



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103997974 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201280055019. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 08

A61B 10/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/557, 127 2011. 11. 08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/064130 2012. 11. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/070899 EN 2013. 05. 16

(71) 申请人 奥康细胞实验室公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 鲁兹贝赫·R·塔吉扎德

约翰·米德

(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限

公司 11298

代理人 陈波 吴立

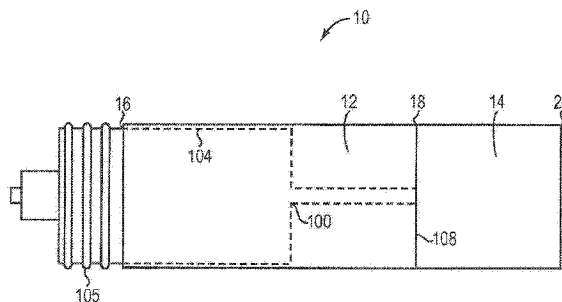
权利要求书4页 说明书11页 附图13页

(54) 发明名称

用于处理细胞的系统和方法

(57) 摘要

本发明高效地并高成本效益地从组织中提取和收集细胞。本发明人发现,使用具有多个部件的系统或工具套件,可以将组织高效地碎裂并且可以纯化所得到的细胞。本发明的优点在于组织处理在封闭系统中进行,使得即使在处理期间移除某些部件,也可以例如通过使用阀、夹子和热密封在整个过程中维持无菌性。此外,任何或所有步骤可以根据应用或用户的具体需求自动或手动地完成。



1. 一种组织切碎工具,包括:
区室,该区室用于组织样本;
切削表面,该切削表面在所述区室的一个末端处;以及
无菌密封容器,
其中,所述切削表面将所述区室与所述无菌密封容器分隔开,使得通过所述切削表面的组织样本沉积在所述无菌密封容器内。
2. 如权利要求 1 所述的组织切碎工具,其中,所述切削表面的尺寸被设置为将所述组织样本切碎成平均横截面不超过 4 平方毫米的碎片。
3. 如权利要求 2 所述的组织切碎工具,其中,所述平均横截面不超过 1 平方毫米。
4. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,还包括用于减小所述碎片的平均横截面的第二切削表面。
5. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,其中,所述切削表面包括自动切削系统。
6. 如权利要求 5 所述的组织切碎工具,其中,所述自动切削系统包括半自动剪刀。
7. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,还包括位于所述切削表面附近的至少一个切碎器筛网。
8. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,还包括用于在所述组织切碎工具运行期间使所述组织切碎工具稳定的吸盘。
9. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,还包括与所述无菌密封容器连通的流体导管和配置在所述流体导管内的过滤器。
10. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,其中,所述无菌密封容器包括至少一个密封的进入端口,允许将流体无菌导入到所述容器中。
11. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,其中,所述区室的内表面带有螺纹。
12. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,还包括用于密封所述区室的垫圈。
13. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,其中,所述区室靠近其末端的部分具有基本上恒定的横截面。
14. 如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具,其中,所述区室靠近其末端的部分为锥形或圆锥形。
15. 如权利要求 13 或 14 所述的组织切碎工具,还包括被造型成与所述区室的所述部分匹配并填充所述部分的实心元件,该实心元件在所述区室的所述部分内可移动,以推动配置在所述部分中的所述组织样本通过所述切削表面。
16. 如权利要求 1 所述的组织切碎工具,还包括用于使所述切削表面朝向所述组织样本移动的轴曲柄。
17. 一种工具套件,包括:
如权利要求 1-14 中的任一项所述的组织切碎工具;以及
实心元件,该实心元件被造型成与所述区室的所述部分匹配并填充所述部分,所述实心元件可以在所述区室的所述部分内移动,以推动在所述部分中的所述组织样本通过所述

切削表面。

18. 一种切碎组织样本的方法,所述方法包括:

推动所述组织样本通过如前述权利要求中的任一项所述的组织切碎工具的所述切削表面。

19. 一种消化组织样本的方法,所述方法包括:

如权利要求 18 所述的方法切碎所述组织样本;以及
将酶注入到所述无菌密封容器中,由此所述酶消化所述切碎的组织。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其中,所述酶是胶原酶。

21. 一种从组织样本分离细胞的方法,所述方法包括:

如权利要求 19 或 20 所述的方法消化所述组织样本;以及
除去未消化的组织。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中,通过过滤除去所述未消化的组织。

23. 如权利要求 18-22 中的任一项所述的方法,其中,所述组织样本包含脐带胶样组织干细胞。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中,所述组织样本基本上不含血管。

25. 一种细胞收集方法,所述方法包括在细胞收集装置中沉积细胞,其中所述细胞收集装置包括:

无菌容器,该无菌容器用于包含细胞的流体;以及

流通通道,该流体通道与所述无菌容器连通,所述流体通道包括细胞捕获区,其中,所述细胞捕获区的容积小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和所述细胞捕获区构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积将所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。

26. 如前一权利要求所述的细胞收集方法,其中,所述细胞收集装置还包括与所述流体通道连通的第二无菌容器。

27. 如前一权利要求所述的细胞收集方法,其中,所述细胞收集装置还包括可移除的夹子,以调控所述第二无菌容器内材料的通路。

28. 如权利要求 26 或 27 所述的细胞收集方法,其中,所述第二无菌容器是可热密封的。

29. 如权利要求 26-28 中的任一项所述的细胞收集方法,其中,所述第二无菌容器包括袋子。

30. 如权利要求 25 所述的细胞收集方法,还包括将所述细胞收集装置离心以加速所述细胞的沉积。

31. 如权利要求 25-30 中的任一项所述的细胞收集方法,其中,所述细胞是脐带胶样组织干细胞。

32. 如权利要求 31 所述的细胞收集方法,其中,所述流体包含切碎和/或酶消化的脐带组织。

33. 如权利要求 25-32 中的任一项所述的细胞收集方法,还包括向所述细胞添加冷冻保护剂。

34. 如权利要求 33 所述的细胞收集方法,其中,所述冷冻保护剂包含二甲基亚砷。

35. 如权利要求 33 或 34 所述的细胞收集方法,其中,所述冷冻保护剂包含白蛋白。

36. 如权利要求 33-35 中的任一项所述的细胞收集方法,其中,所述冷冻保护剂包含葡聚糖。

37. 如权利要求 25-36 中的任一项所述的细胞收集方法,还包括向所述细胞添加自体血浆。

38. 一种细胞收集装置,包括:

流体,该流体包含细胞;

无菌容器,该无菌容器用于容纳所述细胞;以及

流体通道,该流体通道与所述无菌容器连通,所述流体通道包括细胞捕获区,其中所述细胞捕获区的容积小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和所述细胞捕获区构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积将所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。

39. 如前一权利要求所述的细胞收集装置,还包括与所述流体通道连通的第二无菌容器。

40. 如前一权利要求所述的细胞收集装置,还包括可移除的夹子,以调控所述第二无菌容器中材料的通道。

41. 如权利要求 39 或 40 所述的细胞收集装置,其中,所述第二无菌容器是可热密封的。

42. 如权利要求 39-41 中的任一项所述的细胞收集装置,其中,所述第二无菌容器包括袋子。

43. 一种细胞收集装置,包括:

无菌容器,该无菌容器用于包含细胞的流体,所述无菌容器适合用于沉积;以及

流体通道,该流体通道与所述无菌容器连通,所述流体通道包括细胞捕获区,其中所述细胞捕获区的容积小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和所述细胞捕获区构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积将所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。

44. 如权利要求 43 所述的细胞收集装置,其中,所述无菌容器适合用于离心。

45. 如权利要求 43 或 44 所述的细胞收集装置,还包括与所述流体通道连通的第二无菌容器。

46. 如前一权利要求所述的细胞收集装置,还包括可移除的夹子,以调控所述第二无菌容器中材料的通道。

47. 如权利要求 45 或 46 所述的细胞收集装置,其中,所述第二无菌容器是可热密封的。

48. 如权利要求 45-47 中的任一项所述的细胞收集装置,其中,所述第二无菌容器包括袋子。

49. 一种细胞收集装置,包括:

无菌容器,该无菌容器用于容纳所述细胞;

流体通道,该流体通道与所述无菌容器连通,所述流体通道包括细胞捕获区,其中所述细胞捕获区的容积小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和所述细胞捕获区构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积将所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中;以及

第二无菌容器,该第二无菌容器与所述流体通道连通,所述第二无菌容器包括选自袋

子、可热密封的容器和可移除的夹子所组成的组的元件。

50. 一种细胞收集装置,包括:

区室,该区室用于接收组织;

切削表面,该切削表面的尺寸被设置成使得将所述组织样本切碎成平均横截面不超过4平方毫米的碎片;

无菌密封容器,该无菌密封容器用于容纳所述切碎组织的悬液,所述无菌容器具有比所述用于接收组织的区室的容积大至少10倍的容积;

过滤袋,该过滤袋与所述无菌密封容器流体连通,所述过滤袋包含至少一个过滤器,该过滤器具有小得足以持留大于约250 μm 的粒子的孔径;以及

沉积袋,该沉积袋与所述过滤袋流体连通,所述沉积袋包括锥形部以促进沉积的细胞的浓缩。

用于处理细胞的系统和方法

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2011 年 11 月 8 日提交的美国临时专利申请 No. 61/557, 127 的优先权和利益, 并以其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 在各种实施方式中, 本发明涉及用于处理组织以分离和收集靶细胞的系统和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 从组织样本中纯化活细胞可能是繁琐的过程, 其涉及解剖和其他手动操作和处理步骤, 并且在某些情况下涉及细胞培养。在纯化过程期间维持细胞的无菌性也是重要的考虑因素。尽管层流罩可用于维持无菌性, 但它们具有许多缺点。例如, 这样的层流罩价格昂贵、相对难以移动、使用麻烦并消耗宝贵的实验室空间。细胞纯化过程的效率是另一个考虑因素, 其使纯化过程进一步复杂化。从组织样本中分离稀少细胞例如干细胞, 需要高效的过程来回收尽可能多的细胞。

[0006] 对于用于提取和收集细胞例如干细胞的实用、高成本效益、无菌且高效的机制和方法仍存在需求, 以便推进依赖于这些细胞的给药的潜在疗法。

发明内容

[0007] 本发明高效并高成本效益地从组织中提取并收集细胞。本发明人发现, 使用具有多个部件的系统或工具套件, 可以高效地破碎组织并且可以纯化所得到的细胞。本发明的优点在于组织处理在封闭系统中发生, 使得即使在处理期间移除某些部件, 也可以例如通过使用阀、夹子和热密封在整个过程中维持无菌性。此外, 任何或所有步骤可以根据应用或用户的具体需求自动或手动地完成。

[0008] 因此, 一方面, 本发明涉及一种组织切碎工具。所述组织切碎工具包括用于组织样本的区室 (compartment), 在所述区室的一个末端处的切削表面, 以及无菌密封容器。所述切削表面将所述区室与所述无菌的密封容器分隔开, 使得通过所述切削表面的组织样本可以沉积在所述容器内。所述切削表面的尺寸被设置成将所述组织样本切碎成平均横截面不超过 4 平方毫米的碎片。例如在本发明的各个实施方式中, 所述平方毫米数可以不超过 3、2、1、0.5、0.3、0.2、0.1 或 0.05。所述组织切碎工具还可以包括第二切削表面, 用于进一步减小所述碎片的平均横截面。所述组织切碎工具的切削表面可以包括自动切削系统。例如, 所述切削表面可以包括半自动剪刀。可以一个或多个切碎器筛网位于所述切削表面附近。所述组织切碎工具可以进一步包括吸盘, 用于在运行期间使工具稳定。所述组织切碎工具另外或者可替代地包括与所述无菌密封容器连通的流体导管以及在所述流体导管内的分离器单元例如一个或多个过滤器。所述无菌密封容器任选地包括至少一个密封的进入端口, 允许将流体无菌导入到所述容器中。

[0009] 在所述组织切碎工具中, 所述用于组织样本的区室可以合并一个或多个零件, 用

于促进向所述组织样本施加力,推动它超出所述切削表面并进入所述无菌的密封容器。例如,所述区室的一部分可以造型成接受实心元件以压缩所述组织样本。这样的实心元件可以任选地与组织切碎工具一起被包括,不论是与所述组织切碎工具相连还是作为分开的部件提供。

