



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101801431 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 19

(21) 申请号 200880101718. 2

B01D 21/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 06. 20

B04B 1/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 35/12 (2006. 01)

60/945, 733 2007. 06. 22 US

A61M 1/36 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2010. 02. 03

US 6027655 A, 2000. 02. 22, 全文.

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2005/0095695 A1, 2005. 05. 05, 全文.

PCT/US2008/067677 2008. 06. 20

US 2005/0184012 A1, 2005. 08. 25, 说明书第

(87) PCT国际申请的公布数据

18-39 段, 图 1-5.

W02009/002849 EN 2008. 12. 31

审查员 薛林

(73) 专利权人 循环生物制品有限责任公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 马修·R·凯尔 托马斯·库尔

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

A61M 1/02 (2006. 01)

A61M 1/34 (2006. 01)

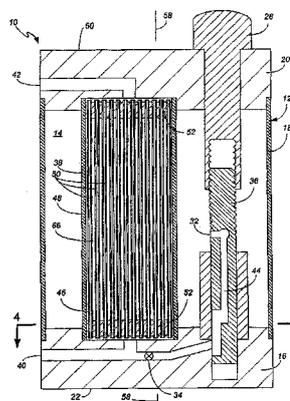
权利要求书2页 说明书29页 附图8页

(54) 发明名称

流体浓缩器和自体浓缩体液及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了对流体进行浓缩的装置和方法以及用该被浓缩的流体对患者进行治疗的方法。所述浓缩设备包括界定出分离室 (14) 的主壳体 (12)、过滤器壳体 (48), 该过滤器壳体 (48) 包括具有滤芯的过滤器 (46)、将被浓缩的流体从分离室移动到过滤器的管道 (44), 和用来对被浓缩的流体加压以通过过滤器滤芯的端口 (32)。本发明可提供了被浓缩的体液 (包括自体浓缩体液) 的多种用途。例如, 被浓缩的流体可以用于外科应用中, 包括移植应用, 比如说异体移植、异种移植和自体移植应用。



1. 一种流体浓缩器,该流体浓缩器包括:
主壳体,该主壳体界定出用于容纳包括组织的体液的分离室;
过滤器壳体,该过滤器壳体与所述分离室相连;
容纳于所述过滤器壳体内的包括生长基质的过滤器;
用于将包括组织的体液的级分从所述分离室向所述过滤器进行移动的管道;
其中,所述分离室包括位置可调的第一端口,该第一端口与所述管道流体连通。
2. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,该流体浓缩器还包括一个或多个端口用来对经过所述过滤器的流体级分加压。
3. 根据权利要求2所述的流体浓缩器,该流体浓缩器还包括相对于所述一个或多个端口的可移动安装的泵用来对经过所述过滤器的流体级分加压。
4. 根据权利要求3所述的流体浓缩器,其中,所述泵为注射器或具有贮液槽的真空泵。
5. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,该流体浓缩器还包括至少一个用来施加真空压力以通过过滤器的端口。
6. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述分离室包括第二端口以将所述包括组织的体液引入所述分离室。
7. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述分离室界定出离心过程中的纵向导向,并且其中,所述过滤器壳体和过滤器界定了过滤过程中被提取的级分的纵向流动方向,该纵向流动方向与所述分离室的纵向导向一致。
8. 根据权利要求7所述的流体浓缩器,该流体浓缩器还包括相对于一个或多个部分,可移动安装的泵以对所述过滤器的第三部分分离的级分加压,以及沿所述过滤器纵向流动方向设置的浓度检测器。
9. 根据权利要求8所述的流体浓缩器,其中,所述浓度检测器设置于所述过滤器和泵之间。
10. 根据权利要求8所述的流体浓缩器,其中,所述浓度检测器包括光散射流通池、吸收池或分光光度计测量装置。
11. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述分离室包括过滤器。
12. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述过滤器内含有一种或多种配体。
13. 根据权利要求12所述的流体浓缩器,其中,所述配体为受体或抗体。
14. 根据权利要求12所述的流体浓缩器,其中,一种或多种所述配体结合有一种或多种生长因子、一种或多种分化因子、一种或多种趋化因子、一种或多种粘附分子,或者它们的组合。
15. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述生长基质为一种或多种纳米纤维网络;纳米原纤维结构;具有被蚀刻的或形成有微图案的表面的玻璃、硅或塑料;具有微米孔隙或纳米孔隙的玻璃、硅或塑料表面;聚合物支架;挤出支架;纺织品或网织品;棒;螺丝钉;金属丝;网状物或笼子。
16. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述组织包括骨、骨髓、肌组织、脑、心脏、肝脏、肺、胃、小肠、大肠、子宫卵巢、睾丸、软骨、软组织或乳腺组织。
17. 根据权利要求1所述的流体浓缩器,其中,所述组织包括结肠、皮肤或皮下组织。
18. 一种培养细胞或组织的方法,该方法包括

在根据权利要求 1 所述的流体浓缩器内对生物学流体进行分离；
将所需的细胞级份从权利要求 1 中所述分离室中取出；
并使被取出的所需的细胞级份通过权利要求 1 所述的过滤器，其中，所述过滤器为生长基质，由此使被浓缩的细胞接种于该生长基质上。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述分离包括离心或重量分离。

20. 根据权利要求 18 所述的方法，该方法还包括在促进细胞增殖和 / 或分化的条件下对含有被浓缩的细胞的生长基质进行培养。

21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述生物学流体包括血液或碎裂的组织。

22. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述生长基质含有一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子、干细胞，或者它们的组合。

23. 根据权利要求 18 所述的方法，其中，所述生长基质为一种或多种纳米纤维网络；纳米原纤维结构；具有被蚀刻的或形成有微图案的表面的玻璃、硅或塑料；具有微米孔隙或纳米孔隙的玻璃、硅或塑料表面；聚合物支架；挤出支架；纺织品或网织品；棒；螺丝钉；金属丝；网状物或笼子。

流体浓缩器和自体浓缩体液及其使用方法

[0001] 本申请是于 2008 年 6 月 20 日递交的国际专利申请, 归于美国国营公司——千禧医药技术公司 (MILLENNIUM MEDICAL TECHNOLOGIES, INC.) 名下, 该公司也是针对除美国以外所有指定国的申请人, 而美国公民马修·R·凯尔 (Matthew R. KYLE) 和托马斯·考尔 (Thomas COULL) 是仅针对美国作为指定国时的申请人。同时, 本申请要求 2007 年 6 月 22 日递交的美国临时专利申请序列号 No. 60/945, 733 的优先权。

背景技术

[0002] 本申请提供了一种用来对流体进行浓缩的装置和方法。更具体地说, 本申请提供了一种用来对自体生物学体液或体液进行浓缩的装置和方法。

[0003] 在医学领域内, 已经对浓缩和 / 或过滤体液进行了长期的实践。许多医学治疗需要将流体或胶状物质施覆到伤口或病位。对于一些医学治疗来说, 这种流体或胶状物质是从其他的人或动物的体液中获得的。也可以从其他物种获得组成体液或其他身体部分 (例如组织) 的体液, 且将它们用于人类患者。目前, 在人类医学应用中普遍使用的这种生物材料的实例是哺乳动物的血液和骨的组分, 例如包括来自人类、牛和猪类来源的异体 (allogenic) 移植材料、异种 (xenogenic) 移植材料或同源 (autogenic) 移植材料。在一些应用中, 在正在进行的流动过程中进行过滤和 / 或浓缩操作, 该过程中, 将体液同时从患者体内移出, 然后从下游循环回患者体内。在其他的应用中, 过滤和 / 或浓缩操作是在水浴过程中进行的, 该过程中, 将体液按单位从体内取出, 对其进行处理, 随后按单位循环回患者体内。

[0004] 最近已经对体液进一步地进行了过滤 (例如离心得到的血级分) 从而使滤液中的细胞或级分浓度得到提高。美国专利 No. 5, 733, 545、No. 6, 010, 627 和 No. 6, 342, 157 记载了这些实例, 上述专利通过引用而被结合于此。已经表明, 这些经过浓缩并被离心分离的体液在各种治疗模式下都是有效的, 例如直接将经过浓缩的血液成分施覆到整形伤口部位。然而, 上述专利教导的方法和装置存在的不足妨碍了它在操作环境下得到广泛的接受和使用。比如, 在治疗中使用来自其它的人或动物体液的流体或胶状物质, 当将它们施覆到患者上时会提高患者发生感染或疾病 (例如肝炎或艾滋病 (AIDS)) 的风险。而使用自体体液则能避免受到来自外部体液感染的风险。对人类进行治疗过程中使用获得自其它物种的体液或体液成分时, 可能会引起有害反应, 例如过敏、排斥等。使用自体体液还能避免排斥性反应和对外源流体或组织的有害排斥性反应的风险。

[0005] 因此, 需要一种装置和方法来对体液或自体流体进行有效的浓缩和 / 或过滤, 从而防止流体受到污染并使该流体能用于仍存在较高的污染、感染或排斥反应的风险的治疗过程中。

发明内容

[0006] 一方面, 本发明包括了治疗患者过程中所用的流体 (特别是自体流体) 进行浓缩的设备和方法。该浓缩设备包括界定出重力分离室的主壳体、过滤壳体, 该过滤壳体含有包

括滤芯 (filter element) 的过滤器、用来将分离室中经过浓缩的流体移动至过滤壳体的管道、和用来对经过所述过滤器滤芯的浓缩后流体加压的端口。在一种实施方式中,所述重力分离室为离心室。

[0007] 另一方面,本发明涉及制备和使用经过浓缩的体液。从患者中提取出体液或组织。将提取的物质分成不同的重力级分,例如通过离心分离、重量分离 (gravitational weight separation) 或将所提取的物质与引起分离和 / 或沉淀的反应剂混合。分离成不同的级分后,取出柱高的一部分,并使该级分通过过滤器。随后将所得的经过浓缩和过滤的产物施覆于提供起始体液或组织的同一患者或其他患者的特定部位上。根据对哪一级分进行浓缩和从何种体液中进行过滤的不同,可以在不同的情况下使用本发明。

[0008] 第三方面,在移植应用中使用经过浓缩的自体流体,所述移植应用包括异体移植、异种移植和自体移植的应用。被浓缩的自体流体可以用来使冻干或粉末状的异体移植材料、自体移植材料或异体移植材料重建。被浓缩的流体还能在植入过程中直接施覆在异体移植物或自体移植物上,被浓缩的流体中的生长因子促进了植入手术后的愈合和组织再生。可以将被浓缩的流体涂敷在异体移植材料上从而与涂敷在聚合物芯上的反应性官能团结合或互相作用,使异体移植在术后愈合所需的期间内以受控的方式释放生长因子。

附图说明

[0009] 图 1 为本发明第一实施方式的透视图;

[0010] 图 2 为图 1 中实施方式沿线 2-2 的剖面侧视图;

[0011] 图 3 为图 1 中实施方式沿线 3-3 的剖面侧视图;

[0012] 图 4 为图 2 和图 3 沿线 4-4 的剖面俯视图;

[0013] 图 5 为图 2 和图 3 的侧视图,对其进行了简化和改进以在一个视图上使全部功能得到展现,箭头 A-I 指示了体液通过本发明装置过程时逐个处理步骤;

[0014] 图 6 为本发明第二实施方式的剖面侧视图;

[0015] 图 7 为本发明第三实施方式的透视图,虚线表示被隐藏的细节;

[0016] 图 8 为图 7 所示实施例的剖面图。

[0017] 虽然上述经确定的附图描述了优选的实施方式,但是也可以构想出本发明的其他实施方式,它们中的一些在讨论中会有提及。在所有情况下,本公开通过描述而非限制性的方式展现了本发明所阐述的实施方式。

[0018] 本领域技术人员可做出许多其他微小改进和实施方式,这些都落入了本发明的范围和实质基准内。

具体实施方式

[0019] 参考附图对本发明的各种实施方式进行详细描述,其中,相同的附图标记代表全部视图中相同的部分。对各个实施方式的描述不对本发明的范围产生限制,本发明仅由随附权利要求书的范围限定。此外,任何在本说明书中进行了描述的实施例也不产生限制作用,而仅仅是提出所要求的发明中多种可能实施方式中的一部分。

[0020] 定义

[0021] 除非另有说明,本文中使用的全部技术术语和科技术语具有本领域技术人员通常知

晓的意思。任何与本文所描述的那些相似或等价的方法、装置和材料也可以在实践或测试中使用,下面对本发明的方法、装置和材料进行描述。

[0022] 术语“体液”指的是采集自受试者的生物学流体。所述受试者可以为哺乳动物,包括但不限于人类、牛、猪、绵羊、马或山羊。体液可以是自体的。所述体液包括但不限于:血液、血浆、血清、尿液、唾液、粘膜液、脑脊液、淋巴液、精液、羊水、玻璃体液,以及从患者细胞的细胞培养物收集到的流体等。体液还包括组织,例如骨、骨髓、肌组织、脑、心脏、肝脏、肺、胃、小肠、大肠、结肠、子宫卵巢、睾丸、软骨、软组织、皮肤、皮下组织、乳腺组织、来自其他物种的组织、手术中得到的患者组织等。所述组织可以是碎裂的。已经知道对组织进行破碎的方法,包括均质处理和酶处理。本发明的体液还包括,例如骨髓、手术中得到的流体、流体滤液 (fluid filtrates)、组织滤液或组织碎片,手术中得到的骨碎片 (bone chips) 或骨折片 (bone fragments) 等。

[0023] 术语“被浓缩的”指的是已通过重力、离心分离和 / 或过滤分成不同级分的流体。术语级分 (fraction) 指的是离心、重量分离和 / 或过滤后,被分离出来的各种生物学流体组分。各级分相对于其他级分和初始流体富含有特定流体成分 (即,得到了浓缩)。浓缩过程还除去了不必要的组分,因此被浓缩的级分仅含有必要的或所需要的组分。

[0024] 本文中使用的“异体移植”指的是从一位患者获得组织或器官,并将其移植到基因不相同的患者上。当组织或器官是获得自患者身体上的一部分,并被移植到同一患者身体上的另一部分时,将这种材料称为自体移植物。异体移植材料包括但不限于以牛、猪类和人类作为来源而得到的骨、骨粉、骨屑或骨块、或骨颗粒 (bone particles)、肌腱、韧带、皮肤、晶状体碎片等。人类来源包括患者和尸体。异体移植材料通常是冻干的并且在使用前必须用生物相容性流体进行重建。也可以使用生物合成和人造材料来替代异体移植材料,包括但不限于脱矿质骨基质 (demineralized bone matrix) 胶原蛋白、陶瓷、水泥、聚合物和共聚物。

[0025] 本文使用的术语“生长因子”表示的是促进细胞或组织增殖的生物活性分子。本发明中有用的生长因子包括但不限于,转化生长因子- α (TGF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、包括 AA、AB 和 BB 亚型的血小板源性生长因子 (PDGF)、包括 FGF 酸性亚型 1 和亚型 2、FGF 碱性型 2、和 FGF4、FGF8、FGF9 和 FGF10 的成纤维细胞生长因子 (FGF)、,包括 NGF 2.5s、NGF 7.0s 和 β -NGF 的神经生长因子 (NGF) 和神经营养因子、脑源性神经营养因子、软骨源性因子 (cartilage derived factor)、骨生长因子 (BGF)、碱性成细胞纤维生长因子、胰岛素样生长因子 (IGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、EG-VEGF、VEGF- 相关蛋白、Bv8、VEGF-E、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、胰岛素样生长因子 (IGF) I 和 II、肝细胞生长因子、胶质细胞源性神经营养生长因子 (glial neurotrophic growth factor, GDNF)、干细胞因子 (SCF)、角质细胞生长因子 (KGF)、转化生长因子 (TGF),包括 α -TGF、 β -TGF、 β 1-TGF、 β 2-TGF 和 β 3-TGF、骨骼生长因子 (skeletal growth factor)、骨基质源性生长因子 (bone matrix 源性生长因子)、和骨源性生长因子以及它们的混合物。一些生长因子还可以促进细胞或组织的分化。例如说,TGF 和 VEGF 能促进细胞或组织的生长和 / 或分化。一些优选的生长因子包括 VEGF、NGFs、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、FGFb、FGFa 和 BGF。

[0026] 本文中使用的术语“分化因子”表示的是能促进细胞或组织分化的生物活性分子。

该术语包括但不限于神经营养因子、集落刺激因子 (CSF) 或转化生长因子。CSF 包括粒细胞-CSF、巨噬细胞-CSF、粒细胞-巨噬细胞-CSF、促红细胞生成素和 IL-3。一些分化因子还能促进细胞或组织的生长或增值。例如说, TGF 和 IL-3 能促进细胞的分化和 / 或生长。

