



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111492242 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 12

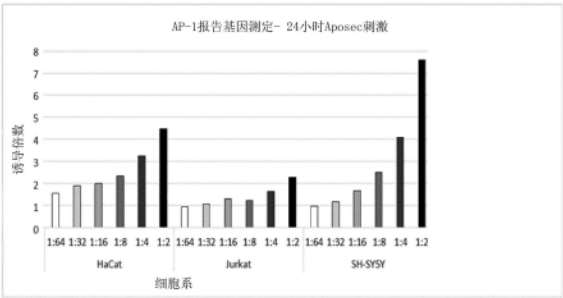
(21) 申请号 201880081300.3	(72) 发明人 亨德里克·简·安克斯密特 迈克尔·米尔德纳
(22) 申请日 2018.12.19	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111492242 A	(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事 务所(普通合伙) 11201 专利代理师 宋融冰
(43) 申请公布日 2020.08.04	
(30) 优先权数据 17209165.4 2017.12.20 EP	(51) Int.Cl. G01N 33/50 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.06.16	(56) 对比文件 CN 101189348 A,2008.05.28 CN 101160055 A,2008.04.09 US 2016256444 A1,2016.09.08 US 2015352092 A1,2015.12.10 EP 2044935 A1,2009.04.08
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2018/085955 2018.12.19	审查员 门婧睿
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/121989 EN 2019.06.27	
(73) 专利权人 艾普赛恩斯股份公司 地址 奥地利维也纳	权利要求书2页 说明书15页 附图26页

(54) 发明名称

分泌组的效力测定

(57) 摘要

本发明涉及用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法。



1. 一种用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法, 包括以下步骤:

a) 分别在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中和在缺少所述上清液的培养基中孵育SH-SY5Y细胞; 和

b) 测量激活蛋白1 (AP-1) 启动子的启动子活性,

其中基于在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在所述缺少所述上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高至少50%, 则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力,

其中所述哺乳动物细胞是外周血单核细胞, 并且

其中所述炎症病症是与缺血相关的病症。

2. 一种用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法, 包括以下步骤:

a) 在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育SH-SY5Y细胞;

b) 测量激活蛋白1 (AP-1) 启动子的启动子活性,

其中基于在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在包含能够用于治疗炎症病症的参考上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高或低多至10%, 则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力,

其中所述哺乳动物细胞是外周血单核细胞, 并且

其中所述炎症病症是与缺血相关的病症。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述炎症病症是皮肤病症或内部炎症病症。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少2小时。

5. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少4小时。

6. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少6小时。

7. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少12小时。

8. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少18小时。

9. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中将步骤a) 的所述SH-SY5Y细胞在所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育至少24小时。

10. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含至少20%的所述上清液。

11. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含至少50%的所述上清液。

12. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的

培养基包含至少70%的所述上清液。

13. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含至少80%的所述上清液。

14. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含至少90%的所述上清液。

15. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含至少95%的所述上清液。

16. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤a)的所述培养基是杜贝卡氏改良型伊格氏培养基(DMEM)、Ham F12培养基(F12)、最小必需培养基或者这些培养基中的一种或多种的组合。

17. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤a)的所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含2%至20%的胎牛血清(FBS)和/或L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

18. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤a)的所述包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基包含5%至15%的胎牛血清(FBS)和/或L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

19. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述SH-SY5Y细胞包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的所述激活蛋白1(AP-1)启动子。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述报告蛋白选自由以下组成的组:萤光素酶和荧光蛋白。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述萤光素酶选自萤火虫萤光素酶。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述荧光蛋白选自绿色荧光蛋白。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在所述缺少所述上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高至少80%。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在所述缺少所述上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高至少100%。

25. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在所述缺少所述上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高至少150%。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性比当在所述缺少所述上清液的培养基中培养所述SH-SY5Y细胞时测量的启动子活性高至少200%。

分泌组的效力测定

技术领域

[0001] 本发明涉及用于测定组合物用于治疗炎症病症的能力的效力测定。

背景技术

[0002] 许多司法管辖区的法规要求包含多种活性化合物的药物制剂(其确切组成可能甚至不完全知晓)在上市之前要对其效力进行评估。通常,生产的每个批次的效力必须使用各自的效力测定进行评估。

[0003] 效力测定可用于显示特定产品具有与治疗疾病或病症相关的生物学活性。不要求效力测定反映产品的所有生物学功能,但是其应指示一种或多种相关的生物学功能。迫切需要确定对治疗产品的功效至关重要的那些参数并控制它们(例如通过效力测试),从而可以制造出质量一致的产品。效力测定的主要优点是以下事实,通过鉴定和/或定量复杂药物制剂中的少量“报告”蛋白或酶活性(例如2、3、4或5种,理想地仅1种),可以确定所述制剂的治疗适用性。

[0004] 已知细胞,特别是哺乳动物细胞在培养期间会将多种物质分泌到细胞培养基中。如此获得的条件培养基可用于治疗和/或预防疾病和病症。例如,WO 2010/070105和WO 2010/079086公开了通过培养外周血单核细胞(PBMC)获得的并且可用于治疗多种炎症病症的条件培养基(“上清液”)。

发明内容

[0005] 通过培养在培养前或培养期间经受胁迫诱导条件的PBMC可获得的无细胞或含细胞的条件培养基被证明在治疗各种与炎症相关的疾病方面是有效的(参见WO 2010/070105和WO 2010/079086)。由于这样的条件培养基包含由PBMC分泌或释放的可能影响条件培养基的生物学活性的多种物质,重要的是进行指示所述培养基是否具有期望活性的测定。

[0006] 因此,本发明的一个目的是提供一种测定,其能够确定通过培养PBMC可获得的条件培养基是否具有用于治疗与炎症相关的疾病和病症的活性。这样的测定可用于证明制药用途可接受的条件培养基的不同生产批次之间的一致效力。

[0007] 发明人发现了通过监测特定蛋白质的表达和/或某些启动子的调节来测量条件培养基的生物学活性和治疗功效的效力测定。令人惊奇地发现,对于通过培养PBMC可获得的并且具有治疗与炎症相关的疾病和病症的能力的条件培养基,在所述条件培养基中孵育真核细胞时,其能够在这些细胞中诱导磷酸化热激蛋白27 (HSP27)的表达。此外,条件培养基在真核细胞中激活选自以下组成的组的至少一种启动子:激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子。因此,磷酸化HSP27的表达增加以及AP-1、NF-KB、Sox2、STAT3、EGR-1和/或SRE启动子的激活表明,通过培养PBMC可获得的条件培养基可用于治疗与炎症相关的疾病和病症。

[0008] 因此,本发明涉及用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法,该方法包括以下步骤:

[0009] a) 在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育真核细胞,

[0010] b) 测量选自由以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性:激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子,和/或测量由所述真核细胞释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量,

[0011] 其中如果至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养所述真核细胞时测量的启动子活性高至少50%,和/或如果释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比当在缺少所述上清液的培养基中培养所述真核细胞时释放到培养基中的磷酸化HSP27的量高至少20%,则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0012] 用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法,该方法包括以下步骤:

[0013] a) 在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育真核细胞,

[0014] b) 测量选自由以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性:激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子,和/或测量由真核细胞释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量,

[0015] 其中如果至少一种启动子的启动子活性比当在包含可用于治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高或低多至25%,和/或如果释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比释放到包含可用于治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞上清液的步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量高或低多至25%,则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的上清液是外周血单核细胞 (PBMC) 培养物的上清液。

[0017] 在本发明的另一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物包含T细胞、B细胞和/或NK细胞。

[0018] 在本发明的另一个实施方案中,将哺乳动物细胞培养物中的哺乳动物细胞培养在细胞培养基中,所述细胞培养基选自由以下组成的组:细胞生长培养基,优选CellGro培养基 (CellGenix, Freiburg, Germany),更优选Cellgro GMP DC培养基 (也称为“CellGenix GMP DC培养基”; CellGenix, Freiburg, Germany), RPMI、DMEM、X-vivo和Ultraculture。

[0019] 在本发明的一个实施方案中,在培养之前或培养期间,使哺乳动物细胞经受一种或多种胁迫诱导条件。

[0020] 在本发明的另一个实施方案中,胁迫诱导条件选自由以下组成的组:辐射,特别是电离辐射或紫外线辐射,缺氧、臭氧、热、渗透压和pH变化。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,使哺乳动物细胞以至少10Gy、优选至少20Gy、更优选

至少40Gy的剂量经受电离辐射。

[0022] 在本发明的另一个实施方案中,在分离其上清液之前,将哺乳动物细胞培养至少4小时,优选至少6小时,更优选至少12小时。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,炎性病症是与缺血相关的病症,优选皮肤病症或内部炎性病症。

[0024] 在本发明的另一个实施方案中,皮肤病症选自由以下组成的组:伤口、组织缺血、慢性伤口、糖尿病伤口、皮肤溃疡、皮肤烧伤、整形手术中的皮瓣和牙齿移植后的组织再生。

[0025] 在本发明的一个实施方案中,内部炎性病症选自由以下组成的组:心肌缺血、肢体缺血、组织缺血、缺血再灌注损伤、心绞痛、冠状动脉疾病、外周血管疾病、外周动脉疾病、中风、缺血性中风、心肌梗死、充血性心力衰竭、创伤、肠病、肠系膜梗死、肺梗死、骨折、牙齿移植后的组织再生、自身免疫疾病、风湿性疾病、同种异体移植和同种异体移植排斥。

[0026] 在本发明的另一个实施方案中,步骤a)的所述真核细胞选自由以下组成的组:腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,非整倍体永生角质形成细胞(HaCaT),人胚胎肾细胞(HEK细胞),优选HEK293细胞,和神经母细胞瘤细胞,优选SH-SY5Y细胞。

[0027] 在本发明的另一个实施方案中,将步骤a)的所述真核细胞在细胞培养基中孵育至少2小时,优选至少4小时,更优选至少6小时,更优选至少12小时,更优选至少18小时,更优选至少24小时。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,培养基包含至少20%、优选至少50%、更优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%的所述上清液。

[0029] 在本发明的另一个实施方案中,步骤a)的所述培养基是杜贝卡氏改良型伊格氏培养基(DMEM)、Ham F12培养基(F12)、最小必需培养基或者这些培养基中的一种或多种的组合。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,步骤a)的所述培养基包含2%至20%、优选5%至15%的胎牛血清(FBS)和/或L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0031] 在本发明的另一个实施方案中,真核细胞包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的启动子,所述启动子选自由以下组成的组:AP-1启动子、NF-KB启动子、Sox2启动子、STAT3启动子、EGR-1启动子和SRE启动子。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,报告蛋白选自由以下组成的组:萤光素酶,优选萤火虫萤光素酶,和荧光蛋白,优选绿色荧光蛋白。

[0033] 在本发明的另一个实施方案中,通过免疫学方法,优选地通过酶联免疫吸附测定(ELISA),通过光度测定法或通过荧光方法确定由细胞释放到培养基中的蛋白质的量。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,HaCaT或HEK细胞,优选HEK293细胞,并且确定磷酸化HSP27的量。

[0035] 在本发明的另一个实施方案中,至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高至少80%,优选至少100%,更优选至少150%,更优选至少200%。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,当测量释放到培养基中的磷酸化HSP27的量时,步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,HaCaT或HEK细胞,优选HEK293细胞。

[0037] 在本发明的另一个实施方案中,步骤a)的所述真核细胞是神经母细胞瘤细胞,优选SH-SY5Y细胞,或HaCaT细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的AP-1启动子。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的NF-KB或Sox2启动子。

[0039] 在本发明的另一个实施方案中,步骤a)的所述真核细胞是HEK细胞,优选HEK293细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的EGR-1、SRE、AP-1或STAT3启动子。

附图说明

[0040] 图1显示了增殖测定的结果(实施例1)。图指示了过夜增殖后的细胞数(CellTiter-Glo信号)。A:HUVEC细胞;B:NHDF细胞;C:A549细胞。

[0041] 图2显示了细胞Hsp27 ELISA测定1的结果(参见实施例3)

[0042] 图3显示了细胞Hsp27 ELISA测定2的结果(参见实施例3)。

[0043] 图4显示了细胞Hsp27 ELISA测定3的结果(参见实施例3)。

[0044] 图5显示了使用如实施例3中所述的磷酸化HSP27测定,相对于100%CellGro培养基,多种浓度的Aposec的相对效力。

[0045] 图6显示了在5和24小时后,用Aposec刺激的真核细胞中的AP-1报告信号。

[0046] 图7显示了AP-1RGA测定的时间和剂量依赖性。

[0047] 图8显示了使用如实施例3中所述的磷酸化AP-1RGA测定,相对于100%CellGro培养基,多种浓度的Aposec的相对效力。

[0048] 图9显示了使用Aposec和CellGro培养基诱导NF-kB启动子的比较。

[0049] 图10显示了使用实施例5中所述的NF-kB RGA测定,相对于100%CellGro培养基,多种浓度的Aposec的相对效力。

[0050] 图11显示了总结实施例7的转染功效测试的结果的表。

[0051] 图12显示了实施例7.2的信号转导报告阵列的结果。

[0052] 图13显示了实施例7.3的信号转导报告阵列的结果。

具体实施方式

[0053] 本发明涉及用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法。

[0054] 如本文所用,“效力”定义为治疗或预防疾病、障碍或病症,特别是涉及炎症的那些疾病、障碍或病症所需的组合物(例如细胞培养物的上清液)的生物活性。

[0055] 如本文所用,“效力测定”是指用于确定组合物的效力的方法。效力测定直接或间接测量样品(即哺乳动物细胞培养物的上清液)中特定物质或特定物质组合物的存在或量。样品中特定物质或特定物质组合物的存在或量指示上清液是否可用于治疗炎症病症。因此,已知可有效治疗炎症病症的上清液可以用作参考。在这种情况下,测量选自自由以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性:激活蛋白1(AP-1)启动子、核因子激活的B细胞的 κ -

轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子, 和/或测量由真核细胞释放到包含另一批次上清液样品的步骤a) 的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量, 然后与由如上定义的参考上清液引起的作用进行比较。相对于参考上清液, $\pm 25\%$ (即高或低多至25%)、优选 $\pm 20\%$ 、更优选 $\pm 15\%$ 、更优选 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 的范围内的任何启动子活性或蛋白质量变化指示该批次上清液可用于治疗炎症病症。对于磷酸化HSP27的量也同样如此。

[0056] 因此, 本发明的另一方面涉及用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法, 该方法包括以下步骤:

[0057] a) 在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育真核细胞,

[0058] b) 测量选自以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性: 激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子, 和/或测量由真核细胞释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量,

[0059] 其中如果至少一种启动子的启动子活性比当在包含可用于治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高或低多至25%, 和/或如果释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比释放到包含可用于治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞上清液的步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量高或低多至25%, 则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0060] 如本文所用, “炎症病症”是指至少部分与炎症相关的障碍、疾病和病症。

[0061] 如上所述, 哺乳动物细胞培养物的上清液能够影响真核细胞中某些蛋白质的蛋白质表达。除此之外, 这些上清液还能够调节(激活或抑制) 真核细胞中存在的启动子的活性。两种作用都可以用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力。

[0062] 如本文所用, “启动子”是指通常位于编码功能性多肽或蛋白质的核酸分子上游的核酸片段。启动子在宿主细胞中起作用, 并调节在启动子下游发现的核酸片段的转录。启动子包含转录因子结合位点以及转录起始区。

[0063] 已表明, 当用哺乳动物细胞培养物的上清液孵育真核细胞时, 所述上清液增加真核细胞的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的表达速率。如果真核细胞是人细胞, 则人HSP27 (UniProt P04792) 可以在选自HSP27的氨基酸残基15、26、65、78、82、83、86、98、174、176和199的至少一个位置磷酸化, 其中优选的磷酸化氨基酸残基在HSP27的第15和82位。

[0064] 为了根据步骤b) 确定和/或定量培养基中的磷酸化HSP27, 可以采用多种方法。最优选的方法包括使用抗体或其抗原结合片段, 包括Fab片段或其它包含此类抗体的可变抗原结合区的片段。这些抗体和片段可用于免疫测定, 优选酶联免疫吸附测定 (ELISA), 以确定磷酸化HSP27。

[0065] 哺乳动物细胞培养物的上清液(即条件培养基) 对特定启动子的活性的影响可以使用多种方法来测试。一种方法涉及对由与相应启动子可操作连接的核酸编码的天然存在蛋白质的测量。这可以使用与所述蛋白质结合的抗体或其功能片段或通过确定转录并编码所述蛋白质的mRNA的量来完成。或者, 可以使用本领域已知的重组方法将受哺乳动物细胞

培养物的上清液影响的启动子可操作地连接至编码报告蛋白的核酸分子。这些报告蛋白也可以通过在免疫测定中使用抗体或其抗原结合片段来定量。或者,这样的报告蛋白可具有酶活性或荧光性质。如果报告蛋白具有酶活性,则可以使用测定法来确定转化的底物的量,以便得出启动子活性的结论。

[0066] 根据本发明,优选的启动子是激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子。

[0067] 已表明,如果释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时释放到培养基中的磷酸化HSP27的量高至少20%,和/或如果至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高至少50%,则哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0068] 如上所述,启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高至少50%,优选至少60%,更优选至少70%,更优选至少80%,更优选至少90%,更优选至少100%,更优选至少150%,更优选至少200%。“缺少所述上清液”是指在缺少条件培养基(即,哺乳动物细胞培养物的上清液)的培养基中孵育真核细胞。

[0069] 释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时释放到培养基中的磷酸化HSP27的量高至少20%,优选至少30%,更优选至少50%,更优选至少70%,更优选至少100%。

[0070] 在本发明的另一方面,使用已经被显示能够治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞培养物上清液。在这种情况下,至少一种启动子的启动子活性比当在包含所述参考上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高或低多至25%,和/或如果释放到步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比释放到包含所述参考上清液的步骤a) 的所述培养基中的磷酸化HSP27的量高或低多至25%。

[0071] 在本发明方法的第一步中,在包含哺乳动物细胞培养物上清液或由其组成的培养基中培养/孵育真核细胞。培养条件是通常用于在标准培养基中培养真核细胞的条件。通常,在35℃至39℃,优选36℃至38℃,特别是约37℃的温度下培养/孵育真核细胞。

