

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018296.8

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月3日

[11] 公开号 CN 101448527A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.5.18

[21] 申请号 200780018296.8

[30] 优先权

[32] 2006.5.19 [33] US [31] 60/801,975

[86] 国际申请 PCT/IB2007/004413 2007.5.18

[87] 国际公布 WO2008/075206 英 2008.6.26

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.19

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 B·P·陈 G·C·-F·陈

H·L·黄 P·T·张

K·S·-E·威 D·陈

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘玥 付磊

权利要求书3页 说明书33页 附图9页

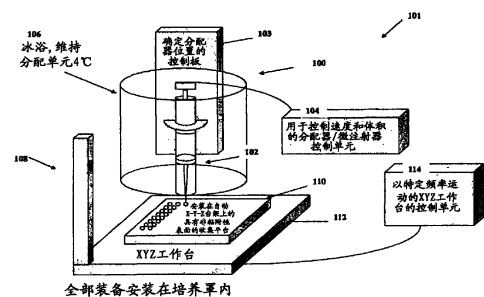
[54] 发明名称

细胞-基质微球, 制备方法和应用

[57] 摘要

使用低形态和机械稳定性的基质或生物材料系统, 开发了生产稳定的细胞-基质微球的方法, 所述微球具有最高100%的胶囊化效率和高的细胞存活率, 其应用包括: 通过微注射或外科植入进行的细胞疗法; 用于体外扩展的3D培养, 不需要用酶促消化或机械解离重复地进行细胞分离; 提高治疗性生物分子的产量; 用于形态发生研究的体外模型。改进的微滴生成法是简单的, 可扩展的, 当所用的基质或生物材料系统浓度低、相变慢、形态和机械稳定性差时仍能生产细胞-基质微球。

用于制备细胞-基质微球的生产装备的示意图



1. 细胞-基质微球，其包含细胞、第一细胞外基质(ECM)，所述基质形成纳米纤维微球，由于细胞外基质的相变，所述微球包埋所述细胞。

2. 权利要求1的微球，其中第一细胞外基质对细胞提供支持，与细胞相互作用，使得细胞在无毒性的条件下生长，并使细胞从微球中迁移以进行生长。

3. 权利要求1的微球，其中第一细胞外基质是胶原。

4. 权利要求1的微球，其中在特定条件下第一细胞外基质可被诱导重建为固体形式，所述条件足够温和以支持细胞存活和生长。

5. 权利要求1的微球，其进一步包含第二细胞外基质，所述第二细胞外基质选自蛋白聚糖和糖胺聚糖(GAGs)。

6. 权利要求5的微球，其中第二细胞外基质由选自软骨、纤维蛋白、弹性蛋白和透明质酸的物质制成。

7. 权利要求5的微球，其中第一细胞外基质可以与活细胞或与第二细胞外基质相互作用，所述相互作用的方式使得体积或容积、细胞外基质密度、细胞密度、机械特性或稳定性发生改变。

8. 权利要求1的微球，其中细胞包括分离自骨髓、皮肤、胃肠道、脂肪组织、胎盘、椎间盘、软骨、肌肉、皮肤、腱、韧带和神经的成熟细胞、间质细胞或干细胞。

9. 权利要求1的微球，其中细胞是来源于骨髓的间质干细胞(MSC)，它是自体的或是来自HLA匹配供体的同种异体的。

10. 权利要求1的微球，其中细胞被基因工程化或经过基因筛选，以生产生物分子。

11. 权利要求1的微球，其进一步包含生长刺激因子，所述因子可选自人血清、富血小板血浆和其他血液制品。

12. 权利要求1的微球，其进一步包含分化因子。

13. 权利要求1的微球，其进一步包含治疗、预防或诊断药剂。

14. 制备微球的方法，其包括：

在促进细胞外基质相变的温度下将细胞外基质与细胞混合并分配，形成细胞-基质微球，

在维持液滴为球形的表面上分配细胞-细胞外基质混合物形成液滴;

加快细胞外基质的相变或凝胶化, 形成细胞-基质微球。

15. 权利要求 14 的方法, 其包括在平台上收集细胞-基质微球。

16. 权利要求 15 的方法, 其包括在分配侧部将组合物维持在 0°C-10°C 的温度下。

17. 权利要求 14 的方法, 其包括将收集平台的温度提高至 25-37°C, 以加快相变一段时间, 所述时间足以使细胞外基质凝胶化, 但不足以使细胞形态发生改变。

18. 权利要求 14 的方法, 其中通过将混合物的温度维持在低至 4°C 使基质的凝胶化速度在凝胶化起始之后立即减慢。

19. 权利要求 14 的方法, 其中通过将混合物的温度提高到 37°C 而在将正在胶凝的基质在收集单元上分配成液滴之后立即加快基质的凝胶化。

20. 权利要求 14 的方法, 其包括:

用最小的机械扰动从收集平台上收集微球;

维持微球在第一介质中自由浮动一段延长的时间, 直至微球的大小基本上恒定; 并且

从第一介质中释放出微球。

21. 权利要求 20 的方法, 其中微球在约 37°C 的温度下维持自由浮动状态约 2 至 7 天。

22. 操作细胞从微球中迁移的方法, 所述微球是如权利要求 1-13 定义的由细胞外基质胶凝化的细胞形成的微球, 所述方法包括以下步骤:

通过将微球铺在培养皿的固体基底上或将微球铺在正在胶凝的基质中或铺在已凝胶化的基质上而对微球提供机械支持;

微球被铺成各微球彼此保持一段距离;

向培养系统中加入第二介质, 用于保持微球;

使细胞从微球中迁移; 并且

在一段延长的时间后从第二介质中释放出微球。

23. 权利要求 22 的方法, 其中迁移出微球的细胞被冷冻保藏或重

新胶囊化。

24. 向动物或人的组织中注入或植入权利要求 1-13 任一项的细胞-基质微球的方法，其包括提供细胞-细胞外基质微球，所述微球处于用于注入或植入组织的药用介质中。

25. 权利要求 24 的方法，其进一步包括将微球注入或植入组织。

26. 权利要求 25 的方法，其中细胞是间质干细胞、软骨形成细胞或分离自组织的细胞。

27. 权利要求 26 的方法，其进一步包括在注入或植入之前诱导细胞分化。

28. 制备生物分子的方法，其包括培养权利要求 1-13 任一项的细胞-细胞外基质微球中的细胞。

29. 用于由细胞外基质和胶囊化细胞制备微球的系统，其包括：

用于将细胞外基质和细胞的混合物分配成液滴的分配单元；

用于收集分配的液滴的收集平台，所述平台具有一个表面，该表面的表面特性使得液滴维持为球形，并且使基质凝胶化形成固体的细胞-基质微球。

30. 权利要求 29 的系统，其进一步包括用于控制分配器的分配速度、体积和位置的控制单元。

31. 权利要求 29 的系统，其进一步包括温度控制单元。

32. 权利要求 29 的系统，其中可通过在适当的时间控制液体环境的温度、pH 和离子强度来起始相变过程。

33. 权利要求 29 的方法，其进一步包括使静态培养容器或生物反应器有规律地搅动、自转或旋转。

细胞-基质微球，制备方法和应用

相关申请的交叉引用

本申请要求 2007 年 5 月 19 日提交的 U.S.S.N. 60/801,975 的优先权。

技术领域

本发明总体上涉及细胞-基质(cell-matrix)微球、相关产品、制备方法和应用。更具体地说，本发明涉及制备细胞-基质微球的方法和固定(immobilizing)活细胞的方法，培养这些细胞的方法和工艺；以更有效和经济的方式用这些微球作为治疗物、作为三维(3D)微载体的方法和工艺，以及制备生物分子（例如治疗性蛋白）的方法和工艺。

背景技术

通过在缺陷部位用微注射针头进行局部注射，基于细胞的疗法提供了最小侵入性途径，为组织修复和再生性医疗提供了可靠的方法。然而，在成功地实现临床应用之前，需要解决一些技术难题，所述技术难题与注射的细胞的定位、长期存活性、宿主组织整合和功能重塑有关（Tatard 等，*Curr. Drug Targets*, 6(1):81-96(2005); Tatard 等，*Biomaterials*, 26(17):3727-37(2005); Pittenger 和 Martin, *Circ. Res.*, 95(1):9-20(2004); Bonaros 等，*Panminerva Med.* 4(1): 13-23(2004)），也与载体的可注射性和机械稳定性有关（Crevensten 等，*Ann. Biomed. Eng.*, 32(3):430-4(2004)）。

微胶囊化是将细胞局限在半透膜或类似固体中。它已被使用了多年，以在同种异体(allogenic)或异种(xenogenic)细胞移植中有助于免疫分离（Uludag 等，*Adv. Drug Deliv. Rev.*, 42(1-2):29-64(2000); Orive 等，*Trends Biotechnol.*, 22(2):87-92(2004)）。藻酸钠在该领域占统治地位，但也可使用其他材料，例如琼脂糖(Batorsky 等，*Biotechnol. Bioeng.*, 92(4):492-500 (2005))和聚乙二醇(PEG) (Nuttelman 等，*Matrix Biol.*, 24(3):208-18 (2005))。上述材料如果未经修饰的话，并不能支持细胞粘

连(attachment)和生长(Grohn 等, *Biotechniques*, 22(5):970-5 (1997); Zimmermann 等, *Biomaterials*, 24(12):2083-96 (2003); Nuttelman 等, *Matrix Biol.*, 24(3):208-18 (2005)), 因此需要补充天然的细胞外基质(例如胶原)加以改良(Grohn 等, *Biotechniques*, 22(5):970-5 (1997); Batorsky 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 92(4):492-500 (2005))。此外, 由于这些系统避免了递送的细胞与宿主组织直接接触, 它们不能使细胞迁移和渗透。这阻止了它们用于再生性医疗和组织工程, 而再生性医疗和组织工程需要细胞水平的宿主-移植物整合。天然细胞外基质(例如胶原、纤维蛋白和透明质酸)是支持细胞生长的合适材料(Yannas, 天然材料, Ratner 等编, *生物材料-医用材料入门(Biomaterials Sciences -An introduction to materials in medicine)*, California, Academic Press, pp.84-93 (1996))。然而, 没有针对这些材料的微胶囊系统, 因为这些材料的机械和形状稳定性差(Yannas, 天然材料, Ratner 等编, *生物材料-医用材料入门*, California, Academic Press, pp.84-93 (1996); Crevensten 等, *Ann. Biomed. Eng.*, 32(3):430-4 (2004); Zhang 等, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 134(1):61-76(2006)), 与现有的微胶囊技术不相容(Uludag 等, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 42(1-2):29-64 (2000))。

现有的微胶囊技术包括用油相形成乳液, 用定制(custom-made)微滴生成器在搅拌的收集浴液(bath)中生成含细胞的微滴, 或用微注射器将细胞注射到预先形成的基质微球或微囊中 (Grohn 等, *Biotechniques*, 22(5):970-5 (1997); Batorsky 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 92(4):492-500 (2005))。然而, 当基质材料浓度低时, 这些方法会遇到问题, 或者对于例如胶原凝胶或透明质酸凝胶而言形状和机械稳定性差。首先, 形成的细胞-基质微滴或乳液难以抵抗在乳化过程中搅拌或在液体收集浴液中搅拌产生的剪切应力。其次, 在加入细胞-基质相之后立即需要搅拌, 以在乳化过程中与油相充分混合, 并且在微滴产生过程中防止细胞-基质微滴融合在一起。如果基质的相变需要较长时间, 并且分裂微球, 会使细胞-基质微球得不到足够的形成时间, 导致胶囊化效率降低。

生物技术普遍采用具有生物合成能力的活的生物体进行有用生物分子(例如治疗性蛋白)的大的、工业规模的生产。虽然大肠杆菌和

酵母已被用于此目的，但所得到的分子可能与天然产物不同，因为这些微生物缺少同时(co-)和在后修饰机制。因此，对蛋白和疫苗而言，哺乳动物细胞是特别好的来源。在悬液中培养细胞可获得高的效率、降低成本，有利于大量生产治疗性蛋白。然而，不是所有细胞都能在悬液中成功生长，只有例如杂交瘤和肿瘤细胞的细胞才可以。微载体技术已被开发了几十年，以通过提供显著增加的表面积实现大规模的3D培养，这对于贴壁依赖型真核细胞是特别有利的。早至70年代微载体就已被用于大规模细胞培养。第一代微载体CYTODEX®（带有阳离子表面的葡聚糖微球）通过显著提高细胞结合的总表面积，被用于扩大细胞培养。该技术在80年代得到发展，包括了胶原包被的葡聚糖微珠，使细胞更好地粘附和生长，得到更高产率。有这样一个趋势，即用细胞的天然细胞外基质包被固体微载体或与之混合，例如胶原包被的藻酸微珠(Grohn等, *Biotechniques*, 22(5):970-5 (1997))、明胶(gelatin)包被的聚乳酸-乙醇酸(PLGA)微珠(Voigt等, *Tissue Eng.*, 8(2):263-72 (2002))和明胶-几丁质组合物微珠(Li等, *Biotechnol. Lett.*, 26(11):879-83 (2004))，或者与主导细胞粘附(adhesion)和粘连的天然肽序列交联，例如RGD修饰的聚乙二醇(Nuttelman等, *Matrix Biol.*, 24(3):208-18 (2005))，以促进细胞粘附和生长。这导致开发出了新一代的微载体CULTISPHER®，该微载体或者是实心的(Liu等, *Cell Transplant*, 13(7-8): 809-16 (2004))或者是多孔的(Bancel和Hu, *Biotechnol. Prog.*, 12(3):398-402 (1996))明胶微珠；以及CELLAGEN®，它是多孔的胶原微珠(Overstreet等, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 39(5-6):228-34 (2003))。然而，这些系统使用了技术上要求高的制备微珠的技术，使得商业制造的成本很高。微珠的制造必须与细胞粘附过程分离，因为大多数微珠制造系统采用了细胞无法存活的严苛的条件，例如高温、冻干、有机溶剂提取和化学交联处理。此外，细胞粘连过程是微载体培养系统的限速步骤(Sun等, *J. Biosci. Bioeng.*, 90(1):32-6 (2000))，要求延长培养时间以使细胞与固体表面粘连或使细胞渗透到多孔微珠中(Bancel和Hu, *Biotechnol. Prog.*, 12(3):398-402 (1996))。因此，使用天然细胞外基质材料的简化的微珠制备过程会提高微载体培养系统的效率、降低成本，所述简化的微珠制备过程不需要严苛的生

