



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689893 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780055219.3

(22)申请日 2017.07.11

(30)优先权数据

62/360,500 2016.07.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2017/050789 2017.07.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/011804 EN 2018.01.18

(71)申请人 博纳斯治疗公司

地址 以色列,海法

(72)发明人 S·米瑞斯基 D·本戴维德

A·诺威克 R·石锐切曼

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信 董志勇

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6883(2018.01)

A61K 35/35(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

G01N 33/50(2006.01)

C12N 5/0775(2010.01)

权利要求书2页 说明书43页 附图19页

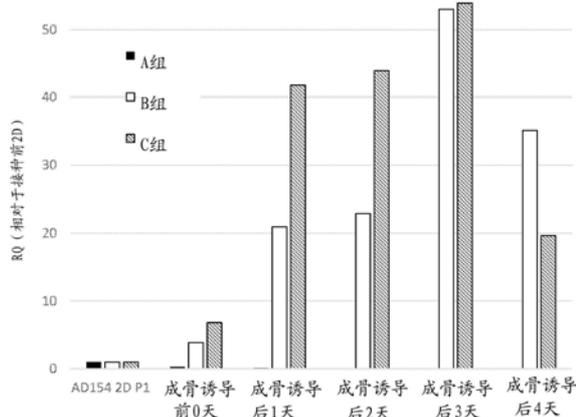
(54)发明名称

用于组织再生的细胞组合物

(57)摘要

包括细胞群体的组合物,其中该群体适合移植入需要其的对象中,并且其特征在于多个基因的表达水平的差异。进一步,用于识别适合移植入需要其的对象中的细胞群体的方法和试剂盒。

内源BMP2表达



1. 包括细胞群体的组合物,其特征在于与对照表达水平相比多个基因的表达水平的差异,所述多个基因选自从表1-11选择的至少两个表。

2. 权利要求1所述的组合物,其中所述多个基因选自表1-11的每个中的一个或多个基因。

3. 权利要求1所述的组合物,其中所述多个基因包括表1-11中列举的至少50%的基因。

4. 权利要求1所述的组合物,其中所述多个基因选自从表1-11选择的表中列举的基因。

5. 权利要求1所述的组合物,其中所述细胞群体来源于离体生长的细胞。

6. 权利要求1所述的组合物,其中所述细胞群体来源于在三维培养物中生长的细胞。

7. 权利要求1所述的组合物,进一步包括无机物颗粒,其中至少一部分所述细胞群体接触(如,附着至)所述无机物颗粒。

8. 权利要求7所述的组合物,其中所述无机物颗粒选自:珊瑚无机物颗粒、骨松质和骨皮质。

9. 权利要求1所述的组合物,其中所述细胞群体来源于人脂肪组织源细胞(HATDC)。

10. 权利要求9所述的组合物,其中所述细胞群体来源于经历成骨分化的HATDC。

11. 权利要求1所述的组合物,其中所述对照表达水平对应来源于在二维培养物中生长的细胞的第二细胞群体。

12. 权利要求7所述的组合物,其中所述第二细胞群体是经历成骨诱导的细胞群体。

13. 权利要求10或12中任一项所述的组合物,其中所述成骨分化通过成骨诱导物进行诱导,所述成骨诱导物选自:骨形态发生蛋白(BMP)-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7。

14. 权利要求1所述的组合物,用于向需要其的对象移植。

15. 识别适合于向需要其的对象移植的细胞群体的方法,所述方法包括:确定细胞群体中多个基因的表达水平,其中与对照表达水平相比选自从表1-11选择的至少两个表的基因的多个基因的表达水平的差异指示所述细胞群体适合于移植。

16. 权利要求1所述的组合物或权利要求15所述的方法,其中对于每个基因,所述表达水平的差异独立地选自上调和下调。

17. 权利要求15所述的方法,其中所述多个基因选自表1-11的每个中的一个或多个基因。

18. 权利要求15所述的方法,其中所述多个基因选自从表1-11选择的表中列举的基因。

19. 权利要求15所述的方法,其中所述多个基因包括表1-11中列举的至少50%的基因。

20. 权利要求15所述的方法,其中所述确定步骤包括从所述细胞群体获得核酸分子的步骤。

21. 权利要求20所述的方法,其中所述核酸分子选自mRNA分子、DNA分子和cDNA分子。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述cDNA分子通过反转录所述mRNA分子获得。

23. 权利要求15所述的方法,其中所述确定进一步包括杂交所述核酸分子与多个配体的步骤,每个所述配体能够特异性地与单一基因复合、结合、杂交,或定量地检测或识别单一基因,所述单一基因选自表1-11中列举的基因。

24. 包括多个配体的试剂盒,每个所述配体能够特异性地与单一基因复合、结合、杂交,或定量地检测或识别单一基因,所述单一基因选自从表1-11选择的至少两个表的多个基因。

25. 权利要求24所述的试剂盒,用于识别适合于移植至对象的细胞群体。
26. 权利要求24所述的试剂盒,其中所述差异选自上调、下调或其组合。
27. 权利要求24所述的试剂盒,其中所述多个基因选自表1-11的每个中的一个或多个基因。
28. 权利要求24所述的试剂盒,其中所述多个基因选自从表1-11中选择的表中列举的基因。
29. 权利要求24所述的试剂盒,其中所述多个基因选自表1-11的每个中的一个或多个基因。
30. 权利要求24所述的试剂盒,其中所述多个基因包括表1-11中列举的至少50%的基因。

## 用于组织再生的细胞组合物

### 技术领域

[0001] 本申请要求2016年7月11日提交的美国临时专利申请号62/360,500的优先权的权益。上述文件的内容通过引用以其全部并入,如其在本文中完全阐述。

[0002] 本发明一般而言是在组织工程学领域中,并且具体地使用细胞组合物用于骨缺陷和障碍的组织再生和治疗。

### 背景技术

[0003] 组织工程学和再生医学提供令人兴奋的新治疗以帮助愈合受损的器官和组织。组织工程学的一个重要方面是使用人自己的细胞来治疗该人的能力。通过使用自体细胞,消除了组织排斥或移植排斥的风险。

[0004] 组织工程学的快速增长部分之一是治疗骨障碍和疾病。骨具有自我修复能力以应对伤害。然而,在复杂的临床条件下,正常骨再生受损。这些病例包括由创伤、感染、肿瘤切除和骨骼异常引起的大骨缺陷,或再生过程遭损的病例,包括血管坏死和骨质疏松症。用于骨修复的治疗途径包括骨移植替代物和治疗分子。

[0005] 骨再生市场,特别是骨移植是一个不断增长的市场。该市场增长受到几个方面的推动,诸如矫形外科手术的增加,人口老龄化的增加,作为自体移植手术代替品或对其补充的骨移植替代品的偏爱增加,对整形外科手术的骨移植替代品的更多采用以及矫形外科手术的补偿的增加。

[0006] 骨移植是一种替换失去的骨的外科手术。骨移植包括使用自体移植(即,使用来自患者身体另一部位的组织)或同种异体移植(即,使用来自活人供体或尸体的组织)。因此,需要从患者或从供体处组织采集的阶段。

[0007] 组织采集通常通过外科手术来执行,其通常涉及从髌嵴、股骨远端、胫骨近端、腓骨或从其他小骨头收集组织。将采集的组织重构并移植到受损部位。

[0008] 然而,移植采集手术与相当大的发病率和实质性疼痛相关联。对于自体移植或来自用于同种异体移植的活体供体的组织采集也可导致诸如炎症、感染或甚至死亡的并发症。

[0009] 有限的供应和继承的采集并发症激发了用于修复显着骨缺陷的替代策略的发展。

[0010] 已经研究了使用诸如骨提取物、聚合物或无机物支架的三维(3-D)骨替代物作为植入物,并且多孔生物相容性支架已经用于骨组织的修复和再生。

[0011] 组织修复的早期尝试主要集中在使用无定形的、生物相容性泡沫作为多孔塞以填充骨中的大空隙。美国专利号4,186,448描述了使用由多羟基酸聚合物诸如聚丙交酯组成的多孔网塞来愈合骨空隙。还描述了制造其他支架的几种不同方法(如,美国专利序号5,133,755;5,514,378;5,522,895;5,607,474;5,677,355;5,686,091;5,716,413;5,755,792;5,769,899;5,770,193;6,333,029;6,365,149和6,534,084)。

[0012] 已经显示骨髓(BM)含有具有成骨潜力的细胞群体。如此,支架-骨诱导方法的替代方案是将具有这种能力的活细胞移植到患者内。在实验模型和人类患者中,细胞因子操纵

的,自体 and 同种异体BM祖细胞已经成功地愈合了龟裂的或再吸收的骨。在存在或不存在生长促进因子的情况下,将成骨谱系的祖细胞接种到生物相容的(可生物降解的或不可生物降解的)支架上(如美国专利序号6,541,024;6,544,290;6,852,330)。在给定支架上的细胞的离体扩展阶段之后进行移植到受影响的患者中。使用这种方法,在陶瓷支架上分层的原代生骨细胞或扩展的间充质基质细胞(MSC)能够再生骨组织。

[0013] 活骨是连续进化的器官,并且在骨维持的正常过程中,正在采用恒定的重塑过程。在这些手术中,旧骨被新骨替换,并且器官响应其对强度和弹性的环境变化要求。因此,正常的重塑进展需要紧密地协调骨再吸收和骨形成过程的机械加载过程。

[0014] 在细胞术语中,这取决于破骨细胞(骨再吸收细胞)和成骨细胞(骨形成细胞)的顺序功能。另外,需要内皮细胞和内皮细胞前体(成血管细胞)在发育的骨组织中形成新血管。然而,参与骨形成的各种细胞类型具有不同的谱系。现在已知成骨细胞来自(stalk from)间充质干细胞,而破骨细胞(直接源自造血干细胞(HSC))和内皮细胞是常见的胚细胞集落形成细胞的后代。如此,依赖于成骨细胞作为专属细胞成分的离体生产骨样材料的方法遭受继承性缺陷。

## 发明内容

[0015] 根据第一方面,本发明提供包括细胞群体的组合物,该细胞群体特征在于与对照表达水平相比,多个基因的表达水平差异,所述多个基因选自从表1-11选择的至少两个表。

[0016] 在一些实施方式中,组合物进一步包括无机物颗粒,其中所述细胞群体的至少部分接触(如,附着至)无机物颗粒。在一些实施方式中,无机物颗粒选自:珊瑚无机物颗粒、骨松质和骨皮质。

[0017] 根据另一方面,本发明提供了识别细胞群体的方法,该方法包括确定细胞群体中多个基因的表达水平,其中与对照表达水平相比,多个基因的表达水平的差异指示所述细胞群体的识别,所述多个基因选自从表1-11选择的至少两个表。

[0018] 根据另一方面,本发明提供识别适合移植入需要其的对象中的细胞群体的方法,该方法包括确定细胞群体中多个基因的表达水平,其中与对照表达水平相比,多个基因的表达水平的差异指示所述细胞群体适合移植,所述多个基因选自从表1-11选择的至少两个表。

[0019] 在一些实施方式中,多个基因选自表1-11的每一个中的一个或多个基因。在一些实施方式中,多个基因包括表1-11中列举的至少50%的基因。在一些实施方式中,多个基因选自从表1-11选择的表中列举的基因。

[0020] 在一些实施方式中,细胞群体来源于离体生长的细胞。在一些实施方式中,细胞群体来源于在三维培养物中生长的细胞。在一些实施方式中,细胞群体来源于人脂肪组织源细胞(HATDC)。在一些实施方式中,细胞群体来源于经历成骨分化的HATDC。

[0021] 在一些实施方式中,对照表达水平对应于第二细胞群体,第二细胞群体来源于在二维培养物中生长的细胞。在一些实施方式中,第二细胞群体是经历成骨分化的细胞群体。

[0022] 在一些实施方式中,成骨分化通过一种或多种成骨诱导物进行诱导,该一种或多种成骨诱导物选自:骨形态发生蛋白(BMP)-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7。

[0023] 在一些实施方式中,本发明的组合物用于向需要其的对象的移植中。

[0024] 在一些实施方式中,表达水平差异(对于每个基因独立地)选自上调和下调。

[0025] 在一些实施方式中,本发明的方法的确定步骤包括从所述细胞群体获得核酸分子的步骤。在一些实施方式中,核酸分子选自mRNA分子、DNA分子和cDNA分子。在一些实施方式中,通过反转录所述mRNA分子获得cDNA分子。

[0026] 在一些实施方式中,本发明的方法的确定步骤进一步包括使所述核酸分子与多个配体杂交的步骤,每个配体能够特异性地与单一基因复合、结合、杂交,或定量地检测或识别单一基因,该单一基因选自表1-11中列举的基因。

[0027] 根据另一方面,本发明提供包括多种配体的试剂盒,每种配体能够特异性地与单一基因复合、结合、杂交,或定量地检测或识别单一基因,该单一基因选自从表1-11选择的至少两个表选择的多个基因。在一些实施方式中,试剂盒用于识别适合移植入对象的细胞群体。在一些实施方式中,差异选自上调、下调或其组合。在一些实施方式中,多个基因选自表1-11的每一个中的一个或多个基因。在一些实施方式中,多个基因选自从表1-11选择的表中列举的基因。在一些实施方式中,多个基因选自表1-11的每一个中的一个或多个基因。在一些实施方式中,多个基因包括表1-11中列举的至少50%的基因。

[0028] 除了上面描述的示例性方面和实施方式,通过参考附图和通过研究下面的详细描述,进一步方面和实施方式将变得明显。

## 附图说明

[0029] 图1A-C是显示(A) BMP-2、(B) SP7和(C) ALP的qPCR分析的柱状图:在成骨诱导的0、1、2、3或4天后在无机物颗粒上的2D和3D系统中培养的HADTC中表达的与在2D系统中培养的未处理的HADTC相比;

[0030] 图2A-C是显示(A) BMP-2、(B) SP7和(C) ALP的qPCR分析的柱状图:在成骨诱导的0、1、2、3或4天后在无机物颗粒上的2D和3D系统中培养的HADTC中表达的与在2D系统中培养的未处理的HADTC相比;

[0031] 图3A-C是显示(A) BMP-2、(B) SP7、和(C) ALP的qPCR分析的柱状图:在成骨诱导的0、1、2、3或4天后在无机物颗粒上的2D和3D系统中培养的HADTC中表达的与在2D系统中培养的未处理的HADTC相比;

[0032] 图4是说明方差分量的比例的柱状图分析;

[0033] 图5是说明相对于对照(BL)导致每个处理组(A、B或C)的差异表达的基因(DEG)的数量的维恩图;

[0034] 图6A-C是说明相对于对照(BL)每个处理组(A) A组、(B) B组和(C) C组的基因表达差异的显著性的图,每个图的y轴代表p值的负 $\log_{10}$ ,因此0.01的p值由y轴上的值2表示,0.001的p值由y轴上的值3表示。

[0035] 图7是处理组A、B、C和BL的分层聚类(热图)。

[0036] 图8说明了相对于对照(BL),处理组A、B和C中基因表达水平差异的比较分析;

[0037] 图9说明了相对于对照组(BL),处理组A、B和C中涉及成骨细胞分化的基因表达水平差异的分析;

[0038] 图10A-B说明了相对于对照组(BL),处理组(A) A、(B) B和C中涉及血管发生和血管化途径的基因表达水平差异的分析;

[0039] 图11是列举与2D系统相比在3D系统中培养的HADTC的示例性差异表达基因 (DEG) 的表(表11)。

### 具体实施方式

[0040] 在一些实施方式中,本发明提供了包括细胞群体的组合物,该细胞群体的特征在于表1-11中所示的基因表达概括(profile)。在一些实施方式中,细胞群体用于移植、植入、施用和/或注射入需要其的患者中。在一些实施方式中,细胞群体来源于离体生长的细胞。

[0041] 在一些实施方式中,本发明提供了确定组合物是否适合移植入需要其的患者中的方法。在另外的实施方式中,本发明提供了可用于确定组合物是否适合移植入需要其的患者中的一组基因。

[0042] 本发明部分基于以下发现:本发明的细胞群体可以特征在于多个基因的基因表达特征。如本文下面所示例,选自表1-11的基因的表达水平可被用于区分细胞(如,人脂肪组织源细胞或HADTC),这些细胞在3维(3D)培养物中培育和/或经历成骨诱导为其他细胞(如,在2维(2D)培养物中培育的HADTC)。

[0043] 在一些实施方式中,如本文公开的包括细胞群体的组合物进一步包括无机物颗粒。在一些实施方式中,组合物是可用于骨移植的可移植的3-维(3D)组合物。在一些实施方式中,细胞群体来源于在3D培养物中培育的细胞。在一些实施方式中,在3D培养物中培育的细胞进一步经历成骨诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过成骨诱导物(如,骨形态发生蛋白(BMP)-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6或BMP-7)进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-2进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-3进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-4进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-5进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-6进行诱导。在一些实施方式中,成骨分化通过BMP-7进行诱导。

[0044] 在一些实施方式中,细胞群体来源于无机物支架上的3D培养物中培育的并经历成骨诱导的HADTC。

[0045] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体是异质细胞群体。在一些实施方式中,异质细胞群体允许各种应用,包括适用于关节缺陷的组合骨和软骨移植和/或骨血管化移植。在一些实施方式中,包括细胞群体的组合物被用于在需要其的患者中进行移植。在另一实施方式,组合物被用于填充骨内的间隙。

[0046] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体具有有利的移植性质。在一些实施方式中,本发明的细胞群体具有改进的移植结果。在一些实施方式中,所述改进的移植结果是超过50%、超过55%、超过60%、超过70%、超过75%、超过80%、超过85%、超过90%、超过95%、超过97%、超过98%或超过99%的实现成功移植(如,在所述对象内移植的细胞群体的融合)的概率。

[0047] 在一些实施方式中,本发明提供用于确定细胞组合物是否具有超过60%、超过70%、超过75%、超过80%、超过85%、超过90%或超过95%的实现成功移植(如,在所述对象内移植的细胞群体的融合)的概率的方法。

[0048] 如本文所使用,术语“对象”指动物,如非人类哺乳动物或人类。非人类动物对象还可包括动物的产前形式,诸如胚胎或胎儿。非人类动物的非限制性实例包括:马、牛、骆驼、

山羊、绵羊、狗、猫、非人类灵长类动物、小鼠、大鼠、兔、仓鼠、豚鼠和猪。在一个实施方式中，对象是人类。人类对象还可包括胎儿。在一个实施方式中，需要其的对象是受断骨、骨损伤、骨量减少和/或骨异常折磨的对象。

[0049] 如本文所使用，术语植入 (implanting或implantation)、移植 (transplanting或transplantation)、施用 (administering或administration)、注射 (injecting或injection)、递送 (delivering或delivery) 全部指向治疗的部位提供本文公开的组合物过程，并且本领域技术人员将理解其具有相同的含义，其取决于进行将组织递送到部位所采用的组合物性质和过程。这些术语可互换地使用并且绝不旨在限制本发明的方法。

[0050] 如本文所使用，术语“基因表达概括”、“基因表达特征”或“基因表达指纹”可互换，并且指与来源于对照细胞 (如，在2D培养物中培育和经历或不经历成骨诱导的细胞) 的群体相比由本发明的异质细胞群体展现的基因表达调节/差异的模式，包括表达的增加或减少。概括或指纹包括与对照相比“差异表达基因” (DEG) 表达的增加或减少的相对程度。

[0051] 术语“差异表达基因”、“DEG”、“差异基因表达”及其同义词互换地使用，其指与对照相比在选定的细胞群体中其表达被上调或下调至更高或更低水平的基因。还应当理解，差异表达基因可以在核酸水平或蛋白质水平下被活化或抑制，或者可以经历可选的剪接以导致不同的多肽产物。例如，这样的差异可以通过mRNA水平、表面表达、多肽的分泌或其他分配的改变进行证明。

[0052] 如本文所使用，“表达水平差异”和“表达水平的调节”以及其同义词互换地使用，其指基因表达的显著差异。该术语涵盖基因表达增加和/或基因表达减少。

[0053] 在测量的表达水平的背景下，术语“显著差异”包括检查的基因的上调/增加/诱导和/或下调/减少/降低，或其组合 (诸如，检查的表达概括的第一基因可以被上调而表达概括的第二基因可以被下调)。

[0054] 在一些实施方式中，确定特定基因的上调或下调指示测试的群体是否适合移植是基于表1-11中列举的数据 (使用“+”或“-”描绘)。在一些实施方式中，所述的显著差异是统计学上显著的差异，诸如在平均表达水平中，如本领域技术人员所认识的。例如，不受限制，与对照值相比，约至少两倍的增加或减少或可选地约至少三倍的增加或减少与细胞分化的具体阶段相关。

[0055] 术语“减少”、“下调”和“降低”在本文中可交换地使用，以指示基因表达的统计学上显著的减少。在一些实施方式中，减少指至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或10倍的减少。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0056] 如本文所使用，术语“增加”、“上调”和“诱导”在本文中可交换地使用，以指示基因表达的统计学上显著的增加。在一些实施方式中，增加指至少1.2、至少1.3、至少1.4、至少1.5、至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或10倍的增加。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0057] 组合物

