



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102482385 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 15

(21) 申请号 201080033364. X

C08F 2/32 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 27

C12N 5/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C08F 222/38 (2006. 01)

61/181, 776 2009. 05. 28 US

C08F 222/16 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2012. 01. 21

W0 2006/105278 A2, 2006. 10. 05, 说明书第

0008-0009, 0074, 0105 段等.

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 贺峥

PCT/US2010/036351 2010. 05. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/138687 EN 2010. 12. 02

(73) 专利权人 康宁股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·德赛 D·亨利 M·赫维

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 江磊

(51) Int. Cl.

C08F 289/00 (2006. 01)

C08F 220/58 (2006. 01)

C08F 220/20 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书21页

序列表13页 附图7页

(54) 发明名称

用来培养细胞的合成微型载体

(57) 摘要

一种细胞培养微型载体, 包含由以下单体 (i)-(iii) 的混合物共聚形成的聚合物:(i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii) 包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及(iii) 亲水性多官能不饱和单体。所述微型载体可以进一步包含偶联于微型载体表面上的多肽, 例如能够促进细胞粘着的多肽;例如, 所述多肽可以通过所述包含羧酸的亲水性不饱和单体的羧基偶联到微型载体表面上。

1. 一种用于细胞培养的微型载体,其包含:
由包含以下单体 (i)-(iii) 的混合物油包水共聚形成的聚合基底物
(i) 至少 60 重量份的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,
(ii) 至少 10 重量份的包含羧酸的亲水性不饱和单体, 以及
(iii) 3-30 重量份的亲水性多官能不饱和单体;和
偶联于微型载体表面上的多肽。
2. 如权利要求 1 所述的微型载体,其特征在于,
(i) 所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体选自(甲基)丙烯酸酯单体或者(甲基)丙烯酰胺单体;
(ii) 所述包含羧酸的亲水性不饱和单体选自(甲基)丙烯酸单体或者(甲基)丙烯酰胺单体;以及
(iii) 所述亲水性多官能不饱和单体选自(甲基)丙烯酸单体或者(甲基)丙烯酰胺单体。
3. 如权利要求 1 所述的微型载体,其特征在于,所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体是甲基丙烯酸-2-羟基乙酯,所述包含羧酸的亲水性不饱和单体是丙烯酸-2-羧基乙酯。
4. 如权利要求 3 所述的微型载体,其特征在于,所述亲水性多官能不饱和单体是亚甲基二丙烯酰胺。
5. 如权利要求 3 所述的微型载体,其特征在于,所述亲水性多官能不饱和单体是二羟基亚乙基二丙烯酰胺。

用来培养细胞的合成微型载体

[0001] 要求享有在先美国申请的优先权

[0002] 本申请要求 2009 年 5 月 28 日提交的美国临时申请系列号 61/181,776 的权益。该文献以及本文提到的所有出版物、专利和专利文献的全部内容都参考结合入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及细胞培养微型载体,更具体来说涉及合成的化学限定的微型载体。

[0004] 关于序列表的声明

[0005] 本申请包括通过 EFS 网站以电子方式提交给美国专利商标局的序列表,其文件名为“SP09156 ST25.txt”,为 2010 年 5 月 27 日建立的 8kb 的文件。

背景技术

[0006] 人们已经将微型载体用于细胞培养,用来以高产率提供附着依赖性细胞。微型载体通常在细胞培养基中进行搅拌或者搅动,与较传统的培养设备相比,所述微型载体能够提供非常大的附着和生长表面积体积比。

[0007] 目前大部分可以获得的微型载体提供细胞与用于细胞生长的载体之间的非特异性连接。虽然这些微型载体可以使用,但是它们无法进行生物特异性细胞粘附,因此无法很容易地对培养的细胞的特性进行设计。例如,由于非特异性相互作用,可能很难将细胞(例如下细胞)保持在特定的分化状态,或者介导细胞以特定的方式进行分化。

[0008] 一些目前可以获得的微型载体提供了生物特异性粘附,但是这些微型载体使用了源自动物来源的涂层,例如胶原或者明胶。这些动物来源的涂层可能会使得细胞接触潜在有害的病毒或者其他传染原,如果将所述细胞用于治疗目的,所述病毒或者其他传染原可能会被传播给病人。另外,这些病毒或者其他传染原可能会对培养的细胞的一般培养和维持造成不利影响。另外,这些生物产品容易在不同批次之间发生变化,并且储藏寿命有限。

发明内容

[0009] 本发明描述了一种可以用来培养细胞的合成的化学限定的微型载体。在各种实施方式中,即使在微球体可能为高度可溶胀的情况下,本文所述的微型载体也能够在保持细胞粘着和生长的同时具有足够的耐受搅拌的能力。

[0010] 在各种实施方式中,用来形成微型载体的组合物包含(i)具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii)包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及(iii)选自以下单体的亲水性多官能不饱和单体:亲水性多官能(甲基)丙烯酸酯单体或者亲水性多官能(甲基)丙烯酰胺单体。所述单体可以选自(甲基)丙烯酸酯单体或者(甲基)丙烯酰胺单体。在一些情况下,相对于所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体、包含羧酸的亲水性不饱和单体以及亲水性多官能不饱和单体的总重量,所述(i)具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为 60%,(ii)所述包含羧酸的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为 10%,(iii)所述亲水性多官能不饱和单体的重量百分数为 3-30%。

[0011] 在各种实施方式中,微型载体包含由以下单体 (i)-(iii) 的混合物共聚形成的聚合物:(i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii) 包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及 (iii) 亲水性多官能不饱和单体。所述微型载体可以进一步包含偶联于微型载体表面上的多肽,例如能够促进细胞粘附的多肽;例如,所述多肽可以通过所述包含羧酸的亲水性不饱和单体的羧基偶联于微型载体表面。较佳的是,所述聚合基底物不允许细胞的非特异性粘附,所述多肽提供了生物特异性细胞结合。

[0012] 在各种实施方式中,用来制备细胞培养微型载体的方法包括:使得单体的混合物共聚以形成微型载体基底物。所述单体的混合物包含:(i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii) 包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及 (iii) 亲水性多官能不饱和单体。在一些实施方式中,所述单体的混合物通过油包水共聚而发生共聚。所述方法还包括将多肽偶联于所述微型载体基底物以形成所述微型载体。

[0013] 在很多实施方式中,用来培养细胞的方法包括使得细胞与包含微型载体的细胞培养基接触。所述微型载体包括由以下单体 (i)-(iii) 的混合物形成的聚合基底物:(i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii) 包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及 (iii) 亲水性多官能不饱和单体;所述微型载体还包含多肽偶联的聚合物。该方法还包括在所述培养基中培养所述细胞。所述细胞可以是干细胞,例如胚胎干细胞,所述培养基可以是化学限定的培养基。

[0014] 本发明列出的一个或多个各种实施方式提供了优于现有技术的用来培养细胞的制品和系统的一个或多个优点。例如,本文描述的合成微型载体能够在无需动物来源的生物涂层的情况下支持细胞粘着,由此限制了病原体污染的风险。当所述细胞用于细胞治疗的时候,这一点是特别要紧的。另外,通过使用本发明所述的微型载体,可以对包括人胚胎干细胞 (hESC) 在内的细胞进行大规模培养。这些微型载体还可以有益地在不希望或者禁止使用胶原、明胶、纤连蛋白之类的动物来源的产品的情况下,用于除了干细胞以外的细胞的培养。本文所述的方法可以用来制造具有很宽范围的性质的微型载体,所述性质包括例如刚度、溶胀性、表面化学性质,还可以提供包含柔软的可溶胀的基材的微型载体,当在搅拌的容器中培养细胞的时候,这种微型基材能够防止细胞受到破坏。另外,所述微型载体可以是整体型的,并不是像大部分商业微型载体那样是涂覆的状态,由此减少了与生产复杂性和细胞相容性相关的成分的数量。结合以下附图,对以下详述部分进行阅读,可以很容易地理解这些优点以及其它的优点。

[0015] 附图简要说明

[0016] 图 1 是根据实施例 1 制备的代表性的微型载体的显微图。

[0017] 图 2A 和 2B 是根据实施例 1 制备的代表性微型载体的扫描电子显微 (SEM) 图。

[0018] 图 3A, B, C 和 D 是进行 PBS 缓冲液洗涤之后获得的代表性的微球体不同放大倍数的 SEM 图。

[0019] 图 4 是根据实施例 1 制备的微型载体颗粒的粒度分布图。

[0020] 图 5A 和 B 是粘附于用 GRGDS 肽接枝的微型载体上的 CHO-M1 细胞的图像。

[0021] 图 6 是粘附于用 GRGDS 肽接枝的微型载体上的 HEK293 细胞的图像。

[0022] 图 7 是粘附于用 GRGDS 肽接枝的微型载体上的 MRC5 细胞的图像。

[0023] 图 8 是根据实施例 6 制备的代表性的微型载体的显微图。

[0024] 图 9A 和 B 是分别在实施例 7 和 8 中讨论的与接枝于微型载体的玻璃体结合蛋白多肽 (A) 和 RGE 多肽 (B) 相连接的 HT1080 细胞的相差显微图。

[0025] 图 10 是制得的微型载体的尺寸与搅拌速率的变化关系图。

[0026] 发明详述

[0027] 在以下详述中,参照构成说明书的一部分的附图,以示意性方式描述本发明的装置、系统和方法的几种具体实施方式。应理解可以在不脱离本发明公开内容的范围或精神的范围内预期其它的实施方式。因此,以下发明详述不应理解为限制性的。

[0028] 除非另外说明,本文使用的所有科学和技术术语的含义是本领域通用的含义。本文提供的定义是用来帮助理解本文常用的某些术语,不会对本发明的范围构成限制。

[0029] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”,“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的相反表示。在本说明书和权利要求书中,通常使用术语“或”表示“和/或”,除非文中有明显的相反表示。

[0030] 在本文中用单字母氨基酸代码和三字母氨基酸代码表示多肽序列。这些代码可以互换使用。

[0031] 在本文中,“单体”表示能够与另一种单体聚合的化合物(无论所述“单体”与另外的单体属于相同或不同的化合物),所述化合物的分子量约小于 1000 道尔顿。在许多的情况下,单体的分子量约小于 400 道尔顿。

[0032] 在本文中,“微型载体基底物”表示其上可以偶联多肽的聚合物微型载体。在本文中,“微型载体基底物”和“聚合微型载体”经常互换使用。微型载体是一个小的不连续的颗粒,用来培养细胞并且细胞可以连接到该颗粒。微型载体可以是任何合适的形状,例如棒状、球形等,可以是多孔的或者非多孔的。

[0033] 在本文中,“肽”和“多肽”表示氨基酸序列,它们可以通过化学方式合成或者可以重组衍生,但是它们无法以完整蛋白质的形式从动物来源分离。出于本发明的目的,肽和多肽不是完整的蛋白质。肽和多肽可以包括作为蛋白质片段的氨基酸序列。例如,肽和多肽可以包括被称为细胞粘附序列(例如 RGD)的序列。多肽可以具有任意合适的长度,例如长度为 3-30 个氨基酸。多肽可以进行乙酰化(例如 Ac-LysGlyGly)或者酰胺化(例如 SerLysSer-NH₂)以保护其自身免于被例如外肽酶破坏。可以理解,在描述某种序列的时候,也考虑了这些修饰形式。

[0034] 在本文中,“(甲基)丙烯酸酯单体”表示甲基丙烯酸酯单体或者丙烯酸酯单体。在本文中,“(甲基)丙烯酰胺单体”表示甲基丙烯酰胺或者丙烯酰胺单体。(甲基)丙烯酸酯和(甲基)丙烯酰胺单体包含至少一个烯键式不饱和部分。在本文中,“聚(甲基)丙烯酸酯”表示由包括至少一种(甲基)丙烯酸酯单体的一种或多种单体形成的聚合物。在本文中,“聚(甲基)丙烯酰胺”表示由包括至少一种(甲基)丙烯酰胺单体的一种或多种单体形成的聚合物。

[0035] 在本文中,“平衡水含量”表示用下式 1 所示的平衡水含量(EWC)定义和测量的聚合物材料的吸水特性:

[0036] 式 1: $EWC(\%) = [(W_{\text{凝胶}} - W_{\text{干}}) / (W_{\text{凝胶}})] * 100$ 。

[0037] 在本文中,“具有”、“含有”、“包括”、“包含”、“含”、“拥有”等表示开放式的含义,通常表示“包括(含),但不限于”。应当理解,“主要由……组成”、“由……组成”等涵盖在术

语“包括”等的范围之内。因此,由包含具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体、包含羧酸的亲水性不饱和单体、以及亲水性多官能单体的单体混合物形成的微型载体可以由一种混合物形成,该混合物主要由以下单体组成,或者由以下单体组成:具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及亲水性多官能不饱和单体。

[0038] 在本文中,当用“亲水性”描述单体的时候,表示该单体能够分离入水包油乳液的水相之内。例如,等于或大于 95%;例如等于或大于 98%的单体分离入水相中。应当理解,保留在水相中的单体的量取决于乳液中的组分(例如油相和乳化剂的组分,如果有的话)。例如,在许多的乳液中,油相是硅油或者氟化溶剂,通常具有极高亲水性的单体,例如二甲基丙烯酸乙二醇酯可以保持分散在水相中(因此在本文中认为其是“亲水性的”)。在通过水包油共聚形成微型载体的时候,单体能够保持在水包油乳液中的水相中的能力是很重要的。如果所述单体不会保持在水相中,则形成微型载体的能力可能会受到负面影响。

