



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102575226 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080045014. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 09. 27

C12N 5/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

12/570, 032 2009. 09. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2010/051033 2010. 09. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02011/040867 EN 2011. 04. 07

(71) 申请人 通用电气公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·鲁宾茨塔恩 R·D·史密斯

E·R·洛格欣 P·苏萨拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 徐晶 林森

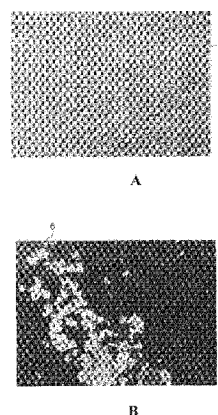
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

细胞释放的方法和试剂盒

(57) 摘要

提供释放细胞的方法和试剂盒。所述方法包括:将培养细胞提供在包括固定在基底上的多层聚电解质涂层的细胞培养载体上,和通过包含DMSO的释放溶液从所述细胞培养载体上释放所述培养细胞。所述试剂盒包括细胞培养载体和释放溶液。所述细胞培养载体包括基底和固定在所述基底上的多层聚电解质涂层且所述释放溶液包含DMSO。



1. 释放细胞的方法,其包括:
 - a) 将培养细胞提供在细胞培养载体上,其中所述细胞培养载体包括固定在基底上的多层聚电解质涂层 ;和
 - b) 通过加入包含 DMSO 的释放溶液从所述细胞培养载体上释放所述培养细胞。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述培养细胞包括间充质基质细胞。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述培养细胞包括人间充质基质细胞。
4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中在所述释放溶液中 DMSO 的浓度为约 0.01% -1.0%。
5. 权利要求 4 的方法,其中在所述释放溶液中 DMSO 的浓度为约 0.02% -0.5%。
6. 权利要求 5 的方法,其中在所述释放溶液中 DMSO 的浓度为约 0.1% -0.5%。
7. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述培养细胞通过在室温下培育所述细胞培养载体而从所述细胞培养载体释放。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述培育进行约 10-30 分钟。
9. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一个均聚物层。
10. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚合物涂层包括至少一个共聚物层。
11. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚合物涂层包括至少一个均聚物层和至少一个共聚物层。
12. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚合物涂层包括交替排列的共聚物层和均聚物层。
13. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚合物涂层包括至少一层温度响应型聚合物。
14. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚合物涂层包括至少一层聚(双(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)-共-聚丙烯酸。
15. 以上权利要求中一项或多项的方法,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一层聚-L-赖氨酸。
16. 用于培养细胞的试剂盒,其包括:
细胞培养载体;
其中所述细胞培养载体包括基底和固定在所述基底上的多层聚电解质涂层 ;和
用于细胞释放的释放溶液,其中所述释放溶液包含 DMSO。
17. 权利要求 16 的试剂盒,其还包括用于培养细胞的培养基。
18. 权利要求 16 或 17 的试剂盒,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一层温度响应型聚合物。
19. 权利要求 16、17 或 18 的试剂盒,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一层聚(双(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)-共-聚丙烯酸。
20. 权利要求 16-19 中一项或多项的试剂盒,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一个均聚物层。
21. 权利要求 16-20 中一项或多项的试剂盒,其中所述多层聚电解质涂层包括至少一层聚-L-赖氨酸。

细胞释放的方法和试剂盒

[0001] 领域

[0002] 本发明涉及细胞释放的方法。更详细地讲,本发明涉及从基于聚合物的细胞培养载体释放细胞的方法。

[0003] 背景

[0004] 黏附细胞通常在玻璃表面或聚合物基底上生长。常将用于细胞培养的表面预处理以增强细胞黏附和繁殖。在生物医学和生物应用中长期需要允许按需细胞脱离或细胞释放的用于黏附细胞的基质。

[0005] 培养的细胞可通过多种方法从细胞培养载体中脱离或释放。常用的细胞释放方法包括机械方法(诸如,刮削)、用蛋白水解酶(诸如,胰蛋白酶)处理、使用钙螯合剂(诸如,EDTA)或这类方法的组合。然而,这些常规细胞释放方法中的许多可对培养的细胞产生不利影响,且可改变其固有的结构和功能。例如,用胰蛋白酶处理细胞(即,胰酶消化)是一种生硬的方法,且由于其对细胞表型的潜在影响而使得对诸如干细胞的脆弱细胞不合需要。此外,胰蛋白酶通常来源于动物,且可含有杂质,如同时分级分离的蛋白质或生物制剂(诸如,病毒或支原体)。动物源杂质可限制释放的细胞用于诸如细胞疗法的严苛应用的用途。释放细胞的机械方法为劳动密集型的且对于工业规模细胞培养应用来说常常不实用。

