



(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 201329231 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 16 日

---

(21)申請案號：101146015 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 07 日

(51)Int. Cl. :                    **C12M3/06 (2006.01)**                    **C12N5/07 (2010.01)**  
                                  **B01D29/31 (2006.01)**                    **B01D29/88 (2006.01)**

(30)優先權：2011/12/07        美國                                    61/567,926

(71)申請人：西投佛拉公司 (美國) CYTOVERA, INC. (US)  
                  美國  
                  財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH  
                  INSTITUTE (TW)  
                  新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：黃樂天 HUANG, LOTIEN R. (US) ; 施冰如 SHE, BIN RU (TW) ; 廖智菁 LIAO,  
                  CHIH CHING (TW)

(74)代理人：彭秀霞

申請實體審查：無    申請專利範圍項數：26 項    圖式數：18        共 105 頁

---

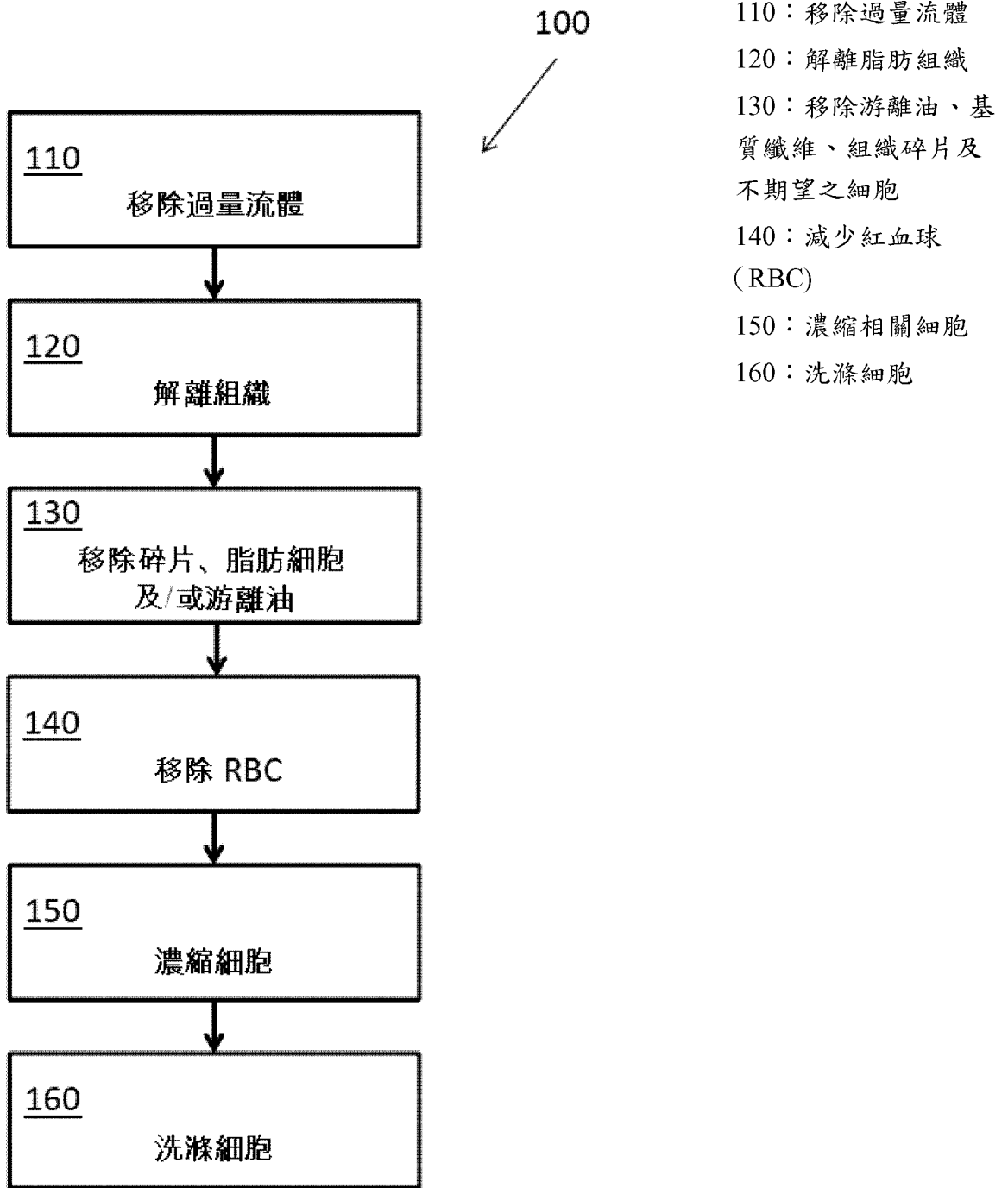
(54)名稱

用於自脂肪組織分離非脂肪細胞之方法及裝置

METHOD AND DEVICE FOR ISOLATION OF NON-FAT CELLS FROM AN ADIPOSE TISSUE

(57)摘要

本揭示案係關於一種用於自動物或人類來源收集之脂肪組織樣本分離非脂肪細胞的方法及裝置。





(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 201329231 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 16 日

(21)申請案號：101146015

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 07 日

(51)Int. Cl.：

*C12M3/06 (2006.01)*

*C12N5/07 (2010.01)*

*B01D29/31 (2006.01)*

*B01D29/88 (2006.01)*

(30)優先權：2011/12/07 美國

61/567,926

(71)申請人：西投佛拉公司 (美國) CYTOVERA, INC. (US)

美國

財團法人工業技術研究院 (中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH  
INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：黃樂天 HUANG, LOTIEN R. (US)；施冰如 SHE, BIN RU (TW)；廖智菁 LIAO,  
CHIH CHING (TW)

(74)代理人：彭秀霞

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：18 共 105 頁

(54)名稱

用於自脂肪組織分離非脂肪細胞之方法及裝置

METHOD AND DEVICE FOR ISOLATION OF NON-FAT CELLS FROM AN ADIPOSE TISSUE

(57)摘要

本揭示案係關於一種用於自動物或人類來源收集之脂肪組織樣本分離非脂肪細胞的方法及裝置。

201329231

智專收字第：1023015668-0



日期：102年01月14日

發明摘要

※ 申請案號：101146015

※ 申請日：101/12/7

※IPC 分類：C12M3/06 (2006.01)  
C12N5/07 (2010.01)  
B01D29/31 (2006.01)  
B01D29/88 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於自脂肪組織分離非脂肪細胞之方法及裝置

(METHOD AND DEVICE FOR ISOLATION OF NON-FAT  
CELLS FROM AN ADIPOSE TISSUE)

【中文】

本揭示案係關於一種用於自動物或人類來源收集之脂肪組織樣本分離非脂肪細胞的方法及裝置。

【英文】

The present disclosure is related to a method and a device for isolating non-fat cells from adipose tissue samples collected from animal or human sources.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1A ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

# 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)

用於自脂肪組織分離非脂肪細胞之方法及裝置

(METHOD AND DEVICE FOR SAMPLE PROCESSING)

## 【技術領域】

本發明係關於自動物或人類來源收集之脂肪組織樣本分離非脂肪細胞之方法及裝置。

## 【先前技術】

生物學及醫學中之許多技術，諸如細胞分離、流動式細胞測量術、細胞分析及細胞療法依賴於解離組織以分離個別細胞。處理組織樣本經常包括多種動作，諸如打碎、洗滌、酶促消化、解離、培育、混合、塊及碎片移除及濃縮。在研究實驗室中，此等動作經常手動進行，使得樣本在開放環境中自試管轉移至試管。此等手動處理需要高度受訓之人員且操作生物樣本造成可能之污染及感染風險。

最近，在研究及醫學團體中存在自脂肪組織分離細胞之興趣。已開發出若干技術以自患者或動物安全移除脂肪組織之部分。舉例而言，腫脹性抽脂術及水噴射抽脂術技術已廣泛用以自患者移除脂肪組織。脂肪組織含有儲存脂肪之脂肪細胞及維持組織之其他非脂肪細胞。脂肪組織之組成細胞、其作用及其相互作用並未得到完

全瞭解，且為活躍的學術及臨床研究之主題。

為研究脂肪組織，可能需要解離組織且分離組成細胞。處理可包括釋放組成細胞、移除碎片及不期望之細胞、濃縮及增濃相關細胞及洗滌細胞。此處理可能費力且可能需要高度受訓之操作者、昂貴的儀器設置及具有適當生物安全性措施之實驗室。多種操作動作亦可導致相關細胞顯著損失，使得分離稀少物質及低普及性細胞困難及不可靠。此外，當使用人類樣本時，交叉污染及感染之風險可為實質性的。

因此需要獲得一種自脂肪組織有效分離相關細胞(尤其是不為脂肪細胞之細胞)之方法，且獲得一種使得自脂肪組織分離非脂肪細胞容易且安全之裝置。

包括含可撓性塑膠片之袋子廣泛用以收集、處理及儲存生物組織樣本，諸如末梢血液、臍帶血液、血液組分、血漿、骨髓、脂肪抽吸物(lipoaspirate)等。袋子具有可撓及可擴展之優勢，且能夠改變其內部容積以容納不同體積之樣本。為有助於樣本處理，許多單獨之袋子經常使用外管來流體式連接以形成系統。此袋及管系統已廣泛用於樣本處理(例如血液份化(blood fractionation)、細胞分離等)中。然而，當整合較多處理動作時，袋及管系統快速變繁複、難用且難以製造。該等系統變成絕緣套管樣且變得傾向於扭結，其中許多組件相互搖晃。為使用此等裝置，操作者需要較高訓練程度及長期親身實踐時間以設置複雜裝置。操作者亦需要對以正確順序

在正確位置安裝各種零件加以額外注意。此外，因為多個袋子、組件及管段經常必須單獨地製造，接著組裝，所以此等裝置及系統可能難以製造且製造昂貴，組裝此等裝置可為勞動密集的，且可呈現滲漏及污染(亦即系統故障)之風險。對於臨床應用，該等裝置經常單次使用，且其可靠性為重要的。密集勞動及裝置故障風險為此等習知絕緣套管樣系統之主要障礙。

## 【發明內容】

根據本揭示案之一個態樣，提供一種用於自脂肪組織樣本分離非脂肪細胞之設備。設備包括第一材料片、結合於第一材料片之第二材料片及複數個界定於第一材料片與第二材料片之間的腔室，該複數個腔室包括樣本解離室，該樣本解離室包括一個入口及一個出口；廢料收集室，該廢料收集室包括一個與樣本解離室之出口流體連通之入口；及細胞精製室，該細胞精製室包括一個與樣本解離室流體連通之入口，及一個出口。

根據一些實施例，樣本解離室進一步包括篩網過濾器，該篩網過濾器包括孔徑在  $70 \mu\text{m}$  與  $300 \mu\text{m}$  之間的孔。

根據一些實施例，設備進一步包括篩網過濾器，該篩網過濾器包括於細胞精製室中，該篩網過濾器包括孔徑在  $20 \mu\text{m}$  與  $50 \mu\text{m}$  之間的孔。

根據一些實施例，樣本解離室進一步包括第一篩網

過濾器，該第一篩網過濾器包括具有第一孔徑之孔，且其中細胞精製室進一步包括第二篩網過濾器，該第二篩網過濾器包括具有第二孔徑之孔，其中第二孔徑小於第一孔徑。

根據一些實施例，設備進一步包括一個構件，該構件控制樣本解離室、廢料收集室及細胞精製室之間的流體連接。

根據一些實施例，控制流體連接之構件包括活塞。

根據一些實施例，設備進一步包括流量控制裝置，該流量控制裝置經組態以將沖洗液及解離液之至少一者引入樣本解離室中，且具有與樣本解離室流體連通之出口。

根據一些實施例，設備進一步包括一個構件，該構件向樣本解離室及細胞精製室之一者施加壓力。

根據一些實施例，設備進一步包括下游處理設備，該下游處理設備與細胞精製室之出口流體連通且包括至少一個微流體裝置，該至少一個微流體裝置經組態以將自細胞精製室輸出之流體分離成第一溶液及第二溶液，該第一溶液具有第一濃度之一或多種相關細胞且該第二溶液具有小於第一溶液濃度之濃度的該一或多種相關細胞，其中相關細胞包含自脂肪組織樣本分離之非脂肪細胞。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種無菌及實質上分離之脂肪組織處理系統。系統包括組織處理室，該組

織處理室包括一個入口、一個出口及至少一個篩網過濾器，該至少一個篩網過濾器安置於組織處理室之入口與組織處理室之出口之間；廢料收集室，該廢料收集室與組織處理室包括於同一外殼中，該廢料收集室包括一個與組織處理室之出口流體連通的入口；及以下一者：碎片移除室，該碎片移除室包括碎片移除機構；及樣本收集室，該樣本收集室與組織處理室包括於同一外殼中且與組織處理室流體連通。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種在組織處理系統中處理脂肪組織樣本之方法。方法包括將待處理脂肪組織樣本經由第一腔室之入口引入第一腔室中、在第一腔室中處理脂肪組織樣本，及將細胞自第一腔室經由第一腔室之出口經由第二腔室之入口轉移至與第一腔室包括於同一外殼中之第二腔室中。

根據一些實施例，處理脂肪組織樣本包括解離脂肪組織樣本。

根據一些實施例，處理脂肪組織樣本包括在第一腔室中自脂肪組織樣本移除過量流體。

根據一些實施例，處理脂肪組織樣本包括在第一腔室中使用沖洗液洗滌脂肪組織樣本。

根據一些實施例，處理脂肪組織樣本包括在第一腔室中使用沖洗液洗滌脂肪組織樣本，及在第一腔室中使用包含至少一種酶之解離液解離脂肪組織樣本。

根據一些實施例，解離液包含膠原酶。

根據一些實施例，解離液包含膠原酶、去氧核糖核酸酶及玻尿酸酶。

根據一些實施例，使用解離液解離脂肪組織樣本係在約 37 攝氏度下發生。

根據一些實施例，方法進一步包括使用包括於第二腔室中之篩網過濾器移除碎片。

根據一些實施例，篩網過濾器之孔徑在 15 微米與 100 微米之間。

根據一些實施例，方法進一步包括將樣本截留於第一腔室內及將廢液經由包括於第一腔室中之篩網過濾器及第一腔室之第一出口經由第三腔室之入口轉移至與第一腔室包括於同一外殼中之第三腔室中。

根據一些實施例，方法進一步包括使用微流體裝置來增濃非脂肪細胞群體。

根據一些實施例，非脂肪細胞包含幹細胞。

根據一些實施例，方法進一步包括自組織處理系統收集細胞。

根據一些實施例，方法進一步包括在與第二腔室之出口流體連通且包括至少一個經組態以將細胞分離成第一溶液及第二溶液之微流體裝置的下游處理設備中處理細胞，該第一溶液具有第一濃度之非脂肪細胞且該第二溶液具有小於第一溶液濃度之濃度的非脂肪細胞。

根據一些實施例，所收集之細胞為基質血管部分細胞。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種用於自脂肪組織分離細胞之設備。該設備包括第一材料片、結合於第一材料片之第二材料片，及複數個腔室，該複數個腔室界定於第一材料片與第二材料片之間，該複數個腔室包括樣本解離室，該樣本解離室包括一個入口及一個出口；廢料收集室，該廢料收集室包括一個與組織解離室之出口流體連通的入口；及細胞精製室，該細胞精製室包括一個與樣本解離室流體連通之入口，及一個出口。

根據一些實施例，樣本解離室進一步包括過濾篩網。

根據一些實施例，設備進一步包括過濾篩網，該過濾篩網包括於細胞精製室中。

根據一些實施例，樣本解離室進一步包括第一過濾篩網，該第一過濾篩網包括具有第一孔徑之孔，且其中細胞精製室進一步包括第二過濾篩網，該第二過濾篩網包括具有第二孔徑之孔。

根據一些實施例，第二孔徑小於第一孔徑。

根據一些實施例，設備進一步包括一個構件，該構件控制樣本解離室、廢料收集室及細胞精製室之間的流體連接。

根據一些實施例，控制流體連接之構件包括活塞。

根據一些實施例，設備進一步包括流量控制裝置，該流量控制裝置經組態以將沖洗液及解離液中至少一者引入樣本解離室中，且具有與組織解離室流體連通之出口。

根據一些實施例，設備進一步包括構件，該構件向樣本

根據一些實施例，設備進一步包括下游處理設備，該下游處理設備與細胞精製室之出口流體連通且包括至少一個微流體裝置，該至少一個微流體裝置經組態以將自細胞精製室輸出之流體分離成第一溶液及第二溶液，該第一溶液具有第一濃度之一或多種相關細胞且該第二溶液具有小於第一溶液濃度之濃度的該一或多種相關細胞。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種實質上隔離之脂肪組織處理系統。系統包括脂肪組織處理室，該脂肪組織處理室包括一個入口、一個出口及至少一個過濾篩網，該至少一個過濾篩網安置於組織處理室之入口與組織處理室之第一出口之間；廢料收集室，該廢料收集室與組織處理室包括於同一外殼中，該廢料收集室包括一個與組織處理室之第一出口流體連通的入口；及以下一者：碎片移除室，該碎片移除室包括碎片移除機構，及樣本收集室，該樣本收集室與組織處理室包括於同一外殼中且與組織處理室之第二出口流體連通。

根據一些實施例，系統進一步包括流體體積量測室，該流體體積量測室與脂肪組織處理室在同一外殼中且包括一個入口及一個與脂肪組織處理室之入口流體連通的出口。

根據一些實施例，流體體積量測室之入口及流體體積量

測室之出口各自包括止回閥。

根據一些實施例，第一出口及第二出口包括與脂肪組織處理室流體連通之活塞的出口。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種自脂肪組織分離細胞之方法。方法包括將待處理樣本經由組織處理室之入口引入組織處理室中、在組織處理室中處理樣本及將細胞自組織處理室經由組織處理室之出口經由樣本儲存室之入口釋放至與組織處理室包括於同一外殼中之樣本儲存室中。

根據一些實施例，方法進一步包括將細胞樣本截留於組織處理室內及將廢液經由包括於組織處理室中之篩網過濾器及組織處理室之第一出口經由廢料收集室之入口轉移至與組織處理室包括於同一外殼中之廢料收集室中。

根據一些實施例，方法進一步包括自組織處理系統提取細胞樣本。

根據一些實施例，方法進一步包括在與樣本儲存室之出口流體連通且包括至少一個經組態以將所提取之細胞樣本分離成第一溶液及第二溶液之微流體裝置的下游處理設備中處理所提取之細胞樣本，該第一溶液具有第一濃度之一或多種相關細胞且該第二溶液具有小於第一溶液濃度之濃度的該一或多種相關細胞。

根據一些實施例，在組織處理室中處理組織樣本包括將組織清潔液引入組織處理室中。

根據一些實施例，在組織處理室中處理組織樣本進一步

包括將組織解離液引入組織處理室中。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種自脂肪組織分離細胞之方法。方法包括將待處理之脂肪抽吸物樣本引入包括篩網之腔室中、自樣本移除過量流體、使解離樣本穿過至少一個篩網以移除脂肪細胞及碎片，及自樣本實質上移除紅血球及使用微流體裝置將樣本濃縮至少三倍。根據一些實施例，方法進一步包括使用洗滌液洗滌樣本。

根據一些實施例，方法進一步包括混合及培育樣本與包含至少一種酶之解離液。

根據一些實施例，微流體裝置包括複數個微流體通道，該複數個微流體通道具有實質上恆定之深度及至少一個小於 750 微米之尺寸，其中至少兩個微流體通道配置於基板之一個表面上。

根據一些實施例，解離液包含膠原酶，且其中在約 20 攝氏度與約 40 攝氏度之間培育樣本及解離液。

根據一些實施例，解離液包含膠原酶及去氧核糖核酸酶，且其中在約 37 攝氏度下培育樣本及解離液。

根據一些實施例，微流體裝置進一步包括柱子，該等柱子經組態以將樣本分離成非脂肪有核細胞部分。

根據一些實施例，微流體裝置經組態以使用洗液來洗滌非脂肪細胞且實質上移除解離液中之酶。

根據本揭示案之一個態樣，提供一種實質上隔離之脂肪組織處理系統。系統包括樣本洗滌及解離室，該樣本洗

滌及解離室包括三個入口、一個第一出口及一個第二出口以及篩網，該篩網安置於三個入口與第一及第二出口之間；塊體減小室，該塊體減小室包括與樣本洗滌及解離室之第一出口流體連接的入口連接器、一個出口及安置於入口連接器與出口之間的篩網；儲集器，該儲集器用於經分離細胞及其他碎片移除，該儲集器具有與塊體減小室之出口流體連通之入口；及廢液收集室，該廢液收集室具有與樣本洗滌及解離室之第二出口流體連通之入口；及微流體裝置。

根據一些實施例，微流體裝置包括複數個微流體通道，該複數個微流體通道具有實質上恆定之深度及至少一個小於 750 微米之尺寸。

根據一些實施例，複數個微流體通道中至少兩者配置於基板之一個表面上。

根據一些實施例，樣本洗滌及解離室、塊體減小室、儲集器及廢液收集室各自包括於同一密封包裝中。

### **【圖式簡單說明】**

隨附圖式不意欲按比例繪製。在圖式中，各個圖中說明之各相同或接近相同之組件係由相同數字表示。為達成清楚之目的，並非在每一圖式中每一組件均可得到標記。除非另外指示，否則應將所有圖式均視為示意性的。在圖式中：

第 1A 圖為根據本揭示案之一個實施例的方法之流程

圖；

第 1B 圖為根據本揭示案之一個實施例的方法之流程

圖；

第 2A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之示意圖；

第 2B 圖為根據本揭示案之一個實施例的流量控制裝

置之示意圖；

第 2C 圖為根據本揭示案之一個實施例的流量控制裝

置之示意圖；

第 2D 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之示意圖；

第 2E 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之示意圖；

第 2F 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之示意圖；

第 2G 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之示意圖；

第 3A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之正視圖；

第 3B 圖為第 3A 圖之樣本處理裝置的等角視圖；

第 3C 圖為第 3A 圖之裝置之腔室之一部分的展開視圖；

第 3D 圖為第 3A 圖之裝置之腔室之一部分的展開視

圖；

第 3E 圖為第 3A 圖之裝置之腔室之一部分的剖面側視

圖；

第 3F 圖為包括視情況選用之夾子的第 3A 圖之樣本處理裝置的正視圖；

第 4 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之正視圖；

第 5A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之腔室的正視圖；

第 5B 圖為第 5A 圖之腔室之一部分的剖面側視圖；

第 6A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之腔室的正視圖；

第 6B 圖為第 6A 圖之腔室的剖面側視圖；

第 7 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之腔室的剖面側視圖；

第 8A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之腔室的正視圖；

第 8B 圖為第 8A 圖之腔室的展開視圖；

第 9A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之腔室的正視圖；

第 9B 圖為第 9A 圖之腔室的展開視圖；

第 10A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之一部分的正視圖；

第 10B 圖為第 10A 圖之樣本處理裝置之部分的展開視圖；

第 11 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝

置之正視圖；

第 12 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之正視圖；

第 13A 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之正視圖；

第 13B 圖為第 13A 圖之裝置之腔室之一部分的剖面視圖；

第 13C 圖為第 13A 圖之裝置之腔室之一部分的剖面視圖；

第 14 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之正視圖；

第 15A 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝置之一部分的說明；

第 15B 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝置之說明；

第 15C 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝置之說明；

第 15D 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝置之說明；

第 15E 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝置之說明；

第 16 圖為根據本揭示案之一個實施例的樣本處理裝置之正視圖；

第 17 圖為本揭示案之一些實施例中包括的微流體裝

置之說明；

第 18A 圖為在本揭示案之一個實施例中處理之流體的相片；且

第 18B 圖為在本揭示案之一個實施例中處理之流體的相片。

### **【實施方式】**

本揭示案不會將其應用限於以下說明書中所述或圖式中所說明之組件的構造及配置細節。該揭示案能夠有其他實施例且能夠實踐或能夠以各種方式進行。又，本文所用之成語及術語係用於描述之目的且不應視作具有限制性。在本文中使用的「包括」、「包含」、「具有」、「含有」、「涉及(involving)」及其變化形式意謂涵蓋其後所列之條目及其等效物以及其他條目。

如本文所用，術語「樣本」、「組織樣本」、「脂肪樣本」及「脂肪組織」可包括脂肪組織樣本，例如脂肪抽取物，且該等術語可互換使用。

如本文所用，術語「微流體裝置」可指具有至少一個流體通道形成於實質上一個表面(其可為實質上平坦或彎曲)上及至少一個小於約 1 mm 之側流槽尺寸的裝置。側流槽尺寸可為例如通道寬度或深度。

已發現需要具有一種自脂肪組織有效分離相關細胞之方法，且具有一種使得自脂肪組織分離細胞輕易及安全之裝置。對於研究及臨床應用，已發現需要多種處理

脂肪組織樣本之動作經合理化以使人類差錯可減到最小。此外，已發現重要的是在實質上「經隔離之」環境中處理脂肪組織樣本，其中提供障壁以隔離脂肪樣本以免直接實體接觸或流體接觸(例如經由未過濾氣流)，使得外部環境及/或操作人員最小化或避免污染及感染風險。亦已發現需要具有一種用於脂肪組織處理之系統及裝置，其中許多組件及隔室整合成一件以向樣本提供實質上經隔離之環境。用於脂肪組織處理之系統及裝置較佳易於使用、易於製造且具有低故障風險。對於許多臨床及研究應用，亦可能較佳的是，與脂肪組織樣本直接接觸之裝置及系統之任何部分均為無菌及拋棄式的。

本揭示案之態樣及實施例提供一種自脂肪組織樣本分離某些組成細胞群體之方法。本揭示案之其他態樣及實施例提供一種以整合、合理化、安全且易於使用之方式實現自脂肪組織樣本分離某些組成細胞群體之方法的裝置。

本揭示案之態樣及實施例提供一種整合裝置，該整合裝置包括多個用於脂肪組織樣本處理之隔室，該隔室可包括(但不限於)經組態及配置用於樣本收集、洗滌、分層、混合、加熱、冷卻、過濾、消化、儲存、流體轉移及操作、細胞標記、樣本處理、解離、廢液收集、塊體移除、碎片移除、細胞濃縮、細胞增濃、細胞分離、細胞培育、生長、培養、分化、擴增等之隔室。本揭示案之實施例的整合裝置亦可包括用於例如控制隔室之間

流體流量之目的之閥調。此等裝置可適用於整合及合理化多種脂肪組織樣本處理動作，例如自脂肪組織分離細胞，且可有助於多種功能，諸如酶促消化、脂肪組織解離、洗滌、廢液收集、碎片移除、細胞濃縮、使用抗體進行標記、使用磁性珠粒進行標記、細胞擴增等。此等裝置可尤其適用於安全性、使用容易性及製造容易性為重要的應用中。本揭示案之一些態樣及實施例包括使用此裝置之方法。

目前揭示之用於自脂肪組織分離細胞之方法的一個實施例包括(但不限於)解離脂肪組織、釋放組成細胞、收集所釋放細胞及移除組織碎片。該方法可在組織解離之前進一步包括脂肪組織清潔動作。脂肪組織清潔動作可包括自脂肪組織樣本移除或排出不期望或過量之流體。此等不期望之流體可包括血液、體液及腫脹性溶液。脂肪組織清潔動作可進一步包括使用沖洗液來沖洗或洗滌脂肪組織。方法可進一步包括一或多種增濃或純化所釋放細胞之動作。另外，方法可進一步包括自處理收集廢液。目前揭示之用於自脂肪組織分離細胞之方法的另一實施例包括(但不限於)自脂肪組織移除過量流體、解離脂肪組織及釋放組成細胞，及移除不期望之細胞及碎片。方法可進一步包括以下一或多者：洗滌脂肪組織樣本、濃縮相關細胞、洗滌相關細胞及使用例如抗體進行免疫分離。在一個實施例中，濃縮及/或洗滌相關細胞可使用至少一個微流體裝置進行。在另一實施例中，一或

多種動作可採用離心。在又一實施例中，一或多種動作可利用中空纖維來進行。

在本揭示案之一個實施例中，提供一種自脂肪組織分離非脂肪細胞群體之方法。方法包括(但不限於)自脂肪組織移除過量流體、用緩衝溶液洗滌脂肪組織、使用例如超音波或含有酶之解離液解離脂肪組織、移除脂肪細胞、游離油、基質纖維及組織碎片、減少紅血球及增濃相關細胞。細胞增濃動作可使用離心機、過濾器或微流體裝置來達成。方法可進一步包括以下一或多者：淋巴細胞減少、細胞洗滌及免疫分離。自脂肪組織移除過量流體、用緩衝溶液洗滌脂肪組織、解離脂肪組織、移除脂肪細胞、游離油、基質纖維及組織碎片及細胞洗滌之動作可使用例如在重力下沈降、離心及/或包括篩網過濾器之濾器來進行。

