



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116745400 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 12

(21) 申请号 202180080915.6

(22) 申请日 2021.12.01

(30) 优先权数据

20211094.6 2020.12.01 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.06.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/083810 2021.12.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/117665 EN 2022.06.09

(71) 申请人 库提斯股份公司

地址 瑞士施利伦格拉本街11号

(72) 发明人 文森特·罗姆福德

杰奎因·伍迪内斯

克劳德·霍恩斯泰因

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有

限公司 44245

专利代理师 刘新容 陈燕娟

(51) Int.Cl.

C12M 1/00 (2006.01)

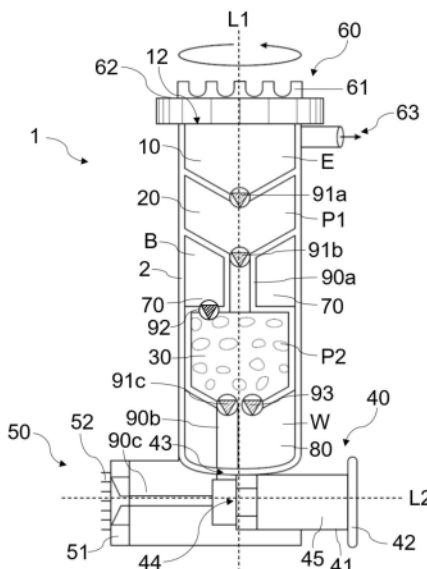
权利要求书3页 说明书15页 附图4页

(54) 发明名称

用于制备细胞悬浮液的装置和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于制备细胞悬浮液的装置(1),该装置包括:酶储器(10);第一纯化隔室(20),该第一纯化隔室用于接收第一纯化材料(P1),其中该第一纯化隔室(20)与该酶储器(10)流体连接或能够与该酶储器(10)流体连接;以及注射器(40),其中该装置(1)包括从酶储器(10)经由第一纯化隔室(20)到注射器入口(43)的流动路径。本发明还涉及一种用于制备细胞悬浮液的方法,该方法包括在酶储器(10)中提供组织样品(T)和酶溶液(E),在酶溶液(E)中温育组织样品(T)以消化组织样品(T)的组分,从而获得细胞悬浮液,使细胞悬浮液从酶储器(10)通过第一纯化隔室(20)进入筒隔室(45),以及从注射器出口(44)分配细胞悬浮液。



1. 一种用于制备细胞悬浮液的装置(1), 所述装置包括:

a. 用于容纳酶溶液(E)的酶储器(10), 所述酶溶液(E)能够消化组织样品(T)的组分以获得细胞悬浮液,

b. 用于接收第一纯化材料(P1)的第一纯化隔室(20), 所述第一纯化材料能够结合和/或保留所述细胞悬浮液的至少一种组分, 其中所述第一纯化隔室(20)与所述酶储器(10)流体连接或能够与所述酶储器(10)流体连接,

c. 注射器(40), 所述注射器包括限定筒隔室(45)的筒(41)和可移动地布置在所述筒隔室(45)中的活塞(42), 其中所述注射器(40)包括连接到所述筒隔室(45)的注射器入口(43), 并且其中所述注射器(40)包括用于从所述筒隔室(45)分配所述细胞悬浮液的注射器出口(44),

d. 其中所述装置(1)包括从所述酶储器(10)经由所述第一纯化隔室(20)到所述注射器入口(43)的流动路径。

2. 根据权利要求1所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括至少一个阀(91), 所述至少一个阀(91)布置在所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径中, 特别地, 其中所述至少一个阀(91)被配置成允许在第一流动方向上从所述酶储器(10)通过所述第一纯化隔室(20)到所述注射器入口(43)的流动, 并且其中所述至少一个阀(91)被配置成阻断在与所述第一流动方向相反的第二流动方向上的流动。

3. 根据权利要求1或2所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括用于接收第二纯化材料(P2)的第二纯化隔室(30), 所述第二纯化材料(P2)能够结合和/或保留所述细胞悬浮液的至少一种组分, 其中所述第二纯化隔室(30)布置在所述第一纯化隔室(20)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径中。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括用于储存缓冲液(B)的缓冲液储器(70), 其中所述缓冲液储器(70)与所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径流体连接或能够与所述流动路径流体连接, 以将所述缓冲液(B)与所述细胞悬浮液混合, 其中特别地, 所述装置(1)包括缓冲液阀(92), 所述缓冲液阀(92)将所述缓冲液储器(70)连接到所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括废料储器(80), 所述废料储器(80)与所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径流体连接或能够与所述流动路径流体连接, 其中特别地, 所述装置(1)包括废料阀(93), 所述废料阀(93)将所述废料储器(80)连接到所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括至少一个磁体(100), 其邻近所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径布置, 其中所述至少一个磁体(100)被配置成结合包括在所述第一纯化材料(P1)和/或所述第二纯化材料(P2)中的磁性颗粒(M)。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括混合室(113)和混合装置(114), 所述混合室(113)布置在所述酶储器(10)和所述注射器入口(43)之间的所述流动路径中, 并且所述混合装置(114)被配置成将所述细胞悬浮液与所述第一

纯化材料(P1)和/或所述第二纯化材料(P2)混合。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括用于获得组织样品(T)的手术工具(60), 其中所述手术工具(60)邻近所述酶储器(10)的开口(12)布置, 特别地使得由所述手术工具(60)获得的所述组织样品(T)自动提供在所述酶储器(10)中。

9. 根据权利要求8所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括布置在所述酶储器(10)中的泵入口(63), 其中所述泵入口(63)被配置成连接到真空泵以在所述酶储器(10)中生成真空, 使得如果受试者的部分皮肤被放置在所述酶储器(10)的所述开口(12)上, 则所述部分皮肤通过所述真空被抽吸到所述酶储器(10)中, 并且其中所述手术工具(60)包括至少一个可移动的刀片组件(61), 所述刀片组件(61)被配置成切除所述部分皮肤, 从而获得所述组织样品(T), 其中特别地, 所述组织样品(T)通过所述真空被提供在所述酶储器(10)中。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的装置(1), 其特征在于, 所述装置(1)包括注射器喷嘴(50), 所述注射器喷嘴(50)包括多个中空针(52), 其中所述注射器喷嘴(50)连接到所述注射器出口(44), 使得所述细胞悬浮液能够通过所述针(52)从所述筒隔室(45)分配。

11. 根据权利要求10所述的装置, 其特征在于, 所述针中的每一者具有100 μm 至500 μm , 特别是100 μm 至200 μm 的长度。

12. 一种用于制备细胞悬浮液的方法, 所述方法包括以下步骤:

- 在根据权利要求1至11中任一项所述的装置(1)的所述酶储器(10)中提供组织样品(T),
- 在所述酶储器(10)中提供酶溶液(E),
- 在所述酶溶液(E)中温育所述组织样品(T)以消化所述组织样品(T)的组分, 从而生成细胞悬浮液,
- 在所述第一纯化隔室(20)中提供所述第一纯化材料(P1),
- 使来自所述酶储器(10)的所述细胞悬浮液穿过所述第一纯化隔室(20)进入所述筒隔室(45)中, 使得所述细胞悬浮液的至少一种组分被所述第一纯化材料(P1)结合或保留, 特别是通过移动所述筒隔室(45)中的活塞(42), 以及
- 从所述注射器出口(44)分配所述细胞悬浮液, 特别是通过移动所述筒隔室(45)中的所述活塞(42)。

13. 根据权利要求12的方法, 其中所述第一纯化材料(P1)是能够选择性结合至少一种细胞类型, 特别是角质形成细胞或黑素细胞的亲和材料, 其中更特别地, 所述亲和材料包括选择性结合至角质形成细胞或黑素细胞的抗体, 其中更特别地, 所述第一纯化材料(P1)包括能够抑制酶活性, 特别是包括在所述酶溶液(E)中的酶的酶活性的抑制剂。

14. 根据权利要求12或13所述的方法, 其中在第二纯化储器(20)中提供所述第二纯化材料(P2), 并且其中在使所述细胞悬浮液通过所述第一纯化隔室(20)之后并且在从所述注射器出口(44)分配所述细胞悬浮液之前, 使所述细胞悬浮液通过所述第二纯化隔室(30)进入所述筒隔室(45), 使得所述细胞悬浮液的至少一种组分被所述第二纯化材料(P2)结合或保留, 特别是通过移动所述筒隔室(45)中的所述活塞(42), 其中特别地, 所述第二纯化材料(P2)是能够根据其分子量和/或流体动力学半径分离所述细胞悬浮液的组分的尺寸排阻材

