



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101945993 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 12

(21) 申请号 200980105172. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 09

C12N 5/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

08000458. 3 2008. 01. 11 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/050209 2009. 01. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02009/087213 EN 2009. 07. 16

(71) 申请人 骨治疗公司

地址 比利时戈斯利

(72) 发明人 辛迪·巴德 恩里科·巴斯蒂亚内利

泽维尔·佩塞斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 4 页

(54) 发明名称

使用生长因子组合的骨髓干细胞和间充质干
细胞之骨生成分化

(57) 摘要

本发明涉及人骨髓干细胞 (bone marrow stem cell, BMSC) 或间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 之骨生成分化的方法, 特别是使用人血浆或血清以及 FGF 和 TGFB 生长因子。本发明还提供了由此获得的细胞和细胞群, 以及包含它们的进一步产物及其在骨治疗中的用途。

1. 用于从成人骨髓干细胞 (BMSC) 或成人间充质干细胞 (MSC) 体外或离体获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞之细胞群的方法, 其包括将所述 BMSC 或 MSC 与人血浆或血清、成纤维细胞生长因子 (FGF) 或者其生物活性变体或衍生物、以及转化生长因子 β (TGFB) 或者其生物活性变体或衍生物相接触。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其包括以下步骤:

(a) 从包含 BMSC 或 MSC 的人对象生物样品回收细胞;

(b) 任选地, 从 (a) 中回收的细胞分离单个核细胞;

(c) 将 (a) 或 (b) 的细胞添加至包含人血浆或血清、FGF 或者其生物活性变体或衍生物、以及 TGFB 或者其生物活性变体或衍生物的培养基, 并培养该细胞-培养基混合物, 从而使细胞贴附至基底表面;

(d) 除去未贴附物, 并继续在 (c) 中所限定之培养基中培养贴附细胞, 从而获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞样细胞或者包含这些细胞的细胞群。

3. 根据权利要求 2 的方法, 其中在步骤 (c) 和 (d) 中培养所述细胞总共约 7 天至约 18 天。

4. 根据权利要求 2 或 3 中任一项的方法, 其还包括收集步骤 (d) 中获得的所述细胞或细胞群。

5. 根据权利要求 2 或 3 中任一项的方法, 其还包括步骤 (e), 传代并继续在 (c) 中所限定之培养基中培养来自步骤 (d) 的细胞或细胞群。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中在步骤 (e) 中培养所述细胞约 3 天至约 12 天。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项的方法, 其中所述 FGF 为 FGF-1、FGF-2 或 FGF-3。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项的方法, 其中所述 TGFB 为 TGFB-1、TGFB-2 或 TGFB-3。

9. 能通过权利要求 1 至 8 中任一项的方法获得的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的分离细胞群。

10. 人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群, 其特征在于所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞 (1) 包含 CD90、CD105、CD73、CD63、CD166、碱性磷酸酶 (ALP) 更具体地为骨-肝-肾型 ALP 的表达, (2) 不表达 CD45、CD14、CD19, 以及 (3) 少于 15% 的细胞表达 HLA-DR。

11. 根据权利要求 10 的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群, 其中所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞还包含骨钙蛋白 (OCN) 的表达。

12. 权利要求 9 至 11 中任一项定义的细胞或细胞群, 其用于治疗骨相关疾病。

13. 根据权利要求 12 的细胞或细胞群, 其中向同种异体对象施用所述细胞或细胞群。

14. 药物组合物, 其包含权利要求 9 至 11 中任一项定义的细胞或细胞群并适用于将所述细胞或细胞群施用在骨损伤部位处。

15. 装置, 其包含用于将组合物施用在骨损伤部位处的手术器械, 还包含权利要求 14 中定义的药物组合物, 其中所述装置适于将所述药物组合物施用在骨损伤部位处。

使用生长因子组合的骨髓干细胞和间充质干细胞之骨生成分化

技术领域

[0001] 本发明涉及骨髓干细胞 (bone marrow stem cell, BMSC) 和间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 的骨生成分化方法, 涉及可由所述方法获得的细胞和细胞群, 还涉及其用途特别是在骨治疗领域中的用途。

背景技术

[0002] 移植能够进行骨生成分化的干细胞或者定向于骨生成分化的细胞是治疗骨相关疾病 (特别是当所述治疗需要新骨产生时) 的有前景的途径。

[0003] 先前已使用骨髓干细胞 (BMSC) 和间充质干细胞 (MSC) 治疗骨疾病 (Gangji 等, 2005, Expert Opin Biol Ther 5:437-42)。然而, 尽管可以将这些相对未分化的干细胞进行移植, 但是它们并不定向分化为骨生成谱系, 因此这样移植的干细胞中有相当大的比例最终可能不会形成期望的骨组织。

[0004] 而且, 可从骨髓或其它来源组织获得的这些干细胞的量常常不能令人满意并且在多种环境下还可能减少, 例如由使用糖皮质激素或滥用酒精或遗传原因所致。

[0005] WO 2007/093431 公开了一种使分离的 BMSC 或 MSC 在体外充分扩增并获得已显示出成骨表型之细胞的方法。在所述方法中, 人 BMSC 或 MSC 在血清或血浆以及碱性成纤维细胞生长因子 (FGF) 存在下培养。WO 2007/093431 未教导使用特定的 FGF 和 TGF 生长因子组合用于获得成骨细胞并且未提示其任何优点。

[0006] 需要另外的简单可靠的方法用于从 BMSC 和 MSC 产生可用的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞。特别期望这些方法可实现更大程度的细胞扩增和 / 或产生具有额外有利性质的细胞, 例如在同种异体对象中导致较低组织排斥的细胞。

[0007] 本发明的一个目的是提供这样的方法以及由此获得的成骨细胞表型细胞。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明人发现, 当在血清或血浆、成纤维细胞生长因子 (FGF) 以及转化生长因子 β (TGFB) 存在下进行培养时, 成体干细胞 (更具体地, 骨髓干细胞 (BMSC) 和间充质干细胞 (MSC)) 的扩增潜力可在骨生成分化后大大增加, 由此可实现可用的骨原细胞或成骨细胞表型细胞及细胞群的数量增加。

[0010] 因此, 在一方面中, 本发明提供了用于从人骨髓干细胞 (BMSC) 或人间充质干细胞 (MSC) 体外或离体获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞的方法, 包括使所述 BMSC 或 MSC 与人血浆或血清、成纤维细胞生长因子 (FGF) 或者其生物活性变体或衍生物、以及转化生长因子 β (TGFB) 或者其生物活性变体或衍生物相接触。

[0011] 本发明的方法可以将显著部分 (例如大多数) 的经处理干细胞向骨原细胞或成骨细胞表型分化。因此, 在一个方面中, 本发明的方法可用于获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞本身。

[0012] 然而, 应当理解, 本发明的方法通常可产生骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细

胞占显著部分（例如大多数）的细胞群。这样的细胞群任选地可包含其它细胞类型。

[0013] 因此，在一方面中，本发明涉及用于从人 BMSC 或人 MSC 体外或离体获得包含骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞之细胞群的方法，包括使所述 BMSC 或 MSC 与人血浆或血清、FGF 或者其生物活性变体或衍生物、以及 TGFβ 或者其生物活性变体或衍生物相接触。

[0014] 本发明方法允许产生用于移植目的的大量骨生成细胞。这使得进一步减少了为获得初始 BMSC 或 MSC 细胞而需要从对象取出的组织的量。其还允许从对象中获得具有减少的 BMSC 或 MSC 细胞数的足够量的骨生成细胞。同时，所述方法使得缩短了经分化细胞可移植进患者的时间，因此导致治疗更快捷。

[0015] 在一个实施方案中，本发明的上述方法可包括以下步骤：

[0016] (a) 从包含 BMSC 或 MSC 的人对象生物样品中回收细胞；

[0017] (b) 任选地，从 (a) 中回收的细胞分离单个核细胞；

[0018] (c) 将 (a) 或 (b) 的细胞添加至包含人血浆或血清、FGF 或者其生物活性变体或衍生物以及 TGFβ 或者其生物活性变体或衍生物的培养基，并培养该细胞 - 培养基混合物，从而使细胞贴附至基底表面；

[0019] (d) 除去未贴附物，并继续在 (c) 中所限定之培养基中培养贴附细胞，从而获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞样细胞，或者包含这些细胞的细胞群。

[0020] 在上述任一方法的一个实施方案中，可将 BMSC 或 MSC 细胞同时暴露于 FGF 和 TGFβ，或者暴露于其生物活性变体或衍生物。

[0021] 在上述任一方法的另一些实施方案中，所述人血浆或血清可以与所述 BMSC 或 MSC 细胞是自体的，或者其可以与所述 BMSC 或 MSC 细胞是同种异体的（同源的）。

[0022] 在上述任一方法的另一些实施方案中，在所述 BMSC 或 MSC 细胞的培养中不使用非人动物材料（例如，血清组分）。这降低了培养细胞在人体中异种排斥的风险，以及降低了病原体污染患者的风险。

[0023] 上述方法的另一些优选实施方案还涉及例如但不限于孵育时间、传代、组分量等的特征，这些特征单独地或组合起来还构成提供本发明之细胞和细胞群的基础。

[0024] 本发明人还出人意料地发现，使用本发明方法获得的成骨细胞表型细胞中 HLA-DR 主要组织相容性复合体的表达比使用 WO 2007/093431 之方法观察到的 HLA-DR 表达显著更低。这样更低的 HLA-DR 表达可增强本发明获得之成骨细胞表型细胞的免疫豁免特性 (immunoprivileged character)，从而降低这些细胞的排斥风险并使其还能更广泛地用于同种异体患者中。

[0025] 因此，本发明还提供了与现有技术相比表现出新的有利特性的成骨细胞表型细胞。因而，本发明的一些方面提供了通过本发明方法可获得或直接获得的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞以及包含这些细胞的细胞群。

[0026] 本发明人还对本发明得到的成骨细胞进行了分析，定义了包含这些细胞的新细胞类型和细胞群，其可为治疗（特别是骨移植治疗）提供特别的优越性。

[0027] 因此，在一方面中，本发明提供了具有如下特征的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞以及包含这些细胞的细胞群，所述细胞 (1) 包含 CD90、CD105、CD73、CD63、CD166 和碱性磷酸酶 (ALP)（更具体地为骨 - 肝 - 肾型 ALP）的表达，(2) 不表达 CD45、CD14、CD19，以及 (3) 少于 25% 的细胞、优选地少于 20% 的细胞以及更优选地少于 15% 的细胞（例如少