[0010] 在一种实施方式中,所述区室的靠近所述切削表面的部分具有基本上恒定的横截面,使得可以将同样形状的实心元件导入到所述区室中并填充该部分,同时将所述组织样本压入到所述切削表面中或通过所述切削表面。在另一种实施方式中,靠近所述切削表面的区室具有锥形或圆锥形末端。在某些实施方式中,所述区室的内表面带有螺纹,使得可以引导带有螺纹的实心元件进入所述区室中。在某些实施方式中,所述区室还包括垫圈,该垫圈可以在将实心元件导入到所述区室中时提供改进的密封。在另一种实施方式中,所述组织切碎工具包括轴曲柄,用于将所述切削表面朝向所述组织样本移动。

[0011] 本发明还提供了通过推动所述组织样本通过工具的切削表面,来使用任何上述组织切碎工具的方法。本发明提供了切碎组织样本并任选地将酶注入到所述无菌密封容器中,使得所述酶增强所述切碎的组织的消化的方法。所述酶可以是蛋白酶,例如分开或组合的胶原酶、透明质酸酶或分散酶。通过切碎和/或消化所述组织样本并除去大于约 40 微米的碎片(例如,被孔径为约 500 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 300 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 250 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 150 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 100 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 70 微米的过滤器保留的碎片,或被孔径为约 40 微米的过滤器保留的碎片),可以任选地将这些步骤合并在从所述组织样本分离细胞的方法中。这些在本文中被称为“未消化的组织”的较大碎片,可以通过过滤或沉积除去。这些方法对于从各种固体组织中的任一种纯化细胞来说是有效的。例如,本文描述的方法可以从脂肪组织或胞衣组织例如胎盘或脐带组织或更具体为包含的脐带胶样组织的组织分离细胞,例如干细胞。在某些实施方式中,所述组织样本基本上不含血管,其可以任选地在将所述组织置于所述区室中之前从所述组织剖下。

[0012] 另一方面,本发明涉及一种细胞收集方法,其包括在细胞收集装置中沉积细胞。所述细胞收集装置包括用于包含细胞的流体的无菌容器以及与所述无菌容器连通的流体通道。所述流体通道包括细胞捕获区,使得所述细胞捕获区的容积可以小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和细胞捕获区可以构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积使所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。这一方面或任何下述方面可以具有任何下述实施方式。所述细胞收集装置进一步包括与所述流体通道连通的第二无菌容器和/或用于调控所述第二无菌容器中材料的通道的可移除的夹子。所述第二无菌容器可以是可热密封的和/或袋子。所述细胞收集方法还可以包括对所述细胞收集装置进行离心以加速所述细胞的沉积,并且所述细胞可以是脐带胶样组织干细胞。所述流体包括机械切碎的和/或酶消化的脐带组织。所述细胞收集方法还可以包括向所述细胞添加冷冻保护剂;所述冷冻保护剂包括 DMSO、白蛋白和/或葡聚糖。所述方法还可以包括向所述细胞添加自体血浆。

[0013] 另一方面,本发明涉及一种细胞收集装置,其具有包含细胞的流体,用于容纳所述细胞的无菌容器和与所述无菌容器连通的流体通道。所述流体通道包括细胞捕获区,其中所述细胞捕获区的容积可以小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和细胞捕

获区可以构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积使所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。这一方面或任何下述方面可以具有任何下述实施方式。所述细胞收集装置另外或可替代地包括与所述流体通道连通的第二无菌容器和 / 或用于调控所述第二无菌容器中材料的通道的可移除的夹子。所述第二无菌容器可以是可热密封的和 / 或袋子。

[0014] 另一方面,本发明涉及一种细胞收集装置,其具有用于包含细胞的流体的无菌容器,使得所述无菌容器可以适合用于沉积,以及与所述无菌容器连通的流体通道。所述流体通道包括第一和第二阀,以限定其间的细胞捕获区,使得所述细胞捕获区的容积可以小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和细胞捕获区可以构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积使所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。这一方面或任何下述方面可以具有任何下述实施方式。所述无菌容器可以适合用于离心。所述细胞收集装置另外或可替代地包括与所述第二阀连通的第二无菌容器和 / 或用于调控所述第二无菌容器中材料的通道的可移除的夹子。所述第二无菌容器可以是可热密封的和 / 或袋子。

[0015] 另一方面,本发明涉及一种细胞收集装置,其具有用于容纳所述细胞的无菌容器,与所述无菌容器连通的流体通道,以及与所述流体通道连通的第二无菌容器。所述流体通道包括细胞捕获区,使得所述细胞捕获区的容积可以小于所述无菌容器的容积的 5%,并且所述无菌容器和细胞捕获区可以构造成使得在所述无菌容器中,所述细胞从所述流体的沉积使所述细胞浓缩在所述细胞捕获区中。所述第二无菌容器包括选自自由袋子、可热密封的容器和可移除的夹子所组成的组的元件。

[0016] 另一方面,本发明涉及细胞收集装置,其包括用于接收组织的区室;大小被设置成将所述组织样本切碎成平均横截面不超过 4 平方毫米的碎片的切削表面;用于容纳所述切碎的组织的悬液的无菌密封容器,所述无菌容器具有比所述用于接收组织的区室的容积大至少 10 倍的容积;与所述无菌密封容器流体连通的过滤袋;以及与所述过滤袋流体连通的沉积袋。所述过滤袋含有至少一个孔径小得足以滞留大于约 250 μm 的粒子的过滤器。所述沉积袋包括有锥形部,以促进沉积的细胞的浓缩。

附图说明

[0017] 当结合附图阅读时,从下面的各种实施方式的描述中,可以更充分地理解本发明的其他特点和优点以及本发明本身,其中:

[0018] 图 1 示意地描绘了根据本发明的实施方式的组织切碎工具;

[0019] 图 2 是根据本发明的实施方式的组织切碎工具的实心元件的示意透视图;

[0020] 图 3 是图 2 的实心元件的示意透视图;

[0021] 图 4 是部分地示出了根据本发明的实施方式的切削表面的示意透视图;

[0022] 图 5A 和 5B 是部分示出了根据本发明的实施方式的实心元件及其互补区室的示意图;

[0023] 图 6A 是根据本发明的另一种实施方式的组织切碎工具的侧视图;

[0024] 图 6B 是沿着图 6A 的组织切碎工具的线 E-E 的横截面图;

[0025] 图 6C 是图 6A 的组织切碎工具的部件分解图;

[0026] 图 7 是根据本发明的又一种实施方式的组织切碎工具的示意透视图;

[0027] 图 8 提供了根据本发明的实施方式,用于从组织样本中收集和分离所需细胞的程

序步骤的概述；

[0028] 图 9 提供了根据本发明的实施方式,用于从组织样本中收集和分离所需细胞的程序步骤的概述;并且

[0029] 图 10A-10G 描绘了用于从组织样本中收集和分离所需细胞的程序。

具体实施方式

[0030] 为了提供本发明的全面理解,现在将描述某些说明性实施方式,包括用于处理细胞的系统和方法。然而,本领域普通技术人员应理解,可以将本文描述的系统和方法进行改造和改良以适用于所针对的应用,并且可以将本文描述的系统和方法使用在其他适合的应用中。应该将所有这样的改造和改良视为在本发明的范围之内。此外应该理解,本文描述的各种实施方式的特点并不是相互排斥的,并且可以以各种不同组合和排列存在。

[0031] 组织切碎工具

[0032] 图 1 示意地描绘了根据本发明的一种实施方式的组织切碎工具 10。组织切碎工具 10 包括:可以收纳并在开始时容纳组织样本的区室 12,以及无菌密封容器 14。区室 12 在第一和第二末端 16、18 之间延伸,而无菌密封容器 14 本身在第一和第二末端 18、20 之间延伸。切削表面 108 位于区室 12 的第二末端 18 处,或者等同地,位于无菌密封容器 14 的第一末端 18 处,并因此将区室 12 与无菌密封容器 14 分隔开。如图所示,组织切碎工具 10 还包括实心元件 100。实心元件 100 被描绘成部分位于区室 12 内(如虚影所示)。实心元件 100 的一部分也被显示为位于区室 12 外部。在实心元件 100 的该外部部分上描绘有螺纹 105。

[0033] 图 2 描绘了组织切碎工具 10 的实心元件 100 的实施方式。未示出组织切碎工具 10 的其他部分(例如,区室 12 和无菌密封容器 14)。实心元件 100 包括直径较大的柱塞 104(示出有螺纹 105)和直径较小的螺杆轴 106。在实心元件 100 的一个末端处配置有手柄 114。在实心元件 100 的相反末端处,切削表面 108 装接于直径较小的螺杆轴 106 的末端。如图所示,直径较小的螺杆轴 106 从切削表面 108 延伸到手柄 114(直径较小的螺杆轴 106 也联结于所述手柄 114),并且在这样做时,直径较小的螺杆轴 106 贯穿直径较大的柱塞 104 的中空(例如中央)部 107。在一种实施方式中,螺杆轴 106 的特点是沿着其一定长度的螺纹 109,并且柱塞 104 在其中空部 107 内包括互补的凹槽 111。通过这种方式,柱塞 104 可螺纹地与螺杆轴 106 螺合。因此,当手柄 114 旋转时,也引起螺杆轴 106 旋转,装接于螺杆轴 106 的末端的切削表面 108 也(可选地(optionally))旋转。此外,螺杆轴 106 的旋转引起柱塞 104 平移,例如朝向切削表面 108。因此可以将容纳在柱塞 104 与切削表面 108 之间的区室 12 内的组织样本压缩成与(可选地旋转的)切削表面 108 相接触,并且正如下面进一步描述的,被其切削。

[0034] 直径较大的柱塞 104 的螺纹部 105 可以与容纳组织样本的区室 12 的互补的螺纹内部螺合并匹配。柱塞 104 与区室 12 之间的螺纹螺合提供了手段和控制力,使得用户可以使用手柄 114 将柱塞 104 更容易地在区室 12 内平移,以及滑动或推动组织样本朝向并通过切削表面 108。如图 1 中所示,柱塞 104 的大小被设置为与区室 12 的内部空腔匹配并基本上填充区室 12 的内部空腔。在一种实施方式中,再次参考图 2,可以在柱塞 104 的一个末端处配置垫圈 118。合在一起,垫圈 118 和柱塞 104 可以基本上填满区室 12 的内部空腔的内

径,从而在区室 12 中产生气密的真空密封。垫圈 118 的形状可以基本上与切削表面 108 互补。例如,垫圈的底表面和切削表面 108 的顶表面两者可以都是圆的或平坦的。在一种实施方式中,垫圈 118 形成平坦表面。当垫圈 118 接触并驱动组织样本时,组织样本被推进通过切削表面 108 并因此被切碎。

[0035] 切削表面 108 可以是任何表面,其被构造当组织样本被推动通过切削表面 108 时,将组织样本切削、分解或分离成较小部分而不损伤来自于组织样本的细胞。例如,切削表面 108 可以将组织样本切碎成平均横截面不超过 4 平方毫米或 1 平方毫米的较小部分,尽管也设想能够组织样本切碎成更大或更小部分的切削表面。组织切碎工具可以包括第二切削表面,以进一步减小切碎的组织样本的平均横截面。切削表面的实例包括具有锋利边缘的格栅、横跨开口的多个锋利金属丝、在区室内部的口承上具有多个孔的钢板或盘、在板中偏置并具有锋利边缘的孔以及限定孔隙的表面锋利的网。此外或可替换地,在切削表面限定孔隙的实施方式中,柱塞 104 的末端可以形成多个突起,例如指状物,该突起与切削表面 108 的孔隙匹配,以帮助推动组织样本通过切削表面 108。在可替换实施方式中,柱塞 104 的末端可以是平坦的。此外,切削表面 108 可以具有纹理或可以形成多个突起(例如楔状物),以产生摩擦表面或当向组织样本施加压力时将组织样本保持在切削表面 108 上。在另一种实施方式中,切削表面 108 可以包括自动切削系统,例如半自动剪刀。

[0036] 在一种实施方式中,可以将任选的鼻状螺母(未示出)配置在切削表面 108 附近,以便当推动组织样本通过它时将切削表面 108 保持在适当位置。例如,可以将任选的鼻状螺母可移除地装接于收纳组织样本的区室 12。任选的鼻状螺母可以包括与区室 12 的凹陷表面螺合的突起部,以形成卡扣连接。此外或可替换地,任选的鼻状螺母的螺纹部可以螺合区室 12 的带有类似和互补螺纹的部分。当任选的鼻状螺母与区室 12 完全螺合时,切削表面 108 被任选的鼻状螺母的口承配置并保持在适当位置。

