



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109963934 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201780050085.6

西里尔·马雷夏尔

(22)申请日 2017.06.26

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

(30)优先权数据

1655922 2016.06.24 FR

代理人 王达佐 洪欣

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.15

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 3/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2017/051703 2017.06.26

F16K 7/06(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/220948 FR 2017.12.28

(71)申请人 赛普罗塞拉公司

地址 法国摩洛哥

(72)发明人 克里斯托夫·瓦拉特

菲利普·希农 克莱尔·索克特

拉乌尔·韦尔 热罗姆·瑟瑞

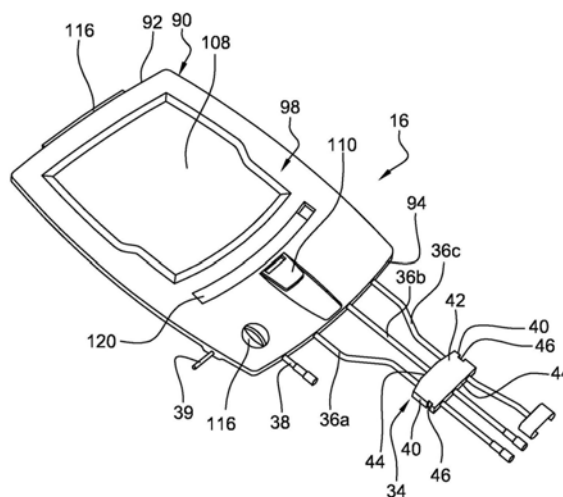
权利要求书3页 说明书24页 附图18页

(54)发明名称

细胞培养盒和自动化设备

(57)摘要

本发明涉及用于细胞培养的盒(16),其包括:-至少部分刚性的壳体(90),其在内部限定内部空间,在所述内部空间中布置并附接有限定内部容积的细胞培养袋(100),-导管(36,38),其各自在一端连接至袋(100)的内部容积,并且每个导管具有位于壳体(90)外部的第二端,-阀(128,130),用于使得/防止流体流动通过安装在壳体(90)上的导管(36,38)。



1. 细胞培养盒(16),其包括:

-壳体(90),所述壳体是至少部分刚性的并且在内部限定出内部空间,在所述内部空间中布置并固定有限定出内部容积的细胞培养袋(100),

-导管(36,38),每个所述导管均在一端连接至所述袋(100)的内部容积,并且每个所述导管均具有位于所述壳体(90)外部的第二端,

-阀(128,130),用于打开/关闭通过安装在所述壳体(90)上的所述导管(36,38)的流体流动。

2. 如权利要求1所述的盒,其中,所述导管(36,38)由柔性管形成,所述阀(128,130)中的至少一些阀包括用于对着所述壳体(90)的结构构件(132)挤压所述管的可移动构件(136,138)。

3. 如权利要求2所述的盒,其中,每个可移动构件(136,138)均包括旋转轴线(136c,138c),每个可移动构件(136,138)的径向外周均包括围绕所述旋转轴线(136c,138c)的至少一个螺旋表面(160),所述至少一个螺旋表面形成所述管(36,38)的挤压表面,以便在所述构件(136,138)转动时改变通过所述管(36,38)的流体通道的截面。

4. 如权利要求3所述的盒,其中,所述可移动构件(136,138)安装在板(132)的凹部(134)中,所述板(132)布置在所述壳体(90)内并与所述壳体(90)成一体,每个凹部(134)均接纳可移动构件。

5. 如权利要求2至4中任一项所述的盒,其中,每个可移动构件(136,138)均包括能从所述壳体(90)的外部操作并设置有用于与致动器的第二旋转联接机构配合的第一旋转联接机构(154)的端部(136a,138b)。

6. 如权利要求4或权利要求4和5所述的盒,其特征在于,所述可移动部件居中,并且在一端可旋转地引导到所述壳体的开口中,且在相对端处可旋转地引导到所述板的开口中。

7. 如权利要求2至6中任一项所述的盒,其中,所述袋(100)具有基本上矩形的形状,其包括第一柔性壁(122)和第二柔性壁,所述第一柔性壁和第二柔性壁在空的状态和充满液体的状态下基本上彼此平行。

8. 如权利要求7所述的盒,其中,所述第一壁(122)和第二壁的表面积总和与所述袋(100)的总内部容积之比为 $500\text{cm}^2/\text{L}$ 至 $690\text{cm}^2/\text{L}$,优选在 $580\text{cm}^2/\text{L}$ 的范围内。

9. 如权利要求7或8所述的盒,其中,所述第一壁(122)和所述第二壁之间的距离小于20mm,优选10mm至20mm,甚至更优选为约14mm。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的盒,其中,所述袋(100)的壁对于气体,特别是 CO_2 是可渗透的,并且优选具有尽可能地限制细胞粘附到所述袋(100)的壁上的性质。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的盒,其中,所述壳体(90)具有与长方体的形状基本对应的形状,并且包括彼此固定在一起的下半壳(96)和上半壳(98),所述下半壳(96)是刚性的,所述上半壳(98)是刚性的或柔性的。

12. 如权利要求11所述的盒,其中,所述上半壳(98)包括开口(108)或中央凹部,所述开口或中央凹部的形状和尺寸被确定为当包含液体的盒(16)围绕水平轴线摆动时允许液体的波动从所述袋(100)传播到所述开口(108)中,所述开口向上设置。

13. 如权利要求11或12所述的盒,其中,所述下半壳(96)包括多个孔(104),优选地,所述多个孔具有例如小于20mm的直径。

14. 如权利要求11至13中任一项所述的盒,其中,所述导管(36,38)延伸穿过所述下半壳(96)或上半壳(98)之一的外缘(102a,102b)之一。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的盒,包括导管(36,38)的支承板条(34),所述支承板条布置在所述壳体(90)的外部并且由所述导管(36,38)中的至少一些导管横穿。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的盒,其特征在于,所述袋包含细胞培养基。

17. 如权利要求16所述的盒,其特征在于,所述细胞培养基包含人胰岛素,人转铁蛋白和人血浆或血清。

18. 如权利要求16或17所述的盒,其特征在于,所述细胞培养基是冷冻的。

19. 如权利要求1-17中任一项所述的盒,其特征在于,所述袋包含CD34+细胞。

20. 细胞培养箱,其包括恒温外壳(28)和用于支承和振荡如前述权利要求中任一项所述的细胞培养盒的装置(14),以及用于将细胞培养盒(16)定位并锁定在支承装置的给定位置中的机构。

21. 如权利要求20所述的培养箱,其中,支承和振荡装置(14)包括用于支承细胞培养盒(16)的盘(54),所述盘围绕水平轴线(63)可旋转地安装,所述盘(54)被设计用于围绕所述水平轴线(63)摆动以振荡和均匀化所述袋(100)的内容物。

22. 如权利要求21所述的培养箱,其中,所述支承和振荡装置(14)包括连杆(64),所述连杆的上端通过摆动件连接到所述板(54),并且所述连杆的下端连接到由电机轴旋转地驱动的曲柄(68),所述电机轴的轴线(70)是基本上水平的。

23. 如权利要求21至22中任一项所述的培养箱,其中,所述盘(54)承载用于打开/关闭所述阀(128,130)的机电致动器(82),所述机电致动器的一个输出部带有第二联接机构,所述第二联接机构用于在所述盒(16)处于所述给定位置时与所述盒的阀(128,130)的第一联接机构(154)配合。

24. 如权利要求20至23中任一项所述的培养箱,包括用于密封所述外壳(28)的开口(26)的门(22),所述开口(26)包括外缘(24),在所述外缘中形成有凹部(32),所述外缘中形成的所述凹部的形状适于容纳用于如权利要求15所述盒的导管的支承板条(34),当所述门处于所述外壳(28)的关闭位置时,所述板条(34)在门(22)和所述外缘之间形成密封构件。

25. 如权利要求20-24中任一项所述的培养箱,包括用于控制细胞培养盒(16)在支承机构中的位置的机构。

26. 细胞培养自动化设备,其包括至少一个如权利要求20-25中任一项所述的培养箱(12);和包括数据捕获和记录装置的计算机控制系统,所述计算机控制系统用于调节所述至少一个培养箱的外壳中的培养条件和用于控制容纳在所述外壳中的所述盒的阀。

27. 借助于权利要求26所述的自动化设备进行细胞培养的方法,其特征在于,其包括以下步骤:

a) 将权利要求1-19中任一项所述的细胞培养盒(16)置于培养箱外壳(12)内并置于支承和振荡装置(14)上的解冻位置;

b) 向袋(100)输送待培养的细胞;

c) 将盒(16)置于所述支承和振荡装置(14)上的细胞培养位置;

d) 振荡所述盒(16)给定时间段以使其内容物均匀化;

e) 将所述盒(16)保持在孵育条件下数天;以及

f) 通过所述盒(16)的其中一个管回收所述盒(16)的内容物。

28. 如权利要求27所述的方法,其特征在于,其包括:

-在步骤d)期间的用于对袋的内容物进行采样的一个或多个采样步骤(196),每个采样步骤之前是将支承盘(54)从水平培养位置倾斜到倾斜位置的步骤,在所述倾斜位置中,所述袋(100)的采样区代表所述袋(100)的最低点。

29. 如权利要求27或28所述的方法,其特征在于,所述待培养的细胞是CD34+细胞。

30. 用于治疗由心肌梗塞诱导的心力衰竭的药物组合物,其特征在于,其包含能通过根据权利要求1-19中任一项所述的盒中,或在权利要求20至25中任一项所述的培养箱中,或在权利要求26所述的自动化设备中进行培养,或通过权利要求27至29中任一项所述的细胞培养方法产生的细胞,所述细胞:

- 是人体细胞,
- 数目至少为 10^7 个,
- 含有至少70%的人CD34+细胞,
- 包含比例为1%至12%的人CD34-CD14+细胞,并且
- 细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 。

细胞培养盒和自动化设备

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞培养盒,以及使用所述盒的细胞培养自动化设备。因此,本发明涉及一种用于细胞培养的称为盒的装置。

背景技术

[0002] 在使用细胞培养的领域中,细胞疗法在工业化方面进展最缓。因此,迫切需要找到一种能够产生足够量的且处于最佳和安全条件下的细胞的技术,以将这些细胞用于治疗应用。

[0003] 一些细胞治疗过程需要在将干细胞重新注射到患者体内之前对其进行培养或扩增,因为收集的量有时不足以产生治疗效果。在培养过程中保证细胞治疗特性的完整性至关重要。在目前的技术中,提出用于离体培养干细胞的解决方案是手工的,非常依赖于经验并且效果不佳。

[0004] 此外,目前的技术不允许产生足够量的干细胞以用于治疗应用。因此,确实需要开发具有简洁/紧凑几何结构且允许细胞大量生长的生物反应器技术。

[0005] 用于治疗或临床环境中的生产应用的干细胞扩增过程的自动化需要能够在受控活动区域(洁净室)中操作的细胞生产装置,而人为干预最少。干细胞培养过程相对复杂,因为它们涉及从患者样品中获得这些细胞,分离细胞,在培养前纯化,最后在培养后收集,纯化和包装细胞,然后将它们送到临床治疗中心的多个步骤。

[0006] 所有这些步骤必须按照严格的无菌和可追溯条件的制造标准进行。制造步骤的倍增(通常是手动的)需要使用不同类别的容纳区域以保持过程无菌。在培养之前和之后适当地进行的准备过程通常涉及将过程中间体从一个区域转移到另一个区域,从而增加了无菌损失的风险和混合生产流程的风险。

[0007] 例如,细胞培养系统,诸如文献US2012/0308531中描述的细胞培养系统是已知的。用于干细胞生产的连续培养物的生产通过子组件的复杂系统进行,该子组件将不同的试剂,细胞和气体带入反应器。

[0008] 申请人还在文献W0/2013/135817中提出了一种用于自动化细胞培养的自动化设备。如果细胞培养在单个袋内进行,由于其柔性结构,其处理可能是困难的。

发明内容

[0009] 本发明的目的特别是为上述现有技术的问题提供一种简单、有效和经济的解决方案。

[0010] 为此,其提出了一种细胞培养盒,包括:

[0011] -限定出内部空间且至少部分刚性的壳体,在所述内部空间中设置并固定有限定出内部容积的细胞培养袋,

[0012] -管道,每个管道均在一端连接到所述袋的内部容积,并且每个管道均具有位于所述壳体外部的第二端,以及

[0013] -用于打开/关闭通过安装在所述壳体上的导管的流体流动的阀。

[0014] 通过盒壳体操作袋和阀。只有管道的第二端需要直接操作。根据本发明,细胞培养盒或装置集成了可能在无菌方面造成困难并且必须限制其直接处理的所有元件。这些元件被预组装在一次性细胞培养盒中。使用后,可以按照良好操作规则处置所有使用过的导管,阀和培养袋。优选地,柔性袋在至少部分刚性的壳体中的集成极大地便于袋的操作,因此袋保持在壳体中。类似地,阀在壳体中的集成使得更容易识别阀位置,则这可以通过培养箱控制机构更容易地处理,如下面的描述中所示。

[0015] 将阀集成到流体盒中作为封闭盒线的手段的解决方案使得可以通过避免使用塑料“夹(通常在冷冻步骤过程中被削弱,并且只能用手操作)或避免使用夹管电磁阀(需要手动安装电磁阀爪中的线路)来改善盒在细胞培养过程中的使用的自动化。因此,该解决方案避免了导管的操纵,以及与导管不正确地插入电磁阀有关的错误。

[0016] 袋中含有细胞培养基的盒可以根据需要冷冻。

[0017] 本发明的另一个特征是导管由柔性管形成,并且至少一些阀包括用于壳体结构元件上的管的可移动挤压构件。如上所述,盒中的阀的集成允许关闭的轨道(储存或培养时间)保持所需时间的自主且安全,而不需要外部的能量。

[0018] 根据本发明的另一个特征,每个可移动构件包括旋转轴线,并且每个可移动构件的径向外周包括至少一个围绕旋转轴线的螺旋表面,形成管的挤压表面,以便在构件旋转时改变通过管的流体通道截面。

[0019] 有利地,阀能够保持给定位置。更具体地,阀设计成使得移动部件能够在没有能量供应的情况下保持给定的打开或关闭位置。特别地,这可以通过以下来实现:确保螺旋表面与管的接触点的垂线朝向移动构件的旋转轴线定向,从而导致围绕所述轴线的零扭矩。

[0020] 在特定的设计中,可移动部件安装在固定到壳体的板的凹部中,每个凹部容纳可移动部件。当壳体由下半壳和上半壳两个制成时,因此可以将细胞培养袋安装在下半壳上,以安装用于将管挤压在下半壳上的可移动部件,然后安装确保同时保持多个可移动部件的板。例如,板可以例如通过螺钉连接到下半壳。因此,板可以确保和便于上述各种部件的组装。它确保阀得到维持。

[0021] 每个可移动构件包括从所述壳体外部可操作并设置有用于与致动器的第二旋转联接机构配合的第一旋转联接机构的端部,所述致动器可以是机电的。

[0022] 从外部操作阀的可移动部件使得可以将盒安装在培养箱的合适支承件上,所述支承件包括第二联接机构,例如,用于旋转第一阀联接机构以按需要打开/关闭液体循环的互补第二联接机构。这种外部可操作性使得可以在阀驱动机构发生故障时手动操作阀。

[0023] 优选地,所述移动部件在位于所述壳体中的开口中的一端处以及在位于板的开口中的相对端处被定中并以旋转方式被引导。当所述壳体由两个半壳组成时,板可以在这两个半壳之间被夹在壳体内。

[0024] 根据本发明的另一个特征,所述袋具有基本上矩形的形状,其具有第一柔性壁和第二柔性壁,所述第一柔性壁和第二柔性壁在空的和充满液体的状态下基本上彼此平行。

[0025] 矩形形状基本上是平的,使得在第一和第二壁之间沿基本垂直于第一和第二壁的第一方向测量的厚度非常小,即远小于沿空间的彼此垂直并且与所述第一方向垂直的另外两个方向测量的袋的另外两个尺寸。“非常显著的低”意味着至少低10倍,这在数学中是普

遍接受的。

[0026] 优选地,第一壁和第二壁的表面积总和与袋的总内部容积之比为 $500\text{cm}^2/\text{L}$ 至 $690\text{cm}^2/\text{L}$,优选地,约 $580\text{cm}^2/\text{L}$ 。当盒放置在培养箱内的恒温外壳中时,该比率确保了柔性袋和外部之间的最佳热交换。

[0027] 在液体填充状态下沿垂直于第一和第二壁的方向上测量的第一壁和第二壁之间的距离或袋的厚度有利地小于 20mm ,优选 10 至 20mm ,甚至更优选为约 14mm 。使用薄的厚度进一步促进了袋中液体内的热量扩散。这也允许培养基的不同组分的均匀冷冻和解冻,其在恒定温度下更快。

[0028] 根据本发明的袋使得可以通过深度冷冻而在冷冻步骤期间保持培养基的稳定性。实际上,源自血液的生物产品的高冷冻速率是保存成分,解冻后培养基的均匀性,以及在冷冻物质的中央的溶液中盐和蛋白质的浓度效应的缺乏的保证。根据本发明的袋由于其具有高表面积与容积比和低厚度的特定几何形状而促进培养基的快速冷冻。