料。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述分配的细胞悬浮液包括黑素细胞,特别是其中所述分配的细胞悬浮液不含角质形成细胞。

用于制备细胞悬浮液的装置和方法

[0001] 本发明涉及一种用于制备细胞悬浮液的装置和方法,具体地用于通过将所制备的细胞悬浮液注射到受皮肤病状影响的皮肤区域中来治疗皮肤病状,例如白癜风、色素脱失或烧伤疤痕。特别地,该装置适于从受试者制备细胞悬浮液并现场注射到同一受试者的皮肤中(自体细胞转移),具体地在其间不培养细胞悬浮液的细胞。

[0002] 可以根据现有技术的方法,通过在皮肤的特定层中注射某些细胞类型来治疗一些皮肤病状。

[0003] 例如,白癜风是一种与皮肤区域的色素脱失相关的疾病,据信其是由针对产生黑色素的黑色素细胞的自身免疫应答引起的。已经表明,白癜风可以通过将黑色素细胞悬浮液微针注射到受影响区域的表皮中来治疗,这最终导致再色素沉着(Regazzetti C,Alcor D,Chignon-Sicard B,Passeron T,《色素细胞与黑色素瘤研究(Pigment Cell Melanoma Res.)》29,481-483,2016;Lagrange S,Montaudie H,Fontas E,Bahadoran P,Lacour J-P,Passeron T:《英国皮肤病学杂志(British Journal of Dermatology)》180,1539-1540,2019)。

[0004] 为了治疗皮肤病状,例如白癜风、色素脱失和烧伤疤痕,非常需要从待治疗的同一患者获得注射的细胞悬浮液,即利用自体细胞转移。与同种异体转移相反,这具有不发生免疫应答、不存在排斥移植细胞的危险和不存在被病原体(例如像HIV这样的病毒)污染的危险的优点。

[0005] 在现有技术中已经描述了从皮肤样品制备用于自体细胞转移的细胞悬浮液的一些装置和方法。例如,在EP 1357922B1中已经公开了用于通过酶消化和随后的过滤进行半自动细胞制备的具有加热装置和过滤器单元的装置以及相应的制备方案。在EP 2970856B1中描述了基于机械细胞崩解的类似的进一步自动化装置和相应的方法。

[0006] 然而,特别地,这些装置和方法的缺点是获得的细胞混合物可能含有对于特定治疗不需要的细胞类型。另外,所得细胞混合物的组成取决于皮肤样品的类型和制备方案,因此并不总是已知的或可控制的,并且不总是可再现的,这可能导致治疗的不同成功。

[0007] 因此,本发明的目的是提供一种用于从皮肤样品制备用于自体转移的细胞悬浮液的装置和方法,考虑到现有技术的上述缺点,所述细胞悬浮液得到改进。

[0008] 这一目的通过独立权利要求1(装置)和12(方法)的主题来实现。本发明的实施方案在从属权利要求2至11和13至15中陈述并且在下文中描述。

[0009] 本发明的第一方面涉及一种用于制备细胞悬浮液的装置,其包括用于容纳酶溶液的酶储器,该酶溶液能够消化组织样品,特别是皮肤样品的组分以获得细胞悬浮液。该装置还包括用于接收第一纯化材料的第一纯化隔室,第一纯化材料能够结合和/或保留细胞悬浮液的至少一种组分,其中第一纯化隔室与酶储器流体连接或能够与酶储器流体连接。该装置还包括注射器,该注射器包括限定筒隔室的筒和可移动地布置在筒隔室中的活塞,其中该注射器包括连接到筒隔室的注射器入口,并且其中该注射器包括用于从筒隔室分配细胞悬浮液的注射器出口。该装置包括从酶储器经由第一纯化隔室到注射器入口的流动路径,使得细胞悬浮液、细胞悬浮液的组分、缓冲溶液等可以从酶储器经由第一纯化隔室流向

注射器入口。

[0010] 特别地,可以通过与注射器出口联接的针或类似装置将细胞注射到待治疗的皮肤区域中。

[0011] 注射器的筒隔室可以刚性地或柔性地联接(例如,通过柔性管)到装置的流动路径,特别是为了允许更好的操作和便于不同身体部位的可接近性。

[0012] 由于第一纯化材料,可能获得含有感兴趣的细胞类型的纯化的细胞悬浮液,其中不需要的细胞和其它材料原位至少部分地、特别是基本上被除去,用于立即进行自体细胞转移,特别是不需要在采集组织样品和注射细胞悬浮液之间培养细胞。

[0013] 此外,用于注射细胞悬浮液的注射器直接联接到细胞制备装置的流动路径,这消除了转移步骤的需要。另外,根据本发明的一些实施方案,注射器可用于在从酶储器到注射器入口的流动路径中生成真空,以简单地通过拉动注射器的活塞使细胞悬浮液移动通过不同的储器和隔室。作为选择,例如,可设置该装置,使得细胞悬浮液、细胞悬浮液的组分、缓冲溶液等由于重力而流过流动路径,即在制备细胞悬浮液期间可将酶储器布置在注射器入口上方。

[0014] 在某些实施方案中,该装置包括布置在注射器入口和酶储器之间的流动路径中的至少一个阀。

[0015] 在某些实施方案中,该装置包括布置在酶储器下游的流动路径中的过滤器,其中过滤器被配置成保留细胞聚集体,特别地其中过滤器被配置成仅允许单个细胞进入第一纯化隔室。

[0016] 在某些实施方案中,该至少一个阀是可切换阀,该可切换阀被配置成在允许流过该阀的打开状态和阻断流过该阀的关闭状态之间切换。这种可切换阀可以手动或自动致动以在打开状态和关闭状态之间切换。通过可切换阀,可能在制备细胞悬浮液期间在期望的时间选择性地打开和关闭流动路径的不同部分。

[0017] 在某些实施方案中,该至少一个阀被配置成允许在第一流动方向上从酶储器通过第一纯化隔室到筒隔室的流动,并且该至少一个阀被配置成阻断在与第一流动方向相反的第二流动方向上的流动。换句话说,该至少一个阀是根据该实施方案的止回阀。这一特征有利地防止了细胞悬浮液的不希望的回流,并因此提高了装置的性能。

[0018] 在某些实施方案中,第一纯化材料是能够选择性结合至少一种细胞类型,特别是角质形成细胞或黑素细胞的亲和基质。

[0019] 在某些实施方案中,第一纯化材料包括选择性结合至角质形成细胞或黑素细胞的亲和分子,特别是抗体。

[0020] 在某些实施方案中,第一纯化材料包括亲和分子,特别是抗体,其结合角质形成细胞但不结合黑素细胞或其结合黑素细胞但不结合角质形成细胞。

[0021] 在某些实施方案中,第一纯化材料包括选择性结合间充质干细胞或毛囊细胞的亲和分子,特别是抗体。

[0022] 这种亲和基质允许选择与特定细胞类型结合的亲和分子,该亲和分子将从细胞悬浮液中除去或与不需要的组分分离,随后从亲和分子中洗脱以生成纯化的细胞悬浮液,从而改善将被注射到靶位点的最终细胞悬浮液的质量。

[0023] 在某些实施方案中,第一纯化材料包括抑制剂,其能够抑制酶活性,特别是包括在

装置的酶储器中提供的酶溶液中的酶的酶活性。

[0024] 这防止了通过不希望的酶消化,例如表面蛋白的酶消化,对细胞悬浮液的细胞造成损害,从而提高了细胞悬浮液的质量。

[0025] 在某些实施方案中,该装置包括用于接收能够结合和/或保留细胞悬浮液的至少一种组分的第二纯化材料的第二纯化隔室,特别是其中第二纯化隔室布置在第一纯化隔室和注射器入口之间的流动路径中。

[0026] 第二纯化隔室使得制备方法更加通用,因为其允许额外的纯化步骤。特别地,通过第二纯化组分,可能从悬浮液中除去第二不需要的细胞类型(例如在亲和基质的情况下)或除去不需要的小分子(例如在尺寸排阻材料的情况下),如果注射到目标皮肤部位,这些可能是有问题的。因此,进一步提高了悬浮液的质量。

[0027] 在某些实施方案中,第二纯化材料是能够根据其分子量和/或流体动力学半径分离细胞悬浮液的组分的尺寸排阻材料。

[0028] 在某些实施方案中,该装置包括用于储存缓冲液的缓冲液储器,其中缓冲液储器与酶储器和注射器入口之间的流动路径流体连接或能够与该流动路径流体连接。

[0029] 在某些实施方案中,该装置包括将缓冲液储器连接到第一纯化隔室和第二纯化隔室之间的流动路径的三通缓冲液阀。

[0030] 在某些实施方案中,该装置包括废料储器,其与酶储器和注射器入口之间的流动路径流体连接或能够与该流动路径流体连接。特别地,废料储器与第二纯化隔室和筒隔室之间的流动路径流体连接或能够与该流动路径流体连接。

