(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118562727 A
(43)申请公布日 2024.08.30

(21)申请号 202410833675.8

(22)申请日 2024.06.26

(71)申请人 深圳科兴药业有限公司
地址 518052 广东省深圳市南山区科技中一路198号创益科技大厦B栋16楼

(72)发明人 秦锁富 王博 王骥 尹江峰 杨敏

(74)专利代理机构 北京知帆远景知识产权代理有限公司 11890
专利代理师 孙鑫

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

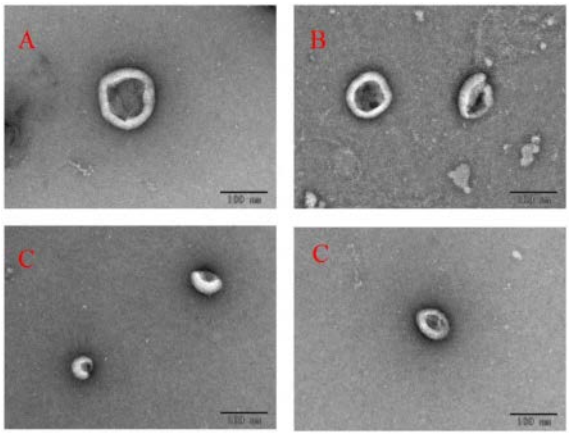
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

纯化外泌体的方法和外泌体质量控制方法

(57)摘要

本申请涉及纯化外泌体的方法和外泌体质量控制方法,属于生物技术领域。其中,纯化外泌体的方法包括:将待纯化外泌体上清液依次进行第一TFF切向流纯化、阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化处理,以获得所述外泌体。基于上述纯化方法能够获得高纯度、高活性以及高安全性的外泌体。



CN 118562727 A

1.一种纯化外泌体的方法,其特征在于,包括:

将待纯化外泌体上清液依次进行第一TFF切向流纯化、阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化处理,以获得所述外泌体。

2.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述上清液来自细胞在2D培养条件或3D悬浮培养条件下收集的细胞上清,所述细胞具有分泌外泌体的能力。

3.根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述细胞为间充质干细胞。

4.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述TFF切向流纯化处理包括第一过滤处理;

任选地,所述第一过滤处理的通量选自220L/m^2-225 L/m^2,优选222L/m^2;

任选地,所述第一过滤处理的流速选自10L/m^2/min-15L/m^2/min;

任选地,所述第一过滤处理进一步包括:对过滤器进行顶洗处理。

5.根据权利要求4所述的方法,其特征在于,在所述第一过滤处理之后进一步包括:对第一过滤处理后的第一滤液进行浓缩超滤处理;

任选地,所述浓缩超滤处理是通过中空纤维模块进行的;

任选地,所述中空纤维模块中的中空纤维的孔径为30nm-50nm;

任选地,所述浓缩超滤处理的跨膜压差选自≤5psi;

任选地,所述浓缩超滤处理的通量选自50L/m^2-60 L/m^2;

任选地,所述浓缩超滤处理的时间选自6-8小时,优选7小时;

任选地,在所述浓缩超滤处理之后,进一步包括对所述浓缩超滤处理后的超滤液进行第二过滤处理。

6.根据权利要求4或5所述的方法,其特征在于,所述阴离子多模式层析纯化采用色谱柱进行第三过滤处理;

任选地,所述色谱柱填料粒径选自85μm-95μm;

任选地,所述色谱柱填料选自Capto Core 700、Sun Core 700、Smac Core 700、Maxtar Coll 700、Monomix Core 1000XXX,优选Capto Core 700;

任选地,所述阴离子多模式层析纯化是在pH选自7.5-8,优选7.8的缓冲液中进行的;

任选地,所述缓冲液包括:37mmol/L-42mmol/L磷酸氢钠和120mmol/L-130mmol/L氯化钠;优选40mmol/L磷酸氢钠和125mmol/L氯化钠;

任选地,所述阴离子多模式层析纯化的流速不大于1cm/min;

任选地,所述第三过滤处理后进一步包括对所述第三过滤处理后的第三滤液进行浓缩和第四过滤处理。

7.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述凝胶过滤层析纯化中采用凝胶柱进行第五过滤处理;

任选地,所述凝胶柱的填料粒径选自45μm～165μm;

任选地,所述凝胶柱的填料选自Seplife 6FF、Superose 6Increase、Siperdex 200Increase、TA-6FF,优选Seplife 6FF;

任选地,所述凝胶柱的加载量为5%-15%柱体积,优选5%-10%柱体积;

任选地,所述凝胶过滤层析处理的流速≤1cm/min;

任选地,所述凝胶过滤层析纯化处理进一步包括对第五过滤处理后的第五过滤液进行

除菌过滤处理。

8.根据权利要求1所述的方法,其特征在于,包括:所述阴离子多模式层析纯化后,凝胶过滤层析纯化前,进一步包括对阴离子多模式层析纯化产物进行第二TFF切向流纯化处理。

9.根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于,所述上清液来自间充质干细胞在3D悬浮培养条件下收集的细胞上清,所述3D悬浮培养是通过如下方式进行的:

将传代密度为3000～10000细胞/cm^2的所述间充质干细胞与微载体进行混合处理;

将混合处理产物接种到生物反应器体系,所述生物反应器体系包括所述培养基;

任选地,所述培养基选自间充质干细胞无血清培养基、HapCult MSC、Xeno-Free、SFM、MSC Xeno-Free SFM、MSC NutriStem和MesenCult™-ACF Plus Medium中的至少之一;

优选地,所述培养基为间充质干细胞无血清培养基;

任选地,接种后,所述微载体在所述生物反应器体系中的浓度为1～4g/L;

任选地,所述微载体选自Cytodex1、Cytodex3、3D TableTrix、Plastic Plus、Plastic、Collagen和HillexⅡ中的至少之一,优选Cytodex1和/或Collagen;

任选地,所述生物反应器体系pH选自7.0～7.8;

任选地,所述接种是在转速为30rpm～50rpm的条件下进行的。

10.一种外泌体质量控制方法,其特征在于,包括:

利用权利要求1～8任一项所述的方法纯化外泌体;以及

对获得的外泌体进行1)-3)检测中的至少之一:

1)蛋白免疫印迹分析;

2)透射电镜扫描;

3)SEC-HPLC纯度检测;

