

适用于细胞三维培养的微载体的制备方法及反应装置

5 技术领域

本公开涉及微载体的制备方法和装置，尤其是可大规模制备微载体的方法和工艺系统。

背景技术

- 10 3D TableTrix 微载片(北京华龛生物科技有限公司)是为干细胞生产制备定制的新型细胞扩增载体材料。该技术产品采用创新微载体片剂设计，每片微载片重量明确、独立灭菌、即开即用，免去称量、灭菌等传统微载体所需的繁琐操作，优于基于传统微载体的细胞培养。

- 15 微载体可制备成微载片形态。微载片遇水即散成数万个弹性三维多孔微载体颗粒，分散后的弹性微载体的 3D 结构及物理性质与制成微载片前的微载体相比保持不变。微载体的孔隙率>90%，粒径大小可控于 50-500 μm 区间，均一度 $\leq 100\mu\text{m}$ ，且生化、物理性质可定制，实现精确可控的 3D 仿生培养。其原材料选用药用级别，符合临床应用标准。3D TableTrix 微载片配合 3DFloTrixDigest 裂解液(北京华龛生物科技有限公司)等试剂可通过裂解微载体进而实现温和、无损回收细胞，无任何有害物质残留。

- 20 鉴于该微载片的市场需求较大，而现有生产方式生产量有限，因此亟需采用新的方法和设备来扩大生产规模。

发明内容

- 25 在一方面，本文提供了制备乳液的方法，其包括让分散相液体从多孔板的一侧穿过所述多孔板上的多个微孔流动到所述多孔板的另一侧，同时让连续相液体在所述多孔板的所述另一侧平行于所述多孔板流动，对穿过所述多孔板的所述分散相液体进行剪切以在流动的所述连续相液体中形成液体微球。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 0.1 μm -500 μm 。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 30 μm -50 μm 。

- 30 在一些实施方案中，所述乳液为油包水型乳液。

在一些实施方案中，通过调整所述分散相液体和/或所述连续相液体的流速来调整所述液体微球的大小。

在一方面，本文提供了制备微载体颗粒的方法，其包括：

- 1) 准备分散相液体和连续相液体，其中：

所述分散相液体包括人工合成聚合物和/或天然生物大分子；以及固化剂；

所述连续相液体包括有机溶剂和非离子型表面活性剂；

2) 让所述分散相液体从多孔板的一侧穿过所述多孔板上设置的多个微孔流动到所述多孔板的另一侧，同时让所述连续相液体在所述多孔板的所述另一侧平行于所述多孔板流动，对穿过所述多孔板的所述分散相液体进行剪切以在流动的所述连续相液体中形成液体微球；

3) 让所述液体微球中的所述人工合成聚合物和/或天然生物大分子和所述固化剂进行反应以形成颗粒物；以及

4) 收集和洗涤所述颗粒物；

其中步骤 2) 中所述连续相液体的温度不超过 0℃；所述步骤 3) 在不超过 0℃ 下进行 2-72 小时。

在一些实施方案中，步骤 2) 在包括所述多孔板的容器中进行，所述多孔板将所述容器的内部分隔为第一部分和第二部分，所述分散相液体通过所述容器上设置的与所述第一部分相通的分散相入口进入所述第一部分，并随后流动穿过所述多孔板进入所述第二部分；所述连续相液体通过所述容器上设置的与所述第二部分相通的连续相入口进入所述第二部分；所述分散相液体和所述连续相液体混合后的包含所述液体微球的混合液体通过所述容器上设置的与所述第二部分相通的容器出口离开所述容器；所述容器出口和所述连续相入口在所述容器上对侧设置。

在一些实施方案中，通过气体加压使所述分散相液体进入所述容器的第一部分并流动穿过所述多孔板；通过齿轮泵使所述连续相液体进入所述容器的所述第二部分并平行于所述多孔板流动。

在一些实施方案中，步骤 3) 在设置有搅拌装置的罐体内进行。

在一些实施方案中，步骤 4) 在设置有过滤装置的罐体内通过抽真空方式进行。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 0.1μm-500μm。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 30μm-50μm。

在一些实施方案中，相同时间内所述连续相液体的流量为所述分散相液体流量的 5-20 倍。

在一些实施方案中，所述人工合成聚合物选自聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、聚乙二醇二丙烯酸酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚羧基酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚酸酯、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯、聚吡咯、聚酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚氧化乙烯中的至少一种。

在一些实施方案中，所述天然生物大分子选自胶原、蛋白多糖、糖蛋白、明胶、明胶衍生物、甲壳素、藻酸盐、藻酸盐衍生物、琼脂、纤维蛋白原、基质胶、透明质酸、层连接蛋白和纤维连接蛋白中的至少一种。

5 在一些实施方案中，所述有机溶剂选自氢氟醚、四氯化碳、石油醚、环己烷、液态石蜡、食用油、大豆油、橄榄油、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳和四氯乙烯中的至少一种。

在一些实施方案中，所述非离子型表面活性剂为选自失水山梨醇脂肪酸酯、脂肪酸甘油酯、月桂酸酯、烷基酚聚氧乙烯醚、高碳脂肪醇聚氧乙烯醚、司班、PO-500、单油酸酯和土温中的至少一种。

10 在一些实施方案中，所述固化剂选自二乙烯基苯、二异氰酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、甲醛、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、钙离子、四甲基乙二胺、硫酸铵、京尼平和转谷酰胺酶中的至少一种。

