



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110291189 A

(43)申请公布日 2019.09.27

(21)申请号 201880007148.4

(22)申请日 2018.01.17

(30)优先权数据

62/447,262 2017.01.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/014032 2018.01.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/136500 EN 2018.07.26

(71)申请人 隆萨沃克斯维尔股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 J·A·罗利 Y·聂 T·费尔纳

P·沃尔什

B·艾哈曼迪巴格巴德拉尼

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 余颖 钱文字

(51)Int.Cl.

C12N 5/0735(2006.01)

C12N 5/0775(2006.01)

权利要求书2页 说明书19页 附图8页

(54)发明名称

单细胞人多潜能干细胞的传代和收获制剂

(57)摘要

本发明的领域是细胞和分子生物学以及干细胞。具体地,本公开涉及用于收获和传代单细胞人多潜能干细胞的制剂,所述制剂包含:(i) 1mM至约30mM柠檬酸钠;(ii)包含10mM至170mM KCl或NaCl的盐;和(iii)不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS),其中所述制剂具有约100mOsmol/升至约350mOsmol/升的渗透压。该制剂可以用于连续传代和移出附着于2D组织培养容器或生长于3D悬浮培养物(小规模 and 大规模生物反应器)的多潜能干细胞,或其中需要以单细胞干细胞群传代的任何其他应用。

1. 一种用于收获和传代单细胞人干细胞的制剂,所述制剂包含:
 - (i) 1mM至约30mM柠檬酸钠;
 - (ii) 包含10mM至170mM KCl或NaCl的盐;和
 - (iii) 不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS);其中,所述制剂的渗透压为约100mOsmol/升至约350mOsmol/升。
2. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂的渗透压为约200mOsmol/升至约300mOsmol/升。
3. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂的渗透压为约250mOsmol/升至300mOsmol/升。
4. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述柠檬酸钠的浓度为约5mMol/升至约15mMol/升。
5. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述盐是KCl。
6. 如权利要求5所述的制剂,其中,所述KCl的浓度为约40mMol/升至约150mMol/升。
7. 如权利要求5所述的制剂,其中,所述KCl的浓度为约80mMol/升至约120mMol/升。
8. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂的pH为约7至约8。
9. 如权利要求1所述的制剂,其中,所述制剂的pH为约7.4和7.8。
10. 如权利要求1所述的制剂,其基本上不含酶。
11. 如权利要求1所述的制剂,其还包含人干细胞。
12. 如权利要求11所述的制剂,其中,所述人干细胞选自:胚胎干细胞、体干细胞和诱导型多潜能干细胞。
13. 如权利要求11所述的制剂,其中,所述人干细胞是诱导型多潜能干细胞。
14. 如权利要求11所述的制剂,其中,所述人干细胞是选自下述的组织特异性干细胞:表皮干细胞,血液干细胞,造血干细胞,上皮干细胞,心脏干细胞和神经干细胞。
15. 一种用于收获和后续传代人干细胞(hSC)的方法,所述方法包括:

在细胞培养板或容器中在权利要求1-12中任一项所述的制剂中孵育所述hSC约2分钟至约20分钟,其中所述hSC从所述细胞培养板或容器脱离成为具有约85%和约100%细胞活力的单细胞。
16. 如权利要求15所述的方法,其中,细胞培养板或容器选自:皮氏培养皿,多孔细胞培养板,堆叠的细胞培养装置,细胞培养工房或锥形管。
17. 如权利要求16所述的方法,其中,在生物反应器、3D悬浮培养容器或锥形管中孵育所述hSC。
18. 如权利要求15所述的方法,所述方法还包括:

所述单细胞的下游处理,其中下游处理选自:连续逆流离心技术,配制,自动化装瓶,冷冻保存和高通量筛选,遗传编辑和定向分化。
19. 如权利要求15-18中任一项所述的方法,其中,所述人干细胞选自:胚胎干细胞、体干细胞和诱导型多潜能干细胞。
20. 如权利要求15-18中任一项所述的方法,其中,所述人干细胞是诱导型多潜能干细胞。
21. 如权利要求15-18中任一项所述的方法,其中,所述人干细胞是选自下述的组织特异性干细胞:表皮干细胞,血液干细胞,造血干细胞,上皮干细胞,心脏干细胞和神经干细

胞。

22. 一种优化用于收获和传代单细胞人干细胞的制剂的方法,所述方法包括:

产生用于收获和传代细胞的多个制剂,所述制剂各自包含至少一种 Ca^{2+} 螯合剂和已知的渗透压,并且其中所述多个单细胞传代溶液中的各制剂具有不同的浓度和不同的渗透压,

测试所述多个制剂中的每一个以确定给定处理时间的剥离培养物百分比以及各给定 Ca^{2+} 螯合剂浓度和渗透压的单细胞百分比,和

从所述多个制剂选择优选的制剂。

23. 一种通过权利要求22所述的方法获得的单细胞传代制剂。

24. 一种用于在2D组织培养容器中收获和后续传代单细胞人多潜能干细胞(hPSC)的方法,所述方法包括:用权利要求1-14中任一项所述的制剂以1:5至1:60的分流比传代所述hPSC,其中所述培养物在分流后10天内达到融合。

25. 一种用于在2D组织培养容器中收获和后续传代人多潜能干细胞(hPSC)的方法,所述方法包括:

i) 接种所述hPSC于介质中,

ii) 吸取所述介质,

iii) 用DPBS洗涤所述hPSC,

iv) 向所述hPSC添加权利要求1-12中任一项所述的制剂并孵育1分钟至30分钟,和

v) 将所述hPSC重悬于培养基中。

26. 如权利要求25所述的方法,其中,在将所述hPSC重悬于培养基中之前从所述hPSC去除(iv)的制剂。

27. 一种用于收获和后续传代在3D悬浮生物反应器中以细胞聚集物的形式生长的人多潜能干细胞(hSPC)的方法,所述方法包括:

i) 使用悬浮培养生物反应器在介质中以细胞聚集物的形式培养hPSC,

ii) 将所述hPSC与所述介质分离并移走,

iii) 用DPBS洗涤所述hPSC,

iv) 向所述hPSC添加权利要求1-12中任一项所述的制剂,轻轻搅拌,并孵育1分钟至50分钟,和

v) 将所述hPSC重悬于培养基中。

28. 如权利要求27所述的方法,其中,在将所述hPSC重悬于培养基中之前从所述hPSC去除(iv)的制剂。

单细胞人多潜能干细胞的传代和收获制剂

技术领域

[0001] 本发明的领域是细胞和分子生物学以及干细胞。具体地,本公开涉及用于收获和传代单细胞干细胞(例如,人多潜能干细胞)的制剂,所述制剂包括:(i) 1mM至约30mM柠檬酸钠;(ii) 含有10mM至170mM KCl或NaCl的盐;和(iii) 不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS),其中所述制剂具有约100mOsmol/升至约350mOsmol/升的渗透压(osmolality)。

背景技术

[0002] 人多潜能干细胞(hPSC)包括人胚胎干细胞(hESC)和诱导型多潜能干细胞(iPSC)可以在培养中无限增殖,同时保持分化成多种类型的体细胞的能力。这些细胞是非常重要的,因为它们可以在细胞疗法和再生医学中提供无限的细胞来源。最近FDA批准临床试验证明,基于人胚胎干细胞(hESC)的细胞疗法正在从实验室向临床发展。然而,当前可用的传统组织培养瓶和基于T型瓶的培养平台严重限制了hPSC生产的可放大性。为了释放hPSC在细胞治疗和再生医学中的潜力,必须开发可放大的hPSC制造工艺。扩大现有基于烧瓶的工艺是将当前的hPSC研究转化为临床应用的关键步骤。最大的挑战之一是为大规模3D悬浮培养或多层容器建立可放大的传代方法,以保持高产量,多潜能表型和核型稳定性。

[0003] 人PSC细胞在传代过程中可以经个体化,即成为单细胞而不是簇,以实现均匀分布和统一处理,用于悬浮培养物中的成像、细胞分选和/或细胞聚集物形成。细胞回收和细胞数量以及活力(viability)对于这些过程的成功至关重要。已经开发了各种制剂(例如,酶促解离方法)以在进行单细胞传代时实现最大的细胞活力。然而,hPSC个体化(即,制成单细胞)后存活不佳,因为这些细胞对处理更加敏感并且易于细胞死亡,这使得通用解离方法的研发变得特别具有挑战性。最重要的是,已知一些现有的单细胞解离方法(例如,酶促解离)将影响细胞特征或细胞的遗传稳定性,因为其在处理过程中从细胞表面剥离重要的细胞粘附和细胞-细胞相互作用介导体。培养条件的质量对hPSC的维持和扩增也是至关重要的。与饲养细胞或动物产品相关的介质成分通常极大地影响细胞培养的一致性,当细胞在转化研究中具有潜在应用时这可能会更成问题。

[0004] 如同用于传代簇的传统方法,单细胞hPSC的传代通常基于细胞存活和/或敏感性来选择。传统上,hPSC通常用酶促解离以聚集物传代,对饲养细胞上的培养物使用胶原酶(Thomson JA,等,Science.282:1145-1147(1998);Reubinoff BE,等,Nat Biotechnol.18:399-404(2000)),而无饲养细胞上的培养物体使用分散酶(Dispase)(Ludwig TE,等,Nat Methods.3:637-646(2006))。还开发了机械方法如细胞刮除器和其他传代工具以解离作为聚集物的细胞。这些过程是劳动密集型的,并且不适用于在多层细胞培养容器中培养hPSC,所述多层细胞培养容器是广泛用于生产商业规模的贴壁细胞的平台。多层细胞培养容器中生长的细胞不能进行刮擦。此外,机械刮擦可能会对细胞造成严重损害。没有刮擦的情况下,细胞活力可以增加高达90%。

[0005] 在分化或转染实验中,TrypLE™和ACCUTASE®可以用于使hPSC个体化,但是较差的存活常常导致异常核型(Ellerstrom C,等,Stem Cells.25:1690-1696(2007);Bajpai

R,等,Mol Reprod Dev.75:818-827 (2008);Thomson A,等,Cloning Stem Cells.10:89-106 (2008))。通常,必须使用如Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂的小化学物质以增强该过程中的细胞存活(Watanabe K,等,Nat Biotechnol.25:681-686 (2007))。

[0006] 所有这些方法都需要专门的工具或试剂,并且这些工具或试剂对于长期或大规模实验而言是昂贵的。同时,酶促方法的一致性通常受到批次间酶质量的影响。考虑到这些方法的可变性,特别希望能够找到一种安全、稳定和可重复的方法,该方法不使用酶并且可以维持多潜能干细胞的关键特征而不影响细胞的遗传稳定性。

[0007] 最近,以非酶促细胞剥离溶液(detachment solution)(主要是EDTA(乙二胺四乙酸)溶液)传代hESC已经被一些hPSC实验室所采用并且正在从学术实验室扩展到工业。可商购的用于细胞解离的含有EDTA的溶液之一是**VERSENE®**EDTA,其包含0.55mM EDTA,并且已经被用于收获和传代hPSC。以**VERSENE®**EDTA传代hESC的典型步骤起始于以无Ca²⁺/Mg²⁺缓冲液(杜氏磷酸盐缓冲盐水;DPBS)洗涤培养物,然后在**VERSENE®**EDTA中孵育培养物4-9分钟。然后去除**VERSENE®**EDTA,并且通过使用培养基经由吹打手动软管冲洗(hose)细胞,将细胞以簇的形式从表面物理移走。相较于常规酶处理后刮擦的方法(参见表1),该方法的优势在于(1)其使用非酶促溶液,因此不需要剥离后(post-detachment)洗涤或离析以去除酶,并且(2)其不需要刮擦,用**VERSENE®**EDTA处理的细胞可以被从表面洗脱。如表1所述,经**VERSENE®**EDTA处理并在没有刮擦的情况下剥离的hESC具有较高的剥离后活性并在传代时更快地再次附着于新的培养表面(分钟相对于小时)。

[0008] 表1:收获/传代hESC的方法

[0009]

常规酶促和刮擦方法	VERSENE® EDTA 方法
1. 去除培养基	1. 去除培养基
2. 于胶原酶或 Dispase®中以 37 °C 孵育 2-5 分钟	2. 用一次无 Ca ²⁺ /MG ²⁺ 缓冲液(例如, DPBS)
3. 去除胶原酶或 Dispase®	3. 于 VERSENE® EDTA 以室温孵育 4-9 分钟。
4. 用培养基洗涤 3 次	4. 去除 VERSENE® EDTA
5. 用细胞刮刀将 hESC 从培养基表面刮去	5. 用培养基将细胞从表面软管冲洗下
6. 收集菌落团块(收获)或转移到新鲜的培养皿(传代)	6. 收集细胞簇(收获)或转移到新鲜的培养皿(传代)

