



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 10355559 B

(45) 授权公告日 2015.04.22

(21) 申请号 201310484895.6

C12N 5/0789(2010.01)

(22) 申请日 2007.07.06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

11/664,212 2007.03.28 US

CN 1249000 A, 2000.03.29, 全文.

US 2002/0051762 A1, 2002.05.02, 全文.

US 2002/0197717 A1, 2002.12.26, 全文.

(62) 分案原申请数据

200780053147.5 2007.07.06

CN 1658941 A, 2005.08.24, 全文.

US 2007/0062885 A1, 2007.03.22, 全文.

(73) 专利权人 热起源公司

地址 美国加利福尼亚州

Kazuo Tsubaki et al. Concentration of Progenitor Cells Collected from Bone Marrow Fluid Using a Continuous Flow Cell Separator. 《Therapeutic Apheresis》. 2001, 第5卷(第1期), 全文.

(72) 发明人 P.H. 科埃略 B.A. 贝克

J.R. 查普曼 李俊之

R.S. 蔡尔德斯 P. 埃曼努埃尔

Figdor et al. Concentration of Hematopoietic Progenitor Cells from Human Bone Marrow by a New Type of Blood Component Separator. 《Vox Sang》. 1985, 第49卷全文.

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李慧惠 权陆军

审查员 王斌

(51) Int. Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/36(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

C12N 5/0775(2010.01)

权利要求书2页 说明书24页 附图20页

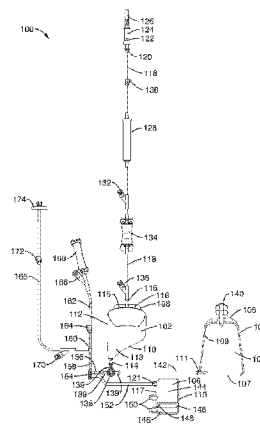
(54) 发明名称

从骨髓或脐带血回收的干细胞和祖细胞组合物;用于制备其的系统和方法

(57) 摘要

本发明包括从骨髓或脐带血回收的干细胞和祖细胞组合物,其包含大多数活的 CD34+ 细胞以及基本上消耗的位于原始样品中的红细胞,无需任何异生素添加剂以帮助细胞分离。本发明还包括用于制备组合物的系统和方法。该系统包括袋组和处理设备,所述处理设备利用光学传感器、微控制器、伺服电动机、加速计、测压仪和电池。该系统和方法利用离心,以使细胞分为数层并且随后将干细胞分离且转移到干细胞袋内。处理设备的微控制器接受来自设备的加速计、测压仪和光学传感器的输入,以指导袋组中的计量阀打开且关闭,以允许转移尽可能多的干细胞与尽可能少的红细胞。

CN 10355559 B



1. 一种用于从骨髓或脐带血制备干细胞产物的系统,其包括:
 - a. 袋组,包括容纳收集的骨髓或脐带血的处理袋、红细胞浓缩袋、干细胞袋和计量阀,其中所述计量阀与所述处理袋、所述红细胞浓缩袋和所述干细胞袋连接;
 - b. 处理设备,所述袋组安装到其内,并且包括微控制器、电动机、光学传感器、LED、测压仪和加速计,
 - c. 所述微控制器可操作地偶联至所述电动机、所述光学传感器、所述 LED、所述测压仪和所述加速计;
 - d. 当所述袋组包含在所述处理设备中时,所述电动机与所述计量阀可操作地偶联;
 - e. 其中所述微控制器被设定为接受来自所述加速计的输入,其中在所述处理设备中所述计量阀关闭,所述袋组以第一相对离心力被离心,所述第一相对离心力足够使所述处理袋中的骨髓或脐带血分层为包含红细胞的层,包含白细胞 / 干细胞和祖细胞的层,以及包含血浆的层 ;和
 - f. 其中所述微控制器被设定为在骨髓或脐带血在所述处理袋中被分层后接受来自所述加速计的输入,其中在所述处理设备中所述袋组以第二相对离心力被离心,所述第二相对离心力低于所述第一相对离心力,然后控制所述电动机,促使所述计量阀打开所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的流体通道,以允许相当一部分所述红细胞从所述处理袋转移至所述红细胞浓缩袋,然后响应所述光学传感器,控制所述电动机,促使所述计量阀关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道,所述光学传感器检测在所述处理袋的顶部边缘和底部出口之间水平通过所述处理袋的来自所述 LED 的透光率的一组量 ;和
 - g. 其中所述微控制器被设定为在促使所述计量阀关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道后接受来自所述加速计的输入,其中在所述处理设备中所述袋组以第三相对离心力被离心,然后控制所述电动机,促使所述计量阀接连多次打开和关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道以相继重复打开和关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道接连重复的、不连续时间量,以允许另一部分所述红细胞从所述处理袋转移至所述红细胞浓缩袋,然后响应所述光学传感器,控制所述电动机,促使所述计量阀关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道,所述光学传感器检测在所述处理袋的所述顶部边缘和所述底部出口之间所述水平的通过所述处理袋的来自所述 LED 的透光率的变化速率的降低 ;和
 - h. 其中所述微控制器被设定为响应所述微控制器接受的来自所述测压仪测量所述干细胞袋重量的输入,使所述干细胞袋校准为零 ;和
 - i. 其中所述微控制器被设定为在所述干细胞袋校准为零后控制所述电动机,促使所述计量阀接连多次打开和关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道以相继重复打开和关闭所述处理袋与所述红细胞浓缩袋之间的所述流体通道接连重复的、不连续时间量,以足够使至少剩余的红细胞以及白细胞 / 干细胞和祖细胞层转移至所述干细胞袋然后响应所述微控制器对来自预设重量的所述测压仪输入在接受,控制所述电动机,促使所述计量阀关闭所述处理袋与所述干细胞袋之间的所述流体通道。
2. 权利要求 1 的系统,其中所述光学传感器位于所述处理设备中,从而使得在所述光学传感器水平和所述计量阀水平之间的所述处理袋中的体积是 2 mL。
3. 权利要求 1 的系统,其中所述微控制器被设定为在步骤(f)之后且步骤(g)之前接

受来自所述加速计的输入,其中在所述处理设备中所述计量阀关闭,所述袋组以第四相对离心力离心,所述第四相对离心力足够使所述处理袋中的骨髓或脐带血再次分层为包含红细胞的层,包含白细胞/干细胞和祖细胞的层,以及包含血浆的层。

4. 权利要求 3 的系统,其中所述第二和所述第三相对离心力低于所述第一相对离心力,并且其中所述第四相对离心力等于所述第一相对离心力。

5. 一种利用权利要求 1 所述的系统从骨髓或脐带血制备干细胞组合物的方法,其包括:

a. 将收集的骨髓或脐带血放置到处理袋内,其中所述处理袋是袋组的部分,所述袋组还包括红细胞浓缩袋、干细胞袋和计量阀,并且进一步地,其中所述计量阀与所述处理袋、所述红细胞浓缩袋和所述干细胞袋连接;

b. 将所述袋组放置到处理设备内,其中所述处理设备包括微控制器、电动机、光学传感器、LED、测压仪和加速计,其中当所述袋组包含在所述处理设备中时,所述电动机与所述计量阀可操作地偶联;

c. 使包含所述袋组的所述处理设备以足够的相对离心力和时间离心,以使所述处理袋中的所述骨髓或脐带血细胞分为红细胞层、WBC/干细胞和祖细胞层以及血浆层,其中所述计量阀关闭;

d. 使包含所述袋组的所述处理设备以低于所述分层步骤中使用的相对离心力的相对离心力和足够的时间离心,以使大多数所述红细胞从所述处理袋分离到所述红细胞浓缩袋内,其中所述计量阀从所述处理袋打开到所述红细胞浓缩袋;

e. 促使所述计量阀响应所述光学传感器检测来自所述 LED 的预定量透光率而关闭;

f. 使包含所述袋组的所述处理设备以足够的相对离心力和时间离心,以使更多所述红细胞从所述处理袋分离到所述红细胞浓缩袋内,其中所述计量阀接连打开且关闭多次;

g. 促使所述计量阀响应所述光学传感器检测透光率的预设变化速率而关闭;

h. 使所述干细胞袋校准为零,其中所述校准使用来自所述测压仪的数据来执行;

i. 使包含所述袋组的所述处理设备以足够的相对离心力和时间离心,以使剩余红细胞、所述 WBC/干细胞和祖细胞层以及一些所述血浆从所述处理袋分离到所述干细胞袋内,其中所述计量阀接连打开且关闭多次;

j. 促使所述计量阀响应所述测压仪测量所述干细胞袋的预设重量而关闭;

k. 从所述处理单元中取出所述袋组;和

l. 从所述袋组中取出包含所述干细胞组合物的所述干细胞袋。

6. 权利要求 5 的方法,其在步骤(e)和(f)之间进一步包括,使包含所述袋组的所述处理设备以足够的相对离心力和时间离心,以使所述处理袋中的所述骨髓或脐带血细胞再次分为红细胞层、WBC/干细胞和祖细胞层以及血浆层,其中所述计量阀关闭。

7. 权利要求 5 的方法,其进一步包括预先选择所述干细胞组合物的体积。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述选择的体积通过选择所述干细胞袋中所述干细胞组合物的重量进行测定。

9. 权利要求 5 的方法,其中所述收集骨髓的体积是 25mL-200mL。

从骨髓或脐带血回收的干细胞和祖细胞组合物；用于制备其的系统和方法

[0001] 本申请为申请号为 200780053147.5 的分案申请,要求 2007 年 3 月 28 日的优先权。

[0002] 与相关申请的交叉参考

[0003] 根据 35U. S. C. § 120, 本申请是于 2002 年 4 月 8 日提交的共同未决的美国专利申请系列号 10/118, 291 的部分继续申请, 并且要求其优先权, 所述美国专利申请的完整公开内容引入本文作为参考。根据 35U. S. C. § 120, 本申请还是于 2007 年 3 月 28 日提交的共同未决的美国专利申请系列号 11/664, 212 的部分继续申请, 并且要求其优先权, 所述美国专利申请是来自于 2005 年 8 月 16 日提交的国际申请系列号 PCT/US2005/029288 的 35U. S. C. § 371 国家阶段申请, 并且要求其优先权, 所述国际申请指定美国并根据 PCTArticle21 (2) 于 2006 年 4 月 13 日作为国际申请号 W02006/038993A2 以英文公开, 并且其依次要求于 2004 年 9 月 30 日提交的美国专利申请系列号 10/957, 095 的优先权, 所述美国专利申请于 2007 年 5 月 1 日作为美国专利号 7, 211, 191 授权, 所述专利的所有公开内容整体引入本文作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] 1. 发明领域

[0006] 总的来说, 本发明涉及用于从人骨髓或脐带血回收特定细胞群体的方法和装置。具体地, 本发明包括用于高效回收(分离且分开) 位于骨髓或脐带血中的干细胞和祖细胞, 并且取出过量红细胞、嗜中性粒细胞、血小板和血浆的系统和方法, 无需借助于通常用于改善干细胞回收效率的异生素添加剂。该系统包括无菌、功能上封闭的袋组(bag set) 以及设计为在离心场中操作的微处理器控制的电机械和光学设备, 所述设备基于其大小和密度使细胞群体分开, 并且随后将这些干细胞和祖细胞以预定最终体积转移至干细胞袋。本发明还包括由人骨髓或脐带血制备的干细胞和祖细胞组合物, 其可用于立即使用或用于贮存和随后使用。

[0007] 2. 相关技术描述

[0008] 为了本说明书和权利要求的目的, 使用下述定义:

[0009] “自体使用” 意指人细胞或组织植入、移植、输注或转移回细胞或组织从其回收的个体内。

[0010] “类晶体” 意指用于电解质替换或增加血管内体积的等渗盐和 / 或葡萄糖溶液, 例如盐水溶液、林格氏(Ringer's) 乳酸盐溶液或 5% 葡萄糖水溶液。

[0011] “造血干细胞” 是产生许多类型的血细胞包括红细胞(RBCs)、白血球、白细胞(WBCs) 和血小板的多能干细胞。

[0012] “白血球” 或白细胞是造血谱系中的细胞, 其主要包括单核细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞, 并且表达细胞表面抗原 CD45 (CD45+ 细胞)。

[0013] “淋巴细胞” 是如通过 Sysmex XE-2100 测量的淋巴样谱系细胞, 其可以包括成熟淋巴细胞(T 细胞、B 细胞、NK 细胞) 以及发育中的淋巴细胞例如淋巴母细胞。

[0014] “最低限度处理的骨髓或脐带血” 意指用于干细胞和祖细胞的抗凝(例如用肝素或

柠檬酸盐)骨髓或脐带血处理,其不包括添加化学物质(除水,类晶体,或灭菌、防腐或贮存试剂外),并且不改变细胞或组织的相关生物特征。

[0015] “单核细胞”是如通过 Sysmex XE-2100 测量的髓样谱系细胞,其可以包括成熟单核细胞和发育中的单核细胞例如成单核细胞。

[0016] “单核的细胞”(MNC)是造血谱系中的细胞,其包括单核细胞和淋巴细胞。

[0017] “嗜中性粒细胞”是如通过 Sysmex XE-2100 测量的髓样谱系细胞,其可以包括多形核嗜中性粒细胞和发育中的嗜中性粒细胞,例如带形、晚幼粒细胞、中幼粒细胞和成粒细胞。

[0018] “血小板”是如通过 Sysmex XE-2100 测量的巨核细胞系细胞,其可以包括成熟血小板(凝血细胞)。

[0019] “祖细胞”是通过一系列细胞分裂产生不同细胞谱系的干细胞直接后代。

[0020] “红细胞”如通过 Sysmex XE-2100 测量的红细胞系细胞,其包括成熟 RBC 而不是具核红细胞。

[0021] “干细胞”是具有 3 种一般性质的多能细胞:(1)它们能够长期分裂且更新其自身;(2)它们是非特化的;和(3)它们可以产生不同的特化细胞类型。关于干细胞的细胞表面抗原标记是 CD34 抗原,升高的胞内酶醛脱氢酶(ALDH)浓度也是这样。

[0022] “斯托克斯定律(Stoke's Law)”是描述颗粒在重力加速度过程中在粘性液体中的沉降速度的数学公式($V_g = d^2 (P_1 - P_2) / 18 \mu \times G$),其中:

[0023] • V_g = 沉降速度,

[0024] • d = 颗粒直径,

[0025] • P_1 = 颗粒密度,

[0026] • P_2 = 液体密度,

[0027] • G = 重力加速度,和

[0028] • μ = 液体粘度。

[0029] “Sysmex XE-2100”是由 Sysmex Corp, Kobe, Japan 制造的自动化血液学细胞分析仪,其通过流式细胞术区分且定量造血细胞,发射半导体激光束,并且检测 3 种光信号:向前散射、侧向散射和侧向荧光。

[0030] “总具核细胞”(TNC)是 WBCs 和具核 RBCs。

[0031] “异生素添加剂”和“异生素试剂”意指并非人体的天然组分的化学物质,其有意加入收集的骨髓或脐带血中用于达到细胞分离过程性能特征中的变化的目的,如果不添加其,所述变化将不发生。

[0032] 异生素添加剂的例子是:

[0033] 1. 沉降试剂(例如,羟乙基淀粉、葡聚糖或明胶);

[0034] 2. 密度梯度介质(例如, **Ficoll®**, **Percoll®**);和

[0035] 3. 用于细胞表面大分子细胞的亲和分子(例如单克隆抗体、与顺磁珠结合的单克隆抗体)。

[0036] 迄今,尽管干细胞的巨大临床潜力,但无干细胞治疗已收到 FDA 许可用于人使用。证实临床功效和安全性且获得干细胞治疗的管理许可的主要障碍是,用于从骨髓或脐带血分离干细胞群体的现有设备和方法具有一个或多个下述明显局限性:它们是冒微生物污染

危险的开放系统；它们是时间和劳动力密集的；它们需要添加不希望有且昂贵的异生素试剂；它们以平均 40-75% 的非常低效率回收干细胞；并且它们与用于组织再生的脐带血或骨髓量不相容。

[0037] 在干细胞治疗严重和频繁的人疾病的广泛使用可以发生前，所述疾病例如心肌梗死、缺血、糖尿病和皮肤伤口，必须克服 3 个关键障碍：

[0038] 1. 临床试验必须证实干细胞治疗的功效和安全性；

[0039] 2. 必须获得由健康管理机构，特别是食品药品监督管理局(FDA) 细胞、组织和基因治疗办公室(Office of Cell, Tissue and Gene Therapy) (OCTGT) 的管理许可；和

[0040] 3. 必须开发用于从最低限度处理的骨髓或脐带血快速和简单回收活的干细胞和祖细胞的实用方法，其不依赖于使用异生素添加剂以取出过量血浆、红细胞和粒细胞。

[0041] 除造血干细胞外，目前已知骨髓和脐带血包含具有用于组织再生且增强伤口愈合的潜在治疗价值的其他类型干细胞和祖细胞。先前命名为骨髓基质细胞的间充质干细胞可以产生骨、软骨、脂肪、肌肉和结缔组织，并且是 ALDH Br+。位于骨髓中的内皮祖细胞是从造血干细胞传下来的原始细胞，可以进入血流并且到达血管损伤区域以帮助修复损害，可以产生新血管，并且是 CD34+。

[0042] 干细胞通过各种细胞表面标记进行鉴定，包括 CD34+ 和醛脱氢酶亮细胞(ALDH Br+)。CD34+ 细胞是表达命名为 CD34 的抗原的干细胞，所述抗原可以通过使用对于那种特定抗原具有特异性的生色团缀合抗体进行检测。其他研究者基于其表达高水平的醛脱氢酶(ALDH) 鉴定成体干细胞。一个公司 Aldagen (Durham, NC) 开发了利用基质的技术，所述基质通过产生强绿色荧光检测表达高水平 ALDH 的细胞。这些所谓的 ALDH 亮细胞(ALDH Br+) 可以使用流式细胞术进行检测。ALDH Br+ 细胞包含不同祖先，其可以产生多种重要细胞系，包括神经和内皮细胞。

[0043] 干细胞的生存力可以通过几种方法加以证实，所述方法包括排斥活体染料例如锥虫蓝或 7-氨基-放线菌素 D (7-AAD)。使用商购可得的试剂盒，通过测量作为关于在骨髓或脐带血中的干细胞替代物的白细胞(CD45+ 细胞) 的生存力常规评估干细胞的生存力。

[0044] 大量骨髓或脐带血是难处理的，特别是因为大量红细胞的存在(对于骨髓中的每个 CD34+ 细胞存在约 25,000 个红细胞，并且对于脐带血中的每个 CD34+ 细胞存在约 180,000 个红细胞)。这些过量红细胞使得难以使用干细胞和祖细胞，因为它们的存在从根本上稀释了在需要组织再生的伤口部位处的干细胞和祖细胞浓度，并且它们干扰用于干细胞的其他处理步骤，包括用于先体外后体内细胞扩增的培养，基因治疗、或细胞群体的亲和纯化。此外，此种大量红细胞的存在产生其他安全性问题，例如在同种异体移植中的 ABO 不相容性。在一些情况下，还可能希望使来自体积减少的干细胞浓缩物的嗜中性粒细胞降到最低，这是由于这些细胞与炎症反应的潜在关联，以及在其细胞质中存在可能影响生存力或可塑性或以其他方式改变干细胞功能性的生物学活性酶和细胞因子。

