



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108690827 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201810325787.7	<i>C12N 5/0793</i> (2010.01)
(22)申请日 2018.04.12	<i>A61K 35/32</i> (2015.01)
(30)优先权数据	<i>A61K 35/34</i> (2015.01)
17166389.1 2017.04.12 EP	<i>A61K 35/35</i> (2015.01)
(71)申请人 瑞瓦提斯股份公司	<i>A61K 35/44</i> (2015.01)
地址 比利时列日市	<i>A61K 35/28</i> (2015.01)
(72)发明人 狄磔尔·瑟特伊恩	<i>A61K 35/30</i> (2015.01)
贾斯汀·瑟乌斯特尔斯	<i>A61K 35/407</i> (2015.01)
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
责任公司 11219	<i>A61P 19/08</i> (2006.01)
代理人 金海霞 杨青	<i>A61P 19/10</i> (2006.01)
(51)Int.Cl.	
<i>C12N 5/071</i> (2010.01)	
<i>C12N 5/077</i> (2010.01)	
<i>C12N 5/078</i> (2010.01)	

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

从肌源性祖细胞获得分化细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及从肌源性祖细胞获得分化细胞的方法。具体地,本发明涉及一种制备分化的哺乳动物细胞的方法,所述方法包括收集肌肉显微活检样品,将所述样品置于细胞培养基中,收集和生长所述细胞,并将它们在适合的分化培养基中分化。

1. 一种制备分化的哺乳动物细胞的方法,所述方法包括(i)从哺乳动物个体收集肌肉显微活检样品,(ii)将步骤(i)的收集的肌肉样品置于适合的培养基中,(iii)生长从所述显微活检样品产生的细胞,(iv)当在所述肌肉样品周围存在足够量的生长的细胞时,将所述显微活检样品与生长的细胞分离,(v)使所述细胞继续生长至接近汇合,以及(vi)将在(v)中获得的细胞在适合的分化培养基中分化,所述方法不使用任何旨在分离某些间充质干细胞群体的分离技术。

2. 权利要求1的方法,其中所述肌肉显微活检样品是从骨骼肌组织获取的。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述显微活检样品为约10mg至约30mg,优选地超过约12mg,更优选地超过约15mg和/或少于约25mg,优选地少于约20mg。

4. 前述权利要求任一项的方法,其中通过将细胞分别在足够的成脂、成骨、成软骨、成肌、造血、内皮、神经元、心脏或肝细胞分化培养基中培养而分化成脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞。

5. 分化的脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞,其通过权利要求1至4任一项的方法获得。

6. 一种药物或兽医组合物,其包含权利要求5的分化的脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞。

7. 一种基材,所述基材至少在其部分表面上包含权利要求5的分化的细胞。

8. 一种治疗哺乳动物对象的方法,所述方法包括向需要的对象给药权利要求5的分化的细胞。

9. 权利要求8的治疗方法,其包括在哺乳动物对象中治疗一种或多种下述病症:韧带炎,骨软骨炎,关节炎,骨质疏松症,肌腱炎,蹄叶炎,肌腱和韧带炎症,骨折和不愈合。

从肌源性祖细胞获得分化细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从肌源性祖细胞 (mdP细胞) 获得分化细胞的新方法。

背景技术

[0002] 干细胞的特征在于自我更新和多谱系分化。目前已发现许多类型的干细胞,但间充质干细胞 (MSC) 由于它们分化成中胚层和非中胚层衍生物的能力、它们的免疫调节潜力、它们广泛的可利用性和它们对维持干细胞内源储备的贡献,仍然受到最多关注 (Karantalis等,2015)。

[0003] MSC广泛分散在整个身体中,但在临床研究中主要使用三种来源,它们是骨髓、脂肪组织以及在较小程度上的脐带 (Lv等,2014;Karantalis等,2015)。骨髓来源的间充质干细胞是最常用的干细胞,尽管它们的取样痛苦并且产率低。为克服这些缺点,已研究了许多其他的干细胞来源。骨骼肌含有能够自我更新和分化成多种谱系、不像卫星细胞那样限于成肌分化的细胞 (Jankowski等,2002;Wu等,2010)。

[0004] 在2006年,考虑到MSC的大量来源,为一致性起见,国际细胞疗法学会 (International Society for Cellular Therapy) (ISCT) 提出了定义人类MSC的最低标准判据: (1) MSC在标准培养条件下必须是贴附于塑料的 (plastic-adherent); (2) MSC必须表达CD105、CD73和CD90,并且不表达CD45、CD34、CD14或CD11b、CD79 α 或CD19和HLA-DR表面分子,并且 (3) MSC必须在体外分化成成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞 (Dominici等,2006)。

[0005] 已使用专利方法从肌肉显微活检样品分离到马肌源性干细胞,所述方法依赖于外植体培养,然后进行不连续Percoll密度梯度离心,以分拣具有不同密度的含有干细胞的级分 (Serteyn和Ceusters,2015,W02015/091210)。这种技术允许在6周内从非常少量的肌肉 (15-20mg) 达到约6千万个干细胞。使用流式细胞术的免疫表型分型显示这些细胞对CD105、CD90和CD44是阳性的,然而它们对CD45和MHC-II是阴性的。通过成功地分化成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、(角化细胞)、肝细胞、心肌细胞和内皮细胞,马肌源性干细胞已证明了它们的多能性。此外,这些细胞也显示出免疫调节性质。因此,这些肌源性干细胞代表了可以以显微侵入性方式丰富且容易地获得的间充质干细胞 (mdMSC) 群体,为骨髓来源的间充质干细胞提供了良好的替代品。