于 10% 的细胞或少于 7% 的细胞) 表达 HLA-DR (即, 相当大比例的细胞不表达 HLA-DR)。

[0028] 如上提及, 本发明还涉及包含本文所定义之骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞的细胞群。示例性的细胞群可包含至少 10%、优选地至少 30%、更优选地至少 50% (例如至少 60%)、更优选地至少 70% (例如至少 80%)、甚至更优选地至少 90% (例如至少 95%) 的如本文所定义的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞。例如, 所述细胞群可包含少于 50%、优选地少于 40%、更优选地少于 30%、更优选地少于 20% 以及更优选地少于 10% (例如少于 7%、少于 5% 或少于 2%) 的除本文所定义之骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞之外的其它细胞类型。

[0029] 如本发明所教导地, 相关方面涉及骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群在骨相关疾病中的治疗性用途以及包含所述细胞或细胞群的相应药物制剂。

[0030] 本发明的这些及其它特征在下文和所附权利要求中进一步得到解释, 并通过非限制性的实例进行说明。

附图说明

[0031] 图 1 显示在含有血浆和 10ng/ml TGF β -1 或者含有血浆和 10ng/ml FGF2 及 10ng/ml TGF β -1 (n = 4) 的培养基中得到的成骨细胞原代培养物的箱线图比较。

[0032] 图 2 显示在补充有或未补充 10ng/ml TGF β -1 的培养基中得到的成骨细胞培养物之比较。(A) 原代培养物, (B) 继代培养物, (C) 全体。

[0033] 图 3 显示在 (A) 仅 FGF2 或 (B) FGF2 及 TGF β -1 存在下所培养细胞的矿化情况, 其通过基质茜素红 (alizarin red) 染色来测定。

[0034] 图 4 示意在 TGF β -1/FGF2 中培养的细胞对经 PHA 刺激之 PBMC 的免疫抑制作用。

[0035] 发明详述

[0036] 本文使用的无数量词修饰形式包括单数和复数含义, 除非上下文另有指明。例如, “细胞”是指一种 (个) 或多种 (个) 细胞。

[0037] 本文所用的术语“包含”与“包括”或“含有”是 synonym, 并且为开放式的, 不排除另外的未记述之成员、要件或方法步骤。

[0038] 由端点记载的数值范围包括该范围内涵盖的所有数字和分数以及所述端点。

[0039] 当涉及可测量值例如参数、数量、持续时间等时, 本文所用的术语“约”, 意在包括从指定值变化 $\pm 10\%$ 或更少、优选地 $\pm 5\%$ 或更少、更优选地 $\pm 1\%$ 或更少以及更优选地 $\pm 0.1\%$ 或更少, 在该变化范围内适于进行本发明公开内容。应理解, 修饰词“约”所指的值本身也是具体且优选公开的值。

[0040] 本说明书中引用的所有文献均通过引用以整体并入本文中。特别地, 本文中具体指出的所有文献之教导通过引用并入本文中。

[0041] 除非另有定义, 本发明公开使用的所有术语 (包括技术和科学术语) 具有本发明所属领域普通技术人员常规理解的含义。

[0042] 1. 发明方法

[0043] 如概述部分中所详述地, 在一方面中, 本发明涉及用于从人骨髓干细胞体外或离体获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞的方法, 以及用于从人骨髓干细胞体外或

离体获得包含骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞的细胞群的方法。

[0044] 如本文所用地,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞一般包括可有助于形成骨材料或骨基质的细胞或者能够发育成可有助于形成骨材料或骨基质之细胞的细胞。特别地,本发明的方法得到可用于在治疗背景下恢复骨形成的细胞和细胞群,如本发明人通过实验所证实地。因此,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞应理解为希望涵盖由本发明方法得到的任何可如此应用的骨生成谱系细胞。

[0045] 骨髓是占据长骨髓腔、某些哈弗管以及松质骨 (cancellous bone) 或海绵骨 (spongy bone) 之骨小梁之间空间的软组织。该术语特别地但非限制性地涵盖红骨髓 (其发现于幼年的所有骨中和成年的有限位置 (例如在海绵骨中) 中) 以及黄骨髓。

[0046] 总的来说,骨髓是包含造血干细胞、红细胞和白细胞及其前体、间充质干细胞 (MSC)、间质细胞 (stromal cell) 及其前体以及包括成纤维细胞、网织红细胞、脂肪细胞在内的一组细胞和形成结缔组织网络 (称为“间质 (stroma)”) 之细胞等的复杂组织。

[0047] 在小鼠和中进行全身移植后,骨髓细胞有助于形成多种不同的组织。这种能力可反映出骨髓中存在多种干细胞 (例如,造血干细胞、间充质干细胞和 / 或骨髓多能干细胞) 的活性。

[0048] 因此,本文使用的术语“骨髓干细胞”或“BMSC”是指存在于骨髓中的任何成体干细胞,以及特别地存在于或 (部分地) 分离自骨髓样品的任何成体干细胞。骨髓 (BMSC) 样品可从例如对象的髌嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或另一些髓质空间获得。术语 BMSC 还包括 BMSC 的后代,例如从对象之样品获得的 BMSC 经体外或离体增殖而得到的 BMSC 后代。

[0049] 涉及特定组分时,术语“分离”表示将该组分与待分离该组分之组合物中至少一种另外组分相分离。本文使用的与任意细胞群有关的“分离的”也暗指这些细胞群不形成动物体或人体的一部分。

[0050] 术语“干细胞”一般是指未特化或相对低特化并且能增殖的细胞,其能够自我更新,即可进行增殖但不分化,并且其或其后代可产生至少一种相对更特化的细胞类型。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亲本干细胞的未特化或相对低特化的表型、分化潜力和增殖能力) 以及显示出有限自我更新的干细胞 (即,与亲本细胞相比,其中后代或其一部分的进一步增殖和 / 或分化的能力可被证明降低)。例如但非限制性地,干细胞可产生可沿一个或多个谱系分化以产生逐渐相对更特化之细胞的后代,其中这些后代和 / 或逐渐相对更特化的细胞本身可以为本文所定义的干细胞,或者产生终末分化的细胞 (即,完全特化的细胞,其可以是终末分化的 (post-mitotic))。

[0051] 本文使用的术语“成体干细胞”是指存在于或获得自 (例如,分离自) 胎儿期或出生后之生物体的干细胞。

[0052] 根据本发明,优选的骨髓干细胞具有产生至少骨生成 (骨) 谱系之细胞 (例如骨生成细胞和 / 或骨原细胞和 / 或前成骨细胞和 / 或成骨细胞和 / 或骨细胞等) 的潜力。

[0053] 优选地,本发明的至少某些骨髓干细胞还可具有产生包含在本发明方法所得细胞群中的另一些细胞 (例如内皮谱系的细胞,例如内皮祖细胞和 / 或内皮细胞) 的潜能。

[0054] 例如但非限制性地,具有产生至少骨生成谱系细胞之潜力的 BMSC 类型为间充质干细胞。本文使用的术语“间充质干细胞”或“MSC”是指中胚层来源的成体干细胞,其能够

产生间充质谱系（通常为两种或更多种间充质谱系，例如骨细胞谱系（骨）、软骨细胞谱系（软骨）、肌细胞谱系（肌肉）、腱细胞谱系（腱）、成纤维细胞谱系（结缔组织）、脂肪细胞谱系（脂肪）和间质生成谱系（骨髓间质））的细胞。MSC 可分离自例如骨髓、血液、脐带、胎盘、胎儿卵黄囊、皮肤（真皮）（特别是胎儿和青少年的皮肤）、骨膜和脂肪组织。人 MSC、其分离、体外扩增以及分化已经描述在例如美国专利 No. 5, 486, 359、美国专利 No. 5, 811, 094、美国专利 No. 5, 736, 396、美国专利 No. 5, 837, 539 或美国专利 No. 5, 827, 740 中。本领域中描述的任何 MSC 以及通过本领域所述任意方法分离的任何 MSC 均适用于本发明，只要这些 MSC 能够产生至少骨细胞（骨）谱系的细胞即可。

[0055] 术语“MSC”还涵盖了 MSC 的后代，例如，从动物或人对象的生物样品获得的 MSC 经体外或离体增殖而得到的后代。

[0056] 可能但非限定地，至少某些 MSC 还可以能够产生包含在本发明方法所得细胞群中的另一些细胞。

[0057] 如实施例所示，本发明的方法涉及选择在特定培养条件下贴附于基底表面的 BMSC 细胞。本领域已知，可以通过选择可贴附于基底表面（例如，塑料表面）的（单个核）细胞来从骨髓（或其它来源）分离 MSC。因此，不受任何假设的限制，本发明人推测在本方法中 MSC 可至少部分地有助于从 BMSC 获得成骨细胞或成骨细胞表型细胞。

[0058] 因此，在一方面中，本发明还涉及用于从人间充质干细胞（MSC）体外或离体获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞的方法，包括使所述 MSC 细胞与人血浆或血清、FGF 或其生物活性变体或衍生物以及 TGFβ 或其生物活性变体或衍生物接触。

[0059] MSC 可包含在生物样品中（例如，在包含 BMSC 样品中），或者可至少部分地从其分离，如本领域已知地。而且，MSC 可至少部分地分离自骨髓或者分离自除骨髓以外的包含 MSC 之任何合适来源，例如血液、脐带、胎盘、胎儿卵黄囊、皮肤（真皮）（特别是胎儿和青少年的皮肤）、骨膜和脂肪组织。

[0060] BMSC 细胞旨在涵盖其任意或所有亚型，例如但不限于“快速自我更新细胞”RS-1 或 RS-2（如 Colter 等，2000 (PNAS 97(7) :3213-8) 中所述）、“侧群细胞”（side population, SP）（如 Goodell 等，1997 (Nat Med 3(12) :1337-45 中所述）、骨生成前体（osteogenic precursor, OP）细胞（其最初由于其低密度（例如通过密度梯度离心来实现）、不贴附性质和低水平表达骨生成标志物而被鉴定出来，如 Long 等，1995. J Clin Invest. 95(2) :881-7 和美国 5, 972, 703 中所述）、原始的前体细胞（其可以产生造血和非造血谱系的细胞，如 Krause 等，2001 (Cell 105 :369-377) 和 Dominici 等，2004 (PNAS 101(32) :11761-6) 中所述）等。

[0061] 应理解，鉴于骨髓干细胞群的复杂性，本发明不应被限制于一种或多种特定的 BMSC 类型。相反，在本发明的方法中，一种或多种 BMSC 细胞类型（例如，如上所述的细胞类型）可有助于（可能以不同的程度）获得骨原细胞、成骨细胞和成骨细胞表型细胞，或者有助于获得包含上述细胞的细胞群。另一方面，应当理解，本发明的方法还可利用特定的 BMSC 群，例如，至少部分地分离自其它 BMSC 群的 MSC。

[0062] 术语“体外”一般表示在动物体或人体的外面或外部。术语“离体”通常是指组织或细胞从动物体或人体取出并在机体外（例如，在培养容器中）维持或增殖。本文使用的术语“体外”应当理解为包括“离体”。