[0045] 在固定离心时间段后细胞的运动速率和最终位置随其大小和密度而变，其中它的运动根据斯托克斯定律进行限定。干细胞在其密度方面低于 RBCs，并且在密度方面高于血小板，具有更接近于 WBCs 的那种的密度。因此，通过密度和大小回收干细胞的常规方法一般涉及通过离心使细胞群体分层，且然后在从离心机取出后，尝试从脐带血或骨髓的剩余部分中捕获干细胞。

[0046] 从骨髓或脐带血分离 WBCs 和干细胞的一种手工方法是将全部骨髓或脐带血插入离心机管内,并且使它们在 1500-2000xg 下在室温下旋转 10-15 分钟。这使骨髓或脐带血分离成上部血浆层、下部红细胞(RBC)层、和在 RBC 和血浆之间的界面处的薄 WBCs 和干细胞和祖细胞层。在分层完成后,一次性塑料转移移液管可以用于下至距离 RBCs 约 1mm 抽吸掉血浆(上层)。当取出血浆时,必须非常小心,以免搅乱必须通过相同的移液技术取出的 WBC/干细胞和祖细胞层,同时尝试提防干细胞和祖细胞丢失到 RBCs 内或干细胞被 RBCs 过度污染。这种在试管中的手工方法的缺点是它是开放系统,这冒着骨髓单位的微生物污染危险;它是劳动力和时间密集的;WBC/干细胞和祖细胞层的红细胞污染量是高度可变的;并且干细胞的丢失是显著且可变的。重要的是避免微生物污染——关于这种方法的主要关注,因为它可以负面影响培养干细胞的能力或冒感染传播给干细胞受体身体的危险。

[0047] 从脐带血或骨髓回收 WBC/干细胞和祖细胞群体的另一种方法利用细胞处理设备,例如 CompomatG4 设备(Fresenius KabiAG, Friedberg, 德国)和 COBE2991 血细胞处理器(Blood Cell Processor)(COBE Laboratories, Lakewood, CO)。这种类型的方法的例子呈现于 Tsubaki, 等人“Concentration of Progenitor Cells Collected from Bone Marrow Fluid Using a Continuous Flow Cell Separator System”, *Apheresis and Dialysis* 5(1), 46-48, 2001 中。对于干细胞收获的骨髓或脐带血量依赖于所提议的临床用途。对于组织再生或修复中基于细胞的治疗,一般收集 50-150mL 骨髓或脐带血。这些血库仪器需要大量骨髓或脐带血(超过 200mL)以正确发挥作用,并且完全不适合于一般对于组织再生医学应用收集的低体积(小于 200mL)。此外,这些机械化方法的细胞产物的最终体积(50-100mL)基本上大于优选的 3-20mL 最终体积,这提供对于临床用途合适的干细胞和祖细胞浓度。这些仪器还需要泵以将血液或骨髓从一个容器移动到另一个,并且这些泵可能潜在引起对于细胞的机械损害。

[0048] 用于骨髓或脐带血的体积减少和纯化的另一种方法利用梯度介质例如 **Ficoll®** 或 **Percoll®**, 以与骨髓或脐带血组合,并且在离心过程中,使其自身介入细胞群体之间,以减少在回收干细胞的尝试过程中细胞群体的混合。**Ficoll®** 是中性的、高分支、高质量、亲水的多糖。**Ficoll®** (例如密度 1.077)可以用于将血液或骨髓分离成其组分(红细胞、白细胞等)。**Ficoll®** 正常放置在管的底部,并且用盐水稀释的骨髓或脐带血随后在 **Ficoll®** 上缓慢成层。在离心后,较重的 RBCs(密度 1.09-1.10)取代在管底部的 **Ficoll®**,并且下述层从顶部到底部在柱中可见:(1)血浆和血小板;(2)单核的细胞(MNC)(密度 1.06-1.07);(3) **Ficoll®**; 和(4)在底部以沉淀形式存在的红细胞和嗜中性粒细胞(密度 1.08-1.09)。这种分离允许以 MNCs 与 RBCs 共混合的更少机会收获 MNCs。一些红细胞俘获(红细胞和嗜中性粒细胞的存在)仍在 MNC 层中发生。

[0049] 用 **Ficoll®** 处理骨髓或脐带血的明显缺点是在将 **Ficoll®** 加入骨髓或脐带血的步骤时它是开放系统,从而意味着微生物可以直接进入骨髓或脐带血内,并且从而增加微生物污染的危险。为了减少这种危险,必须使用生物学安全工作橱执行这个步骤,这可能不总是可得到的,并且是为了可接受的性能必须连续维持且监控的实验室设备的昂贵部分。此外, **Ficoll®** 是异生素,并且在细胞可以安全地施用于人体前必须通过洗涤取出。这个洗

涤步骤需要时间和努力,并且进一步增加关于微生物污染和细胞丢失的可能性。干细胞的回收是低的且高度可变的,为 20-70%。**Percoll®**,用聚乙烯吡咯烷酮包被的胶态二氧化硅,是类似于**Ficoll®**的具有其伴随缺点的另一种密度梯度介质。

[0050] 关于使用羟乙基淀粉(HES)沉降试剂分离骨髓白细胞的技术已由 A.Montuoro 等人,“A technique for isolation of bone marrow cells using hydroxyethyl starch (HES) sedimentation agent,”*Haematologica*76Suppl1:7-9,1991 公开。HES 在临床上用作血浆扩张剂并且特征在于它的分子量及其取代程度。一般以 0.5-2% HES 重量与骨髓或脐带血体积的终浓度的 HES 添加引起红细胞凝集,并且从而基于斯托克斯定律的原理改变其沉降速度。然而,HES 是异生素,并且已与静脉内施用的一些患者中的不利事件相关。此外,HES 的使用增加成本和对于细胞处理的另外复杂性。葡聚糖聚合物制剂和明胶溶液也已用于相同目的,并且具有与 HES 相同的缺点。

[0051] 最后,还已知可以通过使用免疫方法从骨髓或脐带血分离干细胞和祖细胞,所述免疫方法包括流式细胞术细胞分选(Beckton Dickinson 或 Coulter)和通过抗体包被的顺磁颗粒细胞分选例如 Miltenyi Clinimacs 或 Baxter Isolex 系统。对干细胞抗原例如 CD34 具有特异性的抗体用作这些分离技术的部分。这些方法具有需要昂贵的异生素试剂、设备和一次性处理用具,并且执行是费时的缺点。虽然最终产物是具有少的红细胞或白细胞污染的更纯的干细胞群体,但这个纯度水平代表相当大的产生的费用,并且可能不是达到预期细胞治疗效果所需要的。此外,抗体和珠对骨髓或脐带血的添加意味着产物在方法过程中不是“最低限度处理的”,因为这些试剂可能引起非故意的不利生物后果,例如干细胞不可逆的分化成谱系定型途径。

[0052] 由 Minguell, 等人“Preparative separation of nucleated cells from human bone marrow”,*Experientia*35:548-549,1978 的研究比较了由于用葡聚糖、葡聚糖加 **Ficoll®**、**Ficoll®**和血沉棕黄层法处理的体积减少、细胞回收和细胞生存力。该论文证实缺乏用于骨髓的理想制备方法,因为一些方法引起细胞生存力的丧失,并且全部具有 68%或更少淋巴样细胞(单核细胞和淋巴细胞或 MNC)的相对低的细胞回收。为了达到所观察到的 2.7:1 红细胞(RBC)/具核细胞比,命名为血沉棕黄层法的无需沉降辅助的离心法具有低且高度可变的(36-68%)最初存在的这些细胞的淋巴样细胞回收范围。

[0053] 发明概述

[0054] 需要用于从骨髓或脐带血制备干细胞组合物的系统和方法,其选择性回收高百分比的干细胞和非常低百分比的 RBCs;快速,非劳动力密集,且易于以一致方式执行;可以在手术室中使用;在无菌、功能上封闭的系统中执行;不需要异生素添加剂;减少骨髓或脐带血样品的原始体积;能够处理一系列骨髓体积;并且允许用户预先选择最终产物的体积。还需要这样的干细胞组合物,其包括来自原始样品的高百分比干细胞且使那些干细胞维持在存活条件下,包含来自原始样品的非常低百分比的 RBCs,不包括任何异生素添加剂,并且具有可以由用户选择的最终体积。

[0055] 公开了衍生自骨髓或脐带血的干细胞组合物以及用于其制备的系统和方法。公开的发明具有整合到单一系统内的下述 10 个属性:

[0056] 1. 它回收高百分比的干细胞;

[0057] 2. 它通过取出过量血浆、RBCs、血小板和嗜中性粒细胞而减少骨髓或脐带血样品的原始体积；

[0058] 3. 它不需要异生素添加剂以完成干细胞回收，同时增强产物的安全性概况，从而消除关于细胞洗涤的需要，且使成本降到最低；

[0059] 4. 它使干细胞维持在存活条件下；

[0060] 5. 它快速完成(少于 90 分钟)；

[0061] 6. 由于干细胞分离和捕获步骤的自动化，它并非劳动力密集的；

[0062] 7. 它易于以一致方式执行，从而需要最低限度的操作员训练和专业知识；

[0063] 8. 它可以在手术室中或邻近手术室使用用于自体或同种异体用途，或在细胞处理实验室中使用。

[0064] 9. 它在无菌、功能上封闭的系统中分开且分离干细胞和祖细胞，以减少产物的微生物污染危险；和

[0065] 10. 它能够处理用于组织再生的全范围的骨髓和脐带血。

[0066] 在一个方面，本发明包括了包括处理袋组和处理设备的系统。无菌且优选一次性的袋组包括处理袋、RBC 浓缩袋、干细胞袋、计量阀和使计量阀与每个袋连接的管路。一旦脐带血或骨髓已转移到处理袋内，就将袋组放置到安装到离心桶(bucket)内的处理设备内。处理设备与袋组相互作用，以在单次离心运行过程中将 WBC/ 干细胞和祖细胞层从骨髓或脐带血转移到干细胞袋内。处理设备包括光学传感器、微控制器、伺服电动机、一个或多个加速计、测压仪(load cell)和电池。微控制器接受且分析来自光学传感器、加速计和测压仪的输入，并且指导伺服电动机以精确的阀运动打开且关闭计量阀，这允许在离心过程中通过密度和大小分层的不同细胞层转移到不同袋内。

[0067] 在另一个方面，本发明还包括用于从骨髓或脐带血分离且浓缩干细胞的方法。该方法包括下述步骤。将骨髓或脐带血转移到处理袋内。将装载的袋组放置到处理设备内。袋组在处理设备中以足够的 g 力和时间离心，以使处理袋中的骨髓或脐带血的细胞基于其密度和大小分为数层。袋组在处理设备中以较低的 g 力离心，以允许大多数 RBCs 从处理袋分离且转移到 RBC 浓缩袋内。袋组可以任选在处理设备中以足够的 g 力和时间离心，以使处理袋中的细胞基于细胞密度和大小再次分为数层。袋组在处理设备中离心，同时计量阀连续快速打开且关闭多次，以使剩余 RBCs 部分从处理袋分离到 RBC 浓缩袋内，而不同时转移 WBC/ 干细胞和祖细胞层。当袋组在离心时，处理设备使空干细胞袋的重量校准为零。袋组在处理设备中离心，同时计量阀连续快速打开且关闭多次，以使少量剩余 RBCs、WBC/ 干细胞和祖细胞层以及一些血浆从处理袋中分离且转移到干细胞袋内。

[0068] 在另一个方面，本发明包括通过本发明方法的实施方案制备的衍生自骨髓或脐带血的干细胞和祖细胞组合物。来自骨髓的干细胞和祖细胞组合物具有约 1 个 CD34+ 细胞与约 500 个 RBCs 的比，并且来自脐带血的具有 1 个 CD34+ 细胞与 5,000 个 RBCs 的比。这些干细胞和祖细胞组合物不包含任何异生素添加剂。

[0069] 本发明的干细胞组合物解决了无需异生素添加剂的、关于在功能上封闭的袋组中快速制备的干细胞和祖细胞组合物的目前未满足的临床需要，以达到先前难以达到的红细胞与干细胞比。骨髓组合物是有利的，因为它回收高比例的 CD34+ 细胞(约 97%)和 ALDH Br+ 细胞(约 92%)，同时消耗约 98% 的 RBCs，并且不包含异生素添加剂。脐带血组合物也

是有利的,因为它回收高比例的CD34+细胞(约95%),同时消耗约98%的RBCs,并且不包含异生素添加剂。

[0070] 附图简述

[0071] 图1是本发明袋组的实施方案的二维布置图。

[0072] 图2是图1袋组的透视图。

[0073] 图3A是显示图1袋组的计量阀的一个流体通道的示意图。

[0074] 图3B是显示图3A中所示计量阀的第二个流体通道的示意图。

[0075] 图3C是显示图3B中所示计量阀的第三个流体通道的示意图。

[0076] 图4A是显示与图3A-3C实施方案不同的计量阀的实施方案的一个流体通道的示意图。

[0077] 图4B显示图4A中所示计量阀的第二个流体通道的示意图。

[0078] 图5是本发明处理设备的实施方案的透视图。

[0079] 图6是图5处理设备的透视图。

[0080] 图7是图5处理设备的透视图。

[0081] 图8是图5处理设备的透视图。

[0082] 图9是图5处理设备的侧视图。

[0083] 图10是本发明处理设备的基板的实施方案的透视图,显示组分。

[0084] 图11是图5处理设备的分解图。

[0085] 图12是图5处理设备中放置的图1袋组的透视图。

[0086] 图13是图12袋组和处理设备的透视图。

[0087] 图14是图12袋组和处理设备的透视图。

[0088] 图15是图12袋组和处理设备的透视图。

[0089] 图16是图12袋组和处理设备在离心桶中的透视图。

[0090] 图17是显示图16装载的离心桶和离心机的部分分解图。

[0091] 图18是图5处理设备的微控制器的输入和输出的方框图。

[0092] 图19是显示在分层步骤后的细胞层的图1处理袋的部分横截面侧视图。

[0093] 图20是显示在方法的离心步骤过程中随时间而变的在透光率中的变化的曲线图,具体显示在离心过程中随时间而变的在LED和光学传感器之间骨髓或脐带血流体透光率中的变化。

[0094] 发明详述

[0095] 用于从骨髓或脐带血回收干细胞和祖细胞组合物的系统

[0096] 该系统包括袋组100和处理设备200。

[0097] 图1和2显示袋组100的实施方案。袋组100是功能上封闭且优选一次性的。袋组100包括通过管路或管道系统与计量阀连接的3个或更多个袋,具有入口管路、夹、过滤器和取样位点。袋组100优选包括3个袋:处理袋102、红细胞(RBC)浓缩袋104和干细胞袋106。

[0098] 处理袋102可以由乙烯乙酸乙烯酯(EVA)制成,但还可以由PVC或其他塑料制成。RBC浓缩袋可以由PVC或其他塑料制成。干细胞袋106可以由EVA制成,尽管也可以使用其他塑料。袋102和106可以是吹塑的。RBC浓缩袋可以是RF熔接的,尽管它可以是吹塑

的。

[0099] 处理袋 102 是三维袋,其可以具有不对称形状,包括顶部边缘 108、弯曲侧面 110、垂直侧面 112、锥形底部 113 和底部出口 114。顶部边缘 108 包括入口 115 和 2 个洞 116。可替代地,处理袋 102 可以是对称形状的,从而使得它的侧面锥形对称地朝向底部出口 114。处理袋 102 的总体积可以是约 240mL,尽管在使用中,它一般充满约 50-150mL 骨髓或脐带血。处理袋 102 通过与入口 115 连接的入口管路 118 供应。入口管路 118 包括凹形 luer 口 (female luer) 120,其允许袋组 100 与包含待转移到处理袋 102 内的骨髓或脐带血的注射器连接。凹形 luer 口 120 与凸形 luer 头 (male luer) 122 连接,所述凸形 luer 头 122 与钉 124 连接,所述钉 124 由帽 126 覆盖,所述帽 126 允许袋组 100 与包含待转移到处理袋 102 内的骨髓或脐带血的收集袋连接。入口管路 118 包括凝块和骨碎片滤器 128(约 200-300 μ 网孔)。管路或管道系统夹 130 位于凝块和骨碎片滤器 128 与凹形 luer 口 120 之间。入口管路 118 可以任选还包括取样位点 132、取样枕 134 和取样位点 136,全部位于凝块和骨碎片滤器 128 下。取样位点 132 和 136 各自包括无针凹形 luer 口和非放气 luer 口帽。底部出口 114 将输出从处理袋 102 导向计量阀 138。

[0100] RBC 浓缩袋 104 可以是扁平袋,具有顶部边缘 105、底部边缘 107 和 2 个侧面边缘 109,并且包括蝶形钉孔 (spike port) 140,其用于在过程结束时取出 RBCs 的等分试样,如果需要这样的话。底部边缘 107 在一个角落处包括入口 111。RBC 浓缩袋 104 的体积是约 100mL,尽管在使用中,它一般充满约 30-80mL。RBC 浓缩袋 104 在入口 111 处与供应管路 142 连接,所述供应管路 142 在计量阀 138 的连接头 139 之一处与计量阀 138 连接。

[0101] 干细胞袋 106 是形状为矩形的三维袋。干细胞袋 106 包括顶部边缘 117、底部边缘 119、大区室 144 和小区室 146,其中区室 144 和 146 通过 2 个通道 148 连接。顶部边缘 117 包括入口 121 和 2 个钉孔 150,其用于在过程结束时取出干细胞。干细胞袋 106 的体积是约 30mL,尽管在使用中,它一般充满约 25mL,其中约 20mL 在大区室 144 中,并且约 5mL 在小区室 146 中。干细胞袋 106 在入口 121 处与干细胞袋入口管路 152 连接,所述干细胞袋入口管路 152 通过 F 接头 154 与供应管路 156 连接。供应管路 156 在计量阀 138 的连接头 139 之一处与计量阀 138 连接。F 接头 154 使供应管路 156 和干细胞袋入口管路 152 与分支管路 158 连接。分支管路 158 通过 T 接头 160 与取样管路 162 和冷冻保护剂供应管路 164 连接。取样管路 162 包括管路夹 164 和取样位点 166,并且在取样枕 168 中终止。冷冻保护剂供应管路 164 包括取样位点 170 和管路夹 172,并且在无菌滤器 174 (优选约 0.2 μ 网孔)中终止。取样位点 166 和 170 各自包括无针凹形 luer 口和非放气 luer 口帽。

[0102] 管路 118、142、156 和 162 是可以由 PVC、EVA 或其他材料制成的管道系统。管路 152 和 158 是由 EVA 制成的管道系统。冷冻保护剂供应管路 164 是在外部用 PVC 和在内部用 EVA 制备的共挤压管道系统。因为与冷冻保护剂接触的塑料材料(如果它们浸出到冷冻保护剂内)可以进入干细胞袋 106 且污染最终产物,所以使用不包含可以浸出到冷冻保护剂内的增塑剂的材料例如 EVA 用于将与冷冻保护剂接触的管路是有利的。

[0103] 计量阀 138 可以是旋塞阀。在一个实施方案中,计量阀 138 是三通旋塞阀,因为它具有 3 个接头 139,从而使得它可以与 3 个袋连接:处理袋 102、RBC 浓缩袋 104 和干细胞袋 106。其他类型的计量阀或旋塞阀也将发挥作用,例如具有 4 个接头的四通旋塞阀。计量阀 138 包括具有 3 个接头 139 的外部部分 141 和内部部分 143。外部部分 141