[0027] “趋化因子”指的是能够调节细胞和组织进行适当的发育、愈合和 / 或稳态所必须的基本化学物的移动的生物活性分子。趋化因子包括细胞因子。所述细胞因子包括但不限于心肌营养蛋白 (cardiotrophin)、心肌营养蛋白、基质细胞衍生因子、巨噬细胞源性趋化因子 (macrophage derived chemokine, MDC)、黑色素瘤生长刺激活性 (melanoma growth stimulatory activity, MGSA)、巨噬细胞炎性蛋白 1- α (MIP-1- α)、巨噬细胞炎性蛋白 2、巨噬细胞炎性蛋白 3- α 、巨噬细胞炎性蛋白 3- β 、巨噬细胞炎性蛋白 4 和巨噬细胞炎性蛋白 5、白介素 (IL) 1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TNF- α 和 TNF- β 。

[0028] 术语“粘附分子”指的是促进或协助与其他细胞或者细胞外基质 (ECM) 或基底膜 (BM) 进行粘附的生物活性分子。粘附蛋白包括肌动蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维连接蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白、钙粘蛋白、选择素、细胞内粘附分子 1、细胞内粘附分子 2 和细胞内粘附分子 3, 以及细胞-基质粘附受体 (cell-matrix adhesion receptor), 包括但不限于整合素, 例如 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_1\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_3$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 。

[0029] 本文中使用的术语“治疗”或“进行治疗”指的是向患者的伤口或受伤部位给药或施覆被浓缩的生物学流体或浓缩的体液的过程, 以促进伤口或受伤部位的愈合。该被浓缩的流体可以为自体的。以具有治疗效果量来施覆的被浓缩的流体或经过浓缩的体液。例如, 当自体流体施覆到伤口或受伤部位上后能使伤口或受伤处发生愈合的量即为具有治疗效果的量。

具体实施方式

[0030] 本发明提供了使用浓缩装置对体液进行浓缩, 以及由浓缩装置得到的被浓缩的体液和类似物质的使用方法。通过本发明的方法得到的浓缩的体液具有包括了在各种医疗条件下进行治疗的多种用途。

[0031] A. 流体浓缩器

[0032] 本发明包括用来对体液进行浓缩的流体浓缩装置。所述体液可以为自体体液。本发明的浓缩器 10 主要包括界定出分离室 14 的主壳体 12。为了方便制造和组装, 主壳体 12 可以形成为底座 16、中部壳体 18 和顶板 20 (如图 1 所示)。主壳体 12 优选由塑料模塑而成, 但也可以由任何可消毒的材料制成。作为制造和组装的一部分, 优选使底座 16、中部壳体 18 和顶板 20 彼此密封, 例如通过使用环氧密封胶或声焊 (sonic welding)。可选择地, 底座 16、中部壳体 18 和顶板 20 可以通过配合螺纹形成, 因此可以将它们彼此拧在一起, 并使用例如普通的环形垫圈 (O-ring) 进行密封。

[0033] 在一种实施方式中, 中部壳体 18 为透明的或半透明的, 从而能对包含在中部壳体 18 的离心室 14 内的流体进行观察。这就能对分离后的体液进行观察, 以更好地确定要将流体的哪一级分从分离室 14 中除去。可选择地, 所述中部壳体 18 可以包括视窗, 即透明或半透明部分。当生物学流体或体液在室 14 中并进行离心分离时, 可以目测观察到不同组分或级分之间的颜色差别。例如说, 当体液为血液时, 贫血小板血浆、血块棕黄层 (buffy coat)

和红细胞级分或组成具有不同的颜色,并通过目测即可将它们彼此区分开来。对于在离心或重量分离过程中不能对目测分离后的流体,或者使用浮子或其他机构来确定从分离室 14 中除去哪一部分的被分离的流体的情况中,视窗不是必须的。

[0034] 在一种实施方式中,选择主壳体 12 的整体大小,以使其与现有的离心机相适应。比如说,目前存在对 4×4 英寸的试管进行处理的离心机,且主壳体 12 的尺寸与普通的 4×4 英寸的离心机(未示出)相匹配并容纳于其中。在一种实施方式中,主壳体 12 的尺寸与 8×8 英寸的离心机相匹配并容纳于其中。在一种实施方式中,主壳体 12 的尺寸与 12×12 英寸的离心机相匹配并容纳于其中。在一种实施方式中,主壳体 12 的尺寸与最高为 40×40 英寸的离心机相匹配并容纳于其中,例如对于小容量而言最大为 250 μL。底座 16 的底壁(bottomwall)22 是平的,且在它上面没有端口或凸起,因此浓缩器 10 可以直立在平坦表面上,并在离心过程中保持稳定。

[0035] 顶板 20 包括开口 24,该开口 24 起到流体入口的作用。入口 24 优选包括闭合机构(closure mechanism)26(示意性地示于图 3 中)。所述闭合机构 26 可以为橡皮塞,流体通过橡皮塞从下方注入分离室 14 内。然而,优选的闭合机构 26 是具有手动旋转的路厄锁(luer lock)的帽状物,这些在对流体进行处理领域中是公知的。

[0036] 如图 1 所示,顶板 20 上设置有阀调节手柄 28,而在底座 16 上设置有阀控制手柄 30。这两个手柄 28 和 30 对位于浓缩器 10 内的阀开口 32 和阀 34(示于图 2)进行控制。阀调节手柄 28 允许对具有螺纹的阀杆(valve openingstem)36 进行手动旋转,它的转动改变了阀开口 32 相对于主壳体 12 的高度。如图 2 清楚地表示的,使用阀调节手柄 28 将阀开口 32 定位于所期望的高度,从而在进行分离后与所需流体层的高度相对应。由此,阀开口 32 起到使流体从分离室 14 除去的流出端口。虽然螺纹杆 36 提供了一种简便的方式来调整阀开口 32 的高度,但是也可以使用许多类似的机构,例如滑片、浮子或其他调整部件。

[0037] 如图 2 所示地,过滤单元 38 置于分离室 14 内。过滤单元 38 在位于底座 16 上的底座端口 40 和顶板 20 上的顶部端口 42 之间进行连接。所包含的管道用于将流体从阀开口 32 输送到底座端口 40 或过滤单元 38。

[0038] 如在图 2 至图 4 清楚的描述中,优选的过滤器 46 包括过滤器壳体 48 和滤芯或滤膜。本发明的滤芯包括能够起到分离介质、过滤介质、或生长基质或生长表面作用的材料。所述分离介质和/或过滤介质包括亲和柱、具有亲和性的填充床基质和小珠。可以将纳米纤维网络用作过滤介质或生长基质或生长表面。耐纤维网络和制备纳米纤维网络的方法已经是公知的,并且纳米纤维网络可商购自苏尔莫迪克斯公司(明尼阿波利斯,明尼苏达州)(Surmodics (Minneapolis, MN))。例如,参见 WO 2006/094076、U. S. 2005/0095695 和 U. S. 2007/0082393,这些文献通过引用而被结合于此。在实施方式中,滤芯包括反应室或保持室来收集并保留分离后的级分和/或被过滤的流体或细胞。

[0039] 在本发明的实施方式中,所述滤芯或滤膜包括亲和性的膜、载体或柱。亲和柱用于对蛋白质或其他利用了分子间特异性的相互结合作用的生物学大分子进行色谱分离或纯化的过程。一方面,通过化学的方法将特定的配体固定或“耦合”到固相载体上。结合到一般类蛋白质(例如,受体或抗体)或常用的融合蛋白标签(例如,6xHis)上的配体可以商购得到,该配体为待用于亲和性纯化的预固定形式。可选择地,可以用多种商购得到的活化了亲和性载体中之一来对更多特异化的配体例如对目标具有特异性的抗体、抗原或受体进

行固定。例如说,可以将多肽抗原固定到载体上,并对识别该肽的抗体进行纯化。类似地,与生长因子、分化因子、趋化因子或粘附分子结合的受体可以被固定到载体上,并用来在被浓缩的体液级分中对所述因子或分子进行纯化。与生长因子、分化因子、趋化因子结合的抗体和受体,或和 / 或粘附分子、制备这些抗体和受体的方法,和将这些抗体和受体固定到载体上的方法是公知的。

[0040] 可以将一种或多种配体附着到本发明的滤芯上。可以选择配体与一种或多种特定的生长因子、分化因子、趋化因子和 / 或粘附分子进行结合。将一种或多种所选择的配体附着到本发明的滤芯上的能力产生了定制的被浓缩的流体,其中,由例如特定的配体、配体浓度、和 / 或一种配体与使用者选择的另一种配体的比例来对含有经浓缩的体液的特定生物活性分子进行定义。

[0041] 更通常来说,通过配体上的特定官能团和载体上的反应性基团之间形成共价化学键来将配体直接固定或“耦合”到固相载体材料上。官能团和反应性基团的实例包括但不限于,伯胺、巯基、羧酸、醛等。然而,其他的耦合方法也是可能的。例如说,GST 标记的融合蛋白可以通过与 GST 标签发生互相亲和作用首先与固定的谷胱甘肽载体结合,并随后与载体发生化学交联。随后,可以用经过固定的 GST 标记的融合蛋白对它所结合的配偶子 (partner) 进行亲和纯化。

[0042] 在实施方式中,滤芯或滤膜包括具有亲和性的小球或颗粒,或者色谱小球或颗粒。所述小球或颗粒可以为,例如玻璃、海藻酸钠、聚合物微球或颗粒或磁珠或磁性颗粒。所述小球或颗粒以类似于亲和性基质或亲和柱的方式发挥作用,但它们的尺寸有明显的减少,并且因此能特别有效地用于微型生物操作中。在一些实施方式中,使用亲和柱或具有亲和性的小球或颗粒作为过滤装置的滤芯,因此,当被分离的体液或流动的级分流 (fluid fraction) 经过小球或颗粒的时候,那些与配体具有特异性的结合亲和力的分子或流体组分被吸附到小球上,随后可以通过洗脱进行回收或分离。

[0043] 在一些实施方式中,所述滤芯或滤膜包括填充床基质或柱。填充床是颗粒状材料床,它能留住经过的固体颗粒使待过滤的流体和液体中不含有固体污染物或组分。一方面,用于填充床的颗粒状材料可以为砂子,虽然填充在微型容器中或装载在烧结的玻璃漏斗顶部上的西莱特 (celite) 和硅藻土也起到了填充床的作用。不可压缩的硅藻土 (即,主要为二氧化硅)、木材纤维素或其他惰性多孔固体也可以用作填充床过滤器的颗粒状材料。在一些实施方式中,填充床基质或填充柱用作浓缩器装置的滤芯,因此当被分离的流体或级分流经过柱的时候,尺寸大于填充床材料的孔的大小的固体组分或流体组分被保留在填充床内,而其他的流体组分可以通过。

[0044] 在一些实施方式中,所述滤芯或滤膜包括一种或多种纳米纤维网络;纳米原纤维 (nanofibrillar) 结构;具有被蚀刻的或形成有微图案的表面的玻璃、硅或塑料;具有微米孔隙或纳米孔隙的玻璃、硅或塑料表面,或聚合物支架。WO 2006/094076、U. S. 20050059695 和 U. S. 20070082393 已经对这种类型的纳米纤维网络进行了描述,通过引用这些文献而将它们结合于此。可以使纳米纤维网络沉积在基材的表面上,且将纳米纤维结合在基材上可以得到生长基质或生长基材,或作为滤膜。在一种实施方式中,纳米纤维网络的纤维直径约为 30-1200nm,纤维间的平均间隔约为 100-600nm,实度 (solidity) 约为 70% 或更低。可以用各种聚合物或聚合体系来制备纳米纤维。优选地,所述聚合物或聚合体系是不具有细胞

毒性的。在一种实施方式中,纳米纤维是由聚酰胺或聚酯制成的。所述聚酰胺可以为尼龙 6、尼龙 66、尼龙 610 或其他具有生物相容性的聚酰胺。所述聚酯可以为聚(ε-己内酯)、聚(乳酸盐)或聚(乙醇酸)。在一种实施方式中,所述聚酰胺或聚酯适用于人体内的应用。

[0045] 滤芯或滤膜也可以为含有一种或多种纳米纤维的纳米原纤维结构。上述由一种或多种纳米纤维组成的网络界定出纳米原纤维结构。在一种实施方式中,纳米纤维网络沉积在基材的表面上以提供生长基质或生长表面。在某些实施方式中,所述基材可以是玻璃、聚合物、金属、陶瓷、纤维质或蛋白质。基材的实例包括但不限于棒、螺丝钉、金属丝、网状物或笼子。所述基材可以为培养器、盖片或薄膜的表面。所述薄膜可以为水溶性的,也可以为水不溶性的,可以为可生物降解的或者为生物可溶的。优选所述薄膜不具有细胞毒性。在一种实施方式中,所述薄膜包括聚乙烯醇、聚三氟氯乙烯、聚苯乙烯、聚甲基戊烯、或聚环烯(polycylo-olefin)。纳米原纤维结构可以被单独使用,或者将进行层压形成用于细胞或组织培养的多层组装的纳米原纤维结构。在一种实施方式中,纳米原纤维结构含有间隔物(spacer)。该间隔物可以起到支撑结构的作用。间隔物提供了充足的开口以允许细胞渗入并附着到纳米纤维网络上。间隔物可以为水溶性的,也可以为水不溶性的、可以为多孔的或者为非多孔的、或者为生物可降解或者生物课溶解的。优选地,所述间隔物具有生物相容性。在一些实施方式中,纳米原纤维结构用作浓缩装置的滤芯或滤膜,因此,当分离后的流体或级分流通过滤芯的时候,尺寸大于纳米原纤维材料的孔的尺寸的固体组分或流体组分将被保持在该纳米原纤维材料上,而其他的流体组分可以通过。在其他的实施方式中,纳米原纤维结构可以为生长基质,因此,当离心后的自体流体通过滤芯的时候,流体中的生长因子将被保留在滤芯上,并能支持随后的细胞或组织的生长。

[0046] 在一些实施方式中,将分离室构造为能够容纳本发明的滤芯或滤膜。在这种构造中,滤芯或滤膜可以在分离前或在分离过程中起到除去体液中不需要的颗粒或大分子的预滤器的作用。在一种实施方式中,与特异性的分子、较小的分子或特定的分子组合发生结合的具有亲和性的小球或颗粒可以用于从流体中除去不需要的颗粒或大分子。可以在分离室内将所述小球或颗粒加入到生物学流体或体液中,或者在向分离室加入生物学流体或体液之前向分离室中加入这些小球或颗粒。这些小球可以在分离之前或分离之后取出。在一种实施方式中,可以向分离室中或者生物学流体或体液中加入反应剂以使颗粒或大分子沉淀出来。在一种实施方式中,所述反应剂为抗体或可溶性受体。

[0047] 在一些实施方式中,本发明的滤芯或滤膜对离心分离没有耐受性。在这种情况下,将本发明的滤芯或滤膜从过滤器壳体 48 中取出,并在进行离心后再安装回过滤器壳体 48 内。

[0048] 在一种实施方式中,滤膜具有多个纵向导向的成束的过滤管腔 50。密封圈 52 在过滤器壳体 48 两端对过滤束 50 进行密封。优选地,在直径为 3/4 英寸的过滤器壳体 48 内置有数百的长约为 31/2 英寸的过滤束 50,从而提供了约 800cm² 或更大的过滤面积。优选通过所述过滤束 50 的管腔壁的通过尺寸约为 10-30 千道尔顿。利用这些过滤束 50,使滤液或滞留物沿纵向通过管腔 50,并通过过滤器壳体 48,而水和小分子量组分(通常被称为“渗透”)以垂直于滤液流动的方向通过滤膜 50。可以从例如兰乔多明格斯的光谱实验室(加利福利亚洲)(Spectrum Labs of Rancho Dominguez, Calif) 或普利茅斯的明泰科技(明尼

苏达州) (Minnotech of Plymouth, Minn) 获得上述过滤束。

[0049] 在一种实施方式中, 如果需要的话, 底座端口 40 和顶部端口 42 可以具有内螺纹 (未示出) 以接收图 5 所示的转移注射器 (transfer syringe) 54、56。用转移注射器 54、56 将由手控制的压力施加到分离的 (separator) 流体或级分流上, 从而将分离后的流体或级分流推入或抽出通过过滤器 46。在需要的情况下, 底座端口 40 和顶部端口 42 可以为内陷的, 从而使转移注射器 54、56 能向内延伸到过滤器 46 的端部, 从而使转移注射器 54、56 到过滤器 46 端部之间的管道距离 (和管道体积) 最小。

[0050] 在替换的实施方式中, 可以将转移注射器 54、56 可操作地连接到所用过滤的泵系统中, 例如真空泵系统。该泵系统在没有施加由手控制的压力的情况下, 即可施加足以允许流体经过滤芯或滤膜的压力。随后用转移注射器 54、56 来对经过分离或过滤的体液积分进行转移。在一些实施方式中, 所述泵系统装备有用于收集和保存已经过分离和 / 或过滤的体液级分的贮液槽。在其他实施方式中, 在滤芯和泵贮液槽之间安装成列的浓度检测器。因此能方便地测量到过滤后的级分流的浓度, 从而确定是否需要进一步浓缩, 或是否在使用该级分前对其进行稀释。在这种实施方式中, 浓度检测器为光散射流通池 (light-scattering flow cell)、吸收池 (absorbance cell) 或分光光度计测量的装置 (spectrophotometric device)。