[0039] 本发明描述了用来培养细胞的合成微型载体等。在各种实施方式中,所述微型载体设计用来在化学限定的培养基中支持未分化干细胞的增殖和维持。

[0040] 1. 微型载体

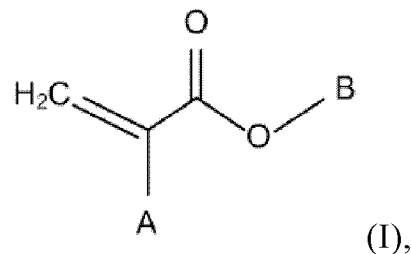
[0041] 在本文中,微型载体是通过包含以下单体的单体混合物聚合形成的:具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,包含羧酸的亲水性不饱和单体,以及亲水性多官能不饱和单体。在一些实施方式中,所述微型载体的聚合基底物是由一种单体混合物形成,所述单体混合物由以下单体组成,或者主要由以下单体组成:具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,包含羧酸的亲水性不饱和单体,以及亲水性多官能不饱和单体。

[0042] A. 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体

[0043] 可以使用任何合适的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体。“不带电荷的”单体表示具有以下性质的单体:当该种单体结合入聚合微型载体中的时候,在特定细胞培养条件下没有带电荷的基团。在细胞培养条件下包括带电荷部分的微型载体可以造成细胞的非特异性连接。在各种实施方式中,希望细胞与微型载体的相互作用具有生物特异性并且对接于微型载体的多肽具有选择性。

[0044] 在各种实施方式中,所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体是化学式 (I) 所示的(甲基)丙烯酸酯单体:

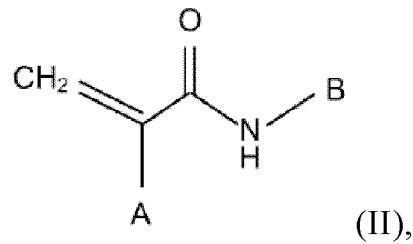
[0045]



[0046] 式中 A 是 H 或甲基, B 是 C1-C6 直链或支链的醇或醚。在一些实施方式中, B 是 C1-C4 直链或支链的醇。例如,可以使用甲基丙烯酸羟丙酯,甲基丙烯酸-2-羟乙酯(HEMA),丙烯酸-2-羟乙酯,甲基丙烯酸甘油酯,丙烯酸羟丙酯,丙烯酸-4-羟丁酯等等。

[0047] 在各种实施方式中,所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体是化学式 (II) 所示的(甲基)丙烯酰胺单体:

[0048]

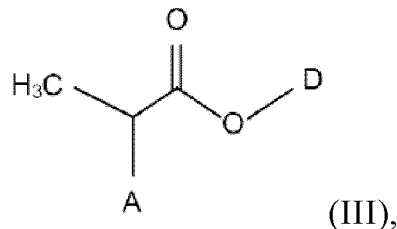


[0049] 式中 A 是 H 或甲基, B 是 C1-C6 直链或支链的醇或醚。在一些实施方式中, B 是 C1-C4 直链或支链的醇。例如, 所述不带电荷的亲水性不饱和单体可以是 N-(羟甲基) 丙烯酸酰胺, N-[三(羟甲基)甲基] 丙烯酸酰胺, 3- 丙烯酸氨基 -1- 丙醇, N- 丙烯酸氨基 - 乙氧基乙醇, N- 羟基乙基丙烯酸酰胺等。

[0050] B. 包含羧酸的亲水性不饱和单体

[0051] 可以使用任何合适的含羧酸的亲水性不饱和单体。在各种实施方式中, 所述含羧酸的亲水性不饱和单体是式 (III) 所示的 (甲基) 丙烯酸酯单体:

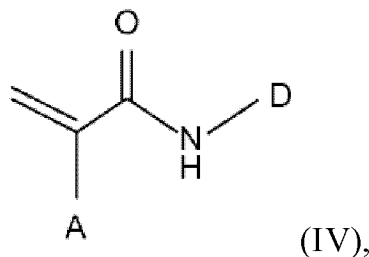
[0052]



[0053] 式中 A 是氢或者甲基, D 是被羧基 (-COOH) 取代的 C1-C6 直链或支链的烷基。在一些实施方式中, D 是被羧基取代的直链或者支链的 C1-C3。例如, 所述包含羧酸的亲水性不饱和单体可以是甲基丙烯酸 2- 羧基乙酯, 丙烯酸 -2- 羧基乙酯, 丙烯酸, 甲基丙烯酸等。

[0054] 在各种实施方式中, 所述含羧酸的亲水性不饱和单体是式 (IV) 所示的 (甲基) 丙烯酰胺单体:

[0055]



[0056] 式中 A 是氢或者甲基, D 是被羧基 (-COOH) 取代的 C1-C6 直链或支链的烷基。在一些实施方式中, D 是被羧基取代的直链或者支链的 C1-C3。例如, 所述包含羧酸的亲水性不饱和单体可以是 2- 羧基乙基丙烯酸酰胺、丙烯酰胺乙醇酸等。

[0057] C. 亲水性多官能不饱和单体

[0058] 可以使用任何合适的亲水性多官能不饱和单体。在本文中, “多官能单体” 表示包含超过一个能够聚合的基团的单体。多官能单体可以作为交联剂。多官能单体可以是二官能、三官能或更高官能度的。在各种实施方式中, 多官能单体是二官能的。多官能单体可以包含任何合适的可聚合基团。在各种实施方式中, 多官能单体包含乙烯基基团; 例如 (甲基) 丙烯酸酯基团或者 (甲基) 丙烯酰胺基团。合适的多官能单体的例子包括 N, N' - 亚甲基二丙烯酸酰胺, N, N' - (1,2 二羟基亚乙基) 二丙烯酸酰胺, 聚乙二醇二 (甲基) 丙烯酸酯,

三甘油二丙烯酸酯,丙二醇甘油化物二丙烯酸酯,三羟甲基丙烷乙氧基化物三丙烯酸酯等。

[0059] D. 聚合微型载体基底物的形成

[0060] 可以通过单体混合物的任何合适的聚合反应形成微型载体。在所述混合物中可以使用任何合适量的以下单体:具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,包含羧酸的亲水性不饱和单体,以及亲水性多官能不饱和单体。在各种实施方式中,用来形成微型载体的单体的混合物包含:(i)至少60重量份的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii)至少10重量份的包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及(iii)3-30重量份的亲水性多官能不饱和单体。在一些实施方式中,所述混合物包含至少80重量份的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体。在一些实施方式中,所述混合物包含10-20重量份的包含羧酸的亲水性不饱和单体。

[0061] 在一些实施方式中,所述聚合微型载体的侧接羧基含量(源自包含羧酸的亲水性不饱和单体)约为1-2毫当量/克,或者约为1.5毫当量/克。在各种实施方式中,所述聚合微型载体的交联密度(源自亲水性多官能不饱和单体的交联)约为 1×10^{-4} 至 5×10^{-3} 摩尔/克,约为 1.5×10^{-3} 至 2.5×10^{-3} 摩尔/克,或者约为 1.7×10^{-3} 摩尔/克。

[0062] 应当理解,单体的相对量以及单体的性质会影响制得的聚合微型载体的所需性质。例如,能够理解,可以通过选择用来形成微型载体的单体控制聚合微型载体的平衡水含量(EWC)。例如,使用的单体的亲水性越高,则聚合微型载体的EWC越高。但是,可以通过增加交联单体的百分比或者增大交联单体(亲水性多官能不饱和单体)的官能度来减弱此种影响,此种单体会减小SA层溶胀的能力,从而减小EWC。虽然不希望被理论所限制,但是认为聚合微型载体的EWC可能是决定微型载体在培养时可以支持何种细胞的重要变量。所述微型载体的硬度和溶胀能力能够模仿使得某些细胞在其中良好生长的环境。如共同待审的专利申请:美国专利申请系列号第12/362,924号以及第12/362,974号所述,EWC约为5-70%的可溶胀表面适合用于培养未分化状态的人胚胎干细胞至少五代。因此,在各种实施方式中,本文所述的微型载体的EWC约为5-70%。部分由于在本文所述的各种实施方式中,在SA中使用含羧酸的单体,EWC可能会随pH值变化而变化。例如,特定微型载体在磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中的EWC可以高于在去离子蒸馏水(pH~5)中的EWC。在各种实施方式中,微型载体在蒸馏去离子水中的EWC为5-70%,5-60%,5-50%,5-40%,在水中为5-35%,10-70%,10-50%,10-40%,5-35%,10-35%或者15-35%。

[0063] 如下文进一步讨论,一种或多种多肽可以偶联于微型载体,可以影响微型载体的EWC(通常是增大EWC)。与微型载体偶联的多肽的量可以作为变量,可以根据微型载体的尺寸(例如直径)变化。因此,根据标准历程制备的具有偶联多肽的微型载体的EWC可以变化。为了重现性,可能需要在与多肽偶联之前测量微型载体的EWC。关于这一点,在一些实施方式中,在微型载体与多肽偶联之后,微型载体-多肽偶联体的实施方式在水中的EWC可以约为10-40%。

[0064] 一旦选择了合适的量的单体,可以通过聚合反应形成聚合微型载体。除了形成微型载体的单体以外,用来形成微型载体的组合物可以包含一种或多种另外的化合物,例如表面活性剂、湿润剂、光引发剂、热引发剂、催化剂和活化剂。

[0065] 可以使用任何合适的聚合引发剂。本领域技术人员能够很容易地选择适合与单体一起使用的合适的引发剂,例如自由基引发剂或者阳离子型引发剂。在各种实施方式中,用

UV 光产生自由基单体以引发链聚合。聚合引发剂的例子包括有机过氧化物、偶氮化合物、醌、亚硝基化合物、酰基卤、脞、巯基化合物、吡喃鎓化合物、咪唑、氯三嗪、苯偶姻、苯偶姻烷基醚、二酮、苯基酮或它们的混合物。能够被紫外光活化或者被可见光活化的光引发剂的可以在市场上购得的合适的例子的商品名为例如：购自美国纽约的塔利镇的希巴特别化学品公司 (Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, N. Y.) 的 IRGACURE 651, IRGACURE 184, IRGACURE 369, IRGACURE 819, DAROCUR 4265 和 DAROCUR 1173, 以及购自巴斯夫公司 (美国北卡罗来纳州, 夏洛特市) 的 LUCIRIN TPO 和 LUCIRIN TPO-L。

[0066] 还可以在合适的引发剂体系中包含光敏剂。代表性的光敏剂包含羰基或叔胺基, 或者这些基团的组合。包含羰基的光敏剂包括二苯甲酮、苯乙酮、苯偶酰、苯甲醛、邻氯代苯甲醛、咕吨酮、噻吨酮、9,10-蒽醌和其它的芳族酮。包含叔胺的光敏剂包括甲基二乙醇胺、乙基二乙醇胺、三乙醇胺、苯基甲基乙醇胺和二甲基胺基乙基苯甲酸酯。可以在市场上购得的光敏剂包括购自彼得索耶尔公司 (Biddle Sawyer Corp) 的 QUANTICURE ITX, QUANTICURE QTX, QUANTICURE PTX, QUANTICURE EPD。

[0067] 一般来说, 光敏剂或光引发剂体系的量可以约为 0.01-10 重量%。

[0068] 可以采用的阳离子引发剂的例子包括鎓阳离子的盐, 例如芳族鎓盐, 以及例如离子芳烃体系之类的有机金属盐。

[0069] 可以使用的自由基引发剂的例子包括偶氮类引发剂, 例如 2-2' -偶氮二(二甲基-戊腈), 偶氮二(异丁腈), 偶氮二(环己烷亚硝酸盐/酯), 偶氮二(甲基-丁腈)等, 过氧化物引发剂, 例如过氧化苯甲酰, 过氧化月桂酰, 甲基乙基酮过氧化物, 过碳酸异丙酯, 2,5-二乙基(dienethyl)-2,5-二(2-乙基己酰基-过氧基)己烷, 二叔丁基过氧化物, 氢过氧化枯烯, 过氧化二氯苄基苯甲酰, 过硫酸钾, 过硫酸铵, 硫酸氢钠, 过硫酸钾、硫酸氢钠等的组合, 以及它们的混合物。当然可以使用任何其他合适的自由基引发剂。引发剂的有效用量通常约为反应混合物的 0.1-15 重量%, 例如约为反应混合物的 0.1-10 重量%或者约 0.1-8 重量%。

[0070] 在各种实施方式中, 在发生聚合反应之前, 一种或多种单体用水稀释。

[0071] (甲基)丙烯酸酯单体、(甲基)丙烯酰胺单体或者其他合适的单体可以通过本领域已知的方式合成, 或者购自供应商, 例如购自聚合科学有限公司 (Polysciences, Inc.), 希格玛-艾尔德里奇有限公司 (Sigma Aldrich, Inc.) 和萨托默有限公司 (Sartomer, Inc.)。

[0072] E. 油包水乳液共聚

[0073] 微型载体可以通过任何合适的方式形成。能够理解, 所采用的反应条件会对制得的聚合微型载体的尺寸和形状造成影响。在很多的实施方式中, 采用油包水共聚形成球形的微型载体。通过采用这样的反应历程和体系, 可以将亲水性单体溶解在水中, 加入油或者疏水性溶液或悬浮液中。可以采用任意合适的疏水性液体, 例如辛醇、甲苯、烷烃, 例如庚烷、己烷或高级烷烃, 例如硅烷、十二烷、十六烷, 重质矿物油, 硅油, 氟化溶剂等。可以加入乳化剂以促进油包水乳液的形成。优选的是不溶于水的(可溶于油的)乳化剂, 因为这些乳化剂的 HLB 值(亲水亲脂比率)低于 9。这些乳化剂的例子为山梨聚糖三油酸酯 (Span 85) HLB = 1.8, 山梨聚糖三硬脂酯 (Span65) HLB = 2.1, 山梨聚糖倍半油酸酯 (Arlacel 83) HLB = 3.7, 甘油基单硬脂酯, HLB = 3.8, 山梨聚糖单油酸酯, (Span 80) HLB = 4.3, 山梨聚

