



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102712899 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201080052044. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 09. 16

C12N 5/071 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 35/36 (2006. 01)

0916370. 0 2009. 09. 18 GB

A61P 17/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/001739 2010. 09. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/033260 EN 2011. 03. 24

(71) 申请人 富士胶片戴奥辛思生物技术英国有限公司

地址 英国比灵赫姆

(72) 发明人 B. V. 卡拉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李进 郭文洁

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 8 页

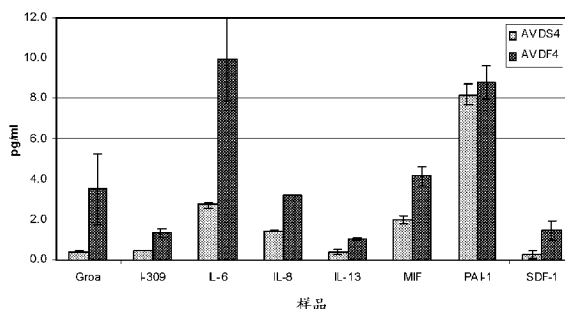
(54) 发明名称

干细胞条件培养基组合物

(57) 摘要

本文提供制备条件细胞培养基的方法。所述方法包括 :a) 将真核细胞培养在具有有效支持细胞生长的组成的生长培养基中 ;b) 将培养细胞与生长培养基分离 ;和 c) 将培养细胞维持在具有适于保持细胞存活率但不支持实质性细胞生长的组成的基础培养基中。细胞优选为真皮鞘细胞、真皮乳头细胞或真皮成纤维细胞。所述组合物可用作药物组合物,尤其用于伤口愈合的药物组合物。

在条件培养基中鉴定的细胞因子的相对水平



1. 一种用于制备条件细胞培养基的方法,所述方法包括:
 - a) 将真核细胞培养在具有有效支持细胞生长的组成的生长培养基中;
 - b) 将培养细胞与生长培养基分离;
 - c) 将培养细胞维持在具有适于维持细胞存活率但不支持实质性细胞生长的组成的基础培养基中。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述细胞为真皮鞘细胞、真皮乳头细胞或真皮成纤维细胞。
3. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述基础培养基在引入培养细胞前不含蛋白质。
4. 前述权利要求中任一项的方法,其中将所述细胞附着在微载体上进行培养。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中将所述细胞在与生长培养基分离后并且在引入所述基础培养基前进行洗涤。
6. 前述权利要求中任一项的方法,其中对步骤 c) 的产物进行随后的下列一种或多种过程:
 - a) 部分或完全纯化;
 - b) 冷冻;
 - c) 冻干;和
 - d) 干燥。
7. 一种组合物,其通过前述权利要求中任一项的方法产生。
8. 一种药物组合物,其通过权利要求 1-6 中任一项的方法产生。
9. 权利要求 8 的组合物,其包含 IL-6、Gro- α 、SDF-1、FGF-2、SPARC、PAI-1、IL-8、胶原、纤连蛋白、I-309、IL-13、MIF 和 SDF-1 和 TGF- β 蛋白的一种或多种。
10. 权利要求 8 或 9 的药物组合物在用于伤口愈合中的用途。
11. 一种药物组合物,其包含如下获得的条件细胞培养基:a) 将选自真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞或真皮乳头细胞的保持干细胞潜能的分化人细胞培养在生长培养基中;和 b) 将培养基与细胞分离。
12. 权利要求 11 的组合物,其包含 Gro- α 、I-309、IL-6、IL-8、IL-13、MIF、PAI-1、SDF-1 和 TGF- β 蛋白的一种或多种。
13. 权利要求 11 或 12 的组合物,进一步对其进行一种或多种下列过程:
 - a) 部分或完全纯化;
 - b) 冷冻;
 - c) 冻干;和
 - d) 干燥。
14. 权利要求 11-13 中任一项的组合物在用于伤口愈合中的用途。
15. 权利要求 8、9、11、12 或 13 中任一项的组合物作为药物的用途。

干细胞条件培养基组合物

[0001] 本发明涉及用于药学、美容和药用美容 (cosmeceutical) 应用的组合物,特别是用于包括病变和烧伤的治疗在内的伤口愈合的组合物。

[0002] 干细胞由于其形成多种类型的细胞的能力而在许多治疗、美容和药用美容领域十分引人关注。参见例如 EP 0980270。此外,已披露了用于供细胞(包括干细胞)生长的培养基,其因生长细胞将蛋白质和其它因子分泌到培养基中而用于治疗、美容和药用美容应用。参见例如 US7,118,746、US7,160,726 和 W02008/020815。仍然需要鉴定用于治疗、美容和药用美容目的的备选组合物。特别需要鉴定产生不被用于支持干细胞生长的蛋白质性物质污染的条件培养基的方法。此外,可能特别需要鉴定制备条件培养基的有效的可规模化的方法。

[0003] 按照本发明的第一个方面,提供包含如下获得的条件细胞培养基的药物组合物:
a) 将选自真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞或真皮乳头细胞的保持干细胞潜能的分化人细胞培养在生长培养基中;和 b) 将培养基与细胞分离。

[0004] 可用于本发明的第一个方面的生长培养基是足以满足细胞生长的培养基。细胞培养方法和培养基为本领域所熟知,包括补充血清的基础培养基、无血清培养基、无蛋白质培养基或化学成分确定的生长培养基。生长培养基通常包含必需氨基酸、糖、盐、维生素、矿物质/无机盐、痕量金属、脂质和核苷,并补充有支持细胞增殖所必需的各种其它组分,例如血清、蛋白质(例如胰岛素、运铁蛋白、生长因子和其它激素)、抗生素(例如庆大霉素、链霉素、青霉素)、附着因子(例如纤连蛋白、胶原、层粘连蛋白)。可组合(例如在血清的情况下)或单独加入补充成分。生长培养基为细胞提供满足特定细胞类型在受控体外环境中生长的营养需要的必需成分。

[0005] 在一个实施方案中,细胞培养过程在一个培养容器中操作,将细胞直接接种到装有微载体的培养容器中,细胞增殖直到达到所需细胞密度。在其它实施方案中,细胞培养过程在至少两个完全不同的细胞培养容器/系统中操作,例如一个或多个种子细胞扩繁容器接着是细胞生产容器。这种多重种子细胞扩繁过程优选利用尺寸递增的培养容器直到得到足够的细胞数目用于最终生产细胞培养容器的接种。种子细胞扩繁培养容器可为相同类型(例如组织培养瓶、摇瓶、滚瓶、转瓶 (spinner flask)、wave 生物反应器、搅拌釜生物反应器),但尺寸随种子细胞扩繁进程递增,或者可为随着种子细胞培养扩繁准备妥要转移到生产生物反应器而尺寸递增的混合培养系统(例如组织培养瓶至摇瓶至转瓶至搅拌釜生物反应器系统)。

[0006] 通常控制体外环境以保持最适生长温度、溶解氧、二氧化碳、pH 和重量摩尔渗透压浓度。许多细胞培养基配方是领域已知的,或者可容易地获自商用来源。本领域技术人员已知可通过将细胞接种到允许细胞在细胞培养期间生长的生长培养基中来产生条件细胞培养基。在细胞培养结束时或在培养期间的选定点,取出细胞,收获条件培养基。条件培养基可含有许多原始细胞培养生长培养基的成分,但还可含有细胞代谢物和由细胞分泌的其它蛋白质。分泌性蛋白可以是有生物活性的生长因子、细胞因子、蛋白酶和其它胞外蛋白质和肽。在许多实施方案中,本发明第一个方面的组合物包含 Gro- α 、I-309、IL-6、IL-8、

IL-13、MIF、PAI-1、SDF-1 和 TGF- β 蛋白的一种或多种,尤其包含 TGF- β 1。

[0007] 按照本发明的第二个方面,提供用于制备条件细胞培养基的方法,所述方法包括:

- a) 将真核细胞培养在具有有效支持细胞生长的组成的生长培养基中;
- b) 将培养细胞与生长培养基分离;
- c) 将培养细胞维持在具有适于维持细胞存活率但不支持实质性细胞生长的组成的基础培养基中。

[0008] 可用于本发明第二个方面的真核细胞披露于‘Basic Cell Culture’ Oxford University Press (2002) J. M. Davis 主编;以及‘Animal Cell Culture’ Oxford University Press (2000) John. R. W. Masters 主编;两份文献通过引用以其整体结合到本文中。术语“干细胞”描述了可产生多种组织类型的细胞的细胞。干细胞是来自胚胎、胎儿或成体的细胞,当与特殊信号转导复合物(其提供成为不同细胞类型的指导)一起出现时,其具有成为不同细胞类型的能力。存在不同类型的干细胞。当精子使卵受精时便形成一个全能细胞,并因此具有形成整个生物体的能力。在受精后头几个小时内,该细胞分裂成相同的全能细胞。受精后大约 4 天以及几个细胞分裂循环后,这些全能干细胞开始特化。在全能细胞变得更加特化时,因此而被称为“多潜能”。多潜能细胞可分化成体内的每种细胞类型,但不产生胎盘或胎儿发育所必需的支持组织。由于多潜能细胞分化的潜力是不“完整的”,因此这类细胞不能称为“全能”,且它们不是胚胎。多潜能干细胞进行进一步特化成为多能干细胞,所述多能干细胞定向分化成特化用于特殊功能的特定谱系的细胞。多能细胞可分化成存在于其从中衍生的组织中的细胞类型;例如多能(成体)干细胞例如间充质干细胞,例如真皮鞘细胞、真皮乳头细胞和真皮成纤维细胞。

[0009] 细胞可来源于成体、新生儿或胎儿组织,并且可以是自体或同种异体细胞。可采用本领域充分确立的方法对细胞进行遗传修饰。可采用遗传修饰改变分泌到细胞生长条件细胞培养基或条件基础细胞培养基中的一种或多种成分的浓度,例如以增量调节或减量调节蛋白质、引入新的蛋白质、或调节离子浓度。

[0010] 在某些实施方案中,使细胞作为共培养物生长。共培养细胞是生长在一起的两种或更多种不同种类的细胞的混合物。

[0011] 适用于第二个方面的方法的细胞可通过本领域已知方法获得。具体地讲,细胞可从组织中分离、由之前已建立的细胞母液中的细胞扩繁、传代并培养以产生细胞生长条件细胞培养基或条件基础细胞培养基。细胞生长条件细胞培养基或条件基础细胞培养基可使用未分化或分化细胞产生。

[0012] 用于本发明第二个方面的方法的细胞优选为保持干细胞潜能的选自真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞或真皮乳头细胞的分化人细胞。

[0013] 可用于本发明第二个方面的生长培养基如上文有关第一个方面中所述。将细胞培养在生长培养基中,直到达到所需细胞密度。

[0014] 用于本发明第二个方面的基础培养基具有适于维持细胞存活率的组成(例如 pH 和重量摩尔渗透压浓度)以避免细胞溶解但不支持实质性细胞生长、优选不支持细胞生长。基础培养基包含基础组分例如无机盐、氨基酸、维生素和能源(包括糖),但不补充例如血清、蛋白质、激素和附着因子等成分。优选的能源包含谷氨酰胺。基础培养基在引入培

养细胞前无蛋白质,并且在引入培养细胞后不向基础培养基中添加蛋白质补充成分。选择基础培养基的组成以维持培养细胞的存活率以供输出细胞代谢物并分泌到基础培养基中。可使用的基础培养基的实例包括 Ames 培养基、Eagle 基础培养基、Click 培养基、Dulbecco 改良的 Eagle 培养基、Ham 养分混合物 F-12、Glasgow 极限必需培养基、Iscove 改良的 Dulbecco 培养基、Eagle 极限必需培养基和 RPMI-1640 培养基。