[0029] 根据本发明的另一个特征,袋的壁对于气体,特别是 CO_2 是可渗透的,并且优选地具有尽可能地限制细胞粘附到所述袋的壁上的性质。

[0030] 袋优选是柔性的,即可变形的。它优选包括能够保持培养基及其细胞扩增(其是液体)的柔性透气壁。在实践中,需要保留袋中所含的任何液体。它优选具有良好的氧气和二氧化碳渗透性,这允许袋内容物良好通气而不需打开它,因此没有污染其内容物的风险。在本发明的一个具体实施方案中,袋包括以下渗透性特征(在一个大气压,即 1 巴的压力下,在 37°C 下每天的 cm^3 数):对于氧气为 418 至 508 ,对于二氧化碳为 699 至 1200 ,对于氮气为 157 至 200 ,并且对于水为 0.05 至 0.1 。

[0031] 所述袋由薄膜制成,该薄膜可以由共聚物如含氟聚合物制成,更特别是由氟乙烯丙烯制成,例如其厚度约为 $120\mu\text{m}$ 。在一个优选实施方案中,袋具有基本上矩形的形状,具有薄的厚度,并且可以达到 230mm 至 250mm 的最大平坦宽度和 230mm 至 250mm 的平坦长度。

[0032] 使用属于含氟聚合物族的材料具有可透过气体并且对液体具有低粘附性的优点。

[0033] 壳体优选地具有与长方体的形状基本对应的形状,并且可以包括彼此固定在一起的下半壳和上半壳,下半壳是刚性的,并且上半壳是刚性的或柔性的。

[0034] 因此,壳体也可以具有基本上扁平的形状,与其长度和宽度相比具有非常薄的厚度。

[0035] 壳体可由任何弹性体热塑性材料,例如SEBS(苯乙烯-乙烯-丁二烯-苯乙烯)制成。下半壳可以是刚性的以确保柔性袋的最佳保持,而上半壳可以是部分刚性的并且包括一个或多个由弹性体材料制成的柔性区(以便于抓握)和一些可变形性,以便于盒在支承和振荡机构中的组装,这将在下面描述。当然,上半壳也可以像下半壳一样是完全刚性的。

[0036] 下半壳和上半壳都可以通过夹紧,胶合或焊接它们的外缘来组装。这两个半壳可以具有相同或不同的厚度。

[0037] 在本发明的一个优选实施方案中,上半壳可包括中央开口或凹部,其形状和尺寸被设计为当包含液体的盒围绕水平轴线摆动时允许液体的波动从袋传播到开口中,所述开口构造成面向上方。需要形成波动以实现袋中液体的快速均匀化。因此,也可以称为开孔或开口的凹部的形成避免了必须增加壳体的厚度。该凹部还确保与袋接触的气体更好地扩散。它可以具有约 210mm 宽和约 28mm 长的尺寸。

[0038] 优选地,下半壳具有多个孔,其优选地具有例如小于20mm的直径。孔口的集成有助于以类似于上半壳的开口的方式传输气体,同时确保袋保持在下半壳上。

[0039] 在本发明的一个实际实施方案中,下半壳可包括约50和400个孔口,每个孔口的直径介于5mm与20mm之间,例如约10mm。孔可以根据网眼尺寸分布,基本图案是等边三角形,单位长度为5至40mm,例如20mm。

[0040] 在根据本发明的盒设计中,所述导管延伸穿过所述下半壳或上半壳之一的外缘之一。管道可以容纳在下半壳或上半壳的外缘之一的狭槽中。

[0041] 盒优选地包括管道支承板条,该管道支承板条布置在所述壳体的外部并且所述管道中的至少一些管道穿过该管道支承板条。该板条支承延伸到盒壳体外部的导管,这限制了导管自由端的无意移动。另外,支承件旨在形成用于培养箱门的防水通道元件,如它将更好地出现在以下描述中那样。

[0042] 盒优选包括储存在袋中的细胞培养基,细胞培养基可以是冷冻的。

[0043] 细胞培养基可以是这样的细胞培养基,其组成适合于哺乳动物细胞,特别是人细胞(不包括人胚胎干细胞)的繁殖。培养基可以包括或不包括培养中的细胞。

[0044] 这些细胞,特别是除人胚胎干细胞外的人细胞,可以有利地是或包括CD34+(人)细胞,特别是CD34+(人)造血细胞或非造血CD34+(人)细胞。这些CD34+(人)细胞例如可以是来自外周血(人)或脐带(人)或人组织特别是外周血(人)的细胞。

[0045] 这些细胞特别是除人胚胎干细胞外的人细胞可以有利地是或包括干细胞或祖细胞,特别是多能细胞或全能细胞。

[0046] 这些细胞不是或不包括人胚胎细胞。

[0047] 该细胞培养基可以包括允许这些细胞繁殖的组分,特别是允许它们繁殖,同时使它们保持在未分化状态,或者至少不到达终末分化阶段的组分。

[0048] 该细胞培养基可包含胰岛素,转铁蛋白和血浆或血清(人)。

[0049] 该细胞培养基可包含或不含饲养细胞,例如成纤维细胞。

[0050] 该细胞培养基例如可以是或包括Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM);例如,参见Iscove,N.N.和Melchers,F.(1978)J.Exper.Med.147:923),可选地补充有谷氨酰胺或含谷氨酰胺的肽。

[0051] 特别地,该细胞培养基可以是或包括IMDM培养基,其可选地补充有谷氨酰胺或含谷氨酰胺的肽,其不含成纤维细胞并且包含人(重组)胰岛素,(人)转铁蛋白和(人)血浆或血清。

[0052] 例如,培养基可包含:

[0053] -1 μ g/mL至50 μ g/mL,特别是8 μ g/mL至12 μ g/mL的胰岛素,

[0054] -100 μ g/mL至2000 μ g/mL,特别是300 μ g/mL至500 μ g/mL的转铁蛋白,和

[0055] -1%至30%,特别是4%至12%的(人)血清或血浆。培养基还可包含肝素,例如1.5IU/mL至3.5IU/mL的肝素。

[0056] 培养基还可包含促红细胞生成素,包括人(重组)促红细胞生成素。

[0057] 培养基还可包含一种或多种生长因子,包括选自氢化可的松,SCF(干细胞因子),白细胞介素3(IL-3),血小板生成素(TOP),FLT3(Fms样酪氨酸激酶3),BMP4(骨形态发生蛋白4),VEGF-A 165(血管内皮生长因子A 165)和IL-6的一种或多种生长因子。

- [0058] 培养基可包含但不限于：
- [0059] -氢化可的松，或
- [0060] -SCF，或
- [0061] -SCF和IL-3，或
- [0062] -氢化可的松和SCF，或
- [0063] -氢化可的松，SCF和IL-3，或
- [0064] -SCF，TOP，FLT3，BMP4，VEGF-A165，IL-3和IL-6。
- [0065] 培养基尤其可以是如W02011/101468（或者在源自或基于该国际PCT申请的美国专利申请之一，例如特别是美国申请2013/0078721A1，其通过引用并入本文）中所述的培养基。
- [0066] 盒可包括如上所述的培养基和/或细胞。
- [0067] 根据一种生产方法，盒包括袋中的培养基，更特别是冷冻形式的培养基，但不包括细胞。
- [0068] 根据另一种生产方法，盒包括袋中的培养基，更特别是非冷冻形式的培养基，并且还包括细胞，特别是培养的细胞，特别是如上所述的CD34+（人）细胞。
- [0069] 本发明还涉及细胞培养箱，其包括恒温外壳和用于支承和振荡根据上述权利要求之一的细胞培养盒的装置以及用于将细胞培养盒定位和阻断在支承装置的给定位置中的机构。
- [0070] 在一实施方案中，所述支承和振荡装置包括用于细胞培养盒的支承板，所述支承板围绕水平轴线可旋转地安装，所述板被设计用于围绕所述水平轴线摆动以振荡和均匀化袋的内容物。
- [0071] 所述支承和振荡装置可包括连杆，所述连杆的上端通过摆动件连接到板并且其下端连接到由电机轴可旋转地驱动的手摇曲柄，所述电动轴具有基本上水平的轴线。
- [0072] 培养箱可包括用于控制细胞培养盒在支承机构中的位置的机构，以确保盒正确地定位在支承机构上并且可以使用它。
- [0073] 所述板可以承载用于打开/关闭所述阀的机电致动器，所述机电致动器的一个出口/输出部带有第二联接机构，所述第二联接机构用于在盒处于所述给定位置时与盒的阀的第一联接机构配合。
- [0074] 根据本发明的另一个特征，所述培养箱包括用于密封所述外壳的开口的门，所述开口包括外缘，在所述外缘中形成凹部，该凹部的形状适于容纳管道支承板条，当门处于外壳的关闭位置时，所述板条在门和所述外缘之间形成密封构件。
- [0075] 管道支承板条的集成允许管道定位在门口能快速且容易地进行。实际上，与已知的技术（该技术包括将导管壳体槽直接集成到外缘中，并将它们一个接一个地放置在槽中）不同，本发明提出在一个步骤中组装所有导管。此外，密封在板条上进行并且不再在管道上进行，这使得更容易进行密封，因为该板条可以具有刚性结构，门可以支承在该刚性结构上。
- [0076] 本发明还涉及细胞培养自动化设备，其包括至少一个如上所述类型的培养箱和计算机控制系统，所述计算机控制系统包括数据捕获和记录装置并用于调节所述至少一个培养箱的外壳中的培养条件和用于控制容纳在外壳中的盒的阀。

[0077] 本发明还涉及借助于上文所述的自动化设备进行细胞培养的方法,所述方法包括以下步骤:

[0078] a) 将上文所述的细胞培养盒置于培养箱外壳内,并位于在支承和振荡装置上的解冻位置中;

[0079] b) 向袋输送待培养的细胞;

[0080] c) 将盒置于支承和振荡装置上的细胞培养位置中;

[0081] d) 振动细胞培养盒给定时间段以使其内容物均匀化;

[0082] e) 将细胞培养盒保持在孵育条件下数天;以及

[0083] f) 通过盒的其中一个管回收盒的内容物。

[0084] 所述方法还包括:

[0085] -在步骤d) 期间的用于对袋的内容物进行采样的一个或多个采样步骤,每个采样步骤之前是将支承板从水平培养位置倾斜到倾斜位置的步骤,在所述倾斜位置中,袋的采样区代表袋的最低点。

附图说明

[0086] 通过举例的方式参考附图阅读以下描述时,将更好地理解本发明,并且本发明的其他细节,优点和特征将出现,其中:

[0087] -图1是根据本发明的细胞培养自动化设备的透视示意图,该自动化设备包括培养箱,其限定打开的恒温控制的外壳;

[0088] -图2是单独的培养箱的透视示意图;

[0089] -图3A和3B是支承和振荡机构的以及盒的的示意性侧视图;

[0090] -图4是支承和振荡机构的以及盒的透视示意图;

[0091] -图5是放在支承和振荡机构上的盒的顶部的示意图;

[0092] -图6A至6C表示盒在自动化设备的恒温外壳中的不同操作位置;

[0093] -图7是根据本发明的盒朝向上半壳的透视示意图;

[0094] -图8是根据本发明的盒朝向下半壳的示意性透视图;

[0095] -图9是图8中虚线区域的较大比例示意图;

[0096] -图10是图7中的盒的示意性透视图,其中上半壳被移除;

[0097] -图11是单独的下半壳的透视示意图,

[0098] -图12是图11中虚线所示区域的透视的较大比例示意图;

[0099] -图13和14是上半壳的透视示意图;

[0100] -图15A是用于盒管道的开关阀的接收板的透视示意图;

[0101] -图15B和15C是在图15A中所示的板的仅一部分的透视示意图和更大比例的示意图;

[0102] -图16A,16B和16C表示可与图15A中的板一起使用的阀的第一变型;

[0103] -图17A和17B表示可与图15A中的板一起使用的阀的第二变型;

[0104] -图18是转动图16A,16B和16C中的阀的机构的透视示意图;

[0105] -图19A和19B是从图17A和17B透视的阀致动器的示意图;

[0106] -图20是由离心机和多个培养箱组成的细胞培养系统的透视示意图;

[0107] -图21是显示根据本发明的细胞培养方法的步骤的组织图。

具体实施方式

[0108] 首先,我们参考图1和2,它们代表了根据本发明的细胞培养自动化设备10的实施方案的实例,该自动化设备10例如被设计用于干细胞培养,但不包括人胚胎干细胞。

[0109] 如图所示,自动化设备10基本上由三个元件组成:

[0110] -具有恒温外壳的培养箱12,其包括用于支承和振荡根据本发明的细胞培养盒16的装置14(图1和3);

[0111] -支承培养箱12和离心机20的架18,和

[0112] -计算机系统,连接到培养箱12和离心机20以用于阀和泵控制并由框架18支承。

[0113] 通常,计算机系统包括数据输入和记录设备,数据处理设备,显示设备,以及用于培养箱以及盒16的阀和泵的控制和监测信号传输设备。优选地,计算机系统包括经操作员或用户的触摸屏显示器22和数据输入。

[0114] 可以通过计算机系统和适当的人机界面(HMI)来确保生物方案步骤的控制和可追溯性,其特别允许:

[0115] -确保以下内容的完全可追溯性:每种干细胞移植物的制造过程;操作员对自动化设备的干预步骤;每个步骤的培养参数如温度,CO₂速率和时间;以及某些过程步骤所需的验证行为,

[0116] -通过输入界面、读取和存储条形码数据和RFID标签的机构、以及所收集的信息与内部数据库间一致性的验证来确保过程中使用的消耗品和试剂的可追溯性。这种可追溯性可应用于消耗品和试剂的整个制造,储存和运输链,以及应用于维持这些件的温度的材料条件。

[0117] -通过说明过程步骤的进度的动画和图像系统地向用户指示方案步骤的细节,

[0118] -安全地记录患者识别数据,与干细胞移植特征相关的生物数据,

[0119] -控制每个致动器控制功能,

[0120] -记录和解释自动化设备或流体盒上存在的各种传感器的数据。

[0121] 如图2所示,培养箱12具有两个门,即用以施加至围绕培养箱12的外壳28的开口26的第一接触表面的第一内门22和用以施加至围绕第一接触表面24的第二接触表面31的第二外门30。第一门22和第二门30例如各自是能围绕相同的竖向轴线可枢转的。外壳28容纳通风机构33,通风机构33位于外壳28的上部中(图1,6A,6B和6C)。这些通风机构33被设计和配置成允许在培养箱室内均匀分布温度和气体,这是有效细胞培养并且具有适当的温度所必需的(图1,6A,6B和6C)。在包含在袋中的培养基的解冻期间,室中的热量因此均匀分布,以允许细胞培养基的快速解冻。

[0122] -内门22可以由透明玻璃制成,从而可以在保持培养箱12处于关闭位置的同时观察培养箱12的室28的内容物。外壳28的开口26包括对应于第一接触表面的外缘24,其下边缘24a包括用于接纳板条34的凹部32,该板条用于保持盒16的管或导管36、38,这将在后面特别是参考图7和8进行更详细的描述。在图4,5,7和8中可见的杆/板条34形成刚性壳,其形状可以是基本上平行六面体的。它还可以具有两个侧面40,所述两个侧面彼此相对并通过上下侧面42彼此连接。管道或管36、38水密地延伸穿过板条34中的孔。这些孔在基本上垂直

于侧面40及上下壁42的壁44中形成。杆34的每个侧面40均具有平行于上下侧面42的凹槽46。侧面40的凹槽46关于杆34的中间平面相对于彼此不对称地布置,并与两个侧面40平行。这些凹槽46用于接纳来自培养箱12的下周边缘24a的凹部32的侧面的肋(不可见),以确保板条34定位于凹部32中。当将板条34安装在培养箱12的凹部32中时,凹槽46的不对称定位使得可以执行编码。因此,更一般地,板条可以包括在将其安装在培养箱开口的外缘的凹部中时的编码机构。然后通过可移动构件(例如门或舱口)关闭该开口,该可移动构件能在培养箱打开位置和培养箱关闭位置之间移动。杆或刚性壳34优选地具有与凹部32的形状互补的形状。这种互补形状可以使得当板条34在凹部32中就位时,其下端面42接触凹部32的底面,并且上端面42与培养箱12的外壳28的开口26的外缘24的其余部分平齐,以形成基本上平坦的表面,第一门22可以以密封的方式安置在该表面上。以这种方式,可以以简单的方式实现内门22在培养箱12的外壳28的开口26的外缘24上的密封。另外,管36、38或管道穿过第一门22可以容易地实现,而不需要一个接一个地处理管36、38。最后,当第一门22施加至板条34时,闭合力施加到板条34的刚性结构而不是管36、38,这防止管36、38的任何挤压并保证它们的供流体通过的横截面。优选地,凹部32可包括板条34的存在传感器47,以确认板条在凹部32中的正确定位,从而允许第一门22,然后是第二门30关闭。

[0123] 如图2所示,培养箱室12的前部具有另一个凹部48,该凹部48通向外壳28的开口26的外缘24的凹部32中。该凹部48旨在允许管道或管36、38超出第一门22和第二门30的凹部32至离心机。在实践中,该第二凹部48可以通过舱口(未示出),例如滑动舱口封闭。

[0124] 如图3A所示,恒温外壳28包括用于支承和振荡根据本发明的细胞培养盒16的装置14。该装置可以分为彼此连接的支承装置50和振荡装置52。支承装置50由支承盘54或盒16的支承架和底座60组成。盘/板54具有位于恒温外壳28底部的第一端56和与第一端相对的第二端58,第二端58绕水平轴线63可旋转地连接至基本上垂直延伸的底座60并由形成恒温外壳28的底部的壁62承载(图3A和4)。更精确地并且如图3B所示,板54的第一端56被承载在从外壳28的底部62垂直延伸并形成在板54的两侧上的两个臂65上并能围绕轴线63转动地位于所述两个臂65上。

