(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113825831 B
(45)授权公告日 2024.09.17

(21)申请号 202080035626.X
(22)申请日 2020.05.13
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113825831 A
(43)申请公布日 2021.12.21
(30)优先权数据
2019901630 2019.05.13 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2020/050473 2020.05.13
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/227772 EN 2020.11.19

(73)专利权人 纽索思创新有限公司
地址 澳大利亚悉尼
(72)发明人 罗伯特·欧内斯特·诺尔东
奥斯蒙德·孙·殷·劳
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 韩晓帆

(51)Int.Cl.
C12M 3/00(2006.01)
C12M 3/06(2006.01)
(56)对比文件
CN 102612554 A,2012.07.25
CN 106459898 A,2017.02.22
审查员 孙昊

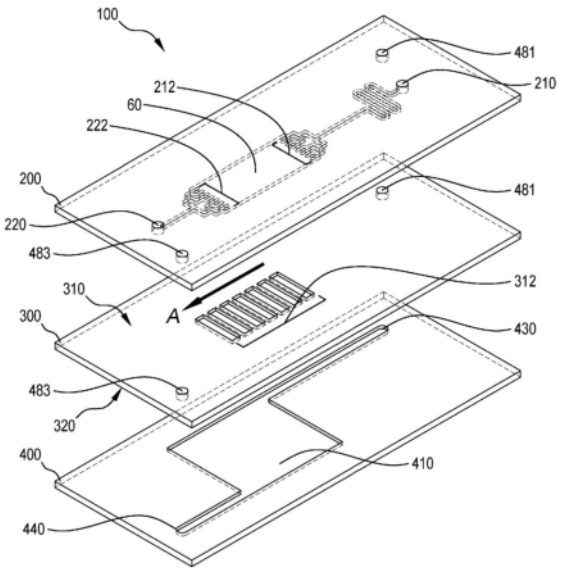
权利要求书3页 说明书38页 附图21页

(54)发明名称

用于细胞培养的微流控装置和方法

(57)摘要

本发明涉及用于培养细胞的多层微流控生物反应器和方法。带凹槽的半透性基底可以使用灌注培养方法来捕获细胞和使细胞生长。微流控几何形状引导流体在凹槽上流动以用于细胞扩增并沿凹槽流动以用于细胞收获。一些实施方案被优化成用于对细胞的生长的高密度和自动化处理。



CN 113825831 B

1.用于细胞培养的多层微流控生物反应器,包括集箱层、基础层和位于所述集箱层与基础层之间的流体可渗透流动层,其中:

(a)所述流动层包含上表面和下表面,并且所述上表面包含用于保留细胞的一个或更多个凹槽;

(b)所述基础层提供用于穿过所述流动层进行气体交换的气体流动路径;以及

(c)所述集箱层被配置成在流动层上表面之上限定流动通道,并且所述集箱层包括:

(i)第一入口端口;

(ii)第一出口端口;

(iii)一个或更多个第一流体入口,其提供所述第一入口端口与流动通道之间的流体连通;以及

(iv)一个或更多个第一流体出口,其提供所述流动通道与第一出口端口之间的流体连通;

其中所述一个或更多个第一流体入口和一个或更多个第一流体出口被定位在所述集箱层中,使得从所述一个或更多个第一流体入口进入所述流动通道的流体以第一流动方向朝向所述一个或更多个第一流体出口移动,所述第一流动方向交叉于所述一个或更多个凹槽以使所述一个或更多个凹槽中接收到的细胞的破坏最小化;

其中交叉于所述一个或更多个凹槽是指,以相对于所述凹槽的纵向尺度在75°至90°的范围内的角度,交叉于所述流动层中的所述凹槽的纵向尺度。

2.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其中所述集箱层包括:

-第二出口端口;以及

-一个或更多个第二流体出口,其提供所述流动通道与第二出口端口之间的流体连通;

其中所述一个或更多个第二流体出口被定位在所述集箱层中,使得通过所述第二出口端口离开所述流动通道的流体以第二流动方向朝向所述一个或更多个第二流体出口流动,所述第二流动方向沿着所述一个或更多个凹槽。

3.根据权利要求2所述的多层微流控生物反应器,其中所述集箱层还包括:

-第二入口端口;以及

-一个或更多个第二流体入口,其提供所述第二入口端口与流动通道之间的流体连通;

其中所述一个或更多个第二流体入口沿着所述集箱的尺度定位,其与所述一个或更多个凹槽的纵向尺度基本上正交,使得从所述一个或更多个第二流体入口进入所述流动通道的流体以所述第二流动方向朝向所述一个或更多个第二流体出口流动。

4.根据权利要求3所述的多层微流控生物反应器,其中所述第二入口端口接收来自一个或更多个介质源的流体,并且所述集箱层包含用于将流体介质接纳到所述第二入口端口中的一个或更多个第二流体通道,并且任选地,

其中所述一个或更多个第二流体通道共线地延伸穿过所述集箱层、流动层和基础层,以形成穿过所述多层微流控生物反应器的垂直通道。

5.根据权利要求2至4中任一项所述的多层微流控生物反应器,其中所述第一流动方向和第二流动方向基本上正交。

6.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其还包含将所述流动通道分隔成第一流动通道和第二流动通道的选择性可渗透膜;其中所述选择性可渗透膜提供低分子量代

谢物的交换。

7.根据权利要求6所述的多层微流控生物反应器,其还包含次级集箱层,其中所述选择性可渗透膜位于所述集箱层与次级集箱层之间,从而形成所述集箱层与次级集箱层之间的第二流动通道,其中所述次级集箱层包含:

(i)与所述第二流动通道流体连通的次级入口端口;以及任选地,

(ii)与所述第二流动通道流体连通的次级出口端口;

其中所述选择性可渗透膜提供进入所述次级入口端口的低分子量流体代谢物的交换,并且任选地,提供通过所述次级出口端口对低分子量流体代谢物的移除。

8.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其中所述一个或更多个凹槽被官能化成限制细胞在所述一个或更多个凹槽中的非特异性结合。

9.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其中所述一个或更多个凹槽用选择性地捕获细胞的捕获试剂官能化。

10.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其中所述一个或更多个凹槽用限制细胞在所述一个或更多个凹槽中的非特异性结合的聚合物官能化。

11.根据权利要求1所述的多层微流控生物反应器,其被配置成用于以堆叠进行布置,所述堆叠包含至少一个另外的多层微流控生物反应器,每个多层微流控生物反应器包含共线地延伸穿过所述集箱层、基础层和流动层中的每一个的一个或更多个贯通端口,并且提供与所述至少一个另外的多层微流控生物反应器的对应贯通端口的流体连通,并且任选地还包含一个或更多个对准特征,用于将至少一个另外的多层微流控生物反应器定位在堆叠的布置中。

12.生物反应器细胞培养系统,其包含:

(a)以堆叠布置的多个根据权利要求1至11中任一项所述的多层微流控生物反应器;

(b)控制器,其被配置成根据存储在控制器的存储器中的细胞培养方案个体控制一个或更多个流体泵的操作,所述一个或更多个流体泵将流体递送至共线地穿过所述至少一个堆叠而提供的一个或更多个贯通端口,所递送的流体根据所存储的细胞培养方案进入所述至少一个堆叠中的每个微流控生物反应器的流动通道。

13.根据权利要求12所述的生物反应器细胞培养系统,其包含以下之一或两者:

(a)所述至少一个堆叠下方的基本刚性的底板;以及

(b)布置在所述至少一个堆叠上的基本刚性的盖板;

其中所述底板和盖板中的每一个对所述至少一个堆叠施加结构支承,并且任选地

其中所述基本刚性的盖板包含多个开口,所述多个开口在一个或更多个堆叠中的贯通端口与一个或更多个流体源和/或废物贮存器之间提供流体连通。

14.根据权利要求12至13中任一项所述的生物反应器细胞培养系统,其中所述控制器可操作地使得通过细胞提取贯通端口从以堆叠布置的各个多层微流控生物反应器的一个或更多个凹槽提取细胞,所述细胞提取贯通端口共线地延伸穿过多层微流控生物反应器堆叠并且与所述各个多层微流控生物反应器中的第二出口端口流体连通,并且任选地还包含用于接收贮存器的联接,所述贮存器用于从一个或更多个微流控生物反应器堆叠无污染地收集提取的细胞。

15.多层生物反应器片,其包含多个根据权利要求1至11中任一项所述的多层微流控生

物反应器,所述多层微流控生物反应器中的每一个包含培养室,所述培养室包含一个或更多个凹槽和一个或更多个贯通端口,所述一个或更多个贯通端口提供交叉于所述一个或更多个凹槽的流体流动,其中所述一个或更多个贯通端口被提供成共线地穿过所述多层生物反应器片的层。

16.根据权利要求15所述的多层生物反应器片,其中每个多层生物反应器片被配置为布置成包含至少一个其他多层生物反应器片的片堆叠,其中所述片堆叠中的每个多层生物反应器片中的贯通端口共线地延伸,提供与每个多层生物反应器片中的各个多层微流控生物反应器的培养室的流体连通。

17.与以片堆叠布置的一个或更多个根据权利要求16所述的多层生物反应器片一起使用的生物反应器细胞培养系统,所述系统包含:

(a)控制器,其根据存储在所述控制器的存储器中的细胞培养方案来单独地控制一个或更多个流体泵的操作;

(b)片堆叠集箱,其提供所述生物反应器细胞培养系统中的至少一个流体或废物贮存器与所述片堆叠中的多个贯通端口之间的流体联接,所述流体联接根据所存储的细胞培养方案要求流向所述至少一个流体或废物贮存器,或者从所述至少一个流体或废物贮存器流出;以及

(c)一个或更多个流体泵,其根据所存储的细胞培养方案将流体经由所述贯通端口递送至所述多层微流控生物反应器的各个培养室。

18.根据权利要求1至11中任一项所述的多层微流控生物反应器、或根据权利要求12至14和17中任一项所述的生物反应器细胞培养系统、或根据权利要求15或16所述的多层生物反应器片用于细胞培养、细胞转染/转导或细胞选择中的用途。

用于细胞培养的微流控装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年5月13日提交的澳大利亚临时专利申请2019901630的优先权,其内容通过引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于细胞培养的微流控生物反应器和方法。本发明特别但不限于涉及用于高密度细胞培养的微流控生物反应器,其允许将多个细胞培养过程集成到单个装置中。

背景技术

[0004] 细胞和基因疗法涉及对从患者血液中提取的细胞进行修饰,并且可以在单次治疗中提供对一些癌症和遗传疾病的治愈。随着细胞和基因疗法从临床概念证明进展到监管批准和产品许可,主要障碍将是患者特异性的治疗的超出规模。据估计,美国和欧盟的细胞和基因疗法市场每年将增长超过200,000次患者特异性治疗。用于用治疗性基因修饰人类细胞的目前方法包括以下步骤:a)从人类血液中纯化血干细胞或免疫细胞;b)使用病毒或非病毒递送系统将治疗性DNA或RNA引入靶细胞;c)通过组织培养若干天使得经转导细胞的有丝分裂活化,以促进病毒进入和稳定的基因组整合。慢病毒载体是临床试验中较常使用的载体之一,因为它们相对安全,对细胞的毒性最小,并且基因转移率高。传统过程涉及对大规模集中制造设施的大量投资,其利用人工、基于烧瓶的培养工艺。这些工艺不仅复杂且劳动密集,而且它们容易出现操作错误,并且由于使用开放式烧瓶而带来污染风险。此外,这些过程不容易扩展到临床疗法。

[0005] 目前在组织培养物中培养细胞的方法由于缺乏扩大规模或由于不利的氧梯度限制了可以生长的细胞的数量,其可能是低效的,特别是对于具有高需氧量的细胞类型,例如肝细胞。这些规模有限的生产过程繁琐且成本高昂。此外,已知的组织培养设备可能因流体剪切应力导致大量介质流中非黏附细胞的损失而是低效的,特别是具有对剪切应力的低耐久性的细胞类型,例如人类胚胎细胞。这可能由于对最大灌注速率的限制而限制细胞可以生长的密度。

[0006] 期望的是,克服或改善以上问题中的一个或更多个,或者至少提供有用的替选方案。

[0007] 本文中包括的本发明的背景的讨论包括对文件、法案、材料、装置、物品等的引用,以解释本发明的上下文。这不应被视为承认或建议所引用的任何材料在任何权利要求的优先权日已公布、已知或属于公知常识。

发明内容

[0008] 从一个方面来看,本公开内容提供了用于细胞培养的多层微流控生物反应器,该多层微流控生物反应器包括集箱(header)层、基础层和在集箱层与基础层之间的流体可渗

透的流动层。流动层包含上表面和下表面,并且上表面包含用于保留细胞的一个或更多个凹槽。基础层提供用于在流动层中进行气体交换的气体流动路径。集箱层被配置成在流动层上表面上限定流动通道,并且集箱层包括:(i)第一入口端口;(ii)第一出口端口;(iii)一个或更多个第一流体入口,其提供第一入口端口与流动通道之间的流体连通;以及(iv)一个或更多个第一流体出口,其提供流动通道与第一出口端口之间的流体连通。一个或更多个流体入口和一个或更多个流体出口位于集箱中,使得从一个或更多个流体入口进入流动通道的流体以第一流动方向朝向一个或更多个流体出口移动,该第一流动方向交叉于至少一个凹槽以使至少一个凹槽中接收到的细胞的破坏最小化。在这样的布置中,细胞和培养基可以进入第一入口端口并流过凹槽,在第一出口端口处以第一流动方向离开,该第一流动方向是横向流动方向。

[0009] 在一些实施方案中,集箱层还包含:第二出口端口;以及一个或更多个第二流体出口,其提供流动通道与第二出口端口之间的流体连通。一个或更多个第二流体出口被定位在集箱中,使得通过第二出口端口离开流动通道的、可能包含留存在一个或更多个凹槽中的细胞的流体以第二流动方向朝向一个或更多个第二流体出口流动,该第二流动方向沿着一个或更多个凹槽。即,第二流体出口沿着与凹槽正交延伸的流动通道的边缘定位。因此,第二流体出口可以被布置在凹槽的端部处,使得细胞和培养基能够以第二流动方向在第二出口端口处离开。通常,第一流动方向和第二流动方向基本上正交。

[0010] 在一些实施方案中,一个或更多个凹槽被官能化成限制细胞在一个或更多个凹槽中的非特异性结合。在一些实施方案中,用限制细胞在一个或更多个凹槽中的非特异性结合的聚合物官能化一个或更多个凹槽。这些聚合物可以物理吸附或共价结合至基底。这些聚合物包括聚乙二醇(PEG)或PEG共聚物,例如普朗尼克(Pluronic)127。用于使表面钝化的其他聚合物包括碳水化合物聚合物(葡聚糖)或两性离子防污聚合物。

[0011] 在一些实施方案中,集箱层还包含:第二入口端口;以及一个或更多个第二流体入口,其提供第二入口端口与流动通道之间的流体连通。一个或更多个第二流体入口沿着与一个或更多个凹槽的纵向尺度基本上正交的流动通道的尺度定位,使得从一个或更多个第二流体入口进入流动通道的流体以第二流动方向朝向一个或更多个第二出口流动。这样的布置允许第一方向上的横向流动(例如,用于培养基的灌注和细胞的播种)和第二方向上的纵向流动(例如,用于细胞的提取)。

[0012] 在一些实施方案中,第二入口端口接收来自一个或更多个介质源的流体,并且集箱包含用于将流体介质接纳到第二入口端口中的一个或更多个第二流体通道。优选地,第二流体通道共线地延伸穿过集箱层、流动层和基础层,以形成穿过多层微流控生物反应器的垂直通道。

[0013] 在一些实施方案中,第一入口端口接收来自一个或更多个培养基源的流体(例如,新鲜细胞和培养基之一或两者),并且集箱包含用于将流体介质接纳到第一入口端口中的一个或更多个第一流体通道。优选地,第一流体通道共线地延伸穿过集箱层、流动层和基础层,以形成穿过多层微流控生物反应器的垂直通道。

[0014] 在一些实施方案中,多层微流控生物反应器还包含将流动通道分隔成第一流动通道和第二流动通道的选择性可渗透膜,其中选择性可渗透膜提供低分子量代谢物的交换。在这样的布置中,多层微流控生物反应器还可以包含次级集箱,其中流体可渗透膜位于集

箱与次级集箱之间,从而形成集箱与次级集箱之间的第二流动通道。次级集箱包含:(i)与第二流动通道流体连通的次级入口端口;以及任选地,(ii)与第二流动通道流体连通的次级出口端口。选择性可渗透膜提供进入第二入口端口的低分子量流体代谢物的交换,并且任选地,提供通过次级出口端口对低分子量流体代谢物的移除。

[0015] 在一些实施方案中,集箱包含多个结构柱,其被配置成抵靠邻接流动层上表面。替选地/另外地,基础层可以包含以下之一或两者:(i)多个结构柱,被配置成抵靠邻接流动层下表面;以及(ii)壁部分或多个壁部分。

[0016] 在一些实施方案中,多层微流控生物反应器包含用于调节流动通道中的流的一个或更多个流动阻力器。流动阻力器可以被设置在生物反应器的任何方便的位置中,并且可以被布置在流动阻力器调节的流的上游或下游。通常,一个或更多个流动阻力器以蛇形的流动路径的形式被设置在集箱层中,该蛇形的流动路径的长度决定阻力的大小。

[0017] 在一些实施方案中,多层微流控生物反应器被配置成布置在包含至少一个另外的多层微流控生物反应器的堆叠中。堆叠中的每个多层微流控生物反应器包含一个或更多个贯通端口,该一个或更多个贯通端口在使用中共线地并且通常垂直地延伸穿过集箱层、基础层和流动层中的每一个,并且提供与至少一个另外的多层微流控生物反应器的对应贯通端口的流体连通。在一些这样的布置中,提供一个或更多个对准特征以用于以堆叠的布置定位至少一个另外的多层微流控生物反应器。

[0018] 从另一方面来看,本公开内容提供了与如本文所公开的多个多层微流控生物反应器一起使用的生物反应器细胞培养系统,所述多个多层微流控生物反应器以至少一个堆叠布置。该系统包含控制器,该控制器被配置成根据存储在控制器的存储器中的细胞培养方案个体控制一个或更多个流体泵的操作,一个或更多个流体泵将流体递送至共线地穿过至少一个堆叠提供的一个或更多个贯通端口,所递送的流体根据所存储的细胞培养方案进入至少一个堆叠中的每个微流控生物反应器的流动室。

[0019] 在一些实施方案中,控制器包括与控制器存储器和用户接口通信联接的处理器,其中存储器存储用于执行一个或更多个细胞培养方案的指令,并且指令在由处理器执行时使控制器操作生物反应器细胞培养系统来执行一个或更多个细胞培养方案。处理器可以被配置成直接或远程例如经由基于云的服务器并行地控制多个细胞培养过程。

[0020] 在一些实施方案中,生物反应器细胞培养系统包含以下之一或两者:(a)在至少一个堆叠下方的基本上刚性的底板;以及(b)被布置在至少一个堆叠上的基本上刚性的盖板。理想地,底板和盖板中的每一个都向至少一个堆叠赋予结构支承。

[0021] 在一些实施方案中,基本刚性的盖板包含多个开口,多个开口在一个或更多个堆叠中的贯通端口与一个或更多个流体源和/或废物贮存器之间提供流体连通。通过盖板,来自多个堆叠的端口可以收集到用于连接至所需流体源和/或废物贮存器的公共通道中。

[0022] 通常,生物反应器细胞培养系统包含与一个或更多个流体源流体连通的一个或更多个泵,其中一个或更多个泵由控制器操作以根据一个或更多个细胞培养方案将流体递送至单独的盖板开口。

[0023] 在一些实施方案中,生物反应器细胞培养系统包括用于以堆叠布置将多层微流控生物反应器对准的一个或更多个导引特征。

[0024] 在一些实施方案中,控制器可操作以使细胞通过细胞提取贯通端口从以堆叠布置

的各个多层微流控生物反应器的一个或更多个凹槽中回收,该细胞提取贯通端口共线地延伸,通常在使用中垂直地延伸穿过多层微流控生物反应器的堆叠,并且与各个多层微流控生物反应器中的第二出口端口流体连通。还可以提供用于接收贮存器的联接,该贮存器用于从一个或更多个微流控生物反应器堆叠中未受污染收集提取的细胞。

[0025] 从另一方面来看,本公开内容提供了一种包含多个多层微流控生物反应器的多层生物反应器片。多层微流控生物反应器中的每一个包含培养室,该培养室包含一个或更多个凹槽以及一个或更多个贯通端口,该一个或更多个贯通端口提供交叉于一个或更多个凹槽的流体流动,其中提供共线地穿过多层生物反应器片的各层的一个或更多个贯通端口。

[0026] 在一些实施方案中,每个多层生物反应器片被配置成用于布置成包括至少一个其他多层生物反应器片的片堆叠,其中片堆叠中的每个多层生物反应器片中的贯通端口共线地延伸,通常在使用中垂直地延伸,这提供与每个多层生物反应器片中的各个多层微流控生物反应器的培养室的流体连通。

[0027] 从另一方面看,本公开内容提供了一种与如本文公开的以片堆叠布置的一个或更多个多层生物反应器片一起使用的生物反应器细胞培养系统,该系统包含:(a)控制器,其用于根据存储在控制器的存储器中的细胞培养方案来单独地控制一个或更多个流体泵的操作;(b)片堆叠集箱,其提供生物反应器细胞培养系统中的至少一个流体或废物贮存器与片堆叠中的多个贯通端口之间的流体联接,该流体联接根据所存储的细胞培养方案要求流向至少一个流体或废物贮存器,或从至少一个流体或废物贮存器流出;以及(c)一个或更多个流体泵,其根据所存储的细胞培养方案将流体经由贯通端口递送至多层微流控生物反应器的各个培养室。

[0028] 本文中还公开了一种与一个或更多个多层微流控生物反应器一起使用的生物反应器细胞培养系统,该系统包括:控制器,其用于根据存储在控制器的存储器中的细胞培养方案来单独地控制一个或更多个流体泵的操作;联接集箱,其提供了该生物反应器细胞培养系统中的至少一个流体或废物贮存器与一个或更多个多层微流控生物反应器的流体端口之间的流体联接,该流体联接根据所存储的细胞培养方案要求流向至少一个流体或废物贮存器,或从该至少一个流体或废物贮存器流出;以及一个或更多个流体泵,其根据所存储的细胞培养方案将流体经由流体端口递送至一个或更多个多层微流控生物反应器;其中该系统被配置成与一个或更多个多层微流控生物反应器一起使用,该多层微流控生物反应器包括一个或更多个凹槽以及一个或更多个贯通端口,该一个或更多个贯通端口提供交叉于一个或更多个凹槽的流体流动。

[0029] 应当理解,本文中描述的各个方面中的每一个可以结合在一个或更多个其他方面的上下文中描述的特征、修改和替选方案。例如,所公开的方法的过程可以结合本文中公开的生物反应器的一些实施方案的特征,并且这样的生物反应器的特征可以提供其他地方公开的方法的过程的执行。为效率起见,这样的特征、修改和替选方案并未针对每个以及每一方面重复公开,尽管本领域技术人员将理解,针对一些方面公开的这样的特征、修改和替选方案的组合类似地适用于其他方面并且在本公开内容的的主题的范围和组成部分的范围内。

[0030] 本公开内容还提供了一种培养细胞的方法,该方法包括:

[0031] 提供微流控装置,该微流控装置包含具有基本上平行的凹槽阵列的基底;

[0032] 将细胞引入凹槽中的一个或更多个中;提供培养基以交叉于凹槽的第一流动方向在凹槽阵列上流动;以及

[0033] 在例如支持细胞生存力、生长或分化的条件下培养细胞。

[0034] 有利地提供培养基以交叉于凹槽的第一流动方向流动(横向流动)允许细胞保留在一个或更多个凹槽中,同时维持细胞生存力,支持细胞生长和/或细胞分化。

[0035] 培养基流取决于细胞的数量并且可以以相当于每天每百万个细胞0.2mL至5mL的流量来提供,例如以每天每百万个细胞至少0.3mL、至少0.4mL、至少0.5mL、至少0.6mL、至少0.7mL、至少0.8mL、至少0.9mL、至少1mL、至少1.1mL、至少1.2mL、至少1.3mL、至少1.4mL、至少1.5mL、至少1.6mL、至少1.7mL、至少1.8mL、至少1.9mL、至少2mL、至少2.5mL、至少3mL、至少3.5mL、至少4mL、至少4.5mL、至少5mL的流量来提供。在一个示例中,流量相当于每天每百万个细胞0.5mL至1.5mL,例如每天每百万个细胞1mL。

