



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102220280 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110112051. X

(22) 申请日 2006. 02. 13

(30) 优先权数据

60/651, 633 2005. 02. 11 US

(62) 分案原申请数据

200680011324. 9 2006. 02. 13

(71) 申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡城

(72) 发明人 V·努科比 S·科尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈迎春 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010. 01)

C12N 5/0775 (2010. 01)

A61K 35/12 (2006. 01)

A61P 43/00 (2006. 01)

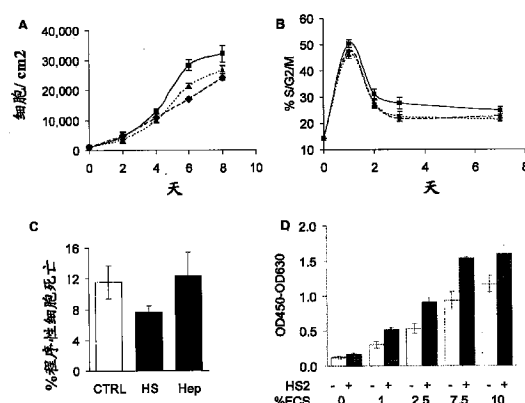
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 7 页

(54) 发明名称

增殖干细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及增殖干细胞的方法。更具体地说，本发明涉及糖胺聚糖类或蛋白聚糖类在先体外后体内培养中促进干细胞生长，同时保护其多能性中的应用。



1. 与硫酸乙酰肝素 2(HS2) 接触的干细胞的体外培养物。
2. 根据权利要求 1 的干细胞的体外培养物,其中所述干细胞是成体干细胞。
3. 根据权利要求 1 或 2 的干细胞的体外培养物,其中所述干细胞是人干细胞。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项的干细胞的体外培养物,其中所述干细胞是充质干细胞。
5. 从含有硫酸乙酰肝素 2(HS2) 的多能干细胞的体外培养物获得的多能干细胞。
6. 根据权利要求 5 的从含有 HS2 的多能干细胞体外培养物获得的多能干细胞,用于 30 次的群体倍增或更多次的群体倍增。
7. 根据权利要求 5 或 6 的多能干细胞,其中所述的干细胞是成体干细胞,人干细胞或者充质干细胞。
8. 治疗量的根据权利要求 5-7 中任一项的干细胞,其获得自含有 HS2 的多能干细胞的体外培养物,并用于治疗。
9. 干细胞在制备用于治疗疾病的药物中的应用,其中所述干细胞获得自含有硫酸乙酰肝素 2(HS2) 的多能干细胞的体外培养物。
10. 硫酸乙酰肝素 2(HS2) 在体外细胞培养中的应用。
11. 根据权利要求 10 的 HS2 的应用,其用于干细胞的体外培养。
12. 根据权利要求 11 的 HS2 的应用,其用于促进干细胞的体外生长。
13. 根据权利要求 11 或 12 的 HS2 的应用,其用于在体外维持干细胞的多能性或者用于在体外促进干细胞的增殖。
14. 体外培养干细胞的方法,该方法包括培养与硫酸乙酰肝素 2(HS2) 接触的干细胞。
15. 预防或者降低在体外培养物中干细胞增殖期间多能干细胞丢失多能状态的体外方法,该方法包括培养与硫酸乙酰肝素 2(HS2) 接触的干细胞。

增殖干细胞的方法

[0001] 本申请为 2006 年 2 月 13 日提交的,发明名称为“增殖干细胞的方法”的 PCT 申请 PCT/IB2006/000278 的分案申请,所述 PCT 申请进入中国国家阶段的日期为 2007 年 10 月 8 日,申请号为 200680011324.9。

发明领域

[0002] 本发明涉及增殖干细胞的方法。更具体地说,本发明涉及糖胺聚糖类或蛋白聚糖类在先体外后体内培养中促进干细胞生长,同时保护其多能性中的应用。

[0003] 发明背景

[0004] 在身体的所有组织中,存在成体干细胞亚群。募集并且活化这些多能细胞以便使其参与组织再生。成体干细胞为疗法富有希望的来源,但其数量极低并且它们需要在体外增殖以便具有治疗应用。当先体外后体内培养这些细胞时,已经证实难以再造其天然微环境,认为所述微环境是来自与胞外基质和相邻细胞的相互作用的信号与微环境的激素状态的总和。因此,使用成体干细胞的再生疗法仍然受到可利用的细胞数量有限和以下事实的阻碍,所述事实即必须获得治疗数量的体外增殖干扰了其分化和增殖潜能。

