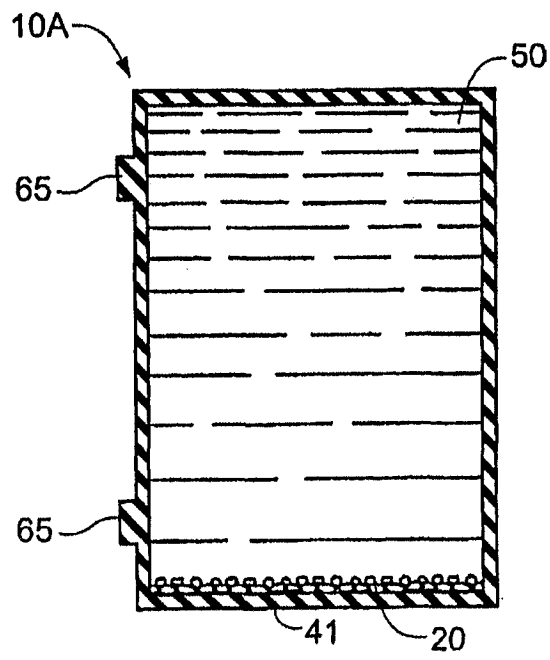


图 4C

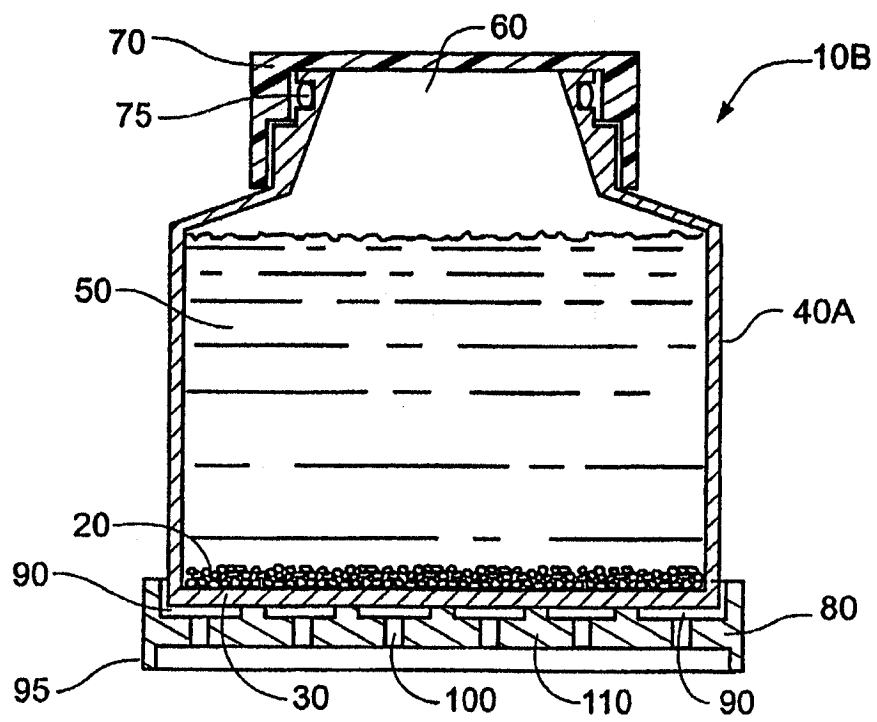


图 5

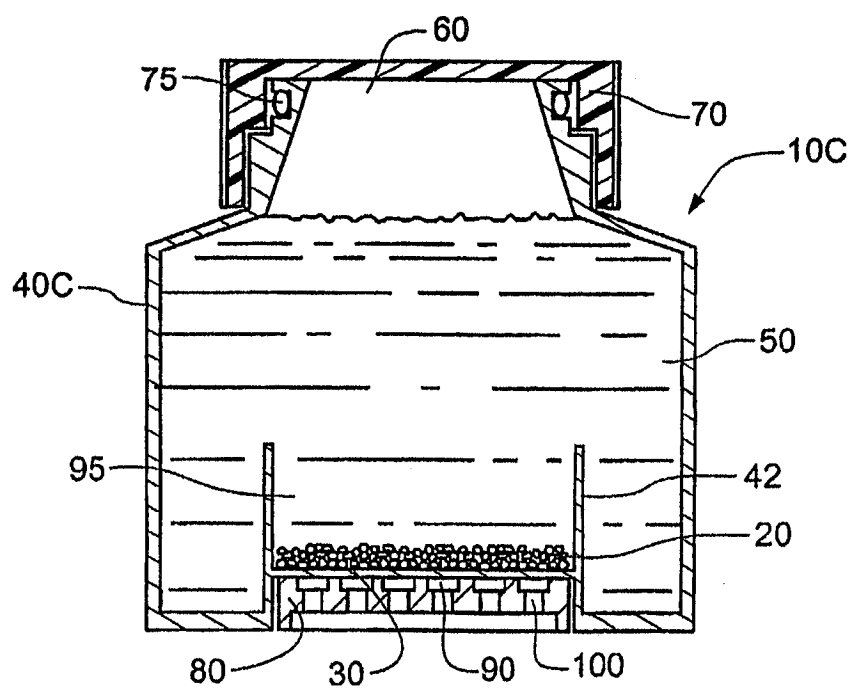


图 6

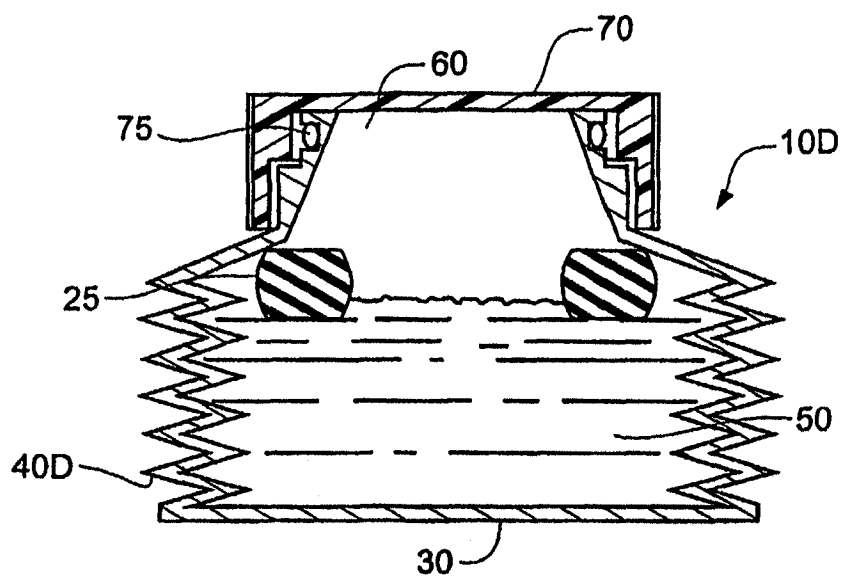