[0006] 其他非酶促法包括使用超声波或冲击波的物理方法,其产生促进细胞脱离的气泡。自包含热响应型聚合物如聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAAm)的细胞培养载体培养的细胞可通过冷却细胞培养载体到在约4-20°C范围内的温度来释放。

[0007] 有效细胞释放对于工业规模细胞培养方法中的高产率特别重要。因此,存在对研发在不影响细胞形态和细胞活力的情况下快速有效细胞脱离的更好细胞释放技术的新兴需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明通常包括用于从细胞培养载体中释放细胞的方法和试剂盒。

[0010] 从细胞培养载体中释放细胞的方法的实例包括将培养细胞提供在细胞培养载体上且通过加入释放溶液从所述细胞培养载体释放所述培养细胞。所述释放溶液包含二甲亚砜(DMSO)。所述细胞培养载体包括在基底上的多层基于聚电解质的涂层。

[0011] 用于培养细胞的试剂盒的实例通常包括细胞培养载体和用于细胞释放的释放溶液。所述释放溶液包含DMSO。所述细胞培养载体包括基底和在所述基底上的多层基于聚电解质的涂层。

[0012] 用于释放细胞的方法的另一实例包括以下步骤:在细胞培养载体(包括在基底上的多层基于聚电解质的涂层)上提供培养的人间充质干细胞,和在室温下通过用释放溶液培育细胞而从所述细胞培养载体释放培养细胞。所述释放溶液包含在PBS中的约0.01% DMSO。

[0013] 附图

[0014] 在参考附图阅读以下详述时将更加透彻地理解本发明的这些和其他特征、方面和优势,在附图中相同的符号表示相同元件,其中:

[0015] 图 1A 为在加入包含 DMSO 的释放溶液之后未涂布载玻片的图像。图 1B 为在使用包含 DMSO 的释放溶液释放细胞之后具有多层基于聚电解质的涂层的载玻片的图像。

[0016] 图 2 代表 WST-1 细胞测定的图示,说明当与释放的细胞混合并在 450nm 下测量时 WST-1 试剂的光学密度的变化。在 450nm 下的光学密度与测定系统中存在的细胞数目相关。细胞使用包含在 PBS 中的 DMSO 的释放溶液而从未涂布或多层聚电解质涂布的载玻片释放。

[0017] 发明详述

[0018] 为了更清楚且简明地描述本发明的发明主题,对于各专业术语提供以下定义,其用于以下描述和随附权利要求书中。在整个说明书,专业术语的范例应该视为非限制性实例。

[0019] 本文所提到的“细胞培养载体”为用于黏附并培养细胞的载体。所述细胞培养载体可包括基底。所述基底可用用于细胞黏附和繁殖的合适涂料涂布或层化。合适的涂料可包括但不限于聚电解质。

[0020] 本文所提到的“基底”为对涂层提供载体的基础或支持物。涂布的基底可用作细胞培养载体。

[0021] 本文所提到的“释放溶液”为帮助细胞从细胞培养载体中释放或脱离的溶液。所述释放溶液包含一种或多种极性非质子溶剂,例如二甲亚砜 (DMSO)。例如, DMSO 属于极性非质子溶剂家族,其为水可混溶的。其他极性非质子溶剂包括但不限于:四氢呋喃、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺。那些溶剂与诸如聚电解质的聚合物强烈相互作用且能够妨碍氢键以及静电相互作用,这影响聚合物聚集和细胞黏附。所述释放溶液包含在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的 DMSO。

[0022] 本文所提到的“聚电解质”为如下聚合物,其中该聚合物的重复单元带有电解质基团。在这些基团在水溶液(例如,水)中解离时,所述聚合物会带电。聚电解质性质因此类似于电解质(盐)和聚合物(高分子化合物)二者,且往往称为聚合盐。聚电解质溶液像盐一样导电且常像聚合物一样粘稠。许多生物分子为聚电解质。聚电解质的实例包括但不限于多肽(或蛋白质)、DNA 和聚合物。

