(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118440893 A
(43)申请公布日 2024.08.06

(21)申请号 202410758974.X

(22)申请日 2024.06.13

(71)申请人 深圳市北科生物科技有限公司
地址 518000 广东省深圳市南山区粤海街道高新南九道59号北科大厦16楼

(72)发明人 袁倩 杨玉林 廖延 杨俭 黄荫富 孟硕 蔡车国 胡隽源

(74)专利代理机构 深圳市科哲专利代理事务所(普通合伙) 44767
专利代理师 周黎阳

(51)Int.Cl.
C12N 5/0775(2010.01)

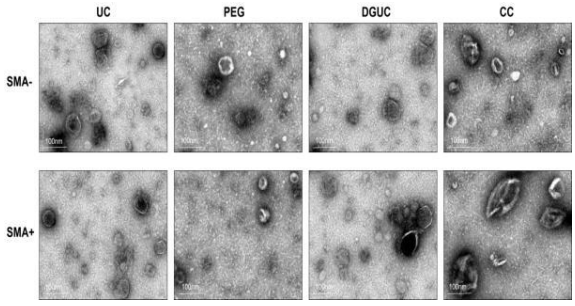
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

高纯度干细胞外泌体的制备方法

(57)摘要

本发明公开一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,涉及外泌体纯化技术领域,该种高纯度干细胞外泌体的制备方法包括如下步骤:S1、生产外泌体所用的干细胞培养上清料液;S2、上清料液经过多重滤器过滤去除掉细胞碎片及大囊泡;S3、添加用于诱导杂蛋白降解的化学试剂分解料液中的杂蛋白以获得高纯度的原液;S4、添加核酸酶,以去除料液中的染色质杂质;S5、经过多重层析柱以获得高纯度的外泌体溶液;S6、经过三级切向流过滤系统处理富集外泌体溶液;S7、经过滤器处理保证终产品无菌;通过多重过滤、多重切向流、化学诱导、串联层析法等方式组合,可以实现大批量、高纯度外泌体的生产,制备出的外泌体纯度高,杂质少。



CN 118440893 A

1.一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

S1、生产外泌体所用的干细胞培养上清料液;

S2、上清料液经过多重滤器过滤去除掉细胞碎片及大囊泡;

S3、采用一级切向流过滤系统处理步骤S2得到的料液,在一级切向流过滤前在料液中添加用于诱导杂蛋白降解的化学试剂分解料液中的杂蛋白以获得高纯度的原液;

S4、采用二级切向流过滤系统处理料液,在二级切向流过滤前在料液中添加核酸酶,以去除料液中的染色质杂质;

S5、步骤S4得到的无染色质的料液再经过多重层析柱以获得高纯度的外泌体溶液;

S6、步骤S5得到的高纯度外泌体溶液再经过三级切向流过滤系统处理富集外泌体溶液;

S7、步骤S6得到的富集外泌体溶液经过滤器处理保证终产品无菌。

2.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S3中的诱导杂蛋白降解的化学试剂为经过预水解的苯乙烯-马来酸酐共聚物,苯乙烯和马来酸酐摩尔比为2:1,苯乙烯-马来酸酐共聚物的使用浓度为5-100nmol,于4℃摇床上孵育8-20h;所述一级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为750KDa,控制系统压力小于10psi,环境温度为4℃。

3.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S4中核酸酶为全能核酸酶,使用浓度为2KU-10KU/L,使用条件为室温孵育30min;所述二级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为300KDa,控制系统压力小于4psi,环境温度为4℃。

4.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S5中层析柱包括阴离子交换层析柱,该阴离子交换层析柱的填料配基为季铵基、二乙基氨基丙基、二乙氨乙基中的一种或多种组合,所用洗脱液为2M NaCl PBS溶液,pH为7.4-8.0;层析柱体积为5mL,层析流速为5mL/min,缓冲体系为磷酸盐缓冲液,控制层析系统压力值小于80psi,环境温度为4℃。

5.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S5中层析柱还包括阳离子交换层析柱,该阳离子交换层析柱的填料配基为羧甲基、磺酸甲基、磺酸乙基中的一种或多种组合,所述洗脱液为2M NaCl PBS溶液,pH为7.4-8.0。

6.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S5中层析柱还包括尺寸排阻层析柱,采用含有多孔的SEC柱分离纯化外泌体,使用Capto Core700或Capto Core400为填料,所用洗脱液为PBS缓冲液。

7.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S6中三级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi,环境温度为4℃。

