



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102089420 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 13

(21) 申请号 200980126878. 7

(22) 申请日 2009. 07. 08

(30) 优先权数据

61/078, 966 2008. 07. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/049944 2009. 07. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/006055 EN 2010. 01. 14

(73) 专利权人 威尔森沃尔夫制造公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 约翰·R·威尔逊

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

公司 32200

代理人 楼高潮

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006. 01)

C12M 1/24 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2008073314 A2, 2006. 06. 19, 说明书摘

要, 图 1-2, 7, 11-13, 18, 说明书第 19-21 页.

US 5693537 A1, 1997. 12. 02, 全文.

US 6562616 B1, 2003. 05. 13, 全文.

US 20070026516 A1, 2007. 02. 01, 摘要, 图 1, 4-5, 8-9.

US 20050148068 A1, 2005. 07. 07, 全文.

审查员 李谦

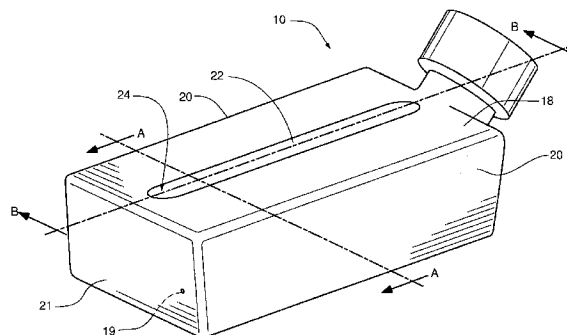
权利要求书2页 说明书10页 附图18页

(54) 发明名称

改进的气体可渗透性细胞培养装置及使用方法

(57) 摘要

本发明公开了提供更为有效的细胞培养的气体可渗透性装置和方法。



1. 一种气体可渗透性培养装置,包括:
一个进入孔,和
一侧壁、一顶壁和一底壁,和
多于一个的支架,一个位于另一个之上,每个所述的支架通过一空间隔离,所述的空间形成细胞隔间,和
一歧管,连接所述的进入孔至所述的细胞隔间,和
多于一个的支架具有穿透支架的上表面和下表面的支架开口,至少一个气体隔间,所述的气体隔间穿透所述的支架开口并位于至少一个所述支架的一部分的空余的空间中,所述的气体隔间具有一开口,其与环境气体相流通,并且所述的气体隔间具有至少两个壁,至少一个为由气体可渗透性材料构成的壁,所述的至少一个由气体可渗透性材料构成的壁不是支架,其中所述的气体隔间的至少一个由气体可渗透性材料构成的壁通常定位为垂直于所述支架。
2. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的一个气体可渗透性材料的壁存在于每个细胞隔间中。
3. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的侧壁由气体可渗透性材料构成。
4. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的侧壁不由气体可渗透性材料构成。
5. 根据权利要求 1 所述的装置,还包括一个朝向所述的气体隔间的开口,所述朝向所述的气体隔间的开口定位在所述的底部上。
6. 根据权利要求 1 所述的装置,还包括一个朝向所述的气体隔间的开口,所述朝向所述的气体隔间的开口定位在所述的顶部上。
7. 根据权利要求 1 所述的装置,还包括一个朝向所述的气体隔间的开口,所述朝向所述的气体隔间的开口位于所述的侧壁上。
8. 根据权利要求 1 所述的装置,还包括朝向所述气体隔间的开口,所述朝向所述气体隔间的开口位于两个相对的壁上,从而所述的气体隔间是一个穿过整个气体可渗透性装置的开口。
9. 根据权利要求 1 所述的装置,还包括朝向所述气体隔间的开口,所述朝向所述气体隔间的开口通常为矩形的形状。
10. 根据权利要求 1 所述的装置,其中该气体可渗透性装置的所述侧壁的至少一部分由气体可渗透性材料构成。
11. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的支架包括聚苯乙烯材料。
12. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的气体隔间的所述至少一个壁的所述气体可渗透性材料为硅树脂。
13. 根据权利要求 12 所述的装置,其中所述硅树脂的厚度为 0.022 英寸或更小。
14. 根据权利要求 1 所述的装置,其中所述的支架具有一开口,所述的气体隔间穿透该开口。
15. 根据权利要求 1 所述的装置,其中进入孔被置于该装置的相对末端。
16. 根据权利要求 15 所述的装置,其中所述的气体隔间开口为矩形并且朝向气体隔间的开口的最长侧通常垂直于相对末端,所述进入孔存在于相对末端的附近。
17. 根据权利要求 1 所述的装置,其包括气体隔间支撑结构。

18. 根据权利要求 1 所述的装置,其中位于最上面的支架之上的空间超过任意其它的支架之间的空间。

19. 根据权利要求 1 所述的装置,其中一间隙存在于所述的支架和壁之间,所述的侧壁和 / 或所述的气体隔间的所述的一个壁临近所述的支架。

20. 根据权利要求 1 所述的装置,其中朝向所述气体隔间的所述开口的宽度为至少 0.1 英寸。

21. 在权利要求 1 所述的装置中,在任意所述支架的上表面上到气体可渗透性材料的最远位置的距离不超过任意其它所述支架上表面上的最远位置到气体可渗透性材料的距离。

改进的气体可渗透性细胞培养装置及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 7 月 8 日提交的美国临时申请号 61/078,966 的权益,其在这里通过引用而全部结合到本文中。

[0003] 政府关注

[0004] 本发明作为由美国政府支持的美国国立卫生研究院小企业创新研究基金 R43 GM077778-01 下的一部分,名称为“高效的气体可渗透性细胞培养装置”。

技术领域

[0005] 本发明的技术领域涉及允许更有效的细胞培养过程的气体可渗透性细胞培养装置和细胞培养方法。

[0006] 发明背景

[0007] 在本申请中和在共同待决的美国申请 10/961,814、美国申请 11/952,848、美国申请 11/952,856 中所引用的每个申请、专利和论文,以及在该每个申请中所引用的文献和参考,包括相应于和 / 或要求这些申请和专利的任一个的优先权的每个共同待决的专利申请和每个 PCT 和外国申请或者专利的审查过程,以及在每个申请所引用的文献中所引用或者参考的每篇文献,在这里明确地结合到本文中。

[0008] 对于按比例放大的贴壁细胞的培养,多搁板烧瓶例如 Nunc Cell Factory 和 Corning® Cell Stack 通常被使用。然而,为了给培养中的细胞提供氧气,这些装置需要每个搁板来使气体存在于培养基上。为了使气体存在于装置中,这就需要使该装置较大并在按比例放大的期间难以处理,浪费了实验室空间并且在培养基更换期间需要使用特殊的设备。最终导致了在培养尺寸增加时复杂的和昂贵的方法。需要气液界面来氧化该培养是这些无效用的根本原因。

[0009] 共同待决的美国专利申请 10/961,814(Wilson 等)描述了多搁板装置,其消除了气体存在于每个搁板之上的需要。在一个实施方式中,用于使细胞存在于其上的一系列的搁板状的支架布置成一个在另一个的上面,并且该装置外壁的至少一部分是气体可渗透性的。该气体可渗透性的外壁定向为垂直于该支架。气体通过气体可渗透性外壁的传递允许细胞在缺少气液界面的情况下被氧化。该培养可以在不需要灌注培养基或气体的情况下(即,在静态模式下操作)进行,允许简单的细胞生产方法。然而,随着该装置加宽,细胞与氧源的距离随之增加。在一些点上,细胞离该氧源太远,该装置在水平方向上的可缩放性就变得有限。因此,尽管该装置比传统的装置更加紧凑,但是其在水平方向上的可缩放性是有限的。

[0010] 共同待决的美国专利申请 11/952,848(Wilson)也描述了消除气体存在于每个搁板之上的需要的装置。在各种实施方式中,一系列的细胞隔间被设置为一个在另一个之上。每个细胞隔间的底部是气体可渗透性的。在使用中,细胞可以存在于该气体可渗透性表面之上,该气体可渗透性表面表现为气体可渗透性支架的功能。当该装置水平和垂直缩放时,这就允许每个细胞与周围氧源的距离一致。然而,这种类型的装置的制造可能会比描述于

共同待决的‘814 中的装置更加困难和昂贵,对于最终使用者抬高了其成本。更进一步,由于存在更大的气体可渗透性表面区域,装置中培养基的蒸发可能会比传统的多搁板烧瓶和共同待决的‘814 中的装置以更高的速率发生。已公开的构造最小化了这一问题,但是它们加入了增加成本的特征。

[0011] 尽管共同待决的‘848 和共同待决的‘814 相对于传统的多搁板烧瓶提供了更多的有效几何空间,其还存在对于无论是共同待决的‘848 还是共同待决的‘814 都不理想的细胞培养的应用。仅作为一个例子,干细胞经常以低表面密度培养,以使得细胞相互之间不要离得太近,从而避免不期望的分化。当该培养产生的细胞的数量增长时,该培养装置需要提供更大的表面区域以保持细胞处于低表面密度。由此,一个允许在水平和垂直方向上按比例放大的装置就是有用的。为了最有效的利用空间,其应当在气液界面缺失的情况下起作用并且不需要装备来泵送培养基或者气体通过。尽管共同待决的‘848 提供了那些特性,以到周围的气体一致的距离放置细胞所产生的额外成本是没有保证的,因为对于细胞依存于其上的每一平方厘米的面积内存在很少的细胞(即,低氧气需求)。共同待决的‘814 的低成本装置在水平方向上具有有限的可缩放性。由此,就需要一种新的装置构造,其可以便宜的制造,使用简便,消除对于气液界面的需要,不需要灌注,并且填补了共同待决的‘848 和共同待决的‘814 之间的空白。这样的装置对于许多重要的细胞培养应用例如干细胞培养将减少花费并简化细胞制备过程。

[0012] 因此,公开了一种改进的气体可渗透性装置,其可以容易的制造,可在气液界面缺失的情况下起作用,不需要装备来泵送培养基或者气体来通过其中,并且在水平和垂直方向允许实质上无限制的可缩放性。

[0013] 发明概述

[0014] 在这里描述的本发明允许高效的细胞培养。至少部分由气体可渗透性材料组成的气体隔间分散在指定地点的培养设备内,当该装置在水平方向上缩放时,其允许细胞相对于气体传递位置保持一个固定的距离。气体隔间的气体可渗透性壁允许与环境气体的气体交换。这样的装置提供许多优势,包括消除对于气液界面的需要的能力,允许细胞培养在静态模式中进行(即,不存在对于泵送培养基或者气体通过该装置的需要),允许该装置的缩放在水平方向和垂直方向均增加,降低培养基蒸发的速率,允许简单和低成本的设备制造,并且提供降低的给料频率的能力。

[0015] 在一种实施方式中,气体可渗透性细胞培养装置包括一个设置在另一个之上的支架,并具有分离它们的空间以形成细胞隔间。一个歧管将一入口连接至该细胞隔间。至少一个气体可渗透性气体隔间与该细胞隔间接触,由此增强细胞隔间与环境气体之间的气体传递

