



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101622337 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 24

(21) 申请号 200880006794. 5

(22) 申请日 2008. 01. 28

(30) 优先权数据

60/892, 460 2007. 03. 01 US

60/971, 382 2007. 09. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 09. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/052185 2008. 01. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02008/109200 EN 2008. 09. 12

(73) 专利权人 泰尔茂比司特公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 G·D·安特韦勒

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 焦丽雅

(51) Int. Cl.

C12M 1/26 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2006119622 A1, 2006. 11. 16,

WO 0228996 A1, 2002. 04. 11,

WO 02087491 A1, 2002. 11. 07,

WO 2006026835 A1, 2006. 03. 16,

US 7198940 B2, 2002. 10. 10,

审查员 王金凤

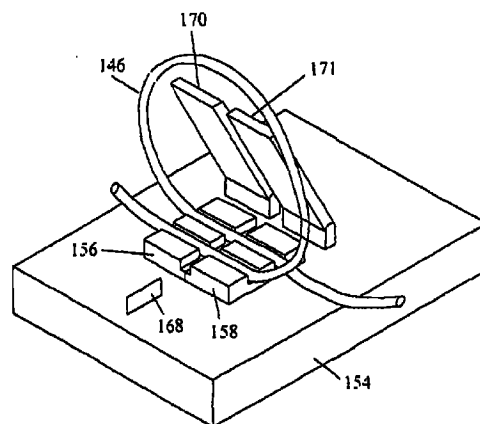
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

用于与细胞扩增装置一起使用的一次性管道成套设备和无菌取样的方法

(57) 摘要

用于细胞扩增的一次性装置, 其具有至少一个生物反应器。所述生物反应器具有细胞生长区域和供应区域, 通过膜将所述细胞生长区域与所述供应区域分开。与所述细胞生长区域流体连通的流体再循环通路允许密封地取出包含细胞物质的样品。所述流体再循环通路可以包括长管、或多个平行管段。所述平行管段具有流入末端和流出末端, 流入末端接合在第一共用接头, 流出末端接合在第二共用接头。所述通用接头可以包括阀门。



1. 用于细胞扩增的一次性装置 (10), 所述装置包括

至少一个生物反应器 (12), 所述生物反应器具有细胞生长区域和供应区域, 通过膜将所述细胞生长区域与供应区域分开, 所述膜适合于抑制细胞从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域, 并且允许某些化合物从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域和允许某些其它化合物从所述供应区域迁移到所述细胞生长区域;

与所述供应区域流体连通的至少一个氧合器 (14);

与所述细胞生长区域流体连通的多个袋 (22, 30), 所述袋适合于为所述细胞生长区域提供流体;

与所述细胞生长区域流体连通的流体再循环通路 (36), 所述流体再循环通路具有用于密封地取出包含细胞物质的样品的工具;

其特征在于所述用于密封地取出样品的工具包括长管 (38), 所述管的长度足够长, 以便允许从所述长管去掉包含所述样品的至少一个长度, 其中用于密封地取出样品的所述工具包括多个平行的管段 (110、112、114、130、136、142、144)。

2. 权利要求 1 的一次性装置, 其中所述平行管段具有流入末端 (118) 和流出末端 (120), 所述流入末端接合在第一共用接头 (124), 所述流出末端接合在第二共用接头 (126)。

3. 权利要求 2 的一次性装置, 其中所述共用接头包括阀门 (122)。

4. 权利要求 1 的一次性装置, 另外包括至少一个取样端口, 所述取样端口适合于允许从所述装置取样非细胞物质。

5. 细胞扩增系统, 包括

一次性装置 (10), 所述一次性装置包括

至少一个生物反应器 (12), 所述生物反应器具有细胞生长区域和供应区域, 通过膜将所述细胞生长区域与供应区域分开, 所述膜适合于抑制细胞从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域, 并且允许某些化合物从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域和允许某些其它化合物从所述供应区域迁移到所述细胞生长区域;

与所述供应区域流体连通的至少一个氧合器 (14);

与所述细胞生长区域流体连通的多个袋 (22、30), 所述袋适合于为所述细胞生长区域提供流体;

