



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117413819 A

(43) 申请公布日 2024.01.19

(21) 申请号 202311147996.4

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2020.04.17

A01N 1/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/835,676 2019.04.18 US

(62) 分案原申请数据

202080028183.1 2020.04.17

(71) 申请人 艾步思国际有限责任公司

地址 美国威斯康星州德弗瑞斯特村里弗路
1525号

(72) 发明人 多梅尼克·布萨 迈克尔·波茨

加里·克拉斯 约翰内森·帕克

(74) 专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务

所(普通合伙) 31251

专利代理师 杨华廷

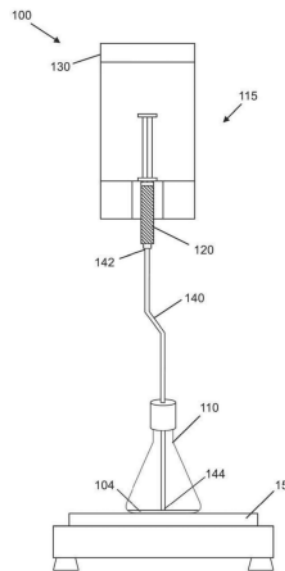
权利要求书2页 说明书11页 附图12页

(54) 发明名称

用于连续添加冷冻保护剂的系统和工艺

(57) 摘要

本文描述了一种用于制备精细胞以提高其在冷冻保存期间的存活率的集成系统和方法。系统具有容器、受控分配器和分配管。分配管具有与分配器流体连接的第一端和设置在容器内的第二端。第二端可以浸没在精细胞液中。受控分配器可以是注射泵,该注射泵包括用于容纳冷冻保护剂的注射器和用于移置注射器的推动机构。注射泵被配置为通过分配管将冷冻保护剂排出到容器中,从而将冷冻保护剂分配到精细胞液中。使用振动台搅动来实现流体的混合。



1. 一种冷冻保护剂分配系统(100),包括:

a) 容器(110);

b) 受控分配器(115);和

c) 分配管(140),所述分配管具有流体连接到所述分配器的排出口(126)的第一端(142)和设置在所述容器(110)内的第二端(144);

其中,所述受控分配器(115)被配置为通过所述分配管(140)分配冷冻保护剂(102)流体并将其分配到所述容器(110)中,从而防止形成液滴,并且所述冷冻保护剂(102)被分配而不会滴落到所述容器(110)中。

2. 如权利要求1所述的系统,其中,所述第二端(144)接触所述容器的内表面(112)或浸没在容纳在所述容器内的材料(104)中。

3. 如权利要求1所述的系统,其中,所述受控分配器(115)包括注射泵,所述注射泵包括用于容纳所述流体(102)的注射器(120)和用于移置所述注射器(120)的推动机构(130),其中,所述推动机构(130)包括可移动的推块(132)、可操作地联接到所述推块(132)的马达(134),和用于控制所述马达(134)的马达控制器(136),其中,所述注射泵被配置为在通过所述推动机构(130)移置所述注射器(120)时分配所述流体。

4. 如权利要求3所述的系统,其中,所述推块(132)和所述注射器(120)布置在轨道(138)上,其中,所述推块(132)与所述注射器(120)对准,使得所述推块(132)能够压靠所述注射器的柱塞(122),其中,所述马达(134)被配置为沿所述轨道(138)在将所述柱塞(122)推入所述注射器的筒(124)中的方向上移动所述推块(132),从而移置所述注射器(120),其中,所述注射器(120)的移置将容纳在所述筒(124)中的所述流体(102)通过所述排出口(126)喷射到所述分配管(102)中,其中,所述流体(102)通过所述第二端(144)离开所述分配管(140)并进入所述容器(110)。

5. 如权利要求1所述的系统,其中,所述受控分配器(115)被配置为将所述流体连续地分配到所述容器(110)中。

6. 如权利要求1所述的系统,其中,所述容器(110)包含生物样本(104)。

7. 如权利要求1所述的系统,还包括混合器(150)。

8. 如权利要求1所述的系统,还包括一个或多个附加的受控分配器(115),以及将每个受控分配器(115)流体连接到所述容器(110)的分配管(140),其中,所述一个或多个附加的受控分配器(115)被配置为通过所述分配管(140)将相同或不同的流体分配到所述容器(110)中。

9. 一种用于将冷冻保护剂(102)分配到生物样本(104)的冷冻保存系统(100),所述系统(100)包括:

a) 容器(110),所述容器用于容纳所述生物样本(104);

b) 注射泵(115),所述注射泵包括用于容纳所述冷冻保护剂(102)的注射器(120)和用于移置所述注射器(120)的推动机构(130);和

c) 分配管(140),所述分配管具有第一端(142)和第二端(144),所述第一端(142)与所述注射器的排出口(126)流体连接,所述第二端(144)设置在所述容器(110)内,使得当所述生物样本(104)容纳在所述容器(110)中时,所述第二端(144)与所述容器的内表面(112)或所述生物样本(104)接触;

其中,所述注射泵(115)被配置为在通过所述推动机构(130)移置所述注射器(120)时通过所述分配管(140)分配所述冷冻保护剂(102)并将其分配到所述容器(110)中,

其中,通过使所述管的所述第二端(144)与所述容器的所述内表面(112)或所述生物样本(104)接触,防止形成液滴,并且所述冷冻保护剂(102)被分配而不会滴落到所述容器(110)中。

10.如权利要求9所述的系统,其中,所述管的所述第二端(144)浸没在所述生物样本(104)中。

11.如权利要求9所述的系统,其中,所述推动机构(130)包括可移动的推块(132)、可操作地联接到所述推块(132)的马达(134)、以及用于控制所述马达(134)的马达控制器(136)。

12.如权利要求11所述的系统,其中,所述推块(132)和所述注射器(120)布置在轨道(138)上,其中,所述推块(132)与所述注射器(120)对准,使得所述推块(132)能够压靠所述注射器的柱塞(122),其中,所述马达(134)被配置为沿所述轨道(138)在将所述柱塞(122)推入所述注射器的筒(124)中的方向上移动所述推块(132),从而移置所述注射器(120),

其中,所述注射器(120)的移置将容纳在所述筒(124)中的所述冷冻保护剂(102)通过所述排出口(126)喷射到所述分配管(102)中,其中,所述冷冻保护剂(102)通过所述第二端(144)离开所述分配管(140)并进入所述容器(110)中。

13.如权利要求11所述的系统,其中,所述马达控制器(136)包括处理器和存储器,所述存储器可操作地联接到所述处理器并存储一组指令,当由所述处理器执行时,所述指令导致所述马达(134)在移置所述注射器(120)的方向上以期望的步长移动所述推块(132),从而以期望的流速将所述冷冻保护剂(102)添加到所述生物样本(104)中。

14.如权利要求13所述的系统,其中,所述推块(132)移置所述注射器(120),使得所述冷冻保护剂(102)以连续的流速添加到所述生物样本(104)。

15.如权利要求13所述的系统,其中,所述推块(132)移置所述注射器(120),使得所述冷冻保护剂(102)以脉冲流速添加到所述生物样本(104)。

16.如权利要求9所述的系统,还包括混合器(150),所述混合器用于将所述冷冻保护剂(102)和容纳在所述容器(110)中的所述生物样本(104)混合,其中,所述混合器(150)防止所述生物样本(104)粘附到所述容器的所述内表面(112)。

17.如权利要求16所述的系统,其中,所述混合器(150)是振动台,其中,所述容器(110)放置在所述振动台上,其中,所述振动台的振动搅动所述冷冻保护剂(102)和所述生物样本(104)。

18.如权利要求9所述的系统,还包括一个或多个附加注射泵(115),每个附加注射泵包括容纳另一流体的注射器(120)和用于移置所述注射器(120)的推动机构(130),以及将每个注射器(120)流体连接到所述容器(110)的分配管(140),其中,所述一个或多个附加注射泵(115)被配置为在通过所述推动机构(130)移置所述注射器(120)时,通过所述分配管(140)将所述另一流体分配到所述容器(110)中。

19.如权利要求18所述的系统,其中,所述另一流体是气体。

用于连续添加冷冻保护剂的系统和工艺

- [0001] 本申请为下述母案申请的分案申请：
- [0002] 国际申请数据：PCT/US2020/028850 2020.04.17；
- [0003] 进入国家阶段日：2021.10.12；
- [0004] 申请日：2020.04.17；
- [0005] 申请号：202080028183.1；
- [0006] 发明名称：用于连续添加冷冻保护剂的系统和工艺。
- [0007] 交叉引用内容
- [0008] 本申请请求在2019年4月18日提交的美国临时申请案No.62/835,676的权益，所述申请案说明书的全部内容通过引用结合于此。

技术领域

[0009] 本发明总体上涉及精液的处理和冷冻保存。特别地，本发明公开了系统和方法，其中在搅动下高精度和连续地添加流体，以优化精细胞的冷冻保存。

背景技术

[0010] 人类精子的冷冻保存涉及精细胞在低温下的稳定。该技术通常用于人工授精过程或保存男性生育能力。在冷冻保存过程中，向精子样本中添加到冷冻保护剂以保护精子免受冷冻损伤。这种方法的缺点是，冷冻保护剂的吸收会对精细胞产生应激，导致细胞死亡。据信，较大的冷冻保护剂与精细胞浓度的不匹配只会增加这种施加的应激。过去已知的解决方案包括通过从悬挂的分配管脱离的液滴逐滴添加冷冻保护剂介质，或者包括间隔几分钟的多个离散添加的逐步添加。

[0011] 在逐滴添加中，使用类似于滴定管滴定的设置。在延长的时间内滴加冷冻保护剂介质（冷冻介质）。在逐步或批量添加中，冷冻介质悬浮在精子样本上方的容器中。连接到容器的旋塞阀用于启动/停止流动。没有对流速的刻意控制；相反，使用质量平衡来估计输送的体积。冷冻介质的添加在几分钟内完成，以读取所需添加的总体积。例如，冷冻介质可以以三次间隔15分钟的不连续批量添加的方式添加。这些过程仍然会导致细胞死亡；因此，在向精细胞中添加冷冻保护剂介质的过程中，需要降低细胞死亡的速率。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供能够减轻冷冻保存对精子完整性的有害影响的系统和方法，如独立权利要求所述。在从属权利要求中给出了本发明的实施方案。如果本发明的实施方案不是互斥的，则它们可以彼此自由组合。