产条件和长时间的细胞粘连过程。

人们一般认为 3D 培养为以不加限制的方式(Geserick 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 69(3):266-74 (2000))、大量地(Durrschmid 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 83(6):681-6 (2003))快速繁殖细胞提供了平台。然而, 活跃地、未受限地繁殖的细胞的生产率通常很低, 因为这些细胞在它们的组织特异性微环境之外可能不会以最高速率来合成蛋白, 而且在活跃繁殖的细胞中, 大多数代谢能量消耗在再生上而不是合成上(Sanchez-Bustamante 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 93(1):169-180 (2005))。通常用受控繁殖技术来提高细胞的蛋白生产率(授予 Bailey 等的美国专利 No. 6,274,341; Wurm, *Nature Biotechnol.*, 2(11):1393-1398 (2004)), 所述受控繁殖技术例如使细胞缺乏必需营养素或添加 DNA 合成抑制剂(Suzuki 和 Ollis, *Biotechnol Prog.*, 6(3):231-6 (1990)), 分离特定的细胞系例如温度敏感型 CHO 细胞(它在温度变为 39°C 时产生更多的蛋白)(Jenkins 和 Hovey, *Biotechnol Bioeng.*, 42(9): 1029-36 (1993)), 以及对生长循环控制基因进行基因操作, 例如过表达肿瘤抑制物基因 p53(Kastan 等, *Cancer Research*, 51: 6304-11 (1991)), p21 (Watanabe, *Biotechnol Bioeng.*, 77: 1-7 (2002))和 p27 (Coats 等, *Science*, 272:877-80 (1996))。然而, 这些繁殖控制策略导致细胞活性降低(Mercille 等, *Cytotechnology*, 15(1-3):117-28 (1994))并且细胞凋亡增加(Ko 和 Prives, *Genes Den*, 10(9): 1054-72 (1996))。细胞循环控制肿瘤抑制物与抗细胞凋亡基因(例如 bcl-2)的共表达已被用于改进细胞活性问题(授予 Bailey 等的美国专利 No. 6,274,341)。然而, 该系统要求对载体(vector)系统进行复杂的设计, 以及复杂的基因操作, 该操作从内部干扰了细胞代谢。此外, 通过使用外部抑制剂-四环素开关系统(Mazur 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 65: 144-150 (1999)), 实现了对双相繁殖和生产循环的自调节控制, 以当达到最适细胞密度时, 保持可诱导的生长阻滞(growth-arresting)生产相, 这样可以达到长达 7 天的增加生产率的更长时间窗。该系统的优点包括使用外部药剂, 不会干扰细胞的总体代谢, 但问题在于消除抗生素的下游纯化步骤、由基因操作带来的基因不稳定性以及培养物中的四环素不稳定性。近来, 已开发了使用挂滴(hanging-drop)法的 3D 多细胞微组织培养, 其在哺乳动物细胞中增加

了蛋白生产率(Sanchez-Bustamante 等, *Biotechnol Bioeng.*, 93(1): 169-180 (2005))。

因此, 本发明的一个目的是提供制备细胞微载体的方法以及所得的细胞基质微载体, 所述方法相对便宜、有效, 并且有利于细胞存活、受控繁殖和生物分子的生产。

本发明的另一个目的是提供用于细胞疗法、组织工程和制造生物分子的方法。

发明概述

使用低形态和机械稳定性的基质或生物材料系统, 开发了生产稳定的细胞-基质微球的方法, 所述微球具有最高 100%的胶囊化效率和高的细胞存活率, 其应用包括: 通过微注射或外科植入进行的细胞疗法; 用于体外扩展的 3D 培养, 不需要用酶促消化或机械解离重复地进行细胞分离(splitting); 提高治疗性生物分子的产量; 用于形态发生研究的体外模塑。改进的微滴生成法是简单的, 可扩展的(*scalable*), 当所用的基质或生物材料系统浓度低、相变慢、形态和机械稳定性差时仍能生产细胞-基质微球。

所述方法使用了包含细胞、第一细胞外基质(ECM)和其他生物分子的制剂。在优选实施方案中, 能够对细胞提供支持、与细胞相互作用使得细胞生长而不产生毒性并且允许细胞迁移和渗透的第一 ECM 是胶原, 或是支持细胞生长和迁移, 并且具有足够温和以支持细胞存活的相变特性的其他材料, 例如纤维蛋白和透明质酸。组合物可以包含第二 ECM, 例如蛋白聚糖或 GAG。它们可以以一定方式相互作用, 该相互作用导致生长和分化中细胞应答以及微球物理特性的改变, 所述微球物理特性例如结构体积、ECM 密度、细胞密度、机械特性和稳定性等。组合物也可包含生长刺激信号, 例如人血清、富血小板血浆或其他血液制品。组合物中也可掺入治疗性组分, 例如抗炎性药物和抗生素。

形成微球的方法包括以正确的次序和正确的时间, 用分配单元将组合物混合并分配成液滴的步骤。第一基质的 pH 被调节到适于细胞存活。细胞悬液和其他生物分子与基质组分尽快地充分混合, 以在加速

(accelerating)相变之前使细胞均匀地完全分布在形成基质的溶液中。用不带有机械扰动的干式收集平台(platform)收集液滴。所述平台具有维持液滴的球形的表面特性,例如高的表面张力。通过维持低的温度,基质相变速率可被控制得尽可能地慢,依赖于基质浓度在2分钟至10小时的范围内,优选30分钟。分配的微球的体积优选为约2.5 μ l。分配的液滴的直径优选为2mm。此外,所述方法包括在分配之后,通过提高收集平台的温度,优选至37°C,加快基质相变的速率。使液滴的基质组分进行相变,以在足以使相变达到平衡的时间内形成细胞-基质微球。

微球被稳定化,方法是用最小的机械扰动从收集平台收集细胞-基质微球;保持微球自由浮动在第一介质中一段时间,直到微球的大小基本上恒定;将微球从第一介质中释放出来。保持微球自由浮动可通过在非粘附性培养盘(例如培替氏培养皿)中保持悬浮状态,或者在搅拌式培养瓶(spinner flask)或旋转式(rotating vessel)生物反应器中培养微球来实现。微球的大小和机械强度可通过控制下列参数中的至少一种来控制:细胞密度、胶原浓度、血清浓度、ECM的组成、第一和第二ECM的比例、液滴的体积、微球自由浮动状态的持续时间。提高细胞密度、降低基质浓度或降低液滴体积可以降低大小,提高细胞-基质微球的稳定性。

产生微球的系统包括上述的组合物、用于将组合物分配成液滴的分配单元、以及收集平台,所述收集平台用于收集分配的液滴以及基质的凝胶化以形成细胞-基质微球,所述收集平台包括具有维持液滴的球形的表面特性的表面。该系统可进一步包括用于控制分配速度和体积的控制单元,以及在分配过程中和基质相变过程中维持组合物的温度的温度控制单元。

包含未分化的活细胞的细胞-基质微球可被注射或移植,用于例如组织修复或再生。方法包括沉淀微球;去除过量的上清;将微球重悬于用于注射或移植的液体;将微球悬液加入用于注射或移植的容器中;将微球注入或植入动物或人的缺陷组织,例如皮肤伤口或损伤的软骨。在一个实施方案中,方法包括注射或移植包含特异性分化的活细胞的细胞-基质微球,其中基质将细胞包埋入动物或人的缺陷组织。细胞-

基质微球也可用于3D培养。与现有的微载体系统相比，它们具有大量的优点。本发明的系统可用于在生理相关微环境中培养分泌蛋白的细胞，与不受限制繁殖的单层培养相比，通过基质诱导的繁殖控制显著地提高了蛋白生产率。

附图简述

图1是示意图，显示了制备细胞-基质微球的生产装备。

图2是流程图，显示机械上稳定的可控制大小的细胞-基质微球的制备。

图3是流程图，显示控制细胞从细胞-基质微球迁移的方法。

图4A、4B和4C显示hMSC-胶原微球的直径(微米)作为细胞密度(图4A)、胶原浓度(图4B)和微滴体积(图4C)的函数随时间(小时)的变化。

图5A和5B显示胶囊化的hMSC的细胞数(图5A)和存活率，细胞数对胶囊化后时间(小时)。所有数据以平均值 \pm SD表示。

图6A-6D细胞数对微球中的细胞密度，细胞/毫升(图6A)，细胞数对平板密度，微球/cm²(图6B)，细胞数，95% CI对单次铺平板，3D第一次铺平板(plating)，3D第二次铺平板，3D第三次铺平板和3D第四次铺平板(图6C)，第一、第二、第三、第四次铺平板的微球数(图6D)。中间线是中位数；最上和最下的条棒(bar)分别是数据的2.5th和97.5th百分位数(percentile)，框线的上限和下限分别是数据的25th和75th百分位数，显示作为细胞密度函数的外生(outgrowing)细胞数(图6A)和平板密度(图6B)；误差棒图(数据以平均值 \pm 95%置信区间表示)比较单层培养和3D微球之间的细胞数(图6C)；框线图显示不同次铺平板的微球数(图6D)。

图7是直方图，显示从hMSC-胶原微球外生的细胞形成的单细胞来源的克隆数，两个受试者，比较单、第一、第二和第三次铺平板。

图8A和8B显示在糖胺聚糖的存在下成纤维细胞诱导的胶原凝胶收缩的程度(mm)，以不同细胞密度(G:C, 3:1, 1:1, 1:3, 无GAG)对时间(天)表示。

图9显示以不同密度包裹细胞的细胞-基质微球的直径(mm)的时

间变化：50、500 和 5000 细胞/微球对时间（天）。

图 10A 和 10B 显示 HEK293 细胞以不同的起始细胞数（2500、25,000、250,000 细胞）在 3D 微球和单层培养中的存活率（10A）和数量（10B）。

图 11A 和 11B 显示 HEK293 细胞在 3D 微球和单层培养中的存活率、百分率（3A）和数量（3B）随时间（天）的时间变化。

图 12A-F 显示 HEK293 细胞中 GDNF 生产率。在 3D 微球和单层培养中 HEK293 细胞随时间（天）的 GDNF 累积分泌（ng GDNF）（图 12A）和分泌速率（ng GDNF/百万细胞/天）（图 12B）。在 3D 微球和单层培养中不同起始细胞数的 HEK293 细胞分泌的总 GDNF（ng）（图 12C）和分泌速率（ng GDNF/百万细胞/天）（图 12F）。在不同的血清浓度（2、5 和 10%）下，在 3D 微球和单层培养中 HEK293 细胞分泌的总 GDNF（ng）（图 12E）和分泌速率（ng GDNF/百万细胞/天）（图 12F）。

图 13A 和 13B 显示在不同的血清浓度（2、5 和 10%）下，在 3D 微球和单层培养中 HEK293 细胞的细胞存活率、百分率（13A）和数量（13B）。

图 14A 和 14B 显示在不同的胶原浓度（0.5、1.0、2.0 和 3.0 mg/ml）下，不同细胞接种密度（0、0.5、1 和 5×10^6 /ml）的样品中 GAG（图 14A）和 GA/DNA（图 14B）的量。

发明详述

I. 定义

在本文中，胶囊化到微球中指的是形成纳米纤维(nanofibrous)微球，由于形成微球的材料相变而在其中包埋了细胞。

在本文中，“ECM”指的是细胞外基质材料，其为纯的、分离的、部分分离的、重组的或合成的形式，或是具有与 ECM 相似的物理和生物学特性的合成材料。

在本文中，机械上稳定的微球是这样一种微球，它在达到平衡后，可被外力机械性地操作，可抵抗快速吹吸(pipetting up and down, 例如 20ml/min)或以最大速率涡旋(vortexed)过程中产生的剪切应力和湍流。

II. 制造细胞-基质微球的材料

使用低形态和机械稳定性的基质或生物材料系统，开发了生产稳定的细胞-基质微球的方法，所述微球具有最高 100%的胶囊化效率和高的细胞存活率，其应用包括：通过微注射或外科植入进行的细胞疗法；体外扩展的 3D 培养，不需要用酶促消化或机械解离重复地进行细胞分离；提高治疗性生物分子的产量；用于形态发生研究的体外模塑。改进的微滴生成法是简单的，可扩展的，当所用的基质或生物材料系统浓度低、相变慢、形态和机械稳定性差时仍能生产细胞-基质微球。该方法使用的制剂包含细胞、第一细胞外基质(ECM)、任意的第二 ECM，以及其他生物分子。

A. ECM 材料

组合物包含至少一种 ECM。ECM 必须能够对细胞提供支持，与细胞相互作用以使细胞生长而不产生毒性，允许细胞迁移并渗透，可以是不同类型的胶原，例如 I 型、II 型和 III 型，或者是适于支持细胞生长和迁移，并具有足够温和的相变特性以支持细胞存活的任何材料，例如纤维蛋白和透明质酸。所用的胶原可以是来源于牛的，例如 FDA 批准的皮肤等同物 Integra®和 Apligraf®和软组织填充物，或已在临床上用于减少皱纹的产品（例如 DermaLive 和 DermaDeep）(Bergeret-Galley 等, *Aesthetic Plast. Surg.*, 25(4):-249-55 (2001))或在治疗尿失禁的产品(Corcus 等, *Urology*, 65(5):898-904 (2005))中所用的。ECM 可以是天然来源的或合成的，并且在足够温和以支持细胞存活和生长的特定条件下可被诱导重建(reconstitute)成固体形式。ECM 可以从不同的动物来源分离或提取制备，所述动物来源例如鼠尾、猪皮、牛跟腱或人胎盘。优选地，第一 ECM 分离自提取过程中的不同级分，例如酸溶性级分、胃蛋白酶溶性级分或不溶性级分。

组合物可进一步包含第二 ECM，它可以是由鲨鱼软骨制得的蛋白聚糖或糖胺聚糖(“GAG”)、纤维蛋白、弹性蛋白或透明质酸。第一 ECM 可以和活细胞相互作用，或者与第二 ECM 相互作用，所述相互作用导致细胞对生长和分化的应答的改变，以及微球物理特性（例如结构体积、ECM 密度、细胞密度、机械特性和稳定性等）的改变。

基质组分也包含其他水凝胶，它们的制造条件足够温和以在胶囊化之后维持高的细胞存活率，不需要使用有机溶剂或其他对细胞有毒性的物质，而且不需要严苛的条件，例如通过添加钙而凝胶化的藻酸凝胶。

B. 细胞

细胞可以是人或临床易得来源的成熟细胞或干细胞，所述临床易得来源例如自体、同种异体、胎儿(fetal)、胚胎和异种来源。细胞可以是不同来源的。在优选实施方案中，细胞是来源于人骨髓的间质干细胞(hMSCs)、有治疗用途的人胚胎和胎儿干细胞、成体干细胞和有治疗用途的成体细胞，分离所述成体干细胞的来源包括但不限于人皮肤、胃肠道、脂肪组织、胎盘，所述有治疗用途的成体细胞来自例如椎间盘、软骨、肌肉、皮肤、腱和韧带等的健康活检样品。细胞可被基因操作以过表达一种或多种特异性生物分子，例如蛋白，或具有分泌一种或多中特异性生物分子(例如蛋白)的活性，细胞的例子是 HEK293 细胞、3T3 成纤维细胞、骨肉瘤细胞、C2C12 细胞系、来源于人骨髓的间质干细胞(hMSCs)等。细胞也可得自有治疗用途的同种异体来源，例如兔 MSC、小鼠 MSC 和在动物疾病模型中有治疗用途的其他动物细胞。优选地，细胞是来源于骨髓的间质干细胞(MSCs)，对 HLA 匹配供体是自体的或者是同种异体的。优选地，成熟细胞是分离自烧伤患者健康皮肤活检样品的角质细胞；分离自骨关节炎患者的健康关节软骨活检样品的软骨细胞；分离自严重椎间盘退化患者的健康椎间盘活检样品的椎间盘细胞；分离自脊髓或其他 CNS 损伤患者的自体外周神经移植的 Schwann 细胞。

用 HEK293 分泌 GDNF 作为生产生物分子的例子。可使用其他细胞例如 3T3 成纤维细胞和 CHO 细胞，也可使用其他有用的生物分子例如糖蛋白和蛋白聚糖。

C. 任选的生长因子

组合物也可包含生长刺激信号，例如人血清、富血小板血浆或其他血液制品。有效地，组合物包含影响 MSC 分化的附加因子。例示性的因子包括用于分化成软骨的 TGF- β 。

D. 细胞培养介质

含水介质可以是培养介质，含有或不含有血清、缓冲盐，或与细胞存活力相容并具有适当离子强度的其他液相。典型的介质包括DMEM、DMEM-LG、MEM和RPMI。

E. 任选的治疗性、预防性或生物活性药剂

制剂也可包含治疗性、预防性或诊断性药剂。例如，可将治疗性组分（例如抗炎药物和抗生素）掺入组合物中。也可掺入诊断药剂，例如染料或放射造影剂。可加入防腐剂用于贮存。

III. 制备细胞-基质微球的方法

用于制备微球的系统包括上述组合物；用于将组合物分配成液滴的单元；以及收集平台，所述收集平台用于收集分配的液滴以及基质的凝胶化以形成细胞-基质微球，所述平台包括具有维持微球为球形的表面特性的表面。液滴分配于其上的基底(substratum)可被封口膜包裹或被明胶包被，或是具有类似表面特性的其他材料，具有高表面张力以尽可能维持液滴的球形的塑料、金属或玻璃平台。该系统可进一步包括用于控制分配速度和体积的控制单元，以及在分配过程中和在基质相变过程中维持组合物的温度的温度控制单元。