[0036] 在一个示例中,该装置可以配置有培养基入口端口和培养基出口端口,并且平均入口速度被设置在例如0.18mm/分钟至0.3mm/分钟,或在0.2mm/分钟至0.27mm/分钟,例如设置为约0.22mm/分钟或0.23mm/分钟。随着细胞分裂和扩张,入口速度可以提高。在一个示例中,在细胞培养的第3天,入口速度提高至少40%至60%,例如提高50%。

[0037] 在一些实施方案中,细胞通过以第一流动方向在凹槽阵列上的流而被引入一个或更多个凹槽中。在另一个或另外的一些实施方案中,细胞通过沿着一个或更多个凹槽的第二流动方向流动而被引入一个或更多个凹槽中。

[0038] 在一个示例中,该装置可以配置有细胞入口端口和细胞出口端口。细胞可以通过从细胞入口端口的流被引入装置中并且允许在静态(例如,出口端口关闭的情况下)或流动(出口端口打开以允许介质流出装置的情况下)的条件下沉积到一个或更多个凹槽(通过沉降)中。

[0039] 本领域技术人员将理解,要引入或装载到装置中的细胞数量将根据装置容量而变化。在一个示例中,1×10^{8}至1×10^{10}个细胞可以以例如50mL至200mL来装载。

[0040] 在一些实施方案中,将细胞培养1至14天,例如1至10天、1至7天、1至5天、1至3天或1至2天。

[0041] 在一些实施方案中,该方法还包括:通过提供提取介质流来收获培养的细胞以例如提高剪切应力以便使细胞从凹槽中移位并促进细胞回收/收获。通常,由于沿凹槽底部的剪切力增大,提高流量将提高提取性能。例如,可以在至少0.1达因/cm^2、至少0.2达因/cm^2、至少0.3达因/cm^2、至少0.4达因/cm^2、至少0.5达因/cm^2、至少0.6达因/cm^2、至少0.7达因/cm^2、至少0.8达因/cm^2、至少0.9达因/cm^2、至少1达因/cm^2、例如以约0.8达因/cm^2的剪切应力下提供提取介质流。

[0042] 在一些实施方案中,通过以第一流动方向在凹槽阵列上的流来收获细胞。在另一或另外的一些实施方案中,通过沿着一个或更多个凹槽的第二流动方向的流来收获细胞。有利地,以第二流动方向的流可以提高细胞生存力和/或产量。

[0043] 在一个实施方案中,装置可以配置有细胞提取介质入口端口和细胞提取介质出口端口并且平均提取介质入口速度被设置在例如至少10mm/分钟、至少15mm/分钟、至少20mm/分钟,至少25mm/分钟、至少30mm/分钟、至少35mm/分钟、至少40mm/分钟、至少45mm/分钟、至少50mm/分钟、至少55mm/分钟、至少60mm/分钟、至少65mm/分钟、至少70mm/分钟、至少75mm/

分钟、至少80mm/分钟、至少85mm/分钟、至少90mm/分钟、至少95mm/分钟、至少100mm/分钟、至少105mm/分钟、至少110mm/分钟、至少115mm/分钟、至少120mm/分钟、至少125mm/分钟、至少130mm/分钟、至少135mm/分钟、至少140mm/分钟、至少145mm/分钟或至少150mm/分钟。例如,在10mm/分钟至200mm/分钟,或在10mm/分钟至150mm/分钟,例如以约70mm/分钟、约71mm/分钟、约72mm/分钟、约73mm/分钟、约74mm/分钟、约75mm/分钟、约76mm/分钟、约77mm/分钟、约78mm/分钟、约79mm/分钟或约80mm/分钟。

[0044] 本公开内容还提供了一种转染/转导细胞的方法,该方法包括:

[0045] 提供微流控装置,该微流控装置包括具有基本上平行的凹槽阵列的基底;

[0046] 将细胞引入凹槽中的一个或更多个;提供至少一种外源分子以交叉于凹槽的第一流动方向在凹槽阵列上的流;以及

[0047] 在用外源分子转染/转导细胞的条件下孵育细胞与至少一种外源分子。

[0048] 有利地提供至少一种外源分子(例如,病毒载体)以交叉于凹槽阵列的第一流动方向流动(横向流动)允许将细胞保留在一个或更多个凹槽中,同时将外源分子递送至在凹槽中接收到的细胞。该方法可以通过克服现有系统的扩散限制来使得要提供的外源分子(例如,病毒载体)显著减少。

[0049] 在一些实施方案中,细胞通过以第一流动方向在凹槽阵列上的流而被引入一个或更多个凹槽中。

[0050] 在一些实施方案中,该方法还包括:提供介质流以从凹槽中冲洗过量的外源分子。在另一或另外的一些实施方案中,该方法包括:提供培养基流。在一些实施方案中,培养基流是在第一流动方向上的。

[0051] 在一些实施方案中,该方法还包括:在提供外源分子之前培养细胞,从而以例如扩增靶细胞的数量和/或活化细胞以表达一种或更多种抗原(例如,细胞表面受体),进而以例如促进病毒载体摄取。

[0052] 在另一或另外的一些实施方案中,该方法包括:培养经转染/转导的细胞,例如扩增经转染/转导的细胞的数量。

[0053] 在一些实施方案中,该方法还包括:通过提供提取介质流来收获经转染/转导的细胞。在一些实施方案中,提取介质通过以第二流动方向即沿着凹槽的流来提供。

[0054] 通常,第一流动方向和第二流动方向基本上正交,但这并非必须是这样的情况。

[0055] 本公开内容还提供了一种从样品中选择细胞的方法,该方法包括:

[0056] 提供微流控装置,该微流控装置包含具有基本平行的凹槽阵列的基底,其中凹槽包含固定在其上的选择性捕获细胞的捕获试剂;以及

[0057] 在用所固定的捕获试剂选择性地捕获细胞的条件下,通过沿一个或更多个凹槽的流将细胞引入所述一个或更多个凹槽中。

[0058] 在一个示例中,该装置可以配置有细胞入口端口和细胞出口端口并且平均入口速度被设置在例如至少5mm/分钟至110mm/分钟、至少5mm/分钟至50mm/分钟、至少5mm/分钟至25mm/分钟,例如约20mm/分钟、约21mm/分钟或约22mm/分钟。

[0059] 在一个或另外的示例中,可以在约0.2达因/cm^2的剪切应力下提供细胞流动。在一个或另外的示例中,可以在设置为例如至少0.05达因/cm^2至1.14达因/cm^2、至少0.05达因/cm^2至0.52达因/cm^2、至少0.05达因/cm^2至0.26达因/cm^2、例如约0.21达因/cm^2、0.22达因/

cm^2、0.23达因/cm^2的剪切应力下提供细胞流。

[0060] 在一些实施方案中,该方法还包括:将捕获试剂固定到凹槽。例如,该方法包括:

[0061] 通过向凹槽流动来提供细胞捕获试剂(例如,抗体);以及

[0062] 将所述凹槽阵列与细胞捕获试剂孵育足够时间段,以使得所述捕获试剂与凹槽的表面结合。

[0063] 在一些实施方案中,捕获试剂通过以交叉于凹槽的横向方向(transverse direction)在凹槽阵列上流动来提供。

[0064] 在一个示例中,该装置可以配置有捕获试剂入口端口和捕获试剂出口端口,并且平均入口速度被设置在例如至少0.001mm/分钟至30mm/分钟、至少5mm/分钟至30mm/分钟、至少5mm/分钟至20mm/分钟、至少5mm/分钟至10mm/分钟、例如约5mm/分钟、约6mm/分钟、约7mm/分钟或约8mm/分钟。

[0065] 在一些实施方案中,该方法还包括:封闭凹槽的表面上的反应基团。例如,该方法包括:

[0066] 通过向凹槽的流来提供封闭试剂(例如,普朗尼克F-127);以及

[0067] 将凹槽阵列与封闭试剂孵育足够长的时间段,以封闭反应基团,例如,以防止细胞非特异性地留存在凹槽中。

[0068] 在一些实施方案中,封闭试剂通过交叉于凹槽的流(横向流动)来提供。

[0069] 在一个示例中,该装置可以配置有封闭试剂入口端口和封闭试剂出口端口并且平均入口速度被设置在例如至少0.001mm/分钟至30mm/分钟、至少5mm/分钟至30mm/分钟、至少5mm/分钟至20mm/分钟、至少5mm/分钟至10mm/分钟、例如约3mm/分钟、约4mm/分钟或约5mm/分钟。

[0070] 在一些实施方案中,该方法还包括:通过提供提取流体的流来收获未结合的细胞。在一些实施方案中,提取流体通过沿凹槽的流来提供。提取流体可以是细胞培养基。

[0071] 在一个或另外的一些实施方案中,该方法还包括:提供介质流以从凹槽中冲洗未结合的细胞。在一些实施方案中,洗涤介质通过沿凹槽的流来提供。在替选或另外的一些实施方案中,洗涤介质通过以交叉于凹槽的方向在凹槽阵列流动来提供。

[0072] 在一个或另外的一些实施方案中,该方法还包括:提供培养基流,例如以维持细胞生存力或者使细胞生长。在一些实施方案中,培养基通过沿凹槽的流来提供。在替选或另外的实施方案中,培养基通过以交叉于凹槽的方向在凹槽阵列上流动来提供。在一个实施方案中,该方法还包括:通过提供提取介质流来收获经转染/转导的细胞。在一些实施方案中,提取介质通过沿凹槽的流来提供。

[0073] 在一些实施方案中,该方法还包括:例如,使用木瓜蛋白酶或神经氨酸酶从捕获试剂释放结合的细胞,以从抗体捕获试剂释放结合的细胞。这样的试剂可以通过沿凹槽或交叉于凹槽的流来提供。在一些实施方案中,该方法还包括:培养所释放的细胞。

[0074] 在一些实施方案中,该方法还包括:用外源分子转染/转导细胞。在一些实施方案中,例如,在释放结合的细胞之后,外源分子通过以交叉于凹槽的流方向的流来提供。应当理解,如果细胞被结合,则可以通过沿凹槽的流来提供外源分子。

[0075] 在一些实施方案中,第一流动方向与一个或更多个凹槽的纵向尺度基本上正交。

[0076] 有利地,本公开内容的方法允许整合细胞选择(例如,使用抗体)、基因转导和细胞

扩增。

[0077] 在一些实施方案中,基底是气体可渗透的,并且该装置包括用于穿过基底交换气体的一个或更多个气体流动路径。在一个实施方案中,一个或更多个气体流动路径位于气体可渗透的基底下方。有利地,该配置允许高密度细胞培养,克服了现有系统的扩散限制。

[0078] 在一些实施方案中,一个或更多个气体流动路径连接至外部气体供应部。

[0079] 在一些实施方案中,本公开内容的方法还包括:例如在将细胞引入装置之前用气体填充一个或更多个气体路径。

[0080] 在一些实施方案中,本公开内容的方法还包括:用培养基填装装置。

[0081] 在一些实施方案中,本公开内容内容的方法还包括:对装置加压以通过扩散移除滞留的气泡。这是由流体与气体路径之间的气体压力差驱动的。

[0082] 本文中还公开了一种用于细胞培养的微流控生物反应器,该微流控生物反应器包含:流动层,其包含至少一个流体流动膜,该流体流动膜包含被配置成用于保留培养的细胞并且垂直于流体的轴向流动定位的至少一个凹槽;集箱,其被配置成引导流体在至少一个流动层的顶层上流动,并且包含与至少一个流动层流体连通的至少一个流体入口以及与至少一个流动层流体连通的至少一个流体出口;以及基础层,其密封到集箱并且被配置成引导流体在培养细胞的底侧上的流。

[0083] 在一些实施方案中,至少一个入口包含针对新鲜细胞培养基的至少一个细胞培养基入口、针对使用过的细胞培养基的至少一个细胞培养基出口、用于新鲜气体的至少一个气体入口和针对废气的至少一个气体出口。

[0084] 在一些实施方案中,用于细胞培养的微流控生物反应器还包含细胞提取/注射端口,该细胞提取/注射端口与至少一个流体入口流体连接并且被配置成用于注射或摄取介质和细胞。

[0085] 在一些实施方案中,至少一个流体流动膜包含被配置成用于气体交换的疏水膜和用于交换低分子量代谢物的透析膜。在一些实施方案中,术语“低分子量”是指基本上小于10,000道尔顿的分子,例如废物(氨、乳酸)或代谢基质(葡萄糖、氨基酸)。

[0086] 在一些实施方案中,可以独立地控制集箱和基础层中的流体流量。以这种方式,可以使介质的消耗最小化以提高成本效率并使生长效率最大化以提高细胞产量。

[0087] 在一些实施方案中,流体流动膜包含半透性带凹槽的基底,其用于在灌注培养期间捕获非黏附细胞类型并交换气体和代谢物并且垂直于流体的轴向流动定位。可以将半透性带凹槽的基底密封在用于气体交换的表面改性疏水膜(由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制造)之间。在一些实施方案中,可以提供选择性可渗透膜,例如透析膜(例如,再生纤维素、聚砜或含有聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的聚合物共混物),以利用流动通道交换低分子量代谢物例如废物(氨、乳酸盐)或代谢营养物(葡萄糖、氨基酸等),使得细胞可以以高密度(例如,比标准组织烧瓶培养高100倍)生长。

[0088] 本文中还公开了一种生产设备,该生产设备包含并联流体连接的如上所述的用于细胞培养的多个微流控生物反应器。

[0089] 此外,还公开了一种生产培养细胞的方法,该方法包括以下步骤:将培养的细胞的悬浮液引入如上所述的用于细胞培养的微流控生物反应器中;以及在细胞介质中培养细胞并使氧气通过生物反应器。

[0090] 在本发明的范围内,本文描述的任何特征可以与本文中描述的任何一个或更多个其他特征以任何组合方式组合。

[0091] 本公开内容的一些实施方案涉及用于可扩展细胞制造过程的多层微流控生物反应器设计和过程,用于递送细胞和基因疗法。本公开内容的一些实施方案提供了在封闭系统内的细胞选择、基因转移和培养扩增的自动化,其可以成本有效地扩展用于临床治疗。带凹槽的半透性基底可以使用灌注培养方法来捕获细胞和使细胞生长;微流控几何形状引导在用于细胞扩增培养的凹槽上的流,以及通常沿用于细胞收获或细胞选择的凹槽的流;并且,使用微流控设计的一些实施方案使整合细胞选择(使用单克隆抗体)、基因转导和细胞扩增过程成为可能。本公开内容的一些实施方案提供了一种针对哺乳动物细胞在细胞培养基中的高密度和自动化生长而优化的多层微流控生物反应器。

附图说明

[0092] 现在将参照附图更详细地描述本发明。应当理解,所示的一些实施方案仅是示例性的,并且不应被视为限制如所附权利要求中所限定的本发明的范围。

[0093] 图1是根据一个实施方案的多层微流控生物反应器的分解示意图,其示出了流体在第一流动方向A(横向流动)上的横向流动。

[0094] 图2是图1的生物反应器的截面示意表示。

[0095] 图3是提供在第一流动方向A上和第二流动方向B(纵向流动)上的流的生物反应器的分解示意图。

[0096] 图4示出了根据本公开内容的实施方案的生物反应器集箱层的下表面(下侧)。

[0097] 图5是图4中的集箱层的右下角的放大等距视图。

[0098] 图6是包括选择性可渗透膜并且其中存在横向流动的生物反应器的分解示意图。

[0099] 图7是图6中的装置的截面示意表示。

[0100] 图8是包括选择性可渗透膜并且其中存在横向流动和纵向流动的生物反应器的分解图。

[0101] 图9是根据本公开内容的另一实施方案的生物反应器的分解图。

[0102] 图10是图9中的基础层的右下角的放大等距视图。

[0103] 图11A和图11B分别以分解图和组装图示出了以堆叠布置的多个生物反应器。

[0104] 图12A至图12C是根据本公开内容的实施方案的盖板的等距视图、顶视图和侧视图。

[0105] 图13是根据一个示例的对流动、氧气和葡萄糖进行建模的模拟输出。

[0106] 图14是根据一个示例的对在24至250秒内到凹槽中的细胞沉积进行建模的模拟输出。

[0107] 图15是根据一个示例的对慢病毒的运输进行建模的模拟输出。

[0108] 图16示出了根据一个示例的来自流动阻力器的校准的数据。

[0109] 图17示出了当流动从左入口进入并在凹槽上行进(图17A)时或当流动从上部入口进入并沿凹槽行进(图17B)时模拟的三维流动。

[0110] 图18是根据本公开内容的实施方案的包含多个生物反应器的多层片的平面图。

[0111] 图19是根据实施方案的生物反应器的示意图,其分别示出了用于细胞装载、用于

扩增的介质灌注和细胞提取的阀门控制。

[0112] 图20示出了Raji H2B-GFP细胞在本公开内容的生物反应器的凹槽中的生长。

[0113] 图21示出了具有凹槽横流灌注的Raji H2B-GFP的扩增。

[0114] 图22示出了通过横流对Raji H2B GFP细胞的不完全回收。

[0115] 图23示出了根据本公开内容的实施方案的TF1a-H2B-GFP在生物反应器中的扩增。TF1a-H2B-GFP细胞的荧光图像示出14天内的扩增。

[0116] 图24示出了本公开内容的生物反应器的用于用GFP转导Jurkat细胞并随后扩增的用途。

[0117] 图25示出了流式细胞术,其示出了GFP在Jurkat细胞中的表达;对照(左),之后是转导和扩增(右)。

[0118] 图26示出了如图19所示的生物反应器,包括用于Jurkat细胞的病毒转导的阀门和介质贮存器。

[0119] 图27示出了与图26所示的生物反应器一起使用的微流控回路。

[0120] 图28示出了普朗尼克F127表面活性剂的结构。

[0121] 图29示出了在纵向流动期间基底化学对CD3+细胞在凹槽中的选择性结合的影响。图29A)抗CD3 moAb物理吸附之前的普朗尼克F127。图29B)未经普朗尼克F127治疗的抗CD3 moAb。图29C)物理吸附抗CD3 moAb之后的普朗尼克F127。

[0122] 图30示出了CD3+或CD34+细胞的特异性捕获。

[0123] 图31示出了细胞释放酶(神经氨酸酶)对细胞分离和培养的影响。

具体实施方式

[0124] 首先参照图1,示出了根据本公开内容的实施方案的提供用于细胞培养的多层微流控生物反应器(“生物反应器”)100的分解示意图。生物反应器100包括集箱层200、基础层400和位于集箱层与基础层之间的流体可渗透流动层300。

[0125] 流动层300包括上表面310和下表面320,并且上表面包括至少一个且通常为若干凹槽312,其在流动层上表面中形成用于保留细胞50的凹槽阵列(图2)。基础层400例如通过结合至围绕流动层300的基础层法兰直接密封至集箱层200,或通过将生物反应器的三层中的每一层结合在一起而间接地密封至集箱层200。基础层400提供气体流动路径410,用于在气体可渗透流动层300中进行气体交换。呼吸气体(空气+10%CO_2)通过气体入口端口430进入气体流动路径410并且呼出气体通过气体出口端口440逸出。

[0126] 由于流动层300是气体可渗透的,因此气体流动路径410中的气体灌注通过带凹槽的层,在该带凹槽的层处气体流动路径410中的气体与保留在流动通道60中的细胞50交换。此外,包含在通过流动通道60循环的介质内的气体也被细胞50吸收。

[0127] 集箱层200具有第一入口端口210,该第一入口端口210将一个或更多个第一流体入口212供给至流动通道60,该流动通道60形成在集箱300的下表面320与流动层的上表面之间。因此,凹槽312形成细胞50在其中沉积和生长的介质室的底部。通常,第一入口端口210促进细胞和培养基通过第一入口212的递送。位于流动通道60的相对侧的一个或更多个第一流体出口222提供与第一出口端口220的流体连通,第一出口端口220被提供以促进废物流体的移除。在一些实施方案中,细胞收获也可以经由出口端口220发生。

[0128] 第一流体入口212和第一流体出口222被定位在集箱中,使得进入流动通道60的流体在第一流动方向A上从流体入口朝向流体出口移动,使得流被引导交叉于凹槽312。该横向流动方向可以用于将细胞装载到一个或更多个凹槽312中。细胞通过流动被引入流动通道60中,并且甚至在流动条件下,由于细胞和周围流体的密度差异而通过沉降沉积到一个或更多个凹槽中。细胞沉积在低剪切应力的区域,并且甚至在流动条件下,也通过沉积和流体动力留存在那里。可以交叉于凹槽312的顶部提供细胞培养基,以提供用于细胞代谢的营养物和生长因子并且移除由留存在其中的细胞生成的废物而不使细胞移位。

[0129] 流量调节细胞到凹槽312中的运输和沉积。在一个示例中,横向流量使得通过横向流动引入的细胞沉积到流体入口附近的一个或更多个凹槽312中。技术人员将理解,细胞沉积也将是细胞大小和细胞密度以及携带它们的流体的性质的函数。类似地,凹槽内的细胞保留受细胞浓度和流量控制。雷诺数和装置几何形状(例如,凹槽深度)也会影响细胞保留。雷诺数与横向流速成正比,并且与板分离成反比。在横向流动期间,细胞在装置中的保留将取决于凹槽的底部的流动再循环的体积,这可以通过流体动力学模拟来确定。当细胞扩增以填充凹槽时,它们将从凹槽移位,流动交叉于流动通道60并通过沉降沉积到相邻凹槽中,直到凹槽阵列被填充。

[0130] 在图1和图2所示的布置中,流动在方向A上,或者是交叉于流动层300中的凹槽312的纵向尺度的“横向流动”。通常,该横向流动与凹槽312的纵向尺度正交(90°),但也预期横向流动不需要精确地正交以实现使用横向流动递送细胞和培养基的有益效果。在一些实施方案中,横向流动的角度相对于凹槽的纵向尺度在大约75°至90°的范围内,优选地在大约80°至90°,更优选地大约85°至90°的范围内。在一些实施方案中,横向流动相对于凹槽的纵向尺度为约90°。

[0131] 图3是根据本公开内容内容的另一实施方案的生物反应器100的分解示意图,其提供第一流动方向A(横向流动)上的流和第二流动方向B(纵向流动)上的流,该第二流动方向B对应于凹槽312的纵向尺度。此处,集箱层200另外包括第二入口端口330,该第二入口端口330将一个或更多个第二流体入口332供给至流动通道60。一个或更多个第二流体出口342位于流动通道60的与第二流体入口332相对的一侧处,并且提供与第二出口端口340的流体连通,该第二出口端口340被提供用于从流动通道移除细胞。在图3所示的实施方案中,第一入口端口210将包含细胞和培养基的流体递送到流动通道60中,经由第一出口端口220移除废物并经由第二流体入口端口330递送细胞提取流体(本文中也称为“提取介质”)以沿凹槽312洗涤培养的细胞,以便通过第二流体出口342和第二流体出口端口340移除。然而,应当理解,不需要提供第二入口端口330,并且第一流体入口端口210可以另外递送用于沿凹槽312洗涤培养的细胞的细胞提取流体,以便通过第二流体出口342和第二流体出口端口340移除。在两种布置中,经由第二流体出口端口340移除细胞是以纵向流动方向沿着凹槽312B,使得细胞能够效地从凹槽移位,以便通过第二流体出口342移除。

[0132] 为清楚起见,图4中呈现了示出横向流动和纵向流动两者的另外的一些实施方案,其示出了集箱层200的下表面或下侧。第二出口端口340经由一个或更多个第二流体出口342与流动通道60流体连通。在所示的实施方案中,成对的第二流体出口342连接以形成流体流动路径,该流体流动路径继而连接来自呈分支布置的相邻的成对流体出口的流体流动路径,其最终用第二出口端口340连接所有流体出口342。在这种布置中,可以通过沿凹槽

312在第二流动方向B(纵向流动)上的流来实现细胞50的移除。以与图3中所示的实施方案类似的方式,包括细胞和培养基的流体可以经由第一入口端口210进入,其中细胞传递通过并进入凹槽312,流动通道中的培养基在方向A上流动。在细胞培养过程的结尾处,可以通过第二出口端口340移除细胞,使得培养的细胞沿凹槽312移位到第二出口端口340。沿凹槽312的层流将保留的细胞50朝向第二出口端口340移位,因此它们可以被收集在密封的容器中以从生物反应器中移除。

[0133] 如本领域技术人员将理解的,本文在“入口端口”和“出口端口”的上下文中使用的术语“端口”应当广义地解释为流动路径的一部分,该流动路径提供流体相对于流动通道60的流入或流出。例如,第一流体入口端口210可以被设置为孔(图1),该孔通过管等(未示出)与第一流体源直接流体联接(fluid coupling)而提供流体的流入。替选地,第一流体入口端口210可以被设置为流体流动路径中的接头(图4),其提供流体通过与第一通孔381、382流体连通的更间接的流体通路的流入。