[0051] 在一种实施方式中, 底座端口 40 和顶部端口 42 位于浓缩器 10 的侧部, 方向与纵轴 58 垂直。这种布置允许在流体组分通过过滤器 46 进行转移时能够到达底座端口 40, 而浓缩器 10 直立于底座 16 的底壁 22 上, 还允许顶部端口 42 协助平衡底座端口 40。可选择地, 底座端口 40 和顶部端口 42 可以相对纵轴 58 呈“八”字倾斜, 或甚至平行于纵轴 58 地延伸穿过底座 16 的底壁 22 和顶板 20 的顶壁 60。平行于纵轴 58 的端口 40、42 的布置将使注射器活塞冲程与流体经过过滤器 46 的移动方向共线, 从而减少了由于管道弯道造成的压力损失, 并从而降低了使用浓缩器 10 的过程中对流体造成破坏的风险。

[0052] 如图 3 至图 5 所示地, 真空端口 62 连通主壳体 12 和过滤器壳体 48。真空压 64 (示意性地示于图 4 中) 能通过真空端口 62 施加到过滤束 50 的外部, 而与此同时, 血液组分流经通过过滤束 50。在使用浓缩器 10 的环境下, 通常可以得到真空源 64。在无法获得真空源 64 的时候, 真空端口 62 还能起到用来除去通过滤膜 50 的水和小分子量组分的重力排水槽的作用。为了协助真空端口 62 发挥重力排水槽的作用, 将真空端口 62 置于过滤室 66 的底部。

[0053] 在一种实施方式中, 密封过滤器壳体 48 以防止流体在分离室 14 和过滤室 66 之间发生连通。可选择地, 过滤器壳体 48 可以向分离室 14 开放, 因此流经滤膜 50 的水和低分子量组分能够进入分离室 14 内。如果过滤器壳体 48 允许流体在过滤室 66 和分离室 14 之间进行连通, 则真空端口 62 将起到从浓缩器 10 中与水和其他小分子量组分一起除去或排出所需要的级分流或组分流。

[0054] 根据图 5 所示的按字母表示的步骤对本发明的用途进行描述。在一种实施方式中, 体液样品 (约 60-80mL) 如箭头 A 所示地经过入口闭合物 26 被加入分离室 14 内。优选地, 将流体从患者体内抽出后数分钟内进行该过程。根据浓缩器 10 的不同浓缩目的, 可以使用不同量或不同类型的流体。

[0055] 在一种实施方式中, 一旦全部的流体样品位于分离室 14 内以后, 入口闭合物 26 关

闭,浓缩器 10 开始进行离心分离。优选该离心操作与已知的离心方法和离心速度一致,这将在下文中进行描述。

[0056] 完成离心或重量分离后,流体被分离为不同的层,这种现象可以通过观察中部壳体 18 目测发现。转移注射器 54、56 附着到底座端口 40 和顶部端口 42 上。旋转阀调节手柄 28 直到阀开口 32 与需要进行进一步处理的流体层底部在一条直线上。利用阀控制手柄 30 打开阀 34,而将需要的流体层排出进入底座 16 和底部注射器 54(如箭头 B 和箭头 C 所示)。如果需要释放压力以从分离室 14 中除去全部的所需流体层,可以在通过阀 34 排出所需的流体层时稍微地打开口闭合物 26。然而,优选使入口闭合物 26 与能释放压力的阀相结合(未示出)。一旦提取到所需的流体层,用阀控制手柄 30 关闭阀 34。从而将不需要的层保持在分离室 14 中。

[0057] 将真空压施加于真空端口 62 上。由于浓缩操作的剩余物与重量分离无关,因此,可以在必要的情况下将浓缩器 10 装置侧放。真空端口 62 优选位于中部壳体 18 上相对于转移端口 40、42 的一侧上,从而在通过过滤器 46 转移所需流体层是提供平衡力和稳定性。推动底部注射器 54 的活塞 68(同时可选择地抽出顶部注射器 56 上的活塞 68),向上推动所需的流体进入顶部注射器 56(如箭头 D 和箭头 E 所示)。通过过滤束 50 除去所需流体中的水、小分子量物质和任何其它不需要的组分(如箭头 F 所示),随后由真空端口 62 排出(箭头 G 所示)。所需的流体流经过滤束 50 并进入顶部注射器 56 内(如箭头 H 所示),成为“第一批被浓缩的(first pass concentrated)”。

[0058] 在一种实施方式中,从阀开口到过滤器 46(包括底部注射器 54)之间的管道 44 的体积被最小化了,从而一种初始样品中得到产量尽可能大的经过了浓缩的流体。如有需要,顶部端口 42 和底座端口 40 可以具有凹槽来容纳转移注射器 54、56 的更多长度,借此使转移注射器 54、56 的端部到过滤器壳体 48 的入口之间的距离最小。

[0059] 可以通过反向过滤对第一批被浓缩的液体进行进一步的浓缩。推入顶部注射器 56 的活塞(同时可选择地抽出底部注射器 54 的活塞 68),从而推动所述第一批被浓缩的流体通过过滤器 46(如箭头 I 所示)进入底部注射器 54 内。从第一批被浓缩的流体中回收额外的水分和小分子量组分(箭头 F 和箭头 G)。反向过滤再次利用了滤芯或滤膜 50,并将第一批被浓缩的流体进一步浓缩为“第二批被浓缩的”流体。如有需要,可以按相似的方式进行多次。

[0060] 经过浓缩的流体可以立即使用,或者经过进一步的制备之后使用,例如将被浓缩的流体与适用于各种应用的其他组分、生长因子、分化因子、趋化因子和/或粘附因子进行混合。例如,当血液为自体流体时,将被浓缩的流体与凝血酶进行混合,然后将其刷至植入物的表面上。

[0061] 在一种实施方式中,所用的成束的过滤器 50 为一次性滤芯,它不能得到有效的清洗和消毒。因此,要将使用了一次的滤芯 46 卸下。在一种实施方式中,整个分离/过滤容器 10 十分廉价,足以在使用一次后就能丢掉整个浓缩器 10 单元。这简化和/或免去了对分离单元和/或过滤器壳体 48 进行清洗。这还简化了对不需要流体成分的处理。

[0062] 在分离容器内进行过滤还提供了其他的可以在作为替换的实施方式中实现的好处。例如说,如果排出阀 34 的开口 32 自动地(而非通过目测)位于所需流体层的合适高度处,则可以利用本领域公知的离心启动阀(centrifugally activated valve)来打开排出

阀 34。用类似的布置,能使所需流体层在离心过程中流经通过过滤器 46,利用离心力将所需的流体推进或抽出过滤器 46。

[0063] 在一种实施方式中,过滤器 46 相对于离心方向(即,相对于纵轴 58)的导向为纵向。这有利于使过滤束 50 在离心过程中从它们端部的密封垫 52 被抽出和/碎裂的可能性最小。可选择实施方式包括使过滤束 50 为横向导向并位于所需流体层的常规高度,从而减少了将所需流体层向过滤器 46 进行转移所需的管道体积。

[0064] 在一种实施方式中,使用外部的注射器 54 和 56 来提供转移压力以推动或抽出所需流体层通过过滤器 46。这提供了施加这种压力的低成本的方法。在一种实施方式中,注射器 54、56 允许外科医生控制过滤室 66 上压力对时间的量,从而迫使经过离的几分钟的水和小分子量组分以所选的量的透过滤膜 50。与使用外部的注射器不同的,可以将注射器 54、56(包括部分的活塞 68 和滑动管装元件(slide tube elements)70)制备为或者附着成为装置的一部分。例如说,底座 16 的底壁 22 和顶板 20 的顶壁 60 可以类似于注射器上的活塞地进行滑动或压下,借以施覆转移的压力从而推动或抽出所需流体层通过过滤器 46。使用注射器 54、56 还能使推动所需流体层通过过滤器 46 的外力能由外科医生或操作者手动控制。

[0065] 图 6 的浓缩器 80 示出了本发明的另一种实施方式。与第一实施方式 10 相似地,在分离过程中使用相同的容器进行过滤。在一种实施方式中,将流体在浓缩器 80 内进行浓缩,或者在浓缩器 80 中进行总量分离,接着在分离过程后向同一浓缩器 80 施加正压或负压,以迫使水、小分子量组分和其他不需要的组分从被分离的级分中分离出来,得到的第一批被浓缩的组分。

[0066] 浓缩器 80 包括三个室 82、84、86。分离室 82 在分离过程中保持流体。水腔 84 接纳所需流体层通过过滤器 46 后分离出来的水、小分子量组分和其他不需要的组分。被浓缩的流体室 86 接受过滤后的被浓缩的流体。

[0067] 优选分离室 82 内存在浮子 88,该浮子 88 具有特定比重,例如,基本等于血块棕黄层的比重。将所需流体层从离心室 82 向过滤器 46 进行转移时,可以用浮子 88 协助注射器(未示出)进行定位。可选择地,浮子 88 上可以有开口,因此可以使级分流在离心过程中流过。

[0068] 被浓缩的流体室 86 所用的“截止”阀 90 可以是位置可变阀,这能使操作者“输入”可能在该被浓缩的流体室 86 内产生的最大压力,和/或水腔 84 和被浓缩的流体室 86 质检的最大压力差,由此控制和最终流出物的浓度。比如说,截止阀 90 可以这样的刻度盘,其上有三个或更多的位置与类似蝶阀或调节阀相连,操作者在刻度盘上选择需要的浓度,然后使需要的流体层加压通过过滤器 46,从而达到所选的压力/浓度水平。根据所选的刻度盘的位置,过滤器 46 内产生了允许除去相应量的水的预定的压力,因而只需要一次操作就可释放所需浓度而不需要完全关闭外端口 92。

[0069] 在图 7 和图 8 所示的第三实施方式中,在分离室 14 和过滤单元 38 之间界定出所需流体层隔离室 94。此外,在分离室 14 和隔离室 94 之间增加了窗式阀 96。该窗式阀 96 通常是封闭的,防止分离室 14 和隔离室 94 之间的流体发生流通。所以,虽然起始流体样品位于分离室 14 内,但是在分离过程中,起始流体不可能通过窗式阀 96 进入到隔离室 94 内(或进入分离室 14 和过滤单元 38 之间的其他管道内,例如在第一实施方式中的管道 44)。

[0070] 在一种实施方式中,窗式阀 96 具有锁闭机构 98,该锁闭机构 98 还起到阀杆的作用。例如,锁 100 防止了球形锁柄 102 被压下,因而防止了窗口 104 在分离过程中被压下从而与分离 14 互相连通。分离完成后,将球形锁柄 102 旋转 90° 至锁 100 与键槽 106 共线的位置,能向下推动锁柄 102 压缩弹簧 108。窗口 104 附着到锁闭 102 上并由其进行控制,向下推动锁柄 102 会使窗口 104 向下移动从而与分离室 14 连通。当窗口 104 向分离室 14 开放时,经过分离的流体流中所需流体层在重力作用下从分离室 14 流入隔离室 94 内。所需流体层流入隔离室 94 后,松开锁柄 102 后弹簧 108 向上移动窗口并截断隔离室 94 和分离室 14 之间的流通。

[0071] 进行下一步操作(例如过滤)前,使所需流体层保持在隔离室 94 内。隔离室 94 界定了分离自起始流体单元并进行了过滤的所需流体层的体积。所需流体层在隔离室 94 内允许了对浓缩器 10 进行处理而无需担心使所需流体层与起始流体的残余物发生混合。例如说,当所需流体层进入隔离室后,可以在进行流体过滤前将浓缩器 10 侧放。隔离室 94 还能使分离和过滤之间存在时间延迟。所需流体层在隔离室 94 内时,就能随意地进行进一步的处理。比如,可以使添加剂与流体在隔离室 94 内进行混合(尤其在添加剂能增强过滤操作的情况下),例如在打开窗式阀 96 之前将添加剂加入隔离室 94 内。

[0072] 打开扭转阀(twist valve)110 以打开隔离室 94 和底座端口 40 以及过滤单元 38 之间的联通。利用注射器 54 使所需流体层通过扭转阀 110 从隔离室 94 内被回收,此时,扭转阀 110 是闭合的。然后在注射器 54 上进行一次逆向活塞冲程以将所需流体层通过过滤单元 38 被推出。如有必要,对通过过滤单元 38 的流体层施加压力的注射器 54、56 的容量可以比隔离室 94 要小得多(打个比方,例如是 1/3 的容量)。因此可以部分地(每次取 1/3)将隔离室 94 内的流体取出,每次对取出的部分进行单独过滤。在制备过程是过滤器 46 各部分之间进行的情况下,将通过过滤单元 38 的所需流体分成数份是特别有利的。比如说,如果过滤器 46 发生阻塞而仅对隔离室 94 内的流体量的 1/3 进行过滤时,在使用过滤器 46 对第二部分进行过滤前,能对清洗流体加压使其通过过滤器 46 来清除过滤器 46 中的阻塞。完成对第一部分的过滤并对过滤器 46 进行清洗后,可以再次打开扭转阀 110 以排除第二部分。随后再次闭合扭转阀 110 对第二部分进行过滤,接着可以任意地对过滤器进行清洗。由于扭转阀 110 控制了隔离室 94 和底座端口 40 之间的流通,因此,可以以期望从任何尺寸的端口将流体从隔离室 94 中排出。

[0073] 在另一种实施方式中(未示出),提供了具有活塞的注射器来将组分从经过离心的初始流体(即,原始流体样品)中拉出(负压)。过滤器 46 设置在注射器内,进行逆向活塞冲程(正压)使组分通过过滤器并将组分分成水和被浓缩的滞留物。

[0074] 在上述这些实施方式中,外科医生或其他操作者可以调控之过滤步骤中的压力和/或持续时间,从而使外科医生或其他操作者控制被浓缩的残留物相对于被分离的组分的浓缩程度如何,并控制过滤步骤中对流体进行多强的操作。

[0075] B. 蛋白质分离和浓缩的自体流体

[0076] 本发明的浓缩装置可以用来对细胞器、细胞或蛋白质进行分离,以及对体液进行浓缩。所述分离过程可以通过离心分离或重量分离进行。在一些实施方式中,液体可以为自体体液。离心是一种将悬浮于液体介质中的物质进行分离或浓缩的方法。该技术的理论基础是作用于悬浮液中的颗粒(包括大分子)上的重力作用。在重力的影响下,不同质量

的两种颗粒以不同的速率沉淀在试管内。离心力 (g) 能增加沉淀速率,而且增加该速率的装置是离心机。所产生的离心力与转子转速 (以转每分钟计 (RPM)) 和转子中心到离心管之间的距离成正比。因此,在给定的离心机中可以使用多个转子尺寸,能灵活地选择离心条件。

[0077] 离心装置所用的转子为固定角式转子、水平转子、连续流动转子、或带状转子,这取决于是否将样品保持与旋转平面成一定角度、是否能从转轴甩开并进入旋转平面上,是否设计有用来对大容量进行分离的入口端口和出口端口,或它们的组合。在一些实施方式中,本发明的方法利用连续流动离心对大量流体进行分离和浓缩。连续流动离心可以根据密度梯度对大范围的颗粒进行分离。这些转子可以含有最多为 2L 的流体并且能用组织样品进行工作 (以盎司计)。将空转子速度提高到 3000RPM,同时通过特定的端口加入具有密度的介质和组织。这种类型的转子具有超越于其他常用转子的梯度限度的突出制备优势。在一些实施方式中,这些转子用于超速离心方法 (ultracentrifugation) 中,并含有最高为 250mL 的小容量的流体。该转子可以用于仅能获得小量流体或少量组织的实验室操作中。对于超速离心来说,可以将转子升高到 15,000-18,000RPM (上限为 20,000RPM)。标准离心所用转子的范围为 $4 \times 2L$ (或 $2.5L$) 至 $40 \times 250 \mu L$ 。在超速离心的应用中,转子的范围为 $6 \times 250mL$ 至 $72 \times 230 \mu L$,中等宽度,例如 $8 \times 6.8mL$ 、 $6 \times 94mL$ 、 $6 \times 4mL$ 、 $8 \times 5.1mL$ 、和 $8 \times 39mL$ 。本发明的流体浓缩器的主壳体的尺寸可以与标准离心转子或超速离心转子相匹配并容纳于其中。在标准离心下,可以使空转子提高到一定速度,同时将介质、样品和组织通过特定的端口加入其中。