[0031] 在某些实施方案中,该装置包括废料阀,特别是三通废料阀,其将废料储器连接到酶储器和注射器入口之间的流动路径。

[0032] 在某些实施方案中,该装置包括至少一个磁体,其邻近酶储器和注射器入口之间的流动路径布置,其中至少一个磁体被配置成结合包括在第一纯化材料和/或第二纯化材料中的磁性颗粒。特别地,该至少一个磁体布置在第一纯化隔室或第二纯化隔室中。特别地,该至少一个磁体邻近形成酶储器和注射器入口之间的流动路径的至少一部分的导管布置,其中该至少一个磁体和该导管相对于彼此布置,使得通过该至少一个磁体在该导管中提供磁场。

[0033] 通过由至少一个磁体提供的磁场,与第一纯化材料的磁性颗粒结合的感兴趣的物种可以被保留,并且特别地富集在至少一个磁体附近。随后,可以通过从磁性颗粒中除去感兴趣的物种(例如,在抗体偶联的磁性颗粒的情况下,通过改变离子强度或pH以从与磁性颗粒偶联的亲分子,特别是抗体中释放感兴趣的物种),或者通过改变至少一个磁体的磁场,来释放磁性颗粒,使得具有结合物种的磁性颗粒被洗脱。作为选择,可以选择磁性颗粒(特别是与颗粒偶联的亲分子),使得初始细胞悬浮液中不需要的组分,例如要从细胞悬浮液中除去的细胞,与磁性颗粒结合。在这种情况下,沿着含有不与磁性颗粒结合的感兴趣细胞的磁体通过的流动可用于生成最终的细胞悬浮液,而与磁性颗粒结合的级分可以例如被丢弃。

[0034] 在某些实施方案中,至少一个磁体包括被配置成相对于导管移动的可切换电磁体或永磁体。这两种机制都可用于改变强度或关闭磁场并从至少一个磁体中释放磁性颗粒。

[0035] 在某些实施方案中,该装置包括混合室和混合装置,该混合室布置在酶储器和注

射器入口之间的流动路径中,并且该混合装置被配置成在混合室中将细胞悬浮液与第一纯化材料和/或第二纯化材料混合。

[0036] 在某些实施方案中,该混合室布置在酶储器与第一纯化隔室之间的流动路径中。在某些实施方案中,该混合室布置在第一纯化隔室与第二纯化隔室之间的流动路径中。在某些实施方案中,该混合室布置在第一纯化隔室与注射器入口之间的流动路径中。在某些实施方案中,该混合室布置在第二纯化隔室与注射器入口之间的流动路径中。

[0037] 在某些实施方案中,该混合装置包括至少一个混合叶片,该混合叶片连接到沿着第一纵向轴线延伸的杆,该装置特别是该装置的主体沿着第一纵向轴线延伸,其中该至少一个混合叶片从该杆沿着相对于该第一纵向轴线的径向方向延伸,使得当该杆围绕该纵向轴线旋转时,该至少一个混合叶片可相对于该杆在圆周方向上旋转。具体地,该杆的一端连接到布置在该装置外部的旋转致动器上,其中旋转致动器被配置成当该旋转致动器围绕该第一纵向轴线手动旋转时使该杆围绕该第一纵向轴线旋转。作为选择,特别地,该杆可通过马达旋转,例如通过在该转子的一端处的联轴器旋转,该联轴器可连接到马达轴。

[0038] 在某些实施方案中,该装置沿着第一纵向轴线延伸,其中该装置包括沿着第一纵向轴线布置的多个层,其中相邻的层被垂直分隔器分开,其中每个层形成至少一个隔室,其中特别地,酶储器、第一纯化隔室、第二纯化隔室、至少一个另外的纯化隔室、混合室、缓冲液储器和/或废料储器由所述隔室之一形成。

[0039] 在某些实施方案中,该装置还包括至少一个水平分隔器,该水平分隔器将在所述层之一内形成的隔室分隔成垂直于第一纵向轴线的至少两个子隔室,其中特别地,酶储器、第一纯化隔室、第二纯化隔室、至少一个另外的纯化隔室、混合室、缓冲液储器和/或废料储器由所述子隔室之一形成。

[0040] 在某些实施方案中,该装置包括用于获得组织样品,特别是皮肤样品的手术工具,其中手术工具邻近酶储器的开口布置,其中开口将酶储器连接到装置的外部,特别地使得由手术工具获得的组织样品自动提供在酶储器中。

[0041] 所附接的手术工具的优点在于实现了独立的装置,其允许在没有任何附加部件的情况下用单个设备执行自体细胞转移的所有步骤。

[0042] 在某些实施方案中,该装置包括布置在酶储器中的泵入口,其中泵入口被配置成连接到真空泵以在酶储器中生成真空,使得如果受试者的部分皮肤被放置在酶储器的开口上,则该部分皮肤通过真空被抽吸到酶储器中,并且其中手术工具包括至少一个可移动的,特别是可旋转的刀片组件,其被配置成切除该部分皮肤,从而获得组织样品。特别地,该装置被这样配置,使得该组织样品可以通过真空被提供在酶储器中。例如,真空可以由医院中提供的现有加压空气出口产生。

[0043] 在某些实施方案中,该装置包括用于将组织样品插入酶储器中的开口,特别是其中该装置包括用于封闭该开口的盖子。

[0044] 在某些实施方案中,该装置包括至少一个无菌过滤器,特别是孔隙大小为0.22 μm 或更小的无菌过滤器,其中该无菌过滤器被布置在通向外部的开口处,特别是将该流动路径连接到外部的开口处,其中特别地过滤器覆盖该开口。

[0045] 在某些实施方案中,该装置包括注射器喷嘴(injector),该注射器喷嘴包括多个中空针,特别是微针,其中注射器喷嘴连接到注射器出口,使得细胞悬浮液可通过针从筒隔

室分配。

[0046] 在某些实施方案中,针中的每一者具有100 μm 至500 μm ,特别是100 μm 至200 μm 的长度。

[0047] 在某些实施方案中,该装置是无菌的(即,灭菌的)和/或一次性的。

[0048] 在某些实施方案中,该装置包括至少第一部分和第二部分,其中第一部分是一次性的并且第二部分是非一次性的。

[0049] 本发明的第二方面涉及一种用于制备细胞悬浮液的方法,该方法包括以下步骤:在根据第一方面的装置的酶储器中提供组织样品,特别是皮肤样品;在酶储器中提供酶溶液,其中酶溶液能够消化组织样品的组分;在酶溶液中温育组织样品以消化组织样品的组分,从而获得细胞悬浮液;在第一纯化隔室中提供第一纯化材料,并且使来自酶储器的细胞悬浮液穿过第一纯化隔室进入筒隔室中,使得细胞悬浮液的至少一种组分被第一纯化材料结合或保留;以及从注射器出口分配细胞悬浮液。

[0050] 在某些实施方案中,第一纯化材料可以包括过滤材料,或者装置可以包括包含过滤材料的过滤器,特别是其中过滤材料能够保留细胞聚集体,更特别是使得仅获得单个细胞。

[0051] 在某些实施方案中,组织样品是活检,特别是全厚度活检或分裂厚度活检。在某些实施方案中,组织样品包括毛囊或毛发,特别是从人体的一部分采集的毛囊或毛发。在某些实施方案中,组织样品是表皮水疱。

[0052] 在某些实施方案中,包括在酶溶液中的至少一种酶在20至25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下是活性的。例如,具有这些特性的胰蛋白酶的工程化变体已经加以描述并且是可商购的。使用这种酶的优点在于整个自体细胞转移和制备过程可以在室温下进行而无需额外的加热装置。

[0053] 在某些实施方案中,通过移动筒隔室中的活塞以降低筒隔室中的压力,使细胞悬浮液从酶储器通过第一纯化隔室进入筒隔室。

[0054] 在某些实施方案中,通过重力,使细胞悬浮液从酶储器通过第一纯化隔室进入筒隔室。

[0055] 在某些实施方案中,通过移动筒隔室中的活塞以增加筒隔室中的压力,从注射器出口分配细胞悬浮液。

[0056] 在某些实施方案中,第一纯化材料和/或第二纯化材料是或包括能够选择性结合至少一种细胞类型,特别是角质形成细胞或黑素细胞的亲和材料,其中更特别地,亲和材料包括选择性结合至角质形成细胞或黑素细胞的抗体,其中特别地,第一纯化材料包括抑制剂,其能够抑制酶活性,特别是包括在酶溶液中的酶的酶活性。

