

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 19/26
C08B 37/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821016.6

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575341A

[22] 申请日 2002. 10. 22 [21] 申请号 02821016. 6
[30] 优先权
[32] 2001. 10. 22 [33] FR [31] 01/13606
[86] 国际申请 PCT/FR2002/003617 2002. 10. 22
[87] 国际公布 WO2003/035886 法 2003. 5. 1
[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 22
[71] 申请人 阿文蒂斯药物股份有限公司
地址 法国安东尼
[72] 发明人 P · 康斯 J - M · 吉洛姆
H · M · M · 里加尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 10 页

[54] 发明名称 从肥大细胞培养物制备肝素的方法
[57] 摘要

本发明涉及从肥大细胞培养物，特别是猪肥大细胞生产肝素。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 生产肝素的方法，其特征在于，该方法包括培养来源于猪的肥大细胞和从得到的培养物中回收肝素。

2. 权利要求1的方法，其特征在于，所述肥大细胞培养物是来源于猪的肥大细胞系。

3. 权利要求1和2中任一项的方法，其特征在于，所述肥大细胞来自于猪胎骨髓或猪胎肝脏。

4. 权利要求1-3中任一项的方法，其特征在于，所述肥大细胞是浆液肥大细胞。

5. 权利要求1或2的方法，其特征在于，所述肥大细胞来自于肥大细胞系，所述肥大细胞系选自：

- 于2001年10月17日保藏在CNCM[国立微生物保藏中心]的、编号为I-2735的细胞系；

- 于2001年10月17日保藏在CNCM的、编号为I-2736的细胞系；

- 于2001年10月17日保藏在CNCM的、编号为I-2734的细胞系。

6. 能够通过权利要求1-5任意一项的方法得到的肝素制品。

从肥大细胞培养物制备肝素的方法

本发明涉及由细胞培养物制备肝素的方法。

肝素属于糖胺聚糖 (GAG) 家族, 该家族包括含有由氨基糖 (D-葡萄糖胺或半乳糖胺) 和糖醛酸 (D-葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸) 组成的二糖序列之重复的线型多糖。

对于和硫酸乙酰肝素一起属于糖胺聚糖亚家族的肝素, 氨基糖是 D-葡萄糖胺。糖醛酸既可以是葡萄糖醛酸(Glc), 也可以是艾杜糖醛(Ido)。葡萄糖胺可以被 N-乙酰化、N-硫酸化或 O-硫酸化。

常规地, 术语“肝素”指高度硫酸化的多聚糖, 其中, 80% 以上葡萄糖胺残基是 N-硫酸化的, 且 O-硫酸的数量大于 N-硫酸的数量。对于肝素来说, 硫酸/二糖的比例一般大于 2。然而, 实际上肝素的结构是非常不均一的, 存在可以包含非常不同比例的链。

如同所有的糖胺聚糖 (GAGs) 一样, 肝素以蛋白聚糖的形式被合成。这样的合成优先地发生在肥大细胞、浆液或结缔组织肥大细胞 (CTMCs) 的亚群中。这些肥大细胞在皮肤和呼吸粘膜下层很丰富。它们有很长的寿命 (至少 6 个月)。除了肝素以外, 它们还包含硫酸乙酰肝素和可观量的组胺 (根据动物种类不同, 大约 10 pg/细胞)。

肝素合成的第一步是形成由规则地交替的丝氨酸和甘氨酸残基组成的 serglycine 蛋白核心。通过连续地增加糖胺 (osamine) 和糖醛酸, 从四糖发生肝素链的延长。

这样形成的蛋白聚糖经历了许多连续的转化: N-脱乙酰作用、N-硫酸化作用、D-葡萄糖醛酸表异构化作用以及 O-硫酸化作用。

然而, 这一完全的成熟仅仅发生在部分蛋白聚糖上, 这所产生的很大结构变异性造成肝素不均匀性。

然后, 多糖链由内切葡萄糖醛酸糖苷酶从 serglycine 裂开。这些链

的分子量在 5000 到 30000 Da 之间。它们与碱性蛋白酶形成复合体，储存在肥大细胞的颗粒体中。肝素是仅在肥大细胞脱粒时被排出。

肝素具有重要的生物学作用，特别在止血方面，它被广泛地应用在治疗上，尤其是作为抗凝血剂和抗血栓形成剂。

目前，大多数使用的肝素是从猪肠粘膜分离出的，由蛋白水解酶提取后，接着在阴离子交换树脂上纯化（一篇制备肝素不同方法的综述：DUCLOS; “L’ Héparine: fabrication, structure, propriétés, analyse”; Ed. Masson, Paris, 1984）。

肝素来源的动物批次的多样性增加了肝素的固有不均匀性。由此导致非常实质性的变异性，尤其反馈在生物活性的水平上。另外，有规律地大量提供原始材料是困难的。

利用来自于哺乳动物的细胞生产 GAG 或蛋白聚糖已经被提议过。

申请 WO 99/26983 描述了从大鼠肥大细胞可以得到肝素类型的化合物，它们可以是蛋白聚糖（HEP-PG）或糖胺聚糖(HEP-GAG)。这些化合物并不是肝素。这样分离的细胞不是建立的细胞系。另外，该申请者推荐与成纤维细胞共同培养分离的细胞。

由 Wang 和 Kovanen 撰写的文章（Circulation Research, 84, 1, 74-83, 1999）也阐述了大鼠浆液肥大细胞的分离以及从这些细胞中进行蛋白聚糖的生产。和申请 WO 99/26983 中的一样，用于制备蛋白聚糖的细胞不是建立的细胞系，而只是已被分离的细胞，随后刺激这些细胞生产蛋白聚糖。

在检索报告中引用的申请 WO 90/14418 描述了从小鼠肥大细胞瘤得到细胞系，并用于肝素制备。因此这些细胞的来源是肿瘤性的细胞，这可能会引起健康问题。Montgomery 等(Proc Natl Acad Sci USA, 89, 23, 11327-11331, 1992)的文章也阐述了小鼠肥大细胞瘤的分离。

本发明意欲克服上述提及的缺点以及避免供应的质量和数量上的问题，使用可方便地获得的具有稳定特性的均匀原始材料，便利质量稳定的肝素制备物的生产。

本发明人已经注意到从肥大细胞系培养物中生产相当大量的具有可以与从猪肠粘膜提取的肝素相比的特性的肝素是可能的。用细胞培养物作为原始材料也使得控制肝素合成条件，由此得到具有可重复的特点的产物成为可能。

本发明主题是一种制备肝素的方法，其特征在于它包括培养来源于猪的肥大细胞以及从得到的培养物中回收肝素。

优选地，所述肥大细胞培养物是来源于猪的肥大细胞系。

这里，术语“培养物”一般指在体外生长的一个细胞或一组细胞。由从动物取得的细胞或组织试样直接形成的培养物称为“原代培养物”。术语“系”用于在继代培养中已经成功地完成至少一次传代，一般几次连续的传代的情况，并指由此得到的任何培养物（SCHAEFFER, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 26, 91-101, 1990）。

有利的是，所述肥大细胞来自猪肥大细胞培养物，尤其是来自按申请 FR 0113608 以及申请人为 INRA 和 ENVA 的在本申请同一天提交的题为“猪肥大细胞培养物以及它们的应用”的 PCT 申请中所述得到的猪肥大细胞系。其中，实施本发明方法的优选系是：

