



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115052966 A

(43) 申请公布日 2022.09.13

(21) 申请号 202180012862.4

(22) 申请日 2021.02.05

(30) 优先权数据

20155628.9 2020.02.05 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/052816 2021.02.05

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/156443 DE 2021.08.12

(71) 申请人 生命TAQ分析学有限责任公司

地址 奥地利多瑙河畔图尔恩

(72) 发明人 M·塔施纳 V·洛伯

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

专利代理师 黄琳娟

(51) Int.Cl.

C12M 1/32 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

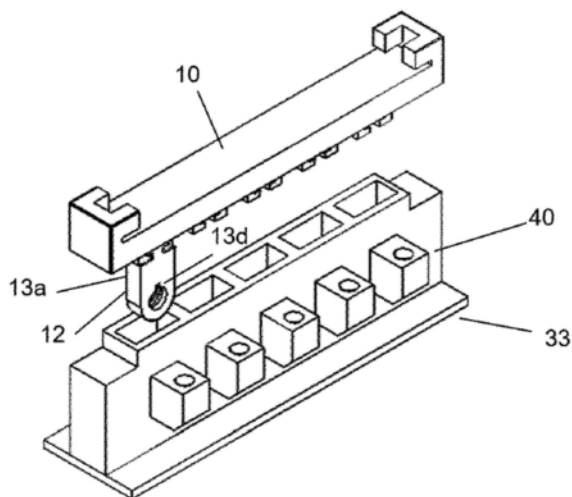
权利要求书3页 说明书16页 附图7页

(54) 发明名称

三维细胞培养

(57) 摘要

本发明涉及一种用于三维细胞培养的细胞培养装置,其包括一个或多个细胞培养单元,其特征在于,细胞培养单元包括:i.至少一个具有用于容置基质的中心开口的基质保持件;ii.固定地或可逆地与所述至少一个基质保持件连接的载体;以及iii.由具有至少一个凹部的容器构成的孔条,所述凹部可以包围至少一个或多个基质保持件,直至所述中心开口的上端,其中所述基质保持件竖直定向。



1. 用于三维细胞培养的细胞培养装置,其具有一个或多个细胞培养单元,其特征在于,细胞培养单元(21)包括:

i 至少一个基质保持件(12),其具有用于容置基质的中心开口或凹部(13);

ii 载体(10),其固定地或可逆地与所述至少一个基质保持件(12)连接;以及

iii 孔条(11),其由具有至少一个凹部的容器构成,所述凹部可以包围至少一个基质保持件(12),直至所述中心开口(13)的上端,

其中所述基质保持件(12)竖直定向。

2. 根据权利要求1所述的细胞培养装置,其中所述基质保持件(12)的中心开口(13)为贯通开口(13a和13c)或具有壁部的凹部(13b),具体地其中所述中心开口(13)包括基质,所述基质为固体多孔载体或水凝胶或其组合。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的细胞培养装置,其中所述基质由天然材料、半合成材料或合成材料或其组合构成,所述天然材料具体地选自胶原蛋白、纤维蛋白、糖胺聚糖和透明质酸,所述合成或半合成材料选自聚合物成分诸如聚甲基丙烯酸甲酯、聚乳酸、聚乙二醇、聚苯乙烯,以及陶瓷成分诸如羟基磷灰石或磷酸三钙。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的细胞培养装置,其特征在于,其中所述载体(10)具有用于与所述基质保持件(12)连接的元件(15),所述基质保持件在其上端处具有凹口(14a、14b),通过所述凹口可以将所述基质保持件可逆地与所述载体(10)的元件(15)连接。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述细胞培养装置,其中所述装置包括至少5个、具体地至少10个基质保持件(12)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述细胞培养装置,其中所述装置还包括能够输送一个或多个细胞培养单元(21)的输送单元(20)。

7. 根据权利要求6所述细胞培养装置,其中所述输送单元(20)包括:

i. 安装导轨(22),其用于将一个或多个细胞培养单元(21)固定在所述输送单元(20)上,

ii. 用于安装导轨(22)的容置单元(20a),

iii. 顶盖(23),以及

iv. 两个间隔元件(24),其用于有序地容置基质保持件的至少两个或更多个载体(10),所述间隔元件可选地直接相互连接,

v. 可选的至少一个标识元件(26),例如RFID芯片或条形码,以及

vi. 可选的定心单元(27)。

8. 根据权利要求6或7所述细胞培养装置,所述孔条(11)包括用于固定至所述安装导轨(20)上的位置(25),和/或,所述细胞培养单元平行布置在间隔件(24)中。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述细胞培养装置,其中所述输送单元(20)包括:

i. 形成所述输送单元的底面的板件(48),

ii. 所述板件(48)中用于在所述板件上对所述输送单元进行定心的开口(49),

iii. 所述板件(48)中用于螺旋连接的开口(50),

iv. 大致安放在所述输送单元的中间高度处的另一板件(51),

v. 可磁化金属棒(52),

vi. 定心支架(54),

- vii. 所述板件 (51) 中用于所述定心支架 (54) 的开口,
- viii. 以及定心物体 (55)。

10. 一种使用根据权利要求1至9中任一项所述细胞培养装置进行细胞培养的方法, 所述方法包括以下步骤:

- i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- ii. 将所述细胞悬液引入根据权利要求1至9中任一项所述的细胞培养装置中,
- iii. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞悬液的细胞培养装置进行培养。

11. 根据权利要求10所述的方法, 所述方法包括以下步骤:

- i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- ii. 通过将所述细胞悬液引入根据权利要求1至9中任一项所述的细胞培养装置中, 对所述基质保持件 (12) 的开口 (13) 中的基质进行定殖,
- iii. 具体地使用所述基质保持件的载体 (10) 将所述基质保持件转移至孔条 (11) 中, 以及
- iv. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞的细胞培养装置进行培养。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述基质保持件 (12) 的开口 (13) 具有用于进行固定的凹部 (13c) 并且通过位于定殖装置 (30) 上的互补密封元件 (31) 可逆地与所述定殖装置 (30) 连接, 所述基质为水凝胶, 所述方法包括以下步骤:

- i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- ii. 将所述细胞悬液与水凝胶的一种或多种成分混合, 以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,
- iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对所述基质保持件 (12) 的开口 (13) 进行定殖, 所述基质保持件在所述定殖装置 (30) 中水平定向,
- iv. 在合适的培养环境中, 优选在37°C以及5%CO₂下, 对细胞附加物进行培养, 直至使所述基质聚合,
- v. 将所述基质保持件 (12) 与所述定殖装置 (30) 分离,
- vi. 优选地使用所述基质保持件的载体 (10) 将所述基质保持件 (12) 转移至填充有介质的孔条 (11) 中,
- vii. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述基质保持件 (12) 的开口 (13) 具有上部开口 (13d) 并且所述基质保持件 (12) 可逆地与定殖装置 (33) 连接, 所述基质为水凝胶, 所述方法包括以下步骤:

- i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合, 以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,
- iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充所述定殖装置 (33) 的孔,
- iv. 通过将所述基质保持件 (12) 浸入所述定殖装置 (33) 中来对所述基质保持件的开口 (13) 进行定殖,
- v. 在合适的培养环境中, 优选在37°C以及5%CO₂下, 对细胞附加物进行培养, 直至使所述基质聚合,

vi. 将所述基质保持件(12)从所述定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)中, 以及

vii. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

14. 根据权利要求12所述的方法, 其中所述基质保持件(12)的开口(13)具有上部开口(13d)并且所述基质保持件(12)可逆地与定殖装置(33)连接, 所述定殖装置包括填充元件(40), 所述基质为水凝胶, 所述方法包括以下步骤:

i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合, 以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

iii. 将所述基质保持件插入所述定殖装置(33)中,

iv. 通过所述填充元件(40)利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充所述定殖装置(33)的孔, 从而利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对所述基质保持件的开口(13)进行定殖,

v. 在合适的培养环境中, 优选在37°C以及5%CO₂下, 对细胞附加物进行培养, 直至使所述基质聚合,

vi. 将所述基质保持件(12)从所述定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)中, 以及

vii. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

15. 根据权利要求1至9中任一项所述细胞培养装置, 其中所述孔条为灌注装置(34), 所述灌注装置具有可选地用于连接到泵上的软管接头(41)。

16. 根据权利要求1至9中任一项所述细胞培养装置, 所述细胞培养装置还包括盒子(44)和用于容置一个或多个细胞培养单元(21)或定殖装置(30)的嵌件(42)。

三维细胞培养

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞培养技术领域,特别是动物细胞和人体细胞的三维细胞培养。

背景技术

[0002] 在生物医学研究和药物研究中,传统上是以二维的方式对动物细胞和人体细胞进行培养的。在此情况下,细胞被转移至塑料或玻璃表面上,这些细胞可以粘附在塑料或玻璃表面上并进行繁殖。然而,此环境不符合细胞的自然生理条件,因此经常会引起细胞的功能丧失、去分化,在最坏的情况下会导致细胞死亡(DE102007020302A1)。人体内的细胞在其环境中的表现与在培养物中的表现完全不同。原因在复杂的细胞间以及细胞外的过程,这些过程例如受相邻细胞、组织或可溶性因子(如生长因子或激素)的影响。虽然2D细胞培养允许细胞在有机体外部附着和生长,但其并不能充分反映细胞在其自然环境中的自然生长条件。

[0003] 为了减少二维细胞培养与体内环境之间的这些差距,近十年来已开发了许多三维细胞培养系统作为替代方案。3D培养具有许多优点,因为所培养的细胞能够实现更符合生理学的人体组织模型。这些培养系统例如包括具有固体载体的系统(如模仿细胞外基质的多孔支撑结构)以及不依赖于载体的系统(如球形培养物)。目前全世界大约有150种不同的3D培养系统,其中76%使用支架进行培养(基于支架)(BCC Research:“3D Cell Cultures: Technologies and Global Markets”(BCC研究:“3D细胞培养:技术和全球市场”),(BI0140A),出版日期:2015年1月)。例如用于制造球体的悬滴多孔板(US 2013/236924 A1)、用于产生包括磁芯的三维基质的系统(US 2017/137766 A1)或包括三维的生物相容支架结构和纳米颗粒的细胞培养系统。这些结构应模仿细胞外基质作为细胞的自然环境(DE102007020302A1)。

[0004] DE10003521A1描述了一种用于制造三维基质体的装置以及其用于在多孔板中培养细胞的用途,这些三维基质体由载体物质和储存在其中的细胞培养物组成。

[0005] US 2019/276784 A1揭示了旨在模仿哺乳动物关节的不同的复杂细胞培养装置。此细胞培养装置包括多个空心支架,其具有多个用于在支架的空腔中容置基质的开口。

[0006] US 2007/237683 A1揭示了一种用于改进二维细胞培养物的光学成像的装置。此装置包括多孔板,该多孔板具有容置孔条的圆柱形无底入口。这些孔条还包括圆柱形凹部,这些凹部配合至多孔板的入口中,但具有用来培养细胞的透明底部。

