



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102171333 A

(43) 申请公布日 2011.08.31

(21) 申请号 200980139345.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.08.06

C12N 5/071 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 5/077 (2006.01)

0814443.8 2008.08.07 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.04.06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2009/001938 2009.08.06

(87) PCT申请的公布数据

W02010/015831 EN 2010.02.11

(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 R·Y·博迪 A·奈特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 权陆军 郭文洁

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 9 页

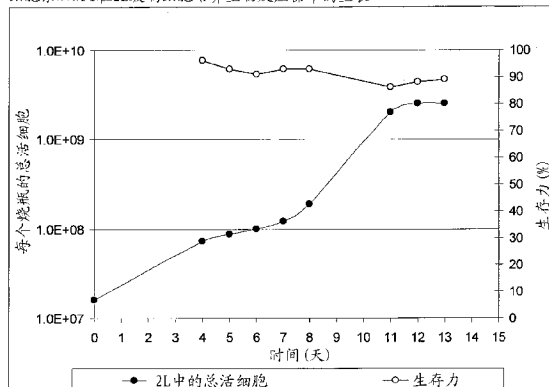
(54) 发明名称

培养细胞的方法

(57) 摘要

提供了用于保持了干细胞潜能的分化的人类细胞的培养的方法。所述方法包括培养锚定到微载体的保持了干细胞潜能的分化的人类细胞,所述微载体选自由明胶微载体和季铵衍生化的聚苯乙烯微载体构成的组。

细胞系AVDP1在2L玻璃细胞培养生物反应器中的生长



1. 一种用于保持了干细胞潜能的分化的人类细胞的培养的方法,其包括培养锚定到微载体的保持了干细胞潜能的分化的人类细胞,所述微载体选自由明胶微载体和季铵衍生化的聚苯乙烯微载体构成的组。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述细胞是成体细胞,优选的是间充质细胞。
3. 根据权利要求2的方法,其中所述细胞是真皮细胞,优选真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞或真皮乳头细胞。
4. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述培养方法包括细胞的培养、所述细胞的收获以及用于进一步培养的细胞对微载体的重附着。
5. 根据权利要求4的方法,其中在整个所述培养方法中采用明胶微载体。
6. 根据权利要求4的方法,其中作为起始或最终的微载体采用季铵衍生化的聚苯乙烯微载体。
7. 根据前述任一项权利要求的方法,其利用进料分批或连续细胞培养条件来操作。
8. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述培养容器用围绕共同的轴固定的两个或更多个叶轮搅动,至少一个叶轮位于所述培养容器中培养基的下三分之一内,至少一个叶轮位于所述容器中培养基的中间三分之一内,或所述容器中培养基的上三分之一内。
9. 根据权利要求8的方法,其中每个叶轮包含相对于所述叶轮轴的轴线成角度的两个、三个或四个叶片。
10. 根据权利要求8或9的方法,其中所述叶轮具有至少0.25:1,例如,在0.3:1到0.7:1的范围内的直径:容器直径比例。

培养细胞的方法

[0001] 本发明涉及培养保持了干细胞潜能的分化的人类细胞的方法。

[0002] 干细胞和具有干细胞潜能的细胞在许多治疗领域越来越被关注。这样的细胞一般通过培养锚定在固相支持培养基上的细胞来产生。小鼠胚胎干细胞已经显示了在 Sigma SoloHill (纤连蛋白包被的聚苯乙烯) 和 Cytodex 3 (胶原蛋白) 微载体上在搅动的悬浮培养物中生长。(Fok EY et al, Stem Cells 2005, 23(9): 1333-42)。猪的骨髓衍生的原代间质干细胞已经显示了在 Cytodex 1、2 和 3 型(胶原蛋白)微载体上生长(Frauschuh S et al, Biotechnol Prog. 2007, 23(1): 187-193)。猫的胚胎肺成纤维细胞已经显示在波浪和搅动罐生物反应器中在 Cytodex 1 上生长(Hundt B et al, Vaccine 2007, 25(10): 3987-95)。小鼠胚胎干细胞也显示了在旋转烧瓶中在 Cytodex 3 微载体上生长(Abranches E et al, Biotechnol Bioeng. 2007, 96(6): 1211-21)。在产生本发明的研究期间, 发现的是, 这样的微载体受到许多缺陷的困扰, 使得它们不适合于保持了干细胞潜能的分化的人类细胞的可靠的和可规模化的生产。

[0003] US2007/0264713 公开了, 可以采用许多不同的微载体来生长许多不同类型的干细胞。在人类胚胎干细胞的培养中举例了明胶微载体以及胶原蛋白微载体。结果显示了, 胶原蛋白微载体得到了为明胶微载体三倍大的细胞增加。

[0004] 根据本发明的一个方面, 提供了培养保持了干细胞潜能的分化的人类细胞的方法, 其包括培养锚定在微载体上的保持了干细胞潜能的分化的人类细胞, 所述微载体选自明胶微载体和季铵衍生化的聚苯乙烯微载体构成的组。

[0005] 所述细胞通过本领域已知的方法锚定在所述微载体上, 例如, 包括通过附着到微载体的表面, 通过附着到大孔微载体的内部结构, 或通过在大孔微载体的内部结构之内的物理俘获。

[0006] 可以在本发明的方法中采用的明胶微载体可以由明胶颗粒、交联的明胶颗粒或用作载体材料上的包被物的明胶组成, 所述载体材料例如聚苯乙烯或玻璃颗粒。明胶可以是天然来源的, 或是重组地或合成地生产的。明胶或胶原蛋白可以通过赖氨酸的胺基基团、通过谷氨酸或天冬氨酸的羧基基团、或其组合来交联。明胶微载体一般是近似球形的, 但可以具有其他形状, 可以是多孔的或实心的。多孔的和实心型的微载体都是商业上可获得的。微载体可以具有带有凹痕的密实表面以便于细胞的锚定。例如, 大孔明胶微载体可从 PerCell Biolytica AB, Sweden 以商品名称 Cultispher, 特别是 Cultispher G 和 Cultispher S 来获得。明胶大孔微载体一般包含基于高度交联的明胶基质的颗粒, 常常具有 10-500 μm 的颗粒大小, 形成包围了一般具有 1-50 μm 直径的大量空腔的聚合物基质。通常选择微载体的颗粒大小范围以足够大来容纳干细胞的锚定, 而又足够小以形成具有适用于细胞培养物生物反应器的性质的悬浮物, 所述生物反应器例如摇瓶、滚瓶、旋转烧瓶、波浪 (wave) 生物反应器和搅拌罐生物反应器系统。

[0007] 可以在本发明中采用的季铵衍生化的聚苯乙烯微载体包含附着于聚苯乙烯的氨基基团, 所述氨基基团被季铵化, 优选的通过三个烷基基团, 特别是三个 C_{1-4} 烷基基团。这样的微载体的实例包括 HyQSphere™ HLX11-170, 可从 Hyclone/ThermoFisher Scientific

Inc. 商业上获得。

[0008] 明胶微载体特别适合于一些应用,其中细胞在不同批次的微载体上培养,其中细胞在第一批次的微载体上培养,然后扩大培养规模,收获细胞并且然后任选地在保存一段时间之后,例如,在冷冻器中保存后,再次附着到微载体,一般是更大批量的微载体上,或总和起来更大数量微载体的多个培养器上。这样的培养-收获和再附着可以按照生产期望数量的细胞所需的频繁度来重复。明胶微载体可以用作起始的微载体或用作随后的微载体,或可选择的微载体,特别是季铵衍生化的聚苯乙烯微载体,可以被采用作为起始微载体,随后收获后的再附着为到明胶微载体。

[0009] 季铵衍生化的聚苯乙烯微载体适合于一些应用,其中细胞接种到微载体上和在该微载体上培养直到收获,没有分离和再附着,或作为起始微载体,带有随后的收获和对明胶微载体的再附着。另外,季铵衍生化的聚苯乙烯微载体可以被采用作为最终的微载体,其他微载体被采用用于较早的培养步骤。

[0010] 可以通过本发明的方法生产的保持了干细胞潜能的分化的人类细胞是本领域已知的,优选地是成体细胞,特别是间充质细胞,最优选地是真皮细胞,包括 adipocyte 细胞。特别优选的细胞包括真皮鞘细胞、真皮成纤维细胞和真皮乳头细胞,特别是 EP-A-0980270 中描述的真皮鞘细胞,US5851831 中描述的真皮乳头细胞,最特别地是共同待决英国专利申请 no. 0913469.3 中描述的真皮纤维形成细胞(dermal fibroblast cells)。

[0011] 根据本发明方法可以在本领域已知的容器中进行,包括组织培养烧瓶、摇瓶、旋转烧瓶、搅拌罐生物反应器、基于可弃袋的生物反应器系统,例如波浪细胞培养物系统,和膨胀床生物反应器系统。大规模生产的选项还包括滚瓶、空心纤维系统、单片、多片或堆叠的平板培养系统和单元立方体。

[0012] 本发明的方法通常通过在搅拌罐培养容器系统中培养细胞来进行。一般地,细胞、微载体和营养培养基被提供给培养容器,并在有助于细胞增殖的条件下保存。如果期望,其他的培养培养基可以添加到培养容器系统,直到培养最后终止和收获细胞。本发明的方法通过在有助于细胞生长同时保持细胞的干细胞潜能的条件下培养细胞来进行。培养物条件,例如,温度、pH 值、溶解氧(包括低氧条件)等等,是已知对特定细胞最佳的那些条件,对于技术人员是显而易见的(参见,例如, *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, B. D., eds., Oxford University Press, New York (1992))。一般地,细胞在约中性 pH 的 pH 值下,通常在 6.5 到 7.5 的范围内,以及在约 30 到 38°C 的范围内的温度下培养。

[0013] 在本发明的某些方面中,细胞在用搅拌器搅动的容器中培养,所述搅拌器包含位于培养容器内不同深度的两个或更多个叶轮,通常为旋转搅拌子(stirrer)。优选的,所述叶轮在共同的轴周围固定。在采用两个叶轮时,一个叶轮优选地位于接近培养容器中培养基的底部,例如,在容器的下三分之一处内,第二叶轮位于接近容器中培养基的中部,例如,在中间三分之一内,或接近容器中培养基的顶部,例如在上三分之一处内。在许多实施方式中,每个叶轮包含两个、三个或四个叶片,其相对叶轮轴的轴线成角度,例如螺旋桨型叶片。优选的,其中旋转的搅拌子被用作叶轮,选择搅拌子以使搅拌子直径:容器直径比为至少 0.25:1,例如,在 0.3:1 到 0.7:1 的范围内。