[0015] 在本发明第二个方面的许多优选实施方案中,在从生长培养基分离后并在引入基础培养基之前洗涤细胞。合适的细胞洗涤溶液的实例为本领域所熟知,包括缓冲液,例如磷酸缓冲盐溶液。在一些优选的实施方案中,所用洗涤溶液为基础培养基,例如上述基础培养基,通常为与随后维持细胞的培养基相同的基础培养基。

[0016] 可以以细胞生长期结束时达到的相同细胞浓度将培养细胞引入基础培养基,或者更优选以较高浓度引入以提高基础培养基中分泌成分的浓度。如果使细胞生长在 2D 培养中,则细胞一般生长产生高度汇合的单层培养物。这种细胞浓度通常为 1×10^4 – 1×10^5 个细胞/ cm^2 ,优选 2×10^4 – 5×10^4 个细胞/ cm^2 。如果与基础培养基的接触以 2D 模式进行,则也是利用这种高度汇合的细胞单层。如果细胞生长在 3D 培养中,例如附着于微载体上,则细胞一般生长至 1×10^7 – 1×10^{12} 个细胞/升的浓度范围,优选为 1×10^8 – 1×10^{10} 个细胞/升。在许多实施方案中,在 2D 或 3D 培养任一种中,所用基础培养基的体积低于支持细胞生长所用培养基体积,至少 1/15、一般 1/10–1/2、1/6–1/4,例如 1/5。

[0017] 一般将培养细胞维持在基础培养基中直到培养基具有所需组成,一般为期超过 12 小时,通常为 18–26 小时,例如约 24 小时。在这种再培育期结束时,取出细胞以产生无细胞的条件基础细胞培养基。条件基础细胞培养基可含有细胞代谢物和分泌性蛋白。分泌性蛋白可为生物活性生长因子、细胞因子、蛋白酶和其它胞外蛋白质和肽。

[0018] 使用不同术语描述培养物中的细胞。‘细胞培养物’一般是指取自活的生物体并生长在受控条件下的细胞。原代细胞培养物是在第一次继代培养前直接取自生物体的细胞、组织或器官的培养物。当将细胞在促进生长和/或分裂的条件下置于生长培养基中时,细胞进行扩繁,产生较大的细胞群。细胞系是通过将原代细胞培养物进行一次或多次继代培养所形成的细胞群。每轮继代培养亦称为传代。本领域技术人员应理解的是,在传代期间,可能有多次群倍增。

[0019] 依赖贴壁细胞或依赖附着细胞是在组织培养中需要附着某一表面以繁殖和生长的细胞。在一些实施方案中,用于实施本发明的细胞能够生长在悬浮培养物中。本文所用的有悬浮能力的细胞是能够生长在悬液中而又不会产生大的坚实聚集体的细胞,即是单分散性的细胞,或者是生长在其中每个聚集体仅有少数细胞的疏松聚集体中的细胞。有悬浮能力的细胞包括而限于在不需适应或操作时生长在悬液中的细胞,以及通过依赖附着细胞对悬液生长逐步适应而成为有悬浮能力的细胞。如果使用这类细胞,则细胞的繁殖可在悬液中进行,因此可仅在生产生物反应器本身中的最终繁殖阶段和在生产阶段使用微载体。在悬液适应的细胞的情况下,所用微载体通常为大孔载体,其中细胞通过物理截留在载体的内部结构中而附着。

[0020] 本文所用术语“微载体”意指适于细胞附着和生长的小的分立颗粒。虽不总是如此,但微载体通常为由聚合物形成的多孔珠粒。微载体还可具有带凹痕的致密表面。细胞常常附着并生长在这类珠粒的外表面上。

[0021] 通过在有利于细胞生长的条件下培养细胞来实施本发明的方法。培养条件,例如温度、pH、溶解氧(包括低氧条件)等,是已知最适于特定细胞的培养条件,并且对本领域的技术人员或操作人员而言是显而易见的(参见例如 *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 第2版, Rickwood, D. 和 Hames, B. D., 主编, Oxford University Press, New York (1992))。

[0022] 在本发明的第一和第二个方面,有利的是,对附着在固体支持培养基上的细胞进行培养。大规模生产的选择包括组织培养瓶、滚瓶、基于灌注的系统(例如中空纤维生物反应器、内部和外部自旋过滤器(internal and external spin filter)、声学细胞滞留装置(acoustic cell retention device)、基于过滤的细胞滞留装置)、单板、多板或堆积板细胞培养系统、细胞立方体(cell cube)和微载体。还可使用由可供细胞与之附着并且可供细胞以不止一层生长的任何材料和/或形状组成的三维支架培养细胞。构架的结构可包括网格、海绵或可由水凝胶形成。一个合适的三维构架是 Integra™ Dermal Regeneration Template (Integra Life Sciences)。可将细胞直接培养在三维支架上,或者可从组织培养瓶、滚瓶、中空纤维系统、单板、多板或堆积板细胞培养系统、细胞立方体和微载体中收获细胞后,将细胞重新接种在三维支架上以产生细胞生长条件细胞培养基或条件基础细胞培养基。还可利用灌注细胞培养来培养细胞。在灌注细胞培养中,使用细胞滞留装置例如过滤器(例如内部或外部自旋过滤器)、细胞截留网格、细胞沉淀器、声学装置等,将细胞保留在生物反应器中。连续或定期向生物反应器中提供细胞培养生长培养基,并连续或周期性地取出不含细胞的‘耗尽’培养基。

[0023] 在某些优选的实施方案中,细胞附着在固体微载体的表面上,或者附着在大孔微载体的内部结构上,或通过物理截留在大孔微载体的内部结构内而附着,其中微载体是明胶(水解胶原)微载体。这类微载体可包含用作载体材料上的涂层的明胶颗粒、交联明胶颗粒或明胶,例如聚苯乙烯或玻璃颗粒。明胶可得自天然来源或者重组或合成产生。

[0024] 在一些实施方案中,细胞培养过程在一个培养容器中操作。将细胞直接接种到装有微载体的培养容器中后,细胞增殖,直到达到所需细胞密度。在无菌下收获含有增殖细胞的微载体并洗涤。然后,将经洗涤的微载体重新悬于基础培养基中,并在维持细胞存活率的最适条件下培育一段时间(通常24小时)。然后收获条件培养基。洗涤步骤可进行一次或多次。

[0025] 在其它实施方案中,细胞培养过程在至少两个完全不同的细胞培养容器/系统中操作,例如一个或多个种子细胞扩繁容器,接着是细胞生产容器。这种多种子细胞扩繁过程优选使用尺寸递增的培养容器,直到得到足够的细胞数目用于最终生产细胞培养容器的接种。种子细胞扩繁培养容器可为相同类型(例如组织培养瓶、摇瓶、滚瓶、转瓶、wave 生物反应器、搅拌釜生物反应器),但尺寸随种子细胞扩繁进程递增,或者可为随着种子细胞培养扩繁准备妥要转移到生产生物反应器而尺寸递增的混合培养系统(例如组织培养瓶至摇瓶至转瓶至搅拌釜生物反应器系统)。

[0026] 如有需要,可通过使微载体沉淀到细胞培养瓶底,之后取出选定百分比(至多全部并包括全部)的生长培养基体积,任选洗涤微载体,将相应百分比的新鲜细胞培养生长培养基加到细胞培养瓶中,来进行培养基更换。然后将微载体重新悬浮于培养基中后继续培养。可重复培养基取出和置换的这个过程,直到达到所需细胞密度。

[0027] 可用于本发明方法的明胶微载体通常为大致球状的,但可具有其它形状,并且可以是多孔的,或可以是固体。多孔和固体类型的微载体两者可获自商品供应商。大孔明胶微载体是市售可获得的,例如可获自 Percell Biolytica AB, Sweden 的“Cultispher”微载体。明胶大孔微载体的特征在于颗粒以高度交联的明胶基质为基础,粒径为 10–500 μm ,由包封直径为 1–50 μm 的大量空穴的聚合物基质组成。细胞附着微载体的使用有利于用于依赖贴壁细胞生长的搅拌釜和相关生物反应器的使用。细胞一般附着在悬浮的颗粒上。悬浮的需要性通常限制可使用的微载体的物理参数。一般选择这样的微载体粒径范围,即粒径足够大以容纳依赖贴壁细胞类型,同时又足够小以形成其性质适用于细胞培养生物反应器的悬液,细胞培养生物反应器例如摇瓶、滚瓶、转瓶、wave 生物反应器和搅拌釜生物反应器系统。明胶或胶原可通过赖氨酸的氨基、通过谷氨酸或天冬氨酸的羧基或其组合交联。

[0028] 通过本领域已知方法,例如采用细胞沉淀和倾析、间歇离心或连续离心和 / 或微量过滤,从细胞在其中生长或维持的培养基中将其分离。可采用例如超滤、渗滤或色谱纯化,对所得到的无细胞培养基进一步加工以浓缩或减少一种或多种因子或成分。

[0029] 在本发明第二个方面的方法中产生的条件培养基优选用作药物组合物。因此,这类药物组合物构成本发明的第三个方面。药物组合物,尤其是得自真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞或真皮乳头细胞的药物组合物一般可应用于伤口和病变愈合。组合物还可用于已知培养基的成分对之有效的其它应用。

[0030] 优选的组合物包含 IL-6、Gro- α 、SDF-1、FGF-2、SPARC、PAI-1、IL-8、胶原、纤连蛋白、I-309、IL-13、MIF 和 SDF-1 和 TGF- β 蛋白的一种或多种,尤其包含 TGF- β 1。尤其优选的组合物包含表 2、3 或 4 中所列举的一种或多种蛋白质。

[0031] 本发明第一和第三个方面的组合物可用于作为液体剂的药物,或可冷冻、冻干、形成膜剂或干燥成散剂。可将组合物稀释、浓缩、与其它成分混合,或者将组合物部分或完全纯化。可通过任何合适的方法,将组合物递送至人体或动物体。可将条件培养基与作为用于内部给予的溶媒的药学上可接受的载体一起配制、直接施用于伤口 / 病灶、与用于局部施用的油膏或软膏一起配制、或者例如制成或加入或分散于生物可降解的聚合物或水凝胶中以产生创伤敷料、可植入组合物和医疗装置涂层。分散于生物可降解聚合物中的一个优势是该系统可用于缓释递送系统。这对于将聚合物的生物活性成分递送至慢性伤口是特别有利的,其必须抵抗伤口蛋白水解环境的快速降解并且具有生物活性成分的缓释。对技术人员而言将是显而易见的是,递送方法将取决于待递送条件培养基的具体体内应用,并且技术人员应能够确定为此要应用哪一种方法。

[0032] 可通过应用细胞分泌物而不是细胞或者除细胞以外应用细胞分泌物加强内源组织修复,来使组织再生或修复组织。本发明基于以下前提,即包括多种蛋白质的差异性表达 / 分泌的多个复杂过程是最适组织修复和重塑所必需的。本发明中产生的条件培养基含有据信对组织修复、重塑和伤口愈合是重要的并且在例如伤口愈合体内模型中显示已被消耗的许多调节蛋白。这类蛋白质的实例包括 TGF- β 、IL-6、Gro- α 、SDF-1、FGF-2、SPARC、PAI-1、IL-8、胶原、纤连蛋白、I-309、IL-13、MIF 和 SDF-1。

[0033] TGF- β 1 是在皮肤伤口愈合中的主要 TGF- β 蛋白。在伤口愈合中,TGF- β 1 在炎症、血管生成、上皮再形成和结缔组织再生中是重要的。已经表明在发生损伤时表达增加 (Kopecki Z, Luchetti MM, Adams DH, Strudwick X, Mantamadiotis T, Stoppacciaro

