



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101352365 B

(45) 授权公告日 2010.09.08

(21) 申请号 200810003467.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2002.11.05

A61B 17/322 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/330,959 2001.11.05 US

(56) 对比文件

60/393,746 2002.07.08 US

US 3613242 A, 1971.10.19, 全文.

60/393,745 2002.07.08 US

WO 94/18895 A1, 1994.09.01, 全文.

(62) 分案原申请数据

02826777.X 2002.11.05

US 4773418 A, 1988.09.27, 全文.

(73) 专利权人 迈德詹尼克斯公司

DE 3432897 A1, 1986.03.20, 全文.

地址 美国加利福尼亚

US 3470782 A, 1969.10.07, 全文.

DE 2939057 A1, 1981.04.09, 全文.

审查员 吕媛

(72) 发明人 安德鲁·L··珀尔曼

斯蒂芬·F··贝洛莫

伦纳德·I··加芬克尔

吉列尔莫·A··皮瓦

梅纳赫姆·D··沙维特

利奥尔·罗森贝格 伊扎克·利平

莫迪凯·布赫曼 埃诺特·阿尔蒙

诺姆·沙尼 尼夫·谢尔

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 张晓威

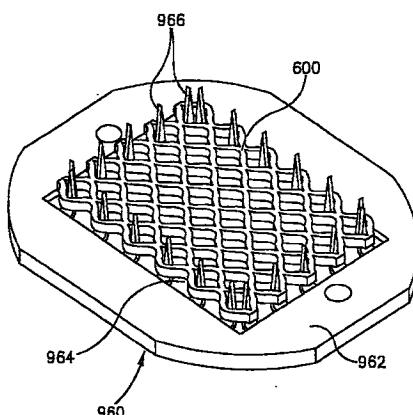
权利要求书 1 页 说明书 31 页 附图 37 页

(54) 发明名称

用于固定微器官的定位器

(57) 摘要

本发明涉及微器官定位器。具体而言，本发明涉及用于在微器官的保持和任选的遗传修饰过程中或者在运输过程中将其固定于生物反应器中的定位器，所述定位器包括：固定器体，其具有一个或多个孔，在所述孔上固定所述微器官；和多个微器官固定元件，所述元件固定相对于所述多个孔中的一个并列的所述微器官，使得所述微器官的超过 70% 的两侧得以暴露。



1. 用于在微器官的保持和任选的遗传修饰过程中或者在运输过程中将其固定于生物反应器中的定位器,所述定位器包括:固定器体,其具有一个或多个孔,在所述孔上固定所述微器官;和多个微器官固定元件,所述元件固定与所述一个或多个孔并列的所述微器官,使得所述微器官的超过 70% 的两侧得以暴露。
2. 权利要求 1 的定位器,其中所述微器官具有网状结构。
3. 权利要求 2 的定位器,其中所述固定元件包括钉或杆,其通过部分或完全拉伸的网中的开口放置,从而将所述网固定于所述孔上。
4. 权利要求 2 的定位器,其中所述固定元件包括适于在非所述微器官周围固定所述网的元件。
5. 权利要求 2 的定位器,其中所述固定元件包括钉或杆,其适于穿透或通过其非微器官周围中的开口放置,从而将所述网固定于所述孔上。
6. 权利要求 1 的定位器,其中所述固定器体是由圆周槽形成的环,其包括所述孔。
7. 权利要求 6 的定位器,其中所述槽的轴向长度为 300 至 2000 微米。
8. 权利要求 6 的定位器,其中所述槽的轴向长度大于 500 微米。
9. 权利要求 6 的定位器,其中所述槽的轴向长度为 1 毫米或更高。
10. 权利要求 6 的定位器,其中所述固定元件沿所述环的圆周放置,并且适于将长的微器官以其长度沿所述圆周固定,使得在所述固定元件之间,所述微器官得以暴露。
11. 权利要求 1 的定位器,使得所述微器官的超过 80% 的两侧得以暴露。
12. 权利要求 1 的定位器,使得所述微器官的超过 90% 的两侧得以暴露。
13. 权利要求 2 的定位器,其中所述固定元件包括适于在所述网和所述孔的周围固定所述网的元件。

## 用于固定微器官的定位器

[0001] 本申请是 2002 年 11 月 5 日提交的,发明名称为“制备皮肤移植物的方法和装置以及由此制备的移植物”的中国专利申请 02826777.X 的分案申请。

### [0002] 相关申请

[0003] 本申请根据 35 U.S.C. 119(e) 要求 2001 年 11 月 5 日提交的美国临时申请 60/330,959 和 2002 年 7 月 8 日提交的美国临时申请 60/393,746 和 60/393,745 的优先权,这些申请引入本文作参考。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及基于组织的微器官领域,如基于组织的治疗微器官。

### 背景技术

[0005] 已知多种递送治疗剂的方法。例如,治疗剂可以口服、经皮、通过吸入、通过注射、通过贮存缓释而递送。在各种情况中,递送方法受到接受药物的机体处理、需要频繁给药,及对可使用的分子大小的限制的限制。在一些方法中,给药间治疗剂的量变化。

[0006] 本文描述了用于制备和使用治疗微器官的方法和装置,治疗微器官 (therapeutic micro-organ) 在本文中称为 TMO,其用于产生和 / 或给予治疗剂。

[0007] 一般而言,微器官和治疗微器官的一些方法及用途在美国专利 5,888,720、PCT 申请 PCT/IL01/00979、欧洲申请 01204125.7 和美国专利申请 09/589,736 中有描述,这些文献引入本文作参考。这些文献也包括现有技术综述,本文不再对其进行重复。它们还包括有关 TMO 可能的用途以及可能产生的蛋白质的类型的信息。

[0008] 授予 Mitrani 的美国专利 5,888,720 和 6,372,482 以及未公布的专利申请 09/589,736、PCT/IL01/00979 和 EP 01204125.7 提供了有关制备和保持微器官以及制备和保持经遗传修饰的微器官的一些信息,这些文献引入本文作参考。这些信息的一部分,包括关于保持所需的营养物及气体的信息和遗传修饰可能性的信息可应用于本发明的一些实施方案中。由于本发明主要涉及制备、保持和使用微器官和治疗微器官的改进的技术,因此没有重复这些文献中描述的细节。

[0009] 作为一般原则,按照图 1 所示的方法产生试剂。首先,小规模制备治疗分子并测试其功效 (10)。然后,开发用于大量制备可能是蛋白质的治疗分子的方法 (12)。这些分子必需被分送 (14)、贮存 (16),然后注射 (18),或者以其他方式引入患者中 (20)。

### 发明内容

[0010] 本文描述用于制备和使用微器官和治疗微器官的方法和装置。

### [0011] 本文所用定义

[0012] 本文中使用的术语“外植块”指来自个体的一个或多个器官的活组织的移取部分。

[0013] 本文中使用的术语“微器官”指来源于外植块的组织结构,所述外植块以对细胞活力和功能有益,同时保持至少一些体内相互作用的方式制备。微器官由两个或多个邻接的

组织层构成,保留了它们所来源于的一个或多个器官的微结构,使足够的营养物和气体能够被动扩散至其细胞,并且使细胞排泄物能够被动扩散出所述细胞,以便使细胞毒性减至最低并且使因营养不足和代谢物积聚引起的细胞死亡减至最低。

[0014] 本文中使用的术语“供体”指从其移取该外植块的个体,所述外植块用于形成一个或多个微器官。

[0015] 本文中使用的术语“治疗微器官”指已经遗传改变,以产生治疗剂,如蛋白质的微器官。该治疗剂可以是或可以不是天然存在的机体物质。

[0016] 本文中使用的术语“植入”指将一个或多个微器官或 TMO 引入受者中,其中所述微器官或 TMO 可以来源于该受者的组织,也可以来源于另一个体或动物的组织。该微器官或 TMO 可以通过移植入该受者的皮肤、通过皮下植入或通过置于该受者中的其他理想的位置而植入。

[0017] 本文中使用的术语“受者”指将一个或多个微器官或 TMO 植入其中的个体。

[0018] 尽管为了使表达清楚完整,本文描述了制备和使用 TMO 的所有方面,并且从过程的开始至结束描述了本发明的代表性实施方案,但应理解,本文所描述的每一方面均可用其他方法和 / 或设备以实现其他方面,并且均可用于其他目的,它们中的一些在本文中有描述。本发明包括关于制备和保持用于转化为 TMO 的部分的微器官。应理解,根据本发明的这些方面制备的微器官除用于转化为 TMO 外,还可用于其他目的。

[0019] 一般而言,TMO 的制备包括 (1) 从要治疗的患者或动物,或者从相同或不同类型的另一个人或动物获取组织样品;(2) 从该组织制备有活力的微器官或微器官结构;(3) 对该微器官进行遗传改变;和 (4) 优选地,验证由经改变的微器官 (TMO) 产生理想的药物(例如蛋白质)。TMO 的应用包括在患者或动物自己体内产生治疗物质,如蛋白质,用于治疗。例如,可以将 TMO 移植入受者的皮肤内或移植至受者的皮肤上,以在体内产生该药物。在来自另一个体的组织的情况下,任选地保护该移植物免受受者免疫系统的反应,例如,通过将 TMO 封闭于免疫保护胶囊或外壳中。例如,将膜置于该 TMO 周围,这通过在移植前将该 TMO 置于胶囊中,或以其他方式进行。该膜的孔径应足够大,以允许营养物、排泄物和该治疗剂通过,同时,该孔径应足够小,以使免疫系统的细胞不能通过。

[0020] 本发明的一些实施方案的一个主要方面涉及采集适合制备微器官的组织样品的装置和方法。在本发明的代表性实施方案中,将皮肤组织用作 TMO 的基础。或者,该组织可以是肺、肠、肌肉或肝组织。任何组织都可能使用。已证明多种组织类型,例如皮肤、肺、肝均适于制备微器官。可以采用本领域已知的任何移取组织的方法从机体移取要采集的组织,如活检程序。优选地,采集程序保持来源组织的微结构的完好。

[0021] 例如,在本发明的代表性实施方案中,当皮肤是被采集的组织时,通过提升该组织表面、切割皮肤切片达特定的深度而采集组织样品。该切片足够厚,以包括所有理想的皮肤层。任选地,理想的层包括整个表皮和至少部分真皮下层(一直到并且包括皮肤的完整厚度),相当于 0.3 至 3 毫米厚,取决于切取样品的皮肤所在的位置。当使用包括表皮和部分真皮(包括全部细胞层、基质和组成真皮的真皮基质结构)的皮肤结构,并将其加工成微器官时,所采集的组织的活力在体内和体外均可保持较长时间,然后用于移植。本文中使用的动词“切”和“切片”用于表示使用锋利的刀片或刀片样物体使组织的一部分与另一部分分离。

[0022] 采集后，必需从所采集的样品制备适当的结构，使其在体外具有活力，并且优选在再植入时在体内具有活力。此样品优选包括全部活的层，并且足够薄以使来自保存样品的培养液的营养物能够扩散到该样品的所有部分，而排泄物能够扩散到培养液中使其可被任选地从其除去（或在更新培养液时除去）。从外表面到每个细胞的距离优选为 100 到 400 微米，但距离小些或者稍微大些也可以保持活力。实际上，在某些情况下，能够成功使用大至 500、600 甚至 1000 微米的距离。当然，切片本身的厚度是最大距离的两倍。

[0023] 本文背景技术部分描述的现有技术方法有其局限性，因为它们没有提供在切取过程中稳定组织的方法。因此，通过这些方法获得的组织切片通常在宽度和形状上不均匀。另外，该微器官的长度也有限，只有简单的平行六面体形状的片能够形成，这使加工和应用该微器官更加困难。而且，皮肤的上皮层坚韧，切片时锋利的刃趋于使样品变形。另外，皮肤趋于粘附到其接触的任何表面上，使切取过程更复杂。

[0024] 本发明的一些实施方案的一个方面涉及从组织样品制备微器官。根据本发明的代表性实施方案，使用一个组装设备的多个切割刀片，在支持基板上使用冲压操作作用于皮肤样品，从而将所采集的皮肤样品切成微器官，而不是采用简单的切割操作。在一个实施方案中，刀片排列成两组。两组刀片互相交错，但沿刀片的长度有轻度位移。当用这种切割器冲压组织样品时，样品交替的端如同在手风琴中那样地相连。当将样品拉出时，产生宽度和厚度（进入皮肤的深度）基本均匀的长的样品。如本文所描述的，这种样品相对容易处理、具有相对大的组织体积，并且在准备使用时可以切成任意合适的长度。由于它是均匀的，每一部分的产生治疗物质的能力基本相同，因此可以根据整个样品在体外产生治疗物质的能力确定，例如用于植入个体中所需的样品长度。尽管以上描述了制备线性结构的一般方法，其也可以修改以用于制备网或其他有用的微器官结构。

[0025] 通过上述方法或任何其他方法使该样品形成合适的微器官结构后，任选地对该微器官进行遗传改变。可以使用本领域已知的任意方法对该组织进行遗传改变。一个代表性方法是用重组病毒载体将基因插入该组织的细胞中。如本领域所知，可以使用多种不同载体中的任意一种，如病毒载体、质粒载体、线性 DNA 等，以将编码治疗剂的外源核酸片段导入靶细胞和 / 或靶组织中。例如，可以使用以下任意方法插入这些载体：感染、转导、转染、磷酸钙介导的转染、二乙氨乙基葡聚糖介导的转染、电穿孔、脂质体介导的转染、生物粒子基因传递 (biolistic gene delivery)、使用 fusogenic 和阴离子脂质体（它们是阳离子脂质体使用的替代）的脂质体基因传递、直接注射、受体介导的摄取、磁穿孔及其他本领域已知的方法。通过将该载体导入该微器官周围而使该载体能够与该微器官的细胞反应，完成基因的插入。一旦将外源核酸片段引入该细胞中，由此核酸片段编码的治疗剂的产生速度就可以得到定量。

[0026] 如上所述，在加工过程中该微器官与营养液相接触。因此，由该微器官产生的治疗剂被分泌入溶液中，在该溶液中其浓度可以得到测量。

[0027] 经过或未经遗传改变的微器官可以几种方式使用。其一是将其（或者是所制备的总量的一部分）植入个体中。在本发明的重要的代表性实施方案中，将该 TMO 植入其所来源于的同一个体中。例如，可以将遗传改变的皮肤植入该个体的皮肤下或移植到该个体的皮肤上。动物实验已证明，这种移植物将在体内在相当长时间内持续产生该治疗剂。

[0028] 或者，可以将该 TMO 在体外保存，并且可以将保留在该 TMO 周围的上清培养液中或

从中分离的治疗剂注射或施用于同一或不同的个体。

[0029] 或者或进一步地,可以通过本领域已知的方法低温保存该微器官或TMO,例如,从组织样品形成遗传改变后立即在含10% DMSO的DMEM中逐步冷冻(0°C、-20°C、-80°C、-196°C)。

[0030] 根据本发明的一些实施方案的一方面,所植入的TMO的量由以下之一或多个条件确定:

[0031] 依据针对相似个体已制定的使用方法、特定的临床方案或人口统计学,通常给予这种个体的相同治疗蛋白的相应量;和

[0032] 在该同一个体以前曾通过注射或其他途径接受同一治疗蛋白时,对该同一个体特定的同一治疗蛋白的相应量。

[0033] 个体数据,如体重、年龄、身体状况、临床状况;

[0034] 来自以前对其他相似个体TMO给药的药代动力学数据

[0035] 以前对该个体TMO给药的反应。

[0036] 根据本发明的一些实施方案的一方面,从微器官/TMO的获取至植入中,使用密闭模块装置负载、支持和改变之。理想地,使用密闭、任选地无菌的模块完成整个过程,在无菌、受控的环境下在模块之间传送该微器官/TMO,而不手工处理该微器官/TMO。

[0037] 在本发明的实施方案中,各模块有匹配的端口,从而可以容易地在各模块之间传送微器官/TMO,并且使各模块可以配合来完成该过程。

[0038] 根据本发明的一些实施方案的一方面,将该模块装置安装于一个或多个系列的对接站(docking station)中,在其中完成该过程和/或在其中保持该微器官/TMO。这一过程可任选地用计算机根据协议控制。

[0039] 根据本发明的一些实施方案的一方面,仅将一部分所制备的TMO用于给定的治疗阶段。剩余的TMO部分返回以保存(或者低温贮存、或者以其他方式保存),以后使用。

[0040] 本发明的一些实施方案的特点是将大量微器官一起加工成TMO。这使确定TMO的分泌及确定剂量更加容易并且更加准确。

[0041] 因此,根据本发明的代表性实施方案,提供了从个体采集组织样品的方法,所述方法包括:

[0042] 将该组织样品的一部分的外表面贴附至基本平的表面区;

[0043] 提升该表面区和组织的部分;和

[0044] 于所述部分的表面以下以给定距离切片组织,以分离该组织部分和该个体。任选地,所述的贴附由真空吸引器提供。或者或进一步地,所述贴附包括给所述基本平的区提供粘合表面。

[0045] 在本发明的代表性实施方案中,提升包括于平的表面区的延伸部分之间放置支持元件,使得该部分的表面基本升起到高于周围组织表面水平的所述给定距离。任选地,切片包括在与从所述组织表面看的支持元件远端表面基本相同的水平上切片。

[0046] 在本发明的代表性实施方案中,该组织是皮肤,而该组织表面是皮肤的外表面。任选地,该给定距离为0.3至3毫米。任选地,该距离为0.5至1.5毫米。

[0047] 在本发明的代表性实施方案中,所采集的组织的尺寸为3至150毫米。任选地,最小尺寸为5至20毫米。或者或进一步地,最大尺寸为20至60毫米。

[0048] 根据本发明的代表性实施方案，提供了切皮刀 (dermatome)，其包括：

[0049] 适于将组织表面粘附至其表面的组织负载器；

[0050] 适于提升所述组织表面的一部分的提升器；和

[0051] 装配的切割刀片，其用于基本平行于所述表面，在所述表面上以受控的距离切割组织。任选地，该负载器表面形成有孔，并且进一步包括真空源，其在所述孔处提供真空，从而提供所述的粘附功能。或者或进一步地，运送器表面是粘附表面，由此提供所述的适于粘附。

[0052] 在本发明的代表性实施方案中，所述切割刀片在推进的同时从一侧向另一侧移动，以提供切片作用。或者或进一步地，在所述切割过程中，该切割刀片与该负载器表面相距受控的距离。或者或进一步地，在所述切割过程中，该切割刀片与该皮肤表面相距受控的距离。任选地，该切皮刀包括导轨，其用以将所述刀片以受控的距离设置。

[0053] 因此，根据本发明的代表性实施方案，提供了由组织形成的微器官结构，其包括至少两个微器官部分，其中所述至少两个微器官通过连接点互相连接，所述连接点由形成该微器官的所述组织形成。任选地，至少三个微器官通过同一连接点互相连接，所述连接点由与形成所述微器官相同的组织形成。在本发明的代表性实施方案中，提供了由上述微器官的连接点形成的微器官网状结构，其中多个所述连接点由微器官互相连接，其中至少一个这样的微器官在该微器官的一端连接至所述连接点之一，并且在所述微器官的另一端连接至另一个连接点。

[0054] 根据本发明的代表性实施方案，还提供了分段线性微器官结构，其具有互连连接点，其中至少一些互连连接点有两个线性微器官与之相连。

[0055] 根据本发明的代表性实施方案，还提供了分段线性微器官结构，其具有互连连接点，其中至少一些所述互连连接点有多于两个的线性微器官与之相连。任选地，每个互连连接点有四个线性微器官结构与之相连。任选地，该线性微器官结构与该连接点形成网状结构。

[0056] 在本发明的代表性实施方案中，该线性微器官与该连接点形成超线性结构，所述超线性结构包括一串交替的微器官与连接点。

[0057] 在本发明的代表性实施方案中，该微器官由多个组织层构成，并且其中该连接点包括相同的层。任选地，该连接点是微器官。

[0058] 在本发明的代表性实施方案中，提供了微器官结构，其中该微器官由多个组织层构成，并且其中该连接点包括较该微器官少的层。

[0059] 在本发明的代表性实施方案中，微器官用人皮肤组织作为该作组织。

[0060] 根据本发明的代表性实施方案，还提供了用于通过切割而从大块组织制备微器官的装置，其包括：

[0061] a) 包括多个邻接的切割刀片的切割阵列，所述切割刀片沿其各自长度的至少一段彼此间非常接近且互相平行地配置，并且沿所述段彼此间保持大致相等的距离，使得所述邻接的切割刀片的刀刃沿所述段以约 200 微米至约 2000 微米的切片距离分开；

[0062] b) 组织样品负载器，其适于固定组织切片，使得当被固定在所述负载器上的所述组织被按压于所述切割阵列上时，所述组织被所述切割刀片切割。任选地，该装置包括可移出护罩，所述可移出护罩包括至少一个插入物，所述插入物与切割刀片的平行的段间相适

应,而不妨碍刀片的切割作用。任选地,该至少一个插入物包括多个所述插入物。任选地,所述多个插入物连接在一起,以便它们可以一起插入切割刀片之间或一起从切割刀片之间移出。或者或进一步地,多个线性插入物在其末端连接在一起。

[0063] 在本发明的代表性实施方案中,该装置包括用于在所述样品负载器和所述切割阵列之间施加压力的工具。

[0064] 在本发明的代表性实施方案中,全部切割刀片有相同的长度,使得它们从组织样品切下多个线性微器官。

[0065] 在本发明的代表性实施方案中,切割刀片具有基本上相同的长度,但纵向地彼此偏移,使得它们切下多个线性微器官,所述线性微器官在其交替的末端通过连接点微器官结构连接于邻接的线性微器官。

[0066] 在本发明的代表性实施方案中,该切割阵列包括至少三组在以给定的间隔隔开的刀片的线性阵列中各自首尾相接排列的多个刀片,其中所述线性阵列并排排列,一个阵列的间隔位于邻接阵列的间隔之间。任选地,该给定的间隔是切片间隔的 0.5 至 2 倍。

[0067] 在本发明的代表性实施方案中,全部切割刀片有相同的长度,且无彼此偏移,并且其中在邻接刀片的交替末端,刀片的刀刃低于刀片的其余部分的刃,使得刀片从组织切下多个线性微器官,所述线性微器官通过连接点相连,所述连接点较组织的完整厚度薄。

[0068] 在本发明的代表性实施方案中,全部切割刀片有相同的长度,且无彼此偏移,并且其中形成在相应于邻接刀片的交替末端的位置具有凹陷的组织固定器,使得刀片从组织切下多个线性微器官,所述线性微器官通过连接点相连,所述连接点较组织的完整厚度薄。

[0069] 在本发明的代表性实施方案中,该切割阵列包括至少三个刀片,所述刀片在其上周期性隔开地具有低于该刀片的其余部分的切削表面的表面的刀刃,其中所述线性阵列并排排列,一个刀片的较低切削表面位于邻接刀片的较低切削表面之间,使得在较低切削表面形成一系列连接点,所述连接点的厚度小于该组织样品的厚度。

[0070] 在本发明的代表性实施方案中,该切割阵列包括至少三个刀片,并且其中形成在其上具有周期性隔开的凹陷的多个平行阵列的组织负载器,所述凹陷相应于所述切割刀片的位置,一个阵列的凹陷位于邻接阵列的凹陷之间,使得在凹陷处形成一系列连接点,所述连接点的厚度小于该组织样品的厚度。

[0071] 在本发明的代表性实施方案中,所述刀片呈一系列同心圆排列,以所述切片间隔隔开,使得多个环形的微器官从该组织产生。

[0072] 在本发明的代表性实施方案中,如上述,所述刀片具有连续螺旋的形式,所述连续螺旋被所述切片间隔隔开,使得螺旋形式的微器官得以产生。

[0073] 在本发明的代表性实施方案中,所述组织负载器适于通过真空固定所述组织。或者或进一步地,所述组织负载器适于通过将所述组织粘附于该负载器的表面而固定之。

[0074] 根据本发明的代表性实施方案,还提供了通过切割而从组织制备易装卸的(accessible) 微器官或微器官结构的方法,所述方法包括:

[0075] a) 提供合适厚度的形成该微器官的组织;

[0076] b) 提供上述的装置;

[0077] c) 将该组织置于所述装置的样品负载器上;

[0078] d) 使该负载器上的组织与所述装置的切割刀片紧密接触;和

[0079] e) 将所述组织按压于所述刀片, 直到已将所述组织的至少一部分切透其厚度, 从而产生至少一个微器官或微器官结构。

[0080] 根据本发明的代表性实施方案, 还提供了通过切割而从组织制备易装卸的微器官或微器官结构的方法, 所述方法包括:

[0081] a) 提供合适厚度的形成该微器官的组织;

[0082] b) 提供上述的装置, 使得所述插入物被置于所述刀片之间;

[0083] c) 将该组织置于所述装置的组织负载器上;

[0084] d) 使该负载器上的组织与所述装置的切割刀片紧密接触;

[0085] e) 将所述组织按压于所述刀片, 直到已将所述组织的至少一部分切透其厚度, 从而产生至少一个微器官或微器官结构; 和

[0086] f) 通过从所述切割刀片之间移出该罩而从该切割刀片之间移出该至少一个微器官或微器官结构, 从而在移出的罩的表面上处理该切下的微器官。

[0087] 在本发明的代表性实施方案中, 按压包括从该负载器的一端向另一端转动圆柱状滚筒, 在其转动时切割该组织。

[0088] 根据本发明的代表性实施方案, 还提供了从组织样品制备微器官的方法, 所述方法包括:

[0089] 提供薄组织样品, 所述样品具有一定厚度和方向垂直于该厚度的长度; 和

[0090] 在该样品的至少一部分上切透该样品的厚度, 产生微器官, 所述微器官至少一维小于 2000 微米, 并且至少另一维大于长度的最大尺寸。任选地, 该切割包括冲压作用。或者或进一步地, 该薄组织样品是薄的, 基本上为矩形的组织样品, 并且其中该切割为一系列基本上直的切器的形式, 其基本上平行于一端, 所述切割具有相似的长度, 并且于纵向上彼此偏移, 以便在该切器的交替末端的交替组织条之间留下所述组织的连接点。任选地, 该方法包括展开如此形成的切割样品以产生伸展的微器官, 所述微器官包括由所述连接点连接的组织条。

[0091] 在本发明的代表性实施方案中, 切割包括以螺旋形切割。任选地, 该方法包括解开该螺旋以提供伸展的细长微器官。

[0092] 在本发明的代表性实施方案中, 切割包括用一系列同心圆切器切割组织。

[0093] 根据本发明的代表性实施方案, 还提供了从组织样品制备微器官的方法, 所述方法包括:

[0094] 提供薄组织样品, 所述样品具有一定厚度和方向垂直于该厚度的长度; 和

[0095] 用多个切器同时切透其厚度, 所述切器在该切器的纵向排列形成, 每一列有多个被螺距隔开, 并且被间隔分开的隔开的切器, 交替的列中的切器沿该切器的方向偏移, 以便给定列的间隔与邻接列的切器部分相邻。任选地, 该偏移约等于该螺距的一半, 并且每一列的切器基本上以邻接列的间隔为中心。或者或进一步地, 邻接切器之间的距离为 200 至 2000 微米。任选地, 该距离为 500 至 1500 微米。

[0096] 在本发明的代表性实施方案中, 邻接切器之间的距离为邻接列之间的距离的五分之一至五倍。或者或进一步地, 邻接切器之间的距离为邻接列之间的距离的一半至两倍。

[0097] 在本发明的代表性实施方案中, 该间隔约等于邻接列之间的距离。

[0098] 在本发明的代表性实施方案中, 该方法包括拉伸所述切割组织样品以便其形成

网。

[0099] 在本发明的代表性实施方案中，切割包括冲压作用。

[0100] 在本发明的代表性实施方案中，该薄组织样品是皮肤组织，其至少包括表皮的基底层和部分真皮。任选地，该组织样品包括整个表皮。或者或进一步地，该组织样品包括角质层。或者或进一步地，该组织样品包括大部分真皮。或者或进一步地，该样品包括基本上整个真皮。

[0101] 在本发明的代表性实施方案中，该薄组织样品厚 0.3 至 3 毫米。任选地，该组织样品厚 0.5 至 1.5 毫米。

[0102] 在本发明的代表性实施方案中，该切器之间的距离为 200 至 2000 微米。任选地，切器之间的距离为 500 至 1500 微米。

[0103] 在本发明的代表性实施方案中，该刀片的长度与该刀片之间的间隔的比为 1 : 1 至 100 : 1。

[0104] 根据本发明的代表性实施方案，提供了用于在微器官的保持和任选的遗传修饰过程中或者在运输过程中将微器官固定于生物反应器中的定位器，该定位器包括：

[0105] 固定器体，其具有一个或多个孔，在该孔上固定该微器官；和

[0106] 多个微器官固定元件，所述元件固定相对于所述一个或多个孔并列的所述微器官，使得所述微器官的超过 70% 的两侧得以暴露。任选地，该微器官的两侧的超过 80% 得以暴露。任选地，该微器官的两侧的超过 90% 得以暴露。