第 1A 圖中(一般以 100 指示)展示自脂肪組織分離非脂肪細胞群體之方法的一個實施例之流程圖。在抽脂術程序期間，經常將腫脹性流體引入患者中以將失血減到最少，使得組織堅固，且提供局部麻醉。腫脹性溶液可含有 0.05%利多卡因(lidocaine)及 1:1,000,000 濃度之腎上腺素。方法包括自脂肪抽吸物脂肪組織移除過量流體之動作(動作 110)。過量流體可包含血液且經常包含腫脹性流體，其可干擾下游處理動作及相關細胞分離。在一個實施例中，因為脂肪組織之密度低於過量流體，所以可使用重力沈降或離心使移除之過量流體的樣本分層為脂

肪組織層及過量流體層。脂肪組織層及過量流體接著可分離至不同容器中以自過量流體分離脂肪組織。包含例如鹽溶液、乳酸林格氏液(lactated Ringer's solution)、漢克斯平衡鹽溶液(Hanks balanced salt solution)或磷酸鹽緩衝鹽水溶液之洗液可應用於脂肪組織以洗滌組織，且可重複分層處理以較徹底地洗滌脂肪組織及移除過量流體。在另一實施例中，可使用包括篩網之濾器排出過量流體。可將洗液添加至脂肪組織且使用濾器排出以洗滌組織。可重複此洗滌處理。在一些實施例中，濾器可包括孔徑為以下之孔：約 30 微米( $\mu\text{m}$ )至約 1 毫米(mm)，例如約 30  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$ 、約 85  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$ 、約 500  $\mu\text{m}$ 、約 700  $\mu\text{m}$  或約 1mm。在其他實施例中，濾器可包括孔徑為以下之孔：約 70  $\mu\text{m}$  至約 500  $\mu\text{m}$ ，例如約 70  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$  或 500  $\mu\text{m}$ 。更特定言之，濾器可包括孔徑為以下之篩網過濾器：約 70  $\mu\text{m}$  至約 200  $\mu\text{m}$ ，例如約 80  $\mu\text{m}$ 、約 90  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 170  $\mu\text{m}$  或約 200  $\mu\text{m}$ 。在本揭示案之另一實施例中，濾器孔徑小於脂肪組織以便濾器截留該組織。為有效移除過量流體，包括添加洗液及移除洗液之洗滌動作可應用約一次至約十次，例如一次、二次、三次、四次、五次、六次、八次或十次。脂肪樣本體積與各次洗滌所添加之洗液體積之間的比率可在約 1:0.2 與約 1:10 之間，例如為約 1:0.2、約 1:0.3、約 1:0.5、

約 1:0.7、約 1:1、約 1:2、約 1:3、約 1:5 或約 1:10。舉例而言，使用腫脹性抽脂術收集之 100 ml 脂肪抽吸物脂肪組織可與 100 ml 乳酸林格氏液混合且使用具有孔徑為約 140  $\mu$  m 之孔的耐綸篩網排放。此處理可進行三次以完成過量流體移除。在另一實施例中，各洗滌動作包括將體積在 0.6 倍與 4 倍樣本體積之間(例如 0.6、0.8、1、1.2、1.5、1.8、2、2.5、3 或 4 倍樣本體積)的洗液添加至樣本中及自樣本移除該洗液，且洗滌動作進行一次、二次、三次或四次。在另一實施例中，過量流體移除動作可組合使用重力之分層動作，繼之以使用濾器排出。在又一實施例中，可將洗液添加至未處理脂肪組織中且與該未處理脂肪組織混合以稀釋過量流體，繼之以分層或使用篩網濾器排出流體。添加洗液可使得分層或排出較有效。

在本揭示案之另一實施例中，過量流體移除動作可藉由將樣本置於具有出口之容器中及接著不使用濾器來排出過量流體來進行。在一個實施例中，容器可進一步包括用於流體控制之構件，例如夾管閥。為進行過量流體移除，過量流體可經由出口排出，且當樣本接近出口時，可使用流體控制構件關閉出口。出口之尺寸可小於脂肪組織樣本或可具有允許組織樣本穿過之大尺寸。該動作可手動進行或藉助於感測器(例如光學感測器或紅外感測器)進行，該感測器相對於出口來偵測樣本。可將洗液添加至脂肪組織樣本中以洗滌或沖洗該樣本，且可重複過量流體移除動作以清潔脂肪組織樣本。第 1A 圖中

所示之方法之第二動作(動作 120)係用於解離脂肪組織。脂肪組織可使用超音波解離。脂肪組織可使用解離液解離。解離液可包含分解脂肪組織之細胞外基質的酶。解離液可包含膠原酶、蛋白酶 (protease)、蛋白酶 (proteinase)、中性蛋白酶、彈性蛋白酶、玻尿酸酶、脂肪酶、胰蛋白酶、釋放酶、DNase、去氧核糖核酸酶、胃蛋白酶或其混合物。解離液可包含濃度在 0.1 mg/ml 與 10 mg/ml 之間(例如約 0.1 mg/ml、約 0.2 mg/ml、約 0.3 mg/ml、約 0.5 mg/ml、約 0.75 mg/ml、約 1 mg/ml、約 1.2 mg/ml、約 1.5 mg/ml、約 2 mg/ml、約 3 mg/ml、約 4 mg/ml、約 5 mg/ml、約 7 mg/ml 或約 10 mg/ml)的膠原酶。解離液可包含胰蛋白酶。解離液可包含膠原酶且去氧核糖核酸酶。解離液可包含膠原酶、玻尿酸酶及去氧核糖核酸酶。解離液可包含 0.2 mg/ml 與 5 mg/ml 之間的膠原酶、0.1 mg/ml 與 4 mg/ml 之間的玻尿酸酶及 1 單位與 400 單位之間的去氧核糖核酸酶，其中各單位係界定為在 pH 5.0 下在 25 攝氏度下使用 DNA 作為受質，在 4.2 mM 之  $Mg^{++}$  濃度下對 A260 產生每分鐘每毫升 0.001 之變化的酶促活性。解離液可進一步包含鈣離子及/或鎂離子。解離液可包括濃度在 0.1 mM 與 10 mM 之間(例如約 0.1 mM、約 0.2 mM、約 0.3 mM、約 0.5 mM、約 0.7 mM、約 1 mM、約 1.5 mM、約 2 mM、約 3 mM、約 4 mM、約 5 mM、約 6 mM、約 7 mM、約 8 mM 或約 10 mM)的鎂或鈣離子。

在添加解離液之後，可在某一溫度(例如約 37 攝氏

度)下培育脂肪組織某一段時間，例如約 5 分鐘至約 30 小時。在培育期間，脂肪組織與解離液可間歇及/或連續混合以促進有效反應。脂肪組織解離動作或培育動作可在 37 攝氏度下進行約 10 分鐘至約 120 分鐘之間，例如約 10 分鐘、約 15 分鐘、約 20 分鐘、約 30 分鐘、約 45 分鐘、約 60 分鐘、約 75 分鐘、約 90 分鐘或約 120 分鐘，其中在解離液中連續或間歇地溫和攪動脂肪組織樣本，其中攪動比每 3 分鐘更頻繁地發生，例如為每秒、每 2 秒、每 3 秒、每 5 秒、每 10 秒、每 20 秒、每 30 秒、每 45 秒、每 60 秒、每 90 秒、每 120 秒或每 180 秒。

在解離動作結束時，可添加諸如乙二胺四乙酸(EDTA)之金屬離子螯合劑以螯合金屬離子且阻止解離液中之酶活性，且溫度可降低至約 4 攝氏度與 30 攝氏度之間，例如室溫、約 25 攝氏度、約 22 攝氏度、約 18 攝氏度、約 15 攝氏度、約 12 攝氏度、約 8 攝氏度或約 4 攝氏度。培育之後，溫度可保持在約室溫，例如約 25 攝氏度，或在 18 攝氏度與 28 攝氏度之間。在另一實施例中，解離動作之後，可添加血漿、血小板增濃血漿或血清以抑制解離液中之酶。

第 1A 圖之方法的第三動作(動作 130)係用於移除游離油、基質纖維、組織碎片及不期望之細胞，例如脂肪細胞。可使用包括孔徑在約 10  $\mu\text{m}$  與約 70  $\mu\text{m}$  之間(例如約 10  $\mu\text{m}$ 、約 15  $\mu\text{m}$ 、約 20  $\mu\text{m}$ 、約 25  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 35  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 60  $\mu\text{m}$  或約 70  $\mu\text{m}$ )

的孔之篩網濾器來實質上移除脂肪細胞、基質纖維及組織碎片。在另一實施例中，使解離之脂肪組織樣本穿過孔徑在約 20  $\mu\text{m}$  與約 50  $\mu\text{m}$  之間(例如約 20  $\mu\text{m}$ 、約 22  $\mu\text{m}$ 、約 25  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 35  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$  及約 45  $\mu\text{m}$ ，及約 50  $\mu\text{m}$ )的篩網。可收集穿過篩網濾器之濾液。或者，脂肪細胞、基質纖維及組織碎片可使用離心加以實質上移除。

第 1A 圖之方法之第四、第五及第六動作(動作 140、150 及 160)包括分別減少紅血球(RBC)、濃縮相關細胞及洗滌細胞。此三個動作之順序可互換。舉例而言，在一個實施例中，細胞可首先經濃縮、洗滌，接著 RBC 減少。在另一實施例中，細胞可在其經濃縮之前首先經洗滌。在又一實施例中，細胞可同時經洗滌及濃縮。濃縮動作宜可在需要較小體積之應用中進行。舉例而言，在研究中經常進行培養自脂肪組織分離之細胞。為在細胞培養燒瓶中獲得較高種細胞密度且為提高培養效率，可濃縮細胞。經分離細胞亦可用於移植或注射至人類或動物體內，其中經常需要高細胞濃度以得到較佳結果。細胞濃縮亦可具有以下優勢：實質上移除先前動作中所用之試劑，例如解離液中之酶，其當移植至動物或人類患者體內時可抑制細胞生長或引起有害作用。在一個實施例中，微流體裝置可用以濃縮相關細胞及/或移除紅血球。微流體裝置可經組態以同時達成第四、第五及/或第六動作。此外，微流體裝置可經組態以移除淋巴細胞以減少免疫

反應可能。在另一實施例中，濃縮動作可使用離心來達成。在又一實施例中，濃縮動作可使用膜過濾器來達成。在又一實施例中，濃縮動作可使用中空纖維(例如中空纖維膜過濾器)來達成。在又一實施例中，紅血球減少動作可使用紅血球經選擇性溶解之紅血球溶解溶液(例如氯化銨)來達成。

第 1A 圖中所示之實施例的第六動作(動作 160)係用於洗滌相關細胞及/或將相關細胞轉移至所需緩衝液中。可採用離心、緩衝液交換及/或透析方法。或者，微流體裝置亦可經組態以進行此動作。此動作進一步減少殘留的先前動作中所用之試劑，且當相關細胞用於臨床移植中時可能需要此動作。在一些實施例中，然而，可省略動作 140-160。

在本揭示案之一個實施例中，方法包括預調節脂肪組織、解離脂肪組織及精製所釋放細胞。第 1B 圖中(一般以 200 指示)展示此方法之此實施例的流程圖。在一個實施例中，該脂肪組織預調節動作(動作 210)包括排放廢液、移除廢液、移除過量流體、沖洗脂肪組織樣本、洗滌脂肪組織樣本及/或打碎脂肪組織樣本。當脂肪組織樣本包含難以用酶消化或解離之大塊時，打碎可能有利。脂肪組織預調節動作可使用本揭示案中揭示之自脂肪組織分離非脂肪細胞群體之態樣及實施例來達成。舉例而言，脂肪組織預調節動作可包括將脂肪組織樣本截留於第一容器中，同時使過量流體(諸如血液、腫脹性溶液或

其他體液)通入第二容器中。截留脂肪組織樣本可使用第一容器中之篩網來達成。在一個實施例中，篩網孔徑係在約 70  $\mu\text{m}$  與約 300  $\mu\text{m}$  之間，例如為約 80  $\mu\text{m}$ 、約 90  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 170  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$  或約 300  $\mu\text{m}$ 。或者，截留脂肪組織樣本可使用偵測脂肪組織樣本相對於第一容器之位置的偵測器或感測器而未在第一容器中使用篩網來達成。脂肪組織預調節動作可進一步包括一次性或重複添加及移除沖洗液以洗滌脂肪組織樣本。組織預調節亦可使用離心來達成，其中在離心力下自過量流體及/或廢液分離脂肪組織樣本。或者，若脂肪組織處於可為解離及精製接受之情況下，則可省略脂肪組織預調節動作。

在一個實施例中，脂肪組織解離動作(動作 220)包括在包含至少一種酶之解離液中在適用於酶消化之溫度下(例如在約 32 攝氏度與約 38 攝氏度之間)培育脂肪組織樣本持續約 3 分鐘與 20 小時之間的持續時間，該至少一種酶例如為膠原酶、蛋白酶、蛋白酶、中性蛋白酶、彈性蛋白酶、玻尿酸酶、脂肪酶、胰蛋白酶、木瓜酶、釋放酶、DNase、去氧核糖核酸酶、胃蛋白酶或其組合。在另一實施例中，脂肪組織解離動作包括使超音波穿過脂肪組織樣本。在脂肪組織解離動作期間自脂肪組織樣本釋放細胞。

精製所釋放細胞(動作 230)可包括細胞濃縮、細胞洗滌、細胞分離(cell separation)、細胞分離(cell isolation)、

碎片移除、非目標細胞移除、紅血球減少或其動作組合，其係使用過濾器、篩網、中空纖維、抗體、微流體裝置或離心機來達成。對於許多應用，諸如護理應用及田間應用點，可能需要在短時段(例如 15 分鐘、20 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、60 分鐘、90 分鐘或 120 分鐘)內進行本揭示案中之整個方法。

本文揭示之自脂肪組織分離非脂肪細胞群體之許多動作及實施例亦可用於研究學習及藥理學測試系統中。可進行非脂肪細胞之分離以用於生理學、代謝及功能研究或用於藥理學測試系統中之藥物測試。本文揭示之許多動作及實施例亦可用於移植之組織工程改造中。可活體外培養使用本文揭示之方法及/或裝置獲得的細胞以形成用於移植之活體外培養之組織。可分離脂肪源性幹細胞以產生功能性細胞及組織。

本揭示案之一個實施例為第 2A 圖中示意性展示之樣本處理裝置且一般以 300 指示。樣本處理裝置 300 包括樣本調節室 310 及廢料室 320。樣本調節室 310 包括用於接受樣本 340 (例如脂肪抽吸物或來自抽脂術之脂肪組織樣本)之第一入口 305、用於自沖洗液來源 350 接收沖洗液(例如緩衝溶液、鹽水溶液等)之第二入口 315、用於在樣本 360 經調節之後收集樣本 360 之第一出口 325，及連接於廢料容器 320 之第二出口 335。第二出口 335 可包括打開及關閉調節室 310 與廢料容器 320 之間的流體連接之構件 345，例如為閥門、夾管閥、活塞等。樣本調節

室 310 使樣本將其過量流體排至廢料容器中且使用沖洗液洗滌。調節室可進一步包括感測器(較佳接近第二出口 335)，以偵測當過量流體或沖洗液排至廢料容器中時樣本是否接近出口。調節室可進一步包括置於第一入口 305 與第二出口 335 之間的濾器，其經組態以在樣本洗滌、樣本沖洗及移除過量流體期間截留脂肪組織。在一些實施例中，濾器可包括過濾器，該過濾器包括孔徑在約 30  $\mu\text{m}$  與約 1 mm 之間(例如約 30  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$ 、約 85  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$ 、約 500  $\mu\text{m}$ 、約 700  $\mu\text{m}$  或約 1 mm) 之孔。在其他實施例中，濾器可包括孔徑為約 70  $\mu\text{m}$  至約 500  $\mu\text{m}$ ，例如為約 70  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$  或 500  $\mu\text{m}$  之孔。濾器可包括孔徑為約 70  $\mu\text{m}$  至約 200  $\mu\text{m}$ ，例如為約 80  $\mu\text{m}$ 、約 90  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 170  $\mu\text{m}$  或約 200  $\mu\text{m}$  之篩網過濾器。在另一實施例中，濾器孔徑小於脂肪組織片以便濾器截留該等組織片。

沖洗液可經由控制添加至調節室中之沖洗液之體積的流量控制裝置 330 (例如蠕動泵)進入調節室中。流量控制裝置可包括至少一個閥門及變化體積容器。舉例而言，如第 2B 圖中示意性展示，流量控制裝置可包括活塞 370 及注射器 380。為分配所量測體積，首先將活塞轉至入口流體式連接至注射器之位置。拉動注射器活塞以將流體自入口抽至注射器中。接著將活塞轉至出口流體式

連接至注射器之位置。接著，推動注射器活塞以將流體經由出口自注射器分配出。最終，又將活塞轉至使注射器流體式連接至入口，以完成一個抽吸週期。可重複抽吸週期直至所需體積之沖洗液添加至調節室中為止。如第 2C 圖中示意性展示，流量控制裝置亦可包括兩個止回閥 CV1、CV2 (亦即使流體在一個方向中流動之閥門)及注射器。為分配所量測體積，首先拉動注射器活塞，接著推動以完成一個抽吸週期。第一止回閥(CV1)經組態以使流體自入口流至注射器，且第二止回閥(CV2)經組態以使流體自注射器流至出口。可重複包括拉動及推動活塞以分別將流體抽入注射器及將流體推出注射器中之抽吸週期直至所需體積之沖洗液添加至調節室中為止。或者，第 2B 圖或第 2C 圖中描繪之流量控制裝置中之注射器可用可充氣及放氣之袋子或體積可以控制方式變化之容器替代。

本揭示案之另一實施例為第 2D 圖中示意性展示之樣本處理裝置且一般以 400 指示。樣本處理裝置 400 包括樣本解離室 410 及細胞精製裝置 420。解離室包括接收樣本之第一入口 405、自解離液來源 430 接收解離液之第二入口 415，及至少一個流體式連接至細胞精製裝置之出口 425。解離室經組態以將樣本解離成較小組成，例如單個細胞及小細胞塊。解離液可包含分解樣本之酶。舉例而言，解離液可包含膠原酶、蛋白酶、蛋白酶、中性蛋白酶、彈性蛋白酶、玻尿酸酶、脂肪酶、胰蛋白酶、釋

放酶、DNase、去氧核糖核酸酶、胃蛋白酶或其混合物。可將溫度控制在例如約 37 攝氏度下，且解離室中之樣本與流體可混合以有助於有效酶促反應及均勻解離。解離室之一個實施例為可撓袋子。該袋子可經反復按摩、擠壓、輾滾、搖動、震盪、部分擠壓及釋放，或以其他方式攪動以有助於混合。解離液亦可包含清潔劑，諸如 Tween 20 或十二烷基硫酸鈉。當使用超音波以解離樣本時，解離液可包含有效傳導超音波之介質。解離室可包括濾器，例如篩網或過濾器。濾器可用以將樣本保持在有效解離之位置，及/或自解離樣本移除大碎片。在一些實施例中，濾器可包括過濾器，該過濾器包括孔徑為以下之孔：約 30  $\mu\text{m}$  至約 1 mm，例如約 30  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$ 、約 85  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$ 、約 500  $\mu\text{m}$ 、約 700  $\mu\text{m}$  或約 1 mm。在其他實施例中，濾器可包括孔徑為以下之孔：約 70  $\mu\text{m}$  至約 500  $\mu\text{m}$ ，例如為約 70  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$  或 500  $\mu\text{m}$ 。濾器可包括孔徑為以下之篩網過濾器：約 70  $\mu\text{m}$  至約 200  $\mu\text{m}$ ，例如約 80  $\mu\text{m}$ 、約 90  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 170  $\mu\text{m}$  或約 200  $\mu\text{m}$ 。在另一實施例中，濾器孔徑小於脂肪組織片以便濾器截留該組織。

細胞精製裝置連接至解離室。在一些實施例中，樣本處理裝置進一步在解離室與細胞精製裝置之間包括閥門 435。閥門可關閉以允許培育樣本與解離液，且打開以

允許所釋放細胞進入細胞精製裝置中。

細胞精製裝置經組態以自解離室接收所釋放細胞且精製所釋放細胞。在一些實施例中，細胞精製裝置包括經由入口 445 流體式連接至解離室之腔室、用於收集精製細胞 440 之出口 455，及經組態以移除解離樣本中大碎片之濾器。濾器可包括孔徑為以下之過濾器：在約 10  $\mu\text{m}$  與約 100  $\mu\text{m}$  之間，例如為約 10  $\mu\text{m}$ 、約 15  $\mu\text{m}$ 、約 20  $\mu\text{m}$ 、約 25  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 35  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$  或約 100  $\mu\text{m}$ 。濾器亦可包括孔徑為以下之篩網：在約 20  $\mu\text{m}$  與約 60  $\mu\text{m}$  之間，例如為約 20  $\mu\text{m}$ 、約 22  $\mu\text{m}$ 、約 25  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 35  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$  及約 60  $\mu\text{m}$ 。

本揭示案之另一實施例為第 2E 圖中示意性展示之樣本處理裝置且一般以 500 指示。樣本處理裝置 500 包括第一腔室 510、廢料容器 520 及細胞精製裝置 530。細胞精製裝置可包括如上揭示之篩網。第一腔室可充當預調節室，其中可在解離之前洗滌樣本，及解離室，其中樣本可解離成較小組成，例如單個細胞或細胞之小聚集體。第一腔室包括用於接收樣本之第一入口 505 及用於自沖洗液來源 350 接收沖洗液之第二入口 515。在一些實施例中，沖洗液及解離液可經由同一入口進入第一腔室。在其他實施例中，第一腔室包括用於自解離液來源 430 接收解離液之第三入口 525。第一腔室可進一步包括濾器，例如篩網或過濾器，如上文關於解離室及調節室所

述。第一腔室流體式連接至廢料室及細胞精製裝置。可包括例如夾管閥或夾閥之閥門 V1 及 V2 可用以控制流體流量。舉例而言，在樣本預調節期間，可打開閥門 V1 以使過量流體及沖洗液能夠自第一腔室流入廢料容器中。V1 與 V2 均可關閉以允許在樣本解離期間培育樣本與解離液。解離之後，可打開 V2 以使解離樣本轉移至細胞精製裝置。

在本揭示案之一些實施例中，將脂肪組織樣本預溫熱至某一溫度，例如 37 攝氏度，隨後加載至第一腔室 510 中。當處理脂肪組織樣本時預溫熱可縮短處理組織樣本所需之時間。在本揭示案之其他實施例中，使用平均波長在 300 nm 與 700 nm 之間的光將脂肪組織樣本光活化，隨後加載至第一腔室 510 中。光活化可提高組織樣本中細胞之效能。在本揭示案之又一實施例中，使用聲波(亦即放鬆組織使組織樣本變得較易於解離之聲波)處理脂肪組織樣本，隨後加載至第一腔室 510 中。

樣本處理裝置可進一步包括如上所述用於控制進入第一腔室之沖洗液流量的流量控制裝置 330。可類似於流量控制裝置 330 之流量控制裝置 330B 亦可用以控制注入第一腔室中之解離液之流量。在一些實施例中，將解離液加載於注射器中，隨後注入第一腔室中。

應瞭解，本文揭示之樣本處理裝置可具有不同變化形式及組合。舉例而言，如第 2F 圖中所示，一般以 500A 指示之樣本處理裝置之實施例可採用兩個閥門(V1、V2)

以控制第一腔室、廢料容器及細胞精製裝置之間的流體流量。流量控制裝置可包括兩個止回閥(CV1、CV2)及體積量測裝置 540，例如注射器。解離液可經由止回閥 CV3 連接至第一腔室。

第 2G 圖中(一般以 500B 指示)示意性展示本揭示案之樣本處理裝置之另一實施例，其中使用至少 3 個活塞(SC1、SC2、SC3)以控制流體流量。舉例而言，在樣本預調節期間，過量流體及沖洗液可自第一腔室轉移至廢料容器中。活塞(SC3)可切斷離開第一腔室之流以允許在樣本解離期間培育樣本與解離液。在解離之後，活塞(SC3)可使第一腔室連接至細胞精製裝置以使解離樣本轉移至細胞精製裝置。

第 3A 圖展示第 2E 圖中示意性展示之裝置的實施例。裝置包括兩個塑膠片接合在一起以形成複數個腔室。裝置可以合理化、易於使用、安全且成本有效之方式有助於本文揭示之脂肪組織處理方法。腔室 1 為量測室，其可經充氣至某一體積。該腔室包括入口(口 1)及出口(口 2)。腔室 1 可設計來吸收流體且分配某一預定體積之流體，藉此控制待經由入口(口 3)分配至腔室 2 中之流體體積以便脂肪組織處理。口 2 與口 3 可經由一個管件流體式連接，使用夾管閥、夾閥、活塞、止回閥或其他閥調機構可使該管件經夾止以將口 2 與口 3 流體式切斷。為操作腔室 1，最初關掉口 2 與口 3 之間的連接。經由口 1 將流體引入腔室 1 中以對腔室進行完全或部分充氣。接

著使用例如彈簧夾、夾管閥、活塞、止回閥或其他閥調機構來切斷口 1。接著，打開口 2 與口 3 之間的閥門以使當腔室 1 放氣時腔室 1 中之流體流入腔室 2 中。腔室 1 放氣可藉由使用重力、藉由虹吸或藉由此項技術中已知之其他方法外部擠壓及/或壓縮該腔室來實現。腔室 1 之位置可高於腔室 2 以有助於使用重力使流體分配至腔室 2 中。此處理將預測定量之流體轉移至腔室 2 中，該量藉由腔室 1 之充氣體積與放氣體積之間的差測定。若需要較小體積之流體，則腔室 1 可經部分壓縮、擠壓及/或夾止以控制進入及/或離開腔室 1 之流體的體積。或者，腔室 1 可僅部分放氣以分配其中流體之一部分。若需要較大體積，則可重複充氣-放氣過程數次直至所需體積之流體轉移至腔室 2 中為止。

腔室 1、口 1 及口 2 可為第 2B 圖或第 2C 圖中示意性展示之流量控制裝置的實施例。

口 1 及口 2 可包括亦稱作單向閥之止回閥，其僅使流體分別進入及離開腔室 1。量測及分配設定體積之流體的動作變得極簡單：使腔室 1 減壓以使流體經由口 1 進入及壓縮腔室 1 以經由口 2 推出流體。

或者，腔室 1 可為儲存室，其提供樣本處理所需之預包裝溶液。舉例而言，乳酸林格氏液、平衡鹽溶液、鹽水溶液、解離液、洗液、沖洗液、含有乙二胺四乙酸 (EDTA) 之溶液及/或酶溶液可包裝於作為裝置之部分的腔室 1 中。

在另一實施例中，量測室可包括注射器，該注射器包括活塞，該活塞可藉由拉動及推動活塞來抽取及/或分配預定體積之流體。在又一實施例中，量測室可包括安裝於蠕動泵上之可撓管，其中使用蠕動泵來控制流體流量。

腔室 2 可為第 2E 圖中示意性展示之第一腔室 510 的實施例。腔室 2 可為脂肪組織洗滌室，其包括一或多個入口及出口。腔室 2 亦可充當解離室，且可進一步包括至少一個篩網，例如包括篩、半透膜及/或多孔或微孔膜之過濾器機構。可經由入口(口 4)將例如脂肪抽吸物或脂肪性脂肪抽吸物組織片之脂肪組織樣本引入或加載至腔室 2 中。樣本之過量流體可通過篩網經由連接器 1 排至廢料收集室(腔室 3)中。可將洗液添加至腔室 2 中以洗滌及/或沖洗樣本。可經由腔室 1 將洗液量測及分配至腔室 2 中。可添加處理樣本之溶液以改變樣本。混合構件可應用於腔室 2 以使沖洗及洗滌更有效。舉例而言，腔室 2 可經反復按摩、溫和擠壓、搖動、震盪、部分擠壓及釋放，或以其他方式攪動以有助於混合。接著可使廢液排至廢料收集室(腔室 3)中。在混合期間可使用閥調構件關閉腔室 2 (連接器 1 及 2)之出口以使在洗液與樣本之間充分混合，隨後排出廢液。可應用如第 3F 圖所說明之夾子(例如夾子 1、夾子 2 及/或夾子 3)以掐住腔室且關閉腔室之間的流體連接。洗滌過程可重複數次，例如 2、3、4 或 5 次。在洗滌動作期間，脂肪組織樣本可截留於腔