[0134] 图3中还示出了与一个或更多个第二流体入口332流体连通的第二入口端口330,其提供了与流动通道60的流体连通。一个或更多个第二流体入口332沿集箱的尺度定位,该集箱的尺度与一个或更多个凹槽312的纵向尺度正交,使得从一个或更多个第二流体入口332进入流动通道60的流体在第二流体方向B上朝向一个或更多个第二流体出口342流动。在图5中呈现了集箱层下侧(图4)的右下角的放大等距视图,其示出了流体流动通道从第二入口端口330起的6层分叉,最终经由第二流体入口332开口到流动通道60中。类似地,图5示出了通过分层接头连接的流体连通的第一流体出口222,形成最终提供通向第一出口端口220的公共流体通路的树形结构。

[0135] 图4和图5中还示出了结构柱250,其在一些实施方案中被设置在集箱200的下侧。结构柱250被配置成抵靠邻接流动层上表面310,位于围绕凹槽312并且跨越在凹槽312之间的基底上。在某些实施方案中,集箱层200、流动层300和基础层400中的一个或更多个可以由诸如硅橡胶(PDMS)的弹性材料制造。结构柱250可以并入到集箱200的设计中以施加结构支承以确保在使用期间流动通道60和凹槽312的通畅。在一些实施方案中,集箱层200和/或基础层400可以由热塑性材料制造,其提供较大的刚性并且因此可以需要较少的结构柱以确保在使用期间流动通道60和凹槽312的通畅。合适的热塑性材料可以包括但不限于环烯烃共聚物(例如,Zeonor®1060R)、聚四氟乙烯(PTFE)、聚醚醚酮(PEEK)、聚苯乙烯和聚碳酸酯等。

[0136] 在图6的示意图中呈现了本公开内容的另一实施方案,其还包括选择性可渗透膜500,该选择性可渗透膜500有效地将流动通道60分隔成两个平行的流动通道,低分子量代谢物可以跨这两个平行流动通道进行交换。在一些实施方案中,选择性可渗透膜500可以由透析膜或类似的膜材料制成。合适的膜材料包括但不限于再生纤维素、聚砜和包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的聚合物共混物。在一个实施方案中,选择性可渗透膜500包括具有适合于交换分子量小于20kD,更优选小于15kD,更优选小于10kD的分子的孔尺度的透析膜。在这种布置中,选择性可渗透膜500将次级集箱700和集箱200分隔开,形成第二流动通道70。细胞经由第一入口端口210进入流动通道60并沉积到凹槽312中。流体即通常包含分子量小于10kD的营养物的基础介质经由第二入口端口730进入第二流动通道70并经由第二出口端口740离开,其中小于10kD的分子扩散穿过膜500进入流动通道60以将营养递送至凹槽312中

的细胞。由凹槽312中的细胞生成的代谢废物分子扩散穿过膜500,进入流动通道70并经由第二出口端口740离开。同时,生长培养基经由第一入口端口210进入流动通道60。废物产物经由第一出口端口220从流动通道60移除。在一些实施方案中,不需要提供次级出口740,因为所有废物都可以通过第一出口端口220排出。然而,这可能导致细胞损坏,并且因此可能是不期望的。如与图1的实施方案中那样,图6提供了细胞与培养基在方向A上的横向流动。通孔381提供了用于递送细胞的垂直通道;通孔391提供了用于移除细胞的垂直通道。通孔481、483提供了用于递送和移除气体的垂直通道。图7提供了图6中的装置的截面图。

[0137] 与提供选择性可渗透膜500相关联的益处在于,可以将流体递送到第二流动通道70中与将流体递送到流动通道60中分开控制,从而允许通道70和通道60中的不同流量,例如基础介质的流量高于生长介质的流量。这可以减少所需的生长介质的量,从而节省成本。

[0138] 图8说明了又一个实施方案,包括选择性渗透膜500,其中在横向流动方向A上递送细胞和介质两者以及在纵向流动方向B上移除细胞,因为集箱200包括第二出口端口340,该第二出口端口340提供细胞在流动方向B上沿凹槽312的纵向流动。在所示的实施方案中,还提供第二入口端口330用于递送细胞和使用生物反应器100的细胞培养方案所需的其他试剂,在本文中提供了其实施例。应当注意,在图6至图8的实施方案中,存在贯穿集箱层200的全厚度形成的空隙,其与流动层200的上表面310和可渗透层500的下表面一起限定了流动通道60。通孔381提供用于递送细胞的垂直通道,通孔383提供用于移除细胞的垂直通道,并且通孔481、483提供用于递送和移除气体的垂直通道。

[0139] 值得注意的是,图1、图3、图6和图8示出了气体输入通道481和气体输出通道483作为形成穿过集箱层200和流动层300的垂直通道的通孔,用于将呼吸气体递送至气体流动路径410以及移除呼出的气体。在一些实施方案中,提供通孔以形成垂直通道,用于将流体递送至每个入口端口,以及从生物反应器中的每个出口端口移除流体,每个通孔共线地延伸穿过生物反应器100的所有三个层,并且每个流体出口与对应的通道流体连通。

[0140] 图9是根据另一实施方案的生物反应器100的分解图,包括集箱层200、流动层300和基础层400。虽然不可见,但集箱200的特征对应于关于图4描述的特征。流动层300中的块312表示在方向B上延伸的细长平行凹槽。基础层400包括气体入口430和气体出口440,它们供给气体流动路径410。此外,示出了多个通孔。在所示的实施方案中,通孔381、382分别提供用于将细胞和培养基递送至第一入口端口210的垂直通道(尽管它们可以替选地经由单独的入口端口递送,如图6至图8中所示)。通孔383和384提供垂直通道,分别用于将细胞和提取流体递送至第二入口端口340(尽管细胞和提取流体也可以经由单独的入口端口递送)。通孔391和392分别提供用于提取细胞和移除过期的介质的垂直通道。

[0141] 图10是来自图9的基础层400的右下角的放大的等距视图。该视图示出了基础层400中的结构柱450,该结构柱450被配置成抵靠邻接流动层300的下表面320,以在使用期间施加结构支承并确保气体流动路径410的通畅。此外,蛇形壁460在蛇形路径中将气体流动从气体入口端口430引导到气体出口端口440。然而,应当理解,壁460可以被设置在壁部分或壁部中,或者根本不需要提供气体简单地从气体入口端口430流向气体出口端口440。在一些实施方案中,结构柱450可以替选地/另外地省略,其中生物反应器尺度和/或材料使得流体流动通路的塌陷低。

[0142] 在一些实施方案中,生物反应器还包括一个或更多个对准特征,例如在生物反应

器的顶层(集箱200或次级集箱700)上的舌状物或突起(未示出),该一个或更多个对准特征与对应的凹槽或凹口在基础层400的底表面配合(或反之亦然)。

[0143] 微流控装置需要对流动的非常精确控制,特别是对于细胞沉积和细胞分离过程。气动控制的流比注射器泵或滚子泵更优选,因为流量取决于流动阻力器的液压阻力,而不是流体的压缩性。因此,在一些实施方案中,流动阻力器被并入流体通路中以管理灌注的速率。在图4中最佳所示的,流动阻力器371调节通常包含细胞的流体从垂直通道381进入第一入口端口210并进一步经由第一流体入口212进入流动通道60中的流动的速率。流动阻力器372调节流体(通常包含培养基)从垂直通道382进入第一入口端口210并进一步经由第一流体入口212进入流动通道60的流动的速率。流动阻力器373(由于其长度而提供与流动阻力器371近似等效的阻力)调节从垂直通道383和384分别将通常包含细胞和提取流体的流体递送到第二入口端口330并进一步经由第二流体入口332递送到流动通道60中的流动的速率。

[0144] 应当理解,在本文中的实施方案中示出的流动阻力器的性质和位置仅是示例性的。虽然流动阻力器通常并入集箱层200中,但它们的位置可以在流动通道60的上游或下游,并且它们的布置可以是如所示的蛇形或细长型,或沿或绕集箱基底盘绕、定向或呈如本领域技术人员将理解的其他布置。在一些情况下,可以至少部分地通过构建生物反应器100的基底层的覆盖区的大小和尺度和/或制造限制来确定一个或更多个流动阻力器的性质和位置。

[0145] 图11a和图11b分别以分解视和组装图示出了以堆叠600布置的多个生物反应器100。该堆叠包括基本刚性的底板610和基本刚性的盖板620,以对堆叠施加结构支承。在优选的实施方案中,导引特征例如柱(未示出)延伸穿过通过多个生物反应器提供的共线柱通道(未示出)以确保形成各个生物反应器的流体输入通道381、382、383、384、流体输出通道391、392、气体输入通道481和气体输出通道483的通孔中的对准和流动通畅。图11a和图11b示出了具有图9中所示的3层设计的二十个多层微流控生物反应器100的堆叠。来自单个多层微流控生物反应器的层200、300和400被示出在分解图上(图11a)。有利地,所有二十个生物反应器由用于细胞培养过程所需的每个流体的共同流体源来供应。然而,应当理解,生物反应器的堆叠可以包括单个生物反应器或例如5、10、20、30、50、60、70、80、90、100或100个生物反应器。

[0146] 图11a和图11b所示的实施方案可以用于选择CD34+细胞,其在调动的外周血单核细胞中通常以1%的频率出现。例如,可以将2×10^9个细胞沉积到凹槽中并以约3.5×10^8个细胞/mL的密度在凹槽中生长,每层有200个凹槽。在一个示例中,可以利用各自具有25×3层的4个堆叠来纯化10^{10}个细胞并从1%CD34+细胞级分(×100扩增)中扩增10^{10}个细胞。

[0147] 在一些实施方案中,生物反应器100被制造成多层片,每个片包含多个生物反应器。在图18所示的实施方案中,四个生物反应器100的流动层形成为单个A5大小的PDMS片。流动层片可以与对应的集箱层片和基础层片组装并结合以形成包括4个单独生物反应器的多层片。多个生物反应器可以根据可以由制造商确定的布局和片大小或为了优化设计或材料消耗而布置在片上。片可以被切割成形成单独的多层生物反应器,或者多层片本身可以被堆叠成形成片堆叠。堆叠中的每个片中的每个生物反应器具有共线设置的贯通端口,当组装堆叠时,这些贯通端口垂直地延伸以按照关于堆叠600讨论的方式将流体递送至生物

反应器中的各个生物反应器。

[0148] 有利地,因为生物反应器通过形成流体输入通道和流体输出通道的垂直孔并联连接,堆叠中的每个单独的生物反应器可以由每种所需流体的单个源供应,并且废物可以从堆叠中的所有生物反应器收集到单个废物贮存器中。片堆叠中的相邻生物反应器中的对应流体入口和出口可以通过适当布置的歧管流体联接,仍然仅需要每种所需流体的单个源和单个废物贮存器。

[0149] 图12a至图12c更详细地示出了盖板620的示例,该盖板620在顶表面610中具有用于接收用于将堆叠600联接至流体源和/或废物贮存器的管的多个开口。在所示的实施方案中,可以通过将管(未示出)与开口681连接而将细胞从单个袋、容器、烧瓶或其他贮存器递送至堆叠中的所有生物反应器,开口681又通过流体输入通道381供应每个生物反应器。可以通过将管(未示出)与开口682连接,将培养基从单个袋、容器烧瓶或其他贮存器递送到堆叠中的所有生物反应器,开口682又通过流体输入通道382供应每个生物反应器。在需要细胞分离的方案中,可以通过将管(未示出)与开口683连接,将细胞递送至堆叠中的所有生物反应器,开口683通过流体输入通道383供应每个生物反应器。可以通过将管(未示出)与开口684连接,将提取流体从供应部(袋、容器、烧瓶等)递送至堆叠中的所有生物反应器,开口684又通过流体输入通道384供应每个生物反应器。诸如氧气的呼吸气体可以通过开口641通过与大气的开放连接或使用泵来供应,以在压力下将大气空气或气体从罐驱动通过气体输入通道481以供应至每个生物反应器中的气体流动路径410。

[0150] 在优选的实施方案中,图11a和图11b所示的类型的一个或更多个堆叠600被并入生物反应器细胞培养系统中。理想地,细胞培养系统具有容纳堆叠和流体源的壳体,其呈容纳执行细胞培养方案所需的试剂并且通过诸如盖板620的歧管流体联接至堆叠的多个试剂袋或容器的形式。该系统包括控制器,该控制器包括与控制器存储器和和用户接口通信联接的处理器,该用户接口理想地并入到壳体中并且可以包括系统的操作者可访问的触摸屏、和/或显示器和键盘。存储器存储用于执行一个或更多个细胞培养方案的指令,并且所述指令在由处理器执行时使控制器操作生物反应器细胞培养系统以执行一个或更多个细胞培养方案。

[0151] 在壳体内部是与一个或更多个流体源连通的一个或更多个流体泵。泵由控制器操作,以通过控制流体管线中的阀门的打开和关闭,根据存储在控制器存储器中的细胞培养方案将流体递送至各个盖板开口。在一些实施方案中,处理器包括微控制器,该微控制器被配置成独立地调节联接至生物反应器输入端的压力源。

[0152] 用户接口接收来自操作者的一个或更多个输入,以从存储器中选择一个或更多个细胞培养方案,或将一个或更多个细胞培养方案输入至存储器。每个培养方案具有存储在存储器中的一组对应的指令,该组指令在由处理器执行时,使控制器根据所选择/输入的方案操作系统的泵和其他部件。

[0153] 例如,控制器可操作成引起通过细胞提取通道从各个生物反应器的凹槽中提取细胞,该细胞提取通道共线地延伸穿过堆叠并且与各个生物反应器中的第二出口端口流体连通。理想地,壳体包括用于接收诸如袋、烧瓶或小瓶的贮存器的平台或区域,该贮存器连接至提取通道以用于无污染地收集提取的细胞。

[0154] 在一些实施方案中,控制器具有经由Wi-Fi或以太网连接的互联网连接,使得能够

远程访问处理器以访问数据、方案的修改和控制以及远程软件更新。此外,控制器可以与扫描仪或其他装置可操作地联接以从样品自动读取或接收用于安全跟踪患者材料和为每个患者定制方案的诸如条形码或电子标签的标识符。

[0155] 细胞沉积到凹槽阵列中的一个或更多个凹槽中

[0156] 本公开内容提供了包括将细胞引入凹槽阵列中的一个或更多个凹槽中的方法。可以通过交叉于凹槽的流(与凹槽的纵向尺度正交的横向流动)或沿凹槽的流(纵向流动)引入细胞。由于在流动或静态条件下细胞和周围流体的密度的差异,因此通过沉降沉积细胞。在将细胞引入凹槽阵列中之前,该装置可以首先通过将培养基(横向流动和/或纵向流动)流入装置中直到装置被填满来灌注。细胞可以存在于体液(例如,血液)、经处理或经部分处理的体液(例如,被处理以移除血小板和/或血清的血液)中,或在被引入装置中之前重新悬浮在适当的流体介质(例如,培养基)中。

[0157] 该装置可以被配置有细胞入口端口和细胞出口端口。如果在静态条件下将细胞沉积到一个或更多个凹槽中,则在通过从入口端口的流引入细胞之后,将关闭出口端口。

[0158] 细胞可以是原核细胞或真核细胞。细胞可以来自单细胞生物体或多细胞生物体。在一些情况下,细胞经过基因工程改造,例如,细胞可以是嵌合细胞。细胞可以是细菌细胞、真菌细胞、植物细胞或动物细胞等。细胞可以来自人或非人动物或哺乳动物。例如,如果细胞来自动物,则该细胞可以是心肌细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、软骨细胞、神经细胞、骨细胞、成骨细胞、肌肉细胞、血细胞、内皮细胞、干细胞、免疫细胞(例如,T细胞、B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞)等。在一些情况下,细胞是癌细胞。细胞可以是非黏附细胞系(例如,L1.2,小鼠免疫B;Jurkat,人类$CD4^+$T;Ramos,人类免疫B)或黏附细胞系(GPE86,小鼠胚胎成纤维细胞)以及原代细胞。在优选的实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代免疫细胞或干细胞。在一个实施方案中,细胞是原代免疫细胞,例如T细胞。在一个实施方案中,细胞是非黏附的并且培养方法用于在悬浮液中培养细胞。在另一实施方案中,细胞是黏附的并且培养方法用于在悬浮液中培养黏附细胞。

[0159] 如本文中所使用的,术语“免疫细胞”是指免疫系统的细胞,其保护身体免受疾病和异物的侵害。免疫细胞的非限制性示例包括:树突细胞,例如骨髓来源的树突细胞;淋巴细胞,例如B细胞、T细胞和自然杀伤细胞;以及巨噬细胞。在一些实施方案中,免疫细胞可以源自合适的受试者的骨髓、脾或血液。例如,免疫细胞可以来自人或非人哺乳动物,例如猴、猿、牛、绵羊、山羊、马、驴、美洲驼、兔、猪、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、狗、猫等。在优选的实施方案中,免疫细胞是T细胞,优选地是人T细胞。

[0160] 如本文所使用的,术语“干细胞”是指能够自我更新并且多向分化的克隆形成细胞。基于它们的来源,将干细胞分类为胚胎干细胞(ESC)或出生后干细胞/体细胞干细胞/成体干细胞(ASC)。

[0161] 胚胎干细胞(ESC)可以源自2至11天大的称为胚泡的胚胎。它们是全能的——能够分化成任何类型的细胞,包括生殖细胞。ESC被认为是永生的,因为它们可以无限地繁殖和维持在未分化的状态。

[0162] 成体干细胞(ASC)存在于大多数成体组织中。它们是多能的——能够分化成多于一个细胞类型,但不是所有的细胞类型。根据它们的来源,可以将AASC进一步分类为造血干细胞(HSC)和间充质干细胞(MSC)。HSC可以从脐带血或外周血中获得。MSC是起源于胎儿的

中胚层并且在成人体内存在于多种组织中的间充质干细胞,例如骨髓干细胞(BMSC)、角膜缘干细胞、肝干细胞、真皮干细胞等。

[0163] 也已从口面部组织中分离出干细胞,口面部组织包括成人牙髓组织、乳牙的牙髓组织、牙周韧带、顶端乳头和颊黏膜。

[0164] HSC可以被划分成能够无限期自我更新的长期子集和在限定的间隔内自我更新的短期子集。HSC产生非自我更新的寡系祖细胞,非自我更新的寡系祖细胞进而产生其分化潜能更受限的后代,最后产生功能成熟的细胞,包括髓细胞(单核细胞和巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞)、红系(红细胞)、巨核细胞(血小板)和淋巴谱系(T细胞、B细胞、NK细胞)。

[0165] 细胞培养

[0166] 细胞可以在维持生存力和/或细胞生长的条件下培养例如1至14天。生长可以由细胞分裂(有丝分裂)或其他过程(例如分化)来表征,在此期间,细胞可以改变为能够具有与整个生物体中的组织或器官类似的功能的特定类型。

[0167] 在培养期间,通过在凹槽阵列的顶部提供细胞培养基以向保留在一个或更多个凹槽中的细胞提供营养物和生长因子以用于细胞代谢,并移除由细胞生成的废物。

[0168] 在一个示例中,培养基连续流动穿过凹槽阵列。这种类型的流动在本文中被称为“连续流动”。连续流动就是连续的。不间断地连续泵送培养基,从而产生连续的营养物和生长因子的流。替选地,可以通过振荡流动或脉动流动来提供培养基。振荡流动是指具有零平均速度的振荡流动。脉动流动是叠加在具有非零平均速度的稳定流动上的振荡流动。

[0169] 当流体流过本文公开的多层微流控生物反应器的流动通道时,取决于流体的速度和黏度,可以发生两种类型的流动中的任一种:层流或湍流。在一个示例中,细胞培养基以层流动灌注整个凹槽阵列。层流倾向于以较低的速度发生,速度在流动变得湍流的阈值以下。湍流是不稳定的流动状态,其由涡旋或小包流体颗粒来表征,这会导致横向混合。在非科学术语中,层流动是平滑的,而湍流动是粗糙的。通常,在本发明的方法中有用的装置中的流动是层流的,因为雷诺数低(通常小于10)。

[0170] 该装置可以配置有细胞培养基入口端口和细胞培养基出口端口。介质可以通过注射泵、蠕动泵、液压或片上微型泵从入口端口灌注整个凹槽。介质灌注向细胞提供生长因子和蛋白质的受控供应以及流体诱导力对细胞的受调节暴露。

[0171] 存在两种灌注模式:单程灌注和再循环灌注。在单程灌注中,细胞培养基被灌注整个凹槽阵列以流向连接至出口端口的废物容器,在此期间,灌注的生长因子、细胞代谢物和分泌的因子在短时间段内暴露于细胞。而在再循环灌注中,介质、细胞代谢物和分泌的因子通过凹槽阵列再循环并在较长时间段内暴露于细胞。

[0172] 如本文所使用的,“培养基”是指被设计成支持细胞生长的介质。细胞培养基通常包括适当的能量源和调节细胞周期的化合物(通常被称为基础介质或基本介质)。典型的培养基由氨基酸、维生素、无机盐、葡萄糖和任选的生长因子、激素和/或附着因子的补体组成。培养物可以用关键营养素(例如,葡萄糖)补充一次或更多次。在一些实施方案中,培养基用例如生长因子、转导增强剂来补充以例如修饰细胞。在一些实施方案中,存在两种培养基流,一种通常包含基础介质成分,另一种通常包含包括高价值营养物/补充物的生长介质成分。除了营养物之外,介质还有助于维持pH值和渗透压。在一些实施方案中,技术人员将

理解,待培养的细胞将决定用于细胞培养的培养基和条件。选择合适的细胞培养基和培养条件(好氧、厌氧、温度、pH)在技术人员的常规技能内。

[0173] O_2可以通过鼓泡、膜扩散和介质灌注供应给培养物。在后一种方法中,介质可以在其进入培养系统之前通过充氧室进行灌注,从而确保不断地补充O_2。通常,需要持续补充氧气以避免与培养物相邻的缺氧条件。这在高细胞密度培养中尤为重要。

[0174] 在一个示例中,包括凹槽阵列的基底是气体可渗透的,并且装置包括在气体可渗透基底下方的与气体流体连通的一个或更多个气体流动路径。包括一个或更多个气体流动路径——例如,紧接在细胞已经培养在其上(在一个或更多个凹槽中)的气体可渗透基底下方——可以提供细胞与所需气氛之间更好的气体交换。它还消除了对气液界面的需要。

[0175] 在一个示例中,生物反应器被放置在专门建造的CO_2培养箱中。通常对于哺乳动物细胞培养,培养箱中的CO_2水平限定了氧气水平。控制培养箱中的温度和CO_2水平和湿度对培养的细胞的健康和生长是重要的。对于大多数哺乳动物细胞系和原代细胞,最佳生长温度为37℃。大约95%的湿润气氛避免培养物的干燥。通常需要CO_2作为介质缓冲系统的一部分来调节pH值。最常用的CO_2——碳酸氢盐缓冲系统取决于5%至10%CO_2的室气氛,其提供7.2至7.4的pH。

[0176] 在另一示例中,该装置配置有连接至气体供应部的入口端口和出口端口。O_2的连续流动可以优于传统的单层培养系统,在传统的单层培养系统中,气体交换仅通过介质发生。

[0177] 在微流控细胞培养系统中,由于基底的气体可渗透性和气体在低于其溶解度的压力下的溶解,因此在系统启动、细胞悬浮液加载和介质灌注过程期间可能形成气泡。气泡可能不利于微量细胞培养,导致微通道堵塞或对细胞的剪切损伤。

[0178] 在一个示例中,施加跨气体可渗透基底的压力差,其驱动气体从流动通道渗透到气体通道中。

[0179] 细胞转染/转导

[0180] 本公开内容还提供了将外源分子引入细胞的方法。如本文中所使用的,“外源”分子是指通常不存在于细胞中但是可以被引入细胞中的分子。“正常存在于细胞中”由细胞的特定发育阶段和环境条件确定。例如,仅存在于组织/器官的胚胎发育期间的分子相对于所述组织/器官的成体细胞是外源分子。类似地,热休克诱导的分子相对于非热休克细胞是外源分子。外源分子可以包括,例如,功能失常的内源分子的功能变体或功能正常的内源分子的功能失常的变体,或者以不同的细胞区室或以高于内源水平的水平表达的内源分子。

[0181] 外源分子可以是通过化学合成生成的小分子,或者是大分子,例如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、其任何修饰的衍生物,或者是包括上述分子中的一种或更多种的任何复合物。

[0182] 有意将核酸递送或引入真核细胞通常称为“转染”。转染还可以指其他方法和细胞类型,尽管通常优选其他术语。转化通常用于描述细菌和非动物真核细胞(包括植物细胞)中的非病毒式DNA转移。遗传物质(例如超螺旋质粒DNA或siRNA构建体)或者甚至蛋白质(例如抗体)可能被“转染”。如本文中所使用的,“转染”通常涉及将分子非病毒地递送至包括细菌和非动物真核细胞的细胞。