15 在一些实施方案中，所述分散相液体还包括缓冲剂，所述缓冲剂选自羧甲基纤维素、氯化钠、聚丙烯酰胺、氯化钾、聚乙烯吡咯烷酮、硫酸钠、氯化钙、氯化钠、碳酸钠和碳酸氢钠中的至少一种。

在一些实施方案中，包括采用清洗剂对所述颗粒物进行洗涤，所述清洗剂选自丙酮、无水硫酸铜、氯化钙、硫酸钠、无水乙醇、医用酒精、氢氟醚、烷基苯磺酸钠、脂肪醇硫酸钠、三聚磷酸钠和去离子水中的至少一种。

20 在一些实施方案中，以重量计，所述连续相液体中有机溶剂和非离子型表面活性剂的比例为 5: 1 至 20: 1。

另一方面，本文提供了乳液制备装置，其包括：

1) 容器；

2) 设置在所述容器内的包括多个微孔的多孔板，所述多孔板将所述第一容器内部分隔为第一部分和第二部分；

25 3) 与所述第一部分相通的用于输入分散相液体的分散相入口；

4) 与所述第二部分相通的用于输入连续相液体的连续相入口；以及

5) 与所述第二部分相通的容器出口，

30 其中所述容器出口和所述连续相入口在所述容器上对侧设置，以使得从所述连续相入口输入的所述连续相液体能够以平行于所述多孔板的方向流过所述第二部分，再从所述容器出口流出。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 0.1 μ m-500 μ m。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 30 μ m-50 μ m。

在一些实施方案中，所述容器为长方体形状。

在一些实施方案中，所述连续相入口为两个或更多个，所述容器出口为两个或更多个。

在一些实施方案中，所述连续相入口和所述容器出口相对于所述容器底部具有相同的水平高度。

5 在一些实施方案中，所述乳液为油包水型乳液。

另一方面，本文提供了制备微载体颗粒的工艺系统，其包括：

1) 乳液制备装置，包括：

容器；

设置在所述容器内的包括多个微孔的多孔板，所述多孔板将所述第一容器内部分

10 隔为第一部分和第二部分；

与所述第一部分相通的用于输入分散相液体的分散相入口；

与所述第二部分相通的用于输入连续相液体的连续相入口；以及

与所述第二部分相通的容器出口，

其中所述容器出口和所述连续相入口在所述容器上对侧设置，以使得从所述连续
15 相入口输入的所述连续相液体能够以平行于所述多孔板的方向流过所述第二部分，再从所述容器出口流出；

2) 与所述分散相入口相通的第一罐体，用于容纳所述分散相液体，所述第一罐体还与加压装置或气瓶相通，以便在压力下使得所述分散相液体进入所述乳液制备装置；

3) 与所述连续相入口相通的配备有冷却设备的第二罐体，用于容纳所述连续相液
20 体并对所述连续相液体降温；

4) 与所述容器出口相通第三罐体，所述第三罐体配备有搅拌器和冷却设备，用于进行乳液反应；以及

5) 与所述第三罐体相通的第四罐体，所述第四罐体配备有过滤设备，用于收集所述乳液反应形成的颗粒物。

25 在一些实施方案中，所述容器为长方体形状。

在一些实施方案中，所述连续相入口为两个或更多个，所述容器出口为两个或更多个。

在一些实施方案中，所述连续相入口和所述容器出口相对于所述容器底部具有相同的水平高度。

30 在一些实施方案中，在所述连续相入口和所述第二罐体之间设置有齿轮泵，用于将所述连续相液体从所述第二罐体输入所述乳液制备装置。

在一些实施方案中，所述工艺洗脱还包括与所述第四罐体相通的第五罐体，所述第五罐体配备有过滤设备，用于对所述颗粒物进行洗涤。

在一些实施方案中，所述第四罐体和第五罐体分别配备有抽真空装置。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 0.1 μ m-500 μ m。

在一些实施方案中，所述微孔的直径为 30 μ m-50 μ m。

本公开提供的方法和设备可用于大规模制备乳液以及微载体颗粒。

5 附图说明

图 1 为乳液制备装置(或微球成型机)的结构示意图。

图 2 为多孔板的结构示意图。

图 3 显示制备微载体颗粒的工艺系统所包括的各种设备及连接关系。

图 4 显示了实施例 1 制备的微载体颗粒的电镜照片。

10 图 5 显示了实施例 2 制备的微载体颗粒的电镜照片。

具体实施方式

除非另有说明，本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员所通常理解的含义。

15 “乳液”，也称为乳状液，为两种互不相溶的液体形成的分散系统，其中将以悬浮的小液滴形式存在的液体称为分散相(或内相)，而连续分布的作为分散介质的液体称为连续相(或外相)。自然界存在大量有机物与水不互溶，有众多乳液是由水相(主要成分分为水或水溶性成分)和有机相(主要成分为不溶于水的有机物，也称为油相)构成。通常，将水相作为分散相，有机相作为连续相的乳液称为“油包水型乳液”。对应地，
20 将有机相作为分散相，水相作为连续相的乳液称为“水包油型乳液”。分散相液体在连续相液体中形成的悬浮小液滴在本文中也称为“液体微球”。

“乳液反应”在本文中指液体微球内各组分之间进行的化学反应。例如，在下文描述的微载体颗粒制备过程中，通过让大分子化合物如人工聚合物在液体微球内进行固化而获得不溶于水相和有机相的颗粒物。