[0072] 在本发明的一个优选实施方案中,哺乳动物细胞培养物的上清液是外周血单核细胞 (PBMC) 培养物的上清液。培养的PBMC的上清液可用于治疗炎症病症(参见例如WO 2010/070105和WO 2010/079086)。如本文定义的PBMC包含T细胞、B细胞或/或NK细胞或由其组成。

[0073] 根据本发明的一个特别优选的实施方案,在胁迫诱导条件下培养本发明的哺乳动物细胞。在本领域中已知哺乳动物细胞能够在培养期间在培养基中分泌物质。如果哺乳动物细胞在培养期间或培养前经受胁迫诱导条件,则该作用可能甚至进一步增强。特别地,已表明受胁迫的哺乳动物细胞分泌在治疗炎症病症中特别有益的物质。

[0074] 如本文所用,术语“在胁迫诱导条件下”是指导致受胁迫的细胞的培养条件。对细胞造成胁迫的条件包括热、化学物质、辐射、缺氧、渗透压等。

[0075] 胁迫诱导条件包括低氧、臭氧、热(例如,比哺乳动物细胞的最佳培养温度(即37℃)高多于2℃,优选地高多于5℃,更优选地高多于10℃)、辐射(例如UV辐射、电离辐射、 γ 辐射)、化学物质、渗透压(即,至少与体液、特别是血液中定期发生的渗透条件相比升高的

渗透条件)或其组合。

[0076] 如果使用辐射来胁迫本发明的哺乳动物细胞,则优选以至少10Gy,优选至少20Gy,更优选至少40Gy来辐射细胞,因此优选使用Cs-137铯源。

[0077] 根据本发明的一个优选实施方案,在分离其上清液之前,将哺乳动物细胞培养至少4小时,优选至少6小时,更优选至少12小时。

[0078] 根据本发明,步骤a)的所述真核细胞优选选自以下组成的组:腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,非整倍体永生角质形成细胞(HaCaT),人胚胎肾细胞(HEK细胞),优选HEK293细胞,和神经母细胞瘤细胞,优选SH-SY5Y细胞。已表明,这些真核细胞尤其可以用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力。

[0079] 将步骤a)的所述真核细胞在细胞培养基中孵育(即培养)至少2小时,优选至少4小时,更优选至少6小时,更优选至少12小时,更优选至少18小时,更优选至少24小时。至少2小时的培养时间足以使包含哺乳动物细胞培养物上清液或由其组成的培养基中存在的物质能够增加磷酸化HSP27的表达和任选的分泌和/或激活上述启动子。

[0080] 步骤a)中使用的培养基包含至少20%、优选至少50%、更优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%的哺乳动物细胞培养物上清液或由其组成。

[0081] 在本发明的优选实施方案中,步骤a)的所述培养基是杜贝卡氏改良型伊格氏培养基(DMEM)、Ham F12培养基(F12)、最小必需培养基或者这些培养基中的一种或多种的组合。

[0082] 在本发明的另一个实施方案中,步骤a)的所述培养基包含2%至20%、优选5%至15%的胎牛血清(FBS)和/或L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0083] 为了确定真核细胞中上述启动子的启动子活性,优选对细胞进行遗传修饰以包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的启动子,所述启动子选自以下组成的组:AP-1启动子、NF-KB启动子、Sox2启动子、STAT3启动子、EGR-1启动子和SRE启动子。

[0084] 如本文所定义,“表达盒”是指含有可操作地连接至基因表达所必需的调控序列的基因(即,编码蛋白质或多肽的核酸分子)的核酸片段。

[0085] “可操作地连接”是指编码特定遗传信息的核苷酸区域的连接,使得核苷酸区域相对于作为功能单位的一部分的其它区域是邻接的,区域的功能被保留并执行。

[0086] 引入真核细胞中的表达盒可以作为载体的一部分提供。“载体”被认为是通过其可以将核酸片段引入宿主生物体(例如真核细胞)的媒介物。“表达载体”是通过其可以将含有足够遗传信息的核酸片段、特别是表达盒引入真核细胞中并且因此可以由这些细胞表达的媒介物。

[0087] 由表达盒编码的报告蛋白可以是可以被抗体或其抗原结合片段结合的多肽或蛋白质,是酶或荧光蛋白或多肽。报告蛋白优选地选自以下组成的组:萤光素酶,优选萤火虫萤光素酶,和荧光蛋白,优选绿色荧光蛋白。

[0088] “萤光素酶”是在萤光素、氧和ATP存在下能够产生生物发光的氧化酶。“荧光蛋白”是具有荧光特性的蛋白质。

[0089] 通过免疫学方法,优选地通过酶联免疫吸附测定(ELISA),通过光度测定法或通过荧光方法确定由真核细胞释放到培养基中的蛋白质(例如磷酸化HSP27,报告蛋白)的量。

[0090] 已表明腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,HaCaT或HEK细胞,优选HEK293细

胞特别适合于确定磷酸化HSP27的量。

[0091] 如果至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高优选至少80%，优选至少100%，更优选至少150%，更优选至少200%，则哺乳动物细胞培养物的上清液可用于治疗炎症病症。

[0092] 当测量释放到培养基中的磷酸化HSP27的量时，步骤a)的所述真核细胞优选为腺癌人肺泡基底上皮细胞，优选A549细胞，HaCaT或HEK细胞，优选HEK293细胞。

[0093] 步骤a)的所述真核细胞优选为神经母细胞瘤细胞，优选SH-SY5Y细胞，或HaCaT细胞，包含至少一个表达盒，所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的AP-1启动子。

[0094] 步骤a)的所述真核细胞优选为腺癌人肺泡基底上皮细胞，优选A549细胞，包含至少一个表达盒，所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的NF-KB或Sox2启动子。

[0095] 步骤a)的所述真核细胞优选为HEK细胞，优选HEK293细胞，包含至少一个表达盒，所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的EGR-1、SRE、AP-1或STAT3启动子。

[0096] 通过以下实施方案和实施例进一步说明本发明，但是本发明不限于此。

[0097] 本发明的实施方案：

[0098] 1.一种用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法，包括以下步骤：

[0099] a)在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育真核细胞，

[0100] b)测量选自由以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性：激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子，和/或测量由所述真核细胞释放到步骤a)的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量，

[0101] 其中如果至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养所述真核细胞时测量的启动子活性高至少50%，和/或如果释放到步骤a)的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比当在缺少所述上清液的培养基中培养所述真核细胞时释放到培养基中的磷酸化HSP27的量高至少20%，则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0102] 2.一种用于确定哺乳动物细胞培养物的上清液用于治疗炎症病症的效力的方法，包括以下步骤：

[0103] a)在包含所述上清液或由所述上清液组成的培养基中孵育真核细胞，

[0104] b)测量选自由以下组成的组的至少一种启动子的启动子活性：激活蛋白1 (AP-1) 启动子、核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强 (NF-KB) 启动子、性别决定区Y-box 2 (Sox2) 启动子、信号转导及转录激活蛋白3 (STAT3) 启动子、早期生长应答蛋白1 (EGR-1) 启动子和血清应答元件 (SRE) 启动子，和/或测量由真核细胞释放到步骤a)的所述培养基中的磷酸化热激蛋白27 (HSP27) 的量，

[0105] 其中如果至少一种启动子的启动子活性比当在包含能够用于治疗炎症病症的参

考哺乳动物细胞上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高或低多至25%，和/或如果释放到步骤a)的所述培养基中的磷酸化HSP27的量比释放到包含能够用于治疗炎症病症的参考哺乳动物细胞上清液的步骤a)的所述培养基中的磷酸化HSP27的量高或低多至25%，则所述哺乳动物细胞培养物的上清液具有用于治疗炎症病症的潜力。

[0106] 3. 根据实施方案1或2所述的方法，其中哺乳动物细胞培养物的上清液是外周血单核细胞(PBMC)培养物的上清液。

[0107] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的方法，其中哺乳动物细胞培养物包含T细胞、B细胞和/或NK细胞。

[0108] 5. 根据实施方案1至4中任一项所述的方法，其中将哺乳动物细胞培养物中的哺乳动物细胞培养在细胞培养基中，所述细胞培养基选自以下组成的组：细胞生长培养基，优选CellGro培养基，更优选Cellgro GMP DC培养基，RPMI、DMEM、X-vivo和Ultraculture。

[0109] 6. 根据实施方案1至5中任一项所述的方法，其中在培养之前或培养期间，使哺乳动物细胞经受一种或多种胁迫诱导条件。

[0110] 7. 根据实施方案6所述的方法，其中胁迫诱导条件选自以下组成的组：辐射，特别是电离辐射或紫外线辐射，缺氧、臭氧、热、渗透压和pH变化。

[0111] 8. 根据实施方案7所述的方法，其中使哺乳动物细胞以至少10Gy、优选至少20Gy、更优选至少40Gy的剂量经受电离辐射。

[0112] 9. 根据实施方案1至8中任一项所述的方法，其中在分离其上清液之前，将哺乳动物细胞培养至少4小时，优选至少6小时，更优选至少12小时。

[0113] 10. 根据实施方案1至9中任一项所述的方法，其中炎症病症是与缺血相关的病症，优选皮肤病症或内部炎症病症。

[0114] 11. 根据实施方案1至10中任一项所述的方法，其中步骤a)的所述真核细胞选自以下组成的组：腺癌人肺泡基底上皮细胞，优选A549细胞，非整倍体永生角质形成细胞(HaCaT)，人胚胎肾细胞(HEK细胞)，优选HEK293细胞，和神经母细胞瘤细胞，优选SH-SY5Y细胞。

[0115] 12. 根据实施方案1至11中任一项所述的方法，其中将步骤a)的所述真核细胞在细胞培养基中孵育至少2小时，优选至少4小时，更优选至少6小时，更优选至少12小时，更优选至少18小时，更优选至少24小时。

[0116] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的方法，其中培养基包含至少20%、优选至少50%、更优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%、更优选至少95%的所述上清液。

[0117] 14. 根据实施方案1至13中任一项所述的方法，其中步骤a)的所述培养基是杜贝卡氏改良型伊格氏培养基(DMEM)、Ham F12培养基(F12)、最小必需培养基或者这些培养基中的一种或多种的组合。

[0118] 15. 根据实施方案1至14中任一项所述的方法，其中步骤a)的所述培养基包含2%至20%、优选5%至15%的胎牛血清(FBS)和/或L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。

[0119] 16. 根据实施方案1至15中任一项所述的方法，其中真核细胞包含至少一个表达盒，所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的启动子，所述启动子选自以下组成的组：AP-1启动子、NF-KB启动子、Sox2启动子、STAT3启动子、EGR-1启

动子和SRE启动子。

[0120] 17. 根据实施方案16所述的方法,其中报告蛋白选自由以下组成的组:萤光素酶,优选萤火虫萤光素酶,和荧光蛋白,优选绿色荧光蛋白。

[0121] 18. 根据实施方案1至17中任一项所述的方法,其中通过免疫学方法,优选地通过酶联免疫吸附测定(ELISA),通过光度测定法或通过荧光方法确定由细胞释放到培养基中的蛋白质的量。

[0122] 19. 根据实施方案1至18中任一项所述的方法,其中步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,HaCaT或HEK细胞,优选HEK293细胞,并且确定磷酸化HSP27的量。

[0123] 20. 根据实施方案1至19中任一项所述的方法,其中至少一种启动子的启动子活性比当在缺少所述上清液的培养基中培养真核细胞时测量的启动子活性高至少80%,优选至少100%,更优选至少150%,更优选至少200%。

[0124] 21. 根据实施方案1至20中任一项所述的方法,其中当测量释放到培养基中的磷酸化HSP27的量时,步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,HaCaT或HEK细胞,优选HEK293细胞。

[0125] 22. 根据实施方案1至21中任一项所述的方法,其中步骤a)的所述真核细胞是神经母细胞瘤细胞,优选SH-SY5Y细胞,或HaCaT细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的AP-1启动子。

[0126] 23. 根据实施方案1至22中任一项所述的方法,其中步骤a)的所述真核细胞是腺癌人肺泡基底上皮细胞,优选A549细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的NF-KB或Sox2启动子。

[0127] 24. 根据实施方案1至23中任一项所述的方法,其中步骤a)的所述真核细胞是HEK细胞,优选HEK293细胞,包含至少一个表达盒,所述表达盒包含与至少一个编码报告蛋白的核酸分子可操作地连接的EGR-1、SRE、AP-1或STAT3启动子。

[0128] 实施例:

[0129] 实施例1:Aposec的产生

[0130] “Aposec”是哺乳动物细胞培养物的上清液,其可以通过在培养所述细胞之前或期间使用胁迫诱导条件(例如辐射、低氧等)培养哺乳动物细胞,特别是PBMC来获得。该方法在以上有所描述,在WO 2010/079086和在WO 2010/070105中,特别是在Lichtenauer M等人(Basic Res Cardiol.2011;106:1283-1297)中。

[0131] 详细地,从年轻健康志愿者获得人PBMC。如Ankersmit HJ等人(Eur J Clin Invest.2009;39:445-456)所述,通过Ficoll-Paque(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)密度梯度离心来分离细胞。通过以60戈瑞(Gy)的铯137辐照诱导PBMC凋亡。在流式细胞仪上通过膜联蛋白-V/碘化丙啶(FITC/PI)共染色(Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)来测量凋亡的诱导。将辐照和未辐照的细胞重悬于无血清的UltraCulture培养基(Lonza, Switzerland)或Cellgro GMP DC培养基(CellGenix, Freiburg, Germany)中,并且在多种细胞密度(1×10^6 、 2.5×10^6 和 25×10^6 个细胞/ml, $n=5$)下培养24小时。24小时后,收集上清液并用作以下实验的实验实体(见下文)或按如下进行冻干:将上清液在4℃下用乙酸铵(浓度为50mM)透析24小时。将获得的液体无菌过滤(Whatman Filter 0.2μm

FP30/o, 2Ca-S, Germany), 冷冻并冻干过夜 (Lyophilizator Christ alpha 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Germany)。

[0132] 实施例2: 增殖测定

[0133] 将HUVEC(人脐静脉内皮细胞)、NHDF(正常人皮肤成纤维细胞)和A549(人上皮样癌细胞)细胞以三种不同的细胞密度接种到96孔板中, 并且用Aposec (2.5U/mL)、bFGF (20ng/mL) 和TNFa (4ng/mL) 处理。除细胞数和处理外, 还用不同百分比的生长培养基培养细胞。在CO₂培养箱中过夜培养后, 使用CellTiter-Glo发光细胞活力测定(CellTiterGlo) 确定细胞数, 这是一种基于对存在的ATP(其为代谢活跃细胞的指标) 进行定量而确定培养物中活细胞数的均质方法(参见Technical Bulletin, CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, TB288, 3/15修订)。

[0134] 在过夜孵育后观察到清晰的细胞密度依赖性细胞数。没有观察到Aposec的增殖诱导的迹象(见图1)。

[0135] 实施例3: 磷酸化HSP27的测定

[0136] 在该实施例中, 研究了Aposec是否能够在体外诱导Hsp27的磷酸化。

[0137] 一般而言, 在具有不同人细胞系(A549、HaCat和HEK293细胞)的细胞ELISA中评估了对人Hsp27、人phospho-Ser15-Hsp27和人phospho-Ser82-Hsp27具有特异性的不同抗体。细胞ELISA基于以下原理: 使细胞在96孔板中生长, 并且在处理/刺激期结束时, 将细胞固定并透化。可以通过依次添加检测磷酸化HSP27(例如, phospho-Hsp27 (Ser82))的抗体, 随后添加过氧化物酶缀合的抗兔IgG抗体(检测抗体)和化学发光过氧化物酶底物来定量磷酸化。

[0138] 下表列出了所评估的人Hsp27特异性抗体:

类型	物种	单/多克隆	来源	目录号
总Hsp27	小鼠	单克隆G31	Cell Signaling Technology	2402
总Hsp27	小鼠	单克隆F-4	Santa Cruz	sc-13132
Hsp27Ser82	兔	单克隆D1H2F6	Cell Signaling Technology	9709
Hsp27Ser15	兔	多克隆	ThermoFisher/Invitrogen	PA1-018

[0140] 3.1 细胞Hsp27 ELISA测定1

[0141] 将A549、HEK293和HaCat细胞用萝卜硫素 (20μM) 和毒胡萝卜素 (1μM) 的组合处理2小时以诱导Hsp27磷酸化, 并用MAPK抑制剂SB203580 (20μM) 处理。将经过固定、透化和封闭的细胞用不同浓度的抗体在4℃孵育过夜。

[0142] 相对于用相同抗体浓度孵育的模拟处理的细胞来表示处理和抗体浓度依赖性信号(见图2)。

[0143] phosphoSer82-Hsp27抗体在A549和HaCat细胞中显示出预期的模式。用萝卜硫素/毒胡萝卜素的共处理导致phosphoSer82-Hsp27信号的预期增加, 而MAPK抑制剂降低该信号: MAPK在Hsp27的上游。在A549细胞中, 较高的抗体稀释度(较少的抗体)导致较高的相对诱导, 最可能是由于非特异性信号减少。

[0144] 3.2 细胞Hsp27 ELISA测定2

[0145] 在不存在或存在MAPK抑制剂SB203580的情况下, 将A549、HEK293、HaCat和SHSY5Y细胞用不同浓度的Aposec、萝卜硫素和毒胡萝卜素处理2小时。将经过固定、透化和封闭的

细胞用两种不同浓度的phosphoSer15-Hsp27 (1:3200和1:6400) 和phosphoSer82-Hsp27 (1:800和1:1600) 抗体在4℃孵育过夜。

[0146] 对于两种抗体,所测试的两种抗体浓度的比较表明,更高的稀释度导致更好的信噪比。在A549细胞中,观察到了phosphoSer15-Hsp27和phosphoSer82-Hsp27的剂量依赖性诱导。在A549细胞中,MAPK抑制剂SB203580阻止了phosphoSer15-Hsp27的诱导,但没有阻止phosphoSer82-Hsp27的诱导。在其它三个测试细胞系(HEK293、HaCat和SH-SY5Y)中,Aposec诱导了phosphoSer15-Hsp27(见图3)。