可以由聚碳酸酯制成。内部部分 143 包括整体模塑的柄 145 和桶 147,其可以由聚乙烯 (polyethelene)制成。桶 147 在几个位置 之间移动,包括定义为不允许任何流体流过计量阀 138 的位置的封闭位置,以及定义为允许流体流过计量阀 138 的位置的 2 个开放位置。2 个开放位置包括允许流体从处理袋 102 流过计量阀 138 到 RBC 浓缩袋 104 的一个位置,和允许流体从处理袋 102 流过计量阀 138 到干细胞袋 106 的一个位置。在图 3A-3C 中所示的一个实施方案中,计量阀 138 的桶 147 可以配置为包含 3 个开口,从而允许流体沿着 3 个可能流体通道流动;如图 3A 中所示从处理袋 102 到 RBC 浓缩袋 104 的预期通道;如图 3B 中所示从处理袋 102 到干细胞袋 106 的预期通道;和如图 3C 中所示在 RBC 浓缩袋 104 和干细胞袋 106 之间的非计划暂时通道,这可能在计量阀 138 在其 2 个预期位置之间移动时出现。此种暂时流体流动是不希望的,因为它可以允许一些另外的 RBCs 流入干细胞袋 106 内,从而减少所得到的干细胞组合物的纯度。为了解决这个担心,在图 4A-4B 中所示的另一个实施方案中,计量阀 138 的桶 147 可以可替代地配置为仅包含 2 个开口,从而允许流体仅沿着 2 个可能的流体通道流动;如图 4A 中所示从处理袋 102 到 RBC 浓缩袋 104 的预期通道;和如图 4B 中所示从处理袋 102 到干细胞袋 106 的预期通道。这种配置将排除在 RBC 浓缩袋 104 和干细胞袋 106 之间任何可能的暂时流体流动。计量阀 138 应能够经得住在离心过程中发生的高压;例如,评定为约 500 磅/英寸² (psi)的阀是令人满意的。供应管路 142 从计量阀 138 导向 RBC 浓缩袋 104。供应管路 156 从计量阀 138 导向 F 连接头 154,所述 F 连接头 154 经由干细胞袋入口管路 152 导向干细胞袋 106。管路 142、152 和 156 可以各自是热封的且与袋组 100 分开。

[0104] 如果需要更多的袋以使来自骨髓或脐带血的另外组分分开,那么袋组 100 可以包括另外的袋。如果包括另外的袋,那么计量阀 138 将具有另外的连接头以供给每个袋,并且袋组将包括另外的供应管路以使计量阀与每个袋连接。例如,如果希望使处理袋 102 中最后部分的 RBCs 与转移到 RBC 浓缩袋 104 内的那些 RBCs 分开,那么需要第四个袋。第四个袋通过分开的供应管路与计量阀 138 连接。在那种情况下,计量阀 138 将是具有 4 个连接头的四通旋塞阀,并且将包括允许从处理袋 102 到其他 3 个袋中每个的流体流动的桶。

[0105] 图 5-15 显示处理设备 200 的实施方案。处理设备 200 是略微圆柱状的,具有顶部 202、底部 204、前部 206、背部 208、侧面 210 和侧面 212。前部 206 包括前门 214 以及前壁 216 和 217。处理设备 200 具有机体 218、干细胞袋区室 220、基板 222、支持托架 224 和处理袋吊架 226。机体 218 和干细胞袋区室 220 优选由模塑的氨基甲酸乙酯制成,尽管还可以使用其他热塑材料。基板 222 优选由不锈钢制成。支持托架 224 优选由铝制成。处理袋吊架 226 优选由不锈钢制成。依一定尺寸制造处理设备 200 以配合具有 1L 最低限度容积的离心桶内,所述离心桶在横截面中可以是圆形或卵圆形的。图 16 显示处理设备 200,包含在离心桶 228 内部的袋组 100。图 17 显示装载的离心桶 228 如何安装到在合适位置中已具有另外 5 个装载的离心桶的离心机内。

[0106] 处理设备 200 的机体 218 包括主区室 230,所述主区室 230 具有加工为接受处理袋 102 的尺寸的延长卵圆形形状。主区室 230 在顶部是开放的,并且由开放前门 214 接近,所述前门 214 通过铰链 232 与处理设备 200 的前部 206 附着。主区室 230 具有符合且支持处理袋 102 的侧壁 234 和 236 以及后壁 238,且朝向通道 240 渐小,所述通道加工为接受处理袋 102 的锥形底部 113 的尺寸。侧壁 234 和 236 在中部附近宽松地用架支撑处理袋 102,并

且在锥形底部 113 处更紧密地用架支撑处理袋 102。接近处理袋 102 锥形底部 113 的更紧密容限是有利的,以提供关于处理袋 102 及其内容物在离心的高压过程中的支持,并且使对袋内容物的干扰降到最低。前门 214 包括在其内部表面上的凹入内部凹进 242,所述凹入内部凹进 242 对应于主区室 230 的侧壁 234 和 236 以及通道 240,并且提供连续表面,从而使得当前门 214 闭合时,它符合且支持处理袋 102。

[0107] 凹进 244 位于处理设备 200 的前部 206 上,在前壁 216 和 217 下,并且配置为支持计量阀 138 的连接头 139。阀门致动器套箍 246 位于凹进 244 内,并且按一定尺寸制造且配置为接受计量阀 138 柄 145。阀门致动器套箍 246 通过螺丝 250 与伺服电动机 248 的轴附着。相应凹进 252 位于前门 214 内部上,并且按一定尺寸制造且配置为接受计量阀 138 的伸出末端和接头 139。

[0108] 一个或多个光学传感器 254 通过主区室 230 的前壁 217 装配,它们的小孔位于侧壁 236 上,其中相等数目的 LEDs 256 位于相对侧壁 234 上。LED 256 包括红色 LED 灯,尽管还可以使用其他类型的 LEDs。一个光学传感器 254 和一个 LED 256 优选位于通道 240 之上约 2cm,从而使得在光学传感器 254 和 LED 256 水平以及计量阀 138 水平之间的处理袋 102 中的体积是约 2mL,尽管还可以使用其他距离和相应体积。如果包括另外的光学传感器和 LEDs,那么它们可以位于光学传感器 254 和 LED 256 之上或之下,这依赖于待分离的 RBCs 所需体积。

[0109] 处理设备 200 的侧面 212 包括槽口 258、贮存腔 260、通道 262、RBC 浓缩袋凹进 264、支持架 266 和钩 268。槽口 258 按一定尺寸制造且配置为接受 RBC 浓缩袋 104 的钉孔 140。RBC 浓缩袋凹进 264 从槽口 258 向下延伸至支持架 266,并且按一定尺寸制造且配置为接受 RBC 浓缩袋 104。贮存腔 260 位于槽口 258 下,并且在 RBC 浓缩袋凹进 264 后且与 RBC 浓缩袋凹进 264 连续。通道 262 沿着 RBC 浓缩袋凹进 264 的内部边缘延伸,与前门 214、顶部 202 和背部 208 邻近。支持架 266 是形成 RBC 浓缩袋凹进 264 的底面的水平架。

[0110] 干细胞袋区室 220 是水平、中空、中空的矩形区室,其具有位于前门 214 的铰链 232 下的较大侧面 270。干细胞袋区室 268 位于基板 232 下,并且与测压仪 272 附着。干细胞袋区室 220 通过向下打开的铰接门 274 接近,并且经由在其顶部边缘处位于干细胞袋区室 220 内部的闩 276 合到应有位置。铰接门 274 的内部包含凹进 278,所述凹进 278 按一定尺寸制造且配置为容纳干细胞袋 106 的钉孔 150 和入口 121。铰接门 274 的外部包含按一定尺寸制造以容纳干细胞袋入口管路 152 的槽 280 和通道 282。

[0111] 底部通道 284 向上延伸并且与基板 222 平行,从在铰链 232 下的前部 206 经过侧面 210 和背部 208 到侧面 212。底部通道 284 按一定尺寸制造以容纳管路 142。

[0112] 处理设备 200 包括在侧面 210 处延伸超过顶部 202 的处理袋吊架 226。处理袋吊架 226 具有衔接在处理袋 102 上的洞 116 的接片 227,使处理袋 102 维持在处理设备 200 内部适当位置中。LED 窗口 229 位于侧面 210 处的顶部 202 上。

[0113] 支持托架 224 是 U 型托架,其通过螺丝 225 与基板 222 附着,并且定向与处理设备 200 的侧面 210 和 212 平行。

[0114] 如图 10 中所示,基板 222 优选具有安装到其上的下述组分:印刷电路板 286、伺服电动机 248、测压仪 272 和界面接触印刷电路板 288。印刷电路板 286 包含可编程只读存储器微控制器 290。由于在离心过程中的热产生,微控制器 290 可能需要温度补偿。测压

仪 272 是补偿温度的应变计测压仪。伺服电动机 248 是齿轮减速电动机。一个或多个加速计 292 安装到印刷电路板 286 上;如果使用 2 个加速计 292,那么一个可以安装到另一个之上。优选地,加速计 292 包括测量约 0-200xg 的低 g 加速计 291,和测量约 1000-1700xg 的高 g 加速计 293。印刷电路板 286 还包括通过 LED 窗口 229 可见的状态 LEDs294。一个或多个状态 LEDs294 可以指示电池 296 的充电状态以及在方法中正执行的当前步骤,以及其他信息。提供界面接触印刷电路板 288 以与外部电池充电器连接,并且提供与个人计算机的通讯连接。基板 222 通过螺丝 298 与机体 218 附着。

[0115] 图 18 是显示微控制器 290 的输入和输出的方框图。光学传感器 254、电池电压 302、测压仪 272 以及加速计 291 和 293,产生转变成由微控制器 290 接受的数字输入的模拟输出。微控制器 290 以预定时间间隔记录、贮存且分析那些输入。微控制器控制伺服电动机 248、关于光学传感器 254 的 LED256 和状态 LEDs294。当包括计量阀 138 的袋组 100 正确放置到处理设备 200 内时,伺服电动机 248 通过其传动轴与阀门致动器套箍 246 连接,并且响应来自微控制器 290 的信号,伺服电动机 248 引起计量阀 138 移动至不同位置,以打开或关闭至袋组 100 的袋的流体流动。

[0116] 电池 296 位于处理设备 200 的侧面 210 处在顶部 202 上的电池腔 300 中。电池 296 是可再充电的镍金属氢化物电池,包括具有总共约 3.8-4 伏的 3 个电池,所述电压进行调节以提供 5 伏的恒定电压。电池 296 给微控制器 290、光学传感器 254、加速计 291 和 293、测压仪 272、光学传感器 LED256、状态 LEDs294、伺服电动机 248、以及处理设备 200 中的所有电路包括与个人计算机的通讯连接提供动力。

[0117] 处理单元 200 可以放置在分开的扩展坞(docking station)中,所述扩展坞包括电池充电器并且可以与个人计算机连接。来自微控制器 290 的数据可以转移给个人计算机,并且经由扩展坞通过界面接触印刷电路板 288,可以接受来自个人计算机的命令。

[0118] 如图 12-15 中所示,袋组 100 如下插入处理设备 200 内。将干细胞袋 106 放置到干细胞袋区室 220 内,从而使得底部边缘 119 首先配合,并且小区室 146 折叠并且放置在较大侧面 270 中。入口 121 和钉孔 150 放置在铰接门 274 的凹进 278 内部。干细胞袋入口管路 152 放置在铰接门 274 的槽 280 中。铰接门 274 随后关闭并且用闩 276 闩上。干细胞袋入口管路 152 放置在通道 282 中。计量阀 138 的柄 145 放置到阀门致动器套箍 246 内。处理袋 102 在主区室 230 中这样定向,从而使得前门 214 在处理袋 102 的垂直侧面 112 上关闭。F 连接头 154 放置在 RBC 浓缩袋凹进 264 内。管路夹 165 关闭且连同取样管路 162 一起放置在通道 262 内部。冷冻保护剂供应管路 165、管路夹 172 (关闭的)和取样位点 170 放置到贮存腔 260 内,其中无菌滤器 174 放置到贮存腔 260 的右侧壁插座内。取样位点 166 锚定在钩 268 处。取样枕 168 安装到直接在 RBC 浓缩袋凹进 264 的右侧中的滤器插座下的凹进内。随后,将供应管路 142 放置到底部通道 284 内,并且将 RBC 浓缩袋 104 放置到 RBC 浓缩袋凹进 264 内。入口管路 118 和取样位点 136 向下并且朝向在侧面 210 处的处理袋吊架 226 折叠。处理袋 102 的洞 116 与吊架 226 的接片 227 附着。前门 214 关闭。钉孔 140 安装到槽口 258 内,其中底部边缘 107 在支持架 266 上,从而使得 RBC 浓缩袋 104 安装在贮存腔 260 上。分支管路 158 沿着贮存腔 260 的左侧垂直放置。

[0119] 从骨髓或脐带血回收干细胞和祖细胞组合物的方法

[0120] 该方法包括使骨髓或脐带血细胞通过细胞密度和大小分层且分离的离心。待处理

的骨髓或脐带血包含血浆、RBCs、WBCs 和干细胞,如由 CD34+ 和 ALDHBr+ 干细胞标记的存在指示的。所得到的干细胞产物是干细胞和祖细胞的组合物,其包括一些 WBCs、以及显著减少的 RBCs 和血浆。使用上文描述的系统的该方法在能够处理一系列骨髓或脐带血体积的无菌、功能上封闭的系统中执行,并且产生其体积可以预先由用户选择的最终产物。该方法通过取出过量 RBCs 和血浆,并且如果临床上有利的,则取出嗜中性粒细胞和血小板,来显著减少骨髓体积,从而使最终干细胞组合物中的干细胞浓缩。对于这种方法不需要异生素添加剂,所述方法从骨髓或脐带血回收高百分比的干细胞和祖细胞。

[0121] 如本说明书中使用的,术语“g 力”指相对离心力,并且所有对特定 g 力的参考均在处理设备 200 中的光学传感器 254 位置处测定。应当理解本文提及的特定 g 力和时间段举例说明该方法的实施方案,并且除所提及的那些外的 g 力和时间段是有用的并且包括在该方法的其他实施方案中。

[0122] 在该方法的一个实施方案中,包括下述步骤:

[0123] 1. 将骨髓或脐带血转移到处理袋内。

[0124] 将骨髓或脐带血收获或收集到收集容器例如袋、注射器或其他容器内,与抗凝剂例如肝素或 CPD 一起保存,并且转移到处理袋 102 内。转移可以这样完成:通过将钉 124 插入收集袋内,使凹形旋锁 luer 口(luerlock) 120 与注射器附着,或使用无菌连接设备无菌对接收集袋和处理袋的管道系统。管路夹 130 是打开的。骨髓或脐带血随后经由重力流动通过入口管路 118 从收集容器转移到处理袋 102。骨髓或脐带血经过凝块和骨碎片滤器 128,在它到达处理袋 102 前,所述凝块和骨碎片滤器 128 从骨髓或脐带血取出聚集物(例如血凝块、脂肪球和骨碎片)。在骨髓或脐带血转移后,入口管路 118 在取样位点 132 之上进行热封,并且取出收集容器、凝块和骨碎片滤器 128 以及管路 118 的其余部分。

[0125] 约 25-200mL 体积的骨髓或脐带血可以放置到处理袋 102 内,其中约 50-170mL 是优选的。如果收集的骨髓或脐带血的原始体积是约 100mL,并且骨髓或脐带血具有约 30% 的血细胞比容,那么 RBC 体积将是约 30mL, WBC 以及干细胞和祖细胞体积将是约 1mL,并且剩余体积将是血浆。

[0126] 出乎意料地,不必需沉降试剂或其他异生素添加剂,以执行这个方法并且达到干细胞和祖细胞从骨髓或脐带血的有效回收,如本文所描述的。如果需要沉降试剂例如 HES,那么它任选加入处理袋 102 中的骨髓中。

[0127] 如果需要,在取样位点 132 之上的入口管路 118 热封后,待处理的骨髓或脐带血样品可以从处理袋 102 中获取。对取样枕 134 进行挤压并且释放以将样品抽取到枕内。入口管路 118 随后在取样位点 136 之上进行热封,并且连同取样位点 132 取出取样枕 134。取样枕 134 中的骨髓或脐带血随后可以通过取样位点 132 接近用于分开的测定,例如用于细胞计数、细胞生存力、微生物污染和 HLA 分析。

[0128] 如果未从处理袋 102 中获取样品,那么入口管路 118 在取样位点 136 之上进行热封,并且取出在取样位点 136 之上的所有组分。

[0129] 2. 将装载的袋组放置到处理设备内。

[0130] 将袋组 100 包括袋、管路和计量阀放置到如上所述的处理设备 200 内。

[0131] 如图 16 和 17 中所示,将处理设备 200 与袋组 100 一起放置到离心机的离心桶 228 内,所述离心桶 228 可以进行冷冻。离心机需要用另一个处理设备 200 或用合适的砝码进

行平衡。

[0132] 3. 使袋组以足够的 g 力和经过时间在处理设备中离心,以使处理袋中的骨髓或脐带血细胞基于其密度和大小分为数层。

[0133] 处理设备 200 中的袋组 100 以足够的预定 g 力和预定时间进行离心,以使处理袋 102 中的骨髓或脐带血细胞群体通过细胞密度和大小分为数层。例如,离心可以在约 1400xg 下执行约 20-约 40 分钟。在这个分层步骤过程中,计量阀 138 处于其关闭位置,从而使得不允许流体流动通过计量阀 138。加速计 293 测量在离心过程中的 g 力。

[0134] 离心优选继续直至细胞已分为 3 层。参见显示在这个分层步骤已执行后的处理袋 102 的图 19。下面、最浓的层 400 主要是 RBCs ;中间密度的中间层 402 是 WBC/ 干细胞和祖细胞以及一些血小板的层 ;并且上面、最不浓的层 404 主要是血浆伴随一些另外的血小板。与干细胞和祖细胞一起存在的血小板百分比将随着离心持续时间增加而变大。1400g 力和 20-40 分钟的离心时间足以引起超过 70% 的干细胞迁移至 WBC/ 干细胞和祖细胞层,尽管优选至少约 80% -90% 的干细胞位于这个层中。

[0135] 4. 袋组在处理设备中以较低 g 力离心,以允许大多数 RBCs 从处理袋分离且转移到 RBC 浓缩袋内。

[0136] 细胞已在先前步骤中在处理袋 102 中分层后,处理设备 200 中的袋组 100 以足够的预定较低 g 力和预定时间进行离心,以允许大多数 RBCs 从处理袋 102 分离且转移到 RBC 浓缩袋 104 内。g 力低于步骤 3 中使用的 g 力,以依具有细胞损伤的最低危险的受控方式,允许 RBC 层从处理袋 102 通过计量阀 138 通过供应管路 142 流动到 RBC 浓缩袋 104 内。例如,离心可以在约 80xg 下执行约 3-约 10 分钟。这个离心步骤可以通过使先前步骤的 g 力自动减少至预定较低 g 力与先前分层步骤的离心连续,或它可以在先前离心步骤已完成且停下来后起始且执行。

[0137] 加速计 291 测量在离心过程中的 g 力。微控制器 290 一接受预定 g 力稳定例如约 30 秒的来自加速计 291 的输入,微控制器 290 就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 打开至这样的位置,所述位置产生从处理袋 102 通过供应管路 142 且到 RBC 浓缩袋 104 内的流体通道。在计量阀 138 打开时,处理袋 102 中由压紧的 RBCs 组成的大部分下层流动到 RBC 浓缩袋 104 内。