形成微球的方法包括以正确的次序和正确的时间，用分配单元将组合物混合并分配成液滴中的步骤。ECM的pH被调节到适于细胞存活。如果需要组分之间特定的相互作用，则将第一和第二基质充分混合。细胞悬液和其他生物分子与基质组分尽快地充分混合，以在加速(accelerating)相变之前使细胞均匀地完全分布在形成基质的溶液中。分配单元可以是手动的或自动的。用不带有机械扰动的干式收集平台收集液滴。

所述平台具有维持液滴的球形的表面特性，例如高的表面张力。分配环境维持在-5至20°C、0至15°C、更优选0°C至10°C的温度下。通过维持低的温度，基质相变速率可被控制得尽可能地慢，依赖于基质浓度例如在2分钟至10小时的范围内，优选30分钟。分配的微球的体积被控制在约0.01至100 μ l、0.05至50 μ l、0.1至20 μ l、0.1至10 μ l、0.5 \pm 1 μ l，或优选为约2.5 μ l。分配的液滴的直径范围为0.5mm至3mm，优选为2mm。

通过在适当的时间控制液体环境的温度、pH 和离子强度来引发液体基质的溶液-凝胶(sol-gel)转变过程。温度由 4°C 提高到 10°C、16°C、25°C、37°C 和优选的 37°C。pH 由 2 提高到 5、6、7、8、大于 8 和优选的 7。通过将混合物的温度维持在低至 4°C，正在胶凝的(gelling)基质的凝胶化速度可以在引发凝胶化之后立即减慢。通过将混合物的温度提高到 37°C，或者通过提高溶液的离子强度，正在胶凝的基质的凝胶化速度可以在将该基质在收集单元分配成液滴之后立即提高。

使液滴的基质组分进行相变以形成细胞-基质微球，时间足够地长以使相变达到平衡，典型地为约 10 至 30 分钟、15 至 60 分钟、0.5 至 5 小时，优选 45 分钟。

使凝胶化的液滴从收集平台脱离或释放，方法是用液体（例如培养介质和磷酸缓冲液）轻柔地清洗，或将平台浸入浴液(bath)中轻柔地搅动(agitation)，或使用足够温和以保持柔软微球的完整性的其他适当方法。微球被稳定化，方法是用最小的机械扰动从收集平台收集细胞-基质微球；保持微球自由浮动在第一介质中一段时间，直到微球的大小基本上恒定；将微球从第一介质中释放出来。保持微球自由浮动可通过在非粘附性培养盘（例如培替氏培养皿）中保持悬浮状态，或者在搅拌式培养瓶或旋转式生物反应器中培养微球来实现。微球可以保持在自由浮动状态 2 小时至 10 天、12 小时至 8 天、或约 2 至 7 天，最优选 3 天。温度可维持在约 25 至 45°C、30 至 40°C 或约 37°C。

微球的大小和机械强度可通过控制下列参数中的至少一种来控制：细胞密度、胶原浓度、血清浓度、ECM 的组成、第一和任选的第二 ECM 的比例、液滴的体积、微球自由浮动状态的持续时间。可通过控制上述参数中的至少一种来控制微球的机械强度和大小。例如，起始细胞密度或每微球的细胞量可被控制在 1 至 2500、1 至 1000、1 至 500 或约 250 细胞/微球；第一 ECM 的浓度可被控制在约 0.01 至 10.0mg/ml、0.1 至 5.0mg/ml、0.1 至 3.0mg/ml 或约 0.5mg/ml；第一 ECM 与第二 ECM 的比例为 1:10 至 10:1、1:5 至 5:1、1:2 至 2:1 或约 1:1；血清浓度可以是 0.1%至 50%、0.5 至 30%、1 至 25%、5%至 15%或约 10%。提高细胞密度、降低基质浓度或降低液滴体积可以降低大小，提高细胞-基质微球的稳定性。

微球的大小可被多个参数精确地控制，所述多个参数包括但不限于起始细胞密度或每微球的细胞数，范围是每微球 1 至 2500，优选 250 个细胞；胶原浓度，范围是 0.1 至 8.0，优选 0.5mg/ml；血清浓度，范围是 2 至 20，优选 10%；不同基质组分之间的比例，例如胶原对 GAG，范围是 10:1 至 1:10，优选 1:1。

细胞-基质微球的配制参数可被优化，以使胶囊化的干细胞更好地分化。例如，可用不同的参数（例如细胞密度和胶原浓度）制备胶原-间质干细胞微球。可改变参数以得到优化的分化结果例如 GAG 产量。可使用每毫升 1×10^4 至 1×10^7 个细胞，优选每毫升 5×10^5 个细胞的细胞密度。提高细胞密度有利于人 MSC 在微球中分化成软骨细胞 (chondrocyte) 样细胞。可使用 0.1 至 10mg/ml，优选 2mg/ml 的胶原浓度。提高胶原浓度有利于人 MSC 在微球中分化成软骨细胞样细胞。因此，可以优化这些参数以在组织再生中得到最佳的分化结果。

在优选的实施方案中，通过控制以下参数来控制微球的机械强度：起始细胞密度或每微球的细胞数，范围是每微球 1 至 2500，优选 250 个细胞；胶原基质的起始浓度，范围是 0.1 至 8.0，优选 0.5mg/ml；血清浓度，范围是 2 至 20，优选 10%；不同基质组分之间的比例，例如胶原对 GAG，范围是 10:1 至 1:10，优选 1:1；自由浮动孵育的持续时间，范围是 2 小时至 14 天，优选 48 小时。提高细胞密度、降低基质浓度并降低分配的液滴的体积、降低 GAG 组成 (composition)、提高血清浓度以及提高自由浮动孵育时间导致所得的微球的机械强度提高。

图 1 显示了用于生产细胞-基质微球的系统 101 的示意图。系统 101 包括分配单元 100，其由手动或自动分配器 102 组成；控制单元 104，其控制分配液的体积、分配的速度和分配器的 X-Y 位置；冷却单元 106（或冰室）在 4°C 下容纳分配单元 100。系统还包括收集单元 108，其由以下部分组成：具有非粘附性表面的可扩展收集平台 110；X-Y-Z 移动台架 (stage) 112，收集平台安装在上面；平板控制单元 114，其控制移动台运动的速度、频率和方向。系统可以是手动的或自动的、定制的或由市售仪器（例如移液器 (liquid handlers)）改制的。

通过系统 101 形成微球的方法包括分配混合物的小液滴（例如 0.5 μ l），所述混合物包含以正确的次序和时间混合的细胞、水性介质

和液体基质。可通过调节分配室侧部的温度来控制基质相变的速率，通过保持分配侧部低温而维持慢的速率。液滴的直径范围是 0.5mm 至 3mm，优选 2mm。使在收集平台上收集的液滴在 37°C 下胶凝足够长的时间，以形成固体细胞-基质微球。从收集平台上释放微球，在培养条件下保持自由浮动，直至形成稳定的微球。

图 2 显示了制备具有可控制的大小和机械强度的细胞-基质微球的方法。微球的大小和机械强度受到多种参数的控制，所述参数包括但不限于细胞-基质混合物的体积、细胞密度或每微球的细胞数量、基质密度、不同基质组分的比例、血清浓度、分配的液滴的体积和细胞-基质微球自由浮动孵育的持续时间。

方法包括步骤 200：在将凝胶化的细胞-基质微球从非粘附性收集平台 110 释放或脱离后，保持凝胶化的细胞-基质微球自由浮动或悬浮在静置的非粘附性培养容器（例如用于细菌培养的容器）中或者在自转(spinning)或旋转(rotating)培养容器中足够长的时间，时间范围是 2 小时至 14 天，优选 72 小时。步骤 202：通过在收集平台 110 上用介质冲洗微球来收集微球。步骤 203 包括使微球维持一段时间。步骤 204 包括：检查微球的大小，直到达到平衡，即微球的大小达到恒定。步骤 206：收集机械上稳定的微球，用于注射、移植或 3D 培养。

自由浮动的持续时间依赖于达到平衡（微球的大小达到恒定）之前细胞-基质相互作用的速率。相互作用的速率依赖于细胞类型和基质类型。达到平衡的细胞-基质微球的直径应当适于体内治疗性注射，范围是 50 至 800 微米，优选 300 微米。

IV. 在形成细胞-基质微球之后改变细胞行为的方法

可操作细胞从微球迁移，方法是：通过将微球铺在培养皿的固体基底上，或将微球置于正在胶凝的基质中或已胶凝的基质上，对微球提供机械支撑；将微球铺在培养皿或正在胶凝的基质中或已胶凝的基质上，其中各微球彼此分开一段距离；向培养系统中加入第二介质，以保持(hold)微球；使细胞从微球迁移出来一段时间；使微球从粘连的基底和第二介质中释放。在加入第二介质之前，微球典型地保持在培养系统中一段时间，例如 30、60、90 或 120 分钟，优选 60 分钟。这

些步骤可以重复几次以使细胞全部迁移。例如，这些步骤可重复3、5、7次，优选10次。细胞迁移的时间范围是2、4、12、48小时至12天，优选约3天。使迁移出微球的细胞生长一段时间，可将其收获用于进一步的应用或重新胶囊化。培养系统可以是2D或3D环境。介质优选是DMEM、DMEM-LG、MEM或RPMI。

V. 细胞-基质微球

所生产的细胞-基质微球是机械上稳定的，能够抵抗流速高达20ml/min的快速注射产生的剪切应力，能够经受机械操作例如镊子的夹取和放下，能够经受最高速度的涡旋产生的湍流。

胶原和其他基质提供了刺激细胞生长的天然微环境，保护细胞在注射或移植产生的局部有害环境中免受酶的消化，固定化可溶性试剂，刺激生长和分化（如果需要的话），而且粘附性的细胞-基质微球容易与宿主组织融合在一起，用宿主组织填充任意的不规则间隙，因此可以弥补组织缺陷。细胞-基质微球是可渗透性的，可以自由交换营养和代谢物。根据3D组织样结构中的质量转移规则，组织样结构的容积(dimension)是有限的(Muschler等, *J. Bone Joint Surg. Am.*, 86-A(7); 1541-58 (2004))。在3D细胞-微球系统中，通常可将微球的大小控制在小至100-300微米，这是进行充分营养交换的3D结构的适当容积。影响微球大小的另一因素是基质浓度。较高的浓度会产生较硬的基质，因此细胞与低浓度的正在胶凝的基质的相互作用产生的收缩力不足以产生大程度的体积减小。此外，当微球与粘连的环境（例如宿主组织）紧密接触时，胶囊化的细胞能够迁移出微球，与宿主组织整合，或者快速生长，因此可以促进移植物-宿主整合，提高移植率。

细胞-基质微球也可用于固定化其他治疗分子，例如诱导特异性分化的因子，例如用于分化成软骨的转化生长因子(TGF) β ，以及抗炎药物。

方法包括以可预测的方式控制获得的细胞的量以及获得该数量的细胞的速度的步骤，控制因素包括但不限于：微球的铺平板密度，范围是每平方厘米0.5至500个，优选5个微球；细胞密度，范围是每微球1至2500个，优选250个细胞；基质（例如胶原）浓度，范围是

每毫升 0.1 至 5.0mg, 优选 0.5mg; 胶原对 GAG 比例, 范围是 1:10 至 10:1, 优选 1:1; 血清浓度, 范围是 2 至 20%, 优选 10%。提高铺平板密度、提高细胞密度、降低基质浓度、降低胶原对 GAG 比例、提高血清浓度, 导致所得的细胞数量提高, 以及获得该细胞数量的速度提高。

图 3 显示控制胶囊化的细胞迁移和生长的方法。步骤 300 包括根据图 1 和图 2 描述的步骤制备机械上稳定的微球。步骤 301 包括通过步骤 302-304, 在不补充介质的情况下, 提供用于微球粘连的机械支撑, 时间足够进行粘连, 例如 5 分钟至 60 分钟、半小时至 6 小时, 优选 45 分钟。步骤 302 和 303 包括将微球(302a)分别铺在培养皿的固体基底和胶原凝胶层(303a)上。步骤 304 包括将微球悬于一定体积的正在胶凝的胶原基质(304a)中, 将混合物注入培养皿, 通过将温度提高至 37°C, 使其凝胶化。步骤 305 包括将完全(full)介质加入培养皿, 而不扰动粘连的微球。步骤 306 包括使细胞从微球的周围迁移(306b)一段时间, 从 12 小时至 3 天, 2 天至 8 天, 4 天至 14 天, 优选 3 天。步骤 307 包括使细胞-基质微球从粘连的基底回收或释放, 方法例如轻柔地用完全介质冲洗基底。步骤 308 包括立刻向培养皿补充完全介质, 使迁移的细胞(308a)在有规律的介质变化下继续生长。步骤 309 包括使脱离的细胞重复进行步骤 301-307 中的铺平板以及细胞外生(未显示)。可在步骤 310 中收获迁移的细胞备用。

该方法包括使浮动的微球发生粘连, 方法是在不存在介质的情况下, 将收缩的细胞-基质微球铺在粘附性的基底(例如培养基)上一段时间, 范围是 30 分钟至 12 小时, 优选 45 分钟, 直到粘连完成。该方法也包括向微球补充足量的介质, 而不扰动粘连的微球。

该方法包括使细胞外生(outgrowth)出粘连的细胞-基质微球。胶原基质允许细胞迁移。和完全收缩的细胞-基质微球中产生的种群压力一起, 使细胞从粘连的微球外周外生到基底上或周围的环境中, 并且迁移的细胞繁殖。诱导细胞外生一段时间, 范围是 12 小时至 14 天, 优选 3 天。

该方法包括当足够数量的细胞迁移出微球使得微球被外生的细胞包围时, 去除细胞-基质微球的粘附。这发生在 12 小时至 14 天, 优选 3 天。该步骤不需要酶促消化, 例如胰蛋白酶消化, 也不需要机械性

破坏微球，所述酶促消化可能会改变表面标记物和细胞活性；只需要简单地用介质或 PBS 轻柔地冲洗微球，或用镊子夹取。

细胞-基质微球是完整的，通过沉淀或 800 至 2000rpm 优选 1000rpm 的温和离心来收集。

细胞-基质微球可以多次重铺于新的空培养容器中，依赖于微球大小、每微球的细胞密度可以铺多达 10 次，使得可以在相同代次(passage)中提供大量细胞，而不改变细胞生长和分化潜能，以及表面标记物。

该方法可被用于根据要求提供细胞，方法是，如果不需要细胞的话，将细胞-基质微球维持在悬液中至少一周。自由浮动的微球以粘连形式提供，以便当需要细胞时，使细胞迁移并外生，直至汇集(confluence)备用。该方法能够恒定地提供来自细胞-基质微球中相同代次的细胞，方法是将微球多次铺平板直至细胞迁移终止。迁移的细胞在一段时间内可以有规律的间隔（优选每天）获得，所述时间为 2 至 30 天，优选 10 天，该时间对构建多层异源组织样结构是必需的，所述结构包括但不限于 IVD、胃肠道和血管。

细胞-基质微球可简单地通过酶促消化来解离(dissembled)，所述酶促消化特异性针对微球的基质组分，例如针对胶原的胶原酶，针对硫酸软骨素 GAG 的软骨素酶。单个细胞悬液可被进一步应用。