8.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S7中富集外泌体溶液经过滤器处理所使用的除菌过滤设备为囊式滤器,滤膜孔径为0.22μm。

9.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S1中干细胞培养上清料液是在2D培养条件或者3D生物反应器中收集得到。

10.根据权利要求1所述的高纯度干细胞外泌体的制备方法,其特征在于:所述步骤S2

中上清料液经过0.8μm、0.45μm过滤去除掉细胞碎片及大囊泡。

高纯度干细胞外泌体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及外泌体纯化领域技术,尤其是指一种高纯度干细胞外泌体的制备方法。

背景技术

[0002] 细胞外囊泡是一类来源于细胞的纳米级囊泡,其携带了母体细胞来源的多种核酸、蛋白质和其他生物分子。其组成比较复杂,按照尺寸大小可分为外泌体(30-150nm)、微囊泡(100-1000nm)、凋亡小体(>1000nm)。其中外泌体由于其在免疫抑制、癌症进展、再生医学、疾病早筛等方面有着十分重大的应用,在过去的十几年受到了越来越多的关注。

[0003] 外泌体的分离方法有许多,比如聚合物沉淀法、免疫亲和法、尺寸排阻法以及目前公认的金标准超速离心法。超速离心是基于粒子密度不同沉降速率不同的一种物理分离方法,但是由于脂蛋白尤其是高密度脂蛋白与外泌体有着十分重叠的密度大小,因此使用超离方法时极容易将两者共分离影响样本的纯度,尤其是在血浆中外泌体分离时,由于血浆中脂蛋白含量比外泌体高出约6个数量级,血浆外泌体极容易被脂蛋白污染,影响病理分析结果。同样当采用尺寸排阻色谱法也就是基于粒子大小分离的方法时,由于脂蛋白尤其是低密度脂蛋白和外泌体尺寸的重叠也难以将这两种物质分离开来。

[0004] 苯乙烯-马来酸酐(SMA)共聚物在生命科学领域有较为悠久的历史,最初其被应用为癌症治疗药物的偶联物。后来人们发现SMA可以与磷脂相互作用,SMA可以诱导生物脂膜自发形成直径约为10nm的盘状颗粒,可以增溶脂蛋白分解的同时保持蛋白质的稳态,因此可以用于去除细胞上清中的脂蛋白。随着SMA的开发,Sigma Aldrich(USA,)公司已经生产出了商业化的SMA聚合物。苯乙烯与马来酸酐的比例不同导致聚合物会有着不同的性质,现有数据证明苯乙烯与马来酸酐比例为2:1时共聚物在生理pH条件下有更好的效果;申请号为202111509707.1的中国发明专利公开了一种EGF间充质干细胞外泌体的纯化方法,现有技术中的制备方法,未通过添加SMA聚合物以及核酸酶处理细胞上清料液,不便于为制备出高纯度外泌体提供保障;未通过多重过滤、多重切向流、化学诱导、串联层析法等方式组合,不便于实现大批量、高纯度外泌体的生产,制备出的外泌体纯度有待提高;因此,针对此现状,迫切需要开发一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,以满足实际使用的需求。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明针对现有技术存在之缺失,其主要目的是提供一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,其通过采用本申请提供的高纯度干细胞外泌体的制备方法,为外泌体的工业化制备提供了较好的依据,本发明添加SMA聚合物以及核酸酶处理细胞上清料液,为制备出高纯度外泌体提供保障;通过多重过滤、多重切向流、化学诱导、串联层析法等方式组合,可以实现大批量、高纯度外泌体的生产,制备出的外泌体纯度高,杂质少。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下之技术方案:

一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,包括如下步骤:

S1、生产外泌体所用的干细胞培养上清料液；

S2、上清料液经过多重滤器过滤去除掉细胞碎片及大囊泡；

S3、采用一级切向流过滤系统处理步骤S2得到的料液，在一级切向流过滤前在料液中添加用于诱导杂蛋白降解的化学试剂分解料液中的杂蛋白以获得高纯度的原液；

S4、采用二级切向流过滤系统处理料液，在二级切向流过滤前在料液中添加核酸酶，以去除料液中的染色质杂质；

S5、步骤S4得到的无染色质的料液再经过多重层析柱以获得高纯度的外泌体溶液；

S6、步骤S5得到的高纯度外泌体溶液再经过三级切向流过滤系统处理富集外泌体溶液；

S7、步骤S6得到的富集外泌体溶液经过滤器处理保证终产品无菌。

[0007] 作为一种优选方案：所述步骤S3中的诱导杂蛋白降解的化学试剂为经过预水解的苯乙烯-马来酸酐共聚物，苯乙烯和马来酸酐摩尔比为2:1，苯乙烯-马来酸酐共聚物的使用浓度为5-100nmol，于4℃摇床上孵育8-20h；所述一级切向流过滤系统使用中空纤维柱，该中空纤维柱的膜孔径为750KDa，控制系统压力小于10psi，环境温度为4℃。

