201546268

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201546268 A

(43)公開日： 中華民國 104 (2015) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：104112665 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 04 月 21 日

(51)Int. Cl.： *C12M3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2014/04/28 歐洲專利局 14166238.7

(71)申請人：維瓦生物細胞公司 (義大利) VIVABIOCELL SPA (IT)
義大利

(72)發明人：卡塔路斯 賈科莫 CATTARUZZI, GIACOMO (IT) ；莫瑞堤 馬西莫 MORETTI, MASSIMO (IT) ；斯菲力構 安東尼歐 SFILIGOJ, ANTONIO (IT) ；柯西奧 法蘭瑟斯科 CURCIO, FRANCESCO (IT)

(74)代理人：賴經臣；宿希成

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：3 共 24 頁

(54)名稱

自動化細胞培養及收獲裝置

AUTOMATED CELL CULTURING AND HARVESTING DEVICE

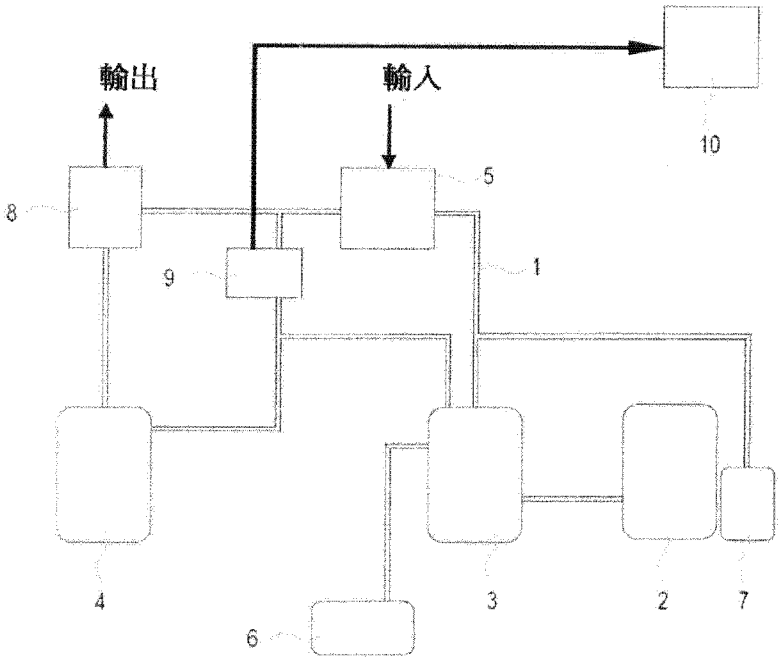
(57)摘要

本發明揭示一種自動化細胞培養裝置，其擴增、脫離及製備準備於活體內植入之細胞。該裝置係由多層細胞培養室、細胞製備室、及自動驅動細胞培養基循環、更換及再填充的關鍵參數控制單元所構成。根據本發明之裝置的特徵在於所有與細胞及培養基接觸之組件構成一完全可棄式「匣筒」以避免交叉污染及改良安全性。該裝置尤其適用於擴增及製備供骨關節炎(OA)治療用之間質幹細胞，以及用於哺乳動物中之其他以細胞為主的治療。

An automated cell culturing device, which expands, detaches and prepares cells, ready to be implanted in vivo is disclosed. The device is composed by a multi-layered cell culture chamber, a cell preparation chamber, and critical parameters control units which automatically drive the cell culture medium circulation, change and refill. The device according to the invention is characterized in that all the components contacting cells and culture medium constitute a totally disposable “cartridge” in order to avoid cross-contamination and improve safety. The device is particularly useful for expanding and preparing mesenchymal stem cells for osteoarthritis (OA) therapy, and for other cell based therapies in mammals.

TW 201546268 A

圖 1



1・・・管件系統

2・・・外部新鮮細胞培養基儲槽

3・・・內部緩衝細胞培養基儲槽

4・・・廢棄物貯槽

5・・・細胞培養室

6・・・氣體混合物瓶

7・・・外部細胞脫離劑儲槽

8・・・細胞製備室

9・・・參數擷取系統

10・・・參數監測系統

201546268

發明摘要

※申請案號：104112665

C12M 3/00 (2006.01)

※申請日：104/04/21 ※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

自動化細胞培養及收獲裝置
AUTOMATED CELL CULTURING AND HARVESTING DEVICE

【中文】

本發明揭示一種自動化細胞培養裝置，其擴增、脫離及製備準備於活體內植入之細胞。該裝置係由多層細胞培養室、細胞製備室、及自動驅動細胞培養基循環、更換及再填充的關鍵參數控制單元所構成。根據本發明之裝置的特徵在於所有與細胞及培養基接觸之組件構成一完全可棄式「匣筒」以避免交叉污染及改良安全性。該裝置尤其適用於擴增及製備供骨關節炎(OA)治療用之間質幹細胞，以及用於哺乳動物中之其他以細胞為主的治療。

【英文】

An automated cell culturing device, which expands, detaches and prepares cells, ready to be implanted in vivo is disclosed. The device is composed by a multi-layered cell culture chamber, a cell preparation chamber, and critical parameters control units which automatically drive the cell culture medium circulation, change and refill. The device according to the invention is characterized in that all the components contacting cells and culture medium constitute a totally disposable "cartridge" in order to avoid cross-contamination and improve safety. The device is particularly useful for expanding and preparing mesenchymal stem cells for osteoarthritis (OA) therapy, and for other cell based therapies in mammals.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