[0058] 根据一个方面，提供了包括细胞群体的组合物，其中组合物特征在于表1-11中任一个中所示的基因表达概括。在一些实施方式中，细胞群体特征在于选自表1-10的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中，细胞群体特征在于选自表1-11的多个基因的表

达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表11的多个基因的表达水平的差异。

[0059] 在一些实施方式中,与对照群体相比,确定表达水平差异。在一些实施方式中,对照群体是来源于2维(2D)培养物中培育的细胞的群体。在一些实施方式中,对照群体来源于2D培养物中培育并经历成骨诱导的细胞。

[0060] 在一些实施方式中,细胞群体特征在于多个基因的表达水平的差异,该多个基因选自以下基因:选自表1的一个或多个基因、选自表2的一个或多个基因、选自表3的一个或多个基因、选自表4的一个或多个基因、选自表5的一个或多个基因、选自表6的一个或多个基因、选自表7的一个或多个基因、选自表8的一个或多个基因、选自表9的一个或多个基因、选自表10的一个或多个基因、和/或选自表11的一个或多个基因,或其组合。在一些实施方式中,多个基因包括来自表1-11的每一个的一个或多个基因。在一些实施方式中,多个基因选自从表1-11选择的表中列举的基因。在一些实施方式中,一个或多个基因是至少两个基因,或至少3个基因,或至少4个基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0061] 在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表1的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表2的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表3的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表4的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表5的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表6的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表7的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表8的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表9的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表10的多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,细胞群体特征在于选自表11的多个基因的表达水平的差异。

[0062] 根据一些实施方式,多个基因包括表1-11中列举的至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30、至少31、至少32、至少33、至少34、至少35、至少36、至少37、至少38、至少39、至少40、至少41、至少42、至少43、至少44、至少45、至少46、至少47、至少48、至少49、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95个不同的基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0063] 根据一些实施方式,多个基因包括表1-11中列举的至多2、至多3、至多4、至多5、至多6、至多7、至多8、至多9、至多10、至多11、至多12、至多13、至多14、至多15、至多16、至多17、至多18、至多19、至多20、至多21、至多22、至多23、至多24、至多25、至多26、至多27、至多28、至多29、至多30、至多31、至多32、至多33、至多34、至多35、至多36、至多37、至多38、至多39、至多40、至多41、至多42、至多43、至多44、至多45、至多46、至多47、至多48、至多49、至多50、至多55、至多60、至多65、至多70、至多75、至多80、至多85、至多90、至多95个不同的基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0064] 根据一些实施方式,多个基因包括表11中列举的至多2、至多3、至多4、至多5、至多6、至多7、至多8、至多9、至多10、至多11、至多12、至多13、至多14、至多15、至多16、至多17、

至多18、至多19、至多20、至多21、至多22、至多23、至多24、至多25、至多26、至多27、至多28、至多29、至多30、至多31、至多32、至多33、至多34、至多35、至多36、至多37、至多38、至多39、至多40、至多41、至多42、至多43、至多44、至多45、至多46、至多47、至多48、至多49、至多50、至多55、至多60、至多65个基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0065] 根据一些实施方式,多个基因包括表1-11中列举的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%的基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0066] 根据另一实施方式,多个基因包括表1中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表2中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表3中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表4中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表5中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表6中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表7中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表8中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表9中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表10中列举的所有基因,或由其组成。根据另一实施方式,多个基因包括表11中列举的所有基因,或由其组成。

[0067] 本发明的细胞群体的基因表达

[0068] MSC标记物的下调

[0069] 如以下实施例部分中所示例的,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于降低干细胞相关基因,所述干细胞相关基因选自:ANPEP (CD13)、NT5E (CD73)、THY1 (CD90)和KLF4(如表1b中所指示的)。

[0070] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表1中列举的一种或多种MSC标记物基因的表达水平的差异,所述MSC标记物基因包括:ANPEP (CD13)、NT5E (CD73)、THY1 (CD90)和KLF4。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于选自ANPEP (CD13)、NT5E (CD73)、THY1 (CD90)和KLF4的一种或多种基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于选自ANPEP (CD13)、NT5E (CD73)、THY1 (CD90)和KLF4的一种或多种基因的表达水平的减少。

[0071] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自ANPEP (CD13)、NT5E (CD73)、THY1 (CD90)和KLF4的一种或多种基因的表达水平的减少指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,相对于对照群体,NT5E (CD73)的表达水平的减少指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0072] 表1. 干细胞标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
ANPEP (CD13)	290	-
NT5E (CD73)	4907	-
THY1 (CD90)	7070	-
KLF4	9314	-

## [0074] 增殖和分化调节基因的表达

[0075] 如以下实施例部分中所示例的,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于表2b中所指示的基因表达水平的差异。进一步,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于选自AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1和ANXA2的增殖调节基因的表达减少。进一步,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于选自SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC的分化调节基因的表达水平的诱导。如在实施例部分中进一步所示例的,经历成骨诱导的在2D或3D培养物中生长的HATDC特征在于选自ID1、ID2和ID3的增殖调节基因的表达水平的差异。

[0076] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表2中列举的一个或多个基因的表达水平的差异,包括:AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1、ANXA2、SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC。在一些实施方式中,本发明的细胞特征在于与对照相比选自AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1、ANXA2、SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞特征在于与对照相比选自AURKA、FGF2、BCL2L1、ANXA2和SFRP2的一个或多个基因的表达水平的差异。

[0077] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比选自AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1和ANXA2的一个或多个基因的表达水平减少。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比选自AURKA、FGF2、BCL2L1和ANXA2的一个或多个基因的表达水平降低。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比选自SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC的一个或多个基因的表达水平增加。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比SFRP2的表达水平增加。

[0078] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1、ANXA2、SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自SFRP2、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC的一个或多个的基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自AURKA、FOS、FGF2、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1和ANXA2的一个或多个基因的表达水平的降低指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,SFRP2的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

## [0079] 表2. 增殖标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
[0080] AURKA	6790	-
FOS	14281	-
SFRP2	6423	+

[0081]	FGF2 (bFGF)	2247	-
	BCL2L1	598	-
	MRAS	22808	+
	NOX4	50507	+
	DDX21	9188	-
	RRAS2	22800	-
	STAT1	6772	-
	ANXA2	302	-
	NOTCH3	4854	+
	RGCC	28984	+

[0082] MHC I 基因的表达

[0083] 如以下实施例部分中所示例的,与在2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于MHC I 基因的表达水平的诱导(如表3b中所指示)。

[0084] 如本文所使用,术语“MHC”指主要组织相容性复合体,其参与外来抗原呈递至免疫系统。如本文所使用,“HLA”是人形式的“MHC”。通常,MHC I 基因几乎在所有分化的细胞中表达。已知间充质干细胞(MSC)表达低水平的MHC I 类分子。

[0085] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表3中列举的一个或多个基因的表达水平的差异,所述基因包括:LA-A、HLA-B、HLA-DMA、HLA-F、HLA-G和HLA-H。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照细胞群体相比,一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,一个或多个基因选自:HLA-A、HLA-B、HLA-DMA、HLA-F、HLA-G和HLA-H。在一些实施方式中,一个或多个基因选自:HLA-A、HLA-B、HLA-F、HLA-G和HLA-H。在一些实施方式中,选自HLA-A、HLA-B、HLA-DMA、HLA-F、HLA-G和HLA-H的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自HLA-A、HLA-B、HLA-DMA、HLA-F、HLA-G和HLA-H的多个基因的表达水平的增加指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自HLA-A、HLA-B、HLA-F、HLA-G和HLA-H的多个基因的表达水平的增加指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0086] 表3.MHC I 标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID	相对于对照的表达
HLA-A	3105	+
HLA-B	3106	+
HLA-DMA	3108	+
HLA-F	3133	+
HLA-G	3135	+
HLA-H	3136	+

[0089] 脂肪细胞标记物的表达

[0090] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培

养物中培育的细胞的细胞群体特征在于多个脂肪细胞标记物基因的表达水平的差异(如表4b中所指示的)。

[0091] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,表4中列举的一个或多个基因的表达水平的差异,所述基因包括:PPARG、DLK1、ACSL1、AEBP1和Sox9。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自PPARG、DLK1、ACSL1、AEBP1和Sox9的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于AEBP1的表达水平的差异。

[0092] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自PPARG和ACSL1的一个或多个基因的表达水平的降低。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,PPARG和ACSL1的表达水平的降低。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自DLK1、AEBP1和Sox9的多个脂肪细胞基因标记物的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于AEBP1的表达水平的诱导。

[0093] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自PPARG、DLK1、ACSL1、AEBP1和Sox9的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自DLK1、AEBP1和Sox9的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,AEBP1的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自PPARG和ACSL1的一个或多个基因的表达水平的降低指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0094] 表4. 脂肪细胞标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
PPARG	5468	-
DLK1	8788	+
ACSL1	2180	-
AEBP1	11568	+
SOX9	6662	+

[0096] 成骨细胞标记物的表达

[0097] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于多个成骨细胞标记物基因的表达水平的差异(如表5b中所指示的)。

[0098] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表5中列举的一个或多个成骨细胞标记物基因的表达水平的差异,所述标记物基因包括:BMP2、BMP2、SP7、ALP(碱性磷酸酶)、POSTN、FGFR3、Msx1(Hox7)、Msx2(Hox8)、DLX5、KAZALD1、CA12、BMPER和FBN2。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMP2、BMP2、SP7、ALP(碱性磷酸酶)、POSTN、FGFR3、Msx1(Hox7)、Msx2(Hox8)、DLX5、KAZALD1、CA12、BMPER和FBN2的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMP2、ALP(碱性磷酸酶)、POSTN、Msx1(Hox7)、Msx2(Hox8)、CA12、BMPER和FBN2的一个或多

个基因的表达水平的差异。

[0099] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMPER和FBN2的一个或多个基因的表达水平减少。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,BMPER和FBN2的表达水平减少。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,FBN2的表达水平减少。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMP2、BMP2、SP7、ALP (碱性磷酸酶)、POSTN、FGFR3、Msx1 (Hox7)、Msx2 (Hox8)、DLX5、KAZALD1和CA12的一个或多个基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMP2、ALP、POSTIN、MSX1、MSX2和CA12的一个或多个基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BMP2、SP7和ALP (碱性磷酸酶)的一个或多个基因的表达水平的诱导。

[0100] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BMP2、BMP2、SP7、ALP (碱性磷酸酶)、POSTN、FGFR3、Msx1 (Hox7)、Msx2 (Hox8)、DLX5、KAZALD1、CA12、BMPER和FBN2的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BMP2、ALP (碱性磷酸酶)、POSTN、Msx1 (Hox7)、Msx2 (Hox8)、CA12和FBN2的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BMP2、BMP2、SP7、ALP (碱性磷酸酶)、POSTN、FGFR3、Msx1 (Hox7)、Msx2 (Hox8)、DLX5、KAZALD1、CA12的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0101] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BMP2、ALP (碱性磷酸酶)、POSTN、Msx1 (Hox7)、Msx2 (Hox8)和CA12的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BMPER和FBN2的一个或多个基因的表达水平的降低指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,FB2的水平降低指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0102] 表5. 成骨细胞标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
BMP2	650	+
BMPR2	659	+
SP7	121340	+
ALP	836158	+
POSTN	10631	+
[0103] FGFR3	2261	+
MSX1 (Hox7)	4487	+
MSX2 (Hox 8)	4488	+
DLX5	1749	+
KAZALD1	81621	+
CA12	771	+
BMPER	168667	-
FBN2	2201	-

[0104] 骨软骨先祖和肥大软骨细胞基因标记物的表达

[0105] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于多个骨软骨先祖和/或肥大软骨细胞基因标记物的表达水平的差异(如表6b中所指示的)。

[0106] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表6中列举的一个或多个骨软骨先祖和/或肥大软骨细胞基因标记物的表达水平的差异,所述基因标记物包括:Sox9、MGP、COL10A1、COL9A2、MMP13、GSN、CBFB、BAPX1 (NKX3-2)、RUNX1、RUNX2和COMP。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自Sox9、MGP、COL10A1、COL9A2、MMP13、GSN、CBFB、BAPX1 (NKX3-2)、RUNX1、RUNX2和COMP的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP13、RUNX1和RUNX2的一个或多个基因的表达水平的差异。

[0107] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自Sox9、MGP、COL10A1、COL9A2、MMP13、GSN、CBFB、BAPX1 (NKX3-2)、RUNX1、RUNX2和COMP的一个或多个基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP13、RUNX1和RUNX2的一个或多个基因的表达水平的诱导。

[0108] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自Sox9、MGP、COL10A1、COL9A2、MMP13、GSN、CBFB、BAPX1 (NKX3-2)、RUNX1、RUNX2和COMP的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自Sox9、MGP、COL10A1、COL9A2、MMP13、GSN、CBFB、BAPX1 (NKX3-2)、RUNX1、RUNX2和COMP的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自MMP13、RUNX1和RUNX2的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0109] 表6. 骨软骨先祖和/或肥大软骨细胞基因标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
SOX9	6662	+
MGP	4256	+
COL10A1	1300	+
COL9A2	1298	+
[0110] MMP13	4322	+
GSN	2934	+
CBFB	865	+
BAPX1 (NKX3-2)	579	+
RUNX1	861	+
RUNX2	860	+
COMP	1311	+

[0111] ECM基因标记物的表达

[0112] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,本发明的细胞群体特征在于多个胞外基质 (ECM) 标记物基因的表达水平的差异 (如表7b中所指示的)。

[0113] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表7中列举的一个或多个ECM标记物基因的表达水平的差异,所述标记物基因包括:BGN、LAMA4、LAMA2、LTBP3、DPT、EFEMP2、PLOD1、TNC、DCN、FBLN2、NDNF和SULF1。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、LTBP3、DPT、EFEMP2、PLOD1、TNC、DCN、FBLN2、NDNF和SULF1的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、DPT、PLOD1、DCN和NDNF的一个或多个基因的表达水平的差异。

[0114] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、LTBP3、DPT、EFEMP2、PLOD1、TNC、DCN、FBLN2、NDNF和SULF1的一个或多个基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、DPT、PLOD1、DCN和NDNF的一个或多个基因的表达水平的诱导。

[0115] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、LTBP3、DPT、EFEMP2、PLOD1、TNC、DCN、FBLN2、NDNF和SULF1的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、LTBP3、DPT、EFEMP2、PLOD1、TNC、DCN、FBLN2、NDNF和SULF1的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自BGN、LAMA4、LAMA2、DPT、PLOD1、DCN和NDNF的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0116] 表7. ECM基因标记物的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表 达
BGN	633	+
LAMA4	3910	+
LAMA2	3908	+
LTBP3	4054	+
DPT	1805	+
EFEMP2	30008	+
PLOD1	5351	+
TNC	3371	+
DCN	1634	+
FBLN2	2199	+
NDNF	79625	+
SULF1	23213	+

[0117] 编码结构蛋白的基因的表达

[0119] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于一个或多个结构蛋白基因的表达水平的差异(如表8b中所指示的)。

[0120] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表8中列举的一个或多个结构基因的表达水平的差异,所述结构基因包括:MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、MMP7、COL16A1、COL24A1、COL6A2、COL7A1、COL8A2、ADAMTS2和PCOLCE。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、MMP7、COL16A1、COL24A1、COL6A2、COL7A1、COL8A2、ADAMTS2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、COL6A2、COL7A1、COL8A2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的差异。

[0121] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、MMP7、COL16A1、COL24A1、COL6A2、COL7A1、COL8A2、ADAMTS2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、COL6A2、COL7A1、COL8A2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的诱导。

[0122] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、MMP7、COL16A1、COL24A1、COL6A2、COL7A1、COL8A2、ADAMTS2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、MMP7、COL16A1、COL24A1、COL6A2、COL7A1、COL8A2、ADAMTS2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自MMP14、MMP2、MMP23B、MMP3、COL6A2、COL7A1、COL8A2和PCOLCE的一个或多个结构蛋白基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0123] 表8. 结构蛋白的基因表达

[0124]

基因名称	Entrez 基因 ID ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	相对于对照的表达
MMP14	4323	+
MMP2	4313	+
MMP23B	8510	+
MMP3	4314	+
MMP7	4316	+
COL16A1	1307	+
COL24A1	255631	+
COL6A2	1292	+
COL7A1	1294	+
COL8A2	1296	+
ADAMTS2	9509	+
PCOLCE	5118	+

[0125] 生成血管的和血管原性的相关基因的表达

[0126] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于一个或多个血管相关标记物基因的表达水平的差异(如表9b中所指示的)。

[0127] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表9中列举的一个或多个生成血管的和血管原性的相关基因的表达水平的差异,所述基因包括:TBX2、TBX3、ANG、ANGPT2、ANGPTL2、TRO、EDNRA、EPHA2、F2R、PGF、CTHRC1、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18)、IL11、HEY1、ECM1、MFGE8、和SRPX2和UNC5B。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TBX2、TBX3、ANG、ANGPT2、ANGPTL2、TRO、EDNRA、EPHA2、F2R、PGF、CTHRC1、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18)、IL11、HEY1、ECM1、MFGE8、和SRPX2和UNC5B的一个或多个基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自ANGPT2、ANGPTL2、TRO、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18) 和ECM1的一个或多个基因的表达水平的差异。

[0128] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TBX2、TBX3、ANG、ANGPT2、ANGPTL2、TRO、EDNRA、EPHA2、F2R、PGF、CTHRC1、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18)、IL11、HEY1、ECM1、MFGE8、和SRPX2和UNC5B的一个或多个基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自ANGPT2、ANGPTL2、TRO、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18) 和ECM1的一个或多个基因的表达水平的诱导。

[0129] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自TBX2、TBX3、ANG、ANGPT2、ANGPTL2、TRO、EDNRA、EPHA2、F2R、PGF、CTHRC1、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18)、IL11、HEY1、ECM1、MFGE8、和SRPX2和UNC5B的一个或多个基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自TBX2、TBX3、ANG、ANGPT2、ANGPTL2、TRO、EDNRA、EPHA2、F2R、PGF、CTHRC1、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18)、IL11、HEY1、ECM1、MFGE8、和

SRPX2和UNC5B的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自ANGPT2、ANGPTL2、TRO、PTGDS、AEBP1、IL8 (Cxc18) 和ECM1的一个或多个基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0130] 表9.生成血管的和血管原性的相关基因的基因表达

基因名称	Entrez 基因 ID	相对于对照的表达
TBX2	6909	+
TBX3	6926	+
ANG	283	+
ANGPT2	285	+
ANGPTL2	23452	+
TRO	7216	+
EDNRA	1909	+
EPHA2	1969	+
[0131] F2R	2149	+
PGF	5228	+
CTHRC1	115908	+
PTGDS	5730	+
AEBP1	165	+
IL8 (Cxc18)	3576	+
IL11	3598	+
HEY1	23462	+
ECM1	1893	+
MFGE8	4240	+
[0132] SRPX2	27286	+
UNC5B	219699	+

[0133] 特异性上游调节子的表达

[0134] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于一个或多个上游调节子基因的表达水平的差异(如表10b中所指示的)。

[0135] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表10中列举的一个或多个上游调节子基因的表达水平的差异,所述上游调节子基因包括:TGFB3、BAMBI、IGFBP2和IGFBP5。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TGFB3、BAMBI、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的差异。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TGFB3、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的差异。

[0136] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TGFB3、BAMBI、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的诱导。在一些实施方式中,本

发明的细胞群体特征在于与对照相比,选自TGFB3、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的诱导。

[0137] 在一些实施方式中,与对照群体相比,选自TGFB3、BAMBI、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的差异指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自TGFB3、BAMBI、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,与对照群体相比,选自TGFB3、IGFBP2和IGFBP5的一个或多个上游调节子基因的表达水平的诱导指示该细胞群体适合于移植入需要其的对象中。

[0138] 表10. 上游调节子的基因表达

[0139]

基因名称	Entrez基因ID	相对于对照的表达
TGFB3	7043	+
BAMBI	25805	+
IGFBP2	3485	+
IGFBP5	3488	+

[0140] 如以下实施例部分中所示例的,与2D培养物中培养的对照群体相比,来源于3D培养物中培育的细胞的细胞群体特征在于一个或多个基因的表达水平的差异(如表11中所指示的)。

[0141] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表11中列举的一个或多个基因的表达水平的至少2倍变化。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表11中列举的一个或多个基因的表达水平的至少3倍变化。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表11中列举的一个或多个基因的表达水平的至少3倍减少,所述基因包括:CLDN1、SFRP1、BCYRN、CDCA7、FLJ21986、ODC1、OSR1、LOC100130516和ROR1。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于选自CLDN1、SFRP1、BCYRN、CDCA7、FLJ21986、ODC1、OSR1、LOC100130516和ROR1的一个或多个基因的表达水平的至少3倍减少。

