



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105408472 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480027247. 0

(22) 申请日 2014. 03. 14

(30) 优先权数据

61/801, 280 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/001200 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/140921 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 马卡斯凯尔·托莱夫·拉尔森

地址 瑞典 S-23734 港口

申请人 安德烈亚斯尼尔斯·沃尔特·赫布斯
特

尼尔斯比亚内·罗兰·伍兹

(72) 发明人 马卡斯凯尔·托莱夫·拉尔森

安德烈亚斯尼尔斯·沃尔特·赫布斯
特

尼尔斯比亚内·罗兰·伍兹

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129

代理人 吴泳历

(51) Int. Cl.

C12N 5/0789(2006. 01)

C12N 5/071(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

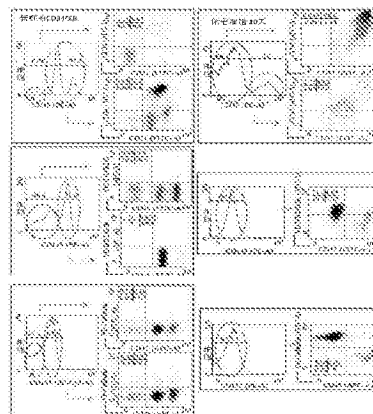
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

用于脐带血收集及细胞分离的细胞、方法和
装置

(57) 摘要

本发明涉及从造血细胞中以保留造血细胞再
生能力和原始状态、不显著降低造血细胞产量的
方式分离脐带血内皮细胞的方法。所述来自脐带
血的内皮细胞在细胞疗法中具有实用性。所述系
统利用细胞的内生粘附性质来促进细胞类型的分
离和单独储存。



提供以下典型权利要求是为了进一步解释本发明的一些实施例,不应被理解为申请人视为其发明的范围限制。

我们要求:

1. 用于分离内皮细胞的方法,包括:
 - (a) 将脐带血样品平铺在一个表面上;和
 - (b) 使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面上,所述附着细胞包括所述内皮细胞。
2. 用于分离内皮细胞和造血祖细胞的方法,包括:
 - (a) 将脐带血样品平铺在表面上;
 - (b) 使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面上;
 - (c) 将未附着的细胞与所述附着的细胞分离,所述附着细胞包括所述内皮细胞,所述未附着细胞包括所述造血祖细胞。
3. 根据权利要求2所述的方法,所述步骤(c)不会引起明显的所述附着细胞脱离所述表面。
4. 根据权利要求2所述的方法,经过步骤(c)后,至少大约10%,大约20%,大约30%,大约40%,大约50%,大约60%,大约70%,大约80%,或大约90%的所述附着细胞仍然附着在所述表面上。
5. 根据权利要求1-4任一所述的方法,所述脐带血样品来自人类。
6. 根据权利要求1-5任一所述的方法,所述脐带血样品是新收集的。
7. 根据权利要求1-5任一所述的方法,所述脐带血样品是冷冻的。
8. 根据权利要求1-7任一所述的方法,所述脐带血样品被处理用于单核细胞富集。
9. 根据权利要求1-7任一所述的方法,所述脐带血样品不进行处理用于单核细胞富集。
10. 根据权利要求1-9任一所述的方法,所述脐带血样品被处理用于造血祖细胞和/或造血干细胞富集。
11. 根据权利要求1-9任一所述的方法,所述脐带血样品不进行处理用于造血祖细胞和/或造血干细胞富集。
12. 根据权利要求1-11任一所述的方法,在大约0℃至大约37℃的温度下平铺所述脐带血样品。
13. 根据权利要求1-12任一所述的方法,用I型胶原蛋白,或凝胶,或类似的细胞外基质成分,或其任意组合来包被所述表面。
14. 根据权利要求1-13任一所述的方法,使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面大约5分钟,大约10分钟,大约15分钟,大约20分钟,大约25分钟,大约30分钟,大约35分钟,大约40分钟,大约45分钟,大约50分钟,大约55分钟,大约60分钟或更长时间。
15. 根据权利要求1-14任一所述的方法,还包括提供维持造血细胞生存能力、原始状态和/或再生能力的合适条件。
16. 根据权利要求1-15任一所述的方法,还包括提供维持内皮细胞生存能力和/或原始状态的合适条件。
17. 生产干细胞或祖细胞的方法,包括重组权利要求1-16任一分离的内皮细胞形成干细胞或祖细胞。

18. 获得干细胞或祖细胞的方法,包括扩增权利要求 2-16 任一方法中所分离到的造血祖细胞,任选地:(1) 从所述扩增的造血祖细胞群分离更原始的细胞,或(2) 重组所述造血祖细胞形成干细胞或祖细胞。

19. 产生体细胞的方法,包括:

(a) 重组权利要求 1-16 任一方法分离到的内皮细胞形成干细胞或祖细胞,并使所述干细胞或祖细胞分化为体细胞;或

(b) 直接将权利要求 1-16 任一方法分离到的内皮细胞重组为体细胞。

20. 用于从脐带血中分离细胞的双容器装置,包括两个容器和用于在容器间运输细胞悬浮液的具有活塞流量调节的无菌管道。

21. 根据权利要求 20 所述的双容器装置,还包括附在封闭系统中便于清洗步骤和细胞转运至容器的具有活塞流量调节的介质室。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的双容器装置,还包括一个或多个便于向容器中添加冷冻保护剂的附加室。

23. 根据权利要求 20-22 任一所述的双容器装置,所述装置预充有含氧量低的、含氧量正常的或含氧量高的气体。

用于脐带血收集及细胞分离的细胞、方法和装置

相关申请

[0001] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的序列号为 61/801,280 的美国临时专利申请的优先权,通过引用将上述申请的内容并入本文。

技术领域

[0002] 在一个实施例中,本文所述的发明涉及生物材料的获得,包括人类脐带血,包括出生时的脐带血;在某些方面涉及无菌脐带血的安全、有效和高产的收集及其装置和方法。在另一个实施例中,本发明涉及来自脐带血的细胞和细胞培养物,以及提取、分离、维持、扩增、重组、分化和储存细胞的方法。还涉及所述细胞在治疗方法、治疗、疾病预防、新药研发、个性化医学、再生医学、组织产生及通用血库中的应用,以及相关的方法和成分。

背景技术

[0003] 用于分离细胞、细胞重组和产生多能细胞和多潜能细胞的方法,以及组织、器官和干细胞疗法,为包括个性化医学和再生医学在内的多种治疗应用所需求。已知多种人类干细胞和其它细胞类型,包括在早期胚胎发育期间分离的胚胎干细胞,以及诸如间充质干细胞或成人干细胞之类的成体干细胞。一些非干细胞可被重组进入更原始的阶段。

[0004] 新生儿脐带血作为移植入血液病和恶性肿瘤患者体内的造血干细胞资源已有几十年,因为该材料中造血干细胞所占的比例高。因此,全世界目前有成千上万的脐带血样品储存在公共筹资和私人筹资的储存库中,以备申请使用。