[0037] 图 3 描绘了组织切碎工具 10 的实心元件 100 的透视图。未示出组织切碎工具的其他部分(例如,区室 12 和无菌密封容器 14)。与前述相同,实心元件 100 包括直径较大的柱塞 104(示出有螺纹 105)和直径较小的螺杆轴 106。在实心元件 100 的一个末端处配置有手柄 114。在实心元件 100 的相反末端处,切削表面 108 装接于直径较小的螺杆轴 106 的末端。在一种实施方式中,如图所示,切削表面 108 包括靠近切碎盘 112 的切削刀片 110。

[0038] 图 4 描绘了组织切碎工具 10 的示例性切削表面 108 的透视图。切削表面 108 包括切削刀片 110。另外,切削表面 108 包括切碎盘 112,该切碎盘 112 具有使组织样本被推进通过其的孔隙 116。

[0039] 图 5A 和 5B 描绘了组织切碎工具 10 的实心元件 100 的两种实施方式。在图 5A 中描绘的一种实施方式中,实心元件 100 的柱塞 104 在其末端附近的形状基本上是柱形的。在图 5B 中描绘的第二种实施方式中,实心元件 100 的柱塞 104 具有锥形(tapered)或圆锥形(cone-shaped)的末端。在每种实施方式中,实心元件 100 的形状被设置为与形状互补的区室 12 匹配并填充到所述区室 12,使得实心元件 100 在区室 12 内可移动,以推进配置在区室 12 内的组织样本通过切削表面 108。当组织样本通过切削表面 108 时,其切削部分配置在无菌密封容器 14 内,所述容器可以是例如袋子。此外或可替换地,区室 12 的内部空腔可以限定凹陷的通道或表面(例如,凸轮面),以接合从柱塞 104 凸出的突起部,使得实心元件 100 可以可移除地紧固于区室 12,并且用户仍然有手段和控制力以将实心元件 100 在区

室 12 内平移（未示出）。

[0040] 图 6A 描绘了根据本发明的另一种实施方式的组织切碎工具 200 的侧视图。图 6B 描绘了组织切碎工具 200 的沿着图 6A 中示出的线 E-E 的横截面图，而图 6C 描绘了图 6A 中示出的组织切碎工具 200 的部件分解图。组织切碎工具 200 包括底座 204、储液器 208 和手柄 212。如图所示，底座 204 可以包括螺纹部 216，该螺纹部 216 用于与储液器 208 可螺纹地螺合。例如，储液器 208 的内表面的特征可以是具有与底座 204 的螺纹部 216 互补的凹槽 218。因此，在组织切碎工具 200 的装配期间，可以将储液器 208 拧在底座 204 上。

[0041] 如图所示，可以将吸盘 220 联结于底座 204 的底部 224。在一种实施方式中，吸盘 220 为组织切碎工具 200 提供了稳定性。例如，在操作中，用户可以使用吸盘 220 将组织切碎工具 200 联结于桌面（或其他支撑表面）。由此，当例如下面进一步描述的用户转动手柄 212 或以其他方式向组织切碎工具 200 传递力量时，向组织切碎工具 200 提供了稳定性。

[0042] 正如在图 6B 中最清楚地示出的，在储液器 208 内包括了用于在开始时容纳组织样本的区室 228。此外，至少一个切削表面（其通过轴曲柄 232 联结于手柄 212）可以在储液器 208 内移动。例如，正如在图 6C 中最清楚地示出的，第一切削表面 236、第一切碎器筛网 240、第二切削表面 244 和第二切碎器筛网 248（其每个通过轴曲柄 232 联结于手柄 212）可以通过轴曲柄 232 的驱动（例如旋转）在储液器 208 内可移动。轴曲柄 232 可以例如由用户通过手柄 212 手动驱动，或者可替代地可以通过分开的装置自动地机器驱动。正如本领域普通技术人员将会理解的，第一和第二切削表面 236、244 可以是上述任何的示例性切削表面。此外，如图所示，第一和第二切碎器筛网 240、248 可以包括不同尺寸的孔隙。

[0043] 在运行中，当旋转轴曲柄 232 时，第一和第二切削表面 236、244 同样旋转，并在储液器 208 内朝向容纳在区室 228 内的组织样本向下移动。第一切削表面 236 与组织样本发生接触并将其切削成一个或多个更小的部分。那些更小的组织部分随后通过第一切碎器筛网 240 的孔隙，被第二切削表面 244 再一次切削成甚至更小的部分，并最终通过第二切碎器筛网 248 的孔隙。第一和第二切削表面 236、244 旋转并在储液器 208 内向下移动，直至基本上所有的组织样本（或至少对于给定应用来说足够量的组织样本）被切碎并通过第二筛网 248。在通过第二筛网 248 后，切碎的和组织样本被收集并容纳在储液器 208 的容器 252 内。尽管没有如此描绘在图 6A-6C 中，但储液器 208 的顶部事实上可以被封顶，并且储液器 208 的内部灭菌，使得容器 252 是无菌密封容器 252。

[0044] 正如本领域普通技术人员将会理解的，并且如上所述，储液器 208 的区室 228 如图 6B 中所示，位于第一和第二切削表面 236、244 以及第一和第二切碎器筛网 240、248 下方，而储液器 208 的无菌密封容器 252 位于第一和第二切削表面 236、244 以及第一和第二切碎器筛网 240、248 上方。因此，在图 6A-6C 中所描绘的组织切碎工具 200 的实施方式中，区室 228 和无菌密封容器 252 的尺寸随着第一和第二切削表面 236、244 向下（或向上）旋转而改变。

[0045] 也正如本领域普通技术人员将会理解的，图 6A-6C 中的组织切碎工具 200 的图示是非限制性的。事实上，设想了多种改变、修改和其他实现方案。例如，可以采用更少或超过两个切削表面 236、244 和 / 或两个切碎器筛网 240、248。作为另一个实例，可以将轴曲柄 232 与手柄 212 联结，使得手柄 212 可以在竖直平面而不是水平平面内旋转（如所示）。

[0046] 图 7 描绘了根据本发明的实施方式的另一个视图的组织切碎工具 300，其操作原

理与图 6A-6C 中描绘的组织切碎工具 200 相似。与前述相同,组织切碎工具 300 包括底座 304、储液器 308 和手柄 312。如图所示,通过使用螺丝 315 和翼形螺母 317 将储液器 308 的顶部联结于其底部。组织切碎工具 300 还包括吸盘 320,以在操作期间向工具 300 提供上述的稳定性。还示出了在通过例如第二筛网 348 后将切碎的组织样本收集在其中的储液器 308 的容器 352。与前述相同,储液器 308 的顶部可以被封顶,并且储液器 308 的内部灭菌,使得容器 352 是无菌密封容器 352。

[0047] 细胞分离和收集方法

[0048] 本发明还提供了用于组织的高效和无菌处理,以分离并收集靶细胞的方法。图 8 提供了用于分离和收集细胞的程序步骤的概述。一般来说,一开始,可以使用任何上述的组织切碎工具,通过将组织样本推进通过工具的切削表面并进入无菌密封容器中,将组织样本切碎。本发明还提供了通过将组织样本暴露于化学物质或酶来进一步消化所述组织样本的任选方法。例如,可以通过将酶注入到容器中以使酶消化切碎的组织,来消化切碎的组织。酶可以是蛋白酶,例如分开或组合的胶原酶、透明质酸酶或分散酶。这些步骤被另外地或任选地合并到将切碎的和 / 或酶消化的组织样本与任何较大碎片(如上所述的“未消化的组织”)分离开的方法中,所述方法例如倾析、吸取、沉积或优选为过滤。在某些实施方式中,在分离步骤之前,对可能是粘稠的切碎和 / 或酶消化的组织进行洗涤或稀释。通过从含有切碎和 / 或酶消化的组织的混合物中沉积细胞,可以实现靶细胞从切碎和 / 或酶消化的组织的分离。尽管可以使用重力沉积,但可以通过例如离心来加速沉积过程。此外并且可替换地,将靶细胞移动到无菌容器中冷冻保存,供日后使用。

[0049] 在一种实施方式中,用于将切碎和 / 或酶消化的组织样本与未消化的组织分开的方法可以包括如图 9 中所描绘的两个或更多过滤步骤。例如,可以使用不同尺寸的过滤器,对切碎和 / 或酶消化的组织样本进行多个过滤步骤。在一种实施方式中,首先使用例如约 500 微米、约 250 微米、约 150 微米或约 100 微米的大孔过滤器对切碎和 / 或酶消化的组织样本进行第一过滤步骤,用于除去粗的未消化的组织。此外,可以使用例如约 70 微米或约 40 微米的小孔过滤器进行第二过滤步骤以过滤来自于第一过滤步骤的洗出物,用于除去另外的污染物例如胶原蛋白纤维。由于切碎和 / 或酶消化的组织通常是粘稠的,因此可以在过程中的任何阶段用适合的无菌溶液(例如缓冲盐溶液)洗涤或稀释组织。例如,在第一过滤步骤后已将切碎和 / 或酶消化的组织与未消化的组织分离开之后,可以在第二过滤步骤之前进行进一步洗涤,以进一步清洁切碎和 / 或酶消化的组织。在多层过滤之后,可以通过沉积来收集基本上不含组织样本的靶细胞。

[0050] 图 10A 描绘了用于从组织样本收集和分离所需细胞的示例性程序。一开始,可以将组织样本置于区室内,可以在区室将组织样本切碎、分解或分离成较小部分。在任何酶消化之前切碎组织样本的优点在于增加酶可以作用于其上的组织样本的总表面积。可以将区室安装并装接于容器(例如消化袋)的一个端口(例如孔隙),使得导入到区室中的组织样本可以直接通过进入到容器中。可以将或不将区室可移除地装接于容器。

[0051] 容器限定了容纳切碎的组织样本和流体的无菌、密封的内部空间。容器可以包括用于导入或分发材料和流体进入或离开容器的密封端口。例如,容器可以包括用于导入流体的一个或多个注入端口,和用于从容器分发或吸出流体和材料的一个或多个抽取端口。此外,在可替换实施方式中,每个注入端口和抽取端口可以构造成使得流体和材料只能以

一个方向移动进出容器。此外,端口可以配置在容器的与区室相反的末端处,尽管端口也可以沿着容器外周的任何部分配置。在一种实施方式中,端口不被可移除地紧固于容器。此外或可替代地,可以将注射器、排气孔、加盖排气孔或与鲁尔接头匹配的其他装置装接于端口。所有端口可以用拭子(swabbable)擦拭,以便维持无菌性。

[0052] 随后,可以通过例如将切碎的组织暴露于化学物质或酶,任选地对其进行消化。在一种实施方式中,可以通过酶例如蛋白酶,例如分开或组合的胶原酶、透明质酸酶或分散酶,将切碎的组织消化。酶可以被直接导入到容器中,以使酶消化切碎的组织。例如,可以将注射器或可以容纳流体、材料或空气的任何其他装置连接到容器(例如通过鲁尔接头),并将其用于将例如蛋白酶分发到容器中,以消化切碎的组织样本。为了增强切碎的组织样本的消化,可以将容器颠倒以使酶在容器各处流通。取决于酶分解切碎的组织样本的速率,可以将容器静置并且可以将切碎的组织样本与酶在 37°C 下温育一段时间,例如约 1 至 3 小时,尽管可以设想更长或更短的时间,以消化切碎的组织样本。此外或可替代地,为了辅助温育过程,可以任选地用定轨摇床将容器定期混合或通过一系列滚筒或其他加压型装置移动,以协助切碎的组织样本在容器内的分解。在组织样本约为 10mL 的实例中,用户可以将约 10mL 酶注入到容器中,尽管可以设想更多或更少的酶。一旦切碎的组织样本被消化后,得到约 20-30mL 消化的组织样本。

[0053] 在从切碎和 / 或酶消化的组织分离细胞之前,任选地除去任何残留的未消化组织的碎片,以便于随后的细胞纯化。取决于它们的尺寸,可以通过例如物理提取、倾析、吸取、沉积或优选地过滤来除去未消化的组织。任选地,被除去的未消化的组织可以被储存和 / 或用于其他目的,例如扩增干细胞的接种源。

