

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780008778.5

[43] 公开日 2009 年 4 月 1 日

[11] 公开号 CN 101400786A

[22] 申请日 2007.1.17

[21] 申请号 200780008778.5

[30] 优先权

[32] 2006.1.18 [33] GB [31] 0600972.4

[86] 国际申请 PCT/GB2007/000107 2007.1.17

[87] 国际公布 WO2007/083093 英 2007.7.26

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.11

[71] 申请人 利兹大学

地址 英国利兹

[72] 发明人 丹尼斯·麦戈纳格尔

埃莱娜·约内斯 安妮·英格利希

保罗·艾莫里

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 王 旭

权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 9 页

[54] 发明名称

细胞的富集

[57] 摘要

本发明涉及分离和富集间充质干细胞(MSC)的方法,该方法包括用一定量的胶原酶处理包含细胞和细胞外基质的组织样品,所述量足以将MSC从细胞外基质中释放到液体培养基中,并且然后再分离含有MSC的培养基级分。该分离的MSC可以是以惊人的大量分离的,以至于该级分可以在大量临床情形中具有直接的应用。这代表了现有技术的进步,所述现有技术需要从不同来源汇集大体积样品组织或需要在培养中扩增MSC。因此,本发明还涉及按照本发明第一方面的方法分离的细胞的临床用途。

1. 分离和富集间充质干细胞（MSC）的方法，该方法包括：
 - （a）用一定量的胶原酶处理包括细胞和细胞外基质的组织样品，所述量足以将 MSC 从细胞外基质释放到液体培养基中；和
 - （b）分离含有 MSC 的培养基级分。
2. 按照权利要求 1 的方法，其中所述组织样品来自骨髓。
3. 按照权利要求 2 的方法，其中所述样品是来自骨盆、胸骨或股骨的钻取活组织检查。
4. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中所述组织样品包括漂浮的脂肪级分（FFF）。
5. 按照权利要求 1 的方法，其中所述组织样品来自选自包括骨吸出物、滑膜和脂肪垫的组的组织。
6. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中将所述样品置于含有 0.25% 胶原酶的缓冲液中。
7. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中将所述样品用胶原酶处理 3-4 小时。
8. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中所述含有 MSC 的级分是通过去除任何固体并离心液体培养基以分离含有单细胞的级分而获得。
9. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中步骤（a）包括两次独立的胶原酶消化。
10. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中步骤（a）还包括透明质酸酶消化。
11. 按照权利要求 9 或 10 的方法，其中所述组织样品是骨，并且所述 MSC 是用于骨修复。
12. 按照上述权利要求中任一项的方法，其中步骤（b）还包括进一步的富集步骤。
13. 按照权利要求 12 的方法，其中所述进一步的富集步骤利用磁性珠进行。
14. 按照权利要求 12 的方法，其中所述进一步的富集步骤包括 FACS

分选。

15. 按照权利要求 12-14 中任一项的方法，其中所述进一步的富集步骤是基于分离具有这样的表型的 MSC，所述表型其特征在于表 1 中鉴定的标记之一。

16. 按照权利要求 15 的方法，其中所述表型是 $CD45^{\text{低}}LNGFR^{+}$ ， $CD45^{\text{低}}D7-FIB^{+}LNGFR^{+}$ 或 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^{+}$ 。

17. 按照通过权利要求 1-16 中任一项所定义的方法富集的分离的间充质干细胞（MSC）。

18. 按照权利要求 17 的分离的间充质干细胞（MSC），其用作药物。

19. 按照权利要求 18 的药物，其用在细胞治疗中。

20. 按照权利要求 18 或 19 的药物，其中对所述 MSC 进行遗传操作，以用于基因治疗。

21. 富集间充质干细胞（MSC）的试剂盒，该试剂盒包括胶原酶。

22. 对需要细胞治疗的受试者进行所述治疗的方法，该方法包括：

（a）从所述受试者获得包含 MSC 和细胞外基质的组织样品；

（b）用一定量的胶原酶处理所述组织样品，所述量足以将 MSC 从细胞外基质释放到液体培养基中；

（c）分离含有 MSC 的培养基级分；和

（d）在允许所述受试者从所述细胞治疗受益的身体部位，将所述级分重新引入到所述受试者中。

23. 对需要细胞治疗的受试者进行所述治疗的方法，该方法包括：

（a）从尸体或捐献者中获得包含 MSC 和细胞外基质的组织样品；

（b）用一定量的胶原酶处理所述组织样品，所述量足以将 MSC 从细胞外基质释放到液体培养基中；

（c）分离含有 MSC 的培养基级分；和

（d）在允许所述受试者从所述细胞治疗受益的身体部位，将所述级分引入到所述受试者中。

24. 按照权利要求 22 或 23 的方法，该方法包括进一步的对 MSC 进行遗传操作的步骤。

25. 按照权利要求 22-24 中任一项的方法，其中所述细胞治疗是用于

临床控制病症的目的，所述病症选自包括下列各项的组：骨修复、软骨修复、骨骼肌修复、腱修复、韧带修复、半月板修复、心肌修复、脊髓损伤、帕金森氏病和其他神经变性疾病、免疫介导的组织排斥、移植物-抗-宿主疾病、类风湿性关节炎、脂肪物质的再生、脉管修复或局部缺血脉管损伤或骨质疏松症。

26. 按照权利要求 22-24 中任一项的方法，其用于修复骨。

27. 按照权利要求 22-24 中任一项的方法，其用于修复软骨。

28. 按照权利要求 22-24 中任一项的方法，其用于治疗骨关节炎。

29. 按照权利要求 22-24 中任一项的方法，其用于治疗骨质疏松症。

30. 由权利要求 19 所定义的药物用于治疗由权利要求 25-29 中任一项所定义的病症的应用。

细胞的富集

本发明涉及间充质干细胞（MSC）的富集。

认为 MSC 是能够在大量科学和临床应用中使用的重要细胞。例如，已经提出并且研究了 MSC 在基于细胞的治疗中的应用。

因为 MSC 是可以被诱导分化为许多细胞类型，包括骨骼、软骨和脂肪细胞谱系的多能干细胞，所以它们是有用的。MSC 可以在体外被诱导分化，且然后用作“成熟”细胞，或者其可以被维持在未分化的形式并容许原位分化。MSC 还具有能够在体外作为贴壁细胞单层增生的有用特征。

不幸地，到目前为止，MSC 在科学和临床上具有有限的应用。其中的一个原因在于一直难以容易地分离有效数量的 MSC。例如，已知骨髓是 MSC 的来源，且许多研究人员试图从骨髓吸出物中分离这样的细胞。然而，仅分离了少量的细胞，且这使得科学界相信只有非常少量的 MSC 存在于这样的组织中。由于为分离临床上有效数量的 MSC 需要不切实际量的组织，所以这代表一个问题。

产生有效数量的唯一方法一直是分离 MSC，然后在体外培养它们，有时数周，从而使数量可以得到扩增或增加（"bulk-up"）。

然而，这样的培养步骤具有许多缺点。

第一，培养扩增是费时的。这限制了 MSC 的临床有效性。存在着一些紧急需干细胞的实例。例如，如果临床医生希望向骨折的受试者施用干细胞，从而促进康复，则在受伤的几小时之内获得合适数量的干细胞将是理想的。然而，常规知识将指示临床医生应该从来自受伤受试者的骨髓吸出物中分离 MSC；然后在培养中扩增群体；并且在一段时间后将干细胞引入到受伤的骨骼中。然而，整个过程可进行数周，且在这段时间后，MSC 在部分痊愈的组织中可能几乎没有用处了。因此，由于细胞来源不是能容易获得的，许多基于细胞的治疗是不切实际的。

第二，MSC 的培养可以在培养的细胞中导致“表型漂变”。如果培养的 MSC 开始分化，则该漂变可能发生。这种分化可以是不可预知的，且

经常可能沿着不期望的谱系。备选地，人工培养条件能够阻止细胞分化为如果细胞在体内保存时可能分化的表型。因此，应该认识到培养的细胞可能不以与细胞在体内生长相同的方式生长。这也导致了临床和科学界对在培养中扩增的 MSC 的价值的质疑。

第三，培养中对 MSC 的操作和扩增能够导致 MSC 的衰老，其可能促成随后的体内功能丧失。延长的 MSC 培养扩增还能够导致遗传不稳定性和细胞转化。此外，制定规章的团体诸如 FDA 质疑了在产生用于治疗人类用途的细胞中使用动物产品的恰当性，对于 MSC 细胞培养扩增程序的情形也是如此。

最后，通常很难成功地获得干细胞群先体外后体内的扩增。为了克服这个困难，必需频繁地使用外源因素诸如血清和生长因子，从而促进干细胞增殖。所述试剂可以既昂贵又引起复杂的培养条件，这需要技术人员的大量工作。

因此，应该理解保证直接方便的不必在体外扩增的 MSC 来源将是理想的。然而，迄今为止仍没有这样的细胞的容易获得的来源，且本发明的一个目的是提供像这样的 MSC 来源。

按照本发明的第一方面，提供了富集间充质干细胞（MSC）的方法，其包括：

（a）用足以将 MSC 从细胞外基质释放到液体培养基中的量的胶原酶处理包括细胞和细胞外基质的组织样品；和

（b）分离含有 MSC 的培养基组分。

优选地，步骤（b）包括利用下文更加详细讨论的严格表型标准分离 MSC。

按照本发明的第二方面，提供了按照本发明第一方面富集的分选的间充质干细胞（MSC）。

按照本发明的第三方面，提供了用作药物的按照本发明第一方面富集的分选的间充质干细胞（MSC）。

按照本发明的第四方面，提供了用于富集间充质干细胞（MSC）的试剂盒，其包括胶原酶和任选地，用于维持、生长或分化细胞的培养基。

术语“间充质干细胞”，我们指多能（pluripotent）或全能（multipotent）

干细胞，其能够作为贴壁细胞单层进行增殖并能够被诱导分化成中胚层谱系的细胞（例如，骨骼、软骨、肌肉、腱、韧带或脂肪细胞）。对上述分化合适的信号可以由环境因子包括可溶性因子（诸如生长因子）和有干细胞或其后代位于其上的底物所提供。采用多能的（pluripotent）或全能的（multipotent），以具有其常规含义，即多能（pluripotent）细胞是能够分化生成多种分化的谱系的干细胞；而全能（multipotent）细胞可以包括具有更受限分化潜能的祖细胞或前体细胞，即能够生成在同一谱系内的不同细胞类型的细胞。

本发明上下文中的间充质干细胞可以包括源自骨髓腔（包括吸出物和小梁骨核）、滑膜或脂肪垫（如下文进一步讨论）的干细胞。例如，本发明上下文中的间充质干细胞可以包括这样类型的干细胞，所述类型是先前从处理过的脂肪吸出物（LPAs）分离而来的，并将其鉴定为具有生成包括下列各项的谱系的能力：成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞和神经元样细胞。

本发明基于实施例 1，2 和 3 中的研究，在所述实施例中本发明人确定从骨髓腔、滑膜和关节脂肪垫中分别能够富集惊人数量的 MSC。他们确定按照本发明的第一方面，该富集步骤可以包括相对简单的酶组织消化。令人惊讶地发现该步骤产生具有表型为 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 的 MSC 群。D7-FIB 是识别成纤维细胞/上皮细胞的单克隆抗体（可从供应商诸如 Serotec, Novus Biologicals 或 Abcam 商购），LNGFR 是低亲和力神经生长因子受体 CD271（可从供应商诸如 Becton Dickinson 或 Miltenyi Biotec 商购）。

本发明人证明了该 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞群包括产克隆和多能 MSC。这引起他们意识到常规临床组织材料能够用作充足数量的 MSC 的来源（大约 10^6 个高度纯化的细胞），从而直接用于多种重要的治疗、诊断和研究目的。这被认为是非常令人惊讶的，因为通过常规方法分离的制剂仅产生小量的 MSC，其需要进行具有上述全部相关缺点的扩增或增加（"bulk-up"），而形成有效数量。通过胶原酶处理组织样品而产生的惊人数量的 MSC 使临床医生或科学家立即获得可用的有效数量的细胞，该细胞能够在不暴露于体外细胞培养的人工环境的情形下得以使用。

按照本发明从中富集 MSC 的组织样品可以源自大量本领域技术人员公知的包含 MSC 的来源。这些包括骨髓、小梁骨（二者均被看作是相同器官，即骨髓腔的主要整体部分）和还有软组织诸如滑膜和关节脂肪垫。本发明不涉及预计或不预计 MSC 被在这样的组织中发现的事实。例如，众所周知地，骨髓包括 MSC，并且已经从骨髓吸出物中分离出非常小量的这样的 MSC。需要从吸出物中分离并培养这些细胞，以扩增 MSC 数量达到科研或临床的有效数量。本发明的创造性步骤包含在这样的事实中，即，胶原酶能够用于从组织（例如，含有骨髓和小梁骨的活组织切片样品）中释放空前数量的新鲜 MSC。从现有技术不能预测到科研和/或临床有效数量的新鲜 MSC (i) 包含在相对小体积的组织中；和 (ii) 能够通过酶处理得以释放。实际上，存在着针对试图按照本发明富集 MSC 的技术偏见。这是因为技术人员会认为如此低的细胞产量会致使生成有效数量 MSC 所需要处理的组织体积将是不切实际的。这种普遍的观点建立在 MSC 是位于间充质祖细胞层级顶点的稀少细胞的历史性认知的基础上；然而本发明人认为与当前 MSC 定义一致的高度可塑性对许多结缔组织细胞，包括一些定型前的（pre-committed）祖细胞和间充质谱系血管周围细胞（周细胞）而言是与生俱来的。

