



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116368217 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 30

(21) 申请号 202180068966.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2021.10.07

专利代理师 黄登高 杨思捷

(30) 优先权数据

63/089613 2020.10.09 US

(51) Int.Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/053930 2021.10.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/076660 EN 2022.04.14

(71) 申请人 VBC控股有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·卡塔鲁齐 A·巴奇斯

A·保利蒂 M·西梅奥尼

M·莫雷蒂

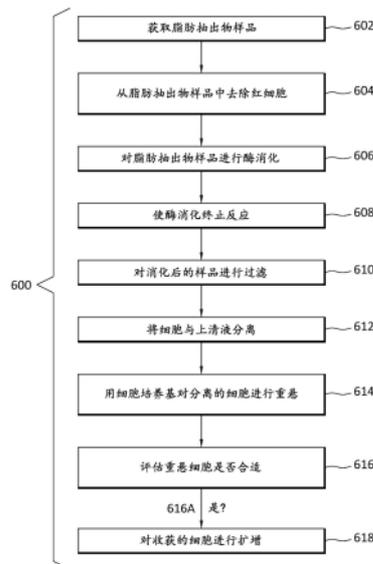
权利要求书2页 说明书9页 附图8页

(54) 发明名称

用于从脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的封闭系统式方法和可抛弃式组件套件

(57) 摘要

披露了一种用于从脂肪抽出物中分离间充质基质细胞(MSC)的封闭系统式(即密封的)方法和套件,其使用无菌互连的特定的密封可抛弃式组件和容器。所设想的方法需要脂肪抽出物作为起始材料,并且在过程结束时获得分离纯化的MSC。设想套件包含由比如改良注射器、管件、离心管、过滤单元等无菌部件构成的可抛弃式组件,这些无菌部件可以在保持无菌性的同时进行无菌连接,从而使该系统相对于外部环境保持封闭(即密封)。因此,可以避免分离过程中污染。因此,在处理结束时获得的MSC准备在后续操作(例如扩增)中进一步操作,也用于治疗目的。



1. 一种用于从获自患者的脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的封闭系统式方法,该方法包括以下步骤:

- i) 提供该患者的脂肪抽出物的样品;
  - ii) 从步骤i)的脂肪抽出物样品中去除红细胞;
  - iii) 对步骤ii)的去掉红细胞之后的脂肪抽出物样品进行酶消化;
  - iv) 使步骤iii)的脂肪抽出物样品的酶消化终止反应;
  - v) 对步骤iv)中的酶消化后的脂肪抽出物样品进行过滤;
  - vi) 将步骤v)的过滤后的脂肪抽出物样品中的间充质基质细胞与上清液分离;
  - vii) 用细胞培养基对步骤vi)的分离的间充质基质细胞进行重悬;以及
  - viii) 对步骤vii)的重悬间充质基质细胞进行评估以用于细胞扩增;
- 其中,所有步骤均在无菌条件下进行以避免与外部环境接触。

2. 如权利要求1所述的方法,进一步包括:

- ix) 在无菌条件下对步骤vii)的重悬细胞进行扩增。

3. 如权利要求2所述的方法,其中,对该重悬细胞进行扩增的步骤是在手动条件下进行的。

4. 如权利要求2所述的方法,其中,对该重悬细胞进行扩增的步骤是通过生物反应器进行的。

5. 如权利要求4所述的方法,其中,该生物反应器是自动化生物反应器。

6. 一种用于从患者的脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的可抛弃式套件,该套件包括以下部件:

注射器,该注射器被配置为从该患者获取脂肪抽出物样品,

红细胞去除组件,该红细胞去除组件被配置为在无菌条件下从该脂肪抽出物样品中去除红细胞,并且被配置为留下除去红细胞的脂肪抽出物样品;

酶消化组件,该酶消化组件被配置为在无菌条件下将酶溶液转移到该红细胞组件中;

终止反应组件,该终止反应组件被配置为在无菌条件下将终止反应溶液转移到该红细胞组件中;

过滤组件,该过滤组件被配置为在无菌条件下从该红细胞组件接收并过滤该消化后的脂肪抽出物样品,该过滤组件进一步被配置用于插入实验室用离心机以及从该实验室用离心机中取出;

废物组件,该废物组件被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收上清液;

细胞培养基组件,该细胞培养基组件被配置为在无菌条件下将细胞培养基转移到该过滤组件中以对该脂肪抽出物样品的间充质基质细胞进行重悬;以及

样品注射器,该样品注射器被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收这些重悬间充质基质细胞的样品;

其中,这些部件中的每一个都配置有一个或多个无菌流体连通装置,以在无菌条件下转移、接收或储存材料。

7. 如权利要求6所述的可抛弃式套件,其中,该套件进一步包括储存注射器,该储存注射器被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收这些重悬间充质基质细胞,该储存注射器进一步被配置为通过一个或多个无菌流体连通装置而在无菌条件下储存和转移这些重悬间

充质基质细胞。

8. 如权利要求6所述的可抛弃式套件,其中,该套件进一步包括储存组件,该储存组件被配置为通过一个或多个无菌流体连通装置而在无菌条件下从该过滤组件或该储存注射器接收并储存这些重悬间充质基质细胞。

9. 如权利要求6所述的可抛弃式套件,其中,该一个或多个无菌流体连通装置各自包括无菌可焊接管件。

10. 如权利要求9所述的可抛弃式套件,其中,该无菌可焊接管件包含热塑性聚合物。

## 用于从脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的封闭系统式方法和可抛弃式组件套件

### 技术领域

[0001] 本发明的领域涉及用于纯化细胞、更具体地用于纯化间充质基质细胞 (MSC) 的技术。

### 背景技术

[0002] 迄今为止,存在几种用于处理脂肪组织和/或脂肪抽出物以提取干细胞的系统和方法。例如,W0 2012148502 A2描述了一种用于脂肪抽出物干细胞分离的系统,其特征在于容器和真空源;US 9931445 B2描述了一种通过单个改良离心管来制备脂肪源性干细胞的系统和方法;US 9453200 B2描述了一种从脂肪组织中分离细胞的设备,该设备包括脂质分离处理器;US 7687059 B2描述了一种用处理后的脂肪抽出物细胞对患者进行治疗的封闭系统式方法。存在几种用于对管件的两个末端进行无菌连接的方法,例如在US 20110220290 A1中描述的,其中使用热驱动无菌焊接作为管件的连接方式;US 8448992 B2描述了一种用于对管件或管件组件进行密封的方法和设备;以及US 20100224329A1描述了另一种使用激光源来连接管件的两个部分的设备。然而,已知的系统未能提供或产生具有所需特性的纯化MSC。

### 发明内容

[0003] 本披露内容涉及一种用于从脂肪抽出物中分离MSC的方法和套件,其以封闭系统式方式使用多个可抛弃式组件。换言之,整个处理过程是在不允许介质或细胞与环境接触的情况下进行的。因此,可以在整个过程中保持无菌。该方法需要套件中的不同组件处于无菌流体连通(即无菌连接和无菌断开连接)。这是通过套件中的一次性使用的可抛弃式且无菌互连的部件来实现的。实施例还设计了一系列进行反应的可抛弃式组件(比如进行脂肪组织的酶解等的可抛弃式组件)以及可以连接容纳有试剂的袋或等效容器的可抛弃式组件。