1 管件系統

2 外部新鮮細胞培養基儲槽

3 內部緩衝細胞培養基儲槽

4 廢棄物貯槽

5 細胞培養室

6 氣體混合物瓶

7 外部細胞脫離劑儲槽

8 細胞製備室

9 參數擷取系統

10 參數監測系統

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

自動化細胞培養及收獲裝置
AUTOMATED CELL CULTURING AND HARVESTING DEVICE

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種用於活體內移植或植入之細胞培養及收獲裝置。更特定言之，本發明係關於一種確保細胞培養之完全自動化及受控擴增，及確保待於活體內移植或植入之細胞懸浮液之完全自動化及受控製備的裝置。細胞係作為單層培養。細胞亦可於三維(3D)結構或適當筏體(raft)或珠粒上進行培養以增加培養表面。

【0002】對於在三維(3D)環境中諸如在 3D 結構或支架上生長細胞愈來愈有興趣。在 3D 支架上之細胞培養在組織工程中有用於產生可植入的組織結構。

【先前技術】

【0003】WO2011/073261A1 描述一種用於培養黏附於三維結構上供活體內移植或植入用之哺乳動物細胞的細胞處理裝置(生物反應器)，其包括循環系統、培養裝置、流體儲槽及泵。

【0004】EP0402272B1 描述一種由在其相對表面中之至少一者上經在其分子單元中具有含氮雜環之 α,β-烯系不飽和單體之(共)聚合物組成之合成高分子薄膜層塗布之高分子基質組成的微生物或細胞培養基質。

【0005】US2013/0058907 描述一種併入可棄式培養器皿模組的細胞培養系統及一種可以自動化、無污染方式擴增細胞(包括初

生細胞及細胞株以及病患特異性細胞或細胞株)之可重複使用的精簡儀器基礎裝置。

【0006】WO2010/048417 描述一種灌流生物反應器，其包括具有入口埠及出口埠之外殼、及細胞生長基質，其中該細胞生長基質係平面、摺皺、或環繞中心核心螺旋捲繞。

【0007】US2008/0032398A1 描述一種用於支撐複數個細胞培養灌流流徑總成匣筒的培養架，其包括：具有含複數個各適於支撐一流徑總成匣筒之溝槽之表面的水平基座；複數個用於在該架與該複數個匣筒之間傳輸數據的數據介面連接器；及至少一個用於在該架與外部電腦之間通訊的控制介面。

【0008】US2008/0220523A1 描述一種於體外擴增細胞之方法，該方法包括：將細胞播種於中空纖維基質上，使得細胞黏附至基質；擴增基質上之黏附細胞；自基質移除擴增細胞，其中該等細胞係非胚胎幹、非生殖細胞，其中該等細胞表現端粒酶、係未經轉變，且具有正常的染色體核型(karotype)。

【0009】US2013/0210130A1 描述一種自動化細胞培養配置，其包括一個密閉式細胞培養模組，該模組包括一個生物反應器，該密閉式細胞培養模組係一密閉系統；及複數個工具模組，包括一個泵及一個額外的工具模組，其中該額外工具模組中之至少一個可相對於該密閉式細胞培養模組或相對於該密閉式細胞培養模組之一或數個組件移動，且經組態或可經組態以作用於或監測生物反應器之內容物，而不用打開密閉式細胞培養模組或將密閉式細胞培養模組自自動化細胞培養配置拆下。

【0010】US2013/0244322A1 描述一種自動化細胞培養裝置，

其包括培養基、生長因子及待培養細胞之貯槽；具有恆溫罩之培養器，其中裝入供細胞培養或擴增用之容器；及控制電腦系統，其包括用於輸入及記錄意欲控制罩中之培養條件之數據及管理用於以預定順序分配流體之閥的構件，其中其包括用於支撐及攪動由該電腦系統控制且裝於該罩內之細胞培養或擴增容器的裝置，且其中該容器係由具有至少一個連接至該等貯槽之入口埠及一個連接至於培養後收獲及儲存細胞之構件之出口埠的細胞擴增袋所形成，此等收獲及儲存構件及該等貯槽係位於罩的外部且藉由管道連接至該細胞擴增袋之該等埠，該等管道與該細胞擴增袋共同形成置於該罩內之預組裝模組，且穿過該罩之壁以允許向細胞擴增袋饋送該等培養基、生長因子及待培養細胞，以及在保持罩封閉的情況收獲該收獲及儲存構件中之該細胞擴增袋的內容物。

【0011】US2012/0315693A1 描述一種細胞生長裝置，其包括：複數個細胞生長室，其各具有可透過氣體、不可透過液體之薄膜、相對表面、及至少一個連接至該可透過氣體、不可透過液體之薄膜及該相對表面中之至少一者之側壁；與至少一個細胞生長室之至少一個可透過氣體、不可透過液體之薄膜相通之至少一個氣管空間；其中該至少一個氣管空間包括在該氣管空間之周邊邊緣上的周邊支撐物；其中在該氣管空間之周邊邊緣上之支撐物係間隔開以產生複數個間隙，從而允許氣體自外部環境經由周邊支撐物間之複數個間隙流入氣管空間中；及歧管，其中該歧管為複數個細胞生長室中的至少一者提供通道。

【0012】US2009191620 描述一種多層細胞培養裝置，其包括三個細胞培養室，每個細胞培養室具有至少一個埠，每個埠具有一

埠蓋；兩個整體氣管室，其中每個埠係經結構化及配置成與鉸接的埠蓋結合，以提供可釋放的液體緊密密封。

【0013】WO08112845A2 描述一種用於細胞擴增之可棄式裝置，其具有至少一個包括細胞生長區域及供給區域之生物反應器，該細胞生長區域係與一板相鄰且經由一薄膜與該供給區域分隔。該生物反應器包括複數個具有粗糙表面或波紋表面之板。至少一片薄膜分隔相鄰的板。相鄰板之間的兩片材可由一網狀物分隔。