A, Gabrielli A, Ramsay RG, Cowin AJ, *J Pathol* 2007 ;211:351-61。Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC, *J Cell Physiol* 1999 ;148:157-73)。体外研究表明, TGF- β 1 通过增加与胞外基质 (ECM) 形成有关的基因表达 (包括纤连蛋白、纤连蛋白受体及胶原和蛋白酶抑制剂) 而有助于启动肉芽形成 (White L A, Mitchell T I, Brinckerhoff C E, *Biochimica et biophysica acta*, 2000 ;1490 (3):259-68。Mauviel A, Chung KY, Agarwal A, Tamai K, Uitto J, *J Biol Chem* 1996 ;271:10917-23。Papakonstantinou E, Aletra AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G, *Cytokine* 2003, 24: 25-35。Zeng G, McCue HM, Mastrangelo L, Mills AJ, *Exp Cell Res* 1996; 228:271-6)。更多的体外研究表明, TGF- β 1 通过促进胶原基质的成纤维细胞收缩而在伤口收缩中起重要作用 (Meckmongkol TT, Harmon R, McKeown-Longo P, Van De Water L, *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ;360:709-14)。在伤口愈合的基质形成和重塑阶段, TGF- β 1 参与胶原产生, 特别是 I 型和 II 型的产生 (Papakonstantinou E, Aletra AJ, Roth M, Tamm M, Karakiulakis G, *Cytokine* 2003 ;24:25-35)。已经表明, 当过量表达时, 已知 TGF- β 1 刺激同样已知在肥厚性瘢痕和瘢痕瘤性瘢痕的发展中起重要作用的结缔组织生长因子 (CTGF) (Colwell AS, Phan TT, Kong W, Longaker MT, Lorenz PH, *Plast Reconstr Aesthet Surg* 2005 ;116:1387-90)。

[0034] 已经表明, IL-6 在启动伤口愈合反应中重要, 和在受伤后表达增加, 在陈旧伤口中趋于持续存在 (Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa, O, *Wound Repair Regen* 2006 ;14:457-62。Grellner W, Georg T, Wilske J, *Forensic Sci Int* 2000 ; 113:251-64。Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, Rocha AM, Jeschke MG, *Shock* 2006 ;26:13-9)。IL-6 对角质形成细胞具有促有丝分裂作用 (Randle M Gallucci, Dusti K Sloan, Julie M Heck, Anne R Murray 和 Sijy J O'Dell, *Journal of Investigative Dermatology* (2004) 122,764-772) 和增殖作用 (Sato M, Sawamura D, Ina S, Yaguchi T, Hanada K, Hashimoto I, *Arch Dermatol Res* 1999 ;291:400-4。Peschen M, Grenz H, Brand-Saberi B, Bunaes M, Simon JC, Schopf E, Vanscheidt W, *Arch Dermatol Res* 1998 ;290:291-7), 并且对嗜中性粒细胞有趋化性。

[0035] Gro- α (CXCL1) 趋化因子是 CXC 家族成员, 是嗜中性粒细胞趋化作用的有效调节剂, 并且在急性伤口中被增量调节。体外研究表明通过促进角质形成细胞迁移而在上皮再形成中起作用 (Englehardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998 ;153:1849-60。Christopherson K II, Hromas R, *Stem Cells* 2001 ; 19:388-96)。

[0036] SDF-1 (CXCL12) 通过将淋巴细胞募集至伤口并促进血管生成而在炎症反应中起作用。当急性伤口的稳态被扰乱时, 在伤口边缘观察到水平升高的 SDF1 (Toksoy A, Muller V, Gillitzer R, Goebeler M, *Br J Dermatol* 2007 ;157:1148-54)。SDF-1 促进上皮细胞的增殖和迁移 (Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ, *Am J Pathol* 1999 ;154:1125-35)。SDF-1 还可提高角质形成细胞增殖从而有助于上皮再形成 (Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, Szabowski A, Angel P, *J Cell Sci* 2005 ;118(Pt9):1981-9)。

[0037] FGF-2 (bFGF) 在上皮再形成期间调节各种 ECM 成分的合成和沉积、增加角质形成

细胞运动性 (Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa, O, *Wound Repair Regen* 2006 ; 14:457-62。Grellner W, Georg T, Wilske J, *Forensic Sci Int* 2000 ;113:251-64。Di Vita G, Patti R, D'Agostino P, Caruso G, Arcara M, Buscemi S, Bonventre S, Ferlazzo V, Arcoleo F, Cillari E, *Wound Repair Regen* 2006 ;14:259-64) 和促进成纤维细胞的迁移并刺激其产生胶原酶 (Sasaki T, *J Dermatol.* 1992 年 11 月 ; 19(11):664-6)。

[0038] 在重塑和修复 (例如愈合皮肤伤口) 期间, SPARC (富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白) 在不同组织中表达 (Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH, *J Histochem Cytochem* 1993, 41:1467-1477), 这就表明了再生中的功能 (Louise H. Jørgensen, Stine J. Petersson, Jeeva Sellathurai, Ditte C. Andersen, Susanne Thayssen, Dorte J. Sant, Charlotte H. Jensen 和 Henrik D. Schrøder, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 第 57 卷 (1): 29-39, 2009)。多种基质细胞蛋白显示因响应损伤而增加表达 (Bradshaw AD, Sage EH, *J Clin Invest* 2001, 107:1049-1054)。SPARC 是基质细胞糖蛋白, 调节细胞与 ECM 的相互作用。据报道在 SPARC 失效小鼠中, 皮肤伤口闭合加速, 胶原沉积改变 (Bradshaw AD, Reed MJ, Sage EH, *J Histochem Cytochem* 2002, 50:1-10)。从伤口部位的表达模式和体外研究来看, SPARC 涉及伤口愈合的控制 (Basu A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC, *BMC Cell Biol.* 2001 ;2:15。2001 年 8 月 7 日网上发表)。

[0039] PAI-1 (SerpineE1) 是纤溶酶产生的重要生理调节剂。虽然在表皮中 PAI-1 通常不是由角质形成细胞表达的, 但已经表明在体外和体内伤口损伤后其表达增加 (Romer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkiaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Dano K, Kristensen P, *J Invest Dermatol* 1991, 97:803-811。Staiano-Coico I, Carano K, Allan VM, Steiner MG, Pagan-Charry I, Bailey BB, Babaar P, Rigas B, Higgins PJ, *Exp Cell Res* 1996, 227:123-134)。支持 PAI-1 在伤口愈合中的作用的一项研究表明, PAI-1 功能的丧失导致伤口愈合加快 (Joyce C.Y. Chan, Danielle A. Duszczyszyn, Francis J. Castellino 和 Victoria A Ploplis, *American Journal of Pathology.* 2001;159:1681-1688)。研究表明, 在上皮再形成过程的角质形成细胞和结缔组织细胞迁移以及与伤口愈合有关的组织重塑期间, uPA 和 PAI-1 的表达在空间和时间上被调节 (Romer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkiaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Dano K, Kristensen P, *J Invest Dermatol* 1991, 97:803-811)。

[0040] 在急性伤口中 IL-8 表达增加 (E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998 ;153:1849-60), 并且已被证实通过增加角质形成细胞迁移和增殖而在上皮再形成中起作用 (Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Reid C, Arenberger P, Ruzicka T, *FEBS Lett* 1992 ;305:241-3。Tuschil A, Lam C, Haslberger A, Lindley I, *J Invest Dermatol.* 1992 年 9 月 ;99(3):294-8)。它还在白细胞中诱导 MMP 的表达, 刺激组织重塑 (Englehardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bocker EB, Gillitzer R, *Am J Pathol* 1998 ;153:1849-60)。它是嗜中性粒细胞强有力的化学引诱物, 因此参与炎症反应 (Rennekampff H0, Hansbrough JF, Kiessig V, Doré C, Sticherling M, Schröder JM, *J Surg Res.* 2000 年 9 月 ;93(1):41-54)。此外, 加入高水平的 IL-8

降低角质形成细胞增殖和由成纤维细胞引起的胶原晶格收缩 (Iocono JA, Collieran KR, Remick DG, Gillespie BW, Ehrlich HP, Garner WL, *Wound Repair Regen.* 2000年5-6月;8(3):216-25)。

[0041] 胶原和纤连蛋白—伤口愈合的增生期的特征在于血管生成、胶原沉积、肉芽组织形成、上皮形成和伤口收缩 (Midwood K.S., Williams L.V., 和 Schwarzbauer J.E. 2004, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (6): 1031-1037)。在纤维组织形成和肉芽组织形成中,成纤维细胞生长,并通过分泌胶原和纤连蛋白形成新的 ECM (Midwood K.S., Williams L.V. 和 Schwarzbauer J.E. 2004, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (6): 1031-1037)。在受伤后 2-5 天成纤维细胞开始进入伤口部位,因为炎症期结束,且其数目在受伤后 1-2 周达到高峰 (de la Torre J., Sholar A. (2006), Wound healing: Chronic wounds. Emedicine.com, 2008 年 1 月 20 日访问)。到第一周结束时,成纤维细胞是伤口中的主要细胞 (Stadelmann W.K., Digenis A.G. 和 Tobin G.R. (1998), *American Journal of Surgery* 176 (2): 26S-38S)。在受伤后 2-4 周,纤维组织形成结束。在损伤后头 2 或 3 天,成纤维细胞主要增殖并迁移,而之后,它们是沉积在伤口部位胶原基质上的主要细胞 (Stadelmann W.K., Digenis A.G. 和 Tobin G.R. (1998), *American Journal of Surgery* 176 (2): 26S-38S)。来自正常组织的成纤维细胞从其边缘迁移至伤口区域中。成纤维细胞最初利用在炎症期形成的血纤蛋白痂迁移过去,附着在纤连蛋白上 (Romo T. 和 Pearson J.M. 2005, Wound Healing, Skin. Emedicine.com, 2006 年 12 月 27 日访问)。然后成纤维细胞将基质沉积在伤口床上,稍后沉积它们可附着以迁移的胶原 (Rosenberg L., de la Torre J. (2006), Wound Healing, Growth Factors. Emedicine.com, 2008 年 1 月 20 日访问)。胶原沉积被认为是重要的,因为它增加伤口的强度;在其沉积下来之前,血纤蛋白-纤连蛋白凝块保持伤口闭合 (Greenhalgh D.G. (1998), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (9): 1019-1030)。同样,参与炎症、血管生成和结缔组织构建的细胞附着在成纤维细胞所沉积的胶原基质上,生长并分化 (Ruszczak Z. 2003, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12): 1595-1611)。

[0042] 人细胞因子 I-309 是一种小的糖蛋白,在结构上与许多炎性细胞因子相关,其在血管生成期间特异性刺激人单核细胞 (Miller MD, Krangel MS, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992b 89:2950-2954)。

[0043] 一般认为在治疗伤口时需要通过直接加入这些因子来增加生长因子的供应。使用该方法,可排除与基于细胞的疗法相关的现有问题,例如但不限于免疫相容性和肿瘤发生。因为许多已知是所需要的一系列因子存在于申请人的细胞生长条件细胞培养基和条件基础细胞培养基中,因此本发明的细胞生长条件细胞培养基和条件基础细胞培养基还可用于治疗其中需要组织修复和/或再生或损害的其它类型的组织损害。

[0044] 在不受限制的情况下,通过下列实施例对本发明进行说明。

[0045] 细胞系的建立

基本上按 EP980270 中所述以及下述修改来分离毛囊间充质细胞。将人皮肤组织样品用含有 $1\mu\text{g/ml}$ 两性霉素和 $10\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的极限必需培养基 (MEM, Sigma M4655) 洗涤 3 次。在解剖显微镜下,使用精细手术剪切下毛发生长初期‘端球’,并放入小体积 (通

常 100–200 μ l) 的 MEM 中。用针将端球倒置, 切开乳头, 抽出鞘。然后将乳头和鞘分别转移到 4 孔细胞培养板 (Nunc) 中。每孔补充了 20% 胎牛血清 (FBS)、0.5 μ g/ml 两性霉素和 5 μ g/ml 庆大霉素的 1ml MEM 中转移 10 个乳头和 10 个鞘。将 4 孔细胞培养板在无菌和标准条件 (37°C、5% 二氧化碳) 下培育。细胞生长 10 天后, 将细胞从各孔中剥离 (采用本领域充分确立的标准方法), 并分别转移到 35mm 直径细胞培养皿 (Nunc) 中。当细胞生长汇合时, 将真皮鞘 (下文称为 ‘AVDS’) 和真皮乳头 (下文称为 ‘AVDP’) 细胞系按前述剥离, 并转移到 T25 细胞培养瓶 (Nunc) 中用于在上述条件下进一步扩繁。