[0014] 在本发明的其他方面中,细胞在用搅拌器搅动的容器中培养,所述搅拌器包含至

少一个螺旋叶片,优选的如国际专利申请 W000/66258 中描述的螺旋搅拌子。

[0015] 在本发明的一个实施方式中,所述方法在一个培养容器中运行,细胞直接接种到含有微载体的培养容器内,增殖细胞,直到达到期望的细胞密度和收获细胞。

[0016] 在本发明的另一个实施方式中,所述方法在至少两个不同的细胞培养物容器中运行。培养可以在一个或更多个种子扩增容器内发生,随后在细胞生产容器中培养,从其中可以收获细胞产物。多个种子扩增方法可以在大小递增的培养容器内进行,直到获得用于最终生产性细胞培养容器接种的足够数量的细胞。种子扩增培养容器可以是相同类型的(例如,组织培养烧瓶、摇瓶、滚瓶、旋转烧瓶、波浪生物反应器、搅拌罐生物反应器),但是随着种子扩增进展而大小递增,或可以是大小递增的培养系统的混合,随着种子培养物被扩增准备用于转移到生产生物反应器(例如,组织培养烧瓶到摇瓶到旋转烧瓶到搅拌罐生物反应器系统,等等)。

[0017] 根据本发明的优选的方面,设计进料分批或连续细胞培养条件来增强细胞在培养物中的生长。培养条件,例如,温度、pH 值、溶解氧(dO_2)等等,是特定细胞使用的那些,对于普通技术人员将是显而易见的。一般地,利用酸(例如, CO_2) 或碱(例如, Na_2CO_3 或 $NaOH$) 将 pH 值调整到约 6.5 和 7.5 之间的水平。培养细胞的适合的温度范围常常在约 30°C 到 38°C 之间,适合的 dO_2 常常是 5-90% 的空气饱和度之间。

[0018] 细胞可以利用本领域已知的方法从明胶微载体上释放,其限制了在细胞回收方法期间对细胞收获物的潜在损伤。细胞通常借助于蛋白裂解酶,例如,胶原酶从明胶微载体上释放。在细胞生长的终止之后,在希望时,使用这样的蛋白裂解酶从载体上释放细胞。

[0019] 通过容许微载体沉积到细胞培养容器底部,之后除去选定百分比的细胞培养生长培养基体积,添加相应百分比的新鲜细胞培养生长培养基到细胞培养容器,可以进行培养基交换。微载体然后重悬浮在培养基中,一般地重复这种培养基去除和替换的方法。

[0020] 各种术语被用于描述培养中的细胞。“细胞培养物”一般是指取自活的有机体、并且在控制的条件下生长的细胞。原代细胞培养物是在第一次传代培养之前直接取自有机体的细胞、组织或器官的培养物。当细胞置于在一定条件下的生长培养基中时,细胞在培养中扩增,所述条件促进生长和 / 或分裂,产生更大的细胞群体。细胞系是通过原代细胞培养物的一次或更多次传代培养形成的细胞的群体。每一轮传代培养被称为一次传代。本领域的技术人员理解的是,在传代期间可以有多个群体倍增。

[0021] 适用于本发明的方法的培养培养基是本领域已知的,包括,补充有血清的基础培养基、无血清培养基、无蛋白质的培养基或化学成分确知的生长培养基。可以使用“条件”培养基。条件培养基是一种培养基,其中培养了特定的细胞或细胞群体,然后被去除。当这些细胞被培养在培养基中时,它们分泌可为其他细胞提供支持的细胞因子。含有细胞因子的培养基是条件培养基。用于条件化培养基的细胞可以是与随后培养的细胞相同类型的,不同的细胞类型,或两者的组合。

[0022] 通过以下实施例非限制性地说明本发明。

[0023] 细胞系的建立

基本上如 EP980270 中描述的分离毛囊间充质细胞,具有以下描述的修改。人类皮肤组织样品用含有 1 $\mu g/ml$ 两性霉素和 10 $\mu g/ml$ 庆大霉素的最低必需培养基(MEM, Sigma)洗涤 3 次。在解剖显微镜下,毛发生长初期(anagen)“末端球”利用精细手术剪解剖,置入

小体积(一般 100–200 μ l)的 MEM 中。球的末端用针头翻转,解剖乳突,提取鞘。乳突和鞘然后单独地转移到 4 孔细胞培养物平板(Nunc)。在补充有 20% 胎儿牛血清、0.5 μ g/ml 两性霉素和 5 μ g/ml 庆大霉素的 1 ml MEM 中每个反应孔转移十个乳突和 10 个鞘。四孔细胞培养物平板在无菌的和标准条件(37°C, 5% 二氧化碳)下孵育。在 10 天的细胞生长之后,从每个反应孔分离细胞(利用本领域良好地建立的标准方法),单独地转移到 35 mm 直径细胞培养物平皿(Nunc)中。当细胞生长汇合时,真皮鞘(以下称为“AVDS”)和真皮乳头(以下称为“AVDP”)细胞系如早先描述的分离,转移到 T25 细胞培养烧瓶(Nunc)用于在如上所述的条件下进一步扩增。

[0024] AVDS 和 AVDP 细胞系从许多不同的人类组织样品建立。在以下实施例中描述的这些细胞系的概述在下文的表 1 中提供。

[0025] 真皮成纤维细胞系的建立

真皮成纤维细胞(以下称为“AVDF”)细胞系从如上所述相同的人类皮肤组织样品建立。从脂肪层分离真皮,然后在显微镜下解剖成大约 2–3 mm² 表面积的碎片。解剖的组织转移到 T25 细胞培养烧瓶(Nunc),所述烧瓶含有如对真皮鞘和真皮乳头细胞系描述的补充的 MEM。含有真皮成纤维细胞(AVDF)细胞系的 T25 细胞培养烧瓶在无菌的和标准条件(如早先描述的)下孵育。真皮成纤维细胞(AVDF)细胞系然后使用在培养物达到汇合时相同的条件来进一步扩增。

[0026] AVDF 细胞系从许多不同的人类组织样品建立。在以下实施例中描述的这些细胞系的概述在下文的表 1 中提供。

[0027] 表 1 :细胞系的概述

细胞系名称	类型
AVDS1	真皮鞘
AVDP1	真皮乳头
AVDS2	真皮鞘
AVDS3	真皮鞘
AVDS4	真皮鞘
AVDS5	真皮鞘
AVDF1	真皮成纤维细胞
AVDF2	真皮成纤维细胞
AVDS6	真皮鞘
AVDF3	真皮成纤维细胞

比较实施例 1

Cytodex I 和 Cytodex III 微载体(Amersham Biosciences)利用厂家描述的标准的制作和杀菌条件制备。Cytodex I 和 III 微载体然后以 5cm²/ml 的浓度使用,用 2.2×10^5 细胞每 125ml 细胞培养摇瓶(Corning)的细胞浓度,在补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)的总体积 15ml 的 MEM(Sigma M4655) 中用 AVDS2 细胞系接种。细胞培养烧瓶置于(天数 = “0”)轨道摇动器上,在 37°C 70 rpm 的搅动下孵育。在第 3 天置换每个烧瓶中的补充有 10% FBS 的 MEM 生长培养基。利用本领域良好建立的标准细胞分离方法在 5 天后收获细胞,利用本领域中良好建立的锥石蓝染色和细胞计数测定 AVDS 活细胞的数目。令人惊讶地,从使用 Cytodex I 或 Cytodex III 微载体的培养物中没有回收到活的 AVDS 细胞。

[0028] Cytodex I 和 Cytodex III 微载体是在产业上用于大范围哺乳动物细胞类型的培养成功地广泛使用的。Cytodex I 和 Cytodex III 都由葡聚糖组成。Cytodex I 由具有阳

离子 DEAE 基团的葡聚糖基质组成,而 Cytodex III 由用变性的猪胶原蛋白包被的葡聚糖基质组成。考虑到 Cytodex I 和 Cytodex III 之间表面化学的差异和它们在产业中的广泛使用,例如,利用这些微载体来生长胚胎干细胞、骨髓衍生的间质干细胞和肺成纤维细胞,本领域技术人员将预计这些微载体将也能够支持真皮鞘细胞(AVDS)的生长。

[0029] 比较实施例 2

2D MicroHex 微载体(Nunc)被用于培养细胞系 AVDS1、AVDS2 和 AVDP1。利用厂家建议的标准方法制备和消毒微载体。2D MicroHex 微载体(Nunc)由用于静态细胞培养(实施例 1 和 2)的相同的材料/表面化学组成。使用 $1.0 \text{ cm}^2/\text{ml}$ 、 $2.0 \text{ cm}^2/\text{ml}$ 和 $4.4 \text{ cm}^2/\text{ml}$ 的微载体浓度,每个 250ml 细胞培养摇瓶(Corning) 4×10^5 个 AVDS1、AVDS2、AVDS3 和 AVDP1 细胞接种到 40 ml 总体积的、补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)的 MEM (Sigma M4655)中。细胞培养烧瓶置于轨道摇动器中, 37°C 在 70 rpm 下搅动。在 3 到 10 天后收获细胞培养烧瓶,利用本领域良好建立的方法测定总活细胞浓度。获得的结果在表 2 中示出。

[0030] 考虑到在静态培养中这些细胞附着在烧瓶的表面并且容易地增殖,没有预计到间充质真皮干细胞系 AVDS1、AVDS2 和 AVDP1 实现的不良生长,完全令人惊讶。2D MicroHex 微载体由静态细胞培养烧瓶中使用的相同的材料/表面化学组成。

[0031] 表 2:在 MicroHex 微载体上细胞系 AVDS1、AVDS2、AVDS3 和 AVDP1 的生长。

细胞系	MicroHex 浓度 (cm^2/ml)	培养的时间 (天)	收获的细胞数量	收获物生存力 (%活细胞)
AVDS1	4.4	7	3.9×10^5	79
AVDP1	4.4	6	4.5×10^5	63
AVDS2	4.4	6	4.4×10^5	48
AVDS2	2.0	10	3.2×10^5	72
AVDS2	1.0	6	4.1×10^5	53
AVDS3	2.0	3	5.0×10^5	76

[0032] 实施例 3

利用每个厂家建议的标准方法制备和消毒以下微载体。制备的微载体是:FACT 和 Pronectin F (Sigma, SoloHill) CGEN 102-L、HLX11-170、Pro-F 102-L、FACT 102-L、P102-L 和 P plus 102-L (Thermo Fisher)。FACT 和 Pronectin F 在 5 g/L 使用, CGEN 102-L、HLX11-170、Pro-F 102-L、FACT 102-L、P102-L 和 P plus 102-L 在 2.5g/L 使用。摇瓶用补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)的 40ml MEM 细胞培养生长培养基 MEM (Sigma M4655)中每个 250ml 烧瓶 4×10^5 个 AVDS2 细胞来接种。烧瓶置于 37°C 和 70rpm 的轨道摇动孵化器中。烧瓶在 6 到 7 天之后收获,如早先描述的测定活细胞浓度。结果在表 3 中示出。