- 来源于猪胎肝脏的肥大细胞系，由 INRA（147 rue de l'Université, 75007 Paris, France）于 2001 年 10 月 17 日保存于 CNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes [国立微生物保藏中心], Pasteur Institute, 26, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France)，编号为 I-2735；

- 起源于猪胎肝脏的、被 SV40 病毒 T 抗原转染的肥大细胞系，由 INRA 在 2001 年 10 月 17 日保存于 CNCM，编号为 I-2736；

- 起源于猪胎骨髓的、被 SV40 病毒 T 抗原转染的肥大细胞系，由 INRA 在 2001 年 10 月 17 日保存于 CNCM，编号为 I-2734。

优选地，这些肥大细胞是浆液肥大细胞（serous mast cells）。

这些肥大细胞优选地培养在确定成分培养基（MEM α /DMEM，

RPMI, IMDM, 等) 中, 所述培养基中添加混合或单独使用的生长因子, 比如浓度在 1 ng/ml 和 1 µg/ml 之间的 SCF (干细胞生长因子), 和非必需的浓度在 0.1 ng/ml 和 100 ng/ml 之间的 IL3 (白细胞介素 3), 或浓度在 1 nM 和 1 µM 之间的 PGE2 (前列腺素 E2)。

也可以在培养基中添加浓度为 0.5% 和 20% (V/V) 之间的牛血清。

在培养基中增加牛血清可以用无血清的培养基如 AIMV (INVITROGEN) 替代, 以降低培养基中的蛋白浓度以及与使用动物来源化合物相关的风险性 (KAMBE et al., J. Immunol. Methods, 240, 101-10, 200)。

通过经转化剂 (transformer) 和/或无限增殖剂 (TSUJIMURA, Pathology International, 46, 933-8, 1996; PIAO and BERNSTEIN, Blood, 87(8), 3117-23, 1996) 的作用而有控制地突变细胞表现型, 有可能获得不依赖于血清的加入和/或生长因子的使用的细胞。

肥大细胞可以采用为真核生物细胞大量培养而发展的技术进行培养, 如, 由 GRIFFITHS 等 (Animal Cell Biology, Eds, Spier and Griffiths, Academic Press, London, Vol. 3, 179-220, 1986) 描述的。使用体积大于几个立方的生物反应器是可能的, 如 PHILIPS 等 (Large Scale Mammalian Cell Culture, Eds, Feder and Tolbert, Academic Press, Orlando, USA, 1985) 或 MIZRAHI (Process Biochem, August, 9-12, 1983) 描述的。

培养也可以根据 VAN MEZEL (Nature, 216, 64-65, 1967) 描述的技术在微型支持物 (microsupport) 上进行或者悬浮地进行。

使用分批培养系统也是可能的, 由于这种系统相当简单地以产业规模应用 (VOGEL 和 TODARO, Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2nd edition, Noyes Publication, Westwood, New Jersey, USA, 1997), 所以在真核细胞培养物中应用很普遍。用这样的系统得到的细胞密度一般在 10^6 至 5×10^6 细胞/ml。

通过从生物反应器中移取一些细胞 (70% 到 90%) 用于 GAG 提

取和肝素分离操作并将剩余细胞保留在同一生物反应器中以开始新的培养，分批培养物的生产力可以有利地被增加。在这“反复分批”培养模式中，将那些允许在细胞中 GAGs 和肝素的更大量累积的参数与细胞生长期的最适参数相区分也是可能的。

也可以使用有或无细胞滞留的连续灌注 - 进料培养系统 (perfusion-fed culture systems) (VELEZ et al., J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987; CHAUBARD et al., Gen. ENG. News, 20, 18-48, 2000)。本发明的上下文中，尤其是可以使用允许细胞保留在反应器中，并导致在生长和生产上比分批培养能够得到的更多的灌注 - 进料培养系统。滞留可以借助旋转过滤器 (spin - filter)、中空纤维或固体基质类型 (WANG et al., Cytotechnology, 9, 41-49, 1992; VELEZ et al., J. Immunol. Methods, 102(2), 275-278, 1987) 的滞留系统而实现。得到的细胞密度一般在 10^7 到 5×10^7 细胞/ml 之间。通过使用在线测量传感器，生物反应器中的培养允许更好地控制细胞生长的物理化学参数以及也是细胞中 GAGs 和肝素的积累的参数：pH、 pO_2 、Red/Ox、生长基质 (growth substrates) 如维生素、氨基酸、以碳为基础的基质 (如，葡萄糖、果糖、半乳糖)、代谢物如乳酸或水性氨，等。

在这样的条件下培养 3 - 30 天以后，一般培养 3 - 10 天以后，细胞可以通过一般是离心或过滤从培养基中收获和分离。

可以使用各种不同的离心系统；可参照例如由 VOGEL 和 TODARO 所描述的那些 (Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2nd Edition, Noyes Publication, Weaswood, New Jersey, USA)。

作为替代方案，或与离心结合在一起，可以使用孔隙度 (porosity) 小于细胞平均直径 (5 - 20 μm) 的膜，经切向微量过滤进行分离，所述膜同时还允许溶液/悬浮液中其它化合物通过。对切向流率 (rate of tangential flow) 与应用于膜的压力进行选择，使得几乎不产生剪切力 (雷诺准数小于 5000/秒)，以在分离操作过程中降低膜的堵塞、保持细胞的完整。

可以使用各种不同种类的膜，如，螺旋型膜（AMICON, MILLIPORE）、平膜或中空纤维（AMICON, MILLIPORE, SARTORIUS, PALL, GF）。

有可能对膜进行选择，使得膜的孔隙度、电荷或接枝（grafting）有可能实现分离和相对于可能存在于培养基中的可能污染物（如，细胞蛋白质、DNA、病毒、或其它大分子）的第一次纯化。

可以利用这样的生产和细胞收获方法，这些方法使得将 GAGs 和肝素保存在细胞内的内含物中成为可能；然而，GAGs 和肝素也可以在细胞的溶胞或脱粒后从培养基中获得。

脱粒可以通过特异配体与在肥大细胞表面存在的受体结合，比如，变态反应原类物质（如，IgE Fc 片断或这一片段的类似物）与肥大细胞 IgE 受体的结合而引起。当肝素通过所有或一些肥大细胞的脱粒或溶胞从细胞内内含物中释放，并在分离步骤时存在于培养基中时，可以设想使用具有较小孔隙度的膜。在这种情况下，细胞分离与由在一个或多个膜上超滤组成的步骤相结合，膜的组构和孔隙度使得浓缩肝素和将它与培养基中存在的其它种类物质作为大小和分子量以及任选的电荷量或生物特性的函数分离开成为可能。

在本实施方案的上下文中，膜的截断阈值优选在 1000 和 5 kDa 之间。可以使用与用于微量过滤的那些膜系统类似的膜系统，比如，螺旋膜、平膜或中空纤维。可以有利地使用这样的膜，这些膜由于其电荷特性或对肝素有亲和性的配体（如，抗体、ATIII、凝集素、肽、核苷酸、等）的接枝（grafting）特性使分离和纯化肝素成为可能。