[0004] 在本披露内容中,通过无菌流体连通装置来实现组件的无菌连接和断开连接。无菌流体连通装置的一个这样的示例是由聚合物材料制成的管件的焊接部分。聚合物管件部分的无菌切割和焊接是一种众所周知的方法,并且目前是需要对管件进行无菌连接的常用标准方法。与本领域已知的其他无菌流体连通装置相比,该方法由于是常用的而更适合用于连接不同的可抛弃式组件和袋。

[0005] 从脂肪抽出物/脂肪组织中分离的MSC (AD-MSC) 广泛用于细胞治疗领域,因为它们的治疗潜力已经通过多项临床试验和应用得到证实,包括肌肉骨骼损伤、心血管损伤、肺损伤、脊髓损伤、自身免疫性疾病、肝病、骨病、软骨疾病、以及COVID-19的ARDS(急性呼吸窘迫综合征)等。MSC是从脂肪抽出物中提取并纯化的,并且可以在无需进一步操作的情况下施用于患者、或在扩增阶段以便获得更多细胞之后施用于患者。MSC可以冷冻和储存,以备将来需要时施用于患者。

[0006] 本技术提供了一种封闭系统式(即密封的)方法和套件,因为分离过程由于密封而在系统不向外部环境开放的情况下进行,允许在洁净室中从脂肪组织中分离细胞以用于后续的AD-MS-C扩增,该洁净室的背景区根据针对前沿疗法药物(ATMP)的良好生产规范(GMP)的无菌生产原则分类为等级D(100,000)。所得到的捕获或纯化的细胞群具有优于先前实现的特性、生长或扩增特性。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明主题的目的是提供一种用于通过使用专用可抛弃式组件和容纳在不同袋中的试剂而从获自患者的脂肪抽出物样品中分离间充质干细胞的方法和套件。首先将脂肪抽出物收集在改良注射器中,随后将该注射器焊接到第一可抛弃式组件并由此将样品与环境隔离。在焊接之后,首先将样品中的红细胞(RBC)除去、沿专用管路转移到专用废物袋中,同时再次确保样品保持隔离。随后,将除去RBC的脂肪抽出物转移到管中,同时将容纳有酶制剂的袋焊接到同一管路,以便在管内进行脂肪抽出物的消化。通常,在37℃下进行消化,同时周期性搅动混合物。在消化之后,将容纳有终止反应剂的袋焊接到同一管路,并且将终止反应剂转移到同一管中。然后将第一可抛弃式组件焊接到不同的第二可抛弃式组件上,并且通过过滤单元对混合物进行过滤并收集在离心管中。从管上取下过滤单元,然后可以对管进行离心以便使细胞和上清液分离。然后将上清液转移到先前焊好的废物袋中,然后将容纳有重悬试剂的袋焊接到同一管路,并且将适当体积的试剂转移到管中,沉淀细胞在该管中重悬。最后,可以焊接改良注射器以取样一定体积的重悬细胞(例如,以离线方式对细胞进行计数、表征或检查),并且焊接另一改良注射器以获取分离细胞。随后可以通过沿专用管路焊接适当的容器来转移这些细胞,以例如在自动化扩增系统中对这些细胞进行接种和扩增、或者转移到其他设备中以用于其他应用。

[0009] 在一个实施例中,提供了一种用于从获自患者的脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的封闭系统式方法。该方法包括以下步骤:

[0010] i) 提供该患者的脂肪抽出物的样品;

[0011] ii) 从步骤i)的脂肪抽出物样品中去除红细胞;

[0012] iii) 对步骤ii)的去除红细胞之后的脂肪抽出物样品进行酶消化;

[0013] iv) 使步骤iii)的脂肪抽出物样品的酶消化终止反应;

[0014] v) 对步骤iv)的酶消化后的脂肪抽出物样品进行过滤;

[0015] vi) 将步骤v)的过滤后的脂肪抽出物样品中的间充质基质细胞与上清液分离;

[0016] vii) 用细胞培养基对步骤vi)的分离的间充质基质细胞进行重悬;以及

[0017] viii) 对步骤vii)的重悬间充质基质细胞进行评估以用于细胞扩增;

[0018] 其中,所有步骤均在无菌条件下进行以避免与外部环境接触。

[0019] 在附加实施例中,该方法进一步包括步骤ix):在无菌条件下对步骤vii)的重悬细胞进行扩增。在另一个实施例中,对重悬细胞进行扩增的步骤是在手动条件下进行的。在另一个实施例中,对重悬细胞进行扩增的步骤是通过生物反应器(比如自动化生物反应器)进行的。

[0020] 在又一个实施例中,提供了一种用于从患者的脂肪抽出物中分离间充质基质细胞的可抛弃式套件,该套件包括以下部件:

[0021] 注射器,该注射器被配置为从该患者获取脂肪抽出物样品,

[0022] 红细胞去除组件,该红细胞去除组件被配置为在无菌条件下从该脂肪抽出物样品中去除红细胞,并且被配置为留下除去红细胞的脂肪抽出物样品;

[0023] 酶消化组件,该酶消化组件被配置为在无菌条件下将酶溶液转移到该红细胞组件中;

[0024] 终止反应组件,该终止反应组件被配置为在无菌条件下将终止反应溶液转移到该红细胞组件中;

[0025] 过滤组件,该过滤组件被配置为在无菌条件下从该红细胞组件接收并过滤该消化后的脂肪抽出物样品,该过滤组件进一步被配置用于插入实验室用离心机以及从该实验室用离心机中取出;

[0026] 废物组件,该废物组件被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收上清液;

[0027] 细胞培养基组件,该细胞培养基组件被配置为在无菌条件下将细胞培养基转移到该过滤组件中以对该脂肪抽出物样品的间充质基质细胞进行重悬;以及

[0028] 样品注射器,该样品注射器被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收这些重悬间充质基质细胞的样品;

[0029] 其中,这些部件中的每一个都配置有一个或多个无菌流体连通装置,以在无菌条件下转移、接收或储存材料。

[0030] 在另一个实施例中,该套件进一步包括储存注射器,该储存注射器被配置为在无菌条件下从该过滤组件接收这些重悬间充质基质细胞,该储存注射器进一步被配置为通过一个或多个无菌流体连通装置而在无菌条件下储存和转移这些重悬间充质基质细胞。

[0031] 在又一个实施例中,该套件进一步包括储存组件,该储存组件被配置为通过一个或多个无菌流体连通装置而在无菌条件下从该过滤组件或该储存注射器接收并储存这些重悬间充质基质细胞。一个或多个无菌流体连通装置的示例是无菌可焊接管件,比如由热塑性聚合物形成的无菌可焊接管件。

## 附图说明

[0032] 图1是用于最初容纳由患者获取的脂肪抽出物样品的改良注射器;

[0033] 图2A、图2B和图2C是进行第一步分离的可抛弃式组件;

[0034] 图3A、图3B和图3C是进行后续分离步骤的可抛弃式组件;

[0035] 图4是用于对细胞进行取样以便进行后续离线分析的改良注射器;