[0005] 除造血干细胞之外,其它的细胞类型(例如,非造血干细胞)也出现在脐带血样品中。这些细胞中的一些已被分离和塑造,用于可能的治疗应用。例如,从脐带血中分离和扩增的内皮细胞已被用于心脏组织修复的细胞治疗中。由于内皮细胞群的低频率(在脐带血中低于 2%),以及用于内皮细胞疗法的技术的有限可用性,从脐带血中分离内皮细胞在临床环境中不经常使用。

[0006] 可用于收集、提取和分离生物组分,包括细胞物质、脐带血及从中发现的细胞的方法和装置还不完全令人满意,例如,在其安全性、所收集的物质避免污染(例如,空气污染)、细胞产量、效率,和/或避免组分破坏的能力等方面。

[0007] 用于分离干细胞和/或从更分化的细胞中产生多潜能和/或多能干干细胞的方法是,例如,包括再生医学和个性化医学(个体优化治疗)在内的细胞治疗应用所需要的。在这些方面需要细胞资源及分离方法。还需要能够很方便地从大量献血者获得的源材料细胞,例如,用于量大的且能够进行操作的细胞的分离。本发明提供了满足这种需求的实施例。

[0008] 例如,对用于安全的、高产量的、脐带血成分破坏最小的无菌脐带血收集的方法和设备的的需求,对于用于包括细胞在内的成分的提取、增殖和分化的方法和设备的的需求,以及对用于安全的、可靠的、不会损害现有的治疗相关的细胞资源的具有重组能力从而产生多能和多潜能细胞的细胞物质的提取和分离方法的需求。

[0009] 对于用于从脐带血样品中分离包括非血细胞在内的细胞的方法的需求,例如,不破坏脐带血中其它细胞类型(例如造血干细胞)的功能。在本文所提供的实施例提供了满足这些需求的方法、设备和成分。

[0010] 同样,对于大量的、能够进行操作、重组和分化的,用于再生医学、治疗和疾病预防、个性化医学及组织产生的细胞的需求。以及对通用血库的需求。所提供的实施例提供了满足这些需求的方法、设备、细胞和成分。

发明内容

[0011] 本发明提供了用于分离内皮细胞的方法,包括:(a) 将脐带血样品平铺在表面上;和(b) 使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面上,所述附着的细胞包括所述内皮细胞。

[0012] 在另一个实施例中,提供了用于分离内皮细胞和造血祖细胞的方法。所述方法包括:(a) 将脐带血样品平铺在表面上;(b) 使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面上;(c) 将未附着的细胞与所述附着的细胞分离,所述附着细胞包括所述内皮细胞,所述未附着细胞包括所述造血祖细胞。一方面,步骤(c) 不会引起明显的所述附着细胞脱离所述表面。另一方面,经过步骤(c) 后,至少大约 10%,大约 20%,大约 30%,大约 40%,大约 50%,大约 60%,大约 70%,大约 80%,大约 85%,大约 90%,大约 95%,或大约 99%的所述附着细胞仍然附着在所述表面上。

[0013] 在本文任何一所述实施例或其任何组合中,所述脐带血样品可以来自人类。在本文任何一个所述实施例或其任何组合中,所述脐带血样品可以是刚获得的或冻存的。在本文任何一个所述实施例或其任何组合中,所述脐带血样品经处理后用于单核细胞富集。在其它实施例中,所述脐带血样品不经处理用于单核细胞富集。在本文任何一个所述实施例或其任何组合中,所述脐带血样品经处理后用于造血祖细胞和/或造血干细胞富集。在其它方面,所述脐带血样品不经处理用于造血祖细胞和/或造血干细胞富集。

[0014] 在本文所述实施例的任何一个或任何组合中,在大约 0℃至大约 37℃的温度下平铺所述脐带血样品。在一个实施例中,所述表面包被有 I 型胶原蛋白,或凝胶,或类似的细胞外基质成分,或其任意组合来包被。在一些方面,使所述脐带血样品中的细胞附着在所述表面大约 5 分钟,大约 10 分钟,大约 15 分钟,大约 20 分钟,大约 25 分钟,大约 30 分钟,大约 35 分钟,大约 40 分钟,大约 45 分钟,大约 50 分钟,大约 55 分钟,或大约 60 分钟或更长时间。

[0015] 在本文所述实施例的任何一个或任何组合中,用于平铺脐带血样品的所述表面可以是包含于任何合适的盘(例如,组织培养盘)、碟、器皿、室、袋(例如,血液收集袋)、容器或类似物中的表面。在优选实施例中,水平放置或基本上水平放置所述表面。

[0016] 在本文所述实施例的任何一个或任何组合中,所述方法还包括提供维持造血细胞生存能力、原始状态和/或再生能力的合适条件。在其它实施例中,所述方法还包括提供维持内皮细胞生存能力和/或原始状态的合适条件。

[0017] 本文还公开了产生干细胞或祖细胞的方法,包括使用任一前述实施例中公开的方法使分离的内皮细胞重组形成干细胞或祖细胞。这里提供的是获得干细胞或祖细胞的方法,包括扩增任一前述实施例中公开的方法所分离的造血祖细胞,任选地:(1) 从所述扩增

的造血祖细胞群分离更原始的细胞,或(2)重组所述造血祖细胞形成干细胞或祖细胞。

[0018] 这里提供的是产生体细胞的方法,包括:(a)重组任一前述实施例中公开的方法使分离的内皮细胞形成干细胞或祖细胞,再使所述干细胞或祖细胞分化成体细胞;或(b)重组任一前述实施例中公开的方法直接分离的内皮细胞形成体细胞。

[0019] 本文还提供用于从脐带血中分离细胞的双容器装置,包括两个容器和具有活塞流量调节的用于在容器间运输悬浮液中的细胞的管道。在一个实施例中,所述双容器装置还包括附在一个封闭系统中的具有活塞流量调节的调节细胞清洗和细胞转运至所述双容器的介质室。一方面,所述双容器装置还包括一个或多个便于向容器中添加冷冻保护剂的附加气室。在一个实施例中,所述双容器装置预充有含氧量低的、含氧量正常的或含氧量高的气体。

附图说明

[0020] 图1阐明了通过流式细胞仪分析测量的新鲜的CD34⁺脐带血细胞和附着细胞(第10天)的细胞表面标记表达。

详细说明

A. 定义

[0021] 除非另有限定,本文所使用的所有行业术语、符号和其它科学术语或术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。在某些情况下,为了更加清楚和/或以备参考,本文定义了具有通常理解含义的术语,这种定义所包含的内容不应该必然理解为代表了所述定义与本领域通常理解含义的本质区别。本文所描述的或参考的许多技术和程序是本领域技术人员熟知的并且是常规方法中通常采用的。