[0013] 在一些方面，本发明的特征在于一种集成的冷冻保存系统，其可以提高精细胞的存活率和处理产量。在示例性实施方案中，本发明的特征在于包括容器、受控分配器和分配管的分配系统。受控分配器可以被配置为通过分配管分配流体并将流体分配到容器中。受控分配器的非限制性示例是注射泵，其包括用于容纳流体（例如冷冻保护剂）的注射器和用

于移置注射器柱塞的推动机构。注射泵可以被配置为在通过推动机构移置注射器时通过分配管将流体分配到容器中。在一些实施方案中,分配管具有与受控分配器的排出口流体连接的第一端和设置在容器内的第二端。在一个实施方案中,第二端可以接触容纳在容器内的材料。容纳在容器内的材料可以是样本介质(即含有例如盐、糖、缓冲液、蛋白质、抗生素、脂质、抗氧化剂等液体介质)中的细胞,例如精细胞。在精细胞的情况下,可以对精细胞进行性别鉴定(即后处理)或非性别鉴定(即“常规”)。系统还可用于其它细胞类型,例如细胞培养物、卵母细胞和胚胎。另外或替代地,第二端可以接触容器的内表面。

[0014] 根据一些实施方案,推动机构可包括可移动的推块、可操作地联接到所述推块的马达、以及用于控制马达的马达控制器。推块和注射器可以布置在轨道上并对齐,使得推块可以压靠注射器的柱塞。马达被配置为沿轨道在将柱塞推入注射器的筒中的方向上移动推块,从而移置注射器。注射器的移置将容纳在筒中的流体通过排出口喷射到分配管中。流体通过第二端离开分配管并进入容器。

[0015] 在其它方面,分配系统还可以包括用于混合容器中的内容物的混合器。在另外的实施方案中,分配系统还可以包括一个或多个附加的受控分配器,以及将每个受控分配器流体连接到容器的分配管。在推动机构移置注射器时,附加的分配器可以通过它们各自的分配管分配相同或不同的流体,例如冷冻保护剂或气体,并进入容器。

[0016] 在一个实施方案中,受控分配器可以连续地分配流体。在一个非限制性示例中,推动机构可以移置注射器柱塞,使得流体从浸没在精细胞中的分配管的第二端连续分配。在另一个实施方案中,受控分配器可以连续地分配流体,从而防止形成液滴,并且流体被分配而不会滴落到容器中。在另外的实施方案中,受控分配器可以以小于或等于最大流速 f_{\max} 的流速将流体分配到容器中,所述最大流速 f_{\max} 由下式确定: $f_{\max}(\text{ml/min}) = 0.0045 * V$,其中 V = 材料体积,单位为ml。在替代实施方案中(例如,具有约45分钟的较短分配时间的实施方案),最大流速 f_{\max} 可由下式确定: $f_{\max}(\text{ml/min}) = 0.0056 * V$,其中 V = 材料体积,单位为ml。最大流速由冷冻保护剂的体积决定(体积又由测定的样本量决定),其在设定的时间量内添加。通常,添加时间为约60分钟,但在一些情况下可以为约45分钟。对于较大的样本,所需的冷冻保护剂的体积将更大,因此最大流速将更大。因此,添加时间可以是大致恒定的,而与样本大小和所添加的冷冻保护剂的体积无关,因为总流速可以与体积成线性比例。

[0017] 根据其它实施方案,本发明的冷冻保存系统可用于制备冷冻保存的生物样本的方法中。当将注射泵用作受控分配器时,方法可包括将冷冻保护剂添加到注射器中,将生物样本添加到容器中,通过分配管将注射器连接到容器上,并移置注射器以期望的流速将冷冻保护剂分配到容器中,从而将冷冻保护剂添加到生物样本中。在一个实施方案中,分配管的一端可以接触生物样本或容器的内表面。在一些实施方案中,将冷冻保护剂连续分配到容器中。在一个优选实施方案中,注射器被移置,从而防止形成液滴,并且冷冻保护剂被分配而不会滴落到容器中。在其它实施方案中,冷冻保护剂以小于或等于最大流速 f_{\max} 的流速分配到容器中,所述最大流速 f_{\max} 由前述方程确定。

[0018] 与批量或逐滴添加相比,本发明的一个独特的技术特征是向样本中连续添加冷冻保护剂。可以在特定的时间段内以缓慢和连续的速率添加相同体积的冷冻保护剂介质,例如基于甘油的冷冻保护剂。本发明的另一个技术特征是分配管浸没或接触容器的内表面,以使冷冻保护剂能够低冲击或软冲击地添加到精细胞溶液中。该特征可允许以减少细胞应

激的方式将冷冻保护剂逐渐引入精细胞溶液中。本发明的另一个技术特征是冷冻保护剂的稀释添加,其中冷冻保护剂以相对低的体积进入精细胞液,以降低对进入点处或附近的局部细胞的细胞毒性。不希望受到特定理论或机制的限制,据信,这些技术特征可以降低工艺风险和细胞死亡率,从而提高精细胞的存活率和工艺产率。目前已知的现有参考文献或著作都不具有本发明的独特的创造性技术特征。

[0019] 此外,本发明的创造性技术特征促成了令人惊讶的结果。在广泛的实验之后,意外地发现,通过冷冻保存制备过程,与间隔15分钟的三次批量添加的逐步添加过程相比,当使用浸没的连续添加过程时,细胞的存活率平均增加了5%。在两种过程中,样本体积与分配的冷冻保护剂体积的比率相同。此外,令人惊讶地发现,使用本发明的冷冻保存制备过程制备的细胞通过冷冻/解冻过程的存活率增加了8%。因此,本发明令人惊讶地能够增加精细胞的处理产率,这是本领域普通技术人员不能简单地预测或设想的结果。本文所述的任何特征或特征的组合都包括在本发明的范围内,只要包括在任何这种组合中的特征不是相互矛盾的,这从上下文、本说明书和本领域普通技术人员的知识中是显而易见的。在下面的详细描述和权利要求中,本发明的其它优点和方面是显而易见的。

附图说明

[0020] 通过考虑以下结合附图给出的详细描述,本发明的特征和优点将变得显而易见,其中:

[0021] 图1示出了本发明的分配或冷冻保存系统的非限制性实施方案。

[0022] 图2A-2B示出了分配系统的受控分配器的非限制性示例。图2A描绘了部分移置的注射泵,图2B描绘了处于完全移置位置的注射泵。

[0023] 图3示出了冷冻保存系统的另一个非限制性实施方案。

[0024] 图4A是冷冻保存系统的另一个非限制性实施方案。图4B示出了可以同时处理多个样本的实施方案。

[0025] 图5A示出了注射器夹具的初始位置。图5B示出了夹持注射器的注射器夹具的移置位置。

[0026] 图6A示出了连接到注射器夹具的感应位置传感器的初始位置;位置变化与电压变化成比例。图6B示出了当注射器夹具夹持注射器时传感器的移置位置。

[0027] 图7是本发明的泵送机构的非限制性示意图。

[0028] 图8A-8C是根据本发明的用于分配冷冻保护剂的工艺流程图的非限制性示例。

[0029] 图9示出了用于分配冷冻保护剂的进料流的非限制性示例。

具体实施方式

[0030] 以下是对应于本文所提及的特定元件的元件列表:

[0031] 100 系统

[0032] 102 流体或冷冻保护剂

[0033] 104 生物样本

[0034] 110 容器

[0035] 112 容器的内表面

- [0036] 115受控分配器,例如注射泵
- [0037] 120 注射器
- [0038] 122 柱塞
- [0039] 124 筒
- [0040] 126 排出口
- [0041] 127 注射器夹具
- [0042] 129 位置传感器
- [0043] 130 推动机构
- [0044] 132 推块
- [0045] 134 马达
- [0046] 136 马达控制器
- [0047] 138 轨道
- [0048] 140 分配管
- [0049] 142 分配管的第一端
- [0050] 144 分配管的第二端
- [0051] 150 混合器

[0052] 如本文所用,“冷冻保护剂”是指添加到生物样本中以保护所述样本在冷冻保存期间免受冷冻损伤的化学物质。术语“冷冻保护剂”可与术语“冷冻保护剂介质”或“冷冻介质”互换使用。冷冻保护剂的示例包括但不限于甘油、乙二醇、二甲基亚砷(DMSO)、蔗糖、海藻糖、葡萄糖、果糖、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、TRIS B、三-果糖-蛋黄-甘油(TFEG)、柠檬酸和1,2-丙二醇。

[0053] 如本文所用,“受控分配器”是指能够以受控流速输送流体(例如冷冻保护剂或气体)的任何装置。在一些优选实施方案中,分配器是自动化的。在其它实施方案中,分配器可以是非自动化的。根据本发明可以使用的受控分配器的非限制性示例包括注射泵、机械泵、蠕动泵、重力泵、直接提升泵、微流体泵、离心泵、压缩机、气体调节器或任何正排量泵。在一些优选实施方案中,分配器可以是能够以与注射泵类似的精度输送流体的任何流量控制器。在另一示例中,受控分配器可包括容器,所述容器具有流体上方的受控压力和下游流速测量值。简单的反馈回路根据流速误差控制压力至设定点。或者,可以使用节流阀来控制流量,而不是控制流体上的压力。

[0054] 如本文所使用,术语“注射器”是指包括筒和可移动(例如可滑动)的柱塞的正排量泵,所述柱塞可插入筒中。柱塞可包括密封件,所述密封件允许柱塞在柱塞被拉离筒时产生吸力,从而将流体吸入并截留在筒中。将柱塞推入筒中,迫使例如从筒中排出截留的流体。如本文所使用,当与注射器结合使用时,术语“移置”及其派生词是指柱塞被推入筒。

[0055] 现在参考图1,在一个实施方案中,本发明的特征在于一种分配系统(100),其包括容器(110)、受控分配器(115)和分配管。在一些实施方案中,分配管(140)具有与受控分配器的排出口(126)流体连接的第一端(142)和设置在容器(110)内的第二端(144)。在一个实施方案中,第二端(144)可以接触容纳在容器内的材料(104)。在另一个实施方案中,第二端(144)可接触容器的内表面(112),如图3所示。在下文中,受控分配器可以以注射泵为例;然而,应当理解,受控分配器不限于注射泵,并且其可以是适于输送流体并控制其流速的任何