室 2 中。對於包含小塊之脂肪組織樣本，腔室 2 可包括篩網或膜過濾器以有效截留樣本。可並有多個篩網及/或過濾層(篩網 1 及篩網 2)以提供所需脂肪組織截留。

洗滌之後，可將解離液添加至腔室 2 中以解離脂肪組織樣本且釋放細胞。腔室溫度可使用加熱、冷卻及/或溫度控制系統而設為某一最佳化溫度以有助於樣本解離。舉例而言，裝置可置於培育箱、水浴中及/或與恆定溫度板接觸以將溫度保持在約 37 攝氏度下以便最佳酶消化。解離液可包含一或多種酶以分解結締基質、細胞外基質等。舉例而言，膠原酶可在 37 攝氏度下使用以分解膠原蛋白纖維。其他試劑(包括蛋白酶、蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶 K、解離酶、酶、溶解溶液、玻尿酸酶、脂肪酶、胰蛋白酶、釋放酶、DNase、去氧核糖核酸酶、胃蛋白酶或其混合物)亦可用於脂肪組織消化。在消化期間，可關閉解離室(腔室 2)之出口(連接器 1 及/或連接器 2)。腔室 2 可經反復按摩、溫和擠壓、搖動、震盪、部分擠壓及釋放，或以其他方式攪動以有助於混合且促進有效脂肪組織解離。當消化動作完成時，可打開連接器 2 以使所釋放細胞離開解離室。腔室 2 中之至少一個篩網可用以移除或截留大片碎片。可應用一或多次包括添加洗液之追加洗滌動作以沖洗掉在消化後可能在腔室 2 中捕獲之細胞。

第 3A 圖中所示之樣本處理裝置可進一步包括碎片移除室(腔室 4)，其可包括篩網、膜過濾器及/或另一碎

片移除機構(例如篩網 3)。可將解離樣本轉移至碎片移除室，其中可自樣本移除大塊、不需要的細胞(諸如脂肪細胞)及/或碎片。腔室 4 亦可充當樣本儲存室，其中容納所釋放細胞直至進一步使用為止。所釋放細胞可經由口 5 收集。腔室 4 可為第 2E 圖中示意性展示之細胞精製裝置 530 的實施例。

第 3B 圖及第 3C 圖展示將篩網併入腔室 4 中之實施例。篩網可折迭、夾在兩個可撓片之間，且經焊接、膠接、熱密封或以其他方式融合在一起以形成腔室 4。類似地，可將篩網或膜過濾器併入腔室 2 中。第 3D 圖及第 3E 圖分別包括展示一或多個篩網可用於腔室 2 中之腔室 2 之一部分的展開視圖及剖面視圖。腔室 2 及/或腔室 4 中包括之篩網可包括沿流體通過腔室 2 及/或 4 之流動路程漸進式變小之孔。舉例而言，篩網 1 (第 3D 圖)之標稱孔徑可為約 100  $\mu\text{m}$  至約 900  $\mu\text{m}$ ，篩網 2 之標稱孔徑可為約 50  $\mu\text{m}$  至約 200  $\mu\text{m}$ ，且篩網 3 (第 3C 圖)之標稱孔徑可為約 10  $\mu\text{m}$  至約 60  $\mu\text{m}$ 。

應瞭解，本揭示案不限於第 3A-3F 圖中所示之實施例的特定組態。本揭示案之實施例可包括比第 3A-3F 圖中所示之腔室更多或更少的腔室。具有各種功能之腔室可用以及組態以達成包括特定動作順序之特定任務。舉例而言，腔室可具有包括(但不限於)以下之功能：樣本收集、洗滌、沖洗、分層、混合、加熱、冷卻、過濾、消化、儲存、閥調、體積量測、抽吸、流體轉移及操作、

細胞標記、樣本處理、解離、廢液收集、塊移除、碎片移除、溶解、濃縮、聚合酶鏈反應(PCR)、培育、雜交、細胞培養、細胞擴增等。

使用兩個塑膠片形成本揭示案之樣本處理裝置之另一實施例(一般以第 4 圖中之 600 說明)。腔室 1 為樣本洗滌及解離室,其包括三個入口(口 1、口 2 及口 3)、篩網(篩網 1),及兩個出口連接器(連接器 1 及連接器 2)。腔室 2 為塊體減小室,其包括入口連接器(連接器 2)、出口/入口連接器(連接器 3)及篩網(篩網 2)。視情況包括篩網(篩網 3)之腔室 3 可為用於經分離細胞及其他碎片移除之儲集器,或細胞精製室。腔室 4 為廢液收集室,其包括與樣本洗滌及解離室(腔室 1)之出口連接器流體連通的入口管(連接器 1)。

第 5A 圖及第 5B 圖展示本揭示案之腔室 610 之另一實施例,其包括兩個篩網。兩個篩網經組態以不會實質上重迭。各篩網係經折迭及夾在兩個可撓性外部片之間。因為僅雙層篩網必須在該等片之間融合,所以此實施例可具有較易製造之優勢。

第 6A 圖及第 6B 圖展示本揭示案之腔室 620 之又一實施例,其包括至少一個展開篩網夾在兩個可撓性外部片之間。篩網位於入口與出口之間,且經組態以使自入口進入之流體必須穿過篩網以達出口。入口及出口係在篩網之對側。因為僅一層篩網必須在兩片之間密封,所以此組態可具有易於製造之優勢。

第 7 圖展示本揭示案之腔室 630 之又一實施例，其包括夾在兩個可撓性外部片之間的褶迭篩網。此組態可具有增大篩網面積之優勢。

第 8A 圖及第 8B 圖展示本揭示案之腔室 640 的又一實施例，其中篩網沿密封邊折迭及密封以形成小袋，隨後併入腔室中。可使用例如熱封或高頻焊接使一片塑膠篩網(例如聚醯胺篩網)沿折迭線折迭且沿兩條密封線密封以形成篩網小袋。篩網小袋接著可位於兩個可撓性塑膠片(例如聚氯乙烯(PVC)片)中間，且使用例如熱封或高頻焊接沿密封邊密封以形成腔室。

第 9A 圖及第 9B 圖展示本揭示案之腔室 650 的又一實施例，其中篩網經折迭、夾在兩個可撓性塑膠片之間且密封於腔室中。在本文中，腔室及篩網經組態以使經由入口進入腔室之樣本可經由出口 1 離開而未穿過篩網，而經由出口 2 離開之樣本的部分必須穿過篩網。篩網之折迭線為約垂直的。在另一實施例中，折迭線相對於垂直線可成一個角度。

第 5A 至 9B 圖中說明之任何一或多種篩網組態均可用於任一本文揭示之樣本處理裝置之任一腔室中，例如用於樣本處理裝置 500 之腔室 2 或腔室 4 之一或多者中及/或樣本處理裝置 600 之腔室 1、腔室 2 及/或腔室 3 之一或多者中。

第 10A 圖及第 10B 圖展示兩個腔室之間的連接器，其包括至少一個管區段，該區段其可包括於本文揭示之

樣本處理裝置之任一實施例中。塑膠片經切割且自一個腔室至另一腔室之管橋橫穿該切割。此組態可使閥調構件進接該管。舉例而言，可採用彈簧夾或滑塊夾以打開或關閉通過該管之流體連接。管區段可進一步包括軟且可撓之段(第 10A 圖及第 10B 圖中之管 2)以有助於可靠之掐緊。當使用夾管閥時，此可為有利的。夾管閥可手動、氣動或用螺線管致動。可撓管必要時亦可有助於蠕動泵。

本文揭示之樣本處理裝置之實施例可進一步包括其他零件，諸如第 11 圖中說明之零件(例如可插入洗液袋中之刺針、一或多個彈簧夾、Y 插入位點、刺針口及/或用於連接至注射器之魯爾連接器)，及/或可連接至作為較大系統之整體部分的其他模組。可採用隔片、注射口、刺針口、閥門、止回閥、管、配接器、魯爾、母魯爾鎖、公魯爾鎖、注射器、活塞及/或其他連接機構以使本揭示案之實施例之部分與其他零件互連。

本揭示案之另一實施例為一種樣本製備裝置，其包括樣本解離室(腔室 1)、廢料容器(腔室 2)及細胞精製室(腔室 3)，其一般以第 12 圖中之 700 所說明。腔室 1 可視情況包括第一濾網以有助於樣本洗滌、沖洗及預調節。篩網包括孔徑在約 20  $\mu\text{m}$  與約 600  $\mu\text{m}$  之間的孔。為處理脂肪抽吸物樣本，篩網之孔徑較佳可在約 40  $\mu\text{m}$  與約 200  $\mu\text{m}$  之間，例如為約 40  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 60  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$ 、約 80  $\mu\text{m}$ 、約 90  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 120  $\mu\text{m}$ 、約 140  $\mu\text{m}$ 、約 170  $\mu\text{m}$  或約 200  $\mu\text{m}$ 。活塞控制口 5 之流

體連接，其可在樣本解離及培育期間關閉，其可在樣本洗滌期間經由口 7 連接至腔室 2，且其可經由口 6 連接至腔室 3 以便收集所釋放之細胞。腔室 3 可包括孔徑在約 15  $\mu\text{m}$  與約 150  $\mu\text{m}$  之間的第二濾網。第二篩網自解離樣本移除碎片且精製所釋放細胞，其可在口 8 收集。裝置可進一步包括接收樣本之開口，例如口 4，其可包括刺針口；接收沖洗液之入口，例如口 1，其可包括刺針；及至少一個接收解離液之入口，例如口 2。

本揭示案之又一實施例為一種樣本製備裝置，其包括兩片以預定模式結合在一起以形成樣本解離室(腔室 1)、廢料容器(腔室 2)及細胞精製室(腔室 3)之可撓材料，例如塑膠，其一般以第 13 圖中之 800 說明。腔室 1 可包括第一篩網(篩網 1)以有助於樣本洗滌、沖洗及預調節。腔室 3 可包括孔徑小於第一篩網之孔徑的第二篩網(篩網 2)。活塞 1 控制腔室 1、腔室 2 及腔室 3 之間的流體連接。腔室 1 包括入口(口 1)，該入口包括可有助於自注射器(例如具有導管尖之注射器)接收樣本之連接器。腔室 1 進一步包括連接至包括活塞 2 及活塞 3 之活塞歧管的另一口(口 2)。沖洗液(例如乳酸林格氏注射液)可經由刺針連接至樣本製備裝置。注射器 1 與活塞 2 在一起可充當流量控制裝置，其使規定量之沖洗液添加至腔室 1 中。可將解離液加載至注射器 2 中且經由活塞 3 添加至樣本製備裝置中。可以濃縮形式將解離液加載至注射器 2 中，且使用沖洗液再構成為正常工作濃度。腔室 3 包括出口，

其中可收集所釋放之細胞。在一些實施例中，需要增大出口處壓力。腔室 3 可以氣密方式封閉於加壓室(腔室 4) 中。腔室 4 包括壓力口，其中可施加加壓流體(例如壓縮空氣)以經由腔室 3 之可撓片對腔室 3 中之流體間接加壓。第 13B 圖說明腔室 3 之實施例且第 13C 圖展示包括腔室 4 之加壓室的實施例。腔室 3 系藉由將兩個可撓片在預定位置結合在一起來形成(第 13B 圖)。在該等片中產生切口(切口 1)以使另一片封閉腔室 3 且形成腔室 4。

本揭示案之另一實施例包括下游處理單元(第 14 圖中所說明之 DPU 1000)，其可進一步處理、精製、培養、擴增及/或分析所處理之脂肪組織及/或經分離細胞。下游處理單元可經組態以有助於例如以下一或多種功能：樣本洗滌、樣本濃縮、樣本分離、樣本增濃、樣本分離、緩衝液交換、樣本標記、樣本改變、過濾、磁性標記、磁性分離、聚合酶鏈反應(PCR)、抗體相互作用、使用抗體之親和力捕獲、細胞成像、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、蛋白質製備、蛋白質純化、蛋白質增濃、質譜分析、高效液相層析、流動式細胞測量術、細胞分選、功能分析、細胞培養、細胞擴增、細胞分化、免疫分型、橫流分析、螢光原位雜交、去氧核糖核酸(DNA)雜交、核糖核酸(RNA)雜交、去氧核糖核酸(DNA)反應、核糖核酸(RNA)反應等。

下游處理單元可包括微流體單元，該微流體單元包括至少一個微流體裝置。微流體裝置可包括至少一個小於約 1 mm (例如約 0.95 mm、約 800  $\mu$ m、約 600  $\mu$ m、

約 500  $\mu\text{m}$ 、約 400  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 150  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 80  $\mu\text{m}$ 、約 60  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 20  $\mu\text{m}$  及/或約 15  $\mu\text{m}$ )之通道尺寸。微流體裝置亦可包括具有至少一個實質上恆定深度之通道。舉例而言，微流體裝置可包括深度為以下之通道：約 1 mm、約 800  $\mu\text{m}$ 、約 600  $\mu\text{m}$ 、約 500  $\mu\text{m}$ 、約 400  $\mu\text{m}$ 、約 300  $\mu\text{m}$ 、約 200  $\mu\text{m}$ 、約 150  $\mu\text{m}$ 、約 100  $\mu\text{m}$ 、約 80  $\mu\text{m}$ 、約 60  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 30  $\mu\text{m}$ 、約 20  $\mu\text{m}$  或約 15  $\mu\text{m}$ 。微流體裝置之通道深度可在標稱通道深度之 20%內。微流體裝置可進一步包括實質上在一個表面上之通道，其可實質上為平坦或彎曲的。微流體裝置亦可包括通在一或多個實質上平坦表面上形成之通道。

微流體裝置可使用以下來形成：微製造、奈米製造及/或微機械加工技術，其包括(但不限於)光微影術、蝕刻、反應性離子蝕刻、深反應性離子蝕刻、濕式蝕刻、壓印、射出成形、壓紋、軟壓紋、立體微影術、成形、軟微影術、陽極結合、超音波結合、自組裝及/或此項技術中已知之其他製造技術。

本揭示案之微流體單元的實施例可包括以下中所揭示之裝置：國際申請案 PCT/US10/061866、國際公開案 WO 2011/079217 A1、美國專利第 US 7,150,812 B2 號、美國專利第 US 7,735,652 號、美國專利第 US 8,021,614 號、美國專利第 US 8,186,913 B2 號、美國專利申請公開案第

US 2012/0063664 A1 號、美國專利申請公開案第 US 2011/0294187 A1 號，該等案係以全文引用的方式併入本文中以用於所有目的，採用以下之裝置：迪安流(Dean flow)、慣性力、離心力、確定性橫向位移、柱子陣列、柱陣列、掐緊流(pinch flow)、磁性結構、抗體組分、細胞捕獲部分、蛋白質捕獲部分、去氧核糖核酸(DNA)部分、核糖核酸(RNA)部分、過濾、切向流過濾、超音波聚焦、掐緊流等。

值得注意的是，本揭示案之一些實施例，特定言之並有國際公開案 WO 2011/079217 A1 中揭示之微流體裝置的實施例提供對嚴重阻塞及積垢具有抗性之裝置，阻塞及積垢到目前為止已為阻礙將微流體裝置用於經消化脂肪組織之切向流過濾的嚴重問題。

本揭示案之另一實施例包括濃縮及/或洗滌經分離細胞之中空纖維單元。

在包括微流體裝置之下游處理單元的另一實施例中，微流體裝置洗滌細胞且移除不期望之試劑。下游處理單元可包括緩衝溶液入口以引入緩衝溶液以洗滌細胞。細胞洗滌亦可使用設計來進行透析之微流體裝置來達成。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括微流體裝置，該微流體裝置將下游處理單元之輸出中之酶濃度降低至小於約 1/10，舉例而言，酶濃度降低至約 1/10、約 1/20、約 1/30、約 1/40、約 1/50、約 1/70、約 1/100、

約 1/150、約 1/200、約 1/400、約 1/500、約 1/750、約 1/1,000、約 1/2,000、約 1/5,000、約 1/10,000、約 1/20,000、約 1/50,000、約 1/100,000、約 1/200,000、約 1/500,000 或約 1/1,000,000。國際公開案 WO 2011/079217 A1 揭示可達成此酶移除之微流體裝置的一個實施例，其中微流體裝置包括柱子且採用至少一個緩衝液流(例如沖洗液流)以洗滌細胞。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括微流體裝置，該微流體裝置移除大於 89%在樣本解離期間引入之酶，例如移除約 90%、約 95%、約 97%、約 98%、約 99%、約 99.5%、約 99.8%、約 99.9%、約 99.95%、約 99.98%、約 99.99%、約 99.995%、約 99.998%、約 99.999%、約 99.9995%或約 99.9999%在樣本解離期間引入之酶。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括移除約 100%在樣本解離期間引入之酶的微流體裝置。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括提供具有以下膠原酶濃度之輸出的微流體裝置：小於約 0.1 mg/ml，例如約 0.09 mg/ml、約 0.05 mg/ml、約 0.03 mg/ml、約 0.02 mg/ml、約 0.01 mg/ml、約 0.007 mg/ml、約 0.005 mg/ml、約 0.003 mg/ml、約 0.002 mg/ml、約 0.001 mg/ml、約 0.0005 mg/ml、約 0.0002 mg/ml、約 0.0001 mg/ml、約 0.00005 mg/ml、約 0.00002 mg/ml、約 0.00001 mg/ml、約 0.000005 mg/ml 或約 0.0000001 mg/ml。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括提

供基本上不含在樣本解離期間引入之酶之輸出的微流體裝置。在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括提供不含在樣本解離期間引入之酶之輸出的微流體裝置。

在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括提供基本上不含在樣本解離期間引入之膠原酶之輸出的微流體裝置。在本揭示案之又一實施例中，下游處理單元包括提供不含在樣本解離期間引入之膠原酶之輸出的微流體裝置。

可用於任何一或多種本文揭示之樣本處理裝置中之微流體裝置的實例示意性說明於第 15A、15B、15C、15D 及 15E 圖中，一般分別以 910、920、930、940 及 950 指示。

第 15A 圖展示具有細胞入口、緩衝液入口、細胞出口及緩衝液出口之微流體通道 910。微流體通道之寬度及/或深度如此之小，例如約  $100\ \mu\text{m}$ ，以致細胞樣本及緩衝液形成兩個相互並列流動而未實質上對流混合之層流之流。流動速度經組態以給予不需要的粒子(例如酶)以足夠時間以自細胞流之流擴散至緩衝液流之流。因為細胞比不需要的粒子大得多，所以其擴散係如此小以致其保留於細胞流之流中。細胞流及緩衝液流經由不同出口離開微流體通道，藉此實質上移除不需要的粒子。

第 15B 圖展示具有細胞入口、兩個緩衝液入口、細胞出口及兩個緩衝液出口之另一微流體通道 920。通道及

流動速度經組態以使不需要的粒子自細胞流擴散至緩衝液流，藉此實質上移除不需要的粒子。因為不需要的粒子可藉由兩個緩衝液流移除，所以此組態可具有高移除效率。

例如第 15C 圖中所說明之微流體通道 930 中所說明，柱或柱子可位於微流體通道中以穩定化細胞及緩衝液流、促進分子擴散及/或支撐微流體通道。

用於透析之微流體裝置可串聯組態以形成級聯。第 15D 圖展示一個實例，其中攜帶不需要的粒子之緩衝溶液自緩衝液出口 1 移除且新鮮緩衝溶液可經由緩衝液入口 2 引入以實質上移除殘留之不需要的粒子。

第 15E 圖展示微流體裝置 950 之另一實施例，其包括通道及通道中之柱陣列。設計引入通道之流體的流動速度及通道尺寸以使流體流為層狀的。通常，當微流體裝置中流體之雷諾數(Reynolds number)小於約 1 時出現層流及層狀流體流。柱陣列增大緩衝液流中粒子之有效擴散係數，且改良自細胞流移除不需要粒子(例如酶)之效率。

在一些實施例中，用以在微流體裝置中形成緩衝液流之緩衝液為沖洗液。

在又一實施例中，下游處理單元包括透析膜。

第 16 圖中示意性展示之下游處理單元 1000 之又一實施例包括微流體裝置單元，其包括至少一個濃縮經分離細胞之微流體裝置，及至少一個收集儲集器，例如收

集袋，其經組態以接收作為微流體裝置之輸出的經分離細胞。下游處理單元可進一步包括連接至該收集儲集器之注射器。在已使用微流體裝置處理樣本之後，輸出可自收集儲集器吸入注射器中。下游處理單元可進一步包括廢料儲集器，例如廢料袋。

在本揭示案之另一實施例中，下游處理單元包括多個微流體裝置以達成所需容量、輸貫量(throughput)及功能以便處理大量輸出樣本。

流體轉移可使用重力、外部壓力、真空、正壓、負壓、頭高(head height)、泵(例如蠕動泵)、經組態以擠壓袋子之機構、擠壓袋子之軋輥、擠壓袋子之板及/或此項技術中已知之其他流體轉移機構來達成。在一個實施例中，流體可使用注射器轉移。在另一實施例中，如第 13 圖中所示，可使用施加於腔室(例如封閉含有細胞之袋子(腔室 3)的腔室 4)之外部氣壓來轉移流體。

在本揭示案之另一實施例中，下游處理單元包括用於培養細胞之細胞培養室。細胞培養室可使用允許細胞培養室拆離之連接器來連接。細胞培養室可置於培育箱中，其中用於細胞生長之溫度及條件可得到最佳化，例如在約 37 攝氏度之溫度及約 5%二氧化碳濃度下。細胞培養室可進一步包括可透空氣之材料，例如濾膜或聚矽氧橡膠膜，從而允許在細胞培養期間進行氣體交換。

如本文揭示之樣本處理裝置之一或多個腔室可包括篩網、多層篩網及或篩網級聯(第 5B 圖)。在一些實施例

中，用於脂肪組織處理之篩網的孔徑(例如孔之開口的中值或平均尺寸)可在約  $1\ \mu\text{m}$  與約  $10\ \text{mm}$  之間，例如為約  $1\ \mu\text{m}$ 、約  $3\ \mu\text{m}$ 、約  $6\ \mu\text{m}$ 、約  $10\ \mu\text{m}$ 、約  $15\ \mu\text{m}$ 、約  $25\ \mu\text{m}$ 、約  $40\ \mu\text{m}$ 、約  $70\ \mu\text{m}$ 、約  $100\ \mu\text{m}$ 、約  $140\ \mu\text{m}$ 、約  $300\ \mu\text{m}$ 、約  $700\ \mu\text{m}$ 、約  $1\ \text{mm}$ 、約  $2\ \text{mm}$  或約  $3\ \text{mm}$ 。自脂肪抽吸物組織分離非脂肪細胞，篩網孔徑可在約  $10\ \mu\text{m}$  與約  $2\ \text{mm}$  之間。在一些實施例中，可採用約  $40\ \mu\text{m}$ 、約  $70\ \mu\text{m}$ 、約  $100\ \mu\text{m}$ 、約  $140\ \mu\text{m}$ 、約  $250\ \mu\text{m}$  及/或約  $700\ \mu\text{m}$  孔徑篩網，例如聚醯胺(耐綸)篩網。

本揭示案之樣本處理裝置的另一實施例包括一或多個腔室，其包括兩個篩網，第二篩網與第一篩網之下游流體連通，其中第二篩網之孔實質上小於第一篩網之孔。

本揭示案之樣本處理裝置的又一實施例包括一或多個腔室，其包括兩個膜過濾器。第二膜過濾器可與第一膜過濾器之下游流體連通。第二膜過濾器之孔可實質上小於第一膜過濾器之孔。

本揭示案之樣本處理裝置的又一實施例包括一或多個腔室，其包括徑跡蝕刻膜過濾器。

如本文揭示之樣本處理裝置或其子組件的實施例可使用包括(但不限於)以下之材料構造：熱塑性塑膠、丙烯腈丁二烯苯乙烯(ABS)、丙烯酸系物質(PMMA)、賽璐珞(celluloid)、乙酸纖維素、環烯共聚物(COC)、環烯共聚物(COP)、乙烯-乙酸乙烯酯(EVA)、乙烯乙醇醇(EVOH)、氟塑膠(PTFE，以及 FEP、PFA、CTFE、ECTFE、ETFE)、

離子聚合物、液晶聚合物(LCP)、聚甲醛(POM 或縮醛)、聚丙烯酸酯(丙烯酸系物質)、聚丙烯腈(PAN 或丙烯腈)、聚醯胺(PA 或耐綸)、聚醯胺-醯亞胺(PAI)、聚芳基醚酮(PAEK 或酮)、聚丁二烯(PBD)、聚丁烯(PB)、聚對苯二甲酸伸丁酯(PBT)、聚己內酯(PCL)、聚氯三氟乙烯(PCTFE)、聚對苯二甲酸伸乙酯(PET)、聚對苯二甲酸伸環己酯二亞甲酯(PCT)、聚碳酸酯(PC)、聚羥基烷酸酯(PHA)、聚酮、聚酯、聚乙烯(PE)、聚醚醚酮(PEEK)、聚醚酮酮(PEKK)、聚醚醯亞胺(PEI)、聚醚砜(PES)、氯化聚乙烯(CPE)、聚醯亞胺(PI)、聚乳酸(PLA)、聚甲基戊烯(PMP)、聚伸苯醚(PPO)、聚伸苯硫(PPS)、聚鄰苯二甲醯胺(PPA)、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚砜(PSU)、聚對苯二甲酸丙二酯(PTT)、聚胺基甲酸酯(PU)、聚乙酸乙烯酯(PVA)、聚氯乙烯(PVC)、聚二氯亞乙烯(PVDC)、苯乙烯-丙烯腈(SAN)及/或丙烯腈丁二烯苯乙烯(ABS)。對於醫學應用，可撓性塑膠片，諸如聚氯乙烯(PVC)、聚胺基甲酸酯(PU)、乙烯-乙酸乙烯酯(EVA)、聚醯胺(PA 或耐綸)可用作片材。在一些實施例中，如本文揭示之樣本處理裝置可包括兩個可撓片結合在一起且於其中界定一或多個腔室。在其他實施例中，如本文揭示之樣本處理裝置可包括可撓片結合於剛性或半剛性材料(例如厚塑膠片及/或任何一或多種上文揭示之材料)且在可撓片與剛性或半剛性材料之間界定一或多個腔室。

在一些實施例中，片材厚度可在約 0.1 mm 與約 0.8

mm 之間，例如約 0.1 mm、約 0.15 mm、約 0.2 mm、約 0.25 mm、約 0.3 mm、約 0.35 mm、約 0.4 mm、約 0.5 mm、約 0.6 mm、約 0.7 mm 或約 0.8 mm。在其他實施例中，片材厚度可在約 0.2 mm 與約 0.4 mm 之間，例如約 0.2 mm、約 0.25 mm、約 0.3 mm、約 0.35 mm 或約 0.4 mm。

膜過濾器及/或篩網之材料可包括(但不限於)乙酸纖維素(CA)、玻璃微纖維(GMF)、聚醚砜(PES)、聚丙烯(PP)、再生纖維素(RC)、聚醯胺(PA 或耐綸)、聚四氟乙烯(PTFE)及/或聚偏二氟乙烯(PVDF)。

在一些實施例中，篩網材料厚度可在約 10  $\mu$  m 與約 1,000  $\mu$  m 之間，例如為約 10  $\mu$  m、約 15  $\mu$  m、約 20  $\mu$  m、約 25  $\mu$  m、約 30  $\mu$  m、約 40  $\mu$  m、約 50  $\mu$  m、約 60  $\mu$  m、約 70  $\mu$  m、約 80  $\mu$  m、約 90  $\mu$  m、約 100  $\mu$  m、約 120  $\mu$  m、約 150  $\mu$  m、約 175  $\mu$  m、約 200  $\mu$  m、約 250  $\mu$  m、約 300  $\mu$  m、約 400  $\mu$  m、約 500  $\mu$  m、約 600  $\mu$  m、約 700  $\mu$  m、約 800  $\mu$  m、約 900  $\mu$  m 或約 1 mm。在其他實施例中，篩網材料厚度可在約 50  $\mu$  m 與約 300  $\mu$  m 之間，例如為約 50  $\mu$  m、約 60  $\mu$  m、約 70  $\mu$  m、約 80  $\mu$  m、約 90  $\mu$  m、約 100  $\mu$  m、約 110  $\mu$  m、約 125  $\mu$  m、約 140  $\mu$  m、約 160  $\mu$  m、約 180  $\mu$  m、約 200  $\mu$  m、約 220  $\mu$  m、約 250  $\mu$  m、約 275  $\mu$  m 或約 300  $\mu$  m。

本揭示案之實施例可使用包括(但不限於)以下之標準塑膠製造技術來構造：塑膠焊接、熱封、射出成形、壓紋、膠合、紫外光(UV)固化黏接、溶劑結合、熱氣焊接(hot gas welding)、徒手焊接、速度觸點焊接(speed tip

welding)、擠出焊接、接觸焊接、熱板焊接、高頻焊接、射頻焊接、注射焊接、超音波焊接、摩擦焊接、旋轉焊接、雷射焊接及/或溶劑焊接。

本揭示案之實施例(例如第 2A-2G 圖之任一者中示意性展示之樣本處理裝置)可使用熱塑片之高頻焊接來構造。焊接模可由例如鋁、黃銅或不銹鋼之金屬製成。將可折迭之篩網件，及管件置於焊接模上之兩個熱塑片之間。接著使用另一焊接模夾入熱塑片。當壓力、溫度及射頻電力施加於焊接模時形成腔室。為密封具有聚醯胺篩網之聚氯乙烯(PVC)片，可施加以下溫度：在約 25 攝氏度與約 120 攝氏度之間，例如約 25 攝氏度、約 50 攝氏度、約 60 攝氏度、約 70 攝氏度、約 80 攝氏度、約 90 攝氏度、約 100 攝氏度、約 110 攝氏度或約 120 攝氏度，以下壓力：在約 10 psi 與約 600 psi 之間，例如約 10 psi、約 20 psi、約 30 psi、約 40 psi、約 50 psi、約 60 psi、約 80 psi、約 100 psi、約 150 psi、約 200 psi、約 300 psi、約 400 psi、約 500 psi 或約 600 psi，及以下射頻電力：在約 300 W 與 10 kW 之間，例如約 300 W、約 500 W、約 600 W、約 700 W、約 800 W、約 900 W、約 1 kW、約 1.2 kW、約 1.5 kW、約 2 kW、約 2.5 kW、約 3 kW、約 4 kW、約 5 kW、約 6 kW、約 7 kW、約 8 kW、約 9 kW 或約 10 kW。可施加射頻電力持續以下持續時間：在約 0.5 秒與約 1 分鐘之間，例如約 0.5 秒、約 1 秒、約 2 秒、約 3 秒、約 4 秒、約 5 秒、約 6 秒、約 7 秒、約 8 秒、約 10 秒、約