[0078] 本发明的浓缩器可以通过密度梯度离心对蛋白质或细胞进行分离。密度梯度是在对颗粒混合物、细胞混合物进行离心分离和对亚细胞器和大分子 (包括) 进行纯化中的常规方法。所述颗粒可以为大分子或细胞。将待分离的颗粒混合物置于液体立柱表面上,其密度从上往下逐步增加,然后进行分离。虽然悬浮液中的颗粒个体的密度重于梯度顶部的液体,但样品 (即颗粒加上悬浮液) 的平均密度较低。速率-区带分离 (rate-zonal separation) 和等密度分离是密度梯度离心的两种主要类型。在速率取代分离中,颗粒基于其尺寸和质量而被分离。颗粒沿梯度移动,直到它们的尺寸和质量与梯度相匹配的点。这种离心法能有效地将具有相同或非常接近的密度但是质量不同的颗粒分离开来。诸如抗体的许多蛋白质,可以用这种方法进行分离。能通过仿真软件来预测对蛋白质进行的离心分离,例如 EPS 速率区带运行 (贝克曼库尔特,加州福乐顿市) (EPSRate Zonal Run (Beckman Coulter, Fullerton CA))。在等密度分离中,颗粒通过溶剂梯度进行移动,直到达到与它们密度相等的梯度处,即,等密度点。一旦颗粒达到它们的等密度点,无论离心再进行多场时间它们都不会在梯度中移动。举例来说,等密度梯度包括氯化铯密度梯度。

[0079] 密度梯度可以影响利用本发明的浓缩器对蛋白质或细胞进行的分离。有两种类型的密度梯度:阶梯式密度梯度和连续密度梯度。阶梯式密度梯度铜鼓在离心室内对不同密度的溶液进行连续分层制备得到,并使待分离的样品在最后一级的顶部上分层。阶梯式密度梯度能有效地用于密度梯度离心中,原因在于不连续的密度接替可以作为离心过程中颗粒可以发生沉淀的表面。这导致了各级上颗粒层的不连续分布。可以在离心机转子或离心管中形成该梯度,用移液管或其他机构或注射器装置,从密度最大的层开始小心地逐层形成。可选择地,该梯度也可以首先形成密度最小层,用窄套管或其他机构或注射器装置将各

个层沉积于离心室底部。连续密度梯度是这样的梯度,其中,密度从一个极限或最大值到另一个发生平滑且连续的变化。这种梯度可以由阶梯式梯度经过足够长的时间的扩散以消除阶梯而制备得到,但是连续梯度通常利用特殊的装置(梯度产生器 (gradient maker) 或梯度机 (gradient engine)) 直接制得。

[0080] 可以通过密度梯度法利用本发明的浓缩装置对体液进行浓缩。在实施方式中,所述体液为自体体液。在离心结束时,将密度梯度和被分离的颗粒、细胞或蛋白质和所需流体层从转子取出,并作为一系列的级分进行收集。

[0081] 在一些实施方式中,使一种或多种收集自浓缩装置的级分流与相应于被浓缩的体液。可以利用离心或重量分离来制备各种不同的被浓缩的体液,包括但不限于血液级分(富含血小板血浆 (PRP)、贫血小板血浆 (PPP)、干细胞(脐带血源性干细胞和骨髓干细胞),例如,被浓缩的精液、被浓缩的脊髓液等。

[0082] 在一种实施方式中,将级分流的浓缩至约为 1 : 10、约为 1 : 20、约为 1 : 30、约为 1 : 40、约为 1 : 50、约为 1 : 100、约为 1 : 200、约为 1 : 500、或约为 1 : 1000。在一种实施方式中,被浓缩的级分流中的一种或多种组分与未经浓缩的流体内同样的一种或多种组分相比,被浓缩了约为 1 : 10、约为 1 : 20、约为 1 : 30、约为 1 : 40、约为 1 : 50、约为 1 : 100、约为 1 : 200、约为 1 : 500、或约为 1 : 1000。在一种实施方式中,级分流被浓缩的浓度约为 1 : 20 至约 1 : 50、约为 1 : 20 至约 1 : 100、约为 1 : 50 至约 1 : 100、约为 1 : 50 至约 1 : 200、约为 1 : 100 至约 1 : 200、约为 1 : 200 至约 1 : 500、约为 1 : 200 至约 1 : 1000、或约为 1 : 500 至约 1 : 1000。在一种实施方式中,被浓缩的级分流中的一种或多种组分与未经浓缩的流体内同样的一种或多种组分相比,被浓缩了约 1 : 20 至约 1 : 50、约 1 : 20 至约 1 : 100、约 1 : 50 至约 1 : 100、约 1 : 50 至约 1 : 200、约 1 : 100 至约 1 : 200、约 1 : 200 至约 1 : 500、约 1 : 200 至约 1 : 1000、或约 1 : 500 至约 1 : 1000。在某些实施方式中,本发明的浓缩器维持或保持了组分在体液级分中的生理比例。由于在浓缩过程中保持了相对生理比例,各组分的抽提率不大。

[0083] 在一种实施方式中,将用本发明的浓缩装置获得的经过浓缩和过滤的自体流体级分向受试者进行给药,给药的时间为对来自受试者的自体 (antilogous) 流体进行分离后约 5 分钟、约 10 分钟、约 20 分钟、约 30 分钟、约 40 分钟、约 50 分钟、约 60 分钟、约 1.5 小时、约 2 小时、约 2.5 小时、约 3 小时、约 3.5 小时、或约 4 小时。

[0084] 本发明方法的用途和方法

[0085] 通过本发明的方法得到的被浓缩的体液可以用于多种应用,包括但不限于外科应用、用于植入术的异体移植材料的制备、组织再生或组织培养、干细胞的生长或分离、精液分级 (seminal fluid fractionation)、蛋白质分离和 DNA 纯化。在一些实施方式中,本发明的被浓缩的生物学流体为自体体液。

[0086] 外科用途

[0087] 本发明的浓缩器可以用来获得经过被浓缩的血液或血浆级分,包括富含血小板血浆 (PRP) 和贫血小板血浆 (PPP)。在一些实施方式中,在手术过程中用本发明的浓缩器从患者血液样品中获得经过浓缩的 PRP 以用于外科应用中,例如骨愈合。在一种实施方式中,将全血从患者体内抽出,并在本发明的浓缩器中以 25-1000g 的离心力进行 5-30 分钟离心;在其他实施方式中,将全血用 400g 的离心力进行约 15 分钟的离心。通过颜色目测识别经过

离心后的血液中央的 PRP 层,并将其从分离室内抽出。使 PRP 层在注射器压力作用下通过过滤单元 1-10 次,在一种实施方式中,使 PRP 层通过过滤器 6 次。过滤可以是切向流过滤或死端过滤 (dead end filtration)。在一种实施方式中采用切向流过滤,该切向流过滤使用的纤维过滤膜的截止大小 (size cutoff) 为 0.1-100,000nm,且表面积为 1-6000cm²。这能产生经过浓缩的 PRP。得到的经过浓缩的 PRP 具有厚的、胶状粘稠度,其中的血小板和白血球的浓度比全血高。随着血小板浓度的升高,得到的物质中含有比血液更高浓度的生长因子。得到的经过浓缩的 PRP 产物可以在手术过程中直接施覆到例如断裂或受损的骨上、伤口处、手术切口处、或受损组织处。在一种实施方式中,由浓缩器获得的被浓缩的 PRP 可以为直接施覆到受伤或断裂的骨、伤口处、手术切口处、或受损组织处上的骨生长刺激物。从患者血液中得到的患者自有的生长因子的浓度越高,骨的愈合速率就越快,减少了在手术部位或伤口周围的轻度感染,还减少了软组织发生炎症反应。如有需要,可以根据不同的应用,用各种已知的稀释剂 (例如缓冲盐水) 来调节自体浓缩 PRP 的粘度。

[0088] 在其他实施方式中,在手术过程中用本发明的浓缩器从患者血液样品中获得经过浓缩的 PRP 以用于外科应用中,例如软骨愈合。将得到的被浓缩的 PRP 产物通过外科手术直接施覆到受损部位、伤口处或被切断的软骨处。如有需要,可以使被浓缩的 PRP 与获得自同一患者或其他来源的软骨细胞混合。在一种实施方式中,用链霉蛋白酶和胶原酶依次对全层关节软骨 (full-thickness articular cartilage) 进行酶消化分离得到软骨细胞。在一种实施方式中,软骨为同源 / 自体的、异体的或异种的。在一种实施方式中,软骨来源于哺乳动物源,包括人类、猪和牛类。还可以将被浓缩的 PRP 与人工聚合物或胶原基软骨替换产品 (collagen-based cartilage replacement products) 混合以提高软骨缺损修复物质的融合性,并增强该软骨缺损修复物质的锚固性。

[0089] 将获得自本发明的浓缩器的经过浓缩的 PRP 作为软骨修复生长刺激物直接施覆在软骨部位上,所得到的生长因子浓度越高,软骨的愈合和向内生长速率就越快,减少了在手术部位的轻度感染,还减少了软组织发生炎症反应。在一种实施方式中,被浓缩的 PRP 为获得自患者自身血液的自体流体。

[0090] 在一些实施方式中,按以上描述得到经过浓缩的 PRP,可以将被浓缩的 PRP 施覆在两处软组织之间 (例如在外科切口处、缝合组织之间等),或者作为施覆在受损软组织部位 (例如烧伤处、裂伤处或擦伤处) 上的药膏 (salve) 或止痛膏 (balm)。作为药膏或止痛膏使用的被浓缩的 PRP 能向组织愈合处释放额外的生长因子和血液蛋白,促使伤口闭合和愈合进行得更快。不期望受到任何特定理论的限制,认为这种用于软组织愈合的药膏或止痛膏中使用的经过浓缩的 PRP 能引起或促进细胞质颗粒、5-羟色胺、ADP、血栓素 A₂、因子 III、因子 V、因子 VII、因子 X、因子 XI 和 / 或因子 XII、血小板凝血因子 (platelet thromboplastic factor, PF₃)、和凝血酶原激活剂中的一种或多种的显著增加。

[0091] 在一些实施方式中,使用本发明的被浓缩的 PRP 作为血小板胶粘伤口密封剂 (platelet glue wound sealant)。这些密封剂记载于美国专利 No. 5,733,545、No. 6,010,627 和 No. 6,342,157 中,这些专利通过引用而被结合于此。如上所述,可以使用本发明的浓缩器得到被浓缩的 PRP。得到的被浓缩的 PRP 为粘性胶状材料,可以类似于外科粘胶地用它将两个组织部分附着在一起。

[0092] 如有需要,本发明的经过浓缩的 PRP 能与外科粘胶物质混合以提高粘附特性,提

高产量、和 / 或调节所得混合物的延展性。比如说,通常级别的组织粘合剂是纤维蛋白系的,并集中含有纤维蛋白原和凝血酶。纤维蛋白粘附剂通常是双组份粘附剂,因此当它们彼此混合时发生反应,以模拟最后阶段产生的凝结物。得到的凝块附着到组织上,并在愈合开始前填补组织间的空隙。可以将本发明的被浓缩的 PRP 与任何这些已知的生物学来源 (presourced)、组织粘附剂进行混合。

[0093] 外科粘胶中使用的经过浓缩的 PRP 能向组织愈合处释放额外的生长因子和血液蛋白,促使伤口闭合和愈合进行得更快。不期望受到任何特定理论的限制,根据上述对用作药膏或止痛膏的经过浓缩的 PRP 的描述,认为这种用于软组织愈合的药膏或止痛膏中使用的经过浓缩的 PRP 能引起或促进细胞质颗粒的显著增加。

[0094] 在一些实施方式中,其他流体(包括贫血小板血浆 (PPP))也能用作外科粘胶材料。例如,在手术过程中用本发明的浓缩器从患者样品中获得经过浓缩的 PPP。在一种实施方式中,将全血从患者体内抽出,并在本发明的浓缩器中以 250-10000g 的离心力进行 2-30 分钟离心。在另一种实施方式中,将来自患者的全血在本发明的离心机中用 6500g 的离心力进行约 5 分钟的离心。通过颜色目测识别经过离心后的血液中的 PPP 层,并将其从分离室内抽出。使 PPP 层在注射器压力作用下通过过滤单元 1-10 次,在一种实施方式中,使 PRP 层通过过滤器 4 次。如有需要,可以在过滤前对 PPP 进行冷却以加速沉淀分离,例如降低至 1-10°C。过滤产生了被浓缩的 PPP。得到的经过浓缩的 PPP 是粘稠液体,其中纤维蛋白原、凝血酶、凝固因子以及相关蛋白和结构的浓度高于全血。可以根据不同的应用,用各种已知的稀释剂(例如缓冲盐水)来调节被浓缩的自体 PPP 的粘度。

[0095] 可以将得到的被浓缩的 PPP 产物用作配制高纤维蛋白粘胶的必要成分。如果对贫血小板血浆进行了冷却步骤,则可以将高纤维蛋白粘胶重新加热至 37°C 后再施覆于患者。

[0096] 如有需要,高纤维蛋白粘胶可以于商购得到的密封制剂混合,例如来自百特国际(迪尔菲尔德,伊利诺伊州)(Baxter International of Deerfield, IL)的迪丝尔(TISSEEL),或与氰基丙烯酸酯类组织粘结剂混合,例如爱惜康公司(萨默维尔,新泽西州)(Ethicon of Somerville, NJ)的德马绷(DERMABOND)。高纤维蛋白粘胶有助于产生稳定、柔韧并具有弹性的纤维蛋白生物活性基质,与生理上血液凝固中缓慢形成的那些物质相似,它能牢固地附着在暴露的胶原蛋白上。本发明的自体 PPP 粘胶还能与基于和醛发生交联的明胶的粘胶进行混合,例如与甲醛交联的明胶-间苯二酚(GRF)或与戊二醛交联的明胶-间苯二酚(GRFG),或者与其他聚合物中的氰基丙烯酸酯源性组织粘胶、聚氨酯源性组织粘胶、聚甲基丙烯酸甲酯源性组织粘胶进行混合。

[0097] 可以在外科手术中使用高纤维蛋白粘胶,例如在胸部外科手术、心血管外科手术和普通外科手术中,以及在矫形术中使用,例如软骨碎片、软骨骨屑或骨块以及骨软骨碎片的固定。还可以将高纤维蛋白粘胶作为心肺转流手术中以及由于腹部受到钝器损伤或刺伤而造成的脾损伤进行的治疗过程中的止血助剂,在这些治疗中,止血是十分关键的。高纤维蛋白粘胶还可以用于切口或裂伤修复。根据本发明,纤维蛋白粘胶的这些用途为修复组织提供了具有柔韧性的耐水性保护层,从而可以免除锋线拆除的需要。高纤维蛋白粘胶还能用来粘附释药基质,或其他能与自体移植、异体移植或异种移植材料(例如韧带、骨组织、皮肤、肌腱、软骨等)结合使用的类似覆盖层。

[0098] 在一些实施方式中,将本发明的方法得到的被浓缩的 PPP 用于软骨愈合。按照以

上描述得到经过浓缩的 PPP。可以直接将被浓缩的 PPP 作为软骨修复物质直接施覆到软骨缺损上。如有必要,可以将被浓缩的 PRP 与获得自同一患者或其他来源的软骨细胞混合。在一种实施方式中,用链霉菌蛋白酶和胶原酶依次对全层关节软骨进行酶消化分离得到软骨细胞。还可以将被浓缩的 PPP 与人工聚合物或胶原基软骨替换产品混合以提高软骨缺损修复物质的融合性,并增强该软骨缺损修复物质的锚固性。

[0099] 移植材料

[0100] 例如,本发明的浓缩器可以用来获得经过浓缩的流体,或经过浓缩的自体流体,例如经过浓缩的自体 PRP、自体 PPP、自体生长因子、自体分化因子、自体趋化因子、自体粘附分子或自体干细胞,以用于外科应用中。在一种实施方式中,移植材料为来源于哺乳动物的异体材料或异种材料,包括人类、牛和猪类来源。在一种实施方式中,在进行器官或组织移植之前或过程中,将经过浓缩的自体 PRP、自体 PPP、自体生长因子、自体分化因子、自体趋化因子、自体粘附分子、自体干细胞或它们的组合施覆到来自具有不同基因的供体的器官或组织上。这种对异体移植或异种移植的应用提高了接受者免疫系统对新器官或组织的接受度,并减少了排斥作用,促进了新器官或组织周围的组织再生,并进一步有利于减少移植手术的愈合时间。

[0101] 可以用本发明的浓缩器从体液中获得含有一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合的被浓缩的流体,以用于进行植入所需的移植材料的制备中。在一种实施方式中,被浓缩的流体为 PRP、PPP、或 PRP+PPP。在一种实施方式中,所述被浓缩的流体为自体流体。可以对移植材料进行包覆,以控制蛋白质(例如一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合)从移植材料表面释放。可以用聚合物材料层对移植材料进行包覆。设计聚合物材料的溶解性或不溶性来控制一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或这些生物活性分子的组合从聚合物敷层上的释放。在一种实施方式中,释放率由构成敷层的聚合物或共聚物的降解速率和/或溶剂速率确定。

