



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111051499 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201880047924.3

(22)申请日 2018.05.24

(30)优先权数据

62/510,617 2017.05.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/034458 2018.05.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/218061 EN 2018.11.29

(71)申请人 哈佛学院校长同事会

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 李·L·鲁宾

菲奥多尔·D·普赖斯

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 金海霞 刘慧

(51)Int.Cl.

C12N 5/077(2010.01)

C12Q 1/02(2006.01)

A61K 35/12(2015.01)

A61K 35/34(2015.01)

A61P 21/00(2006.01)

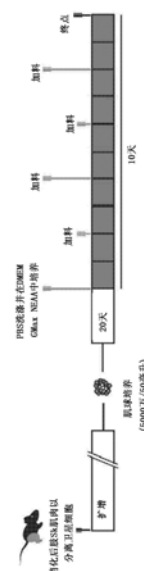
权利要求书4页 说明书30页 附图28页

(54)发明名称

卫星细胞及其组合物和生产方法

(57)摘要

本文公开了产生卫星细胞的方法和包含卫星细胞的组合物。



1. 一种非天然存在的卫星细胞。
2. 权利要求1的非天然存在的卫星细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表现出与内源性卫星细胞的形态类似的形态。
3. 权利要求1的非天然存在的卫星细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达Pax7。
4. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的细胞表现出对肌肉损伤的应答。
5. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞在移植后引起肌肉再生。
6. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达至少一种休眠相关基因。
7. 权利要求6的非天然存在的细胞,其中所述休眠相关基因选自Spry1、Nm1、Nfia、Fos和Dusp1。
8. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达至少一种Notch信号转导通路基因。
9. 权利要求8的非天然存在的细胞,其中所述Notch信号转导通路基因选自Notch1、Notch2、Notch3、HeyL、Hey2和Hes。
10. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达Myf5。
11. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达Pax7、Myf5、至少一种休眠相关基因和至少一种Notch信号转导通路基因。
12. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少一种基因。
13. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少两种基因。
14. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少三种基因。
15. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少一种基因。
16. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少两种基因。
17. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少三种基因。
18. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞不表达MyoD。
19. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞是从成肌细胞群体通过体外去分化产生的。
20. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞源自于去分化的成肌细胞。
21. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞可在培养物中扩增。
22. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞具有重新填充卫

星细胞龛的能力。

23. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞是人类的。

24. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞是未经遗传修饰的。

25. 权利要求1的非天然存在的细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞是经遗传修饰的。

26. 一种细胞系,其包含权利要求1至25任一项的细胞。

27. 一种组合物,其包含非天然存在的卫星细胞,其中:

a. 所述非天然存在的卫星细胞源自于去分化的成肌细胞;

b. 所述非天然存在的卫星细胞可在培养物中扩增;

c. 所述非天然存在的卫星细胞具有重新填充卫星细胞龛的能力;或

d. 所述非天然存在的卫星细胞在移植后引起肌肉再生。

28. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达至少一种休眠相关基因。

29. 权利要求28的组合物,其中所述休眠相关基因选自Spry1、Nm1、Nfia、Fos和Dusp1。

30. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达至少一种Notch信号转导通路基因。

31. 权利要求30的组合物,其中所述Notch信号转导通路基因选自Notch1、Notch2、Notch3、HeyL、Hey2和Hes。

32. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达Myf5。

33. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少一种基因。

34. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少两种基因。

35. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少三种基因。

36. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少一种基因。

37. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少两种基因。

38. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少三种基因。

39. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的卫星细胞不表达MyoD。

40. 权利要求27的组合物,其中所述非天然存在的细胞表达Pax7。

41. 一种从成肌细胞群体产生非天然存在的卫星细胞的方法,所述方法包括使旋转培养物中包含成肌细胞的细胞群体与至少一种培养基接触足以诱导所述旋转培养物中的至少一个成肌细胞去分化为非天然存在的卫星细胞的时间。

42. 权利要求41的方法,其中所述至少一种培养基是成肌细胞培养基。

43. 权利要求41的方法,其中所述至少一种培养基是旋转培养基。

44. 权利要求41的方法,其中所述至少一种培养基是分化培养基。

45. 一种从成肌细胞产生非天然存在的卫星细胞的方法,所述方法包括:

使包含成肌细胞的细胞群体与成肌细胞培养基接触以形成扩增的成肌细胞群体;

使旋转培养物中扩增的成肌细胞群体与旋转培养基接触以形成包含分化和增殖细胞的至少一个骨骼肌类器官;以及

使旋转培养物中的所述至少一个骨骼肌类器官与分化培养基接触足以诱导所述骨骼肌类器官的至少一个增殖细胞去分化为非天然存在的卫星细胞的时间。

46. 权利要求45的方法,其中将所述细胞群体在旋转培养基的悬浮培养物中维持足以诱导所述细胞群体中的成肌细胞体外转化为包含分化和增殖细胞的骨骼肌类器官的时间段。

47. 权利要求46的方法,其中所述时间段包括至少10天。

48. 权利要求46的方法,其中所述时间段包括10天至30天。

49. 权利要求46的方法,其中所述时间段包括10天至20天。

50. 权利要求46的方法,其中所述时间段包括20天。

51. 权利要求45的方法,其中将所述至少一个骨骼肌类器官在悬浮培养物中维持足以诱导所述骨骼肌类器官的至少一个增殖细胞体外去分化为至少一个非天然存在的卫星细胞的时间段。

52. 权利要求51的方法,其中所述时间段包括至少10天。

53. 权利要求51的方法,其中所述时间段包括10天至30天。

54. 权利要求51的方法,其中所述时间段包括10天至20天。

55. 权利要求51的方法,其中所述时间段包括10天。

56. 权利要求45的方法,其中所述细胞群体中至少1%的成肌细胞被诱导去分化为非天然存在的卫星细胞。

57. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达Pax7、Myf5、至少一种休眠相关基因和至少一种Notch信号转导通路基因。

58. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少一种基因。

59. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少两种基因。

60. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8A和/或图8C中鉴定的至少三种基因。

61. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少一种基因。

62. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少两种基因。

63. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表达在图8C中鉴定的至少三种基因。

64. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞表现出对肌肉损伤的应答。

65. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞在移植后驱动肌肉再生。

66. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞源自于去分化的成肌细胞。
67. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞具有重新填充卫星细胞龛的能力。
68. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞包括人类细胞。
69. 权利要求45的方法,其中非天然存在的卫星细胞的体外产生是可扩大规模的。
70. 权利要求45的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞可在培养物中扩增。
71. 一种分离的非天然存在的卫星细胞群体,其是根据权利要求45至70任一项的方法产生的。
72. 一种微囊,其包含封装在其中的权利要求71的分离的非天然存在的卫星细胞群体。
73. 一种组合物,其包含根据权利要求45至70任一项的方法产生的非天然存在的卫星细胞群体。
74. 一种测定法,其包含根据权利要求45至70任一项的方法产生的分离的非天然存在的卫星细胞群体。
75. 权利要求74的测定法,其用于鉴定一种或多种促进至少一个成肌细胞去分化为至少一个非天然存在的卫星细胞的候选试剂。
76. 一种用于治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含根据权利要求45至70任一项的方法产生的分离的卫星细胞群体的组合物。
77. 权利要求76的方法,其中所述卫星细胞被封装在微囊中。
78. 权利要求76的方法,其中所述非天然存在的卫星细胞是由从施用所述非天然存在的卫星细胞的同一受试者获得的成肌细胞群体产生的。
79. 权利要求76的方法,其中所述受试者具有肌肉退行性病症或具有增加的患上肌肉退行性病症的风险。
80. 权利要求76的方法,其中所述受试者具有肌肉创伤或具有增加的患上肌肉创伤的风险。
81. 权利要求76的方法,其中所述受试者具有肌肉减少症或具有增加的患上肌肉减少症的风险。
82. 通过权利要求45至70任一项的方法产生的分离的非天然存在的卫星细胞群体的用途,其用于施用于有需要的受试者。
83. 权利要求82的用途,其中将所述分离的非天然存在的卫星细胞群体封装在微囊中施用于所述受试者。
84. 权利要求82的用途,其中所述受试者具有肌肉退行性病症或具有增加的患上肌肉退行性病症的风险。
85. 权利要求82的用途,其中所述受试者具有肌肉创伤或具有增加的患上肌肉创伤的风险。
86. 权利要求82的用途,其中所述受试者具有肌肉创伤或具有增加的患上肌肉创伤的风险。

卫星细胞及其组合物和生产方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年5月24日提交的美国临时申请号62/510,617的权益。上述申请的全部教导内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 骨骼肌具有显著的再生能力。这种再生能力归因于卫星细胞,即骨骼肌干细胞(Collins等,2005;Kuang等,2007;Mauro,1961)。对损伤作出应答或处于疾病状态时,卫星细胞退出休眠(quiescence),增殖并产生祖细胞的过渡扩增群体,称为成肌细胞(Yin等,2013)。当在体外培养时,卫星细胞变成成肌细胞,并在体内移植后丧失其重新填充干细胞龛(niche)的能力(Montarras等,2005)。迄今为止,还没有证据表明体外培养的成肌细胞可以去分化为卫星细胞。

发明内容

[0004] 需要用于产生足够量的卫星细胞的方法或方案,以用于细胞疗法和筛选以及其它用途。本文所述的3D培养系统(例如,骨骼肌类器官)为体外培养的成肌细胞去分化为卫星细胞创造了合适的龛。这种龛的产生使成肌细胞恢复休眠,呈现卫星细胞的转录特征,并开始表达仅存在于卫星细胞龛中的关键糖蛋白。

[0005] 在一些方面,本公开提供了一种非天然存在的(即非自然的)卫星细胞。

[0006] 在一些实施方式中,所述非天然存在的卫星细胞表现出与内源或天然存在的卫星细胞的形态类似的形态。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达Pax7和/或Myf5,并且在一些实施方式中,该表达处于与内源或天然存在的卫星细胞中相应基因的表达水平一致的水平。在一些实施方式中,非天然存在的细胞表现出对肌肉损伤的应答。例如,非天然存在的卫星细胞可以在移植后启动或驱动肌肉再生。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达至少一种休眠相关基因。所述休眠相关基因可以例如选自Spry1、Nm1、Nfia、Fos和Dusp1。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达至少一种Notch信号转导通路基因。所述Notch信号转导通路基因可选自Notch1、Notch2、Notch3、Hey1、Hey2和Hes。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达Pax7、Myf5、至少一种休眠相关基因和至少一种Notch信号转导通路基因。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达本文图8A和图8C中鉴定的基因中的至少一种、至少两种或至少三种。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞表达本文图8C中鉴定的至少一种、至少两种或至少三种基因。非天然存在的卫星细胞不表达MyoD(该基因的表达与成肌细胞相关)。

[0007] 在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞在体外从成肌细胞去分化。非天然存在的卫星细胞可以源自于去分化的成肌细胞。非天然存在的卫星细胞可以是人类的。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞是未经遗传修饰的,而在其它实施方式中,其可以是经遗传修饰的。例如,非天然存在的卫星细胞可以被修饰以表达或以增加的水平表达对细胞的接受者有益的相关蛋白质(例如胰岛素)。非天然存在的卫星细胞可以具有重新填充卫

星细胞龛的能力和/或可以在培养物中扩增。

[0008] 在一些方面,本公开提供了一种细胞系,其包含如本文所述的非天然存在的卫星细胞。

[0009] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含非天然存在的卫星细胞,其中所述非天然存在的卫星细胞源自于去分化的成肌细胞;所述非天然存在的卫星细胞可在培养物中扩增;所述非天然存在的卫星细胞具有重新填充卫星细胞龛的能力;并且所述非天然存在的卫星细胞在移植后驱动肌肉再生。

[0010] 在一些方面,本文描述的工作提供了一种从成肌细胞群体产生非天然存在的卫星细胞的方法,所述方法包括使旋转培养物中的包含成肌细胞的细胞群体与至少一种培养基接触足以诱导所述旋转培养物中的至少一个成肌细胞去分化为非天然存在的卫星细胞的时间。在一些实施方式中,所述至少一种培养基是成肌细胞培养基、旋转培养基和/或分化培养基。

[0011] 在一些方面,本公开提供了一种从成肌细胞群体产生非天然存在的卫星细胞的方法,所述方法包括使包含成肌细胞的细胞群体与成肌细胞培养基接触以形成扩增的成肌细胞群体;使旋转培养物中的扩增的成肌细胞群体与旋转培养基接触,以形成包含分化和增殖细胞的至少一个骨骼肌类器官;以及使旋转培养物中的所述至少一个骨骼肌类器官与分化培养基接触,以诱导所述骨骼肌类器官的至少一个增殖细胞去分化为非天然存在的卫星细胞。

[0012] 在一些实施方式中,将细胞群体在旋转培养基的悬浮培养物中维持足以诱导所述细胞群体中的至少一个成肌细胞(通常为至少数个)在体外成熟为包含分化和增殖细胞的至少一个骨骼肌类器官的时间段。在一些实施方式中,所述时间段包括至少10天,10天至30天,或10至20天。在一些实施方式中,所述时间段是20天。

[0013] 在一些实施方式中,将至少一个骨骼肌类器官在悬浮培养物中维持足以诱导骨骼肌类器官的至少一个增殖细胞在体外成熟为至少一个非天然存在的卫星细胞的时间段。在一些实施方式中,所述时间段包括至少10天,10天至30天,或10至20天;在一些实施方式中,所述时间段是10天。在一些实施方式中,细胞群体中至少1%的成肌细胞被诱导去分化为非天然存在的卫星细胞。因此,本文所述的非天然存在的卫星细胞可以源自于去分化的成肌细胞。

[0014] 在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞的体外产生是可扩大规模的。非天然存在的卫星细胞可以在培养物中扩增。在一些实施方式中,非天然存在的卫星细胞具有重新填充卫星细胞龛的能力。

[0015] 在一些方面,本公开提供了一种根据本文所述的方法产生的分离的非天然存在的卫星细胞群体。

[0016] 在一些方面,本公开提供了一种微囊,其包含封装在其中的本文所述的分离的非天然存在的卫星细胞群体。

[0017] 在一些方面,本公开提供了一种组合物,其包含根据本文所述的方法产生的非天然存在的卫星细胞群体。

[0018] 在一些方面,本公开提供了一种测定法,以鉴定促进至少一种成肌细胞去分化为至少一种非天然存在的卫星细胞的一种或多种候选试剂。

[0019] 在一些方面,本公开提供了一种用于治疗有需要的受试者的方法,该方法包括向受试者施用包含非天然存在的卫星细胞的组合物,例如,根据本文所述的方法产生的分离的非天然存在的卫星细胞群体。在一些实施方式中,卫星细胞被封装在微囊中。非天然存在的卫星细胞可以由从施用所述非天然存在的卫星细胞的同一受试者获得的成肌细胞群体产生。在一些实施方式中,受试者具有肌肉退行性病症、肌肉创伤或与年龄相关的肌肉无力(例如肌肉减少症),或者具有增加的患上肌肉退行性病症、肌肉创伤或与年龄相关的肌肉无力(例如肌肉减少症)的风险。

[0020] 在一些方面,本公开提供了例如通过本文所述的方法产生的非天然存在的卫星细胞群体用于向有需要的受试者施用的用途。可以将分离的非天然存在的卫星细胞群体封装在微囊中施用于受试者。在一些实施方式中,受试者具有肌肉退行性病症、肌肉创伤或与年龄相关的肌肉无力(例如肌肉减少症),或者具有增加的患上肌肉退行性病症、肌肉创伤或与年龄相关的肌肉无力(例如肌肉减少症)的风险。

[0021] 除非另有说明,否则本发明的实践通常将采用在本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组核酸(例如DNA)技术、免疫学和RNA干扰(RNAi)的常规技术。这些技术中的某些的非限制性描述可见于以下出版物: Ausubel, F. 等(编),《最新分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology),《最新免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology),《最新蛋白质科学实验指南》(Current Protocols in Protein Science)和《最新细胞生物学实验指南》(Current Protocols in Cell Biology),均为John Wiley&Sons, N.Y., 2008年12月版; Sambrook, Russell和Sambrook,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. 和 Lane, D.,《抗体-实验手册》(Antibodies-A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R. I.,《动物细胞的培养:基本技术手册》“Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique”,第5版, John Wiley&Sons, Hoboken, NJ, 2005。关于治疗剂和人类疾病的非限制性信息可见于Goodman和Gilman的《治疗学的药理基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics),第11版, McGraw Hill, 2005; Katzung, B. (编)《基础和临床药理学》(Basic and Clinical Pharmacology), McGraw-Hill/Appleton&Lange; 第10版(2006)或第11版(2009年7月)。关于基因和遗传病症的非限制性信息可见于McKusick, V. A.:《人类孟德尔遗传:人类基因和遗传病症目录》(Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998(第12版),或者更新的在线数据库:人类孟德尔遗传在线数据库(Online Mendelian Inheritance in Man), OMIMTM。约翰·霍普金斯大学(马里兰州,巴尔的摩)的McKusick-Nathans遗传医学研究所和国家生物技术信息中心,国家医学图书馆(马里兰州,贝塞斯达)(截至2010年5月1日),万维网URL: ncbi.nlm.nih.gov/omim/和动物孟德尔遗传在线数据库(Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA),该数据库是动物物种(人类和小鼠除外)的基因、遗传病症和性状的数据库,网址为 omia.angis.org.au/contact.shtml。本文提及的所有专利、专利申请和其它出版物(例如,科学文章、书籍、网站和数据库)均通过引用以整体并入本文。如果本说明书与任何引用的参考文献之间发生冲突,则以本说明书(包

括其任何修正,其可能基于并入的参考文献)为准。除非另有说明,否则本文使用术语的标准领域公认含义。本文使用各种术语的标准缩写。

附图说明

[0022] 本专利或申请文件包含至少一张彩图。在提出请求并支付必要的费用后,将由专利局提供带有彩图的本专利或专利申请公开的副本。

[0023] 图1A-1D描绘了三维骨骼肌类器官的培养。图1A描绘了概述成肌细胞的分离以及在旋转烧瓶中扩增和培养以形成三维骨骼肌类器官的示意图。图1B示出了接种到旋转烧瓶中后10、20和30天的鼠类三维骨骼肌类器官。使用针对Pax7 (绿色) 和MyHC (红色) 的抗体进行免疫荧光成像。将核用Hoechst反染色。比例尺表示100 μ m。图1C示出了接种到球状平板中10天后的人类三维骨骼肌类器官。在第2天,将骨骼肌类器官从球状平板转移到低粘附力的10cm平板中,在轨道振荡器上再培养8天。图1D示出了接种到球状平板中10天后的人类三维骨骼肌类器官。使用针对Pax7 (绿色) 和MyHC (红色) 的抗体进行免疫荧光成像。将核用Hoechst反染色。比例尺表示100 μ m。

[0024] 图2A-2B描绘了骨骼肌类器官来源的卫星样细胞的转录图谱。图2A提供了描绘卫星细胞和培养的成肌细胞的基因图谱的热图。红色表示被上调的基因,而蓝色表示在成肌细胞与卫星细胞之间被下调的基因。图2B示出了在3D培养后第30天,来自骨骼肌类器官来源的nGFP⁺细胞的qPCR验证。使用源自于单个Pax7nGFP小鼠的不同成肌细胞系,一式三份地进行生物学实验(n=3)。结果显示为相对于增殖的成肌细胞的对数倍变化。

[0025] 图3A-3D证实骨骼肌类器官来源的卫星样细胞表达了卫星细胞龛所特有的蛋白聚糖。图3A提供了描绘卫星细胞特异性蛋白聚糖基因的子集相对于其在培养的成肌细胞上的表达的热图。红色表示被上调的基因,而蓝色表示在成肌细胞与卫星细胞之间被下调的基因。图3B示出了在3D培养后30天,来自骨骼肌类器官来源的nGFP⁺细胞的蛋白聚糖基因的qPCR验证。使用源自于单个Pax7nGFP小鼠的不同成肌细胞系,一式三份地进行生物学实验(n=3)。结果显示为相对于增殖的成肌细胞的对数倍变化。图3C提供了骨骼肌类器官的培养和分化以检测蛋白聚糖的示意图。图3D示出了在分化的第20天或第10天时冷冻切片的骨骼肌类器官。使用针对Pax7 (绿色) 和Bgn (红色-顶部) 或Tgfb β 3 (红色-底部) 的抗体进行免疫荧光成像。将核用Hoechst反染色。比例尺表示100 μ m。

[0026] 图4A-4E显示生成骨骼肌类器官的方法。图4A提供了概述骨骼肌类器官(SkMO)细胞形成的示意图。SkMO细胞通常包括SkMO 30D生长细胞和SkMO 30D分化细胞。SkMO 30D生长细胞是在旋转培养基中生长30天的骨骼肌类器官细胞。SkMO 30D分化细胞是在旋转培养基中培养20天和在分化培养基中培养10天的骨骼肌类器官细胞(在本文中也称为非天然存在的卫星细胞)。图4B示出了SkMO 30D生长细胞和SkMO 30D分化细胞。图4C示出了SkMO细胞表达Pax7,Pax7是内源性卫星细胞的关键转录因子。通过RNAseq研究SkMO的转录图谱,并使用多维比例图评估它们在状态空间中的聚集能力,如图4D所示。SkMO GFP⁺细胞(绿色和蓝色)就其转录特征而言接近内源性卫星细胞(红色)。SkMO D30生长细胞(蓝色)显示出比SkMO D30分化细胞(绿色)更易增殖,其中SkMO D30分化细胞聚集在更靠近内源性卫星细胞(红色)的位置。图4E提供了全局热图和树状结构关系图,进一步证实了图4D中提供的数据。

[0027] 图5A-5D提供了生物标志物和表型数据,表明骨骼肌类器官(SkMO)来源的细胞与

内源性卫星细胞相似。图5A提供了EdU掺入测定法(48小时处理)的结果,表明成肌细胞分裂并掺入了EdU,而内源性卫星细胞则没有。SkM0来源的细胞比成肌细胞更加休眠,并且与内源性卫星细胞(紫色)非常相似(SkM0 D30分化条件(红色))(图5B)。图5C提供了预测卫星细胞功能的体外测定法。卫星细胞在96孔板悬浮液中以单细胞形式培养,形成克隆,而成肌细胞则没有。这类似于成人干细胞的经典克隆测定法。图5D示出了源自于给定细胞类型的每个克隆的大小。SkM0来源的细胞与内源性卫星细胞更相似。

[0028] 图6A-6F提供了体内数据,表明骨骼肌类器官(SkM0)细胞在移植入受损的骨骼肌后会植入并重新填充。图6A提供了示出移植后SkM0细胞的植入和重新填充的方法的示意图。图6B-6C示出了源自SkM0处理的腿的生物发光(BLI)信号,而对于使用成肌细胞处理的腿,所述细胞无法提供足够的BLI信号(图6B)。在21天的时间过程(D2、D7、D14和D21)中对此进行定量,并包括了统计数据(图6C)。图6D示出了来自成肌细胞和来自供体源SkM0 D30分化细胞的纤维。图6E提供了图6D中所示的植入的定量。图6F示出了与成肌细胞相比,在用SkM0来源的细胞移植后,细胞在卫星细胞龛中的重新填充。图6G提供了重新填充测定法的定量(*注:SkM0细胞目前并不显著)。

[0029] 图7A-7C提供了证实人类成肌细胞形成SkM0细胞的人类数据。由人类成肌细胞形成的SkM0细胞为Pax7阳性(图7A)。图7B提供了说明从人类成肌细胞产生SkM0细胞并移植这些细胞的方法的示意图。图7C提供了人类成肌细胞的BLI定量。

[0030] 图8A-8E鉴定了在内源性卫星细胞和SkM0细胞中上调和下调的基因。对细胞进行多重RNA测序以鉴定内源性卫星细胞和SkM0细胞中与成肌细胞相比上调和下调的基因。鉴定了内源性卫星细胞、SkM0 D30生长细胞和SkM0 D30分化细胞相对于成肌细胞上调(图8A)和下调(图8B) >2倍的多个基因。这些基因可用于广泛定义内源性卫星细胞。经典通路中涉及的基因以绿色突出显示,而p53通路中涉及的基因以黄色突出显示。(注意*Pax7和Tgfbr3用红色标识,因为它们没有通过多重RNA测序鉴定,但根据先前获得的数据,已知存在于卫星和SkM0细胞中。)此外,鉴定出在SkM0 D30生长细胞和SkM0 D30分化细胞中相对于成肌细胞上调(图8C)和下调(图8D) >2倍但在内源性卫星细胞中不存在的多个基因。这些基因可用于区分SkM0细胞与内源性卫星细胞。与内源性卫星细胞相比,SkM0细胞特有的基因可能参与多种通路,包括Wnt信号转导的抑制(以红色突出显示)和/或蛋白酶体激活(以紫色突出显示)。图8E提供了显示在内源性卫星细胞、SkM0 D30生长细胞和SkM0 D30分化细胞中上调和下调的基因重叠的维恩图。另外鉴定了所涉及的通路(Notch激活、Wnt抑制、蛋白酶体激活)。

具体实施方式

[0031] 本公开的方面涉及用于从至少一个成肌细胞产生卫星细胞(本文称为非天然存在的卫星细胞或非自然卫星细胞)的组合物、方法、试剂盒和试剂,以及通过所述组合物、方法、试剂盒和试剂产生的卫星细胞,其用于细胞疗法、测定法和各种治疗方法中。

[0032] 根据本文所述方法产生的体外产生的卫星细胞显示出许多优点;例如,它们能够重新填充卫星细胞龛并增强肌肉再生。另外,所产生的卫星细胞可以提供用于细胞疗法(例如,移植到需要额外和/或功能性卫星细胞的受试者中)和研究的新平台。