最优选地，本发明方法的步骤（b）包括通过应用严格的表型标准选择 MSC 群。按照技术发展水平，存在着：（1）缺乏关于体内 MSC 表型的充分的知识，因此缺乏清楚地区分 MSC 和污染细胞的能力；（2）缺乏对新鲜 MSC 能够在临床上有效的认识，因为新鲜提取的 MSC 具有比培养扩增的 MSC 更高的增殖能力----因此技术人员需要比预测的更少的“新鲜”细胞；和（3）缺乏这样的理解，即，甚至部分纯但新鲜的 MSC 制剂（按照步骤（b）分离级分可能含有血小板、巨噬细胞和其它生成生长因子的细胞）可以比表型纯合的经培养处理的 MSC 在临床上更加有效。

MSC 的表型选择/鉴定可以基于识别大量的位于靶细胞群上的 MSC 标记。这些标记包括表 1 中识别的那些。

表 1

标记/Mab	其它名称	与新鲜 MSC 的反应性
--------	------	--------------

CD45	CLA	低
GlyA	血型糖蛋白 A	-
D7-FIB	NA	+++
CD271	LGFR, GFR, p75	++++
CD13	氨肽酶 N	+++
CD73	SH3	+++
CD105	SH2	+
CD90	Thy-1	+++
CD63	HOP-26	++
CD49a	Intergin VLA-1	++
CD118	LIF 受体	++
CD130	Gp130	++
CD81	TAPA-1	+++
CD39	ATPD 酶	+++
JAM2	VEJAM	+
CD10	CALLA, MME	++
ALP	碱性磷酸酶	+++
CD146	MCAM	+

尽管许多标记是有效的, 本发明人发现某些标记对识别按照本发明制备的新鲜 MSC 特别有效。因此, D7-FIB, LGFR (即 CD271), CD13, CD73 和 CD90 是特别有用的标记。对于识别新鲜 MSC 最优的标记鉴定具有这样表型的细胞: $CD45^{\text{低}}D7-FIB^{+}LGFR^{+}$ 。本发明人认为 $LGFR^{+}$ 对于识别按照本发明的 MSC 而言是一种最重要的标记。

应该理解上述标记对于按照本发明步骤 (b) 分离 MSC, 以及为了鉴定细胞的目的而言是有效的。例如, 如下文中更加详细地讨论, 当通过 FACS 分类分离时, 可以利用本发明人关于 MSC 表型的知识。

优选地, 组织样品是骨髓 (BM) 或含有 BM 和小梁骨 (TB) 的核心活组织切片。以下以及在实施例 1 中更加详细地描述从这些组织富集 MSC 的方法。本发明基于本发明人关于表征表型和证明从 BM 吸出物中回收

MSC (基于该表型) 的低产率的工作。他们确定了 BM 吸出物中所有 MSC 的活性受限于稀少的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞群。因此, 希望分离 MSC 的任何人应该选择 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞。该实施例描述了他们如何进一步研究该细胞群的频率和克隆发生。正是在这些研究过程中, 他们高兴且吃惊地发现表型纯的 MSC 具有许多与基质外膜网状细胞 (ARCs) 共同的特性。BM 基质网络由 ARCs, 内皮细胞和周围的周细胞, 脂肪细胞, 巨噬细胞和骨内膜细胞组成, 后者细胞内衬在骨骼的表面。ARCs 形成互相连接的细胞网络, 其参与造血细胞-支持的基质功能, 并且已经表明了它们作为脂肪细胞和成骨细胞的前体的作用。本发明人假设 MSC 活性和可塑性是许多, 如果不是全部 ARCs, 周细胞, 前脂肪细胞和骨内膜细胞所固有的, 且全部这些细胞属于同一间充质细胞谱系。本发明人关于 ARCs 和 MSC 相似表型的数据支持该假说。在文献中描述了这样的事实: 相当特化的间充质细胞 (诸如脂肪细胞或成骨细胞) 能够在体外转分化和去分化。因此, 本发明人提示相似的过程能够在体内发生, 且收获这些间充质谱系细胞 (其可以仅通过酶处理获得) 会释放增多数量的高可塑性 MSC。相反地, 在 BM 吸出过程中, 这些间充质细胞保持在原位, 紧紧地相互附着并围绕细胞外基质 (与容易被吸出的疏松附着的造血细胞相比较)。因此, 本发明人假定先前在 BM 吸出物中发现的低数量 MSC 不是它们实际在体内数量的全部代表。因此, 他们发现通过按照本发明第一方面的方法用胶原酶处理组织样品, 能够从组织中释放出空前数量的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞 (MSC)。这引导他们意识到可以从小体积组织中快速而容易地获得科研和临床上有效数量的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞/MSC。

按照本发明还可以从其他结缔或软组织中分离 MSC。这些组织包括滑膜和关节脂肪垫 (分别如在实施例 1 和 3 中所描述)。

本发明人证明了使用骨髓活组织切片样品开发的方法能够应用于这些组织以富集惊人数量的具有相同基本表型和相似功能性的 MSC (即, $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$)。本发明人还认识到处于不同组织中的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞可以没有进行特异性的局部分化途径, 并因此在不同应用中起作用 (即, BM $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞应该更适合于骨修复

应用，而滑膜 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞应该更适合于软骨修复应用)。本发明人表明在滑膜和脂肪垫中， $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞具有周细胞的形貌 (topography) (即，间充质细胞参与支持组织脉管形成和新脉管形成)。他们表明这些 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 占据了与脉管周细胞相同的生态位 (niche)，可能是相同的；是产克隆的；且具有与 BM MSC 相似的功能性。因此本发明的方法提供从固体组织，包括滑膜和脂肪中的这一特殊血管周围生态位富集 MSC 的方法。本发明的方法容许大多数骨髓 MSC 活性的纯化，且还容许大多数滑膜和脂肪垫 MSC 活性的纯化。

本发明第一方面的方法可以用于来自其他组织，包括但不限于胎盘和脐带的血管周围 (周细胞) 生态位中分离 MSC。认为这些组织源富含特别适合于神经变性应用的 MSC。因此，按照本发明的方法，从胎盘或脐带富集的 MSC，可以优选地用于治疗神经变性病症。在周细胞分布范围内分离的软组织 MSC 仅具有与 BM MSC 相同的表型，但是可以具有 BM MSC 所有的潜力，且因此可以用于下述全部应用中。

组织样品的来源依赖于所富集的 MSC 的最终用途。

优选的组织样品是来自骨，并且特别是骨髓 (BM)。从 BM 样品中富集的 MSC 在骨修复应用中特别有用。BM 活组织切片材料可以获自于大量的身体部位 (例如，胸骨、股骨、骨盆或髌嵴)。优选的 BM 来源是股骨头或髌嵴。可以通过钻取活组织切片 (例如，利用 4mm 的钻取活组织切片) 收集样品。备选地，可将股骨头切成两半，并利用骨研磨机 (Bone Mill) (De Puy 或其他制造商) 均质化，从而获得甚至更小的片段以经历酶消化。可以从来自患者或志愿者的髌嵴活组织切片中获得的自体 BM，并且可以从尸体捐献者的任何小梁骨中获得大数的 MSC 用于研究目的或用于异源 MSC 应用。

在胶原酶处理前，可将核心活组织切片样品或小组织片段置于 PBS (磷酸缓冲的盐水) 中，从而防止它们干燥。然而，不应该用 PBS 大量洗涤样品。这是为了保持 BM，以便穿过骨髓的 MSC (ARCs) 和附着于骨骼的 MSC (骨内膜细胞) 均可用于酶提取。

在优选的实施方案中，按照本发明的富集受影响的组织样品包括源自骨髓的漂浮脂肪组分 (FFF)。本发明人发现了从前在分离 MSC 过程中丢

弃的该组分，构成了惊人的丰富的 MSC 来源。

仅通过举例的方式，可以将 0.1 克组织样品（取作单活组织切片）置于 0.5ml 胶原酶溶液（例如，来自干细胞科技（Stem Cell Technologies）（产品号 07902）的商业胶原酶溶液，其为在 20% (v/v) 胎牛血清（FCS）中的 0.25% 的胶原酶溶液）中。

应该理解胶原酶可以获自于大量的商业来源（例如，加拿大温哥华的干细胞科技公司（Stemcell technologies Inc））。可以使用许多不同的胶原酶。然而，优选地，该酶有效用于消化胶原蛋白 I。

应该理解需要胶原酶的量足以从受到处理的样品中释放出 MSC。该量应该取决于因素的数量，其包括：所用样品的类型（例如，来自骨骼活组织切片或脂肪垫的样品）；受到处理的样品量；包含样品的缓冲液/溶液的体积；和使用酶的温育时间。作为一般的指导，本发明人发现大约 100-500 单位的酶，和更优选地 250-375 单位的酶足以从 0.1g BM 活组织切片样品，滑膜或脂肪垫样品（以 0.5ml 的体积，在 37℃，温育时间为 3-4 小时）释放出 MSC。

此外，100-500 单位的酶，和更优选地 250-375 单位的酶，足以从所述 0.1g BM 样品中释放出大约 10,000-50,000 个 MSC，且优选地大约 25,000-150,000 个 MSC（通过 FACS 纯化至 100% 纯度）。如此显著数量的 MSC 可以得到释放是令人惊讶地和意义重大的，因为已知相似，和甚至更小剂量的新鲜 MSC 在患有 OI 的儿童中和在骨非结合治疗中具有功效。应该理解如果仅需要“半纯的”MSC（例如从胶原酶处理过的样品中倾析而出的细胞级分，所述样品未经历进一步的富集步骤，例如利用微珠或 FACS 分选进一步纯化），则制剂中应该存在更多细胞。

应该在对胶原酶活性最佳的温度下进行样品温育。这通常是大约 37℃。然而，应该理解一些胶原酶具有稍微不同的最佳催化温度，和/或能够在一个温度范围（例如 20℃-47℃）内起作用。

在本发明第一方面方法的优选实施方案中，将 4mm 钻取活组织切片 BM 样品置于 0.5ml 0.25% 胶原酶中。可将该酶保持在 37℃，以消化样品 0.5-8 小时，但更优选地，3-4 小时。

培养过程中，可以进行每小时检查并“轻敲”样品，从而监测细胞从

活组织切片中的释放。细胞释放后，胶原酶溶液变浑浊，而 BM 活组织切片本身变得更白（暴露骨）或软组织活组织切片完全溶解。特别是对于 BM 活组织切片样品，第二次独立的 1 小时胶原酶处理可以优选地释放骨内衬细胞，并由此获得特别富集最高成骨潜力的 MSC 的细胞级分。在优选的温育时间结束时，可以进行最后的轻敲，从而确保最大细胞释放。

利用许多本领域已知的方法（例如，稀释、过滤或离心及随后倾析）能够终止胶原酶活性。终止胶原酶活性和按照步骤（b）分离细胞的优选方法包括：用超过 20 倍的过量 PBS(v/v)或相似缓冲液稀释样品。可以使用注射器/针头混合释放的细胞和 PBS，并迫使剩余的细胞从活组织切片中出来进入到溶液中。随后立即通过 70 微米的细胞滤网过滤 PBS/细胞混合物，并然后将其转移到另一个离心管中进行离心（在 1800 rpm 下进行 5 分钟）。然后丢弃胶原酶/PBS 溶液，并将细胞沉淀重新混悬于适合细胞计数和后续操作（磁性和 FACS 分离）的培养基中，通常是含有 2% FCS 的 DMEM。

胶原酶消化和细胞分离后（例如，如前段中所述），本发明人发现表型纯的 MSC 群（CD45^{low}D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞）的比例比吸出物中的高出 100 倍多。细胞的数量可能是所释放的总细胞的 5-10%或更多。按照本发明该制剂是临床上有效的。

在本发明的一些实施方案中，本发明人确定了通过在步骤（a）中包括进一步酶消化能够制备的最佳 MSC 制剂。因此，应该理解进一步酶消化的选择应该受到所处理的样品和 MSC 的最终用途的指导。通过举例的方式，本发明人发现第二次胶原酶处理和/或透明质酸酶（hyaluronidase）处理可以特别有效地用于骨释放最大数量的 MSC。进行第二次胶原酶处理和透明质酸酶处理的方案记述在实施例 1 中。最优选地，当组织是骨且 MSC 将用于骨修复目的时，将步骤（a）改造为包括第二次胶原酶处理和/或透明质酸酶处理。

按照本发明的某些实施方案，步骤（b）能够通过进一步的程序性步骤得到补充，所述程序性步骤能够用于提高 MSC 制剂的质量，并且这些可以包括（1）死细胞/碎片的去除和（2）MSC 的进一步富集。

细胞碎片/死细胞的去除能够通过大量已知的方法（例如，利用来自

Miltenyi 生物技术 (Miltenyi Biotec) 的死细胞去除试剂盒 (Dead Cell Removal Kit)) 完成。如果进一步的富集是通过磁性珠完成的 (见下), 则该步骤的理想的。然而, 本发明人发现如果进一步的富集步骤是 FACS 分选 (也见下), 则不需要该细胞碎片/死细胞的去除。

为了后继的以磁性为基础从释放的细胞级分中富集 MSC, 能够使用多种方法。例如, 本发明人用抗成纤维细胞微珠 (直接与 D7-FIB 抗体缀合)、MACSelect 微珠 (直接与 LNGFR 抗体缀合) 或 CD271-APC 微珠 (全部来自 Miltenyi 生物技术, 比利兹 (Bisley), 英国) 进行了阳性选择。这两种方法均导致随后 MSC 比例超过 10 倍的增加 (达到胶原酶消化液中全部细胞的 50-60%)。基于本发明人对于 MSC 表型的知识, 他们相信其他可能有效的微珠是 CD73-缀合的或 CD105-缀合的 (后者可从 Miltenyi 生物技术商购获得)。备选地, 可以使用谱系-阴性消耗法, 该方法利用经仔细选择绝对不与 MSC 交互反应的抗体混合物。因此随着微珠的使用, 本发明的应用能够导致比迄今认为可能的高至少 10 倍的可用 MSC 用于治疗发展。