[0036] 图5A是用于收集分离细胞并最终将其制备以用于后续的在扩增系统中进行接种的改良注射器。

[0037] 图5B是改良袋,在该袋中细胞可以与细胞培养基混合。

[0038] 图6是展示了根据实施例的细胞的分离步骤的流程图。

[0039] 图7是示出接种后一(1)天的MSC的显微照片。

[0040] 图8是示出接种后三(3)天的MSC的显微照片。

[0041] 图9是示出接种后六(6)天(收获日)的MSC的显微照片。

## 具体实施方式

[0042] 下面描述了一种用于通过具有无菌流体连通装置的专用可抛弃式组件而从获自

患者的脂肪抽出物样品中分离间充质干细胞(MSC)的封闭系统式(即密封的)方法和套件。换言之,专用可抛弃式组件均被配置为在无菌条件下转移、接收或储存所需材料。这是部分地通过每个组件与一个或多个无菌流体连通装置适配来实现的,这将在下文进一步详细描述。

[0043] 专用可抛弃式组件(例如袋及相关管件)通常由在室温下是柔性的热塑性聚合物形成。与此相反,组件中使用的离心管通常由在室温下是刚性的聚合物形成。根据实施例,热塑性聚合物可以由单一单体(例如乙烯或丙烯)或由共聚单体(例如同链上的乙烯己烷共聚单体)形成。热塑性聚合物的好处在于材料可以容易地切割和热焊接,以在多个组件之间设置无菌流体连通装置(例如密封连接)。此外,由于由热塑性聚合物制成的管件所具有的好处,单个组件可以进行多次切割和焊接。根据实施例,可以使用其他无菌流体连通装置,比如无菌快速连接联接器。但是,由于焊接设备的普及,对热塑性管件进行切割/焊接以对组件进行连接是首选的。

[0044] 参考图1,示出可抛弃式组件10的实施例为使用改良注射器101从患者采集脂肪抽出物样品100。注射器101与闭端管件102处于流体连通,该闭端管件附接到注射器101的筒尖103。在与注射器101相反的端部,闭端管件102与密封末端104适配以维持封闭系统。通常,将脂肪抽出物在室温下在注射器中静置15分钟、或在37°C下静置5分钟,允许红细胞105由于重力而在悬浮液的底部形成一层。

[0045] 如图1所示,注射器101还设有标签106,允许在整个分离过程中跟踪样品。标签106可以是条形码、RFID标签、或者任何其他等效装置,以在整个分离过程中跟踪样品。还可以使用更复杂的跟踪和样品验证方法。在转让给Nantcell公司的名称为“Production and Delivery Tracking and Sample Verification of Patient-Specific Therapeutics[患者特异性治疗药物的生产和交付跟踪和样品验证]”的共同未决的美国申请号16/561,773中描述了一种这样的方法,该美国申请通过援引并入本文。在转让给Nant控股有限责任公司的名称为“Sample Tracking Via Sample Tracking Chains, Systems and Methods[通过样品跟踪链、系统和方法进行样品跟踪]”的PCT公开号WO 2018/057520中描述了另一种这样的方法,该公开也通过援引并入本文。

[0046] 参考图2A,示出可抛弃式组件20的实施例为离心管200被改良为盖的特征在于两个不同的管路与离心管200的内部处于流体连通。虽然在图2A的组件20中使用离心管,但是也可以使用其他等效容器,只要容器被配置用于插入离心机以及从离心机中取出。换言之,容器的形状和尺寸应当允许其插入离心机以及从离心机中取出。

[0047] 回到图2A,在其与离心管200相反的端部,第一管路201包括0.2 $\mu$ m过滤器。第二管202与旋塞阀203适配,以选择性地与离心管200或袋205处于流体连通,但不同时与两者处于流体连通。旋塞阀203还与闭端管件适配,该闭端管件在旋塞阀203的与离心管200相反的一侧具有密封末端204。本领域技术人员还将理解,任何合适的无菌阀装置都可以用作旋塞阀的替代物。使用旋塞阀仅仅是无菌阀装置的一个示例。如图2A进一步示出的,离心管200和袋205都配备有标签206,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0048] 根据实施例,组件10的末端104和组件20的末端204例如通过切割和焊接而连接(即被放置成彼此处于流体连通)。通过转动旋塞阀203,由技术人员向注射器柱塞(未标记)施加力而使红细胞(RBC)层从注射器101转移到袋205中。在另一个实施例中,末端104和204

的特征可以在于具有无菌流体连通装置(例如无菌连接器),使得在避免与外部环境接触的同时进行流体连通。一旦RBC层被转移,技术人员就将旋塞阀203切换为使管路202打开并将通向袋205的通路关闭。一旦打开管路202,由技术人员就将除去RBC的脂肪抽出物从注射器101转移到离心管200中。如上所述,离心管200可以由袋或由其他封闭的(即密封的)容器代替。其中任何一种都将为脂肪抽出物提供临时无菌储存。

[0049] 参考图2B,示出可抛弃式组件22的实施例为袋210容纳有对脂肪抽出物中包含的脂肪组织进行消化的酶溶液。一种这样的用于消化的酶是II型胶原酶。为了与管200处于无菌流体连通,袋210与管路211适配,该管路在与袋210相反的管端具有密封末端212。为了进行酶消化,技术人员切断通向袋205的管路并且将袋205丢弃。然后将管路202(例如通过切割和焊接)连接到管路211,使得酶溶液可以在不暴露于外部环境的情况下转移到管200中。将混合物在37℃下孵育,同时周期性搅动,以促进样品中的脂肪组织的酶消化。图2B还示出,袋210设有标签213,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0050] 可以通过任何常规技术实现周期性搅动。例如,可以将袋放置在摇床或倾斜/摇动机构上以搅动样品。倾斜/摇动机构也可以是自适应的,并且对由倾斜/摇动机构上的传感器(例如显微镜、加速度计、秤等)记录的数据做出反应。在转让给VivaBioCell控股有限责任公司的名称为“Systems, Apparatus and Methods for Controlling a Movement of a Cell Culture to Optimize Cell Growth[用于控制细胞培养物的运动以优化细胞生长的系统、设备和方法]”的美国专利号10,801,005中描述了一种这样的自适应倾斜/摇动机构,该美国专利通过援引并入本文。美国专利号10,801,005描述了一种系统,该系统包括托盘,该托盘被配置为固持容纳有细胞培养物的容器,其中基于细胞培养物的相机图像来调整托盘的运动。使用适当的算法,倾斜/摇动机构的处理器可以确定酶消化的进度。基于该进度,处理器随后将基于一个或多个传感器输入来调整运动速率。倾斜/摇动机构还可以包括各种传感器以监测细胞培养物的其他参数。这些在以上引用的专利中进行了更详细的讨论。

[0051] 参考图2C,示出可抛弃式组件24的实施例为袋220容纳有阻止(即停止)酶的作用的终止反应溶液。要使用的终止反应溶液的示例包括但不限于磷酸盐缓冲盐水(PBS)和牛血清白蛋白(BSA)。袋220的特征在于管路221在与袋相反的端部具有密封末端222。技术人员然后切断管路202并将袋210丢弃。然后将管路221和202(例如通过切割和焊接)连接,使得终止反应溶液可以转移到离心管200中。图2C还示出,组件24被设置为袋220具有标签223,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。在经过足够长的时间之后,可以将袋220丢弃,如下文进一步描述的。