任选地,所述蛋白免疫印迹分析包括检测外泌体特异性标记物Calnexin、Alix、CD63、CD9和CD81中的至少之一。

纯化外泌体的方法和外泌体质量控制方法

技术领域

[0001] 本申请属于生物技术领域,具体地,本申请涉及纯化外泌体的方法和外泌体质量控制方法。

背景技术

[0002] 外泌体(Exosome)是指由细胞内多泡体(multivesicular body,MVB)与细胞膜融合后,释放到细胞外基质中的膜性囊泡,直径大约30-150nm,内部包含了蛋白质、脂质、多糖及RNA等物质,外泌体天然存在于体液中,包括血液、唾液、尿液和母乳等,被分泌出的外泌体会进入血液、唾液、尿液、及乳汁等体液中,通过循环系统到达其他细胞与组织,产生远程调控作用。

[0003] 进行外泌体研究时,首要解决的重大问题是要获取足够量的高纯度外泌体。但众所周知,在外泌体提取过程中,外泌体的纯度和得率往往是两个相对矛盾的问题,在努力提高纯度的时候可能会损失掉一些得率,但是仅追求得率的话也会造成纯度的降低,后者可能会更致命,因为它会直接导致我们的标志物筛选或功能验证相关数据的不准确、影响剂量的判断、实验的重复性低甚至无法重复。纯度更是药物递送系统的关键问题,低纯度的外泌体可能会影响载药效率,增加的免疫原性可能会产生意想不到的毒性。随着更多科研机构及科研工作者对外泌体领域研究的日益深入,对相关数据的要求会越来越严格,因此广大科研工作者对如何获得高纯度外泌体的诉求也越来越迫切。

发明内容

[0004] 本申请旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题至少之一。为此,本申请一个目的在于提供一种有效获取高纯度外泌体的手段。

[0005] 具体而言,本申请提供了如下技术方案:

[0006] 在本申请的第一方面,本申请提出了一种纯化外泌体的方法。根据本申请的实施例,所述方法包括:将待纯化外泌体上清液依次进行第一TFF切向流纯化、阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化处理,以获得所述外泌体。基于上述纯化方法能够获得高纯度、高活性以及高安全性的外泌体。

[0007] 在本申请的第二方面,本申请提出了一种外泌体质量控制方法。根据本申请的实施例,所述方法包括:利用第一方面所述的方法纯化外泌体;以及对获得的外泌体进行1)-3)检测中的至少之一:1)蛋白免疫印迹分析;2)透射电镜扫描;3)SEC-HPLC纯度检测。基于前述外泌体质量控制方法,可以实现外泌体的准确表征,从而实现外泌体生产工艺各阶段的质量控制,获得大量高纯度、无污染的外泌体。

[0008] 本申请的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本申请的实践了解到。

附图说明

[0009] 本申请的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0010] 图1为本申请实施例提供的缓冲液的SEC(排阻色谱法)纯度检测结果示意图(对照);

[0011] 图2为本申请实施例提供的经阴离子多模式层析纯化后外泌体的SEC纯度检测结果示意图;

[0012] 图3为本申请实施例提供的经第二次浓缩后外泌体的SEC纯度检测结果示意图;

[0013] 图4为本申请实施例提供的经凝胶过滤层析纯化后外泌体的SEC纯度检测结果示意图;

[0014] 图5为本申请实施例提供的不同工艺步骤的外泌体电镜检测结果示意图;其中,(A)阴离子多模式层析,(B)第二次浓缩,(C)凝胶过滤层析;

[0015] 图6为本申请实施例提供的各实施案例总回收率对比结果示意图;

[0016] 图7为本申请实施例提供的各实施案例比值纯度结果对比示意图。

具体实施方式

[0017] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0018] 在本文中,如无特别说明,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0019] 在本文中,如无特别说明,术语“包含”或“包括”为开放式表达,即包括本发明所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

[0020] 在本文中,如无特别说明,术语“任选地”、“任选的”或“任选”通常是指随后所述的事件或状况可以但未必发生,并且该描述包括其中发生该事件或状况的情况,以及其中未发生该事件或状况的情况。

[0021] 为了解决外泌体提取过程中的纯度与得率之间的矛盾,提高外泌体的纯度和产量。本申请提出了一种纯化外泌体的方法,该方法包括:将待纯化外泌体上清液依次进行第一TFF切向流纯化、阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化处理,以获得所述外泌体。

[0022] 在本申请的一些示例中,所述上清液来自细胞在2D培养条件或3D悬浮培养条件下收集的细胞上清,所述细胞具有分泌外泌体的能力。

[0023] 在本申请的一些示例中,所述细胞为间充质干细胞。

[0024] 在本申请的一些优选示例中,所述上清液来自间充质干细胞在3D悬浮培养条件下收集的细胞上清,所述3D悬浮培养是通过如下方式进行的:包括将传代密度为3000～10000细胞/cm^2的所述间充质干细胞与微载体进行混合处理;以及将混合处理产物接种到生物反应器体系,所述生物反应器体系包括所述培养基。

[0025] 在本申请的一些示例中,所述培养基选自间充质干细胞无血清培养基、HapCult MSC、Xeno-Free、SFM、MSC Xeno-Free SFM、MSC NutriStem和MesenCult™-ACF Plus Medium

中的至少之一。在本申请的一些优选示例中,所述培养基选自间充质干细胞无血清培养基。选择间充质干细胞无血清培养基培养可以减少外源性因子对细胞生长和表型的影响,从而减少实验中的变量,使结果更加可靠。其次,使用无血清培养基可以避免血清中可能存在的病毒、细菌和激素等污染物,提高生物制品的安全性。

[0026] 在本申请的一些示例中,接种后,所述微载体在所述生物反应器体系中的浓度为1g/L～4g/L。前述浓度可选地为1g/L、2g/L、3g/L或4g/L。

[0027] 在本申请的一些示例中,前述微载体选自Cytodex1、Cytodex3、3D TableTrix、Plastic Plus、Plastic、Collagen和HillexⅡ中的至少之一。在本申请的一些优选示例中,所述微载体选自Cytodex1和/或Collagen。Cytodex1和/或Collagen微载体能够更好的模拟类似体内环境的生长条件,有助于间充质干细胞与培养基中的营养物质和生长因子的交换,促进细胞的生长和代谢活动。