FACS 分选能够用于进一步富集按照本发明的方法所产生的 MSC 级分。通过 FACS 分选可以轻易地获得超过 95% 的 MSC 纯度。此外, 基于 PI, 7AAD 或其他死细胞排除染色, 可以消除死细胞/碎片。FACS 分选容许 MSC 的纯化在短于 1 小时的时间内完成。

应该理解 MSC 富集还能够通过利用识别细胞上的细胞表面标记的抗体或其他试剂完成。表 2 提供了它们识别的能够用于分离 MSC 的抗体和标记。

表 2

Mab	其他名称	缀合物	来源
CD45	CLA	FITC	DAKO, BD
D7-FIB	NA	纯化的	Serotec
CD271	LNGFR, NGFR, p75	PE PE, APC	BD Miltenyi 生物技术
CD13	氨肽酶 N	PE, FITC	Serotec

CD73	SH3	PE	BD
CD105	SH2	PE	Serotec
CD90	Thy-1	FITC	BD
CD63	HOP-26	PE	BD
CD49a	Intergin VLA-1	PE	BD
CD118	LIF 受体	PE	BD
CD130	Gp130	PE	BD
CD81	TAPA-1	PE	BD
CD39	NA	FITC	BD
JAM2	NA	PE	Serotec
CD10	GALLA, MME	APC	BD
ALP	碱性磷酸酶	PE	发育研究杂交瘤库 (developmental Studies Hybridoma Bank), 爱荷华大 学
CD146	MCAM	PE	BD

包含 MSC 的级分可以立即使用。备选地，能够利用常规低温技术冷冻 MSC，从而在将来使用。

按照本发明第一方面纯化的 MSC 通常对 MSC 和干细胞领域的科学研究人员来说是非常有用的。

技术人员应该理解本发明所述的方法、细胞和试剂盒在多种预后或诊断测试中也特别有用。例如，血液学实验室能够富集 MSC（按照本发明）/骨髓基质支持细胞，以作为筛选下列疾病中基质异常诊断测试的一部分，所述疾病包括，但不仅限于，骨髓纤维化、骨髓瘤和骨髓增生异常综合症。骨科/整形外科/风湿病学/内分泌学和其他临床部门能够对 MSC/成骨细胞祖细胞进行富集，以作为筛选骨质疏松症、骨石化症、骨关节炎和骨坏死中的成骨细胞异常诊断测试的一部分。用于糖尿病/肥胖症的诊断测试能够利用按照本发明富集的 MSC/脂肪细胞祖细胞/前脂肪细胞，作为筛选所述疾病中脂肪细胞发育中的异常的诊断测试的一部分。此外，关于“衰老”

的诊断和预后测试能够利用按照本发明富集的 MSC，作为筛选/预测它们在移植前自体治疗能力的诊断测试的一部分。

本发明的方法对解释骨髓微环境生物学的科学家是特别有用的。该方法提供纯化大量基质支持细胞的方法，这容许在健康和疾病中先体外后体内地研究它们的生物学。骨髓基质细胞/MSC 在培养扩增后，经历了相当大的改变，这使当前的 Dexter 型基质培养物成为体内生物学的不可靠的替代物。本发明容许骨髓微环境在正常骨髓、骨髓增生异常骨髓和恶性骨髓中得到更好的理解。先体外后体内地研究骨髓基质的能力对定义一批基本骨髓病症，例如多骨髓瘤和转移性骨髓疾病的生长因子、趋化因子和细胞因子支持具有重要的影响。这能够引起一批用于骨髓病症的新型治疗。同样地，对于理解健康和疾病中的骨髓微环境的潜力能够影响治疗骨相关疾病，包括骨质疏松症的新型治疗的发展。

本发明的方法能够用于生产按照本发明第三方面的药物，该药物能够用于细胞治疗技术中。细胞治疗可以利用自体或异源的 MSC。

按照本发明第三方面的药物应该包括按照本发明第一方面的方法分离的细胞和生理用缓冲液或支架。该缓冲液包括无菌细胞培养基（和优选地不需要添加血清的成分明确的培养基等），所述培养基维持 MSC 处于生存状态，并且安全施用于待治疗受试者。该支架包括无菌生物相容性材料，其支持 MSC 附着和分化，并且安全施用于待治疗受试者。

当需要自体细胞治疗时，按照本发明第一方面提供的 MSC 特别有效。本发明第一方面的方法使临床医生能够获得来自受试者的组织样品；用胶原酶处理该组织，从而释放临床有效数量的 MSC；并然后向受治疗的受试者重新引入该细胞。本发明的方法容许临床医生快速地向被提取了组织样品的受试者重新引入 MSC。例如，能够在提取样品几天内，同一天或，在临床和支持人员的小心协调下在几小时内（例如 3 小时内），将细胞重新引入。这可以意味着能够在不需要将受试者移出治疗室或手术室的情形下，提取组织样品并将富集的 MSC 重新引入。这体现了超越现有技术的显著改进，所述现有技术包括收获 MSC；培养 MSC 从而扩增数量；并然后向受试者重新引入细胞（通常至少数周后）。这体现了本发明特别重要的特征。因此，按照本发明第五方面，提供了对需要细胞治疗的受试者进

行所述治疗的方法，该方法包括：

- (a) 从所述受试者中获得包含 MSC 和细胞外基质的组织样品；
- (b) 用一定量的胶原酶处理所述组织样品，所述量足以将 MSC 从细胞外基质释放到液体培养基中；
- (c) 分离含有 MSC 的培养基级分；和
- (d) 在允许所述受试者从所述细胞治疗受益的身体部位，将所述组分重新引入到所述受试者中。

本发明人发现能够从受试者中分离惊人数量的 MSC，所述数量足以治疗相关量重新引入到同一受试者中。

优选地，通过使用本发明第一方法的方法，按照本发明的第五方面，可以富集 MSC（例如，从骨髓/小梁骨）。

优选地，在获得样品的 24 小时内，优选地 12 小时内和优选地 3-4 小时内，将级分重新引入。

优选地，使用按照本发明第五方面的方法所使用的细胞，从而不需要冷冻所述 MSC。

本发明人确定了本发明可适用于大量自体细胞治疗方案，其包括但不限于：

- (1) 骨修复（外伤骨折、部分骨缺陷、颅面重建、窦上升适应症、脊骨融合适应症、骨瘤/囊肿适应症）
- (2) 软骨修复（外伤性损伤、骨关节炎）
- (3) 骨骼肌修复（杜兴肌营养不良和其他）
- (4) 腱修复（运动员中的外伤损伤）
- (5) 韧带修复（运动员中的外伤性损伤）
- (6) 半月板修复（运动员中的外伤损伤）
- (7) 心肌修复（心肌梗死和心肌症后）
- (8) 脊髓损伤，帕金森氏病和其他神经变性疾病
- (9) 免疫介导的组织排斥，移植物-抗-宿主疾病和类风湿性关节炎（免疫调节的细胞治疗）
- (10) 脂肪物质的再生（例如，与跖骨等相关的脂肪垫的重建；或与乳房相关的脂肪组织的再生，例如在手术或事故后的乳房重塑中）。

(11) MSC 能够分化为内皮细胞。因此该方法对于脉管手术或局部缺血血管损伤是有效的,其中在该治疗中可能需要非常大量的能够形成内皮的细胞。

(12) 骨质疏松症。

本发明特别优选的实施方案是将按照本发明制备的 MSC 用于骨修复中(上述1)。作为置换手术、外伤、癌症、骨关节炎、骨质疏松症、先天性异常或骨骼缺陷的结果,每年超过一百万的整形外科手术包括骨修复。大的骨缺陷的重建持续需要骨移植,其具有许多缺点,包括供体部位损伤、疼痛和感染和病原体传染的潜在风险。在骨质疏松症中,完整髋部置换手术依然是目前可用的取代髋部骨折的唯一治疗。即使随着降低新骨折风险的骨合成代谢药物(诸如,特立帕肽和雷奈酸锶(strontium ranelate))的新发展,但是由于人口老龄化,预测(projected)全世界骨质疏松性髋部骨折的发生率在将来的50年中会增加最少3倍。因此,一般而言,发现修复这些骨折和复原骨的新方法是紧急的健康保健的首要问题。在这种情形中,使用 MSC 的细胞治疗提供了新的解决方案。

MSC 是缺乏与胚胎干细胞相关的伦理关注的成熟干细胞,且已知其在体内形成骨。因此,利用 MSC 的骨组织改造(任选地,利用骨传导支架和骨诱导生长因子)是在外伤和重建手术中骨异源或自体移植的备选方案。对于骨折治疗,通过局部递送 MSC,实现了骨连接速度和修复的骨的质量的极大提高。MSC 细胞治疗也是对成骨不全(OI)非常有效的治疗。

迄今为止,这些已知的治疗一直依赖于 MSC 在培养中的扩增,从而能够产生临床有效的数量。尽管 MSC 培养-扩增产生几乎无限供应量的细胞,但是其制备过程漫长且成本高。这排除或严格限制了一般公众对这些产品的使用(例如,对于政府资助的卫生保健诸如英国的 NHS)。除高成本外,长期的 MSC 培养与严重生物问题,诸如用于细胞转化的能力、突变的积累、细胞衰老和全能性(multipotentiality)丧失有关。最后,为了评估扩增的 MSC 的纯度和成骨“能力”,仍然存在重要的调节因素。例如,现已证明了培养的 MSC 的 CD73, CD105 和其他“经典”标记对于全能(multipotent)细胞(表达在皮肤和其他成纤维细胞类型上)不特异。因

此，存在着新型、经济且得到更好表征的 MSC 产品的领域。

应该理解按照本发明第一方面的方法制备的 MSC 应该填补该领域。本发明人吃惊地发现可以从组织样品中分离出临床有效数量的新鲜 MSC。与扩增的 MSC 相反，新鲜分离的 MSC 的明显优点是能够获得该细胞产品的速度。按照本发明第一方面的方法，在 5 小时的分离程序后，小的小梁骨活组织切片样品可以产生 $\sim 5 \times 10^5$ 个纯 MSC (CD45^低 D7-FIB⁺ LNGFR⁺ 细胞)。新鲜分离的 MSC 的第二个优点是它们显示出高纯度的完整表型特性。第三个优点是它们更高的成骨潜力。

在本发明进一步优选的实施方案中，将按照本发明制备的 MSC 用于软骨修复（上述 2）和特别地用于治疗骨关节炎（OA）中。OA 是特征为具有关节器官衰退的关节分解的疾病。认为关节软骨的丧失在受害者子群中是关键的主要事件。尚未证明用小分子的治疗干预在软骨再生中起作用。目前利用细胞治疗的软骨修复的黄金标准是自体软骨细胞移植（ACI）方法。然而常规 ACI 从最初的软骨收获的时间到治疗可能需要数月。这是非常昂贵的程序，且因此实用性受到限制。此外，该程序仅适合于年轻的受试者，因为来自软骨的细胞在增殖和分化中显示出与年龄相关的衰退，由此促成在年长受试者中利用 ACI 方法缺乏成功。而且，该方法是潜在有害的，其原因在于它包括首先从软骨中提取活组织切片。然而，ACI 方法是判断全部其他细胞治疗的基准。近期，与 ACI 相关的发展，包括使用基质协助细胞移植，已经得到了发展，但是这些并没有避开该方法较广的局限性。与骨再生相比较，其中大量骨诱导基质，生长因子和细胞产品已经进入了市场，情况对于软骨修复而言相当不同。

因此，应该理解在 ACI 程序的技术回顾中，具有分化为关节软骨潜力的 MSC 可以被视为用于 OA 治疗发展的潜在细胞来源。然而，意识到的 MSC 的稀有性意味着这些细胞还必须经历冗长的培养扩增程序，其伴随着感染、暴露于胎牛血清、细胞衰老、潜力消失、花费和成本的风险。本发明的方法使临床医生能够迅速地获得大量的干细胞，并快速地将它们返回到 OA 关节软骨缺陷中。这体现了 OA 治疗的显著进步。倘若随着用于 OA 评估的磁共振成像的普遍使用，越来越多地识别到软骨缺陷，那么迅速分离大量 MSC 的能力在当前的趋势中特别实用。

在本发明更进一步优选的实施方案中，将按照本发明制备的 MSC 用于治疗骨质疏松症。本发明人注意到含有成骨祖细胞的 MSC（按照本发明制备的）的生物学和表型与从培养扩增的 MSC 显著不同。培养扩增的 MSC 已经形成了用于评估人类成骨祖细胞功能的黄金标准。进行大规模 MSC/成骨祖细胞的纯化的能力能够为在骨质疏松症中的治疗途径发现开辟新的途径。

按照本发明进一步的实施方案，本发明人确定了按照本发明还能够从异质来源分离 MSC，并然后将其应用到受试者的细胞治疗中，所述受试者患有能够通过干细胞治疗进行治疗的医学病症（例如，骨折或 OA）。能够从尸体捐献者的多种部位，包括髌部、椎骨和胸骨髓；从亲戚/同胞；或匹配的无关捐献者中富集异源 MSC。因此按照本发明的第六方面，提供了对需要细胞治疗的受试者进行所述治疗的方法，该方法包括：