25 “多孔板”在本文中指在其上形成有多个微孔的板状物。在本公开提供的方法和设备中，将“多孔板”用来限制分散相液体的流动，使分散相液体从多孔板的一侧到达另一侧仅能靠穿过所述多个微孔来实现。因此，就用途来说，多孔板并不限于特定的形状，甚至可以采取不规则形状，只要能实现该目的即可。但是，就制备乳液而言，采用板状形状是优选的，既方便加工，也有利于形成均一的液体微球尺寸。微孔
30 的大小一般为直径 0.1 μ m-500 μ m。在多孔板有相当的厚度时，微孔实际上是有一定长度的微管道，但是，为了叙述简洁，“微孔”在含义上也包括这种微管道。类似地，本发明也不对微孔板的材质做具体限定，只要能实现上述目的并且对分散相液体和连续相液体在化学上均为惰性即可，例如可以采用塑料、陶瓷等材料。

本文中提到在乳液制备装置中让连续相“平行”于多孔板流动。在理想状态下，分散相液体垂直于多孔板穿过微孔，而连续相液体的流动方向垂直于穿过微孔的分散相液体液流(即平行于所述多孔板)，从而将分散相液体液流切割为液体微球。当然，本领域技术人员会意识到，在大多数情况下，即使不是严格平行流动，也可以实现连续相液体将分散相液体液流切割为液体微球的目的。因此，在乳液形成过程中，大部分情况下，让乳液制备装置上的连续相液体入口和出口设置在乳液制备装备的相对的两侧即可，即“对侧设置”。在一些实施方案中，连续相液体入口和出口具有相同的水平高度。在一些实施方案中，可以在大致为立方体形状的容器的相对两侧水平设置多个连续相液体入口和多个容器出口，以有利于连续相液体的平行流动。

10 “微载体颗粒”或“微载体”指微米尺度范围大小的颗粒物，适合于细胞附着于其上生长。微载体颗粒的大小优选在 50-500 μm 之间。孔隙率通常大于 80%，例如，90%或 95%。大多数细胞只有贴附在固体基质表面才能增殖，而微载体多孔、大表面积、生物相容性等特征使细胞可以生长在本文制备出的微载体的内部，形成三维培养模式，这种仿生型三维培养模式得到了越来越广泛的应用。

15 “大规模”指制备的产物的量可以满足实验室研究直至工业生产需要。例如，可以每次制备 1 mL 至 1000 L (例如，5mL 至 100L，100mL 至 10L，500mL 至 1 L 等)、甚至更多的乳液。对于微载体颗粒，“大规模”例如包括每次制备 1mg 至 1000kg (例如 100mg 至 100kg，1g 至 10kg，200g 至 1kg 等)、甚至更多的微载体颗粒。

在本公开的一些方面，提供了制备乳液的方法，可用于进行大规模的乳液制备。

20 该方法包括让分散相液体从多孔板的一侧穿过所述多孔板上的多个微孔流动到所述多孔板的另一侧，同时让连续相液体在所述多孔板的所述另一侧平行于所述多孔板流动，对穿过所述多孔板的所述分散相液体进行剪切以在流动的所述连续相液体中形成液体微球。由于多孔板上可密集地设置众多微孔，通过分散相液体和连续相液体在多孔板附近以基本上垂直的方向交叉流动，可连续地和快速地制备大量乳液。

25 在一些具体实施方案中，该乳液形成过程在包括多孔板的容器中进行。更详细地，设置在所述容器内的多孔板将所述容器的内部分隔为第一部分和第二部分，所述分散相液体通过所述容器上设置的与所述第一部分相通的分散相入口进入所述第一部分，并随后流动穿过所述多孔板进入所述第二部分；所述连续相液体通过所述容器上设置的与所述第二部分相通的连续相入口进入所述第二部分；所述分散相液体和所述连续相液体混合后的包含所述液体微球的混合液体通过所述容器上设置的与所述第二部分相通的容器出口离开所述容器。为了让所述连续相基本上与所述多孔板平行地通过所述第二部分，所述容器出口和所述连续相入口在所述容器上对侧设置。

通常，所用的分散相液体的量不大于连续相液体的量，例如在制备的乳液中分散相液体与流动相液体比例为 1: 1 至 1: 30，优选 1: 5 至 1: 20。超出此比例范围可能

会影响到最终产物的产率。通过调整微孔的大小可控制形成的液体微球的大小。另外，分散相的流速和连续相的流速以及它们之间的相对流速也可以影响液体微球的大小。

为了让分散相液体和连续相液体基本上匀速地流动，可通过使用加压气体或诸如齿轮泵的装置来控制液体流动。例如，在一个具体实施方案中，通过气体加压促使分散相液体匀速流动，通过齿轮泵转动来推动连续相液体匀速流动。在本发明的一些实施方案中，该分散相为包括反应物的水相，连续相为包括有机物的有机相。

采用上述乳液形成过程，本公开还提供了制备微载体颗粒的方法。该方法适合于大规模制备微载体颗粒。在该方法中，使用的分散相液体包括待固化的化合物(例如，人工合成聚合物和/或天然生物大分子)和固化剂。使用的连续相包括有机溶剂和非离子型表面活性剂。通过乳液形成过程产生的液体微球在搅拌条件下反应，形成颗粒物。随后通过过滤收集所述颗粒物，并采用清洗剂对颗粒物进行洗涤。