糖单硬脂酯, (Span 60)HLB = 4.7, 山梨聚糖单棕榈酸酯, (Span 40)HLB = 6.7 山梨聚糖单月桂酸酯, (Span 20)HLB = 8.6。合适的乳化剂的其他例子包括:疏水改性的水溶性聚合物或者由不同极性的组分构成的无规共聚物或者嵌段共聚物或接枝共聚物。疏水改性的水溶性聚合物乳化剂的一个例子是乙基纤维素。当然也可以使用其它的这样的乳化剂。

[0074] 无论如何制备微型载体, 在一些实施方式中, 微型载体的密度略大于用来将所述微型载体悬浮在其中的细胞培养基, 以促进微型载体与周围介质的分离。在各种实施方式中, 所述微型载体的密度约为 1.01-1.10 克/立方厘米。可以通过温和的搅拌将具有这样的密度的微型载体很容易地保持悬浮在细胞培养基中。预期可以通过改变水与单体的比例, 很容易地调节微型载体的密度。

[0075] 另外, 优选微型载体的尺寸变化很小, 以确保大部分(即使不是所有的)微型载体可以在温和的搅拌条件下悬浮。例如, 所述微型载体的几何尺寸分布可以约为 1-1.4。微型载体可以具有任何合适的尺寸。例如, 微型载体的直径尺寸可以约为 20-1000 微米。对于具有这样的直径的球状微型载体来说, 每个微型载体可以支持数百至数千个细胞的附连。可以通过改变搅拌速度或者使用的乳化剂种类, 很容易地调节通过油包水共聚技术形成的微型载体的尺寸。例如, 较高的搅拌速度倾向于得到较小的粒度(例如参见图 10)。另外, 认为与使用较低分子量乳化剂的情况相比, 通过使用乙基纤维素之类的聚合乳化剂, 可以获得较大的颗粒。因此, 可以很容易地改变搅拌速度或者搅拌强度和乳化剂, 以得到具有所需粒度的微型载体。

[0076] 发现油包水乳液共聚可以制得非多孔性的球状微型载体。在本文中, “非多孔性”表示不含孔, 或者孔的平均尺寸小于用所述微型载体培养的细胞, 例如约小于 0.5-1 微米。当所述微型载体不是可降解的时候, 需要使用非多孔性微型球体, 这是因为进入大孔性微型载体的孔之内的细胞难以除去。但是, 如果所述微型载体是可降解的, 例如它们包含可通过酶的作用降解或者以其他方式降解的交联剂, 可能希望所述微型载体是大孔的。

[0077] 在一些实施方式中, 微型载体是光学透明的, 使得可以对细胞与微型载体的相互作用进行显微观察。透明的微型载体允许对微型载体相反面(与被观察面相反的面)上的细胞进行观察。微型载体的透明度越高, 则越容易通过显微镜观察到所述相互作用。发现由以下单体形成的微型载体具有高度的透明度: 甲基丙烯酸-2-羟乙酯、丙烯酸-2-羧基乙酯以及二羟基亚乙基二丙烯酸酰胺(参见实施例 6 和图 8)。

[0078] F. 多肽与聚合微型载体的偶联

[0079] 可以将任何合适的多肽与微型载体偶联。较佳的是, 多肽包括能够与微型载体偶联的氨基酸; 例如, 通过由包含羧酸的亲水性饱和单体形成的游离羧基偶联。例如, 在多肽中可以包含任何能够进行亲核加成(例如通过形成酰胺键)的天然或者仿生氨基酸, 用来与微型载体进行偶联。具有适合用来与微型载体的羧基偶联的性质的氨基酸的例子是赖氨酸、高赖氨酸、鸟氨酸、二氨基丙酸以及二氨基丁酸。另外, 如果多肽的 N-末端胺没有封端, 其可以用来与羧基偶联。在各个实施方式中, 与微型载体偶联的多肽氨基酸位于多肽的羧基末端位置或者氨基末端部分。

[0080] 在很多实施方式中, 所述多肽或者其一部分具有细胞粘附活性; 也即是说, 当多肽与微型载体偶联时, 所述多肽允许细胞粘附于含肽的微型载体的表面。例如, 所述多肽可以包含由整联蛋白族的蛋白质识别或者导致与细胞分子的相互作用从而维持细胞粘附的氨

基序列,或者其细胞粘附部分。例如,所述多肽可以包含源自以下的氨基酸序列:胶原、角蛋白、明胶、纤连蛋白、玻璃体结合蛋白、层粘连蛋白、骨唾液蛋白(BSP)等,或者它们的部分。在各种实施方式中,多肽包含氨基酸序列 ArgGlyAsp(RGD)。

[0081] 本文所述的微型载体提供了合成表面,任何合适的粘附多肽或多肽的组合可以偶联在所述合成表面上,提供了对于包含未知组分的生物底物或者血清的替代方式。在目前的细胞培养实践中,已知一些细胞类型需要在培养表面上存在生物多肽或者多肽的组合,以便细胞粘附于所述表面并进行可持续的培养。例如,HepG2/C3A肝细胞可以在存在血清的情况下附连于塑料培养皿。还已知血清可以提供能够附着于塑料培养皿的多肽,以提供供某些细胞附着的表面。但是,生物来源的底物和血清包含未知的组分。对于一些细胞,导致细胞附着的血清或者生物来源的底物中的特定组分或者组分(肽)的组合是已知的,这些已知的多肽可以合成并应用于本文所述的微型载体,由此可以在不含或者包含很少未知来源或组成的组分的合成表面上培养细胞。

[0082] 对于本文讨论的任何多肽,应当理解可以用保守氨基酸代替具体限定的或者已知的氨基酸。在本文中,所谓“保守氨基酸”表示功能与第二种氨基酸类似的氨基酸。在多肽中,这些氨基酸可以根据公知技术彼此替代而对多肽的结构或功能造成非常小的影响。以下五组各自含有可互相保守取代的氨基酸:脂族:甘氨酸(G),丙氨酸(A),缬氨酸(V),亮氨酸(L),异亮氨酸(I);芳族:苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);含硫的:蛋氨酸(M),半胱氨酸(C);碱性的:精氨酸(R),赖氨酸(K),组氨酸(H);酸性的:天门冬氨酸(D),谷氨酸(E),天冬酰胺(N),谷酰胺(Q)。

[0083] 可以使用连接物或者间隔物,例如重复的聚(乙二醇)连接物或者任何其它合适的连接物,增大从多肽到微型载体表面的距离。所述连接物可以具有任何合适的长度。例如,如果所述连接物是重复的聚(乙二醇)连接物,所述连接物可以包含2-10个重复的乙二醇单元。在一些实施方式中,所述连接物是包含大约4个重复乙二醇单元的聚(乙二醇)连接物。全部的、一部分的、或者没有多肽通过连接物与微型载体偶联。其它的可能使用的连接物包括多肽连接物,例如聚(甘氨酸)或者聚(β -丙氨酸)。

[0084] 多肽可以以任何密度与微型载体相连,优选其密度适合支持未分化的肝细胞或者其他种类的细胞的培养。多肽可以以以下密度与微型载体偶联:每平方毫米的微型载体表面偶联大约1-50pmol。例如,所述多肽的密度可以大于5pmol/mm²微型载体表面,大于6pmol/mm²,大于7pmol/mm²,大于8pmol/mm²,大于9pmol/mm²,大于10pmol/mm²,大于12pmol/mm²,大于15pmol/mm²,或者大于20pmol/mm²。应当理解,多肽的含量可以根据微型载体的组成、微型载体的尺寸以及多肽自身的性质变化。

[0085] 可以通过任何合适的技术将多肽偶联于聚合微型载体。可以通过氨基末端氨基酸、羧基末端氨基酸或者内部氨基酸,将多肽与聚合微型载体偶联。本领域公知,一种合适的技术包括盐酸1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学方法。EDC和NHS或N-羟基磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)可以与可溶胀(甲基)丙烯酸酯层的羧基反应,制得胺活性NHS酯。EDC与可溶胀(甲基)丙烯酸酯层的羧基反应,制得容易水解的胺活性O-酰基异脲中间体。通过加入NHS或者磺基-NHS,将胺活性O-酰基异脲中间体转化为胺活性NHS或磺基-NHS酯,使得可以进行两步过程,由此使得胺活性O-酰基异脲中间体稳定化。在可溶胀(甲基)丙烯酸酯层活化之后,可以随后加入

多肽,所述多肽的末端胺可以与胺活性酯反应,形成稳定的酰胺键,从而使得多肽与可溶胀的(甲基)丙烯酸酯层偶联。当使用 EDC/NHS 化学试剂将多肽与可溶胀的(甲基)丙烯酸酯层偶联的时候,N-末端氨基酸优选是含胺的氨基酸,例如赖氨酸,鸟氨酸,二氨基丁酸或者二氨基丙酸。当然也可以使用任何可以接受的亲核试剂,例如羟基胺、肼、羟基等。

[0086] EDC/NHS 化学试剂带来多肽与微型载物的零长度交联。可以向多肽的 N-末端氨基酸中加入具有末端胺的连接物或间隔物,例如聚(乙二醇)连接物(例如商业购自款沓生物设计公司(Quanta BioDesign, Ltd.))。当将连接物加入 N-末端氨基酸的时候,所述连接物优选是 N-PG-酰氨-PEGX-酸,其中 PG 是保护基团,例如 Fmoc 基团,BOC 基团,CBZ 基团或者任何其它的可用于肽合成的基团,X 为 2,4,6,8,12,24,或者任何其它的可行的离散的 PEG。

[0087] 在各种实施方式中,使得 $1\ \mu\text{M}$ - $10,000\ \mu\text{M}$ 的多肽流体组合物,例如溶液、悬浮液等,与活化微型载体接触以偶联多肽。例如,所述多肽浓度可以约为 100 - $2000\ \mu\text{M}$,约为 500 - $1500\ \mu\text{M}$,或者约为 $1000\ \mu\text{M}$ 。能够理解,所述多肽组合物的体积以及浓度可以变化,以实现所需的多肽与微型载体的偶联密度。

[0088] 所述多肽可以是环状的,或者包括环状部分。可以使用任何合适的用来形成环状多肽的方法。例如,可以通过使得合适的氨基酸侧链上的游离氨基官能团与合适的氨基酸侧链上的游离羧基成环,形成酰氨连接键。另外,可以在肽序列中合适的氨基酸侧链的游离巯基之间形成二硫键。可以采用任何合适的技术形成环状多肽(或其部分)。例如,可以使用 WO 1989005150 所述的方法形成环状多肽。可以使用首尾相接的环状多肽,其中多肽的羧基末端和氨基末端之间形成酰胺键。二硫键的一种替代是使用两个硒半胱氨酸的二硒键,或者混合的硒/硫键,如以下文献所述:Koide 等人的 1993, Chem. Pharm. Bull. 41(3):502-6;Koide 等人的 1993, Chem. Pharm. Bull. 41(9):1596-1600;或者 Besse 和 Moroder, 1997, Journal of Peptide Science, 第 3 卷,442-453。

[0089] 多肽可以通过本领域已知的方式合成(或者通过分子生物技术制备)或者由供应商处获得,例如购自美国肽公司(American Peptide Company), CEM 公司或者 GS 公司(GenScript Corporation)。连接物可以通过本领域已知的方式合成,或者购自供应商,例如购自款沓生物设计公司(Quanta BioDesign, Ltd.)的离散的聚乙二醇(dPEG)连接物。

[0090] 可以偶联于微型载体的多聚多肽的一个例子是包含 KGGNGEPRGDTYRAY (SEQ ID NO:1) 的多肽,其为源自骨唾液蛋白的含 RGD 的序列,在 N 末端添加了另外的“KGG”序列。赖氨酸(K)作为用于化学偶联的合适的亲核试剂,两个甘氨酸氨基酸(GG)作为间隔物。也可以将胱氨酸(C)或者其他合适的氨基酸用作化学偶联,取决于采用的偶联方法。当然,也可以存在或者不存在偶联或者隔离物序列(例如 KGG 或 CGG)。用来与微型载体偶联(有或没有偶联或间隔物序列)的合适的多肽的其他例子为包括以下序列的多肽:NGEPRGDTYRAY, (SEQ ID NO:2), GRGDSPK (SEQ ID NO:3) (短纤连蛋白)AVTGRGDSPASS (SEQ ID NO:4) (长 FN), PQVTRGDVFTMP (SEQ ID NO:5) (玻璃体结合蛋白), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO:6) (层粘连蛋白 β 1), KYGRKRLQVQLSIRT (SEQ ID NO:7) (mL α 1 res2719-2730), NGEPRGDTRAY (SEQ ID NO:8) (BSP-Y), NGEPRGDTYRAY (SEQ ID NO:9) (BSP), KYGAASIKVAVSADR (SEQ ID NO:10) (mL α 1 res2122-2132), KYGKAFDITYVRLKF (SEQ ID NO:11) (mL γ 1 res139-150), KYGSETTVKYIFRLHE (SEQ ID NO:12) (mL γ 1 res 615-627), KYGTDIRVTLNRLNTF (SEQ ID