[0033] 表 3:在各种微载体上细胞系 AVDS1、AVDS2 和 AVDS3 的生长。

细胞系	微载体类型	微载体浓度 (g/L)	培养的时间 (天)	收获的细胞 数量	收获物 生存力 (%活细胞)
AVDS2	CGEN 102L	2.5	6	3.8×10^5	82
AVDS1	FACT	5.0	7	2.7×10^5	82
AVDS2	FACT	5.0	6	5.0×10^4	7
AVDS2	FACT 102L	2.5	6	3.3×10^5	55
AVDS2	HLX11-170	2.5	6	1.2×10^6	89
AVDS3	HLX11-170	2.5	7	1.5×10^6	93
AVDS2	P 102-L	2.5	6	3.0×10^4	18
AVDS2	P plus 102-L	2.5	6	1.1×10^5	46
AVDS2	ProF 102-L	2.5	6	4.4×10^5	57
AVDS1	Pronectin F	5.0	7	3.0×10^4	15
AVDS2	Pronectin F	5.0	6	3.0×10^4	26

[0034] 发现的是,仅 HLX11-170 微载体支持 AVDS2 间充质真皮干细胞的任何显著生长和增殖(高于原始接种的种子数量(4×10^5 个细胞)),这是令人惊讶的。HLX11-170 微载体由包被阳离子三甲基铵的聚苯乙烯组成。令人惊讶地不支持生长的其他微载体由具有阳离子电荷的 I 型猪胶原蛋白,未包被的聚苯乙烯塑料,或带表面电荷的塑料或包被有重组纤连蛋白或纤连蛋白的塑料组成。考虑到现有技术展现了大范围的细胞,例如胚胎干细胞系、骨髓衍生的间质干细胞系和肺成纤维细胞系将容易地在由胶原蛋白组成的微载体上生长,AVDS2 细胞的不良生长是特别令人惊讶的。

[0035] 实施例 4

在静态培养条件中生长的真皮鞘细胞 AVDS4 的八个 225cm^2 细胞培养烧瓶(Nunc)使用本领域充分描述的方法来进行分离和计数。 2.3×10^7 个 AVDS4 细胞被用于接种玻璃细胞培养生物反应器(Applikon),其含有总体积 1.0 L 的 MEM 细胞培养生长培养基(Sigma M4655),所述培养基补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)、0.2% Pluronic F-68 (Sigma P1300)和 5g/L HLX11-170 微载体(其如早先描述的制备和消毒)。生物反应器在 36.5°C 的温度、pH 7.0 (通过二氧化碳气体喷射和 / 或氢氧化钠的添加来人工控制)和 80 rpm 的叶轮速度下培养。在描述的条件下孵育 2 天之后,补充有 10% FBS 和 0.2% Pluronic F-68 的另外 1.0L MEM 细胞培养生长培养基无菌地添加到细胞培养生物反应器中。孵育在所描述的条件下继续进行另外五天。然后收获生物反应器,从生物反应器中回收 4.4×10^8 个 AVDS4 活细胞。结果展现了,HLX11-170 微载体可以用于在紧密控制的和可规模化条件下具有充分定义的特征的大量干细胞的可重复产生。

[0036] 实施例 5

从实施例 4 中描述的 HLX11-170 微载体生物反应器培养物回收的 AVDS4 细胞被用于利用本领域充分建立的方法制备冷冻细胞储备物。在液氮中储存 4 天之后,解冻 2 个安瓿瓶,在补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)的 30ml MEM 细胞培养生长培养基(Sigma M4655)中稀释。这种 AVDS4 细胞悬浮液然后用于接种 6 个细胞培养烧瓶,如表 4 所示。具有 HLX11-170 微

载体的摇瓶置于 37℃ 和 70 rpm 下的轨道摇动孵化器中, 225cm² 细胞培养烧瓶在没有微载体的静态培养条件(37℃, 5% 二氧化碳)下生长。烧瓶在 5 到 6 天之后收获, 如早先描述的测定活细胞浓度。

[0037] 表 4: 在从 HLX11-170 微载体收获后 AVDS4 细胞在静态和摇瓶培养中的生长。

烧瓶编号	烧瓶类型	微载体浓度	总体积 (ml)	接种的细胞数量	孵育的天数	收获的细胞数量	收获物生存力 (%)
1	225cm ² 细胞培养烧瓶 (Nunc): 静态培养	无微载体	45	5.0×10^5	5	2.1×10^6	93
2	225cm ² 细胞培养烧瓶 (Nunc): 静态培养	无微载体	45	7.5×10^5	5	3.1×10^6	94
3	225cm ² 细胞培养烧瓶 (Nunc): 静态培养	无微载体	45	7.5×10^5	5	3.2×10^6	93
4	250ml 细胞培养摇瓶 (Corning)	2.5g/L	50	5.0×10^5	6	8.4×10^4	88
5	250ml 细胞培养摇瓶 (Corning)	2.5g/L	50	7.5×10^5	6	2.5×10^5	84
6	250ml 细胞培养摇瓶 (Corning)	2.5g/L	50	1.0×10^6	6	4.1×10^5	87

[0038] 来自烧瓶 2 和 3(表 4)的 2.8×10^6 个 AVDS4 细胞然后用于接种在 1L 摇瓶 (Corning) 的具有 5 g/L HLX11-170 微载体、补充有 10% FBS 总体积 125ml 的 MEM 细胞培养生长培养基中。顶部空间用空气中的 5% CO₂ 来平衡, 烧瓶转移到 37℃、70 rpm 的轨道摇动孵化器上。在所描述的条件下的 2 天孵育之后, 进一步向烧瓶添加补充有 10% FBS 的 125 mL MEM 细胞培养生长培养基。孵育在所描述的条件继续另外 4 天。收获烧瓶, 如早先描述的测定活细胞浓度。没有回收到活细胞。

[0039] 令人惊讶地, HLX11-170 微载体(烧瓶 4、5 和 6)不支持 AVSD4 细胞的生长(其早先从 HLX11-170 微载体生物反应器培养物收获——实施例 5), 从烧瓶中回收到比原始接种的更少数量的细胞。从 HLX11-170 微载体生物反应器培养物(实施例 5)收获的 AVDS4 细胞在缺乏微载体的静态培养物中不生长和增殖(烧瓶 1、2、3)。

[0040] 更出乎意料的是发现, 从烧瓶 2 和 3 收获的 AVDS4 细胞未能在 HLX11-170 微载体上附着和增殖。

[0041] 数据表明, 虽然细胞可以利用 HLX11-170 微载体扩增(实施例 5), 如果它们是早先从 HLX11-170 微载体培养物收获的, 它们不能在 HLX11-170 微载体上附着和增殖。

[0042] 实施例 6

在静态培养物中生长的真皮鞘细胞 AVDS5 的一个 225cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)和两个 75cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)利用本领域充分建立的方法来分离。2.2×10⁶ 和 1.1×10⁶ 个 AVDS5 细胞然后分别用于接种 1L 细胞培养摇瓶(Nunc)和 500 ml 细胞培养摇瓶(Nunc)。细胞培养烧瓶分别在 1L 和 500 ml 摇瓶中总体积 200 ml 和 100 ml 补充有 10% FBS 的 MEM 细胞培养生长培养基中含有 1 g/L CultiSpher S 微载体(如早先描述的制备的)。顶部空间用空气中的 5% CO₂ 来平衡,烧瓶转移到 37℃、40 rpm 的轨道摇动孵化器上。在描述的条件 下 7 天孵育之后,收获烧瓶的内容物,从微载体上分离细胞。9.1×10⁶ 个 AVDS5 细胞被用于 接种 2L 玻璃细胞培养生物反应器(Applikon)中总体积 500 ml 的补充有 10% FBS + 0.2% pluronic F-68 和 2g/L CultiSpher S 微载体的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 36.5℃、pH 7.0 (如实施例 6 中描述的来维持)和 50 rpm 的搅拌器速度下培养。在描述的 条件下的 3 天孵育之后,如上所述的 500 ml 细胞培养生长培养基添加到生物反应器,搅拌 器速度提高到 60 rpm。在总共 7 天的孵育之后,从生物反应器中取出微载体,从微载体上分 离细胞。收获了 1.3×10⁷ 个细胞,生存力 83%。

[0043] 实施例 7

在静态培养中生长的真皮乳头细胞 AVDP1 的三个 225cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)进行分 离。2.0×10⁶ 个 AVDP1 细胞用于接种在总体积 250ml 补充有 10% FBS 的 MEM 细胞培养生长 培养基中含有 1.5g/L CultiSpher S 微载体的两个 1.5L 细胞培养旋转烧瓶的每一个。顶 部空间用空气中的 5% CO₂ 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37℃),利用磁性 搅拌器底座在 30 rpm 搅动。在描述的条件 下 4 天孵育之后,125 ml 消耗的细胞培养生长 培养基从每个烧瓶中除去,用如上所述的新鲜的细胞培养生长培养基替换。在描述的条件 下 6 天的孵育之后,从微载体分离 AVDP1 细胞。1.6×10⁷ 个细胞用于接种 2L 玻璃细胞培 养生物反应器(Applikon)中总体积 2L 的补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L CultiSpher S 的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 37℃、pH 7.10 (如实施例 6 中 描述的来控制)、溶解氧张力 20% (空气饱和度)和 50 rpm 的搅拌器速度下培养。溶解氧水 平利用 CO₂ 和 N₂ 喷射来维持。在描述的条件 下 4 和 8 天孵育之后,1L 的消耗的培养基从生 物反应器中除去,用 1L 新鲜培养基(如上所述)来替换。在 4 天孵育之后,搅拌器速度提高 到 70rpm,在第 11 天孵育时,搅拌器速度提高到 90 rpm。从生物反应器中周期性地取出样 品,如早先描述的分离细胞和测定活细胞的数量。生存力和细胞数量在附图 1 中示出。达 到了 2.9×10⁹ 个 AVDP1 细胞的显著高峰值活细胞密度。

[0044] 实施例 5、6 和 7 的结果展现了,明胶微载体也可以用于在紧密控制的和可规模化的 条件下、具有充分定义的特征的显著大数量的干细胞的可重复产生。

[0045] 实施例 8

如早先描述的制备 CultiSpher S 微载体。微载体然后用于培养真皮成纤维细胞细胞 系 AVDF1。具有补充有 10% 胎儿牛血清(FBS)的 25 ml MEM 细胞培养生长培养基(Sigma M4655)的 250 ml 摇瓶(Corning)用 5×10⁵ 个 AVDF1 细胞和 1g/L CultiSpher S 微载体接 种。烧瓶置于 37℃和 70rpm 的轨道摇动孵化器中。在描述的条件 下孵育 24 小时后,进一步 向烧瓶添加 25 ml 生长培养基(如上所述),烧瓶放回到摇动孵化器上,在如上所述的条件下 继续孵育。在 5 天的孵育之后,收获烧瓶内容物,如早先描述的测定活细胞的总浓度。收获