[0016] 在另一种实施方式中,该气体隔间包括垂直于支架定向的壁。

[0017] 在另一种实施方式中,对环境气体开放的气体隔间位于气体可渗透性装置的底部。

[0018] 在另一种实施方式中,对环境气体开放的气体隔间位于该装置的顶部。

[0019] 在另一种实施方式中,对环境气体开放的气体隔间位于该装置的侧壁。

[0020] 在另一种实施方式中,对环境气体开放的气体隔间位于该装置的顶部和/或底部和侧壁。

[0021] 在另一种实施方式中,对环境气体开放的气体隔间横穿该整个的气体可渗透性装置,具有的气体开口位于气体可渗透性装置的相对的壁。

[0022] 在另一种实施方式中,该气体隔间包括气体隔间支撑结构。

附图说明

[0023] 图 1A 是本发明示例性的实施方式的透视图。气体可渗透性装置 10 的内容物通过气体可渗透性外壁和气体隔间 24 与环境气体交流。

[0024] 图 1B 是图 1A 装置的 A-A 横截面视图,展示出如何使用气体隔间 24 来减少细胞和气体隔间壁之间的距离。

[0025] 图 1C 是图 1A 装置的 B-B 横截面视图,展示出考虑到接种和培养基交换的设计。

[0026] 图 2 是本发明示例性的实施方式的横截面视图,示出细胞和提供气体传递的壁之间的距离如何能够通过气体隔间的数目和位置来改变。

[0027] 图 3A 是本发明示例性的实施方式的横截面视图,示出气体隔间如何占据气体可渗透性细胞培养装置。

[0028] 图 3B 是本发明示例性的实施方式的横截面视图,示出气体隔间如何通过侧壁横穿该气体可渗透性细胞培养装置。

[0029] 图 3C 是本发明示例性的实施方式的横截面视图,示出气体隔间如何完全穿过该气体可渗透性细胞培养装置。

[0030] 图 3D 是本发明示例性的实施方式的横截面视图,示出气体隔间如何具有任意的几何形状,在这一案例中为具有圆孔的圆柱形隔间。

[0031] 图 4A 是本发明示例性的实施方式的透视图,示出气体隔间如何成为该装置周界的一部分。

[0032] 图 4B 是本发明示例性的实施方式的俯视图,示出气体隔间如何成为该装置周界的一部分。

[0033] 图 5 利用横截面视图示出本发明示例性的实施方式,其示出在在装置周界不存在气体可渗透性壁的情况下放置气体隔间的优选方法。

[0034] 图 6A 示出本发明示例性的实施方式的透视图,其构造为允许细胞和培养基以最小的湍流进入该装置。

[0035] 图 6B 示出图 6A 的 B-B 横截面,显示了入口进入孔和出口进入孔。

[0036] 图 6C 示出图 6A 的 A-A 横截面,显示了流体如何从该实施方式的一个末端流到另一个末端。

[0037] 图 7A 是本发明示例性的实施方式的分解图,示出优选的实施方式如何被组装。

[0038] 图 7B 是示于图 7A 中示例性的实施方式的另一个分解图。

[0039] 图 7C 是示于图 7A 中示例性的实施方式以组装状态的横截面视图。

[0040] 图 8A 示出示例性的实施方式,其具有任选的气体隔间支撑结构 50。

[0041] 图 8B 示出先前于图 7A 中描述的示例性的实施方式的分解图,具有以组装存在的气体隔间支撑结构 50。

[0042] 图 8C 示出图 8B 的组装横截面视图。

[0043] 图 9A 是示例性的实施方式的横截面视图,该气体可渗透性细胞培养装置允许存

在于每一支架之上的培养基的高度与传统的烧瓶和多搁板烧瓶一致,但是相对于传统的烧瓶能够降低给料频率。

[0044] 图 9B 示出在使用中的图 9A 中的气体可渗透性细胞培养装置以及在接种过程中如何加入培养基 60 以使得其以一定的高度存在于该最上部支架 28 之上,其与存在于每一个其他的支架 28 之上的高度相同。这就允许在接种过程中细胞接种的一致性。

[0045] 图 9C 示出为了降低给料频率,过量的培养基 60 如何被加入至图 9A 的气体可渗透性细胞培养装置。

[0046] 发明详述

[0047] 图 1A 示出本发明的一种实施方式的透视图。该气体可渗透性装置 10 的外部包括顶部 18,侧壁 20,后侧壁 21 和底部 19。气体隔间 24 从顶部 18 向下延伸进入气体可渗透性装置 10 内。气体隔间 24 被构造为允许环境气体与壁 22 相接触。经选择的壁 22 和 / 或壁 22 的区域是气体可渗透性的。在这一实施方式中,存在一个对于气体隔间 24 的开口并且该开口定位在顶部 18 上。允许通过气体隔间 24 的经选择的的部分的气体传递,从而允许在气体可渗透性装置 10 的内容物与环境气体之间改善的气体交换。以这种方式,该装置可属于标准的 CO₂ 培养器,同时气体隔间 24 促进存在于气体可渗透性装置内的培养的气体交换。除了气体隔间,该气体可渗透性装置的外壁可以是气体可渗透性的,进一步增强了气体传递。

[0048] 图 1B 示出图 1A 装置使用时的 A-A 横截面视图,并帮助解释气体隔间 24 的优点。在这一描述中,细胞 32 和细胞培养基 34 在该装置中示出。细胞 32 放置在支架 28 之上。支架 28 一个存在于另一个之上,它们之间的空间形成细胞隔间 30。细胞隔间 30 由此限制在支架 28 的上侧和下侧,除了最端部的细胞隔间 30,其通过支架 28 限定了更低的一侧并通过顶部 18 限定了更高的一侧。优选地,气体隔间 24 占据每个细胞隔间 30 的一部分。不像是传统的多搁板烧瓶,对于气体可渗透性装置 10,其不需要使气体存在细胞隔间 30 中而起作用。在这一描述中,培养基 34 填充细胞隔间 30。优选地,每个支架 28 之间的距离(即,细胞隔间的高度)应当是相等的并且支架 28 相互之间应当是平行的,为了使细胞均匀分布和培养条件一致。因为典型推荐的在传统烧瓶培养中的培养基高度为 2mm 至 3mm 之间,使得支架之间 2mm 至 3mm 的距离将导致与传统的烧瓶相似的给料频率。为了降低给料频率,可增加支架之间的距离,因为这样做会增加培养基体积对支架表面积的比例并对于每平方厘米的生长区域提供更多的溶质。被宣称为不同地,在相对于在传统烧瓶的每个搁板之上的培养基,每个细胞隔间中更多的培养基可以降低给料频率。

[0049] 图 1C 示出图 1A 的 B-B 横截面视图。气体隔间 24 沿着支架 28 的长度延伸并且穿过细胞隔间 30。歧管 5 存在于支架 28 和进入孔 6 之间,允许培养基通过进入孔 6 被加入至细胞隔间 30 中或者从其中移除。歧管 5 起进入每个细胞隔间 30 的培养基通道的作用。优选地,气体隔间 24 沿着支架 28 的长度延伸至最大的实用距离,从而当它们涉及气体交换的时候使气体可渗透性装置 10 内的条件最大化的均一。气体可渗透的气体隔间壁 22 的表面积的数量取决于制造方法和对于给定的细胞培养应用所需要的气体传递的数量。最大化气体可渗透性的表面积可以增加至每一个细胞隔间 30 的气体传递。优选地,通过气体隔间 24 提供的气体传递能力被均匀地分配至每一个细胞隔间 30。简而言之,该气体隔间被优选地构建为对于从细胞隔间至细胞隔间的气体传递产生相等的容积。甚至是如果该气体隔间

的整个表面都是气体可渗透性的,该蒸发作用也小于‘848 的实施方式。由此,另一个优点为能够相对于‘814 的实施方式在水平方向上增加该装置的尺寸,同时相对于‘848 的实施方式降低蒸发作用。

[0050] 控制在接种过程中细胞沉积的区域是一项设计考虑。当该装置使用接种体填充时,每个细胞直接移向该装置位于其下的区域。优选该设计允许至少 90%,并且更优选 95% 的细胞以一致的分布模式移向该支架。由此,歧管 5 应当占据最小体积的空间,同时仍能促使容易地传递培养基或者移除该培养基。支架 28 可以或者不可以使液体紧密接触侧壁 20 和后侧壁 21。如果能够以那种方式更容易地制造该装置或者决定从细胞隔间到细胞隔间移动溶质所需要的横截面积大于由歧管可以提供的,那么支架 28 和相邻的壁之间的间隙是可以存在的。如果决定该间隙将存在,那么会意识到来自接种体的细胞移动将通过该间隙落入至最低的支架(或者底部)并且以高于该支架其他区域的表面密度接种。注意支架和外壁之间相同的物理关系对于该支架和气体隔间壁适用。由此,该间隙包括了支架和相邻的壁之间的距离。该间隙区域和歧管区域致使细胞的数量在支架上不均一地接种。在一种优选的实施方式中,除了在歧管位置处,支架和外壁之间的距离为约 0.2 英寸或更小。

[0051] 气体隔间 24 的存在起到减小存在的细胞到气体传递位置的距离。为了帮助解释这一概念,再次参考图 1B,考虑侧壁 20 和气体隔间壁 22 是气体可渗透性的。气体隔间 24 的存在允许细胞 32A 与该装置发生气体传递的区域的间隔更短的距离,该距离比在不存在气体隔间 24 的情况下要短。

[0052] 该气体隔间的目的是允许环境气体(典型的培养器气体)存在于该新颖的装置的气体隔间内。环境气体的移动通过在培养过程中在细胞隔间的内容物和环境气体之间形成的浓度差异来驱动。例如,在培养过程中贯穿气体可渗透性材料形成的浓度梯度导致气体(例如氧气和二氧化碳)从显示为最高浓度的气体可渗透性材料的一侧传递至显示为最低的一侧。例如,形成典型的氧气梯度以使得氧气从标准的细胞培养器传递至该新颖装置的细胞隔间。

[0053] 气体隔间最优选构建为允许环境气体自由进入气体隔间,不存在通过辅助装置例如泵的压力流体。通过这样构造的气体隔间,不需要用于导引在压力下产生的气流的入口端口和出口端口。气体在传导期间快速的移动并且在气体隔间的最接近的相对的壁之间的距离仅需要足够大以使得气体可以以大于培养所需要的速率移动。通常来说,气体隔间至该装置外部表面的深度越大,该气体隔间应该越宽。太窄的横截面会限制气流。使得该宽度变小通常会起到使该装置的尺寸更加紧凑的目的。然而,该节省的空间实质上已经通过消除对气液界面的需要来提供。由此,优选朝向气体隔间的开口的横截面的宽度为约 0.1 英寸或更大。而且,该开口的形状优选在贯穿该气体隔间的深度内保持一致。例如,对于具有 0.1 英寸宽度的矩形开口,该气体隔间壁将通常保持平行并且以约 0.1 英寸的距离贯穿该气体隔间。由于被气体隔间取代的空间的体积与该气体可渗透性装置的体积相比相对较小,所以更大的距离没有导致很大的空间流失。由此,基于该装置的宽度和高度,以及所使用的气体隔间的数目,高至 1 英寸的朝向该气体隔间的开口的横截面的宽度能够有效的允许气体传递,而对该装置的占用的空间没有太大的影响。

[0054] 对于包括该气体隔间的几何形态和材料具有很多可能的选择。气体隔间的长度、

宽度、深度、气体传递速率和所有其它的方面可以被改变,以满足所给定的细胞培养应用的需要。液体可渗透性的气体可渗透性材料为优选的,例如二甲基硅树脂。然而,共同待决的‘856 描述了如何使用液体可渗透性材料。

[0055] 可以改变气体隔间的位置和数量以控制细胞到气体传递位置的距离。当该气体可渗透性装置在水平方向上按比例放大为更大的尺寸时,可以加入越来越多的气体隔间。图2 示出气体可渗透性装置 11 的横截面视图,其被改进以减少细胞(例如细胞 32B 和细胞 32C)到气体传递区域的最大距离。在这一描述中,两个气体隔间 24 延伸进气体可渗透性装置 11 内。在该情形中,侧壁 20 和气体隔间壁 22 为气体可渗透性的,可以看出气体隔间 24 如何允许细胞 32B 和 32C 比在不存在气体隔间 24 的情况下更接近气体传递区域。由此,当该装置在水平方向上缩放时在培养基中保持可接受的氧张力的能力通过允许细胞接近环境气体的气体隔间和气体可渗透性壁的使用来获得。

[0056] 气体隔间不需要延伸进入细胞隔间来允许细胞更接近气体隔间壁。任意的减小细胞到气体可渗透性壁的距离的布置都是可以存在的。例如,气体隔间可以延伸进入,贯穿通过,和/或完全穿过气体可渗透性细胞培养装置。例子在图 3A,图 3B,图 3C 和图 3D 中示出,其中气体隔间 24,气体隔间 24 的气体可渗透性壁 22,装置侧壁 20,支架 28,和/或细胞隔间 30 相对于彼此可以被看到。在所有的示例中,作为选择,气体可渗透性装置的任意外壁可以是气体可渗透性的,但是气体隔间的至少一部分必须是气体可渗透性的。如何决定何时依赖于气体可渗透性外部的装置壁,例如侧壁,将在这里描述。

[0057] 图 3A 示出本发明示例性的实施方式的横截面视图。气体可渗透性细胞培养装置 12A 包括气体隔间 24,其延伸进入气体可渗透性细胞培养装置 12A 内。一个朝向气体隔间 24 的开口是存在的并且位于底部 19。由气体可渗透性材料构成的气体隔间 24 的壁 22 提供到细胞隔间 30 的气体传递。细胞隔间 30 通过支架 28 限定了它们较低的一侧。气体隔间 24 存在于每一个细胞隔间 30 内。

[0058] 图 3B 示出本发明示例性的实施方式的透视图。气体可渗透性细胞培养装置 12B 包括气体隔间 24。朝向气体隔间 24 的开口存在于至少一个侧壁 20 上。

[0059] 图 3C 示出本发明示例性的实施方式的横截面视图。气体可渗透性细胞培养装置 12C 包括气体隔间 24,其被构建以产生完全穿过气体可渗透性细胞培养装置 12C 的开口。由此,该开口存在于两个相对的壁,在这种情况下为顶壁 18 和底壁 19。由气体可渗透性材料构成的气体隔间 24 的壁 22 提供了到细胞隔间 30 的气体传递。细胞隔间 30 通过支架 28 限定了它们较低的一侧。