其它试剂也可以诱导肥大细胞的脱粒。这些试剂可以被分为若干类，如，细胞毒性剂、酶、多糖、凝集素、过敏毒素、基本的化合物（basic compounds）（化合物 48/80、P 物质、等）、钙（A23187 离子载体、离子霉素、等）[D. Lagunoff 和 T. W. Martin, 1983, Agents that release histamine from mast cells. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23:331-51]。脱粒剂可以对培养中维持的相同细胞反复使用。在这一制备方法中，通过简化从上清液收获的方法以及在培养中细胞的维持，

使生产率明显地增加。

尤其在 A23187 离子载体的情况下，可以通过例如用浓度在 1~100 μ g/ml 的 A23187 离子载体对 2×10^6 肥大细胞/毫升 (ml) 处理 1 分钟到 4 小时，诱导肥大细胞的脱粒。

肥大细胞的溶胞可以通过例如使用低渗透压或高渗透压溶液引起的渗透压休克、热休克（冰冻/解冻）、机械性休克（如超声波处理或压力变化）、化学试剂的作用（NaOH、THESITTM、NP40TM、TWEEN 20TM、BRIJ-58TM、TRITON XTM-100 等）、或酶裂解（木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、等）、或这些方法中的两种或更多种的组合来诱导。

为了从细胞溶胞产物中提取和纯化肝素、从 serglycine 核心中分离多糖链、和从存在于提取介质中的其它 GAGs 中分离肝素链，可以使用与那些本身已知的和被描述在基本工具书如由 DUCLOS 编的手册（如上提及的）中的用于从动物组织中提取和纯化肝素类似的方法。

为了从核酸、细胞蛋白中分离肝素和溶解肝素，即，切断与 serglycine 核心连接的键，作为非限制性的例子：

- 细胞溶胞产物可以接受一个或更多个酶消化的作用（链霉蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶，等）；

- 肝素 - 蛋白键可以在硫酸盐或氯化物存在下在碱性介质中水解；

- 为了破坏细胞起源的核酸和蛋白质，在酸性介质中（如，冷却条件下用三氯乙酸）进行处理也是可能的，应用可能解离 GAG-蛋白相互作用的离子溶液加入到酸性介质中；

- 酶水解以后进行用胍的提取也是可能的；为了纯化溶解的肝素，有可能例如将其用醋酸钾、季铵、丙酮等沉淀。

这些纯化步骤可以有利地增加或代以一个或多个层析步骤，尤其是阴离子交换层析或亲和层析步骤。

本发明的主题也是使用本发明的方法能够从肥大细胞培养物中得到的肝素制备物。

依照本发明的肝素制备具有可以与现有技术中从动物组织中获得

到的肝素制备物的生物学特性相比较的生物学特性，并可以运用于所有肝素通常的应用中。

从以下有关从肥大细胞培养物中制备肝素和表征所得到的肝素的附加实施例中，将会更清楚地理解本发明。

实施例 1：从肥大细胞培养物中提取肝素

肥大细胞的培养

使用猪胎肝脏肥大细胞系和转染 SV40 病毒 T 抗原的猪胎肝脏肥大细胞系（分别是 CNCM I-2735 系和 CNCM I-2736 系）。

细胞以 10^5 到 5×10^5 细胞/ml 的比例接种在含有猪 IL-3 (2 ng/ml) 和猪 SCF (80 ng/ml) 的完全 MEM α 培养基中。

培养物被准备在培养皿中或以悬浮形式在 1 升的旋动培养瓶中（spinner flask）。每天监测细胞生长，持续 4 到 12 天。通过分析培养物中所产出的糖胺聚糖来平行监测肝素的生产。其结果在图 1-5 中给出。

图 1、2 和 3 说明在培养皿静止培养中（图 1；接种起始：◆： 1×10^5 细胞；■： 2×10^5 细胞）和在培养瓶悬浮培养中（图 2）的肝肥大细胞的生长，以及在培养瓶悬浮培养中的转染的肝肥大细胞的生长（图 3）。

这些实验中，培养瓶中悬浮培养物显示出从大约 8×10^5 （非转染细胞）到大约 1.5×10^6 细胞/ml（转染细胞）的最大细胞密度。在指数生长期被计算的倍增时间是 24 - 48 小时。

糖胺聚糖纯化

为了裂解蛋白聚糖和避免离子型 GAG/蛋白相互作用，在含盐的碱性介质中将细胞进行水解。

该处理包括下列步骤：

1. 用含盐介质中的 NaOH 处理：这一步的目的是破坏细胞和裂解位于肝素与其母体蛋白间的键。

这一步包括在 10^6 细胞的沉淀块中加入 100 μ l 的 1M NaOH

和 800 μ l 的 0.5M NaCl. 这样得到的混合物在 80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 分钟, 然后超声处理 5 分钟, 之后用 1N HCl 中和。

2. 提取: 经水解的样品, 加样在阴离子交换树脂柱 (SAX, Varian) 上, 该树脂柱可保留肝素。用含有 0.5M NaCl 的 Tris/HCl 缓冲液, pH 7.4 洗柱 3 次以除去蛋白以及其它的 GAGs, 尤其是皮肤素 (dermatan)。然后, 用 1ml 含有 3M NaCl 的 pH7.4 的 Tris/HCl 缓冲液对肝素进行洗脱。

3. 脱盐/冷冻干燥: 通过在 SEPHADEX G10 胶上的空间排阻层析和随后的电导测定法进行 NaCl 的去除 (为了能够应用于一些以下描述的分析方法, 这是必要的)。然后将收集的肝素级分冷冻干燥, 以浓缩样品。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析

这一技术能够根据其分子大小和其电荷分离 GAGs, 且构成了快速检验肝素存在与否的试验。

将如上所描述得到的纯化制备物, 以每加样孔中 20 μ l 制备物的比例加样到用于分离 30 到 1 kDa 的分子的 Tris/tricine 聚丙烯酰胺凝胶 (梯度为从 10 到 20%) 中。20ng 的皮肤素, 25ng 的 SPIM 标准猪肝素 (从肠粘膜提取的猪肝素第四次国际标准) 以及从猪粘膜提取并通过在和上文所述条件相同的条件下用 NaOH 处理以及在阴离子交换树脂上纯化而纯化的肝素加样在相同凝胶上。

用记载在 AL-HAKIM 和 LINHARDT (Applied and Theoretical Electrophoresis 1, 305-12, 1991) 的爱茜蓝溶液和然后的硝酸银双重染色可以显示糖胺聚糖 (单独用硝酸银只显示蛋白质)。

然后为量化各种 GAGs, 用扫描仪 (BIO-RAD) 对凝胶进行分析。肝素定量极限是每条带 10ng。

实验的结果汇总在下表 1 中, 其中细胞产生的肝素量表示为 μ g/ 10^6 细胞。

表 1

收获时间 (天)	3	4	5	6	7	10	11	14
肝脏细胞, 培养皿	2.6	3.5	4.4	6.5	3.7	4.2	-	8.1
转染的肝脏细胞, 培养皿	2.6	6.9	9.0	11.7	10.8	8.5	5.4	7.1
肝脏细胞, 培养瓶	1.2	-	-	-	-	-	-	-
转染的肝脏细胞, 培养瓶	-	2.1	-	-	-	-	-	-

