



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113249311 B

(45) 授权公告日 2022.06.28

---

(21) 申请号 202010450191.7	B01J 13/02 (2006.01)
(22) 申请日 2020.05.25	(56) 对比文件
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113249311 A	GB 1535150 A, 1978.12.06 US 2012156779 A1, 2012.06.21 US 4373027 A, 1983.02.08 CN 105567626 A, 2016.05.11
(43) 申请公布日 2021.08.13	汪少久等. 电荷-胶原蛋白双作用微载体的 制备和性能调控.《过程工程学报》.2015, (第02 期),
(73) 专利权人 北京唐颐惠康生物医学技术有限 公司 地址 100010 北京市西城区西什库大街31 号院23号楼	审查员 马静
(72) 发明人 曹毓琳 贺伟	
(74) 专利代理机构 北京卓爱普专利代理事务所 (特殊普通合伙) 11920 专利代理师 王玉松 宋丹丹	
(51) Int. Cl. C12N 5/0775 (2010.01)	权利要求书1页 说明书11页 附图1页

---

(54) 发明名称

间充质干细胞培养用可降解微载体的制备  
方法及其产品和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体,该微载体包括可降解微载体基质材料交联成的凝胶球芯、包被于所述球芯的明胶层、偶联于所述明胶上的DEAE;本发明提供的间充质干细胞培养用可降解微载体成本低廉,易于形成工业化生产,使微载体能够在搅拌状态下悬浮培养,适合于间充质干细胞大规模悬浮培养。

1. 一种间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于:所述方法包括以下步骤:

(1) 制球:将浓度为1%-2%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为0.5%-3%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,所述纳米化海藻酸钠溶液与所述氯化钙溶液的体积比为1:3-1:5;

(2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次;

(3) 明胶包被:将浓度为0.05%-5%的明胶溶液和浓度为0.3%-1%的戊二醛溶液等比例混合均匀制得混合液,将所述海藻酸钙微胶珠浸泡在所述混合液中反应,所述混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为1-3:1;

(4) 洗涤:待所述包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次;

(5) 中和:加入浓度为0.5%-2%的甘氨酸溶液反应,所述甘氨酸溶液的体积与步骤(3)所述的混合液体积相同;

(6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次;

(7) 偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为1-3mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为0.5-2mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;所述海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:1-3:1-3;

(8) 洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以300rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为1-3:1,制得湿润微载体;

(9) 冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干得到微载体。

2. 如权利要求1所述的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于,步骤(2)、步骤(4)和步骤(6)中至少一个所述的用无菌纯化水洗涤具体操作方法为:以50-300rpm的转速搅拌5-10min后弃洗涤液去除多余液体,所述纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为1-3:1。

3. 如权利要求1所述的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于,步骤(3)所述将所述海藻酸钙微胶珠浸泡在所述混合液中反应的反应条件为:温度为20-60℃,搅拌速度为50-300rpm,时间为30min-2h。

4. 如权利要求1所述的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于,步骤(5)所述的反应条件如下:中和温度为40℃-60℃,搅拌速度为50-300rpm,中和时间为2-3h。

5. 如权利要求1所述的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于,步骤(7)所述两次搅拌的具体条件如下:搅拌速度为50-300rpm,搅拌温度为60-80℃,搅拌时间为0.5-2h。

6. 如权利要求1所述的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法,其特征在于,步骤(8)所述的洗涤方法如下:以50-300rpm的转速搅拌5-10min后弃洗涤液。

## 间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法及其产品和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法及其产品和应用。

### 背景技术

[0002] 间充质干细胞培养本质上属于动物细胞培养,动物细胞生物反应器微载体培养技术是当前生物制药行业贴壁依赖性细胞培养的领先技术,微载体是细胞培养中所使用的一类无毒性、非刚性、密度均一、透明的小颗粒,能使贴壁依赖性细胞贴附在颗粒表面进行悬浮培养,从而增加细胞贴附生长的面积,有利于细胞的大规模培养和收集。