[0060] 图 3D 示出本发明示例性的实施方式的透视图。气体可渗透性细胞培养装置 12D 包括延伸进入气体可渗透性细胞培养装置 12D 的圆形气体隔间 24。

[0061] 气体隔间不需要被限制在该装置的主体来起作用。图 4A 示出本发明示例性的实施方式的透视图。气体可渗透性细胞培养装置 16 包括气体隔间 24,其形成气体可渗透性细胞培养装置 16 周壁的一部分。图 4B 示出气体可渗透性细胞培养装置 16 的俯视图,显示了气体隔间 24。在这一构造中,气体隔间 24 起到扩展气体可渗透性装置 16 的周界的作用并且气体可渗透性壁 22 起到很大的改善气体传递进入气体可渗透性装置 16 和从其中排出的作用。本领域技术人员将认识到朝向气体隔间 24 的开口不需要完全穿过该顶部和底部以极大地增加用于气体传递的表面积。该开口可以穿过该顶部和/或底部和侧壁。

[0062] 尽管气体隔间可以是任意尺寸和形状,优选该气体隔间的结构被构造为能够实现在每一个细胞隔间内提供最一致的培养环境的意图。培养条件一致性的程度可以依据处于气体可渗透性培养装置内的气体隔间所在位置来建立。为了改善一致性,一个设计的目标是产生控制细胞到气体隔间壁的最远距离的结构。优选地,制造一定形状的气体可渗透性装置,允许气体隔间位于相对于该装置的中心线处于对称样式,这是一种在细胞培养隔间中提供均一条件的方式。图5示出本发明由此构建的示例性的实施方式。其为示出在气体可渗透性壁不存在的情况下在装置周界放置气体隔间的优选方法的横截面视图。在这一描述中,两个气体隔间24延伸进入气体可渗透性细胞培养装置17。支架28均匀隔开并且一个定位在另一个的上面。为了说明该外壁20不需要气体可渗透性作为合适的功能,考虑到该情形在这一描述中它们不是气体可渗透性的。考虑到气体隔间24的气体隔间壁22沿着它们的整个高度为气体可渗透性,其如此放置,从而细胞到它们的最大距离D在整个横截面内是固定的。以这种方式,只要细胞在支架上均一地分布,在距离气体隔间壁22的最远点D的细胞的氧气传递就大致相当于贯穿了该装置。该实际距离D可依赖于培养所期望的氧气需求而变化。例如,当形成气体隔间的壁的气体可渗透性是一致的时候,具有高氧气需求的培养例如肝细胞的距离D将小于保持在低表面密度的具有低氧气需求的培养例如干细胞。该气体隔间被优选地构建,以使得其壁通常垂至于该支架。以那种方式,存在于每一个细胞隔间中的培养基的体积通常可以是相等的,在接种过程中,支架上的细胞分布是一致的,并且存在于每一个细胞隔间内的细胞到细胞隔间壁有一个相似的物理距离。优选地,气体隔间的气体可渗透性壁的设计以提供到每一个细胞隔间相似的气体传递能力的方式而完成。由此,当构建气体隔间的壁的时候,气体可渗透性的区域应当相对于每一个细胞隔间和每个其它的气体隔间具有一致的材料类型、厚度和表面积。

[0063] 不是所有的气体隔间的壁都需要是气体可渗透性的以产生横穿该气体可渗透性装置的水平横截面的基本上一致的气体传递。再次参考图5,考虑到该情形中壁20为气体可渗透性的。如果气体隔间24的壁22A和壁22B不是气体可渗透性的,而壁22C是气体可渗透性的,那么在水平横截面上观察到的存在于支架28上任意给定位置的细胞就可以保持在气体传递位置的距离D内。

[0064] 然而,当培养需要的气体交换没有克服气体隔间的能力来满足气体传递需要的时候,并且当制造成本可以通过气体隔间的不同构型来降低的时候,支架和气体隔间之间的优选关系的偏离是可选择的。那些本领域技术人员将认识到具有许多可能的设置来满足基本的目标,其允许通过使用气体隔间来改善到细胞隔间的气体传递在水平方向上更进一步的可缩放性。

[0065] 对于如何物理定位和布置该气体隔间的另一个考虑是在培养基输送过程中和在从该装置移除的过程中该气体隔间可能具有的对流体流动的影响。优选地,该气体隔间将以促进流体容易地流动的方式来布置。该气体隔间应当优选为不阻隔培养基流动,不在装置内捕获气体,或者不产生高湍流。该进入孔的位置可以帮助克服这些潜在的不希望的流体特征。

[0066] 图6A,图6B和图6C示出气体可渗透性装置的示例性的实施方式,其被设置为允许细胞和培养基以最小的湍流进入该装置。盖帽37和38覆盖入口进入孔36和出口进入孔35,其在这一描述中被布置在气体可渗透性装置18相对的末端。在这一实施方式中,朝向

气体隔间 24 的开口通常为矩形的形状,当该培养基被加入至该装置中或者从其中移除的时候,朝向气体隔间 24 的开口的最长侧定位为液体流动的方向。被宣称为不同的,朝向气体隔间 24 的开口的最长侧通常平行于该装置的中心轴线。在任意的实施方式中,进入孔可以被构造为用于关闭或者开启系统的功能。图 6B 示出图 6A 的 B-B 横截面,贯穿该装置的中心轴线,其进入孔盖帽被移除。布置支架 28 以形成细胞隔间 30。入口进入孔 36 和出口进入孔 35 通过入口歧管 26 和出口歧管 25 与每个细胞隔间 30 相连通。在这一实施方式中,细胞隔间 30 形成从入口进入孔 36 到出口进入孔 35 的导管。图 6C 示出图 6A 的 A-A 横截面,流体流动箭头 54 指示当培养基被引入至入口进入孔 36 时,培养基和气体所走的路径。在这一描述中,该气体隔间 24 的形状和位置促使一致的流体形式。那些本领域技术人员将认识到具有很多种可能的气体隔间构造和几何形状,其将满足促使贯穿该气体可渗透性装置的流体流动一致性的基本目标。一个优选的几何形状为朝向该气体隔间的矩形的开口,该矩形开口的长边被定向为在该侧壁的方向和平行于该侧壁的方向。

[0067] 用于制造本发明的气体可渗透性装置的材料可以是任意的用于细胞培养装置中的在先使用的或者描述的那些,并且特别是在共同待决的 ‘814 和 ‘848 中描述的那些。尽管是液体可渗透性的,气体可渗透性的材料可以如共同待决的 ‘856 中描述的那样使用,该优选的实施方式利用液体不可渗透性的但是气体可渗透性的材料。在该优选的实施方式中,该装置是一次性的并且该材料为光学上透明的,非细胞毒性的,并且可以通过注塑成型法制备。对于支架和气体可渗透性材料所需要的不同的特征之前已经在明确结合到本文的专利中进行了描述。除了在先描述的用于微观评估的结构,延伸进气体可渗透性装置的气体隔间可以利用足够宽以允许光线照进该气体隔间的开口来构造,以促使最底部支架的倒置显微镜。

[0068] 除了更加有效的利用通过消除在每个支架上的气液界面的需要同时允许在水平方向和垂直方向的可缩放性而获得的空间,容易地制造本发明装置的能力允许在细胞培养过程中进一步的成本降低。一个优选的实施方式集成了传统的由聚苯乙烯构成的平面支架和气体可渗透性硅树脂壁,其在图 7A,图 7B 和图 7C 中示出。在图 7A 的分解图中,气体可渗透性硅树脂壳体 40 存在于一叠支架 28 之下。在这一描述中,每个支架 28 通过凸起 42 从其相邻的支架 28 分离,其通过从该大堆分离出的支架 28 示出。支架开口 44 存在于支架 28 上不同的位置(在这一描述中两个位置)。支架开口 44 为从支架 28 移除的一部分材料,以允许支架 28 配合气体隔间 24。优选地,在任意的实施方式中,当不连续层板的材料形成支架时,部分的材料从支架移除以允许气体隔间穿过该支架。在这一描述中,在组装过程中,气体隔间 24 延伸自气体可渗透性硅树脂壳体 40 的底部以移动进入通过支架开口 44 产生的空余的空间。顶部 46 存在于支架 28 之上。法兰夹具 48 存在于顶部 46 的下面。当支架 28 被置于气体可渗透性硅树脂壳体 40 的内部,法兰夹具 48 连接至顶部 46 并且通过挤压气体可渗透性硅树脂壳体 40 的法兰 43 形成液压密封。图 7B 示出从显示了朝向气体隔间 24 的开口的组装部件的底部观看的另一个视图。如果意图是培养贴壁细胞,并且该气体可渗透性装置将要经受伽玛射线,共同待决的 ‘856 提供了在伽玛辐射之前制备硅树脂材料的指导,从而支架的表面化学在伽玛辐射的过程中没有改变。

[0069] 图 7C 示出图 7A 和图 7B 中所示的组装部件的横截面视图,显示了处于组装状态的不同组件。法兰夹具 48 通过挤压法兰 43 以液密的方式紧固顶部 46 和硅树脂壳体 40。

细胞培养装置设计领域的技术人员将认识到具有很多不同的方法和构造来生产液密装置。而且,如上所述,该装置的外壁不需要是气体可渗透性的。由此,该硅树脂外壳不需要形成该装置的外壁。在那种情况下,顶部 46 可以以形成该装置外壁的方式来制造。气体隔间 24 穿过支架开口 44 以允许气体隔间 24 提供至培养隔间 30 的气体传递。在这种情况下,当气体隔间的壁包括是硅树脂的区域时,该硅树脂的厚度应当优选为小于 0.22 英寸,并且更优选 0.01 英寸或更小,以促使充足的气体传递。通过延伸进入细胞培养隔间 30,当该装置在标准的组织培养器中来回移动之时,该气体隔间 24 的定位促使可能形成的任意浓缩物的排出。大体上,当选择该气体隔间的定位和几何形状时,应当注意使在可能减少环境气体与气体隔间的气体可渗透性区域的接触的区域收集溢出的或者浓缩的几率最小化。这样的结果将改变进入该细胞隔间或者从其中排出的气体传递的速率。

[0070] 图 8A 示出任选的气体隔间支撑结构 50 的示例性的实施方式,其起到提供作为描述于共同待决的‘814 中的“气体可渗透性材料支撑”和 / 或描述于共同待决的‘848 中的“培养隔间支撑”的类似的功能。本质上,其确保了气体隔间在培养过程中没有坍塌,其可能是由于依赖于细胞培养基的流体静力学压力和气体隔间的气体可渗透性材料的结构强度和位置的原因。气体隔间开口 52 允许气体进入该气体隔间。气体隔间支撑结构开口 53 允许环境气体与该气体隔间的气体可渗透性材料接触。突起物 54 起到使该气体隔间的壁与气体隔间支撑结构 50 保持一定的距离的作用,并且由此确保该气体可以围绕该气体隔间的气体可渗透性部分的表面移动。

[0071] 图 8B 示出在先描述于图 7A 中的具有处于组装状态的气体隔间支撑结构 50 的示例性实施方式的分解图。图 8C 示出图 8B 的组件的横截面视图。大量的支架 28 已经被移除以简化该视图。气体隔间支撑结构 50 在恰当的位置,具有放大的视图以更加清晰的展示突起物 54 如何起到接触气体隔间 24 的壁 22 的作用,留下壁 22 的一部分没有与气体隔间支撑结构 50 接触并且由此允许壁 22 直接接触环境气体。环境气体自由穿过气体隔间开口 52 和气体隔间支撑结构开口 53。至细胞隔间 30 或者来自其中的气体传递利用气体隔间 24 的壁 22 来发生,至少一部分由气体可渗透性材料构成。

[0072] 当构造本发明任意特别的结构时,应当注意确保考虑到 CO_2 的交换速率和 / 或蒸发速率。共同待决的‘848 可以提供如何最小化或者控制由于过多的进入该细胞隔间和从其中排出的气体传递速率而产生的不需要的 pH 变化或者渗透变化速率的指导。