[0125] 振荡装置52包括连杆/具有连杆64的曲柄型系统,连杆64的上方一端连接到摆动件或垂直摆动杆66的下端,摆动件或垂直摆动杆66通过其相对的上端支承所述板54的下端面。连杆64的下端连接到手摇曲柄68,手摇曲柄68由具有基本上水平的旋转轴线70的电机轴可旋转地驱动。该轴线70垂直于轴线63。摆动件66的上端连接到所述盘,以便使摆动件在垂直于旋转轴线70的平面内移动。另外,摆动件66的上端沿轴线70的方向可移动地连接到支承板54,可能地,这种连接可以通过使来自摆动件66的上端的指状部滑动进入板54中的狭槽71或槽中来实现。

[0126] 如图3、4和5所示,摆动件64穿过培养箱12的外壳28的底壁62。优选地,在底壁62的通过区域的高度处围绕摆动件66设置密封机构,例如波纹管,以便避免热量和湿气传递到恒温外壳28外部,热量和湿气传递到恒温外壳28外部可能会损坏振荡装置52的机械组成部分。

[0127] 图6A,6B和6C表示盘54在其通过振荡机构移动期间所采取的三个位置。图6A示出了处于其上方位置的盘54,图6B示出了处于其下方位置的盘54。在这两个位置中的任何一个中,所述板相对于水平面倾斜。图6C示出了盘54处于基本上水平的中间位置。在操作期

间,盒支承板54因此能够围绕轴线63(图4)在其极限位置(图6A和6C)之间成角度。

[0128] 如图2所示,盒16的支承板54由框架72形成,框架72具有开口74或中空部分和实心部分76。位于盘54的第一端56附近的中空部分74用于面向盒的下半壳,这将在下面描述。实心部分76布置在盘54的第二端58附近。该实心部分76包括用于将细胞培养盒定位和锁定在盘54上的给定位置的机构,该给定位置对应于盒16安置在框架72上并允许进行孵育阶段的位置。定位机构包括向上突出以与盒16中的两个盲孔配合(下面描述)的两个销78。盒16的锁定机构包括夹钩80或带有盒钩的弹簧钩(下面将对其进行描述),以便将盒16锁定在盘54上。盘54的框架72的实心部分46的钩80布置在两个销78之间。

[0129] 如图2所示,所述板包括用于打开/关闭阀的三个机电致动器82,每个致动器82包括具有第二联接机构的输出部,第二联接机构用于在盒16安置在板54的框架72上时与盒的第一阀联接机构配合。

[0130] 框架72顶置有结构84,该结构84用于将盒16支承在距离框架72的一定距离处。该支承结构84允许盒16被支承在对应于解冻阶段的第二位置。该支承结构84包括通过平坦壁88彼此连接的两个横向翼部86,它们一起形成用于处于第二位置的盒16的共同支承平面。应注意,盒16在处于第一位置时的支承平面与盒16在处于第二位置时的支承平面相对于彼此倾斜。第二位置允许不透气地真空密封在包层中的盒16被支承在离框架72一定距离处,以避免在解冻阶段期间因销78导致的对通常由塑料制成的包层的任何撕裂。

[0131] 现在参考图7和8,它们代表根据本发明的用于细胞培养的盒16,其包括壳体90,壳体90的形状基本上对应于具有第一端92和第二端94的长方体的形状,参考盒16在盘54上的定位。壳体90具有彼此成一体的下半壳96(图9至12)和上半壳98(图13和14),下半壳96是刚性的,并且上半壳98是刚性的或部分刚性的即包括柔性部分。下半壳96和上半壳98一起限定出壳体,在壳体中固定有柔性细胞培养袋100,该柔性细胞培养袋100限定了待填充细胞培养基的内部容积。

[0132] 下半壳96和上半壳98通过四个外缘/周向边缘102a,102b彼此连接。下半壳96和上半壳98可通过夹紧,胶合或焊接它们的外缘102a,102b来组装。在一个优选实施方案中,下半壳96和上半壳98都是刚性的。

[0133] 下半壳96包括多个孔104,孔104的直径优选小于20mm。例如,盒16的长为405mm,宽为305mm,厚为25mm。它还包括两个盲孔106,所述两个盲孔彼此间隔开并将通孔107框在其间。盲孔106由下半壳96中的凹部109形成,朝向上半壳98延伸(图11和12)。上半壳98包括开口或凹部108,其形状和尺寸被确定为当包含液体的盒16围绕水平轴线63摆动/振荡时允许液体的波动从袋100传播到开口中,开口108(或开孔)向上布置(图7,13,14)。如上所述,当盒16在盘54上安装为处于第二位置并且该盘按如图6A,6B和6C所示的摆动方式移动时,凹部108的形成允许壳体内部的袋100的表面起伏。上半壳98包括弹性舌片110,弹性舌片110用以承载夹钩112和板54的框架72的钩80,如上所述。因此,上半壳98的钩112构造造成穿过下半壳96的开口107。最后,上半壳98还包括用于插入手动阀致动插头116的圆孔114,其用途将参考图17和18更清楚地显示出来。

[0134] 应该注意的是,下半壳96的位于壳体90的第一端92处的外缘102a具有直肋116,当细胞培养盒16以其第一位置安装在培养箱12的外壳28中的板54上时(图8,9,11,12),该直肋116用于与板54的支承结构84的狭槽118配合。在该第一位置,上半壳98的夹钩112穿过下

半壳96的开口107,并与板54的框架72的钩80配合,以确保盒16被锁定在该第一位置(图3,4和5)。为了释放盒16并将其从培养外壳28中取出,只需按压突片110,这导致上半壳98的钩110从钩80和因此盘54脱离。

[0135] 板120通过卡扣固定到上半壳中并且适于以折叠位置将盒16的管36,38保持在上半壳98的外端面上。

[0136] 图10示出了壳体90的内部,未示出上半壳98。如可见,细胞培养袋100具有基本上矩形的形状,其具有在空的和液体填充状态下基本上彼此平行的第一壁122和第二壁(不可见)。第一壁122和第二壁通过其外缘/周向边缘123,借助诸如焊接或胶合的任何方式彼此连接并成一体。在本发明的一个特定实施方案中,第一壁122或第二壁中的一个的表面积与袋的内部容积的比率为 $540\text{--}600\text{cm}^2/\text{L}$,并且优选地为约 $580\text{cm}^2/\text{L}$ 。第一壁122和第二壁之间的距离小于20mm,优选地介于10mm至20mm之间,甚至更优选为约14mm。

[0137] 细胞培养袋100通过从下半壳96的内侧突出的销124固定在下半壳96上。这些销124穿过细胞培养袋100的外缘123中的孔。袋100的内部容积通过多个导管与外部连通。特别地,盒16可包括四个管道或柔性管36,38,其中三个管道或柔性管36连接到先前描述的杆34,第四个管道或柔性管38是独立的。

[0138] 更具体地,盒16包括第一和第二采样管36a,36b以及排空管36c。管38对应于用于注射感兴趣细胞的管。如图5、7、8、9和10所示,盒还包括管39,用于用培养基初始填充袋100。在根据本发明的盒16的一个优选配置中,四个管36a,36b,36c,38配备有可以是无菌连接器和/或无针抽出连接器的连接器,如有必要,所述连接器还包括止回机构。在本说明书的其余部分中,当单独使用附图标记36时,它将指代管36a,36b或36c中的至少一个。

[0139] 如图10所示,管36,38延伸穿过下半壳96的相同外缘102a,即在壳体90的第二端94处形成的外缘102a中的凹口126。填充管39在与供管36,38通过的一侧相邻的一侧上延伸并且其布置在壳体90内部的一端连接在管36的流体连接在阀128和袋100之间的部分中。

[0140] 每个管36,38穿过阀128,130a,130b,130c,用于打开/关闭通过管36,38的流体流,这些夹管阀128,130布置在壳体90中。在所示的示例中,三个管36穿过第一类型的阀130,管36a穿过阀130a,管36b穿过阀130b并且管36c穿过阀130c,而第四个管38穿过第二类型的阀128(图10和15A)。更确切地说,壳体90包括板132(图15A,15B和15C),板132具有多个基本上圆柱形的凹部134,每个凹部134接纳可移动构件136,138,用于夹紧管36,38(图16和17)。该板因此形成阀128,130的主体或机体部分。板132的每个凹部134包括限定出中心孔142的环形底壁140,当将板132安装在壳体90中时,中心孔142与下半壳96的孔144对齐(图10和12)。

[0141] 每个可移动部件136,138均包括下端136a,138a和上端136b,138b,参考下半壳96和上半壳98并且参考盒相对于竖向的布置。当然,可以更一般地将下端指定为第一端而将上端指定为与第一端相对的第二端。因此,每个可移动构件136,138的上端136b,138b包括环形肩部146b,该环形肩部用以沿旋转轴线136c,138c支承在板132的凹部134的孔口142的周边上并围绕圆筒形壁148b,圆筒形壁148b用于装入凹部的孔口142中。在这种情况下,构件136的表面146b支承在阀130a,130b,130c的凹部134的底表面140上。因此,可以在板132的凹部134中进行可移动部件136,138的第二端136b,138a的旋转引导和定中。每个可移动构件136,138的下端136a,138a均包括环形肩部146a和圆筒形壁148a,环形肩部146a用于沿旋转轴线136c,138c支承在下半壳96的孔口144的周边上,圆筒形壁148a用于插入下半壳96

的孔口144中。在这种情况下,件138的表面146b支承在阀128的凹部134的底表面140上。这样,每个可移动构件136,138在下半壳96和板142上被引导旋转并且定中,板142自身通过由下半壳96的内面上的螺柱152穿过耳部150并且由于上半壳98而被固定到下半壳96,上半壳98的外缘102b固定到下半壳96的外缘102a。可移动构件136,138的下端136a,138a因此通过下半壳96打开,并且因此可从下半壳96的外表面接近,如图9所示。

[0142] 如图16A,16B,16C所示,与管36相关联的可移动件136在其下端136a处具有从壳体外部可操作的第一联接机构,以便与布置在培养箱中的可移动件136的第二致动器联接机构82配合。形成在构件136的下侧上的第一联接机构在此包括径向狭槽151和以旋转轴线136c为中心的半圆形槽153,径向狭槽151的径向内端由旋转轴线136c横穿。致动器82的第二联接机构可以例如包括两个杆155a,155b,其中第一杆155a以致动器82的旋转轴线为中心,第二杆155b相对于第一杆155a径向偏移/偏置。当盒16安装在框架72上时,如图3A所示,第一杆155a接合在狭槽151的径向内端,而第二杆155b接合在半圆形槽153中。可以理解,使用半圆形槽153确保了第二杆153b与槽153配合,而不管可移动构件136在将盒16安装在框架72上之前的角位置。可移动部件136上的径向狭槽151的集成允许可移动部件136在必要时被手动操作。

[0143] 在与管38相关联的图17A和17B中的阀138的情况下,第一联接机构形成在可移动构件138的上端138b处。与阀130的三个可移动构件136不同,阀128的可移动构件138不由机电致动器致动,而是由旋转构件或旋钮154手动致动,如图18A和18B所示。这里通过在可移动构件138的上端138b处的十字凹部157进行所述联接,其中致动按钮154的互补的十字形构件156接合在该十字凹部中。按钮154借助于多个可弹性变形的钩158固定到上半壳98上,钩158保留/悬置在上半壳98的圆形孔口114的内周上。

[0144] 为了夹紧管36,38,每个可移动构件136,138均包括围绕可移动构件136,138的旋转轴线136c,138c的螺旋突起160。每个突起160的径向外表面在管36,38上形成支承表面。每个突起160在垂直于旋转轴线136c,138c的平面中具有对称平面。每个管36,38部分地容纳在下半壳96的具有半圆形截面的直线槽162中并且另一部分容纳在板132的具有半圆形截面的直线槽164中,以便在垂直于移动部件的旋转轴线136c,138c的方向上穿过板132的凹部134的周边(图11,12,15A,15B,15C)。因此,由于阀128,130的可移动构件136,138的旋转,突起160确保根据可移动构件136,138的旋转方向逐渐打开或关闭/闭合管36,38的截面。

[0145] 板132的凹部的每个环形底壁140带有两个止动构件166a,166b,它们伸入到凹部134内并且彼此成角度地间隔开。开孔167形成在每个凹部134的环形底壁140中,以限定弹性薄片168,弹性薄片168具有在凹部134中承载突起的自由端,该突起具有凸起部分171以与移动部件136,138滑动配合(图15B,15C)。突起170与每个可移动部件136,138的槽172滑动配合,槽172具有圆弧形状和凹形弯曲底部。对于图16A,16B和16C中的可移动构件136,槽172形成在轴向地布置于突起160和上环形肩部146b之间的径向环形凸缘174上并形成在面向可移动构件136的上端136b的面上。类似地,对于图17A和17B中的移动构件138,槽172形成在轴向地布置于突起160和上环形肩部146b之间的径向环形凸缘174上并形成在面向移动构件138的上端138b的面上。

[0146] 半球形腔176a,176b形成在每个槽170,172的角端部处,以便形成可移动构件136,

138的停止位置,一个用于对应于流体可以流动的打开位置且另一个对应于流体不能流动的关闭位置。还应注意,每个可移动构件136,138包括从上肩部146b横向延伸出的径向指状部178,该径向指状部与凸缘174的承载槽172的表面接触。因此,在阻止流动通过管36,38的位置中,可移动构件136,138定位成使得弹性薄片168的突起170接合在可移动构件136,138的腔或凹部176a中,可移动构件136,138的径向指状部178布置成在图15中的逆时针旋转中停靠在止动构件166a上。在流动通过管36,38的位置中,可移动构件136,138定位成使得弹性薄片168的突起170接合在可移动构件136,138的腔或凹部176b中,可移动构件136,138的径向指状部178布置成在图15中的顺时针旋转中停靠在止动构件166b上。应当理解,突起170与腔176a,176b的配合使得可以确保可移动部件136,138在闭合和打开位置的弹性锁定。

[0147] 容易理解的是,上述阀可以很好地用在需要装置打开/关闭通过歧管的流体流动的其他装置中。因此,本说明书还包括集成所述阀的任何装置,例如包括板132的装置,板132具有多个凹部134,其中旋转部件接合在凹部134中。

[0148] 可以为盒16和/或培养箱配备检查盒16在其第一和第二位置的每一个中的正确定位的自动机构。为此目的,磁体可以在下半壳96的内侧上被置于在壳体90的内部,该磁体与两个霍尔效应传感器配合,所述霍尔效应传感器相对于待检测的第一和第二位置适当地定位在板上。

[0149] 图20表示细胞培养系统180,其包括如上所述的多个培养箱12和离心机20。培养箱12和离心机20由计算机系统控制。

[0150] 图21是表示根据本发明的细胞培养方法的步骤的组织图。

[0151] 在下述方法之前,使用侧管39为细胞培养盒16填充细胞培养基。填充后,例如通过焊接立即密封该管39。然后将细胞培养盒16冻平,即处于水平位置,以便储存和随后使用。

[0152] 方法182的第一步是使用计算机系统捕获和记录生物方案特有的培养参数。该输入由操作者进行,输入的参数例如是患者的识别,盒的识别等。为了便于输入这些参数,计算机系统可以配备条形码阅读器,盒可以包括条形码,该条形码直接报告计算机系统盒的数量和性质。然后通过条形码读取或通过触摸屏输入关于待培养细胞的容器(例如袋)的标签上指示的个人识别数据。

[0153] 在第二步184中,计算机系统在根据细胞培养时间表检查培养箱的可用性之后将给定的培养箱分配给操作者。操作者将包含细胞培养液的细胞培养盒16安装在所述指定的培养箱中,然后其他培养箱优选地不可接近,即其他培养箱12的门22,30被锁定。

[0154] 在第三步186中,该方法包括解冻容纳在如上所述的培养盒的柔性袋中的培养基。为此目的,将气密密封在无菌保护包层中的细胞培养盒16以第二位置安装在由计算机系统指定的培养箱支承和振荡机构52上,即在支承结构84上(图3A和3B)。操作员关闭门22和30,计算机系统启动解冻程序,门22和30自动锁定。支承和振荡装置以盒16水平定位的方式操作。

[0155] 在第四步188中,在解冻后,从培养箱中取出细胞培养盒16,并在充分控制活性的区域中除去外壳。

[0156] 在第五步190中,将感兴趣的细胞(不包括人胚胎干细胞)注射到盒中。为此目的,手动阀128定位在打开位置。回想一下,管36,38配备有防回流机构,以防止袋100中的液体

流出。通过管38将细胞注射入袋100中,然后将阀128定位于关闭位置,并用紧密的盖密封管38。

[0157] 在第六步192中,将填充有培养基和感兴趣细胞的盒16安装在对应于孵育位置的第一位置。板条34安装在门22的开口32中,管36的与袋100相对的端部延伸到开口38中并连接到图20所示系统的流体回路。

[0158] 然后,根据本发明的方法包括孵育步骤194,其可持续数天,例如约10天。定期地,根据方案参数,通过如上所述使盘54围绕轴线63摆动,可以使袋100的内容物均匀化。这种均匀化(持续时间,重复频率,振幅)由所选方案的参数确定。

[0159] 在孵育步骤期间,操作者可从袋100中取出一个或多个样品196(图14和22)。这些采样中的一些可以由计算机系统施加。使用管36a和36b采样。

[0160] 为了获取第一样品,计算机系统启动与其相应的阀130a相关联的可移动构件136,以允许流体流过管36a。当通过计算机系统采样时,管36a的最终填充操作以确保无菌并且避免任何随后使用已经使用的采样管的方式进行。第二次采样以相同的方式完成,但是使用管36b。