[0142] 在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于表11中列举的一个或多个基因的表达水平的至少3倍增加,所述基因包括:ALOX15B、HEPH、FNDC1、C14ORF132、PFKFB4、GABARAPL1、CRISPLD2、C13ORF15、SLC6A10P、JAM2、NBL1、OGN、ASS1、SSPN、ALOX15B、TMEM90B、FLJ35258、TMEM16A、CRLF1、CD24、CMTM8、ARHGEF19、OMD、BTBD11CYGB、C1QTNF5、MARCKSL1、INSC、ATP1B1、CPE、NBL1、ENC1、APCDD1L、SEZ6L2、SLC7A8、ISLR、ATP1B1、TSPAN7、SAMD11、ATP1B1、ALDOC、RGS2、DYNC1I1、RASL11B、EYA2、DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少3倍增加:ALOX15B、HEPH、FNDC1、C14ORF132、PFKFB4、GABARAPL1、CRISPLD2、C13ORF15、SLC6A10P、JAM2、NBL1、OGN、ASS1、SSPN、ALOX15B、TMEM90B、FLJ35258、TMEM16A、CRLF1、CD24、CMTM8、ARHGEF19、OMD、BTBD11CYGB、C1QTNF5、MARCKSL1、INSC、ATP1B1、CPE、NBL1、ENC1、APCDD1L、SEZ6L2、SLC7A8、ISLR、ATP1B1、TSPAN7、SAMD11、ATP1B1、ALDOC、RGS2、DYNC1I1、RASL11B、EYA2、DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中,本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少4倍增加:FLJ35258、TMEM16A、CRLF1、

CD24、CMTM8、ARHGEF19、OMD、BTBD11CYGB、C1QTNF5、MARCKSL1、INSC、ATP1B1、CPE、NBL1、ENC1、APCDD1L、SEZ6L2、SLC7A8、ISLR、ATP1B1、TSPAN7、SAMD11、ATP1B1、ALDOC、RGS2、DYNC1I1、RASL11B、EYA2、DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中，本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少5倍增加：SLC7A8、ISLR、ATP1B1、TSPAN7、SAMD11、ATP1B1、ALDOC、RGS2、DYNC1I1、RASL11B、EYA2、DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。

[0143] 在一些实施方式中，本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少6倍增加：ATP1B1、TSPAN7、SAMD11、ATP1B1、ALDOC、RGS2、DYNC1I1、RASL11B、EYA2、DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中，本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少7倍增加：DIO2、CRYAB、KLK4、MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中，本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少8倍增加：MXRA5、CA9、H19、PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。在一些实施方式中，本发明的细胞群体特征在于选自以下基因中的一个或多个基因的表达水平的至少10倍增加：PENK、RARRES2、KANK4、PTGES和ANKRD38。

[0144] 表11. 具有显著表达调节的差异表达基因

[0145]

基因名称	Entrez 基因 ID	相对于对照的表达	基因名称	Entrez 基因 ID*	相对于对照的表达
CLDN11	5010	-	C1QTNF5	114902	+
SFRP1	6422	-	MARCKSL1	65108	+
BCYRN1	618	-	INSC	387755	+
CDCA7	83879	-	ATP1B1	481	+
ODC1	4953	-	CPE	1363	+
OSR1	13097	-	NBL1	4681	+
ROR1	4919	-	ENC1	8507	+
ALOX15B	247	+	APCDD1L	164284	+
HEPH	9843	+	SEZ6L2	26470	+
FND1	84624	+	SLC7A8	23428	+
C14ORF132	56967	+	ISLR	3671	+
CYGB	114757	+	ATP1B1	481	+
PFKFB4	5210	+	TSPAN7	7102	+
GABARAPL1	23710	+	SAMD11	148398	+
CRISPLD2	83716	+	ATP1B1	481	+
RGCC (C13ORF15)	28984	+	ALDOC	230	+
SLC6A10P	386757	+	RGS2	5997	+
JAM2	58494	+	DYNC111	1780	+
NBL1	4681	+	RASL11B	65997	+
OGN	4969	+	EYA2	2139	+
ASS1	445	+	DIO2	1734	+
SSPN	8082	+	CRYAB	1410	+
ALOX15B	247	+	KLK4	9622	+
SYNDIG1 (TMEM90B)	79953	+	MXRA5	25878	+
CRLF1	9244	+	CA9	768	+
CD24	100133941	+	H19	283120	+
CMTM8	152189	+	PENK	5179	+
ARHGEF19	128272	+	RARRES2	5919	+
OMD	4958	+	KANK4	163782	+
BTBD11	121551	+	PTGES	9536	+

[0146] 成骨诱导后表达的调节

[0147] 如以下实施例部分中所示例的(表12),发现经历成骨诱导的HATDC展现基因 ATOH8、CGB1、CMTM4、FOXO、ID1、ID2、ID3、NEBL、OSR1、PRRX2、SAMD11、SLC16A3和SMAD9的表达

水平的调节。

[0148] 在一些实施方式中,来源于经历成骨诱导的细胞的细胞群体特征在于选自以下的基因中的一个或多个基因的表达水平的差异:ATOH8、CGB1、CMTM4、FOXO、ID1、ID2、ID3、NEBL、OSR1、PRRX2、SAMD11、SLC16A3和SMAD9。在一些实施方式中,来源于经历成骨诱导的细胞的细胞群体特征在于选自以下的基因中的一个或多个基因的诱导:ATOH8、CGB1、CMTM4、FOXO、ID1、ID2、ID3、NEBL、PRRX2、SAMD11、SLC16A3和SMAD9。在一些实施方式中,来源于经历成骨诱导的细胞的异质细胞群体特征在于OSR1基因的表达水平的降低。

[0149] 识别适合于移植的组合物的方法

[0150] 根据一个方面,提供了确定细胞组合物用于移植的适合性的方法,该方法包括确定所述组合物的多个基因或其产物的表达水平,其中与对照相比多个基因的表达水平的显著差异是组合物适合移植的指示。

[0151] 在一些实施方式中,多个基因选自表1-11中列举的基因。在一些实施方式中,多个基因选自表1-11的每一个中的一个或多个基因。在一些实施方式中,多个基因选自从表1-11中选择的表中列举的基因。在一些实施方式中,多个基因选自表1-11的任一个中列举的基因。

[0152] 在一些实施方式中,对照群体是来源于2维(2D)培养物中培育的细胞的群体。在一些实施方式中,对照群体来源于2D培养物中培育并经历成骨诱导的细胞。

[0153] 术语“确定”、“测量”、“评估”和“分析”可互换地使用并且包括定量和定性确定两者。这些术语指任何形式的测量,并且包括确定特性、特点或特征是否存在。评估可以是相对的或绝对的。

[0154] 根据一些实施方式,多个基因包括表1-10中列举的至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29、至少30、至少31、至少32、至少33、至少34、至少35、至少36、至少37、至少38、至少39、至少40、至少41、至少42、至少43、至少44、至少45、至少46、至少47、至少48、至少49、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95个不同的基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。根据一些实施方式,多个基因包括表1-11中列举的至多2、至多3、至多4、至多5、至多6、至多7、至多8、至多9、至多10、至多11、至多12、至多13、至多14、至多15、至多16、至多17、至多18、至多19、至多20、至多21、至多22、至多23、至多24、至多25、至多26、至多27、至多28、至多29、至多30、至多31、至多32、至多33、至多34、至多35、至多36、至多37、至多38、至多39、至多40、至多41、至多42、至多43、至多44、至多45、至多46、至多47、至多48、至多49、至多50、至多55、至多60、至多65、至多70、至多75、至多80、至多85、至多90、至多95个不同的基因。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0155] 本文描述的多个基因任选地包括以至少一个其他标记物例如其他已知基因为特征的任意子组合和/或组合。

[0156] 基因表达的确定

[0157] 基因表达是通过RNA聚合酶将DNA转录为信使RNA。如本文所使用,术语“表达”指基因产物的生物合成,包括所述基因产物的转录和/或翻译。因此,核酸分子的表达可以指核酸片段的转录(如,转录导致mRNA或其他功能RNA)和/或RNA翻译成前体或成熟蛋白(多肽)。

[0158] 上调描述了已经观察到在一个样品(如,适合于移植的样品)中与另一个(如对照样品)相比具有更高的表达(如,更高的mRNA水平)的基因。下调描述了已经观察到在一个样品(如,适合移植的样品)中与另一个(如对照样品)相比具有更低的表达(如,更低的mRNA水平)的基因。

[0159] 在实施方式中,在蛋白质水平下测量基因表达。测量样品中蛋白质的量/水平的方法的实例包括但不限于:蛋白质印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、“夹心”免疫测定、放射免疫测定(RIA)、免疫沉淀、表面等离子体共振(SPR)、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学(IHC)分析、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、微细胞计数(microcytometry)、微阵列、抗体阵列、显微镜检查(如,电子显微镜检查)、流式细胞术和基于蛋白质组的分析。

[0160] 在另一实施方式,在核酸(mRNA、cDNA)水平下测量基因表达。

[0161] 术语“核酸”是本领域熟知的。如本文所使用,“核酸”通常是指包括核碱基的DNA、RNA或其衍生物或类似物的分子(即,链)。核碱基包括,例如,在DNA中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基(如,腺嘌呤“A”、鸟嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”或胞嘧啶“C”)或RNA中发现的天然存在的嘌呤或嘧啶碱基(如,A、G、尿嘧啶“U”或C)。术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”、“核酸序列”和“核酸分子”在本文中可互换使用。

[0162] 许多检测和定量技术可用于确定多个核酸的表达水平,包括但不限于:PCR、RT-PCR、RT-qPCR、NASBA、RNA印迹技术、杂交阵列、分支核酸扩增/技术、TMA、LCR、高通量测序或下一代测序(NGS)方法(诸如RNA-seq)、原位杂交技术、和扩增过程(然后进行HPLC检测或MALDI-TOF质谱法)。

[0163] 在本发明的实施方式中,可以通过诸如聚合酶链反应(PCR)及其变化的方法扩增和检测核酸的全部或部分,例如但不限于定量PCR(Q-PCR)、反转录PCR和实时PCR(包括作为测量样品中每个序列的mRNA拷贝的初始量的手段)。这些方法将利用与核酸的部分互补的一种或两种引物,其中引物用于引发(prime)核酸合成。新合成的核酸任选地被标记,并且可以直接检测或通过本发明的多核苷酸杂交检测。可以在允许其杂交的条件下使新合成的核酸与多核苷酸(包含序列)接触。检测表达的核酸表达的其他方法包括RNA酶保护测定,包括液相杂交和细胞的原位杂交。

[0164] 如本领域技术人员所理解的,核酸表达的检测可以通过检测这些核酸的任何适当部分或片段或整个核酸的表达来进行。优选地,该部分足够大以包含相对于样品中表达的其他序列的独特序列。而且,技术人员将认识到核酸的任一链可以作为核酸表达的指示物进行检测。这是因为核酸在细胞中表达为RNA分子,其可以转化为cDNA分子,以便于操作和检测。得到的cDNA分子可以具有表达的RNA的序列以及与其互补的链的那些序列。因此,可以检测RNA序列链或互补链中的任一个。当然,也可以检测没转化成cDNA的表达的RNA。

[0165] 在实施方式中,方法包括进行样品中存在的mRNA分子的反转录;和使用与cDNA杂交的引物扩增靶cDNA和一个或多个对照cDNA。

[0166] 用于测量RNA丰度的常用技术是RT-qPCR,其中反转录(RT)之后是实时定量PCR(qPCR)。可以使用市售的定量PCR的系统,例如Applied Biosystems®、Roche的LightCycler®、BioRad®的iCycler®等的“实时PCR系统”。反转录首先从RNA生成DNA模板。该单链模板被称为cDNA。然后,在定量步骤中扩增cDNA模板,在此期间,标记的杂交探针或嵌

入染料发出的荧光随着DNA扩增过程进展而变化。定量PCR产生原始RNA拷贝的增加或减少的测量,并且已经用于尝试限定与可相比的健康组织相比癌组织中基因表达的变化(Nolan T, et al. Nat Protoc 1:1559-1582, 2006; Paik S. The Oncologist 12:631-635, 2007; Costa C, et al. Transl Lung Cancer Research 2:87-91, 2013)。

[0167] 通过下一代测序(NGS)技术可能完成的大规模平行测序是另一种实现组织样品中RNA转录物计数的方法,并且RNA-seq是利用其的方法。它是目前用于转录组分析的最强大的分析工具,包括不同生理条件之间的基因表达水平差异,或发育期间或疾病进展过程中发生的变化。具体而言, RNA-seq可用于研究现象,如基因表达变化、可变剪接事件、等位基因特异性基因表达和嵌合转录物——其包括基因融合事件、新型转录物和RNA编辑。

[0168] 如本文所使用,术语“扩增(amplification或amplify)”意思是本领域已知的用于拷贝靶核酸——如表1-11中列举的基因——从而增加所选核酸序列的拷贝数的一个或多个方法。扩增可以是指数的或线性的。在具体实施方式中,靶核酸是RNA。

[0169] 如本文所使用,“核酸”泛指染色体的区段, DNA、cDNA和/或RNA的区段或部分。核酸可以来源于来自任何来源的原始分离的核酸样品或从其获得(如,从样品DNA或RNA中分离、纯化、扩增、克隆或反转录的)。

[0170] 如本文所使用,术语“寡核苷酸”指由脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其任何组合组成的短聚合物。寡核苷酸的长度通常在约10和约100个核苷酸之间。寡核苷酸通常为15至70个核苷酸长度,其中20至26个核苷酸是最常见的。寡核苷酸可用作引物或探针。如果当寡核苷酸和核酸比对时寡核苷酸与核酸的部分具有至少50%的序列同一性,则寡核苷酸对核酸是“特异性的”。对核酸特异性的寡核苷酸是在适当的杂交或洗涤条件下能够与感兴趣的靶标杂交并且基本上不与不感兴趣的核酸杂交的寡核苷酸。较高水平的序列同一性是优选的,并且包括至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的序列同一性。

[0171] 如本文所使用,在核酸背景中的“片段”指核苷酸残基序列,其具有至少约5个核苷酸、至少约7个核苷酸、至少约9个核苷酸、至少约11个核苷酸或至少约17个核苷酸。片段通常小于约300个核苷酸、小于约100个核苷酸、小于约75个核苷酸、小于约50个核苷酸、或小于约30个核苷酸。在某些实施方式中,片段可用于聚合酶链反应(PCR)或各种杂交程序以识别或扩增同一的或相关的DNA分子。

[0172] 如本文所使用,用于扩增的“引物”是寡核苷酸,其与靶核苷酸序列或标记物核苷酸序列特异性地退火。引物的3'核苷酸应当在相应的核苷酸位置与靶序列或标记物序列同一,以便通过聚合酶进行最佳引物延伸。如本文所使用,“正向引物”是与双链DNA(dsDNA)的反义链退火的引物。“反向引物”与dsDNA的有义链退火。

[0173] 如本文所使用,“靶核酸”指染色体的区段、具有或不具有基因间序列的完整基因、具有或不具有基因间序列的基因的区段或部分、或设计探针或引物的核酸的序列。靶核酸可以来源于基因组DNA、cDNA或RNA。如本文所使用,靶核酸可以是天然DNA或PCR-扩增的产物。

[0174] 以上描述的检测方法旨在示例如何可以实践本发明,而非旨在限制本发明的范围。考虑根据本发明可以采用用于检测对象样品中核酸的存在其他基于序列的方法。

[0175] 确定基因表达的试剂盒

[0176] 根据一些方面,试剂盒、面板(panel)或微阵列用于确定包括细胞群体的组合物是

否适合移植入需要其的对象中。在一些实施方式中,提供了包括多个配体的试剂盒、面板或微阵列,每个配体能够与选自表1-11中列举的基因的单一基因特异性复合、结合、杂交,或定量检测或识别选自表1-11中列举的基因的单一基因。在一些实施方式中,多个配体独立地能够检测或识别选自表1-11中列举的基因的多个基因。在一些实施方式中,多个配体独立地能够检测或者识别选自表1-11的表中列举的基因的多个基因。本文所描述的多个基因任选地包括以至少一个其他标记物例如其他已知的基因为特征的任何子组合和/或组合。在一些实施方式中,多个基因选自:选自表1的一个或多个基因、选自表2的一个或多个基因、选自表3的一个或多个基因、选自表4的一个或多个基因、选自表5的一个或多个基因、选自表6的一个或多个基因、选自表7的一个或多个基因、选自表8的一个或多个基因、选自表9的一个或多个基因、选自表10的一个或多个基因来、和/或选自表11的一个或多个基因,或其组合。

[0177] 在一些实施方式中,试剂盒、面板或微阵列包括至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、50、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000种不同的配体。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,试剂盒、面板或微阵列包括至多10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、50、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000种不同的配体。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0178] 术语“微阵列”指在基底上可杂交阵列元——优选多核苷酸探针——的有序排列。

[0179] 在某些实施方式中,一个或多个算法或计算机程序可用于将测试样品中每个基因的量化表达水平与预定截止值(或与多个预定截止值)相比。可选地,可以提供由人手动执行必要步骤的一个或多个指令。用于确定和相比模式分析的算法包括但不限于主成分分析、Fischer线性分析、神经网络算法、遗传算法、模糊逻辑模式识别等。在分析完成之后,所得到的信息可以例如被显示在显示器上、传输到主计算机或者存储在存储设备上以便随后检索。

[0180] 异质细胞群体

[0181] 根据一些实施方式,本发明的细胞群体是异质细胞群体。

[0182] 如本文所使用,术语“细胞群体”指表达相似或不同表型的至少两个细胞的组。在非限制性实例中,细胞群体可包括表达相似或不同表型的至少约10、至少约100、至少约200、至少约300、至少约400、至少约500、至少约600、至少约700、至少约800、至少约900、至少约1000个细胞。如本文所使用,术语“异质细胞群体”指至少两个细胞的组,其中至少部分细胞表达不同的表型。

[0183] 如本文所使用,术语“间充质干细胞”或“MSC”指能够在多个间充质谱系中产生分

化细胞的细胞,具体地是成骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和成软骨细胞。通常,间充质干细胞还具有一个或多个以下性质:经历异步或对称复制的能力,即分裂后的两个子细胞可具有不同的表型;广泛的自我更新能力;和它们存在的组织的克隆再生,例如,骨髓的非造血细胞。“先祖细胞”与干细胞不同,其在于它们通常不具有广泛的自我更新能力。

[0184] 在一些实施方式中,细胞群体是异质细胞群体。在一些实施方式中,异质细胞群体包括具有本文中描述的所述表达概括的至少10%细胞、至少20%细胞、至少30%细胞、至少50%细胞、至少50%细胞、至少60%细胞、至少70%细胞、至少80%细胞或至少90%细胞。

[0185] 在一些实施方式中,异质细胞群体包括选自以下的两种或多种细胞型:间充质干细胞、骨先祖细胞和生骨细胞。在一些实施方式中,异质细胞群体的30-70%的细胞是骨先祖细胞。在一些实施方式中,异质细胞群体的40-60%的细胞是骨先祖细胞。在一些实施方式中,异质细胞群体的50-60%的细胞是骨先祖细胞。

[0186] 在一些实施方式中,异质细胞群体来源于经历成骨诱导的细胞。

[0187] 术语“成骨”或“骨生成”指来自未分化的间充质干细胞和成骨细胞谱系的细胞的骨细胞的增殖和骨组织的生长(即,新骨基质的合成和沉积)。骨生成也指先祖或前体细胞分化或转分化为骨细胞(即,成骨细胞)。先祖或前体细胞可以是多能干细胞,其包括如间充质干细胞。先祖或前体细胞可以是预定向(pre-committed)为成骨细胞谱系(如,成前骨细胞)的细胞或未预定向为成骨细胞谱系(如,前脂肪细胞或成肌细胞)的细胞。

[0188] 如本文所使用,术语“分化”是指细胞从原始阶段到成熟形成的细胞发育,其与细胞表面抗原标记物的特性组的表达相关。分化是一种发育过程,因此细胞呈现特化的表型,例如,获得与其他细胞类型不同的一种或多种特性或功能。在一些情况下,分化的表型指在一些发育途径中处于成熟终点的细胞表型(“终末分化的细胞”)。

[0189] 术语“成骨诱导”指成骨分化的上调或刺激。

[0190] 在一个实施方式中,异质细胞群体来源于经历至少24小时的成骨引发时期的细胞。在另一实施方式,异质细胞群体来源于经历至少48小时的成骨引发时期的细胞。在另一实施方式,异质细胞群体来源于经历至少72小时的成骨引发时期的细胞。在另一实施方式,异质细胞群体来源于经历至少96小时的成骨引发时期的细胞。

[0191] 在一些实施方式中,细胞的成骨分化的诱导通过选自以下的一种或多种成骨诱导物实现:BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7。

[0192] 在一些实施方式中,利用至少25纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞以获得异质细胞群体。在另一实施方式,利用至少50纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞以获得异质细胞群体。在另一实施方式,利用至少75纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞以获得异质细胞群体。在另一实施方式,利用至少100纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞以获得异质细胞群体。在另一实施方式,利用至少150纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞以获得异质细胞群体。