[0138] 同时在计量阀 138 打开时,微控制器 290 在流体流过 LED256 时指导光学传感器 254 从 LED256 获取通过处理袋 102 中的骨髓或脐带血的透光率读数。微控制器 290 连续记录且分析透光率,它接受所述透光率作为随时间而变的来自光学传感器 254 的输入。图 20 显示随着细胞层流经 LED256 和光学传感器 254 在离心过程中随时间而变的相对透光率,在步骤 4 中计量阀 138 打开后开始并且持续经过步骤 8,排除任选步骤 5。线近似 S 形曲线,具有其中存在很少的透光率或无透光率并且线几乎水平的区域 A ;其中存在透光率量中的快速增加并且线的斜率陡的区域 B ;和其中存在大量透光率并且线几乎水平的区域 C。

[0139] 在这个步骤过程中,RBC 层流经光学传感器 254。因为 RBC 层具有最大的细胞浓度,所以它阻断光透射至光学传感器 254。因此,在这个步骤过程中,光学传感器 254 检测出来自 LED256 的很少光或未检测出光,如图 20 上的区域 A 所示。

[0140] 在 RBC 层已流经光学传感器 254 后,RBC 层和 WBC/ 干细胞和祖细胞层之间的界面开始流过光学传感器 254。因为这个层具有比 RBC 层更低的细胞浓度,所以更多的光通过光

学传感器 254 从 LED256 检测出。微控制器 290 一由光学传感器 254 通知,预定量的透光率已达到,这指示 WBC/ 干细胞和祖细胞组合物层的经过的开始,微控制器就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 关闭,从而使得通过计量阀 138 的流体流动停止。这由图 20 上的点 D 显示。因此,WBC/ 干细胞和祖细胞层的最低部分一开始达到光学传感器 254,计量阀 138 就关闭。

[0141] 在这个分离步骤后,约 2mL 压紧的 RBC 体积保留在处理袋 102 中,大部分 RBC 体积已转移到 RBC 浓缩袋 104 内。例如,在具有 30% 血细胞比容的 100mL 收集的骨髓的原始体积中,约 28mLRBC 体积(约 93%)目前将在 RBC 浓缩袋 104 中,并且约 2mL (7%)RBC 体积将保留在处理袋 102 中。

[0142] 5. 袋组可以任选在处理设备中以足够的 g 力和经过时间离心,以使处理袋中的细胞基于细胞密度和大小再次分为数层。

[0143] 这是个任选步骤。如果这个步骤不执行,那么该方法前进到下一个步骤。

[0144] 由于先前分离步骤和当细胞溶液通过计量阀 138 取出时发展的科里奥利 (Coriolis) 力,处理袋 102 中的细胞层(这包括 RBC 层的剩余部分、所有 WBC/ 干细胞和祖细胞层、和所有血浆层)可以在其界面处变得略微更少确定且更多混合。在这个任选步骤中,处理设备 200 中的袋组 100 可以以足够的预定 g 力和时间离心,以使剩余细胞通过细胞密度和大小再次分为更确定的层。例如,离心可以在约 1400xg 下执行约 5- 约 15 分钟。这个离心步骤可以通过给离心机编程以自动增加 g 力与先前分离步骤的离心连续,或它可以在先前离心步骤已完成且停下来后起始且执行。

[0145] 在这个离心步骤过程中,计量阀 138 处于其关闭位置,从而使得不允许流体流动通过计量阀 138。离心优选持续直至细胞已再次分为在层之间的界面处具有减少的混合的 3 层:剩余 RBCs 的下层、WBC/ 干细胞和祖细胞的中间层、和血浆上层。离心力和时间是足够的,从而使得超过 70% 的干细胞位于 WBC/ 干细胞和祖细胞层中,尽管优选至少约 80% -90% 的干细胞位于这个层中。

[0146] 6. 袋组在处理设备中离心,同时计量阀接连快速打开且关闭多次,以使剩余 RBCs 的相当大部分从处理袋更精确地转移到 RBC 浓缩袋内,而不同时转移 WBC/ 干细胞和祖细胞层。

[0147] 先前任选再分层步骤后,或如果未执行再分层步骤,那么在先前分离步骤后,处理设备 200 中的袋组 100 以足够的预定 g 力和预定时间段离心,以完成这个步骤以及步骤 7 和 8。例如,离心可以在约 80xg (与步骤 4 中使用的相同的 g 力) 下执行约 5- 约 15 分钟。

[0148] 在这个步骤中,在处理袋 102 中剩余 RBCs 的相当大部分精确地转移到 RBC 浓缩袋 104 内。较低 g 力的目的是以具有细胞损伤的最低危险的受控方式,允许 RBCs 从处理袋 102 流动到 RBC 浓缩袋 104 内。这个离心步骤可以与先前步骤的离心连续,如果先前步骤是再分层,那么通过给离心机编程以自动减少 g 力来实现,或如果先前步骤是分离,那么通过以相同 g 力继续离心来实现,或它可以在先前离心步骤完成且停下来后起始且执行。

[0149] 加速计 291 测量在离心过程中的 g 力。微控制器 290 一接受预定 g 力稳定例如约 30 秒的来自加速计 291 的输入,微控制器 290 就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 打开至这样的位置,所述位置产生从处理袋 102 通过供应管路 142 且到 RBC 浓缩袋 104 内的流体通道,并且随后关闭,经过预定时间间隔的预定持续时间连续重

复打开和关闭多次达预定数目的循环,允许从处理袋 102 到 RBC 浓缩袋 104 访问足够的重复的、不连续时间量,以允许血浆层接近光学传感器 254 水平。例如,计量阀 138 可以设定为打开约 0.1-约 0.2 秒的持续时间,并且关闭约 10 秒,这个循环重复约 10-约 30 次,尽管持续时间、时间间隔和重复的其他组合也将良好工作。随着计量阀 138 打开且关闭,处理袋 102 中剩余 RBCs 部分流动到 RBC 浓缩袋 104 内。这个精确的红细胞取出步骤引起在先前步骤后保留在处理袋 102 中的 2mLRBC 体积中约 1-1.5mL 从处理袋 102 流动到 RBC 浓缩袋 104 内,甚至进一步减少处理袋 102 中留下的 RBC 体积,并且由于伴随计量阀 138 每次短暂打开和关闭的微小体积的 RBC 转移,RBCs 不与干细胞和祖细胞混合,并且由于科里奥利力,干细胞和祖细胞不吸入到转移的红细胞内。如果需要,甚至更大比例的剩余 RBCs 也可以通过这种方式转移到 RBC 浓缩袋 102 内。

[0150] 这个最终精确计量活性由微控制器 290 指导,所述微控制器 290 随着处理袋 102 中的细胞层流过 LED256,从光学传感器 254 接受来自 LED256 的透光率读数。微控制器 290 连续记录且分析随时间而变的透光率,并且使当前值与先前值比较。在这个步骤过程中,WBC/干细胞和祖细胞层流经光学传感器 254。因为这个层在其与 RBC 层的界面处具有较高的细胞浓度,并且在其与血浆层的界面处具有较低的细胞浓度,所以随着 WBC/干细胞和祖细胞层流经光学传感器 254 和与血浆层的界面接近,透光率稳定增加。因此,在这个步骤过程中,光学传感器 254 检测出在来自 LED256 的透光率中的稳定增加。这由图 20 上区域 B 中线的斜率显示。

[0151] WBC/干细胞和祖细胞层已流经光学传感器 254 后,WBC/干细胞和祖细胞层和血浆层之间的界面开始流过光学传感器 254。因为血浆层具有比 WBC/干细胞和祖细胞层更少的细胞,所以通过光学传感器 254 从 LED256 检测出更多的光。微控制器 290 一接受来自光学传感器 254 的输入,所述输入为透光率的变化率中的预定减少已发生,这基于光学传感器 254 检测预定速率值,微控制器 290 就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 关闭,从而使得 RBCs 通过计量阀 138 的转移终止。这由图 20 上的点 E 显示,在从区域 B 中线的陡斜率到区域 C 中几乎水平的线的转换处,这是在其下 WBC/干细胞和祖细胞组合物层已流过光学传感器 254 之下并且血浆层已开始流经光学传感器 254 的点。因此,血浆层的最低部分一开始达到光学传感器 254,计量阀 138 就关闭。

[0152] 在这个分离步骤后,约 0.5-1.0mLRBC 体积保留在处理袋 102 中,另外 1-1.5mLRBC 体积已转移到 RBC 浓缩袋 104 内。

[0153] 7. 当袋组在离心时,处理设备使空干细胞袋的重量校准为零。

[0154] 计量阀 138 在先前步骤中已关闭后,离心以步骤 6 中设定的 g 力和时间继续。加速计 291 证实设定的 g 力,在这个点下测压仪 272 和微控制器 290 组合以使空干细胞袋 106 的重量校准为零。

[0155] 8. 袋组在处理设备中离心,同时计量阀接连快速打开且关闭多次,以使少量剩余 RBCs、WBC/干细胞和祖细胞层以及一些血浆从处理袋中分离且转移到干细胞袋内。

[0156] 袋组 106 在处理设备 200 中的离心以步骤 6 中设定的 g 力和时间继续。当微控制器 290 接受来自测压仪 272 的输入,所述输入为空干细胞袋 106 的重量已校准为零,微控制器 290 就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 打开至这样的位置,所述位置产生从处理袋 102 通过供应管路 156 和干细胞袋入口管路 152 到干细胞袋

106 内的流体通道,并且随后关闭,经过预定时间间隔的预定持续时间连续重复打开和关闭多次达预定数目的循环,允许从处理袋 102 到干细胞袋 106 访问足够的重复的、不连续时间量,以允许干细胞袋 106 填充直至达到它的预定重量。例如,计量阀 138 可以设定为打开约 0.1-约 0.2 秒的持续时间,并且关闭约 10 秒,这个循环重复多次。随着计量阀 138 打开且关闭,处理袋 102 中的剩余 RBCs、WBC/ 干细胞和祖细胞层以及一些血浆流动到干细胞袋 106 内。这个步骤过程中较低 g 力的目的是以具有细胞损伤(其在较高 g 力下将发生)的最低危险的受控方式,允许这些细胞从处理袋 102 流动到干细胞袋 106 内。

[0157] 在这个分离步骤过程中,测压仪 272 测量干细胞袋 106 的重量,并且微控制器 290 接受来自测压仪 272 的输入。预设 WBC/ 干细胞和祖细胞层的所需重量,并且可以设定为约 3 克-约 30 克。例如,如果干细胞袋 106 中最终干细胞产物的所需体积是 10mL,那么可以使用 10 克的重量。微控制器 290 一接受来自测压仪 272 的输入,所述输入为干细胞袋 106 已达到其预设重量,微控制器 290 就指导伺服电动机 248,以引起阀门致动器套箍 246 使计量阀 138 关闭,从而使得通过计量阀 138 的流体流动停止。

[0158] 计量阀 138 关闭后,离心以相同的 g 力继续直至已达到步骤 6 中的预设时间段设置。

[0159] 9. 离心结束并且从处理设备中取出袋组。

[0160] 在预设离心时间段结束时,离心终止并且从离心机中取出处理设备 200。从处理单元 200 中取出袋组 100,包括所有袋、计量阀 138 和管路。

[0161] 干细胞袋 106 包含剩余 RBCs、WBC/ 干细胞和祖细胞、以及一些血浆。干细胞袋 106 的内容物在本文中称为“干细胞组合物”或“干细胞的组合物”。RBC 浓缩袋 104 包含 RBCs。处理袋 102 包含在干细胞袋 106 中不包含的血浆的剩余部分。

[0162] 若需要,可以获取来自 RBC 浓缩袋 104 和干细胞袋 106 的样品。取样管路 162、取样枕 168、取样位点 166 和管路夹 164 用于取样干细胞袋 106。

[0163] 如果干细胞组合物立即使用,例如在自体背景中,那么干细胞袋 106 随后使用 Sebra 密封器(Sebra Corp., Tucson, AZ.) 与袋组 100 的其余部分分离。

[0164] 如果干细胞组合物待冷冻,那么冷冻保护剂溶液例如 DMSO 溶液 应通过无菌滤器 174 和冷冻保护剂供应管路 165 加入干细胞袋 106 中。使用骨髓和脐带血作为干细胞来源的方法的例子

[0165] 从授权供应商收集 5 单位人骨髓和 6 单位脐带血,并且在收集 1-3 天内进行处理。下表显示对于通过本文所述方法处理的骨髓和脐带血获得的数据。骨髓用肝素进行抗凝,并且脐带血用 CPD 进行抗凝。依一定尺寸制造以包含处理设备的台式离心机提供离心场。在这些实验中不使用异生素添加剂作为沉降助剂。下表 1 提供用于骨髓和脐带血实验的方法步骤概括。

[0166] 表 1:用于骨髓和脐带血实验的方法概括

[0167]

步骤	方法描述	骨髓实验1、2和3 以及所有脐带血 实验	骨髓实验4和5
1	将骨髓或脐带血转移到处理袋内。	是	是
2	将装载的袋组放置到处理设备内。	是	是
3	使袋组以足够的g力和时间在处理设备中离心,以使处理袋中的骨髓或脐带血细胞基于其密度和大小分为数层。	是,在1400 x g 下离心40分钟	是,在1400 x g 下离心40分钟
4	袋组在处理设备中以较低g力离心,以允许大多数RBCs从处理袋分离且转移到RBC浓缩袋内。	是,在80 x g下离 心5分钟	是,在80 x g下离 心15分钟
5	袋组可以任选在处理设备中以足够的力和时间离心,以使处理袋中的细胞基于细胞密度和大小再次分为数层。	是,在1400 x g 下离心10分钟	否,任选步骤省 略
6	袋组在处理设备中离心,同时计量阀接连快速打开且关闭多次,以使剩余RBCs部分从处理袋分离到RBC浓缩袋内,而不同时转移WBC/干细胞和祖细胞层。	是,在80 x g下离 心10分钟	是,离心从步骤4 在80 x g下继续
7	当袋组在离心时,处理设备使空干细胞袋的重量校准为零。	是	是
8	袋组在处理设备中离心,同时计量阀接连快速打开且关闭多次,以使小量剩余RBCs、WBC/干细胞和祖细胞层以及一些血浆从处理袋中分离且转移到干细胞袋内。	是,步骤6的80 x g离心	是,离心从步骤4 在80 x g下继续

[0168] 在处理前获取骨髓和脐带血样品,并且在处理后获取最终产物(干细胞组合物)样品。使用 Sysmex XE-2100 执行 RBCs、WBCs、血小板、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞的细胞计数。使用商业 Stem-Count 试剂盒(Beckman Coulter, Inc, Miami, FL) 根据制造商的说明书,对处理前和后的样品执行 CD34+ 细胞和 CD45+ 细胞(在所有白细胞上和在大多数 CD34+ 细胞上表达的抗原)的计算。试剂盒允许通过流式细胞术同时鉴定且计算在生物样品中的 CD45+ 和双阳性 CD45+, CD34+ 细胞群体百分比和绝对细胞计数。CD45+ 细胞的生存力基于活体染料 7-AAD 的染料排除进行测定。通过流式细胞术用在适当配置的 Beckman Coulter FC-500 流式细胞仪(Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) 上的合适门控和分析获

得细胞群体测量。使用商购可得的具有 Beckman Coulter FC-500 流式细胞仪的 Aldecount 试剂盒 (Aldagen, Durham, NC) 根据制造商的说明书,对来自骨髓单位 1、2 和 3 的样品在处理前和后执行 ALDHBr+ 细胞的鉴定和计算。试剂盒中提供的试剂促使干细胞染为亮荧光绿色。这些细胞命名为 Aldagen 亮 (ALDHBr+) 细胞。

[0169] A. 骨髓数据

[0170] 表 2 显示在处理前关于 5 次实验的骨髓体积和细胞计数。显示了每个单位中 RBCs、血小板、TNCs、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、MNCs、CD34+ 细胞和 ALDHBr+ 细胞的总数目。ND 的条目指示数据“未测定”。

[0171] 表 2 :骨髓处理前(体积和总细胞计数 / 骨髓单位)

[0172]

实验	单位 体积 (mL)	RBC	血小板	TNC	嗜中性 粒细胞	淋巴 细胞	单核 细胞	MNC	CD34+ 细胞	ALDH Br+
		10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ /单 位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位
1	83	329,000	5,390	1636	843	412	124	536	8.18	13.09
2	154	427,000	6,140	2229	1157	429	183	611	19.50	17.61
3	149	467,000	5,970	1904	1060	346	119	466	17.23	23.41
4	78	189,000	5,280	1723	1180	109	132	241	8.96	ND
5	78	170,000	6,720	1728	1235	133	149	281	9.50	ND
平均值	108	317,000	5,900	1844	1095	286	141	427	12.7	18.04
SD	39	135,000	590	236	155	154	26	161	5.3	5.18

[0173] 表 3 显示来自在表 2 中提及的 5 单位骨髓关于在 5 次实验中获得的干细胞组合物的体积和细胞计数。显示了每个单位中 RBCs、血小板、TNCs、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、MNCs、CD34+ 细胞和 ALDHBr+ 细胞的总数目。

[0174] 表 3 :骨髓干细胞组合物(体积和总细胞计数 / 骨髓单位)

[0175]

实验	单位 体积 (mL)	RBC	血小板	TNC	嗜中性 粒细胞	淋巴 细胞	单核 细胞	MNC	CD34+ 细胞	ALDH Br+
		10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位	10 ⁶ / 单位
1	20.9	6,700	5,710	1271	531	374	98.2	472	8.6	11.4
2	20.7	6,210	6,090	1482	600	339	161.5	501	19.7	20.2
3	21.3	6,390	6,010	1325	552	264	98	362	13.7	17.4
4	21	6,090	4,530	1407	880	170	79.8	250	9.7	ND
5	20.8	4,160	6,010	1075	647	96	106.1	202	9.5	ND
平均值	20.9	5910.0	5670.0	1312.0	642.0	248.6	108.7	357.4	12.2	16.3
SD	0.2	1004.9	653.6	154.9	140.4	115.8	31.0	131.8	4.6	4.5

[0176] 表 4 呈现了基于表 2 和 3 中呈现的 5 次实验结果,每个细胞类型的百分比回收。通过将干细胞组合物中的细胞计数(表 3)除以骨髓处理前样品中的相应值(表 2),并且将这个商乘以 100,计算百分比回收。例如,在实验 1 中,通过将(6,700x10⁶)除以(329,000x10⁶),并且将商乘以 100,以得到 2.0%的回收(表 4),计算 RBCs 的百分比回收。可以通过从 100%中减去百分比回收简单地计算百分比消耗。例如,在实验 1 中,红细胞的百分比消耗是 100% - 2.0% = 98.0%。

[0177] 表 4:在骨髓干细胞组合物中每个细胞类型的百分比细胞回收

[0178]

实验	RBC	血小板	TNC	嗜中性 粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	MNC	CD34+ 细胞	ALDH Br+
1	2.0	105.9	77.7	63.0	90.8	79.2	88.1	105.1	87.1
2	1.5	99.2	66.5	51.9	79.0	88.3	82.0	101.0	114.7
3	1.4	100.7	69.6	52.1	76.3	82.4	77.7	79.5	74.3
4	3.2	85.8	81.7	74.6	156.0	60.5	103.7	108.3	ND
5	2.4	89.4	62.2	52.4	72.2	71.2	71.9	100.0	ND
平均值	2.1	96.2	71.5	58.8	94.8	76.3	84.7	98.8	92.0
SD	0.8	8.3	8.0	10.0	34.9	10.8	12.2	11.3	20.6