[0073] 使用这里公开的气体可渗透性装置的一个优选的方法为形成一个容器,其集成了多于一个的堆叠的支架,其被布置以使得该支架一个存在与另一个的顶上并且平行于相邻的支架,在它们之间具有一空间。在每个支架之间的空间形成细胞隔间。每个支架优选为层状材料,该材料优选为刚性聚苯乙烯。至少一个气体隔间存在于气体可渗透性装置中。该气体隔间的几何形状为具有垂至于支架的壁并且其由气体可渗透性材料构成,以使得其可以提供气体传递至每个细胞隔间。该气体可渗透性装置具有至少一个进入孔和一个连接该进入孔至细胞隔间的歧管。在使用中,该进入孔盖帽被移除并且接种体被加入以使得其填充该细胞隔间。该进入孔盖帽被重新盖上并且起到阻隔污染物的作用。对于封闭的系统流体的引入和移除,还可以任意构造该进入孔。细胞安置在它们下面的支架上。该装置被置于细胞培养器中,其中细胞被允许增殖。当细胞消耗氧气的时候,在细胞隔间内的培养基与气体隔间内部的环境气体之间形成浓度梯度。通过被动的传送和扩散,作为应答,氧气穿过

气体隔间的气体可渗透性材料并且进入细胞隔间中。当溶质达到预设的水准,培养基就被交换。

[0074] 图 9A 示出气体可渗透性细胞培养装置的示例性实施方式,其允许存在于每个支架之上的培养基的高度符合传统的烧瓶和多搁板烧瓶(最多约 3mm),但是相对于传统的烧瓶可以降低给料频率。该气体隔间在该横截面视图中未示出,以帮助使该描述更加清晰地显示在最上面的支架 28 之上的空间的体积如何能够起到降低给料频率的作用。气体可渗透性装置 20 被构造使得在最上面的支架 28 之上的空间超过每个支架 28 之间的空间,其优选为相等的。如在图 9B 中所示的,当在使用时,培养基 60 在接种的过程中被加入以使得其存在于该最上面的支架 28 之上的高度与存在于每个其它的支架 28 之上的高度相同。如果目标是模仿传统的烧瓶条件,那么该高度为 2mm 至 3mm。这就允许在接种过程中,对于每个支架 28 一致的细胞接种,包括最上面的支架 28。气体 65 存在于培养基 60 之上。接下来,在细胞被接种之后,可以加入更多的培养基 60(在这里称为“过量的培养基”),如在图 9C 的横截面视图中所示。气体 65 通过过量的培养基 60 被置换。在过量的培养基 60 中的溶质能够通过歧管 25 和 26 移动至每个细胞隔间 30。而且,如果支架 28 没有以液密的方式附着在该侧和/或在气体可渗透性装置 20 的气体隔间壁,就产生用于额外的溶质从过量的培养基 60 移动到细胞隔间 30 的间隙。大体上,该过量的培养基的体积将指示给料频率的降低。例如,如果过量的培养基的体积与存在于其下的培养基的体积相等,可以期望给料频率减少 50%。

[0075] 本领域技术人员将认识到可以作出大量的变形可以而没有背离本发明的精神。由此,其不会意图将本发明的范围限制在示例性的和描述的实施方式中。恰恰相反,本发明的范围通过附加的权利要求和它们的等价物来解释。