[0107] 在本发明的代表性实施方案中，所述微器官具有网状结构，并且其中所述固定元件包括适于在所述网和所述孔的周围固定该网的元件。任选地，该固定器包括钉或杆，其通过部分或完全拉伸的网中的开口放置，从而将该网固定于该孔上。

[0108] 在本发明的代表性实施方案中，所述的微器官具有网状结构，并且其中所述固定元件包括适于在其非微器官的周围固定该网的元件。任选地，该固定器包括钉或杆，其适于穿透或通过其非微器官周围中的开口放置，从而将该网固定于该孔上。

[0109] 在本发明的代表性实施方案中，所述固定器体是具有圆周槽的环，所述槽包括所述孔。

[0110] 在本发明的代表性实施方案中，该槽的轴向长度为 300 至 2000 微米。任选地，该槽的轴向长度大于 500 微米。任选地，该槽的轴向长度为 1 毫米或更高。

[0111] 在本发明的代表性实施方案中，该固定元件沿该环的圆周放置，并且适于将长的微器官以其长度沿圆周固定，使得在该固定元件之间该微器官得以暴露。

[0112] 根据本发明的代表性实施方案，提供了在微器官的保持和任选的遗传修饰过程中以及在运输过程中固定微器官的方法，所述方法包括：

[0113] 提供具有至少两个微器官固定元件的固定定位器；

[0114] 将该微器官固定于所述固定元件中，使得至少该微器官的表面介于各元件之间，并且该表面的所有侧均得以暴露。

[0115] 根据本发明的代表性实施方案，提供了确定要植入患者中的治疗微器官的量的方法，所述方法包括：

[0116] 通过微器官的体外定量而确定治疗剂的分泌水平；

[0117] 评估该治疗剂的体外分泌与体内血清水平的关系；和

[0118] 基于所确定的分泌水平和所评估的关系,确定要植入的治疗微器官的量。任选地,基于选自下组因素的一个或多个因素评估该关系:

[0119] a) 个体数据,如体重、年龄、身体状况、临床状况;

[0120] b) 来自以前对其他相似个体 TMO 给药的药代动力学数据;和

[0121] c) 来自以前对该个体 TMO 给药的药代动力学数据。

[0122] 任选地,基于所述因素的至少两个来评估该关系。任选地,基于所述因素的三个来评估该关系。

[0123] 在本发明的代表性实施方案中,确定要植入患者中的治疗微器官的量还基于以下一点或两点:

[0124] 依据针对相似个体已制定的使用方法、特定的临床方案或人口统计学,通常给予这种个体的同一治疗蛋白的相应量;和

[0125] 在同一个体以前曾通过注射或其他给药途径接受同一治疗剂的情况下,对同一个体特定的同一治疗剂的相应量。

[0126] 在本发明的代表性实施方案中,该方法包括依据所确定的量制备一定量的用于移植的治疗微器官。

[0127] 根据本发明的代表性实施方案,还提供了将微器官植入患者中的方法,所述方法包括:

[0128] 制备具有已知的皮肤表面方向的微器官;

[0129] 在患者皮肤中形成切口;和

[0130] 将该微器官植入该切口中,其方向相应于与皮肤相同的方向。任选地,形成包括形成具有预定大小和形状的切口。或者或进一步地,所述微器官是皮肤组织微器官。

[0131] 在本发明的代表性实施方案中,植入包括:

[0132] 将该微器官置于该切口中,以便皮肤表面和相应的微器官表面处于基本相同的水平。任选地,该方法包括该微器官在所述的水平、适当的位置时关闭切口,以便将该微器官固定于适当的位置。

[0133] 在本发明的代表性实施方案中,该微器官是经遗传改变的治疗微器官,其分泌治疗剂。

[0134] 根据本发明的代表性实施方案,还提供了将微器官植入患者中的方法,所述方法包括:

[0135] 刺穿组织表面;

[0136] 从所述孔于皮肤表面下推进导管;

[0137] 将细长的负载器插入并穿过该导管,使之穿出该组织的表面,在所述负载器上的已知位置连接有微器官;

[0138] 定位该负载器,使得该微器官位于该组织的表面下的导管中的已知位置;和

[0139] 保持该微器官于合适的位置的同时移出该导管。任选地,该微器官是经遗传改变的分泌治疗剂的治疗微器官。

[0140] 根据本发明的代表性实施方案,还提供了调整由植入个体中的分泌治疗剂的治疗微器官产生的治疗剂的剂量的方法,所述方法包括:

[0141] (a) 监测该个体中的治疗剂水平;

[0142] (b) 将该治疗剂的水平与理想的水平相比较；

[0143] (c) 如果该水平低于最低水平，则植入追加的治疗微器官；和

[0144] (d) 如果该水平高于最高水平，则灭活或移出部分已植入的微器官。任选地，该方法包括周期性地重复(a)-(d)。或者或进一步地，灭活或移出由移出部分已植入的微器官组成。任选地，移出包括外科手术移出。或者或进一步地，灭活或移出包括灭活。任选地，灭活包括杀死部分已植入的微器官。任选地，灭活包括消融部分已植入的微器官。

[0145] 根据本发明的代表性实施方案，提供了微器官加工系统，其包括：

[0146] 多个操作模块，每个所述模块完成从组织样品制备所述微器官的方法的全部或一部分；和

[0147] 在该方法中，通过该模块中的端口，不将该组织样品从该模块中移出而将该组织样品或微器官从一个模块传送至下一模块的工具。任选地，模块之一是组织采集器模块，将其按压至组织并采集受控厚度的组织表面切片。任选地，所述采集器采集受控长度和宽度的组织表面切片。或者或进一步地，模块之一是微器官模块，在其中将该组织样品切割成一个或多个微器官。任选地，该组织样品固定于样品负载器上，并冲压至切割器上，同时仍被固定在所述负载器上，形成微器官。

[0148] 在本发明的代表性实施方案中，模块之一是微器官模块，在其中将该组织样品切成一个或多个微器官。

[0149] 在本发明的代表性实施方案中，以迂曲切器切割该组织，使得这样形成的微器官具有未展开的手风琴形状。

[0150] 在本发明的代表性实施方案中，该微器官被传送至另一模块，同时将该微器官展开为长的超线性形状，其长度长于组织样品。任选地，该微器官的前沿被传送至该另一模块，并且其中展开的微器官被传送至其中的固定器上。任选地，固定器固定该微器官，使得该微器官仅在其有限的部分接触表面。任选地，该部分相当于小于该微器官的10%。任选地，该部分相当于小于该微器官的5%。

[0151] 在本发明的代表性实施方案中，该另一模块安装有营养物入口和排泄物出口，使得该微器官可以保持在其中。或者或进一步地，另一模块安装有用于提供转导剂的入口，使得该微器官可以在其中被遗传改变。或者或进一步地，该另一模块安装有取样出口，所述取样出口用于对其中的周围液体进行取样。或者或进一步地，该另一模块安装有切割装置，所述切割装置适于将其中的该微器官切成一个或多个更小的块。

[0152] 在本发明的代表性实施方案中，该系统包括传送模块，所述传送模块具有臂，所述臂适于进入所述另一模块的端口并从其中移出至少选定的微器官部分，以传送至所述传送模块。

[0153] 在本发明的代表性实施方案中，该模块具有匹配的端口和连接的机械装置，使得材料可以在它们之间传送而不暴露于外界环境。或者或进一步地，从引入该组织样品开始，所述模块在无菌条件下完成该方法。

[0154] 根据本发明的代表性实施方案，提供了用于控制微器官的保持和任选的遗传改变的微器官加工站，其包括：

[0155] 至少一个用于对接模块或多个相连的模块的端口；

[0156] 流控 (fluidics) 控制系统，其用于控制一种或多种液体和排泄物流向至少一个

模块和从至少一个模块流出；和

[0157] 动力控制系统，其用于为至少一些模块中的元件提供动力。任选地，该加工站包括真空控制系统，其用于为至少一个模块提供受控的真空，用以将材料固定在至少一个模块中。任选地，该流控控制系统用于控制至少一种材料的引入，所述材料在一个模块中引起微器官的遗传改变。

[0158] 在本发明的代表性实施方案中，该加工站包括包括用于从至少一个模块中取液体样品的取样机械装置。或者或进一步地，该加工站包括用于分析液体的一个或多个加工参数的分析器，所述参数包括葡萄糖、乳酸盐、溶解氧、溶解二氧化碳、氨、谷氨酰胺、pH、污染物或分泌的治疗剂。任选地，该分析器分析液体的由该微器官分泌的治疗剂。

[0159] 在本发明的代表性实施方案中，该站包括控制器，所述控制器监控治疗剂的量，并且在该微器官适于植入时提供指示。任选地，该站包括用于增强该微器官的遗传改变的工具。任选地，该用于增强的工具包括机械或声学振动。

[0160] 在本发明的代表性实施方案中，所述动力控制系统控制将组织切割成一个或多个微器官。

## 附图说明

[0161] 以下参照附图描述了本发明的代表性非限制性实施方案。在附图中，出现在多张附图中的其相同和相似的结构、元件或部分通常用相同或相似的标记标注在其出现的图中。图中所示的组件的大小和特征的选择主要是为了表达的方便和清晰，不一定按照比例。附图是：

[0162] 图 1 是用于生产和使用药物的代表性现有技术“药物”范例的示意图；

[0163] 图 2 是根据本发明的实施方案用于生产和使用遗传改变的微器官 (TMO) 的代表性方法的示意框图；

[0164] 图 3A 和 3B 示意根据本发明的代表性实施方案从个体采集皮肤样品的代表性方法；

[0165] 图 4A-4D 显示在本发明的代表性实施方案中，用于从组织样品，例如使用图 3 中所示的方法采集的皮肤组织样品制备微器官的代表性装置；

[0166] 图 5A-5B 显示在本发明的代表性实施方案中，从组织样品，例如使用图 3 中所示的方法采集的皮肤组织样品制备微器官的代表性刀片结构，以及所得的微器官；

[0167] 图 6A-6C 显示根据本发明的代表性实施方案的网型微器官结构；

[0168] 图 7 显示根据本发明的代表性实施方案的以如下方式切割后的皮肤样品，该方式使得可以从此形成网型微器官；

[0169] 图 8 示意性地显示根据本发明的代表性实施方案的用于切割图 7 的式样的工具；

[0170] 图 9A 和 9B 示意性地显示根据本发明的代表性实施方案，用于固定超线性和网型微器官的定位器在其传送、保持和遗传修饰之一或多个的过程中各自的结构；

[0171] 图 10 显示根据本发明的代表性实施方案用于加工微器官以制备 TMO 的简单生物反应器；

[0172] 图 11 显示根据本发明的代表性实施方案用于植入 TMO 或微器官的工具；

[0173] 图 12A-D 显示根据本发明的实施方案在第一皮下植入程序中的连续步骤；

- [0174] 图 13A-E 示意图根据本发明的实施方案在第二皮下植入程序中的连续步骤；
- [0175] 图 14A 显示根据本发明的实施方案 mINF α-TMO 植入前的体外分泌与其植入后的体内血清水平之间的相关分析；
- [0176] 图 14B 表述根据本发明的实施方案，在患者中各种注射的重组治疗蛋白和在 SCID 小鼠中由人皮肤 TMO 产生并递送的 mIFN α 的药代动力学；
- [0177] 图 15 显示根据本发明的实施方案，在不同时间加工的不同患者的皮肤样晶体外分泌水平的改变程度；
- [0178] 图 16 显示根据本发明的实施方案，移植后 SCID 小鼠中红细胞生成素的升高的水平；
- [0179] 图 17 显示作为植入的 TMO 的不同数目的函数的被植入小鼠中红细胞生成素的体外反应；
- [0180] 图 18A 和 18B 分别显示根据本发明的实施方案，在小型猪中自体 TMO 植入后通过 ELISA 测定法测定的升高的血清 hEPO 水平，以及网织红细胞计数升高；
- [0181] 图 19A-C 显示根据本发明的多个实施方案转导后检测的 hEPO 蛋白体外分泌；
- [0182] 图 20 显示根据本发明的实施方案密闭无菌微器官加工盒的主要模块，该模块被分开以便于目视观察；
- [0183] 图 21 和 22 显示根据本发明的实施方案的组织采集器模块的操作和细节；
- [0184] 图 23-25 显示根据本发明的实施方案从皮肤组织样品形成微器官；
- [0185] 图 26-28 显示根据本发明的实施方案的 TMO 生物加工模块的一些细节和将微器官传送至其；
- [0186] 图 29 显示根据本发明的实施方案的加工站，其具有多个盒，每个盒由多个模块组成，并装入其中；
- [0187] 图 30-32 显示根据本发明的实施方案将超线性微器官切成片段；
- [0188] 图 33 示意性地显示根据本发明的一个实施方案的传送模块；
- [0189] 图 34-37 示意性地显示根据本发明的一个实施方案，从生物加工模块移出微器官 /TMO 的片段和将它们传送至传送模块；
- [0190] 图 38 示意性地显示将微器官 /TMO 的片段传送至移植固定器。
- [0191] 具体实施方案
- [0192] 该系统的概述
- [0193] 图 2 以框图形式显示根据本发明的代表性实施方案，用于制备和使用微器官和遗传改变的微器官 (TMO) 的方法 200 的概况。在 202 中，从个体采集组织外植块。在本发明的一些实施方案中，该外植块采集自将在以后接受治疗的同一个体。在本发明的代表性实施方案中，该样品是皮肤样品。任选地，以类似于以下描述的用于皮肤样品的方式采集和使用其他组织。以下描述的方法是代表性的，其他采集组织样品的方法，如去除中心部份 (coring)、打孔 (punching) 等可以用于本发明的一些实施方案中。此外，一般而言，可以使用任何可商购的切皮刀。任选地检查所采集的样品以确定其状况，然后任选地使用以下描述的方法将其传送至微器官形成装置。如果需要，可以将该组织外植块低温贮存以备后用 (即，在该方法的同一阶段引入)。
- [0194] 在 204 中，从该外植块制备有活力的微器官。为了有活力，该微器官必须至少有一

维足够小,以使营养物能够从与该微器官接触的营养培养液扩散到该微器官的所有细胞,并且使排泄物能够扩散出该微器官并扩散到该培养液中。这使该微器官在体外能够在足够长时间内有活力,以便进行下述的进一步加工,并且任选地进一步应用该微器官作为治疗剂,如蛋白质的来源。从该微器官的外表面到保持活力的任意组织的最大距离优选应小于约 1000 微米,但更大的距离也可能制备有活力的结构。如下述,从组织样品制备微器官的方法通常得到有数月体外寿命的微器官。

[0195] 制备该微器官后,任选地目视检测以确定其正确形成并具有期望的尺寸。检测也可以通过光学进行。然后,任选地将其安放至固定器上并传送(206)到在其中可对其进行遗传改变的装置中。准备合适的遗传修饰剂(208)。准备该试剂的另一代表性方法包括:使用病毒颗粒的预定稀释缓冲液制备具有期望效价的等分试样,可能的低温贮存和在受控的温度下(0-4°C)将该病毒等分试样解冻,并且验证该病毒载体的活性。所有这些方法均为本领域所熟知。此时,可以将微器官低温贮存,以备以后在此方法的同一位置引入。这可以使用已知的逐步冷冻组织和细胞的方案进行,使用例如,含 10% DMSO 的 DMEM 培养基。

[0196] 在 210 中,对该微器官进行遗传改变。如发明内容中所述,已知多种遗传改变的方法,它们可以在本发明中使用。例如,以下描述基于使用病毒载体将基因插入至该微器官的细胞中。这一方法是众所周知的,除非有关将病毒导入至微器官所用的特殊方法和装置,将不再进一步描述。

[0197] 在 212 中,任选地测试遗传改变的微器官(TMO)的治疗剂分泌速度。有各种测定分泌量的方法,例如:ELISA、其他免疫测定、光谱分析等。另外,任选地测试分泌物的质量,例如分泌的蛋白质的无菌度和活性。这可以周期性地进行或联机连续进行。

[0198] 此时,该 TMO 可以低温贮存,以备后用。

[0199] 在 214 和 216 中,确定产生所期望的治疗效果所需的 TMO 的量。如以下所示,可以依据所评估或已知的体外分泌与体内血清水平之间的关系,从测量的分泌速度、患者参数和人口统计学估计所需的治疗剂量。

[0200] 在 218 中,将 TMO 的选定部分传送至植入工具。代表性的执行工具描述如下。如果需要,对于同种异体移植植物或异种移植植物而言。或因为其他原因,将 TMO 包封。如果经装载的执行工具(或该 TMO)必需被运输,任选地将其置于(220)保存袋中,运输过程中其中的温度、湿度等保持于允许该 TMO 生存的水平。任选地,将剩余 TMO 材料于体外保存,以备后用。这可以于温暖的培养箱条件(37°C)下、在上述条件下或在冷的培养箱条件(4°C)下,它们可以延长其体外生存力。

[0201] 在 224 中,将该 TMO 的一部分(或前面步骤制备的 TMO 的一部分)植入个体中。本文描述了用于此植入程序的多种方法。完成其的其他方法是本领域技术人员已知的,并且主要取决于所使用的微器官的特定几何形状。动物研究已证明,该微器官和 TMO 在体内保持活力,其依据是植入后该 TMO 继续产生和分泌该治疗剂达数月的时间。在动物研究中,治疗量产生达 120 天(或更长)的时间。尽管该微器官或 TMO 的组织似乎整合入接受植入的个体的组织中(特别是如果将该组织植入至与其采集部位相同种类的组织中),构成该微器官或 TMO 的细胞继续产生并分泌该治疗剂。

[0202] 在本发明的另一实施方案中,从体外 TMO 采集治疗剂并经纯化以去除营养质和排泄物。该经纯化的试剂通过注射或其他方式给予个体。

[0203] 在任一情况下,任选地测定该 TMO 的体内性能 (228)。如以下所述,然后可以基于这种评价例如和 / 或以前的患者数据 (226),通过增加植入物的量或移出部分植入物来调节患者剂量 (230)。随着植入物的功效改变,追加植入 TMO 片段。

[0204] 以下的部分更详细地描述以上的一些操作和它的变化。

#### [0205] 采集外植块

[0206] 图 3A 和 3B 示意性地显示根据本发明的代表性实施方案,从个体采集皮肤样品的代表性方法。将底盘 314 放置于个体 311 的供体部位上,皮肤样品将从该供体部位采集。任选地将底盘用轻微的压力压至皮肤上,例如通过环绕手臂的带 313 或通过其他方法。该底盘有剪切窗口,其限定要采集的组织的长度和宽度,并且还起稳定供体部位周围皮肤的作用。样品负载器 310 位于该底盘上表面以上已知的距离(要采集的组织的深度)。在本发明的实施方案中,样品负载器 310 具有小孔或槽沟,并且将真空头 312 置于样品负载器 310 的背后,用以在真空源 320 激活时将皮肤表面吸引至样品负载器,并将其紧紧固定在底盘上方的预定高度位置上。可以提供多种孔结构用于以下所示的不同形状的微器官结构。真空用于稳定将要采集的皮肤样品并且在组织脱离人后将所采集的皮肤样品保持贴附于该负载器。或者,将粘合剂置于样品负载器上,以使皮肤贴附于其。例如,将双面胶置于样品负载器 310 的底面。如果使用粘合剂,作好准备工作,以使该样品负载器在被提升离开周围皮肤之前接触皮肤。

[0207] 沿底盘的上表面拉动薄的锋利刀片 316 以采集皮肤样品 318。样品负载器 310 上的样品的厚度由底盘的上表面至样品负载器 310 的底面的距离决定。任选地使刀片在向前推进时从一侧向另一侧移动,以推动将样品切片。从一侧向另一侧的移动可以是机动的或全部运动通过手动完成。另外,刀片的向前运动可以是机动的。以下过程开始的过程中,真空头可以保持连接于样品负载器上,以防止皮肤样品 318 脱离样品负载器 310。

[0208] 通常,皮肤样品宽 6 毫米、长 35 毫米、厚 1 毫米。然而,其他的长、宽、厚也是有用的。无论如何,侧面的尺寸并不重要。然而,在通过下述方法制备一致的微器官时,获取标准大小的外植块是有用的。

#### [0209] 制备和安装微器官

[0210] 图 4A 和 4B 显示在本发明的代表性实施方案中,从组织样品,例如使用图 3 中所示方法采集的皮肤组织样品制备微器官的代表性装置 410。

[0211] 在图 4A 中,皮肤样品 318 置于样品负载器 310(未显示)上并通过真空头 312 固定,将该皮肤样品接触并按压至安装于基座 414 上的一系列刀片 412 上。刀片平行、等长,并且比样品的长度稍长。在组织切割前,将微器官罩 416 置于刀片 412 之间。当将样品负载器用足够的力按压至刀片上时,组织被切透成片并且皮肤样品(现在是微器官 418)被固定于刀片之间。如果微器官在刀片之间固定情况极好,可将负载器及相连的真空源一起移出。否则,将真空或粘附力去除。这在图 4B 和 4C 中分别显示,图 4B 和 4C 是切片后微器官的等角和截面图。刀片间间隔 W 决定切割微器官的宽度。然后从刀片提升微器官罩 416(图 4D),然后可移出微器官切片用于进一步加工。以上描述的按压作用可通过压制固定器辅助,或者通过在样品负载器顶部上滚动杆辅助。

[0212] 图 5A 显示用于切割不同形状微器官的结构的等角图。如图所示,在该结构中,刀片 512 被分为彼此轴向偏移的两组。与罩 416 相似的微器官罩安装于刀片 512 之间。当皮

肤样品与刀片接触并被按压至刀片时,皮肤样品被切成图 5B 所示的式样,此处将切割的皮肤样品(在下文中称作微器官)标记为 518。将微器官罩 416 抬起,移出微器官罩 416 上的微器官 518。如图 5B 所示,当切割时,微器官 518 呈迂曲形状。

[0213] 在上述方法中,在线性结构之间的连接点端保留有样品的完整厚度,一般而言,在以下加工中,实际上只需要足够将线性片固定的结构即可。例如,对于皮肤样品,仅留下上皮层可能已足够。一种方法是使刀片排成一行且等长。在组织样品负载器中形成有适当的凹陷(如在图 3E 中),使得在这些位置刀片不将组织完整厚度切透。这得到仅有组织部分深度的“连接点”。

[0214] 当展开该结构(即伸展至其全长)时,该微器官是极长的结构,几乎呈平行六面体的形式。由于它与最初样品的长度相比极长的长度,本文中有时将这种结构称为“超线性”结构。其他形状也是可能的。例如,如果在外植块中切割螺旋形,则结果类似于参照图 5 描述的方法的产物。也可以通过压制或切割制备环形结构或矩形薄壁结构。巨大微器官结构的另一变体是两个相邻的线性微器官在两端通过连接点相连,使得该结构可以被打开以形成微器官组织环。

[0215] 图 6A 中显示代表性网形微器官 600 的示意图,该网的细节在图 6B 和 6C 中显示。

[0216] 观看图 6 时,应理解,图中所见的表面是皮肤层的外表面(角质层)或相对的皮肤内表面(真皮下层)。设计网结构 600,使得该网结构的每一部分距表面的距离都允许其接受营养物并将排泄物排出至周围的营养浴中,另外,该距离保持整个组织样品真正地固定在一起以简化组织处理和加工。此外,该结构允许不断鉴定皮肤的哪一面是哪一面,以便能够以正确的方向将该微器官或 TMO 植入,如下所述。

[0217] 如图 6B 所示,如果使该网的两个元件之间的连接点 604 的宽度 602 等于网中的臂 608 的厚度 606(图 6C)(如图所示),比臂 608 的最内部组织更远离营养物的区域非常小。而且,其仅轻微远离营养物源等。使宽度 602 更小进一步减小该区域和距离。在本发明的一些实施方案中,使宽度等于厚度 606。在其他实施方案中,它大于或小于厚度 606。如图 6B 中可见,该网的每一段都基本上与线性微器官相同。

[0218] 制备网,如图 6A-C 所示的网,的一种方式是在组织样品的一部分中压出样式 700,如图 7 中所示。可以理解,切口长度与连接点长度的比可以是 1 : 1 至 1 : 100 的宽的数据范围。该比值控制网的紧密性和拉伸开时可被扩展的程度。图 8 中显示用于压制切割的代表性刀片盒排列 800(相应于图 4A 的装置 414)。或者,如以上就超线性结构而言所述的,可以使用特别设计的负载器上的未更改的等长刀片,其将产生足以将该结构固定在一起成网的部分厚度连接点。

[0219] 应该理解,上述超线性和网微器官结构均可被视为线性微器官在连接点处连接在一起的结构,所述连接点可以是微器官本身或非微器官组织的部分。压制组织形成结构后,如图 7 所示,将该组织横向拉伸形成图 6A 中所示的网。图 7 上的标记数字相当于图 6 中上同一数字所标记的特征。该网可被拉伸直至切口张开呈钻石形状。或者,可以使该网张开小于该最大程度。

[0220] 图 9A 显示用于在加工过程中固定该“超线性”微器官的代表性结构 900。根据本发明的代表性实施方案,结构 900 的另一功能是促进将该微器官引入和移出生物反应器。

[0221] 如图 9A 所示,结构 900 包括形成有与该组织样品的宽度相同或稍宽的狭槽 912 的

基本上矩形（但弯曲）的体 910。狭槽使液体能够自由通过到达该微器官的两面。

[0222] 沿体 910 的长度周期性地形成有夹子 914 或其他用于将该微器官固定于适当位置的工具。当将微器官 518 装载至体 910 上时，夹子关闭以固定该微器官。如本领域中已知，可以通过用真空拾取工具抓住该微器官的末端而实现在最开始将该微器官放入该夹子中。第一个夹子（标识为 914'）显示为关闭并固定该微器官。当将该微器官固定在体 910 上时，由于该微器官的一侧上自由暴露的表面，而另一侧上有狭槽，所以其表面区域的大部分得以暴露。这使该微器官与其周围的液体或试剂有良好的物理接触。这提高了该微器官在体外期间的生存力。或者，夹子（第一个和最后一个之间）未在该微器官上关闭。相反，它们打开，而打开的夹子防止该微器官从一侧向另一侧移动。或者，中间的夹子被垂直于固定器表面，防止微器官向一侧滑动的元件代替。

[0223] 图 9B 显示用于在加工过程中固定网微器官的代表性结构 960。根据本发明的实施方案，结构 960 的另一功能是促进将该微器官引入和移出生物反应器。

[0224] 如图 9B 所示，将网型微器官 600 安装于固定器 962 上，固定器 962 在其中央部具有孔 964。围绕孔 964 的边缘形成有多个钉 966。如上所述，拉伸网结构 600，并由钉 966 固定在孔中。虽然显示了钉或棒型固定器，但也可以使用其他固定该网的边缘的固定器（如夹子）。另外，虽然显示了正方形孔，但也可以使用矩形、圆形或多于四个边的形状。虽然显示了完全打开的网，但不同的微器官尺寸和大小可以得到仅部分打开的网。

#### [0225] 微器官生物反应器和遗传改变

[0226] 一旦微器官得到制备和安装，就已准备好将微器官遗传改变以形成 TMO。

[0227] 一般而言，遗传改变包括将选定的一个或多个基因导入细胞，其导致该细胞产生和任选地分泌所期望的治疗剂，如蛋白质。在本发明的代表性实施方案中，如上所述，在遗传改变期间保持该微器官的方法的至少部分和该遗传改变本身在生物反应器中进行。

[0228] 理想地，这样的生物反应器具备下列性质的一部分或全部：

[0229] 1) 允许向该微器官表面供应营养物和气体，以便它们能够扩散进入该微器官，并且该微器官可以保持有活力。因此，该微器官的大部分区域和体积不应被阻断与周围液体的接触。