与细胞生长区域流体连通的流体再循环通路 (36), 所述流体再循环通路具有用于密封地取出包含细胞物质的样品的工具; 和

用于接纳所述一次性装置的恒温箱 (84), 所述恒温箱 (84) 具有用于控制所述生物反应器内的流体流动的工具;

其特征在于所述用于密封地取出样品的工具包括长管 (38), 所述管的长度足够长, 以便允许从所述长管去掉包含所述样品的至少一个长度, 其中所述用于密封地去掉样品的工具包括多个平行的管段 (110、112、130、136、142、144)。

6. 权利要求 5 的细胞扩增系统, 其中所述平行管段具有流入末端 (118) 和流出末端 (120), 所述流入末端接合在第一共用接头 (124), 所述流出末端接合在第二共用接头 (126)。

7. 权利要求 6 的细胞扩增系统, 其中所述共用接头包括阀门 (122)。

8. 权利要求 5 的细胞扩增系统, 另外包括至少一个取样端口, 所述取样端口适合于允许从所述装置取样非细胞物质。

用于与细胞扩增装置一起使用的一次性管道成套设备和无 菌取样的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于与细胞扩增用机器一起使用的一次性成套设备。所述一次性成套设备包括至少一个生物反应器或细胞扩增模块、一个氧合器和相关的袋和管道。还可以包括用于帮助将管道组织在机器上的片匣 (cassette), 以及各种滴流室 (drip chamber)、取样端口和在线过滤器。本发明提供用于从成套设备的包含细胞的部分取得多个无菌样品的的方法和装置。所述装置可以包括具有多个平行管段的管, 可以从中去掉一个选定的管段而不中断所述一次性成套设备内的流体流动。

[0002] 发明背景

[0003] 可以在细胞扩增装置中从少量供体细胞扩增得到干细胞。所得的经过增殖的细胞可用于修复或代替受损的组织或有缺陷的组织。干细胞具有用于各种疾病的广泛的临床应用。再生药物领域的新近发展证明, 干细胞具有独特的性能, 例如高的增殖速率和可自更新的能力、能够保持非特化的细胞状态的能力、和能够在特定条件下分化成特化细胞的能力。

[0004] 作为再生药物的重要组分, 生物反应器系统对于为细胞扩增提供优化的环境来说起到重要作用。生物反应器为细胞提供有效的养分供应并且除去代谢物, 并且提供有助于细胞生长的理化环境。特别地, 必须将外源细胞 (例如, 气生病原体) 排斥在生物反应器的细胞生长区以外。同时, 重要的是能够获得在扩增的干细胞的样品, 以便确定细胞生长进行的程度。对于用于从生物反应器的细胞生长区域密封取样在扩增的细胞材料而不受环境污染的改进的装置和方法仍有需要。

发明内容

[0005] 本发明包括用于细胞扩增的一次性装置, 其具有至少一个生物反应器。所述生物反应器具有细胞生长区域和供应区域, 通过膜将所述细胞生长区域与所述供应区域分开。所述膜抑制细胞从细胞生长区域迁移到供应区域并且允许某些化合物从细胞生长区域迁移到供应区域以及允许某些其它化合物从供应区域迁移到细胞生长区域。至少一个氧合器与供应区域流体连通, 并且有多个袋与细胞生长区域流体连通, 所述袋为细胞生长区域提供流体。流体再循环通路与所述细胞生长区域流体连通, 所述流体再循环通路具有用于密封取出包含细胞物质的样品的工具。

[0006] 所述用于密封取出样品的工具可以包括长管, 管的长度足够长, 以便允许从所述长管去掉包含所述样品的至少一个长度。在本发明的另一个方面中, 用于密封取出样品的工具可以包括多个平行管段。

[0007] 在又一个方面中, 所述平行管段具有流入末端和流出末端, 流入末端接合在第一共用接头, 流出末端接合在第二共用接头。在本发明的又一个特征中, 所述共用接头可以包括阀门。

[0008] 本发明的另一个方面包括扩增细胞物质的方法, 所述方法包括提供至少一个生物反应器, 所述生物反应器具有一个细胞生长区域和供应区域, 通过膜将所述细胞生长区域