[0063] 在一个实施方案中, BMSC 或 MSC 从对象的生物样品中获得。

[0064] 本文使用的术语“对象”是指动物, 更特别地是指非人哺乳动物和人。非人动物对象还可包括动物的出生前形式, 例如胚胎或胎儿。人对象也可包括胎儿, 但优选不包括胚胎。人对象是优选的。

[0065] 本文使用的术语“生物样品”或“样品”一般是指从生物来源获得的样品, 例如从生物体、器官、组织或细胞培养物等获得的样品。动物或人对象的生物样品是指从动物或人对象取出并包含其细胞的样品。动物或人对象的生物样品可包括一种或多种组织类型以及一种或多种组织类型的细胞。获得动物或人对象之生物样品的方法是本领域公知的, 例如组织活检或取血。

[0066] 对象的可用生物样品包括其 BMSC 或 MSC。这些样品通常可从骨髓获得, 例如从对象的髌嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或其它髓质空间获得。另外的包含 MSC 的可用生物样品例如可以源自对象的血液、脐带、胎盘、胎儿卵黄囊、皮肤(真皮)(特别是胎儿和青少年的皮肤)、骨膜或脂肪组织。

[0067] 在一个实施方案中, BMSC 或 MSC 可从健康对象获得, 这可有助于确保从所述 BMSC 或 MSC 获得之成骨细胞或成骨细胞表型细胞的功能性。

[0068] 在另一实施方案中, BMSC 或 MSC 可从如下对象中获得, 所述对象具有骨相关疾病的风险或患有骨相关疾病, 并且可因而特别地受益于施用根据本发明方法从所述 BMSC 或 MSC 获得的成骨细胞或成骨细胞表型细胞。

[0069] 本文使用的术语“骨相关疾病”是指任何类型的骨疾病, 对其的治疗可受益于向患有该疾病之对象施用骨生成谱系细胞(例如骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞)。特别地, 这些疾病可表征为例如: 骨形成降低或过度的骨吸收, 骨中存在的成骨细胞或骨细胞的数目、生存力或功能降低, 对象中的骨量降低, 骨薄, 骨强度或骨弹性降低等。

[0070] 例如而非限制性地, 可受益于施用本发明之成骨细胞或成骨细胞表型细胞的骨相关疾病可包括局部或全身性的疾病, 例如任意类型的骨质疏松或骨质减少(例如原发的、绝经后的、老年性的、肾上腺皮质激素诱发的、任何继发的、单部位或多部位的骨坏死)、任意类型的骨折(例如不愈合的、不良愈合的、延迟愈合的骨折或压迫性骨折)、需要骨融合的情况(例如, 脊柱融合以及重建、颌面骨折、骨重建(例如, 在外伤性损伤或癌症手术后的骨重建)、颅面骨重建)、成骨不全、溶骨性骨癌、佩吉特病(Paget's Disease)、内分泌疾病、低磷酸血症、低钙血症、肾性骨营养不良、骨软化、无力性骨疾病、类风湿性关节炎、甲状旁腺功能亢进、原发性甲状旁腺功能亢进、继发性甲状旁腺功能亢进、牙周病、Gorham-Stout 病和麦-阿综合征(McCune-Albright syndrome)。

[0071] 在本发明的方法中, 将 BMSC 或 MSC 与人血浆或血清、FGF 或者其生物活性变体或衍生物以及 TGFβ 或者其生物活性变体或衍生物相接触。

[0072] 本文使用的术语“接触”意指将一种或多种分子、组分或材料与另一分子、组分或材料直接地或间接地拉拢在一起, 从而促进它们之间的相互作用。通常, 可通过将生长因子或者其生物活性变体或衍生物以及入血浆或血清包含在培养 BMSC 的培养基中, 从而使它们与所述 BMSC 相接触。

[0073] 本领域技术人员应理解, 人血浆和血清是复杂的生物组合物, 其可包含一种或多种生长因子、细胞因子或激素。因此, 还提供了除外源加入或补充到血浆或血清中以外的所

述生长因子 FGF 和 TGFB 或者它们各自的生物活性变体或衍生物。

[0074] 在另一实施方案中,除了 FGF 和 TGFB 以外,BMSC 或 MSC 还可以与一种或多种外源加入的其它生长因子(除 FGF 和 TGFB 以外)相接触。本文使用的术语“生长因子”是指这样的生物活性物质,其影响不同细胞类型的增殖、生长、分化、存活和/或迁移并且可影响生物体的发育变化、形态变化和功能变化,其单独地或被其它物质调节而起作用。生长因子通常可作为配体通过与细胞中存在的响应于该生长因子的受体(例如,表面或细胞内受体)结合来起作用。特别地,本文中的生长因子可以是包含一个或多个多肽链的蛋白质实体。

[0075] 在一个优选实施方案中,本发明方法中使用的任何一种或多种或所有生长因子(泛指本文使用的生长因子,特别地涵盖 FGF 和 TGFB 生长因子以及任选地一种或多种另外的生长因子)均为人生长因子。本文使用的术语“人生长因子”是指与天然的人生长因子基本上相同的生长因子。例如,当所述生长因子是蛋白质实体时,其组成肽或多肽可具有与天然的人生长因子一致的一级氨基酸序列。在本发明方法中使用人生长因子是优选的,由此预计生长因子对人的细胞功能具有期望的作用。

[0076] 术语“天然的”用于描述可在自然界中发现的物体或实体,其与人工制备的有实质性区别。例如,生物体中存在的多肽序列(其可从天然来源中分离并且未在实验室中进行人为修饰)是天然的。当涉及特定实体(例如,多肽或蛋白质)时,该术语涵盖天然存在的其所有形式和变体,例如由于物种间和个体间的正常变异导致的形式和变体。例如,当涉及蛋白质生长因子时,术语“天然的”涵盖这样的生长因子,其在其组成肽或多肽的一级序列中具有由于物种间的遗传趋异和个体间的正常等位基因变异所导致的差异。

[0077] 本文使用的术语“FGF”涵盖成纤维细胞生长因子(FGF)家族之生长因子的任何及所有成员。特别地,本发明方法中使用的 FGF 可选自 FGF-1、FGF-2 和 FGF-3,更优选地其为 FGF-2。

[0078] 酸性成纤维细胞生长因子(FGF-1)也常称为“肝素结合生长因子 1(HBGF-1)”、“aFGF”、“ β -内皮细胞生长因子”或“ECGF- β ”。示例性的人 FGF-1 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot(<http://www.expasy.org/>) 登记号 P05230 所示之一级氨基酸序列的 FGF-1。本领域技术人员应理解,所述序列是前体 FGF-1 的序列并可包含成熟 FGF-1 经加工除去的部分。示例性的人 FGF-1 也描述于 Jaye 等,1986(Science 233:541-545) 和 Harper 等,1986(Biochemistry 25:4097-4103) 等中。

[0079] 碱性成纤维细胞生长因子也常称为“FGF-b”、“FGF-2”、“BFGF”、“HBGF-2”、“prostatropin”和“肝素结合生长因子 2 前体(HBGF-2)”。示例性的人 FGF-2 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot 登记号 P09038 所示之一级氨基酸序列的 FGF-2。本领域技术人员可以理解,所述序列是前体 FGF-2 的序列并可包含成熟 FGF-2 经加工除去的部分。示例性的人 FGF-2 已描述于 Abraham 等,1986(EMBO J 5:2523-8) 和 Kurokawa 等,1987(FEBS Lett 213:189-94) 等中。

[0080] 成纤维细胞生长因子 3(FGF-3)也常称为“INT-2 原癌基因蛋白”或“HBGF-3”。示例性的人 FGF-3 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot 登记号 P11487 所示之一级氨基酸序列的 FGF-3。本领域技术人员可以理解,所述序列是前体 FGF-3 的序列并可包含成熟 FGF-3 经加工除去的部分。示例性的人 FGF-3 已描述于 Brooks 等,1989(Oncogene 4:

429-436) 等中。

[0081] 本文使用的术语“TGF β ”或“TGFB”涵盖转化生长因子 β (TGFB) 家族之生长因子的任何及所有成员。特别地,本发明方法中使用的 TGFB 可选自 TGFB-1、TGFB-2 和 TGFB-3,更优选地其为 TGFB-1。

[0082] 转化生长因子 β -1 也称为“TGFB-1”和“TGF- β -1”。示例性的人 TGFB-1 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot 登记号 P01137 所示之一级氨基酸序列的 TGFB-1。本领域技术人员可以理解,所述序列是前体 TGFB-1 的序列并可包含成熟 TGFB-1 经加工除去的部分。示例性的人 TGFB-1 已描述于 Derynck 等,1985(Nature 316:701-5) 等中。

[0083] 转化生长因子 β -2 也称为“TGFB-2”、“源自成胶质细胞瘤的 T 细胞抑制因子”、“G-TSF”、“BSC-1 细胞生长抑制剂”、“polyergin”或“cetermin”。示例性的人 TGFB-2 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot 登记号 P61812 所示之一级氨基酸序列的 TGFB-2。本领域技术人员可以理解,所述序列是前体 TGFB-2 的序列并可包含成熟 TGFB-2 经加工除去的部分。示例性的人 TGFB-2 已描述于 Webb 等,1988(DNA 7:493-497) 等中。

[0084] 转化生长因子 β -3 也称为“TGFB-3”。示例性的人 TGFB-3 包括但不限于具有如 Uniprot/Swissprot 登记号 P10600 所示之一级氨基酸序列的 TGFB-3。本领域技术人员可以理解,所述序列是前体 TGFB-3 的序列并可包含成熟 TGFB-3 经加工除去的部分。示例性的人 TGFB-3 已描述于 Dijke 等,1988(PNAS 85:4715-4719) 和 Derynck 等,1988(EMBO J 7:3737-3743) 等中。

[0085] 本发明的方法可利用任何一种或多种或所有生长因子的生物活性变体或衍生物。在本发明的方法中,当其它条件基本上一致时,生长因子的“生物活性”变体或衍生物至少与该生长因子实现大致一样的从 BMSC 获得成骨细胞或成骨细胞表型细胞的能力。

[0086] 当生长因子通过结合其相关受体来行使其作用时,所述生长因子的生物活性变体或衍生物可显示出结合该相关受体的亲和力和/或特异性,其至少约与所述生长因子结合该受体的亲和力和/或特异性一样高。例如,所述生物活性变体或衍生物可具有如下的结合相关受体的亲和力和/或特异性,其为各自生长因子结合该受体之亲和力和/或特异性的至少 80% (例如至少 85%),优选地至少 90% (例如至少 90%) 或 100% 或更高。

[0087] 当给定生长因子的活性可通过已有测定(例如体外或细胞测定(例如测量细胞培养物中的促有丝分裂活性))容易地测量时,所述生长因子的生物活性变体或衍生物可在这些测定中显示活性,其至少约与该生长因子的活性一样高。例如,所述生物活性变体或衍生物可显示出如下的活性,其为各自生长因子之活性的至少 80% (例如,至少 85%),优选地至少 90% (例如,至少 90%) 或 100% 或更高。