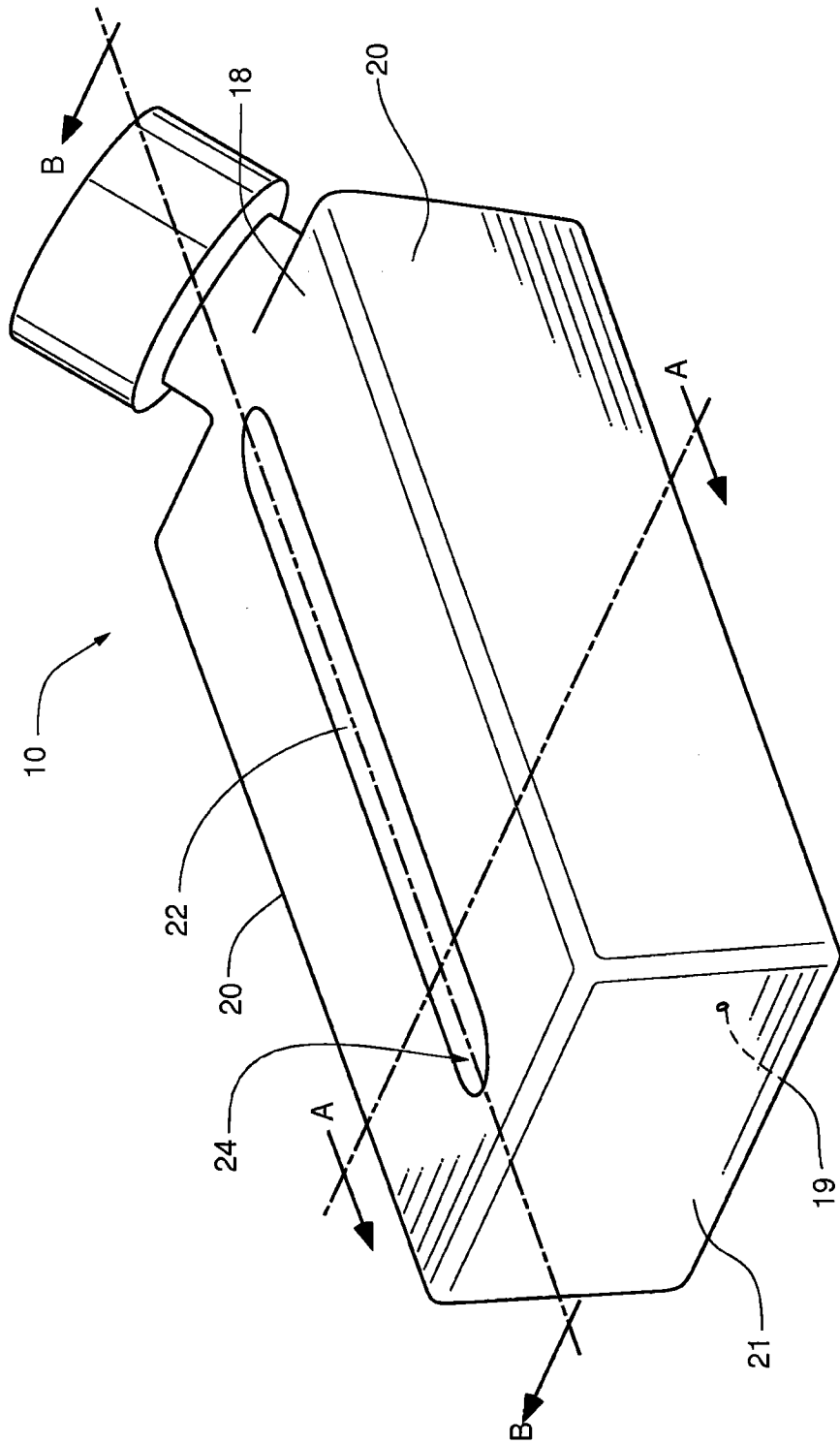


图 1A

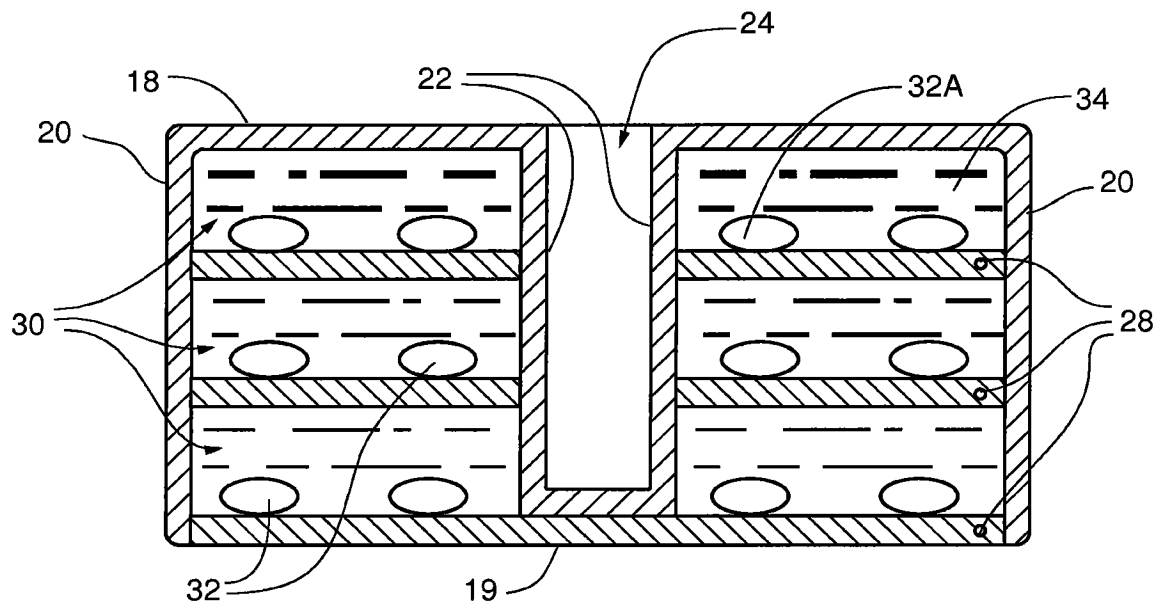


图 1B

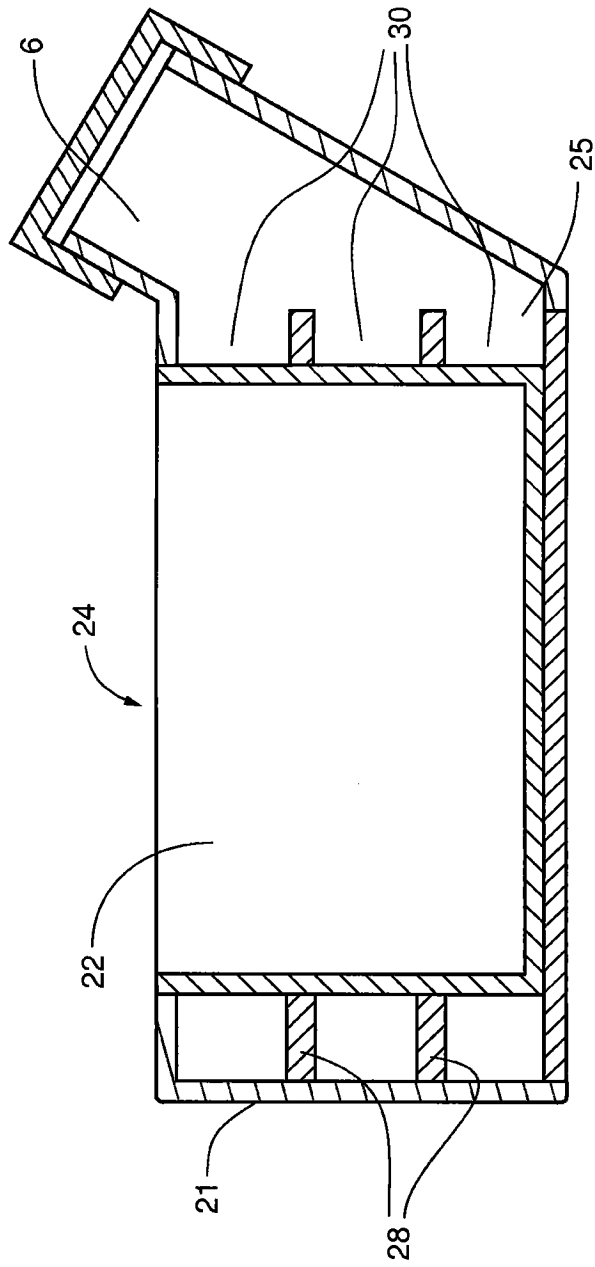


图 1C

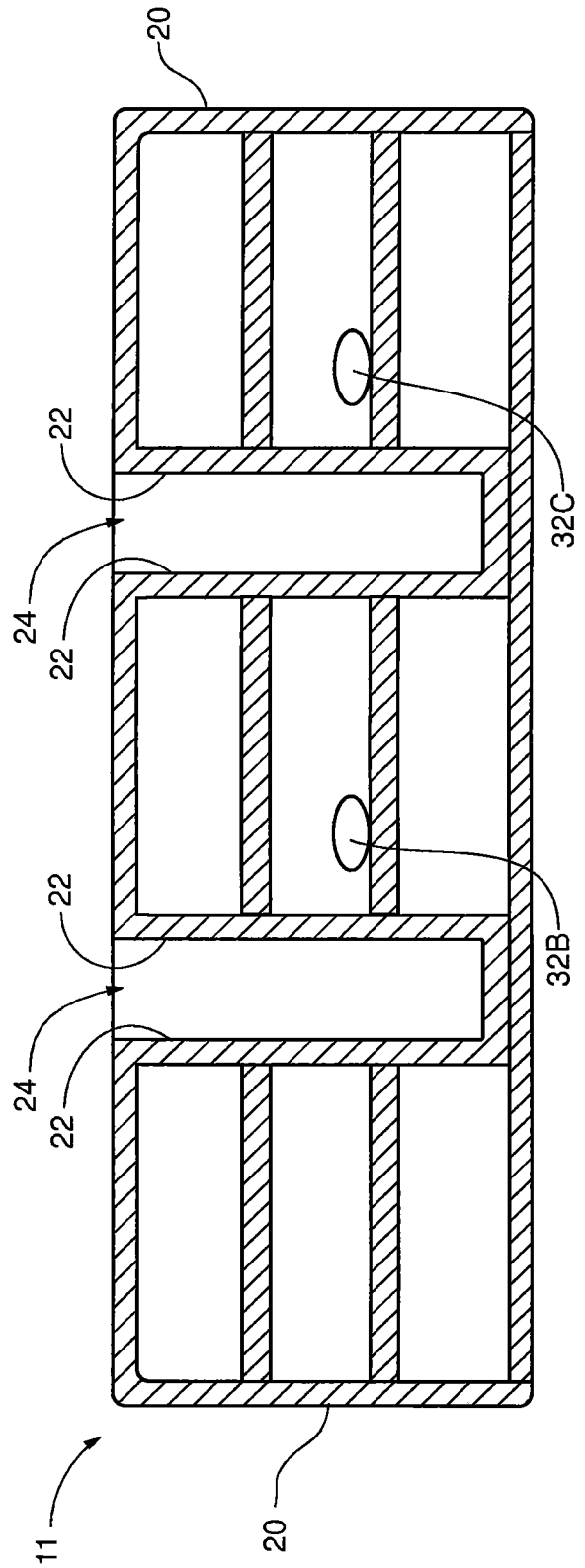


图 2

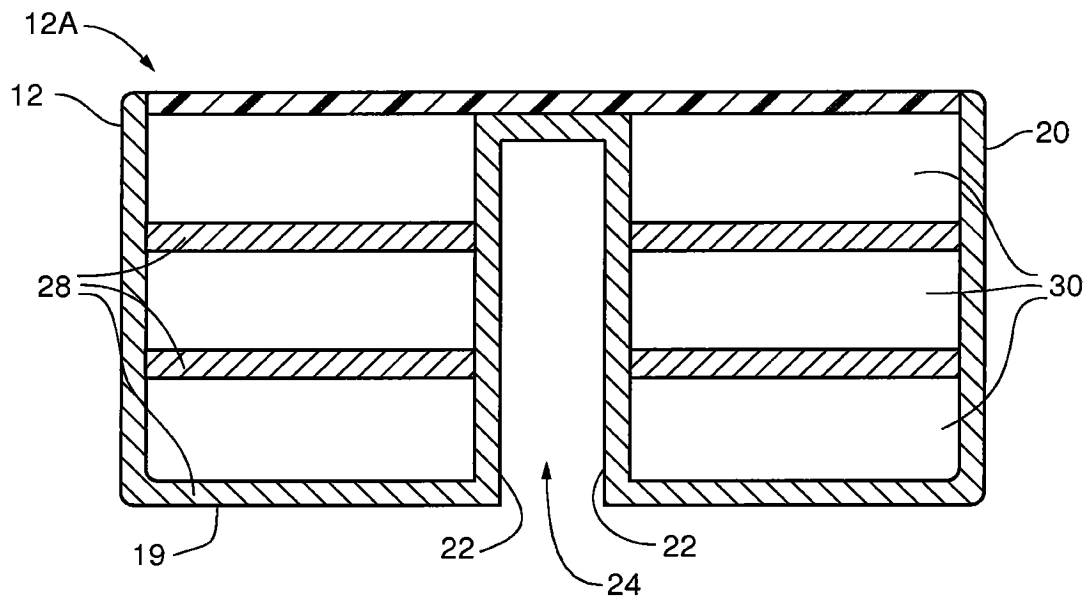


图 3A

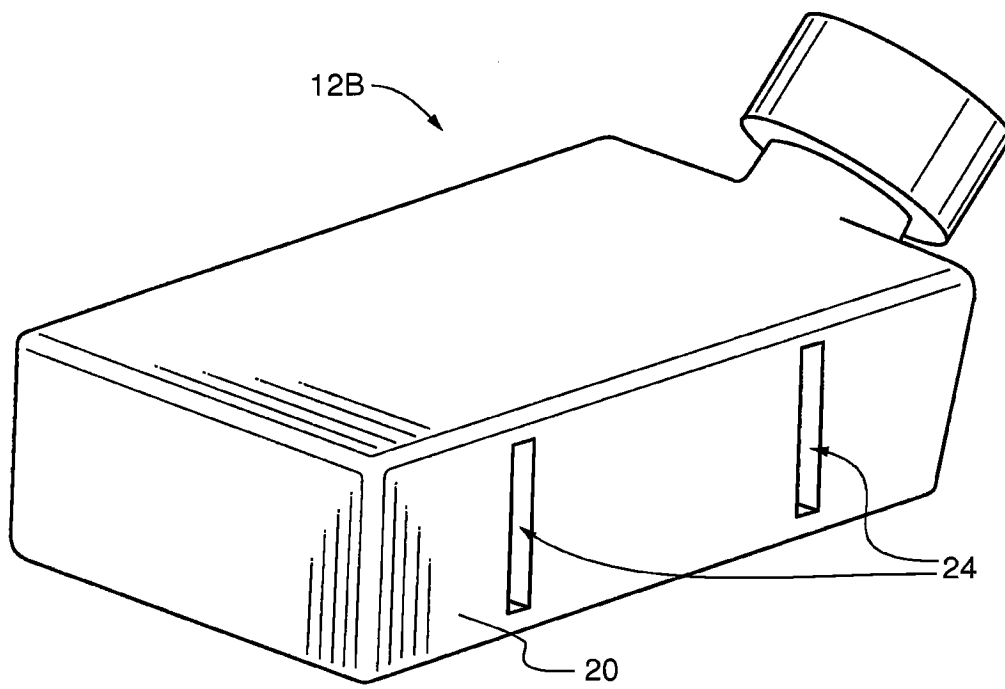


图 3B