NO :13) (mLM γ 1 res 245-257), TSIKIRGTYSER (SEQ ID NO :14) (mLM γ 1 res 650-261), TWYKIAFQRNRK (SEQ ID NO :15) (mLM α 1 res 2370-2381), SINNNRWHSIYITRFGNMGS (SEQ ID NO :16) (mLM α 1 res 2179-2198), KYGLALERKDHS (SEQ ID NO :17) (tsp1 RES 87-96) 或者 GQKCIVQTTSWSQCCKS (SEQ ID NO :18) (Cyr61 res 224-240)。

[0091] 在一些实施方式中,肽包含 KGGK⁴DGEPRGDTYRATD¹⁷ (SEQ ID NO :19),其中 Lys⁴ 和 Asp¹⁷ 一起形成酰胺键,从而使得多肽的一部分环化;KGGL⁴EPRGDTYRD¹³ (SEQ ID NO :20),其中 Lys⁴ 和 Asp¹³ 一起形成酰胺键以使得多肽的一部分成环;KGGC⁴NGEPRGDTYRATC¹⁷ (SEQ ID NO :21),其中 Cys⁴ 和 Cys¹⁷ 一起形成二硫键,使得多肽的一部分环化;KGGC⁴EPRGDTYRC¹³ (SEQ ID NO :22),其中 Cys⁴ 和 Cys¹³ 一起形成二硫键,从而使得多肽的一部分环化,或者 KGGAVTGDGNSPASS (SEQ ID NO :23)。

[0092] 在一些实施方式中,所述多肽可以乙酰化和/或酰胺化。虽然提供了这些实施例,但是本领域技术人员能够认识到,任何肽或者多肽序列可以如本文所述与微型载体偶联。

[0093] 2. 细胞培养制品

[0094] 本文所述的微型载体可以用于任何合适的细胞培养系统。通常将微型载体和细胞培养基放在合适的细胞培养制品中,微型载体在培养基中搅拌或者混合。合适的细胞培养制品包括生物反应器,例如 WAVE BIOREACTOR® (Invitrogen),单孔板和多孔板,例如 6, 12, 96, 384 和 1536 孔板,广口瓶,皮氏培养皿,烧瓶,多层烧瓶,烧杯,板,滚瓶,管子,袋子,膜,杯,转瓶,灌注腔,生物反应器,CellSTACK®培养室(康宁有限公司(Corning Incorporated))和发酵器。

[0095] 3. 在包含微型载体的培养基中培育细胞,所述微型载体包含偶联的多肽。

[0096] 可以用细胞对上文所述的容纳有包含偶联多肽的培养基的细胞培养制品进行接种。使用的偶联多肽可以根据培养的细胞的种类进行选择。所述细胞可以属于任何细胞种类。例如,所述细胞可以是结缔组织细胞,上皮细胞,内皮细胞,肝细胞,骨骼肌或平滑肌细胞,心肌细胞,肠细胞,肾细胞,或者源自其他器官的细胞,干细胞,岛细胞,血管细胞,淋巴细胞,癌细胞,原代细胞,细胞系等。所述细胞可以是哺乳动物细胞,优选是人细胞,但是还可以是非哺乳动物细胞,例如细菌、酵母菌、或者植物细胞。

[0097] 在很多实施方式中,所述细胞是干细胞,本领域公知,干细胞表示能够连续分裂(自我更新)并且能够分化成各种专门化细胞的细胞。在一些实施方式中,干细胞是能够从对象的器官或组织分离的多能、全能或多向性干细胞。这些细胞能够得到完全分化的或者成熟的细胞种类。干细胞可以是源自骨髓的干细胞,类似的或者其它的,为神经干细胞或者胚胎干细胞。干细胞可以是 Nestin 阳性的。干细胞可以是造血干细胞。干细胞可以是选自上皮和脂肪组织、脐带血、肝、脑或其他器官的多谱系细胞。在各种实施方式中,所述干细胞是多能干细胞,例如从哺乳动物分离的多能胚胎干细胞。合适的哺乳动物可以包括啮齿动物,例如小鼠或大鼠,灵长类动物,包括人类和人类以外的灵长类动物。在各种实施方式中,所述包含偶联多肽的微型载体支持胚胎干细胞 5 代或更多代、7 代或更多代、或者 10 代或更多代的未分化培养。通常干细胞在达到大约 75% 的融合度之后将其传代到新的表面。细胞达到 75% 的融合度所需的时间取决于培养基、接种密度以及本领域已知的其他因素。

[0098] 因为人胚胎干细胞(hESC)能够以未分化状态在培养的过程中连续生长,本文所述用于微型载体的 hESC 可以由已建立的细胞系获得。已经建立的人胚胎干细胞

系的例子包括但不限于 H1, H7, H9, H13 或 H14(可得自威斯康辛大学 (University of Wisconsin) 建立的 WiCell) (Thompson(1998) Science 282 :1145) ;hESBGN-01, hESBGN-02, hESBGN-03(布勒萨基因有限公司 (BresaGen, Inc.), 美国佐治亚州埃瑟 (Athens, GA)) ; HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6(得自新加坡的 ES 细胞国际有限公司 (ES Cell International, Inc., Singapore)) ;HSF-1, HSF-6(得自美国圣弗朗西斯科的加利福尼亚大学 (University of California, San Francisco)) ;I3, I3.2, I3.3, I4, I6, I6.2, J3, J3.2(源自以色列海法的以色列科技研究所 (Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel)) ;UCSF-1 和 UCSF-2(Genbacev 等人, Fertil. Steril. 83(5) : 1517-29, 2005) ;细胞系 HUES 1-17(Cowan 等人, NEJM350(13) :1353-56, 2004) ;以及细胞系 ACT-14(Klimanskaya 等人, Lancet, 365(9471) :1636-41, 2005)。胚胎干细胞还可以直接由原始胚胎组织直接获得。通常是在体外受精的卵子进行冷冻来完成, 这些卵子原本是要弃去的。

[0099] 其他多能干细胞的来源包括灵长类多能干 (iPS) 细胞。iPS 细胞表示由幼年或成年哺乳动物 (例如人) 获得的细胞, 该细胞用一种或多种合适的载体转染进行遗传修饰, 使其重新编码以获得多能干细胞如 hESC 的表型。这些重新编码的细胞获得的表型特征包括与从胚泡分离的干细胞类似的形态, 以及与源自胚胎干细胞的胚泡类似的表面抗原表达、基因表达和端粒酶活性。所述 iPS 细胞通常能够分化成各个主要胚层的至少一种细胞: 外胚层, 内胚层和中胚层。所述 iPS 细胞与 hESC 类似, 当注入免疫缺陷小鼠, 例如 SCID 小鼠体内的时候, 也会形成畸胎瘤。(Takahashi 等人, (2007) Cell1131(5) :861 ;Yu 等人, (2007) Science318 :5858)。

[0100] 为了将干细胞保持在未分化状态, 可能需要最大程度减少细胞与微型载体表面的非特异性相互作用或者附连, 同时获得与表面连接的多肽的选择性附连。可以在偶联多肽之前, 测试干细胞与没有偶联多肽的微型载体表面相连的能力, 以确定所述微型载体是否提供很少的或者未提供干细胞的非特异性相互作用或者附连。一旦选择合适的微型载体之后, 可以将细胞接种到包含所述微型载体的培养基中。

[0101] 在接种细胞之前, 无论细胞为何种类型, 可以将细胞收获并悬浮在合适的培养基中, 例如使用其中一旦接种细胞便可对细胞进行培养的生长培养基。例如, 可以将细胞悬浮在以下培养基中并在其中进行培养: 含血清的培养基, 条件培养基, 或者化学限定的培养基。在本文中, “化学限定的培养基”表示不含具有未知组成的组分的细胞培养基。在各种实施方式中, 化学限定的细胞培养基可以不含具有未知组成的蛋白质、水解物 (hydrolysate) 或肽。在一些实施方式中, 化学限定的培养基包含具有已知组成的多肽或者蛋白质, 例如重组体生长激素。因为化学限定的培养基中所有的组分都具有已知的化学结构, 可以减少在培养条件中的变异性, 并且由此减少细胞响应中的变异性, 由此提高了重现性。另外, 降低了污染的可能性。另外, 至少部分由于以上讨论的因素, 可以更容易地进行按比例规模放大。化学限定的细胞培养基可以是商业购自英杰 (Invitrogen) (英杰公司 (Invitrogen Corporation), 1600Faraday Avenue, PO Box 6482, 卡尔斯巴德 (Carlsbad), 美国加利福尼亚州 92008) 的 STEM PRO, 由胚胎干细胞生长和扩展特别配制的完全不含血清和饲养体 (feeder) (SFM), Xvivo (Lonza), 以及干细胞技术有限公司 (Stem Cell Technologies, Inc.), 例如用于人胚胎干细胞的 mTeSR™1 维持培养基。

[0102] 可以在培养基中加入一种或多种生长因子或者其它的因子,在所述培养基中,用与多肽偶联的微型载体对细胞进行培育。这些因子可能促进细胞增殖、粘着、自我更新、分化等。可以添加的或者包括在培养基中的因子的例子包括肌肉形态发生因子 (MMP),血管内皮生长因子 (VEGF),白细胞介素,神经生长因子 (NGF),促红细胞生成素,源自血小板的生长因子 (PDGF),表皮生长因子 (EGF),活化素 A (ACT) 例如活化素 A,造血生长因子,视黄酸 (RA),干扰素,成纤维蛋白质生长因子,例如基础成纤维蛋白质生长因子 (bFGF),骨形态形成蛋白质 (BMP),肽生长因子,肝素结合生长因子 (HBGF),肝细胞生长因子,肿瘤坏死因子,胰岛素样生长因子 (IGF) I 和 II,转化生长因子,例如转化生长因子- β 1 (TGF β 1),和集落刺激因子。

[0103] 细胞可以以任何合适的浓度接种。一般来说,细胞的接种浓度约为 10,000 个细胞/平方厘米微型载体至约 500,000 个细胞/平方厘米。例如,细胞可以以大约 50000-150000 个细胞/平方厘米基质的浓度接种。但是,也可以很容易地采用更高和更低的浓度。培育时间和条件,例如温度、CO₂ 和 O₂ 含量、培养基等,将取决于培养的细胞的性质,可以很容易地进行改良。细胞在微型载体中培养的时间长度可以根据所需的细胞响应变化。

[0104] 培养的细胞可以用于任何合适的目的,包括 (i) 在化学限定的培养基中的合成表面上获得足够量的培养的未分化的干细胞,用于研究或开发治疗应用,(ii) 用于对培养中的细胞进行研究,(iii) 用来开发治疗应用,(iv) 用于治疗目的,(v) 用来研究基因表达,例如通过产生 cDNA 文库来研究基因表达,(vi) 用来研究药物和毒性筛选,以及 (vii) 其他目的。

[0105] 一种确定细胞是否分化的合适的方式是测定是否存在 OCT4 标记物。在各种实施方式中,未分化的干细胞在本发明所述的微型载体上培养 5 代、7 代、10 代或更多代之后,保留其分化能力。

[0106] 4. 概述

[0107] 本文所述的微型载体包含由以下单体形成的微型载体基底物:(i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii) 包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及 (iii) 亲水性多官能不饱和单体。可以使用任意合适的单体。在各种实施方式中,所述单体是亲水性(甲基)丙烯酸酯或亲水性(甲基)丙烯酰胺单体。

[0108] 例如,所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体可以是以上所述式 I 或式 II 的单体。可以采用的合适的不带电荷的亲水性不饱和单体的例子包括甲基丙烯酸羟丙酯,甲基丙烯酸-2-羟基乙酯,丙烯酸-2-羟基乙酯,甲基丙烯酸甘油酯,丙烯酸羟丙酯,丙烯酸-4-羟丁酯,N-(羟基甲基)丙烯酰胺,N-[三(羟基甲基)甲基]丙烯酰胺,3-丙烯酰氨基-1-丙醇,N-丙烯酰氨基-乙氧基乙醇和 N-羟基乙基丙烯酰胺。

[0109] 所述包含羧酸的亲水性不饱和单体可以是以上所述的式 III 或 IV 的单体。具体的例子包括甲基丙烯酸-2-羧基乙酯,丙烯酸-2-羧基乙酯,丙烯酸,甲基丙烯酸,2-羧基乙基丙烯酰胺以及丙烯酰氨基乙醇酸。

[0110] 合适的亲水性多官能不饱和单体的例子包括二官能、三官能或更高级官能的(甲基)丙烯酸酯或(甲基)丙烯酰胺单体,例如 N,N'-亚甲基二丙烯酰胺,N,N'(1,2-二羟基亚乙基)二丙烯酰胺,聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯,三甘油二丙烯酸酯,丙二醇甘油化物二丙烯酸酯,三羟甲基丙烷乙氧基化物三丙烯酸酯和甘油 1,3-二甘油化物二丙烯酸酯。

如上文所述,可能需要包含疏水性交联单体,该单体可以是任何合适的疏水性交联单体,例如二官能、三官能或者更高级官能的(甲基)丙烯酸酯或者(甲基)丙烯酰胺单体。可以采用的亲水性交联单体的例子包括二甲基丙烯酸四(乙二醇)酯和二丙烯酸四(乙二醇)酯。

[0111] 所述微型载体基底物可以由以上讨论的单体的任意合适的混合物形成。在各种实施方式中,用来形成微型载体的单体的混合物包含:(i)至少60重量份的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体;(ii)至少10重量份的包含羧酸的亲水性不饱和单体;以及(iii)3-30重量份的亲水性多官能不饱和单体。在一些实施方式中,所述混合物包含至少80重量份的具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体。在一些实施方式中,所述混合物包含10-20重量份的包含羧酸的亲水性不饱和单体。