这些结果也在图 4 中说明 (曲线=细胞数; 柱形图=肝素的生产量)。

图 4 表示在培养皿中静止培养的肝脏肥大细胞生长过程中的肝素的生产量。

在静止培养或悬浮培养中, 一般观察到的肝素浓度为 $2 - 14\mu\text{g}/10^6$ 细胞。

实施例 2: 从肥大细胞培养物中得到的肝素制备物的表征 用 HPLC 分析的二糖分布图

二糖的成分使肝素与其它糖胺聚糖区分成为可能。

在培养的肥大细胞产生的糖胺聚糖中二糖的分析按照 LINHARDT 等描述的方法进行 (Biomethods, 9, 183-97, 1997)。

用肝素鞘氨醇杆菌 (Flavobacterium heparinum) 的肝素酶 (肝素酶 I、II 和 III, GRAMPIAN ENZYMES) 的混合物对在上述实施例 1 中得到的 GAG 制备物进行解聚。所使用条件描述在以上提及到的 LINHARDT 等的发表物中。

作为对照, SPIM 标准肝素在同样条件下进行解聚反应。

在这样的条件下, 解聚完全, 从而产生二糖。

图 5 中显示了总共 8 个主要的二糖, 它们或是 N-乙酰化的或是 N-硫酸化的。

UV 检测

这些二糖在 LINHARDT 等 (以上提及的) 描述的阴离子交换柱

上由 HPLC 分离和鉴定。

其结果在图 6 中有说明，该图表示了胎肝脏来源肥大细胞的培养瓶培养物产生的肝素制备物的二糖分布图（■）与标准肝素的二糖分布图（□）的比较。

这些结果显示，所有存在于 SPIM 参照猪肝素中的二糖也出现在肥大细胞肝素中，虽然具有不同的比例。IS/IIS 比例是 3.7。

荧光检测

一种采用荧光检测的类似方法能够仅定量肝素特有的 IS 和 IIS 二糖，并计算其比例。

以上文描述的相同方法进行酶法的解聚以及 HPLC 分离。分离之后进行后柱衍生化（post-column derivatization），与胍形成荧光复合物。

将对此技术具有最强反应系数（response factor）的 IS 三硫酸化二糖相对于已知浓度的标准肝素溶液进行检测和定量。

此方法的检测极限值是每 ml 细胞培养物样品中约 5ng 肝素。

以下的表 2 举例说明了细胞培养物随着时间变化的 IS/IIS 比例。

表 2

收获日期（天）	3	4	5	6	7	10	11	14
肝脏细胞，培养皿	1.9	1.6	1.6	1.4	1.4	1.3	-	1.4
转染肝脏细胞，培养皿	4.1	5	4.6	6.6	3.7	4.9	5.6	5.7
肝脏细胞，培养瓶	2.3	-	-	-	-	-	-	-
转染肝脏细胞，培养瓶	-	2.9	-	-	-	-	-	-

实施例 3: 通过测定抗-XA 和抗-IIA 的活性描述肝素的生物学特征

生物学活性

凝血因子 Xa 和 IIa 的失活是肝素特有的，并有可能将肝素与硫酸乙酰肝素和皮肤素相区别。

所使用的方法描述在第三版的欧洲药典，低分子量的肝素专论

中（European Pharmacopoeia, 3rd edition（1997））。

该反应包括三个步骤：

1. ATIII+肝素 → [ATIII-肝素]
2. [ATIII-肝素]+因子（过剩的） →
[ATIII-肝素-因子]+因子（剩余的）
3. 因子（剩余的）+生色底物 → pNA

释放出对硝基苯胺（pNA）的量在 405nm 处测量。它是与肝素的量成反比例的。

抗-Xa 或抗-IIa 活性参照用 SPIM 标准建立的校准直线进行评价。

该方法的灵敏度是 0.006 IU/ml。

得到的结果在以下表 3 中给出。

表 3

收获日期（天）	3	4	5	6	7	10	11	14
肝脏细胞，培养皿：								
抗-Xa	2.1	1.8	5.7	4.0	2.4	2.2	-	0.0
抗-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
抗-Xa/抗-IIa 比例	-	-	-	-	-	-	-	-
转染肝脏细胞，培养皿：								
抗-Xa	44	11.5	11.7	12.3	11.4	13.0	11.6	12.9
抗-IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
抗-Xa/抗-IIa 比例	-	-	-	-	-	-	-	-
肝脏细胞，培养瓶：								
抗-Xa	0.7	-	-	-	-	-	-	-
抗-IIa	1.4	-	-	-	-	-	-	-
抗-Xa/抗-IIa 比例	0.6	-	-	-	-	-	-	-
转染肝脏细胞，培养瓶：								
抗-Xa	-	3.1	-	-	-	-	-	-
抗-IIa	-	14	-	-	-	-	-	-
抗-Xa/抗-IIa 比例	-	0.2	-	-	-	-	-	-

分别将从培养的肥大细胞中得到的肝素的抗 Xa 或抗 IIa 活性与从猪粘膜获得的肝素或标准肝素的抗 Xa 或抗 IIa 活性进行了比较,其结果在以下表 4 中表示。

表 4

	抗 - Xa (IU/mg)	抗 - IIa (IU/mg)	Xa/IIa (IU/mg)
肥大细胞肝素	18 - 3.1	14-3	0.2-1
粘膜的肝素	80	81	1
标准肝素	180	180	1

ATIII 结合的表征

肝素与 ATIII 间的结合采用描述在 LEE 和 LANDER(Proc.Natl.Acad.Sci.,88,2768-72, 1991)的电泳技术通过迁移变动 (migration shift) 得到证实。

电泳是在 0.8%琼脂糖凝胶上, pH 为 3 的溶液(醋酸/氢氧化锂)中进行。

将浓度从 584 μ g/ml 减到 183 μ g/ml 的 100 μ l 的 ATIII 溶液(人类由来的; BIOGENIC)加入到 100 μ l 的实验样品中。

点加 100 μ l 的样品。在 100 伏特下移动 30 分钟。

将凝胶用 0.1% 溴化十六烷基三甲基铵固定 (CETAVLON-SIGMA)。

在 Azure A(0.08%溶于水中)进行显影。

将凝胶进行扫描,并用 QUANTITY ONE 软件(BIO-RAD)进行解读。

结果表示为与 ATIII 结合的肝素的百分比。

在转染肝脏细胞的培养瓶培养的情况下所得到的结果表示在图 7 中。

在标准肝素 (SPIM) 存在时,观察到有 31% ATIII 结合(理论值为 33%),在由培养肥大细胞培养中得到的肝素(化合物)存在情

况下，有 27% ATIII 结合。

实施例 4：在重复分批的生物反应器中肥大细胞的培养

使用来源于猪胎肝脏的非转染肥大细胞系。将细胞以 $2.0-4.0 \times 10^5$ 细胞/ml 的比例接种在添加有猪 IL3(2 ng/ml)和猪 SCF (80 ng/ml)的完全 DMEM/F12 培养基中。

所使用的生物反应器具有体积为 2 升的培养基，培养物的氧压保持在 20%-40%的饱和度，pH 保持在 7.0-7.4，通过生物反应器套中的恒温水循环，使温度维持在 $37^\circ\text{C} + /-0.5^\circ\text{C}$ 。使用转速在 80 - 150rpm 的船用螺旋桨(marine propeller)，对培养物进行搅拌。