本发明人发现，在低温条件下(0℃以下，例如-10℃以下，例如-30℃)进行上述乳液形成过程和反应过程，所制得的颗粒物具有更好的孔隙率和比表面积，更适于作为细胞培养的三维载体。通常，温度越低，制备得到的微载体颗粒的孔径越小。例如，在-30℃下进行反应，制备得到的微载体颗粒的孔径在 5μm-20μm 左右。

为了让分散相液体和连续相液体基本上匀速地流动，可通过使用加压气体或诸如齿轮泵的装置来控制液体流动。例如，在一个具体实施方案中，通过气体加压促使分散相液体匀速流动，通过齿轮泵转动来推动连续相液体匀速流动。通常，分散相受到的压强越大，流速越快，则制备的微载体粒径越大，反之则越小。另外，连续相流速越低则所制备的微载体颗粒的粒径越大，反之则粒径越小。因此，可通过灵活控制多孔板上微孔的直径以及分散相液体和连续相液体的流速来调整最后制得的微载体颗粒的粒径。

作为实例，所述人工合成聚合物包括聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、聚乙二醇二丙烯酸酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚羟基酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚酸酯、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯、聚吡咯、聚酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚氧化乙烯中的至少一种。

作为实例，所述天然生物大分子包括胶原、蛋白多糖、糖蛋白、明胶、明胶衍生物、甲壳素、藻酸盐、藻酸盐衍生物、琼脂、纤维蛋白原、基质胶、透明质酸、层连接蛋白和纤维连接蛋白中的至少一种。

作为实例，所述固化剂包括二乙烯基苯，二异氰酸酯，N-羟基琥珀酰亚胺 N,N-亚甲基双丙烯酰胺，甲醛、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、钙离子、四甲基乙二胺、硫酸铵、京尼平、和转谷酰胺酶的至少一种。

作为实例，所述有机溶剂包括氢氟醚、四氯化碳、石油醚、环己烷、液态石蜡、食用油、大豆油、橄榄油、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳和四氯乙烯中的至少一种。

作为实例，所述非离子型表面活性剂包括失水山梨醇脂肪酸酯、脂肪酸甘油酯、月桂酸酯、烷基酚聚氧乙烯醚、高碳脂肪醇聚氧乙烯醚、司班、PO-500、单油酸酯、土温中的至少一种。

作为实例，对所述颗粒物进行洗涤所采用的清洗剂包括丙酮、无水硫酸铜、氯化钙、硫酸钠、无水乙醇，医用酒精、氢氟醚、烷基苯磺酸钠、脂肪醇硫酸钠、三聚磷酸钠、和去离子水中的至少一种。

在一些实施方案中，所述分散相液体还包括缓冲剂。作为实例，所述缓冲剂包括羧甲基纤维素、氯化钠、聚丙烯酰胺、氯化钾、聚乙烯吡咯烷酮、硫酸钠、氯化钙、氯化钠、碳酸钠、和碳酸氢钠中的至少一种。

通常，分散相中待固化的化合物的浓度在 1%-20%(wt)之间，而固化剂的用量则可根据待固化的化合物的性质和固化剂本身的性质进行调整。

应指出，上述组分仅作为实例列出了适合于制备微载体颗粒的部分原料，本领域技术人员易于根据这些物质的理化性质采用其他类似物质对它们进行一种或多种物质替换，并根据本公开提供的方法进行简单实验来验证可行性。显然，采用替换物根据本公开提供的方法制备微载体颗粒的方法及其产物也应落入本发明的范围内。

在一些方面，本公开还提供了一种乳液制备装置，其可用于大规模制备乳液。该乳液制备装置包括：

容器；

设置在所述容器内的包括多个微孔的多孔板，所述多孔板将所述第一容器内部分隔为第一部分和第二部分；

与所述第一部分相通的用于输入分散相液体的分散相入口；

与所述第二部分相通的用于输入连续相液体的连续相入口；以及

与所述第二部分相通的容器出口，

其中所述容器出口和所述连续相入口在所述容器上对侧设置，以使得从所述连续相入口输入的连续相液体能够以平行于所述多孔板的方向流过所述第二部分，再从所述容器出口流出。

图 1 为本发明的乳液制备装置主体结构的截面图，示意性地显示了该乳液制备装置的一些结构和各种液体流动方向。如图 1 所示，容器 1 包括由容器壁 11 围成的内部空间，该内部空间由设置在容器 1 内的多孔板 14 分隔为上侧的第一部分 12 和下侧的第二部分 13。该容器 1 设置有与第一部分 12 相通的分散相入口 15、与第二部分 13 相通的连续相入口 16 和容器出口 17。连续相入口 16 与容器出口 17 分别设置在容器 1 的两侧。在一些实施方案中，连续相入口 16 与容器出口 17 相对于容器 1 的底部 18 基本

上在同一高度。多孔板 14 上设置有多个微孔 141 (见图 2)。可通过加压将分散相液体从分散相入口 15 输入第一部分 12, 在压力下, 分散相液体会继续流动穿过多孔板 14 上的微孔 141 进入下侧的第二部分 13。同时, 连续相液体通过连续相入口 16 进入第二部分 13, 基本上平行于所述多孔板 14 流动, 并从所述容器出口 17 流出。在多孔板 14 的下侧, 流动连续相液体将穿过多孔板 14 上的微孔 141 的分散相液体剪切为液体微球, 该液体微球不溶于连续相液体而形成悬浮于连续相液体中的众多液体微球。这些液体微球随连续相的流动而从容器出口 17 离开。收集从容器出口 17 流出的液体混合物即得到制备的乳液。