[0193] 对于非限制性实例,异质细胞群体来源于使细胞经历成骨培养物分化条件,包括:由下面分子中的一种或多种以优选的浓度组成的成骨培养物分化培养基:地塞米松(10-200nM)、 $\beta$ -甘油磷酸钠(5-25mM)、1,25二羟基胆钙化醇(骨化三醇:1-50nM)、L-抗坏血酸-2-磷酸盐(0.05-500mM)和成骨诱导物(10ng/ml-10ug/ml)。

[0194] 在另一实施方式,利用至少150纳克/毫升的一种或多种成骨诱导物处理细胞48小

时以获得异质细胞群体。

[0195] 在一些实施方式中,细胞来源于干细胞。在一些实施方式中,干细胞是间充质干细胞(MSC)。在一些实施方式中,MSC是自体MSC。在一些实施方式中,MSC是同种异体MSC。在一些实施方式中,自体MSC来源于自体人脂肪组织,并且被称为人脂肪组织源细胞(HATDC)。在另一实施方式,人脂肪组织源细胞(HATDC)是通过吸脂手术从脂肪组织获得的细胞。

[0196] 如本文所使用,术语“人脂肪组织源细胞(HATDC)”指起源于脂肪组织的血管基质区室的细胞的异质群体,其可用作许多不同细胞疗法的替代细胞源。如本文所使用,HATDC包括细胞的异质群体,其包括多个:脂肪来源的干细胞(CD34<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD11b<sup>-</sup>、CD19、HLA-DR<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>),间充质细胞,间充质干细胞,血管平滑肌细胞(平滑肌 $\alpha$ -肌动蛋白阳性、结蛋白阳性、h-钙调结合蛋白阳性、平滑肌肌球蛋白重链阳性),骨先祖、成骨细胞、骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞和破骨细胞的任意组合中的脂肪形成、软骨形成和生骨细胞,以及内皮先祖细胞(EPC)(CD31<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD144<sup>+</sup>、CD146<sup>+</sup>、CD102)、造血先祖细胞(HPC-CD34<sup>+</sup>)和成熟EC(CD31<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD90<sup>-</sup>、CD144<sup>+</sup>、CD146<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>)。

[0197] 在一些实施方式中,在成骨诱导之前,在3维(3D)培养物中培育细胞。在一些实施方式中,在无机物支架上的3D培养物中培育细胞。在一些实施方式中,在生物反应器或动态生长系统中的3D培养物中培育细胞。在另一实施方式,本发明的细胞在37°C下在组织培养物培养箱中在5%CO<sub>2</sub>的湿润条件下维持和生长。

[0198] 在一些实施方式中,包括异质细胞群体的组合物被移植入需要其的患者中。在一些实施方式中,离体来源的移植的组合物中的异质细胞群体的细胞被暴露至在移植部位(如,骨)处可用的体内成骨诱导物。在一些实施方式中,异质细胞群体的细胞进一步体内分化为成熟成骨细胞。

[0199] 如本文所使用,术语“离体”指从活生物体中移出细胞并在该生物体外繁殖的过程。如本文所使用,术语“体内”指在活生物体内发生的任何过程。

[0200] 在另一实施方式,本发明提供试剂盒,其包括无机物颗粒和说明书,无机物颗粒包括附着至其的3D细胞培养物,说明书用于从提供的3D细胞培养物生成本发明的异质细胞群体。在另一实施方式,3D细胞培养物包括HATDC。在另一实施方式,说明书包括为了获得本发明的组合物,在无机物支架上的3D培养物中培育的HATDC的成骨诱导的推荐条件。在另一实施方式,试剂盒进一步提供至少一种成骨诱导物和/或成骨培养物分化培养基。

#### [0201] 多层细胞培养物

[0202] 在一些实施方式中,多分层的细胞培养物为由至少两种细胞类型组成的异质细胞培养物。在另一实施方式,多分层的细胞培养物为由至少三种细胞类型组成的异质细胞培养物。在另一实施方式,多分层的细胞培养物为由至少四种细胞类型组成的异质细胞培养物。在另一实施方式,多分层的细胞培养物包括成骨引发时期后48小时的人脂肪组织源细胞(HATDC)。

[0203] 在另一实施方式,多分层的细胞培养物包括底部细胞层和顶部细胞层。在另一实施方式,多分层的细胞培养物包括底部细胞层、中间细胞层和顶部细胞层。在另一实施方式,多分层的细胞培养物是3D(三维)细胞培养物(与称为2D(二维)细胞培养物的单个细胞层相对)。在另一实施方式,3D细胞培养物由细胞和胞外基质组成。在另一实施方式,3D细胞培养物在如本文所描述的无机物颗粒的表面上生长。在另一实施方式,3D细胞培养物由生

物质组成。在另一实施方式,2个或更多个细胞层的3D细胞培养物被附着至无机物颗粒。在另一实施方式,2个或更多个细胞层的3D细胞培养物被可操作地附着至无机物颗粒。

[0204] 在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物包括至少2个细胞层,其中一个层中至少10%的细胞与另一层中至少10%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物包括至少3个细胞层。

[0205] 在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少10%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少10%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少20%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少20%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少30%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少30%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少40%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少40%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少50%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少50%的细胞接触。在一些实施方式中,多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的一个层中的至少60%的细胞与同一多分层的细胞培养物或3D细胞培养物内的另一层中的至少60%的细胞接触。在另一实施方式,短语“接触”是物理接触。在另一实施方式,短语“接触”是细胞与细胞相互作用。

[0206] 在另一实施方式,短语“3D细胞培养物”或“3D培养物”指其中细胞被置于与细胞生长相容的条件下,同时允许细胞在超过一个层中生长的培养物。在另一实施方式中,3D细胞培养物内的细胞保持在允许建立各种局部微环境的胞外基质纳米级纤维的复合网络中。在另一实施方式中,ECM内的细胞外配体不仅介导与基底膜的附着,还介导进入各种血管和淋巴管。在另一实施方式中,3D细胞培养物内的细胞暴露于氧、激素和营养物。在另一实施方式中,3D细胞培养物的特征在于细胞-细胞和细胞-ECM相互作用。

[0207] 支架

[0208] 在另一实施方式中,组合物进一步包括骨传导颗粒。此处所使用的“骨传导”指物质作为骨可以沿其生长的合适模板或物质的能力。对于非限制性实例,一种或多种类型的骨传导颗粒为选自以下的骨传导陶瓷颗粒:碳酸钙、羟基磷灰石(HA)、脱矿质骨材料、颗粒型骨移植物(morselized bone graft)、皮质网状骨质同种异体移植物、皮质网状骨质自体移植物、皮质网状骨质异种移植物、磷酸三钙、珊瑚无机物和硫酸钙。

[0209] 在另一实施方式,组合物进一步包括无机物颗粒。在另一实施方式中,无机物颗粒是携带3D细胞培养物的支架。在另一实施方式中,无机物颗粒是生物相容的。在另一实施方式中,细胞可附着于无机物颗粒。在另一实施方式中,无机物颗粒促进附着的细胞的扩展。在另一实施方式中,无机物颗粒为粉碎组合物的形式。在另一实施方式中,无机物颗粒为微粉碎组合物的形式。在另一实施方式中,无机物颗粒包括提供更多细胞附着部位的边缘和凹槽。如本文所使用,“扩展(expansion或expanding)”指基本上没有细胞分化的细胞增殖的过程。经历扩展的细胞因此保持它们的细胞更新性质,即增加细胞群体(如,至少2倍),而没有伴随这种增加的分化。

[0210] 在另一实施方式,无机物颗粒是骨纤维。在另一实施方式,本发明的骨纤维具有增

强的细胞结合表面。在另一实施方式,本发明的骨纤维来源于骨组织。在另一实施方式,沿骨组织长度或沿骨组织的颗粒方向切割骨组织,以形成骨纤维。

[0211] 在另一实施方式,无机物颗粒是携带3D细胞培养物的骨支架。在另一实施方式,无机物颗粒是骨无机物颗粒。在另一实施方式,无机物颗粒是研磨的矿化骨皮质。在另一实施方式,无机物颗粒是研磨的矿化骨松质。在另一实施方式,无机物颗粒是矿化网状骨质颗粒。在另一实施方式,无机物颗粒是矿化皮质颗粒。在另一实施方式,无机物颗粒是珊瑚无机物颗粒。在另一实施方式,无机物颗粒由无机物构成。在另一实施方式,无机物颗粒包括磷酸钙。在另一实施方式,无机物颗粒包括磷酸钙衍生物。在另一实施方式,无机物颗粒包括硫酸钙。在另一实施方式,无机物颗粒包括硫酸钙衍生物。在另一实施方式,无机物颗粒包括羟基磷灰石钙。在另一实施方式,无机物颗粒包括硅酸盐。在另一实施方式,无机物颗粒包括硫酸钙衍生物。在另一实施方式,无机物颗粒包括硅酸盐无机物羟基磷灰石。在另一实施方式,无机物颗粒包括 $\beta$ -3磷酸钙。在另一实施方式,无机物颗粒包括本领域技术人员已知的无机物的任何组合。

[0212] 在一些实施方式中,支架进一步包括胞外基质蛋白,诸如纤连蛋白、层粘连蛋白、纤维蛋白原和胶原蛋白。在一些实施方式中,无机物颗粒被胞外基质蛋白包被。

[0213] 在另一实施方式,无机物颗粒的直径为至少50微米。在另一实施方式,无机物颗粒的直径为至少100微米。在另一实施方式,无机物颗粒的直径范围为50微米至2000微米。在另一实施方式,无机物颗粒的直径范围为100微米至1000微米。在另一实施方式,无机物颗粒的直径范围为200微米至2000微米。在一些实施方式中,无机物颗粒在长度方面具有1厘米至15厘米(cm)的大小。在一些实施方式中,无机物颗粒在长度方面具有5cm至15厘米(cm)的大小。在一些实施方式中,无机物颗粒在长度方面具有上至15厘米的大小。

[0214] 在另一实施方式,在进行成骨分化诱导之前,利用细胞培养基生长和/或保持附着至无机物颗粒的3D细胞培养物持续5天的时期。在另一实施方式,在进行成骨分化诱导之前,利用细胞培养基生长和/或保持附着至无机物颗粒的3D细胞培养物持续4至6天的时期。在另一实施方式,在进行成骨分化诱导之前,利用细胞培养基生长和/或保持附着至无机物颗粒的3D细胞培养物持续如下天的时期:2至21、或可选地4至21、或可选地2至16、或可选地3至16、或可选地4至16、或可选地1至10、或可选地2至10、或可选地3至10、或可选地4至10、或可选地1至6、或可选地2至6、或可选地3至5、或可选地3至6、或可选地4至6。

[0215] 细胞接种

[0216] 接种从组织迁移的细胞

[0217] 在一些实施方式中,通过以具体比的组织与无机物颗粒保持脂肪组织与无机物颗粒接触持续预定的一段时间以允许细胞迁移并附着至无机物颗粒来进行细胞的接种。在一些实施方式中,脂肪组织保持完整或可选地被机械解离(如,切碎成小组织片段)。

[0218] 在一些实施方式中,脂肪组织和支架保持接触持续促进HATDC从脂肪组织迁移到支架上并居留(populate)在支架的表面上所需的持续时间。在一些实施方式中,需要至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10天的接触温育以促进HATDC迁移到并居留于无机物支架的表面。在一些实施方式中,接种时期为至少3天。在另一实施方式,接种时期为至少4天。在另一实施方式,接种时期为至少5天。在另一实施方式,接种时期为至少6天。在另一实施方式,接种时期为至少7天。在一些实施方式中,保持脂肪组织和支架接触持

续3-7天。在一些实施方式中,保持脂肪组织和支架接触持续3-10天。在一些实施方式中,保持脂肪组织和支架接触持续5-10天。

[0219] 在一些实施方式中,脂肪组织和支架具有1微升组织/1毫克支架的比,此后称为1:1的比。在一些实施方式中,比的范围分别为10:1-1:10、9:1-1:9、8:1-1:8、7:1-1:7、6:1-1:6、e5e5、4:1-1:4、3:1-1:3、或2:1-1:2。在一些实施方式中,脂肪组织和支架分别具有范围从3:1-1:2的比。在一些实施方式中,脂肪组织和支架分别具有范围从2:1-1:4的比。在一些实施方式中,比的范围分别为2:1-1:3、2:1-1:2、3:1-1:4、1:1-1:4、1:1-1:2或2:1-1:1。每一种可能性表示本发明的单独的实施方式。在一些实施方式中,脂肪组织和支架之间的比为1:1。对于非限制性实例,1毫升脂肪组织与1克无机物支架接触。

[0220] 在一些实施方式中,为了实现脂肪组织和支架之间的接触,首先在培养基(如,无异种(xeno free)培养基)的存在下混合脂肪组织和支架。在一些实施方式中,将脂肪组织和支架放置接触同时暴露于培养基和氧气。在一些实施方式中,使脂肪组织和支架接触允许至少一部分脂肪组织与至少一部分支架物理接触。对于非限制性实例,可以在容器、生物反应器、平板中进行接触。在一些实施方式中,脂肪组织接触无机物颗粒的组合厚度被培养基部分覆盖。对于非限制性实例,1-2毫米的组合厚度保持在1-2毫米的培养基水平中。在一些实施方式中,培养基是无异种生长培养基。如本文所使用,“无异种”意思是不含培养的细胞的物种以外的物种的任何细胞或细胞产物的细胞培养物条件。在其他实施方式中,培养基补充有血清。血清的非限制性实例包括:胎牛血清(FCS)、人AB血清和自体血清或血小板裂解物。

[0221] 接种首先从组织获得的细胞

[0222] 在其他实施方式中,通过在无机物颗粒存在的情况下以具体比的细胞与无机物颗粒保持细胞的具体浓度持续预定时间周期以允许细胞附着至无机物颗粒来进行细胞的接种。

[0223] 在一些实施方式中,附着周期为至少1小时。在另一实施方式,附着周期为至少2小时。在另一实施方式,附着周期为至少3小时。在另一实施方式,附着周期为至少4小时。在另一实施方式,附着周期为至少5小时。在另一实施方式,接种周期为至少10小时。在另一实施方式,接种周期为上至7天。

[0224] 在一些实施方式中,每1毫克(mg)的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $1 \times 10^2$ 个细胞。在另一实施方式,每1mg的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $1 \times 10^3$ 个细胞。在另一实施方式,每1mg的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^6$ 个细胞。在另一实施方式,每1mg的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $1 \times 10^2$ 至 $1 \times 10^4$ 个细胞。在另一实施方式,每1mg的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $5 \times 10^2$ 至 $5 \times 10^4$ 个细胞。在另一实施方式,每1mg的无机物颗粒接种如本文描述的至少 $3.5 \times 10^3$ 个细胞。

[0225] 在一些实施方式中,以至少 $1 \times 10^3$ 细胞/1毫升的培养基的浓度接种如本文描述的细胞。在另一实施方式,以至少 $10 \times 10^3$ 细胞/1毫升的培养基的浓度接种如本文描述的细胞。在另一实施方式,以至少 $50 \times 10^3$ 细胞/1毫升的培养基的浓度接种如本文描述的细胞。在另一实施方式,以至少 $100 \times 10^3$ 细胞/1毫升的培养基的浓度接种如本文描述的细胞。在一些实施方式中,培养基是无异种生长培养基。在其他实施方式中,培养基补充有血清,诸如,胎牛血清(FCS)、人AB血清和自体血清或血小板裂解物。

### [0226] 生物组分

[0227] 在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括白蛋白。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括胞外基质(ECM)蛋白。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括纤维蛋白。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括纤连蛋白。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括I型胶原。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括层粘连蛋白。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括玻连蛋白。

[0228] 在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括骨形态发生蛋白(BMP)。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括胰岛素样生长因子。在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括白细胞介素-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子(TNF)、RANKL或其任意组合。在另一实施方式中,组合物包括悬浮在含有人血清白蛋白(HSA)的培养基中的自体多细胞3D细胞培养物。在另一实施方式中,如本文描述的组合物还包括抗炎剂。在另一实施方式中,如本文所述的组合物还包括抗生素。

[0229] 在另一实施方式中,本发明提供了组合物还包括生物相容性粘合剂。在另一实施方式中,生物相容性粘合剂是选自纤维蛋白粘合剂、凝血因子I、凝血酶、贻贝粘合剂蛋白、丝(silk)、弹性蛋白、胶原、酪蛋白、明胶、白蛋白、角蛋白、甲壳质和壳聚糖中的一种或多种。在另一实施方式中,生物相容性粘合剂是选自淀粉、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸-共-乙醇酸、聚二噁烷酮、聚己内酯、聚碳酸酯、聚氧酯、聚氨基酸、聚酐、聚羟基丁酸酯、聚羟基戊酸酯、聚(丙二醇-共-富马酸)、酪氨酸类聚碳酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、乙基纤维素和羧甲基纤维素中的一种或多种。

[0230] 在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括维生素。在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括葡糖胺。在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括细胞因子。在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括生长因子。

[0231] 在另一实施方式,本发明提供了组合物还包括透明质酸。在另一实施方式,术语“透明质酸(HA)”与乙酰透明质酸或透明质酸钠是同义词。在另一实施方式,透明质酸在包含生理缓冲液的组合物内。在另一实施方式,透明质酸具有200,000至850,000道尔顿的分子量。

[0232] 在另一实施方式,透明质酸是用于使沉积或附着至无机物颗粒的异质细胞群体悬浮的组合物。在另一实施方式,透明质酸是包括0.5mg至50mg透明质酸/1mL的溶液(包括缓冲液)的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括0.5mg至5mg透明质酸/1mL的溶液(包括缓冲液)的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括5mg至20mg透明质酸/1mL的溶液(包括缓冲液)的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括10mg至30mg透明质酸/1mL的溶液(包括缓冲液)的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括10mg至25mg透明质酸/1mL的溶液(包括缓冲液)的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括按重量计0.05%至5%的透明质酸的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括按重量计0.1%至1%的透明质酸的组合物。在另一实施方式,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是包括按重量计0.1%至0.5%的透明质

酸的组合物。

[0233] 在另一实施方式中,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是溶液。在另一实施方式中,用于使沉积或附着至无机物颗粒的细胞悬浮的透明质酸组合物是凝胶。

[0234] 制造骨修复组合物的方法

[0235] 本发明的组合物可以通过几种可选方法制备。在一些实施方式中,方法包括在3D培养物中培养细胞。在一些实施方式中,方法包括在3D培养物中培养之前在2D培养物中培养细胞。

[0236] 在一些实施方式中,首先从组织样品中分离细胞。在一些实施方式中,分离包括血浆去除、离心和/或胶原酶温育。在其他实施方式中,细胞直接从组织迁移到支架。在一些实施方式中,组织是脂肪组织。在一些实施方式中,细胞是干细胞。在一些实施方式中,干细胞是人脂肪组织源细胞。

[0237] 在一些实施方式中,首先在2D系统(如烧瓶)中培育和扩展分离的细胞。接下来,使用允许贴壁细胞附着和生长的培养基,在无机物颗粒上在无菌条件下离体培育和扩展在2D系统中生长的细胞。在一些实施方式中,培养基是无异种培养基。在其他实施方式中,培养基补充有血清。在一些实施方式中,支持这些细胞的初始生长和扩展阶段的培养基可任选地被另一种支持这些细胞和骨形成的分化的细胞培养物配方代替。

[0238] 在一些实施方式中,使组织和支架接触,其中接触促进细胞从脂肪组织迁移到支架上并将细胞附着到其上,从而提供居留有细胞的支架。在一些实施方式中,方法还包括培养和扩展居留有细胞的支架的步骤,以允许细胞扩展。在一些实施方式中,方法包括将脂肪组织与其他细胞如红细胞分离的预备步骤(preliminary step)。如本文所使用,术语“预备”指在组织和支架接触之前采取的步骤。在一些实施方式中,通过使脂肪组织经历洗涤诸如在盐水(如生理盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或细胞生长培养基)中,然后离心来利用分离,所述离心导致含有红细胞、碎片等的沉淀。在一些实施方式中,方法还包括将脂肪组织与支架和附着至其的HATDC分离的步骤。在一些实施方式中,脂肪组织和由HATDC居留的支架之间的接触可以分开,例如通过混合,导致居留有HATDC的支架沉淀和脂肪组织漂浮。在一些实施方式中,通过移出脂肪组织实现分离。在一些实施方式中,通过洗涤(如用培养基)移出漂浮的脂肪组织。对于非限制性实例,可以通过抽吸液体(例如,通过移液)和混合(如通过涡旋)脂肪组织和支架,从而导致居留有HATDC的支架沉淀和脂肪组织漂浮来实现分离,并且其可以轻松移出。

[0239] 在另一实施方式中,附着于无机物颗粒的3D异质细胞群体来源于附着于经历流通式生物反应器系统的无机物颗粒的3D细胞培养物。在另一实施方式中,附着于无机物颗粒的3D异质细胞群体来源于使3D细胞培养物进一步经历成骨分化。在另一实施方式中,使3D细胞培养物经历成骨分化48小时、或可选地至少24小时、或可选地至少48小时、或可选地至少72小时、或可选地至少96小时。