[0007] CA 2579680 A1揭示了一种具有灌注单元和多孔板的生物反应器,该多孔板包括多个生物反应器单元,可以在这些生物反应器单元中分别进行不同的实验。

[0008] WO 2004/027016 A1揭示了一种具有蠕动泵的灌注培养箱,其特别是可用于培育胚胎。

[0009] 然而,基于支架的系统和现有的三维细胞培养系统通常难以操作,并且进行自动化细胞培养非常困难或甚至无法实现。因此,需要坚固、易于操作并且优选还可以在自动化系统中运行的三维细胞培养系统。

发明内容

[0010] 因此,本发明的目的是提供用于在体外培养动物细胞和人体细胞的有所改进的装置。本发明的目的特别是在于提供能够简化操作并且可选地也可以实现操作自动化的细胞培养装置。

[0011] 本发明用以达成上述目的的解决方案在于本发明的主题。

[0012] 由于不同材料和技术方面的复杂性,在自动化细胞培养过程中使用基于支架的基质较为困难。有鉴于此,已研发了可以使用水凝胶和多孔支撑结构的新的细胞培养系统。特别是已研发了用于在三维(3D)环境中培养细胞的竖直定向的细胞培养装置。在此情况下,目标在于尽可能降低人工成本以及能够针对中高通量应用采用由水凝胶或多孔支撑结构构成的3D培养。

[0013] 本发明包括一种用于三维细胞培养的细胞培养装置,所述细胞培养装置具有一个或多个细胞培养单元,其特征在于,细胞培养单元包括以下:

[0014] i. 至少一个基质保持件(12),其具有用于容置基质的中心开口(13);

[0015] ii. 载体(10),其固定地或可逆地与所述至少一个基质保持件(12)连接;以及

[0016] iii. 孔条(11),其由具有至少一个凹部的容器构成的,所述凹部可以包围至少一个或多个基质保持件(12),直至所述中心开口(13)的上端,

[0017] 其中所述基质保持件(12)竖直定向。

[0018] 细胞培养单元的紧凑结构能够实现一个或多个基质保持件的简易操作。

[0019] 基质保持件(12)的中心开口(13)可以具有贯通的开口(13a和13c)或包括壁部的凹部(13b)。

[0020] 开口(13)的内壁可以具有 $1-30^{\circ}$ 的角度,使得开口(13)的两端可以具有不同的直径。这些内壁具体地可以具有大约 1° 、 2° 、 3° 、 4° 、 5° 、 6° 、 7° 、 8° 、 9° 、 10° 、 11° 、 12° 、 13° 、 14° 、 15° 、 16° 、 17° 、 18° 、 19° 、 20° 、 21° 、 22° 、 23° 、 24° 、 25° 、 26° 、 27° 、 28° 或 29° 的角度。

[0021] 本发明还包括定殖装置(30、33)。

[0022] 在基质保持件(12)的一种实施方式中,所述基质保持件的开口(13)具有用于密封定殖装置(30、33)以及可逆地固定到定殖装置上的凹部(13c)。

[0023] 根据一种具体实施方式,定殖装置(30、33)包括密封元件(31)。所述定殖装置可以具有隆起(32)。

[0024] 在另一实施方式中,开口(13a)具有上部凹部(13d),以便避免在水平定殖期间基质中包含气泡。

[0025] 根据所述细胞培养装置的一种优选实施方式,中心开口(13)包括基质,所述基质为固体多孔载体或水凝胶或其组合。基质例如可以是固体多孔载体,在固体多孔载体上施加水凝胶和/或固体多孔载体填充有水凝胶。

[0026] 细胞培养单元可以包括多个基质保持件(12)。细胞培养单元具体地可以包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个基质保持件(12)。细胞培养单元所包含的基质保持件(12)可以包括相同或不同的基质。

[0027] 细胞培养单元的基质保持件(12)具体地分别包含由水凝胶构成的基质或作为固体多孔载体的基质。这样就能在同一三维环境中对细胞进行同时培养,其中孔条(11)的孔中的介质可以是相同或不同的。一方面,介质的成分可以有所不同,以便例如研究介质对细

胞生长的影响。另一方面,如果介质含有测试有效物质,则可以测试不同的有效物质或有效物质的不同浓度。

[0028] 细胞培养单元具体地为包括基质为水凝胶的基质保持件(12)和基质为固体多孔载体的基质保持件。如果细胞培养单元包括不同的基质保持件(12),则例如可以快速对不同的三维环境进行筛查。

[0029] 基质具体地由天然、半合成或合成材料或其组合构成。可选地,基质可以用蛋白质或肽序列进行改性或涂布。基质例如可以具有抗体或抗体片段或RGD序列。

[0030] 具体地,可以将任何与动物细胞或人体细胞的培养相容的材料用作在此所描述的基质的材料。天然材料具体地选自胶原蛋白、纤维蛋白、糖胺聚糖和透明质酸,合成或半合成材料选自聚合物成分(如聚甲基丙烯酸甲酯、聚乳酸、聚乙二醇、聚苯乙烯)和陶瓷成分(如羟基磷灰石或磷酸三钙)。

[0031] 根据另一实施方式,载体(10)具有用于容置基质保持件(12)的元件(15),基质保持件(12)在其上端处具有凹口(14a、14b),通过这些凹口可以将所述基质保持件可逆地与载体(10)的元件(15)连接。

[0032] 根据所述细胞培养装置的载体(10)的另一具体实施方式,所述载体在至少一端处,优选在两端处,具有用于例如用螺钉来固定可磁化螺母(45)的开口。所述载体具体地还具有用于基质保持件(46)的多个开口,例如可以用固定销(47)将这些开口与载体连接。

[0033] 根据一种具体实施方式,所述装置还包括可以输送一个或多个细胞培养单元(21)的输送单元(20)

[0034] 输送单元(20)具体地简化了标的细胞培养装置在自动化环境中的使用。可以用输送单元来移动和操作一个或多个细胞培养单元。借此特别是能够实现特定过程的自动化,例如实现自动化的培养基更换或单元的自动化定殖。特别是可以借助机器人来实现自动化。

[0035] 根据一种具体实施方式,所述输送单元包括:

[0036] i. 安装导轨(22),其用于将一个或多个细胞培养单元(21)固定在输送单元(20)上,

[0037] ii. 用于安装导轨(22)的容置单元(20a),

[0038] iii. 顶盖(23),以及

[0039] iv. 两个间隔元件(24),其用于有序地容置基质保持件的至少两个或更多个载体(10),所述间隔元件可选地直接相互连接,

[0040] v. 可选的至少一个标识元件(26),例如RFID芯片或条形码,以及

[0041] vi. 可选的定心单元(27)。

[0042] 孔条(11)具体地包括用于固定到安装导轨(20)上的位置(25)。

[0043] 这些间隔元件用于容置和有序地排列细胞培养单元,这些细胞培养单元在间隔件中安放在基质保持件的载体(10)上方。这些细胞培养单元具体地平行布置在间隔件(24)中。这些间隔元件可以以固定地或可逆地相互连接,或者并非直接相互连接,而是仅通过基质保持件的载体而相互连接。

[0044] 根据一种具体实施方式,所述输送单元(20)包括:

[0045] i. 形成所述输送单元的底面的板件(48),

- [0046] ii. 板件 (48) 中用于在板件上对所述输送单元进行定心的开口 (49),
- [0047] iii. 板件 (48) 中用于螺旋连接的开口 (50),
- [0048] iv. 大致安放在所述输送单元的中间高度处的另一板件 (51),
- [0049] v. 可磁化金属棒 (52),
- [0050] vi. 定心支架 (54),
- [0051] vii. 板件 (51) 中用于定心支架 (54) 的开口,
- [0052] viii. 以及定心物体 (55)。
- [0053] 可磁化金属棒 (52) 具体地用于与细胞培养机器人可逆地连接。根据一个具体示例, 可磁化金属棒 (52) 用作与用于输送所述输送单元的机器人单元可逆连接的对接点, 例如用作用于与 Oli-MAT (可从多瑙河畔图尔恩的 LifeTaq-Analytics GmbH 购得) 的磁体可逆连接的对接点。Oli-MAT 的 Z 轴具有两个永磁体, 用于将转移单元从一个位置移至另一位置。可以通过短脉冲使磁铁暂时消磁, 从而关掉转移单元。
- [0054] 本发明还包括一种在使用在此所揭示的细胞培养装置的情况下进行细胞培养的方法。
- [0055] 所述方法具体地包括以下步骤:
- [0056] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- [0057] ii. 利用所述细胞悬液对基质保持件 (12) 的开口 (13) 中的基质进行定殖,
- [0058] iii. 具体地使用基质保持件的载体 (10) 将所述基质保持件转移至孔条 (11) 中, 以及
- [0059] iv. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞的细胞培养装置进行培养。
- [0060] 根据在此所揭示的方法的一种具体实施方式, 在基质保持件 (12) 的水平布局中, 利用细胞悬液对基质进行定殖。
- [0061] 用于所述方法的细胞培养装置的基质保持件 (12) 具体地具有包括凹部 (13c) 的开口 (13), 其中所述基质保持件通过位于定殖装置 (30) 上的互补密封元件 (31) 可逆地与定殖装置 (30) 连接, 其中所使用的基质为水凝胶, 并且所述细胞培养方法具体地包括以下步骤:
- [0062] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,
- [0063] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶的一种或多种成分混合, 以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,
- [0064] iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对基质保持件 (12) 的开口 (13) 进行定殖, 所述基质保持件在定殖装置 (30) 中水平定向,
- [0065] iv. 在合适的培养环境中, 优选在 37°C 以及 5% CO₂ 下, 对细胞附加物进行培养, 直至使基质聚合,
- [0066] v. 将基质保持件 (12) 与定殖装置 (30) 分离,
- [0067] vi. 优选地使用基质保持件的载体 (10) 将基质保持件 (12) 转移至填充有介质的孔条 (11) 中,
- [0068] vii. 在有利于细胞生长的条件下, 对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。
- [0069] 水凝胶的聚合具体地可能持续大约 5 分钟至 24 小时。聚合的持续时间通常取决于水凝胶的组成、特别是其成分及其浓度以及环境, 例如空气湿度和空气温度。本领域技术人

员能够相应地确定凝胶硬化所需的时间。

[0070] 在细胞悬液与水凝胶的混合物聚合后,可以将另一层细胞悬液与水凝胶的混合物引入基质中。另一细胞悬液与水凝胶的混合物可以包含不同于第一混合物的细胞,例如第一混合物的细胞的改性变体。另一细胞悬液与水凝胶的混合物可以包含与第一混合物相同的细胞,但是例如采用不同的水凝胶组成。