[0006] 干细胞代表了用于体外研究的有价值的工具。事实上,一旦分化流程被确立,它们能够以非常标准化的方式工作并产生高度可重复的细胞模型,代替基于永生化细胞、源自于尸体或源自于靶物种之外的其他物种的细胞的不太适合的模型 (Pittenger等,2013MSC book)。此外,干细胞为从单一个体并因此从单次取样提供大量不同细胞类型提供了机会,这对于在其取样是危险的或甚至不安全的细胞类型上进行的研究来说,是非常宝贵的工具。此外,干细胞满足了产生个体治疗方法的需求,这对于评估不同治疗对所讨论的患者的一种或多种细胞类型的效能和/或毒性来说,是极为重要的。到目前为止,科学文献在经过分离、培养和扩增阶段后,从源自于骨髓、脂肪组织、血液、骨髓、脐带血等的间充质干细胞获得分化的细胞。

发明内容

[0007] 现在已发现,可以从肌肉显微活检样品获得分化的细胞,而不需任何预先的分离技术来分离某些或不同的间充质干细胞群体。这些分离技术通常包括酶消化、预铺板、密度梯度分离等。

[0008] 根据本发明,用于制备分化的哺乳动物细胞的方法包括(i)从哺乳动物个体收集肌肉显微活检样品,(ii)将步骤(i)的收集的肌肉样品置于适合的培养基中,(iii)生长从所述显微活检样品产生的细胞,(iv)当在所述肌肉样品周围存在足够量的生长的细胞时,将所述显微活检样品与生长的细胞分离,(v)使所述细胞继续生长至接近汇合,以及(vi)将来自于步骤(v)的细胞在适合的分化培养基中分化,所述方法不使用旨在分离某些间充质干细胞的分离技术或步骤。

[0009] 根据本发明的优选实施方式,所述肌肉显微活检样品是从骨骼肌组织获取的。

[0010] 所述显微活检肌肉样品与从其产生并在其周围生长的细胞的分离,可以通过除去所述组织样品来实现,由此在相关培养基中留下所述细胞用于进一步生长。

[0011] 有利情况下,所述培养基包含DMEM/F12以及约20%胎牛血清、约5ml青霉素(1000U/ml)-链霉素(10000 μ g/ml)、约2.5ml两性霉素B(250 μ g/ml)和约5ml HEPES。其他实例是CTS(商品名)和Therapeak(商品名)培养基。专业技术人员可以发现其他同样适合的培养基,并且可以利用其常识、经验和技巧改造所述培养基,以满足所述方法的要求。

[0012] 所述哺乳动物可以选自家畜和农畜、动物园动物、竞技动物、宠物、伴侣动物和实验动物,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔、狗、猫、豚鼠、牛、奶牛、绵羊、马、猪和灵长动物例如猴和猿,也可以选自人类。

[0013] 有利情况下,所述显微活检样品从骨骼肌组织获得,例如来自于颈、肩、胸、背、尾、肢、后肢、前肢、后躯(hindquarter)、后腿等的肌肉。在哺乳动物如马的情况下,所述显微活检样品优选地从肱三头肌组织获得,更优选地从肱三头肌的长头获取。在人的情况下,所述显微活检样品可以从三角肌获得。本领域技术人员能够没有过度负担地选择适合的来源。

[0014] 例如,在马的情况下,所述显微活检样品可以在肱三头肌的长头中约5cm的深度处收集,并且可以含有约10至约30mg、优选地超过约12mg或超过约15mg和/或少于约25mg或少于约20mg组织。在人的情况下,所述显微活检样品可以含有约10至约20mg组织。明显地,尽管取决于哺乳动物和骨骼肌组织来源,但专业技术人员可以在其常识的基础上和/或通过常规实验,没有过多负担地改变显微活检样品的深度和待提取的组织样品的量。

[0015] 所述分离的肌源性祖细胞可以通过将它们分别在足够的成脂、成骨、成软骨、成肌、造血、内皮、神经元、心脏或肝细胞分化培养基中培养而分化成脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞。相关的分化培养基对于专业技术人员来说是已知的,所述专业技术人员可以在其常识、经验和技巧的基础上,没有过多负担地选择适合的培养基和培养条件。

[0016] 当在本文中使用时,术语“肌源性祖细胞”或“mdP细胞”被理解为意指在不使用例如不连续Percoll密度梯度分离含有干细胞的不同级分的情况下,通过外植体培养从显微活检样品产生的所有细胞。

[0017] 细胞分化被理解为意指细胞从一种细胞类型变化为总体上更加特化的类型的过

程。这一过程可以通过控制基因表达的适合的培养基来引发。当在本文中使用时,术语“分化的细胞”被理解为意指特化的细胞类型例如脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞,它们比它们所源自的祖细胞或干细胞更加特化。