为了得到适合大小的液体微球, 可以对多孔板 14 上的微孔 141 的孔径进行调整。在微孔直径为 $0.1\mu\text{m}$ – $500\mu\text{m}$ 时, 可制备成 $1\mu\text{m}$ – $1000\mu\text{m}$ 范围内、粒径误差在 $100\mu\text{m}$ 以内的均一性液体微球。

在一些实施方案中, 所述分散相液体为水相液体, 所述连续相液体为有机相液体, 所制备的乳液为油包水型乳液。

在一些方面, 本公开提供了制备微载体颗粒的工艺系统, 其用于可大规模制备微载体颗粒。该工艺系统除包括上述乳液制备装置, 还包括多个罐体。

其中的一个罐体与所述分散相入口相通, 用于容纳所述分散相液体。该罐体可配备有搅拌器, 用于配制分散相液体。该罐体还可以与加压设备或者容纳有压缩气体的气瓶连接, 通过向该罐体内加压而使分散相液体进入所述乳液制备装置。所用的气体应不与分散相液体和连续相液体反应, 例如可以选自空气、氮气、二氧化碳、氧气及氩气等。所用的气体压强例如可以为 1Kpa 至 100Kpa 。

其中的另一个罐体与所述连续相入口相通, 用于容纳所述连续相液体并对所述连续相液体降温。该罐体也可用于所述连续相液体的配制, 或者在将配制好的连续相液体输入罐体后对连续相液体进行降温。对罐体内容物进行降温的方法在本领域是公知的, 例如通过给罐体设置夹套, 并通过制冷机在夹套内造成制冷液循环。制冷液可例如包括液氮、乙醇、三氯乙烷、异丙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙二醇、丙二醇、异丁烷、正己烷、氯仿、四氢呋喃、溴己烷、乙腈中的至少一种。

其中的另一个罐体与所述容器出口相通, 可接收从所述乳液制备装置流出的包括液体微球的混合液体。该罐体配备有搅拌器和制冷机, 在低温条件下(例如 -10°C)让所述液体微球中含有的反应物(例如生物大分子和相应的固化剂)进行反应, 形成颗粒物。

其中的另一个罐体用于从混合液中分离所形成的颗粒物。该罐体内可设置为有滤设备, 例如真空过滤器, 方便利用真空泵通过抽真空方式去除液体成分, 留下所述颗粒物。

任选地，还可以包括一个用于对所述颗粒物进行洗涤的罐体。该罐体也可设置有真空过滤器，通过向该罐体内加入洗涤剂后抽真空，反复多次(例如 3 至 5 次)对所述颗粒物进行洗涤。

5 在一个具体实施方案中，本发明的制备微载体颗粒物的工艺系统如图 3 所示。其中混合罐用于连续相液体(有机相)的配制，在配制完成后可例如通过压力将连续相液体转移至配备有制冷机的预冷罐，在这里将连续相液体降至 0℃ 以下(例如-10℃ 以下)。水相罐用于分散相液体的配制。将配制好的分散相液体和连续相液体分别通过压力和泵输送至乳液制备装置。接着将乳液制备装置内生成的包括液体微球的乳液转移至反应罐中进行乳液反应。反应生成的颗粒物随后在滤油罐中通过真空过滤与乳液的其他成分分离。最后在水洗濯中经清洗剂洗涤，获得微载体颗粒物。

10 现结合图 3 对上述工艺系统的结构和工作方式进一步详细说明。

本系统由混合罐、预冷罐、水相罐、反应罐、滤油罐、水洗罐六个罐体为主体，配合使用的真空泵、冷水机、控制面板等其他设备，若干条罐体间连接管道，以及外接的饮用水、纯化水、注射用水、压缩空气、高温蒸汽等输送管道组成。本系统除部分阀门、连接外，通体为 316L 不锈钢材质，保证物料接触均为 316L 不锈钢材质，避免引进其他杂物。

罐体排列按照工艺步骤左右排开，并根据重要工艺控制点对部分罐体高度位置进行确定，以工作台形式体现。表 1 中对各个设备进行了简要说明。

表 1 对各个罐体及其他相关设备的简要说明

罐体	简要说明
混合罐	1、混合罐采取可移动设计，使得油相配比、清洗更方便； 2、混合罐配有压缩空气接头，使罐体与其他固定罐体有效衔接，驱动物料进行后续处理； 3、电机采用全密封结构，有效实现罐体全密封功能； 4、配有密度计，可实时观测物料实时密度。
预冷罐	1、配有密度计，可实时观测物料实时密度； 2、配有压缩空气、蒸汽两个接口，有效实现设备清洗，在线灭菌； 3、罐体采用底部进料方式，有效避免物料贴壁损耗等现象，同时避免罐底管道有物料留存。
齿轮泵连接	1、齿轮泵通过快接口连接，在保证密闭性同时，可轻易拆卸进行清洗维修；
反应罐	1、配有压缩空气、蒸汽两个接口，有效实现设备清洗，在线灭菌；