- (a) 从尸体或捐献者中获得包含 MSC 和细胞外基质的组织样品；
- (b) 用一定量的胶原酶处理所述组织样品，所述量足以将 MSC 从所述细胞外基质释放到液体培养基中；
- (c) 分离含有 MSC 的培养基级分；和
- (d) 在允许所述受试者从所述细胞治疗受益的身体部位，将所述组分引入到所述受试者中。

应该理解尸体或捐献者与受试者是相同物种。最优选地，所述受试者是人。然而，本发明人注意到许多其他动物（例如，母牛、马、山羊和绵羊）中保留了 LNGFR 标记。因此，应该理解能够使用相同的程序获得用于在动物（例如，宠物如狗，和特别是马）中进行骨或软骨修复的细胞。

能够将该富集的异源 MSC 来源用于与本发明第五方面相关列出的相同的治疗方案（1-12）中。

可以参考在随后的细胞分化上要实现的理想的治疗特定，而选择按照本发明的方法从中富集 MSC 的组织。例如，本发明人发现从滑膜组织中富集的 MSC 产生具有显著成软骨特性的细胞，且因此优选地，应该从处于这样状态的滑膜中富集 MSC，其中在所述状态中需要在治疗上促进软骨的产生。

类似地，本发明人发现从髌下脂肪垫富集的 MSC 生成具有一贯高成

脂特性的细胞,且因此优选地,应该从处于这样状态的脂肪垫中富集 MSC,其中在所述状态中需要在治疗上促进脂肪组织的产生。

按照本发明第六方面富集的 MSC 还能在这种情形下的基因治疗中获得应用,其中在所述情形中异源 MSC 具有改正接受治疗的受试者中的异常缺陷的基因型。能够用所述细胞治疗的病症包括:

(a) 与骨和软骨功能损失相关的先天性异常,包括但不限于成骨不全和稀有的软骨发育不良和肌肉遗传疾病

(b) 与基质功能损失相关的血液学异常,包括骨髓瘤和骨髓增生异常综合症和其他。

按照本发明进一步的实施方案,能够改造本发明第五和第六方面的治疗方案,由此处理在步骤(c)中分离的级分,从而在引入(或重新引入)受试者中前,从遗传上修饰富集的 MSC。

优选地,遗传修饰来自受试者的 MSC(即自体 MSC),并将其重新引入到所述受试者中。然而,应该理解一些临床状态能够指示可能需要来自尸体或捐献者来源的 MSC。实际上,所述 MSC(来自尸体或捐献者来源)能够包括需要的基因型。因此能够将该细胞引入到受试者中,从而改正一种遗传异常(如以上所预期地),并能够进行遗传修饰,从而对正接受治疗的受试者具有进一步的遗传影响。因此,按照本发明富集的细胞能够用于治疗许多具有遗传组成的病症,其包括以上(1)-(9)和特别地(10)和(11)中所预期的那些。

按照本发明第四方面的试剂盒能够包括上述任何胶原酶。优选地,所述胶原酶消化胶原蛋白 I。胶原酶能够获自溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)(例如,由加拿大温哥华的干细胞科技公司(Stemcell Technologies Inc),供应)。

该试剂盒能够任选地含有对胶原酶(例如,磷酸缓冲液(PBS)-任选地,包含终浓度 20%的胎牛血清)和样品(这也可以是 PBS,优选地含有 2%胎牛血清,或另一种生理用缓冲液诸如 DMEM)适合的稀释液和缓冲液。

当步骤(b)欲包括进一步的 MSC 纯化时,优选地,该试剂盒进一步包含用于实现这一目的试剂。因此,该试剂盒能够包括适合于 MSC 磁性

珠分离的试剂和设备。因此，如本文所述，该试剂盒能够包括：MACS 柱、微珠、MACS 缓冲液（含有 0.1%牛血清清蛋白）。备选地，该试剂盒能够包含用于进一步纯化释放的 MSC 的 FACS 试剂（例如，表 2 中列出的抗体，和缓冲液（例如，PBS））。

本发明通过实施例和参考下列附图得到进一步的举例说明，其中：

图 1：举例说明如实施例 1 中所述，从骨髓（BM）中分离的 MSC 的多参数流式细胞术结果；

图 2：A，B，C 和 E 举例说明骨髓（BM）中的 MSC 的组织学分析以及随后的扩增；D 说明由分离的 MSC 引起的碱性磷酸酶表达的流式细胞术分析结果；和 F 是举例说明如实施例 1 中所述地，在体内和培养的细胞所引起的 IL-7 和 IL-7R 表达水平随时间的变化的柱状图；

图 3：包括上下两组图。图 3 的上组图举例说明了 FACS 数据，其表明通过本发明的方法，依赖骨髓样品的富集而产生的 MSC 的高比例。图 3 的下组图展示了流式细胞术数据和显微照片，其说明了这些按照本发明富集的 BM MSC 具有 MSC 表型，并能够产生一定范围的不同的细胞谱系，这与它们的全能状态相一致。

图 4：进一步举例说明胶原酶消化程序对分离具有较高成骨能力的骨内衬细胞/细胞级分的有效性。A 和 B—胶原酶消化步骤前（左）和后（右），BM 腔的扫描电子显微镜方法（A）和荧光共聚焦显微镜方法（B）图像，其显示出去除了大部分但不是全部骨内衬细胞。B 的右图举例说明了骨表面（在彩色图像上显示为绿色钙荧光素染色）上的细胞的减少（因为与彩色图像的左侧相比，右侧含有较少的由 DAPI 染色的蓝色细胞）。(C) 举例说明了与第一次胶原酶消化（左）相比，第二次胶原酶消化（右）中如较暗颜色（成骨祖细胞，茜素红染色）所示的 CFU-成骨细胞数量的增多。第二次消化去除残留的骨内衬细胞，且留下的细胞仅为骨细胞（D），所述骨细胞陷入骨本身中且因此使酶难以接近（一些区域的模糊显示骨细胞位于不同的位面）。

图 5：也包括上下两组图。图 5 的上组图举例说明 FACS 数据，其显示出按照本发明关于源自骨髓样品的漂浮脂肪片段的富集产生的惊人高比例的 MSC。图 5 的下组图展示了流式细胞术数据和显微照片，其说

明了这些按照本发明从 FFF 富集而来的 MSC 具有 MSC 的表型，并能够产生一定范围的不同的细胞谱系，这显示了它们的全能状态。

图 6：显示组织学切片的照片，其说明了如上实施例 2 所讨论地，D7-FD3 抗体染色全部成纤维细胞，而 LNGFR 仅染色在血管周围区域中的成纤维细胞。

图 7：显示组织学切片的照片，其对比了的血管内衬的内皮细胞和实施例 2 中所述的与组织样品中的血管相关的 MSC 的分布。

图 8：举例说明了实施例 2 中的代表试验，该试验说明了实施例 2 中从滑膜富集而来的 MSC 中的 LNGFR 表达。组 (i) 显示一团滑膜组织的最初消化，由此通过 PI 选通去除死/干细胞。如基于其 CD45/SSC 分布图而识别地，大部分细胞是非造血的，含有小比例的淋巴细胞 (2%) 和大量单核细胞/巨噬细胞 (MM) (9%)。MM 具有低 CD14，这与巨噬细胞上的表达相一致。组 (ii) 举例说明了用 CD13 的双标记，并证明了全部滑膜组织成纤维细胞 (CD31+) 表达 D7-FIB，即另一种成纤维细胞标记 (A)；CD31+ 细胞均一地表达低水平的 CD166 (ALCAM)，即一种推定的 MSC 标记 (B)；LNGFR，即一种 BM MSC 标记，也通过滑膜组织成纤维细胞 (CD13+) 表达，且显示出阳性光谱，从非常亮到较暗的细胞 (C)。(D) 显示出对照染色。组 (iii) 举例说明了用 D7-FIB 的双标记，并证明了 LNGFR，即一种 BM MSC 标记，在滑膜组织成纤维细胞上表达 (D7-FIB+) 且显示出阳性光谱，从非常亮到较暗的细胞 (左组)，LNGFR 在滑膜组织内皮细胞上无表达 (CD31+)，这证实了免疫组化数据。

图 9：举例说明了实施例 2 中用于分离 MSC 的分选方案，且还举例说明了通过该富集方案产生的细胞的形态学。

图 10：显示了如实施例 2 中所述的软骨片的培养和组织学切片照片，其说明了从滑膜分离而来并经过体外培养之后的 MSC 的分化。

图 11：显示了如实施例 3 中所述的组织学切片的照片，其说明了脂肪垫中 LNGFR+ 细胞具有血管周围的形貌。

图 12：也显示了如实施例 3 中所述的组织学切片的照片，其说明了脂肪垫中 LNGFR+ 细胞具有血管周围的形貌，并进一步说明了脂肪垫 MSC 的表型和分选方案。

实施例 1：从骨髓样品富集间充质干细胞

1.1 材料和方法

1.1.1 样品收集

(i) 从正常捐献者的背部髂嵴中获得 BM 吸出物 (2-10 ml)。用 Lymphoprep (Nycomed, 奥斯陆, 挪威) 分离后, 收集 BM 单核细胞 (MNC)。通过搅动手工分散集中在漂浮脂肪级分 (FFF) 中的细胞聚集物, 并对其进行离心。单泡脂肪细胞保持漂浮在上层, 而基质细胞集中到沉淀中。

(ii) 从在经过同意的患有骨关节炎 (OA) 患者的髌部关节造形术过程中摘除的股骨头中获得 BM 活组织切片材料。由外科医生将股骨头切成两半, 并在装有 PBS 的无菌容器中递送到实验室中。利用 4mm 钻取活组织切片收集样本。备选地, 利用骨研磨机 (De Puy 或其他制造商) 搅匀股骨头, 从而获得平均较小的片段以进行酶消化。

1.1.2 胶原酶消化

用 0.5 ml 0.25% 胶原酶 (干细胞科技, 温哥华, 加拿大) 消化 0.1g 钻取活组织切片样品 3-4 小时。这相当于大约 250-375 单位的酶。本发明人发现这对于细胞回收和生存能力是最佳的。

1.1.3 MSC 级分的处理

优选的温育时间结束时, 用超过 20 倍的过量 PBS (v/v) 稀释胶原酶溶液, 并使用注射器/针头混合所释放的细胞和 PBS, 并迫使剩余的细胞从活组织切片中出来进入到溶液中。随后立即通过 70 微米的细胞滤网过滤 PBS/细胞混合物, 并然后将其转移到另一个离心管中进行离心 (在 1800 rpm 下进行 5 分钟)。然后丢弃胶原酶/PBS 溶液, 并将细胞沉淀重悬于适合细胞计数和后续操作 (磁性和 FACS 分离) 的培养基中, 通常是含有 2% FCS 的 DMEM。

从一些样品中, 对 $CD45^{-}D7-FIB^{+}LNGFR^{+}$ 细胞进行了流式细胞术、纯化、扩增和分化, 如前所述。(Jones 等, 关节炎风湿病 (Arthritis Rheum) 2002;46: 3349-60)。

1.2 结果

1.2.1 证实了骨髓(BM)吸出物中稀少的间充质干细胞(MSC)具有 D7-FIB⁺CD45^低LNGFR⁺表型

本发明人确定了在 BM 吸出物中所有 MSC 活性受限于 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞稀有种群。他们进一步研究了该种群的频率和克隆发生。对于同一捐献者,通过 4 色细胞计数法的测量, BM (单核细胞) MNC 级分中 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞的平均频率是 $0.039 \pm 0.037\%$ (图 1, 上), 且其在量级上与相同样品中发生的 $0.007 \pm 0.006\%$ ($n=30$) 的平均 CFU-F 频率相当。

此外, 本发明人发现在用 D7-FIB 微珠预富集后, 该稀有细胞群的频率增高~100 倍 (高达 $7 \pm 6\%$, $n=38$) (图 1, 中间图)。该预富集步骤是用直接与 D7-FIB 缀合的微珠 (抗-成纤维细胞微珠, Miltenyi 生物技术) 进行的阳性选择。简要地, 将 10^8 个 BM MSC 与 100 μ l 微珠在室温下温育 15 分钟, 再以 1800rpmX5 分钟洗涤, 从而去除未结合的微珠。然后将细胞应用到 MiniMacs 柱 (置于磁体中) 中, 并将未结合的级分收集到 6ml MACS 缓冲液 (具有 0.5%BSA 的 PBS) 中。随后, 将该柱移出磁体, 并将结合的组分 (含有 MSC) 释放到 0.5-1ml MACS 缓冲液中。这是 MACS 分离的标准方案。

FACS 分选选择 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺种群后, CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞群的纯度增高到超过 95% (图 1, 下图)。在标准 CFU-F 测定中, 在该富集的种群中, 每 6 个细胞中的 1 个 ($17 \pm 4\%$, $n=6$) 形成确定的由 30 或更多细胞的集群 (Castro-Malaspina 等 (1980) 血液 (Blood) 56 第 289-301 页)。

由匹配的 CD45⁺细胞没有生长出集群。这些数据证实了 BM 吸出物中所有生成克隆的 MSC 包含在稀有的 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺种群中。

1.2.2 体内 BM MSC 的基质特征

本发明人注意到从 BM 吸出物中纯化的 MSC 显示出基质形态学 (具有许多突出物的星形), 这令人回想到 BM 外膜网状细胞 (ARC), 并且在

它们的细胞质中发现了小脂肪滴（图 2A）。在 BM 活组织切片上，具有 ARC 形态学的细胞对 CD10 标记显示阳性，所述 CD10 标记在体内 MSC 中表达（图 2B）。而且，纯化的体内 BM MSC 统一地对碱性磷酸酶（ALP）显示阳性，这是 ARC 的主要特征（图 2C）。用针对 ALP 的抗体（B4-78 克隆，针对 ALP 骨/肝同种型）进行的染色证明了在所有体内 MSC 上的均一表达（图 2D）。MSC 培养扩增后，ALP 表达逐渐消失（图 2E）。IL-7，即一种对于淋巴细胞生成的基质支持至关重要且已知是由 ARC 产生的细胞因子，也在扩增后衰退（图 2F）。培养的皮肤成纤维细胞始终对 ALP 显示阴性，并表达最少量的 IL-7（图 2，E 和 F）。