[0018] 术语“干细胞”总的来说是指未特化或特化程度相对较低且能够增殖的细胞,其能够自我更新,即能够增殖而不分化,并且其或其后代可以产生至少一种相对更加特化的细胞类型。该术语涵盖了能够基本上无限自我更新的干细胞,即其中干细胞的后代或其至少一部分基本上保留了母体干细胞的未特化或特化程度相对较低的表型、分化潜力和增殖能力,还涵盖表现出有限自我更新的干细胞,即其中后代或其一部分进一步增殖和/或分化的能力与母体细胞相比明确降低。例如但非限制性地,干细胞可以产生能够沿着一个或多个谱系分化以产生越来越相对更加特化的细胞的后代,其中这些后代和/或越来越相对更加特化的细胞自身可以是本文中所定义的干细胞,或者甚至产生终端分化细胞,即完全特化的细胞,其可以是有丝分裂后的。

[0019] 当在本文中使用时,术语“间充质干细胞”或“MSC”是指成年哺乳动物的中胚层来源的干细胞,其能够产生间充质谱系的细胞,通常为两种、优选为三种或更多种间充质谱系例如骨细胞(骨骼)、软骨细胞(软骨)、肌细胞(肌肉)、肌腱细胞(肌腱)、成纤维细胞(结缔组织)、脂肪细胞(脂肪)和成基质细胞(stromogenic)(骨髓基质)谱系的细胞。通常但不是限制性的,如果细胞能够使用标准的、本领域接受的分化条件和细胞表型评估方法形成每种脂肪细胞、软骨细胞和骨细胞谱系的细胞,则所述细胞可以被认为是MSC,所述方法例如在Pittenger等,1999(Science 284:143-7)或Barberi等,2005(PLoS Med 2:e161)和ūsas等,2011中所描述的方法。术语MSC也涵盖MSC的后代,例如通过从对象的生物样品获得的MSC的体外或离体繁殖获得的后代。

[0020] ISCT精确地确定了被定义为间充质干细胞(MSC)的细胞必须具有的下述品质:所述细胞必须是贴附于塑料的,对标志物CD73、CD90和CD105阳性,对标志物CD14(或CD11b)、CD34、CD45、CD79a(或CD19)和MHC-II阴性,并且必须表现出分化成中胚层起源的细胞例如成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞的能力(Dominici等,2006)。也报道了其他MSC标志物例如CD29或CD44的使用(Pittenger等,1999)。因此,按照本发明使用的哺乳动物MSC细胞被定义为它们至少表达或共表达(即对其阳性)间充质标志物CD105,并且优选地还表达或共表达一种或多种下述标志物:CD44和CD90。本发明的哺乳动物MSC细胞也被定义为它们可以表达或共表达(即对其阳性)一种或多种下述微RNA:miR-128,miR-133B,miR-218或miR-802。本发明的哺乳动物MSC细胞也被定义为它们不表达miR-656。

[0021] 术语微RNA、miRNA、miR或eca-miR在本文中可互换使用,并且是指源自于活生物体例如动物的内源基因的19-25个核苷酸的成熟的非编码RNA或其前体或其片段。成熟的微RNA从长度约为75个核苷酸的被称为前微RNA(前-miR)的较长的发夹状前体加工而成。

[0022] 当细胞被称为对特定标志物或微RNA是阳性时,这意味着专业技术人员当进行适合的测量时,与适合的对照相比,推断出该标志物或微RNA的独特信号的存在或证据,例如可以用抗体检测或通过反转录聚合酶链反应检测。当所述方法允许定量评估所述标志物或微RNA时,阳性细胞产生与对照相比明显不同并且更高或更强的信号,例如但不限于比由对照细胞产生的这种信号高至少1.5倍,例如高至少2倍、至少4倍、至少10倍、至少20倍、至少

30倍、至少40倍、至少50倍或甚至更高。

[0023] 细胞特异性标志物的表达可以使用本领域中已知的任何适合的免疫学技术来检测,例如免疫细胞化学或亲和吸附、Western印迹分析、FACS、ELISA等,或通过任何适合的酶活性的生物化学测定法或通过测量标志物mRNA的量的任何适合的技术例如Northern印迹、半定量或定量RT-PCR等来检测。

[0024] 微RNA的表达可以例如使用用于全局基因表达的测定法(例如使用用于微RNA表达情况分析的微阵列测定法、即用型微RNA qPCR板或RNA测序)来确定,或通过特异性检测测定法例如但不限于定量PCR、定量反转录(实时)PCR(qRT-PCR)、锁核酸(LNA)实时PCR或northern印迹分析来确定。具体来说,微RNA表达的测量可以使用特异性用于检测所述微RNA的寡核苷酸探针来进行。所述寡核苷酸探针可以直接且特异性地结合到所述微RNA,或者可以特异性地反转录所述微RNA。或者,所述寡核苷酸探针可以结合从所述微RNA获得的cDNA。所述寡核苷酸探针也可以扩增从所述微RNA获得的cDNA。