[0179] 表 4 中的数据出乎意料地证实可能达到平均 97.9%的 RBCs 消耗 (2.1%回收),同时回收超过 90%的干细胞,如通过 CD34+ 细胞和 ALDHBr+ 细胞测量的(分别为 98.9%和 92.0%的平均回收)。更加出乎意料地,表 4 证实甚至可以回收超过 90%的干细胞,同时回收平均仅 59%的嗜中性粒细胞。骨髓的这个选择性细胞分离水平将预期需要使用异生素沉降试剂。

[0180] 表 5 和 6 显示在处理前骨髓中和在干细胞组合物中 RBCs 与具核细胞类型比,其基于表 2 和 3 的数据。这些细胞彼此的比限定在自然界中未发现也未由任何其他细胞处理系统产生的独特干细胞组合物。具有非常低数目 RBCs 的干细胞组合物的开发通过产生更安全的细胞产物代表干细胞治疗的重要进展,这是由于与关于干细胞输液的过量红细胞相关的不利作用和有助于用免疫亲和或流式细胞术方法的进一步纯化过程的细胞产物。具体地,表 5 和 6 中的数据显示在处理前的骨髓中,RBCs 与 CD34+ 细胞的平均比最初是 25,642 :

1,并且在处理后,干细胞组合物中的比是 539 :1。RBCs 与干细胞比中的这种急剧减少反映该方法选择性消除 RBCs 而不损失 CD34+ 细胞的成功。观察到红细胞与 ALDHBr+ 细胞比中的相似减少。

[0181] 表 5 :骨髓单位(处理前)中 RBCs 与具核细胞比

[0182]

实验	RBC:TNC	RBC: 嗜中性粒细胞	RBC: 淋巴细胞	RBC:单核细胞	RBC: MNC	RBC:CD34+	RBC: ALDH Br+
1	201	390	799	2653	614	40220	25134
2	192	369	995	2333	699	21897	24248
3	245	441	1350	3924	1002	27104	19949
4	110	160	1734	1432	784	21094	ND
5	98	138	1278	1141	605	17895	ND
平均值	169	300	1231	2297	741	25642	23110
SD	63	140	358	1102	163	8795	2773

[0183] 表 6 :骨髓干细胞组合物中 RBCs 与具核细胞比

[0184]

实验	RBC:TNC	RBC: 嗜中性粒细胞	RBC: 淋巴细胞	RBC:单核细胞	RBC: MNC	RBC:CD34+	RBC: ALDH Br+
1	6	14	20	75	16	847	640
2	4	10	18	38	12	315	308
3	5	12	24	65	18	468	368
4	4	7	36	76	24	627	ND
5	4	6	43	39	21	437	ND
平均值	5	10	28	59	18	539	439
SD	1	3	11	19	5	205	177

[0185] 这些细胞群体的效用是其包含活细胞固有的。表 7 包含关于骨髓中 CD45+ 细胞的细胞生存力的分析结果,如使用商业试剂盒(Stem-Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA)测量的。不存在处理后 CD45+ 细胞生存力中的显著变化,这证实该过程的生物相容性。

[0186] 表 7 :在骨髓处理前中和在干细胞组合物中活 CD45+ 细胞百分比

[0187]

实验	在骨髓处理前中活 CD45+ 细胞 %	在干细胞组合物中活 CD45+ 细胞 %
1	76.0	79.8
2	83.0	82.0
3	82.0	84.0
4	92.3	93.5
5	94.2	91.9
平均值	85.5	86.2
SD	7.6	6.1

[0188] B. 脐带血数据

[0189] 表 8 显示在处理前 6 个脐带血单位的体积和细胞计数。显示了处理前每个单位中 RBCs、血小板、TNCs、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、MNCs 和 CD34+ 细胞的总数目。

[0190] 表 8 :脐带血处理前(体积和总细胞计数 / 脐带血单位)

[0191]

实验	单位 体积 (mL)	RBC	Plt.*	TNC	Neut.	Lymph.	Mono.	MNC	CD34+ 细胞
		(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)
1	114	370170	25478	880	483	239	103	342	11.7
2	90	332394	16258	789	535	146	60	206	6.47
3	127	462065	28483	2852	1290	1144	242	1386	2.99
4	89	302792	22311	799	460	256	62	318	1.12
5	92	322158	30843	745	403	212	102	314	0.89
6	80	272902	15720	575	295	251	18	269	0.8
平均值	98.7	343746.8	23182.2	1106.7	577.7	374.7	97.8	472.5	4.0
SD	17.9	66315.3	6268.1	861.0	358.5	379.1	77.4	450.1	4.4

[0192] *Plt. = 血小板, Neut. = 嗜中性粒细胞, Lymph. = 淋巴细胞, Mono. = 单核细胞

[0193] 表 9 显示关于来自表 8 中提及的脐带血相应单位的 6 次实验中获得的干细胞组合物的体积和细胞计数。显示了处理后每个单位中 RBCs、血小板、TNCs、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、MNCs 和 CD34+ 细胞的总数目。

[0194] 表 9 :脐带血干细胞组合物。(体积和总细胞计数 / 脐带血单位)

[0195]

实验	单位 体积 (mL)	RBC	Plt.*	TNC	Neut.	Lymph.	Mono.	MNC	CD34+ 细胞
		(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)	(10 ⁶ /单位)
1	12	2070	5971	432	115	191	99	308	11.33
2	11	9990	11988	651	367	186	58	244	5.77
3	11	3996	21079	1386	287	878	202	1080	2.29
4	11	5016	19152	535	207	250	71	320	1.12
5	11	12744	20736	610	329	192	76	268	0.82
6	12	5980	15077	571	269	256	21	277	0.94
平均 值	11.3	6632.7	15667.2	697.5	262.3	325.5	87.8	416.2	3.7
SD	0.5	3985.7	5916.5	345.5	90.4	272.5	61.5	326.4	4.2

[0196] *Plt. = 血小板, Neut. = 嗜中性粒细胞, Lymph. = 淋巴细胞, Mono. = 单核细胞

[0197] 表 10 呈现了基于表 8 和 9 中呈现的 6 次实验结果, 每个细胞类型的百分比回收。通过将干细胞组合物中的细胞计数(表 9)除以脐带血处理前样品中的相应值(表 8), 并且将这个商乘以 100, 计算百分比回收。

[0198] 表 10 :在干细胞组合物中每个脐带血细胞类型的细胞百分比回收

[0199]

实验	RBC	Plt.*	TNC	Neut.	Lymph.	Mono.	MNC	CD34+ 细胞
1	0.6	23.4	49.1	23.8	79.9	96.1	90.1	96.8
2	3.0	73.7	82.5	68.6	127.4	96.7	118.4	89.2
3	0.9	74.0	48.6	22.2	76.7	83.5	77.9	76.6
4	1.7	85.8	67.0	45.0	97.7	114.5	100.6	100.0
5	4.0	67.2	81.9	81.6	90.6	74.5	85.4	92.1
6	2.2	95.9	99.3	91.2	102.0	116.7	103.0	117.5
平均值	2.0	70.0	71.4	55.4	95.7	97.0	95.9	95.4
SD	1.3	25.0	20.2	29.5	18.3	16.6	14.5	13.5

[0200] *Plt. = 血小板, Neut. = 嗜中性粒细胞, Lymph. = 淋巴细胞, Mono. = 单核细胞

[0201] 表 10 中的数据证实可能达到 98.0% 的平均 RBCs 消耗 (2.0% 回收), 同时回收平均 95% 的干细胞, 如通过 CD34+ 标记测量的。此外, 表 10 证实甚至回收平均 95% 的干细胞, 同时仅回收平均 55% 的嗜中性粒细胞。与骨髓的情况一样, 将预期需要使用异生素沉降助剂以达到这个选择性细胞分离水平。

[0202] 下表 11 和 12 显示在处理前脐带血中和在脐带血干细胞组合物中 RBCs 与各种其他细胞类型比, 这基于表 8 和 9 的数据。不存在异生素添加剂, 这些细胞彼此的比限定在自然界中未发现也未由任何其他细胞处理系统产生的独特干细胞组合物。这些干细胞组合物的效用要求干细胞是活的, 具有红细胞的显著消耗且无异生素添加剂。包含位于来源骨髓或脐带血中的大多数干细胞和祖细胞且具有非常低 RBC 与 CD34+ 细胞比的干细胞组合物的可用性通过产生更安全的细胞产物代表干细胞治疗的重要进展, 这是由于与关于干细胞输液的过量红细胞相关的潜在不利作用。

[0203] RBCs 与 CD34+ 细胞的平均比最初是 201,834 : 1, 并且在处理后, 它减少至 5,007 : 1。RBCs 与干细胞比中的这种急剧减少反映该方法选择性消除 RBCs 而不显著损失 CD34+ 细胞的成功。

[0204] 表 11 : 在脐带血单位 (处理前) 中 RBCs 与具核细胞比

[0205]

实验	RBC:TNC	RBC:Neut.*	RBC:Lymph.	RBC:Mono.	RBC:MNC	RBC:CD34+
1	421	766	1549	3594	1082	31638
2	421	621	2277	5540	1614	51375
3	162	358	404	1909	333	154537
4	379	658	1183	4884	952	270350
5	432	799	1520	3158	1026	361975
6	475	925	1087	15161	1015	341128
平均值	382	688	1337	5708	1004	201834
SD	112	194	619	4806	408	143933

[0206] *Neut. = 嗜中性粒细胞, Lymph. = 淋巴细胞, Mono. = 单核细胞

[0207] 表 12 : 在脐带血干细胞组合物中 RBCs 与具核细胞比

[0208]

实验	RBC:TNC	RBC:Neut.	RBC:Lymph.	RBC:Mono.	RBC:MNC	RBC:CD34+
1	5	18	11	21	7	183
2	15	27	54	172	41	1731
3	3	14	5	20	4	1745
4	9	24	20	71	16	4479
5	21	39	66	168	48	15541
6	10	22	23	285	22	6362
平均值	11	24	30	123	23	5007
SD	7	9	25	104	18	5617

[0209] *Neut. = 嗜中性粒细胞, Lymph. = 淋巴细胞, Mono. = 单核细胞

[0210] 这些细胞群体的效用是其包含活细胞固有的。表 13 包含关于脐带血中 CD45+ 细胞的细胞生存力的分析结果,如使用 Stem-Kit 测量的。不存在 CD45+ 细胞生存力中的显著变化,这是展示处理后脐带血产物中干细胞生存力维持的公认替代物。

[0211] 表 13 :在脐带血处理前中和在脐带血干细胞组合物中活 CD45+ 细胞百分比

[0212]

实验	在脐带血处理前中活 CD45+细胞 %	在脐带血干细胞组合物中活 CD45+细胞 %
1	82	75
2	61	61
3	96	94
4	79	77
5	88	88
6	74	72
平均值	80.0	77.8
SD	11.9	11.9

[0213] 干细胞组合物

[0214] 如上所述的方法产生了衍生自骨髓或脐带血的干细胞组合物,其包括干细胞、血浆、RBCs 和 WBCs,并且不具有异生素添加剂。衍生自骨髓的干细胞组合物具有对于每个 TNC 约 5 个 RBCs,对于每个嗜中性粒细胞约 10 个 RBCs,对于每个 MNC 约 18 个 RBCs,和对于每个干细胞约 400-500 个 RBCs 的比,如通过 CD34+ 细胞或 ALDHBr+ 细胞测量的(表 6)。衍生自脐带血的干细胞组合物具有对于每个 TNC 约 11 个 RBCs,对于每个嗜中性粒细胞约 24 个 RBCs,对于每个 MNC 约 23 个 RBCs,和对于每个干细胞约 5,000 个 RBCs 的比,如通过 CD34+ 细胞测量的(表 12)。

[0215] 衍生自骨髓的干细胞组合物回收约 79% - 约 100% CD34+ 细胞,和约 74% - 约 100% ALDHBr+ 细胞,同时消耗约 97% - 约 99% RBCs。衍生自脐带血的干细胞组合物回收超过约 77% - 约 100% CD34+ 细胞,同时消耗约 96% - 约 99% RBCs。

[0216] 结果证实出乎意料的发现:在 RBCs 从处理袋分离且转移到 RBC 浓缩袋内的过程自

始至终,骨髓或脐带血中的干细胞可以维持其在 WBC/ 干细胞和祖细胞层中相对较高的位置(比红细胞层更接近于血浆层),并且嗜中性粒细胞维持其在 WBC/ 干细胞和祖细胞层中相对较低的位置(更接近于红细胞层)。将预期流出处理袋的 RBCs 将引起干细胞、嗜中性粒细胞和红细胞以及其他细胞类型的显著混合,这是由于随着 RBCs 向下朝着计量阀流动的科里奥利效应和非层流。此种混合将预期阻碍观察到的相对于嗜中性粒细胞低回收的干细胞高回收,以及相对于 RBCs 高效消耗的干细胞高回收。