[0112] 在一些实施方式中,所述聚合微型载体的侧接羧基含量(源自包含羧酸的亲水性不饱和单体)约为1-2毫当量/克,或者约为1.5毫当量/克。在各种实施方式中,所述聚合微型载体的交联密度(源自亲水性多官能不饱和单体的交联)约为 1×10^{-4} 至 5×10^{-3} 摩尔/克,约为 1.5×10^{-3} 至 2.5×10^{-3} 摩尔/克,或者约为 1.7×10^{-3} 摩尔/克。

[0113] 本发明描述和考虑了包含用来形成所述微型载体的各种单体的组合物。例如,用来形成微型载体的组合物(无论是通过油包水乳液共聚或其它的方法)可以包含(i)具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,(ii)包含羧酸的亲水性不饱和单体,以及(iii)亲水性多官能不饱和单体,例如上文所述的那些。所述单体可以以任何合适的比例包含在所述组合物中,例如以上关于微型载体基底物所述的那些比例。例如,相对于所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体、包含羧酸的亲水性不饱和单体以及亲水性多官能不饱和单体的总重量,所述(i)具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为60%,(ii)所述包含羧酸的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为10%,(iii)所述亲水性多官能不饱和单体的重量百分数为3-30%。

[0114] 所述微型载体基底物可以根据任何合适的方法制备。在各种实施方式中,采用油包水乳液共聚形成所述微型载体基底物。通过采用这样的反应历程和体系,可以将亲水性单体溶解在水中,加入油或者疏水性溶液或悬浮液中。可以采用任意合适的疏水性液体,例如辛醇、甲苯、烷烃,例如庚烷、己烷或高级烷烃,例如硅烷、十二烷、十六烷,重质矿物油,硅油,氟化溶剂等。可以加入乳化剂以促进油包水乳液的形成。优选的是不溶于水的(可溶于油的)乳化剂,因为这些乳化剂的HLB值(亲水亲脂比率)低于9。这些乳化剂的例子为山梨聚糖三油酸酯(Span 85)HLB = 1.8,山梨聚糖三硬脂酯(Span 65)HLB = 2.1,山梨聚糖倍半油酸酯(Arlacel 83)HLB = 3.7,甘油基单硬脂酯,HLB = 3.8,山梨聚糖单油酸酯,(Span 80)HLB = 4.3,山梨聚糖单硬脂酯,(Span 60)HLB = 4.7,山梨聚糖单棕榈酸酯,(Span 40)HLB = 6.7山梨聚糖单月桂酸酯,(Span 20)HLB = 8.6。合适的乳化剂的其他例子包括:疏水改性的水溶性聚合物或者由不同极性的组分构成的无规共聚物或者嵌段共聚物或接枝共聚物。疏水改性的水溶性聚合物乳化剂的一个例子是乙基纤维素。当然也可以使用其它的这样的乳化剂。

[0115] 本文所述的微型载体还可以包含与微型载体基底物偶联的多肽。可以用任何合适的方法偶联所述多肽。在各种实施方式中,所述多肽偶联于源自包含羧酸的亲水性不饱和单体的羧酸基团。可以用EDC/NHS或者任何其他合适的化学试剂将多肽与微型基底物的羧

酸基团偶联。

[0116] 可以将任何合适的多肽与微型载体基底物偶联。较佳的是,所述多肽促进细胞以生物特异性的方式粘附于所述微型载体。在各种实施方式中,所述多肽包含由整联蛋白族的蛋白质识别或者导致与细胞分子的相互作用从而维持细胞粘附的氨基序列或其一部分。例如,所述多肽可以包含源自以下的氨基酸序列:胶原、角蛋白、明胶、纤连蛋白、玻璃体结合蛋白、层粘连蛋白、骨唾液蛋白(BSP)等,或者它们的部分。在各种实施方式中,多肽包含氨基酸序列 ArgGlyAsp(RGD)。

[0117] 可以与微型载体基底物连接的多肽的例子包括 KGGNGEPRGDTYRAY (SEQ ID NO: 1); NGEPRGDTYRAY, (SEQ ID NO: 2); GRGDSPK (SEQ ID NO: 3); AVTGRGDSPASS (SEQ ID NO: 4); PQVTRGDVFTMP (SEQ ID NO: 5); RNIAEIIKDI (SEQ ID NO: 6); KYGRKRLQVQLSIRT (SEQ ID NO: 7); NGEPRGDTRAY (SEQ ID NO: 8); NGEPRGDTYRAY (SEQ ID NO: 9); KYGAASIKVAVSADR (SEQ ID NO: 10); KYGKAFDITYVRLKF (SEQ ID NO: 11); KYGSETTVKYIFRLHE (SEQ ID NO: 12); KYGTDIRVTLNRLNTF (SEQ ID NO: 13); TSIKIRGTYSER (SEQ ID NO: 14); TWYKIAFQRNRK (SEQ ID NO: 15); SINNNRWHSIYITRFGNMGS (SEQ ID NO: 16); KYGLALERKDHS (SEQ ID NO: 17); GQKCI VQTTSWSQCSKS (SEQ ID NO: 18); KGGK⁴DGEPRGDTYRATD¹⁷ (SEQ ID NO: 19), 其中 Lys⁴ 和 Asp¹⁷ 一起形成酰胺键,使得多肽的一部分环化; KGGL⁴EPRGDTYRD¹³ (SEQ ID NO: 20), 其中 Lys⁴ 和 Asp¹³ 一起形成酰胺键,使得多肽的一部分环化; KGGC⁴NGEPRGDTYRATC¹⁷ (SEQ ID NO: 21), 其中 Cys⁴ 和 Cys¹⁷ 一起形成二硫键,使得多肽的一部分环化; KGGC⁴EPRGDTYRC¹³ (SEQ ID NO: 22), 其中 Cys⁴ 和 Cys¹³ 一起形成二硫键以使得多肽的一部分环化, KGGAVTGDGNSPASS (SEQ ID NO: 23); 以及 Ac-Lys-Gly-Gly-Pro-Gln-Val-Thr-Arg-Gly-Asp-Val-Phe-Thr-Met-Pro-NH₂ (SEQ ID NO: 24)。

[0118] 多肽可以以任何密度与微型载体相连,优选其密度适合支持未分化的肝细胞或者其他种类的细胞的培养。多肽可以以以下密度与微型载体相连:每平方毫米的微型载体表面连接大约 1-50pmol。例如,所述多肽的密度可以大于 5pmol/mm² 微型载体表面,大于 6pmol/mm², 大于 7pmol/mm², 大于 8pmol/mm², 大于 9pmol/mm², 大于 10pmol/mm², 大于 12pmol/mm², 大于 15pmol/mm², 或者大于 20pmol/mm²。

[0119] 本文所述的微型载体可以用于任何合适的体系。例如生物反应器,单孔和多孔板,广口瓶,皮氏培养皿,烧瓶,烧杯,滚瓶,管子,袋子,膜,杯子,转瓶,灌注腔,发酵器等。

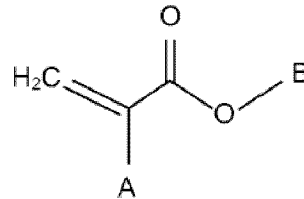
[0120] 所述微型载体可以在合适的体系中用来培养任何合适的细胞,例如哺乳动物细胞,优选人细胞,或者非哺乳动物细胞,例如细菌、酵母菌或者植物细胞。可以用本文所述的微型载体培养的哺乳动物细胞的例子包括结缔组织细胞,上皮细胞,内皮细胞,肝细胞,骨骼肌或平滑肌细胞,心肌细胞,肠细胞,肾细胞,或者源自其他器官的细胞,干细胞,岛细胞,血管细胞,淋巴细胞,癌细胞,原代细胞,细胞系等。在很多实施方式中,所述细胞是干细胞,例如多能、全能或多向性干细胞。在一些实施方式中,所述细胞是胚胎干细胞。在本文中,所述微型载体可以用来在化学限定的培养基中培养胚胎干细胞。

[0121] 培养的细胞可以用于任何合适的目的,包括 (i) 在化学限定的培养基中的合成表面上获得足够量的培养的未分化的干细胞,用于研究或开发治疗应用, (ii) 用于对培养中的细胞进行研究, (iii) 用来开发治疗应用, (iv) 用于治疗目的, (v) 用来研究基因表达,例如通过产生 cDNA 库来研究基因表达, (vi) 用来研究药物和毒性筛选,以及 (vii) 其他目的。

[0122] 在第一个方面,提供了一种用来通过油包水乳液共聚形成微型载体的组合物,该组合物包含 (i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体,其选自具有羟基的亲水性(甲基)丙烯酸酯单体,或者具有羟基的亲水性(甲基)丙烯酰胺单体;(ii) 含羧酸的亲水性不饱和单体,其选自含羧酸的(甲基)丙烯酸酯单体或者含羧酸的(甲基)丙烯酰胺单体,以及 (iii) 选自以下的亲水性多官能不饱和单体:亲水性多官能(甲基)丙烯酸酯单体或者亲水性多官能(甲基)丙烯酰胺单体。在第二个方面,提供了一种如第一个方面所述的组合物,相对于所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体、包含羧酸的亲水性不饱和单体以及亲水性多官能不饱和单体的总重量,所述 (i) 具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为 60%, (ii) 所述包含羧酸的亲水性不饱和单体的重量百分数至少为 10%, (iii) 所述亲水性多官能不饱和单体的重量百分数为 3-30%。在第三个方面,提供了一种如第一个或第二个方面所述的组合物,其中所述亲水性多官能不饱和单体选自 N, N'-亚甲基二丙烯酰胺, N, N'(1,2-二羟基亚乙基)二丙烯酰胺,聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯,三甘油二丙烯酸酯,丙二醇甘油化物(glycerolate)二丙烯酸酯,三羟甲基丙烷乙氧基化物三丙烯酸酯,以及甘油 1,3-二甘油化物二丙烯酸酯。在第四个方面,提供了一种如第一个方面或第二个方面所述的组合物,其中,所述亲水性多官能不饱和单体选自亚甲基二丙烯酰胺和二羟基亚乙基二丙烯酰胺。

[0123] 在第五个方面,提供了中如第一至第四个方面中的任一项所述的组合物,其中所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体是下式 (I) 或 (II) 所述的单体:

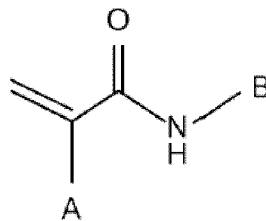
[0124]



[0125] 式 (I)

[0126] 式中 A 是 H 或甲基, B 是 C1-C6 直链或支链的醇或醚;

[0127]



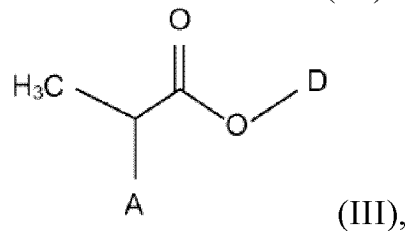
[0128] 式 (II)

[0129] 式中 A 是 H 或甲基, B 是 C1-C6 直链或支链的醇或醚。

[0130] 在第六个方面,提供了如第 1-4 个方面所述的组合物,其中具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体选自甲基丙烯酸羟丙酯,甲基丙烯酸-2-羟基乙酯,丙烯酸-2-羟基乙酯,甲基丙烯酸甘油酯,丙烯酸羟丙酯,丙烯酸-4-羟丁酯, N-(羟基甲基)丙烯酰胺, N-[三(羟基甲基)甲基]丙烯酰胺, 3-丙烯酰氨基-1-丙醇, N-丙烯酰氨基-乙氧基乙醇和 N-羟基乙基丙烯酰胺。在第七个方面,提供了一种如第 1-4 个方面中任一项所述的组合物,其中,所述具有羟基的不带电荷的亲水性不饱和单体是甲基丙烯酸-2-羟乙酯。在第八个方面,

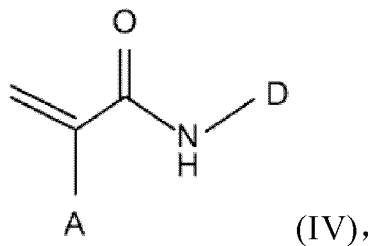
提供了一种如第 1-7 个方面中任一项所述的组合物,其中,所述含羧酸的亲水性不饱和单体是式 (III) 或式 (IV) 所述的单体:

[0131]



[0132] 式中 A 是氢或者甲基, D 是被羧基 (-COOH) 取代的 C1-C6 直链或支链的烷基;或者

[0133]



[0134] 式中 A 是氢或者甲基, D 是被羧基 (-COOH) 取代的 C1-C6 直链或支链的烷基。

[0135] 在第九个方面,提供了一种如第 1-7 个方面中任一项所述的组合物,其中所述含羧酸的亲水性不饱和单体选自甲基丙烯酸-2-羧基乙酯,丙烯酸-2-羧基乙酯,丙烯酸,甲基丙烯酸,2-羧基乙基丙烯酰胺以及丙烯酰氨乙醇酸。在第十个方面,提供了一种如方面 1-7 中任一项所述的组合物,其中,所述含羧酸的亲水性不饱和单体是甲基丙烯酸-2-羧基乙酯。