[0240] 在另一实施方式中,生长培养基(细胞培养基)补充有生长因子和细胞因子,诸如,例如以下中的一种或多种:转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、成骨蛋白-1(OP-1)、成纤维细胞生长因子(FGF)成员(如FGF-2、FGF-9和FGF-10)以及骨形态发生蛋白(BMP)的成员(诸如BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7)。

[0241] 在另一实施方式中,将由异质细胞群体的3D培养物覆盖的无机物颗粒移植到需要其的对象中。在另一实施方式中,将由异质细胞群体的3D培养物覆盖的无机物颗粒移植到预先确定的骨丢失或间隙部位。

[0242] 在另一实施方式中,本发明的可植入组合物提供有注射器。在另一实施方式中,本文提供了:注射器、沉积或附着于无机物颗粒的本发明的3D异质细胞群体和半固体培养基(如,透明质酸)。在另一实施方式,本文提供了试剂盒,其包括:注射器、悬浮液,其包括:沉积或附着于悬浮在半固体培养基中的无机物颗粒的3D异质细胞群体。

[0243] 在另一实施方式中,通过简单地混合半固体培养基(如透明质酸)和本发明的附着于无机物颗粒的3D异质细胞群体来制备用于填充骨内间隙的药物组合物。在另一实施方式中,通过简单地混合半固体培养基和悬浮液来制备用于填充骨内间隙的药物组合物,该悬浮液包含:沉积或附着于悬浮在细胞培养基中的无机物颗粒的3D异质细胞群体。

[0244] 在另一实施方式中,用于填充骨内间隙的试剂盒包括含有有效量的半固体培养基的第一部分,和含有有效量的悬浮液的第二部分,该悬浮液包括:沉积或附着于悬浮在细胞培养基中的无机物颗粒的3D异质细胞群体。在另一实施方式中,试剂盒用于注射,并且第一和第二部分可以是溶液形式并且分别放置在独立的包装(诸如塑料瓶或玻璃瓶如安瓿)中。在另一实施方式中,每个包装可包括第一或第二部分的多个剂量,但优选单剂量。在另一实施方式中,在注射之前,根据说明书中的信息(包括诸如试剂盒的操作方法、溶液的混合比等的信息)将两部分放入注射器中,以施加制剂。在另一实施方式中,在注射之前,将两部分放入注射器内部或外部的混合装置中。在另一实施方式中,在注射之前,通过注射器内部或外部的混合装置将两部分混合。

[0245] 术语半固体指具有凝胶状稠度的材料,诸如对于非限制性实例,在室温下基本上尺寸稳定,但具有一定的弹性和柔性,这通常是由于残留的溶剂含量。

[0246] 已经出于说明的目的给出了对本发明的各种实施方式的描述,但是并不旨在穷举的或限制于所公开的实施方式。在不脱离所描述的实施方式的范围和精神的情况下,许多修改和变化对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。选择本文使用的术语以最好地解释实施方式的原理、对市场中发现的技术的实际应用或技术改进,或者使本领域普通技术人员能够理解本文公开的实施方式。

[0247] 在讨论中,除非另有说明,否则诸如“基本上”和“约”修饰本发明实施方式的一个或多个特征的条件或关系特性的形容词应理解为表示该条件或特性被定义为在对于其预期的应用的实施方式的操作可接受的公差内。除非另有说明,否则说明书和权利要求中的词语“或”被认为是包含性的“或”而不是排他性的或,并且表示其连接项目中的至少一个或任意组合。

[0248] 应当理解,如上文和本文其他地方所使用的术语“一(a, an)”指罗列的组分中的“一个或多个”。除非另外特别说明,否则本领域普通技术人员将清楚,单数的使用包括复数。

[0249] 为了更好地理解本教导并且决不限制本教导的范围,除非另有说明,否则应理解在说明书和权利要求中使用的表示数量、百分比或比例以及其他数值的所有数字,在所有情况下都被术语“约”修饰。因此,除非有相反的指示,否则在说明书和所附权利要求中提出的数值参数是近似值,其可以根据寻求获得的所需性质而变化。至少,每个数值参数应该至

少根据报告的有效数字的数量和应用普通的舍入技术来解释。

[0250] 在本申请的说明书和权利要求书中,每个动词“包括”,“包含”和“具有”及其同源词用于表示动词的一个或多个宾语不一定是动词的一个或多个主语的成分、要素或部分的完整列表。如本文所使用的其他术语旨在由它们在本领域中众所周知的含义来定义。

[0251] 应当理解,为了清楚起见,在单独的実施方式的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方式中组合提供。相反,为简洁起见,在单个實施方式的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供,或者在本发明的任何其他描述的實施方式中适当地提供。在各种實施方式的上下文中描述的某些特征不被认为是那些實施方式的必要特征,除非该實施方式在没有那些要素的情况下不起作用。

[0252] 通过检查以下实施例,本领域普通技术人员将明白本发明的其他目的、优点和新颖特征,这些实施例不旨在是限制性的。另外,如上文描述的和如所附的权利要求部分中要求保护的本发明的各种實施方式和方面中的每一个在以下实施例中找到实验依据。

### [0253] 实施例

[0254] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells—A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测定法在专利和科学文献中有广泛的描述,参见,例如,美国专利号 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 and 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M.J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) and “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification

and Characterization-A Laboratory Course Manual”CSHL Press (1996);其所有通过引用并入。贯穿本文档提供了其他一般参考文献。

[0255] 材料和方法:

[0256] 实验设计

[0257] 在四种不同条件下(指代为处理组:BL、A、B和C)培育细胞,这些不同的条件总结于表13中。每个实验重复三次。

[0258] BL组代表维持持续上至传代4次的2D培养物,并且在该组中的基因的表达水平被用作基因表达的基线水平。利用无异种培养基在2D系统中培养HATDC持续传代2-4次。BMP2没有补充至培养基。如本文所使用,术语“传代”指细胞培养技术,其中在组织培养容器中已经实现汇合或接近汇合的培养物中生长的细胞被从容器移出,利用新鲜培养基稀释(即,稀释1:5)并放入新的组织培养容器,从而允许它们继续生长和存活。

[0259] A组,利用无异种培养基在2D系统中培养HATDC。传代1-3次后,细胞在2D系统中重新接种,并且在接种(第0天)后1-2天,向生长培养基补充一种或多种成骨诱导物,并培养细胞持续另外2天(第2天,A组)。

[0260] B组,利用无异种培养基在烧瓶(2D)中培养HATDC持续传代1-2次。接下来,使用无异种培养基将细胞接种在皮质支架上的3D系统中。从3D中接种4-5天后,向细胞补充一种或多种成骨诱导物以诱导成骨分化,并培养细胞持续另外两天(第2天,系统B)直至收获。

[0261] C组,将脂肪组织置于无异种培养基中的无机物支架上,并且HATDC正迁移至支架颗粒。从接种10-12天后,向细胞补充一种或多种成骨诱导物以诱导成骨分化,并培养细胞持续另外两天。

[0262] 在第0天(BMP2诱导前)和成骨诱导后第2天(第2天)收获2D中培养的HADTC。在成骨诱导后2天(第2天)收获3D(组B和C)中培养的HADTC。

[0263] 通过一种或多种成骨诱导物(诸如BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6和BMP-7)来诱导成骨诱导。

[0264] 表13. 指代在不同条件下培育的四个组

[0265]

处理组	条件
BL(基线)	2D系统,没有成骨诱导
A	2D系统,2天成骨诱导
B	3D系统,2天成骨诱导
C	3D系统,2天成骨诱导

[0266] RNA样品制备:

[0267] 使用具有RNeasy微型试剂盒的Qiacube机器人(Qiacube robot with RNeasy mini kit)(Qiagen)提取RNA。使用TapeStation(Agilent)评估所有总RNA样品的质量。所有样品的RNA值>9.5。使用用于Illumina BeadChips的TargetAmp纳米标记试剂盒(TargetAmp Nano labeling kit for Illumina BeadChips)(Epicentre)通过体外转录将RNA扩增为生物素化的cRNA。根据直接杂交测定法(Illumina Inc.),将生物素化的cRNA与Illumina HumanHT-12v4Expression BeadChip杂交。利用具有链霉抗生物素蛋白-Cy3的链霉抗生物素蛋白(GE Healthcare Amersham)对杂交芯片染色,用Illumina HiScan扫描,并将图像输

入GenomeStudio (Illumina) 进行质量控制 (QC)。然后将数据输入JMP Genomics (SAS) 进行统计分析,和输入IPA进行网络富集分析。

#### [0268] 微阵列

[0269] 对于微阵列分析,使用靶向超过47,000个探针的HumanHT-12v4Expression BeadChip Kit (illumina)。获得的原始数据包含超过47,000个探针。在log<sub>2</sub>转化、低表达过滤和样品间低变异性过滤后,保留约9,000个探针用于统计分析。

#### [0270] 统计分析:

[0271] 将原始基因表达数据从GenomeStudio输出并输入JMP Genomics v7软件 (SAS Institute Inc, Cary, NC)。在对非表达的基因 (检测p值<0.01) 和对于样品间的低方差转录物 (方差<5%) 进行过滤之后,对log<sub>2</sub>转化的数据进行JMP基因组学中的质量控制和分析。数据分布显示相似的表达,因此该数据未标准化。使用单向ANOVA分析数据。差异表达的基因 (DEG) 被定义为使用具有至少两倍变化差异的假发现率 (FDR) 在校正的p值≤0.05下具有统计学显著性的转录物。使用以下软件进行数据分析: (1) GeneAnalytics, LifeMap sciences, (2) Ingenuity Pathway analysis (IPA 8.0), Ingenuity, Qiagen。

#### [0272] 实施例1

[0273] 如通过qRT-PCR分析的内源BMP-2、SP7、ALP的表达

[0274] 为了评价3D系统 (C和D组) 和2D系统 (A组) 的成骨潜力,检查早期成骨标记物 (内源骨形态发生蛋白 (BMP2)、Ostrix (SP7) 和碱性磷酸酶 (ALP)) 的表达水平。首先, A、B和C组的成骨分化由补充到无异种培养基的150ng/ml BMP2诱导,持续两天。接下来,从系统A、B和C获得的RNA样品通过qRT-PCR分析。相对于对照组 (BL组) 的表达水平,分析表达水平。使用来自不同生物来源的三个重复 (指代为AD153、AD154和AD160) 进行实验,结果分别呈现在图1、2和3中。

[0275] 在成骨诱导后,早期成骨标记物: BMP-2 (图1A、2A和3A)、SP7<sup>2</sup> (图1B、2B和3B) 和 ALP<sup>2</sup> (图1C、2C和3C) 的表达水平升高。

[0276] 先前的研究已经证明,除了外源性BMP2之外, BMP2的内源表达也对于成骨分化起关键作用并且是必需的。结果证明由外源BMP2诱导的3D-HADTC中内源BMP2的升高 (图1C、2C和3C)。在分化的第3天,内源BMP2平均增加 (对于所使用的三个批次)  $3.02 \pm 0.76$  倍。

[0277] 值得注意的是,所有测试的基因 (BMP2、SP7、ALP) 的表达与具有或不具有BMP2的2D相比,在BMP2处理后在3D中更高 (图1A-C、2A-C和3A-C)。这些结果表明相对于在2D系统中生长的HADTC,在3D系统中生长的HADTC分化为成骨细胞的效力增加。

#### [0278] 实施例2

[0279] 微阵列分析

[0280] 首先,通过分析不同处理组 (系统) 之间和不同生物复制 (AD153、AD154和AD160) 之间的差异来建立方差分量。

[0281] 结果表明总方差的约66%是由于处理组之间的差异,并且另外约18%的方差是由于生物复制之间的差异 (图4)。

[0282] 对于每个处理组 (A、B、C),与基线水平 (BL) 相比,分析基因表达水平,并且在维恩图中呈现差异表达基因 (DEG) (图5)。差异表达基因是与基线水平相比显示至少2倍变化 ( $FC \geq 2$ ) 的基因。如图5所示,与基线水平 (BL) 相比,组A中31个基因差异表达。另外,与基线水

平(BL)相比,在B组或C组中超过500个基因差异表达。值得注意的是,与基线水平(BL)相比,B和C组之间376个DEG是共有的。与基线水平(BL)相比,376个DEG中的362个仅在B组和C组之间是共有的,而14个DEG对于处理组A、B和C是共有的。这些结果说明,3D系统中生长的细胞影响细胞超过成骨诱导(一个或多个成骨诱导物,持续2天)。此外,与基线水平(BL)相比,DEG的诱导和降低对于B组和C组比A组更显著(图6)。

[0283] 而且,图7中所示的热图说明,处理组A和BL是相似的并且与处理组B和C显著不同,处理组B和C是相似的。

[0284] 微阵列分析说明,当HATDC在3D中扩展时,发生基因表达概括的显著改变。相反,当相同的细胞在2D条件中生长时——利用相同的培养基和成骨诱导条件(BMP2、2d),基因表达概括与基线对照(2D,无BMP2条件)非常相似,并且与在3D条件下获得的基因表达概括(B组和C组)非常不同。

[0285] 实施例3

[0286] 微阵列分析结构

[0287] 分析微阵列结果并将DEG分成不同的簇。结果说明,与基线水平(BL)相比,对于经历用一种或多种成骨诱导物成骨诱导的处理组(A、B和C组),仅14个DEG是共有的(表12)。

[0288] 发现经历48小时成骨诱导的HATDC显示基因 $ATOH8$ 、 $CGB1$ 、 $CMTM4$ 、 $FOXO$ 、 $ID1$ 、 $ID2$ 、 $ID3$ 、 $NEBL$ 、 $OSR1$ 、 $PRRX2$ 、 $SAMD11$ 、 $SLC16A3$ 和 $SMAD9$ 的表达水平的调节。具体而言,与未经历成骨处理的HATDC(BL)相比,在成骨诱导(A、B和C组)后,基因: $ATOH8$ 、 $CGB1$ 、 $CMTM4$ 、 $FOXO$ 、 $ID1$ 、 $ID2$ 、 $ID3$ 、 $NEBL$ 、 $PRRX2$ 、 $SAMD11$ 、 $SLC16A3$ 和 $SMAD9$ 的表达水平被诱导。与未经历成骨诱导的HATDC(BL)相比,经历成骨诱导(A、B和C组)的HATDC中基因 $OSR1$ 的表达水平降低。

[0289] 表12. 处理组A、B和C之间共有的DEG

基因符号	Entrez 基因 ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a> )	A-BL	B-BL	C-BL
$ATOH8$	84913	6.15	5.98	5.51
$CGB1$	114335	2.53	2.52	3.06
$CMTM4$	146223	3.13	3.17	2.99
$FOXO1$	2308	2.23	4.23	4.14
$ID1$	3397	11.87	10.26	12.35
$ID2$	3398	3.51	5.33	5.63
$ID3$	3399	8.17	9.58	10.16
$NEBL$	10529	2.58	2.78	3.24
$OSR1$	130497	-3.94	-3.70	-3.36
$PRRX2$	51450	5.41	9.26	10.00
$SAMD11$	148398	5.16	6.20	6.86
$SLC16A3$	9123	2.49	2.49	3.34
$SMAD9$	4093	2.07	2.80	3.09

[0291] 图8说明了在不同测试生长条件下诱导或减少的经典途径(左)、上游调节子(中)和功能分析相关的描述符(descriptor)的比较。通过IPA分析工具进行3个处理相比。这里

显示的每个描述符代表与基线 (BL) 处理相比诱导或减少的许多相关DEG。在这些热图中总结并说明了每个描述符的所有相关DEG的总体效果。结果显示,两种3D生长条件 (B和C处理) 显著地影响所提到的描述符,而2D生长条件 (处理A) 相对于基线 (BL) 具有较小影响。

[0292] 干细胞标记物

[0293] 与对照 (BL) 相比,多能 (pluripotent/multipotent) 干细胞标记物 (包括:CD13、CD73、CD90和KLF4) 的表达水平在3D系统 (B和C组) 中生长的HATDC中降低 (表1和1b)。这些结果指示,在3D系统中生长的HATDC经历增强的分化。

[0294] 表1b. 间充质干细胞相关标记物

[0295]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
ANPEP (CD13)	丙氨酰 (膜) 氨肽酶	-1.36	-2.4	-2.06
NT5E (CD73)	5'-核苷酸酶,胞外 (Ecto)	1.18	-1.7	-1.42
THY1 (CD90)	Thy-1细胞表面抗原	-1.41	-1.72	-2.36
KLF4	Kruppel-样因子4 (Gut)	-2.2	-3.4	-2.99

[0296] 增殖分化和凋亡标记物

[0297] 在3D系统中生长的HATDC表现减少的增殖和增强的分化。微阵列结果说明,在3D系统中生长的HATDC表现细胞标记物 (AURKA、FOS、FGF2 (bFGF)、BCL2L1、DDX21、RRAS2、STAT1和ANXA2) 的表达增加。此外,在3D系统中生长的HATDC表现细胞标记物 (包括:SFRP2、ID1、ID2、ID3、MRAS、NOX4、NOTCH3和RGCC) 的表达增加 (表2和2b)。

[0298] 表2b. 3D系统中增殖标记物减少

[0299]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
AURKA	极光激酶 A	1.18	-2.4	-1.95
FOS	FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同源物	-7.6	-12.13	-10.8
FGF2 (bFGF)	成纤维细胞生长因子 2 (基础)	1.4	-1.6	-1.5
BCL2L1	BCL2-样 1	1.15	-1.76	-1.97
DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)框解旋酶 21	-1.14	-2.04	-1.9
RRAS2	RAS 相关病毒 (R-Ras)癌基因同源物 2	-1	-2.49	-2.37
STAT1	信号转导和转录激活因子 1, 91kDa	-1.44	-2.3	-3.1
ANXA2	膜联蛋白 A2	1.39	-3.2	-2.7
SFRP2	分泌的卷曲相关蛋白 2	-1.52	12.15	12.10
ID1	DNA 结合抑制剂 1, (2,3,)显性负螺旋-环-螺旋蛋白	11.87	10.26	12.35
ID2	DNA 结合抑制剂 2, 显性负螺旋-环-螺旋蛋白	3.5	5.3	5.6
ID3	DNA 结合抑制剂 3, 显性负螺旋-环-螺旋蛋白	8.17	9.6	10.16
MRAS	肌肉 RAS 癌基因同源物	1.06	2.31	2.17

[0300]

NOX4	NADPH 氧化酶 4	1	3.75	2.8
NOTCH3	刻缺蛋白 3	1.2	5.84	6.6
RGCC	细胞周期调节子	1.35	3.44	4.34

[0301] MHC I蛋白

[0302] 主要组织相容性复合体 (MHC) 抗原几乎在所有分化的细胞中表达。这些蛋白参与外来抗原向免疫系统的呈递。已知MSC表达低水平的MHC I类分子。

[0303] 相对于在2D系统中生长的HATDC, MHC I基因在3D系统中生长的HATDC中被诱导, 指示了3D系统中细胞分化增强(表3、3b)。

[0304] 表3b.MHC I基因

[0305]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
HLA-A	主要组织相容性复合体, I类, A	-1.19	2.29	2.46
HLA-B	主要组织相容性复合体, I类, B	-1.68	4.10	4.56
HLA-DMA	主要组织相容性复合体, II类, DM $\alpha$	1.02	1.63	1.82
HLA-F	主要组织相容性复合体, I类, F	-1.41	3.47	3.80
HLA-G	主要组织相容性复合体, I类, G	-1.13	2.08	2.47

HLA-H	主要组织相容性复合体, I类, H	-1.30	3.82	3.86
-------	-------------------	-------	------	------

[0306] 脂肪细胞标记物

[0307] 由于细胞已经被定向骨分化, 所以成熟的脂肪细胞的基因标记物 (如: PPARG) 被减少 (表4、4b)。然而, 早期脂肪细胞标记物在3D中 (如: DLK1, SOX9) 被诱导 (表4、4b)。这些结果可能暗示, 在合适的生长条件下, 在3D系统中生长的细胞具有分化成脂肪细胞以及骨的潜力。

[0308] 表4b. 脂肪细胞标记物

[0309]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	-1.3	-2.12	-1.89
DLK1	$\delta$ 样1同源物 (果蝇)	1	1.8	1.9
ACSL1	酰基辅酶A合成酶长链家族成员1	-1.33	-2.06	-1.86
AEBP1	AE结合蛋白1	-1.78	2.90	2.79
Sox9	SRY (性别决定区Y)-框9	1.01	2.73	2.53

[0310] 成骨细胞标记物

[0311] 该簇的基因标记物对于成骨细胞分化是关键性的 (如内源BMP2、SP7和ALP), 其相对于2D在3D条件下增强。

[0312] 结果说明了标记物诸如BMP2、SP7和ALP的诱导, 这些结果得到qRT-PCR结果的进一步支持 (图1A-C、2A-C和3A-C)。在3D中获得的骨分化的其他重要标记物是: POSTN、FGFR3和DLX5。Msx1和Msx2的诱导指示发育过程以及神经嵴细胞中发生骨分化的机制 (表5、5b)。