当综合这些数据时，本发明人吃惊地认识到体内 BM MSC 具有许多与 ARC 相一致的特征，且这些特征在体外培养后消失了。这提示了两件事。第一，MSC 培养可能是不理想的，因为其导致表型改变。第二，技术人员应该尚未意识到体内 MSC 具有 ARC 样特性。ARC 形成相互连接的细胞网络，并且能够通过酶处理得到释放。因此，本发明人意识到利用酶消化分离 MSC 也将是可能的。本发明人认为 MSC 活性存在于 ARC 和可能其他从前没注意到的细胞，诸如骨内衬细胞、周细胞和前脂肪细胞中。所有这些不可能吸出，且这就是为什么需要酶消化作用。

1.2.3 从 BM 基质细胞聚集物中酶释放体内 MSC

已经认识到 MSC 能够具有 ARC 样特性，本发明人研究了组织的酶消化作用是否会释放 MSC。他们对获自股骨头的材料测试了该想法，该股骨头材料是在患有骨关节病（OA）患者的髌部关节造形术过程中摘除的。

MSC 代表了来自 BM 吸出物的单细胞混悬液中非常稀有的种群。来自 10^8 个吸出的 BM MNC 中高纯度 MSC（CD45^{low}D7-FIB⁺LNGFR⁺）的平均细胞产量是 11,000 个细胞（范围 4,000-63,000, n=14），相当于~2,000 MSC/毫升吸出的骨髓。该产量太低以至于不具临床有效性，并需要体外扩增以产生有效量的细胞。此外，如上所示，本发明人认为扩增步骤能够导致 MSC 表型的改变。

已经认识到体内 BM MSC 共有许多与 ARC 细胞相同的特征，本发明人下一步测试了与常规骨髓吸出物来源相反，使用 1.1 中所述方法（基于

能够分解 ARC/基质网络的那些) 的酶促提取方法是否适合于从固体组织活组织切片中释放增多数量的 MSC。

3 小时或 3-4 小时的胶原酶处理活组织切片释放了 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞, 其在形态学和表型上与从吸出物纯化的 MSC 相似, 但是, 令人惊讶地, 在从活组织切片样品中释放的种群中那些细胞的比例比在吸出物中发现的水平高~100 倍($5\pm3\%$ 活细胞, $n=8$, 与 BM 吸出物中的 $0.039\pm0.037\%$ 或细胞, $n=30$,相反)。该增高显示在图 3 上组图中所示的 FACS 结果中。

此外, 本发明人吃惊地发现尽管源自疾病的微环境, 按照本发明第一方面的方法从消化的活组织切片中纯化的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞就增殖和分化而言保持了正常的 MSC 功能, 尽管软骨形成的水平减低了 ($1\pm1\mu\text{g}$ 硫酸葡胺聚糖 (GAG)/片, 与通过正常 BM 对照产生的 $3\pm2\mu\text{g}$, $n=4$ 相比较)。该发现与源自 OA 患者 BM 的 MSC 的已知性质相一致。当使用来自正常个体的小梁骨活组织切片时, 获得正常水平的 MSC 软骨形成(数据未显示)。该研究的结果显示在图 3 的下组图中, 其举例说明了按照本发明第一方面方法富集的 MSC 显微照片和 FACS 分析。该组中左图显示的 FACS 结果举例说明了在由示例其 MSC 性质的标记所选通的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞(即新鲜 MSC)上的表达。该组右图中所示的显微照片说明了通过胶原酶消化所获得的 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞能够分化为 3 种间充质谱系。

从消化的活组织切片中分选而来的高度富集的 MSC ($CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$) 的产率比通常获自吸出物的那些平均高 50 倍(且在某些情形中超过 100 倍)(~550,000 个细胞/ 10^8 总细胞, 范围 80,000-800,000, $n=6$, 与来自 10^8 个吸出的 BM MNC 中的 11,000 个细胞, 范围 4,000-63,000, $n=14$ 相比较)。平均, 0.1g 活组织切片产生大约 150,000 个 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞, 其相当于大约 25,000 CFU-F ($n=7$)。释放的细胞级分中 CFU-F 的比例直接与 $CD45^{\text{低}}D7-FIB^+LNGFR^+$ 细胞的频率有关 ($R=0.89$, $n=7$)。因此, 本发明人能够从单个 0.1cm^3 (重量 0.1g) 的活组织切片中获得大约 10,000 个 MSCS 或 25,000 或 150,000 个 MSC (依赖于分别列举的方法, 即 CFU-F 测定或流式细胞术)。本发明人吃惊地认识到

该产率足够高，足以容许得自该方法的 MSC 的直接临床应用。这些产率与使用 150-350 毫升 BM 吸出物等效。

实际上，本发明人发现通过按照本发明第一方面的方法由胶原酶消化所释放的 $CD45^{-}$ $D7-FIB^{+}$ $LNGFR^{+}$ 细胞的频率(2-9%, n=8)如此高，以至于为了使它们能够获得检测，分离或用作治疗，不再需要利用微珠进行预富集。在另一方面，如果将来自常规 BM 吸出物中的相同 MSC 剂量（即，150-350 毫升）用于相同的目的，则必须对 MSC 进行相当大地浓缩，从而确保相似的纯度水平。这说明了本发明人的方法是何等的有利，因为本发明容许临床医生在不需复杂耗时的富集步骤或在培养中扩增的情形下，快速地利用取自样品的 MSC。而且，本发明人确定了按照本发明的方法能够处理来自单一患者的一个股骨头，并提供足够用于多种治疗的 MSC，这在如果使用 BM 吸出物时是不可能的。

1.2.3 利用胶原酶双消化酶促释放高度成骨 MSC

对于骨修复的应用，使用具有突出成骨能力的 MSC 是理想的。已经认识到 MSC 活性可以存在于骨内衬细胞中，本发明人能够显示除如 1.1 中所述的 3-4 小时胶原酶消化步骤以外的其他酶促提取方法适合于释放具有增高成骨能力的 MSC。如图 4 中 A 和 B 所示，本发明人能够证明使用 1.1 中所述的方法的胶原酶消化步骤去除了大部分但非全部骨内衬细胞（平均大约 2% 总 DNA 留在骨上，n=3）。当在收集了第一次的消化物后对活组织切片片段进行了第二次 1 小时的胶原酶消化步骤，残留在骨上的细胞的比例减少了接近 5 倍，且回收的细胞总产量增高了平均 5% (n=3)。尽管第二次消化的克隆发生与第一次消化相似(分别地，13 CFU-Fs/5,000 释放的细胞，与 12 CFU-Fs/5,000 释放的细胞相比较, n=3)，但是其成骨能力经常是两倍高(分别地，170 μ g Ca^{++} /5,000 释放的细胞，与 90 μ g Ca^{++} /5,000 释放的细胞相比较)（图 4C）。本发明人还能够证明第二次胶原酶消化步骤可以被 1 小时的 0.5ml 在 PBS 中稀释到终浓度 50U/ml 的透明质酸酶（西格玛(Sigma)）溶液的处理所替代。与胶原酶消化类似，用透明质酸酶的处理在 37°C 在细胞振荡器上进行。该处理还释放骨内衬细胞，其贡献了所释放总细胞的额外的 5%(n=3)。使用胶原酶或透明质酸酶获得的

第二次消化物中的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞的 MSC 标记表型与第一次消化物中的 ($CD73^{+++}CD105^+CD90^{+++}CD146^{++}$, $n=2$) 相似。该双消化步骤后, 保持在原位的唯一残留细胞位于骨内 (骨细胞) (图 4D)。

因此, 应该理解为了骨修复应用处理骨样品的优选方法是进行如上所述的第二次胶原酶处理或备选地透明质酸酶处理。

1.2.3 从漂浮脂肪聚集物中酶促释放体内 MSC

正常 BM 包含漂浮的脂肪滴, 称为漂浮的脂肪级分 (FFF), 在作为 MSC 富集开端的制备 BM MNC 的过程中通过密度梯度离心将其丢弃。在衰老的个体 (因为他们的骨髓日益变成脂肪状的) 或患有一些疾病的人群 (诸如类风湿性关节炎或骨质疏松症) 中, FFF 增多。

本发明人吃惊地发现本发明的方法可以应用于吸出物, 从而增加 MSC 的产量。这需要收集 FFF。然后按照本发明进行胶原酶处理, 从而从成熟脂肪细胞中分离基质细胞/ARCs/MSCs。

本发明人分析了利用常规现有技术从正常 BM 收集的吸出物中漂浮的脂肪组分 (FFF) 聚集物。在利用相同捐献者的研究中, 在分散的 FFF 中具有 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 表型的细胞比例为 $0.3 \pm 0.1\%$, 因此比相应的 MNC 级分中存在的比例 (0.03 ± 0.006 , $n=5$) 高 ~10 倍。因此本发明人吃惊地发现按照现有技术经常会被丢弃的 FFF 代表了有价值的 MSC 来源。

此外, 本发明人发现当用胶原酶消化 FFF 时, 产生的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞的比例进一步得到增高, 并达到总活细胞的 $7 \pm 5\%$ ($n=5$) (图 5, 上组图)。该产量比按照现有技术用作 MSC 来源的 MNC 级分中的产量高 ~200 倍。从 FFF 中释放出的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞与它们的 MNC 负体相比具有相似扩展的表型, 并在扩增后是全能的 (如图 5 下组图中所示, 其举例说明了上述研究了相同细胞谱系的 FACS 结果和形态学研究)。从 FFF 富集而来的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞是 ALP 阳性的, 且在它们的细胞质中含有小脂肪滴。这表明该细胞具有体内“前脂肪细胞”状态。它们的体内碱性磷酸酶表达提示它们的“前成骨细胞”状态。综上所述, 这提示了个体单细胞所固有的全能性。

作为一个整体, 这些数据显示 BM 中存在的大部分 MSC 不以单个细

胞（可以预期利用如现有技术所提示的吸出物来收集的类型）的形式存在。相反，令人惊讶地发现大部分 BM MSC 结合在基质细胞网络中，其与相邻细胞，包括漂浮脂肪细胞和胶原蛋白基质形成聚集物。

根据这个惊人的发现，应该承认本发明第一方面的方法（利用胶原酶消化从而从基质细胞和基质中释放 MSC）可以用于从比另外可以利用现有技术获得的大得多的起始种群中分离和富集 MSC。因此，本发明第一方面的方法提供了新颖的且有创造性方法，通过该方法可以实现 MSC 的增加的富集。

实施例 2：从滑膜富集间充质干细胞

2.1 材料和方法

2.1.1 样品收集

研究了来自 8 种滑膜组织来源的样品：来自一名正常捐献者，来自 4 名患有 RA 的患者，一名患有 OA 的患者，一名患有痛风的患者和一名患有血清反应阴性关节炎的患者。

在诊断关节内镜检查过程中提取滑膜活组织切片。将小组织的活组织切片（大约 44mg）置于装有 2ml 培养基（通常 DMEM/2% FCS）的 15ml 离心管中，从而运送到实验室中。

2.1.2 胶原酶的消化

一旦进入实验室中，去除培养基，将活组织切片置于 0.25%胶原酶溶液中，并在持续旋转的条件下消化 3 或 4 小时。当样品被完全消化时，胶原酶溶液变浑浊，且细胞活组织切片完全分解和消失。温育后，加入 10ml PBS，并使用注射器/针头破坏任何可能残留的组织团块。随后立即通过 70 微米的细胞滤网过滤 PBS/细胞混合物，并然后将其转移到另一个离心管中进行离心（在 1800 rpm 下进行 5 分钟）。然后丢弃胶原酶/PBS 溶液，并将细胞沉淀重悬于适合细胞计数和后继操作（磁性和 FACS 分离）的培养基中，通常是含有 2%FCS 的 DMEM。

2.1.3 细胞分选方案

对于 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞, 利用图 9 中示意性显示的方案, 使用上述胶原酶消化技术富集从滑膜样品释放的细胞。简要地, 以高碘化丙锭 (PI) 染色为基础丢弃死细胞, 且随继对剩余的活细胞进行分选, 从而选择具有低 $CD45$ 表达但高 $LNGFR$ 表达的那些细胞。

图 9 的最后一幅图像中说明了通过该方案产生的分选的细胞的成纤维细胞形态。这些分选的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞随继能够在培养中产生成长的细胞单层, 这与它们的高度增殖本性相一致。

2.2 结果

2.2.1 免疫化学和流式细胞术分析

已经在许多其他组织中报道了间充质干细胞, 但是先前尚不知它们的体内形貌和表型。本发明人研究了固体组织, 包括滑膜和关节脂肪垫中 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞的形貌。在滑膜中, $D7\text{-FIB}$ 抗体染色了全部的成纤维细胞, 而 $LNGFR$ 仅染色了血管周围区域的成纤维细胞 (图 6)。

图 7 中显示了说明 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞的周细胞样分布的结果。 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞区别于内皮细胞 (已知为 $CD31^+$ 和冯维勒布兰德因子⁺), 所述内皮细胞在血管内腔内深处形成单细胞厚度的层 (免疫标记显示在图 7A 中)。

相反, $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞形成如同延伸到组织中的数层阳性细胞一样的血管支持, 这与固体组织中的 MSC 是周细胞的概念相一致 (图 7B)。