[0023] 对于诸如药物筛选和细胞疗法的应用需要高产率的健康活细胞。工业规模的细胞制造单元或细胞生物反应器常使用合适的细胞培养载体来培养细胞。如果培养的细胞将用于治疗应用中,用于从细胞培养载体中释放细胞的有效非酶促法则会特别有用。

[0024] 用于从细胞培养载体中释放细胞的本发明的方法和试剂盒可用于诸如干细胞的脆弱细胞。正常细胞或脆弱细胞的有效释放可使用本发明的用于释放细胞的方法和试剂盒达成。

[0025] 用于释放培养细胞的方法的一个实例包括以下步骤:将培养细胞提供在细胞培养载体上,和通过加入包含 DMSO 的释放溶液从所述细胞培养载体上释放所述培养细胞。所述细胞培养载体可包括固定在基底上的多层聚电解质。

[0026] 所述细胞使用包含 DMSO 的释放溶液释放。所述释放溶液中 DMSO 的浓度(v/v)可为约 0.01% -1.0%。在一些实施方案中,所述释放溶液中 DMSO 的浓度可为约 0.02% -0.5%,以及 0.1% -0.5%。细胞释放效率可通过改变释放溶液中 DMSO 的浓度来增强。细胞释放效率可随 DMSO 浓度增加而增加。所述释放溶液还可包含在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的 DMSO,其中所述溶液的 pH 为约 7.5。

[0027] 培养细胞的释放可通过在室温下或在约 15℃ -37℃、约 20℃ -35℃ 或约 20℃ -30℃ 的范围内用释放溶液培育细胞培养载体来进一步优化。

[0028] 细胞可通过在室温下在细胞培养载体上培育诸如约 1 小时 -2 小时、约 30 分钟 -1 小时或约 10 分钟 -30 分钟的多种时间段而从细胞培养载体释放。在一些实施方案中，细胞释放效率可通过改变在加入释放溶液之后用于细胞释放的培育时间来改变。例如，细胞释放效率可随培育时间增加而增加。

[0029] 释放细胞的方法包括将培养细胞提供在细胞培养载体上的步骤。所述方法可包括在细胞培养载体上培养细胞。所述细胞可根据例如细胞类型在约 20℃ -37℃、约 30℃ -37℃ 和约 35℃ -37.5℃ 范围的各种温度下培养。

[0030] 所述细胞可在培养瓶中生长且可加到细胞培养载体以便进一步生长。细胞可在从诸如但不限于血液、骨髓或组织切片的生物源中提取之后在细胞培养载体上生长。在其他实施方案中，所述细胞培养载体可引入旋转瓶、叠层式培养瓶、搅拌釜反应器或任何其他体外细胞培养系统中。

[0031] 所述方法还可用于释放脆性细胞，一旦它们在细胞培养载体上培养。所述脆性细胞可包括但不限于胚胎干细胞、成人干细胞、诱导多能干细胞、树状细胞、造血细胞、间充质基质细胞、神经细胞、再编程细胞或去分化细胞。例如，培养的干细胞通过用包含 0.01% (v/v) DMSO 的释放溶液培育细胞培养载体约 10 分钟的时间而从细胞培养载体释放。

[0032] 用于干细胞培养的有效方法对于以高产率产生用于临床或研究应用的具有高纯度的干细胞来说是关键的。干细胞的培养常需要专用技术，因为干细胞可能损失其多能性或多潜能性或可能在细胞培养期间分化。此外，诸如机械刮削或胰酶消化的释放细胞的常规方法可能不适合释放培养的干细胞。这些问题可通过使用用于释放细胞的本方法的非酶促实例之一来解决。例如，间充质基质细胞可使用本文所述的非酶促、基于 DMSO 的细胞释放方法在对培养的间充质基质细胞没有任何不利影响的情况下成功地培养并释放。

[0033] 所述细胞培养载体可构造为包括一层或多层聚合物的细胞培养床、细胞载体珠粒、盘或支架。基底的非限制性实例包括微载体、膜、纤维、中空纤维、毛细管、容器、烧瓶、圆盘、珠粒、皮氏培养皿、板、织造或非织造织物或网筛、纳米纤维垫、粒子、支架或发泡体。基底材料的实例包括但不限于玻璃、聚合物、金属、陶瓷及其组合。