通过形成细胞-基质微球，用于包裹细胞的天然细胞外基质材料（例如胶原）以 3D 方式提供了生理上相关的微环境。胶囊化细胞所处的组织样基质微环境约束(constrains)细胞繁殖。结果，细胞的繁殖暂时受到控制，3D 微球中的细胞数量在第 4 天仅提高 2 倍多一点，而传统的单层培养在相同时间内提高超过 20 倍。在不同的时间点，在不同的细胞密度下，3D 微球中的细胞繁殖指数一致地比传统单层培养中的低。该方法提供了天然存在的、外部应用的对繁殖的控制，不需要对细胞代谢进行基因操作。

IV. 应用

A. 组织修复或再生

本发明的方法和细胞-基质微球可用于治疗心血管病，例如心肌梗塞的修复；用于神经疾病，例如脊髓损伤；用于肌肉骨骼疾病，例如

软骨损伤、椎间盘退化和肌营养不良。与干细胞治疗有关的服务和产品也可使用本发明的方法和细胞-基质微球，以用 3D 或与单层培养结合的方式来培养干细胞，以根据需要大量地生产干细胞，不需改变它们的特性(identity)、自我更新和分化能力。

含有未分化的活细胞的细胞-基质微球可被注射或移植，例如用于组织修复或再生。该方法包括以下步骤：沉淀微球一段时间，优选 10 分钟，或在 800-2000rpm（优选 800rpm）的速度下温和地离心微球悬液一段时间，优选 5 分钟；除去过量的上清；将微球重悬于用于注射或移植的液体，例如已知体积的盐水、介质、磷酸缓冲液、低浓度水凝胶例如胶原凝胶；将微球悬液加入用于注射或移植的容器，例如带有 G18-G30（优选 G27）针头的注射器；将微球注射或移植到动物或人的缺陷组织中，例如皮肤伤口或损伤的软骨。

在一个实施方案中，本发明的方法包括注射或移植含有特异性分化的活细胞的细胞-基质微球，其中基质将这些细胞包埋到动物或人的缺陷组织中。该方法包括添加分化介质，其中化学信号（例如 TGF- β ）包含在微球悬液中一段时间，该时间足以将微球中存在的干细胞成软骨性(chondrogenic)分化成为成软骨细胞；沉淀带有分化细胞的微球一段时间，优选 10 分钟，或在 800-2000rpm（优选 800rpm）的速度下温和地离心微球悬液一段时间，优选 5 分钟；除去过量的上清；将微球重悬于用于注射或移植的液体，例如已知体积的盐水、介质、磷酸缓冲液、低浓度水凝胶例如胶原凝胶；将微球悬液加入用于注射或移植的容器，例如带有 G18-G30（优选 G27）针头的注射器；将微球注射或移植到动物或人的缺陷组织中，例如皮肤伤口或损伤的软骨。微球可用于通过注射或移植进行的细胞治疗，所治疗的疾病包括但不限于肌肉骨骼病、心血管病和神经系统疾病。

细胞-基质微球可用作相同代次的细胞的长时程来源，不需要使用通常在单层培养和在 3D 支架上接种细胞中所用的细胞分离(splitting)法，例如重复进行酶促消化以及机械破裂。

B. 作为生物反应器的细胞-基质微球

提供与细胞（遗传修饰或未修饰的）培养物中的 3D 微载体有关的服务或产品（用于生产治疗性生物分子例如但不限于生长因子）的公

司可使用本发明的方法和组合物来生产能进一步提高治疗性分子产率的自组装微载体。细胞-基质微球可像生物技术和制药工业所用的传统微载体培养那样用于 3D 培养。它们可作为悬液培养，以便容易地提高床体积 (bed volume)，并放大培养系统。与传统的微载体培养相比，本发明的方法在提高效率和降低费用方面提供了几个重要的优点。细胞以几乎 100% 的胶囊化效率固定化在正在胶凝的基质中，几乎所有的细胞都被胶囊化。在静态培养条件下，胶囊化过程仅需要 30-60 分钟。另一方面，传统的微载体培养系统需要耗时而且低效率的细胞结合过程，以使细胞与悬液中预先制造微载体表面结合。为了提高细胞与预先制造微载体结合的效率，需要复杂的培养容器设计，例如旋转式生物反应器、灌注式生物反应器、搅拌式培养瓶以及其他方法，例如恒定搅动。细胞结合步骤有时需要超过一周。由于本发明的方法消除了这些复杂而耗时的步骤的必要性，它成为更有效、低费用的 3D 培养方法。其次，微胶囊化系统将微球的形成和基质系统中细胞固定化结合成一个步骤。这显著地降低了费用，节约了时间。此外，它消除了单独制造微载体的必要性，显著降低了系统的费用，因为可以避免制造微载体在技术上需要的步骤，例如相分离、溶剂蒸发、化学交联。第三，微胶囊化系统是在确保高细胞存活率的生理相关温度和条件下处理的。另一方面，制造微载体过程中使用的有机溶剂和有毒的化学交联剂（例如戊二醛）的残留可能降低细胞存活率。

细胞-基质微球也可用于 3D 培养。与现有的微载体系统相比，它们具有大量的优点。本发明的系统可用于在生理相关微环境中培养分泌蛋白的细胞，与未受限制繁殖的单层培养相比，本发明的系统通过基质诱导的繁殖控制显著地提高了蛋白生产率。

当在低血清浓度（例如 2%）下培养微球时，3D 微球的生产率提高。这表明培养系统可以维持在低血清浓度下，这样可以简化下游的蛋白纯化过程。细胞培养在带有或不带有恒定搅动、自转、旋转或灌注的培养容器或生物反应器中。

在微球内部达到最大细胞密度之前，以有规律的周期（1 天至 10 天，优选 2 天）在微球悬浮培养后用替代法收获培养介质中分泌的蛋白一段时间（7 天至 3 个月，优选 14 天）。通过在液体基质的亚最适

(sub-optimal)浓度下 (1×10^4 至 1×10^7 细胞/毫升, 优选 1×10^5 细胞/毫升) 胶囊化细胞, 可以实现更宽的蛋白生产窗口(windows)。当基质微球中的细胞繁殖受到控制时, 细胞的生产率显著提高。该窗口可以维持至少 2 周, 比其他受控繁殖策略中的生产率提高的窗口长得多。与其他繁殖控制技术不同, 本发明的方法通过在合适的浓度和时间, 在天然细胞外基质材料中胶囊化细胞, 对繁殖进行了暂时的、可逆的控制。

与不使用基质微球的 2D 培养相类似, 细胞数在对数时程(phase)内线性提高。在该时程内, 总蛋白产量随细胞数线性地提高, 而特定蛋白的产率降低。这可能是由于更多的能量被引向再生而不是蛋白生产。在该时程中生产的特定蛋白也可被收获。由于空间限制和营养竞争, 细胞将达到最大或最适密度, 而细胞的繁殖率将会下降。这通常伴随着蛋白产量的提高。然而, 在该时程内, 可能诱发细胞凋亡和死亡, 细胞内成分的释放可能降解分泌产物。因此, 在最适化过程中的适当时间点收获分泌的蛋白是有利的。与其他系统不同, 该方法使得高蛋白产率和快速繁殖相分离。该蛋白生产时程在对数繁殖时程之前, 并伴随着对数繁殖时程。因此, 该系统是可持续的, 并且典型地以显著提高细胞数而结束。

培养系统的有效性和费用降低可通过在 2 周至 3 个月, 优选 1 个月的时间达到最适细胞密度之后, 用重胶囊化技术(re-encapsulation)使胶囊化的细胞循环而实现。这在经济上是有效率的, 因为蛋白收获可以正好在活跃繁殖时程之前开始, 而系统的产出不仅包括所生产的特定蛋白, 而且包括提高高存活率的细胞数量。此外, 可通过酶促释放细胞并重新胶囊化成新的基质微球来重新启动循环, 这样启动以下循环: 具有高蛋白生产率的基质诱导的繁殖控制和随后在 3D 微球中的活跃细胞繁殖。

这一系统的另一个优点是细胞的繁殖可被直接控制, 提高蛋白生产率, 这不同于传统的繁殖控制技术, 例如营养耗竭(deprivation)和肿瘤抑制子基因过表达, 以控制细胞代谢并诱导细胞凋亡或死亡, 其在不同的时间点总是维持高的细胞存活率(几乎 100%), 具有不同的细胞密度和血清浓度。在使用分泌 GDNF 的 HEK293 细胞的实施例中, 在不同的细胞密度和不同的血清浓度下, 3D 微球中的细胞生产率在不

同的时间点通常高于（3至67倍）单层培养的。

实施例

通过参考以下非限制性实施例，可以进一步理解本发明。

实施例 1: hMSC-胶原微球的制备

用 NaOH 中和溶于乙酸的 I 型鼠尾胶原溶液（主要由三螺旋单体组成），稀释至终浓度为 0.5mg/ml。所有步骤在冰浴中进行以防止胶原凝胶形成。以最快的速度将处于完全介质（10%FBS 和 1%P/S 的 DMEM-LG）中的来源于人骨髓的间质干细胞(MSCs)充分地悬于中和的胶原溶液中。将冰冷的细胞混合物加入分配器中，每次分配 2.5 微升的小体积到覆盖了 UV 照射的封口膜(parafilm)的细菌培养皿上。为了防止液滴中气泡的形成，在分配液滴后将分配器上移或将收集平台下移。对液滴进行热诱导以重建成组织化胶原纤维的凝胶网络，与胶囊化细胞相互作用，通过在 37°C 的孵育器中下孵育 1 小时形成固体微球。通过用介质轻柔地冲洗封口膜，将形成的细胞-基质微球收集到含完全介质的具有非粘附性基底的浴液中。

实施例 2: 制备机械上稳定的细胞-基质微球并控制微球大小参数材料和方法

按图 2 所示的步骤，在存在不同浓度（ 2×10^4 、 1×10^5 和 5×10^5 细胞/毫升）的处于实施例 1 中所述具有 10%FBS 的 DMEM 介质中的来源于人骨髓的 MSC 的条件下，中和 I 型鼠尾胶原溶液并稀释成不同浓度（0.5、1.0、2.0 和 3.0mg/ml）。将细胞-基质微球收集到含 DMEM 介质的细菌培养皿中。在培养容器中在 37°C 下将收集的微球维持在自由浮动状态 2 至 7 天，直至达到平衡，其特征在于微球大小恒定。

结果

记录不同细胞密度和胶原基质密度的细胞-基质微球的时间形态变化。第 0 天的微球显现包埋在胶原基质中的单个细胞，微球仍然透明。随时间流逝，较高细胞密度（例如 1×10^5 和 5×10^5 细胞/毫升）和 0.5、1.0 和 2.0mg/ml 的较低胶原基质密度的微球收缩，变得更不透明和密实。这表明 hMSC 将基质重组形成微球中的更紧密的基质。低细

胞密度 (2×10^4 细胞/毫升) 的微球需要长得多的时间以收缩到恒定大小, 而较高胶原基质密度(3.0mg/ml)的微球显示出很少的收缩以至于基质看起来是透明的。HMSC 诱导的胶原微球收缩程度与细胞密度、胶原浓度和液滴体积(分别为图 4A、4B 和 4C)成正比, 证实这些参数可用于控制微球的最终大小。在达到平衡后, 可用镊子对 hMSC-胶原微球进行机械操作, 并且 hMSC-胶原微球可抵抗快速吹吸(例如 20ml/min)或甚至最高速度的涡旋产生的剪切应力和湍流。结果, 这些微球在机械上足够稳定, 可以抵抗微注射器注射时产生的剪切应力, 易于进行细胞治疗和组织工程目的的注射和移植。

实施例 3: 控制胶原微球中胶囊化的 hMSC 的生长速率

hMSC 分离自从捐献者抽取的骨髓, 所述捐献者根据人类伦理委员会的规定签署了知情同意书。如 Li 等(2004)的描述培养 hMSC。冷冻保藏通过传统的单层培养从第 2 和 3 次传代收获的细胞, 用于生产不同胶原密度(0.5 和 2mg/ml)的细胞-基质微球。如实施例 1 和 2 所述获得完全收缩的机械上稳定的 hMSC 胶原微球。用 $2 \mu\text{M}$ Calcein AM 和 $4 \mu\text{M}$ 乙锭均二聚物-1 孵育这些微球 45 分钟, 用于同时染色活的和死的细胞。染色的微球在 4%多聚甲醛(paraformaldehyde)中固定 1 小时, 用激光共焦扫描显微镜检查堆叠的(stacked)影像。在单独的实验中, 微球(每平板 100 个微球, 一式三份)在完全介质中培养 10 小时、3 天、6 天和 9 天。在孵育的末期, 用 100U/ml 细菌胶原酶在 37°C 下消化微球 45-80 分钟, 然后 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 消化 5 分钟。对获得的单个细胞悬液的细胞数和存活率进行计数。

结果

在微胶囊化后的起始阶段同时发现了活的和死的细胞。在 3 天后, 较低胶原浓度的微球中的大多数细胞存活, 而在较高胶原浓度的微球中能发现死细胞。所有的活细胞显示了伸长的形态。在第 6 天, 细胞更加伸长, 达到了细胞与细胞接触。在较低胶原浓度的微球中, 细胞遍布基质, 而在 3 毫克胶原/毫升的微球中, 较多的细胞排列在周围。如图 5A 所示, 微胶囊化细胞的生长依赖于胶原浓度。在胶囊化后第 8 个小时, 两个浓度下的细胞数量降到起始微胶囊化细胞的大约 40%。

0.5mg/ml 组在第 6 天后细胞数量只有轻微的增加,但在 2mg/ml 组中观察到细胞数量快速增加。两因素方差分析(two-way ANOVA)显示时间和胶原浓度都显著地影响细胞数量($p < 0.001$)。Bonferroni's post-hoc 检测显示第 6 或第 9 天与较早的时间点之间有显著的差异($p < 0.001$)。如图 5B 所示,在第 8 小时发现细胞存活率显著降低($p \leq 0.033$),但之后不是这样($p = 0.959$)。

实施例 4: 控制胶囊化 hMSC 从胶原微囊中迁移和生长

材料和方法

在胶囊化 3 天后将细胞密度为 2×10^4 、 1×10^5 或 5×10^5 细胞/毫升的自由浮动 hMSC-胶原微球转移到 100mm 直径的组织培养平板,平板密度为每平板 63、125 或 250 个微球,相应于 0.64、1.59 和 3.18 个微球/平方厘米。在抽取过量的介质后使微球与培养平板粘连 1 小时,补充完全介质。在第 72 小时,通过轻柔地用完全介质冲洗使微球脱离培养平板,沉淀下来,并重铺于新的培养平板若干次,直至细胞外生停止。在单独的实验中,微球以 0.5mg/ml 接种到胶原凝胶上,以评估细胞是否会迁移到软性基底。将不同次铺平板后生长出微球的细胞培养 12 天,有规律地更换介质,在第 3、38 和 154 小时记录它们的形态。用胰蛋白酶处理从 250 个微球外生的细胞,进行细胞计数,以便与用相同起始细胞数接种的常规单层培养进行比较。

结果

在微球铺平板之后没有立即发生细胞迁移。在第 38 小时,细胞外迁,形成集群(cluster)。在第 72 小时脱离微球之后,外生的细胞长成大的集落。这些细胞均匀地小而伸长,可被冷冻保藏以进一步用于例如基于细胞的检测、冷冻保藏、重新胶囊化和制造组织样结构。外生的 hMSC 的形态即使在 10 次铺平板之后也维持不变,性态类似于单层培养早期传代的形态。相反,在低细胞密度的微球中只有很少的外生细胞。当细胞密度(图 6A)和微球铺平板密度(图 6B)提高时,外生细胞数量线性地提高。Kruskal Wallis 检测显示各组之间存在显著的差异($p = 0.044$)。脱离的微球可以重铺几次,不需要酶促消化。包裹 250 个细胞的微球可以铺至少三次,而包裹 500 个细胞的微球可以铺至少