[0054] 图 10A-10D 示出了通过过滤来实现分离的各种实施方式。具体来说,图 10A-10D 描绘了将容纳消化的组织样本的容器连接到可以可移除地装接于容器的过滤单元的流体通道。过滤单元可以使用单个过滤器或多个任选地尺寸逐渐减小的过滤器。或者,可以将过滤器安装并配置在容器中,以便将容器分成两个子空间。可以将过滤器对称或不对称地放置在容器内。此外或可替代地,可以将过滤器安装在端口例如抽取端口内。取决于应用,过滤器的尺寸可以为约 500 微米、约 250 微米、约 150 微米、约 100 微米、约 70 微米、约 40 微米或其任何范围。在过滤之前,可以将可能是粘稠的消化的组织样本稀释,以便得到的组织样本能够更容易地移动通过过滤器,进入下游容器或用于进一步处理的部件。稀释溶液的实例包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)、5%人血清白蛋白、盐水、羟乙基淀粉和新鲜血浆(例如自体血浆)。在一种实施方式中,使用注射器或能够容纳流体的任何其他装置,通过注入端口将稀释溶液分发到容器中。在消化的组织样本约为 20-30mL 的实例中,用户可以将约 250mL 稀释溶液注入到容器中,尽管可以设想更多或更少的溶液。结果,容器容纳约 250-300mL 稀释的消化的组织样本。在过滤后,可以例如通过真空、抽吸或重力,将洗出物经优选地通过线夹(例如蝴蝶线夹)调控的流体通道推进到第二无菌容器(例如清洗 / 离心袋)中。

[0055] 从稀释的切碎和 / 或酶消化的组织分离细胞,可以通过各种机制来实现。在一种实施方式中,通过沉积从稀释的切碎和 / 或酶消化的组织分离靶细胞。尽管可以使用重力沉积,但可以通过例如离心来加速沉积过程。本发明可以包括定制的离心桶、插件和配重,以确保系统的正确离心。

[0056] 沉积从稀释的切碎和 / 或酶消化的组织样本分离靶细胞。为了便于细胞收集,任

选地通过出口端口和优选地通过线夹调控的流体通道除去基本上不含细胞的上清液。上清液可以通过例如倾析或抽吸来去除。在第二无菌容器是可压缩袋的实例中,可以通过对袋子进行物理加压来倾析上清液。或者,可以例如通过真空、抽吸或重力来除去上清液。任选地,可以将上清液移除到废液容器中,所述废液容器通过出口端口和通过线夹调控的流体通道连接到第二无菌容器。在一种实施方式中,被移除的上清液可以被储存和/或用于其他目的,例如维持细胞(在培养中)。

[0057] 为了收集靶细胞,可以加入小体积的稀释溶液(例如20ml自体血浆),以重悬可能收集在第二无菌容器的底部处的细胞沉淀物。如图10A中描绘的实施方式中所示,第二无菌容器可以具有以一定角度变细的底部,其足以促进靶细胞移动到位于容器底部处的流体通道中,并任选地进入转移容器(例如,转移袋)中。或者,如图10B中所描绘的,可以将靶细胞移动到位于容器侧面处的流体通道中,并任选地进入转移容器中。细胞离开第二无菌容器并进入流体通道和任选地进入转移容器的移动,可以通过真空或抽吸来促进,并且可以通过线夹来调控。

[0058] 如果需要,纯化的靶细胞可以立即使用。然而,通常将细胞冷冻保存以供日后使用。为了实现长期储存,可以将细胞从任选的转移容器转移到适合于冷冻的可密封无菌容器(例如冷冻袋)中。或者,可以将细胞从第二无菌容器直接收集在可冷冻容器中,供日后使用。为了协助靶细胞的储存和保存,加入冷冻保护剂,所述冷冻保护剂可以包括例如分开或组合的二甲基亚砜(DMSO)、白蛋白和/或葡聚糖。可以在沉积后向第二无菌容器内的细胞加入冷冻保护剂。或者,可以向任选的转移容器内或可冷冻容器内的细胞加入冷冻保护剂并与其混合,用于长期储存和日后使用。

[0059] 在一种实施方式中,用于将切碎和/或酶消化的组织与未消化的组织分离开的方法,可以如图10C-10D中所描绘地包括两个或更多过滤步骤。例如,可以对切碎和/或酶消化的组织进行第一过滤步骤,以除去粗的、未消化的组织。由于切碎和/或酶消化的组织通常是粘稠的,因此可以在过程中的任何阶段用适合的无菌溶液清洗或稀释组织。例如,在第一过滤步骤后已将切碎和/或酶消化的组织与未消化的组织分开之后,可以在第二过滤步骤之前进行进一步清洗,以进一步清洁组织。在一种实施方式中,第二过滤步骤可以利用尺寸较小的过滤器,以便从切碎和/或酶消化的组织移除污染物例如胶原蛋白纤维。在第二过滤步骤后,可以通过沉积来收集靶细胞,并通过位于容器底部处(图10C)或容器侧面处(图10D)的流体通道将其移动到任选的转移袋中。或者,可以将细胞直接收集到无菌冷冻袋中,用于长期储存和日后使用。

[0060] 用于分离切碎的组织样本的其他示例性过程描绘在图10E-10G中。在每个这些过程中,将组织样本置于切碎机例如图7的切碎机中。在操作中,切碎机迫使组织样本通过一个或多个切削表面,并将细细切碎的组织沉积在切削表面的另一个侧面上。提供盐水袋以允许将组织冲出切碎机;为此目的,通常可以使用多达500mL盐水。当从切碎机冲出时,切碎的组织可以流入到任选的消化袋(如所示)中,在所述消化袋中可以在进一步处理之前对切碎的组织进行酶消化(如参考图10A-10D所述)。任选的消化袋与稀释袋流体连通。或者,如果机械切碎消除了对任何酶消化的需求,则切碎的组织可以直接流入到稀释袋中。机械切碎的组织(不论是否经历酶消化)可能是粘稠的。可以对稀释袋进行机械操作,以促进组织与盐水的混合。稀释袋也装配有任选的注入端口,允许根据需要另外的盐水注

入到稀释袋中。

[0061] 然后,一旦将粘度充分降低后,对组织悬液进行过滤。如图 10E-G 中所示,悬液从稀释袋通过并进入到具有至少一个袋内过滤器的过滤袋。图 10E 描绘了具有单一袋内过滤器的实施方式,所述过滤器持留大于约 40-70 μm 的粒子。图 10F 描绘了具有单一袋内过滤器的实施方式,所述过滤器持留大于约 150-250 μm 的粒子。在图 10F 中,来自于袋内过滤器的滤液然后通过第二在线过滤单元,其持留大于约 40-70 μm 的粒子。图 10G 描绘了过滤袋含有两个连续的袋内过滤器的实施方式,每个袋内过滤器具有至少 300 cm^2 的表面积;第一过滤器持留大于约 500 μm 的粒子,第二过滤器持留大于约 100 μm 的粒子。在每个图 10E-G 中,过滤袋包括允许从第一过滤器除去截留物的端口。该截留物可以任选地作为组织外植体用于培养细胞。

[0062] 图 10E-G 中的滤液通入到离心袋中,例如图 10A-D 中所示的离心袋。通过沉积(例如通过离心)从悬液分离细胞,并将细胞浓缩在袋子的底部中或与袋子的底部相连的流体通道中。可以通过任选地与废液容器相连的管道,来移除上清液(例如通过倾析、吸取、真空、抽吸或通过挤压袋子)。上清液可用于其他目的,例如维持培养物中的细胞。

[0063] 为了收集靶细胞,可以加入小体积的稀释溶液(例如,20ml 自体血浆)以重新悬浮沉积的细胞。如图 10E-G 中所示,任选地在通过第二过滤袋、例如在图 10G 中所示的含有表面积为至少 100 cm^2 并持留大于约 40 μm 的粒子的过滤器的第二过滤袋之后,重新悬浮的细胞可以从离心袋通过进入到转移袋中。如上对图 10A-D 所述,可以将细胞转移到冷冻袋,并且可以加入一种或多种冷冻保护剂例如 DMSO、白蛋白和 / 或葡聚糖。

[0064] 本文描述的方法对于从各种实体组织纯化细胞来说是有效的。例如,本文描述的方法可以从脂肪组织或胞衣组织例如胎盘或脐带组织或更具体地包含脐带胶样组织的组织中分离细胞,例如干细胞。纯化的脐带胶样组织干细胞可用于治疗或再生各种组织中的任一种,例如骨骼、软骨、脂肪或肌肉。这些细胞也可以促进造血移植物植入,并具有在宿主中调控和抑制免疫应答的潜力。

[0065] 除了纯化的细胞之外,本文描述的方法还产生其他有用产品。例如,当从切碎和 / 或酶消化的组织分离细胞时,剩余的缺失了细胞的组织是丰富的无菌溶液,其可用于维持细胞(例如在培养物中)。此外,在消化过程后残留的未消化的组织的任何碎片也可能是有用的。例如,未消化的脐带组织可用作接种源,用于间充质干细胞的扩增。

[0066] 在本文中使用的术语和表述被用作描述而非限制性的术语和表述,并且在这样的术语和表述的使用中,不意图排除所示出和描述的特点或其部分的任何等同物。此外,尽管已描述了本发明的某些实施方式,但对于本领域普通技术人员来说,显然可以使用合并本文公开的概念的其他实施方式,而不背离本发明的精神和范围。因此,所描述的实施方式在所有方面应该被当作仅仅是说明性而非限制性的。此外,本文中描述的构造旨在作为说明性而决不是限制性的。同样,尽管出于解释的目的已提供了物理解释,但不意图受到任何特定理论或机制的限制或按照它来限制权利要求。

[0067] 参考文献并入

[0068] 本文中引用的每个专利文献和学术文章的全部公开内容,以其全文为所有目的通过引用并入本文。

[0069] 等同性

[0070] 本发明可以以其他特定形式体现而不背离其精神或本质特征。因此,上述实施方式在所有情况下被当作对本文描述的发明的说明而不是限制。因此,本发明的范围由随附的权利要求书而不是上面的描述来指明,并且意图将在权利要求书的等同性意义和范围之内的所有改变涵盖在其中。