[0052] 参考图3A,示出可抛弃式组件30的实施例为离心管300被改良为盖的特征在于两个不同的管路与组件20的离心管200相似,但具有一些改动。该盖具有第一管路301,在其与离心管300相反的端部具有0.2 $\mu$ m过滤器。该盖还具有第二管件302,该第二管件包括旋塞阀303、从旋塞阀303延伸的闭端管路304、以及在旋塞阀303的与离心管300相反的一侧上的过滤单元305。在与旋塞阀303相反的一侧,过滤单元305还具有闭端末端306。根据实施例,闭端末端306如所有其他末端一样是密封的。图3A还示出,离心管300设有标签307,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0053] 根据分离过程,技术人员切断管路202并且将袋220丢弃。此后将组件20的管路202与组件30的末端306(例如通过切割和焊接)连接以提供无菌流体连通装置,从而允许混合

物(即细胞悬浮液)转移到管300中。在混合物从离心管200转移到离心管300时,过滤单元305对混合物进行过滤。根据实施例,材料的转移是简单地通过使用重力来实现的。然而,也可以通过没有改变封闭系统的泵来辅助材料转移。一种这样的泵是蠕动泵。在转移后,然后由技术人员将离心管200丢弃。

[0054] 在实施例中,过滤单元305包括两个不同的过滤屏障,其孔径分别为 $175\mu\text{m}$ 和 $40\mu\text{m}$ 。过滤允许脂肪组织和纤维组织(保留在过滤单元305中)与收集在管300中的其余悬浮液分离。在转移到管300后,在旋塞阀303与过滤单元305之间的区域将管路302切断并(例如通过切割和焊接)密封。然后使管300进行离心(例如以 $500\times g$ 持续5分钟),以便使基质血管组分(SVF)中包含的细胞沉淀。

[0055] 参考图3B,示出可抛弃式组件32的实施例为是空袋310的特征在于,在管路311的与袋310相反的端部,管路311具有密封末端312。组件32的管路311与组件30的管路302(例如通过切割和焊接)连接,使得离心后在管300中获得的上清液被转移到废物袋310中而被丢弃。在转移后,沉淀的细胞留在离心管300中。再一次,通过重力简单地实现转移。然而,也可以使用不影响密封的泵。图3B还示出,袋310可以设有标签313,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0056] 参考图3C,示出可抛弃式组件34的实施例为袋320容纳有用于对沉淀细胞进行重悬的细胞培养基。袋320的特征在于,在管路321的与袋320相反的端部,管路321具有密封末端322。将管路321和302(例如通过切割和焊接)连接,使得细胞培养基可以转移到管300中。在此,技术人员通过轻柔地轻弹/搅动管300,使含有细胞的沉淀物重悬。图3C还示出,袋320可以设有标签323,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0057] 参考图4,示出可抛弃式组件40的实施例为改良注射器400的特征在于闭端管件401与注射器400的筒尖402处于流体连通。在与注射器400相反的端部,闭端管件401与密封末端403适配以维持封闭系统。可以将组件40的管路401与组件30的管路304(例如通过切割和焊接)连接以提供无菌流体连通装置,以便可以用改良注射器来取样一定量的重悬细胞悬浮液。例如,样品可以可选地进行比如细胞计数、细胞密度、免疫表型分析、存活率评估等离线分析。还可以通过使用如先前所指示的一个或多个公证式或分布式分类帐技术来跟踪样品分析的结果。图4还示出,注射器400可以设有标签404,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0058] 参考图5A,示出可抛弃式组件50的实施例为改良注射器500。注射器500包括与注射器500的筒尖502处于流体连通的闭端管件501。闭端管件501还具有与筒尖502相反的密封末端503和定位在末端503与旋塞阀504之间的旋塞阀504。旋塞阀504也具有从其延伸的闭端管路505。旋塞阀504被配置为选择性地打开和关闭通向管路501和505的通路。为了从离心管300中取出重悬细胞,将管路501和304(例如通过切割和焊接)连接以提供无菌流体连通装置,以便可以将重悬细胞悬浮液转移到注射器500中。之后,技术人员将离心管300丢弃。管路501(例如通过切割和焊接)密封,使得容纳有细胞悬浮液的注射器500可以被运输、储存、或用作供后续操作的输入。图5A还示出,注射器500设有标签506,允许在细胞的分离过程中进行跟踪和认证。

[0059] 参考图5B,示出可抛弃式组件52的实施例为袋510容纳有细胞培养基,从而使用生物反应器来实现培养细胞的后续扩增。袋510的特征在于,在管路511的与袋520相反的端

部,管路511具有密封末端512。通过将管路511和505(例如通过切割和焊接)连接来实现重悬细胞的转移。一旦连接,转动旋塞阀504以打开通向管件505的通路,并且技术人员按压注射器500的柱塞(未标记)以将细胞悬浮液转移到袋510中并与细胞培养基混合。在实施例中,管路511可以(例如通过切割和焊接)而密封。现在容纳有重悬细胞的袋510现在可以(例如通过使用管路511以及通过切割和焊接)连接到使得用于(自动或手动)细胞扩增的系统可以将袋内容物导入的任何其他管件上。

[0060] 一种这样的用于自动细胞扩增的系统是位于意大利乌迪内的VivaBioCell股份有限公司出售的Nant XL自动化生物反应器系统。可以将袋510放置在Nant XL生物反应器中进行扩增。在替代方案中,可以使用注射器500将重悬细胞直接转移到Nant XL细胞培养瓶中。袋510和Nant XL细胞培养瓶则均设有通向生物反应器的多个不同部件的无菌流体连通装置。之后,使细胞扩增进行足够长的时间,直到满足成功扩增所需的参数。

[0061] 在也转让给VivaBioCell股份有限公司的名称为“Automated Cell Culturing and Harvesting Device[自动化细胞培养和收获设备]”的美国公开号US 2017/0037357中,描述了另一种这样的用于自动细胞扩增的系统,该公开通过援引并入本文。通过使用注射器500,可以将重悬细胞直接转移到US 2017/0037357中描述的多层细胞培养室中。之后,使细胞扩增进行足够长的时间,直到满足成功扩增所需的参数。

[0062] 参考图6,提供了描述本发明的实施例的封闭系统式方法600的一般步骤的流程图。在一个实施例中,首先使用如上文所述的套件中的注射器100从患者获取脂肪抽出物的样品(步骤602)。步骤602还包括将闭端管件102密封以形成末端104,以维持如上文所讨论的封闭系统。

[0063] 之后,该方法则需要红细胞(RBC)沉降到注射器100的底部时从脂肪抽出物样品中除去RBC(步骤604)。在一个实施例中,使用套件的彼此处于无菌流体连通的离心管200和袋205来实现步骤604。在将RBC从注射器101转移到袋205中后,在致动旋塞阀203以允许打开通向离心管200的通路后将除去RBC的脂肪抽出物从注射器101转移到离心管200中。由技术人员将袋205丢弃。