了总共 2.1×10^6 个活细胞。

[0046] 实施例 9

在静态培养中生长的真皮成纤维细胞 AVDF2 的两个 225cm^2 细胞培养烧瓶(Nunc)利用本领域充分描述的方法分离和计数。 2.0×10^6 个 AVDF2 细胞用于接种两个 1L 细胞培养摇瓶(Nunc)的每一个,所述摇瓶含有总体积 90 ml 的、补充有 10% FBS、含有 2g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。细胞培养烧瓶的顶部空间用空气中的 5% CO_2 平衡。细胞培养烧瓶转移到 37°C 、40 rpm 搅动的轨道摇动孵化器上。烧瓶在所描述的条件下游育 24 小时,进一步向每个烧瓶添加 90 ml 的细胞培养生长培养基(如上所述的)。烧瓶放回处在如上所述的条件下的摇动孵化器上,继续孵育 7 天。收获烧瓶的内容物,从微载体分离细胞(如早先描述的)。 1.65×10^7 个 AVDF2 细胞然后用于接种 3L 旋转细胞培养烧瓶(Corning)的总体积 750ml、补充有 10% FBS、含有 2g/L Cultispher S 微载体的 MEM 细胞培养生长培养基中。顶部空间用空气中的 5% CO_2 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 30 rpm 搅动。在描述的条件下游育 2 天后,进一步向旋转烧瓶添加如上所述的 750 ml 细胞培养生长培养基。孵育在如上所述的条件下继续另外 4 天。收获细胞培养旋转烧瓶的内容物,回收细胞。回收了 4.0×10^7 个 AVDF2 细胞,生存力 91%。

[0047] 实施例 10

在静态培养中生长的真皮成纤维细胞 AVDF2 的一个 75cm^2 烧瓶(Nunc)利用本领域充分描述的方法分离和计数。 2.2×10^6 个 AVDF2 细胞用于接种 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)中总体积 240 ml 的、补充有 10% FBS、含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。烧瓶的顶部空间用氮气中的 5% CO_2 和 2% O_2 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 40 rpm 搅动。在描述的条件下游育 4 天孵育之后,从旋转烧瓶除去 120 ml 的细胞培养上清液,120 ml 新鲜的细胞培养生长培养基(如上所述的)添加到旋转烧瓶。孵育在如上所述的条件下再继续 24 小时。从细胞培养旋转烧瓶采集进一步的样品(90 ml),回收细胞。回收了 5.7×10^6 个 AVDF2 细胞,生存力 76%。回收的细胞(2.4×10^6 个 AVDF2 细胞)然后用于接种两个 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)的每一个中每个烧瓶总体积 300 ml 含有 1.5 g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的细胞培养生长培养基(如上所述的)。烧瓶的顶部空间用氮气中的 5% CO_2 和 2% O_2 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 40 rpm 搅动。在描述的条件下游育 4 天后,在直到第 7 天孵育和包括第 7 天孵育的每一天中,从每个旋转烧瓶取出 30ml 体积的细胞培养物上清液,用 30 ml 新鲜的细胞培养生长培养基(如上所述的)替换。在描述的条件下游育 8 天之后,回收了 6.6×10^7 个 AVDF2 细胞,生存力 88%。这些细胞(1.6×10^7 个 AVDF2 细胞)用于接种 2L 玻璃细胞培养生物反应器(Applikon)中总体积 2L、补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 37°C 、pH 7.0 (如实施例 7 中描述控制的)、溶解氧张力 2.0% (空气饱和度)和 50 rpm 的搅拌器速度下培养,搅拌器速度在培养的方法中逐渐提高到 90rpm。细胞培养物中的溶解氧水平利用 CO_2 和 N_2 气体喷射来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下游育 4 天孵育之后,生物反应器中 20% 的总培养体积每 24 小时用新鲜的细胞培养生长培养基替换。

从生物反应器中周期性地取出样品,如早先描述的分离细胞和测定活细胞的数量。生存力和细胞数量在附图 2 中示出。在培养 18 天后达到了 5.0×10^8 个细胞的活细胞数量。

[0048] 实施例 11

解冻细胞系 AVDS6 的小瓶,添加 50 ml 补充有 10% FBS 的 MEM 细胞培养生长培养基。回收了生存力 90% 的 4.2×10^6 个细胞。 2×10^6 个 AVDS6 细胞用于接种两个旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)的每一个,其具有总体积 250 mL 生长培养基(如上所述的)中 8.0×10^3 个细胞/mL 和 1.5 g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)。烧瓶如实施例 10 描述的孵育。在描述的条件下孵育 4、5、6 和 7 天后,从每个旋转烧瓶取出 30 ml 体积的细胞培养上清液,用 30 ml 新鲜的细胞培养生长培养基替换(如上所述的)。总共 8 天孵育之后,收获烧瓶的内容物,回收了 80% 生存力的 4.9×10^7 个细胞。 1.6×10^7 个 AVDS6 细胞然后被用于接种 2L 玻璃细胞培养生物反应器(Applikon)中总体积 1.5L、补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 37°C、pH 7.0 (如实施例 7 中描述控制的)、溶解氧张力 2.0% (空气饱和度)和 50 rpm 的搅拌器速度下培养,搅拌器速度在培养的过程中逐渐提高到 90rpm。溶解氧水平如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下 4 天之后,进一步 500 ml 的生长培养基(如上所述的)添加到生物反应器中。从培养的第 5 天起,每 24 小时替换 5% 的总培养体积。从生物反应器中周期性地取出样品,分离细胞和测定活细胞的数量(如早先描述的)。生存力和细胞数量在附图 3 中示出。在培养 17 天之后在 2L 生物反应器中观察到 9.0×10^7 个细胞的活细胞数量。

[0049] 实施例 12

来自静态培养中生长的细胞系 AVDS6 的五个 225cm² 烧瓶(Nunc)的细胞利用本领域充分描述的方法分离和计数。 2.0×10^6 个 AVDS2 细胞用于接种两个 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)的每一个中总体积 200 ml 的、补充有 10% FBS、含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。顶部空间用氮气中 5%CO₂ 和 2% O₂ 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 40 rpm 搅动。在描述的条件下孵育 4 天后,在直到第 6 天孵育和包括第 6 天孵育的每一天中,从每个旋转烧瓶取出 20ml 体积的细胞培养物上清液,用 20 ml 新鲜的细胞培养生长培养基(如上所述的)替换。在描述的条件下孵育 7 天后,收获烧瓶,回收了 87% 生存力的 3.6×10^7 个细胞。 2.8×10^7 个 AVDS6 细胞用于接种 5L 玻璃细胞培养生物反应器(Applikon),使用总体积 3.5L、补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 36.5°C 的温度、pH 7.1 (如实施例 7 中描述控制的)、溶解氧张力 5.0% (空气饱和度)和 70 rpm 的搅拌器速度(其在培养的过程中逐渐提高到 110 rpm)下培养。溶解氧水平如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下第 4 到 7 天孵育期间,每 24 小时置换 10% 的总培养体积。培养中的第 8 到 10 天每 24 小时替换 15% 的总培养体积,培养中的第 11 到 22 天,每 24 小时替换总培养体积的 20%。从生物反应器中周期性地取出样品,分离细胞和测定活细胞的数量(如早先描述的)。生存力和细胞数量在附图 4 中示出。在培养 23 天后在 5L 生物反应器中观察到 4.1×10^8 个细胞的最大活细胞数量,展现了放大到 5L 生物反应器规模的成功方法。

[0050] 实施例 13

在静态培养中生长的细胞系 AVDS6 的三个 225cm² 烧瓶(Nunc) 利用本领域充分描述的方法分离和计数。回收了 84% 生存力的 4.3×10^6 个细胞。 3.0×10^6 个 AVDS6 细胞然后用于接种 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton) 中补充有 4mM 谷氨酰胺(Sigma)、含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的总体积 300 ml 的低血清(2%)生长培养基。培养物如实施例 12 描述的孵育。在描述的条件下孵育 6 天之后,收获烧瓶的内容物,回收了生存力 93% 的总共 3.8×10^7 个细胞。 2.0×10^7 个 AVDS6 细胞用于接种玻璃细胞培养生物反应器(Applikon), 使用总体积 2.0L、补充有 4mM 谷氨酰胺(Sigma)、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的无血清生长培养基。生物反应器在 36.5℃ 的温度和 pH 7.1 (如实施例 7 中描述所控制的)、溶解氧张力 5.0% (空气饱和度)和搅拌器速度 70rpm 下培养,搅拌器速度在培养的过程中逐渐提高到 130 rpm。溶解氧水平如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下第 4 到 7 天孵育期间,每 24h 用新鲜的生长培养基替换 10% 的总培养体积。培养中的第 8 到 10 天每 24h 用新鲜的生长培养基替换 15% 的总培养体积,培养中的第 11 到 20 天,每 24 小时用新鲜的生长培养基替换总培养体积的 20%。从生物反应器中周期性地取出样品,如早先描述的分离细胞和测定活细胞的数量。生存力和细胞数量在附图 5 中示出。在培养 20 天后观察到 1.2×10^8 个细胞的最大活细胞数量。这展现了本发明的方法的广泛的实用性。此外,本领域的熟练技术人员将认识到利用低血清培养基生长细胞的益处。

[0051] 实施例 14

解冻细胞系 AVDF3 的小瓶,利用补充有 10% FBS 的 45 ml MEM 细胞培养生长培养基重新悬浮。回收了 94% 生存力的 7.7×10^6 个 AVDF3 细胞。 2.4×10^6 个 AVDS6 细胞用于接种两个 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)的每一个,其具有总体积 300 mL 生长培养基(如上所述的)中 8.0×10^3 个细胞/mL 和 1.5 g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)。烧瓶如实施例 10 描述的孵育。在这些条件下孵育 8 天之后,收获烧瓶,回收了 96% 生存力的 8.4×10^7 个细胞。 1.6×10^7 个细胞被用于接种玻璃细胞培养生物反应器(Applikon) 中总体积 2L、补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 36.5℃ 的温度、pH 7.0 (如实施例 7 中描述的控制的)、溶解氧张力 5.0% (空气饱和度)和 70 rpm 的搅拌器速度下培养,搅拌器速度在培养的过程中逐渐提高到 120 rpm。溶解氧水平如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下第 4 到 7 天孵育期间,每 24h 用新鲜的生长培养基替换 10% 的总培养体积。培养中的第 8 到 10 天每 24 小时用新鲜的生长培养基替换 15% 的总培养体积,培养中的第 11 到 20 天,每 24 小时用新鲜的生长培养基替换总培养体积的 20%。从生物反应器中周期性地取出样品,分离细胞和如早先描述的测定活细胞的数量。生存力和细胞数量在附图 6 中示出。在第 15 天实现了 3.3×10^8 个细胞的最大值活细胞数量。