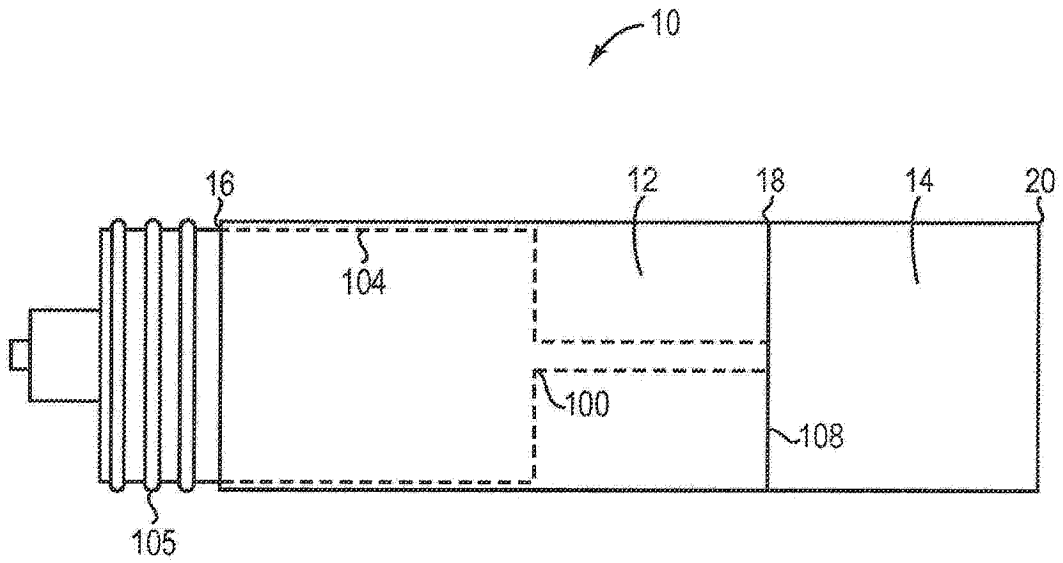


图 1

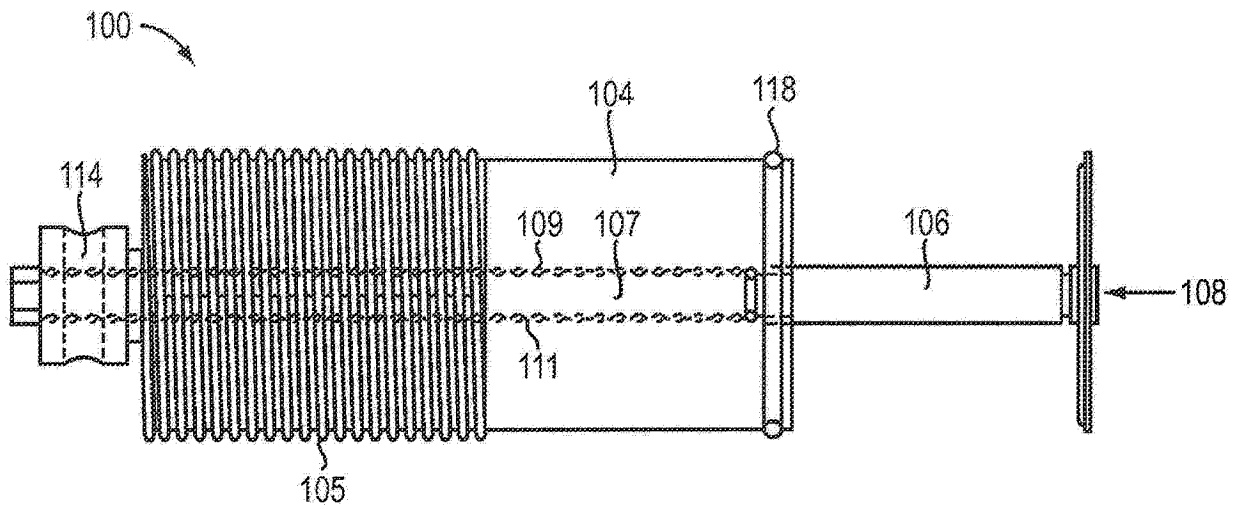


图 2

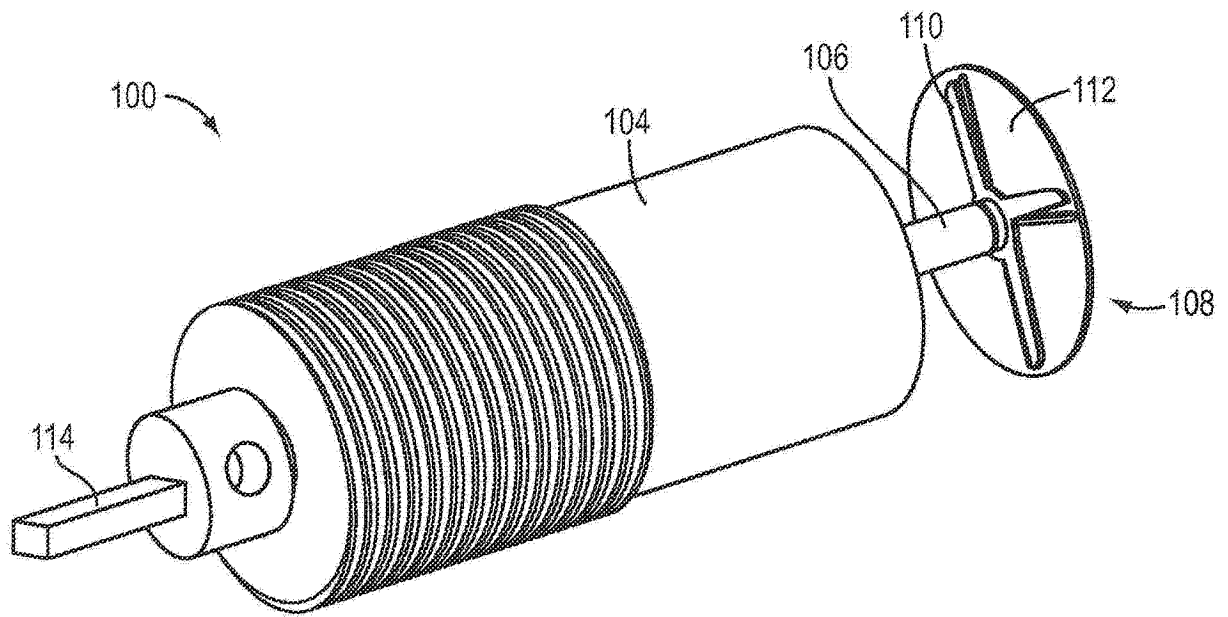


图 3

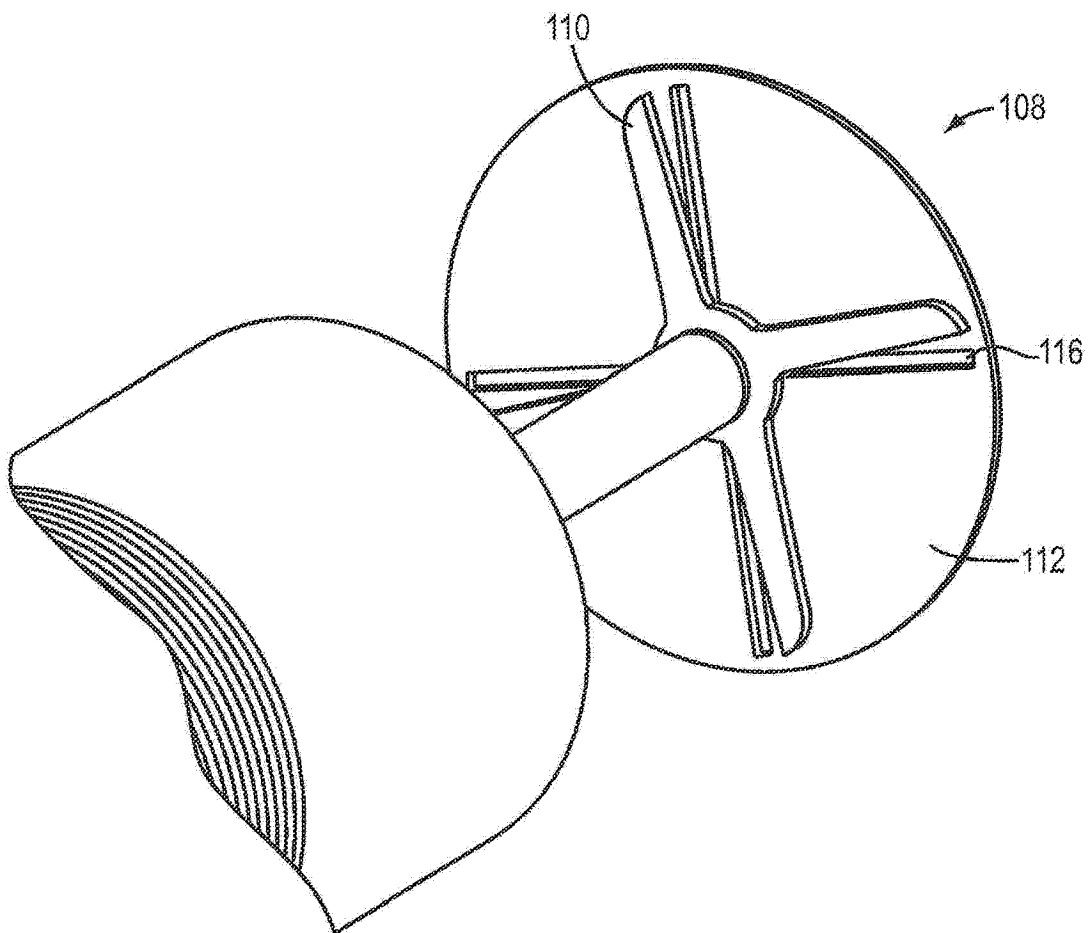


图 4

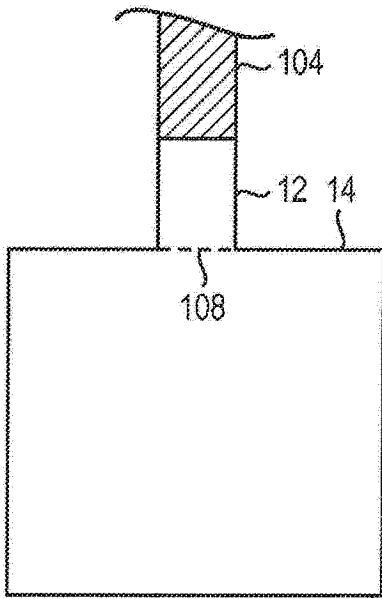


图 5A

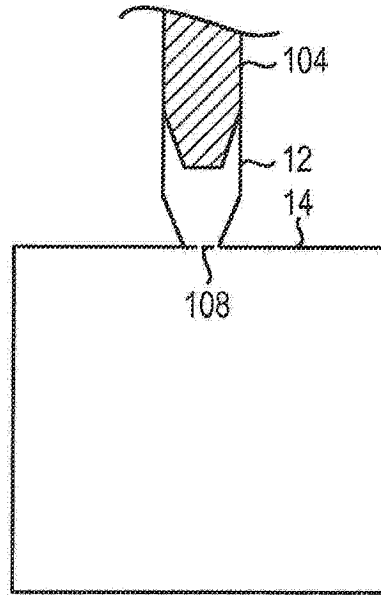