[0025] 当在本文中使用时,术语“生长”和“培养”被理解为意指细胞繁殖到一定的汇合水平。

[0026] 术语“显微活检样品周围的足够量的细胞”意味着在肌肉样品上和/或其附近已经生长了足够的细胞,使得可以将它们从所述肌肉样品分离以备进一步生长。

[0027] 本发明的方法提供了分化的细胞的容易来源,所述分化的细胞包括但不限于脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞和肝细胞,用于体外研究包括例如毒性测定、基于芯片上的器官(organ-on-a-chip)的实验、药物开发和个性化医学治疗开发。后者可以包括通过评估所述哺乳动物的分化细胞的阳性响应水平来评估患者的阳性响应的可能性。

[0028] 本发明为文献中已经描述的方法提供了一种有效且有前景的替选方案,并且由于祖细胞收集的极小侵入性特点,提供了在活生物体上进行的可能性。正如已知的,肌源性细胞是来自于不同谱系和不同发育阶段的子群体、包括干细胞的混合物。细胞培养可以使用简单的方法开始:可以使用肌肉显微活检样品作为外植体,并且祖细胞在适当的时候自发出现。通过这样来做,减少了操作次数,避免了潜在污染源,并且不需添加外部生长因子,因为由所述肌肉显微活检样品(外植体)自然分泌的生长因子是足够的。

[0029] 本发明提供了一种用于以高得率产生分化细胞的简化且有效的方法。在本发明的首次提交日期时的知识水平不允许推断出普通技术人员可以从肌肉活检样品直接生产分化的细胞。基于所述首次提交日期时专业技术人员可以获得的知识,本发明的方法是违反直觉的。不能预期普通技术人员能够从肌肉样品分化出几种细胞谱系,包括骨细胞(骨骼)、软骨细胞(软骨)、肌细胞(肌肉)、肌腱细胞(肌腱)、成纤维细胞(结缔组织)、脂肪细胞(脂肪)和成基质细胞(骨髓基质)谱系。

[0030] 本发明特别适合于自体细胞用途,意味着不太依赖于遗传特点或异常的更加可靠的结果。

[0031] 本发明还提供了通过将所述分化的细胞给药到需要的对象的治疗方法,所述需要的对象包括将从给定病症的治疗获益的对象(哺乳动物)。这些对象可以包括但不限于已被诊断为患有所述病症的对象,易于发生所述病症的对象和/或将要在其中预防所述病症的对象。所述分化的细胞可用于治疗一种或多种下述病症:分化的骨细胞用于在哺乳动物对

象中治疗骨质疏松症、骨折和不愈合；分化的软骨细胞用于治疗韧带炎、骨软骨炎、关节炎、肌腱炎、蹄叶炎、肌腱和韧带炎症；成肌细胞和心脏细胞用于治疗心脏病，例如改善心脏功能、重建梗塞的心脏组织；分化的造血细胞用于治疗自体免疫疾病以及血液和骨髓的癌症例如多发性骨髓瘤和白血病；内皮细胞用于治疗内皮机能障碍；神经细胞用于治疗退行性神经疾病、帕金森氏病、亨廷顿病、多发性硬化症；分化的肝细胞用于治疗肝功能障碍和癌症。

[0032] 术语“治疗”涵盖了已经发生的病症的治疗性治疗例如已经发生的肌肉-关节-骨骼病症的治疗以及预防性或预防措施两者，在后者中目的在于阻止不想要的病患的发生或减少其发生的机会，例如阻止肌肉-关节-骨骼病症的收缩和进展的机会，所述肌肉-关节-骨骼病症例如但不限于：韧带炎，骨软骨炎，关节炎，骨质疏松症，肌腱炎，肌腱和韧带炎症，骨折和不愈合。这种治疗的有益或所需临床结果可以包括但不限于一种或多种症状或一种或多种生物标志物的缓解、疾病程度的降低、疾病状态的稳定（即不恶化）、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或减轻等。“治疗”也可以指与不接受治疗情况下的预期存活时间相比延长存活时间。

[0033] 术语“预防有效量”是指如研究人员或兽医正寻找的符合本发明的兽医或药物组合物在对象中抑制或延迟病症的发作的量。当在本文中使用时，术语“治疗有效量”是指指研究人员或兽医正寻找的符合本发明的兽医或药物组合物在对象中引发生物或医学响应的量，所述响应尤其可以包括待治疗的疾病或病症的症状的缓解。用于确定治疗和预防有效剂量的方法在本领域中是已知的。

[0034] 治疗可以利用自体（即源自于待治疗对象的细胞）、同种异体（即源自于待治疗对象之外但属于同一物种的对象的细胞）或异种（即源自于与待治疗对象属于不同的物种的对象的细胞）的如本文中所定义的分化的细胞或它们相应的细胞群体。

[0035] 所述兽医或药物组合物通常包含按照本发明获得的分化的细胞或细胞群体作为活性成分，以及一种或多种可药用载体/赋形剂。当在本文中使用时，“载体”或“赋形剂”包括任何和所有的溶剂、稀释剂、缓冲剂（例如中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水）、增溶剂、胶体、分散介质、溶媒（vehicle）、填充剂、螯合剂（例如EDTA或谷胱甘肽）、氨基酸（例如甘氨酸）、蛋白质、崩解剂、粘合剂、润滑剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、增香剂、增稠剂、用于获得药性持久效果的药剂、包衣剂、抗真菌剂、防腐剂、稳定剂、抗氧化剂、张性（tonicity）控制剂、吸收延迟剂等。这些介质和药剂用于兽医或药物活性物质的用途在本领域中是公知的。这些材料应该是无毒的，并且不应干扰细胞的活性。对于兽医用途来说，所述细胞也可以配制成饲料添加剂或作为饲料添加剂给药。