[0183] 将外源分子引入细胞的方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于脂质介

导的转移(即脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注射、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀,DEAE-葡聚糖介导的转移和病毒载体介导的转移。

[0184] 本发明包括使载体用于遗传构建体的操作或转移的用途。载体是可以用于人工携带外源遗传物质的核酸分子,优选DNA分子;进入在其中可以被复制或表达的另一细胞。将包含外源DNA的载体称为"重组载体"。载体的示例包括但不限于质粒、病毒载体、黏粒、染色体外元件、微染色体。

[0185] 载体通常是由插入物(转基因)和充当载体"骨架"的较大序列组成的DNA序列。将遗传信息转移到另一细胞的载体的目的通常是在靶细胞中分离、繁殖或表达插入物。专门设计用于在靶细胞中表达转基因的载体被称为"表达载体",并且通常具有驱动转基因表达的启动子序列。合适载体的选择在本领域技术人员的知识范围内。

[0186] 如本文中所使用的,术语"启动子"应以其最广泛的含义理解,并且包括基因组基因的转录调节序列,该基因组基因的转录调节序列包括TATA盒或起始元件,其是精确转录起始所需的,具有或不具有例如响应于发育和/或外部刺激或者以组织特异性方式来改变核酸表达的其他调节元件(例如上游激活序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)。在本文上下文中,术语"启动子"也用于描述重组、合成或融合核酸,或赋予、活化或增强与其可操作链接的核酸的表达的衍生物。示例性启动子可以包含一个或更多个特异性调节元件的额外拷贝,以用于进一步增强表达和/或改变所述核酸的空间表达和/或时间表达。

[0187] 如本文中所使用的,术语"可操作地链接"是指相对于核酸对启动子进行定位,使得核酸的表达受启动子控制。启动子例如可以通过内部核糖体进入位点可操作地链接至许多核酸。

[0188] 如本文中所使用的,"病毒"是指在没有宿主细胞的情况下不能生长或复制的一大群感染性实体中的任何。病毒通常包含围绕遗传物质的RNA或DNA核心的蛋白质外壳,但是没有半透膜,并且仅能够在活细胞中生长和增殖。病毒包括当例如在包含将全部或部分病毒基因组的载体转导至合适的细胞或细胞系中以生成这样的颗粒时形成的那些病毒。所得病毒颗粒具有多种用途,包括但不限于将核酸转移至细胞中。因此,病毒是经包装的病毒基因组。病毒可以指单个颗粒、颗粒的储备或病毒基因组。

[0189] 如本文中所使用的,病毒载体是指核酸载体构建体,该核酸载体构建体包括病毒来源的至少一个元件并且可以包装到病毒载体颗粒或病毒中。当病毒载体包装在蛋白质外壳内时,本文中提及的病毒载体可以与病毒互换使用。病毒载体颗粒或病毒可以用于将DNA、RNA或其他核酸转移到细胞中的目的。病毒载体包括但不限于逆转录病毒载体、痘苗病毒载体、慢病毒载体、疱疹病毒载体(例如HSV)、杆状病毒载体、巨细胞病毒(CMV)载体、乳头瘤病毒载体、猿猴病毒(SV40)载体、辛德毕斯载体、塞姆利基森林病毒载体、噬菌体载体、腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。病毒载体通常包括工程病毒,该工程病毒可操作地链接至外源基因以将外源基因转移(作为载体或穿梭机)到细胞中。

[0190] 当病毒载体或病毒颗粒用于将感兴趣的遗传物质转移到细胞中时,该技术被称为"转导"。因此,一般来说,"转导"细胞是使用病毒载体或病毒颗粒将遗传物质转移到细胞中。

[0191] 如本文中所使用的,核酸分子包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),其可以是单链或双链的;可以是线性的、分支的或圆形的;并且可以是任何长度。核酸包括那些能

够形成双链体的核酸以及形成三链体的核酸。核酸还包括DNA或RNA的类似物或衍生物。类似物可以包括一个或更多个改变的骨架(例如,磷酸-糖骨架类似物)、戊糖或核碱基(例如,通用碱基、异种核酸)。示例包括肽核酸(PNA)、吗啉代寡聚物、锁核酸(LNA)以及乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。核酸可以编码基因产物,例如多肽、调节RNA(例如微RNA、小干扰RNA(siRNA)、指导RNA(gRNA)和反义)、核酶和小发夹。

[0192] 在通过横向流动和/或纵向流动将外源分子(例如载体)引入细胞的同时或之后将其引入装置中。可以在细胞扩增后通过本文描述的培养方法将外源分子(例如载体)引入装置中。可以在促进转染/转导(例如,辅助、促进或有助于进入细胞)的培养基中提供外源分子,培养基包括脂质体制剂、脂质转染剂或支持病毒转导的培养基。在一些方法中,细胞在加入病毒载体之前被活化,例如,T细胞可以通过经由CD3-和CD28-特异性抗体与诸如IL-7和IL-15的细胞因子组合刺激TCR活化途径而被活化。

[0193] 该方法可以包括静态(例如,单次装载)或流动转染/转导或其组合。流动转导方法可以包括但不限于连续灌注或循环灌注,在连续灌注中,外源分子(例如载体)在整个转染/转导期间连续地灌注通过装置,在循环灌注中,病毒载体可以例如使用蠕动泵循环通过装置。在另一示例中,连续灌注用于装载外源分子并且使外源分子在静态条件下孵育。在缩短转染/转导期后,可以将外源分子的新鲜储备装载到装置中以添加更多的外源分子并且补充细胞培养基营养物/生长因子。

[0194] 在转染/转导之后,可以通过本文中描述的培养方法扩增细胞。当转染/转导的DNA中包含适当的抗药性标记时,可以通过药物选择来实现转染/转导的细胞的扩增。在这样的实施方案中,使用包含药物的选择性培养基来扩增转染/转导的细胞。

[0195] 细胞选择

[0196] 本公开内容还提供了使用固定在凹槽上的捕获或结合试剂来选择细胞的方法。抗体可以用作捕获试剂。抗体可以用于分别基于某些表面抗原的表达或谱系特异性抗原的表达的缺乏而在细胞沿凹槽流动时正向或负向选择细胞。例如,该方法可以用于通过使用抗CD34抗体的正向选择来选择或富集CD34+造血干细胞/祖细胞。在另一示例中,该方法可以用于使用抗T细胞抗体(例如,CD2、CD3、CD4/CD8、T细胞受体α/β)选择或富集T细胞。可以使用例如蛋白水解酶木瓜蛋白酶或神经氨酸酶从抗体中释放捕获的细胞。随后可以通过本文中公开的培养方法扩增细胞和/或通过本文中公开的方法转导/转染细胞。

[0197] 抗体可以是多克隆或单克隆抗体。优选地,抗体制剂是亲和纯化的。特别有用的抗体在吸附到固体表面之后保持反应性,并且在完全干燥时仍保持结构完整性,并且当再水化时是反应性的。

[0198] 可以使用本领域技术人员已知的常规方法将抗体固定在凹槽阵列上。“固定的”结合配偶体是指永久地或半永久地吸附、嵌入或附着至凹槽的结合配偶体。

[0199] 在一些实施方案中,该方法包括在将细胞引入装置之前将抗体固定在凹槽上。例如,可以通过横向流动和/或纵向流动将抗体提供至凹槽,并且使其在静态或流动条件下孵育以吸附至凹槽。在一些实施方案中,凹槽表面上的反应性基团在捕获试剂固定后被阻断。可以使用防止生物分子非特异性吸附的任何涂层。这些涂层通常是与水结合的聚合物,例如聚乙二醇(PEG)或PEG共聚物例如普朗尼克127。可以使用的其他聚合物包括碳水化合物聚合物(葡聚糖)或两性离子防污聚合物。

[0200] 如本文中所使用的,术语“特异性结合”是指特异性捕获试剂优先与细胞上的给定配体相互作用,而不是与细胞上的其他配体或样品中存在的组分相互作用。例如,特异性结合给定配体的特异性结合剂在合适的条件下以相对于与样品中其他组分的任何非特异性相互作用可观察到的量或程度结合给定配体。合适的条件是允许给定特异性结合剂与给定配体之间相互作用的那些条件。这些条件包括pH、温度、浓度、溶剂、孵育的时间等,并且在给定的特异性结合剂与配体对之间可以不同,但是可以由本领域技术人员容易地确定。

[0201] 本文中所使用的术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白分子以及能够结合抗原表位的免疫球蛋白分子的片段。

[0202] 抗体可以是任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。这些类别通过它们包含的重链的类型来区分。IgG分子包含称为γ链的重链;IgM具有μ-链;IgA具有α-链;IgE具有ε链;并且IgD具有δ链。

[0203] 可以通过一种重链类型(例如,μ、δ、γ、α或ε)与一种轻链类型(例如,λ或κ)的缔合来形成抗体。常规抗体的基本(单体)单位是由两条相同重链和两条相同轻链通过二硫键连接在一起组成的四个多肽单位。并且轻链(HC和LC)还包含用于稳定的分子内二硫键。轻链较短,其中分子量低于重链。抗体的一般形状是Y,在Y的中心具有柔性铰链(域间)区。每条多肽链具有恒定区和可变区。

[0204] 轻链可变区的常用符号是VL,并且轻链恒定区的常用符号是CL。重链可变区(VH)和恒定区(CH)的符号相似,其中CH1、CH2和CH3表示重链的不同恒定区结构域。片段可结晶(Fc)区仅包含来自重链(CH)的恒定区,但是片段抗原结合区(Fab)包括重链和轻链(VH和CL)的恒定结构域和可变结构域。片段可变区FV区仅包含两个可变结构域。

[0205] 如本文中所使用的,“可变区”是指与抗原特异性结合的抗体的轻链和/或重链的部分,并且例如包括CDR的氨基酸序列;即CDR1、CDR2和CDR3,以及框架区(FR)。例如,可变区包括三个或四个FR(例如,FR1、FR2、FR3和任选地FR4)以及三个CDR。VH是指重链的可变区。VL是指轻链的可变区。

[0206] 如本文中所使用的,术语“互补确定区”(syn.CDR;即,CDR1、CDR2和CDR3)是指抗体可变区的氨基酸残基,其存在是对特异性抗原结合的主要贡献者。每个可变区通常具有三个CDR区,标识为CDR1、CDR2和CDR3。在一个示例中,根据Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1987and 1991(本文中也称为“Kabat编号系统”)来限定分配给CDR和FR的氨基酸位置。根据Kabat的编号系统,VHFR和CDR如下定位:残基1-30(FR1)、31-35(CDR1)、36-49(FR2)、50-65(CDR2)、66-94(FR3)、95-102(CDR3)和103-113(FR4)。根据Kabat的编号系统,VLFR和CDR如下定位:残基1-23(FR1)、24-34(CDR1)、35-49(FR2)、50-56(CDR2)、57-88(FR3)、89-97(CDR3)和98-107(FR4)。

[0207] “框架区”(FR)是除了CDR残基之外的那些可变结构域残基。

[0208] 本文中使用的术语“完整抗体”是指包括重链和轻链的完整或全长抗体,包括Fc区。恒定结构域可以是野生型序列恒定结构域(例如,人野生型序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。

[0209] 抗体的化合价可以不同。一些免疫球蛋白可以经由J链通过免疫球蛋白的Fc结构域的链接形成多聚体。

[0210] 抗体可以是多克隆的、单克隆的、重组的。

[0211] 本文中使用的术语“多克隆抗体”是指针对不同决定簇(表位)的抗体的混合群。修饰语“多克隆”指示抗体群的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,可以通过将完整病原体或分离的抗原接种或感染引入宿主(例如山羊)以诱导宿主产生针对病原体或抗原的抗体而制备根据本发明使用的多克隆抗体。

[0212] 本文中使用的术语“单克隆抗体”(mAb)是指从基本上同质的抗体群或所述抗体群获得的抗体。除了可能存在少量的可能天然发生的突变之外,包括所述群的各个抗体基本相同。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相比,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过Kohler等人Nature(1975)256:495首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法制备。例如,还可以使用在Clackson等人Nature(1991)352:624-628和Marks等人J.Mol.Biol.(1991)222:581-597中描述的技术或者通过本领域已知的其他方法从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0213] 抗体的“抗原结合片段”包括完整抗体的一个或更多个可变区。可以使用还原剂和蛋白酶选择性地从免疫球蛋白分子上切割诸如F(ab')2、Fab、Fab'和Fv的免疫球蛋白分子的片段,以消化或切割免疫球蛋白结构的某些部分。也可以重组制备免疫球蛋白分子的片段。

[0214] 这些抗体片段保留了选择性结合它们来源抗体的抗原(例如,多肽抗原)的一些能力,可以使用本领域公知的方法来制备(参见例如Harlow和Lane,同上)并且如下进一步描述这些抗体片段。

[0215] Fab片段由抗体分子的单价抗原结合片段组成,并且可以通过用木瓜蛋白酶消化完整的抗体分子来产生,以产生由重链的一部分和完整轻链组成的片段。

[0216] 可以通过用胃蛋白酶处理完整抗体分子、然后还原以产生由重链的一部分和完整轻链组成的分子来获得抗体分子的Fab'片段。以这种方式处理的每个抗体分子获得两个fab'片段。

[0217] 可以在不需要随后的还原的情况下通过用胃蛋白酶处理完整抗体分子来获得抗体的(Fab')2片段。(Fab')2片段是由两个二硫键结合在一起的两个Fab'片段的二聚体。

[0218] Fv片段定义为包含表达为两条链的轻链可变区和重链可变区的遗传工程片段。

[0219] 本文使用的“重组抗体”是指通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体,例如(a)从免疫球蛋白基因(例如人免疫球蛋白基因)转基因的动物(例如,小鼠)或从其制备的杂交瘤分离的抗体;(b)从转化以表达抗体的宿主细胞分离的抗体;(c)从重组抗体文库分离的抗体;以及(d)通过涉及将免疫球蛋白基因序列拼接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。

[0220] 可以以任何形式产生重组抗体。保留其完整抗原结合位点的最小抗原结合片段是Fv片段,其组成整个可变(V)区。使用可溶性和柔性氨基酸肽接头以将V区连接至scFv(单链片段可变)片段以稳定分子,或者将恒定(C)结构域添加至V区以生成Fab片段(片段,抗原结合)。scFv和Fab是广泛使用的片段,可以容易地在原核宿主中产生。其他抗体形式包括二硫

键稳定的scFv(ds-scFv)、单链Fab(scFab),以及二体和诸如二体、三体和四体的多聚体抗体形式或包括由链接至寡聚化结构域的scFv组成的不同形式的微型抗体(miniAb)。最小的片段是骆驼重链抗体和单结构域抗体(sdAb)的V_{HH}/V_{H}。

[0221] 本文中使用的术语“抗体”还包括人源化抗体、灵长类抗体、人抗体、合成人源化抗体和嵌合抗体。

[0222] 选择之后,可以通过本文中描述的培养方法扩增细胞。当转染/转导的DNA中包括合适的抗药性标记时,可以通过药物选择来实现转染/转导的细胞的扩增。在这样的实施方案中,使用包含药物的选择性培养基以扩增转染/转导的细胞。

[0223] 细胞收获

[0224] 本公开内容的方法可以包括收获步骤,该收获步骤包括提供提取培养基的横向流动和/或纵向流动,以将细胞从凹槽转移到流动流中并且移出装置用于收集和使用。

[0225] 虽然提取培养基的横向流动可能具有实用性,特别是在需要连续供应细胞的实验室应用中,但是纵向流动提取更有效,并且因此在更大规模的细胞培养系统中是优选的。

[0226] 根据本公开内容的实施方案,使用数值模拟以指导微流控生物反应器100的设计。使用通常用于计算流体动力学、质量传递和化学反应的COMSOL Multiphysics以对以下进行模拟:a)细胞运输和沉积到微槽中;b)摄取葡萄糖和氧,以及c)将慢病毒载体运输到细胞中。

[0227] 实施例1:用于高密度生长的流、氧气和葡萄糖浓度的模拟

[0228] 给定装置几何形状、半透膜的性质以及流量,使用COMSOL Multiphysics对流体动力学和质量传递进行模拟以测试细胞是否具有足够的营养以用于高密度细胞生长。流动层由氧气可渗透的聚二甲基硅氧烷(PDMS)制造。表1示出了对氧和葡萄糖质量传递进行模拟的参数。

[0229] 表1

[0230]

符号	参数	描述
rho	1000[k/m^3]	流体密度
eta	1e-3[Pa*s]	流体黏度
v0	0.005[cm/s]	入口速度
Dglu	le-9[m^2/s]	葡萄糖在水中的扩散系数
Doxy	4e-9[m^2/s]	氧在水中的扩散系数
Coxy	0.25[mol/m^3]	边界处的氧浓度
Cglu	10[mol/m^3]	入口处的葡萄糖浓度
Vfrac	0.8	细胞体积分数
etacell	10*eta	包装细胞黏度
rhocell	1.06*rho	包装细胞密度
tpDMS	0.1[mm]	PDMS 厚度
PC	6.7	氧的分配系数(Cwater/CPDMS)
DoxyPDMS	3.4e-9[m^2/s]	氧在 PDMS 中的扩散系数
Soxy_water	0.96[mM/atm]	氧在水中的溶解度
Soxy_PDMS	PC*Soxy_water	氧在 PDMS 中的溶解度

[0231]

PO2	0.2[atm]	氧的分压
Groove_Pitch	50e-6[m]	槽距
Groove_Width	150e-6[m]	槽宽度
Groove_Height	200e-6[m]	槽高度
Plate_Separation	100e-6[m]	板间距
Cell_Concentration	1e9[1/ml]	细胞浓度
Specific_Glu_U	0.73e-17[mol/s]	每个细胞的葡萄糖特异性摄取
Specific_O2_U	2.6e-17[mol/s]	每个细胞的氧特异性摄取

[0232] 对氧和葡萄糖浓度进行模拟以确定细胞可以在微槽内以(10^8至10^9细胞/ml)的组织密度生长。图13中所示的2D模拟几何形状是穿过PDMS多层生物反应器的截面,其中在凹槽基底上存在横向流动。该模拟假设氧在透气凹槽膜的下侧和装置的顶部为0.2bar。板间距为100μm。凹槽深度、宽度和间距分别为200μm、150μm和200μm。凹槽底部的细胞浓度为10^9

细胞/ml,并且假设细胞填充每个凹槽底部的80％。入口介质流速从左到右为0.05mm/s(流线显示为白线)(图13A)。

[0233] 如流线所示,流动分离发生在堆积的细胞团与介质之间的边界处,表明层流穿过凹槽。极少的介质渗入生物质。如预期的那样,流体静压沿通道线性降低。

[0234] 图13C和图13D示出了葡萄糖和氧的浓度。每个凹槽下部的80％体积中生物质对葡萄糖和氧的特异性摄取基于细胞系测量(葡萄糖特异性摄取＝0.73e-17[mol/s/细胞],氧特异性摄取＝2.6e-17[mol/s/细胞])。葡萄糖进料浓度为10mM。只要葡萄糖浓度保持在4mM以上,细胞将保持存活。葡萄糖在下游穿过流动通道被消耗(0.15mM/mm)。每个凹槽内也存在葡萄糖梯度。每个凹槽底部的葡萄糖浓度消耗约0.2mM。

[0235] 将氧(空气中20％体积分数)从平行板凹槽边界的上部和下部边界供应至细胞(图13D)。氧是最稀缺的代谢物,因为它在水中的溶解度相对较低(37℃下为0.25mM)。模拟示出了通过使用诸如PDMS的氧可渗透材料作为流动层(其氧溶解度比水高6.7倍)增强了向细胞的氧运输。通过第3至第4凹槽在下游建立稳定的氧浓度分布。它在生物质的中间最低(0.11mM)。骨髓细胞通常在5％atm(约5mM)下生长,因此在该模型中低氧不太可能限制的细胞生长。

[0236] 该模拟证明装置可以提供以10^8-10^9细胞/ml生长的细胞的氧和葡萄糖需求,这比标准烧瓶或袋培养物高约1000倍。

[0237] 图17示出了当流体从左入口进入并且在凹槽上行进时(图17a)或者当流体从上入口进入并且沿凹槽行进时(图17b)模拟的三维流体。当流动穿过凹槽时(图17a),颗粒将被涡流捕获,因为它们遵循具有与凹槽的纵向尺度正交的圆形路径的流线。当流动的方向与凹槽的方向相同时,凹槽内的颗粒将遵循与凹槽的壁平行的流线(图17b)经由下出口离开。图17还示出了对于相同的入口流体速度,与从左入口进入的流相比,从上入口进入的流在凹槽内生成更高的流体速度。使用该模拟方法还估计凹槽底部处的壁剪切应力。如下所示,抗体以22mm/min的平均上入口流速选择性捕获细胞。该流动在凹槽的底部生成0.0218Pa的壁剪切应力。

[0238] 实施例2:凹槽中细胞沉积的模拟

[0239] 细胞具有1.05至1.1的比重,并且在培养基中沉降。使用具有4.8μm/min的入口流体速度和4.2μm/s的细胞沉降速度的层流混合物模型对细胞沉降到凹槽中进行模拟。图14示出了大部分细胞在使用沉降的短时间(约200秒)内沉积在前5个凹槽中,因为沉降距离仅为200微米。一旦细胞沉积在凹槽基底中,它们在培养过程期间保持在那里,使得能够在细胞不流出装置的情况下交换介质。使细胞保持高活力的培养基的典型灌注速率为约1ml/百万细胞/天。在下表2中示出将细胞沉积到凹槽基底中的模拟参数。

[0240] 表2

[0241]

符号	参数	描述
rho_s	1060[k/m^3]	固体颗粒的密度
rho_f	1000[k/m^3]	纯流体的密度
eta_f	1e-3[Pa*s]	纯流体的黏度
phi_max	CC_max*CV	最大包装
phio	CC*CV	平均浓度
R	5e-6[m]	颗粒半径
u_st	(2/9)*(-g_const)R^2*(rho-s-rho_f)/eta_f	沉降速度

[0242]

H	200e-6[m]	通道高度
W	6[mm]	通道长度
Vi	0.5[mm/s]	入口速度
D1	0.41*R^2	模型参数 D_phi
D2	0.62*R^2	模型参数 D_mu
Dg	300e-6[m]	凹槽深度
Wg	400e-6[m]	凹槽宽度
T1	100[s]	细胞输入脉冲宽度
CC	1e7[1/ml]	入口细胞浓度
CV	4*pi*R^3/3	细胞体积
CC_max	(2*R)^(-3)	最大细胞浓度
CW	8[mm]	通道宽度
N_cells	FR*CC*T1	细胞装载的数目
FR	CW*H*Vi	流量

[0243] 模拟还示出了在模型使用的几何形状中,由于流动在凹槽入口处分离,不可能通过引导横穿过通道的流动(横向流动)从凹槽中回收细胞(图17A)。

[0244] 实施例3:沉积在凹槽基底中的细胞对病毒摄取的微流控运输的模拟

[0245] 本公开内容解决的另一个寻求解决的问题是基因载体向细胞表面的缓慢运输速率。病毒载体的扩散速率为约$2\times10^{-8}cm^2/sec$。扩散时间与距离的平方成比例,因此病毒颗粒扩散1mm需要140小时,但是扩散50微米仅需要30分钟。增加病毒向细胞内运输的方法是利用离心(Spinoculation),这在临床规模上难以自动化。然而,在微流控系统中,扩散距离

显著减小。COMSOLMultiphysics用于对慢病毒(Lentivirus)进入凹槽底部的细胞单层的运输速率进行模拟(图15)。表3示出了用于对病毒在凹槽基底上运输到细胞中进行模拟的模拟参数。与100μm深的凹槽相比,使用浅50μm深的凹槽增强了病毒向细胞中的运输,因为当凹槽深度为100μm时发生流动分离(图15左图),这阻碍了病毒向单层中的运输。微槽底部的涡流引入了扩散屏障,因为它的流量比主流动通道中的流量低约10分之一。该模拟证明了需要选择对于将病毒转移到细胞中的最佳凹槽深度。

[0246] 表3

符号	参数	描述
Cvirus	(1e10/6.02e23)[mol/cm^3]	病毒的入口浓度
Dvirus	2e-8[cm^2/s]	病毒扩散系数
EntryRatio	10	输入长度比
epsilon	0.4	孔隙率
eta	1e-3[Pa*s]	黏度
etacell	10*eta	包装的细胞黏度
Groove_Height	50e-6[m]或 100e-6[m]	凹槽高度
Groove_Pitch	25e-6[m]	凹槽间距
Groove_Width	100e-6[m]	凹槽宽度
Kvirus	1e-7[m/s]	病毒跨细胞壁转移的传质系数
Plate_Separation	50e-6[m]	板分离
rho	1000[kg/m^3]	密度
rhocell	1.06*rho	包装的细胞密度
Specific_Virus_U	(0.01/6.02e23) [mol/s]	病毒的特异性摄取
tPDMS	0.1[mm]	PDMS 厚度
Uvirus	Cell_Concentration*Specific_Virus_U	病毒摄取
v0	0.001[cm/s]	入口速度
Vfrac	0.2	细胞体积分数