[0230] 2) 允许将该微器官保持于理想的温度。

[0231] 3) 允许在该微器官的周围保持理想的 pH 和气体组成。

[0232] 4) 允许从该微器官和该生物反应器中移出排泄物。

[0233] 5) 允许用简单方法插入遗传修饰的载体而没有插入载体污染周围环境的实际危险。

[0234] 6) 允许移出过多的未使用的载体。

[0235] 7) 允许测量所产生的治疗剂的量。

[0236] 8) 允许移出基本上无菌的治疗剂。

[0237] 9) 允许微器官的容易插入及移走全部或测定量的 TMO。

[0238] 图 10 显示根据本发明的代表性实施方案的生物反应器 1000 的主要截面示意图。尽管生物反应器 1000 未具备最终生物反应器的全部理想的品质，但它例示了简单有用的生物反应器模型。尽管所示的结构最适用于图 9 中所示的固定在固定器上的网型微器官，但该结构的简单变体能够用于超线性结构和现有技术的短线性结构。

[0239] 塑料或其他非反应性材料的容器 1002 于其底部形成有凹陷 1004。凹陷 1004 适于固定微器官,如固定器 962 中的微器官 600(图 6A 和 9B)。任选地在该容器的最低部分的排水管 1006 由阀 1008 控制。

[0240] 该容器中形成有输入端口 1010。将任选地具有维持该微器官所需的溶解气体的营养液,例如包含谷氨酰胺和抗生素的最低 DMEM 从营养物贮器 1012 由泵 1014 泵入该容器中。

[0241] 容器 1002 中还形成有溢流出口 1016,使得容器 1002 中过多的营养液溢流入溢流容器 1018 中。稳态液体水平得以保持,使得从该生物反应器排出的平均流速等于入口流速。容器 1002 被盖子 1020 覆盖,盖子 1020 装有合适的垫圈系统(未显示),以使其密封并保持无菌。容器 1002、营养物贮器 1012 和溢流容器 1018 还装有任选的空气入口 1021(或出口),经过滤以保持容器内无菌。装备空气入口的主要原因是保持压力平衡。然而,任选地在容器 1002 中营养液水平以上提供气体流动系统,以控制氧和 / 或其他气体的浓度。任选地,可以通过将气体通入贮器 1012 或容器 1006 中的营养液而使气体溶解于该营养物液体中。

[0242] 如图 2 中的 206 所示,在操作中,将微器官 600 插入容器 1002 中。在一个任选的实施方案中,微器官固定器可以通过一个或多个棒连接于盖子 1020 的内侧,所述棒在盖上盖子时使该微器官在容器 1002 内正确定位。该容器部分填充有营养液 1030 并保持于接近体温的适当温度。不断将新的营养液泵入该容器中,而溢流营养液(通过出口 1016 流出)携带部分由该微器官产生的排泄物。任选地,通过机械或声学方法搅拌该营养液,或通过液流混合而混合营养液,以使新鲜的营养液稳定流至该微器官,并使排泄物不在该生物器官附近浓缩。

[0243] 或者,营养液泵入容器 1002 的速度与通过排水管 1006 移出的速度相同。由于排水管 1006 接近该微器官,并且由于液流总是从该微器官流向该排水管,因此新鲜的营养液始终被传送至该微器官,而排泄物被有效地移出。入口和出口流速应足以保持所需要的营养物和气体浓度,但流速不能大到冲走有该微器官天然生成的、当在最低培养基中保持时维持其生存力所需的生长因子。

[0244] 在任一情况下,任选地周期性或连续检测离开容器 1006 的营养物质以确定葡萄糖、乳酸盐、氨、溶解氧、溶解二氧化碳和其他营养物如氨基酸的水平。如果该水平超出理想的范围,则采取校正措施。

[0245] 在通常是 24 小时的量级的特定的潜伏期之后,(或者,任选地,在将该微器官插入容器 1002 后立即)通过排水管 1006 移出营养液 1030,并且替换以新的含有病毒载体的营养液,已发现该潜伏期辅助微器官的病毒转导。仅需提供足够的营养液以覆盖该微器官,但可以使用更多的营养液。任选地,通过单独的隔膜端口 1023 将病毒载体注射加入。或者,将其通过端口 1010 和通向端口 1010 的线中的三向连接输入。任选地,仅移出部分营养液,而剩余营养液用于在基因插入过程中提供营养物质。

[0246] 任选地,在遗传修饰过程中不改变营养液。此过程结束后,将含有病毒的营养物质从容器 1002 中排出,并将容器充满和排空一次或多次以去除痕量病毒。

[0247] 添加新的营养液并持续灌注特定时间,通常是数天的量级。这任选地允许精确表征分泌水平并测定无菌度等。

[0248] 任选地，在加工过程的全部阶段，具体而言是在潜伏、转导和转导后保持的过程中，可以通过以上所列的任何方法（振动、摇动、旋转、液流混合、声学搅拌等）完成微器官的搅拌。然后周期性地检测治疗剂分泌的发展，例如，通过测量通过排水管 1006 或出口 1016 移出的物质中的治疗剂浓度。任选地，可以根据分泌数据采取纠正措施，例如可以进行追加的转导。

[0249] 另外，一旦知道了期望的试剂从该微器官的分泌水平，该信息可以与适当的药代动力学模型和 / 或人口统计学数据一起使用以确定为了实现期望的体内治疗效果所需返回该个体中的微器官 / TMO 的量。将该 TMO 植入患者的皮肤中或皮下或任何其他组织中，使其保持有活力、血管化并且保持活跃的生理功能，同时在较长的时间内产生和递送用于安全和有效治疗的理想水平的试剂。在本发明的一些实施方案中，将该微器官 / TMO 植入最初组织样品所来源于的同一个体中（自体）。在另一任选的实施方案中，可以将该微器官 / TMO 植入不同个体中（非自体）。在以下部分中给出有关植入的更多信息。

[0250] 微器官 / TMO 的移植

[0251] 根据本发明的实施方案，已证实 TMO 的移植相对简单和有效。

[0252] 移植前，必须将该 TMO 的一部分从生物反应器中移出，并为移植做准备。对于图 9A 和 9B 的实施例，将 TMO 固定其上的固定器 962（或 900）从该生物反应器中移出，并将所需的 TMO 部分取出用于移植。任选地，依据生物反应器中分泌水平的测定值决定取出材料的量。

[0253] 通过将 TMO 植入需要治疗蛋白的个体而最佳地实现 TMO 的完全治疗潜能。移植的过程对功效及使用 TMO 治疗的可能副作用有重要影响。

[0254] 为了使 TMO 的功效最大化，应该以使该 TMO 分泌的治疗蛋白的益处最优化的方式将该组织引入患者中。例如，可以将该 TMO 植入需要局部蛋白质递送的区域，或者可以将它们植入以提供（或最优化）全身递送。最佳地，在该过程中被移植的组织应不以任何方式被改变或损伤，因为这种损伤可能影响该治疗的疗效。另外，在一些实施方案中，理想地，植入程序简单易于执行，优选不需要整形外科专家、皮肤科医生或其他专家。该过程还应快速完成，并且对所治疗的患者产生最小的痛苦。

[0255] 植入的 TMO 的数量和大小可以控制治疗剂量。可以植入或移出 / 消除全部或部分 TMO 以调节患者中的分泌水平。也可以植入多个各自产生不同治疗剂的 TMO。

[0256] 以下描述移植线性 TMO 的一种方法和皮下植入 TMO 的两种方法。

[0257] 线性 TMO 移植：

[0258] 图 11 显示用于将一段 TMO 植入皮肤表面 1106 中的切口 1104 的工具 1102。如图 11 所示，工具 1102 上形成有多个孔 1108，孔 1108 通过管 1110 与真空源（未显示）相连。孔固定一段 TMO 1112，其角质层边缘被真空固定。该真空拾取工具用于将 TMO 引导入切口 1104 中。

[0259] 可以如下将线性 TMO 移植到患者的皮肤上：在受体部位做适当深度和长度的切口，将该线性 TMO 置入该切口中并重新封闭伤口，使该 TMO 处于适当的位置。移植的 TMO 在受体部位成为皮肤整体的一部分。为了得到最好的结果，TMO 方向应该使该 TMO 的角质层、上皮和真皮层与周围皮肤组织的相应层排列在一起。任选地，用于做切口的手术刀固定在控制切割深度的结构上。这个用于做切口的手术刀工具应具有基板，基板具有限定期切口长

度的窗口，并且提供使切割前周围皮肤在轻度牵力下的工具。将该手术刀工具置于基板上，并且允许该手术刀尖伸出基板底面下约 1 毫米，使得切口深度得以精确控制。一旦做好切口，则可以移开该手术刀工具并替换为引导，其用于将真空拾取工具下降至正确的方向，使得该工具上的 TMO 被正确地定位至该切口中。一旦处于合适的位置，则放松被拉紧的周围组织，使得该线性 TMO 移植物周围的切口闭合，并且任选地施加轻微的压力以保持伤口闭合。在这个阶段，可解除真空，真空工具与基板可以一起移开。

[0260] 伤口包扎应确保在愈合期间移植物不被挤出或暴露于环境中。任选地，包扎将施加适度的压力至移植物以保持其位于适当的位置并且辅助其整合。由移植的 TMO 产生的蛋白质被分泌入皮肤组织中并进入真皮和皮下空间 (subcutaneous space)。由于该 TMO 是自体皮肤样品，所以没有移植物排斥的担心。

[0261] 皮下线性 TMO 植入：

[0262] 皮下移入的 TMO 将保持于合适的位置（不会被挤出）并且保护其免受小创伤。这种执行与移植过程相比涉及更少的对皮肤的外部损伤，因此疼痛轻且更美观。皮下移入过程更类似于注射而不是外科切割过程。

[0263] 在皮下植入程序中，使导管穿过皮肤、皮下空间的一部分，使得锋利的尖端任选地在对面穿出皮肤表面。为了确保导管在皮下穿过已知的长度，可以通过一些机械装置，如通过真空源或通过提升双面胶带的粘条而将受体部位的患者皮肤提起，而导管可以穿过该皮肤隆起的基部。可以通过使用的产生真空的工具的大小或双面胶带的粘条的大小限定该基部的长度。

[0264] 一旦植入皮下后，TMO 即已接近皮下空间中的细胞内液并且分泌的蛋白质全部进入皮下空间，此空间与许多快速注射治疗蛋白的注射部位相同。

[0265] 图 12A-D 显示根据本发明的实施方案的皮下植入程序的连续步骤。在这一过程中，为了准备用于植入，首先将 TMO 1202 贴附于外科手术缝线 1204 或使用例如钛夹或其他固定工具的其他相似类型的缝线上。将导管 1206 插入皮肤 1208 以下，以使其末端没有穿出另一侧（图 12A）。缝线可以是硬的或柔韧的，可吸收或不可吸收的，由任何生物相容的材料制成，并且具有较宽的直径范围。缝线具有前端缝合针 1203 或其他连接在其前端的针样物体，它比导管的长度长。将该针和相连的缝线以及夹于其上的 TMO 一起导入上述导管中（图 12B），并且穿透超过导管前端的皮肤，然后被拉出，直到该 TMO 被正确定位于上述皮肤下的皮下空间中（图 12C）。撤走导管时，医生握住缝针和 / 或缝线，使缝线和 TMO 保持在合适的位置（图 12D）。可以将缝线于一端平齐于皮肤剪断，使其仅在一端有轻微突出，或者可以使其在两端都轻微突出。

[0266] 缝线帮助标记该 TMO 的位置，因此便于其识别以及以后如果需要，为了调整或停止蛋白治疗而移出。更重要的是，缝线提供了通道，由 TMO 的皮肤产生的角蛋白通过这个通道可以排出该皮下区域。从该 TMO 皮肤的角质层脱落的角蛋白可能积聚于该皮下植入物区域，导致形成包涵囊肿。缝线的存在可以使角蛋白沿缝线的纵轴流动并流出体外。在一些情况下，该 TMO 的上皮将围绕缝线产生上皮细胞，使围绕缝线形成稳定的角蛋白通道。

[0267] 在以上过程的一个变体中，将导管置于皮下空间中，使得锋利的尖端在对面穿出皮肤表面。然后将缝合针连接于外科缝线的前端，然后将缝线连接至 TMO。其余的过程如上所示。

[0268] 在另外一种设计中,可以使缝线具有钩状突出。不用针,将连接有 TMO 的该缝线在将导管置入皮下空间之前装入该导管中。如上所述,将导管适当定位,但不穿出对侧的皮肤表面。当导管得到适当定位后,立即将其撤走,而缝线上的钩阻止缝线与导管一起被撤走。

[0269] 一般而言,对于皮下程序,TMO 可以未包封或者其可以被包封或封闭于膜中。该膜应具有这样的孔径,其足够大以允许营养物、排泄物和治疗剂通过,但足够小以使免疫系统的细胞不通过。

[0270] 图 13A-E 显示根据本发明的实施方案的第二皮下植入程序的连续步骤。

[0271] 该程序类似于第一皮下植入程序,但在这本例中,缝线被消除。在该程序中,如上所述使空导管 1302 穿过皮下空间,使得锋利的末端在另一端穿出皮肤表面。是真空拾取工具 1304 穿过该导管并在该导管的出口末端与 TMO 1306 的一端相连(图 13A)。另一真空拾取工具 1308 用于固定该 TMO 的另一末端。然后同时移开两个真空拾取工具,使得 TMO 1306 在导管内定位(图 13B 和 13C)。工具仍然固定 TMO 的同时,撤走导管,使得只有该 TMO 定位于皮下空间中(图 13D)。在该位置,TMO 的两个末端任选地伸展至皮肤表面以外。然后可以使用手术刀在受体部位的皮肤上做短的切口,TMO 的每个末端一个并与之邻接。然后关闭真空、解除拾取工具。然后将该 TMO 的突出末端移植入患者皮肤上邻接的切口中(图 13E),类似于以上描述的线性 TMO 移植程序。

[0272] 在该程序中,在两个末端的移植的 TMO 部分作为该 TMO 位置的标记。另外,该 TMO 皮肤的角质层自身形成角蛋白流出体外的通道。当用缝线时,该 TMO 的表皮将围绕角质层的角蛋白产生上皮细胞,使得围绕该 TMO 角质层形成稳定的角蛋白通道。角蛋白将通过此通道分泌,并防止与该 TMO 邻接地形成包涵囊肿。

[0273] 未植入的微器官 /TMO 材料可于低温条件下贮存,以备后用,例如,在植入材料功效下降至低于所需的量时。

[0274] 或者,可以从营养物质中回收试剂,经纯化并注射或以其他方式给予个体。

[0275] TMO 移出或消除:

[0276] 用于治疗的微器官 /TMO 的优点是分泌治疗剂的组织位于体内明确的位置。因此,如果由于任何原因需要终止治疗,简单的移出该组织就会停止蛋白递送。或者,如下所述,可以将该移植组织消融或使之停止工作。

[0277] 在移植的情况下,使该微器官 /TMO 的位置可视化的参考点由该 TMO 自身提供,或者在皮下植入的情况下,由缝线提供,或者由为该目的与该 TMO 一起植入的任何材料提供。例如,可以将荧光珠植入该 TMO 的每个末端,使得可以将荧光来源用于定位该珠以实现移出该 TMO 的目的。类似地,可以使用在超声、X 射线、MRI 或其他可视化源下可见的材料以及具有磁性的材料。

[0278] 移植时,可以用手术刀切皮刀或其他切割工具手术移出该微器官 /TMO。代替移出,该 TMO 可以保留在原位,但通过使用外部能量源消融该 TMO 的部分至全部细胞,所述外部能量源例如但不限于激光、低温、射频和微波能量。该消除程序的实施方案包括,在皮肤上沿移植植物的路径在该微器官 /TMO 的旁边引入探针。该探针可以将 RF 或微波辐射带到该 TMO 区域,或者可以将该探针冷却至低温以杀死该 TMO 的细胞,可能还杀死其周围的少量组织。

[0279] 当皮下植入时,也可以采用手术刀或其他切割工具手术移出该 TMO。例如,可以使用去除中心部份的装置找到该 TMO 的通路,以除去该植入的组织和最少量的周围宿主组

织。也可以通过用上述能量来源消融而消除该皮下 TMO。在一个实施方案中，沿该移植植物的通路引入探针。该探针可以用于递送，例如，RF 能量，以引起该 TMO 附近的过热。这将导致 TMO 细胞的大多数受到重大损伤，使得蛋白质分泌停止。

[0280] 实施例

[0281] 实施例 1

[0282] 植入 SCID 小鼠中，表达小鼠干扰素  $\alpha$  (mIFN  $\alpha$ ) 的人皮肤 TMO

[0283] 通过腹部整形 (tummy-tuck) 手术取得新鲜的皮肤组织样品，制备人皮肤微器官。切取皮肤厚度 (深度) 1.4–1.5 毫米的切片并用次氯化物 (hypochloride) 溶液 (10% Milton 溶液) 冲洗。使用组织切片机 (TC-2chopper, Sorval, Du-pont instruments) 将冲洗后的皮肤样品于无菌条件下切片，制成 450 微米的切片 (宽度)。所得的微器官被置于 48 孔培养板，每孔一个切片，每个孔中含有 400 微升无血清的 DMEM 培养液 (Biological Industries-Beit Haemek) 于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 下培养 24 小时。此后，使用携带鼠干扰素  $\alpha$  基因的腺病毒载体 (Adeno-mIFN  $\alpha$ ) ( $1 \times 10^9$  IP/ml) 对每个孔进行基因转导以产生治疗微器官 (TMO)。此后，TMO 再次保存在每孔 400 微升的 DMEM 培养液中。每 2–3 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #CK2010-1, Cell Science Inc.) 分析分泌的鼠干扰素  $\alpha$  (mIFN  $\alpha$ ) 的浓度。将以上所述的人皮肤 mIFN  $\alpha$  TMO 皮下植入数只 SCID (重症联合免疫缺陷) 小鼠体内。经移植的小鼠显示血清干扰素  $\alpha$  的水平升高达数周。经病毒细胞病变抑制检测法检测，发现在这些 SCID 小鼠血清中检测到的分泌的 mIFN  $\alpha$  具有生物学活性 (数据未显示)。图 14A 显示鼠干扰素  $\alpha$  - 治疗微器官 (mIFN  $\alpha$  -TMOs) 植入前体外分泌与其植入后体内血清水平间的相关分析。此相关数据表明植入前检测到的体外分泌水平可被用于计算和配制需要植入的 TMO 的量，以获得一个理想的治疗效果。

[0284] 图 14B 描述患者体内各种注射的重组治疗用蛋白质的药代动力学，以及重症联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠体内人皮肤 TMO 产生并释放的鼠干扰素  $\alpha$  的药代动力学。数值表示进行比较的蛋白的血清水平，蛋白质包括带标记的注射的蛋白质及采用 TMO 技术的 SCID 小鼠血清中的蛋白质，数值表示为每种蛋白质各自最大浓度的百分数。

[0285] 实施例 2

[0286] 表达小鼠干扰素  $\alpha$  (mIFN  $\alpha$ ) 的人皮肤 TMO 在蛋白质产量方面显示患者间的高度再现性

[0287] 制备微器官并且应用标准的 (非最佳化) 方案，如上所述，包括腺病毒效价  $1 \times 10^9$  IP/ml，采用 Ad5/CMV-mIFN  $\alpha$  载体转导生成 TMO。制备微器官 24 小时后进行转导。使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #CK2010-1, Cell Science Inc.) 分析转导后第 6 天培养液中体外分泌 mIFN  $\alpha$  的水平。图 15 显示不同时间处理的、来源于不同患者的皮肤样品之间的差异程度非常小。人类患者之间的差异小表明在实际应用中，可以通过来源于患者的标准大小的皮肤样品确定蛋白质的分泌水平标准，用以确定所需移植的 TMO 的量，以达到理想的治疗疗效。

[0288] 实施例 3

[0289] 植入 SCID 小鼠中，包括再次植入的表达人红细胞生成素 (hEPO) 的人皮肤线性 TMO

[0290] 通过腹部整形 (tummy-tuck) 手术取得新鲜的皮肤组织样品，制备线性 (20 毫米

长、0.4 微米宽)人皮肤微器官。切取移出 0.85-1.1 毫米皮肤厚度(深度)的组织样品并且在皮氏培养皿(90mm)中用含有谷氨酰胺和青霉素-链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0291] 为制备线性微器官,使用具有上述刀片装置的压制设备将上述的组织样品切割成理想的尺寸:20 毫米×400 微米。所得的线性微器官被置于 24 孔培养板,每孔一个切片,每个孔中含有 500 微升无血清的 DMEM 培养液(Biological Industries-Beit Haemek)于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下,使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体(Adeno-hEPO)(1×10<sup>10</sup>IP/ml)对每个孔进行基因转导 24 小时以产生治疗微器官(TMO)。每 2-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems)分析分泌的人红细胞生成素(hEPO)的浓度。

[0292] 将以上所述的人皮肤 hEPO 线性 TMO 皮下植入数只 SCID 小鼠体内。从图 16 中可以看出,经移植的小鼠显示血清红细胞生成素的水平升高达数周。红细胞比容值的升高显示在这些 SCID 小鼠血清中检测到的分泌的 hEPO 具有生物学活性。植入后 70 天,对数只小鼠进行第二次植入,植入追加的线性 hEPO TMO,以获得更长时间的 hEPO 分泌并由此得到更持久的治疗作用。

#### [0293] 实施例 4

[0294] 以几个剂量植入 SCID 小鼠的,表达人红细胞生成素(hEPO)的人皮肤线性 TMO

[0295] 通过腹部整形(tummy-tuck)手术取得新鲜的皮肤组织样品,制备线性(30.6 毫米长、0.6 微米宽)人皮肤微器官。切取移出 0.85-1.2 毫米皮肤厚度(深度)的组织样品并且在皮氏培养皿(90mm)中用含有谷氨酰胺和青霉素-链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0296] 为制备线性微器官,使用具有上述刀片装置的压制设备将上述的组织样品切割成理想的尺寸:30.6 毫米×600 微米。所得的线性微器官被置于 24 孔培养板,每孔一个切片,每个孔中含有 500 微升无血清的 DMEM 培养液(Biological Industries-Beit Haemek)于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下,使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体(Adeno-hEPO)(1×10<sup>10</sup>IP/ml)对每个孔进行基因转导 24 小时以产生治疗微器官(TMO)。每 2-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems)分析分泌的人红细胞生成素(hEPO)的浓度。

[0297] 将以上所述的人皮肤 hEPO 线性 TMO 以 3 种剂量(每只小鼠 1、2、3 个线性 TMO)皮下植入数只 SCID 小鼠体内。从图 17 中可以看出,经移植的小鼠显示血清红细胞生成素的水平升高达数周。而且,不同小鼠的血清水平与植入的线性 TMO 数量相关,由此获得一个剂量相关的作用。红细胞比容值的升高显示在这些 SCID 小鼠血清中检测到的分泌的 hEPO 具有生物学活性。

#### [0298] 实施例 5

[0299] 表达人红细胞生成素(hEPO 进入免疫活性动物)的小型猪皮肤线性 TMO 的自体移植

[0300] 在全身麻醉下,从活体动物取得新鲜的皮肤组织样品,制备线性(30.6 毫米长、0.6 微米宽)小型猪(Sinclair 猪)皮肤微器官。使用商品化的取皮刀(Aesculap GA630)切取移出 0.9-1.1 毫米皮肤厚度(深度)的组织样品并且在皮氏培养皿(90mm)中用含有谷氨酰胺和青霉素-链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0301] 为制备线性微器官,使用具有上述刀片装置的压制设备将上述的组织样品切割成

理想的尺寸 :30.6 毫米 ×600 微米。所得的线性微器官被置于 24 孔培养板,每孔一个切片,每个孔中含有 500 微升无血清的 DMEM 培养液 (Biological Industries-Beit Haemek) 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下,使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体 (Adeno-hEPO) ( $1 \times 10^{10}$  IP/ml) 对每个孔进行基因转导 24 小时以产生小型猪皮肤治疗微器官 (猪皮肤-TMO)。每 2-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&DSystems) 分析分泌的人红细胞生成素 (hEPO) 的浓度。

[0302] 以上所述的小型猪皮肤 hEPO 线性 TMO 通过皮下植入和皮肤移植两种方法移植至数只具有免疫活性的小型猪体内 (两只小型猪皮下植入 TM0s-hEPO, 在另外两只小型猪中, TM0s-hEPO 移植到其 1 毫米深的切器中)。在每只小型猪体内植入充分数量的 TM0s-hEPO, 使每只猪的移植物移植前总分泌水平达到约每天 7 微克。移植后, 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定的血清 hEPO 水平的升高 (图 18A) 和网织红细胞计数的升高 (图 18B) 持续 7 天。图 18A 和 B 显示释放至猪血清中的具有生理活性 (红细胞生成素效应) 的 hEPO 的治疗量。

[0303] 实施例 6

[0304] 体外表达人红细胞生成素 (hEPO) 的人皮肤线性和网 TMO

[0305] 使用商品化的取皮刀, 通过腹部整形 (tummy-tuck) 手术取得新鲜的皮肤组织样品, 制备线性 (28 毫米长、0.6 微米宽) 和网 (每个网部分宽 0.6 微米) 的人皮肤微器官。切取移出 0.85-1.2 毫米皮肤厚度 (深度) 的组织样品并且在皮氏培养皿 (90mm) 中用含有谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0306] 为制备线性和网状微器官, 使用具有图 4A 所示的用于制备线性微器官的刀片盒或使用具有图 8 所示的用于制备网状微器官的刀片盒的压制设备切割上述的组织样品。所得的线性 / 网状微器官被分别置于 48/24 孔培养板, 每孔一个切片, 每个孔中含有 500/1000 微升无血清的 DMEM 培养液 (Biological Industries-Beit Haemek) 于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下, 使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体 (Adeno-hEPO) ( $1 \times 10^{10}$  IP/ml) 对每个孔进行基因转导 24 小时以产生治疗微器官 (TMO)。每 3-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems) 分析分泌的人红细胞生成素 (hEPO) 的浓度。从图 19A 中可以看出, 转导后检测 hEPO 蛋白质的体外分泌 31 天。

[0307] 实施例 7

[0308] 体外表达人红细胞生成素 (hEPO) 的人皮肤线性和超线性 TMO

[0309] 通过腹部整形 (tummy-tuck) 手术取得新鲜的皮肤组织样品, 制备线性 (20 毫米长、0.6 微米宽) 和部分超线性 (15 毫米长、0.6 微米宽) 的人皮肤微器官。切取移出 0.85-1.2 毫米皮肤厚度 (深度) 的组织样品并且在皮氏培养皿 (90mm) 中用含有谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0310] 为制备线性和超线性微器官, 使用具有图 4A 所示的用于制备线性微器官的刀片盒或使用具有图 5A 所示的用于制备超线性微器官的刀片盒的压制设备切割上述的组织样品。所得的线性 / 超线性微器官被置于每孔含有 500 微升无血清 DMEM 的培养板中, 每孔一个切片 (线性), 或置于含有 3750 微升无血清 DMEM (Biological Industries-Beit Haemek)

的皮氏培养皿中,于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下,使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体 (Adeno-hEPO) ( $1 \times 10^{10}$  IP/ml) 对每个孔进行基因转导 24 小时以产生治疗微器官 (TMO)。每 3-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems) 分析分泌的人红细胞生成素 (hEPO) 的浓度。从图 19B 中可以看出,转导后检测 hEPO 蛋白质的体外分泌 14 天。

[0311] 实施例 8

[0312] 体外表达人红细胞生成素 (hEPO),来源于用新的切皮刀采集的皮肤样品的人皮肤线性 TMO

[0313] 通过腹部整形 (tummy-tuck) 手术取得新鲜的皮肤组织样品,制备线性 (30.6 毫米长、0.6 微米宽) 人皮肤微器官。使用图 3A-3E 中描述的取皮刀切取移出 0.9-1.1 毫米皮肤厚度 (深度) 的组织样品并且在皮氏培养皿 (90mm) 中用含有谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养液冲洗。

[0314] 为制备线性微器官,使用本发明中描述的具有图 4A 所示的用于制备线性微器官的刀片盒的压制设备切割上述的组织样品。所得的线性微器官被置于每孔含有 500 微升无血清 DMEM (Biological Industries-BeitHaemek) 的培养板中,每孔一个线性片段,于 5% CO<sub>2</sub>、37℃下培养 24 小时。培养板振荡条件下,使用携带人红细胞生成素基因的腺病毒载体 (Adeno-hEPO) ( $1 \times 10^{10}$  IP/ml) 对每个孔进行基因转导 24 小时以产生治疗微器官 (TMO)。每 3-4 天更换培养液一次并使用特异的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Cat. #DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems) 分析分泌的人红细胞生成素 (hEPO) 的浓度。从图 19C 中可以看出,转导后检测 hEPO 蛋白质的体外分泌 23 天。