[0036] 所述载体或赋形剂或其他材料的确切性质取决于给药途径。例如，所述组合物可以采取肠胃外可接受的水性溶液的形式。对于药物配制中的一般原则，读者可参考《细胞疗法：干细胞移植、基因疗法和细胞免疫疗法》（Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy），G. Morstyn & W. Sheridan 主编，Cambridge University Press, 1996；以及《造血干细胞疗法》（Hematopoietic Stem Cell Therapy），E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000。

[0037] 这些兽医或药物组合物可以含有确保其中的（分化的）细胞或细胞群体的生存能力的其他组分。例如，所述组合物可以包含适合的缓冲系统（例如磷酸盐或碳酸盐缓冲系

统)以获得所需pH,更通常为接近中性的pH,并且可以包含足够的盐以确保对细胞来说等渗的条件,以防渗透压力。例如,用于这些目的的适合的溶液可以是本领域中已知的磷酸盐缓冲盐水(PBS)、氯化钠溶液、林格注射液(Ringer's Injection)或乳酸盐林格注射液(Lactated Ringer's Injection)。此外,所述组合物可以包含载体蛋白例如白蛋白,其可以提高细胞的生存能力。

[0038] 所述兽医或药物组合物可以包含在待治疗的相关组织或器官或其功能的修复或再生中有用的其他组分。作为实例,所述兽医或药物组合物可以包含在骨骼创伤和缺损的修复中有用的组分。例如,这些组分可以包括但不限于骨形态发生蛋白、骨基质(例如通过本发明的细胞或通过其他方法在体外生产的骨基质)、羟基磷灰石/磷酸三钙粒子(HA/TCP)、明胶、聚乳酸、聚乳酸-乙醇酸、透明质酸、壳聚糖、聚L-赖氨酸和胶原蛋白。例如,可以将成骨细胞与脱矿物质的骨基质(DBM)或其他基质合并,以使所述复合材料具有成骨性(自身就可以形成骨骼)以及骨诱导性。

[0039] 所述兽医或药物组合物还可以包括补充的生物活性因子例如骨形态发生蛋白如BMP-2、BMP-7或BMP-4或任何其他生长因子,或者可以与所述生物活性因子共同给药。其他可能的伴随组分包括适用于协助骨骼再生的钙或磷酸盐的无机来源(WO 00/07639)。如有需要,可以将细胞制备物在载体基质或材料上给药,以提供改进的组织再生。例如,所述材料可以是颗粒陶瓷或生物聚合物例如明胶、胶原蛋白、骨粘连蛋白、纤维蛋白原或骨钙蛋白。多孔基质可以按照标准技术来合成(例如Mikos等,Biomaterials 14:323,1993)。

[0040] 所述兽医或药物组合物还可以包括补充的消毒剂、防腐剂或微生物破坏剂例如杀菌剂、抗菌剂、抗生素或抗真菌剂和/或消炎剂,或者与它们共同给药,以避免在所述分化细胞的引入或给药位点处由感染或炎症造成的并发症。

[0041] 所述分化的细胞或细胞群体可以以允许它们移植或迁移到目标组织位点并重构或再生功能缺陷区域的方式给药。所述组合物的给药依赖于所修复的肌肉-关节-骨骼位点。例如,所述分化的细胞或细胞群体可以直接给药到病灶中(例如肌腱或韧带中)或滑液关节中(例如肌腱或关节滑液中)。

[0042] 例如,可以按照手术程序促进骨生成,以重塑组织或插入皮片(split)或假体装置。在其他情况下,不需要侵入性手术,并且所述组合物可以通过注射例如超声波引导的注射或使用可引导的内窥镜给药。

[0043] 在另一个实施方式中,本发明的分化的细胞或细胞群体可以被转移到和/或培养在适合的基材上,以提供植入物。可以将所述细胞施加在其至少部分表面上并培养的基材,可以是金属例如钛、钴/铬合金或不锈钢,生物活性表面例如磷酸钙,聚合物表面例如聚乙烯等。尽管不太优选,但含硅材料例如玻璃陶瓷,也可以用作基材。最优选的是金属例如钛和磷酸钙,尽管磷酸钙不是基材的不可或缺的组分。所述基材可以是多孔或无孔的。所述基材可以是生物可降解或生物可吸收的。

[0044] 例如,可以将按照本发明获得的分化的细胞转移到三维固体支持物上,以便如有必要,通过将所述固体支持物在本发明的液体营养培养基中温育,使所述细胞繁殖和/或继续分化过程。可以例如通过用含有细胞的液体悬液浸渍三维固体支持物,将所述细胞转移到所述支持物上。通过这种方式获得的浸渍过的支持物可以被植入到对象中。这些浸渍过的支持物也可以在最终植入之前,通过将它们浸泡在液体培养基中进行重新培养。