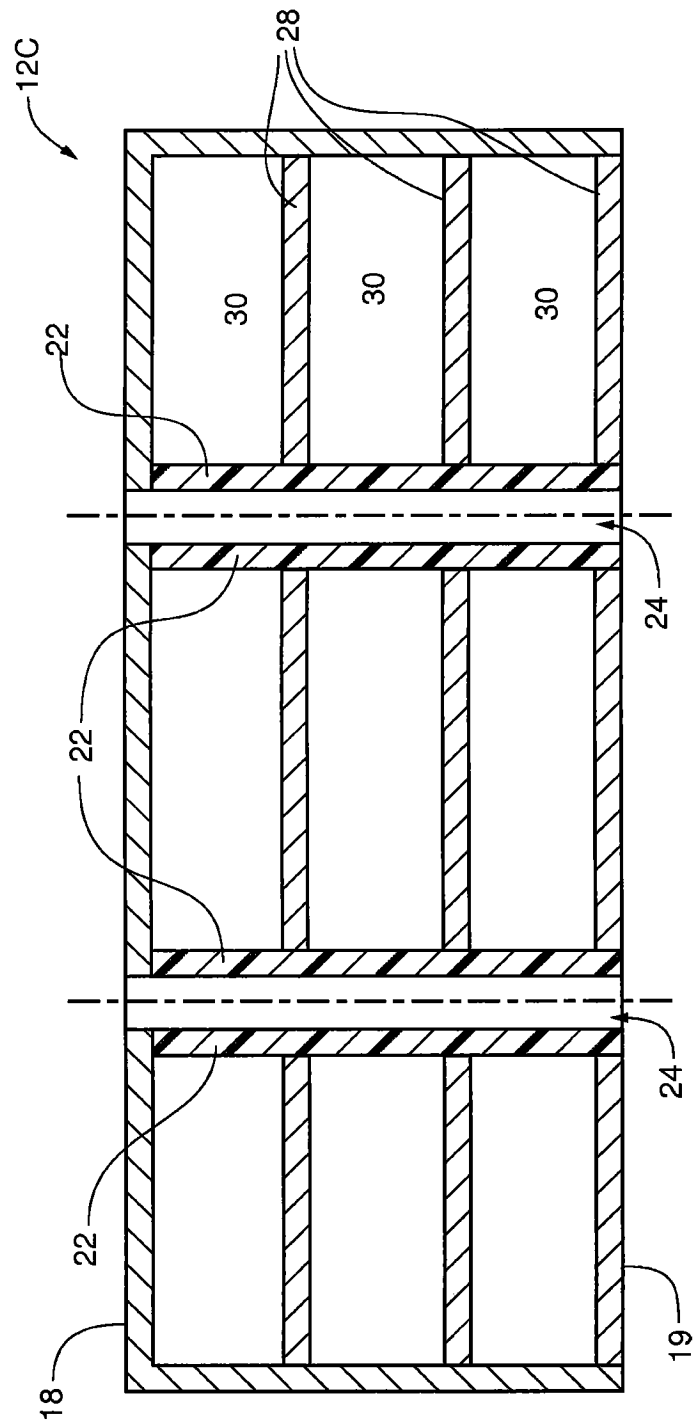


图 3C

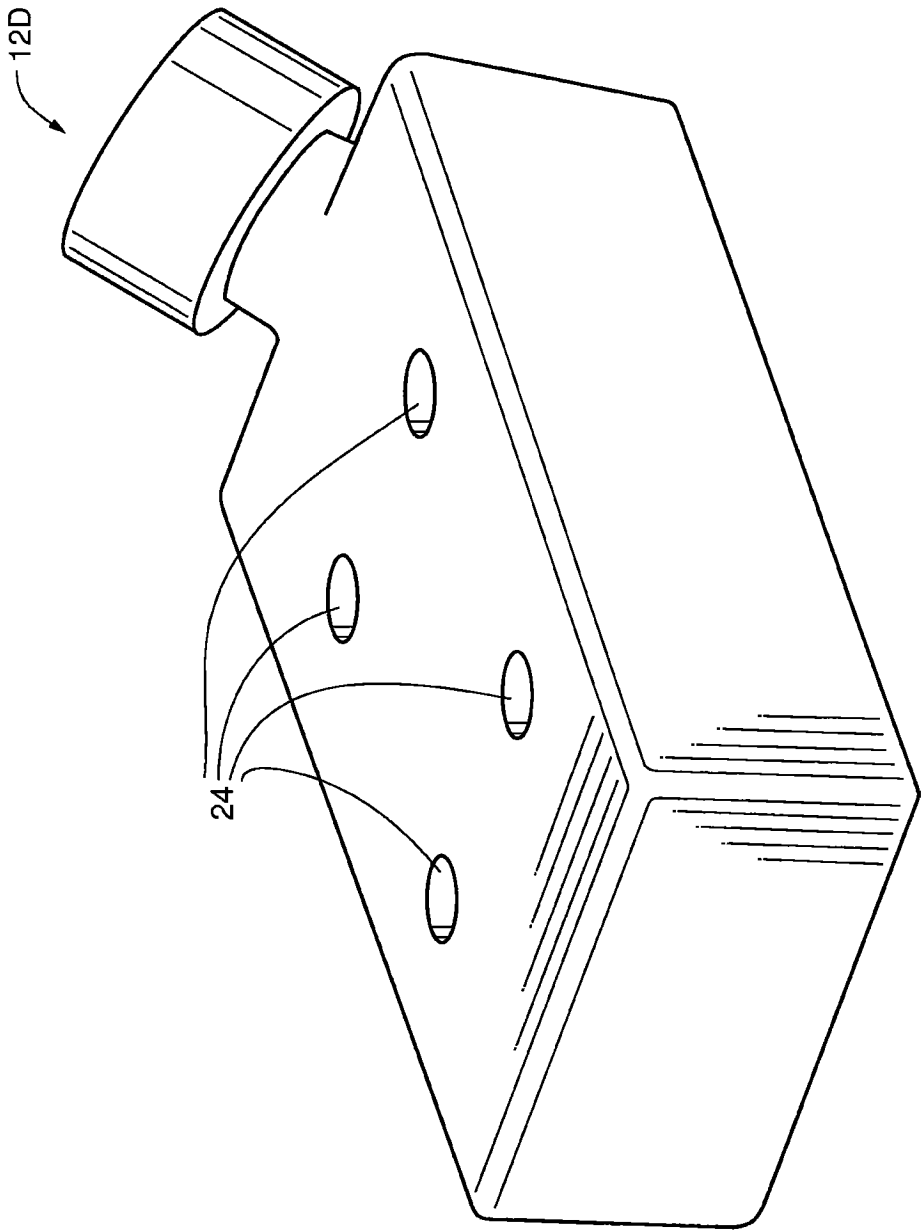


图 3D

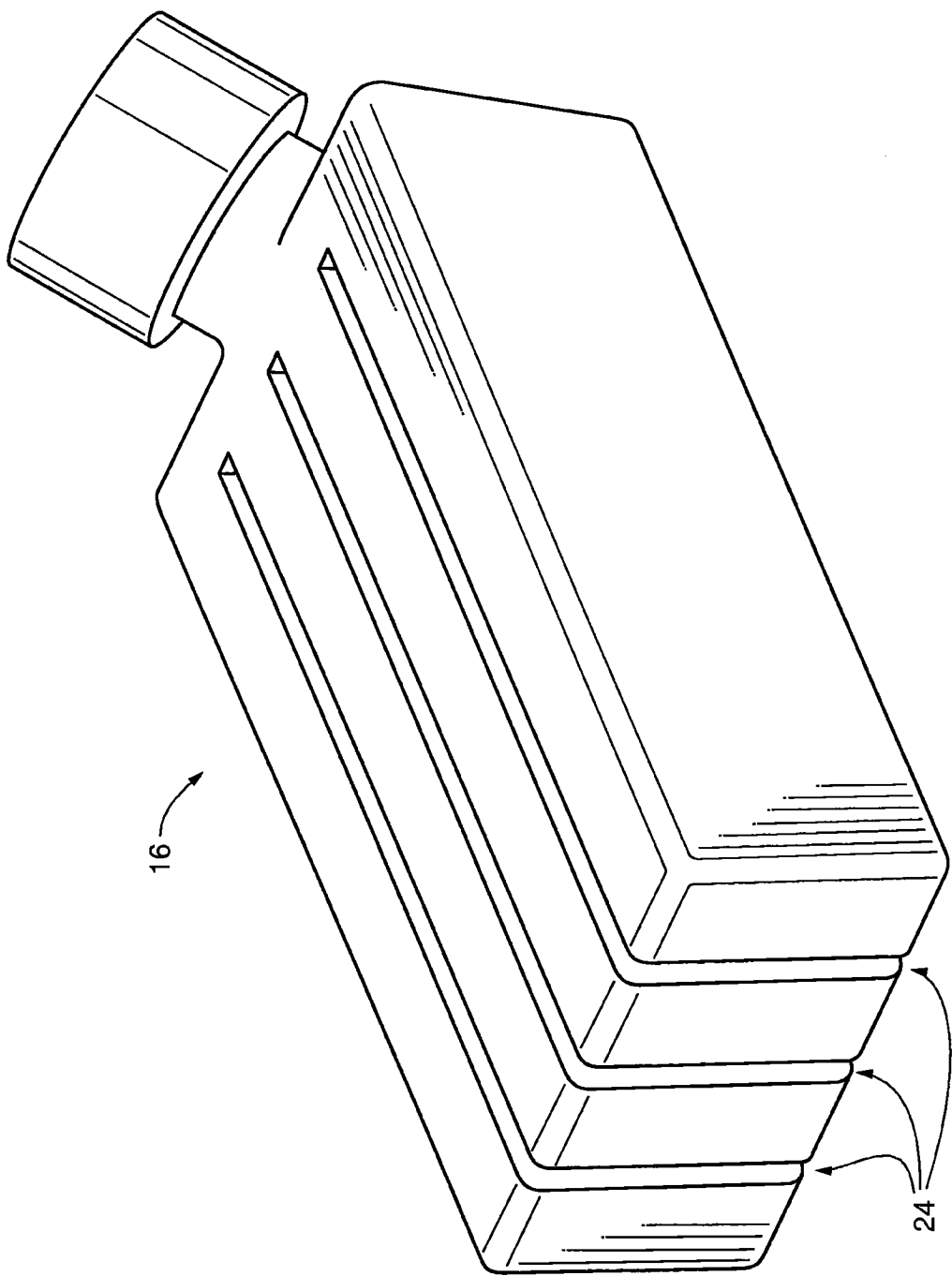


图 4A

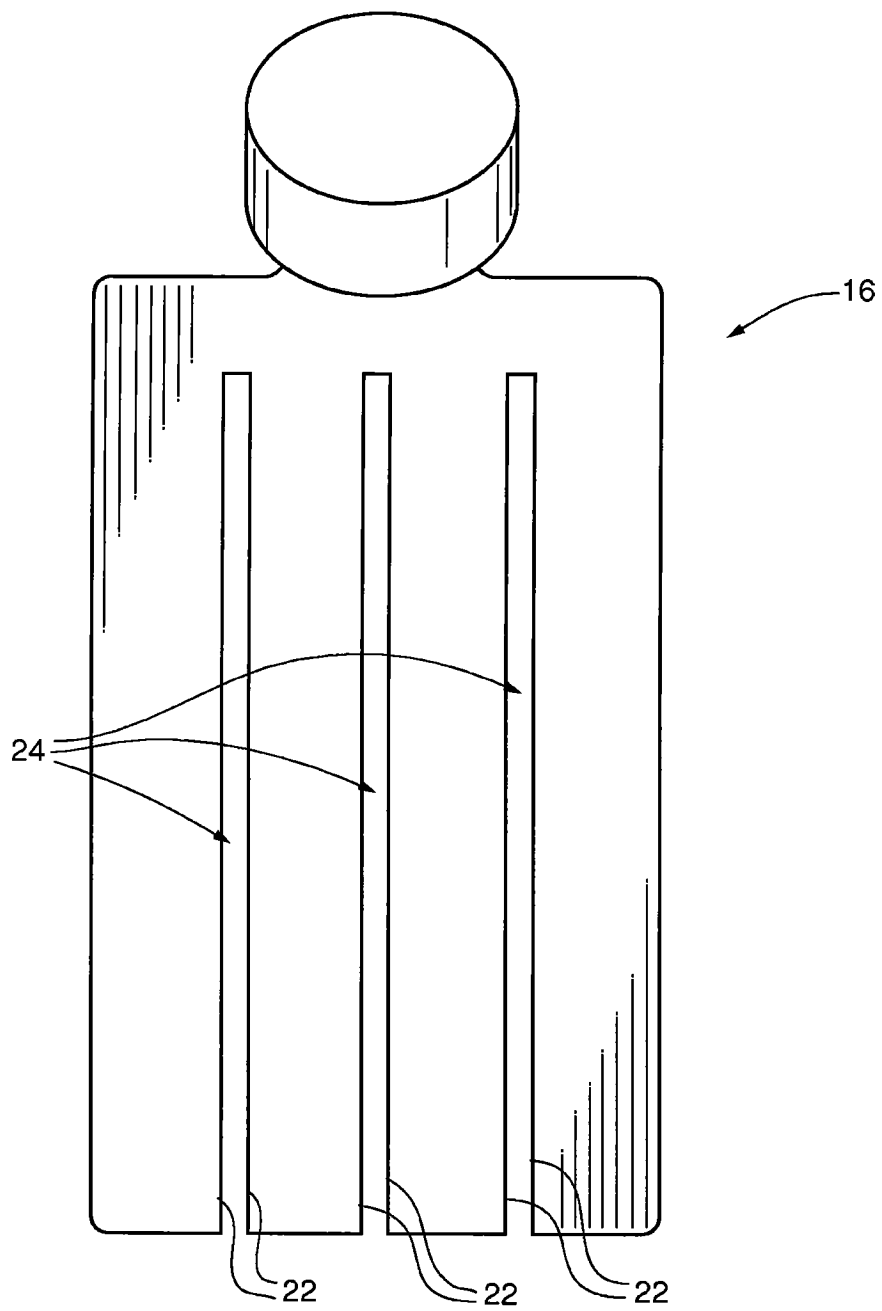


图 4B

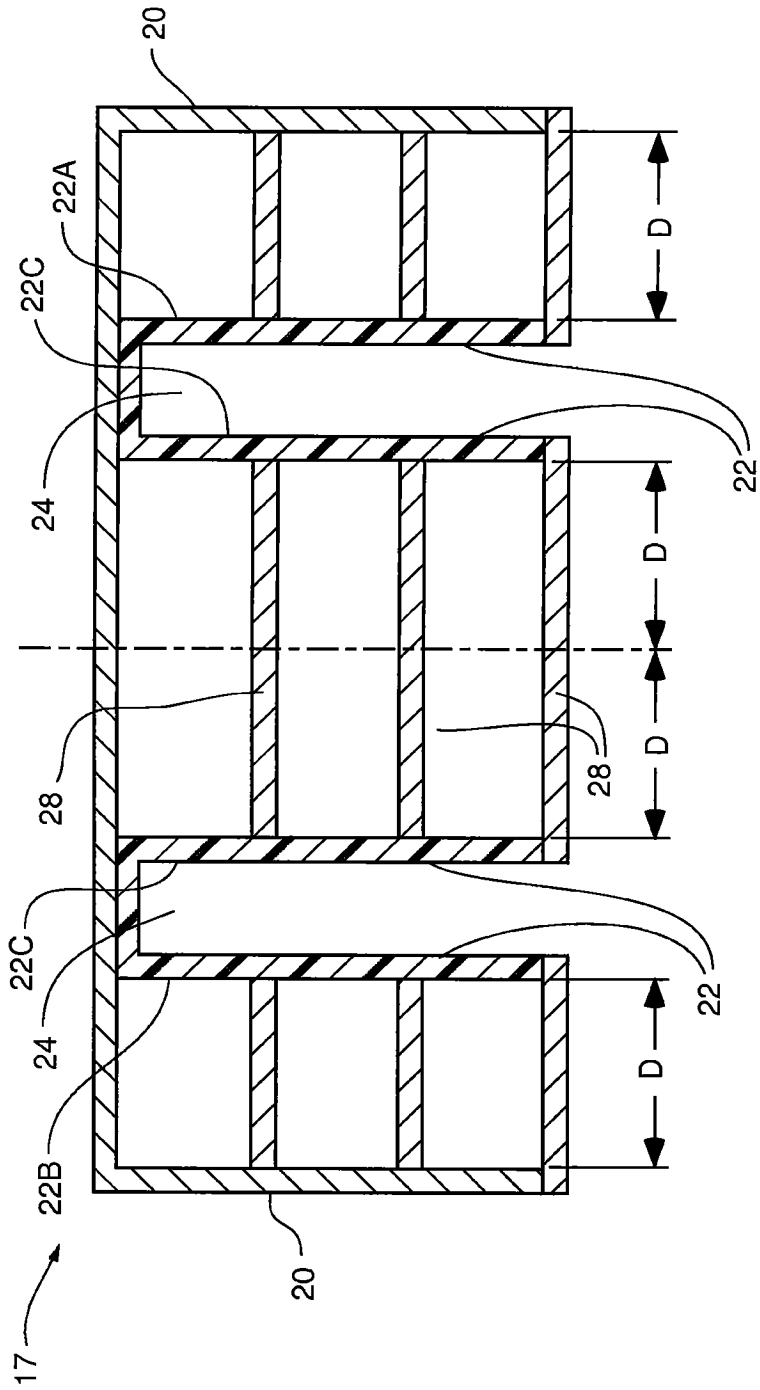


图 5

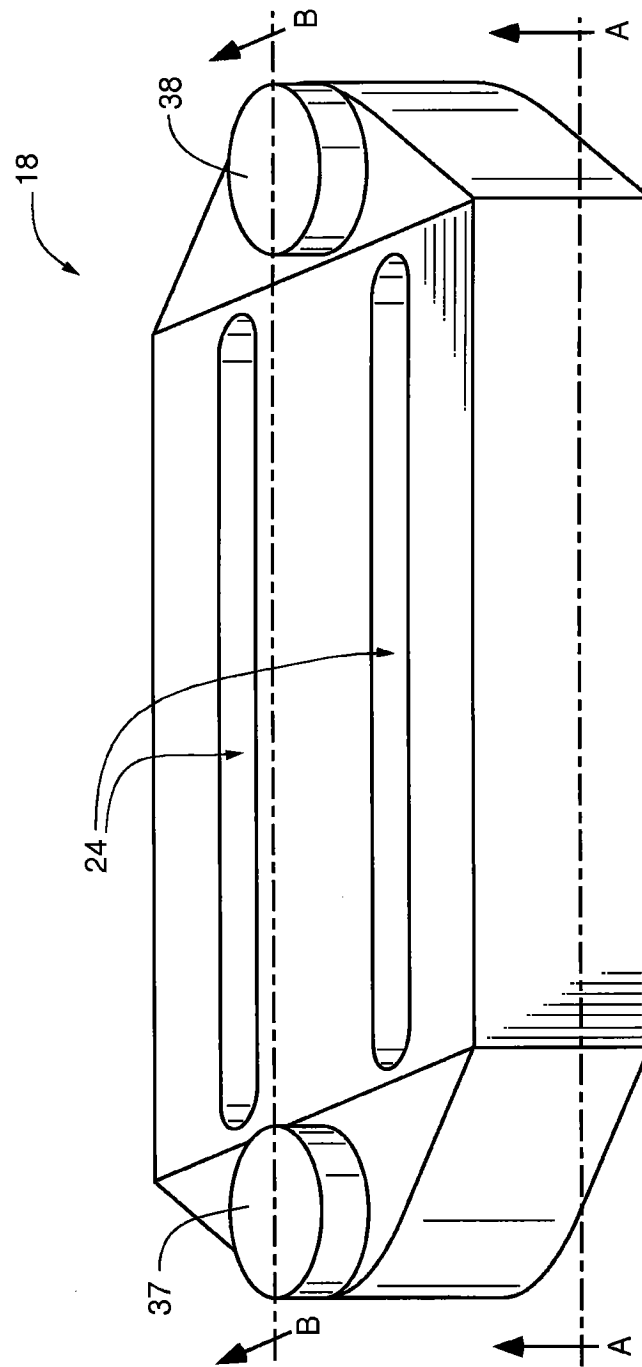


图 6A