装置。在一些实施方案中,注射泵(115)可以包括用于容纳流体(102)的注射器(120)和用于移置所述注射器(120)的推动机构(130)。注射泵(115)可以被配置为在通过推动机构(130)移置注射器(120)时通过分配管(140)将流体分配到容器(110)中。

[0056] 根据一些实施方案,本发明的分配系统(100)可用于冷冻保存过程。例如,在一个实施方案中,本发明的特征在于用于将冷冻保护剂(102)分配到生物样本(104)的冷冻保存系统(100)。在一些实施方案中,冷冻保护剂(102)可包括甘油、乙二醇、二甲基亚砷(DMSO)、1,2-丙二醇或可防止在冷冻期间对生物样本造成损害的任何其它合适的物质。

[0057] 在一个实施方案中,生物样本(104)可以包括精细胞。精细胞可以包括性别分类的或性别偏斜的细胞,其中,它们主要含有X染色体或Y染色体。例如,可以对精细胞进行性别分类,使其主要含有X染色体,以增加授精后所产生的胎儿为女性的可能性。在另一个实施方案中,精细胞可以是未分类的。在其它实施方案中,本发明不仅限于精细胞。根据本发明,可以冷冻保存其它类型的样本。例如,生物样本可以包括组织、干细胞、骨髓、胚胎、卵、卵母细胞、卵细胞、羊水和脐带、肝细胞、血细胞、神经元细胞、器官、牙齿、植物种子和微生物。

[0058] 在一个实施方案中,冷冻保存系统(100)可以包括用于容纳生物样本(104)的容器(110)、包括用于容纳冷冻保护剂(102)的注射器(120)的注射泵(115)和用于移置所述注射器(120)的推动机构(130),以及分配管(140),所述分配管具有与注射器的排出口(126)流体连接的第一端(142)和设置在容器(110)内的第二端(144)。在通过推动机构(130)移置注射器(120)时,注射泵(115)可通过分配管(140)分配冷冻保护剂(102),并将其分配到容器(110)中。

[0059] 在一些实施方案中,第二端(144)可以与容器的内表面(112)接触。例如,第二端(144)可直接接触或邻近容器的内表面(112)设置。在其他实施方案中,当生物样本(104)容纳在容器(110)中时,第二端(144)可以与生物样本(104)接触。例如,管的第二端(144)可以浸没在生物样本(104)中。在优选实施方案中,通过使管的第二端(144)与生物样本(104)或容器的内表面(112)接触,防止分配的冷冻保护剂(102)滴入容器(110)中。如本文所用,术语“液滴”及其派生词是指从悬挂的分配管脱离的液滴。

[0060] 在一个实施方案中,容器的内表面(112)可包括容器的内侧表面或内侧底面。在一些实施方案中,容器(110)可以是烧瓶、管或具有足够的体积容量以容纳冷冻保护剂(102)和生物样本(104)的任何容器。例如,容器(110)可具有约20ml至约100ml的体积容量。在另一个实施方案中,容器(110)的容量可为约100ml至约250ml或约250ml至约500ml。在又一实施方案中,容器(110)的容量可大于500ml。在其它实施方案中,容器(110)可以是封闭的或密封的容器。如图4A所示,容器可包括盖,所述盖具有用于接收分配管(140)的输入口,因此盖允许容器被密封,同时仍提供进入容器内部的入口。在一些实施方案中,容器(110)可由刚性或半刚性材料构成,例如玻璃或塑料。在另外的实施方案中,如果样本是光敏的,则材料可以是不透明的,或者对于进入容器的可见性来说是基本透明的。

[0061] 在一个实施方案中,如果分配管的第二端(144)与生物样本(104)接触,则将冷冻保护剂(102)直接添加到生物样本(104)。例如,当冷冻保护剂(102)被添加到容器中时,第二端(144)浸没在生物样本(104)和冷冻保护剂(102)中。在另一个实施方案中,如果分配管的第二端(144)与容器的内表面接触但不与生物样本(104)(例如,容器侧壁)接触,则可以将冷冻保护剂(102)间接添加到生物样本(104)。如图3所示,如果第二端(144)接触容器侧

壁,则冷冻保护剂(102)随着其逐渐添加到样本而沿着容器侧壁流动。在任一实施方案中,液滴形成被破坏,并且分配的冷冻保护剂(102)不会滴入容器(110)中。

[0062] 不希望将本发明限制于特定的机构,注射泵可以通过注射器柱塞的精确位移来控制冷冻保护剂的输送速率。在一个实施方案中,添加速率可编程地设置为细胞体积的函数。由于精细胞的批量大小可以根据从精液中获得的细胞数量而有很大变化,因此必须满足大范围的添加体积。在一些实施方案中,精细胞液的体积可以在每个精液样本约1ml至约100ml的范围内。在优选的实施方案中,添加的冷冻介质的总体积可以是精细胞样本体积的约10%至约25%。例如,25ml的精液样本可能需要约20%的冷冻介质,因此冷冻介质体积为约5ml。

[0063] 在一些实施方案中,每批的总冷冻介质添加持续约60分钟。在其它实施方案中,添加时间可为约45至90分钟。由于冷冻介质的总体积随精细胞液体积的变化而变化,因此根据目标体积除以添加时间来设定流速。在一个实施方案中,分配流体的流速(也称为添加速率)可在约0.01ml/min至约1ml/min的范围内。例如,流速可以是0.017-0.333ml/min。在另一个实施方案中,流速可以是约0.01ml/min至约0.05ml/min或约0.05ml/min至约0.1ml/min。在另一个实施方案中,流速可以为约0.1ml/min至约1ml/min或大于1ml/min。继续前面的示例,可以在约60分钟的时间跨度内将5ml冷冻介质连续添加到25ml精液样本中,因此冷冻介质流速为约0.083ml/min。

[0064] 如图2A-2B所示,推动机构(130)可包括设置在轨道(138)上的可移动推块(132)。推块(132)和注射器(120)可以布置在轨道(138)上,使得推块(132)与注射器(120)对准。推块(132)可沿轨道(138)移置以压靠注射器的柱塞(122)。如图5A-7所示,推动机构(130)还包括可操作地联接到推块(132)的马达(134),以及用于控制马达(134)的马达控制器(136)。马达(134)可以被配置为沿着轨道(138)在将柱塞(122)推入注射器的筒(124)中的方向上移动推块(132),从而移置注射器(120)以将容纳在筒(124)中的流体(102)(例如冷冻保护剂)通过排出口(126)喷射到分配管(102)中。然后,流体(102)通过第二端(144)离开分配管(140)并进入容器。

[0065] 如图7所示,在一些实施方案中,使用诸如计算机的外部处理器来控制整个系统。计算机可以执行LabVIEW软件来操作系统。例如,在接收到可以通过诸如鼠标或键盘的外围设备输入的用户输入时,计算机将信号传输到可以集成到注射泵中的马达控制器。在一个实施方案中,马达控制器(136)可以包括处理器和可操作地耦接到处理器的存储器。存储器可以存储一组指令,当处理器在接收到计算机信号后执行该组指令时,该组指令导致马达(134)沿着轨道以期望的步长在移置注射器(120)的方向上移动推块(132)。因此,冷冻保护剂(102)以期望的流速添加到生物样本(104)中。

[0066] 在一些实施方案中,连续流动可指平滑或非离散流动、稳定流动或不间断流动。在一个实施方案中,推块(132)移置注射器(120),使得冷冻保护剂(102)以连续流速添加到生物样本(104)中。例如,马达以特定的步长移动推块(132),使得冷冻介质流速为约0.083ml/min,以在约60分钟内将5ml冷冻介质连续分配到25ml精液样本中,如图9所示,进料A。

[0067] 在其他实施方案中,推块(132)可以移置注射器(120),使得冷冻保护剂(102)以脉冲流速或间断流速添加到生物样本(104)。脉冲或间断流速是指在流动中存在离散间断的流速;然而,流动不是逐滴的。例如,在10分钟的时间跨度内将25%的冷冻介质体积缓慢且

连续地添加到样本中,然后暂停5分钟,然后重复直到分配了全部体积的冷冻介质。作为另一个示例,在3-4分钟的时间跨度内将10%的冷冻介质体积缓慢且连续地添加到样本中,然后暂停2-3分钟,然后重复直到分配了全部体积的冷冻介质。脉冲流或间断流的各种非限制性示例在图9中示出,进料B-G。在一些实施方案中,脉冲流速可以是稳定的或恒定的流速,例如在进料B-D和F-G中。或者,冷冻保护剂可以以变化的脉冲流速(例如,非恒定流速)在如进料E中所示的流的过程中进料。在优选实施方案中,冷冻保护剂以抑制液滴形成的方式和/或流速分配。

[0068] 在一个实施方案中,如果注射泵的线性步长是固定的,则添加的精度可以是注射器内孔直径的函数。为了在一定范围的添加体积上实现相同的精度,通过输送体积与目标体积的百分比,可以使用多种尺寸的注射器。在一些实施方案中,控制软件基于精细胞的体积指定注射器的尺寸。如果在系统上放置了错误的注射器,则输送的冷冻保护剂介质的量可能明显大于或小于规定的量。该误差相当于通过该过程中的初始细胞死亡(过量递送)或在冷冻保存的细胞解冻后测量的增加的死亡(递送不足)而造成的细胞的显著损失。通过使用感应位置传感器(128)来确定放置在系统上的注射器的外径,可以减轻这种风险。如图5A-6B所示,感应位置传感器(128)可以连接到注射器夹具(127)。当注射器夹具夹持注射器时,传感器移置,并且传感器位置的这种变化与电压的变化成比例,电压的变化与注射器的外径相关。