【0014】因此，與細胞培養裝置相關的一個問題係由於人類操作以及將相同設備用於不同細胞培養所致的污染。

【0015】需要提供高度自動化之培養及製備待於活體內植入或移植之細胞的方法，以避免人類操作及污染，及提供一種由可棄式部件構成的裝置，以防止不同細胞株間的交叉污染。

【發明內容】

【0016】吾人現發現一種自動化細胞培養及收獲裝置，其自動地擴增、脫離及製備準備於活體內植入之細胞，其中與細胞及培養基接觸之組件構成一完全可棄式「匣筒」，以避免交叉污染及改良安全性。

【0017】因此，本發明之一目的係一種自動化細胞培養裝置，其自動地擴增、脫離及製備準備於活體內植入之細胞，其中與細胞及培養基接觸之組件構成一完全可棄式「匣筒」。

【0018】根據本發明之細胞培養及收獲裝置之所有與細胞及細胞培養基接觸的組件係完全可棄式(單次使用)，以完全避免一種培養物與另一種培養物間的交叉污染，且無需洗滌或就地清潔裝置的任何組件。

【0019】根據本發明之細胞培養及收獲裝置係由一組不與細胞及細胞培養基接觸的組件(閥、泵、感測器、致動馬達、溫度控制系統、非侵入性參數控制感測器)構成。此組組件可構成裝置的「硬體」部分。

【0020】與細胞及培養基接觸的組件群組(管件系統、細胞培養室、細胞製備室、儲槽、廢棄物貯槽)可構成裝置的可棄式部分，即「匣筒系統」或「匣筒」。

【0021】本發明之裝置標的較佳係由經於不同溫度下調節的分離隔室所構成。

【0022】較佳地，使其中發生細胞播種及擴增之第一隔室經受溫度控制，以維持約 37℃之溫度，且其可包括細胞培養的關鍵組件(諸如培養室)及特定量的循環細胞培養基。

【0023】較佳地，使第二隔室經受溫度控制，以維持介於約 4℃與約 8℃間之溫度，且其可包括新鮮培養基儲槽、及待於最終操作期用於細胞脫離之特定量的細胞脫離劑。

【0024】較佳將新鮮培養基及脫離劑維持在低溫下，以保留其關鍵組分的生物活性。

【0025】較佳地，根據本發明之裝置具有培養基的連續循環，其確保營養物分佈於細胞培養室內部，及有效率的氣體交換，以將 pH 維持於約 7。此外，培養基更換(即排出耗盡的培養基並重新填充新鮮培養基)對於維持最佳營養物濃度及於細胞數目增加後減低分解代謝產物濃度係重要的。

【0026】術語「營養物」或「營養液」意欲包括含有對於培養哺乳動物或脊椎動物細胞而言不可或缺之彼等營養物質的液體溶

液。營養液亦可影響所培養細胞之表現型的特定變化。可用於本發明之適當營養物為技術中所知曉，且可包括胎牛血清、人類自體血清、L-抗壞血酸、抗生素、胺基酸補充物、抗氧化劑、礦物質、細胞調節劑、活化劑或抑制劑。

【0027】在本發明之裝置標的中，監測營養物及分解代謝產物濃度容許根據技術中已知之原理，即營養物濃度絕不應低於特定臨限值及分解代謝產物濃度絕不應超過特定值，來自動執行培養基更換。

【0028】較佳地，培養基更換操作包括自本發明之裝置標的的第二隔室輸入新鮮培養基，及將培養基排放至廢棄物貯槽。

【0029】在培育黏附及生長於表面上之細胞的情況中，於細胞培養室內的均勻細胞播種係自動化裝置中的常見問題。為確保待播種細胞的適當分佈，較佳將本發明之裝置標的的細胞培養室設計成包括數個生長表面(層)及介於層與外部殼之間的空間。

【0030】在本發明之裝置標的的播種期操作中，旋轉細胞培養室及存在空間可確保細胞均勻分佈於播種表面上。

【0031】技術中已知之自動化細胞培養裝置的另一問題在於細胞脫離及收獲。

【0032】本發明之另一目的係提供一種亦可自動地脫離黏附細胞及將其製備成可用於植入體內之自動化細胞培養裝置。

【0033】本裝置之特徵在於在細胞脫離期中連同旋轉及振動細胞培養室一起自動投與脫離劑，此確保有效率及均勻的細胞收獲。

【0034】在細胞製備室中，濃縮細胞同時棄置脫離劑。

【0035】細胞培養室較佳係由任何生物相容性材料所構成，較佳地，外部殼及轉向器係選自聚苯乙烯(PS)、聚碳酸酯(PC)、聚甲醛，及內部層係由聚苯乙烯(PS)所構成，其最終經處理以增進細胞黏附。

【0036】較佳地，用於細胞黏附之處理包括氧電漿表面處理、聚-D-離胺酸處理、活性肽丙烯酸酯處理。或者，可將層塗布適用於後續細胞脫離之物質。較佳地，將層塗布添加或不添加黏附斑(adhesion focal plaque)組分(RGD)或細胞表面黏附分子的藻酸鹽凝膠。

【0037】細胞製備室較佳連接至技術中已知用於立即收集細胞(「輸出細胞」)的注射器或其他擷取裝置。「輸出細胞」係指於在裝置中擴增之後自裝置收獲的細胞。輸出細胞較佳係用在臨床或用於其他用途，諸如研究、臨床試驗等等。