[0022] 本公开自始至终,以范围形式呈现了本发明的各个方面。应该理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁明了,不应当解释为对本发明范围的不可改变的限制。范围的描述应该理解为已经具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的个体数值。例如,如1~6的范围描述应该理解为已经具体公开了如1~3,1~4,1~5,2~4,2~6,3~6等的子范围,以及所述范围内的个体数值,例如1,2,3,4,5和6。在另一个实施例中,以“周”为单位的范围描述包括了所述周端点之间的天数的公开。这适用于所有宽度的范围。

[0023] 如本文所用,术语“安全的”可以理解为:指任何对母亲和/或胎儿无明显伤害风险的方法或装置。

[0024] 如本文所用,“分离的”,当用于描述一个或多个细胞时,指的是已经从它们的天然环境中分离出来的一个或多个细胞,包括从细胞起源的对象(例如患者)中分离,和/或从天然环境中的一种或多种其它组分(例如碎片、组织、组织聚集体和其它细胞)中分离。

[0025] 如本文所用,“胎儿的”用于描述来自胚胎期之后及出生之前的发育中的哺乳动物,例如人类的细胞或其它物质的特性。如本文所用,“婴儿的”用于描述来自出生至1岁龄的新生或幼小的哺乳动物,包括早产儿和新生儿的细胞或其它物质的性质。

[0026] 如本文所用,“多能的”指的是细胞分化成三个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)中任一胚层的细胞类型的能力。“多潜能的”指的是细胞分化成大量多元的但细胞系数目有限的细胞的能力。

[0027] 在以下本文提供的具体实施例的描述中,对作为本文一部分的附图进行了引用,

通过对可以实施本发明的具体实施例进行图解的方式来呈现。要理解的是,可以使用其它实施方式,并且在不超出本发明范围的情况下可以进行结构变化。

B. 脐带血和脐带血细胞分离

[0028] 在提供的实施例中,有装置、设备和用于生物材料,包括细胞和细胞资源,例如从脐带血中获得的细胞和细胞资源的收集、分离和使用的方法,以及通过所述方法获得的细胞和其它物质,及其用途,包括治疗和分析用途,例如,用于再生医学包括个性化和万能供血者中。

[0029] 多种人类干细胞正被用于治疗或评估用于临床试验中,包括体细胞,例如间质干细胞和造血干细胞,例如,分别用于神经疾病和血液疾病中。其它具有更高分化能力的体细胞可被重组进入更原始阶段,例如内皮细胞重组形成多能干细胞。

[0030] 诱导的多能干(iPS)细胞由多种细胞类型产生,包括皮肤成纤维细胞。Masip et al., 2010, Mol Hum Reprod 16(11):856-868; Takahashi and Yamanaka, 2006, Cell 126(4):663-676; Yu et al., 2007, Science 318(5858):1917-1920. 备选的起始材料的选择基于:容易重组(包括足够的增殖速率)、疾病模型的遗传背景、容易获得足够数量的活细胞,以及遗传准确性。Hanna et al., 2009, Nature 462(7273):595-601; Park et al., 2008, Cell 134(5):877-886; Ye et al., 2009, Blood 114(27):5473-5480; Carette et al., 2010, Blood 115(20):4039-4042; Kumano, et al., 2012, Blood 119(26):6234-6242; Ikehata et al., 2003, Environ Mol Mutagen 41(4):280-292; Ikehata et al., 2004, Mutat Res 556(1-2):11-24; Osanai and Lee, 2011, Med Mol Morphol 44(4):200-206.

[0031] 可用于产生 iPS 细胞的方法伴随着一些具体的问题。例如,大部分 iPS 细胞由成人皮肤成纤维细胞产生。尽管如此,由于表观遗传记忆,用作 iPS 细胞产生资源的细胞所剩余的表观遗传状态会影响衍生的 iPS 细胞的分化能力。具体而言, iPS 细胞系能够通过继续表达一组关键的供体细胞基因来维持组织来源的表观遗传记忆。Marchetto et al., 2009, PLoS One 4(9):e7076; Ghosh et al., 2010, PLoS One 5(2):e8975; Bar-Nur et al., 2011, Cell Stem Cell 9(1):17-23. 表观遗传记忆能够影响许多细胞资源的分化能力,能够使某些分化细胞(例如神经祖细胞、某些血细胞、成纤维细胞、肌原细胞、胰岛 β 细胞和其它胰细胞)不适于 iPS 细胞产生。Kim et al., 2010, Nature 467(7313):285-290; Polo et al., 2010, Nat Biotechnol 28(8):848-855; Bar-Nur et al., 2011, Cell Stem Cell 9(1):17-23; Marchetto et al., 2009, PLoS One 4(9):e7076; Ghosh et al., 2010, PLoS One 5(2):e8975.

[0032] 因此,在某些语境中具有多潜能分化能力的更原始的细胞指更加合适的用于 iPS 细胞产生的起始材料,其具有广泛的分化能力。

[0033] 在某些语境中,与环境接触最少的、包含未损坏基因组的,和/或具有在体外培养系统中增殖和/或扩增能力的稚细胞例如,用于治疗的组织、器官和/或干细胞是细胞重组所需的。来自足月的或接近足月的胎儿或新生儿的某些细胞物质将满足这些特征。出生时的细胞资源(例如脐带血)包含具有这些特性的细胞。

[0034] 脐带血是通常用于造血干细胞移植的资源。脐带血造血干细胞具有最少的暴露于环境中全基因组)、高增殖能力及分化潜能等稚细胞状态。在脐带血中存在低频率数量的非

血细胞类型,适用于细胞再生医疗目的,例如,脐带血的内皮细胞部分。重组技术的可用性(例如,Takahashi and Yamanaka, 2006, Cell 126(4):663-676 所描述的)使特定谱系的细胞可被“重组”为另一种类型的细胞系或胚胎样状态,提高存在于脐带血中的稀有细胞部分的价值,可以用作重组和细胞治疗的资源。

[0035] 可用于收集、提取和分离生物组分,包括细胞物质、脐带血及从中发现的细胞的方法和装置还不完全令人满意,例如,在其安全性、避免所收集的物质污染(例如,空气污染)、细胞产量、效率,和/或避免组分破坏的能力等方面。

[0036] 随着脐带血的收集,如果脐带早早被夹紧,会对新生儿产生某些负面影响。已知的用于培养来自脐带血的造血干细胞(HSCs)的方法无法维持所述造血干细胞的再生能力。大多数可用的分离程序涉及培养物孵育,其会对造血干细胞池产生有害作用。通过已知方法获得的脐带血应用于重组用途会降低或完全消除其全部的造血潜能(包含在供体库系统中的主要原因)。需要用于从脐带血样品中获得非血细胞而不影响造血干细胞部分的功能的方法。尤其是,由于成千上万的造血干细胞样本储存在世界各地的库中,因此需要用于分离和扩增这些细胞而不影响通常用于治疗目的的造血干细胞部分的功能的方法。