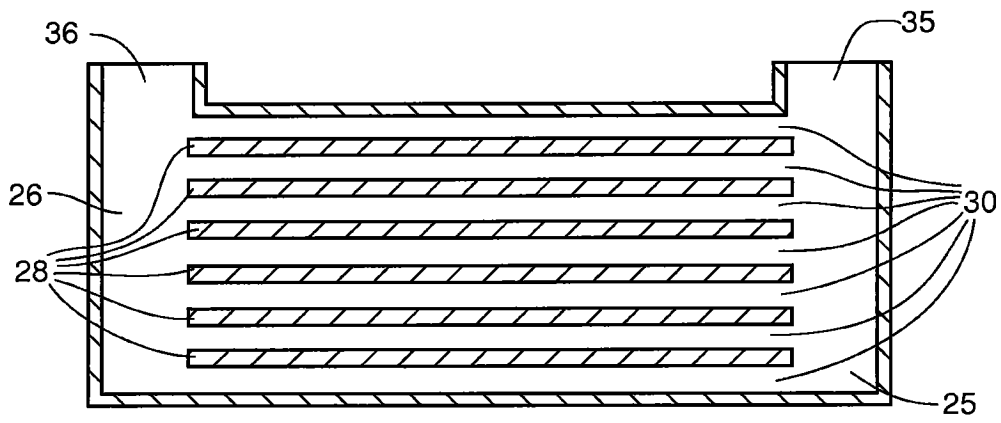


图 6B

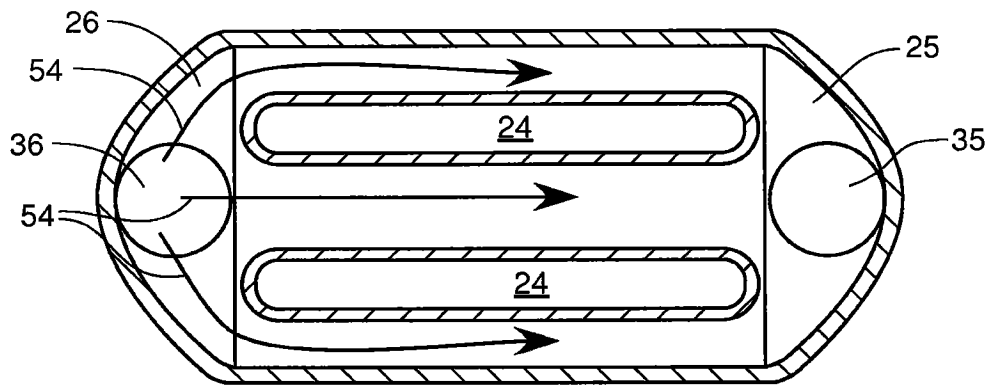


图 6C

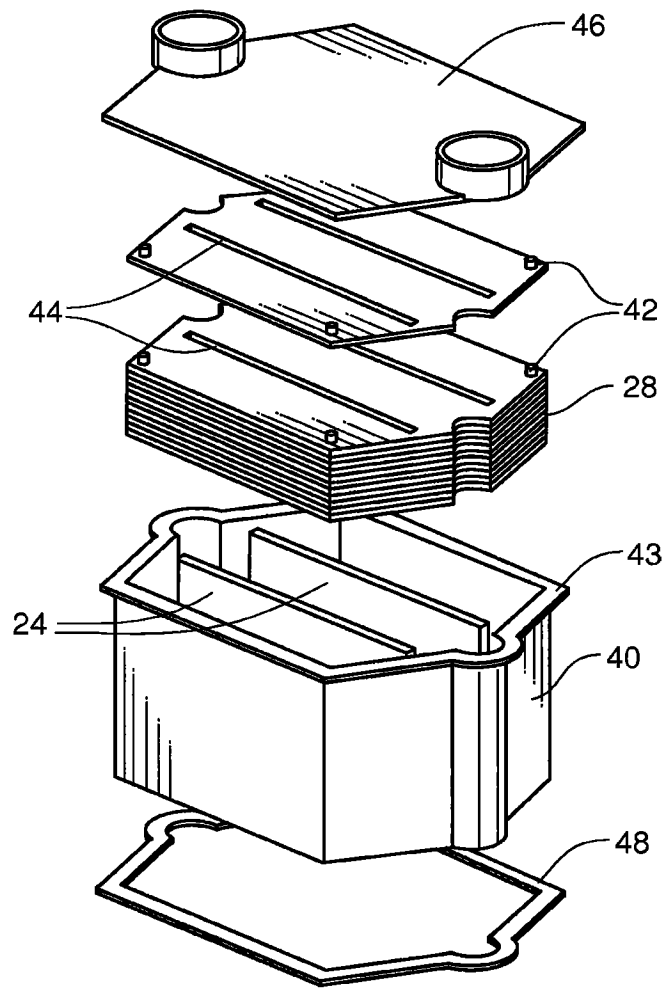


图 7A

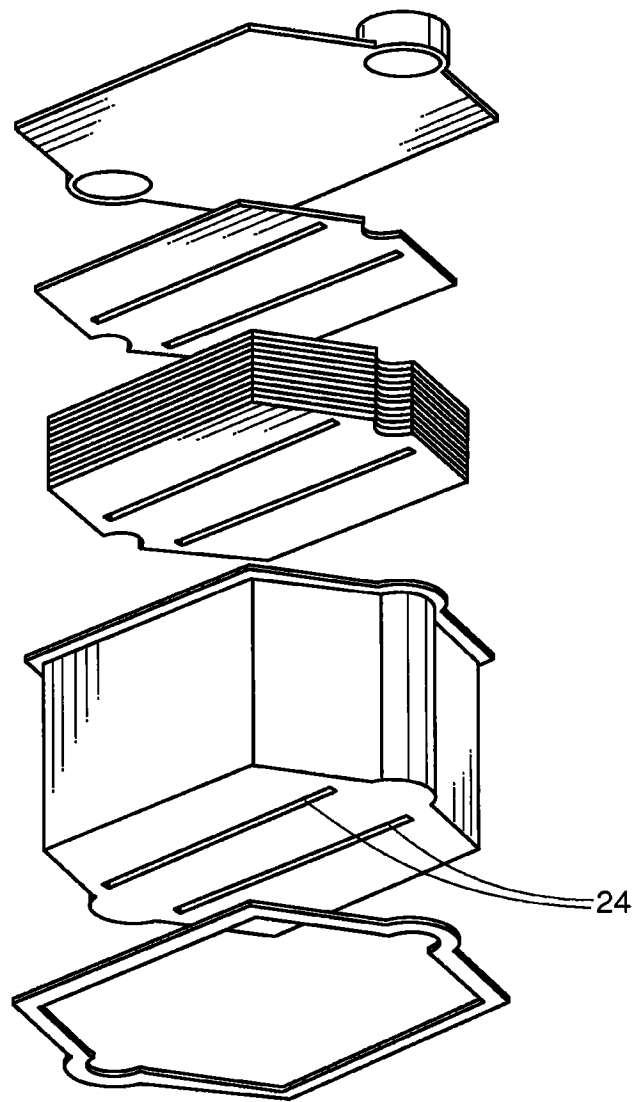


图 7B

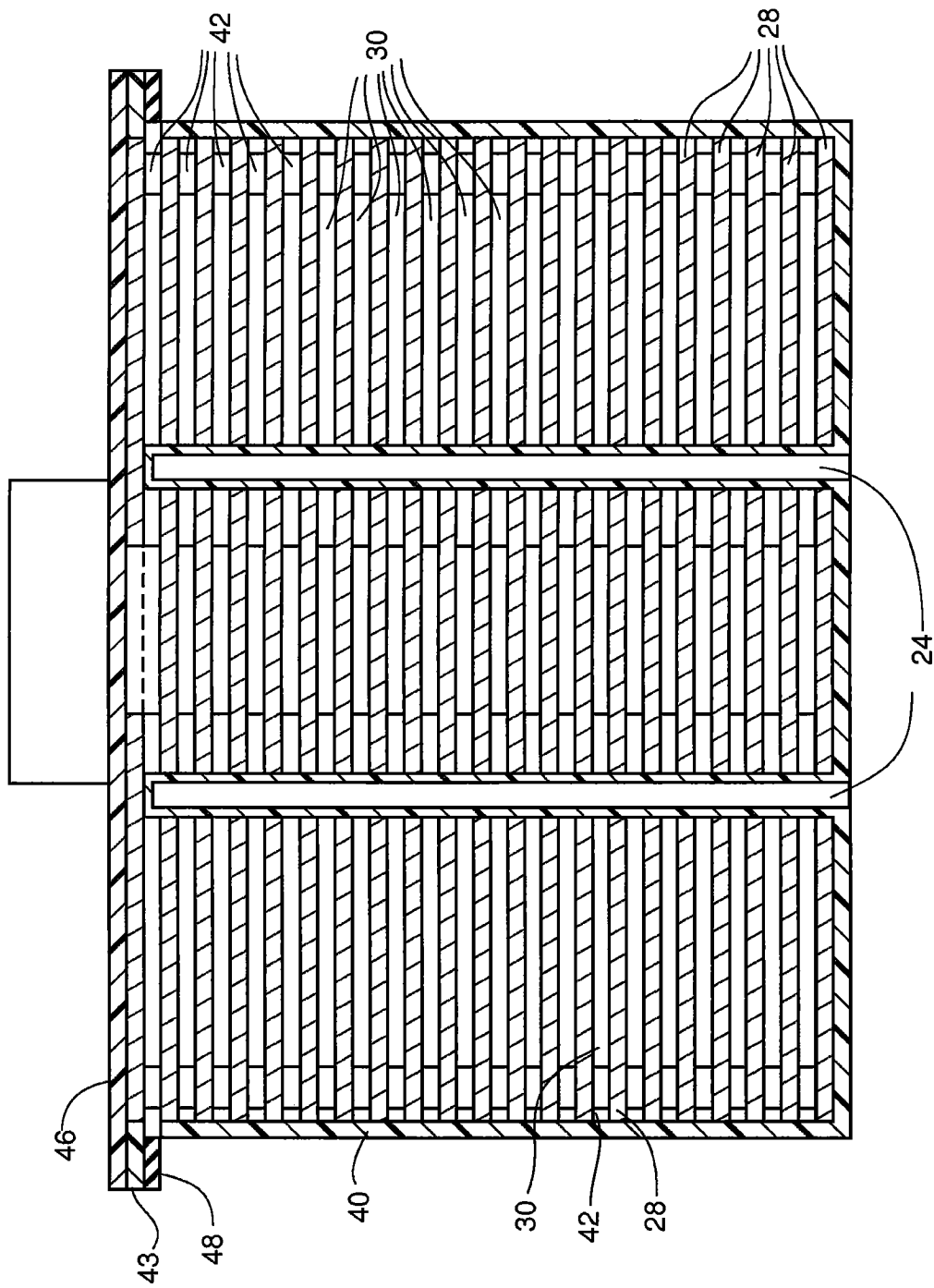


图 7C

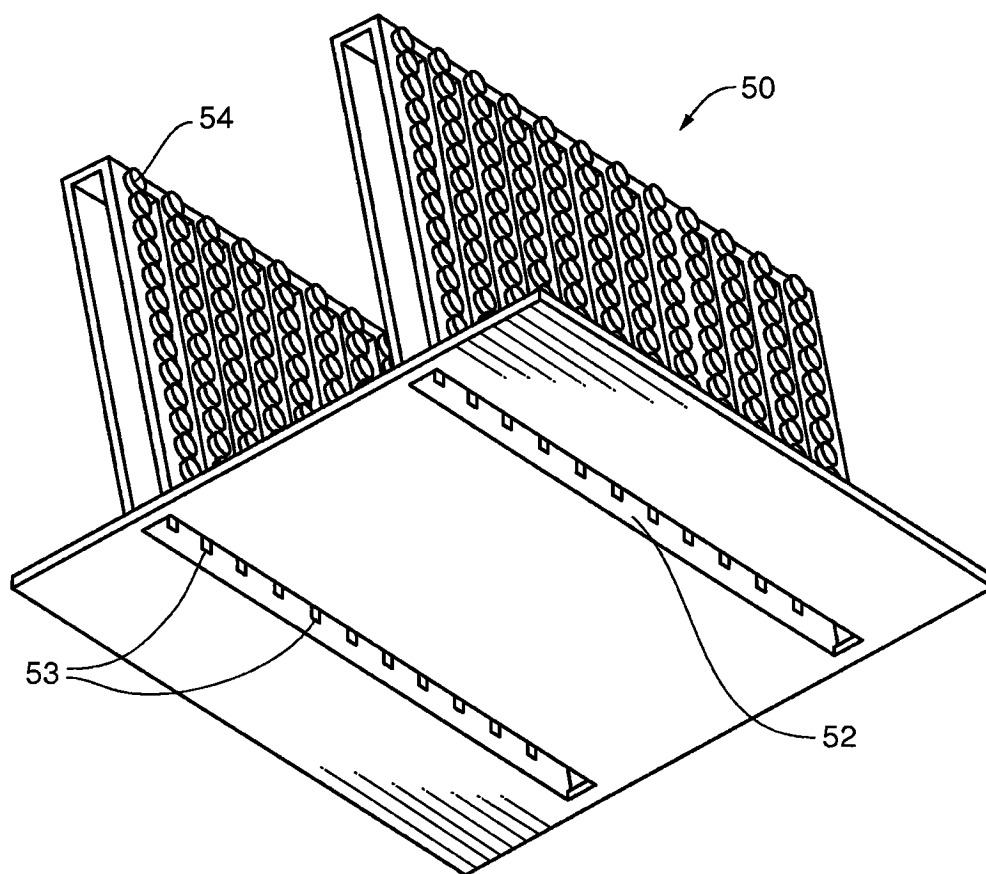


图 8A