图 7A

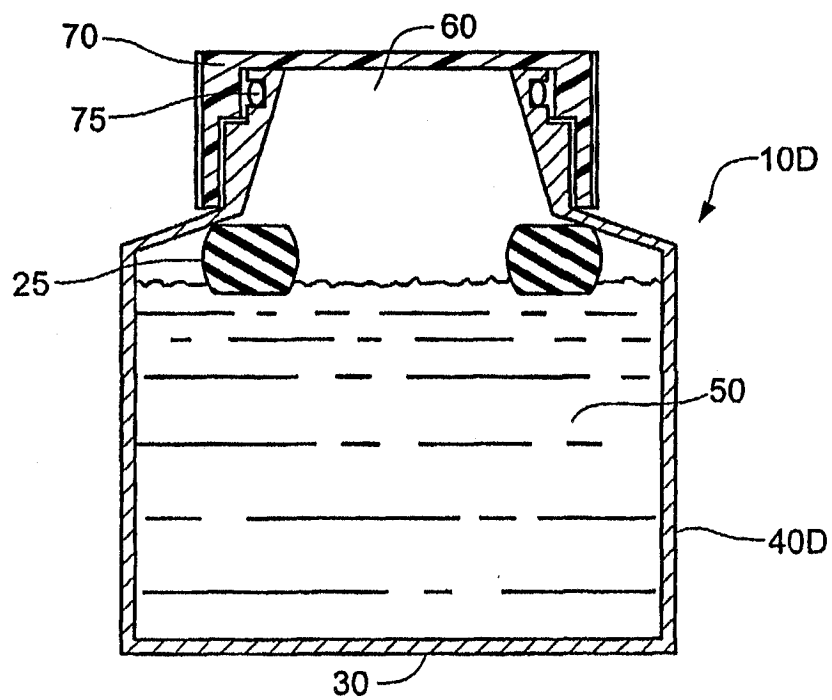


图 7B

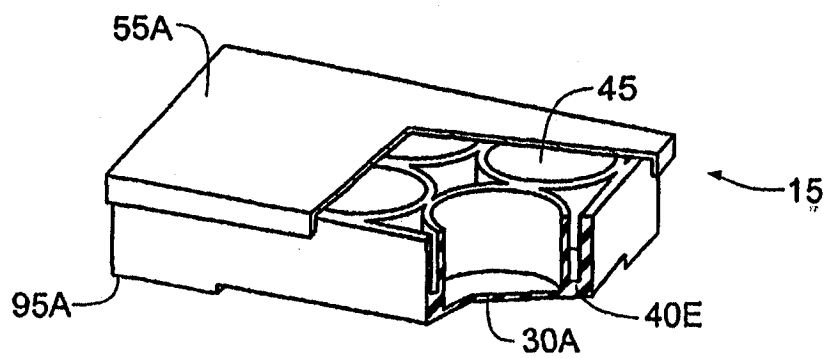


图 8

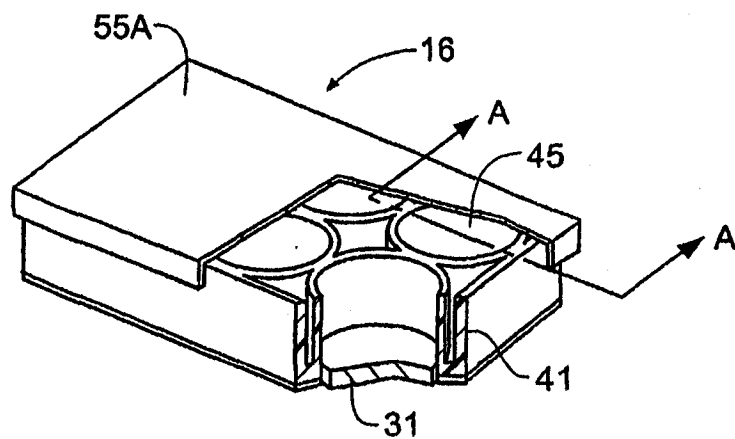


图 9A

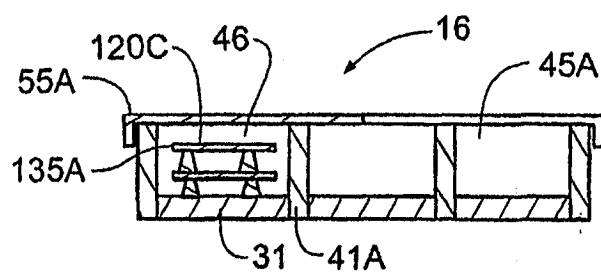