[0102] 在一种实施方式中,聚合物层含有一种或多种能与被浓缩的自体流体中的一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合进行反应或共价结合的反应性官能团。合适的聚合物材料的实例包括但不限于尤里卡杜厄特(EUREKA DUET)原位形成基质、EUREKA DUET 生物可降解基质装置、恩可(ENCORE)释药聚合物基质、合成生物体系(SYNBIOSYS)可生物降解药物聚合物释放基质、卡美奥(CAMEO)可生物降解聚合药物释放基质、聚活性(POLY ACTIVE)生物降解聚合物要释放基质、塞拉布瑞森(CELLABRATION)封装聚合物基质、和福多林科(苏尔摩的科斯,明尼阿波利斯,明尼苏达州)(PHOTOLINK(Surmodics, Minneapolis, MN))。被浓缩的体液或自体流体可以用来对通常为冻干形式的移植材料进行重建。使用被浓缩的自体流体(例如 PRP)对移植材料进行重建提高了移植部位的组织的接受性,并提高了移植手术后的愈合速度。

[0103] 在其他实施方式中,敷层剂含有直接或间接附着到一种或多种取代基上的非聚合物中心分子,该取代基包括带负电的基团或能与被浓缩的流体中的生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子等的正电部分发生互相作用的反应性物质。在一种实施方式中,敷层剂含有直接或间接地附着到一种或多种取代基上的非聚合物中心分子,该取代基包括带负电的基团或能与被浓缩的流体中的生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合发生互相作用的反应性物质。根据本发明,反应性组分包括能将敷层附着到表面上的第一反应

性组分,和一种或多种能激发聚合作用的第二反应性组分。在一些实施方式中,用生物可降解的纳米级的多糖层、抗菌剂、抗真菌剂、生物活性大分子(例如蛋白质、肽和氨基酸类似物)等对聚合物进行包覆。在其他实施方式中,聚合物层涂敷有细胞、细胞结块(cell agglomerate)或细胞基质。这种聚合物层和制备这种聚合物层的方法是本领域公知的,并且已记载于例如美国专利 No. 6, 514, 734 中,该专利通过引用而被并入于此。

[0104] 在其他的实施方式中,用纳米纤维或微米纤维对移植材料进行涂敷。所述纳米纤维或微米纤维含有一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合。可以将这些分子附着到纤维的表面上,例如,通过官能团或带电部分,或在进行电纺(electrospinning)之前加入到聚合物溶液中。在一种实施方式中,利用等离子体沉积使官能团沉积在生长表面上。等离子体沉积在纤维表面产生了局部等离子体。随后将经过处理的表面与气体分子例如丙烯胺和/或烯丙醇在反应室内进行反应。在另一种实施方式中,在制备纤维的过程中引入官能团。例如,可以在制备过程中向聚合物溶液中加入十二烷胺、月桂醛、十二烷基硫醇、或十二醇。部分加入的胺、醛、巯基或醇部分分别暴露于纤维表面。合适的纳米纤维和微米纤维的实例在例如 U. S. 2005/0059695、WO 2006/094076、U. S. 2007/0082393 中进行了描述,并可商购自例如苏尔莫迪克斯公司(Surmodics)(明尼阿波利斯(Minneapolis), MN)。

[0105] 设计纳米纤维或微米纤维的溶解性或不溶性来控制一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或这些生物活性分子的组合从纳米纤维或为纤维上的释放。在一种实施方式中,释放率由构成纳米纤维或微米纤维的聚合物或共聚物的降解速率和/或溶剂速率确定。

[0106] 在一些实施方式中,在无效过滤(void)的情况下,例如脱矿质骨基质(DBM)在本发明的浓缩器中得到的经过浓缩的流体中发生重建和/或涂敷有该经过浓缩的流体。在一种实施方式中,流体为被浓缩的自体 PRP。可以在手术过程中用浓缩器从患者血液样品中获得经过浓缩的 PRP。被浓缩的 PRP 可以与骨隙填充物进行混合,例如 DBM。合适的 DBM 可以从维吉尼亚海滩(弗吉尼亚州)的生命网络(LifeNet)上得到,商品名为 CELLECT、CEL25、DCAN5(脱钙骨松质 1-4mm(Demineralized Cancellous))、DGC20 或 DGC 40(脱钙骨皮质(Demineralized Cortical Bone)、GDS005、GDS 010 或 GDS 015(I/C 移植腔(I/C Graft Chambers))、奥普蒂姆(OPTIUM)凝胶 AGEL05 或 AGEL 10(用于不承重的应用)、OPTIUM 油灰 APUT05 或 APUT05(用于不承重的应用),以及来自奥斯特科技公司(伊顿郡,新泽西州)(Osteotech, Inc. of Eatontown, New Jersey),商品名为格拉夫顿 DBM 匡驰(GRAFTON DBMCRUNCH)和格拉夫顿 DBM 基质皮尔夫(GRAFTON DBM MATRIX PLF)。可以对 DBM 进行冻干,进而随后能在手术中与经过浓缩的富含血小板血浆进行混合。与例如 DBM 的骨填充物进行混合后,以将得到的混合物用于在多种应用中的任意一种的手术过程,包括但不限于脊柱融合、脊柱缺陷、骨外伤、骨囊肿、骨瘤、骨折、骨质填充缺陷、全关节增生(augmenting total joint)、窦增生、脊保存(ridge preservation)、关节矫正(joint revision)、后外侧融合过程(posterolateral fusion procedure)和普通矫形应用。为了治疗目的将患者自身的被浓缩的 PRP 与骨隙填充物进行混合然后放入患者体内,提高了骨引导(osteoconductivity)并加快了骨的生长。骨隙填充物材料更可能易于被患者免疫系统接受,并降低了发生排斥反应的几率,还促进了骨隙填充物材料周围的骨组织再生。

[0107] 组织再生 / 培养的方法

[0108] 由本发明的方法获得的被浓缩的流体可以用于组织再生、组织培养以及细胞培养。含有一种或多种生长因子、分化因子、趋化因子、粘附分子或它们的组合被浓缩的流体可以被加入到生长基质或直接加入到组织或细胞培养基中。在一种实施方式中,将被浓缩的流体施覆到伤口或受伤部位,从而促进细胞增殖并对伤口处的组织进行修复和再生。

[0109] 本发明的浓缩器的过滤器壳体可以被构造成生长室。在这种实施方式中,过滤器壳体装配有生长基质或生长表面。生长基质或生长表面的实例包括但不限于一种或多种纳米纤维网络;纳米原纤维结构;具有被蚀刻的或形成有微图案的表面的玻璃、硅或塑料;具有微米孔隙或纳米孔隙的玻璃、硅或塑料表面、聚合物支架、织物支架(woven scaffold)、纺织品或网织品、挤出支架(extruded scaffold)、棒、螺丝钉、金属丝、网状物或笼子。在一些实施方式中,生长基质或生长表面可以为玻璃、聚合物、金属、陶瓷、纤维质或蛋白质。在某些实施方式中,生长基质的表面涂覆有支持细胞种子在表面上生长和 / 或附着到表面上的纳米纤维或聚合物敷层。合适的表面包括但不限于棒、螺丝钉、金属丝、网状物或笼子表面。本文中对支持细胞种子在具有敷层的生长和 / 或附着到具有敷层的表面上的纳米纤维和 / 或聚合物敷层进行了描述,并且这是本领域公知的。

[0110] 在一种实施方式中,生长基质为纳米原纤维结构。可以对纳米原纤维结构进行层压以形成多层组装的纳米纤维原。可以通过对构成单个纳米原纤维结构的纳米纤维网络、基材和 / 或间隔物设计特定的化学和物理特性,和 / 或依次层压单个纳米原纤维结构,可以构造出用于细胞或组织的多阵列生长环境。

[0111] 可以在单个纳米原纤维结构内或由两个或更多的层压纳米原纤维结构内设计特定的纳米环境和 / 或微环境。单个纳米原纤维结构的物理特性和 / 或特征包括但不限于,表面粗糙度、粘附性、孔隙率、硬度、弹性、形状、贯通性、比表面积、纤维直径、纤维溶解性 / 不溶性、亲水性 / 疏水性、原纤维密度和纤维取向,可以对它们进行设计以模拟 ECM 或 BM 的纳米形态。例如,可以设计组装的单个纳米原纤维结构的纳米形态的物理和几何性质来模仿细胞外基质或基底膜的纳米形态。

[0112] 可以将特异性识别的构型,例如肽、多肽、脂类、碳水化合物、氨基酸、核苷酸、核酸、多聚核苷酸,或多糖包括但不限于生长因子、分化因子、纤维蛋白、粘附蛋白、糖蛋白、官能团、粘附化合物,和靶分子以等密度或梯度的方式设计到纳米原纤维网络、单个纳米原纤维结构或多层组装纳米原纤维结构中的基材和 / 或间隔物内,从而提高了适当的细胞活性,包括细胞生长和 / 或分化。包括氨基酸、肽、多肽和蛋白质的实施方式可以包括任意类型具有任意大小和复合度的这种分子以及这些分子的组合。实例包括但不限于结构蛋白、酶、生长因子、分化因子和肽类激素。

[0113] 纳米原纤维生长基质和使用生长基质进行细胞增殖和分化和进行细胞或组织培养的方法描述于例如 U. S. 20050095695 和 WO 2006/094076 中,这些文献通过引用而被结合于此。

[0114] 在一种实施方式中,将流体、细胞或组织加入本发明的浓缩器的分离室中,并将浓缩器利用重量进行离心或分离。在一种实施方式中,组织为碎裂的组织。在一种实施方式中,流体、细胞或组织为自体的。将所需的细胞级分从分离室内取出,并通过转移端口向包括生长基质的过滤室转移。可以使细胞在浓缩器内的生长基质上进行培养,或者可以将生

长基质取出进行单独培养。可以使用已知的方法和条件使细胞或组织在体内、体外、离体 (ex vitro) 的生长基质上进行生长。用于本发明的方法的细胞包括干细胞、体细胞、定向干细胞、分化细胞和瘤细胞。细胞可以来自哺乳动物。哺乳动物可以为人类。细胞可以为组织。组织的实例包括皮肤、骨、肝脏、心脏、肾、膀胱、肌肉、韧带、肌腱、软骨、脑、视网膜、角膜和胰。本发明的方法中有用的细胞的实例包括但不限于成骨细胞、成肌细胞、神经元、成纤维细胞、成神经胶质细胞、生殖细胞、干细胞、肝细胞、软骨细胞、角质形成细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、结缔组织细胞、胶质细胞、上皮细胞、内皮细胞、激素分泌细胞、神经元、和淋巴样细胞例如 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、和中性粒细胞。干细胞的实例包括但不限于胚胎干细胞、间充质干细胞、骨髓干细胞、和脐带血源性干细胞。干细胞可以为哺乳动物干细胞。在一种实施方式中，干细胞为人类干细胞。在一种实施方式中，干细胞为胚胎干细胞。

[0115] 干细胞可以来源于接受者、同种非特定供体、或不同种的供体。细胞可以来自转基因动物的组织，其中将细胞设计为表达一种或多种多聚核苷酸、抑制一种或多种多聚核苷酸的表达，或具有上述两种功能。能用于本发明的方法的从基因上进行了设计的细胞的实例为这样的细胞：它被设计成产生和分泌一种或多种所需的生物活性分子。当这些细胞植入有机体或患者体内时，细胞产生的生物活性分子能产生局部效应或全身效应。生物活性分子的实例包括生长因子、分化因子和激素。激素的实例包括胰岛素、人类生长因子、促红细胞生成素、促甲状腺激素、雌激素、或孕酮。可以设计使细胞产生抗原。这些细胞可以植入有机体或患者体内易产生免疫应答。可以设计使细胞产生抑制或刺激生物活性分子炎症、加速愈合、抑制免疫排斥和、提供激素替代、代替神经递质、抑制或破坏癌细胞、促进细胞生长、抑制或刺激血管形成、组织增生，并促进或诱导皮肤、关节液、肌腱、软骨、韧带、骨、肌肉、器官、硬脑膜、血管、骨髓和细胞外基质的补给和更换。

[0116] 基因设计可以包括例如向细胞加入或除去基因物质，改变现有的基因物质，或同时适用标准重组方法。将细胞进行转染或设计成对多聚核苷酸进行表达的实施方式可以使用暂时转染或永久转染的多聚核苷酸，或二者均得以使用。多聚核苷酸序列可以为全长或部分、被克隆的或天然产生的。

[0117] 干细胞方法

[0118] 在一些实施方式中，本发明的被浓缩的流体为含有骨髓干细胞的流体。在一种实施方式中，被浓缩的流体为自体流体。在一种实施方式中，外科医生直接将大针头插入患者下背骨的骨髓腔内，并用针头多次插入骨将骨髓从骨中抽吸出来。随后，将抽吸出来的骨髓在本发明的浓缩器内进行离心，例如在 400g 离心力下离心 5 分钟。被抽吸的骨髓为血样物质，具有差别很大的细胞和细胞以及分子大小和分子量，从而离心操作将骨髓分离层不同的级分。如有需要，在进行离心前可以将抽吸出来的骨髓与 0.56% (0.075M) 的 KCl (0.56g 溶解于 100ml 的去离子水) 进行混合。随后取出底层并通过过滤器进行 1-10 次进行过滤，优选经过 4 次。如本申请中其他地方所描述地，使用含有滤芯或滤膜的过滤系统对该层进行过滤。

[0119] 在某些实施方式中，被浓缩的流体为含有脐带血源性干细胞的流体。在一种实施方式中，血液获得自生产过程中的脐带。可以将脐带血在本发明的浓缩器内进行离心，例如在 400g 的离心力下进行 5 分钟的离心，从而将脐带血分成不同级分。随后取出底层并通过过滤器进行 1-10 次进行过滤，优选经过 4 次，由此得到脐带血源性干细胞浓度得到提高的

物质。如本申请中其他地方所描述地,使用含有滤芯或滤膜的过滤系统对该层进行过滤。

[0120] 可以沿离心后的体液柱对装置的收集视窗进行无限调整,从而能更加精确地收集经过浓缩的自体骨髓干细胞。富集有干细胞的流体可以用来使细胞和骨屑物质相结合。富集有干细胞的流体通过对干细胞保持恒定的环境,还能使干细胞保持更长时期的活性。

[0121] 随后将经过浓缩的干细胞注入到患者体内或施覆到特定的目的部位处。在某些实施方式中,使用载体(例如 DBM)来注射或给药干细胞。比如说,可以将被浓缩的干细胞注入到大脑内来治疗大脑损伤,或在脊髓受到损伤或疾病(例如 ALS(路格里克氏病(Lou Gehrig's disease)))后注入到脊髓附近或脊髓内。可以将经过浓缩的干细胞注入肌肉受损的肌肉内,具体地说,例如为了治疗非缺血型(先天性)心力衰竭和缺血型心力衰竭而注入心脏内。可以将干细胞注入循环系统,或回到骨髓内以增加血细胞产量。浓缩的细胞可以置于胶质内以形成牙蕾,可以置于耳蜗内诱导耳蜗毛细胞再生长从而治疗耳聋,或者可以移植到受损的细胞膜上来治疗失明。可以局部地施覆浓缩的干细胞来治疗软组织伤口或烧伤或类似伤害。可以将浓缩的干细胞加入受伤或断裂的骨处以促进骨愈合。还可以用浓缩的干细胞进行诊断。

[0122] 精子的筛选和分离

[0123] 本发明的方法和浓缩器可以用来对精子进行筛选。在一种实施方式中,可以使用浓缩装置从哺乳动物的精液样品中收集精子,并筛选出 X 基因型或 Y 基因型。这些方法建立可以根据 pH 或密度特性对哺乳动物的两种精子类型(X 和 Y)进行分离的基础上。在一种实施方式中,精子来源于哺乳动物牲畜,例如牛、马、绵羊或山羊。对于利用密度特性进行的分离来说,使用液体分离介质内的浮力导致浮力较大的精子在分离介质中的水平与浮力小的精子不同。当利用本发明的装置对精液样品进行离心时,由于各个基因型的密度不同,可以将流体分离为含有 X 基因型或 Y 基因型的精子级分。沿精液样品时来自人类患者的样品时,将其分离成 X 基因型和 Y 基因型需要在本发明的浓缩器内使用 pH 梯度。基本纯净的精子级分(含有 X 基因型或 Y 基因型特性)在利用本发明的装置获得的被浓缩的流体中分离为顶层或底层。在特定情况下,通过向装置的滤芯或滤膜施加压力(正压或负压),可以增强精子分馏或对一种特定基因型的浓缩。对精子进行密度分离的方法是公知的,并在例如美国专利 No. 4, 327, 177 中进行了记载,该专利通过引用而被结合于此。