与供应区域分开,所述膜适合于抑制细胞从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域,并且允许某些化合物从所述细胞生长区域迁移到所述供应区域和某些其它化合物从所述供应区域迁移到所述细胞生长区域。所述方法另外包括将包含细胞物质的流体引导到细胞生长区域中;为所述供应区域提供氧化的流体,用于保持所述细胞生长区域中有助于细胞生长的条件;从与所述细胞生长区域流体连通的流体再循环通路密封取出包含细胞物质的样品。

[0009] 本发明的另一个特征包括提供长管,管的长度足够长以便允许从所述长管去掉至少一个包含样品的长度;将所述长管的回路置于密封装置中,使得在所述密封装置中管与其自身形成交叉;在所述交点处将所述管切断,以形成所述管的两个自由端和具有两个末端的形成回路的管段;烧灼所述管段的两个末端;并将所述管的两个自由端密封在一起,以便将所述管再连接起来。

[0010] 参考附图和权利要求,本发明的这些和其它特征和优点可以从以下详细说明变得显而易见。

[0011] 附图简述

[0012] 图 1 是细胞扩增装置的示意图。

[0013] 图 2 是用于从细胞扩增装置的细胞扩增面取出细胞样品的工具。

[0014] 图 3 是具有阀门的用于取出细胞样品的工具的一个透视图。

[0015] 图 4 是用于取出流体样品的工具的一个实例。

[0016] 图 5 是管道线圈的透视图。

[0017] 图 6 是管道密封器的透视图。

[0018] 图 7 是图 6 的密封器的一部分的俯视图。

[0019] 图 8 是图 7 的密封器的一部分的另一个俯视图。

[0020] 图 9 是图 6-8 的密封器的一部分的另一个俯视图。

[0021] 发明的详细说明

[0022] 在以下发明说明书和附图中,同样的编号表示同样的部件。

[0023] 细胞扩增模块

[0024] 细胞扩增模块 12 或生物反应器可以由包封在外壳中的中空纤维或平板膜制成。如果使用了中空纤维,则所述纤维可以由生物相容性聚合材料例如 Polyamix 制成,所述 Polyamix 是聚酰胺、聚芳基醚砜和聚乙烯吡咯烷酮的共混物。取决于要在生物反应器中扩增的细胞类型,所述纤维可以或者可以不用物质处理,以便增强细胞生长和 / 或对膜的粘附。所述纤维可以用聚乙烯灌注保持在外壳内就位。所述生物反应器外壳具有至少四个通入外壳内部的开口。两个开口到毛细血管内或 IC 空间中,与中空纤维的内部流体连接,另两个开口到毛细血管外或 EC 空间中,与包围中空纤维的空间流体连接。

[0025] 细胞可以在 IC 空间中生长。所述 IC 空间用其最小体积降低所需的昂贵的培养基和昂贵的细胞因子 / 生长因子的量。所述半透膜允许代谢组分、废物和气体在 EC 和 IC 隔室之间的转移。所述中空纤维的分子转移特性经过选择,以便使昂贵的试剂从 IC 面的损失最小化,同时允许代谢废物扩散通过膜到 EC 面,以便除去。EC 空间将营养素携带给 IC 空间中的细胞,除去废物副产品并且保持气体平衡。所述生物反应器可以用由聚氨基甲酸乙酯 (Tygothane C-210-A) 制成的连接器连接于一次性成套设备的其余部分。

[0026] 氧合器

[0027] 使用的氧合器 14 可以是任何市售的氧合器。可以使用的一个可选的氧合器是中空纤维 Oxy-CellMate 氧合器,其纤维支数为 1820,内部纤维直径为 280 μm ,外部纤维直径为 386 μm ,毛细管间液体量为 16mL。氧合器的中空纤维被包装在具有四个端口开口的外壳中。进口 20 和出口 46 端口与中空纤维的内部(毛细管间(intercapillary)或 IC 空间)流体连接。另一组进口 48 和出口 50 端口与包围中空纤维的空间(毛细管外或 EC 空间)流体连接。