[0161] 在从袋100采样196的每个子步骤之后,操作者可以对样品进行分析,其结果可以由操作者或自动地输入并记录在计算机系统中。

[0162] 在方法198的最后步骤中,计算机系统恢复或清空盒16的袋100的内容物。

[0163] 最后,袋的内容物在无菌注射器中进行纯化和包装步骤以备后用。

[0164] 本申请还涉及细胞培养方法,特别是哺乳动物细胞,特别是人细胞的培养,不包括人胚胎干细胞。

[0165] 这些细胞,特别是除人胚胎干细胞外的人细胞,可以有利地是或包括CD34+(人)细胞,特别是CD34+(人)造血细胞或非造血CD34+(人)细胞。这些CD34+(人)细胞可以是,例如,来自(人)外周血,(人)脐带或人组织,特别是(人)外周血的细胞。

[0166] 这些细胞,特别是除人胚胎干细胞外的人细胞可以有利地是或包括干细胞或祖细胞,特别是多能细胞或全能细胞。

[0167] 这些细胞不是或不包括人胚胎细胞。

[0168] 这些细胞,特别是除人胚胎干细胞外的人细胞,可以有利地是或包括人CD34+(多能或全能)干细胞或由生长因子如G-CSF(生长菌落刺激因子)动员的外周血祖细胞。

[0169] 这些细胞,特别是不包括人胚胎干细胞的人细胞,可以是人类受试者或患者(新生儿,儿童,青少年,成人或老年人)中收集的或已经从人类受试者或患者(新生儿,儿童,青少年,成人或老年人)中收集。本发明特别适用于可从人受试者或患者的外周血中收集的人CD34+细胞(多能或全能)。如果患者要接受化疗,可以在化疗之前或化疗开始时收集这些细胞。

[0170] 含有用于培养的细胞的生物样品(例如(人)血液样品,特别是(人)外周血,(人)脐带血或人体组织的样品,特别是人外周血样品)是从人类受试者或患者收集的或已从人类受试者或患者收集。

[0171] 本申请的方法具有不需要使用白细胞分离术的优点:简单的血液样品,例如200mL至250mL血液的样品,特别是220mL血液的样品,足以获得大量细胞,特别是足以进行治疗和/或预防性处理,更特别是用于(人)受试者或患者的自体或同种异体细胞疗法,更特别是

用于(人)受试者或患者的自体细胞疗法的许多细胞。

[0172] 对于用于治疗 and/或预防性处理,更特别地用于受试者或患者的自体或同种异体细胞疗法,更特别地用于受试者或患者的自体细胞疗法的人CD34+细胞尤其如此。人CD34+细胞可以是非胚胎人CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞。人CD34+细胞不是或不包括胚胎CD34+细胞。

[0173] 本申请的细胞培养方法允许从少量血液(例如200mL至250mL血液,特别是220mL血液的样品)获得至少 10^7 个或至少 10^8 个包含至少70%的人(非胚胎)CD34+细胞的群体的。相比之下,为了从单个受试者或患者的血液中直接(没有细胞培养)获得这样量的人CD34+细胞,需要通过白细胞分离术处理7L至10L体积的血液。

[0174] 用于培养的细胞,特别是人(非胚胎)CD34+细胞,可以从收集的生物样品,包括血液样品,特别是外周血样品(例如200mL至250mL外周血,特别是220毫升外周血的样品)中纯化或分离。

[0175] 可以纯化细胞以达到某种细胞类型的最低水平。例如,它们可以被纯化以包括至少70%或至少80%或至少85%或至少90%的人(非胚胎)CD34+细胞,特别是人CD34+造血(非胚胎)细胞。

[0176] 该分离或纯化可以通过本领域技术人员已知的任何方法完成。

[0177] 例如,对于人CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞,可以使用人抗CD34单克隆抗体例如由DAKO DENMARK AS (Produktionsvej 42;DK-2600Glostrup;Denmark)以克隆QBEnd-10(代码M7165)销售的人鼠抗CD34单克隆抗体进行这种分离或纯化。CD34+(人)细胞分离或纯化系统也是可商购的,例如,由BAXTER (Deerfield, IL, USA)销售的ISOLEX 300i磁性细胞分离器,或由MILTENYI BIOTECH (2303Lindbergh Street, Auburn, CA 95602, USA)销售的CD34微珠试剂盒。

[0178] 将纯化或分离的细胞置于培养基上或培养基中,培养基的组成适合于这些细胞的增殖。上文已经描述了这种培养基的实例,包括适合培养人CD34+细胞的培养基。例如,它可以是如上所述的培养基,包括含有人胰岛素,人转铁蛋白和人血浆或血清的培养基。该培养基可以包含在本申请的盒的袋中。

[0179] 然后将细胞置于孵育中,例如通过将袋或含有袋的盒置于培养箱,包括根据本申请的培养箱中。例如,孵育时间可以是几天,特别是8到10天,特别是9天,特别是当它涉及人CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞的培养物时。

[0180] 本申请还涉及除人胚胎干细胞外的细胞,包含此类细胞的细胞群,以及包含此类细胞或细胞群的药物组合物。

[0181] 如上所述,这些细胞或细胞群可以通过根据本申请的培养获得。

[0182] 在本申请中,细胞尤其可以包括(人)CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞,特别是(人)造血CD34+细胞或(人)非造血CD34+细胞。

[0183] 这些(人)CD34+细胞可以是,例如,来自(人)外周血,(人)脐带或人组织,特别是(人)外周血的细胞。

[0184] 这些细胞可以有利地是或包括干细胞或祖细胞,特别是多能细胞或全能细胞,不包括人胚胎干细胞。

[0185] 这些细胞不是或不包括人胚胎细胞。

[0186] 这些细胞尤其可以包括来自自由生长因子如G-CSF(生长菌落刺激因子)动员的外周血的人CD34+干细胞或祖细胞(多能或全能)。

[0187] 本申请的细胞,包括本申请的(人)CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞,可以是纯的或分离的形式,或者可以包括在细胞群中。

[0188] 因此,根据本申请的细胞群可以是非胚胎人细胞群,其包括根据本申请的人CD34+细胞。

[0189] 特别地,根据本申请的细胞可包括非胚胎人细胞(群),其特征在于:

[0190] -它们数量为至少 10^7 个人细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人细胞,以及

[0191] -它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的)。

[0192] 这些人细胞也可以具有相同的HLA分型,特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型。

[0193] 例如,根据本申请的细胞可包括人非胚胎造血细胞(群),其特征在于:

[0194] -它们数量为至少 10^7 个人造血细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人造血细胞,以及

[0195] -它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的)。

[0196] 这些人造血细胞也可以均具有相同的HLA分型,特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型。

[0197] 本申请的细胞可具有一种或多种特征,其将它们与天然细胞/原初细胞区分开。

[0198] 本文中的术语“天然/原初”是指这些细胞是已直接从人类受试者或患者获得的,并且可能已被纯化但尚未培养的细胞。

[0199] 实际上,已经观察到在根据本申请进行培养后(例如在如上所述的培养基上和/或袋或盒中),所得的人细胞群与最初置于培养物中的天然群体在以下的一个或多个方式中不同:

[0200] -较大的平均直径(直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$),

[0201] -较高比例的CD34-CD14+细胞(单核细胞,其可对细胞移植物的有效性产生积极影响),

[0202] -较高比例(但不是100%)的CD34+CD33-细胞(CD33是髓样系的标志物),

[0203] -较小比例(但仍然大于10%)的CD34+CD133+细胞(内皮祖细胞的标志物)。

[0204] 特别地,本申请的细胞可以是具有一种或多种以下特征的人细胞,不包括人胚胎干细胞:

[0205] 1/它们数量为至少 10^7 个人细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人细胞,

[0206] 2/它们都具有相同的HLA分型,更特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型,

[0207] 3/它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),

- [0208] 4/它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,
- [0209] 5/它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人) CD34-CD14+细胞,
- [0210] 6/它们含有比例大于10%或大于20%或大于25%(并且有利地小于100%,特别是小于60%或小于50%或小于40%或小于35%)的(人) CD34+CD33-细胞,
- [0211] 7/它们含有比例小于60%或小于50%(并且有利地大于20%,特别是大于25%或大于30%)的(人) CD34+CD133+细胞。
- [0212] 根据一个实施方案,本申请的细胞是不包括人胚胎干细胞在内的人细胞,其具有这七种特征中的至少两种,特别是这七种特征中的至少三种,或至少四种,或至少五种,或至少六种,或者具有所有七种特征。
- [0213] 例如,本申请的细胞可以是人造血细胞,其具有一种或多种以下特征:
- [0214] 1/它们数量为至少 10^7 个人造血细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1.5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1.7 \cdot 10^8$ 个人造血细胞,
- [0215] 2/它们都具有相同的HLA分型,更特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型,
- [0216] 3/它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),
- [0217] 4/它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,
- [0218] 5/它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人) CD34-CD14+细胞,
- [0219] 6/它们含有比例大于10%或大于20%或大于25%(并且有利地小于100%,特别是小于60%或小于50%或小于40%或小于35%)的(人) CD34+CD33-细胞,
- [0220] 7/它们含有比例小于60%或小于50%(并且有利地大于20%,特别是大于25%或大于30%)的(人) CD34+CD133+细胞。
- [0221] 根据一个实施方案,本申请的细胞是人造血细胞,其具有这七种特征中的至少两种,特别是这七种特征中的至少三种,或至少四种,或至少五种,或至少六种,或具有所有七种特征。
- [0222] 特别地,本申请的细胞可以是具有一种或多种以下特征的人细胞,不包括人胚胎干细胞:
- [0223] 1/它们数量为至少 10^7 个人细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1.5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1.7 \cdot 10^8$ 个人细胞,
- [0224] 2/它们都具有相同的HLA分型,更特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型,
- [0225] 3/它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),
- [0226] 4/它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,
- [0227] 5/它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人) CD34-CD14+细胞。
- [0228] 根据一个实施方案,本申请的细胞是不包括人胚胎干细胞在内的人细胞,其具有

这五种特征中的至少两种,特别是这五种特征中的至少三种,或至少四种,或全部五种特征。

[0229] 例如,本申请的细胞可以是具有一种或多种以下特征的人造血细胞:

[0230] 1/它们数量为至少 10^7 个人造血细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人造血细胞,

[0231] 2/它们都具有相同的HLA分型,更特别是相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型,

[0232] 3/它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),

[0233] 4/它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,

[0234] 5/它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人)CD34-CD14+细胞。

[0235] 根据一个实施方案,本申请的细胞是人造血细胞,其具有这五种特征中的至少两种,特别是这五种特征中的至少三种,或至少四种,或全部五种特征。

[0236] 特别地,本申请的细胞可以是不包括人胚胎干细胞在内的人细胞,其具有以下特征:

[0237] -它们数量为至少 10^7 个人细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人细胞,

[0238] -它们包含至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),并且还具以下特征中的至少一种或两种:

[0239] -它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,

[0240] -它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人)CD34-CD14+细胞。

[0241] 例如,本申请的细胞可以是人造血细胞,其具有以下特征:

[0242] -它们数量为至少 10^7 个人造血细胞,更特别是至少 10^8 个,或至少 $1,5 \cdot 10^8$ 个,或 10^7 到 $1,7 \cdot 10^8$ 个人造血细胞,以及

[0243] -它们含有至少70%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),更特别是至少80%,或至少85%或至少90%的人CD34+细胞(多能或全能,并且不是胚胎的),

[0244] 并且其还具有以下特征中的至少一种(或两种):

[0245] -它们的细胞直径为 $11.2 \pm 0.5 \mu\text{m}$,特别是 $11.18 \pm 0.49 \mu\text{m}$,

[0246] -它们含有比例为1%至12%,特别是2%至10%或3.8%至10%的(人)CD34-CD14+细胞。

[0247] 该群体中的细胞可以全部具有相同的HLA-A,HLA-B,HLA-C和HLA-DR分型。

[0248] 该群体中的细胞还可包括:

[0249] -比例大于10%或大于20%或大于25%(并且有利地小于100%,特别是小于60%或小于50%或小于40%或少于35%)的(人)CD34+CD33-细胞,

[0250] -比例小于60%或小于50%(并且有利地大于20%,特别是大于25%或大于30%的CD34+CD133+细胞)的(人)CD34+CD133+细胞。

[0251] 作为替代或补充,本申请的细胞可具有与天然细胞,特别是天然人细胞,特别是天然人造血细胞相同(或不显著不同)的一种或多种特征。

[0252] 实际上,已经观察到在根据本申请进行培养后(例如在如上所述的培养基上和/或盒袋中),所得的人细胞群(包括所得的人造血细胞群)可具有与最初放置在培养物中的天然(造血)细胞群共同的特征。

[0253] -特别地,本申请的细胞可以是这样的细胞(包括造血细胞),即其与天然细胞(包括天然造血细胞)相比,并且更特别地与最初置于培养物中的(天然)细胞相比,具有一种或多种以下特征:

[0254] 1/相同数量或比例(或没有显著差异)的CD34表位,

[0255] 2/相同(或没有显著差异)的分裂能力,特别是相同的端粒相对长度(或没有显著差异),

[0256] 3/同样没有染色体异常和多倍体(或相同比例的相同染色体异常或多倍体),

[0257] 4/相同(或没有显著差异)的活力,特别是相同(或没有显著差异)的CD34+细胞活力,例如至少90%或至少95%的CD34+细胞活力,

[0258] 5/相同(或没有显著差异)比例的CD34-CD2+/CD3+细胞,

[0259] 6/相同(或没有显著差异)比例的CD34-CD19+/CD20+细胞,

[0260] 7/相同(或没有显著差异)比例的CD34-CD56+细胞,

[0261] 8/相同(或没有显著差异)比例的CD34-CD15+细胞。

[0262] 根据另一实施方案,本申请的细胞具有这八种特征中的至少两种,或至少三种,或至少四种,或至少五种,或至少六种,或至少七种,或具有所有八种特征。

[0263] 特别地,本申请的细胞可以是这样的细胞(包括造血细胞),即其与天然(造血)细胞相比,特别是与最初培养的(天然)细胞相比,具有一种或多种以下特征:

[0264] 1/相同数量或比例(或没有显著差异)的CD34表位,

[0265] 2/相同(或没有显著差异)的分裂能力,特别是相同的端粒相对长度(或没有显著差异),

[0266] 3/同样没有染色体异常和多倍体(或相同比例的相同的染色体异常或多倍体)。

[0267] 根据又一实施方案,本申请的细胞具有这三种特征中的至少两种,或全部三种。

[0268] 本申请明确包括此处描述的细胞特征的任何组合,包括以下组合:

[0269] -本申请的细胞与天然细胞不同的特征,以及

[0270] -与天然细胞相同的特征。

[0271] 本申请的细胞培养方法基本上对应于离体细胞扩增的方法。它具有提供大量(更特别是治疗上足够数量的)自体或同种异体细胞,特别是来自患者或受试者的外周血的小样品的自体细胞(更特别是自体或同种异体CD34+细胞,更特别是自体CD34+细胞),不会在这些细胞中引入有害的修饰的优点。

[0272] 下面的表1提供了在根据本申请的培养袋中实施培养之前和之后,从一群健康人志愿者的外周血获得的细胞群的特征的图示(在补充谷氨酰胺并且不含成纤维细胞,并含有0.01mg/mL胰岛素,330pg/ml转铁蛋白和5%(VN)人血清的IMDM培养基上培养9天),来自沉淀分离的细胞,并通过免疫亲和在抗CD34磁珠上纯化):

[0273] 表1

[0274]

年龄为 21 至 57 岁的 71 名男性健康人志愿者群体	CD34+细胞群
-------------------------------	----------

[0275]

生物样品=每个患者 220 ml 外周血	天然群体 (未经过细胞培养获得的)	根据本申请培养后获得的群体的实例(细胞培养后每个患者的平均值)
CD34+ 细胞的数量	5,1.10 ⁶ 至 40,9.10 ⁶	1.10 ⁷ 至 1,7.10 ⁸
CD34+细胞的活力	大于 95%	大于 95%
CD34+的细胞直径	8.8 ± 0.1 μm	11.18 ± 0.49 μm
CD34+细胞的百分比 (纯化后)	至少 70% (或至少 80%, 或至少 85%, 或至少 90%)	至少 70% (或至少 80%, 或至少 85%, 或至少 90%)
CD34- CD14+细胞	0.2%至 0.8%	3.8%至 10%
CD34+ CD33-细胞	4.2%	33%
CD34+ CD133+细胞	75.8%	44.5%
每个细胞 CD34+表位的数量	14 804 ± 2 294	15 363 ± 2 730
端粒相对长度	9.17 ± 1.32 %	8.35 ± 2.07 %
染色体异常	无	无
多倍体	无	无
CD34- CD2+/CD3+ 细胞	0 至 0.3%	0 至 1%
CD34- CD19+/CD20+细胞	0 至 0.6%	0.1%至 1%
CD34- CD56+细胞	0%	0 至 1%
CD34- CD15+细胞	2%至 5.8%	2.5%至 5%