2.2.2 从滑膜中酶促释放 MSC

利用以上 2.1 中概述的方法从滑膜中释放 MSC。

按照本发明第一方面的方法酶消化滑膜产生高比例的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞, 如图 8 中所示。发现该 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞富集与从中分离所述细胞的样品的健康状态无关 (例如, 组 (iii) 中来自痛风的组织样品, 进一步说明本发明第一方面的方法在从甚至患有疾病的患者中治疗性分离自体 MSC 的适宜性。

从多样的滑膜样品中 (一种来自正常捐献者, 4 种来自患有 RA 的患

者，一种来自患有 OA 的患者，一种来自患有痛风的患者和一种来自患有血清反应阴性关节炎的患者）富集了 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞。不依赖于疾病的性质， $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞以平均比例 $15\pm 9\%$ ，和在其他数据组中的 $16\pm 10\%$ ，存在于所有滑膜消化物中。

与显示了全部成纤维细胞对于 D7-FIB 阳性标记的免疫组化数据相一致， $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+$ 细胞以增高的比例存在于滑膜消化物中（平均比例 $76\pm 20\%$ ，和在另一个数据组中为 $50\pm 12\%$ ）。

图 8 的组 (ii) 和 (iii) 中显示了证明 LNGFR 和 D7-FIB 在滑膜组织胶原酶消化物上的表达的代表性试验。特别是，图 (iii) 显示了 $CD45^{\text{低}}LNGFR^+$ 细胞（滑膜周细胞）构成 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+$ 细胞（滑膜成纤维细胞）的级分，这与免疫组化数据相一致。表型上的共同性提示了它们共同的间充质谱系本性且 MSC 存在于具有两种表型的细胞中可能性。

2.2.3 分选的 $CD45^{\text{低}}LNGFR^+$ 细胞含有 MSC 的功能证据

由分选的 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞产生细胞单层（第 4 次传代），所述 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞是按照本发明第一方面的方法从滑膜组织（即，从滑膜周细胞）富集而来。如下所述，对这些细胞单层进行成骨、成脂肪和成软骨分化（ $n=1$ ）的功能体外测定。

i) 用 100nM 地塞米松、0.05mM L-抗坏血酸-2-磷酸酯和 10mM β 甘油磷酸（全部来自西格玛）诱导成骨分化。分别利用西格玛试剂盒 82 和 1% 茜素红（西格玛）检测碱性磷酸酶（AP）活性和基质矿化。利用西格玛试剂盒 85 测量了 Ca^{++} 的沉积。

ii) 在增补了 0.5mM 异丁基甲基黄嘌呤（isobutylmethylxanthine）（西格玛）、60 μ M 吡啶美辛（ICN, Basingstoke, 英国）和 0.5mM 氢化可的松（西格玛）的 DMEM/10% FCS 中诱导成脂分化。如前所述，用 0.5% 的油红显现脂质泡的累积。

iii) 对于成软骨分化，将 2.5×10^5 个细胞置于无血清的培养基中，该培养基由高葡萄糖 DMEM（Gibco）、100 μ g/ml 丙酮酸钠、40 μ g/ml 脯氨酸、50 μ g/ml L-抗坏血酸-2-磷酸酯、1 mg/ml BSA、1x ITS+、100 nM 地塞米松（全部来自西格玛）和 10 ng/ml TGF- β 3（R&D 系统（R&D Systems））

组成。每隔一天更换培养基。在第3周收获沉淀，并制备冷冻切片（5 μ m厚）。用1%甲苯胺蓝（西格玛）显现硫酸化的GAG。利用爱茜蓝结合测定（IDS）测量sGAG。

3周分化后，源自CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞的培养物成功地分化为成脂、成骨和成软骨的表型，所述CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞是按照本发明从滑膜组织中释放而来的。该研究的结果显示在图9中，其展示了说明由培养的细胞所获得的表型的显微照片。

比较源自分选的滑膜CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞的细胞和源自BM（n=5）或滑膜（n=5）的培养物的细胞的全能性，其中培养物是通过标准可塑-贴壁（plastic-adherence）方法产生的。产生的脂肪细胞的比例是相似的（分别地，30%对比33 $\pm$ 15%和22 $\pm$ 15%），且产生的钙量（指示骨形成）处于相同范围内（分别地，100 μ g/盘对比80 $\pm$ 37 μ g和121 $\pm$ 47 μ g）。具体地，软骨形成是非常强的，且产生的蛋白聚糖（GAG）的量高于对照培养物（分别地，9 μ g/片对比2.6 $\pm$ 1.9 μ g/片和2.2 $\pm$ 1.4 μ g）。

扩展该数据组，从而以n=15对滑膜进行比较。得到了相似的结果，且在该情形中，产生的蛋白聚糖（GAG）的量高于对照培养物（分别地，9 μ g/片对比2.6 $\pm$ 1.9 μ g/片和1.8 $\pm$ 1.7）。

总之，CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺级分含有超过总消化物成软骨活性的2/3，仅将1/3留给了剩余的级分。这些数据显示与对照培养物相比，滑膜的CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞（滑膜周细胞）含有MSC活性，且特别富含成软骨活性。

2.2.4 以单细胞水平证实 MSC 存在于按照本发明富集的滑膜 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞群中

本发明人研究了按照本发明从滑膜组织中释放的个体细胞的产克隆能力（n=3名捐献者，全部患有RA）。

通过利用图9中示意性显示的方案的FACS分选纯化CD45^低D7-FIB⁺细胞（滑膜成纤维细胞）。平均起来，通过该方案分选的贴壁细胞的10%能够经历12-13次细胞分裂，然而这些中仅有25%（或总贴壁CD45^低D7-FIB⁺细胞的2.5%）是高度增殖性的（能够经历20-22次细胞分裂）。

另外,对通过胶原酶消化一种滑膜组织(RA)而释放的细胞进行分选,从而选择 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 种群(滑膜周细胞)。在该试验中,总贴壁 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞的 4% 是高度增殖和产克隆的(能够经历 20-22 次细胞分裂)。所有这三种单 MSC 来源的克隆是三能性的(图 10)。

这些试验显示高度产克隆和全能(multipotential) MSC 存在于滑膜成纤维细胞和滑膜周细胞群中,且它们数字上富含在周细胞级分($CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞)中,其中所述滑膜成纤维细胞和滑膜周细胞是按照本发明利用胶原酶消化从滑膜组织中释放而来的。此外,这些结果说明了该富集的滑膜血管周围 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+LNGFR^+$ 细胞是特别好的软骨祖细胞来源。

能够从一个小的 44mg 的活组织切片获得的滑膜周细胞的细胞产量是平均 400,000 个细胞 ($n=8$)。该量足以用于治疗小病灶性软骨缺陷(目前用于标准自体软骨细胞移植(ACI)程序的细胞密度是 10^6 个细胞/ cm^2)。如果使用滑膜成纤维细胞或总滑膜组织消化物,则利用一个小的活组织切片可以治疗大得多的软骨缺陷(高达 10cm^2)。滑膜组织具有高度再生能力,且收集多个活组织切片或较大部分的滑膜将能够治疗如在 OA 和 RA 中见到的非常大的软骨缺陷。滑膜周细胞的高度增殖和产克隆活性提示与常规 ACI 标准相比,可以使用小得多的细胞接种密度(例如,最初的细胞数量)。

实施例 3: MSC 存在于髌下脂肪垫中

关节脂肪垫中的 MSC(由 $LNGFR^+$ 免疫标记显示)具有与该细胞在滑膜中的形貌相似的血管周围形貌,如图 11 和 12, A 所示。

按照本发明对髌下脂肪垫(在初步试验中 $n=4$, 并扩展到 $n=6$, 全部是患有 OA 的患者)进行胶原酶消化。流式细胞术数据证实了脂肪垫周细胞($CD45^{\text{低}}LNGFR^+$ 细胞)构成脂肪垫成纤维细胞($CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+$ 细胞)级分(图 12,B)。流式细胞术显示 $CD45^{\text{低}}LNGFR^+$ 细胞的平均比例在初步试验($n=4$)中是 $20\pm 12\%$, 且在 $n=6$ 时甚至更好(37 ± 9)。

利用流式细胞术还研究了所述消化物中 $CD45^{\text{低}}D7\text{-FIB}^+$ 细胞(成纤维细胞)的比例,且结果显示(与来自滑膜研究的数据一致)这些细胞组成消化物更高的比例($60\pm 12\%$ ($n=4$) 和 $51\pm 17\%$ ($n=6$))。与我们所分析的滑

膜消化物相比，脂肪垫中成纤维细胞的比例是相似的（分别地，50 对比 51%），然而周细胞（CD45^低LNGFR⁺细胞）的比例是两倍高（分别地，37 对比 16%）。这提示在细胞产量方面，脂肪垫可能是对于选择 MSC 特别有用的组织来源。

为了从脂肪垫消化物中纯化 CD45^低D7-FIB⁺LNGFR⁺细胞（周细胞），本发明人使用了基于微珠的使用 MACSelect 抗-LNGFR 微珠的技术（图 12，C）。MACSelect 抗-LNGFR 微珠可购自 Miltenyi 生物技术。选择方案与对 D7-FIB 微珠所述的方案严格相同（见上）。

在该磁性分选程序（n=4）后的细胞纯度低于通过直接 FACS 分选所获得的那些（~60-70%纯度对比 95%）（图 20，C）。然而，本发明人认为这可能是由于评估纯度的方法的局限性，而非实际纯度本身。尽管有这些局限性，来自胶原酶消化物的脂肪垫来源的 CD45^低LNGFR⁺周细胞的克隆发生能力与滑膜来源的 CD45^低LNGFR⁺细胞相似（总贴壁 CD45^低LNGFR⁺细胞的 4%）。源自分选的脂肪垫周细胞的集群显现在图 12，C 中。

分选的脂肪垫来源的 CD45^低LNGFR⁺周细胞甚至在培养扩增前具有一些全能性。这可能得到评估，是因为释放的/分选的细胞的数量足以进行分化测定中的体外测试。

这些测定的结果显示表 3 中，其比较了下列特性：

- i) 通过胶原酶消化产生的 CD45^低LNGFR⁺细胞；和
- ii) 通过胶原酶消化产生的 CD45^低LNGFR⁻细胞；
- iii) 在培养中扩增（标准方法）后的对照脂肪垫来源的可塑-贴壁细胞。

利用标准扩增方案获得来自上述（iii）的细胞。简要地：按照标准方案消化脂肪垫。将 5×10^5 - 10^6 个细胞接种到小的 25cm² 的烧瓶中，并培养直到汇合。对汇合的细胞进行胰蛋白酶化，并分置于另外两个烧瓶中直到汇合。如上所述，将扩增的细胞（第 1 次传代）用于测试全能性。

表 3

细胞	捐献者	#1	#2	#3	#4	平均
CD45 ^低 LNGFR ⁺ 细胞	Ca++	5	9	ND	2	4
	GAG	0.5	0	9	0	2.4

	脂肪细胞	~50%	~50%	~50%	~50%	~50%
CD45 ^低 LNGFR ⁺ 细胞	Ca++	2	2	0.5	0.5	1.2
	GAG	0	0	4	0	1
	脂肪细胞	~50%	~50%	~50%	~50%	~50%
扩增的脂肪垫细胞	Ca++	ND	ND	18	37	27
	GAG	ND	ND	13	6	9
	脂肪细胞	ND	ND	70%	64%	67%

从表 3 中可以看出, 脂肪垫来源的 CD45^低LNGFR⁺细胞比 CD45^低LNGFR⁺细胞更具成软骨性。平均而言, 对照培养的脂肪垫来源的 MSC 比新鲜的 CD45^低LNGFR⁺细胞产生更高的成软骨性 (分别地, 9 ± 7 对比 2.4 ± 4.4 , $n=6$ 和 $n=4$)。本领域技术人员应该理解源自接受治疗性施用 MSC 的患者的分化的细胞应该提供增高的和有利的在本文中鉴定的成软骨特性, 其中所述 MSC 是按照本发明富集而来的。

能够从小小的 30mg 活组织切片中获得的脂肪垫周细胞的细胞产量是平均 700,000 个细胞 ($n=2$)。该量足以用于治疗小病灶性软骨缺陷 (目前用于标准自体软骨细胞移植 (ACI) 程序的细胞密度是 10^6 个细胞/ cm^2)。能够从 1 克组织中获得的脂肪垫周细胞的细胞产量是平均 23×10^6 个细胞 ($n=2$)。能够从整个脂肪垫获得的脂肪垫周细胞的细胞产量是平均 500×10^6 个细胞 ($n=2$)。这使其能够治疗如在 OA 和 RA 中见到的非常大的软骨缺陷。这将使得能够使用异源状态中的脂肪垫, 从而为许多治疗提供成软骨级分。

总之, 这些结果证明了存在于关节脂肪垫中的 CD45^低LNGFR⁺细胞是:

- i) 血管周围的,
- ii) 产克隆的; 和
- iii) 全能的。

这些特性都与这些细胞作为包含间充质干细胞的鉴定相一致。

利用本发明的富集方法, 可能将这些细胞纯化到充足数量 (超过 10^6 个细胞), 从而在不求助体外培养扩增的情形下, 直接测试它们的全能性。对于通过本方法的富集, 使用髌下脂肪垫, 即一种细胞来源, 是特别优选

的，其原因在于该组织的大尺寸，且在脂肪垫中存在相当高比例的 $CD45^{\text{低}}LNGFR^{+}$ 细胞。这些特性使髌下脂肪垫成为利用本发明第一方面的方法获得未处理 MSC 的极好的来源。该富集的细胞特别适合于组织改造应用。