[0147] 3.3细胞Hsp27 ELISA测定3

[0148] 在实施例3的这一部分中,研究了迄今为止在Aposec处理后观察到phosphoSer15-Hsp27和phosphoSer82-Hsp27诱导是否是Aposec特异性的。

[0149] 将A549细胞用不同浓度的Aposec和CellGro处理1小时。所用的冻干物已用0.9% NaCl或H₂O进行了重构,以评估Aposec和CellGro中NaCl浓度的影响。将经过固定、透化和封闭的细胞用一种浓度的phosphoSer82-Hsp27抗体在4℃孵育过夜。除了Aposec与CellGro和0.9%NaCl或H₂O的比较之外,还评估了Aposec和CellGro(在H₂O中重构)的15、30或60分钟处理。

[0150] 由在H₂O或0.9%NaCl中重构的Aposec和CellGro的phosphoSer82-Hsp27诱导的比较表明,用H₂O重构的CellGro不诱导phosphoSer82-Hsp27,而与用0.9%NaCl重构的Aposec相比,用0.9%NaCl重构的CellGro诱导少得多的phosphoSer82-Hsp27。动力学表明,用Aposec刺激15分钟和30分钟产生可比较的诱导(5倍),而刺激1小时的诱导为约4倍(见图4)。

[0151] 3.4细胞Hsp27 ELISA测定-测定范围

[0152] 在实施例3的这一部分中,研究了可以用phosphoSer82-Hsp27测定来定量Aposec的哪个测定范围。

[0153] 使用25%、50%和200%Aposec和100%CellGro样品处理A549细胞,并使用4PL全曲线模型在PLA中分析数据。

[0154] 图5示出了PLA拟合的曲线,并且所得的相对效力写在曲线图下方。

[0155] 该测定允许定量25%至200%的Aposec相对效力。CellGro的相对效力在20%的范围内。这种CellGro活性反映了用0.9%NaCl对冻干物进行重构引起的非特异性作用。

[0156] 实施例4:AP-1报告基因测定

[0157] 在该实施例中,解决了Aposec是否确实在体外诱导AP-1启动子的问题。

[0158] 使用表达AP-1(激活蛋白1)转录因子反应性报告基因(萤火虫萤光素酶)(QIAGEN, Cignal Lenti Reporter Handbook For lentiviral-based cell signaling activity assays, Document No.1073762;08/2012)的慢病毒颗粒(QIAGEN Order No.CLS-011L)产生AP-1报告基因测定(RGA)细胞(Brasier AR等人Methods Enzymol.1992;216:386-97)。用不同量的Aposec刺激AP-1RGA细胞。如果Aposec刺激AP-1启动子,则萤火虫萤光素酶表达。在利用APOSEC的刺激期结束时,裂解细胞,并使用发光型萤光素酶试剂测定萤光素酶活性。

[0159] 4.1 AP-1RGA测定1

[0160] 在实施例4的该部分中,研究了Aposec是否能够刺激不同细胞系中的AP-1启动子。

[0161] 将用AP-1启动子报告构建体稳定转化的三种不同细胞系用不同稀释度的Aposec

刺激5或24小时。

[0162] 相对于细胞系特异性基础信号来表示AP-1报告信号(诱导倍数)。25小时后,在Ha-Cat、Jurkat和SH-SY5Y细胞中可以观察到剂量依赖性的AP-1刺激。5小时后,仅在SH-SY5Y细胞中观察到显著的AP-1诱导(见图6)。

[0163] 4.2 AP-1RGA测定2

[0164] 在实施例4的该部分中,评估了在Aposec的过夜或例如4小时刺激期是否可用于效力测定以及应使用哪个Aposec剂量范围。

[0165] 将SH-SY5Y AP-1RGA细胞用宽剂量范围的Aposec处理过夜或4小时。在4小时和过夜刺激中测试了从1:2至1:47.5的12种不同稀释度的剂量范围。

[0166] AP-1报告信号(原始数据=发光计数)在图7中以对数x轴示出。4小时的刺激显示了优选的剂量反应模式,对于最高Aposec浓度为平台样情形,对于中等Aposec浓度为几乎线性模式。在两个时间点均未观察到CellGro依赖性诱导。

[0167] 4.3 AP-1RGA测定3

[0168] 在实施例4的该部分中,研究了可以用AP-1RGA测定来定量Aposec的哪个测定范围。

[0169] 使用25%、50%和200%Aposec和100%CellGro样品处理AP-1SH-SY5Y细胞4小时,并使用4PL全曲线模型在PLA中分析数据。

[0170] 图8示出了PLA拟合曲线,并且所得的相对效力写在曲线图下方。

[0171] 该测定允许定量25%至200%的Aposec相对效力。CellGro的相对效力在20%的范围内。这种CellGro活性反映了用0.9%NaCl对冻干物进行重构引起的非特异性作用(见图8)。

[0172] 实施例5:Nf-KB报告基因测定

[0173] 在该实施例中,评估了Aposec是否确实在体外诱导NF-KB(即,NF- κ B;核因子激活的B细胞的‘ κ -轻链增强’)启动子。

[0174] 使用如上文所述针对AP-1RGA细胞的慢病毒颗粒(QIAGEN Order No.CLS-013L)产生NF-KB RGA细胞。用不同量的Aposec刺激NF-KB RGA细胞。如果Aposec刺激NF-KB启动子,则由在NF-KB(核因子激活的B细胞的‘ κ -轻链增强’)依赖性启动子的转录控制下编码萤火虫萤光素酶的稳定整合的表达盒表达萤火虫萤光素酶。在利用APOSEC的刺激期结束时,裂解细胞,并使用发光型萤光素酶试剂测定萤光素酶活性。

[0175] 5.1 NF-KB RGA测定1

[0176] 在实施例5的该部分中,评估了A549 NF- κ B RGA细胞是否显示出对Aposec刺激的剂量依赖性响应性。

[0177] 在读出NF- κ B RGA信号之前,用不同稀释度的Aposec和CellGro(均在NaCl中重构)刺激A549 NF- κ B RGA细胞4小时。

[0178] 相对于细胞克隆特异性基础信号来表示NF-KB报告信号(诱导倍数)。在刺激4小时后,可以观察到剂量依赖性的NF-KB刺激,而未观察到CellGro依赖性诱导(见图9)。

[0179] 5.2 NF-KB RGA测定2

[0180] 在实施例5的该部分中,用NF-KB RGA测定确定Aposec的测定范围。

[0181] 使用25%、50%和200%Aposec和100%CellGro样品处理NF-KB A549细胞4小时,

并使用4PL全曲线模式在PLA中分析数据。

[0182] 下图显示了PLA拟合曲线,并且所得相对效力写在图10中。

[0183] 实施例6:APOSEC NFkB报告基因测定

[0184] 可以通过其激活A549细胞(腺癌人肺泡基底上皮细胞系)中的NF- κ B启动子的能力来确定APOSEC效力。详细地说,用预定量的APOSEC刺激NF- κ B RGA A549细胞导致由在NF- κ B(核因子‘ κ -轻链增强’)依赖性启动子的转录控制下编码萤火虫萤光素酶的稳定整合的表达盒表达萤火虫萤光素酶。

[0185] 将细胞在DMEM/F12+Glutamax+10%FBS+嘌呤霉素中培养。将每孔20000个细胞在50 μ L刺激培养基(OptiMEM+Glutamax+5%FBS)中接种到测定板的每个孔中。将测定板在加湿的CO₂培养箱中于37℃孵育过夜。在测定培养基中的稀释板中制备多种浓度的APOSEC工作标准品(R)和测试样品(A、B、C和D)。详细地,将样品用刺激培养基预稀释至12.5U/mL:例如,将500 μ L样品(25U/mL)添加到500 μ L刺激培养基中。在将50 μ L APOSEC从稀释板转移到测定板后,最终测定浓度为:6.25(#1)、4.17(#2)、2.78(#3)和1.85(#4)U/mL。在用APOSEC刺激4小时之后,裂解细胞,并使用发光型萤光素酶试剂测定萤光素酶活性。

[0186] 通过与在相同测定中分析的用作参考材料的限定批次的APOSEC进行比较来确定APOSEC测试样品的功能活性。根据用于产生APOSEC的PMBC数量对测试样品进行归一化。然后使用PLA软件计算相对效力。

[0187] 实施例7:信号转导报告阵列

[0188] 在该实施例中,评估了Aposec是否确实特异性诱导某些信号传导通路。

[0189] 将‘Cignal 45-Pathway Reporter Array’(Qiagen order no.CCA-901L)用于鉴定在Aposec刺激后被特异性诱导的信号传导通路。报告通路允许在瞬时转染所选细胞系之后对45种不同的报告基因构建体进行平行分析。

[0190] 7.1转染功效测试1和2

[0191] 使用与存在于报告阵列中的萤光素酶载体进行比较的对照萤光素酶载体(Cignal Positive Control(luc),QIAGEN Order No.336881)以及2种不同的转染试剂(Attractene(QIAGEN Order No.301005)和Fugene HD(PROMEGA Order No.E2311))转染A549、HEK293和HaCat细胞。对每个细胞系的2种不同的细胞数(20000和80000个细胞/孔)评估了不同的DNA:转染试剂比率。

[0192] 对于Fugene HD而言,转染功效和稳健性显示出良好的结果,其与Attractene相比略高(总的来说,Fugene的发光计数更高)。与HEK293和A549细胞相比,HaCat细胞的发光计数更低。已知HaCat细胞难以转染(见图11)。

[0193] 仅对HEK293和A549细胞进行了第二次转染功效测试。再次使用了Fugene HD和Attractene试剂。除了转染功效(萤火虫和海肾萤光素酶计数)外,还使用CellTiterGlo分析了细胞的活力,以排除由于转染而对细胞活力造成的负面影响。有关转染功效的初步结果可以再现,并且未观察到对细胞活力的明显影响。根据这些结果,选择了‘Fugene与DNA’比率为3.375的Fugene HD用于即将进行的报告阵列实验。

[0194] 7.2信号转导报告阵列-测定1

[0195] 在实施例7的该部分中,研究了在A549和HEK293细胞中经Aposec过夜刺激后,特异性激活了哪些信号传导通路(报告基因构建体)。

[0196] 将上面描述的‘Cignal 45-Pathway Reporter Array’用于HEK293和A549细胞，20000个细胞/孔，具有Fugene HD和过夜刺激。用Aposec (1:4稀释或6.25U/mL) 刺激细胞。CellGro (1:4稀释或6.25U/mL) 用作对照刺激。使用的Aposec和CellGro均用0.9%NaCl重构。

[0197] 将报告基因的活性相对于CellGro对照归一化，并将发光计数归一化以用于转染功效(萤火虫/海肾计数)。一些报告基因/通路被显著上调(例如Stat3、Sox2、NF- κ B、XRE)，而另一些被显著下调(例如RARE、ERE、MEF2) (见图12)。

[0198] 7.3信号转导报告阵列-测定2

[0199] 在实施例7的这一部分中，研究了在A549和HEK293细胞中在Aposec刺激4小时之后，特异性激活了哪些信号传导通路(报告基因构建体)。

[0200] 用4小时的Aposec刺激重复上述测定(见7.2)，其中将细胞刺激过夜。

[0201] 将报告基因的活性相对于CellGro对照归一化，并将发光计数归一化以用于转染功效(萤火虫/海肾计数)。一些报告基因/通路被显著上调，而另一些则被显著下调。

[0202] 由于标准差相当小并且大多数基因没有被上调或下调，上述报告基因阵列测定的结果似乎是稳健的。此外，在多于一种测定中发现了一些被上调或下调的报告基因/通路，例如NF- κ B、AP-1、STAT3和Sox-2。

[0203] 实施例8:猪烧伤模型

[0204] 为了评估PBMC培养物的分泌组是否显示出与已经测试了治疗功效的根据实施例1的标准APOSEC制备物相当的治疗效果，根据实施例1的方案制备了四种不同的PBMC上清液制备物。用于获得所述四种上清液(A、B、C和D)的PBMC分离自四个不同的个体。作为治疗模型，使用了在Hacker S等人(Sci Rep 6(2016):25168)中广泛描述的猪烧伤模型。

[0205] 在第一步中，已经用上述标准APOSEC制备物和四种上清液A、B、C和D重复了实施例3.3、4.2和5.1中描述的实验。孵育60分钟后测量phosphoSer15-Hsp27的量，并且在4小时后测定AP-1和NF- κ B报告子活性的信号。已表明，与APOSEC相比，上清液A和D在phosphoSer15-Hsp27水平以及AP-1和NF- κ B活性方面显示出小于5%的变化。与APOSEC相比，上清液B和C在phosphoSer15-Hsp27水平以及AP-1和NF- κ B活性方面分别低35%和50%。

[0206] 将所有四种上清液A、B、C和D以及APOSEC与水凝胶组合，以形成可施用于伤口的组合物。在Hacker S等人中描述了获得这些制备物的方法。也已经按照Hacker S等人的描述制备猪皮肤上的伤口。在本实施例中与Hacker S等人相对的是，仅评估了用APOSEC和四种上清液处理的伤口的平均表皮厚度。已表明，APOSEC以及上清液A和D表现出相当的平均表皮厚度($125.1 \pm 23.8 \mu\text{m}$)。与此相对，施用包含上清液B和C的制备物使得表皮厚度分别为 $97.6 \pm 23.8 \mu\text{m}$ 和 $92.6 \pm 18.6 \mu\text{m}$ ，比仅包含CellGro培养基的制备物($88.3 \pm 14.2 \mu\text{m}$)的略高。