[0313] 在IPA (参见, 独创性途径分析-<http://www.ingenuity.com/products/ipa>) 分析后获得的结果说明, 3D生长条件 (B和C组) 导致参与成骨细胞分化的超过30个DEG, 而A组 (在2D系统中生长并经历成骨诱导) 不导致参与该途径的DEG。

[0314] 表5b. 成骨细胞标记物

[0315]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
BMP2	骨形态发生蛋白 2	-1.04	3.05	3.80
BMP2R	骨形态发生蛋白受体, II 型	1.34	2.20	2.03
SP7	Sp7 转录因子	1.20	14.60	17.79
AIPL	碱性磷酸酶, 肝/骨/肾	-4.91	1.32	2.50
POSTN	成骨细胞特异性因子 2	-1.42	2.85	2.59
FGFR3	成纤维细胞生长因子受体 3	1.90	17.54	13.82
Msx1 (Hox7)	Msh 同源框 1	-1.01	1.91	1.78
Msx2 (Hox8)	Msh 同源框 2	-1.10	2.51	2.09
DLX5	远中缺失同源框 5 (Distal-Less Homeobox 5)	1.81	16.96	19.37
KAZALD1	Kazal-型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域 1	1.41	2.07	1.98
CA12	碳酸酐酶 XII	-1.46	2.94	5.06
BMPER	BMP 结合内皮细胞调节子	-1.54	-3.64	-4.28
FBN2	肌原纤维蛋白 2	1.12	-3.4	-6.5

[0316] 骨软骨先祖和/或肥大软骨细胞基因标记物

[0317] 破骨细胞标记物特异于软骨发育和软骨细胞、骨软骨先祖和肥大软骨细胞。这些基因标记物指示骨分化机制涉及软骨内骨化(表6、6b)。具体标记物是:COL10A1、MMP13和COMP。

[0318] 表6b. 骨软骨先祖和/或肥大软骨细胞基因标记物

[0319]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
Sox9	SRY (性别决定区 Y)-框 9	1.01	2.73	2.53
MGP	基质 Gla 蛋白	1.35	13.16	10.8

[0320]

COL10A1	胶原, X 型, $\alpha 1$	1.94	11.27	11.32
COL9A2	胶原, IX 型, $\alpha 2$	1.11	2.42	2.05
MMP13	基质金属肽酶 13	-1.00	4.58	4.00
GSN	凝溶胶蛋白	1.01	1.88	1.76
CBFB	核心结合因子, $\beta$ 子单元	1.26	2.42	2.58
BAPX1 (NKX3-2)	NK3 同源框 2	1.11	1.76	1.62
RUNX1	Runt 相关转录因子 1	-1.13	1.83	1.48
RUNX2	Runt 相关转录因子 2	-1.48	1.24	1.71
COMP	软骨寡聚基质蛋白	1.79	58.91	39.70

[0321] ECM标记物和结构蛋白

[0322] ECM(表7、7b)和结构蛋白(表8、8b)的基因标记物指示3D中细胞分化增强。而且,在软骨内骨化过程中,由肥大软骨细胞产生了几种ECM蛋白。主要ECM标记物是:TNC和DPT基因。

[0323] 表7b.ECM标记物

[0324]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
BGN	二聚糖	-1.6	3.06	3.38
LAMA4	层粘连蛋白, $\alpha 4$	-3	1.07	1.6
LAMA2	层粘连蛋白, $\alpha 2$	-1.2	2.86	2.79
LTBP3	潜在转化生长因子 $\beta$ 结合蛋白3	1.1	1.83	1.72
DPT	皮连蛋白(Dermatopontin)	-1.72	12.26	13.55
EFEMP2	含EGF的纤蛋白-样细胞外基质蛋白2	1.41	2.52	2.63
PLOD1	前胶原-赖氨酸,2-氧代戊二酸5-二氧化酶1	-1.05	1.63	1.67
TNC	肌腱蛋白C	1.75	3.87	3.57
DCN	饰胶蛋白聚糖	-1.17	2.1	3.05
FBLN2	纤蛋白2	1.3	5.85	6.82
NDNF	神经元来源的神经营养因子	-1.15	1.85	3.7
SULF1	硫酸酯酶1	1.3	18.14	22.2

[0325] 表8b. 编码结构蛋白的基因

[0326]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
MMP14	基质金属肽酶 14	-1.09	1.79	1.48

[0327]

MMP2	基质金属肽酶 2	-1.34	2.05	1.96
MMP23B	基质金属肽酶 23B	-1.03	2.2	1.69
MMP3	基质金属肽酶 3	-1.27	18.8	22.2
MMP7	基质金属肽酶 7	1.07	4.5	4.3
COL16A1	胶原, XVI 型, $\alpha 1$	1.07	2.1	2.35
COL24A1	胶原, XXIV 型, $\alpha 1$	1.04	3.39	3.13
COL6A2	胶原, VI 型, $\alpha 2$	-1.36	3.12	3.93
COL7A1	胶原, VII 型, $\alpha 1$	-1.3	2	2.07
COL8A2	胶原, VIII 型, $\alpha 2$	-1.09	2.6	2.3
ADAMTS2	具有血小板反应蛋白 1 型基序的 ADAM 金属肽酶, 2	1.05	1.98	2.2
PCOLCE	前胶原 C-内肽酶增强子	-1.2	2.14	2.45

[0328] 生成血管和血管原性基因

[0329] 生成血管和血管原性基因标记物有助于血管发生和血管生成 (vascularogenesis) 过程。有些是生长因子或细胞因子, 诸如: PGF 和 IL8。其他是血管形成的特定调节物, 诸如: ANG、ANGPT2 和 ANGPTL2。通常, 在广泛骨生成期间, 主要通过软骨内骨化过程增强血管发生。

[0330] 结果说明, 与 2D 生长条件相比, 3D 中诱导了许多生成血管的因子 (表 9、9b)。而且, IPA 分析的结果说明血管发生和血管生成途径被显著诱导 (图 8, 右, 用虚线箭头标记), 并涉及 96 个 (B 组) 和 105 个 (C 组) 相关 DEG (图 10B)。相反, 在 2D 生长条件 (组 A) 中, 这些过程不被诱导 (图 8, 右, 由虚线箭头标记和图 10A)。

[0331] 表 9b. 血管标记物的表达

[0332]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
TBX2	T-框 2	1.56	2.45	1.99
TBX3	T-框 3	1.05	2.54	3.00
ANG	血管生成素, 核糖核酸酶, RNA 酶 A 家族, 5	1.02	1.67	2.52
ANGPT2	血管发生素(Angiopoietin)2	1.25	3.26	2.58
ANGPTL2	血管发生素-样 2	-1.93	12.08	9.05
TRO	滋养蛋白	-1.01	2.07	2.11
EDNRA	内皮素受体 A 型	-1.06	4.95	4.24
EPHA2	EPH 受体 A2	1.13	2.10	2.28

[0333]

F2R	凝血因子 II (凝血酶)受体	1.28	1.75	1.73
PGF	胎盘生长因子	1.04	2.07	2.47
CTHRC1	包含胶原三重螺旋重复 1	1.16	2.13	2.02
PTGDS	前列腺素 D2 合成酶, 21kDa (脑)	-1.21	5.24	2.88
AEBP1	AE 结合蛋白 1	-1.78	2.90	2.79
IL8 (Cxcl8)	趋化因子(C-X-C 基序)配体 8	-1.20	2.63	2.17
IL11	白介素 11	1.02	1.62	2.09
HEY1	具有 YRPW 基序的 Hes 相关家族 BHLH 转录因子 1	1.69	11.58	13.3
ECM1	胞外基质蛋白 1	-1.13	1.9	1.65
MFGE8	乳脂肪球-EGF 因子 8 蛋白	1.05	2.78	2.41
SRPX2	含 Sushi 重复蛋白, X-连接 2	1.52	3.42	2.68
UNC5B	Unc-5 同源物 B (秀丽线虫)	1.4	4.08	3.55

[0334] 上游调节子的表达

[0335] 结果说明,与2D生长条件相比,在3D中诱导上游调节子(表10、10b)。

[0336] 表10b.上调调节子的表达

[0337]

基因符号	基因全称	A-BL	B-BL	C-BL
		FC	FC	FC
TGFB3	转化生长因子,β3	-1.81	2.66	3.30
BAMBI	BMP和激活素膜结合抑制剂	1.45	10.16	8.57
IGFBP2	胰岛素-样生长因子结合蛋白2,36kDa	-1.04	3.09	1.76

IGFBP5	胰岛素-样生长因子结合蛋白5	-1.48	6.49	8.11
--------	----------------	-------	------	------

[0338] 在表达水平中具有显著调节的另外的DEG

[0339] 表11b说明了具有至少3倍变化的DEG(参见图11)。

[0340] 尽管已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但显然许多替代、修改和变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。因此,旨在涵盖落入所附权利要求的精神和广泛范围内的所有这些替代、修改和变化。