图 5B

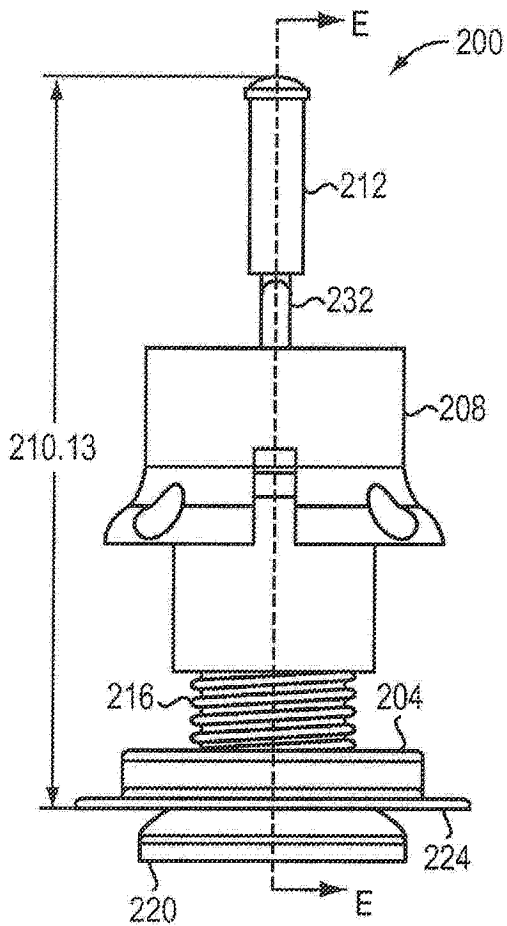


图 6A

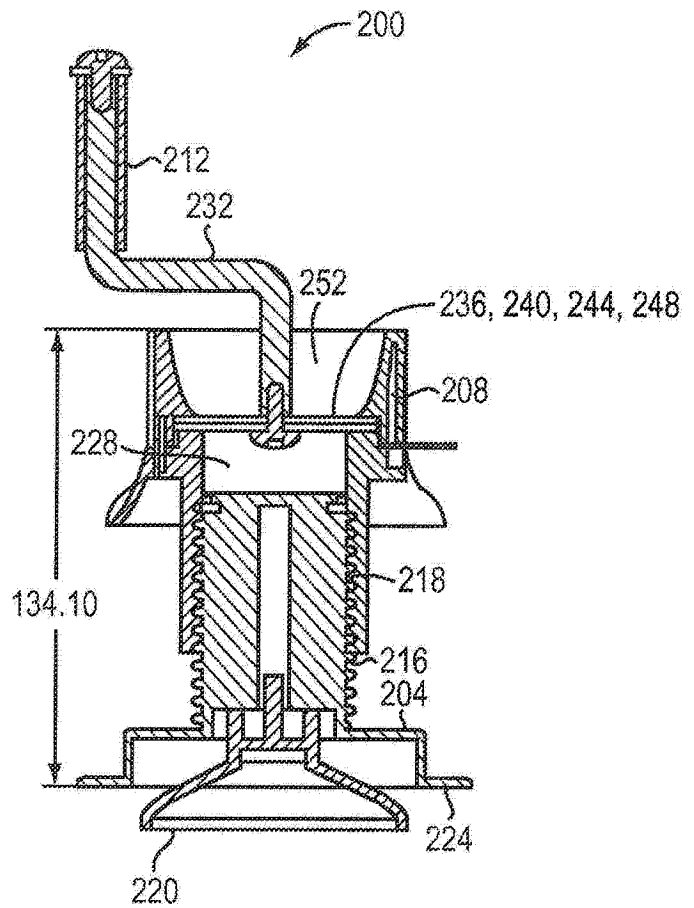


图 6B

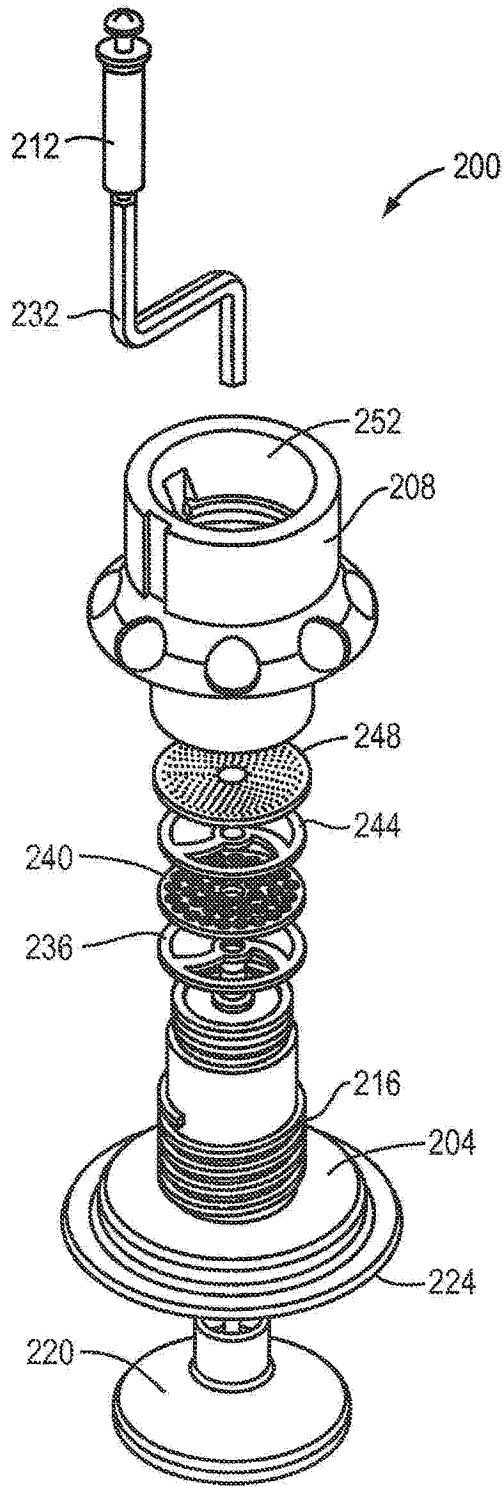


图 6C

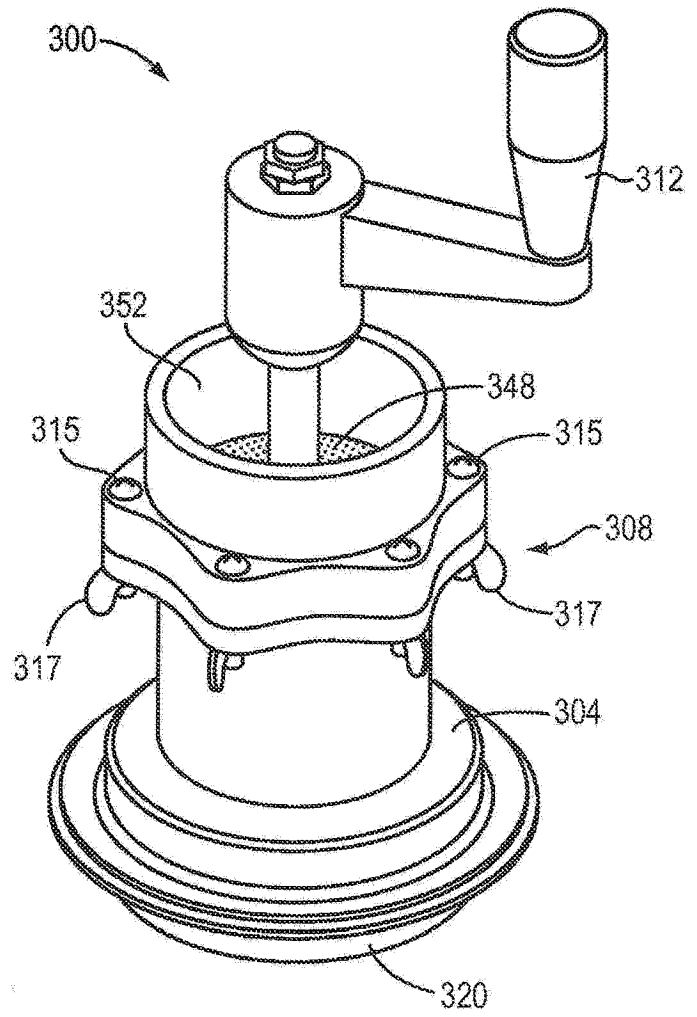


图 7

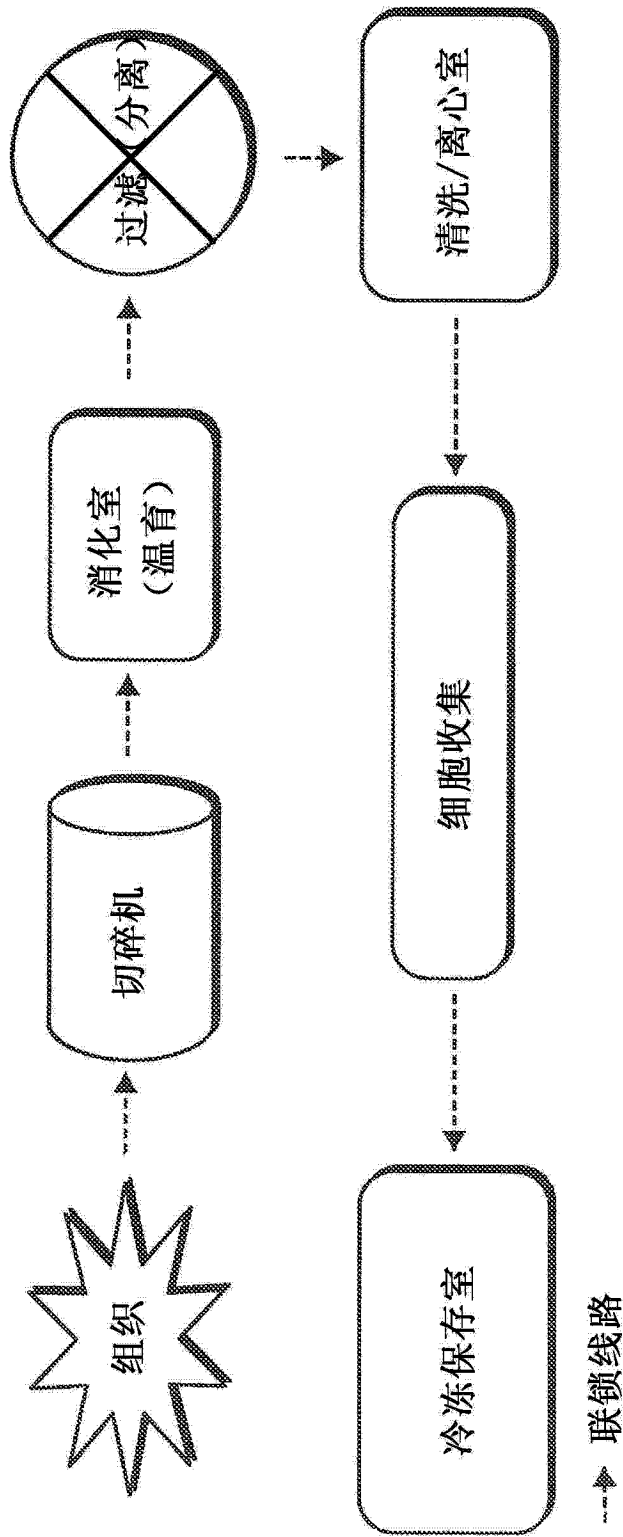
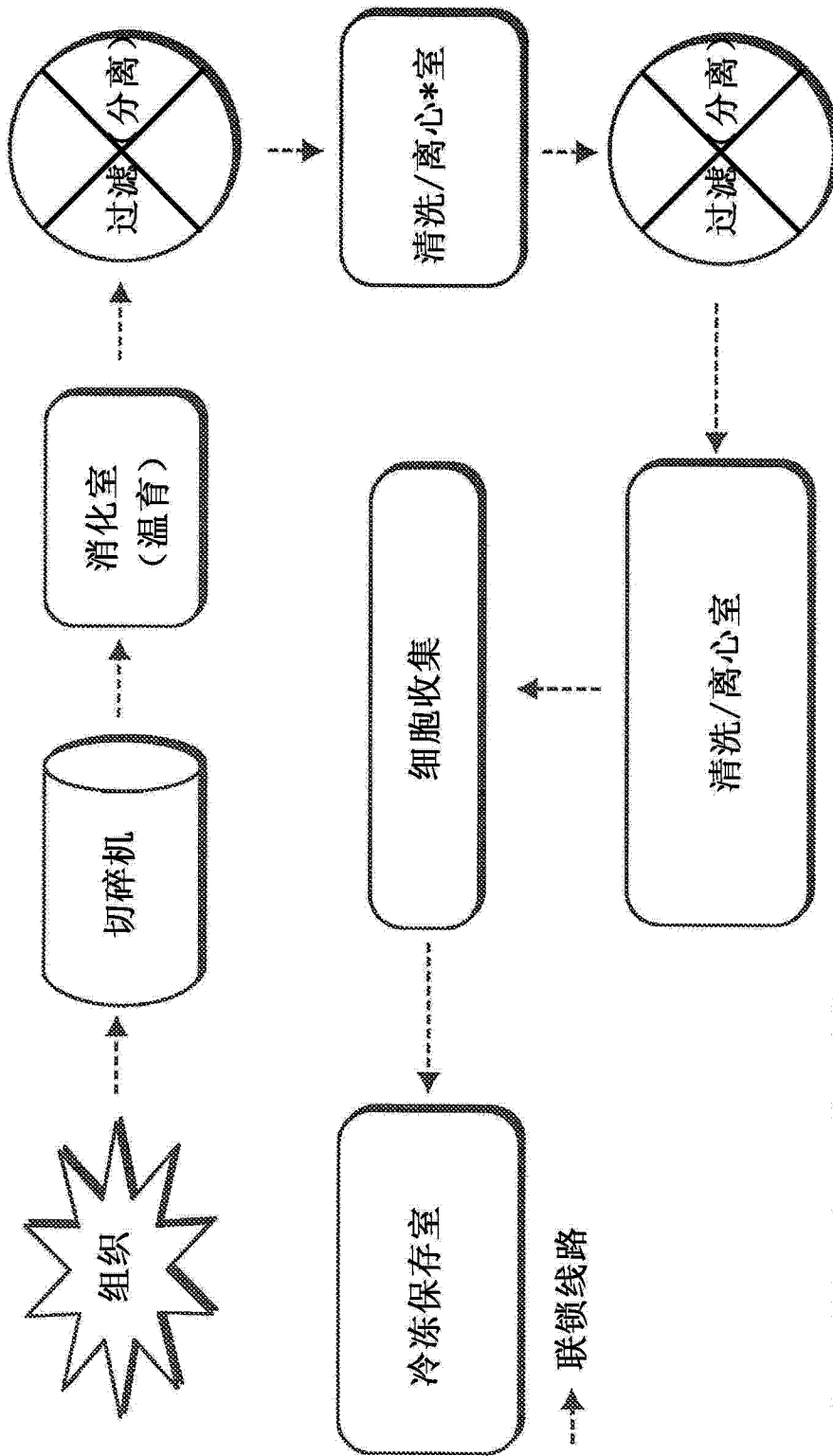