[0052] 实施例 15

在静态培养条件下生长的真皮成纤维细胞 AVDF3 的一个 225cm² 细胞培养烧瓶(Nunc) 利用本领域充分描述的方法分离和计数。 2.3×10^6 个细胞用于接种在总体积 330 ml 的补

充有 2mM 谷氨酰胺(Sigma)的无血清生长培养基中含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 1.5L 细胞培养旋转烧瓶。烧瓶的顶部空间用 5% CO₂、2% O₂ 气体来平衡。旋转烧瓶转移到 37°C 的细胞培养孵化器中,利用磁性搅拌器底座在 35 rpm 搅动。在描述的条件下游育 4 天后,35 mL 的细胞培养上清液从烧瓶中取出,用新鲜的无血清生长培养基(如上所述的)替换。在第 5 天和第 7 天,取出 50 mL 的培养上清液,用如上所述新鲜的无血清培养基替换。在第 8 天,取出 80 mL 的培养上清液,用新鲜的无血清培养基替换。培养 10 天后,从微载体上分离 AVDF3 细胞。1.35×10⁷ 个细胞被用于接种玻璃细胞培养生物反应器(Applikon)中总体积 2L、补充有 2mM 谷氨酰胺、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的无血清生长培养基。生物反应器在 36.5°C、pH 7.0 (如实施例 7 中描述的控制的)、溶解氧张力 5.0% (空气饱和度)和 40 rpm 的搅拌器速度下培养,搅拌器速度在培养的过程中逐渐地提高到 60 rpm。溶解氧张力如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下游育 4 天后,200 mL 的培养上清液从生物反应器中取出,用新鲜的无血清生长培养基(如上所述的)替换。在第 6、8、10、11、13、15、17 和 21 天,取出进一步的 200 mL 培养上清液,用新鲜的无血清生长培养基(如上所述的)替换。从生物反应器中周期性地取出样品,从微载体上分离细胞、如早先描述的测定活细胞的数量。在第 15 天达到了峰细胞密度 7.3×10⁷ 个细胞。这进一步展现了该方法的实用性。利用无血清培养基的益处对本领域技术人员是明显的,特别是,生产的可重复性、更一致的性能、被随机试剂污染细胞的可能性的降低。无血清培养基是本领域已知的,可从商业的供应商容易地获得。

[0053] 实施例 16

来自静态培养条件下生长的细胞系 AVDS2 的两个 225cm² 烧瓶(Nunc)的细胞利用本领域充分描述的方法分离和计数。回收了 90% 生存力的 3.1×10⁶ 个细胞。2.9×10⁶ 个 AVDS2 细胞用于接种两个 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)的每一个中总体积 300 mL 的、补充有 10% FBS、含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。烧瓶的顶部空间用氮气中的 5% CO₂ 和 2% O₂ 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 40 rpm 搅动。在描述的条件下游育 4 天后,在直到第 7 天孵育和包括第 7 天孵育的每一天中,从每个旋转烧瓶取出 30mL 体积的细胞培养物上清液,用 30 mL 新鲜的细胞培养生长培养基(如上所述的)替换。在描述条件下孵育 8 天之后,收获烧瓶,回收了 96% 生存力的 4.7×10⁷ 个细胞。2.0×10⁷ 个 AVDS2 细胞被用于接种玻璃细胞培养生物反应器(Applikon)中总体积 2L、补充有 10% FBS、0.2% pluronic F-68 和 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。生物反应器在 36.5°C 的温度、pH 7.1 (如实施例 7 中描述控制的)、溶解氧张力 5.0% (空气饱和度)和 40 rpm 的搅拌器速度下培养,搅拌器速度在培养的过程中逐渐提高到 70rpm。溶解氧水平如实施例 10 中描述的来维持。当发生泡沫时,将乳剂 C 防沫剂(Sigma)添加到生物反应器中。在描述的条件下游从第 4 到 7 天,每 24 小时替换 10% 的总培养基,从培养的第 8 到 10 天,每 24 小时替换总培养基的 15%。这个实施例中使用的叶轮(搅动)结构对实施例 7 到 15 中使用的进行改变。这个实施例中使用的叶轮结构由具有 0.4 和 0.3 的叶轮直径与生物反应器直径比例的 2 个叶轮组成。在实施例 7 到 15 中,在叶轮轴的底部使用 0.3 比例的叶轮,即,位于细胞培养容器的底部。在这个实施例中,在叶轮轴的底部 / 细胞培养容器的底部使用

0.4 直径比的叶轮,具有 0.3 直径比例的叶轮连接到叶轮轴上相对于轴底部的叶轮和最终细胞培养基体积(收获时)的中间位置。从生物反应器中周期性地取出样品,分离细胞和如早先描述的测定活细胞的数量。生存力和细胞数量在附图 7 中示出。在培养 10 天后观察到 2.0×10^8 个细胞的最大活细胞数量。

[0054] 令人惊讶地,改变的叶轮结构产生了对所述方法的显著的改进。在细胞培养期间可以使用更低的搅动速度,降低了对细胞的剪切应力的可能的负面影响,而不影响维持良好的细胞生长和生存力所需的最佳混合。更显著地,达到高活细胞数量花费的细胞培养时间被显著地降低。在实施例 13 中,可以看出的是,DS 细胞系的峰细胞数量在第 23 天达到。在当前实施例中,类似的峰细胞数量在第 11 天达到,显著地降低了细胞培养时间。对本领域技术人员显而易见的是,当方法被扩大来商业性地制造用于治疗应用的细胞时,细胞制造时间的降低将会怎样降低制造时间和成本。

[0055] 实施例 17

皮肤衍生的前体(SKP)是可以从真皮细胞分离的细胞的自我更新的、多能的前体群体。SKP 细胞已经在本领域中充分描述了,展现了与胚胎神经脊干细胞相似的基因表达分布,因而可以用于产生神经脊衍生物,包括 Schwann 细胞和外周神经系统的神经元。SKP 细胞可以通过利用生长培养基中高浓度的成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 和表皮生长因子(EGF) 培养真皮细胞来分离。SKP 作为漂浮的球体增殖,因而容易利用本领域充分建立的方法目检和定量。在如上所述的实施例中产生的细胞在早先的实施例中描述的条件生长之后被用于 SKP 形成分析。利用生物反应器条件扩增 / 生长之后细胞形成 SKP 的能力被用作多能性的一种度量,因而确认这些细胞的治疗潜力在生物反应器扩增 / 细胞产物制造之后没有受到不利的影响。

[0056] 从生物反应器培养(实施例 6)收获的细胞的低温保存的细胞系 AVDS5 小瓶进行解冻,添加补充有 10% FBS 的 44ml MEM 细胞培养生长培养基。细胞悬浮液转移到 225cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)中,在如上所述的静态培养条件下孵育 6 天。然后分离和计数细胞,回收了 80% 生存力的总共 8.3×10^5 个细胞。细胞然后在 $180 \times g$ 离心 5 分钟,在 SKP 生长培养基中重悬浮,所述 SKP 生长培养基由 74% 的 DMEM (Sigma)、24% 具有 Glutamax (Invitrogen)的 F12、0.1% 青霉素 / 链霉素(Sigma)、40 ng/mL 人 FGF-2 (R & D Systems)、20 ng/mL 人 EGF (R & D Systems)和 2% B27 添加物(Invitrogen)组成。 2.5×10^5 个细胞然后转移到 25cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)中,如上所述的孵育。每 3 到 4 天,从烧瓶中取出 1 ml 的无细胞上清液,用含有 5 倍浓度的 EGF、FGF-2 和 B27 添加物的 1 ml 的 SKP 生长培养基替换。

[0057] 在 22 天孵育之后,SKP 在烧瓶中是可见的,表明利用实施例 6 中描述的 CultiSpher S 微载体的生物反应器扩增没有不利地影响细胞形成 SKP 的能力,确认了它们的多能干细胞特征。本领域技术人员将理解,在扩增时细胞性质的保留的重要性,特别是,而不限于,干细胞多能性的保留。

[0058] 来自没有在生物反应器中生长的(仅在细胞培养烧瓶中使用静态培养传代)细胞储备物的低温保存的细胞系 AVDS4 小瓶进行解冻,添加补充有 10% FBS 的 15ml MEM 细胞培养生长培养基。细胞悬浮液转移到两个 25cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)中,在如上所述的条件下孵育 1 天。细胞然后从烧瓶中分离,用于接种 225cm² 细胞培养烧瓶(Nunc)中总体积 45 mL 的细胞培养生长培养基。在描述的条件孵育 4 天后,分离细胞,回收 88% 生存力的

1. 3×10^6 个细胞。细胞然后在 $180 \times g$ 离心 5 分钟,在如上所述的 SKP 生长培养基中重悬浮。
2. 5×10^5 个细胞然后转移到 25cm^2 细胞培养烧瓶(Nunc)中,如上所述的孵育。每 3 到 4 天,从烧瓶中取出 1 ml 的细胞上清液,用含有 5 倍浓度的 EGF、FGF-2 和 B27 添加物的 1 ml 的 SKP 生长培养基替换。

[0059] 在 22 天孵育之后,SKP 在烧瓶中可见。

[0060] 这个实施例展现了在 Cultispher S 微载体上生长的细胞保持了它们形成 SKP 的能力,确认了细胞保持了能力和多能干细胞特征。这是特别令人惊讶的,因为在 HLX11-170 微载体上生长的细胞不形成 SKP,因而丧失了这种关键的多能性潜力。