[0033] 定义

[0034] 为方便起见,此处集合了本说明书、实施例和所附权利要求书中所用的某些术语。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。

[0035] 如本文所用,术语“体细胞”是指与种系细胞相对的形成生物体的主体的任何细胞。在哺乳动物中,种系细胞(也称为“配子”)是精子和卵子,它们在受精过程中融合在一起,产生一种称为合子的细胞,整个哺乳动物的胚胎都由此发育。哺乳动物体内的每种其它细胞类型——除了精子和卵子、产生它们的细胞(配子细胞)和未分化的干细胞之外,都是体细胞类型:内部器官、皮肤、骨骼、血液和结缔组织全部都由体细胞构成。在一些实施方式中,体细胞是“非胚体细胞”,其是指不是存在于胚胎中或从胚胎获得并且不是由这种细胞在体外增殖产生的体细胞。在一些实施方式中,所述体细胞是“成人体细胞”,其是指存在于或获自除胚胎或胎儿之外的生物体的细胞,或者由这种细胞在体外增殖产生的细胞。

[0036] 如本文所用,术语“成人细胞”是指在胚胎发育后遍及全身的细胞。

[0037] 术语“祖细胞”或“前体”细胞在本文中可互换使用,并且是指相对于其可以通过分化产生的细胞具有更原始(即,与完全分化的细胞相比,处于发育途径或进展的较早步骤)的细胞表型的细胞。通常,祖细胞也具有显著或非常高的增殖潜能。祖细胞可以产生多种不同的分化细胞类型或单一分化的细胞类型,取决于发育途径以及细胞发育和分化的环境。

[0038] 术语“表型”是指定义在特定的一组环境条件和因素下的细胞或生物体的一个或多个总生物学特征,而与实际基因型无关。

[0039] 如本文所用,术语“多能的”是指能够分化成超过一种分化细胞类型,并且优选地分化成所有三个胚细胞层的特征性细胞类型的细胞。多能细胞的主要特征是,使用例如裸鼠畸胎瘤形成测定法,它们能够分化为超过一种细胞类型,优选分化为所有三个胚层。多能性还可以通过胚胎干(ES)细胞标志物的表达来证明,尽管多能性的优选测试是证明能够分化为三个胚层中的每个的细胞。应该注意的是,简单地培养这些细胞本身并不能使其具有多能性。相对于通常在培养物中仅能够进行有限次数的分裂的原代细胞亲代,重编程的多能细胞(例如,如本文所定义术语的iPS细胞)也具有能够延长传代而不会丧失生长潜能的特征。

[0040] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够增殖并产生更多祖细胞的未分化细胞,所述祖细胞能够产生大量的母细胞,所述母细胞又可产生分化的或可分化的子细胞。所述子细胞本身可以被诱导以增殖并产生后代,所述后代随后分化成一种或多种成熟细胞类型,同时还保留了一个或多个具有亲代发育潜能的细胞。术语“干细胞”是指在特定情况下能够或有潜力分化为更特化或分化的表型并且在某些情况下保留增殖而基本上不分化的能力的祖细胞子集。在一种实施方式中,术语干细胞通常是指天然存在的母细胞,其子代(后代)通常在不同的方向上通过分化例如通过获得完全独立的特性而特化,如在胚胎细胞和组织的逐渐多样化中所发生。细胞分化是通常通过许多细胞分裂发生的复杂过程。分化的细胞可以源自于多能细胞,所述多能细胞本身也源自于多能细胞,等等。虽然这些多能细胞中的每一个都可以被认为是干细胞,但是每个细胞可以产生的细胞类型的范围可显著变化。一些分化的细胞也具有产生更大发育潜能的细胞的能力。这样的能力可以是自然的,或者可以在用各种因素处理后被人工诱导。在许多生物学实例中,干细胞也是“多能的”,因为它们可以产生超过一种的不同细胞类型的后代,但这不是“干细胞性”所必需的。自我更新是干细

胞定义的另一经典部分,并且在本文中使用时必不可少。在理论上,自我更新可以通过两种主要机制之一发生。干细胞可能不对称分裂,其中一个子代保持干细胞状态并且另一个子代表现出一些不同的其它特定功能和表型。或者,群体中的一些干细胞可以对称地分为两份干细胞,从而整体上维持一些干细胞在群体中,而群体中的其它细胞仅产生分化的后代。在形式上,开始于干细胞的细胞可能会走向分化的表型,但是然后“逆转”并重新表达干细胞表型,该术语通常由本领域普通技术人员称为“去分化”或“重编程”或“逆分化”。如本文所用,术语“多能干细胞”包括胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、胎盘干细胞等。

[0041] 本文使用的术语“内源性肌卫星细胞”或“内源性卫星细胞”是指在成熟肌肉中存在的几乎没有细胞质的小的单核祖细胞。发现它们夹在单个肌肉纤维的基底膜与肌膜(细胞膜)之间,并且可能难以与纤维的肌膜下核分开。内源性卫星细胞能够分化并融合,以增强现有的肌肉纤维并形成新的纤维。这些细胞代表了已知的最古老的成人干细胞龛,并参与肌肉的正常生长以及损伤或疾病后的再生。在未受损的肌肉中,大多数内源性卫星细胞是休眠的;它们既不分化也不经历细胞分裂。对机械应变作出应答,内源性卫星细胞被激活。激活的内源性卫星细胞最初会增殖为骨骼成肌细胞,然后进行成肌分化。内源性卫星细胞可通过本文所述的许多特征与本发明的非天然存在的卫星细胞区分开。

[0042] 如本文所用,“卫星细胞”、“非天然存在的卫星细胞”、“非自然卫星细胞”和“SkMO 30D分化细胞”均是指经由成肌细胞去分化而产生的卫星细胞。卫星细胞可能表现出一种或多种与内源性卫星细胞共有的特征,包括但不限于:重新填充卫星细胞龛的能力,驱动肌肉再生的能力,展现基因标志物的适当表达、糖蛋白的适当表达,和在培养物中的可扩增性。然而,非天然存在的卫星细胞与如本文所述的内源性卫星细胞不相同且可区分,包括基于基因表达的不同。

[0043] 如本文所用,术语“增殖”是指细胞的生长和分裂。在一些实施方式中,如本文关于细胞所用的术语“增殖”是指可以在一段时间内数量增加的细胞群组。

[0044] 如本文所用,“诱导”、“增强”或“增加”卫星细胞增殖是指卫星细胞以更快的速率和/或更频繁地复制。在本文描述的该方面和其它方面的一些实施方式中,相对于未处理的对照,卫星细胞增殖增加至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或更多。相对于其中卫星细胞不与本文所述的化合物接触的对照,可以通过测量与所述化合物接触时复制的卫星细胞的数量来确定卫星细胞增殖的%或倍数增加。增殖的增加还可以基于在相应的处理和未处理的对照中复制细胞与细胞总数的比率。在一些实施方式中,将已处理和未处理对照中的细胞总数用于确定增殖。可以使用在美国专利公开号2009/0136481中描述的BrdU掺入方法来确定卫星细胞增殖,所述专利公开的内容通过引用并入本文。

[0045] 在细胞个体发育的情况下,形容词“分化的”或“分化”是一个相对术语,意指“分化的细胞”是相比于所比较的细胞在发育途径上进一步发展的细胞。因此,干细胞可以分化成谱系受限的前体细胞(例如外胚层干细胞),继而又可以沿途径进一步向下分化成其它类型的前体细胞(例如神经外胚层细胞),然后分化成末期阶段分化细胞,其在某些组织类型中发挥特征性作用,并且可以保留或不保留进一步增殖的能力。

[0046] 术语“分化的细胞”是指包括以其天然形式不具有如本文所定义术语的多能性的任何原代细胞。换句话说,术语“分化的细胞”是指在细胞分化过程中源自于较不特化的细

胞类型的细胞(例如干细胞,如诱导的多能干细胞)的较特化的细胞类型的细胞。

[0047] 相反,形容词“去分化的”或“去分化”是一个相对术语,意指“去分化的细胞”是在发育途径上已恢复到该细胞的先前形式的细胞。术语“去分化的细胞”是指包括源自于较特化的细胞类型的较不特化的细胞类型的任何细胞。例如,成肌细胞可以去分化为卫星细胞。

[0048] 如本文所提及的术语“细胞培养基”(本文中也称为“培养基”)是含有维持细胞活力并支持增殖的营养素的用于培养细胞的培养基。细胞培养基可以以适当的组合包含以下任何一者:盐,缓冲液,氨基酸,葡萄糖或其它糖,抗生素,血清或血清替代品,以及其它成分如肽生长因子等。通常用于特定细胞类型的细胞培养基是本领域技术人员已知的。

[0049] 术语“营养培养基”是指含有促进增殖的营养素的用于培养细胞的培养基。营养培养基可以以适当组合形式包含任何以下物质:等渗盐水,缓冲液,氨基酸,抗生素,血清或血清替代品,以及外源性添加因子。通过在培养基中培养第一细胞群体,然后收集培养基来制备“条件培养基”。然后可以将条件培养基(连同细胞分泌到培养基中的任何物质)用于支持第二细胞群体的生长。

[0050] 本文所提及的各种培养基包括成肌细胞培养基、旋转培养基和分化培养基。术语“分化培养基”是指用于分化和去分化细胞两者的培养基。

[0051] 如本文所用,术语“试剂”是指任何化合物或物质,例如但不限于小分子、核酸、多肽、肽、药物、离子等。“试剂”可以是任何化学物质、实体或部分,包括但不限于合成的和天然存在的蛋白质和非蛋白质实体。在一些实施方式中,试剂是核酸、核酸类似物、蛋白质、抗体、肽、适体、核酸寡聚体、氨基酸或碳水化合物,包括但不限于蛋白质、寡核苷酸、核酶、DNA酶、糖蛋白、siRNA、脂蛋白、适体及其修饰和组合等。在某些实施方式中,试剂是具有化学部分的小分子。例如,化学部分包括未取代或取代的烷基、芳族或杂环基部分,包括大环内酯、来普霉素和相关的天然产物或其类似物。化合物可以已知具有所需的活性和/或性质,或者可以选自多种化合物的文库。

[0052] 如本文所用,术语“接触”(即,使至少一个胚状体或其前体与分化培养基或试剂接触)旨在包括将分化培养基和/或试剂与细胞一起在体外温育(例如,向培养的细胞中添加分化培养基或试剂)。在一些实施方式中,术语“接触”并不旨在包括细胞在体内暴露于在受试者中可能天然存在的如本文所公开的化合物(即,由于自然生理过程而发生的暴露)。可以以任何合适的方式进行如与卫星细胞的产生有关的实施方式中使至少一种成肌细胞或其前体与分化培养基或试剂接触的步骤。例如,可以在贴壁培养或悬浮培养中处理细胞。在一些实施方式中,在促进骨骼肌类器官(本文也称为肌球)形成的条件下处理细胞。本公开内容涵盖促进骨骼肌类器官形成的任何条件。促进骨骼肌类器官形成的条件的实例包括但不限于在低附着组织培养板、旋转烧瓶、Aggrewell板中的悬浮培养。在一些实施方式中,发明人已经观察到骨骼肌类器官在含有20%血清(例如,热灭活胎牛血清)的培养基中保持稳定。

[0053] 应当理解,与分化培养基和/或试剂接触的细胞也可以同时或随后与另一种试剂,例如其它分化试剂或环境接触,以稳定细胞或进一步分化所述细胞。

[0054] 术语“外源”是指存在于不是其天然来源的细胞或生物体中的物质。例如,术语“外源核酸”或“外源蛋白质”是指已经通过涉及人手的过程被引入到生物系统中的核酸或蛋白质,所述生物系统例如是其中所述核酸或蛋白质通常不会存在或以较低量存在的细胞或生

物体。如果将某种物质引入继承该物质的细胞或该细胞的祖先,则该物质将被视为外源物质。相反,术语“内源”是指生物系统的天然物质。

[0055] 术语“表达”是指参与产生RNA和蛋白质并且视情况分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如转录、翻译、折叠、修饰和加工。“表达产物”包括从基因转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA获得的多肽。

[0056] 在核酸或多肽的情况下,如本文所用的术语“分离的”或“部分纯化的”是指与至少一种其它成分(例如,核酸或多肽)分离的核酸或多肽,所述其他成分在其天然来源中与所述核酸或多肽一起存在和/或在由细胞表达时或在分泌多肽的情况下分泌时将与所述核酸或多肽一起存在。化学合成的核酸或多肽或使用体外转录/翻译合成的被认为是“分离的”。

[0057] 如本文所用,术语“分离的细胞”是指已经从其最初存在的生物体中去除的细胞或该细胞的后代。任选地,已经例如在其它细胞存在下体外培养所述细胞。任选地,随后将所述细胞引入第二生物体中或重新引入到从中分离出它(或其来源细胞)的生物体中。

[0058] 如本文所用,针对分离的细胞群体的术语“分离的群体”是指已经从混合的或异质的细胞群体中去除并分离的细胞群体。在一些实施方式中,与从中分离或富集细胞的异质群体相比,分离的群体是基本上纯的细胞群体。

[0059] 术语“富集”或“富集的”在本文中可互换使用,并且是指一种类型的细胞的产量(分数)相比于起始培养或制备中该类型的细胞的分数增加至少10%。

[0060] 术语“调节”与其在本领域中的用法一致地使用,即意指引起或促进相关过程、途径或现象的定性或定量变化、改变或修饰。不加限制地,这种改变可以是过程、途径或现象的不同组分或分支的相对强度或活性的增加、减少或改变。“调节剂”是引起或促进相关过程、途径或现象的定性或定量变化、改变或修饰的试剂。

[0061] 如本文所用,术语“DNA”定义为脱氧核糖核酸。

[0062] 如本文所用的“标志物”用于描述细胞的特征和/或表型。标志物可用于选择包含相关特征的细胞。标志物将随特定细胞而变化。标志物是特定细胞类型的细胞或该细胞类型表达的分子的特征,无论是形态、功能还是生化(酶)特征。优选地,这样的标志物是蛋白质,并且更优选地,具有针对抗体或本领域可用的其它结合分子的表位。然而,标志物可以由细胞中存在的任何分子组成,包括但不限于蛋白质(肽和多肽)、脂质、多糖、核酸和类固醇。形态特征或性状的实例包括但不限于形状、大小和核质比。功能特征或性状的实例包括但不限于粘附于特定衬底的能力,掺入或排除特定染料的能力,在特定条件下迁移的能力,以及沿特定谱系分化或去分化的能力。标志物可以通过本领域技术人员可用的任何方法来检测。标志物也可以是形态特征的不存在或者蛋白质、脂质等的不存在。标志物可以是多肽的存在和不存在的一组独特特征与其它形态特征的组合。

[0063] 术语“可选择标志物”是指当表达时赋予细胞以可选择表型的基因、RNA或蛋白质,例如对细胞毒性或细胞生长抑制剂的抗性(例如抗生素抗性),营养原养,或可以用作区分表达特定蛋白质的细胞与不表达该蛋白质的细胞的基础的特定蛋白质的表达。可以容易检测表达的蛋白质,例如荧光或发光蛋白质或作用在底物上以产生有色、荧光或发光物质的酶(“可检测标志物”)构成了可选择标志物的子集。与通常在多能细胞中选择性或排他性表达的基因的天然的表达控制元件相连的可选择标志物的存在,使得有可能鉴定和选择已被重编程为多能状态的体细胞。可以使用多种可选择标志物基因,例如新霉素抗性基因

(neo), 嘌呤霉素抗性基因 (puro), 鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (gpt), 二氢叶酸还原酶 (DHFR), 腺苷脱氨酶 (ada), 嘌呤霉素-N-乙酰基转移酶 (PAC), 潮霉素抗性基因 (hyg), 多药抗性基因 (mdr), 胸苷激酶 (TK), 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) 和 hisD 基因。可检测的标志物包括绿色荧光蛋白 (GFP), 蓝色、天蓝色、黄色、红色、橙色和青色荧光蛋白, 以及任何这些蛋白的变体。也可以使用发光蛋白, 例如荧光素酶 (例如萤火虫或海肾荧光素酶 (*Renilla luciferase*))。对本领域技术人员显而易见的是, 如本文所用的术语“可选择标志物”可以指基因或该基因的表达产物, 例如编码的蛋白质。

[0064] 在一些实施方式中, 相对于不表达或以显著较低水平表达可选择标志物的细胞, 可选择标志物赋予表达其的细胞以增殖和/或存活优势。当细胞维持在特定条件即“选择性条件”下时, 通常会出现这种增殖和/或存活优势。为了确保有效选择, 可以将细胞群体维持在特定条件下并持续足够的时间段, 以使得不表达所述标志物的细胞不增殖和/或不能存活, 并从群体中消除或将它们的数量减少到群体的仅很小一部分。通过将细胞群体维持在特定条件下而得以在很大程度上或完全消除不表达该标志物的细胞的选择表达赋予增殖和/或存活优势标志物的细胞的过程, 在本文称为“正选择”, 并且所述标志物被称为“对正选择有用”。在本文所述的某些方法中, 负选择和可用于负选择的标志物也受到关注。相对于不表达标志物或以显著较低水平表达标志物的细胞, 此类标志物的表达赋予表达标志物的细胞以增殖和/或存活劣势 (或换一种说法, 不表达标志物的细胞相对于表达标志物的细胞具有增殖和/或存活优势)。因此, 当在选择性条件下维持足够的时间段时, 可以从细胞群体中很大程度上或完全消除表达标志物的细胞。

[0065] 术语“受试者”和“个体”在本文可互换使用, 并且是指动物, 例如人类, 可以从中获得细胞和/或利用如本文所述的细胞对其进行治疗, 包括预防性治疗。为了治疗对特定动物例如人类受试者具有特异性的那些感染、病状或疾病状态, 术语受试者是指该特定动物。如本文可互换使用的“非人类动物”和“非人类哺乳动物”包括哺乳动物, 例如大鼠、小鼠、兔、绵羊、猫、狗、牛、猪和非人类灵长类动物。术语“受试者”还涵盖任何脊椎动物, 包括但不限于哺乳动物、爬行动物、两栖动物和鱼类。然而, 有利地, 受试者是哺乳动物, 例如人类, 或其它哺乳动物, 例如家养哺乳动物, 例如狗、猫、马等, 或生产哺乳动物, 例如牛、羊、猪等。

[0066] 如应用于分离细胞, 术语“处理”等包括使细胞经受任何种类的过程或条件或对细胞进行任何种类的操作或程序。如应用于受试者, 术语“治疗”、“处理”等是指向个体提供医学或外科看护、护理或管理。个体通常生病或受伤, 或者相对于普通人群而言患病风险增加, 并且需要这种看护、护理或管理。它可以包括向受试者施用有效量的组合物, 以使得受试者表现出疾病的至少一种症状的减轻或疾病的改善, 例如有益或期望的临床结果。为了本发明的目的, 有益或期望的临床结果包括但不限于一种或多种症状的减缓, 疾病程度的减轻, 疾病状态的稳定 (即不恶化), 疾病进展的延迟或减慢, 疾病状态的改善或缓和, 以及可检测或不可检测的缓解 (无论是部分缓解还是全部缓解)。治疗可以指与未接受治疗的预期存活相比延长存活。因此, 本领域技术人员意识到治疗可以改善疾病状况, 但是可能不是完全治愈该疾病。术语“治疗”包括预防。需要治疗者包括已经被诊断出患有病状 (例如肌肉病症或疾病) 的那些, 以及由于遗传易感性或其它因素而可能患上病状的那些。

[0067] 术语“组织”是指一组或一层特化细胞, 它们一起执行某些特殊功能。术语“组织特异性”是指来自特定组织的细胞来源。

[0068] 术语“减少”、“降低”或“抑制”在本文中通常都用来表示减少统计学显著量。然而，为了避免疑问，“降低”、“减少”或“抑制”是指与参考水平相比减少至少10%，例如与参考水平相比减少至少约20%，或至少约30%，或至少约40%，或至少约50%，或至少约60%，或至少约70%，或至少约80%，或至少约90%，或至多且包括100%的减少（即与参考样品相比不存在的水平），或介于10-100%之间的任何减少。

[0069] 术语“增加”或“增强”或“激活”在本文中通常都用来表示增加统计学显著量；为了避免任何疑问，术语“增加”或“增强”或“激活”是指与参考水平相比增加至少10%，例如与参考水平相比增加至少约20%，或至少约30%，或至少约40%，或至少约50%，或至少约60%，或至少约70%，或至少约80%，或至少约90%，或至多并包括100%增加或介于10-100%之间的任何增加，或与参考水平相比增加至少约2倍，或至少约3倍，或至少约4倍，或至少约5倍，或至少约10倍，或介于2倍与10倍以上之间的任何增加。

[0070] 术语“统计学显著”或“显著地”是指统计学显著性，并且通常是指低于正常的标志物浓度的两个标准差(2SD)或更低。该术语是指存在差异的统计证据。它定义为当零假设实际上为真时作出拒绝零假设的决定的可能性。通常使用p值作出决定。

[0071] 如本文所用，术语“包含”是关于对本发明必需的组合物、方法及其各自组分使用的，但仍可包括未指定的要素，无论是否必要。

[0072] 如本文所用，术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本发明的该实施方式的基本和新颖或功能性特征的额外要素。

[0073] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其相应组分，其排除了在实施方式的描述中未列举的任何要素。

[0074] 除非上下文另外明确指出，否则如本说明书和所附权利要求书中所用的不带具体数量的单数形式包括复数个指称物。因此，例如，对于“方法”的提及包括一种或多种本文所述类型的方法和/或步骤，和/或在阅读本公开等之后对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

[0075] 克隆与细胞培养

[0076] 可以在本文描述的技术中使用的用于分子遗传学和遗传工程的说明性方法可见于例如：现行版的《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (Sambrook等, Cold Spring Harbor); 《哺乳动物细胞的基因转移载体》(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells) (Miller和Calos编); 以及《最新分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology) (F.M. Ausubel等编, Wiley&Sons)。细胞生物学、蛋白质化学和抗体技术可见于例如《最新蛋白质科学实验指南》(Current Protocols in Protein Science) (J.E. Colligan等编, Wiley&Sons); 《最新细胞生物学实验指南》(Current Protocols in Cell Biology) (J.S. Bonifacino等, Wiley&Sons) 和《最新免疫学实验指南》(Current protocols in Immunology) (J.E. Colligan等编, Wiley&Sons.)。用于遗传操作的说明性试剂、克隆载体和试剂盒可以例如从BioRad、Stratagene、Invitrogen、ClonTech和Sigma-Aldrich Co. 商购获得。

[0077] 合适的细胞培养方法可见于例如现行版的《动物细胞培养：基础技术手册》(Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique) (R.I. Freshney编, Wiley&Sons); 《细胞培养的通用技术》(General Techniques of Cell Culture) (M.A. Harrison和

I.F.Rae,Cambridge Univ.Press);和《胚胎干细胞:方法和方案》(Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols)(K.Turksen编,Humana Press)。合适的组织培养物供应和试剂可例如从Gibco/BRL、Nalgene-Nunc International、Sigma Chemical Co.和ICN Biomedicals商购获得。

[0078] 多能干细胞可由本领域普通技术人员进行增殖,并使用促进增殖而不促进分化的培养条件连续培养。示例性的含血清ES培养基由80%DMEM(例如敲除DMEM,Gibco)、20%的限定胎牛血清(FBS,Hyclone)或血清替代品(WO 98/30679)、1%非必需氨基酸、1mM L-谷氨酰胺和0.1mMB-巯基乙醇制成。在即将使用前,将人类bFGF添加至4ng/mL(WO 99/20741, Geron Corp.)。传统上,ES细胞是在饲养细胞层上培养的,饲养细胞通常是源自于胚胎或胎儿组织的成纤维细胞。

[0079] 或者,即使没有饲养细胞,多能SC也可以维持在未分化状态。无饲养细胞培养的环境包括合适的培养底物,尤其是细胞外基质,例如MATRIGEL®(胶状蛋白混合物)或层粘连蛋白。通常,在细胞完全分散之前停止酶促消化(使用胶原酶IV约5分钟)。然后将约10至2,000个细胞的团块直接铺在衬底上,而无需进一步分散。

[0080] 产生卫星细胞

[0081] 本公开的方面涉及产生卫星细胞(例如骨骼肌细胞等)。通常,根据本文公开的方法生产的卫星细胞表现出功能性卫星细胞的几个标志,包括但不限于重新填充卫星细胞龕、驱动肌肉再生、证明基因标志物的适当表达的能力,并且可在培养物中增殖。

[0082] 可以根据用于将成肌细胞去分化至所需的去分化阶段的任何合适的培养方案或一系列培养方案来生产卫星细胞。在一些实施方式中,通过在适于至少一个成肌细胞去分化为卫星细胞的条件下将至少一个成肌细胞培养一段时间来生产卫星细胞。在一些实施方式中,卫星细胞是基本上纯的卫星细胞群体。

[0083] 在某些实施方式中,在成肌细胞培养基中培养成肌细胞。可以在微孔板(例如胶原包被的培养皿)上在培养基中培养成肌细胞。在一些实施方式中,成肌细胞培养基包括营养培养基(例如Ham's F10)、胎牛血清(例如20%热灭活胎牛血清)、碱性成纤维细胞生长因子、非必需氨基酸和glutamax。可以将成肌细胞在微孔板中培养1至30天、1至15天、1至10天、1至5天或约4天。在一些方面,将成肌细胞在微孔板上培养,直至达到50至100汇合、75至90汇合或约80汇合。

[0084] 在一些实施方式中,成肌细胞是从受试者的骨骼肌中分离出来的。例如,成肌细胞可以从人类或非人类动物例如大鼠、小鼠、兔、绵羊、猫、狗、牛、猪和非人类灵长类动物的骨骼肌中分离。或者,成肌细胞可以是胚胎来源的肌肉细胞。