6次。此外，从早期铺平板的微球获得的细胞数量与单层培养（图6C）相近，而从较晚铺平板的微球获得的细胞数明显下降($p \leq 0.018$)。这与聚集和解离造成的微球数量显著下降($p = 0.009$)有关（图6D）。微胶囊化的hMSC也可迁移到软胶原凝胶中。来自不同次铺平板的细胞的存活率没有显示出差别。在粘连后72小时观察到微球聚集和解离。粘连后24小时外生的细胞渗入胶原凝胶中。

实施例5：多次铺平板后维持由微球外生的hMSC的表面标记物
用溶于EDTA的0.05%胰蛋白酶消化10次铺平板后迁移出微球的hMSC 6至9分钟，然后固定，并用抗表面标记物的抗体（包括CD34、CD14、CD29、CD105、CD4和HLA）。按先前描述的(Li等，2004)用适当的同型对照进行流式细胞计数。

结果

hMSC显示与单层培养的P1相同的表面标记物组(panels)，CD14、CD34和CD45阴性，CD105、CD29和HLA-A、B、C阳性。这表明在hMSC-胶原微球铺平板和重铺平板的10次循环之后，hMSC的特征(identity)没有改变。由于这些细胞来自相同代次的单层培养的单一等分试样(aliquot)，通过将3D培养系统和传统的单层培养结合，可以用来自单层培养的另一次传代的另一个或多个等分试样重复这些铺平板循环，可以实现长期存储和丰富的细胞来源，其对于基于细胞的测试和组织工程中制造组织样结构是必需的。

实施例6：在多次铺平板后维持从微球外生的hMSC的自我更新能力

材料和方法

用集落形成测试来表征得自3D和单层培养的hMSC的自我更新潜力。以非常低的密度（每100毫米直径的培养平板250个细胞）一式三份地接种得自传统单层培养的第3次至第5次传代的hMSC和3D培养的第1次至第5次铺平板的hMSC，培养14天并有规律地补充介质。用溶于甲醇的5%结晶紫（Sigma公司）对形成的集落染色和固定10分钟，用蒸馏水清洗两次。对直径大于2毫米的集落进行计数，以

所有接种的细胞形成集落的百分数来计算来自单个细胞的集落形成效率。

结果

多次铺平板后从微球外生的细胞的自我更新能力与传统单层培养得到的相近，如图 7 所示。单因素方差分析显示在所有组中来自单个细胞的集落的数量没有统计学上明显的差异。

实施例 7: 在多次铺平板后维持从微球外生的 hMSC 的多次分化潜能

材料和方法

细胞外生的多次分化潜能

根据先前报道的标准方案 (Pittenger 等, *Science*, 284(5411): 143-7 (1999); Okamoto 等, *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 295(2):354-61 (2002); Romanov 等, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 140(1): 138-43 (2005)) 进行软骨形成、骨形成和脂肪形成的分化测试, 以考察从 3D 微球获得的 hMSC 是否仍保留多次分化潜力。使用得自单层培养第 2 次传代和 3D 培养第 3 次和第 10 次铺平板的细胞。

软骨形成

在室温下将 2×10^5 个细胞的等分试样在 15 毫升离心管 (Falcon 公司) 中以 800rpm 离心 5 分钟。将沉淀 (pellet) 重悬于成软骨性分化诱导介质中, 所述介质被定义为高葡萄糖 DMEM, 补充了 10ng/ml 重组人转化生长因子 $\beta 3$ (hrTGF- $\beta 3$), 100nM 地塞米松, 6mg/ml 胰岛素, 100mM 2-磷酸抗坏血酸, 1mM 丙酮酸钠, 6mg/ml 转铁蛋白, 0.35mM 果仁糖 (praline) 和 1.25mg/ml 牛血清白蛋白。将细胞再次离心成沉淀, 维持 3 周, 每 2 天有规律地用诱导介质替换。在孵育的末期, 固定沉淀, 并加工成 5 微米厚的石蜡切片, 用于阿利辛 (Alcian) 蓝染色。

骨形成

用 100nM 地塞米松、50 μ M 2-磷酸抗坏血酸和 10mM β 甘油磷酸盐进一步补充完全介质, 作为骨形成分化诱导介质。以 3×10^3 细胞/平方厘米将 hMSC 一式两份或一式三份接种到 4 或 6 孔平板上, 维持在分化诱导介质中三周, 每 3 天有规律地更换介质。在孵育的末期, 用 PBS

清洗细胞，用 10%缓冲福尔马林在室温下固定 10 分钟，用 5%硝酸银(Nakarai Tesque, Kyoto, Japan)染色，用于冯科萨(von Kossa)染色。

脂肪形成

通过向完全介质补充 1 μ M 地塞米松、0.2mM 吲哚美辛(indomethacin)、10 μ g/ml 胰岛素和 0.5mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤制备脂肪形成分化诱导介质；通过向完全介质仅补充 10 μ g/ml 胰岛素制备维持介质(maintenance medium)。以 2 \times 10⁴ 细胞/平方厘米将 hMSC 一式两份或一式三份接种到完全介质中的 4 或 6 孔平板上，直至汇集。加入脂肪形成分化诱导介质 3 天，然后在维持介质中 2 天，进行三次诱导/维持循环。清洗、固定细胞，然后用 0.3% Oil-Red-O(Nakarai)染色，用于油滴(oil droplets)染色。

结果

在多次铺平板循环之后维持了 hMSC 的多次分化潜能。第 3 次和第 11 次铺平板后从微球获得的细胞外生仍能够分化成成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。这通过冯科萨、Oil Red O 和阿利辛蓝染色中分别对钙沉积、油滴和蛋白聚糖的阳性染色而证实。

实施例 8: 胶原微球中 hMSC 的成软骨性分化

材料和方法

hMSC 以 5 \times 10⁶ 个细胞/毫升的终浓度悬于 100 微升中和的胶原溶液(2mg/ml)。如实施例 7 所述将如此制备的微球孵育于成软骨性分化介质中 3 周。如实施例 7 所述对分化的微球的软骨特异性基质标记物进行染色。

结果

由于微胶囊化的 hMSC 能够软骨形成性地分化成具有典型圆形形状的软骨细胞样细胞，可能会形成软骨微组织。如葡糖氨基聚糖、软骨可聚蛋白多糖(aggrecan)和 II 型胶原的阳性染色所示，分化的细胞失去了迁移能力，并产生了软骨特异性细胞外基质。

实施例 9: 胶原-hMSC 微球在 NOD/SCID 小鼠中的体内皮下植入 材料和方法

根据机构规定在适当的伦理认可下进行动物实验。具有 0.5 和 2mg/ml 胶原以及每个微球 250 个细胞的胶原-hMSC 微球在 2 μ M Calcein AM 中孵育 45 分钟, 进行活细胞标记。十二只 NOD/SCID 小鼠(25-30g)被麻醉。在背部做一个切口, 产生大约 1x1cm 的皮下袋(pocket)。植入一千个胶原-hMSC 微球, 用不可吸收的丝质缝线缝合伤口。在植入 2、7 和 14 天后, 用过量的麻醉剂杀死动物。收集植入部位的皮瓣, 在荧光显微镜下观察, 追踪活细胞。

结果

微球保持完整并定位在植入部位, 而胶囊化的细胞在 NOD/SCID 小鼠中存活至少 14 天。在植入后第 2、7 和 14 天鉴别出被活体(vital) 荧光染料染色的包裹了活 hMSC 的微球集群。活 hMSC 显示出典型的伸长的形态。通过人抗原 β 2 微球蛋白的免疫阳性染色, 证实了它们来源于人。在参与血管形成的细胞中也发现了人抗原免疫阳性染色。

实施例 10: 在糖胺聚糖(GAG)的存在下接种了成纤维细胞的胶原凝胶的收缩程度

材料和方法

用 NaOH 中和酸性鼠尾胶原溶液, 并稀释到终浓度为 0.5mg/ml。将糖胺聚糖(Chondroitin-6-sulfate)加入正在胶凝的混合物, 质量比为 (1:3、1:1 和 3:1)。所有的步骤在冰浴中进行, 以防止形成胶原凝胶。然后在完全介质(具有 10%FBS 和 1%P/S 的 DMEM-LG)的存在下, 将来源于人骨髓的间质干细胞(MSC)尽快地充分悬于中和的具有 GAG 的胶原溶液, 终密度为 1 或 5x10⁵ 细胞/毫升。将混合物倒入 4 孔培养板中, 在 37°C 的孵育器中孵育 1 小时, 进行凝胶化。用注射针头使凝胶脱离培养板的孔, 补充足够的介质。在解剖显微镜下测量不同时间点的凝胶大小, 记录收缩程度。

结果

如图 8A 和 8B 所示, 在所有细胞密度下, 由于细胞迁移和繁殖, 接种了成纤维细胞的凝胶随时间显著收缩。第二介质(例如 GAG)的存在确实影响了胶原凝胶中的细胞反应。具体地说, GAG 的存在以剂量依赖方式降低了成纤维细胞诱导的凝胶收缩程度, 即较高的 GAG:

胶原质量比导致较低程度的收缩，比较图 8A 中 1×10^5 细胞/毫升的结果和图 8B 中 5×10^5 细胞/毫升的结果可以看出这一点。

实施例 11: HEK293 细胞培养和胶囊化

材料和方法

HEK293 细胞（第 4 传代）被转染以过表达 GDNF。用具有 10 毫升完全杜氏改性 Eagle 介质 - 高葡萄糖(DMEM-HG, 2%、5%或 10%FBS, 1%PS)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐的 T75 烧瓶在 5%CO₂, 37°C 下培养细胞。每两天更换新鲜的介质和 G418 硫酸盐。这些细胞被用于随后的胶囊化。

用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 HEK293 细胞。在置于 DMEM 中的 HEK293 细胞的存在下，用 NaOH 中和 I 型鼠尾胶原溶液，稀释为终浓度 4mg/ml。在使用之前在冰浴中将细胞混合物保持在 4°C。将细胞混合物加入分配器，以每次 5 微升的小体积分配到收集平台或覆盖了 UV 照射过的封口膜的细菌培养皿上。通过在 5%CO₂, 37°C 的孵育器中孵育 1 小时而使微滴重建成固体微球。通过用介质轻柔地冲洗封口膜，将形成的细胞-基质微球收集到含 DMDM 介质，具有非粘附性基底的 bath 中。用完全介质将包裹了细胞的胶囊悬浮在 35mm 陪替氏培养皿中。将 3D 微球中 HEK293 细胞的细胞繁殖、细胞存活率、GDNF 产率与传统单层培养的进行比较。

结果

微球的形态学分析

在倒置显微镜下观察包裹了细胞的胶囊。在 40x 放大率下测量胶囊的直径。在每个设置(set up)中，测量 50 个包裹了细胞的胶囊中 5 个胶囊的直径，确定平均值。如图 9 所示，包裹了细胞的胶囊的收缩率依赖于细胞接种密度。在较高的细胞接种密度下，包裹了细胞的胶囊在较早的时间点，以较高的速率(rate)收缩。用 5000 细胞/胶囊的高细胞接种密度，收缩在第 4 天开始。平均直径在第 0 天和第 12 天分别是 $2.42\text{mm} \pm 0.05$ 和 $1.77\text{mm} \pm 0.07$ 。如果细胞接种密度为 500 细胞/微球，第 0 天的平均直径是 $2.4\text{mm} \pm 0.01$ 。在第 8 天之前没有收缩，第 12 天的平均直径是 $2.24\text{mm} \pm 0.15$ 。如果是 50 细胞/微球的低细胞接种密度，

第 0 天和第 12 天的平均胶囊直径都是 $2.4\text{mm}\pm 0.04$ 。这表示微球没有可观察到的收缩。细胞接种密度为 5000、500 和 50 细胞/微球的平均直径变化百分比分别是(-)26.9%、(-)6.67%和 0%。第 6 天开始形成细胞集落或聚集，第 8 天至第 14 天聚集的大小一直增加。

实施例 12: 胶囊化细胞的命运(fate)、细胞的存活率和数量 材料和方法

对于传统的单层培养，用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 HEK293 细胞。用台盼蓝染色来检测存活率。用血细胞计数器来计算细胞数量。对于 3D 微球，用胶原酶（30 单位/毫升）来消化包裹了细胞的胶囊。然后向集落悬液中加入胰蛋白酶/EDTA，用 5%CO₂ 在 37°C 下孵育 3 分钟，已制备单细胞悬液。用台盼蓝检测存活率，进行细胞计数。

结果

在早期时间点，在胶囊内发现单个细胞。细胞大小增加，在第 6 天形成小的细胞聚集。细胞连续聚集形成网络，细胞形态类似于单层培养的细胞。图 10 显示了细胞存活率。不同细胞接种密度下的细胞存活率几乎相同。这显示细胞接种密度不影响细胞存活率。此外，单层培养的细胞的存活率和胶囊化细胞的存活率实际上没有差别。图 10B 显示了细胞数量。在单层组和微球组之间存在显著的差别。单层组的繁殖指数总是比微球组的高，大约为 4 至 140 倍。在不同细胞接种密度之间也存在显著的差别。细胞密度和组之间的相互作用也是显著的。单层组的繁殖指数随细胞接种密度下降，而在微球组中这种作用并不明显。

实施例 13: GDNF 定量分析

材料和方法

按照制造商(Promega)提供的说明用 GDNF E_{max}[®]免疫测试系统测量 GDNF。用结合可溶性 GDNF 的抗 GDNF 单克隆抗体(mAb)包被 96 孔板，4°C 下静置过夜。用抗人 GDNF 多克隆抗体(pAb, 1μg/ml)结合俘获的 GDNF 4°C 下静置孵育过夜。在清洗后，检测特异性结合的 pAb 的量，方法是用抗鸡 IgY 孵育，与辣根过氧化物酶(HRP)在室温下在有

规律的搅动下缀合(conjugate)2小时。通过清洗除去未结合的缀合物,然后用 TMB One 溶液(一种生色底物)在室温下静置孵育 15 分钟。加入 1N HCl 终止反应。用酶标仪(microplate reader)在终止反应后 30 分钟内测量 450nm 吸收。待测溶液中 GDNF 的量与氧化还原反应产生的颜色成比例。该 ELISA 系统可检测最少 31.2pg/ml 的 GDNF,线性范围是 31pg/ml 至 1000pg/ml GDNF。

用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 HEK293 细胞。对于单层培养,用 2ml 完全介质(DMEM, 10%FBS, 1%PS)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐将 2.5×10^4 HEK293 细胞接种到 6 孔板上。对于 3D 培养,如上所述形成微球。细胞接种密度为 500 个细胞/微球,微球数量为每 35mm 培替氏培养皿 50 个。用 2ml 完全介质(DMEM, 10%FBS, 1%PS)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐将微球悬于培替氏培养皿。不同的时间点包括第 2、4、8、10、14 天。对单层培养和微球培养二者而言,每个时间点有四份样品(n=4)。在所有设置中每两天收集并替换介质,用于 GDNF 定量。

用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 HEK293 细胞。对于单层培养,用 2ml 完全介质(DMEM, 10%FBS, 1%PS)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐将 2.5×10^3 、 2.5×10^4 或 2.5×10^5 HEK293 细胞接种到 6 孔板上。对于 3D 培养,如实施例 2 所述形成微球。细胞接种密度为 50、500 或 5000 个细胞/微球。每个 35mm 培替氏培养皿用 2ml 完全介质(DMEM, 10%FBS, 1%PS)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐悬浮 50 个微球。3D 培养的起始细胞数量与单层培养的相同。对单层培养和 3D 培养二者而言,每个起始细胞数量组有四份样品(n=4)。在所有组中每两天收集并替换介质,用于收集 GDNF 并随后定量。在第 12 天进行细胞存活率检测和细胞计数。