[0061] 实施例 18

收获细胞系 AVDS4 的两个 225cm^2 细胞培养烧瓶(Nunc),回收了 91% 生存力的 4.7×10^6 个细胞。 2×10^6 个细胞然后用于接种 1L 旋转细胞培养烧瓶(Wheaton)中总体积 250 ml 的、补充有 10% FBS、含有 1.5g/L Cultispher S 微载体(如早先描述制备的)的 MEM 细胞培养生长培养基。烧瓶的顶部空间用氮气中的 5% CO_2 和 2% O_2 来平衡。旋转烧瓶转移到细胞培养孵化器中(37°C),利用磁性搅拌器底座在 40 rpm 搅动。在描述的条件孵育 4 天后,在直到第 6 天孵育和包括第 6 天孵育的每一天中,从每个旋转烧瓶取出 25ml 体积的细胞培养物上清液,用 25 ml 新鲜的细胞培养生长培养基(如上所述的)替换。在描述的条件孵育 7 天后,收获烧瓶,回收了 95% 生存力的 2.1×10^7 个细胞。 1.3×10^5 个细胞然后接种到在总体积 17ml 细胞培养生长培养基(如上所述的)中含有 12.5cm^2 碎片的 3-维生物相容的组织再生支架(Integra 真皮再生模板(Integra Life Sciences))的 125ml 细胞培养摇瓶(Corning)中。Integra 真皮再生模板置于烧瓶中,使得硅层面对细胞培养烧瓶底部,胶原蛋白表面向上,因而浸浴在细胞悬浮液/细胞生长培养基中。烧瓶的顶部空间用氮气中的 5% CO_2 和 2% O_2 平衡,转移到设置在 37°C 和 60 rpm 的轨道摇动孵化器中。每 3 到 4 天,从烧瓶除去 8 ml 的细胞上清液,用 8 ml 新鲜的细胞培养生长培养基替换。烧瓶在这些条件下孵育 14 天,然后用细胞接种的 Integra 真皮再生模板从烧瓶中取出,利用本领域充分描述的方法用甲醇/丙酮的 50/50 混合物(Fisher)固定。细胞进入 Integra 真皮再生模板的浸润和增殖然后通过本领域中建立的用碘化丙锭($10\text{ }\mu\text{g/mL}$, 543 nm 激发,在 610-640nm 的范围内捕获发射)染色细胞核、二等分以及共焦激光扫描显微镜检查(CLSM)来分析。捕获的 CLSM 图像利用图像分析软件(Image J, NIH)来分析。分析 Integra 真皮再生模板的横截面的 CLSM 扫描,细胞数量(从表面到支架内的空间分布)在附图 8 中示出。

[0062] 数据表明细胞进入 Integra 真皮再生模板的浸润和增殖。这些数据进一步例示了所述方法的实用性,展现了利用 Cultispher S 微载体培养制造的细胞保持了在生物相容的 3 维支架例如 Integra 真皮再生模板内浸润和增殖的能力。对于真皮再生领域的技术人员明显的是,如果细胞仅在支架的外表面存在,则伤口愈合的关键方面,包括但不限于细胞外基质生产和血管化将是有限的,成功的组织再生的可能性将是低的/不良的。

[0063] 实施例 19

本领域中充分建立的是,细胞凋亡是细胞生长和增殖的重要的和主动的调节途径。细胞凋亡可能受到(但不限于)生长培养基、压力条件或其他参数的影响。细胞培养物群体中细胞凋亡细胞的水平的测定可以用作监视和评估方法条件的负面影响、细胞增殖等等的工具。膜联蛋白 V 分析是本领域充分建立的,用于测量在具有 MEM + 10% FBS 细胞培养生长

培养基的生物反应器中 Cultispher S 微载体上生长的细胞的细胞凋亡。也在 MEM + 10% FBS 中生长的、来自静态培养中连续传代的细胞被用作对照来比较在生物反应器中利用 Cultispher S 微载体生长的细胞群体中细胞凋亡的水平。

[0064] 来自从生物反应器收获的(实施例 11)的细胞的储备物的低温保存的细胞系 AVDS4 小瓶进行解冻,接种到 225cm² 烧瓶的 MEM + 10% FBS 中。对照培养物通过扩增以早先描述的烧瓶的相同水平接种到 225cm² 烧瓶的 MEM + 10% FBS 中的、来自细胞库的 AVDS4 产生。这个对照培养物没有利用微载体或生物反应器培养来加工。两种烧瓶在 37°C、5% CO₂ 孵育 5 天,然后准备每种细胞培养物用于以下的分析。从细胞单层分离生长培养基。然后洗涤细胞单层,如本领域中充分建立的从组织培养烧瓶上分离。然后重新组合生长培养基、洗液和分离的单层。细胞在室温下在 300×g 离心 5 分钟。吸出上清液,细胞丸粒以 5×10⁵ 个细胞 /ml 重悬浮在新鲜的 MEM+ 10% FBS 中。100 μl 的这种细胞悬浮液转移到含有 100 μl Guava Nexin 试剂(Guava Technologies Inc, Hayward, USA)的微离心管中。在混合之后,细胞 / 试剂在室温下在暗处孵育 20 分钟。然后利用 Guava PCA 细胞计(根据 Guava PCA 厂家指导)分析样品。在 5 天的孵育之后两种培养物达到类似的活细胞计数。分析结果的点图在附图 9 中示出,每种群体中细胞凋亡细胞的水平在表 5 中示出。

[0065] 表 5 细胞系 AVDS4 生物反应器后和静态培养(对照)中的细胞凋亡测量值

培养物	活细胞(%)	早期细胞凋亡细胞(%)	晚期的细胞凋亡 / 死细胞(%)
AVDS4 对照	94	3	3
AVDS4 生物反应器后	89	6	5

显著地,已经利用 Cultispher 微载体在生物反应器中培养,并且相比对照细胞处于培养中显著更长时间的细胞,显示了可比较的和可接受的细胞生存力 / 细胞凋亡细胞的水平。

[0066] 实施例 20

转化生长因子 β 1 (TGF-β 1) 是细胞因子的转化生长因子 β 超家族的多肽成员。它是分泌的蛋白质,进行许多细胞功能,被鉴定为在伤口愈合中具有关键作用。TGF-β 1 duo ELISA 分析(R & D systems)被用于测定在具有 MEM + 10% FBS 细胞培养生长培养基的生物反应器中在 Cultispher S 微载体上生长的细胞的培养上清液中蛋白质的水平。也在 MEM + 10% FBS 中生长的、在利用组织培养烧瓶的静态培养中来自连续传代的细胞用作对照,来比较两种细胞群体产生的 TGF-β 1 的水平。

[0067] 来自从生物反应器收获的(实施例 11)的细胞的储备物的低温保存的细胞系 AVDS4 小瓶进行解冻,接种到 225cm² 烧瓶的 MEM + 10% FBS 中。对照培养物通过扩增以早先描述的烧瓶的相同水平接种到 225cm² 烧瓶的 MEM + 10% FBS 中的、来自细胞库的 AVDS4 产生。这个对照培养物没有利用微载体或生物反应器培养来加工。两个烧瓶在 37°C、5%CO₂ 孵育 5 天,然后收获残余的细胞培养基,利用 ELISA 分析(R & D systems)进行分析来测定 TGF-β 1 的浓度。一式两份地分析样品,结果在附图 10 中示出。TGF-β 1 水平针对细胞浓度对比烧瓶表面积来标准化。

[0068] 结果清楚地展现了,利用微载体在生物反应器培养物中扩增的细胞,以相等于利用静态培养传代的细胞的水平继续表达 TGF-β 1,因而维持了这种关键的质量属性。