【0038】整個操作並不包括使細胞或細胞培養基與外部環境接觸，因此防止污染可能性。此外，操作完全由自動致動器控制，因此防止可能的人為誤差。

【0039】待於本裝置中播種、擴增、製備及收獲的較佳細胞類型包括，但不限於，由任何期望組織(包括，但不限於，骨髓、脂肪組織、臍帶血、臍帶間充質(umbilical cord matrix)、末梢血液、胎盤、胎盤血、肌肉、腦、腎及其他實體器官或分泌流體)製備得之非胚胎幹非生殖細胞。

【0040】較佳地，待於本發明之裝置標的中播種、擴增、製備及收獲的細胞係可於體外存活及黏附增殖的細胞，更佳係脂肪衍生的間質幹細胞(AD-MSC)、骨髓衍生的間質幹細胞(BMSC)。

【0041】本發明之裝置標的的較佳用途係在需要使黏附依賴型細胞(adhesion-dependent cells)懸浮以供注射之所有應用中，諸如在骨關節炎(OA) (亦稱為退化性關節炎或退化性關節疾病或非炎性骨關節病)治療或其他需要免疫調節及／或組織修復之疾病中，擴增間質幹細胞以供體內細胞治療用。

【0042】因此，本發明之另一目的係使用自動化細胞培養裝置於擴增及製備供哺乳動物體內細胞治療用之間質幹細胞，較佳用於其中需要使黏附依賴型細胞懸浮以供注射之所有應用，更佳用於製造供治療骨關節炎或其他需要免疫調節及／或組織修復之疾病的細胞。

【圖式簡單說明】

【0043】圖 1 呈現一顯示本發明之一較佳具體例之自動化細胞培養及收獲裝置的整體方塊圖。

【0044】圖 2 呈現一 4 層培養室(A：俯視圖；B：縱向剖面圖)。

【0045】圖 3 呈現一顯示本發明之一較佳具體例之自動化細胞培養及收獲裝置之主要組件的詳細視圖。

【實施方式】

【0046】圖 1 包括容許細胞培養基於裝置之不同組件內循環及流動之管件系統 1；於其中播種、生長及脫離細胞的細胞培養室 5，其容許由操作人員通過入口埠(輸入)輸入細胞；外部新鮮細胞培養基儲槽 2；內部緩衝細胞培養基儲槽 3；外部細胞脫離劑儲槽 7；氣體混合物瓶 6，其連接至內部緩衝劑儲槽 3；廢棄物貯槽 4；細胞製備室 8，其容許由操作人員通過出口埠(輸出)輸出經製備的細胞；參數擷取系統 9，其連接至參數監測系統 10。經由入口埠將細

胞注入至細胞培養室 5 中；細胞培養基在管件系統 1 內自內部緩衝劑儲槽 3 連續流動至細胞培養室 5，並通過參數控制系統 9 循環回同一緩衝劑儲槽 3；定期地，根據參數擷取系統 9 及監測系統 10 在特定參數值下，將確定量之新鮮細胞培養基自外部新鮮培養基儲槽 2 輸入至內部緩衝劑培養基儲槽 3，同時將相同量排出至廢棄物貯槽 4；在細胞培養結束時，將確定量的細胞脫離劑自外部細胞脫離劑儲槽 7 輸入至細胞培養室 5 中；在細胞脫離操作所需之確定時間後，將脫離細胞輸出至細胞製備室 8；其中，當將過剩的脫離劑排出至廢棄物貯槽 4 時，可通過出口埠輸出期望體積的製備細胞。

【0047】圖 2 呈現連接至管件系統以自室之一側輸入細胞培養基 1a，及使其在室外部流至另一側 1b 的細胞培養室。殼 2 內包含數個於其上黏附及生長細胞的層 3，且其經由若干個固定器 4 與殼 2 相連。此確立在隨後操作期中容許細胞及培養基之較佳分佈的空間 5。各層 3 係由平坦表面製成，其於其中心處具有圓形間隙 6。殼 2 以及流動轉向器 7 可由任何生物相容性材料構成。適當材料的非排他性實例為聚苯乙烯(PS)、聚碳酸酯(PC)、聚甲醛等等。層 3 可由任何適用於培養細胞的生物相容性材料構成，其最終經處理以增進細胞黏附。適當材料的非排他性實例為聚苯乙烯(PS)。用於細胞黏附之處理的非排他性實例為氧電漿表面處理、聚-D-離胺酸處理、活性肽丙烯酸酯處理。或者，可將層塗布適用於後續細胞脫離之物質。塗層的非排他性實例係添加或不添加黏附斑組分(精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸)或其他分子的藻酸鹽凝膠。

【0048】位在室之兩側上的流動轉向器 7 係由若干管(每層一個管 8)組成，以分配進入的細胞培養基流 1a 及離開的細胞培養基

流 1b，並提供培養基之準確的分配至各層 3。位於室頂部、置於一系列圓形間隙 6 上方之注射器插塞 11 允許將待播種的細胞初始注入至該等層上。細胞可藉由注射針或任何其他適合連接至插塞及在無菌條件下穿入至室中的構件注射。存在圓形間隙容許注射針(或任何其他適當構件)不僅到達上層，而且到達室的最內部空間，以確保細胞在播種期中的更均勻分佈。

【0049】於在室內注射細胞後，播種期在於藉由與供旋轉用之致動馬達連結的旋轉齒輪 9 溫和旋轉整個培養室。旋轉確保細胞之再更準確的分佈，且亦歸因於在殼與層之間存在空間 5，其容許培養基及細胞在旋轉期間沿室的內壁循環。由於在室的兩側上存在自由旋轉接頭 10，因此管件系統支援室的旋轉。溫和旋轉可僅於注射後發生短暫的確定時間，以及於持續直至 24 小時之播種期的稍後時刻發生短暫的確定時間。在此期間中，細胞將黏附於層的上及下表面兩者上。於播種期後，細胞培養基之流動連同室的旋轉容許未黏附細胞流至室外。