综上所述，这些数据显示：

(1) 第一次比较了新鲜分选而来的细胞群和扩增细胞的全能性，并显示出新鲜分选而来的细胞群具有 MSC 活性；

(2) $CD45^{\text{低}}LNGFR^{+}$ 细胞比 $CD45^{\text{低}}LNGFR^{-}$ 细胞具有更高的成软骨性和成骨性（因此， $CD45^{\text{低}}LNGFR^{+}$ 细胞代表了对本发明第一方面的步骤(b)中的选择而言优选的表型）；和

(3) 新鲜细胞的成脂活性与扩增的细胞相似，因此人们可以简单地从身体的一部分收集和消化脂肪，并将细胞注射/移植到其他部分中。不需要在培养中扩增细胞来提高它们的脂肪生成。

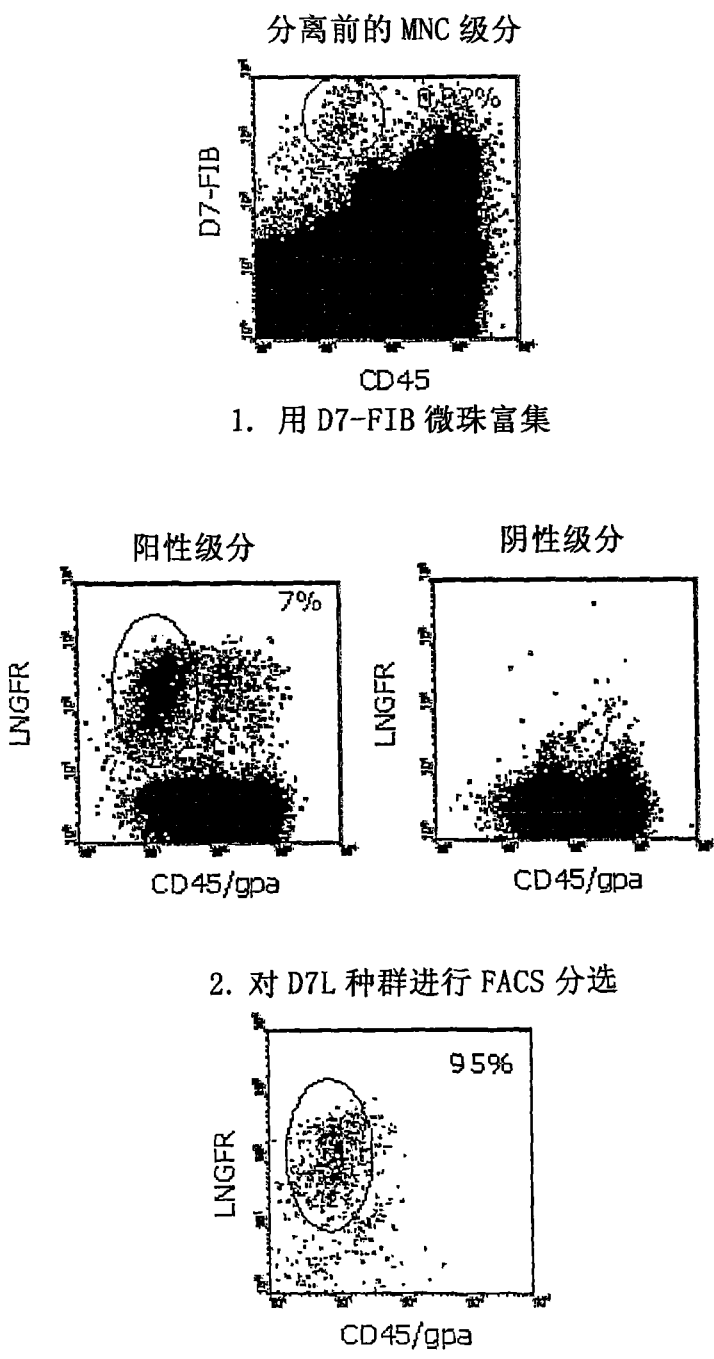


图 1

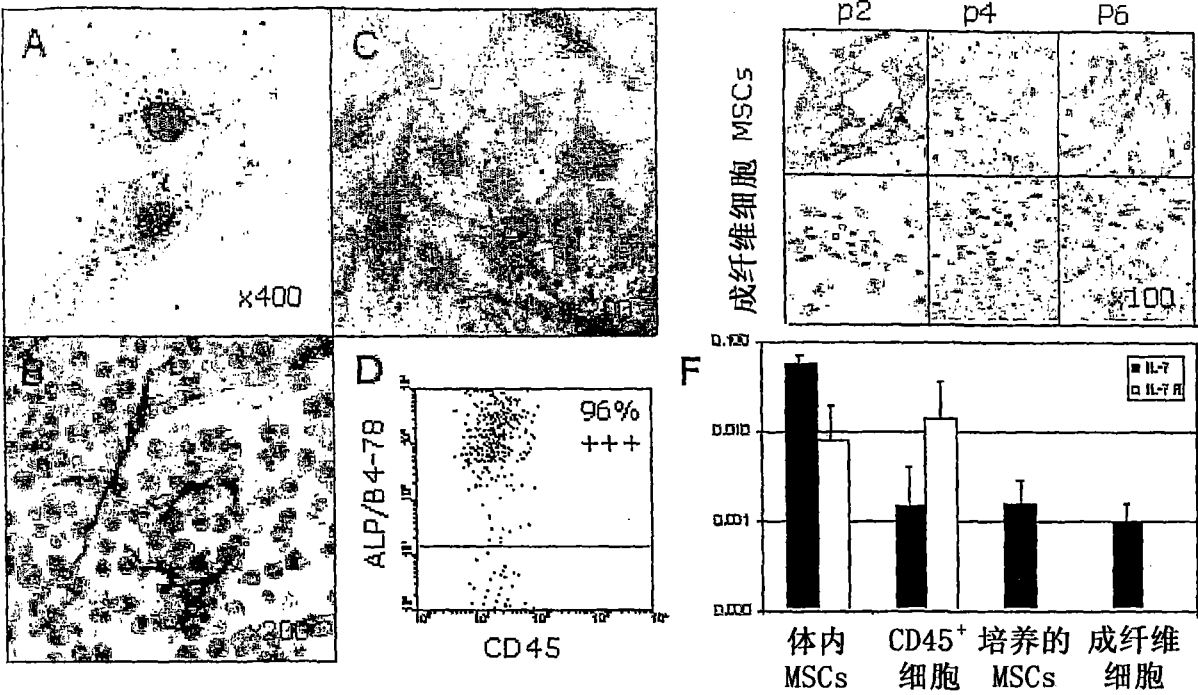
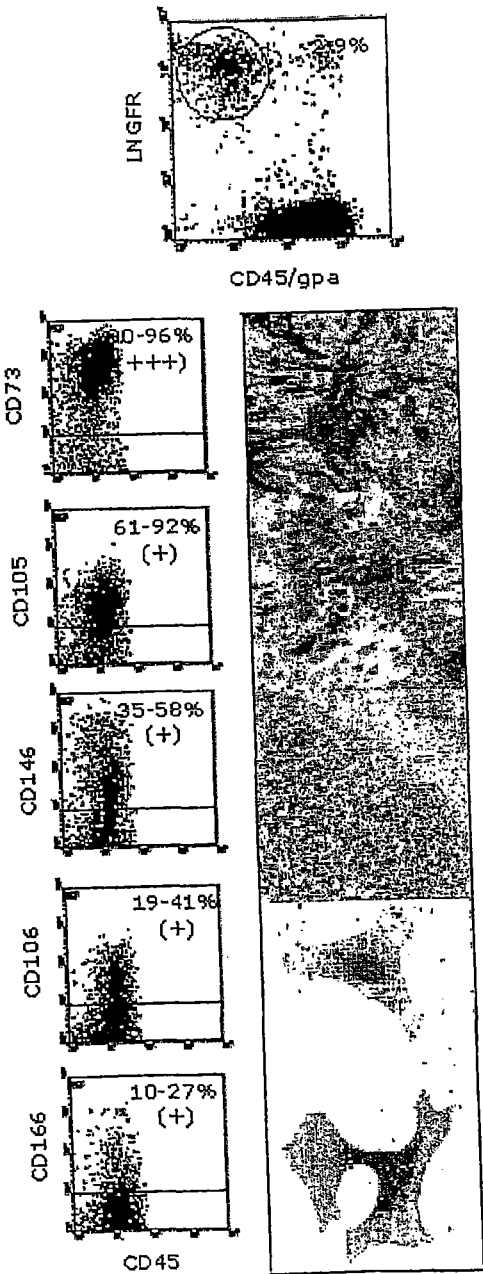


