



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104540933 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 22

(21) 申请号 201380042821. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 08. 20

C12M 1/12(2006. 01)

C12M 1/34(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/691, 193 2012. 08. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/055831 2013. 08. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/031666 EN 2014. 02. 27

(71) 申请人 泰尔茂比司特公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 布莱恩·J·南柯维斯

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 张颖玲 孟桂超

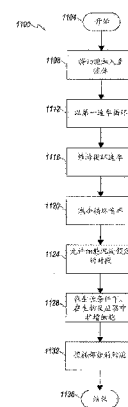
权利要求书5页 说明书20页 附图22页

(54) 发明名称

在细胞扩增系统的生物反应器中加载和分配细胞的方法

(57) 摘要

所描述的一个或多个实施方式涉及在细胞扩增系统的生物反应器中加载和分配细胞的方法和系统。相应的,实施方式包括可提供用于将多种细胞加入至在细胞扩增系统的生物反应器内的流体的方法和系统。第一百分比的多种细胞被允许沉淀在该生物反应器中,而第二百分比的多种细胞被允许沉淀在该生物反应器的外部。随后,该第一百分比的细胞在该生物反应器中扩增。第二百分比的细胞被废弃。



1. 一种在细胞扩增系统中加载多种细胞的方法,所述方法包括:  
将所述多种细胞加入至以第一速率在所述细胞扩增系统的生物反应器内循环的流体中;  
将所述流体的循环速率维持在所述第一速率预定的时段,以在所述流体中得到期望的细胞浓度;  
在已经达到所述期望的细胞浓度之后;  
将所述流体的循环速率减小至减小的速率,该减小的速率低于所述第一速率;以及  
允许经过预定的时段,以便第一百分比的所述多种细胞沉淀在所述生物反应器中,并且第二百分比的所述多种细胞沉淀在所述生物反应器的外部;  
在所述生物反应器中扩增第一百分比的细胞;以及  
废弃第二百分比的细胞。
2. 一种在细胞扩增系统中加载多种细胞的方法,所述方法包括:  
将所述多种细胞加入至以第一速率在所述细胞扩增系统的生物反应器内循环的流体中;  
在加入所述多种细胞之后,将在所述生物反应器内循环的流体的循环速率从所述第一速率增加至高于所述第一速率的第二速率;  
将所述流体的循环速率维持在所述第二速率预定的时段,以在所述流体中得到期望的细胞浓度;  
在已经达到所述期望的细胞浓度之后;  
将所述流体的循环速率减小至减小的速率,该减小的速率低于所述第二速率;以及  
允许经过预定的时段,以便第一百分比的所述多种细胞沉淀在所述生物反应器中,并且第二百分比的细胞沉淀在所述生物反应器的外部;  
在所述生物反应器中扩增第一百分比的细胞;以及  
废弃第二百分比的细胞。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约50%。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约55%。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约60%。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约65%。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约70%。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约75%。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约95%。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比小于或等于所述多

种细胞的约 90%。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 85%。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 80%。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 25ml/min。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 50ml/min。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 75ml/min。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 100ml/min。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 125ml/min。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 130ml/min。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 135ml/min。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 140ml/min。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 145ml/min。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率大于或等于约 150ml/min。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 400ml/min。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 375ml/min。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 350ml/min。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 325ml/min。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 300ml/min。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 275ml/min。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述第一速率小于或等于约 250ml/min。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述第一速率小于或等于约 225ml/min。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述第一速率小于或等于约 200ml/min。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述第一速率小于或等于约 175ml/min。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 在所述维持的过程中:

使所述生物反应器绕转动轴从第一取向转动至第二取向;

使所述生物反应器在所述第二取向处暂停第一时段;

使所述生物反应器绕所述转动轴转动至所述第一取向; 以及

使回到所述第一取向处的所述生物反应器暂停第二时段。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述第二时段基本等于所述第一时段。

35. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述第二时段基本等于  $2\omega-1$ , 其中,  $\omega$  为当转动所述生物反应器时, 所述生物反应器的角速度 (rad/sec)。

36. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述生物反应器具有纵轴 LA-LA, 并且其中, 所述生物反应器在处于所述第一取向时的纵轴 LA-LA 基本与所述生物反应器在处于所述第二取向时的纵轴 LA-LA 正交。

37. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述生物反应器具有纵轴 LA-LA, 并且其中, 当所述生物反应器处于所述第一取向时, 所述纵轴 LA-LA 是基本水平的, 并且当所述生物反应器处于所述第二取向时, 所述纵轴 LA-LA 是基本垂直的。

38. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 在使所述生物反应器在所述第一取向和所述第二取向之间转动的同时, 维持第一角速度。

39. 根据权利要求 38 所述的方法, 其中, 在使所述生物反应器绕所述转动轴转回所述第一取向的同时, 维持第二角速度, 并且其中, 所述第二角速度基本等于所述第一角速度。

40. 一种用于扩增多种细胞的系统, 所述系统包括:

生物反应器, 所述生物反应器包括第一流体流动路径, 所述第一流体流动路径具有至少相对的端部, 所述第一流体流动路径的第一相对端部与中空纤维膜的第一端口流体相连, 并且所述第一流体流动路径的第二端部与所述中空纤维膜的第二端口流体相连, 其中, 所述第一流体流动路径包括所述中空纤维膜的内毛细管部分;

流体进入路径, 所述流体进入路径与所述第一流体流动路径流体相连, 其中, 所述多种细胞通过第一流体进入路径被引入至所述第一流体流动路径中;

第一泵, 所述第一泵用于使流体在所述生物反应器的第一流体流动路径中循环; 以及

控制器, 所述控制器用于控制所述第一泵的运行, 其中, 所述控制器被配置为控制所述泵, 以:

使流体在所述第一流体流动路径内以第一速率循环;

将所述流体的循环速率维持在所述第一速率预定的时段, 以在所述流体中得到期望的细胞浓度;

在已经达到所述期望的细胞浓度之后, 将所述流体的循环速率减小至低于所述第一速率的减小的速率, 以允许第一百分比的所述多种细胞沉淀在所述生物反应器中, 并且第

二百分比的所述多种细胞沉淀在所述生物反应器的外部；

使具有生长介质的流体循环,用于在所述生物反应器中扩增第一百分比的细胞,并且废弃来自所述第一流体流动路径的大部分的第二百分比的细胞。

41. 根据权利要求 40 所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 50%。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 55%。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 60%。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 65%。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 70%。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比等于或大于所述多种细胞的约 75%。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 95%。

48. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 90%。

49. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 85%。

50. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一百分比小于或等于所述多种细胞的约 80%。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 25ml/min。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 50ml/min。

54. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 75ml/min。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 100ml/min。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 125ml/min。

57. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 130ml/min。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 135ml/min。

59. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约 140ml/min。

60. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约145ml/min。

61. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率大于或等于约150ml/min。

62. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约400ml/min。

63. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约375ml/min。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约350ml/min。

65. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约325ml/min。

66. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约300ml/min。

67. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约275ml/min。

68. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约250ml/min。

69. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约225ml/min。

70. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约200ml/min。

71. 根据前述权利要求中任一项所述的系统,其中,所述第一速率小于或等于约175ml/min。

## 在细胞扩增系统的生物反应器中加载和分配细胞的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求 2012 年 8 月 20 日递交的标题为“在细胞扩增系统的生物反应器中加载和分配细胞的方法”的美国临时专利申请号 61/691, 193 的优先权, 并且通过引用而将该美国临时专利申请整体并入本文中, 就如其全文涵盖在本申请中一样。

### 背景技术

[0003] CES 用于扩增细胞和使细胞分化。细胞扩增系统是本领域已知的。例如, U. S 专利申请号 5, 162, 225 和 6, 001, 585 笼统地描述了被设计用于细胞扩增的细胞扩增系统。

[0004] 干细胞在各种治疗和疗法中的潜在应用已经取得了特别的关注。细胞扩增系统可用于扩增(例如生长)干细胞以及其它类型的细胞, 诸如骨髓细胞。从供体细胞扩增的干细胞可用于修复或替换受损的或有缺陷的组织, 并且对于大量疾病都具有广泛的临床应用。再生医学领域中的最新进展证实了, 干细胞具有很多特性, 诸如增殖和自我更新能力、维护非特化状态以及在特定条件下分化成特化细胞的能力。

[0005] 细胞扩增系统包括用于扩增细胞的一个或多个腔(诸如细胞生长腔室), 在本文中也称为“生物反应器”。为了扩增细胞, 通常将初始体积的细胞加载并分配至生物反应器内。因此, 需要一种在与细胞扩增系统相关联的生物反应器中加载且分配细胞的方法。本公开解决了该需求以及其它需求。

[0006] 鉴于这些和其它方面的考虑, 已经进行了本发明的实施方式。但是, 上述相对具体的问题并不用于限制本发明的实施方式对解决其它问题的适用性。

### 发明内容

[0007] 提供该总结以简单介绍本发明的一些实施方式的各个方面, 但并不用于确定所要求保护的发明的关键要素或基本要素, 也不用于限制权利要求的范围。

[0008] 应当理解的是, 本发明可包括各种不同的变型或实施方式, 该总结并不用于限制或涵盖所有的变型或实施方式。该总结提供了对可包括在实施方式中的特征的一般性描述, 并且还提供了对可包括在其它实施方式中的其它特征的一些更具体的描述。

[0009] 一个或多个实施方式通常涉及在细胞扩增系统的生物反应器中加载和分配细胞的方法和系统。因此, 实施方式包括如下方法, 该方法可提供将多种细胞加入至在细胞扩增系统的生物反应器内以第一速率循环的流体中。将流体的循环速率维持在第一速率预定的时段, 以在流体中得到期望的细胞浓度。在已经达到期望的细胞浓度之后, 将所述流体的循环速率减小至低于第一速率的减小的速率。第一百分比的多种细胞被允许沉淀在生物反应器中, 并且第二百分比的细胞被允许沉淀在生物反应器的外部。随后, 第一百分比的细胞在生物反应器中扩增。废弃第二百分比的细胞。将循环速率维持在第一速率时, 实施方式可提供使生物反应器绕转动轴从第一取向转动至第二取向转动, 使生物反应器在第二取向处暂停第一时段, 使生物反应器绕转动轴转动至第一取向; 以及随后使回到第一取向处的生物反应器暂停第二时段。

[0010] 本发明的实施方式还涉及一种用于扩增细胞的系统。该实施方式可包括生物反应器,该生物反应器包括具有至少相对的端部的第一流体流动路径,所述第一流体流动路径的第一相对端部流体与中空纤维膜的第一端口流体相连,并且所述第一流体流动路径的第二端部与所述中空纤维膜的第二端口流体相连,其中,所述第一流体流动路径包括所述中空纤维膜的内毛细管部分。该实施方式还可包括流体进入路径,所述流体进入路径与所述第一流体流动路径流体相连,其中,多种细胞通过第一流体进入路径被引入至第一流体流动路径中。在实施方式中还可包括第一泵,该第一泵用于使流体在生物反应器的第一流体流动路径中循环。实施方式可进一步包括控制器,该控制器用于控制第一泵的运行,其中,控制器被配置为控制泵以使流体以第一速率在第一流体流动路径中循环,将流体的循环速率维持在第一速率预定的时段以在流体中得到期望的细胞浓度;在已经达到期望的细胞浓度之后,将所述流体的循环速率减小至低于第一速率的减小的速率,以允许第一百分比的多种细胞沉淀在所述生物反应器中,并且第二百分比的细胞沉淀在所述生物反应器的外部;以及使具有生长介质的流体循环,用于扩增生物反应器中的第一百分比的细胞,并且移除来自第一流体流动路径的大部分的第二百分比的细胞。

[0011] 如本文中所使用的,“至少一种”、“一种或多种”及“和/或”为在实施中既可连接性又可分离的开放式表述。例如,“A、B和C中的至少一种”、“A、B或C中的至少一种”、“A、B和C中的一种或多种”、“A、B或C中的一种或多种”以及“A、B和/或C”表示单独的A,单独的B,单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,或者A、B和C一起。

[0012] 在如本文所提供的以及如通过权利要求具体化的附图和具体实施方式中,示出了本发明的各种实施方式。然而,应当理解的是,该总结并不包括一个或多个本发明的所有方面和实施方式,并不意味着以任何方式进行限制或约束。并且本领域技术人员应当理解的是,本文所公开的发明涵盖对其明显改进和修改的范围。

[0013] 根据下文的描述,尤其是在参照附图所进行的描述中,将更加明白本文所示出的实施方式的额外的优点。

## 附图说明

[0014] 为了进一步明确本发明的上述优点和其它优点以及特征,通过参照在附图中例示的本发明的具体实施方式来更具体地描述本发明。应当知晓的是,这些附图仅描绘了本发明的典型实施方式,因此不能被认为是对本发明范围的限制。通过使用附图,将更加具体且详细地描述和解释本发明。在附图中:

[0015] 图 1A 描绘了细胞扩增系统 (CES) 的一个实施方式;

[0016] 图 1B 描绘了 CES 的另一实施方式;

[0017] 图 1C 描绘了 CES 的又一实施方式;

[0018] 图 1D 描绘了在 CES 运行期间,用于转动或横向地移动细胞生长腔室的摇动装置;

[0019] 图 1E 描绘了与 CES 一起使用的可拆卸的流动线路;

[0020] 图 2A 描绘了细胞生长腔室的中空纤维细胞生长腔室实施方式的侧视图;

[0021] 图 2B 描绘了图 2A 的中空纤维细胞生长腔室实施方式的侧剖视图;

[0022] 图 3 为生物反应器的实施方式的正视图,示出了穿过生物反应器的循环路径;

[0023] 图 4 为细胞扩增系统的一部分的透视图,该细胞扩增系统包括可拆卸地附接的生



物反应器；

[0024] 图 5 为与在细胞扩增系统中加载和分配细胞相关的方法的流程图；

[0025] 图 6 为处于第一取向的生物反应器的正视图；

[0026] 图 7 为图 6 的生物反应器的正视图,其中,示出的生物反应器转动了  $90^{\circ}$ ；

[0027] 图 8 为图 6 的生物反应器的正视图,其中,示出的生物反应器转动了  $180^{\circ}$ ；

[0028] 图 9 为图 6 的生物反应器的正视图,其中,示出的生物反应器转动了  $270^{\circ}$ ,并且到达第二位置；

[0029] 图 10 为图 6 的生物反应器的正视图,其中,示出的生物反应器转回到最初的起始位置；

[0030] 图 11 为连接至 CES 的轴组件的生物反应器的透视图；

[0031] 图 12 为图 11 中示出的结构的侧视图；

[0032] 图 13 为用于使生物反应器绕其纵轴转动的管件的详细的透视图；

[0033] 图 14 为例示以滚动形式转动的生物反应器的侧视图；

[0034] 图 15 为示出了在利用先前的方法加载和分配之后,收获的扩增细胞的图表；

[0035] 图 16 为示出了在利用本发明的实施方式的方法加载和分配之后,收获的扩增细胞的图表；

[0036] 图 17 为示出了在利用根据本发明的实施方式的方法已经被加载和分配的细胞的扩增期间,乳酸生成的图表；

[0037] 图 18 为示出了在利用根据本发明的实施方式的方法已经被加载和分配的细胞的扩增期间,葡萄糖消耗的图表；

[0038] 图 19 为示出了利用先前的方法加载和分配之后的细胞的扩增期间,乳酸生成的图表；

[0039] 图 20 示出了利用先前的方法加载和分配之后的细胞的扩增期间,平均乳酸生成的图表；

[0040] 图 21 例示了可用于实施本发明的实施方式的基础计算机的框图；以及

[0041] 图 22 为与在根据实施方式的细胞扩增系统中加载和分配细胞相关联的方法的流程图。

## 具体实施方式

[0042] 通过参照以下详细的描述以及附图中描绘的实施方式,可进一步理解本发明的原理。应当理解的是,尽管相对于具体的实施方式,下文示出并描述了具体的特征,但是本发明并不限于下文所述的实施方式。总体来讲,本公开涉及在细胞扩增系统的生物反应器中分配多种细胞的方法。如下所述,在生物反应器中分配细胞的方法可包括:将细胞加载至生物反应器中;使生物反应器转动,以及维持生物反应器静止在特定的取向处。

[0043] 在图 1A 中描绘了示例性细胞扩增系统 (CES) 的示意图。CES10 包括第一流体循环路径 12 和第二流体循环路径 14。第一流体流动路径 16 具有与中空纤维细胞生长腔室 24 (在本文中也被称为“生物反应器”) 流体相连的至少相对端部 18 和 20。具体地,相对端部 18 与细胞生长腔室 24 的第一入口 22 流体相连,并且相对端部 20 与细胞生长腔室 24 的第一出口 28 流体相连。第一循环路径 12 中的流体流经布置在细胞生长腔室 24 中的中空

纤维膜 50 的中空纤维的内部（细胞生长腔室和中空纤维膜将在下文中进行更加详细地描述）。此外，第一流体流动控制器 30 与第一流体流动路径 16 可操作地相连，并且控制第一循环路径 12 中流体的流动。

[0044] 第二流体循环路径 14 包括第二流体流动路径 34、细胞生长腔室 24 以及第二流体流动控制器 32。第二流体流动路径 34 具有至少相对端部 36 和 38。第二流体流动路径 34 的相对端部 36 和 38 分别与细胞生长腔室 24 的进入端口 40 和排出端口 42 流体相连。流经细胞生长腔室 24 的流体与细胞生长腔室 24 中的中空纤维膜 50 的外部相接触。第二流体循环路径 14 与第二流体流动控制器 32 可操作地相连。

[0045] 因此，第一流体循环路径 12 和第二流体循环路径 14 通过中空纤维膜 50 在细胞生长腔室 24 中是分离的。第一流体循环路径 12 中的流体流经细胞生长腔室中的中空纤维的内毛细管（“IC”）空间。因此，第一循环路径 12 也被称为“IC 回路”。第二循环路径 14 中的流体流经细胞生长腔室中的外毛细管（“EC”）空间。因此，第二流体循环路径 14 也被称为“EC 回路”。第一流体循环路径 12 中的流体能够以相对于第二流体循环路径 14 中的流体流动的顺流或逆流的方向流动。

[0046] 流体进入路径 44 与第一流体循环路径 12 流体相连。流体进入路径 44 允许流体进入第一流体循环路径 12，而流体排出路径 46 允许流体离开 CES10。第三流体流动控制器 48 与流体进入路径 44 可操作地相联。可替代地，第三流体流动控制器 48 能够与第一排出路径 46 可替代地相关联。

[0047] 本文中所使用的流体流动控制器可为泵、阀、夹具或它们的组合。多个泵、阀和夹具能够以任何的组合来布置。在各个实施方式中，流体流动控制器是蠕动泵或包括蠕动泵。在进一步的实施方式中，流体循环路径、进入端口和排出端口可以由任何材料的管子构成。

[0048] 各组件在本文中被称为“可操作地相联”。如本文所使用的，“可操作地相联”是指组件以可操作的方式连接在一起，并且涵盖其中组件直接连接的实施方式以及其中在两个连接的组件之间放置有额外的组件的实施方式。“可操作地相联的”组件可为“流体相连”。“流体相连”是指将组件连接在一起，以使得能够在它们之间运输流体。“流体相连”涵盖其中在两个流体相连的组件之间放置有额外的组件的实施方式，以及其中组件之间是直接相连的实施方式。流体相连的组件可包括不与流体相接触，而与其它组件相接触以操控系统的组件（例如，通过压缩管的外部来泵送流体穿过柔性管子的蠕动泵）。

[0049] 通常来讲，任何类型的流体（包括缓冲液、含蛋白的流体以及含细胞的流体）都可流经各循环路径、进入路径以及排出路径。如本文所使用的，“流体”、“介质”以及“流体介质”是可互换使用的。

[0050] 图 1B 描绘了更详细的细胞扩增系统 800。CES800 包括第一流体循环路径 802（也被称为“内毛细管回路”或“IC 回路”），以及第二流体循环路径 804（也被称为“外毛细管回路”或“EC 回路”）。第一流体流动路径 806 与细胞生长腔室 801 流体相连，以形成第一流体循环路径 802。流体通过 IC 进入端口 801A 流入细胞生长腔室 800，流经细胞生长腔室 800 中的中空纤维，并且经由 IC 排出端口 801B 流出。压力传感器 810 测量离开细胞生长腔室 801 的介质的压力。除了压力以外，传感器 810 在实施方式中也可在运行期间检测介质压力和温度的温度传感器。介质流经可用于控制介质流动速率的 IC 循环泵 812。IC 循环泵 812 可沿第一方向泵送流体，或沿与第一方向相对的第二方向泵送流体。排出端口 801B 可