培养 4 天后，细胞密度达到 1.3×10^6 细胞/ml，相应于 24 - 48 小时的倍增时间。在收获这一天，取出 80 % 的培养物用于提取肝素，剩余的培养物保持在生物反应器中，用新鲜培养基将其稀释到浓度为 $2.0-3.0 \times 10^5$ 细胞/ml，如同重复 - 批量生产操作所描述的。用重复 - 批量模式稀释 3 天以后，所得到的细胞密度为 9.0×10^5 细胞/ml，相当于 24 - 48 小时的倍增时间，可以与第一次培养的相比（图 8）。

如实施例 1 中所描述的，纯化肝素。

然后如实施例 2 所述，用 HPLC 对纯化的肝素进行分析，用 SPIM 标准肝素作为对照。

表 5 和图 9 表示了与 SPIM 标准肝素 (□) 得到的分布比较，通过对起源于猪胎肝脏 (■) 的肥大细胞进行悬浮培养产生的肝素制备物的 serglycine (Gly-Ser) 蛋白核心的比例以及二糖分布。

表 6 表示了与 SPIM 标准肝素中的二糖比较，通过对来源于猪胎肝脏肥大细胞进行悬浮培养产生的肝素制备物中二糖的 N-乙酰化、N-硫酸化以及 O-硫酸化分布。

表 5

	% 标准样	% 培养物
Gly-Ser	3.5	3.2
IVa	4	5.4
IVs	3.1	7.6
IIa	3.1	4.4
IIIa	1.5	0.7
IIs	8.4	11.9
IIIs	7.2	17.1
Ia	1.3	0.2
Is	62	48.8

表 6

二糖	% 标准样	% 培养物
乙酰化	11.8	10.7
2-O-硫酸化	23	8
6-O-硫酸化	42	42
N-硫酸化	83	85
2-O-硫酸化	84	77
6-O-硫酸化	89	71
硫酸/羧酸	2.4	2.1

当使用转染有 SV40 病毒 T 抗原的肥大细胞系时,得到相似的结果。

实施例 5: 使用脱粒剂在培养物上清中生产肝素

该实验是在非转染胎肝脏肥大细胞系中进行的。

在第 762 天(从第一次培养开始计算),将肥大细胞浓度调整到 2×10^6 细胞/ml,将培养物培育在包含 4 $\mu\text{g/ml}$ 的可诱导肥大细胞脱

粒的离子载体 A23187 的 MEM 培养基中 1 小时。

通过 PAGE 对细胞所产生的总 GAGs 和分泌性 GAGs 进行定量。图 10 显示，经离子载体 A23187 处理以后在上清液中发现 70-75% 的 GAGs，而在非处理细胞(0 $\mu\text{g/ml}$ A23187)中大约有 10% 的 GAGs。