	2、罐底阀门采用手动阀、气动隔膜阀双层控制，保证物料意外排出； 3、反应罐入料口为弯角状，可使液体物料贴壁流入罐体，减少风险。
滤油罐	1、罐体连接真空泵，并且罐底为 50μm 的 316L 筛网。可快速有效去除液体留存，并有效留住物料； 2、罐体出料口距离罐底有一定高度，可有效去除无效物料，将有效物料转入后面工序。
水洗罐	1、配有注射用水入口，且注射用水通过换热器，可快速冷却至常温通入罐体； 2、罐体连接真空泵，并且罐底为 50μm 的 316L 筛网。可快速有效去除液体留存，并有效留住物料；
控制面板	1、本罐体系统的所有搅拌转速开启关闭及调节、气动隔膜阀开启关闭、温度检测等重要参数均在控制面板上进行控制，极大的减少了劳动量；
罐体系统灭菌	1、反应罐、水洗罐、水相罐、预冷罐均有高温高压蒸汽接口，并且均由气动隔膜阀控制，整个罐体系统可实现在线灭菌，并且灭菌时长及灭菌温度可通过控制面板设定。

1. 有机相原液 1 配比。首先检查混合罐、预冷罐、液体除菌过滤器、量具洁净状态及清场记录，洁净且在清场效期内方可使用。量取原辅料，将多种原辅料通过一定比例依次使用蠕动泵加入混合罐。打开混合罐搅拌，转速设定为 10-150rpm，搅拌时间 0.5-4h。将罐体封闭只保留压缩空气口打开，至罐体内部压力达到 0.1MP-1MP 将原液 1 打入液体除菌过滤器，再通入预冷罐，预冷罐外壁夹层中配有制冷液。通过冷水机持续制冷作用，将原液 1 温度降至 0℃到-196℃备用，期间预冷罐搅拌保持在 10-2000rpm；搅拌时间 0.5-24h。

有机相原液 1 为混合有机相，含有有机溶剂和非离子型表面活性剂，其中，所述有机溶剂为选自氢氟醚、四氯化碳、石油醚、环己烷、液态石蜡、食用油、大豆油、橄榄油、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳和四氯乙烯中的至少一种，所述非离子型表面活性剂为选自失水山梨醇脂肪酸酯、脂肪酸甘油酯、月桂酸酯、烷基酚聚氧乙烯醚、高碳脂肪醇聚氧乙烯醚、司班、PO-500、单油酸酯、土温中的至少一种。

制冷液包括但不限于液氮、乙醇、三氯乙烷、异丙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙二醇、丙二醇、异丁烷、正己烷、氯仿、四氢呋喃、溴己烷、乙腈中的至少一种，利用低温制冷机冷却至 0~-196 摄氏度。

2. 原液 2 配比。首先检查水相罐、量具洁净状态及清场记录，洁净且在清场效期内方可使用。称取原料，将主要原液 2-1 投入注射用水中配比为一定浓度、一定体积的原液 2-1 溶液。将原液 2-1 溶液用蠕动泵加入至水相罐，再加入原液 2-2，转速设定为 10-300rpm，搅拌时间 5min-120min。

5 原液 2-1 包括人工合成的生物材料和或天然生物材料；以及缓冲液。

所述人工合成的生物材料为选自聚乙二醇、聚乙二醇衍生物、聚乙二醇二丙烯酸酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚羟基酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚酸酯、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯、聚吡咯、聚酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚氧化乙烯中的至少一种。

所述天然生物材料为选自胶原、蛋白多糖、糖蛋白、明胶、明胶衍生物、甲壳素、藻酸盐、藻酸盐衍生物、琼脂、纤维蛋白原、基质胶、透明质酸、层连接蛋白和纤维连接蛋白中的至少一种。

缓冲液包括羧甲基纤维素、氯化钠、聚丙烯酰胺、氯化钾、聚乙烯吡咯烷酮、硫酸钠、氯化钙、氯化钠、碳酸钠、和碳酸氢钠的至少一种。

原液 2-2 包括但不限于：二乙烯基苯、二异氰酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺 N,N-亚甲基双丙烯酰胺、甲醛、戊二醛、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、钙离子、四甲基乙二胺、硫酸铵、京尼平、转谷酰胺酶等。

3. 进入反应罐进行混合。首先检查反应罐洁净状态及清场记录，均合格方可使用。反应罐外壁夹层中流动制冷液，先将反应罐通过冷水机持续作用，将罐体温度降至 0-负 196℃，温度达到要求，且原液 1 及原液 2 均准备完成后，将原液 1 通过微球成型机(即乳液制备装置)以 50-5000ml/min 的流速进行混合打入反应罐。将原液 2 通过气体加压的方式，通过微球成型机进入反应罐，气体压强 1Kpa-100Kpa。气体组成包括但不限于空气、氮气、二氧化碳、氧气及氩气等。打开反应罐搅拌并将转速设定为 10-1200rpm，搅拌 2-72h。

微球成型机结构可参见图 1，可分为 3 部分：

上层为原液 2 室，液体流动方向为垂直方向，原液 2 自上而下流动；原液 2 为惰性气体驱动。稳定的气压驱使原液 2 以垂直方向自上而下的匀速通过多孔板。

中间层为多孔板，板面由大量的切割后的微孔组成，微孔直径范围 0.1μm-500μm，切割板可以为单层片状、多层片状、空管状、空心块状等。微孔的大小会影响形成的乳液液滴直径及最终材料粒径，最终微载体颗粒的粒径约为微孔直径 5-20 倍。

下层为原液 1 流通层，流通方向为水平方向。原液 1 由齿轮泵驱动，控制单位时间内，原液 1 流量为垂直通过切割板的原液 2 的 5-20 倍。流速会影响最终形成乳液的稳定性。偏离此范围有可能造成较严重的破乳现象。