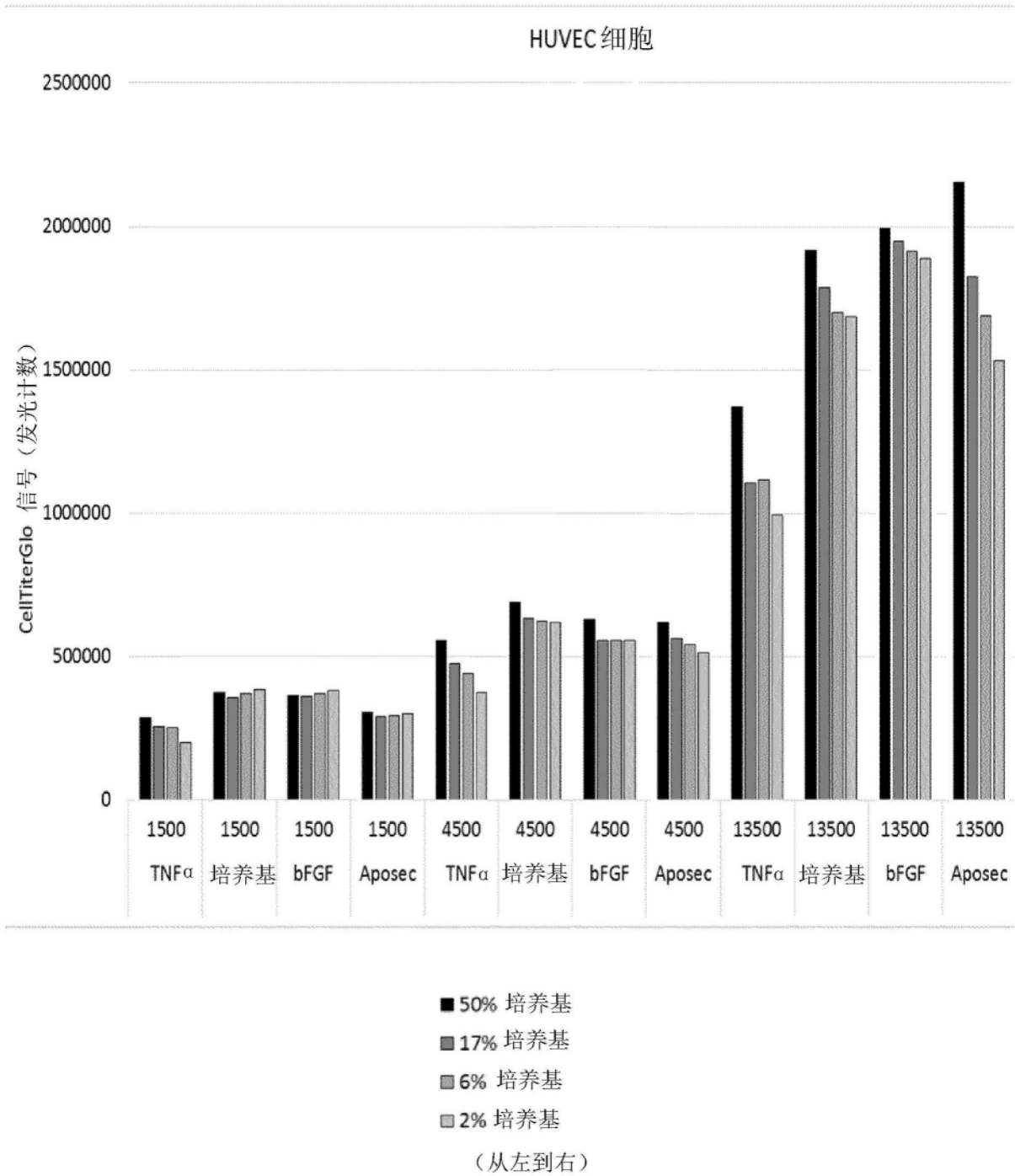


图1A

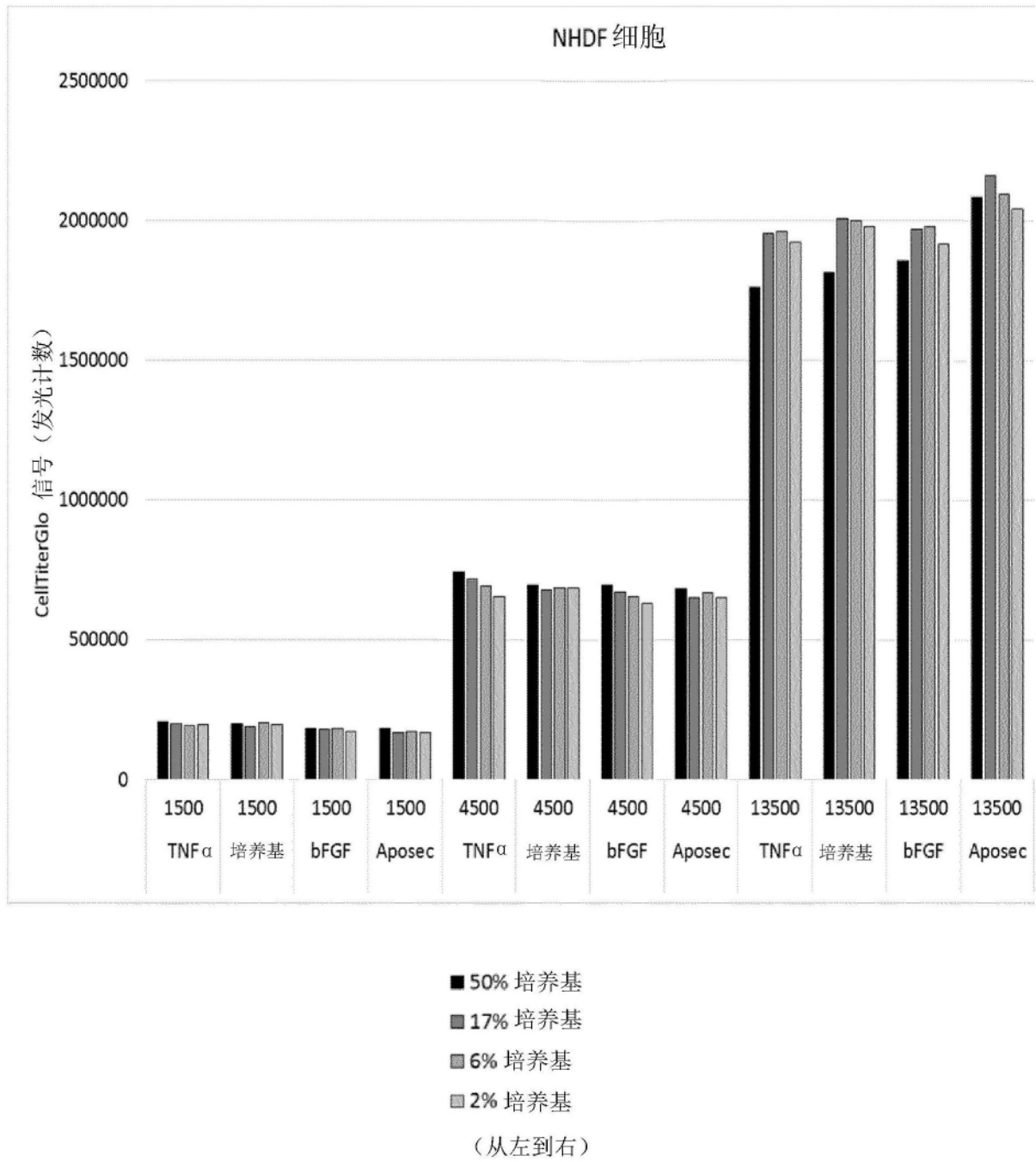


图1B

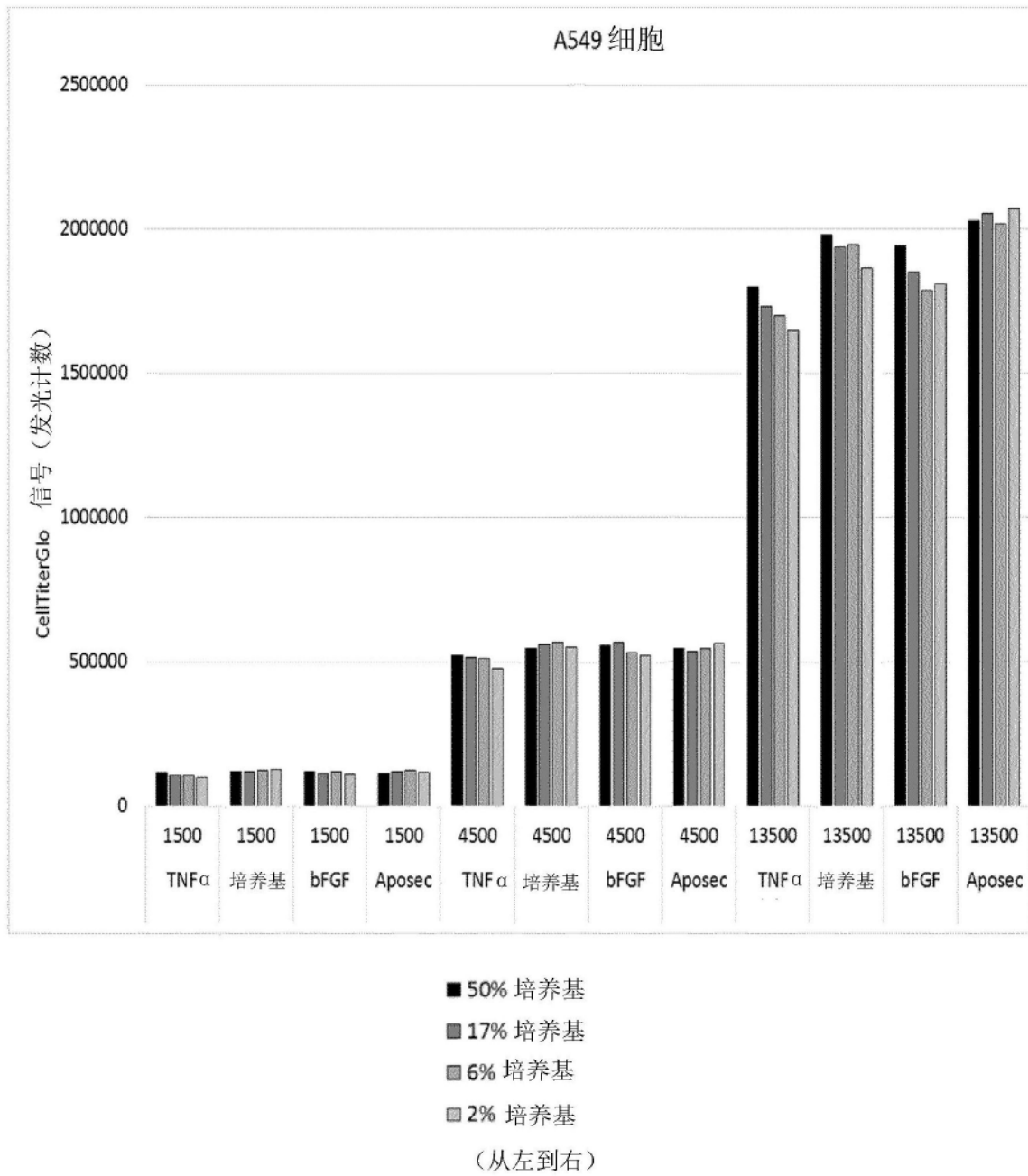


图1C

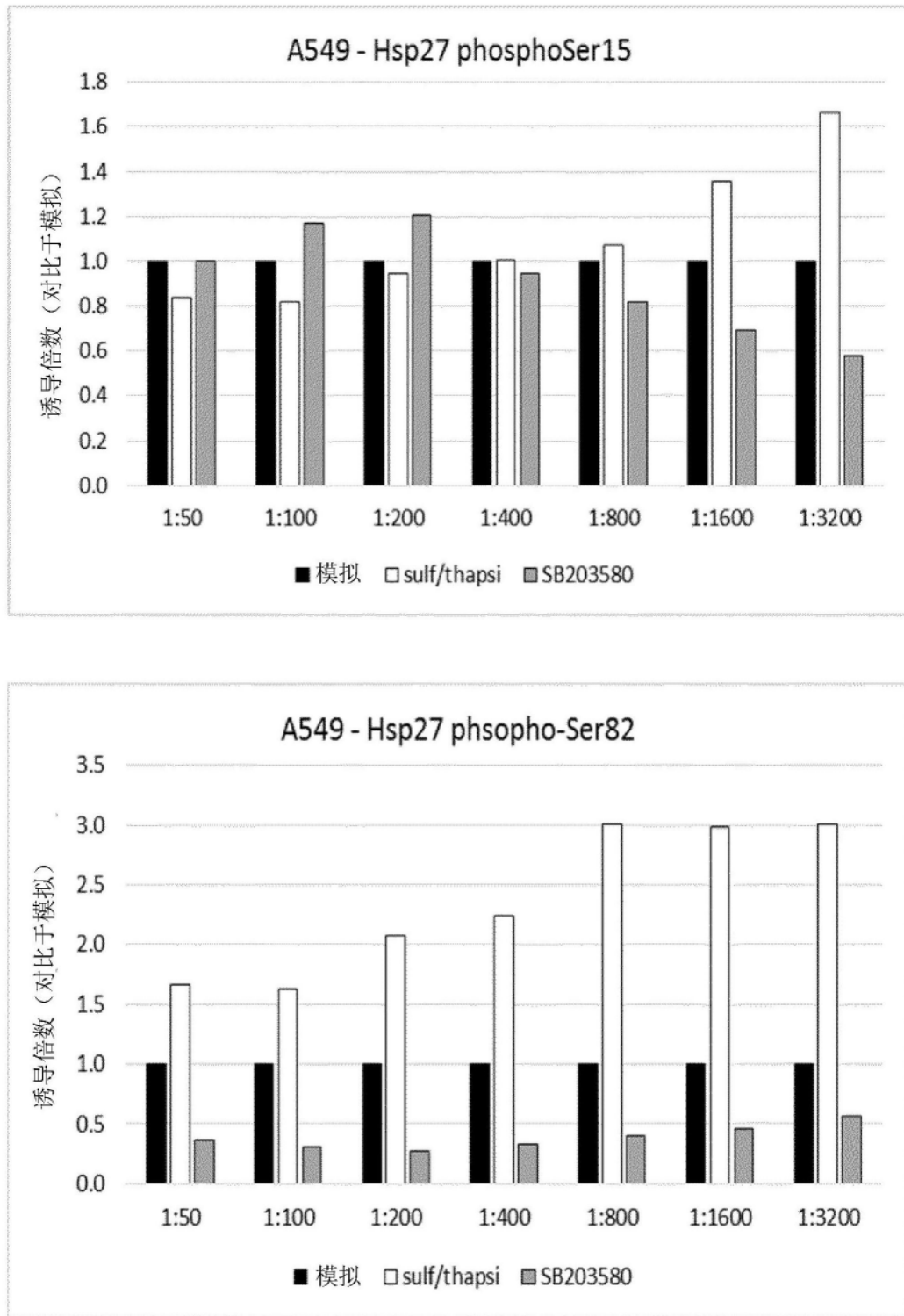


图2

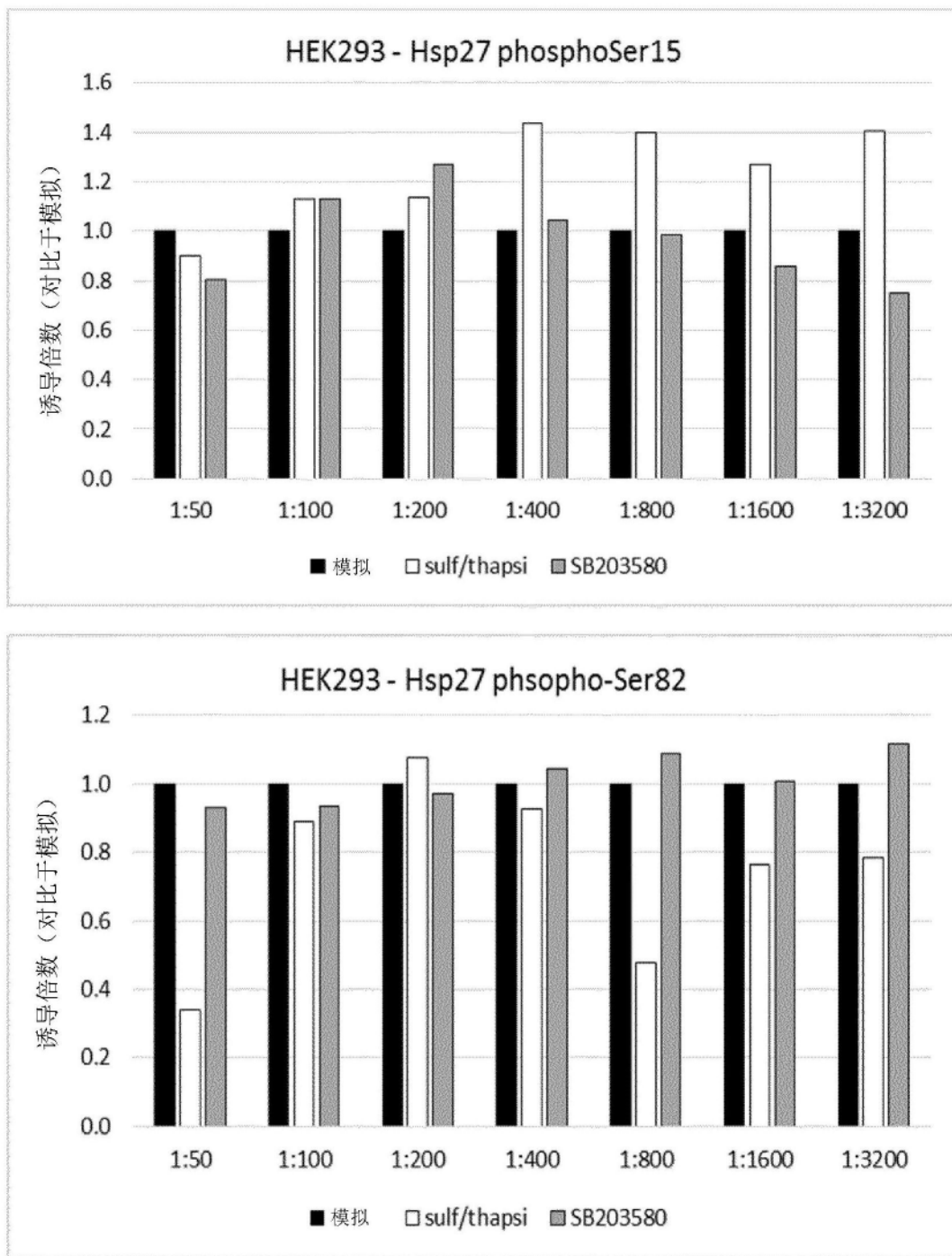


图2(续)

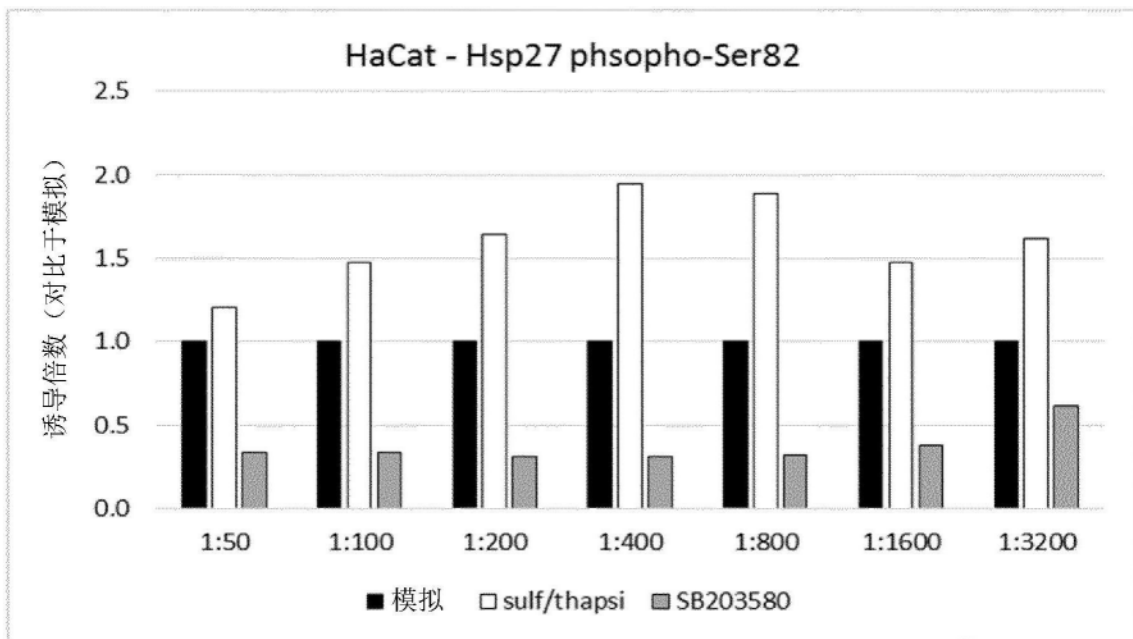
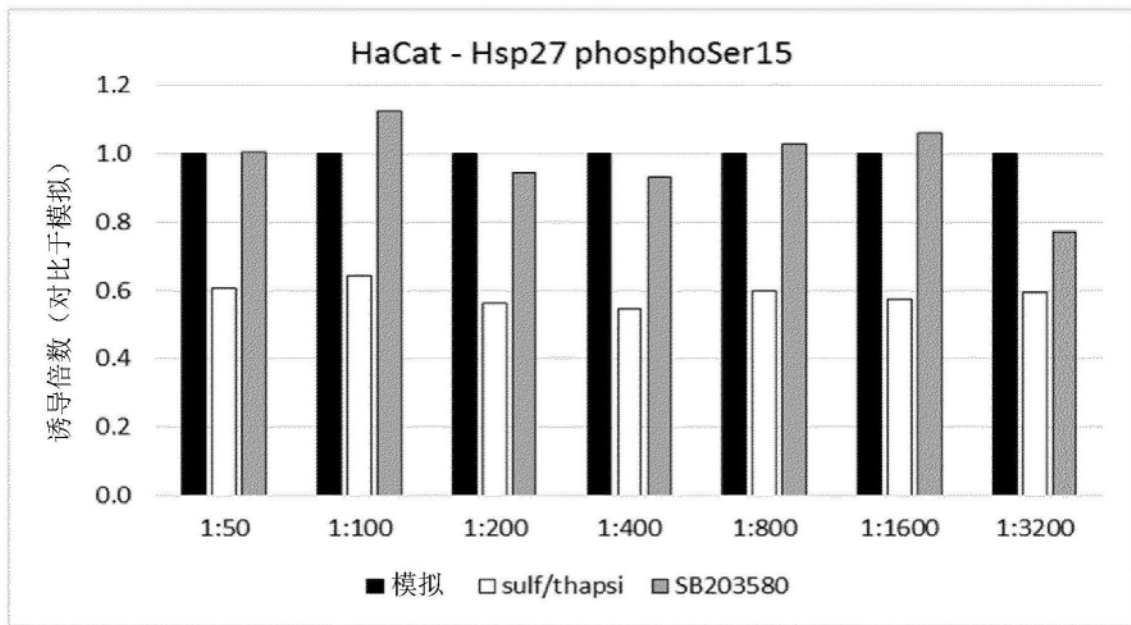