被用作相反方向中的入口。进入 IC 回路的介质可经过阀 814 进入。如本领域技术人员所知晓的,可在各位置放置额外的阀和 / 或其它装置,以沿流体路径的多个部分隔离和 / 或测量介质的特性。因此,应当理解的是,示出的示意图代表 CES800 的各元件的一种可能的配置,并且对示出的示意图的修改在一个或多个实施方式的范围之内。

[0051] 对于 IC 回路,能够在运行期间从样品线圈 818 中获得介质样品。随后介质返回至 IC 进入端口 801A,以完成流体循环路径 802。在细胞生长腔室 801 中生长 / 扩增的细胞可被冲出细胞生长腔室 800,通过阀 898 和管线 897 进入收获袋 899。可替代地,当阀 898 关闭时,细胞也可在腔室 801 内重新分配以用于进一步的生长。

[0052] 第二流体循环路径 804 中的流体经由 EC 进入端口 801C 进入细胞生长腔室 801 中,并且经由 EC 排出端口 801D 离开细胞生长腔室 801。在 EC 回路中的介质与在细胞生长腔室 801 中的中空纤维的外部相接触,从而允许小分子分散到可在腔室 801 内的中空纤维内或中空纤维外。

[0053] 在介质进入细胞生长腔室 801 的 EC 空间之前,布置在第二流体循环路径 804 中的压力 / 温度传感器 824 允许测量介质的压力和温度。在介质离开细胞生长腔室 801 之后,传感器 826 允许测量在第二流体循环路径 804 中的介质的压力和温度。对于 EC 回路,能够在运行期间从样品端口 830 或样品线圈中获得介质样品。

[0054] 在离开细胞生长腔室 801 的 EC 排出端口 801D 之后,在第二流体循环路径 804 中的流体穿过 EC 循环泵 828 到达气体运输模块 832。EC 循环泵 828 也可沿相对方向泵送流体。第二流体流动路径 822 经由气体运输模块 832 的进入端口 832A 和排出端口 832B 与气体运输模块 832 流体相连。在运行中,流体介质经由进入端口 832A 流入气体运输模块 832 中,并且经由排出端口 832B 离开气体运输模块 832。气体运输模块 832 将氧加入到 CES800 的介质中并且去除 CES800 的介质中的气泡。在各实施方式中,在第二流体循环路径 804 中的介质与进入气体运输模块 832 中的气体相平衡。气体运输模块 832 可为本领域已知的任何合适尺寸的装置,并且用于氧化作用或气体运输。空气或气体经由过滤器 838 流入气体运输模块 832,并且通过过滤器 840 流出氧合器或气体运输装置 832。过滤器 838 和过滤器 840 降低或防止氧合器 832 和相关介质的污染。在启动顺序的部分期间,从 CES800 净化的空气或气体能够经由气体运输模块 832 排入大气中。

[0055] 在描绘的 CES800 的配置中,在第一流体循环路径 802 和第二流体循环路径 804 中的流体介质沿相同的方向(顺流配置)流经细胞生长腔室 801。CES800 也可被配置为以逆流构造流动。

[0056] 根据至少一个实施方式,包括细胞(来自诸如细胞容器(例如袋)的源)的介质可附接在附接点 862 处,并且来自介质源的流体介质能够附接在附接点 846 处。经由第一流体流动路径 806,能够将细胞和介质引入到第一流体循环路径 802 中。附接点 862 经由阀 864 与第一流体流动路径 806 流体相连,并且附接点 846 经由阀 850 与第一流体流动路径 806 流体相连。试剂源可与点 644 流体连接,并且经由阀 648 与流体进入路径 842 相关联,或经由阀 848 和阀 872 与第二流体进入路径 874 相关联。

[0057] 空气去除腔室 (ARC) 856 与第一循环路径 802 流体相连。空气去除腔室 856 可包括一个或多个传感器(上传感器和下传感器),以在空气去除腔室 856 内的特定测量位置检测空气、流体的缺乏,和 / 或气体 / 流体界面,例如空气 / 流体界面。例如,超声波传感器可

被用在靠近空气去除腔室 856 的底部处和 / 或顶部处, 以检测在这些位置处的空气、流体, 和 / 或气体 / 流体界面。在不脱离本公开的精神和范围的情况下, 实施方式提供了多个其它类型的传感器的应用。例如, 根据本公开的实施方式, 可使用光学传感器。在启动顺序的部分期间或其它方案中, 从 CES800 净化的空气或气体能够经由管线 858 从空气阀 860 排出进入大气, 其中管线 858 与空气去除腔室 856 流体相连。

[0058] EC 介质源可附接至 EC 介质附接点 868, 并且冲洗液源可附接至冲洗液附接点 866, 以将 EC 介质和 / 或冲洗液加入至第一流体流动路径或第二流体流动路径中。附接点 866 可与阀 870 流体相连, 其中阀 870 经由阀 872 和第一流体进入路径 842 与第一流体循环路径 802 流体相连。可替代地, 通过打开阀 870 和闭合阀 872, 附接点 866 可经由第二流体进入路径 874 和第二流体流动路径 884 与第二流体循环路径 804 流体相连。同样地, 附接点 868 与阀 876 流体相连, 其中阀 876 可经由第一流体进入路径 842 和阀 872 与第一流体循环路径 802 流体相连。可替代地, 通过打开阀 876 和闭合阀分配器 872, 流体容器 868 可与第二流体进入路径 874 流体相连。

[0059] 在 IC 回路中, 首先, 流体可通过 IC 进入泵 854 向前移动。在 EC 回路中, 首先, 流体通过 EC 进入泵 878 向前移动。空气检测器 880, 诸如超声波传感器也可与 EC 进入路径 884 相关联。

[0060] 在至少一个实施方式中, 第一流体循环路径 802 和第二流体循环路径 804 与废物管线 888 连接。当阀 890 打开时, IC 介质可流经废物管线 888, 并且到达废物袋 886。同样地, 当阀 892 打开时, EC 介质可流至废物袋 886。

[0061] 在细胞已经在细胞生长腔室 801 中生长后, 可经由细胞收获路径 897 来收获生长的细胞。此时, 在阀 898 是打开的情况下, 能够通过泵送含细胞的 IC 介质, 使其经过细胞收获路径 897 进入细胞收获袋 899, 收获来自细胞生长腔室 801 的细胞。

[0062] CES800 的各组件也可被包含或封装在机器或壳体 ( 诸如细胞扩增器 202 ) 内, 其中, 该机器将细胞和介质维持在预定的温度。进一步需要注意的是, 在实施方式中, CES 800 的组件可与其它 CES, 诸如 CES10 ( 图 1A ) 或 CES300 ( 图 1C ) 组合。在其它实施方式中, CES 可包括比图 1A 至图 1C 中所示出的部件少的部件, 并且这样的实施方式仍然在本公开的范围之内。

[0063] 图 1C 示出了 CES 的另一实施方式。CES300 包括第一流体循环路径 302 ( 也被称为 “内毛细管 (IC) 回路”) 以及第二流体循环路径 304 ( 也被称为 “外毛细管回路” 或 “EC 回路”)。

[0064] 第一流体流动路径 306 与细胞生长腔室 308 流体相连, 以形成第一流体循环路径 302。流体通过进入端口 310 流入细胞生长腔室 308 中, 流经细胞生长腔室 308 中的中空纤维, 并且经由排出端口 307 离开。压力计 317 测量离开细胞生长腔室 308 的介质的压力。介质流经可被用于控制介质流动速率的阀 313 和泵 311。在运行期间, 能够从样品端口 305 或样品线圈 309 获得介质样品。布置在第一流体循环路径中的压力 / 温度计 315 允许在运行期间检测介质的压力和温度。随后, 介质返回至进入端口 310, 以完成流体循环路径 302。在细胞生长腔室 308 中扩增的细胞可被冲出细胞生长腔室 308 或被再分配在中空纤维中, 以用于进一步的生长。

[0065] 第二流体循环路径 304 包括第二流体流动路径 312, 该第二流体流动路径 312 在回

路中与细胞生长腔室 308 流体相连。第二流体循环路径 304 中的流体经由进入端口 314 进入细胞生长腔室 308, 并且经由排出端口 316 离开细胞生长腔室 308。介质与细胞生长腔室 308 中的中空纤维的外部相接触, 允许小分子分散在中空纤维内和中空纤维外。

[0066] 在介质进入细胞生长腔室 308 的 EC 空间之前, 布置在第二循环路径中的压力 / 温度计 319 允许测量介质的压力和温度。在介质离开细胞生长腔室之后, 压力计 321 允许测量在第二循环路径中的介质的压力。

[0067] 在离开细胞生长腔室 308 的排出端口 316 之后, 第二流体循环路径 304 中的流体穿过泵 320 和阀 322 到达氧合器 318。第二流体流动路径 312 经由氧合器进入端口 324 和氧合器排出端口 326 与氧合器 318 流体相连。在运行中, 流体介质经由氧合器进入端口 324 流入氧合器 318 中, 并且经由氧合器排出端口 326 离开氧合器 318。

[0068] 氧合器 318 将氧加入到 CES 中的介质中。在各实施方式中, 第二流体循环路径 304 中的介质与进入氧合器的气体相平衡。氧合器可为本领域已知的任何氧合器。气体经由过滤器 328 流入氧合器 318 中, 并且通过过滤器 330 流出氧合器 318。过滤器 328 和过滤器 330 降低或防止氧合器 318 和相关介质的污染。

[0069] 在描绘的 CES300 的配置中, 第一循环路径 302 和第二循环路径 304 中的流体介质沿相同的方向 (顺流配置) 流经细胞生长腔室 308。本领域技术人员应知晓的是, CES300 也可配置为逆流构造。本领域技术人员应知晓的是, 相应的进入端口和排出端口可布置在细胞生长腔室中的任何位置处。

[0070] 细胞和流体介质可经由第一流体进入路径 332 被引入至流体循环路径 302 中。流体容器 334 和流体容器 336 分别经由阀 338 和阀 340 与第一流体进入路径 332 流体相连。同样地, 细胞容器 342 经由阀 343 与第一流体循环路径 302 流体相连。细胞和流体前进经过热交换器 344、泵 346, 并且进入滴注腔室 (drip chamber) 348。滴注腔室 348 与第一流体循环路径 302 流体相连。来自滴注腔室 348 的溢出物可经由阀 352 从溢出物管线 350 流出滴注腔室 348。

[0071] 可将来自流体容器 354 和流体容器 356 的额外流体加入至第一流体循环路径 302 或第二流体循环路径 304 中。流体容器 354 与阀 358 流体相连, 其中, 阀 358 经由第一流体进入路径 360 与第一流体循环路径 302 流体相连。第一流体流动路径包括阀 364。可替代地, 流体容器 354 与第二流体进入路径 362 流体相连。同样地, 流体容器 356 与阀 366 流体相连, 阀 366 经由第一流体进入路径 360 与第一流体循环路径 302 流体相连。可替代地, 流体容器 364 与第二流体进入路径 362 流体相连。

[0072] 第二流体进入路径 362 被配置为, 使流体在进入滴注腔室 370 前流经泵 368。第二流体进入路径 362 延续至第二流体循环路径 304。溢出的流体可经由溢出物管线 372 通过阀 374 流出至废物容器 376。

[0073] 可经由细胞收获路径 378 收获细胞。通过泵送含细胞的介质穿过细胞收获路径 378 到达细胞收获袋 380, 能够收获来自细胞生长腔室 308 的细胞。

[0074] 第一流体循环路径 302 和第二流体循环路径 304 通过连接器路径 384 相连。当阀 386 打开时, 介质可流经在第一循环路径 302 和第二循环路径 304 之间的连接器路径 384。同样地, 泵 390 可将介质泵送穿过在第一流体循环路径 302 和第二流体循环路径 304 之间的另一连接器路径 388。

[0075] CES 的各组件可被包含在培养箱 399 内。培养箱 399 将细胞和介质维持在恒定的温度。

[0076] 本领域技术人员应知晓的是,任何数目的流体容器(例如介质袋)与 CES 能够以任何组合流体相连。进一步应注意到的是,滴注腔室的位置或独立于滴注腔室的传感器可在 CES 中进入端口 310 之前的任何位置。

[0077] CES 可包括额外的部件。例如,在 CES 上的蠕动泵的位置处可增加一个或多个泵回路(未示出)。泵回路可由聚氨酯(PU)(可作为 Tygothane C-210A)构成。可替代地,也可包括作为一次性部分的盒子(cassette),该盒子用于组织管线并且也可包括容纳蠕动泵的管道回路。

[0078] 在一些实施方式中还可提供可拆卸的流动线路(本文中也可称为“可拆卸的循环模块”)。可拆卸的流动线路可为细胞扩增模块的一部分,该细胞扩增模块被配置为附接至 CES 的更永久的固定部分。通常来讲,CES 的固定部分包括蠕动泵。在各实施方式中,CES 的固定部分可包括阀和/或夹具。

[0079] 可拆卸的流动线路可包括具有至少两个端部的第一流体流动路径。第一端部被配置为与细胞生长腔室的第一端部流体相连,并且第一流体流动路径的第二端部被配置为与细胞生长腔室的第二端部流体相连。

[0080] 同样地,可拆卸的流动线路可包括具有至少两个端部的第二流体流动路径。可拆卸的流动线路的一部分可被配置为与氧合器和/或生物反应器流体相连。可拆卸的流动线路可包括第二流体流动路径,该第二流体流动路径可被配置为与氧合器和细胞生长腔室流体相连。

[0081] 在各实施方式中,可拆卸的流动线路可拆卸地且一次性地安装至流体流动控制器。可拆卸的流动线路可包括与 CES 的一部分相连的可拆卸的流体导管(例如软管)。参考图 1E,可拆卸的流动线路包括用于第一流体循环路径 126 的管道,但在没有泵 142。可拆卸的流动线路可进一步包括用于冲洗管线 132 的管道,且在没有阀 133。可拆卸的流动线路可进一步包括将第一循环路径 126 连接至冲洗管线 132 以及第一流体进入路径 124 的管道。在各种其它更换中,可拆卸的流动线路可包括将介质进入袋 106 和介质进入袋 108,排出袋 110 和细胞输入袋 112 连接至滴注腔室 186 的管道。可拆卸的流动线路也可包括将细胞收获袋 140 连接至第一循环路径 126 的管道。

[0082] 同样地,可拆卸的流动线路可包括构成第二循环路径 166 的管道。例如,管道可包括将氧合器 104 连接至细胞生长腔室 102 以及滴注腔室 186 的管道。可拆卸的流动线路也可包括流体进入路径 114。

[0083] 在进一步的实施方式中,可拆卸的流动线路可包括细胞生长腔室、氧合器以及用于容纳介质和细胞的袋子。在各实施方式中,组件可以是连接在一起的,或是相互隔开的。可替代地,可拆卸的流动线路可包括被配置为附接至流体流通控制器的一个或多个部分,诸如,阀、泵以及它们的组合。在使用蠕动泵的变型中,可拆卸的线路模块可包括蠕动回路,该蠕动回路被配置为环绕管道的蠕动部分安装。在各实施方式中,蠕动回路可被配置为与循环路径、进入路径和排出路径流体相连。可拆卸的流动线路也可组合在工具袋(kit)中,该工具袋具有将可拆卸的流动线路组装或附接至流体流动控制器,诸如泵和阀的说明书。

[0084] 实施方式提供了使用多个不同方法将细胞引入至 CES 的生物反应器中。如下文中

更详细的描述,实施方式包括在生物反应器分配细胞以促进细胞一致扩增的方法和系统。

[0085] 根据实施方式,细胞可在 IC 回路或 EC 回路中生长(“扩增”)。能够扩增贴壁细胞和非贴壁的悬浮细胞。在一个实施方式中,细胞生长腔室纤维的内腔可涂覆有纤连蛋白。将无二价阳离子(例如,无钙和镁)的 PBS 加入至 CES 系统中。在将贴壁细胞引入至细胞生长腔室,例如,腔室 24、308 或 801 之后,孵育足够的时间以使它们附着至中空纤维。循环 IC 和 EC 介质,以确保为细胞供应足够的营养。

[0086] 可将 IC 回路和 EC 回路的流动速率调节至特定值。在各实施方式中,可将 IC 回路和 EC 回路的流动速率独立地设置为约 2mL/分钟、约 4mL/分钟、约 6mL/分钟、约 8mL/分钟、约 10mL/分钟、约 15mL/分钟、约 20mL/分钟、约 25mL/分钟、约 30mL/分钟、约 35mL/分钟、约 40mL/分钟、约 45mL/分钟、约 50mL/分钟、约 60mL/分钟、约 70mL/分钟、约 80mL/分钟、约 90mL/分钟、约 100mL/分钟、约 200mL/分钟、约 300mL/分钟、约 400mL/分钟或约 500mL/分钟。在各实施方式中,IC 线路回路的流动速率可为 10mL/分钟至 20mL/分钟,并且 EC 线路回路的流动速率可为 20mL/分钟至 30mL/分钟(允许介质流经氧合器并且重建氧的水平)。可以较低的流动速率(例如,在一些实施方式中为 0.1mL/分钟)将额外的介质泵入至 CES 中,以更换通过气体交换模块诸如,气体交换器/氧合器 30、318 或 832 蒸发的介质。在各实施方式中,EC 回路去除细胞废物,并且 IC 回路在介质中包含生长因子。

[0087] CES 在不同的生长条件和标准中可提供很大的灵活性。通过使介质持续循环,可以使细胞在 IC 回路中保持悬浮。可替代地,可停止介质的循环,从而引起细胞的沉淀。通过超滤可将新鲜的介质加入至 IC 回路中,以调整过量的体积而不去除细胞。EC 介质的循环允许气体、营养物、废弃产物进行交换,并且允许新介质的加入,而不去除细胞。

[0088] 扩增的细胞可包括贴壁细胞、非贴壁细胞或本领域中任何组合的细胞的共培养。

[0089] 在实施方式中,为了收获贴壁细胞,IC 和 EC 介质可被替换成无二价阳离子的介质(例如,无二价阳离子的 PBS)。在一个实施方式中,可将胰蛋白酶加载至第一循环路径中,并且与贴壁细胞一起孵育一段时间(在一些实施方式中,一起孵育约 5 分钟至约 10 分钟)。随后,可将胰蛋白酶从系统中冲洗掉。通过增加穿过细胞生长腔室的流动速率向细胞施加剪切力,并且从细胞生长腔室中释放的贴壁细胞可被泵入至细胞收获袋中。

[0090] 当扩增非贴壁细胞时,可从循环 IC 线路冲洗出细胞。贴壁细胞保持在细胞生长腔室中,而去除了非贴壁细胞。

[0091] CES 可用于进行各种细胞扩增方法。

[0092] 在一个实施方式中,可扩增接种的细胞群。细胞可被引入或接种至 CES 中。在某些情况下,可使中空纤维的内腔处于适当的条件以允许细胞的附着。随后,将细胞加入至细胞生长腔室中,并且贴壁细胞附着至中空纤维,而非贴壁细胞(例如造血干细胞或 HSC)并不附着。非贴壁细胞可从系统中冲洗掉。在孵育一段时间之后,可释放并收获贴壁细胞。

[0093] 干细胞、祖细胞以及完全分化的细胞都可进行扩增。

[0094] 在实施方式中,细胞扩增系统的细胞生长腔室包括中空纤维膜,中空纤维膜由隔开第一流体循环路径和第二流体循环路径的多个半通透的中空纤维组成。

[0095] 图 2 中描绘了细胞生长腔室的实施方式,图 2 描绘了中空纤维细胞生长腔室 200 的侧剖视图。细胞生长腔室 200 由细胞生长腔室壳体 202 界定。细胞生长腔室壳体 202 进一步包括四个开口或端口:进入端口 204、排出端口 206、进入端口 208 和排出端口 210。