[0028] 通过氧合器的 IC 入口 20 连接 EC 进口管线 18,用于为氧合器 14 递送来自 EC 培养基袋 16 的新鲜的培养基或再循环的 EC 培养基。与 IC 出口端口 46 连接的 EC 管线 18 递送氧化的 EC 培养基给生物反应器 12 上的 EC 入口端口 48。与 EC 入口端口 48 连接的是通往气体源 54 的管线 52(气体管线)。EC 出口端口 50 对大气开放,用 0.22 μ 的在线过滤器 56 预防微生物进入和污染所述封闭系统。

[0029] EC 培养基袋和 EC 培养基入口管线

[0030] EC 培养基袋 16 包含用于流动通过生物反应器的 EC 面的培养基,其可以经由挠性管路(EC 入口管线)18 的一部分连接于氧合器 14 的 IC 入口端口 20。EC 入口管线 18 为要被氧化的氧合器 14 带来新鲜的 EC 培养基。EC 入口管线 18 可由聚氯乙烯与氟化乙丙烯制成(PVC/FEP(作为 Tygon SE-200 销售))。

[0031] IC 培养基袋和 IC 培养基入口管线

[0032] IC 培养基袋 22 包含用于流动通过生物反应器的 IC 面的培养基,其可以经由挠性管路(IC 入口管线)24 的一部分连接于生物反应器 12 的入口端口 26。IC 入口管线 24 为生物反应器的 IC 面带来新鲜的 IC 培养基。IC 入口管线 24 也可以由 PVC/FEP 制成。

[0033] 排气袋

[0034] 排气袋 28 可以经由挠性管路 27 连接于一次性成套设备,用于在用培养基和细胞填充系统之前收集最初存在于系统中的任何空气。

[0035] 细胞输入袋

[0036] 细胞输入袋 30 包含要被加入到生物反应器 12 中的细胞。所述细胞输入袋 30 连接于 IC 入口管线 24,所述 IC 入口管线 24 经由细胞输入管线 29 将细胞递送到中空纤维的腔中。

[0037] 细胞收获袋

[0038] 在细胞即将收获时,将细胞从生物反应器 12 的 IC 出口端口 34 冲洗出来,通过细胞收获管线 31 到细胞收获袋 32 中。

[0039] IC 再循环 / 重播管道回路

[0040] 所述一次性管道成套设备可包括作为 IC 循环回路 36 起作用的一定长度的管道。IC 培养基从 IC 出口端口 34 流出生物反应器 12,通过管道回路 36 并且通过 IC 入口端口 26 返回到生物反应器中。这个回路 36 用于使 IC 培养基再循环通过中空纤维。其还可以用于将细胞从中空纤维冲洗出来,并且将它们在整个中空纤维中重播 / 再分布用于进一步生长。

[0041] 所述 IC 再循环回路 36 可以包含采样管 38,例如另外的一段管道。这个另外的管道使得可以从一次性成套设备无菌地去掉管道的小段并且对内部的培养基进行细胞代

谢标记物的检验,例如 pH、葡萄糖、乳酸盐、电解质、氧和二氧化碳含量。取样管道 38 可由 Sanipure 管 (SEBS) 制成。可以使用环己酮将取样管 38 溶剂粘合到 IC 回路 36 中。

[0042] EC 再循环回路

[0043] EC 再循环回路允许生物反应器的 EC 面的培养基被再循环。EC 再循环回路允许 EC 培养基从 EC 出口端口 50 流出生物反应器并且通过 EC 入口端口 48 回到生物反应器。这个回路可用于使包围中空纤维的 EC 培养基再循环。

[0044] 废物袋

[0045] 包含细胞生长产生的代谢分解产物的 IC 和 EC 培养基经由管道 58 从系统除去到废物袋 60 中。

[0046] 泵回路

[0047] 如图 1 所示,所述管道成套设备可以接合三个或更多个泵回路,其与细胞扩增设备上的蠕动泵的位置相对应。在一个实施方案中,所述管道成套设备可具有五个泵回路,对应于装置上的泵 P1-P5。所述泵回路可由聚氨基甲酸乙酯 (PU(可作为 Tygothane C-210A) 得到) 制成。