细胞系AVDP1在2L玻璃细胞培养生物反应器中的生长

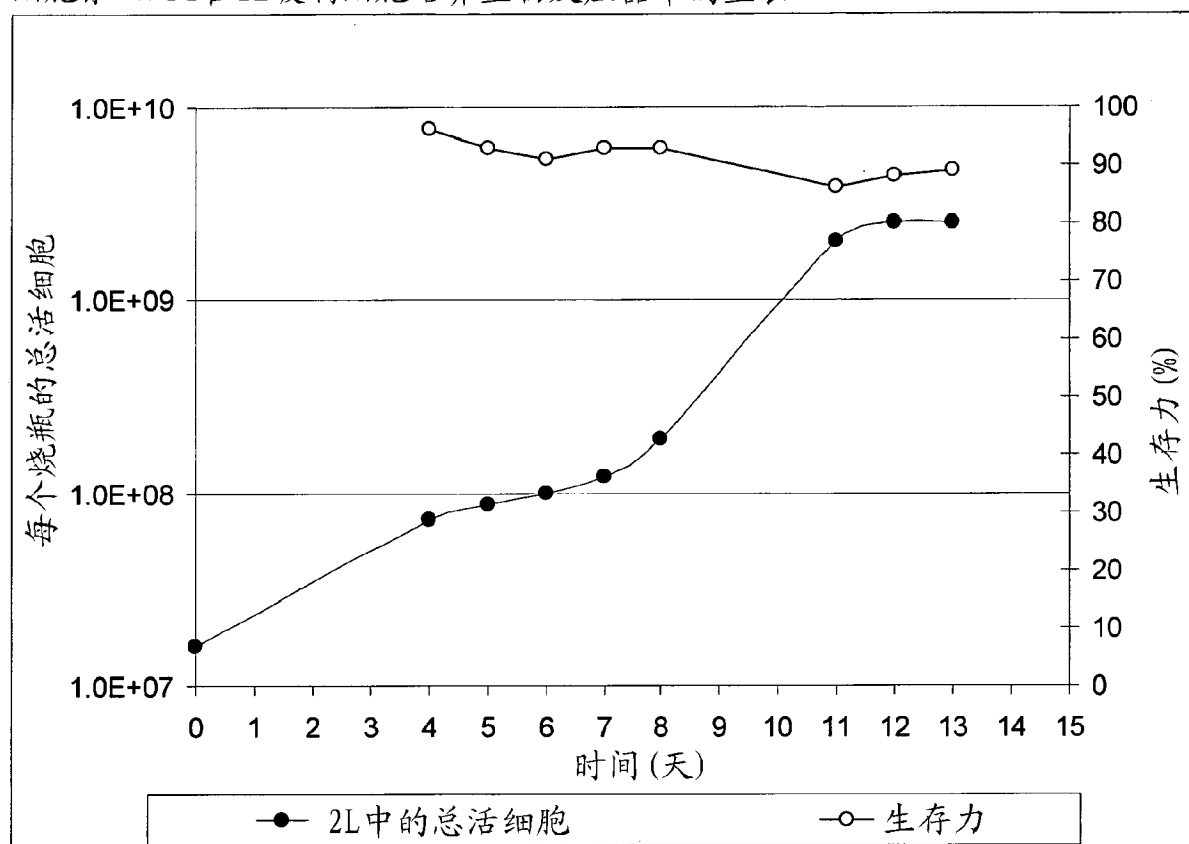


图 1

细胞系AVDF2在细胞培养生物反应器中的生长

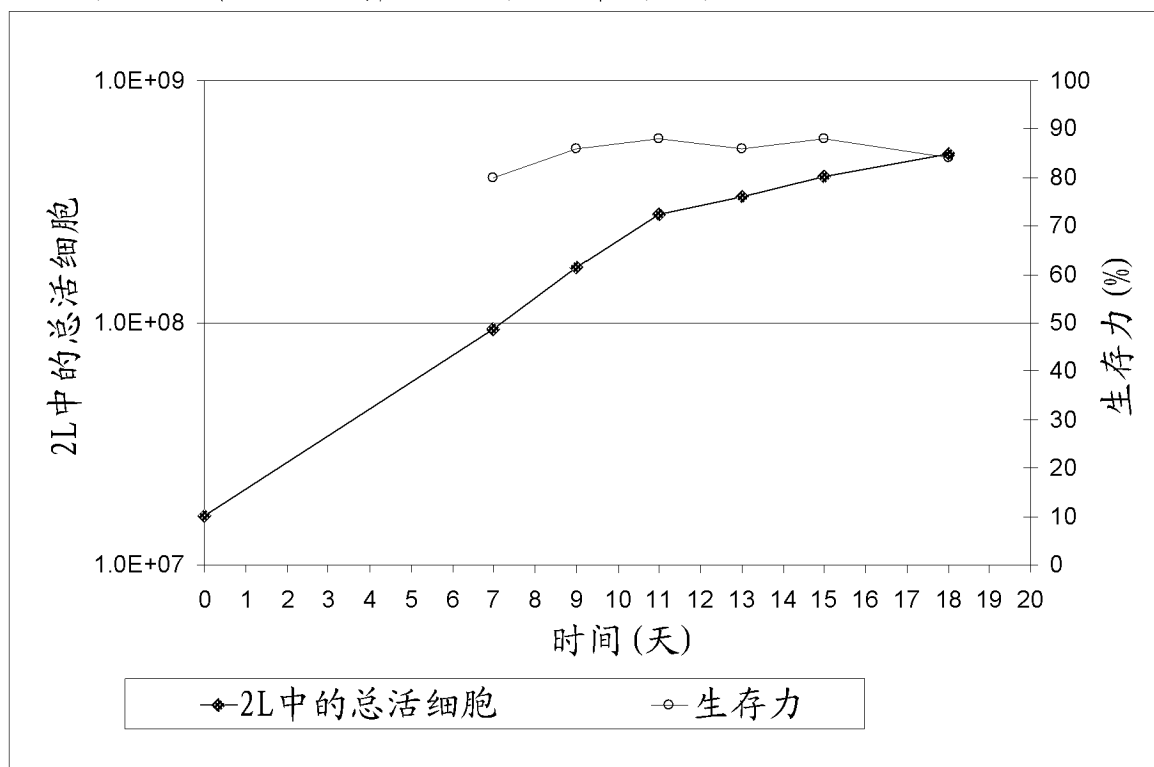


图 2

细胞系AVDS6在细胞培养生物反应器中的生长

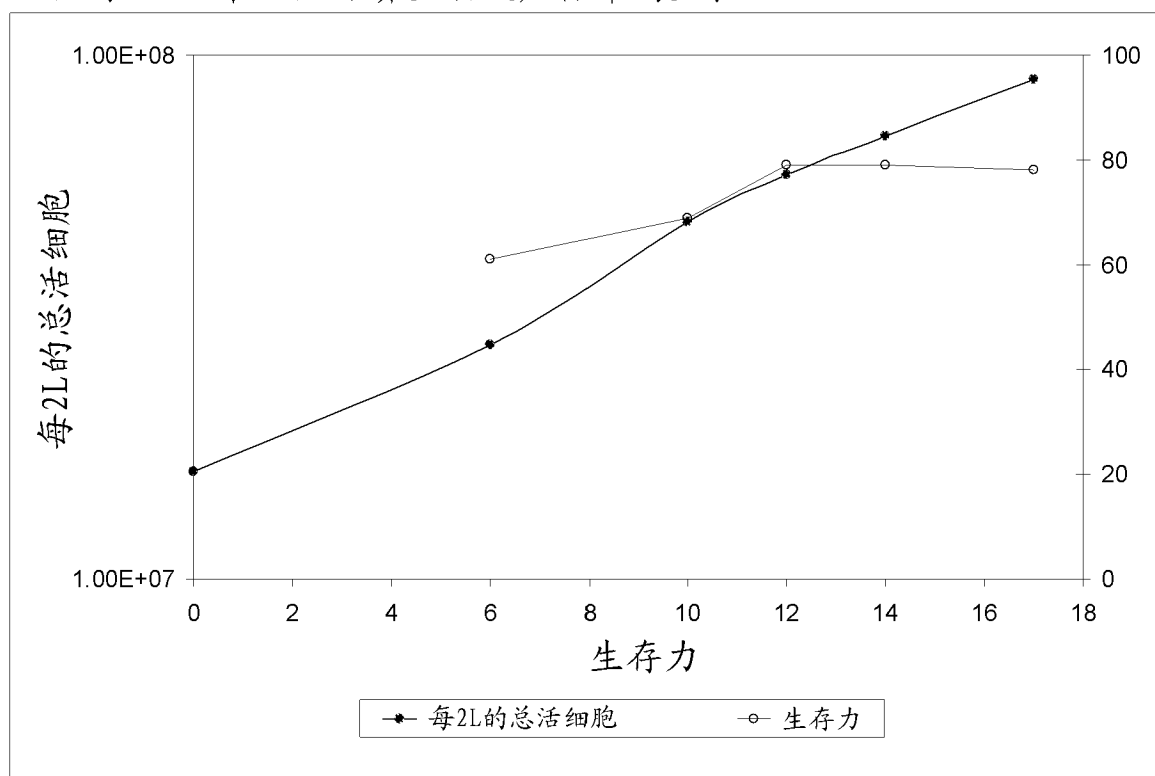


图 3

细胞系 AVDS6 在细胞培养生物反应器中的生长

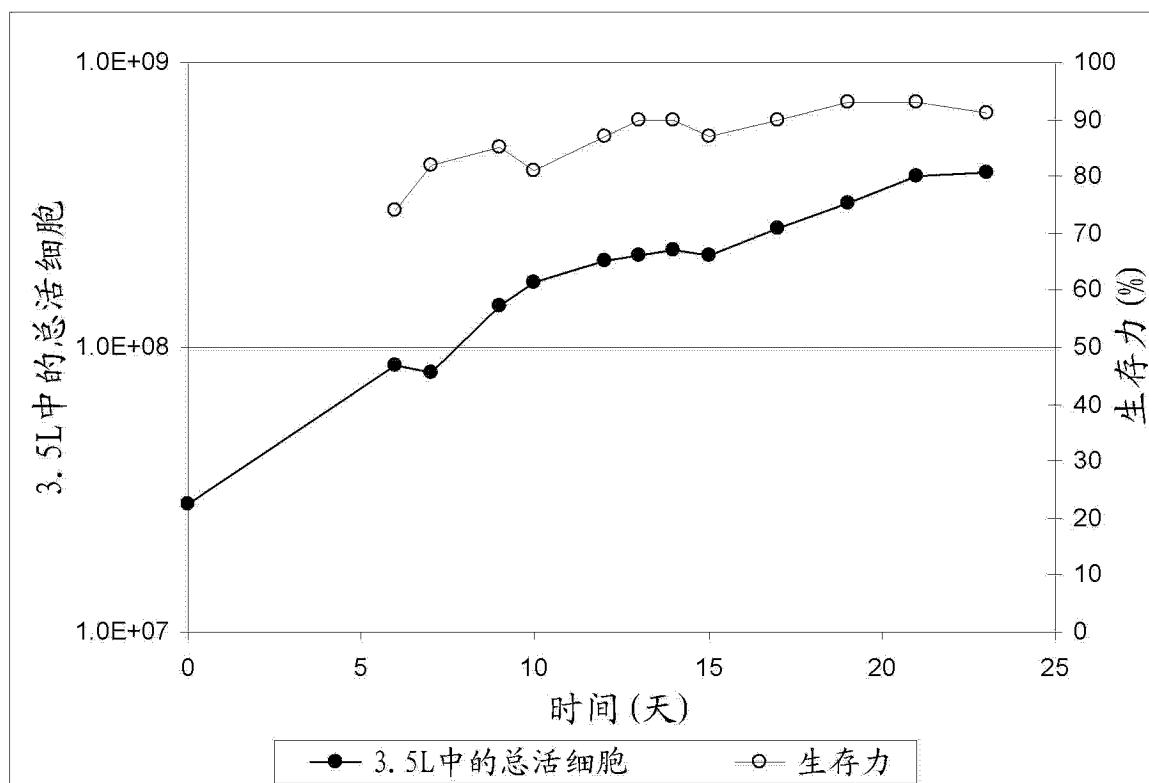


图 4

细胞系AVDS6在细胞培养生物反应器中的生长

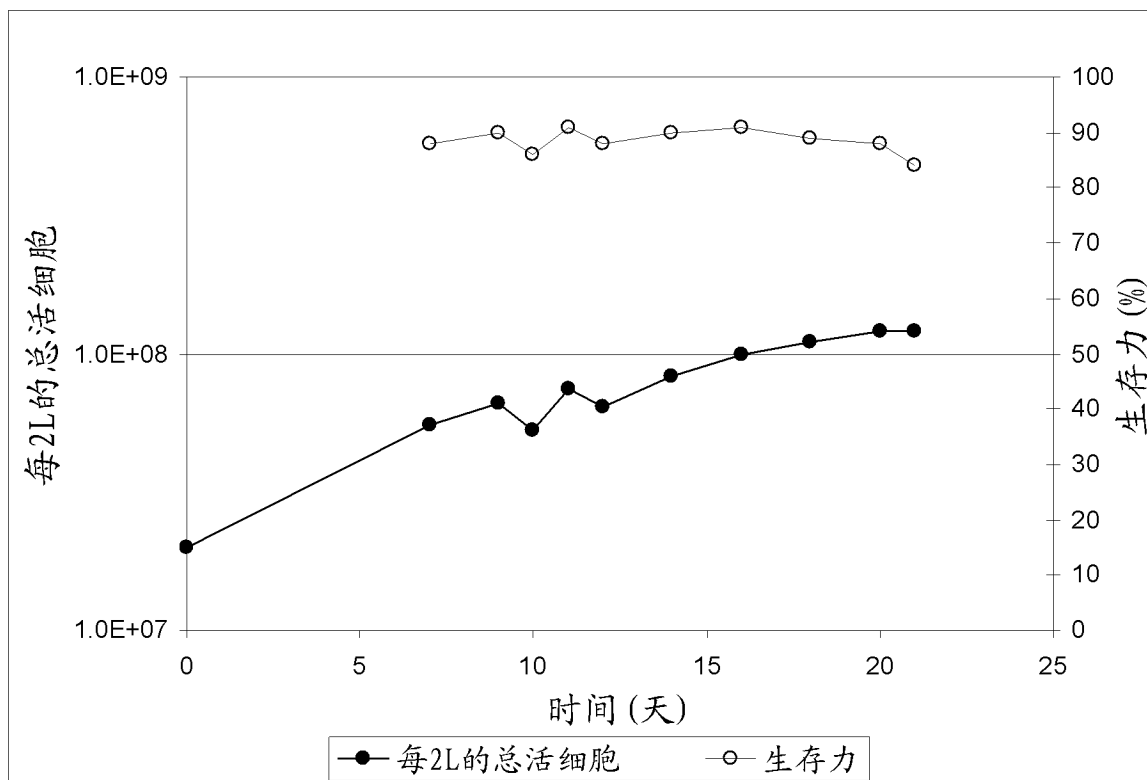


图 5