[0064] 如图6进一步所示,使除去RBC的脂肪抽出物进行酶消化(步骤606)。在一个实施例中,使用如上文所讨论的套件的容纳有酶溶液的离心管200和袋210来实现步骤606。通过将离心管200和袋210放置成彼此处于无菌流体连通来实现酶溶液(未标记)的转移。这可以通过将管路202和管路211切割并焊接在一起以使酶溶液可以转移到管200中来实现。一旦酶溶液已经转移,技术人员可以将袋210切割并丢弃。

[0065] 在经过足够长的时间之后,必须使离心管200中的酶反应终止(即停止)(步骤608)。在一个实施例中,使用套件的容纳有终止反应溶液的离心管200和袋220来实现步骤608。通过将离心管200和袋220放置成彼此处于无菌流体连通来实现终止反应溶液的转移。这可以通过将管路202和管路221切割并焊接在一起以使终止反应溶液可以转移到管200中来实现。在足够长的时间之后,技术人员可以将袋220切割并丢弃。

[0066] 一旦酶反应终止,就对消化后的脂肪抽出物样品进行过滤(步骤610)。在一个实施例中,使用套件的离心管200和离心管300来实现步骤610。如上文所述,离心管300被改良成盖的特征在于两个不同的管路与离心管200相似、但是具有一些附加改动。离心管300包括具有闭端末端306的过滤单元305。根据实施例,闭端末端306如所有其他末端一样是密封

的。通过将离心管200和300放置成彼此处于无菌流体连通来实现混合物的转移和过滤。这可以通过将管路202和末端306切割并焊接在一起以进行转移和过滤来实现。一旦混合物被过滤,技术人员就可以切割并丢弃离心管200。

[0067] 一旦过滤完成,在离心管300中MSC与细胞基质分离(步骤612)。在一个实施例中,这是通过首先从组件中取下过滤单元305来实现的。技术人员切割并密封位于旋塞阀303与过滤单元305之间的管路302。然后可以丢弃过滤单元305。然后将离心管300和旋塞阀303放置在常规实验室用离心机中,使组件旋转以形成细胞的沉淀物和细胞基质的上清液。步骤612还包括从管300中移除上清液。这是通过将套件的空废物袋310放置成与管300处于无菌流体连通来实现的。然后技术人员将废物袋310的管路311密封于与旋塞阀303连接的剩余管路302。在将上清液转移到废物袋310中后,可以由技术人员将废物袋310丢弃,从而将沉淀细胞留在离心管300中。还考虑,可以经由机械技术(如于2019年1月10日提交的名称为“Microfluidic Cellular Device and Methods of Use Thereof[微流体细胞设备及其使用方法]”的W0 2019/140104中所述)来分离细胞。

[0068] 一旦完成沉淀物的分离,就用新鲜细胞培养基对细胞进行重悬(步骤614)。这通过以下来实现:切割管路321和302并且彼此密封,从而提供无菌流体连通装置,使得细胞培养基(未标记)可以从套件的袋320转移到管300中。由技术人员通过轻柔地轻弹/搅动管300而使含有细胞的沉淀物重悬。一旦完成转移,就可以从组件上切下并丢弃细胞基质袋310,同时管路可以密封直到进一步使用。

[0069] 一旦细胞被重悬,就取重悬后的样品来评估细胞是否有条件进一步扩增(步骤616)。这是通过使用套件中的改良注射器400来对重悬细胞取样来实现的。注射器400的闭端管件401密封并且放置成与来自离心管300的管路304处于无菌流体连通。

[0070] 如果细胞有条件进行扩增,则取出管件300中的剩余细胞(步骤616A)以在生物反应器(自动或手动的)中进一步扩增(步骤618),如上文所讨论的。可以使用套件的改良注射器500将剩余细胞从管件300中取出。注射器500具有闭端管路501,该闭端管路可以被切割并与管300的管路304密封,由此使两个组件之间处于无菌流体连通。一旦细胞被转移,就可以切断管路304并且将管300丢弃。管路501(例如通过切割和焊接)密封,使得注射器500可以被运输、储存或用作供后续操作的输入。

[0071] 如果需要,储存在注射器500中的细胞可以进一步转移到套件的袋510中,该袋容纳有细胞培养基,允许后续使用生物反应器对培养细胞进行扩增(步骤618)。

[0072] 实例

[0073] 以下非限制性示例说明了从患者的脂肪抽出物中分离MSC的使用实施例。

[0074] 实例1

[0075] 使用上述的无菌可抛弃式组件并按照图6所述的方法从新鲜脂肪组织中分离SVF细胞。通过使用可焊接管件作为无菌流体连通装置来维持无菌条件。根据实施例的方法的需求来切割和焊接每个组件的管件。在最终分离过程结束时,对细胞进行计数,然后在手动条件下进行扩增。然后通过荧光激活细胞分选(FACS)分析来表征扩增细胞。

[0076] 用该系统进行4次分离后,对于不同患者的每次分离,从仅10ml脂肪组织开始即可获得平均1510万个细胞(SVF组分;n=4)。SVF组分在 $\alpha$ MEM 4F培养基(含有10% FBS、1%青霉素/链霉素以及四种生长因子)中培养。 $\alpha$ MEM、FBS和青霉素/链霉素是从Gibco获得的,四

种生长因子是从Sigma Aldrich获得的。平均培养6天后(在新瓶中无传代),获得平均1200万个细胞(瓶T175;n=4)。还使用FACS分析(平均值:n=4)来表征MSC标记物和存活率,其与脂肪组织的典型培养物一致。结果在下面的表1中示出。

[0077] 表1

|        | 存活率    | CD45  | CD14  | CD31  | HLA-DR | CD90   | CD166  | CD73   | CD105  |
|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| [0078] | 94.70% | 0.89% | 1.79% | 3.22% | 0.09%  | 97.28% | 77.06% | 99.67% | 89.19% |

[0079] 基于观察,在手动条件下培养和扩增的细胞呈现出MSC类型的细胞的正确形态。在图7-9的显微照片中可以看到分离和扩增的MSC在不同阶段的细胞形态。图7示出接种后一(1)天的MSC。图8示出接种后三(3)天的MSC。图9示出接种后六(6)天的MSC,在此时收获细胞。