[0048] 片匣

[0049] 还可以包括片匣作为所述一次性成套设备的一部分,用于组织管道管线并且还可以包含用于蠕动泵的管道回路。根据需要,可以添加另外的管道管线,以便于特定应用,例如在生物反应器中重播/再分布细胞。为了控制流体经过一次性成套设备 10 的通过,可以提供人工操作的夹具 64、66。另外,可以将微处理器控制的夹阀 68、70、72、74、76、78、80、82 连接在一次性成套设备的选定管道上。微处理器控制的夹阀可用于血液处理装置例如 **Trima®** 成分输血机器上,购自本发明的受让人。可以对 Trima 成分输血机器进行改进以便接受一次性成套设备 10,通过去掉通常设置在 Trima 成分输血机器内的离心器并将生物反应器和氧合器置于作为恒温箱 84 的机器内。可以将温度传感器 86、88、90 和压力传感器 92、94、和 96 连接于一次性成套设备 10 的选定管道上并且与微处理器 (未示出) 电通讯。应该理解,优选只是临时地通过接触将泵、温度传感器、压力传感器和夹阀连接于一次性成套设备。另一方面,手动夹具通常设置在相应的管道上并且可以随所述一次性成套设备供应。

[0050] 在一次性装置 10 安装在恒温箱 84 中的情况下,体外培养基在装置 10 中到处流动,包括所有的连接管、第一和第二滴液室 98 和 100、氧合器 14 和生物反应器 12。由 EC 入口管线 18 控制的泵 P1、P2、P3 和 P4 可以选择性地启动,以便推动流体进入一次性装置 10 的各部分中,以便预先准备好所述装置。在准备好之后,可以从袋 22、30 通过第一滴液室 98 添加细胞间培养基和细胞例如间充质干细胞并且引导到生物反应器 12 的细胞扩增区域和相关的管道 (包括再循环通路 36 和取样工具 38) 中。通过提供排气袋 28 保持气密封的条件,所述排气袋 28 与第一滴液室 98 连接,用于适应 EC 培养基袋 16、IC 培养基袋 22 和细胞输入袋 30 的流量变化。由泵 P2 驱动的体外流体通过氧合器 14,其中流体与气体一起灌输到生物反应器 12 的供应区域中。所述供应区域通过膜与细胞扩增区域分开,所述膜允许氧和其它需要的化学组分进入细胞扩增区域并且允许细胞扩增过程的废物通过渗透性离开细胞扩增区域,同时预防细胞物质通过所述膜。流动通过生物反应器的供应区域的流体状态通过温度传感器 88 和压力传感器 94 以及监控进入氧合器 14 的流体温度的温度传感器

90 来监控。适当的气体例如氧气或气体混合物被以通过传感器 96 监控的压力引导通过氧合器 14。所述气体优选是医疗等级的并且也是通过 0.22 微米过滤器 56、57 从环境空气分离的。还可以通过生物反应器的流入和流出管线上的取样端口抽出流体样品来检查体外流体的特征。取样端口具有内部过滤器,所述内部过滤器允许抽出流体,但是阻止细胞大小的颗粒进出装置 10。

[0051] 泵优选是蠕动泵。除了手动夹具和自动控制的阀门之外,泵也作为阀门起作用,在泵没有被主动驱动时阻止流体流过泵。因此,在泵 P1 不操作和阀门 76、78 关闭时,形成通过生物反应器 12 和泵 P4 的再循环回路。细胞在其中生长的这种再循环回路的状态用温度传感器 86 和压力传感器 92 以及通过取样端口 S3 取得流体样品来监控。如上所述,通过样品端口 S3 抽出的流体不包含细胞或细胞大小的颗粒。重要的是能够监控细胞生长随时间的进行而不损害装置 10 的气密封状态。一旦已经达到期望的细胞浓度,可以将生物反应器 12 的内容物收获到细胞收获袋 32 中。