[0057] 在某些实施方案中,第一纯化材料是能够选择性结合黑素细胞的亲和材料,其中第一纯化材料未结合至角质形成细胞。

[0058] 在某些实施方案中,第一纯化材料是能够选择性结合角质形成细胞的亲和材料,其中第一纯化材料未结合至黑素细胞。

[0059] 在某些实施方案中,在使细胞悬浮液通过第一纯化隔室之后并且在从注射器出口分配细胞悬浮液之前,在第二纯化隔室中提供第二纯化材料,并且使细胞悬浮液通过第二纯化隔室进入筒隔室,使得细胞悬浮液的至少一种组分被第二纯化材料结合或保留。

[0060] 在某些实施方案中,通过移动筒隔室中的活塞以降低筒隔室中的压力,使细胞悬

浮液从第一纯化隔室通过第二纯化隔室进入筒隔室。作为选择,细胞悬浮液在重力的驱动下从第一纯化隔室通过第二纯化隔室流入筒隔室。

[0061] 在某些实施方案中,第二纯化材料是能够根据其分子量和/或流体动力学半径分离细胞悬浮液的组分的尺寸排阻材料。

[0062] 在某些实施方案中,第一纯化材料和/或第二纯化材料包括磁性颗粒,特别是偶联到能够选择性结合细胞悬浮液中感兴趣的物种的亲材料的磁性颗粒。

[0063] 在某些实施方案中,将第一纯化材料和细胞悬浮液在混合室中混合,从而获得混合物,其中将混合物提供在第一纯化隔室或第二纯化隔室中,并且其中将至少一个磁体提供在第一纯化隔室或第二纯化隔室中,使得结合至磁性颗粒,特别是结合至偶联到磁性颗粒的亲分子的感兴趣的物种被至少一个磁体提供的磁场保留在第一纯化隔室或第二纯化隔室中。特别地,在第一纯化隔室或第二纯化隔室中提供洗涤缓冲液,以在通过至少一个磁体保留磁性颗粒之后对磁性颗粒进行洗涤。特别地,从磁性颗粒中除去结合的物种,特别是通过提供能够减弱磁性颗粒和结合的物种之间的相互作用(例如通过低pH或高离子强度)的洗脱缓冲液,或者通过减小由至少一个磁体作用在磁性颗粒上的磁场(例如通过移动永磁体或通过经电磁体控制电压)。

[0064] 特别地,将包括磁性颗粒的第一纯化材料储存在储存隔室中,其中将第一纯化材料或第二纯化材料提供在第一纯化隔室、第二纯化隔室或来自储存隔室的混合室中,以将第一纯化材料或第二纯化材料与细胞悬浮液混合。

[0065] 在某些实施方案中,分配的细胞悬浮液包括黑素细胞。在某些实施方案中,分配的细胞悬浮液富含黑素细胞或为纯的黑素细胞的悬浮液。

[0066] 在某些实施方案中,分配的细胞悬浮液包括间充质干细胞或毛囊细胞。

[0067] 在某些实施方案中,分配的细胞悬浮液包括减少量的角质形成细胞,其中特别地,分配的细胞溶液基本上或完全不含角质形成细胞。

[0068] 在某些实施方案中,在从注射器出口分配细胞悬浮液时,即通过连接到注射器出口的至少一个针将细胞悬浮液注射到受试者皮肤的靶位点。

[0069] 在某些实施方案中,在从注射器出口分配细胞悬浮液时,即通过包括连接到注射器出口的多个中空针,特别是微针的注射器喷嘴将细胞悬浮液注射到受试者皮肤的靶位点。

[0070] 在本文中,将单个可分离特征的替代方案设计为“实施方案”的情况下,应理解,此类替代方案可自由组合以形成本文所公开的本发明的离散实施方案。

[0071] 通过以下实施例和附图进一步说明本发明,从以下实施例和附图中可以得出进一步的实施方案和优点。这些实施例旨在说明本发明而非限制其范围。

[0072] 图1示出了根据本发明第一实施方案的用于制备细胞悬浮液的装置的示意图;

[0073] 图2示出了根据本发明第二实施方案的用于制备细胞悬浮液的装置的示意图;

[0074] 图3示出了根据本发明第三实施方案的用于制备细胞悬浮液的装置的示意图;

[0075] 图4描绘了代表性的流式细胞术图像,其示出了在加载到柱之前细胞混合物中角质形成细胞(CD117(-))和黑素细胞(CD117(+))的存在(图4A);含有未结合细胞的流过物(图4B),以及被柱磁性保留的洗脱细胞(图4C)。数字表示每种细胞类型相对于分析的细胞总数的相对丰度。

[0076] 图1示出了用于制备细胞悬浮液的装置1的示意性剖视图,其包括沿着第一纵向轴线L1延伸的主体2。装置1包括酶储器10、第一纯化隔室20和第二纯化隔室30,它们形成在主体2内部并且在图1中沿着第一纵向轴线L1从上到下布置。手术工具60附接到主体2。

[0077] 装置1还包括布置在主体2的底端上的注射器40,该注射器沿着垂直于第一纵向轴线L1的第二纵向轴线L2延伸。注射器40的注射器入口43与第二纯化隔室30流体连接。注射器40还包括连接到注射器喷嘴50的注射器出口44,特别是包括附接到支撑件51的多个针52(例如微针)。

[0078] 手术工具60包括可旋转刀片组件61,该可旋转刀片组件61包括相对于第一纵向轴线L1在圆周方向上布置的多个刀片。可旋转刀片组件61布置并固定到连接到主体2的实心底座62上。可旋转刀片组件61围绕通向装置1的酶储器10的开口12布置。用于连接真空泵的泵入口63从形成酶储器10的主体2的壁分支出来。

[0079] 为了制备组织样品T,可以将手术工具60放置在受试者的皮肤表面上,可以将真空泵连接到泵入口63,并且可以通过真空泵在酶储器10中生成真空,使得受试者的部分皮肤被部分地抽吸到装置1的酶储器10中。通过例如手动地或通过马达驱动,围绕纵向轴线L1旋转可旋转刀片组件61,可以切割该部分皮肤,从而生成微水疱形式的组织样品T,然后通过真空将其自动抽吸到酶储器10中。

[0080] 在酶储器10中提供组织样品T之前或之后,在酶储器10中提供酶溶液E以消化组织样品T的组分,例如细胞外基质的组分,以获得细胞悬浮液,特别是含有角质形成细胞和黑素细胞的细胞悬浮液。酶溶液E可以含有单一的酶或酶的混合物,例如胰蛋白酶或胰蛋白酶衍生物。为了获得基质组分的消化,装置1特别地在酶溶液E中的一种或多种酶具有活性的温度(例如,室温或37℃)下温育,并且特别地温育足以完全降解细胞外基质的组分并且获得不含这些不需要的组分的细胞悬浮液的时间。

[0081] 此后,将获得的细胞悬浮液从酶储器10移至第一纯化隔室20。

[0082] 为此,例如,在连接到第二纯化隔室30的注射器入口43打开并且朝向注射器喷嘴50的注射器出口44关闭的同时,例如通过拉动注射器40的活塞42,可以在装置的下游端提供真空。

[0083] 作为选择,可通过由真空泵生成的真空或通过在上游端,即开口12或泵入口63施加压力,将细胞悬浮液移至第一纯化隔室20。

[0084] 又作为选择,该装置可这样设置,使得细胞悬浮液在重力的驱动下流入第一纯化隔室20,即在酶储器10布置在第一纯化隔室20上方的情况下。

[0085] 可以在第一纯化隔室20的上游提供阀91a,例如止回阀或可切换阀,以允许在从酶储器10到第一纯化隔室20的方向上的流动,但阻断在相反方向上的流动(在止回阀的情况下),或者当切换到打开状态时允许从酶储器10到第一纯化隔室20的流动,但在关闭状态下阻断流动。

[0086] 第一纯化隔室20含有第一纯化材料P1,例如特异性结合至细胞悬浮液中的某些细胞类型如角质形成细胞或黑素细胞的亲和基质。为此,第一纯化材料P1可以以珠的形式提供,对某些细胞类型例如角质形成细胞或黑素细胞具有特异性的抗体与珠偶联。另外,第一纯化材料P1可以含有能够抑制包含在酶溶液E中的至少一种酶的抑制剂,以确保由酶溶液E完成的消化不会持续到不希望的程度。抑制剂可以固定在第一纯化材料P1例如抗体偶联的