[0096] 第一循环路径中的流体通过进入端口 204 进入细胞生长腔室 200, 进入且穿过多个中空纤维的内毛细管侧 (在各实施方式中被称为, 中空纤维膜的内毛细管 (“IC”) 侧或 “IC 空间”), 以及通过排出端口 206 流出细胞生长腔室 200。术语 “中空纤维”、“中空纤维毛细管” 以及 “毛细管” 可互换使用。多个中空纤维一起被称为 “膜”。第二循环路径中的流体通过进入端口 208 流入细胞生长腔室中, 而与中空纤维的外部 (也被称为膜的 “EC 侧” 或 “EC 空间”) 相接触, 并经由排出端口 206 离开细胞生长腔室 200。细胞可被包含在第一循环路径或第二循环路径内, 并且可在膜的 IC 侧或 EC 侧。

[0097] 尽管细胞生长腔室壳体 202 被描绘为圆柱形的形状, 但是它可具有本领域已知的任何形状。细胞生长腔室壳体 202 可由任何类型的生物相容性聚合物材料制成。其它各种细胞生长腔室壳体可具有不同的形状和尺寸。

[0098] 本领域技术人员应知晓的是, 术语细胞生长腔室并不意味着在 CES 中生长或扩增的所有细胞都是生长在细胞生长腔室中的。在许多实施方式中, 贴壁细胞可附着至布置在生长腔室中的膜, 或可在相关联的管道内生长。非贴壁细胞 (也被称为 “悬浮细胞”) 也可生长。细胞可在第一流体循环路径或第二流体循环路径内的其它区域中生长。

[0099] 例如, 中空纤维 212 的端部可通过连接材料 (在本文中也被称为 “灌封” 或 “灌封材料”) 被灌封至细胞生长腔室的侧面上。只要不阻塞介质和细胞进入中空纤维中的流动, 并且穿过 IC 进入端口流入细胞生长腔室中的液体仅流入中空纤维中, 则该灌封可为用于粘合中空纤维 212 的任何合适的材料。示例性灌封材料包括但并不限于聚氨基甲酸以及其它合适的粘合或粘着组分。在各实施方式中, 也可在每一端部通过垂直于中空纤维的中心轴切割中空纤维和灌封, 以允许流体流入和流出 IC 侧。端部帽 214 和 216 被布置在细胞生长腔室的端部。

[0100] 经由进入端口 208 进入细胞生长腔室 200 的流体与中空纤维的外部相接触。该部分的中空纤维细胞生长腔室也被称为 “外毛细管 (EC) 空间”。小分子 (例如水、氧、乳酸等) 能够穿过中空纤维从中空纤维的内部扩散至 EC 空间, 或从 EC 空间扩散至 IC 空间。大分子量的分子诸如生长因子通常太大而不能穿过中空纤维, 从而保持在中空纤维的 IC 空间中。在细胞生长 IC 空间中的实施方式中, EC 空间被用作介质储存器, 以为细胞供应营养物并且除去细胞代谢的副产物。根据需要可更换介质。介质也可通过氧合器进行循环, 以交换所需的气体。

[0101] 在各实施方式中, 可通过包括注射的各种方法将细胞加载至中空纤维中。细胞也可从流体容器, 例如袋子中被引入到细胞生长腔室中, 其中该流体容器可与细胞生长腔室流体相连。

[0102] 中空纤维被配置为允许细胞生长在纤维的内毛细管空间 (即, 中空纤维内腔的内部) 中。中空纤维大的足以允许细胞附着在内腔上, 而基本上不阻碍介质穿过中空纤维内腔的流动。在各实施方式中, 中空纤维的内直径可大于或等于约 10000 微米、约 9000 微米、约 8000 微米、约 7000 微米、约 6000 微米、约 5000 微米、约 4000 微米、约 3000 微米、约 2000 微米、约 1000 微米、约 900 微米、约 800 微米、约 700 微米、约 650 微米、约 600 微米、约 550 微米、约 500 微米、约 450 微米、约 400 微米、约 350 微米、约 300 微米、约 250 微米、约 200 微米、约 150 微米或约 100 微米。同样地, 中空纤维的外直径可小于或等于约 10000 微米、约 9000 微米、约 8000 微米、约 7000 微米、约 6000 微米、约 5000 微米、约 4000 微米、约 3000



微米、约 2000 微米、约 1000 微米、约 900 微米、约 800 微米、约 700 微米、约 650 微米、约 700 微米、约 650 微米、约 600 微米、约 550 微米、约 500 微米、约 450 微米、约 400 微米、约 350 微米、约 300 微米、约 250 微米、约 200 微米、约 150 微米或约 100 微米。在一些实施方式中，中空纤维壁的厚度应当足以允许小分子的分散。

[0103] 只要中空纤维能够与细胞生长腔室的进入端口和排出端口流体相连，则在细胞生长腔室中可使用任意数目的中空纤维。在各实施方式中，细胞生长腔室可包括数目大于或等于约 1000、约 2000、约 3000、约 4000、约 5000、约 6000、约 7000、约 8000、约 9000、约 10000、约 11000 或约 12000 的中空纤维。在其它实施方式中，细胞生长腔室可包括数目小于或等于约 12000、约 11000、约 10000、约 9000、约 8000、约 7000、约 6000、约 5000、约 4000、约 3000、约 2000 的中空纤维。在其它各实施方式中，中空纤维的长度可大于或等于约 100 毫米、约 200 毫米、约 300 毫米、约 400 毫米、约 500 毫米、约 600 毫米、约 700 毫米、约 800 毫米或约 900 毫米。在实施方式中，细胞生长腔室大致含有约 9000 个中空纤维，这些中空纤维具有约 295mm 的平均长度、215 微米的平均内直径以及 315 微米的平均外直径。

[0104] 中空纤维可由任何能够形成如下尺寸的材料构成，该尺寸足以形成能够将液体从细胞生长腔室的进入端运输至细胞生长腔室的排出端口的纤维。在各实施方式中，中空纤维可由塑料附着材料构成，该塑料附着材料能够粘合某些种类的细胞，诸如贴壁干细胞（例如 MSC）。在各其它实施方式中，中空纤维可经诸如纤连蛋白的化合物进行处理，以形成附着表面。

[0105] 在某些实施方式中，中空纤维可有半通透的生物相容性聚合材料制成。一种可使用的这样的聚合材料为聚酰胺、聚芳醚砜和聚乙烯吡咯烷酮的共混物（在本文中也被称为“PA/PAES/PVP”）。半通透膜允许穿过膜在 EC 空间和 IC 空间之间转移营养物、废物和溶解的气体。在各实施方式中，选择中空纤维膜的分子转移特性，以最大限度地降低细胞生长所必需的昂贵试剂，诸如生长因子、细胞因子从中空纤维中的丢失，同时允许代谢废弃产物穿过膜扩散进入中空纤维内腔侧而被去除。

[0106] 在某些变型中，每一 PA/PAES/PVP 中空纤维的一个外层的特征在于，具有限定表面粗糙度的均匀且开孔的结构。孔的开口尺寸可在约 0.5 微米至 3 微米的范围内，并且在纤维外表面上的孔的数目可在约 10000 个孔 /mm<sup>2</sup> 至约 150000 个孔 /mm<sup>2</sup> 的范围内。该外层具有约 1 微米至约 10 微米的厚度。在每个中空纤维中的下一层为具有海绵结构形式的第二层，并且在实施方式中具有约 1 微米至约 15 微米的厚度。该第二层可用作外层的支架。紧挨着第二层的第三层可具有指状结构的形式。该第三层提供了机械稳定性和高孔隙体积，使得膜在穿过膜运输分子时具有较低的阻力。在使用期间，指状孔隙填充有流体，并且与具有较低空隙体积的海绵填充结构的基质相比，流体为扩散和对流给予了较低的阻力。该第三层可具有约 20 微米至约 60 微米的厚度。

[0107] 在进一步的实施方式中，中空纤维膜可包括在约 65wt% 至 95wt% 之间的至少一种疏水性聚合物，以及在约 5wt% 至约 35wt% 之间的至少一种亲水性聚合物。疏水性聚合物可选自由聚酰胺 (PA)，聚芳酰胺 (PAA)，聚芳醚砜 (PAES)，聚醚砜 (PES)，聚砜 (PSU)，聚芳砜 (PASU)，聚碳酸酯 (PC)，聚醚，聚氨酯 (PUR)，聚醚酰亚胺，以及上述任何聚合物的共聚物的混合物（诸如聚醚砜，或聚芳醚砜和聚酰胺的混合物）所组成的组。在额外的实施方式中，亲水性聚合物可选自由聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙二醇 (PEG)、聚乙二醇单酯、水溶

性纤维衍生物、聚山梨醇酯和聚乙烯-聚丙烯氧化物共聚物所组成的组。

[0108] 根据要在细胞生长腔室中扩增的细胞的类型,聚合物纤维可经诸如纤连蛋白的物质进行处理,以增强细胞生长和/或细胞对膜的附着。

[0109] CES 可包括一装置,该装置用于通过将其附接至转动和/或横向摇动的装置,相对于细胞扩增系统的其它组件移动或“摇动”细胞生长腔室。图 1D 示出了这样的装置,其中,生物反应器 400 与两个转动摇动组件和横向摇动组件转动地相连。

[0110] 第一转动摇动装置组件 402 绕生物反应器的中心轴 410 转动生物反应器,并且与横向摇动装置 404 横向地相连。转动摇动装置组件 402 与生物反应器 400 转动地相联。转动摇动装置随后绕生物反应器的中心轴 410 转动生物反应器 400。转动可沿顺时针方向进行或沿逆时针方向进行。生物反应器 400 可沿单一方向绕中心轴 410 以顺时针方向或逆时针方向连续地转动。可替代地,生物反应器 400 可以以交替的方式转动,首先绕中心轴 410 顺时针转动,随后绕中心轴 410 逆时针转动。

[0111] CES 也可包括第二转动摇动组件,该第二转动摇动组件绕转动轴 412 转动生物反应器 400。转动轴 412 穿过生物反应器 400 的点的中心并且与中心轴 410 正交。生物反应器 400 可沿单一方向绕转动轴 412 以顺时针方向或逆时针方向连续地转动。可替代地,生物反应器 400 可以以交替的方式转动,首先绕转动轴 412 顺时针转动,随后绕转动轴 412 逆时针转动。在各实施方式中,生物反应器 400 也可绕转动轴 412 转动,并且位于相对于重力的水平取向或垂直取向上。

[0112] 横向摇动组件 404 与生物反应器 400 横向地相联。横向摇动组件 404 的平面沿 X 方向和 Y 方向横向移动。因此,通过含细胞的介质在中空纤维中的运动降低了细胞在生物反应器中的沉淀。

[0113] 摇动装置的转动运动和/或横向运动能够降低装置内细胞的沉淀并且降低细胞被捕获在生物反应器的一部分内的可能性。根据斯托克 (Stoke) 定律,细胞在细胞生长腔室中沉淀的速率与细胞和悬浮液介质之间的密度差异成比例。在某些实施方式中,进行如上所述的重复的具有暂停的 180° 转动(快)(具有 30 秒的总组合时间)使非贴壁的红细胞保持悬浮。在一些实施方式中,进行约 180° 的最小转动;然而,在其它实施方式中,可利用高达 360° 或更大的转动。可独立地或可以任意组合地使用不同的摇动组件。例如,绕中心轴 410 转动生物反应器 400 的摇动部件可与绕轴 412 转动生物反应器 400 的摇动组件相组合。同样地,也可以任意组合,独立地进行绕不同轴的顺时针转动和逆时针转动。

[0114] 现参照图 3,示出了另一细胞生长腔室的实施例生物反应器 300 的正视图。生物反应器 300 具有纵轴 LA-LA,并且包括生物反应器壳体 304。在至少一个实施方式中,生物反应器壳体 304 包括四个开口或端口:IC 进入端口 308、IC 排出端口 320、EC 进入端口 328 以及 EC 排出端口 332。

[0115] 第一循环路径中的流体通过在生物反应器 300 的第一纵向端部 312 处的 IC 进入端口 308 进入生物反应器 300,进入且流经多个中空纤维 316 的内毛细管侧(在各种实施方式中被称为中空纤维膜的内毛细管(“IC”)侧或“IC 空间”)并且通过位于生物反应器 300 的第二纵向端部 324 处的 IC 排出端口 320 流出生物反应器 300。第二循环路径中的流体通过 EC 进入端口 328 流入生物反应器 300 中,与中空纤维 316 的外毛细管侧或外部(也被称为膜的“EC 侧”或“EC 空间”)相接触,并且经由 EC 排出端口 332 离开生物反应器 300。

经由 EC 进入端口 328 进入生物反应器的流体与中空纤维的外部相接触。小分子（例如水、氧、乳酸等）能够穿过中空纤维从中空纤维的内部扩散至 EC 空间，或从 EC 空间扩散至 IC 空间。大分子量的分子诸如生长因子通常太大而不能穿过中空纤维，从而保持在中空纤维的 IC 空间内。可以根据需要更换介质。介质也可通过氧合器进行循环，以交换所需的气体。细胞也可被包含在第一循环路径和 / 或第二循环路径中，并且可在膜的 IC 侧和 / 或 EC 侧。通过示例性且非限制性的方式，在一个实施方式中，生物反应器 300 可包括具有  $215 \times 10^{-6} \text{m}$  的内直径 (ID) 的约 11520 个纤维。

[0116] 尽管生物反应器壳体 304 被描绘为圆柱形的形状，但是其可具有各种形状，诸如长方体。生物反应器壳体 304 可由任何类型的生物相容性聚合物材料制成，包括允许观察者观察多个中空纤维 316 中的一个或多个以及残留在生物反应器壳体 304 内的流体的基本透明的材料。各种其它的生物反应器壳体可具有不同的形状和尺寸。

[0117] 现在参照图 4，示出了 CES400 的一部分的透视图，并且包括 CES400 的主体 408 的后部 404。为了清晰起见，主体 408 的前部未示出，然而，前部诸如通过铰链 412 附接至后部 404，从而允许前部包括门或舱口，该门或舱口能够打开以进入 CES400 的生物反应器 300。卷轴 416 可附接至生物反应器 300 以用做管道和取样端口 420。在生物反应器 300 附近的环境为温控的，以为细胞生长提供合适的条件。

[0118] 现在参照图 5，示出了描述与使用 CES 相关的细胞扩增过程 500 的一个实施方式的流程图，其中包括与在生物反应器 300 中加载和分配细胞相关的步骤，下面将进行进一步描述。尽管 CES400 的特征被描述为执行过程 500 的一些步骤，但是本发明并不限于此。事实上，在过程 500 的一些实施方式中，可利用本文中未描述的具有不同特征的其他 CES。因此，参照 CES400 诸如生物反应器 300 的特征仅提供用于解释说明的目的，并且过程 500 并不限于在 CES400 中使用。

[0119] 为了开始细胞扩增过程 500，生物反应器 300 和任何相关联的管道以及相关的结构在 504 处被附接至主体 408，以提供可操作的 CES400。一旦附接至主体 408，在 508 处，利用合适的预补液 (priming fluid) 诸如，生理盐水启动生物反应器 300 和其相关联的管道和相关的结构。在 512 处，细胞被加载和分配在生物反应器 300 中。在实施方式中的细胞的加载和分配涉及一定数目的子步骤，例如，在一些实施方式中，步骤 512 额外地包括在 516 处使生物反应器 300 定向在起始位置，并且随后在 520 处在生物反应器 300 中加载和分配细胞。在生物反应器 100 中加载和分配细胞之后，在 528 处进行细胞的扩增。也就是说，允许生物反应器 300 中的细胞进行生长和 / 或繁殖。在 532 处，对是否需要将额外的细胞加入至生物反应器 300 中，和 / 或是否需要转动生物反应器 300 以在生物反应器 300 内分配细胞进行评价。如果需要将额外的细胞加载至生物反应器 300 中，和 / 或如果需要将细胞分配在生物反应器 300 中，则随后细胞扩增过程 500 返回至步骤 512。如果不需要加入细胞和 / 或不需要转动生物反应器 300，则随后在 536 对细胞扩增过程 528 是否完成进行评价。如本文所使用的，如果已经达到了足够数目的细胞和 / 或已经实现了细胞特性的改变，则确定细胞扩增过程完成。如果细胞扩增过程 528 完成，则在 540 处收获细胞。如果细胞扩增过程 528 没有完成，则随后允许在 528 处继续进行细胞扩增过程。

[0120] 进一步参照图 5 的流程图，现在将提供关于在生物反应器中加载和分配细胞的额外的细节，如在 512 处所示。更具体地，在 516 处，将生物反应器 300 定向在其起始位置。如

在图 6 中最清楚地看出,在至少一个实施方式中,生物反应器 300 水平定位,以起始细胞在生物反应器 300 中的加载和分配。也就是说,在生物反应器 300 在 508 处启动时,生物反应器 300 在 516 处被定向在其纵轴 LA-LA 的起始位置中,诸如基本水平的位置。此后,在 520 处,多种细胞被加载至生物反应器 300 中,同时以特定顺序转动(如下所述)生物反应器 300 以促进细胞遍及生物反应器 300 的分配。

[0121] 在至少一个实施方式中,通过引起携带细胞的介质从 IC 入口 308 经过至 EC 出口 332,可将细胞加载至生物反应器 300 的 IC 侧(或进入生物反应器 300 的中空纤维 316 中)。此外,通过引起携带细胞的介质从 EC 入口 328 经过至 IC 出口 320,可将细胞加载至生物反应器 300 的 EC 侧(或至生物反应器 300 的中空纤维 316 的外部)。

[0122] 对于一个实施方式,为了辅助确定生物反应器 300 的期望的运动以促进细胞在生物反应器 300 内进行改进的分配,可进行一系列的运算以计算出定位生物反应器 300 的基础。更具体地,通过转动生物反应器 300,能够相对于生物反应器 300 的几何构型影响重力对生物反应器 300 内的给定细胞(例如骨髓细胞)的加速的作用。为了实现细胞的零净冲量(net impulse),可进行冲量(“I”)的计算以确定在转动期间的变化,以及使用在  $0^\circ$  和  $270^\circ$  处的合适的暂停时间来抵消冲量。

[0123] 开始时,最初考虑在生物反应器 300 内的细胞体验到的加速。作为本发明的实施方式的前提,可取的是,抵消与在生物反应器 300 中分配细胞相关联的,重力(“g”)对生物反应器 300 内给定细胞的加速。因此,寻找一生物反应器 300 的转动顺序,以实现与在生物反应器 300 中加载和分配细胞相关联的,给定细胞的零净重力影响。下表 1 提供了与生物反应器 300 相关联的,沿两个轴(即图 6 中示出的 T 轴和  $\hat{L}\hat{L}$  轴)的重力加速影响的总结。

[0124] 表 1:加速方向的总结表

[0125]

生物反应器位置	$a_T$	$a_{\hat{L}\hat{L}}$
在 $0^\circ$ 时	- (g 仅沿 T 轴)	0
当从 $0^\circ$ 转动至 $90^\circ$ 时	-(g 的一分量是沿 T 轴的)	-(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)
当从 $90^\circ$ 转动至 $180^\circ$ 时	+(g 的一分量是沿 T 轴的)	-(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)
当从 $180^\circ$ 转动至 $270^\circ$ 时	+(g 的一分量是沿 T 轴的)	+(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)
在 $270^\circ$ 度暂停	0	+(g 仅沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴)
当从 $270^\circ$ 转动至 $180^\circ$ 时	+(g 的一分量是沿 T 轴的)	+(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)
当从 $180^\circ$ 转动至 $90^\circ$ 时	+(g 的一分量是沿 T 轴的)	-(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)
当从 $90^\circ$ 转动至 $0^\circ$ 时	-(g 的一分量是沿 T 轴的)	-(g 的一分量是沿 $\hat{L}\hat{L}$ 轴的)