[0071] 根据一种具体实施方式,定殖装置(30)具有内部隆起(32),其确保在细胞悬液与水凝胶的混合物的聚合过程中在开口(13)中产生凹部,可以在移除定殖装置(30)之后对凹部填充另一细胞悬液与水凝胶的混合物。这样就能例如实现不同细胞类型的共培养或者在基质保持件(12)中的不同三维环境中对一种细胞类型进行培养。

[0072] 根据在此所揭示的方法的另一实施方式,其中在基质保持件(12)的水平布局中,利用细胞悬液对基质进行定殖,基质保持件(12)的开口(13)具有包括壁部的凹部(13b),所述基质为固体多孔载体。所述方法具体地包括以下步骤:

[0073] i. 将固体多孔载体转移至凹槽(13b)中,

[0074] ii. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0075] iii. 将所述细胞悬液转移至基质保持件(12)的开口(13b)中,

[0076] iv. 在有利于细胞在固体多孔载体上生长的条件下,对定殖装置培养至少30min至24h,

[0077] v. 具体地使用基质保持件的载体(10)将所述基质保持件转移至先前已填充有介质的孔条(11)中,以及

[0078] vi. 在有利于细胞生长的条件下,对包含附着在所述多孔载体上的细胞的细胞培养装置进行培养。

[0079] 根据在此所揭示的方法的另一实施方式,在基质保持件(12)的竖直布局中,利用细胞悬液对基质进行定殖。

[0080] 用于所述方法的细胞培养装置的基质保持件(12)具体地具有上部开口(13d),基质保持件(12)可逆地与定殖装置(33)连接,所述基质为水凝胶。所述方法具体地具有以下步骤:

[0081] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0082] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合,以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

[0083] iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充定殖装置(33)的凹部(孔),

[0084] iv. 通过将基质保持件(12)浸入定殖装置(33)中来对所述基质保持件的开口(13)进行定殖,

[0085] v. 在合适的培养环境中,优选在37°C以及5%CO₂下,对细胞附加物进行培养,直至使基质聚合,

[0086] vi. 将基质保持件(12)从定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)中,以及

[0087] vii. 在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

[0088] 为了使体积保持尽可能小,与孔条(11)相比,定殖装置(33)的孔的容积可以有所减小。此外,定殖装置(33)还可以具有填充元件(40)。可以通过填充元件(40)利用介质来填充定殖装置(33)的孔。

[0089] 在使用具有填充元件(40)的填充装置(33)的情况下,所述方法具体地具有以下步骤:

[0090] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0091] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合,以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

[0092] iii. 将所述基质保持件插入定殖装置(33)中,

[0093] iv. 通过填充元件(40)利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充定殖装置(33)的孔,从而利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对所述基质保持件的开口(13)进行定殖,

[0094] v. 在合适的培养环境中,优选在37℃以及5%CO₂下,对细胞附加物进行培养,直至使基质聚合,

[0095] vi. 将基质保持件(12)从定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)中,以及

[0096] vii. 在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

[0097] 根据另一具体实施方式,所述基质保持件水平定向以进行定殖。在该实施方式中,基质保持件(12)的开口(13)具有包括壁部的凹部(13b),所述基体为固体多孔载体。在该实施方式中,基质保持件的定殖方法包括以下步骤:

[0098] i. 将固体多孔载体转移至凹口(13b)中,

[0099] ii. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0100] iii. 将所述细胞悬液转移至基质保持件(12)的开口(13b)中,

[0101] iv. 在有利于细胞在所述固体多孔载体上生长的条件下,对定殖装置进行培养,具体地培养至少30min至24h。

[0102] 然后具体地,可以使用基质保持件的载体(10)将所述基质保持件转移至填充有细胞培养基的孔条(11)中,并且可以在有利于细胞生长的条件下,在包含附着在多孔载体上的细胞细胞培养装置中对这些细胞进行培养。

[0103] 根据本发明的方法的一种具体实施方式,可以通过机器人支持的抓臂自动将基质保持件转移至孔条中并且对整个细胞培养装置和/或孔条进行转移。

[0104] 根据所述细胞培养装置的一种具体实施方式,所述孔条为灌注装置(34),其具有用于连接到泵上的软管接头(41)。可以借助泵通过这些软管接头来对细胞相容性液体(例如细胞培养基)穿过灌注装置的连续流动进行导引。

[0105] 根据另一实施方式,所述细胞培养装置还包括盒子(44)和用于在盒子(44)中容置一个或多个细胞培养单元(21)的嵌件(42)。

[0106] 根据另一实施方式,所述细胞培养装置还包括盒子(44)和用于在盒子(44)中容置一个或多个定殖装置(33)的嵌件(43)。

附图说明

[0107] 图1示出细胞培养单元(21)的实施方式的组成部分,具体是具有不同开口(13a、13b、13c、13d)的基质保持件(12)、孔条(11)和载体(10)。

[0108] 图2示出输送单元(20)的实施方式的组成部分,具体是容置单元(20a)、多个细胞培养单元(21)、安装导轨(22)、顶盖(23)、间隔元件(24)、标识元件(26)和定心单元(27)。

[0109] 图3示出定殖装置。图3a)示出具有密封元件(31)的定殖装置(30),可以通过开口

(13c)的凹部将这些密封元件可逆地与基质保持件(12)连接。图3b)示出具有隆起(32)的定殖装置(30)。

[0110] 图4示出细胞培养单元的组成部分和具有填充元件(40)的定殖装置(33)。

[0111] 图5示出细胞培养单元的组成部分和具有软管接头(41)的灌注装置(34)。

[0112] 图6示出细胞培养单元(10、11、12)的组成部分和盒子(44)以及用于在该盒子中容置一个或多个细胞培养单元的嵌件(42)。

[0113] 图7示出具有定殖装置(30)的细胞培养单元(10、12)的组成部分以及用于容置一个或多个定殖装置的盒子(44)。

[0114] 图8示出细胞培养装置的载体(10)的另一实施方式,其具有用于借助螺钉(45)来固定可磁化螺母的开口、载体中用于基质保持件(46)的多个开口、基质保持件的固定销(47)和基质保持件(12)。

[0115] 图9示出包括多个细胞培养装置(21)的输送单元(20)的另一实施方式。该图示出形成输送单元的底面的板件(48)、板件(48)中用于在板件上对输送单元进行定心的开口(49)、板件(48)中用于螺旋连接的开口(50)、大致安放在输送单元的中间高度处的另一板件(51)、可磁化金属棒(52)、定心支架(54)和板件(51)中用于定心支架(54)的开口以及定心物体(55)。

[0116] 图10示出包括密封元件(31)的定殖装置(30)的另一实施方式。该图示出具有引入定殖装置中的基质保持件(12)的载体(10)。

具体实施方式

[0117] 由于不同材料和技术方面的复杂性,在自动化细胞培养过程中使用不同基质较为困难。有鉴于此,已研发了可以使用水凝胶和固体多孔载体的系统。使用自动化过程的目标是尽可能降低人工成本。

[0118] 根据本发明,标的细胞培养装置开辟了在中通量至高通量自动化应用中使用具有由水凝胶和/或多孔支撑结构构成的基质的三维细胞培养的可能性。因此,例如可以在自动化环境中,在三维细胞培养中进行毒理学研究。

[0119] 本发明涉及用于在体外培养生物细胞和组织的细胞培养装置以及使用这些细胞培养装置的培养方法。标的细胞培养装置特别是较为坚固且易于操作并且能够在三维环境中实现细胞的体外培养。标的细胞培养装置的另一具体优点在于,其适于用于自动化支持的环境,例如与机器人结合使用。

[0120] 通过根据本发明的细胞培养装置、特别是细胞培养单元的紧凑结构,可以在不同环境中同时培养不同的细胞类型,其中特别是通过人与细胞培养装置的交互减少细胞培养过程中的变化。特别是可以同时培养细胞培养系统的多个复制品。

[0121] 标的细胞培养装置包括至少一个基质保持件、用于固定基质保持件的载体和具有至少一个通常呈盆状的凹部(孔)的容器,该容器被称为孔条。根据本发明的细胞培养装置的特征尤其在于,所述至少一个基质保持件竖直定向。

[0122] 所述基质保持件的特征具体在于,其由外部的基部基本形状构成并且包括内部中心开口。开口可以具有不同的改性和形式,开口例如可以是贯通开口或具有后壁的凹部,因此,开口仅朝一侧敞开。这样就能使用水凝胶以及固体多孔载体。基质保持件的开口可以是

贯通的或不贯通的,基质保持件例如可以具有矩形或圆形开口并且例如成形为圆柱体、长方体、角锥体或立方体。

[0123] 基质保持件的开口的内壁可以是直的或者成约1至25度的角度。基质保持件的开口的内壁具体地可以具有大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25度的角度。可选地,开口的外壁也可以具有这种角度。

[0124] 借此,开口的两端可以具有不同的直径。因此,在开口为具有壁部的凹部的情况下,后壁例如可以具有与正面开口相比更小的直径。此举的效果在于,水凝胶较少粘附在后壁上并且可以更容易地从基质保持件的开口移除。这样就能防止在从基质保持件移除时损坏水凝胶和细胞。

[0125] 在一种具体实施方式中,基质保持件还具有围绕内部中心开口的改性。这些改性例如可以是开口周围的其他凹部,从而围绕开口形成壁部。壁部具体地表现为具有内部盆状开口的凸起倒圆部,开口可选地具有壁部,例如后壁,或者是贯通的。这种类型的改性特别是适于例如通过插式系统将基质保持件可逆地与相应兼容的定殖装置连接。

[0126] 在另一具体实施方式中,基质保持件在开口的上边缘处具有凹部或凹陷,使得气泡可以从孔中逸出。这样例如就能避免基质中包含气泡,特别是在定殖期间。

[0127] 已知机械刺激会激励细胞外基质蛋白的形成。根据一种具体实施方式,基质保持件由具有不同肖氏硬度的柔软弹性硅胶构成,使得诸如牵拉、拉伸或挤压等机械力可以作用于基质保持件上,进而可以作用于基质中的细胞上,而不会产生任何负面影响。

[0128] 标的细胞培养装置具有至少一个载体,其固定地或可逆地与至少一个基质保持件连接。载体优选适于固定地或可逆地容置一个以上的基质保持件,具体地至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个或更多个基质保持件。在此情况下,这些基质保持件优选沿纵向布置,特别是布置成一排或平行排列。

[0129] 根据一种具体实施方式,其中基质保持件可逆地与载体连接,载体包括用于各容置一个基质保持件的结构或元件。优选地,这些结构或元件沿纵向布置,特别是布置成一排或平行排列。这些基质保持件具有与载体的结构或特征兼容并且由此可以可逆地与载体连接的元件,例如凹口。载体的元件和基质保持件的凹口例如可以表示插式系统,其中将基质保持件的凹口插入或推入载体的元件中。

[0130] 根据另一具体实施方式,载体具有用于固定或可逆连接和固定至输送单元上的元件。载体和输送单元具体地是具有兼容的元件,可以通过这些元件将载体与输送单元固定地或可逆地相互连接。例如可以通过将这些元件中的一个推入或插入与其配合的元件中来将载体与输送单元连接在一起。