【0050】圖 3 呈現細胞培養及收獲裝置，其中操作始於藉由注射器 1 或任何其他適當構件通過插塞 3 將細胞注射至細胞培養室 2 中。於一非排他性實例中，插塞可為矽隔片、或任何其他確保注射期間之無菌性的構件。播種包括細胞培養室 2 之數次短暫的溫和旋轉(其係由供旋轉用的齒輪系統 4 及其致動馬達 5 實現)、及數個其間室保持靜止、其層呈水平位置的長時間間隔。在播種期中，沒有培養基流過整個細胞培養室。播種期總時間的非排他性實例為 6 至 24 小時。待於播種期中致動之旋轉次數的非排他性實例為 1 至 12。各次旋轉之期間的非排他性實例為 1 至 5 分鐘。上述操作可稱為「播

種期」。

【0051】管件系統 14 連接內部細胞培養基緩衝劑儲槽 6 至細胞培養室 2 及至裝置的其他組件，運送細胞培養基，其係由蠕動泵 15 或任何其他構件的作用驅動。管件系統可由任何適宜的生物相容性材料製成。生物相容性管件材料的非排他性實例為聚矽氧、聚氯乙烯(PVC)、Pharmed® BPT。儲槽瓶 6 亦與氣體混合物瓶 25 連接，以提供與細胞培養基的氣體交換，以及在於細胞培養基內存在碳酸鹽緩衝劑之情況維持 pH。在此實例中，10b、11b 及 12b 係平常關閉的閥(在實例中為電動閥)，而 10、11 及 12 係平常開啟的閥(在實例中為電動閥)。由於上述的閥組態，泵 15 之作用驅動細胞培養基 9 自儲槽瓶 6 至細胞培養室 2，及經由 14b 管件部分回到儲槽瓶 6。上述培養基的流動可稱作「循環期」。於播種期後，培養基流動通過整個細胞培養室將可確保移除未黏附細胞及更換細胞培養室內的細胞培養基。經由關閉平常開啟的閥 11 及打開平常關閉的閥 11b，培養基將自細胞培養室流至廢棄物貯槽 13。上述培養基的流動可稱作「洗滌期」，且可利用特定量經緩衝的細胞培養基。

【0052】於洗滌期後，已排出至廢棄物貯槽 13 的細胞培養基量應經相同量的新鮮細胞培養基取代。為此，泵 7(或任何其他適當構件)及連接儲槽瓶 6 與外部新鮮培養基儲槽 8 之管件系統的作用確保將新鮮培養基輸入至儲槽瓶中。上述新鮮培養基的流動可稱作「再填充期」。黏附細胞於細胞培養室內之生長(或者指示為「擴增」)持續獲得期望細胞數目所需的時間，即獲得層表面所可獲得之最大細胞數目所需的時間。在細胞生長期間，循環期與數個洗滌期及再填充期交替。洗滌期及再填充期的數目以及其時間係視數個表徵循

環細胞培養基之參數的值而定。可使用數個參數感測器(在本具體例中為 28 及 29)來監測、記錄及控制循環培養基之組成。根據設定在特定參數值及特定臨限值之感測器數據，在循環期後可跟著洗滌及再填充期，以恢復循環培養基的適當組成。此操作係由自動地作用於如上述之閥 11、11b 及泵 7 的參數控制單元來自動地控制。待監測、記錄及控制之參數的非排他性實例為 pH、葡萄糖濃度、溶氧濃度、乳酸濃度。特定而言，在非排他性實例中，葡萄糖消耗速率可源自細胞生長期中的葡萄糖濃度動力學，將其使用作為室內細胞濃度的間接指標。因此，細胞生長期之終點可由裝置自動決定。

【0053】如前所述，於適當的細胞生長後，需要使於室內生長於層上的黏附細胞脫離。為此，藉由關閉閥 10 及 11 及藉由打開閥 11b(同時閥 10b 及 12b 保持關閉)，泵 15 之作用將因驅動細胞培養基至廢棄物貯槽 13 而導致排空培養室。上述培養基的棄置可稱作「排空期」。

【0054】一旦細胞培養室排空(即內部不存在細胞培養基)，即打開閥 10b(同時閥 10 保持關閉，如前所述)，以容許泵 15 讓特定量的脫離劑 16 流入細胞培養室內。脫離劑之量係預定的且足以填充細胞培養室。脫離劑的非排他性實例為：檸檬酸鹽(當細胞培養層經塗布藻酸鹽凝膠時)、胰蛋白酶／EDTA、膠原蛋白酶(當細胞黏附於塑膠上時)。

【0055】連同脫離劑對黏附細胞的脫離作用，為改良脫離效率，可進行細胞培養室的快速旋轉。如前所述，旋轉係由供旋轉用的齒輪系統 4 及其致動馬達 5 進行。此外，為進一步改良細胞脫離效率，可使細胞培養室經受由振動馬達 17 所致動的振動移動。振

動時間的非排他性實例大約為 30 秒，同時振動強度為 0.1 至 10 赫茲(Hertz)。上述細胞的脫離可稱作「脫離期」。

【0056】於細胞脫離後，關閉閥 12，同時打開閥 12b；藉此，泵 15 將使脫離細胞連同脫離劑一起流至細胞培養室外，到達細胞製備室 19。細胞製備室於其圓錐形底部處設有過濾器 20。此過濾器之孔隙係經設計成容許脫離劑及任何其他液體物質通過，同時阻擋細胞。過濾器 20 之孔隙尺寸的非排他性實例為 1 微米。一旦細胞製備室經填充脫離細胞及脫離劑，則泵 18 將使液體通過過濾器 20 流向廢棄物貯槽 13，同時於製備室的圓錐形底部留下濃縮細胞 21。上述濃縮細胞及棄置脫離劑可稱作「製備期」。