[0136] 在第十一个方面,提供了一种用来形成细胞培养微型载体的方法,该方法包括:通过油包水共聚使得以上第 1-10 个方面中的任一项所述的组合物中的单体共聚;将多肽与微型载体基底物偶联以形成所述微型载体。在第十二个方面,提供了一种用于细胞培养的微型载体,该微型载体包括:通过使得以上第 1-10 个方面中任一项所述的组合物中的单体共聚形成的聚合微型载体基底物;以及与所述聚合基底物偶联的多肽。在第十三个方面,提供了如第 12 个方面所述的微型载体,其中,所述微型载体基底物的平衡水含量为 5-70%。在第十四个方面,提供了如第 12 或 13 个方面所述的微型载体,其中,多肽偶联于源自含羧酸的亲水性不饱和单体的羧酸基团。在第十五个方面,提供了一种如第 12-14 个方面中任一项所述的微型载体,其中,所述多肽是能够提高细胞与微型载体的粘附性的多肽。在第十六个方面,提供了如第 12-14 个方面中任一项所述的微型载体,其中,所述多肽选自 BSP 多肽,玻璃体结合蛋白多肽,纤维结合蛋白多肽以及胶原多肽。在第十七个方面,提供了一种根据第 12-14 个方面中任一项所述的微型载体,其中,所述多肽是含 RGD 的多肽。在第十八个方面,提供了一种根据第 12-17 个方面中任一项所述的微型载体,其特征在于,所述微型载体基底物是整体性的。在第十九个方面,提供了一种用来培养细胞的方法,该方法包括:使得细胞与包含如第 12-18 个方面中任一项所述的微型载体的细胞培养基接触;在所述培养基中培养所述细胞。

[0137] 在下文中给出了非限制实施例,其中描述了以上讨论的微型载体和方法的各种实施方式。

实施例

[0138] 实施例 1:微型载体制备

[0139] 向装有恒温套和底部排放口、滴液漏斗、锚式搅拌器以及惰性气体鼓气管的 500 毫升反应器中加入 250 克无水甲苯以及 15 克 SPAN 85 乳化剂。将反应器的温度设定在 40°C,该混合物在氩气鼓泡条件下,在 500rpm 的转速下搅拌至少 15 分钟。然后制备包含以下组分的均一混合物:22 毫升去离子水,6.3 克甲基丙烯酸-2-羟乙酯,1.8 克 2-羧基乙基丙烯酸酯钠盐和 1 克亚甲基二丙烯酰胺,该混合物用 NaOH 将 pH 值调节到 8-10。将 0.5 克过硫酸铵溶解在该水溶液中,直至得到透明均一的溶液。然后在 40°C 通过滴液漏斗将所述溶液逐滴加入搅拌的甲苯/SPAN85 混合物。由于形成油包水乳液,该混合物迅速变为乳状。混合 15 分钟之后,将 100 微升的四甲基乙二胺快速加入所述搅拌的乳液中。反应 2 小时之后,将温度冷却至 20°C,通过反应器的底部排放口,将微型载体从反应器中移出。制得的微型载体用丙酮充分洗涤,以除去不溶于水的乳化剂和未反应的材料。干燥之后,制得白色、可以自由流动的粉末形式的微型载体粉末,该粉末可以在室温下储藏,而不需要采用特殊的条件。

[0140] 在不进行筛分的情况下,用显微镜对微型载体进行观察,发现其大体为球形,具有很窄的粒度分布。图 1 显示了代表性的图像。

[0141] 然后在扫描电子显微镜的帮助下观察微型载体。用 6 纳米的金-铂对珠粒进行金属化。使用场效应枪扫描电子显微镜进行观察(参考 LE01550)。图中球形微型载体的表面是平整而非多孔性的(见图 2)。图 2A 显示 500 倍放大的图像,图 2B 显示 2,000 倍放大的图像。图 3A-D 显示用 PBS 缓冲液洗涤之后得到的微球体不同放大倍数下的 SEM 图像。

[0142] 然后用激光衍射粒度分析仪测定微型载体的粒度分布。使用装有水性液体模块和自来水的多波长 Beckman Coulter™ LS 13 320 进行分析。图 4 显示了颗粒的粒度分布图。制得的颗粒的直径为 101.8 微米(+/-24.42 微米)。实施例 6,8 和 9(见下文)讨论了具有较大直径的微型载体的合成。

[0143] 微球体还在水中溶胀(在 20 毫升水中加入 1.5 立方厘米的干微型载体)。该微球体溶胀至体积约为 4.5 立方厘米。

[0144] 实施例 2:使用结晶紫测定 COOH 的含量

[0145] 将 10 微克根据实施例 1 制备的干微型载体悬浮在 2 毫升去离子水中,加入 10 微升 5% wt/v 的晶体紫水溶液。沉降之后,用去离子水洗涤染色的微型载体,直至得到无色的上清液。将洗涤过的微型载体悬浮在 2 毫升去离子水中。观察到染色的均一分布(数据未显示),表明羧基在微型载体的表面上均一分布。

[0146] 实施例 3:用 Alexa Fluor™ 488 偶联检测的胺偶联

[0147] 在 Eppendorf 塑料管中称取 10 微克根据实施例 1 制备的微型载体,加入 900 微升的水,通过振荡分散所述微型载体。然后加入 100 微升的 200mMEDC 以及 50mM NHS 或磺基-NHS。该活化进行 30 分钟。在通过离心使得微型载体沉淀之后,用 1 毫升去离子水冲洗所述微型载体。冲洗重复三次。然后将活化的微型载体悬浮在 400 微升的 pH 值为 9.2 的硼酸盐缓冲液中,加入 100 微升 1mM 的购自英杰分子探针(Invitrogen Molecular probes™)的 Alexa Fluor™ 488。进行一小时的偶联之后,离心收集微型载体,用 PBS 缓冲液冲

洗三次。

[0148] 观察到用 EDC/NHS 和磺基 -EDC/NHS 胺介导的偶联产生很大的荧光（数据未显示），表明这两种物质中的任一种均可用来将多肽连接到微球体的表面。磺基 -EDC/NHS 得到的荧光略强于 EDC/NHS。

[0149] 实施例 4：肽接枝

[0150] 为了证明原理，采用 EDC/磺基 NHS 或 EDC/NHS 介导的偶联将 GRGDS (SEQ ID NO: 26) 肽接枝在根据实施例 1 所述制备的微型载体上。如上文的说明书所述，可以用类似的过程接枝其它的相关的肽，例如由整联蛋白族的蛋白质识别或者导致与细胞分子的相互作用从而维持细胞粘附的氨基酸序列的那些肽。简单来说，在 Eppendorf 管子中称取 10 微克干的微型载体，分散在 900 微升的去离子水中。然后加入 100 微升 20mM EDC 和 5mM 磺基 -NHS，并静置 30 分钟，以使得羧基团活化。通过离心收集活化的微型载体，用去离子水冲洗三次。然后将其重新悬浮在 400 微升的硼酸盐缓冲液 (pH 9.2) 中，加入 100 微升 5mM gGRGDS (SEQ ID NO: 26) 肽，使其反应 1 小时。

[0151] 通过离心收集微型载体，用 pH 为 7.4 的 1 毫升 PBS 缓冲液洗涤三次。最后，通过用 1 毫升乙醇胺封端 30 分钟，使得过量的活化的酯失活。收集肽接枝并封端的微型载体，用 PBS 冲洗三次。用 PBS 冲洗之后，用体积百分比为 70 : 30 的乙醇 / 水对所述微型载体冲洗两次，在细胞培养之前储存在该乙醇 / 水溶液中。

[0152] 实施例 5：肽接枝的微型载体上的细胞培养

[0153] 将 CHO-M1 (ATCC # CRL-1984) 接种到补充了 10% 的牛胚胎血清 (Hyclone) 以及青霉素 / 链霉素的 F-12Kaighn 改性培养基 (Gibco) 中。细胞在 37°C、5% CO₂ 潮湿气氛的培养箱中培养，每隔 3 天更换培养基，需要时对细胞进行胰蛋白酶消化和稀释以保持低于融合的状态。

[0154] 在细胞接种之前，将根据实施例 4 制备的微型载体保持在乙醇 / 水溶液 (70/30) (见实施例 4) 中，在 HBSS 缓冲液 (Gibco) 中洗涤三次。最后，将微型载体悬浮在细胞培养基中，分配在 Corning® ULA 板中。

[0155] 用来在微型载体上接种的细胞在其指数生长期过程中通过胰蛋白酶消化而收集。对这些细胞进行计数，用 HBSS 缓冲液洗涤。将细胞浓度调节到 10⁶ 个细胞 / 毫升，将细胞分配在微型载体上，在培养箱中培育至少 4 小时。

[0156] 在最初 4 小时的培育之后，观察到肽接枝的微型载体上的细胞粘着。图 5 显示了载体上的 CHO-M1 粘着图。图 A 显示了接种 4 小时后的细胞：圆形的细胞是粘着早期步骤的特征。在培育 16 小时之后（图 B），细胞在表面上的扩展很明显，表明整联蛋白接合和粘着斑形成。在此阶段的细胞可以转移到悬浮培养容器中，用于进一步的生长。

[0157] 在肽接枝的不同阶段，将 HEK293 (ATCC # cr1-1573) 细胞接种在微型载体上，在 DMEM Gibco+10% FBS (Hyclone) 中培养。在不存在肽和乙醇胺处理的情况下，没有观察到细胞粘着（图中未显示）。图 6 是粘附于用 GRGDS 肽接枝的微型载体上的 HEK293 细胞的图像。简单来说，HEK293 细胞在肽接枝的不同阶段接种在微型载体上。在不存在肽和乙醇胺处理的情况下，没有观察到细胞粘着。

[0158] 在肽接枝的不同阶段，将 MRC5 (ATCC# CCL-171) 细胞接种在微型载体上，在 DMEM Gibco+10% FBS (Hyclone) 中培养。在不存在肽和乙醇胺处理的情况下，没有观察到细胞粘

着（图中未显示）。图 7 是粘附于用 GRGDS 肽接枝的微型载体上的 MRC5 细胞的图像。

[0159] 结果证明使用这些培养条件中使用的微型载体没有毒性。

[0160] 实施例 6 :微型载体制备

[0161] 向装有恒温套和底部排放口、滴液漏斗、锚式搅拌器以及惰性气体鼓气管的 500 毫升反应器中加入 250 克无水甲苯以及 15 克 SPAN 85 乳化剂。将反应器的温度设定在 40℃,该混合物在氩气鼓泡条件下,在 260rpm 的转速下搅拌至少 15 分钟。然后制备包含以下组分的均一混合物:22 毫升去离子水,6.3 克甲基丙烯酸-2-羟乙酯,1.8 克 2-羧基乙基丙烯酸酯钠盐和 0.5 克二羟基亚乙基二丙烯酰胺,该混合物用 NaOH 将 pH 值调节到 8-10。将 0.5 克过硫酸铵溶解在该水溶液中,直至得到透明均一的溶液。然后在 40℃通过滴液漏斗将所述溶液逐滴加入搅拌的甲苯 /SPAN85 混合物。由于形成油包水乳液,该混合物迅速变为乳状。混合 15 分钟之后,将 100 微升的四甲基乙二胺快速加入所述搅拌的乳液中。反应 2 小时之后,将温度冷却至 20℃,通过反应器的底部排放口,将微型载体从反应器中移出。制得的微型载体用丙酮充分洗涤,以除去不溶于水的乳化剂和未反应的材料。在干燥之后,微型载体粉末为白色粉末,可以在 4℃储存,以防微球体发生团聚。

[0162] 在不进行筛分的情况下,用显微镜对微型载体进行观察,发现其为高度的球形,具有可以接受的粒度分布和非常高的透明度。图 8 显示了代表性的图像。

[0163] 实施例 7 :玻璃体结合蛋白-肽接枝

[0164] 采用 EDC/磺基 NHS 介导的接枝,将玻璃体结合蛋白质-肽接枝在如实施例 6 所述制备的微型载体上。简单来说,在 Eppendorf 管子中称取 10 微克干的微型载体,分散在 900 微升的去离子水中。然后加入 100 微升 20mMEDC 和 50mM 磺基-NHS,并静置 30 分钟,以使得羧基团活化。通过离心收集活化的微型载体,用去离子水冲洗三次。然后将其重新悬浮在处于 1000 微升的 pH = 9.2 的硼酸盐缓冲剂的 10mM 玻璃体结合蛋白质肽(参考号 341587 (ID#VN),购自美国加利福尼亚州的美国肽有限公司 (American peptide Company Inc. CA USA),包含以下氨基酸序列:Ac-Lys-Gly-Gly-Pro-Gln-Val-Thr-Arg-Gly-Asp-Val-Phe-Thr-Met-Pro-NH₂ (SEQ ID NO :24)) 中,使其反应 2 小时。通过离心收集微型载体,用 pH 为 7.4 的 1 毫升 PBS 缓冲液洗涤三次。最后,通过用 1 毫升乙醇胺封端 30 分钟,使得过量的活化的酯失活。收集肽接枝并封端的微型载体,用 PBS 冲洗三次。用 PBS 冲洗之后,用体积百分比为 70 : 30 的乙醇 / 水对所述微型载体冲洗两次,在细胞培养之前储存在该乙醇 / 水溶液中。

[0165] 实施例 8 :RGE-肽接枝

[0166] 重复与实施例 7 所述相同的步骤,区别在于,用 RGE-肽(参考号 348454 (ID#RGE),购自美国加利福尼亚州美国肽有限公司 (American peptide Company Inc. CA USA),包含以下氨基酸序列 Ac-Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro-Ile-Ile-Lys-NH₂ (SEQ ID NO :25)) 代替实施例 7 的玻璃体结合蛋白质肽。这些用包含 RGE 核心的肽接枝的微型载体用作阴性对照。

[0167] 实施例 9 :在用玻璃体结合蛋白质-肽以及 RGE-肽接枝的微型载体上进行 HT1080 细胞培养

[0168] 将 HT-1080 细胞 (ATCC# CCL-121) 接种到包含 10% 小牛胚胎血清 (Hyclone) 的 IMDM 培养基 (Gibco) 中。