[0008] 作为一种优选方案：所述步骤S4中核酸酶为全能核酸酶，使用浓度为2KU-10KU/L，使用条件为室温孵育30min；所述二级切向流过滤系统使用中空纤维柱，该中空纤维柱的膜孔径为300KDa，控制系统压力小于4psi，环境温度为4℃。

[0009] 作为一种优选方案：所述步骤S5中层析柱包括阴离子交换层析柱，该阴离子交换层析柱的填料配基为季铵基、二乙基氨基丙基、二乙氨乙基中的一种或多种组合，所用洗脱液为2M NaCl PBS溶液，pH为7.4-8.0；层析柱体积为5mL，层析流速为5mL/min，缓冲体系为磷酸盐缓冲液，控制层析系统压力值小于80psi，环境温度为4℃。

[0010] 作为一种优选方案：所述步骤S5中层析柱还包括阳离子交换层析柱，该阳离子交换层析柱的填料配基为羧甲基、磺酸甲基、磺酸乙基中的一种或多种组合，所述洗脱液为2M NaCl PBS溶液，pH为7.4-8.0。

[0011] 作为一种优选方案：所述步骤S5中层析柱还包括尺寸排阻层析柱，采用含有多孔的SEC柱分离纯化外泌体，使用Capto Core700或Capto Core400为填料，所用洗脱液为PBS缓冲液。

[0012] 作为一种优选方案：所述步骤S6中三级切向流过滤系统使用中空纤维柱，该中空纤维柱的膜孔径为100KDa，控制系统压力小于4psi，环境温度为4℃。

[0013] 作为一种优选方案：所述步骤S7中富集外泌体溶液经过滤器处理所使用的除菌过滤设备为囊式滤器，滤膜孔径为0.22μm。

[0014] 作为一种优选方案：所述步骤S1中干细胞培养上清料液是在2D培养条件或者3D生物反应器中收集得到。

[0015] 作为一种优选方案：所述步骤S2中上清料液经过0.8μm、0.45μm过滤去除掉细胞碎片及大囊泡。

[0016] 本发明与现有技术相比具有明显的优点和有益效果，具体而言，由上述技术方案可知，通过采用本申请提供的高纯度干细胞外泌体的制备方法，为外泌体的工业化制备提供了较好的依据，本发明添加SMA聚合物以及核酸酶处理细胞上清料液，为制备出高纯度外

泌体提供保障;通过多重过滤、多重切向流、化学诱导、串联层析法等方式组合,可以实现大批量、高纯度外泌体的生产,制备出的外泌体纯度高,杂质少;针对目前外泌体分离方法难以实现规模化以及脂蛋白存在影响其纯度等问题。本发明提供一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,基于SMA化学诱导法联合切向流过滤系统以及蛋白纯化层析系统生产出高纯度、高产量的外泌体,以满足临床以及产业的需求。

[0017] 为更清楚地阐述本发明的结构特征和功效,下面结合附图与具体实施例来对其进行详细说明。

附图说明

[0018] 图1为本发明之实施例中最终纯化的外泌粒径分布示意图;

图2为本发明之实施例中最终纯化的外泌体的电镜观察示意图;

图3为本发明之实施例中最终纯化的外泌体的脂蛋白标记物(APOE)表达示意图;

图4为本发明之实施例中最终纯化的外泌体的阳性蛋白标记物(CD63/CD9)阴性标记物(GM130/Calnexin)脂蛋白标记物(APOE)及内参蛋白(GAPDH)表达示意图;

图5为本发明之实施例4中样品在UV280处的吸收峰峰图。

具体实施方式

[0019] 本发明如图1至图 5 所示,一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,包括如下步骤:

S1、生产外泌体所用的干细胞培养上清料液;

S2、上清料液经过多重滤器过滤去除掉细胞碎片及大囊泡;

S3、采用一级切向流过滤系统处理步骤S2得到的料液,在一级切向流过滤前在料液中添加用于诱导杂蛋白降解的化学试剂分解料液中的杂蛋白以获得高纯度的原液;