[0276] *数值来自8个志愿者的群体。

[0277] 培养一旦完成后,可以收集获得的细胞,尤其是获得的(人)CD34+细胞。

[0278] 收集的细胞可以是纯化或分离的,更特别是纯化的。特别地,可以纯化CD34+细胞,例如通过使用如上所述的本领域技术人员可获得的纯化方法。

[0279] 收集的 and 可能纯化的细胞可以置于组合物中,特别是药物组合物中,特别是液体药物组合物中,例如用于人的无毒和等渗药物溶液。所得组合物或溶液是本申请的主题。

[0280] 所述组合物可包含用于人的生理学上可接受的载体。

[0281] 所述组合物可以配制成可施用于人体或施用在人体内,更具体地是可注射于人体或人体内。因此它可以是液体并且包含对人无毒的化合物,优选人体等渗浓度的无毒化合物。

[0282] 因此,除细胞外,组合物可以例如包含对人无毒的缓冲溶液,例如盐水磷酸盐缓冲溶液(磷酸盐缓冲盐水或PBS),或葡糖酸盐和/或乙酸盐缓冲溶液。

[0283] 所述组合物还可包含至少一种对人无毒的添加剂,例如来自人血清或人血浆的蛋白质,包括人血清白蛋白(HSA)。

[0284] 可以将本申请的组合物或溶液储存直至使用,例如通过冷藏(冷冻)。

[0285] 本申请的方法可用于细胞治疗(治疗的和/或预防的),特别是用于自体或同种异体细胞治疗,有利地是自体细胞治疗。

[0286] 该细胞治疗可包括向患者或受试者施用:

[0287] -如上所述的本申请的细胞,特别是含有CD34+细胞的人细胞,不包括人胚胎干细胞,或

[0288] -含有这些细胞的药物组合物或溶液。

[0289] 该患者或受试者可以与最初收集细胞用于细胞培养的患者或受试者相同(自体细胞治疗或疗法)。或者,该患者或受试者可以与最初收集细胞用于细胞培养的患者或受试者不同(同种异体细胞治疗或疗法)。

[0290] 细胞治疗,更特别是自体或同种异体(特别是自体)细胞治疗,可包括治疗或预防心力衰竭或非心脏疾病。

[0291] 心力衰竭特别可以是:

[0292] -心力衰竭,其包括心室衰竭,特别是左心室衰竭,

[0293] -特别是收缩功能受损的心力衰竭,

[0294] -更特别是心室,特别是左心室的收缩功能改变的肝脏衰竭,

[0295] -更特别地,心力衰竭伴随着与左心室射血分数(LVEF)降低相关的收缩期末期容积增加。

[0296] 根据纽约心脏病协会(NYHA)分类[The Criteria Committee of the New York Heart Association],1994.Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels.(第9版)。波士顿:Little,Brown&Co.,第253-256页,这可以包括II级或更高级别的心力衰竭,特别是由二尖瓣关闭不全引起的二级或更高级别的心力衰竭(根据NYHA分类)。

[0297] 心力衰竭可包括由以下引起的心力衰竭:

[0298] -高血压,

[0299] -瓣膜损伤,

[0300] -先天性疾病,

[0301] -难治性心绞痛(例如,难以用增强的体外反向脉冲(EECCP)或神经刺激治疗(特别是经皮神经刺激(TNS)或脊髓刺激(SMS)或螯合治疗(特别是EDTA施用治疗)治疗的心绞痛,

- [0302] -心肌病,特别是
- [0303] -缺血性心肌病,特别是心肌梗塞,特别是急性心肌梗塞,
- [0304] -扩张型心肌病,
- [0305] -肥厚性心肌病,
- [0306] -限制性心肌病,
- [0307] -致心律失常性右室心肌病 (ARVC)。
- [0308] 心力衰竭可包括由心肌病引起的心力衰竭,特别是由以下引起的心力衰竭:
- [0309] -缺血性心肌病,特别是心肌梗塞,特别是急性心肌梗塞,
- [0310] -扩张型心肌病,
- [0311] -肥厚性心肌病,
- [0312] -限制性心肌病,
- [0313] -致心律失常性右室心肌病 (ARVC)。
- [0314] 心力衰竭可包括由心肌病,特别是缺血性心肌病,特别是心肌梗塞,特别是急性心肌梗塞引起的心力衰竭。
- [0315] 可以特别是通过减少或甚至消除心力衰竭和/或限制心力衰竭的发展来治疗或预防心力衰竭。
- [0316] 由缺血性心肌病,特别是心肌梗塞,特别是急性心肌梗塞引起的心力衰竭可以通过减少或消除这种心力衰竭和/或限制这种心力衰竭的发展来治疗或预防。
- [0317] 实际上,通过根据本申请的培养并且可能通过纯化获得的细胞(特别是CD34+细胞),或者含有这些细胞的药物组合物或溶液,可以用于以下目的中的一个或多个:
- [0318] -减少或甚至消除缺血后心肌损伤,包括梗死后坏死和/或梗死后瘢痕大小,
- [0319] -部分或完全再生结构和/或使心肌或梗塞区域血运重建,
- [0320] -改善或恢复心室功能,特别是左心室功能,特别是心室收缩力,特别是左心室收缩力,例如减少收缩期末期容积,同时增加左心室射血分数 (LVEF) (特别是实现LVEF超过45%)。
- [0321] 更具体地,目标是治疗或预防由(急性)心肌梗塞,更特别是由冠状动脉性心脏病或心脏病发作引起的(急性)心肌梗塞引起的心力衰竭。此用途更特别地用于:
- [0322] -左心室功能受损或收缩力受损的患者,以及
- [0323] -具有以下情况的患者:
- [0324] -在第一次事件或心脏综合征(此第一次事件或心脏综合征可能已导致支架植入和经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA) 和/或冠状动脉旁路移植术 (CABG) 后具有从头发生的急性心肌梗塞;和
- [0325] -在该第一次心脏事件后至少10天(例如,在该第一次心脏事件或心脏综合征后至少3个月或至少6个月),具有45%或更低的左心室射血分数 (LVEF)。
- [0326] 细胞,本申请的细胞或药物组合物或溶液的施用可以例如在缺血事故后数周内,特别是3-6周内进行。
- [0327] 心力衰竭的治疗或预防可包括细胞心肌成形术(通过植入在梗塞心脏区中施用的细胞)。
- [0328] 这种治疗或预防可包括通过手术或导管注射来施用根据本申请的细胞群(包括人

细胞群,人细胞群包括CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞),或根据本申请的细胞(包括人CD34+细胞,不包括人胚胎干细胞),或根据本申请的组合物或溶液。

[0329] 手术注射可以是直接注入梗塞区域,例如,在冠状动脉旁路移植术(CABG)期间进行。

[0330] 导管注射可包括经皮经股注射。

[0331] 导管可包括冠状动脉内,心外膜或经心内膜注射或输注导管。

[0332] 例如,注射或输注导管可以配备有螺旋针,例如由BIOCARDIA®(125Shoreway Road,Suite B,San Carlos,CA 94070,U.S.A.)销售的HELIX®导管,其可以联接到2-维(2D)引导系统,例如2D荧光透视引导系统。

[0333] 注射或输注导管可以是例如由BIOSENSE WEBSTER,INC.(15715Arrow Highway;Irwindale;CA 91706;U.S.A.)销售的MYOSTAR®导管。

[0334] 例如,注射或输注导管可以联接到三维(3D)引导系统,例如由BIOLOGICS DELIVERY SYSTEMS GROUP(CORDIS Corp.,Diamond Bar,CA,USA)销售的NOGA®XP电磁3D心脏标测系统。

[0335] 可以施用,更特别地注射到患者或受试者中一种或多种趋化因子,特别是CXC家族的一种或多种趋化因子,特别是趋化因子CXCL12(基质细胞衍生因子-1或SDF-1)。对于施用,更特别是注射根据本申请的细胞群(包括细胞CD34+细胞的人细胞群,不包括人胚胎干细胞),或本申请的细胞(包括人CD34+,不包括人胚胎干细胞),或本申请的组合物或溶液,这种给药/施用或注射在时间上可以是同时的,联合的或延迟的。

[0336] 本申请的方法的用途不限于治疗或预防由缺血性心肌病引起的心力衰竭或由化疗治疗引起的心力衰竭。本申请的方法(特别是本申请的CD34+方法)可以替代地用于治疗或预防非心脏疾病。

[0337] 它可能是并非由心脏介入引起的非心脏病。

[0338] 本申请的方法可用于治疗骨髓抑制,包括由淋巴瘤,特别是非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,慢性淋巴细胞白血病的化疗引起的骨髓抑制。则如上所述,通过静脉内植入,可以使用本申请的方法将包括含CD34+细胞的造血细胞群(自体或同种异体)的造血细胞(自体的或来自另一个受试者的)植入患者的骨髓中。然后将植入的细胞用于再生患者的骨髓。

[0339] 或者,本申请的方法可用于治疗或预防病理诱导的软骨退化,例如骨关节炎。然后,本申请的方法可以用于将根据本申请的细胞(自体的或来自另一个受试者的)植入患者体内,特别是在关节炎区域,包括如上所述的包括CD34+细胞的细胞群。然后将植入的细胞用于再生患者的软骨。

[0340] 或者,本申请的方法可用于治疗或预防肝功能不全,特别是慢性肝功能不全,特别是慢性非酒精性肝功能不全(例如,以预防肝细胞癌的发展)。然后,本申请的方法可用于将根据本申请的细胞(自体的或来自另一个受试者的)植入患者体内,特别是在肝区,包括如上所述的包括CD34+细胞的细胞群(自体)。然后将植入的细胞用于再生患者的肝脏。

[0341] 与“包含”或“含有”同义的术语“包括”是开放术语,并不排除存在没有明确指出的一个或多个另外的元件,成分或方法步骤,而术语“由.....组成”或“构成”是封闭式术语,其排除了未明确说明的任何其他另外的元件,步骤或成分的存在。术语“基本上由.....组成”或“基本上由.....构成”是部分开放的术语,其不排除存在一个或多个另外的元件,成