图 9B

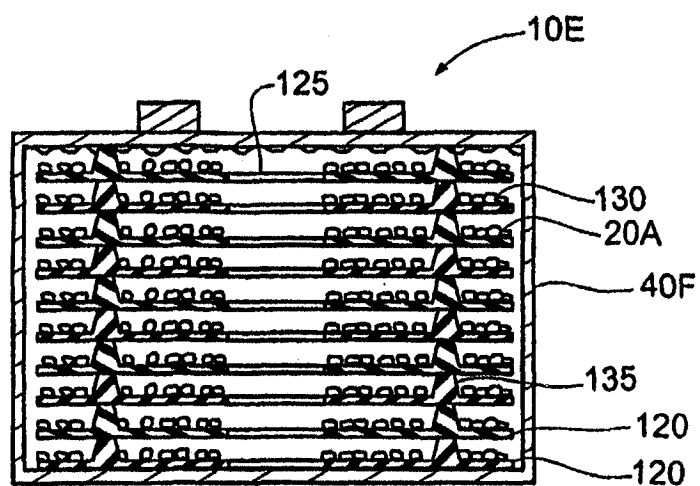


图 10A

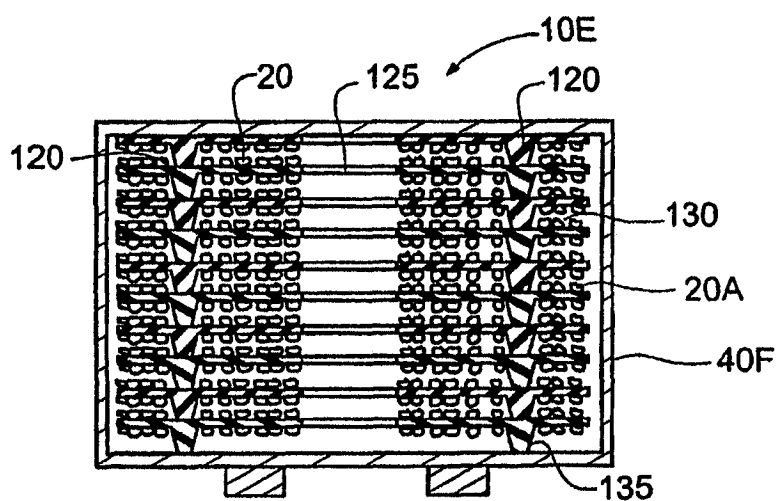


图 10B

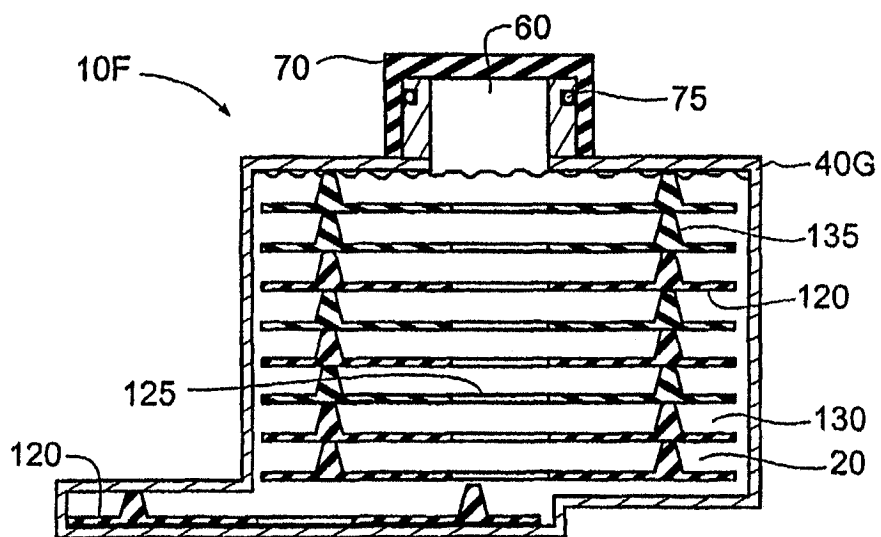


图 11