S4、采用二级切向流过滤系统处理料液,在二级切向流过滤前在料液中添加核酸酶,以去除料液中的染色质杂质;

S5、步骤S4得到的无染色质的料液再经过多重层析柱以获得高纯度的外泌体溶液;

S6、步骤S5得到的高纯度外泌体溶液再经过三级切向流过滤系统处理富集外泌体溶液;

S7、步骤S6得到的富集外泌体溶液经过滤器处理保证终产品无菌。

[0020] 该步骤S3中的诱导杂蛋白降解的化学试剂为经过预水解的苯乙烯-马来酸酐共聚物,苯乙烯和马来酸酐摩尔比为2:1,苯乙烯-马来酸酐共聚物的使用浓度为5-100nmol,于4℃摇床上孵育8-20h;该一级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为750KDa,控制系统压力小于10psi,环境温度为4℃。

[0021] 该步骤S4中核酸酶为全能核酸酶,使用浓度为2KU-10KU/L,使用条件为室温孵育30min;该二级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为300KDa,控制系统压力小于4psi,环境温度为4℃。

[0022] 该步骤S5中层析柱包括阴离子交换层析柱,该阴离子交换层析柱的填料配基为季铵基、二乙基氨基丙基、二乙氨乙基中的一种或多种组合,所用洗脱液为2M NaCl PBS溶液,pH为7.4-8.0;层析柱体积为5mL,层析流速为5mL/min,缓冲体系为磷酸盐缓冲液,控制层析

系统压力值小于80psi,环境温度为4℃。

[0023] 该步骤S5中层析柱还包括阳离子交换层析柱,该阳离子交换层析柱的填料配基为羧甲基、磺酸甲基、磺酸乙基中的一种或多种组合,该洗脱液为2M NaCl PBS溶液,pH为7.4-8.0。

[0024] 该步骤S5中层析柱还包括尺寸排阻层析柱,采用含有多孔的SEC柱分离纯化外泌体,使用Capto Core700或Capto Core400为填料,所用洗脱液为PBS缓冲液。

[0025] 该步骤S6中三级切向流过滤系统使用中空纤维柱,该中空纤维柱的膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi,环境温度为4℃。

[0026] 该步骤S7中富集外泌体溶液经过滤器处理所使用的除菌过滤设备为囊式滤器,滤膜孔径为0.22μm。

[0027] 该步骤S1中干细胞培养上清料液是在2D培养条件或者3D生物反应器中收集得到。

[0028] 干细胞培养上清料液的培养制备方式包括使用生物反应器、细胞工厂或培养瓶。

[0029] 该步骤S2中上清料液经过0.8μm、0.45μm过滤去除掉细胞碎片及大囊泡。

[0030] 实施例1:高纯度干细胞外泌体的制备方法

收获两份400mL间充质干细胞细胞培养上清料液后(以下称A料液,B料液)在4℃条件下,经过多重滤器(0.8μm,0.45μm)过滤去除细胞碎片及大囊泡,取澄清后上清料液备用。

[0031] 在上一步得到的A料液中加入50nmol聚乙烯-马来酸酐(2:1)共聚物,B料液不添加共聚物,4℃摇床孵育10h后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统浓缩80倍,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为750KDa,控制系统压力小于4psi。根据切向流的原理收集回流端的液体进行下一步提纯。

[0032] 上述液体进一步洗滤,洗滤溶液为PBS缓冲液,洗滤倍数为20倍,去掉待提纯液体中的杂质,收集洗滤完毕的上清液进行下一步操作。

[0033] 在洗滤完毕的上清料液中加入2KU/L全能核酸酶,室温短暂共孵育30min后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统去除酶副产物,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi。收集回流端液体进行下一步提纯。

[0034] 将上述上清液置于超速离心管中配平后,置于贝克曼OptimaXPN100超速离心机中,选择SW32Ti转头,温度设置4℃,转速设置100000g,时间设置1小时30分,离心完毕弃上清,用适量的PBS重悬底部的沉淀后再次配平离心,离心机参数与第一次一致,离心完毕收集底部沉淀用适量PBS重悬后通过0.22μm滤膜过滤后视为最终纯化后的外泌体溶液。

[0035] 实施例2:高纯度干细胞外泌体的制备方法

收获两份400mL间充质干细胞细胞培养上清料液后(以下称A料液,B料液)在4℃条件下,经过多重滤器(0.8μm,0.45μm)过滤去除细胞碎片及大囊泡,取澄清后上清料液备用。