[0315] 密闭无菌的微器官处理盒

[0316] 图 20-39 描述用于进行从组织获取到植入受体体内的微器官 /TMO 处理全部过程的盒式模块。在所述的盒式模块中,各种以上描述的功能均在无菌环境中完成,微器官 /TMO 在模块间的传送通过有效的、无菌的、可控制的方式完成。

[0317] 图 20 显示主要的盒式模块 2000,模块被分离以便易于观察。主要的模块包括:组织采集器 2002、微器官模块 2010、生物加工模块 2020、流控模块 2040。每个模块都具有一个塑料的或其他具有生物相容性的腔。一般而言,获取组织时,组织采集器 2002 与盒的其余部分分离。获取组织后,将其连接至微器官模块 2010 并向后者传送获取的组织。每套模块唯一地用于特定的个体和特定的样品,通过例如条形码的方法鉴别。使用之后,优选的,将模块丢弃。

[0318] 图 21 和 22 显示获取器 2002 的操作和详图

[0319] 在一个临床无菌环境下,例如:门诊患者诊所或手术室中,使用皮肤获取器 2002 从供体获取皮肤样品。任选地,获取器 2002 通过其上安装的电池驱动或通过单独的动力模块 (未显示) 驱动,也可以通过例如医疗隔离电源的方法提供动力。

[0320] 依据以上所述的组织获取设备的设计原理,参考图 3,获取器 2002 使用一个真空源 2102,可以是专用的便携式真空源或者来源于非便携式已安装的真空源。在供体部位做标准的手术部位准备,并且使用局部麻醉剂。

[0321] 端口 2116 在基板 2412 上打开形成窗口 2120,这是对无菌组织采集器的唯一的开放。然后,通过一种方法 (未显示) 将其安装至受体的理想部位,使有足够的压力导致皮肤

表面 2114 向窗口 2120 凸起。

[0322] 活塞 2106 根据需要沿密闭的腔 2105 中的无菌衬套 2104 降低以接触皮肤, 通过样品负载器 2108 使用真空经孔 2110 将皮肤平坦的表面固定于样品负载器的表面上。

[0323] 样品负载器的接触表面垂直于活塞并且保持于刀片刀刃上方理想的距离, 以切割理想厚度的皮肤样品。

[0324] 任选地, 刀片 2118(视图上显示其末端) 通过传动器 2122 的作用从一端向另一端摆动以切割组织(例如: 皮肤), 传动器通过螺旋传动装置 2126 驱动。螺旋传动装置 2126 被马达(未显示) 驱动。

[0325] 图 22 显示所得的获取的皮肤样品 2202 贴附于负载器上, 同时端口 2116 位于关闭位置。组织采集器现在再次以无菌的方式封闭, 并准备传送微器官至微器官模块。

[0326] 图 23-25 显示根据本发明的实施方案利用皮肤样品制备生成微器官。

[0327] 如图 23 所显示, 负载器上带有皮肤样品的关闭的获取器 2002 通过空气密封垫圈 2304 利用夹子 2302 可分离的固定安装至微器官模块 2010 上。图 20 显示的顶视图中, 获取器模块定位于 2014。

[0328] 在微器官模块 2010 中, 修整刀片盒 2320 含有特有的两个平行的刀片 2318, 间隔距离是超线性微器官单个片段的理想长度, 一般距离在 30 毫米以内, 并与 2321 的刀片排列相应。任选地, 修整刀片盒 2320 含有四个排列成矩形的刀片, 可以限定样品的长度和宽度。

[0329] 修整刀片盒 2320 与获取器上的样品负载器对齐, 并且获取器上的端口 2116 和微器官模块上的端口 2306 被打开。

[0330] 用于使组织样品在切割和传送过程中保持潮湿的湿润剂通过一个分配器释放至修整刀片盒和切割刀片盒(图 23 中未显示, 图 29 中的顶视图中可见)。

[0331] 活塞 2106 向刀片盒 2320 推进, 使刀片切割皮肤至负载器底部, 由此修整皮肤样品的两个边缘。

[0332] 退回活塞 2106 至刀片 2318 上方的高度, 保持真空, 以固定修整的样品和剪下的边缘于负载器上。

[0333] 依据以上所述的原理并参考图 4 和 5, 切割刀片盒 2321 含有多个相互平行的切割刀片 2330, 刀片之间通过安装于支持基座 2322 上的定位架 2331 相间隔, 奇数刀片与相对应的偶数刀片间纵轴上偏移, 偏移距离等于微器官的宽度, 一般在几百微米范围内。

[0334] 可移动面板 2328 被插在刀片 2330 之间, 并被托架 2326 固定于合适的位置, 托架跨于支架(offset) 2324 上。任选地, 托架 2326 由压力, 如被锁键固定的压缩弹簧的压力固定于合适的位置(未显示)。

[0335] 用螺旋传动装置 2233 推进修整刀片盒 2320 和微器官刀片盒 2321, 使微器官刀片盒 2321 与负载器对齐。

[0336] 活塞 2106 向刀片盒 2330 推进, 如图 24 所示, 直到刀片切割皮肤至负载器底部。

[0337] 升高活塞 2306, 一般升至其安装至 2010 前的初始位置, 如图 25 所示。

[0338] 通过托架 2326 将面板 2328 升起高于刀片 2330, 升高托架的方法有多种, 例如通过解除固定的锁键使压缩弹簧弹回(未显示)。固定锁键的解除可以在切割刀片盒切割时通过活塞的压力完成或通过其他方法完成。

[0339] 所得的超线性微器官 2502 保持在面板 2328 上, 于一个已知的位置和方向准备传

送。注意：负载器 2108 现在固定修剪下的组织边缘，超线性微器官保持在面板上。

[0340] 图 26-28 显示生物加工模块 2020 的一些详图，这些在图 20 中也有显示，现在对其作进一步的说明，并且微器官被传送至其中。生物加工模块 2020 含有一个腔 2021，其上具有端口 2024。如以下所描述的，在腔 2020 内部，安装有可旋转的固定机械装置 2602。腔 2020 上还具有多个流控端口 2023，它从流控模块 2040 传导动力至模块 2020 中的元件。腔 2020 上还具有固定栓，它可以与模块 2010 的腔上的相匹配的洞 2013 紧密结合，并且通过密封垫圈 3037 将两个模块密封。

[0341] 图 20 中还显示了一个真空导槽 2011，显示的是其收回至模块 2010 中的状态。

[0342] 图 26 和 27 显示固定机械装置 2602 的详图。机械装置 2606 含有一个内部旋转机械装置 2702 (inner rotating mechanism) 和旋转微器官固定器 2704。真空拾取器导线 2604 与内部旋转机械装置相连，通过旋转内部旋转机械装置使其放松。

[0343] 图 26 示意性地显示微器官在模块 2010 和模块 2020 之间的传送。端口 2025 和 2306 已被打开（未显示）。真空导槽 2011 的初始位置位于模块间的端口区，真空拾取器导线 2604 置于真空导槽 2011 中使其拾取器 2606 的位置轻度偏离面板 2328 上的微器官 2502。为了抓住微器官 2502，顺时针方向轻度旋转内部旋转机械装置 2702 使拾取器 2604 被推至邻近微器官 2502 的一侧，并且末端重叠。启动真空拾取器 2606，逆时针方向旋转内部机械装置 2702 在真空导槽 2011 的引导下将拾取器导线收回至模块 2020，导线置于真空导槽后导槽有刚刚够的真空压力保持拾取器导线 2604 和微器官 2502。当微器官的前方末端到达旋转微器官固定器 2704 时，它位于片段定位器 2610 上。片段定位器 2610（在虚线的圆中显示其放大的图像）含有至少两个关闭部分 2608、一个任选的可伸展的横杆 2614（在以下描述）、还任选的含有一个环 2612，其功能在以下描述。一旦微器官到达微器官固定器 2704 时，内部旋转机械装置 2702 与外层旋转机械装置 2703 锁定使两者作为一个装置同时转动，结果出现微器官固定器 2704 逆时针转动将微器官装载于其上。

[0344] 真空导槽 2011 对微器官使用低水平真空，使器官在传送过程中保持方向并且不会扭曲。任选地，它的形状是一个矩形横断面的管（在插图 A-A 中显示），沿其长轴具有孔 2630，通过孔应用轻度的真空足以使微器官轻轻地贴附于其侧壁并沿其长轴滑动。任选地，附加一个调整部件 2632，调整微器官防止卷曲。其上的槽还可保持导线 2604 位于导槽 2011 中的正确位置。

[0345] 旋转微器官固定器 2704 具有一组片段定位器 2610（在虚线的圆中显示其放大的图像），每个片段定位器均具有微器官的单个片段的长度且其两端均有一个夹子。因此，微器官固定器旋转时，微器官片段的一端位于片段定位器一端的夹子上，然后另一端位于片段定位器另一端的夹子上。当片段定位器经过一个闭合机械装置 2616 时，此机械装置旋转使两个轮翼升高以关闭片段定位器末端的夹子 2608。一旦微器官被完全固定，就可以关闭真空拾取器和真空导槽的真空。微器官被安全地固定在微器官固定器 2704 上后，通过螺旋传动装置推动将导槽 2011 收回至微器官盒 2010 中，直到端口部位被清空，然后关闭端口。微器官模块 2010 连同组织采集器模块 2202 可以一起被丢弃。

[0346] 图 28A 显示以上过程的侧面观，图 28B 显示微器官固定在片段定位器上。

[0347] 升起生物反应器的容器 (bio-reactor base) 2802 直到超线性微器官固定器 2704 被封闭于容器 2802 的内表面。容器 2802 的升起通过，例如，马达 2806 驱动的支持托板

2805 完成,马达与支持托板间有连接器 2808。在一个实施方案中,装有超线性微器官的容器 2802 没有被盖子盖住。任选地,如果需要,可以使用盖子以防止由于振荡导致的生物反应器内液体的溅出或减少蒸发。盖子可以是松弛覆盖的盖子类似于有盖培养皿或者是一个密封的盖子以完全密封生物反应器。盖子可由硬的塑料材料或其他生物相容材料制成,或者由膜制成,例如:能透过气体不能透过液体的膜或其他类型的膜。能透过气体的膜具有其他优点,允许通过调节所述生物反应器周围附加的容器内气体的浓度来控制气体环境。盖子可在刀片组 3220 之下(以下描述)或位于其上。

[0348] 图 29 显示一个加工站 2900,具有一组模块安装于其中。在本发明的代表性实施方案中,参考图 23-28,以上描述的功能通过控制模块 2900 左侧的部分模块完成,如图所示。清楚的显示是模块 2010、2020 和 2040。模块 2002 连接在模块 2010 的一个端口上,此端口在图 20 和 29 中标记为 2014。操作过程中,模块 2002、2010、2020 和 2040 挂接在真空调节器 2923 和流控控制器 2921 上,例如,通过快速断开方式挂接。真空调节器 2923 和流控控制器 2921 受局部控制器 2960 控制,局部控制器 2960 受主控制器 2940 控制。局部控制器 2960 还控制开启端口、旋转固定器等操作所需的马达,如上所述。应该明白的是:虽然对流控和电控都作了描述,但只能单独使用流控或者电控。

[0349] 利用获取器模块 2002 获取组织样品后,获取器模块 2002 通过端口 2014 被连接到模块 2010 上。获取的组织样品被切割(图 23-25),并且经切割的微器官被传送至模块 2020 中,如上所述并参考图 26-28。此时,模块 2010 连同仍与其相连的模块 2002 已不再被需要,可以与模块 2020 分离并被丢弃。

[0350] 生物加工模块 2020 和流控模块 2040 被传送至图 29 中所示方位的右侧的对接站。加工站 2900 可为含有不同组织样品的盒式模块提供多个对接站,这些组织样品可能来源于多个患者/位置之一。多个对接站上的所有盒式模块在其处理的开始阶段都需要经过左侧的对接口。在图的这一侧,显示模块 2020 和 2040 连接至一个流控调节器 2920(被流控控制器 2932 控制)和一个真空调节器 2922(被真空调节器 2934 控制)。马达 2224、2226、2906 和 2912 被马达控制 2936 调节。

[0351] 模块 2020 和 2040 置于外壳 2901 中,通过加热器 2942 保持理想的温度,加热器 2942 由温度传感器(未显示)调节并由加热器控制器 2938 控制。控制器可以是单独的控制器,也可以是大局部控制器 2930 的一部分。局部控制器 2930 还控制通过采样器 2912 从 TMO 中采样和分析。采样器 2912 通过一个无菌的端口 2943,例如一个隔膜,从生物反应器 2037 中采集液体并将其注入分析器 2996 中。分析器 2996 传送信息至主控制器 2940。任选地,传感器对多种参数敏感,如:温度、湿度、CO<sub>2</sub>、pH 或其他生物反应器中记录或控制用的通常监测的参数。

[0352] 液体,例如:营养物质、排泄物、气体等,通过流控模块 2040 输入输出生物反应器 2037。

[0353] 生长介质贮存在调剂容器 2905 中,在流控控制器 2932 的控制下释放至生物反应器 2037 中。

[0354] 排泄物介质在流控控制器 2932 的控制下排出到调剂容器 2909 中

[0355] 调剂容器 2907 可以释放无菌气体,例如:氧气、氮气、CO<sub>2</sub>、或它们的混合物。或者,调剂容器 2907 可以被用于释放抗生素、消毒剂或其他期望的液体。

[0356] 如果在使用真空时需要平衡气压,可以在每个模块上添加无菌空气过滤器(未显示)。

[0357] 在主控制器 2940 执行的主 TMO 处理程序(algorithm)的控制下,处理过程沿步骤的时间顺序进行,包括在适当的时间注入或移除液体(包括基因转染载体),并且通过各种方法搅拌,例如:固定在生物反应器 2037 中的微器官的旋转和平移运动、使用声学能量作用于生物反应器 2037 中的液体或者其他的方法。这些步骤的时间选择和持续时间由预先设定的程序和 / 或测定的处理条件所决定,一般进行选择以适应于特定基因或基因转染载体的特性、应用的目的、个体的特定数据。

[0358] 基因转染载体定量容器 2950 一般保存在低温条件下,方法未显示,在合适的时间被取出、解冻、通过一个无菌端口 2929(例如一个隔膜)应用,并注入调剂容器 2911 中。调剂容器 2911 在流控控制器 2932 的控制下依次注入生物反应器 2937 中。

[0359] 在适当的时间,一般是超线性微器官制成功后 24 小时,基因转染载体通过无菌端口 2929 被注入以充满调剂容器 2911,所述载体的第一部分释放开始。

#### [0360] 分析 TMO 的性能

[0361] 分析 TMO 的性能参数,例如蛋白质生成率,可以在应用基因转染载体之前、期间、之后的各种时间进行,用于检测和调节制备过程以得到具有期望性能的 TMO,例如:单位时间可生产出期望范围的蛋白质。进行这种分析的一种方法是利用物理的方法从生物反应器中获取组织的样品或者组织周围的液体,应用免疫分析或类似的化学或生物分析检测样品材料的一部分。另一种方法,可以代替第一种方法或与第一种方法联合应用,利用光学的方法、分子探针传感器技术(例如 DNA 或蛋白质分析)或其他本领域已知的方法检测生物反应器中 TMO 或它的培养液的性能参数,而不需要用物理的方法采样分析。可以任选一种方法,在从微器官被引入生物反应器到其被移出使用的期间上的各个时间点上均可分析 TMO 的性能。

[0362] 控制特定个体的微器官转化成 TMO 的设计方案可以在制备 TMO 以达到期望的性能范围的过程中应用一个或多个变量,这些变量的实施例包括但不限于:

[0363] 1. 载体处理的次数:通过向含有微器官的生物反应器介质中添加基因转染载体,利用载体一次或多次处理微器官

[0364] 2. 每次处理的持续时间:一般通过置换部分或全部介质、从生物反应器中移出剩余的载体的方法终止每一次的处理,还可简单的允许载体随时间延长失活或加热失活或其他类似方法降低生物反应器中载体的活性。处理之间的时间也是一个变量。

[0365] 3. 使用的载体的剂量:每次处理应用特定剂量或量的基因转染载体,不同的处理可以选择相同或不同的量。一般通过使用相同或不同特定效价的载体(使用病毒载体时是感染和非感染病毒粒子的效价)或改变加入生物反应器中的总容量以改变使用的载体量。

[0366] 4. 载体增强的方法:可在载体存在于含有微器官的介质中时或之前或之后,任选的采用一种或多种方法提高基因转染的效率以增强载体的作用。这些方法包括:添加各种已知具有增强载体的摄取或效应作用的化学制剂;对微器官进行物理的处理,例如:组织(例如:皮肤组织的角质层或真皮)打磨或穿孔,以增加载体的进入;在培养液中物理搅拌微器官;引起微器官或其培养液物理的振动;将微器官或其培养液暴露于声波或超声波能量中;应用各种电的方法增强载体的摄取或效应,例如;电穿孔和应用电磁场,等。

[0367] 5. 调节保存条件 :预定的培养液移除和置换的量和周期、气体交换率、添加制剂如缓冲液或其他化学剂至生物反应器培养液中,以保持生物反应器中培养液的理想的条件。

[0368] 6. 步骤的时序安排:从制备微器官直至 TMO 预备使用,微器官转变成 TMO 的每一步的时间选择和持续时间。

[0369] 可以预设用于制备 TMO 的程序 (algorithm), 固定已知时间选择和持续时间的特定步骤的顺序, 包括固定上述变量的预设值和步骤的计划表。或者, 程序 (algorithm) 可被改编, 设计成能够依据测定的 TMO 在制备过程的各阶段中的性能对一个或多个以上的变量进行自我调整, 以改变 TMO 的性能使其在用于治疗一个个体时能够达到理想范围的值。

[0370] 制备期间, 通过采样器 2912 对生物反应器 2937 中的培养液进行采样并利用分析器 2996 分析样品, 一般是对生成的特定期望的蛋白质定量分析, 分析采用本领域已知的分析方法之一, 例如: 酶联免疫吸附试验 (ELISA)。还可以使用其他的测试检测 TMO 产生的蛋白质的性质, 例如光谱分析或其他测试。

[0371] 另外, 一般通过采样检测 TMO 的安全性, 例如: 无菌和不含特定的外来药物。

[0372] 当处理结果表明 TMO 已制备完成并准备应用至一个个体时, 容器 2802 被进一步升起 (如图 30 所示) 并推进至刀片组 3220, 刀片组中的刀片 2804 与相邻片段定位器之间预先形成的狭槽相匹配 (图 32)。图 31 显示刀片的上面观 (与图 30 的侧面观比较)。接触容器后, 刀片 3804 将超线性微器官切割成单独的片段。

[0373] 任选地, 刀片组 3220 可被保留于原位, 用于将液体和单独的微器官 / TMO 充分分离成单独的腔室。这样就可以从每个分离的切割的微器官 / TMO 片段中单独取样。在这种实例中, 在容器 2802 的底面和侧面具有软的、生物相容的、不能渗透的层 3004, 例如: 硅橡胶。刀片组 3220 具有一个相同材料的嵌于其底面的内部盘 (inner disk) 3012。刀片组 3220 与容器 2802 的内径紧密配合, 随着它的下降切入层 3004 中, 此时盘 3012 与容器 2802 的底面紧密配合。结果每一个 TMO 片段形成一个单独的腔室, 与其他片段充分隔离, 允许测量每个片段的单独的分泌水平。

[0374] 准备 TMO 以应用至一个个体时, 应估计所需使用的片段的数量, 一般需要参考以下数据, 但不限于此:

[0375] a) 依据针对相似个体已制定的使用方法、特定的临床方案或人口统计学资料, 相同治疗用蛋白质常规应用于同类个体的相应的量。

[0376] b) 在相同个体以前曾通过注射或其他途径应用相同的治疗用蛋白质时, 相同治疗用蛋白质特定地应用于相同个体的相应的量。

[0377] c) 个体的数据, 例如: 体重、年龄、身体健康状况、临床状况。

[0378] d) 以前 TMO 应用于其他相似个体所得到的药代动力学数据。

[0379] e) 以前 TMO 应用于此个体所产生的反应。

[0380] 将模块从对接站移出, 可拆分的一个 TMO 传送模块 3300 通过连接 3304 和密封垫圈 3306 密封地连接至生物加工器 2020 上并且被插回加工站 2900 左侧的对接站 (图 34)。(图中显示的 3402 是什么? 它是对接站么?)

[0381] 如图 33 和 34 所示, 传送模块 3300 包括一个腔 3302, 腔上有端口 3305; 固定在 x-y 平台 (x-y stage) 3311 上的多个传送钉 3310, x-y 平台 (x-y stage) 含有两个导螺杆 3312

和 3314, 由马达 3406 驱动 (概略地显示)。传送钉 3310 适合选择性地通过端口 3305。

[0382] 如图 34 所示, 模块 2020 在保持与模块 2040 相连的同时与模块 3300 相连, 形成组合体 3402。模块 2020 与模块 3300 之间的端口被打开。非常概略地显示两个马达 3404 和 3406。运转这些马达可以转动微器官固定器 2704 并且操作 x-y 平台 (x-y stage) 3311。

[0383] 图 35 显示一个钉 33 10 伸入模块 2020 中, 与一个微器官片段定位器 2610 连接。图 37(在 A 中) 显示钉 3310 连接至片段定位器 2610 顶部的环 2612 上。轻微旋转微器官固定器 2704 或者横向移动钉 3310(通过 x-y 平台 (x-y stage)) 可导致片段定位器 (连同一个微器官 /TMO 片段 3702) 与固定器 2704 分离, 使微器官片段 3702 被钉 3310 固定 (在 B 中)。环 2612 显示为圆形结构, 但也可以是管状或其他形状, 以协助抓住钉 3310 的引导部分。

[0384] 然后, 通过控制 x-y 平台 (x-y stage) 可将钉 3310 和片段 3702 一起撤回至模块 3300 中, 如图 36 所示。可以将另外的钉装入 x-y 平台 (x-y stage) 并从模块 2020 中抓取另外的微器官片段, 此过程可以多次重复以获得移植所需数量的片段。关闭端口, 模块 2020 与模块 2040 一起可以返回图 29 中右侧的对接站以继续保存剩余的微器官 /TMO。

[0385] 整个 TMO 传送模块 3300 从组合体上分离, 并被输送至处理中心, 任选地, 输送时控制温度、湿度、气体和其他环境参数。任选地, 模块 3300 具有可手工操作取出想要的钉 3310 的功能。

[0386] 当微器官 /TMO 将要被移植时, 从模块 3300 中取出钉, 并且传送到工具 1110 上用于移植 (图 38), 参考图 11 的描述。当然, 本领域所描述的或本文中所描述的其他方法也可以被使用。

[0387] 一般在一个临床洁净的房间中, 例如: 门诊患者诊所或手术室中, 应用微器官 /TMO。一般在处理室中在受体的面前手工使用模块 3300。

[0388] 如图 38 所示, 每个取出的钉 3310 可能都需要经过矫直处理。如左边的图所示, 如果处理过程中微器官 /TMO 片段 3702 松弛, 将导致在下一个步骤中片段不能充分伸直, 通过矫直可获得下图的结果。

[0389] 注意: 每个片段定位器包括一个共同的棘条 3810 上的三个部分, 显示为 3802、3804 和 3806。通过将 3802 和 / 或 3806 部分向远离中心部分 3804 的方向牵拉, 也可以使 TMO 片段紧张, 得到伸直的片段 3812。

[0390] 伸直的微器官 /TMO 片段现在可以从片段定位器中以可靠的定向被移出。一般使用真空拾取工具 1110 完成这一步骤, 以结合参考图 11 所描述的方法使用。与真空源相连的工具 1110 与伸直的片段 3812 紧密接触, 以使其能够固定住伸直的片段 3812 的角质层 3816 一侧并且通过其真空孔固定微器官 /TMO。

[0391] 重复此过程, 直到所需数量的微器官 /TMO 应用至受体。

[0392] 在本发明的一个实施方案中, 生物反应器被保存在接近体温的条件下 (例如: 36–38°C; 于高湿度下, 优选 95%; 含丰富 CO<sub>2</sub> 的空气 (3–10% CO<sub>2</sub>、90–97% 空气))。任选地, 微器官保存条件中含有抗生素、抗真菌剂和 / 或其他药物。准确测量蛋白质分泌所需的化学药品或试剂可以冷冻保存以等待被使用。

[0393] 输入指令和接收数据的控制中心也是任选提供的。控制器 2940 具有软件, 以使程序自动化或半自动化并且提供数据给显示器。

[0394] 应该明白的是,通过实施例提供的本发明代表性实施方案的非限制的细节描述对本发明进行了描述,其目的不是为了限制本发明的范围。特别是,所描述的系统显示得非常详细。很明显,对于本领域技术人员以上描述的许多操作可以通过其他方法完成,并且以上描述的许多过程和显示的特征并非绝对必要。

[0395] 例如,仅仅显示了有限数量的遗传改变。然而,依据本文中描述的方法活组织被移植到患者体内并且移植后组织在体内保持活力,很明显实际上通过任意的已知方法诱导的组织任意的遗传改变都将导致患者分泌目标蛋白质或其他治疗剂。

[0396] 本发明的实施方案可以产生变化,包括结合各种实施方案的特点。因此,本发明的范围仅被权利要求的范围所限制。另外,为避免有关权利要求的范围的问题,在权利要求中使用的术语“包括”、“包含”、“具有”以及它们的同根词的含义是“包括但不必限于”。