[0005] 人充质干细胞(hMSC)因其形成软骨、骨、脂肪和其他结缔组织的能力而构成了基于细胞的疗法在再生患病或受损组织中的令人兴奋的前景。将这些成体干细胞从小体积的骨髓抽吸物中容易地纯化并且在它们达到复制衰老前在体外扩增,以进行有限数量的群体倍增(PD)(≈ 30)。可能这种生长停滞与端粒缩短有关,因为端粒末端转移酶(hTERT)催化亚基的过量表达足以将寿命增加至几百的群体倍增。这些“端粒化”细胞保持其呈现间充组织表型的能力,由此提供用于 hMSC 研究的有用工具。然而,它无法解决在培养中获得治疗数量的多能干细胞而不会严重影响其再生潜能的问题。

[0006] 在培养中干细胞自发分化是在幼稚干细胞生态位中正常发现的微环境改变的结果。如上所述,干细胞生态位为与来自胞外基质(ECM)和相邻细胞的特异性成分相互作用的信号与微环境中的激素状态的总和。

[0007] 因此,对有助于克服先体外后体内干细胞培养物增殖中遇到的问题的方法和培养基组合物存在需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的一个目的在于克服与干细胞先体外后体内培养和增殖相关的问题。

[0010] 本发明目前发现通过向来自骨髓的人成体充质干细胞培养物中添加糖胺聚糖或蛋白聚糖,可以优化这些细胞生长和分化的培养条件。

[0011] 因此,本发明的第一个方面涉及增殖干细胞的方法,包含将糖胺聚糖或蛋白聚糖添加到干细胞的先体外后体内培养物中。

[0012] 在这方面,注意到蛋白聚糖类一般代表了一类专用的明显糖基化的糖蛋白。它们由带有一个或多个共价结合的糖胺聚糖(GAG)链的核心蛋白质组成。这些糖胺聚糖链为在生理条件下因存在硫酸酯和糖醛酸基团而带负电荷的长的线性糖类聚合物。蛋白聚糖类为动物胞外基质的主要成分。其中,蛋白聚糖类既与其他蛋白聚糖类,而且还与纤维基质蛋白

(诸如胶原蛋白)形成较大的复合物。它们还参与结合阳离子(诸如钠、钾和钙)和水并且还调节分子通过基质的运动。证据还表明它们可以影响基质内蛋白质和信号分子的活性和稳定性。蛋白聚糖类的各个功能可以归因于蛋白质核心或结合的 GAG 链。

[0013] 已经证实与胞外基质的蛋白聚糖类结合的生长因子体外和体内调节人干细胞的分化和增殖。这些生长因子通过与特异性膜受体激酶相互作用(即涉及蛋白聚糖结合的相互作用)而进行信号传导。然而,现存的使用生长因子,诸如 FGF 的方法存在缺陷,即在刺激干细胞增殖的同时,生长因子的添加还导致干细胞多能性的显著丧失。与此相反并令人意外的是,观察到按照本发明方法实现的增殖增加伴有对干细胞多能性的保护。

[0014] 蛋白聚糖类也可以用在本发明中,但是它们在某些实施方案中不如相应的糖胺聚糖类使用便利,这是因为发现糖链更容易操作,即更小和更稳定,更可溶,并且较不易于干扰(例如与胞外基质)相互作用。因此,与蛋白聚糖类相比,糖胺聚糖类每微克具有增加的生物学活性。

[0015] 因此,在本发明的另一方面中,糖胺聚糖或蛋白聚糖优选为糖胺聚糖,且更优选硫酸乙酰肝素。

[0016] 在这方面,注意到硫酸乙酰肝素蛋白聚糖类(HSPG)代表了高度不同的蛋白聚糖类亚组,并且由与蛋白质骨架共价结合的硫酸乙酰肝素糖胺聚糖侧链组成。核心蛋白质可以以三种形式存在:称作基底膜蛋白聚糖的分泌形式;称作磷脂酰肌醇蛋白聚糖的锚定在质膜中的形式;和称作多配体蛋白聚糖的跨膜形式。它们为哺乳动物细胞表面和大部分胞外基质中的遍在成分。