[0131] 根据细胞培养装置的载体的另一具体实施方式,载体在至少一端处,优选在两端处,具有用于例如借助螺钉来固定可磁化螺母的开口。载体具体地还具有用于基质保持件的多个开口,例如可以借助固定销将这些开口与载体连接。

[0132] 螺母优选由铁或其他可磁化金属制成。螺母可以被永磁体磁化,例如在诸如机器人的独立结构中。该独立的结构例如可以是细胞培养机器人,如01i-Mat(可从多瑙河畔图尔恩的LifeTaq-Analytics GmbH购得)。可以通过可磁化螺母将载体可逆地与独立的结构连接,进而使得细胞培养单元能够通过载体移动(例如移动至新鲜的培养基中)。为了放置在目标位置处,可以通过物理力效应或短脉冲将载体与磁体分离。

[0133] 标的细胞培养装置具有至少一个孔条,孔条由具有至少一个凹部的容器构成。凹部可以完全包围至少一个基质保持件,至少直至基质保持件的中心开口的上端。孔条优选具有凹部,其数量与载体上的基质保持件的数量对应。作为替代方案,孔条也可以具有与载体上的基质保持件相比更多的凹部,和/或孔条的凹部中的至少一个可以容置一个以上的基质保持件。可选地,孔条仅具有一个凹部,凹部大到足以容置一个载体或多个载体的所有基质保持件。如果孔条的凹部包括多个基质保持件,则这些基质保持件与同一介质接触,从而例如可以避免不同凹部之间的介质组成发生变化。

[0134] 根据一种具体实施方式,孔条具有用于固定地或可逆地固定到输送单元上的元件。可选地,孔条也具有打磨或刮除结构。特别是在自动化环境中使用细胞培养装置(例如借助机器人)时,采用打磨结构是有利,因为这样就能避免细胞培养基在输送各个单元时滴落。

[0135] 根据一种具体实施方式,这些凹部中的至少一个具有嵌件,从而减小凹部的体积。借此例如可以减少所需的细胞培养基或水凝胶的体积,从而可以显著降低细胞培养的成本。通过减小体积还可以减少在细胞培养系统中对细胞进行测试或使用的试剂量。

[0136] 标的细胞培养装置的组成部分可以由可用于细胞培养系统的任何材料制成。细胞培养装置的组件具体地由生物相容且可消毒的材料构成。其中例如包括硅胶、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚砜(PSU)、聚苯砜(PPSU)等材料以及细胞培养系统中常用的其他材料。

[0137] 在此所描述的基质可以是固体多孔载体或水凝胶或其组合。基质例如可以是固体多孔载体,在固体多孔载体上施加水凝胶和/或固体多孔载体填充有水凝胶。多孔基质例如也可以脱水。具体而言,多孔基质可以是加工成在纤维直径和孔径方面非常一致的微纤维的聚(L-丙交酯)(PLLA)。作为替代方案,其可以是适用于3D细胞培养的聚苯乙烯支架。基质具体地由天然、半合成或合成材料或其组合构成。可选地,基质可以借助蛋白质或肽进行改性或涂布。基质例如可以具有抗体、抗体片段或RGD序列。RGD序列是含精氨酸/甘氨酸/天冬酰胺的氨基酸序列。这些序列存在于EC基质的蛋白质(例如纤连蛋白/玻连蛋白)中。细胞可以通过整合素与这些蛋白质结合。

[0138] 可以将多孔基质转移至基质保持件中,但作为替代方案,也可以借助冻干法将多孔介质整合在基质保持件中。

[0139] 具体地可以将任何与动物细胞的培养相容的材料用作在此所描述的基质的材料。天然材料具体地选自胶原蛋白、纤维蛋白、糖胺聚糖和透明质酸,合成或半合成材料选自聚合物成分(如聚甲基丙烯酸甲酯、聚乳酸、聚乙二醇、聚苯乙烯)和陶瓷成分(如羟基磷灰石或磷酸三钙)。

[0140] 根据一种具体实施方式,在基质保持件中借助蛋白质或蛋白质成分来制备基质。在此情况下,在基质保持件中形成水凝胶或固体多孔载体。随后,可以通过传统的交联技术(如NHS-EDC)或点击化学或其他变体借助功能性蛋白质(如抗体、生长因子或细胞外蛋白质)以及功能性肽对基质进行功能化,其中不同的液体储存在不同的孔条中,并且通过从一个孔条手动更换至下一孔条来进行化学反应。而后,可以在动物有机体中进行细胞定殖或手术干预。

[0141] 可以在标的细胞培养系统中对粘附细胞以及悬浮细胞进行培养。

[0142] 待培养的细胞优选为真核细胞,特别是动物细胞。这些细胞优选为哺乳动物细胞,

特别优选为人体细胞,但也可以是非人细胞,例如老鼠、仓鼠、负鼠、长鼻袋鼠或大鼠、昆虫、牛细胞系、狗(如MDCK细胞系)、猪等的啮齿动物细胞。

[0143] 这些细胞可以是干细胞,例如全能的、多能的、专能的或单能的,或者可以是分化的组织细胞或血细胞或淋巴细胞。这些细胞可以来自永生化细胞系,例如肿瘤细胞系。可以以某种方式培养细胞,从而发生分化。因此,细胞也可以改变分化程度。这一点优选通过培养条件(例如生长或分化因子)来确定。

[0144] 粘附细胞包括通常用于生物医学研究或药物研究中的任何动物细胞,特别是人体细胞。其中例如包括各种来源的干细胞(例如来自间充质、脂肪、肝、脑或其他来源的干细胞)或分化的细胞(如成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞、不同来源的上皮细胞、内皮细胞、神经元细胞、肝细胞以及诱导的胚胎来源的多能干细胞)和细胞系。

[0145] 悬浮细胞例如可以包括血祖细胞或分化的血细胞。在此情况下,可以将悬浮细胞嵌入水凝胶基质中,或者可以将其作为共培养研究中的悬浮液在孔条中进行培养,其中在第二种情况下,将粘附细胞培养物嵌入基质保持件中的基质中。例如可以在作为悬浮液的血细胞与基质保持件中的水凝胶中的间充质干细胞之间进行交互研究。

[0146] 三维细胞培养系统是指在体外条件下,在微结构化的三维细胞培养物中培养细胞。培养物或其细胞应具有空间定向。这主要以由纤维蛋白、胶原蛋白、明胶(聚)甲基丙烯酸酯或基质胶等支架蛋白构成以及由固体支架构成(例如由聚苯乙烯、聚乳酸或其他化学物质构成)的水凝胶的形式实现。在三维环境中,多个细胞系形成球体,在细胞嵌入后,随着时间的推移,这些球体的直径增大。即使是非球体形成的细胞也经常表现出与二维培养有很大不同的形态。

[0147] 在根据本发明的细胞培养装置和根据本发明的方法中,优选使用细胞相容性液体、特别是细胞培养基。上述步骤ii)至v)优选在液体中进行。液体用作复杂细胞环境的一部分。液体可以是适合细胞生长或适于为细胞给养的培养基。定义的细胞培养基基于氨基酸、碳水化合物、无机盐和维生素等组分组。通常所包含的盐例如是氯化钙、氯化钾、硫酸镁、氯化钠和磷酸一钠。通常所包含的维生素例如是叶酸、烟酰胺、核黄素和B12。此外,细胞培养基可以包含FCS(Fetal Calf Serum)或FBS(Fetal Bovine Serum)。优选的细胞培养基是MEM、 α -MEM、DMEM、RPMI以及以上物质的变体或改性。

[0148] 如果根据本发明的细胞培养装置还包括细胞相容性液体(例如细胞培养基)和活细胞,则其也被称为细胞培养系统。

[0149] 细胞培养系统具体地包括容器和培养基,但不包括特定的大气成分。因此,在标的方法的步骤ii)中,可以从具有应有利于尽可能良好地生长的大气条件的培养箱中取出这些细胞。对于动物细胞而言,针对尽可能良好的细胞生长,优选的大气条件为35-38°C,特别优选约37°C,以及0-10%CO₂,特别优选3-6%CO₂。

[0150] 在此所描述的用于输送细胞培养单元的输送单元优选包括用于固定一个或多个细胞培养单元的安装导轨(22)、用于安装导轨(22)的容置单元(20a)、顶盖(23)和两个用于有序地容置基质保持件的至少两个或更多个载体(10)的间隔元件(24),这两个间隔元件可选地直接相互连接。可选地,输送单元可以包括一个或多个标识元件(26),例如RFID、条形码或QR码,和/或包括尤其用于自动化过程的定心单元(27)。输送单元优选由固体材料构成,例如由塑料构成,其优选是耐温和/或耐酸的。输送单元的各个元件可以由相同或不同

的材料构成。

[0151] 可选地,在此所描述的转移单元还可以具有形成输送单元的底面的板件(48)、板件(48)中用于在板件上对输送单元进行定心的开口(49)、板件(48)中用于螺旋连接的开口(50)、大致安放在输送单元的中间高度处的另一板件(51)、可磁化金属棒(52)、定心支架(54)和板件(51)中用于定心支架(54)的开口以及定心物体(55)

[0152] 可磁化金属棒(52)能够可逆地与外部结构连接,例如与用于细胞培养的自动操作的机器人连接。可磁化金属棒(52)例如用作与用于输送单元的机器人单元可逆连接的对接点,例如用作用于与Oli-MAT(可从多瑙河畔图尔恩的LifeTaq-Analytics GmbH购得)的磁体可逆连接的对接点。Oli-MAT的Z轴具有两个永磁体,用于将转移单元从一个位置移至另一位置。可以通过短脉冲使磁铁暂时消磁,从而关掉输送单元。

[0153] 此外,该系统还包含一个用于沿水平和竖直定向进行定殖的装置。

[0154] 在以竖直布局进行定殖的情况下,例如将细胞与水凝胶混合,并且借助移液管将这些细胞转移至用于素质定殖的装置、孔条中。然后将具有用于基质保持件的装置的基质保持件浸入水凝胶中,直到水凝胶聚合。而后将基质保持件小心地转移至填充有介质的孔条中,其中仅将聚合水凝胶的内部开口中的定义的量与相应细胞一起转移。具体视水凝胶组分的浓度而定,聚合可能需要几分钟到几小时。与此相应地,视情况必须将培养物转移至培养箱中。在此情况下,为避免在聚合过程中开口中出现气泡,基质保持件可以在开口上方在竖直表面上具有较小的开口。

[0155] 在竖直定殖的另一变体中,首先将基质保持件转移至用于竖直定殖的装置中,然后添加具有细胞的水凝胶。在完成聚合之后,再次转移至填充有介质的孔条中。

[0156] 作为替代方案,在采用水凝胶的情况下,可以借助水平定殖装置以水平布局进行定殖。在此情况下,借助用于将基质保持件固定在定殖装置上的装置事先对基质保持件进行固定。然后将细胞与水凝胶混合,并且将混合物转移至基质保持件的开口中。在完成聚合之后,手动地将装置与基质保持件分离并且将装置转移至填充有介质的孔条中。与竖直布局相比,通过该布局可以件体积减小至少5倍。