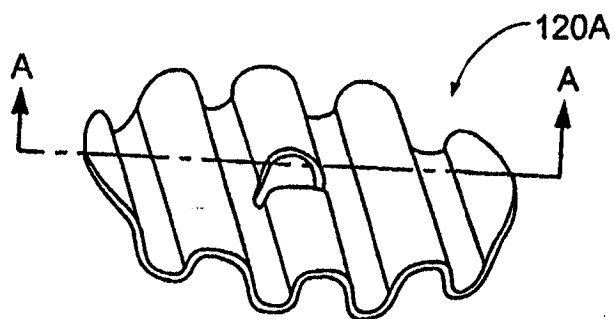


图 12A

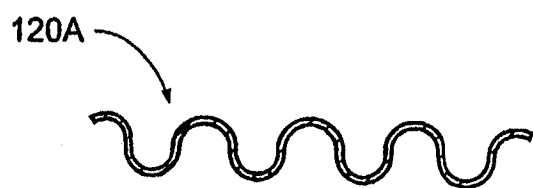


图 12B

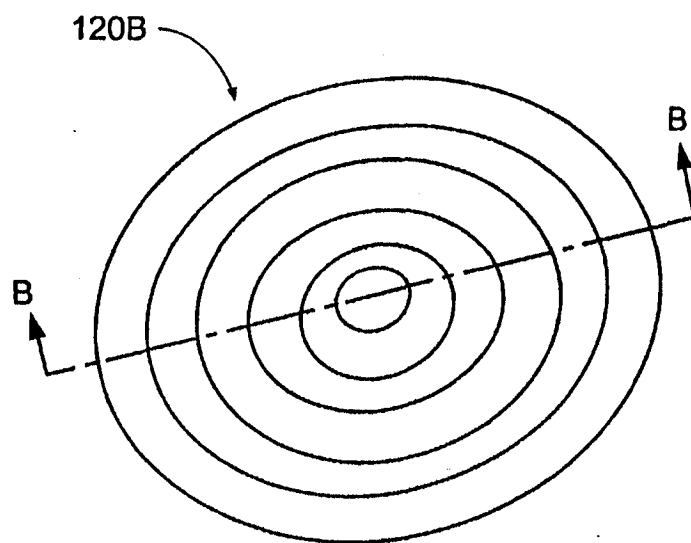


图 12C

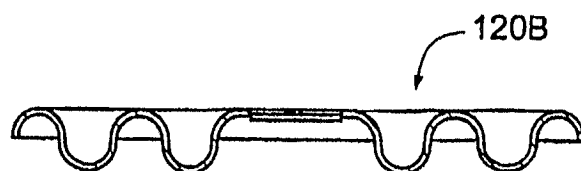


图 12D