[0017] 硫酸乙酰肝素侧链由交替排列的通过(1→4)糖苷键连接的D-葡萄糖醛酸或L-艾杜糖醛酸与D-葡萄糖胺组成。葡萄糖胺通常被N-乙酰化或N-硫酸化并且糖醛酸和葡萄糖胺都可以另外被O-硫酸化。用于特定的结合配偶体的特定HSPG的特异性通过与葡萄糖胺和糖醛酸连接的羧基、乙酰基和硫酸酯基的具体模式产生。与肝素相反,硫酸乙酰肝素包含较少的N-和O-硫酸酯基和较多的N-乙酰基。硫酸乙酰肝素侧链通过四糖键(-葡萄糖醛酸基-β-(1→3)-半乳糖基-β-(1→3)-半乳糖基-β-(1→4)-木糖苷基(xylosyl)-β-1-O-(丝氨酸))区与核心蛋白质的丝氨酸残基连接。

[0018] 硫酸乙酰肝素链和核心蛋白质均可以进行一系列最终可能影响其生物活性的修饰。认为HS的复杂性超过了核酸的复杂性(Lindahl等,1998, J. Biol. Chem. 273, 24979; Sugahara 和 Kitagawa, 2000, Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 518)。HS种类的变化形式来源于糖残基的非随机高度硫酸化序列的合成,这些糖残基通过包含N-乙酰化葡萄糖胺的二糖类未硫酸化区分隔开。N-乙酰葡萄糖胺向N-磺基葡萄糖胺的最初转化产生了用于其他修饰的中心,所述修饰包括包括葡萄糖醛酸差向异构化成艾杜糖醛酸和葡萄糖胺或艾杜糖醛酸上O-硫酸化的复杂模式。此外,在未修饰的低硫酸化的N-乙酰化序列内,己糖醛酸酯(hexuronate)残基保持为葡萄糖醛酸酯,而在高度硫酸化N-硫酸化区内,C-5差向异构物艾杜糖醛酸酯占优势。这就限制了可能在任意指定链上潜在的二糖变体的数量,但没有限制每种的多度。大部分修饰出现在N-硫酸化结构域中或直接与其相邻,使得在成熟链中存在通过低硫酸化结构域分隔开的高度硫酸化区(Brickman等(1998), J. Biol. Chem. 273(8), 4350-4359,将该文献完整地引入本文作为参考)。

[0019] 据推定高度可变的硫酸乙酰肝素链在调节大量胞外配体的作用中起关键作用,包

括通过自分泌、近分泌和旁分泌反馈环的复杂组合调节和将生长和黏着因子呈递给细胞,从而控制胞内信号传导和由此的干细胞分化。例如,尽管大体上描述了硫酸乙酰肝素糖胺聚糖类 (Alberts 等 (1989) Garland Publishing, Inc, New York & London, 第 804 和 805 页),但是分离自单一来源的硫酸乙酰肝素糖胺聚糖种类可能在生物活性方面存在差异。正如 Brickman 等 1998, Glycobiology 8, 463 表明的,获自神经上皮细胞的硫酸乙酰肝素糖胺聚糖类的两种单独的收集物可以特异性地活化 FGF-1 或 FGF-2,这取决于促细胞分裂的状态。类似地,硫酸乙酰肝素 (HS) 与 FGF-1 或 FGF-2 的能力描述在 WO 96/23003 中。按照该专利申请中,能够与 FGF-1 相互作用的相应 HS 可获自约 11 到约 13 天胎龄的鼠细胞,而能够与 FGF-2 相互作用的 HS 可在约 8 到约 10 天胎龄时获得。

[0020] 在本发明的另一方面中,硫酸乙酰肝素优选为硫酸乙酰肝素 2 (HS2)。HS2 表示 HSPG 的糖链,已经发现它对 FGF-2 具有亲和力。HS2 具有约 25kDa 的分子量且由此推断每个二糖中的平均分子量为 400Da,由约 60 个二糖组成。HS2 的二糖组成如 Brickman 等所述 (文献同上),将该文献完整地引入本文作为参考。