[0088] 多肽的“变体”具有与该多肽之氨基酸序列基本上一致(即,很大程度上而非完全一致)的氨基酸序列。本文中,“基本上一致”是指至少 85% 一致,至少 90% 一致,优选地至少 95% 一致,例如至少 99% 一致。序列差异可通过插入(添加)、缺失和/或替换一个或多个氨基酸而得到。

[0089] 两个多肽之间的序列一致性可通过最优比对(两个蛋白质序列之间的最优比对是使配对得分的总和尽可能大并使引入空位的罚分尽可能少的比对;并且可优选地通过计算机化执行的算法来进行,例如使用 Needleman 和 Wunsch 1970 算法(J Mol Biol 48:443-453)的“Gap”、或使用 Smith 和 Waterman 1981 算法(J Mol Biol 147:195-197)的

“Bestfit”,它们可以在例如 Accelrys 的 GCG™ v. 11. 1. 2 软件包中获得) 所述多肽的氨基酸序列、并对在比对中所述多肽包含相同氨基酸残基的位置数(一方面)和在比对中所述两个多肽序列不同的位置数(另一方面)进行打分来确定。当所述多肽在某一位置包含不同的氨基酸残基时(氨基酸替换)或者当所述多肽之一在该位置包含氨基酸残基而另一多肽不包含氨基酸(反之亦然)时(氨基酸插入或缺失),这两个多肽在比对中在该位置的序列不同。序列一致性被计算为:比对中多肽包含相同氨基酸残基的位置与比对中位置总数相比的比例(百分数)。用于进行序列对比和确定序列一致性的另一些合适算法包括基于最初由 Altschul 等,1990(J Mol Biol 215 :403-10)描述的基本局部比对检索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)的算法,例如由 Tatusova 和 Madden 1999(FEMS Microbiol Lett 174 :247-250)描述的“Blast 2 sequences”算法。

[0090] 变体的氨基酸序列和与该变体基本一致之各多肽的氨基酸序列之间的至少一些差异可包括氨基酸替换。优选地,所述差异的至少 85%(例如,至少 90%)、更优选地至少 95%(例如,100%)可以为氨基酸替换。优选地,所述氨基酸替换可以是保守性的。本文使用的术语“保守性替换”表示一个氨基酸残基被生物学上相似的另一氨基酸残基所替代。保守性替换的非限制性实例包括疏水氨基酸残基(例如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)之间相互替换,或者极性残基之间相互替换(例如,精氨酸和赖氨酸之间,谷氨酸和天冬氨酸之间,或谷氨酰胺和天冬酰胺之间),等等。

[0091] 本文使用的多肽之“变体”还特别地包括与所述多肽具有一定程度之相似性的多肽。优选地,这样的变体可以为至少 90%相似,例如优选地至少 91%相似,例如至少 92%相似、93%相似,更优选地至少 94%相似,例如 95%相似,更优选地至少 96%相似,例如至少 97%相似,更优选地至少 98%相似,例如至少 99%相似。

[0092] 两个多肽之间的序列相似性可如下确定:最优比对(见上文)所述多肽的氨基酸序列并对(一方面)比对中所述多肽包含相同或相似(即,保守性替换)氨基酸残基的位置数以及(另一方面)比对中所述两个多肽序列不同的位置数进行比对。当多肽在给定位置包含非保守性氨基酸残基时,或者当多肽之一在给定位置包含氨基酸残基而另一多肽在该位置不含氨基酸残基(反之亦然)时(氨基酸插入或缺失)时,两个多肽在所述位置的序列不同。序列相似性计算为:比对中多肽包含相同或相似氨基酸残基的位置与比对中位置总数相比的比例(百分数)。

[0093] 变体生长因子可包括一种或多种肽或多肽,其中至少一种是如上定义的生长因子之各组成肽或多肽的变体。

[0094] 多肽的“衍生物”可通过化学方式改变一个或多个氨基酸残基和/或在一个或多个氨基酸残基位置添加一个或多个实体而衍生化,例如,通过糖基化、磷酸化、酰基化、乙酰化、硫化、脂化、烷基化等。通常,衍生多肽中少于 50%(例如,少于 40%)、优选地少于 30%(例如,少于 20%)、更优选地少于 15%(例如,少于 10%或少于 5%,例如少于 4%、3%、2%或 1%)的氨基酸可这样进行衍生化。衍生蛋白质生长因子可包括一种或多种肽或多肽,其中至少一种可以在至少一个氨基酸残基上进行衍生化。

[0095] 在一个优选的实施方案中,所述生长因子或者其生物活性变体或衍生物可以是重组的,即由宿主生物通过表达重组核酸分子而产生,所述重组核酸分子已被引入该宿主生物(例如,细菌诸如但不限于大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、粘质沙雷

氏菌 (*Serratia marcescens*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); 酵母诸如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*); 栽培植物细胞诸如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和烟草 (*Nicotiana tobaccum*) 细胞等; 动物细胞诸如哺乳动物和昆虫细胞; 或多细胞生物诸如植物或动物) 或其祖先中并且其包含编码所述多肽的序列。使用重组表达的生长因子或者其生物活性变体或衍生物降低病原体传播的风险。重组产生 TGF β -1 已描述于 Bourdrel 等, 1993 (Protein Expr Purif 4:130-40) 等中。重组生长因子也常常是市售的 (例如, 从 Sigma, Biological Industries, R & D Systems, Peprotech 等)。

[0096] 术语“血浆”如常规定义。血浆通常从提供了抗凝剂 (例如, 肝素、柠檬酸盐、草酸盐或 EDTA) 或与抗凝剂接触的全血样品获得。随后, 通过适当的技术 (通常通过离心) 将血液样品中的细胞组分与液体组分 (血浆) 分离。因此, 术语“血浆”所指的组合物不构成人或动物体的一部分。

[0097] 术语“血清”如常规定义。通常可如下从全血样品获得血清: 首先使样品中发生凝结, 随后通过适当的技术 (通常通过离心) 将血液样品中这样形成的凝块和细胞组分与液体组分 (血清) 分离。惰性催化剂 (例如, 玻璃珠或粉末) 可促进凝结。或者, 可以通过从血浆除去抗凝剂和血纤蛋白来获得血清。因此, 术语“血清”所指的组合物不构成人或动物体的一部分。

[0098] 所述分离的血浆或血清可直接用于本发明的方法中。也可以将它们适当地储存以备 (例如, 储存较短的时间段, 例如最多约 1 ~ 2 周, 在高于血浆或血清各自凝固点但低于环境温度的温度下, 该温度通常为约 4°C ~ 5°C; 或者通过冷冻储存较长时间, 通常为约 -70°C 和约 -80°C 之间)。

[0099] 如本领域已知地, 所述分离的血浆或血清可进行热灭活, 特别地用以除去补体。当本发明方法使用的血浆或血清与在它们存在下所培养的细胞是自体时, 对血浆或血清进行热灭活可以不是必需的。当血浆或血清至少部分地与所培养细胞是同种异体时, 对血浆或血清进行热灭活可以是有利的。

[0100] 任选地, 还可以在储存或使用前对血浆或血清进行灭菌, 其使用常规的微生物滤器, 优选地使用 0.2 μ m 或更小的孔径。

[0101] 在一个实施方案中, 本发明方法可使用这样的人血浆或血清, 其与其所接触的人 BMSC 或 MSC 是自体的。涉及血浆或血清时, 术语“自体”表示血浆或血清获得自所述血浆或血清待接触之 BMSC 或 MSC 的同一对象。

[0102] 在另一实施方案中, 所述方法可使用这样的人血浆或血清, 其与其所接触之人 BMSC 或 MSC 是“同源的”或“同种异体的”, 即, 其获得自除获得所述 BMSC 或 MSC 之对象以外的一个或多个 (合并) 人对象。

[0103] 在另一实施方案中, 所述方法可使用如上定义之自体 and 同源 (同种异体) 血浆或血清的混合物。

[0104] 如所述, 在一方面, 本发明方法通常可包括以下步骤:

[0105] (a) 从包含 BMSC 或 MSC 的人对象生物样品回收细胞;

[0106] (b) 任选地, 从 (a) 中回收的细胞分离单个核细胞;

[0107] (c) 将 (a) 或 (b) 的细胞添加至包含人血浆或血清、FGF 或者其生物活性变体或衍生物以及 TGF β 或者其生物活性变体或衍生物的培养基, 并培养该细胞 - 培养基混合物, 从

而使细胞贴附至基底表面；

[0108] (d) 除去未贴附物，并继续在 (c) 中所限定之培养基中培养贴附细胞，从而获得骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞样细胞，或者包含这些细胞的细胞群。

[0109] 步骤 (b) 可使用常规方法例如密度梯度离心来进行。

[0110] 在培养基（常常为液体细胞培养基）存在下培养来自步骤 (a) 或 (b) 的细胞悬液。通常，所述培养基包含本领域已知的基础培养基配方。可使用多种基础培养基配方（例如可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得，或者可从 Invitrogen, Carlsbad, California 获得）培养本文中的细胞，包括但不限于可从 Invitrogen 或 Cambrex (New Jersey) 获得的 Eagle 低限量基本培养基 (Eagle's Minimum Essential Medium, MEM)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)、 α 改良低限量基本培养基 (α -MEM)、基础培养基 (Basal Medium Essential, BME)、BGJb、F-12 营养混合物 (Ham)、Iscove 改良 Dulbecco 培养基 (IMDM) 或 X-Vivo-10 无血清培养基（临床级），及其变型和 / 或组合。上述基础培养基的组合物一般是本领域已知的，并且必要时针对所培养细胞修饰或调节培养基和 / 或培养基补充剂浓度在本领域技术人员技能范围内。

[0111] 这样的基础培养基配方包含哺乳动物细胞发育所必需的成分，其本身是已知的。通过举例说明但非限制性地，这些成分可包括无机盐（特别是盐，包括 Na、K、Mg、Ca、Cl、P 以及可能的 Cu、Fe、Se 和 Zn）、生理缓冲液（例如，HEPES、重碳酸盐）、核苷酸、核苷和 / 或核酸碱基、核糖、脱氧核糖、氨基酸、维生素、抗氧化剂（例如，谷胱甘肽）和碳源（例如，葡萄糖、丙酮酸钠、醋酸钠）等。