[0169] 对于粘附实验,在 D-PBS 中对源自实施例 7 和 8 的 10 毫克肽接枝的微型载体进行

洗涤,重新悬浮在不含血清的培养基内,转移到 24 孔的多孔板中。对 HT1080 细胞进行胰蛋白酶消化,计数,将 500,000 个细胞与之前制备的珠粒混合。板在 37°C 培育 1 小时,通过相差显微术观察细胞粘附,参见图 9。通过比较图 A 和图 B 表明,细胞粘附对玻璃体结合蛋白质肽的 RGD 核心具有特异性。

[0170] 实施例 10 :微型载体制备

[0171] 重复实施例 1 的步骤,不同之处在于,搅拌速度为 260rpm。观察到平均粒度为 330 微米(见图 10)。

[0172] 实施例 11 :微型载体制备

[0173] 重复实施例 1 的步骤,不同之处在于,搅拌速度为 300rpm。观察到平均粒度为 210 微米(见图 10)。

[0174] 因此,描述了用来培养细胞的合成微型载体的实施方式。本领域技术人员可以理解本发明公开的实验、组合物、试剂盒和方法可以采用除上述公开之外的其它实施方式实施。本文所述的实施方式是举例说明的目的,而不会构成限制。

<220>

<223> 多肽

<400> 2

Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Arg Ala Tyr

1

5

10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 3

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys

1

5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 4

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 7

Lys	Tyr	Gly	Arg	Lys	Arg	Leu	Gln	Val	Gln	Leu	Ser	Ile	Arg	Thr
1				5					10					15

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 8

Asn	Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Asp	Thr	Arg	Ala	Tyr
1				5					10	

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 9

[0005]

Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Arg Ala Tyr
 1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 10

Lys Tyr Gly Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 11

Lys Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe
 1 5 10 15

<210> 12

[0006]

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> 残基 4 的亮氨酸与残基 13 的天冬氨酸形成酰胺键，以使得多肽环化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> 残基 13 的天冬氨酸与残基 4 的亮氨酸形成酰胺键，以使得多肽环化

<400> 20

Lys Gly Gly Leu Glu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Arg Asp

1

5

10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

[0011]