[0036] 在上一步得到的A料液中加入50nmol聚乙烯-马来酸酐(2:1)共聚物,B料液不添加共聚物,4℃摇床孵育20h后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统浓缩100倍,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为750KDa,控制系统压力小于4psi。根据切向流的原理收集回流端的液体进行下一步提纯。

[0037] 上述液体进一步洗滤,洗滤溶液为PBS缓冲液,洗滤倍数为50倍,去掉待提纯液体中的杂质,收集洗滤完毕的上清液进行下一步操作。

[0038] 在洗滤完毕的上清料液中加入10KU/L全能核酸酶,室温短暂共孵育30min后,通过

瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统去除酶副产物,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi。收集回流端液体进行下一步提纯。

[0039] 将上一步得到的上清料液加入等体积的PEG溶液中,使得最终溶液中的PEG含量为5%-15%,在4℃摇床孵育20h,然后1500g,4℃,离心30min,弃上清收集底部沉淀并用适量PBS溶液重悬通过0.22μm滤膜过滤后视为纯化后的外泌体溶液。

[0040] 实施例3:高纯度干细胞外泌体的制备方法

收获两份400mL间充质干细胞细胞培养上清料液后(以下称A料液,B料液)在4℃条件下,经过多重滤器(0.8μm,0.45μm)过滤去除细胞碎片及大囊泡,取澄清后上清料液备用。

[0041] 在上一步得到的A料液中加入50nmol聚乙烯-马来酸酐(2:1)共聚物,B料液不添加共聚物,4℃摇床孵育8h后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统浓缩50倍,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为750KDa,控制系统压力小于4psi。根据切向流的原理收集回流端的液体进行下一步提纯。

[0042] 上述液体进一步洗滤,洗滤溶液为PBS缓冲液,洗滤倍数为30倍,去掉待提纯液体中的杂质,收集洗滤完毕的上清液进行下一步操作。

[0043] 在洗滤完毕的上清料液中加入2KU/L全能核酸酶,室温短暂共孵育30min后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统去除酶副产物,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi。收集回流端液体进行下一步提纯。

[0044] 配置不同浓度蔗糖溶液加入离心管中,从上到下依次是0.25mol/L,0.5mol/L,0.8mol/L,1.16mol/L,1.3mol/L,2mol/L,将上述上清料液缓慢加至蔗糖溶液最上层,然后置于贝克曼OptimaXPN100超速离心机中,选择SW32Ti转头,温度设置4℃,转速设置100000g,时间设置1小时30分,离心完毕后轻轻取出超离管,吸取从上至下第4-9层溶液,将溶液收集至截流孔径10KDa超滤管中,通过4000g,4℃离心换液浓缩至500μL,收集上管中的溶液,通过0.22μm滤膜过滤后视为最终纯化的外泌体溶液。

[0045] 实施例4:高纯度干细胞外泌体的制备方法

收获两份400mL间充质干细胞细胞培养上清料液后(以下称A料液,B料液)在4℃条件下,经过多重滤器(0.8μm,0.45μm)过滤去除细胞碎片及大囊泡,取澄清后上清料液备用。

[0046] 在上一步得到的A料液中加入50nmol聚乙烯-马来酸酐(2:1)共聚物,B料液不添加共聚物,4℃摇床孵育8h后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统浓缩60倍,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为750KDa,控制系统压力小于4psi。根据切向流的原理收集回流端的液体进行下一步提纯。

[0047] 上述液体进一步洗滤,洗滤溶液为PBS缓冲液,洗滤倍数为30倍,去掉待提纯液体中的杂质,收集洗滤完毕的上清液进行下一步操作。

[0048] 在洗滤完毕的上清料液中加入8KU/L全能核酸酶,室温短暂共孵育30min后,通过瑞普利金KrosFlo®KMPi切向流系统去除酶副产物,选用中空纤维柱进行该过程,膜孔径为100KDa,控制系统压力小于4psi。收集回流端液体进行下一步提纯。

[0049] 缓冲液配制:Buffer A(50mM HEPES,20mM NaCl,pH=7.0),Buffer B(50mM HEPES,2M NaCl,pH=7.0),Buffer C(1M NaOH,2M NaCl),20%乙醇,校准BufferA/B pH值至7。