[0157] 在进行水平定殖的情况下,定殖装置可以配设有平台。在如上所述进行定殖之后,将基质保持件与水平定殖装置分离,其中在水凝胶的背面产生一个凹部。在此情况下,在一种具体实施方式中,在凹部上可以借助另一种例如上皮来源的细胞类型(例如血管的内皮细胞或肠的上皮细胞)进行定殖并且可以形成屏障状结构。

[0158] 在采用多孔固体载体的情况下,优选以水平布局进行定殖。在此情况下,中心开口具有包括壁部的凹部。多孔载体位于壁部上,可以在多孔载体上直接进行定殖,其中在该布局中,可以在几个小时至一天内将构建体转移至培养箱中。在进行定殖后,可以将基质保持件转移至填充有培养基的孔条中。具体视载体而定,可以在定殖之前,分几个步骤对载体进行脱水。这可以通过将具有基质保持件的装置从一个填充有液体的孔条转移至另一填充有液体的孔条中来提前完成。在进行定殖之后,可以通过将具有基质保持件的装置和3D细胞培养物从具有旧介质的旧孔条转移至先前填充有新鲜介质的新孔条中进行后续的介质更换。在一种具体实施方式中,也可以介质输送单元或机器人支持的抓臂来自动转移具有基质保持件的孔条。

[0159] 对于在作为水凝胶或多孔可降解载体的基质中对细胞进行长期培养而言,根据一

种具体实施方式,可以使培养物脱细胞,以便无细胞地获得细胞外基质。在此情况下,例如可以在数周内将间充质干细胞分化成成骨细胞、软骨细胞或脂肪细胞,最后可以借助标准脱细胞方案使获得的基质无细胞。

[0160] 在另一可能的变体中,完全省去2D中的预培养并且避免细胞在2D中通过。在此情况下,将细胞以较低的浓度(<5000-10000/孔)定殖在作为水凝胶或固体多孔载体的基质保持件上并将其培养至较高浓度。然后将基质溶解或者借助酶促反应将这些细胞与载体分离并回收用于下一次定殖。

[0161] 在另一实施方案中,可以用细胞和水凝胶基质来填充基质保持件并将这各基质保持件转移至用于灌注的装置中,其中可以引起连续或周期性的流动。

[0162] 可以在盒子中对根据本发明的细胞培养装置进行储存或输送,可选地借助用于容置这些装置的特殊嵌件。具体而言,盒子可以具有用于进行调温或冷却的其他元件或用于温度控制和/或温度记录的元件或用于CO₂或O₂测量的传感器。此外,盒子可以是等温盒子。

[0163] 作为替代方式,可以将例如由硅胶制成的基质保持件转移至具有灌注的生物反应器系统中。例如可以在低浓度下对细胞进行培养,如果细胞数量对于纯静态培养而言过大,则可以将基质保持件转移至更大的容器或具有灌注的生物反应器系统中。这样就能引起连续或周期性的流动。

[0164] 在此描述了使用根据本发明的细胞培养装置的不同方法。为此,基质保持件可以水平或竖直定向。具体而言,用于进行培养的元件是无菌的,特别是高压灭菌的。可以针对培养来准备所使用的细胞,特别是通过洗涤和与分解维持细胞复合体的蛋白质的蛋白酶(例如胰蛋白酶)接触。这样就能将细胞与载体分离、隔开并在进一步的过程中使这些细胞悬浮。为了增加细胞密度,也可以对细胞进行离心。用于嵌入或定殖基质的细胞数量可由本领域技术人员来确定,细胞数量例如可为每个基质约1000-100000个细胞。具体地可以使用基质保持件的载体(10)将基质保持件转移至孔条(11)中。借助细胞悬液对基质保持件(12)的开口(13)中的基质进行定殖的条件可以针对各个细胞类型进行单独调整,例如温度可以是大约30°C至38°C,就哺乳动物细胞培养而言,温度例如约为37°C。

[0165] 根据另一实施方式,细胞培养装置可以包括一个或多个电极。这些电极特别是以某种方式布置,以便可以度待培养的细胞进行电刺激。这些电极优选位于孔条中,具体地位于孔条的凹部中的一个或多个中。

[0166] 本发明还包括以下实施方式:

[0167] 1、一种用于三维细胞培养的细胞培养装置,其具有一个或多个细胞培养单元,其特征在于,细胞培养单元(21)包括:

[0168] i. 至少一个基质保持件(12),其具有用于容置基质的中心开口(13);

[0169] ii. 载体(10),其固定地或可逆地与所述至少一个基质保持件(12)连接;以及

[0170] iii. 孔条(11),其由具有至少一个凹部的容器构成,所述凹部可以包围至少一个或多个基质保持件(12),直至所述中心开口(13)的上端,其中所述基质保持件(12)竖直定向。

[0171] 2、根据点1所述的细胞培养装置,其中所述基质保持件(12)的中心开口(13)为贯通开口(13a和13c)或具有壁部的凹部(13b)。

[0172] 3、根据点1或2所述的细胞培养装置,其中所述中心开口(13)包括基质,所述基质

为固体多孔载体或水凝胶或其组合。

[0173] 4、根据点1至3中任一项所述的细胞培养装置,其中所述基质由天然材料、半合成材料或合成材料或其组合构成。

[0174] 5、根据点4所述的细胞培养装置,其中所述天然材料选自胶原蛋白、纤维蛋白、糖胺聚糖和透明质酸,所述合成或半合成材料选自诸如聚甲基丙烯酸甲酯、聚乳酸、聚乙二醇、聚苯乙烯之类的聚合物成分以及诸如羟基磷灰石或磷酸三钙之类的陶瓷成分。

[0175] 6、根据点1至5中任一项所述的细胞培养装置,其中所述载体(10)具有用于容置基质保持件(12)的元件(15),所述基质保持件在其上端处具有凹口(14a、14b),通过所述凹口可以将所述基质保持件可逆地与所述载体(10)的元件(15)连接。

[0176] 7、根据点1至6中任一项所述的细胞培养装置,其中所述装置包括至少5个、具体地至少10个基质保持件(12)。

[0177] 8、根据点1至7中任一项所述的细胞培养装置,其中所述装置还包括能够输送一个或多个细胞培养单元(21)的输送单元(20)。

[0178] 9、根据点8所述的细胞培养装置,其中所述输送单元(20)包括:

[0179] i. 安装导轨(22),其用于将一个或多个细胞培养单元(21)固定在所述输送单元(20)上,

[0180] ii. 用于安装导轨(22)的容置单元(20a),

[0181] iii. 顶盖(23),以及

[0182] iv. 两个间隔元件(24),其用于有序地容置基质保持件的至少两个或更多个载体(10)的,所述间隔元件可选地直接相互连接,

[0183] v. 可选的至少一个标识元件(26),例如RFID芯片或条形码,以及

[0184] vi. 可选的定心单元(27)。

[0185] 10、根据点8或9所述的细胞培养装置,其中所述孔条(11)包括用于固定至所述安装导轨(20)上的位置(25)。

[0186] 11、根据点8或9所述的细胞培养装置,其中所述细胞培养单元平行布置在所述间隔件(24)中。

[0187] 12、一种使用根据点1至11中任一项所述的细胞培养装置进行细胞培养的方法。

[0188] 13、根据点12所述的方法,包括以下步骤:

[0189] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0190] ii. 利用所述细胞悬液对所述基质保持件(12)的开口(13)中的基质进行定殖,

[0191] iii. 具体地使用所述基质保持件的载体(10)将所述基质保持件转移至孔条(11)中,以及

[0192] iv. 在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞的细胞培养装置进行培养。

[0193] 14、根据点13所述的方法,其中利用所述细胞悬液在所述基质保持件(12)的水平布局中对所述基质进行定殖。

[0194] 15、根据点14所述的方法,其中所述基质保持件(12)的开口(13)具有用于进行固定的凹部(13c)并且通过位于定殖装置(30)上的互补密封元件(31)可逆地与所述定殖装置(30)连接,所述基质为水凝胶,所述方法包括以下步骤:

[0195] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0196] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶的一种或多种成分混合,以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

[0197] iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对所述基质保持件(12)的开口(13)进行定殖,所述基质保持件在所述定殖装置(30)中水平定向,

[0198] iv. 在合适的培养环境中,优选在37℃以及5%CO₂下,对细胞附加物进行培养,直至使所述基质聚合,

[0199] v. 将所述基质保持件(12)与所述定殖装置(30)分离,

[0200] vi. 优选地使用所述基质保持件的载体(10)将所述基质保持件(12)转移至填充有介质的孔条(11)中,

[0201] vii. 在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

[0202] 16、根据点13所述的方法,其中利用所述细胞悬液在所述基质保持件(12)的竖直布局中对所述基质进行定殖。

[0203] 17、根据点16所述的方法,其中所述基质保持件(12)的开口(13)具有上部开口(13d)并且所述基质保持件(12)可逆地与定殖装置(33)连接,所述基质为水凝胶,所述方法包括以下步骤:

[0204] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0205] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合,以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

[0206] iii. 利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充所述定殖装置(33)的孔,

[0207] iv. 通过将所述基质保持件(12)浸入所述定殖装置(33)中来对所述基质保持件的开口(13)进行定殖,

[0208] v. 在合适的培养环境中,优选在37℃以及5%CO₂下,对细胞附加物进行培养,直至使所述基质聚合,

[0209] vi. 将所述基质保持件(12)从所述定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)中,以及

[0210] vii. 在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

[0211] 18、根据点16所述的方法,其中所述基质保持件(12)的开口(13)具有上部开口(13d)并且所述基质保持件(12)可逆地与定殖装置(33)连接,所述定殖装置包括填充元件(40),所述基质为水凝胶,所述方法包括以下步骤:

[0212] i. 使待培养的细胞悬浮在适量的细胞培养基中以形成细胞悬液,

[0213] ii. 将所述细胞悬液与水凝胶混合,以制备细胞悬液与水凝胶的混合物,

[0214] iii. 将所述基质保持件插入所述定殖装置(33)中,

[0215] iv. 通过所述填充元件(40)利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物来填充所述定殖装置(33)的孔,从而利用所述细胞悬液与水凝胶的混合物对所述基质保持件的开口(13)进行定殖,

[0216] v. 在合适的培养环境中,优选在37℃以及5%CO₂下,对细胞附加物进行培养,直至使所述基质聚合,

[0217] vi. 将所述基质保持件(12)从所述定殖装置(33)转移至填充有培养基的孔条(11)