[0010] 然而,当应用于多层容器中扩增hESC时,**VERSENE®**EDTA传代/收获方法并不理想。**VERSENE®**EDTA似乎比破坏细胞表面结合更快地破坏细胞-细胞结合。去除**VERSENE®**EDTA后,在六孔板或T烧瓶培养形式中,需要流体剪切力以从表面移出细胞,所述流体剪切力通过用培养基经由手动吹打软管冲洗产生。然而,多层容器中的hESC培养物不能用培养基手动剪切,因为移液管不能被导入容器内。相反,在这种培养形式中,在用培养基替换**VERSENE®**EDTA后,通过剧烈地拍打来移出细胞。机械力(拍打)后立即用培

培养基替换 **VERSENE®**EDTA, 因为 **VERSENE®**EDTA 处理的 hESC 一旦与培养基接触即快速地与表面再次附着。事实上, 在当前现有技术水平下, 仅有可能收获多层细胞工房 (factory) 中全部培养物的 40-70%——极大地影响了这些非常昂贵的细胞的产量。提高产量的一种可能的解决方案不是用培养基替换 **VERSENE®**EDTA, 而是在 **VERSENE®**EDTA 存在的情况下移出细胞。然而, 在这种情况下, 细胞暴露于 **VERSENE®**EDTA 的时间增加, 而这增加了获得核型不稳定集落的风险。此外, 从最终收获物回收并中和 **VERSENE®**EDTA 后的剥离后处理的额外步骤增加了劳动强度。最终, 在 2D 或 3D 中以单细胞连续传代 PSC 时, 使用 **VERSENE®**EDTA 处理的传代并不是可行的选择, 因为 PSC 在暴露于 **VERSENE®**EDTA 后将留存在细胞聚集物或集落中。

[0011] 本文引用各种公开文献, 其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。

[0012] 发明概述

[0013] 本公开涉及用于人干细胞 (例如, 多潜能干细胞) 的收获和传代制剂以及这类制剂的用途。在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和传代单细胞干细胞 (例如, 人多潜能干细胞) 的制剂, 所述制剂包含: (i) 1mM 至约 30mM 柠檬酸钠; (ii) 包含 10mM 至 170mM KCl 或 NaCl 的盐; 和 (iii) 不含 Ca^{2+} / Mg^{2+} 的杜氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS), 其中所述制剂具有约 100mOsmol/升至约 350mOsmol/升的渗透压。

[0014] 在一些实施方式中, 制剂的渗透压为约 200mOsmol/升至约 300mOsmol/升。在一些实施方式中, 制剂的渗透压为约 250mOsmol/升至 300mOsmol/升。

[0015] 在一些实施方式中, 柠檬酸钠的浓度为约 5mMol/升至约 15mMol/升。

[0016] 在一些实施方式中, 盐是 KCl。在一些实施方式中, KCl 的浓度为约 40mMol/升至约 150mMol/升。在一些实施方式中, KCl 的浓度为约 80mMol/升至约 120mMol/升。

[0017] 在一些实施方式中, 制剂的 pH 为约 7 至约 8。在一些实施方式中, 制剂的 pH 为约 7.4 至 7.8。在一些实施方式中, 制剂基本上不含酶。

[0018] 在一些实施方式中, 制剂还包含人干细胞, 例如, 人多潜能干细胞。在一些实施方式中, 人多潜能干细胞选自: 胚胎干细胞、体干细胞和诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中, 人干细胞是诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中, 人干细胞是选自下述的组织特异性干细胞: 表皮干细胞, 血液干细胞, 造血干细胞, 上皮干细胞, 心脏干细胞和神经干细胞。

[0019] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代人多潜能干细胞 (hPSC) 的方法, 所述方法包括: 在细胞培养板或容器中在本文所述制剂中孵育 hPSC 约 2 分钟至约 20 分钟, 其中从细胞培养板或容器剥离的所述 hPSC 为具有约 85% 和约 100% 细胞活力的单细胞。在一些实施方式中, 细胞培养板或容器选自: 皮氏培养皿, 多孔细胞培养板, 堆叠的细胞培养装置, 细胞培养工房或锥形管。在一些实施方式中, 在生物反应器、3D 悬浮培养容器或锥形管中孵育 hPSC。在一些实施方式中, 该方法还包括单细胞的下游处理, 其中下游处理选自: 连续逆流离心技术, 配制, 自动化装瓶, 冷冻保存和高通量筛选, 遗传编辑和定向分化。

[0020] 在一些实施方式中, 本公开涉及优化人多潜能干细胞单细胞传代溶液的方法, 所述方法包括: (i) 生成多个单细胞传代溶液, 各单细胞传代溶液包含至少一种 Ca^{2+} 螯合剂和已知的渗透压, 并且多个单细胞传代溶液中的各单细胞传代溶液具有不同的浓度和不同的

渗透压, (ii) 测试各所述多个单细胞传代溶液以确定给定处理时间的剥离培养物百分比以及各给定 Ca^{2+} 螯合剂浓度和渗透压的单细胞百分比, 和 (iii) 由多个单细胞传代溶液选择优选的单细胞传代溶液。

[0021] 在一些实施方式中, 本公开涉及通过本文所述的方法获得的单细胞传代溶液。

[0022] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代单细胞hPSC的方法, 所述方法包括用本文所述的制剂以1:5至1:60的分流比例对hPSC进行传代, 其中培养物在分流后7天内达到融合。

[0023] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代人多潜能干细胞 (hPSC) 的方法, 所述方法包括: (i) 将hPSC接种到介质中, (ii) 吸取介质, (iii) 用DPBS洗涤hPSC, (iv) 将本文所述制剂添加至hPSC并孵育1分钟至30分钟, 和 (v) 将hPSC重悬于培养基中。在一些实施方式中, 在将hPSC重悬于培养基之前去除 (iv) 的制剂。

[0024] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和传代3D悬浮生物反应器中以细胞聚集物的形式生长的人多潜能干细胞 (hPSC) 的方法, 所述方法包括: (i) 使用悬浮培养生物反应器在介质中以细胞聚集物的形式培养hPSC, (ii) 将hPSC与介质分离并移走, (iii) 用DPBS洗涤hPSC, (iv) 添加本文所述的制剂, 轻轻搅拌, 并孵育1分钟至50分钟, 和 (v) 将hPSC重悬于培养基中。在一些实施方式中, 在将hPSC重悬于培养基之前去除 (iv) 的制剂。

[0025] 附图简要说明

[0026] 图1是体外生成功能性人胰腺β细胞的概述 (Pagliuca等, Cell 159:428-439 (2014)), 包括在阶段0由多潜能干细胞开始的定向分化过程并诱导成定形内胚层、胰腺祖细胞、内分泌祖细胞, 最后形成分泌胰岛素的β胰岛细胞。

[0027] 图2是使用不同的细胞培养系统 (包括介质、基质和传代溶液) 解冻多潜能干细胞并在2D (即孔板或组织培养瓶) 中扩增然后将hPSC传代到3D容器 (Biott旋转器 (Biott Spinner)) 中的试验步骤示意图。

[0028] 图3是 (i) ESSENTIAL 8® 介质 (赛默飞世尔公司 (Thermofisher)) + 重组玻连蛋白 (rVTN)、(ii) NUTRISTEM® 介质 (生物工业公司 (Biological Industries)) + 层粘连蛋白和E-钙粘蛋白L&E-Cad、(iii) 包含L7™ 介质 (隆萨公司 (Lonza)) + L7™ 基质 (隆萨公司) 的L7™ 细胞培养系统、(iv) mTeSR™ 1 介质 (干细胞技术公司 (Stemcell Technologies)) + L7™ 基质 (隆萨公司) 或 (v) ESSENTIAL 8® (赛默飞世尔公司) + (rVTN) 中培养的WA27干细胞平面培养的结果。然后使用 VERSENE® EDTA 溶液 (隆萨公司)、TrypLE™ 溶液 (赛默飞世尔公司) 或如表2所述的制剂3 (“L7F3”) 传代细胞。第1天后以4x放大倍数观察到细胞。P24表示传代24, 而T-75表示组织培养瓶T-75。

[0029] 图4是 (i) ESSENTIAL 8® 培养基 (赛默飞世尔公司) + 重组玻连蛋白 (rVTN)、(ii) NUTRISTEM® 介质 (生物工业公司) + 层粘连蛋白和E-钙粘蛋白 (L&E-Cad)、(iii) 包含L7™ 介质 (隆萨公司) + L7™ 基质 (隆萨公司) 的L7™ 细胞培养系统, (iv) mTeSR™ 1 介质 (干细胞技术公司) + L7™ 基质 (隆萨公司), 或 (v) ESSENTIAL 8® (赛默飞世尔公司) + rVTN 中培养的WA27干细胞平面培养的结果。然后使用 VERSENE® EDTA 溶液 (隆萨公司)、TrypLE™ 溶液 (赛默飞世尔公司) 或如本文所述的制剂3 (“L7F3”) 传代细胞。第3天后以4x放大倍数观察到细胞。

[0030] 图5描述了在2D组织培养瓶中的(i) ESSENTIAL 8®+rVTN基质并用TrypLE™传代,或(ii) ESSENTIAL 8®+rVTN基质并用制剂3(“L7F3”)传代中连续继代培养细胞后以约 0.6×10^6 细胞/mL的浓度在Biott旋转器培养中的Nutristem介质中接种H1细胞的结果。在2D培养中的细胞扩增期间,E8介质补充有100、40或10ng/mL的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。用制剂3(“L7F3”)连续继代培养悬浮培养中的细胞。在第4天后观察到细胞。

[0031] 图6描述了如图5所述的不同细胞介质中2D(组织培养瓶)和3D悬浮培养(Biott旋转器)扩增后,H1细胞定向分化的结果。根据细胞培养条件,细胞显示出与处于分化阶段4的胰腺祖细胞类似的细胞形态。该图像表明,悬浮生长和使用制剂3“L7F3”传代的细胞保持分化成特定细胞谱系的能力(在这种情况下是内胚层)。

[0032] 图7描述了如图5所述的不同细胞介质中在2D(组织培养瓶),3D悬浮培养(Biott旋转器)中扩增,然后定向分化成胰腺祖细胞后,H1细胞各种转录因子(Oct-4、Sox-17、PDX-1和NKX6.1)表达的流式细胞术分析。悬浮生长并使用制剂3“L7F3”传代的细胞保持分化成高水平胰腺祖细胞的能力,所述祖细胞在不存在多潜能干细胞标志物Oct4和早期内胚层标志物SOX-17的情况下表现出高水平双阳性表达PDX-1和NKX6.1。PDX-1和NKX6.1的表达再一次确认使用制剂3“L7F3”在悬浮生长和传代的细胞保持分化成特定细胞谱系的能力。

[0033] 图8描述了在含有制剂3(“L7F3”)的3D培养(Biott旋转器)中使用搅拌并不进行手动吹打的情况下将多潜能干细胞聚集物解离成单细胞悬浮培养物的图像。细胞最初以 0.6×10^6 细胞/mL接种于悬浮培养物中并以细胞聚集物的形式生长。去除细胞培养基后,将聚集物暴露于L7F3传代溶液不同的孵育时间(20分钟、30分钟和40分钟),同时通过60rpm的搅拌保持悬浮。

[0034] 发明详述

[0035] 公开了在不使用酶和/或刮擦由细胞培养容器移出细胞情况下用于将人干细胞(hSC)例如人多潜能干细胞(hPSC)传代成单细胞的制剂和方法。该制剂和方法能够从各种细胞培养容器(包括孔板或组织培养瓶)的表面和3D细胞培养容器中生长的hPSC以单细胞收获细胞。此外,该制剂和方法提供了用于后续传代的收获细胞的高产量和高收获后细胞活力。用本文所述制剂和方法传代的多潜能干细胞保持未分化并表达典型的干细胞标志物,同时保持其分化能力并且可以分化成所有三个胚层中的细胞并产生畸胎瘤,甚至在多轮收获和传代之后。在用制剂传代长时间后,这些hPSC还保持正常的核型。

[0036] 术语“一种”或“一个”当与“包含”在权利要求和说明书中联用时,可表示“一个”,但也与“一个或多个”,“至少一个”和“一个或多个”的意思一致。

[0037] 在整篇申请中,术语“约”用于表示包含用于测定数值的装置/方法的误差的固有差异或存在于研究对象中的差异的值。通常该术语表示视情况而定包括大约或少于1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,16%,17%,18%,19%或20%可变性。

[0038] 在权利要求中使用术语“或”表示“和/或”,除非特别指出仅替代方式,或替代方式互相排除,但公开内容支持仅指替代方式和“和/或”的定义。

[0039] 如本说明书和权利要求中所使用的,术语“包含”(和任何形式的包含,例如“含有”和“含”),“具有”(以及任何形式的具有,例如“有”和“拥有”),“包括”(以及任何形式的包括,例如“囊括”和“括入”)或“含有”(以及任何形式的含有,例如“含入”和“包含”)都是纳入