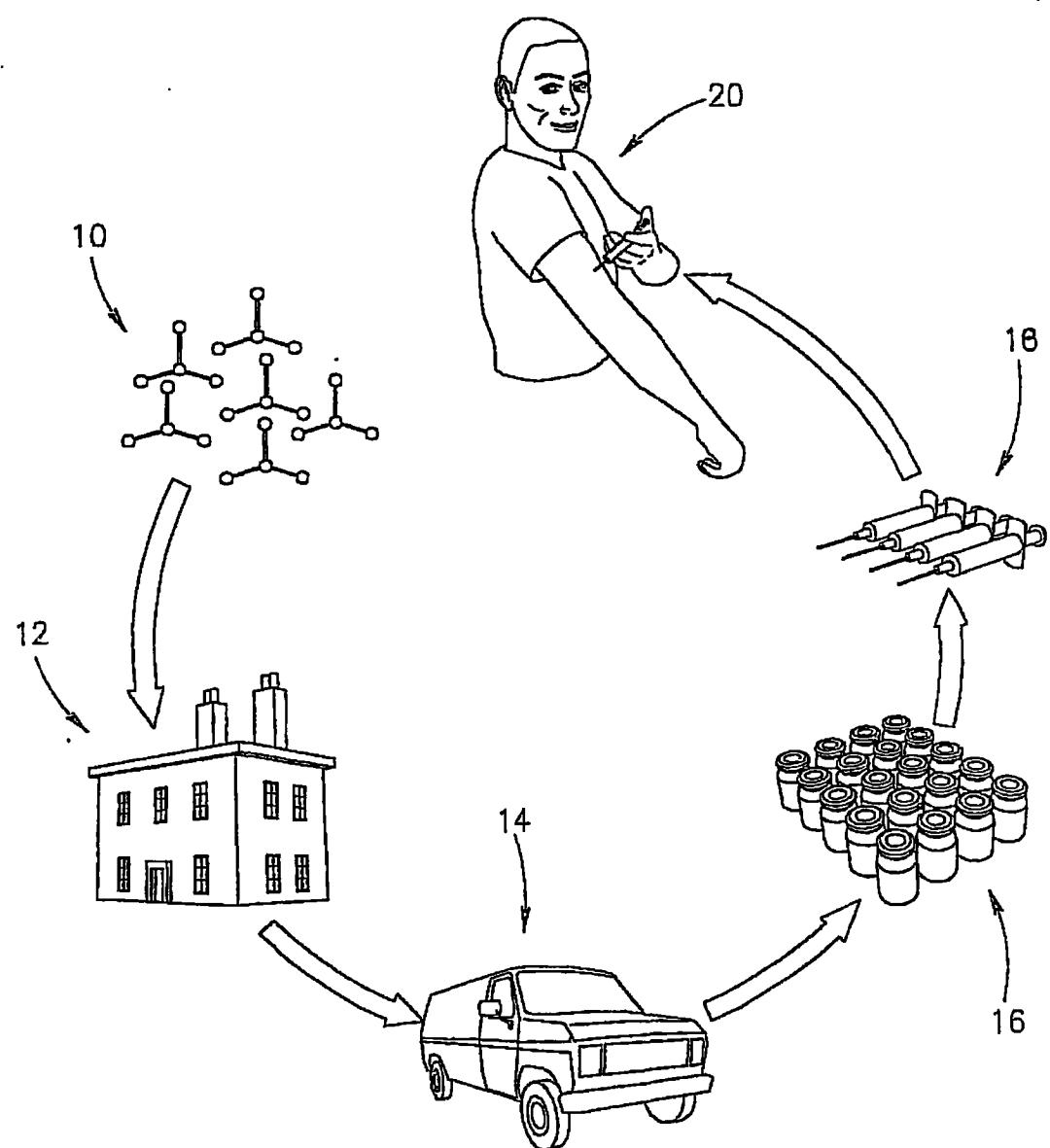


图 1

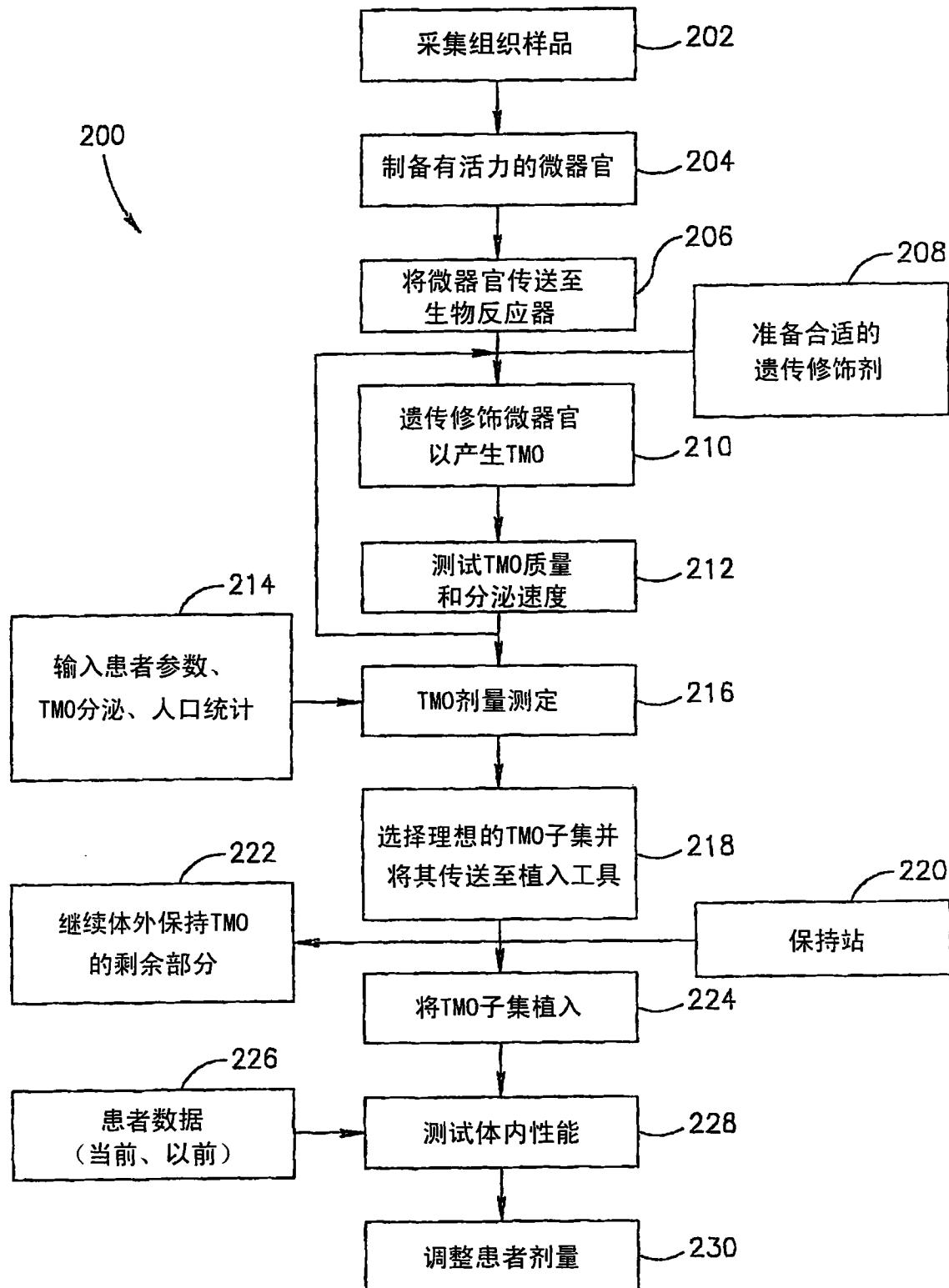


图2

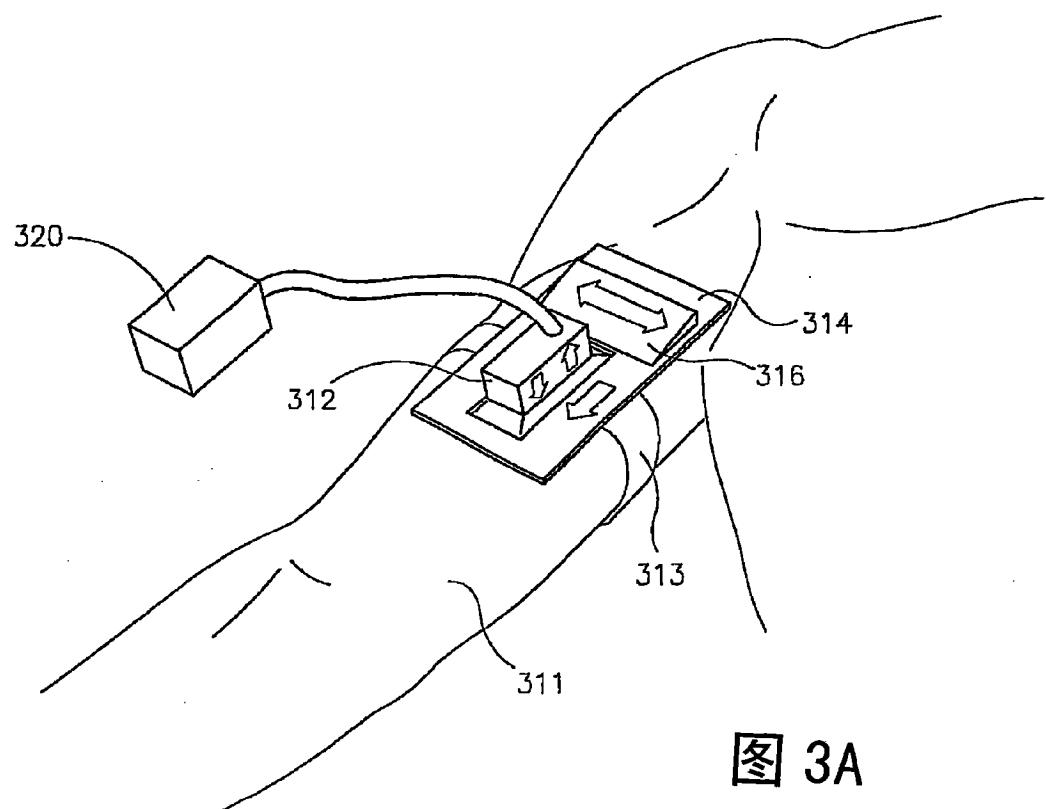


图 3A

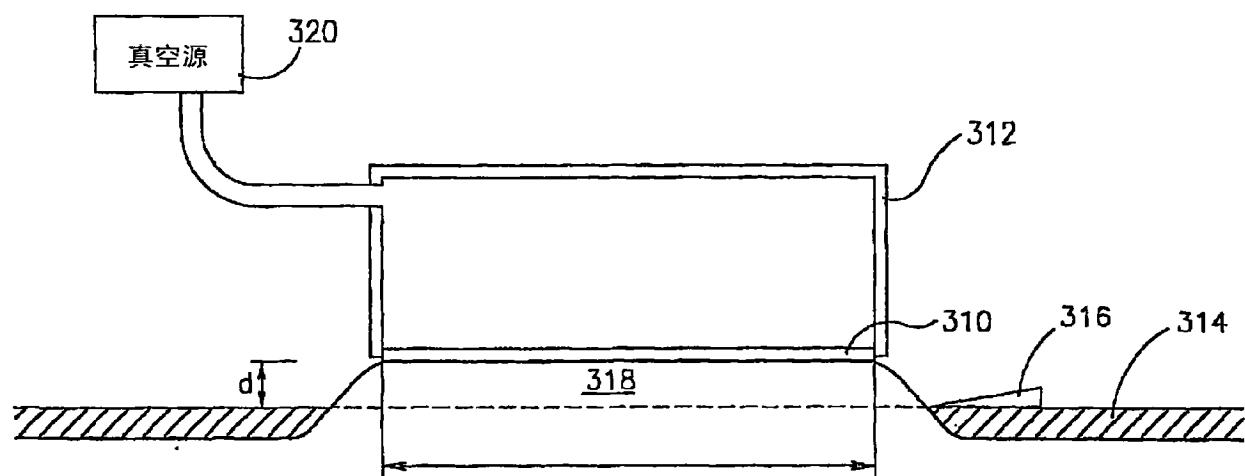


图3B

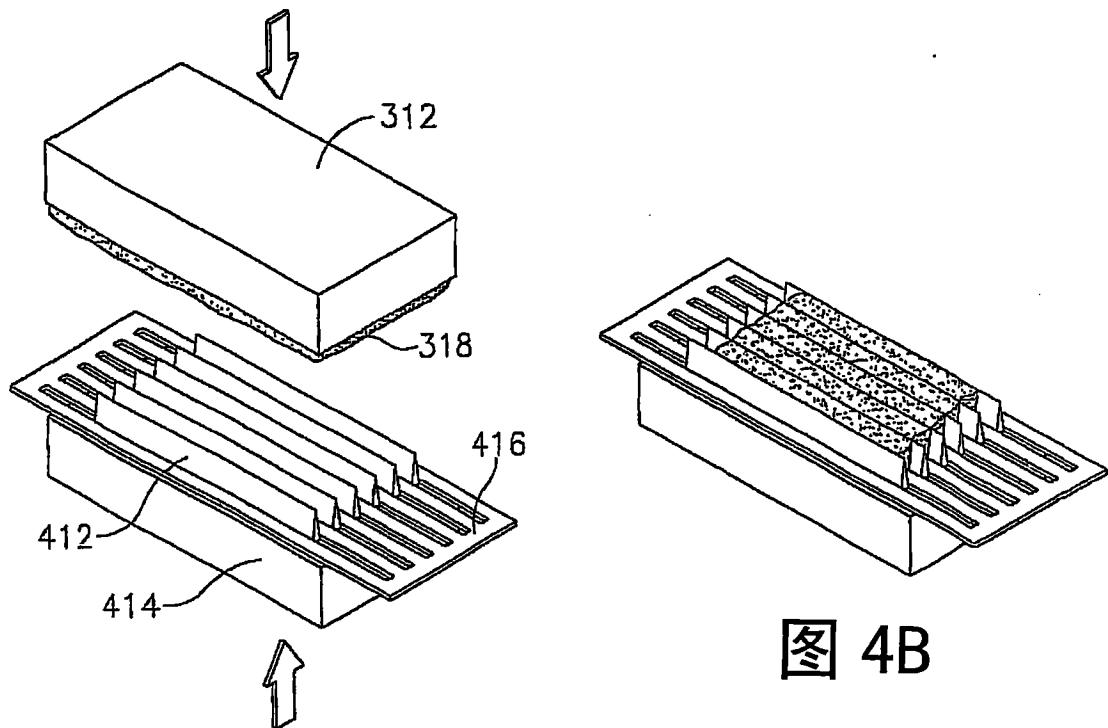


图 4A

图 4B

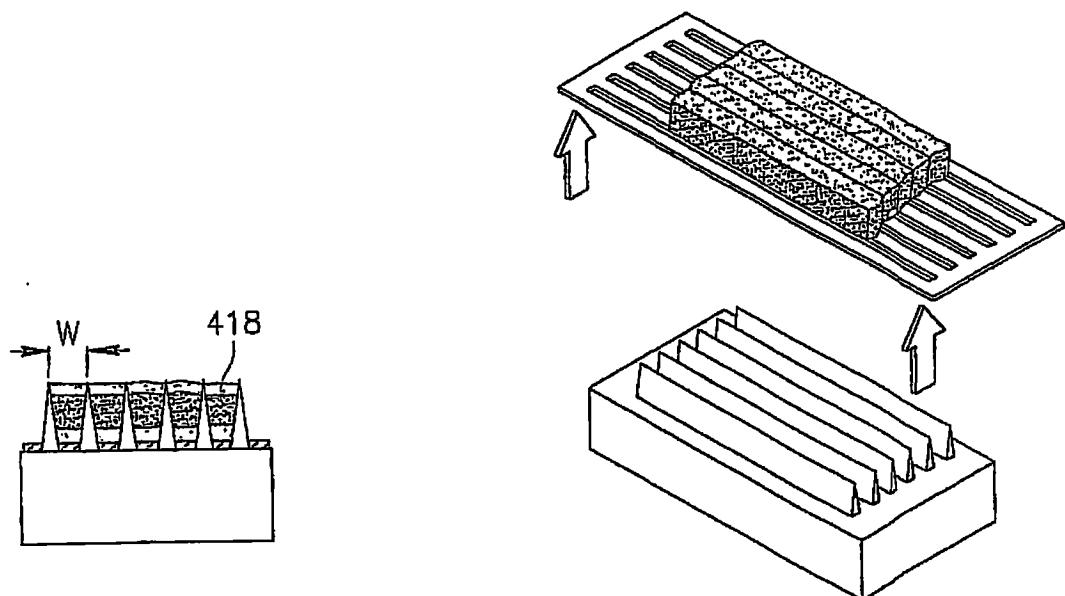


图 4C

图 4D

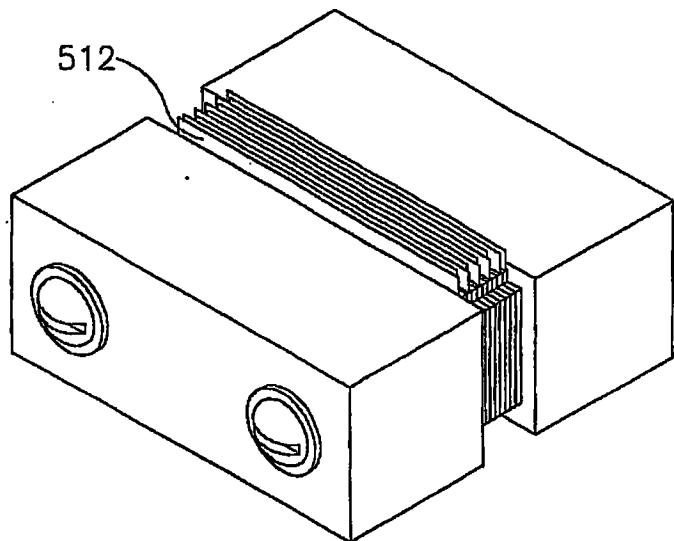


图 5A

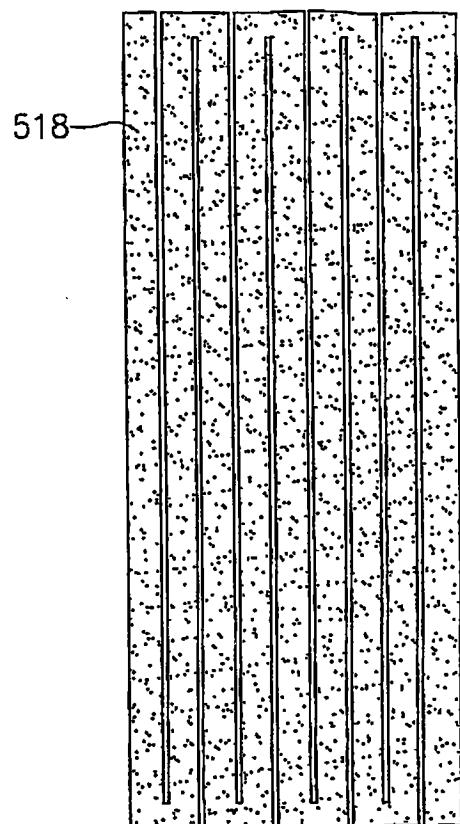
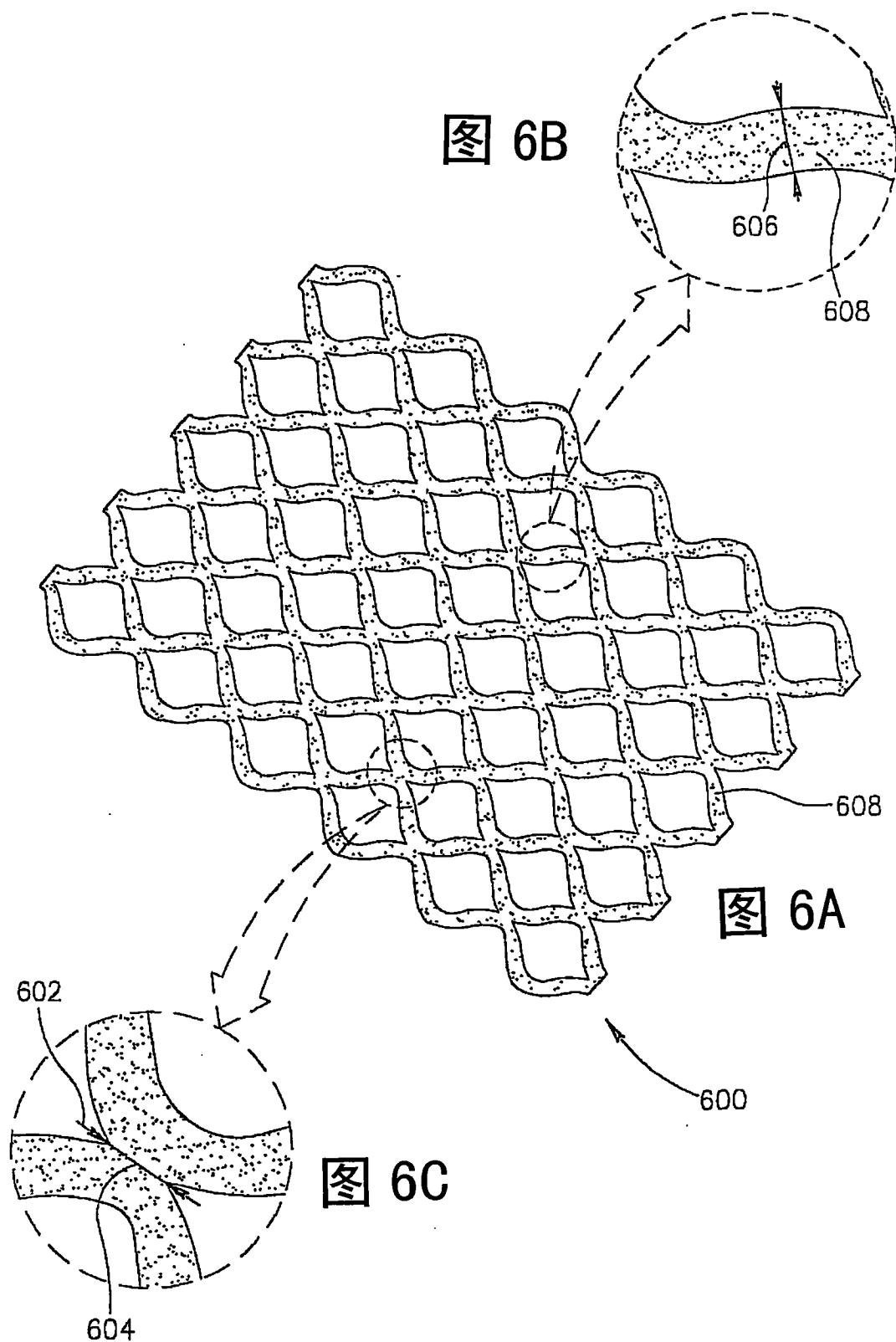