12 秒、約 15 秒、約 20 秒、約 30 秒、約 40 秒、約 50 秒及約 60 秒。射頻電力可以相等或不同強度施加數次以形成可靠密封。對於醫學應用，裝置可在控制之清潔環境中製造且使用標準滅菌技術來滅菌，該等標準滅菌技術包括(但不限於)  $\gamma$  輻射、環氧乙烷(EO)滅菌及紫外光(UV)輻射。

在本揭示案之一些實施例中，樣本製備裝置為無菌的。在本揭示案之一些實施例中，樣本製備裝置為單次使用的。此外，在本揭示案之一些實施例中，樣本製備裝置為提供隔離環境之實質性防護障壁，其中保護樣本避免直接實體接觸或流體接觸(例如經由未過濾氣流)，使得外部環境及/或操作人員最小化或避免污染及感染風險。

應瞭解，本揭示案之實施例可充當實質上減少或消除脂肪組織樣本與周圍環境之間的任何直接實體接觸、流體連接及/或氣流連接之防護障壁。可與樣本直接實體接觸、流體連接及/或未過濾氣流連接的本文揭示之裝置的實施例之任何部分均可為無菌及/或單次使用的。應瞭解，本文揭示之裝置的實施例可實質上保護樣本避免污染風險且保護操作者不受感染風險。

應瞭解，本揭示案可設計極易於使用之脂肪組織處理裝置。亦應瞭解，本揭示案可大幅簡化此等組織處理裝置之製造方法且降低此等脂肪組織處理裝置之製造成本。應進一步瞭解，本揭示案之實施例可實現使用將樣

本與周圍實驗室或醫院環境實質上隔離之裝置來安全處理脂肪組織樣本而實質上無污染及感染風險。

### 實例

實例 1. 自人類脂肪抽吸物組織分離非脂肪細胞。

使用包括第 1 圖中所描繪之動作及如第 3A 及 11 圖中所示之裝置的方法處理人類脂肪抽吸物。該裝置為約 25 cm 寬及約 40 cm 長。可撓性塑膠片係由聚氯乙烯(PVC)製成且篩網係由聚醯胺(耐綸)製成。篩網 1、2 及 3 之標稱孔徑分別為約 140  $\mu$  m、約 70  $\mu$  m 及約 35  $\mu$  m。使用腫脹性抽脂術自同意之供體收集約 40 ml 人類脂肪抽吸物且在自收集起 24 小時內加以處理。在處理之前在 4 攝氏度下運送及儲存樣本。

起初，應用夾子 1 及 2 以關閉連接器 1 及 2 (第 3F 圖)。將約 100 ml 脂肪抽吸物經由刺針口添加至裝置中(第 11 圖)。打開夾子 2 以使包含血液及腫脹性溶液之過量流體在重力下排至腔室 3。在過量流體實質上移除之後，關閉夾子 2 且打開彈簧夾 1 以使約 50 ml 乳酸鹽林格氏溶液進入量測室(腔室 1)中。關閉彈簧夾 1 且打開彈簧夾 2。使用兩個平板擠壓腔室 1 以使乳酸鹽林格氏溶液轉移至腔室 2。重複此流體量測及轉移過程直至約 100 ml 乳酸鹽林格氏溶液添加至腔室 2 中為止。使用腔室 2 之溫和按摩來混合乳酸鹽林格氏溶液與脂肪抽吸物樣本以洗滌樣本。打開夾子 2 以使廢液排出。在本文中進行此洗滌動作三次。

組織溶解行係以關閉夾子 1 及 2 及將解離液自 Y 插入位點添加至腔室 1 中開始(第 11 圖)。解離液包含 200 mg 膠原酶及 50 mg DNase I 溶解於 20 ml 乳酸鹽林格氏溶液中。將更多乳酸鹽林格氏溶液引入腔室 1 中以稀釋解離液。接著將解離液轉移至腔室 2 中。再次將乳酸鹽林格氏溶液引入腔室 1 中以洗滌腔室 1 且將殘留解離液轉移至腔室 2。在組織溶解動作期間將約 100 ml 乳酸鹽林格氏溶液添加至腔室 2 中。將裝置置於 37 攝氏度培育箱中且頻繁按摩以有效混合組織樣本與解離液。組織溶解動作耗時約 45 分鐘至 60 分鐘。

在溶解之後，打開夾子 1 以使所釋放細胞進入碎片移除室(第 3A 圖中之腔室 4)。隨後打開夾子 2 以使樣本穿過篩網 3。在此動作期間實質上移除組織碎片及脂肪細胞。

流出腔室 4 之溶液接著在重力下饋至微流體裝置 1100 中，如第 17 圖中所說明及國際申請案 PCT/US10/061866 (以引用的方式併入本文中以用於所有目的)中所揭示。微流體裝置包括約 110 個模組配置於基板平面上。各模組包括約 900 根組態成四列之柱子。微流體通道之深度為約 30  $\mu$  m。

第 18A 圖及第 18B 圖中展示微流體裝置之輸出。實質上在有核細胞產物部分中收集濃縮之非脂肪細胞(第 18A 圖)。與輸入相比，有核細胞產物部分之體積減少至約 1/8。接著用吡啶橙(2 mg/l)對細胞染色且使用螢光顯

微鏡進行成像。影像展示脂肪細胞實質上不存在於微流體裝置之產物輸出中，且非脂肪有核細胞實質上收集於有核細胞部分中。影像亦展示細胞呈良好形態且產物輸出實質上無破裂細胞。

使用 ADAM MC 自動哺乳動物細胞計數器來進一步表徵使用所揭示之方法及裝置分離之細胞的總有核細胞計數及黏著存活有核細胞計數。腔室 4 之輸出具有總共約  $6.0 \times 10^5$  個有核細胞/毫升所處理之脂肪抽吸物。將補充有 10% 胎牛血清 (FBS) 之  $\alpha$ -MEM 用作黏著存活有核細胞計數之培養基。對腔室 4 之輸出取樣且在細胞培養室 (例如細胞培養皿或細胞培養) 中在培養基中在 37 攝氏度下培養 3 日。3 日之後，棄置培養基且使用杜貝可 (Dulbecco) 磷酸鹽緩衝鹽水溶液洗滌細胞培養室。接著使用胰蛋白酶使黏著於培養室之細胞自腔室表面釋放 3 分鐘。黏著存活有核細胞計數為約  $1.5 \times 10^5$  個/毫升所處理之脂肪抽吸物。

實例 2. 使用樣本處理袋裝置自人類脂肪抽吸物組織分離非脂肪細胞之方法。

使用如第 13 圖中描繪之樣本處理袋裝置處理人類脂肪抽吸物。裝置包括樣本解離室 (腔室 1)、廢料室 (腔室 2) 及細胞精製室 (腔室 3)。裝置為約 24 cm 寬、約 36 cm 長且由兩個各自約 0.3 mm 厚之聚氯乙烯 (PVC) 片製成。樣本解離室及細胞精製室包括第一耐綸篩網 (篩網 1) 及第二耐綸篩網 (篩網 2)。第一篩網之孔徑為約  $125 \mu\text{m}$  且

第二篩網之孔徑為約  $25\ \mu\text{m}$ 。第一篩網之孔徑或者可在約  $70\ \mu\text{m}$  與約  $160\ \mu\text{m}$  之間，例如為約  $70\ \mu\text{m}$ 、約  $80\ \mu\text{m}$ 、約  $90\ \mu\text{m}$ 、約  $100\ \mu\text{m}$ 、約  $110\ \mu\text{m}$ 、約  $120\ \mu\text{m}$ 、約  $130\ \mu\text{m}$ 、約  $140\ \mu\text{m}$ 、約  $150\ \mu\text{m}$  或約  $160\ \mu\text{m}$ 。第二篩網之孔徑或者可在約  $20\ \mu\text{m}$  與約  $50\ \mu\text{m}$  之間，例如為約  $20\ \mu\text{m}$ 、約  $22\ \mu\text{m}$ 、約  $25\ \mu\text{m}$ 、約  $30\ \mu\text{m}$ 、約  $35\ \mu\text{m}$ 、約  $40\ \mu\text{m}$  或約  $50\ \mu\text{m}$ 。

使用腫脹性抽脂術自同意之供體收集人類脂肪抽吸物且在自收集起 6 小時內加以處理。在處理之前在 4 攝氏度下運送及儲存樣本。

起初，將活塞 1 設為連接腔室 1 與腔室 2 之位置。將包含 100 mg 膠原酶、100 mg 玻尿酸酶及 20,000 U 去氧核糖核酸酶之解離液加載於注射器 2 中。使用刺針將樣本處理袋裝置連接至包含乳酸林格氏注射液之沖洗液袋。

使用具有導管尖之注射器將約 75 ml 脂肪抽吸物樣本自口 1 注入腔室 1 中。

應用洗滌動作以清潔脂肪抽吸物樣本。為開始洗滌週期，將活塞 1 設為將腔室 1 自腔室 2 及 3 流體式切斷之關閉位置。使用注射器 1 及活塞 2 作為流量控制裝置將約 100 ml 乳酸林格氏注射液注入腔室 1 中，注射器 1 及活塞 2 係使用以下動作順序來工作：(a)轉接活塞 2 以使沖洗液連接至注射器 1；(b)將沖洗液抽至注射器 1 中；(c)轉接活塞 2 以使注射器 1 連接至腔室 1；(d)將沖洗液

自注射器 1 注入腔室 1 中。可重複該順序直至所需體積之溶液添加至解離室中為止。

接著按摩腔室 1 以混合沖洗液與樣本，且轉接活塞 1 以將過量流體(亦即廢液)排至腔室 2 中。在排放之後，完成第一洗滌週期。重複洗滌週期兩次。

洗滌動作可包括一個或許多個洗滌週期，例如一、二、三、四或五個週期。

在洗滌之後，將解離液添加至腔室 1 中。亦將約 100 ml 沖洗液添加至腔室 1 中。接著在 37 攝氏度下培育樣本處理袋裝置持續約 60 分鐘之培育時間。在此時間期間按摩腔室 1 以混合樣本與解離液。在一些實施例中，亦可使用其他培育時間，例如約 15 分鐘、約 20 分鐘、約 30 分鐘、約 40 分鐘、約 50 分鐘、約 75 分鐘、約 90 分鐘或約 120 分鐘。

培育之後，使自樣本釋放之個別細胞穿過活塞 1 進入腔室 3 中，同時大組織碎片係由篩網 1 捕獲且留於腔室 1 中。腔室 3 中之篩網 2 進一步自解離樣本移除大脂肪細胞及碎片。接著在腔室 3 之出口收集非脂肪細胞(包括外被細胞、脂肪源性幹細胞及祖細胞)。

為濃縮所釋放之細胞及所移除之殘留紅血球及碎片，接著使在樣本處理袋裝置之腔室 3 之出口收集的釋放細胞穿過如國際公開案 WO 2011/079217 A1 中所揭示之第一微流體裝置。微流體裝置包括 73 個配置於基板表面上模組。各模組包括約 1,300 根組態成四列之柱子。

微流體裝置包括實質上相同深度，在約 35  $\mu\text{m}$  與約 50  $\mu\text{m}$  之間的通道。在另一實施例中，微流體裝置可包括深度為以下之通道：在約 30  $\mu\text{m}$  與約 80  $\mu\text{m}$  之間，例如為約 30  $\mu\text{m}$ 、約 35  $\mu\text{m}$ 、約 40  $\mu\text{m}$ 、約 45  $\mu\text{m}$ 、約 50  $\mu\text{m}$ 、約 60  $\mu\text{m}$ 、約 70  $\mu\text{m}$  或約 80  $\mu\text{m}$ 。將微流體裝置之輸出的細胞濃縮約 3 倍。在本發明之另一實施例中，微流體裝置可用以將細胞濃縮大於約 2.5 倍，例如約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 8 倍、約 10 倍、約 12 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 80 倍、約 100 倍或約 125 倍。

為移除酶，經由國際公開案 WO 2011/079217 A1 中揭示之第二微流體裝置處理細胞。第二微流體裝置包括 83 個配置於基板表面上之模組。各模組包括約 900 根組態成四列之柱子。將沖洗液流引入各模組中且細胞轉移至沖洗液流中、與酶分離。

應用酶聯免疫吸附分析(ELISA)以量測第二微流體裝置後膠原酶之殘留量。結果顯示膠原酶濃度減少至 1/1,000，且精製細胞含有小於 0.001 mg/ml 膠原酶。

已因此描述了至少一個實施例之若干態樣，應瞭解，熟習此項技術者應輕易想到各種改變、修改、組合及改良。此等改變、修改、組合及改良意欲為本揭示案之部分，且意欲在揭示案之精神及範疇內。因此，前述說明書及圖式僅舉例而言。

## 【符號說明】

**【生物材料寄存】**

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

**【序列表】** (請換頁單獨記載)

## 申請專利範圍

1. 一種用於自脂肪組織樣本分離非脂肪細胞之設備，  
該設備包括：  
第一材料片；  
第二材料片，該第二材料片結合於該第一材料片；  
及  
複數個腔室，該複數個腔室界定於該第一材料片與  
該第二材料片之間，該複數個腔室包括：  
樣本解離室，該樣本解離室包括一個入口及一個出  
口；  
廢料收集室，該廢料收集室包括一個與該樣本解離  
室之該出口流體連通之入口；及  
細胞精製室，該細胞精製室包括一個與該樣本解離  
室流體連通之入口，及一個出口。
2. 如申請專利範圍第 1 項之設備，其中該樣本解離室  
進一步包括篩網過濾器，該篩網過濾器包括孔徑在  
70  $\mu\text{m}$  與 300  $\mu\text{m}$  之間的孔。
3. 如申請專利範圍第 1 項之設備，其進一步包括篩網  
過濾器，該篩網過濾器包括於該細胞精製室中且包  
括孔徑在 20  $\mu\text{m}$  與 50  $\mu\text{m}$  之間的孔。
4. 如申請專利範圍第 1 項之設備，其中該樣本解離室

進一步包括第一篩網過濾器，該第一篩網過濾器包括具有第一孔徑之孔，且其中該細胞精製室進一步包括第二篩網過濾器，該第二篩網過濾器包括具有第二孔徑之孔，其中該第二孔徑小於該第一孔徑。

- 5.如申請專利範圍第 1 項之設備，其進一步包括一個構件，該構件控制該樣本解離室、該廢料收集室及該細胞精製室之間的流體連接。
- 6.如申請專利範圍第 5 項之設備，其中該控制流體連接之構件包括活塞。
- 7.如申請專利範圍第 1 項之設備，其進一步包括流量控制裝置，該流量控制裝置經組態以將沖洗液及解離液之至少一者引入該樣本解離室中，且具有與該樣本解離室流體連通之出口。
- 8.如申請專利範圍第 1 項之設備，其進一步包括構件，該構件向該樣本解離室及該細胞精製室之一者施加壓力。
- 9.如申請專利範圍第 1 項之設備，其進一步包括下游處理設備，該下游處理設備與該細胞精製室之該出口流體連通且包括至少一個微流體裝置，該至少一

個微流體裝置經組態以將自該細胞精製室輸出之流體分離成第一溶液及第二溶液，該第一溶液具有第一濃度之一或多種相關細胞且該第二溶液具有小於該第一溶液濃度之濃度的該一或多種相關細胞，其中該等相關細胞包含自脂肪組織樣本分離之非脂肪細胞。

10.一種無菌及實質上隔離之脂肪組織處理系統，該組織處理系統包括：

組織處理室，該組織處理室包括一個入口、一個出口及至少一個篩網過濾器，該至少一個篩網過濾器安置於該組織處理室之該入口與該組織處理室之該出口之間；

廢料收集室，該廢料收集室與該組織處理室包括於同一外殼中，該廢料收集室包括一個與該組織處理室之該出口流體連通的入口；及

以下一者：碎片移除室，該碎片移除室包括碎片移除機構；及樣本收集室，該樣本收集室與該組織處理室包括於同一外殼中且與該組織處理室流體連通。

11.一種在組織處理系統中處理脂肪組織樣本之方法，該方法包括：

經由第一腔室之入口將待處理脂肪組織樣本引入

該第一腔室中；

在該第一腔室中處理該脂肪組織樣本；及

將細胞自該第一腔室經由該第一腔室之出口經由與該第一腔室包括於同一外殼中之第二腔室之入口轉移至該第二腔室中。

12.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中處理該脂肪組織樣本包括解離該脂肪組織樣本。

13.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中處理該脂肪組織樣本包括在該第一腔室中自該脂肪組織樣本移除過量流體。

14.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中處理該脂肪組織樣本包括在該第一腔室中使用沖洗液洗滌該脂肪組織樣本。

15.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中處理該脂肪組織樣本包括在該第一腔室中使用沖洗液洗滌該脂肪組織樣本，及在該第一腔室中使用包含至少一種酶之解離液解離該脂肪組織樣本。

16.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該解離液包含膠原酶。

- 17.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該解離液包含膠原酶、去氧核糖核酸酶及玻尿酸酶。
- 18.如申請專利範圍第 15 項之方法，其中使用解離液解離該脂肪組織樣本係在約 37 攝氏度下發生。
- 19.如申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包括使用篩網過濾器來移除碎片，該篩網過濾器包括於該第二腔室中。
- 20.如申請專利範圍第 19 項之方法，其中該篩網過濾器之孔徑在 15 微米與 100 微米之間。
- 21.如申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包括將該樣本截留於該第一腔室內及將廢液經由包括於該第一腔室中之篩網過濾器及該第一腔室之第一出口經由與該第一腔室包括於同一外殼中之第三腔室之入口轉移至該第三腔室中。
- 22.如申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包括使用微流體裝置對非脂肪細胞群體進行增濃。
- 23.如申請專利範圍第 22 項之方法，其中該等非脂肪

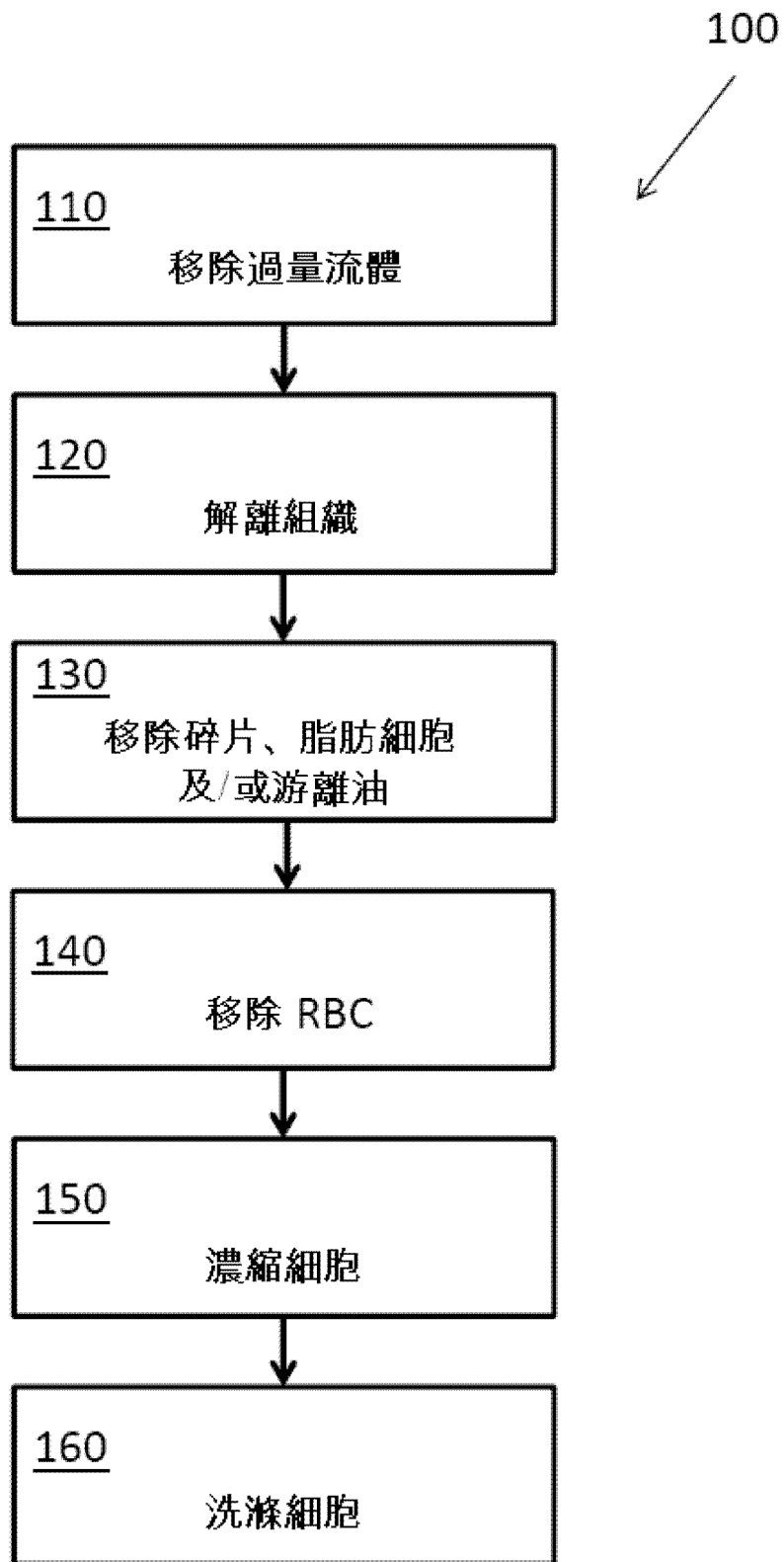
細胞包含幹細胞。

24.如申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包括自該組織處理系統收集細胞。

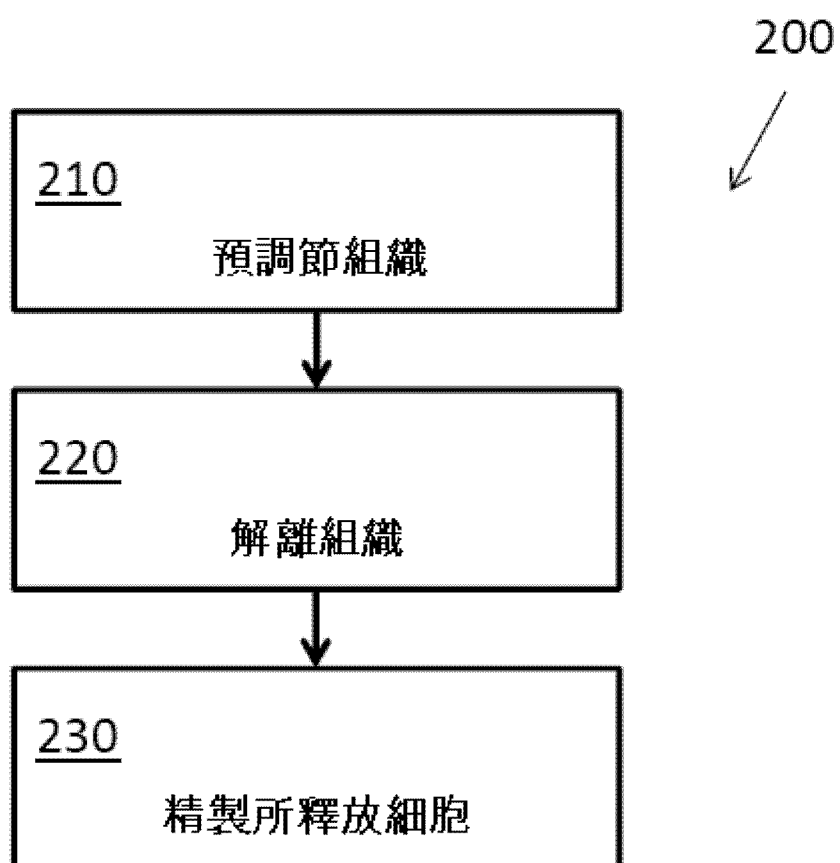
25.如申請專利範圍第 11 項之方法，其進一步包括在下游處理設備中處理該等細胞，該下游處理設備與該第二腔室之出口流體連通且包括至少一個經組態以將該等細胞分離成第一溶液及第二溶液的微流體裝置，該第一溶液具有第一濃度之非脂肪細胞且該第二溶液具有小於該第一溶液濃度之濃度的非脂肪細胞。