性或开放性的,并不排除额外的未提到的元素或方法步骤。考虑本说明书中所讨论的任何实施方式可以用任何本发明的方法、系统、宿主细胞、表达载体和/或组合物实现,反之亦然。此外,本发明的组合物、系统、宿主细胞和/或载体可用于实现本发明的方法和蛋白质。

[0040] 术语“例如”及其相应缩写“如”(无论是否用斜体)的使用意味着所引用的特定术语是本发明的代表性示例和实施方式,并不旨在限于所引用或援引的特定示例,除非另有明确说明。

[0041] 本发明提供了以高产量和高传代后细胞活力由2D组织培养容器和3D悬浮培养物收获和后续传代多潜能干细胞为单细胞的方法和非酶促传代制剂。本公开的制剂提供了消除或减少本领域已知方法缺点的用于hPSC的可放大和高产量传代和收获制剂和方法。

[0042] 本公开涉及用于人多潜能干细胞收获和传代制剂以及这类制剂的用途。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单细胞人多潜能干细胞的制剂,所述制剂包含:(i) 1mM至约30mM柠檬酸钠;(ii) 包含10mM至170mM KCl或NaCl的盐;和(iii) 不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS),其中所述制剂具有约100mOsmol/升至约350mOsmol/升的渗透压。

[0043] 术语“干细胞”表示具有成为该组织中其谱系的至少所有分化的细胞类型的能力的细胞。干细胞可以具有区别于其他类型细胞的两个重要特征。首先,它们是非特化的细胞,其通过细胞分裂长时间自我更新。其次,在合适的条件下,它们可以被诱导成为具有特殊功能的细胞,而这可以被认为是分化。本文所用术语“人干细胞”表示可以自我更新并分化成至少一种细胞类型的人细胞。术语“人干细胞”包括人干细胞系,人多潜能细胞(包括人和人衍生的诱导型多潜能干细胞和胚胎干细胞),人多潜能干细胞或人成体干细胞。“多潜能干细胞”可以包括产生全部3个胚层(即内胚层、中胚层和外胚层)的干细胞。本文所用术语“成体干细胞”指胚胎发育完成后源自生物体组织的干细胞,即非胚胎干细胞;这类细胞在本领域中也称为“体干细胞”。在一些实施方式中,人多潜能干细胞是胚胎干细胞或诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中,干细胞是诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中,人干细胞是选自下述的组织特异性干细胞:表皮干细胞,血液干细胞,造血干细胞,上皮干细胞,心脏干细胞和神经干细胞。

[0044] 干细胞可以源自各种组织。例如,干细胞可以来自外胚层(表皮、神经、神经嵴和毛囊);中胚层(心肌,骨骼肌,脐带血,间叶细胞,造血,脐带基质和多潜能成体前体);内胚层(胰岛和肝卵圆细胞);和胚芽(原始胚芽)干细胞。在一些实施方式中,人干细胞是人间叶细胞干细胞。在一些实施方式中,干细胞是多潜能干细胞。在一些实施方式中,干细胞是诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中,人多潜能干细胞源自成纤维细胞或外周血衍生的单核细胞,或脐带血衍生的祖细胞,或骨髓衍生的干细胞或祖细胞。

[0045] 在一些实施方式中,本公开涉及用于传代单个人诱导型多潜能干细胞(iPSC)的制剂,所述人诱导型多潜能干细胞是通过用诱导因子接触人体细胞而产生的干细胞类型,所述诱导因子重编程体细胞以生成iPSC。诱导因子包括至少一个“重编程元件”(也就是指导体细胞去分化的元件)和“表达使能元件(expression-enabling element)”(其能够使重编程元件在体细胞内进入和/或表达)。诱导因子可以是遗传构建体或融合蛋白。

[0046] 当诱导因子是遗传构建体时,该构建体可以具有一个或多个核苷酸序列或其活性片段或衍生物,其编码选自OCT4、SOX2、NANOG、LIN28和C-MYC的一种或多种重编程元件和

Notch途径分子。构建体可以编码多个重编程元件,或者仅可以编码单个重编程元件。单个重编程元件可以编码OCT4、SOX2、LIN28、C-MYC或NANOG中的一个。或者,构建体可以包含2个重编程元件,所述重编程元件选自OCT4和SOX2,或OCT4和NANOG,或SOX2和NANOG,OCT4和LIN28,或LIN28和NANOG,或SOX2和LIN28。构建体可能还包括2个或更多个重编程元件和Notch途径分子的任何组合,所述重编程元件选自OCT4、SOX2、NANOG、LIN28和C-MYC。遗传构建体的表达使能元件可以是慢病毒或附加型载体骨架。

[0047] 人多潜能干细胞的培养与标准哺乳动物细胞培养具有许多相同的方案。然而,在未分化状态下成功培养和维持人多潜能干细胞(hPSC)需要额外考虑以确保细胞保持其自我更新和多潜能性的关键特征。培养哺乳动物细胞需要几种基本技术,包括解冻冷冻原种,在培养容器中接种细胞,改变介质,收获,传代和冷冻保存。作为在产生功能性/特化的细胞中应用人多潜能干细胞的示例,可以在图1中找到生长和分化待用于治疗用途的人干细胞的概述。收获表示收集干细胞用于其预期用途,例如,治疗用途。传代表示从其当前的培养容器中移走细胞并将其转移到一个或多个新的培养容器中。传代需要减少过度拥挤的有害影响并且用于扩大培养。在一些实施方式中,传代包括在将细胞转移至新的容器之前通过移出与容器粘附的细胞将细胞从其当前的容器移走。在一些实施方式中,传代包括通过去除细胞培养基来将多潜能干细胞聚集物从其当前的悬浮培养物(例如,3D培养物或生物反应器)移走,将细胞聚集物暴露于传代溶液,搅拌或混合,并将聚集物解离成单细胞。

[0048] 不同的细胞系具有不同的生长动力学,因此传代的时间和条件在不同细胞系之间变化。然而,通常hPSC在解冻后的前几周内缓慢生长,然后更快,直到生长速率达到平台期。如果正确地培养细胞,那么细胞生长速率可以在许多传代保持在平台期。在一些实施方式中,每天观察本发明的干细胞的生长以建立培养的细胞系的生长模式。

[0049] 在一些实施方式中,在显微镜下评估细胞生长和质量。在一些实施方式中,视觉观察(通过显微镜)可用于确定细胞何时传代和传代的频率。在2D组织培养容器(例如,2D组织培养瓶)中,细胞附着于预先涂有一种或多种蛋白质的培养容器表面,所述蛋白质包括玻连蛋白,层粘连蛋白,钙粘蛋白或本领域已知的其他细胞基质。在2D培养中,健康的、未分化的hPSC集落通常具有明确界定的均一边界,并且集落内的单个细胞看起来是相似的。确切的集落形态在不同的细胞系和培养条件(例如,使用的培养物)不同。本文所用术语“形态”用于描述关于细胞物理外观的一个或多个特征,所述特征区别于给定的细胞类型或状态或使其与给定的细胞类型或状态相似。在一些实施方式中,细胞彼此粘附并在不存在细胞表面附着的情况下在悬浮培养(3D生物反应器)中形成球状或圆形的聚集物。3D培养中的术语“形态”是指细胞的聚集物。

[0050] 人多潜能干细胞通常在个体化(即,制成单细胞)后存活不佳,因为这些细胞对处理敏感并且易于细胞死亡,这使得通用解离方法的研发变得特别具有挑战性。已经尝试了各种制剂以在进行单细胞传代时使细胞活力最大化并使多潜能干细胞扩增。然而,这些制剂通常具有可能影响细胞培养抑制性动物产品,当细胞在转化研究中具有潜在应用时这可能会更成问题。多潜能干细胞传代步骤中用于解离的一些方法包括用胶原酶或分散酶(干细胞技术公司)的酶促解离,或使用TrypLE™和ACCUTASE®(通常导致遗传不稳定或异常核型),机械方法,如细胞刮刀和使用移液管研磨,这经常导致传代后显著的细胞死亡以及不良的活力和产量。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细

胞的制剂,其中所述制剂基本上不含动物产品。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含酶。在一些实施方式中,制剂基本上不含胶原酶,分散酶,TrypLE™和/或ACCUTASE®。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含EDTA。

[0051] 不同的培养条件产生不同类型的分化细胞和变化的生长速率。在一些实施方式中,当下述任何一种情况发生时将干细胞传代:(i) 解冻的细胞是7天、10天、14天、15天、20天或21天龄时,(ii) 当大于约30%,大于约40%,大于约50%,大于约60%或大于约70%的集落大于2000μm时,(iii) 集落过于稠密(大约大于约50%,大于约60%,大于约70%,大于约80%融合),(iv) 悬浮培养中细胞形成大于50μm,大于100μm,大于150μm,大于200μm,大于250μm,大于300μm,大于350μm,大于400μm,大于450μm,大于500μm的细胞聚集物,或(v) 集落表现出分化增加。

[0052] 在本发明的一些实施方式中,本文所述干细胞在传代后存活。本文所用术语“传代后存活”指单细胞在使用本文所述制剂从亲本培养物传代至继代培养物后存活的能力。在一些实施方式中,大于60%,大于70%,大于80%,大于85%,大于90%,大于95%,大于96%,大于97%,大于98%或大于99%的细胞在传代后存活,即保持活力。

[0053] 如本文所述,已发现有助于收获和传代单细胞人多潜能干细胞的制剂。本文所示制剂包含柠檬酸钠。当存在于溶液中时,术语柠檬酸钠可包括柠檬酸的任何钠盐,包括单钠盐,二钠盐和三钠盐,以及钠和弱酸柠檬酸盐。本领域技术人员可以理解的是也可以使用其他I族盐,例如,锂和钾,并且可以认为是钠盐的等同物。

[0054] 虽然不受任何理论束缚,但柠檬酸钠可通过螯合/隔绝Ca²⁺(细胞表面和细胞-细胞结合所需的二价阳离子)来破坏细胞表面键和细胞-细胞结合。设计和开发如本文所述基于柠檬酸钠的制剂和方法以解决常规或大规模hPSC培养和制造过程中的独特挑战。hPSC通常以多细胞簇/聚集物传代。然而,在一些实施方式中,需要将hPSC传代为单细胞,这包括(i) 当单细胞悬浮液对于产生具有均匀大小分布的大量圆形细胞聚集物(聚集物的大小保持在较近的尺寸范围内)十分关键之时,在悬浮培养中连续继代培养细胞,(ii) 当需要细胞的单细胞群以便于通过细胞表征仪器如流式细胞仪或细胞分选机进行计数或处理时,和/或(iii) 开始下游处理时,如用多潜能干细胞的单细胞群的定向分化过程。另一方面,由于hPSC的低克隆效率和核型异常的高风险,通常避免单细胞传代。本文所述的制剂和方法针对一些关键质量参数(例如,活力,产量,剥离后簇大小,可传代能力(passageability)和维持多潜能表型的能力)优化用于收获和传代单细胞hPSC。本文所述制剂和方法可以用于常规实验室实践以减少的劳动强度和处理时间来扩增hPSC培养物。例如,本文所述制剂和方法需要减少的机械刮擦(或不刮擦)以使细胞离开容器表面,并且不需要洗涤和离心细胞收获物以去除用于剥离培养物的试剂。在一些实施方式中,当细胞在不能应用刮擦的多层细胞培养容器中生长时,本文所述的制剂和方法适用于大规模hPSC生产。在一些实施方式中,可以超过90%的活力收获超过90%的多层细胞培养容器中生长的hPSC。在一些实施方式中,当hPSC在可放大的3D悬浮培养中以细胞聚集物的形式生长并解离成单细胞悬浮液时,本文所述制剂和方法适用于连续继代培养hPSC。在一些实施方式中,可以超过90%的活力

收获超过90%的3D培养中生长的hPSC。

[0055] 在一些实施方式中,提供了其他传代和收获制剂,包括含有EDTA和EGTA,除了柠檬酸钠外的其他 Ca^{2+} 螯合剂,或各种 Ca^{2+} 螯合剂的组合的制剂。所有这些试剂(EDTA、EGTA和柠檬酸钠)都是 Ca^{2+} 螯合剂,并且历史上已经用于剥离培养物中的贴壁细胞。如之前所述,一些实验室已经常规使用**VERSENE®** EDTA进行收获/传代hESC;EDTA和EGTA(与胰蛋白酶组合)两者在Thomson等人2008年于苏格兰的罗斯林研究所公开的研究中被用于传代hESC(Thomson等(2008),“使用酶促方法传代的人胚胎干细胞保持正常核型并表达CD30 (Human Embryonic Stem Cells Passaged Using Enzymatic Methods Retain a Normal Karyotype and Express CD30)”,Cloning and Stem Cells,10(1),1-17)。然而,在一些实施方式中,包含EDTA(或EGTA)的传代制剂增加了获得核型不稳定集落的风险。在一些实施方式中,从最终收获物回收和中和包含EDTA(或EGTA)的传代制剂后的剥离后处理的额外步骤增加了劳动强度。在一些实施方式中,本公开提供了不包含EDTA和/或EGTA的收获和传代制剂。在一些实施方式中,本公开提供了包含EDTA和/或EGTA量大幅减少的收获和传代制剂,例如,制剂具有小于0.05mM的EDTA,小于0.01mM的EDTA,小于0.005mM的EDTA或小于0.001mM的EDTA。