[0034] 所述细胞培养载体可包括多层基于聚电解质的涂层。所述多层基于聚电解质的涂层可包括至少一个共聚物层或至少一个均聚物层。在其他实施方案中，所述多层基于聚电解质的涂层可包括至少一个共聚物层和至少一个均聚物层。所述共聚物层和所述均聚物层也可以交替排列堆叠于涂层中。例如，所述细胞培养载体可包括共聚物层和 / 或均聚物层的交替组。多层基于聚电解质的涂层可利用层叠层 (layer-by-layer, LBL) 技术制造。一个或多个聚合物层可通过使用 LBL 技术一层排列在另一层上。

[0035] 所述多层基于聚电解质的涂层可包含共聚物，其中所述共聚物可为嵌段共聚物。所述涂层可包括多层相同或不同的嵌段共聚物。嵌段共聚物的非限制性实例为热响应型两亲性嵌段共聚物 (TRABC)。所述嵌段共聚物可包括聚(双(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)-共-聚(丙烯酸)。除了所述嵌段共聚物以外，所述多层涂层还可包括一个或多个额外聚合物层(例如，均聚物或共聚物)。均聚物的非限制性实例包括聚(L-赖氨酸)、聚(烯丙胺)、聚(乙烯亚胺)和聚(乙烯基吡咯烷酮)。

[0036] 在所述多层聚电解质涂层中的均聚物或共聚物可对诸如温度、pH 或离子强度的一种或多种外界刺激作出响应。所述均聚物可对离子强度或 pH 或两者作出响应。所述共聚物可对温度或 pH 或两者作出响应。

[0037] 所述多层基于聚电解质的涂层可经非共价相互作用黏附到基底上。聚合物涂层非共价附着到基底上提供显著的优势,诸如使用以复杂基底几何形状(例如,平板、珠粒、立方形、多孔发泡体、纤维和非织造织物)的基底的灵活性。

[0038] 用于培养并释放细胞的本发明试剂盒的一个实施方案可包括具有基底的细胞培养载体,在所述基底上具有多层基于聚合物的涂层;和释放溶液。所述试剂盒还可包括细胞(例如,处于冷冻条件下)和/或用于培养细胞的培养基。所述试剂盒还可包括关于自细胞培养载体处理、培养和/或释放细胞的方案。所述试剂盒可连同描述使用所述试剂盒的方法的手册一起包装。

[0039] 实施例 1

[0040] 制备多层聚合物涂布的细胞培养载体

[0041] 如下制备多层聚合物涂布的细胞培养载体。将聚-L-赖氨酸(PLL)涂布的载玻片(Polysciences Inc.)切割成 8×8mm 的方块。将载玻片用去离子(DI)水洗涤且用绝对乙醇洗涤,接着在室温下风干。在 37℃ 下将干燥的载玻片浸入聚(双(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)-共-聚(丙烯酸)(PDEGMEME-co-PAA)在去离子水中的 0.1% 溶液中历时 60 分钟。随后将载玻片用去离子水洗涤且在 37℃ 下用聚-L-赖氨酸(Aldrich)的 0.1% 溶液(w/v)培育 60 分钟。所述聚-L-赖氨酸(PLL)的 0.1% 溶液含有少量(约 0.1mol%)用荧光素 5-异硫氰酸酯(FITC-PLL)(FITC 得自 Sigma)荧光探针官能化的聚-L-赖氨酸。引入荧光探针能够测量聚合物层的荧光强度以测定多层涂层的正确形成。将载玻片用温(37℃)去离子水洗涤且随后在 37℃ 下用聚(双(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯)-共-聚(丙烯酸)的 0.1% 溶液(w/v)培育 60 分钟。将载玻片用去离子水洗涤并风干。沉积的 PLL 的量通过在 Typhoon 荧光成像器上测量 FITC 荧光的强度来测定。

[0042] 所测量荧光的定量分析证实了 PLL/PDEGMEME-co-PAA 五层涂层(FITC 结合)的形成。基底上 PLL/PDEGMEME-co-PAA 涂层的形成另外通过飞行时间二次离子质谱(ToF SIMS)分析证实(数据未示出)。ToF SIMS 光谱显示观察到的负 SiO₂ 离子的峰高和峰位置的逐渐降低。具有五层 PLL/PDEGMEME-co-PAA 的样品的 LBL 涂层足够厚,使得 SiO₂ 离子对于未涂布的载玻片几乎不可检测(数据未示出)。