26.如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該等所收集之細胞為基質血管部分細胞。

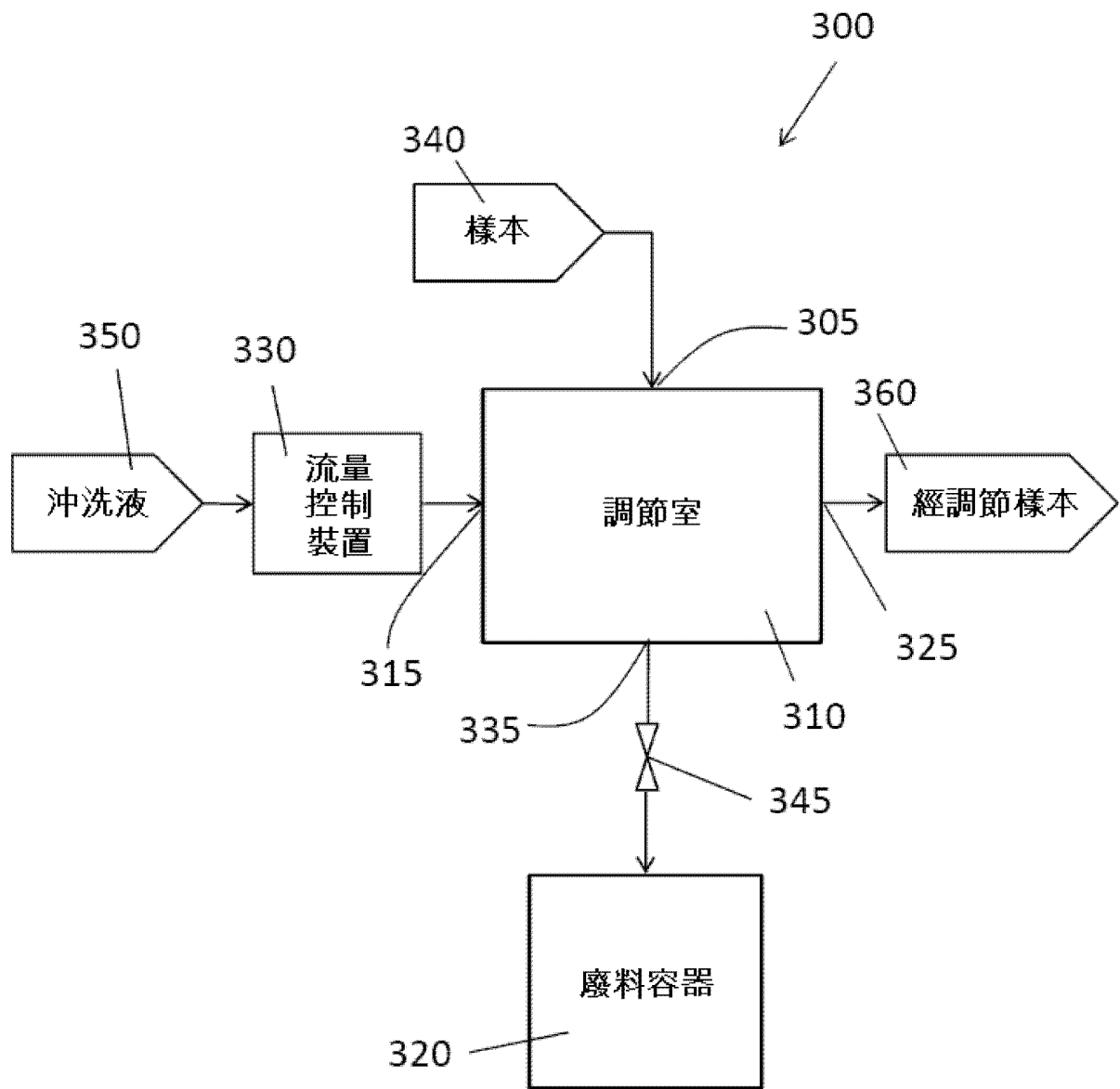
圖式



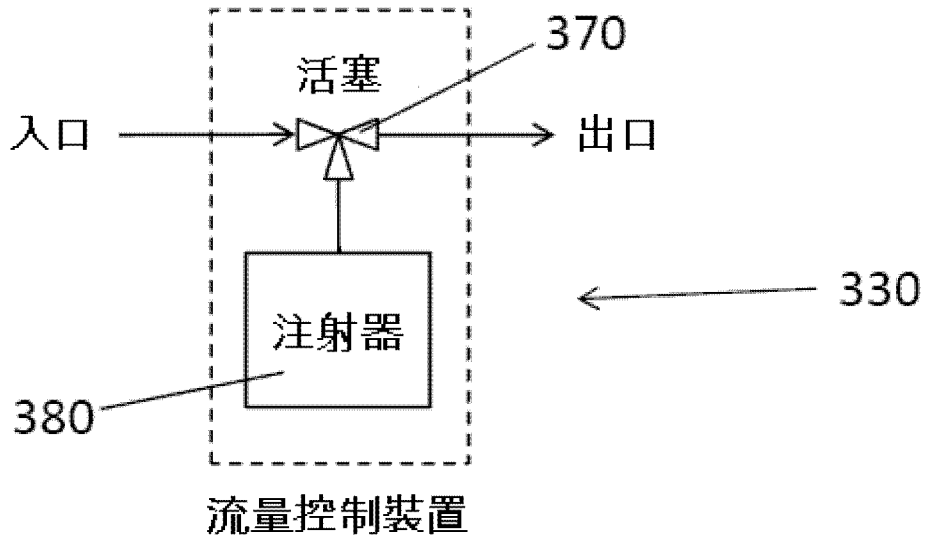
第 1A 圖



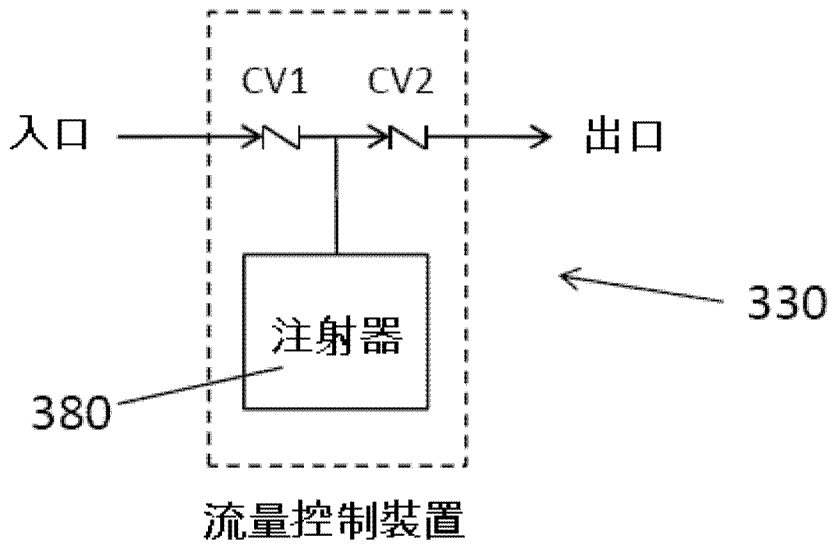
第 1B 圖



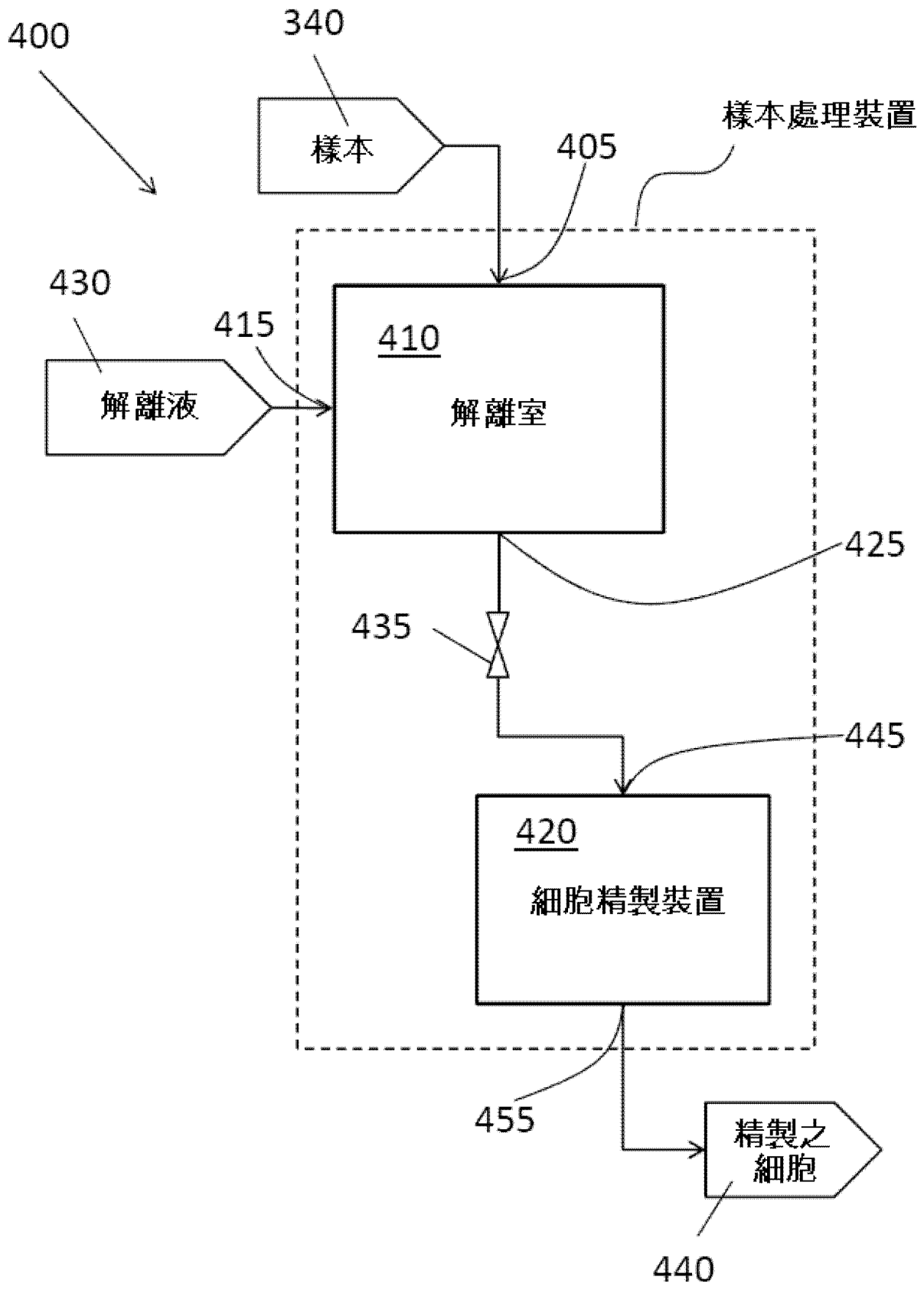
第 2A 圖



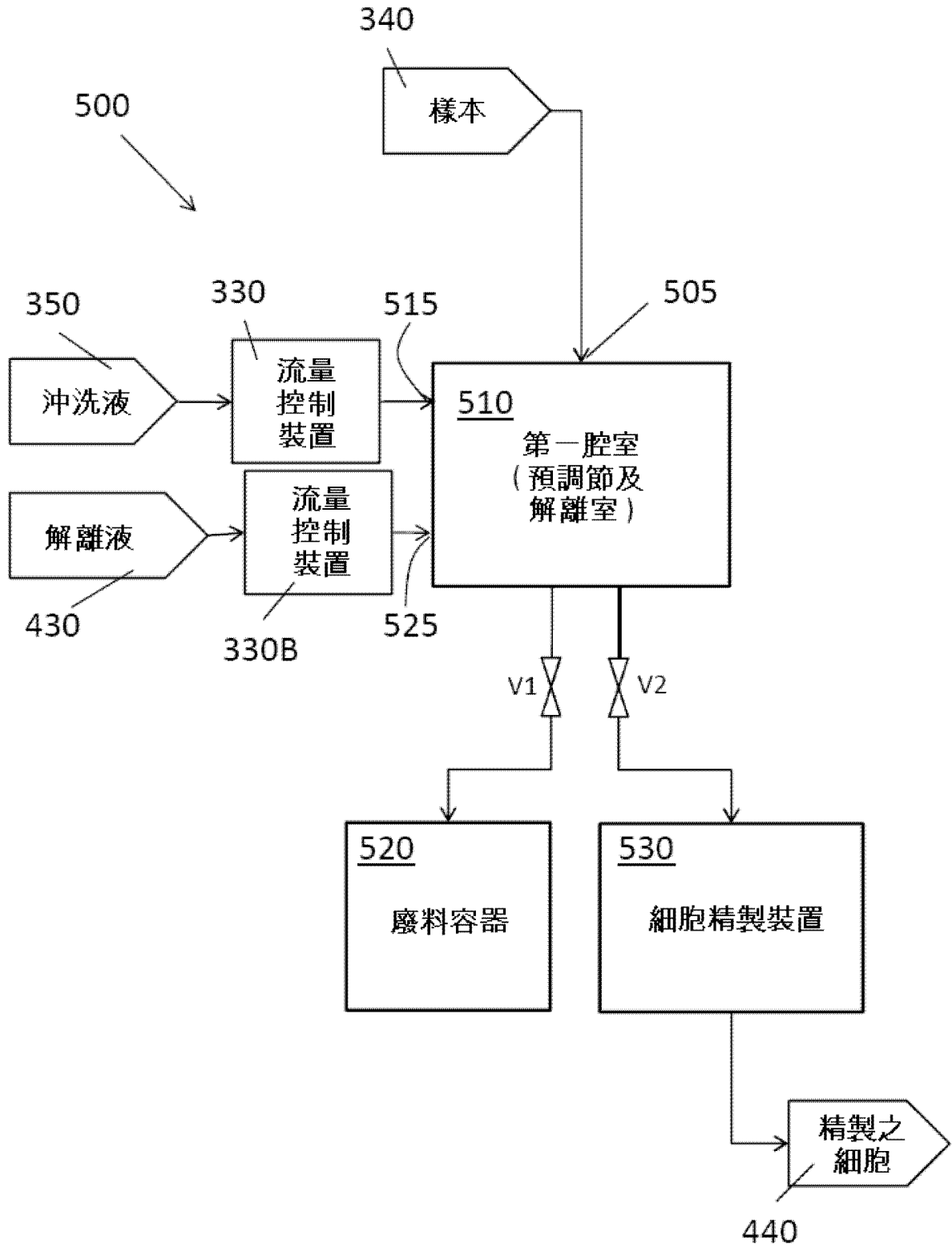
第 2B 圖



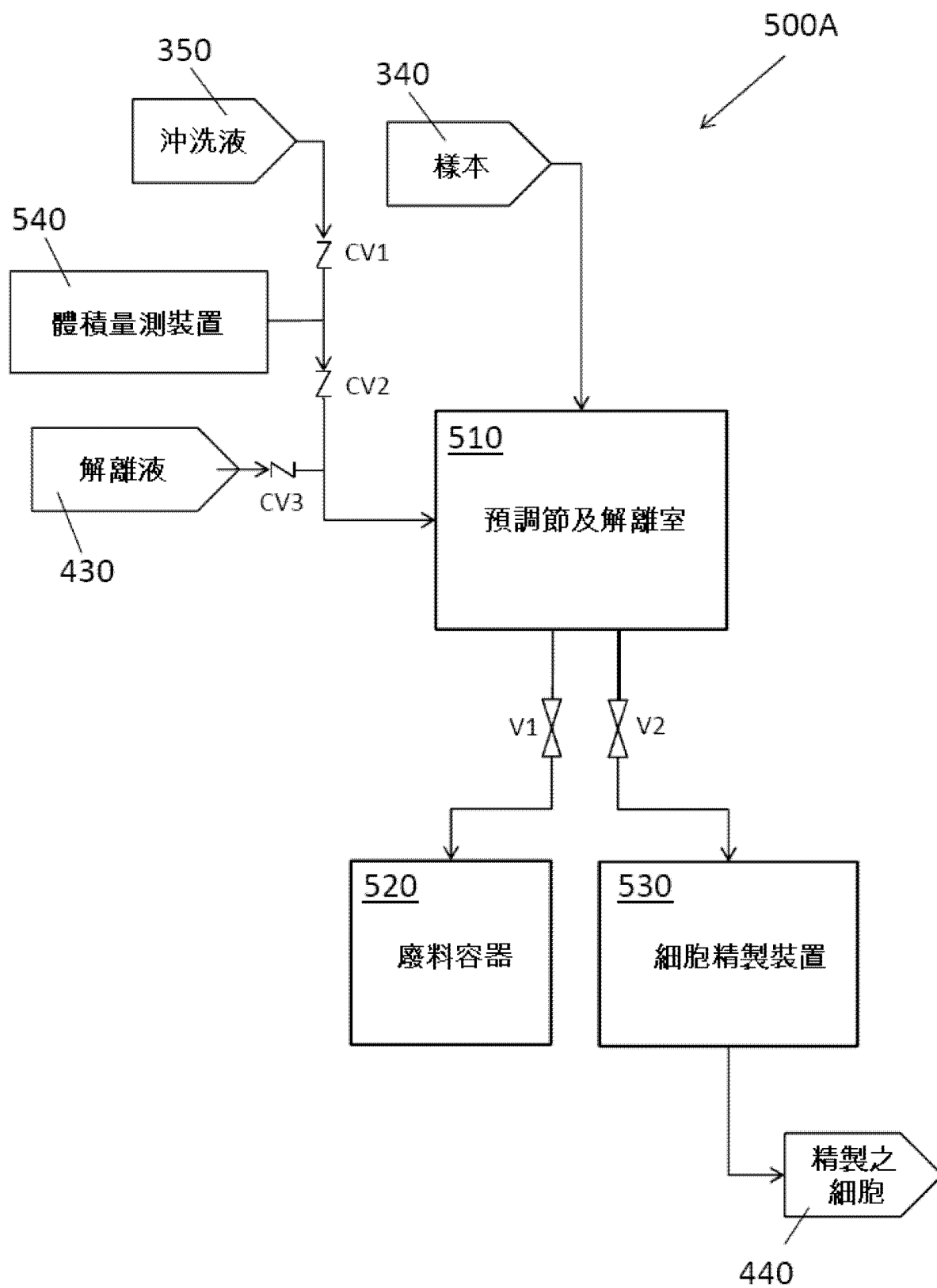
第 2C 圖



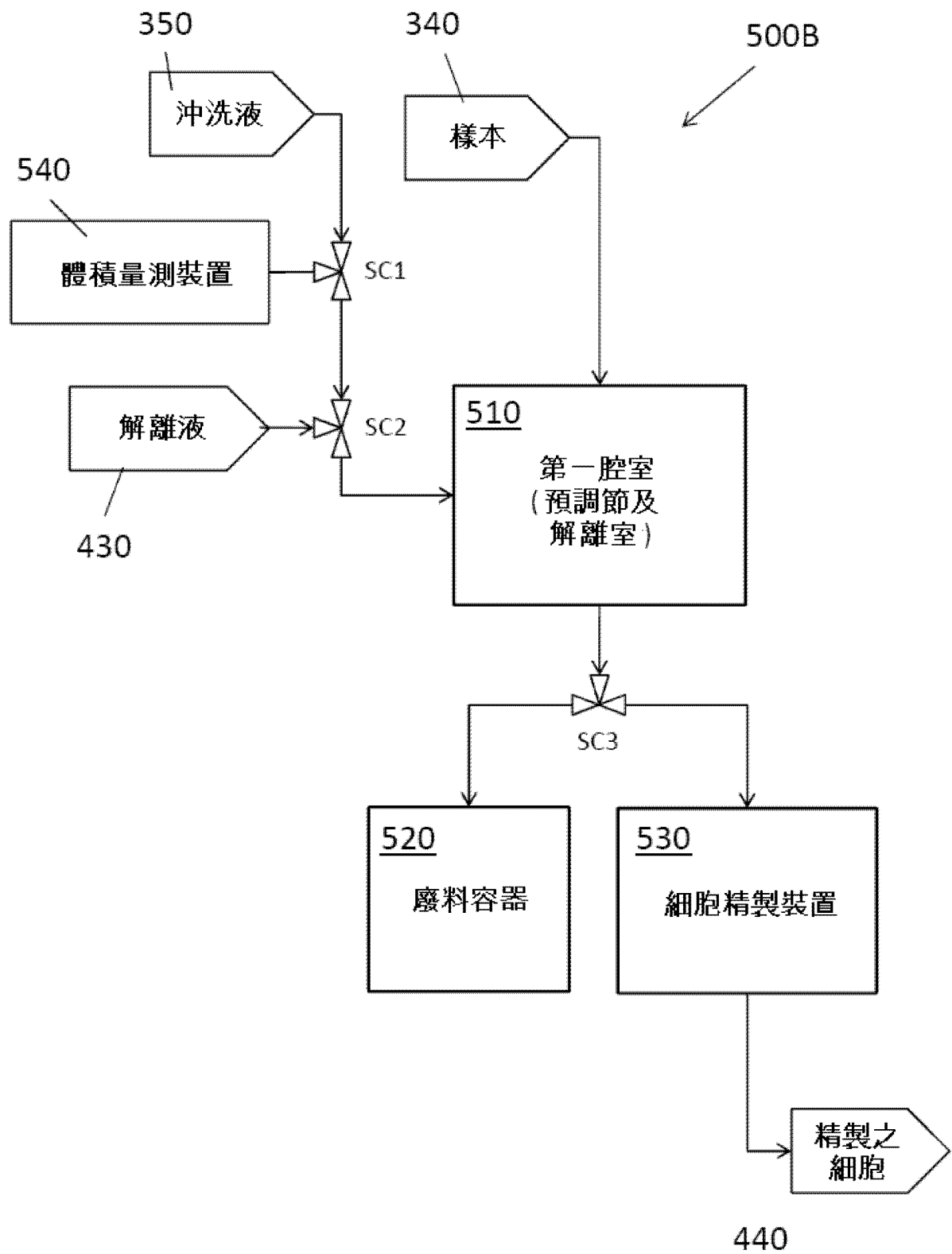
第 2D 圖



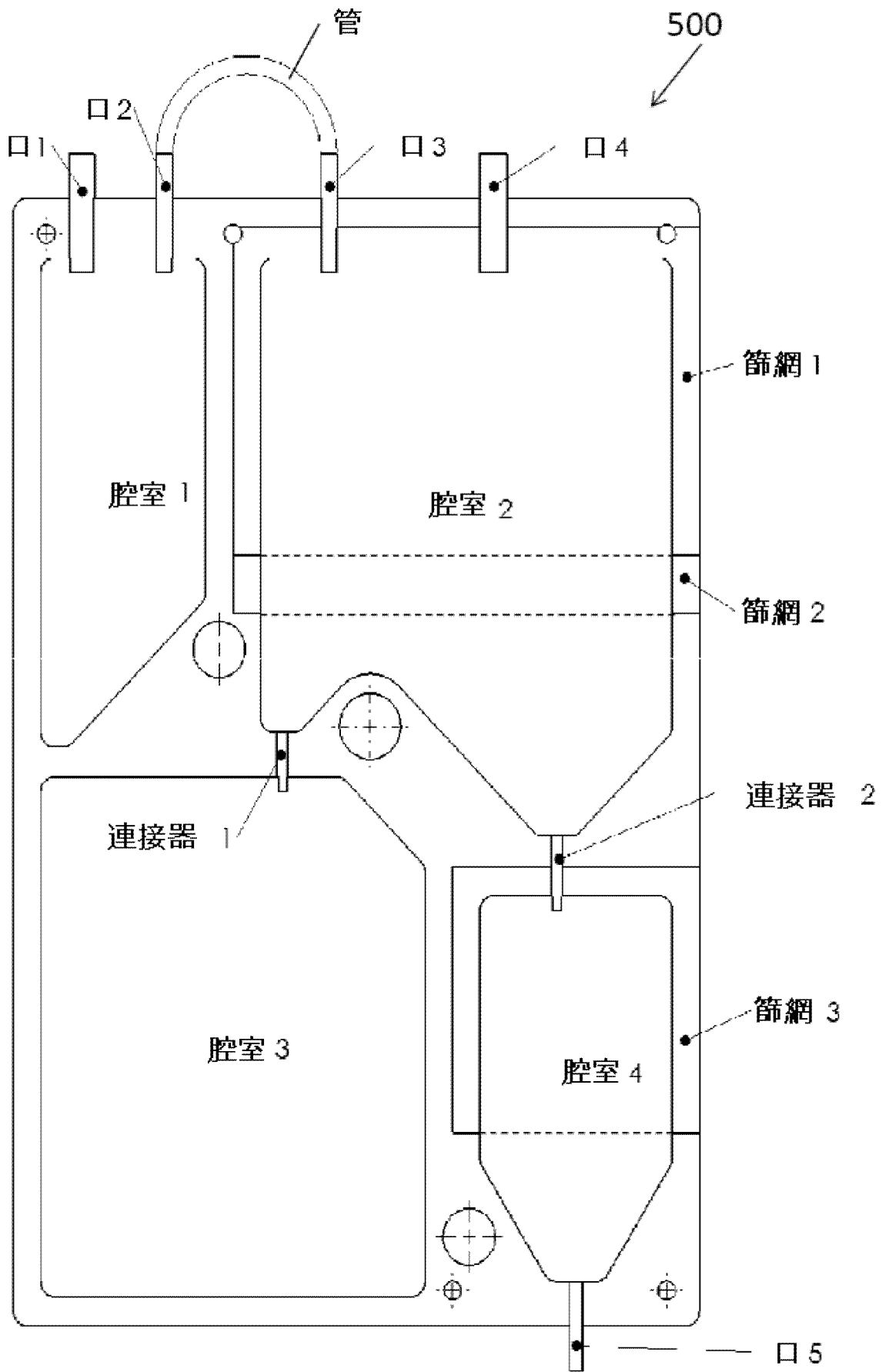
第 2E 圖



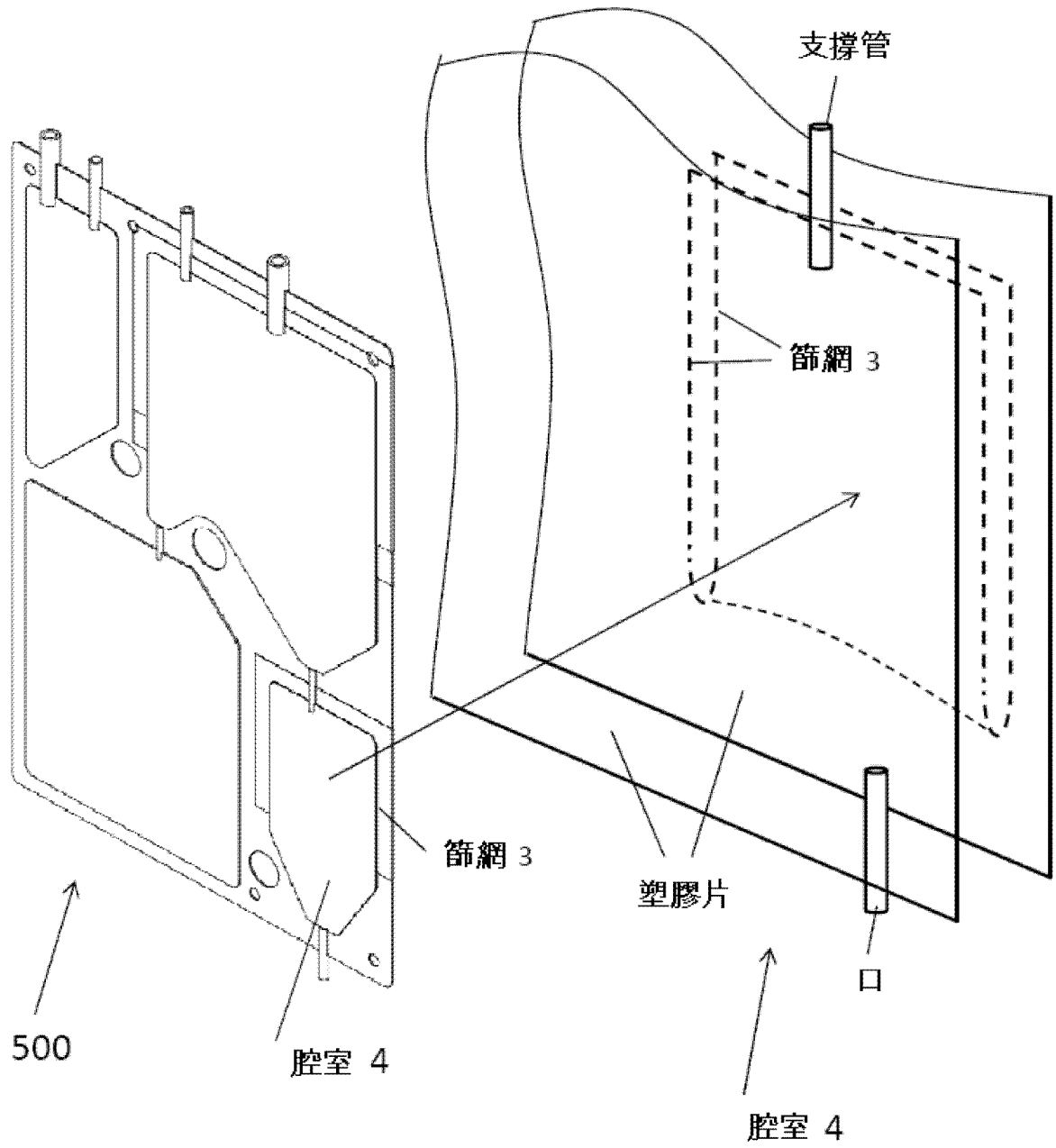
第 2F 圖

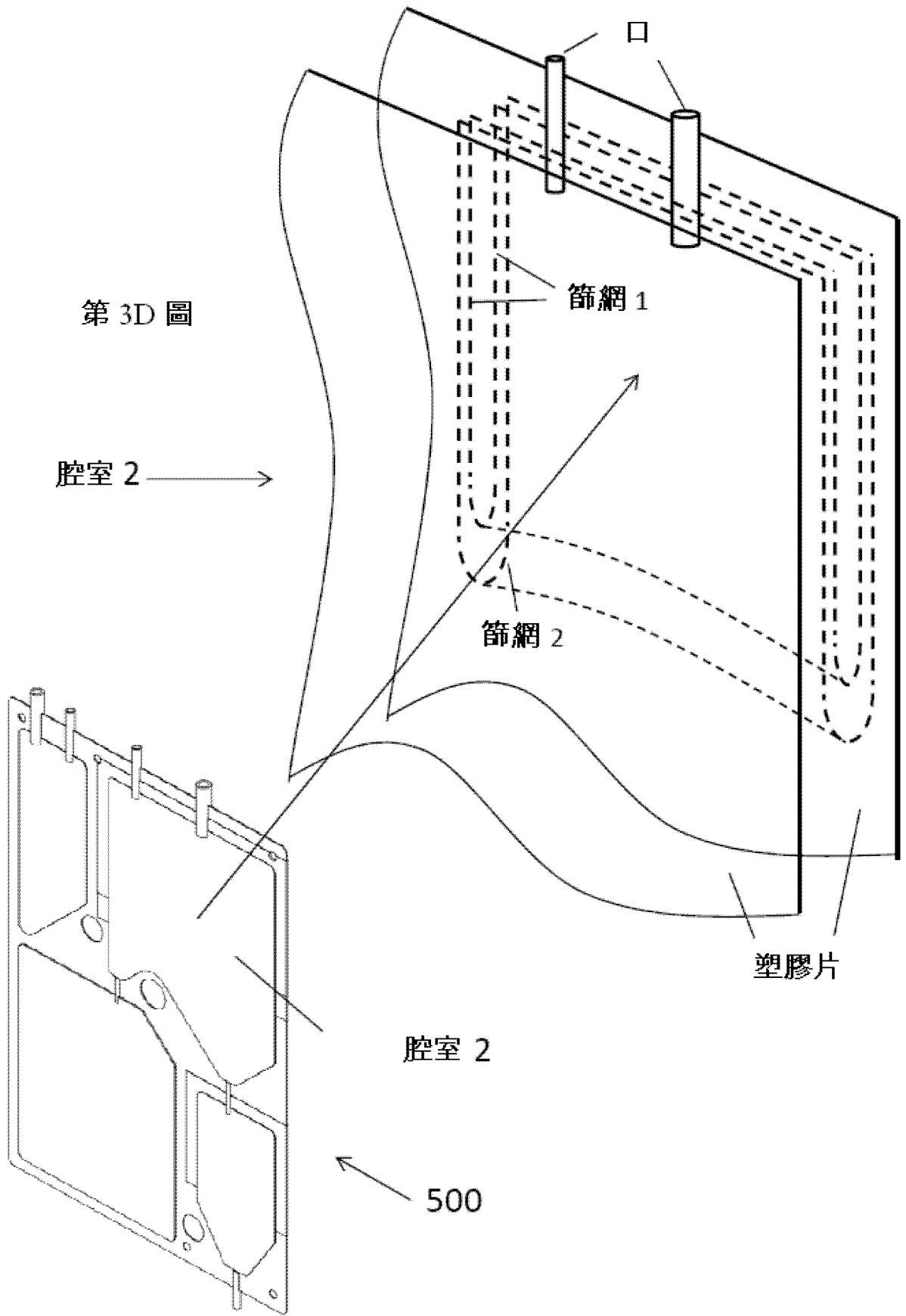


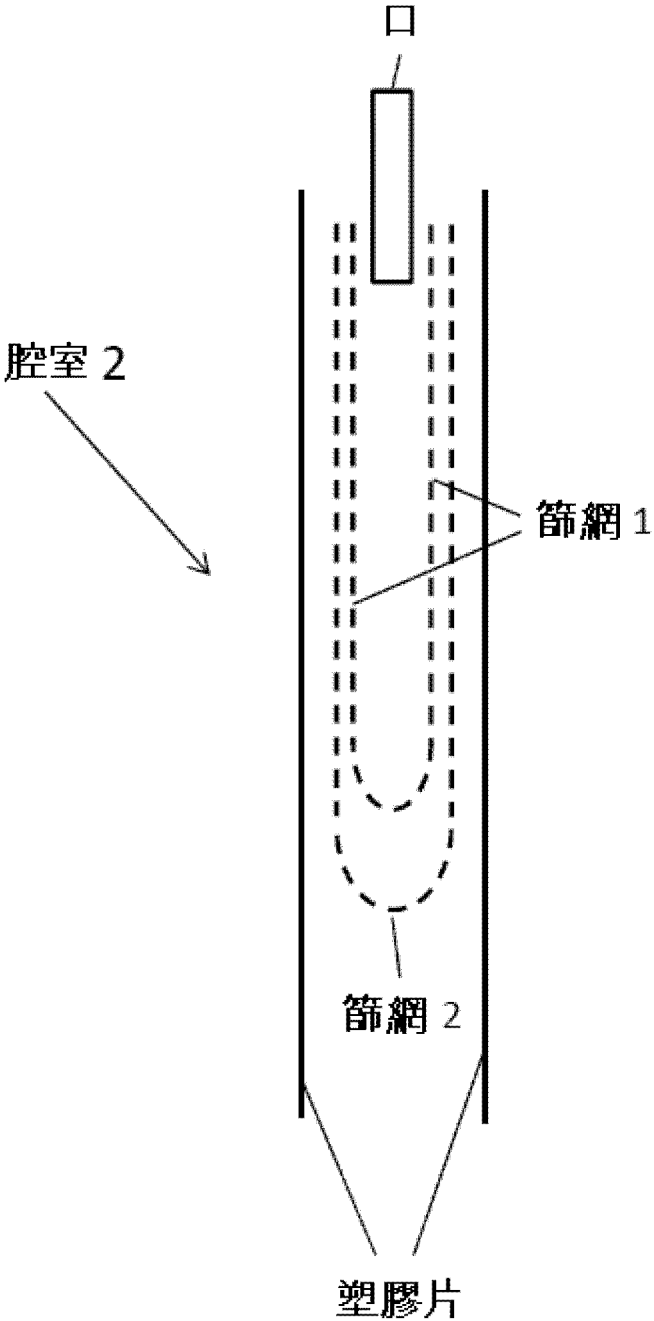
第 2G 圖



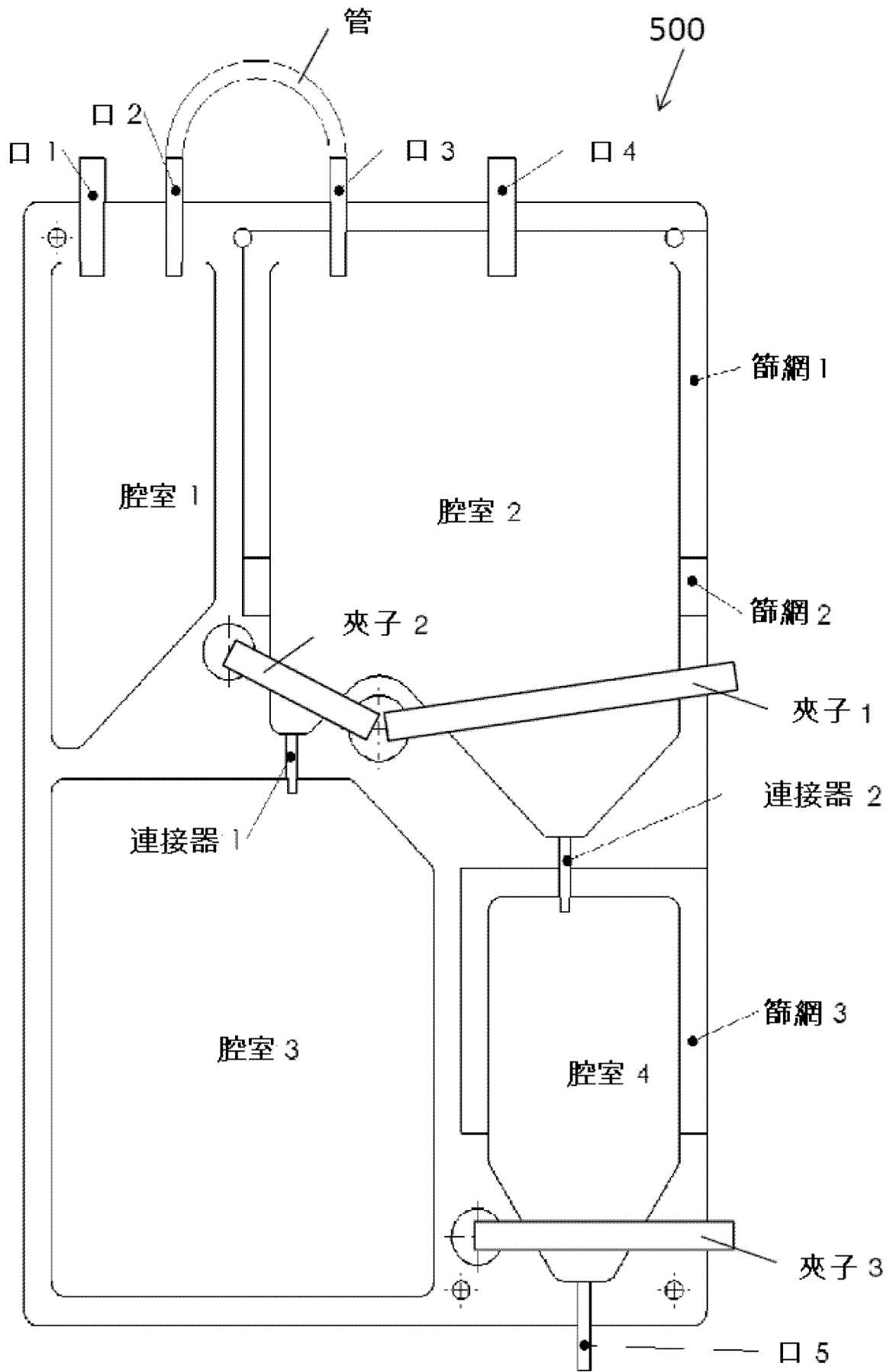
第 3A 圖



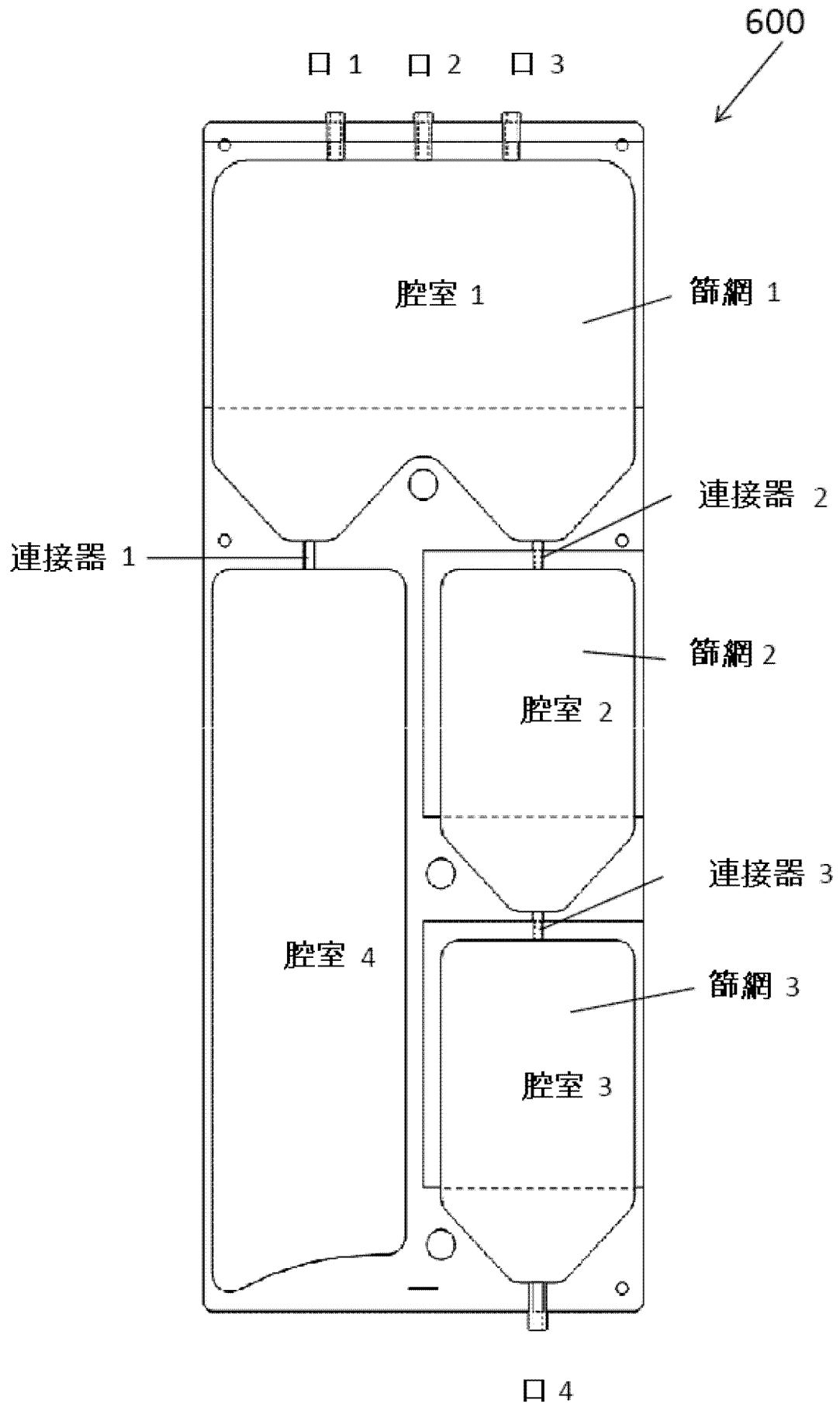




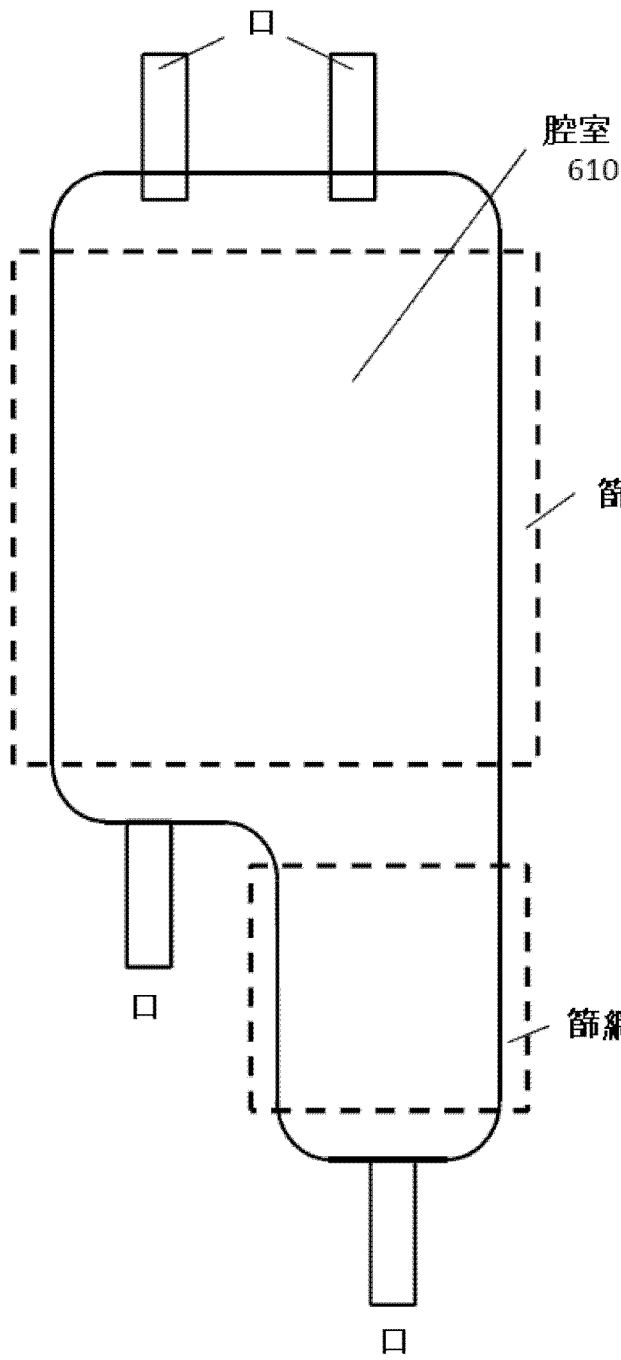
第 3E 圖