【0057】為收獲濃縮細胞，可將注射器 23(或任何其他適當構件)連接至插塞 22。於一非排他性實例中，插塞可為矽隔片、或任何其他確保注射期間之無菌性的構件。可將注射器活塞 23b 連接至活塞致動馬達 24。致動馬達向上拉引活塞，以使注射器填充經脫離的濃縮細胞。於一非排他性實例中，致動馬達亦可上下拉動活塞數次，以確保濃縮細胞的均勻再懸浮。注射器亦可包含一或多種適當物質諸如稀釋劑、防腐劑、載劑。此等物質的非排他性實例為玻尿酸溶液、生理溶液、鹽水緩衝液、膠原蛋白溶液、富血小板血漿(PRP)。上述自細胞製備室最終收獲細胞可稱作「收獲期」。

【0058】可將含有收獲細胞及如上述之最終其他稀釋劑之注射器 23(或任何其他適當構件)移除及用於直接將細胞植入體內。植入部位之非排他性實例為關節、乳房組織、心臟、肝臟、腦脊髓液(CSF)、血液。

【0059】包括細胞培養室 2、緩衝培養基儲槽 6、管件系統 14

的所有上述組件及相關組件係包含在藉由適當溫度控制系統 26 經受溫度控制的隔室(如圖 3 所示)內。用於播種及擴增細胞的最佳溫度為 37℃。氣體交換瓶 25、廢棄物貯槽 13、細胞製備室 19 及相關組件可能未經受溫度控制，且可在室溫下作用。外部新鮮培養基儲槽 8 及脫離劑 16 係包含在藉由適當溫度控制系統 27 經受溫度控制的分離隔室(如圖 3 所示)內。培養基儲槽及脫離劑係維持在介於約 4℃與約 8℃間之溫度下。

【0060】參照圖 3，構成可棄式「匣筒」系統的組件為：2、3、6、14、19、20、22、23、23b。組件 8、13 及 16 亦為可棄式，且係藉由管件系統適當地連接至「匣筒」系統。

【符號說明】

1　管件系統(圖 1)；注射器(圖 3)

1a　細胞培養基

1b　細胞培養基

2　外部新鮮細胞培養基儲槽(圖 1)；殼(圖 2)；細胞培養室(圖 3)

3　內部緩衝細胞培養基儲槽(圖 1)；層(圖 2)；插塞(圖 3)

4　廢棄物貯槽(圖 1)；固定器(圖 2)；供旋轉用的齒輪系統(圖 3)

5　細胞培養室(圖 1)；空間(圖 2)；致動馬達(圖 3)

6　氣體混合物瓶(圖 1)；圓形間隙(圖 2)；內部細胞培養基緩衝劑儲槽(圖 3)

7　外部細胞脫離劑儲槽(圖 1)；流動轉向器(圖 2)；泵(圖 3)

8　細胞製備室(圖 1)；管(圖 2)；外部新鮮培養基儲槽(圖 3)

9　參數擷取系統(圖 1)；齒輪(圖 2)；細胞培養基(圖 3)

10　參數監測系統(圖 1)；自由旋轉接頭(圖 2)；閥(圖 3)

10b 閥

11 注射器插塞(圖 2)；閥(圖 3)

11b 閥

12 閥

12b 閥

13 廢棄物貯槽

14 管件系統

14b 管件部分

15 蠕動泵

16 脫離劑

17 振動馬達

18 泵

19 細胞製備室

20 過濾器

21 濃縮細胞

22 插塞

23 注射器

23b 注射器活塞

24 活塞致動馬達

25 氣體混合物瓶

26 溫度控制系統

27 溫度控制系統

28 參數感測器

29 參數感測器

申請專利範圍

1. 一種自動化細胞培養及收獲裝置，其擴增、脫離及製備準備於活體內植入之細胞，其中，與細胞及培養基接觸之組件構成一完全可棄式「匣筒」。

2. 如申請專利範圍第 1 項之自動化細胞培養及收獲裝置，其包括容許細胞培養基於裝置之不同組件內循環及流動之管件系統 1；於其中播種、生長及脫離細胞的細胞培養室 5，其容許由操作人員通過入口埠(輸入)輸入細胞；外部新鮮細胞培養基儲槽 2；內部緩衝細胞培養基儲槽 3；外部細胞脫離劑儲槽 7；氣體混合物瓶 6，其連接至內部緩衝劑儲槽 3；廢棄物貯槽 4；細胞製備室 8，其容許由操作人員通過出口埠(輸出)輸出經製備的細胞；連接至參數監測系統 10 之參數擷取系統 9。

3. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其係由經於不同溫度下調節的分離隔室所構成。

4. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，使第一隔室經受溫度控制以維持約 37℃之溫度，且其包括細胞培養室及特定量的循環細胞培養基；及使第二隔室經受溫度控制以維持介於約 4℃與約 8℃間之溫度，且其包括新鮮培養基儲槽、及特定量的細胞脫離劑。

5. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其具有培養基之連續循環。

6. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養裝置，其中，該培養基更換操作包括自該裝置之第二隔室輸入新鮮培養基，及將培養基排出至廢棄物貯槽。

7. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，該培養室包括數個生長表面(層)及介於層與外部殼之間的空間。

8. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，該細胞培養室係由任何生物相容性材料所構成，較佳地，外部殼及轉向器係選自聚苯乙烯(PS)、聚碳酸酯(PC)、聚甲醛，及內部層係由聚苯乙烯(PS)所構成，其最終經處理以增進細胞黏附。

9. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，該等用於細胞黏附之處理包括氧電漿表面處理、聚-D-離胺酸處理、活性肽丙烯酸酯處理，或將層塗布適用於後續細胞脫離之物質，較佳地，塗布添加或不添加黏附斑(adhesion focal plaque)組分(RGD)或分子的藻酸鹽凝膠。

10. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，在細胞脫離期中連同旋轉及振動細胞培養室一起自動投與脫離劑。

11. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，該細胞製備室係連接至用於立即收集細胞的注射器或其他擷取裝置，其較佳用於臨床或其他用途，諸如研究、臨床試驗等等。

12. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，該等待播種、擴增、製備及收獲的細胞係由任何期望組織，較佳為骨髓、脂肪組織、臍帶血、臍帶間充質(umbilical cord matrix)、末梢血液、胎盤、胎盤血、肌肉、腦、腎及其他實體器官或分泌流體所製備得之非胚胎幹非生殖細胞。

13. 如前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置，其中，可注入至細胞培養室中之細胞係可於體外存活及黏附增殖的細胞，較佳係脂肪衍生的間質幹細胞(AD-MSC)或骨髓衍生的間質幹細胞(BMSC)。

14. 一種前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置之用途，其係用於擴增及製備供哺乳動物體內細胞治療用之間質幹細胞。