[0045] 所述三维固体支持物需要是生物相容的,以使它能够被植入到对象中。它可以具有任何适合的形状例如圆柱形、球形、板形或任意形状的一部分。在适合于生物相容的三维固体支持物的材料中,可以具体提到的是碳酸钙、特别是具体来说采取珊瑚骨架形式的霏石,基于氧化铝、氧化锆、磷酸三钙和/或羟基磷灰石的多孔陶瓷,通过能够使碳酸钙转化成羟基磷灰石的热液交换而获得的仿珊瑚骨架,或磷灰石-硅灰石玻璃陶瓷,生物活性玻璃陶瓷例如Bioglass (TM) 玻璃。

[0046] 在本说明书中,本文中使用的术语“约”当指称可测量的值例如参数、量、时长等时,意味着涵盖偏离所指定的值 $\pm 10\%$ 或更小、优选地 $\pm 5\%$ 或更小、更优选地 $\pm 1\%$ 或更小、又更优选地 $\pm 0.1\%$ 或更小的变动,前提是这些变动适合于在所公开的发明中执行。应该理解,修饰语“约”所指称的值本身也被具体且优选地公开。

[0047] 对于与本发明相关的通用方法,可以参考公知的教科书,包括例如《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual) 第二版(Sambrook等,1989),《动物细胞培养》(Animal Cell Culture) (R.I.Freshney主编,1987),《酶学方法》丛书(Methods in Enzymology) (Academic Press),《用于哺乳动物细胞的基因转移载体》(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells) (J.M.Miller&M.P.Calos主编,1987),《分子生物学现代方法和分子生物学简短方法》(Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology) 第三版(F.M.Ausubel等主编,1987&1995),《重组DNA方法学II》(Recombinant DNA Methodology II) (R.Wu主编,Academic Press 1995),其通过参考并入本文。

[0048] 对于在本发明的实践中有用的通用技术的进一步详细阐述,从业人员可以参考细胞生物学、组织培养和胚胎学的标准教科书和综述。这包括《畸胎癌和胚胎干细胞实用方法》(Teratocarcinomas and embryonic stem cells:A practical approach) (E.J.Robertson主编,IRL Press Ltd.1987),《小鼠发育技术指南》(Guide to Techniques in Mouse Development) (P.M.Wasserman等主编,Academic Press 1993),“胚胎干细胞体外分化”(Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro) (M.V.Wiles, Meth.Enzymol.225:900,1993),“胚胎干细胞的性质和用途:应用于人类生物学和基因疗法的展望”(Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy) (P.D.Rathjen等,1993)。干细胞的分化综述在例如Robertson.1997.Meth Cell Biol 75:173和Pedersen.1998.Reprod Fertil Dev 10:31和ūsas等,2011中,其通过参考并入本文。

[0049] 细胞培养和培养基收集的通用技术概括在“大规模哺乳动物细胞培养”(Large Scale Mammalian Cell Culture) (Hu等,1997.Curr Opin Biotechnol 8:148)、“无血清培养基”(Serum-free Media) (K.Kitano.1991.Biotechnology 17:73)、“大规模哺乳动物细胞培养”(Large Scale Mammalian Cell Culture) (Curr Opin Biotechnol 2:375,1991)、《动物细胞培养:基础技术手册》(Culture of animal Cells:A manual of basic technique,Freshney,R.I.等,2005,第5版,Wiley,New York)中,所述文献通过参考并入本文。

[0050] 本公开中列出的标志物蛋白的核酸和氨基酸序列数据是公知的,并且可以从公共数据库获得,例如NIH“网上蛋白质综述”(Protein Reviews on the Web)数据库(<http://>

mpr.nci.nih.gov/prow/)、NIH“Entrez Gene”数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>)或Uniprot/Swissprot数据库(<http://www.expasy.org/>)。所述标志物的适合的检测试剂和方法可以在这些序列信息的基础上设计,或者更通常地,可以商购(例如标记的单克隆抗体试剂)。

[0051] 术语“CD105”涵盖了被称为CD105的抗原或其同义语例如内皮糖蛋白(endoglin)。CD105是一种位于细胞表面上的膜糖蛋白,并且是已知的间充质干细胞标志物。作为实例,马CD105抗原的部分氨基酸序列可以在Genbank数据库中登记号AGW16345.1下找到。

[0052] 术语“CD90”涵盖了抗原CD90或其同义语例如Thy-1膜糖蛋白。作为实例,马CD90抗原的氨基酸序列可以在Genbank数据库中登记号ACG61223.1下找到。

[0053] 术语“CD44”涵盖了通常被称为CD44的抗原或其同义语例如细胞外基质受体III、GP90淋巴细胞归巢/粘附受体、HUTCH-I、Hermes抗原、透明质酸受体或吞噬细胞糖蛋白1。作为实例,马CD44抗原的氨基酸序列可以在Genbank数据库中登记号CAA47331.1下找到。

[0054] 用于检测所述MSC标志物的示例性的可商购抗体试剂尤其包括单克隆抗体抗CD105-RPE抗体(ABD Serotec)、抗CD44-APC抗体(BD Pharmigen)和抗CD90抗体(VMDR)。本领域技术人员可以鉴定特异性结合到CD105、CD44或CD90的可替代抗体。