[0069] 在优选实施方案中,根据本发明使用的注射器应当与样本生物相容。注射器应不含润滑剂或其他可能对精细胞有害的物质。适用于本发明的注射器的非限制性示例是NORM-JECT luer锁定注射器。在一些实施方案中,注射器的体积容量可在约2ml至约50ml的范围内。在一个实施方案中,注射器的体积容量可为约2ml至约5ml。在另一个实施方案中,注射器的体积容量可为约5ml至约20ml。在又一实施方案中,注射器的体积容量可为约20ml至约50ml。在进一步的实施方案中,注射器的体积容量可以大于50ml。

[0070] 在其它实施方案中,分配管可由塑料、橡胶或硅树脂材料构成。例如,分配管可以由PVC、不含DEHP的PVC、Tygon®、C-Flex®、高密度聚乙烯、铂固化的硅树脂或过氧化物固化的硅树脂制成。此外,管道材料可以是医用级质量。在一个实施方案中,分配管可以由具有1/16" OD、0.020" ID的PEEK构成。管的内径的尺寸可以在约0.01"至约0.1"的范围内变化。例如,内径可以是0.020"。分配管可以是预定的长度,或者可选择地切割成所需的长度,以充分跨越注射器和容器之间的距离。在一些实施方案中,管道材料可以是不透明的。或者,管道材料可以是基本透明的,以允许管内的可见性,例如,来观察管子里的任何堵塞。在其它实施方案中,分配管可以是柔性的、半刚性的,或者刚性的。压力下的管道膨胀可能会增加目标输送体积的误差。为了确保精度,管可以具有高的OD/ID比和刚性材料,从而降低管道膨胀的风险。

[0071] 在现有技术中,具有用于添加的旋塞阀或滴定管的悬浮容器具有物理限制,其禁止分配尖端的浸没。例如,容器的典型开口尺寸或滴定管尖端的尺寸限制了浸没尖端的能力。此外,通过使用通常由脆性玻璃制成的滴定管,与容器壁的物理接触将在玻璃上施加弯曲力,使其处于破裂的风险中。容器的径向搅动只会增加破裂风险。相反,本发明的分配管允许分配尖端的浸没以及容器的搅动。

[0072] 一旦精细胞被包装出售,每一批都要进行细菌检测。如果细菌水平高于阈值,则该

批次不会出售,因为它可能会带来健康风险。此外,防止批次之间的细胞交叉污染是最重要的。因此,需要防止冷冻介质被细菌和/或其它细胞污染。本发明通过使用可重复使用或一次性使用的流体路径来解决这些问题。在不希望受限于特定理论或机制的情况下,整个流体路径可消除来自细菌的污染风险和不同样本(例如男性-男性)之间的交叉污染。

[0073] 在一些实施方案中,分配管和容器可以通过清洗和高压灭菌过程来重复使用。在其它实施方案中,注射器可以在使用后丢弃。在优选实施方案中,分配管浸没在含有精细胞的流体中。通过浸没分配管的端部而不是将其悬置,添加速率由注射泵控制,而不是由从分配管的端部悬置液滴的粘附力控制。

[0074] 在进一步的实施方案中,系统(100)还可以包括混合器(150),用于混合冷冻保护剂(102)和包含在容器(110)中的生物样本(104)。不希望限制本发明,混合器(150)可以防止生物样本(104)粘附到容器的内表面(112)。在一个实施方案中,混合器(150)可以是振动台。作为示例,振动台可包括固定基座和可支撑容器的可移动平台。如图4A所示,容器(110)可以放置在振动台上,所述振动台为容器中的流体提供搅动,从而将冷冻保护剂介质混合到包含精细胞的流体中,并降低分配管末端的局部浓度。如果设备的旋转半径是固定的,则振动台的搅动速率可以通过旋转速度来编程设置。虽然振动台可以通过消除与容器内容物的接触来减少污染,但其它类型的混合设备也可以与系统一起使用,例如具有搅动板的磁力搅动棒或具有叶轮、桨叶或叶片的顶置式混合器。然而,由于需要最小化精细胞上的剪切力,所述精细胞可能被浸没的旋转物体物理破坏,因此可以根据本发明实施声学混合。例如,声学混合可涉及声处理,声处理是使用声能的搅动。

[0075] 如图4B所示,在一些实施方案中,分配系统(100)可以是实现多个受控分配器和容器以同时处理多个样本的多分配系统。在一些实施方案中,每个容器可以包含其自己的样本,所述样本可以与其它容器中的样本相同或不同。每个容器可以联接到其自身的受控分配器,例如注射泵,以分配其自身的流体。每个分配器中的流体可以与其它分配器中的流体相同或不同。例如,一个分配系统可用于将甘油分配到精液样本中,而第二分配系统可用于将甘油分配到相同或不同来源的另一精液样本中。作为另一个示例,一个分配系统可用于将甘油分配到组织样本中,而第二分配系统可用于将甘油分配到精液样本中。在另一个实施方案中,一个分配系统可用于将甘油分配到胚胎样本中,而第二分配系统可用于将DMSO分配到精液样本中。容器可以放置在单个振动台上,条件是振动台能够支撑和混合多个容器。或者,每个容器可具有其自身的混合器。

[0076] 在其它实施方案中,多分配系统可以实现多个受控分配器,例如注射泵,所述受控分配器流体联接到单个容器。通过从多个分配器分配冷冻保护剂流体,这可以允许更短的处理时间。或者,分配器可以同时或顺序地将各种流体(例如冷冻保护剂或气体)分配到单个容器中。例如,分配系统可以包括多个注射泵,其将各种流体分配到单个容器中,用于精细胞的玻璃化。每一种流体都可以以它们自己独立的流速和定时进行分配。在一个实施方案中,分配系统可以包括分配冷冻保护剂的注射泵和将气体分配到单个容器中的第二受控分配器。每一种流体都可以以它们自己独立的流速和定时进行分配。在一个实施方案中,多分配系统可以被配置为分配两种或更多种不同的介质,所述介质被添加到所述细胞,从而类似于配方来定义输送。每种介质的流速可以独立地变化,和/或介质之间的输送可以协调,例如增加流速。

[0077] 在一些实施方案中,容器可配备有可产生气密封的盖,使得气体可添加并容纳在容器内。盖可包括用于接收气体的端口以及用于接收液体的其它端口。例如,用于体外受精的样本的制备可能需要较低的氧气浓度和/或容器中某种类型的气体覆盖,以提高存活率。在一个实施方案中,容器可被密封并用氩气、CO₂和/或氮气净化,其可经由一个或多个端口添加,每个端口联接到其自身的泵或气体调节器。可以使用单独的出口来维持大气条件并防止容器中的压力积聚。在另一个实施方案中,过程可通过将端口连接到真空泵而在减压下操作。在一些实施方案中,冷冻介质可以通过单独的输入口和泵与气体一起添加。与注射泵结合或作为注射泵的替代,根据本发明,可以使用其他类型的泵,例如微流体泵、离心泵、压缩机、气体调节器或另一种正排量泵,以分配冷冻介质、气体或其他流体。

[0078] 根据一些实施方案,本发明的分配系统可以在冷冻保存过程中实现温度斜坡。当制备用于冷冻保存的生物样本时,样本和冷冻保护剂优选处于温度受控的环境中。在优选实施方案中,样本和冷冻保护剂保持在约5°C的温度下。温度的任何偏差不应超过±2°C。例如,温度偏差可以是±1°C。在一些实施方案中,整个系统可以位于温度受控的房间中。如果专用的冷藏室不可用,至少注射泵和容器可以包含在温度受控室中,例如冷箱,以保持样本和冷冻保护剂的恒定温度。在另一个实施方案中,容器和/或注射器可以用加热/冷却装置夹套。温度反馈可以通过热电偶或热敏电阻来实现,热电偶或热敏电阻可以浸没在样本溶液或附着在容器上。

[0079] 根据一些方面,本文所述的系统可用于将冷冻保护剂分配到生物样本的方法中,如图8A-8C所示。作为关键的初始步骤,基于样本的量,通过预先称量容器、添加样本、称量组合的容器和样本、并减去质量以确定样本的质量、并计算冷冻保护剂的适当体积,可以确定要添加的冷冻保护剂的体积。在如图8A所示的一个实施方案中,方法可包括提供本文所述的冷冻保存系统(100)中的任何一个,将冷冻保护剂(102)流体连接到受控分配器(115),将生物样本(104)添加到容器(110)中,以及启动受控分配器(115)以通过分配管(140)连续地分配冷冻保护剂(102)并将其分配到容器(110)中。在一个实施方案中,受控分配器(115)包括具有如前所述的注射器和泵送机构的注射泵。优选地,推动机构(130)移置注射器(120),使得冷冻保护剂(102)以期望的流速连续地添加到生物样本(104)中。这可以防止液滴形成,使得冷冻保护剂(102)被分配而不会滴落到容器(110)中。

[0080] 在如图8B所示的另一个实施方案中,方法可包括提供本文所述的任何一种冷冻保存系统(100),将所需体积的冷冻保护剂(102)添加到注射器(120)中,将生物样本(104)添加到容器(110)中,并启动推动机构(130)以移置注射器(120)。通过移置注射器,冷冻保护剂(102)通过分配管(140)分配到容器(110)中。优选地,推动机构(130)移置注射器(120),使得以小于或等于最大流速 f_{\max} 的流速将冷冻保护剂(102)添加到生物样本(104),所述最大流速 f_{\max} 由下式确定:

[0081] $f_{\max}(\text{ml}/\text{min}) = 0.0045 * V$,其中 V =生物样本的体积,单位为ml。

[0082] 回到前面的示例,将5ml冷冻保护剂分配到25ml精液样本中的 f_{\max} 计算为0.11ml/min。因此,冷冻保护剂的流速应小于或等于0.11ml/min,最小分配时间为约45分钟。0.083ml/min的先前示例流速和60分钟的分配时间在这些参数内。

[0083] 现在参考图8C,方法的另一个实施方案可包括提供本文所述的任何一种冷冻保存系统(100),将所需体积的冷冻保护剂(102)添加到注射器(120)中,将生物样本(104)添加

到容器(110)中,调节分配管的第二端(144),使得第二端(144)接触生物样本(104)或容器的内表面(112),以及致动推动机构(130)以移置注射器(120)。通过移置注射器,冷冻保护剂(102)通过分配管(140)分配到容器(110)中。优选地,推动机构(130)移置注射器(120),使得冷冻保护剂(102)以期望的流速添加到生物样本(104)中。更优选地,通过使分配管的第二端(144)与容器的内表面(112)或生物样本(104)接触,防止所分配的冷冻保护剂(102)滴入容器(110)中。