[0085] 在某些实施方式中,将成肌细胞在成肌细胞培养基中培养直至达到约80汇合,然后将其接种到旋转烧瓶、球状板等中。在一些方面,以约500,000个细胞/毫升至约150万个细胞/毫升、或约750,000个细胞/毫升至约125万个细胞/毫升、或约100万个细胞/毫升的密度接种旋转烧瓶。在旋转烧瓶中在旋转培养基中培养成肌细胞。在一些实施方式中,旋转培养基包括基础培养基(例如DMEM:F12)、胎牛血清(例如20%热灭活胎牛血清)、碱性成纤维细胞生长因子、非必需氨基酸和glutamax。可以将成肌细胞在旋转烧瓶中培养至少10天、至少20天、至少30天、10至30天,10至20天,或者在一些方面培养20天。所得的骨骼肌类器官或肌球由Pax7+和MyHC+细胞的组合构成。

[0086] 在旋转烧瓶中在旋转培养基中培养的成肌细胞形成三维球体(例如,肌球或骨骼肌类器官)。在一些方面,骨骼肌类器官包括分化的骨骼肌细胞和增殖性肌原细胞。在形成骨骼肌类器官时,可以将培养基改变为分化培养基。在一些方面,分化培养基是无血清培养基。分化培养基可包括营养培养基(例如DMEM)、非必需氨基酸和glutamax。在一些方面,将骨骼肌类器官在分化培养基中培养至少1天、至少5天、至少10天、1至10天、1至30天、10至30天、10至20天,或在一些实施方式中持续10天。在用分化培养基培养的过程中,骨骼肌类器官中存在的增殖性肌原细胞休眠并返回到卫星细胞状态。然后可以从培养基中分离出卫星细胞。

[0087] 在一些实施方式中,卫星细胞在培养物中可增殖。在一些实施方式中,将产生的卫星细胞与化合物接触以增加卫星细胞增殖。诱导、增强或增加卫星细胞增殖的方法包括使卫星细胞与选自以下的化合物接触:激酶抑制剂、G蛋白偶联受体(GPCR)调节剂、表观遗传修饰剂、组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)调节剂、刺猬信号转导通路调节剂、神经肽、多巴胺受体调节剂、血清素受体调节剂、组胺受体调节剂、腺苷受体激动剂、离子载体、离子通道调节剂、 γ -分泌酶调节剂、皮质类固醇及其任何组合。增殖增强剂的实例包括但不限于在PCT/US2017/016099中描述的那些,所述文件通过引用并入本文。

[0088] 卫星细胞

[0089] 在一些实施方式中,本公开提供了功能性卫星细胞。在一些实施方式中,本发明的方法允许生成展现一个或多个特征的卫星细胞,所述特征包括但不限于重新填充卫星细胞龛的能力,驱动肌肉再生的能力,展现基因标志物的适当表达,糖蛋白的适当表达并且在培养物中可扩增。

[0090] 在一些实施方式中,可以使用本领域普通技术人员常用的任何方法来确认通过暴露于至少一种分化培养基而使成肌细胞去分化而产生的卫星细胞的存在。在一些实施方式中,可以通过选择性基因表达标志物来鉴定此类卫星细胞。在一些实施方式中,所述方法可以包括检测卫星细胞标志物的阳性表达(例如存在)。在一些实施方式中,可以使用试剂检测标志物。用于标志物的试剂可以是例如针对标志物的抗体或用于RT-PCR或PCR反应例如半定量或定量RT-PCR或PCR反应的引物。此类标志物可用于评估是否已产生卫星细胞。抗体或其它检测试剂可以与用于检测的标记例如放射、荧光(例如GFP)或比色标记连接。如果检测试剂是引物,则其可以以干燥制剂例如冻干制剂或以溶液的形式提供。

[0091] 可以通过测定卫星细胞的特征性标志物的表达来监测至少一个成肌细胞或其前体向卫星细胞的进展。在一些过程中,通过检测某些标志物的存在或不存在来确定所述标志物的表达。或者,可以通过测量某些标志物在细胞培养物的细胞或细胞群体中存在的水平来确定所述标志物的表达。在某些过程中,确定了卫星细胞的特征性标志物的表达,以及成肌细胞或其前体的特征性标志物的显著表达的缺乏。

[0092] 如关于监测从成肌细胞产生卫星细胞所述,可以使用定性或半定量技术,例如印迹转移方法和免疫细胞化学,使用本领域普通技术人员通常已知的方法来测量标志物表达。或者,可以通过使用诸如定量PCR的技术通过本领域通常已知的方法来准确地定量标志物表达。

[0093] 在一些实施方式中,所产生的卫星细胞表达选自核心肌原基因Pax7和Myf5的一种或多种基因表达标志物。可替代地或附加地,所生成的卫星细胞不表达骨骼肌MyoD的主要

转录因子。

[0094] 在一些实施方式中,卫星细胞可以替代地或附加地以表达选自休眠相关基因 *Spry1*、*Nm1*、*Nfia*、*Fos*、*Dusp1*或其任何组合的一种或多种标志物为特征。在一些实施方式中,骨骼肌类器官培养物中的卫星细胞的特征还可以在于表达选自Notch信号转导通路 *Notch1*、*Notch2*、*Notch3*、*HeyL*、*Hey2*、*Hes*或其任何组合的一种或多种标志物。卫星细胞可表达 *Pax7*、*Myf5*、至少一种休眠相关基因和至少一种Notch信号转导通路基因。

[0095] 在一些实施方式中,卫星细胞表达糖蛋白(例如,通常仅存在于卫星细胞龛中的糖蛋白)。卫星细胞表达的糖蛋白标志物可以包括 *Bgn*、*TgfbrIII*、*Dag1*、*Dcn*和 *Gpc3*。

[0096] 在一些实施方式中,卫星细胞表达至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种或至少三十种以下基因:*Dcn*、*Dpt*、*Hey1*、*Nr4a1*、*Col4a1*、*Pax7*、*Tgfbr3*、*Fos*、*Egr1*、*Dag1*、*Apoe*、*Spry1*、*Kat2b*、*Cav1*、*Cd82*、*Igfbp4*、*Thbs2*、*Igfbp7*、*Serp1g1*、*Fosb*、*Zfp36*、*Nrep*、*Sepp1*、*Junb*、*Ier2*、*Col15a1*、*Adh1*、*Cp*、*Ramp2*、*Sparc11*、*P2ry14*、*Pmp22*、*Igf1*、*S1pr3*、*Klf9*、*Col6a1*、*Txnip*、*Glul*、*Col6a2*、*Ncald*、*Cc2d2a*、*Gpm6b*、*Timp3*、*Prkcdp*、*Nfia*、*Gpr124*、*Psmb11*、*Ccdc80*、*Malat1*、*Zfp3611*、*Gsn*、*Sdpr*、*Slc16a2*、*Olfml3*、*1810026B05Rik*、*Adamts1*、*Olfml2b*、*Gng11*、*Cd200*、*Fcgrt*、*Nav1*、*Lamc1*、*Atp2b4*、*Tagln*、*Mkl2*、*Col4a2*、*Htra3*、*Fxyd1*、*Ogn*、*Tgfb3*、*Tcp1112*、*Spats21*、*Capn6*、*Fgfr1*、*Mt2*、*Cdkn2c*、*Tln2*、*Ndr2g*、*Bhlhe40*、*Fst11*、*Tcf4*、*Igsf3*、*Tmem123*、*Col3a1*、*Emp2*、*Itm2a*、*Xbp1*、*Crip1*、*Sparc*、*Cd9*、*Itgb5*、*Sdc1*、*Vcan*、*Bgn*、*Igfbp5*、*Col5a1*、*Zcchc24*、*Lum*、*Postn*、*Sfrp4*、*Spon2*、*Col8a1*、*Wisp2*、*Adamts2*、*Colec12*、*Dnm3os*、*Plat*、*2310010J17Rik*、*Ctsa*、*Ank*、*Dkk2*、*Fap*、*Mmp3*、*Dmp1*、*Col6a3*、*Pdgfrb*、*Colla1*、*Mgp*、*Tmem100*、*Ctsc*、*Nr2f1*、*Cfh*、*Pdgfra*、*Dio2*、*Htra1*、*Dkk3*、*Islr*、*Foxs1*、*Tgfb2*、*Tgm2*、*Thbd*、*Uba7*、*Agtr2*、*Cyp1b1*、*Tspan15*、*Osr2*、*Fam129a*、*Plekha6*、*Mmp2*、*Arrdc3*、*Matn2*、*Mab2111*、*Pvr12*、*Adamts14*、*Cd248*、*Gulp1*、*Mfap2*、*Idua*、*Cspg4*、*Spock1*、*Mfap4*、*Hexb*、*Cilp*、*Pold4*、*Crebrf*、*Col14a1*、*Tmem42*、*Nedd9*、*Rcn3*、*Sept8*、*Pcolce*、*Edil3*、*Nupr1*、*Phf17*、*Plin3*、*Aebp1*、*Hmgcs1*、*P4ha1*、*Lama2*、*Csrp2*、*Rnf167*、*H1f0*、*Fnl1*、*Mmp14*、*Cpq*、*Mrc2*、*Ifngr1*、*St3gal5*、*Fbn1*、*Sdc2*、*Adcy7*、*Ckm*、*Hexa*、*Capg*、*Klhl13*、*Loxl1*、*Fdft1*、*Ifi2711*、*Rbp1*、*Nr2f2*、*Cst3*、*Pxdn*、*Ecml*、*Mybpcl*、*Igf2r*、*Serpinh1*、*Mt1*、*Lpar1*、*Atraid*、*Scd2*、*Dap*、*Ppic*、*App*、*Lamp2*、*Col5a2*、*Gpc1*、*Hspa5*、*Pmepa1*、*Laptm4a*和 *Lrp1*。在一些方面,与成肌细胞相比,所表达的基因上调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0097] 在一些实施方式中,卫星细胞表达至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种或至少三十种以下基因:*Dcn*、*Dpt*、*Hey1*、*Nr4a1*、*Col4a1*、*Pax7*、*Tgfbr3*、*Fos*、*Egr1*、*Dag1*、*Apoe*、*Spry1*、*Kat2b*、*Cav1*、*Cd82*、*Igfbp4*、*Thbs2*、*Igfbp7*、*Serp1g1*、*Fosb*、*Zfp36*、*Nrep*、*Sepp1*、*Junb*、*Ier2*、*Col15a1*、*Adh1*、*Cp*、*Ramp2*、*Sparc11*、*P2ry14*、*Pmp22*、*Igf1*、*S1pr3*、*Klf9*、*Col6a1*、*Txnip*、*Glul*、*Col6a2*、*Ncald*、*Cc2d2a*、*Gpm6b*、*Timp3*、*Prkcdp*、*Nfia*、*Gpr124*、*Psmb11*、*Ccdc80*、*Malat1*、*Zfp3611*、*Gsn*、*Sdpr*、*Slc16a2*、*Olfml3*、*1810026B05Rik*、*Adamts1*、*Olfml2b*、*Gng11*、*Cd200*、*Fcgrt*、*Nav1*、*Lamc1*、*Atp2b4*、*Tagln*、*Mkl2*、*Col4a2*、*Htra3*、*Fxyd1*、*Ogn*、*Tgfb3*、*Tcp1112*、*Spats21*、*Capn6*、*Fgfr1*、*Mt2*、*Cdkn2c*、*Tln2*、*Ndr2g*、*Bhlhe40*、*Fst11*、*Tcf4*、*Igsf3*、*Tmem123*、*Col3a1*、*Emp2*、*Itm2a*、*Xbp1*、*Crip1*、*Sparc*和 *Cd9*。在一些方面,与成肌细胞相比,所

表达的基因上调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0098] 在一些实施方式中,卫星细胞表达至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种或至少三十种以下基因:Itgb5、Sdc1、Vcan、Bgn、Igfbp5、Col5a1、Zcchc24、Lum、Postn、Sfrp4、Spon2、Col8a1、Wisp2、Adamts2、Clec12、Dnm3os、Plat、2310010J17Rik、Ctsa、Ank、Dkk2、Fap、Mmp3、Dmp1、Col6a3、Pdgfrb、Col1a1、Mgp、Tmem100、Ctsc、Nr2f1、Cfh、Pdgfra、Dio2、Htra1、Dkk3、Islr、Foxs1、Tgfb2、Tgm2、Thbd、Uba7、Agtr2、Cyp1b1、Tspan15、Osr2、Fam129a、Plekha6、Mmp2、Arrdc3、Matn2、Mab21l1、Pvrl2、Adamts14、Cd248、Gulp1、Mfap2、Idua、Cspg4、Spock1、Mfap4、Hexb、Cilp、Pold4、Crebrf、Col14a1、Tmem42、Nedd9、Rcn3、Sept8、Pcolce、Edil3、Nupr1、Phf17、Plin3、Aebp1、Hmgcs1、P4ha1、Lama2、Csrp2、Rnf167、Hlf0、Fn1、Mmp14、Cpq、Mrc2、Ifngr1、St3gal5、Fbn1、Sdc2、Adcy7、Ckm、Hexa、Capg、Klhl13、Loxl1、Fdft1、Ifi2711、Rbp1、Nr2f2、Cst3、Pxdn、Ecm1、Mybp1、Igf2r、Serpinh1、Mt1、Lpar1、Atraid、Scd2、Dap、Ppic、App、Lamp2、Col5a2、Gpc1、Hspa5、Pmepa1、Laptm4a和Lrp1。在一些方面,与成肌细胞相比,所表达的基因上调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0099] 在一些实施方式中,卫星细胞表达Pax7、Tgfbr3、Fos、Spry1、Cav1和Cd82中的至少一种。与成肌细胞相比,所表达的基因可以上调至少两倍。

[0100] 在一些实施方式中,卫星细胞表达一种或多种参与Wnt通路抑制的基因。在一些方面,涉及Wnt通路抑制的基因选自:Sfrp4、Wisp2、Dkk2和Dkk3。在一些实施方式中,卫星细胞表达涉及蛋白酶体激活的一种或多种基因。在一些方面,涉及蛋白酶体激活的基因选自:Ctsa、Ctsc、Idua、Hexb、Hexa、Igf2r、Lamp2和Laptm4a。

[0101] 在一些实施方式中,卫星细胞下调至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种或至少三十种以下基因的表达:Tspan9、Sema3e、Hspd1、Tipin、Rasa1、Sct、Mdm2、Csf1、Mstn、Alox5、Ckap2、Camk1g、Mcpt8、Ccng1、Tuba1c、Rps271、Hmga2、Ccnb1、Itga6、Nasp、Dynap、Myof、Epha2、Gtse1、Lcelg、Cd24a、Lgals3、Steap1、Ankrd1、Hes6、Cox6b2、Gm15772、S100a6、Col18a1、Steap2、Smyd4、Tmem171、Cttn、Car3、Rrm2、Asns、Chrna1、Ugcg、Cdh2、Myod1、Tpml、Pa2g4、Fabp5、Mcm4、Rrm1、Ftl1、Aaas、Tmsb10、Lrrn1、Ddx21、Odc1、Tmem55a、Prdx6、Sox11、Cited2、Ddx39、Slc44a2、Bax、Gal、Rbm11、Mak16、Nap111、Dctpp1、Nme1、Ccnb1、Cks1b、Myl9、Prrc2c、Set、Hnrnpf、Ppp1r14b、Ran、Tuba1b、Rbm3、Hsp90aa1、Nme2、Hsp61、Snrpg、Npm1、Reln、Msln、Sema6d、Itgb4、Ldhd、Nop58、Dkc1、Rpl12、Gchfr、Mgmt、Milr1、Fnbp11、Anxa3、Tek、2010204K13Rik、Selp、Efnb2、Cirh1a、Fgf21、Stmn2、Gpatch4、Peg3、Snhg8、Fbl、Ahcy、Ebna1bp2、Nop56和Pcna。在一些方面,与成肌细胞相比,表达下调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0102] 在一些实施方式中,卫星细胞下调至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种、至少二十五种或至少三十种以下基因的表达:Tspan9、Sema3e、Hspd1、Tipin、Rasa1、Sct、Mdm2、Csf1、Mstn、Alox5、Ckap2、Camk1g、Mcpt8、Ccng1、Tuba1c、Rps271、Hmga2、Ccnb1、Itga6、Nasp、Dynap、Myof、Epha2、Gtse1、Lcelg、Cd24a、Lgals3、Steap1、Ankrd1、Hes6、Cox6b2、

Gm15772、S100a6、Col18a1、Steap2、Smyd4、Tmem171、Cttn、Car3、Rrm2、Asns、Chrna1、Ugcg、Cdh2、Myod1、Tpm1、Pa2g4、Fabp5、Mcm4、Rrm1、Ftl1、Aaas、Tmsb10、Lrrn1、Ddx21、Odc1、Tmem55a、Prdx6、Sox11、Cited2、Ddx39、Slc44a2、Bax、Gal、Rbm11、Mak16、Nap111、Dctpp1、Nme1、Ccnd1、Cks1b、Myl9、Prrc2c、Set、Hnrnpf、Ppp1r14b、Ran、Tuba1b、Rbm3、Hsp90aa1、Nme2、Hspe1、Snrpg和Npm1。在一些方面,与成肌细胞相比,表达下调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0103] 在一些实施方式中,卫星细胞下调至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十五种、至少二十种或至少二十五种以下基因的表达:Reln、Msln、Sema6d、Itgb4、Ldhd、Nop58、Dkc1、Rpl12、Gchfr、Mgmt、Milr1、Fnbp11、Anxa3、Tek、2010204K13Rik、Selp、Efnb2、Cirhl1a、Fgf21、Stmn2、Gpatch4、Peg3、Snhg8、Fbl、Ahcy、Ebna1bp2、Nop56和Pcna。在一些方面,与成肌细胞相比,表达下调至少1.5倍、至少2倍、至少2.5倍或至少3倍。

[0104] 应当理解,本发明不限于本文列为卫星细胞标志物的那些标志物,并且本发明还包括诸如细胞表面标志物、抗原和其它基因产物的标志物,包括EST, RNA (包括微RNA和反义RNA), DNA (包括基因和cDNA) 及其部分。

[0105] 卫星细胞的特征性标志物包括细胞表面蛋白或编码基因的表达,细胞内蛋白或编码基因的表达,细胞形态特征等。本领域技术人员将认识到,已知的免疫荧光、免疫化学、聚合酶链式反应、原位杂交、RNA印迹分析、化学或放射化学或生物学方法可以容易地确定是否存在卫星细胞特异性特征。

[0106] 本公开的方面涉及根据本文所述的方法产生的分离的卫星细胞群体。可以通过将群体中的至少一些成肌细胞去分化为卫星细胞来获得分离的卫星细胞群体。

[0107] 本公开的方面涉及包含本文所述的分离的细胞群体(例如卫星细胞)的微囊。微囊是本领域众所周知的。微囊的合适实例在文献中有所描述(例如,Orive等,“细胞封装在生物治疗药物的控制递送中的应用(Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics)”,《先进药物输送评论》(Advanced Drug Delivery Reviews) (2013), dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.009; Hernandez等,“用于原位细胞递送的微胶囊和微载体(Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery)”,《先进药物输送评论》(Advanced Drug Delivery Reviews) 2010; 62: 711-730; Murua等,“细胞微囊化技术:走向临床应用(Cell microencapsulation technology: Towards clinical application)”,《控制释放杂志》(Journal of Controlled Release) 2008; 132: 76-83; 和Zanin等,“封装细胞技术作为神经和感觉疾病疗法的发展(The development of encapsulated cell technologies as therapies for neurological and sensory diseases)”,《控制释放杂志》(Journal of Controlled Release) 2012; 160: 3-13)。微囊可以多种方式配制。示例性的微囊包含被外部藻酸盐膜覆盖的聚阳离子层围绕的藻酸盐核心。聚阳离子膜形成半透膜,其赋予稳定性和生物相容性。聚阳离子的实例包括但不限于聚L-赖氨酸、聚L-鸟氨酸、壳聚糖、乳糖改性的壳聚糖和光聚合的生物材料。在一些实施方式中,对藻酸盐核心进行修饰,例如以制备包含藻酸盐核心的骨架,该藻酸盐核心与具有RGD序列(精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸)的寡肽共价结合。在一些实施方式中,对藻酸盐核心进行修饰,例如以产生具有增强稳定性的化学酶促工程改造藻酸

盐的共价增强的微囊。在一些实施方式中,对藻酸盐核心进行修饰,例如以制备通过丙烯酸酯官能化的磷脂的原位聚合组装的膜-模拟薄膜。在一些实施方式中,微囊由利用差向异构酶经酶促修饰的藻酸盐组成。在一些实施方式中,微囊包含微囊膜的相邻层之间的共价连接。在一些实施方式中,所述微囊包括亚筛尺寸的胶囊,其包含与苯酚部分偶联的藻酸盐。在一些实施方式中,微囊包括包含藻酸盐-琼脂糖的骨架。在一些实施方式中,卫星细胞用PEG修饰,然后封装在藻酸盐中。在一些实施方式中,分离的细胞群体,例如卫星细胞,被封装在光反应性脂质体和藻酸盐中。应当理解,微囊中使用的藻酸盐可以用其它合适的生物材料代替,包括但不限于PEG,壳聚糖,PES中空纤维,胶原蛋白,透明质酸,具有RGD的葡聚糖,EHD和PEGDA,PMBV和PVA,PGSAS,琼脂糖,具有明胶的琼脂糖,PLGA和这些的多层实施方式。

[0108] 卫星细胞存在的确认和鉴定

[0109] 可以使用本领域普通技术人员常用的任何方式来确认卫星细胞例如如本文所述通过成肌细胞去分化产生的非天然存在的卫星细胞的存在。

[0110] 在一些实施方式中,卫星细胞标志物(例如化学诱导的卫星细胞)的存在可以通过检测是否存在一种或多种指示内源性卫星细胞的标志物来进行。在一些实施方式中,所述方法可以包括检测卫星细胞标志物的阳性表达(例如存在)。在一些实施方式中,可以使用试剂,例如用于检测Pax7和Myf5的试剂,来检测标志物。待检测的其它标志物包括Notch信号转导通路标志物Notch 1、Notch 2、Notch3、HeyL、Hey2和Hes1,以及与休眠有关的基因或标志物Nm1、Nfia、Fos、Spry1和Dusp1。待检测的其它标志物可选自:Dcn、Dpt、Hey1、Nr4a1、Col4a1、Pax7、Tgfb3、Fos、Egr1、Dag1、ApoE、Spry1、Kat2b、Cav1、Cd82、Igfbp4、Thbs2、Igfbp7、Serp1、Fosb、Zfp36、Nrep、Sepp1、Junb、Ier2、Col15a1、Adh1、Cp、Ramp2、Sparc11、P2ry14、Pmp22、Igf1、Slpr3、Klf9、Col6a1、Txnip、Glu1、Col6a2、Ncald、Cc2d2a、Gpm6b、Timp3、Prkcdp、Nfia、Gpr124、Psm11、Cc2c80、Malat1、Zfp3611、Gsn、Sdpr、Slc16a2、Olfml3、1810026B05Rik、Adamts1、Olfml2b、Gng11、Cd200、Fcgrt、Nav1、Lamc1、Atp2b4、Tagln、Mkl2、Col4a2、Htra3、Fxyd1、Ogn、Tgfb3、Tcpl112、Spats21、Capn6、Fgfr1、Mt2、Cdkn2c、Tln2、Ndr2、Bhlhe40、Fstl1、Tcf4、Igsf3、Tmem123、Col3a1、Emp2、Itm2a、Xbp1、Crip1、Sparc、Cd9、Itgb5、Sdc1、Vcan、Bgn、Igfbp5、Col5a1、Zcchc24、Lum、Postn、Sfrp4、Spon2、Col8a1、Wisp2、Adamts2、Clec12、Dnm3os、Plat、2310010J17Rik、Ctsa、Ank、Dkk2、Fap、Mmp3、Dmp1、Col6a3、Pdgfrb、Col1a1、Mgp、Tmem100、Ctsc、Nr2f1、Cfh、Pdgfra、Dio2、Htra1、Dkk3、Islr、Foxs1、Tgfb2、Tgm2、Thbd、Uba7、Agtr2、Cyp1b1、Tspan15、Osr2、Fam129a、Plekha6、Mmp2、Arrdc3、Matn2、Mab2111、Pvrl2、Adamts14、Cd248、Gulpl、Mfap2、Idua、Cspg4、Spock1、Mfap4、Hexb、Cilp、Pold4、Crebrf、Col14a1、Tmem42、Nedd9、Rcn3、Sept8、Pcolce、Edil3、Nupr1、Phf17、Plin3、Aebp1、Hmgcs1、P4ha1、Lama2、Csrp2、Rnf167、Hlf0、Fn1、Mmp14、Cpq、Mrc2、Ifngr1、St3gal5、Fbn1、Sdc2、Adcy7、Ckm、Hexa、Capg、Klhl13、Loxl1、Fdft1、Ifi2711、Rbp1、Nr2f2、Cst3、Pxdn、Ecm1、Mybp1、Igf2r、Serpinh1、Mt1、Lpar1、Atraid、Scd2、Dap、Ppic、App、Lamp2、Col5a2、Gpc1、Hspa5、Pmepa1、Laptm4a和Lrp1。

[0111] 用于标志物的试剂可以是例如针对标志物的抗体或用于RT-PCR或PCR反应例如半定量或定量RT-PCR或PCR反应的引物。此类标志物可用于评估是否已产生卫星细胞。抗体或其它检测试剂可以与用于检测的标记例如放射、荧光(例如GFP)或比色标记连接。如果检测