[0112] 为了用于培养，可向基础培养基提供一种或多种另外的组分。例如，可使用另一些补充剂向细胞提供必需痕量元素和物质用于最佳的生长和扩增。这些补充剂包括胰岛素、转铁蛋白、硒盐及其组合。这些组分可包含在盐溶液中，所述盐溶液例如但不限于 Hanks' 平衡盐溶液 (HBSS)、Earle 盐溶液。可添加另外的抗氧化剂补充剂，例如 β -巯基乙醇。尽管许多基础培养基已包含氨基酸，但仍可在之后补充某些氨基酸，例如 L-谷氨酰胺（已知其在溶液中较不稳定）。还可向培养基补充抗生素和 / 或抗真菌化合物，通常例如青霉素和链霉素的混合物和 / 或另外的化合物例如但不限于：两性霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、博来霉素、潮霉素、卡那霉素、丝裂霉素、霉酚酸、茶啉酸、新霉素、制霉菌素、巴龙霉素、多粘菌素、嘌呤霉素、利福平、壮观霉素、四环素、泰乐菌素和吉欧霉素 (zeocin)。

[0113] 还可使用脂质和脂质载体补充细胞培养基。这样的脂质和载体可包括但不限于环糊精、胆固醇、缀合于白蛋白的亚油酸、缀合于白蛋白的亚油酸和油酸、未缀合的亚油酸、缀合于白蛋白的亚油酸-油酸-花生四烯酸、未缀合和缀合于白蛋白的油酸等。白蛋白可类似地用于不含脂肪酸的配方中。

[0114] 在一些实施方案中，人血浆或血清可以如下比例（血浆或血清体积 / 培养基体积）包含在所述培养基中：约 0.5% 至约 30%，优选地约 1% 至约 15%。本发明方法可令人满意地用相对较低的血浆或血清量来进行，例如，约 5（体积）% 或 10（体积）%，或者更低，例如约 1（体积）%、约 2（体积）%、约 3（体积）% 或约 4（体积）%，从而允许降低为培养 BMSC 所需获得的血浆或血清体积。

[0115] FGF 和 TGF β 以如下浓度包含在所述培养基中，所述浓度足以诱导 BMSC 分化为成骨细胞或成骨细胞表型细胞。通常，FGF 或者其生物活性变体或衍生物可以如下浓度包含所述

培养基中,即 0.1 ~ 100ng/ml,优选地 0.5 ~ 20ng/ml,例如约 19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7 或 6ng/ml,或者约 5ng/ml 或更低,例如约 4、3、2、1 或 0.5ng/ml。通常, TGFB 或者其生物活性变体或衍生物可以如下浓度包含在所述培养基中,即 0.1 ~ 100ng/ml,优选地 0.25 ~ 20ng/ml,例如约 19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7 或 6ng/ml,或者约 5ng/ml 或更低,例如约 4、3、2、1 或 0.5ng/ml。所述值旨在指各生长因子或者其生物活性变体或衍生物外源补充至培养基中的浓度。

[0116] 在一个实施方案中, BMSC 或 MSC 可持续地与人血浆或血清、FGF 和 TGFB 或者其生物活性变体或衍生物接触,也即,所述组分将包含在所有这样的培养基中,在所述培养基中以本发明的方法培养 BMSC 或 MSC、其后代和 / 或源自其的细胞。通常,所述血浆或血清和生长因子可以基本上一致的各自浓度向所有 (新鲜) 培养基提供,以用于在所述方法中培养 BMSC 或 MSC。

[0117] 在一个实施方案中,在步骤 (c) 中以 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞 / cm^2 、优选 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞 / cm^2 、更通常以约 5×10^4 个细胞 / cm^2 将 (a) 或 (b) 的细胞铺板用于培养。

[0118] 在一个优选的实施方案中,所述培养容器可提供塑料表面以使得细胞能够贴附。在另一实施方案中,所述表面可以是玻璃表面。在又一实施方案中,所述表面可包被有助于细胞贴附和生长的材料,例如 Matrigel (R)、层粘连蛋白或胶原蛋白。

[0119] 在一些实施方案中,可使细胞贴附约 1 ~ 8 天,更通常地约 2 ~ 6 天,更通常地约 4 天,然后在步骤 (d) 中除去未贴附物。

[0120] 通常,所述细胞可以在步骤 (c) 和 (d) 中培养总共约 7 至约 18 天,通常约 11 至约 15 天,更优选地约 12 ~ 14 天。或者,所述细胞可以在步骤 (c) 和 (d) 中培养至它们的汇合度达到约 60% 或更高,或者约 80% 或更高,或者约 90% 或更高,或者甚至高达 100%。

[0121] 在一个实施方案中,在步骤 (d) 之后,所述方法可包括收集由此获得的细胞或细胞群。

[0122] 在另一实施方案中,在步骤 (d) 之后,可将所获得的细胞传代一次或多次,通常为一或两次,更优选一次。所述传代数是指细胞群从培养容器中移出并进行继代培养 (即,一次传代) 的次数。例如,传代可通常包括使用二价离子螯合剂 (例如, EDTA 或 EGTA) 和 / 或胰蛋白酶或合适的蛋白酶来剥离细胞;重悬所剥离的细胞;以及以期望的细胞密度在同一培养容器或新培养容器中将细胞重新铺板。

[0123] 在一个优选实施方案中,在上述步骤 (d) 之后,所述方法还包括步骤 (e) 传代 (特别是传代一次),以及继续在 (c) 中所定义的培养基中培养来自步骤 (d) 的细胞或细胞群。在该步骤 (e) 之后,可收集所述细胞或细胞群。

[0124] 在所述传代步骤 (e) 中,所述细胞优选地以如下密度铺板用于继续培养,即 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞 / cm^2 ,优选地 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^4$ 个细胞 / cm^2 ,更通常地约 5×10^3 个细胞 / cm^2 。

[0125] 通常,在传代后,所述细胞在步骤 (e) 中培养约 3 天至约 12 天、通常约 6 天至约 10 天、更通常约一周的时间段。该时间段提供了令人满意的细胞扩增。

[0126] 以上详述的本发明方法产生具有如下优越特征的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者细胞群,所述特征例如特别高的扩增率和低的 HLA-DR 表达,这样的细胞和细胞群适用于患者骨组织中的预防性或治疗性移植。

[0127] 因此,本发明的一些方面涉及可使用上述本发明方法获得或直接获得的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群,以及涉及用于疗法中和/或用于治疗骨相关疾病(例如,在本说明书其它部分列出的那些)的这些细胞或细胞群,以及涉及这些细胞或细胞群用于制备治疗骨相关疾病之药物的用途。

[0128] 在另一方面中,本发明涉及药物组合物,其包含可通过本发明方法获得或直接获得并适于在骨损伤部位施用的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群。

[0129] 在一方面,本发明还涉及用于预防和/或治疗有此需要之对象中骨疾病的方法,其包括:(i)如上所述进行本发明的方法,以获得人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞,或者包含这些细胞的细胞群,以及(ii)向所述对象施用这样获得的细胞或细胞群,例如在骨损伤(如手术或骨折)部位施用。

[0130] 2. 本发明的细胞和细胞群

[0131] 对由本发明方法产生之成骨细胞的进一步研究定义了新的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞类型,这可以揭示用于骨治疗中所观察到的有利特性。

[0132] 特别地,本发明的一方面提供了人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞以及包含这些细胞的细胞群,特征在于所述细胞(1)包含CD90、CD105、CD73、CD63、CD166和碱性磷酸酶(ALP)(更特别地骨-肝-肾型ALP)的表达,(2)不表达CD45、CD14、CD19,以及(3)少于25%的细胞、优选地少于20%的细胞以及更优选地少于15%的细胞表达HLA-DR。

[0133] 当谈及细胞对特定标志物呈阳性时,这意味着本领域技术人员会推断出,当进行适当测量时,与合适的对照相比存在或显示针对该标志物的独特信号,例如可用抗体检测的信号或通过逆转录聚合酶链式反应检测的信号。当所述方法允许定量评估标志物时,阳性细胞可平均产生显著不同于对照的信号,例如但不限于比对照细胞所产生的信号高出至少1.5倍的信号,例如高出至少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倍或者更高。

[0134] 可使用本领域已知的任何合适的免疫学技术(例如免疫细胞化学技术或亲和吸附、Western印迹分析、FACS、ELISA等)或通过任何合适的酶活性生化测定(例如,针对ALP)或通过任何合适的测量mRNA标志物数量的技术(例如,Northern印迹、半定量或定量RT-PCR等)来检测上述细胞特异性标志物的表达。本公开内容中列出的标志物的序列数据是已知的并且可以从公共数据库(例如GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))获得。

[0135] 在另一实施方案中,当暴露于骨生成培养基(Jaiswal等,1997. J Cell Biochem 64:295-312)时,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞显示出使外周环境(external surrounding)矿化的能力或合成含钙细胞外基质的能力。细胞内的钙积累和在基质蛋白质中的沉积可通过以下方式常规测量,例如通过在 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 培养,清洗以及再次培养,然后测定细胞中存在的或者细胞外基质中沉积的任何放射性(美国专利No. 5,972,703),或通过使用 Ca^{2+} 测定试剂盒(Sigma试剂盒#587)测定培养基质的矿化,或如实施例中所述。

[0136] 在另一实施方案,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞基本上不向脂肪细胞谱系的细胞(例如脂肪细胞)或软骨细胞谱系的细胞(例如软骨细胞)中的任一种分化,优选地不向上述两者分化。可使用本领域建立的标准分化诱导条件(例如参见

Pittenger 等,1999. Science 284 :143-7) 和测定方法(例如,当被诱导时,通常用油红 O 染色脂肪细胞以显示脂质积累;通常用爱茜蓝(alcian blue)或番红 O 染色软骨细胞)测试不向这些细胞谱系分化。基本上缺乏向脂肪生成分化或软骨生成分化的倾向通常可意味着,当应用于各测试时,少于 65%、或少于 50%、或少于 35%、或少于 20%或少于 10%的测试细胞将显示脂肪生成分化或软骨生成分化的迹象。

[0137] 在另一实施方案中,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞还可表达骨钙蛋白(OCN)(在一些具体实验中,通过 FACS 检测 8 ~ 85%的细胞表达 OCN)。

[0138] 在另一实施方案中,所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞还可表达骨涎蛋白(BSP)(在一个具体的半定量 RT-PCR 实验中,所述细胞表达弱的至中等水平的 BSP)。

[0139] 如上文表征的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群显示了优越的特征,例如特别高的扩增率和低 HLA-DR 表达,这些细胞和细胞群适用于患者骨组织中的预防性或治疗性移植。

[0140] 因此,本发明的一些方面涉及如上表征的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群,其用于疗法中和 / 或用于治疗骨相关疾病(例如在本说明书其它部分列出的那些),以及涉及这些细胞或细胞群用于制备治疗骨相关疾病之药物的用途。

[0141] 在另一方面中,本发明涉及药物组合物,其包含如上表征的人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群,并适于在骨损伤部位施用。

[0142] 在一方面,本发明还涉及用于预防和 / 或治疗有此需要之对象中骨疾病的方法,其包括向所述对象施用如上表征的所述人骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或者包含这些细胞的细胞群,例如在骨损伤(如手术或骨折)部位施用。