中,以及

[0218] vii.在有利于细胞生长的条件下,对包含细胞悬液与基质的混合物的细胞培养装置进行培养。

[0219] 19、根据点1至7中任一项所述的细胞培养装置,其中所述孔条为灌注装置(34),所述灌注装置具有可选地用于连接到泵上的软管接头(41)。

[0220] 20、根据点1至7中任一项所述的细胞培养装置,所述细胞培养装置还包括盒子(44)和用于在所述盒子(44)中容置一个或多个细胞培养单元(21)的嵌件(42)。

[0221] 21、根据点1至7中任一项所述的细胞培养装置,所述细胞培养装置还包括盒子(44)和用于在所述盒子(44)中容置一个或多个定殖装置(33)的嵌件(43)。

[0222] 示例

[0223] 通过以下示例对本发明进行进一步说明,但不必局限于本发明的这些具体实施方式。

[0224] 示例1:

[0225] 使用水平定殖装置(30)对具有细胞的水凝胶基质进行定殖并且随后在细胞培养单元中培养细胞

[0226] 将具有基质保持件(13c)的载体与定殖装置(30)连接并共同高压灭菌。然后借助不含Ca/Mg的DPBS对由间充质干细胞构成的2D培养物进行2次清洗并且使其胰蛋白酶消化。而后将分离的细胞容置在具有血清的介质中并将其转移至50ml的Falcon试管中。随后借助超速离心机以0.3RPM的速度对这些细胞进行5min的离心,弃去上清液。在下一步中加入不含血清的新介质,此外,进行细胞计数。而后再以0.3RPM的速度对这些细胞进行5min的离心,弃去上清液。针对50个基质保持件制备了5ml的细胞-纤维蛋白原-凝血酶溶液。具体视纤维蛋白原和凝血酶的初始浓度而定,使用不同的体积。在本示例中,将细胞团块加入到1.75ml的不含血清的介质中,使得每个基质的细胞数量为1000-100000个细胞。然后加入750 μ l的重构的纤维蛋白原,使得纤维蛋白原的浓度达到5mg/ml。随后将2 μ l的凝血酶原液(8000U/ml)转移至250 μ l的40mM CaCl₂(~64U/ml)中。从该溶液中,将40 μ l转移至2.5ml的40mM CaCl₂中(~1U/ml)。借助移液管将45 μ l的细胞纤维蛋白原溶液移液至基质保持件(12)中。随后将不含气泡的45 μ l的凝血酶溶液(目标浓度:纤维蛋白原为~2.5mg/ml,凝血酶为0.5U/ml)小心地添加到每个细胞纤维蛋白原液滴中并将其转移至37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下的培养箱中以进行聚合。在进行聚合之后,手动地将定殖装置(30)与基质保持件(12)分离,将具有聚合基质细胞溶液的载体转移至具有~1-1.5ml的新鲜介质的新孔条(11)中并且转移至培养箱(37 $^{\circ}$ C/5%CO₂)中。

[0227] 示例2:

[0228] 使用竖直定殖装置(33)对具有细胞的水凝胶基质进行定殖并且随后在细胞培养单元中培养细胞

[0229] 将定殖装置(33)和具有基质保持件(13a)的载体一同高压灭菌。然后借助不含Ca/Mg的DPBS对由间充质干细胞构成的2D培养物进行2次清洗并且使其胰蛋白酶消化。而后将分离的细胞容置在具有血清的介质中并将其转移至50ml的Falcon试管中。随后借助超速离心机以0.3RPM的速度进行5min的离心并随后弃去上清液。在下一步中加入不含血清的新介质并且进行细胞计数。而后再以0.3RPM的速度对这些细胞进行5min的离心并且再次弃去

上清液。针对5个基质制备了5ml的细胞-纤维蛋白原-凝血酶溶液。具体视纤维蛋白原和凝血酶的初始浓度而定,使用不同的体积。在此情况下,将细胞团块加入到1.75ml的不含血清的介质中,使得每个基质的细胞数量可为50000-250000个细胞。然后加入750 μ l的重构的纤维蛋白原,使得纤维蛋白原的浓度达到5mg/ml。随后将2 μ l的凝血酶原液(8000U/ml)转移至250 μ l的40mM CaCl₂(~64U/ml)中。从该溶液中,将40 μ l转移至2.5ml的40mM CaCl₂中(~1U/ml)。而后将纤维蛋白原细胞溶液与凝血酶溶液混合并将0.5ml-1ml转移至定殖装置(33)中。一旦溶液处于定殖装置中,就将载体迅速浸入基质保持件中并且将定殖装置储存在37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下的培养箱中,直到完成聚合。在完成聚合之后,将载体小心地从定殖装置中向上拉出,将载体转移至具有新鲜介质的新孔条中并且将其转移至培养箱(37 $^{\circ}$ C/5%CO₂)中。

[0230] 示例3:

[0231] 对固体多孔基质进行定殖并且随后在细胞培养单元中培养细胞

[0232] 将具有无开口的基质保持件(13b)载体和多个孔条(11)一同高压灭菌。在此情况下,使用镊子将多孔脱水基质(例如“Alvetex”Reprocell或“Mimetix”TheElectroSpinningCompany)转移至基质保持件中。作为替代方案,基质可能已借助冻干步骤整合在基质保持件中。在下一步中,根据制造商的说明借助乙醇对基质进行再水合和清洗。在此情况下,为了有效进行处理,将所使用的液体转移至多个平行的孔条中,以便可以将载体从一个孔条快速浸入另一孔条中。

[0233] 借助不含Ca/Mg的DPBS对由间充质干细胞构成的2D培养物进行2次清洗并且使其胰蛋白酶消化。而后将分离的细胞容置在具有血清的介质中并将其转移至50ml的Falcon试管中。随后借助超速离心机以0.3RPM的速度进行5min的离心并且随后弃去上清液。在下一步中加入不含血清的新介质并且进行细胞计数。而后再以0.3RPM的速度对这些细胞进行5min的离心并且弃去上清液。针对50个基质保持件制备了5ml的细胞溶液,其中每个基质的细胞数量为1000-20000个细胞。将具有基质保持件的载体水平放置并且将90 μ l的细胞悬液转移至基质上的开口中。然后在37 $^{\circ}$ C以及5%CO₂下,将构建体在培养箱中培养12-24h,直到细胞附着到基质上。在实现附着之后,将载体转移至具有新鲜介质的新孔条中并且随后在培养箱(37 $^{\circ}$ C/5%CO₂)中对其进行培养。