[0003] 自1967年Van Wezel第一个用DEAE-Sephadex A 50作为贴壁细胞培养用微载体以来,研究报道的细胞培养用微载体已有十多种,包括葡聚糖微载体、聚赖氨酸液体微载体、大孔明胶微载体、纤维素微载体、壳聚糖微载体、甲壳素微载体、聚苯乙烯微载体、聚氨酯泡沫微载体、藻酸盐凝胶微载体以及磁性微载体等。我国目前使用的商品化微载体主要有:GE公司的Cytodex 1、Cytodex II、Cytodex III和Thermo公司的Cytopore、Cytoline、Blsilon、Cultispher G等,均为进口产品,价格昂贵,目前市场价已达每公斤3-10万元人民币,还出现供不应求的现象,而我国国产的微载体大多数尚在研制之中,或者生产规模较小,难以工业化生产,不能满足我国生物制药领域疫苗、重组药物蛋白、单克隆抗体、细胞因子及其受体等医用生物制品生产的需要,是限制我国动物细胞培养技术从转瓶细胞培养工艺向生物反应器微载体培养工艺转型的技术瓶颈之一。

[0004] 间充质干细胞作为一种有巨大医疗价值的细胞,目前正在走向临床,该阶段的主要问题是目前的细胞生产方法在质和量上不能满足临床需要,基于反应器的微载体培养技术是间充质干细胞走向临床的必需生产工艺,目前的瓶颈有二,一是没有专门用于间充质干细胞培养的微载体,现在用于间充质干细胞培养的微载体是已经商品化的微载体,而这些微载体本来不是用于培养干细胞的;二是传统的生物反应器也不是专门用于培养间充质干细胞的,传统的动物细胞培养所生产的目标是疫苗、重组药物蛋白、单克隆抗体、细胞因子及其受体等;发达国家的生物制药行业贴壁依赖型动物细胞培养工艺已经普遍采用生物反应器微载体培养工艺,规模发展到几千升、上万升;微载体细胞培养的规模已达到6000L以上,这也预示了间充质干细胞培养的未来发展规模。

[0005] 传统的间充质干细胞的收获方法使用消化酶,但消化酶对细胞有损害,所以发展干细胞的无酶收获方法对于干细胞的活性维持有重要意义。

[0006] 因此,开发适合于间充质干细胞培养用的微载体,不仅对促进我国的间充质干细胞产业的发展,也对促进我国生物医药的发展具有重要的历史意义。

### 发明内容

[0007] 为了解决以上技术问题,本发明提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法及其产品和应用。

[0008] 本发明具体技术方案如下：

[0009] 本发明提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体，该微载体包括可降解微载体基质材料交联成的凝胶球芯、包被于所述球芯的明胶层、偶联于所述明胶上的DEAE。

[0010] 优选地，可降解微载体基质材料为海藻酸盐或果胶，所述海藻酸盐为海藻酸钙。

[0011] 本发明提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法，该方法包括以下步骤：

[0012] (1) 制球：将浓度为1%-2%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为0.5%-3%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠，纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:3-1:5；

[0013] 其中步骤(1)制得的海藻酸钙微胶珠直径为80-300 $\mu\text{m}$ ；

[0014] (2) 洗涤：除去多余的氯化钙溶液，用无菌纯化水洗涤一次；

[0015] (3) 明胶包被：将浓度为0.05%-5%的明胶溶液和浓度为0.3%-1%的戊二醛溶液等比例混混合均匀制得混合液，将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中反应，混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为1-3:1；

[0016] (4) 洗涤：待包被反应结束后，除去多余的混合液，用无菌纯化水洗涤三次；

[0017] (5) 中和：加入浓度为0.5%-2%的甘氨酸溶液反应，甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同；

[0018] (6) 洗涤：弃反应后的废液，用无菌纯化水洗涤三次；

[0019] (7) 偶联DEAE-HCl：取洗涤后的海藻酸钙微胶珠，加入浓度为1-3mol/L的NaOH溶液搅拌，再加入浓度为0.5-2mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌；海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:1-3:1-3；

[0020] (8) 洗涤：除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液，依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤，每次洗涤均以300rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液，所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>+PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为1-3:1，制得湿润微载体；

[0021] (9) 冻干：将步骤(8)所得到的微载体冻干得到微载体。

[0022] 其中，步骤(1)中纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的反应时间为6-10min，制得的海藻酸钙微胶珠的直径为80-300 $\mu\text{m}$ ；步骤(7)主要是包被明胶偶联上DEAE，正电荷和明胶两者共同作用，满足细胞贴壁的需求又不产生细胞毒性，同时满足细胞的增值要求，DEAE为纤维素，本发明提供的微载体可应用于细胞培养方瓶、转瓶、磁悬浮瓶、细胞工厂或生物反应器中，应用本发明的微载体培养间充质干细胞时，对培养液没有具体要求，任何能够用于培养间充质干细胞的培养液均能够在使用本发明的微载体培养细胞时使用。