用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 HEK293 细胞。对于单层培养,用 2ml 具有不同血清百分比(2%、5%、10%)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐的介质将 2.5×10^4 HEK293 细胞接种到 6 孔板上。对于 3D 培养,如实施例 2 所述形成微球。细胞接种密度为 500 个细胞/微球,每个 35mm 培替氏培养皿 50 个微球,等同于起始细胞数量为 2.5×10^4 细胞。微球悬浮于 2ml 具有不同血清百分比(2%、5%、10%)和 500 μ g/ml G418 硫酸盐的介质中。对单层培养和微球培养二者而言,每个血清百分比有四份样品(n=4)。在所有设置中每两天收集并替换介质,用于 GDNF 定量。

在第 12 天进行细胞存活率检测和细胞计数。

结果

图 11A 和 11B 分别显示了单层和 3D 微球中 HEK293 细胞在各时间点（第 2、4、8、10、14、18、22、26 和 30 天）的存活率和数量。单层组的细胞数量总是比微球组的高，它们之间有显著的差异。在 3D 微球组中，除了起始细胞存活率较低，大约为 80% 之外，在随后的全部时间点所有组的细胞存活率都接近 100%。在单层组和微球组中，GDNF 的累积分泌都与时间成线性比例（图 12）。单层组和微球组的 GDNF 累积分泌之间存在显著差别。在此之后的检测显示第 2 天和第 4 天与所有其他时间点之间存在显著差别。图 12B 显示了不同组在不同时间点的 GDNF 分泌速率。对单层组和微球组二者而言，GDNF 的分泌速率持续上升，直至第 8 天。单层组和微球组的分泌速率之间存在显著的差别。在第 2、4、8、10 和 14 天，3D 微球中 HEK293 细胞的 GDNF 分泌速率分别是单层培养中的第 67、12、10、10 和 3.5 倍。这表明 3D 微球中的生产率明显较高。

单层组和微球组的总 GDNF 分泌都与细胞接种密度成线性比例（图 12C）。总 GDNF 分泌在单层组和微球组之间，以及不同细胞密度之间存在显著差别。由于细胞数量的差别很大，单层组的总 GDNF 分泌比微球组的高。在各细胞接种密度下，单层组的细胞数量在第 12 天比微球组的细胞数量高约 7-20 倍。然而，发现在所有组中 HEK293 细胞的 GDNF 分泌速率比单层培养的高（图 12D），而且单层培养和微球培养之间，以及不同起始细胞数量的组之间的差别是统计学上显著的。

在单层和微球组中，第 0 天和第 12 天分泌的总 GDNF 都与介质中的血清百分比成线性比例（图 12E）。单层组和微球组之间，以及介质中不同的血清百分比之间的总 GDNF 分泌存在显著的差别。单层组的总 GDNF 分泌总是比微球组的高，在所有血清百分比下差别低于 2 倍。在组和介质中血清百分比之间没有相互作用。然而，在所有血清百分比下，每天每百万 HEK293 细胞的 GDNF 分泌速率（图 12F）明显高于单层培养的。在所有血清浓度下，3D 微球中的 GDNF 分泌速率的差别超过 4 倍，表明 3D 微球中 HEK293 细胞生产率的提高依赖于

血清百分比。也表明当将胶囊化的细胞维持在含 2% 血清的介质中时，它们以最高速率分泌 GDNF。图 13A 和 13B 分别显示了在不同血清浓度下培养的微球中的细胞存活率和 HEK293 细胞数量。在所有血清浓度下存活率几乎都是 100% (图 13A)，表明降低血清浓度并没有显著地影响细胞存活率。因此，可通过降低血清浓度来简化所分泌蛋白的下游纯化步骤。

实施例 14: HEK293 细胞条件介质中的 GDNF 生物活性测试 测量和方法

将 PC 12 细胞生长在 24 孔板上的 81.5% F12K 介质中，所述介质补充了 15% House 血清、2.5% 胎牛血清和 1% PS。含有分泌的 GDNF 的条件介质(conditioned medium)以 1:1 的体积比与用于 PC12 培养的完全介质混合，用于培养 PC12 细胞。以每孔大约 3000 个细胞 (800 微升) 的密度将细胞铺平板。2 天后，固定细胞以便在相差显微镜下观察。具有比一个细胞的细胞体长度更长的轴突外生(neurite outgrowth)的细胞被认为是阳性结果。已知浓度的标准 GDNF 也被用作阳性对照。不含条件介质的完全介质被用作阴性对照。

结果

GDNF 标准(10 和 50ng/ml)和所有的条件介质样品都显示了 PC12 细胞中的轴突生长，而阴性对照没有显示轴突生长。这表明 HEK293 细胞释放到条件介质中的 GDNF 没有保留其生物活性。

实施例 15: HEK293 细胞条件介质中的 GDNF 生物活性测试

将分泌 GDNF 的 HEK293 细胞包裹在 3D 胶原微球中，培养 14 天。在制备 10 μ m 厚的冷冻切片之前，在 4% 的多聚甲醛中固定微球 3 小时，然后在 30% 蔗糖溶液中过夜。用 1:100-1:50 稀释的第一抗体 (鸡抗人 GDNF 多克隆抗体(Promega 公司)) 和 1:100-1:50 稀释的第二抗体 (兔抗鸡 IgY(Promega 公司)) 进行 GDNF 的免疫组织化学分析，以证实其分泌。用 HRP-DAB 底物系统来观察微球中免疫阳性染色的 GDNF。通过免疫组织化学分析来证实 GDNF 的合成。GDNF 的免疫阳性染色局限于 3D 微球中的细胞集落。

实施例 16: 细胞-基质微球的配制参数的优化

依次加入并混合培养介质、NaOH、胶原溶液、硫酸软骨素溶液和细胞悬液, 如实施例 1 所述制备混合物的 100 微升微球。在标准介质中培养微球 1 天, 然后改为成软骨性分化介质(高葡萄糖 DMEM, 10ng/ml 重组人转化生长因子 β 3(Merck 公司), 100nM 地塞米松(Sigma 公司), 6 μ g/ml 胰岛素(Merck 公司), 100mM 2-磷酸-L-抗坏血酸(Fluka 公司), 1mM 丙酮酸钠(Gibco 公司), 6 μ g/ml 转铁蛋白(Sigma 公司), 0.35mM L-脯氨酸(Merck 公司)和 1.25mg/ml 牛血清白蛋白(Sigma 公司))。

培养微球 21 天, 每 2 天更换介质。在培养 21 天后, 或者对样品进行免疫组织化学分析和组织学分析, 以进行定性分析; 或者在 60°C 下在木瓜蛋白酶溶液(溶于 50mM PB 中的 300 μ g/ml 木瓜蛋白酶, 含有 5mM L-半胱氨酸和 5mM EDTA)中消化过夜, 以进行软骨形成的定量分析。用 1,9-二甲基亚甲蓝(DMMB)测试来进行 GAG 定量。简要地说, 向试管中的样品消化物(sample digest)加入 1ml 的 DMMB 染料溶液, 在摇动器(shaker)上混合容纳物 30 分钟。将试管在 13.2k rpm 下离心 10 分钟, 形成 GAG-染料复合物沉淀。将沉淀重悬于 200 微升的解离剂中, 旋涡混合器(vortex)混合, 测量 656nm 处的吸收。通过荧光测定法由消化混合物定量分析 DNA 含量。简要地说, 将 100 微升 Hoechst 33258 染料溶液加入样品消化物, 分别用 365nm 的激发波长和 458nm 的发射波长进行荧光测量。然后用 DNA 含量使 GAG 含量归一化(normalized)。

结果

如图 14A 所示, 随着细胞接种密度和胶原浓度的提高, 沉积在胶原微球中的 GAG 的量提高。统计学分析显示四个细胞接种密度组之间以及胶原密度组之间的差别是显著的($p < 0.05$)。当用 DNA 含量归一化时, GAG/DNA 的量也随细胞接种密度和胶原浓度的提高而提高, 如图 14B 所示。统计学分析也显示不同组之间也存在显著差异($p < 0.05$)。