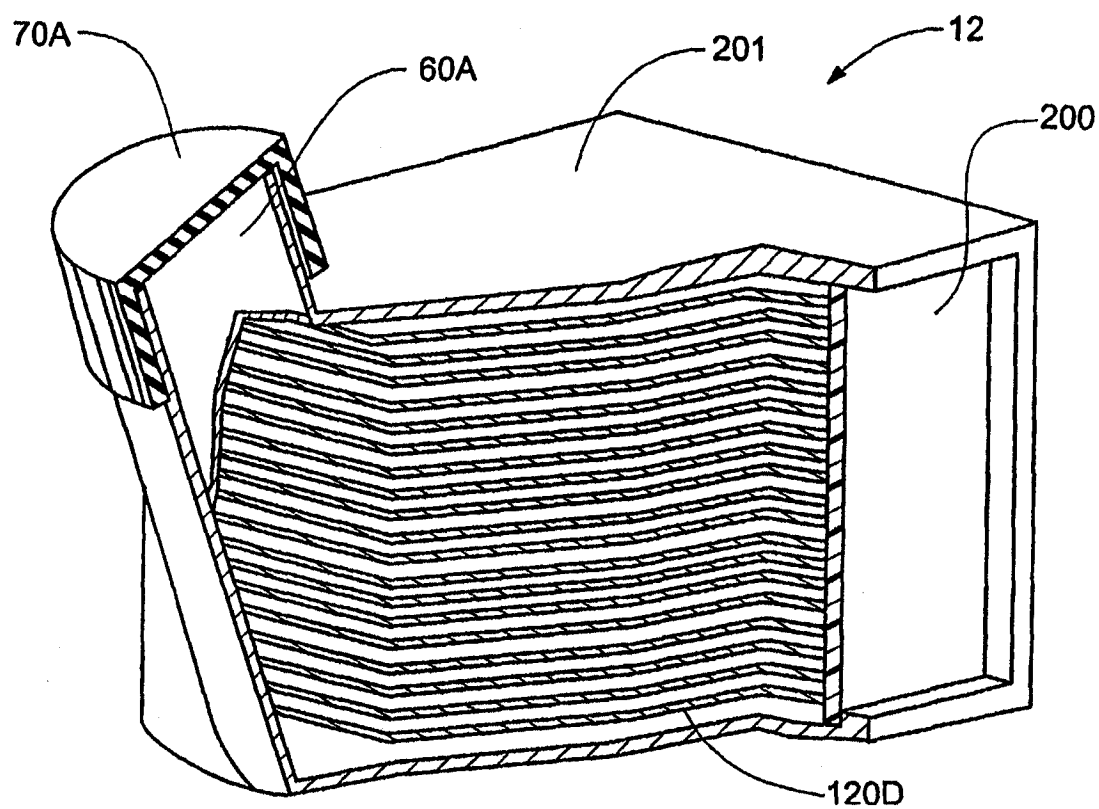


图 13

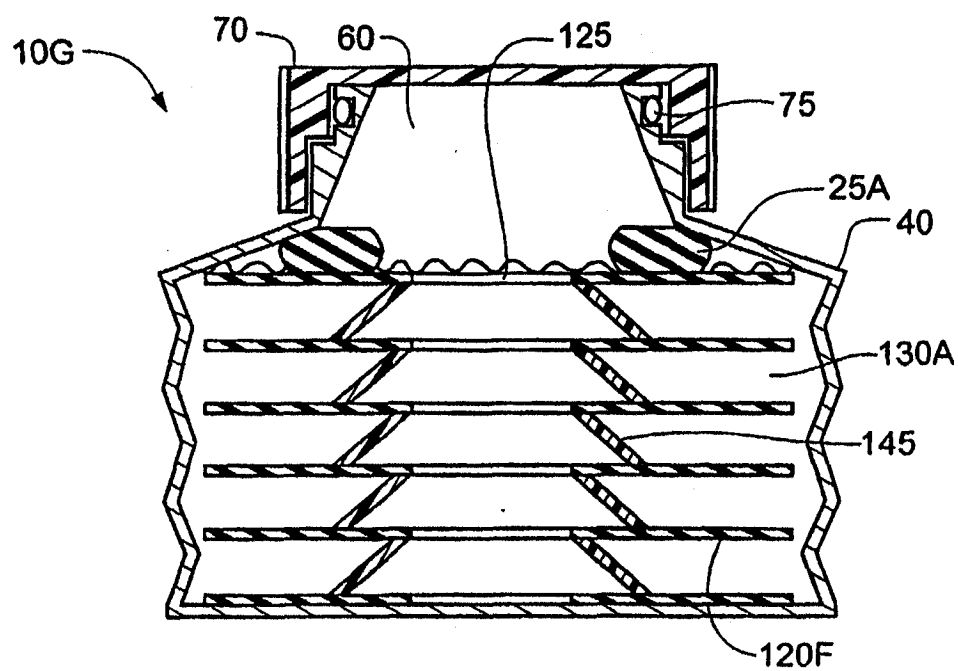


图 14A

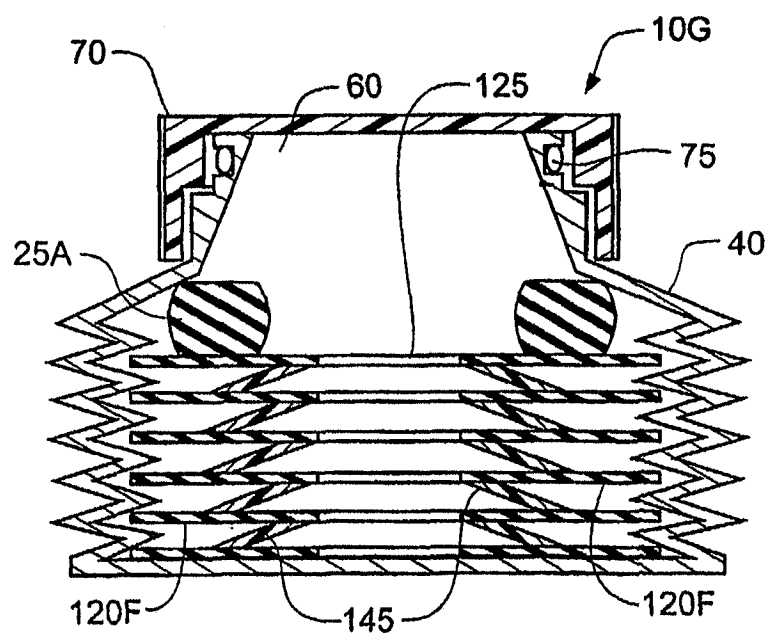


图 14B

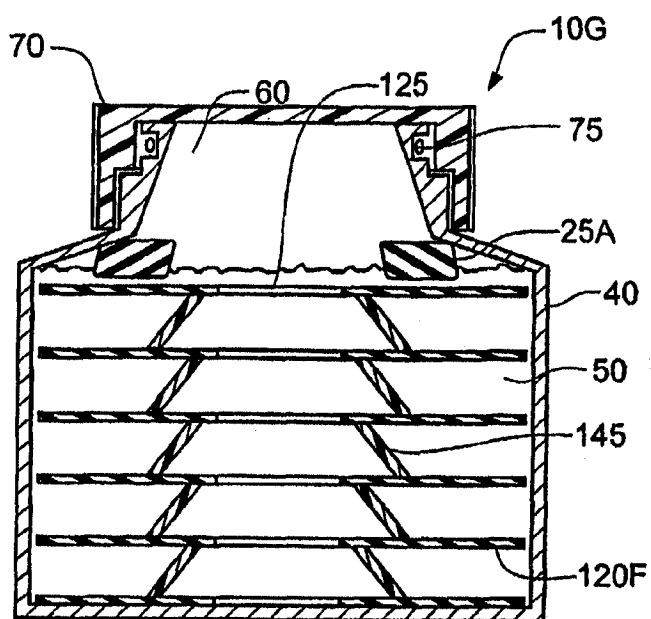