图 8



*离心不是必需，而是可选的

图 9

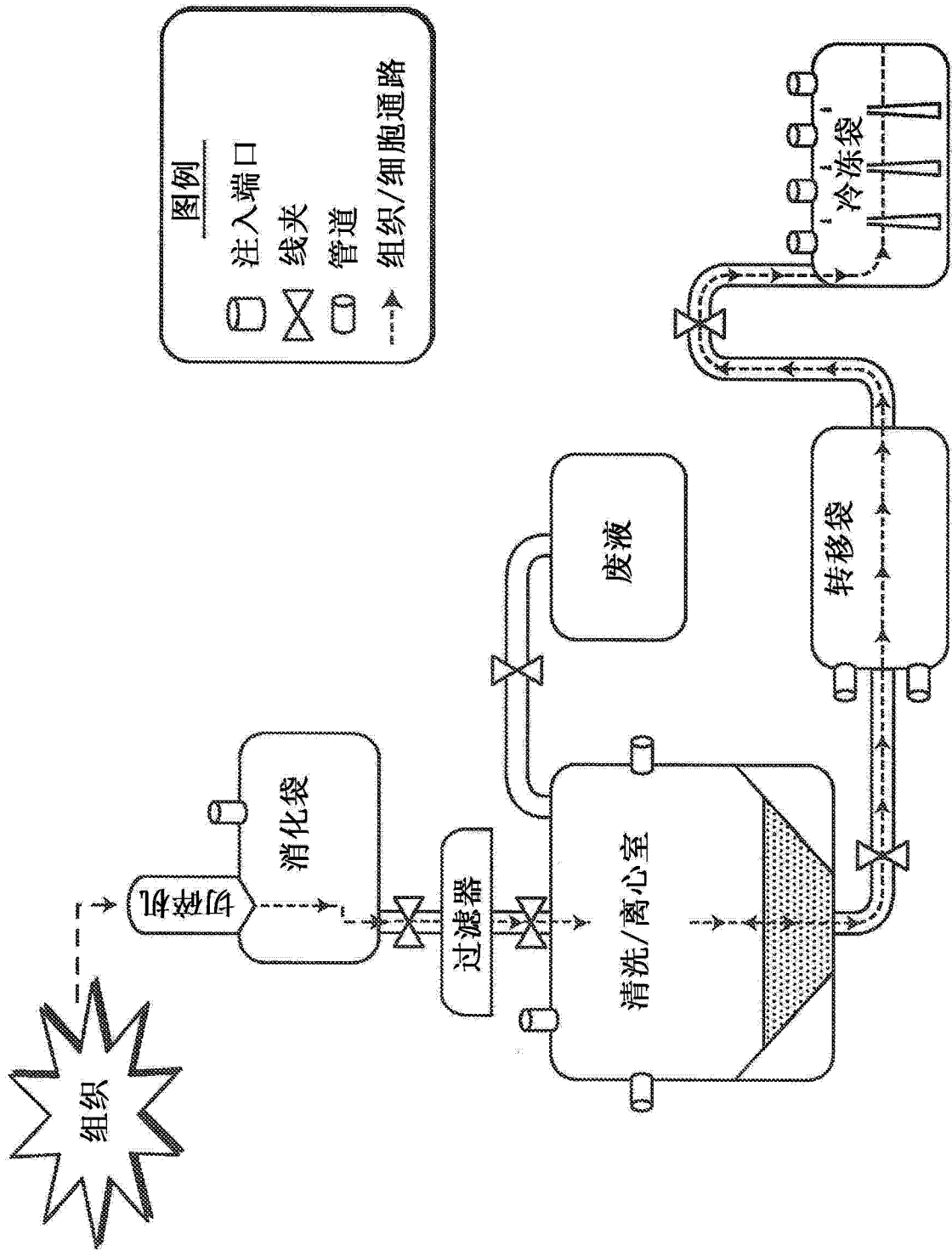


图 10A

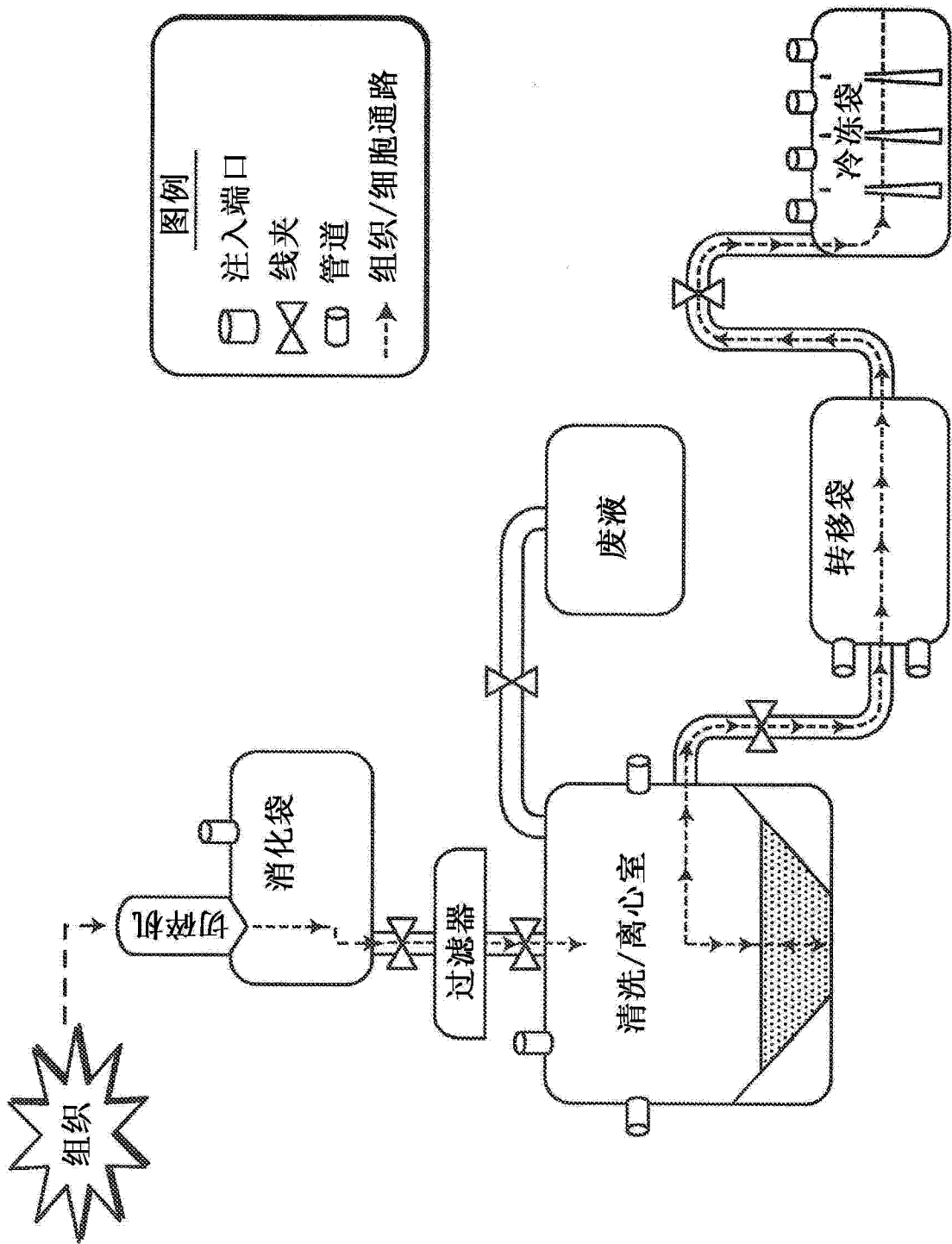


图 10B

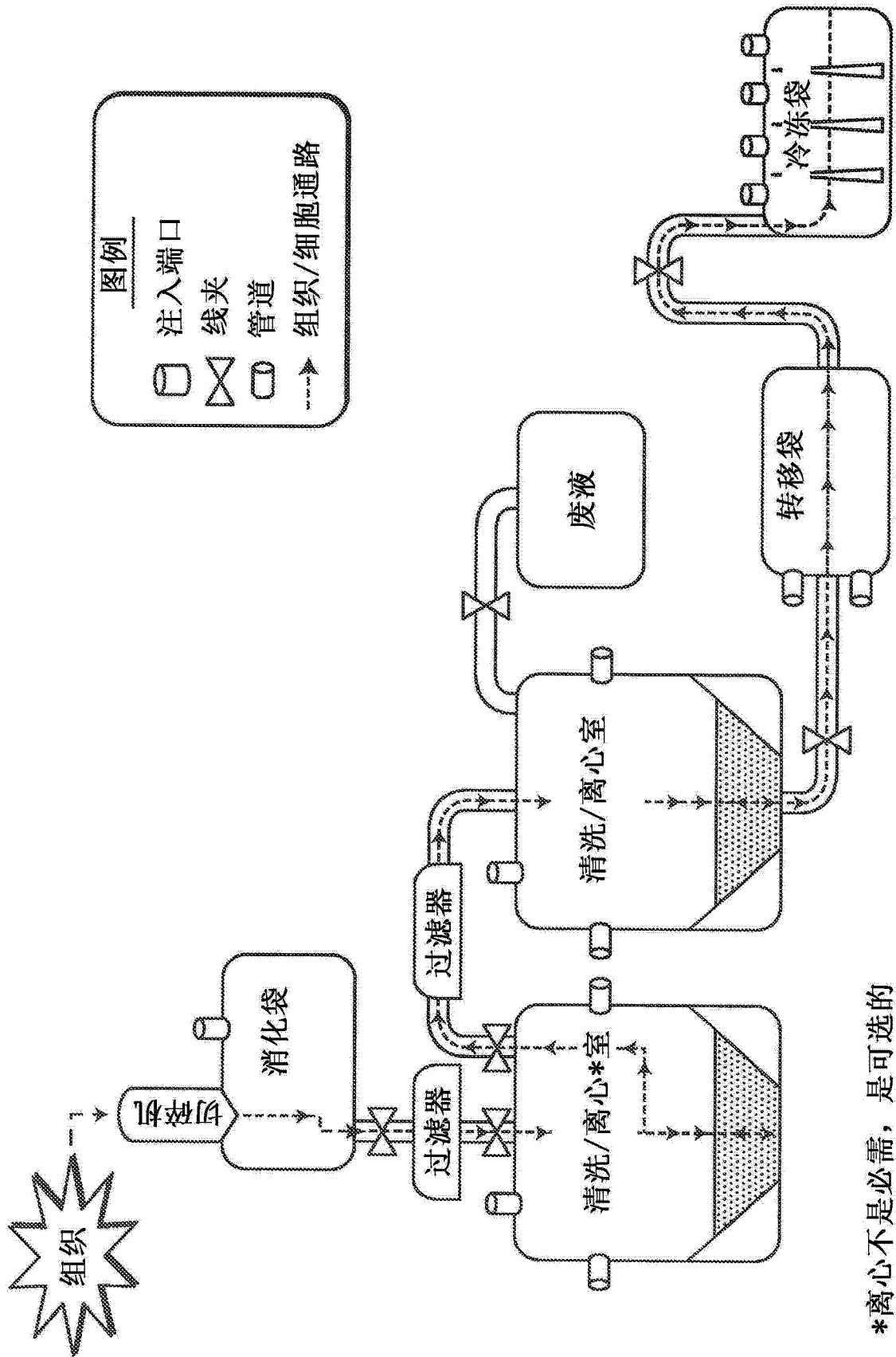


图 10C