[0037] Takahashi 和 Yamanaka 首先将重组技术描述为“重组”或“脱分化”体细胞,使其进入多能/胚胎样状态,或直接“重组”体细胞成为另一种细胞系类型。Takahashi and Yamanaka, 2006, Cell 126(4):663-676. 因此,存在于脐带血中的稀有内皮细胞部分可被用作重组和细胞治疗的起始材料。这些细胞的性质使其经得起重组的考验。在一个实施例中,利用本发明从脐带血中分离到的细胞类型是内皮祖细胞。脐带血衍生的内皮祖细胞适于重组,其主要优点包括,它们是粘着的、快速分裂的、原始的(它们是具有相应增殖/分化潜能及表观遗传谱的祖细胞),并且它们来自新生的资源。此外,脐带血衍生的内皮祖细胞较少暴露于诱变剂中,因此,与成人患者资源细胞相比,很可能具有较少的基因组突变积累。在一个实施例中,以不损害造血干细胞的功能或大幅减少造血干细胞数量的方式从脐带血中获得内皮细胞。因此,本发明提供了脐带血样品除用于造血干细胞移植之外的附加价值。

[0038] 在一个实施例中,本文所述发明提供了从人类脐带血中有效提取内皮细胞并且使具有治疗价值的造血干细胞损失最小的系统。一方面,本发明提供了附着的内皮祖细胞从脐带血中同时快速的分离,该细胞具有重组能力并因此具有潜在的巨大治疗价值。在优选的实施例中,脐带血提供造血干细胞的能力总体上得到维持或未受影响。

[0039] 人类脐带血内皮祖细胞可以采用 Fico11 梯度离心和直接平铺单核细胞部分来分离。分离的细胞可以直接平铺在凝胶或 I 型胶原蛋白包被的表面上,或利用磁珠为祖细胞标记例如但不限于 CD34 和 CD133 以进一步纯化后再平铺。然后使用内皮细胞培养基培养细胞数天或数周。至此,可见扩增的内皮细胞/祖细胞附着层,待提取。然而,这个过程使造血祖细胞和干细胞不适于移植,因为内皮祖细胞生长的体外条件不能维持造血干细胞。在这种情况下,会发生大规模的原始祖细胞分化。此外,随着定期的培养基更换,由于造血细胞不再能够重构移植后的造血系统,因此被移除和弃掉。

[0040] 本发明使造血细胞和内皮细胞均同时分离、储存和使用成为可能,从而提高了人类脐带血的治疗价值。在一个实施例中,本发明不依赖于培养细胞,或延长培养细胞时间。在优选实施例中,保护了具有传统治疗价值的造血干/祖细胞部分的生存能力和功能,同时,分离了具有生存能力和功能的内皮细胞。

[0041] 先前的工作已显示了从脐带血中分离内皮祖细胞的能力。这些祖细胞具有大规模扩大和复制的潜能,同时保留了分化成为内皮细胞系的潜能。所述细胞群通过其在培养系统中形成毛细血管形态的管状样结构的能力而定义。最近,已经证实,脐带血衍生的内皮细胞,包括 AC133⁺细胞和 CD34⁺内皮细胞,可被用于有效产生 iPS 细胞。这意味着这些细胞能被有效重组为具有类似于胚胎干细胞性质的多能干细胞状态。然而,以前采用的方法会损害或削弱细胞功能,或减少造血干细胞的数量。例如,内皮细胞,造血祖细胞和干细胞在它们的表面表达一些共有的标记,例如 CD34, CD31, VEGFR 和 AC133。因此,通过靶向这些标记从脐带血中分离内皮细胞会产生内皮细胞和造血祖 / 干细胞的混合物的分离。靶向这些共有标记也会导致造血细胞的减少。例如,通过使用磁珠筛选 CD45⁺细胞,最多获得 70% 的造血细胞。因此,大约减少了 30% 的造血细胞产量,并且花费很长时间来处理这些细胞,对分离细胞的质量造成极大的风险。虽然分选方法产生了高纯度的细胞成分,但其产量甚至低于 50%。

[0042] 延长总体脐带血细胞的培养时间是另一种从造血细胞部分分离内皮细胞的方法。这些细胞培养过程通常耗费 7-14 天。内皮细胞被播种形成菌落并最终在平板上形成附着层,而造血细胞部分将仍然处于悬浮液中或仅有微弱的粘附。造血干细胞这样长时间的细胞培养,或甚至短期暴露于体外孵育环境中,已被证明会严重改变造血干细胞 (HSCs) 的转录谱,并且更重要的,会降低 HSCs 的功能重建效率。因此,需要用另外的方法来分离内皮细胞部分和造血干细胞部分。

[0043] 从脐带中获得相对纯的内皮细胞的备选方法是分离人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的程序。然而,分离人脐静脉内皮细胞的程序必须在脐带血收集的时候、脐带丢弃之前完成,因为该细胞来自脐带本身的内皮而非位于脐带管内的脐带血。由于收集 HUVECs 的程序复杂,需要脐带组织处理,包括脐带组织的手动分离和干燥,以及酶促细胞分解步骤 (例如,胰蛋白酶化作用),均在临床核准的细胞处理实验室中进行,该程序在全世界大多数医院不可能实现。因此,目前保存在生物库中的大多数脐带血样品不包含 HUVECs。此外,收集 HUVECs 的过程要耗费数天至数周才能能够获得大量用于冰冻和储存的该内皮细胞。然而,将人类脐带中的血液收集到灭菌管中是全世界许多诊所的常规程序。在一个实施例中,本文提供分离脐带血中存在的细胞类型的方法。因此,本发明满足了细胞材料容易使用、灭菌和保存的要求,不会显著影响这些诊所进行脐带血收集过程。

[0044] 在分娩病房内进行的典型的脐带血收集首先是夹紧并剪开脐带,然后通常是通过一根连接着闭合系统导管的针刺入脐带静脉和动脉将血液采集至无菌收集袋中,或简单地将脐带血从脐带剪开处的开口排入收集管中。脐带的重力或物理操作促使从脐带进入收集管的血液采集过程。所述收集管通常包含抗凝血剂 (例如,硫酸肝素、柠檬酸或 EDTA)。如果脐带血样品要进行冰冻保存,还可以包含冷冻保护剂,例如 DMSO。在一些方面,脐带血被加工用于祖 / 干细胞富集,例如,如上所述的,使用临床级抗体结合磁珠。

[0045] 一方面,本发明的实施例提供用于从人类脐带血中分离内皮祖细胞和造血细胞的快速临床应用系统,从而获得具有临床意义的内皮细胞类型,同时保护造血干细胞的产量和再生能力。所述实施例允许脐带血样品用于其它用途。在一个实施例中,使用新获得的脐带血样品。在其它实施例中,使用先前处理的并且冰冻保存的样品。在一个实施例中,使用全部样品或脐带血的单核细胞部分。在另一个实施例中,使用为祖细胞富集而处理的样

品。在一个实施例中,本发明利用造血细胞成部分和内皮细胞部分的细胞表面粘附性质的不同,从而使两种细胞分离。在一个实施例中,将脐带血样品平铺在包被过的平板上。细胞在平板上短暂孵育之后进行分离程序,该程序能够在床边进行。本发明克服了导致造血细胞存活力低、产量低和品质低的现有技术的局限性。