[0052] 取样管 38 允许不时地从细胞扩增区域取出包含细胞的流体的离散样本。然后可以检验样品,以便确定细胞扩增区域中的细胞生长状态。取样管 38 的一个实施方案在图 2 中更详细地说明。取样管 38 包括两个或更多个分支 110、112、114。分支中的一个或多个可以设有能够解除的夹具 116,用于临时停止流体流动通过所选的分支。或者,可以使用其它闭合工具,例如止血钳。优选地,通过停止通过其它分支的流动来指引流动通过所选的分支 114。在已经建立稳定的流动使得所选分支的内容物合理地代表细胞扩增区域中流体的一般内容物之后,可以将至少一个其它分支打开并将所选的分支关闭。这样保持通过所述管道的流动。然后可以通过在分支的相对端部 118、120 施加 RF 密封(未示出)去掉所选的分支 114。得到的管段包含流体样品,优选约 1mL 容积。所述管段和装置 10 的其余部分都保持为气密封的。

[0053] 不需要除去整个分支来获得样品。可以将分支形成为足够长,使得可以取得多个样品。在包括六个分支的优选实施方案中,可以从用夹具或止血钳封闭的第一分支取得样品,而流体继续流动通过第二分支。将第一分支的自由端再连接,如下所述。在要取得第二个样品时,可以将夹具或止血钳置于第二分支上,可以去掉样品并可以用与第一分支相同的方法将第二分支的自由端再连接起来。然后可以通过在第一和第二分支之间交替取得另外的样本。这样保持两个分支具有相似的长度。此外,因为两个分支中的流体流动在取样之间得以恢复,使得在流动路径中形成滞流区的可能性很小。

[0054] 在图 3 中所示的可选实施方案中,可以使用阀门 122 代替夹具 116。

[0055] 分支 110、112、114 可以如图 2 中所示接合在通用接头 124、126,或者可以如图 4 中所示在中心管 128 周围串联间隔开。第一分支 130 可以在第一出口 132 处从中心管 128 引出并且在第一进口 134 处回到中心管。第二分支 136 可以在第二出口 138 处从中心管引出,线性地设置在第一出口 132 下游并且在管周围径向地偏离第一出口。所述第二分支 136 可以在第二进口 140 处回到中心管,同样是在第一进口 134 的下游并与之径向地偏离。可以为第三分支 142、第四分支 144 等重复这种模式,按需要形成任意多个分支。可以通过在分支的出口和进口附近进行烧灼来从分支去掉样品,如上述说明的。

[0056] 在图 5 到 9 中说明的另一个实施方案包括用于从长管去掉包含细胞样品的管段的方法。如图 5 所示,取样管 38 可以显著地延长超过将装置连接在一次性成套设备 10 中

所需的长度。管的另外的长度可以储存为多个回路 146、148、150、152。在需要包含细胞材料的样品时,将回路 146 置于管道焊接机 154 中,例如得自 Terumo Medical Corporation, Somerset, New Jersey 的管道焊接机。焊接机 154 可具有可滑动的管座 156、158,其具有用于接收管的平行槽。首先,将第一管座 156 中的槽 160 和 162 与第二管座 158 中的槽 164 和 166 对准。将挡器 170、171 在相应的管座 156、158 上闭合,将管及其回路 146 保持在适当的位置。在图 7、8 和 9 中未示出挡器 170、171,以便更清楚地表示管的位置。将一次性铜焊圆片从管道焊接机 154 中的料盒(未示出)插入在管座 156、158 之间的间隙 172 中。电加热所述圆片以便切割、烧灼和密封管道的末端。在加热的圆片分割管之后,可以从焊接机取出包含所需样品的回路 146。然后偏移管座 156、158,直到第一管座 156 的第二槽 162 与第二管座 158 的第一槽对准,从而使管的被切断的末端 174、176 彼此邻接。然后可以去掉圆片 168 并且将加热的管末端熔合在一起。然后流体可以恢复流入管中。只要管具有形成所需回路的足够长度,就可以不时地取得另外的样品。

[0057] 所述的装置和方法可用于从细胞扩增系统收集包含细胞物质的流体样品。在通过分析样品确定已经进行充分的细胞复制之后,可以将生物反应器的内容物收获到细胞收获袋 32 中。然后扩增的细胞材料可用于治疗和其它目的。