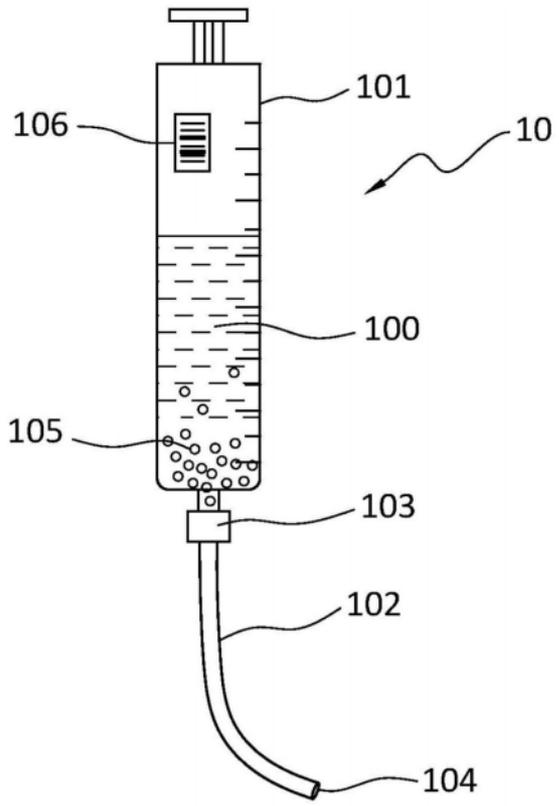


图 1

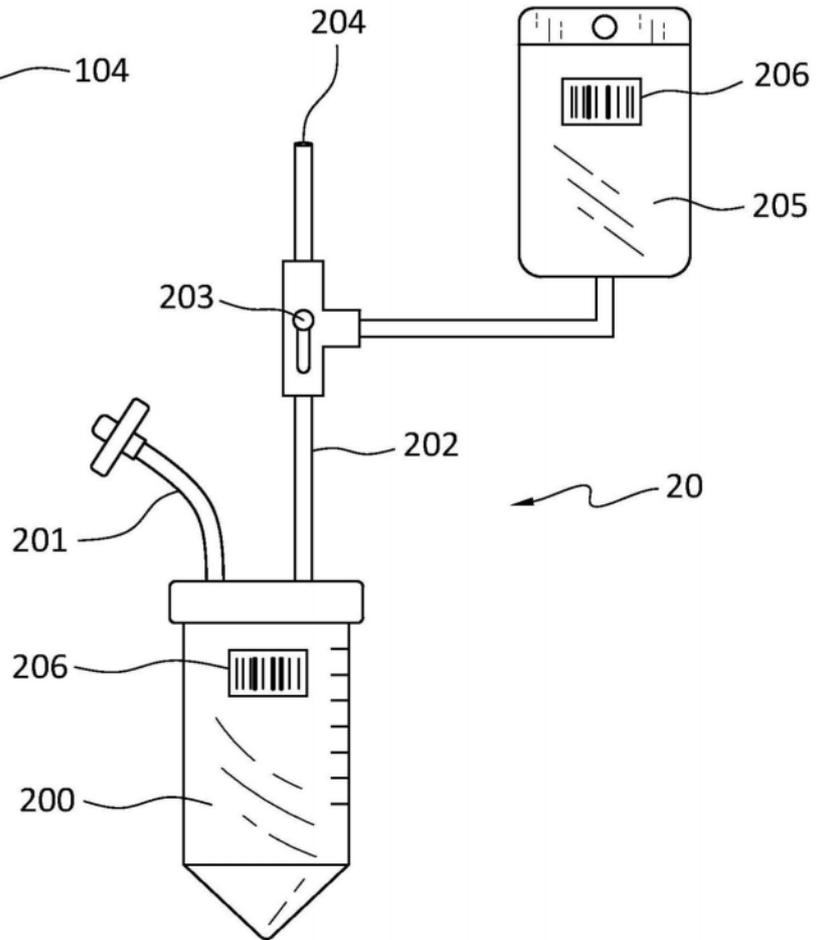


图 2A

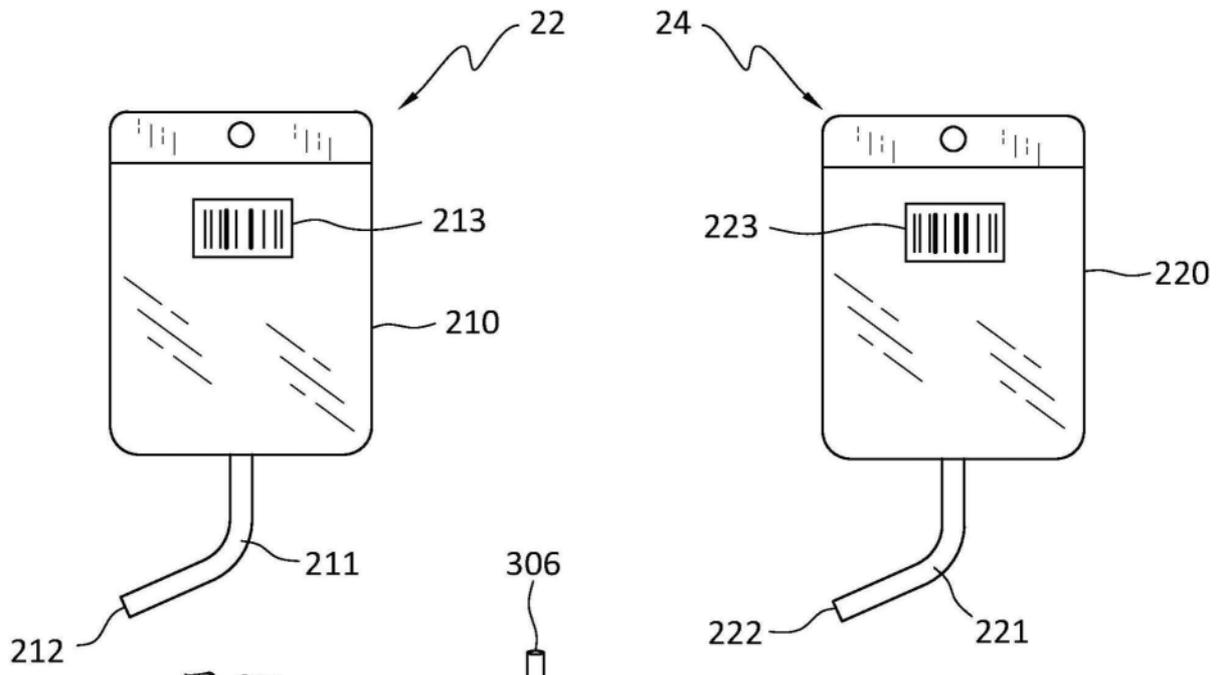


图 2B

图 2C

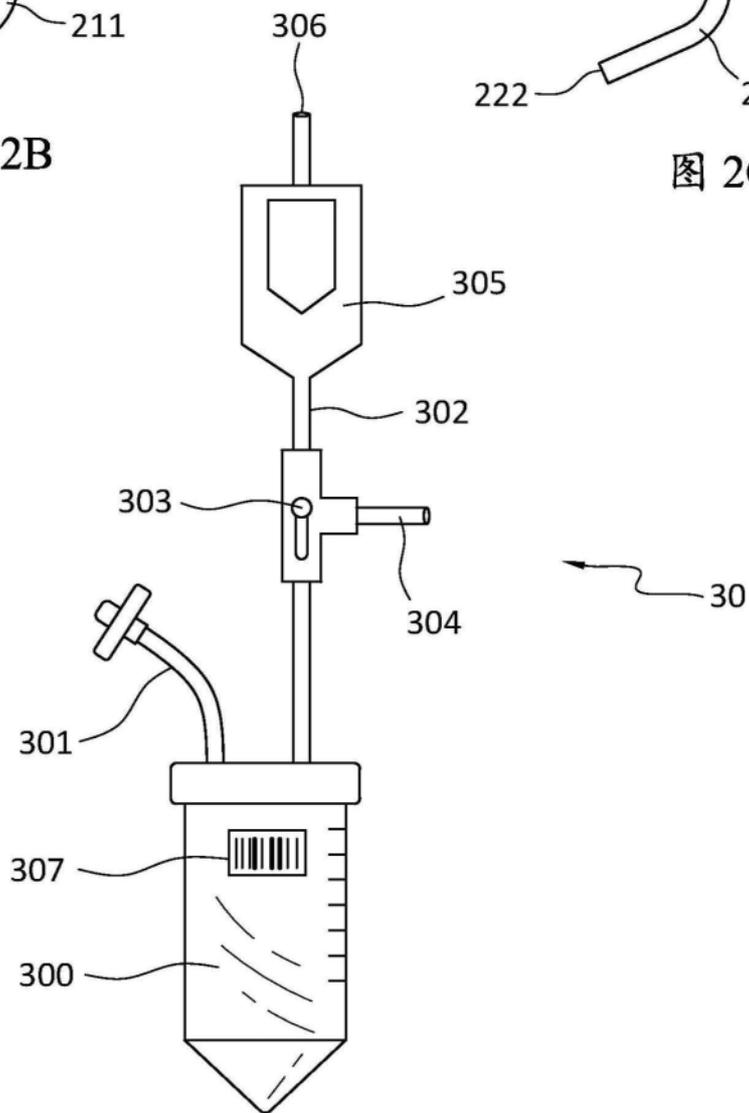


图 3A