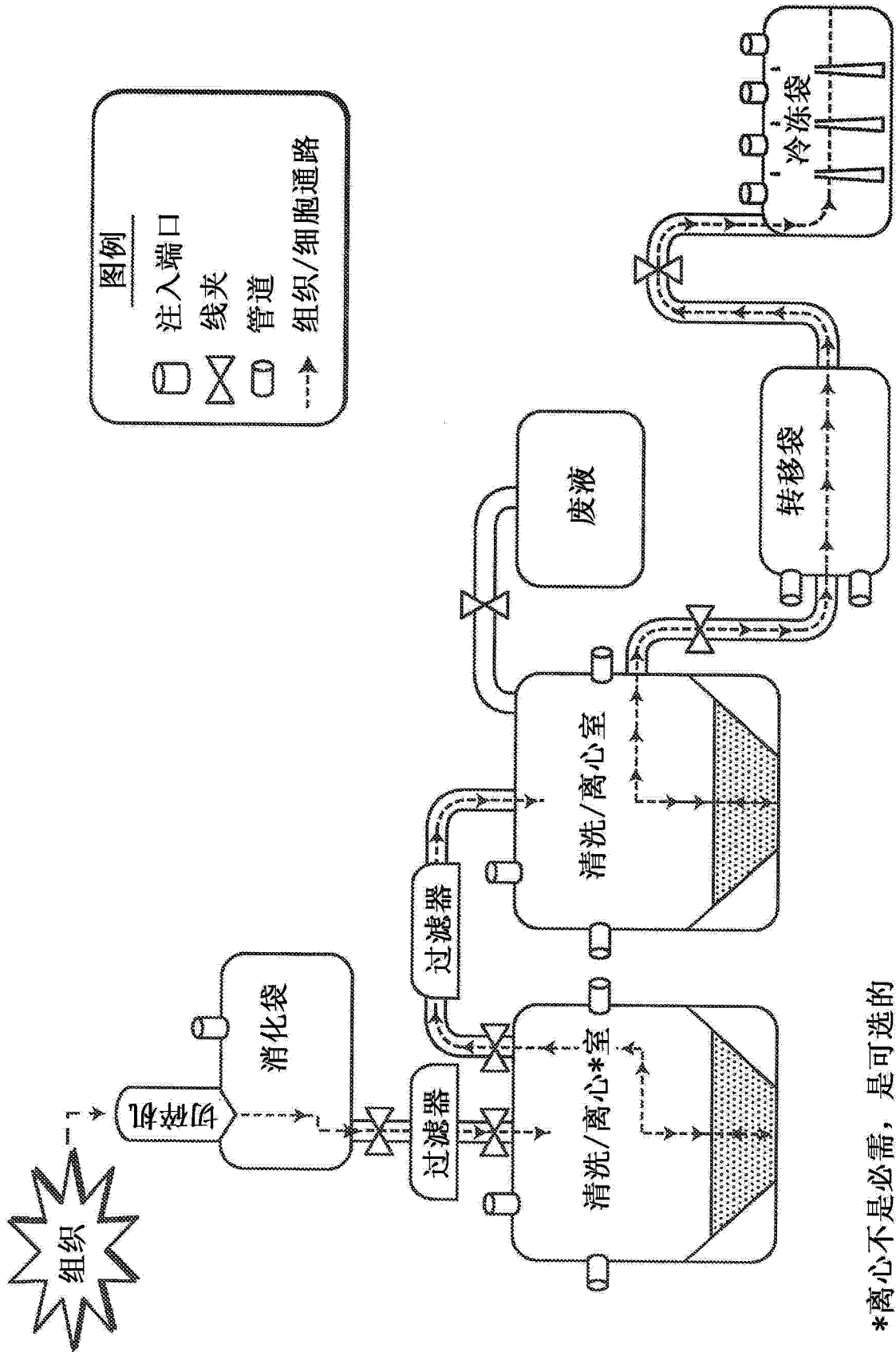


图 10D

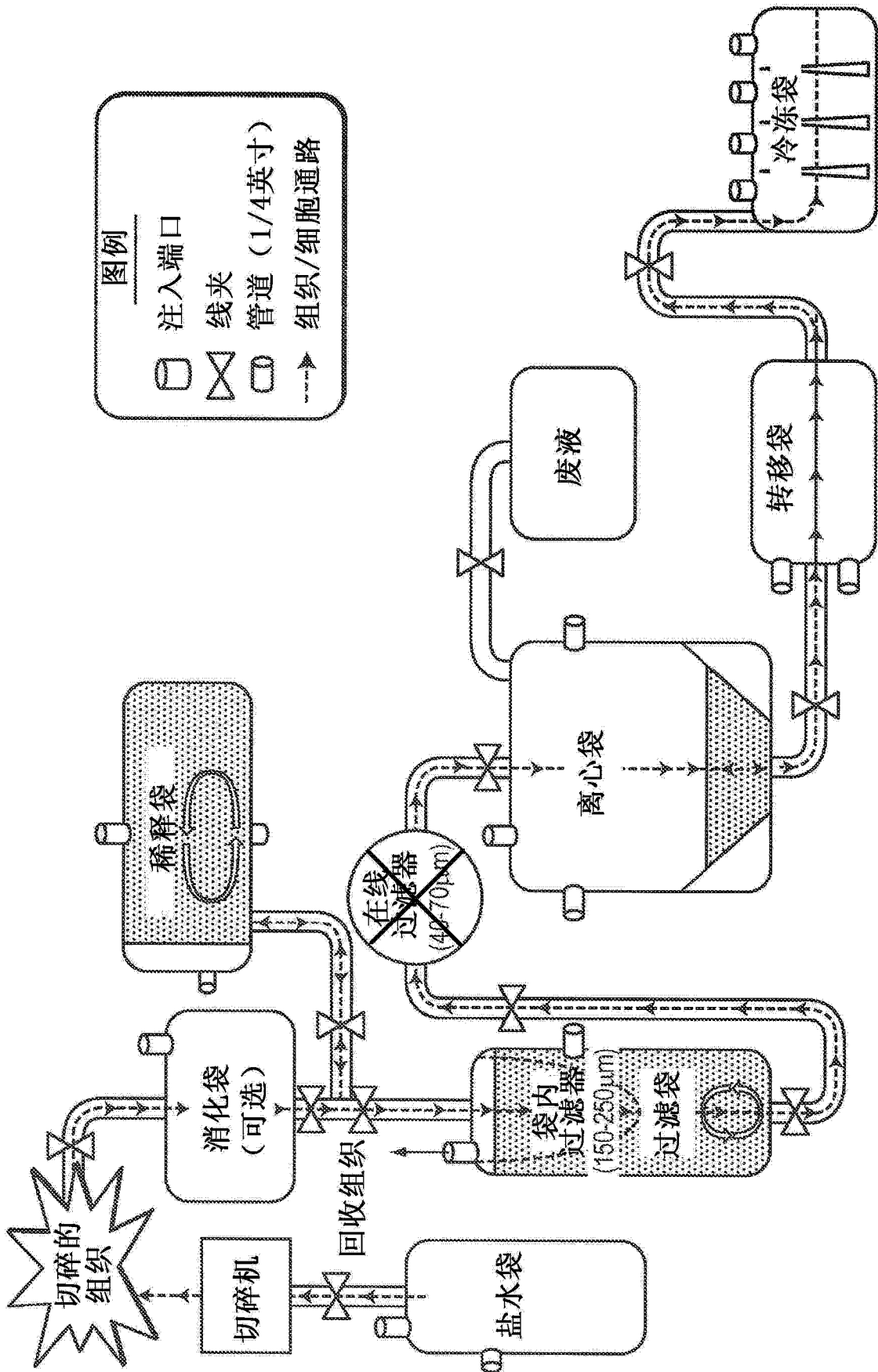


图 10E

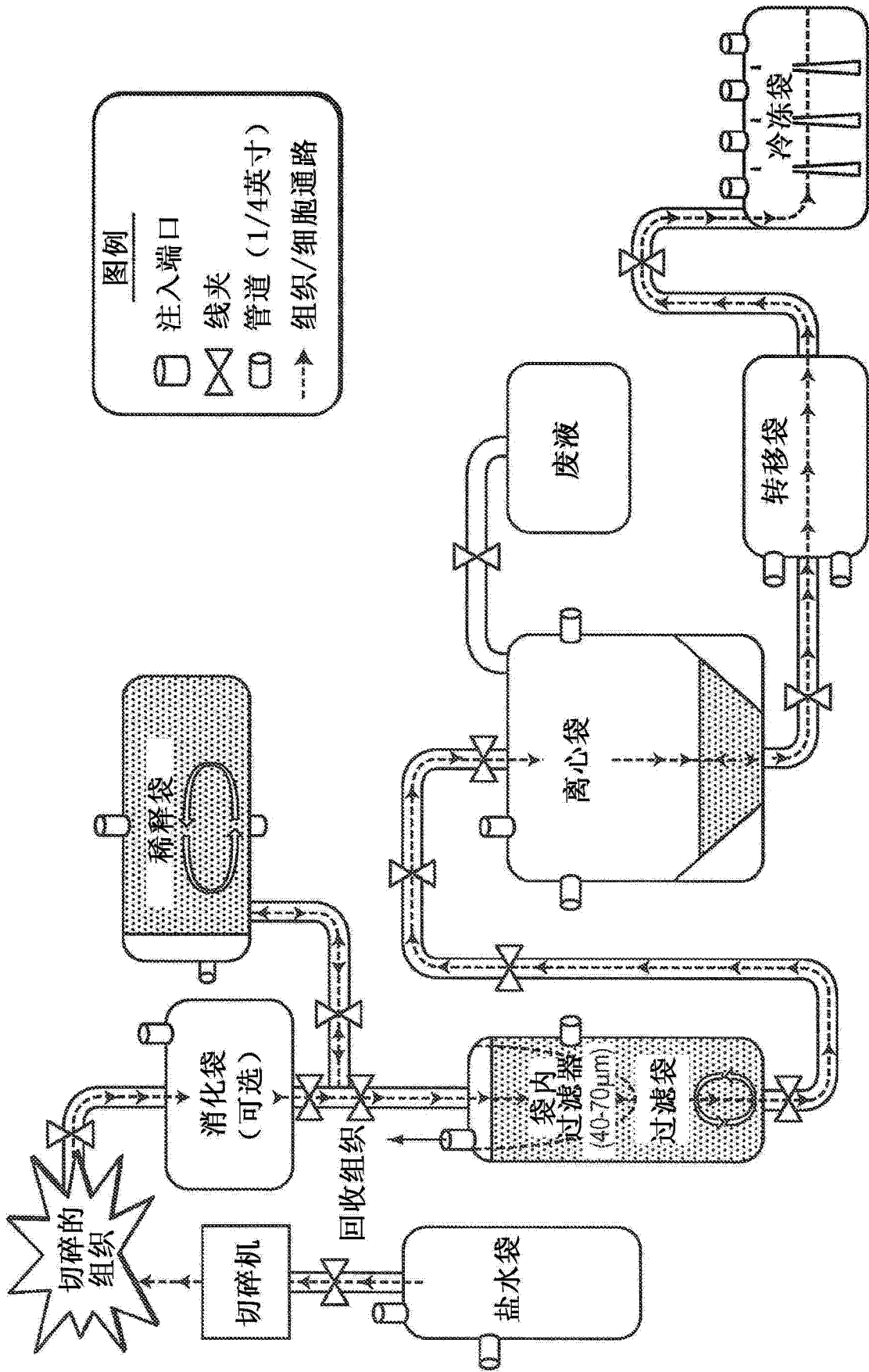


图 10F

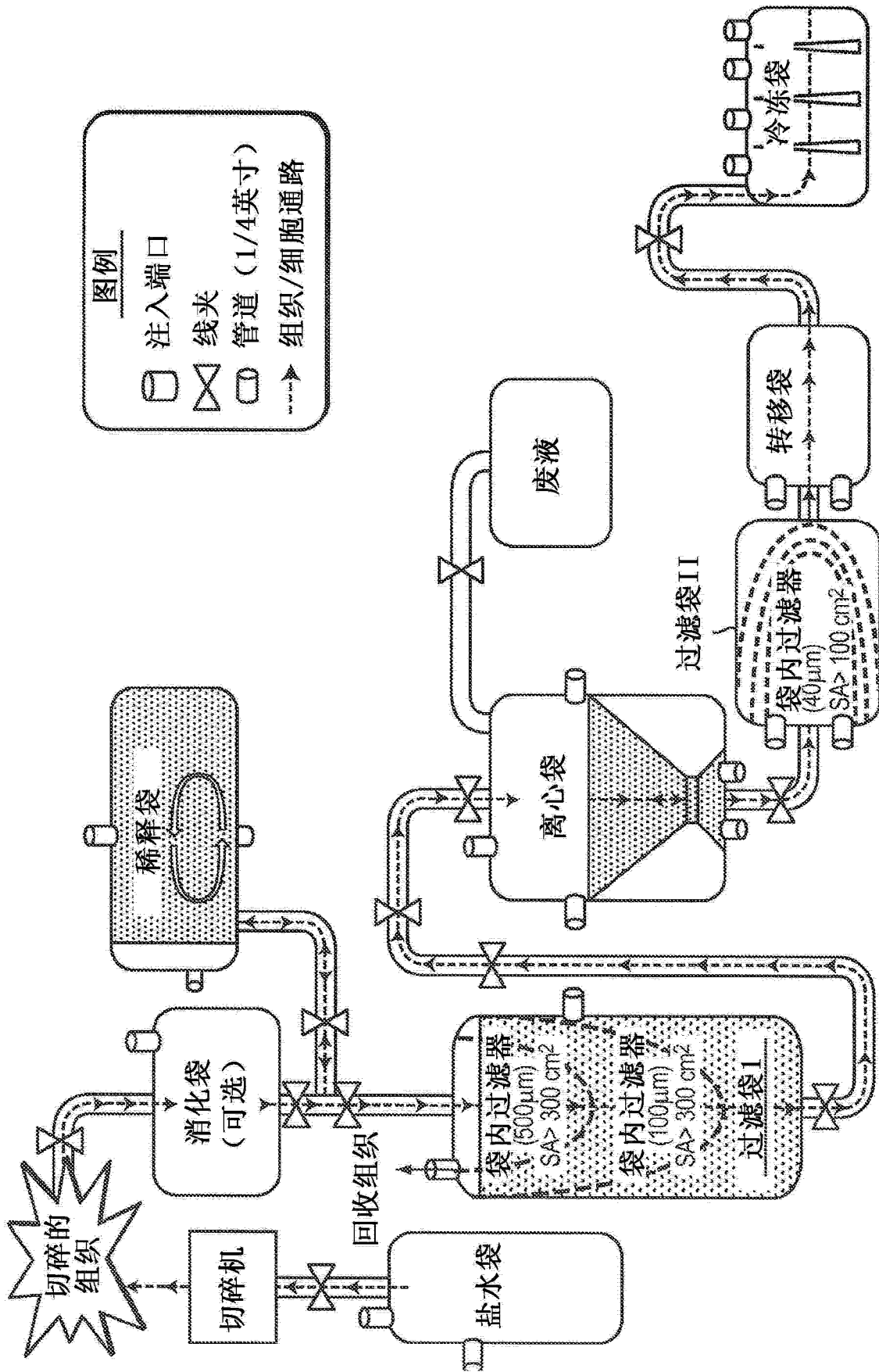


图 10G