[0217] 本发明在上文已参考特定实施方案进行描述。本领域技术人员可以设想包含在权利要求范围内的本发明的其他实施方案和变化。

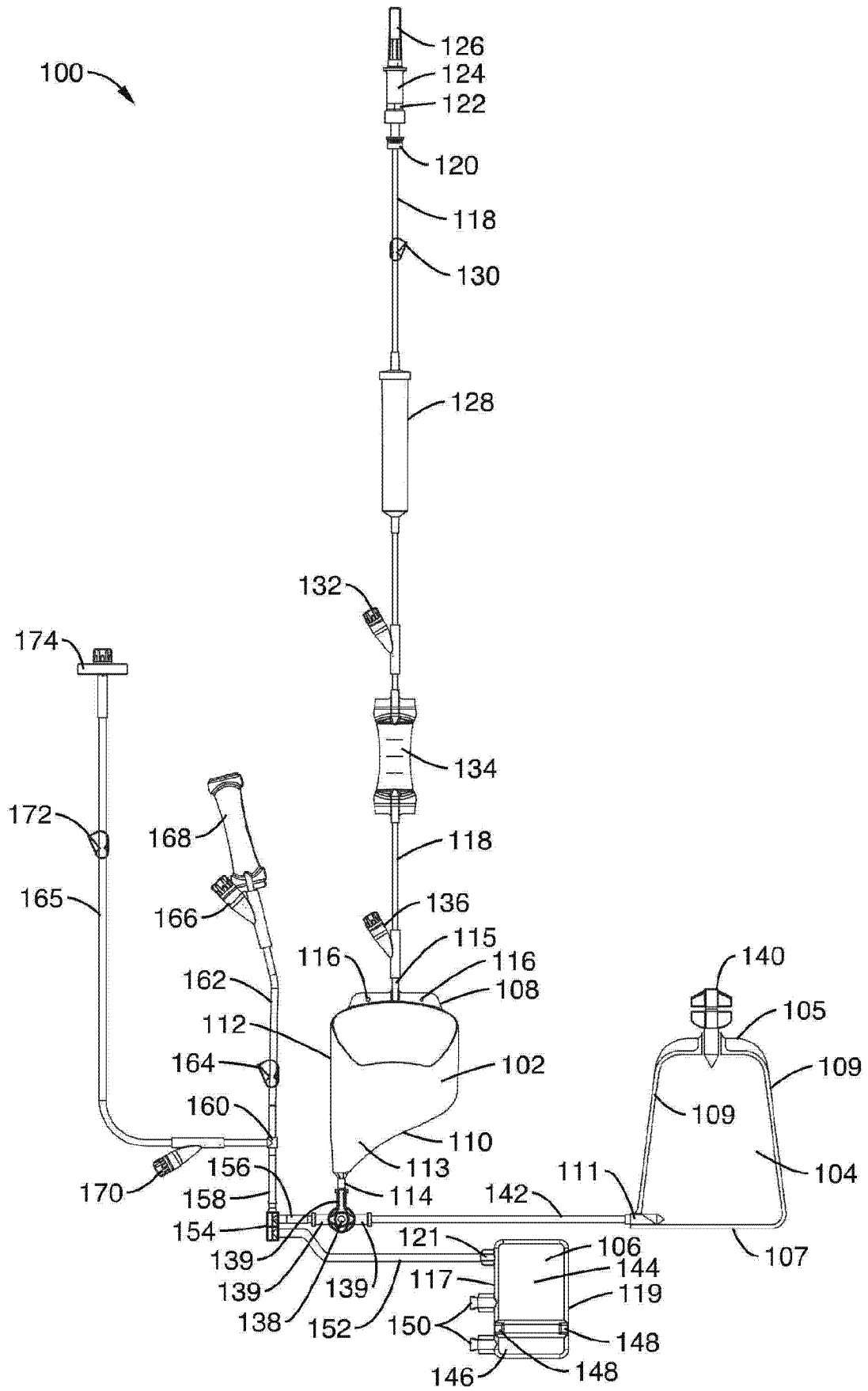


图 1

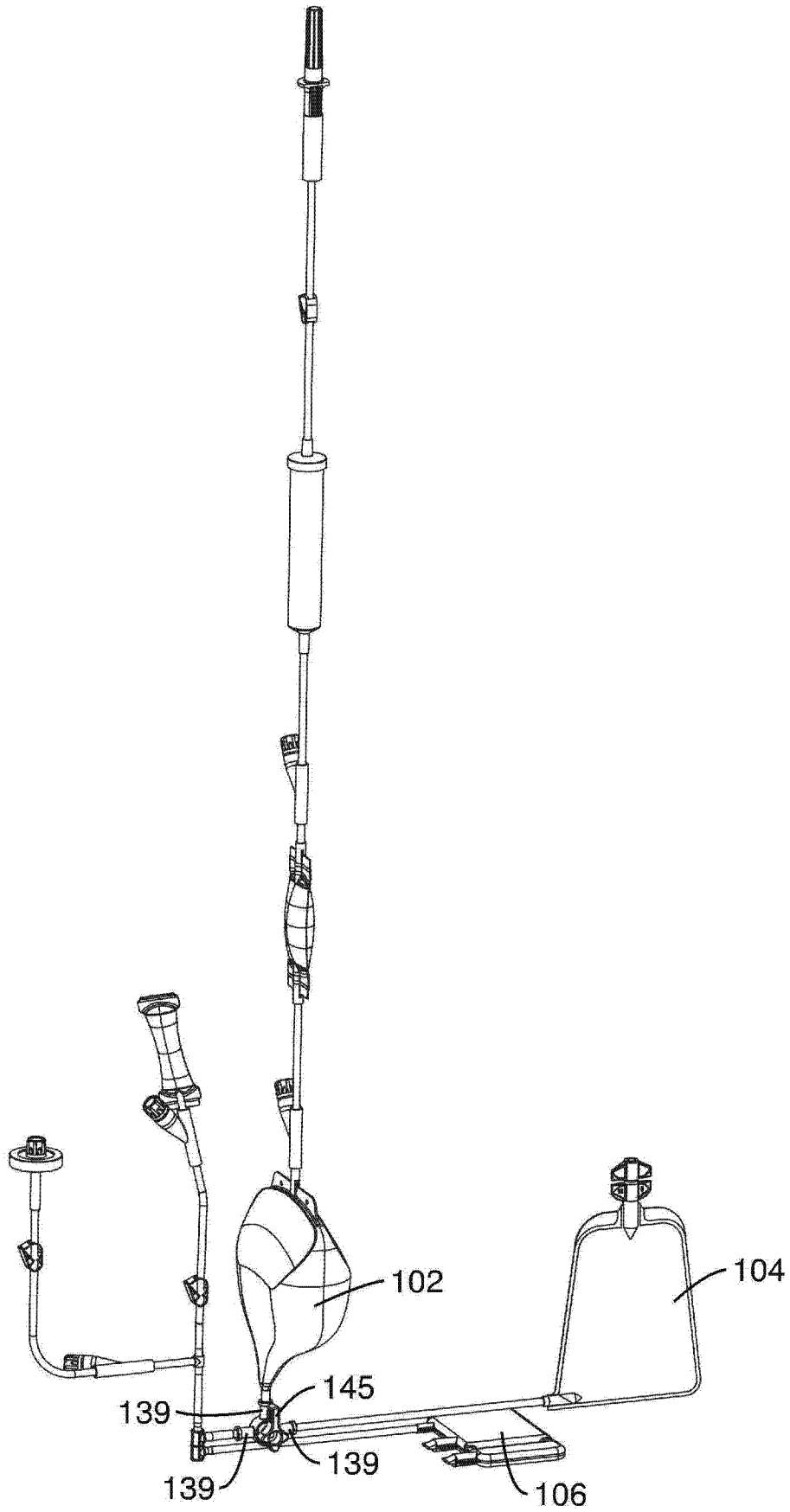


图 2

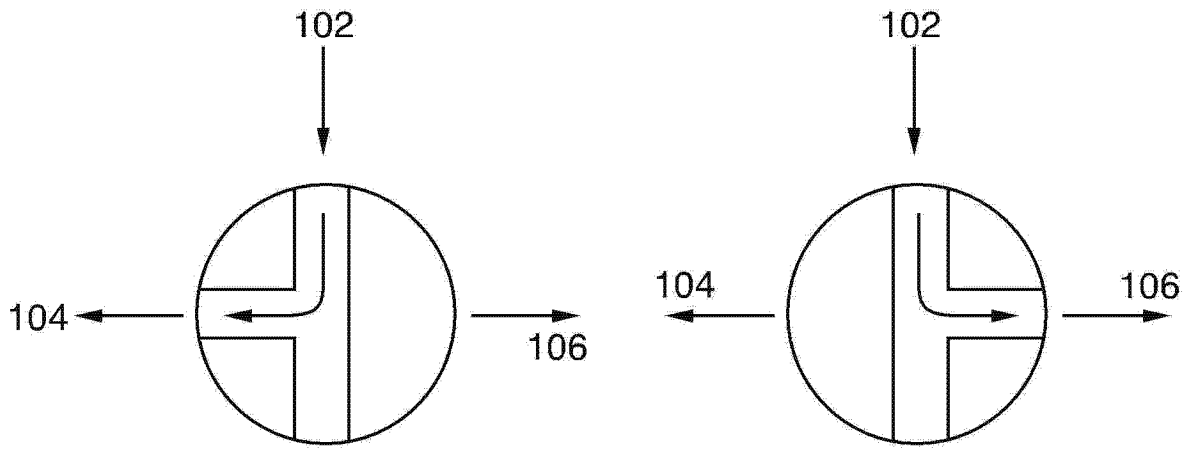


图 3A

图 3B

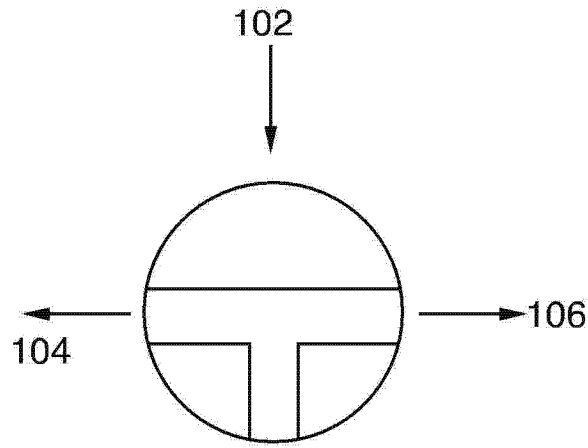


图 3C

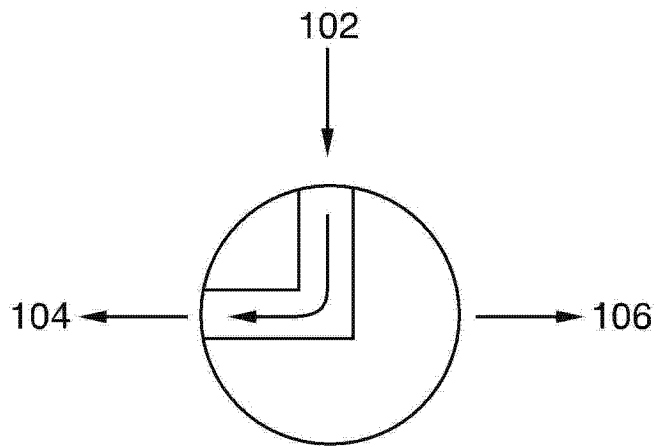


图 4A

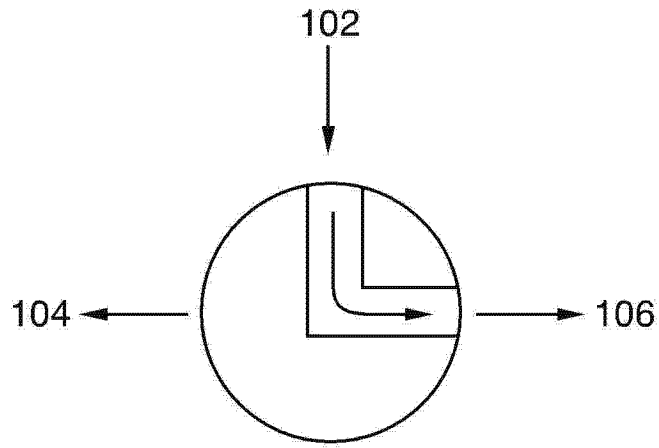


图 4B