[0046] 从上述相同的人皮肤组织样品中建立真皮成纤维细胞 (下文称为 ‘AVDF’) 细胞系。将乳头真皮与网状真皮和脂肪层相分离, 然后在显微镜下切成面积约 2–3mm² 的片。将切割组织转移到装有如上述用于真皮鞘和真皮乳头细胞系的补充成分的 MEM 的 T25 细胞培养瓶 (Nunc) 中。将装有真皮成纤维细胞 (AVDF) 细胞系的 T25 细胞培养瓶在无菌和标准条件下培育 (如前所述)。当培养物达到汇合时, 采用相同条件使真皮成纤维细胞 (AVDF) 细胞系进一步扩繁。

[0047] 从多个不同的人组织样品建立 AVDS、AVDP 和 AVDF 细胞系。在下列实施例中描述的这些细胞系的概况见下表 1。

[0048] 表 1: 细胞系概况

细胞系名称	类型
AVDP2	真皮乳头
AVDS4	真皮鞘
AVDS6	真皮鞘
AVDF3	真皮成纤维细胞
AVDF4	真皮成纤维细胞
AVDP3	真皮乳头

[0049] 实施例 1

收获生长在静态培养的 MEM + 10% FBS 中的 AVDF4 和 AVDS4 细胞 (采用本领域充分确立的标准方法)。以 5 x 10⁵ 个细胞 / 瓶将细胞接种到 225cm² 培养瓶的 50ml MEM + 10% 胎牛血清 (FBS) 中, 在 37°C、5% CO₂ 下培育 8 天, 在第 4 天更换新鲜培养基 (MEM + 10% FBS)。在第 8 天收获条件培养基, 过滤 (0.2 μ m), 在分析前冷冻保存于 -20°C 下。

[0050] 按照试剂盒提供的方法, 使用人细胞因子阵列 “panel A” 试剂盒 (R&D SYSTEMS ARY005), 对得自 AVDF4 和 AVDS4 的条件培养基进行了分析。因为 AVDF4 和 AVDS4 生长培养基含有 10% FBS, 所以也对作为对照的 MEM + 10% FBS 进行了分析。所得结果见图 1。采用本领域充分描述的方法, 对鉴定为与 MEM + 10% FBS 对照相比强度增强的点进行了定量测定。相对各膜上的阳性对照并且相对 MEM+10% FBS 对照膜上的相应细胞因子点, 将数据归一化。图 2 提供的结果表示从一式两份样品的 AVDS4 和 AVDF4 条件培养基中鉴定的各种细胞因子的相对水平。出人意料的是, 在所鉴定的细胞因子 (限于所用 “panel A” 试剂盒中包括的细胞因子) 中, 在由 AVDS4 和 AVDF4 细胞系两者产生的条件培养基中均检出细胞因子 Gro α 、I-309、IL6、IL-8 PAI-1。本领域已证实这些细胞因子在促进伤口愈合过程中的

重要性。

[0051] 实施例 2

从真皮成纤维细胞系、真皮鞘细胞系和真皮乳头细胞系制备无血清条件培养基。使 AVDF4、AVDS4 和 AVDP2 细胞在静态培养的 MEM + 10% FBS 细胞培养生长培养基中于 37℃、5% CO₂ 下生长 6 天。收获细胞（采用本领域充分确立的标准方法），并用来以 2×10^6 个细胞 / 瓶分别接种至 75cm² 培养瓶的 15ml MEM + 10% 胎牛血清 (FBS) 中。将培养瓶在 37℃、5% CO₂ 下培育 24 小时。在此培育时间后，从各瓶中取出生长培养基弃去。将细胞单层培养物用 20ml 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 小心地洗涤 3 次，然后单独用 20ml MEM（无 FBS）再洗涤 3 次。然后将补充了 2mM 谷氨酰胺的新鲜 MEM（无 FBS, 6 ml）加到各瓶中，将培养瓶在 37℃、5% CO₂ 下培育 24 小时。从各瓶中收获条件基础培养基，过滤 (0.2 μm)，在分析前冷冻保存在 -20℃ 下。还包括 MEM 生长培养基（无 FBS）的样品作为对照。将样品 (8ml) 融化，并使用 Amicon Ultra 15 Centriprep 装置 (Millipore) 在 3200 RCF、45 分钟、室温下浓缩至 250μl。然后使用 Speedvac，将 200μl 的各样品再浓缩 2 倍。然后使用 4-20% NuPage (Invitrogen) 还原性 SDS-PAGE 凝胶，对 4 种样品中每一个的 10μl 进行了分析，用 EZBlue (Sigma) 染色。SDS-PAGE 凝胶见图 3。用干净的解剖刀片将 SDS-PAGE 凝胶的各个泳道 (1-4) 切成 10 个条带，采用 ProGest 消化机器人 (digestion robot) 的标准方法，用胰蛋白酶消化 40 个条带各条带中的蛋白质。应用本领域充分确立的 LC-MS-MS，使用 Thermo LTQ XL Orbitrap Electrospray 质谱仪，对 5μl 各消化物进行了分析。利用 Mascot (Matrixscience) 和 Sequest (Thermo) 检索引擎和 ProteomeDiscoverer (Thermo) Interface，相对数据库 Swissprot 当前版本检索 MS-MS 谱。非常严格地设置检索参数 (FDR < 1%)。对于 AVDP2、AVDF4 和 AVDS4 的条件培养基，所鉴定的蛋白质分别见表 2、3 和 4。

[0052] 表 2 :AVDP2 条件基础细胞培养基中鉴定的蛋白质

鉴定的蛋白质		
45 kDa 钙结合蛋白	细丝蛋白-A	磷酸甘油酸激酶 1
6-磷酸葡萄糖酸内酯酶	细丝蛋白-B	磷酸甘油酸变位酶 1
72 kDa IV 型胶原酶	细丝蛋白-C	磷酸丝氨酸氨基转移酶
含自水解酶 (abhydrolase) 域的蛋白 14B	FK506 结合蛋白 9	色素上皮衍生因子
脂肪细胞增强子结合蛋白 1	果糖二磷酸醛缩酶 A	纤溶酶原激活物抑制物 1
醇脱氢酶[NADP+]	半乳凝素-1	网蛋白-1
醛糖还原酶	半乳凝素-3 结合蛋白	多肽 N-乙酰氨基半乳糖 基转移酶 10
α -2-巨球蛋白	γ -谷氨酰水解酶	多肽 N-乙酰氨基半乳糖 基转移酶 2
α -辅肌动蛋白-4	凝溶胶蛋白	多肽 N-乙酰氨基半乳糖 基转移酶 5
α -烯醇化酶	神经胶质衍生连接蛋白	妊娠特异性 β -1-糖蛋白 5
膜联蛋白 A1	葡萄糖-6-磷酸异构酶	前胶原 C-内肽酶增强子 1
天冬氨酸氨基转移酶, 胞质	谷胱甘肽 S-转移酶 P	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊 二酸 5-双加氧酶 1

表 2(续)

ATP 合酶亚基 β , 线粒体	谷胱甘肽转移酶 α -1	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 2
基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 3
双功能天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶 1	甘氨酸基-tRNA 合成酶	抑制蛋白-1
双糖链蛋白聚糖	热激 70kDa 蛋白 6	蛋白质二硫键异构酶 A6
胆绿素还原酶 A	热激蛋白 β -1	蛋白质 S100-A6
钙黏着蛋白-11	血红素结合蛋白 2	嘌呤核苷磷酸化酶
钙同线蛋白-1 (Calsyntenin-1)	HLA I 类组织相容性抗原, α 链 G	推定的异源核内核糖核蛋白 A1 样蛋白 3
网腔钙结合蛋白	乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白 1	推定的核苷二磷酸激酶
巯基还原酶[NADPH] 1	失活丝氨酸蛋白酶 RAMP	推定的醌氧化还原酶
软骨寡聚基质蛋白	胰岛素样生长因子结合蛋白 2	丙酮酸激酶同工酶 M1/M2
组织蛋白酶 B	胰岛素样生长因子结合蛋白 3	醌氧化还原酶
组织蛋白酶 Z	胰岛素样生长因子结合蛋白 4	Rab GDP 解离抑制剂 α
CD109 抗原	胰岛素样生长因子结合蛋白 6	Rab GDP 解离抑制剂 β
CD166 抗原	胰岛素样生长因子结合蛋白 7	Ras GTP 酶激活样蛋白 IQGAP1
胞内氯离子通道蛋白 1	整联蛋白 β 样蛋白 1	网钙结合蛋白-1
硫酸软骨素蛋白聚糖 4	间质胶原酶	Rho GDP 解离抑制剂 1

表 2(续)

簇蛋白	角蛋白, I 型细胞骨骼 9	含有富含半胱氨酸结构域的清道夫受体蛋白质 LOC284297
胶原 α -1(I) 链	驱动蛋白样蛋白 KIF7	脑衰蛋白 (Semaphorin)-7A
胶原 α -1(III) 链	乳酰谷胱甘肽裂解酶	丝氨酸蛋白酶 HTRA1
胶原 α -1(IV) 链	核纤层蛋白-A/C	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B6
胶原 α -1(V) 链	层粘连蛋白亚基 β -1	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B7
胶原 α -1(VI) 链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白 2	血清白蛋白
胶原 α -1(VII) 链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白, 同种型 1S	S-甲酰谷胱甘肽水解酶
胶原 α -1(XI) 链	含有富含亮氨酸的重复 序列的蛋白 15	司腺钙蛋白-2
胶原 α -1(XII) 链	含有富含亮氨酸的重复 序列的蛋白 40	溶基质蛋白酶-1
胶原 α -2(I) 链	L-乳酸脱氢酶 A 链	巯基氧化酶 1
胶原 α -2(IV) 链	L-乳酸脱氢酶 B 链	Nesh-SH3 的靶标
胶原 α -2(V) 链	腔蛋白聚糖	含硫氧还蛋白结构域的 蛋白 5
胶原 α -2(VI) 链	赖氨酰氧化酶同源物 2	硫氧还蛋白依赖性过氧化 化物还原酶, 线粒体
胶原 α -3(VI) 链	苹果酸脱氢酶, 胞质	血小板反应蛋白-1
补体 C1q 肿瘤坏死因子 相关蛋白 5	苹果酸脱氢酶, 线粒 体	转醛醇酶
C 型凝集素结构域家族 11 成员 A	哺乳动物室管膜蛋白 (ependymin) 相关蛋 白 1	转化生长因子- β -诱导 蛋白 ig-h3
半胱氨酸蛋白酶抑制剂-C	基质重塑相关蛋白 8	转酮醇酶
Dickkopf 相关蛋白 3	金属蛋白酶抑制剂 1	胰蛋白酶-3
二氢嘧啶酶相关蛋白 2	线粒体分裂因子同源 物 A	色氨酸-tRNA 合成酶, 胞 质
DNA-(无嘌呤或无嘧啶 位点) 裂解酶	膜突蛋白	泛醌生物合成蛋白 COQ7 同源物
含有 EGF 的纤蛋白样 胞外基质蛋白 2	神经毡蛋白-1	泛素羧基端水解酶同工 酶 L1

表 2(续)