[0124] 蛋白质筛选和分离

[0125] 本发明的方法和浓缩器可以用来对蛋白质进行筛选。在一种实施方式中,蛋白质可以为生长因子、分化因子、趋化因子或粘附分子。来自下列普通级别的蛋白质也可以用于本发明的方法:前白蛋白(甲状腺素和视黄醇结合蛋白)、白蛋白、 α -球蛋白和 β -球蛋白、载脂蛋白、凝固蛋白(coagulation protein)、细胞相关血浆蛋白(cell-related plasma protein)、免疫球蛋白、淀粉样蛋白等。这些蛋白家族和蛋白个体(记载于弗兰克普特南的“血浆蛋白”,第四卷,第 2 版,1984(Frank Putnam "The Plasma Proteins", Volume IV, 2nd Edition, 1984))列于表 1 中。

[0126] 表 1. 血浆蛋白

[0127]

前白蛋白, 甲状腺素结合蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	相同链的非共价键四聚体	127	54,980
前白蛋白, 甲状腺素结合蛋白				
视黄醇结合蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	单链	182	20,957
视黄醇结合蛋白				
白蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	单链	585	66,458
白蛋白		核酸前体	609	69,365
	牛	单链	582	66,210
		核酸前体	606	
	猪	单链	~575	~66,300
	绵羊	单链	575	~66,300
	鸡	单链	575	~66,300
	大鼠	单链	584	64,600
		核酸 前体	608	
α -球蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质				
α -球蛋白	人类	单链	167	26,000
α_1 -微球蛋白	人类	单链	181	40,000
α_1 -酸性糖蛋白	大鼠	核酸前体	187	~40,000
	人类	单链	394	54,000
α_1 -抗胰蛋白酶		核酸前体		
	狒狒	核酸前体	394	~54,000
	人类	单链	~440	68,000
α_1 -抗糜蛋白酶			408	
	人类	单链		65,000
α_2 -抗纤维蛋白溶酶	人类	核酸前体	590	66,300
α_1 -甲胎蛋白	大鼠	核酸前体		
	小鼠	核酸前体	586	72,000
9.5S α_1 -糖蛋白	人类	两个五边形 (10个非共价键合相同亚基)	(182) ₁₀	~250,000
(血清淀粉样P成分)	人类	可能为单链	~480	68,000
α_1 B-糖蛋白	人类	单链	~776	85,000
α_1 T-糖蛋白	人类	单链	~450	52,000
维生素D结合蛋白				

[0128]

(Gc 球蛋白)	人类	单链		54,000
甲状腺素结合蛋白	人类	单链		~160,000
间- α -胰蛋白酶抑制剂	人类	单链 (易裂开)	1,046	132,000
血浆铜蓝蛋白	人类	单链	~440	58,500
富含 3.8S 组氨酸的 α_2 -糖蛋白	人类	单链	~213	81,000
半乳糖蛋白	人类	单链 e	312	50,000
富含 3.1S 亮氨酸的 α_2 -糖蛋白	大鼠 (雄性)	核酸前体	162	18,709
α_2 -球蛋白	人类	单链	~258	41,000
Zn- α_2 -糖蛋白	人类	双链 (A 链和 B 链)	~359	49,000
α_2 HS-糖蛋白		B 链	27	3,386
	人类	4 个相同亚基	1,450	725,000
α_2 -巨球蛋白	人类	单链	~465	60,000
4S- $\alpha_2\beta_1$ -糖蛋白	人类	2 对不相同的链($\alpha\beta$) ₂	656	86,018
结合球蛋白		单链前体	245	
		α^1 链	83	9,189
		α^2 链	142	15,939
		β 链	245	33,820
		β 链		
	犬类	成对链($\alpha\beta$)中的 β 链		
	人类	单链		52,000
糖皮质激素结合球蛋白	人类	四聚体		220,000
8S α_3 -糖蛋白				
β -球蛋白 s	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	三聚 体		(42,300) _n	
妊娠特异性 人 β_1 -糖蛋白	人类	单链	678	79,550
铁传递蛋白			679	
	鸡	单链	686	77,770
卵铁传递蛋白		核酸前体	686	
	人类	单链	439	60,000
血液结合素	兔	单链	~440	57,000
	人类	单链	99	11,731
β_2 -微球蛋白	小鼠	单链	99	
	兔	单链	99	
	几内 亚猪	单链	99	
	人类	亚基结合成环状五聚体	187	(20,946) ₅
C 反应蛋白	兔	五角形结构	186	
	人类	单链	326	~50,000
β_2 -球蛋白 I	人类	单链,		35,000

[0129]

形成络合物				
β_2 -糖蛋白 III				
载脂蛋白 s	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均分子量
蛋白质	人类	单链; 无二硫化物	243	28,076
载脂蛋白 A-I (HDL)	人类	2 条相同链的二聚体, 由二硫化物连接	77	17,414
载脂蛋白 A-II	人类	单链; 无二硫化物	57	6,631
载脂蛋白 C-I (VLDL)	人类	单链; 无二硫化物	78	8,829
载脂蛋白 C-II	人类	单链 糖肽	79	8,764
载脂蛋白 C-III (VLDL)	人类	单链	299	34,183
载脂蛋白 E				
γ -流动蛋白 (非免疫球蛋白)	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均分子量
蛋白质	人类	单链	47	5,100
0.6S γ_2 -流动蛋白	人类	单链	132	14,000
2S γ_2 -流动蛋白	人类	单链	~85	9,000
碱性蛋白 B2	人类	单链	120	13,248
后- γ -球蛋白(γ -微量)				
补充成分	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均分子量
蛋白质	人类	6 相同的非共价键连接的亚基, 每一个上具有 3 个相似的链 (A 链、B 链和 C 链), 共 18 条链		410,000
C1q		B 链	226	
		C 链	~200	
	人类	非共价二聚体		(83,000) ₂
C1r	人类	B 链	242	27,096
C1r	人类	单链		83,000
C1s	人类	两条链(a 链和 b 链)		83,000
C1s	人类	单链		102,000
C2	人类	两条键合了二硫化物的链	~1,630	~185,000
C3		α 链	~960	115,000
		β 链	~670	75,000
	小鼠	ProcC3 为单链前体		~190,000
	人类	C3 的 α 链片段	77	9,093
C3a	猪	C3 的 α 链片段	77	~9,000
	大鼠	C3 的 α 链片段	78	~9,000
	小鼠	C3 的 α 链片段	78	~9,800
	人类	三条键合了二硫化物的链		
C4		α 链	~785	93,000
		β 链	~660	75,000
		γ 链	~250	33,000
	人类	α 链片段	77	8,763

[0130]

C4a	牛	α 链片段	77	
	人类	两条键合了二硫化物的链		185,000
C5		α 链	~960	115,000
		β 链	~670	75,000
	人类	α 链片段	74	8,274
C5a	人类	单链	~900	1,048,000
C6	人类	单链	~800	92,400
C7	人类	两个非共价连接的亚基		163,000
C8	人类	键合了二硫化物的亚基(M_r 75,000)		540,000
C4 结合蛋白	人类	单链		24,000
因子 D (C3 前活化剂转化酶)	人类	单链		90,000
因子 B (C3 前活化剂)		Bb 片段	505	60,000
	人类	4 条相同的非共价键	~480	220,000
备解素	人类	单链	~1,275	155,000
因子 H (β_1 H)	人类	两条键合了二硫化物的链		90,000
C3b-灭活剂		轻链		40,000
		重链		50,000
凝固蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均分子量
蛋白质	人类	单链	581	72,000
凝血酶原	牛	单链	582	72,000
	牛	两条键合了二硫化物的链	~340	37,000
凝血酶		A 链	49	5,728
		B 链	259	31,000
	人类	单链 (活化后为两条链)		48,000
因子 VII	人类	非共价络合物		(100,000) _n
因子 VIII	人类	单链前体	462	51,801
因子 IX	牛	单链	427	~55,000
	人类	重链和轻链	381	
因子 IX a (活化后)		轻链	145	
		重链	236	
	牛	重链和轻链	390	~46,500
		轻链	146	16,600
		重链	232	27,300
	人类	重链和轻链		59,000
因子 X		轻链	139	16,211
	牛	重链和轻链	447	55,000
		轻链	140	16,143
		重链	307	38,000
	牛	重链和轻链	396	44,000
活化后的因子 X a		轻链	140	16,000
		重链	256	28,000
	人类	两条键合了二硫化物的链		130,000
因子 XI	牛	两条键合了二硫化物的链	415	55,000

[0131]

蛋白 C		轻链	155	21,000
		重链	260	35,000
	人类	单链		~69,000
S 蛋白	牛			~66,000
	牛	单链		~50,000
Z 蛋白	人类	三对键合了二硫化物的链	2,964	340,000
纤维蛋白原		α 链	610	64,115
		β 链	461	52,314
		γ 链	411	46,468
	人类	单链	790	~92,000
纤维蛋白溶酶原		活化后为双链	790	
血纤维蛋白溶酶		重链(A)	560	
		轻链(B)	230	
	人类	单链		76,000
因子 XII		两对不同的链 ($\alpha_2\beta_2$)		320,000
因子 XIII (转谷氨酰胺酶)	牛	单链前体	621	
高重均分子量(HMW)和低重均分子量(LMW)的预激肽原 (Prekininogens)	牛	重链	361	
LMW 激肽原		轻链	47	
	人类	单链	430	58,000
抗凝血酶 III				
细胞相关血浆蛋白	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	二硫化物连接的二聚体	~1,900	~440,000
纤维连结蛋白	人类	二硫化物连接的二聚体	~1,880	~440,000
	人类	相同链的四聚体	81	35,404
β -血小板球蛋白	人类	相同链的四聚体	70	(7,769) ₄
血小板因子-4	牛	单链	60	6,647
血清碱性蛋白酶抑制剂				
免疫球蛋白 (抗体)	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	高级 脊椎 动物	4 条键合有二硫化物的链, 两条 为重链两条为轻链		(160,000) _n
免疫球蛋白 (抗体)	人类	二聚物单体	~214	~23,000
κ 轻链或 λ 轻链 (本周蛋白)	人类	κ	~214	~23,500
		λ	~214	~23,000
	人类	($\gamma\kappa$) ₂ 或 ($\gamma\lambda$) ₂ 的单体		~150,000
免疫球蛋白 G (IgG)		γ_1 重链	~475	~50,000
LgG ₁		γ_2 重链	~450	~50,000
LgG ₂		γ_3 重链	~475	~55,000
LgG ₃		γ_4 重链	~450	~50,000
LgG ₄	人类	($\alpha_2\kappa_2$) _n 或 ($\alpha_2\lambda_2$) _n n=1,2 或 4		~(160,000) _n
免疫球蛋白 A		α_1 重链	~475	~60,000

[0132]

(IgA)				
IgA1		$\alpha 2$ 重链	~450	~60,000
IgA2	人类	$\mu 2\kappa 2$ 或 $\mu 2\lambda 2$ 的单体		~950,000
免疫球蛋白 M (IgM)		μ 重链	~575	~75,000
	人类	$\delta 2\kappa 2$ 或 $\delta 2\lambda 2$ 的单体	~510	~175,000
免疫球蛋白 D (IgE)		δ 重链		~65,000
	人类	$\sigma 2\kappa 2$ 或 $\sigma 2\lambda 2$ 的单体		~190,000
免疫球蛋白 E (IgE)		σ 重链	~550	~72,000
	人类	单链	129	14,619
J 链		单链前体	137	
淀粉样蛋白 (非免疫球蛋白)	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	单链前体	104	11,683
淀粉样相关脱辅基蛋白 (apoSAA ₁)	人类	单链前体	76	9,150
AA(FMF)(AS)	人类	单链前体	76	9,145
AA(TH)(AS)	人类	10 个亚基集成成 2 个五聚体	~184	~25,000
血清淀粉样 P 成分 (9.5 S 7 α 1-糖蛋白)				
微量组成杂项	物种	亚基结构	链长	蛋白质重均 分子量
蛋白质	人类	AA		
癌胚抗原	人类	AA		Asp
血管紧张素原	大鼠	单链前体 NA	49,548	Asp

[0133] 进行蛋白质筛选和收集的基本方法包括对生物学流体或者碎裂细胞或组织进行离心分离或其他重力分离。可以对含有特定所需蛋白质的柱高或柱的视窗进行无限调整,从而选择所需的蛋白质并收集流体。如本文中所讨论的,可以使用多种过滤器来进一步浓缩或使被浓缩的特定蛋白质具有更高的浓度。这种筛选和收集方法通过使它们的环境保持在天然流体的状态下,因此有利于维持蛋白质生命力和活性。

[0134] 可以将蛋白质用于例如愈合、外科应用、治疗应用、细胞或组织培养、诊断目的或重新施用到患者体内。在一种实施方式中,将一种或多种生长因子、一种或多种分化因子、一种或多种趋化因子、一种或多种粘附分子或它们的组合给药到骨、软骨、伤口、软组织损伤或外科部位上以促进愈合。还可以将经过浓缩的蛋白质与干细胞进行混合。软骨可以为受伤、受损或断裂的软骨。伤口可以为外科切口、擦伤、溃疡、烧伤或任何皮肤上其他的破裂。在一种实施方式中,向受试者给药一种或多种生长因子、一种或多种分化因子、一种或多种趋化因子、一种或多种粘附分子或它们的组合来治疗骨科疾病,或在手术过程中或手术后进行给药来矫正骨科疾病从而促进愈合。经过浓缩的蛋白质还能与干细胞一起被给药。在一种实施方式中,将被浓缩的蛋白质和 / 或干细胞给药到外科手术部位上。在一种实施方式中,骨科疾病包括脊柱融合、脊柱缺损、骨外伤、骨囊肿、骨瘤、骨折、骨质填充缺陷、关节增生、窦增生、脊保存、关节矫正、或后外侧融合。

[0135] 在一种实施方式中,来自肾的流体或组织可以为在本发明的装置中进行自体浓缩

以获得经过浓缩的试样或级分,该试样或级分含有促红细胞生成素、尿扩张素、骨化三醇 (calcitrol) 和 / 或肾素。可以对脾脏中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有调理素、备解素和促吞噬肽。可以对肝脏中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有胆汁、肝细胞、胆管细胞、单潜能或双潜能干细胞、胰岛素样生长因子 (IGF);血管紧张肽原、和 / 或血小板生成素。可以对甲状腺中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有激素、主要甲状腺素 (T_4)、三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 和 / 或降钙素。可以对下丘脑中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、多巴胺、促性腺激素释放激素 (GnRH)、生长激素释放激素 (GHRH)、生长激素抑制素、促甲状腺激素释放激素 (TRH)、和 / 或下丘脑分泌素。可以对松果体中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有褪黑激素。可以对脑垂体中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有 TRH(促甲状腺激素释放激素)、CRH(促肾上腺皮质激素释放激素)、DA(多巴胺,“催乳激素抑制因子”/PIF)、GnRH(促性腺激素释放激素)、GHRH(生长激素释放激素)、催乳激素、促卵泡激素、黄体化激素、甲状腺刺激激素、促肾上腺皮质激素、内啡肽和 / 或生长激素。可以对副甲状腺中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有甲状旁腺激素 (PTH)。可以对心脏中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有心钠素。可以对胃和 / 或肠道中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有胆囊收缩素 (CCK)、胃泌素、饥饿激素 (ghrelin)、神经肽和 / 或生长激素抑制素。可以对胰腺中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有胰岛素、胰高血糖素、生长激素抑制素、胰多肽、旁分泌、自分泌和 / 或其他由胰岛产生的激素。可以对肾上腺中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有糖皮质激素 (可的松)、矿物性皮质激素 (醛甾酮)、和 / 或雄激素类 (DEHA 和睾丸激素)。可以对睾丸中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有雄性激素和 / 或睾丸酮。可以对卵巢中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有雌激素 (雌二醇) 和 / 或孕酮。可以对胎盘中的流体或组织进行自体浓缩以获得经过浓缩的试样或级分,试样或级分含有孕酮、雌激素、人类绒毛膜促性腺激素、和 / 或人胎盘泌乳素。可以对丘脑或内分泌系统的其他部分中的流体或组织进行类似的自体浓缩。

[0136] DNA 纯化方法

[0137] 本发明的浓缩器和方法能用来分离和纯化 DNA。在一些实施方式中,DNA 可以为基因组 DNA、质粒 DNA、分离自组织或细胞的 DNA、合成寡核苷酸等。对 DNA 进行分离和纯化的基本方法包括用化学或物理方法破碎含有 DNA 的细胞或组织。随后用滤芯对破碎后的细胞或组织进行过滤,然后在本发明的浓缩器中进行离心。细胞或组织保持在滤芯上,同时施加压力使含有 DNA 的流体层通过过滤器并进入浓缩装置的离心室内。可以在超速离心机和微型离心机规模上以最高为 15,000RPM 的高速进行离心。可以使用多种过滤器来使利用了本发明的浓缩器进行的 DNA 的纯化更有效。例如,本发明的滤芯可以为优选对流体中的 DNA 进行吸附的亲和柱,然后进行洗脱。本发明的方法允许 DNA 以简单而有效的方法得到纯化,所需的机械或化学操作最少。本发明的方法得到的纯化的 DNA 可以用于诊断和治疗多个目