原液 2 自上而下，通过水相罐上部的外接气路，输送稳定的气压，气体压强可设置范围 1Kpa-100Kpa，稳定区间在 ± 1 Kpa。气体组成成本包括但不限于空气、氮气、二氧化碳、氧气及氩气等。在稳定压强的作用下，原液 2 稳定地自上而下通过多孔板，形成圆形液滴的初始液。与此同时，原液 1 通过齿轮泵在多孔板的下部匀速流过，原液 1 将通过多孔板的原液 2 剪切成稳定的微球液滴，由于原液 1 原液 2 不互溶，因此形成稳定的有原液 2 组成的微球液滴悬浮于原液 1 中。原液 2 微球的粒径受多孔切割板上微孔模具直径的影响，微孔模具的直径范围 0.1 μ m-500 μ m 区间，可制备成 1 μ m-1000 μ m 范围内，粒径误差范围在 100 μ m 以内的均一性液体微球。

4. 清洗。首先检查滤油罐、水洗罐洁净、量具状态及清场记录，洁净且在效期内方可使用。将反应完成的物料通过 0.1MP-1MP 的压缩空气打入滤油罐，通过真空泵持续作用去除物料中多余液体。上述工序完成后首先加入清洗剂，打开滤油罐搅拌，设定 10-70rpm 使物料与清洗剂充分混合。将搅拌关闭 2-5 分钟静置，再开启搅拌设定为 20-50rpm 使有效物料与清洗剂充分混合。使用 0.1MP-1MP 压缩空气将有效物料与清洗剂打入水洗罐。通过真空泵持续作用将水洗罐中的清洗剂除去。加入一定体积及温度的注射用水至水洗罐进行五次反复清洗，每次搅拌（清洗）时长分别为 10 分钟-24 小时。

清洗剂包括但不限于丙酮、无水硫酸铜、氯化钙、硫酸钠、无水乙醇，医用酒精、氢氟醚、烷基苯磺酸钠、脂肪醇硫酸钠、三聚磷酸钠、去离子水等。

5. 冻干与筛选。首先检查冻干盒、量具、冻干机洁净状态及清场记录，洁净且在效期内方可使用。将清洗完成的物料根据湿重与注射用水以一定比例进行混合，在-10~-196 摄氏度的冷冻装置或冷冻液中进行冷冻，冷冻后转移至冻干机内冷冻干燥 12 小时-96 小时。得到的三维多孔微载体上微孔的孔径为 20-200 微米，孔隙率可以达到 85-95%。

6. 制片包装。首先检查制片机洁净状态及清场记录，洁净且在效期内方可使用，将需要制片的物料加入制片机，通过设备调试的各项参数，可压出质量相同、形态一致的独立片剂。制片过程中会实时观察记录并测试片剂的各项性能，如吸水性，分散性，稳定性等。制成的片剂会及时按照一定量装入相应的包装瓶，包装完成后即可申请检验等后续操作。

以下通过具体实施例进一步阐述本发明制备微载体颗粒的工艺过程。

30

实施例 1

油相配比

1.1 首先检查混合罐、预冷罐、液体除菌过滤器、量具洁净状态及清场记录，洁净且在清场效期内方可使用；

1.2 取石油醚 100L、PO-500 试剂 10L 依次使用蠕动泵加入混合罐。打开混合罐搅拌，转速设定为 60rpm 搅拌 1 小时；

- 1.3 将混合罐罐体封闭只保留压缩空气口打开，至罐体内部压力达到 0.1MP 将油相打入预冷罐。通过冷水机持续制冷作用，将油相温度降至-10℃备用，期间预冷罐搅拌保持在 40rpm 即可。

水相配比

2.1 首先检查水相罐、量具洁净状态及清场记录，洁净且在清场效期内方可使用。

2.2 称取明胶 100g 投入 5L 去离子水中使用搅拌器设定 60rpm 搅拌明胶溶液至充分溶解，使用蠕动泵加入至水相罐，转速设定为 150rpm 搅拌 90 分钟备用；

10 混合

3.1 首先检查反应罐洁净状态及清场记录，均合格方可使用；

- 3.2 将反应罐通过冷水机持续作用，使罐体温度将至-10℃以下。反应罐温度达到要求，油相温度达到-10℃，加入 5mL 的 75%甲醛溶液至水相并设定 80rpm 转速搅拌 10 分钟，后将油相与水相通过微球成型机进行混合，随后进入反应罐。油相驱动方式为齿轮泵（泵速为 3000mL/min），水相驱动方式为固定压强的惰性气体(气体选用空气)，压强设置为 5KPa。微球成型机选用多孔板的微孔孔径为 30μm。

- 微球成型机选用尺寸 40CM*40CM*30CM 的长方体构成，成型机内部在水平设置的油相入口和成型机出口上方 1cm 处水平设置一块 40cm*40cm 的塑料板，塑料板厚度 1cm。塑料板利用微加工技术制备大量直径 30μm 通透圆孔，微孔阵列为 300*300，微孔间距为 50μm。分散相(水相)垂直于微孔板流入微球成型机，并通过微孔板上的微孔垂直穿透过微孔板，微孔板下方的油相溶液从水平入口快速流入微球成型机并对穿过微孔的水相溶液进行连续快速的剪切形成微球，形成的微球分散在油相内从水平出口流出。