试剂是引物,则其可以以干燥制剂例如冻干制剂或溶液的形式提供。

[0112] 在一些实施方式中,可以通过检测一种或多种指示卫星细胞的标志物的存在或不存在来确定卫星细胞标志物的存在。例如,可以从内源性卫星细胞中鉴定出卫星细胞。在一些实施方式中,所述方法可以包括检测卫星细胞标志物的阳性表达(例如存在)。所述标志物可以选自:Itgb5、Sdc1、Vcan、Bgn、Igfbp5、Col5a1、Zcchc24、Lum、Postn、Sfrp4、Spon2、Col8a1、Wisp2、Adamts2、Colec12、Dnm3os、Plat、2310010J17Rik、Ctsa、Ank、Dkk2、Fap、Mmp3、Dmpl、Col6a3、Pdgfrb、Colla1、Mgp、Tmem100、Ctsc、Nr2f1、Cfh、Pdgfra、Dio2、Htra1、Dkk3、Islr、Foxs1、Tgfb2、Tgm2、Thbd、Uba7、Agtr2、Cyp1b1、Tspan15、Osr2、Fam129a、Plekha6、Mmp2、Arrdc3、Matn2、Mab2111、Pvrl2、Adamts14、Cd248、Gulp1、Mfap2、Idua、Cspg4、Spock1、Mfap4、Hexb、Cilp、Pold4、Crebrf、Coll4a1、Tmem42、Nedd9、Rcn3、Sept8、Pcolce、Edil3、Nupr1、Phf17、Plin3、Aebp1、Hmgcs1、P4ha1、Lama2、Csrp2、Rnf167、H1f0、Fn1、Mmp14、Cpq、Mrc2、Ifngr1、St3gal5、Fbn1、Sdc2、Adcy7、Ckm、Hexa、Capg、Klhl13、Loxl1、Fdft1、Ifi2711、Rbp1、Nr2f2、Cst3、Pxdn、Ecm1、Mybpc1、Igf2r、Serpinh1、Mt1、Lpar1、Atraid、Scd2、Dap、Ppic、App、Lamp2、Col5a2、Gpc1、Hspa5、Pmepa1、Laptm4a和Lrp1。

[0113] 可以通过测定卫星细胞的特征性标志物的表达来监测至少一个成肌细胞或其前体向卫星细胞的进展。在一些过程中,通过检测某些标志物的存在或不存在来确定所述标志物的表达。或者,可以通过测量某些标志物在细胞培养物的细胞或细胞群体中存在的水平来确定所述标志物的表达。在某些过程中,确定了卫星细胞特征性标志物的表达以及成肌细胞或其所来源的前体的特征性标志物的显著表达的缺乏。

[0114] 如关于监测从成肌细胞产生卫星细胞所述,可以使用定性或半定量技术,例如印迹转移方法和免疫细胞化学,使用本领域普通技术人员通常已知的方法来测量标志物表达。或者,可以通过使用诸如定量PCR的技术通过本领域通常已知的方法来准确地定量标志物表达。因而,可以利用用于测量细胞外标志物含量的技术,例如ELISA。

[0115] 应当理解,本发明不限于在本文中列为卫星细胞标志物的那些标志物,并且本发明还涵盖诸如以下标志物:细胞表面标志物(例如,CD56、EGFR和 β 1-整联蛋白),抗原,和其它基因产物,包括EST、RNA(包括微RNA和反义RNA)、DNA(包括基因和cDNA)及其部分。

[0116] 卫星细胞的富集、分离和纯化

[0117] 本发明的另一方面涉及从异质细胞群体中分离卫星细胞群体,这种混合细胞群体包含卫星细胞、成肌细胞、分化的骨骼肌细胞和增殖性肌原细胞。可以通过使用成肌细胞或其所来源的前体上不存在的卫星细胞上存在的任何细胞表面标志物,来富集、分离和/或纯化通过任何上述方法产生的卫星细胞群体。这样的细胞表面标志物也被称为对卫星细胞具有特异性的亲和标签。卫星细胞特有的亲和标签的实例是对标志物分子例如多肽具有特异性的抗体、配体或其它结合剂,所述标志物分子存在于卫星细胞的细胞表面上,但基本上不存在于其它细胞类型(例如成肌细胞)上。在一些过程中,与卫星细胞上的细胞表面抗原结合的抗体被用作亲和标签,以富集、分离或纯化化学诱导的(例如通过与本文所述的至少一种分化培养基接触)通过本文所述的方法产生的卫星细胞。这样的抗体是已知的并且可商购。

[0118] 本领域技术人员将容易理解使用抗体来富集、分离和/或纯化卫星细胞的方法。例如,在一些实施方式中,将试剂(例如抗体)与包含卫星细胞的细胞群体一起温育,其中已经

对该细胞群体进行处理以减少细胞间和衬底的粘附。然后洗涤细胞群体，离心并重悬。在一些实施方式中，如果抗体尚未用标记进行标记，则将细胞悬浮液与二级抗体例如能够结合初级抗体的FITC偶联抗体一起温育。然后将卫星细胞洗涤，离心并重悬于缓冲液中。然后使用荧光激活细胞分选仪 (FACS) 对卫星细胞悬浮液进行分析和分选。抗体结合的荧光重编程的细胞与非结合的非荧光的细胞分开收集，从而使卫星细胞与存在于细胞悬浮液中的其它细胞例如成肌细胞、分化的骨骼肌细胞或增殖性肌原细胞分离。

[0119] 在本文所述的方法的另一实施方式中，可以通过使用替代的基于亲和力的方法或通过使用对卫星细胞具特异性的相同或不同的标志物进行额外回合的分选来进一步纯化包含卫星细胞的分离的细胞组合物。例如，在一些实施方式中，FACS分选用于首先将表达Myf5的卫星细胞与细胞群体中不表达那些标志物之一的细胞（例如阴性细胞）分离，所述Myf5单独表达或与Pax7一起表达，或者可替代地与本文公开的卫星细胞标志物一起表达。第二次FACS分选，例如使用FACS再次对阳性细胞进行分选，以分离出对于与第一次分选不同的标志物呈阳性的细胞，从而富集重编程细胞的细胞群体。

[0120] 在另一种实施方式中，FACS分选用于通过阴性分选存在于大多数成肌细胞上但不存在于卫星细胞上的标志物来分离细胞。

[0121] 在本文所述方法的一些实施方式中，在不使用抗体的情况下对卫星细胞进行荧光标记，然后通过使用荧光激活细胞分选仪 (FACS) 将卫星细胞与未标记的细胞分离。在这些实施方式中，使用上述方法，使用编码GFP、YFP的核酸或编码可表达的荧光标志物基因的另一种核酸，例如编码荧光素酶的基因，来标记重编程的细胞。

[0122] 除了上述程序外，化学诱导的卫星细胞也可以通过其它细胞分离技术进行分离。另外，还可以通过一系列继代培养的方法在促进卫星细胞选择性存活或选择性扩增的生长条件下富集或分离卫星细胞。这样的方法是本领域普通技术人员已知的。

[0123] 在一些实施方式中，分离的卫星细胞可在培养物中扩增。在一些实施方式中，将分离的卫星细胞与化合物接触以增加卫星细胞增殖。诱导、增强或增加卫星细胞增殖的方法包括使卫星细胞与选自以下的化合物接触：激酶抑制剂，G蛋白偶联受体 (GPCR) 调节剂，表观遗传修饰剂，组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 调节剂，刺猬信号转导通路调节剂，神经肽，多巴胺受体调节剂，血清素受体调节剂，组胺受体调节剂，腺苷受体激动剂，离子载体，离子通道调节剂， γ -分泌酶调节剂，皮质类固醇及其任何组合。增殖增强剂的实例包括但不限于在通过引用并入本文的PCT/US2017/016099中描述的那些。相对于未经处理的卫星细胞，所述化合物可以诱导、增强或增加卫星细胞增殖至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、50%、70%、80%、90%、1倍、1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍以上。

[0124] 包含卫星细胞的组合物

[0125] 本发明的一些实施方式涉及包含卫星细胞的细胞组合物，例如细胞培养物或细胞群体，其中所述卫星细胞已经源自于至少一个成肌细胞。在一些实施方式中，所述细胞组合物包含成肌细胞。在一些实施方式中，所述细胞组合物包含分化的骨骼肌细胞。在一些实施方式中，所述细胞组合物包含增殖性肌原细胞。

[0126] 根据某些实施方式，化学诱导的卫星细胞是哺乳动物细胞，并且在一个优选的实施方式中，此类卫星细胞是人类卫星细胞。在一些实施方式中，成肌细胞源自于胚胎肌肉细胞。在其它实施方式中，成肌细胞已经从受试者的骨骼肌分离。

[0127] 本发明的其它实施方式涉及包含通过如本文公开的方法产生的卫星细胞的组合物,例如分离的细胞群体或细胞培养物。在这样的实施方式中,卫星细胞占卫星细胞群体中细胞总数的小于约90%,小于约85%,小于约80%,小于约75%,小于约70%,小于约65%,小于约60%,小于约55%,小于约50%,小于约45%,小于约40%,小于约35%,小于约30%,小于约25%,小于约20%,小于约15%,小于约12%,小于约10%,小于约8%,小于约6%,小于约5%,小于约4%,小于约3%,小于约2%或小于约1%。在一些实施方式中,所述组合物包含卫星细胞群体,其占细胞群体中细胞总数的大于约90%,例如细胞群体中细胞总数的约至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少约99%、或约至少100%是卫星细胞。

[0128] 组合物和试剂盒

[0129] 本文描述了用于实施本文公开的方法和用于制备本文公开的卫星细胞的试剂盒。本文还描述了用于治疗肌肉损伤的试剂盒。在一个方面,试剂盒包括如本文所述的至少一个成肌细胞和至少一种培养基,并且任选地,试剂盒可以进一步包括用于使用本文所述的方法将至少一个成肌细胞转化为卫星细胞群体的说明书。在一些实施方式中,试剂盒包含至少两种培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含至少三种培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含至少一种补充剂。在一些实施方式中,试剂盒包含至少两种补充剂。在一些实施方式中,试剂盒包含至少三种补充剂。在一些实施方式中,试剂盒包含用于将成肌细胞去分化为卫星细胞的培养基和/或补充剂。在一些实施方式中,试剂盒包含例如用于将成肌细胞去分化为卫星细胞的培养基和/或补充剂的任何组合。

[0130] 在一些实施方式中,试剂盒包含至少一种成肌细胞培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含至少一种旋转培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含至少一种分化培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含成肌细胞培养基、旋转培养基和分化培养基。在一些实施方式中,试剂盒包含选自以下的化合物:激酶抑制剂、G蛋白偶联受体 (GPCR) 调节剂、组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 调节剂、刺猬信号转导通路调节剂、神经肽、多巴胺受体调节剂、血清素受体调节剂、组胺受体调节剂、离子载体、离子通道调节剂、 γ -分泌酶调节剂及其任何组合。

[0131] 在一些实施方式中,试剂盒中的化合物可以提供在水密或气密容器中,所述容器在一些实施方式中基本上不含试剂盒的其它组分。所述化合物可以提供在超过一个容器中,例如,其可以提供在具有用于预定数量的反应(例如1、2、3或更多数量的单独反应)的足够试剂的容器中,以将成肌细胞诱导为卫星细胞。培养基和/或补充剂可以以任何形式提供,例如液体、干燥或冻干形式。优选本文所述的化合物(例如,培养基或试剂)是基本上纯的和/或无菌的。当以液体溶液形式提供本文描述的化合物时,所述液体溶液优选为水溶液,优选无菌水溶液。当本文描述的化合物以干燥形式提供时,重构通常是通过添加合适的溶剂来进行的。试剂盒中可任选提供溶剂,例如无菌水或缓冲液。

[0132] 在一些实施方式中,所述试剂盒还任选地包括信息材料。所述信息材料可以是与本文所述方法和/或本文所述化合物用于本文所述方法的用途有关的描述性、指导性、市场营销或其它材料。

[0133] 所述试剂盒的信息材料不限于其说明书或信息材料。在一种实施方式中,信息材料可以包括关于化合物的生产、化合物的分子量、浓度、有效期、批次或生产地点信息等的信息。在一种实施方式中,信息材料涉及化合物的施用方法。另外,试剂盒的信息材料不限

于其形式。在许多情况下,信息材料例如说明书以印刷品例如印刷文字、图画和/或照片,例如标记或印刷活页提供。但是,信息材料也可以其它格式提供,例如盲文、计算机可读材料、视频记录或音频记录。在另一种实施方式中,所述试剂盒的信息材料是联系信息,例如物理地址、电子邮件地址、网站或电话号码,其中所述试剂盒的使用者可以获得关于本文所述化合物和/或其在本文所述方法中的用途的大量信息。当然,信息材料也可以任何格式的组合来提供。

[0134] 在一种实施方式中,信息材料可以包括以合适的方式施用如本文所述的化合物(例如,培养基和/或补充剂)以执行本文所述方法的说明书,例如以合适的剂量、剂型或施用模式(例如本文所述的剂量、剂型或施用模式)(例如施用至体外细胞或体内细胞)。在另一种实施方式中,信息材料可以包括将本文所述的化合物施用于合适的受试者例如人类,例如具有本文所述的病症或有患上本文所述病症的风险的人类或施用于体外细胞的说明书。

[0135] 除本文所述的化合物之外,所述试剂盒的组合物可包括其它成分,例如溶剂或缓冲剂、稳定剂、防腐剂、调味剂(例如,苦味拮抗剂或甜味剂)、香料或其它化妆品成分,和/或用于治疗本文所述的病状或病症的其它药剂。或者,其它成分可以包含在试剂盒中,但在与本文所述化合物不同的组合物或容器中。在这些实施方式中,所述试剂盒可以包括用于将本文所述的化合物与其它成分混合,或用于将本文所述的化合物与其它成分一起使用的说明书,例如,关于在施用之前将两种药剂组合的说明书。

[0136] 所述试剂盒可包括一个或多个用于含有至少一种如本文所述的培养基和/或补充剂的组合物的容器。在一些实施方式中,所述试剂盒包含单独的容器(例如,用于两种药剂的两个单独的容器),用于组合物和信息材料的分隔物或隔室。例如,所述组合物可以包含在瓶、小瓶或注射器中,并且信息材料可以包含在塑料套或小包中。在其它实施方式中,所述试剂盒的单独元件被容纳在单个未分隔的容器中。例如,所述组合物包含在以标签形式附有信息材料的瓶、小瓶或注射器中。在一些实施方式中,所述试剂盒包括多个(例如,一包)单独的容器,每个容器包含一个或多个本文所述化合物的单位剂型(例如本文所述的剂型)。例如,所述试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包或泡罩包装,各自包含单个单位剂量的本文所述的化合物。所述试剂盒的容器可以是气密的,防水的(例如,不可渗透水分或蒸发的变化)和/或不透光的。

[0137] 所述试剂盒任选地包括适合于施用所述组合物的装置,例如注射器、吸入器、移液管、镊子、量匙、滴管(例如滴眼液)、拭子(例如棉签或木签)或任何此类递送装置。在一个优选的实施方式中,所述装置是医疗植入装置,例如被包装用于外科手术插入。

[0138] 所述试剂盒还可包括用于检测卫星细胞的标志物例如本文所述的标志物的组分,例如用于检测卫星细胞的试剂。或者在一些实施方式中,所述试剂盒还可包含用于检测卫星细胞的阴性标志物的试剂,用于负选择卫星细胞或鉴定不表达这些阴性标志物的细胞(例如卫星细胞)。所述试剂可以是例如针对标志物的抗体或RT-PCR或PCR反应例如半定量或定量RT-PCR或PCR反应的引物。此类标志物可用于评估是否已产生iPS细胞。如果检测试剂是抗体,则其可以以干燥制剂例如冻干制剂或溶液形式提供。抗体或其它检测试剂可以与用于检测的标记例如放射、荧光(例如GFP)或比色标记连接。如果检测试剂是引物,则其可以以干燥制剂例如冻干制剂或溶液的形式提供。

[0139] 所述试剂盒可以包括卫星细胞,例如,源自于相同类型的成肌细胞的卫星细胞,例如用作阳性细胞类型对照。

[0140] 施用细胞的方法

[0141] 在一种实施方式中,本文所述的细胞,例如卫星细胞群体是可移植的,例如卫星细胞群体可以施用于受试者。在一些实施方式中,被施用卫星细胞群体的受试者是与从其获得用于去分化为卫星细胞的成肌细胞相同的受试者(例如用于自体细胞治疗)。在一些实施方式中,受试者是不同的受试者。在一些实施方式中,受试者患有肌肉损伤,或者是正常受试者。例如,用于移植的细胞(例如包含卫星细胞群体的组合物)可以是适合于移植的形式。

[0142] 所述方法可以进一步包括将细胞施用于有需要的受试者,例如哺乳动物受试者,例如人类受试者。细胞的来源可以是哺乳动物,优选人类。细胞的来源或接受者也可以是非人类受试者,例如动物模型。术语“哺乳动物”包括生物体,其包括小鼠、大鼠、牛、绵羊、猪、兔、山羊、马、猴子、狗、猫,优选人类。同样,可以从这些生物体中的任何一种获得可移植细胞,所述生物体包括非人类转基因生物体。在一种实施方式中,对可移植细胞进行基因工程改造,例如,所述细胞包括外源基因或已经被基因工程改造以灭活或改变内源基因。

[0143] 可以使用可植入装置将包含卫星细胞群体的组合物施用于受试者。可植入装置和相关技术在本领域中是已知的,并且可用作需要本文所述的化合物或组合物的连续或定时释放递送的递送系统。另外,可植入装置递送系统可用于靶向化合物或组合物递送的特定地点(例如,局部位点、器官)。Negrin等,《生物材料》(Biomaterials), 22 (6) :563 (2001)。涉及替代递送方法的定时释放技术也可以用于本发明中。例如,基于聚合物技术、持续释放技术和封装技术(例如,聚合物、脂质体)的定时释放制剂也可以用于递送本文所述的化合物和组合物。

[0144] 药物组合物

[0145] 为了施用于受试者,通过本文公开的方法产生的细胞群体,例如卫星细胞群体(通过使至少一种成肌细胞与至少一种培养基(例如本文所述的成肌细胞培养基、旋转培养基和/或分化培养基)接触而产生)可以例如以药学上可接受的组合物形式施用于受试者。这些药学上可接受的组合物包含治疗有效量的如上所述的卫星细胞群体,其与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制。

[0146] 如以下详细描述,本发明的药物组合物可以被特别配制为以固体或液体形式施用,包括适合于以下的那些:(1)口服施用,例如,灌药(水性或非水性溶液或混悬剂),锭剂,糖衣丸,胶囊,丸剂,片剂(例如,靶向颊、舌下和全身吸收的那些),大丸剂,散剂,颗粒剂,糊剂,以施用于舌头;(2)肠胃外施用,例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如以无菌溶液或混悬液或缓释制剂形式;(3)局部应用,例如以乳膏、软膏或控释贴剂或喷雾剂形式应用到皮肤上;(4)阴道内或直肠内,例如子宫托、乳膏或泡沫;(5)舌下;(6)经眼;(7)透皮;(8)透粘膜;或(9)经鼻。另外,可将化合物植入患者体内或使用药物递送系统注射。参见例如Urquhart等,《药理学与毒理学年评》(Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.) 24:199-236 (1984);Lewis编,《农药和药物的控制释放》(Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals) (Plenum Press, New York, 1981);美国专利号3,773,919;以及美国专利号353,270,960。

[0147] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适用于与人

类和动物的组织接触而不具有过量毒性、刺激性、过敏反应或者其它问题或并发症并与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0148] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌,或硬脂酸)或溶剂封装材料,其涉及将主题化合物从一个器官或身体的一部分运载或转运到另一器官或身体的一部分。在与制剂的其它成分相容并且对患者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末状黄耆胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石粉;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;(22)填充剂,例如多肽和氨基酸;(23)血清成分,例如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C₂-C₁₂醇,例如乙醇;和(23)药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。制剂中还可存在润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、加香剂、防腐剂和抗氧化剂。诸如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等的术语在本文中可互换使用。

[0149] 如本文所用,就细胞群体而言,短语“治疗有效量”是指细胞(例如卫星细胞)群体或包含本发明的卫星细胞的组合物中相关细胞的量,其可有效在适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比下,在动物的至少细胞子群体中产生某些所需的治疗效果。例如,施用于受试者的卫星细胞群体的数量足以在至少一种肌肉损伤症状如肌肉修复或再生等上产生统计学上显著的可测量的变化。确定治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内。通常,治疗有效量可以随受试者的病史、年龄、状况、性别以及受试者中医学病状的严重程度和类型以及其它药物活性剂的施用而变化。

[0150] 如本文所用,术语“修复”是指减轻或完全消除肌肉组织的损伤的过程。在一些实施方式中,至少一个肌肉组织损伤的症状减轻至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

[0151] 疾病或病症的“治疗”、“预防”或“改善”是指延迟或预防此类疾病或病症的发作,逆转、减轻、改善、抑制、减慢或停止与此类疾病或病症相关的病状的进展、加重或者进展或严重程度的恶化。在一种实施方式中,疾病或病症的症状减轻至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。

[0152] 如本文所用,术语“施用”是指通过导致组合物至少部分定位在所需位点的方法或途径将组合物置于受试者中,从而产生所需效果。适用于本发明方法的施用途径包括局部和全身施用。通常,与受试者的全身相比,局部施用导致更多的施用的卫星细胞(或经增殖增强剂处理的卫星细胞)被递送至特定位置,而全身性施用导致将卫星细胞递送至基本上受试者的全身。局部施用的一种方法是通过肌肉内注射。

[0153] 在施用经化合物处理的细胞的背景中,术语“施用”还包括将这种细胞移植到受试

者中。如本文所用,术语“移植”是指将至少一个细胞植入或转移至受试者的过程。术语“移植”包括例如自体移植(将细胞从患者的一个位置移出并转移至同一患者的相同或另一位置),同种异体移植(相同物种成员之间的移植)和异种移植(不同物种成员之间的移植)。技术人员熟知本发明可用的用于肌肉修复和再生的细胞植入或移植的方法。参见例如美国专利号7,592,174和美国专利公开号2005/0249731,两者内容均通过引用并入本文。

[0154] 卫星细胞或包含其的组合物可以通过本领域已知的任何适当途径进行施用,包括但不限于口服或肠胃外途径,包括静脉内、肌肉内、皮下、经皮、气道(气溶胶)、经肺、经鼻、经直肠以及局部(包括经颊和舌下)施用。

[0155] 示例性的施用模式包括但不限于注射、输注、滴注、吸入或摄取。“注射”包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、脊髓内和胸骨内注射和输注。在优选的实施方式中,所述组合物通过静脉内输注或注射施用。

[0156] 如本文所用,“受试者”是指人类或动物。通常,动物是脊椎动物,例如灵长类动物、啮齿动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔子和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括牛,马,猪,鹿,野牛,水牛,猫科物种例如家猫,犬科动物例如狗、狐狸、狼,禽类物种例如鸡、鹌鹑、鸵鸟,和鱼类例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。患者或受试者包括前述的任何子集,例如,上述所有,但不包括一个或多个群体或物种,例如人类、灵长类动物或啮齿动物。在本文所述方面的某些实施方式中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人类。术语“患者”和“受试者”在本文可互换使用。术语“患者”和“受试者”在本文可互换使用。受试者可以是雄性或雌性。

[0157] 优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人类、非人类灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人类以外的哺乳动物可以有利地用作代表与自身免疫性疾病或炎症相关的病症的动物模型的受试者。另外,本文所述的方法和组合物可用于治疗家养动物和/或宠物。

[0158] 受试者可以是先前已被诊断出患有或被鉴定为患有或具有以肌肉损伤或肌肉萎缩/消瘦为特征的病症的受试者。受试者可以是先前已被诊断出患有或被鉴定为具有肌肉退行性病症的某些人。

[0159] 在本文描述的方面的一些实施方式中,所述方法还包括在对受试者进行肌肉修复或再生治疗之前,就肌肉损伤或肌肉萎缩/消瘦诊断和/或选择所述受试者。

[0160] 在一些实施方式中,肌肉组织受损是由肌肉减少症造成的。如本文所用,术语“肌肉减少症”是指随着年龄增长不可避免地发生的肌肉质量和功能的丧失。肌肉减少症造成身体活动水平下降,而身体活动水平下降又可能导致体内脂肪增加和肌肉进一步丧失。肌肉质量的丧失是由肌肉蛋白质合成与肌肉蛋白质分解之间的负净平衡引起的。人们认为这种骨骼肌质量和功能丧失的病因尚不清楚。身体活动水平下降,继发于中枢神经系统变化的运动单位的丧失以及蛋白质摄入不足均有牵连。

[0161] 在一些实施方式中,受损的肌肉组织是由于身体损伤或创伤造成的。受损的肌肉可以是骨骼肌。在一些实施方式中,受试者具有肌肉损伤、损害、创伤或疾病,或以其它方式受到肌肉损伤、损害、创伤或疾病的影响。

[0162] 在一些实施方式中,导致肌肉组织受损的疾病是肌病。不加限制地,肌病可以是先

天性肌病或后天性肌病。示例性肌病包括但不限于营养不良,肌强直(神经肌强直),先天性肌病(例如,杆状体肌病、多/小核肌病、中心核肌病(或肌管肌病)),线粒体肌病,家族性周期性麻痹,炎症性肌病,代谢性肌病(例如,糖原贮积病和脂质贮积病),皮炎,多发性肌炎,包涵体肌炎,骨化性肌炎,横纹肌溶解症和肌红蛋白尿。