细胞系AVDF3在细胞培养生物反应器中的生长

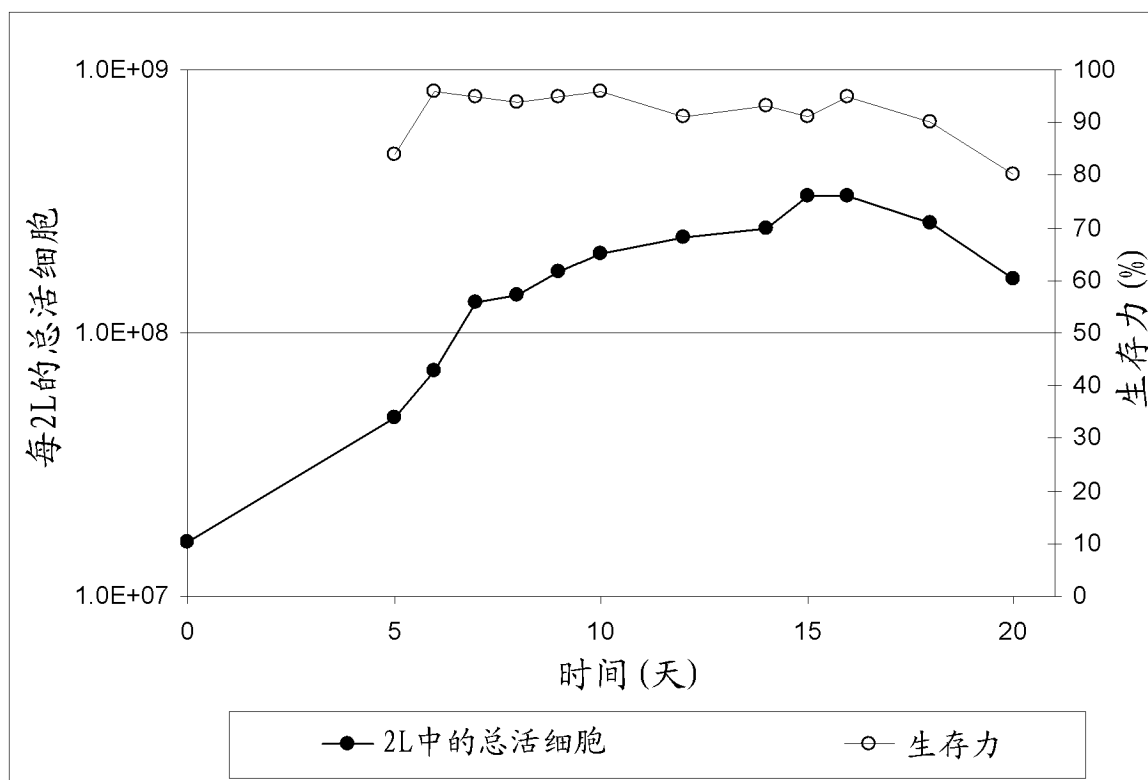


图 6

细胞系AVDS2在细胞培养生物反应器中的生长

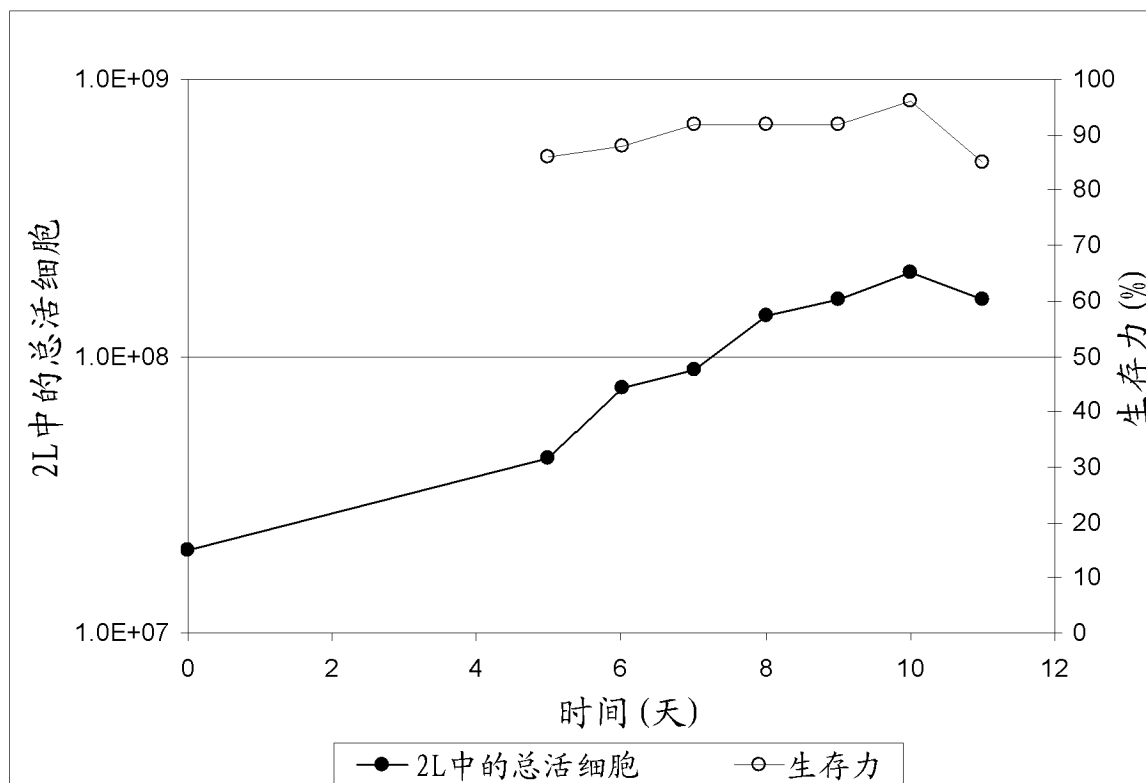


图 7

在Integra真皮再生模板上接种的细胞的CLSM分析

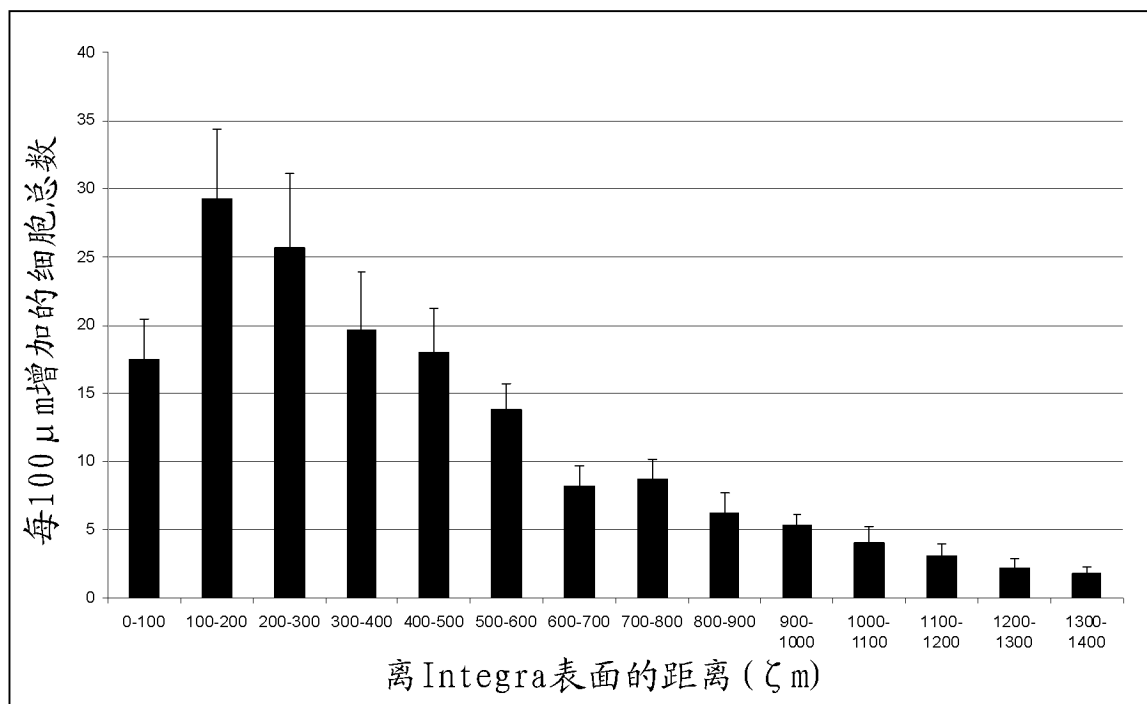


图 8

AVDS4生物反应器后和静态培养物(对照)的膜联蛋白V分析结果的点图呈现

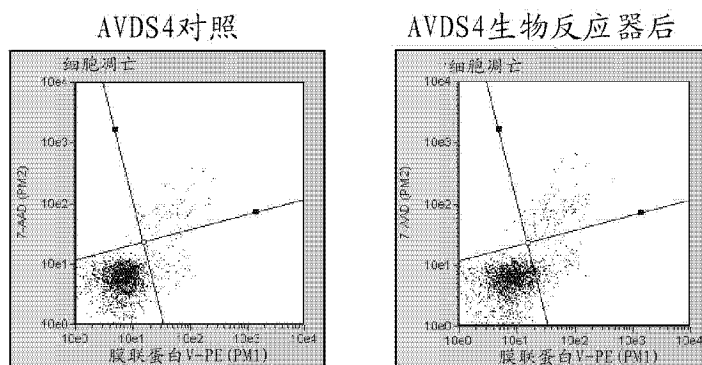


图 9

AVDS4细胞生物反应器后和对照培养物中的 TGF- β 1生产

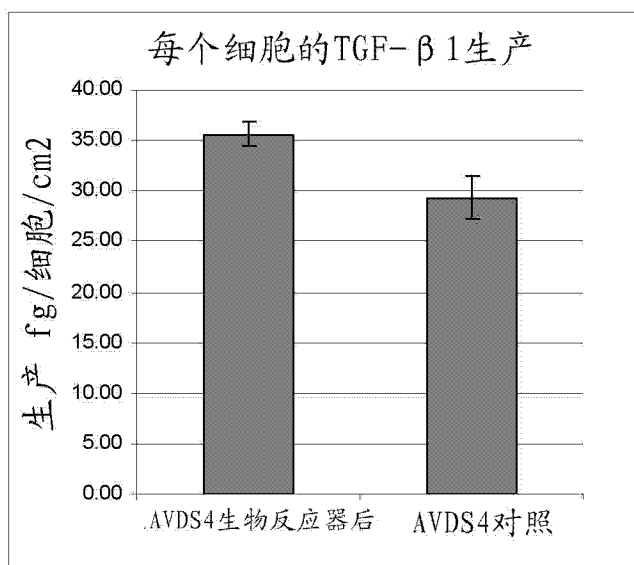


图 10