[0043] 实施例 2

[0044] 在多层细胞培养载体上的细胞培养和随后的细胞释放

[0045] 使用细胞培养载体以培养人间充质干细胞(hMSC, ATCC)。这些细胞首先使用间充质干细胞生长培养基(PT-3001, Lonza)在聚苯乙烯表面上培养。为了培养细胞,将约 10⁵ 个人间充质干细胞(原代培养物)接种在细胞培养载体(未涂布和/或涂布的载玻片)的表面并在 37℃ 下在 5% CO₂ 的湿润气氛中培育。

[0046] 让细胞在细胞培养恒温箱中在未涂布和/或聚合物涂布的玻璃表面上繁殖一周。通过明视野显微镜监测细胞扩增且每 3-4 天更换培养基。细胞释放通过加入在 PBS 中的包含 0.01% (v/v) DMSO 的释放溶液试验。当细胞约 100% 汇合时,从细胞培养载体(未涂布或涂布的载玻片)除去培养基。将细胞用 PBS 漂洗,接着加入足够的释放溶液以用附着细

胞覆盖生长表面。将具有释放溶液的细胞培养载体在室温下培育 30 分钟。在倒置显微镜中观察细胞,直至细胞层分散。随后,释放的细胞通过从细胞培养载体中吸出而从细胞培养载体中移出。图 1A 显示在通过使用包含 0.01% (v/v) DMSO 的释放溶液释放培养的人间充质干细胞之后未涂布的细胞培养载体 (2) 的图像。图 1B 显示在通过使用包含 0.01% (v/v) DMSO 的释放溶液释放人间充质干细胞 (6) 之后多层 PLL/PDEGMEMA-co-PAA (五层) 涂布的细胞培养载体 (4) 的图像。

[0047] 实施例 3

[0048] 定量评估释放的细胞

[0049] 细胞释放的定量测量通过使用 WST-1 测定试剂在 450nm 下测量细胞增殖测定溶液的光学密度提供于图 2 中。释放的细胞通过使细胞悬浮液以 500g 下离心 5 分钟而沉淀。使沉淀的细胞再悬浮在 200 μ l 生长培养基中且将其转移在 96 孔板中。将该板以 500g 旋转 5 分钟。向各孔中加入 150 μ l 新鲜生长培养基和 15 μ l WST-1 细胞测定试剂。在 37°C 下用测定试剂培育细胞 2.5 小时。该实验以 3 个不同组重复进行。自未涂布的载玻片 (条 8) 和五层 PLL/PDEGMEMA-co-PAA 涂布的载玻片 (条 10) 的细胞释放示于图 2 中。该数据显示,与载玻片 (8) 的未涂布表面相比,五层 PLL/PDEGMEMA-co-PAA 涂布的载玻片的细胞有效释放。未涂布的载玻片充当对照物。自未涂布的载玻片释放的细胞的信号与自五层 PLL/PDEGMEMA-co-PAA 涂布的载玻片释放的细胞的信号之间的差异给出释放效率的量度,这点由图 2 示出,多层聚合物涂布的细胞培养载体显然更有效。

[0050] 虽然在本文中仅说明并描述了本发明的某些特征,但本领域技术人员将想到许多修改和变化。因此,应理解所附权利要求书将涵盖所有这类属于本发明的范围内的修改和变化。