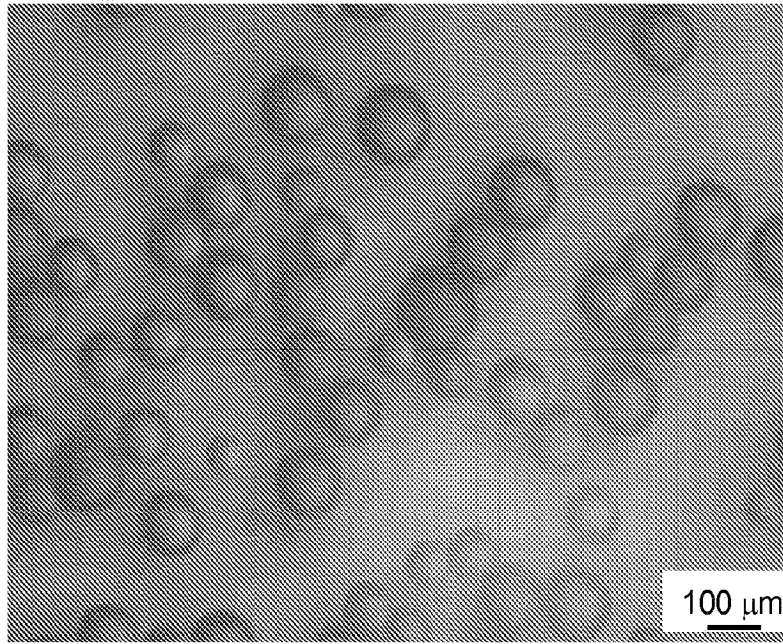


图 1

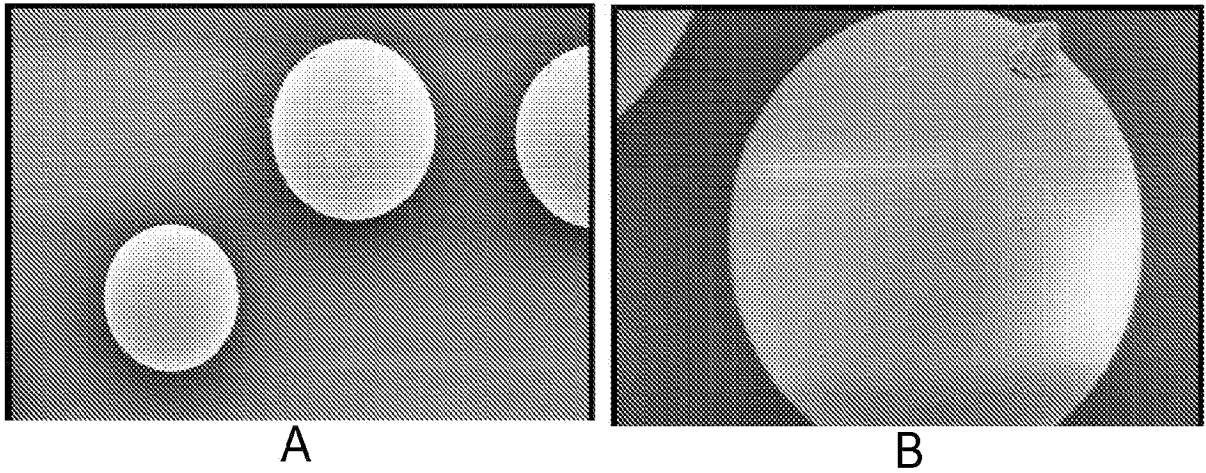


图 2

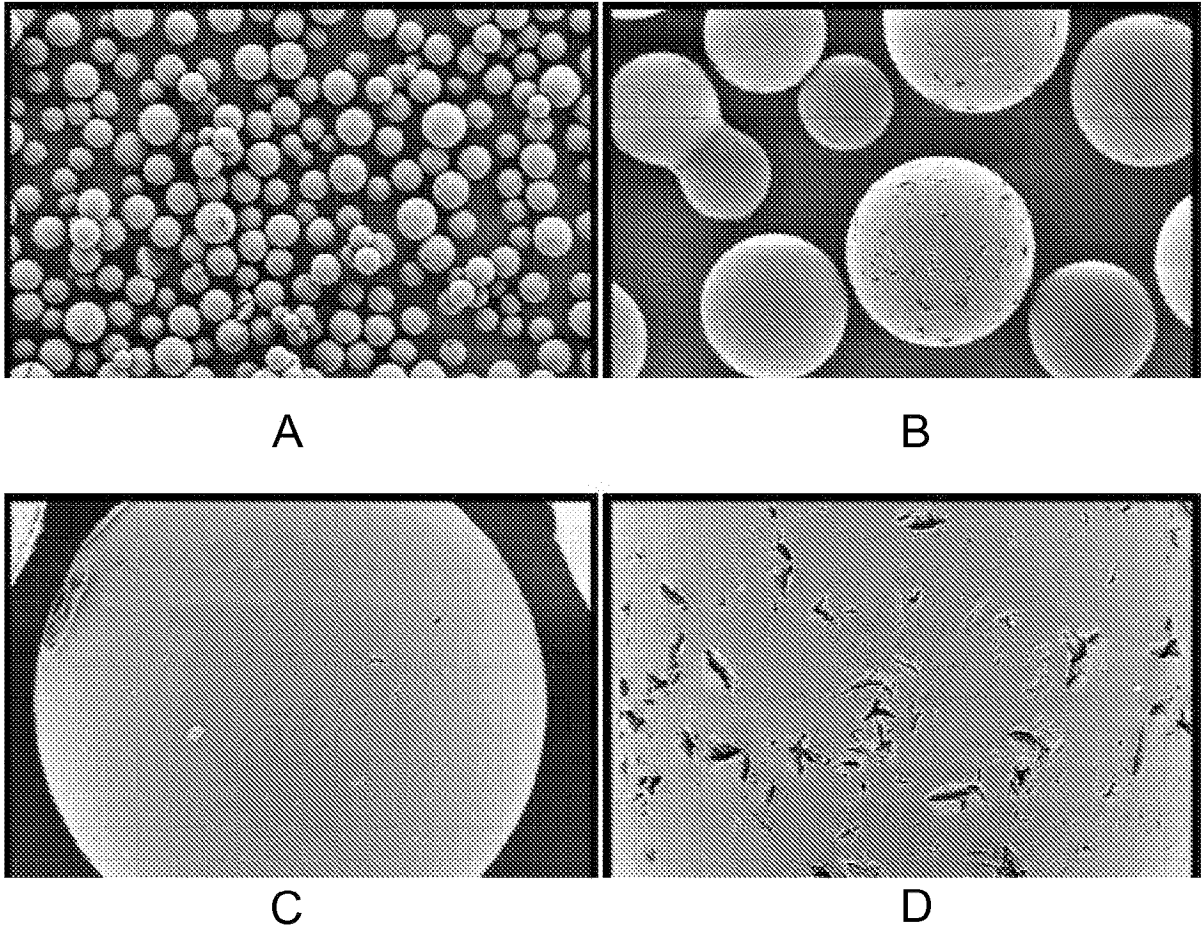


图 3

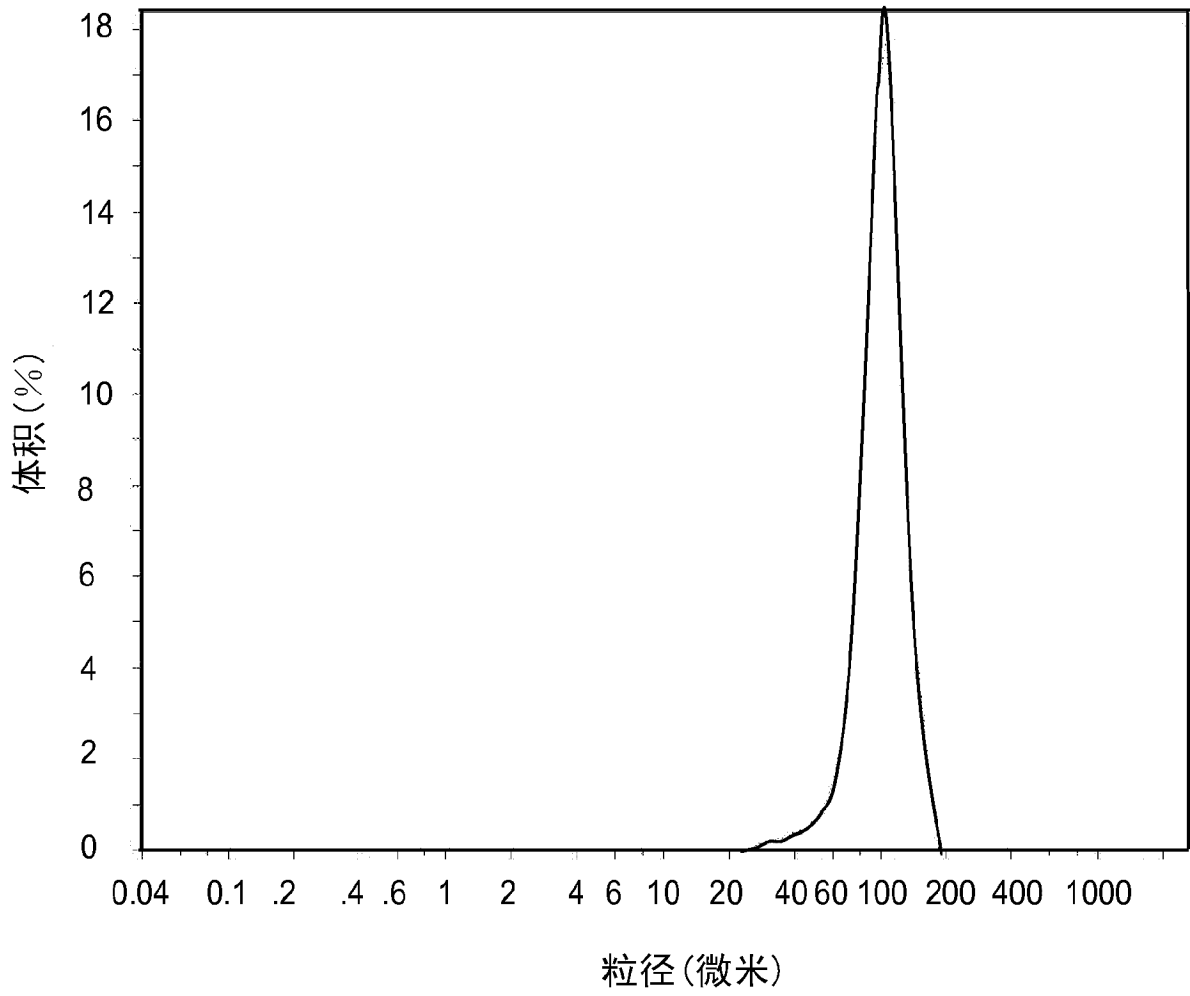


图 4

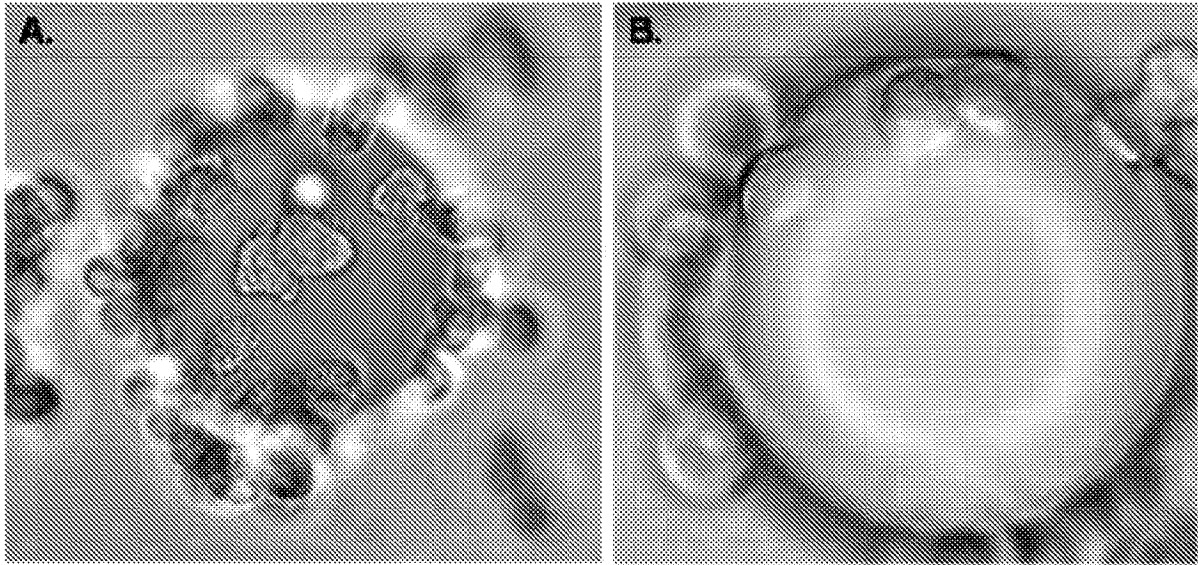


图 5

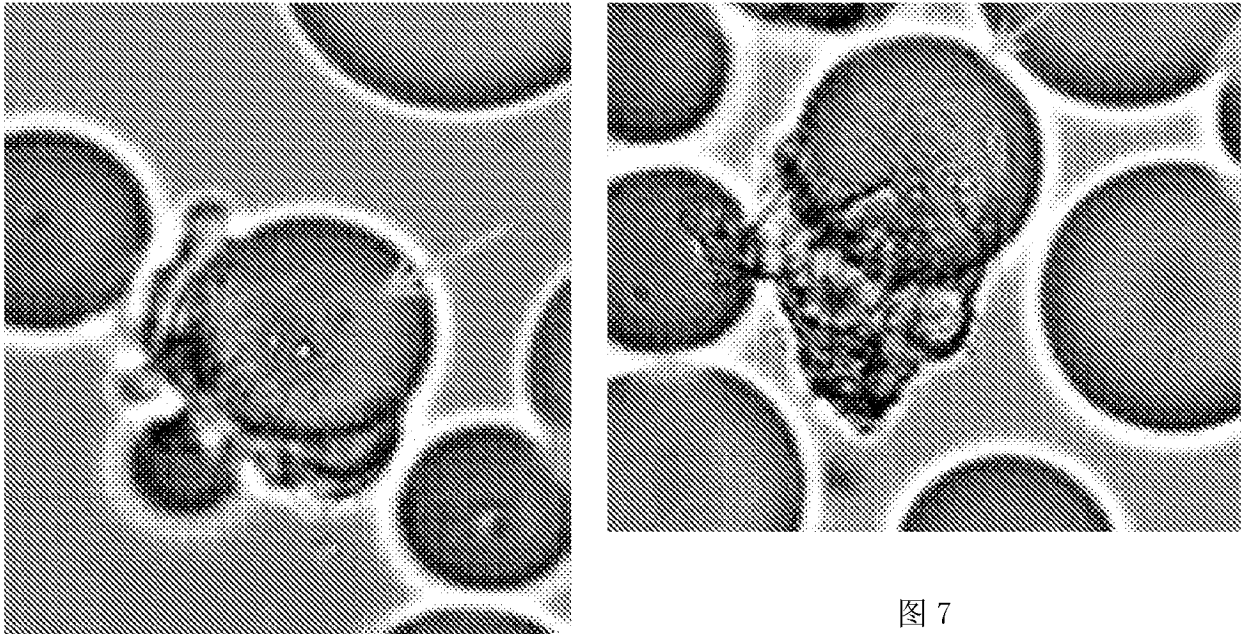


图 6

图 7

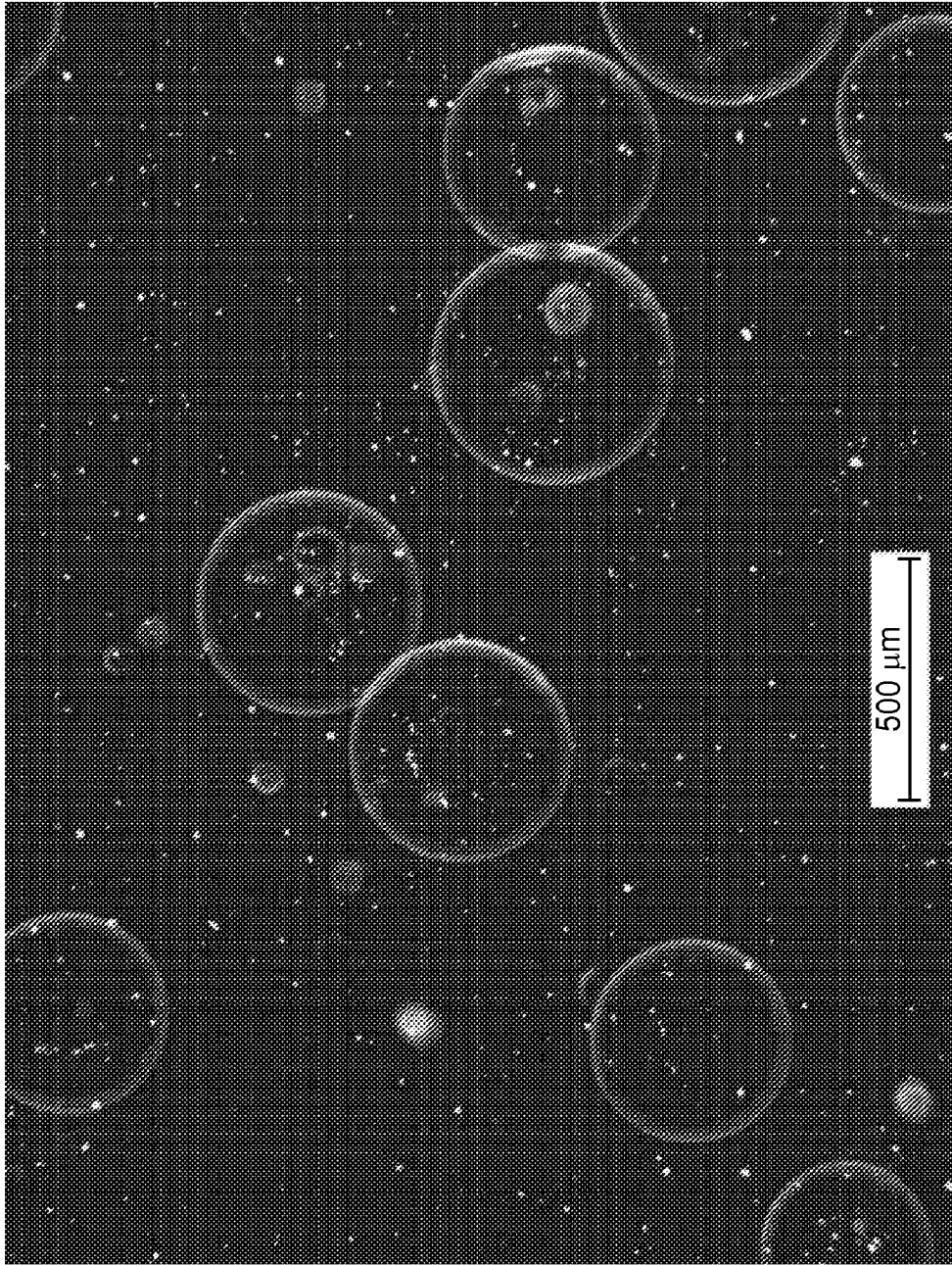


图 8

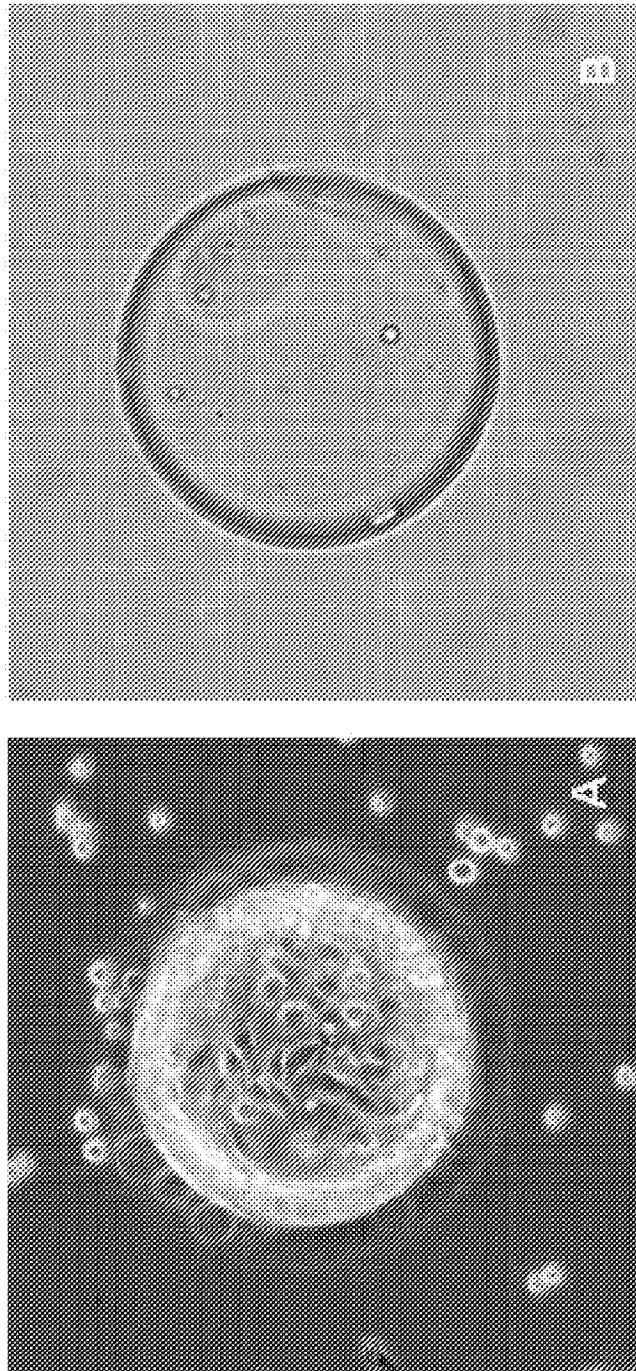


图 9

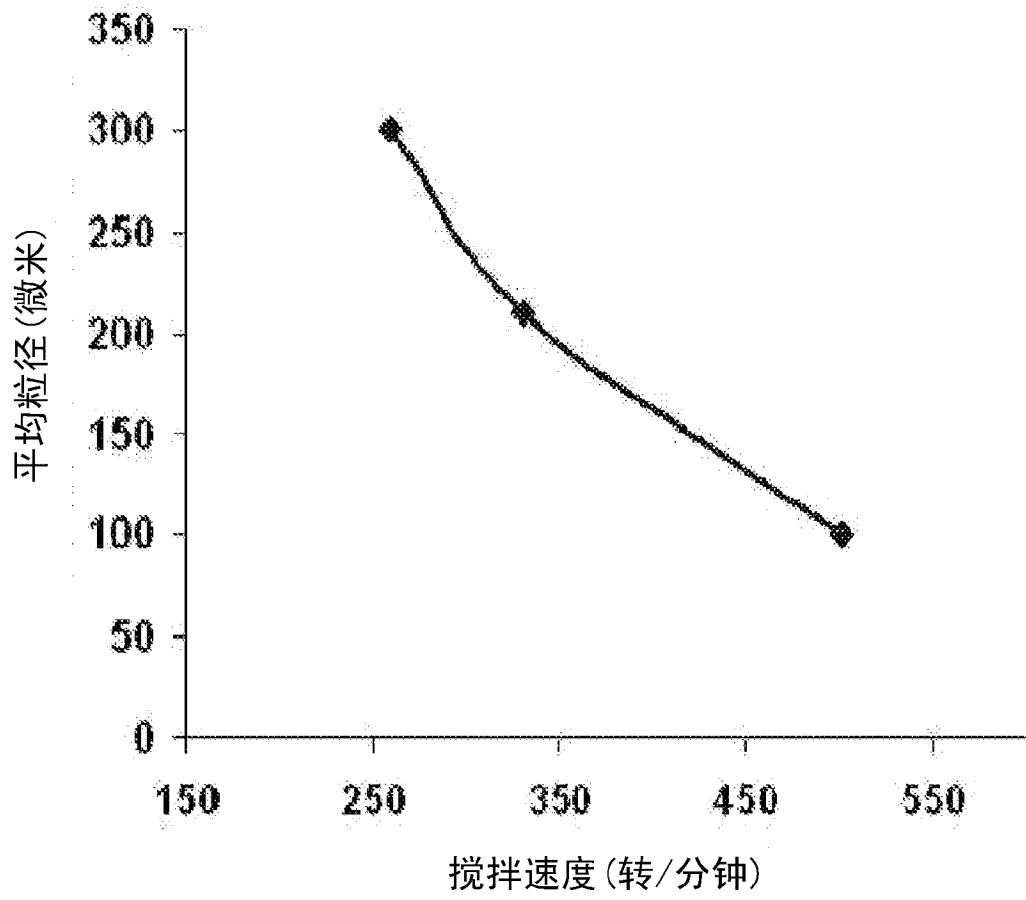


图 10