图 14C

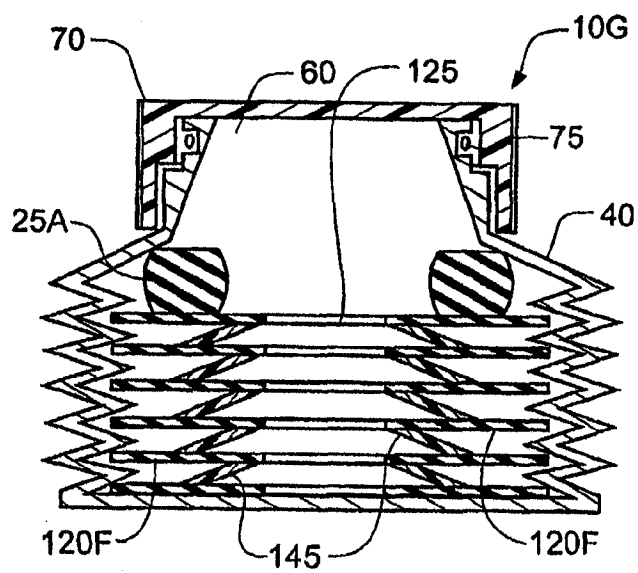


图 14D

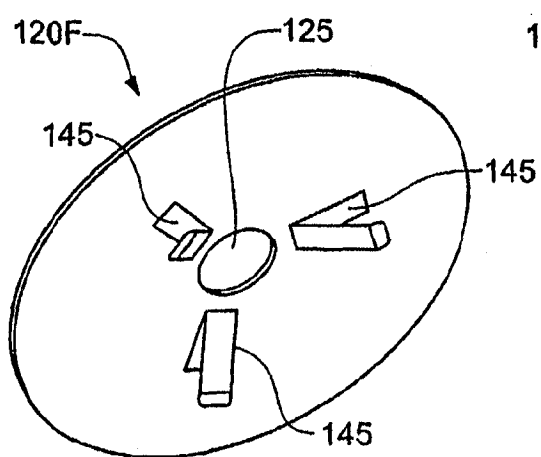


图 14E

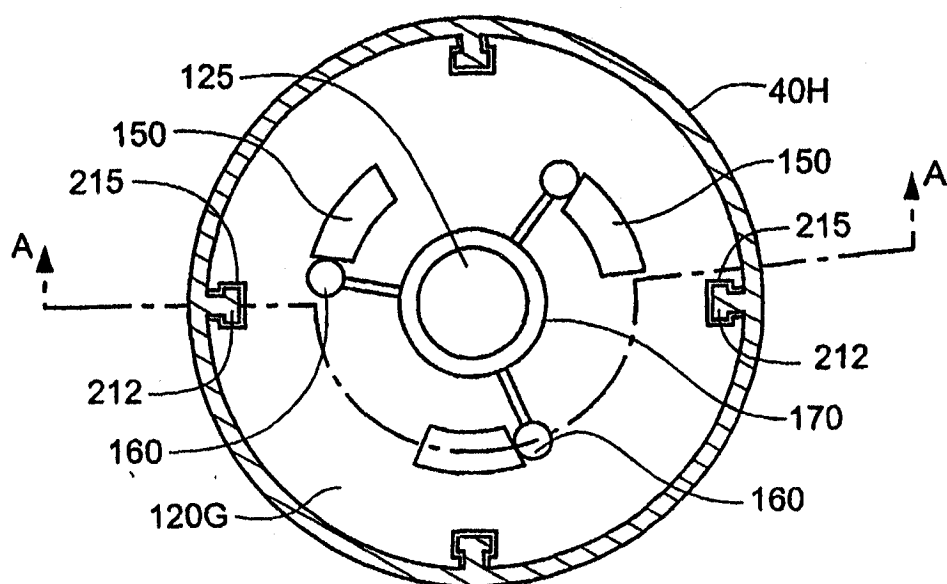


图 15A

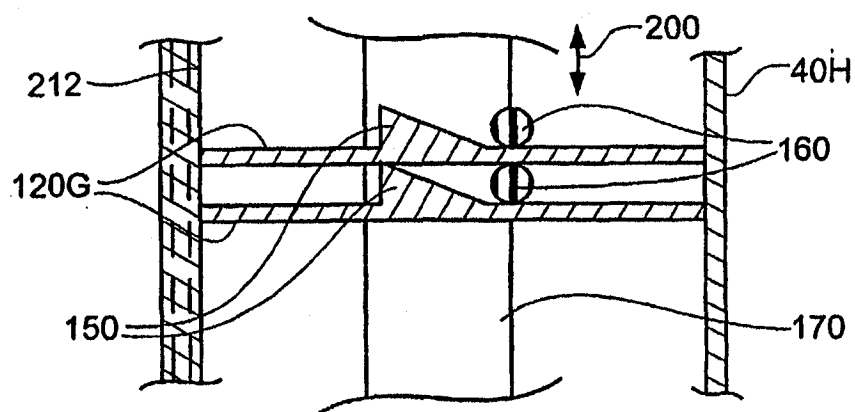