15. 一種前述申請專利範圍中任一項之自動化細胞培養及收獲裝置之用途，其係用於製造供治療骨關節炎或其他需要免疫調節及／或組織修復之疾病之細胞。

圖式

圖 1

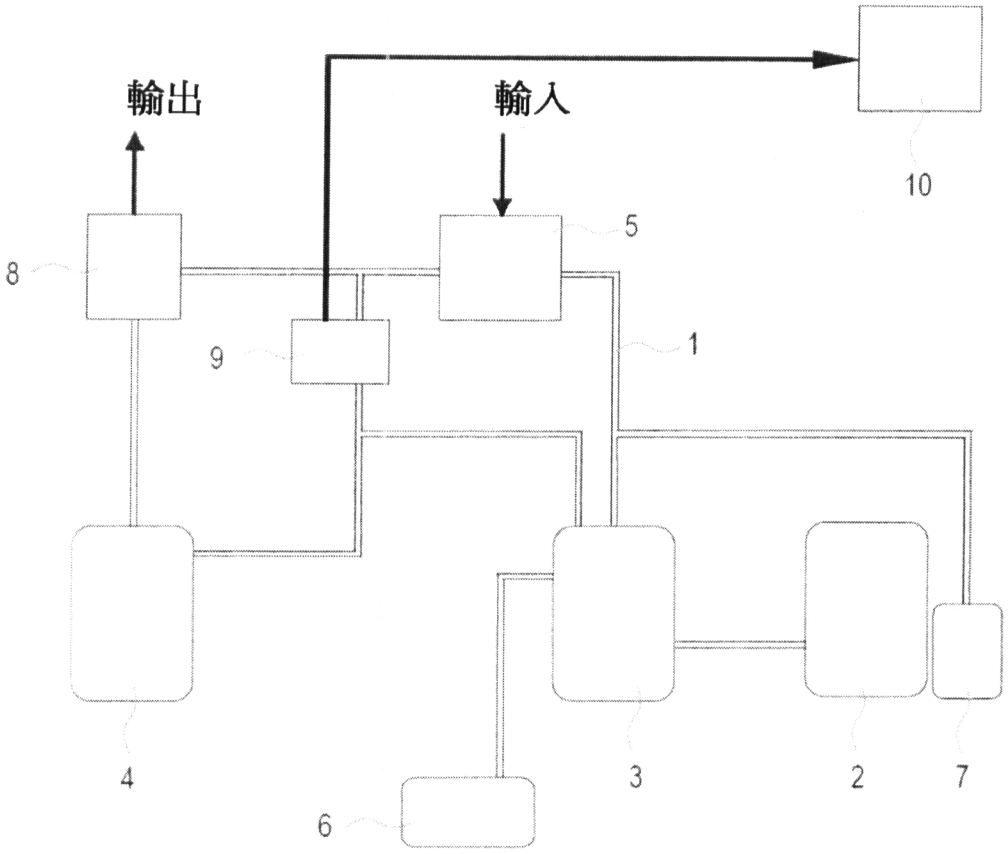


圖 2

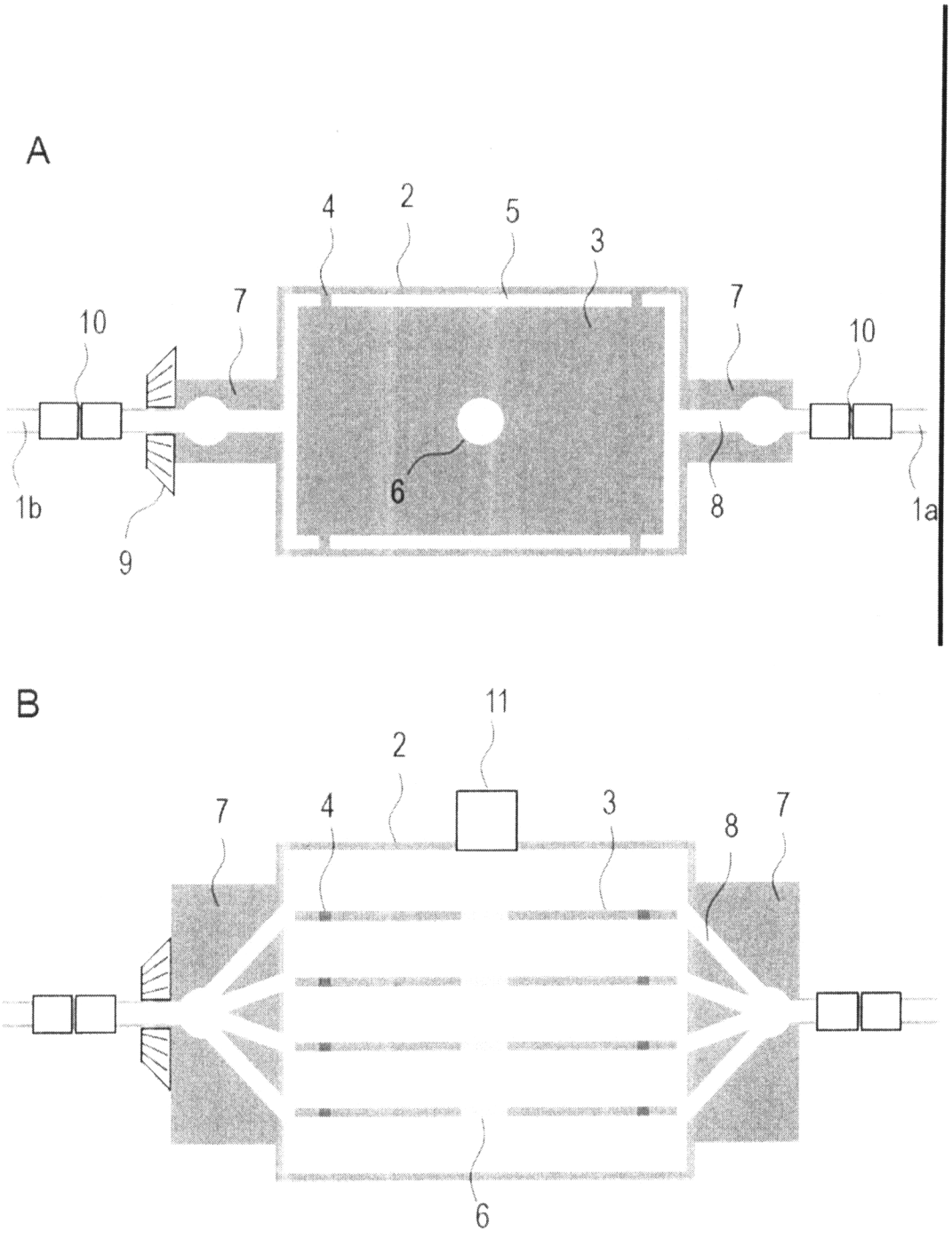
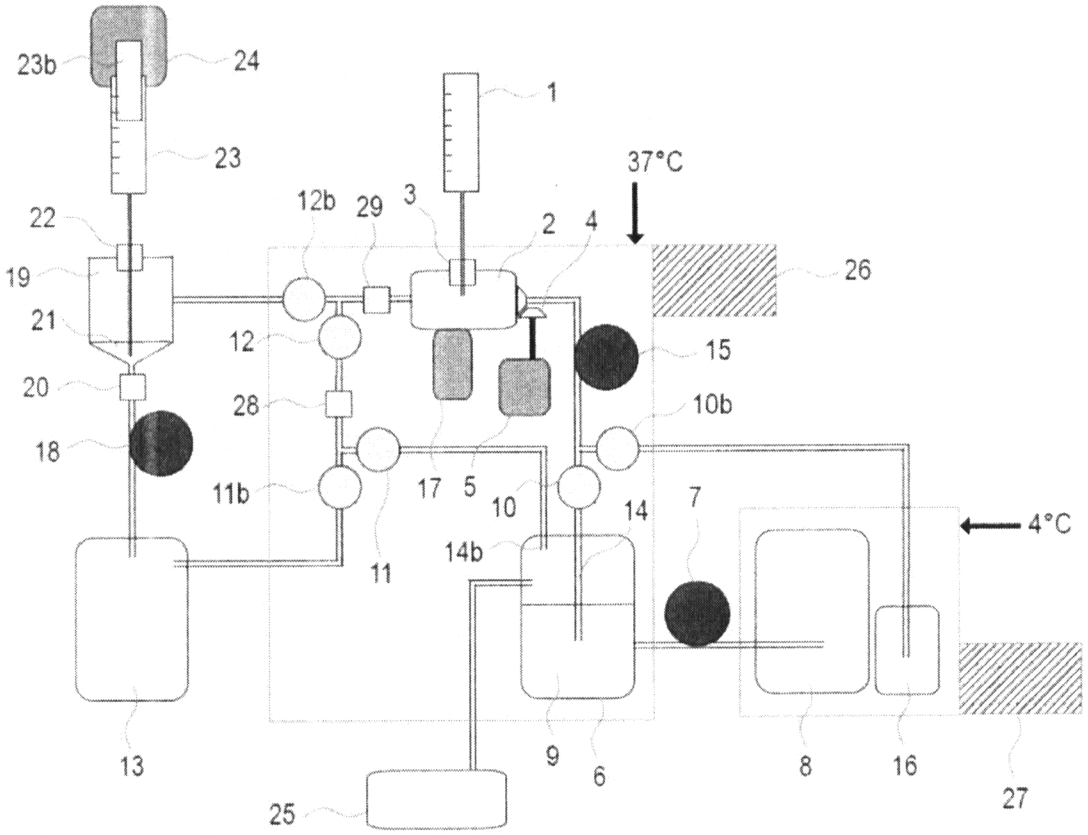


圖 3


23b
24
23
22
19
21
20
18
1
37°C
12b
29
3
2
4
26
12
15
28
10b
11b
17
5
10
14
7
4°C
11
14b
13
9
6
8
16
27
25