珠上,或者可以以可溶形式提供。

[0087] 特别地,第一纯化材料P1的目的是从细胞悬浮液中除去某种细胞类型如角质形成细胞,以纯化细胞悬浮液。例如,如果组织样品T主要含有角质形成细胞和黑素细胞,则第一纯化材料P1的目的可以是完全从细胞悬浮液中除去角质形成细胞,但保持流过第一纯化材料P1的悬浮液中的黑素细胞。

[0088] 作为选择,第一纯化材料P1可以结合至某种感兴趣的第一细胞类型如黑素细胞,但可以不结合至第二细胞类型如角质形成细胞,其应该从最终的细胞悬浮液中除去。在这种情况下,可以丢弃第一纯化材料P1的流过物,并且可以在随后的步骤中从第一纯化材料P1洗脱结合的感兴趣的细胞,例如通过将合适的洗脱缓冲液应用于第一纯化材料P1。

[0089] 特别地,这两种方法都可用于获得纯的黑素细胞悬浮液或富含黑素细胞的悬浮液。

[0090] 根据本发明方法的另一任选步骤,部分纯化的悬浮液经由另一阀91b和导管90a移动到含有第二纯化材料P2的第二纯化隔室30。

[0091] 类似于上述将细胞悬浮液移动到第一纯化隔室20,这可以通过在第二纯化隔室30的下游提供真空,例如通过拉动注射器40的活塞42,通过在第二纯化隔室30的上游提供压力或通过重力流动来实现。

[0092] 例如,第二纯化材料P2可以是尺寸排阻材料,其例如由具有限定直径和孔隙大小的球形颗粒形成。这种尺寸排阻材料能够典型地根据分子大小和/或流体动力学半径分离溶液或悬浮液,使得能够进入球形颗粒中的孔隙的小分子被保留,而较大的物种如细胞围绕尺寸排阻材料流动,因此首先被洗脱。这一原理可用于第二纯化隔室30中,以将预纯化的细胞悬浮液与不需要的小分子分离,这些小分子例如是在将细胞悬浮液注射到人或动物体内之前必须除去的剩余的活性或非活性酶或盐。

[0093] 进一步任选地,第二纯化隔室30可以连接到用于接收废液W的废料储器80,即通过废料阀93,特别是可切换阀。特别地,通过打开废料阀93并使缓冲溶液流过第二纯化隔室30(和布置在其中的第二纯化材料P2),可以从第二纯化材料P2中除去细胞悬浮液的不需要的组分,即小分子,其中流过物保留在废料储器80中。例如,缓冲溶液可以储存在缓冲液储器70中,该缓冲液储器70可以例如通过缓冲液阀92连接到第二纯化隔室30。

[0094] 在其下游端,第二纯化隔室30还通过另一阀91c和导管90b连接到通向注射器40的筒隔室45的注射器入口43。

[0095] 任选地,在阀93和91c是可切换阀的情况下,可以首先通过打开阀93将细胞悬浮液中不需要的组分从第二纯化材料30中除去到废料储器80,随后通过打开阀91c将最终的细胞悬浮液移入注射器的筒隔室45中。

[0096] 然后可以将注射器40端部的注射器喷嘴50放置在待治疗受试者(特别是从其获得组织样品T的同一受试者,换言之,以实现自体细胞转移)的皮肤区域上,使得针52(特别形成为微针)刺穿角质层,并且针52的尖端延伸到感兴趣的皮肤层,例如表皮或真皮,这取决于针的长度。然后移动注射器40的活塞42以将细胞悬浮液从筒隔室45通过注射器出口44、导管90c和注射器喷嘴50注射到皮肤的相应层中,例如表皮中(即利用约100 μ m至200 μ m的针长度)。

[0097] 在黑素细胞悬浮液的情况下,该方法可用于治疗受白癜风或色素脱失影响的皮肤

区域。然而,可以制备其它细胞类型以治疗其它疾病或病症,特别是皮肤疾病或病症。

[0098] 图2是用于制备细胞悬浮液的装置1的另一实施方案的示意图。类似于图1所示的装置1,该实施方案包括主体2,其包括或包围填充有酶溶液E的酶储器10、含有第一纯化材料P1的第一纯化隔室20、含有第二纯化材料P2的第二纯化隔室30、缓冲液储器70和废料储器80。

[0099] 在根据图2的实施方案中,酶储器10、第一纯化隔室20和第二纯化隔室30通过导管90a、90b、90c、90d、90e连接,导管90a、90b、90c、90d、90e可以例如由实心主体2内的通道或由主体2包围的管道形成。

[0100] 此外,装置1包括具有形成筒隔室45的筒41和可移动地布置在筒隔室45中的活塞42的注射器40,其中注射器40包括通向筒隔室45的注射器入口43,其中注射器入口43与第二纯化隔室30的下游侧流体连接。注射器40还包括连接到注射器喷嘴50的注射器出口44,注射器喷嘴50包括支撑件51,一排针52例如微针连接到支撑件51。

[0101] 与图1所示的实施方案相反,图2所示的装置不含手术工具60,而是通过开口12从装置1的外部可接近酶储器10,开口12可由盖子11关闭。

[0102] 可以例如通过单独的手术工具、解剖刀、活检针、植皮刀等获得的组织样品T可以通过该开口12从外部提供在酶储器10中,然后如上所述被酶溶液E消化。此外,通过在下游侧施加真空,例如通过拉动注射器40的活塞42,通过在上游侧施加压力,例如经由酶储器10的开口12,或者通过重力流动,经过消化组织样品T获得的细胞悬浮液可以移动穿过装置1的不同储器和隔室,如上所述。

[0103] 图2所示的装置1包括用于容纳缓冲溶液的缓冲液储器70,其中缓冲液储器70通过三通缓冲液阀92连接到第一纯化隔室20和第二纯化隔室30之间的流动路径。

[0104] 通过在缓冲液储器70和第二纯化隔室30之间的方向上打开三通缓冲液阀92,并通过进一步打开布置在第二纯化隔室30、废料储器80和筒隔室45之间的三通废料阀93,细胞悬浮液中不需要的组分,例如用于酶中和的小分子或蛋白质组分,可以从第二纯化材料P2中洗出进入废料储器80以从细胞悬浮液中除去。这具有的优点是,这些组分不会最终进入由注射器喷嘴50注射的细胞悬浮液中,从而避免了潜在的健康问题。

[0105] 附加地或作为选择,在三通废料阀93在第二纯化隔室30和筒隔室45之间打开的同时,可以将缓冲溶液从缓冲液储器70施加到第二纯化材料P2,以从第二纯化材料P2洗脱(例如推出)细胞悬浮液,特别是在重力分离之后,并且将细胞悬浮液移动到注射器40的筒隔室45中以进行后续的注射。

[0106] 在第二纯化材料P2是尺寸排阻材料的情况下,可以在将来自缓冲液储器70的缓冲液加载到第二纯化隔室30中的尺寸排阻材料上之前,施用缓冲液以稀释细胞悬浮液,从而避免尺寸排阻基质的潜在堵塞。这种稀释可以通过在三通缓冲液阀92的下游和第二纯化隔室30的上游混合细胞悬浮液和缓冲溶液来实现。

[0107] 细胞悬浮液的纯化和注射到待治疗的皮肤区域可以用根据图2所示的第二实施方案的装置1,与上述图1所示的实施方案相同或相似的方式进行。

[0108] 图3图解说明了装置1的另一实施方案,其中图3a示出了装置1的平行于第一纵向轴线L1的截面,并且图3B以垂直于第一纵向轴线L1的剖视图示出了装置1的示例性层3。

[0109] 根据图3所示的实施方案,装置1包括主体2,主体2由沿着第一纵向轴线L1布置在

基部4上方的多个层3a、3b、3c、3d、3e、3f构成。

[0110] 层3a、3b、3c、3d、3e、3f由垂直分离器5(与主体2一体形成或作为单独部件提供)分离,其中垂直分离器5垂直于第一纵向轴线L1延伸。由于垂直分离器5,层提供了分离的隔室,其中某些隔室通过布置在垂直分离器5的开口中的阀91a、91b、91c、91d、92、93连接。

[0111] 如图3B中的层3示意性所示,层3a、3b、3c、3d、3e、3f可包括附加的水平分离器6,其将由层形成的隔室分离成多个子隔室7a、7b。当然,图3B中所示的布置仅是一个实施例,并且在根据图3的实施方案中可以使用任何数量的水平分离器6,从而产生具有任何所需形状和尺寸的子隔室。