图 5B



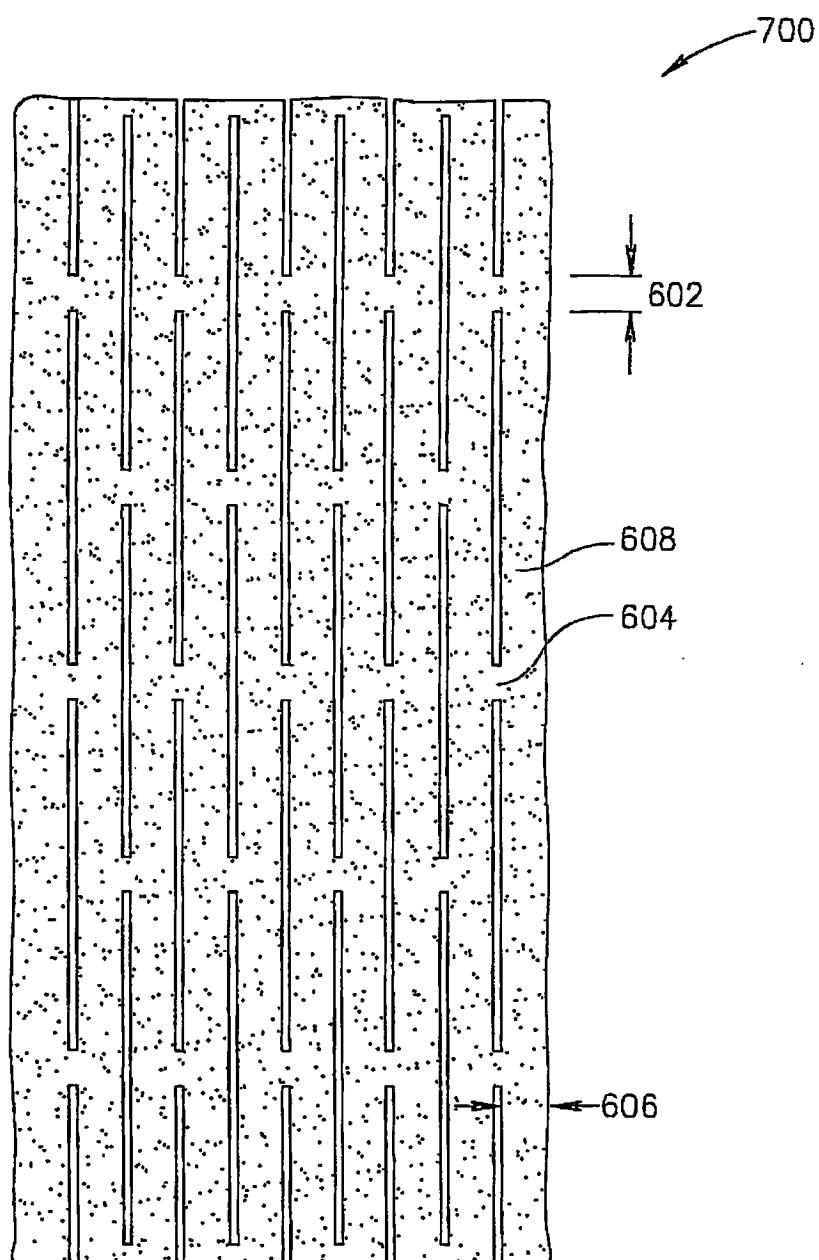


图 7

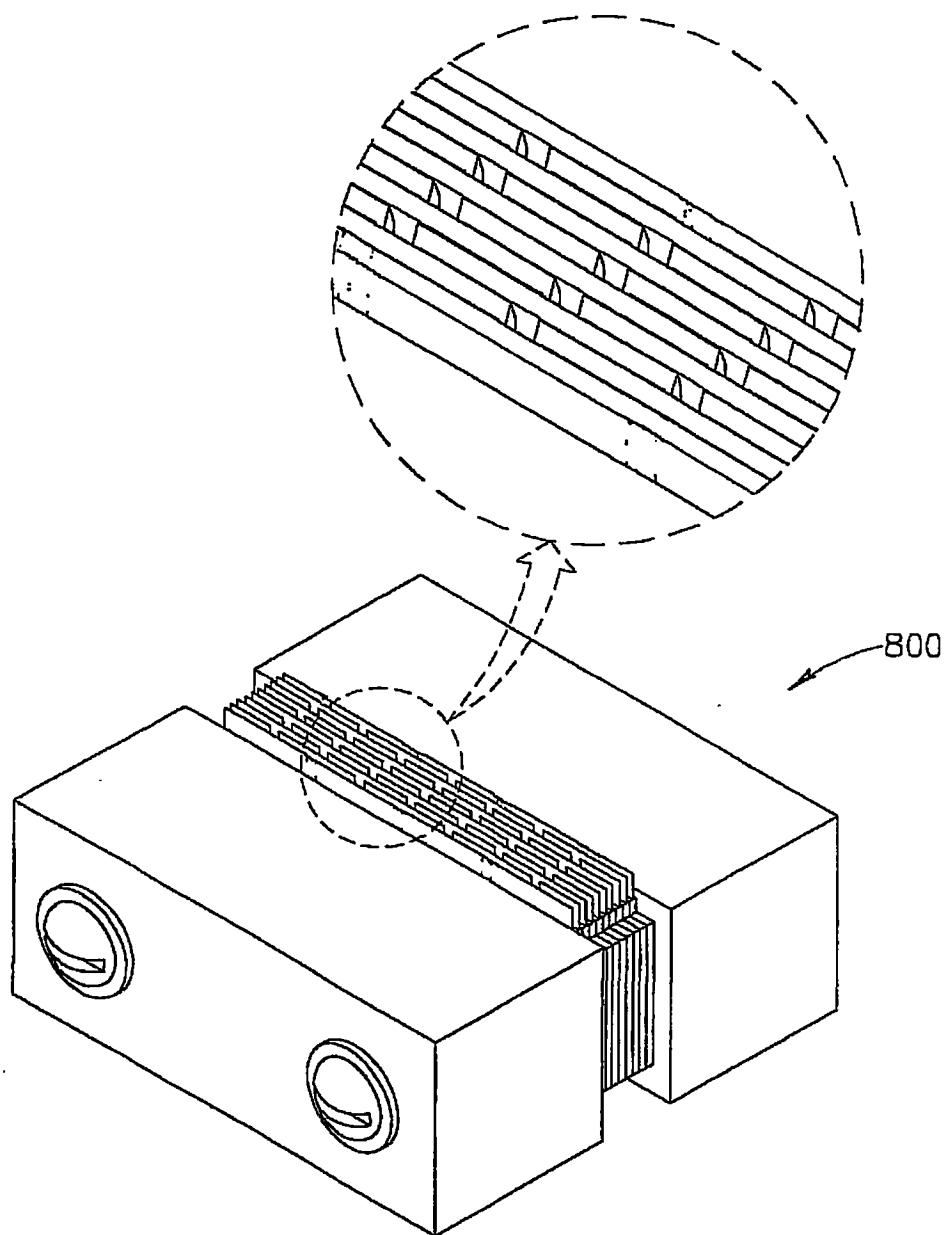


图 8

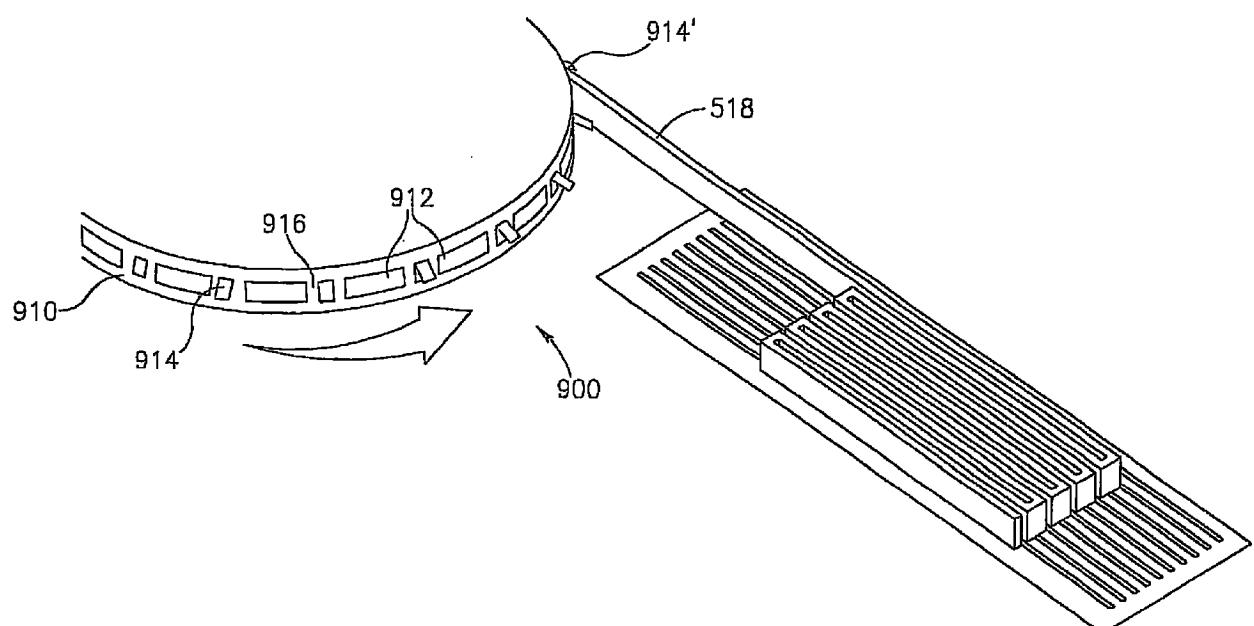


图 9A

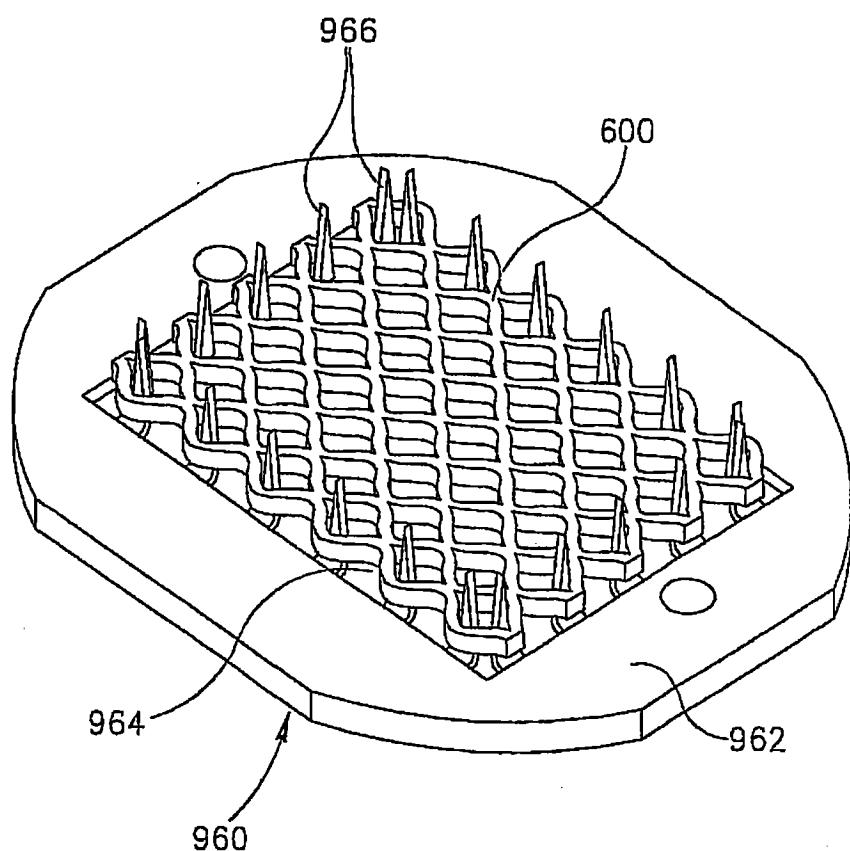


图 9B

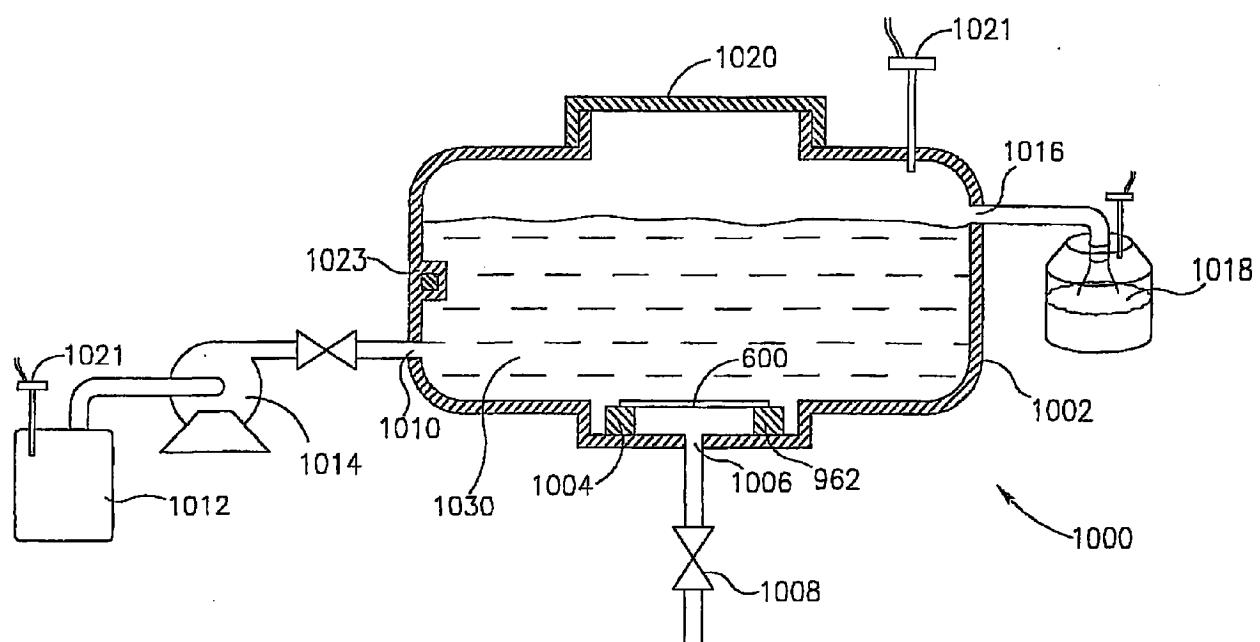


图 10

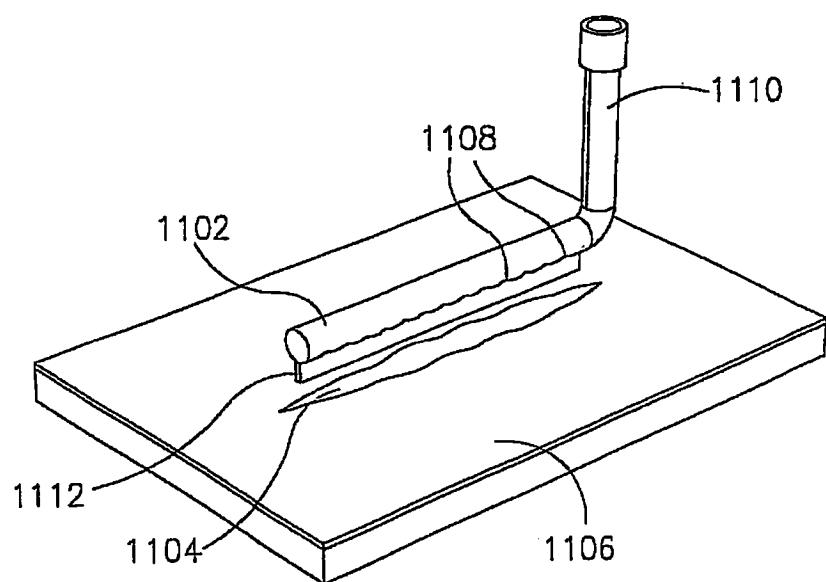


图 11

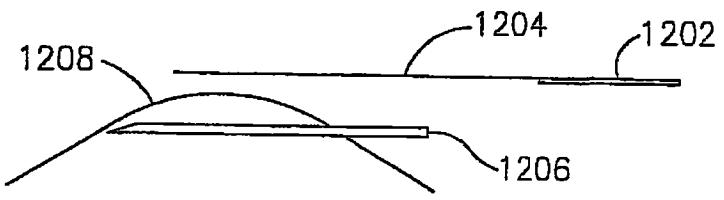


图 12A

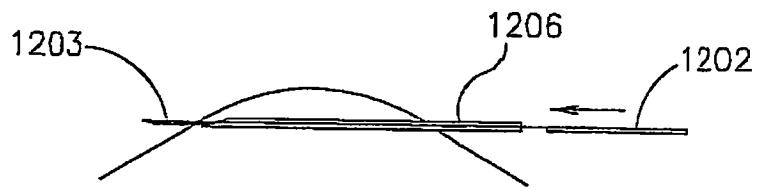


图 12B

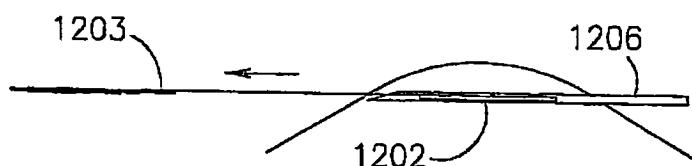


图 12C

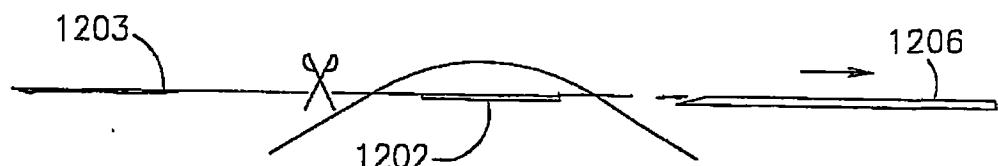


图 12D

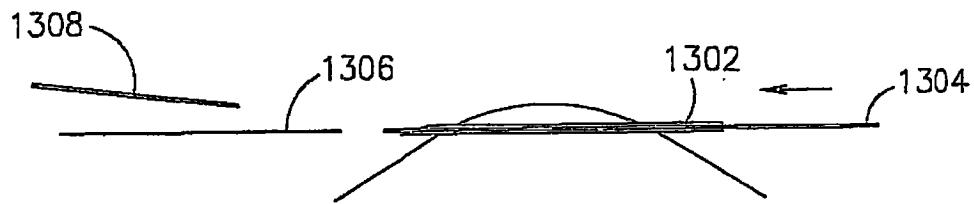


图 13A

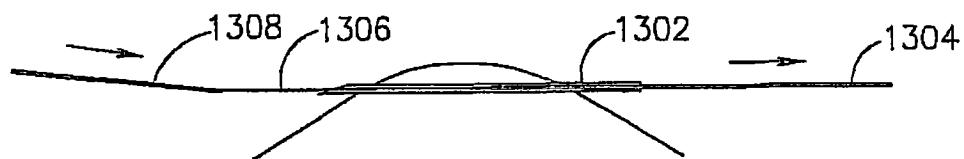


图 13B

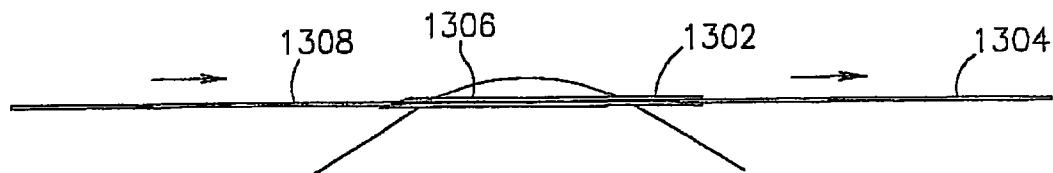


图 13C

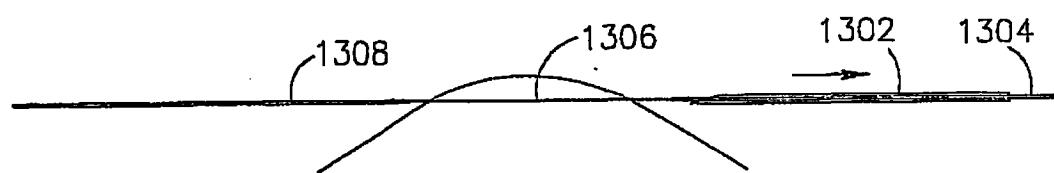


图 13D

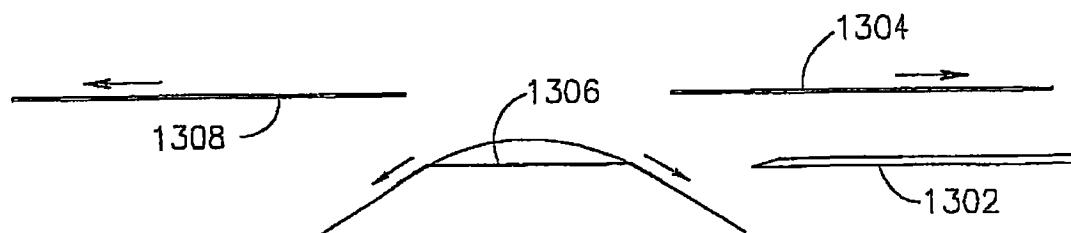