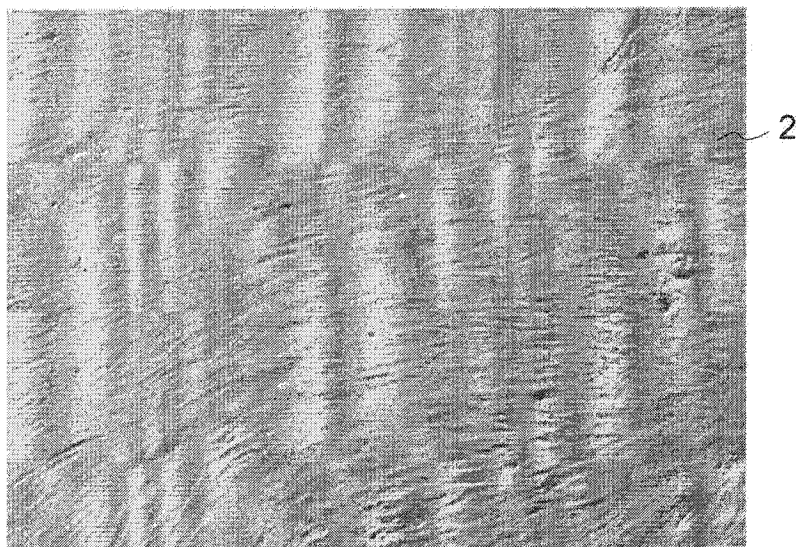


图 1A

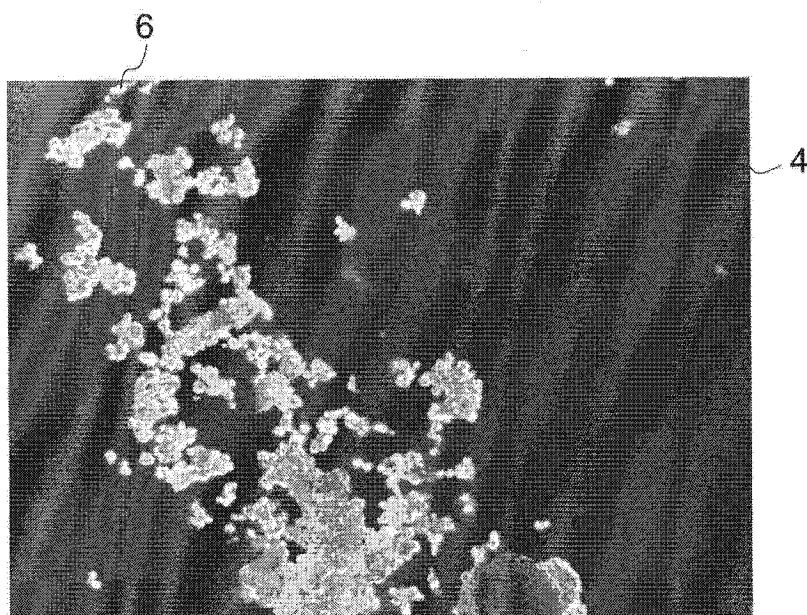


图 1B

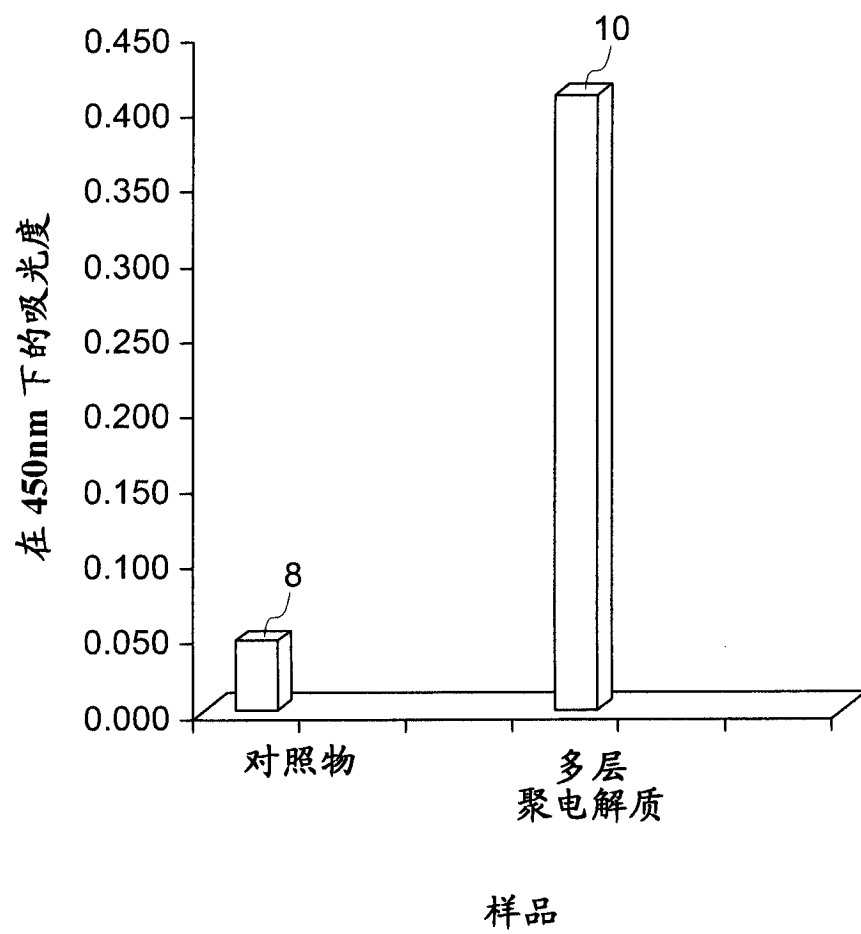


图 2