[0163] 在本文所述的此方面和其它方面的一些实施方式中,肌病是选自以下的营养不良:肌营养不良,杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy),贝克尔肌营养不良(Becker's muscular dystrophy),反射性交感神经营养不良,视网膜营养不良,圆锥体营养不良,肌强直性营养不良,角膜营养不良及其任何组合。

[0164] 先天性肌病是一个术语,其有时适用于可能在出生时存在的数百种不同的神经肌肉病症,但通常保留给一组罕见的遗传性原发性肌肉病症,这些病症导致在出生时或在新生儿期间的肌张力低下和虚弱,以及在某些情况下,儿童后期的运动发育迟缓。患者患有从轻度无力(儿童后期开始和能够行走直至成年)到重度无力(生命的第一年内发生呼吸功能不全和死亡)的肌无力。

[0165] 先天性肌病的最常见类型是杆状体肌病、肌管肌病、中枢核心肌病、先天性纤维类型失调和多核肌病。它们主要通过其组织学特征、症状和预后来区分。诊断由特征性临床发现指示,并由肌肉活检证实。

[0166] 特定肌病的实例包括但不限于在PCT/US2017/016099中描述的那些,所述文献通过引用并入本文。

[0167] 本文所述的卫星细胞组合物可以与本文所述的增殖增强剂和/或药物活性剂组合共同施用于受试者。示例性的药物活性化合物包括但不限于以下中存在的那些:《哈里森内科学原理》(Harrison's Principles of Internal Medicine),第13版,T.R.Harrison等编,McGraw-Hill N.Y.,NY;《内科医生案头参考》(Physicians' Desk Reference),第50版,1997,Oradell New Jersey,Medical Economics Co.;《治疗学的药理学基础》(Pharmacological Basis of Therapeutics),第8版,Goodman和Gilman,1990;《美国药典—国家处方集》(United States Pharmacopeia,The National Formulary),USP XII NF XVII,1990;现行版的Goodman和Oilman的《治疗学的药理学基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics);以及现行版的《默克索引》(The Merck Index),所有文献的完整全部内容通过引用以整体并入本文。

[0168] 在本文描述的方面的一些实施方式中,所述药物活性剂是生长因子。示例性生长因子包括但不限于碱性表皮生长因子(bEGF),成纤维细胞生长因子(FGF),FGF-1,FGF-2(bFGF),FGF-4,胸腺素,血小板衍生生长因子(PDGF),表皮生长因子(EGF),转化生长因子(TGF),TGF- α ,TGF- β ,软骨诱导因子-A和软骨诱导因子-B,类骨质诱导因子,骨生成素,骨形态发生蛋白和其它骨生长因子,胶原生长因子,肝素结合生长因子-1或肝素结合生长因子-2及其生物活性衍生物。

[0169] 卫星细胞组合物、增殖增强剂和/或药物活性剂可以在相同的药物组合物或不同的药物组合物中(同时或在不同时间)施用于受试者。当在不同时间施用时,卫星细胞组合物、增殖增强剂和/或药物活性剂可以在另一物质施用5分钟、10分钟、20分钟、60分钟、2小时、3小时、4小时、8小时、12小时、24小时内施用。当以不同的药物组合物施用卫星细胞组合物、增殖增强剂和/或药物活性剂时,施用途径可以不同。

[0170] 可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定施用包含卫星细胞群体的组合物的毒性和治疗功效,例如,用于确定LD50(所述群体的50%的致死剂量)和ED50(在所述群体的50%中治疗有效的剂量)。优选包含展现大治疗指数的卫星细胞群体的组合物。

[0171] 可以使用几种公认的动物模型来测试包含卫星细胞群体的组合物的量。

[0172] 在一些实施方式中,从细胞培养测定法和动物研究中获得的数据可用于制定用于人类的剂量范围。这类化合物的剂量优选在循环浓度的范围内,所述循环浓度包括几乎没有毒性的ED50。剂量可以在此范围内变化,这取决于所采用的剂型和所利用的施用途径。

[0173] 包含卫星细胞群体的组合物的治疗有效剂量也可以最初从细胞培养测定法中估算出来。或者,可以通过合适的生物测定法监测任何特定剂量的作用。

[0174] 关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常监测受试者以确定该治疗何时提供治疗益处,并确定是否增加或减少剂量,增加或减少施用频率,中止治疗,恢复治疗或对治疗方案进行其它更改。给药时间表可以从每周一次到每天一次,取决于许多临床因素。所需剂量可以一次施用或分成子剂量,例如2-4个子剂量,并在一段时间内例如以一天中的适当时间间隔或其它适当的时间表施用。这样的子剂量可以作为单位剂型施用。在一些实施方式中,施用是长期的,例如在几周或几个月的时期内每天一剂或多剂。给药时间表的实例是每天一次、每天两次、每天三次或每天四次或更多次,历经1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月或更长的时期施用。

[0175] 在本发明的另一方面,所述方法提供了如本文公开的分离的卫星细胞群体的用途。在本发明的一种实施方式中,如本文所公开的分离的卫星细胞群体可以用于产生药物组合物,以用于移植到需要治疗的受试者中,例如具有肌肉疾病或病症(例如肌肉退行性病症)或有患上肌肉疾病或病症(例如肌肉退行性病症)的风险的受试者。实例包括具有肌肉萎缩或肌肉损伤的受试者。在一个实施方式中,分离的卫星细胞群体可以是经遗传修饰的。在另一个方面,所述受试者可以具有肌肉损伤或肌肉萎缩或者有肌肉损伤或肌肉萎缩的风险。在一些实施方式中,如本文所公开的分离的卫星细胞群体可以是自体的和/或同种异体的。在一些实施方式中,所述受试者是哺乳动物,并且在其它实施方式中所述哺乳动物是人类。

[0176] 本发明的一种实施方式涉及一种治疗受试者的肌肉损伤或疾病的方法,其包括向具有肌肉损伤或疾病的受试者施用有效量的包含本文公开的卫星细胞群体的组合物。其它实施方式涉及一种治疗受试者的肌肉退行性病症的方法,其包括向具有肌肉退行性病症的受试者施用有效量的包含本文公开的卫星细胞群体的组合物。在另一个实施方式中,本发明提供了一种治疗肌肉疾病的方法,其包括将包含本文公开的卫星细胞群体的组合物施用于具有肌肉疾病或患上肌肉疾病的风险增加的受试者。

[0177] 在一些实施方式中,如本文所公开的卫星细胞群体可以于任何生理上可接受的赋形剂中施用,其中卫星细胞可以找到适当的复制、增殖和/或植入位点。在一些实施方式中,如本文所公开的卫星细胞群体可以通过注射、导管等引入。在一些实施方式中,如本文所公开的卫星细胞群体可以在液氮温度下冷冻并长期保存,其能够解冻使用。如果冷冻,则卫星细胞群体通常将存储在10%DMSO、50%FCS、40%RPMI 1640培养基中。一旦解冻,可通过使用与如本文所公开的卫星细胞培养相关的生长因子和/或饲养细胞来扩增细胞。

[0178] 在一些实施方式中,如本文所公开的卫星细胞群体可以以药物组合物的形式提供,所述药物组合物包含在足够无菌条件下制备的等渗赋形剂,以供人类施用。对于药物制剂的一般原理,读者可以参考G.Morstyn和W.Sheridan编的《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), Cambridge University Press, 1996; 以及《造血干细胞疗法》(Hematopoietic Stem Cell Therapy), E.D.Ball, J.Lister和P.Law, Churchill Livingstone, 2000。包含如本文所公开的卫星细胞群体的组合物的细胞赋形剂和任何伴随成分的选择将根据用于施用的途径和装置进行调整。在一些实施方式中,包含卫星细胞群体的组合物还可以包含一种或多种其它成分或伴有一种或多种其它成分,所述成分促进卫星细胞的植入或功能动员。合适的成分包括支持或促进卫星细胞或互补细胞类型粘附的基质蛋白。在另一种实施方式中,所述组合物可以包含可吸收的或可生物降解的基质骨架。

[0179] 基因疗法可用于修饰细胞以替代基因产物,促进组织再生,治疗疾病,或改善植入受试者后的细胞存活率(即防止排斥)。

[0180] 在一些实施方式中,可以根据良好的医学实践来施用和给药卫星细胞群体,其中考虑到个体患者的临床状况,施用部位和方法,施用时间表,患者年龄,性别,体重和医学专业人员已知的其它因素。因此,通过本领域已知的此类考虑因素来确定用于本文目的的药学“有效量”。所述量必须有效地实现改善,包括但不限于提高的存活率或更快的恢复,或症状的改善或消除以及本领域技术人员选择作为适当措施的其它指标。可以在以下地点对受试者施用卫星细胞群体:诊所,临床办公室,急诊科,病房,重症监护室,手术室,导管插入套间和放射套间。

[0181] 在其它实施方式中,卫星细胞群体被存储用于以后的植入/输注。卫星细胞群体可以被分成超过一个等分试样或单位,使得卫星细胞群体的一部分被保留下来供以后应用,而另一部分则立即应用于受试者。如在美国专利公开号2003/0054331和专利公开号WO 03/024215中所公开的,全部或部分细胞在细胞库中的中等至长期储存也在本发明的范围内,并且将所述文献整体并入本文。在处理结束时,可以将浓缩的细胞加载到诸如注射器的递送装置中,以通过本领域普通技术人员已知的任何方式将其置于接受者中。

[0182] 在一些实施方式中,卫星细胞群体可以单独应用,或者可以与其它细胞,组织,组织片段,生长因子如VEGF和其它已知的血管生成或动脉生成生长因子,生物活性或惰性化合物,可吸收塑料支架,或旨在增强群体的递送、功效、耐受性或功能的其它添加剂组合应用。在一些实施方式中,也可以通过插入DNA或通过放置在细胞培养物中来修饰卫星细胞群体,从而改变、增强或补充细胞的功能,以衍生结构性或治疗性目的。例如,如(Morizono等, 2003; Mosca等, 2000)中所公开,干细胞的基因转移技术是本领域普通技术人员已知的,并且可以包括病毒转染技术,更具体地,腺相关病毒基因转移技术,如(Walther和Stein, 2000)以及(Athanasopoulos等, 2000)中所公开。基于非病毒的技术也可以如(Muramatsu等, 1998)中所公开进行。

[0183] 在另一方面,在一些实施方式中,可以将卫星细胞群体与编码促血管生成生长因子的基因组合。也可以应用编码抗凋亡因子或药剂的基因。基因(或基因组合)的添加可以通过本领域已知的任何技术,包括但不限于腺病毒转导,“基因枪”,脂质体介导的转导,以及逆转录病毒或慢病毒介导的转导,质粒腺相关病毒。可以将细胞与携带基因递送媒介物

的载体材料一起植入,所述载体材料能够随着时间的流逝向细胞释放和/或呈递基因,使得转导可以持续或启动。特别是当将细胞和/或包含细胞的组织施用于除从其获得所述细胞和/或组织的患者以外的患者时,可以将一种或多种免疫抑制剂施用于接受细胞和/或组织的患者,以减少并且优选防止移植排斥。如本文所用,术语“免疫抑制药物或药剂”旨在包括抑制或干扰正常免疫功能的药剂。适用于本文公开方法的免疫抑制剂的实例包括抑制T细胞/B细胞共刺激途径的药剂,例如经由CTLA4和B7途径干扰T细胞和B细胞偶联的药剂,如通过引用并入本文的美国专利公开号2002/0182211中所公开。在一种实施方式中,免疫抑制剂是环孢菌素A。其它实例包括霉酚酸酯、雷帕霉素和抗胸腺细胞球蛋白。在一种实施方式中,免疫抑制药物与至少一种其它治疗剂一起施用。免疫抑制药物以与施用途径相容的制剂施用,并以足以实现所需治疗效果的剂量施用于受试者。在另一种实施方式中,将免疫抑制药物短暂施用足够的时间以诱导对本发明的卫星细胞的耐受性。

[0184] 本发明还涵盖了包含有效量的卫星细胞群体的药物组合物。这些组合物包含有效数量的卫星细胞,任选地,与药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂组合。在某些适应症中可优选向受试者全身施用卫星细胞群体,而在其它适应症中可优选在患病和/或受损组织的部位或附近直接施用。

[0185] 在一些实施方式中,可以任选地将卫星细胞群体与用于所需目的的书面说明(例如,在施用于受试者之前对卫星细胞群体进行重构或解冻(如果冷冻的话))包装在合适的容器中。

[0186] 实施例:

[0187] 实施例1-在3D旋转环境中培养的成肌细胞自组装成由分化的骨骼肌和增殖性肌原群体组成的骨骼肌类器官

[0188] 当在3D旋转条件下培养时,从WT (C57b1/6)、MyoDCre ROSATdtomato、Pax7^{nGFP}和Pax7Cre ROSATdtomato中分离的成肌细胞自组装成3D球体(图1A)。为了确定存在于骨骼肌类器官中的细胞的分化状态,我们收集了在3D条件下生长第10天、第20天和第30天的球体。在每个时间点,将收集的球体冷冻在OCT:蔗糖中并切成10 μ m切片。切片用Pax7 (DSHB) 染色以鉴定成肌细胞或卫星细胞(Seale等,2000),并使用识别肌球蛋白重链的抗体(MyHC, MF20-DSHB),所述肌球蛋白重链是骨骼肌终末分化的标志物(Bader等,1982)。在三个时间点的每个时间点,骨骼肌类器官由Pax7⁺和MyHC⁺细胞的组合组成,其中Pax7⁺细胞的百分比随时间降低。

[0189] 为了确定该发现是否对人类细胞有效,我们在具有较高浓度的bFGF (10ng/ml) 的成肌细胞培养基中增殖了WT人类骨骼成肌细胞(Life Technologies#A12555)。将人类成肌细胞接种到球形96孔微孔板(Corning-4515)中持续4天的时期,然后转移到保持在定轨振荡器上的10cm低粘附板上。培养10天后,形成了人类骨骼肌类器官(图1B)。用Pax7和MyHC染色的冷冻切片的人体骨骼肌类器官显示出大多数细胞呈MyHC阳性。有趣的是,人类成肌细胞在常规培养过程中不表达转录因子Pax7,因此重要的是要注意骨骼肌类器官中存在Pax7阳性人类细胞的存在(图1C)。我们的数据表明,当人类成肌细胞接种到球状平板中时,它们能够自组装成3D球体。形成球体后,Pax7⁺人类肌原细胞的出现表明已发生了去分化或重新编程,使成肌细胞返回到类似于卫星细胞状态的细胞。

[0190] 接下来,我们进行了RNAseq分析,以鉴定卫星细胞状态的转录指纹(图2A)。多个核

心肌原基因在卫星细胞中高度表达 (Pax7, Myf5), 而骨骼肌MyoD的主要转录因子优先在成肌细胞中表达并且在卫星细胞中不存在。这些肌原标志物与一组休眠相关基因 (Spry1, Nm1, Nfia, Fos, Dusp1) 和Notch信号转导通路成员 (Notch1、2、3, HeyL, Hey2, Hes) 组合作为指定卫星细胞的转录指纹。为了确定驻留在骨骼肌类器官中的Pax7阳性细胞是否与卫星细胞具有相似的转录谱, 我们从经由荧光激活细胞分选 (FACS) 从30天培养的骨骼肌类器官中纯化的nGFP细胞中分离了总RNA (图2B)。在qPCR分析后, 我们确定了Pax7 (约4.5倍) 和Myf5 (约18倍) 的增加以及MyoD的显著降低 (约50倍)。此外, 在nGFP⁺第30天骨骼肌类器官来源的细胞中, 增加了Notch信号转导通路标志物Notch1 (约2.5倍)、Notch2 (约4倍)、Notch3 (约35倍)、HeyL (约580倍)、Hey2 (约37倍) 和Hes1 (约11倍)。在来自第30天骨骼肌类器官的nGFP⁺细胞群体中, 与休眠相关的基因或激活标志物增强, 包括Nm1 (约5倍)、Nfia (约5倍)、Fos (约480倍)、Spry1 (约34倍) 和Dusp1 (约20倍) (图2B)。该数据表明, 从骨骼肌类器官分离的nGFP⁺细胞的转录谱类似于卫星细胞。

[0191] 为了从机械角度解决骨骼肌类器官如何使肌原细胞返回到卫星细胞状态, 我们考虑了标准2D和3D培养之间的环境差异。成年干细胞具有不对称分裂的能力, 从而产生了祖细胞群体, 而同时又自我更新以维持干细胞池 (Kuang等, 2007)。为了做到这一点, 干细胞龛内的因子至关重要。我们评估了细胞外分子的RNAseq数据集, 其可解释2D和3D培养中对成肌细胞呈现的龛中的这些差异。在分析后, 出现了一组核心蛋白聚糖, 与成肌细胞相比, 它们富含于卫星细胞 (图3A)。在3D培养后, nGFP⁺细胞高度富含这些蛋白聚糖标志物 (图3B)。为了进一步证实这些蛋白聚糖在蛋白质水平上的存在, 我们对骨骼肌类器官进行了切片和染色, 所述骨骼肌类器官在旋转培养基中培养20天或在旋转培养基中培养10天并接着在无血清分化培养基中培养10天 (图3C)。在无血清培养基中分化后, 我们观察到Bgn和TgfbrIII的存在增加 (图3D)。我们的数据表明3D培养更准确地类似于体内卫星细胞龛, 因此产生在转录谱上类似于卫星细胞的细胞, 并分泌对建立卫星细胞龛至关重要的蛋白聚糖。

[0192] 材料和方法

[0193] 培养基

[0194] 成肌细胞培养基-Ham's F10 (Wisent), 20%热灭活的胎牛血清, 5ng/ml bFGF (Millipore), 1x非必需氨基酸 (Life Technologies), 1x Glutamax (Life Technologies)。

[0195] 旋转培养基-DMEM:F12 (Life Technologies), 20%热灭活胎牛血清, 10ng/ml bFGF (Millipore), 1x非必需氨基酸 (Life Technologies), 1x Glutamax (Life Technologies)。

[0196] 分化培养基-DMEM (Life Technologies), 1x非必需氨基酸 (Life Technologies), 1x Glutamax (Life Technologies)。

[0197] 细胞系

[0198] 使用多种小鼠品系和人类系, 包括B1/6、MyoDiCre、Pax7nGFP、Pax7CreROSA^{Tdt}、Pax7CreROSA^{Luc}, 和来自Gibco和Cook的人类系, 进行了生成卫星细胞的方法。

[0199] 成肌细胞扩增

[0200] 从后肢骨骼肌中分离出多种小鼠品系的成肌细胞, 并在成肌细胞培养基中的胶原蛋白包被培养皿上进行培养。用胰蛋白酶 (Life Technologies) 使成肌细胞系传代。将成肌细胞系在10cm培养皿上扩增以获得10个平板。随后将细胞传代并接种到10个15cm平板上,

并进行培养直至它们达到约80汇合,然后再接种到旋转烧瓶中。

[0201] 3D球体形成条件

[0202] 将成肌细胞以1百万个细胞/毫升的密度接种到125ml旋转烧瓶(Corning)中。烧瓶的旋转速度设置为55rpm。每两天向培养物中加料,方法是除去一半培养基并用新鲜培养基代替。

[0203] 分化条件

[0204] 旋转培养(旋转培养基)中的成肌细胞形成了由分化和增殖性细胞组成的肌球或骨骼肌类器官。在无血清条件(分化培养基)中培养后,增殖性肌原细胞休眠并返回到卫星细胞状态。骨骼肌类器官在旋转培养基中生长20天的持续时间。分化进行10天。

[0205] 参考文献

[0206] Bader,D.,Masaki,T.,and Fischman,D.A. (1982).体内和体外禽肌发生过程中肌球蛋白重链的免疫化学分析(Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro).J Cell Biol 95,763-770.

[0207] Collins,C.A.,Olsen,I.,Zammit,P.S.,Heslop,L.,Petrie,A.,Partridge,T.A.,and Morgan,J.E. (2005).来自成年肌肉卫星细胞龕的细胞的干细胞功能,自我更新和行为异质性(Stem cell function,self-renewal,and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche).Cell 122,289-301.

[0208] Kuang,S.,Kuroda,K.,Le Grand,F.,and Rudnicki,M.A. (2007).肌肉中卫星干细胞的不对称自我更新和定型(Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle).Cell 129,999-1010.

[0209] Mauro,A. (1961).骨骼肌纤维的卫星细胞(Satellite cell of skeletal muscle fibers).J Biophys Biochem Cytol 9,493-495.

[0210] Montarras D.,Morgan J.,Collins C.,Relaix F.,Zaffran S.,Cumano A.,Partridge T.,Buckingham M.用于骨骼肌再生的卫星细胞的直接分离(Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration.Science).2005;309:2064-2067.

[0211] Price,F.D.,Kuroda,K.,and Rudnicki,M.A. (2007).治疗肌营养不良的基于干细胞的疗法(Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy).Biochim Biophys Acta 1772,272-283.

[0212] Seale,P.,Sabourin,L.A.,Girgis-Gabardo,A.,Mansouri,A.,Gruss,P.,and Rudnicki,M.A. (2000).成肌卫星细胞的规范化需要Pax7(Pax7is required for the specification of myogenic satellite cells).Cell 102,777-786.

[0213] Yin,H.,Price,F.,and Rudnicki,M.A. (2013).卫星细胞和肌肉干细胞龕(Satellite cells and the muscle stem cell niche).Physiol Rev 93,23-67.