[0126] 对于表 1,正号“+”表示,当生物反应器处于如列 1 中示出的位置或转动时的主体轴的正向加速;负号“-”表示,当生物反应器处于如列 1 中示出的位置或转动时的主体轴的负向加速;以及,零“0”表示,当生物反应器处于如列 1 中示出的位置时,主体轴基本无加速。零度( $0^\circ$ )被限定为,当纵轴 LA-LA 是水平取向,同时 EC 入口 328 和 EC 出口 332 为取向上时的,生物反应器 300 的取向(如图 6 所示); $90^\circ$  被限定为垂直,同时 EC 入口 328 和 EC 出口 332 取向向左(如图 7 所示); $180^\circ$  被限定为纵轴 LA-LA 水平取向,同时 EC 入口 328 和 EC 出口 332 取向向下(如图 8 所示);以及, $270^\circ$  被限定为垂直,同时 EC 入口 328 和 EC 出口 332 取向向右(如图 9 所示)。

[0127] 在生物反应器 300 中分配细胞的方法包括操纵生物反应器 300 的取向,从而使得作用于加载至生物反应器 300 内的细胞的重力的净冲量基本为零。根据至少一个实施方式,生物反应器的操纵包括,转动生物反应器 300,及之后维持生物反应器静止预定的时段。根据至少一个实施方式,维持生物反应器 300 静止的时间  $t_p$  大约等于量  $2\omega^{-1}$ ,其中,当生物反应器 300 进行转动时,角速度  $\omega$  (rad/sec) 在该时段中基本恒定。本领域技术人员应知晓的是,可使用不同的角速度和暂停时间。

[0128] 再次参照图 6,并且根据至少一个实施方式,示出了在最初起始位置处的生物反应器 300 的取向。此时,生物反应器的纵轴 LA-LA 是基本水平的。当将细胞加载至生物反应器 300 内时,采取一系列的操纵以减轻重力对加载至生物反应器 300 内的细胞的影响。更具体地,在实施方式中,生物反应器 300 以第一角速度  $\omega$  转过大约  $270^\circ$ 。图 7 例示了转过  $90^\circ$  的生物反应器 300。接着,图 8 例示了已经转过  $180^\circ$  的生物反应器 300。最后,图 9 例示了在定向为第二取向的生物反应器,其中使生物反应器 300 维持静止一定时段以允许重力的全部影响作用在  $\hat{L}\hat{L}$  轴的正方向上。在使生物反应器 300 暂停合适的时段后,生物反应器 300 随后转回至它原始或最初的起始位置,如图 10 所示。

[0129] 如本领域技术人员所知晓的,多个转动方向是可能的。此外,只要实现了重力对加载至生物反应器 300 内的细胞的影响的平衡,多个最初的起始位置也是可能的。因此,本文中的计算、实施例和讨论提供了用于操纵生物反应器 300 以降低、最大限度地降低或消除重力对细胞的影响,以及改进细胞在生物反应器内的分配的一种或多种可能的配置。但是,在本公开涵盖的其它实施方式和变型的范围内,计算、描述和附图应被认为是示例性的而非限制性的。

[0130] 根据至少一个实施方式,通过施加至生物反应器 300 的角速度,控制重力对生物反应器 300 中的细胞分配的影响。更具体地,转动或角速度  $\omega$  (rad/sec) 用于平衡生物反应器 300 内的细胞所体验到的重力的净冲量。

[0131] 根据至少一个实施方式,将细胞分配在具有纵轴 LA-LA 的生物反应器 300 中的方法包括:当纵轴 LA-LA 基本水平或相对于水平约  $45^\circ$  角时,开始在生物反应器 300 中加载以及分配细胞;使生物反应器 300 转过总共大约  $540^\circ$  的角位移;以及,在多个取向中使生物反应器 300 维持静止。在至少一个实施方式中,转动的角速度对于其中生物反应器是转动的时间间隔是基本相同的。在至少一个实施方式中,对于生物反应器 300 正在转动的时间段,生物反应器 300 的转动的角速度从第一角速度  $\omega_1$  变成第二角速率  $\omega_2$ 。

[0132] 现在参照图 11 和图 12,示出了生物反应器 300 的不同视图,其中,生物反应器 300 通过腔室联轴器 604 与轴组件 600 互连。发动机 608 用于使外轴 612 绕转动轴转动,从而使生物反应器 300 以如图 7 至图 10 所示的摇摆 (pitch) 模式转动,该转动轴穿过轴 612 定向且基本垂直于生物反应器 300 的纵轴。发动机 616 用于使位于外轴 612 内的内轴 (参见图 13) 转动,以使得辊装配在腔室联轴器 604 内,以使生物反应器 200 绕其纵轴 LA-LA 转动。如在图 13 中最清楚地看出,内轴 700 包括用于啮合位于腔室联轴器 604 内的辊环 704 的结构。内轴构件 700 包括位于内轴构件 700 的非常远端的小锥齿轮 (beveled pinion) 708,并且小锥齿轮 708 与辊环 704 的坡面 712 接触,这样当内轴构件 700 转动时,辊环 704 转动,从而引起细胞生长腔室绕其纵轴 LA-LA 转动。

[0133] 现在参照图 14,例示了以滚动模式转动细胞生长腔室的实施例。在图 14 中,示出

了细胞生长腔室 300 的侧视图,其中,在第一滚动位置时(以实线示出),EC 进入端口 328 竖直向上取向。在第二滚动位置时(以虚线示出),EC 进入端口 328 向下取向。应当理解的是,可选择性地控制细胞生长腔室 300 的滚动,这样使得细胞生长腔室 300 能够绕其纵轴以任何角度转动。滚动的细胞生长腔室 300 的周期性转动有助于防止在图 5 所示的流程图中描述的步骤 512 中的细胞加载和分配期间发生细胞集落(colony)的沉淀。

[0134] 在至少一个实施方式中,在运行超过约 2 分钟的加载和分配步骤期间,细胞被加载和分配在整个生物反应器 300 中。在至少一个实施方式中,加载和分配步骤可运行几分钟。在加载和分配步骤期间,生物反应器 300 进行多个转动顺序,这些转动顺序从细胞开始加载的时间直至基本上所有的细胞都已经被加载至生物反应器 300 和其相关的管道中的时间内持续地进行。

[0135] 在至少一个实施方式中,生物反应器 300 被加载有多种细胞,同时进行转动,以便相对于生物反应器 300 不进行转动时作用于多种细胞的重力的净冲量,生物反应器 300 的转动减小了作用于多种细胞的重力的净冲量。也就是说,该方法包括操纵生物反应器的取向,以便相对于生物反应器维持在其静止位置时作用于多种细胞上的重力的无效净冲量(avoided net impulse),减小了作用于多种细胞的重力的实际净冲量。

[0136] 在至少一个实施方式中,生物反应器 300 至少转过  $180^\circ$  以减小作用于多种细胞的重力的净冲量。

[0137] 在至少一个实施方式中,生物反应器 300 以摇摆模式进行转动,以减小作用于多种细胞的重力的净冲量,其中,转动轴的取向垂直于生物反应器 300 的纵轴 LA-LA。在至少一个实施方式中,生物反应器 300 以滚动模式进行转动,以减小作用于多种细胞的重力的净冲量,其中,转动轴的取向基本平行于生物反应器 300 的纵轴 LA-LA。此时,基本平行于纵向轴 LA-LA 的转动轴与纵向轴 LA-LA 可能是一致的。

[0138] 在至少一个实施方式中,通过如本文所述的操纵生物反应器 300 的取向,从生物反应器 300 收获细胞。也就是说,在收获步骤期间,转动生物反应器 300 以减小作用于细胞的重力的净冲量。在细胞收获期间对细胞生物反应器的这种操纵改善了细胞的收集效率。另外,由于细胞被冲洗出生物反应器 300 时克服了重力的影响,所以在细胞收获期间对细胞生物反应器的这种操纵也改善了收集的细胞数目。

[0139] 在至少一个实施方式中,其中细胞以悬浮形式生长在细胞反应器中并且并不附着至中空纤维的壁,可以连续地操纵生物反应器以减小重力对位于生物反应器中的细胞的影响。

[0140] 可通过多种方法将细胞加入到 CES 中。如上所提及的,参照图 5,加载和分配细胞可涉及多个步骤或子步骤。图 22 例示了用于扩增/生长细胞的过程 1100,该过程包括用于将细胞加载和分配在细胞生长腔室或生物反应器中的多个步骤。相对于系统的特征可描述为以下的步骤,但是本发明并不限于此。在其它实施方式中,这些步骤可通过 CES 的其它部件进行。因此,过程 1100 的步骤并不限于在任何特定结构中进行。

[0141] 过程 1100 在 1104 开始。在步骤 1108 中,细胞被加入至在细胞生长腔室中循环的流体中。在一个实施方式中,细胞被加载至生物反应器(例如生物反应器 300)的内毛细血管(“IC”)空间回路中,并且利用循环而均匀地悬浮。可使 IC 回路中的流体循环,同时将细胞加入到 IC 空间回路中。在步骤 1112 中,细胞可以第一速率循环穿过细胞生长腔室。利

用循环泵可进行流体的循环。

[0142] 在步骤 1116 中,使循环速率维持预定的时段。在一些实施方式中,当细胞被引入时(例如步骤 1108),循环泵可使流体以一速率在 IC 回路中循环,并且随后在引入细胞之后使流体以更高的第二速率循环。在这些实施方式中,步骤 1116 涉及将循环维持在较高的第二速率。

[0143] 一旦细胞均匀地悬浮,进行步骤 1120 以减小循环速率。步骤 1120 可涉及减小循环泵的速率或完全停止泵。在任何情况下,在步骤 1120 中可减小流体循环的速率。随后在步骤 1124 中,允许细胞沉淀。应知晓的是,细胞大致均匀地分配在整个系统例如 CES 10、CES300、CES800 中。在步骤 1124 中,位于生物反应器内的细胞将沉淀在生物反应器中,而在生物反应器外部的细胞将沉淀在生物反应器的外部。

[0144] 在步骤 1128 中,在步骤 1124 中沉淀在生物反应器中的细胞在生物反应器中扩增。步骤 1128 可涉及使流体,诸如介质和其它营养物循环至生物反应器以促进细胞生长。沉淀在生物反应器外部的细胞将被废弃,所以它们不处于在促进它们生长的条件下的生物反应器内。相应的,在步骤 1132 中,在步骤 1124 中沉淀在生物反应器外部的细胞被废弃。术语“废弃”表示细胞并未在最优化的促进细胞生长的条件(如在生物反应器内存在的条件)下。因此,废弃的细胞并不在生物反应器中扩增,并且在一些实施方式中,废弃的细胞死亡和/或在 CES 中的流体循环中被冲走。在一些实施方式中,废弃的细胞可在 CES 的其它部分中扩增或生长,并且在一些实施方式中,它们甚至可被收获,但是它们将不会经历与如生物反应器中的细胞所经历对其生长最优化的条件相同的条件。过程在 1136 处结束。

[0145] 在一些实施方式中,在系统中进行过程 1100,在该系统中,生物反应器中的体积为含细胞体积,即 IC 回路的体积的约 65%至约 70%,诸如约 69%。当细胞在步骤 1124 中沉淀时,将废弃约 30%至约 35%,诸如约 31%的细胞(位于 IC 回路的外部的体积中)。

[0146] 根据过程 1100 的实施方式,由于在生物反应器中分配的细胞受到细胞分配的影响较小,因为它们通常均匀地分配在生物反应器内,并且与加载细胞的常规方法相比,废弃的细胞的损失并不导致扩增的细胞数量的减小。

[0147] 在将细胞加载在生物反应器中的常规方法中,进行以试图将沉淀在 IC 回路中不在生物反应器内的体积中的细胞推入生物反应器内的体积中的步骤。改变 IC 回路中的液体的循环,以便通过使流体从管线流入生物反应器的进入端部和排出端部,以使细胞从输入管线和输出管线进入生物反应器。在不受理论的限制下,应当认为该方法增加了生物反应器中细胞的量,但并不提供细胞的均匀分配。在上述方法(过程 1100)中提供的细胞的均匀分配创建了用于细胞扩增的更适宜的环境,并且相对于先前的方法,由在生物反应器中分配的细胞的较小的起始量构成。

[0148] 应当注意的是,仅仅用于解释说明的目的而提供上述方法。其它变型也在本发明的范围内。例如,IC 回路可使得在生物反应器中沉积的细胞的百分比等于或大于被引入 CES 的 IC 回路中的细胞的约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%或约 95%。在一些实施方式中,CES 的 IC 回路可使得在生物反应器中沉积的细胞的量小于或等于被引入至 CES 的 IC 回路中的细胞的约 95%、约 90%、约 85%、约 80%、约 75%、约 70%、约 65%或约 60%。

[0149] 如上所提及的,在一些实施方式中,在过程 1100 的各个步骤中,可改变循环泵的

循环速率。例如,在步骤 1108 中,当细胞被引入 IC 回路中时,循环速率可为第一速率。在细胞被引入 IC 回路中之后,可随后增加该速率。在其它实施方式中,当细胞被引入 IC 回路中时,可关闭循环泵或以低循环速率运行循环泵,并且随后在引入细胞之后,打开循环泵或增加循环速率。在实施方式中,IC 回路中的循环速率在方法的各个步骤中可大于或等于约 25ml/min、约 50ml/min、约 75ml/min、约 100ml/min、约 125ml/min、约 130ml/min、约 135ml/min、约 140ml/min、约 145ml/min 或约 150ml/min。在实施方式中,在方法的各个步骤中,IC 回路中循环速率可小于或等于约 400ml/min、约 375ml/min、约 350ml/min、约 325ml/min、约 300ml/min、275ml/min、约 250ml/min、约 225ml/min、约 200ml/min、约 175ml/min、约 170ml/min、约 165ml/min、约 160ml/min、约 155ml/min、150ml/min、145ml/min 或 140ml/min。

[0150] 在一些实施方式中,除了 IC 回路的循环以在 IC 回路体积中均匀地分配细胞之外,在关闭循环泵或将循环泵设置在低循环速率之前,还可转动生物反应器以进一步均匀地悬浮细胞。参照图 3 至图 14,在细胞被引入 IC 回路体积中之前、期间和 / 或之后,如上所述进行生物反应器的转动。

[0151] 实施例

[0152] 在该实施例中,利用与如上所述方法类似的加载和分配方法,在生物反应器中扩增 hMSC 细胞。

[0153] 第 0 至 5 天细胞的扩增:13.6M 至 177M ;CV = 10% ;dT = 32.7 小时

[0154] 第 5 至 6 天扩增:177M 至 296M ;CV = 10% ;dT = 32.4 小时 s

[0155] 第 6 至 7 天扩增:296M 至 408M ;CV = 1% ;dT = 51.7 小时。

[0156] 在第 7 天,在烧瓶培养中约 80% 融合的细胞,收获 20,160 细胞 /cm<sup>2</sup>。在 CES 中,在第 7 天收获 19,429 细胞 /cm<sup>2</sup>。这表明在生物反应器中为约 80% 的融合。

[0157] 约 80% 融合的指标,从第 6 天至第 7 天 (32 小时至 51 小时) 的细胞倍增时间的延长以及 CV% 的减小均暗示细胞 - 细胞的相互作用减缓了细胞,并且生物反应器的容量接近该特定细胞群的最大值。

[0158] 图 15 例示了对于利用常规方法加载和分配的细胞,作为乳酸生成速率的函数的细胞收获数目。图 16 例示了对于利用上述的方法,即本发明的实施方式,诸如过程 1100 的实施方式加载和分配的细胞,作为乳酸生成速率的函数的细胞收获数目。比较图 15 和图 16,示出当速率与均匀扩增的细胞群体 (即在接种期间被良好分配的) 相关联时,收获数目是更可预测的 (如图 16 所示)。

[0159] 图 17 和图 18 例示了利用如上所述的方法,即本发明的实施方式,诸如过程 1100,加载和分配的细胞的数据。图 17 例示了乳酸生成,并且图 18 例示了葡萄糖的消耗。图 17 和图 18 例示了高度运行 - 运行一致性。图 17 和图 18 例示了倍增时间:烧瓶 CV% = 9.4,本发明的实施方式 CV% = 2.4 ;以及收获时的细胞 /cm<sup>2</sup>:烧瓶 CV% = 28.0,本发明的实施方式 CV% = 10.2。细胞群体指数增长是均匀细胞分配的信号,尤其是在 7 天后扩增的信号。

[0160] 图 19 和图 20 例示了利用先前的方法加载和分配细胞的数据。图 19 和图 20 提供了对比。利用回归分析使图 19 和图 20 中的数据最好拟合是“功率”回归线的事实,是乳酸浓度“恒定”增加的指示。相对比的,本发明的实施方式中的方法呈现出指数增加,如图 17 和图 18 所示。

[0161] 最后,图 21 例示了基本计算机系统 1200 的示例性部件,在该基础计算机系统中,



可执行本发明的实施方式。计算机系统 1200 可执行加载和分配细胞的方法中的一些步骤。系统 1200 可为控制如上示出 CES 系统 10、100、300 和 400 的特征，例如流动控制装置、泵、阀、生物反应器转动等的控制器，细胞被加载和分配在 CES 系统 10、100、300 和 400 中以进行扩增。

[0162] 计算机系统 1200 包括输出装置 1204，和 / 或输入装置 1208。输出装置 1204 可包括一个或多个显示器，包括 CRT、LCD 和 / 或等离子显示器。输出装置 1204 可包括打印机、扬声器等。输入装置 1208 可包括键盘、触摸输入装置、鼠标、语音输入装置等。

[0163] 根据本发明的实施方式，基础计算机系统 1200 也可包括处理单元 1212 和 / 或存储卡 1216。处理单元 1212 可为通用处理器，可操作地用于执行存储卡 1216 中存储的指令。根据实施方式，处理单元 1212 可包括单个处理器或多个处理器。进一步地，在实施方式中，每个处理器可为具有一个或多个核的多核处理器，以读取和执行独立的指令。处理器可包括通用处理器，专用集成电路 (ASIC)、现场可编程门阵列 (FPGA)，其它集成电路。

[0164] 根据实施方式，存储卡 1216 可包括用于短期存储或长期存储的任何实体介质和 / 或可执行指令的处理器。存储卡 1216 可包括，例如随机存取存取卡 (RAM)、只读存储卡 (ROM) 或电可擦除可编程只读存储卡 (EEPROM)。其它存储介质可以包括，例如，CD-ROM、磁带、数字多功能盘 (DVD) 或其它光存储器，磁带、磁盘存储器、磁带、其它磁存储装置等等。在实施方式中，系统 1200 可用于控制生物反应器 300 的转动和 / 或 CES 系统的各种流动控制装置、泵、阀。存储卡 1216 可存储方案 1220 和程序 1224，诸如将细胞加载和分配在生物反应器的方案和程序，能够控制循环泵、阀、生物反应器转动等的运行。

[0165] 存储器 1228 可为长期数据存储装置或组件。根据实施方式，存储器 1220 可包括连同存储卡 1216 一起描述的一个或多个系统。存储器 1228 可为永久的或可擦除的。在实施方式中，系统 1200 为 CES 的一部分，并且存储器 1228 可存储利用 CES 系统的各种方案。

[0166] 在本文中，各种组件可被称为“可操作地相联”。如本文所使用的，“可操作地相联”是指以能够操作的方式连接在一起的部件，并且涵盖其中组件之间直接联接的实施例，以及其中在两个联接的部件之间放置有额外部件的实施方式。

[0167] 在不脱离本发明的精神或基本特征的情况下，一个或多个本发明可以其它特定的形式来展现。所述的实施方式在所有方面仅被认为是示例性而不是限制性。因此，本发明的范围由所附的权利要求书来确定而不是通过前述说明来确定。在权利要求等效的含义和范围内的所有的改变都被认为涵盖在本发明的范围内。

[0168] 在各实施方式中，一个或多个本发明包括基本如本文所描绘和描述的包括各种实施方式、子组合物以及子集的组件、方法、过程、系统和 / 或装置。本领域技术人员在理解本公开之后将知晓如何制造和使用本发明。

[0169] 在各实施方式中，一个或多个本发明包括在不存在如没有在本文或其各实施方式中所描绘和描述的项目下，所提供的装置和方法，包括在不存在这些项目的情况下可能已经在先前的设备或方法中使用的装置和方法（例如，用于提供性能、实现易用性和 / 或降低实施成本）。

[0170] 前述讨论的一个或多个本发明以解释和说明的目的来呈现。上文并不用于将一个或多个本发明限制为所公开的一个或多个形式。例如在上文所详细描述的实施例中，一个或多个发明的各特征在一个或多个实施方式中组合在一起，以简化本公开。所公开的方法