的。

[0138] 其他用途和应用

[0139] 在某些实施方式中,可以将被浓缩的流体(例如 PRP 和 / 或 PPP) 施覆到止血纱布或止血垫上。所述止血纱布或止血垫可以由织造纱布材料或无纺布绷带材料制成。所述纱布或垫优选由生物可降解材料形成。可选择地,无纺布绷带材料可以填充有自体浓缩的 PRP。在一种实施方式中,将止血纱布或止血垫贴于伤口部位。可以直接将该止血纱布或止血垫贴在流血部位开始阻止继续流血,例如拔出经皮导管或经皮置管后的血管通路处,随后由于止血纱布或止血垫是可生物吸收的,因此能加速组织愈合。

[0140] 在一种实施方式中,止血纱布或止血垫可以涂敷或含有其他抑制的止血试剂。例如,可以向商购自雅培血管部门(圣克拉拉,加利福尼亚州)(AbbottVascular of Santa Clara, CA)的奇多密封(CHITO-SEAL)局部止血垫施覆经过浓缩的 PRP 和 / 或 PPP,该止血垫为涂敷有壳聚糖的柔软、无菌无纺垫。商业上通过对甲壳物质进行脱乙酰来获得壳聚糖(也可以由甲壳物质制得),甲壳是甲壳类(蟹、虾等)外骨骼的结构元素。还可以将经过浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 施覆到含有分离自牛血浆的凝血酶的垫子上,以提高垫子的止血特性。可商购得到的含有凝血酶的垫子的实例可以从血管解决方案公司(明尼阿波利斯,明尼苏达州)(Vascular Solutions of Minneapolis, MN)得到,商品名为 D-STAT DRY、D-STAT RADIAL、凝血胶(THROMBIGEL)、D-STAT 2DRY 和 THROMBIX。

[0141] 根据以上描述得到的被浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 可以用于流动止血中。被浓缩的 PRP 或 PPP 可以是自体的。可以将被浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 直接以液体形式施覆到伤口部位的表面。被浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 有利于通过启动人体自身凝固机制来抑制伤口活动性流血。在一种实施方式中,将自体浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 与其他来源的促凝血组分(例如胶原蛋白和凝血酶)结合。被浓缩的 PRP 和 / 或 PPP 能用来阻止任何活性表面发生流血,并能特别有效地直接施覆在桡动脉通路部位、从而在除凝块过程后进行的透析移植穿刺、PICC/ 静脉内置线,随后除去静脉和动脉鞘。

[0142] 可以根据以上描述得到的被浓缩的 PPP 直接以液体形式施覆到伤口部位的表面。自体浓缩的 PPP 有利于通过启动人体自身凝固机制来抑制从伤口活动性流血。如有需要,可以将自体浓缩 PPP 与其他来源的促凝血组分(例如胶原蛋白和凝血酶)结合。自体浓缩 PPP 能用来阻止任何活性表面发生流血,并能特别有效地直接施覆在桡动脉通路部位、从而在除凝块过程后进行的透析移植穿刺、PICC/ 静脉内置线,随后除去静脉和动脉鞘。

[0143] 在一些实施方式中,本发明的被浓缩的流体为 PRP 和 PPP 的组合。被浓缩的流体可以为自体性的。在一种实施方式中,使用本发明的浓缩器在手术过程中从患者的血液样品中得到经过浓缩的富含血小板血浆和经过浓缩的贫血小板血浆。将全血从患者体内抽出,并在 '142 浓缩器中以 25-10000g 的离心力进行 5-30 分钟离心,最优选在 4000g 的离心力下离心约 15 分钟。通过颜色在视觉上识别离心后的血液中中央层的富含血小板血浆和贫血小板血浆,并从离心室中取出。在注射器压力下同时使上述两层通过过滤单元 1-10 次,最优选为 6 次。过滤可以是切向流过滤或死端过滤。在一种实施方式中采用切向流过滤,该切向流过滤使用的纤维过滤膜的截止大小(size cutoff)为 0.1-100,000nm,且表面积为 1-6000cm²。过滤得到经过浓缩的富含血小板血浆 / 贫血小板血浆("PRP+PPP")。得到的被浓缩的 PRP+PPP 是血小板、白血球、纤维蛋白原、凝血酶、凝固因子和相关蛋白和结构的

浓度比全血发生了增加的粘稠液体。可以根据不同的应用,用各种已知的稀释剂(例如缓冲盐水)来调节被浓缩的自体 PRP+PPP 的粘度。

[0144] 可以在手术过程中直接将得到的经过浓缩的 PRP+PPP 产物施覆到断裂或受损的骨上。被浓缩的 PRP+PPP 产物能有效地减少断裂处的流血,接着能提高骨生长速率。

[0145] 在一些实施方式中,可以将浓缩的 PRP+PPP 与骨隙填充物进行混合,例如脱矿质骨基质(“DBM”)。与骨填充物进行混合后,可以将得到的混合物用于在多种应用中的任意一种的手术过程,包括但不限于脊柱融合、脊柱缺陷、骨外伤、骨囊肿、骨瘤、骨折、骨质填充缺陷、全关节增生、窦增生、脊保存、关节矫正、后外侧融合过程和普通矫形应用。为了治疗目的将患者自身的被浓缩的 PRP+PPP 与骨隙填充物进行混合然后放入患者体内,减少了流血由此提高了骨引导并加快了骨的生长。

[0146] 在一些实施方式中,将被浓缩的 PRP+PPP 作为软骨修复材料而直接施覆于软骨缺陷上。如有需要,可以将被浓缩的 PRP+PPP 与不同来源的软骨细胞混合。在一种实施方式中,用链霉菌蛋白酶和胶原酶依次对骨骼成熟的小牛的全层关节软骨进行酶消化分离得到软骨细胞。

[0147] 在一些实施方式中,将被浓缩的 PRP+PPP 在移植过程中施覆到器官或组织上来减少流血,从而使接受者的免疫系统接受新器官或组织,并减少排斥的发生机会。

[0148] 在一些实施方式中,将被浓缩的 PRP+PPP 做外科粘胶物质使用。或者单独使用,或者与外科粘胶材料混合使用,得到的被浓缩的 PRP+PPP 可以类似于外科粘胶用来使两个组织部分粘合在一起。

[0149] 仅以阐述的方式描述了以上多个实施方式,而且这些描述不应该被理解为是对本发明的限制。本领域技术人员显然可以知道,本发明的实质和范围由随附权利要求书所限定,无须根据本文所阐述和描述的实施方式和应用就可以对本发明做出多种修改或改变,本文中未阐述和描述的实施方式和应用也不背离本发明的实质和范围的基础上。