内质网氨肽酶 1	核结合蛋白-1	泛素样修饰因子激活酶 1
内质网蛋白 ERp29	嗅介蛋白样蛋白 2B	未表征的金属磷酸酯酶 CSTP1
内皮唾酸蛋白	嗅介蛋白样蛋白 3	尿激酶型纤溶酶原激活物
胞外基质蛋白 1	Out at first 蛋白同源物	Vasorin
F-肌动蛋白加帽蛋白亚基 α -1	肽基脯氨酰顺反异构酶 B	多功能蛋白聚糖核心蛋白
肌成束蛋白	过氧蛋白 (Peroxidasin) 同源物	波形蛋白
原纤维蛋白-1	过氧化物氧还蛋白-1	黏着斑蛋白
纤连蛋白	过氧化物氧还蛋白-4	含 WD 重复序列的蛋白质 1
纤蛋白-1	过氧化物氧还蛋白-6	Xaa-Pro 二肽酶
聚丝蛋白-2	磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1	锌指蛋白 276

表 3 :在 AVDF4 条件基础细胞培养基中鉴定的蛋白质

鉴定的蛋白质		
2', 3'-环核苷酸 2'-磷酸二酯酶	纤连蛋白	纤溶酶原激活物 抑制物 1
45 kDa 钙结合蛋白	纤蛋白-1	丝束蛋白-3
60 kDa 热激蛋白, 线粒体	细丝蛋白-A	妊娠特异性 β -1- 糖蛋白 5
72 kDa IV 型胶原酶	细丝蛋白-B	前胶原 C-内肽酶 增强子 1
聚集蛋白聚糖核心 蛋白	细丝蛋白-C	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双 加氧酶 1
醛糖还原酶	FK506 结合蛋白 10	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双 加氧酶 2
α -2-巨球蛋白	果糖二磷酸醛缩酶 A	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双 加氧酶 3
α -辅肌动蛋白-4	半乳凝素-3 结合蛋白	抑制蛋白-1

表 3(续)

α -烯醇化酶	γ -谷氨酰水解酶	脯氨酰 3-羟化酶 1
芳基硫酸酯酶 B	凝溶胶蛋白	蛋白质 BCCIP 同源物
天冬氨酸氨基转移酶, 线粒体	葡萄糖-6-磷酸异构酶	蛋白质二硫键异构酶 A6
含 ATP 酶家族 AAA 结构域的蛋白 5	热激蛋白 β -1	蛋白质 ZNF 750
Band 3 阴离子转运蛋白	含免疫球蛋白超家族的富含亮氨酸的重复序列蛋白	推定的异源核内核糖核蛋白 A1 样蛋白 3
基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白	失活丝氨酸蛋白酶 RAMP	推定的核苷二磷酸激酶
双糖链蛋白聚糖	胰岛素样生长因子结合蛋白 4	丙酮酸激酶同工酶 M1/M2
生物素酰胺酶	胰岛素样生长因子结合蛋白 6	Rab GDP 解离抑制剂 α
钙同线蛋白-1	胰岛素样生长因子结合蛋白 7	Rab GDP 解离抑制剂 β
网腔钙结合蛋白	整联蛋白 β 样蛋白 1	Ras GTP 酶激活样蛋白 IQGAP1
软骨寡聚基质蛋白	间质胶原酶	网钙结合蛋白-1
组织蛋白酶 B	层粘连蛋白亚基 α -4	脑衰蛋白-7A
组织蛋白酶 Z	层粘连蛋白亚基 β -1	丝氨酸蛋白酶 HTRA1
CD 109 抗原	层粘连蛋白亚基 γ -1	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B6
胶原 α -1(I)链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白 2	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B7
胶原 α -1(III)链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白, 同种型 1S	司腺钙蛋白-2
胶原 α -1(IV)链	L-乳酸脱氢酶 A 链	溶基质蛋白酶-1
胶原 α -1(V)链	腔蛋白聚糖	巯基氧化酶 1
胶原 α -1(VI)链	赖氨酰氧化酶同源物 2	辜丸蛋白聚糖-1
胶原 α -1(XII)链	巨噬细胞金属弹性蛋白酶	含硫氧还蛋白结构域的蛋白 5

表 3(续)

胶原 α -2(I)链	苹果酸脱氢酶, 胞质	血小板反应蛋白-1
胶原 α -2(V)链	基质重塑相关蛋白 5	血小板反应蛋白-2
胶原 α -2(VI)链	基质重塑相关蛋白 8	转醛醇酶
胶原 α -3(IV)链	金属蛋白酶抑制剂 1	转化生长因子- β -诱导蛋白 ig-h3
胶原 α -3(VI)链	膜突蛋白	转凝蛋白
含胶原三股螺旋重复序列的蛋白质 1	巢蛋白-1	转酮醇酶
补体 C1r 亚成分	嗅介蛋白样蛋白 3	色氨酸-tRNA 合成酶, 胞质
补体 C1s 亚成分	嗅感受器 5C1	酪氨酸蛋白激酶受体 UFO
Dickkopf 相关蛋白 3	Out at First 蛋白同源物	泛素羧基端水解酶同工酶 L1
二氢硫辛酸脱氢酶, 线粒体	肽基脯氨酸顺反异构酶 B	泛素样修饰因子激活酶 1
二氢嘧啶酶相关蛋白 2	Periostin	Vasorin
含有 EGF 的纤蛋白样胞外基质蛋白 2	过氧化物氧还蛋白-1	波形蛋白
内质网蛋白 ERp29	磷酸甘油酸激酶 1	黏着斑蛋白
胞外基质蛋白 1	磷酸甘油酸变位酶 1	玻连蛋白
肌成束蛋白	磷酸丝氨酸氨基转移酶	含 WD 重复序列的蛋白质 1
原纤维蛋白-1	色素上皮衍生因子	

表 4: AVDS4 条件基础细胞培养基中鉴定的蛋白质

鉴定的蛋白质		
45 kDa 钙结合蛋白	胞外基质蛋白 1	核结合蛋白-2
60 kDa 热激蛋白, 线粒体	埃兹蛋白	嗅介蛋白样蛋白 3
72 kDa IV 型胶原酶	肌成束蛋白	肽基脯氨酸顺反异构酶 B

表 4(续)

78 kDa 葡萄糖调节蛋白	原纤维蛋白-1	Periostin
腺嘌呤基环化酶相关蛋白 1	原纤维蛋白-2	过氧蛋白同源物
醛糖还原酶	纤连蛋白	过氧化物氧还蛋白-1
α -2-巨球蛋白	纤蛋白-1	过氧化物氧还蛋白-6
α -辅肌动蛋白-4	细丝蛋白-A	磷酸甘油酸激酶 1
α -烯醇化酶	细丝蛋白-B	磷酸甘油酸变位酶 1
α -N-乙酰葡萄糖苷酶	细丝蛋白-C	磷酸丝氨酸氨基转移酶
天冬氨酸氨基转移酶, 胞质	果糖二磷酸醛缩酶 A	色素上皮衍生因子
天冬氨酸氨基转移酶, 线粒体	果糖二磷酸醛缩酶 C	纤溶酶原激活物抑制物 1
Band 3 阴离子转运蛋白	半乳凝素-1	血小板衍生生长因子 D
基底膜特异性硫酸乙酰肝素蛋白聚糖核心蛋白	半乳凝素-3 结合蛋白	网蛋白-1
β -1,4-半乳糖基转移酶 5	γ -谷氨酰水解酶	多肽 N-乙酰氨基半乳糖基转移酶 10
双糖链蛋白聚糖	凝溶胶蛋白	多肽 N-乙酰氨基半乳糖基转移酶 2
生物素酰胺酶	神经胶质衍生连接蛋白	前胶原 C-内肽酶增强子 1
钙黏着蛋白-11	葡萄糖-6-磷酸异构酶	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 1
钙黏着蛋白-2	谷胱甘肽 S-转移酶 P	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 2
钙同线蛋白-1	谷胱甘肽转移酶 ω -1	前胶原-赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 3
网腔钙结合蛋白	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	抑制蛋白-1
软骨寡聚基质蛋白	甘氨酸-tRNA 合成酶	脯氨酸 3-羟化酶 1
组织蛋白酶 B	G 蛋白偶联受体 143	蛋白质二硫键异构酶 A6

表 4(续)

组织蛋白酶 D	热激 70 kDa 蛋白 6	蛋白质 ZNF750
组织蛋白酶 Z	热激蛋白 β -1	推定的异源核内核糖核蛋白 A1 样蛋白 3
CD109 抗原	乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白 1	推定的核苷二磷酸激酶
CD166 抗原	Ig γ -1 链 C 区	丙酮酸激酶同工酶 M1/M2
CD44 抗原	含免疫球蛋白超家族的富含亮氨酸的重复序列蛋白	Rab GDP 解离抑制剂 α
胞内氯离子通道蛋白 1	抑制素 β A 链	Rab GDP 解离抑制剂 β
胶原 α -1(I) 链	胰岛素样生长因子结合蛋白 4	Ras GTP 酶激活样蛋白 IQGAP1
胶原 α -1(III) 链	胰岛素样生长因子结合蛋白 6	网钙结合蛋白-1
胶原 α -1(IV) 链	胰岛素样生长因子结合蛋白 7	脑衰蛋白-7A
胶原 α -1(V) 链	整联蛋白 β 样蛋白 1	丝氨酸蛋白酶 HTRA1
胶原 α -1(VI) 链	间质胶原酶	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B6
胶原 α -1(VII) 链	核纤层蛋白-A/C	丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 B7
胶原 α -1(XI) 链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白 2	司腺钙蛋白-2
胶原 α -1(XII) 链	潜伏转化生长因子 β 结合蛋白, 同种型 1S	溶基质蛋白酶-1
胶原 α -2(I) 链	豆球蛋白 (legumain)	巯基氧化酶 1
胶原 α -2(IV) 链	含有富含亮氨酸的重复序列的蛋白 15	睾丸蛋白聚糖-1
胶原 α -2(V) 链	L-乳酸脱氢酶 A 链	含硫氧还蛋白结构域的蛋白 5
胶原 α -2(VI) 链	腔蛋白聚糖	血小板反应蛋白-1
胶原 α -3(VI) 链	赖氨酰氧化酶同源物 2	血小板反应蛋白-2
补体 C1r 亚成分	巨噬细胞甘露糖受体 2	转醛醇酶
C 型凝集素结构域家族 11 成员 A	巨噬细胞迁移抑制因子	转化生长因子- β -诱导蛋白 ig-h3

表 4(续)

细胞周期蛋白-A2	苹果酸脱氢酶, 胞质	转凝蛋白
半胱氨酸蛋白酶抑制剂-C	苹果酸脱氢酶, 线粒体	转酮醇酶
核心蛋白聚糖	基质重塑相关蛋白 5	色氨酸-tRNA 合成酶, 胞质
Dickkopf 相关蛋白 3	金属蛋白酶抑制剂 1	酪氨酸蛋白激酶受体 UFO
二氢硫辛酸脱氢酶, 线粒体	微原纤维相关蛋白 2	泛素羧基端水解酶同工酶 L1
二肽基肽酶 3	微原纤维相关蛋白 5	泛素样修饰因子激活酶 1
DnaJ 同源物亚家族 A 成员 4	膜突蛋白	Vasorin
营养不良蛋白聚糖	膜突蛋白/埃兹蛋白/根蛋白同源物 1	波形蛋白
含有 EGF 的纤蛋白样胞外基质蛋白 2	神经毡蛋白-1	黏着斑蛋白
延伸因子 1-γ	巢蛋白-1	玻连蛋白
内质网蛋白 ERp29	核受体辅激活蛋白 5	含 WD 重复序列的蛋白质 1
内皮噁酸蛋白	核结合蛋白-1	

出人意料的是,在得自细胞系 AVDP2 的条件基础细胞培养基中鉴定出共 177 种不同的人蛋白质,在得自细胞系 AVDF4 的条件基础培养基中为 131 种不同的人蛋白质,在得自细胞系 AVDS4 的条件基础培养基中为 167 种不同的人蛋白质。考虑到用于产生条件基础细胞培养基的相对短的培育时间和基础细胞培养基,这个结果尤其是意料不到的。因此,本文描述的细胞可用作这些蛋白质的任一种或全部、或者由其分泌或表达的任何蛋白质或其它分子的来源。本领域技术人员应意识到,分析表明本领域充分确立的蛋白质的存在对伤口愈合很重要,并且应意识到鉴定出新的蛋白质。对本领域技术人员而言将是显而易见的是,如何使用 3 个细胞系之间的差异产生条件基础细胞培养基的不同实际实施方案或者如何将条件基础细胞培养基进一步加工以浓缩或减少一种或多种因子或成分,例如使用超滤、渗滤或色谱纯化。