[0055] 本公开中列出的微RNA是公知的,并且可以从公共数据库例如miRBase数据库(<http://www.mirbase.org>)等获得。术语“miR-128”涵盖了被称为miR-128的微RNA或其前体。作为实例,马miR-128的核苷酸序列可以在miRBase数据库中登记号MI0012821下找到。术语“miR-133B”涵盖了被称为miR-133B的微RNA或其前体。作为实例,马miR-133B的核苷酸序列可以在miRBase数据库中登记号MI0012844下找到。术语“miR-656”涵盖了被称为miR-656的微RNA或其前体。作为实例,马miR-656的核苷酸序列可以在miRBase数据库中登记号MI0012915下找到。专业技术人员完全明白,微RNA可以用不同的名称或同义语指称。

[0056] 术语“细胞群体”通常是指一组细胞。细胞群体可以由至少一部分同样类型或具有共同特征的细胞构成,或者可以包含所述至少一部分细胞。这些特征可以包括但不限于形态特征、分化潜力(例如全能性、多能性、单能性等;例如如果是多能或单能的,朝向特定细胞类型分化的能力)或一种、两种、三种或更多种细胞相关标志物例如表面抗原的存在和/或水平。因此,这些特征可以定义细胞群体或其一部分。优选地,这种细胞群体是间充质干细胞群体,更优选为基本上均质的间充质干细胞群体。

[0057] 表述“密度梯度离心”涵盖了所有类型的细胞分离技术或产品,其涵盖基于密度的细胞分离。非限制性实例可以是在蔗糖聚合物或胶体二氧化硅的梯度中的密度梯度离心。可商购的梯度的非限制性实例是:percoll(用聚乙烯吡咯烷酮或硅烷包被的胶体二氧化硅),ficoll(高分子量蔗糖聚合物),Ficoll-Paque(Ficoll加上泛影酸钠和乙二胺四乙酸钙二钠),浮力密度溶液(BDS,包含胶体二氧化硅),lymphoprep(泛影酸钠和多糖)等。

[0058] 具有所需表达情况的活细胞允许与特异性针对相应标志物的试剂(最常见为免疫试剂例如单克隆抗体)结合,其中所述试剂进而被修饰(例如通过荧光团或通过固定化在磁性粒子或另一种类型的静止相上),例如以便于从未被所述试剂结合的细胞中选择或捕获被所述试剂结合的细胞。对于这些方法的通用指导,尤其参考《流式细胞术和细胞分选》(Flow Cytometry and Cell Sorting)第二版,Andreas Radbruch主编,Springer 1999(ISBN 3540656308);《活性颜色:流式细胞术和细胞分选流程》(Living Color:Protocols

in Flow Cytometry and Cell Sorting) 第一版, RA Diamond和S Demaggio主编, Springer 2000 (ISBN 3540651497); “流式细胞术流程” (Flow Cytometry Protocols) (《分子生物学方法》Methods in Molecular Biology) 第二版, TS Hawley和RG Hawley主编, Humana Press 2004 (ISBN 1588292355); 《亲和分离实用方法》(Affinity Separations: A Practical Approach), P Matejtschuk主编, Oxford University Press, 1997 (ISBN 0199635501); 和Dainiak等, 2007. Adv Biochem Eng Biotechnol 106:1-18。

[0059] 表述“适合的培养基”涵盖支持细胞、间充质干细胞 (MSC) 或间充质干细胞群体的存活和/或生长的所有细胞培养基。非限制性实例是: DF20, DMEM-Ham's F12, DMEM, Alpha-MEM等, 其通常至少增补有抗生素和胎牛血清 (FBS), 并任选地增补有抗真菌剂和缓冲剂。仅作为实例, 在实施例中使用了下述培养基: DF20培养基, 其包含: DMEM/F12以及约20%胎牛血清、约5ml青霉素 (1000U/ml) -链霉素 (10000μg/ml)、约2.5ml两性霉素B (250μg/ml) 和约5ml HEPES。其他实例是CTS (商品名) 和Therapeak (商品名) 培养基。

[0060] 为了分化成例如脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞, 将祖细胞培养在足够的“分化培养基”中。所述分化培养基可以是例如: 对于成脂分化来说: NH AdipoDiff培养基 (Miltenyi Biotec); 对于成软骨分化来说: 软骨细胞分化培养基 (NH ChondroDiff培养基; Miltenyi Biotec); 对于成骨分化来说: 成骨培养基 (NH OsteoDiff培养基; Miltenyi Biotec)。本文中列出的培养基仅作为示例性培养基显示, 但专业技术人员可以使用任何其他商品化或特别开发的分化培养基。用于其他细胞例如成肌细胞、造血细胞、内皮细胞、神经细胞、心脏细胞或肝细胞的适合的分化培养基的其他实例, 可以通过将祖细胞分别在足够的成肌、造血、内皮、神经元、心脏或肝细胞分化培养基中培养来进行, 所述培养基的实例可以例如在Usas等, 2011中找到。