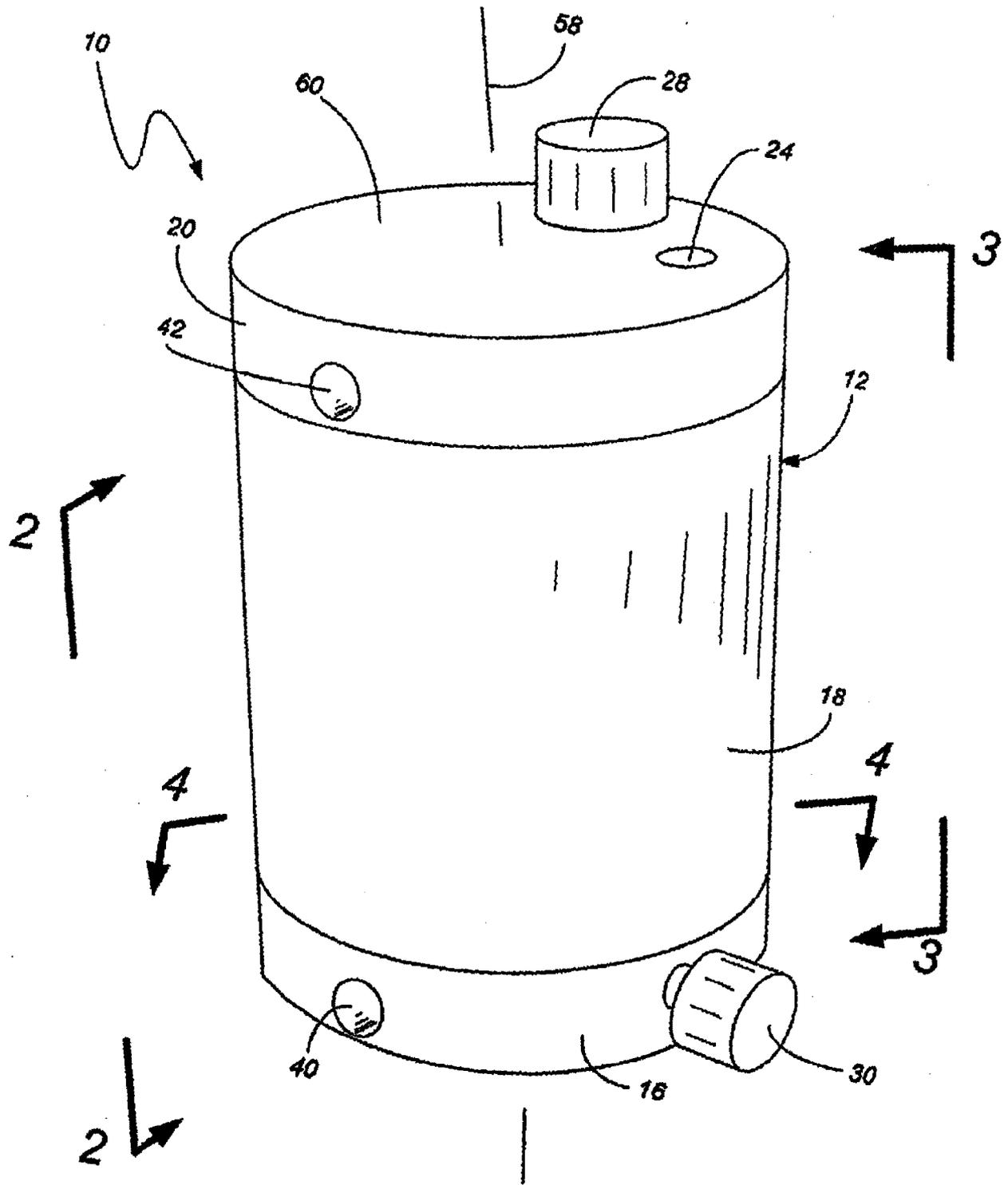


图 1

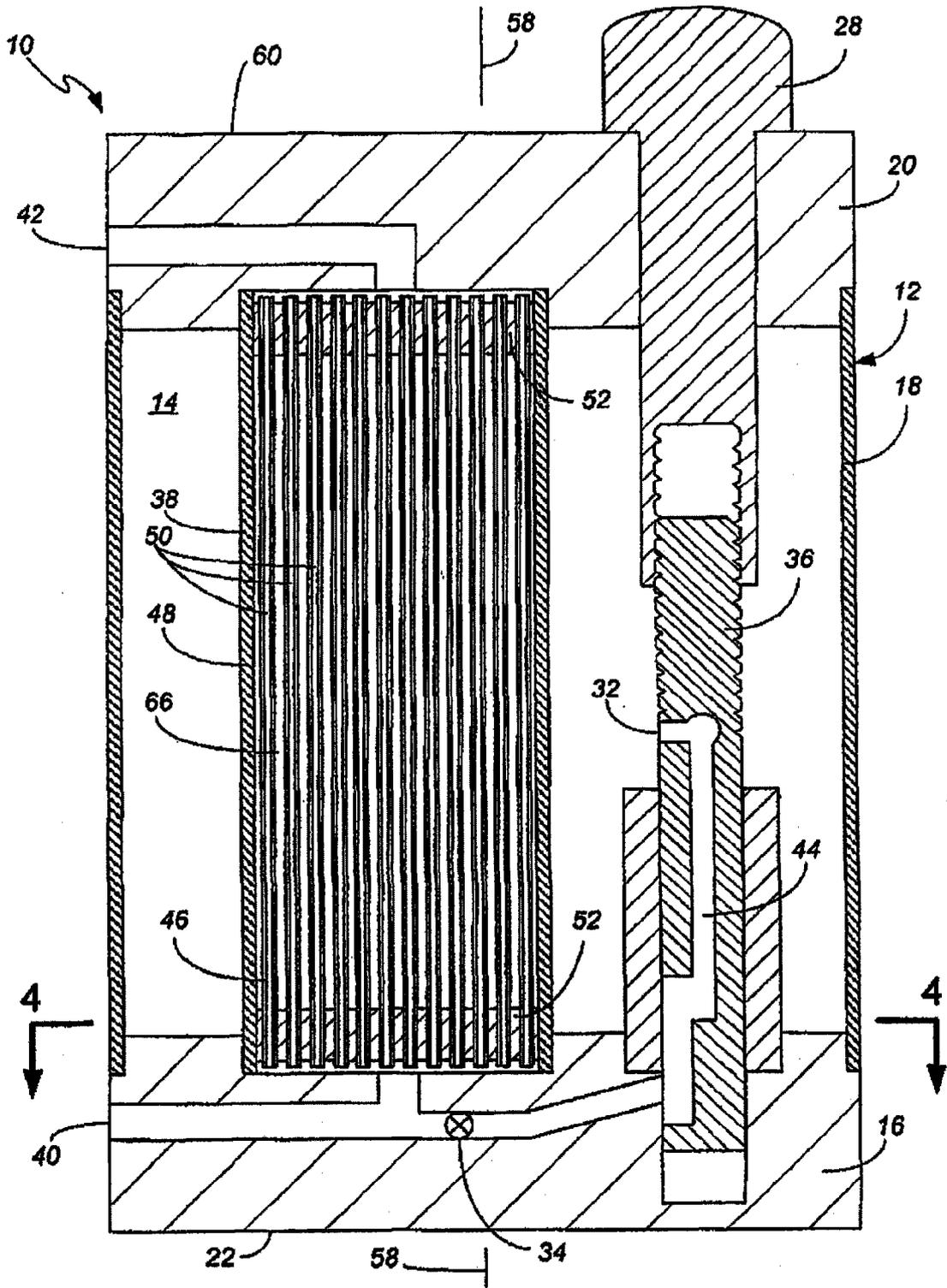


图 2

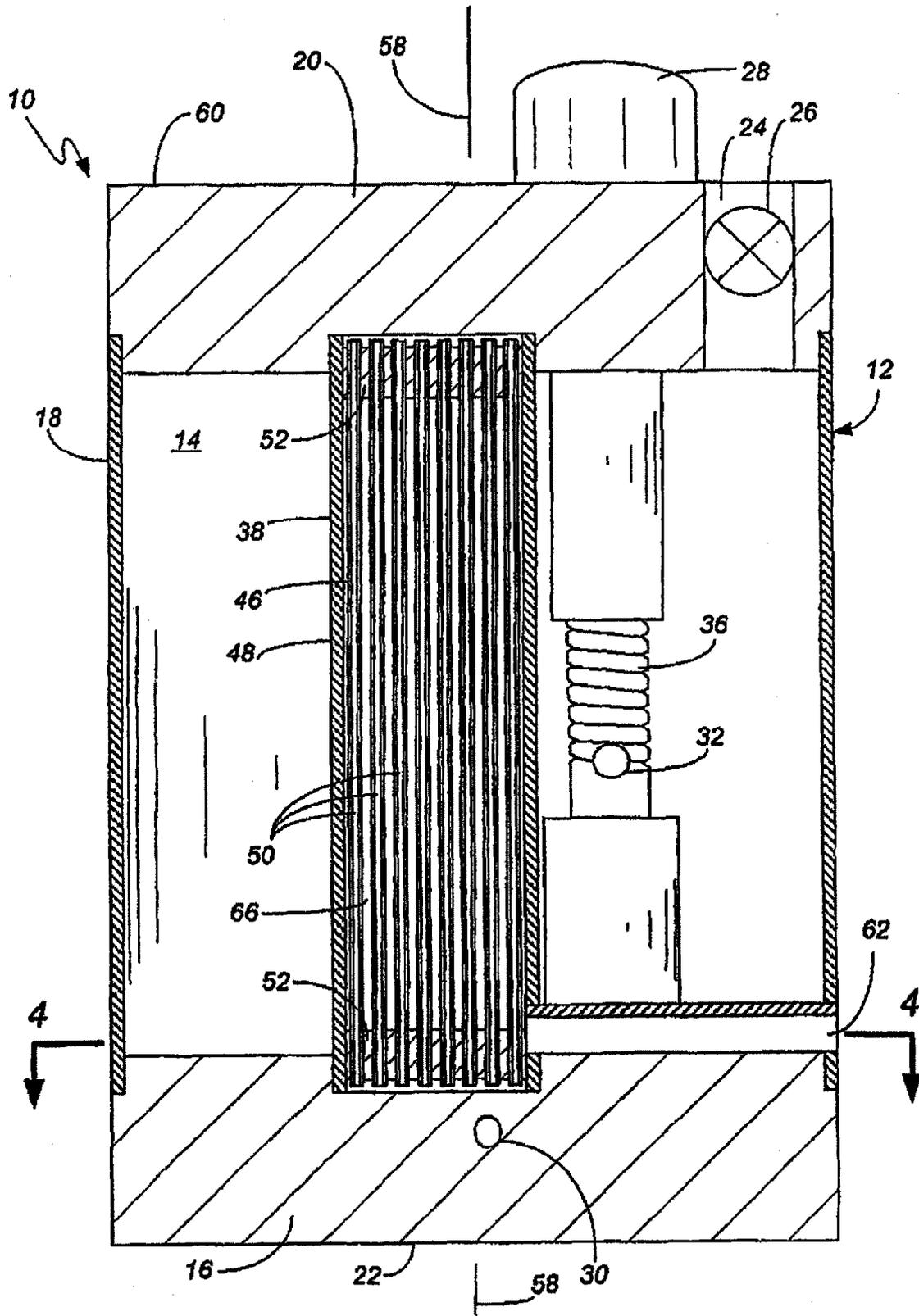


图 3

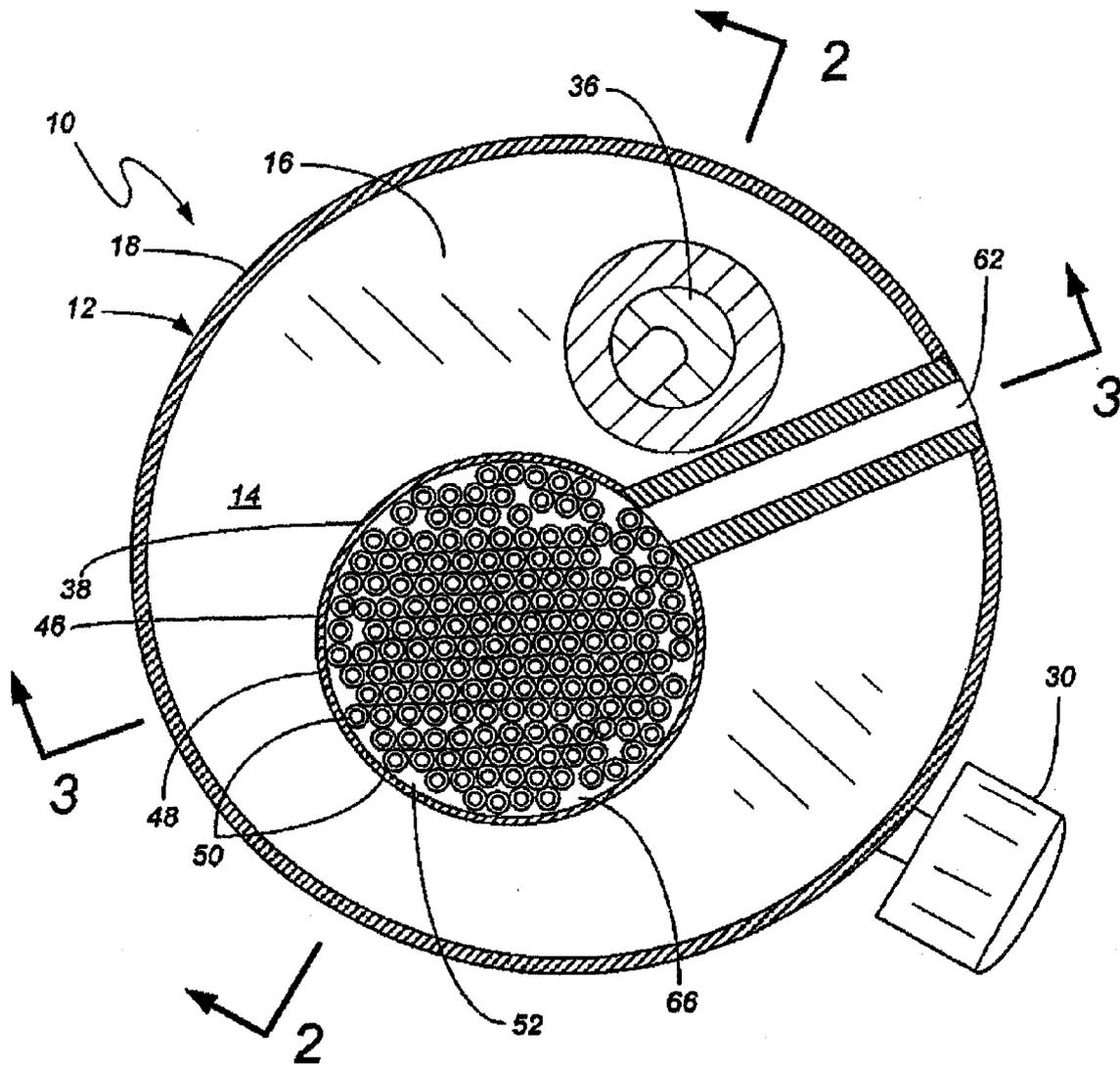


图 4

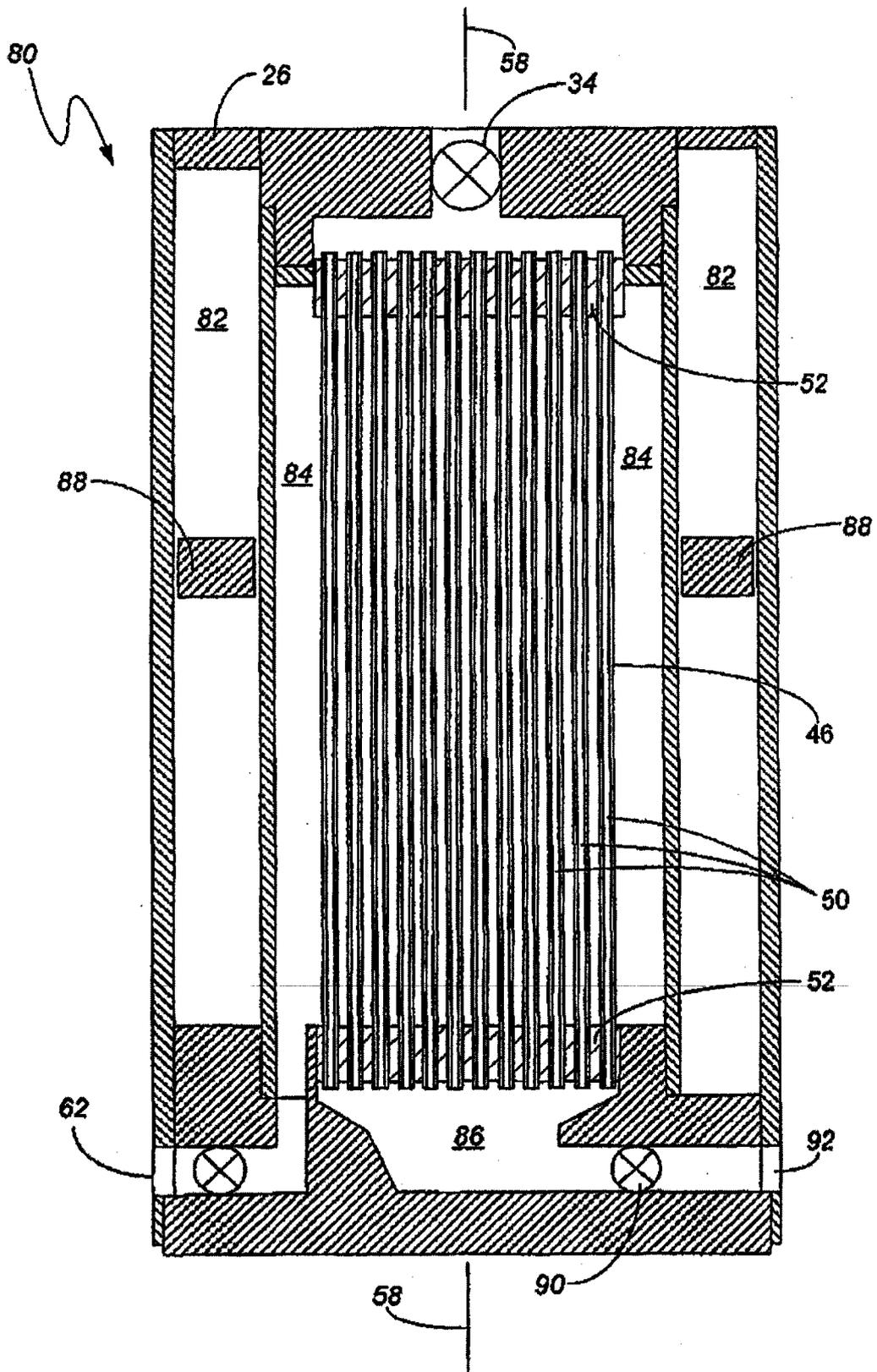


图 6

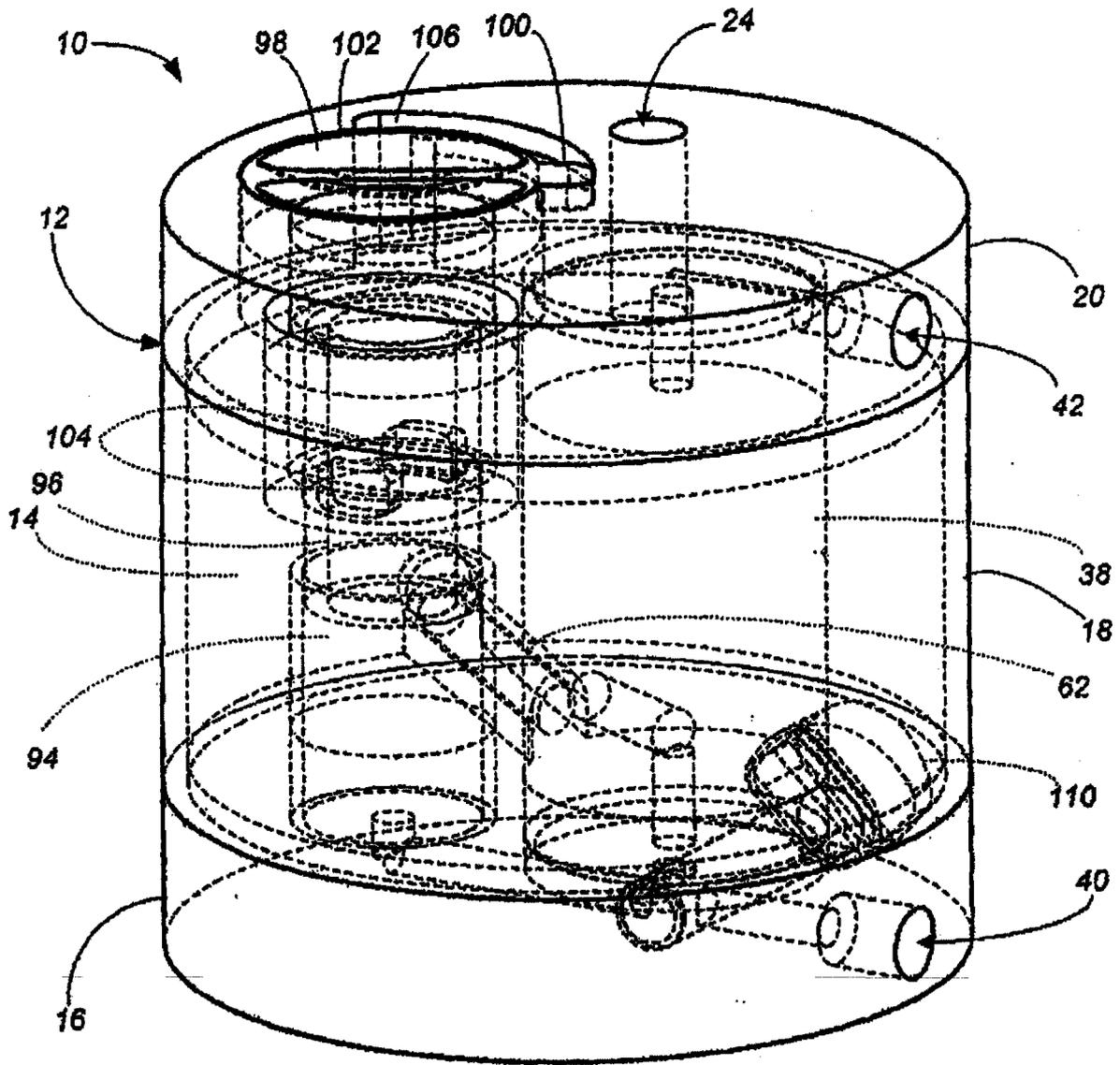


图 7

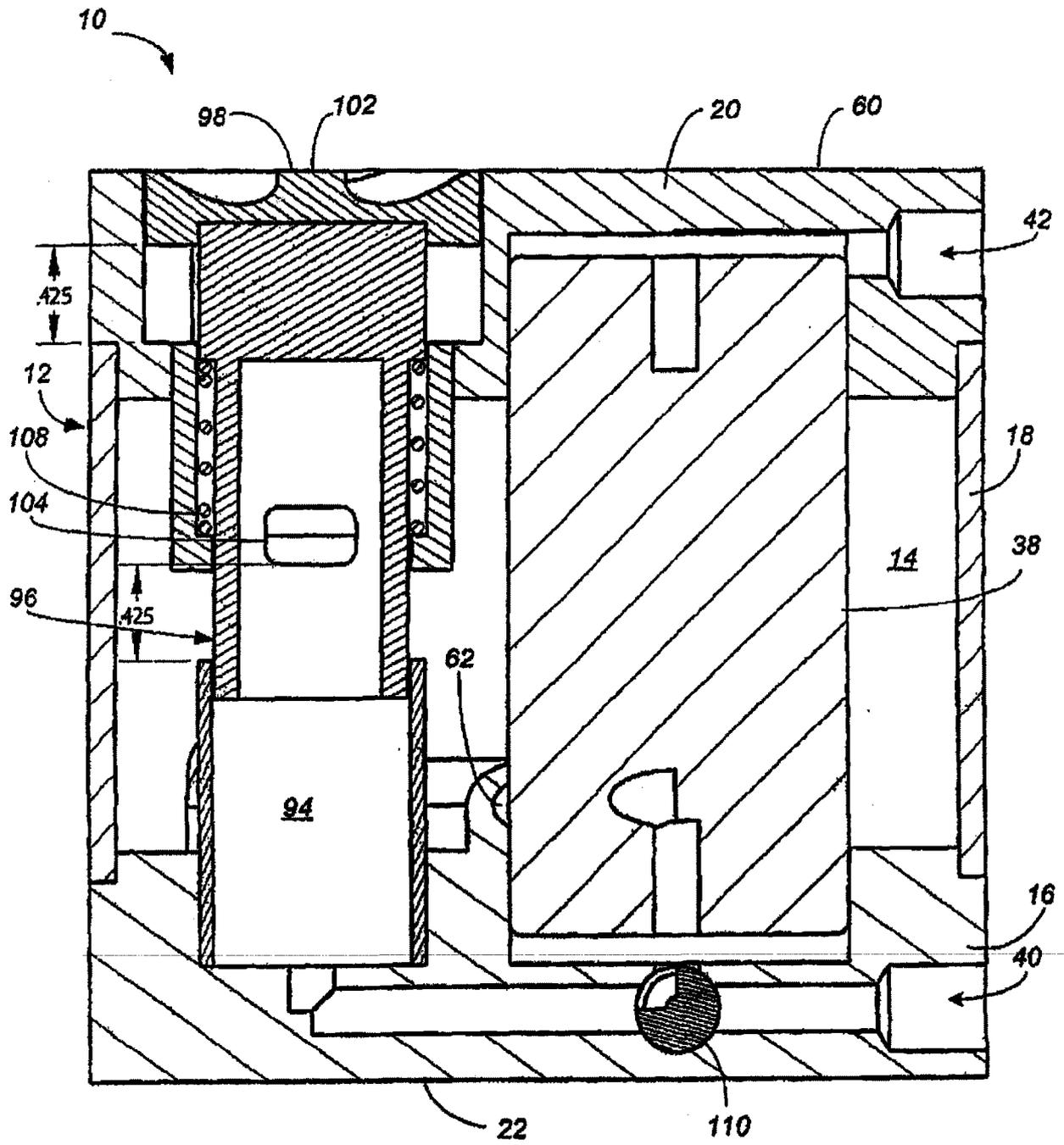


图 8