[0053] 实施例 3

将生长在静态培养条件的 225cm² 细胞培养瓶 (Nunc) 的真皮成纤维细胞 AVDF3 剥离,采用本领域充分描述的方法测定细胞数。使用 2.3×10^6 个细胞以接种到 1.5L 细胞培养转瓶中,转瓶中装有补充了 2mM 谷氨酰胺 (Sigma) 的总体积为 330ml 的无血清生长培养基中的 1.5g/L CultiSpher S 微载体 (按生产商所述制备)。转瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体平衡。将转瓶转移到 37°C 细胞培养箱中,使用磁性搅拌器座 (magnetic stirrer base) 在 35rpm 下搅拌。在所述条件下培育 4 天后,从转瓶中取出 35ml 细胞培养上清液,并更换为新鲜无血清生长培养基 (如上所述)。培育第 5 天和第 7 天,取出 50ml 培养上清液并更

换为上述新鲜无血清培养基。在第 8 天,取出 80ml 培养上清液并更换为新鲜无血清培养基。在培养共 10 天后,采用本领域充分确立的方法,使 AVDF3 细胞从微载体上脱离。使用 1.35×10^7 个细胞接种至玻璃细胞培养生物反应器 (Applikon) 中补充了 2mM 谷氨酰胺、0.2% Pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体 (按前述方法制备) 的总体积为 2L 的无血清生长培养基中。生物反应器在 36.5℃ 温度、pH 7.0 (通过二氧化碳气体鼓泡和 / 或加入氢氧化钠手工控制)、溶解氧压力 5.0% (空气饱和) 和搅拌器速度 40rpm (在培养进程中逐渐增加到 60rpm) 下培养。使用 CO₂ 和 N₂ 气体鼓泡保持细胞培养中的溶解氧水平。在观察到起泡时,将 Emulsion C 消泡剂 (Sigma) 加到生物反应器中。在所述条件下培育 4 天后,从生物反应器中取出 200ml 培养上清液并更换为新鲜无血清生长培养基 (如上所述)。在第 6、8、10、11、13、15、17 和 21 天再取出 200ml 培养上清液并更换为新鲜无血清生长培养基 (如上所述)。生长 17 天后,无菌收获 200ml 培养物 (培养基和有细胞附着的微载体)。将收获的培养物等分至 4 个 50ml 样品锥形管中,在重力下,允许有细胞附着的微载体沉淀到样品管底。小心地取出无微载体的培养基,将沉淀的有细胞附着的微载体先用 PBS 洗涤 3 次,再用 MEM (无 FBS) 洗涤 3 次除去痕量的来自原始细胞培养物的耗尽的生长培养基。将有细胞附着的微载体合并入最终体积为 45ml 的 MEM (无 FBS) + 2mM 谷氨酰胺中。使用该悬液接种 3 x E125 摇瓶,约为 2×10^6 个细胞 / 瓶。瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体平衡后,转移至定轨摇床,在 37℃、60rpm 下达 24 小时。从各瓶中收获条件基础培养基,使用 0.2 μm 过滤器过滤,分析前保存在 -20℃ 下。

[0054] 实施例 4

将生长在静态培养条件下的 2 个 225cm² 细胞培养瓶 (Nunc) 的真皮成纤维细胞 AVDP3 剥离,并采用本领域充分描述的方法进行计数。使用 2.4×10^6 个细胞接种 1.5L 细胞培养转瓶,转瓶中装有补充了 4mM 谷氨酰胺的总体积为 300ml 的 MesenPro 生长培养基 (低血清, Invitrogen) 中的 1.5g/L CultiSpher S 微载体 (按前述方法制备)。转瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体平衡。将转瓶转移到 37℃ 细胞培养箱中,使用磁性搅拌器座在 35rpm 下搅拌。在所述条件下培育 3 天后,从转瓶中取出 80ml 细胞培养上清液并更换为新鲜生长培养基 (如上所述)。在所述条件下培育共 9 天后,从转瓶中取出 10ml 样品,采用本领域充分描述的标准方法测定细胞数和细胞存活率。利用细胞数和细胞存活率估算保留在转瓶中附着在微载体上的活细胞总数。如前所述使用 PBS 洗涤转瓶中有细胞附着的微载体,然后悬于 75ml MEM (无 FBS) 中,并用来接种一个 250ml 摇瓶,其中约 2.5×10^7 个细胞附着在微载体上。瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体平衡,并转移到定轨摇床,在 37℃、60rpm 下达 24 小时。从瓶中收获条件基础细胞培养基,用 0.2 μm 过滤器过滤,分析前保存在 -20℃ 下。

[0055] 将生长在静态培养条件下的 2 个 225cm² 细胞培养瓶 (Nunc) 的真皮成纤维细胞 AVDS6 剥离,并采用本领域充分描述的方法进行计数。使用 2.4×10^6 个细胞接种 1.5L 细胞培养转瓶,转瓶装补充了 4mM 谷氨酰胺的总体积为 300ml 的 MesenPro 生长培养基 (Invitrogen) 中的 1.5g/L CultiSpher S 微载体 (按前述方法制备)。瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体平衡。将转瓶转移到 37℃ 细胞培养箱中,使用磁性搅拌器座在 35rpm 下搅拌。在所述条件下培育 3 天后,从转瓶中取出 80ml 细胞培养上清液并更换为新鲜生长培养基 (如上所述)。在所述条件下培育共 9 天后,从转瓶中取出 10ml 样品,采用本领域充分描述的标准方法测定细胞数和细胞存活率。利用细胞数和细胞存活率估算保留在转瓶中的

活细胞总数。如前所述使用 PBS 洗涤有细胞附着的微载体,然后合并在 54ml MEM (无 FBS) 的最终体积中,并用来接种一个 250ml 摇瓶,其中约 1.8×10^7 个细胞附着在微载体上。瓶的顶部空间用 5% CO_2 、2% O_2 气体平衡,转移到定轨摇床,在 37℃、60rpm 下达 24 小时。从瓶中收获条件基础培养基,用 0.2 μm 过滤器过滤,分析前保存在 -20℃ 下。

[0056] 实施例 5

应用 SearchLight Array Technology (Aushon Biosystems Inc.) 对得自 AVDF4、AVDS4 和 AVDP2 (按实施例 1 和 2 所述制备)、AVDF3 (按实施例 3 所述制备) 和 AVDS6 和 AVDP3 (按实施例 4 所述制备) 的条件培养基进行了分析。包括作为对照的 MEM 和 MEM + 10% FBS 生长培养基。Aushon SearchLight Protein Array Technology 是以分析物的化学发光或荧光检测为基础的多路夹心 ELISA 系统,所述分析物相应的俘获抗体被点样在 96 孔微量培养板各孔内的阵列中。每孔可测量至多 16 种分析物 (各孔中 4 x 4 阵列),因此用各样品 (50 μl) 可同时测定 16 种细胞因子或其它生物标记。对样品的 TGF β -1、IL-6、IL-8 和 PAI-1 水平进行了测定。在条件培养基 / 条件基础培养基样品中鉴定的各种蛋白质的浓度见图 4、5、6 和 7。指定样品为 1-10 号,这些样品的性质见表 5。

[0057] 表 5:样品性质

样品编号	细胞系名称	条件培养基产生方法
1	MEM 对照	-
2	AVDF3	实施例 3
3	AVDS6	实施例 4
4	AVDP3	实施例 4
5	AVDS4	实施例 1
6	AVDF4	实施例 1
7	AVDP2	实施例 2
8	AVDS4	实施例 2
9	AVDF4	实施例 2
10	MEM + 10% FBS 对照	-

图 4-7 中所示数据举例说明了可在得自 3 种新的细胞类型 AVDS、AVDP 和 AVDF 的条件培养基中,检出并定量测定参与伤口愈合的关键蛋白 (TGF β -1、IL-6、IL-8 和 PAI-1)。可通过调节所用细胞浓度和 / 或生长培养基组成和 / 或细胞培养系统来改变条件细胞培养基或条件基础细胞培养基中蛋白质的水平。对本领域技术人员还将是显而易见的是,如何进行进一步的细胞培养生长条件、所用细胞系的开发以增加附着在微载体上的细胞数,以及当产生条件基础细胞培养基时,这将如何影响蛋白质的分泌。对本领域技术人员而言将是显而易见的是,使用附着在微载体上的细胞,采用 2L 搅拌釜细胞培养生物反应器所产生的数据表明了作为用于本发明实际实施方案的大量生产的可规模化的经济型制造系统的条件基础培养基的产生。对本领域技术人员而言将是显而易见的是,在扩繁细胞的基于微载体的生物反应器过程完成时,可使微载体沉淀,收获条件培养基和 / 或原位洗涤附着在微载体上的细胞,并用基础细胞培养基培育。可通过微载体 (重力沉降) 的原位沉降以及无细胞条件基础细胞培养基的倾析,而容易地收获条件基础培养基。

[0058] 实施例 6

对得自 AVDF4、AVDS4 和 AVDP2（按实施例 1 和 2 所述制备）、AVDF3（按实施例 3 所述制备）和 AVDS6 和 AVDP3（按实施例 4 所述制备）的条件培养基通过本领域充分确立的蛋白质印迹法进行了分析。简单地说，样品经浓缩，使用 MES 运行缓冲液，与 SeeBlue 分子量标志物（Invitrogen）一起在 4-12% BisTris 凝胶（Invitrogen）上运行。然后将样品转移到 PVDF 膜上。转印后，将膜在 15ml 封闭缓冲液（PBS + 1% BSA）中在摇摆平台上于室温下培育 1 小时。倾析封闭缓冲液，将膜在 8ml 1/2000 稀释的小鼠单克隆抗 SPARC 抗体（Sigma WH0006678M2）中于 4℃ 培育过夜。然后将膜在 15ml PBS + 0.05% 吐温 20（Tween 20）中，在摇摆平台上于室温下洗涤 3 次各 5 分钟。加入 8ml 1/10,000 稀释的兔抗小鼠 IgG（完整分子）- 过氧化物酶（Sigma A9044），在摇摆平台上于室温下培育 1 小时。然后将膜在 15ml PBS + 0.05% 吐温 20 中，在摇摆平台上于室温下洗涤 3 次各 5 分钟。通过将膜在溶于 15ml 水的 SIGMAFAST™ 3,3' - 二氨基联苯胺片（Sigma D4418）中，在摇摆平台上于室温下培育 15 分钟而显色。蛋白质印迹的结果见图 8。

[0059] 使用细胞培养瓶、转瓶和生物反应器扩繁的所有 3 个细胞系 AVDS、AVDP 和 AVDF 的条件培养基表明 SPARC 蛋白的分泌和蓄积。

[0060] 实施例 7

通过点印迹法（本领域充分确立的方法），对得自 AVDF4、AVDS4 和 AVDP2（按实施例 1 和 2 所述制备）、AVDF3（按实施例 3 所述制备）和 AVDS6 和 AVDP3（按实施例 4 所述制备）的条件培养基中的纤连蛋白和胶原蛋白的分泌和蓄积进行了分析。将 PVDF 膜用甲醇湿润，然后浸入 PBS 中，将 10 μl 的各个样品和对照点在膜上。也将 50ng 和 5ng 标准品（纤连蛋白 - Sigma F1141 或胶原 - Sigma C8919）点在膜上，使所有点风干 1 小时。然后再次将膜在甲醇中湿润，在 PBS 中漂洗，然后在 8ml 封闭缓冲液（PBS + 1% BSA）中于 4℃ 培育过夜。倾析封闭缓冲液，将膜在 4ml 1/200 稀释的小鼠单克隆抗纤连蛋白抗体（Sigma F7387）或小鼠单克隆抗胶原抗体（Sigma C2456）中在摇摆平台上于室温下培育 2 小时。然后将膜在 8ml PBS + 0.05% 吐温 20 中在摇摆平台上于室温下洗涤 3 次各 5 分钟。加入 4ml 1/2000 稀释的兔抗小鼠 IgG（完整分子）- 过氧化物酶（Sigma A9044），在摇摆平台上于室温下培育 1 小时。然后将膜在 8ml PBS + 0.05% 吐温 20 中在摇摆平台上于室温下洗涤 3 次各 5 分钟。通过将膜在溶于 15ml 水的 SIGMAFAST™ 3,3' - 二氨基联苯胺片（Sigma D4418）中在摇摆平台上于室温下培育 15 分钟而显色。点印迹法的结果见表 6。