[0247]

[0248] 实施例4:PDMS(硅橡胶)微槽生物反应器的制造

[0249] 使用标准光刻法制造阴模。将流动层设计印刷在高分辨率(2400dpi、50μm特征)A4正性平版印刷膜(玫瑰图形)或石英照相掩模(1μm特征,Bandwidth Foundry,悉尼大学)上,其中将设计接触印刷在旋涂到硅晶片上的负性光致抗蚀剂(KMPR 1050,MMRC有限公司)上。

使用掩模对准器以用UV光对准和曝光光掩模。

[0250] 通过软压印复制负硅晶片模具以产生第二ZEONOR®1060R热塑性塑料(新加坡的Zeon Asia有限公司)负模具,其与硅母模相比具有更高的耐用性,并且可以重复使用以制造具有相同几何形状的多个装置。硅母模的PDMS(SYLGARD™ 184,陶氏化学公司(Dow Chemical Company))模具用于对ZEONOR®1060R热塑性模具进行热压印。

[0251] 在实验室原型中,将三层PDMS装置与具有对准柱的3D打印工具对准,并且在洁净室中与空气等离子体结合在一起。然后将其黏合到玻璃板上以用于结构支承、易于处理和高压灭菌。

[0252] 实施例5:设计

[0253] 与图1对应的一般设计具有用于细胞接种和收获的单独端口,以及用于供应介质的端口。介质端口连接至阻流器以降低流量,因为培养基流量远低于细胞接种和收获所需的流量。在表4中示出小规模设计(4×106个单元)的尺寸。

[0254] 表4

[0255]

尺度	值
流动层通道高度	50μm
流动层厚度	3mm
凹槽层深度	75μm
凹槽层厚度	0.6mm
凹槽层通道高度	50μm
气体层厚度	1mm
细胞培养室体积	28μL
细胞容量	4百万个细胞

[0256] 在表5中示出将生长体积提高25倍(10^8细胞)的大规模设计的尺寸。考虑到需要50ml至100ml组织培养瓶来生长该数量的细胞,装置非常紧凑。

[0257] 表5

[0258]

尺度	值
流动层通道高度	50μm
流动层厚度	3mm
凹槽层深度	75μm
凹槽层厚度	0.6mm
凹槽层通道高度	50μm
气体层厚度	1mm
细胞培养室体积	336μL
细胞容量	10^8个细胞

[0259] 参照图19中的实施方案,生物反应器提供横向流动和纵向流动,提供多个阀门和介质贮存器以实现细胞装载、细胞扩增和细胞提取的状态。对于细胞装载(图19A),打开细胞入口1381和介质灌注出口1392,但是关闭细胞提取入口1330、细胞提取出口1391和介质灌注入口1382。对于细胞扩增(图19B),经由打开的介质灌注入口1382和介质灌注出口1392

以及关闭的细胞入口1381、细胞提取入口1330和细胞提取出口1391将生长介质灌注到介质贮存器中。对于细胞提取(图19C),打开细胞提取入口1330和细胞提取出口1391,并且关闭细胞入口1381、介质灌注入口1382和介质灌注出口1392。

[0260] 表6提供了根据本公开内容的实施方案的另一多层生物反应器的参数,其中四个生物反应器设置在单个A5片上,如图18所示。

[0261] 表6

[0262]

参数	值
汇合时的细胞密度(细胞/ml)	3.50E+08
凹槽宽度(微米)	250
凹槽间距(微米)	300
凹槽深度(微米)	100
凹槽长度(mm)	60
流动细胞长度(mm)	60
每次流动细胞的凹槽数目	200
每次流动细胞的细胞数目	1.05E+08

[0263]

[0264] 表7提供了用于形成一次性大规模单元的24个生物反应器片的堆叠(图18)中的又一多层生物反应器的参数,该一次性大规模单元可以由根据本公开内容的实施方案的自动化生物反应器细胞培养系统利用。

[0265] 表7

[0266]

参数	值
每层的流动细胞的数目	4
每层细胞的数目	4×10^8
层宽度（mm）	148
层长度（mm）	210
层深度（mm）	3
生长10^{10}个细胞的层数	24
堆叠的高度（mm）	71
每堆叠的面积（cm^2）	3000
每个细胞的面积（μm）(10^8 CD34+细胞)	3000

[0267] 实施例6:流动阻力器的校准

[0268] 如图16中所示,使用经校准的液压阻力器来验证使用集管200上的流动阻力器的流动控制对于从细胞源通过第一入口端口210的细胞装载、通过第二入口端口330的细胞提取流体递送以及从培养基源到第一入口端口210中的培养基的递送是准确且可再现的。压力源和流动传感器分别为XenoWorks®Digital Microinjector(Sutter Instrument)和FM-ECO-Micro-1X,1-80μL/分钟(CorSolutions,Ithica,NY)。通过设置数字压力源来控制流量。使用3通手动操作阀或管夹关闭流动路径。

[0269] 实施例7:使用微槽生物反应器证明细胞沉积、扩增和回收

[0270] 使用生物反应器设计(具有108个细胞的容量)以使非贴壁B细胞系Raji-H2B-GFP生长。约8×10^6的Raji H2B-GFP细胞通过横向流动沉积装载到生物反应器中,并且在17天的时间内扩增以填充生物反应器。使用图21中模拟的类似流动状态将细胞沉积到前5至10个凹槽中(参见第1天,图21)。使用时间推移荧光显微镜以跟踪来自整合GFP荧光的生长速率(图20)。当细胞增殖时,它们溢出到下游凹槽中。这种生长模式如图20所示。随着细胞的数目增加,流量提高。将介质灌注流量设置为约1ml/百万细胞/天,足够低以通过微凹槽保留细胞,但是足够高以支持细胞生长和增殖。

[0271] 细胞在第17天生长至汇合,填充整个凹槽基底,其中细胞从装置的出口流出。在第17天不可能完全收获扩增的细胞(在出口回收了30.9×10^6个细胞,存活率为67.5%,图22)。最大流量为7.2ml/天,因此存活率降低,因为灌注速率跟不上细胞扩增(即应当为50ml/天至100ml/天,参见图22)。

[0272] 根据该实验,估计凹槽基底(凹槽深度80μm,宽度150μm,间距100μm)的汇合细胞密

度为170万个细胞/cm^2。细胞在凹槽内以约3.5亿个细胞/ml的密度生长。因此,预计(60mm×15mm)的装置可以生至1500万个细胞。

[0273] 本发明人开发了双向凹槽生物反应器以提高细胞回收和存活率。可以使用横向流动或纵向流动通过沉积将细胞装载到凹槽中。本发明人还将培养区域的长度减少了4分之一,使得微流控培养灌注流量可以与装置支持的细胞数目保持一致。

[0274] Jurkat、Raji、Nalm6、TF1a细胞系在双向流动装置中生长(图23)。使用横向流动将约1×10^6个细胞装载入200μL(5百万个细胞/mL)。装载效率为约80%。在第14天通过纵向流动收获细胞(12.2×10^6,存活率为87%,参见图23)。在表8中示出了扩增方案的总结。

[0275] 表8细胞扩增方案

[0276]

过程	持续时间(分钟)	细胞入口	介质灌注入口	细胞提取入口	介质灌注出口	细胞提取出口	描述
用细胞培养基装填装置	30	O	0.9 μL/分钟	25.3 μL/分钟	O	O	用细胞培养基(细胞系特异性)预填充装置和管路,以确保所有表面均润湿
装置排气	60	X	X	200 hPa	X	X	对透气装置加压以通过扩散去除截留的气泡
细胞装载	20	19.5 μL/分钟	X	X	O	X	经由细胞装载口以5百万/mL(总计1百万个细胞)的浓度装载200μL细胞
培养基灌注	5-14 天	X	0.07μL/分钟(1mL/天),从第3天开始每天提高0.035μL/分钟	X	O	X	以相当于每天每百万个细胞1 mL的流量流动细胞培养基,以回收和扩增装载的细胞
细胞提取	15	X	X	114.9 μL/分钟	X	O	提取细胞以进行处理

值状态	
O	开
X	关

[0277] 实施例8:使用可渗透凹槽生物反应器的细胞选择、基因转移和细胞扩增的微流控

整合

[0278] 可以使用凹槽微反应器以执行a)使用结合至凹槽的单克隆抗体的靶细胞的选择b)捕获的靶细胞的基因转导以及(c)在包含大量并联连接的微流控装置的单个盒内的转导细胞的培养扩增。可以通过阀门和压力源的气动控制使这些过程的顺序自动化,如下:

[0279] 经由来自外部细胞存储的贮存器的细胞输入通过连接至生物反应器的液压管线来实现细胞接种,其中通来自气动管线的气动压力实现细胞转移,气动管线经由压力源连接至外部细胞贮存器,连同开放的细胞废物出口以接收用过的细胞溶液。

[0280] 经由来自外部细胞贮存器的开放细胞输入和来自经由液压管线连接至生物反应器流体的细胞洗涤贮存器的细胞洗涤入口的打开,以及来自经由连接至流动记录器的液压管线的细胞洗涤贮存器的细胞洗涤输入和用过的细胞洗涤出口贮存器的打开,实现靶细胞富集。

[0281] 通过将载体从载体贮存器经由液压管线输入到生物反应器中来实现基因转移,其中载体流经气动管线和连接至载体贮存器的压力源;另外,打开矢量流液压管线以允许过量的矢量流从生物反应器通过。

[0282] 通过经由生物反应器顶部和底部的液压供应管线向生物反应器中的培养细胞供应新鲜培养基,连同经由连接至生物质传感器的介质废物管线和贮存器输入空气和二氧化碳并且输出废弃生长介质,以利用细胞输出管线监测松散细胞的流以用于细胞收获,来实现细胞培养物扩增。

[0283] 经由流体读数器将细胞洗涤从外部源输入生物反应器并且经由细胞输出管线输出收获的细胞来实现细胞收获。

[0284] 实施例9:Jurkat细胞的病毒转导

[0285] 该实验描述了使用慢病毒载体将绿色荧光蛋白(GFP)作为标记递送到细胞中的Jurkat细胞转导。用表达GFP的hrSIN慢病毒载体转导Jurkat细胞。根据表9所示的方案,将从Phoenix ECO包装细胞系产生的载体用于病毒转导。

[0286] 表9病毒转导

[0287]

过程	持续时间（分钟）	细胞入口	介质灌注入口	细胞提取入口	介质灌注出口	细胞提取出口	描述
用细胞培养基装填装置	30	O	0.9 μL/分钟	25.3 μL/分钟	O	O	用细胞培养基（细胞系特异性）预填充装置和管路，以确保所有表面均润湿
装置排气	60	X	X	200 hPa	X	X	对透气装置加压以通过扩散去除截留的气泡
细胞装载	20	19.5 μL/分钟	X	X	O	X	经由细胞装载口以5百万/mL（总计1百万个细胞）的浓度装载200μL细胞
病毒培养基装载	120	X	5 μL/分钟	X	O	X	用包含病毒载体的介质替换装置中包含的细胞培养基
病毒培养基灌注	24 小时	X	0.07 μL/分钟	X	O	X	降低病毒培养基的流量以允许装载细胞的感染
培养基灌注	4 天	X	0.07μL/分钟（1mL/天），从第3天开始每天提高0.035μL/分钟	X	O	X	用细胞培养基替换病毒培养基以回收和扩增转导细胞
细胞提取	15	X	X	114.9 μL/分钟	X	O	提取细胞以进行处理

[0288] 将病毒培养基(VCM)冲洗到系统中以替换细胞培养基,降低流量以在接下来的24小时内继续转导。然后通过灌注培养在随后的天数内扩增转导的细胞。在扩增后,收获细胞

并且通过流动细胞术分析。图24使出了在接种时、转导后第2天和转导后第5天的双向流动生物反应器的宽场显微照片。收获时94％的Jurkat细胞表达GFP(图25,表10)。在转导之前,可以通过例如沿着凹槽流动将用于增强转导效率的试剂纤维连接蛋白(Retronectin)引入装置。

[0289] 图26示出了本实验中使用的生物反应器装置。细胞装载入口和含病毒培养基(VCM)入口引导细胞和垂直于微槽的取向的VCM的流。流体在VCM出口处流出装置。用于提高转导效率的试剂纤维连接蛋白可以在转导之前通过例如使用纤维连接蛋白入口和出口与微槽取向平行的流而引入装置。然而,纤维连接蛋白不是有效转导所必需的。纤维连接蛋白入口和出口也用于通过与微槽取向平行的流来收获细胞。

[0290] 表10.转导性能

[0291]

第 0 天输入	第五天收获	第 5 天转导效率(GFP+)	第五天生存率
1 百万	225 万	95.4%	82.1%

[0292] 图27示出了如何将微流控生物反应器装置连接至加压密封容器以装载纤维连接蛋白、细胞和VCM。使用XenoWorks® Digital Microinjector通过调节每个容器内的压头来控制流量。使用以下方法步骤以执行病毒转导:

[0293] 1.将约1百万个细胞装载到微流控装置中;在20分钟内,使用+125hPa的压头将200μl细胞悬浮液(@5×10^6Jurkat细胞/ml)装载到不含纤连蛋白的装置中。

[0294] 2.然后将1ml解冻的VCM(递送GFP的慢病毒)在1小时内以+500hPa注入微流控装置中。

[0295] 3.然后将微流控装置和贮存器移入组织培养箱中过夜。使用+40hPa的压头降低VCM流量过夜。

[0296] 4.第二天使用荧光显微镜对微流控装置成像以量化细胞内GFP的表达。

[0297] 该实验证明了Jurkat细胞在封闭系统中的慢病毒转导,而不使用离心和纤维连接蛋白来浓缩病毒。

[0298] 实施例10:细胞分离

[0299] 使用物理吸附的单克隆抗体以捕获靶细胞,因为它们沿凹槽底部滚动,其中流动方向与凹槽方向相同(纵向流动)。使用普朗尼克(Pluronic)F127以减少抗原阴性细胞的非特异性吸附。使用比例为1:1的荧光细胞系混合物来评价细胞分离的性能。

[0300] 普朗尼克F127是减少非特异性蛋白结合的表面活性剂,并且对于微流控蛋白测定特别有效。它是用-CH3基团改性的聚乙二醇大分子,其与疏水性PDMS强烈结合(图28)。本发明人评估了普朗尼克F127对抗原阴性细胞的非特异性结合的作用。细胞混合物是1:1比例的Jurkat-H2BmCherry(CD3阳性,CD34阴性)和TF1a-H2B-GFP(CD3阴性,CD34阳性)(50000细胞/ml)。

[0301] 通过在4℃下过夜吸附在微流控生物反应器内物理吸附抗CD3 moAb(4D3,50μg/ml)来选择CD3细胞。通过1:1比率的CD3+:CD3-细胞混合物沿凹槽连续流动2小时观察到细胞的捕获。为了确定细胞捕获后的细胞活性,通过横向流动灌注培养在原位培养细胞。表11

中描述了更详细的方案。

[0302] 表11细胞分离

[0303]

过程	持续时间（分钟）	细胞入口	介质灌注入口	细胞提取入口	介质灌注出口	细胞提取出口	描述
用细胞培养基装填装置	30	O	0.9 μL/分钟	25.3 μL/分钟	O	O	用细胞培养基（细胞系特异性）预填充装置和管路，以确保所有表面均润湿
装置排气	60	X	X	200 hPa	X	X	对透气装置加压以通过扩散去除截留的气泡
装载抗体	30	35.2 μL/分钟	X	X	O	X	用抗体替换装置中包含的细胞培养基
在4°C下物理吸附抗体	过夜	50 hPa	X	X	X	X	用抗体涂覆微流控室过夜以产生细胞特异性结合表面
装载普朗尼克F-127	60	31.6 μL/分钟	X	X	X	O	用防污溶液替换装置中包含的抗体(1%普朗尼克F-127)
涂覆普朗尼克F-127	60	50 hPa	X	X	X	X	用1%普朗尼克F-127涂覆微流控室以消除非特异性细胞结合
连续的细胞装载和分离	120	X	X	31.6 μL/分钟	X	O	平行于凹槽装载细胞以捕获阳性细胞（所吸附抗体特异性）并且去除阴性细胞
培养基灌注	5-14 天	X	0.07μL/分钟(1mL/天)，从第3天开始每天提高0.035μL/分钟	X	O	X	以相当于每天每百万个细胞1 mL的速率流动细胞培养基，以回收和扩增装载的细胞
细胞提取	15	X	X	114.9 μL/分钟	X	O	提取细胞以进行处理

[0304] 在抗CD3moAb吸附之前涂覆有普朗尼克127的装置既不结合Jurkat-H2B-mCherry(CD3+)也不结合TF1a H2B GFP(CD3-)(图29A)。使用单独涂覆有抗CD3 moAb的模块,CD3+细

胞(Jurkat-H2B-mCherry)的结合更强(图29B)。通过在抗体结合后用普朗尼克阻断非特异性细胞结合来增强吸附的抗CD3 moAb的选择性(图29C)。还示出了结合的细胞在24小时内分离并且能够在灌注培养中扩增。

[0305] 本发明人已经证明了使用双向流动微流控生物反应器整合基因转移和培养扩增的小规模可行性。

[0306] 实施例11

[0307] 本发明人已经证明,当沿凹槽的底部流动时,细胞被结合到它们的表面抗原的单克隆抗体捕获。沿凹槽的平均流动速率为21.5mm/min。COMSOL模拟示出了凹槽的底部的流体剪切应力为0.2达因/cm^2。

[0308] 本发明人已经证明捕获细胞的释放和随后使用神经氨酸酶扩增靶细胞。

[0309] 疏水性聚苯乙烯组织培养皿用结合CD3或CD34抗原的单克隆抗体(moAb)物理吸附,随后用表面活性剂普朗尼克F127处理。在收获未结合的细胞之前,将CD34+(TF1a-GFP)和CD3+(Jurkat Cherry)的1:1混合物在定轨摇床@160RMP上的培养皿上温育30分钟。图30示出了富含抗CD3 MoAb或抗CD34 MoAb分别结合CD3+(黑条)或CD34+细胞(白条)。用普朗尼克F127阻断细胞与未处理的聚苯乙烯皿的非特异性结合。

[0310] 结合的CD3+细胞和CD34+细胞在组织培养中扩增(分别为具有白色斜线的黑色或具有黑色斜线的白色),尽管示出了扩增和产量通过从底物释放细胞而提高。

[0311] 神经氨酸酶切割结合CD3+或CD34+细胞,培养5天后扩增水平提高(图30)。

[0312] 在这些实验中,在没有轨道剪切的情况下将细胞培养在处理过的聚苯乙烯上。通常,结合的CD3+(黑条)和CD34+细胞(白条)的富集水平在没有轨道摇动的情况下较低(参见图30相比于图31)。神经氨酸酶使抗体结合的细胞分离,留下相对较少的结合细胞(具有斜线的条)。酶释放的细胞(白色斑点条,CD34+细胞;黑色斑点条,CD3+细胞)比结合细胞(具有黑色水平线的白色,CD34+细胞;具有水平白色线的黑色,CD3+细胞)生长更好。因此,流体剪切和酶释放提高了活细胞的纯度和产量。

[0313] 本公开内容的实施方案提供了多层微流控生物反应器以制造用于人类细胞和基因治疗的细胞(包括遗传修饰的细胞)。本公开内容的实施方案提供了现有大占地面积机器的可行且经济的替选方案,所述机器通常基于瓶或袋并且需要熟练的工作人员和复杂的多步骤程序,从而造成过于昂贵的处理成本,并且限制了生命改变和疾病治愈治疗的可达性和占用。

[0314] 在一些实施方案中,各个生物反应器并联连接,例如,使用通常以叠层形式堆叠的多层片,以形成用于更大规模制造细胞的微流控处理器。通常,微流控处理器堆叠是一次性的(每个患者单次使用)。在一些实施方案中,可以通过将一个或更多个微流控生物反应器或生物反应器堆叠装载到生物反应器细胞培养系统中来使大规模细胞制造自动化,其中系统具有控制器,该控制器可操作以调节调节参数,例如封闭系统中的气体和流体流动、温度、湿度、定时和样品处理,从而消除伴随基于烧瓶的细胞培养系统的污染和人为错误的风险。

[0315] 虽然实验室应用可能需要单个或少量的多层微流控生物反应器以生成所需数目的细胞,但是使用处理器控制的部件的大规模生产使得能够实现用于大规模生产细胞的方案的自动化,其中方案可以在患者之间变化且根据临床需要来确定。凹槽流动层的几何形

状与提供横向流动的能力以及在许多实施方案中提供纵向流动的能力相结合,提供在各种细胞培养过程期间对凹槽内部的细胞保留和培养细胞的有效移除的控制。

[0316] 可以根据所需的细胞培养目的、要处理的细胞数目、接种物中细胞的频率和要制造的细胞数目来修改和调整几何形状。使用诸如COMSOL Multiphysics的软件包进行模拟能够快速且可靠地模拟这样的几何形状。有利地,可以修改使用诸如COMSOL Multiphysics的产品模拟的模型以模拟设计和边界条件的影响,并且可以用于引导不同细胞培养过程的凹槽几何形状。以这种方式,根据本公开内容的实施方案的生物反应器可以针对不同的过程进行“调整”,例如细胞分离、选择、转导、转染、扩增,或这些的组合。一旦确定了期望的过程的几何形状,就可以将各个生物反应器并联连接,通常以堆叠形式连接,并且连接到所需介质源的单个流体管线经由通孔向每个单独的入口提供共同的进料,所述通孔提供了供应每个输入的垂直流体流动通道,并且分别提供了用于废物输出和提取的细胞的出口路径。

[0317] 用于细胞生产的放大和缩小的先前方法分别涉及增加生物反应器系统的体积和数量。这是昂贵且复杂的,因为物理(热和质量传递例如氧传递和混合时间)、生物化学(培养基组成和流变学)和工艺步骤(包括细胞分离、基因传递和培养扩增)将根据临床剂量而变化。由于细胞产物和过程对每个患者是特异性的,因此出现了进一步的复杂性;修改的是患者或组织匹配供体的细胞。使用以前的实验室方法和供应链制造成千上万的定制细胞产品的后勤提出了以前无法解决的挑战。本公开内容的实施方案通过以可以执行多个处理步骤的方式将独特的微流控几何结构结合到半透性基底中来解决这些需求。这种独特的布置还提供更好的细胞操作、高细胞密度并且极大地减少介质和细胞生产时间范围的消耗。

[0318] 本公开内容提供了试剂和介质交换步骤的自动化,替代了倾向于被阻塞的繁琐人工方法,例如细胞传代(移液)和离心,或过滤装置。所公开的方法、装置和系统用单个(但可扩展的)微流控生物反应器装置和引导试剂和细胞流动的可编程控制器代替复杂的“生产线”过程(细胞选择/基因转移/扩增)。本发明还解决了用于细胞和基因治疗的细胞制造的组织匹配(自体或同种异体)的“扩展”的费用。

[0319] 在提供大规模细胞生产的实施方案中,平行流阻网络确保到每个微流控亚单元的流是相同的并且不受例如供给通道几何形状或流动通道几何形状的影响。有利地,针对小规模(单个微流控生物反应器)和大规模(并联连接的多个微流控生物反应器)系统部署相同的操作和生产参数,包括流量和介质成分。该过程以小规模廉价地优化,并且通过平行复制按扩展,如果要生长的细胞数目增加,则不需要重复优化过程。

[0320] 有利地,微流控电阻并联网络的使用保证了到多单元处理器或堆叠中的每个微流控生物反应器的相同的流动,尽管大规模系统中的各个堆叠可以在控制器的控制下单独地配置,以用于根据各个患者需要的方案并行处理细胞。在测试过程中的意外观察是,在横向流动的情况下,细胞在生长阶段期间(以及在细胞沉积期间)填充连续的下游凹槽,并且可以在出口处连续收获,尽管它们不需要。该优点在常规使用批处理(袋或搅拌生物反应器)进行的现有大规模生产中不存在。

[0321] 当在本说明书(包括权利要求书)中使用术语“包括(comprise)”、“包括(comprises)”、“包括(comprised)”、“包括(comprising)”时,应当将其解释为指定所陈述的特征、整数,步骤或部件的存在,但不排除一个或更多个其他特征、整数、步骤或部件或其组合的存在。