图 15B

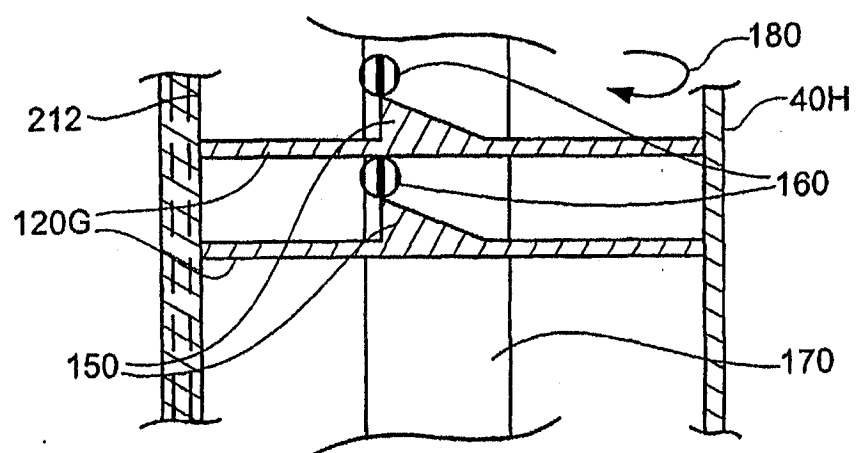


图 15C

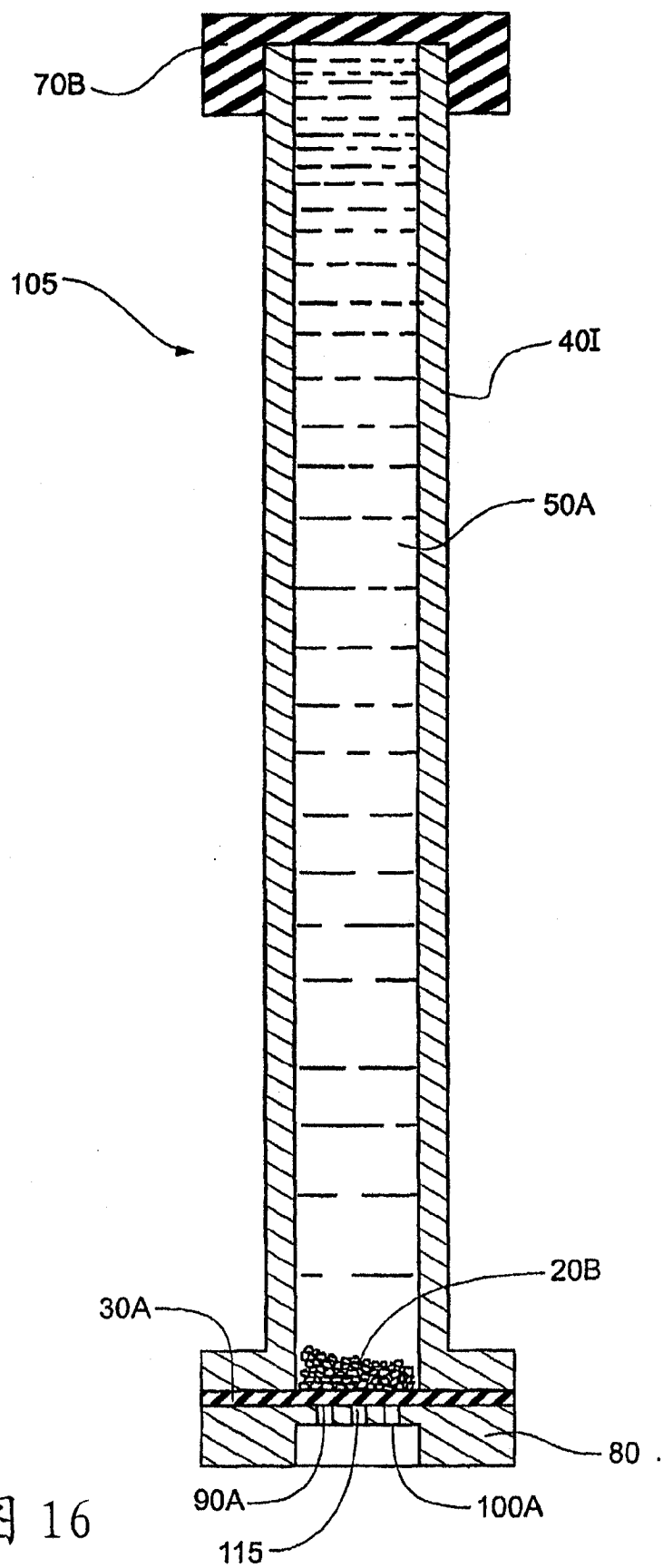


图 16

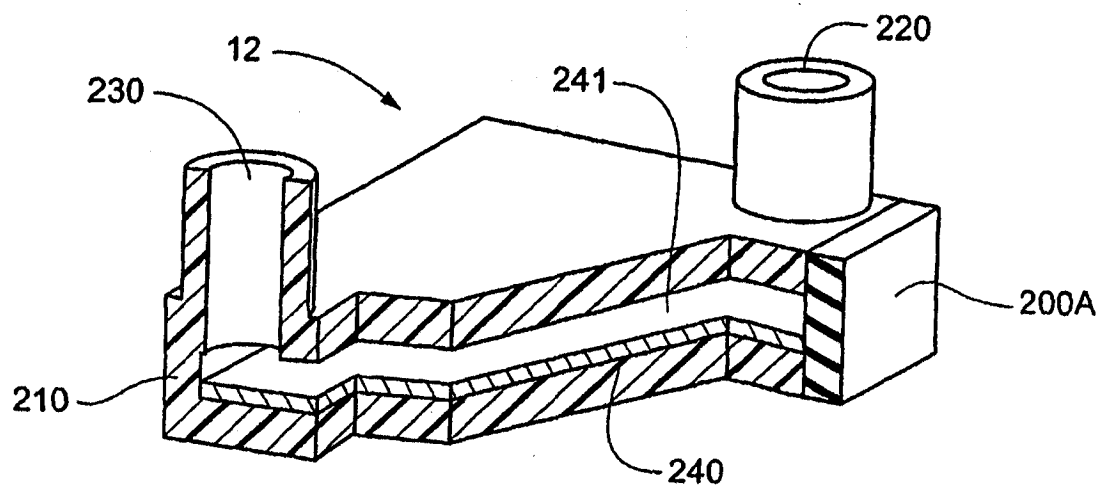


图 17