[0143] 3. 涉及本发明细胞和细胞群的方面

[0144] 以下描述涉及包含上述方面和如下的另一些方面:通过上面第一部分所述方法获得或可获得的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞以及包含这些细胞的细胞群;或者,如上面第二部分表征的骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞以及包含这些细胞的细胞群。

[0145] 如所解释地,本发明的细胞或细胞群可以被引入人对象之手术或骨折部位的骨中。将本发明的成骨细胞引入骨中可用于治疗骨折和骨相关异常,例如在本发明说明书其它部分列出的那些。

[0146] 在一个实施方案中,成骨细胞可以从将要引入分化成骨细胞之对象的 BMSC 或 MSC 获得(即,自体细胞)。在另一任选方案(由于本发明细胞的低 HLA-DR 表达而在本文及其它中可用的方案)中,成骨细胞可以从除了将要引入分化成骨细胞之人对象以外的一个或多个人对象的 BMSC 或 MSC 获得(即,同种异体细胞)获得。在又一实施方案中,成骨细胞可以从非人动物(优选非人哺乳动物)的 BMSC 或 MSC 获得并引入人对象中(即,异种细胞)。

[0147] 如所述,可将本发明的成骨细胞配制成药物组合物并且以药物组合物的形式施用。

[0148] 除了本文所述的成骨细胞之外,这样的药物组合物可包含可药用的赋形剂、载体、缓冲液、防腐剂、稳定剂、抗氧化剂或本领域技术人员熟知的其它材料。这些材料应是无毒的并且应当不干扰细胞的活性。所述载体或其它材料的精确性质将取决于施用途径。例

如,所述组合物可采用肠胃外可接受的水溶液形式,其为无热原的并且具有合适的 pH、等渗性和稳定性。针对一般的医药配制原则,读者可参考 G.Morstyn & W.Sheridan 编的 *Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, Cambridge University Press,1996;以及 *Hematopoietic Stem Cell Therapy*,E. D.Ball, J.Lister & P.Law,Churchill Livingstone,2000。

[0149] 这些药物组合物可包含确保其中细胞生存力的另外组分。例如,所述组合物可包含合适的缓冲液系统(例如,磷酸盐或碳酸盐缓冲系统)以实现期望的 pH,更通常为接近中性 pH,并且可包含足够的盐以确保针对细胞的等渗条件从而避免渗透压。例如,出于这些目的合适溶液可以是如本领域已知的磷酸盐缓冲液(PBS)、氯化钠溶液、林格注射液或乳酸林格注射液。此外,所述组合物可包含载体蛋白质,例如白蛋白(其可增加所述细胞的生存力)。

[0150] 所述药物组合物可包含可用于修复骨创伤和缺陷的另一些组分。例如,这样的组分可包括但不限于骨形态发生蛋白、羟磷灰石/磷酸三钙颗粒(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,所述成骨细胞可与脱矿骨基质(demineralised bone matrix,DBM)或另一些基质联用从而产生成骨复合材料(其自身形成骨)以及骨诱导复合材料。使用自体骨髓细胞以及同种异体 DBM 的类似方法产生了好的结果(Connolly 等,1995. Clin Orthop 313:8-18)。

[0151] 所述药物组合物还可包含补充性的生物活性因子(例如骨形态发生蛋白质,如 BMP-2、BMP-7 或 BMP-4,或任何其它生长因子)或与其共同施用。其它可能的伴随组分包括适于辅助骨再生的钙或磷酸盐无机物来源(WO 00/07639)。需要时,可利用载体基质或材料来施用细胞制备物以提供改善的组织再生。例如,所述材料可以陶瓷颗粒或生物聚合物例如明胶、胶原蛋白、骨连蛋白、凝血因子 I 或骨钙蛋白。多孔基质可根据标准技术来合成(例如,Mikos 等,Biomaterials 14:323,1993;Mikos 等,Polymer 35:1068,1994;Cook 等,J. Biomed. Mater. Res. 35:513,1997)。

[0152] 作为替代或另外地,所述 BMSC 或 MSC 细胞或者本发明所得的成骨细胞或细胞群可在引入对象的骨损伤(例如手术或骨折部位)前用目的核酸稳定或瞬时转化。目的核酸序列包括但不限于编码增强成骨细胞生长、分化和/或矿化之基因产物的核酸序列。例如,可出于治疗难愈合骨折(non-healing fracture)或骨质疏松的目的将针对 BMP-2 的表达系统以稳定或瞬时方式引入 BMSC 或 MSC 中。转化 BMSC 或 MSC 的方法和转化成骨细胞的方法是本领域技术人员已知的。

[0153] 因此,本发明还涵盖了通过混合本发明的细胞与上述一种或多种另外组分产生所述药物组合物的方法。

[0154] 在另一方面中,本发明涉及装置,其包含用于将组合物施用在骨损伤部位处的手术器械,还包含本发明的成骨细胞或细胞群或包含所述细胞或细胞群的药物组合物,其中所述装置适于将所述药物组合物施用在骨损伤部位处。例如,合适的手术器械能够将包含本发明细胞的液体组合物注射至骨损伤部位。

[0155] 所述骨原细胞、成骨细胞或成骨细胞表型细胞或细胞群可采用如下方式施用,所述方式允许它们移植或迁移至目标组织部位并重建或再生该功能缺陷区域。所述组合物的施用将取决于所修复的骨骼肌肉部位。例如,手术方法使组织重塑或者插入裂口或假体装

置（如髋关节置换）可有助于骨生成。在另外的情形中，不需要侵入性手术，可通过注射或（例如，针对脊柱修复）使用可引导内窥镜来施用所述组合物。

[0156] 在一个实施方案中，如上定义的药物细胞制备物可采用液体组合物的形式施用。在一些实施方案中，所述细胞或包含这些细胞的药物组合物可全身性、局部地或在损伤部位施用。

[0157] 在另一实施方案中，所述成骨细胞或细胞群可以被转移至和 / 或培养在合适的基底上以用于移植。所述细胞可施加并培养于其上的基底可以是金属（例如钛、钴 / 铬合金或不锈钢）、生物活性表面（例如磷酸钙）、多聚体表面（例如聚乙烯）等。尽管不是最优选地，硅质材料（例如玻璃陶瓷）也可用作基底。最优选的是金属，例如钛和磷酸钙，尽管磷酸钙不是所述基底中必不可少的组分。所述基底可以是多孔的或无孔的。

[0158] 例如，必要时，可将在培养皿中已增殖的细胞或正在分化的细胞移至三维固体支持物上，从而通过在本发明的液体营养培养基中孵育所述固体支持物而使它们增殖和 / 或继续分化过程。可例如通过用含有所述细胞的液体悬液填充三维固体支持物而将细胞移至该支持物上。这样获得的经填充支持物可被移植入对象中。这样的经填充支持物还可通过在最终移植前将它们浸于液体培养基中来再次培养。

[0159] 所述三维固体支持物需要为生物相容性的，从而使其能够被移植入人中。它可以具有任何适当的形状，例如圆柱、球、平板或任意形状的一部分。在适用于所述生物相容性三维固体支持物的材料中，特别关注碳酸钙，尤其是霰石，具体采用基于矾土、氧化锆、磷酸三钙的珊瑚骨骼、多孔陶瓷的形式，和 / 或羟磷灰石、通过水热交换使碳酸钙转化成羟磷灰石而获得的仿珊瑚骨骼、或者磷灰石 - 硅灰石玻璃陶瓷、生物活性玻璃陶瓷例如 Bioglass(TM) 玻璃。

[0160] 以上方面和实施方案通过以下非限制性实施例得到进一步支持。

实施例

[0161] 实验方法

[0162] 细胞培养和血浆制备物

[0163] 从患有骨疾病的患者或从健康志愿者的髌嵴获得 20 ~ 60ml 经肝素化的骨髓 (BM)。将 BM 与磷酸盐缓冲液 (PBS, 体积比 2 : 1) 混合，并层铺在密度梯度 Ficol1 溶液上。离心后，从分界面收集单个核细胞并用 PBS 清洗两次。平行地，将排至干试管的 160ml 血液离心后，获得来自患者或健康供者的血清。所述细胞用补充有 15% 同种异体血浆（可使用自体血浆，结果基本上一致）、10ng/ml FGF2 和 10ng/ml TGFb-1 的 DMEM 培养基进行重悬。所述细胞以 1×10^8 个细胞 / 175cm^2 (烧瓶) 的密度铺板，并维持在含 5% CO_2 的 37°C 湿润气氛中。在第一次更换培养基之前，使所述细胞贴附 1 天。另外两次部分培养基更换（更换一半体积）在第 7 天和第 11 天进行。第 14 天，在 37°C 使用胰蛋白酶 / EDTA 溶液剥离细胞 1 ~ 5 分钟。对所述细胞计数并以 1×10^5 个细胞 / 175cm^2 铺板，再培养一周。

[0164] 表型分析

[0165] 通过流式细胞术在不同时间点（第 14 天和第 21 天）分析细胞内和细胞表面的标志物。对于细胞表面标志物来说：用以下经缀合的单克隆抗体孵育细胞 15 分钟：抗 CD45、CD90、CD105、CD73、CD166、CD63、CD14、CD19、HLA-ABC、HLA-DR、CD28、CD80、CD86 和 CTLA-4，

然后用 PBS 清洗,继而进行离心并用 0.3ml PBS 重悬。对于细胞内标志物 (OCN 和 ALP) 来说,使用透化试剂盒,并根据制造商的使用说明 (Analys) 使用经缀合的特异性抗 ALP 单克隆抗体。然后,用 PBS 清洗细胞,继而用 0.3ml PBS 进行重悬。

[0166] ALP 测定

[0167] 通过基于 pNPP (对硝基苯磷酸盐) 水解的生化测定来测量碱性磷酸酶的酶活性。当 pNPP 被 ALP 去磷酸化时,它变为黄色并且可通过分光光度计在 410nm 处检测。在第 21 天,确定相对于标准曲线的所述细胞 ALP 酶活性,所述标准曲线是基于纯化的牛肠碱性磷酸酶的活性。所述 ALP 活性表示为每毫克蛋白质的 ALP 单位。一个单位的 ALP 在 37°C 在 1 分钟内水解 $1 \mu\text{mol}$ pNPP。

[0168] 矿化测定

[0169] 通过向培养物中添加骨生成培养基来评估细胞矿化潜力的诱导。在第 14 天,在补充有 $0.1 \mu\text{M}$ 地塞米松、 0.05mM 抗坏血酸和 3mM 甘油磷酸盐的血浆的存在下,将 5,700 个骨形成细胞/ cm^2 铺板至 6 孔板中。培养 2 周后,用 3.7% 甲醛 /PBS 固定细胞并通过茜素红 (alizarin red) 染色。如下给出每个培养物的矿化分数:0 = 无矿化,1 = 正在进行的矿化,以及 2 = 完全矿化。