[0028] 需要说明的是,上述微载体可重复使用。

[0029] 在本申请的一些示例中,所述生物反应器体系pH选自7.0～7.8。前述pH可选地为7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7或7.8。

[0030] 在本申请的一些示例中,所述接种是在转速为30rpm～50rpm的条件下进行的,可选地为30rpm、31rpm、32rpm、33rpm、34rpm、35rpm、36rpm、37rpm、38rpm、39rpm、40rpm、41rpm、42rpm、43rpm、44rpm、45rpm、46rpm、47rpm、48rpm、49rpm或50rpm。

[0031] 在本申请的一些示例中,所述培养处理的第一天在转速为30rpm～50rpm的条件下进行,24小时后在转速为70rpm～100rpm、后每天增加10rpm,最高不超过150rpm的条件下进行。通过步进式转速增加的培养策略能够有效地平衡培养的剪切力和细胞的适应能力,有助于提高外泌体的产量和质量。

[0032] 在本申请的一些示例中,所述3D悬浮培养处理过程中不换液或换液。

[0033] 在本申请的一些示例中,所述换液是在培养第4天进行60％培养基换液。

[0034] 在本申请的一些示例中,所述换液是在培养第5天和第7天进行60％培养基换液。

[0035] 通过定期进行中途换液可以维持培养环境的稳定性,促进细胞的生长和外泌体的产生,有助于提高培养效率和外泌体的产量。选择换液60％可以在保持培养环境稳定的同时,有效清除代谢产物,满足细胞的营养需求,同时节约培养成本。

[0036] 在本申请的一些示例中,所述TFF切向流纯化处理包括第一过滤处理。通过第一过滤处理除去大颗粒的杂质,并保持较高的通透性和通量。

[0037] 在本申请的一些示例中,所述第一过滤处理是通过材质为双层PVDF膜的过滤器进行的。

[0038] 在本申请的一些示例中,所述过滤器的外层孔径为1.0μm,内层为0.45μm。1.0μm的孔径可以阻挡住大颗粒的杂质如细胞、微载体、细胞代谢物等,但又能保持较高的通透性,使得过滤不容易发生堵塞,0.45μm的孔径可以使得大的囊泡不轻易通过,而使得直径在30～150nm区间的外泌体容易通过,这样即提高了过滤的通透性和通量,又截留了直径较大的且不需要的细胞囊泡。

[0039] 在本申请的一些示例中,所述第一过滤处理的通量选自220L/m^2-225 L/m^2。在本申请的一些优选示例中,所述第一过滤处理的通量为222L/m^2。基于前述通量,过滤效果更优。

[0040] 在本申请的一些示例中,所述第一过滤处理的流速选自10L/m^2/min-15L/m^2/min。

前述流速可以保证在过滤过程中不会因为流速过快而使得杂质快速堆积形成滤饼,进而堵塞滤器影响过滤通量。

[0041] 在本申请的一些示例中,所述第一过滤处理进一步包括:对过滤器进行顶洗处理。通过顶洗步骤,将被截留在孔径中和被吸附在滤器膜上外泌体冲洗下来,以减少颗粒数的损失。

[0042] 在本申请的一些示例中,所述顶洗处理是采用10L/m^2的缓冲液(如40mM PB、125mM NaCl,pH7.8;PBS,pH7.4)对第一过滤处理中的过滤器进行清洗。

[0043] 在本申请的一些示例中,所述第一过滤处理之后进一步包括:对第一过滤处理后的第一滤液进行浓缩超滤处理。通过浓缩超滤,去除滤液中的杂质,提高外泌体的纯度。

[0044] 在本申请的一些示例中,所述浓缩超滤处理是通过中空纤维模块。其中,所述中空纤维模块中的中空纤维的孔径为30nm-50nm,等同于500KD。在本申请的一些示例中,采用中空纤维模块产生的剪切力更小,有利于保护外泌体的完整性;其次,中空纤维模块能够高效浓缩大体积的发酵上清液,有利于后续阴离子复合层析等步骤的操作;此外,中空纤维模块的孔径大小能够有效过滤掉大多数杂质,如细胞碎片、蛋白质和核酸,而外泌体则得以保留,实现了对外泌体的高效分离和浓缩;更重要的是,中空纤维模块相对于其他浓缩技术来说操作简单,易于控制和维护,为实验操作提供了便利。

[0045] 在本申请的一些示例中,所述浓缩超滤处理的跨膜压差选自≤5Psi,可以保证浓缩超滤过程中外泌体的稳定性和缩短工艺时间。

[0046] 在本申请的一些示例中,所述浓缩超滤处理的通量选自50L/m^2-60 L/m^2。前述范围的通量能够保证浓缩超滤处理过程的高效性和稳定性。

[0047] 在本申请的一些示例中,所述浓缩超滤处理的时间选自6-8小时。在本申请的一些优选示例中,所述浓缩超滤处理时间为7小时,在此处理时间内,可以保证外泌体的完整性,避免外泌体因长时间的浓缩超滤处理而破碎。

[0048] 在本申请的一些示例中,在所述浓缩超滤处理之后,进一步包括对所述浓缩超滤处理后的超滤液进行第二过滤处理。基于第二过滤处理,对浓缩超滤后的料液进行澄清处理,防止阴离子复合层析介质的结块和堵塞,影响使用和除杂效果。

[0049] 在本申请的一些示例中,所述阴离子多模式层析纯化采用色谱柱进行第三过滤处理。通过阴离子多模式层析进一步去除溶液中的杂质,提高外泌体的纯度。

[0050] 在本申请的一些示例中,所述色谱柱填料粒径选自85μm-95μm。在本申请的一些优选示例中,所述色谱柱填料粒径选自90μm。

[0051] 在本申请的一些示例中,所述色谱柱填料选自Capto Core 700、Sun Core 700、Smac Core 700、Maxtar Coll 700、Monomix Core 1000XXX,优选Capto Core 700。Capto Core 700填料的最外层包裹有5μm的钝化层,该钝化层不能与外泌体结合,钝化层上有直径大小为700KD(40-60nm)的小孔,从小孔进入填料内部,内部含有多模式辛胺基,可以结合HCP、BSA、内毒素、核酸等物质,由于外泌体的粒径分布为30～150nm,大多数外泌体无法通过钝化层上的小孔进入填料内部,只能通过球与球之间的间隙向下流动,而大多数的HCP、内毒素、核酸等物质由于本身的粒径小(一般在500KD以内),可以通过钝化层上的小孔进入填料内部与辛胺基结合,这样就达到了去除杂质的目的。