[0023] 进一步地，步骤(2)、步骤(4)和步骤(6)中至少一个的用无菌纯化水洗涤具体操作方法为：以50-300rpm的转速搅拌5-10min后弃洗涤液去除多余液体，纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为1-3:1。

[0024] 进一步地，步骤(3)将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中反应的反应条件为：温度为20-60 $^{\circ}\text{C}$ ，搅拌速度为50-300rpm，时间为30min-2h。

[0025] 进一步地，步骤(5)的反应条件如下：中和温度为40 $^{\circ}\text{C}$ -60 $^{\circ}\text{C}$ ，搅拌速度为50-300rpm，中和时间为2-3h。

[0026] 进一步地，步骤(7)中两次搅拌的具体条件如下：搅拌速度为50-300rpm，搅拌温度

为60-80℃,搅拌时间为0.5-2h。

[0027] 进一步地,步骤(8)的洗涤方法如下:以50-300rpm的转速搅拌5-10min后弃洗涤液。

[0028] 进一步地,步骤(9)冻干后还对微载体进行灭菌,灭菌方式为钴60 $\gamma$ 射线辐射灭菌;辐照剂量为18-20K Gy。

[0029] 本发明还提供了以上间充质干细胞培养用可降解微载体在间充质干细胞的培养中的应用。

[0030] 本发明还提供了一种应用间充质干细胞培养用可降解微载体培养细胞的收获方法,该收获方法是使用螯合剂与缓冲液进行收获。

[0031] 优选地,该收获方法是使用含浓度为5-10mM的EDTA的PBS缓冲液进行收获。

[0032] 本发明还提供了一种使用应用间充质干细胞培养用可降解微载体培养细胞的方法,该方法是将微载体经PBS缓冲液浸泡溶胀,除去多余的PBS缓冲液,与待培养细胞一起接种至细胞培养液中进行细胞培养,细胞培养液中含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10 $\mu$ g/L的EGF;待培养细胞的接种密度为 $1 \times 10^5$ - $4 \times 10^5$  cells/ml;每过3天半量换液一次,培养5-7d;溶胀后微载体占微载体和培养液总体积的2/5-1/10;细胞培养液为DMEM培养基、M199培养基、F12培养基、MEMa培养基、DMEM/F-12培养基中的任意一种。

[0033] 本发明提供的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法制备的微载体能够用于培养干细胞,适用于多种规格的生物反应器,包括5L以上的生物反应器,可进行大规模、大批量的细胞培养,使用本发明提供的微载体培养细胞,可在15min内完成无酶收获细胞,避免了消化酶对细胞的损害,对干细胞的活性维持有重要意义。

## 附图说明

[0034] 图1. 试验例2中实施例4的微载体培养脐带间充质干细胞5d的光镜图;

[0035] 图2. 试验例2中实施例4的贴壁率曲线图。

## 具体实施方式

[0036] 实施例1

[0037] 本实施例提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体,该微载体的制备方法包括以下步骤:

[0038] (1) 制球:将5L浓度为1%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为0.5%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:3;

[0039] (2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以50rpm的转速搅拌5min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为1:1;

[0040] (3) 明胶包被:将10L浓度为0.05%的明胶溶液和10mL浓度为0.3%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中在温度为20℃、搅拌速度为50rpm的条件下反应30min,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为1:1;

[0041] (4) 洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以50rpm的转速搅拌5min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙

微胶珠的体积比例为1:1;

[0042] (5) 中和:加入浓度为0.5%的甘氨酸溶液在温度为40℃、搅拌速度为50rpm的条件下中和2h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0043] (6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以50rpm的转速搅拌5min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为1:1;

[0044] (7) 偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为1mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为0.5mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:1:1;两次搅拌的具体条件均为:搅拌速度为50rpm,搅拌温度为60℃,搅拌时间为0.5h;

[0045] (8) 洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以50rpm的转速搅拌5min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为1:1,制得湿润微载体;

[0046] (9) 冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干,用钴60  $\gamma$  射线辐射灭菌,辐照剂量为20K Gy,制得微载体。