并不意于反映本发明,其中所要求保护的本发明需要比在每个权利要求明确记载的更多的特征。此外,如下文权利要求所反映的,创造性方面较小地依赖于在前述的单一实施方式的所有特征。因此,将后附权利要求并入到该详细说明中,其中每个权利要求代表一个或多个本发明的独立优选的实施方式。

[0171] 此外,尽管一个或多个本发明的描述已经包括一个或多个实施方式的描述以及某些变型和修改,但其它变型或修改也在本发明的范围内(例如,在理解本公开之后,其可包含在本领域的技能和知识的范围内)。在不用于向公众贡献任何可专利性的主题的情况下,其用于获得在一定范围内允许的替代实施方式的权利,这些替代实施方式包括所包括的权力的可替代地、可互换的和/或等价的结构、功能、范围或步骤,而不管这些可替代的、可互换的和/或等价的结构、功能、范围或步骤是否被本文所公开。

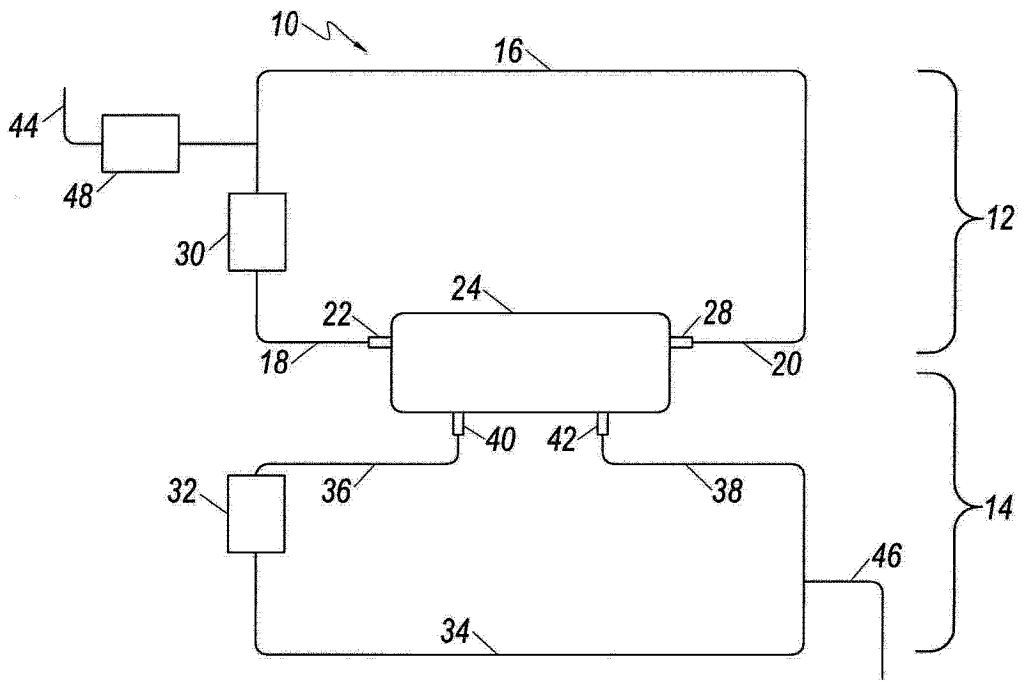


图 1A