[0052] 在本申请的一些示例中,所述阴离子多模式层析纯化是在pH选自7.5-8,优选7.8

的缓冲液中进行的。大多数宿主蛋白(Host Cell Protein,HCP)、核酸、内毒素等物质的等电点＜6.0,在pH7.8时带有负电荷,而填料中的辛胺基上带有正电荷,这样可以有效的吸附HCP、核酸、内毒素等杂质。

[0053] 在本申请的一些示例中,所述缓冲液包括:37mmol/L-42mmol/L磷酸氢钠和120mmol/L-130mmol/L氯化钠;优选40mmol/L磷酸氢钠和125mmol/L氯化钠。一般缓冲体系大多使用20mmol/L的磷酸钠,而本申请使用40mmol/L磷酸氢钠可以更快的将填料pH冲洗至预设pH值;此外,由于填料中的辛胺基上含有疏水基团,在缓冲液中添加125mmol/L的氯化钠,可以更好的发挥辛胺基的疏水作用。

[0054] 在本申请的一些示例中,所述阴离子多模式层析纯化的流速不大于1cm/min。更小的流速有利于HCP、核酸、内毒素等物质可以顺利通过小孔进入填料内部与辛胺基结合,缓慢的线性流速提供了足够的结合时间,足够的结合时间能够更好的去除这些杂质。

[0055] 在本申请的一些示例中,所述色谱柱填料结合载量≤11mg/ml。由于外泌体上清液中含有核酸、内毒素、色素等物质,会占用辛胺基上的结合位点,从而导致对HCP的结合载量下降,因此在实验中需选择结合载量较高的填料。

[0056] 在本申请的一些示例中,所述第三过滤处理后进一步包括对所述第三过滤处理后的第三滤液进行浓缩和第四过滤处理。通过浓缩减少料液体积,提高料液中的外泌体浓度;基于第四过滤处理,对浓缩后的料液进行澄清处理,防止凝胶过滤层析介质的结块和堵塞,影响使用和除杂效果。

[0057] 在本申请的一些示例中,所述凝胶过滤层析纯化中采用凝胶柱进行第五过滤处理。通过凝胶过滤层析,可以有效地提高外泌体样品的纯度,去除掉分子大小较小的杂质,如蛋白质、核酸、小分子代谢产物等,从而得到更纯净的外泌体样品。

[0058] 在本申请的一些示例中,所述凝胶柱的填料粒径选自45μm～165μm。

[0059] 在本申请的一些示例中,所述凝胶柱的填料选自Seplife 6FF、Superose 6Increase、Siperdex 200Increase、TA-6FFXXX,优选Seplife 6FF,此步层析可以进一步去除HCP,将总蛋白含量进一步降低,从而提高比值纯度和SEC纯度。

[0060] 在本申请的一些示例中,所述凝胶柱的加载量为5%-15%柱体积,可选地为5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%,优选5%-10%柱体积。不同的上样体积会影响外泌体颗粒的回收率,发明人通过单因素实验对柱体积与外泌体颗粒回收率关系研究发现:上样体积越大,回收率越高,在一般凝胶过滤层析中,上样载量一般为1%～5%柱体积,发明人通过研究发现,外泌体的上样体积可以达到10%柱体积,而且不影响凝胶过滤层析的分离效果,大大的提升了经济性。

[0061] 在本申请的一些示例中,所述凝胶过滤层析处理的流速≤1cm/min。凝胶过滤层析说明书推荐流速≤5cm/min,发明人经过实验发现,流速≤1cm/min能够提升分离效果并减少洗脱时间。

[0062] 在本申请的一些示例中,所述凝胶过滤层析纯化处理进一步包括对第五过滤处理后的第五过滤液进行除菌过滤处理。通过除菌过滤处理,能够有效降低微生物的限度,保证外泌体的安全性。

[0063] 在本申请的一些示例中,所述除菌过滤是采用0.2μm大小的除菌滤器进行的。

[0064] 在本申请的另一些示例中,所述纯化外泌体的方法进一步包括:所述阴离子多模

式层析纯化后,凝胶过滤层析纯化前,进一步包括对阴离子多模式层析纯化产物进行第二TFF切向流纯化处理。

[0065] 在本申请的一些示例中,所述第二TFF切向流纯化处理和第一TFF切向流纯化处理步骤相同或进行部分优化。

[0066] 本申请的纯化外泌体的方法能够用于工业化应用,相较于一般的超速离心和密度梯度离心,处理量大大增加。且通过本方法处理提纯后的外泌体颗粒度(particles)高(>1E+11particles/ml),蛋白浓度低(<200μg/ml),以particles/蛋白最为纯度指标可达到1E+9particles/μg以上,远高于中国外泌体协会推出的团体标准:>1E+8particles/μg。经过检测,外泌体SEC-HPLC纯度非常高,可以达到98%以上。更重要的是,本方法比较温和,对外泌体的外观、形态、标志物等不会产生破坏。

[0067] 在本申请的另一方面,本申请提出了一种外泌体质量控制方法,该方法包括:对获得的外泌体进行1)-3)检测中的至少之一:1)蛋白免疫印迹分析;2)透射电镜扫描;3)SEC-HPLC纯度检测。利用前述外泌体质量控制方法,可以实现外泌体的精准表征,从而实现外泌体生产工艺各阶段的质量控制,获得大量高纯度、无污染的外泌体。

[0068] 在本申请的一些示例中,所述蛋白免疫印迹分析包括检测外泌体特异性标记物Calnexin、Alix、CD63、CD9和CD81中的至少之一。

[0069] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0070] 实施例1

[0071] 测试例1:纯化外泌体的方法(包括:第一TFF切向流纯化、阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化处理)

[0072] 1.1第一TFF切向流纯化

[0073] 1.1.1取料液进行浓缩,将中空纤维的进液端和回流端放入容器中,透过端放入废液桶中,启动蠕动泵开始浓缩,浓缩10~20倍,TMP≤5psi。

[0074] 1.1.2超滤:待样品浓缩完成后,一边向料液中流加平衡液A,一边继续浓缩,并保持浓缩液体积基本不变,洗滤4~5倍,至pH达到7.7~7.9,然后排空管路回收料液。

[0075] 1.2阴离子多模式层析纯化

[0076] 1.2.1平衡:使用平衡液A冲洗15~20CV,流速≤1cm/min.