[0170] T 细胞增殖测定

[0171] 将补充有或没有 10ng/ml TGFb-1 的来自个体 A (PRE0Ba) 的每毫升 2,000 ~ 20,000 个前成骨细胞与来自个体 B (PBMcb) 的每毫升 200,000 个 T 细胞共培养。使用浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的植物血凝素 (phytohemagglutinine, PHA) 用作 T 细胞增殖的阳性对照。在 24 孔微量滴定板中培养所述细胞 7 天,并在培养期间的最后 18 个小时中用 3H- 胸苷进行脉冲以测量 T 细胞增殖。用冰冷的 PBS 清洗细胞两次,并用冰冷的 5% 三氯乙酸 (TCA) 清洗两次。最后,利用含有 0.1N NaOH 和 0.1% Triton-X100 的溶液裂解细胞。收集上清液并将其与闪烁液混合,从而利用 β - 计数器进行分析。

[0172] 结果

[0173] 血浆和 TGF 相比于血浆和 TGF/FGF2

[0174] 我们首先测试作为唯一生长因子的 TGFb-1 (其被添加至含有 15% 同种异体血浆的培养基) 的作用。如图 1 所示,仅有 TGFb-1 的原代培养物无法得到合适数量的扩增细胞;事实上,与只含有 TGFb-1 的培养瓶中相比,从培养基中含有 FGF2 和 TGFb-1 的培养瓶中收集的细胞几乎多出 20 倍 ($p = 0.0317$, 双尾 Mann Whitney 检验)。

[0175] 血浆和 FGF 相比于血浆和 TGF/FGF2

[0176] 评估了来自 15 名患者的成骨细胞在含有同种异体血浆和 FGF2 (添加有或没有 10ng/ml TGFb-1) 的增殖速率 (图 2)。以下实验显示,在原代培养物 ($1.07\times$)、继代培养物 ($2.5\times$) 和全部培养物 ($3.08\times$) 中,在补充有 TGFb-1 的血浆中培养的细胞的平均扩增产率大大地优于无 TGFb-1 时培养的细胞之产率 (表 1)。

[0177] 表 1:用 FGF2 和 FGF2/TGFb-1 培养的细胞的培养物产率

[0178]

	15% 血浆 FGF2	15% 血浆 FGF2/TGFb-1

[0179]

铺板细胞百分数相比于数目	原代培养产率 (P1)	继代培养产率 (P2)	总产率	原代培养产率 (P1)	继代培养产率 (P2)	总产率
中值	51.3	625.3	297.4	54.4	1553.7	914.8
SD	44.5	322.7	283.1	71.3	798.1	1343.8

[0180] 而且,如表2中所示,与不存在TGF下培养的细胞相比,用TGFb-1培养的细胞的扩增速率维持了更长的一段时间。只用FGF培养的细胞在大约4次传代后停止增殖,而在FGF2和TGFb-1存在下培养的细胞则继续增殖直至第7次传代。这意味着增殖增加超过800倍(857.1)。

[0181] 表2:用FGF2和FGF2/TGFb-1培养的细胞的累积产率(%)

[0182]

%	FGF	FGF/TGF
P1	51,3	54,5
P2	32.213,3	84.649,4
P3	103.144,8	1.144.807,1
P4	177.156,9	9.370.159,7
P5	131.512,9	31.860.445,3
P6	72.555,5	78.055.251,8
P7	28.637,9	151.841.324,1
P8	12.554,9	120.405.153,2
P9	6.364,8	71.159.511,4
P10	1.912,5	24.220.683,9
P11	2.616,0	9.910.647,4
P12	1.620,1	254.1373,2

P13	447,5	112.5860,9
P14	311,1	123.3310,1
P15	28,3	587.957,5

[0183] 细胞表型

[0184] 流式细胞术显示,针对大多数标志物来说,在补充有 FGF2 和 TGFb-1 的培养基中获得的细胞表型与没有 TGFb-1 时培养的细胞表型类似。两种细胞类型均表达 CD90、CD105、CD73、CD63、CD166 和 ALP,但未观察到 CD45、CD14 或 CD19 的表达(表 3)。与仅有 FGF2 的条件相比,在 FGF2/TGFb-1 培养条件下 ALP 的表达降低(分别为 73.6%和 42.2%)。

[0185] 而且,与没有 TGFb-1 时培养的细胞相比,用 TGFb-1 孵育的细胞表达高水平的 HLA-ABC(HLA-I),但低水平的 HLA-DR。另外,在 TGFb-1 处理的细胞中,所测试的所有共刺激分子(CD80、CD86、CD28、CD40L 和 CTLA-4)以可以忽略的水平表达(表 3)

[0186] 表 3:在补充有或没有 10ng/ml TGFb-1 的培养基中培养的成骨细胞表型标志物(通过 FACS 认定为阳性的细胞百分比)。

[0187]

15%血浆 /FGF2				15%血浆 /FGF2/TGFb-1		
	N	中值	SD	N	中值	SD
ALP	34	73,57	17,55	22	42,18	24,82
CD105	34	90,68	8,03	24	93,08	5,71
CD90	9	96,33	4,22	4	94,75	2,95
CD73	10	97,20	1,60	6	97,50	1,71
CD166	9	92,56	5,21	4	94,00	4,85
CD63	9	71,11	20,73	5	68,00	25,26
CD45	33	2,29	2,43	24	1,92	1,00
CD14	16	1,69	1,61	12	1,42	1,11
CD19	16	9,38	11,93	9	4,00	2,62
HLA-DR	10	62,90	19,26	22	6,14	5,80
HLA-I	9	94,78	5,22	22	95,18	3,71
B7-2	9	3,67	2,71	6	1,17	1,07
CD28	9	2,00	1,94	6	0,83	0,37
CD80	9	2,22	1,03	11	0,91	0,67
CD40L	9	1,89	1,66	4	1,00	0,71
CTLA4	9	6,11	3,66	4	5,00	4,74

[0188] ALP 酶活性:

[0189] 通过比色测定来评估细胞的 ALP 酶活性,显示与不用 TGFb-1 培养的细胞相比用该生长因子培养的细胞具有较低的 ALP 活性(表 4)。这些结果与通过 FACS 测量的 ALP 表达强烈地相关。

[0190] 表 4:在 FGF2 和 FGF2/TGFb-1 中培养的细胞在第二次传代时的 ALP 活性、ALP 表达

和荧光中值强度 (MIF)

[0191]

	15%血浆 FGF			15%血浆 FGF/TGF		
	ALP 活性 (mU/mg)	细胞表达 (%)	MIF	ALP 活性 (mU/mg)	细胞表达 (%)	MIF
中值	1129.02	71.78	85.85	281.00	55.63	19.94
SD	1196.69	18.68	47.59	320.08	22.43	9.50

[0192] 矿化

[0193] 即使 ALP 的表达相对较低,用 FGF2/TGFb-1 培养 的细胞显示出与只用 FGF2 培养的细胞同样的生物活性 (矿化)。这通过矿化来测定。

[0194] 在 FGF2 (A) 或 FGF2/TGFb-1 (B) 存在下所培养细胞的矿化是一致的 (超过 65% 的孔表面被矿化 - 图 3)。类似地,在 FGF2 中所培养细胞的矿化分数中值 (1.75) 与在 FGF2/TGFb-1 中所培养细胞的分数 (1.83) 重叠,最大值为 2。

[0195] T 细胞增殖

[0196] 为了测定在 TGFb-1 存在下培养的骨形成细胞是否诱导由同种异体 T 细胞引起的增殖应答,将外周血单个核细胞 (PBMC) 与数目渐增的骨形成细胞 (2,000 ~ 20,000/ml) 一起培养。如表 5 和图 4 所示,FGF2/TGFb-1 产生的成骨细胞不诱导 PBMC 的同种异体应答 (左侧),但还能诱导高达 90% 的对 PHA 所刺激 PBMC 增殖的抑制。

[0197] 表 5 成骨细胞对 T 细胞增殖的抑制作用 (值表示为 PHA/PBMC 的百分比。

[0198]

FGF+TGF

[0199]

	PBMCb	PBMCb + PHA	PBMCb + PHA BMOBa (2000/ml)	PBMCb + PHA BMOBa (10000/ml)	PBMCb + PHA BMOBa (20000/ml)
1	0	100	61	41	18
2	0	100	48	29	8
3	0	100	56	29	8
4	0	100	62	56	17
5	0	100	61	41	18

[0200] 结论

[0201] 为了开发快速且显著扩增的源自免疫豁免 BMSC 或 MSC 的骨形成细胞的方法,已评估了 TGFb 对这些细胞的生长和特征的效力。

[0202] 出人意料地,只含有 TGFb 和血浆的培养条件不能使 MSC 扩增和分化成骨形成细胞,而其与 FGF2 的组合则具有非常显著的扩增和分化作用(与仅使用血清 /FGF 相比,扩增多达 12 倍)。而且,针对间质和造血标志物来说,在 TGFb 存在下所培养细胞的表型状态保持不变,只有 ALP 表达略微减少,但这并不对细胞生物活性产生影响。令人感兴趣地,在 TGFb 条件下,HLA-DR 在骨细胞上的表达水平非常低 / 检测不到。此外,在混合的淋巴细胞反应中,在血浆 /FGF 条件下在 TGFb 存在时培养细胞是免疫豁免的,因为它们不诱导同种异体反应并因此不会导致同种异体移植中的免疫排斥。最后,我们表明,在 TGFb 存在下生长的细胞仍保持它们的生物学功能。

[0203] 我们可以得出结论,为了使 BMSC 或 MSC 扩增为成骨细胞但不改变细胞表型,使用补充有 TGFb 的培养基优于不使用 TGFb 的培养基条件。

[0204] 在另一些实例中,使用除 FGF2 之外的 FGF 因子(例如,FGF-1 或 FGF-3)和 / 或使用除 TGFb-1 之外的 TGF 因子(例如, TGFb-2 或 TGFb-3)以基本上相同或类似的方式进行上述实验步骤,得到类似的结果和 / 或作用。