图2(续)

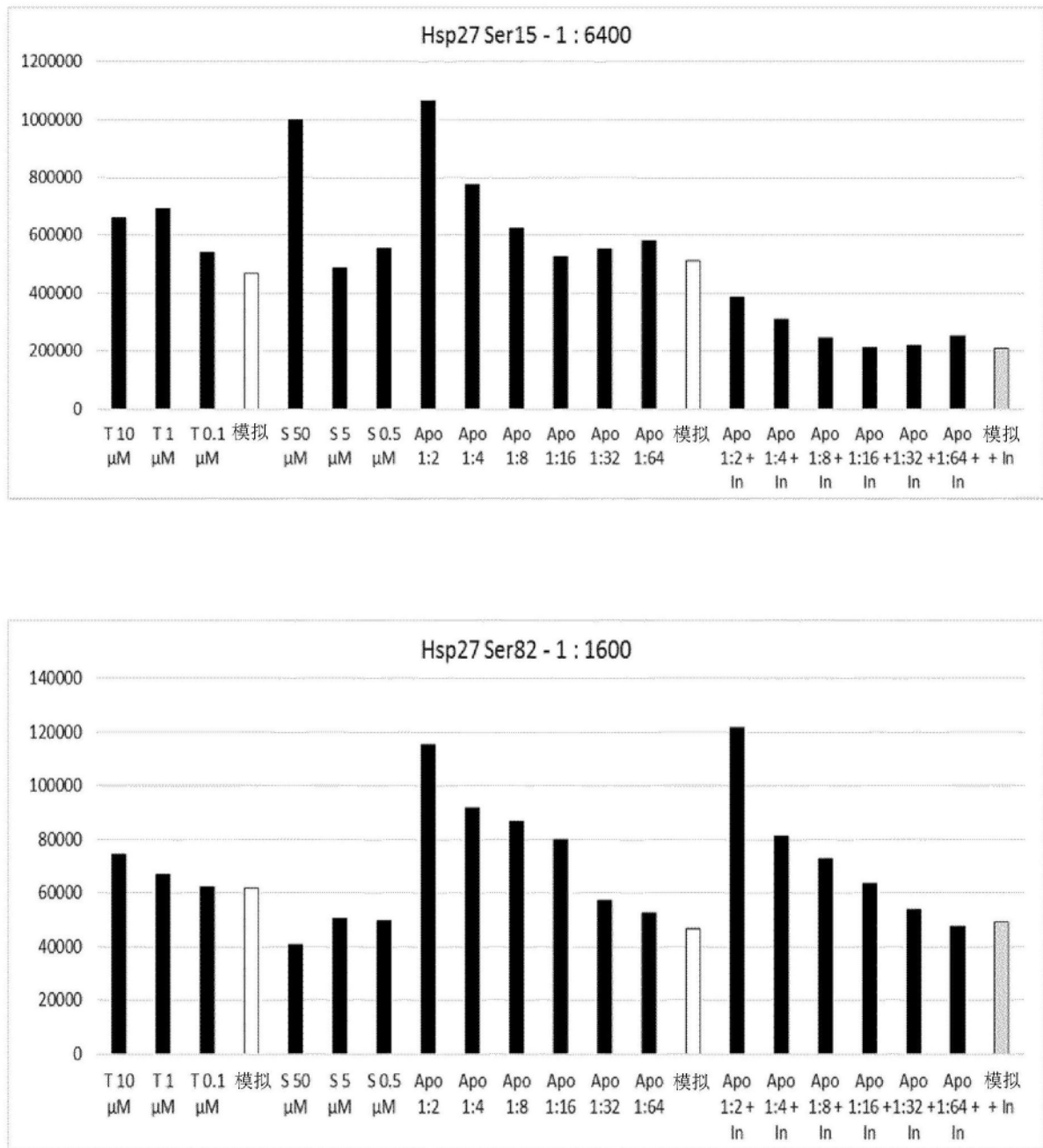


图3

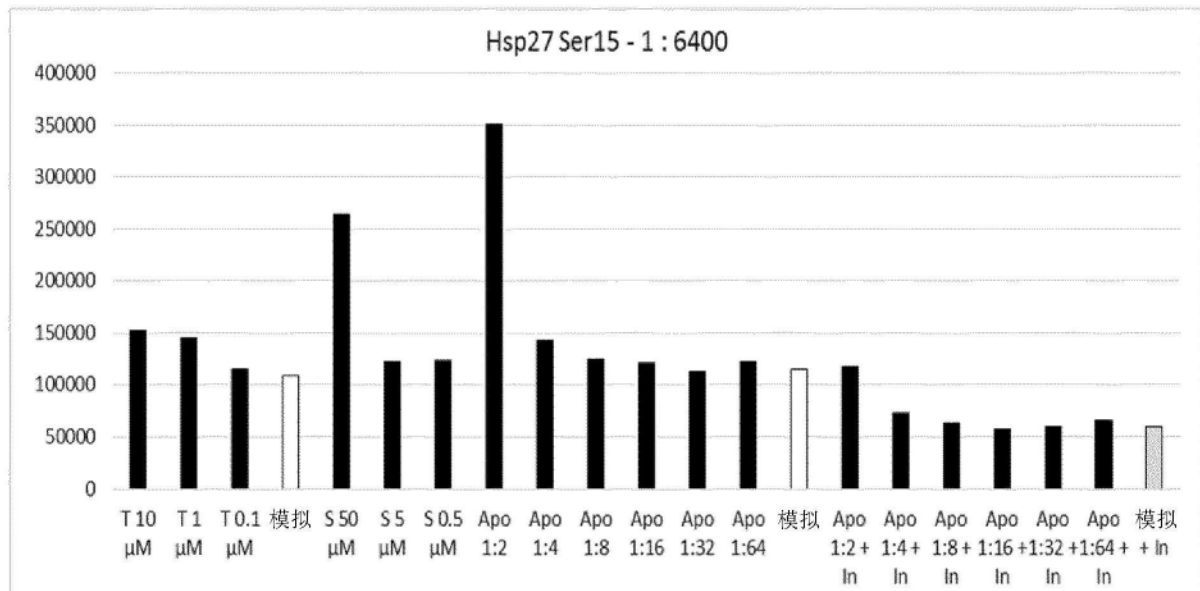
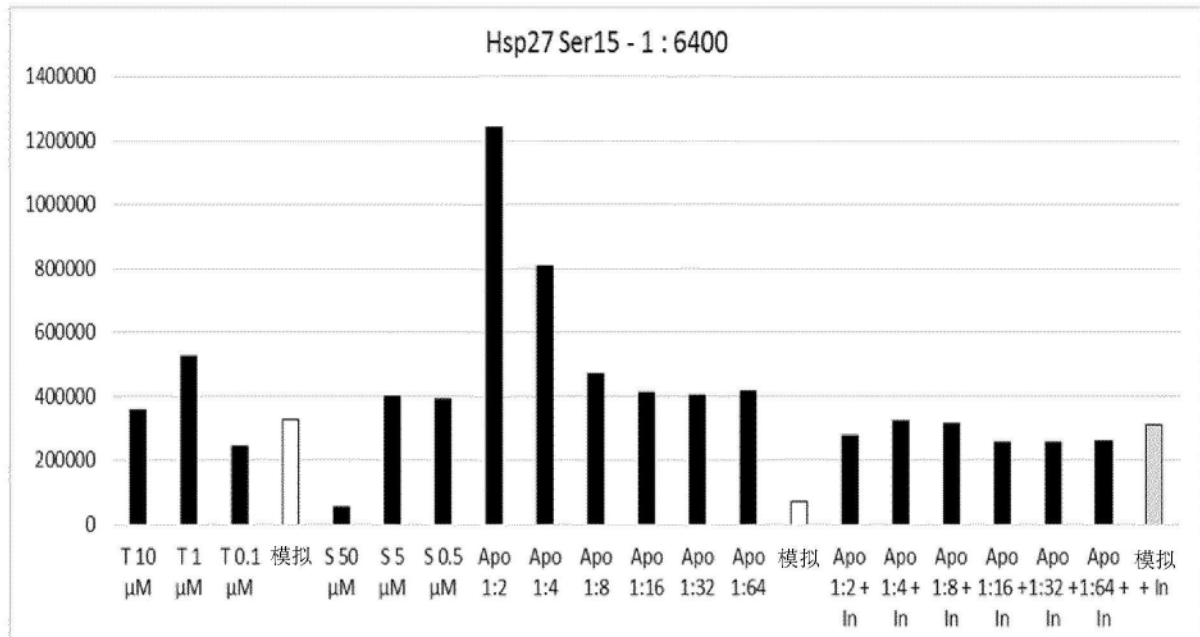


图3(续)

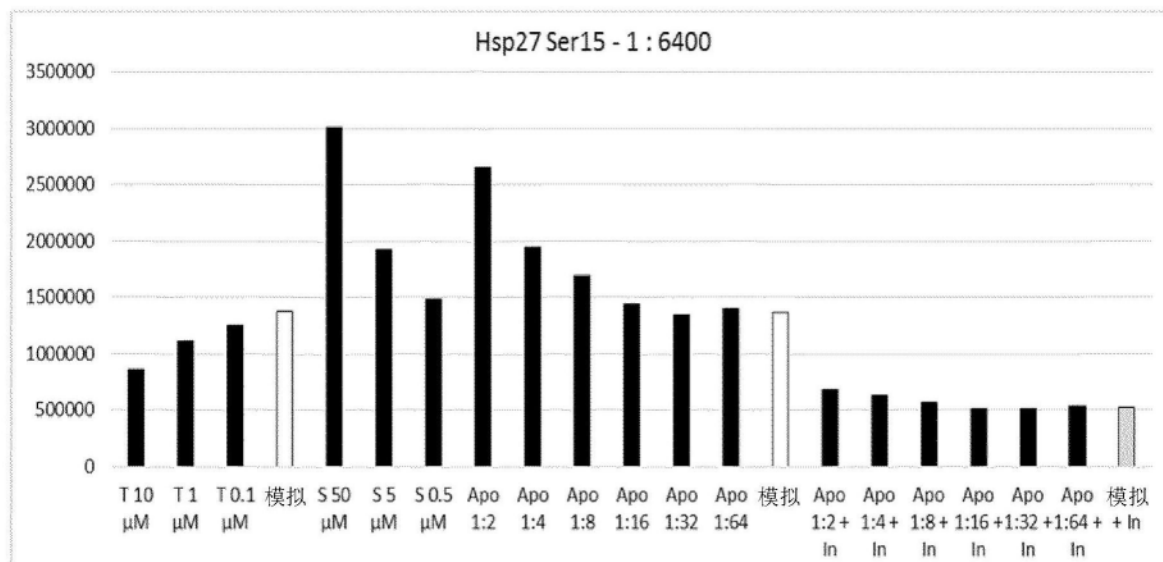


图3(续)

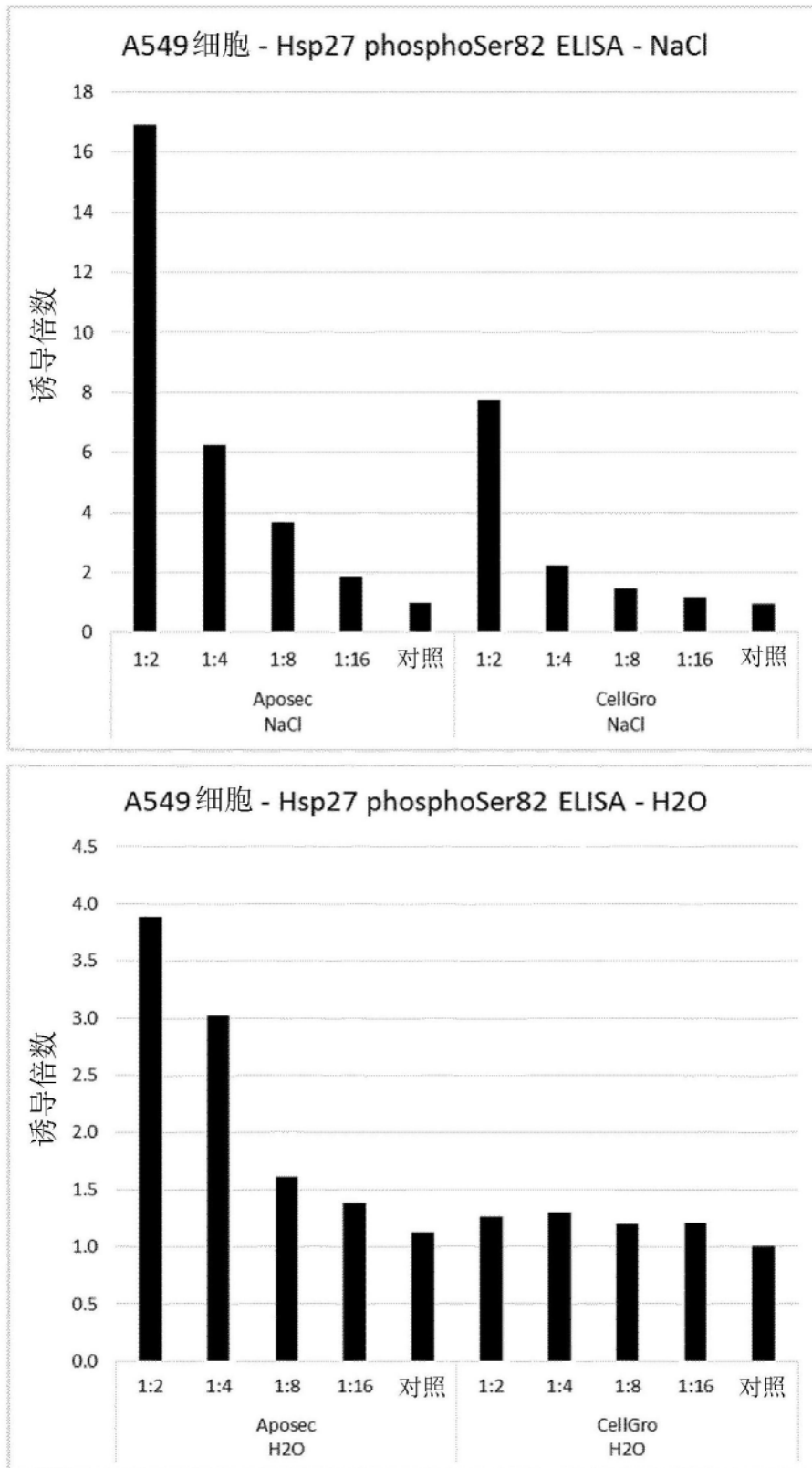


图4

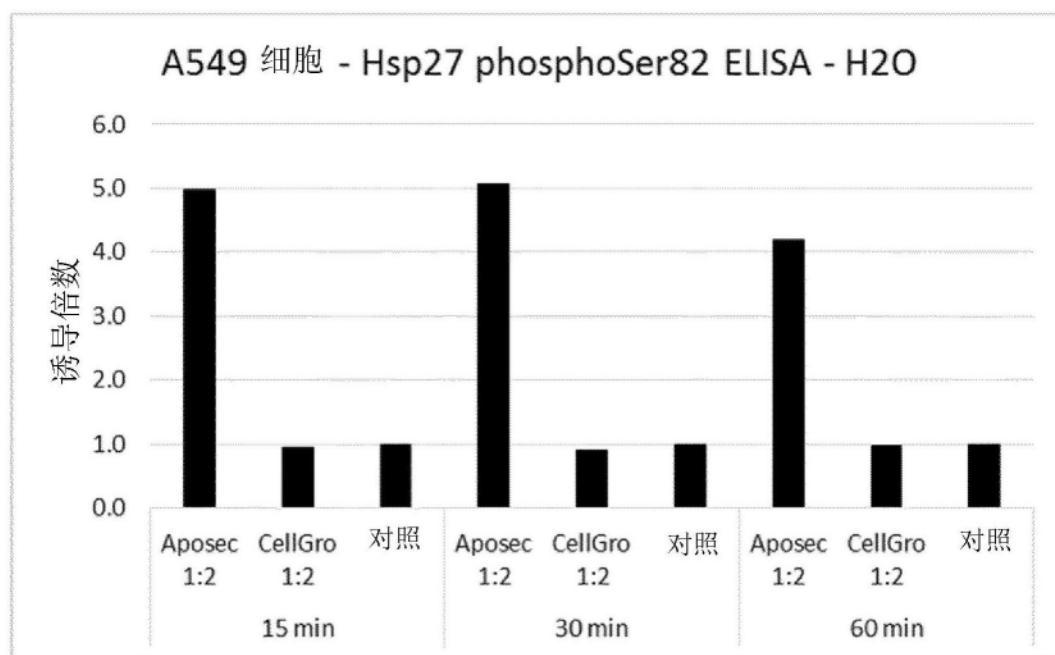


图4(续)