[0046] 在配体亲和性和时间依赖的结合方面,脐带血造血细胞和内皮细胞不同的特异结合性质的恰当使用,可用于分离这两种细胞。例如内皮细胞表达 V-CAM,血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin),内皮细胞选择素 (E-selectin) 以及 VLA-1 (整和素 $\alpha 1 \beta 1$),它们是提升这些细胞及其隔细胞之间的信号的细胞结合因子。因此,这些因子和其它的内皮细胞标记可以专门开发用于这些细胞与造血细胞的分离,造血细胞不表达这些标记或仅仅微弱地结合内皮细胞受体。而造血细胞被认为是悬浮细胞类型,在这些细胞上表达的是微弱的粘附配体,例如 CXCR4。CXCR4 结合趋化因子 SDF-1,趋化因子 SDF-1 与细胞外基质成分纤维连接蛋白结合。此外,造血细胞上也表达诸如 VLA-1 和 VLA-4 之类的整联蛋白,VLA-1 和 VLA-4 分别与胶原蛋白和 VCAM 1 结合。在非组织损伤的造血细胞类型中还有其它的弱粘附因子。本发明提供用上述内皮粘附因子的配体或表位包被的细胞收集装置、容器或培养室,用于造血细胞和内皮细胞分离。

[0047] 在本发明中,新解冻的或新获得的脐带血或祖富集细胞成分在暴露给预包被的无菌容器中的特异粘附因子后可被分离。特异的包被可以通过特异的聚合物/蛋白混合物来实现。此外,可以采用类似于细胞外基质或其成分(例如,凝胶或 I 型胶原蛋白)作为包被物。所述包被物用最小的支撑介质(临床使用级别)覆盖,用于在分离过程中维持细胞的生存能力。在一些实施例中,单核细胞富集的脐带血样品,或祖的或干细胞富集的脐带血样品,可以每 100cm^2 大约 1000 万个细胞平铺于平板或碟子上。在一些实施例中,脐带血样品不是为了细胞亚型富集而处理的,或不是为了红细胞减少而处理的,以每 100cm^2 大约 10000 万个细胞平铺于平板或碟子上。在一个实施例中,介质的总体积至少是每 100cm^2 10mL。在一个实施例中,在平铺的时候,将包含细胞和介质的所述容器置于固体表面上,从而使所述细胞能够附着在所述容器的表面。在一些实施例中,所述细胞在室温下,在 4 摄氏度冰箱,或在 37 摄氏度恒温箱中孵育,取决于所述分离容器中使用的特异包被物的结合亲和性和性质。在一些实施例中,在 5 分钟之内大多数内皮细胞松散地附着在包被的表面上。在其它实施例中,经过 15 分钟后细胞充分地附着,因此可以清洗所述表面以去除未粘附的造血细胞部分,例如,使用介质清洗 3 次。清洗下来的造血细胞悬浮液可以使用低温防护剂进行冷冻处理。与此同时,将所述包被表面上留下的粘附的内皮细胞部分重新浸于含有冷冻保护剂的介质中,用于冷冻和保存。在另一个实施例中,所述包被表面上留下的粘附的内皮细胞部分用温和的胰蛋白酶处理从而使所述细胞与所述包被物分离,由此所述细胞可被进一步培养于合适的内皮细胞培养基中,用于扩大培养以及内皮细胞的扩增。

[0048] 在使用无菌条件下的针和导管系统直接收集血液来获得脐带血的情况下,本发明还提供能够在患者床边进行的细胞分离程序。在一个实施例中,这种临床分离程序采用从导管直接排入到所述无菌的预包被的分离容器中进行,然后孵育收集的脐带血并将造血部分清洗至新的未包被的容器中。在一个实施例中,本发明提供用于直接冷冻和保存的与封闭收集系统相连的双容器。在一个优选的实施例中,本发明消除了实验室环境下培养或处理细胞的需要。

[0049] 还提供的是用于扩增、重组和分化所述分离的细胞和细胞部分的方法,以及它们的用途的方法,例如,用于细胞和组织再生、再生和个性医学、疾病治疗以及其它过程。

[0050] 还提供的是使脐带血样品的用途最优化的方法。在一些实施例中,这种方法使医学相关的细胞部分组分的用途以其它方式不可用。在一个实施例中,这种方法和细胞成分有利于提高已经建立的脐带血供体库的价值,通过允许双重用途:(1) 所述细胞用于患者造血重建的用途,以及(2) 脐带血中存在的其它细胞的再生医学目的的用途。

C. 用于脐带血收集和细胞分离的装置

[0051] 本发明还涉及采用上述方法的主要工作方式从脐带血材料中有效收集和分离细胞成分的装置。一个这方面的实施例包含无菌双容器封闭收集系统,对其中一个容器进行预包被,用于内皮细胞附着。当脐带血样品准备好处理时,即已经新收集到单独的收集容器中,或已经为祖细胞富集而进行处理并置于单独的临时储存容器中,或已经在储存容器中新解冻,将所述脐带血或富集的细胞转移至具有内皮细胞粘附包被的容器中(容器1)。可以通过直接将容器1连接在包含血液或细胞的收集/储存容器上,经由针以及从该容器出来的导管并进入的到包被的容器1中的导管来完成脐带血材料向容器1的转移。转移至容器1后,细胞在适当的温度下孵育合适的时间,所述温度和时间取决于扁平面上的包被物中所使用的粘附因子。细胞粘附孵育步骤之后,将悬浮液中的细胞未粘附部分转移至通过无菌管连接到包被袋的造血细胞收集容器中(容器2)。随后,储存在一个或多个连接着容器1的独立密封储存室中的清洗介质可以在三个单独清洗步骤(每次25-100mL)中被转移至容器1内。在一个实施例中,将活塞阀或类似结构置于介质室和容器之间的管道上。然后通过封闭的管道将含有造血细胞悬浮液的清洗介质转移至造血细胞收集容器中(容器2)。此外,可以在这种结构中采用活塞阀或其等效物。转移后,将容器1中的粘附部分重新浸入介质中并打开含有冷冻保护剂的附加室,释放适量的冷冻保护剂,直接冷冻粘附细胞。容器2也具有附加的冷冻保护剂缓冲室,因此造血细胞悬浮液可直接被冷冻。

[0052] 可以使用具有针和导管的预包被容器1从脐带中直接收集脐带血。这使得分离能够在收集之后直接进行。发生如上所述的造血细胞和内皮细胞的分离。所述系统允许在封闭系统中快速简单处理脐带血各部分,能够在临床无菌进行。

D. 来自脐带血的细胞的分离、培养、继代培养、重组和分化

[0053] 还提供的是用于脐带血细胞分离的方法,例如,使用本发明提供的方法和装置收集脐带血。

[0054] 可以对细胞计数来确定产量。在一个实施例中,所述程序产生至少是或大约是10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%的存活细胞。在优选的实施例中,所述程序产生至少是或大约是50%的存活细胞。