[0056] 本文所述适合用于提供能够用于传代的单细胞hPSC的制剂包含浓度为1mM至约30mM,2mM至约25mM,3mM至约20mM或5mM至约15mM的柠檬酸钠。在一些实施方式中,本文所述制剂的浓度为约5mM、约10mM或约15mM。在一些实施方式中,制剂包含浓度为约5mMol/升至约15mMol/升的柠檬酸钠。

[0057] 本文所述制剂包含盐。在一些实施方式中,盐是氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)盐或其组合。在一些实施方式中,盐包含NaCl、KCl、LiCl、 Na_2HPO_3 、 NaH_2PO_3 、 K_2HPO_3 、 KH_2PO_3 和/或 NaHCO_3 。

[0058] 本文所述适合用于提供能够用于传代的单细胞hPSC的制剂包含浓度为10mM至170mM、20mM至150mM、30mM至130mM或40mM至120mM的NaCl或KCl。在一些实施方式中,盐是KCl。在一些实施方式中,KCl的浓度为约40mMol/升至约150mMol/升。在一些实施方式中,KCl的浓度为约80mMol/升至约120mMol/升。在一些实施方式中,盐是NaCl。在一些实施方式中,NaCl的浓度为约40mMol/升至约150mMol/升。在一些实施方式中,NaCl的浓度为约80mMol/升至约120mMol/升。本领域技术人员可以理解的是可以调整盐的浓度以获得所需的渗透压。例如,如果柠檬酸钠(或另一种组分)的浓度降低,那么可以增加盐的量以获得所需的渗透压。同样,如果柠檬酸钠(或其他组分)的浓度增加,那么可以减少盐的量以获得所需的渗透压。

[0059] 本发明的制剂可以使用各种渗透压。如本文所述,调节柠檬酸钠和盐浓度并将制剂的渗透压改变成约100mOsmol/升至约350mOsmol/升提供了可以用于传代单细胞多潜能干细胞,而不是干细胞簇的传代溶液。在一些实施方式中,如本文所述降低渗透压导致hPSC更容易地从容器离解,例如,没有机械刮擦的情况下。在一些实施方式中,制剂的渗透压为约100mOsmol/升至约350mOsmol/升,约125mOsmol/升至约320mOsmol/升,约150mOsmol/升至约300mOsmol/升,约175mOsmol/升至约275mOsmol/升,或约200mOsmol/升至约250mOsmol/升。在一些实施方式中,制剂的渗透压为约250mOsmol/升,约260mOsmol/升,约270mOsmol/升,约280mOsmol/升,约290mOsmol/升,或约300mOsmol/升。在一些实施方式中,

制剂的渗透压为约200mOsmol/升至约300mOsmol/升。在一些实施方式中,制剂的渗透压为约250mOsmol/升至约300mOsmol/升。

[0060] 在一些实施方式中,本发明的制剂包含不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)。杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS)是一种不含钙盐或镁盐的平衡盐溶液,其用于各种细胞培养应用,如在解离、运输细胞或组织样品前洗涤细胞,稀释细胞进行计数,以及制备试剂。细胞解离之前从培养物中冲洗整合剂需要不含钙和镁的制剂。DPBS含有氯化钾(0.2g/l)、无水磷酸二氢钾(0.2g/l)、氯化钠(8.0g/l)和磷酸氢二钠-7-水合物(2.160g/l)。

[0061] 本发明的制剂可以具有各种pH水平。在一些实施方式中,制剂的pH为约7至约8。在一些实施方式中,制剂的pH为约7.4至7.8。

[0062] 在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含动物产品。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含酶。在一些实施方式中,制剂基本上不含胶原酶,分散酶, TryPLE™和/或ACCUTASE®。在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和传代单个人多潜能干细胞的制剂,其中所述制剂基本上不含Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂。在一些实施方式中,制剂基本上不含酶。

[0063] 本文所述的制剂适用于收获和传代单细胞人多潜能干细胞。因此,在一些实施方式中,制剂还包含人多潜能干细胞。在一些实施方式中,制剂还包含人间充质干细胞。在一些实施方式中,人多潜能干细胞选自:胚胎干细胞和诱导型多潜能干细胞。在一些实施方式中,本公开提供了包含制剂(柠檬酸钠的浓度为约1mM至约30mM, KCl的浓度为约10mMol/升至约170mMol/升和不含Ca²⁺/Mg²⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS))和人多潜能干细胞的组合物。

[0064] 使用各种技术和方案培养哺乳动物细胞,包括解冻冷冻原种,在培养容器中接种细胞,改变介质,传代和冷冻保存。图2示出了培养和收获过程的总体概述。在一些实施方式中,本公开涉及用于在2D中收获和后续传代人多潜能干细胞(hPSC)的方法,所述方法包括:在细胞培养板或容器中在本文所述的收获和传代制剂中孵育hPSC约2分钟至约20分钟,其中从细胞培养板或容器脱离的所述hPSC为具有约85%和约100%细胞活力的单细胞。在一些实施方式中,hPSC在收获和传代制剂中孵育约5分钟至约15分钟,或约8分钟至约12分钟。在一些实施方式中,本公开涉及用于从人多潜能干细胞(hPSC)当前的悬浮培养物(例如,3D培养物或生物反应器)收获和后续传代人多潜能干细胞的方法,其通过去除细胞培养基,将细胞聚集物暴露于传代溶液约10分钟至约40分钟搅拌或混合,并将聚集物解离成单细胞。

[0065] 在一些实施方式中,将约0.2mL至约10mL的收获和传代制剂添加至细胞培养板或容器。在一些实施方式中,将约0.5mL至约5mL的收获和传代制剂添加至细胞培养板或容器。在一些实施方式中,将约1mL至约2mL的收获和传代制剂添加至细胞培养板或容器。在一些实施方式中,将约5mL至约10mL的收获和传代制剂添加至悬浮培养容器或生物反应器。在一些实施方式中,将约15mL至约40mL的收获和传代制剂添加至悬浮培养容器或生物反应器。在一些实施方式中,将约50mL至约100mL的收获和传代制剂添加至悬浮培养容器或生物反应器。在一些实施方式中,将约150mL至约500mL的收获和传代制剂添加至悬浮培养容器或生物反应器。在一些实施方式中,将约500mL至约2000mL的收获和传代制剂添加至悬浮培养容器或生物反应器。收获和传代制剂的量可以根据容器的类型和大小调整。

[0066] 在一些实施方式中, 敲击或涡旋细胞培养板或容器以协助从表面移出细胞。在一些实施方式中, 3D悬浮培养中形成的细胞聚集物沉积并使用抽吸器或介质收获线吸取生长培养基。在一些实施方式中, 利用非机械吹打或刮擦从表面移出细胞。在一些实施方式中, 在悬浮培养中使用搅拌, 以在传代制剂存在的情况下将细胞聚集物解离成单细胞。在一些实施方式中, 生物反应器中的搅拌速度为40rpm、50rpm、60rpm、70rpm、80rpm或90rpm。在一些实施方式中, 悬浮生物反应器中细胞聚集物和传代溶液的孵育时间为10、20、30、40或50分钟。在一些实施方式中, 孵育阶段后向收获和传代溶液添加生长培养基。在一些实施方式中, 在添加生长培养基之前不去除本文所述的收获和传代制剂。在一些实施方式中, 孵育阶段后对收获和传代制剂中的hPSC进行离心, 并吸取包含存活和传代制剂的上清液, 并用适当体积的补充有Y-27623 (Y化合物) (Rho相关蛋白激酶 (ROCK) 抑制剂, 马萨诸塞州剑桥的干细胞科技公司) 的生长培养基将沉淀重悬。在一些实施方式中, 收获和传代溶液中的hPSC以100g至300g (例如, 200g) 离心约1至约10分钟, 例如, 约2分钟至5分钟或约3分钟。

[0067] 本领域技术人员已知各种能够用于培养和传代hPSC的各种容器和器皿 (例如, 细胞培养板或容器)。在一些实施方式中, 细胞培养板或容器选自: 皮氏培养皿, 多孔细胞培养板, 堆叠的细胞培养装置, 细胞培养工房, 锥形管, 装有搅拌器或叶轮的不同类型的旋转烧瓶, 或装有叶轮的悬浮培养生物反应器。在一些实施方式中, hPSC在锥形管中孵育。

[0068] 在一些实施方式中, 该方法还包括单细胞的下游处理, 其中下游处理选自: 连续逆流离心技术, 成像, 细胞分选, 配制, 自动化装瓶, 冷冻保存, 高通量筛选, 遗传编辑, 定向分化, 和悬浮培养中的工作, 其中细胞恢复和细胞数量对于成功, 例如, 作为比较克隆选择的基础至关重要。

[0069] 本公开提供了具有适用于收获和传代细胞的特定渗透压的 Ca^{2+} 螯合剂制剂 (例如, 柠檬酸钠) 的用途。本发明的公开内容适用于优化本发明以寻找用于特定细胞类型或特定培养条件的人多能干细胞的单细胞传代溶液。在一些实施方式中, 本公开涉及针对人多潜能干细胞优化单细胞传代溶液的方法, 所述方法包括: (i) 生成多个单细胞传代溶液, 各单细胞传代溶液包含至少一种 Ca^{2+} 螯合剂和已知的渗透压, 并且多个单细胞传代溶液中的各单细胞传代溶液具有不同的浓度和不同的渗透压, (ii) 测试各所述多个单细胞传代溶液以确定给定处理时间的剥离培养物百分比以及各给定 Ca^{2+} 螯合剂浓度和渗透压的单细胞百分比, 和 (iii) 由多个单细胞传代溶液选择优选的单细胞传代溶液。在一些实施方式中, 本公开涉及通过本文所述的方法获得的单细胞传代溶液。

[0070] 在一些实施方式中, 本公开提供了基于参数针对收获和传代单个hPSC优化的制剂和方法, 所述参数诸如高活力、高产量、大剥离后簇尺寸、连续可传代能力以及多潜能表型 (例如, 表达与干细胞通常相关的标志物, 如OCT4、Sox2、Nanog、SSEA4、TRA-1-60和TRA-1-81) 和核型稳定的维持。

[0071] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代单细胞hPSC的方法, 包括用本文所述的制剂以1:5至1:60的分流比例对hPSC进行传代, 其中各培养物在分流后的3至10天内达到融合。在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代单细胞hPSC的方法, 所述方法包括用本文所述的制剂以 2×10^5 细胞/mL至 2×10^6 细胞/mL的接种细胞密度对hPSC进行传代, 其中培养物在分流后的3至6天内达到所需的细胞密度。

[0072] 在一些实施方式中, 本公开涉及用于收获和后续传代人多潜能干细胞 (hPSC) 的方

法,所述方法包括:(i)将hPSC接种到介质中,(ii)吸取介质,(iii)用DPBS洗涤hPSC,(iv)将本文所述制剂添加至hPSC并孵育1分钟至30分钟,和(v)添加hPSC于培养基,例如,将hPSC重悬于培养基中。在一些实施方式中,在将hPSC重悬于培养基之前去除(iv)的制剂(例如,通过过滤或离心)。

[0073] 在一些实施方式中,本公开涉及用于收获和后续传代人多潜能干细胞(hPSC)的方法,所述方法包括:(i)使用悬浮培养生物反应器在介质中培养hPSC,(ii)将hPSC与培养基分离并移走,(iii)用DPBS洗涤hPSC,(iv)添加本文所述的制剂,轻轻搅拌(例如,以30-70rpm的范围),并孵育1分钟至50分钟,和(v)添加hPSC于培养基,例如,将hPSC重悬于培养基中。在一些实施方式中,在将hPSC重悬于培养基之前去除(iv)的制剂(例如,通过过滤或离心)。在一些实施方式中,在将hPSC添加于培养基之前不去除(iv)的制剂。

[0074] 在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其可以用于常规实验室实践以减少的劳动强度和处理时间来扩增hPSC培养物。

[0075] 在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其不需要机械刮擦以从培养容器表面移走细胞并提供用于传代的单个hPSC。在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其使从培养容器表面移走细胞并提供用于传代的单个hPSC所需的机械刮擦减少50%、80%、90%或95%。