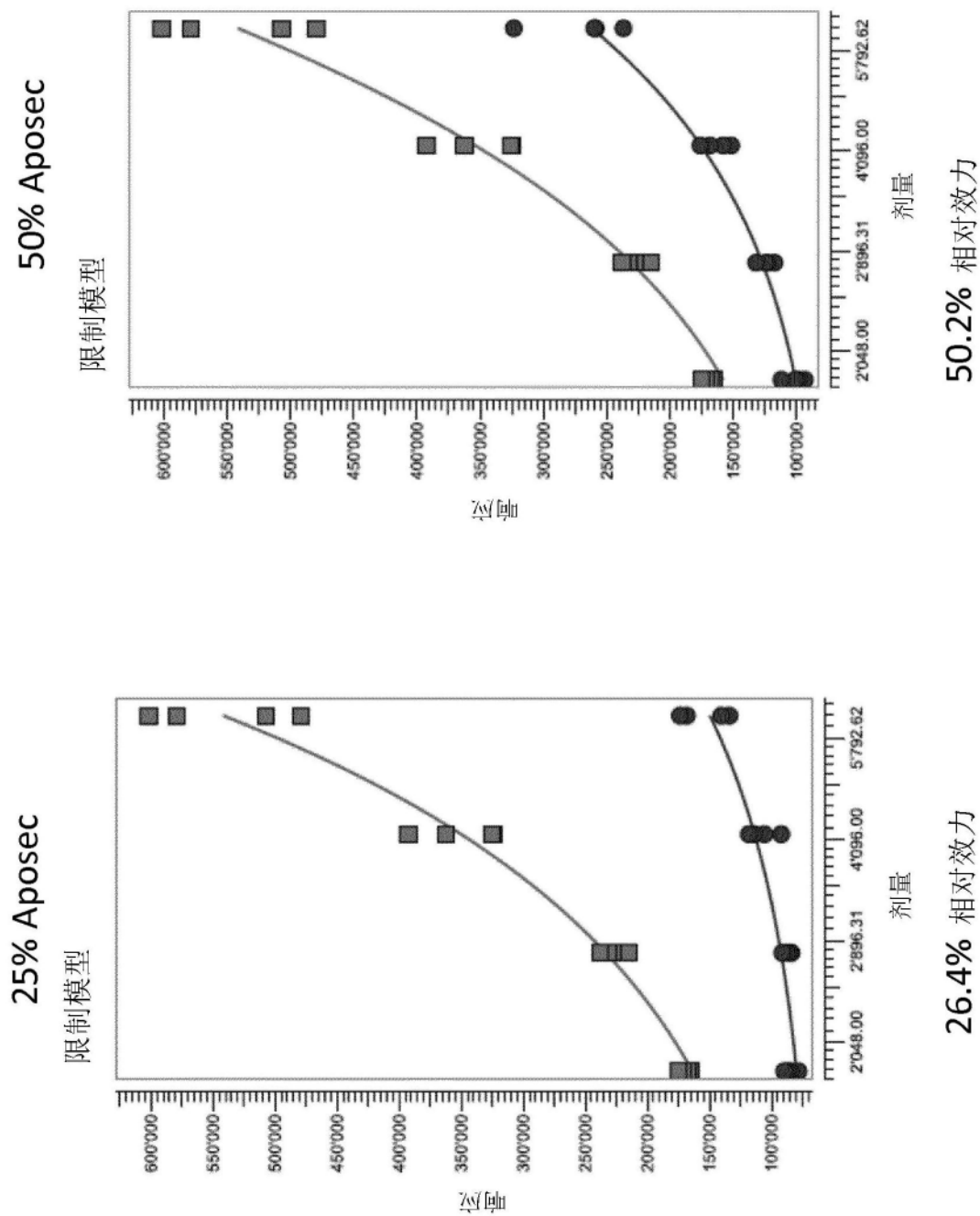


图5

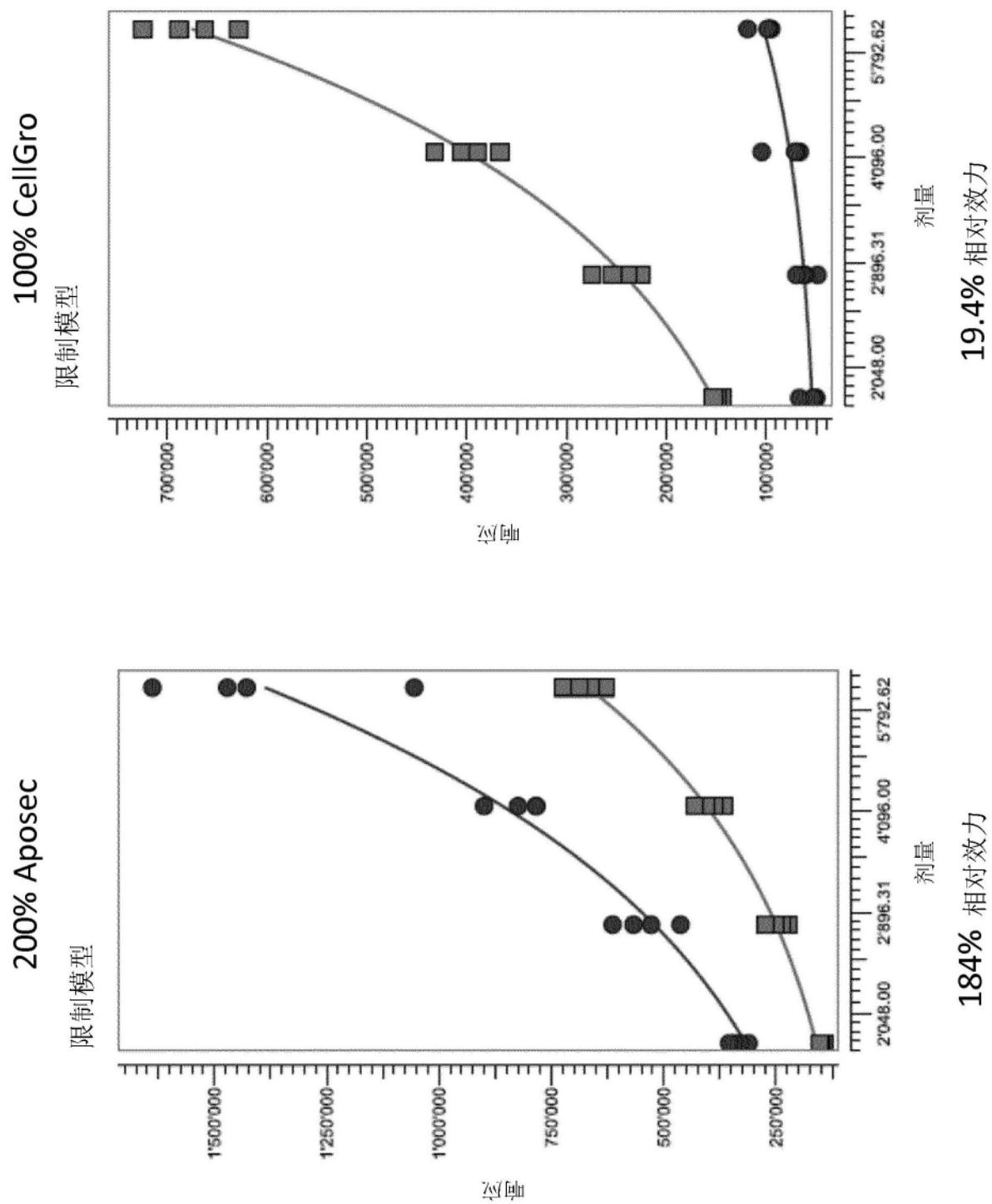


图5(续)

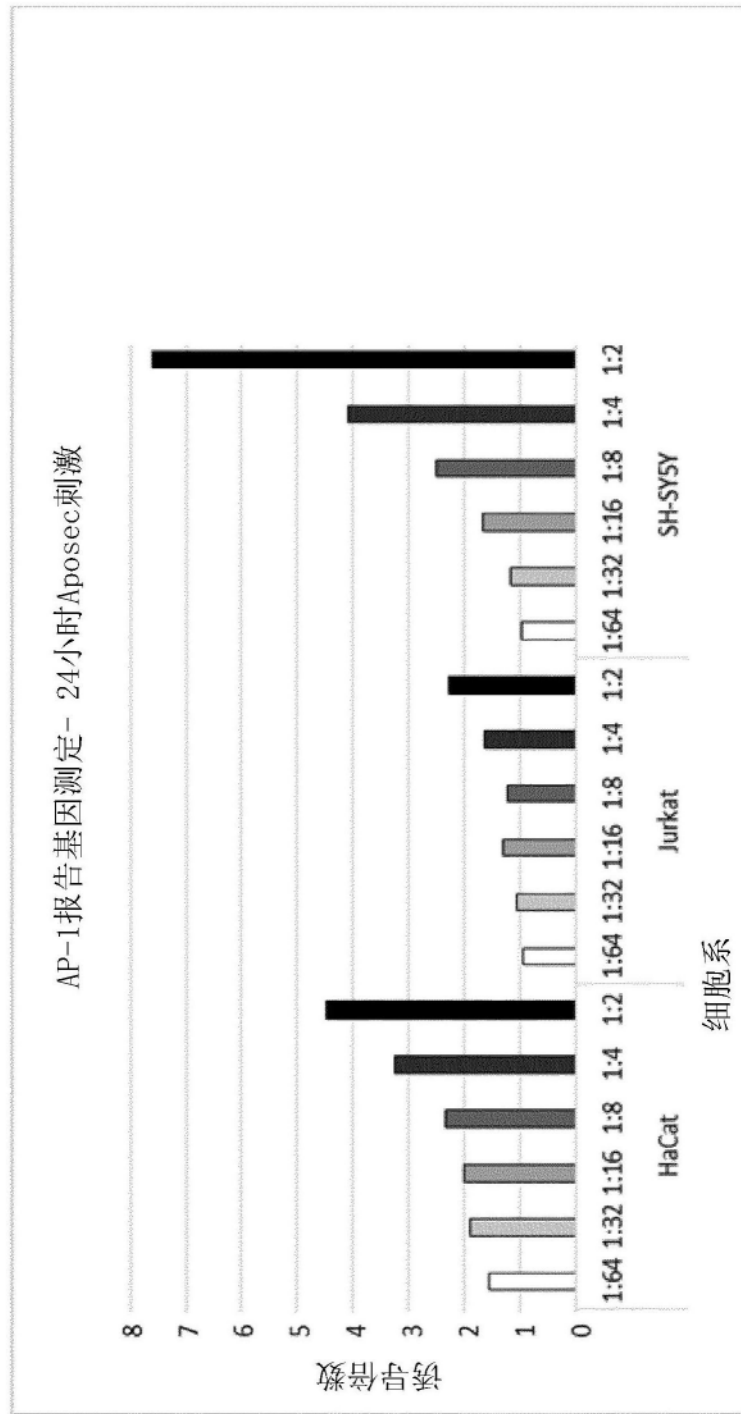


图6

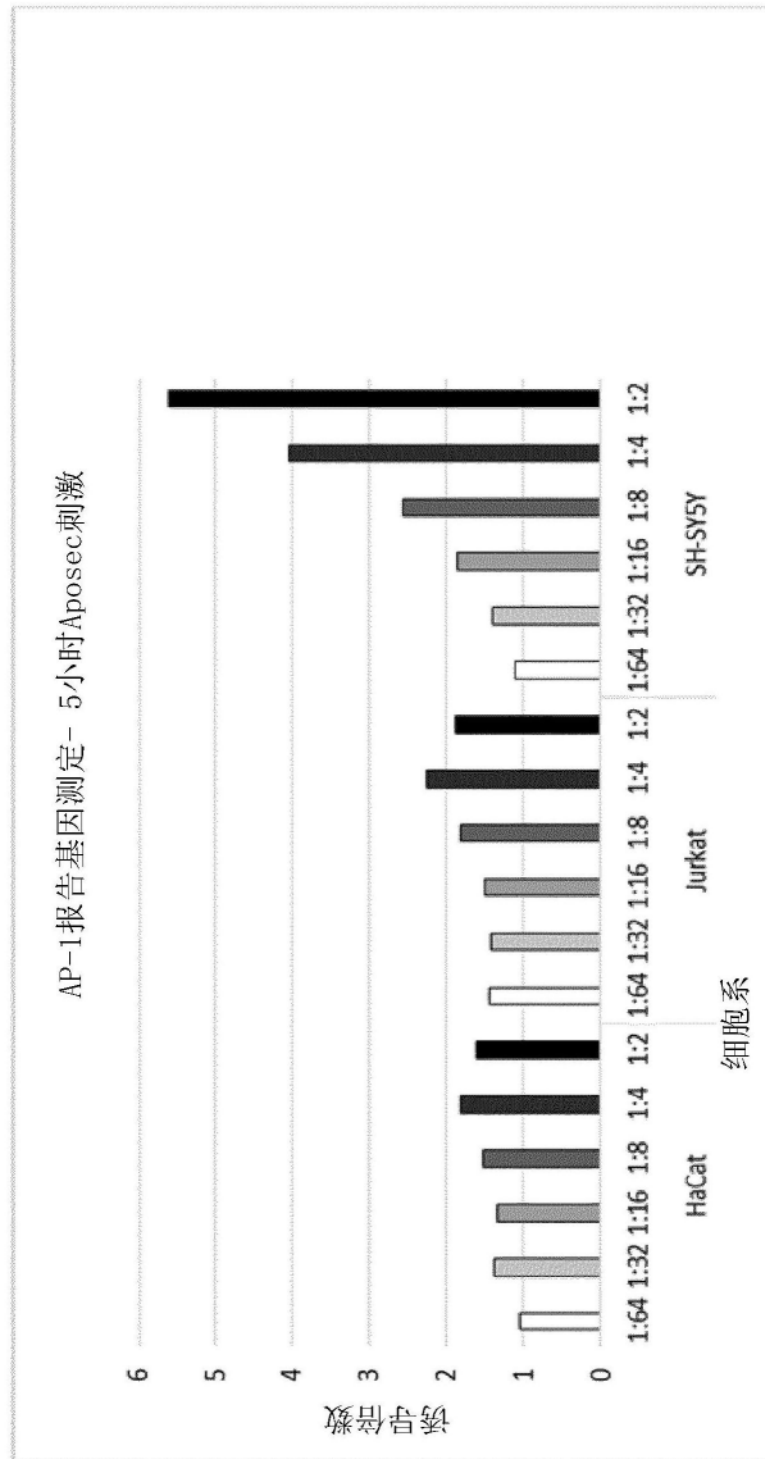
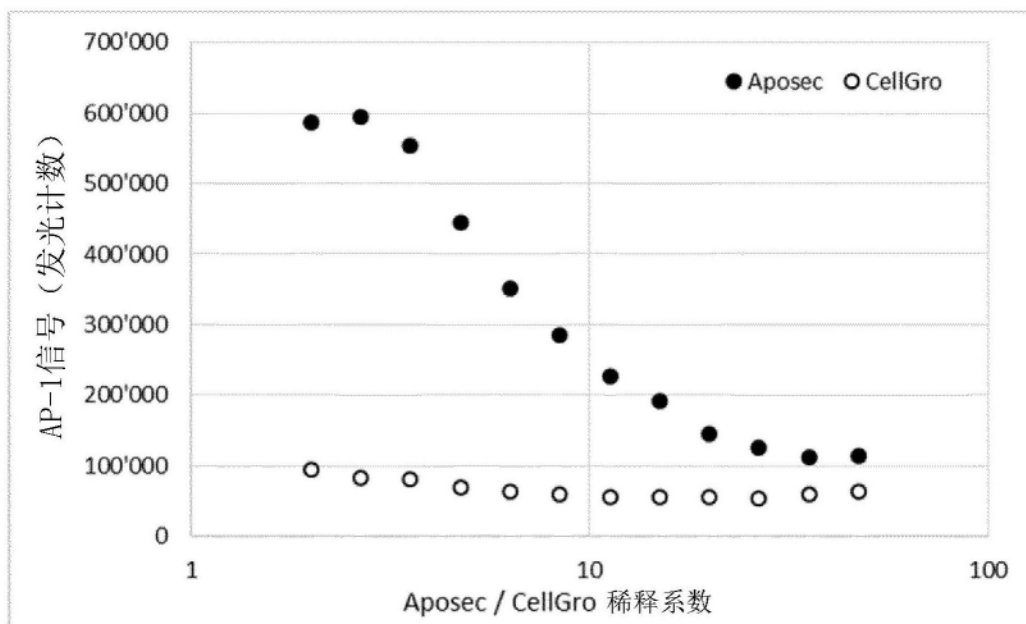


图6(续)

AP-1 SH-SY5Y细胞的4小时刺激



AP-1 SH-SY5Y细胞的过夜刺激

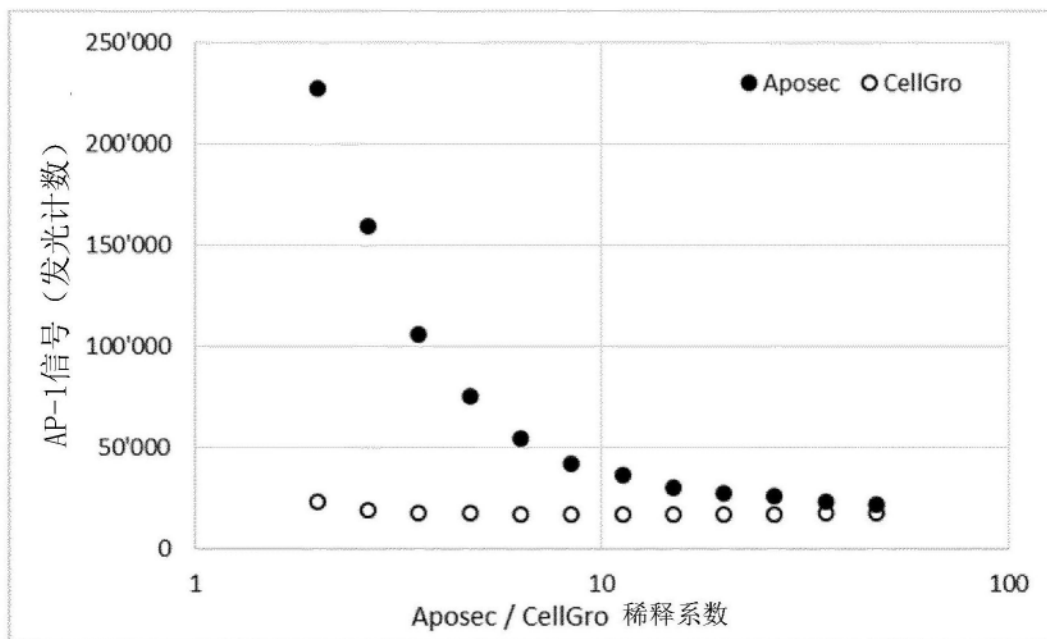
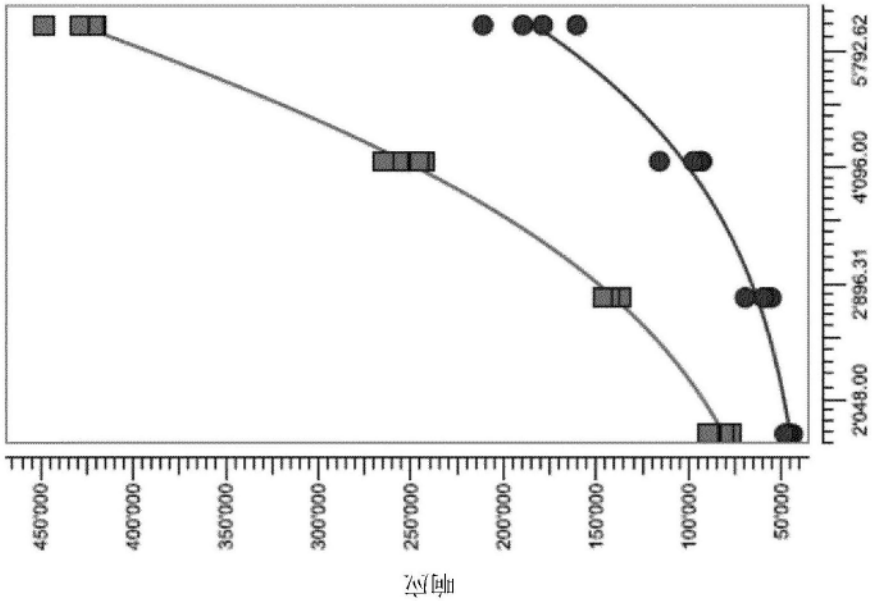