[0112] 装置1的层3a,特别是由水平分隔器7(未示出)形成的层3a的多个子隔室之一,形成用于接收酶溶液E的酶储器10。酶储器10包括朝向装置1外部的开口12,其可由盖子11封闭。类似于图2中所示的实施方案,组织样品T可以例如通过单独的手术工具、解剖刀、活检针、植皮刀等获得,并且通过开口12从外部提供在酶储器10中。然后如上所述,用酶溶液E消化组织样品T。

[0113] 在完成酶消化之后,打开酶储器10和第一纯化隔室20之间的阀91a(其可以是可切换阀),特别是使用致动器94a,使得获得的细胞悬浮液例如通过重力流动流入布置在层3b中的第一纯化隔室20。

[0114] 特别地,第一纯化隔室20由相应的水平分隔器7形成为层3b的子隔室。第一纯化隔室20含有第一纯化材料P1,例如过滤材料,其特别地从细胞悬浮液中除去细胞碎片和细胞外基质组分,如果存在的话。

[0115] 随后,可以打开阀91b,使得过滤的细胞悬浮液进入由装置1的层3c形成的混合室113,例如通过重力流动。包括连接到可旋转杆111的混合叶片110的混合装置114布置在混合室113中。杆111平行于第一纵向轴线L1布置,并从旋转致动器112穿过层3a、3b、3c、3d、3e、3f的中心通孔朝向基部4延伸。当杆111借助于旋转致动器112(例如手动地或通过连接马达)旋转时,叶片110在混合室113中围绕第一纵向轴线L1旋转。

[0116] 层3c上方的层3b的另一子隔室形成储存隔室130,其包含第二纯化材料P2,特别是包括磁性颗粒M和任选的用于抑制酶溶液E的酶的抑制剂溶液I。磁性颗粒M可以与亲和分子如抗体偶联,该亲和分子特异性结合至通过本发明的方法获得的感兴趣的细胞。

[0117] 包括磁性颗粒M的第二纯化材料P2可以提供在混合室113中,特别是通过打开储存隔室130和混合室113之间的阀91c。阀91c和/或阀91b的打开可以通过致动致动器94b来执行。

[0118] 在将第二纯化材料P2添加到混合室113中的细胞悬浮液中之后,混合装置114的混合叶片110借助于联接到杆111的旋转致动器112围绕第一纵向轴线L1旋转,以将细胞悬浮液与第二纯化材料P2混合,使得磁性颗粒M结合至细胞悬浮液中的某些细胞,特别是通过偶联到磁性颗粒M的亲和分子,例如抗体。

[0119] 然后将细胞悬浮液和第二纯化材料P2的混合物收集在由层3d形成的收集室120中,特别是由水平分隔器7形成的收集室的子隔室中。任选地,收集室120通过阀91d连接到混合室113,阀91d可以由致动器94d致动。

[0120] 装置1的层3e形成第二纯化隔室30,其中布置有用于结合和保持磁性颗粒M的至少一个磁体100。特别地,第二纯化隔室30还包括在收集室120和废料储器80之间沿着磁体100

提供流动路径的导管90,其中更特别地,导管延伸穿过磁体100中的通孔101或磁体100之间的间隙101(在多于一个磁体的情况下),以实现细胞悬浮液与一个或多个磁体100的紧密接近。这导致增加的磁场和提高的磁性颗粒M与结合的感兴趣细胞的保持力。

[0121] 导管90可以任选地含有被配置成放大导管中的磁体100的磁场的基质材料,特别是含有多孔铁磁颗粒的基质材料。

[0122] 特别地,没有结合至磁性颗粒M的细胞悬浮液的组分通过导管90流入废料储器80。

[0123] 层3d的另一子隔室可包含缓冲液储器70,其可经由缓冲液阀92(例如,由致动器94d致动)联接到导管90。导管90的另一端可以连接到注射器入口43,使得在缓冲液储器70和注射器40的筒隔室45之间建立流动路径。

[0124] 可以通过导管90施加缓冲液,以洗脱具有结合的感兴趣细胞的磁性颗粒,并在筒隔室45中提供最终的细胞悬浮液。例如,与第二纯化材料P2的缓冲液条件相比,该缓冲液可以被配置成例如通过增加的离子强度或降低的pH来减弱或消除偶联到磁性颗粒的亲分子与感兴趣的细胞之间的结合。

[0125] 作为选择或附加地,第二纯化隔室30中,特别是导管90中的磁场可以例如通过移动第二纯化隔室30中的磁体100(例如,在永磁体的情况下)或通过关闭磁体100(在电磁体的情况下)而减弱或消除。

[0126] 作为上述方法的替代方案,代替由磁性颗粒保留感兴趣的细胞并除去流过物中不需要的细胞,可以由磁性颗粒保留不需要的细胞,并且穿过磁体100的流过物可以作为最终的细胞悬浮液直接提供在注射器的筒隔室45中。

[0127] 特别地,在将细胞悬浮液提供在筒隔室45中之后,将注射器40从装置1中取出,并通过注射器喷嘴50将细胞悬浮液注射到皮肤中。

[0128] 实施例1—使用磁性颗粒分离角质形成细胞和黑素细胞

[0129] 细胞和细胞培养条件

[0130] 如别处所述,分离原代人角质形成细胞(KC)。简言之,将分裂厚度皮肤活检(购自ProviSkin)切成大约1cm²的碎片,然后在37°C下进行分散酶消化(康宁公司(Corning), 3542359)1.5小时。此后,将表皮和真皮机械分离。在37°C下用10X-胰蛋白酶(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich), 59418C-100)消化表皮碎片2分钟,并通过100μm细胞滤器过滤。在37°C下在饱和湿度的5%CO₂/95%空气气氛中,在CellNTec培养基(补充有CnT-07HC.S、CnT-07HC.S、两性霉素B和庆大霉素的CnT-BM.1)中培养角质形成细胞,直至达到传代n3。角质形成细胞的纯度通过角质形成细胞特异性标记PanK5/K8测定为>99.9%(数据未显示)。

[0131] 人黑素细胞(MC)购自Promocell(C-12400),并按照制造商的建议在黑素细胞生长培养基(Promocell,C-24010)中扩增,直到传代n6-9。将角质形成细胞和黑素细胞这两种细胞类型在细胞冷冻培养基—不含DMSO血清(西格玛奥德里奇,C6295)中冷冻并在液氮中储存3至5周,直到实验当天。当天,将细胞在37°C下快速解冻,并用补充有10%胎牛血清(FBS)的杜氏改良伊格尔培养基(DMEM)洗涤一次,然后离心一轮并更换培养基。将再悬浮的细胞通过100μm细胞滤器,并一式两份评估其浓度和活力。将细胞混合,得到5×10⁶活细胞的最终细胞悬浮液,其中80%是角质形成细胞,其余20%是黑素细胞(4:1)。

[0132] 磁性细胞分离

[0133] 柱制备

[0134] 用LD柱(美天旎(Miltenyi), 130-042-901), 按照制造商的说明书, 进行细胞的磁性分离。简言之, 将柱置于磁性支架(MidiMACS Separator—130-042-302, 美天旎)上, 并用柱缓冲液(PBS, pH 7.2, 0.5%牛血清白蛋白, 2mM EDTA)洗涤一次。将 4×10^6 细胞(角质形成细胞和黑素细胞混合物, 如前所述, 4:1)与藻红蛋白(PE)偶联的抗CD117抗体(Biolegend, 313204, 稀释因子1:50)以300 μ l的最终体积温育(在4 $^{\circ}$ C下温育, 避光10分钟), 然后进行两轮离心洗涤, 再悬浮于1ml新鲜的柱缓冲液中。将细胞沉淀重悬于80 μ l柱缓冲液中。向其中添加20 μ l超纯抗PE微珠(美天旎, 130-105-639), 然后温育15分钟(4 $^{\circ}$ C, 避光)。通过离心洗涤细胞一次并重悬于柱缓冲液中至最终体积为500 μ l。所有以下步骤在室温下进行。

[0135] 流过物收集

[0136] 将细胞加载在平衡柱的顶部(其在该步骤的全长期间保持结合至MidiMACS Separator)。通过施加 2×1 ml柱缓冲液将柱洗涤两次。将从该步骤收集的细胞悬浮液保存在单独的管中, 下文称为未结合细胞。

[0137] 洗出液收集

[0138] 为了洗脱磁性结合至柱上的细胞, 将柱从磁性支架上取下并置于新的收集管上。将3ml柱缓冲液施加在柱的顶部, 并将全部内容物收集在同一管中, 下文称为结合细胞。