[0084] 与前面的实施方案一致,本文所述的方法还可包括连续地或间歇地混合冷冻保护剂(102)和容纳在容器(110)中的生物样本(104)。冷冻保护剂(102)和生物样本(104)可使用本文所述的任何混合设备进行混合。在进一步的实施方案中,方法还可包括通过启动一个或多个与容器流体连接的附加受控分配器向容器添加一种或多种附加流体,每个分配器包含一种附加流体。该方法可以利用如前所述的多分配系统。在一些实施方案中,一种或多种附加流体可以是冷冻保护剂或气体。例如,第二流体可以通过第二注射泵的启动而被添加到容器中,第二注射泵具有包含第二流体的注射器并且与容器流体连接。

[0085] 与前面的实施方案一致,本文所述的方法可进一步包括在添加结束时称重容器,以验证已经添加了正确质量的冷冻保护剂。在此阶段,如果确定质量低于其应有的质量,则可以手动或自动添加额外的冷冻保护剂,以使冷冻保护剂的总量达到计算的量。如果二次或手动添加的体积与总计算体积相比较,则可以在多个子体积添加之间以等待时间间隔添加。作为非限制性示例,如果手动添加的体积高达总体积的32%,则可以在一次添加中输送全部剩余体积。如果手动添加的体积为总体积的33-65%,则可将其分成两个等量,在添加之间有15分钟的休息时间。如果手动添加的体积等于或大于总体积的66%,则可将其分成三个等量,在添加之间有两次15分钟的休息时间。

[0086] 在一些方面,高浓度的冷冻保护剂可能对生物样本(例如精细胞)有毒。通过大量或逐滴添加来分配冷冻保护剂,可以在冷冻保护剂扩散到细胞溶液中之前,将高浓度的冷冻保护剂立即递送到最接近冷冻保护剂进入位置的细胞,从而导致对局部细胞的细胞毒性。在其它方面,由于液滴撞击细胞,逐滴添加冷冻保护剂可导致应激或物理损伤。不希望将本发明限制于特定的理论或机制,本发明允许通过缓慢的连续流动、低冲击进入和/或确定的流速以较小的体积添加冷冻保护剂,这降低了局部浓度,从而使细胞毒性和细胞应激最小化。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的分配系统可以用在冷藏室或大型冷处理柜中,以保持样本活力。在可选实施方案中,系统可以安装在冰箱或迷你冰箱内。系统的一些部件,例如框架,可能需要减小尺寸,以便框架、主注射泵和振动台都适合安装在冰箱或迷你冰箱内。在一些实施方案中,次框架可设置在冰箱或迷你冰箱的外部(例如,在冰箱或迷你冰箱的顶部上),并且诸如计算机、电源和监视器的部件可安装到次框架。

[0088] 在一些实施方案中,泵柱塞可被设计成还用作将注射器夹持在泵和块中的弹簧加载的夹紧件。某些柱塞和夹具可能会导致测量结果不一致。作为非限制性示例,单元的传感器到标签的距离可被改变,并且又可导致系统不正确地识别什么注射器被装载到泵中。因此,专用柱塞可能是有利的。另外,专用注射泵盖可能是有利的,以便提供更安全的电缆管理和更容易的维护移除。

[0089] 示例

[0090] 以下是本发明的非限制性示例。应当理解,所述示例并不旨在以任何方式限制本发明。等效物或替代物在本发明的范围内。

[0091] 实施了冷冻保存系统并与现有冷冻保存过程进行了比较。通过本系统以连续流速添加冷冻保护剂,而现有过程包括间隔15分钟的三次不连续添加。在两种过程中,样本体积与分配的冷冻保护剂体积的比率相同。本发明导致5%的细胞回收,因此本发明比现有过程平均多提供5%的细胞。不希望将本发明限制于特定的理论或机制,冷冻保存系统通过冷冻保存冷冻至解冻减少了细胞死亡。此外,与现有过程相比,本发明使吸管中的授精剂量增加了8%。

[0092] 如本文所用,术语“约”是指所引用数字的正或负10%。

[0093] 尽管已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域的技术人员来说显而易见的是,可以在不超出所附权利要求的范围的情况下对其进行修改。因此,本发明的范围仅由所附权利要求限定。在一些实施方案中,本专利申请中呈现的图是按比例绘制的,包括角度、尺寸比等。在一些实施方案中,附图仅是代表性的,权利要求不受附图尺寸的限制。在一些实施方案中,本文中使用短语“包括”描述的本发明的描述包括可描述为“基本上由……组成”或“由……组成”的实施方案,并且因此满足了使用短语“基本上由……组成”或“由……组成”来要求本发明的一个或多个实施方案的书面描述要求。

[0094] 在下面的权利要求中引用的附图标记仅仅是为了便于本专利申请的审查,并且是示例性的,而不是以任何方式将权利要求的范围限制为在附图中具有相应附图标记的特定特征。