[0047] 实施例2

[0048] 本实施例提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体,该微载体的制备方法包括以下步骤:

[0049] (1) 制球:将5L浓度为1.5%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为1.5%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:4;

[0050] (2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0051] (3) 明胶包被:将10L浓度为2.5%的明胶溶液和20mL浓度为0.6%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中在温度为40℃、搅拌速度为175rpm的条件下反应1.5h,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为2:1;

[0052] (4) 洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0053] (5) 中和:加入浓度为1.5%的甘氨酸溶液在温度为50℃、搅拌速度为175rpm的条件下中和2.5h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0054] (6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0055] (7) 偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为2mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为1.5mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:2:2;两次搅拌的具体条件如下:搅拌速度为150rpm,搅拌温度为70℃,搅拌时间为1.5h;

[0056] (8) 洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以175rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>+PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为2:1,制得湿润微载体;

[0057] (9) 冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干,用钴60  $\gamma$  射线辐射灭菌,辐照剂量为19K Gy,制得微载体。

[0058] 实施例3

[0059] 本实施例提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体,该微载体的制备方法包括以下步骤:

[0060] (1) 制球:将5L浓度为2%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为3%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:5;

[0061] (2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以300rpm的转速搅拌10min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为3:1;

[0062] (3) 明胶包被:将10L浓度为5%的明胶溶液和30mL浓度为1%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中在温度为60℃、搅拌速度为300rpm的条件下反应2h,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为3:1;

[0063] (4) 洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以300rpm的转速搅拌10min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为3:1;

[0064] (5) 中和:加入浓度为2%的甘氨酸溶液在温度为60℃、搅拌速度为300rpm的条件下中和3h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0065] (6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以300rpm的转速搅拌10min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为3:1;

[0066] (7) 偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为3mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为2mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:3:3;两次搅拌的具体条件如下:搅拌速度为300rpm,搅拌温度为80℃,搅拌时间为2h;

[0067] (8) 洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以300rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>+PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为3:1,制得湿润微载体;

[0068] (9) 冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干,用钴60  $\gamma$  射线辐射灭菌,辐照剂量为20K Gy,制得微载体。

[0069] 实施例4

[0070] 本实施例提供了一种间充质干细胞培养用可降解微载体,该微载体的制备方法包括以下步骤:

[0071] (1) 制球:将20L浓度为1.5%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为1.5%的氯化钙溶

液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:4;

[0072] (2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0073] (3) 明胶包被:将40L浓度为2.5%的明胶溶液和40L浓度为0.6%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中在温度为40℃、搅拌速度为175rpm的条件下反应1.5h,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为2:1;

[0074] (4) 洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0075] (5) 中和:加入浓度为1.5%的甘氨酸溶液在温度为50℃、搅拌速度为175rpm的条件下中和2.5h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0076] (6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0077] (7) 偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为2mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为1.5mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:2:2;两次搅拌的具体条件如下:搅拌速度为150rpm,偶联温度为70℃,搅拌时间为1.5h;

[0078] (8) 洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以175rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>+PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为2:1,制得湿润微载体;

[0079] (9) 冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干,用钴60  $\gamma$  射线辐射灭菌,辐照剂量为19K Gy,制得200g微载体。

#### [0080] 实施例5

[0081] 本实施例提供了一种细胞培养的方法,取1g实施例2制得的微载体,用200ml无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液浸泡溶胀24min,除去多余的PBS缓冲液,与脐带间充质干细胞一起接种至细胞培养液中进行细胞培养,细胞培养液为含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10ug/L的EGF的DMEM/F12培养基;脐带间充质干细胞的接种密度为 $3 \times 10^5$  cells/ml,培养温度为37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%;每过3天半量换液一次,培养7d后用收获液收获;溶胀后微载体占微载体和培养液总体积的1/5;收获液为含浓度为8mM的EDTA的PBS缓冲液;细胞培养液为DMEM/F-12培养基。

#### [0082] 实施例6

[0083] 本实施例提供了一种细胞培养的方法,取1g实施例2制得的微载体,用200ml无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液浸泡溶胀24min,除去多余的PBS缓冲液,与脐带间充质干细胞一起接种至细胞培养液中进行细胞培养,细胞培养液为含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10ug/L的EGF的DMEM/F12培养基;脐带间充质干细胞的接种密度为 $3 \times 10^5$  cells/ml,培养温度为37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%;每过3天半量换液一次,培养7d后用收获液收获;溶胀后微载