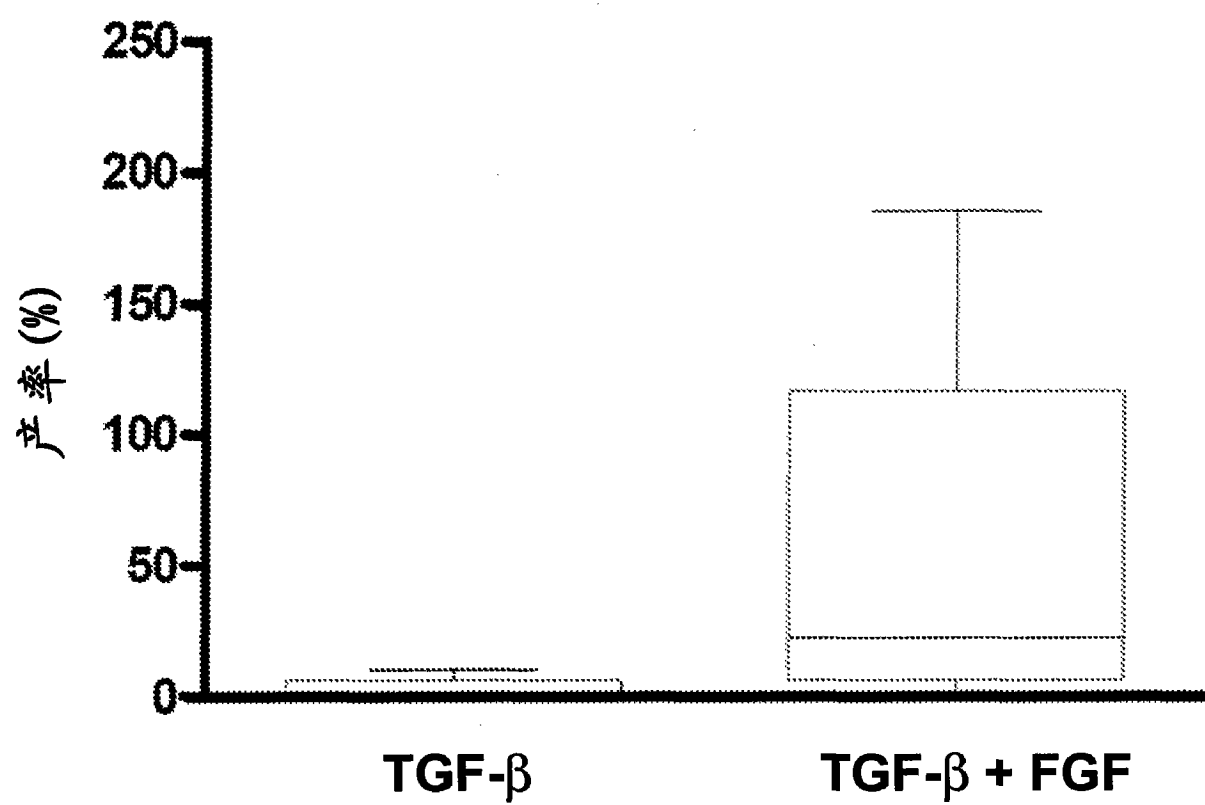
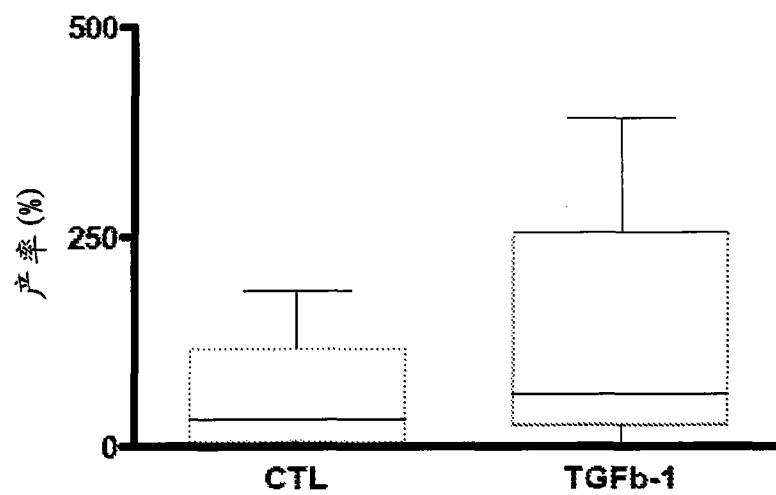
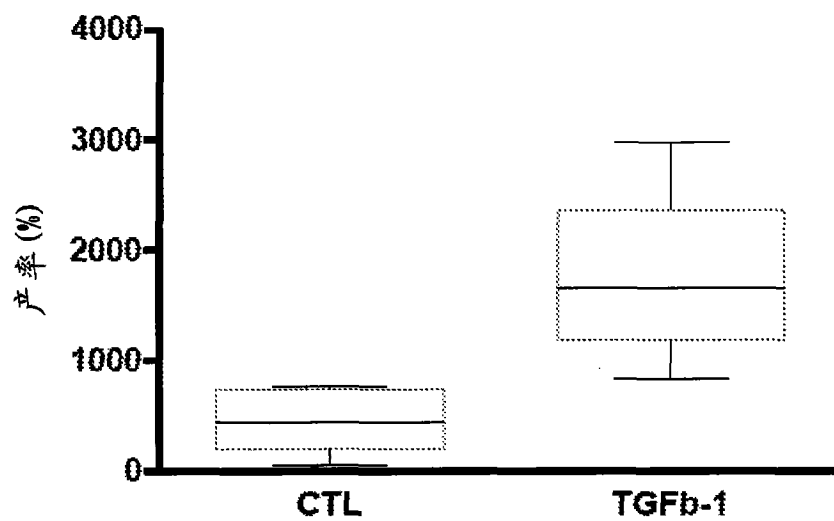


图 1

(A)



(B)



(C)

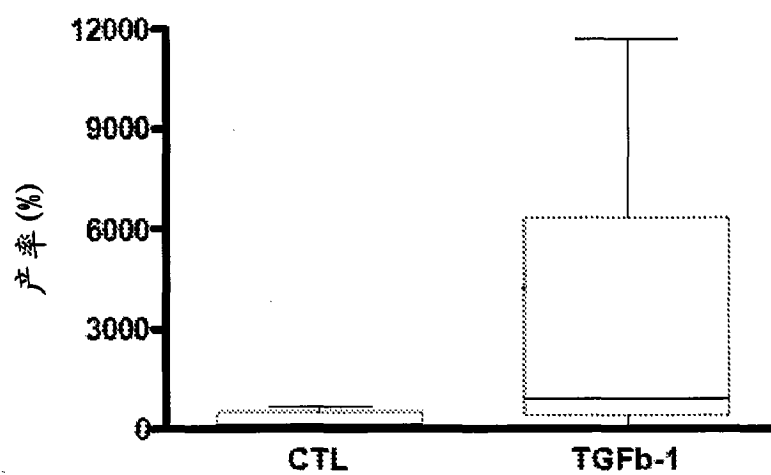
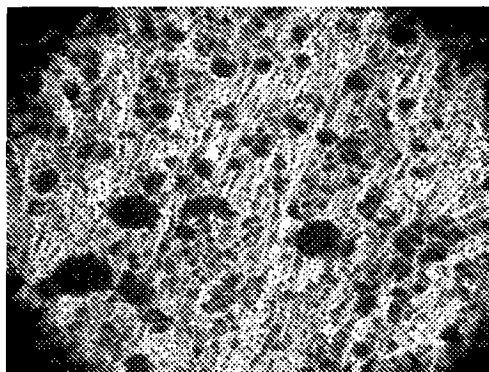


图 2

(A)



(B)

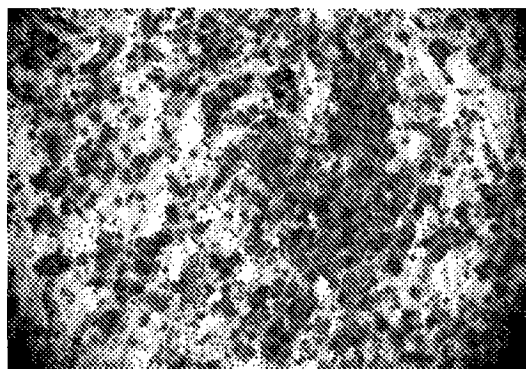


图 3

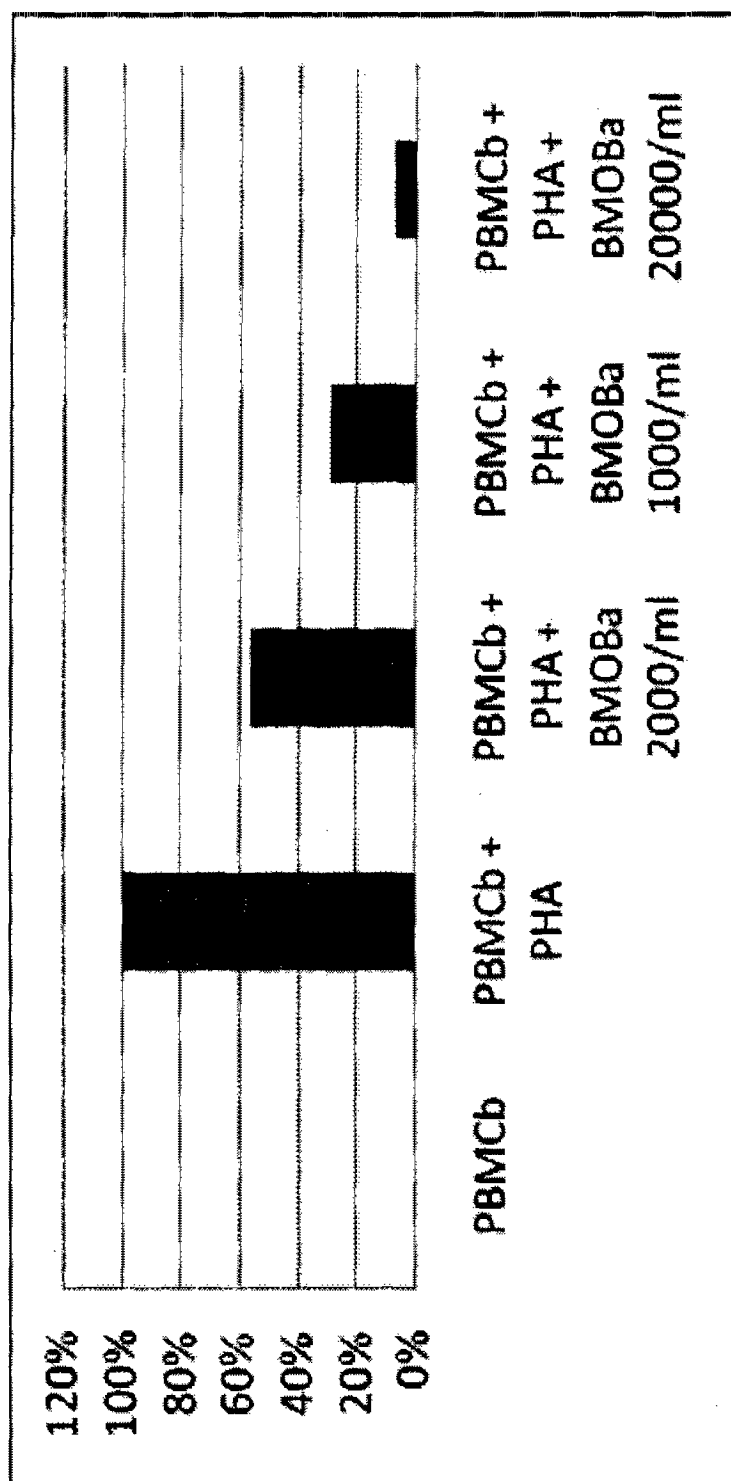


图 4