[0322] 应当理解,在不脱离所附权利要求限定的本发明范围的情况下,可以对先前描述的部分进行各种修改、添加和/或改变。

[0323] 未来的专利申请可以基于或要求本申请的优先权在各个国家提交。应当理解,所附权利要求仅通过示例性的方式提供,并且不旨在限制在任何这样的未来申请中可能要求保护的范围。以后可以将特征添加至权利要求中或从权利要求中省略这些特征,以进一步限定或重新限定本发明。

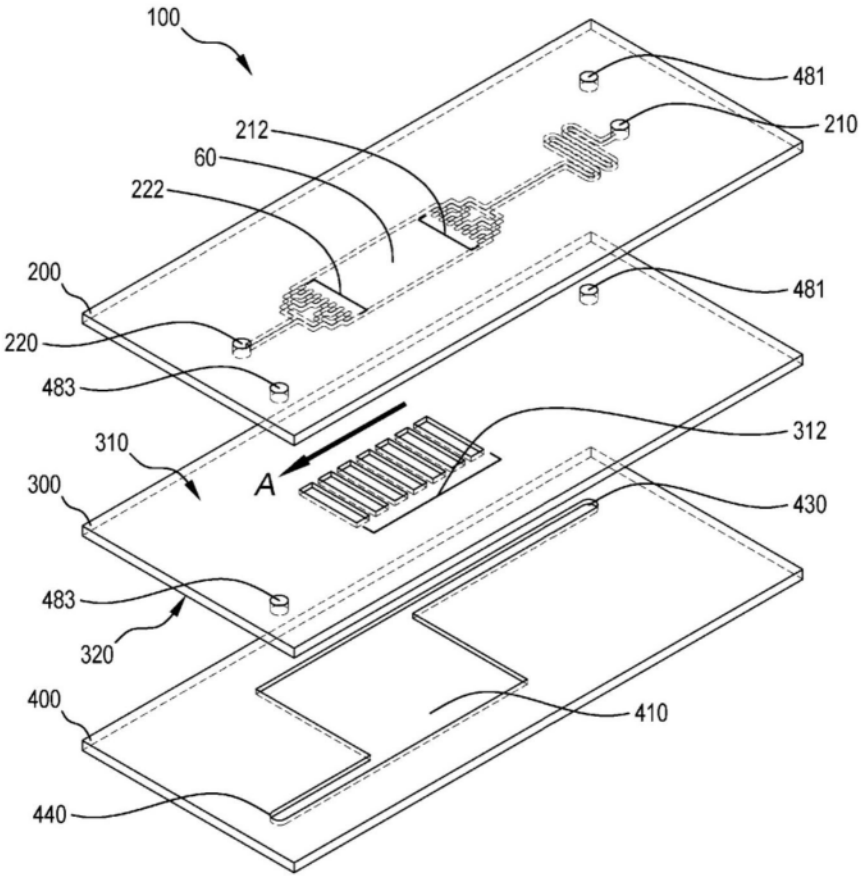

100
481
210
212
60
222
200
481
220
483
310
312
A
300
430
483
320
400
410
440

图1

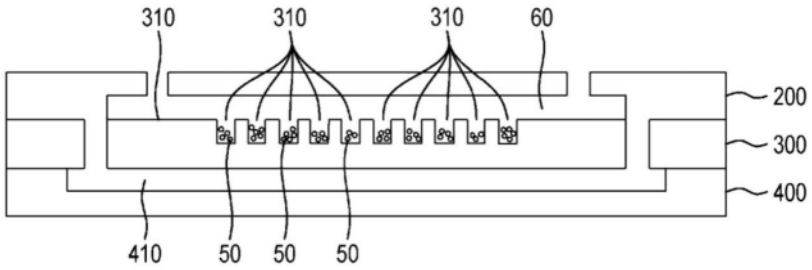

310
310
310
60
200
300
400
410
50
50
50

图2

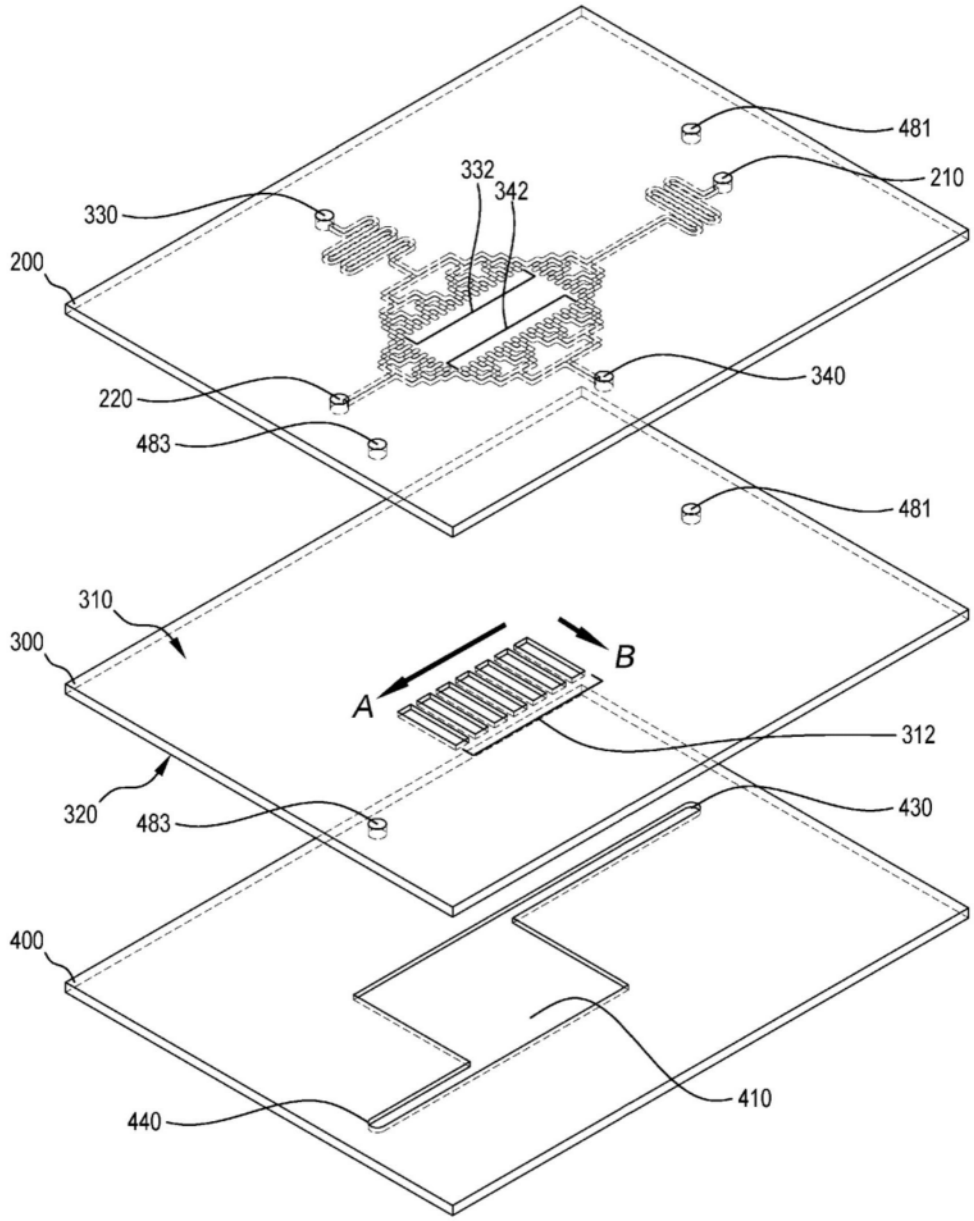

481
210
332
342
330
200
340
220
483
481
310
300
A
B
312
320
483
430
400
410
440

图3

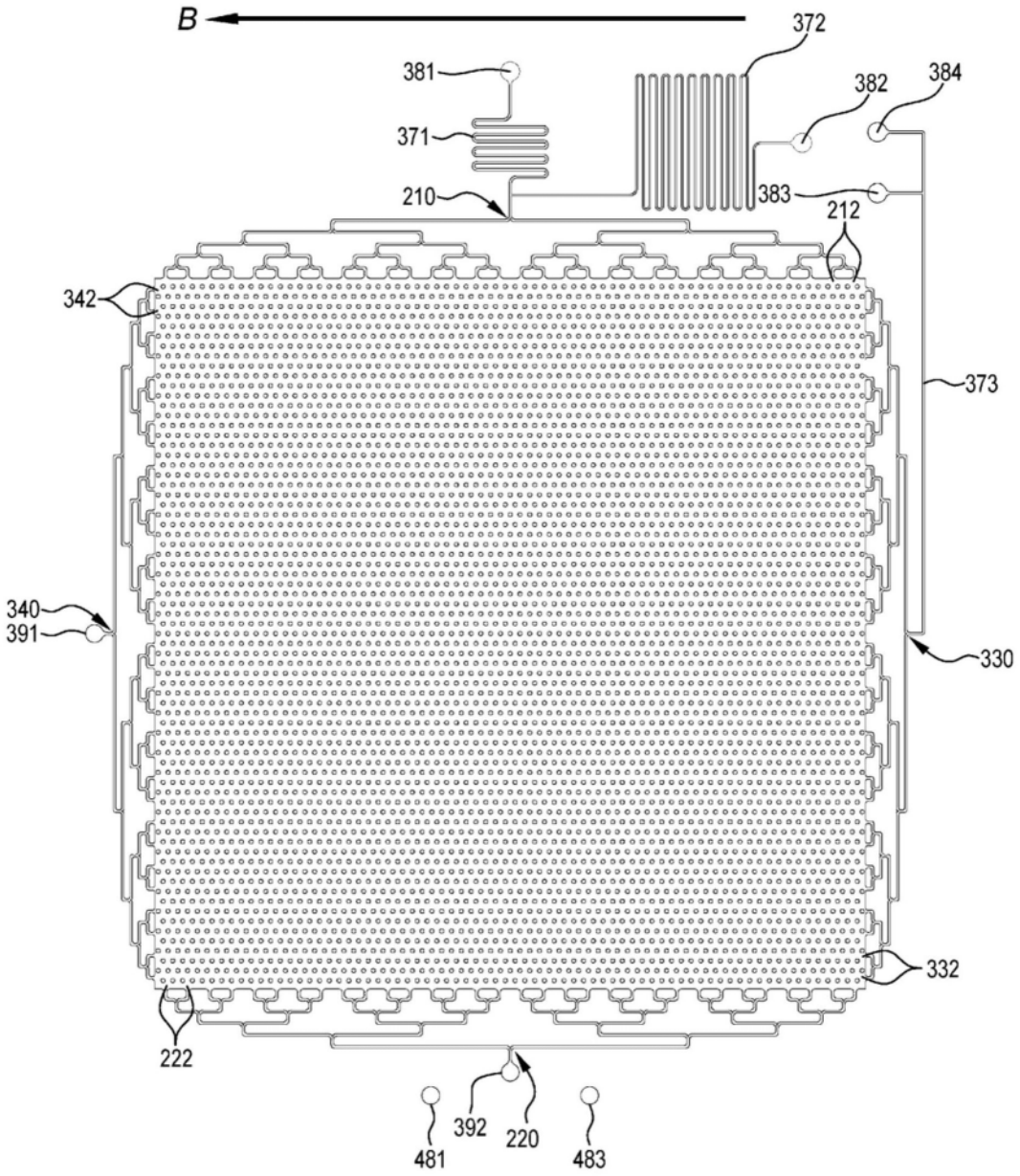

B
372
381
382
384
371
210
383
212
342
373
340
391
330
332
222
392
220
481
483

图4

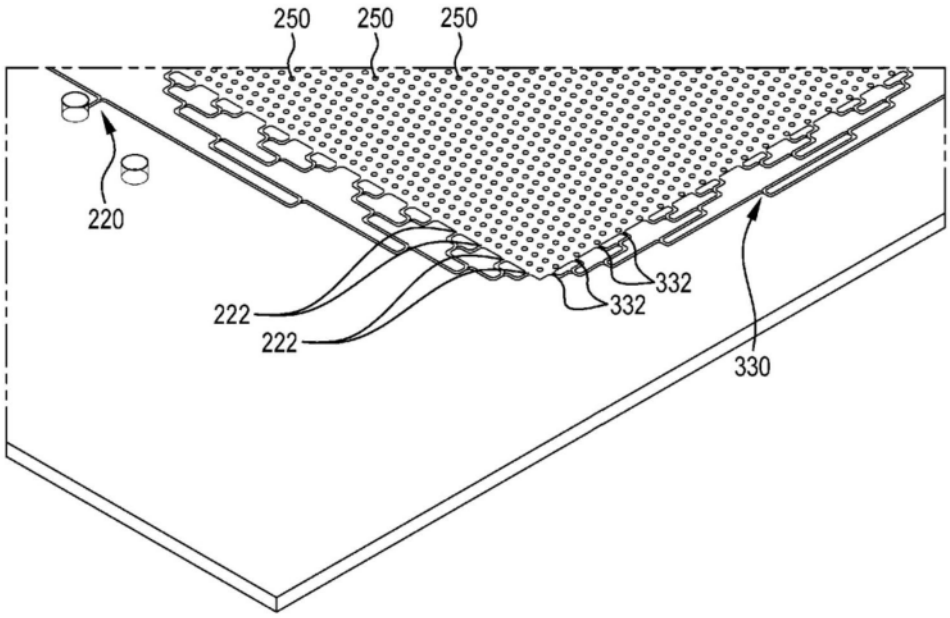


图5

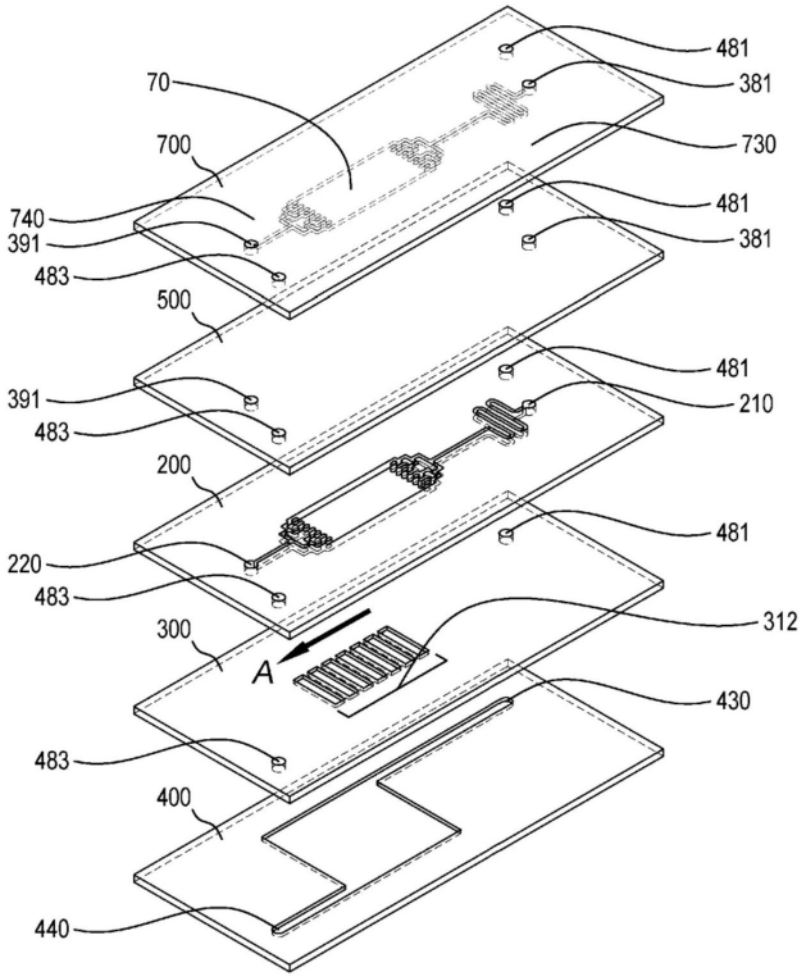

481
381
730
481
381
70
700
740
391
483
500
481
210
391
483
200
481
220
483
312
300
A
430
483
400
440

图6

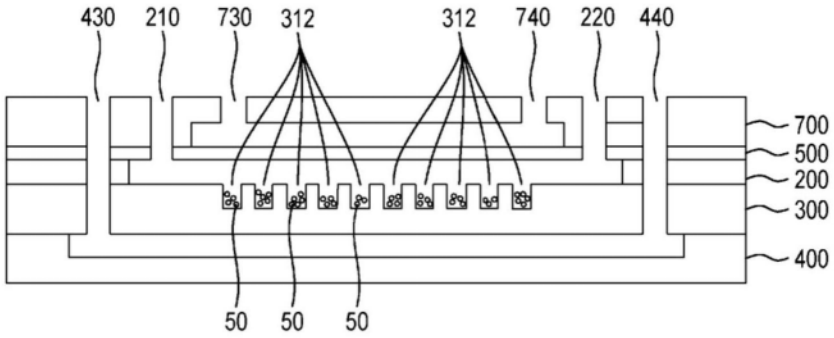

430
210
730
312
312
740
220
440
700
500
200
300
400
50
50
50

图7

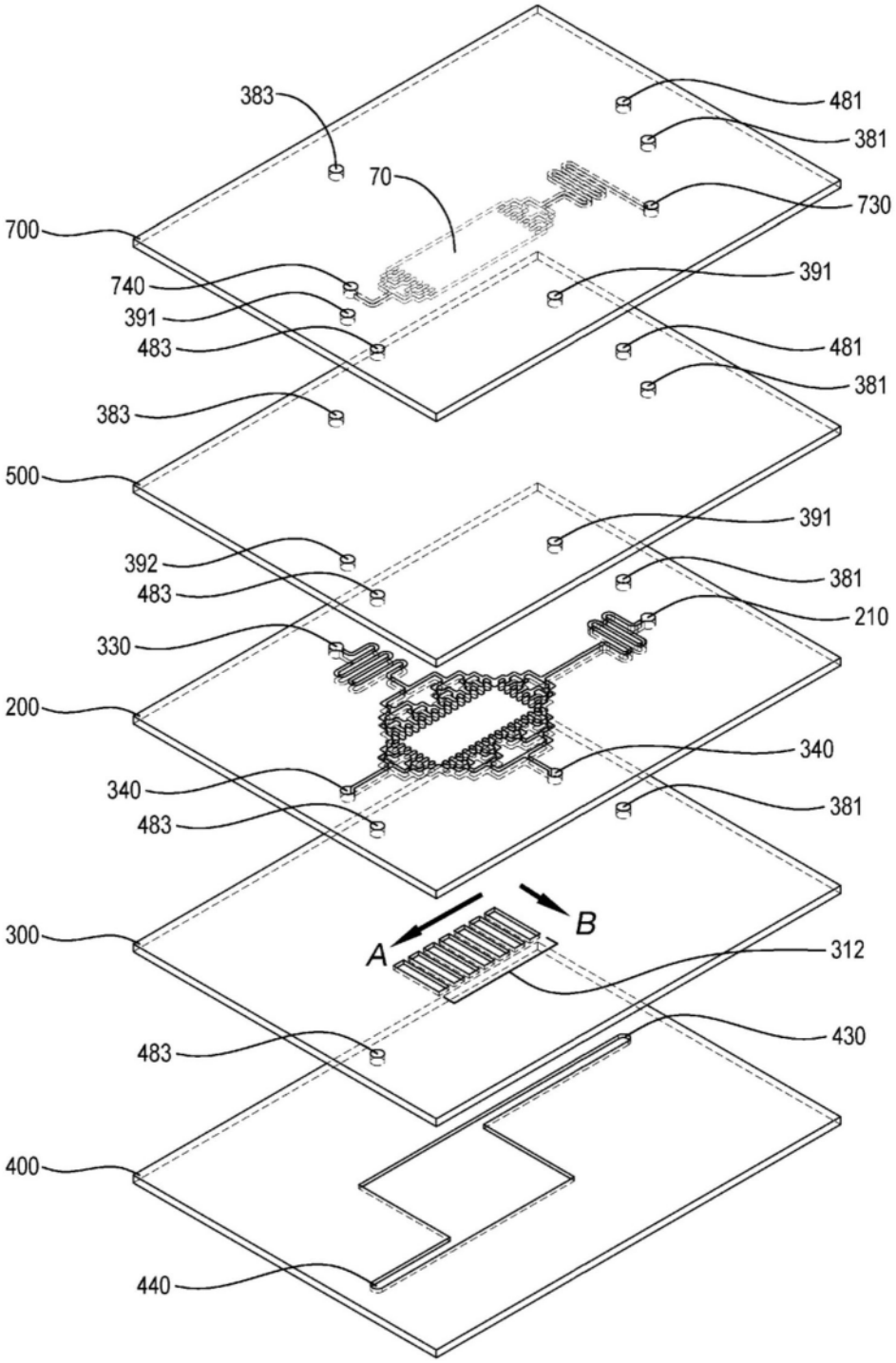

383
481
381
70
730
700
740
391
391
483
481
381
383
500
391
392
381
483
210
330
200
340
340
381
483
B
A
300
312
483
430
400
440