[0055] 在一些实施例中,培养分离的细胞,例如,以此扩增细胞。在一个实施例中,将细胞转移至具有适合所需细胞类型的生长培养基的培养容器中,例如烧瓶。在一个实施例中,使用成纤维细胞生长培养基。在一个实施例中,使用间充质干细胞生长培养基。在一个实施例中,使用内皮细胞生长培养基。在一个实施例中,使用小气道上皮细胞生长培养基。在没有任何理论限制时,在具体的实施例中可以使用其它细胞培养基。在一个实施例中,将分离的细胞在培养基中培养至少或大约一周、两周、三周、四周或五周。在某些实施例中,将分离的细胞在培养基中培养至少或大约11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26

, 27, 28, 29 或 30 天。可以使用流式细胞术、显微镜或其它已知的程序来评估培养细胞的状态和表型。

[0056] 在一个实施例中,繁殖所述细胞,例如继代培养。在一个实施例中,繁殖所述细胞至少或大约 10, 20, 30, 40, 50, 60 或 70 天,或 30 次群体倍增,或直到细胞已经扩增至少 10, 000, 100, 000, 200, 000, 300, 000, 400, 000, 500, 000, 或 1 百万, 2 百万或 3 百万倍,或直到细胞已经到达衰老期或刚好在细胞到达衰老期之前。

[0057] 在一个实施例中,通过在低氧条件下继代培养来维持 Oct-4 的高表达,相当于子宫内的低氧张力状态。

[0058] 还提供的是用于重组和分化细胞的方法,例如,用于产生所需类型的细胞或组织,例如用于再生治疗应用。在某些实施例中,细胞被重组至分化程度低的时期,例如多能或多潜能时期。重组方法,例如多能干细胞 (iPSC) 的诱导是众所周知的,可以用来还原细胞的分化,从而产生多能或多潜能细胞。在 Takahashi and Yamanaka, 2006, Cell 126(4):663-676, and in Yu et al., 2007, Science 318(5858):1917-1920. 中描述了典型的方法。

[0059] 在一些实施例中,将细胞,例如多能或多潜能细胞,分化成所需要的细胞或组织类型。在一个实施例中,在用于产生所需细胞类型或组织类型,例如内胚层、外胚层或中胚层衍生的组织,例如肝细胞或组织、内分泌组织、肺细胞或组织、血细胞、骨髓细胞、神经元细胞、星形胶质细胞、心脏细胞或组织,例如心肌细胞、视觉细胞或组织、神经细胞或组织、脑细胞或组织、肌肉细胞或组织、皮肤细胞或组织、胰细胞或组织,例如 β -细胞、成脂细胞、骨软骨原细胞、骨原细胞及神经细胞,的条件下培养细胞。在某些实施例中,所述细胞在其它细胞类型中分化成神经元、肝细胞、胰岛细胞、肾细胞和造血细胞。在一些实施例中,所述细胞分化为代表所有三个胚层的细胞类型。在一些实施例中,所述细胞在重组后保留着跨胚层的高效分化能力。一方面,所述细胞与人类胚胎干细胞或细胞系相比具有更高的造血能力。一个所述人类胚胎干细胞系为 H9。另一方面,所述细胞具有将近 100% 的神经元细胞分化能力。在一些实施例中,所述细胞分化为成骨细胞或脂肪细胞。

[0060] 分化方法众所周知。许多已知方法中的任何一个可以结合本实施例使用,例如,颁发给 Haas 的美国专利号 7,596,385、美国专利公布号 US 2005/0054093 和 US2005/0042595,以及颁发给 Atala 等人的美国专利公布号 US 2005/0124003 和国际专利申请号 WO 03/042405 中所述的方法,以及“Teratocarcinomas and embryonic stem cells:A practical approach,”E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987; “Guide to Techniques in Mouse Development,”P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993; “Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro, M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993; “Properties and uses of Embryonic Stem Cells Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy,”P. D. Rathjen et al., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998; 和“Stem cell biology,”L. M. Reid, Curr. Opinion Cell Biol. 2:121, 1990. 中所述的方法。

[0061] 分化诱导剂、熟化剂和熟化因子用于特定细胞类型的分化也是众所周知的,例如颁发给 Rambhatla 等人的美国专利号 6,506,574 中所述的试剂,例如,正丁酸用于分化为肝细胞,以及其它的熟化剂、熟化因子、生长因子、肽类激素、细胞活素、配体受体复合物、皮质

类固醇、视黄酸和有机溶剂,例如 DMSO、伴随 cAMP 增强剂的糖皮质激素、甲基异丁基黄嘌呤和消炎痛。分化剂的选择将取决于所需细胞或组织类型。

[0062] 这里提供的细胞、成分和组织,例如分化的细胞有利于疾病的治疗,例如,但不限于,不育症、肝硬化、胰腺炎、糖尿病、帕金森氏症、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、骨关节炎、类风湿性关节炎、癌症,例如白血病,例如急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、急性混合型白血病以及急性未分化性白血病;慢性髓细胞性白血病、慢性淋巴细胞白血病、幼年型慢性粒细胞白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、淋巴瘤例如非何杰金淋巴瘤、何杰金病、多发性骨髓瘤、浆细胞白血病、乳癌、尤文肉瘤、成神经细胞瘤、肾细胞癌、遗传性血液病、脑失调例如阿尔茨海默氏病、难治性贫血、难治性贫血伴环状铁幼粒红细胞、难治性贫血伴原始细胞增多、难治性贫血伴原始细胞增多转化型、再生障碍性贫血、范科尼贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、纯红细胞再生障碍、急性型骨髓纤维化、特发性骨髓外化生、骨髓纤维变性、真性红细胞增多症、特发性血小板增多症、白细胞异常色素减退综合征、慢性肉芽肿性疾病、中性粒细胞肌动蛋白缺乏症、网状组织发育不全、黏多糖贮积症、赫尔勒综合征、黏多糖贮积症 IS 型、Hunter 综合征、黏多糖贮积症 III 型、黏多糖贮积症 IV 型、黏多糖贮积症 VI 型、黏多糖贮积症 VII 型、 β -葡萄糖醛酸酶缺乏、脑白质肾上腺素萎缩症、粘脂沉积症 II、克拉伯病、高歇病、尼曼-皮克病、酸性脂酶缺乏症、异染性脑白质病变、家族性噬红细胞性淋巴组织细胞增多症、组织细胞增生症 X、噬红细胞作用、遗传性红细胞异常、乙型地中海型贫血、镰刀形红细胞贫血病、遗传性免疫系统疾病、共济失调毛细血管扩张、婴儿型遗传性粒细胞缺乏症、白细胞粘附缺陷、迪格奥尔格综合征、少淋巴细胞综合征、Omenn 综合征、重症联合免疫缺陷、常见变异型免疫缺陷病、威斯科特-奥尔德里奇综合征、X 连锁淋巴增生性障碍、其它遗传性疾病、HGPRT 缺损、软骨毛发发育不良、血小板无力症、骨骼石化症、遗传性血小板异常、无巨核细胞、先天性血小板减少症、浆细胞病以及特发性巨球蛋白血症。