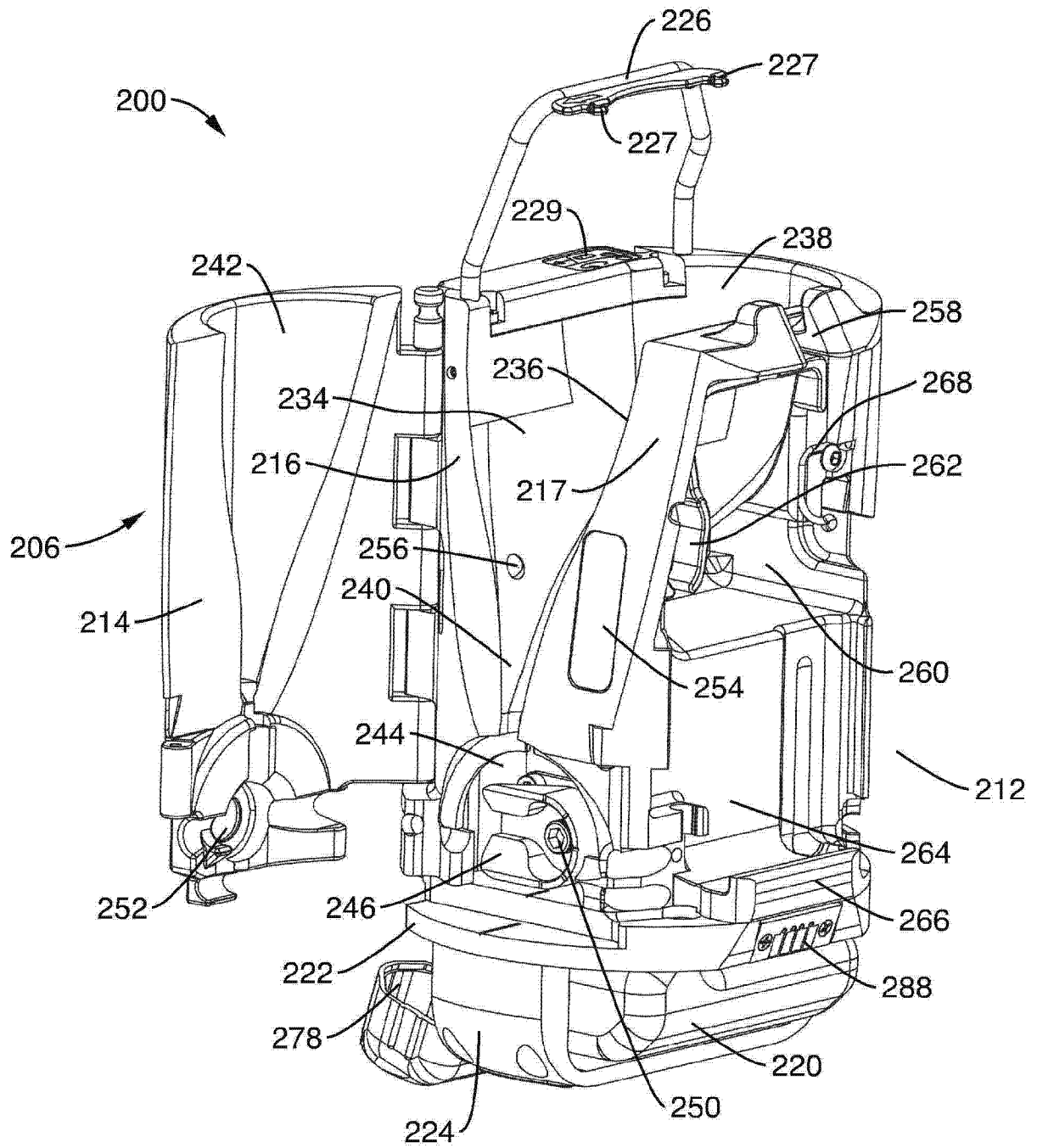


图 5

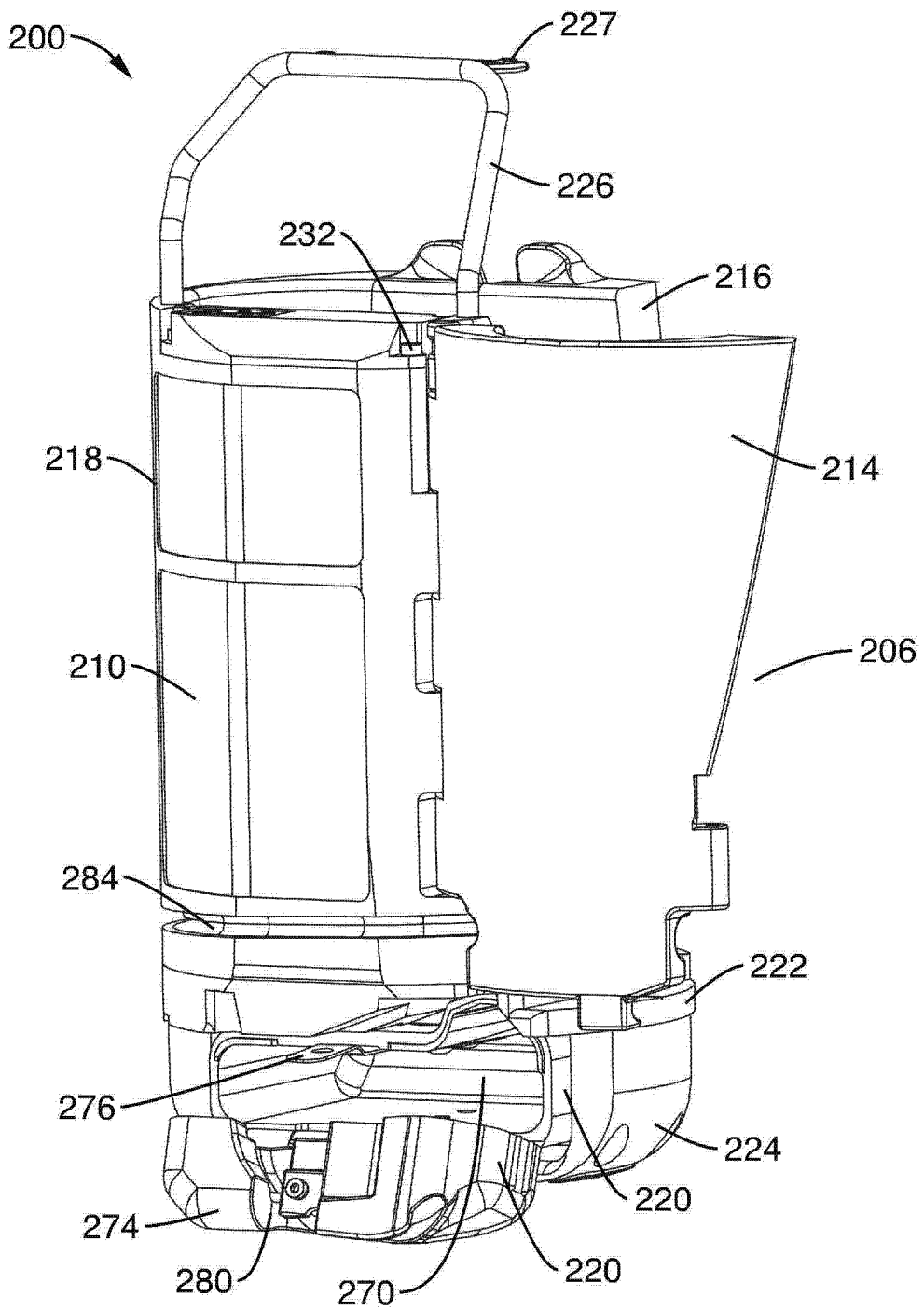


图 6

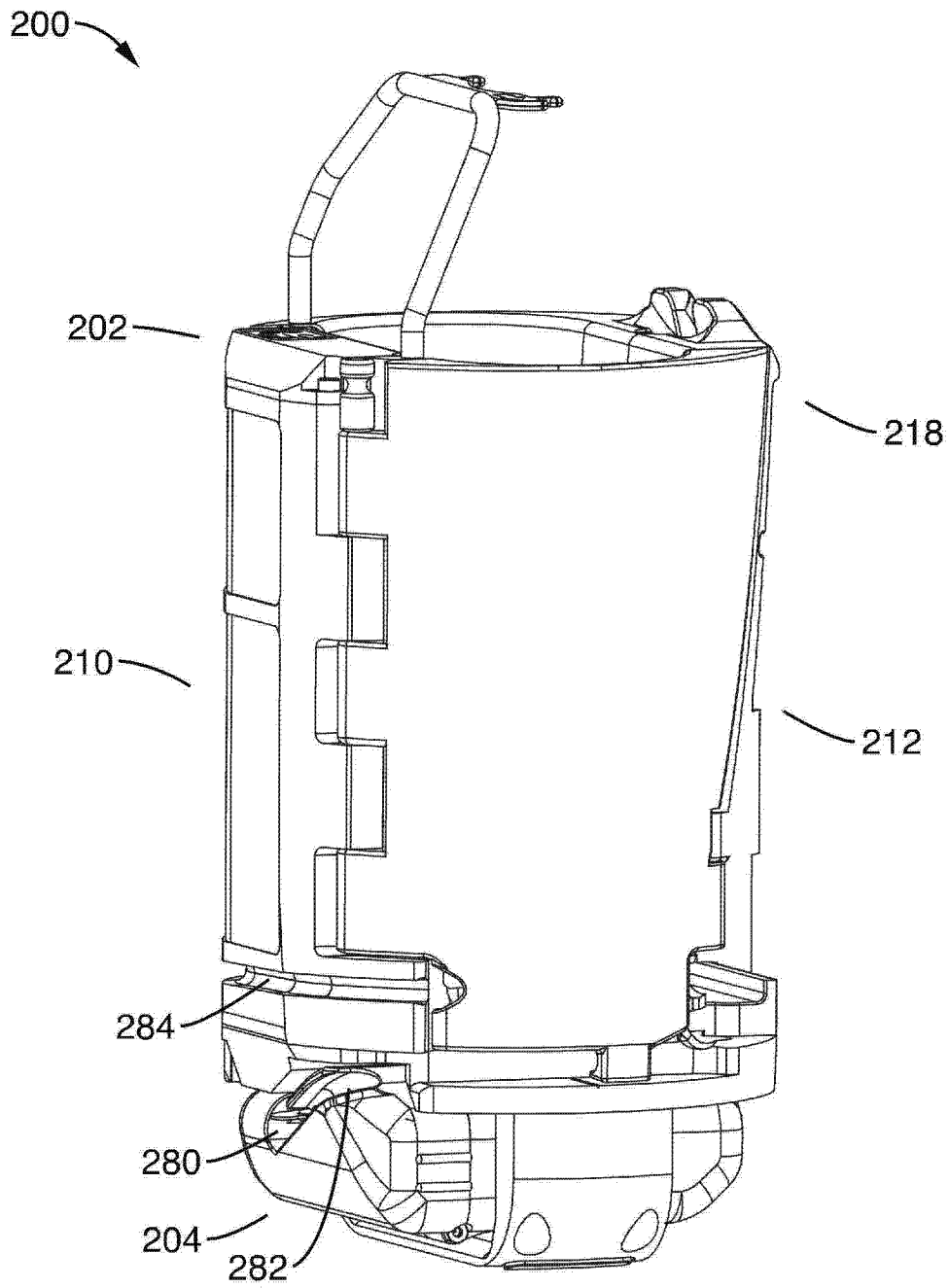


图 7

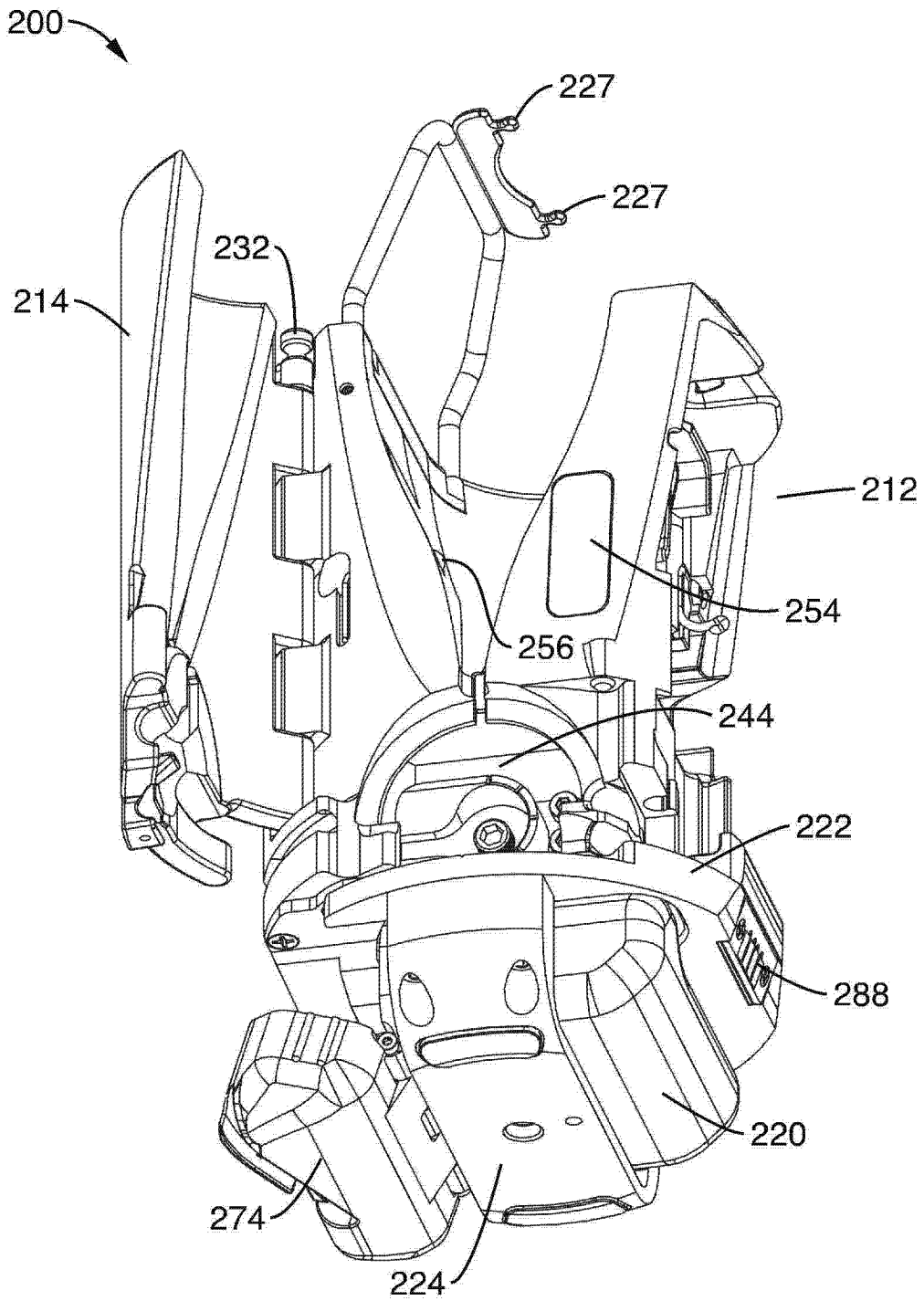


图 8

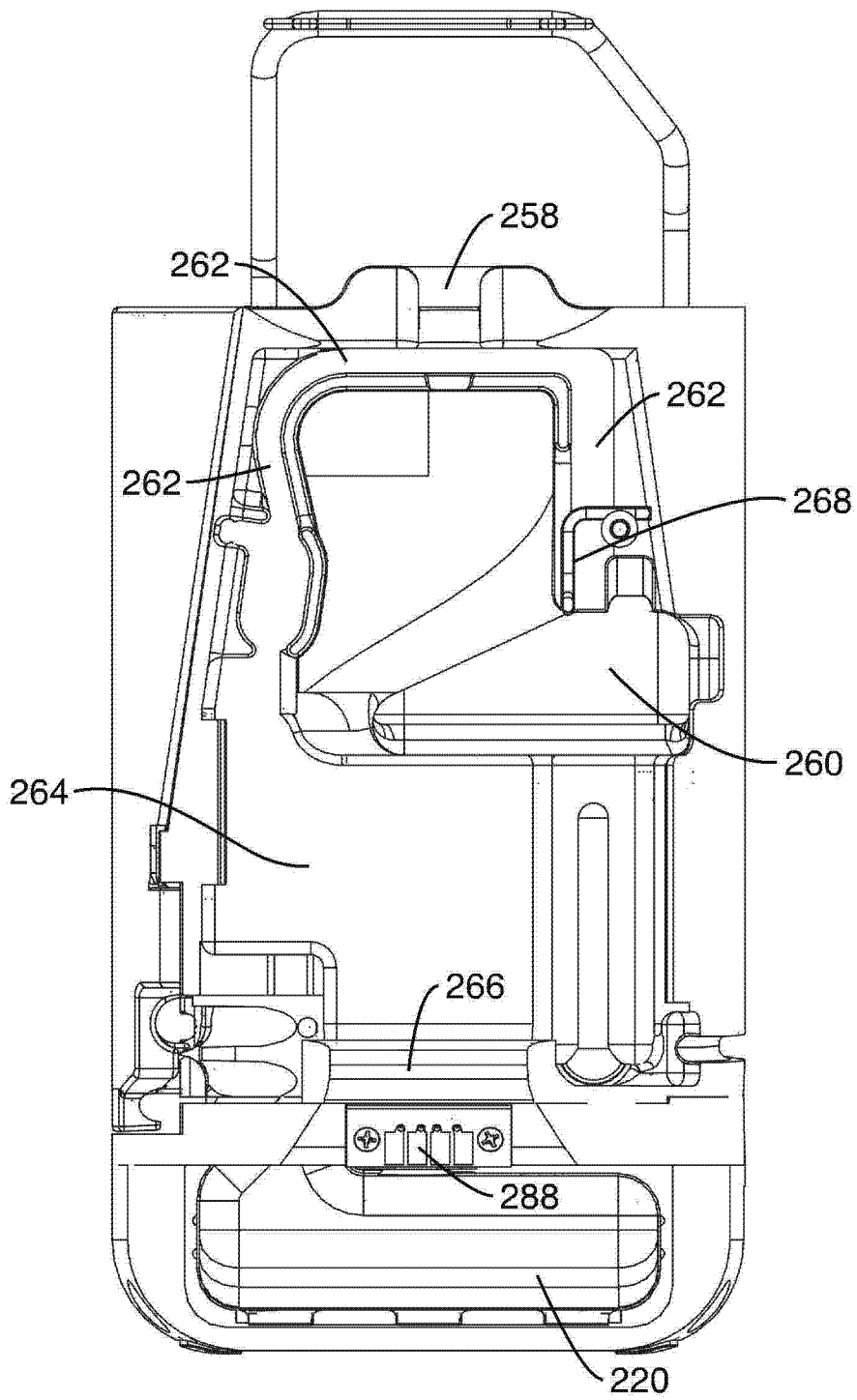


图 9

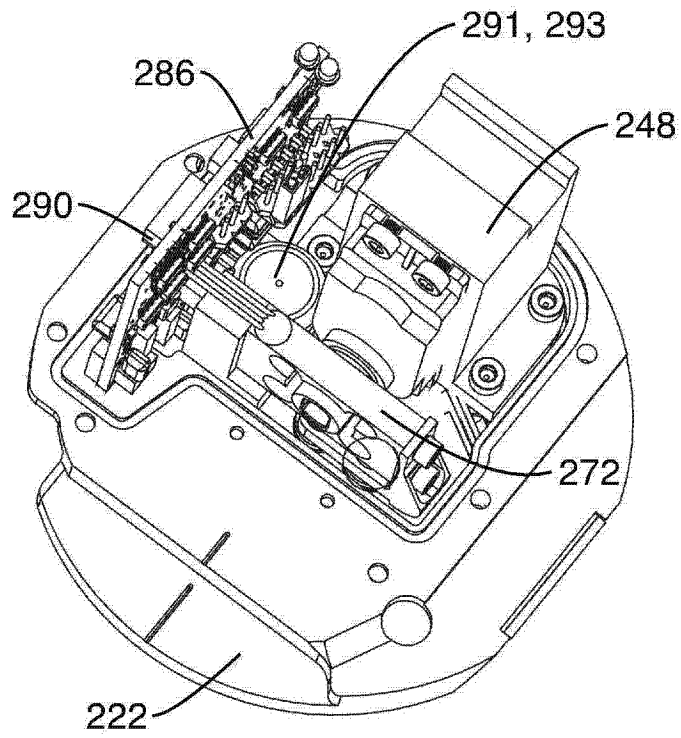


图 10

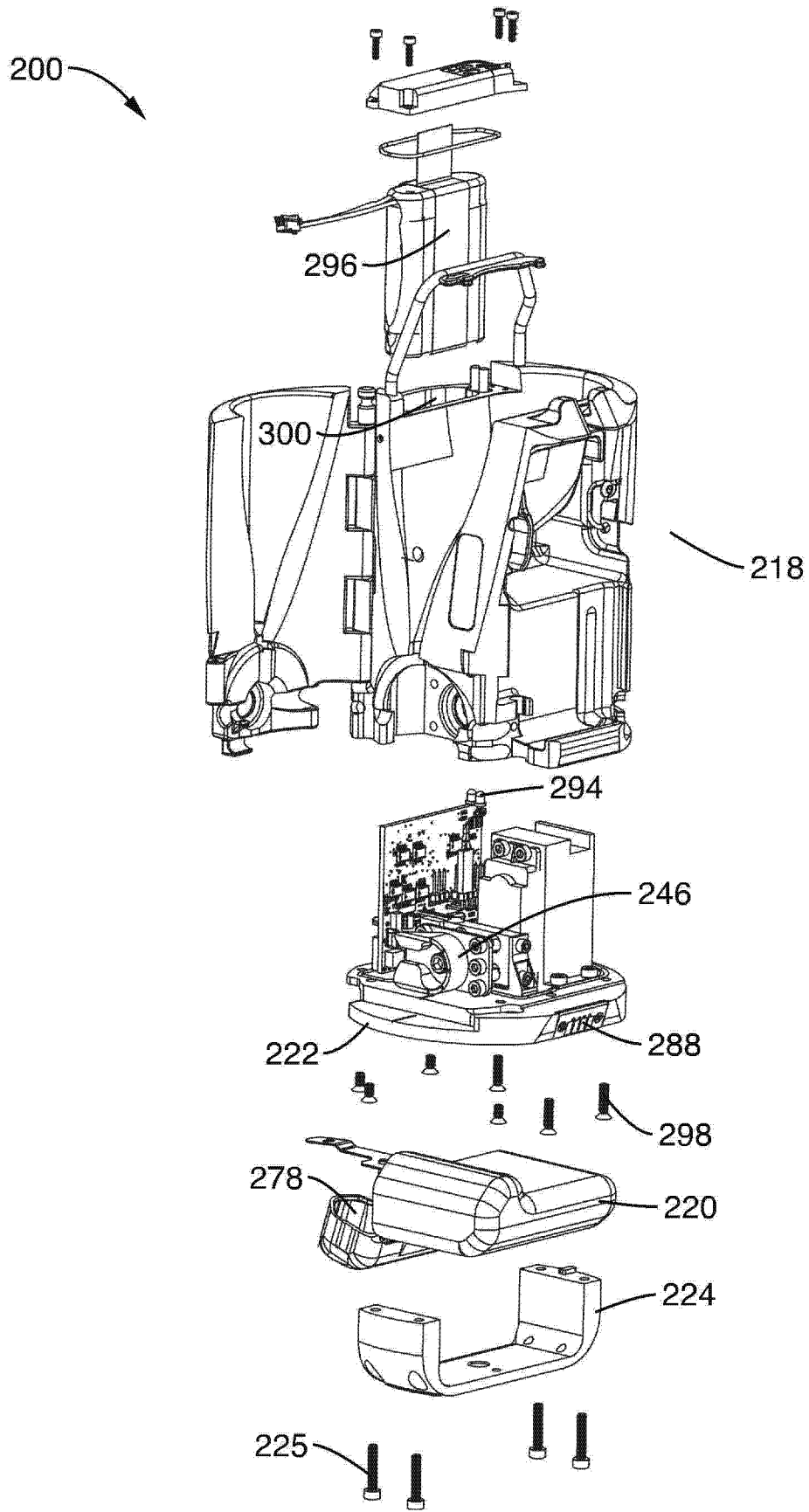


图 11

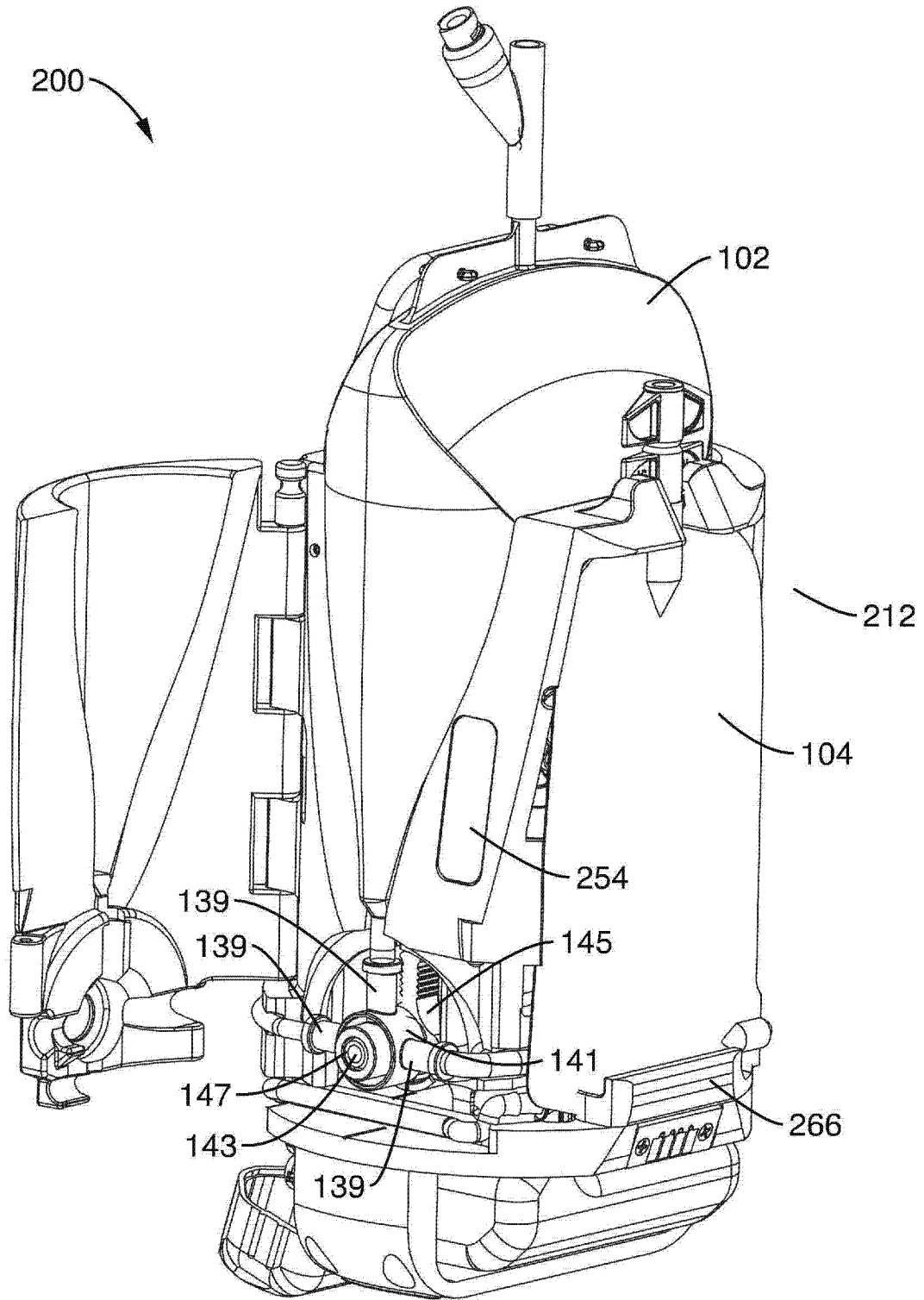


图 12