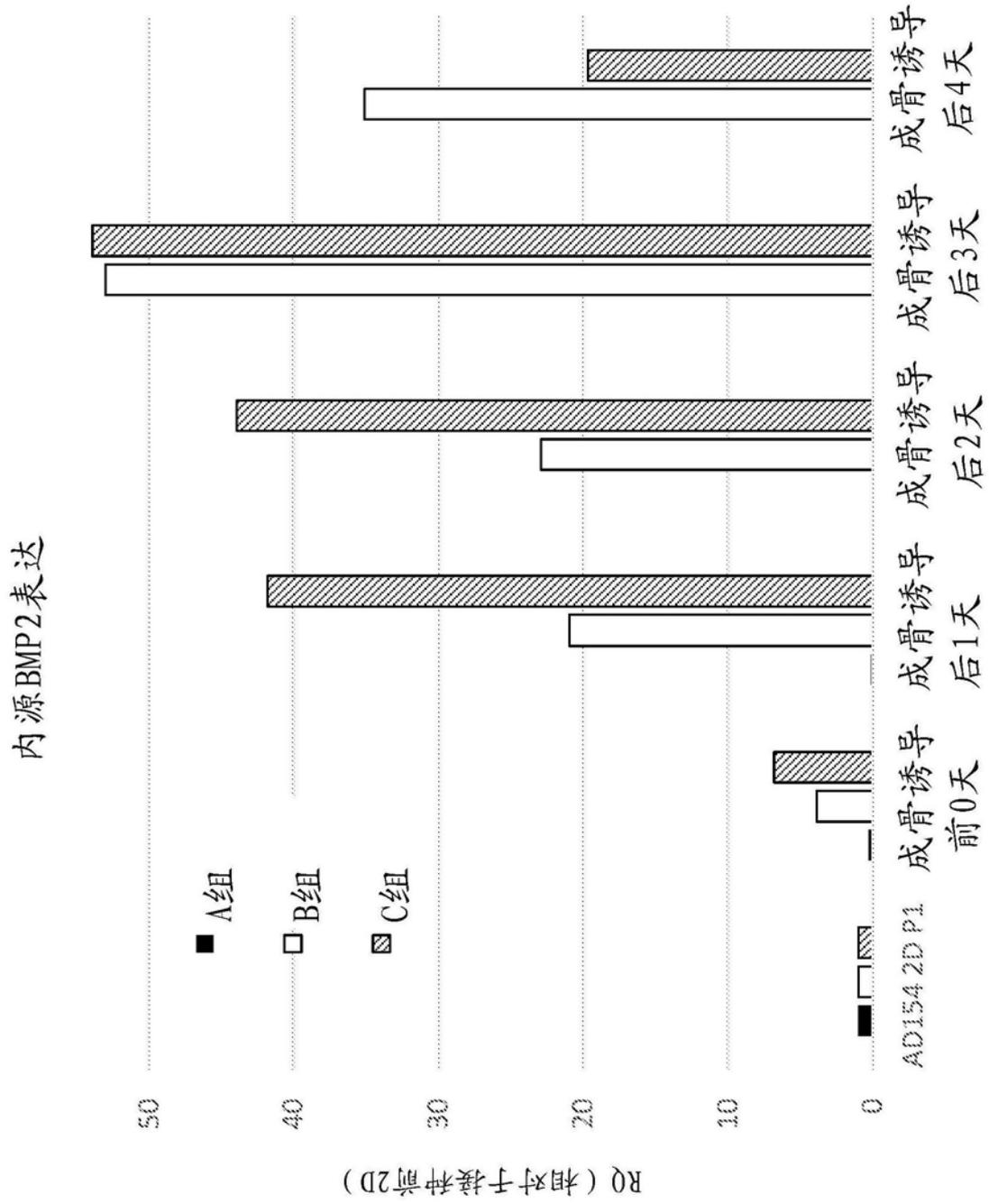


图1A

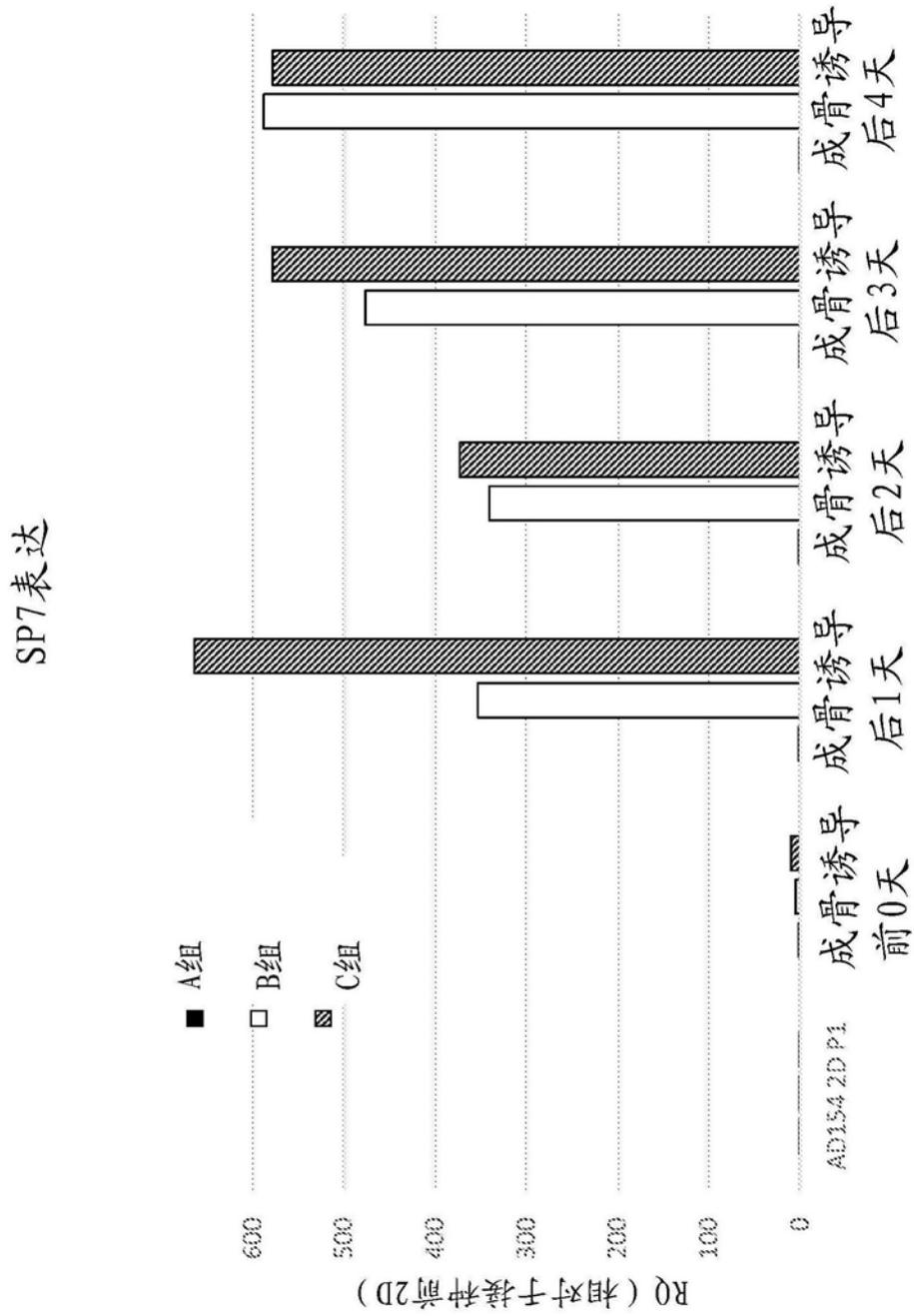


图1B

ALP表达

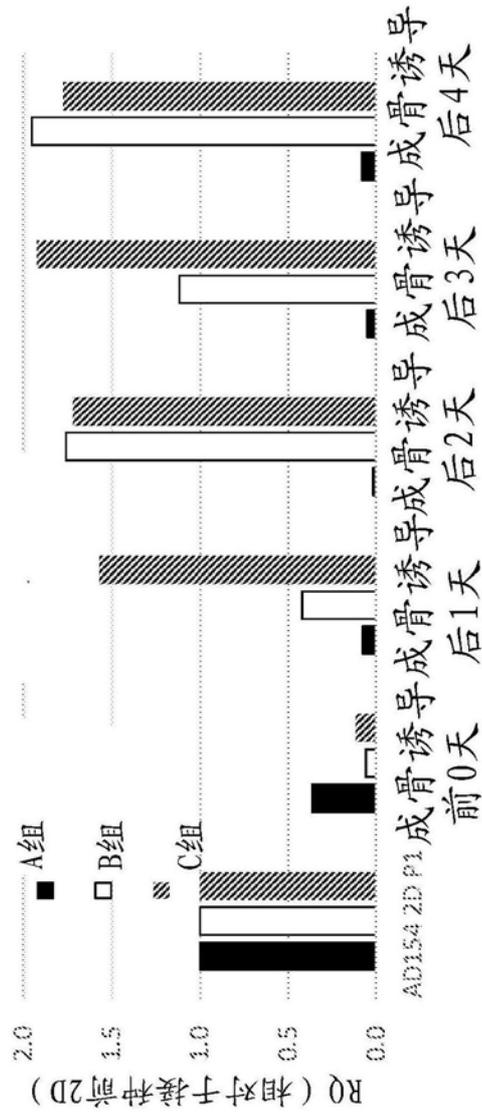


图1C

内源BMP2表达

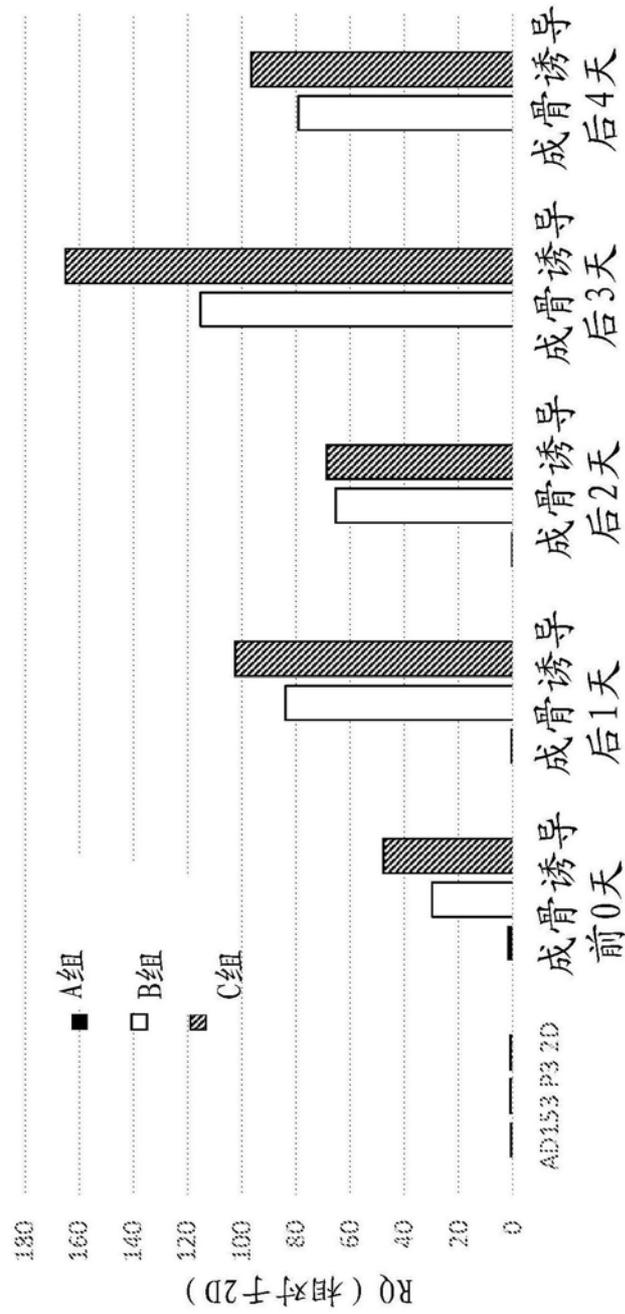


图2A

SP7表达

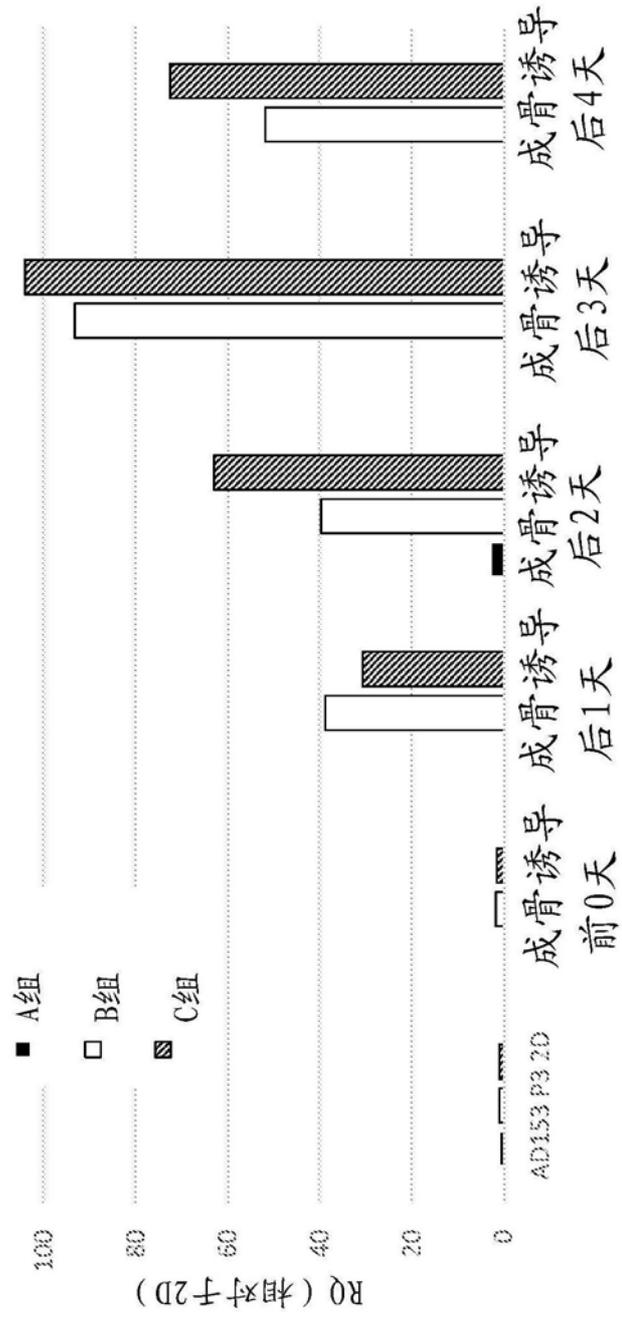


图2B

ALP表达

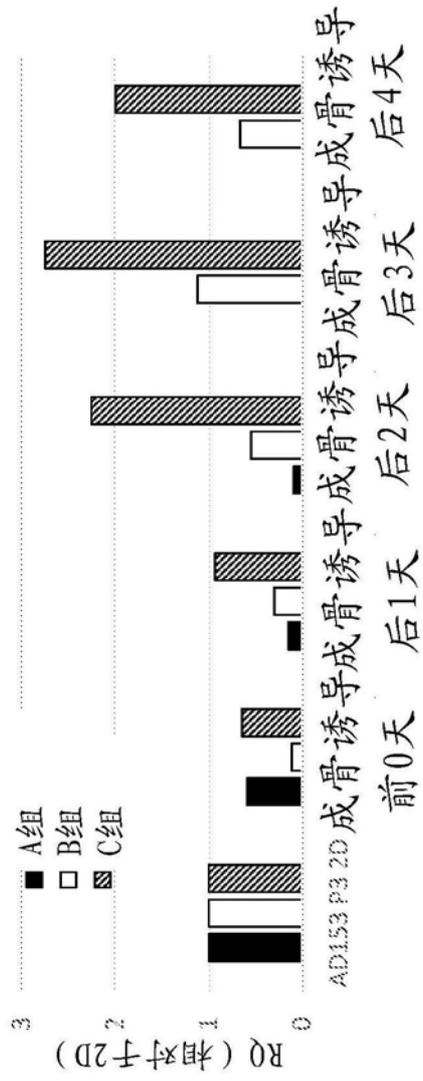


图2C

BMP2表达

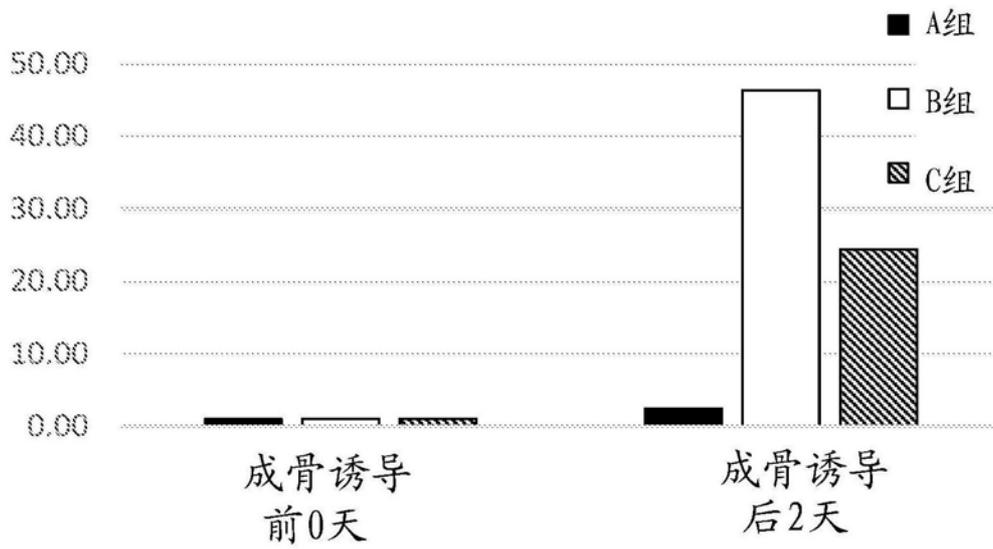


图3A

SP7表达

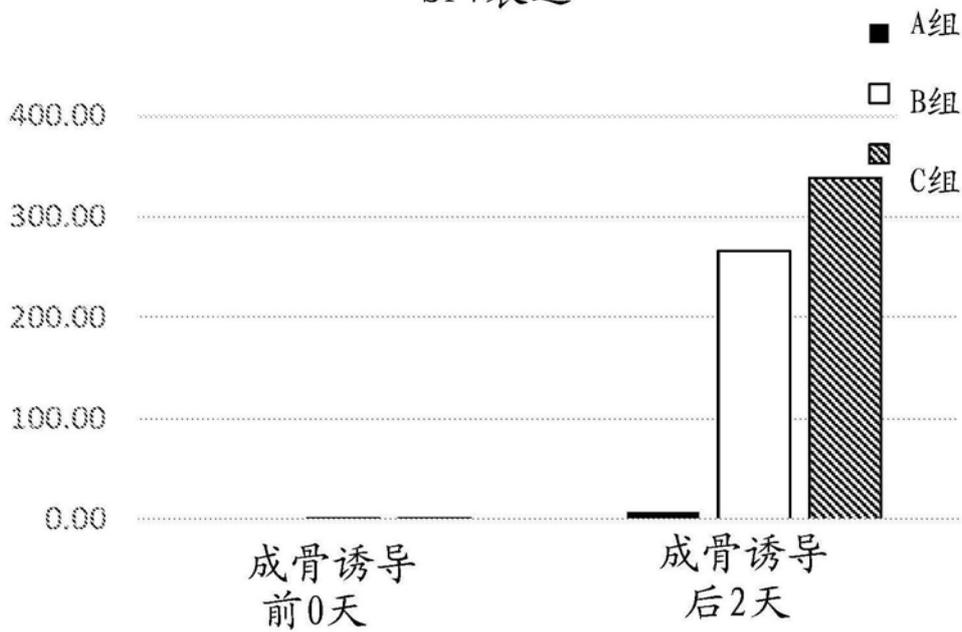


图3B

ALP表达

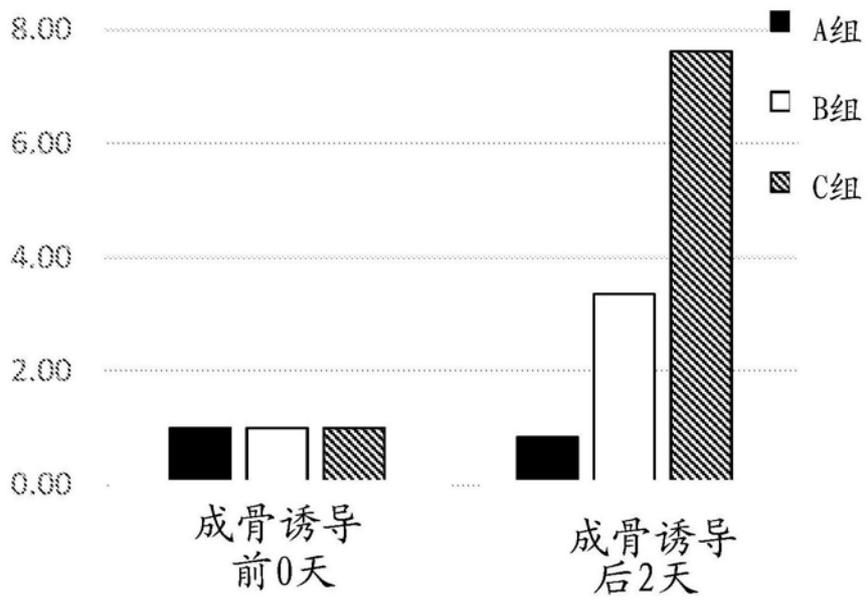
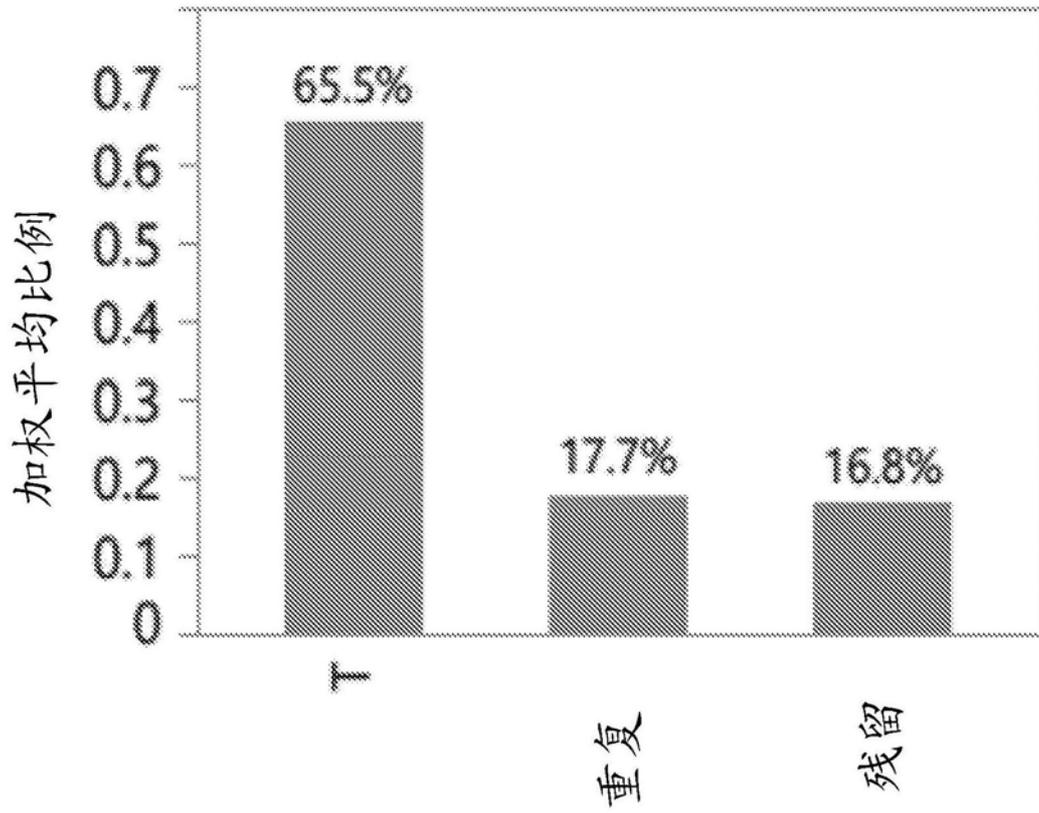