[0058] 已经提供了前述的对本发明的说明,用于例证和描述的目的。此外,所述说明不是意在将本发明限制于本文中所公开的形式。因此,与上述教导相应的变体和修饰、以及相关领域的技巧和知识都在本发明的范围内。本文中上述实施方案进一步意在说明已知用于实践本发明的最佳方式并且使本领域技术人员能够以这种或其它实施方案以及在本发明的特定应用或用途所需的各种修饰利用本发明。

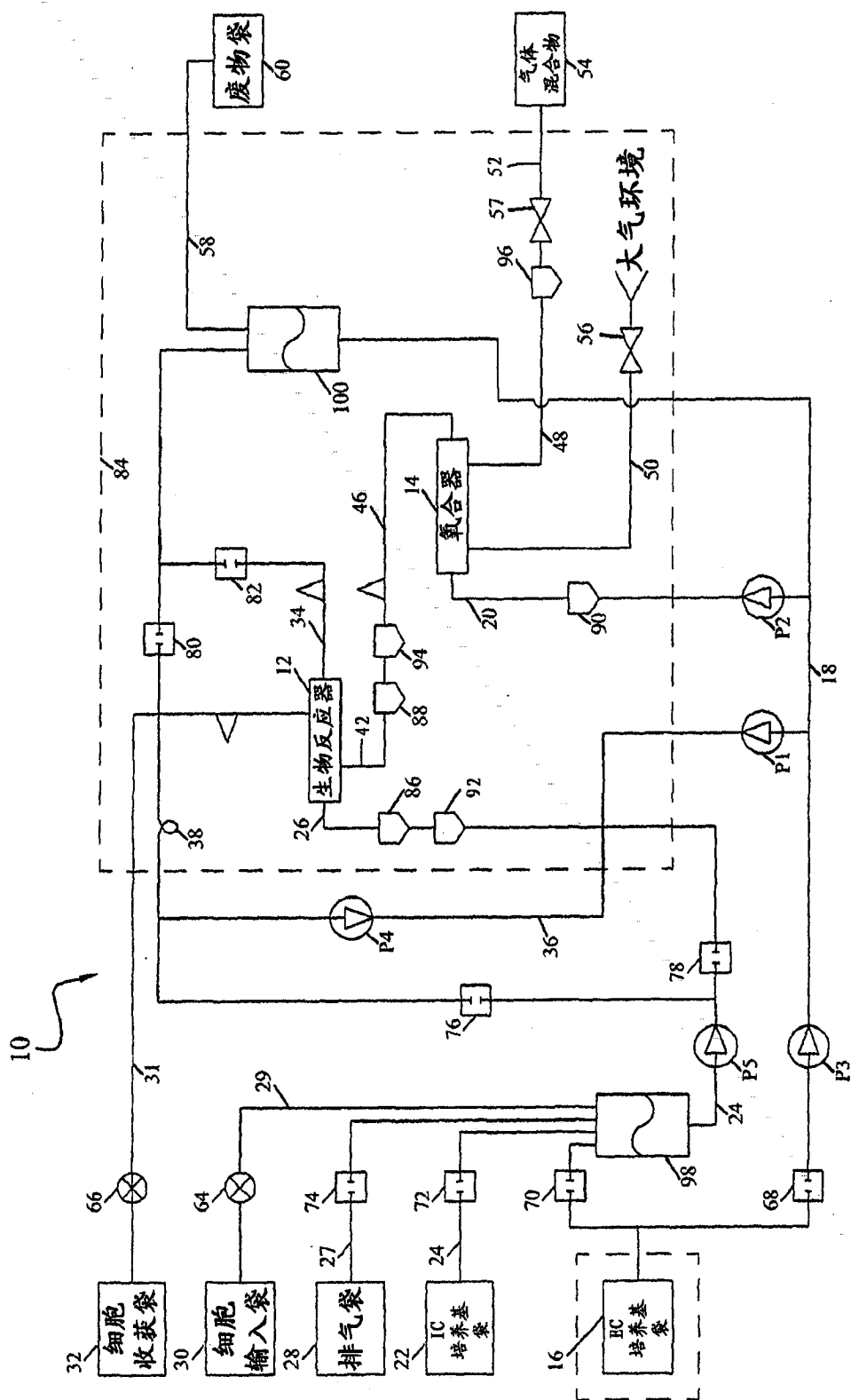


图 1