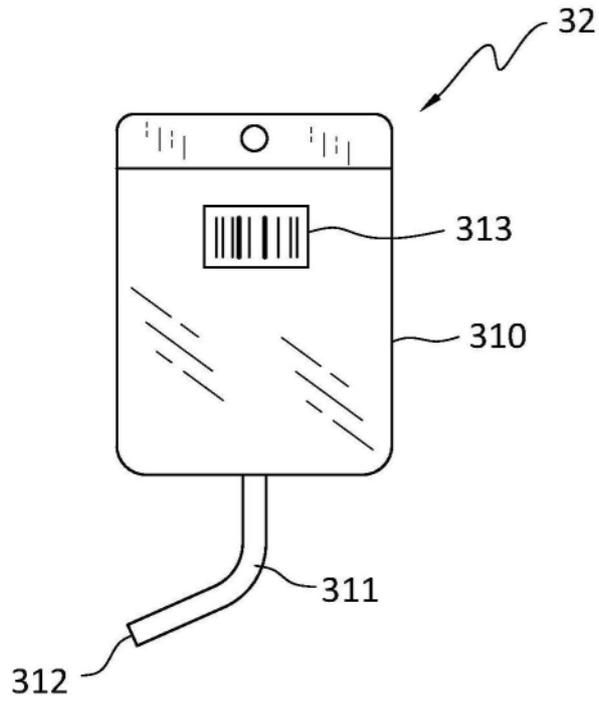


图3B

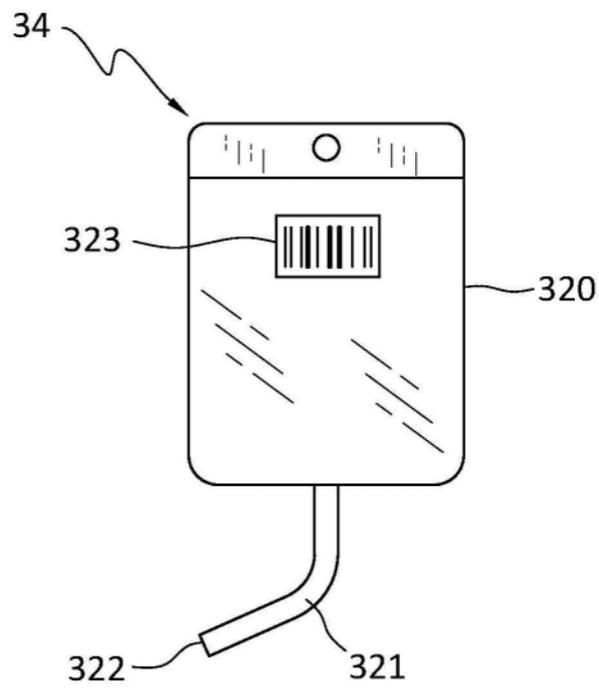


图3C

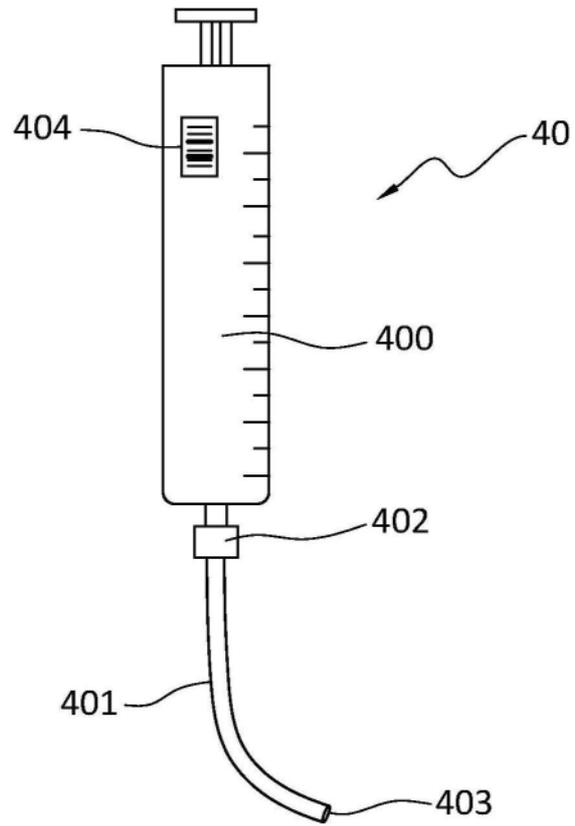


图4

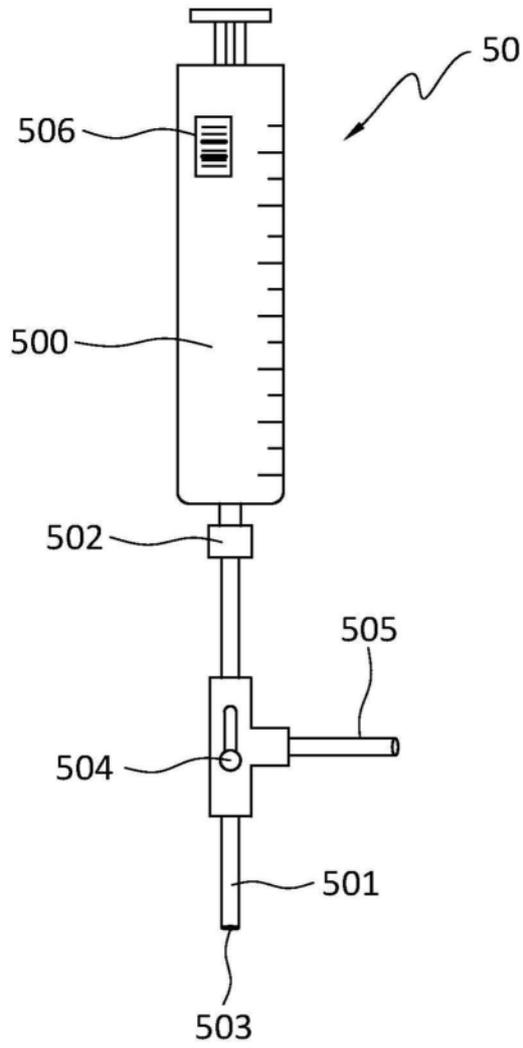


图5A

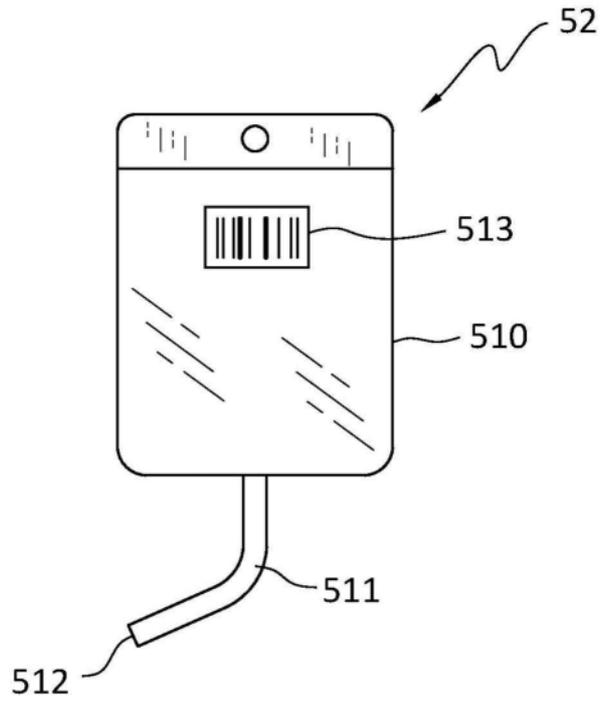