图 13E

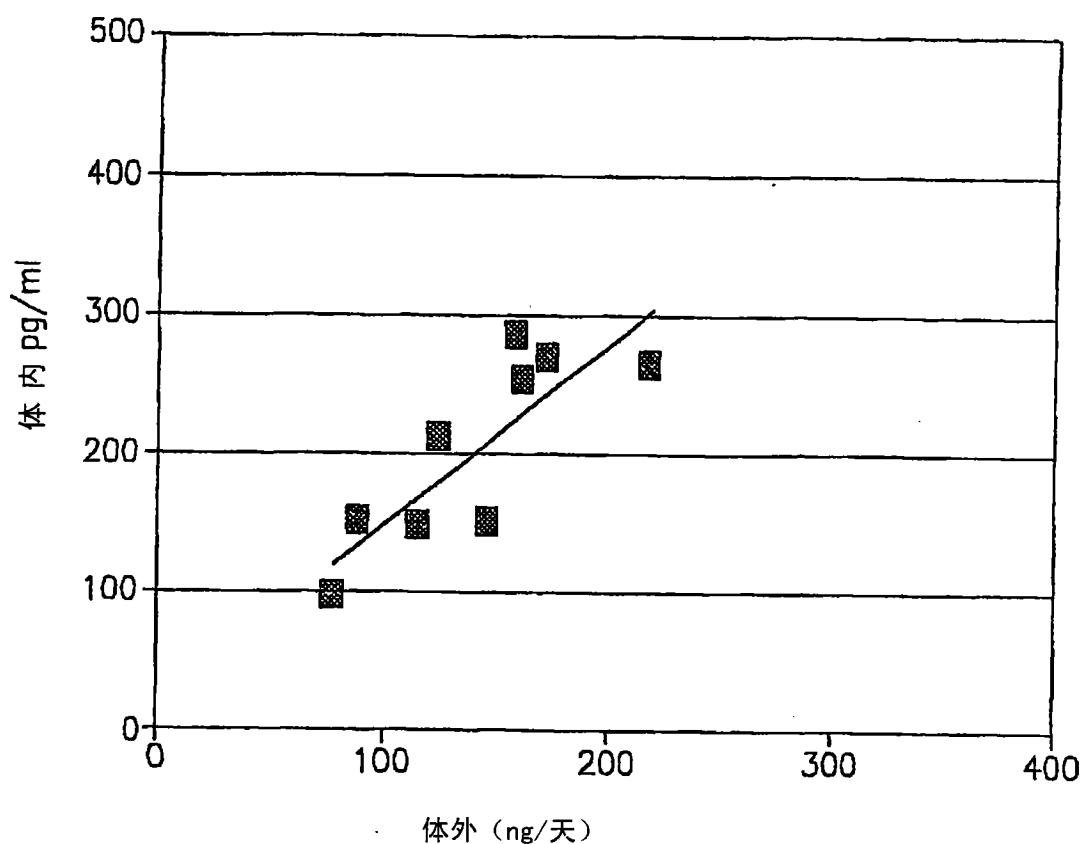


图14A

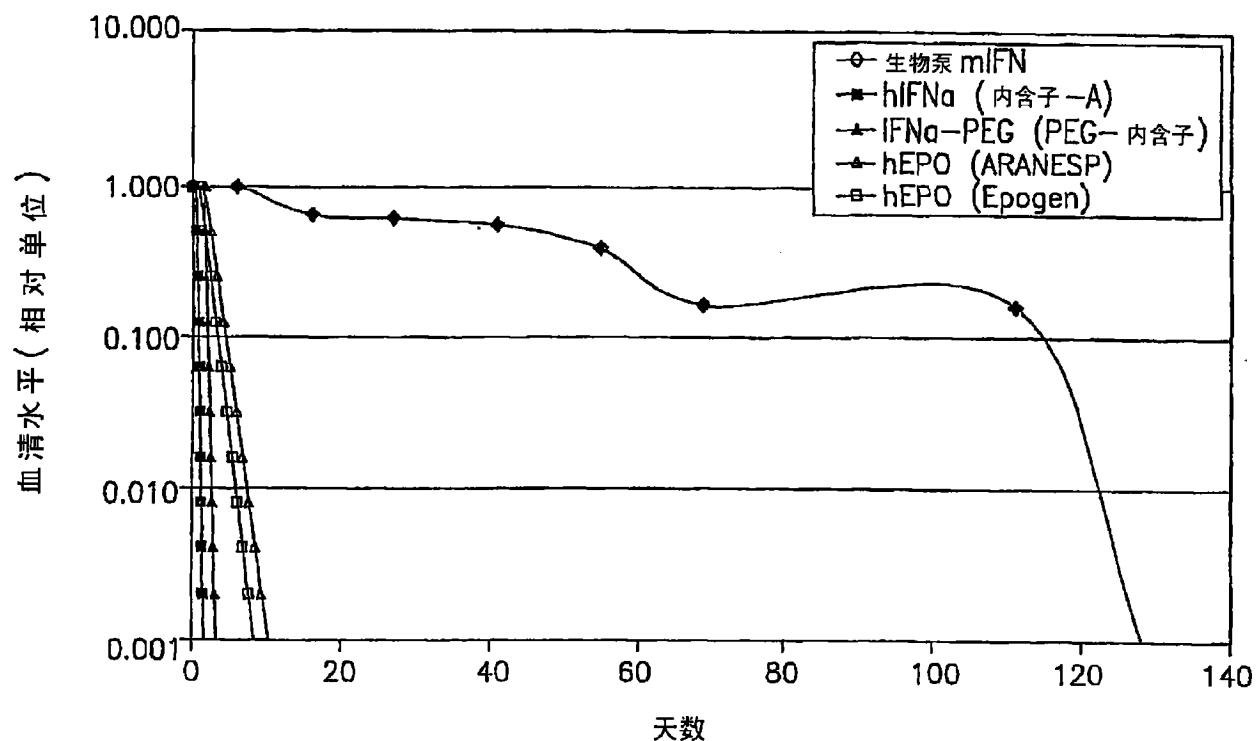


图 14B

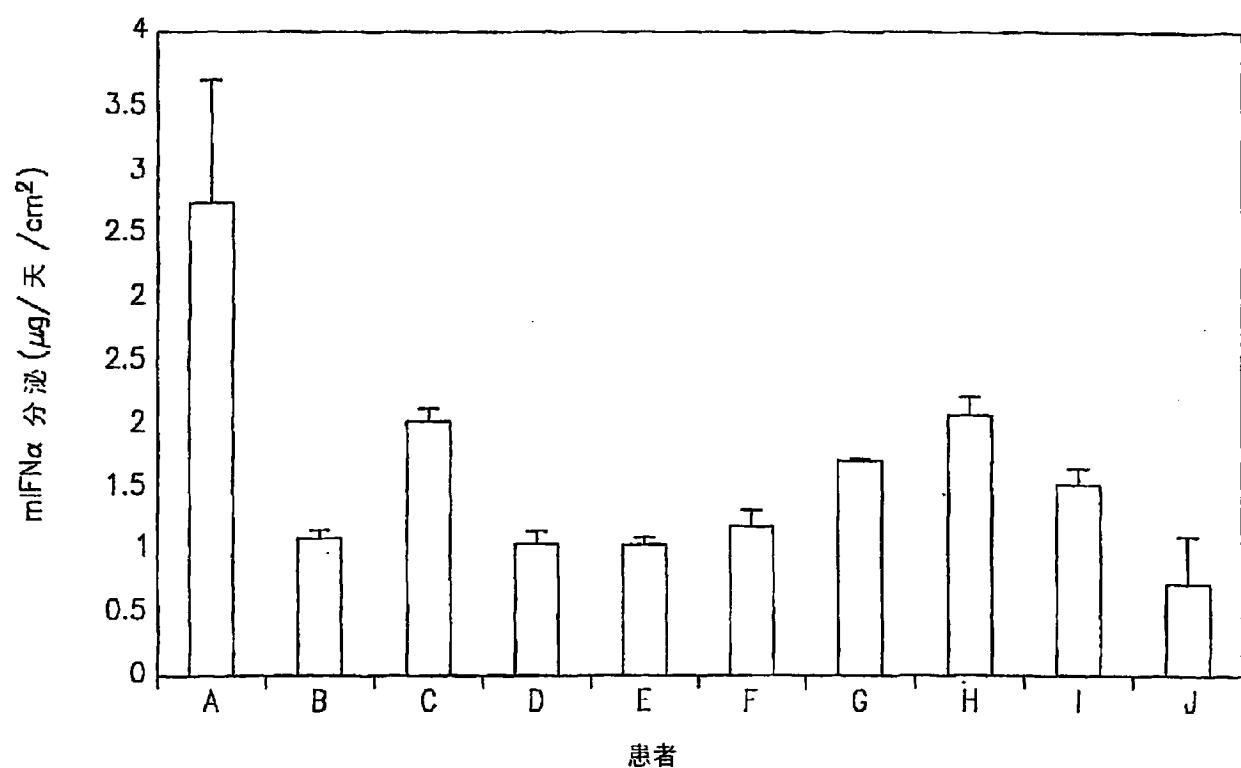


图 15

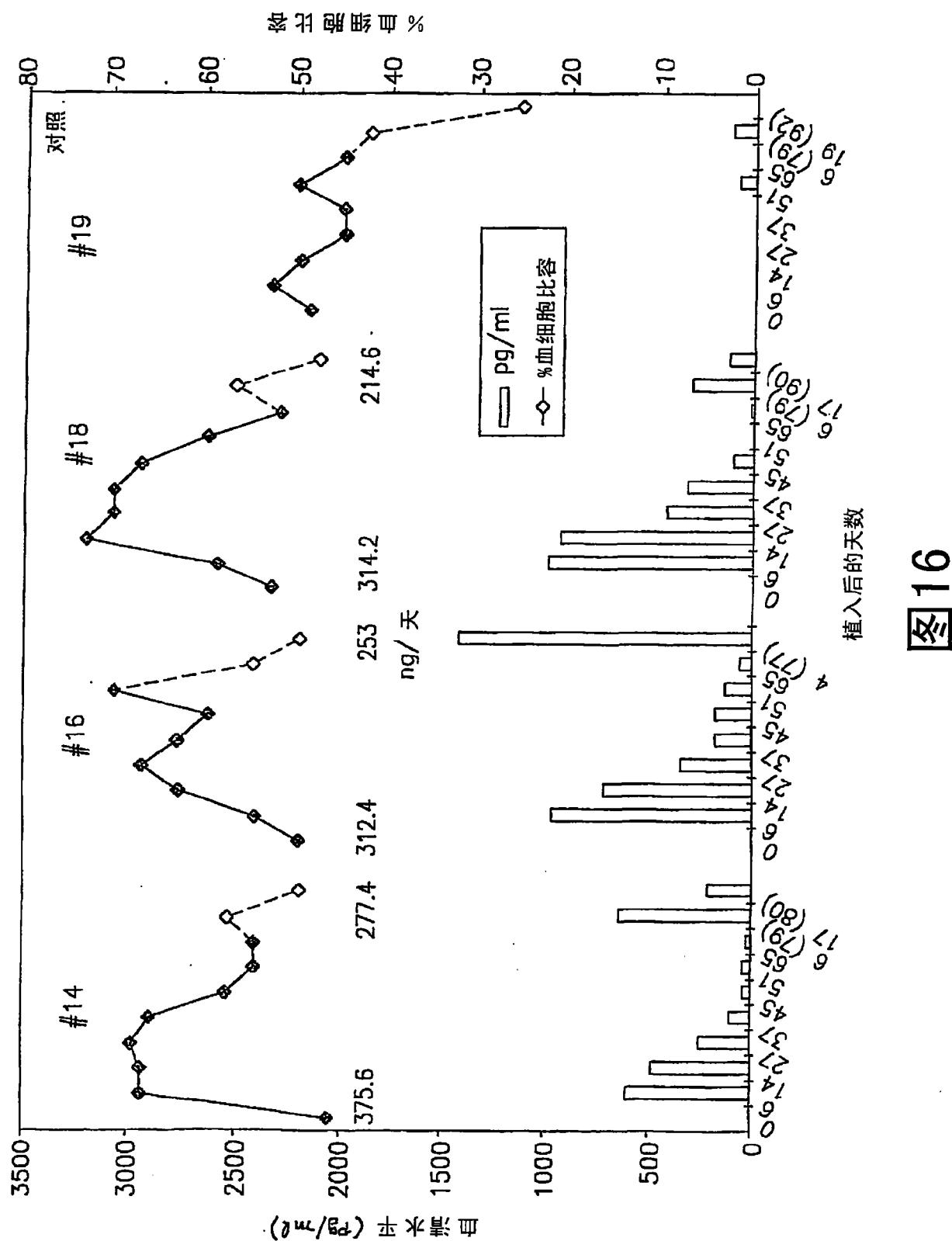


图 16

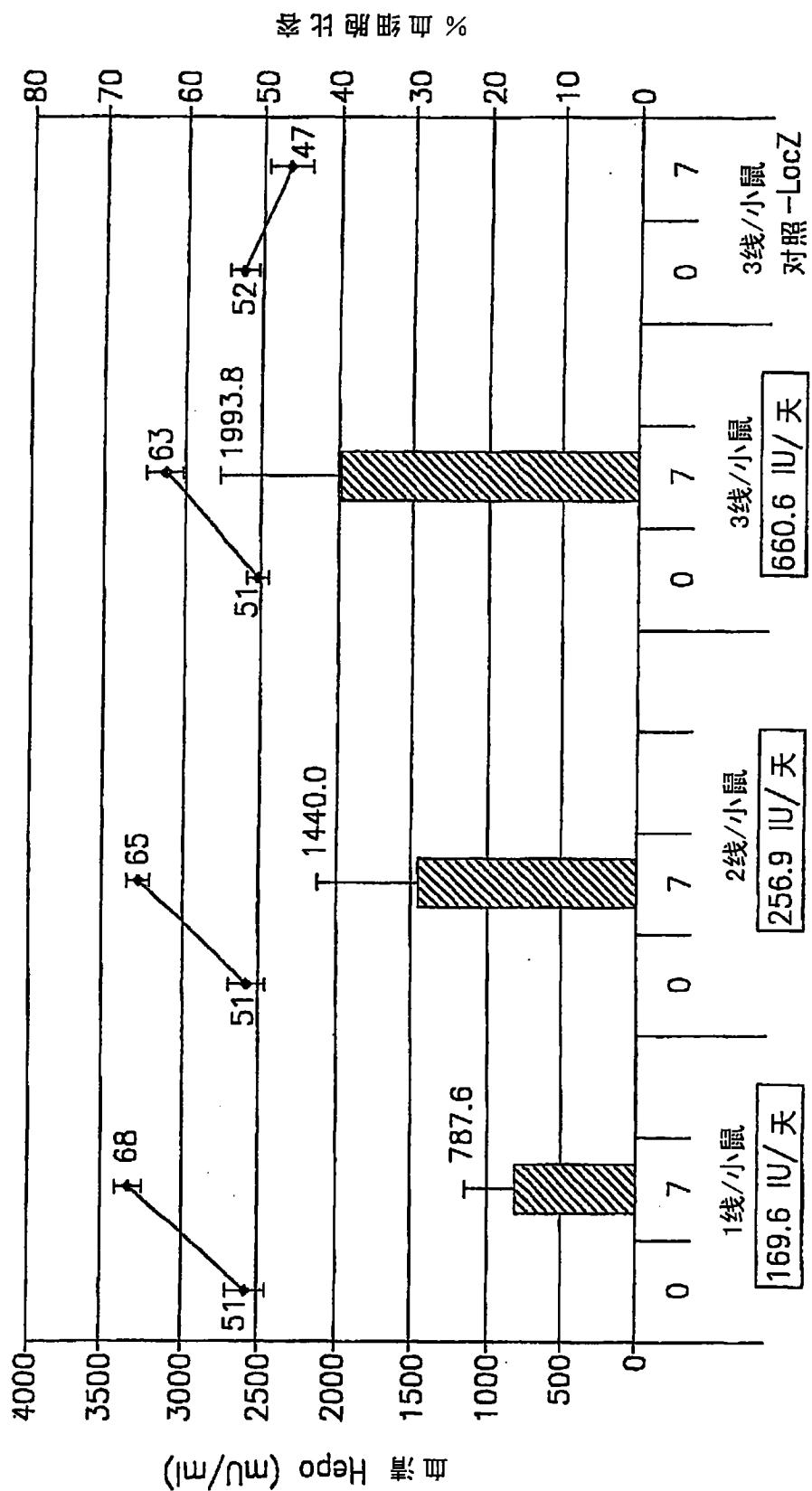


图 17

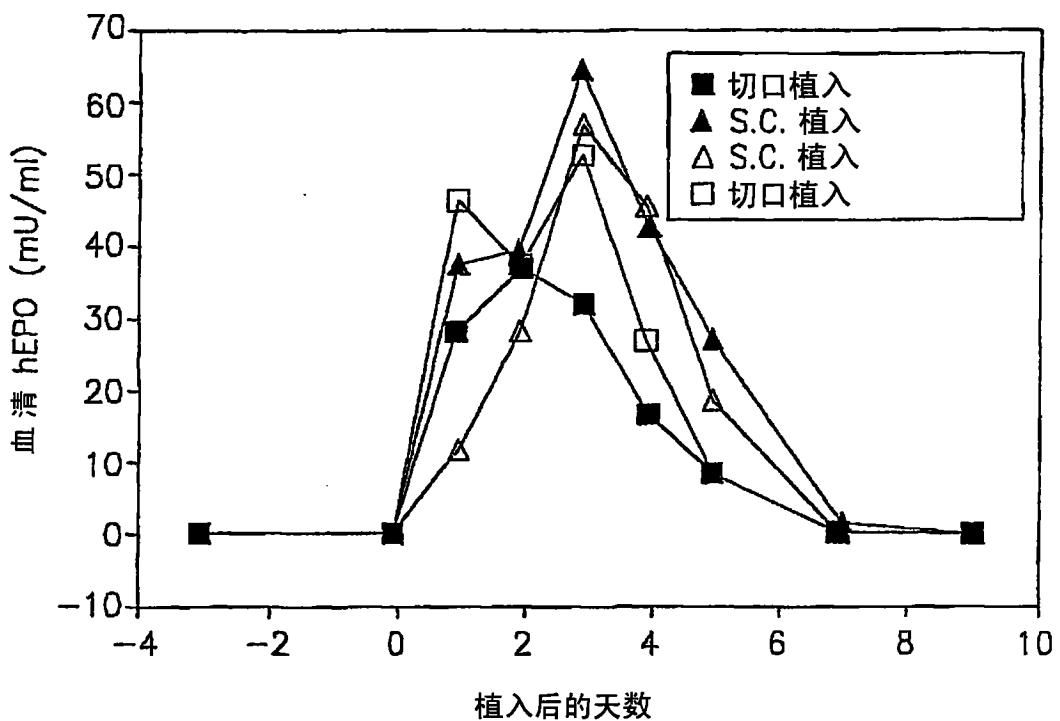


图 18A

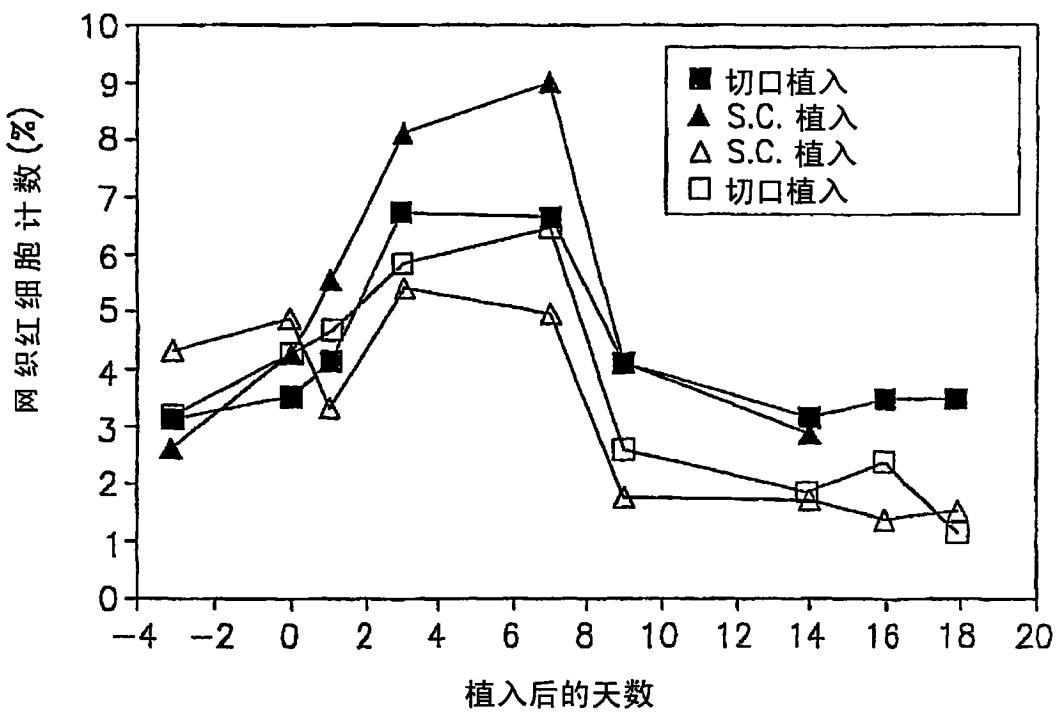


图 18B

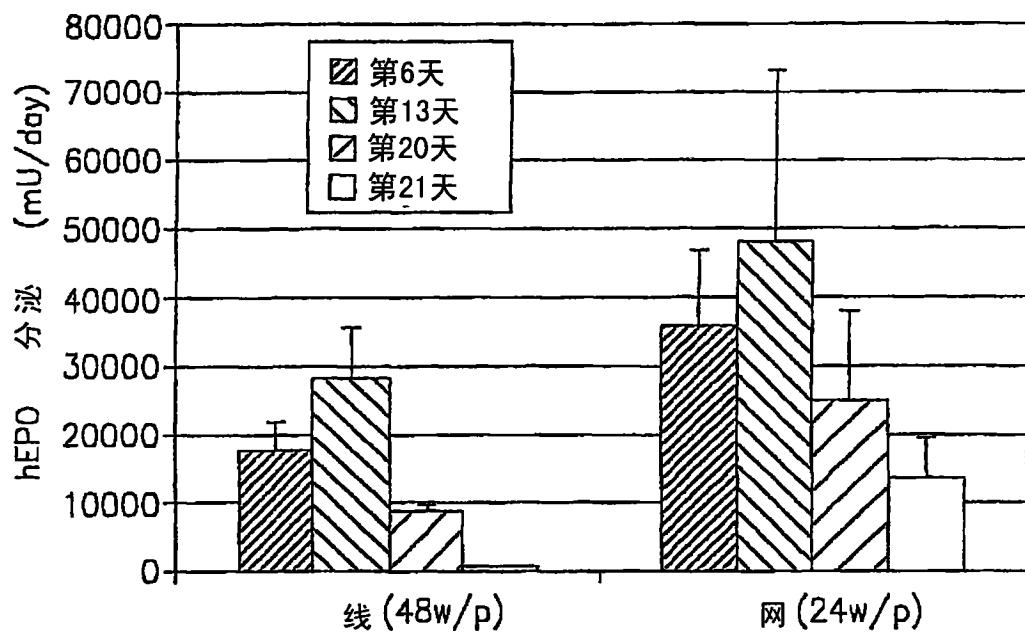


图 19A

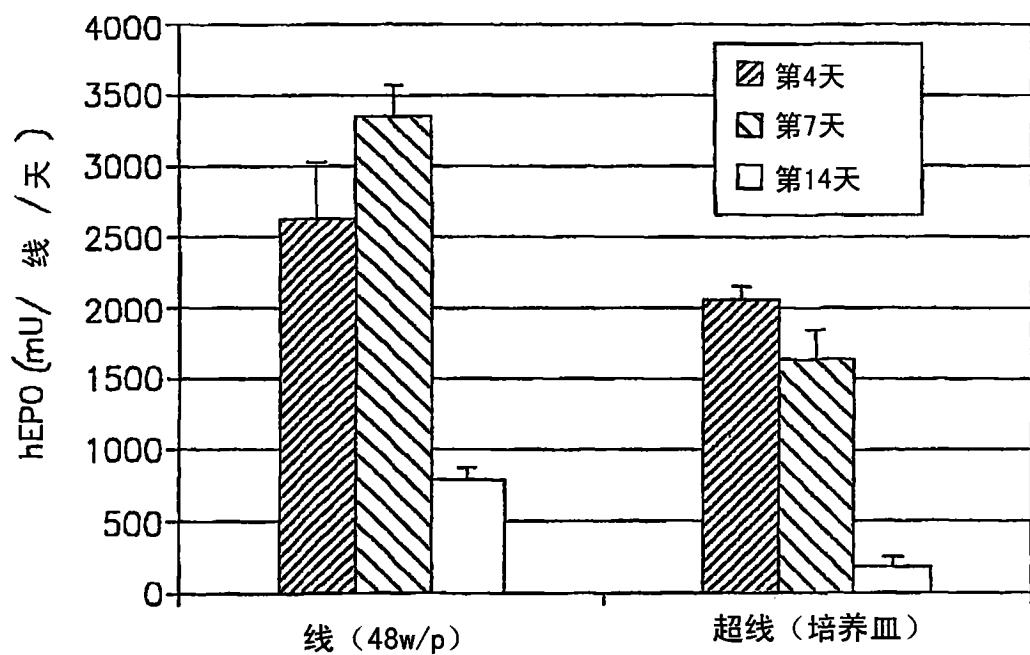


图 19B

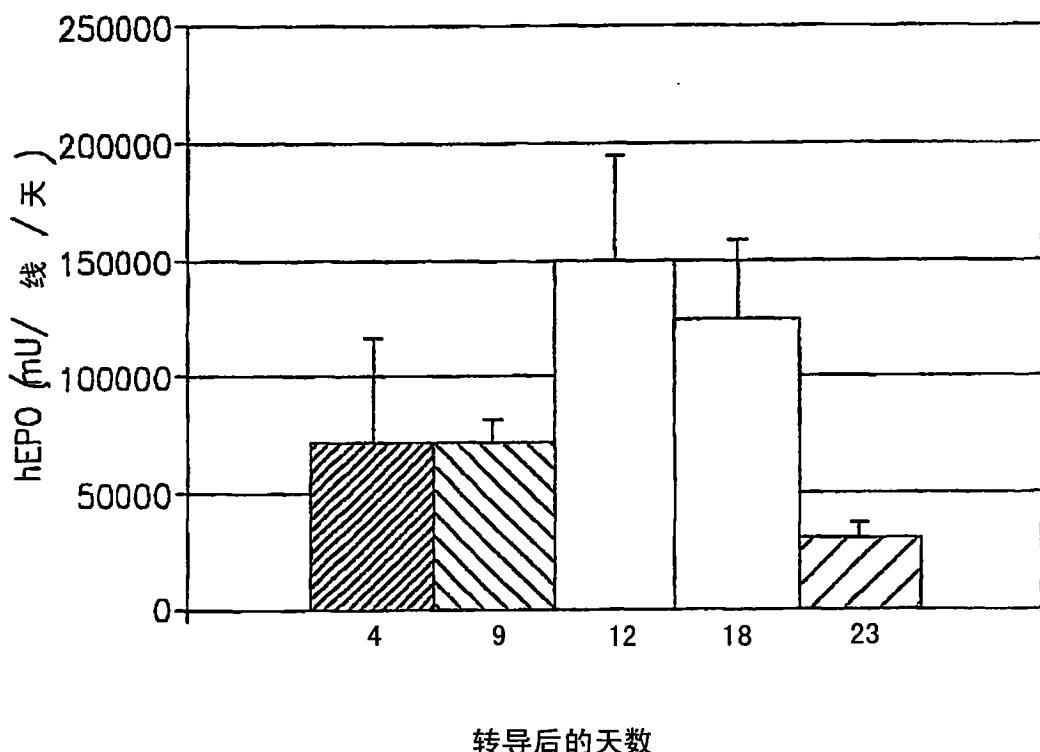


图 19C

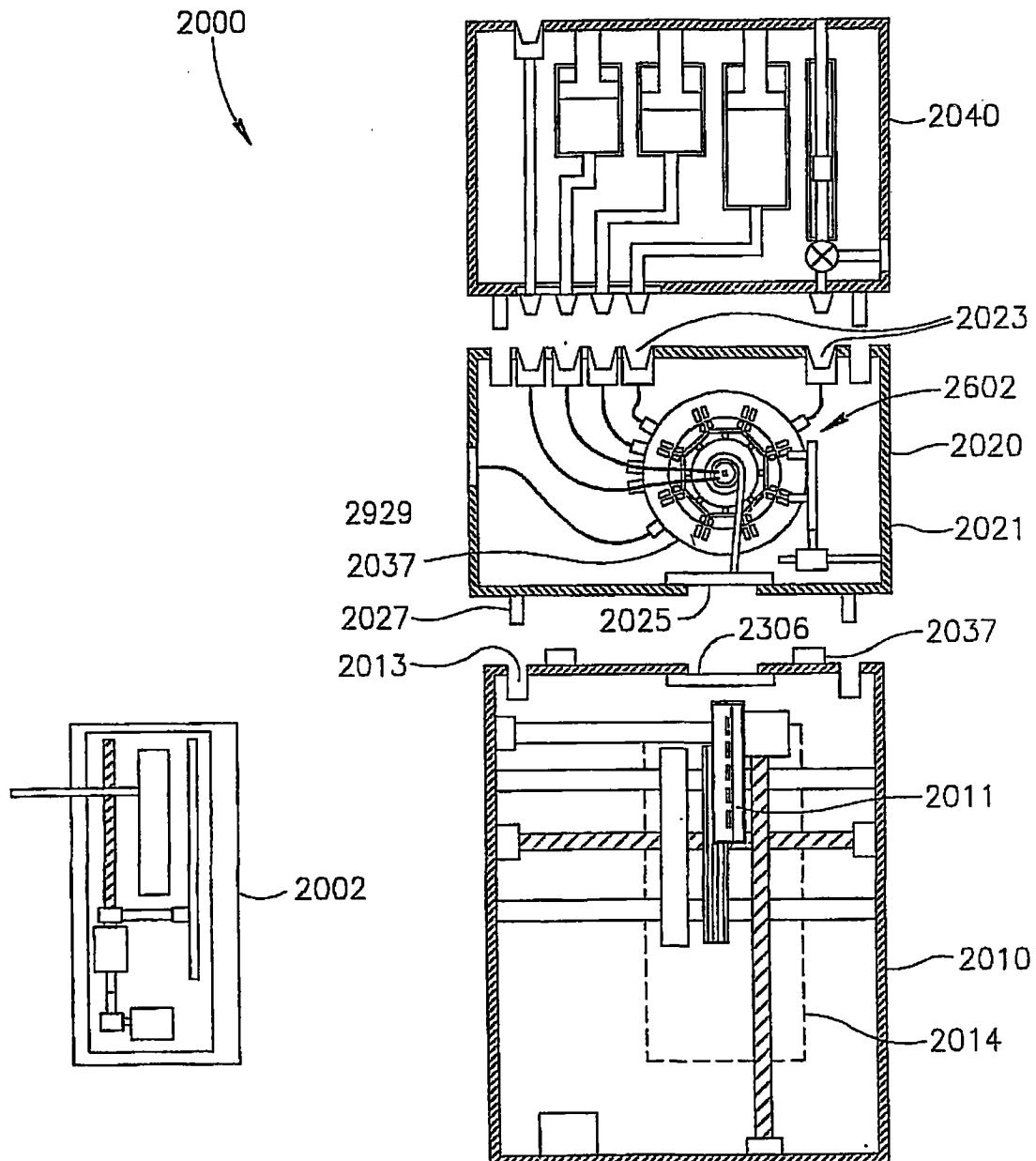


图 20

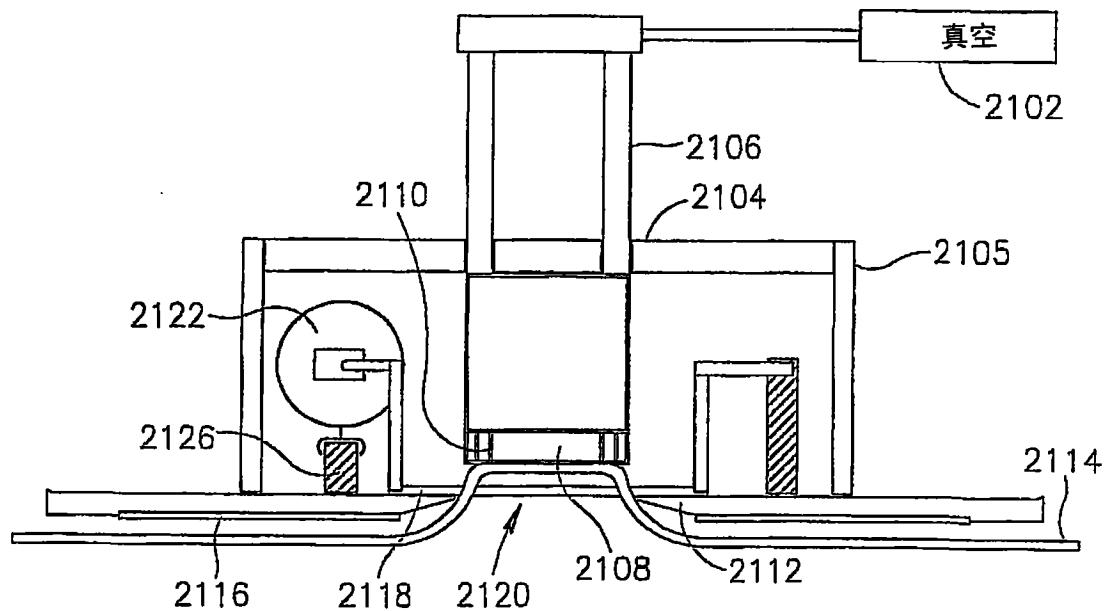


图 21

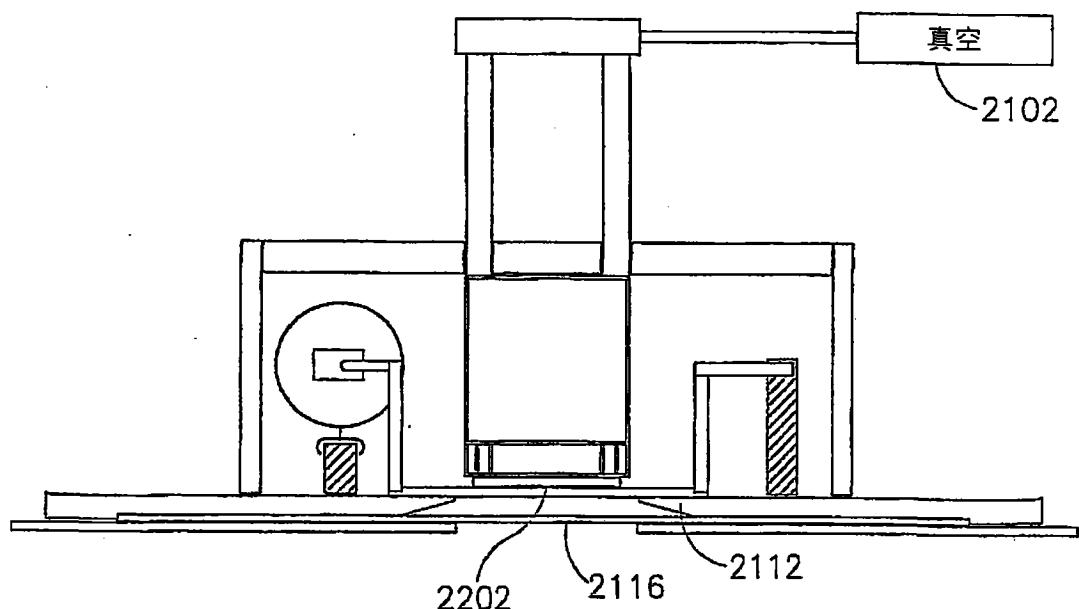


图 22

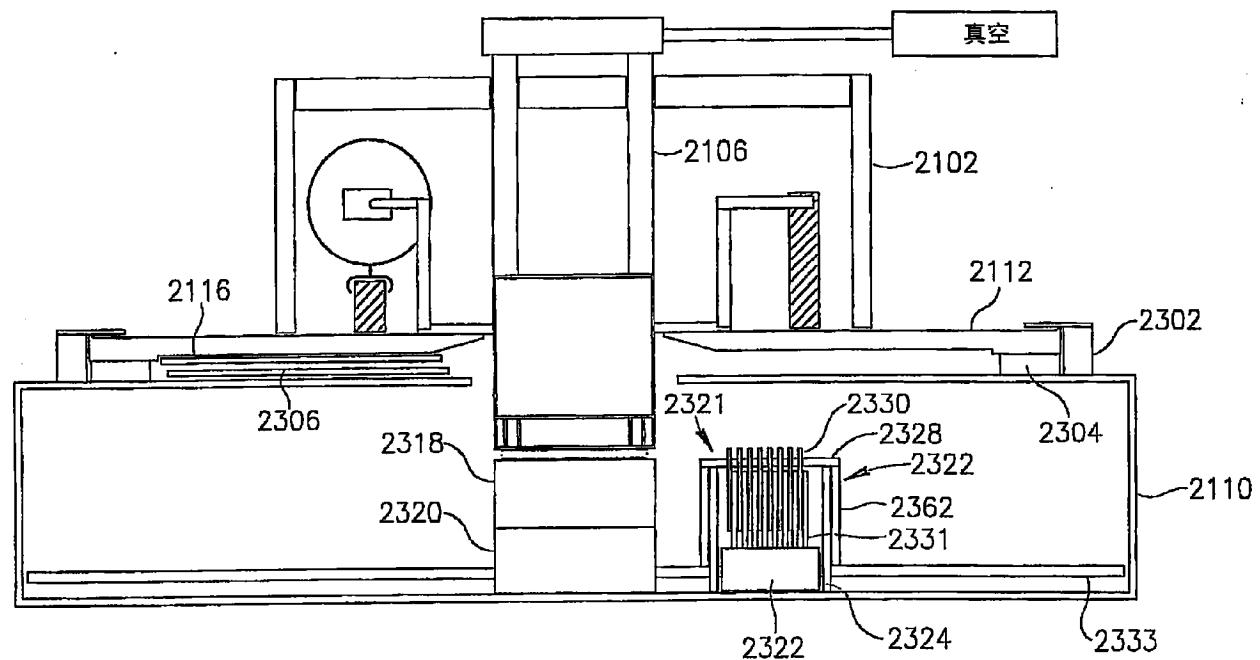


图 23

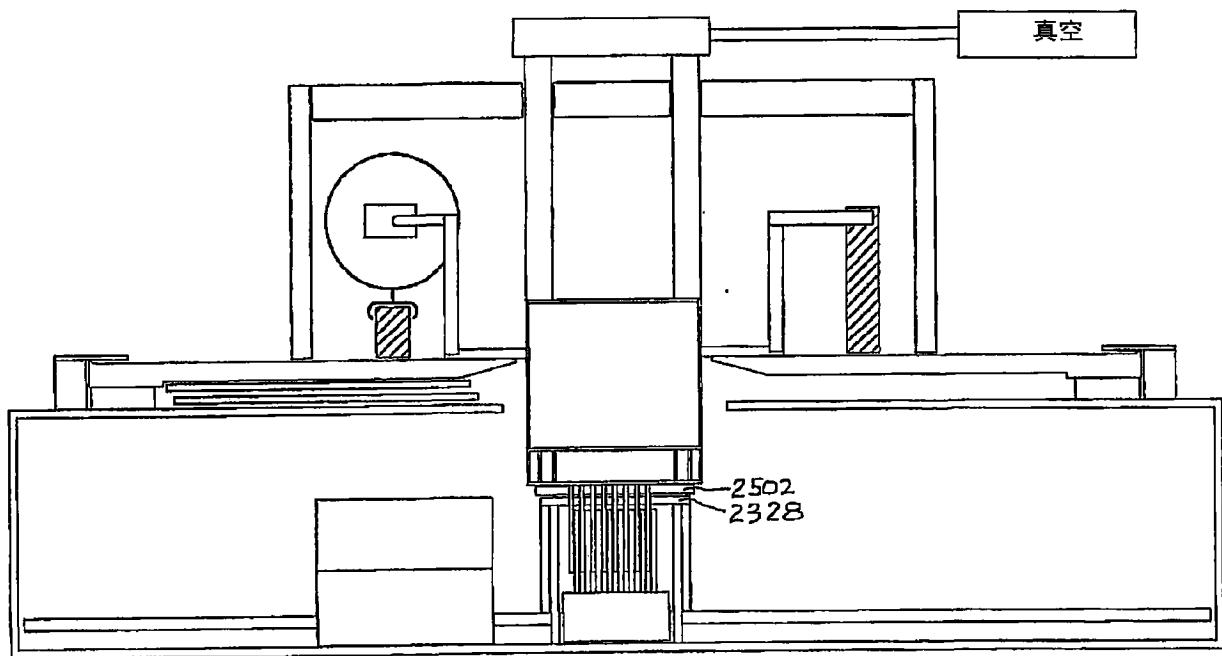