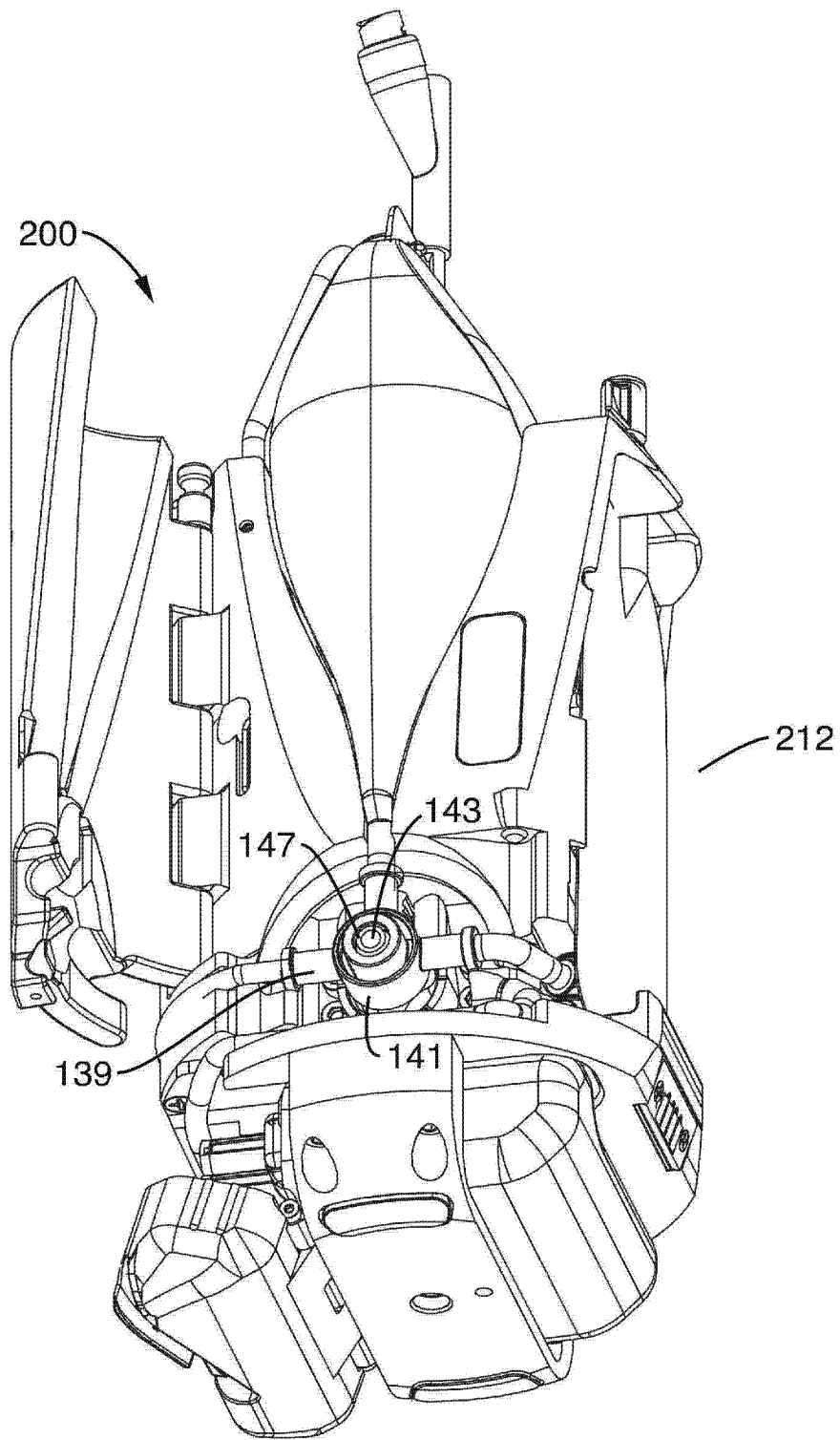


图 13

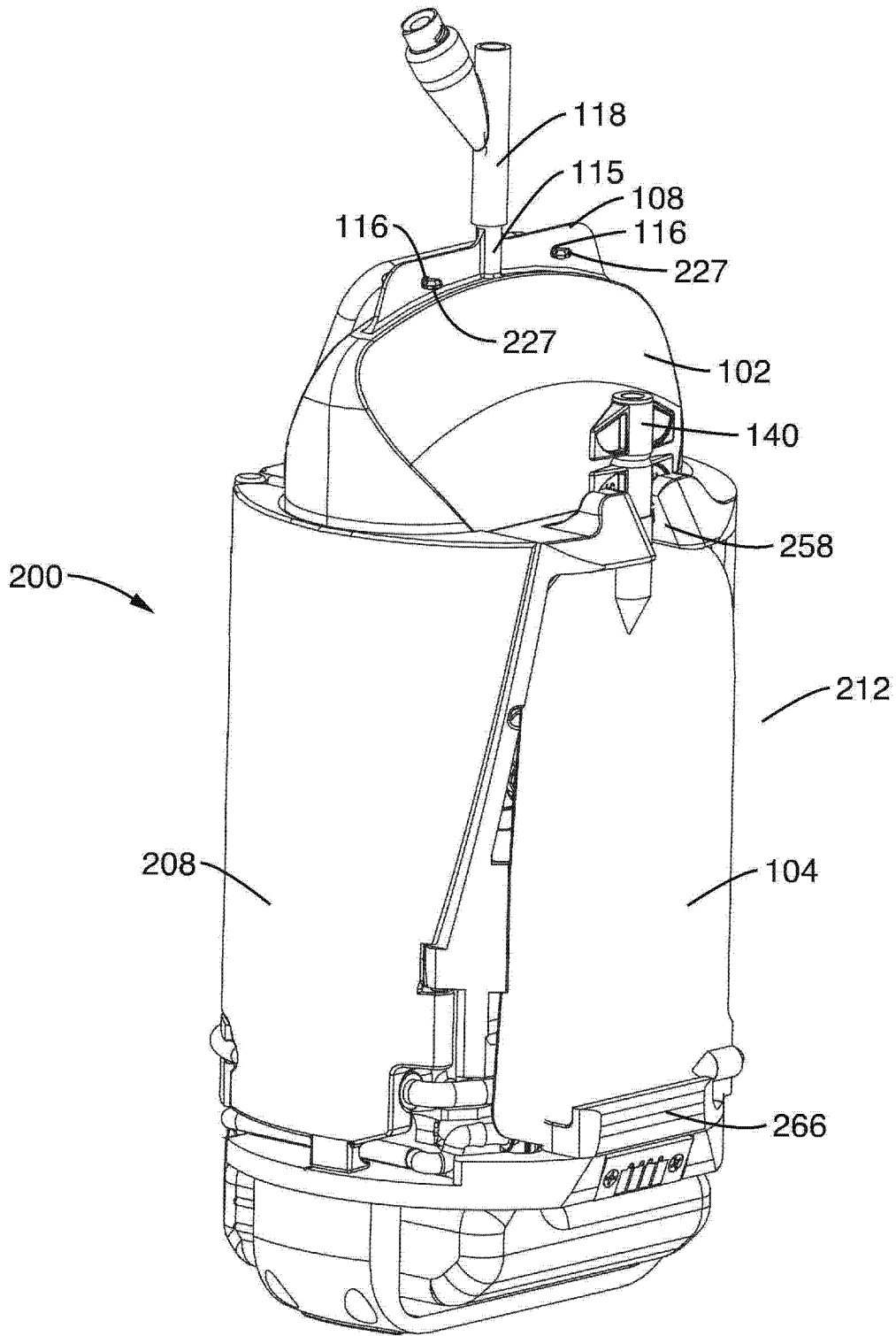


图 14

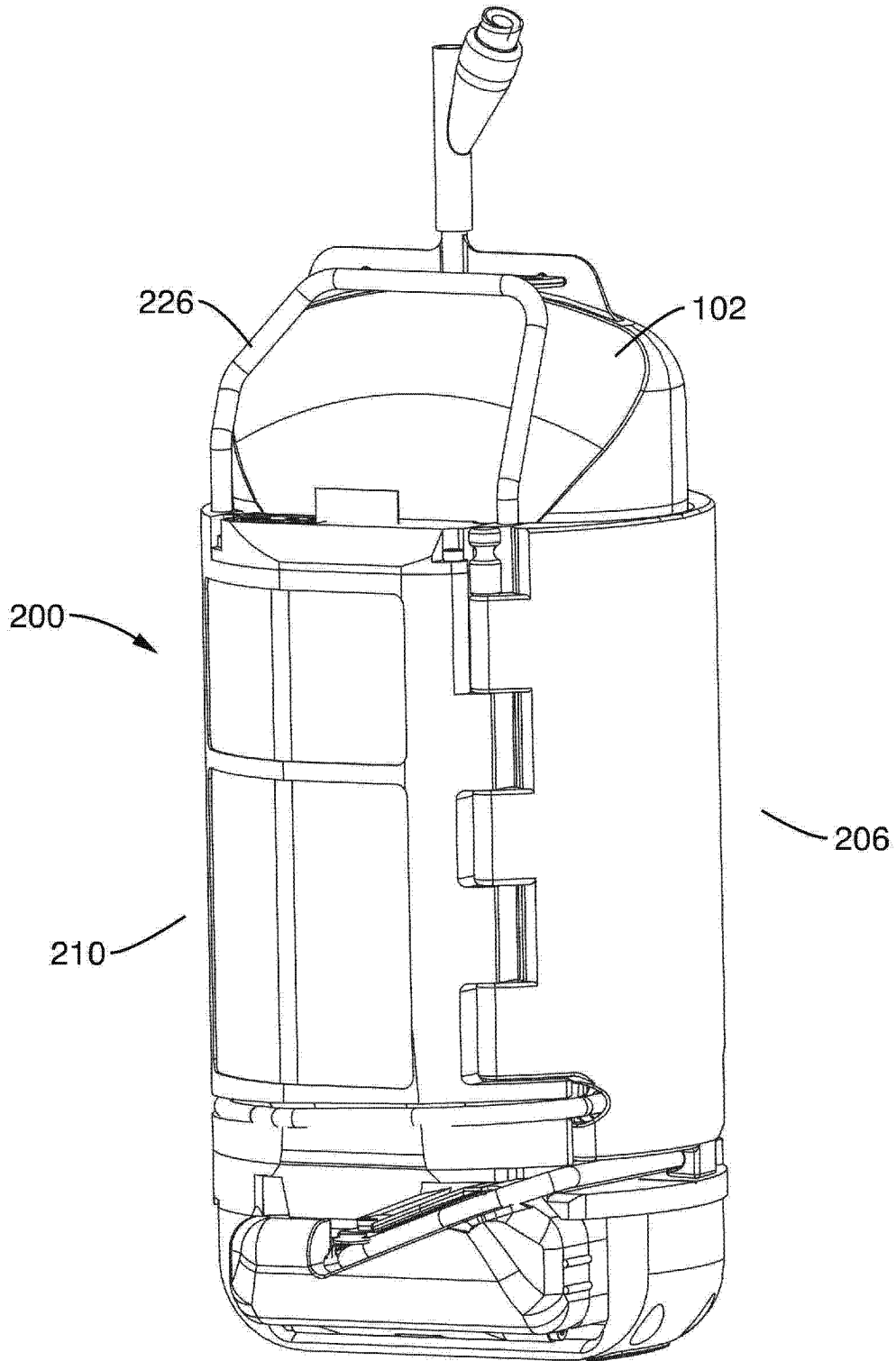


图 15

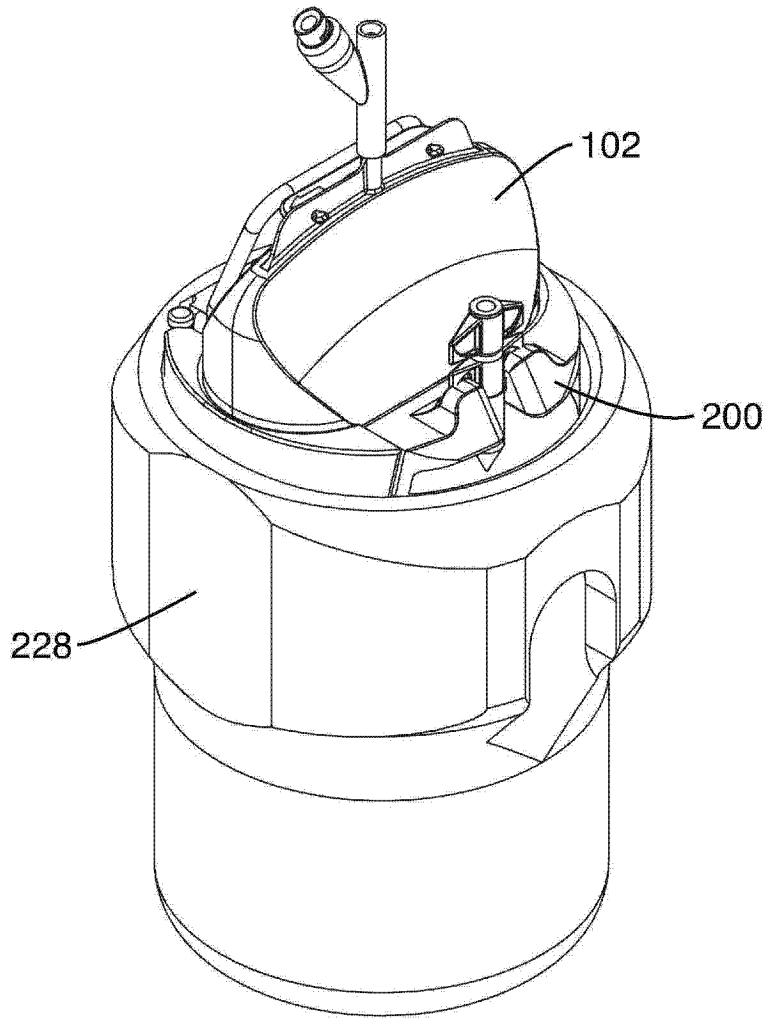


图 16

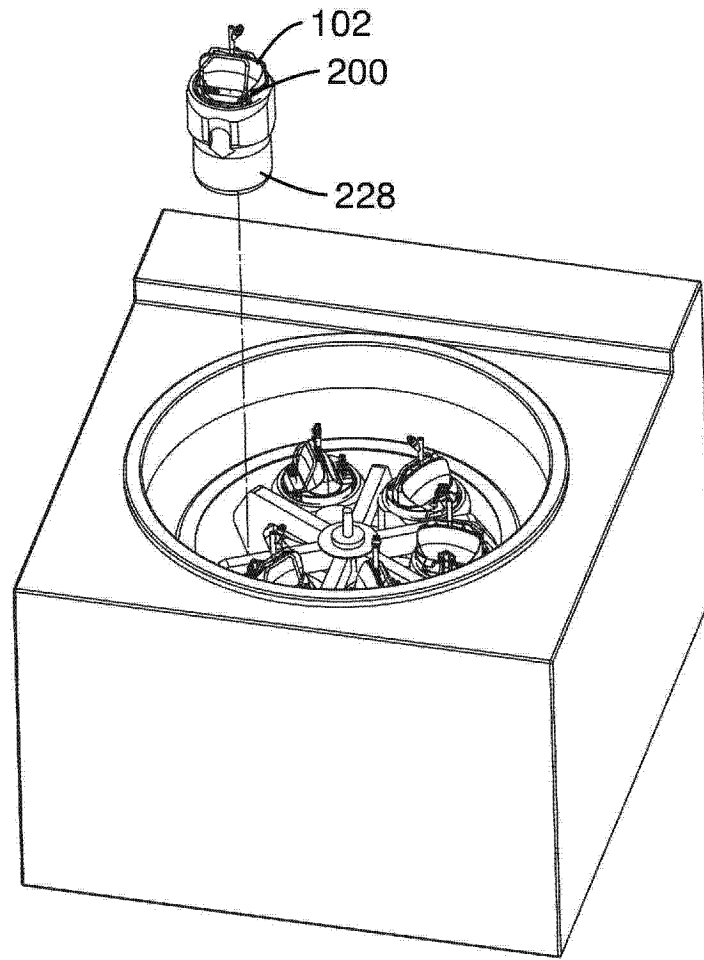


图 17

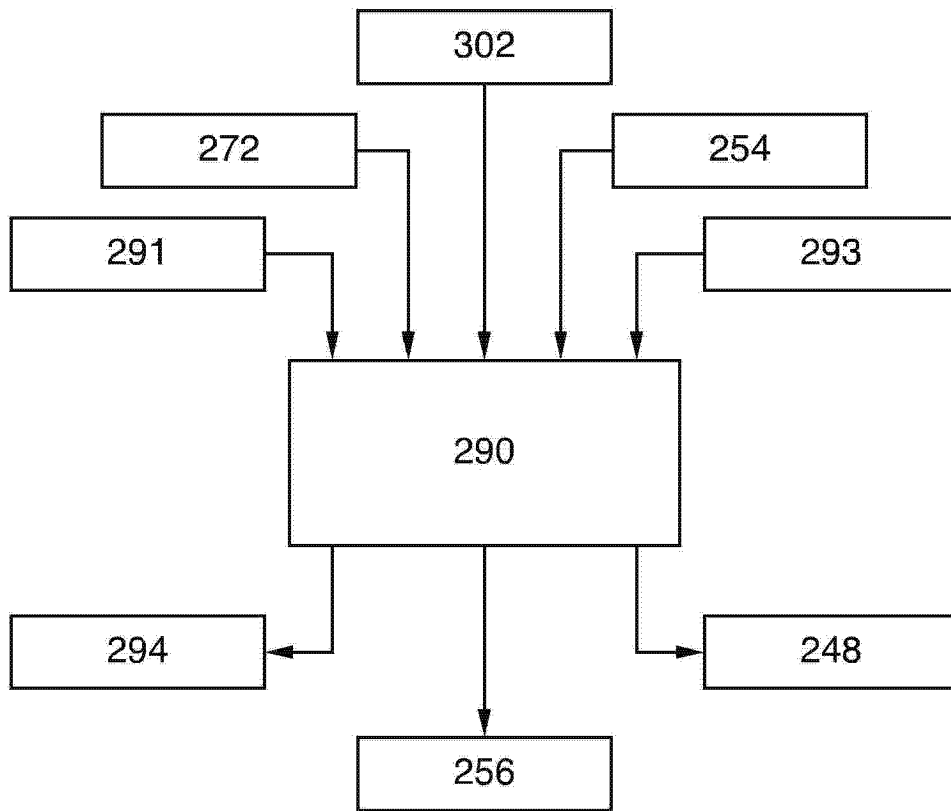


图 18

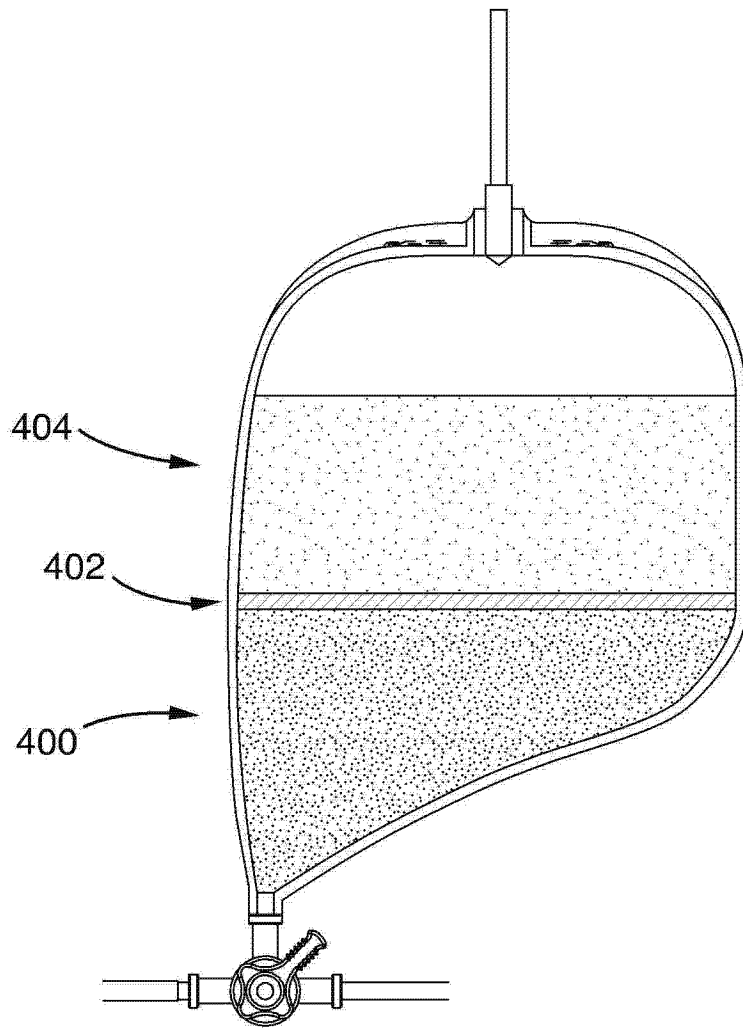


图 19

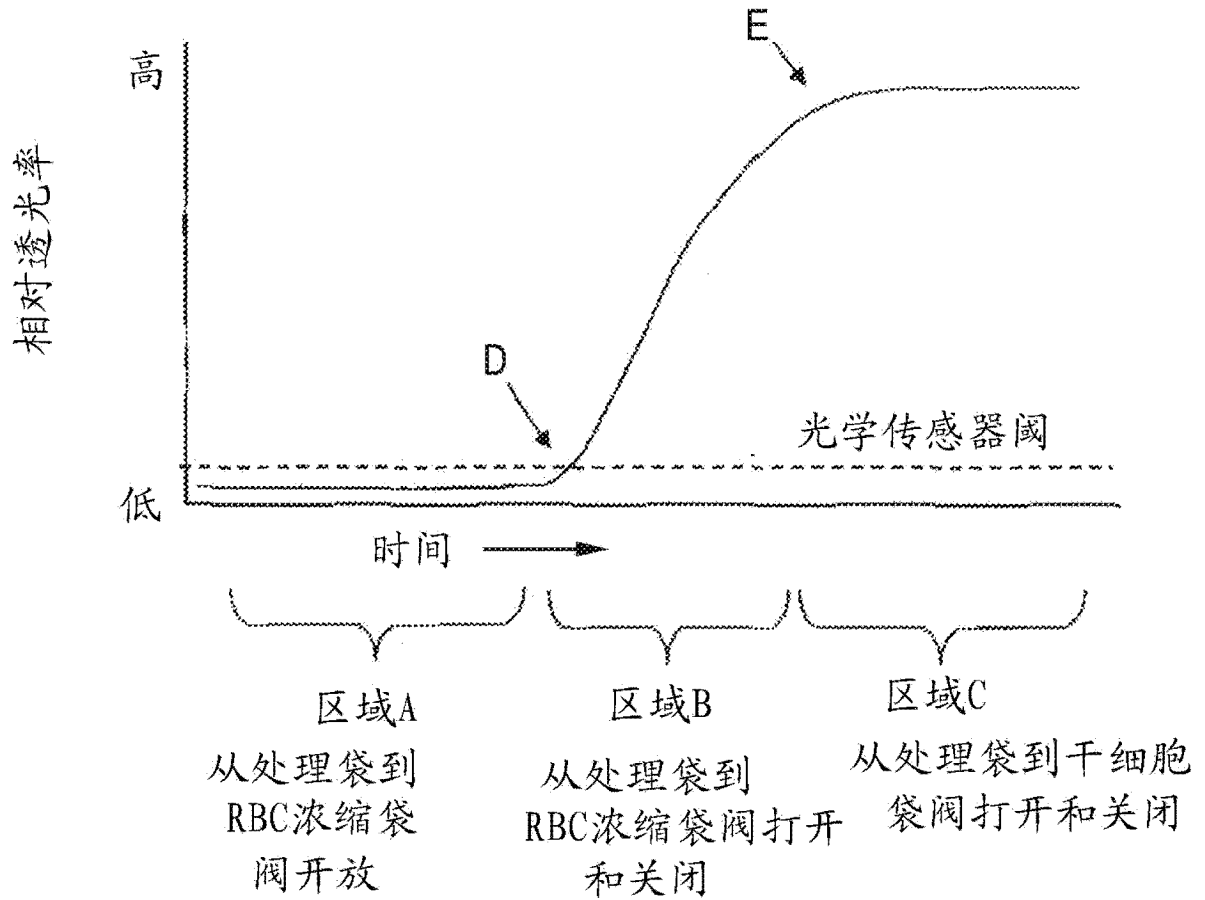


图 20