图 2

消化的来自 OA 患者的活组织切片



3

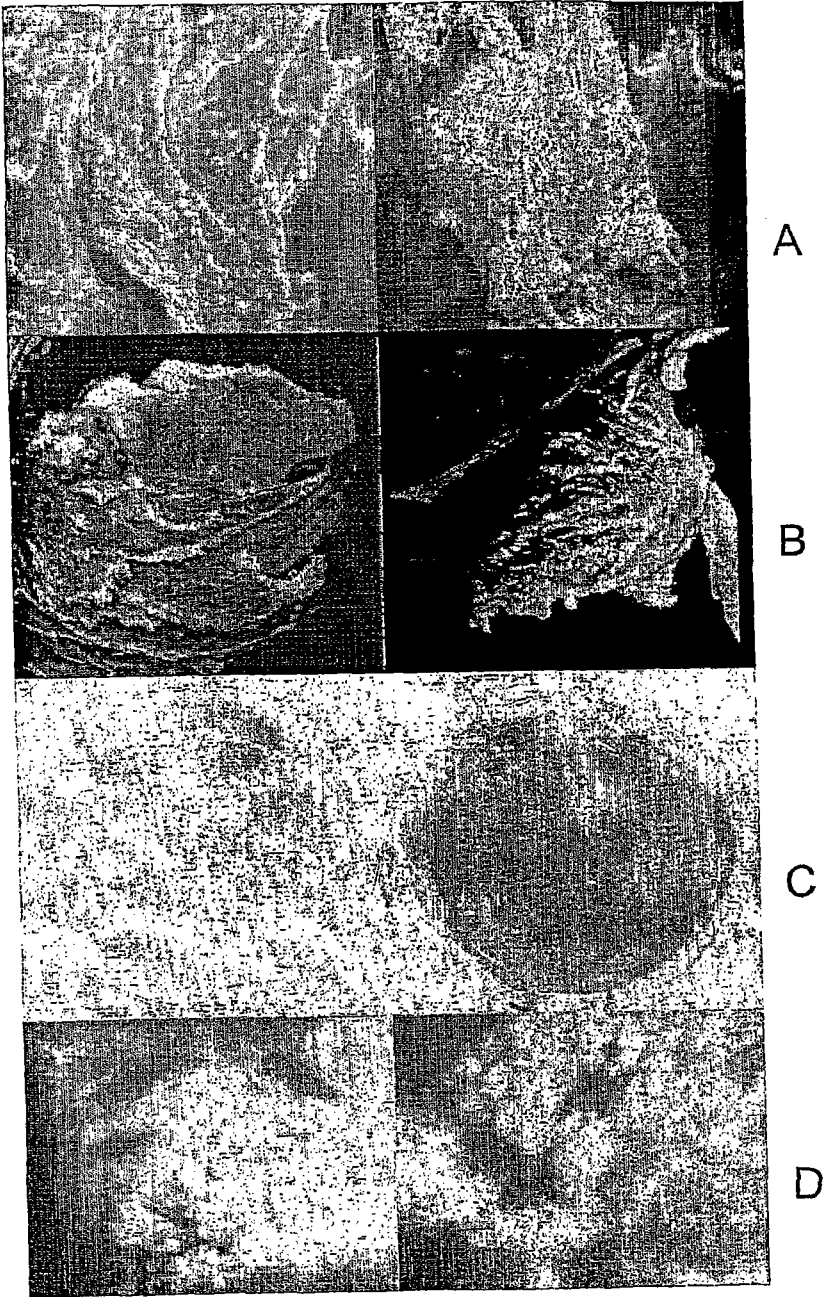


图 4

消化的来自脂肪级分的细胞聚集物

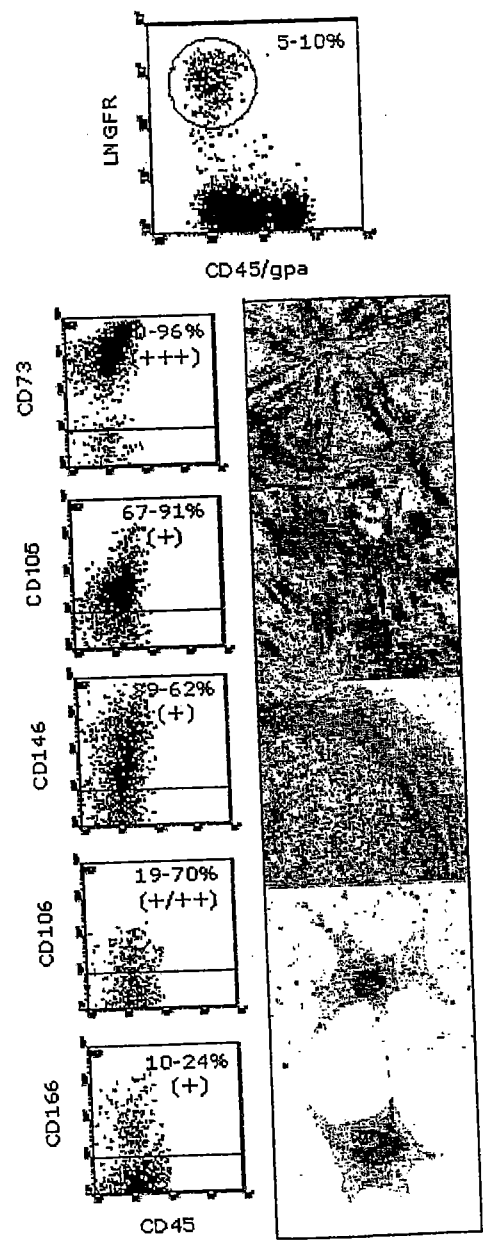


图 5

滑膜组织中的 D7-FIB⁺ LNGFR⁺ 细胞

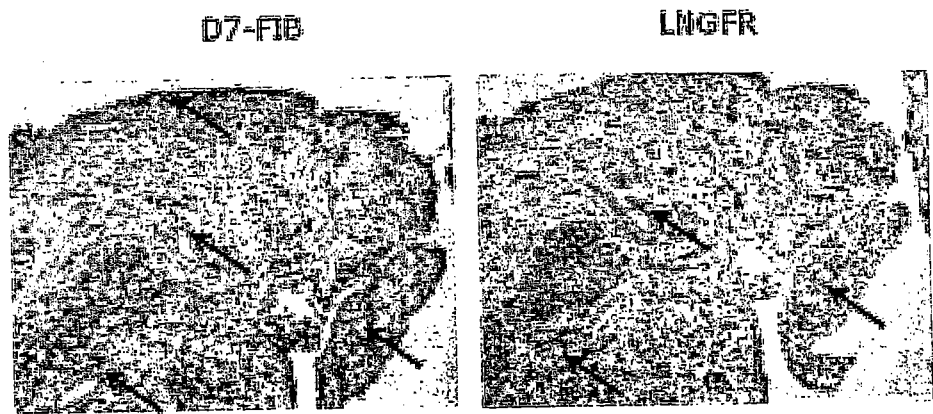


图 6

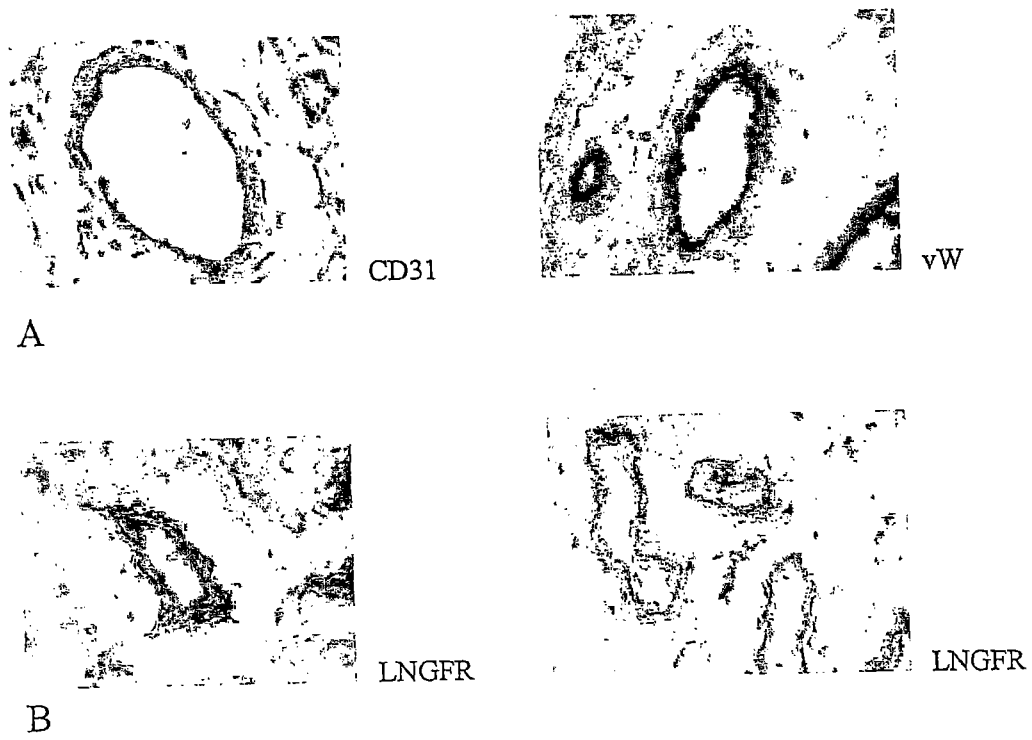
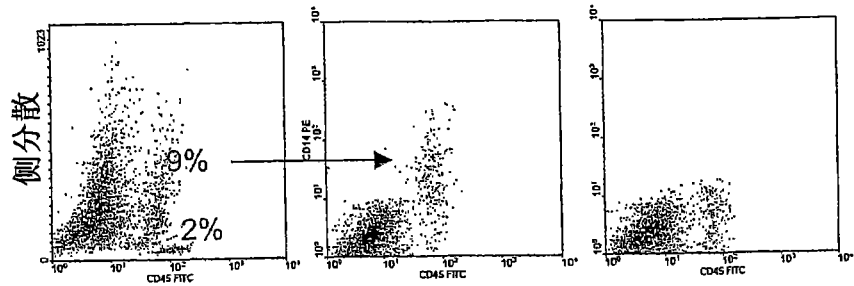
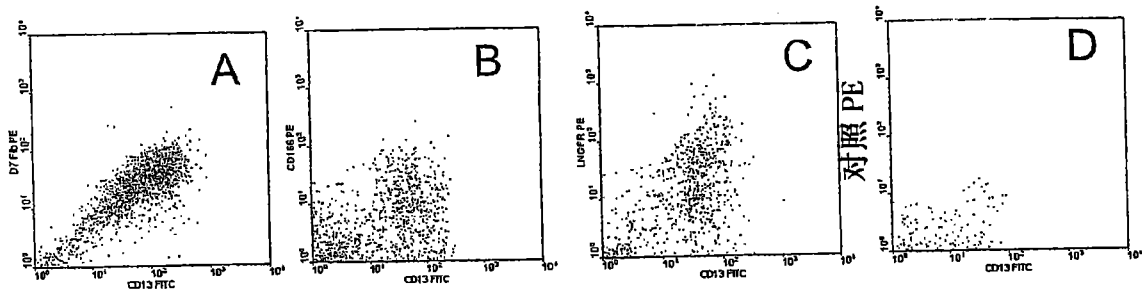


图 7

(i)



(ii)



(iii)

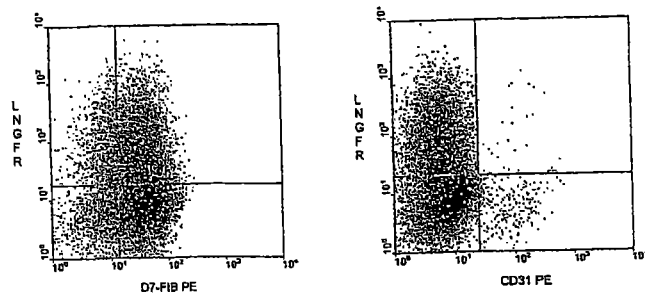


图 8

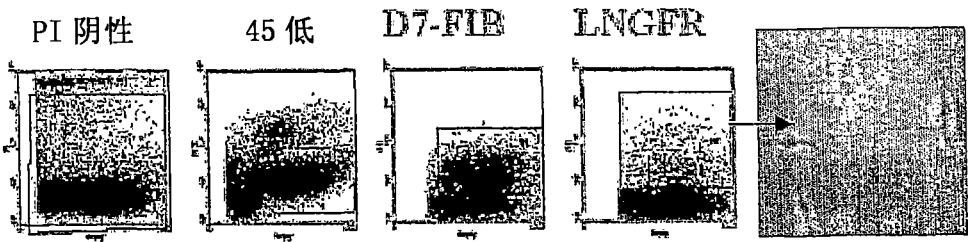


图 9

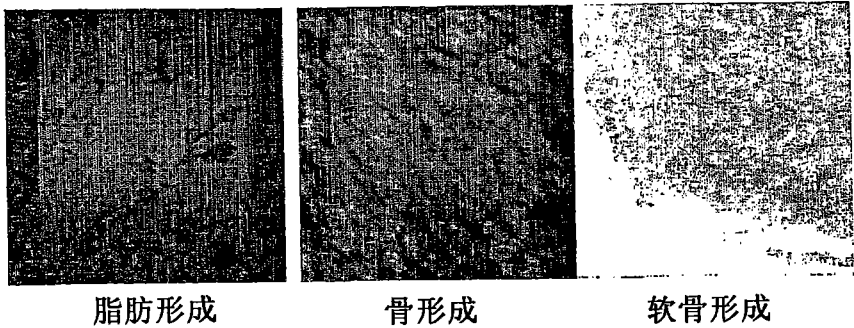


图 10

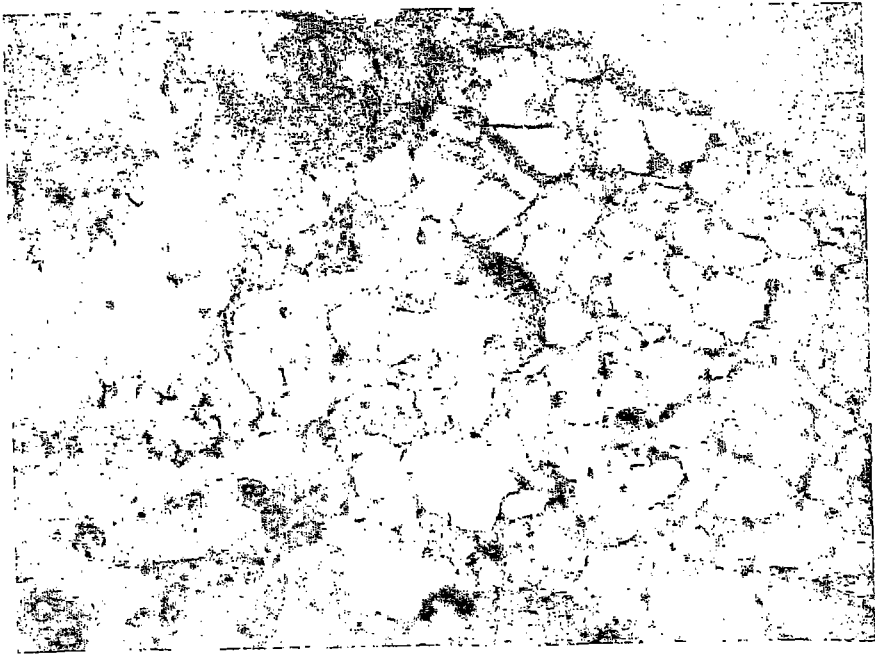


图 11

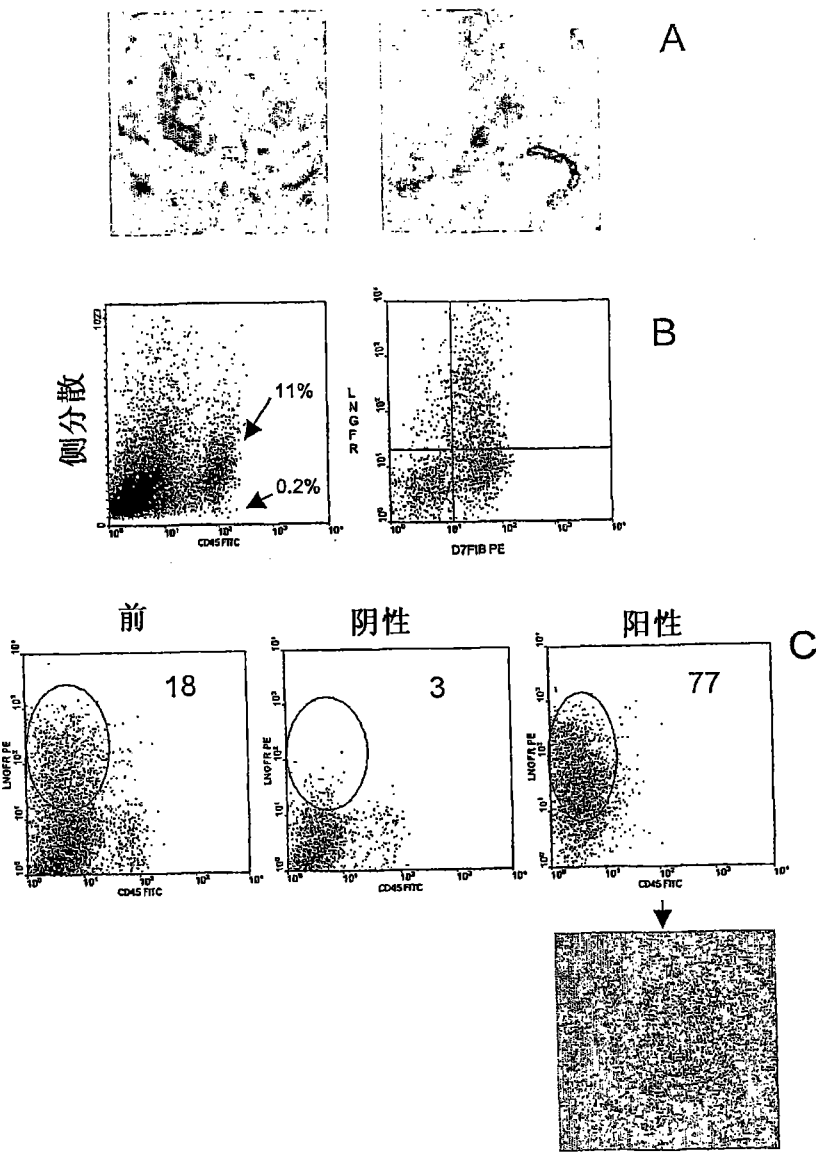


图 12