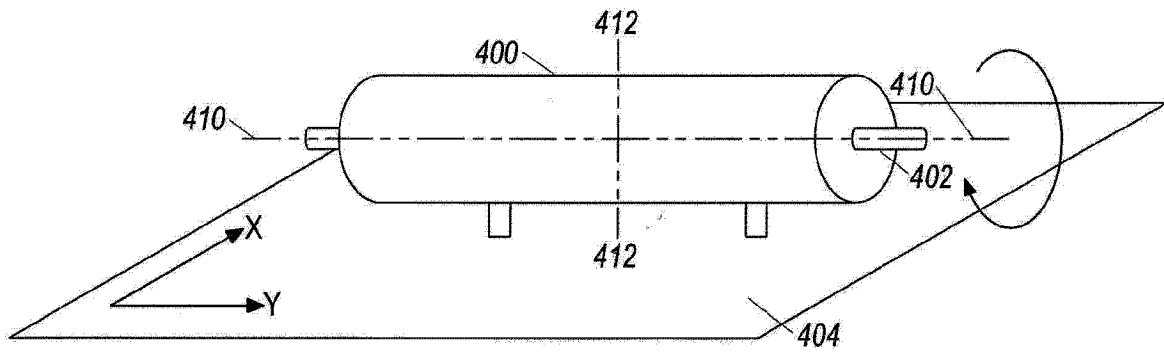


图 1D

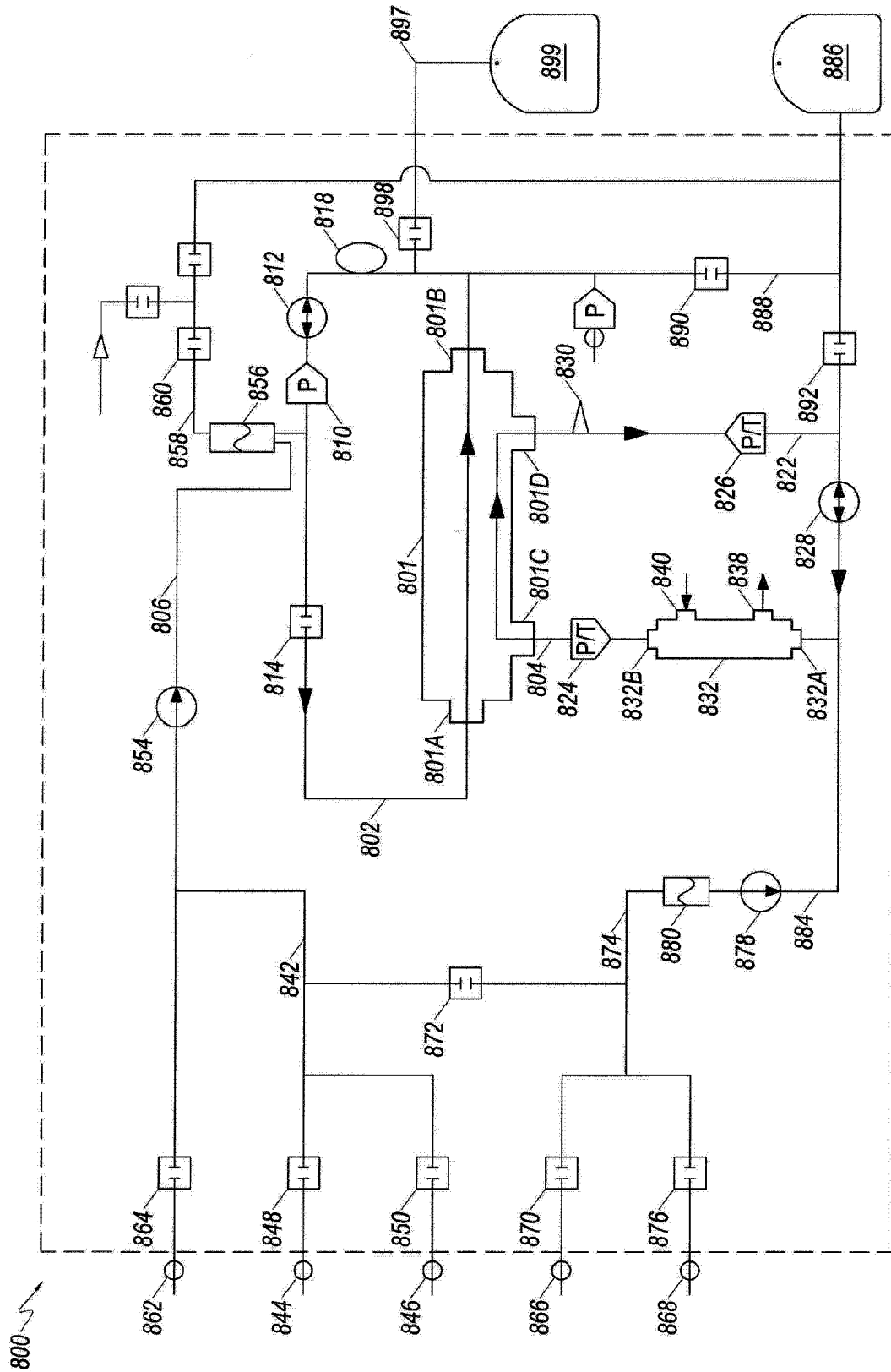


图 1B

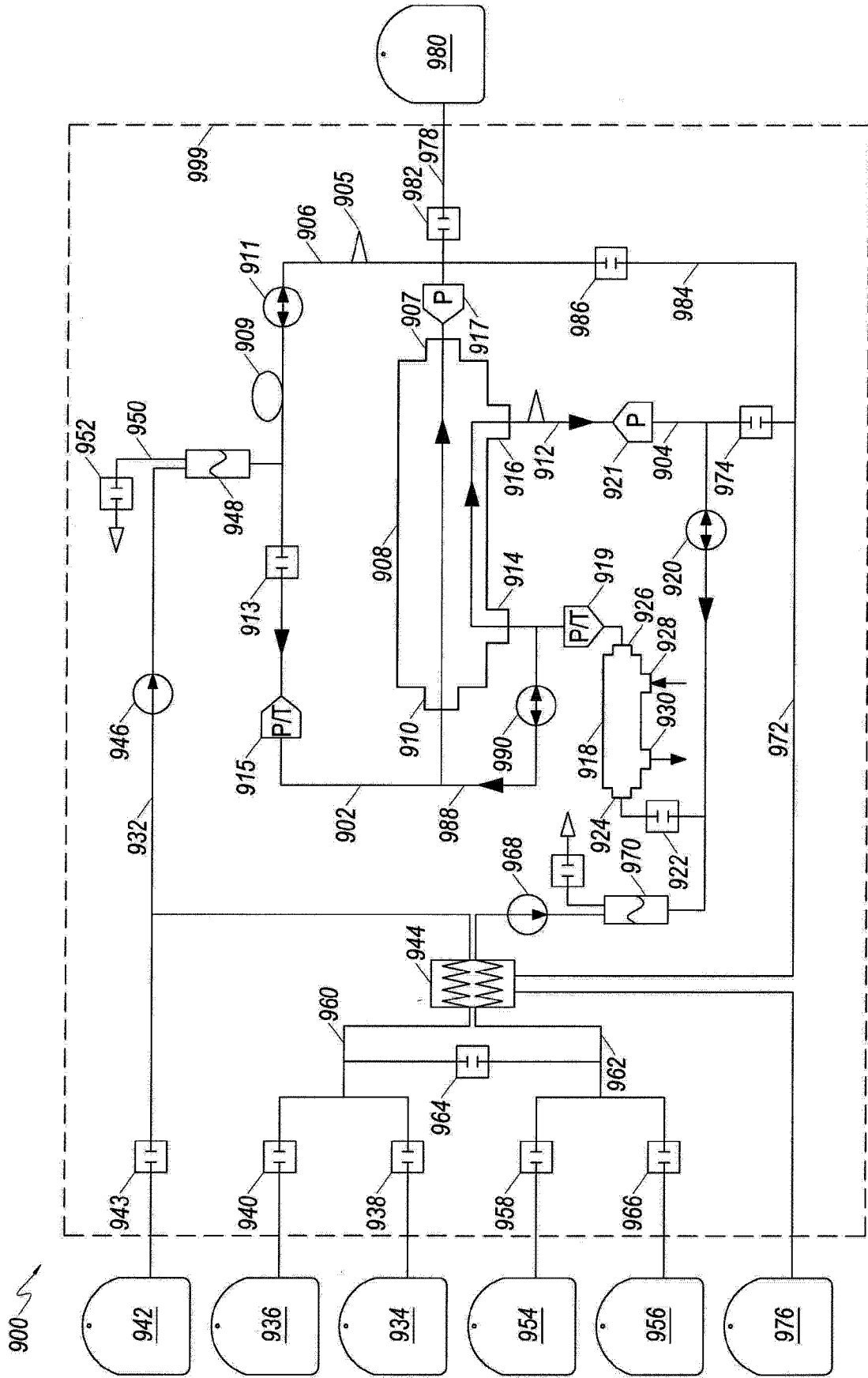


图 1C

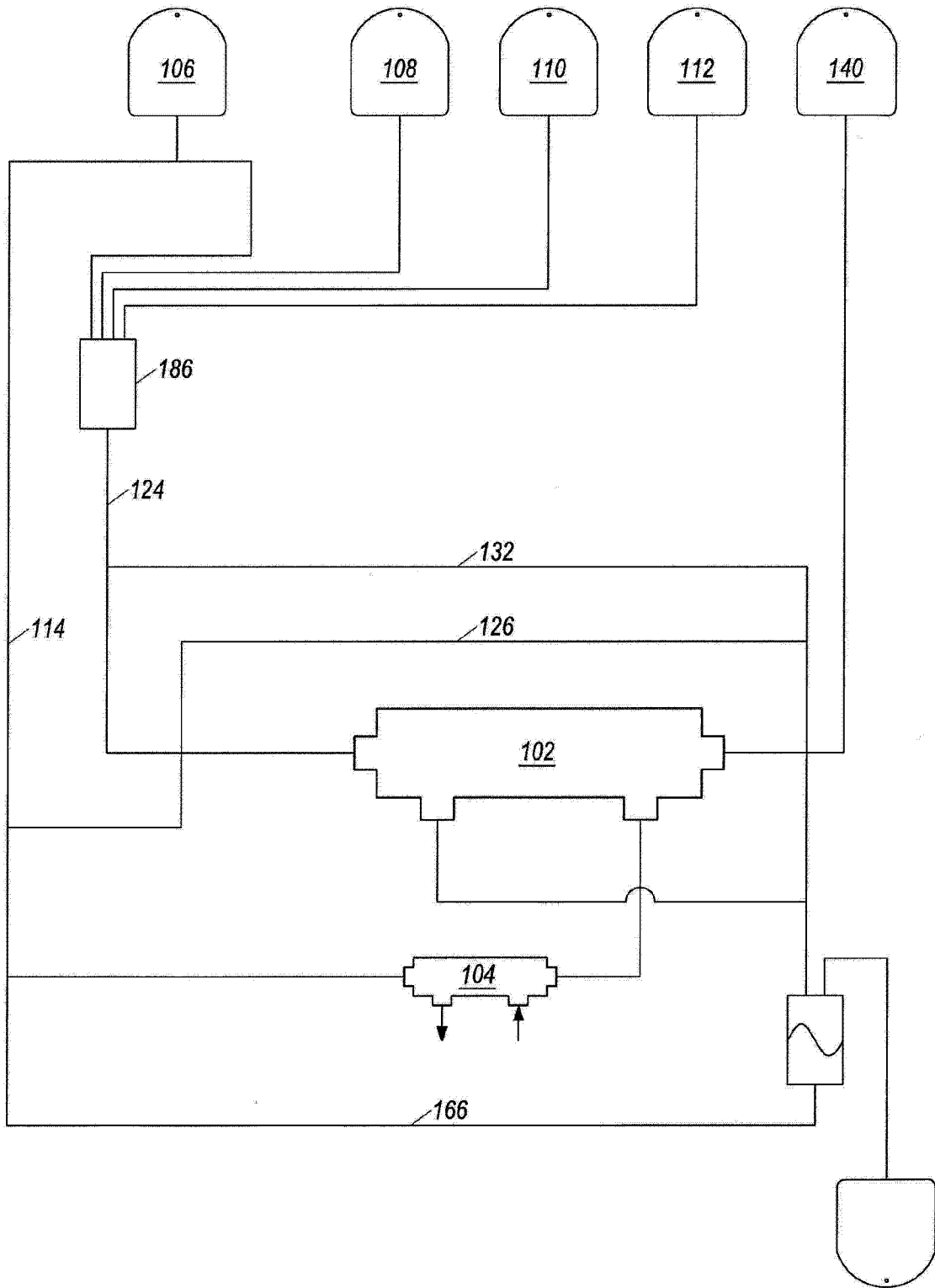


图 1E

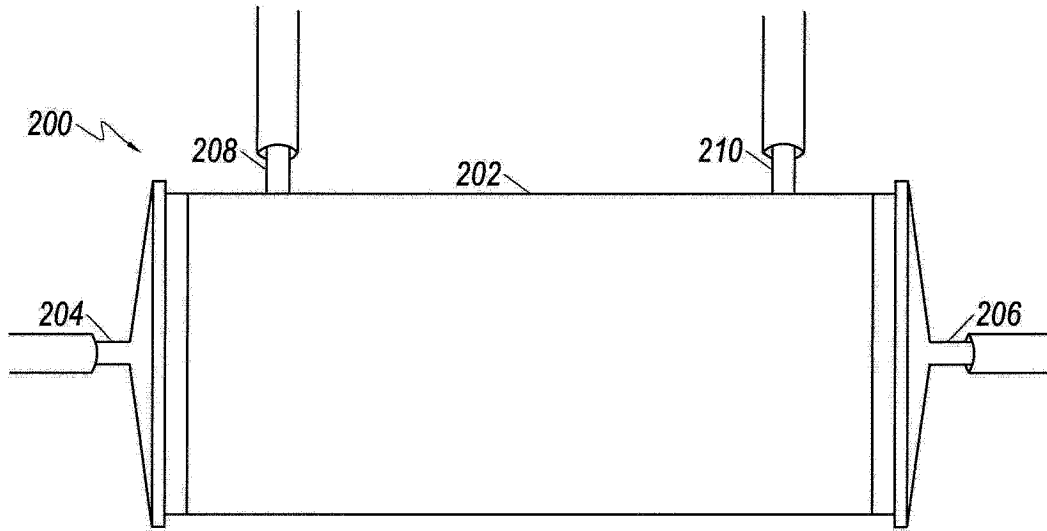


图 2A

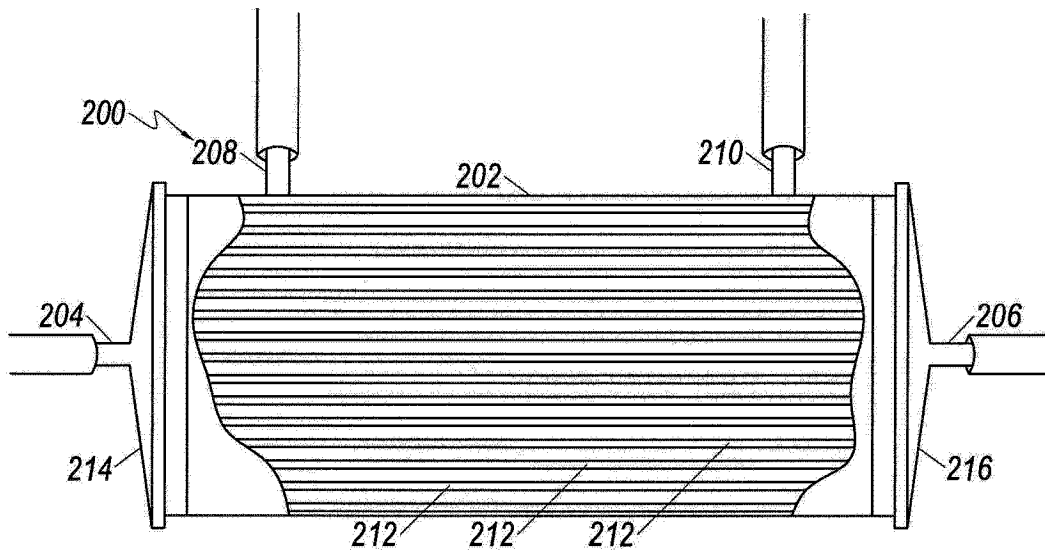


图 2B

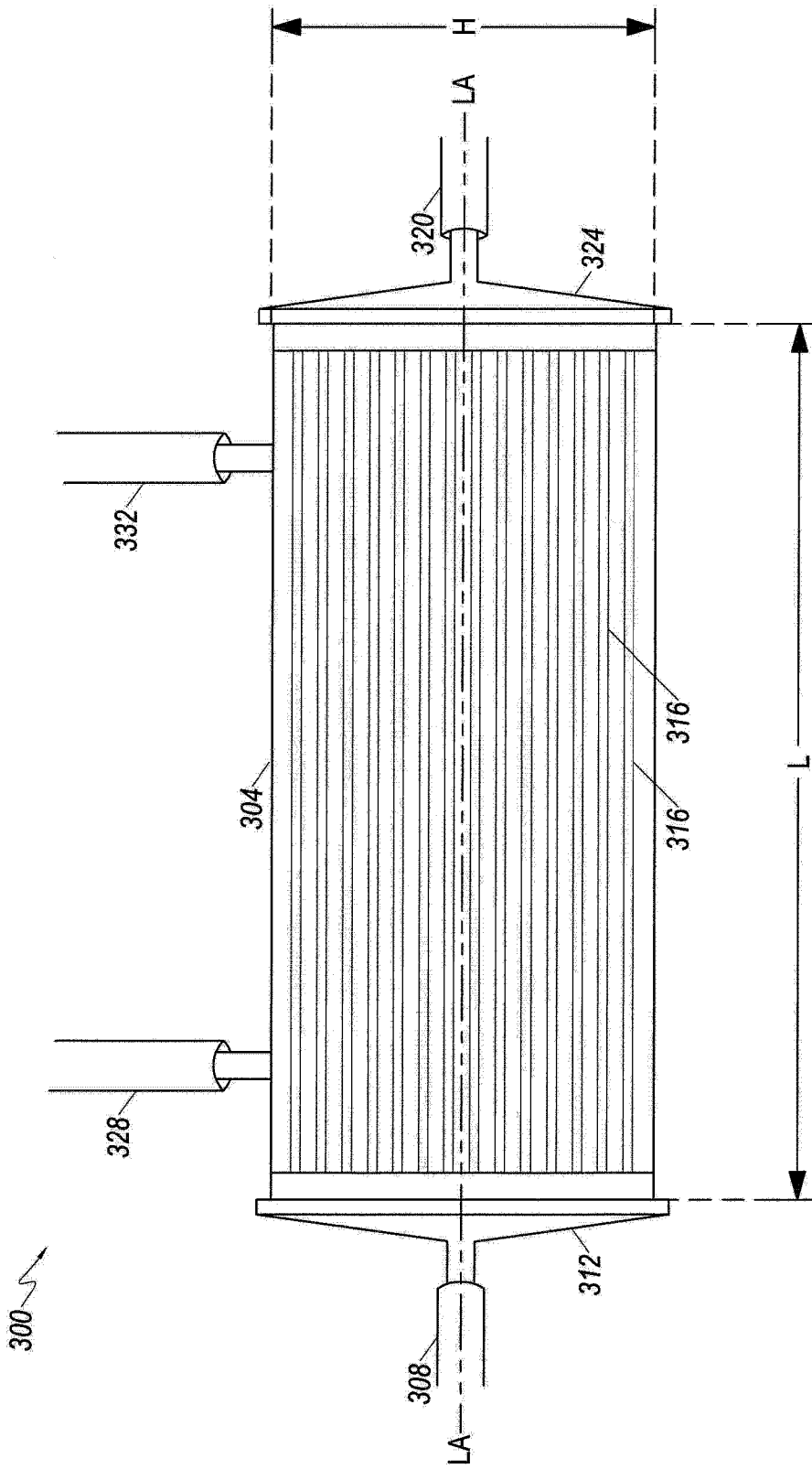


图 3



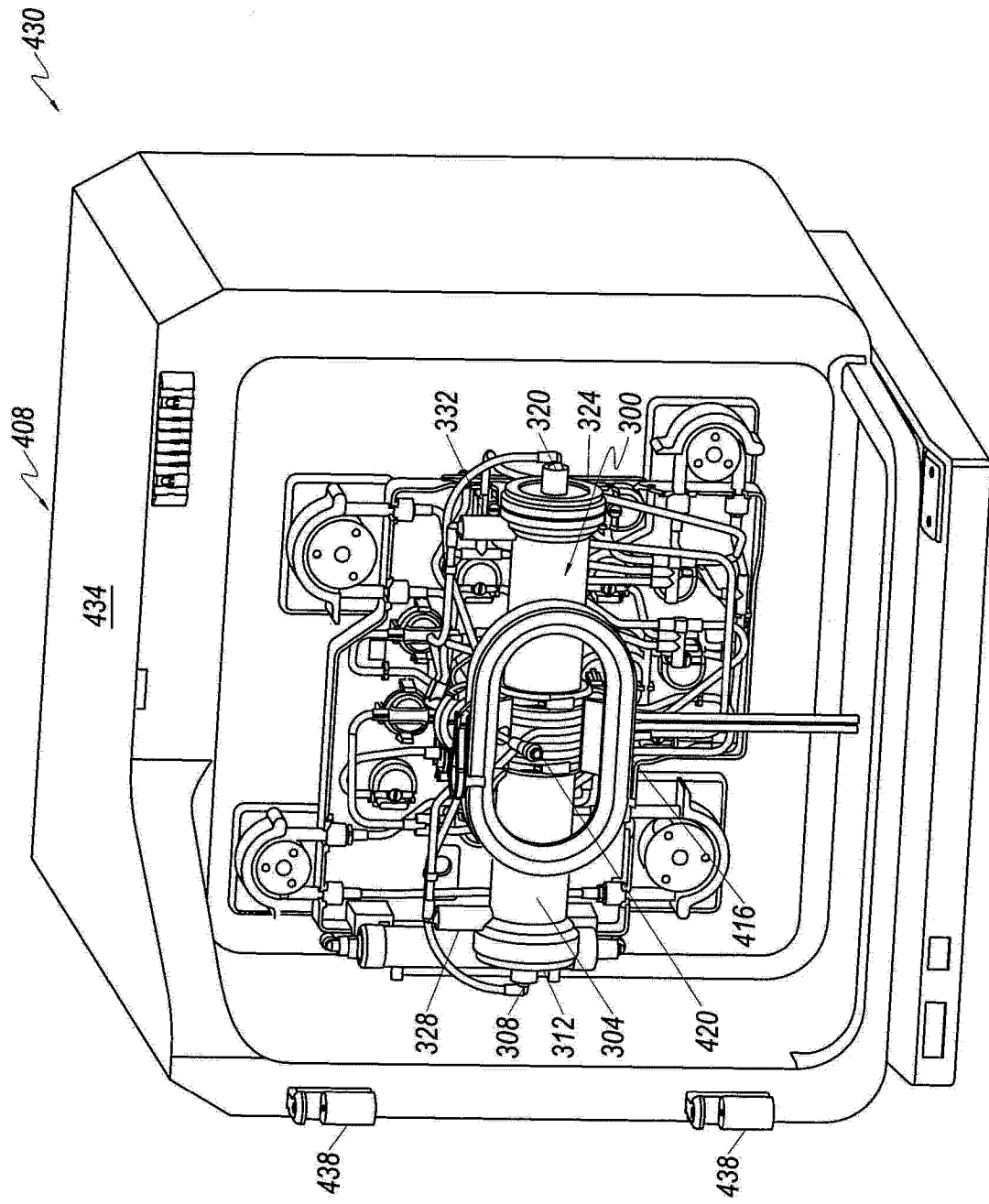


图 4

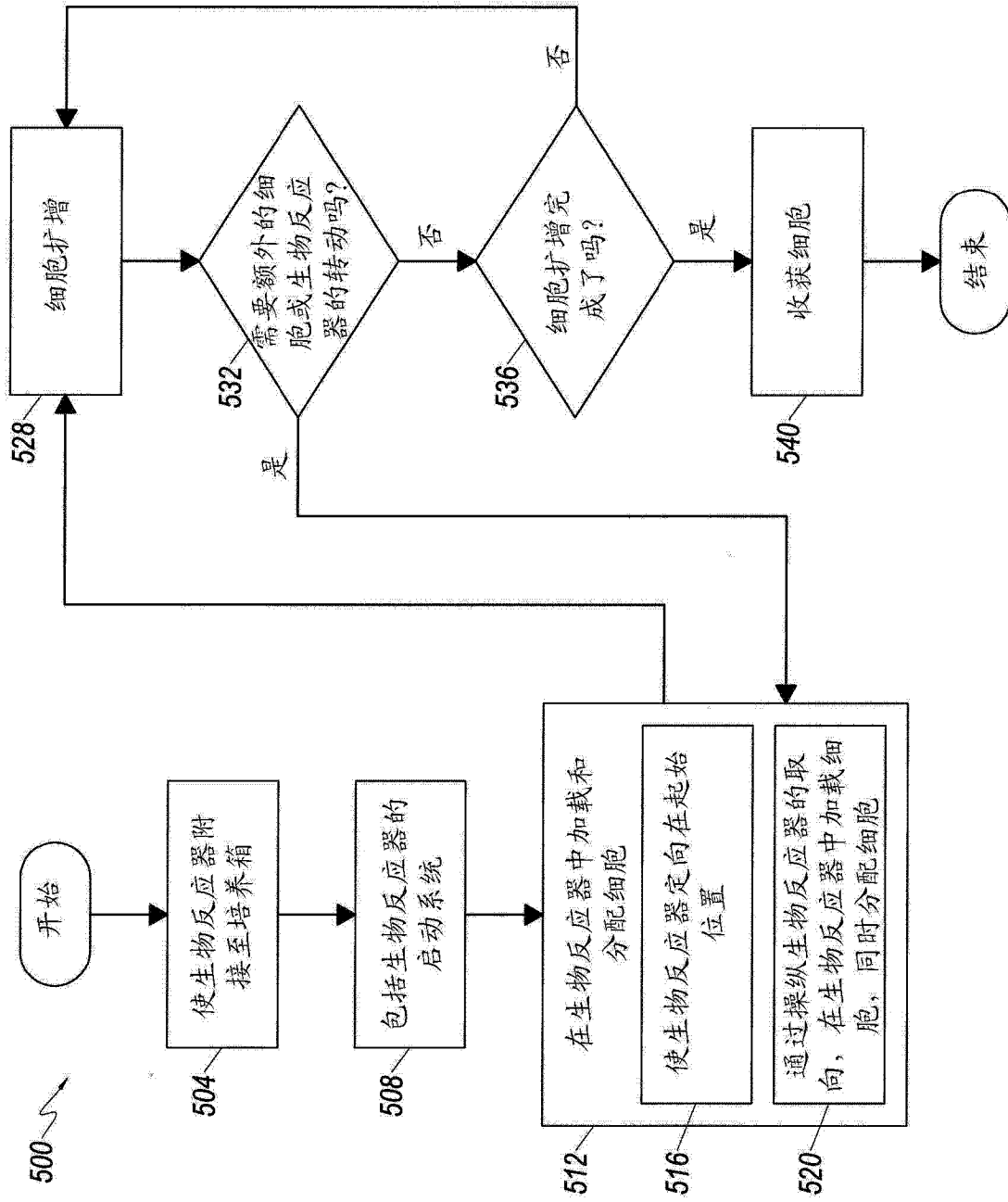