体占微载体和培养液总体积的1/5;收获液为含浓度为5mM的EDTA的PBS缓冲液;细胞培养液为DMEM/F-12培养基。

[0084] 实施例7

[0085] 本实施例提供了一种细胞培养的方法,取1g实施例2制得的微载体,用200ml无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液浸泡溶胀24min,除去多余的PBS缓冲液,与脐带间充质干细胞一起接种至细胞培养液中进行细胞培养,细胞培养液为含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10ug/L的EGF的DMEM/F12培养基;脐带间充质干细胞的接种密度为3×10<sup>5</sup> cells/ml,培养温度为37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%;每过3天半量换液一次,培养7d后用收获液收获;溶胀后微载体占微载体和培养液总体积的1/5;收获液为含浓度为10mM的EDTA的PBS缓冲液;细胞培养液为DMEM/F-12培养基。

[0086] 对照例1

[0087] 本对照例提供了一种微载体,该微载体的制备方法为:(1)制球:将5L浓度为1.5%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为1.5%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:4;

[0088] (2)洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0089] (3)偶联DEAE-HCl:取洗涤后的海藻酸钙微胶珠,加入浓度为2mol/L的NaOH溶液搅拌,再加入浓度为1.5mol/L的DEAE-HCl溶液进行搅拌;海藻酸钙微胶珠的体积与NaOH溶液的体积和DEAE-HCl溶液的体积的比值为1:2:2;两次搅拌的具体条件如下:搅拌速度为150rpm,搅拌温度为70℃,搅拌时间为1.5h;

[0090] (4)洗涤:除去多余的NaOH溶液和DEAE-HCl溶液,依次用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS缓冲液洗涤,每次洗涤均以175rpm的转速搅拌8min后放出洗涤液,所用无菌纯化水、0.1M盐酸、0.1mM盐酸、无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液与海藻酸钙微胶珠的体积比例均为2:1,制得湿润微载体;

[0091] (5)明胶包被:将10L浓度为2.5%的明胶溶液和20mL浓度为0.6%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将湿润微载体浸泡在混合液中在温度为40℃、搅拌速度为175rpm的条件下反应1.5h,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为2:1;

[0092] (6)洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0093] (7)中和:加入浓度为1.5%的甘氨酸溶液在温度为50℃、搅拌速度为175rpm的条件下中和2.5h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0094] (8)洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0095] (9)冻干:将步骤(8)所得到的微载体冻干,用钴60 γ 射线辐射灭菌,辐照剂量为19K Gy,制得微载体。

[0096] 对照例2

[0097] 本对照例提供了一种微载体,该微载体的制备方法包括以下步骤:

[0098] (1) 制球:将5L浓度为1.5%的纳米化海藻酸钠溶液滴入浓度为1.5%的氯化钙溶液中反应生成海藻酸钙胶珠,纳米化海藻酸钠溶液与氯化钙溶液的体积比为1:4;

[0099] (2) 洗涤:除去多余的氯化钙溶液,用无菌纯化水洗涤一次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0100] (3) 明胶包被:将10L浓度为2.5%的明胶溶液和10L浓度为0.6%的戊二醛溶液混合均匀制得混合液,将海藻酸钙微胶珠浸泡在混合液中在温度为40℃、搅拌速度为175rpm的条件下反应1.5h,混合液与纳米化海藻酸钠溶液的体积比为2:1;

[0101] (4) 洗涤:待包被反应结束后,除去多余的混合液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0102] (5) 中和:加入浓度为1.5%的甘氨酸溶液在温度为50℃、搅拌速度为175rpm的条件下中和2.5h,甘氨酸溶液的体积与步骤(3)的混合液体积相同;

[0103] (6) 洗涤:弃反应后的废液,用无菌纯化水洗涤三次,洗涤方法是加入纯化水后以175rpm的转速搅拌8min后弃洗涤液去除多余液体,纯化水与海藻酸钙微胶珠的体积比例为2:1;