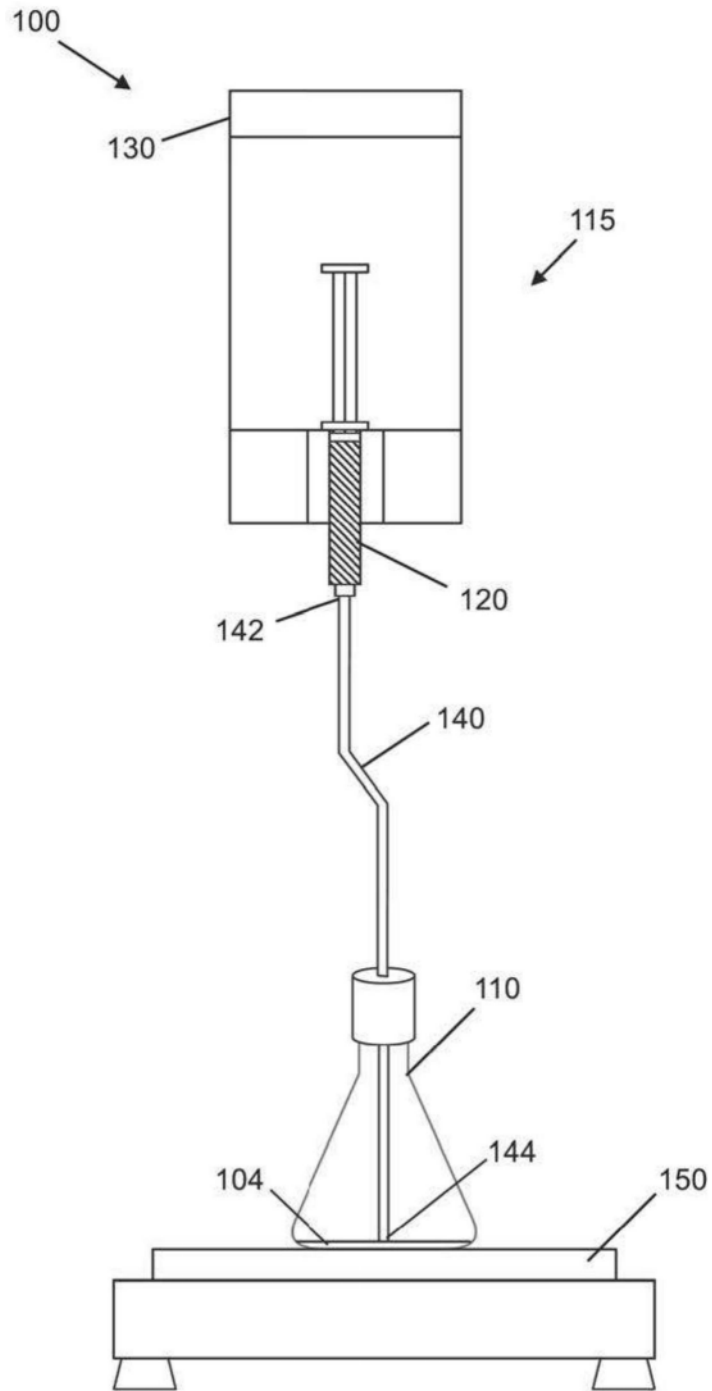


图1

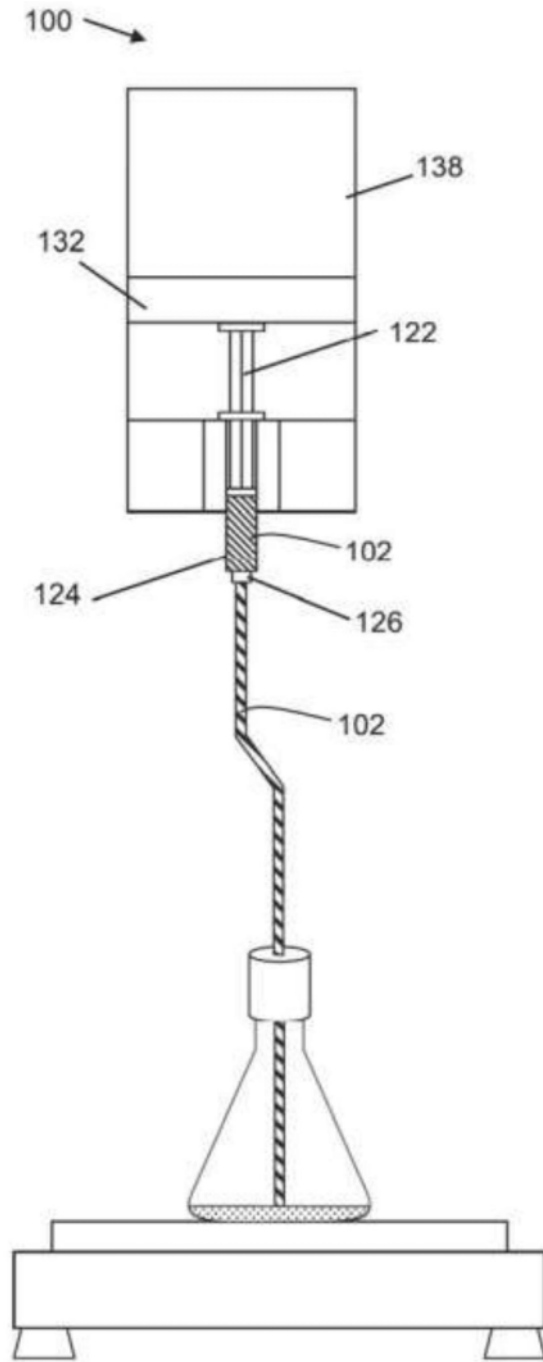


图2A

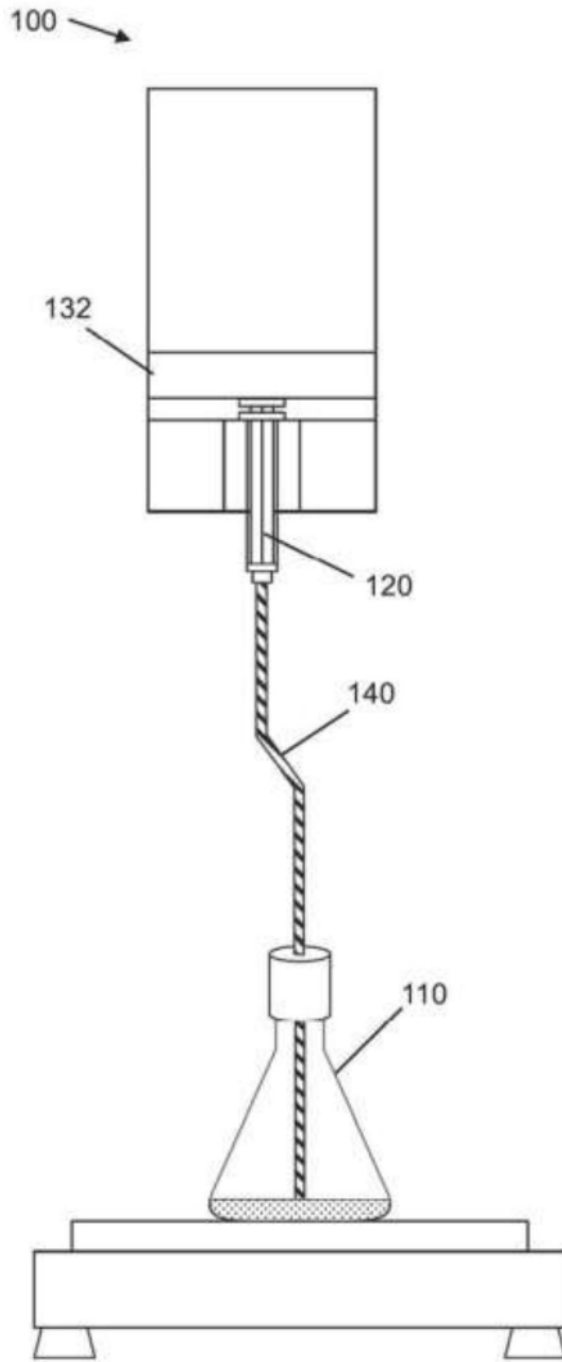


图2B

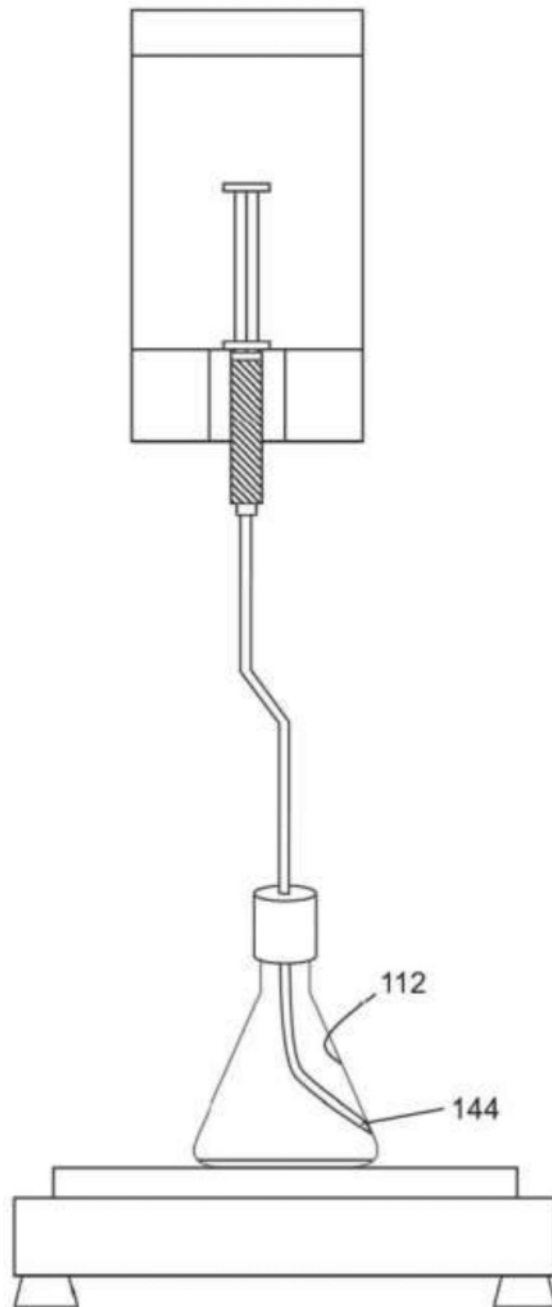


图3

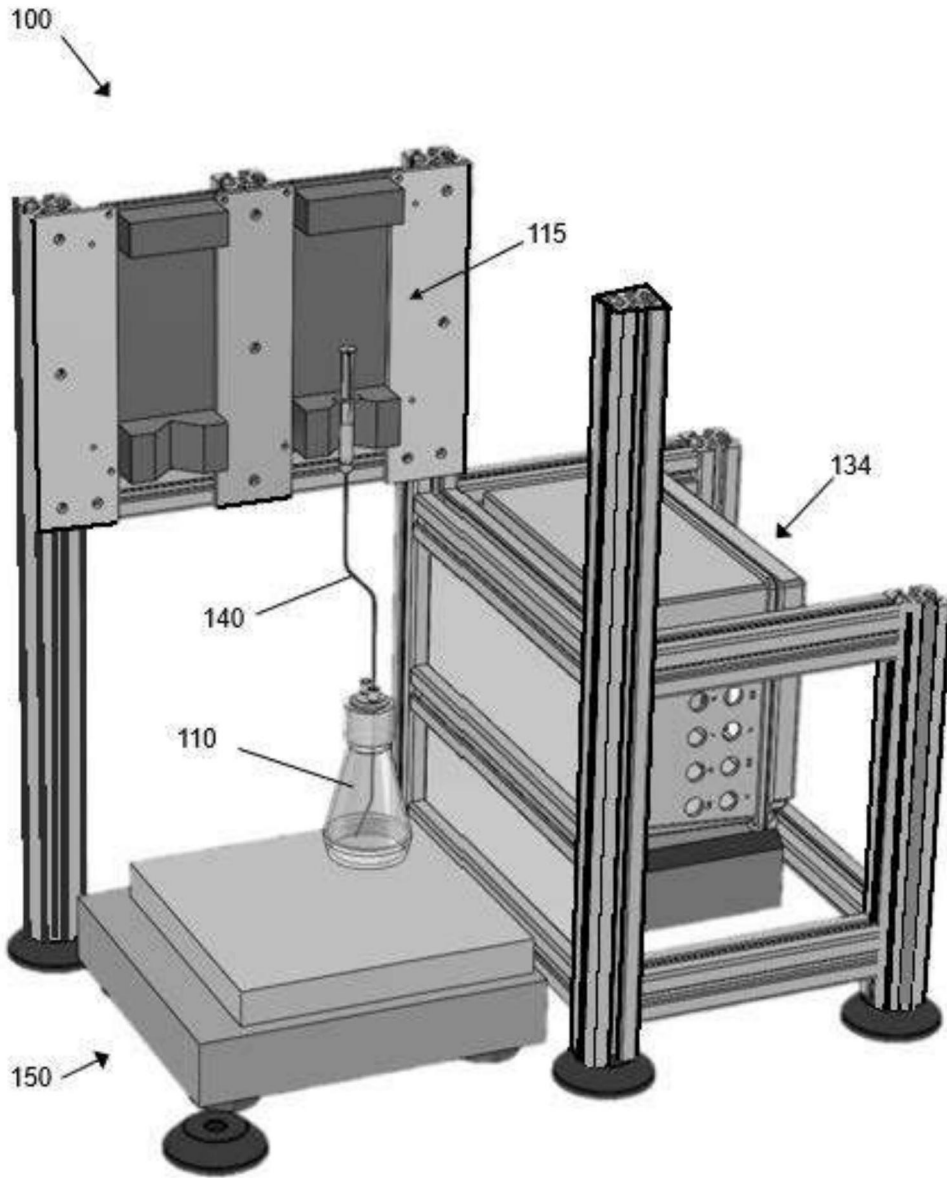