[0139] 流式细胞术分析

[0140] 用CytoFLEX B5-R3-V5流式细胞仪(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))分析两个收集管的内容物(未结合细胞和结合细胞)及初始细胞混合物。每个样品记录6,000个细胞事件, 门控通过在PE信号轴上存在两个非常不同的群体来定义。该分析仅包括单细胞和活细胞。用软件Kaluzo C(贝克曼库尔特公司)按照制造商的说明书分析数据。

[0141] 结果和结论

[0142] 本实验的目的是证明磁性细胞分离方法应用于含有角质形成细胞和黑素细胞的细胞群体混合物的适用性和功效, 角质形成细胞和黑素细胞都是人表皮中最丰富的细胞类型。如本说明书所述, 该混合物在组成上类似于可通过第一纯化材料和/或第二纯化材料纯化的细胞悬浮液。

[0143] 已知黑素细胞特异性标记CD117(C-Kit)在角质形成细胞中不存在, 这简化了CD117阳性(高PE信号):黑素细胞和CD117阴性(低PE信号):角质形成细胞的细胞计数读数。在将细胞加载到柱中之前, 细胞混合物的正确初始组成(角质形成细胞:黑素细胞, 4:1)通过流式细胞术证实(图4A)。重要的是, 未结合的细胞级分(“流过物”)在角质形成细胞中高度富集(99.84%, 图4B), 表明角质形成细胞对柱没有亲和力或具有非常低的亲和力, 如预期的那样(角质形成细胞未与抗CD117抗体结合)。与此相反, 结合的细胞级分在黑素细胞中高度富集(92.68%, 图4C), 表明黑素细胞被分离基质保留并且仅当柱从磁性托架分离时才被洗脱。

[0144] 该方法被证明是一种在实验室制备的纯黑素细胞和角质形成细胞的混合物中分离黑素细胞的可靠方法。特别地, 通过使用本说明书中详述的一种或多种硬件配置, 对该方案的修改可用于纯化人表皮活检中存在的黑素细胞。

[0145] 附图标记列表

	装置	1
	主体	2
[0146]	层	3, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f
	基部	4
	垂直分离器	5

[0147]

水平分离器	6
子隔室	7a, 7b
酶储器	10
盖子	11
开口	12
第一纯化隔室	20
第二纯化隔室	30
注射器	40
筒	41
活塞	42
注射器入口	43
注射器出口	44
筒隔室	45
注射器喷嘴	50
支撑件	51
针	52
手术工具	60
旋转刀片	61
基部	62
泵入口	63
缓冲液储器	70
废料储器	80
导管	90, 90a, 90b, 90c, 90d, 90e
阀	91a, 91b, 91c, 91d
缓冲液阀	92
废料阀	93
致动器	94a, 94b, 94c, 94d, 94e
磁体	100
通孔或间隙	101
混合叶片	110

[0148]

杆	111
旋转致动器	112
混合室	113
混合装置	114
收集室	120
储存隔室	130
酶溶液	E
抑制剂溶液	I
第一纵向轴线	L1
第二纵向轴线	L2
磁性颗粒	M
组织样品	T
第一纯化材料	P1
第二纯化材料	P2
废液	W