[0076] 在一些实施方式中,本公开提供了制剂和方法,其中收获的细胞不需要经洗涤和离心以去除用于从培养容器表面剥离细胞的传代制剂。

[0077] 在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其中可以超过90%的活力收获超过90%的平面或多层细胞培养容器中生长的hPSC。在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其中可以超过90%的活力收获超过92%、超过94%、超过96%或超过98%的平面或多层细胞培养容器中生长的hPSC。在一些实施方式中,本公开提供了制剂和使用方法,其中可以超过90%、超过92%、超过94%、超过96%、超过98%或超过99%的活力收获超过90%的平面或多层细胞培养容器中生长的hPSC。在实施方式的一些方面中,该方法导致从培养容器的表面收获例如至少90%的细胞和至少90%的细胞活力。

[0078] 在一些实施方式中,本公开提供了在这样过程中的制剂和使用方法,所述过程由T型瓶扩增和传代hPSC至多层细胞工房,其中收获和传代不利用任何酶,然后通过连续逆流离心技术(例如,kSep[®]技术)进行下游处理。

[0079] 在一些实施方式中,本公开提供了用于研发hPSC的细胞剥离和细胞分离制剂的制剂和使用方法,其中,传代的细胞是单细胞,并且以给定处理时间剥离和单数化的培养物百分比可以通过渗透压和Ca²⁺螯合剂浓度控制。鉴定的与细胞剥离和细胞个体化有关的两个因素包括Ca²⁺螯合剂浓度和渗透压。

[0080] 在一些实施方式中,本公开提供了这样的制剂和使用方法,其用于在细胞培养容器中本文所公开的制剂或通过本文所公开的方法鉴定的制剂中对悬浮培养(例如,3D生物反应器)中生长的hPSC进行收获和后续传代,持续2至50分钟,使任何hPSC聚集物单数化或使hPSC从表面或微载体剥离,并且细胞活力为约80%至100%。

[0081] 在一些实施方式中,本公开提供了用于收获和后续传代hPSC的制剂和使用方法,其中hPSC以高分流比例传代(1:5至高达1:60;或接种时的细胞密度为约100x 10³/cm²至低至5x 10³/cm²),并且培养物在分流后10天内达到融合。在一些实施方式中,本公开提供了用

于在悬浮培养中收获和后续传代hPSC的制剂和使用方法,其中,hPSC以 2×10^5 细胞/mL至 2×10^6 细胞/mL的接种密度传代,并且培养物在6天内达到最大细胞数量。

[0082] 在一些实施方式中,本公开提供了用于收获和后续传代hPSC的制剂和使用方法,其中hPSC在超过50次传代后保持多潜能性和正常的G-条带(G-banding)核型。

[0083] 在一些实施方式中,本公开提供了选择性剥离和传代单个未分化的hPSC的制剂和方法。

[0084] 在一些实施方式中,本公开提供了用于以高解冻后恢复和再铺板效力收获和后续冻存单个hPSC的制剂和方法。

[0085] 在一些实施方式中,本公开提供了用于在密闭系统中下游处理收获的单细胞hPSC的制剂和使用方法,所述密闭系统包括连续逆流,离心,配制,自动化分配和使用受控速率冷冻器的冷冻保存。

[0086] 在一些实施方式中,本公开提供了用于在不进行刮擦并且基本上不存在活力损失的情况下收获和后续传代人多潜能干细胞的制剂和使用方法。在该实施方式的一个方面,制剂包括,例如,柠檬酸钠,盐和磷酸盐缓冲盐水溶液,其渗透压为约10至170mOsmol/升。

[0087] 本文因此概述,或者说广泛地概述了本发明更重要的特性,从而可以更好地理解下面的详细说明,并且可以理解对本领域的当前贡献。当然,本发明的其他特征将在下文中进一步描述。

[0088] 在该方面中,在详细说明本发明至少一个实施方式之前,应当理解的是,本发明在其应用中并不限于以下说明中所示或下图中所阐述的各部件的构造和排列的详细内容。本发明可以具有其它实施方式并且以各种方式予以实施和执行。另外,应理解的是,本文中使用的措辞和用词是为了描述的目的而不应被认为是限制性的。

[0089] 如此,本领域技术人员将认识到,本公开内容基于的概念可以以容易地用作设计用于实现本发明的多个目的的其他结构、方法和系统的基础。因此,重要的是本发明包括等同构造,只要该等同构造不偏离本发明的精神和范围即可。

[0090] 为了更好地理解本发明、本发明的操作优点以及其应用得到的具体目标,参照附图和说明本发明优选实施方式的描述性事项。

实施例

[0091] 实施例1

[0092] 初步筛选和表征各种非酶促细胞剥离制剂溶液和方法

[0093] 设计一系列新的传代溶液以寻找将协助以单细胞状态由细胞壁剥离hPSC的溶液。之前,已经使用了1mM柠檬酸钠(570mOsmol/kg)的溶液。然而,先前的制剂在细胞剥离时导致簇的形成,和/或需要进一步处理以除去传代制剂。表2列出了一系列新的传代制剂。

[0094] 表2:新的非酶促单细胞传代溶液

[0095]

之前的制剂	1 mM 柠檬酸钠 570 mOsmol/kg
制剂 1	5 mM 柠檬酸钠 270 mOsmol/kg
制剂 2	10 mM 柠檬酸钠 270 mOsmol/kg
制剂 3	15 mM 柠檬酸钠 270 mOsmol/kg

[0096] 测试各种制剂在单细胞状态下剥离hPSC同时保持高活力的能力(数据未显示)。基于生成较大单细胞群的能力,解离/传代后生成较低百分比的聚集物(L7制剂3相较于L7制剂1和2持续生成少于5%的细胞聚集物),较高的活力(L7制剂3相较于L7制剂1和2持续地产生90%的高活力或更高),维持培养中多潜能干细胞的形态,以及以两种不同的PSC系(H1和HEUS8)评估的结果的稳健性,发现制剂3优于制剂1和2。通过将取自解离后细胞悬浮的样品通过Nucleocounter NC-200运行来评估解离后细胞聚集物的活力和数量,所述Nucleocounter NC-200是旨在评估样品中存在的细胞总数量、活力细胞总数量、活力和细胞聚集物/簇百分比的细胞计数机器。

[0097] 实施例2

[0098] 平面培养中比较制剂3与其他解离处理

[0099] 在包含各种介质和基质的不同多潜能干细胞系和细胞培养系统中比较制剂3传代溶液和酶促以及其他非酶促细胞剥离溶液。一个目标是改善由平面容器收获的单细胞hPSC的产量,同时保留之前收获/传代方法的简易性。该筛选包括3种不同的细胞系(H1、WA27和HAD106),4种不同的生长培养基(NUTRISTEM®,生物工业公司;ESSENTIAL 8®介质(“E8介质”),赛默飞世尔科技公司;mTeSR™ 1介质,干细胞科技公司;L7™介质,隆萨公司)和4种不同的基质(层粘连蛋白和E-钙粘蛋白;重组VTN; Matrigel®基质,康宁公司(Corning);和L7™基质,隆萨公司)。下表3列出各种组合。

[0100] 表3

[0101]

细胞系	介质	解离处理	基质
H1	NUTRISTEM®	TrypLE™	层粘连蛋白和 E-钙粘蛋白（按照 Semma 方案）
	E8®介质	制剂 3	rVTN
	mTeSR1™	制剂 3	L7™基质
	L7™介质	制剂 3	L7™基质（逐渐变化 - 2 次传代）
	mTeSR1（对照）	TrypLE™	Matrigel®
WA27	NUTRISTEM®	TrypLE™	层粘连蛋白和 E-钙粘蛋白（按照 Semma 方案）
	E8®介质	制剂 3	rVTN
	mTeSR1™	制剂 3	L7™基质
	E8®介质（control）	VERSENE®	rVTN
	L7™介质	制剂 3	L7™基质
HAD106	mTeSR1™	制剂 3	Matrigel®
	NUTRISTEM®	制剂 3	L7™基质（逐渐变化 - 2 次传代）
	L7™介质	制剂 3	L7™基质（逐渐变化 - 2 次传代）
	NUTRISTEM®（对照）	TrypLE™	HDF
	NUTRISTEM®	TrypLE™	层粘连蛋白和 E-钙粘蛋白（按照 Semma 方案）

[0102] WA27细胞在指定培养基中的平板上培养。然后通过离心从培养基中移走细胞，并从培养容器中吸取介质。然后用无Ca²⁺/Mg²⁺缓冲液（例如，DPBS）以1mL DPBS/10cm²洗涤细胞一次。添加1mL/10cm²的预热传代溶液并以37℃孵育5–15分钟。以5分钟间隔检查细胞。然后敲击/涡旋容器以由表面移出细胞。然后用10mL移液管吹打细胞溶液5次。用等体积的补充有Y化合物的生长培养基淬灭解离。然后将细胞在室温下以200g离心3分钟。吸取上清液，并用适当体积的补充有Y化合物的指定生长培养基重悬细胞。

[0103] 图3显示了指定介质和基质中生长，并使用指定传代制剂（包括实施例1的制剂3）传代的WA27细胞的结果。如传代后第1天拍摄的图像所示，无论细胞培养基（L7介质，ESSENTIAL 8®（E8），NUTRISTEM®和mTeSR™-1）或基质（层粘连蛋白和E-钙粘蛋白；重组VTN；Matrigel®基质或L7™基质）如何，当与酶促传代的TrypLE相比时，使用制剂3传代制剂传代的WA27细胞产生相当的个体化细胞和相当的或较高的细胞附着。versene传代溶液在传代后不能够生成单细胞悬浮液，因为它旨在以细胞簇的形式传代PSC（如图3所示）。通过该试验，相较于TrypLE™和VERSENE®制剂，制剂3的柠檬酸钠溶液令人惊讶地被鉴定为优异的试剂。

[0104] 图4显示了传代后3天的细胞生长。将制剂3用作传代制剂在传代后导致显著更高的细胞生长（相对于使用TrypLE™和VERSENE®传代制剂，通过L7细胞培养系统和E8+

L7™(E8plus L7™) 基质中的更高融合度评估)。

[0105] 不同细胞培养系统中不同传代方法之间的定量比较在表4中证明。相较于酶促传代TrypLE,发现制剂3在解离/传代后产生更优或相当的活力、总细胞数或聚集物百分比。如所预期,Versene传代无法生成单细胞悬浮液。使用Nucleocounter NC-200计数(一种盒式方法)产生活力,解离后细胞聚集物的数量和总活细胞。考虑到关于导致异常核型的酶促传代的问题,制剂3似乎是更安全的非酶促传代溶液,其可以产生可接受的定量结果。

[0106] 表4

[0107]

介质	基质	传代制剂	转换的 VCC	转换的活力	总细胞	%聚集物
NUTRISTEM®	层粘连蛋白和 E-钙粘蛋白 (Lam&E-cad)	TrypLE™	5.38×10^6	105.2	5.38×10^7	5
ESSENTIAL 8®		VERSENE®	分流 1:14	n/a	n/a	n/a
ESSENTIAL 8®	rVTN	制剂 3	5.22×10^6	91.0	2.76×10^7	9
L7™	L7™基质	制剂 3	5.41×10^6	88.9	2.41×10^7	14
mTeSR™-1	L7™基质	制剂 3	5.21×10^6	103.7	5.21×10^7	12

[0108] 基于对多种培养条件和细胞的评估,由H1细胞系产生类似的数据(数据未显示),选择与ESSENTIAL 8®或NUTRISTEM®组合的制剂3传代制剂用于悬浮培养研究中的进一步分析。

[0109] 实施例3

[0110] 悬浮培养(3D,Biott旋转器)中比较制剂3与其他解离处理

[0111] H1细胞在补充有不同水平的bFGF的细胞培养基中在2D培养中生长,然后使用L7制剂3将其转变成悬浮培养物(Biott旋转器)并在相同的细胞培养基中在3D中生长。在2D培养中的细胞扩增期间,E8介质补充有100、40或10ng/mL的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。然后将细胞从培养基中移走并置于50mL锥形管中。将容器Biott旋转器容器用10mL DPBS冲洗并转移至相同的锥形管以转移任何残留的细胞。然后将管在室温下以100g离心1分钟以使细胞沉降。吸取上清液,将细胞重悬于30mL DPBS中。将细胞在室温下再次以100g离心1分钟,并通过抽吸再次去除上清液。

[0112] 添加6毫升预热的制剂3,并在37℃水浴中孵育细胞15-20分钟。每3分钟涡旋管。将管转移到BSC内,并用10mL移液管针对整个体积进行5次吹打。添加20mL生长培养基(含有Y-化合物)以猝灭。然后将细胞在室温下以200g离心5分钟,吸取去除上清液,然后将细胞重悬于20mL补充有Y化合物的生长培养基中。用25mL移液管测量总终体积。然后使用NC-200(一种盒式方法)对细胞进行计数。进行10倍稀释(450μL补充有Y化合物的生长培养基和50μL细胞悬浮液)。在以 0.6×10^6 细胞/mL接种后第4天测定Biott旋转器培养的细胞生长和活力,并示于表5中。使用L7制剂3传代细胞后的结果显示可接受水平的细胞倍数扩增(约4-5倍),培养物中残留聚集物的百分比(6-12%),聚集物大小(直径约150-200微米)。取决于处理,用L7制剂3处理的细胞的活力介于80-84%之间。为了改善活力并降低培养物中剩余的聚集物的百分比,通过增加孵育时间(从15分钟到20、30和40分钟)并在旋转瓶内使用搅拌对用