图 5

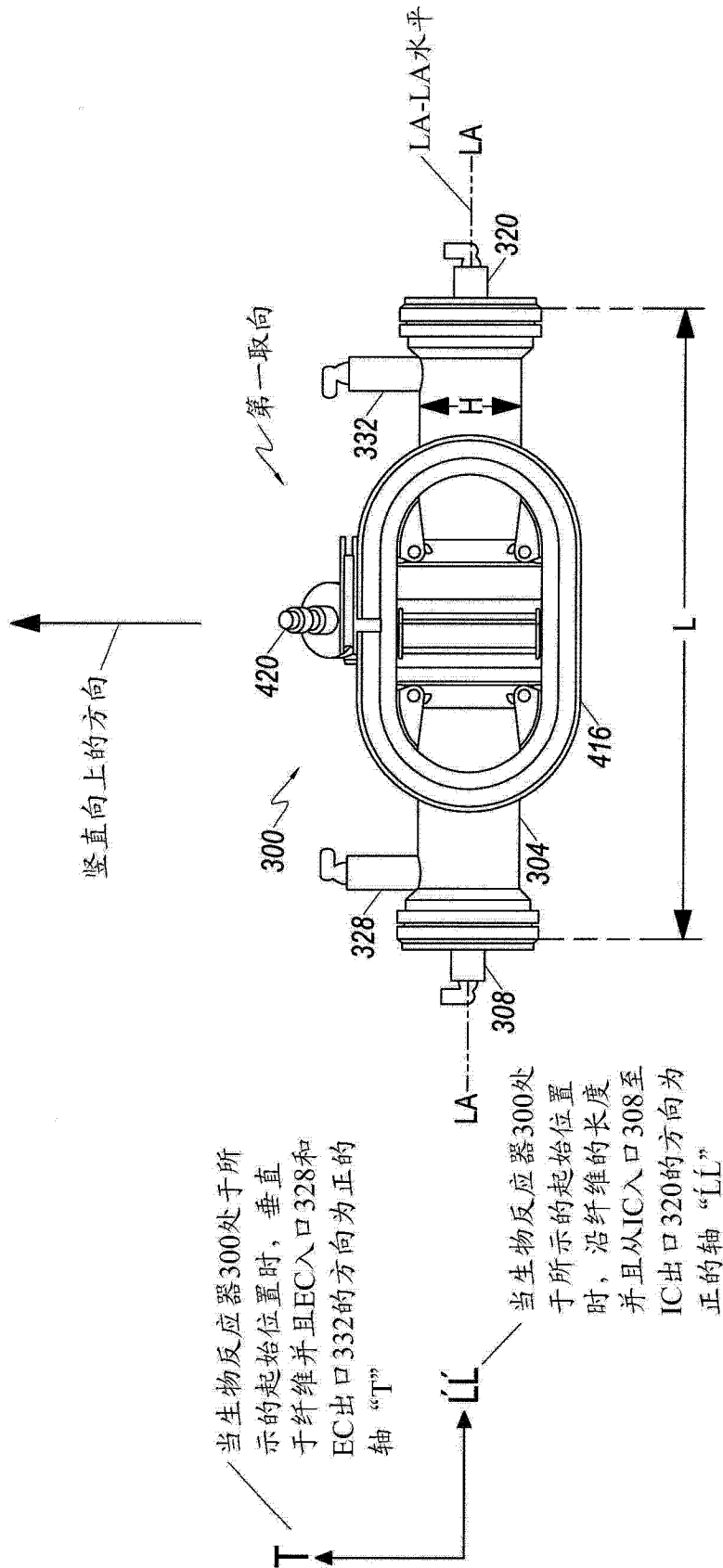


图 6

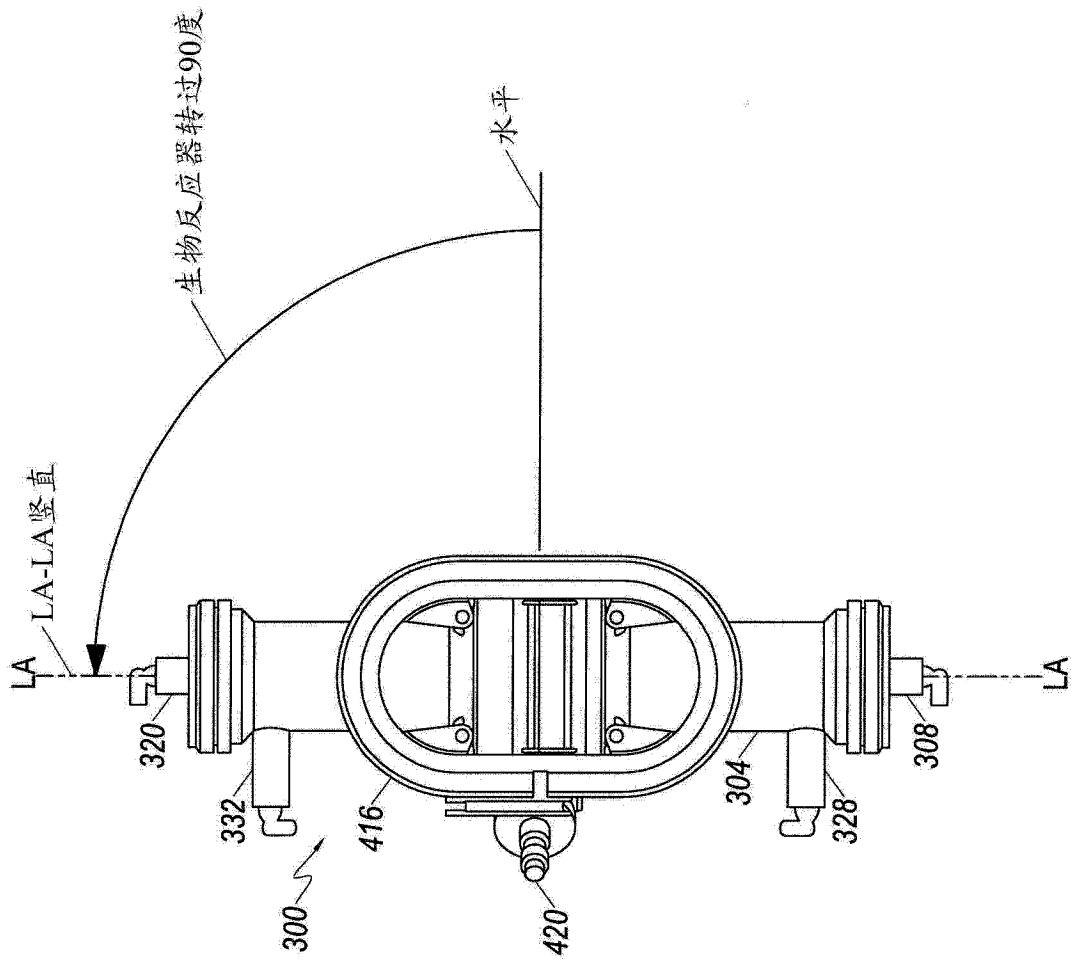


图 7

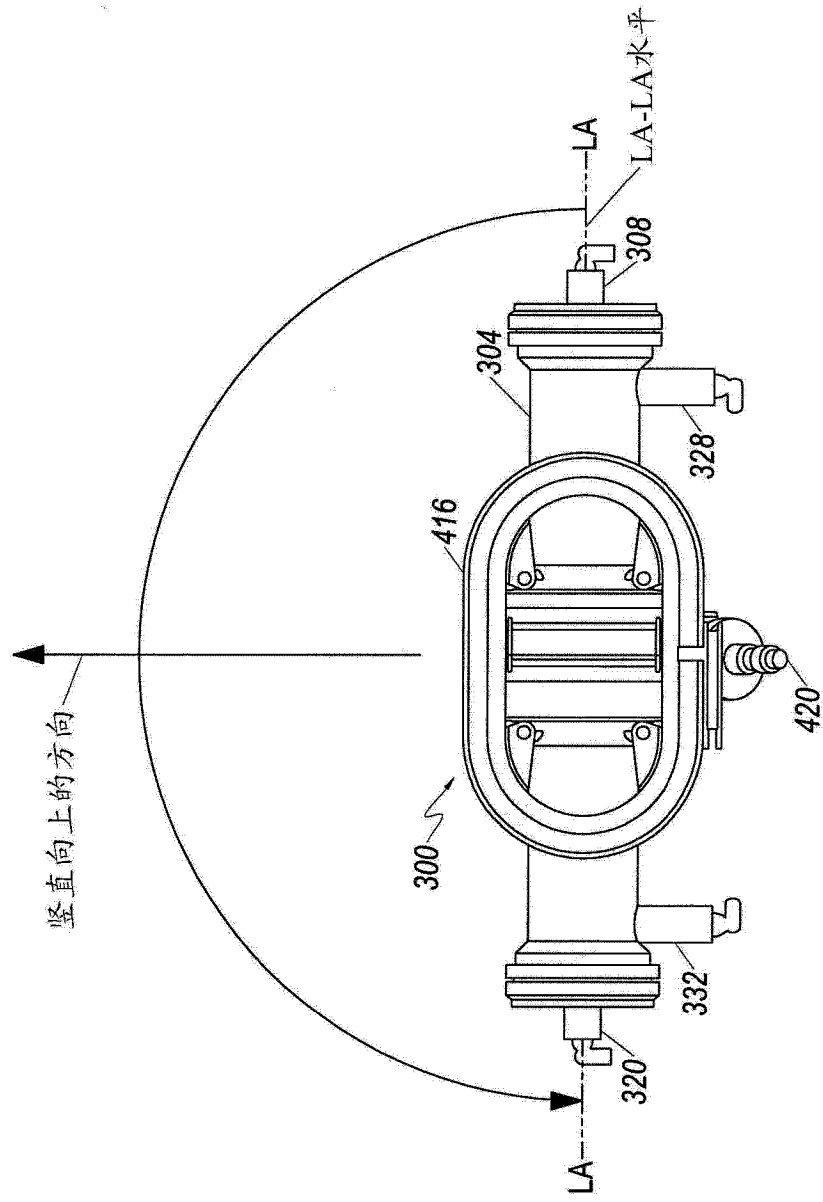


图 8

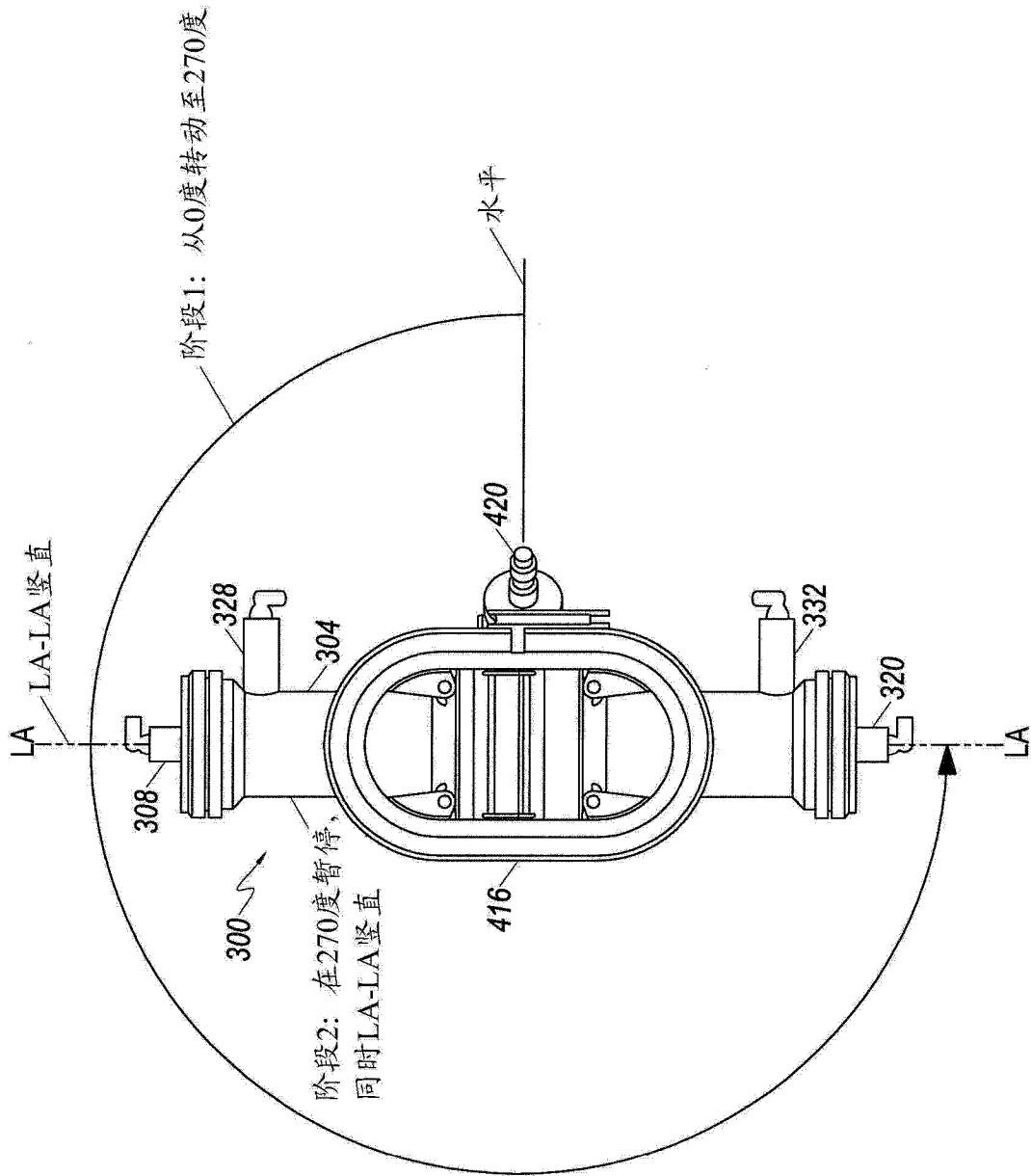


图 9

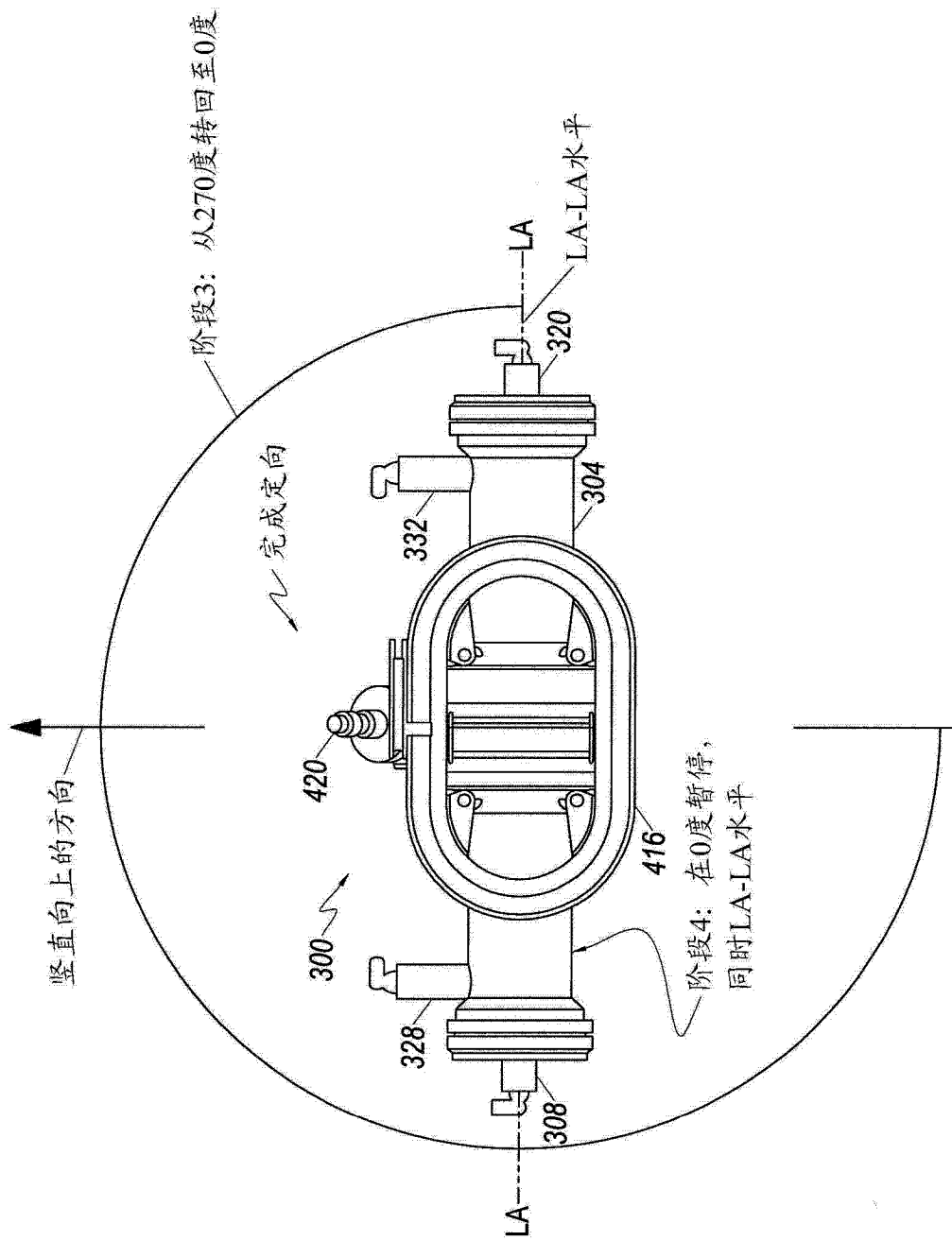


图 10

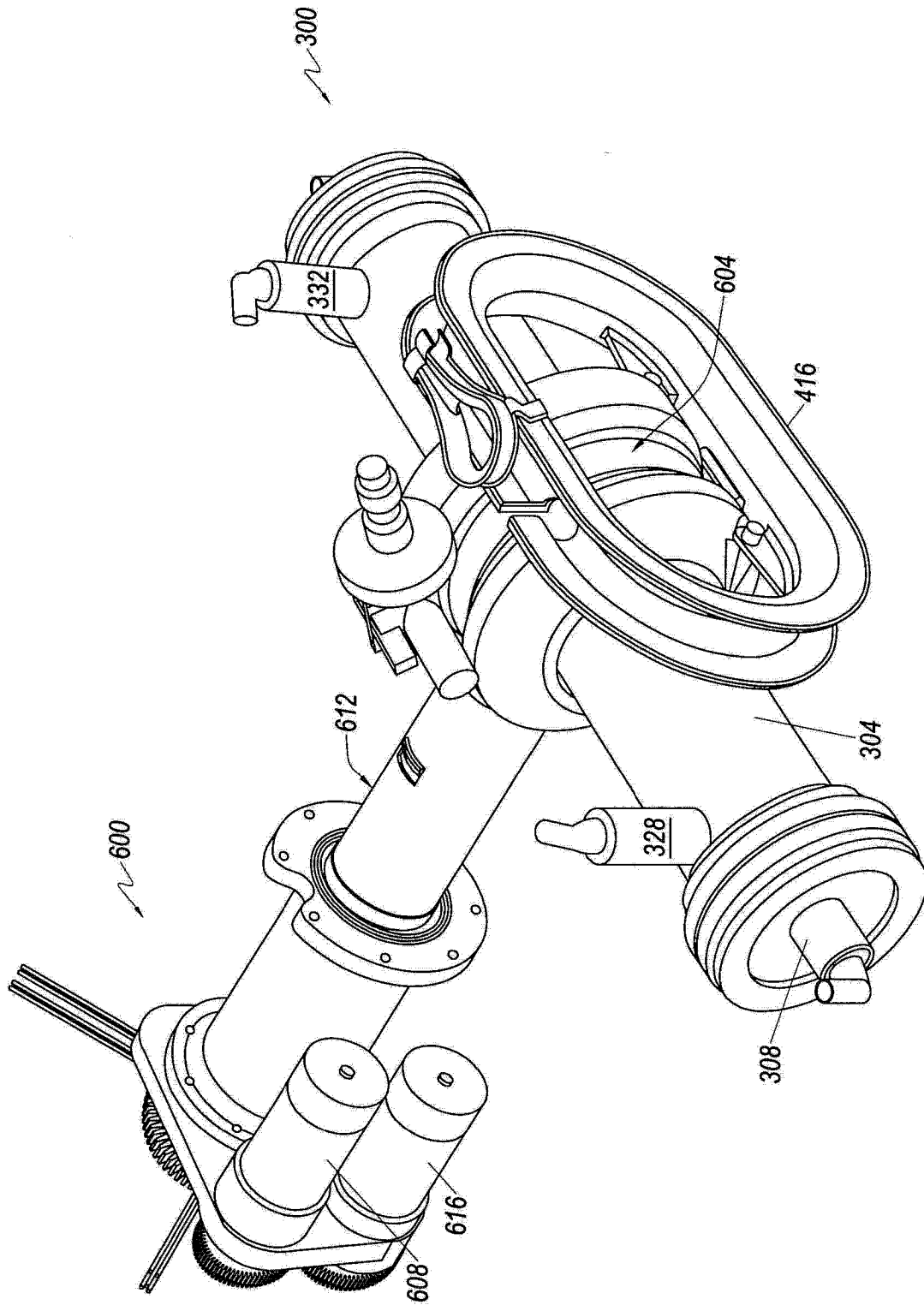


图 11



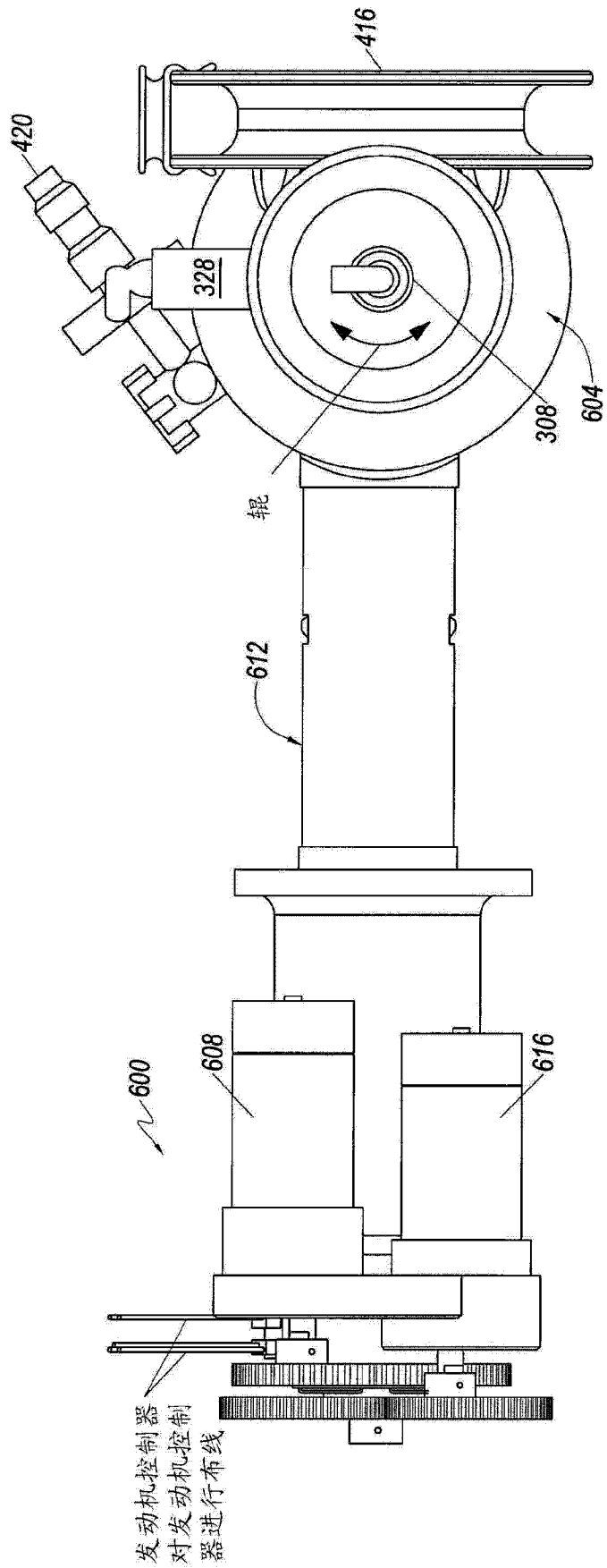


图 12

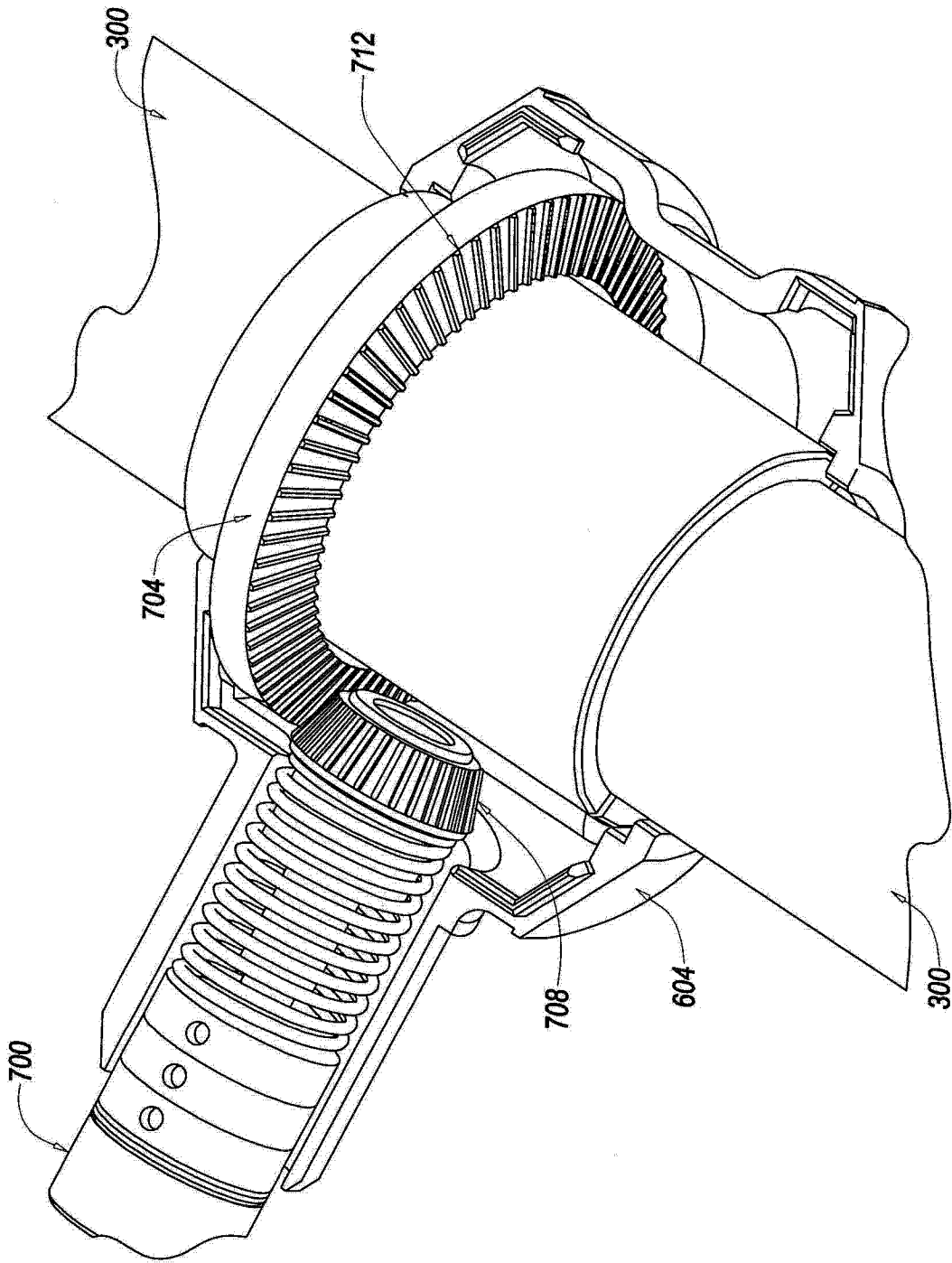


图 13