将在培养第 762 天进行了 GAG 收获的肥大细胞再次培养。发现并没有丧失其生长速率或成活力。

21 天以后，这些肥大细胞被再一次脱粒，如上所述进行 GAGs 测定。在第 762 天没有进行脱粒的同龄肥大细胞培养物作为对照。

结果显示在图 10 中，该图显示，分泌的 GAGs 的百分比与第一次脱粒中所得到的相当，并与同龄的对照细胞中所得到的相当。

当使用转染了 SV40 病毒 T 抗原的肥大细胞系时，得到类似的结果。

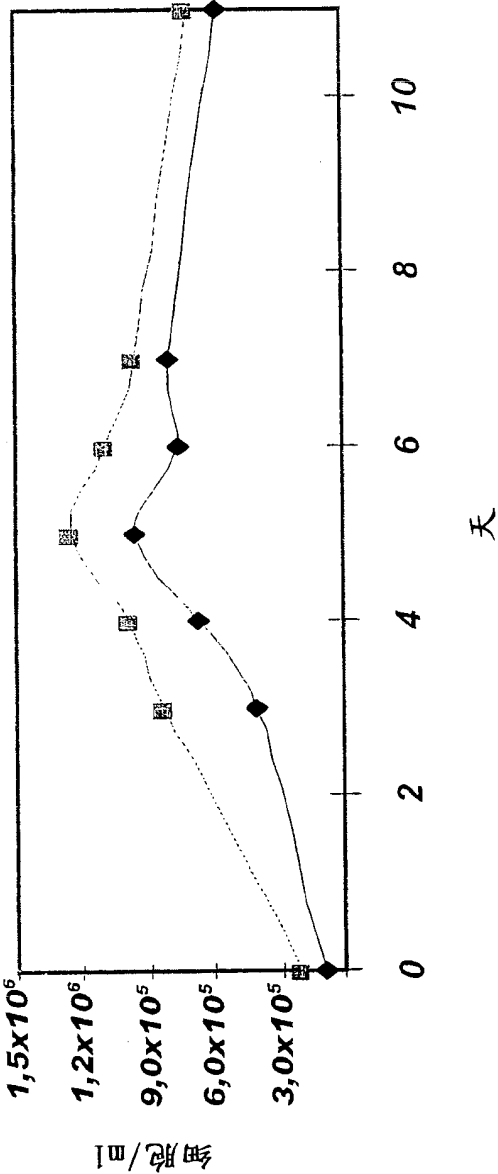


图1

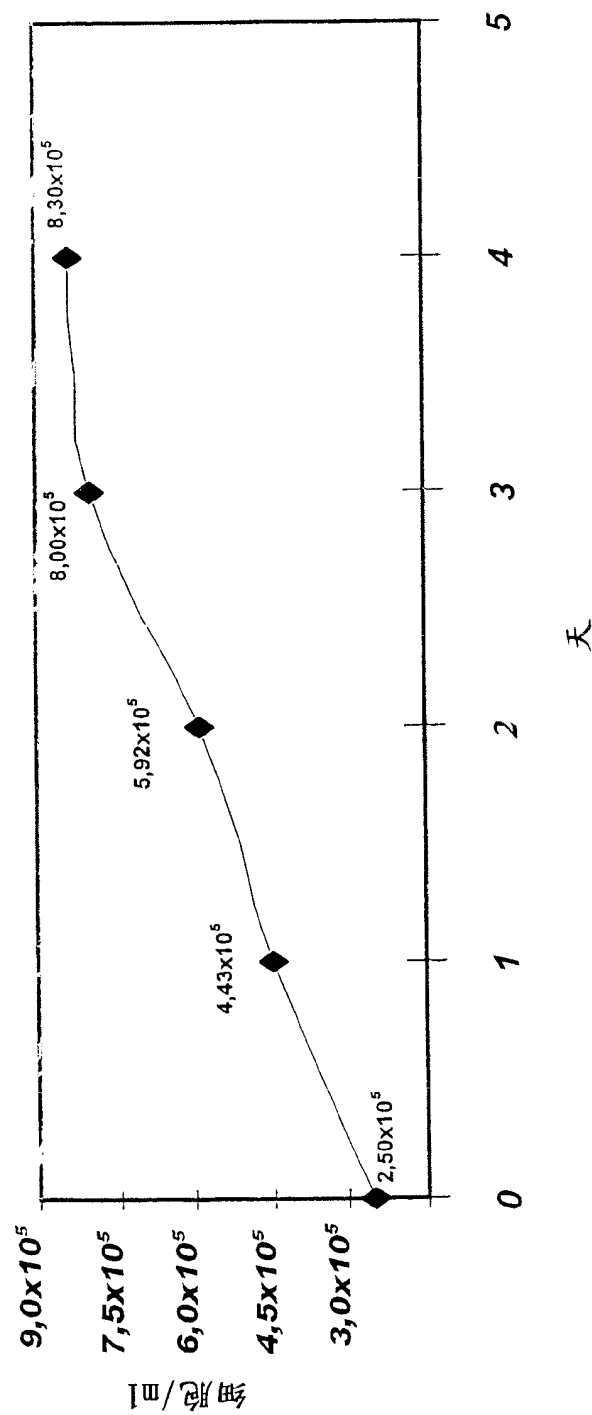


图 2

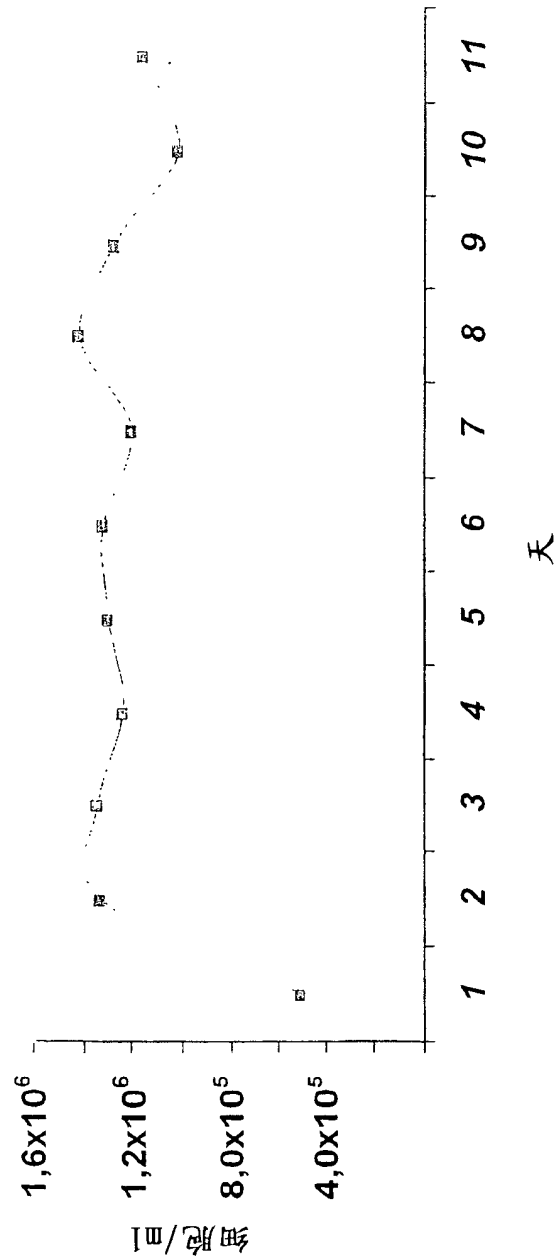


图 3

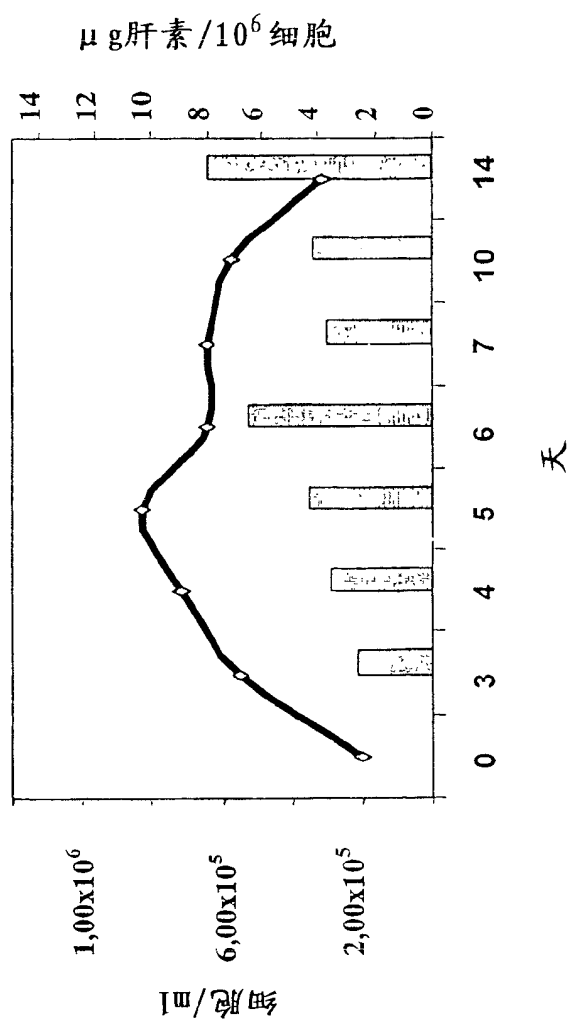
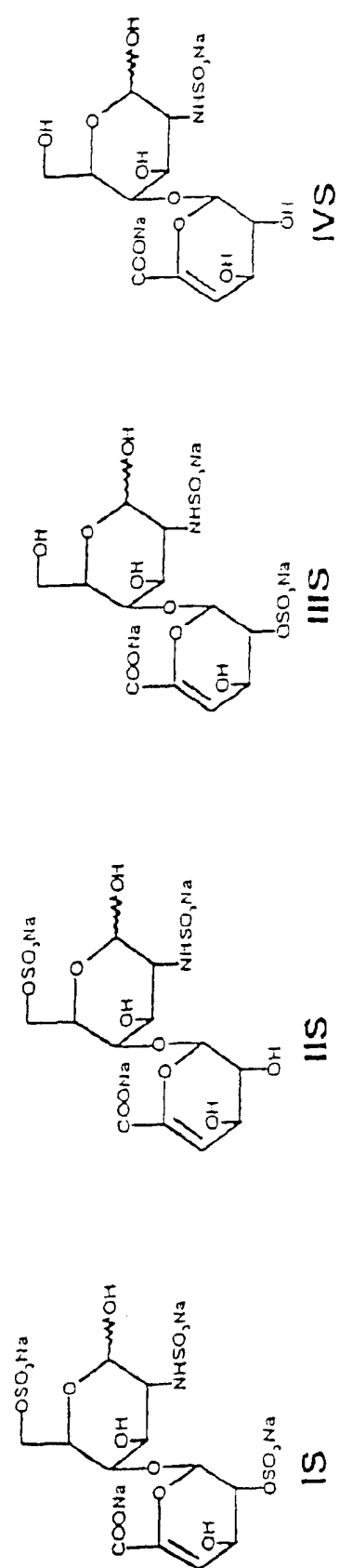