图3C



方差分量

图4

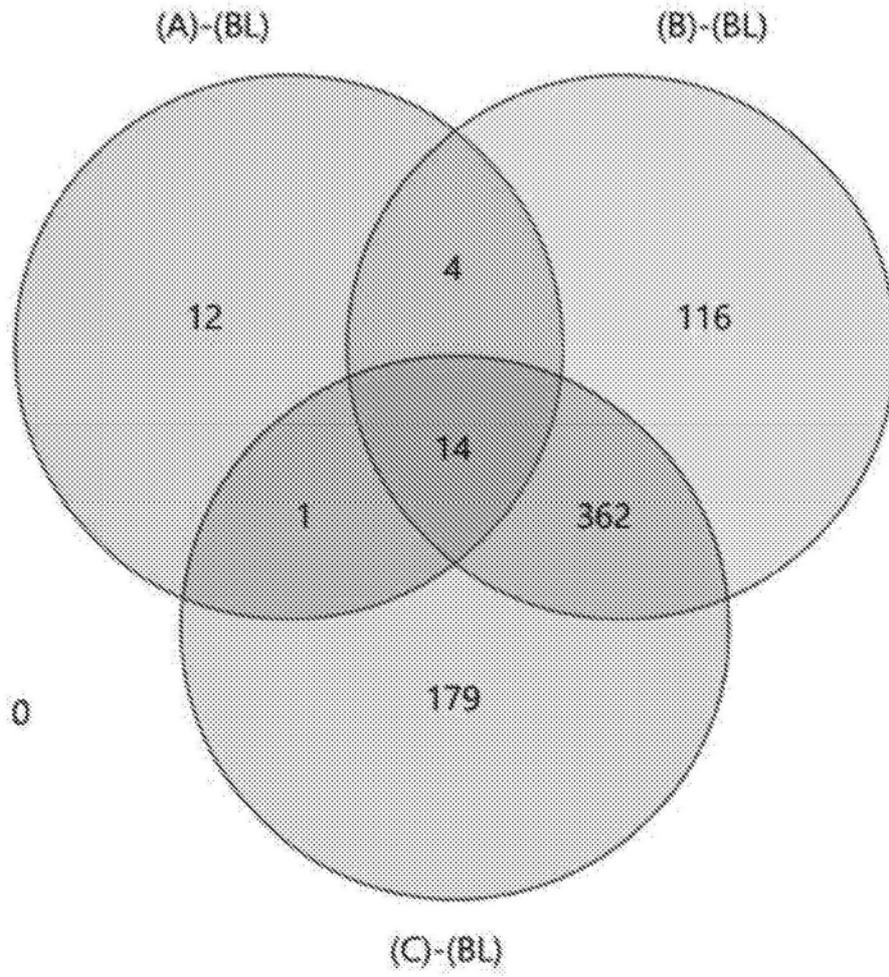


图5

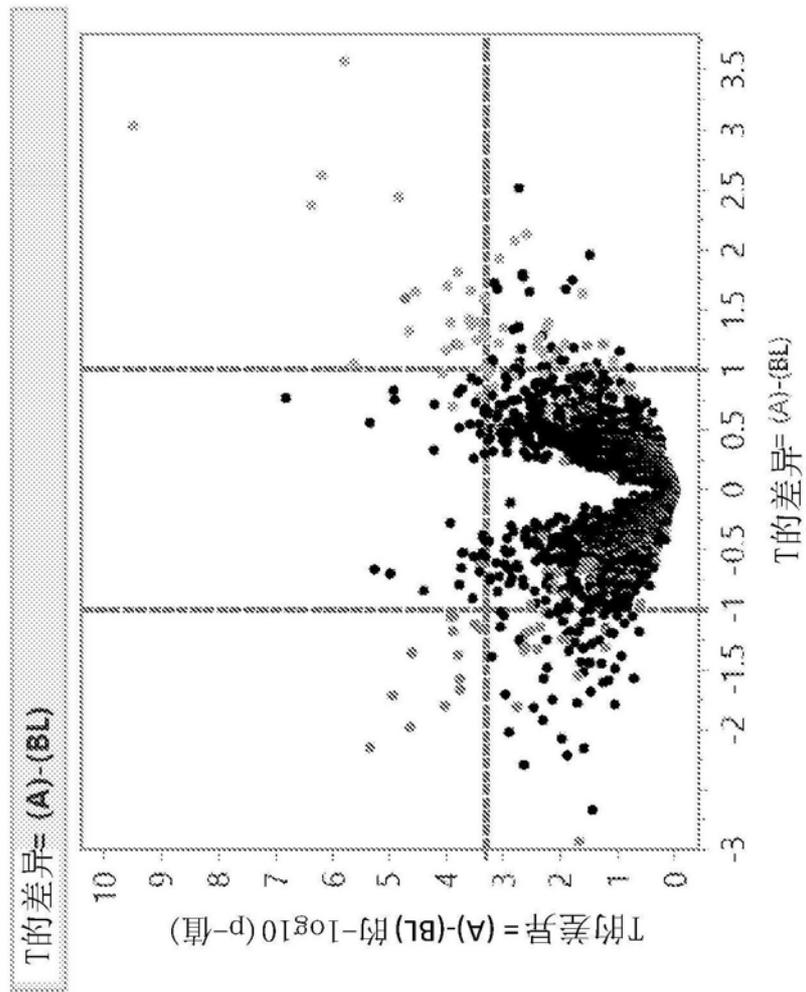


图6A

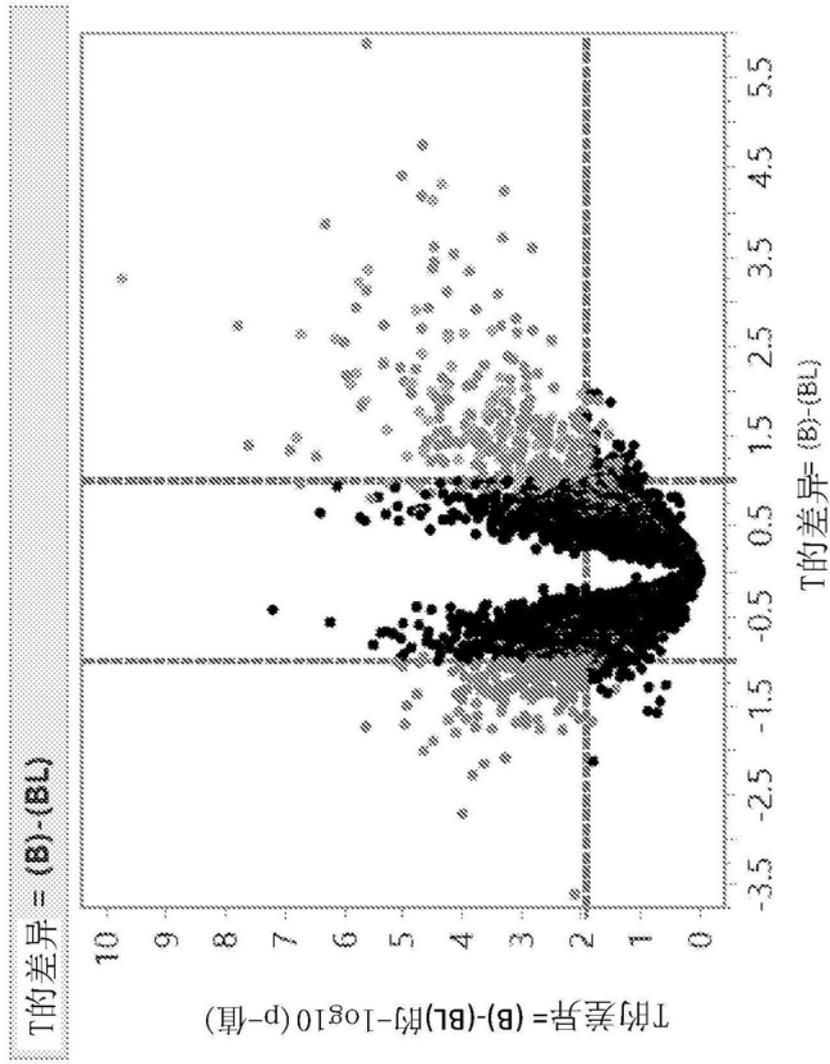


图6B

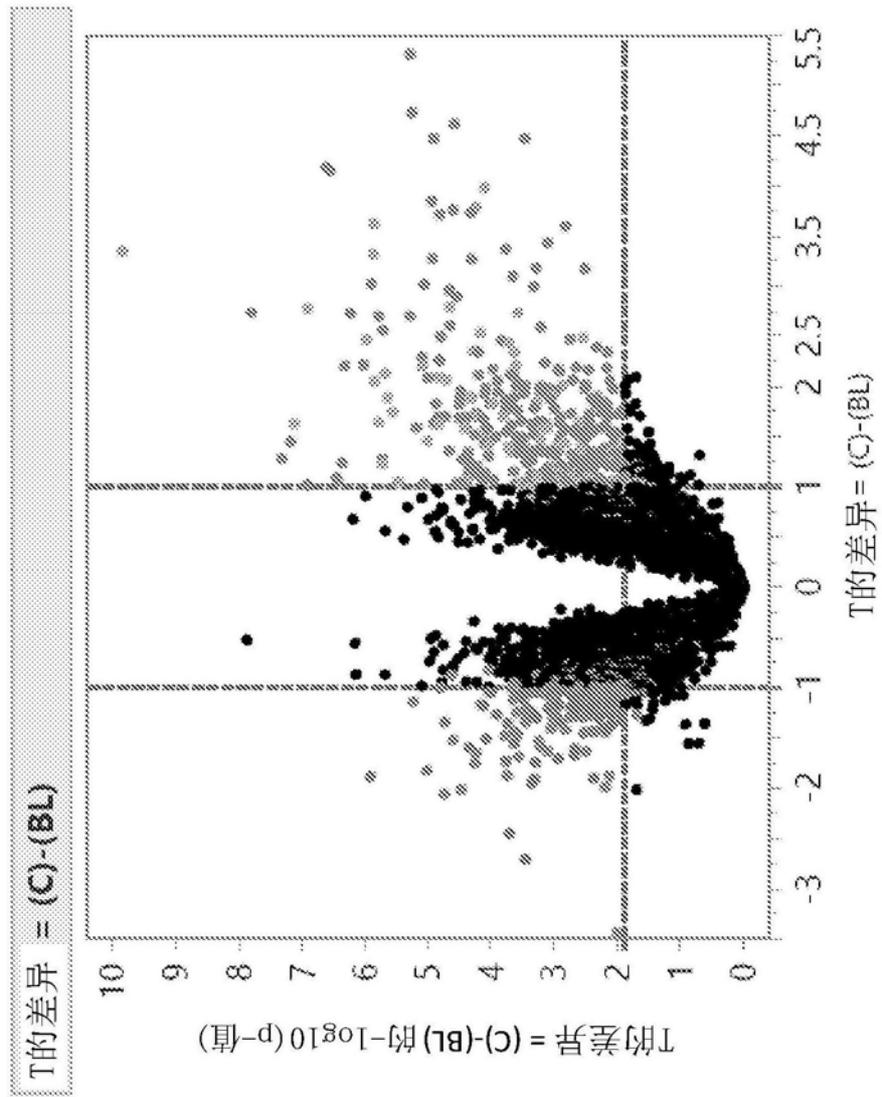


图6C

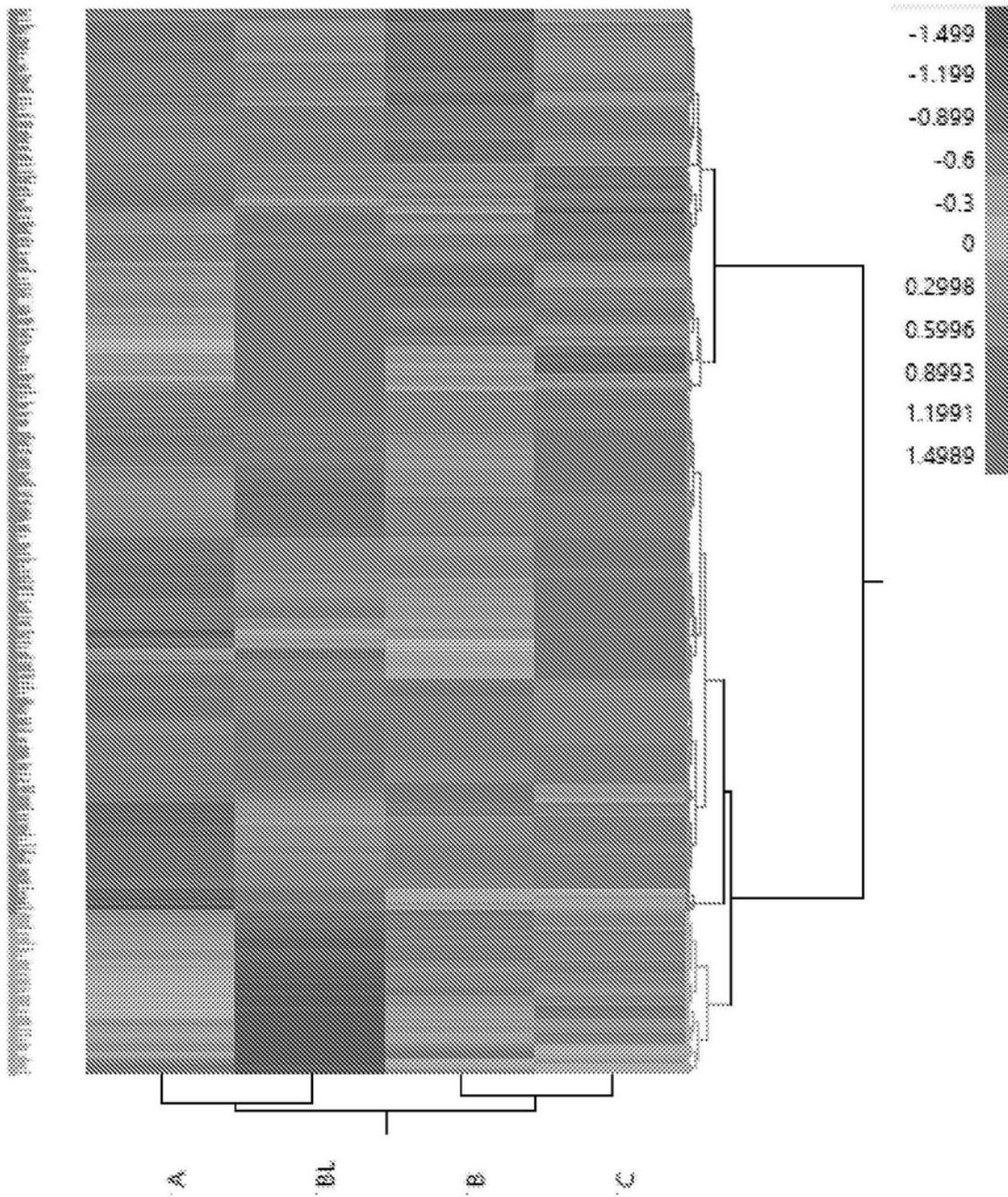


图7

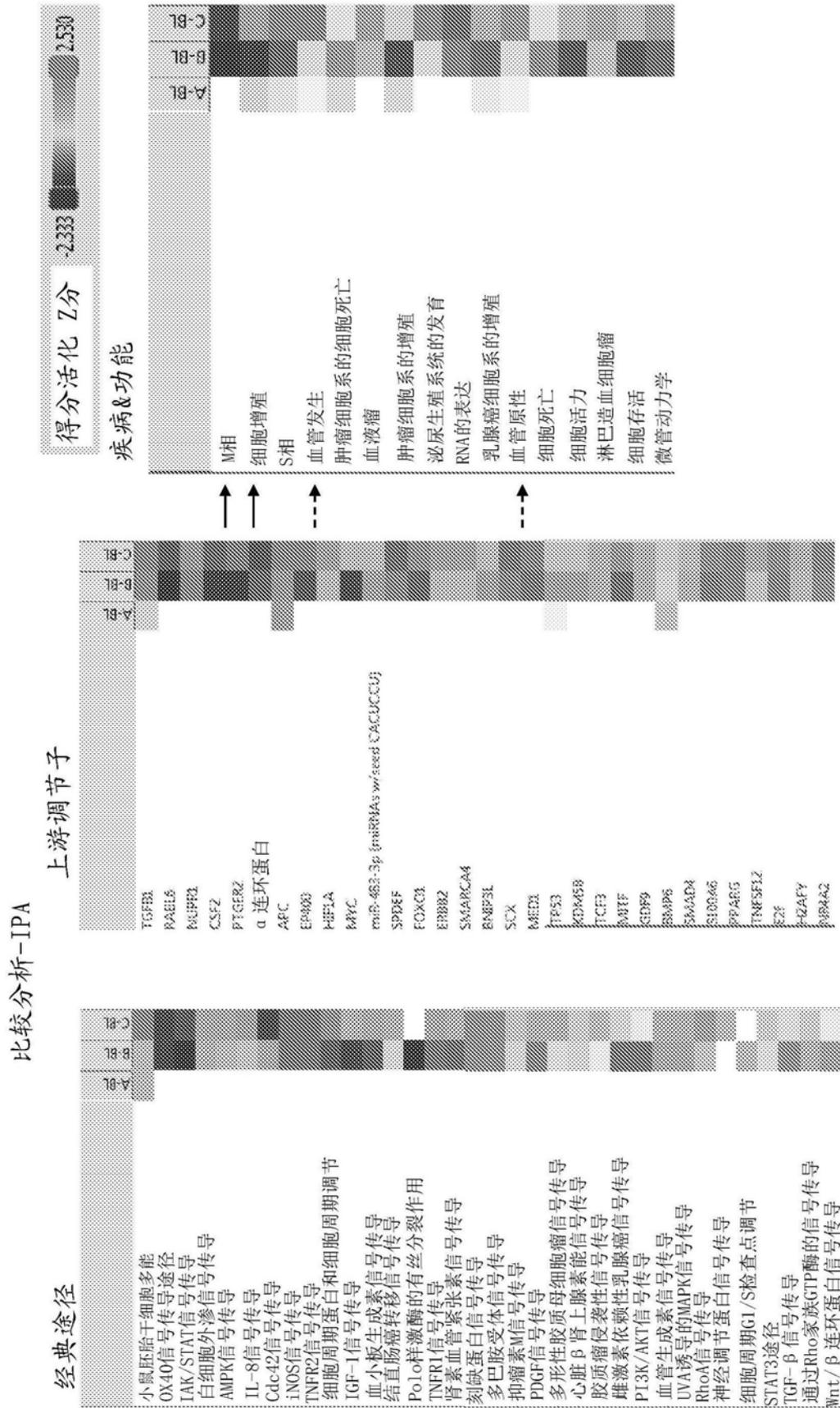


图8

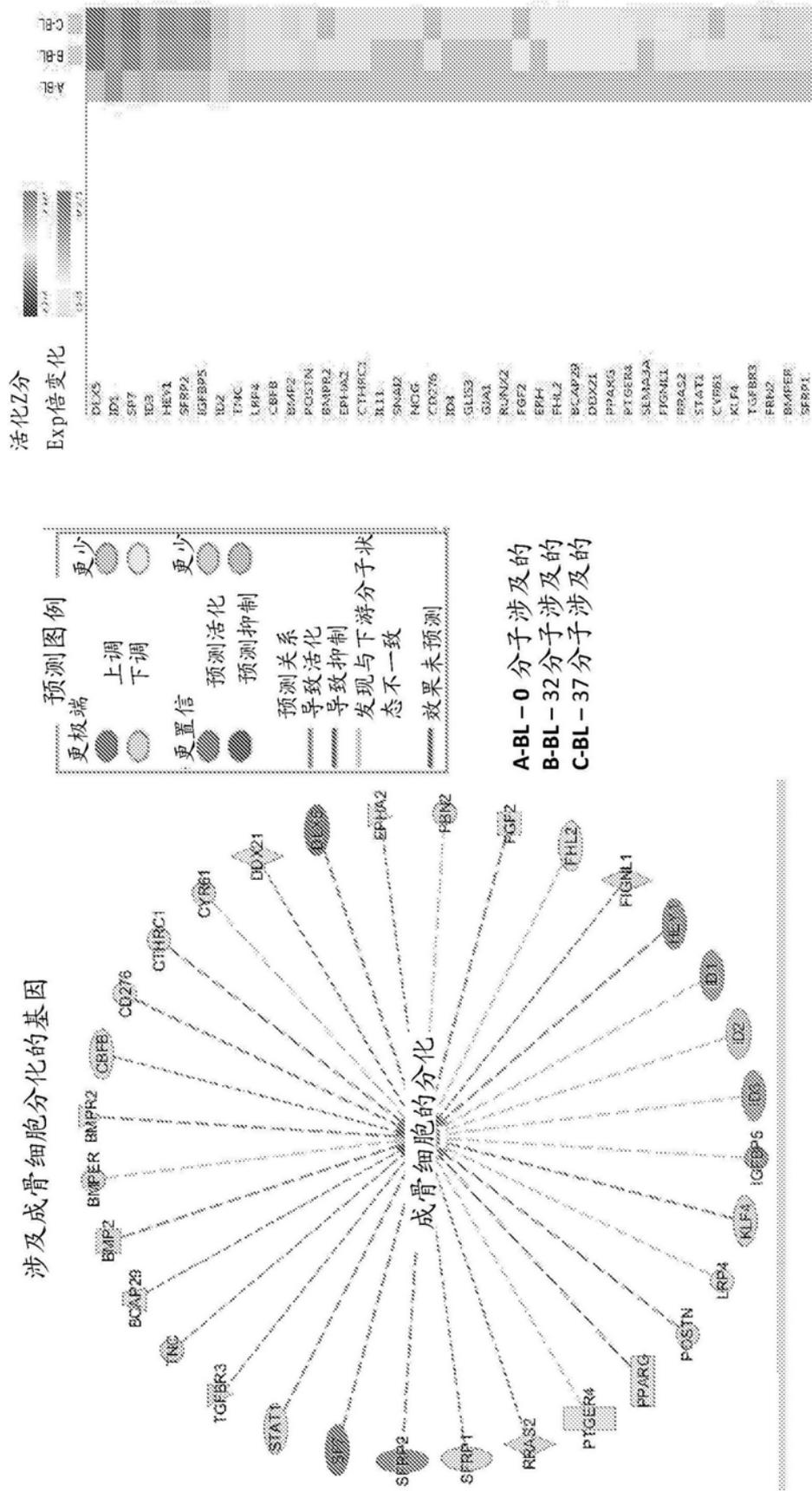


图9

血管发生&血管原性途径

A-BL-9 分子涉及的

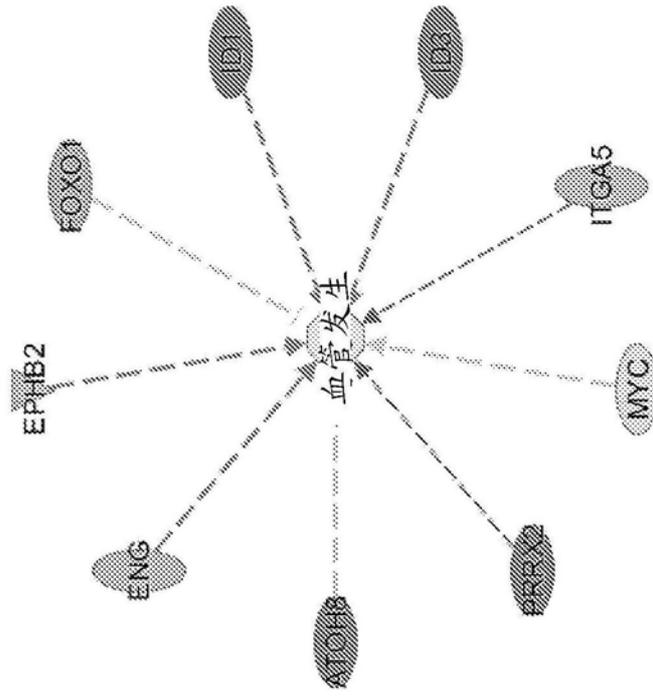


图10A

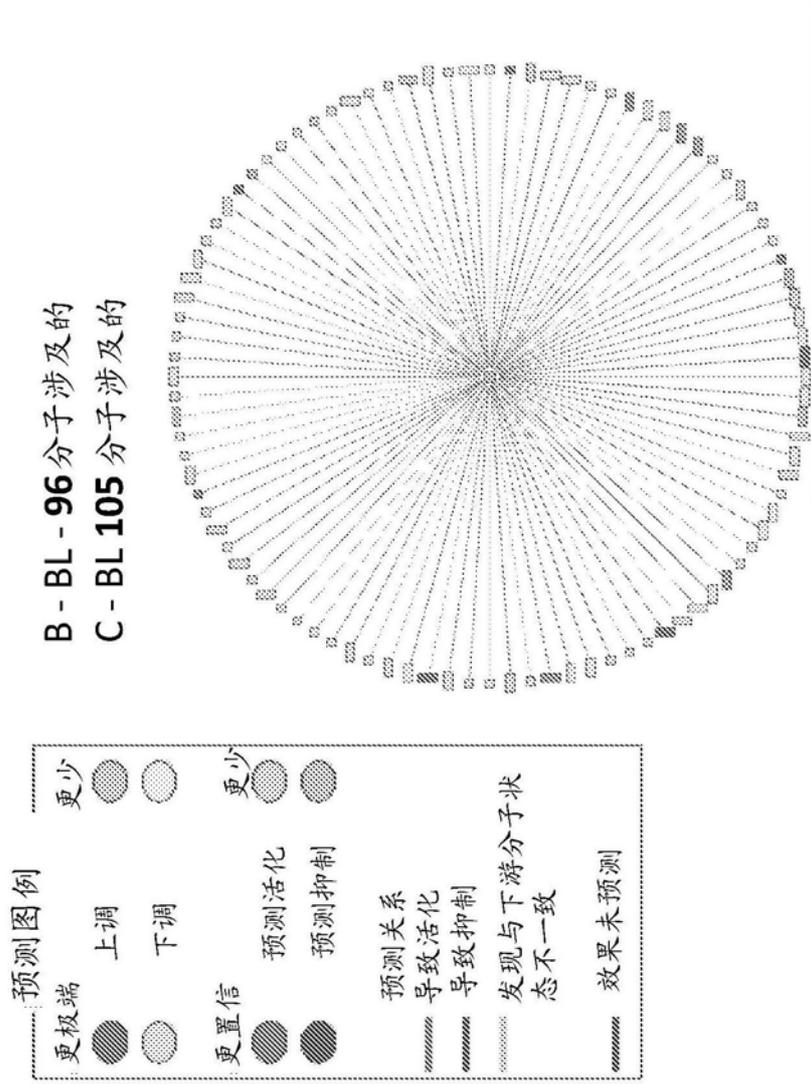


图10B

基因符号	A-BL	B-BL	C-BL	基因符号	A-BL	B-BL	C-BL
CLDN11	-1.14	-6.52	-5.47	CYGB	2.31	4.46	3.75
SFRP1	-1.02	-4.82	-3.75	C1QTNF5	-1.08	4.51	2.90
BCYRN1	-1.19	-4.42	-3.86	MARCKSL1	1.20	4.52	4.64
CDCA7	-1.95	-4.24	-3.19	INSC	1.35	4.57	4.92
FLJ21986	-1.11	-4	-4.15	ATP1B1	1.97	4.59	4.37
ODC1	-3.94	-3.87	-4.21	CPE	-1.68	4.64	6.46
OSR1	1.31	-3.70	-3.36	NBL1	1.28	4.74	4.77
LOC100130516	-1.57	-3.60	-3.57	ENC1	1.51	4.78	4.88
ROR1	1.24	-3.48	-4.04	APCDD1L	1.79	4.85	5.10
ALOX15B	-1.34	3.03	4.51	SEZ6L2	1.28	4.89	5.47
HEPH	-1.07	3.07	4.69	SLC7A8	-1.02	5.11	2.93
FNDC1	1.50	3.10	4.16	ISLR	-1.06	5.93	5.24
C14ORF132	1.43	3.20	4.07	ATP1B1	1.99	6.03	5.78
PFKFB4	1.09	3.33	5.17	TSPAN7	1.10	6.19	7.44
GABARAPL1	1.15	3.35	4.16	SAMD11	5.16	6.20	6.86
CRISPLD2	1.35	3.43	4.47	ATP1B1	2.62	6.24	5.39
C13ORF15	1.38	3.44	4.34	ALDOC	1.50	6.29	10.34
SLC6A10P	-1.19	3.56	4.60	RGS2	1.81	6.40	9.08
JAM2	1.23	3.66	7.77	DYNC111	1.55	6.62	6.65
NBL1	-1.43	3.68	4.00	RASL11B	1.24	6.62	6.02
OGN	-2.49	3.72	5.06	EYA2	1.09	6.65	6.50
ASS1	-1.15	3.75	4.52	DIO2	1.28	7.00	5.53
SSPN	1.15	3.76	4.77	CRYAB	2.40	7.49	6.93
ALOX15B	1.01	3.86	5.84	KLK4	1.00	7.53	4.51
TMEM90B	1.01	3.93	5.88	MXRA5	1.69	8.48	7.99
FLJ35258	1.01	4.07	3.20	CA9	1.02	8.62	14.39
TMEM16A	1.25	4.12	2.69	H19	-1.43	8.69	18.18
CRLF1	1.08	4.16	6.06	PENK	-1.07	10.75	13.73
CD24	2.03	4.21	4.50	PARRES2	-1.17	10.92	9.65
CMTM8	1.19	4.22	4.60	KANK4	2.11	19.81	15.81
ARHGEF19	-1.4	4.23	5.63	PTGES	2.29	21.18	26.56
OMD	1.10	4.37	3.89	ANKRD38	2.31	26.92	24.56
BTBD11	-1.14	4.44	3.94				

图11