L7制剂3处理进行进一步优化3,结果总结在实施例5和图8中。

[0113] 表5

[0114]

H1 - 培养系统 - 营养系统旋转器 (Nutrosystem spinners)	传代次数	细胞计数 (总活力) 百万计	倍数扩增	细胞活力 (%活力)	%聚集物	簇直径 (平均)	标准偏差/ 最小值/最大值
E8/rVTN/TrypLE™ 100 ng/ml	45	80.4	4.5	86.5	5	171.29	31.93 96.61 261.88

[0115]

E8/rVTN/TrypLE™ 40 ng/ml	45	85.2	4.7	97.0	2	146.67	23.15 96.07 196.03
E8/rVTN/ 制剂 3 FGF 100 ng/ml	45	74.6	4.1	83.0	12	172.15	43.28 99.08 338.69
E8/rVTN/ 制剂 3 FGF 40 ng/ml	45	85.5	4.8	80.5	12	171.94	40.81 110.77 311.46
E8/rVTN/ 制剂 3 FGF 100 ng/ml	45	74.5	4.1	84.2	6	136.6	42.77 74.82 378.16

[0116] 图5显示了在Biott旋转器培养中的Nutristem介质中以约 0.6×10^6 细胞/mL的浓度接种后在悬浮培养中生长的H1细胞的结果。在3D Biott旋转器中接种之前,细胞在2D组织培养瓶中这样进行连续继代培养:(i) ESSENTIAL 8®+rVTN基质并用TrypLE™传代,或(ii) ESSENTIAL8®+rVTN基质并用制剂3(“L7F3”)传代。在2D培养中的细胞扩增期间,E8介质补充有100、40或10ng/mL的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。用制剂3(“L7F3”)连续继代培养悬浮培养中的细胞,并且图像显示了第4天的H1细胞聚集物。这些图像证明使用制剂3传代H1细胞后,细胞的圆形和球形聚集物在悬浮液中生成。聚集物大小分布根据2D培养中处理和bFGF浓度变化。这些结果证实了在不影响细胞生长或形态的情况下在3D悬浮培养中使用L7F3连续传代hPSC的可行性。

[0117] 实施例4:

[0118] H1 E8平面顶NutriStem biott DD1

[0119] 图6显示了基于图1所示过程定向分化成内胚层谱系的H1细胞结果。经历在不同细胞培养基中的2D(组织培养瓶)和3D悬浮培养(Biott旋转器)中的扩增后,用L7制剂3连续继代培养的H1细胞被用于该定向分化过程(即,分化成内胚层谱系),通过分化第4阶段类似于胰腺祖细胞的细胞的形态所证明。

[0120] 表6显示了针对3D扩增和使用L7制剂3的连续继代培养后定向分化H1细胞的细胞计数活力(cell count viability)、聚集物大小以及各种转录因子(Oct-4、Sox-17、PDX-1和NKX6.1)表达流式细胞术分析的结果。细胞表现出高水平PDX-1和NKX6.1(用于证明胰腺祖细胞阳性表达的两种标志物)和非低水平多潜能干细胞标志物Oct4和早期内胚层标志物SOX-17。

[0121]

	E8/rVTN/ 制剂 3 FGFb 100 ng/ml	E8/rVTN/ 制剂 3 FGFb 40 ng/ml	E8/rVTN/ 制剂 3 FGFb 10 ng/ml	E8/rVTN/ TrypLE™ FGFb 100 ng/ml	E8/rVTN/ TrypLE™ FGFb 40 ng/ml
	37.9	6.52	36.1	39.1	20.2
细胞活力	92.664	89.1	94.932	97.956	95.904
簇直径	186.71±41.44	157.99±48.46	186.54±42.42	209.28±76.17	200.58±55.24
Pdx1%	NA	93.8	96.6	91.7	92.8
NKX6.1%	NA	35.8	62.8	20.8	30.1
Sox17%	NA	2.2	1.4	1.7	2.5
Oct4%	NA	9.1	9.1	12.4	13.5

[0122] 图7、表7和图8描述了在如图5所述的不同细胞介质中在2D(组织培养瓶), 3D悬浮培养(例如, Biott旋转器)中扩增, 以及定向分化成胰腺祖细胞后, H1细胞各种转录因子(Oct-4、Sox-17、PDX-1和NKX6.1)表达的流式细胞术分析。使用制剂3“L7F3”悬浮生长并传代的细胞保持分化成高水平这样的胰腺祖细胞的能力, 所述祖细胞在不存在多潜能干细胞标志物Oct4和早期标志物SOX-17的情况下表现出高水平双阳性表达PDX-1和NKX6.1。PDX-1和NKX6.1的表达再一次确认使用制剂3“L7F3”悬浮生长和传代的细胞保持分化成特定细胞谱系的能力。

[0123] 表7

[0124]

&表达	PDX-1	NKX-6.1	Oct-4	Sox-17
	Iso/靶标/最终	Iso/靶标/最终	Iso/靶标/最终	Iso/靶标/最终
制剂 3 FGF-10	0.8/97.4/96.6%	0.9/63.7/62.8%	0.7/9.8/9.1%	0.8/2.2/1.4%
制剂 3 FGF-40	0.9/94.7/93.8%	1.0/36.8/35.8%	1.0/10.1/9.1%	0.9/3.1/2.2%
制剂 3 FGF-100	0.9/95.4/94.5%	1.0/36.3/35.3%	1.0/6.7/5.7%	0.9/3.1/2.2%

[0125] 表8:FACS总结

[0126]

%表达	PDX-1	NKX-6.1	Oct-4	Sox-17
	Iso/靶标/最终%	Iso/靶标/最终%	Iso/靶标/最终%	Iso/靶标/最终%
Lam FGF-10	0.9/89.8/88.9%	0.8/22.5/21.7%	1.0/10.6/9.6%	0.9/4.0/3.1%
Lam FGF-40	1.0/89.5/88.5%	1.0/18.0/17.0%	0.9/7.0/6.1%	1.0/3.5/2.5%
Lam FGF-100	0.9/89.9/89.0%	1.0/35.5/34.5%	0.9/5.0/4.1%	0.9/2.5/1.6%
VTN FGF-10	1.0/91.9/90.9%	1.0/45.0/44.0%	0.9/8.9/8.0%	0.8/2.9/2.1%
VTN FGF-100	1.0/90.3/89.3%	1.1/35.8/34.7%	1.0/11.6/10.6%	0.9/6.7/5.8%

[0127]

制剂 3 FGF-10	0.8/97.4/96.6%	0.9/63.7/62.8%	0.7/9.8/9.1%	0.8/2.2/1.4%
制剂 3 FGF-40	0.9/94.7/93.8%	1.0/36.8/35.8%	1.0/10.1/9.1%	0.9/3.1/2.2%
制剂 3 FGF-100	0.9/95.4/94.5%	1.0/36.3/35.3%	1.0/6.7/5.7%	0.9/3.1/2.2%
TrypLE™ FGF-40	1.0/93.8/92.8%	1.1/31.2/30.1%	0.8/14.3/13.5%	0.9/3.4/2.5%
TrypLE™ FGF-100	0.9/92.6/91.7%	0.9/21.7/20.8%	0.9/13.3/12.4%	0.9/2.6/1.7%

[0128] 预期正常核型将在大于50次传代时存在。

[0129] 实施例5

[0130] 在不需要手动吹打的情况下将多潜能干细胞传代成3D培养内的单细胞悬液

[0131] 如前所述(参见实施例3),需要进一步优化用L7制剂3的处理以改善活力并降低用L7制剂3解离后剩余的细胞聚集物的百分比。该目标通过增加孵育时间(从15分钟至20分钟、30分钟和40分钟)并在旋转瓶中使用搅拌而不是在单独的管内解离来实现。在这种情况下,通过停止搅拌使3D培养(500mL旋转瓶)中以细胞聚集物形式生长的细胞沉降。然后使用抽吸器吸取介质并在旋转烧瓶中用100mL的制剂3于37℃下孵育20分钟、30分钟或40分钟。将细胞以70rpm搅拌,同时与制剂3一起孵育。取自各培养物的样品和细胞悬浮液使用倒置显微镜观测。在不同处理水平(制剂3处理后与制剂3、旋转和再悬浮后)和不同孵育时间下拍摄图像。图8显示了在不同孵育时间和不同处理水平下使用L7制剂3解离后产生的单细胞悬浮液。这些结果显示了L7制剂3可以经进一步优化以使用40分钟的孵育时间减少培养物中可见聚集物的数量。表9提供了在不同孵育时间观察到的聚集物水平的定性排序,表明40分钟孵育改善了用L7制剂3产生的单细胞百分比。

[0132] 表9:制剂3处理后的聚集物观测

[0133]

样品	制剂 3 孵育时间 (分钟)	制剂 3 处理后	制剂 3 后 + 旋转和再悬 浮	聚集物排序
1	20	是	否	最多
2	30	否	否	中等
3	40	否	否	最少