[0077] 1.2.2上样:将浓缩超滤后的样品进行上样,上样载量≤11mg/ml,流速≤1cm/min。

[0078] 1.2.3收集:在上样或洗脱过程中,当紫外吸收(280nm波长)上升时开始收集,当紫外吸收下降至基线时停止收集。

[0079] 1.3凝胶过滤层析纯化

[0080] 1.3.1使用平衡液A冲洗3~5CV,流速≤1cm/min。

[0081] 1.3.2上样:上样体积为≤10%柱体积,流速≤1cm/min。

[0082] 1.3.2收集:上样结束后,使用平衡液A冲洗1~3CV,流速≤1cm/min,当紫外吸收(280nm波长)上升时开始收集,当紫外吸收下降至基线时停止收集。

[0083] 测试例2(本专利实施案例):纯化外泌体的方法(包括第一TFF切向流纯化、阴离子

多模式层析纯化、第二TFF切向流纯化和凝胶过滤层析纯化处理)

[0084] 2.1第一TFF切向流纯化

[0085] 2.1.1取料液进行浓缩,将中空纤维的进液端和回流端放入容器中,透过端放入废液桶中,启动蠕动泵开始浓缩,浓缩10～20倍,TMP≤5psi。

[0086] 2.1.2超滤:待样品浓缩完成后,一边向料液中流加平衡液A,一边继续浓缩,并保持浓缩液体积基本不变,洗滤4～5倍,至pH达到7.7～7.9,然后排空管路回收料液。

[0087] 2.2阴离子多模式层析纯化

[0088] 2.2.1平衡:使用平衡液A冲洗15～20CV,流速≤1cm/min.

[0089] 2.2.2上样:将浓缩超滤后的样品进行上样,上样载量≤11mg/ml,流速≤1cm/min。

[0090] 2.2.3收集:在上样或洗脱过程中,当紫外吸收(280nm波长)上升时开始收集,当紫外吸收下降至基线时停止收集。

[0091] 2.3第二切向流纯化

[0092] 2.3.1取料液进行浓缩,将中空纤维的进液端和回流端放入容器中,透过端放入废液桶中,启动蠕动泵开始浓缩,浓缩4～5倍,TMP≤5psi,然后排空管路回收料液。

[0093] 2.4凝胶过滤层析纯化

[0094] 2.4.1使用平衡液A冲洗3～5CV,流速≤1cm/min。

[0095] 2.4.2上样:上样体积为≤10%柱体积,流速≤1cm/min。

[0096] 2.4.2收集:上样结束后,使用平衡液A冲洗1～3CV,流速≤1cm/min,当紫外吸收(280nm波长)上升时开始收集,当紫外吸收下降至基线时停止收集。

[0097] 由图1-4可知,外泌体经阴离子多模式层析纯化和凝胶过滤层析纯化后,纯度有大幅度提升,凝胶过滤后的纯度为99.6%。由SEC结果可知,外泌体不聚集,样品中几乎没有宿主蛋白和宿主DNA,纯度符合团体标准。由图5可知,外泌体粒径范围在30-150nm之间,形态呈茶托状,边缘圆润无棱刺,表明外泌体形态良好,膜无破损,符合团体标准。

[0098] 对比例

[0099] 1、对比案例1(切向流过滤法+尺寸排阻色谱法)

[0100] 1.1切向流过滤

[0101] 1.1.1取料液进行浓缩,将中空纤维的进液端和回流端放入容器中,透过端放入废液桶中,启动蠕动泵开始浓缩,浓缩10～20倍,TMP≤5psi。

[0102] 1.1.2超滤:待样品浓缩完成后,一边向料液中流加PBS,一边继续浓缩,并保持浓缩液体积基本不变,洗滤4～5倍,然后排空管路回收料液。

[0103] 1.2尺寸排阻

[0104] 1.2.1平衡:使用10ml PBS冲洗层析柱。

[0105] 1.2.2上样:上样体积为1ml。

[0106] 1.2.3收集:使用10ml PBS冲洗层析柱,当紫外吸收(280nm波长)上升时开始收集,当紫外吸收下降至基线时停止收集。

[0107] 2、对比案例2(切向流过滤法+阴离子交换法)

[0108] 2.1切向流过滤

[0109] 2.1.1取料液进行浓缩,将中空纤维的进液端和回流端放入容器中,透过端放入废液桶中,启动蠕动泵开始浓缩,浓缩10～20倍,TMP≤5psi。

[0110] 2.1.2超滤:待样品浓缩完成后,一边向料液中流加20mM Tris pH8.0,一边继续浓缩,并保持浓缩液体积基本不变,洗滤4～5倍,然后排空管路回收料液。

[0111] 2.2阴离子交换

[0112] 2.2.1平衡:使用20mM Tris pH8.0,冲洗100CV,流速5cv/min。

[0113] 2.2.2上样:将超滤后的样品进行上样,上样完成后,使用20mM Tris冲洗60CV。

[0114] 2.2.3洗脱:0～100%的20mM PB,2M NaCl pH8.0,洗脱30cv,流速1cv/min.

[0115] 3、对比案例3(阴离子交换层析+阳离子交换层析+分子筛层析)

[0116] 3.1阴离子交换

[0117] 3.1.1.使用pH8.0,20mM磷酸盐缓冲液平衡层析柱pH至8.0,柱体积80ml,平衡完毕后设置层析系统紫外检测器归零。

[0118] 3.1.2使用AKTA150层析系统上样泵上样,上样流速为4ml/min,上样过程中紫外吸收值上升至1mAU后开始收集样品,紫外吸收值降至1mAU后结束收集样品。

[0119] 3.2阳离子交换层析

[0120] 3.2.1使用pH7.4,20mM磷酸盐缓冲液平衡层析柱pH至7.4,柱体积100ml,平衡完毕后设置层析系统紫外检测器归零。

[0121] 3.2.2将阳离子交换层析后样品调节pH至7.4,使用AKTA150层析系统上样泵上样,上样流速为20ml/min,上样过程中紫外吸收值上升至1mAU后开始收集样品,紫外吸收值降至1mAU后结束收集样品。