分或步骤,只要这些另外的元件,成分或步骤不会实质上影响本发明的基本性质。

[0342] 因此,术语“包括”或“包含”包括术语“由……组成”,“构成”,以及术语“基本上由……组成”和“基本上由……构成”。

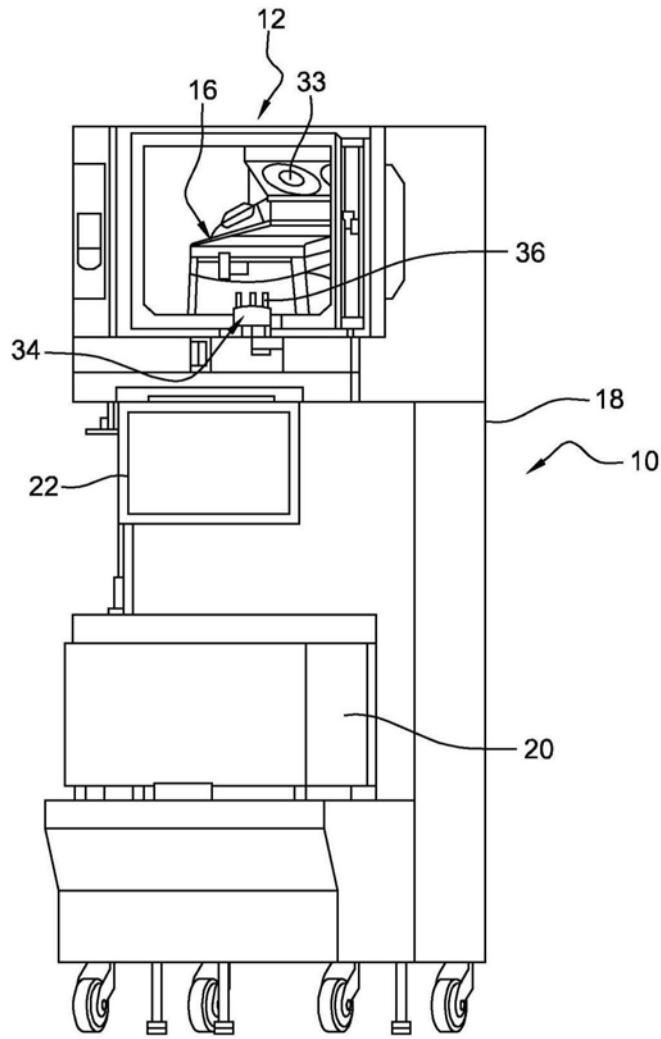


图1

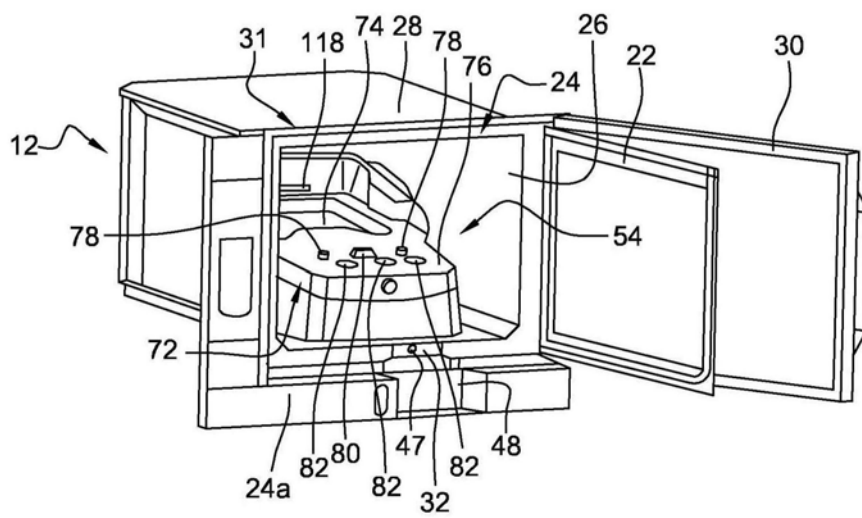


图2

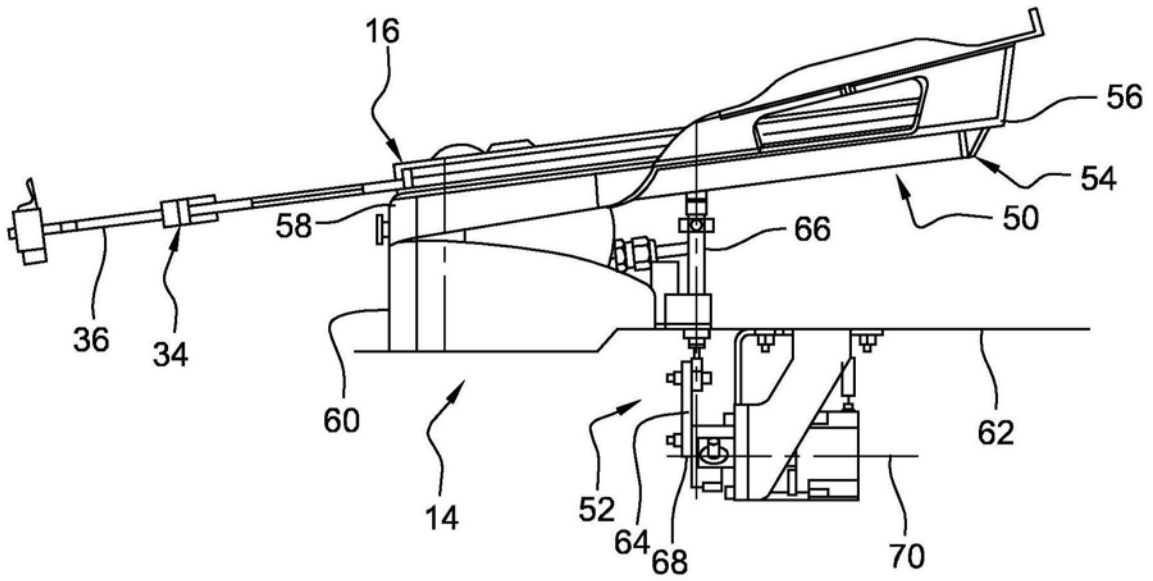


图3A

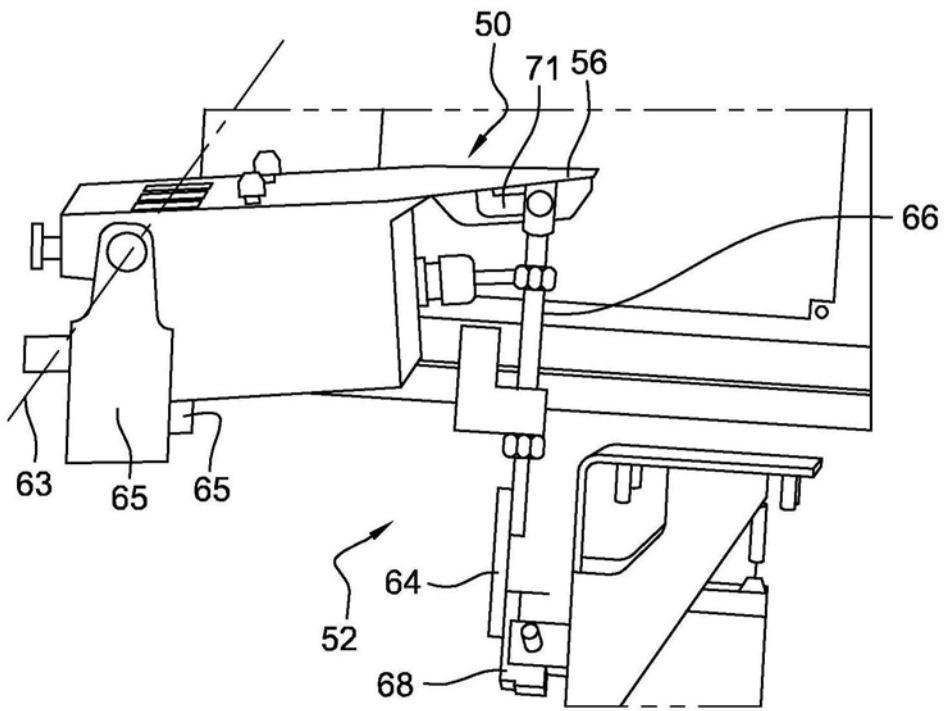


图3B

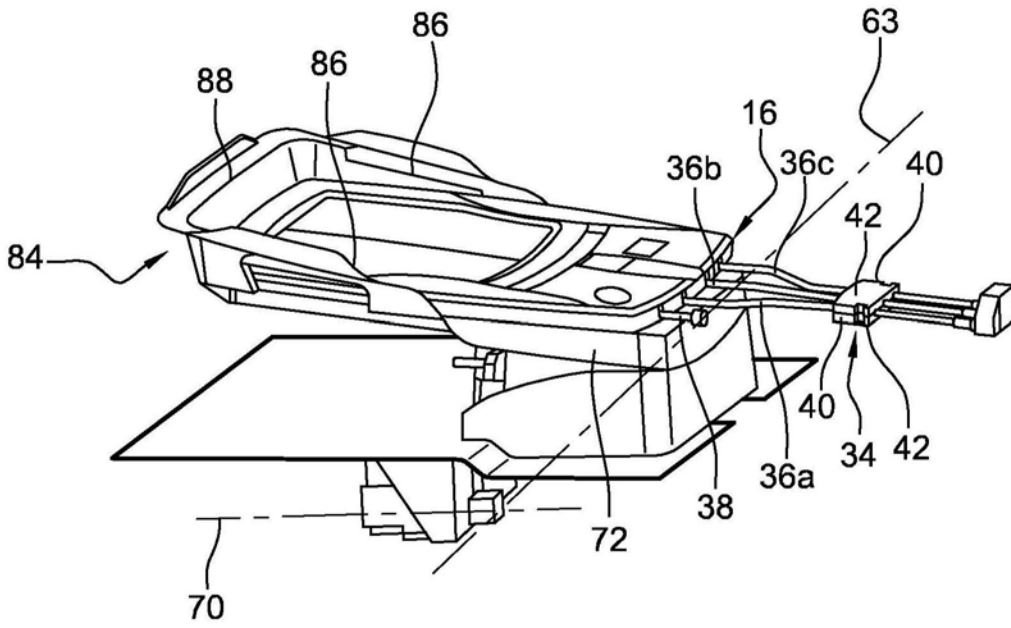


图4

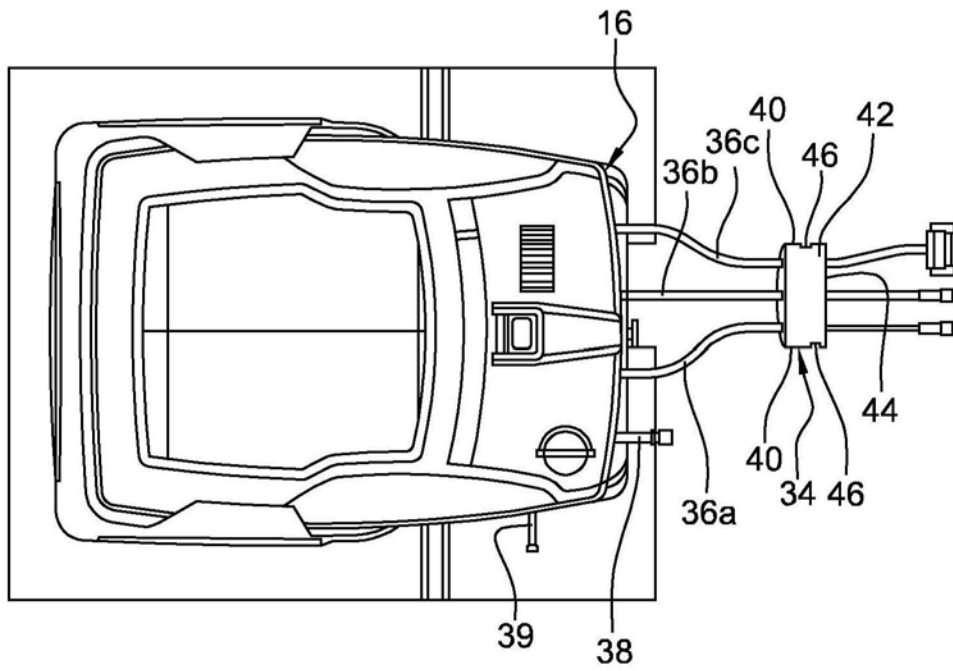


图5

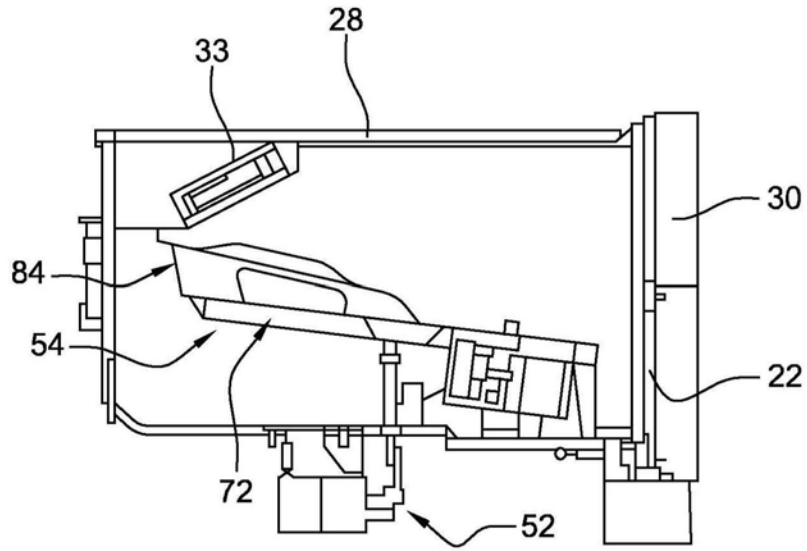


图6A

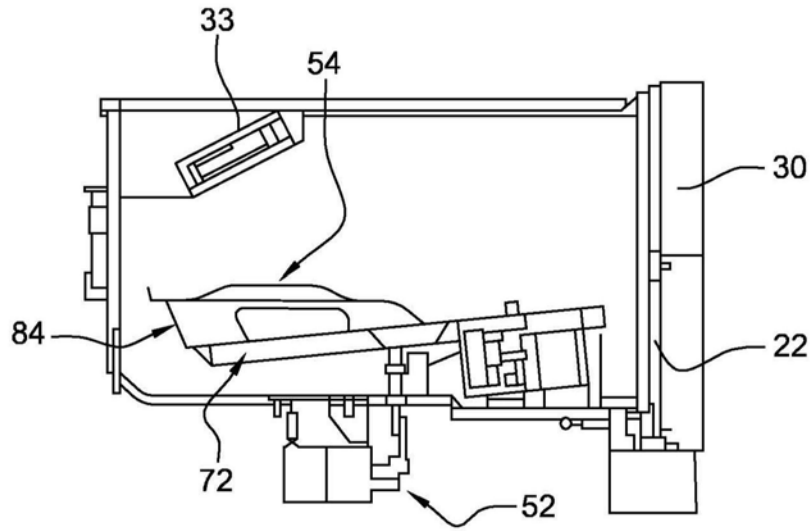


图6B