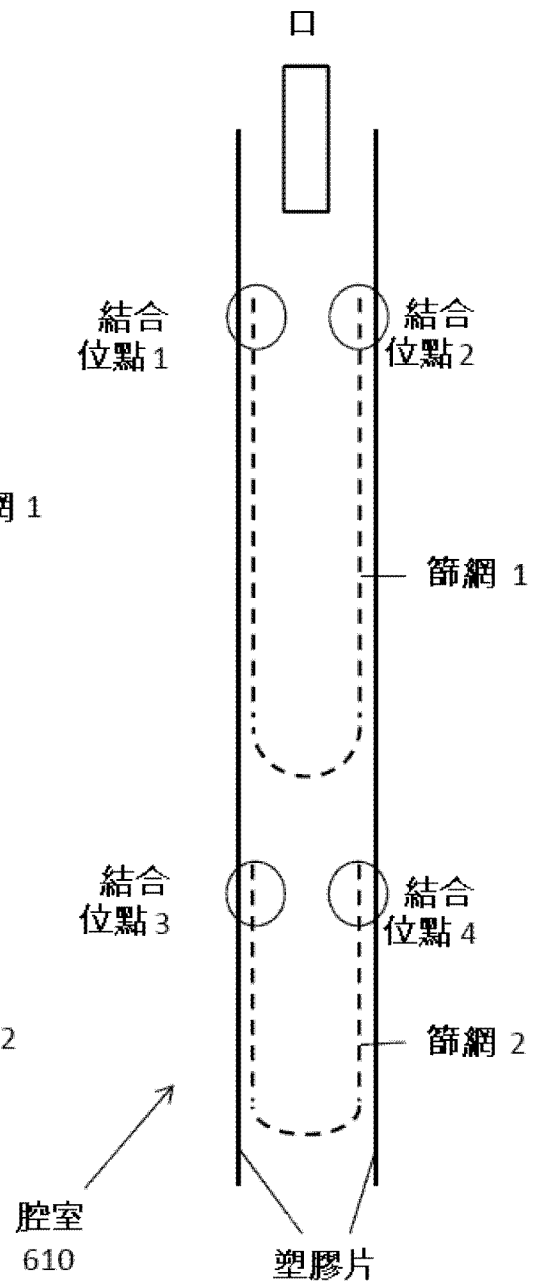
第 3F 圖



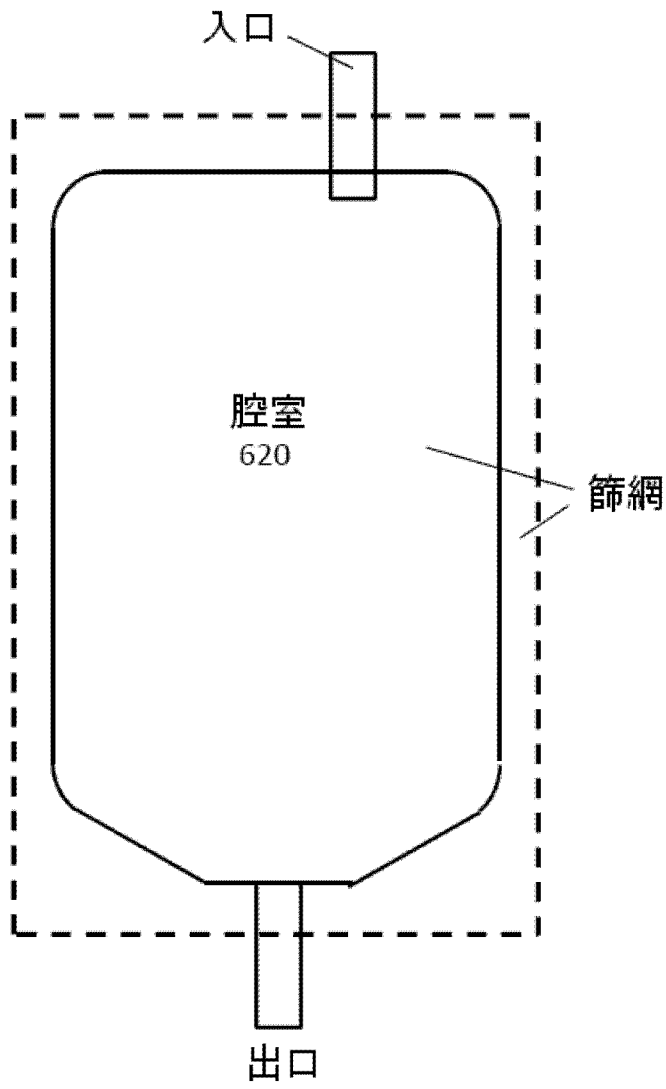
第 4 圖



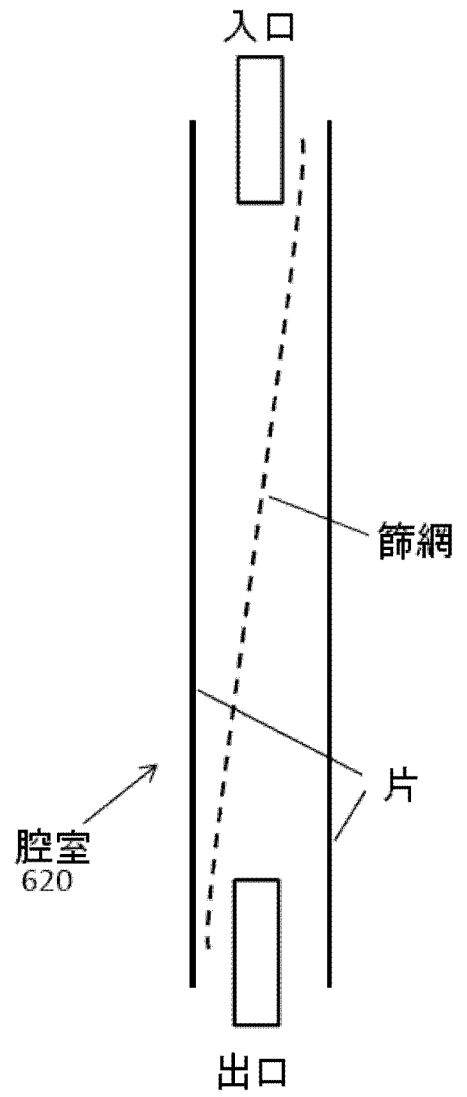
第 5A 圖



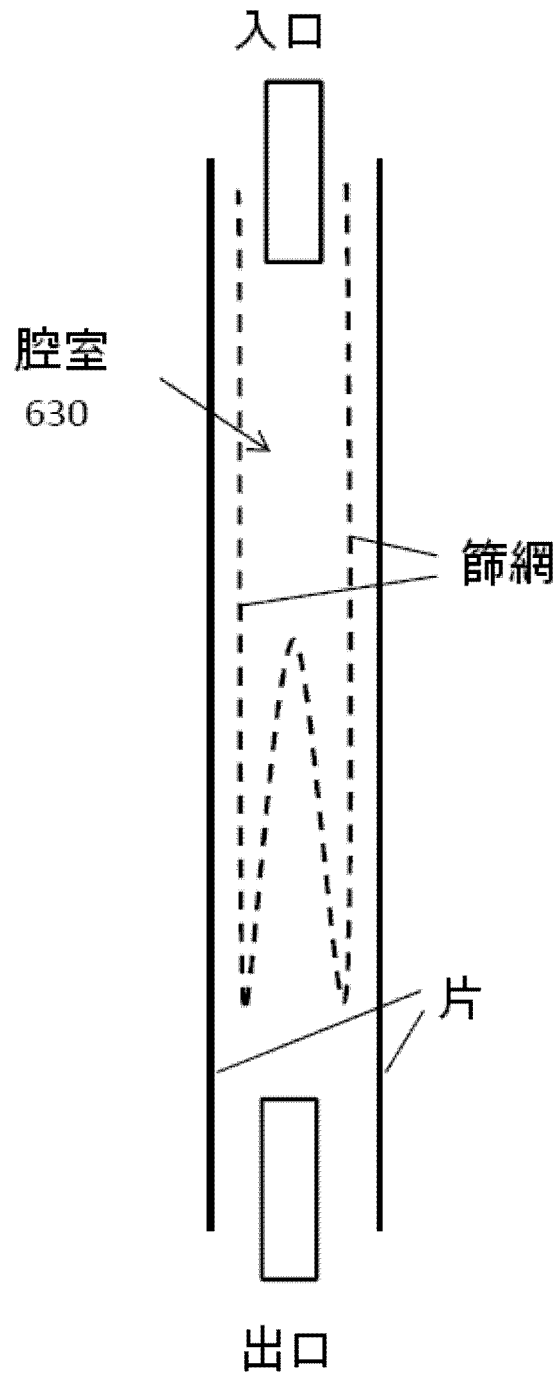
第 5B 圖



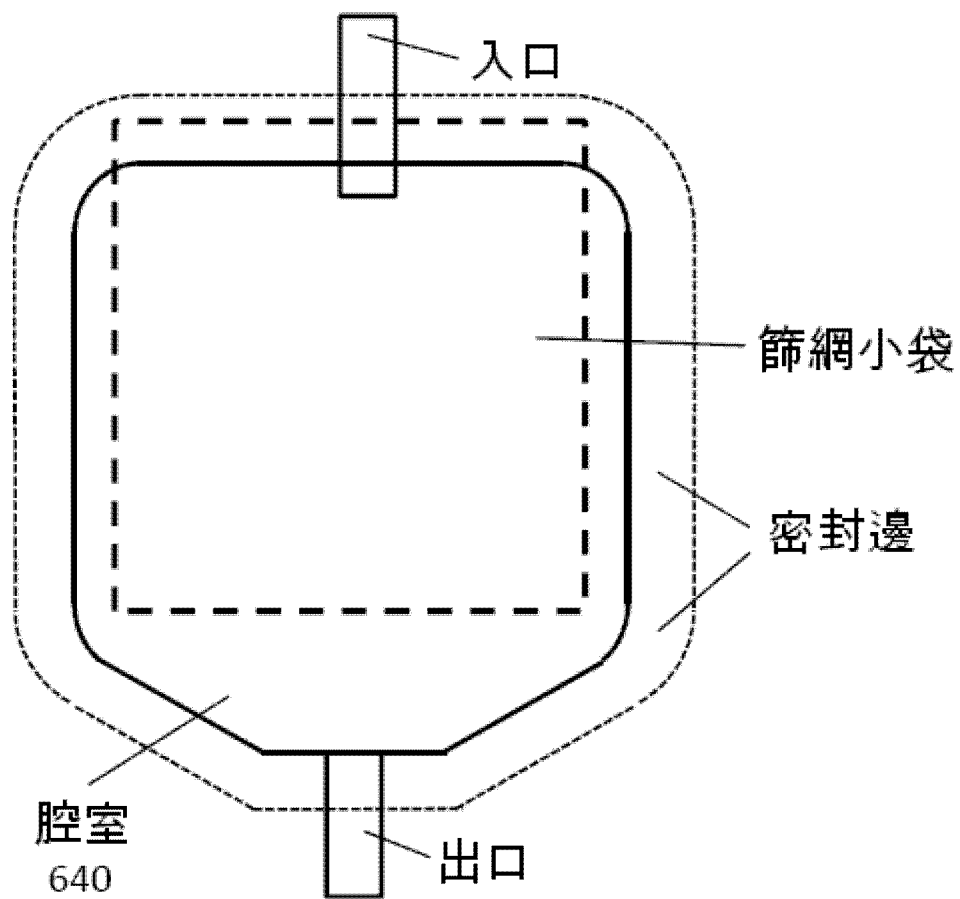
第 6A 圖



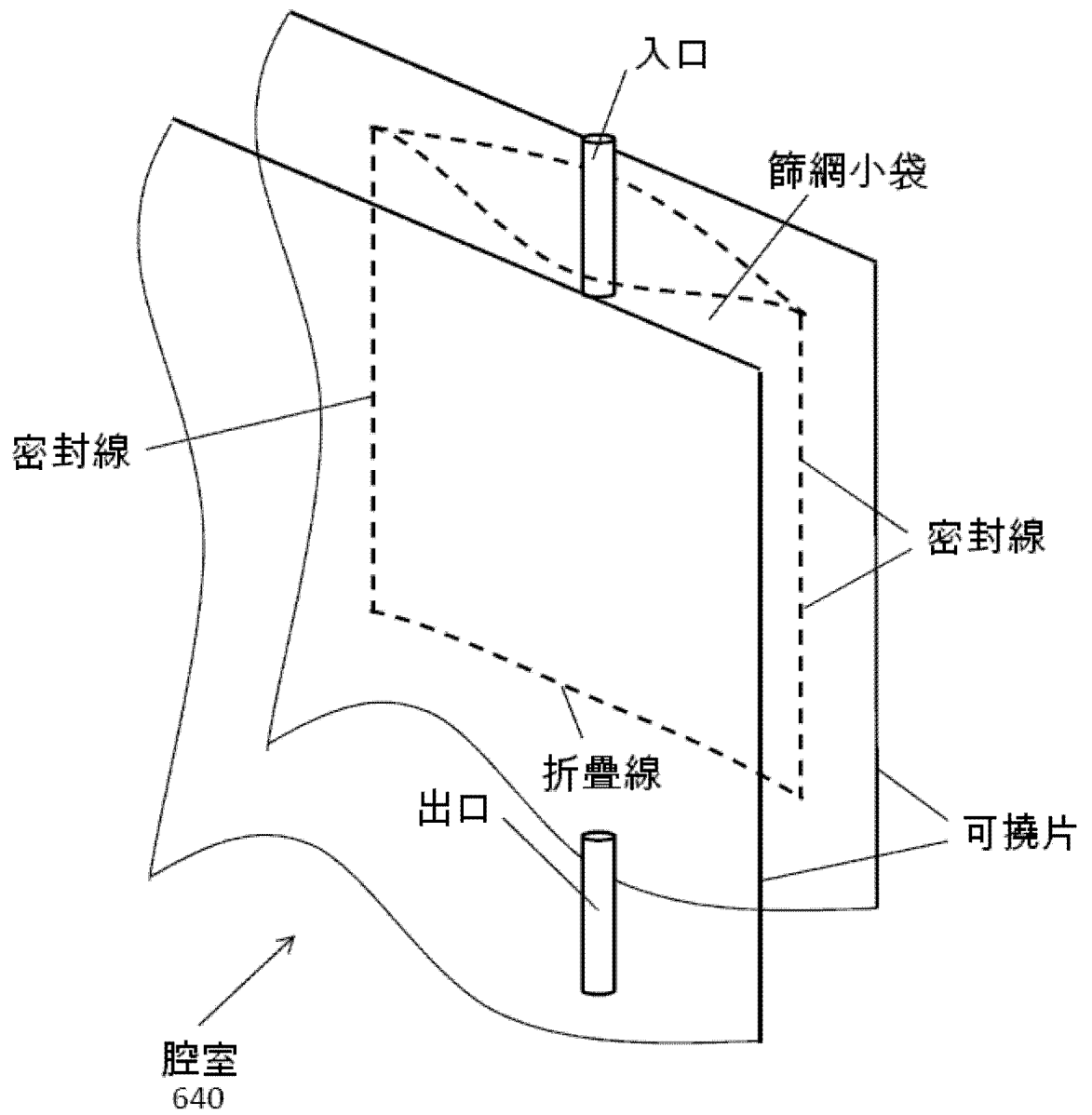
第 6B 圖



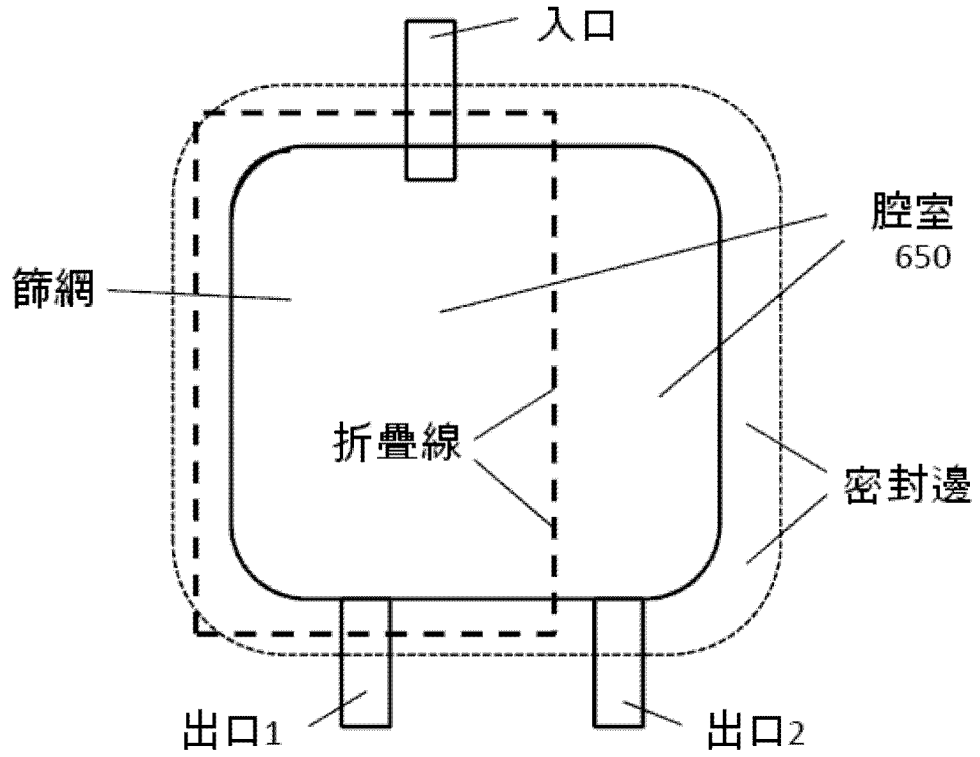
第 7 圖



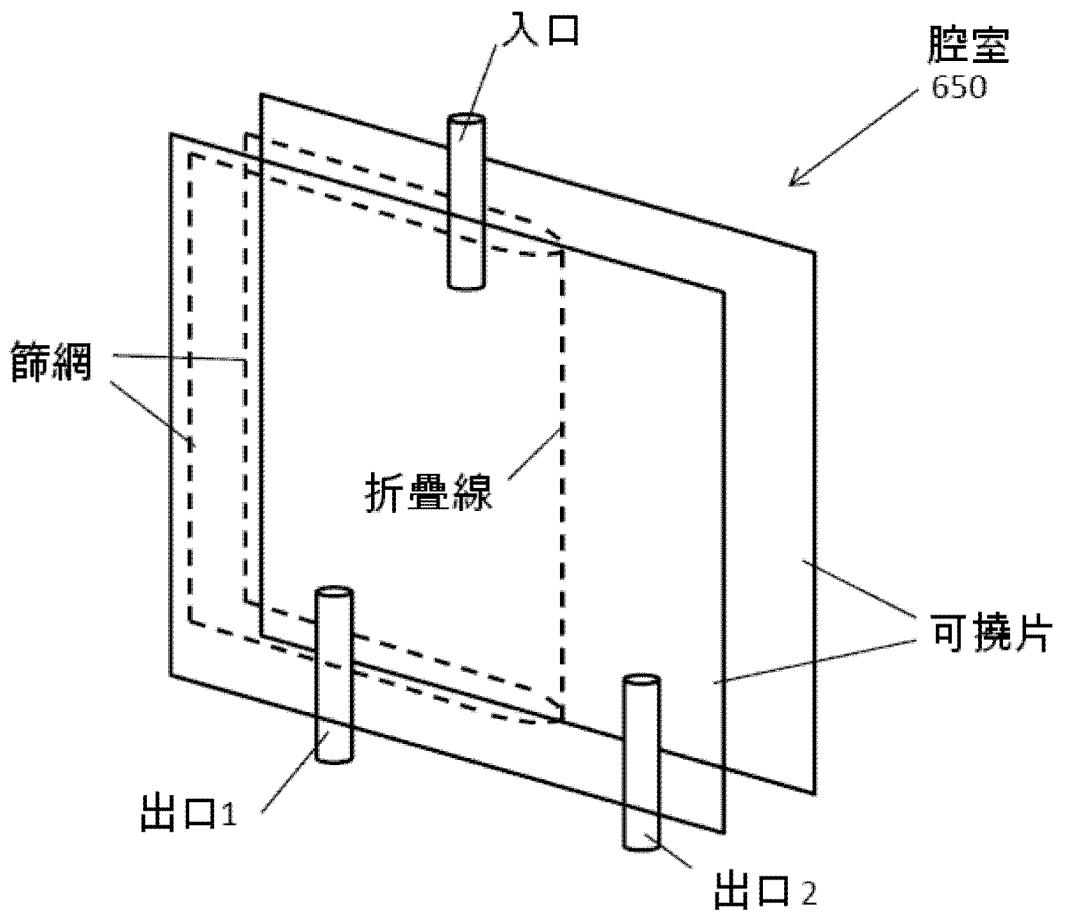
第 8A 圖



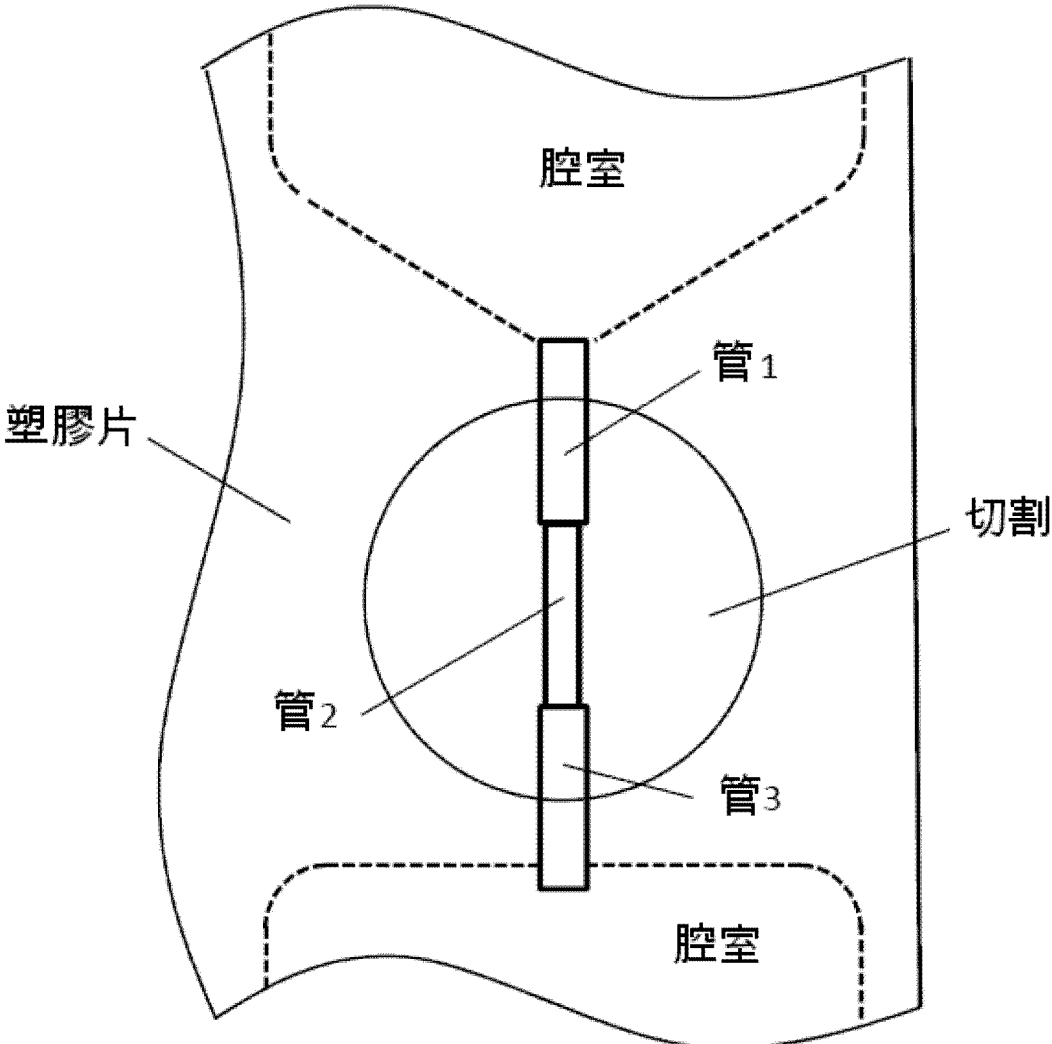
第 8B 圖



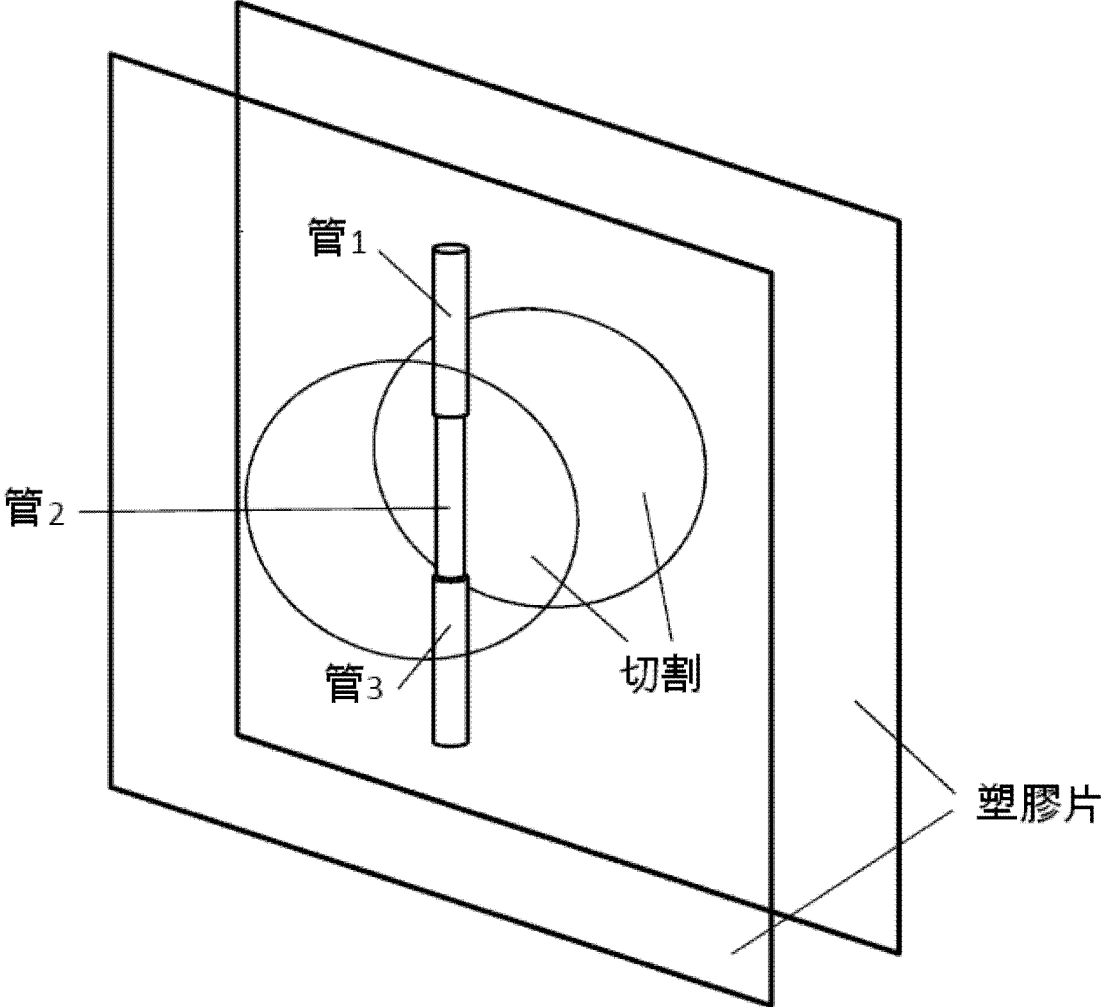
第9A圖



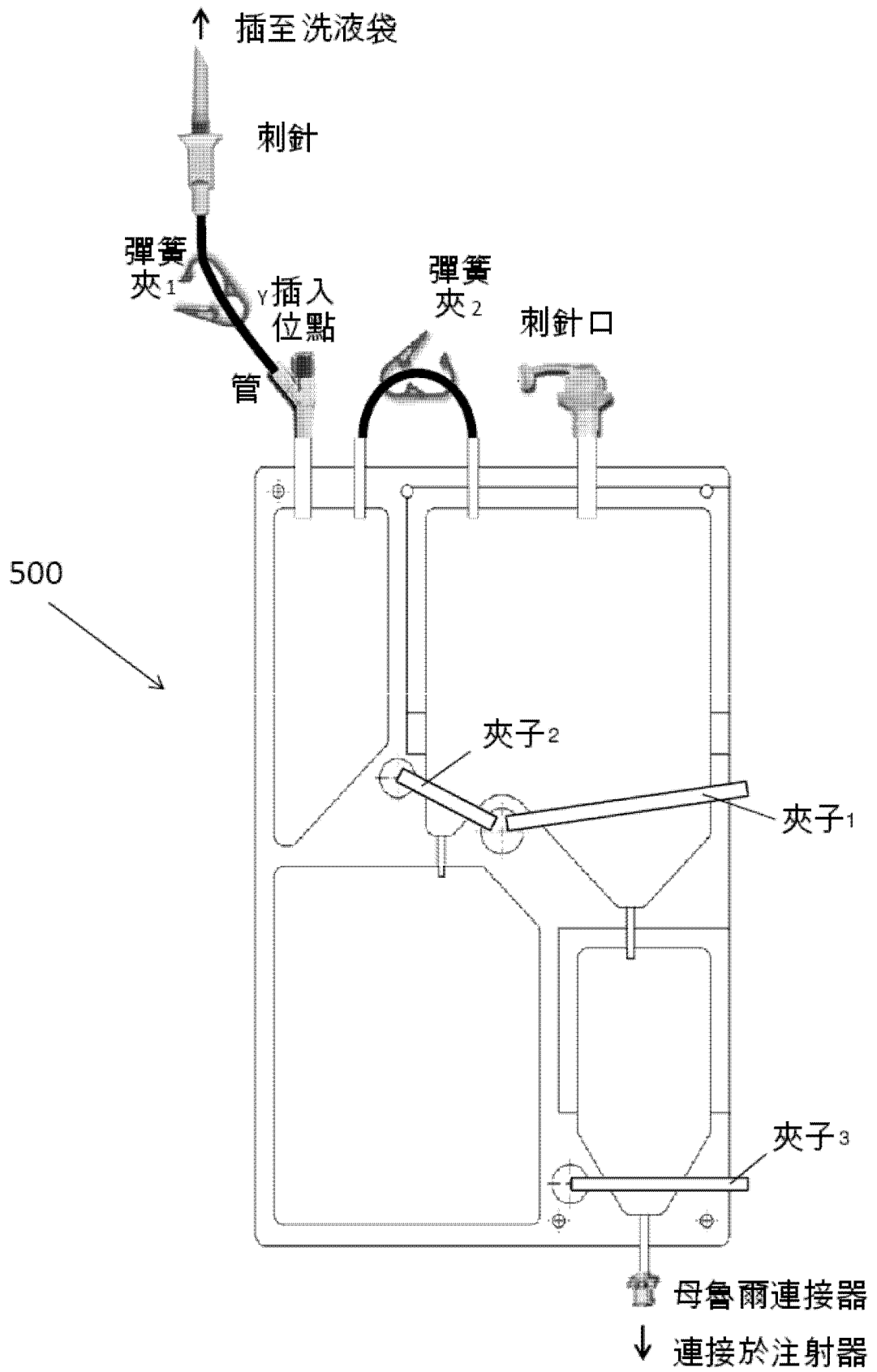
第9B圖



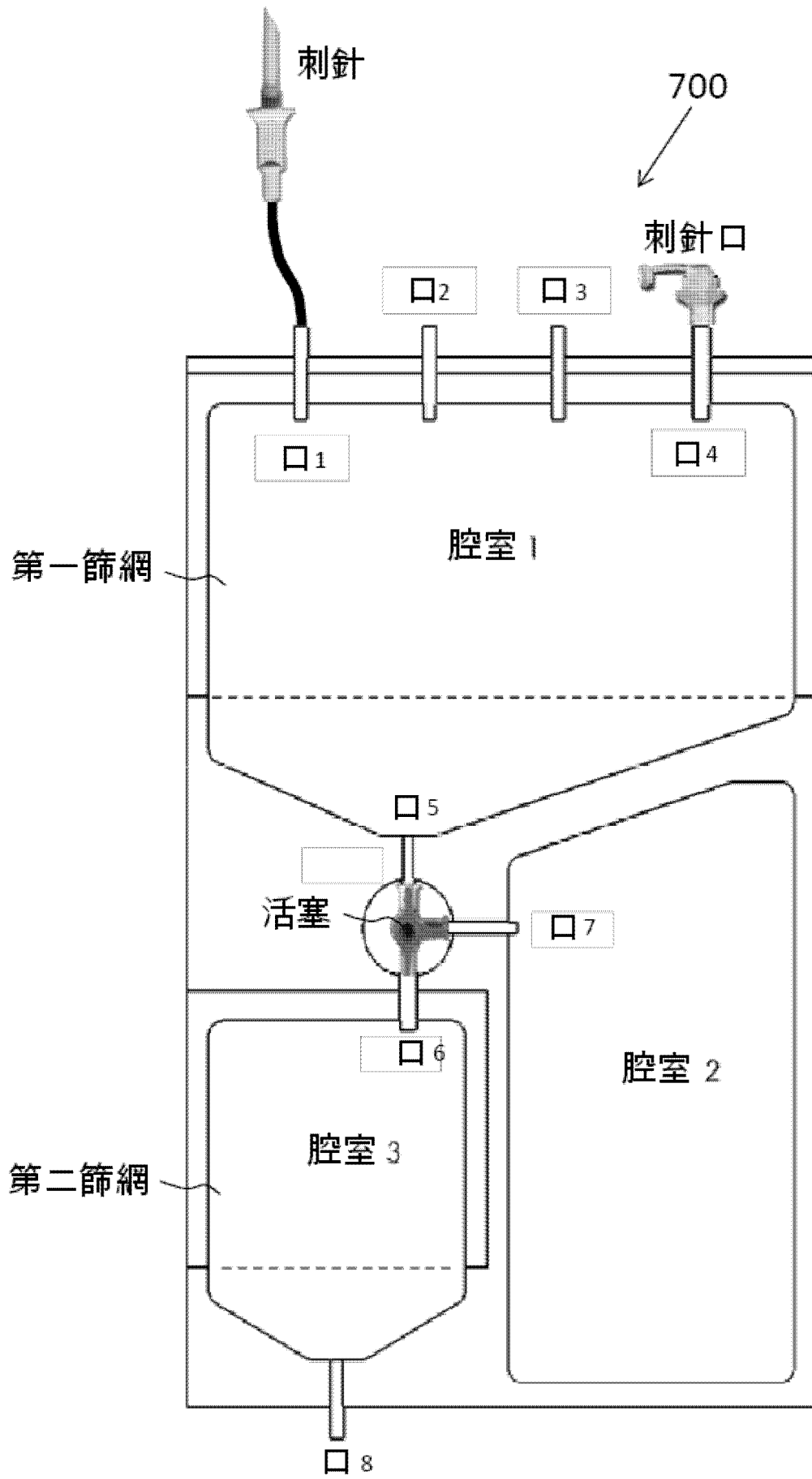
第 10A 圖



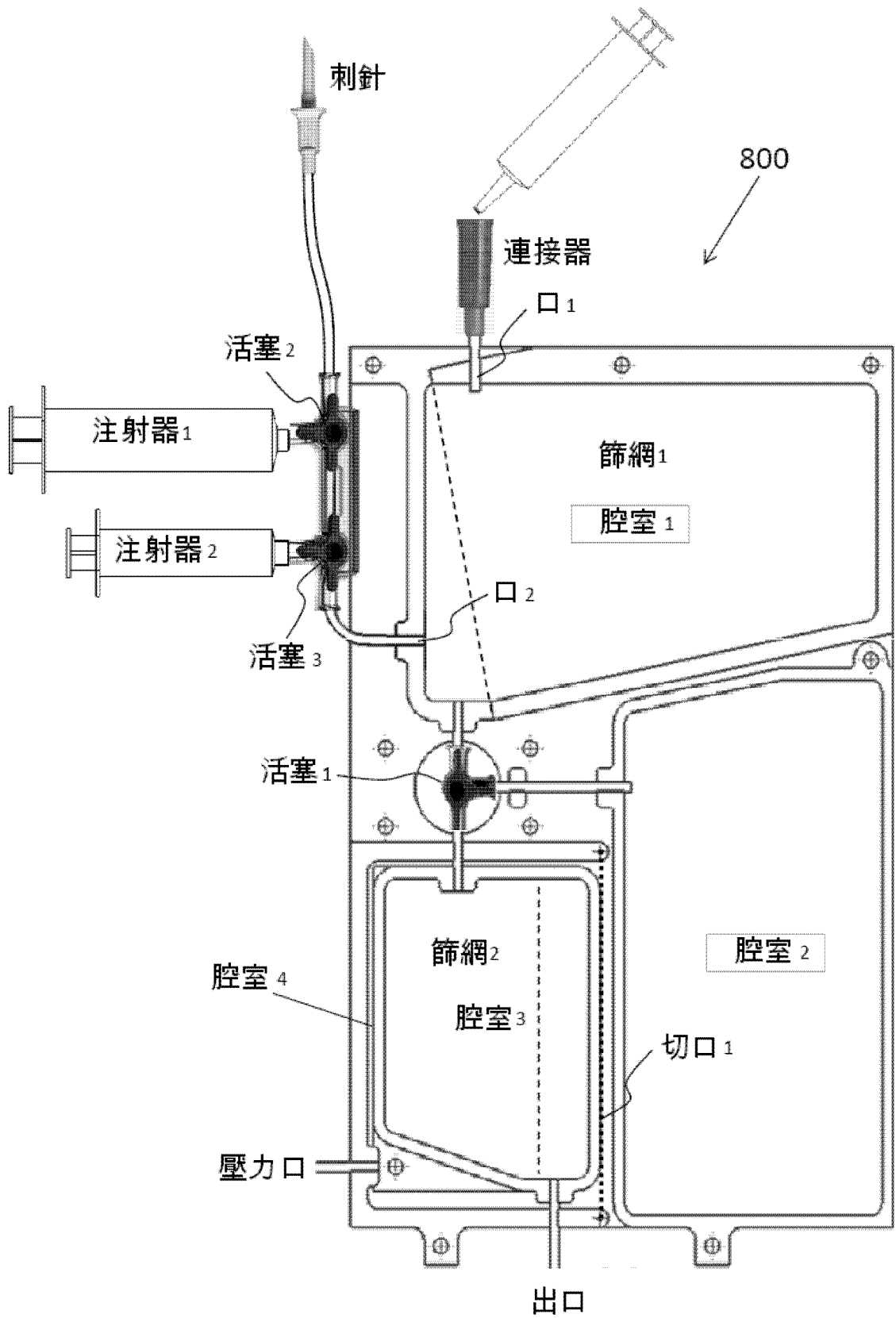
第 10B 圖



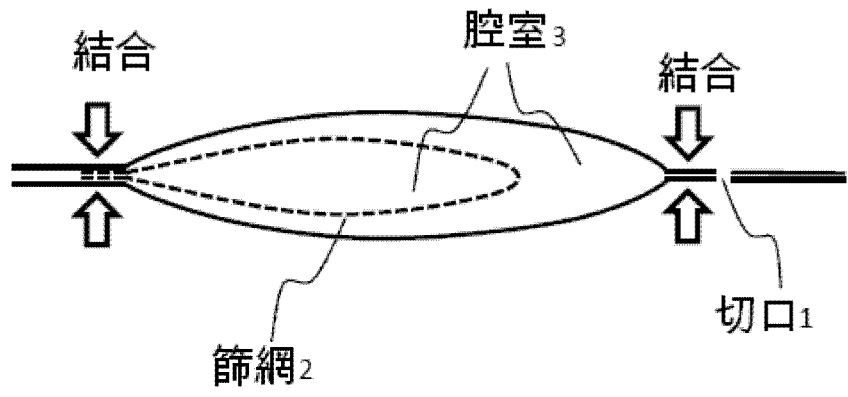
第 11 圖



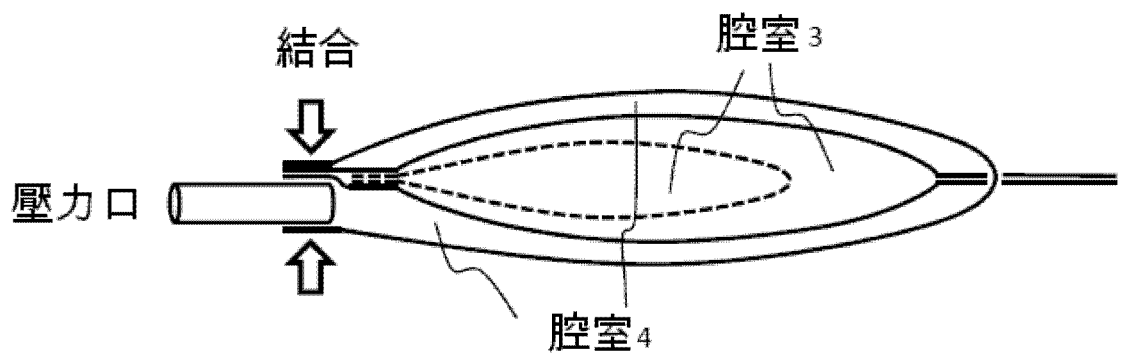
第 12 圖



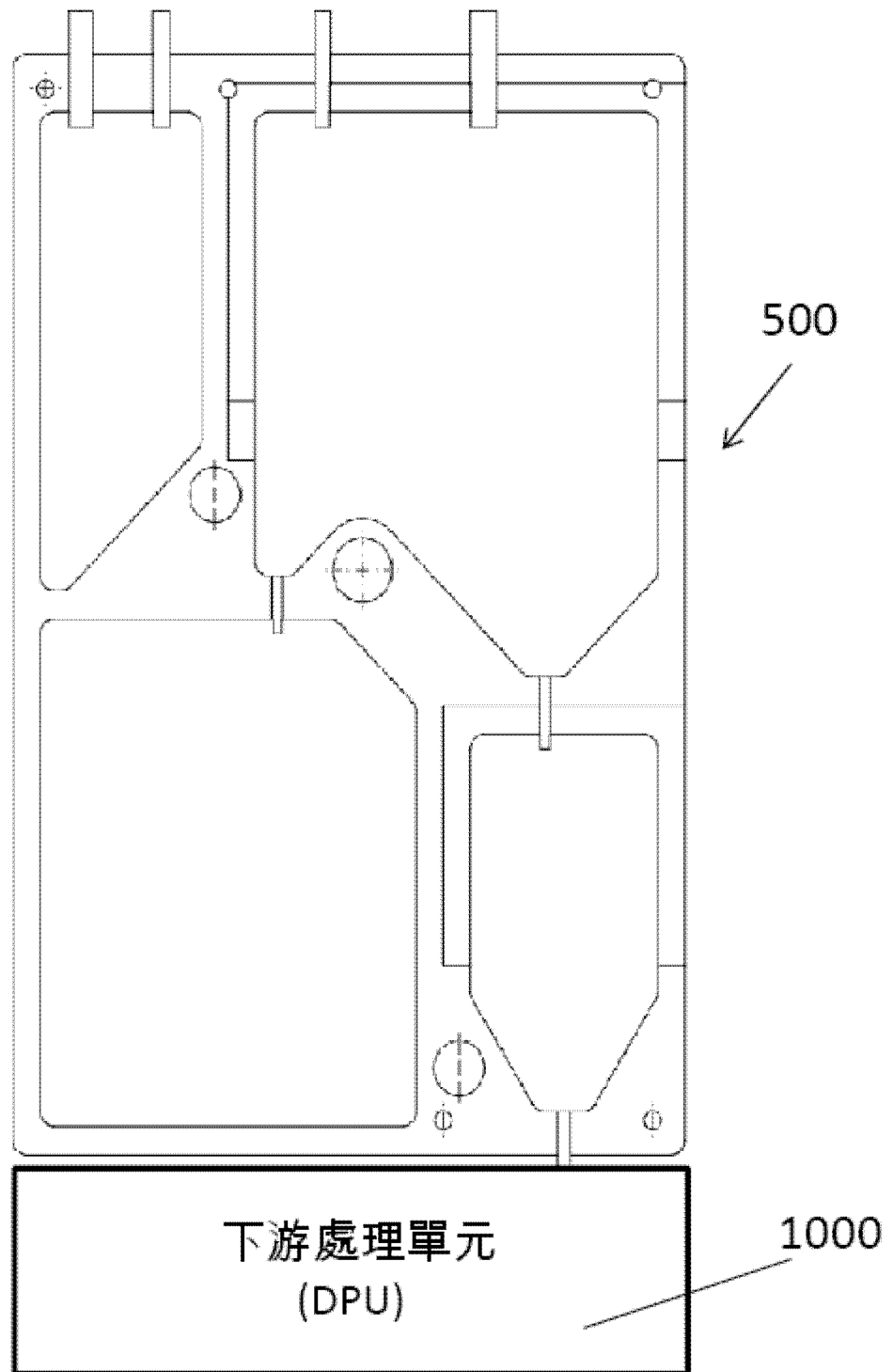