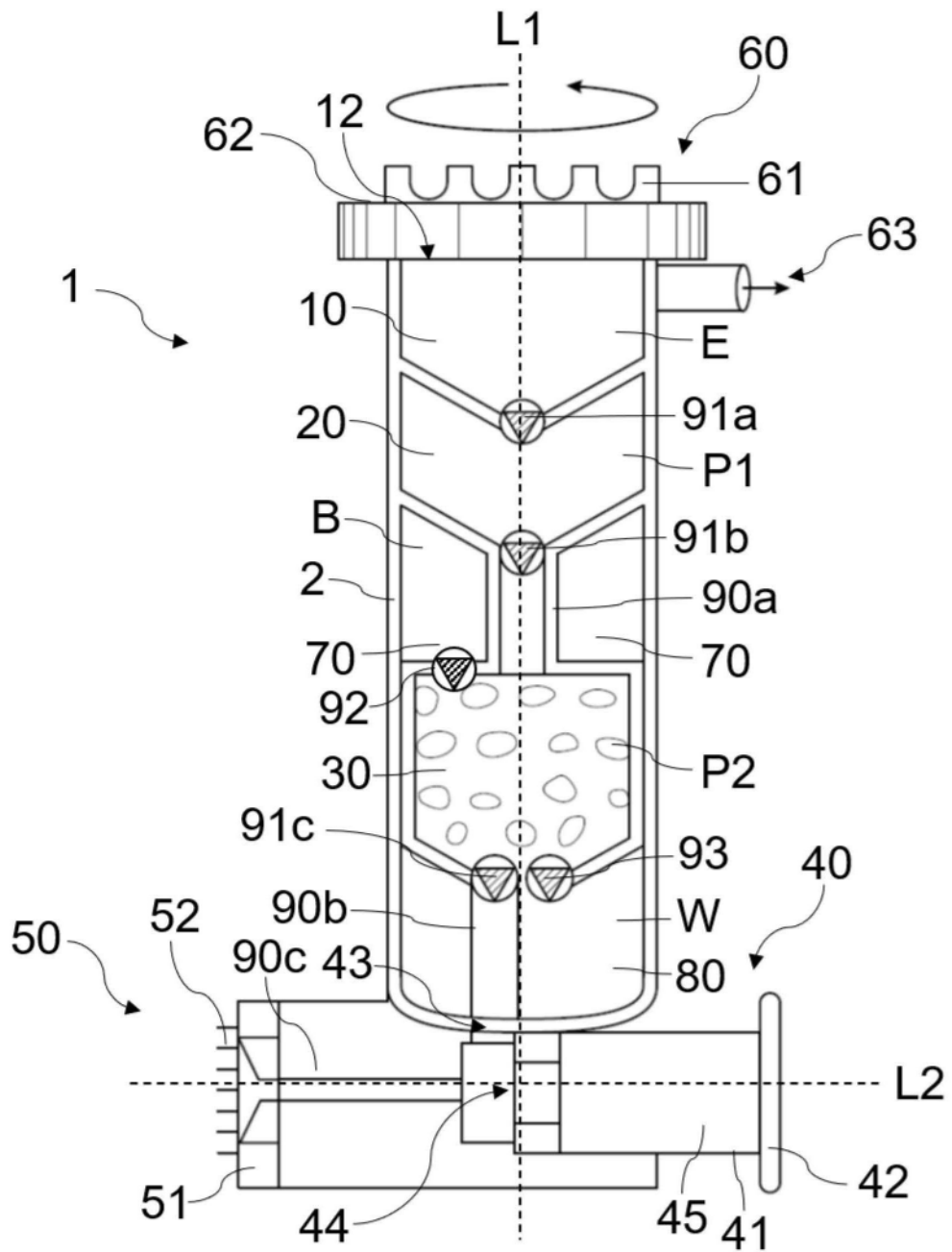


图1

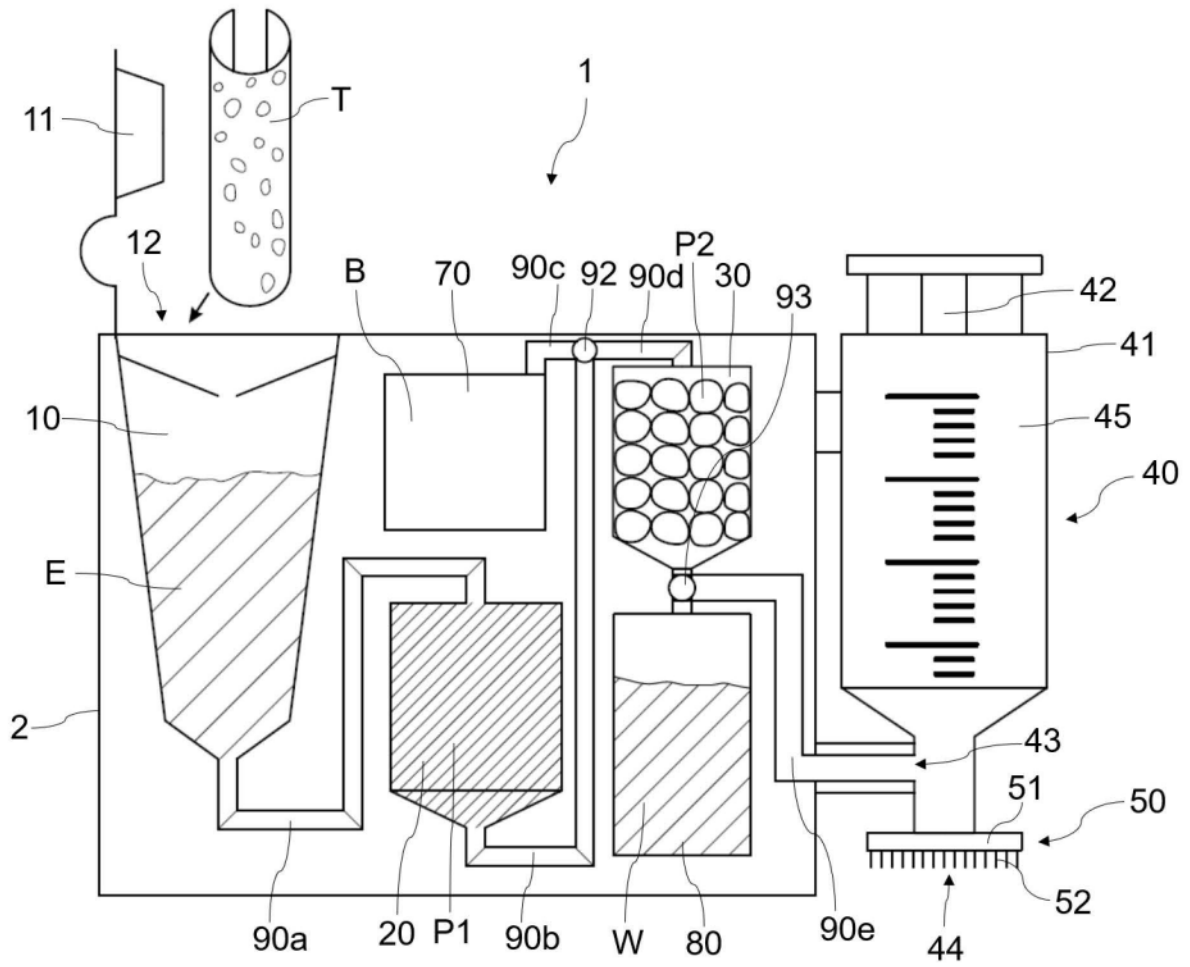


图2

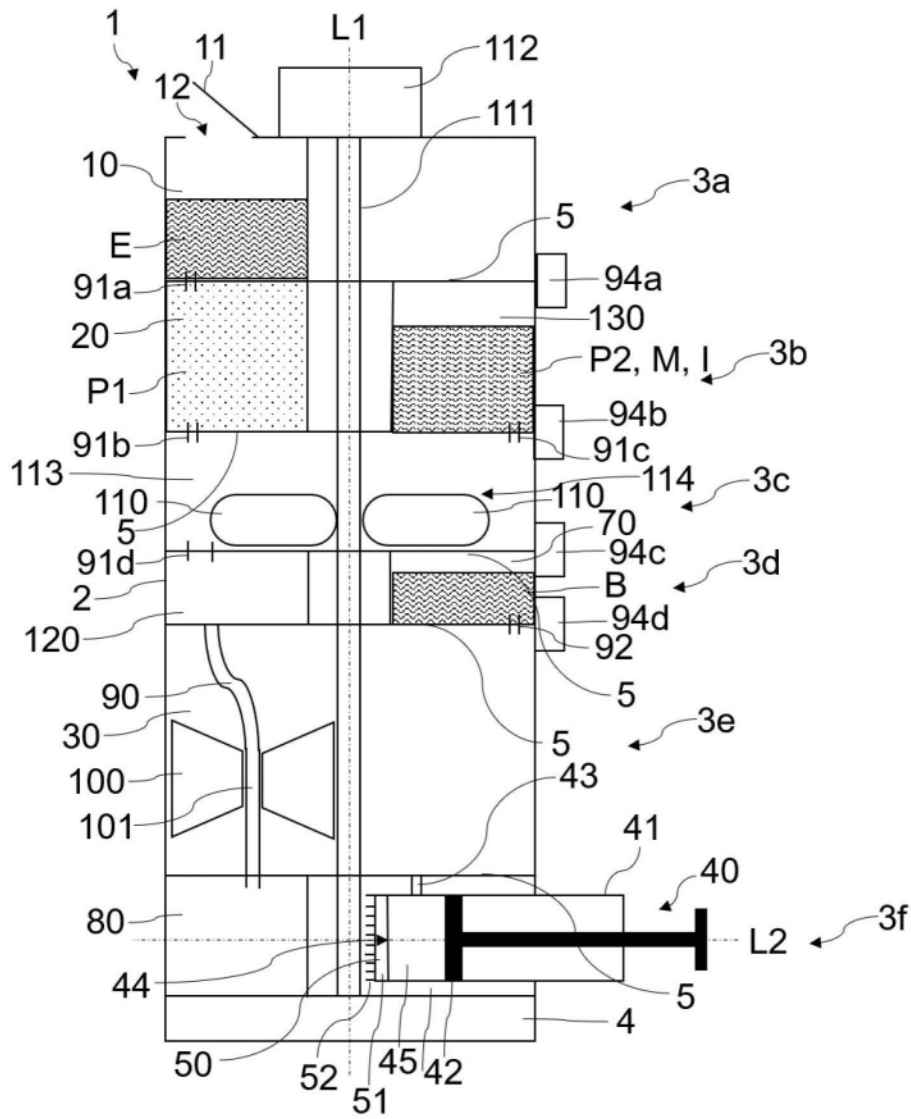


图3A

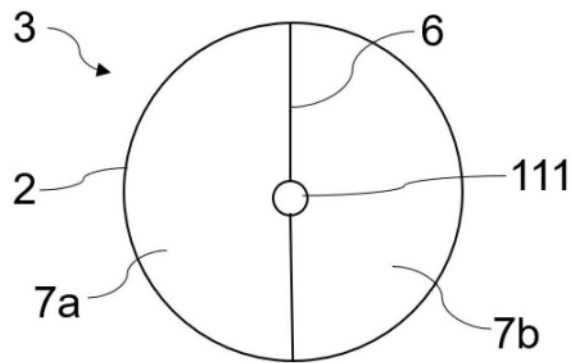


图3B

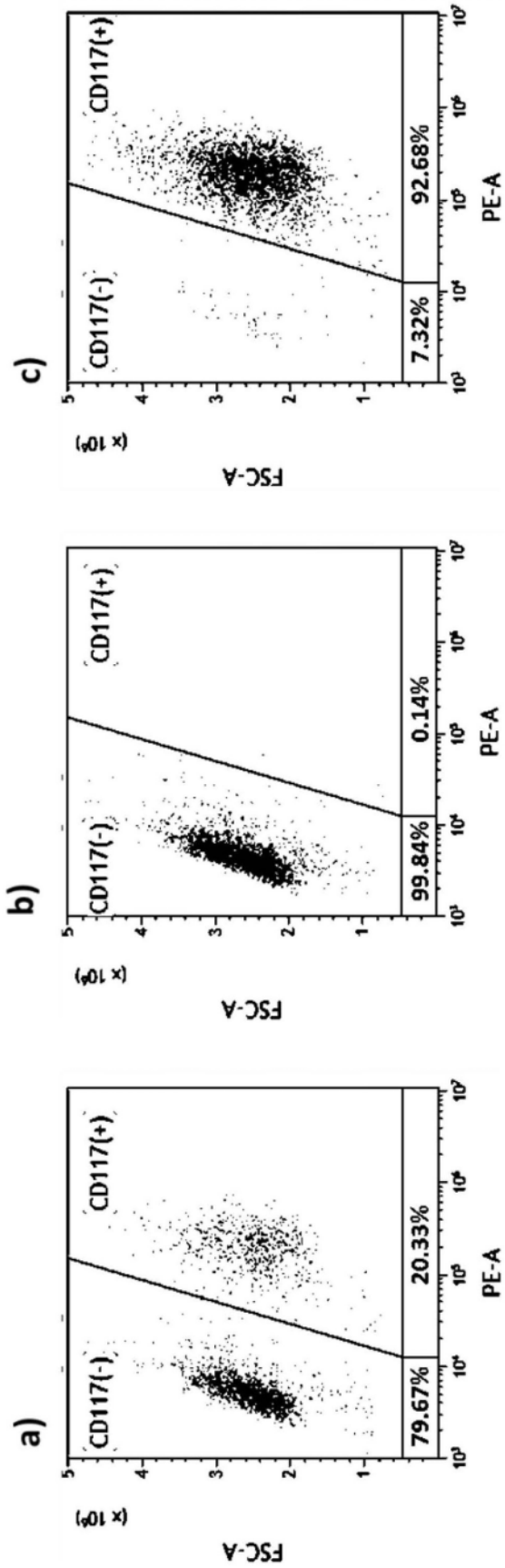


图4