图4A

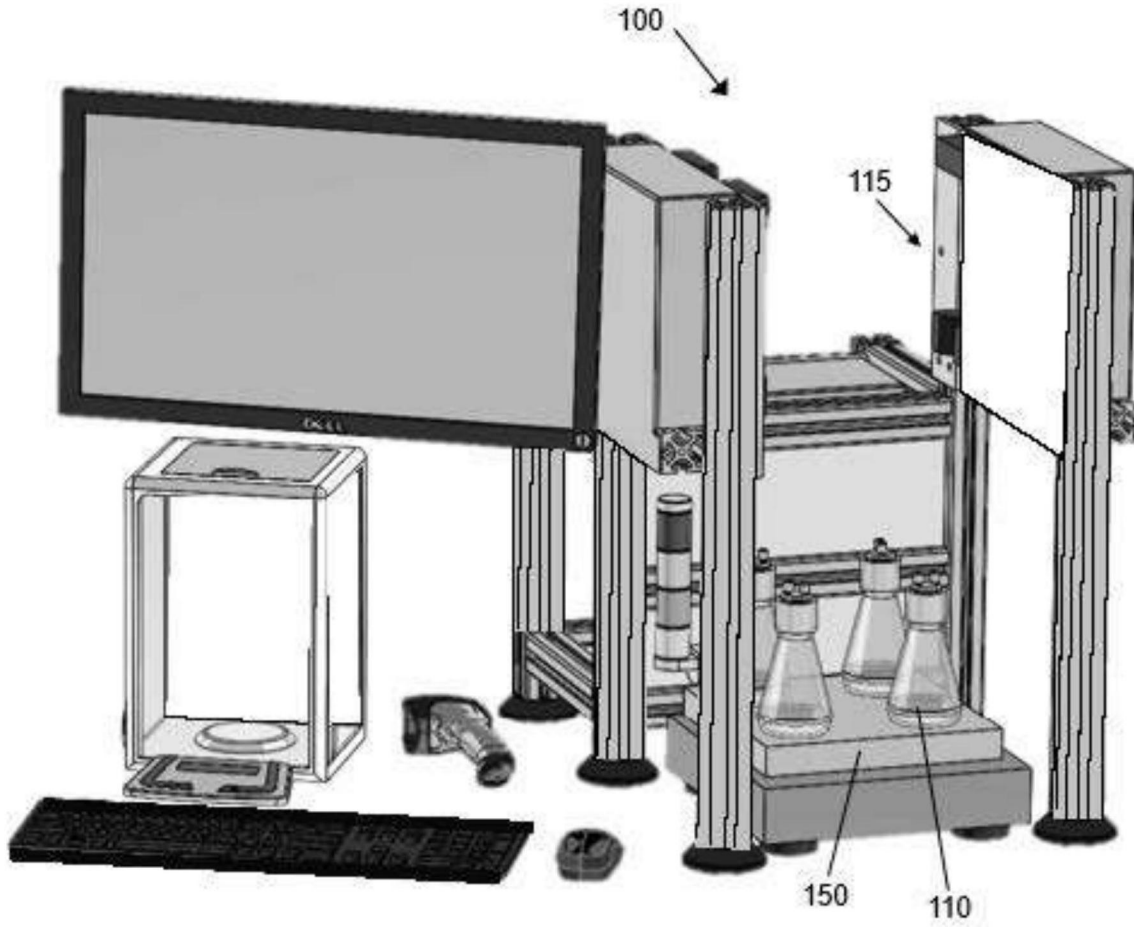


图4B



图5A

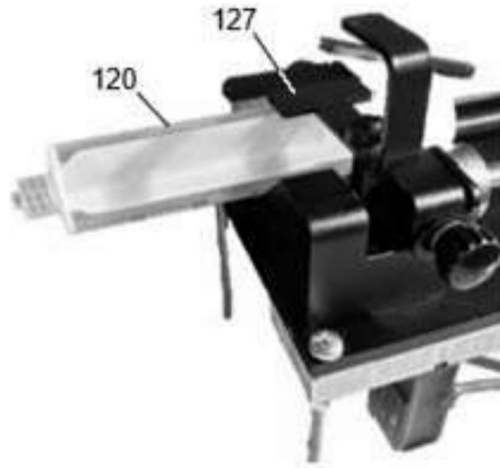


图5B

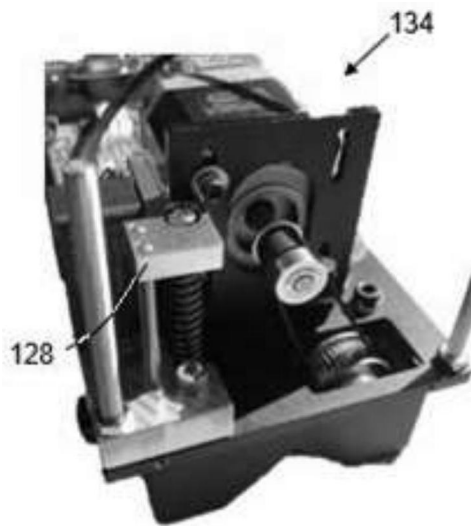


图6A

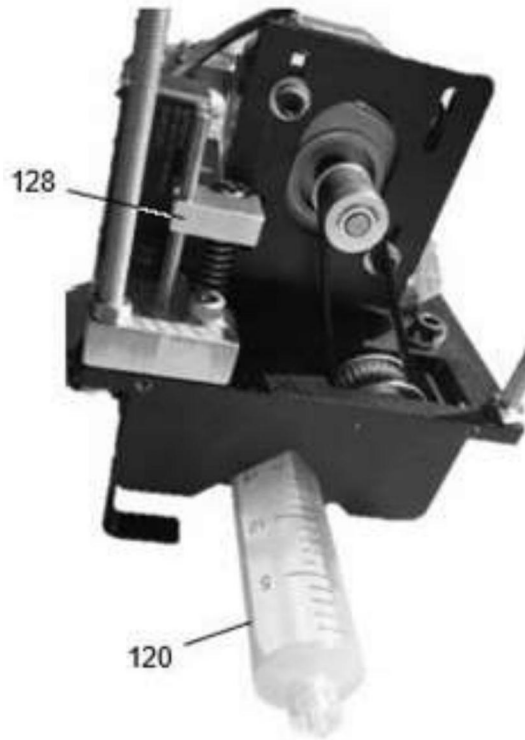


图6B