3.3 反应罐进入物料后，立即打开搅拌并将转速设定为 30rpm 搅拌反应 48h。

25 清洗

4.1 首先检查滤油罐、水洗罐洁净、量具状态及清场记录，洁净且在效期内方可使用；

- 4.2 将反应完成的物料通过 0.15MP 的压缩空气打入滤油罐，通过真空泵持续作用去除物料中多余液体，然后向物料中加入清洗剂，分别是丙酮 50L，氯化钙 10kg，医用酒精 100L，无水乙醇 100L，搅拌转速 100rpm，分别各 20min，每次清洗后多余的液体通过真空泵抽滤去除。使用 0.10MP 压缩空气将有效物料与酒精打入水洗罐；

4.3 加入 20L 去离子水至水洗罐，搅拌设定至 100rpm 充分搅拌 50min，通过真空泵作用除去注射用水。反复清洗 3-5 次。

冻干

5.1 首先检查冻干盒、量具、冻干机洁净状态及清场记录，洁净且在有效期内方可使用；

5.2 将清洗完成的物料根据湿重 50g 与 500mL 注射用水的比例加入冻干盒，并进行混合。置于-20℃冷冻 48 小时。

5 5.3 将冷冻完成的物料放入冻干机，根据冻干机操作规程进行冻干操作，持续冻干 72 小时以上。冻干造成的物料称量总重，转入至物料暂存盒转至下道工序。

筛分

6.1 首先检查筛网及分筛机洁净状态及清场记录，洁净且在有效期内方可使用；

6.2 将冻干完成的物料按照 50-500 微米的范围进行分筛。将分筛后的物料进行收集，
10 可获得一定粒径范围的多孔微载体颗粒。

结果：所得到的微载体平均粒径为 200μm，孔径平均为 25μm，孔隙率 80%。产量约为 50g，产率 50%。将该微载体置于水溶液中所拍摄的电镜照片显示在图 4 中。

15

实施例 2

油相配比

1.1 检查装置，同实施例 1；

1.2 按量取三氯甲烷 80L、石油醚 20L、吐温 20 试剂 10L 依次使用蠕动泵加入混合罐。打开混合罐搅拌，转速设定为 60rpm 搅拌 1 小时；

20 1.3 将混合罐罐体封闭只保留压缩空气口打开，至罐体内部压力达到 0.1MP 将油相打入预冷罐。通过冷水机持续制冷作用，将油相温度降至-30℃备用，期间预冷罐搅拌保持在 40rpm 即可。

水相配比

2.1 检查装置，同实施例 1；

25 2.2 称取明胶 50g+海藻酸钠 10g 投入 1.5L 去离子水中使用搅拌器设定 60rpm 搅拌明胶溶液至充分溶解，使用蠕动泵加入至水相罐，再加入氯化钠 100g，加热到 60℃，转速设定为 150rpm 搅拌 120 分钟备用；

混合

3.1 检查装置，同实施例 1；

30 3.2 将反应罐通过冷水机持续作用，使罐体温度将至-30℃以下。温度越低，制备得到的载体材料孔径越小，-30℃制备得到的微载体孔径在 5μm-20μm 左右。温度降低到预设温度后，加入 5ml 的 75%甲醛溶液至水相并设定 80rpm 转速搅拌 5 分钟，后将油相与水相通过微球成型机以一定流速进行混合打入反应罐。油相驱动方式为齿轮泵（泵速为 1000ml/min），泵速越低则所制备的颗粒材料粒径越大，反之则粒径越小。

该条件下制备材料的平均粒径在 400 μ m 左右。使用氮气增压驱动水相压强设置为 10KPa。压强越大则微球粒径越大，反之则越小。该条件下平均粒径为 400 μ m。微球成型机选用多孔板的微孔孔径为 50 μ m。

除多孔板的微孔孔径为 50 μ m 外，所用的微球成型机同实施例 1。

- 5 3.3 反应罐进入物料后，立即打开搅拌并将转速设定为 30rpm 搅拌反应 48h，期间要定时观察并记录罐体物料反应状态及各项参数。

清洗

4.1 检查装置，同实施例 1；

- 10 4.2 将反应完成的物料通过 0.15MP 的氮气打入滤油罐，通过真空泵持续作用去除物料中多余液体，然后向物料中加入清洗剂，分别是丙酮 50L，无水硫酸镁 20kg，医用酒精 100L，无水乙醇 100L，搅拌转速 300rpm，分别各 20min，每次清洗后多余的液体通过真空泵抽滤去除。使用 0.10MP 压缩空气将有效物料打入水洗罐；

4.3 加入 20L 去离子水至水洗罐，搅拌设定至 100rpm 充分搅拌 50min，通过真空泵作用除去注射用水。反复清洗 3-5 次。

15 冻干

5.1 检查装置，同实施例 1；

5.2 将清洗完成的物料根据湿重 50g 与 300mL 注射用水的比例加入冻干盒，并进行混合。至于-40℃冷冻 96 小时。

- 20 5.3 将冷冻完成的物料放入冻干机，根据冻干机操作规程进行冻干操作，持续冻干 72 小时以上。冻干造成的物料称量总重，转入至物料暂存盒转至下道工序。

筛分

6.1 首先检查筛网及分筛机洁净状态及清场记录，洁净且在有效期内方可使用；

6.2 将冻干完成的物料按照 50-500 微米的范围进行分筛。将分筛后的物料进行收集，可获得一定粒径范围的多孔微载体。

- 25 结果：所得到的微载体平均粒径平均为 400 μ m，孔径平均为 15 μ m，孔隙率 90%。产量约为 20g，产率约 30%。将该微载体置于水溶液中所拍摄的电镜照片显示在图 5 中。