[0122] 3.3分子筛层析

[0123] 3.3.1使用pH7.4,20mM磷酸盐缓冲液平衡层析柱pH至7.4,柱体积200ml,平衡完毕后设置层析系统紫外检测器归零。

[0124] 3.3.2将超滤后样品使用AKTA150层析系统上样泵上样,上样流速为20cm/h,上样完毕后,层析系统紫外吸收值上升时开始收集,第一个外水峰紫外吸收值降至平稳时结束收集,

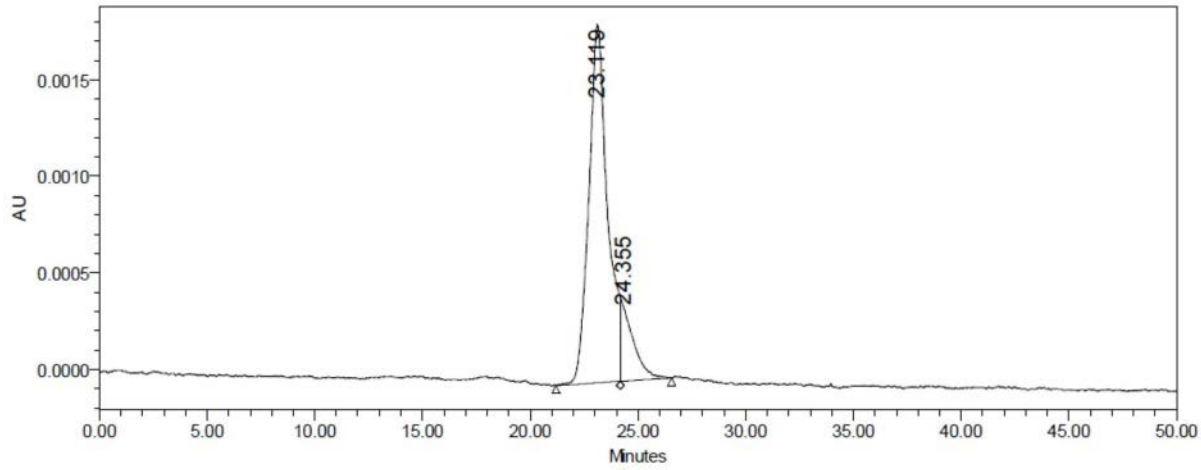
[0125] 3.3.3收集的第一个外水峰样品即为外泌体样品,收集样品放置于80℃低温保存。

[0126] 结果如图6-7所示,外泌体经本申请的方法纯化后,外泌体总回收率明显高于对比案例2和对比案例3,略高于对比案例1,比值纯度均高于对比案例1、2、3;对比案例1和3中凝胶过滤层析(尺寸排阻色谱法)的体积载量比较低,通常为柱体积的1%～10%,且单次处理量低;而本申请先将样品浓缩后进行阴离子多模式层析,去除了大部分的杂质,再通过浓缩减小样品体积,使得通过单次凝胶过滤层析就可以将样品完全纯化完毕,且纯度、回收率均高于对比例。

[0127] 综上,基于本申请技术方案能够获得高纯度、高品质的外泌体。

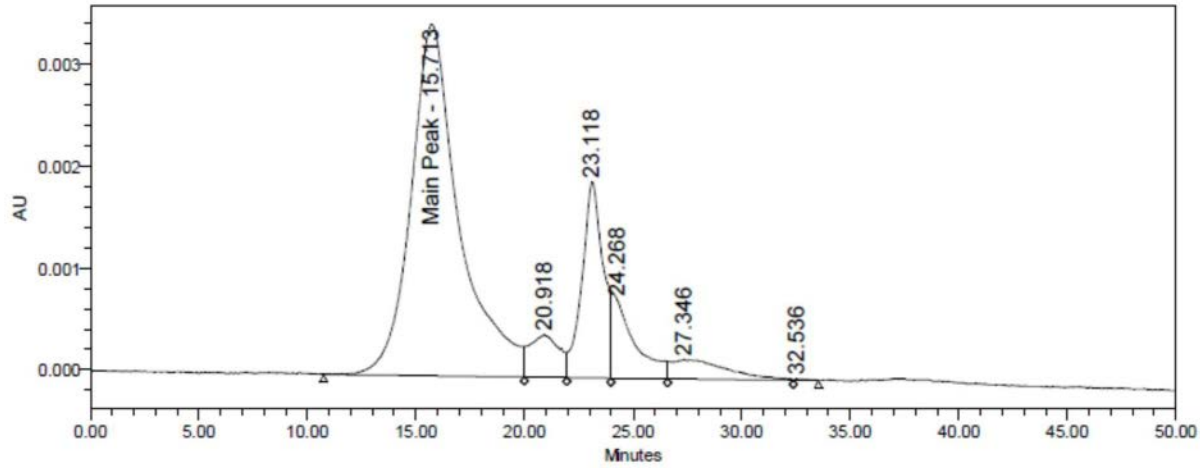
[0128] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0129] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。



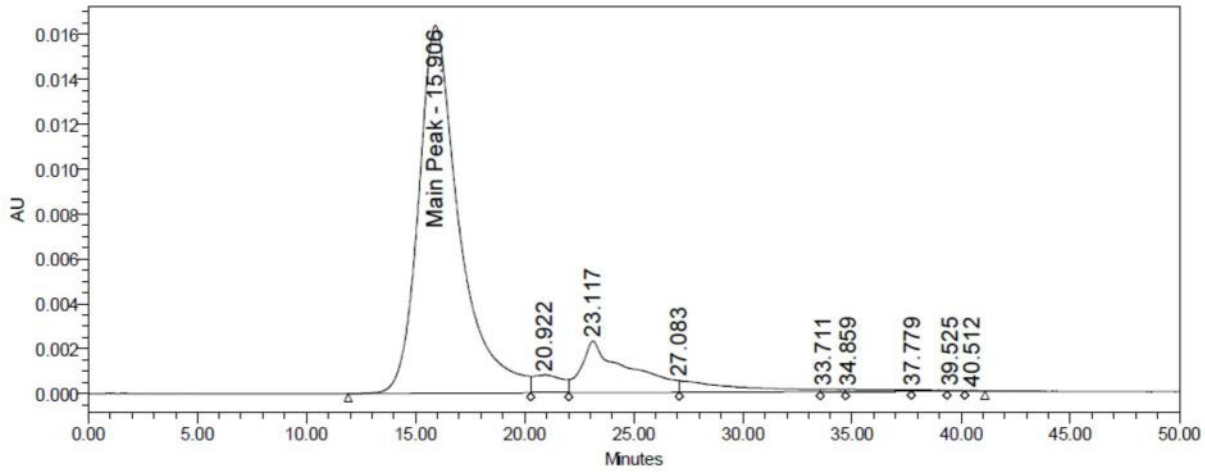
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Channel Description
1	Main Peak	16.000				VWD: Signal B, 280 nm
2		23.119	111984	86.72	1854	VWD: Signal B, 280 nm
3		24.355	17143	13.28	374	VWD: Signal B, 280 nm