用于制备细胞-基质微球的生产装备的示意图

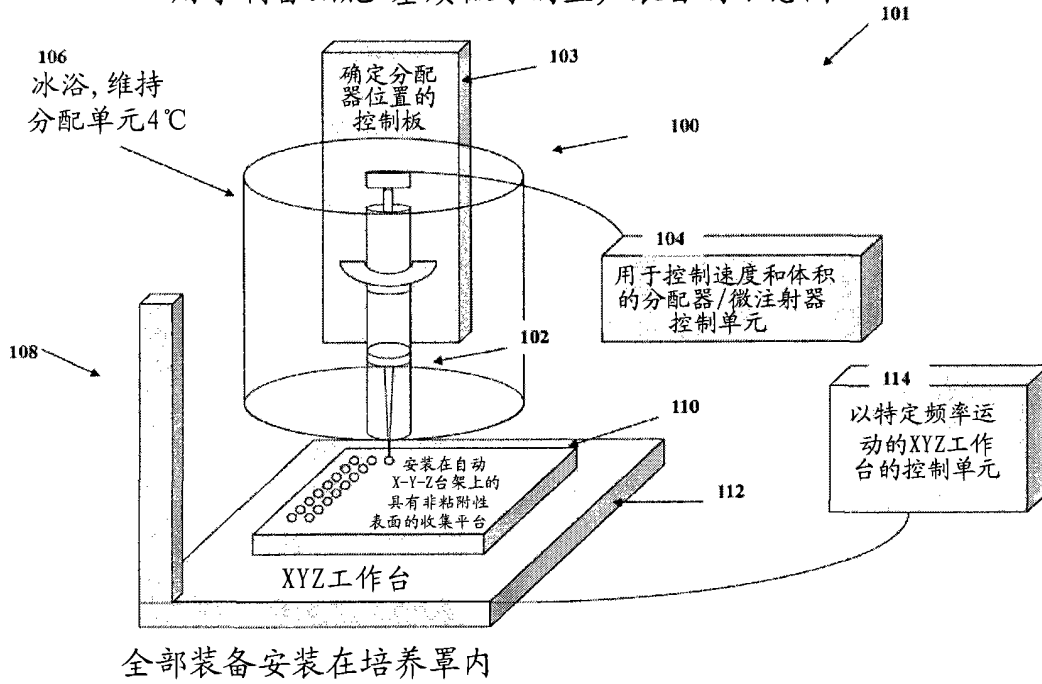


图 1

具有可控制的大小的机械上稳定的细胞-基质微球的生产流程图

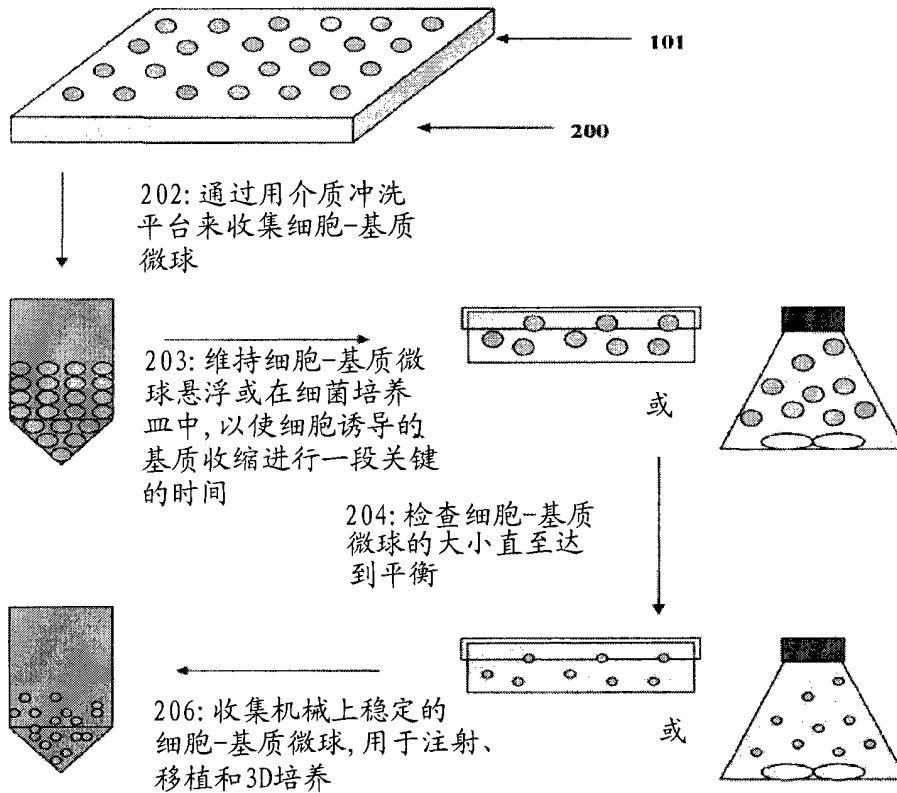


图 2

控制细胞从细胞-基质微球迁移的方法的流程图

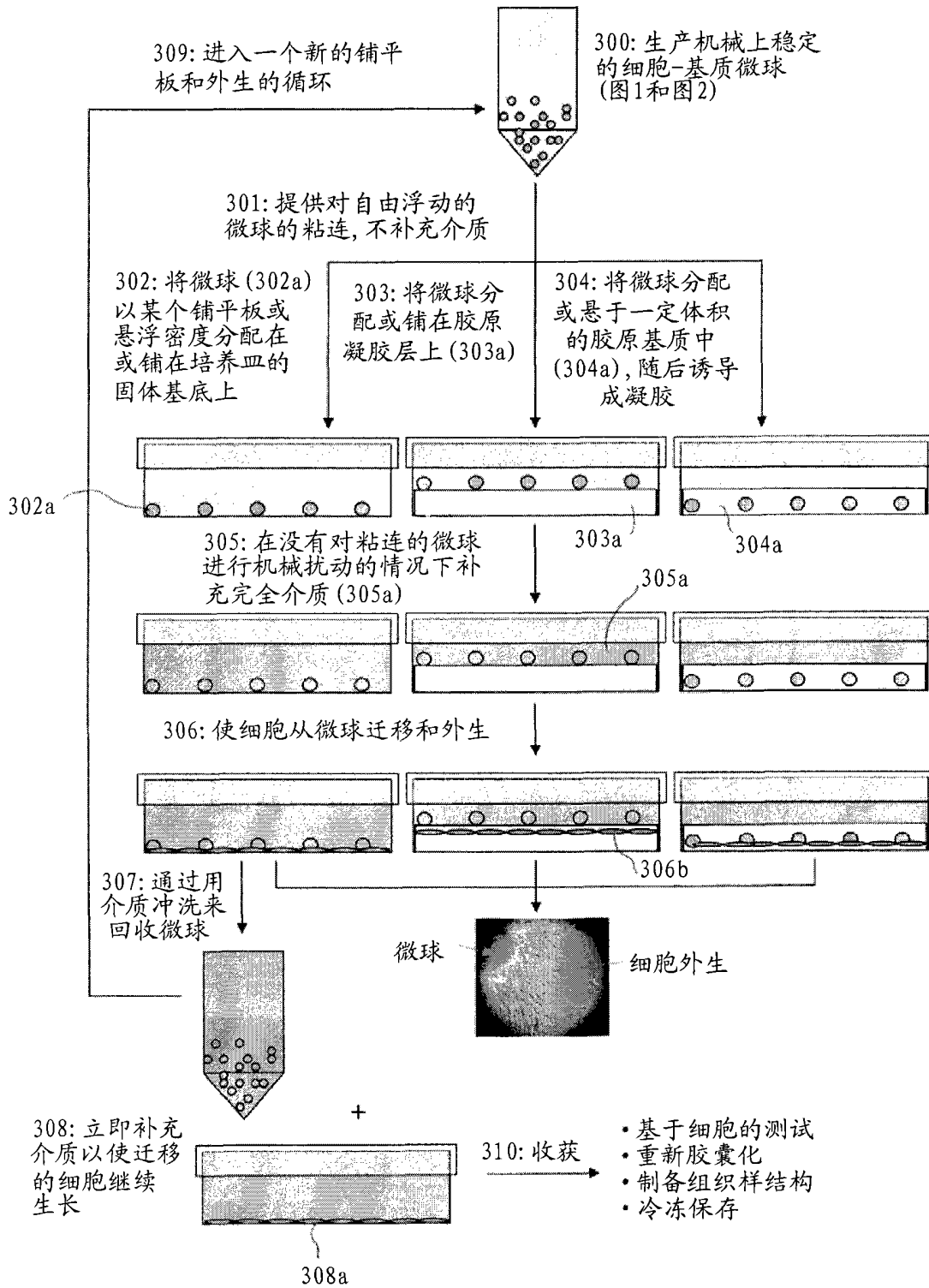


图 3

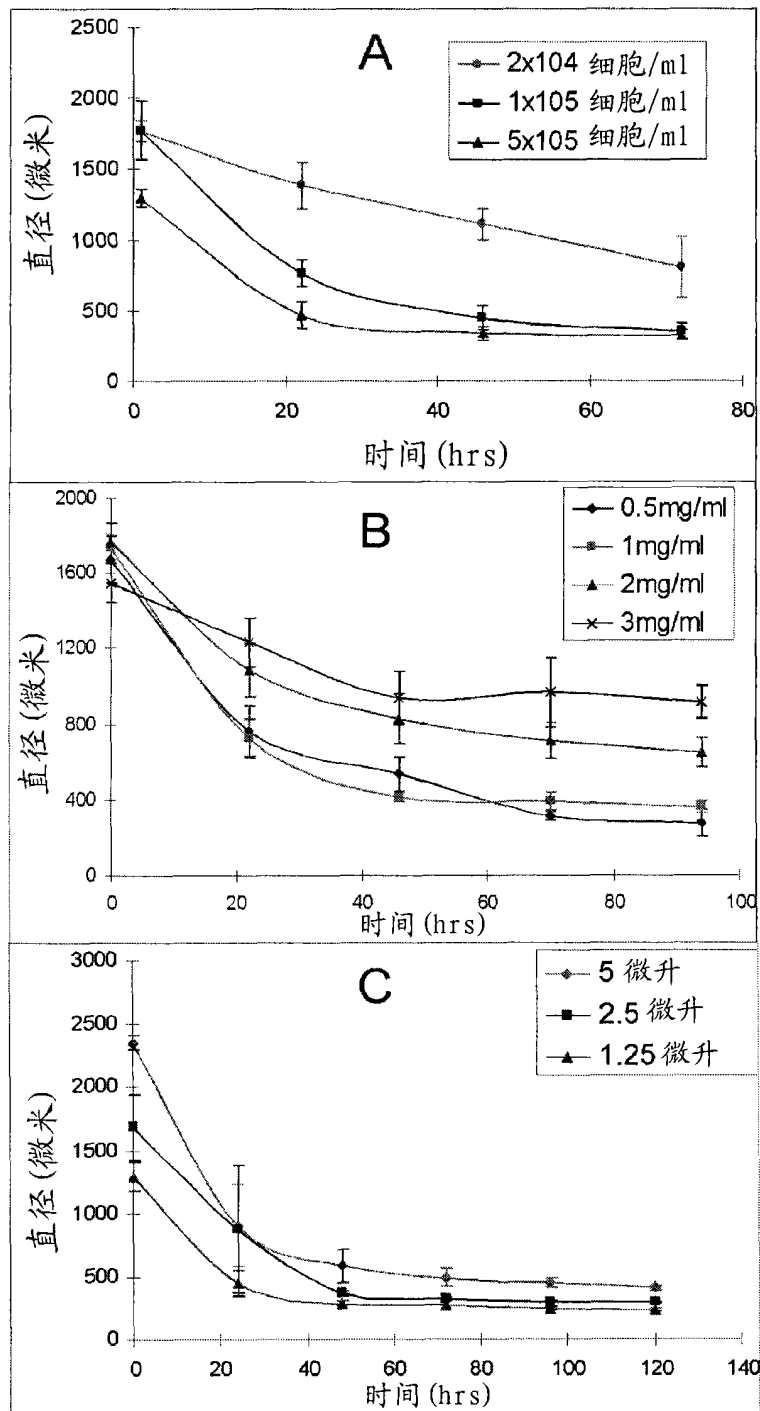


图 4A-4C

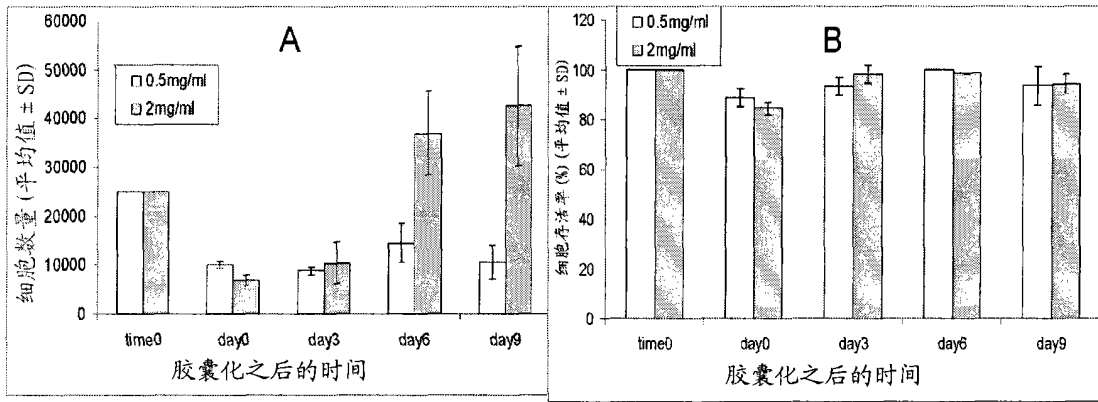


图 5A和5B

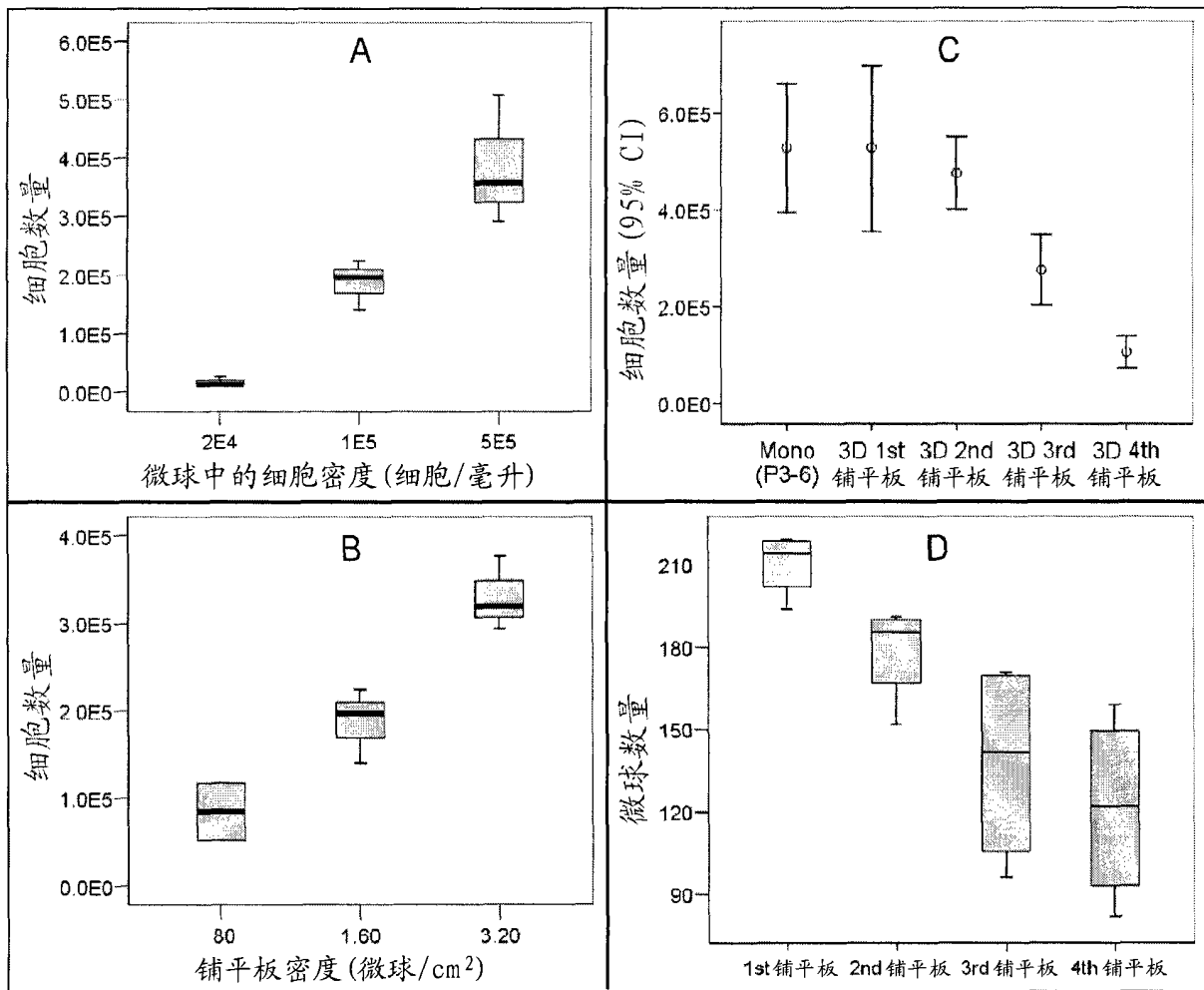


图 6A-6D

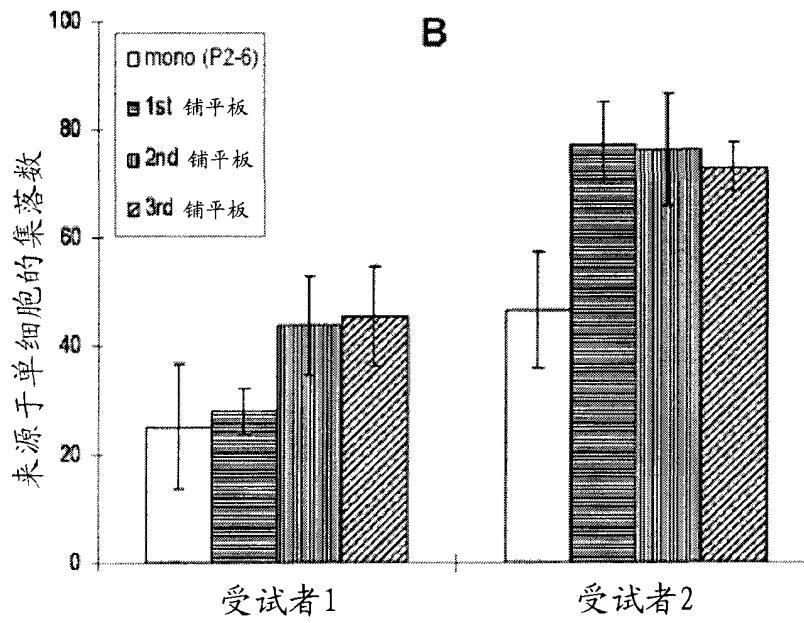


图 7