图4

N-硫酸化二糖



N-乙酰化二糖

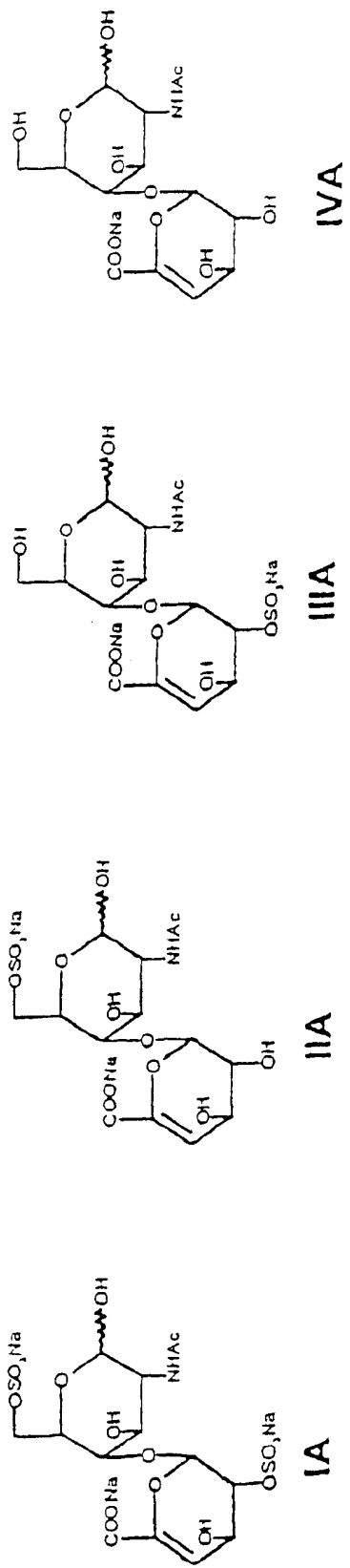


图 5

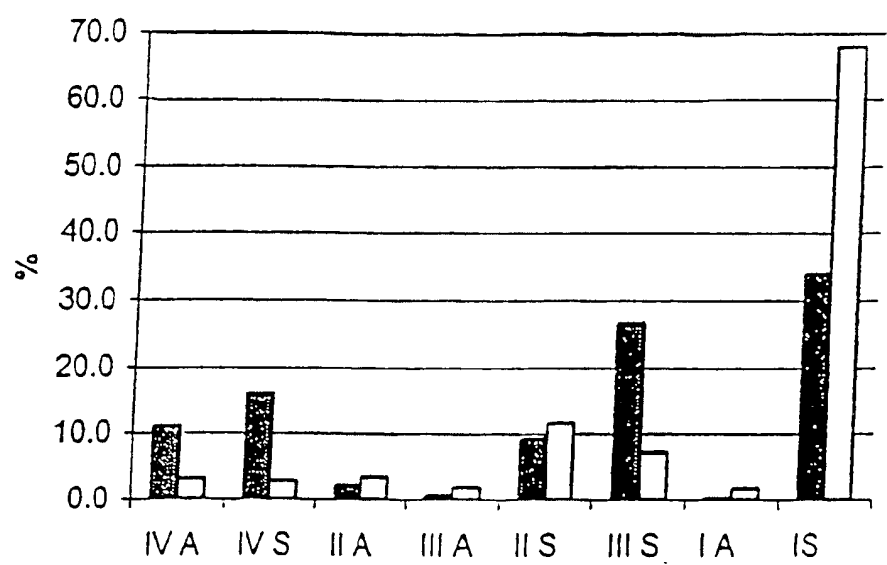


图6

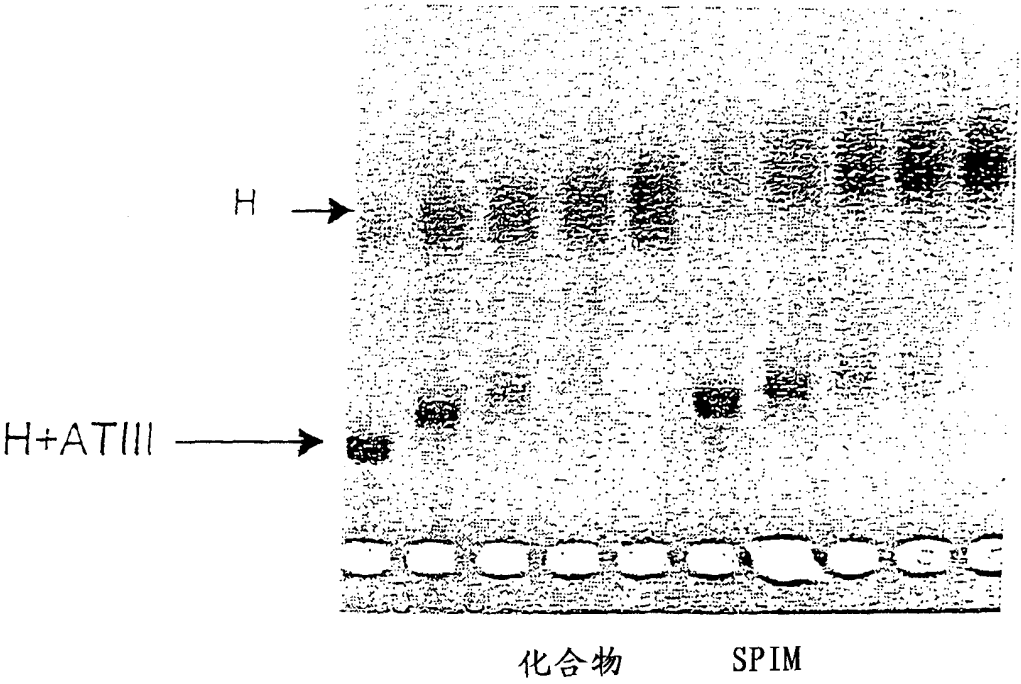