图8

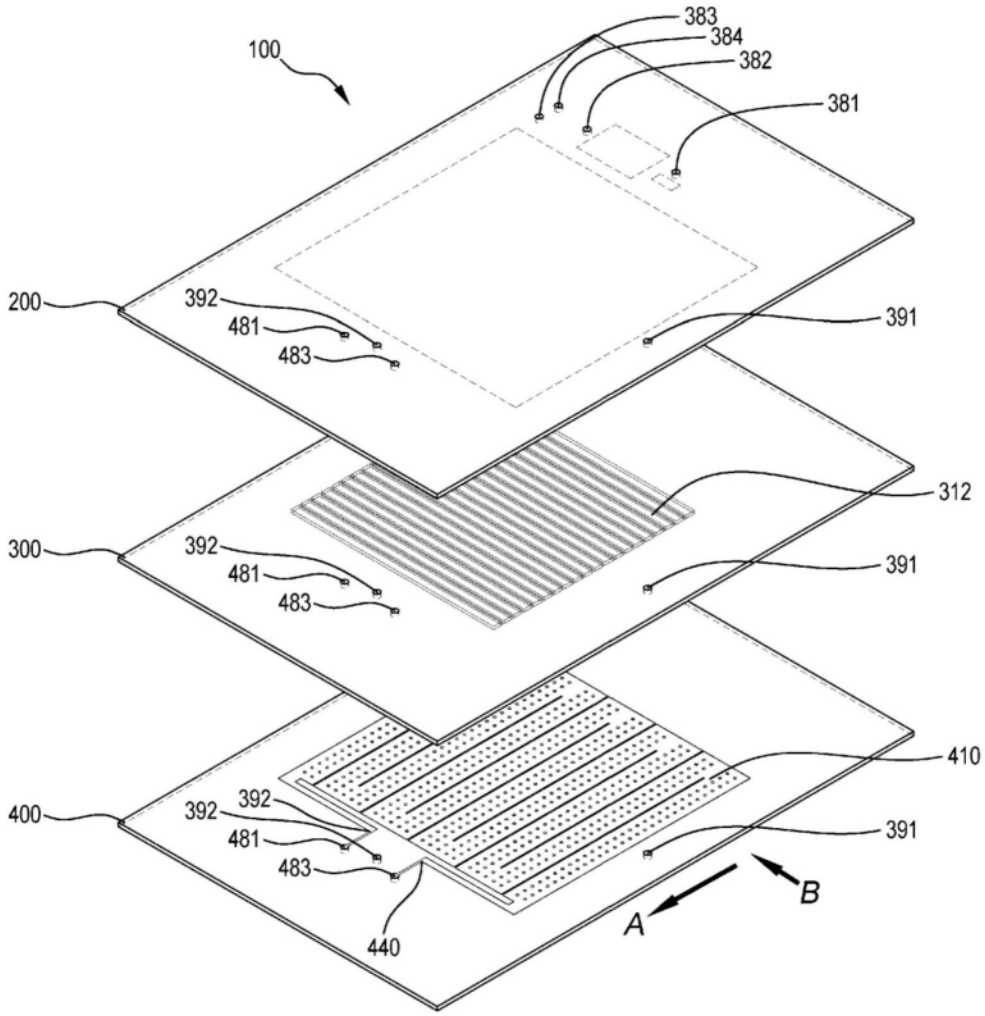

100
383
384
382
381
200
392
481
483
391
312
300
392
481
483
391
410
400
392
392
481
483
391
440
A
B

图9

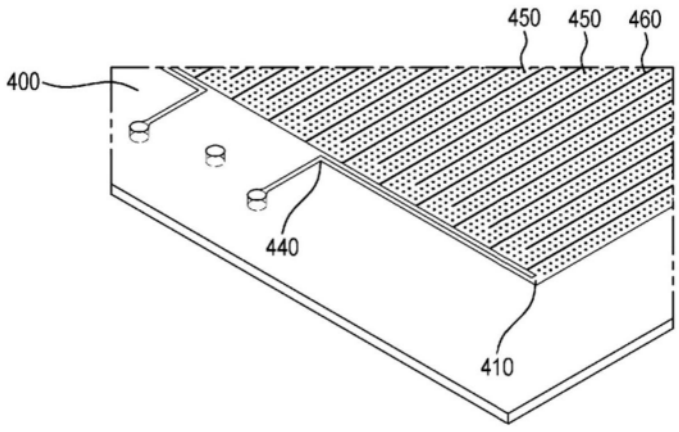

450
450
460
400
440
410

图10

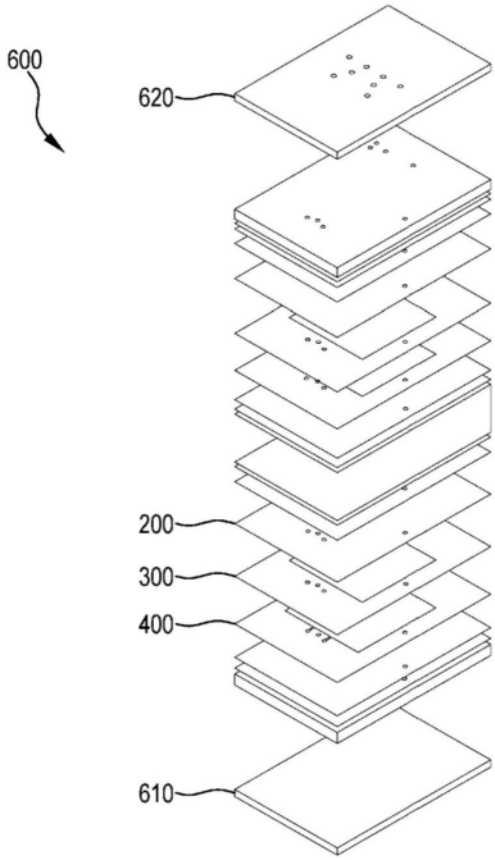


图11A

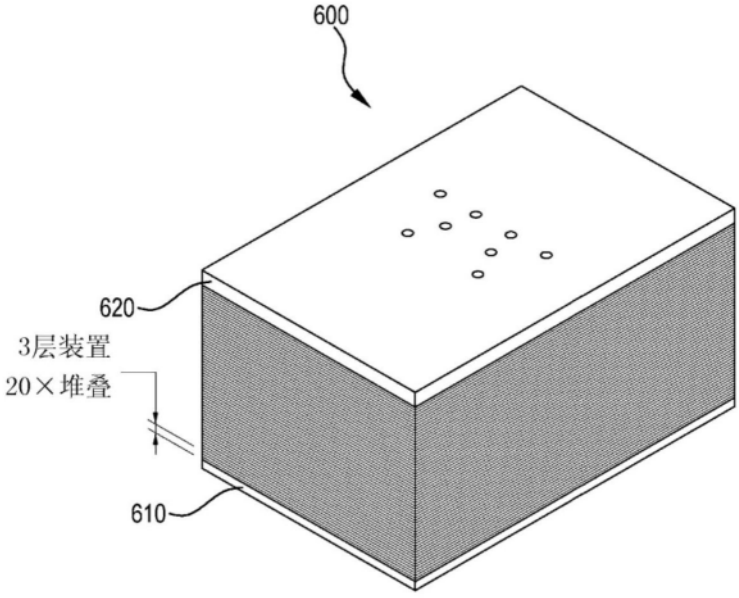


图11B

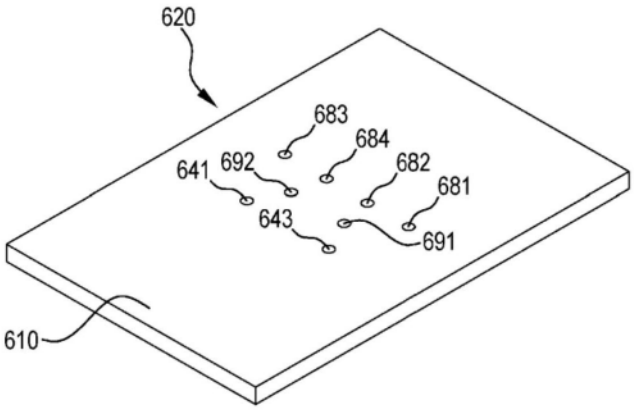

620
683
684
641
692
682
681
643
691
610

图12A

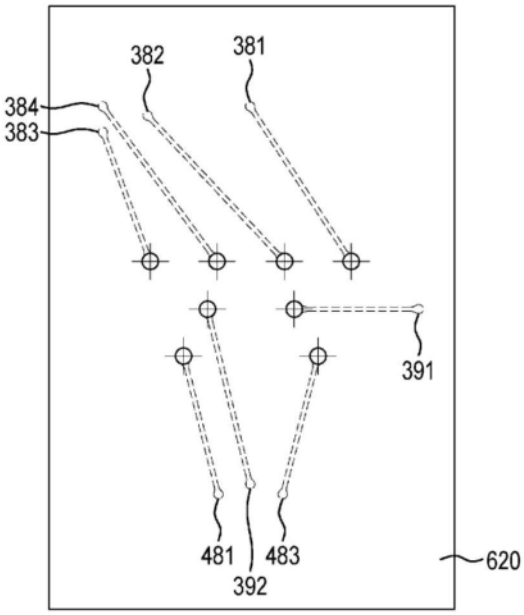

382
381
384
383
391
481
483
620
392

图12B


620

图12C

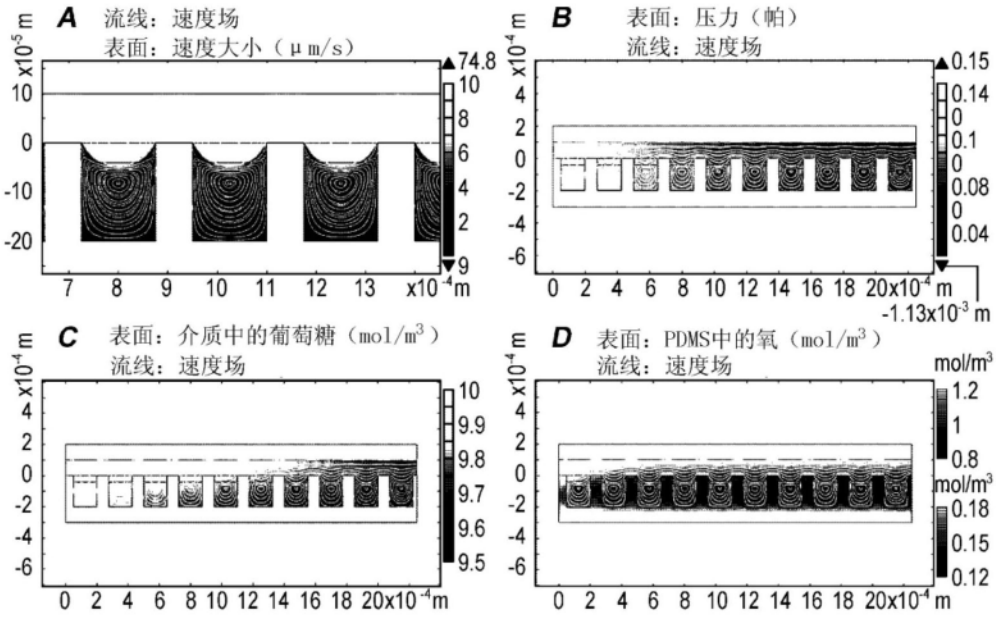

A
流线：速度场
表面：速度大小（μm/s）
B
表面：压力（帕）
流线：速度场
C
表面：介质中的葡萄糖（mol/m3）
流线：速度场
D
表面：PDMS中的氧（mol/m3）
流线：速度场
mol/m3

图13

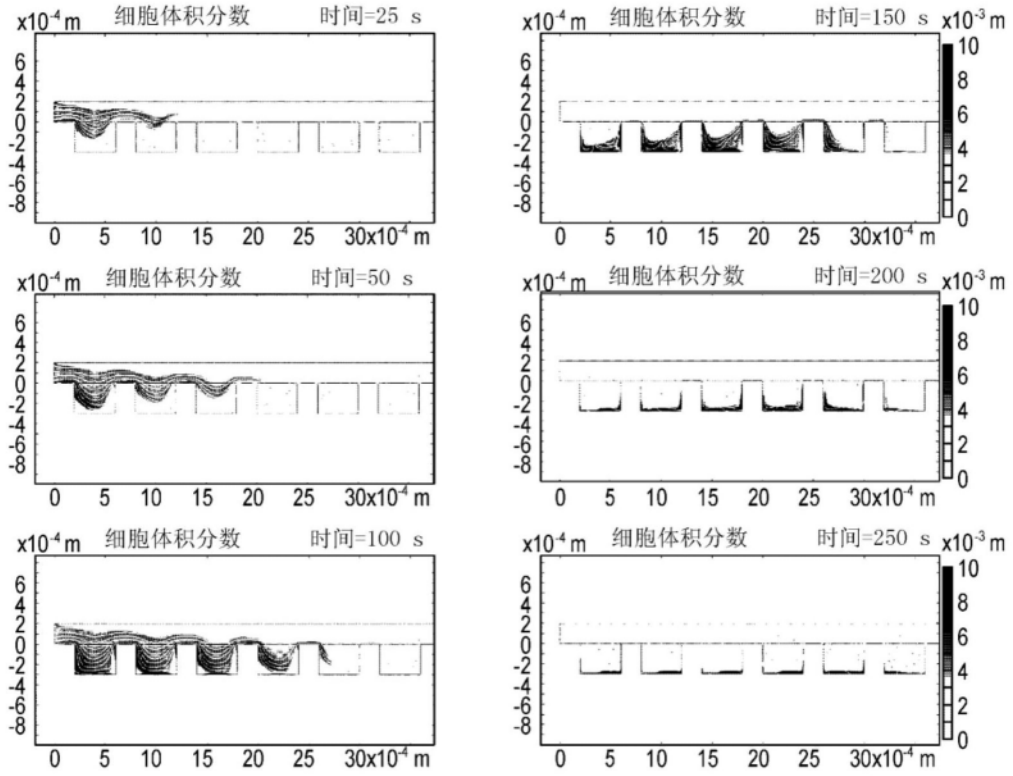

细胞体积分数 时间=25 s
细胞体积分数 时间=150 s
细胞体积分数 时间=50 s
细胞体积分数 时间=200 s
细胞体积分数 时间=100 s
细胞体积分数 时间=250 s
x10-4 m
x10-3 m
30x10-4 m

图14

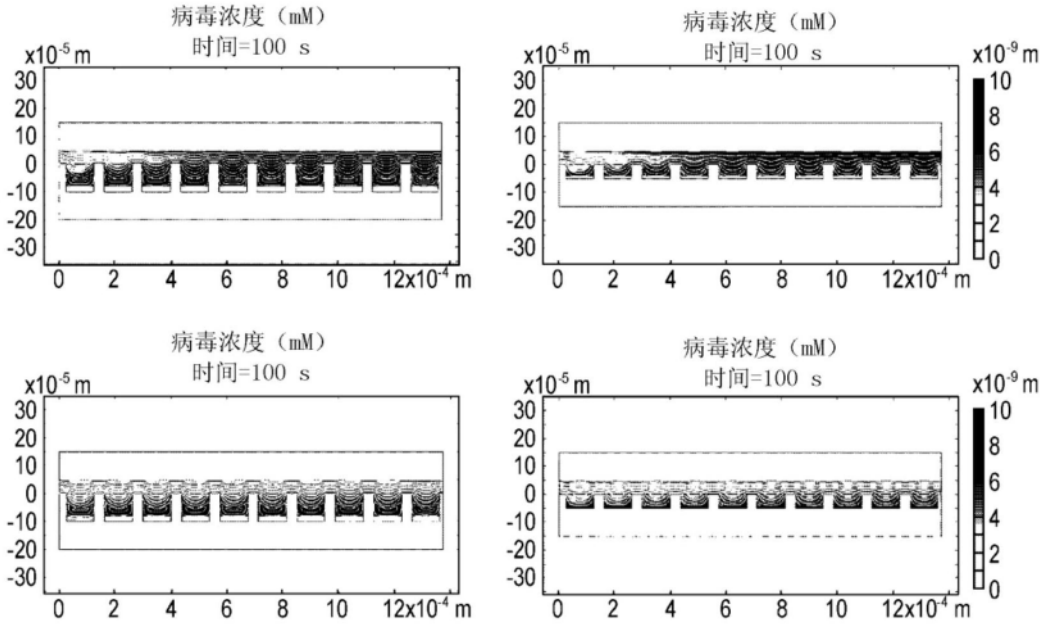

病毒浓度（mM）
时间=100 s
x10-5 m
x10-9 m
12x10-4 m

图15

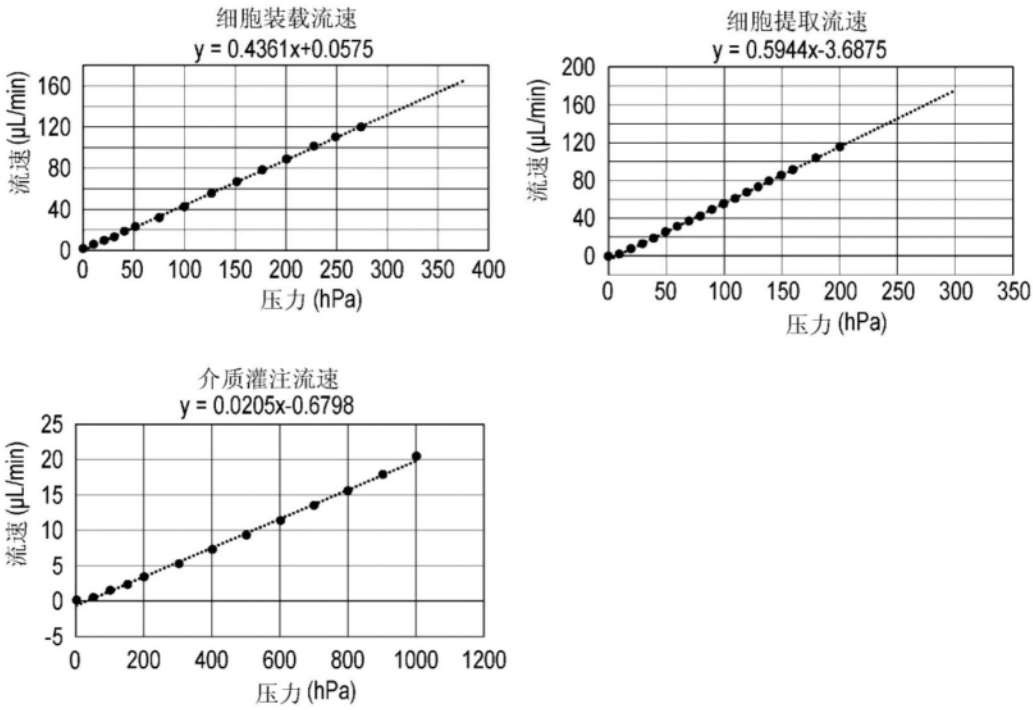

细胞装载流速
y = 0.4361x+0.0575
流速 (μL/min)
压力 (hPa)
细胞提取流速
y = 0.5944x-3.6875
流速 (μL/min)
压力 (hPa)
介质灌注流速
y = 0.0205x-0.6798
流速 (μL/min)
压力 (hPa)