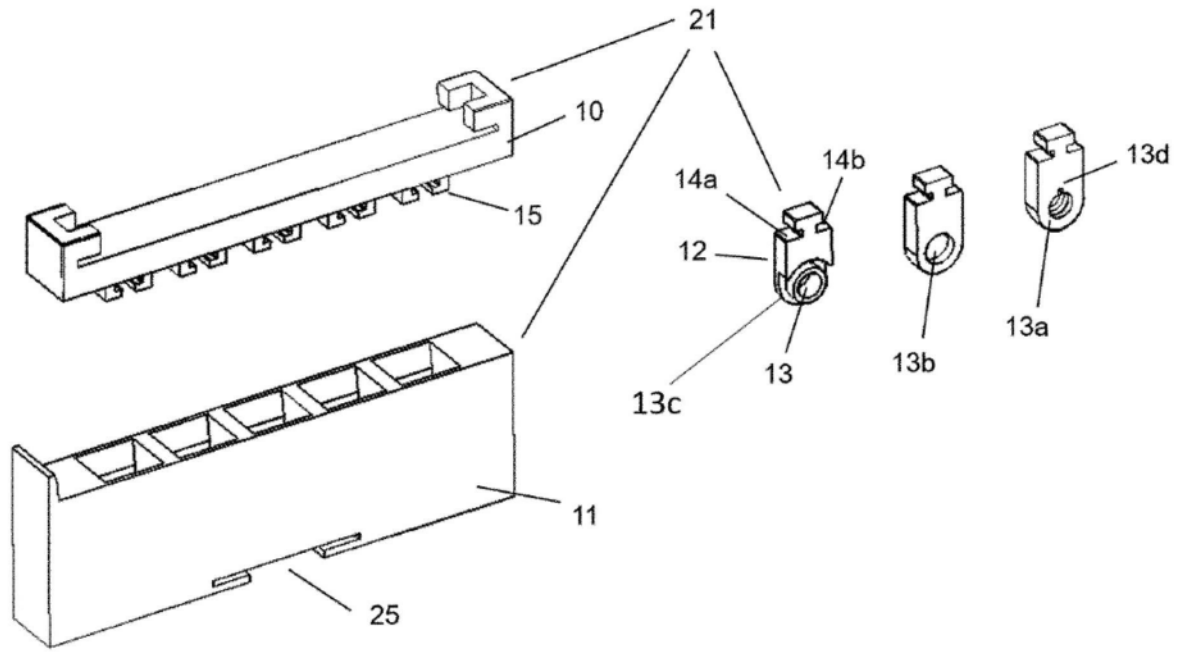


图1

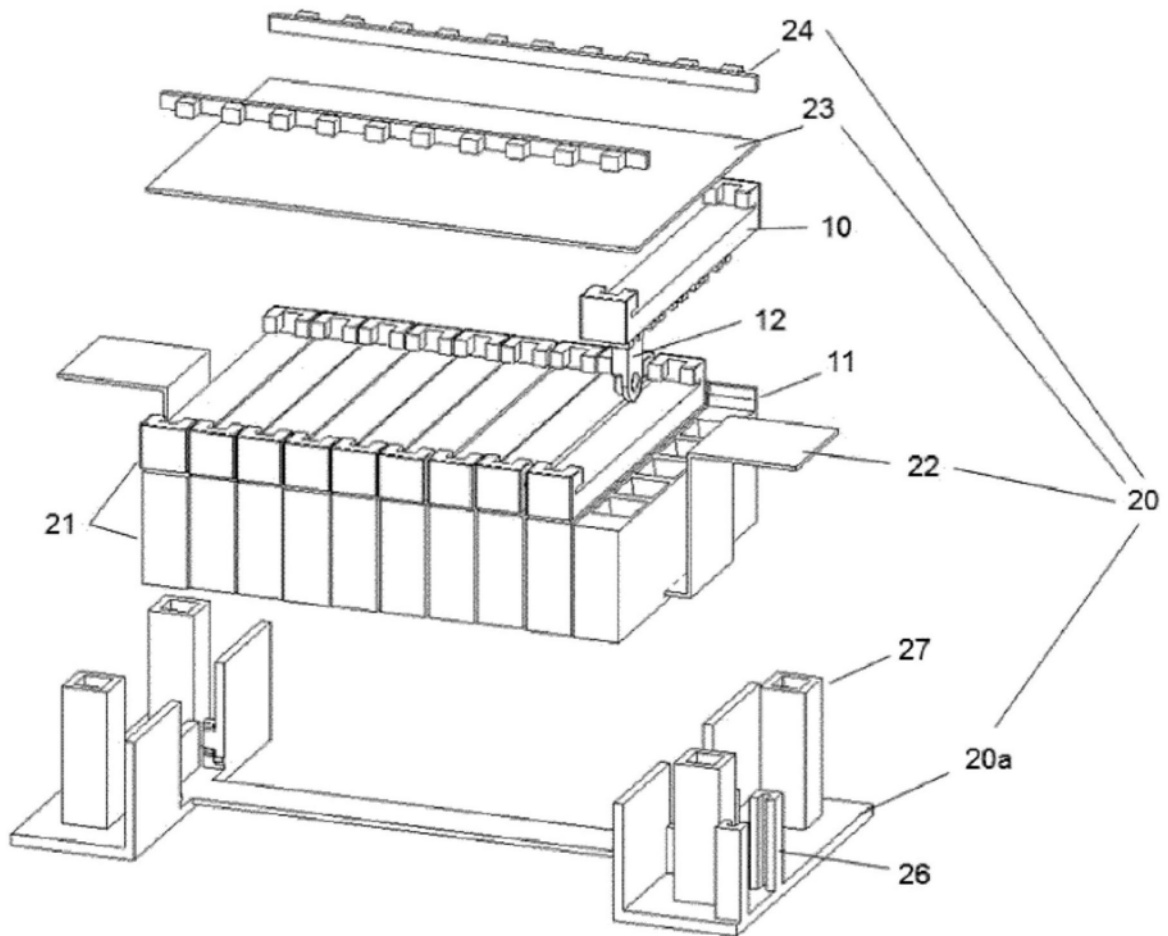


图2

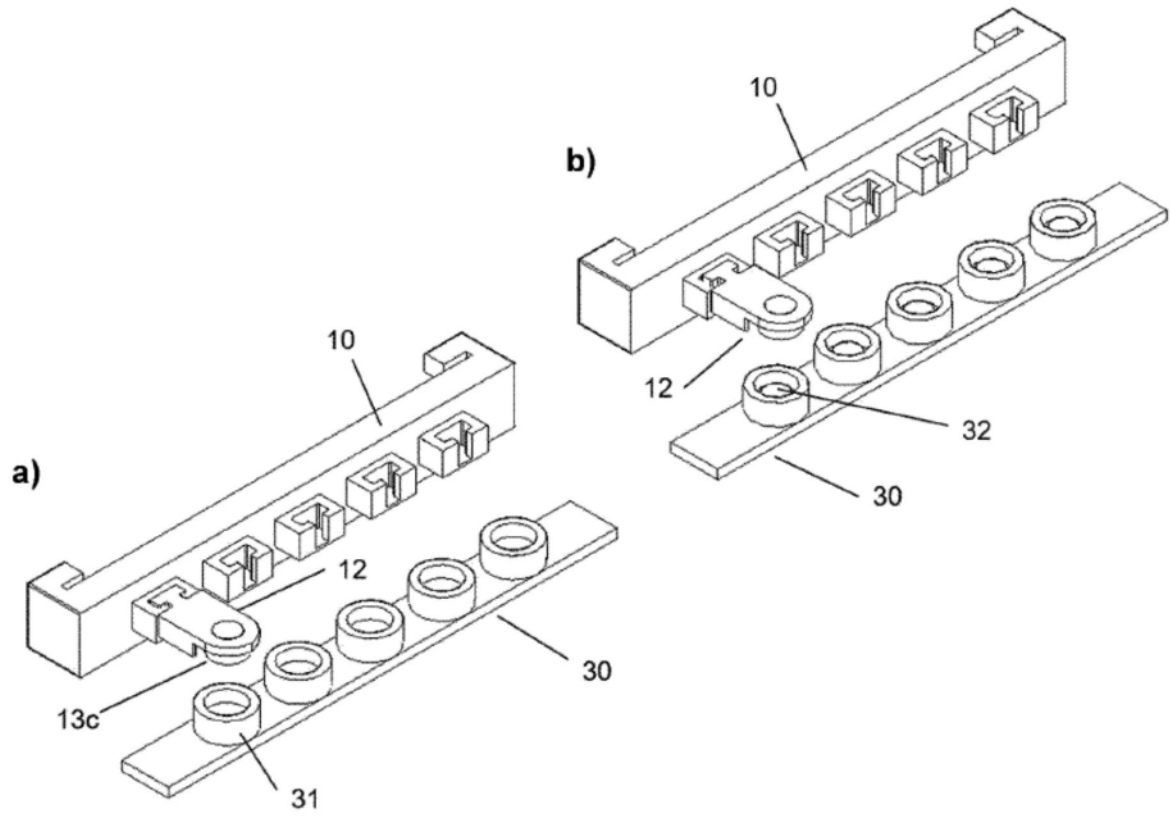


图3

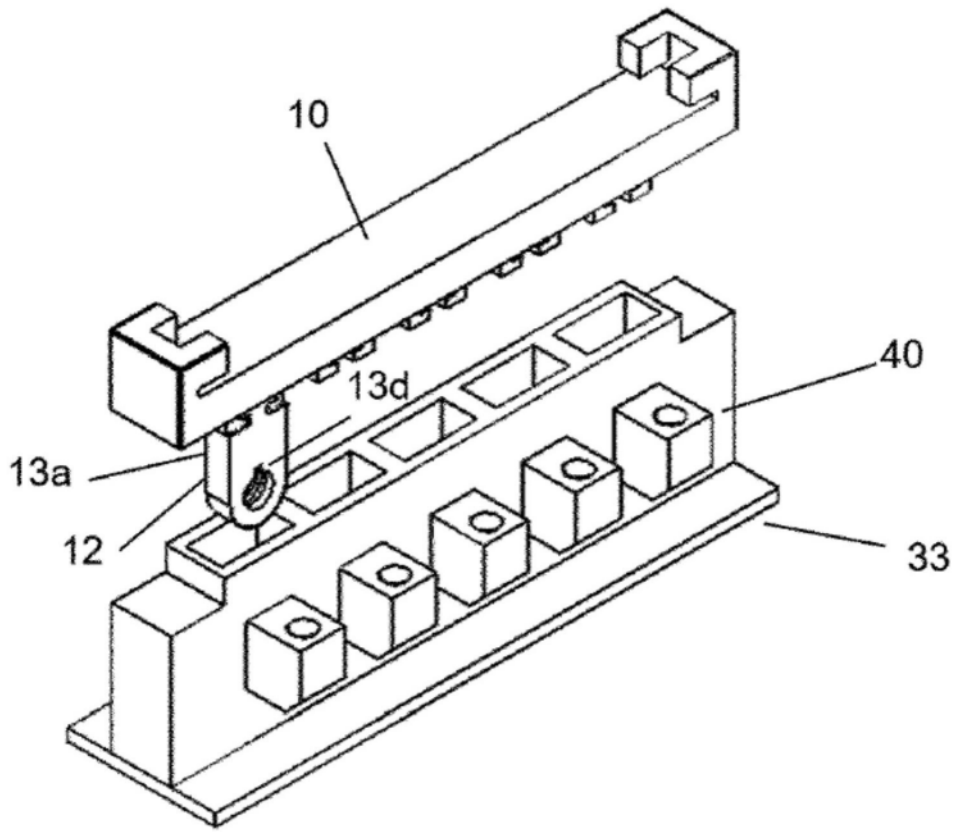


图4

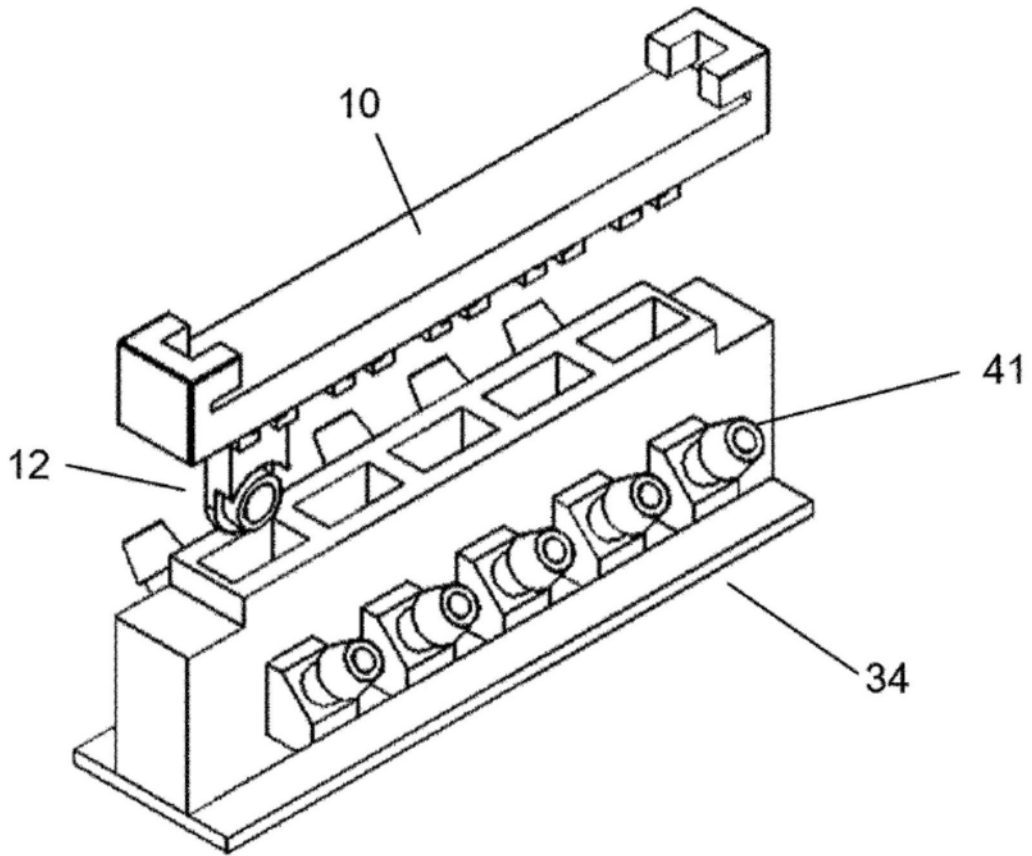


图5