[0104] (7) 冻干:将步骤(6)所得到的微载体冻干,用钴60  $\gamma$  射线辐射灭菌,辐照剂量为19K Gy,制得微载体。

[0105] 试验例1

[0106] 试验方法:在无菌条件下,分别取实施例1-3和对照例1制得的微载体各1g,用200ml无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>PBS缓冲液溶胀24min,去除多余的Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>PBS缓冲液,与脐带间充质干细胞一起接种至细胞培养液中进行细胞培养,细胞培养液为含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10ug/L的EGF的DMEM/F12培养基;脐带间充质干细胞的接种密度为 $3 \times 10^5$  cells/ml,培养温度为37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%;每过3天半量换液一次,培养7d后用收获液收获;溶胀后微载体占微载体和培养液总体积的1/5;收获液为含浓度为8mM的EDTA的PBS缓冲液;细胞培养液为DMEM/F-12培养基;分别在2、6、12、24小时取样测定各组脐带间充质干细胞的贴壁率,

[0107] 贴壁率计算公式为:贴壁率=(贴壁的细胞数/总细胞数)\*100%;

[0108] 试验结果如表1所示。

[0109] 表1.通过各组方法培养的贴壁率试验结果.

组别	培养时间	贴壁率 (%)			
		2h	6h	12h	24h
实施例 1	7 天	12.9	60.5	81.1	95.5
[0110]					
实施例 2	7 天	13.4	60.8	81.3	95.6
实施例 3	7 天	13.8	61.1	81.6	85.6
对照例 1	7 天	11.7	56.3	78.5	82.1

[0111] 由表1可知,在收获时间均为7天时,实施例1-3的方法在大规模培养干细胞时的贴壁率和贴壁速度高于对照例1,由此可知,本发明提供的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法制备的微载体,其培养的干细胞的贴壁率比较高。

[0112] 试验例2

[0113] 试验方法:在无菌条件下,取实施例4制得的微载体各200g,用40000ml无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液溶胀1h,去除多余的Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> PBS缓冲液,与脐带间充质干细胞一起接种至50升生物反应器中进行细胞培养,细胞培养液为含有质量百分浓度为10%的胎牛血清和质量浓度为10ug/L的EGF的DMEM/F12培养基;脐带间充质干细胞的接种密度为1×10<sup>5</sup>cells/ml微载体,培养温度为37℃、CO<sub>2</sub>浓度为5%;每过3天半量换液一次,培养5天后,将微载体培养间充质干细胞用光镜观察,结果见图1,培养7d后用收获液收获;溶胀后微载体占微载体和培养液总体积的1/5;收获液为含浓度为8mM的EDTA的PBS缓冲液;细胞培养液为DMEM/F-12培养基;取样测定贴壁率,试验结果如图2所示。

[0114] 收获前,取1ml微载体,用1.5ml添加了0.1%的专用收获液消化酶解得到单细胞悬液,终止消化后用生理盐水稀释至30ml,然后离心,弃上清,然后用1ml生理盐水重悬,计数,细胞密度2.4×10<sup>6</sup>/ml,换算可得细胞培养终点密度为9.6×10<sup>5</sup>/ml工作体积,一次细胞培养可得4.8×10<sup>10</sup>个细胞。

[0115] 图1可知,脐带间充质干细胞完全贴附在本发明微载体表面,细胞形态正常,说明脐带间充质干细胞能够良好地与本发明的微载体接触并贴附生长。

[0116] 由图2可知,本发明提供的间充质干细胞培养用可降解微载体的制备方法制备的微载体能够应用于细胞的大规模培养,其大规模培养的干细胞的贴壁率和贴壁速度都很高。

[0117] 试验例3

[0118] 取实施例1-4和对照例1的微载体,分别测定三组微载体内的电荷密度,电荷密度

的测定方法为:各组微球均取50g,每组分为5份,每份10g,每份微载体用纯水洗净抽干后均用50mL浓度2.0mol/L的NaCl浸洗,再分别用100mL0.1mol/L的HCl,500mL0.0001mol/L的HCl洗涤,真空抽干,再用100mL10%的Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>滤洗,用SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>置换Cl<sup>-</sup>,收集滤液,最后,以1mL5%的K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>为指示剂,用0.05mol/L的AgNO<sub>3</sub>滴定,测定Cl<sup>-</sup>的用量,由滴定所得的Cl<sup>-</sup>摩尔数除以载体的湿重,即得微球表面的电荷量E (mmol/g),各组结果取平均值,  $E = \frac{V \times C}{m}$ ,其中,E为微球表面电荷密度;V为消耗AgNO<sub>3</sub>的体积,C为的的浓度,m为微球重量,结果见表2。

[0119] 表2. 各组微载体内电荷密度测定结果.