图1



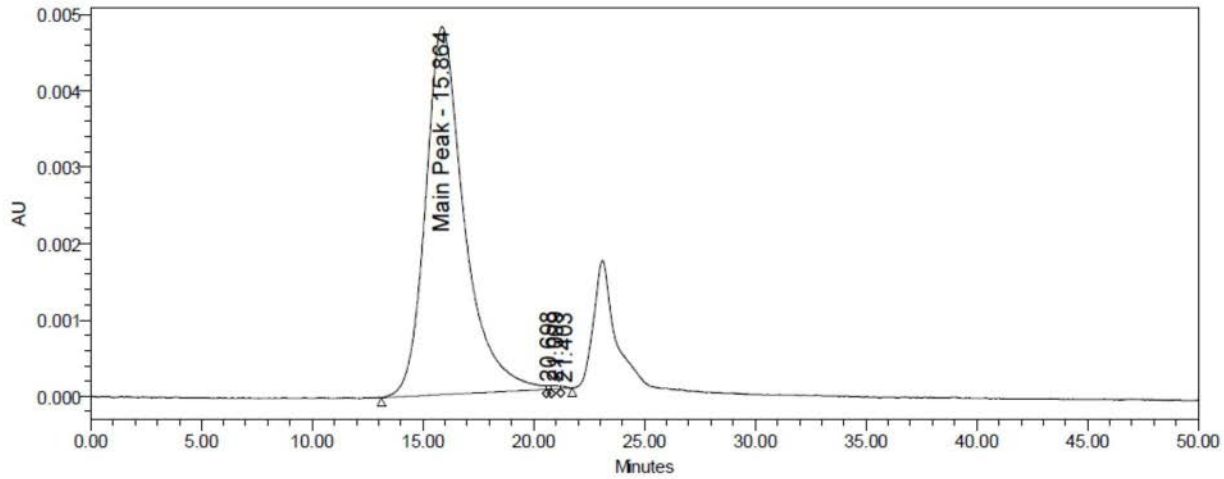
	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Channel Description
1	Main Peak	15.713	535267	67.02	3454	VWD: Signal B, 280 nm
2		20.918	39363	4.93	412	VWD: Signal B, 280 nm
3		23.118	129801	16.25	1923	VWD: Signal B, 280 nm
4		24.268	59773	7.48	768	VWD: Signal B, 280 nm
5		27.346	33954	4.25	189	VWD: Signal B, 280 nm
6		32.536	537	0.07	15	VWD: Signal B, 280 nm

图2



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Channel Description
1	Main Peak	15.906	2127645	79.99	16381	VWD: Signal B, 280 nm
2		20.922	74421	2.80	797	VWD: Signal B, 280 nm
3		23.117	340183	12.79	2297	VWD: Signal B, 280 nm
4		27.083	91677	3.45	519	VWD: Signal B, 280 nm
5		33.711	6345	0.24	101	VWD: Signal B, 280 nm
6		34.859	12931	0.49	84	VWD: Signal B, 280 nm
7		37.779	4835	0.18	66	VWD: Signal B, 280 nm
8		39.525	1234	0.05	34	VWD: Signal B, 280 nm
9		40.512	675	0.03	18	VWD: Signal B, 280 nm

图3



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	USP Tailing	USP Plate Count	Channel Description
1	Main Peak	15.864	586635	99.62	4815	1.3	446.8	VWD: Signal B, 280 nm
2		20.698	656	0.11	49			VWD: Signal B, 280 nm
3		21.009	1046	0.18	42			VWD: Signal B, 280 nm
4		21.403	554	0.09	23			VWD: Signal B, 280 nm