图7

50% Aposec

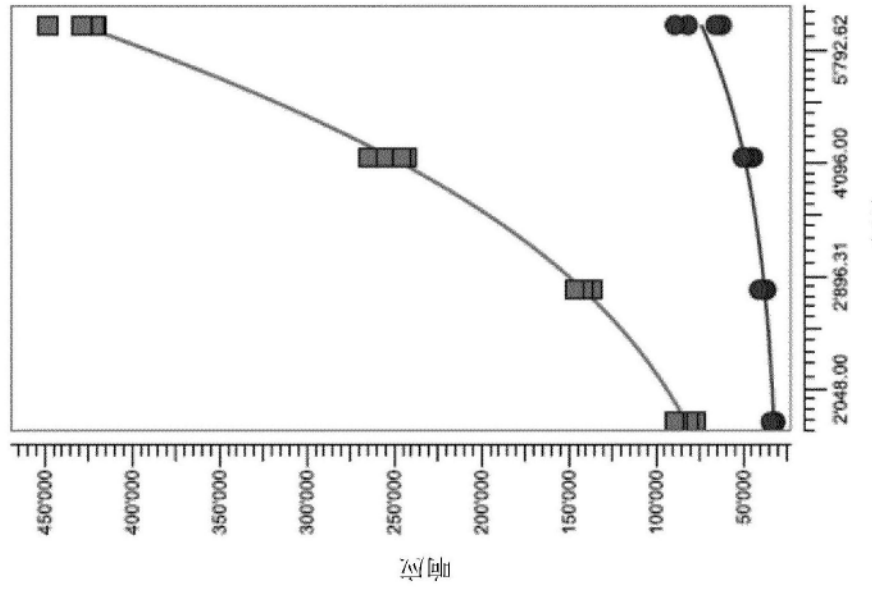
限制模型



53,3% 相对效力

25% Aposec

限制模型



27% 相对效力

图8

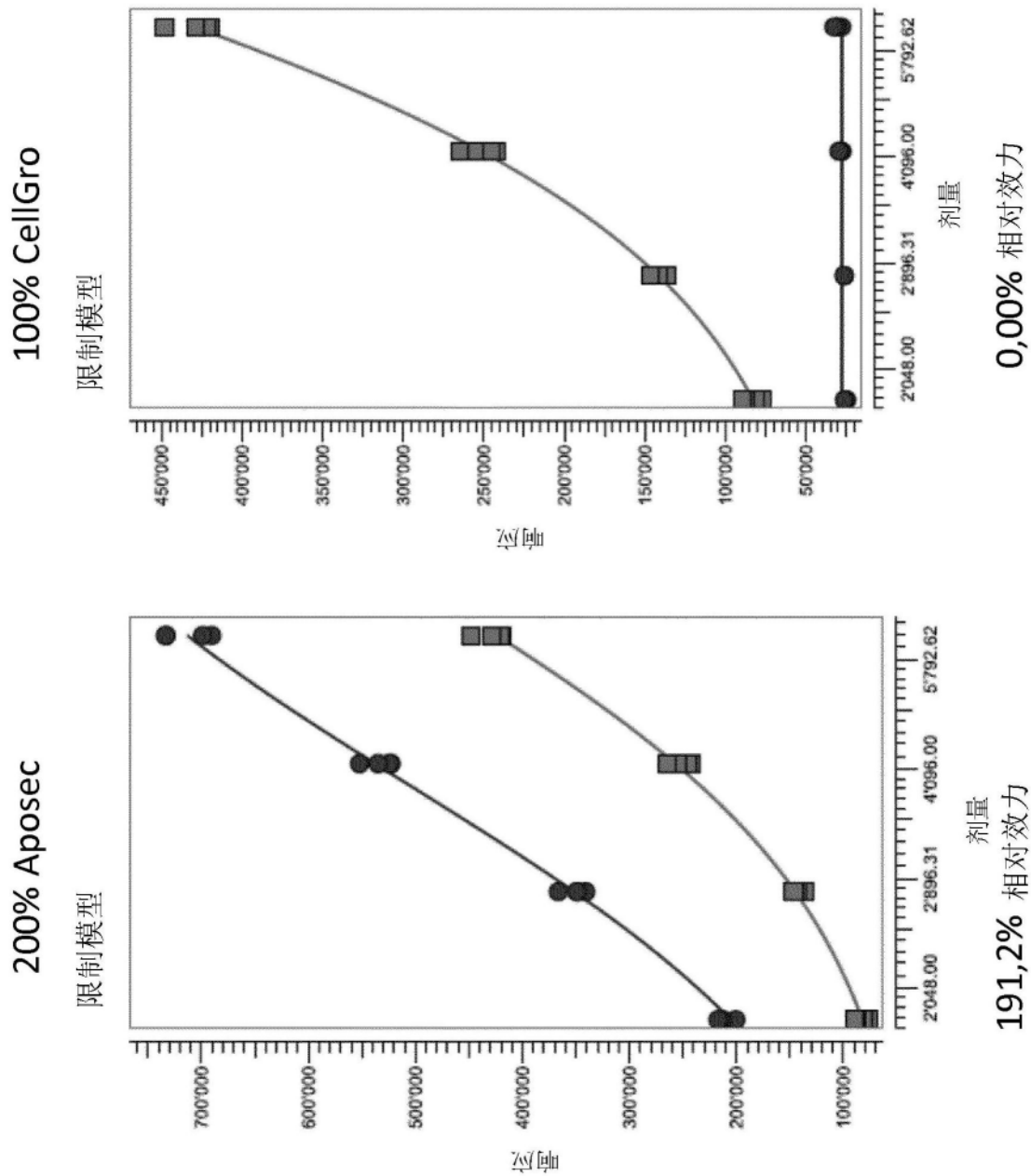


图8(续)

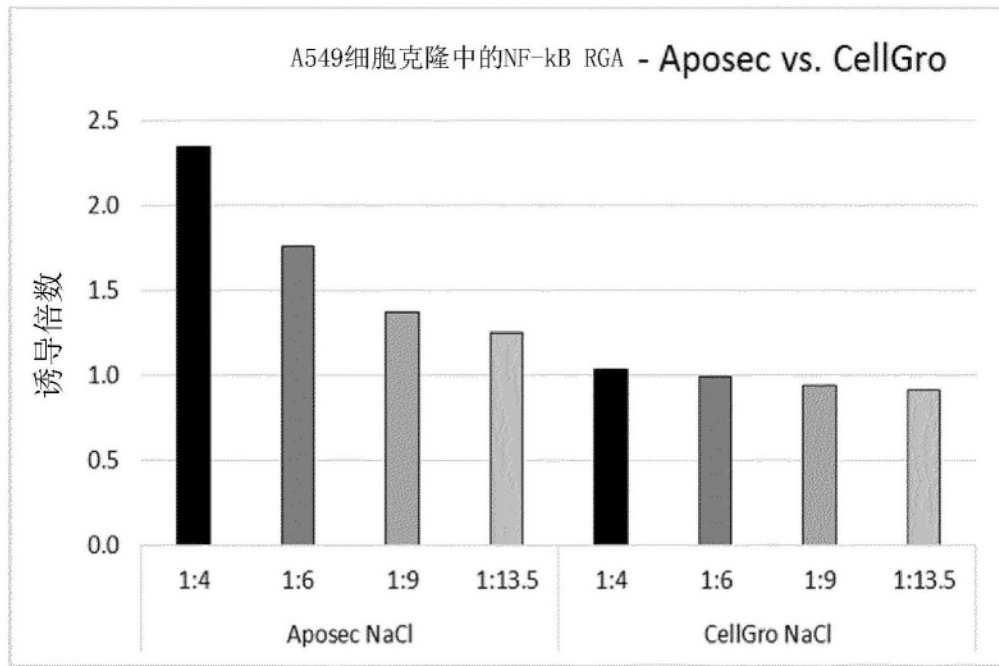


图9

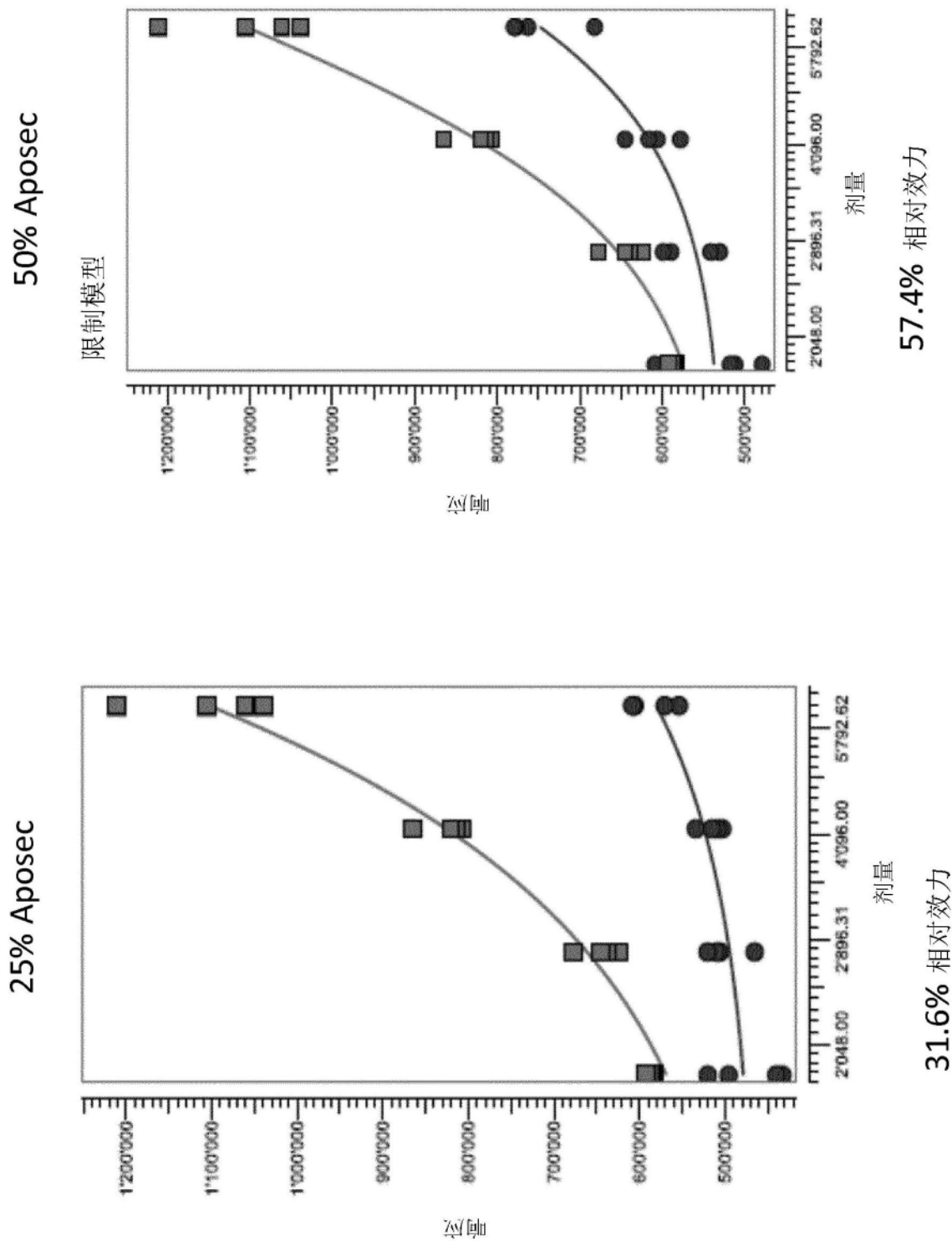


图10

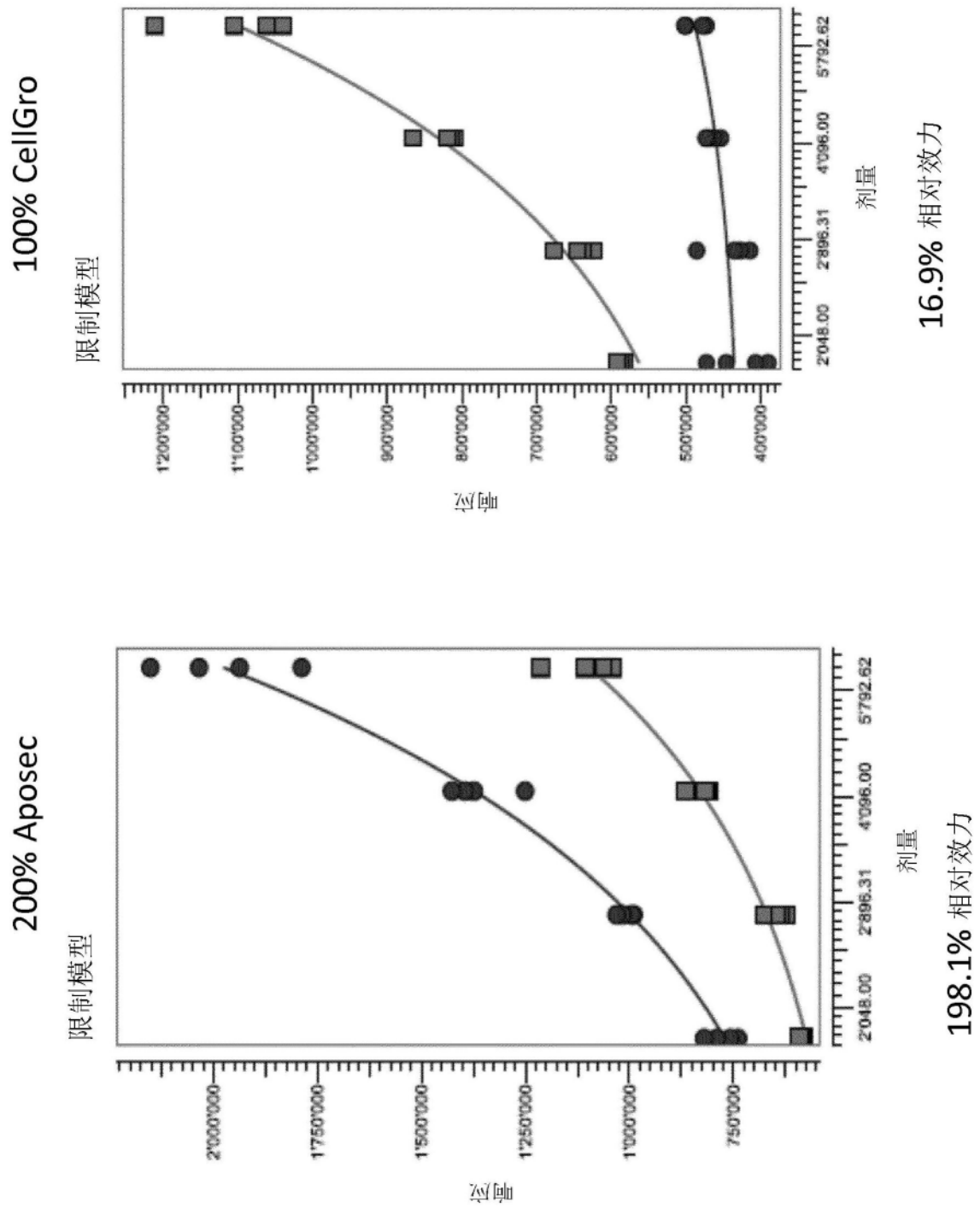


图10(续)