图16

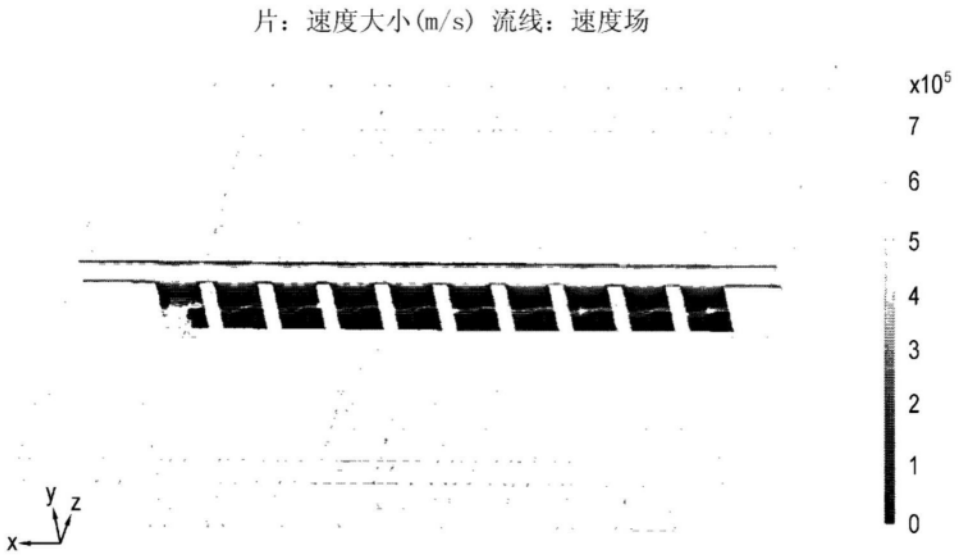

片：速度大小(m/s) 流线：速度场
x10^5
7
6
5
4
3
2
1
0
y
z
x

图17A

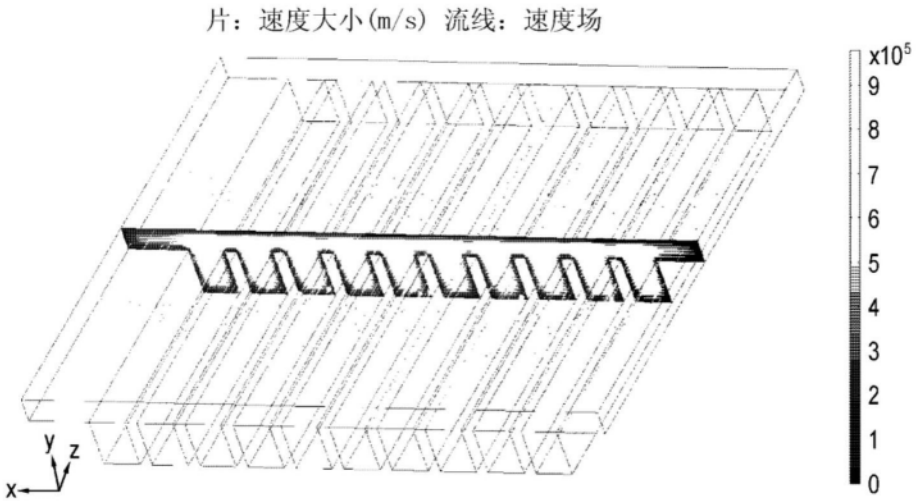


图17B

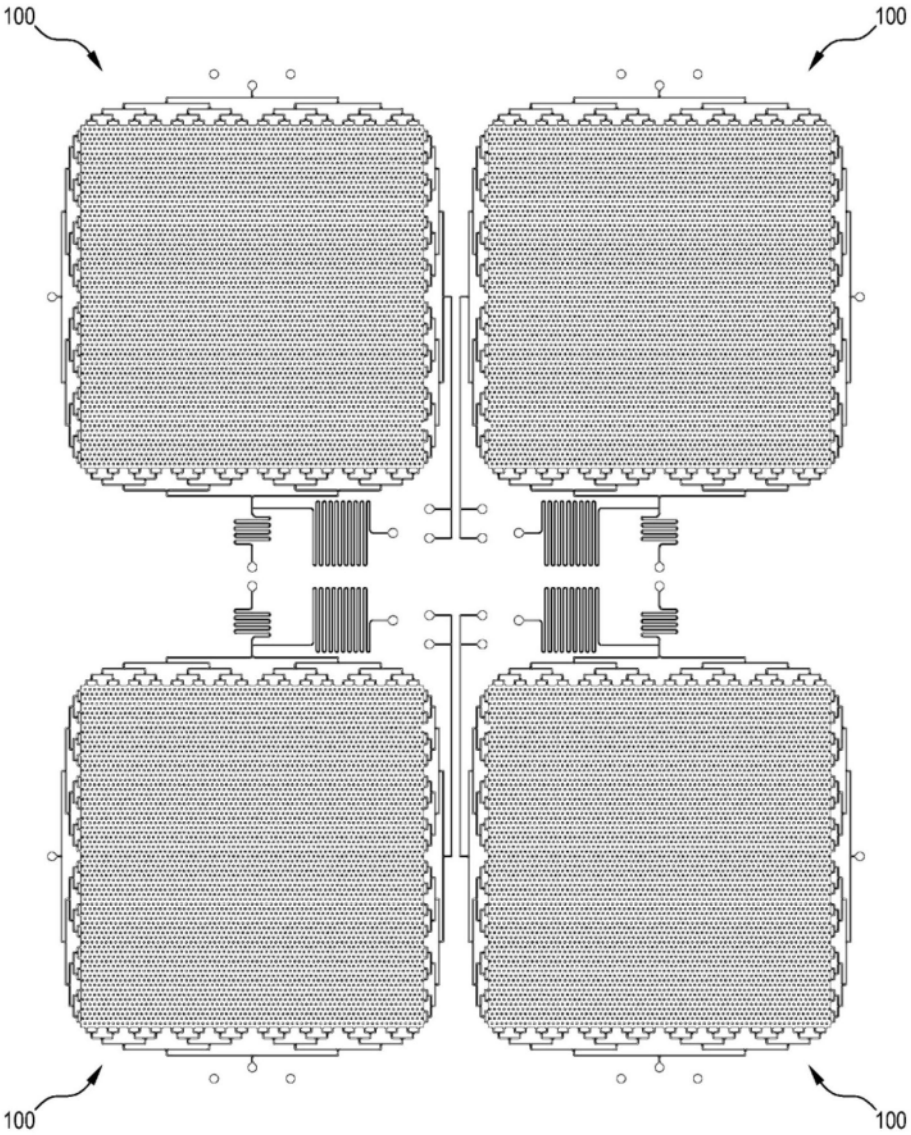


图18

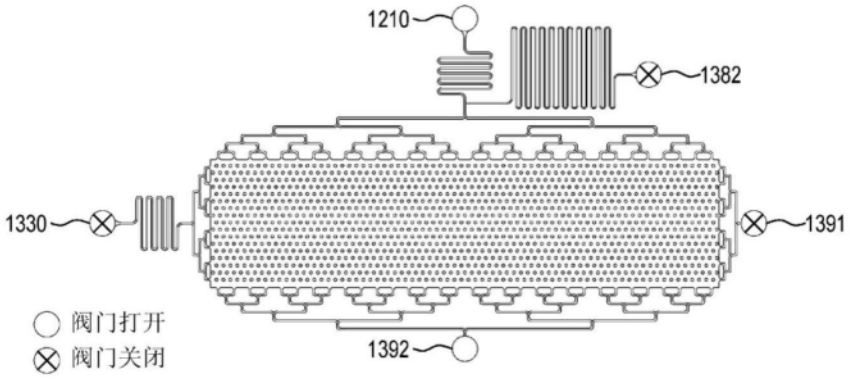


图19A

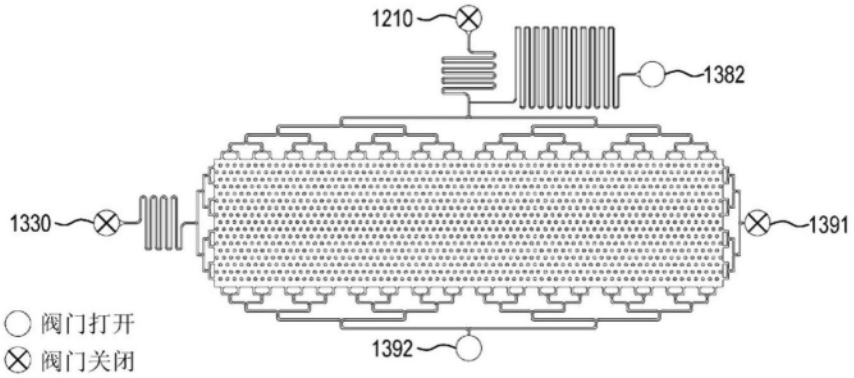


图19B

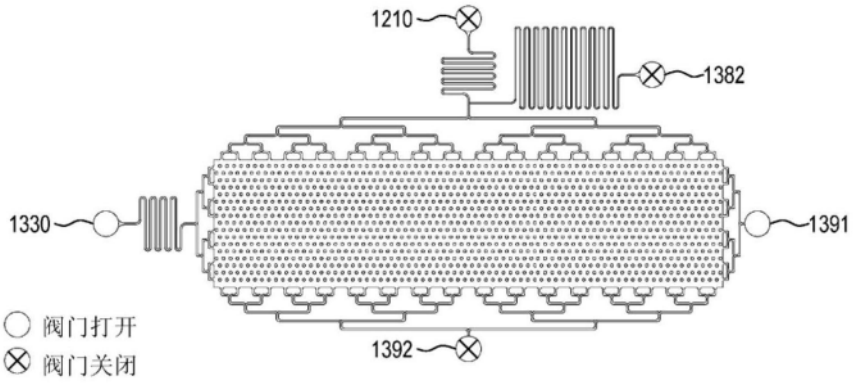


图19C

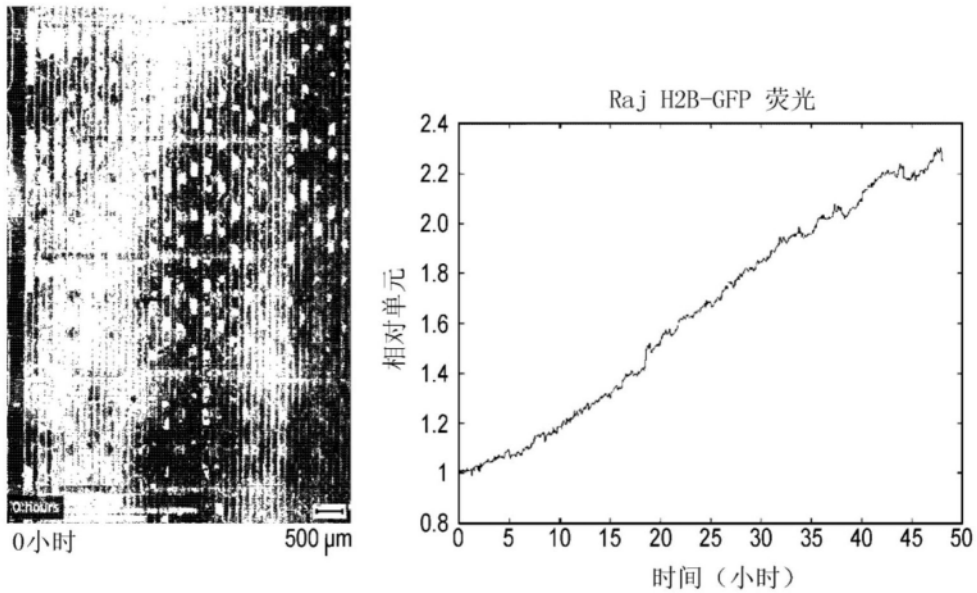


图20

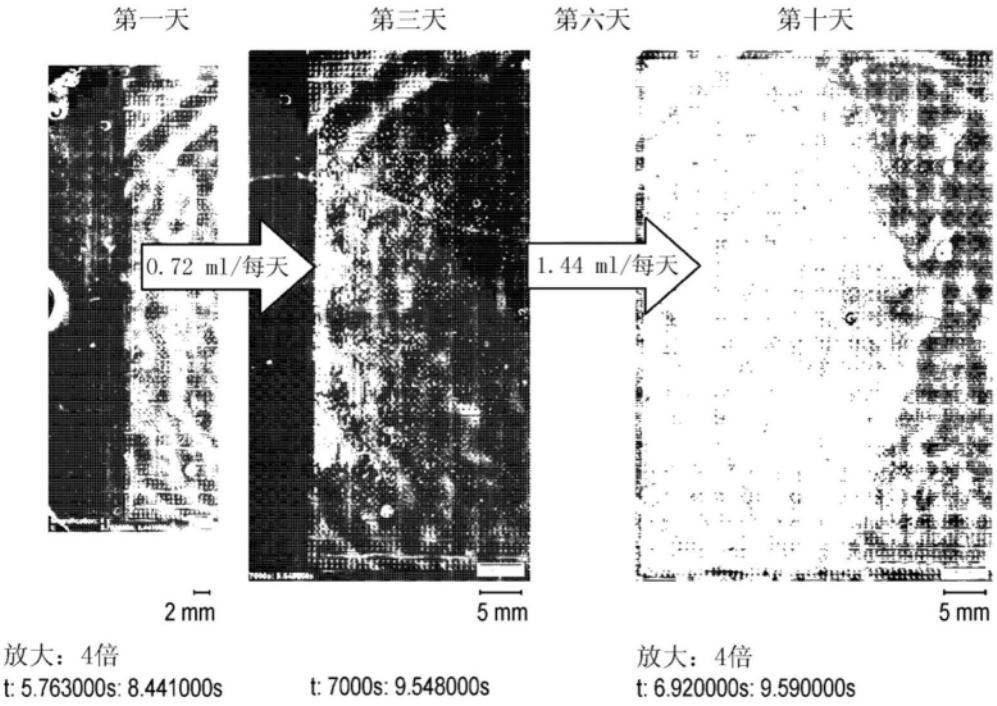

第一天
第三天
第六天
第十天
0.72 ml/每天
1.44 ml/每天
2 mm
5 mm
5 mm
放大：4倍
t: 5.763000s: 8.441000s
t: 7000s: 9.548000s
放大：4倍
t: 6.920000s: 9.590000s

图21

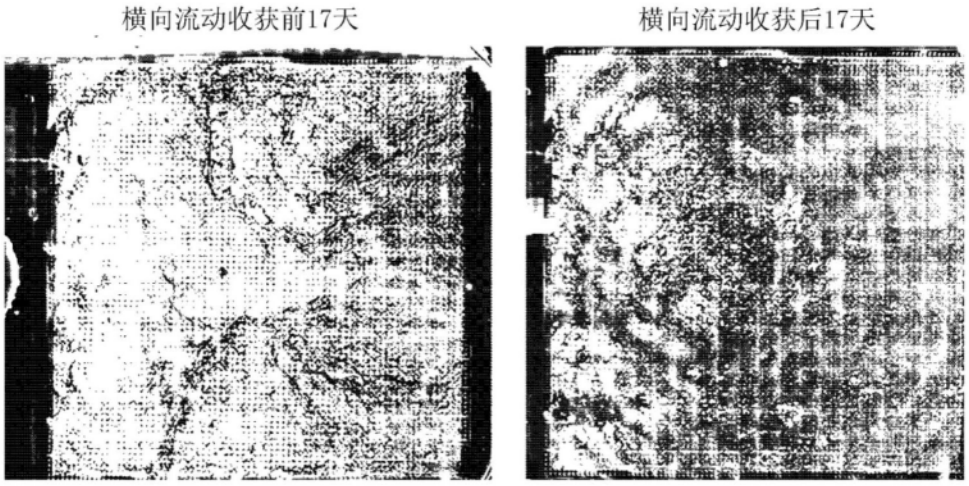

横向流动收获前17天
横向流动收获后17天

图22

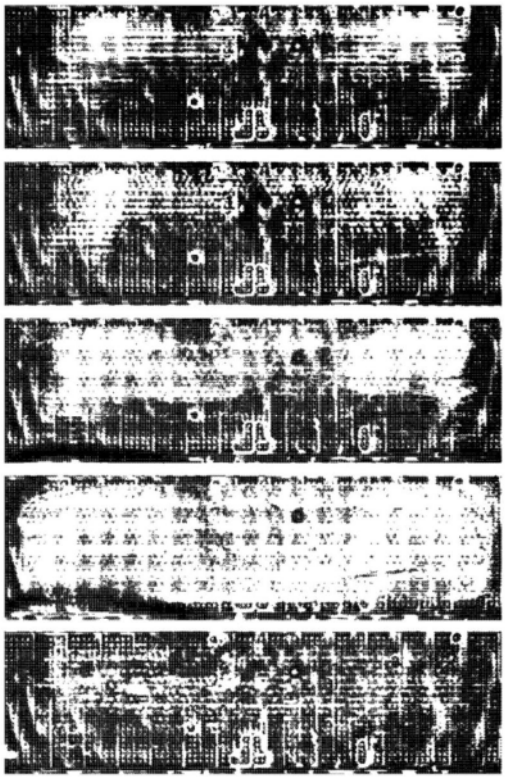

第0天（接种后）
第三天
第八天
第十二天
第十四天（收获后）

图23

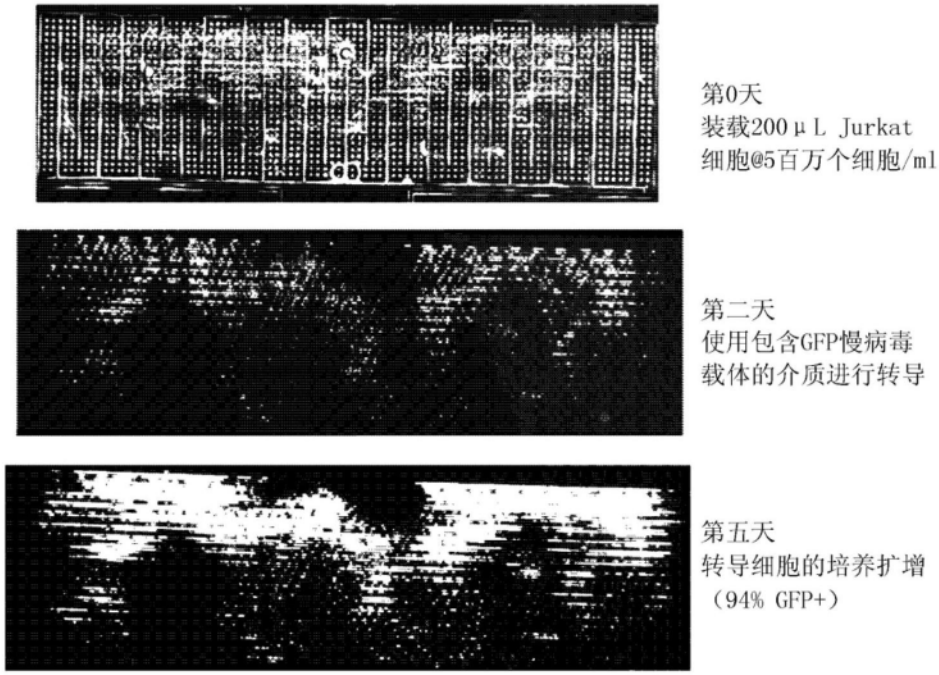

第0天
装载200μL Jurkat
细胞@5百万个细胞/ml
第二天
使用包含GFP慢病毒
载体的介质进行转导
第五天
转导细胞的培养扩增
（94% GFP+）

图24

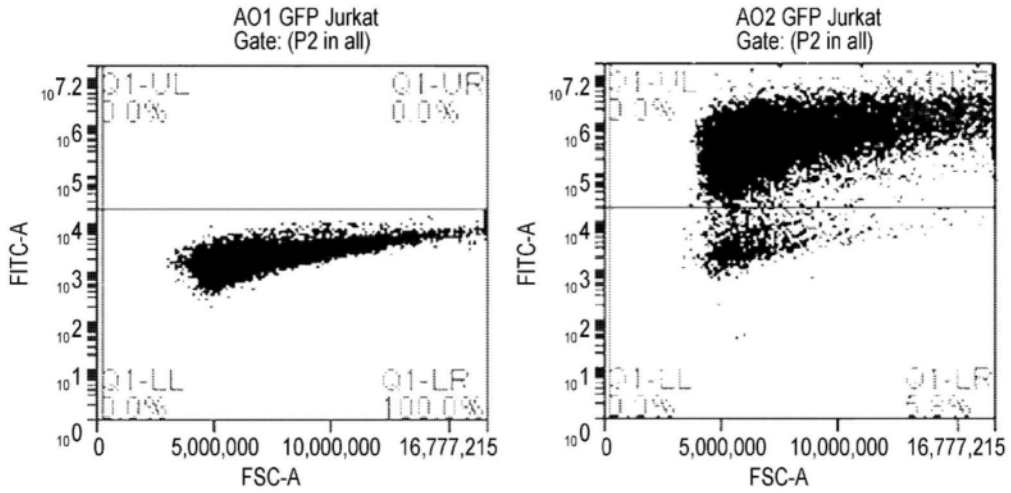

AO1 GFP Jurkat
Gate: (P2 in all)
Q1-UL
0.0%
Q1-UR
0.0%
Q1-LL
0.0%
Q1-LR
100.0%
FITC-A
FSC-A
0
5,000,000
10,000,000
16,777,215
AO2 GFP Jurkat
Gate: (P2 in all)
Q1-LR
5.8%

图25

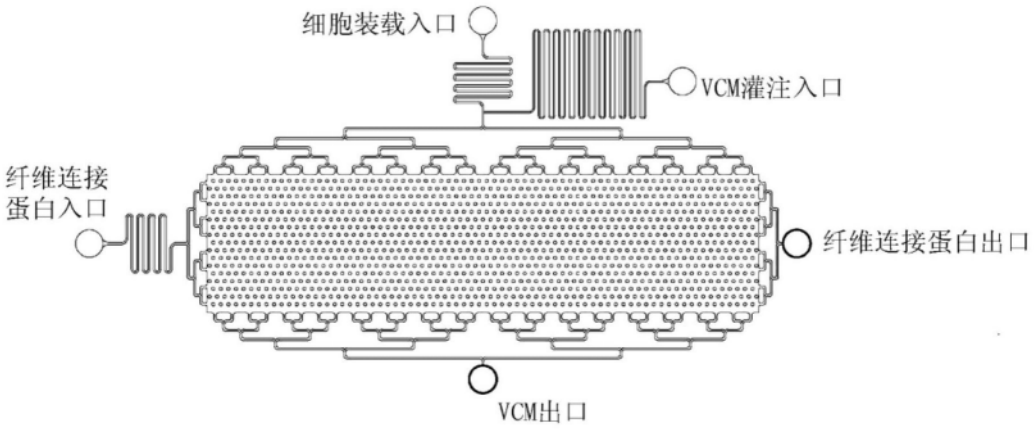

细胞装载入口
VCM灌注入口
纤维连接
蛋白入口
纤维连接蛋白出口
VCM出口

图26

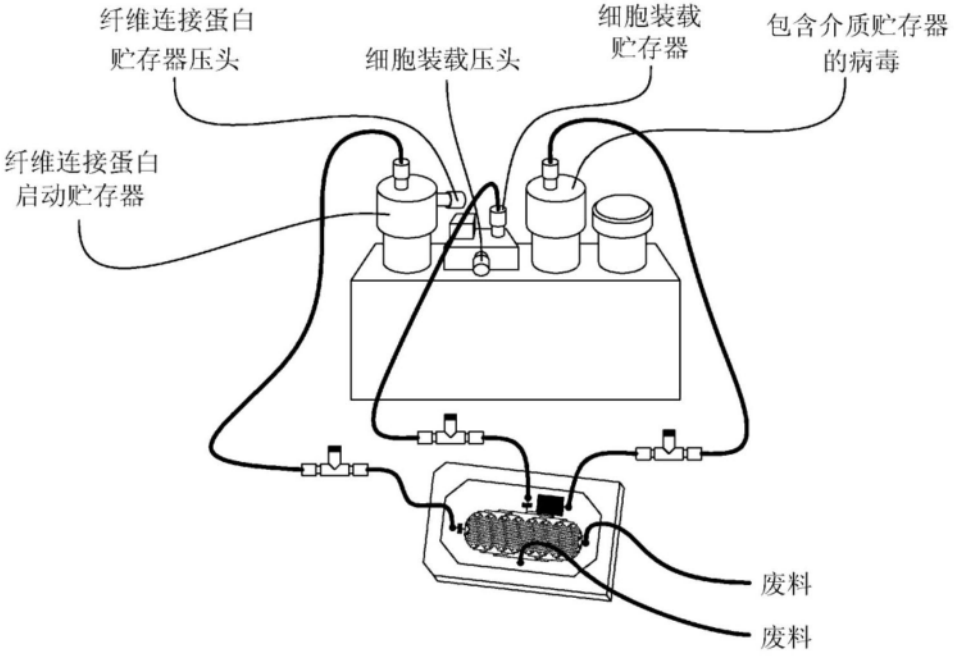
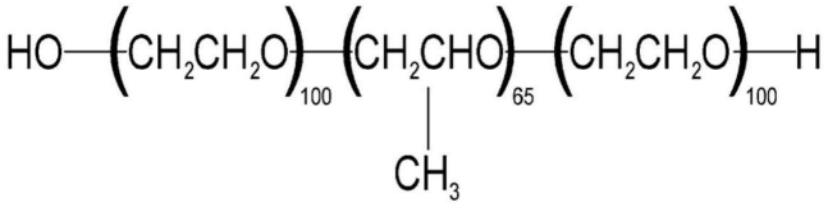


图27



普朗尼克F127

图28

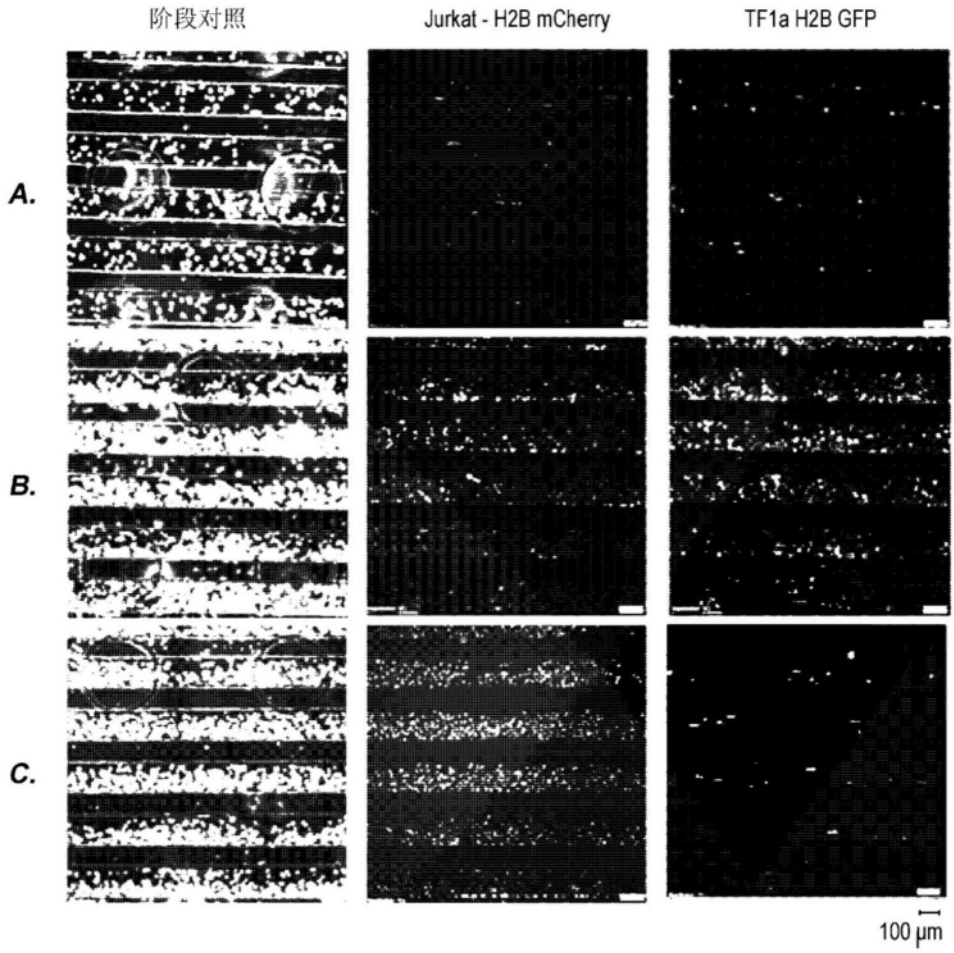

阶段对照
Jurkat - H2B mCherry
TF1a H2B GFP
A.
B.
C.
100 μm

图29

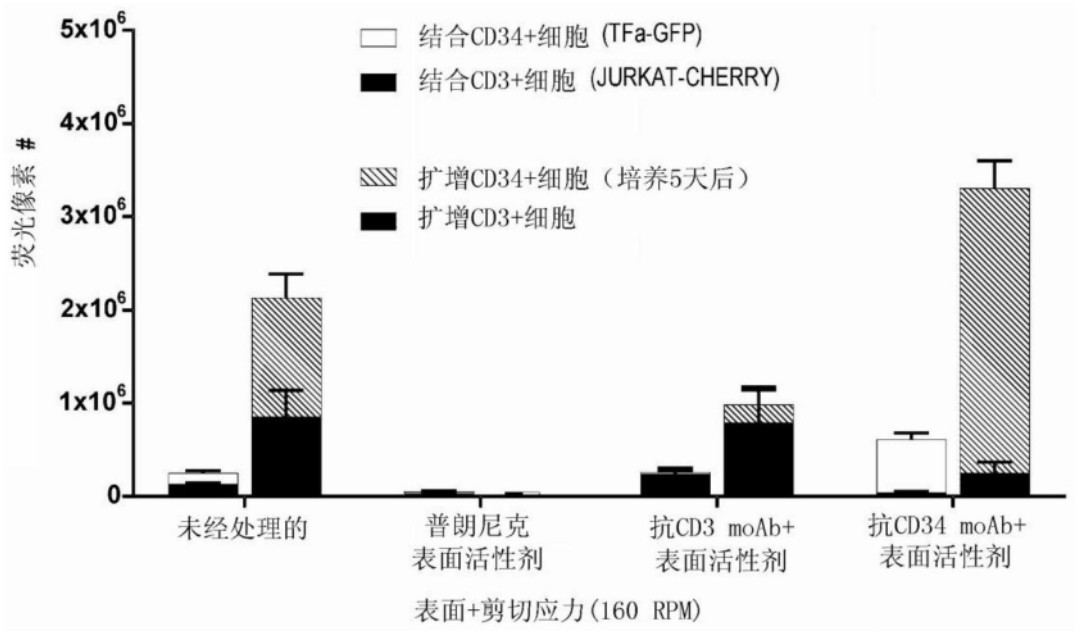

结合CD34+细胞 (TFa-GFP)
结合CD3+细胞 (JURKAT-CHERRY)
扩增CD34+细胞（培养5天后）
扩增CD3+细胞
荧光像素 #
5x10^6
4x10^6
3x10^6
2x10^6
1x10^6
0
未经处理的
普朗尼克 表面活性剂
抗CD3 moAb+ 表面活性剂
抗CD34 moAb+ 表面活性剂
表面+剪切应力(160 RPM)

图30

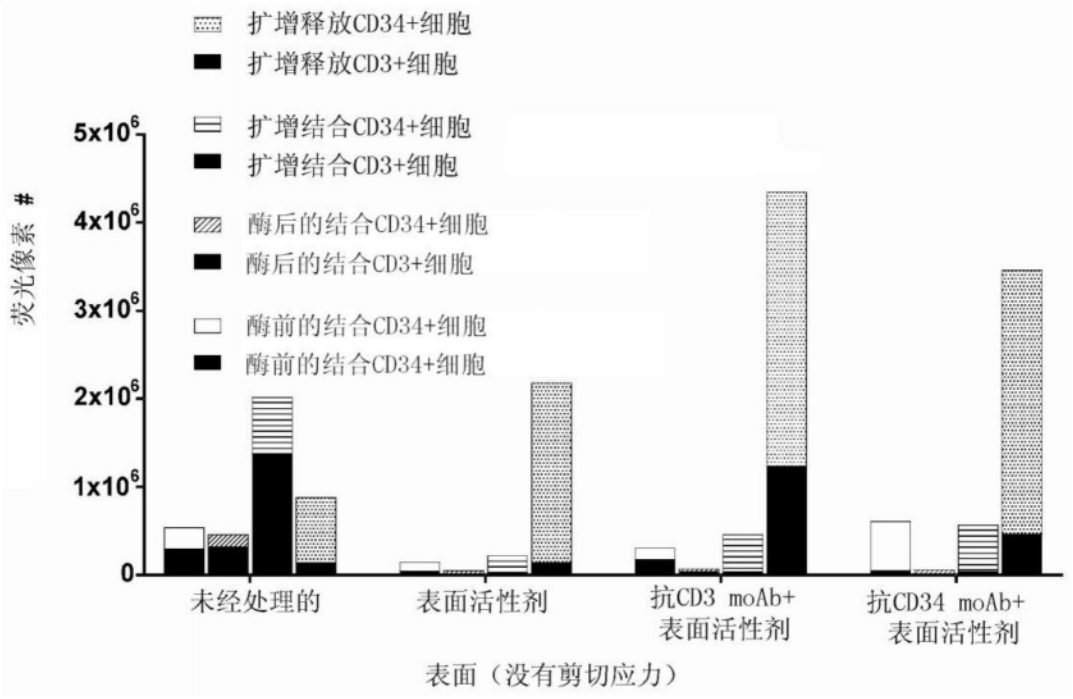

扩增释放CD34+细胞
扩增释放CD3+细胞
扩增结合CD34+细胞
扩增结合CD3+细胞
酶后的结合CD34+细胞
酶后的结合CD3+细胞
酶前的结合CD34+细胞
酶前的结合CD34+细胞
荧光像素 #
5x10^6
4x10^6
3x10^6
2x10^6
1x10^6
0
未经处理的
表面活性剂
抗CD3 moAb+ 表面活性剂
抗CD34 moAb+ 表面活性剂
表面（没有剪切应力）

图31