[0050] 将上述缓冲液、超纯水以及上述上清液通过0.45μm滤膜过滤后备用。

[0051] 蛋白纯化仪开机,电脑开机连接NGC纯化系统,先用超纯水清洗管路,同时排空管

路中的空气,然后开始连接层析柱。

[0052] 以液液相接的方式连接管路与层析柱,确保该过程无气泡进入柱内,采用先Capto core700层析柱后阴离子交换柱的顺序。

[0053] 平衡:使用Buffer A平衡管路,直到系统基线平稳,将紫外检测器归零。

[0054] 上样:系统选择手动操作模式,进样针吸取1CV上清液注入上样阀中,低流速运行等待样品挂柱。

[0055] 洗脱:较低流速运行,线性梯度(0-100%)使用Buffer B洗脱,收集洗脱峰,将收集的液体通过瑞普利金KrosFlo®KR2i切向流系统换液置PBS缓冲液中并浓缩到合适的体积,收集回流端液体,通过0.22μm滤膜过滤后视为最终纯化后的外泌体溶液。

[0056]

实施例1	SMA-	7.61E+11
	SMA+	3.57E+11
实施例2	SMA-	1.04E+12
	SMA+	4.09E+11
实施例3	SMA-	6.28E+10
	SMA+	4.40E+10
实施例4	SMA-	4.26E+11
	SMA+	3.94E+11

[0057] 实施例1至实施例4获得的最终外泌体样品检测结果显示,外泌体在粒径分布及形态上无明显的差异,不同制备方法不会影响外泌体的基本特性,但根据图4可以看出,通过SMA前处理的上清料液通过四种方法分离出的外泌体样品中脂蛋白标记物APOE显著减少,说明SMA可以用于外泌体纯化过程中脂蛋白的去除。根据图5可以看出,SMA前处理结合CC方式纯化的外泌体样本中APOE表达量最少,且外泌体阴性蛋白GM130以及Calnexin表达量也较低,可以推断出这种分离方法纯度较高。而PEG沉淀法分离出的样品外泌体标记蛋白表达量低于通过UC、DGUC以及CC法分离纯化出的外泌体,说明PEG法不适合用于高纯度外泌体分离。

[0058] 同时为了避免脂蛋白与外泌体共分离这一现象,层析法制备外泌体优于常规超离方法。虽然通过密度梯度超速离心法也能尽量避免掉脂蛋白与外泌体共分离,但是考虑到操作的简便性及规模化优选柱层析法。进一步通过电镜结果可以看到脂蛋白共分离的程度减小,足以说明添加SMA结合多柱层析的方式可以制备出更高纯度的外泌体,并且是一种可以放大规模化生产外泌体的方式。

[0059] 本发明提供的一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,包括如下步骤:大规模培养干细胞收获培养上清作为分离外泌体的原料;通过多重过滤器去掉上清液中的细胞碎片及大囊泡;添加核酸酶去除染色质杂质;基于化学诱导法选择性分解脂蛋白获得更高纯度的原液;将上述原液通过多重切向流过滤以提高外泌体产量;将过滤后的原液通过多重层析

柱以获得高纯度外泌体;将层析后的外泌体通过切向流过滤系统换液浓缩富集;最后通过滤器除菌确保最终产物无菌。

[0060] 本发明可以实现不同体积的外泌体纯化,通过化学诱导法分解脂蛋白以及阴离子交换层析、阳离子交换层析、分子筛层析提高了外泌体的纯度,是一种可以实现高纯度干细胞外泌体的生产方法,为外泌体的临床应用转化提供支持。

[0061] 本发明的设计重点在于,与现有技术相比,本发明不需要使用超速离心机,降低了成本。并且层析法是一种适合自动化大规模生产的分离方法,为外泌体的工业化制备提供了较好的依据,本发明添加SMA聚合物以及核酸酶处理细胞上清料液,为制备出高纯度外泌体提供保障。通过多重过滤、多重切向流、化学诱导、串联层析法等方式组合,可以实现大批量、高纯度外泌体的生产,制备出的外泌体纯度高,杂质少;针对目前外泌体分离方法难以实现规模化以及脂蛋白存在影响其纯度等问题。本发明提供一种高纯度干细胞外泌体的制备方法,基于SMA化学诱导法联合切向流过滤系统以及蛋白纯化层析系统生产出高纯度、高产量的外泌体,以满足临床以及产业的需求。

[0062] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明的技术范围作任何限制,故凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所做的任何细微修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