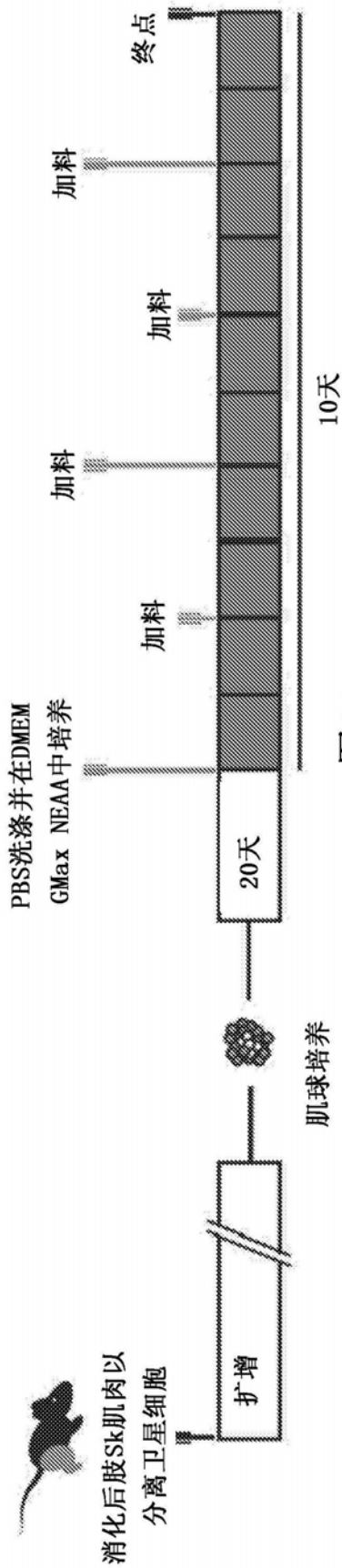


图1A

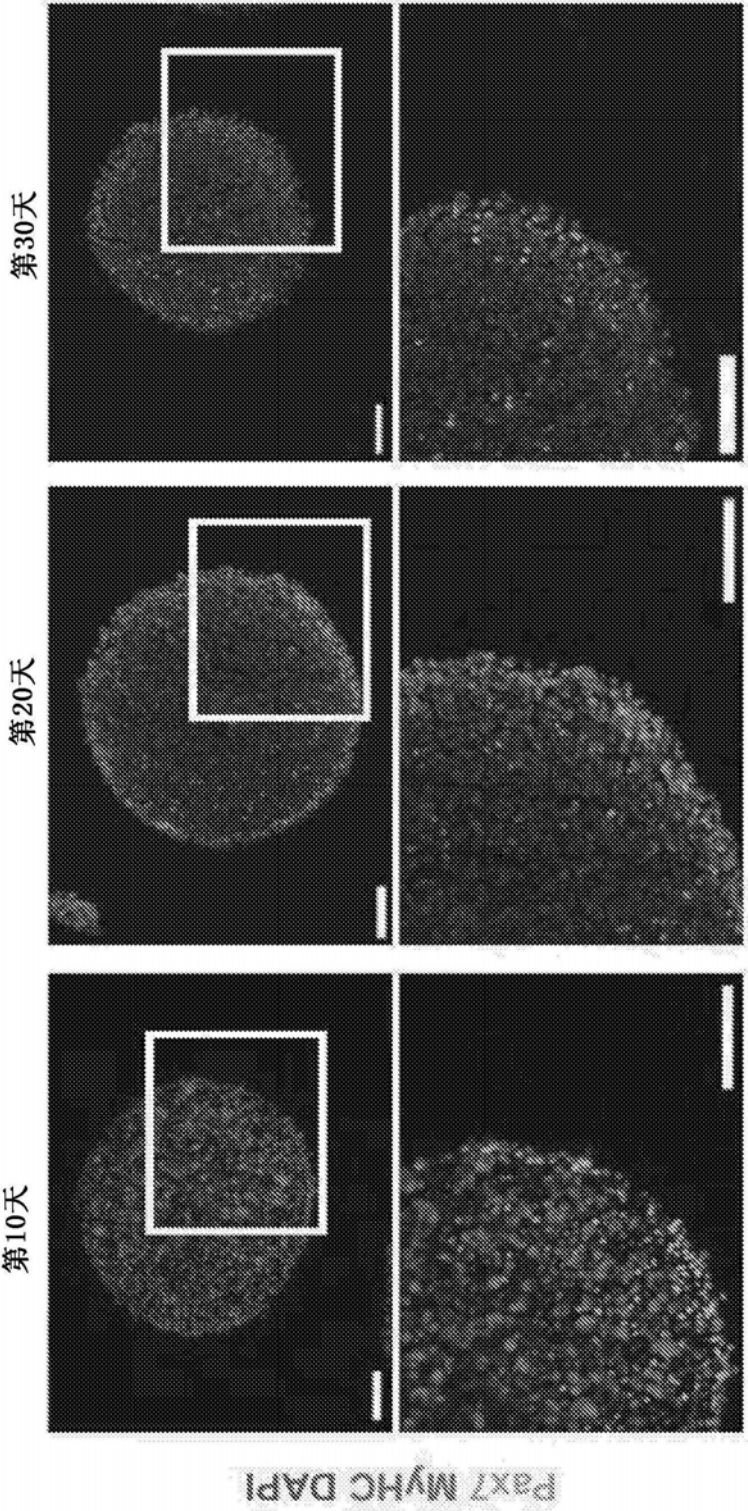


图1B

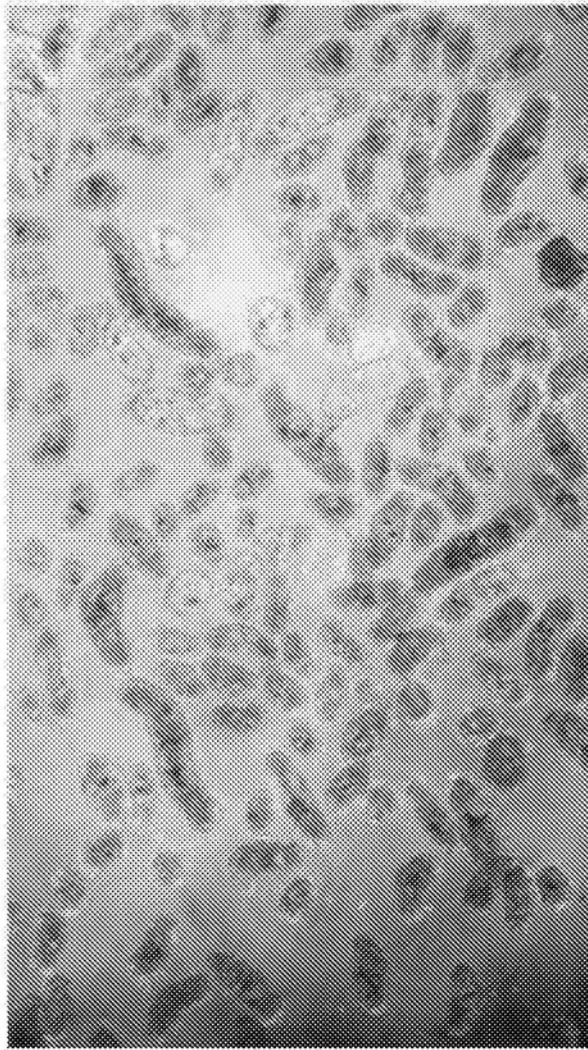


图1C

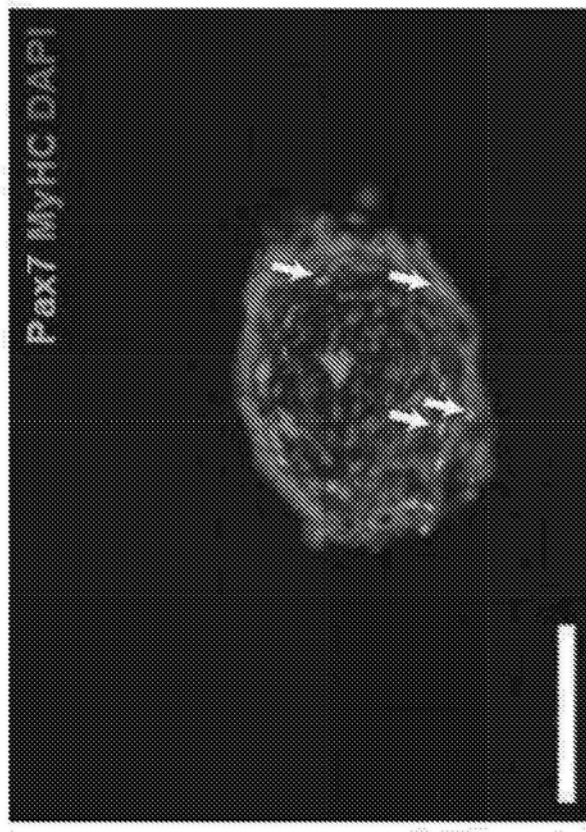


图1D

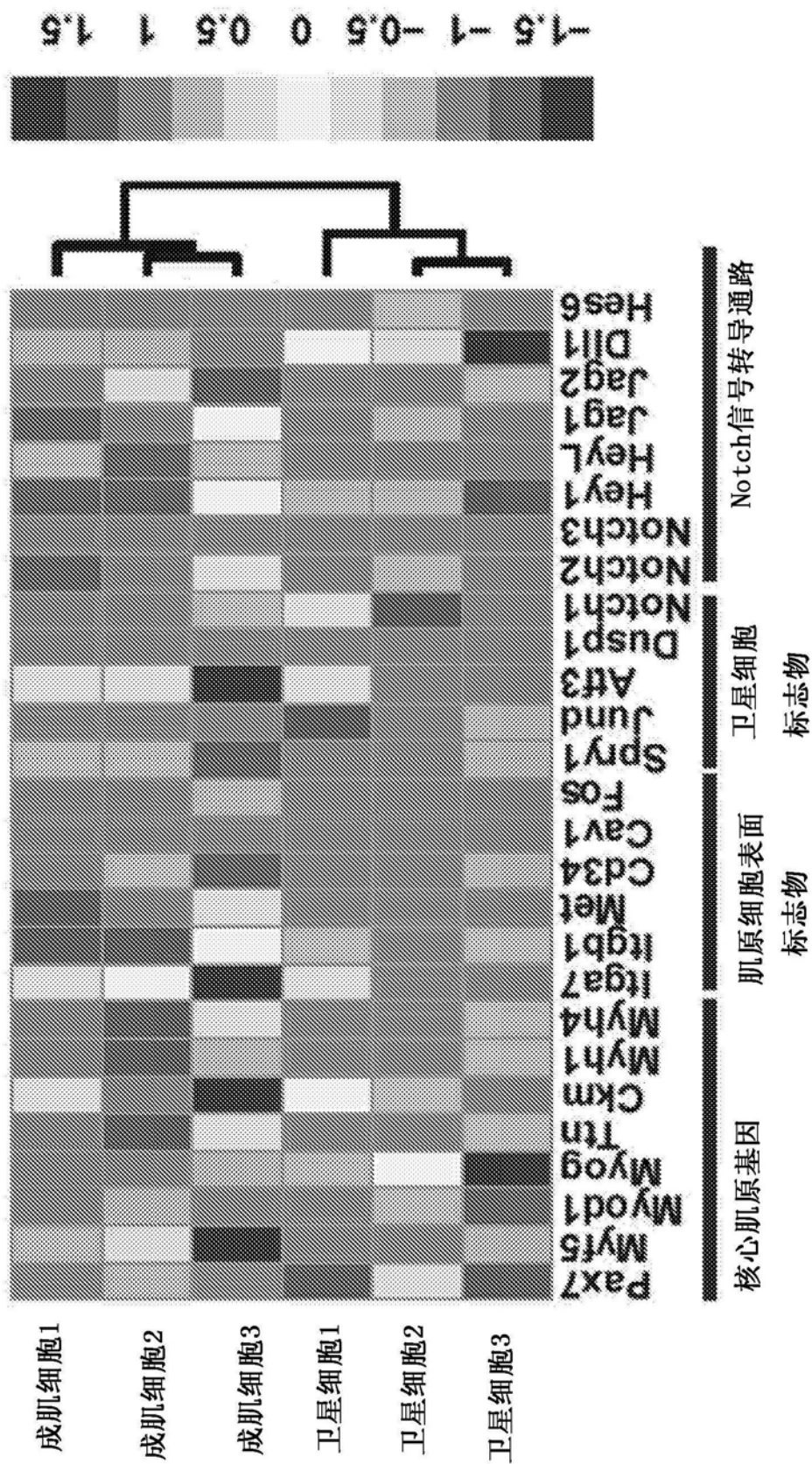


图2A

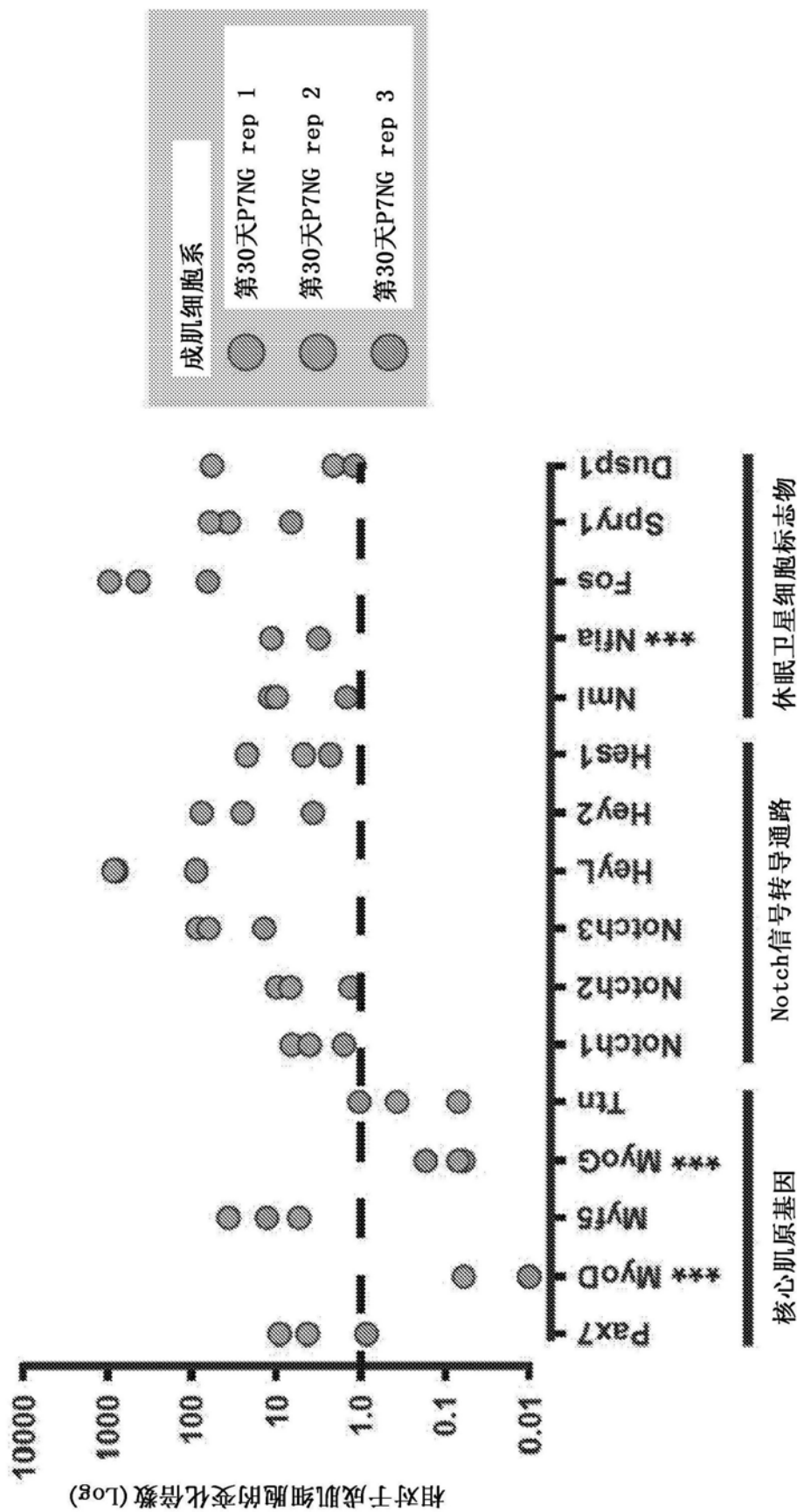


图2B

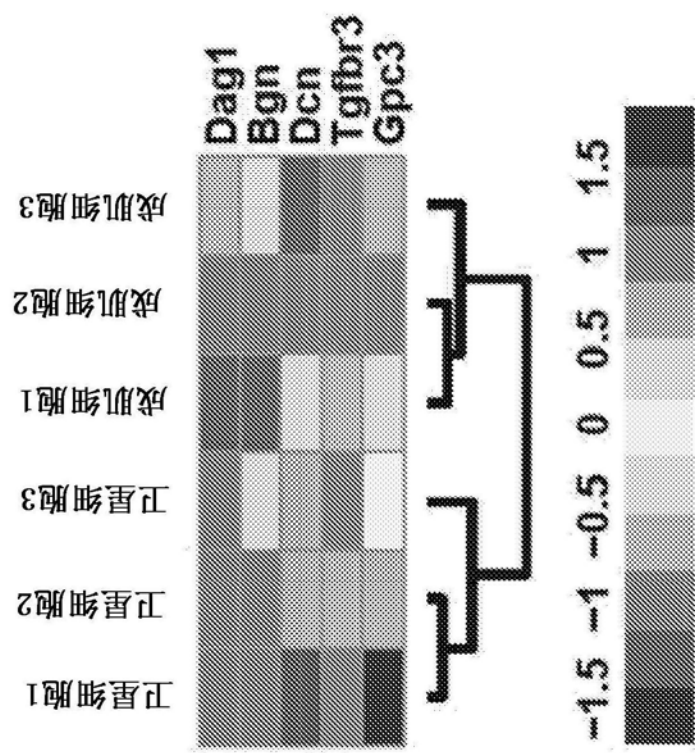


图3A

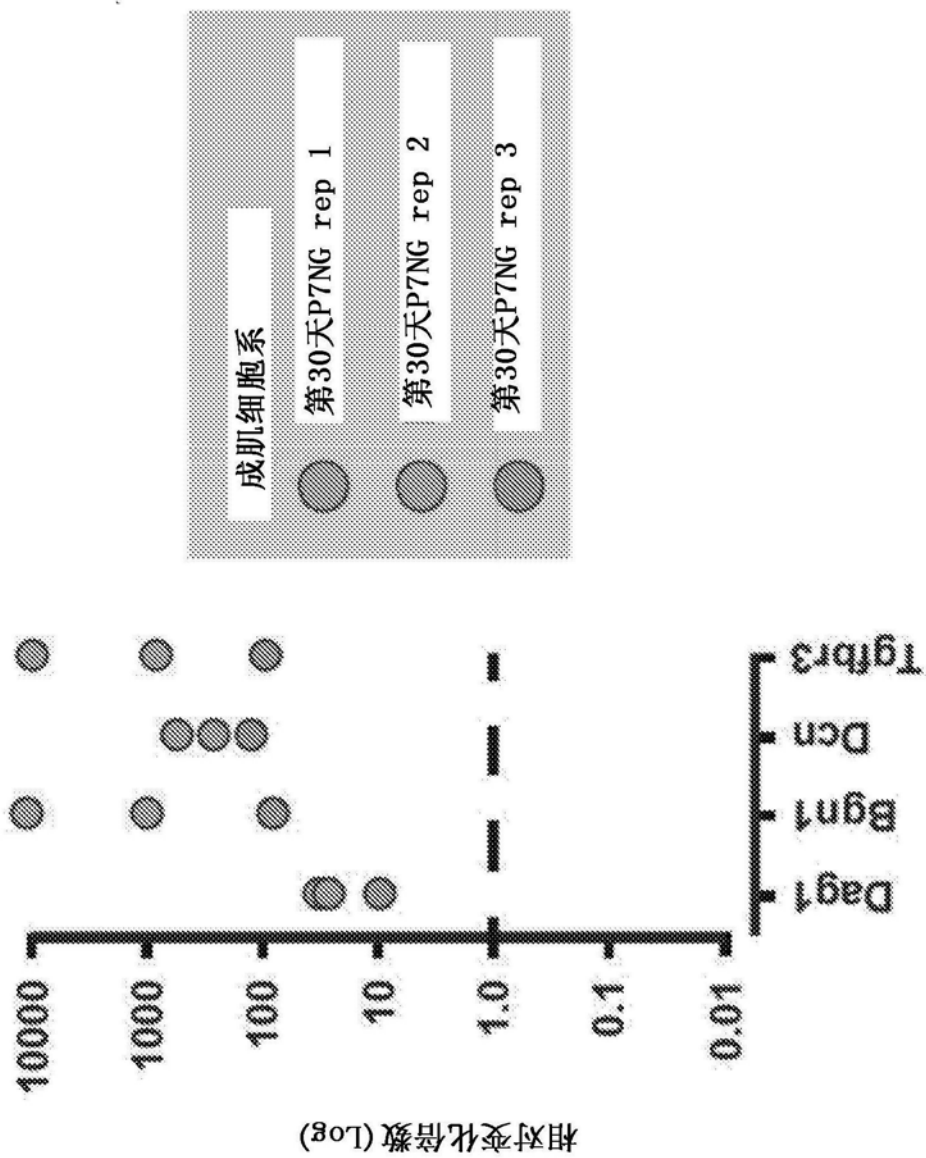


图3B

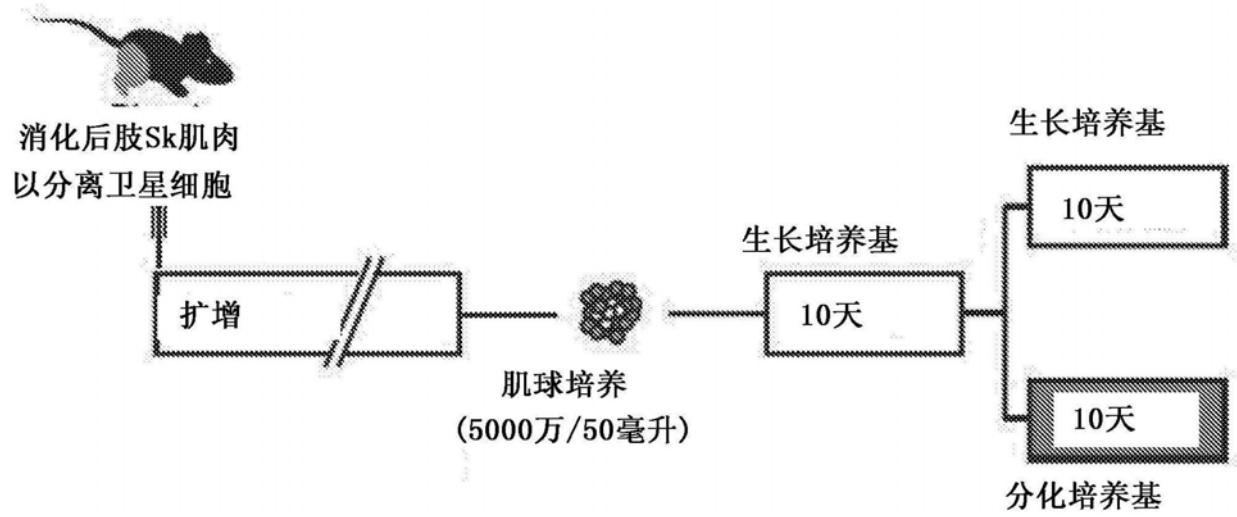


图3C

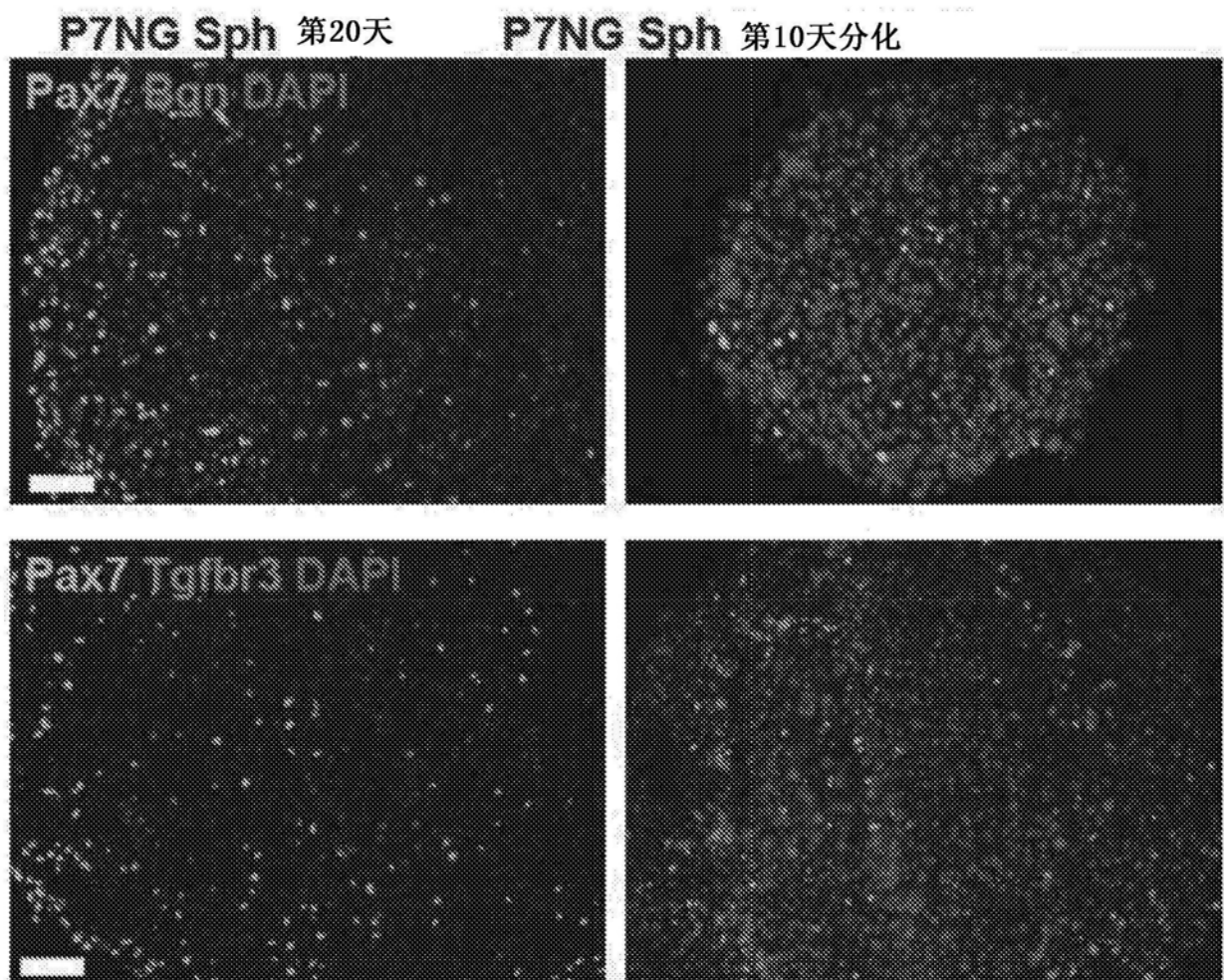


图3D

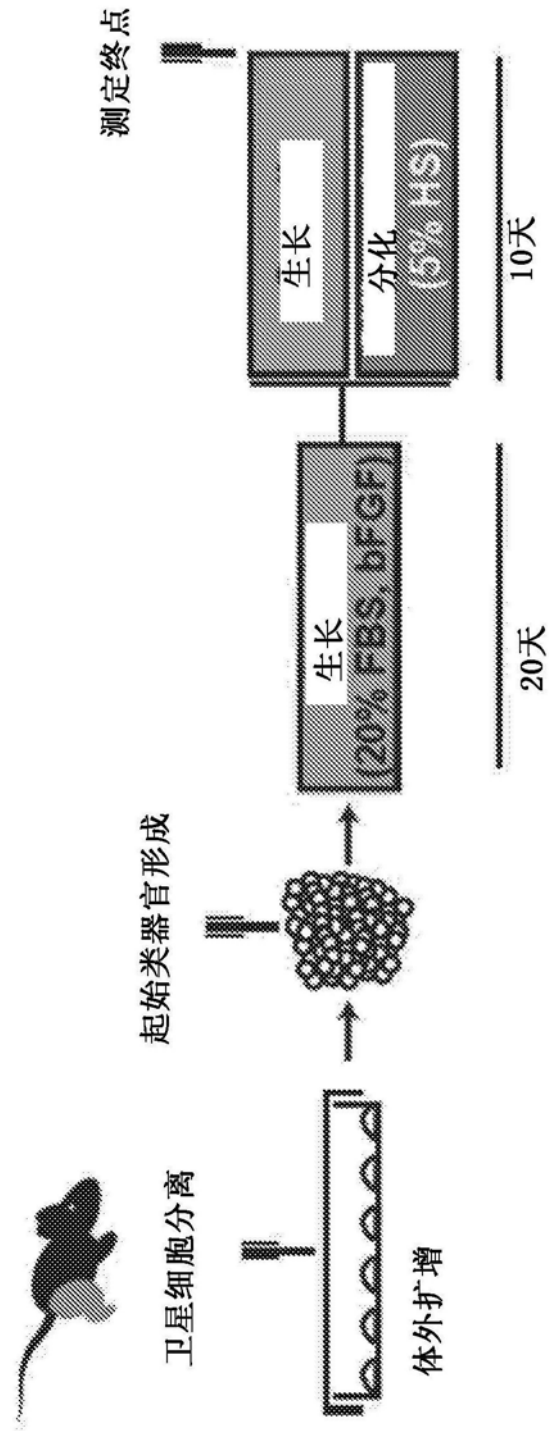


图4A

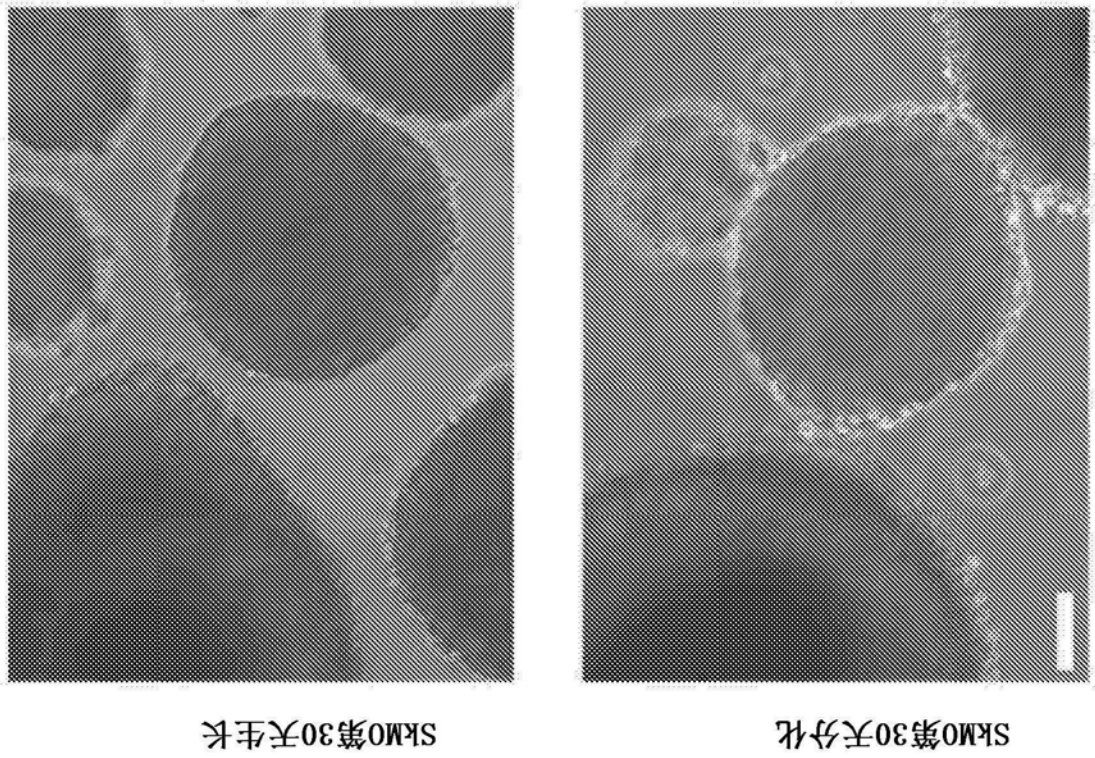


图4B

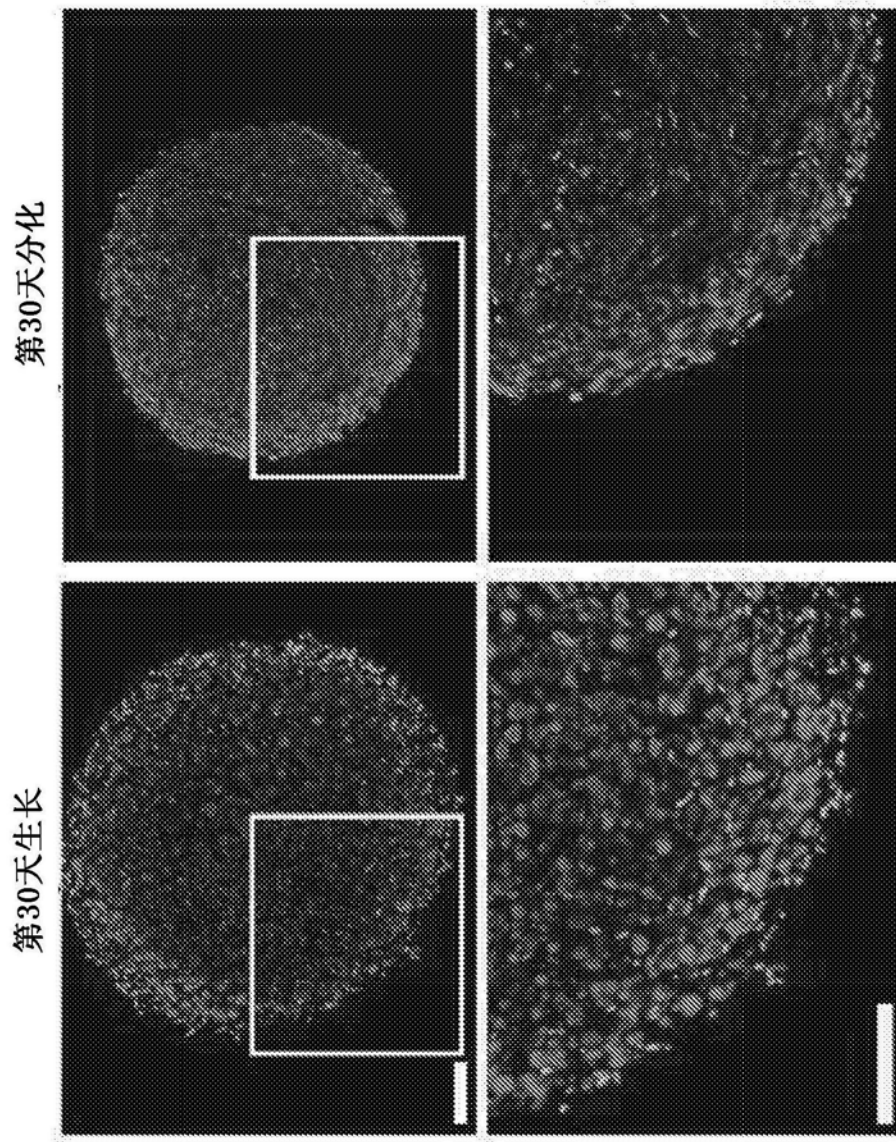


图4C

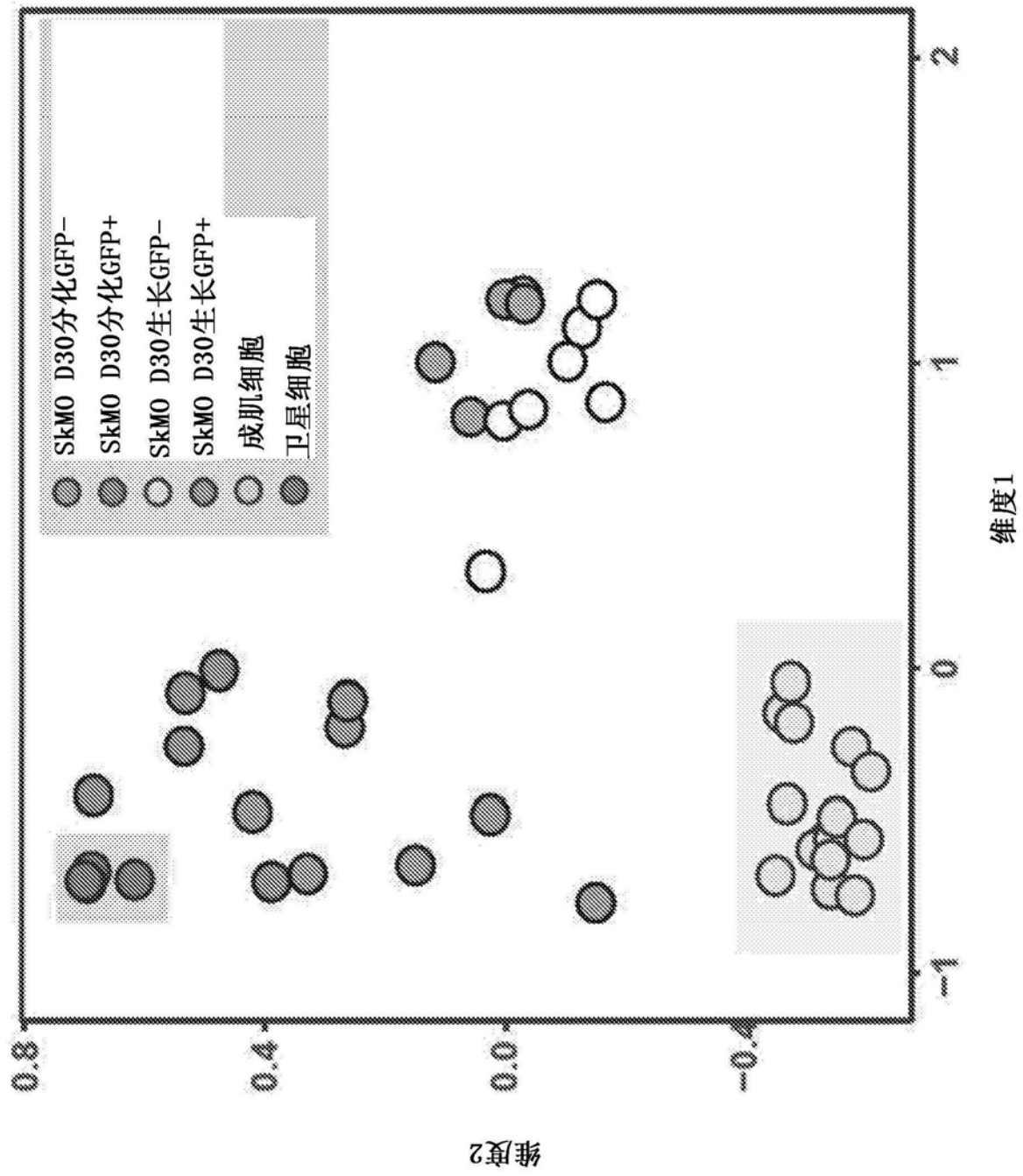


图4D

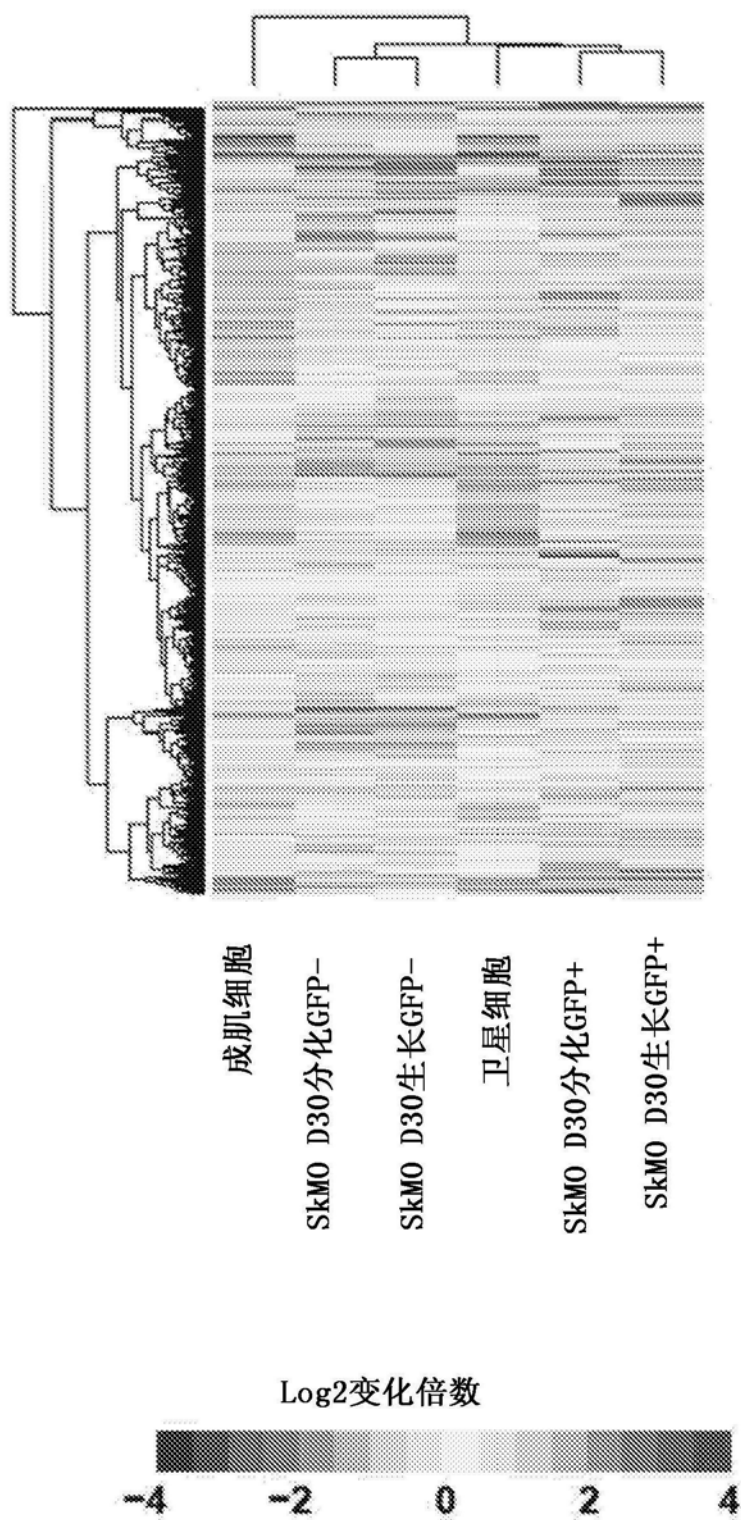


图4E

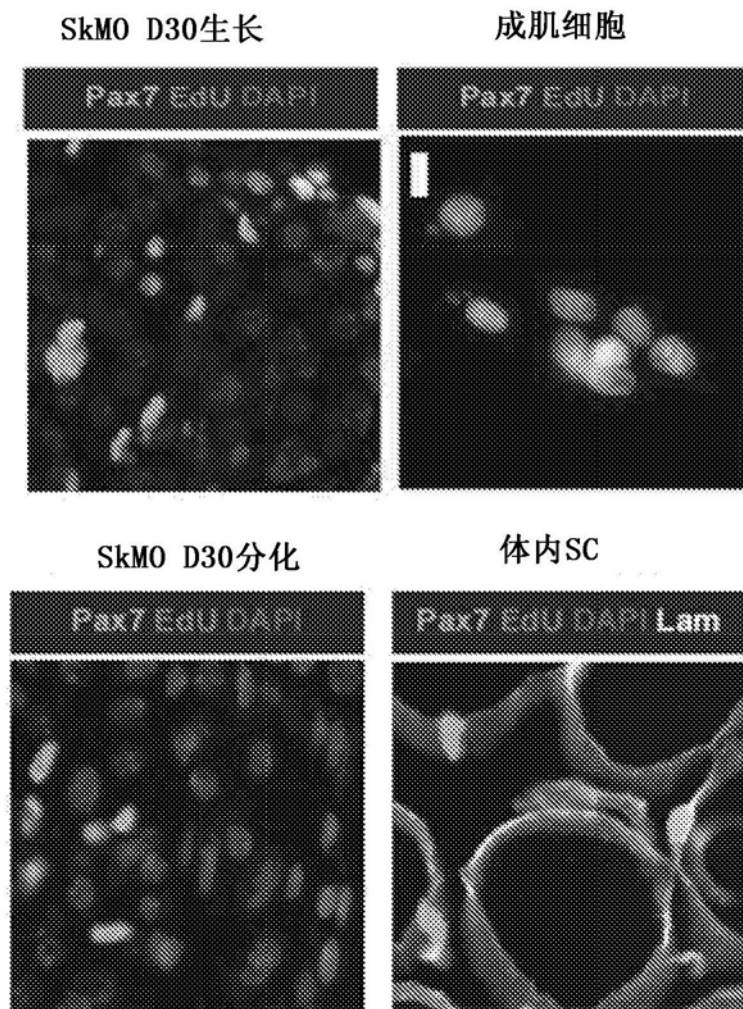


图5A

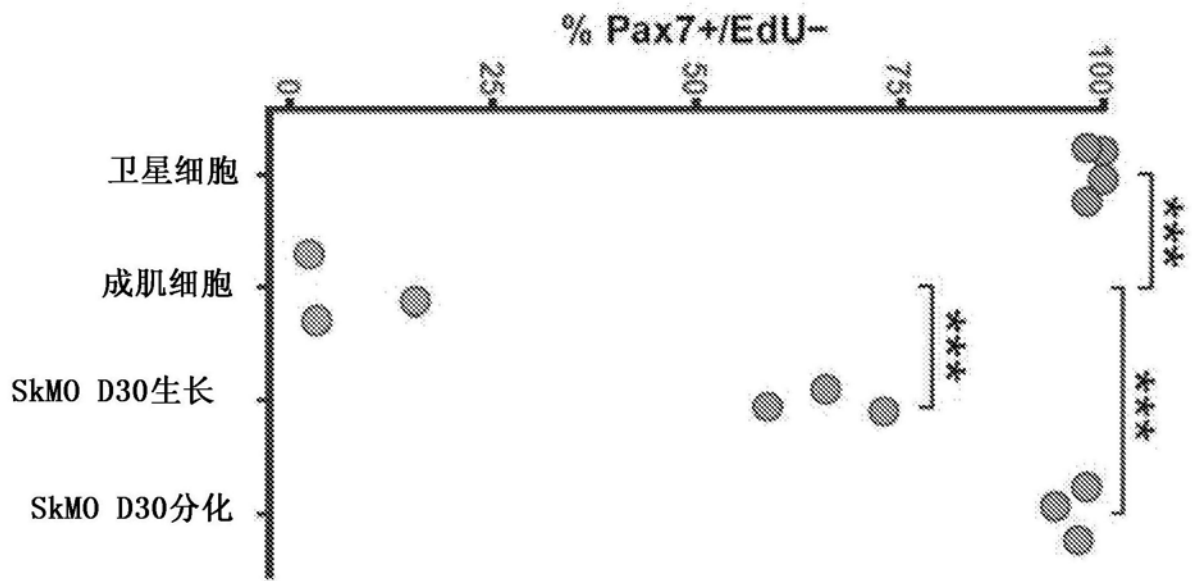


图5B

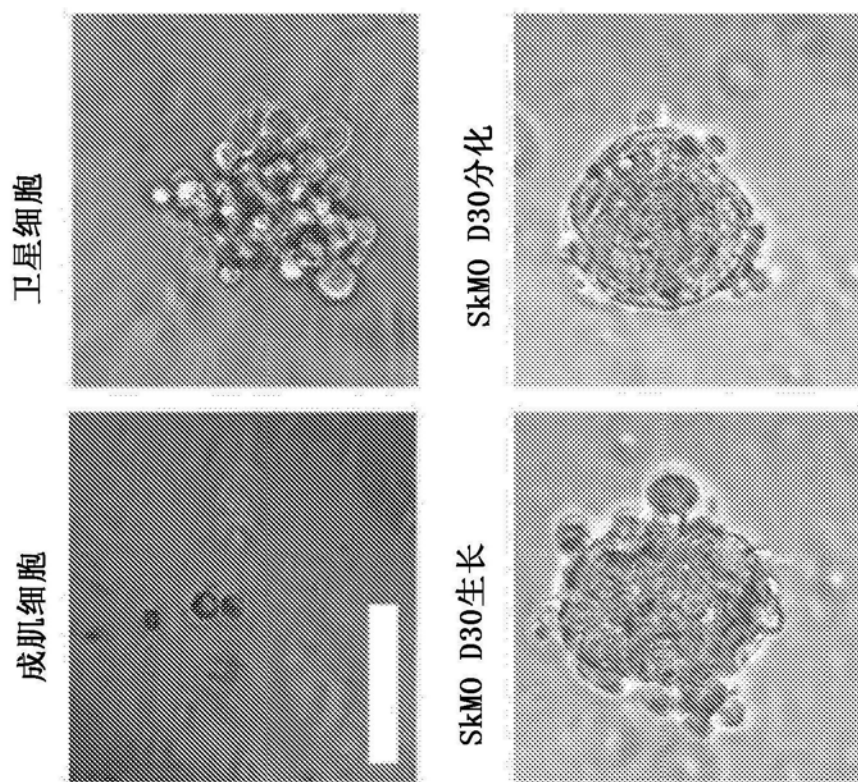


图5C

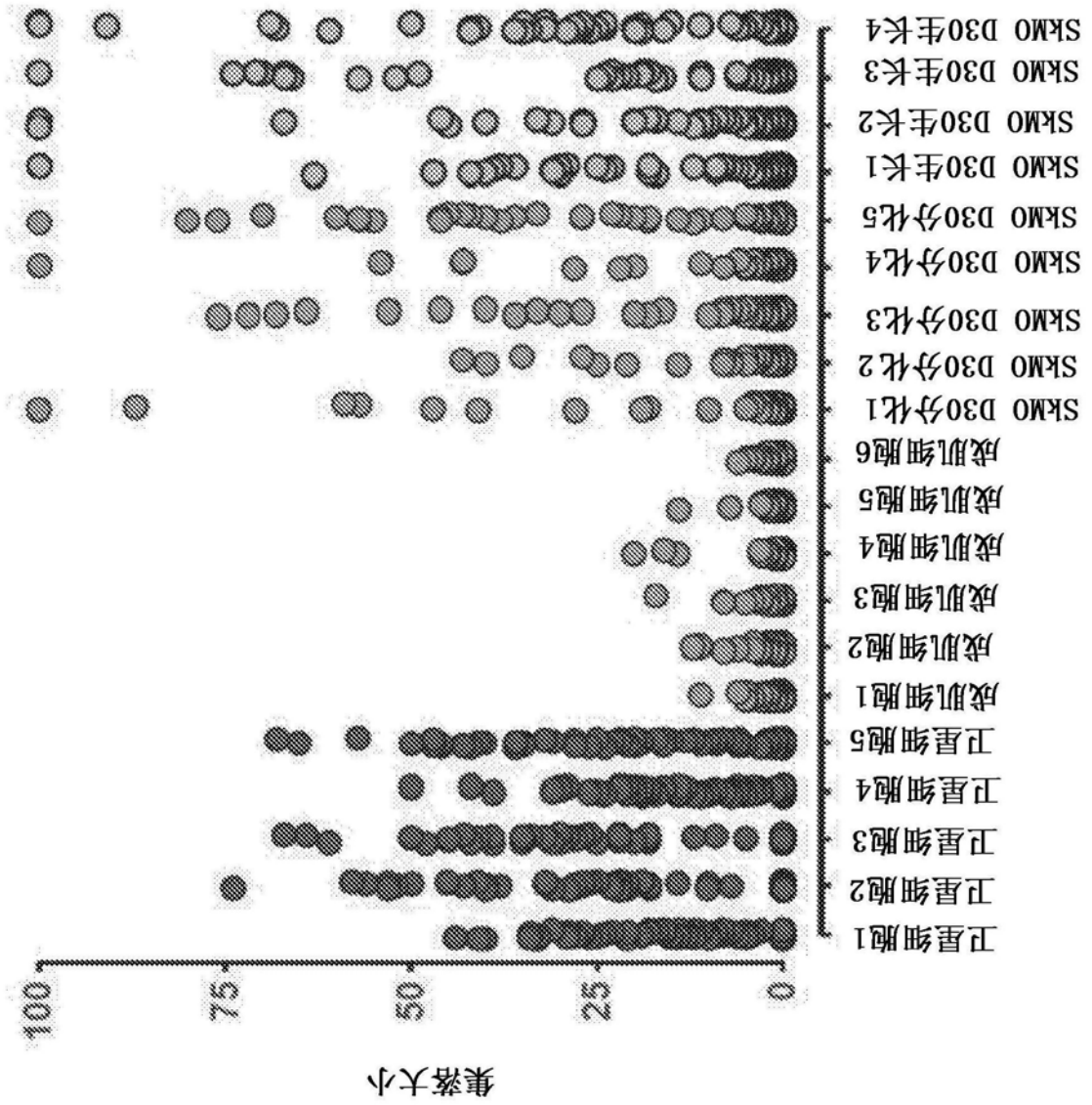


图5D

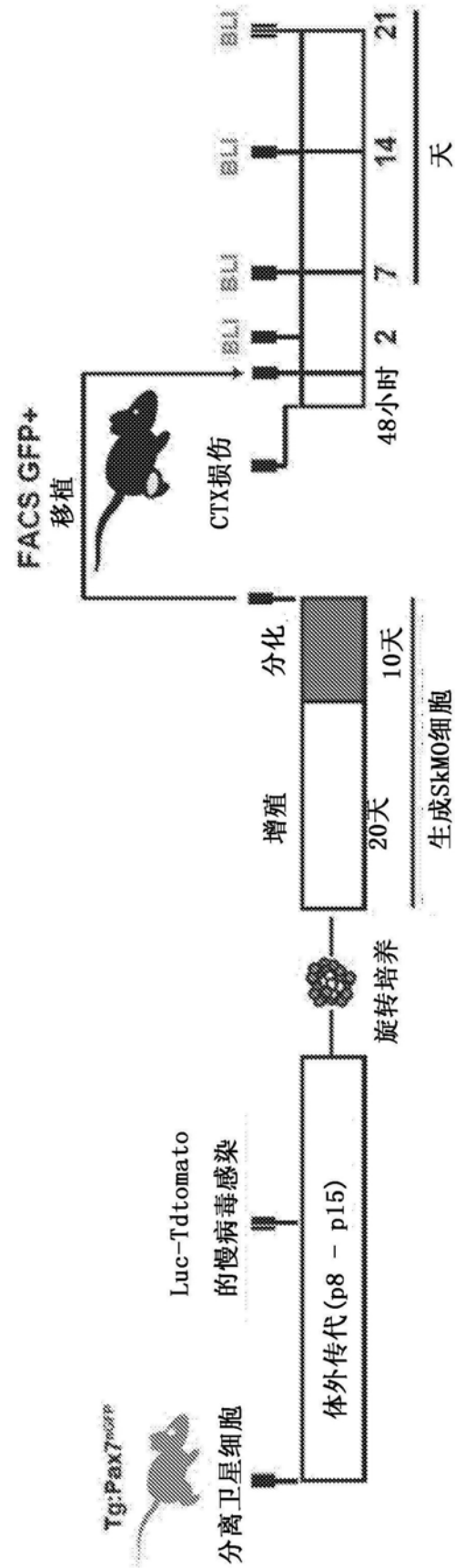


图6A

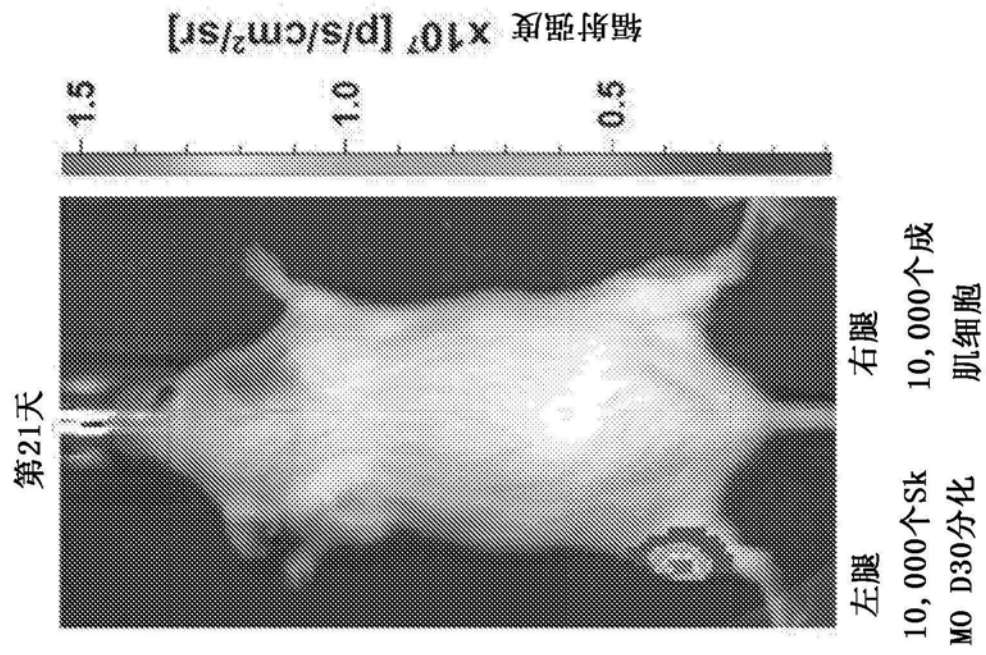


图6B

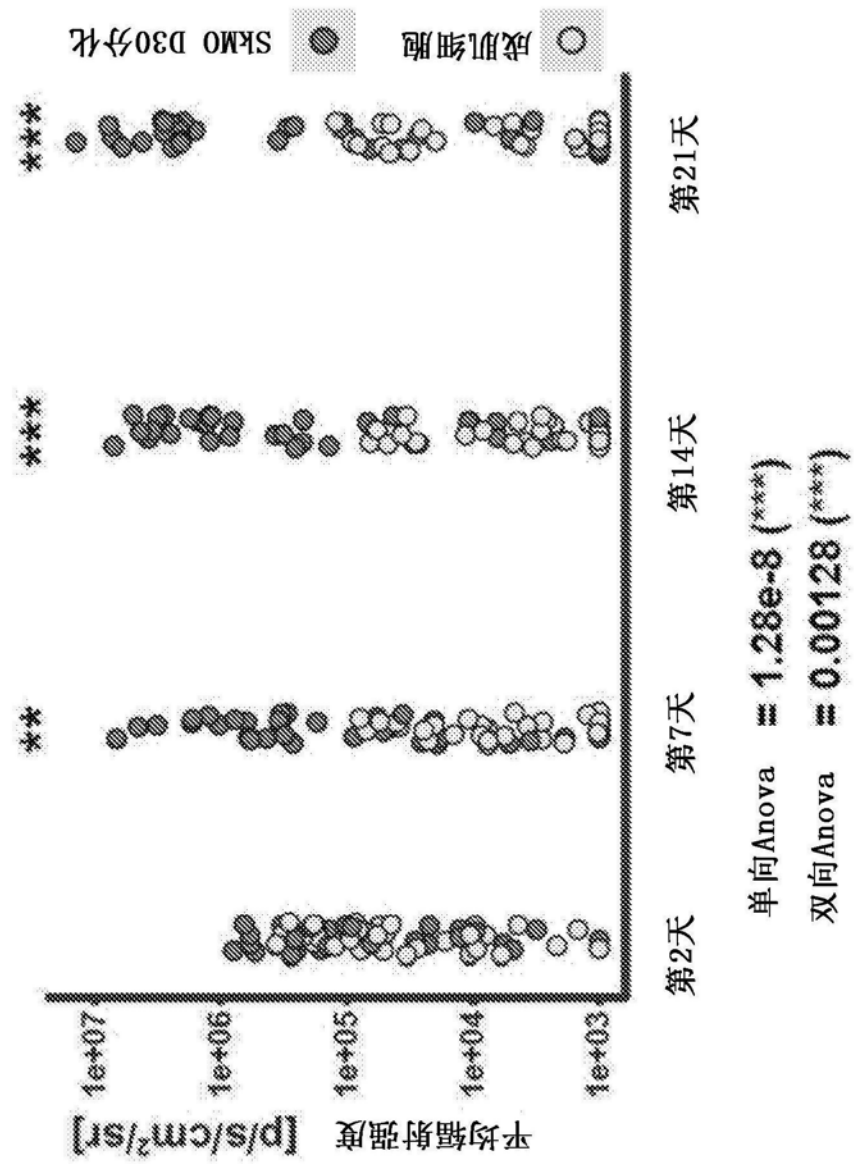


图6C

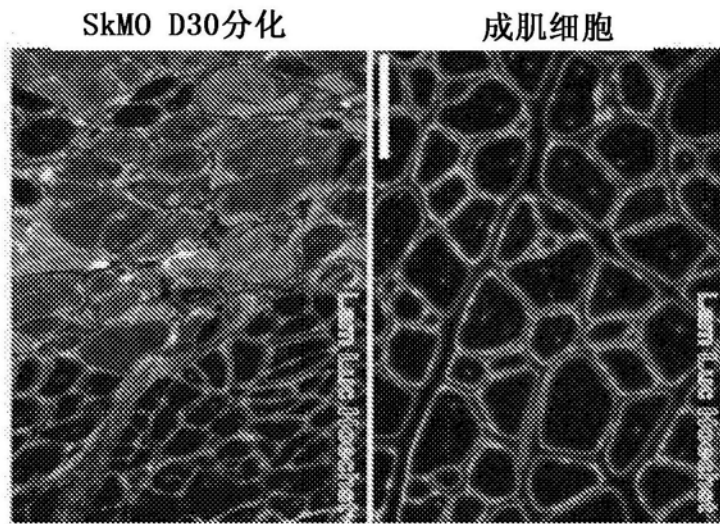


图6D

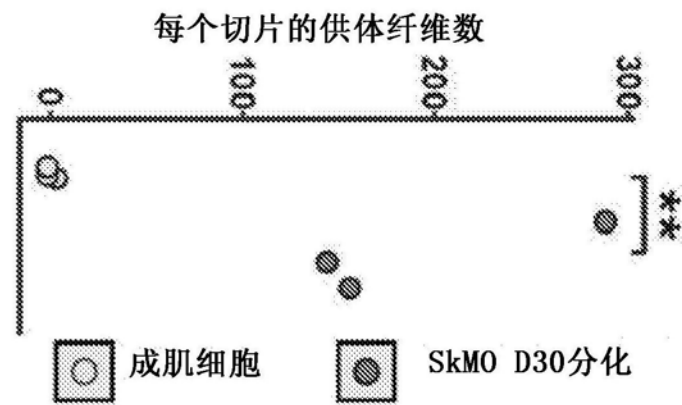