[0134] 数据表明,使用制剂3传代溶液在3D悬浮培养中解离多潜能干细胞聚集物是可行的,并且可以应用于大规模生物反应器系统。

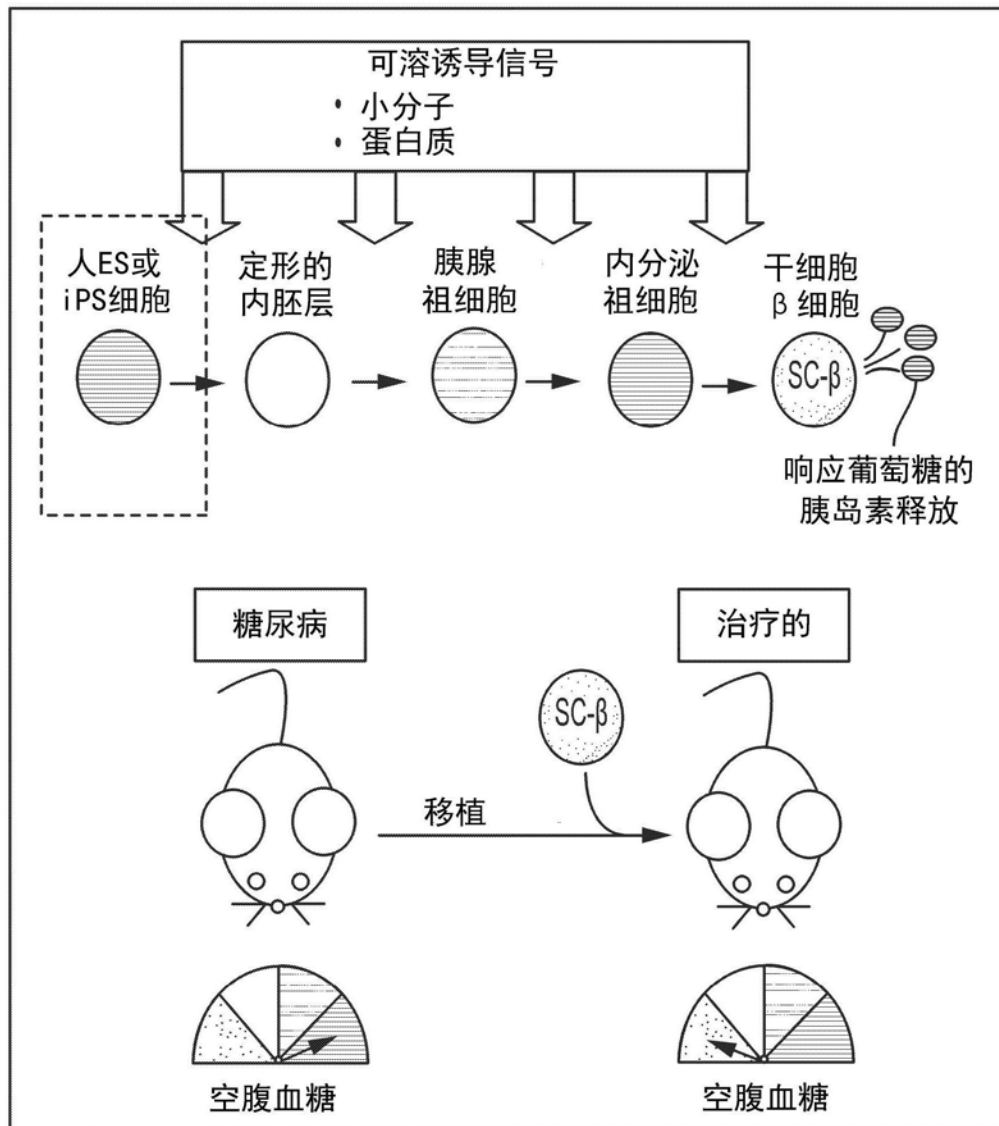


图1

实验步骤

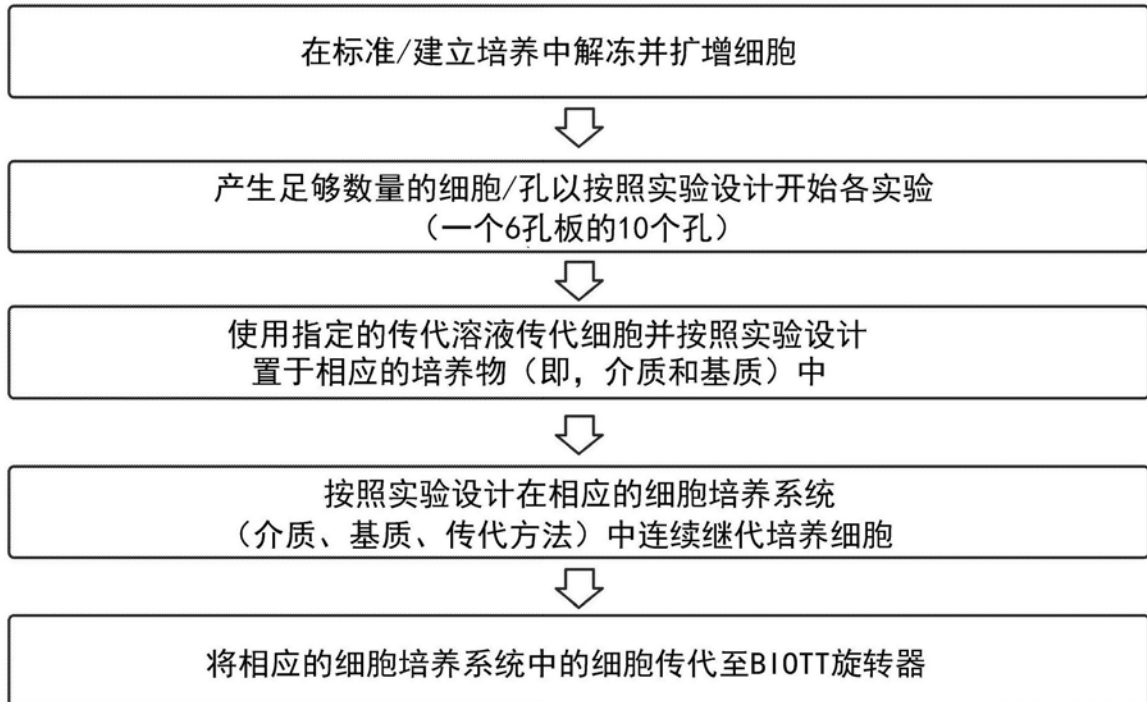


图2

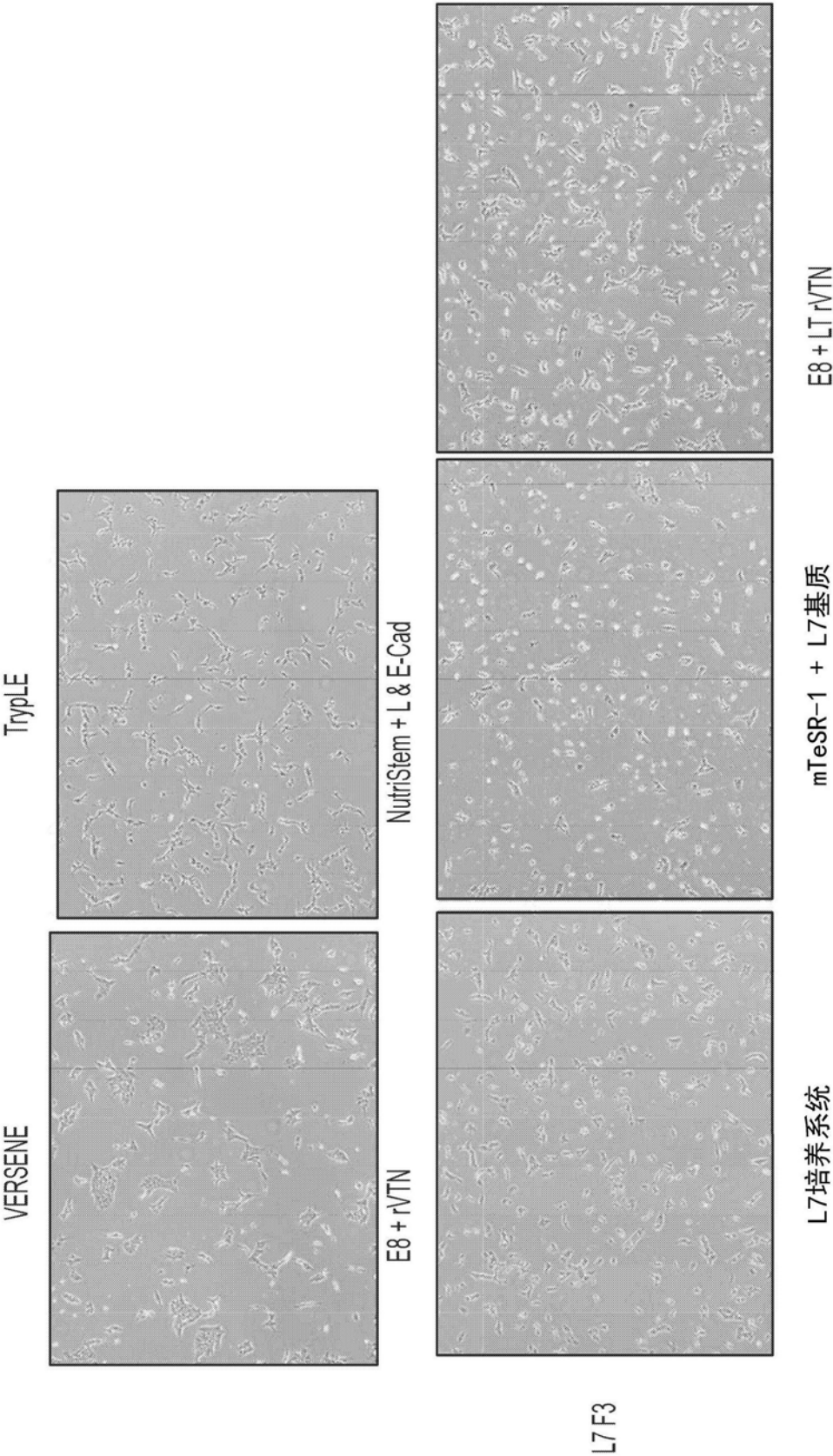


图3