第 13A 圖



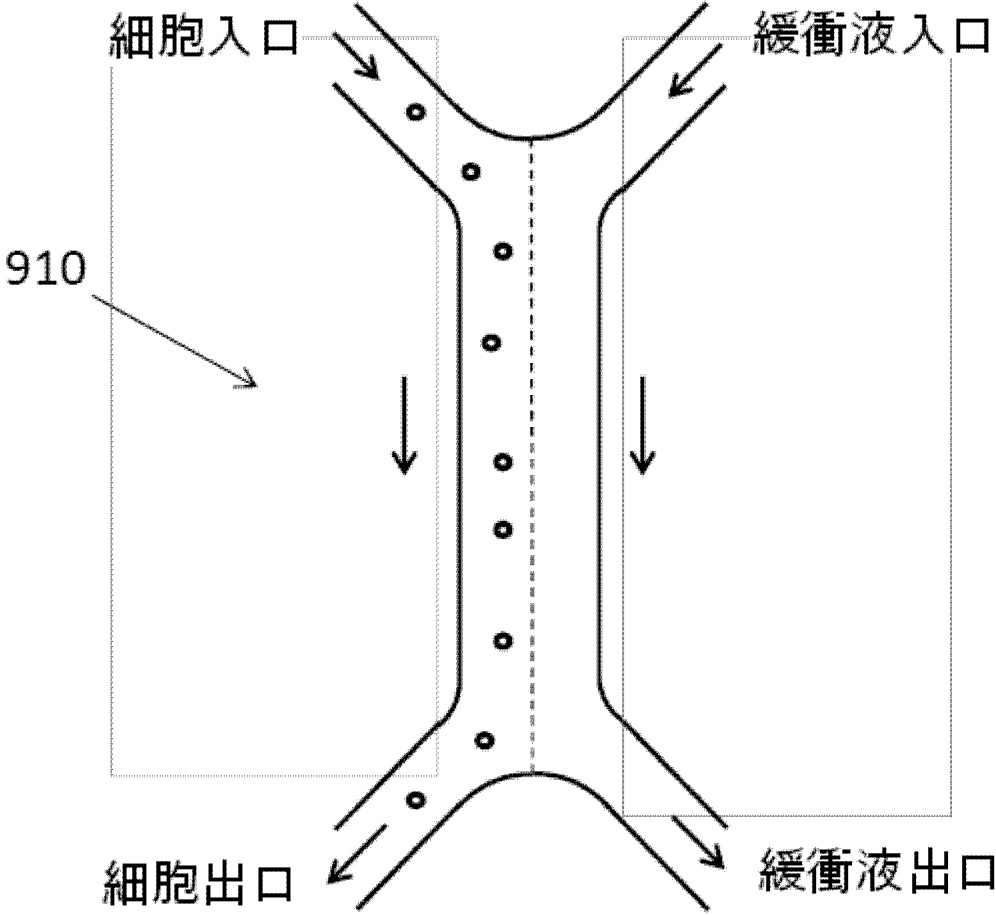
第 13B 圖



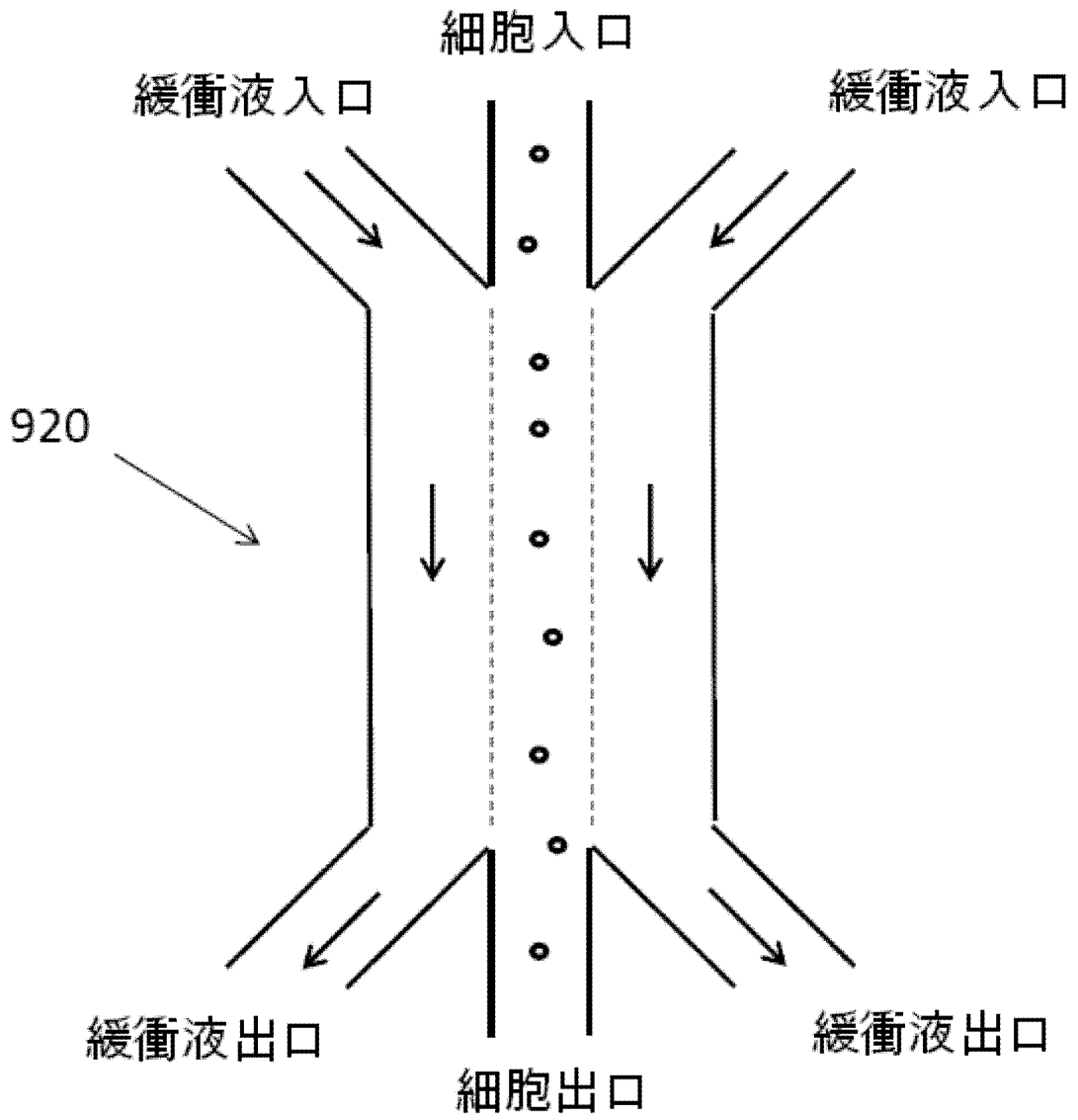
第 13C 圖



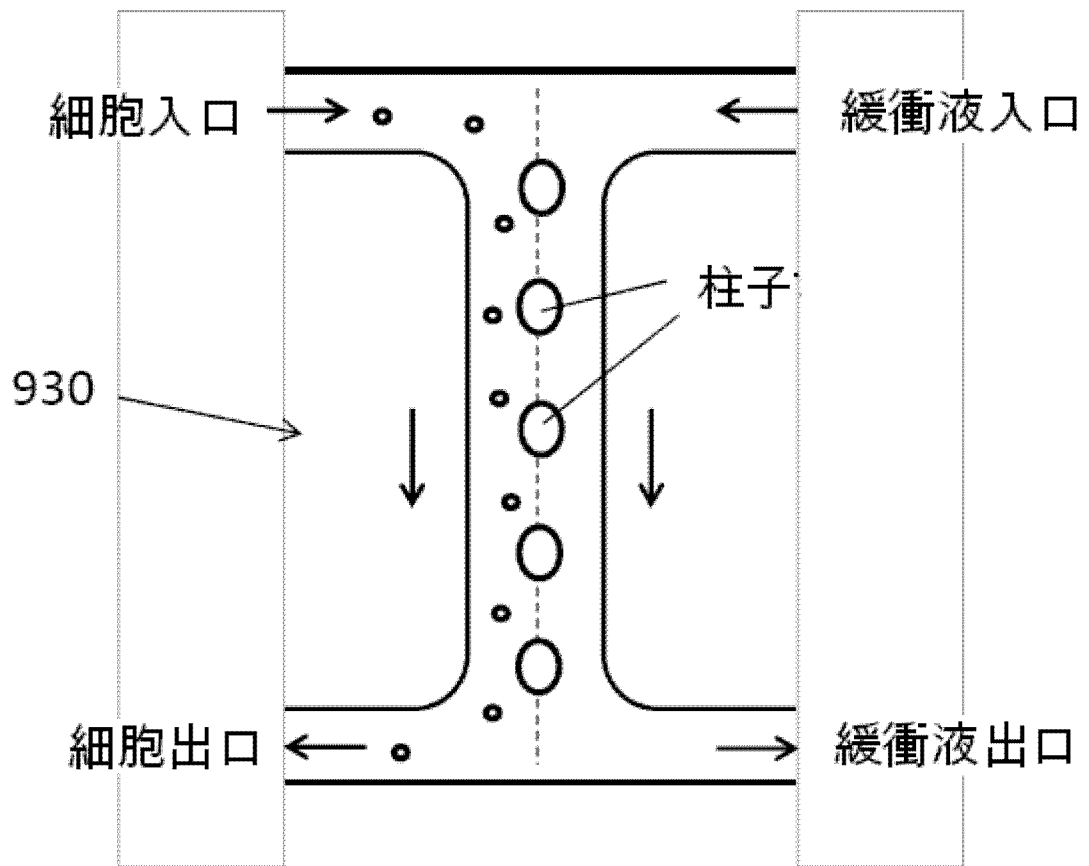
第 14 圖



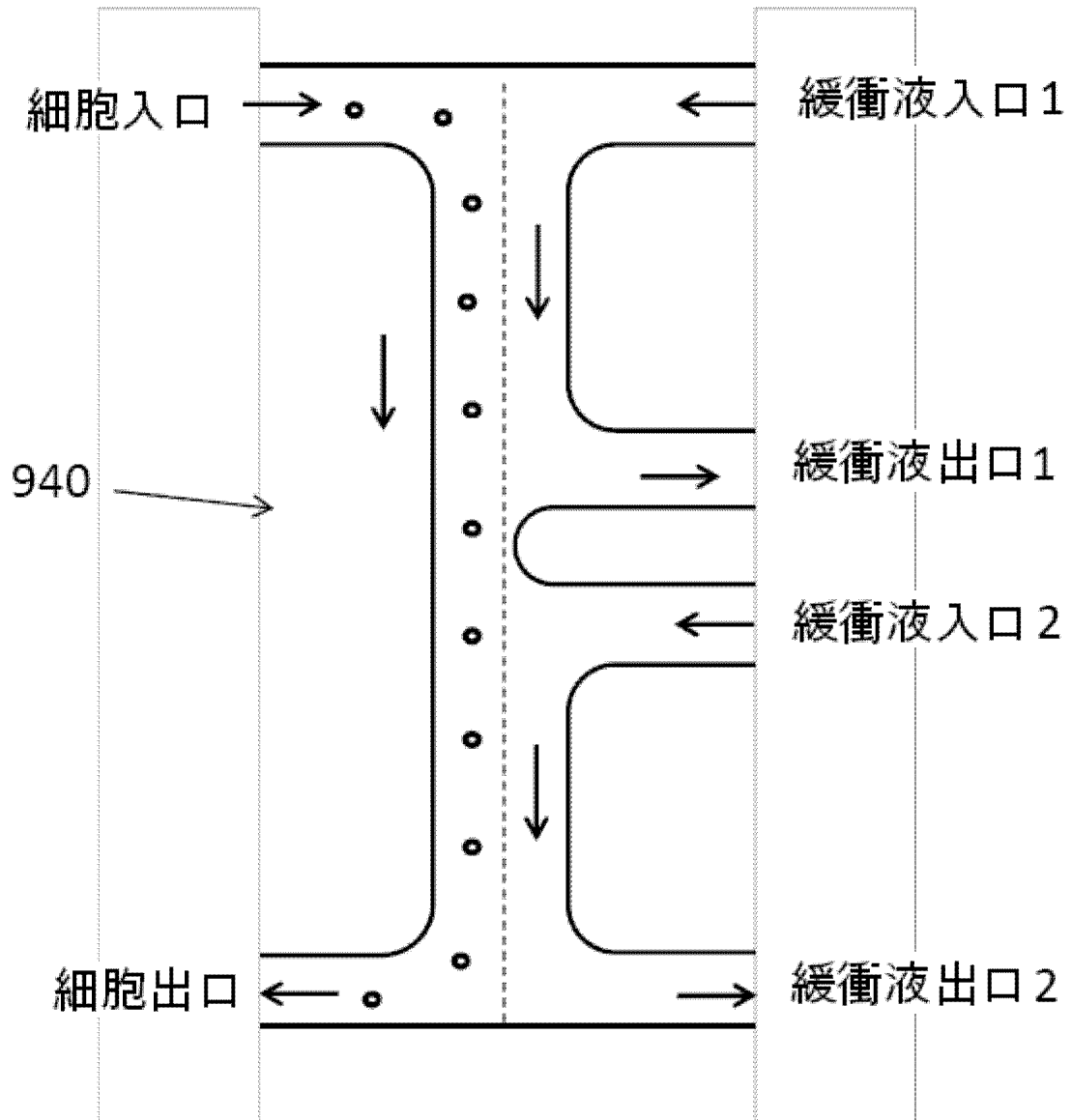
第 15A 圖



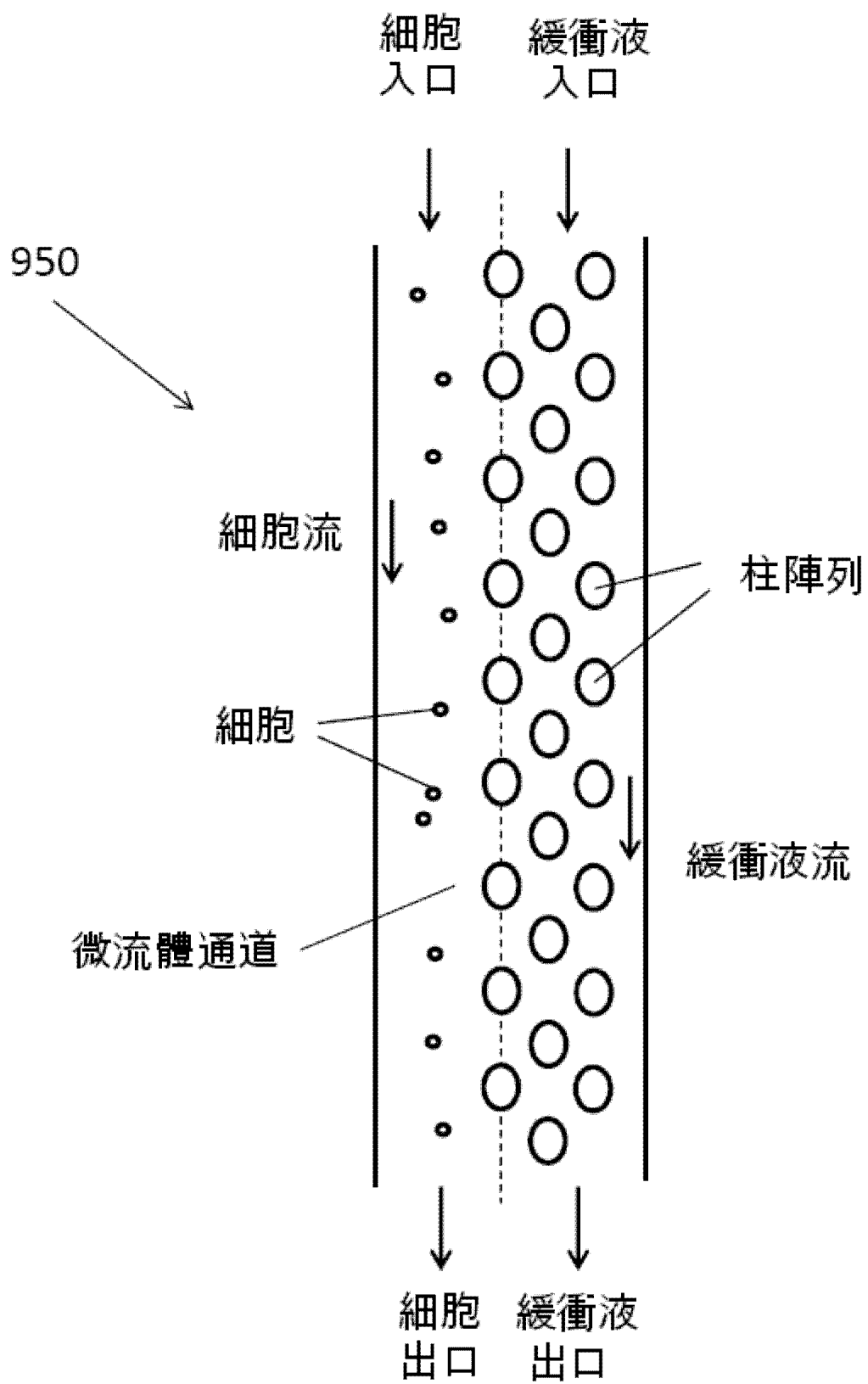
第 15B 圖



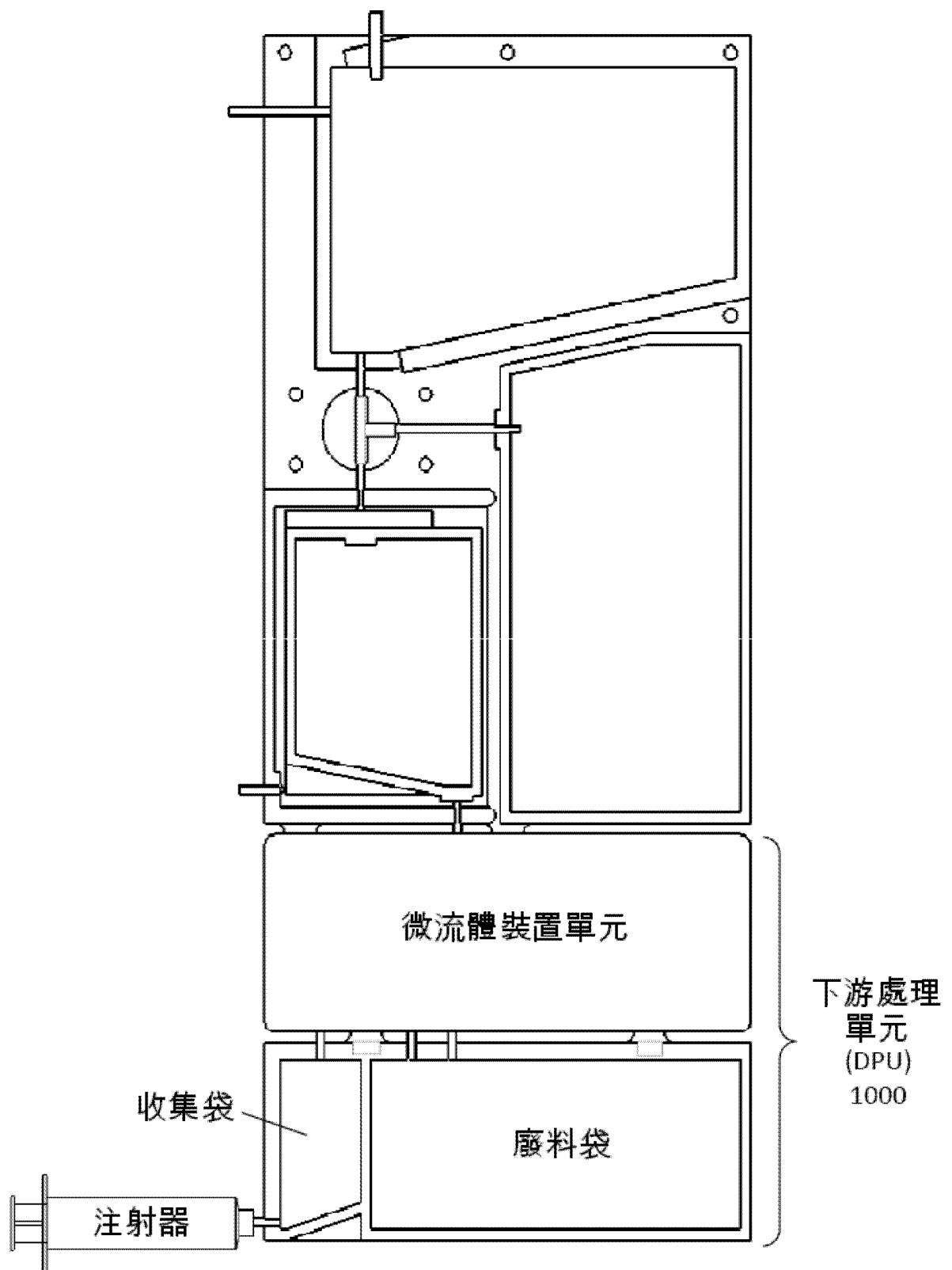
第 15C 圖



第 15D 圖



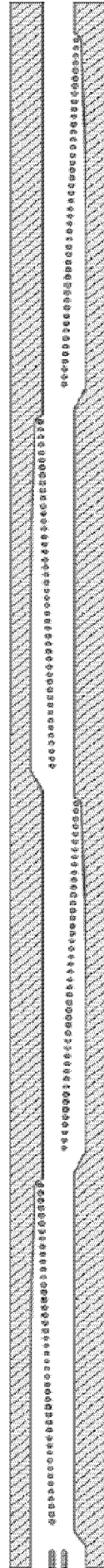
第 15E 圖



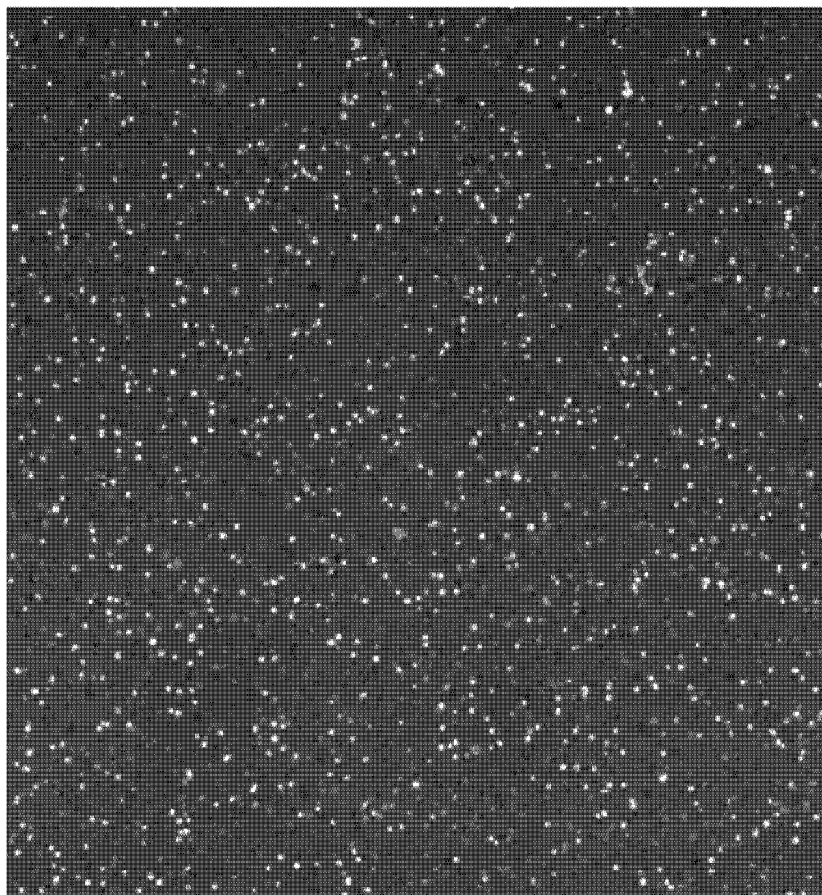
第 16 圖

第 17 圖

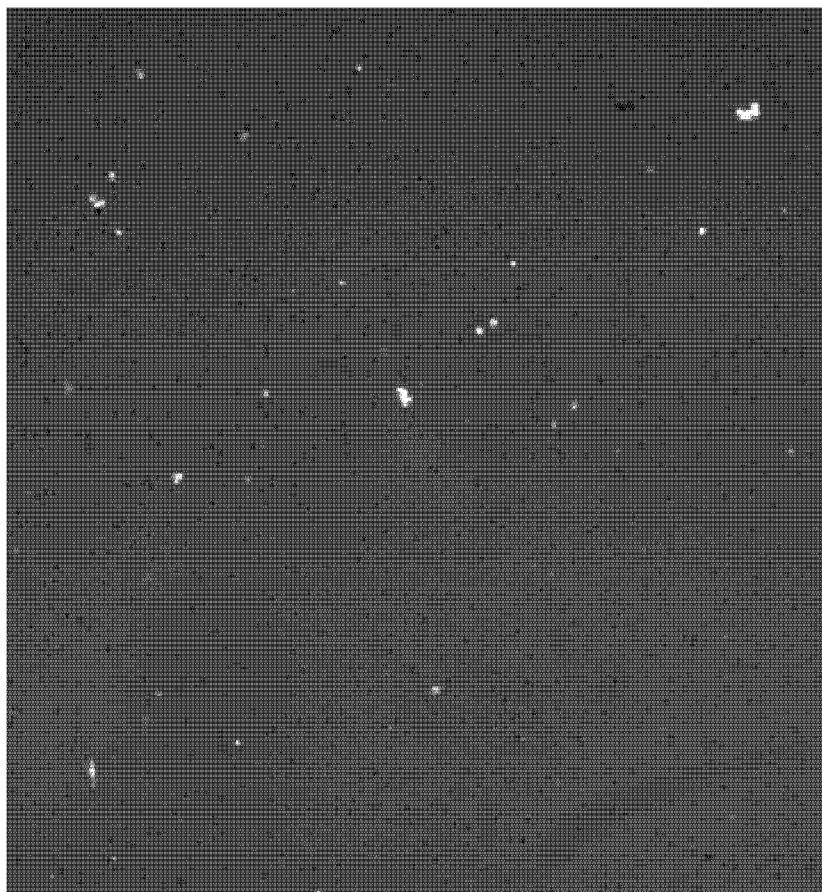
1100



第 18A 圖



第 18B 圖



102年3月20日 修正

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1A ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

110……· 移除過量流體

120……· 解離脂肪組織

130……· 移除游離油、基質纖維、組織碎片及不期望之細胞

140……· 減少紅血球(RBC)

150……· 濃縮相關細胞

160……· 洗滌細胞