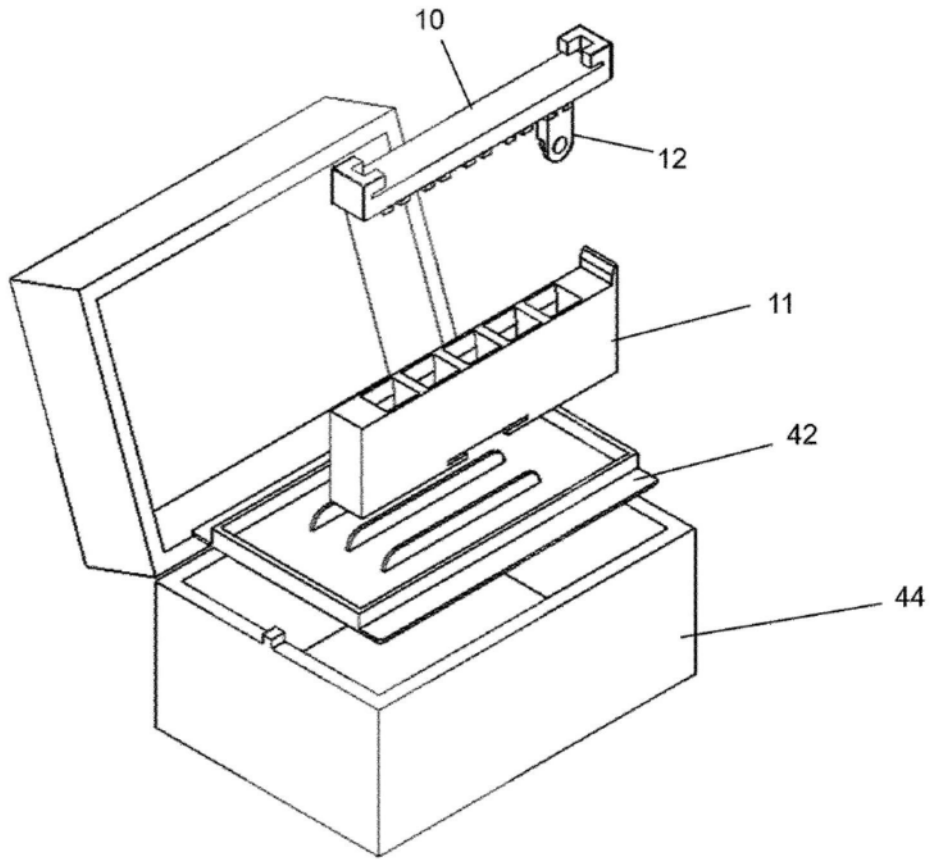


图6

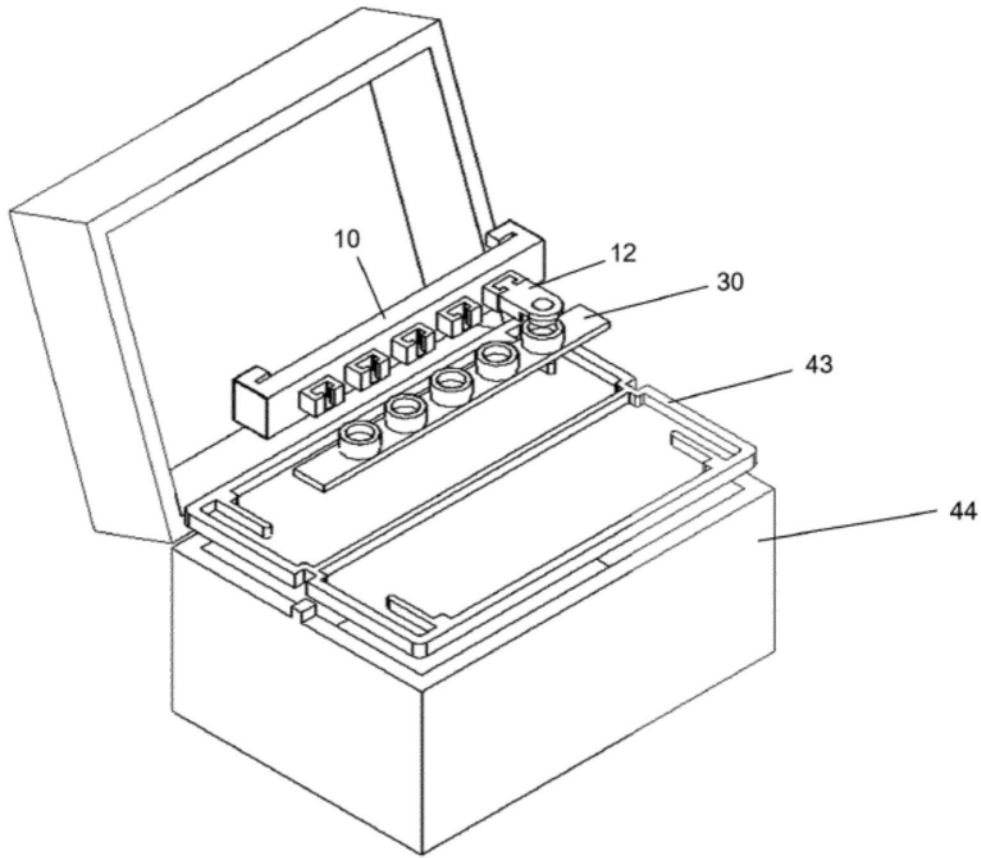


图7

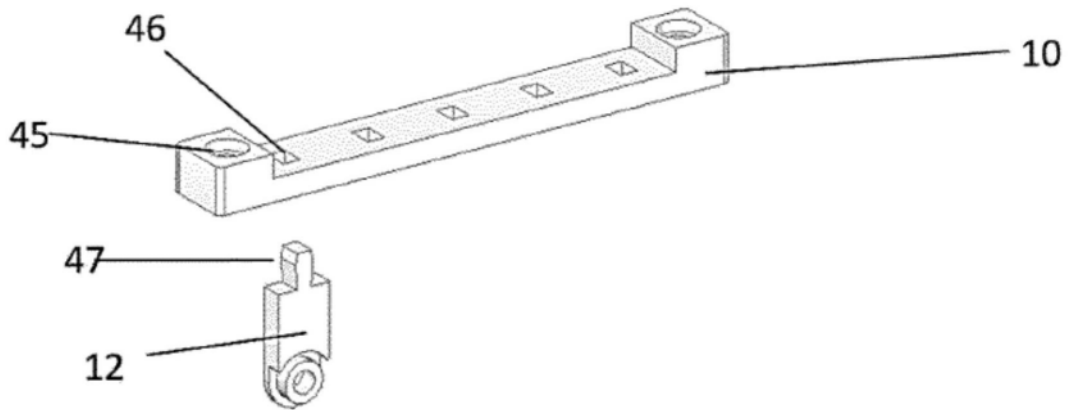


图8

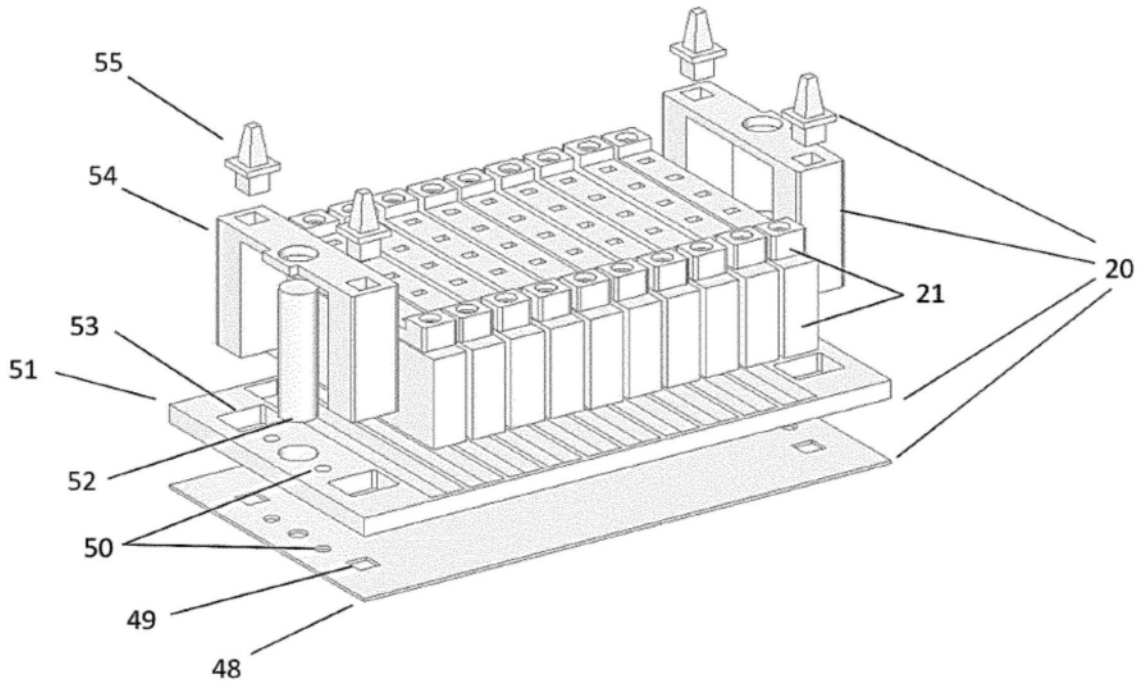


图9

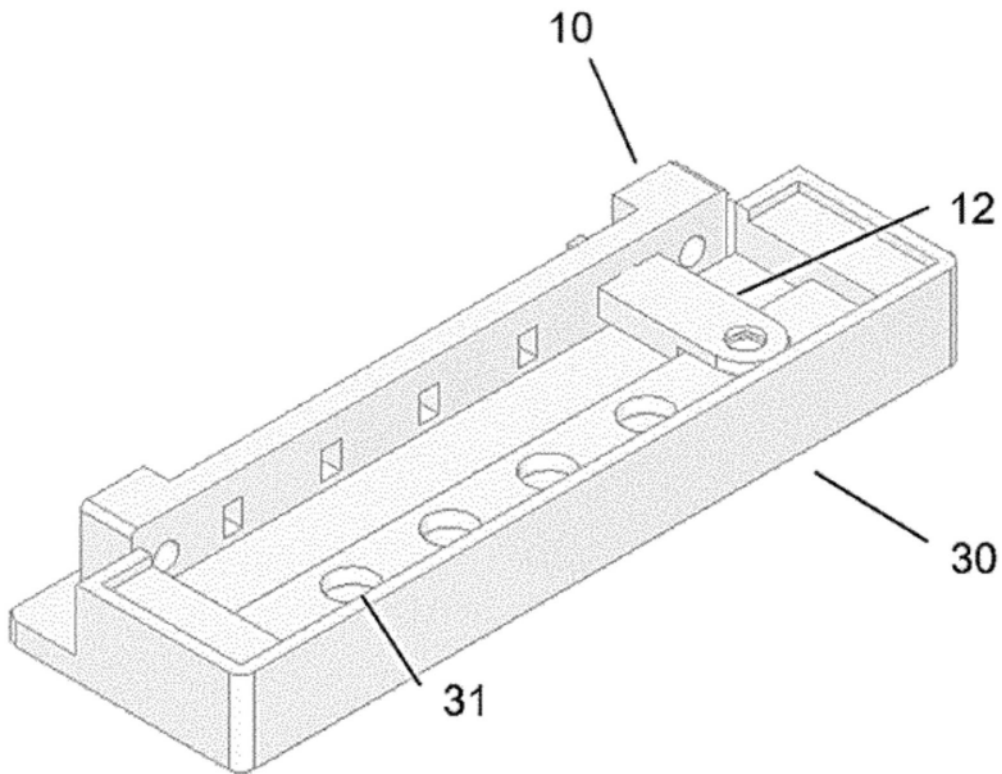


图10