图6E

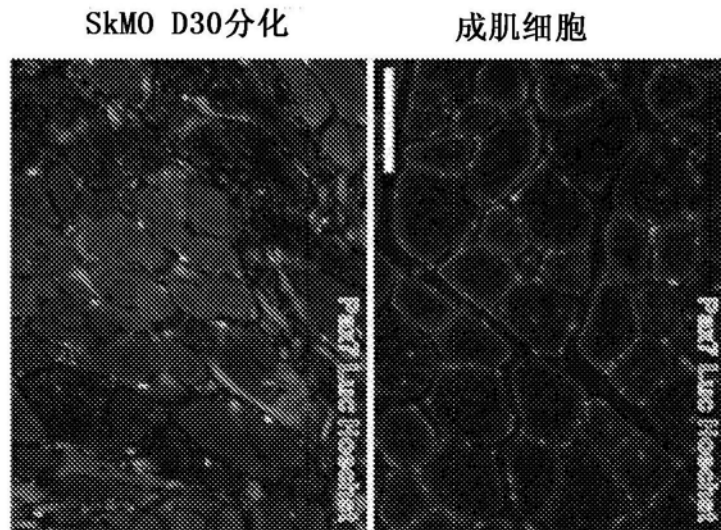


图6F

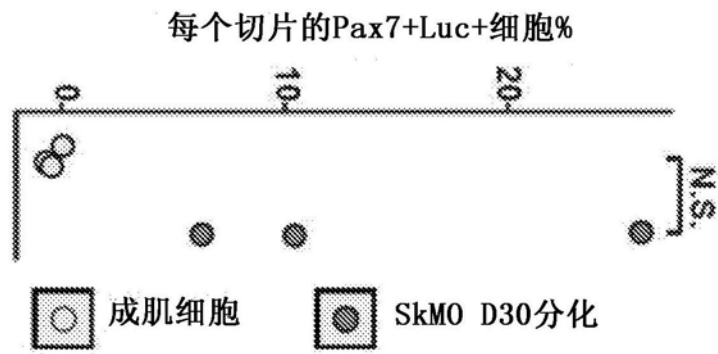
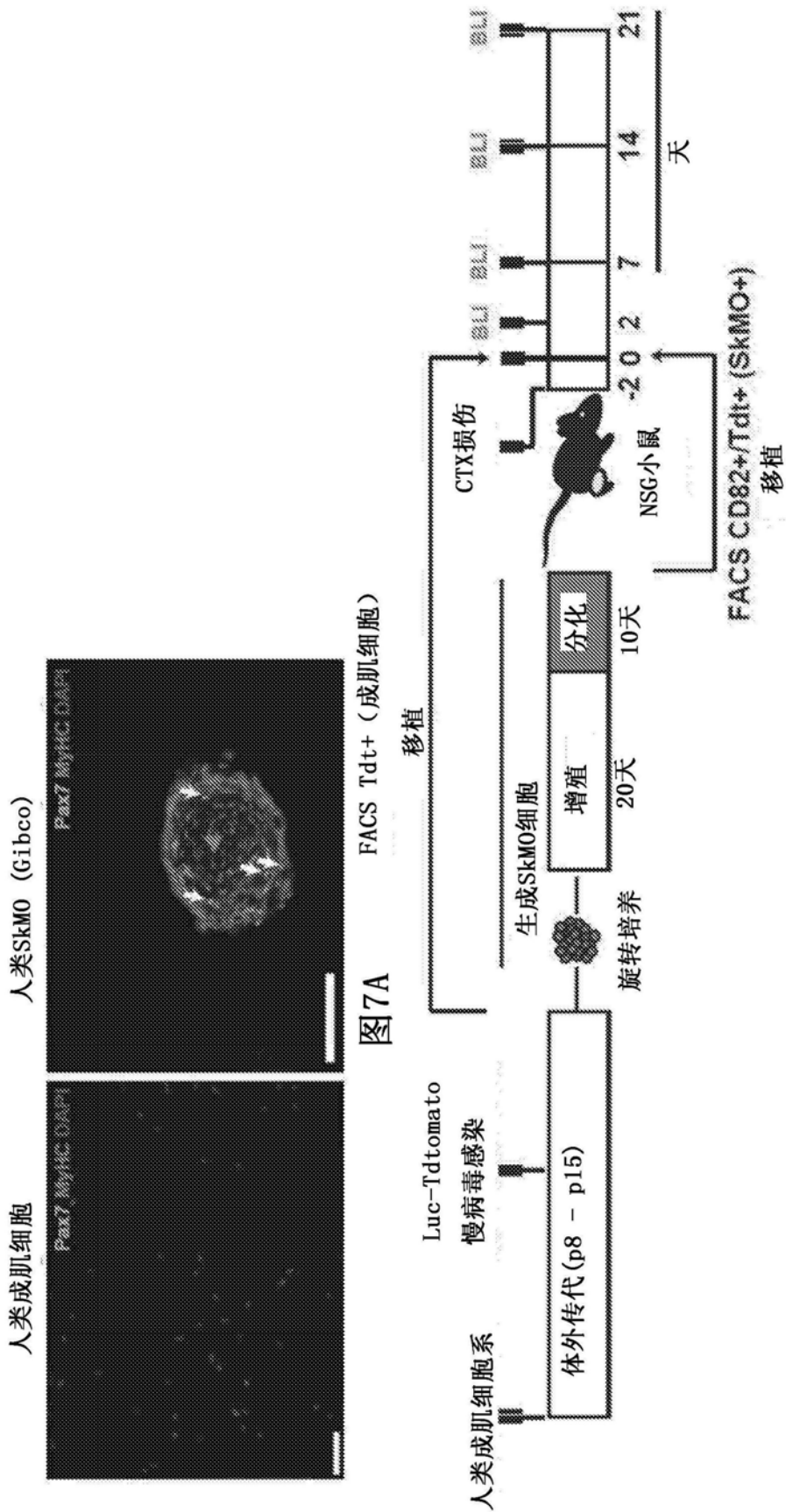


图6G



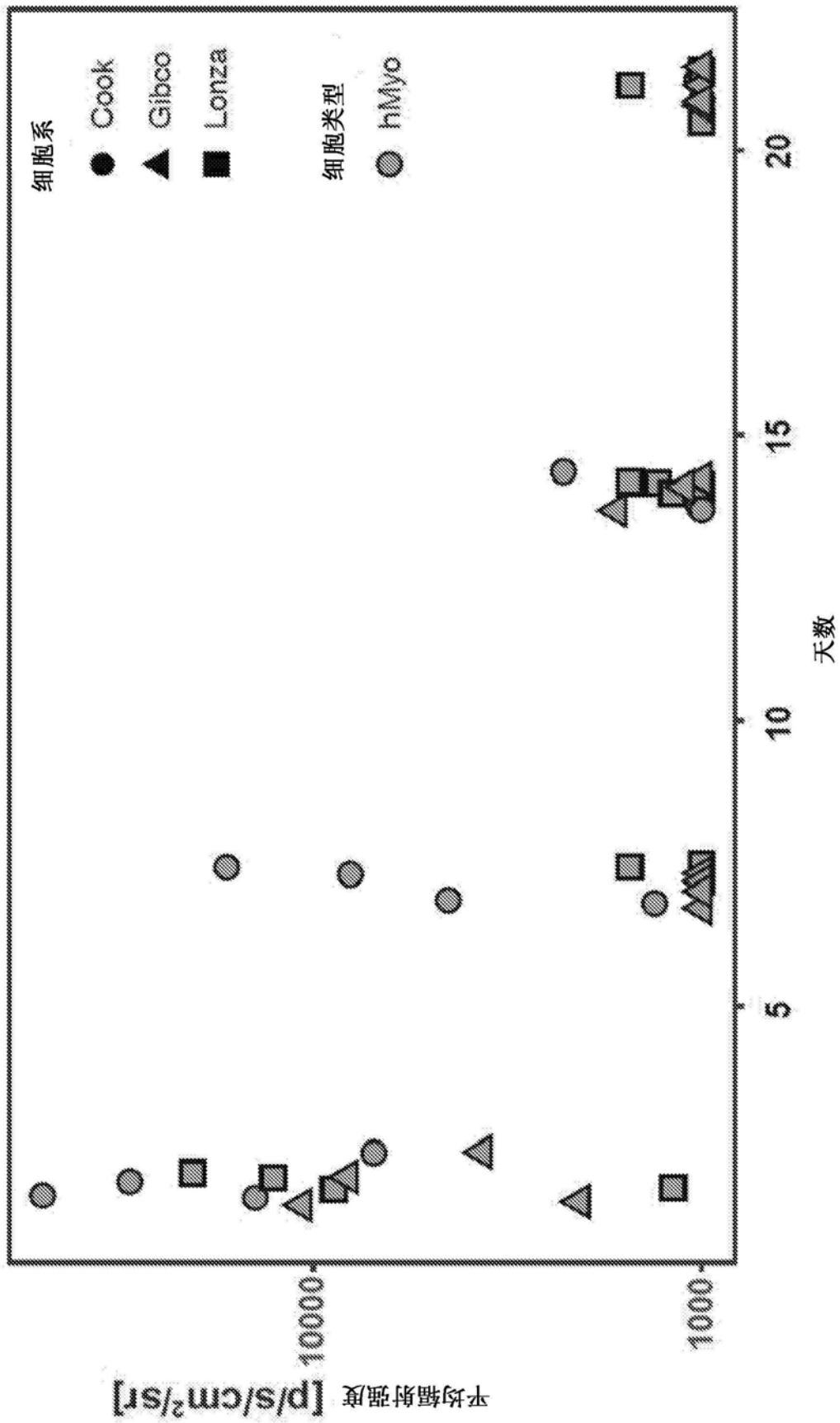


图7C

全部上调		
Dcn	P2ry14	Nav1
Dpt	Pmp22	Lamc1
Heyl	Igf1	Atp2b4
Nr4a1	S1pr3	Tagln
Col4a1	Klf9	Mkl2
Pax7	Col6a1	Col4a2
Tgfb3	Txnip	Htra3
Fos	Glu1	Fxyd1
Egr1	Col6a2	Ogn
Dag1	Ncald	Tgfb3
Apoe	Cc2d2a	Tcp11l2
Spry1	Gpm6b	Spats2l
Kat2b	Timp3	Capn6
Cav1	Prkcdp	Fgfr1
Cd82	Nfia	Mt2
Igfbp4	Gpr124	Cdkn2c
Thbs2	Psmbl1	Tln2
Igfbp7	Ccdc80	Ndrp2
Serping1	Malat1	Bhlhe40
Fosb	Zfp36l1	Fstl1
Zfp36	Gsn	Tcf4
Nrep	Sdpr	Igsf3
Sepp1	Slc16a2	Tmem123
Junb	Olfml3	Col3a1
Irf2	1810026B05Rik	Emp2
Col15a1	Adamts1	Itih2a
Adh1	Olfml2b	Xbp1
Cp	Gng11	Crip1
Ramp2	Cd200	Sparc
Sparg1	Fcgrt	Cd9

图8A

全部下调		
Tspan9	Ankrd1	Tmem55a
Sema3e	Hes6	Prdx6
Hspd1	Cox6b2	Sox11
Tipin	Gm15772	Cited2
Rasa1	S100a6	Ddx39
Sct	Col18a1	Slc44a2
Mdm2	Steap2	Bax
Csf1	Smyd4	Gal
Mstn	Tmem171	Rbmxl1
Alox5	Ctnn	Mak16
Ckap2	Car3	Nap1l1
Camk1g	Rrm2	Dctpp1
Mcpt8	Asns	Nme1
Ccng1	Chrna1	Ccnd1
Tuba1c	Ugcg	Cks1b
Rps27l	Cdh2	Myl9
Hmga2	Myod1	Prrc2c
Ccnb1	Tpm1	Set
Itga6	Pa2g4	Hnmpf