[0061] 得自使用细胞培养瓶、转瓶和生物反应器扩繁的所有 3 个细胞系 AVDS、AVDP 和 AVDF 的条件培养基表明胶原蛋白的分泌和蓄积。

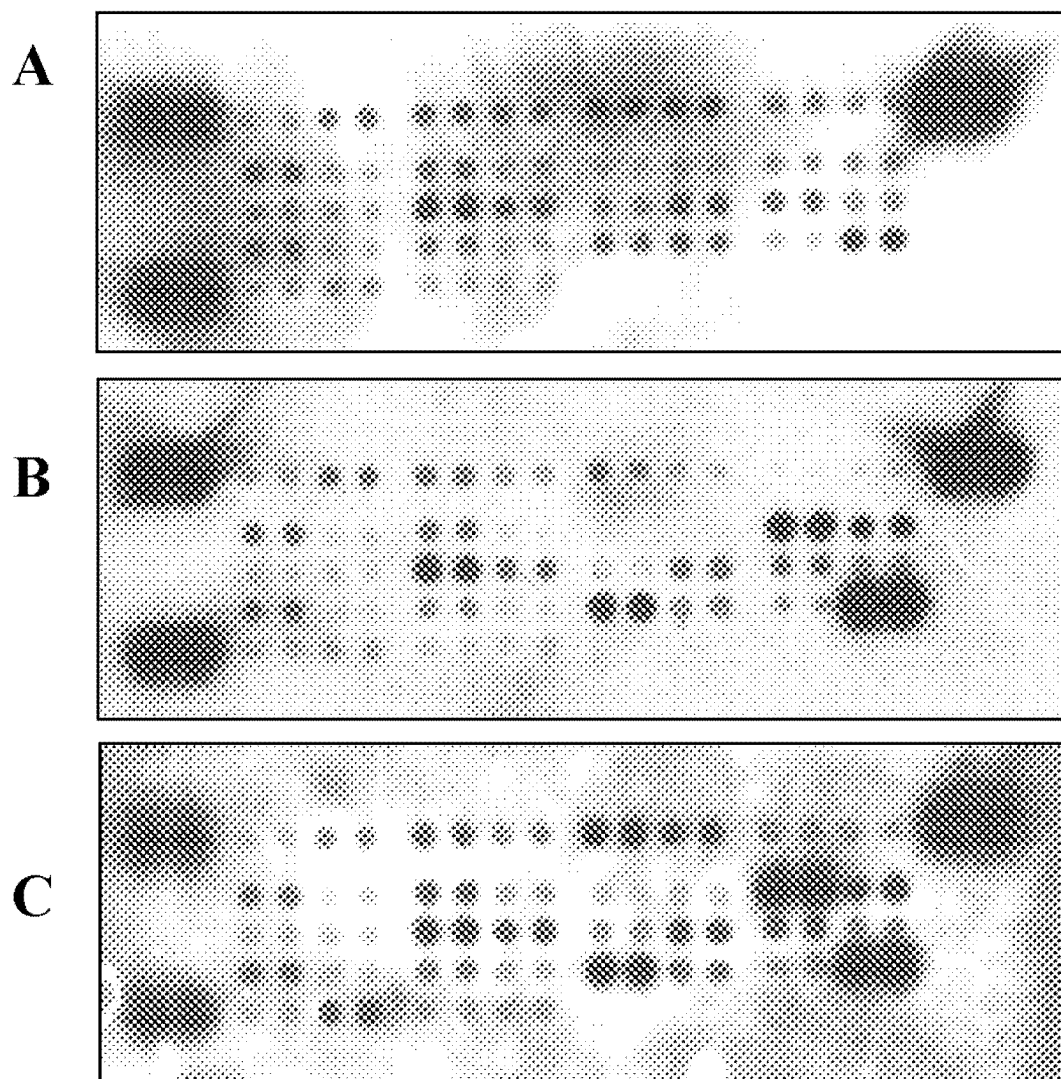
[0062] 表 6：细胞生长条件细胞培养基和条件基础细胞培养基的胶原和纤连蛋白存在情况的分析

样品	条件培养基 制备	相对于 50ng 标准品的点强度 (+++)	
		胶原	纤连蛋白
50ng 标准品	-	+++	+++
MEM 对照	-	ND	ND
AVDS4	实施例 1	+	+++
AVDF4	实施例 1	+	++++
AVDP2	实施例 1	++	++++
AVDS4	实施例 2	(1)	++
AVDF4	实施例 2	+	++++
AVDF3	实施例 3	++++	++++
AVDS6	实施例 4	++	+++
AVDP3	实施例 4	+++	+++
MEM + 10% FBS		ND	+

ND= 未检出

(1) = 被样品中的 FBS 掩蔽的点。LC-MS-MS 分析（实施例 2）表明胶原的分泌和蓄积。

使用“Array Panel A”膜对条件培养基的分析



A - MEM + 10% FBS 对照

B - 条件培养基 - AVDS4

C - 条件培养基 - AVDF4。

图 1

在条件培养基中鉴定的细胞因子的相对水平

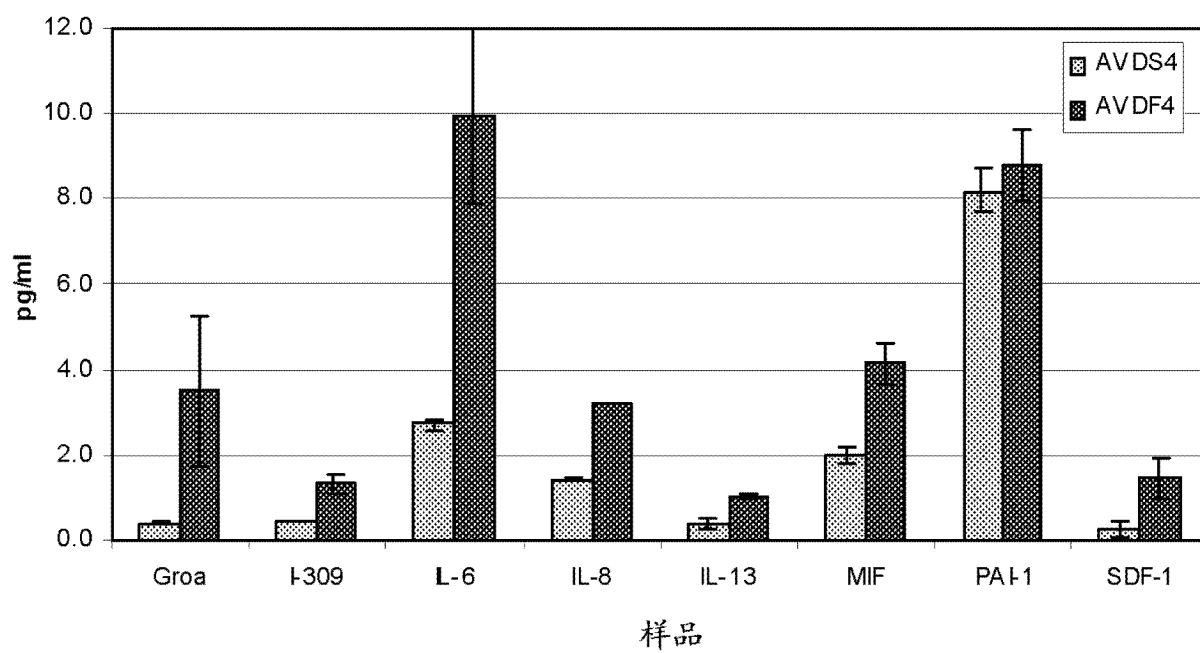
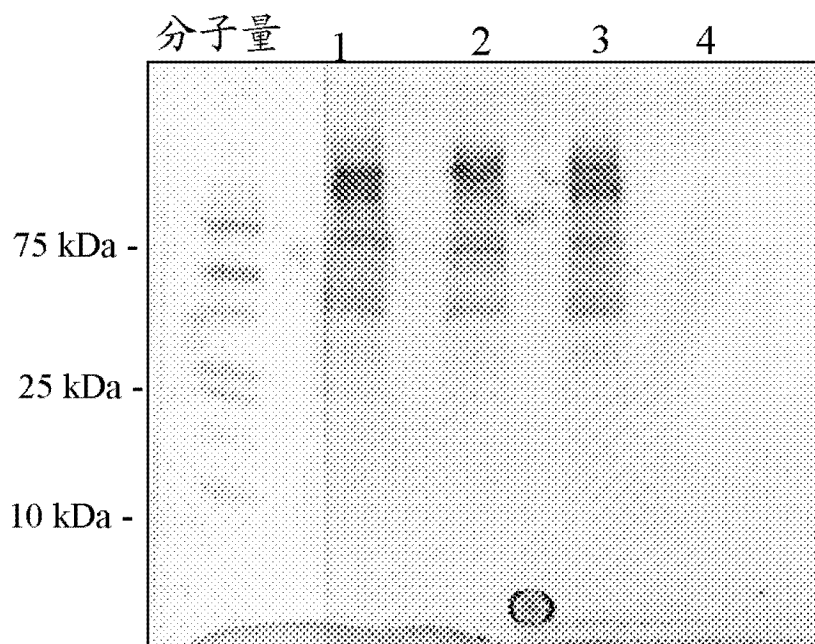