图4

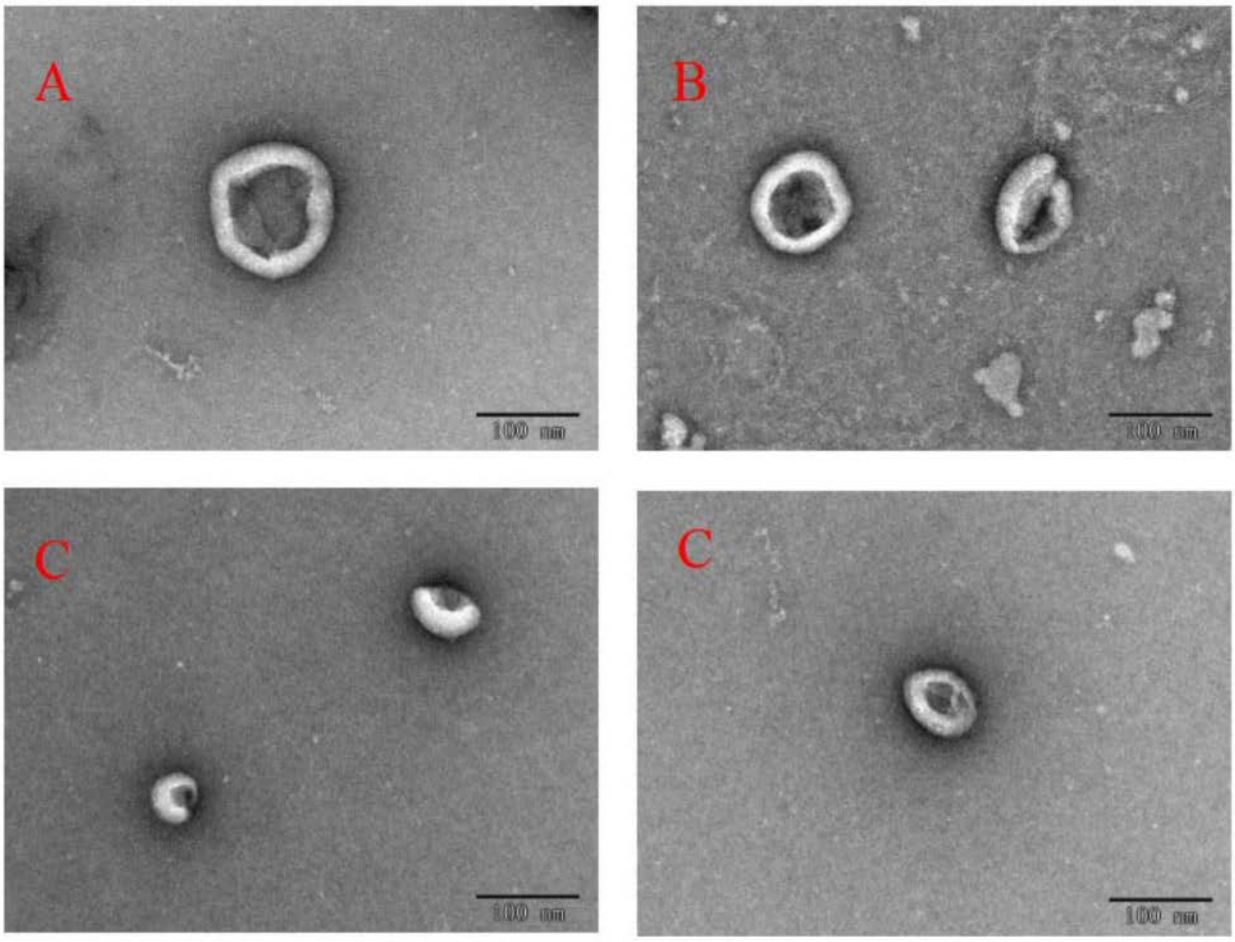

A
100 nm
B
100 nm
C
100 nm
C
100 nm

图5

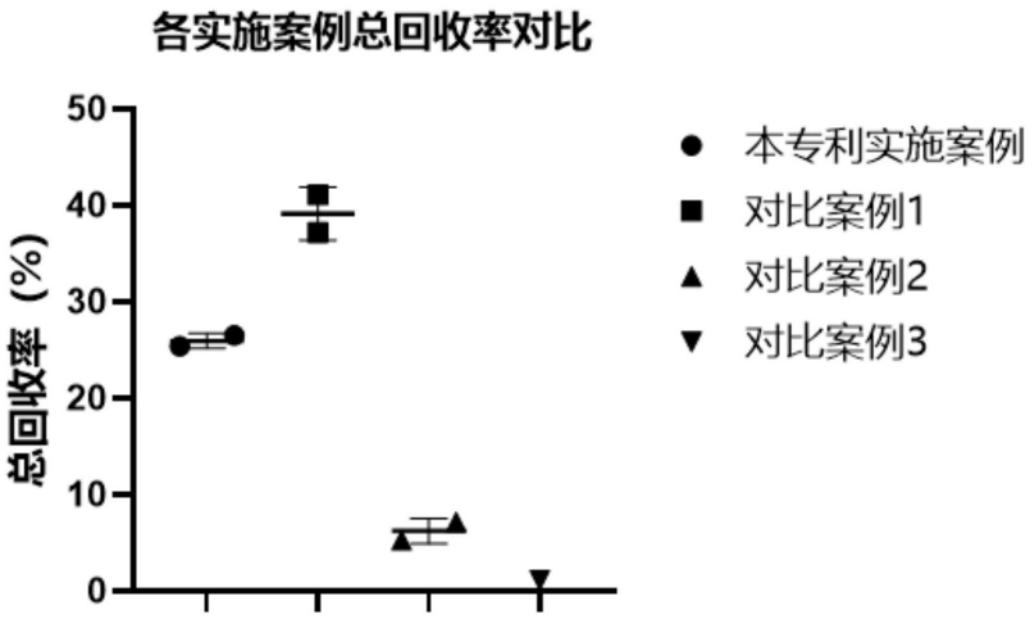

各实施案例总回收率对比
总回收率（%）
50
40
30
20
10
0
本专利实施案例
对比案例1
对比案例2
对比案例3

图6

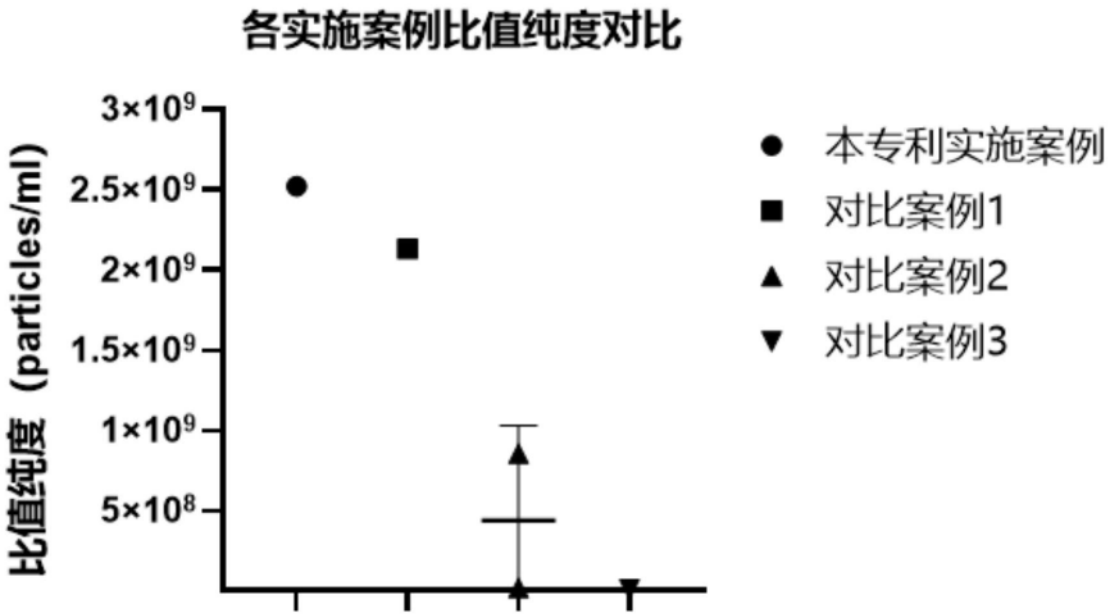

各实施案例比值纯度对比
比值纯度 (particles/ml)
3×10^9
2.5×10^9
2×10^9
1.5×10^9
1×10^9
5×10^8
本专利实施案例
对比案例1
对比案例2
对比案例3

图7