组别	电荷密度 (mmol/g)
实施例 1	3.66
实施例 2	3.69
实施例 3	3.77
实施例 4	3.61
对照例 1	0.62

[0121] 由表2可知,本发明提供的方法能够显著提高海藻酸钙的偶联成功率,对照例1的方法先制备海藻酸钙微球,对海藻酸钙的偶联成功率较低。

[0122] 试验例4

[0123] 使用实施例5-7提供的方法和对照例1-2提供的微载体培养脐带间充质干细胞;对照例1-2的微载体培养脐带间充质干细胞的方法和细胞的收获方式与实施例6相同;测定各组细胞的收获时间,试验结果见表3。

[0124] 表3. 两种方法的收获时间试验结果

---

组别	收获时间 (min)
实施例 5	13.6
实施例 6	14.1
[0125] 实施例 7	14.4
对照例 1	33.9
对照例 2	65.8

---

[0126] 由以上结果可知,本发明提供的方法能够在15min内收获细胞,对照例1的方法制备的微载体与实施例5-7的方法制备的微载体结构不同,导致其收获时间延长,对照例2未在明胶层上偶联DEAE,其收获时间显著延长。

[0127] 综上,仅为本发明之较佳实施例,不以此限定本发明的保护范围,凡依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆为本发明专利涵盖的范围之内。

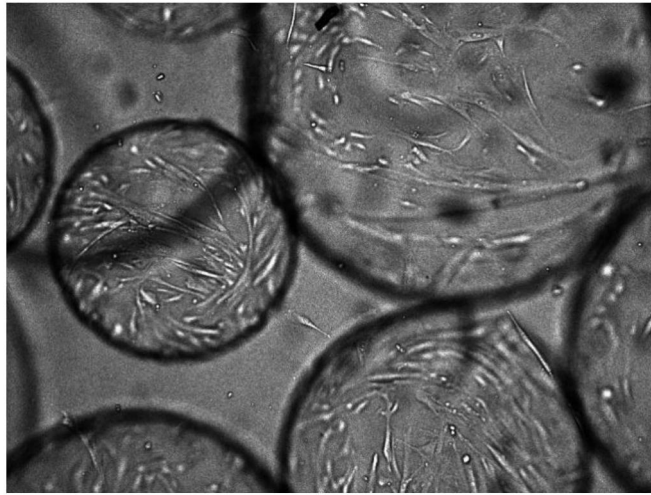


图1

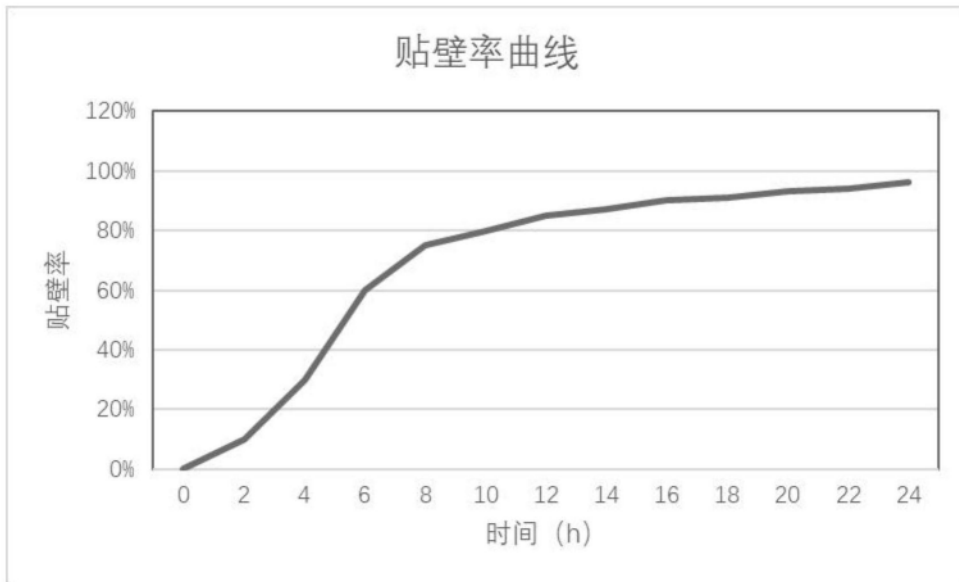


图2