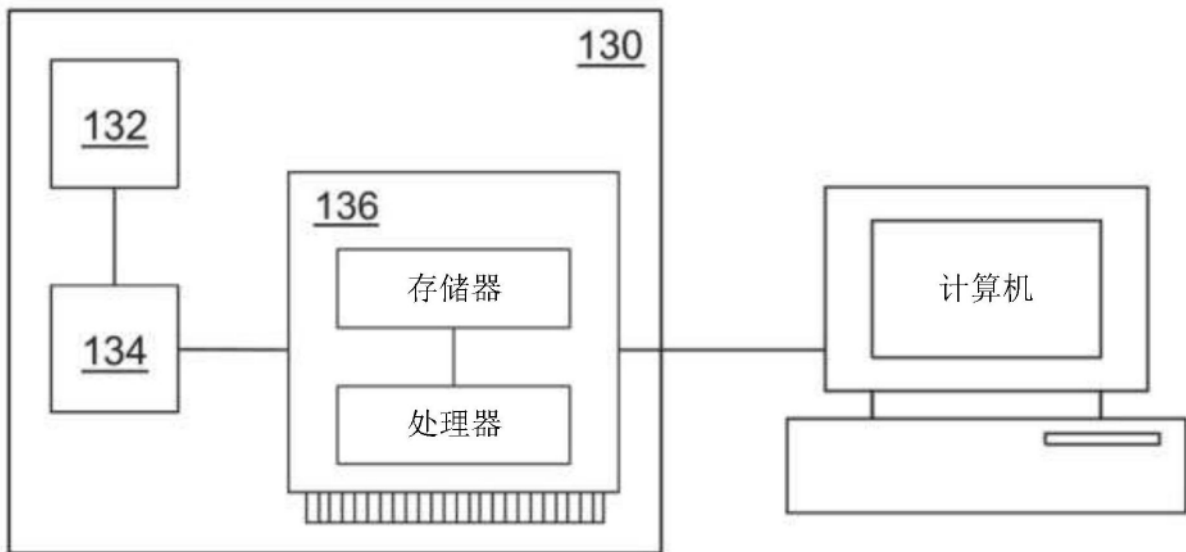


图7

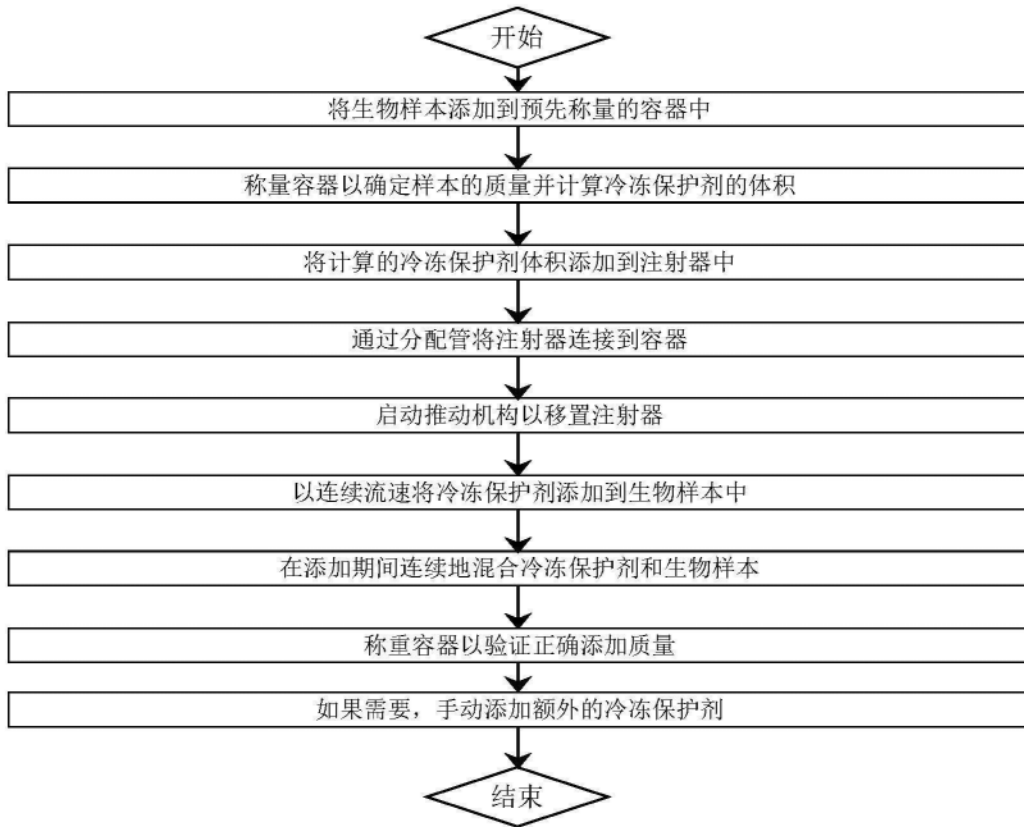


图8A

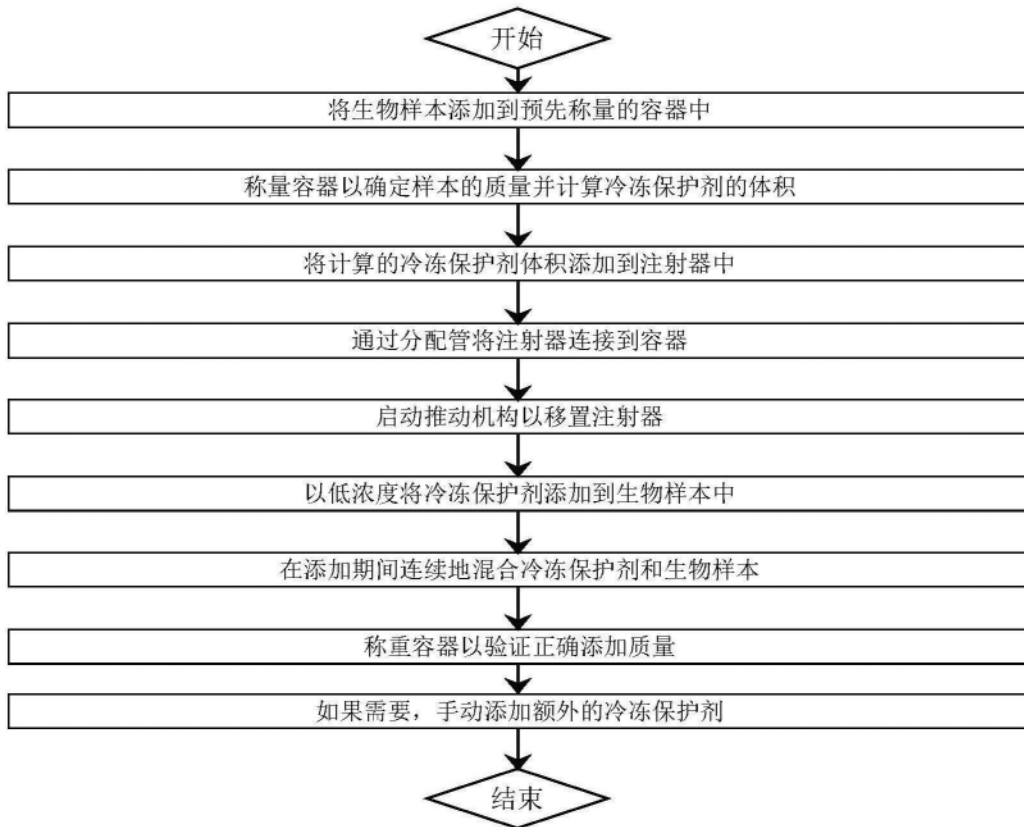


图8B

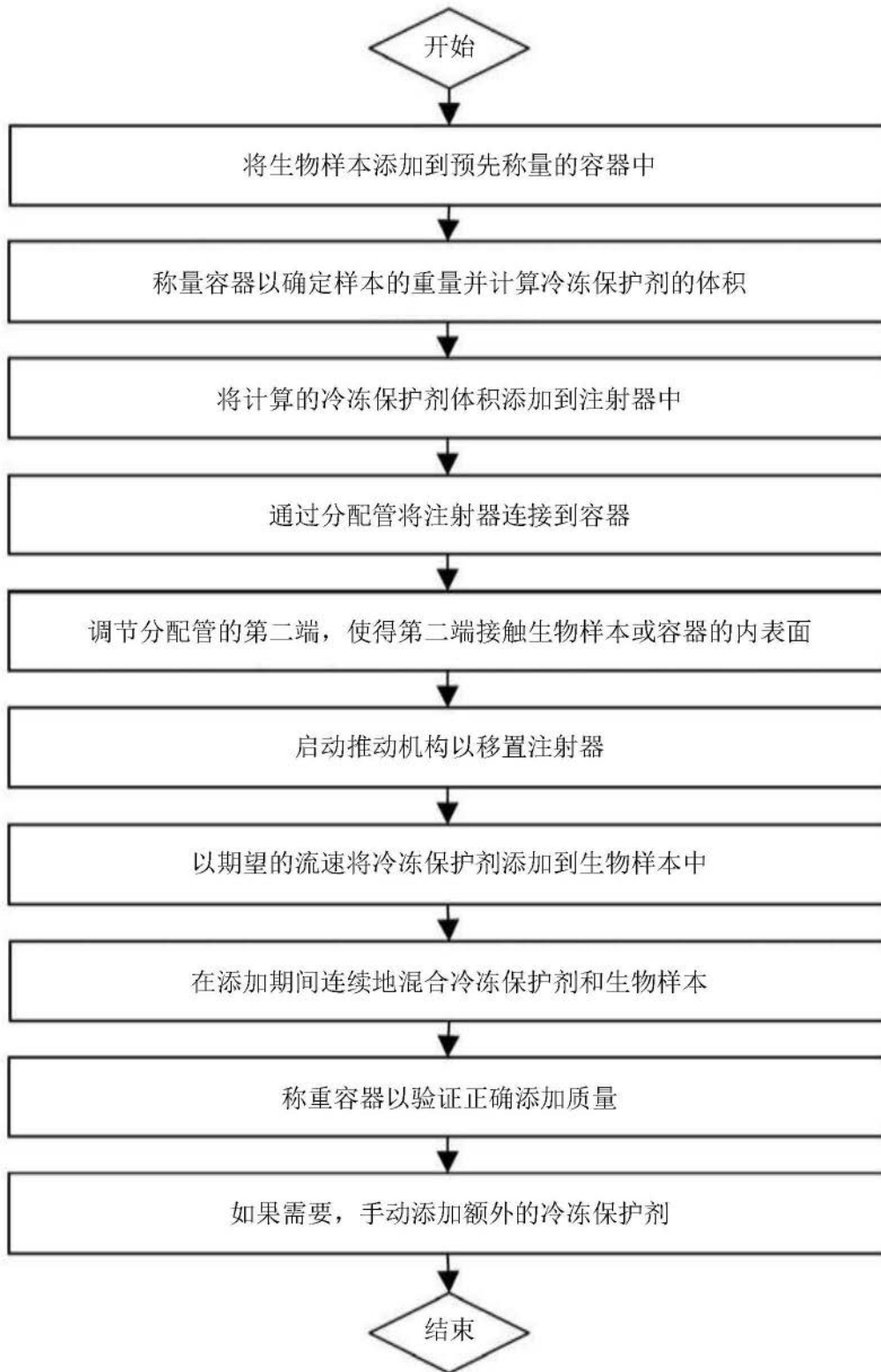


图8C

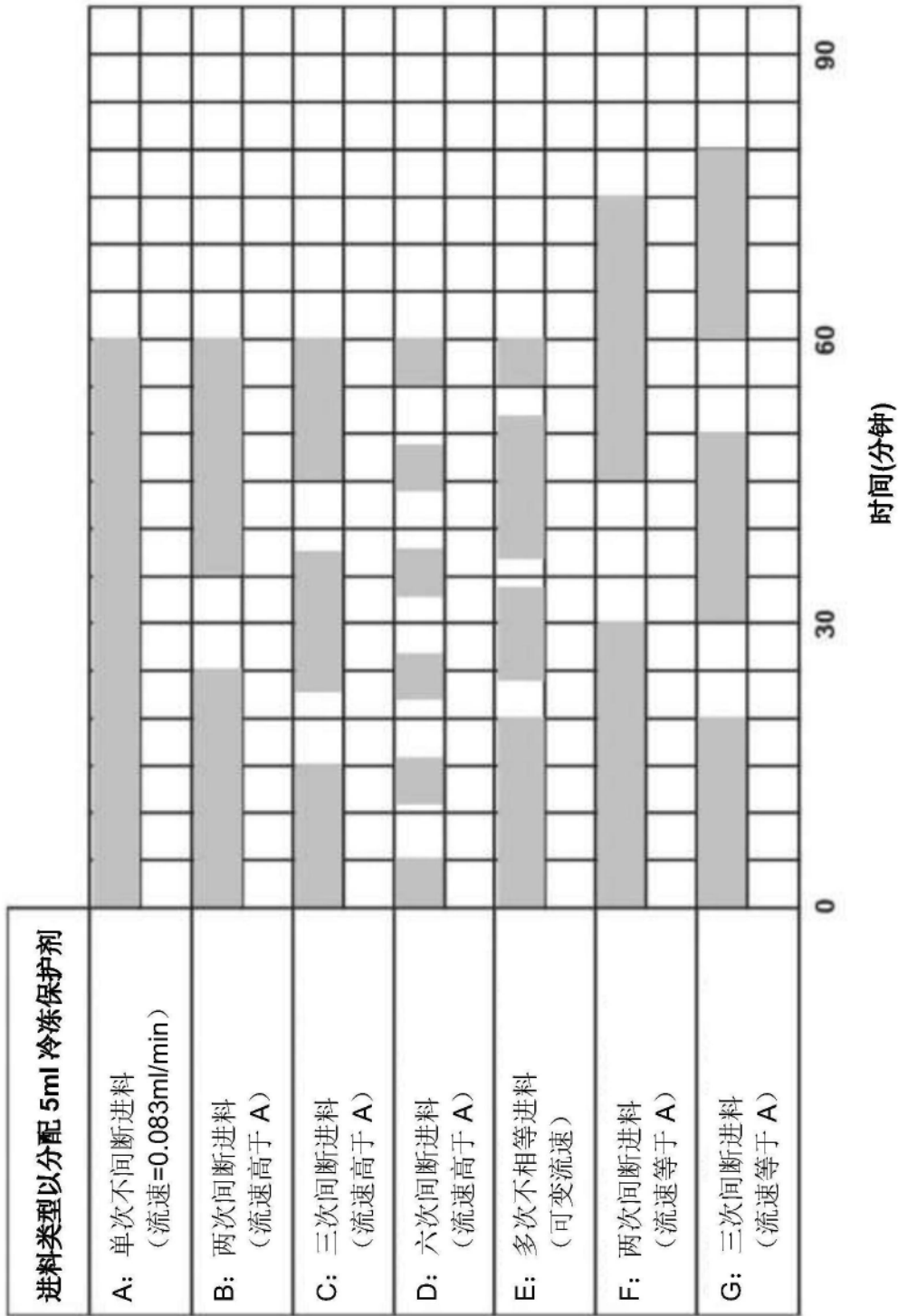


图9