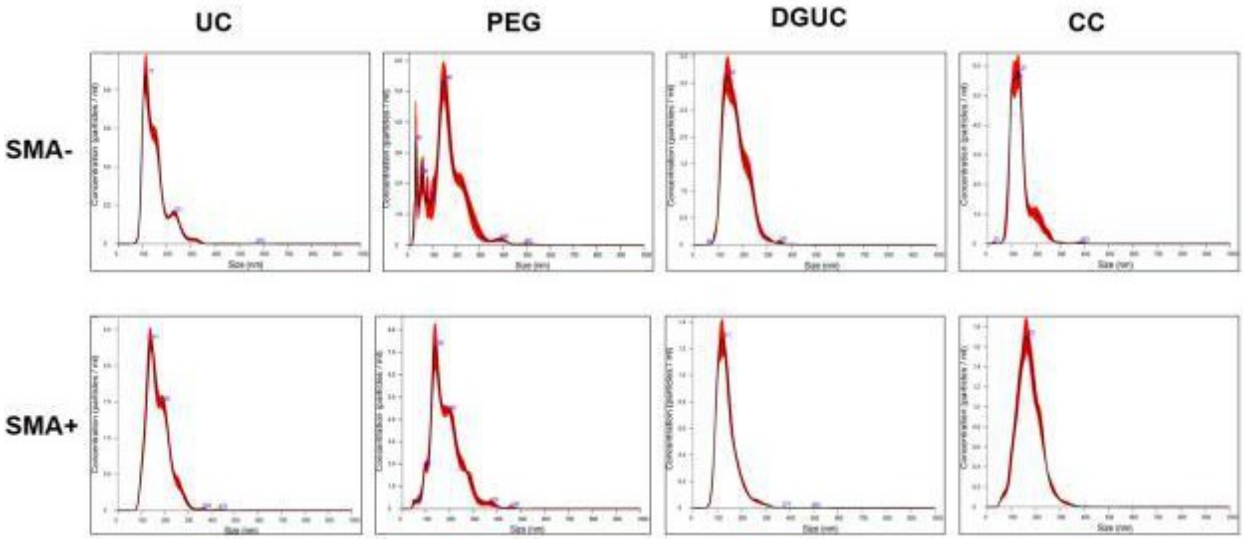


图 1

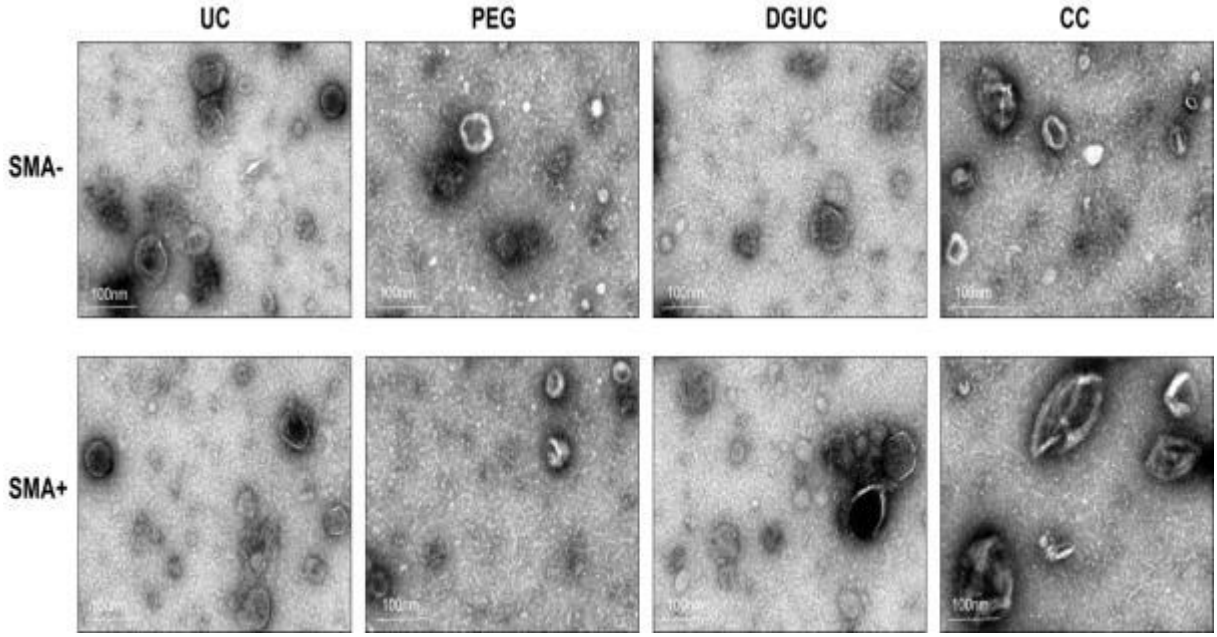


图 2


UC
PEG
DGUC
CC
SMA-
SMA+
APOE
β-Tubulin

图 3

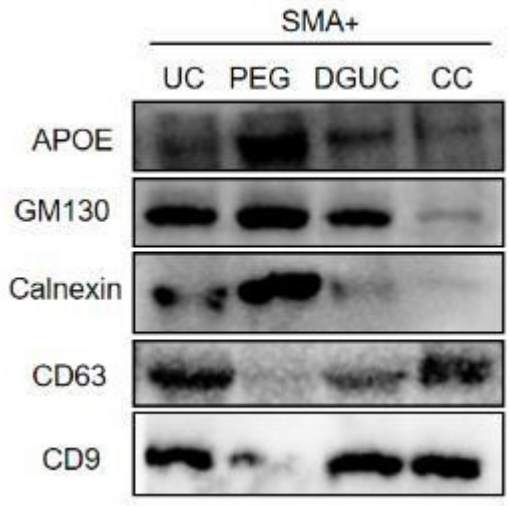

SMA+
UC
PEG
DGUC