[0063] 在某些实施例中,所述细胞用于自体同源的 / 异源的组织再生 / 代替治疗,包括角膜上皮缺损、软骨修复、面部磨削术、烧伤的治疗和皮肤外伤、黏膜、鼓膜、肠道内膜和神经结构的伤口修复。例如,心肌性能的增强可以通过将细胞移植入损坏的心肌内实现(细胞心肌成形术(CCM)),从而增强心肌性能并治疗末期心脏病。所述细胞还可以用于修复许多中枢神经系统紊乱(CNS),例如, Cao et al., 2002, "Stem cell repair of central nervous system injury," J Neuroscience Res 68:501-510. 中所描述的。所述细胞还可以用于损伤组织的重建治疗,通过手术植入用于组织再生(为此产生分化的细胞)的细胞层、解聚的细胞,以及包埋在载体中的细胞。所述细胞还可以用于组织工程构建。这样的构建包含形成适合细胞生长的骨架的生物相容性聚合物。所述骨架可以塑造成加热线、容器(管状的)、平面结构或任何其它合适的形状。这样的构建众所周知,例如 W002/035992, 和美国专利号 6, 479, 064, 6, 461, 628 中描述的那些。

[0064] 要意识到的是,为了清楚的目的,以上表述已经描述了本发明关于细胞收集装置的不同功能单元和 / 或组件的实施例。然而,显而易见的是不同功能单元、组件或模块之间的任何合适的功能分配可以在不损坏本发明的情况下使用。例如,由不同组件完成的功能可以由同一组件完成。因此,具体的功能单元仅仅被视为提供所述功能的合适方法的参考,而不是严格的逻辑或物理结构或组织的指示。

[0065] 本文使用的术语和短语,以及它们的变形,除非另有明文规定,应该被理解为开放

式结束,而非限制。例如前面所述的:术语“包括”应该被理解为“包括,而非限制”等等;术语“例子”用于提供讨论项目的典型实例,并非其详尽的或限制性的列表。以及诸如“常规的”、“传统的”、“通常的”、“标准的”、“已知的”和具有相似含义的术语之类的形容词,不应该被理解为将所述项目限制为指定期间或

可作为指定时间的项目。但是这些术语应该被理解为包含常规的、传统的、通常的或标准的现在或将来任何时间已知的可用技术。同样的,用连词“和”连接的项目组不应该被理解为要求这些项目中的每个和每一个都存在于分组中,而应该被理解为“和/或”,除非另有明文规定。类似地,用连词“或”连接的项目组不应该被理解为要求所述组内的相互排他性,而应该被理解为“和/或”,除非另有明文规定。此外,虽然本公开的项目、元件或成分可能以单数形式表述或要求,但是复数形式也考虑在其范围之内,除非明确表述限制为单数形式。例如,“一种”装置包括一种或多种装置。在某些情况下出现诸如“一个或多个”、“至少”、“但不限于”或其它类似短语的扩展词语和短语,不应该被理解为在这些扩展短语可能不出现的情况下意指或要求范围更窄的情况。

[0066] 虽然上面已经描述了本发明的多个实施例,但是应该理解的是它们仅仅是以实例的方式呈现出来,而非限制的方式。同样地,各种图表可以描绘实例结构或本公开的其它构造,这是为了帮助理解可包含在本公开内的特征和功能。本公开不限于图表所示的实例结构或构造,而是可以使用各种替代结构和构造来实现。另外,虽然以上根据各种典型的实施例和实施方式描述了本公开,但应该理解的是,在一个或多个单独的实施例中描述的各种特征和功能的适用性不限于描述它们的特定实施例。相反地,它们可被单独或以某种组合的方式应用于一个或多个本公开的其它实施例中,无论这样的实施例是否被描述过,并且无论这些特征是否作为描述的实施例的组成部分而存在。因此,本公开的宽度和范围不应该受到任何上述典型实施例的限制。

实施例

[0067] 下述实施例旨在进一步描述和解释本发明的各个方面,但不以任何方式、模型或形式明确地或暗示地限制本发明的范围。

实施例 1:从新获得的脐带血中收集细胞

[0068] 新获得的脐带血被处理用于单核细胞或 CD34+ 细胞分离。在冰冻和液氮储存用于以后使用之前,从单核和 CD34+ 细胞群体中分离内皮祖细胞,用于单独的细胞扩增、冰冻、储存和重组目的。将所有的脐带血单核细胞,或磁珠分离的 CD34+ 造血干细胞和祖细胞,都平铺在用玻璃粘连蛋白、凝胶或 I 胶原蛋白包被的组织培养皿上。孵育大约 5-10 分钟使细胞附着后,用盐溶液或类似介质清洗三次,洗掉造血细胞部分(该部分包含脐带血中未粘附的细胞部分)。造血细胞部分经过 350RCF 离心处理得到细胞团,用于重悬于适当的用于后续冰冻和储存的冰冻介质中。

[0069] 然后将余下的附着的内皮祖细胞在 37℃ 温度下在可商购的内皮细胞培养基中培养,直到起始平铺细胞扩增后形成内皮细胞集落或达到平板融合。然后将内皮细胞部分冰冻并储存在液氮中,用于日后重组。如图 1 所示,新鲜脐带血细胞包含内皮细胞部分(CD45-CD34+CD31+)和造血细胞部分(CD45+)。所有细胞培养 10 天后,内皮细胞部分成为具有 CD34+CD31+ 粘附表型的大多数。新鲜脐带血还包含 CD133+ 和阴性细胞,及少量的表

达内皮细胞标记血管内皮细胞钙黏蛋白和血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2) 的细胞。内皮细胞培养 10 天后,表达血管内皮细胞钙黏蛋白和 VEGFR2 的内皮细胞比例显著提高。

[0070] 内皮细胞部分融化并平铺后,将细胞培养在凝胶或 I 型胶原蛋白包被的组织培养板上面的内皮细胞培养基中,直到 70 % 的平板融合。然后用重组因子 OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC 和 LIN28 的慢病毒载体转导细胞。所述细胞被重组为多能干细胞状态,通过体内畸胎瘤形成实验验证。将所述细胞移植入免疫缺陷小鼠体内,鉴定到三个胚层全部出现。还进行了多能标记的 Q-PCR 以确认从脐带血中分离的重组的内皮细胞的多能干细胞状态。然后可以使用合适的分化系统将多能干细胞分化为神经元细胞系和造血细胞系。