图 24

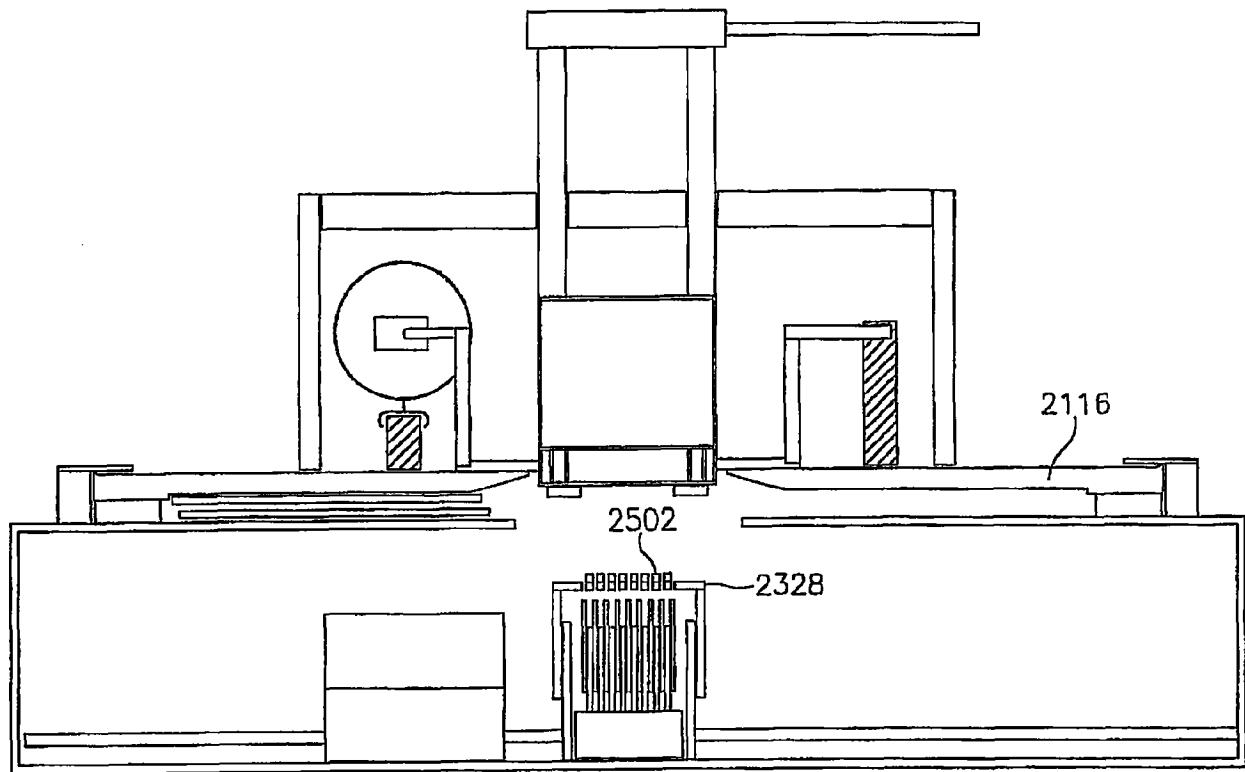


图 25

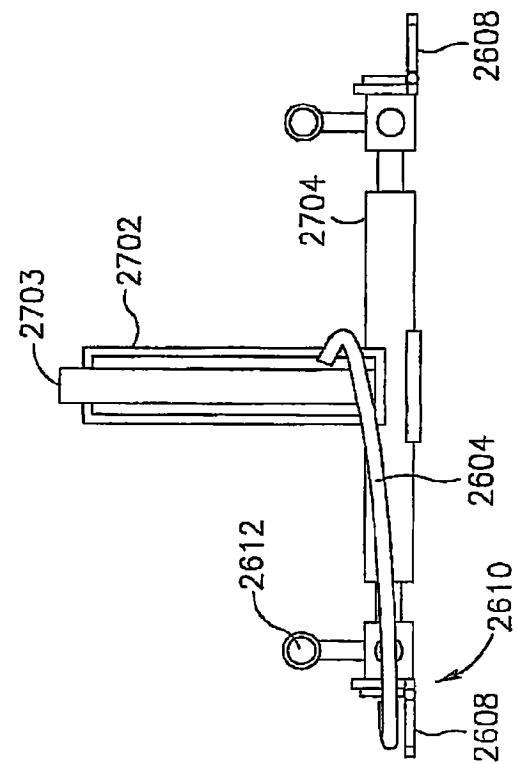


图 27

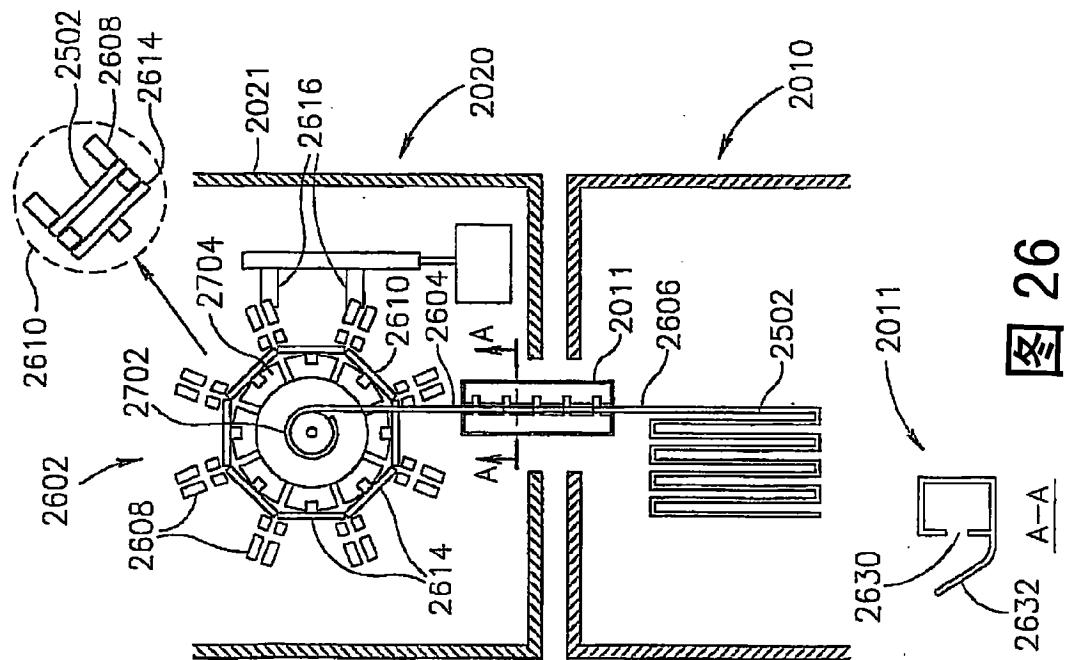


图 26

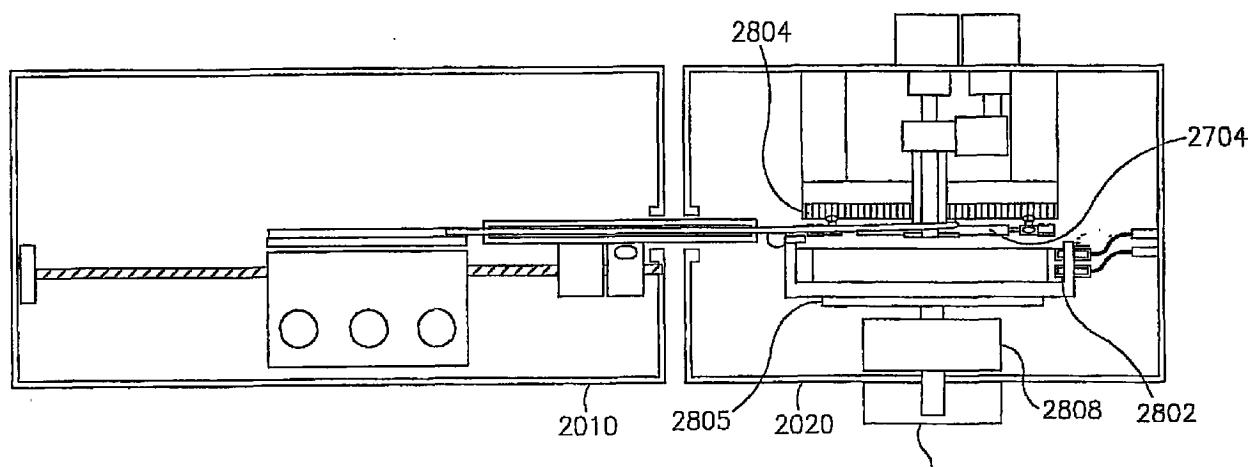


图 28A

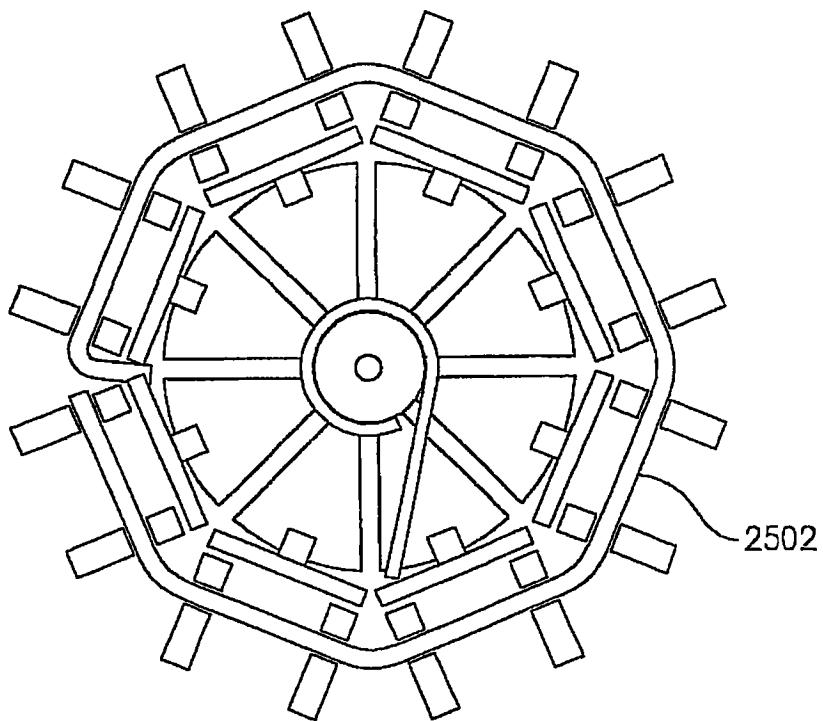


图 28B

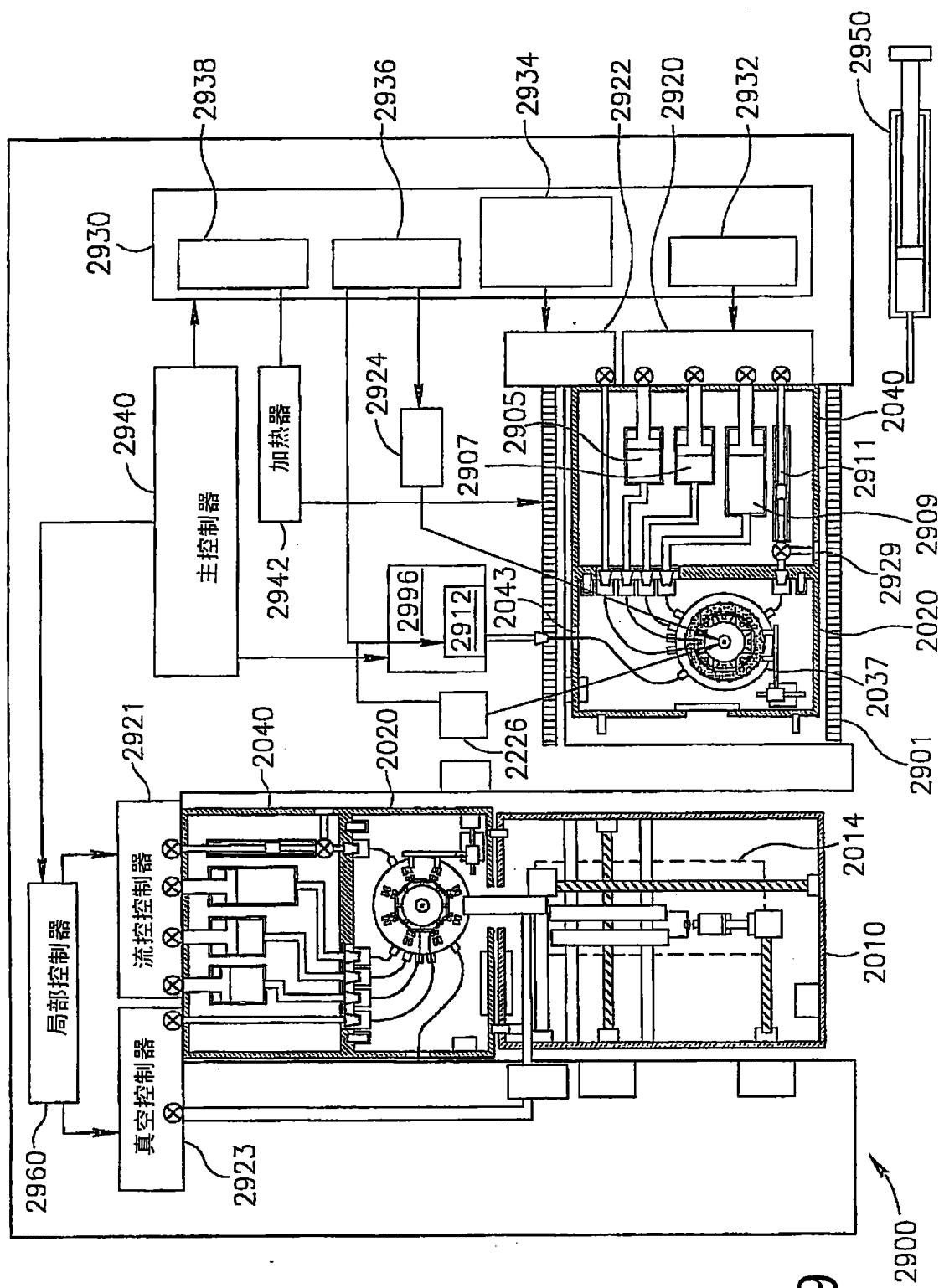
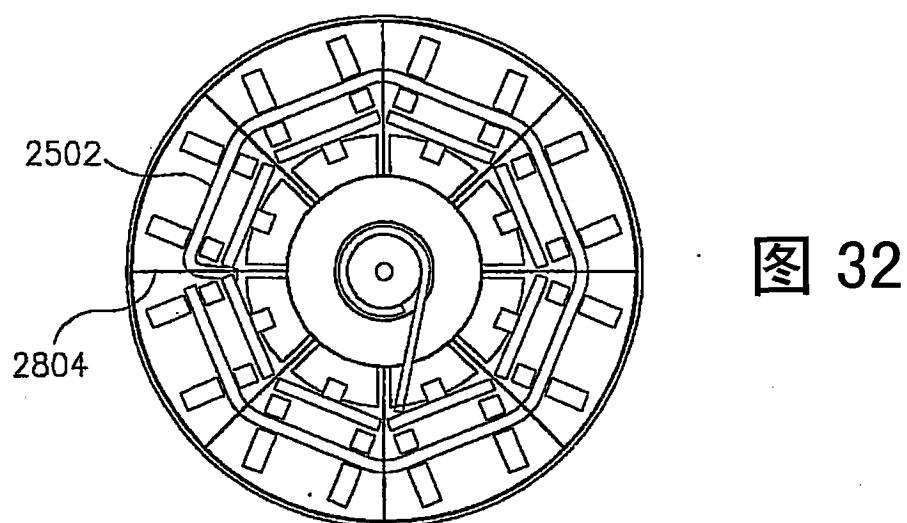
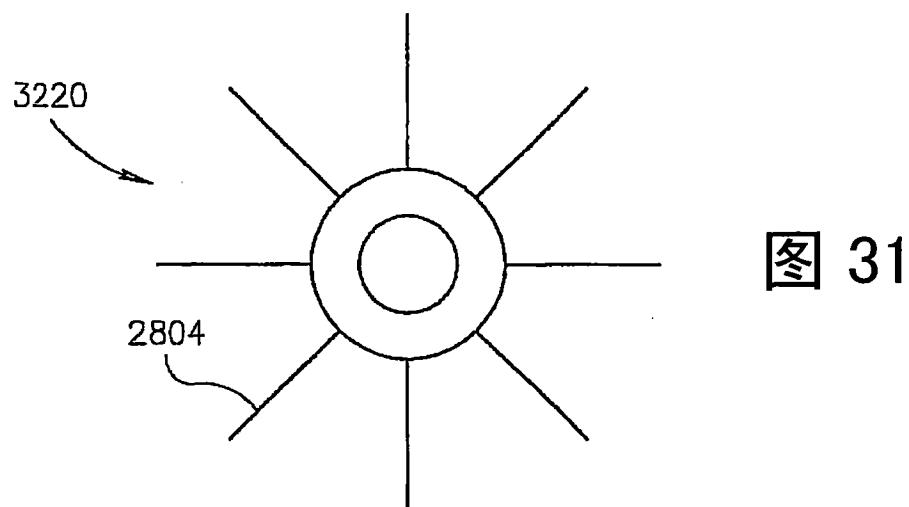
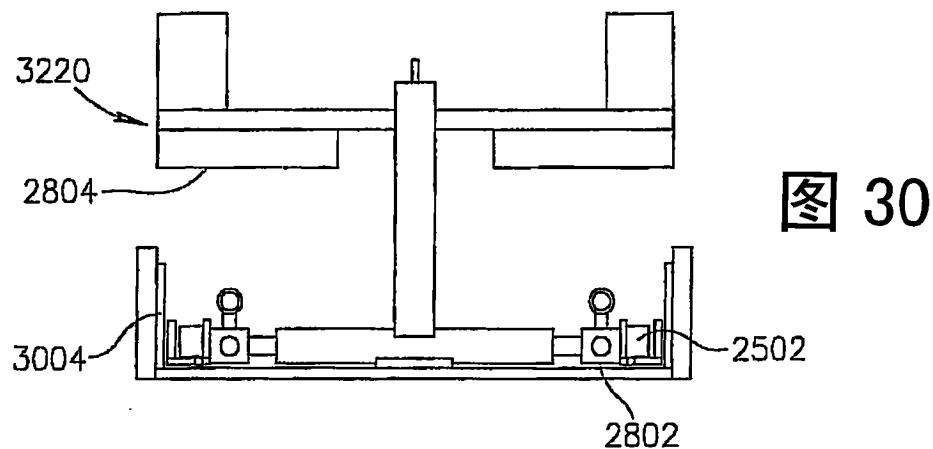


图 29  
冬



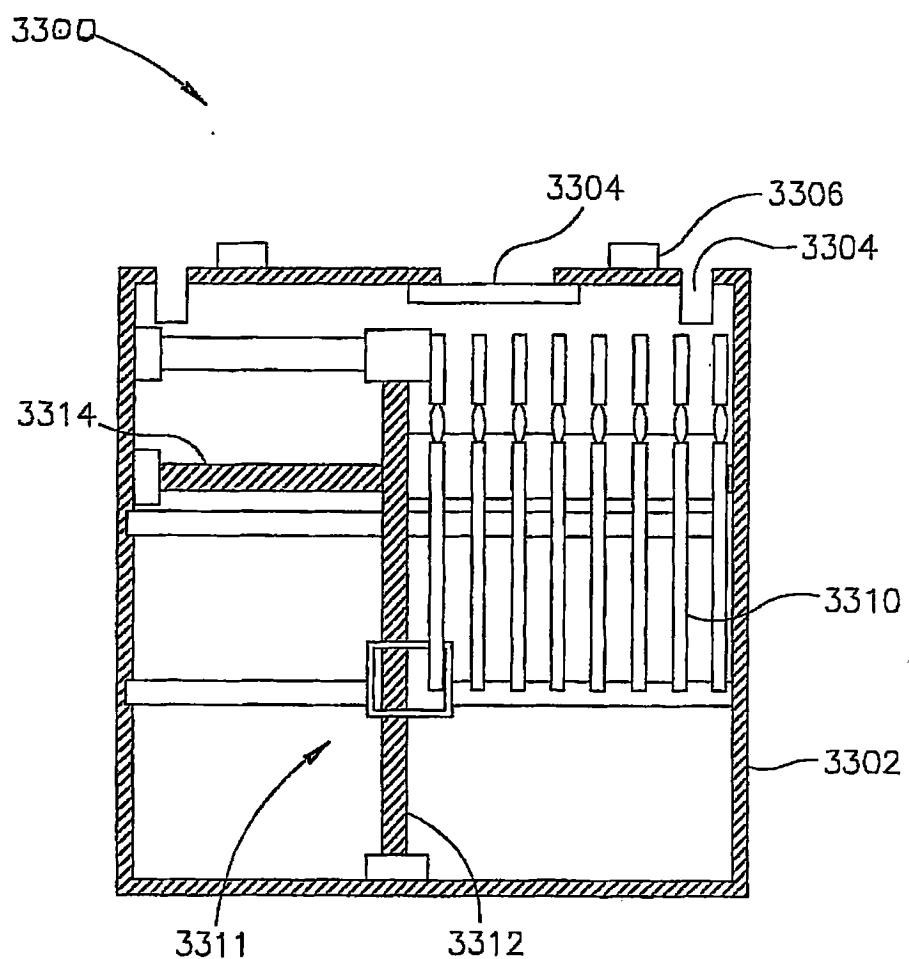
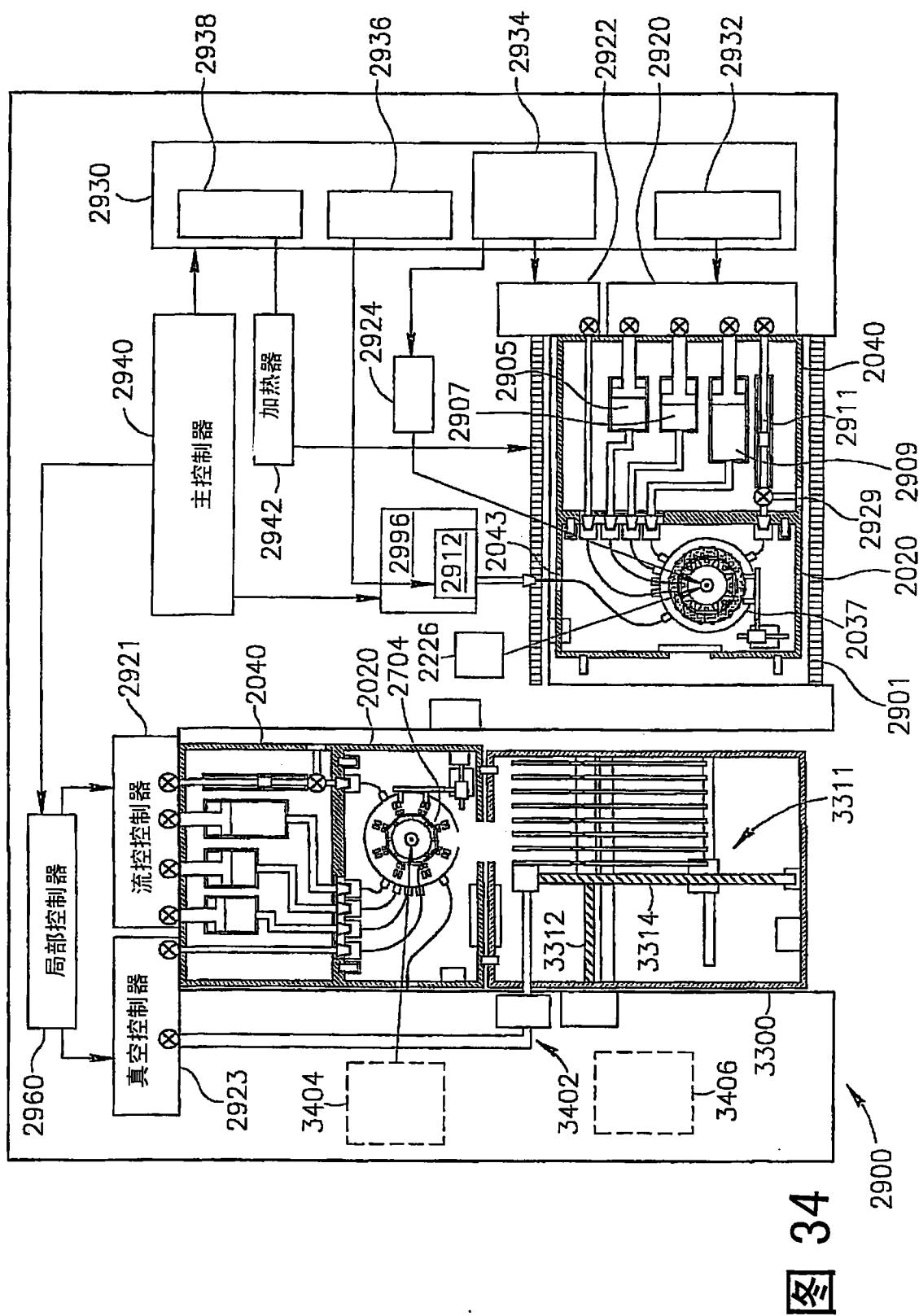


图 33



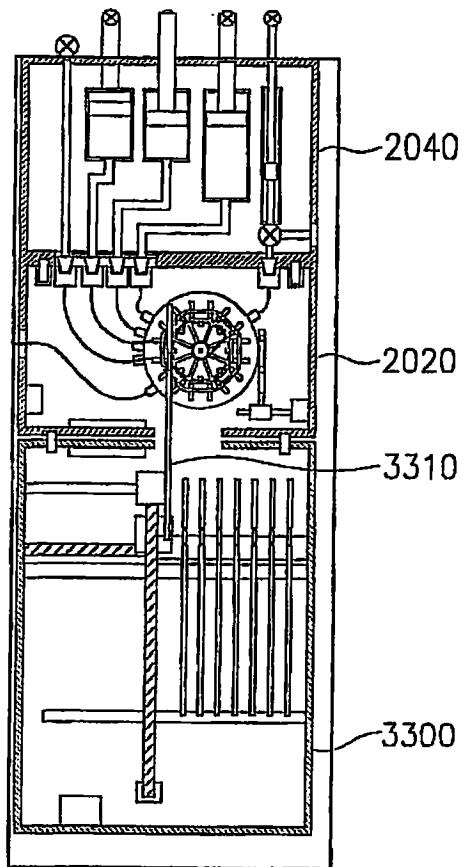


图 35

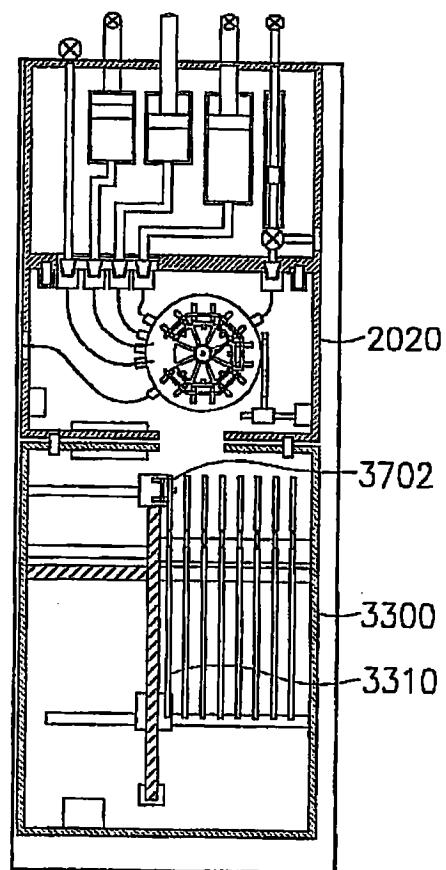


图 36

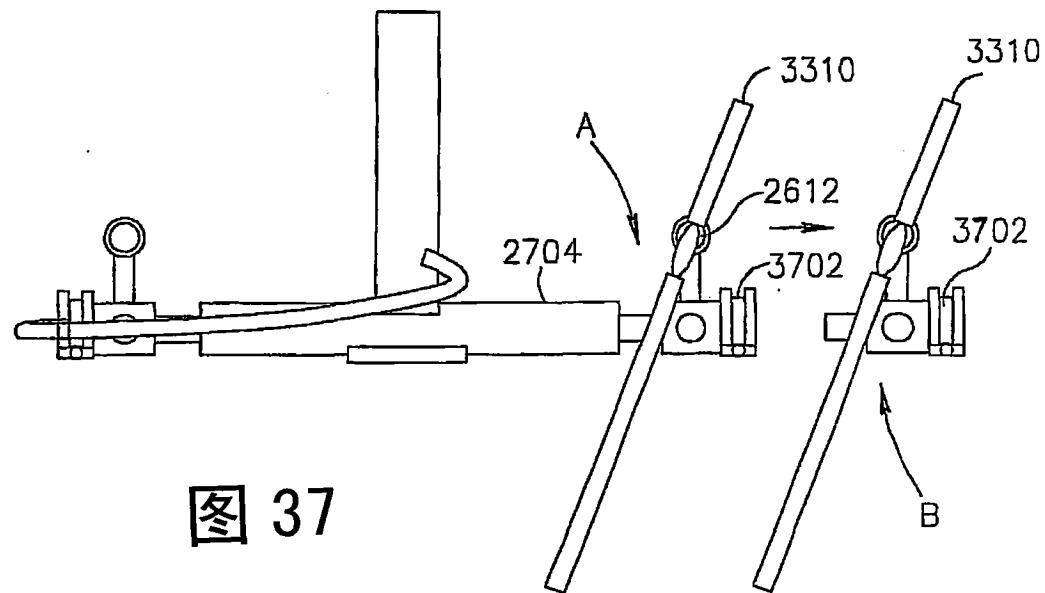


图 37

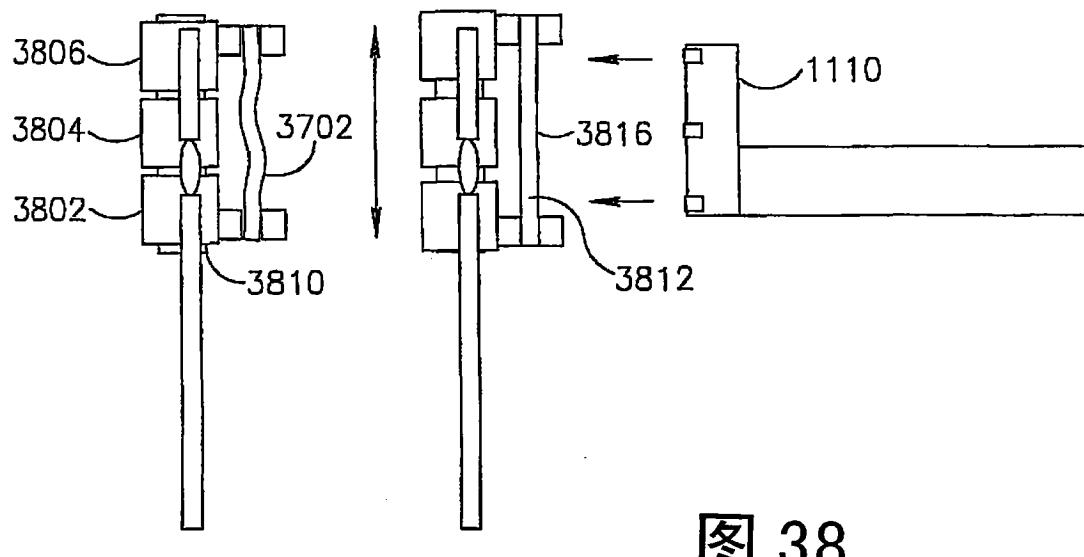


图 38