图 2

浓缩条件培养基的 EZBlue 染色的 SDS-PAGE 分析



1 - AVDP2 培养基

2 - AVDF4 培养基

3 - AVDS4 培养基

4 - MEM 阴性对照

图 3

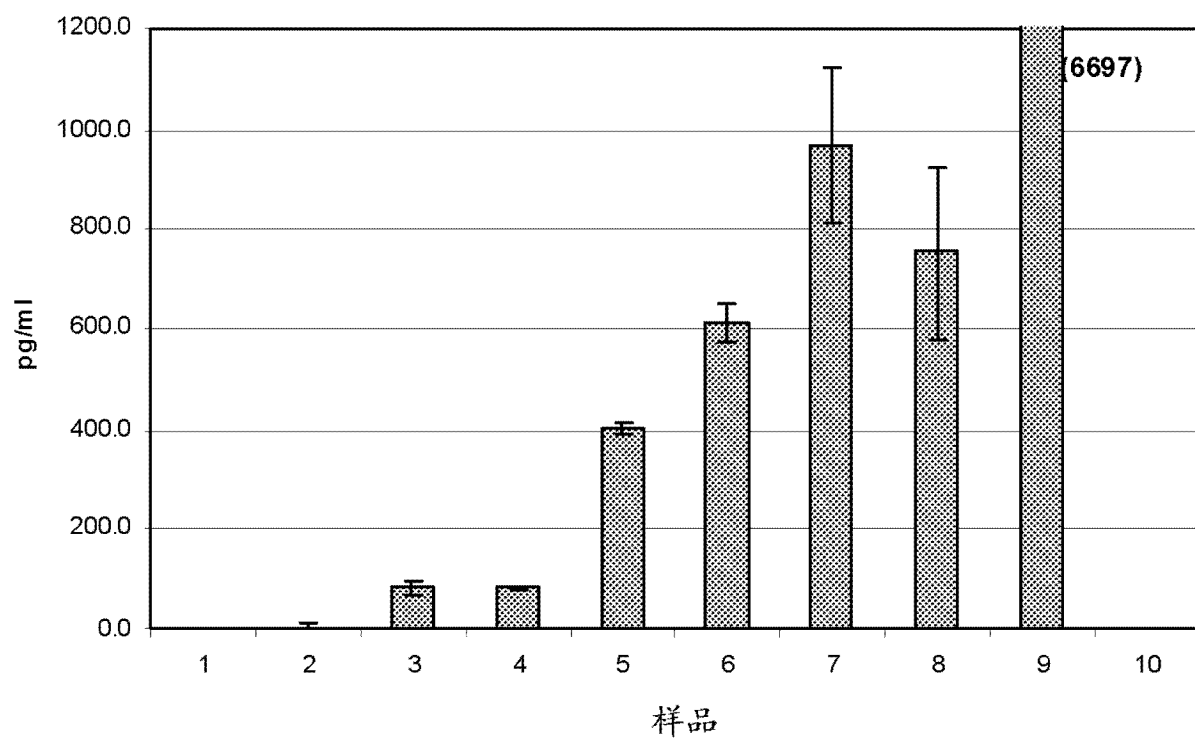
条件培养基样品中人 TGF- β 1 的水平

图 4

条件培养基样品中人 IL-6 的水平

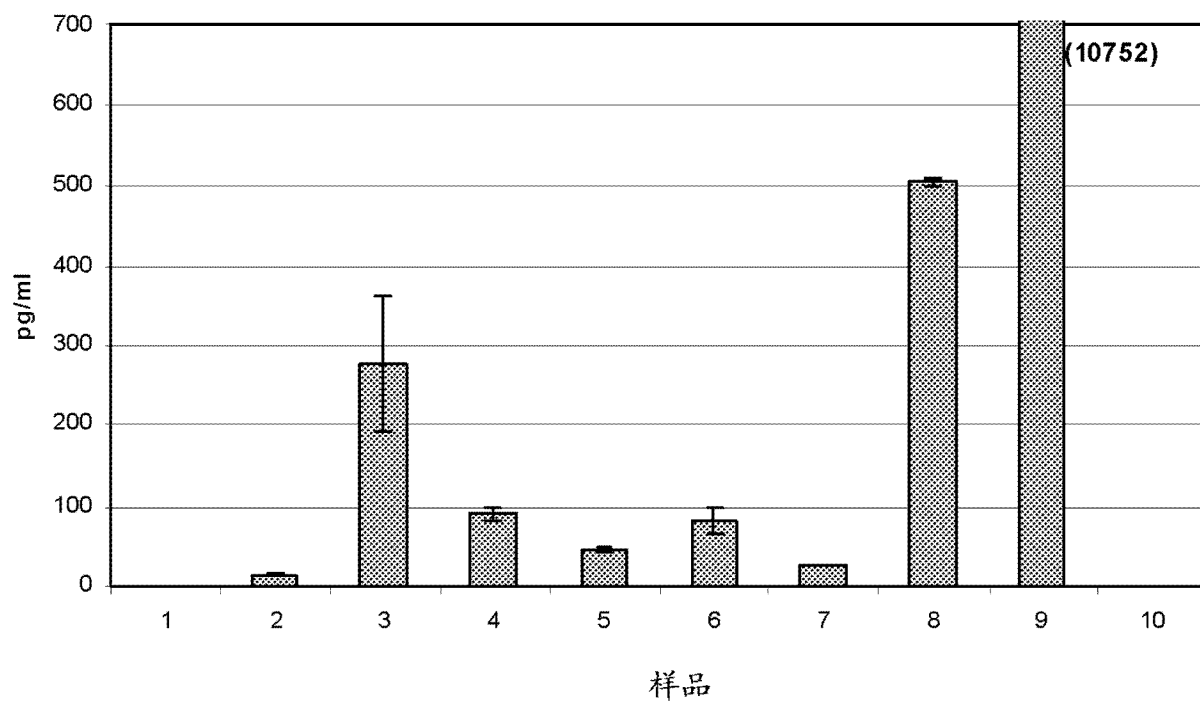


图 5

条件培养基样品中人 IL-8 的水平

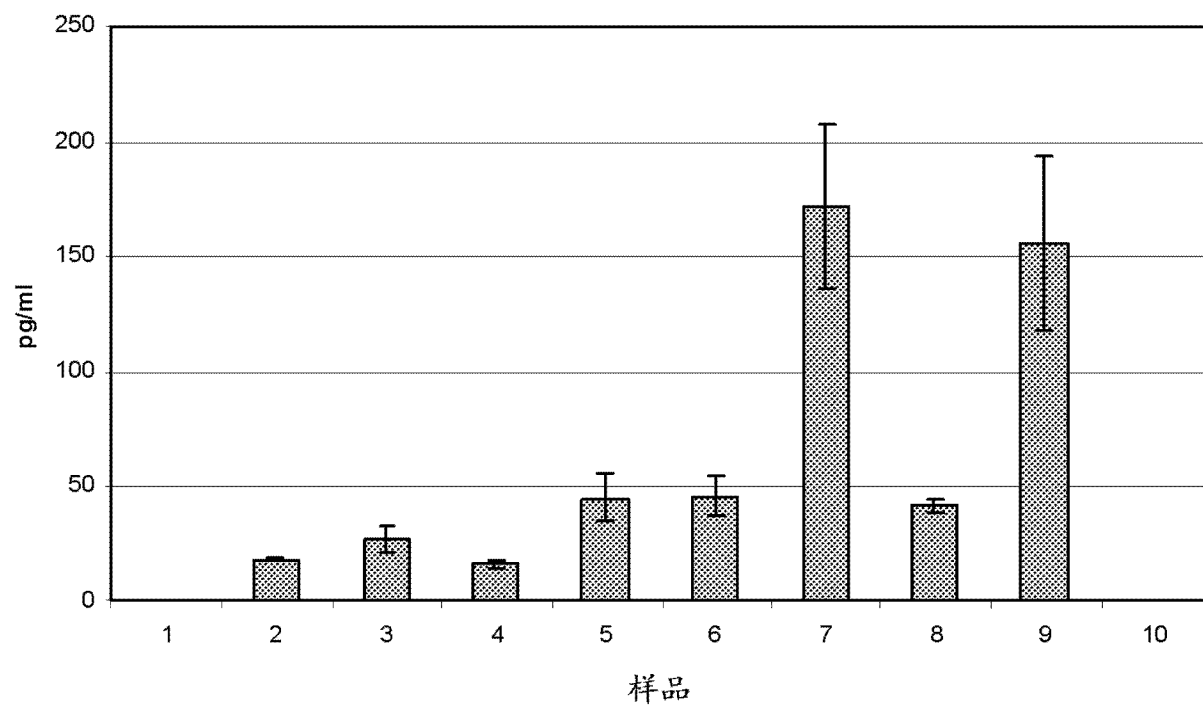


图 6

条件培养基样品中人 PAI-1 的水平

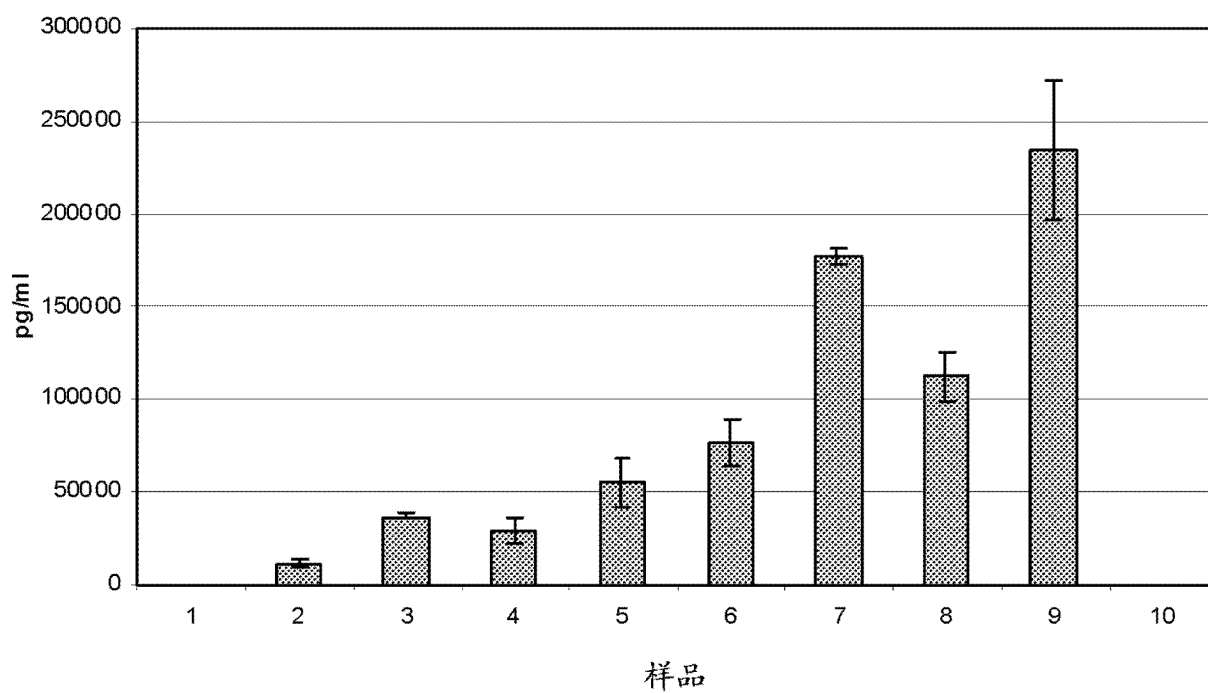
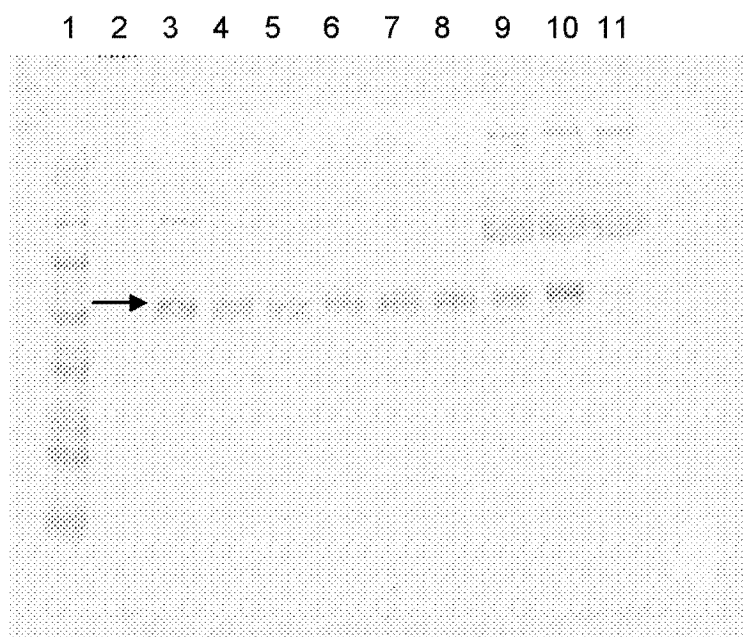


图 7

与小鼠抗 SPARC 抗体一起培育的条件培养基样品的蛋白质印迹。



泳道	样品	条件培养基制备
1	SeeBlue 分子量标志物	
2	MEM 对照	
3	AVDF3	实施例 3
4	AVDS6	实施例 4
5	AVDP3	实施例 4
6	AVDS4	实施例 1
7	AVDF4	实施例 1
8	AVDP2	实施例 2
9	AVDS4	实施例 2
10	AVDF4	实施例 2
11	MEM + 10% FBS	

图 8