图5B

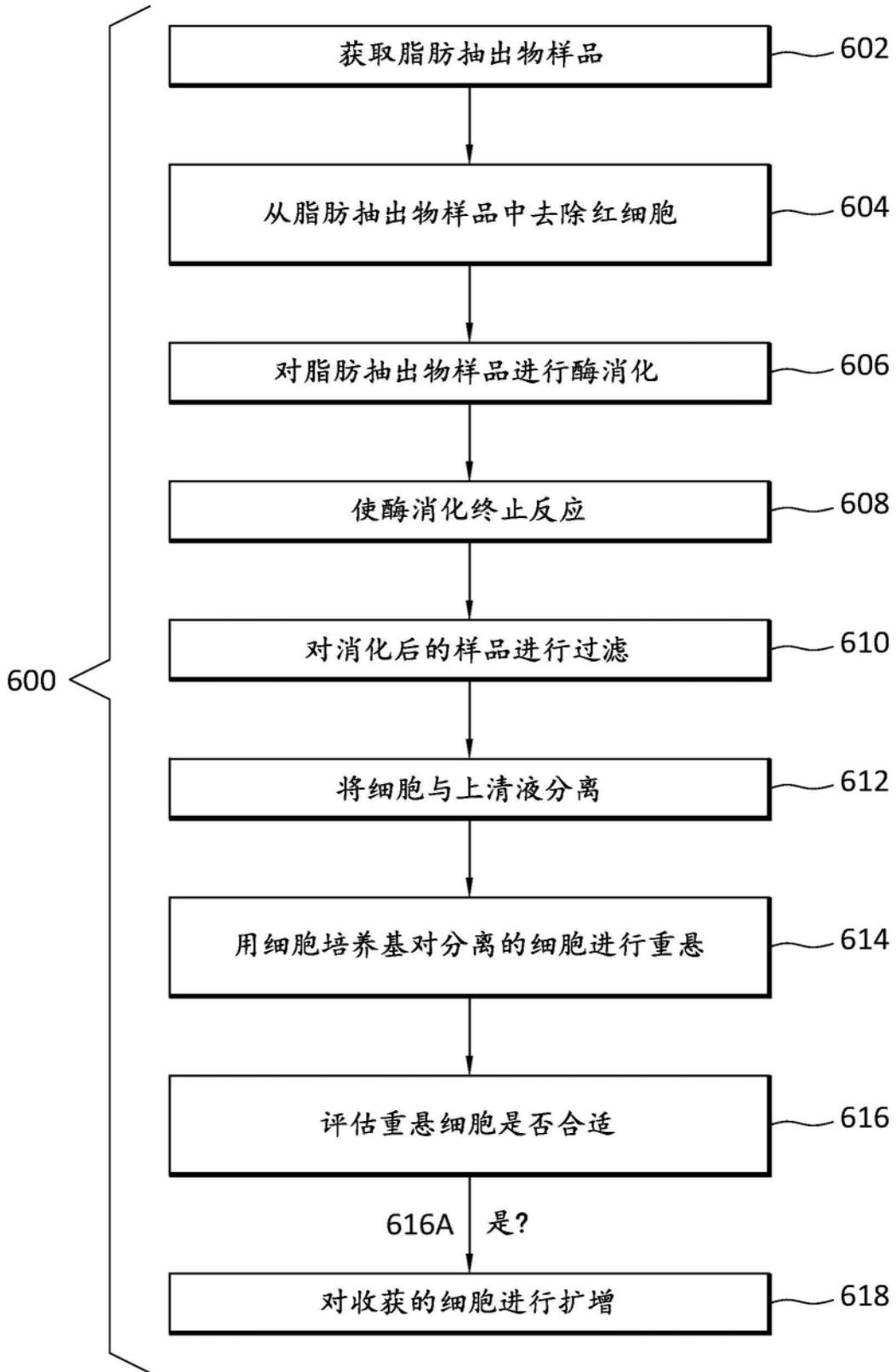


图6

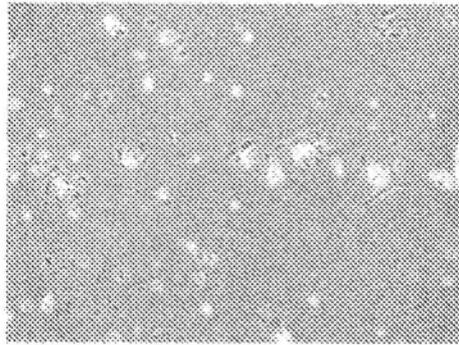


图7

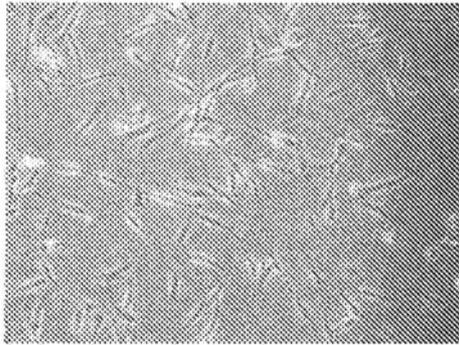


图8

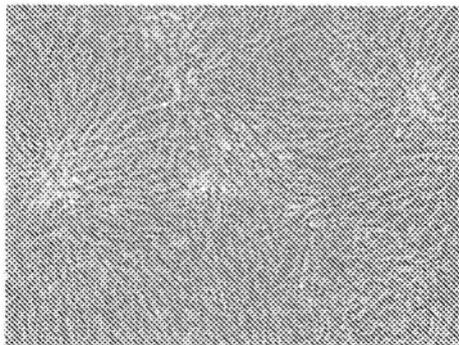


图9