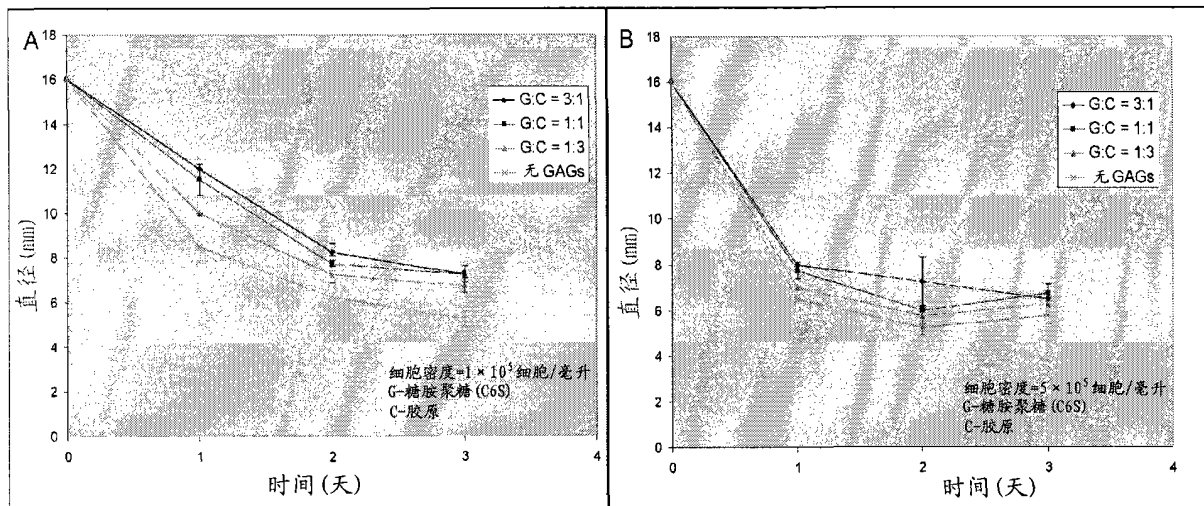


图 8A和8B

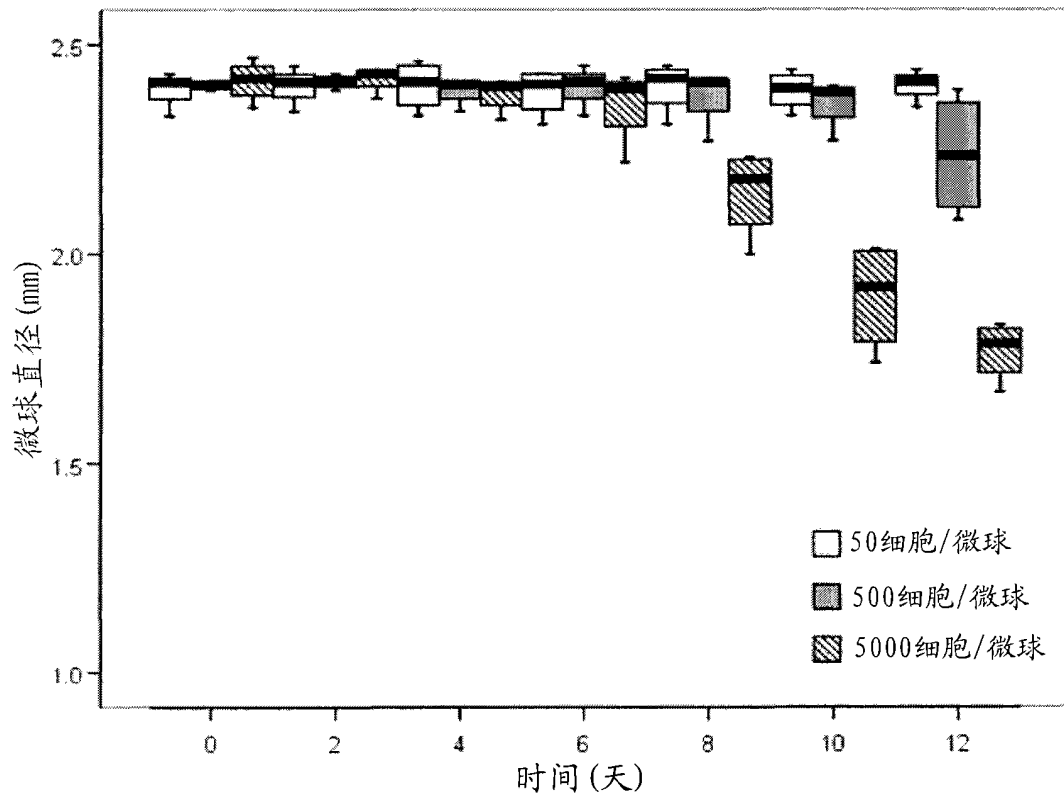


图 9

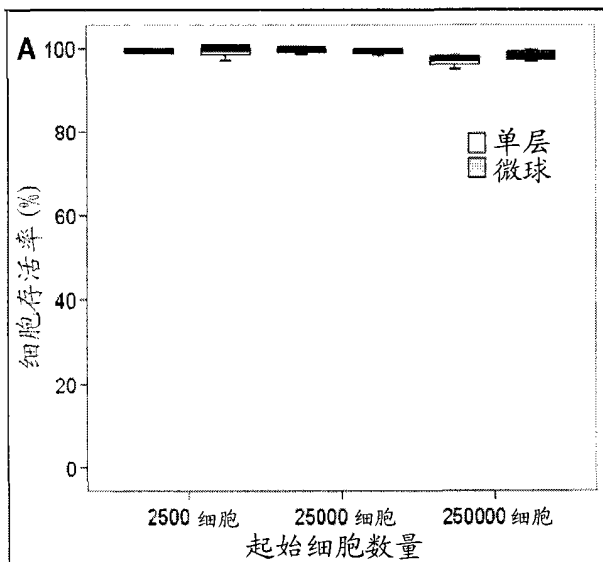


图 10A

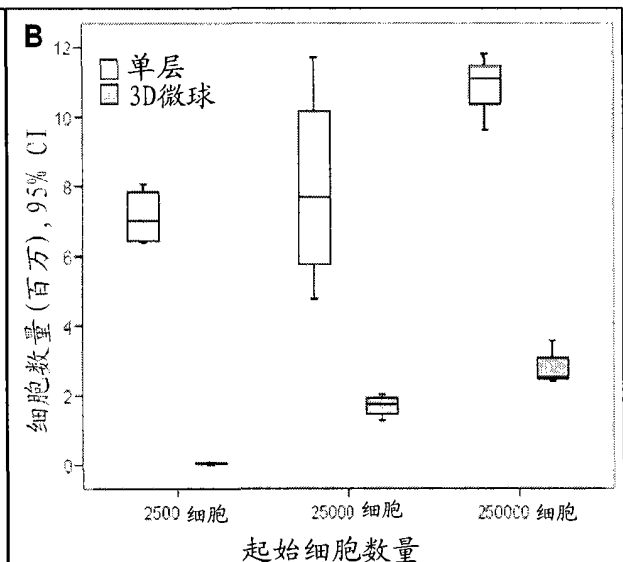


图 10B

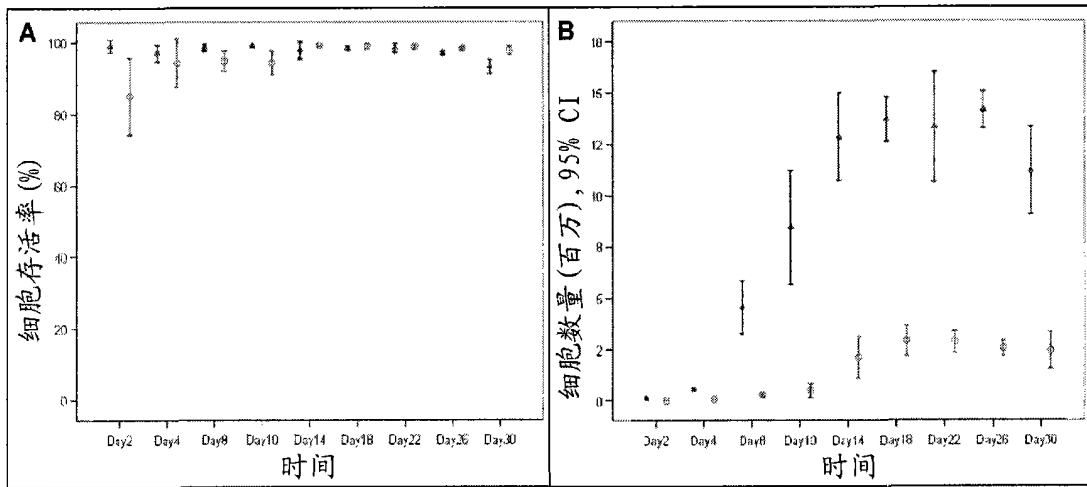


图 11A

图 11B

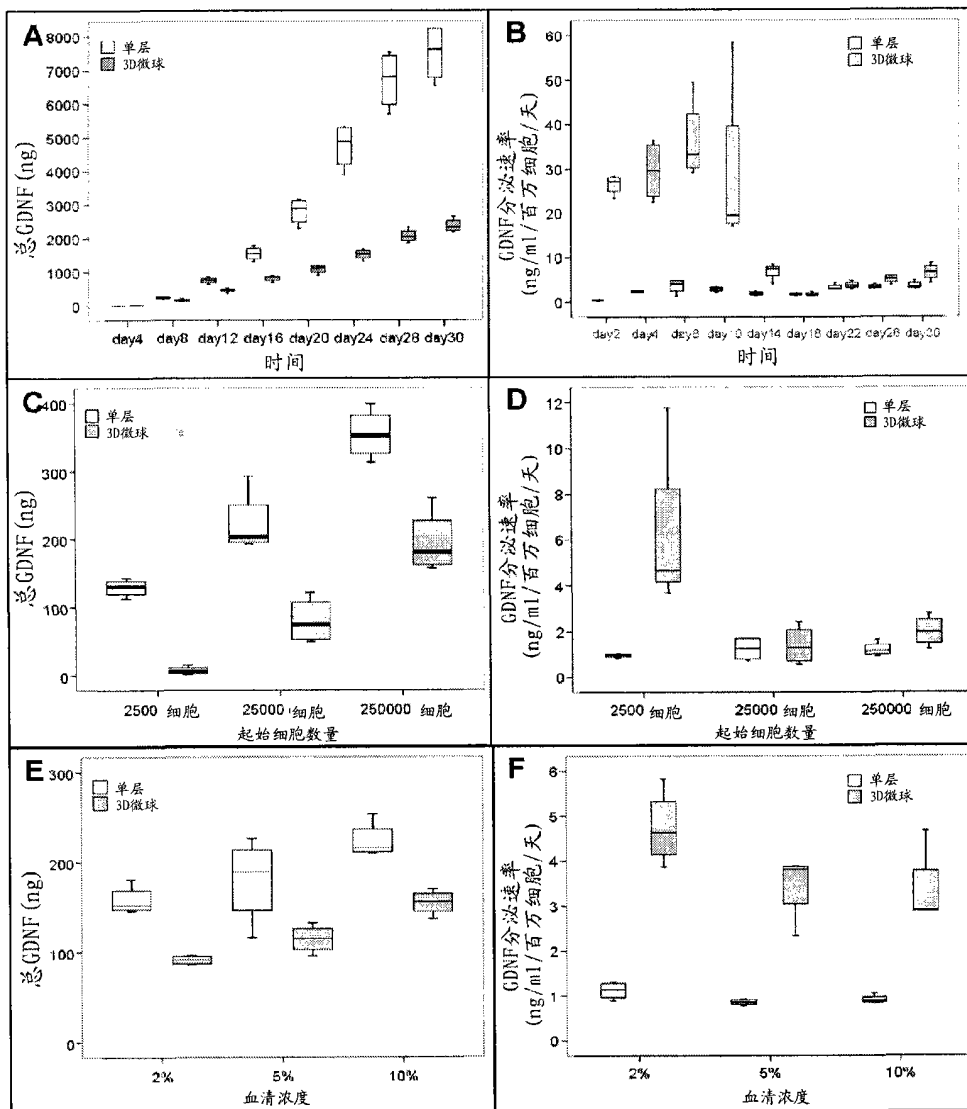


图 12A-12F

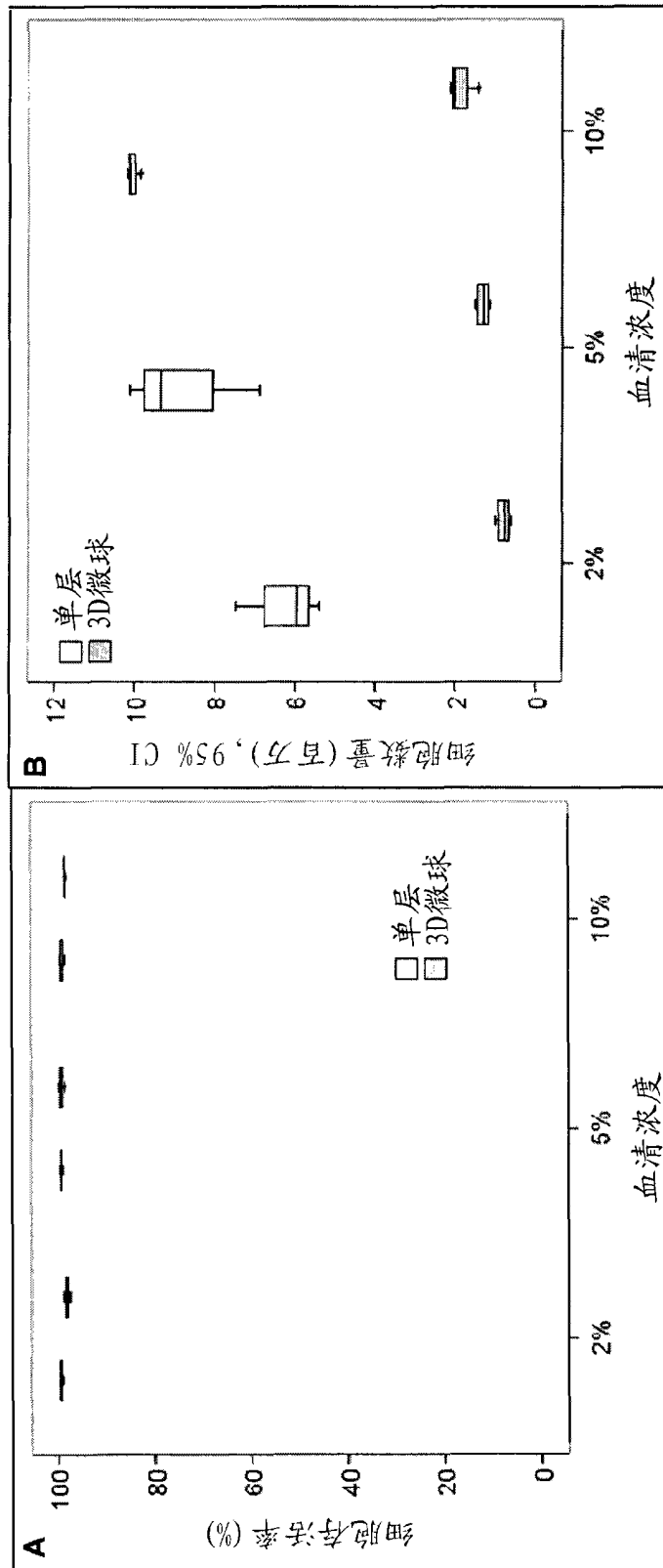


图 13B

图 13A

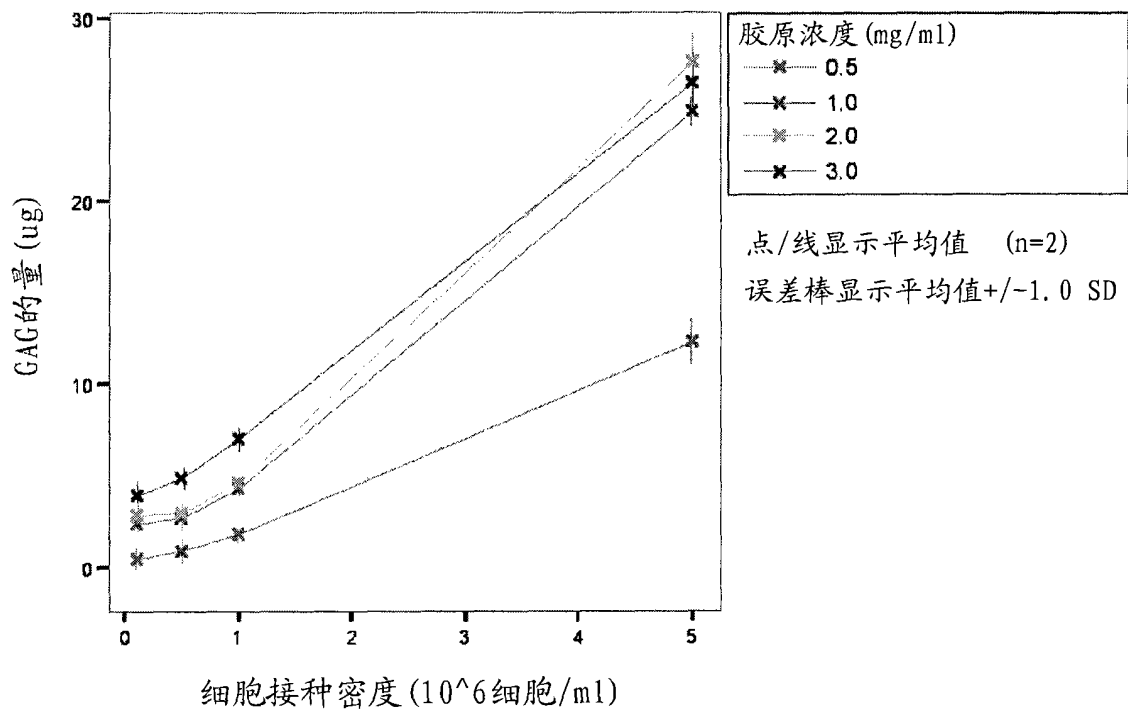


图 14A

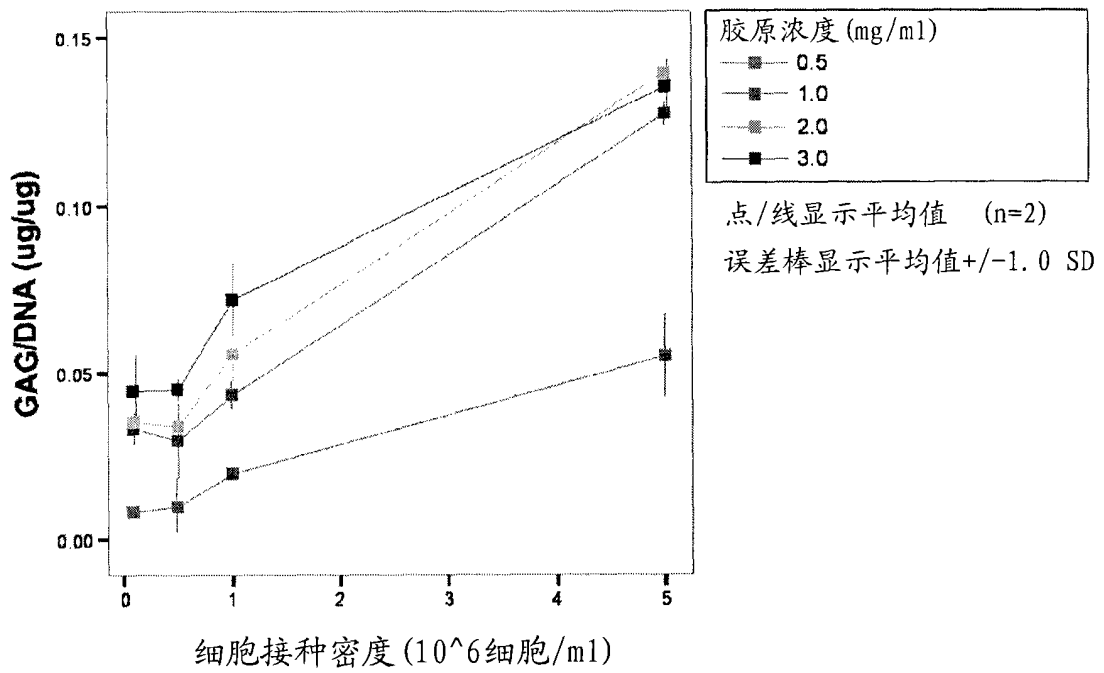


图 14B