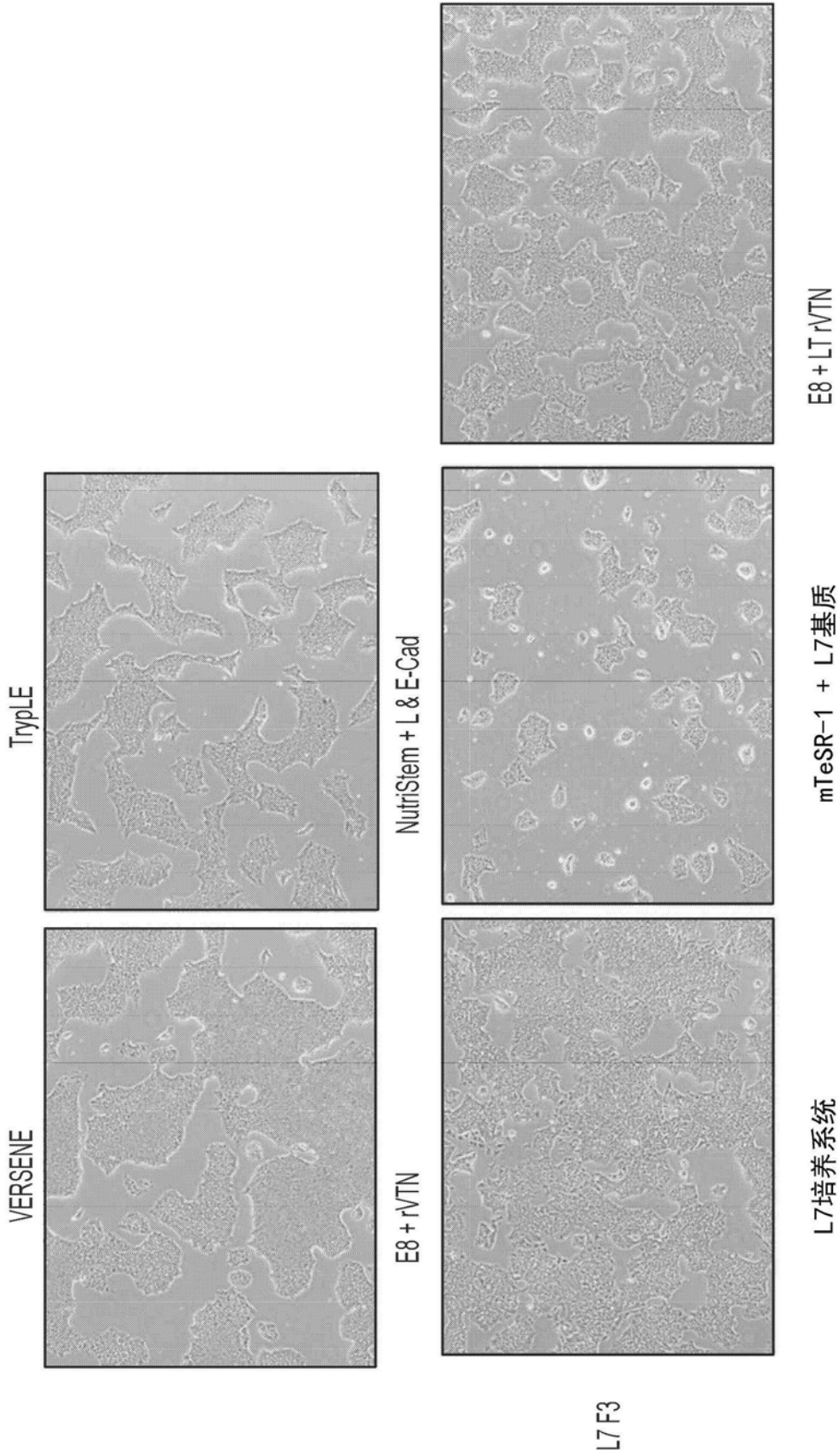


图4

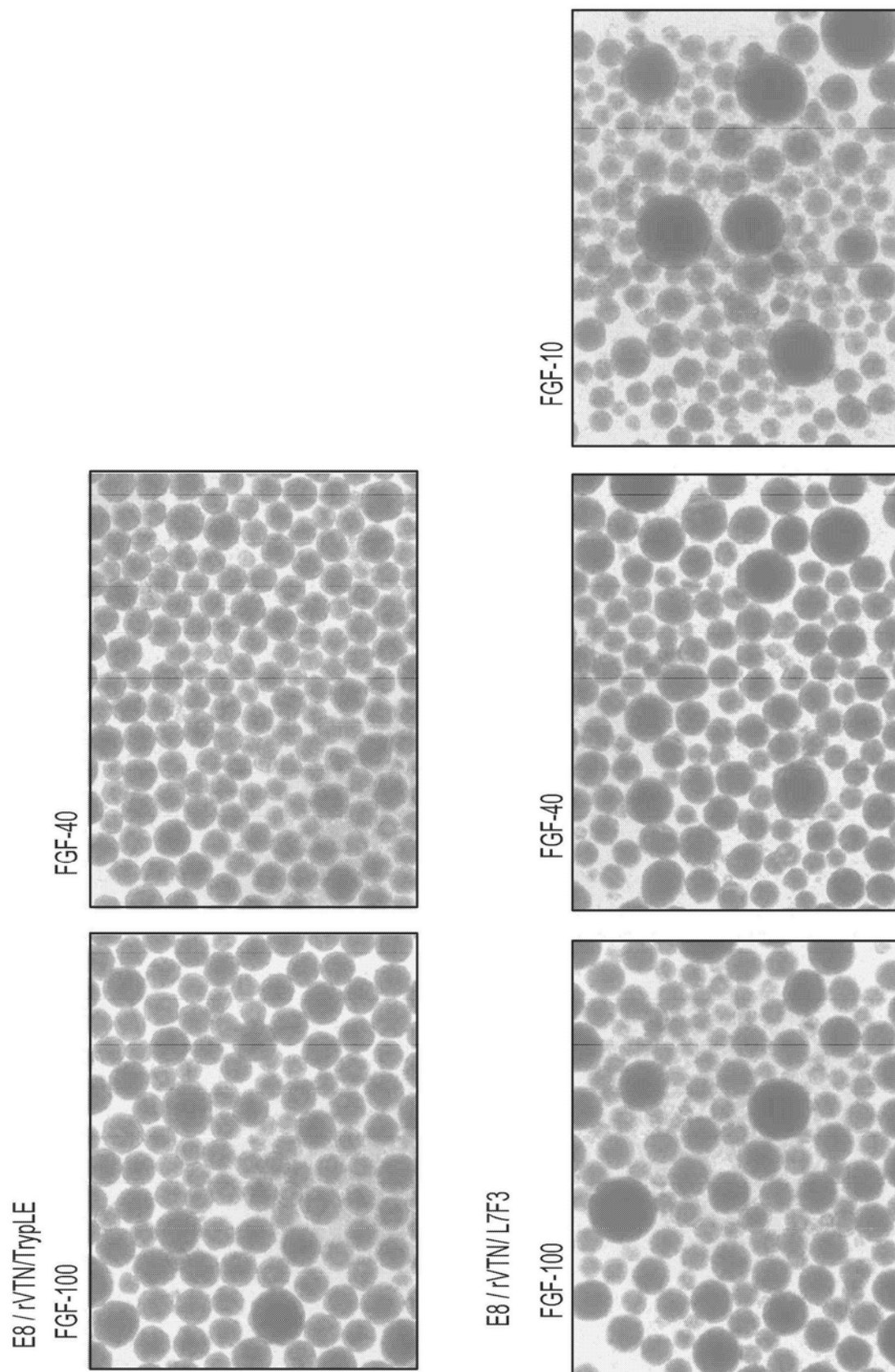


图5

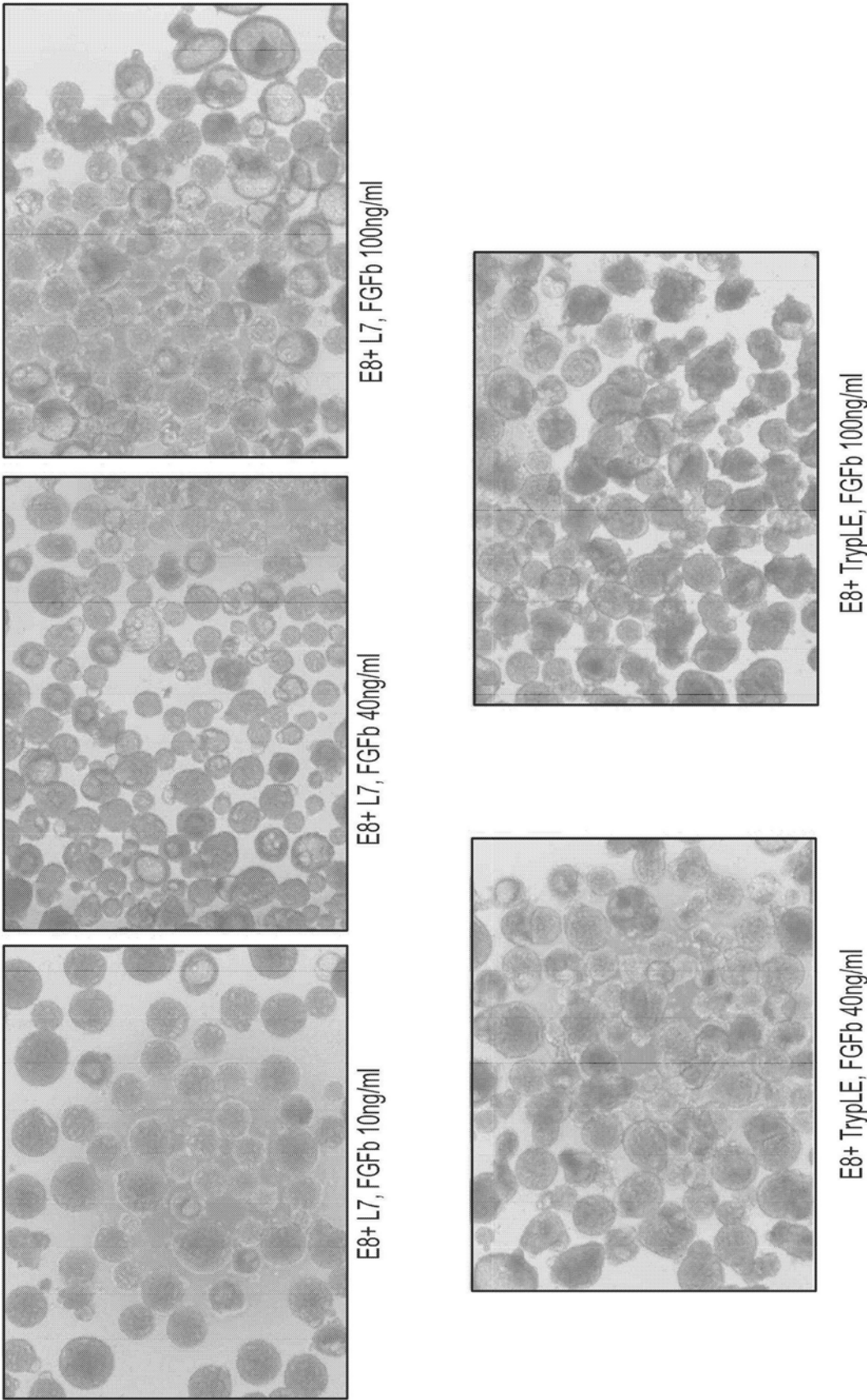


图6

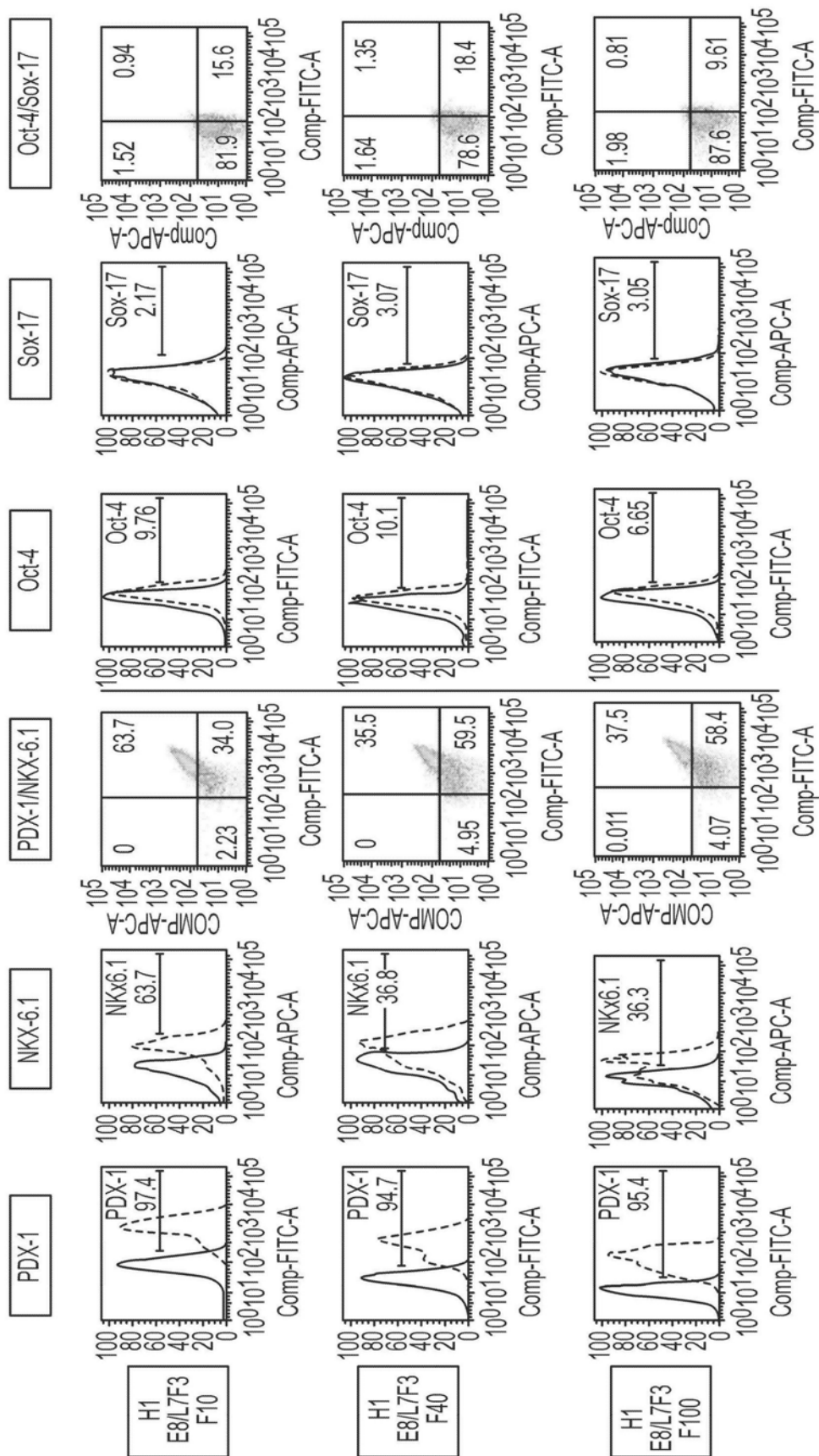


图7

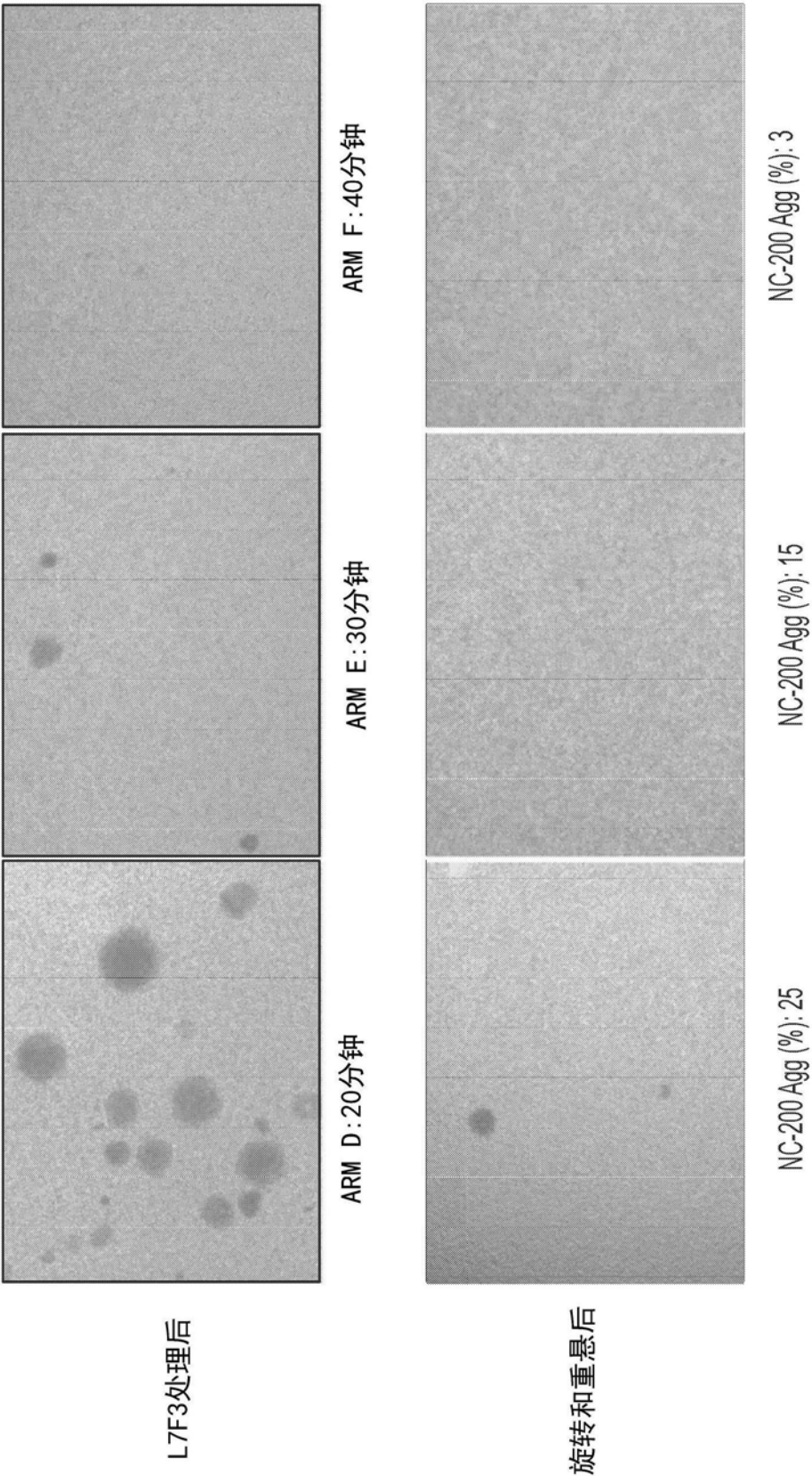


图8