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

110……移除過量流體

120……解離脂肪組織

130……移除游離油、基質纖維、組織碎片及不期望之細胞

140……減少紅血球(RBC)

150……濃縮相關細胞

160……洗滌細胞

○ 200……流程圖

210……預調節脂肪組織

220……脂肪組織解離

230……精製所釋放細胞

300……樣本處理裝置

305……第一入口

310……樣本調節室

○ 315……第二入口

320……廢料室

325……第一出口

330……流量控制裝置

330B……流量控制裝置

335……第二出口

340……樣本

345……流體連接之構件

350……沖洗液

360……樣本

370……活塞

380……注射器

400……樣本處理裝置

405……第一入口

410……解離室



415……第二入口

420……細胞精製裝置

425……出口

430……解離液

435……閥門

440……精製細胞

445……入口



455……出口

500……樣本處理裝置

500A……樣本處理裝置

500B……指示之樣本處理裝置

505……第一入口

510……第一腔室

515……第二入口

520……廢料容器

525……第三入口

530……細胞精製裝置

540……體積量測裝置

600……樣本處理裝置

620、630、640、650……腔室

1000……下游處理單元(DPU)

910、920、930、940、950……微流體通道



1100……微流體裝置

**【生物材料寄存】**

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】



**【序列表】** (請換頁單獨記載)