Nasp	Fabp5	Ppp1r14b
Dynap	Mcm4	Ran
Myof	Rrm1	Tuba1b
Epha2	Ftl1	Rbm3
Gtse1	Aaas	Hsp90aa1
Lce1g	Tmsb10	Nme2
Cd24a	Lrrn1	Hspe1
Lgals3	Ddx21	Snrpg
Steap1	Odc1	Npm1

图8B

SkMO上调		
Itgb5	Thbd	Rnf167
Sdc1	Uba7	H1f0
Vcan	Agtr2	Fn1
Bgn	Cyp1b1	Mmp14
Igfbp5	Tspan15	Cpq
Col5a1	Osr2	Mrc2
Zcchc24	Fam129a	Ifngr1
Lum	Plekha6	St3gal5
Postn	Mmp2	Fbn1
Sfrp4	Arrdc3	Sdc2
Spon2	Matn2	Adcy7
Col8a1	Mab21l1	Ckm
Wisp2	Pvrl2	Hexa
Adamts2	Adamtsl4	Capg
Colec12	Cd248	Klhl13
Dnm3os	Gulp1	Loxl1
Plat	Mfap2	Fdft1
Z310010J17Rik	Idua	Ifi27l1
Ctsa	Cspg4	Rbp1
Ank	Spock1	Nr2f2
Dkk2	Mfap4	Cst3
Fap	Hexb	Pxdn
Mmp3	Cilp	Ecm1
Dmp1	Pold4	Mybpc1
Col6a3	Crebrf	Igf2r
Pdgfrb	Col14a1	Serpinh1
Col1a1	Tmem42	Mt1
Mgp	Nedd9	Lpar1
Tmem100	Rcn3	Atraid
Ctsc	Sept8	Scd2
Nr2f1	Pcolce	Dap
Cfh	Edil3	Ppic
Pdgfra	Nupr1	App
Dio2	Phf17	Lamp2
Htra1	Plin3	Col5a2
Dkk3	Aebp1	Gpc1
Islr	Hmgcs1	Hspa5
Foxs1	P4ha1	Pmepa1
Tgfb2	Lama2	Laptm4a
Tgm2	Csrp2	Lrp1

图8C

SkMO下调
Reln
Msln
Sema6d
Itgb4
Ldha
Nop58
Dkc1
Rpl12
Gchfr
Mgmt
Milr1
Fnbp1l
Anxa3
Tek
2010204K13Rik
Selp
Efnb2
Cirh1a
Fgf21
Stmn2
Gpatch4
Peg3
Snhg8
Fbl
Ahcy
Ebna1bp2
Nop56
Pcna

图8D

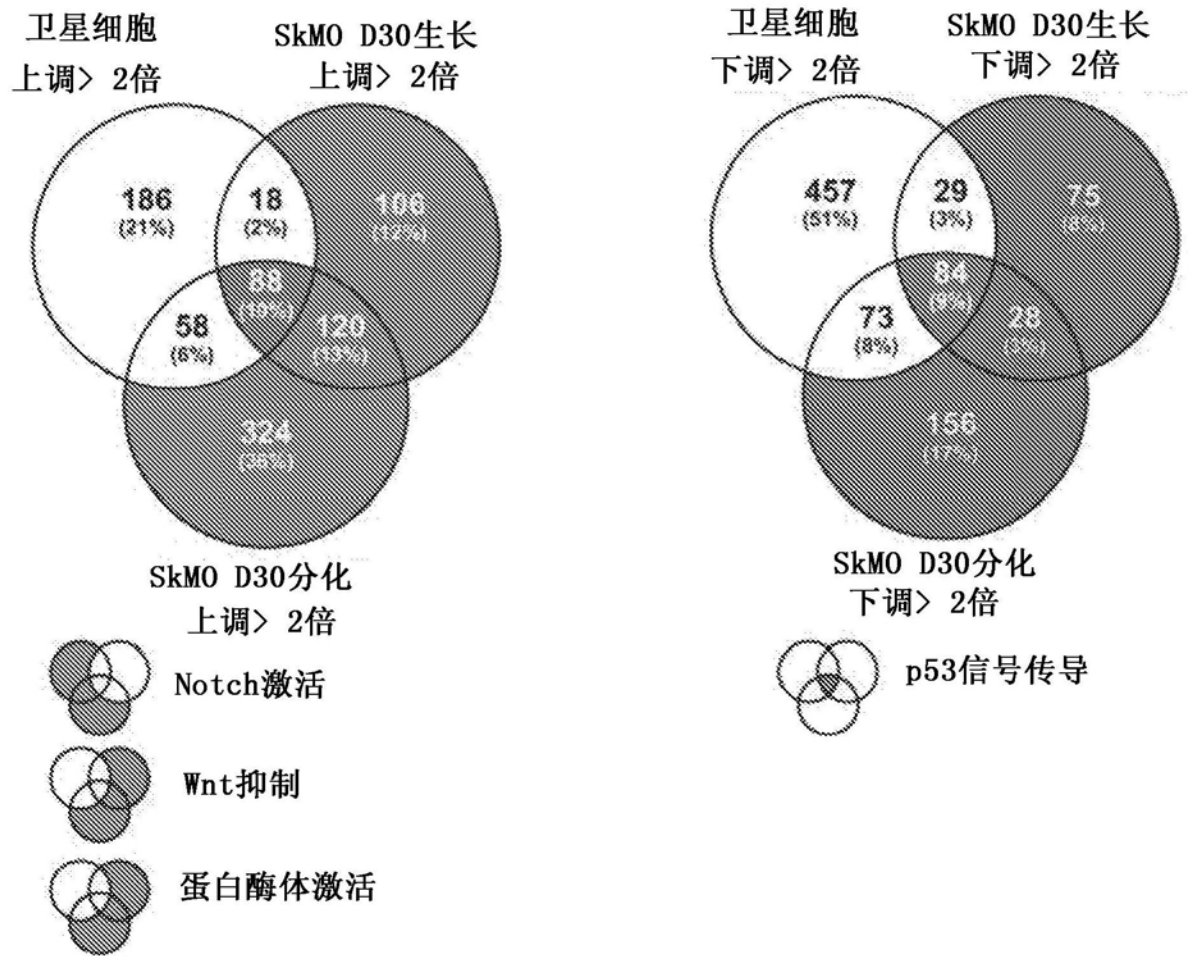


图8E