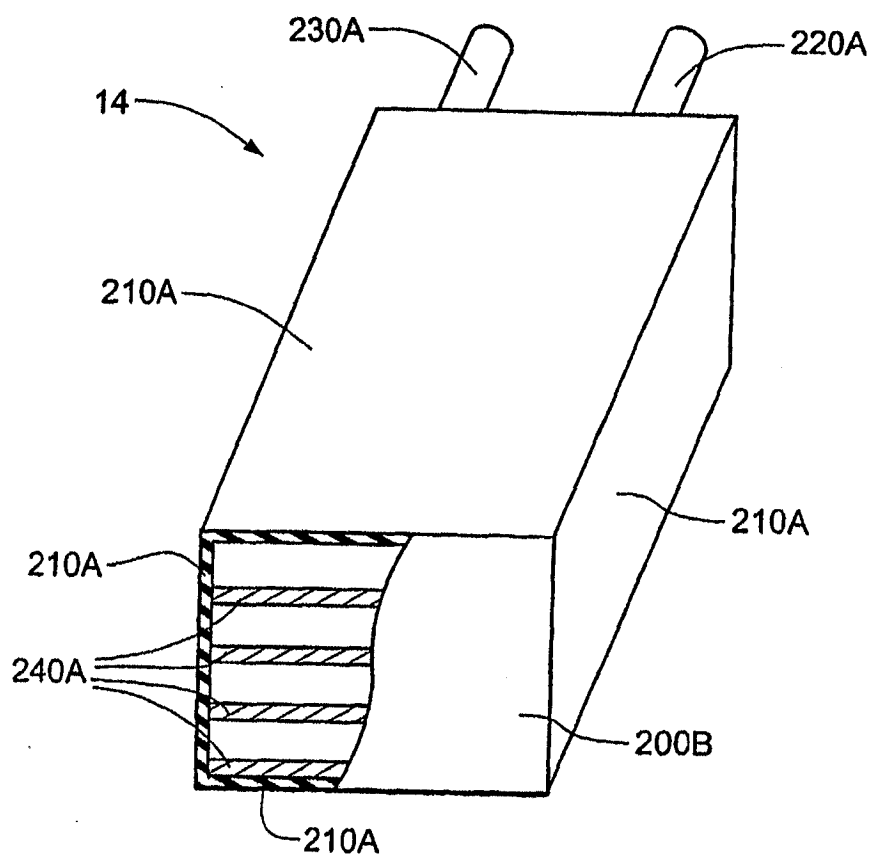


图 18

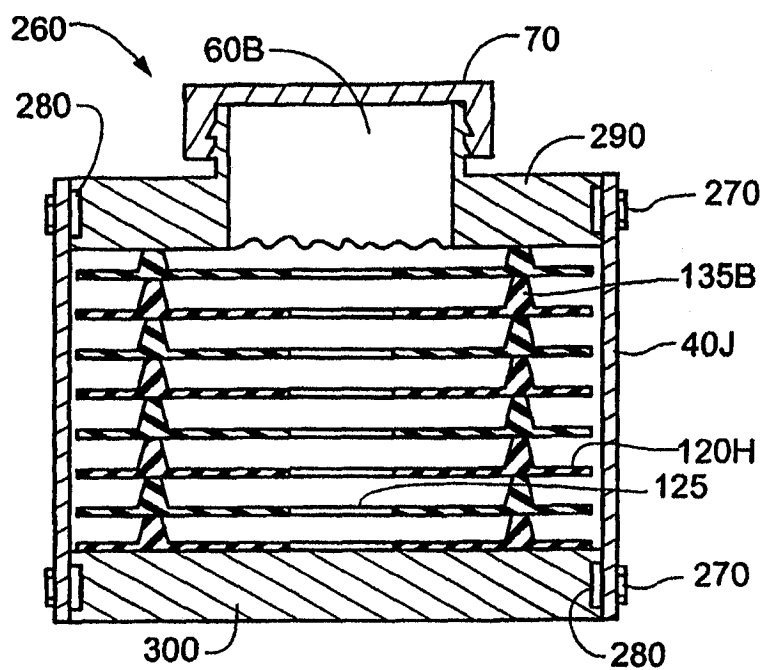


图 19A

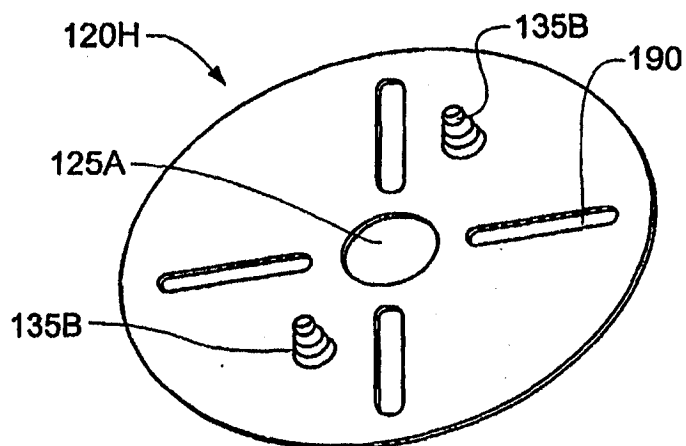


图 19B

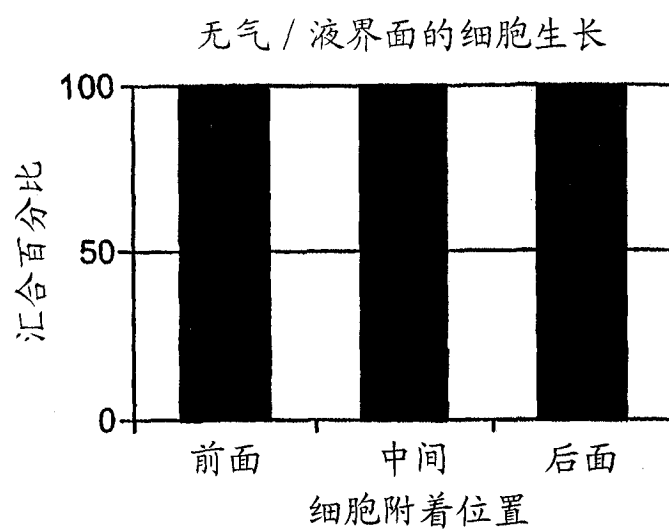


图 20