[0061] “分离”、“分散”、“脱离”或“解离”细胞的适合的方式在本领域中是公知的, 并且可用于本发明中。它们包括例如用蛋白水解酶处理、二价离子的螯合、机械破碎或任何上述方式的组合。优选地, 所述细胞解离可以包括有利地使用胰蛋白酶 (例如如上所述) 的酶消化, 其任选地与有利地使用EDTA (例如如上所述) 的二价离子的螯合和/或如此处理的细胞的机械解离相组合。后者可以包括例如将所述细胞重复地通过小口径移液管 (例如1000μl微量移液器头) 和/或紧靠固体表面 (例如紧靠培养容器的壁) 吹打含有所述细胞的悬液液流。

[0062] 本发明将参考从肌源性祖细胞制备分化的软骨细胞或骨细胞进行更详细描述。

实施例

[0063] 从mdP细胞的分化获得分化的软骨细胞或骨细胞避免了在可能患有骨骼疾病的患者中侵入性和痛苦的骨活检。

[0064] 材料和方法

[0065] 马骨骼肌的取样

[0066] 在列日大学的马诊所 (Equine Clinic of the University of Liege) 从健康的供体收集马骨骼肌。实验流程由列日大学动物伦理学委员会 (Animal Ethics Committee of the University of Liege) 审查并批准 (协议号1162)。所述肌肉显微活检如Sertejn和Ceusters (2015) 所报道的进行。所述显微活检样本从未使用镇静剂的站立的马的肱三头肌 (长头, 在从三角肌顶点延伸的竖直线与肩胛和桡肱关节之间的线的交点处) 获得。所述

样品使用14号显微活检针头和显微活检枪收集。将取样位点剃毛(1cm²就已足够),无菌准备,并皮下注射2ml 2%利多卡因(Xylocaine, AstraZeneca, Sweden)。用15号解剖刀片的尖头切开皮肤并将显微活检针头推进到5cm深度。由于被视为不必要,皮肤切口未被封闭,并且整个程序在15分钟内完成。在收集后,将样品(15-20mg肌肉组织)立即置于10ml培养基中,所述培养基由DMEM/F12(Dulbecco改良的Eagle培养基/Ham's F12(1:1混合物),15mM HEPES,含L-谷氨酰胺;Lonza, Verviers, Belgium; BE12-719F)构成,并增补有20%胎牛血清(FBS; Gibco; 10500-064)、青霉素(100UI/ml)-链霉素(100µg/ml)(Lonza, Verviers, Belgium; DE17-602E)和两性霉素B(1.25µg/ml)(Lonza, Verviers, Belgium; 17-836E)。将样品在4°C下保持在培养基中,并且使用它之前的时限不超过72小时。

[0067] 使用外植体培养分离mdP细胞

[0068] 所述显微活检样本必须非常小心地操作以避免损坏肌肉组织。培养物制备在使用灭菌设备并在层流净化罩下工作的无菌条件下进行。将样品在预热到37°C的5ml磷酸盐缓冲盐水(PBS)(DPBS, Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水0.0095M(P₀₄),无Ca,无Mg; Lonza, Verviers, Belgium; BE17-512F)中漂洗两次,然后在PBS中仔细地剖开,以试图除去尽可能多的非肌肉组织。然后,将剩余的肌肉组织分成侧边长约为1mm的非常小的块。将块以每孔6或7块的比率分配在6孔板的4个孔中。接下来,小心地逐滴添加预热到37°C的培养基直至量被认为是足够的(约1ml),只需要将块覆盖。事实上,缺少培养基不阻止外植体的干燥并且不向产生的细胞提供充足的营养,而过量则阻止外植体的附着,因此保持漂浮。将剩余的2个空孔装填1ml PBS,以防止含有外植体的孔干掉。最后,将所述6孔板在37°C和受控气氛(5%CO₂和21%O₂)下温浴。每日监测含有外植体的孔,并在必要时添加培养基。为了将分泌的生长因子保持在孔内,不更换培养基。在必要时补充含有PBS的孔。

[0069] 当新出现的细胞在肌肉组织块周围形成晕圈时(约10天),将外植体取出以防它们坏死,并给细胞额外的时间以达到80%汇合(约10天)。

[0070] 直接分离的mdP细胞的成骨或成软骨分化

[0071] 当细胞达到80%汇合时,将培养基完全除去并进行成骨或成软骨分化。将细胞在成骨或成软骨分化培养基中维持7至21天。每个孔装有2ml分化培养基,培养基每周一次完全更换。将细胞在37°C和受控的气氛(5%CO₂和21%O₂)下温浴。7天后,将成骨分化的细胞在PBS中清洗并在室温下在70%乙醇中固定5min,然后在H₂O中清洗几次。然后将细胞在室温下,在pH 4.2的40mM茜素红(Sigma)中染色15min,在H₂O中漂洗,然后空气干燥。红色染色通过光学显微镜检查。在21天后,将成软骨分化的细胞在室温下在70%乙醇中固定5min,然后在H₂O中清洗几次。然后将细胞在阿尔新蓝(Alcian Blue)中染色,在H₂O中漂洗,然后空气干燥。蓝色染色通过光学显微镜检查。

[0072] 与现有技术相比,本发明的方法避免了在可能患有骨骼疾病的患者中的痛苦的活检,并且还能生产更大量的成软骨或成骨细胞。