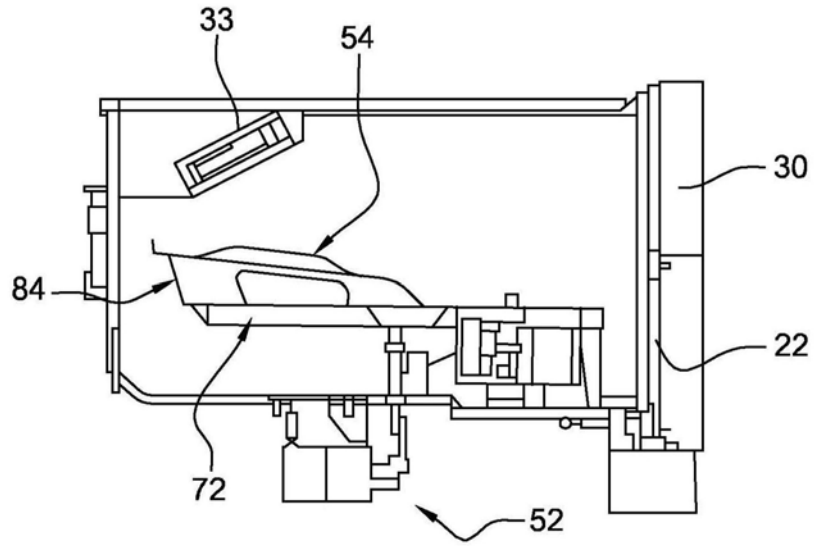


图6C

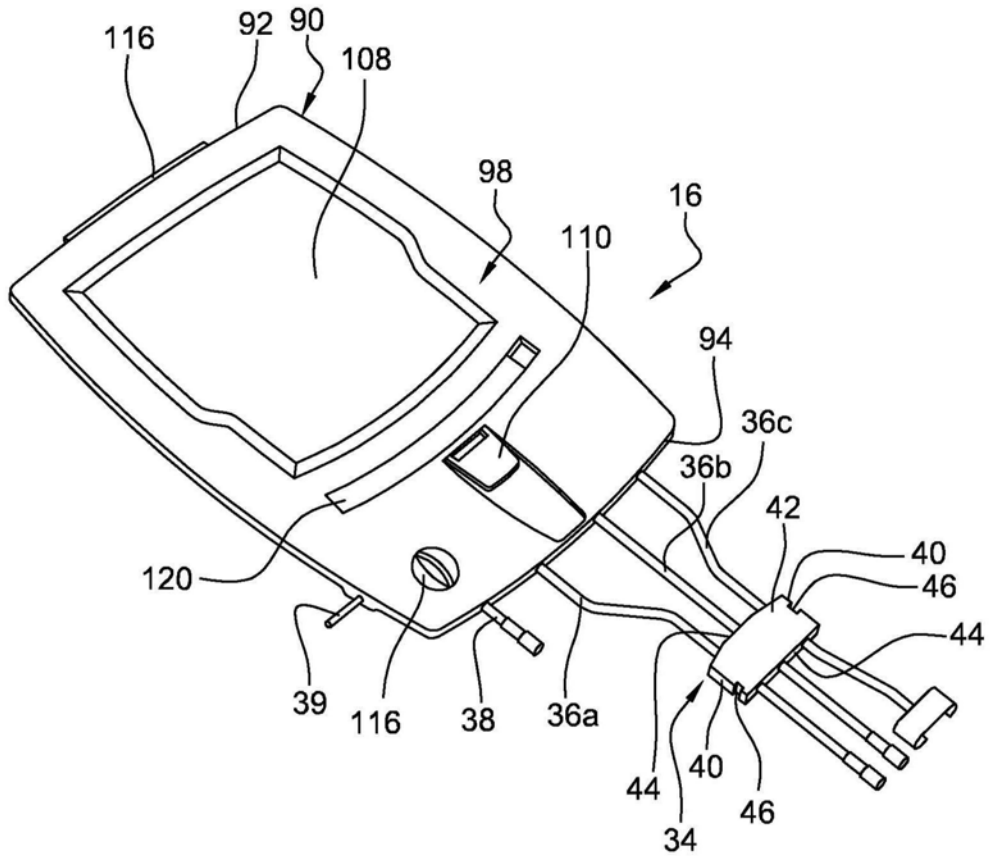


图7

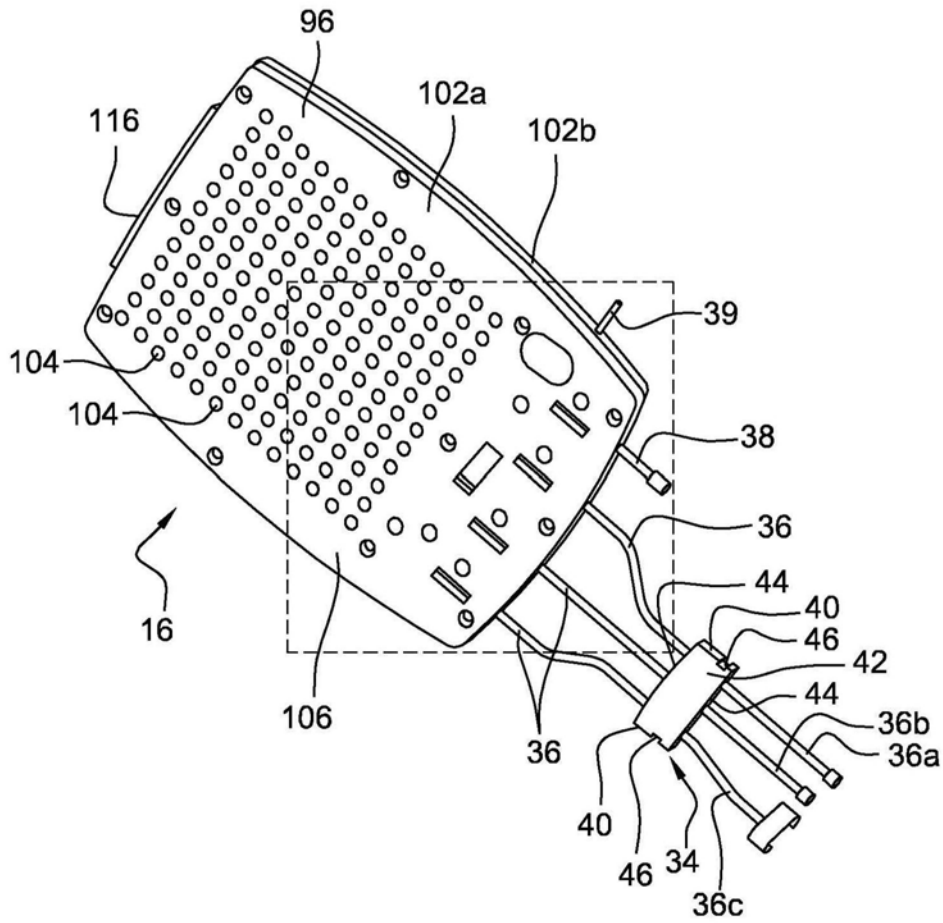


图8

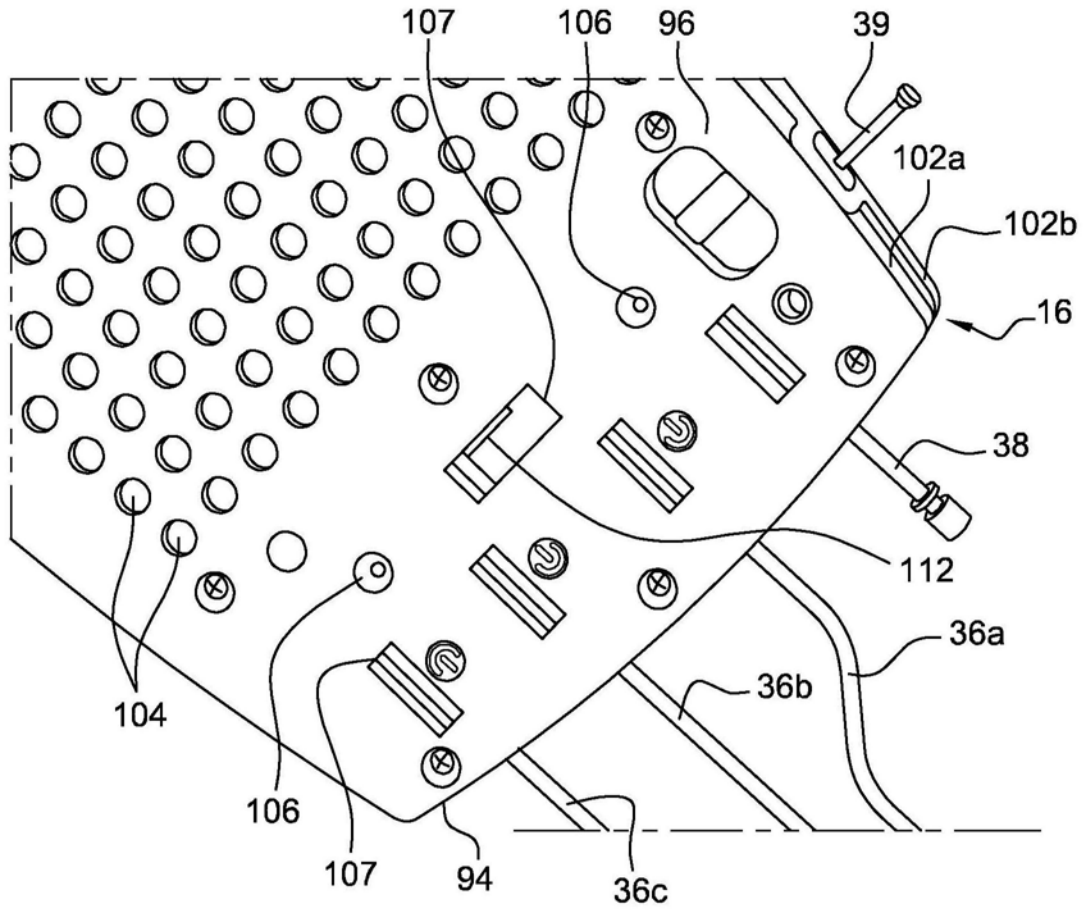


图9

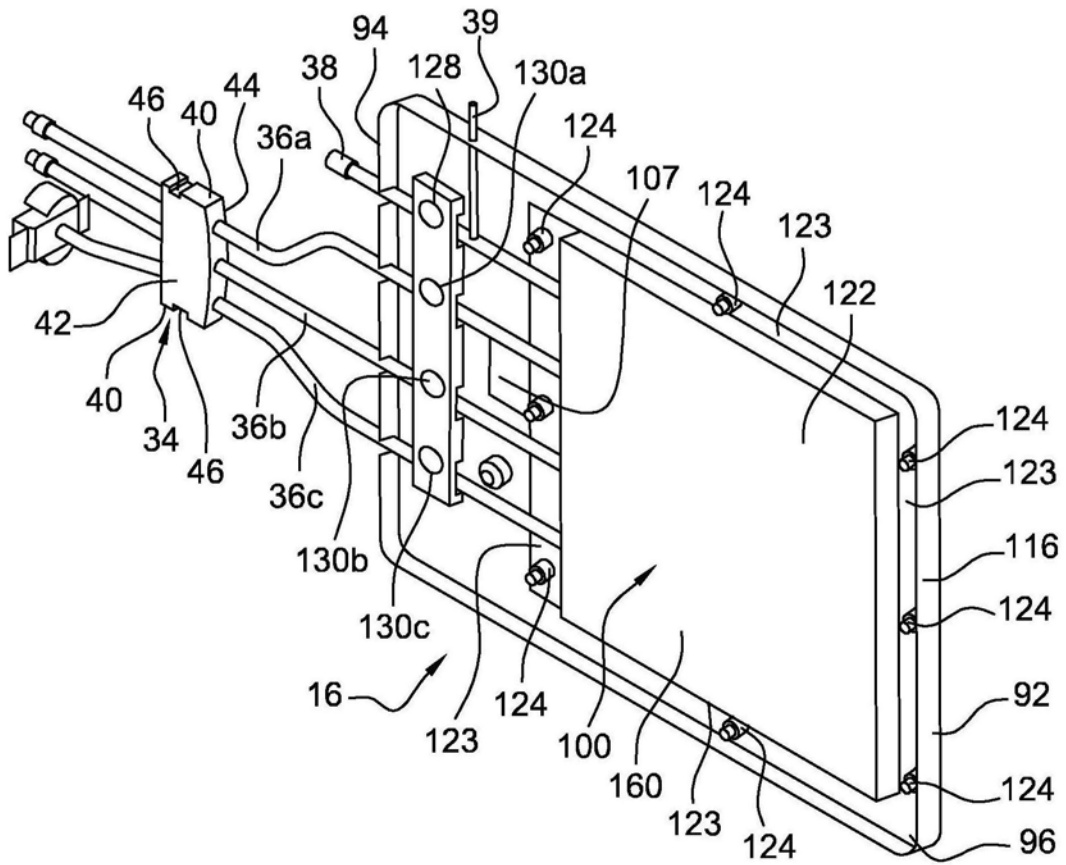


图10

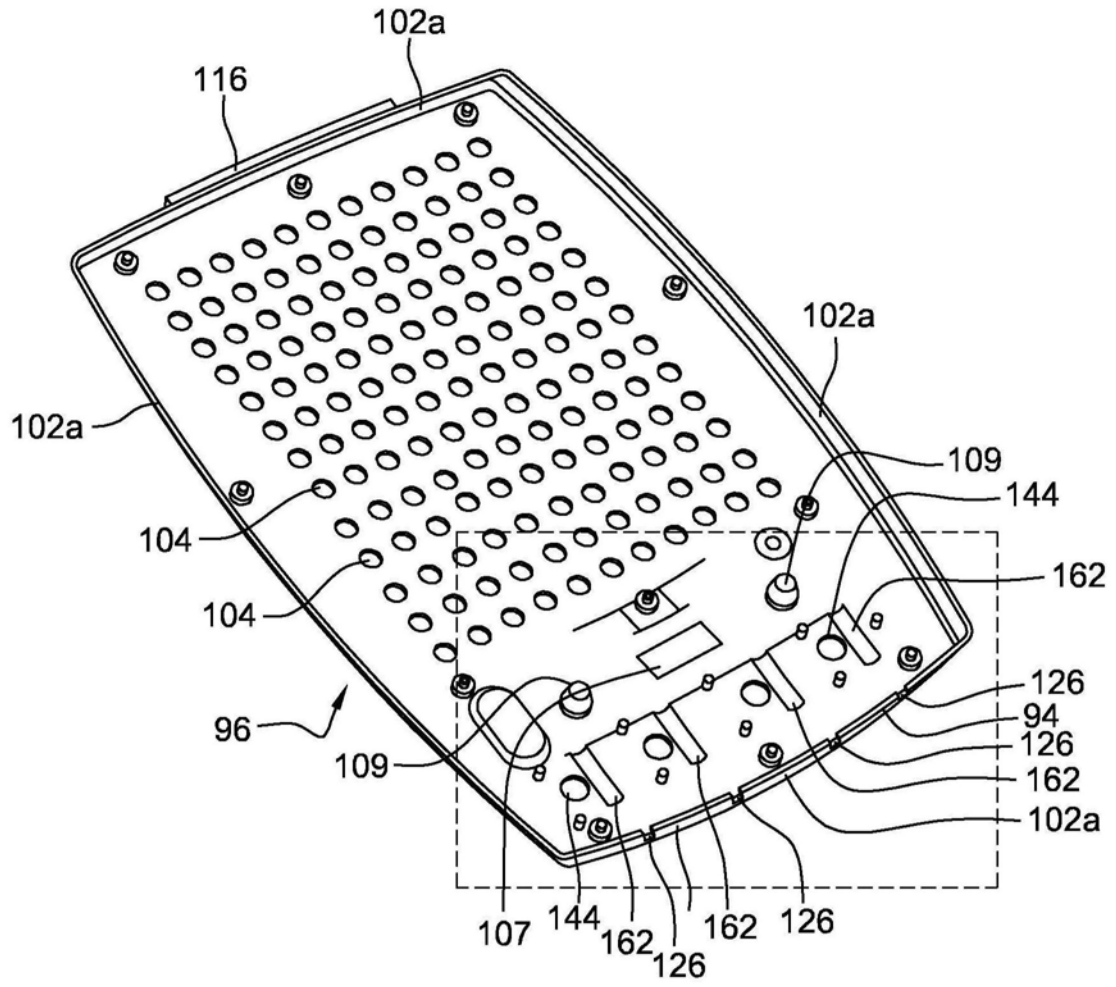


图11

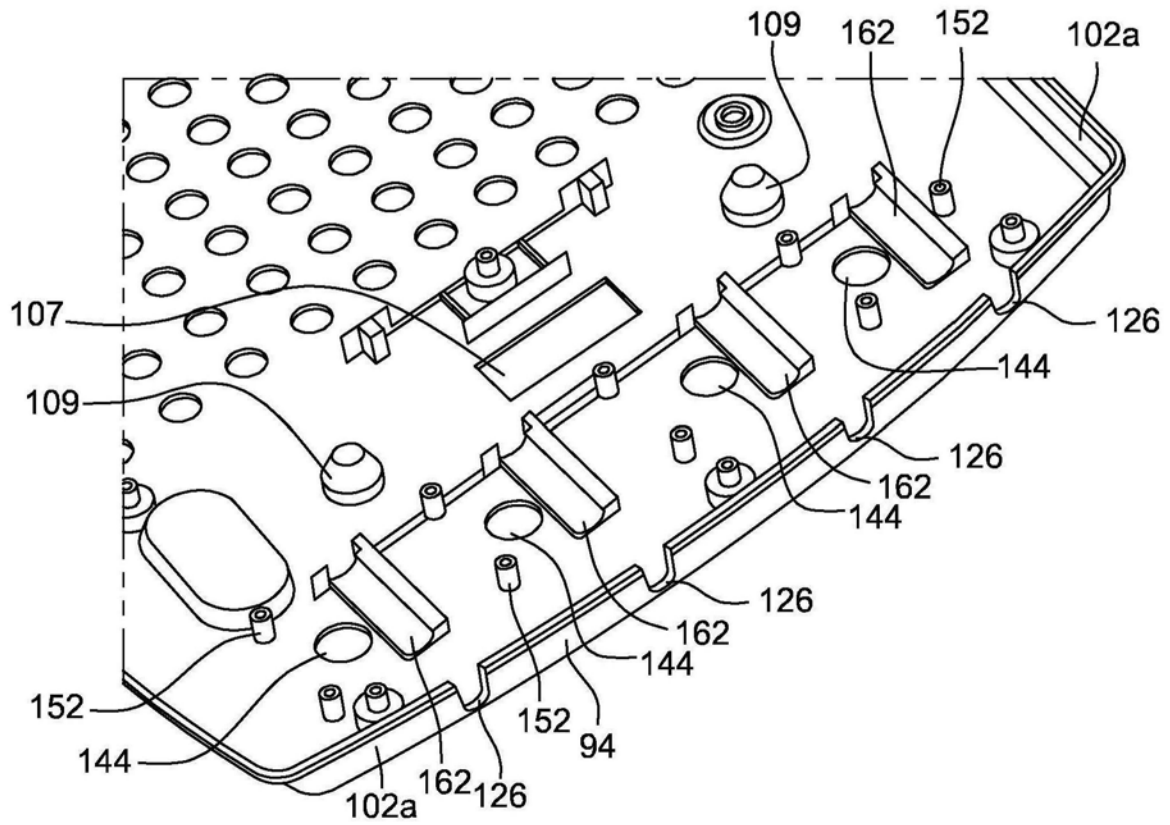


图12

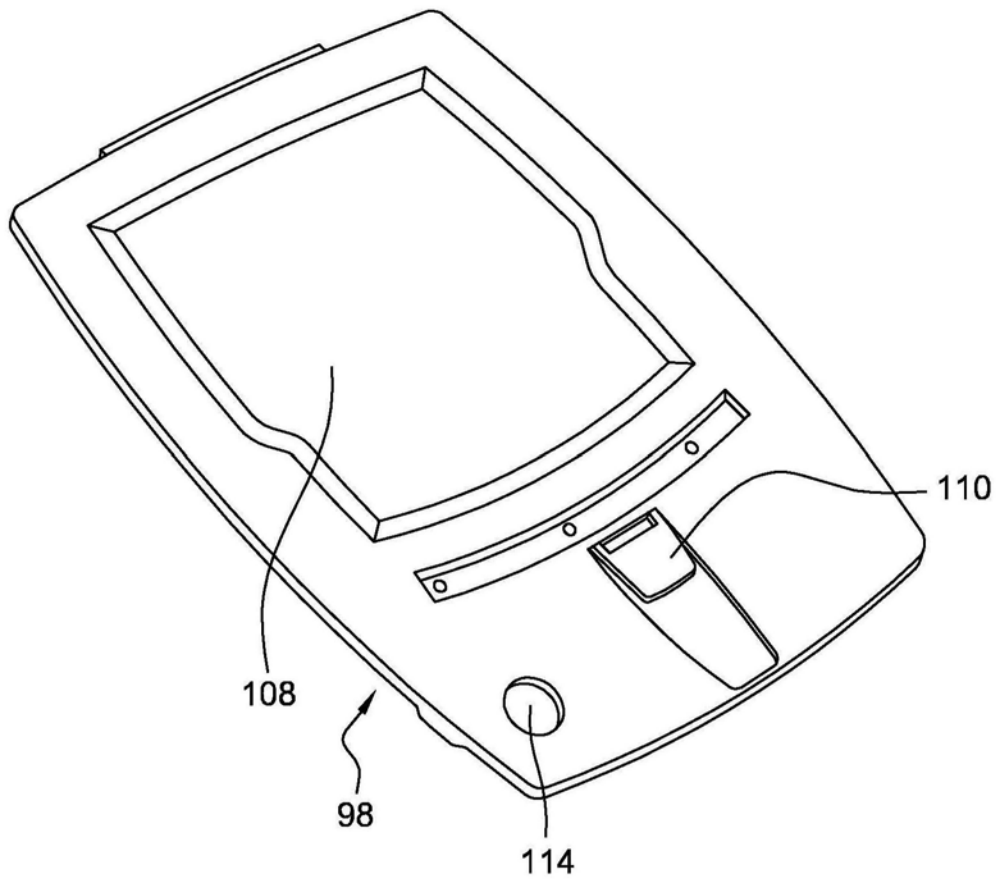


图13

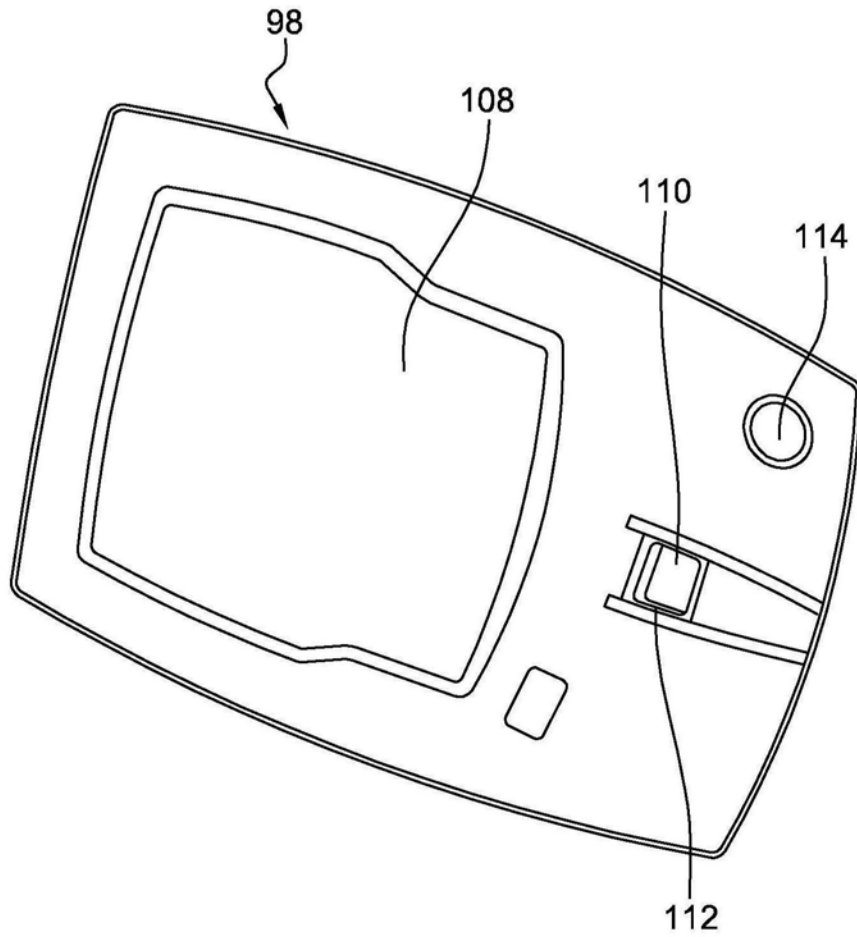


图14

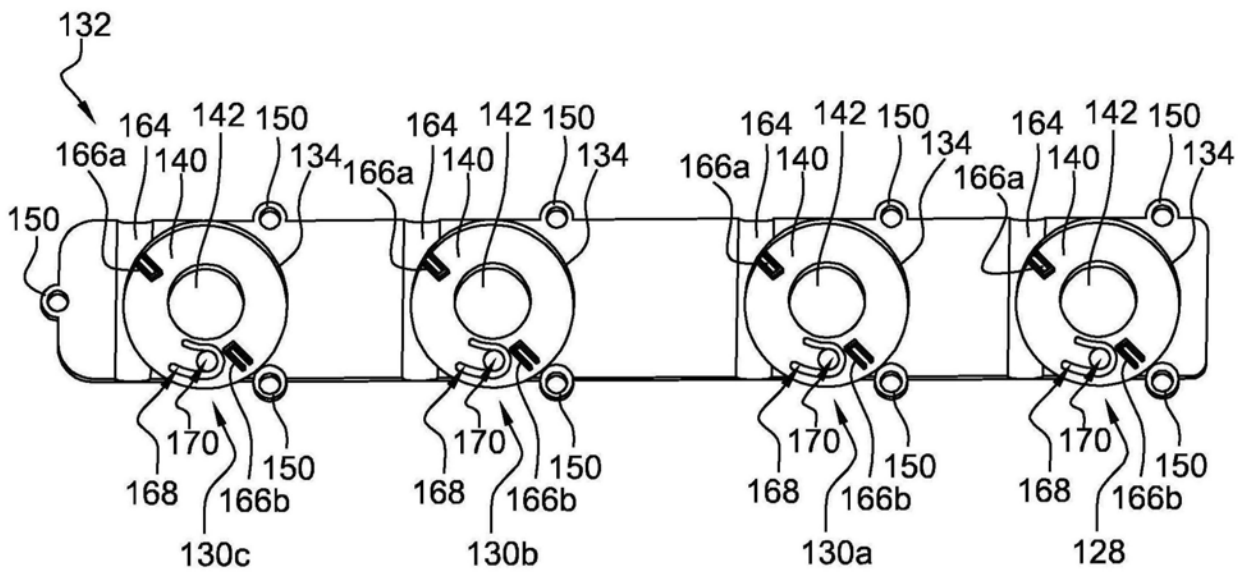


图15A