实施例 2 :从冰冻脐带血中分离细胞

[0071] 将分离自脐带血的单核细胞或 CD34+ 细胞的冰冻样品解冻并平铺于凝胶或 I 型胶原蛋白包被的组织培养皿上。孵育大约 5-10 分钟使细胞附着后,用盐溶液或类似介质清洗三次,洗掉造血细胞部分(该部分包含脐带血中未粘附的细胞部分)。造血细胞部分经过 350RCF 离心处理得到细胞团,用于重悬于适当的用于后续冰冻和储存的冰冻介质中。然后将余下的附着的内皮祖细胞在 37℃ 温度下在可商购的内皮细胞培养基中培养,直到起始平铺细胞扩增后形成内皮细胞集落或达到平板融合。然后将内皮细胞部分冰冻并储存在液氮中,用于日后重组。

实施例 3 :用于从脐带血中收集和分离细胞的装置

[0072] 本发明还涉及采用上述方法的主要工作方式从脐带血材料中有效收集和分离细胞成分的装置。一个这样的实施例包含无菌双容器封闭收集系统,对其中一个容器进行预包被,用于内皮细胞附着。当脐带血样品准备好处理时,即:已经新收集到单独的收集容器中,或已经为祖细胞富集而进行处理并置于单独的临时储存容器中,或已经在储存容器中新解冻,将所述脐带血或富集的细胞转移至具有内皮细胞粘附包被的容器中(容器 1)。可以通过直接将容器 1 连接在包含血液或细胞的收集/储存容器上,通过针以及从该容器出来并进入到包被容器 1 中的导管来完成脐带血材料向容器 1 的转移。转移至容器 1 后,细胞在适当的温度下孵育合适的时间,所述温度和时间取决于扁平面上的包被物中所使用的粘附因子。细胞粘附孵育步骤之后,将悬浮液中的未粘附细胞部分转移至通过无菌管与包被袋连接的造血细胞收集容器中(容器 2)。然后,使用位于介质室和容器 1 之间的管道上的活塞阀或类似结构,可以将储存在连接着容器 1 的独立密封储存室中的清洗介质在三个独立清洗步骤(每次 25-100mL)中转移至容器 1 内。然后通过封闭的也具有活塞阀或其它等效系统的管道将含有造血细胞悬浮液的清洗介质转移至造血细胞收集容器中(容器 2)。转移后,将容器 1 中的粘附部分重新浸入介质中并打开含有冷冻保护剂的附加室,释放适量的冷冻保护剂,直接冷冻粘附细胞。容器 2 也具有附加的冷冻保护剂缓冲室,因此造血细胞悬浮液可直接被冷冻。

[0073] 可以使用具有针和导管的预包被容器 1 从脐带中直接收集脐带血。这使得分离能够在收集之后直接进行。发生如上所述的造血细胞和内皮细胞的分离。所述系统允许在封闭系统中快速简单地处理脐带血各部分,能够在临床无菌条件下进行。

[0074] 本申请自始至终,参考了各种网站数据内容、出版物、专利申请和专利。(通过统一资源定位系统或 URL、万维网地址引用网站。) 本文通过引用将每个所述参考的公开内容全

部包含于此。

[0075] 本发明不限于本文公开的实施例范围,所述实施例旨在作为本发明个别方面的单一解释,任何功能等同的均在本发明范围内。除本文所描述的这些模型和方法之外,对本发明的模型和方法的各种修改,根据前面的描述和教学,对本领域技术人员将是显而易见的,同样地要落入本发明范围内。这些修改或其它实施例在背离了本发明的真实范围和精神的情况下不能得到实施。

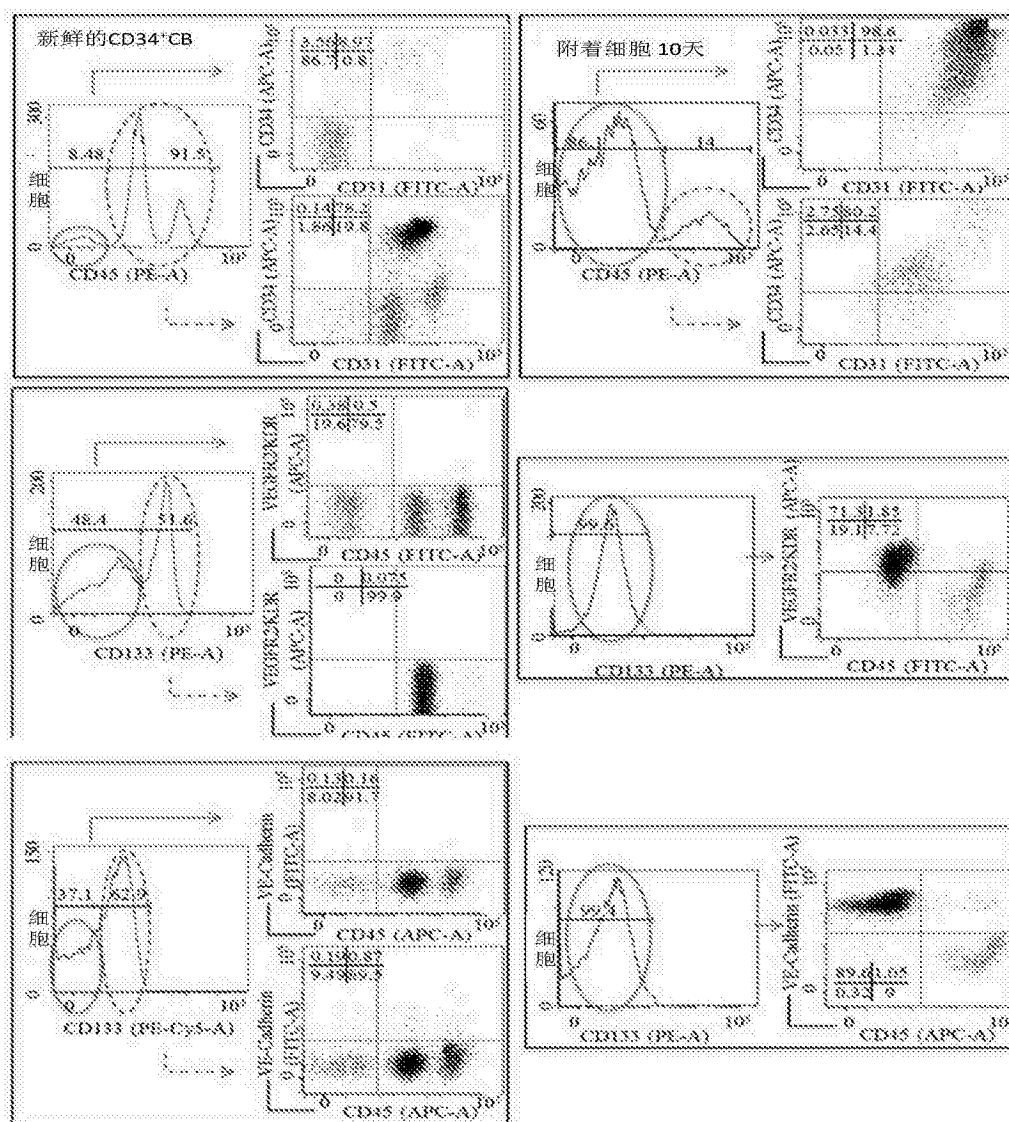


图 1