图 7

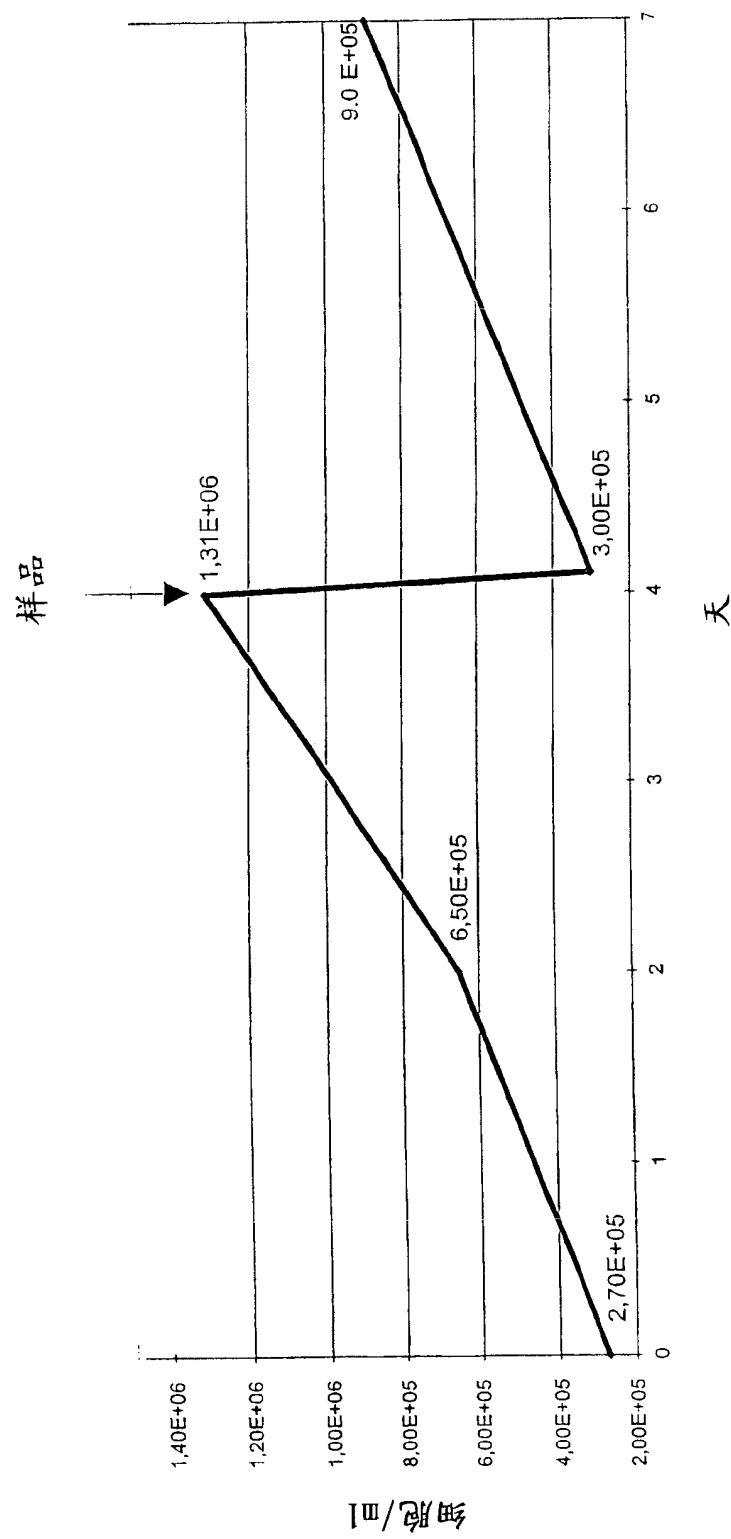


图8

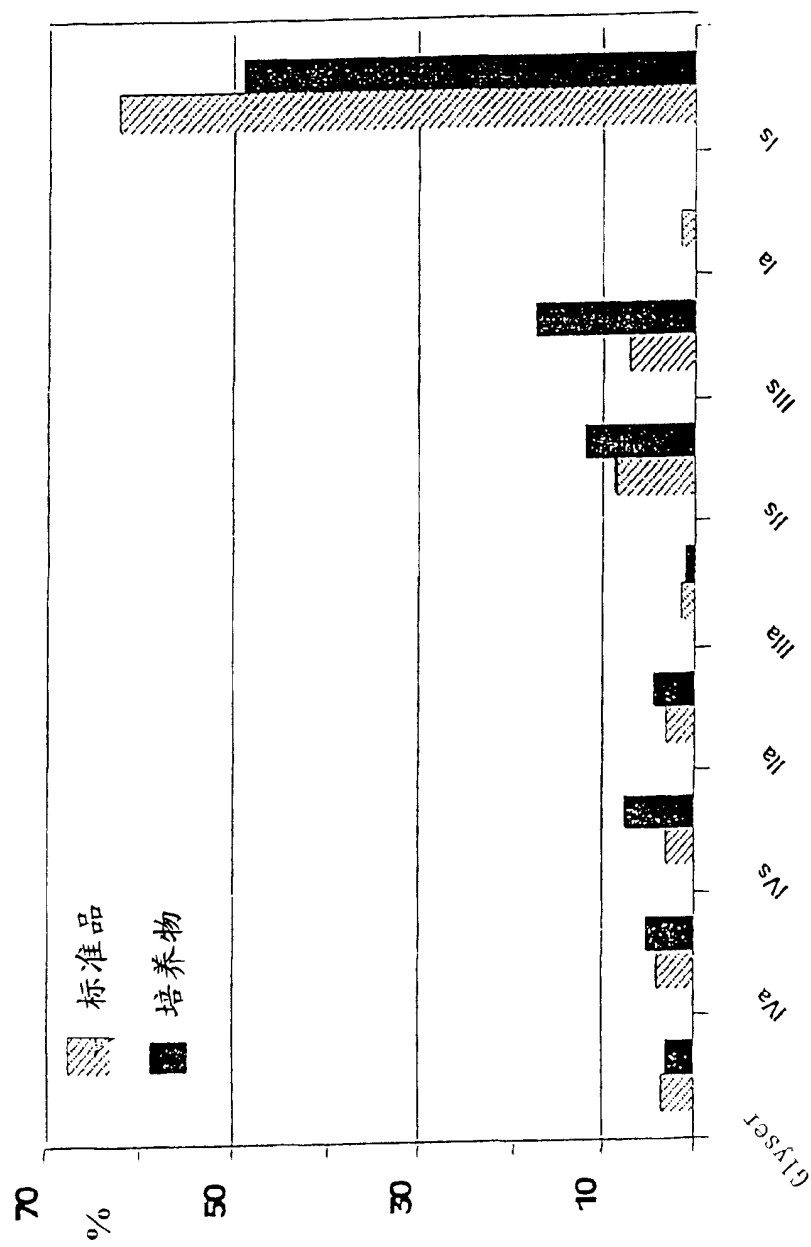


图 9

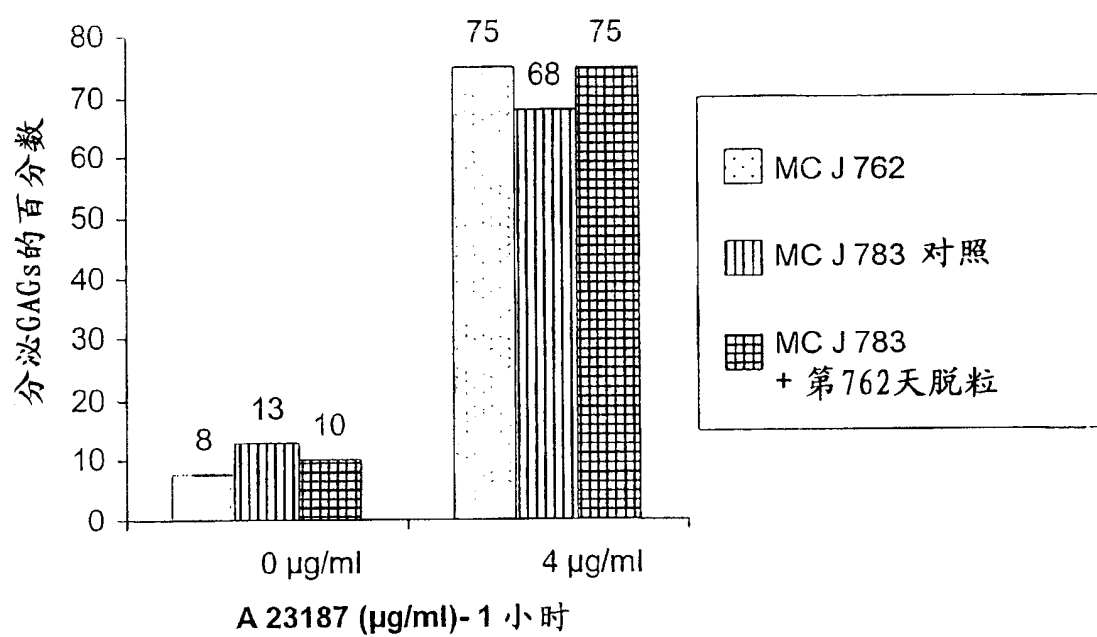


图10