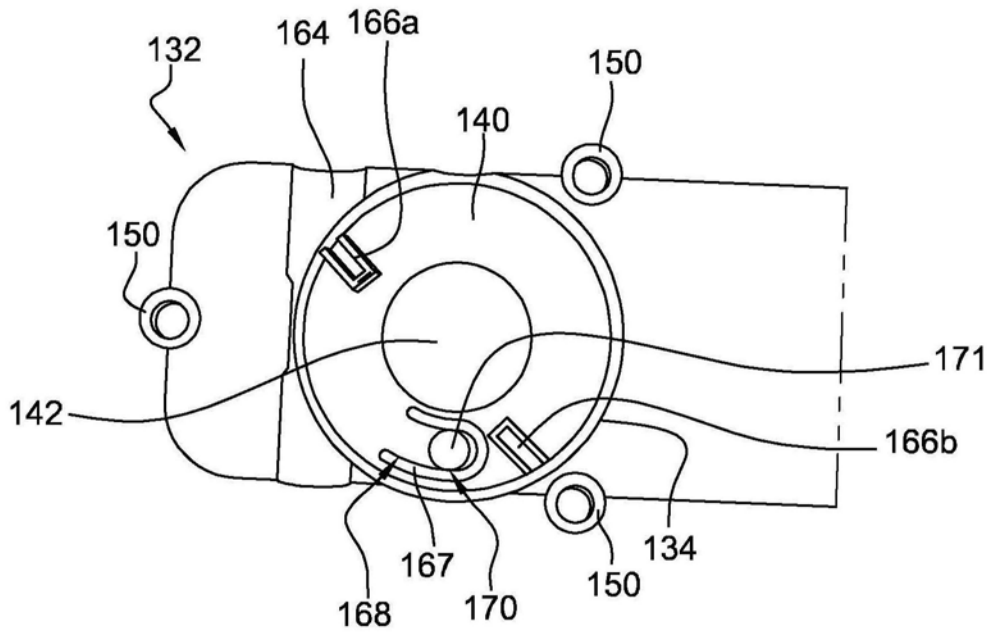


图15B

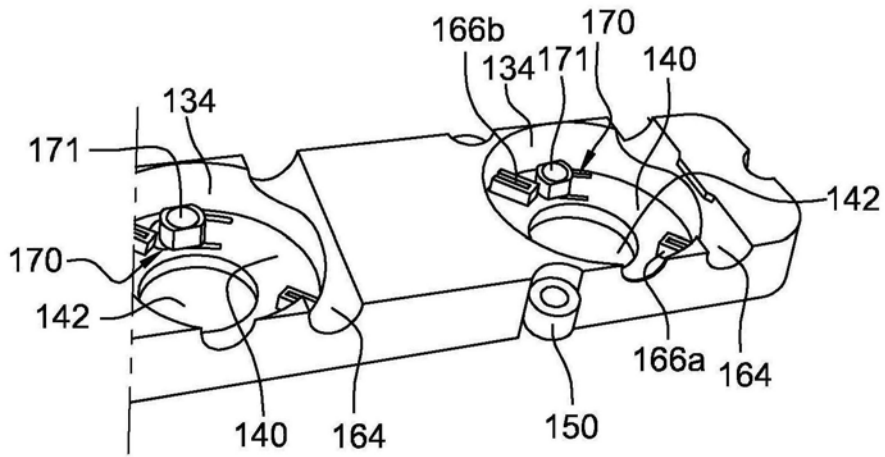


图15C

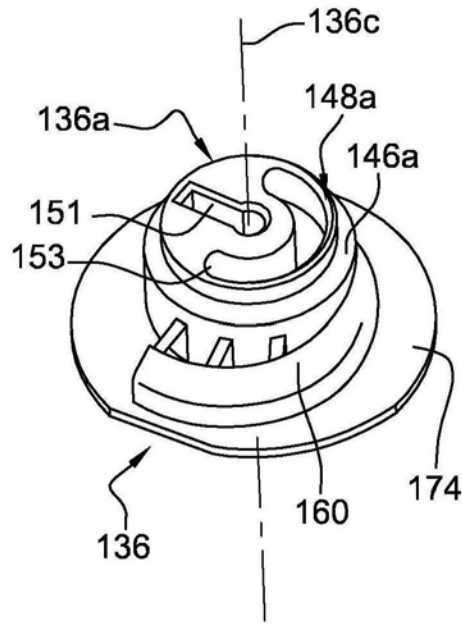


图16A

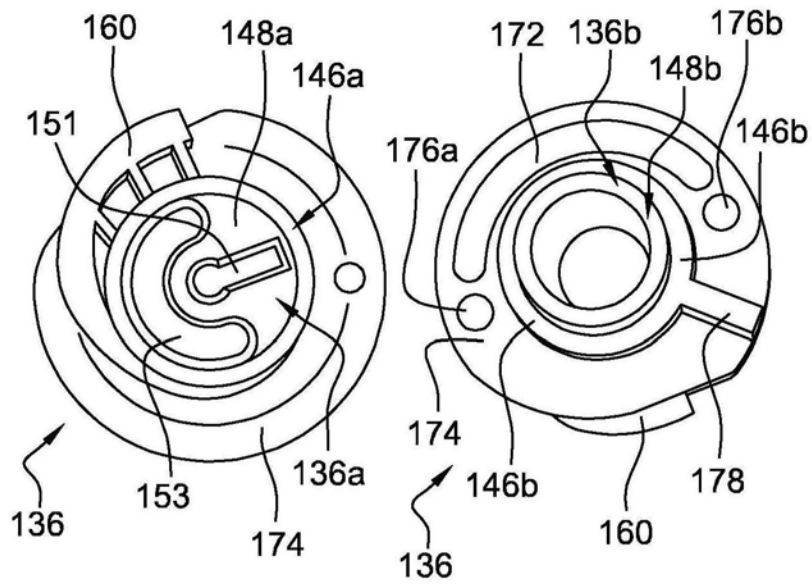


图 16B

图 16C

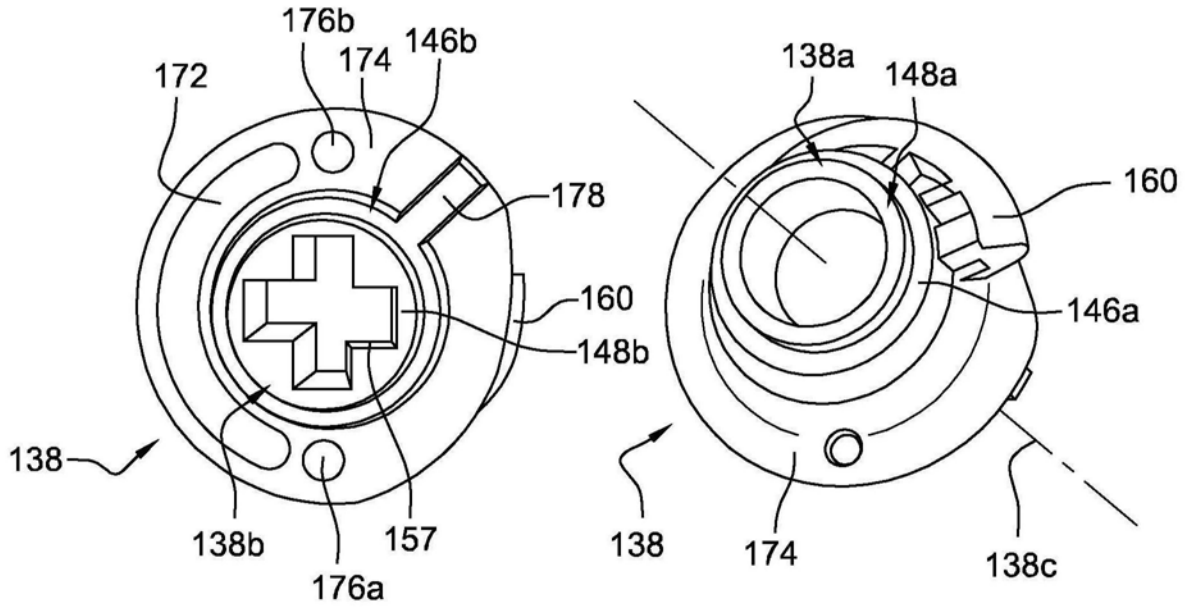


图 17A

图 17B

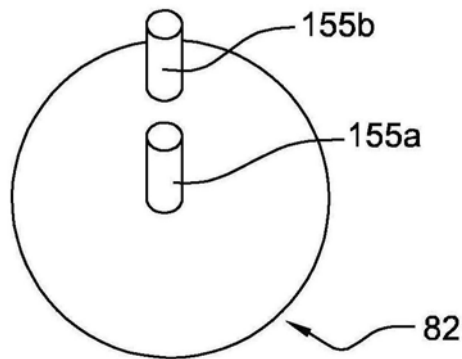


图18

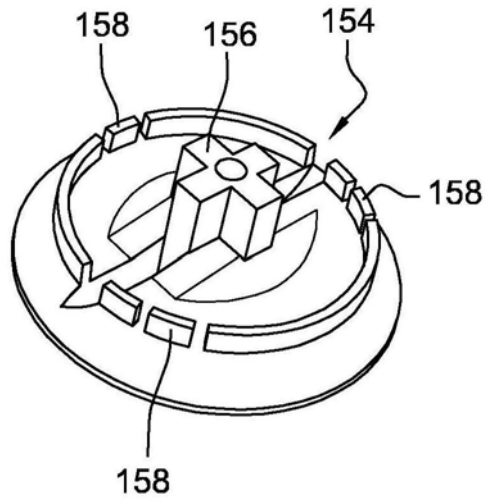


图19A

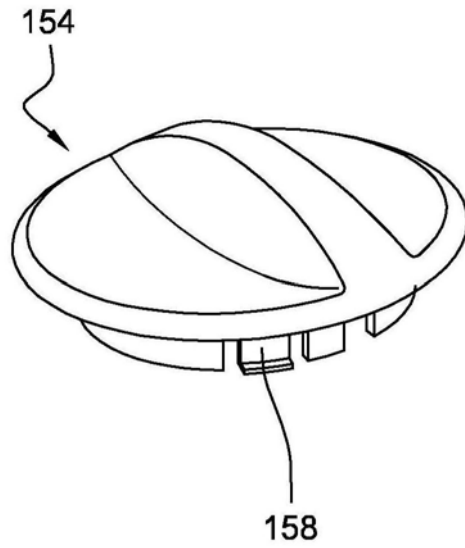


图19B

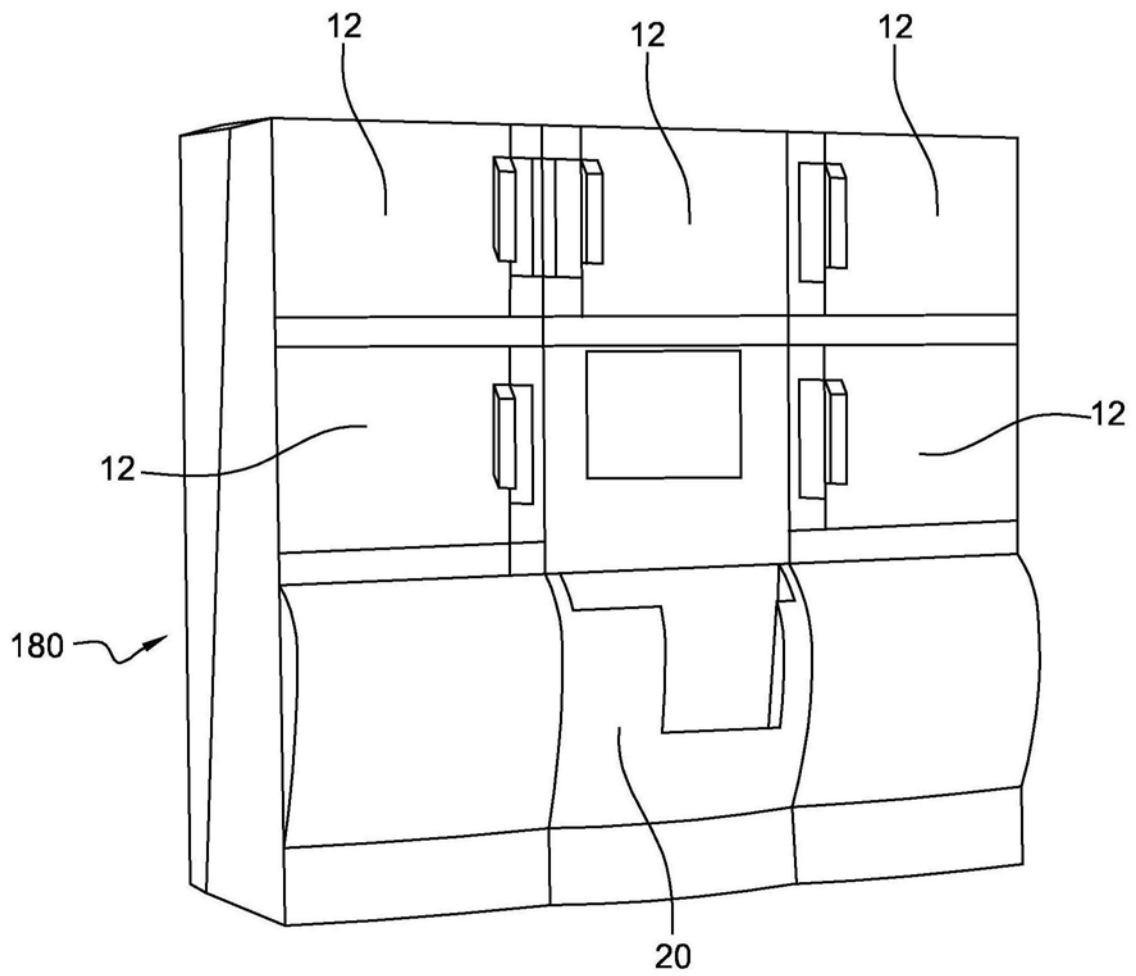


图20

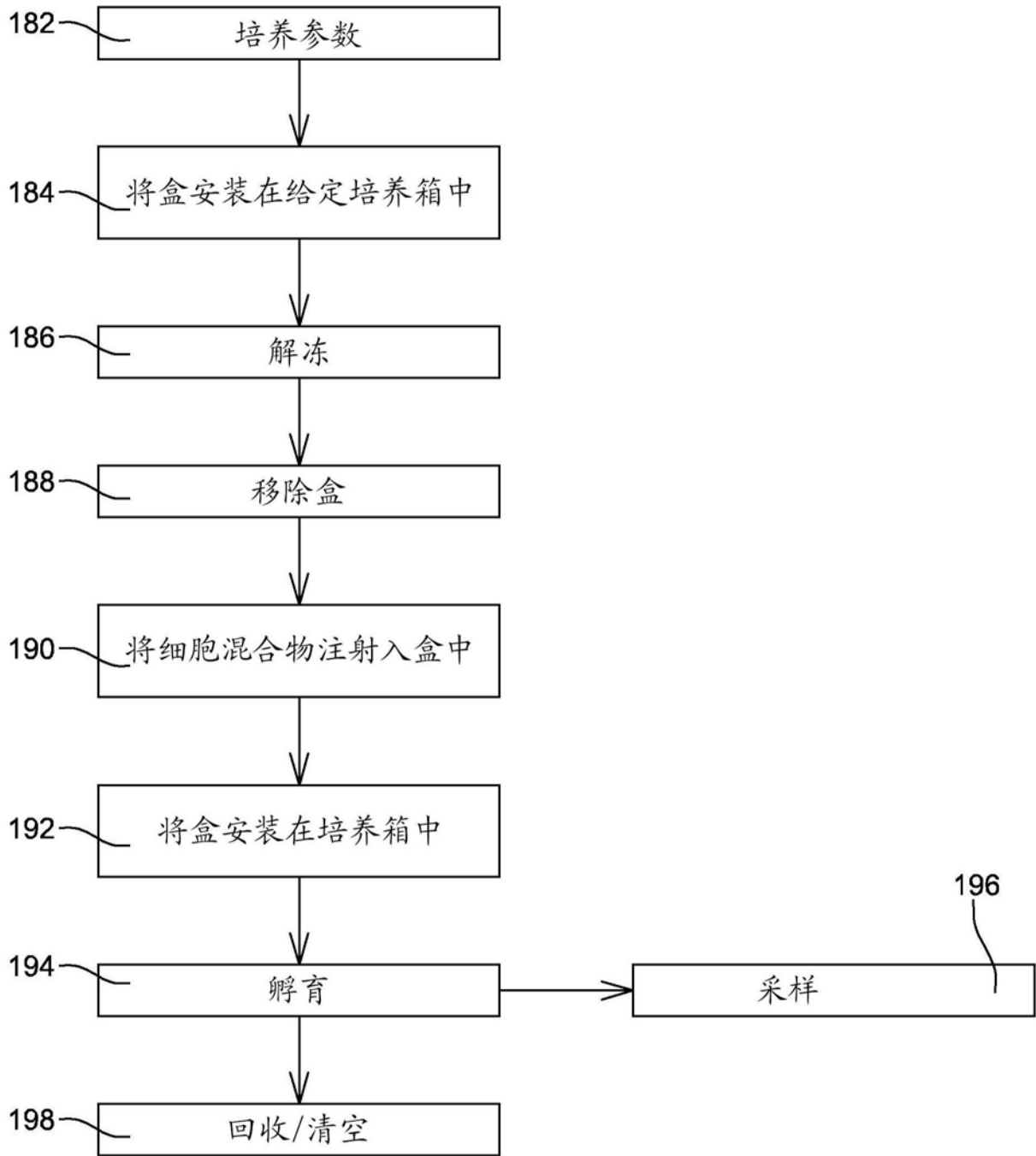


图21