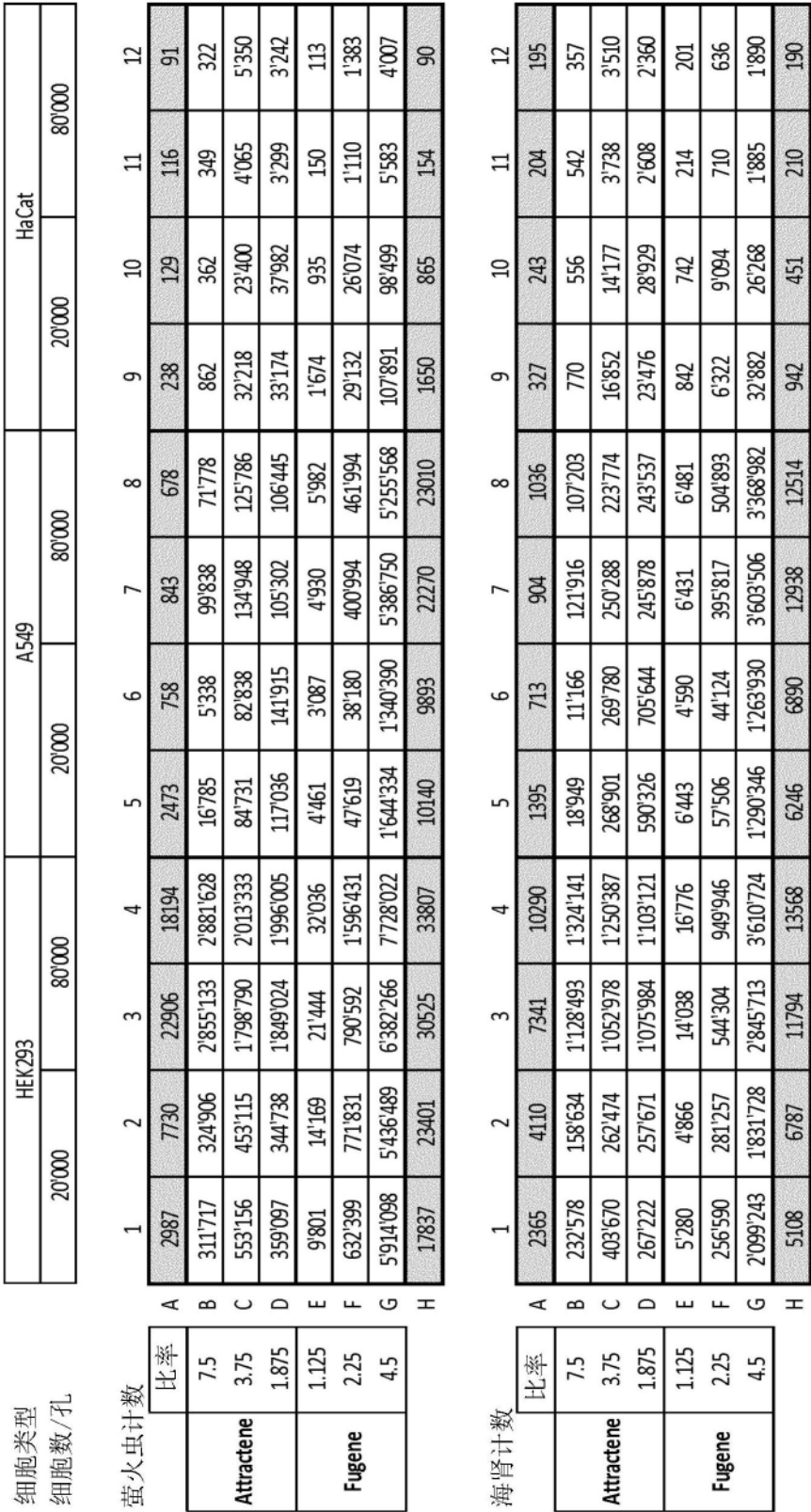


图11

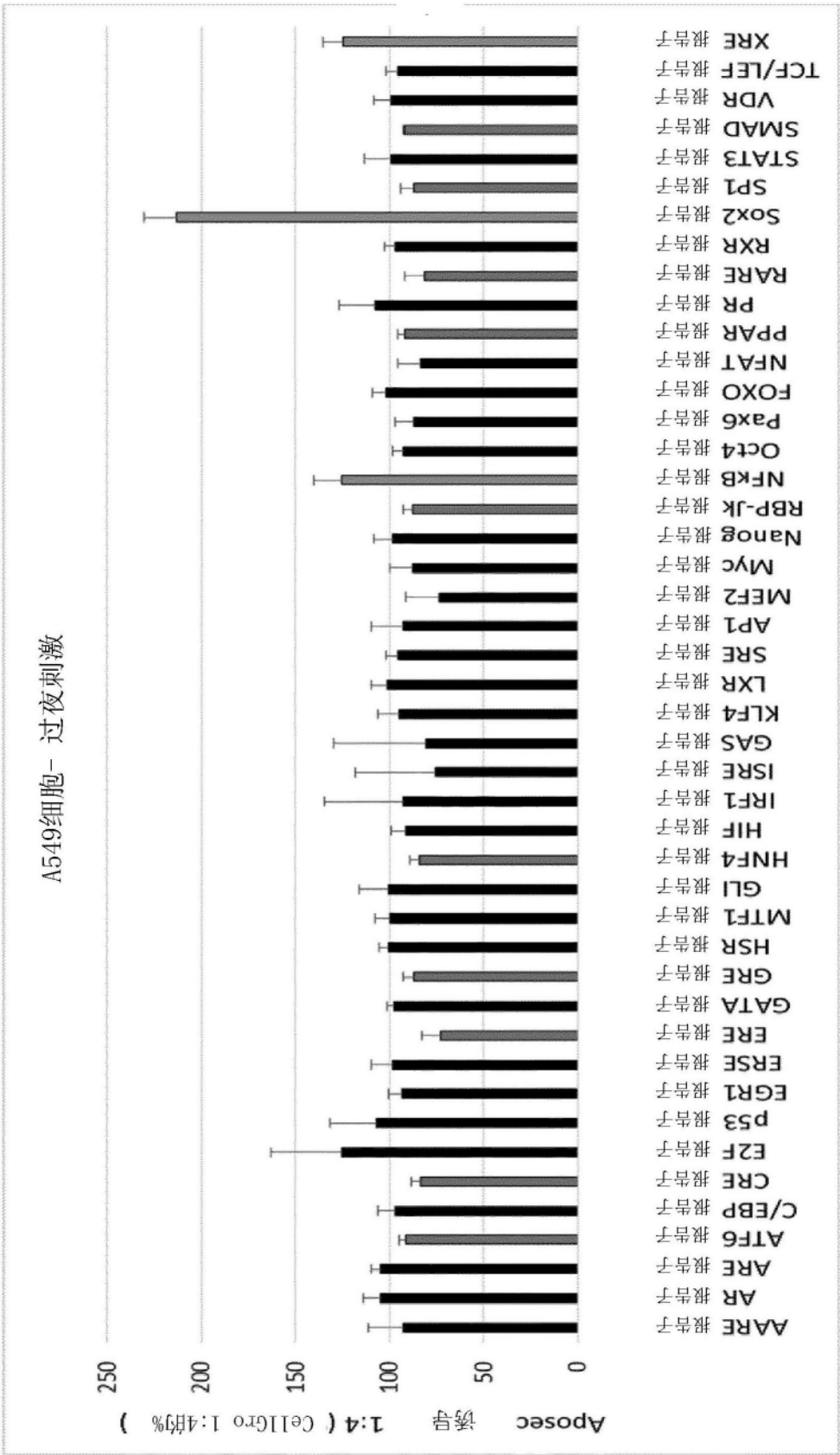


图12

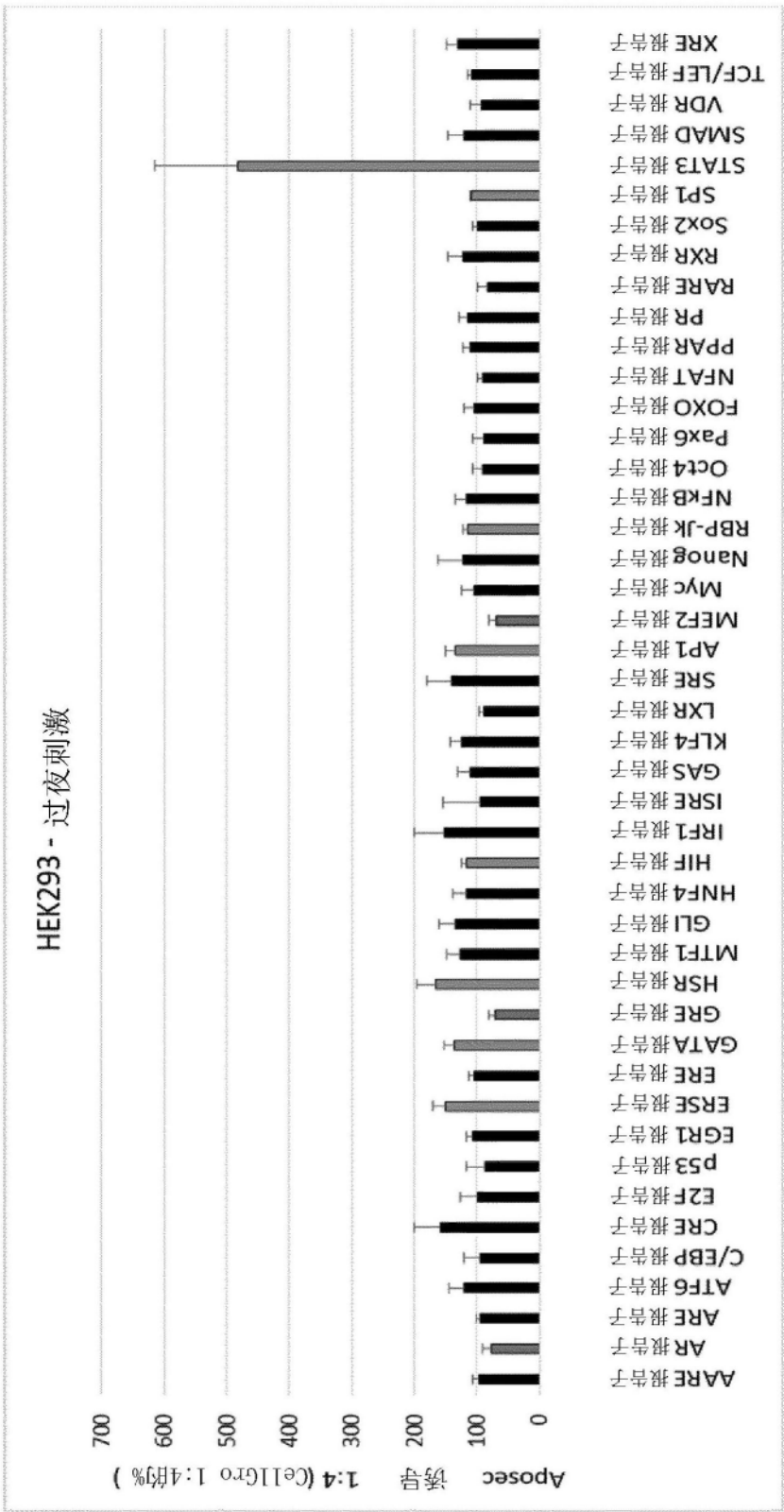


图12(续)

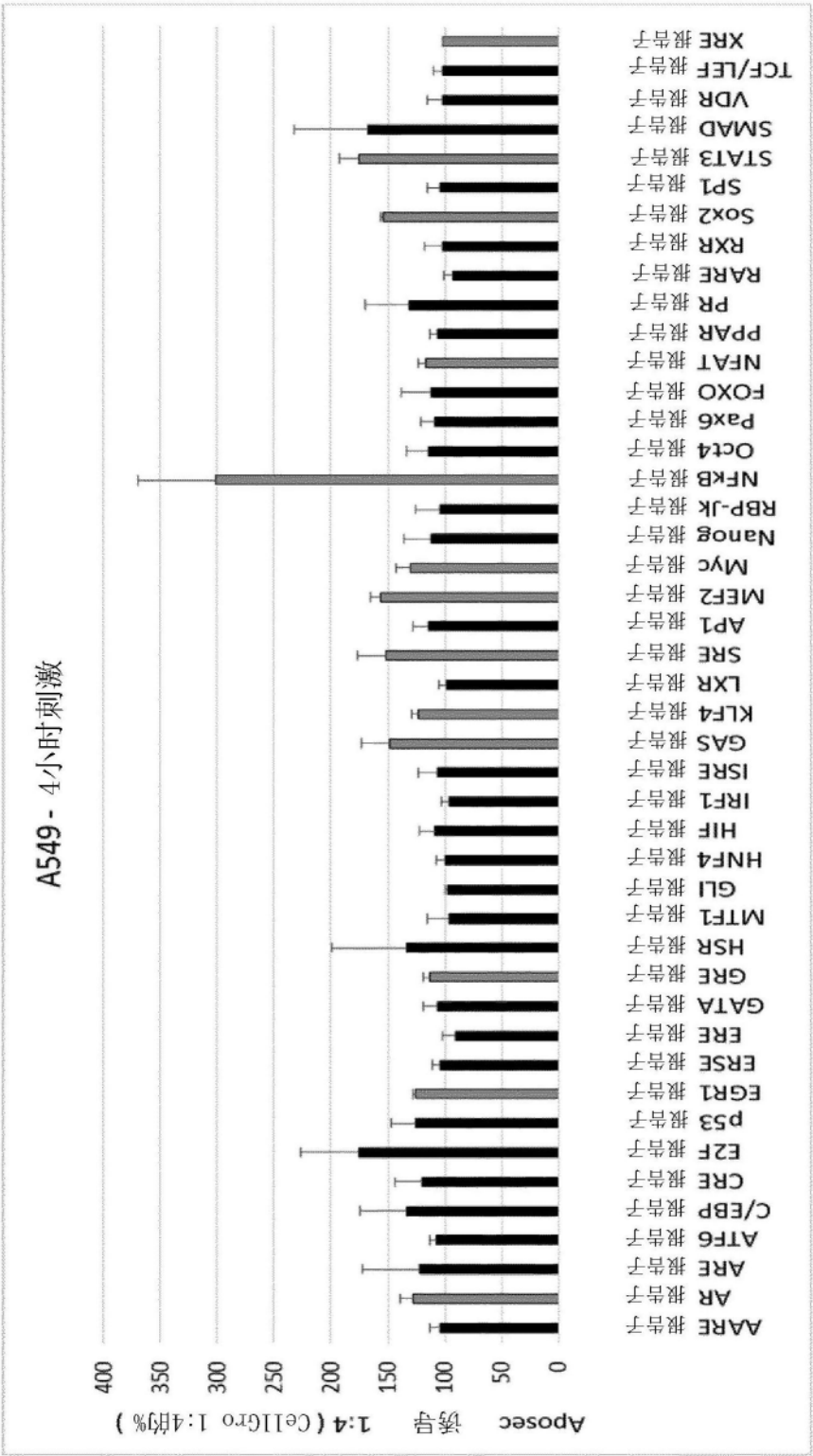


图13

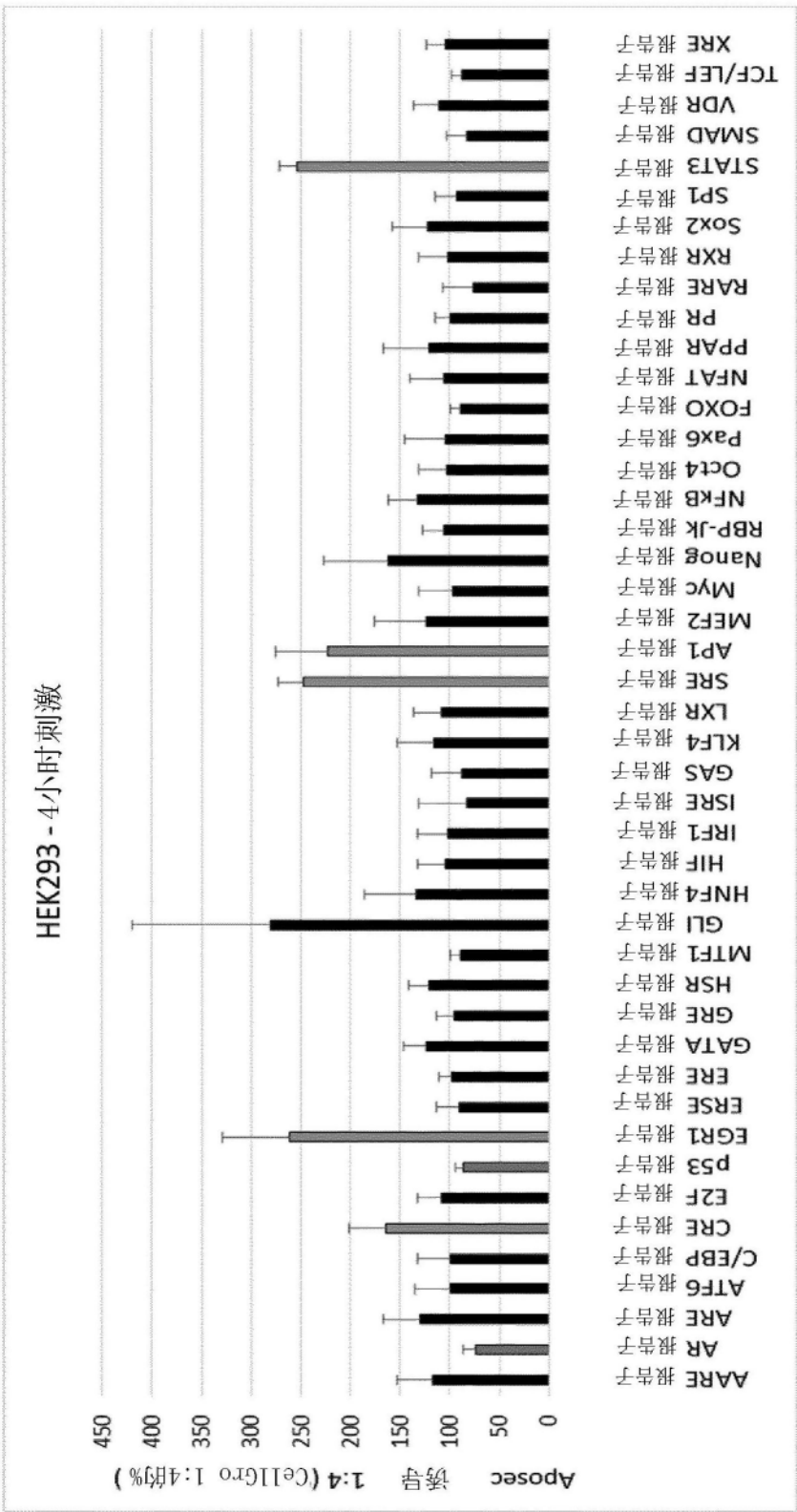


图13(续)