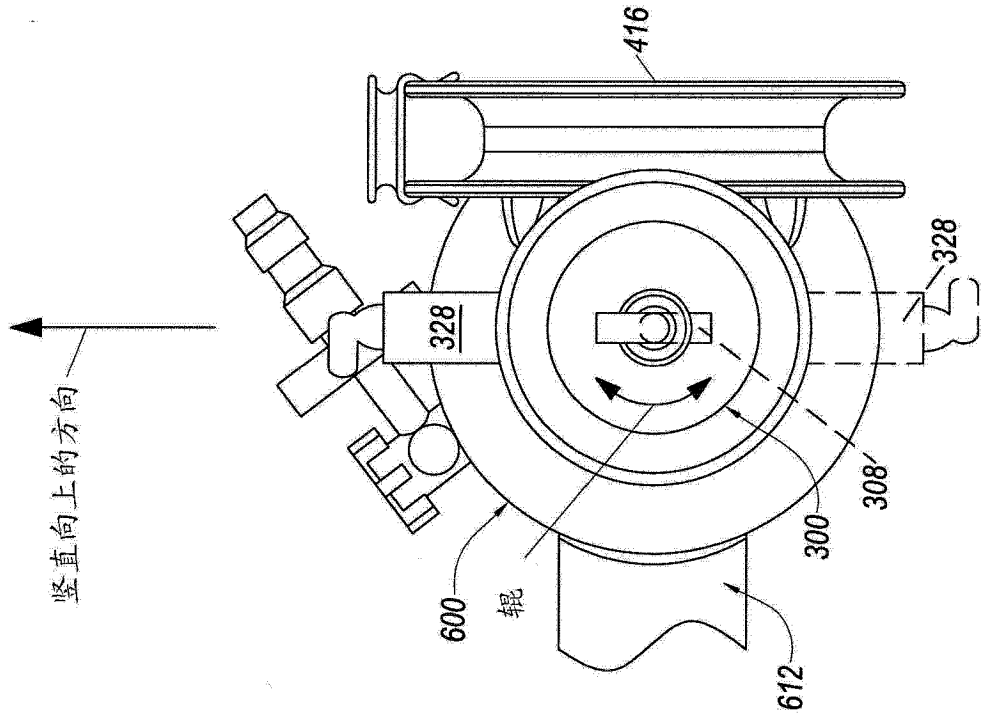


图 14

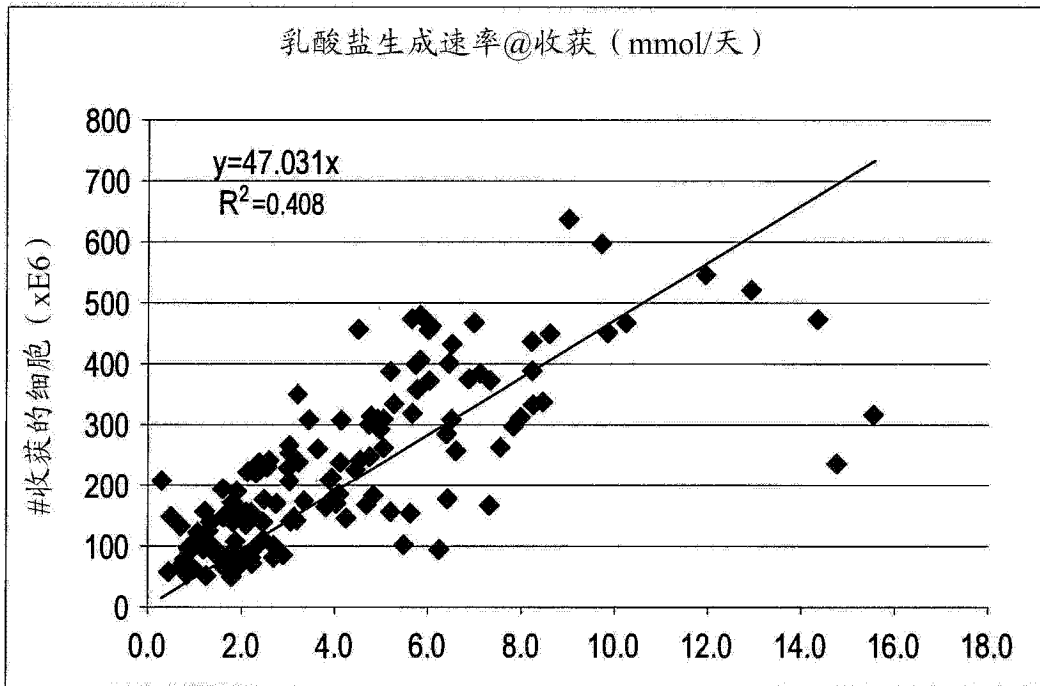


图 15

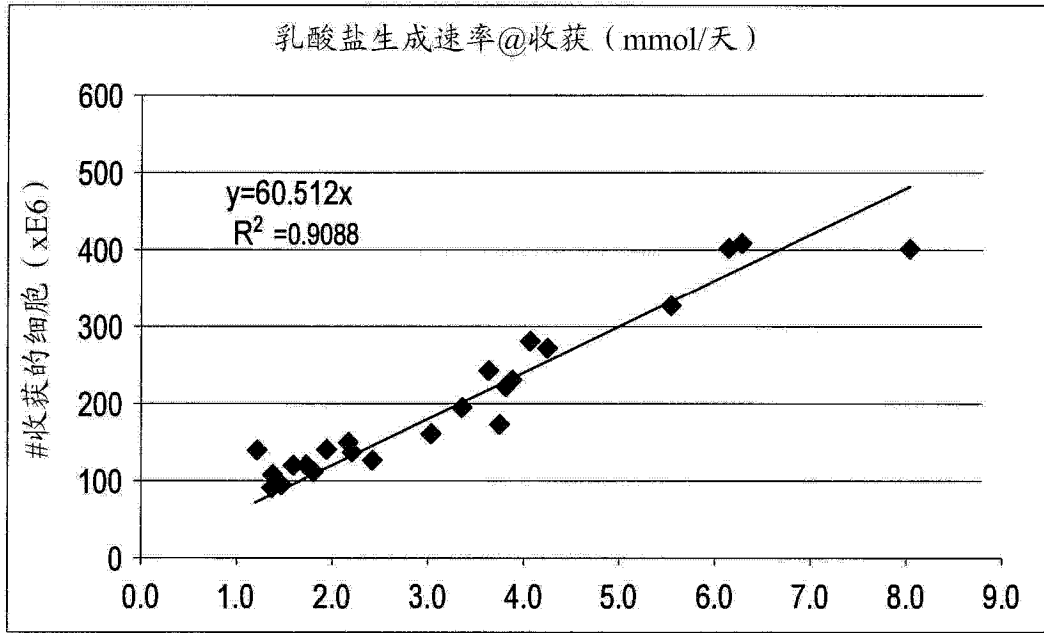


图 16

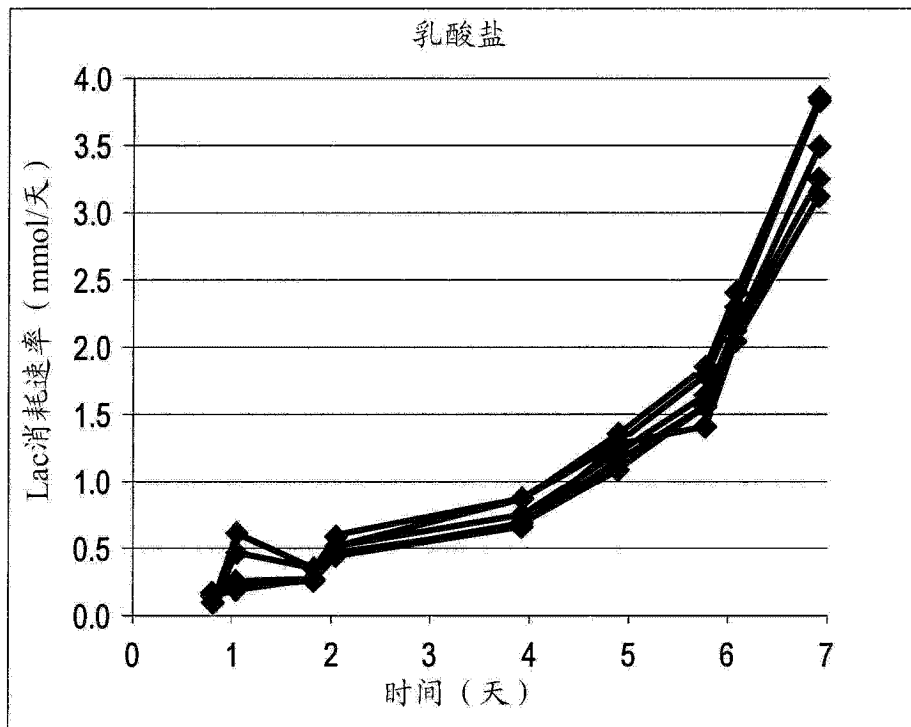


图 17

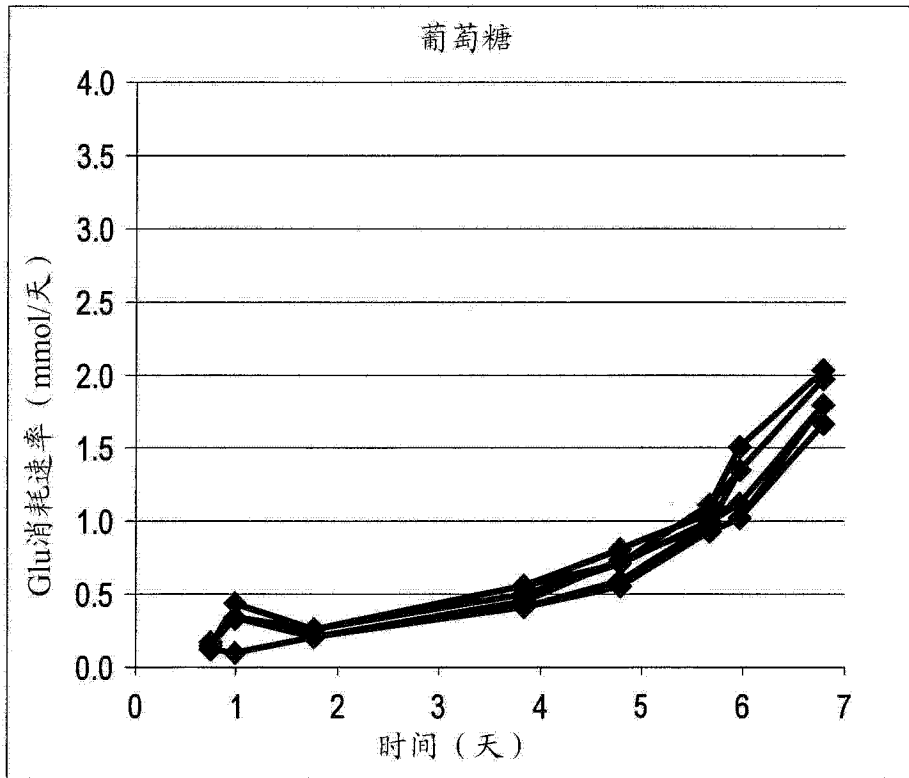


图 18

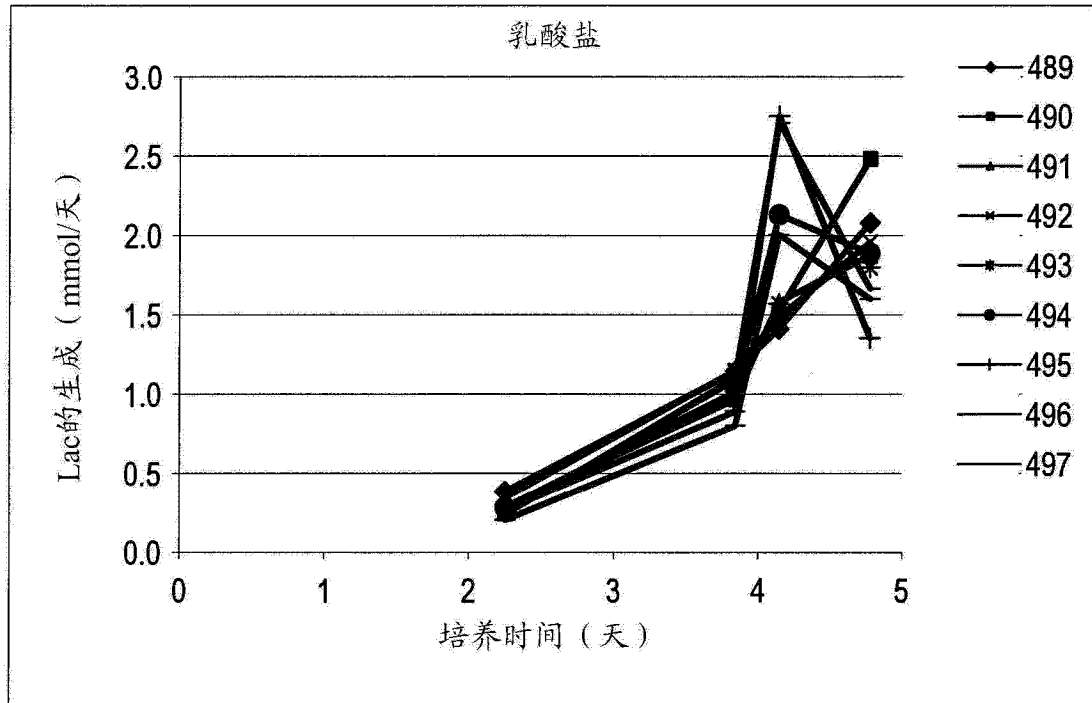


图 19

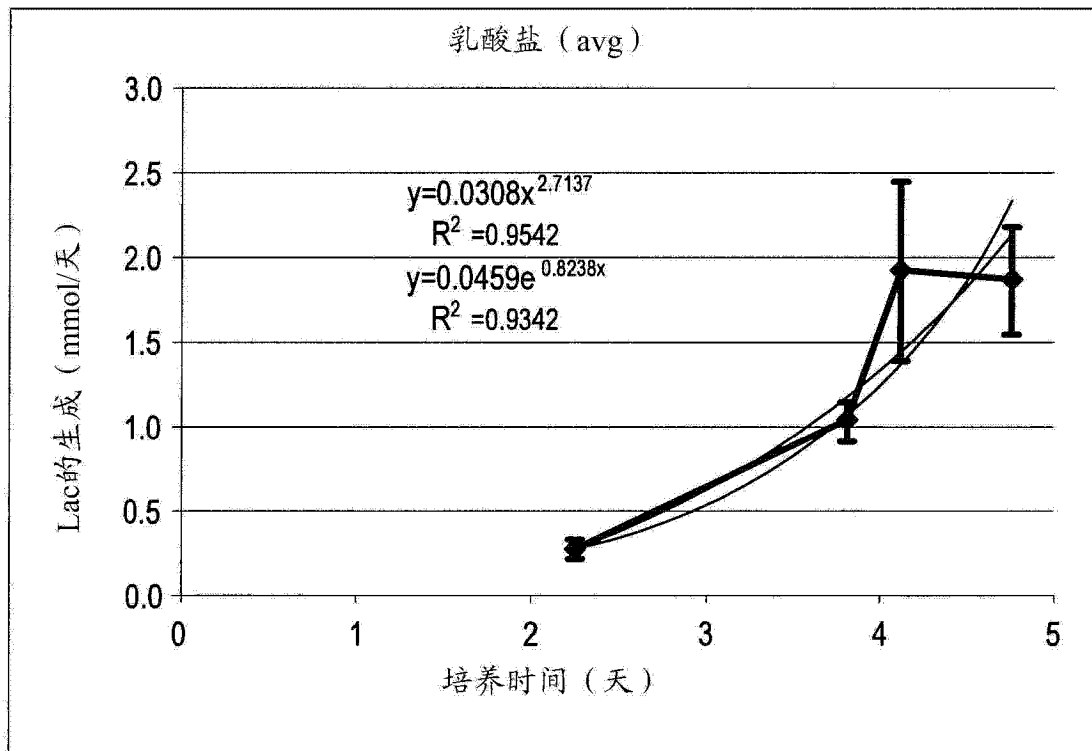


图 20

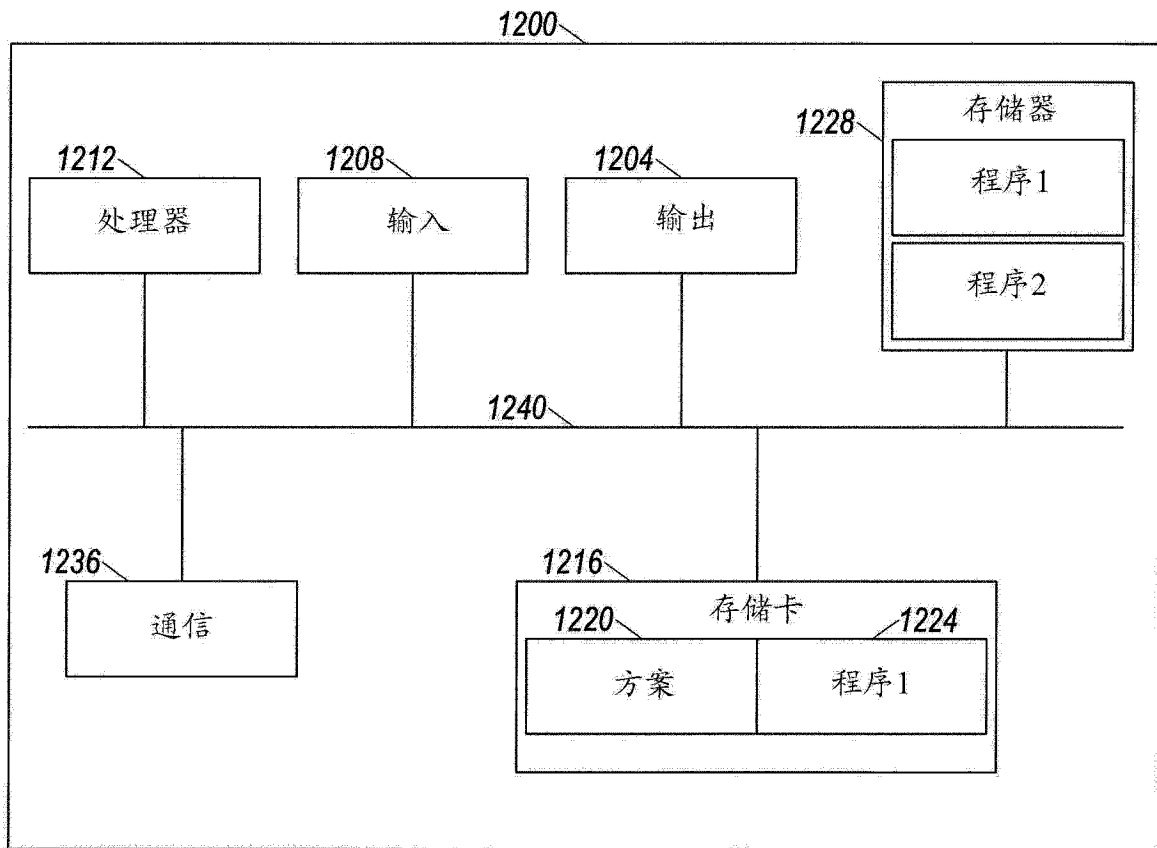


图 21

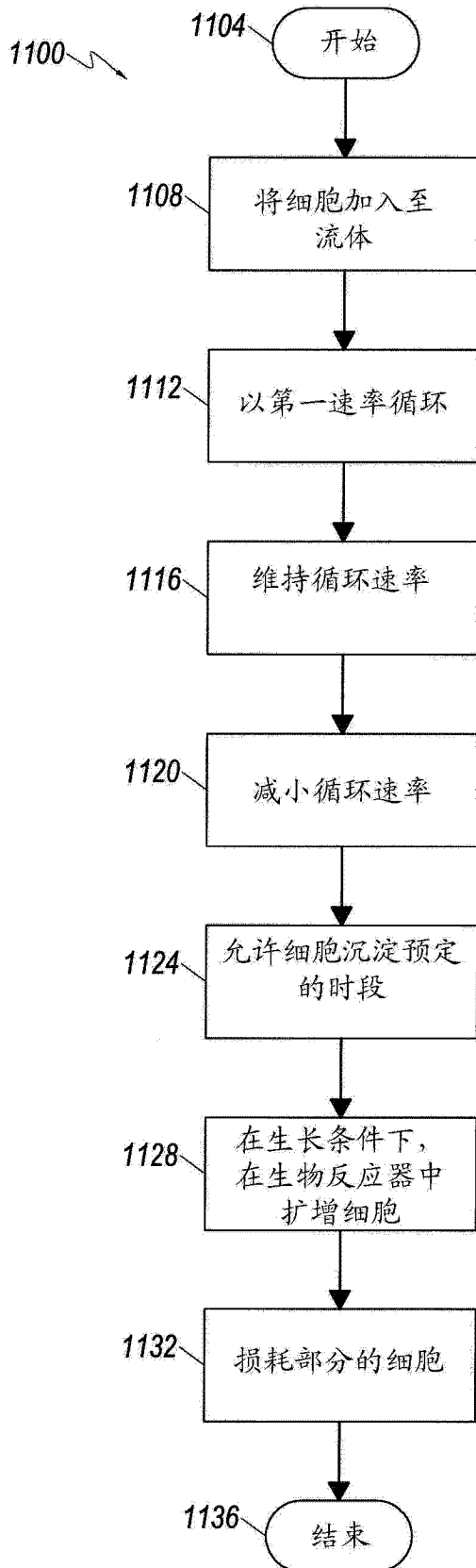


图 22