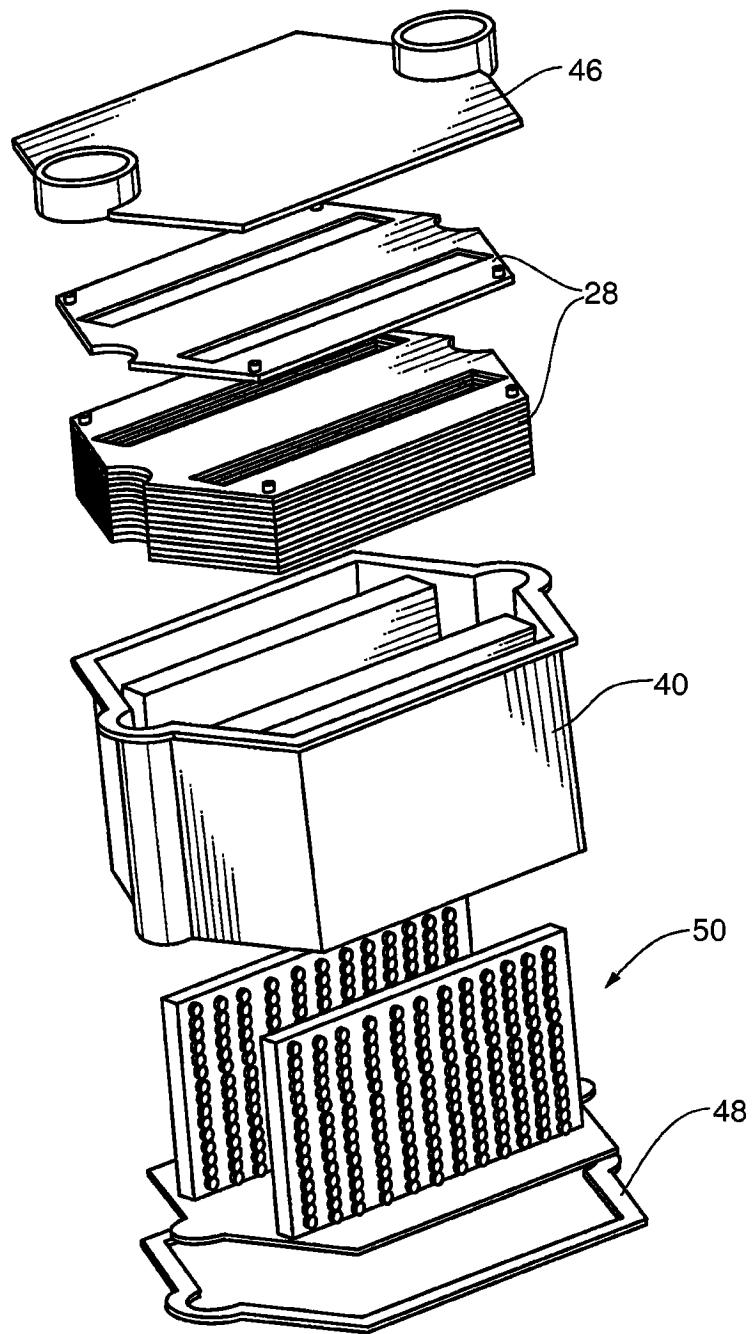


图 8B

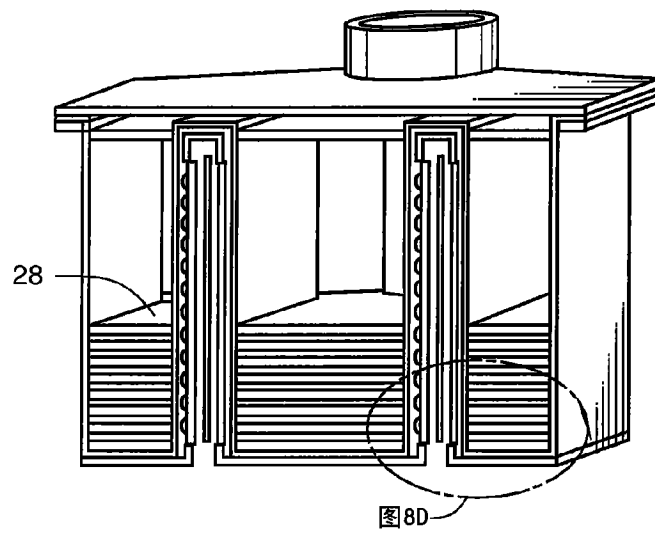


图 8C

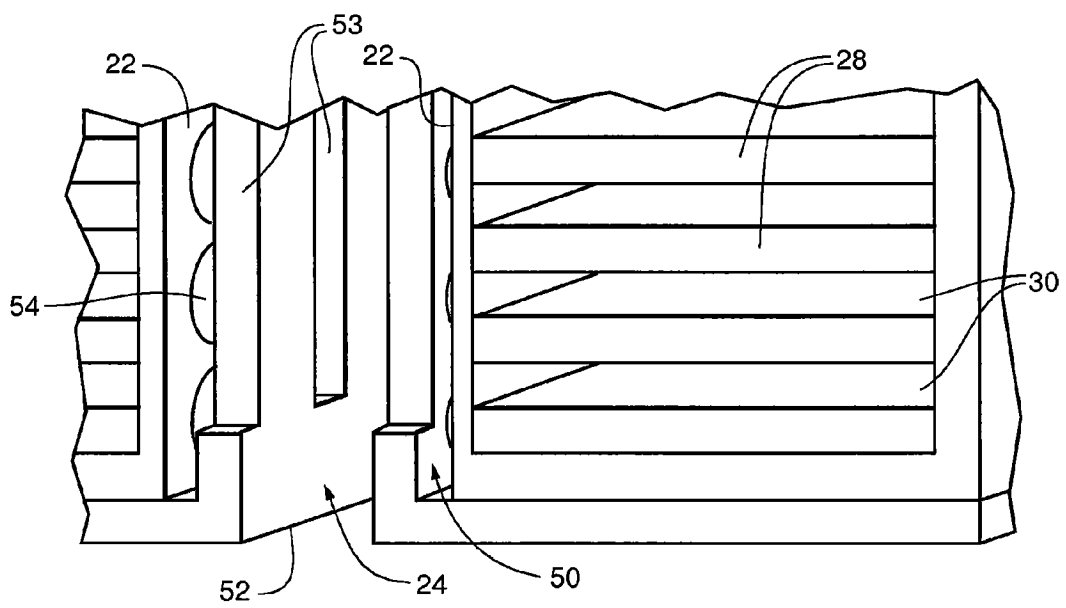


图 8D

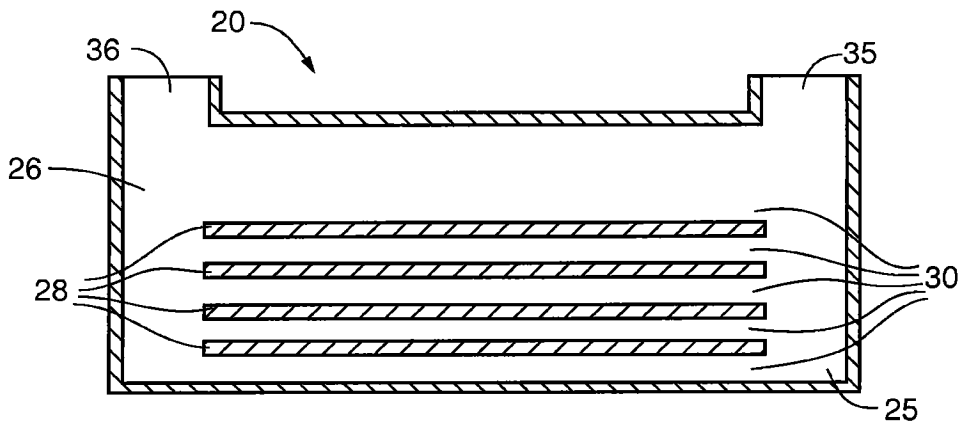


图 9A

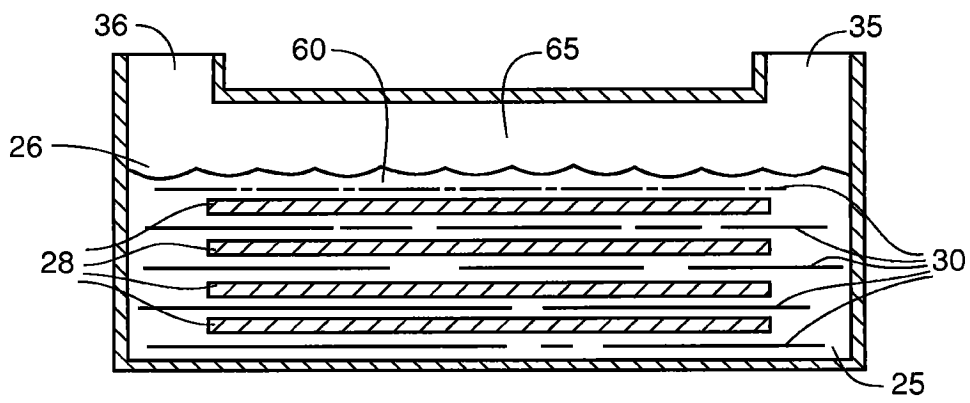


图 9B

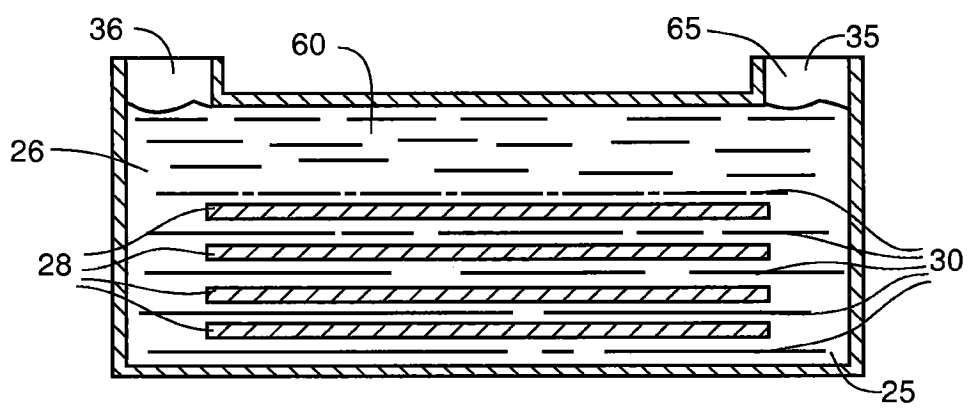


图 9C