CC
APOE
GM130
Calnexin
CD63
CD9

图 4

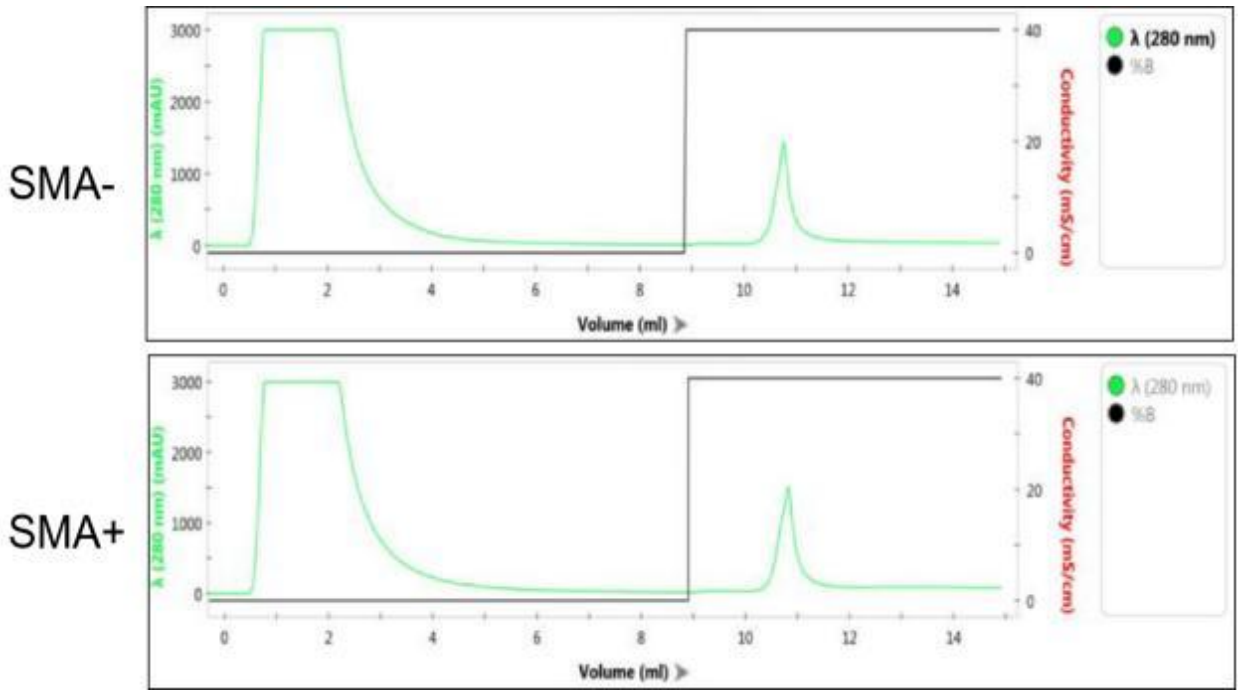

SMA-
SMA+
λ (280 nm)
%B
λ (280 nm) (mAU)
Conductivity (mS/cm)
Volume (ml)
3000
2000
1000
0
40
20
0
2
4
6
8
10
12
14

图 5