[0021] 在本发明的另一方面中,干细胞优选为成体干细胞,其中成体干细胞可以应用于治疗用途。

[0022] 在本发明的另一方面中,成体干细胞优选为充质干细胞。

[0023] 在本发明的另一方面中,干细胞优选为人干细胞,更优选为人成体干细胞,且最优选为人成体充质干细胞。

[0024] 现在参照附图描述本发明的实施方案。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 显示不同硫酸乙酰肝素 2 浓度对人充质干细胞增殖的作用。将人充质干细胞以 3300 个细胞 /cm² 在 96 孔平板 (NUNC) 上铺板并且在有不同浓度硫酸乙酰肝素 2 存在下培养 9 天。在培养 1、3、6 和 9 天后通过 WST-1 测定法 (Roche) 测定代谢活性。

[0027] 图 2 图示硫酸乙酰肝素 2 对短期培养中的人充质干细胞增殖的作用。将 hMSC (Cambrex) 接种在对照培养基 (DMEM, 1000mg/1 葡萄糖, 10% 胎牛血清 (Hyclone), 青霉素 / 链霉素, 2mM L- 谷氨酰胺), 在包含 0.2% FCS 的培养基中血清饥饿 48 小时, 并且在 (第 0 天) 后的当天改变为对照培养基 (虚线和空心条) 或包含 160ng/ml HS2 (实线和灰色条) 或肝素 (条纹线和黑色条) 的培养基。A. 硫酸乙酰肝素 2 增加人充质干细胞的增殖。使用 ViaCount 软件并且使用 FLEX 试剂 (GUAVA technologies) 染色, 在 GUAVA PCA-96 流式细胞仪上按照制造商的说明每隔 1 天测定一次细胞数量。B. 硫酸乙酰肝素 2 增加人充质干细胞的细胞周期数。将 hMSC 以 5000 个细胞 /cm² 铺板并且在 1、2、3、4 和 7 天后分析 DNA 含量。使用胰蛋白酶提取出细胞并且如上所述计数, 用 PBS, 1mM EDTA 洗涤并且固定在 100% 冰冷甲醇中。用 PBA 洗涤细胞并且用 PI, RnaseA, Triton-X 的溶液染色, 且用 GUAVA PCA-96 分析。C. 硫酸乙酰肝素减少了进行程序性细胞死亡的细胞的百分比。将 hMSC 以 3300 个细胞 /cm² 铺板并且在 9 天后测定生存力和程序性细胞死亡。将细胞使用膜联蛋白试剂盒 (GUAVA technologies) 染色并且用 GUAVA PCA-96 流式细胞仪分析。D. 在有或没有硫酸乙酰肝素 2 (HS2) 存在下不同 FCS 浓度对人充质干细胞增殖的作用。将 hMSC 以 3300 个细胞 /cm² 在 96 孔平板上铺板, 在包含 0、1、2.5、7.5 或 10% FCS 的培养基中培养并且在 9 天后使用 WST-1 试剂盒 (Roche) 测定培养物中的代谢活性。附图中的每个点或条代表各

自按照一式三次测定的至少三份独立培养物的平均值和标准偏差。

[0028] 图 3 图示 HS2 增加人充质干细胞培养物的寿命并且维持其干细胞性。将低传代的 hMSC 以 5000 个细胞/cm² 铺板,在(第 0 天)后的当天改变为对照培养基(条纹线和空心条)或包含 160ng/ml HS2(实线和灰色条)或肝素(虚线和黑色条)的培养基中,并且维持在其中。将细胞培养至分汇合并并且在每次传代时用胰蛋白酶提取出细胞,计数并且以 5000 个细胞/cm² 重新接种。A. 来自每次传代的聚积细胞计数。将 hMSC 以 5000 个细胞/cm² 铺板并且在不含(ctrl1)或添加有 160ng/ml HS2 或肝素的 DMEM+10% FCS 中培养。在每次传代时通过 GUAVA viacount 对细胞进行计数(一式三次的两份样品)并且以 5000 个细胞/cm² 的密度重新接种。B. 将来自群体倍增 25 到 27 的三种培养物的细胞以 30 个细胞/cm² 的密度接种在 24 孔平板中并且在维持培养基中培养 12 天。将细胞固定在甲醇中,用姬姆萨染色并且对具有超过 50 个细胞的集落计数。每个条代表总集落数/cm² 的平均值和标准偏差。在图中每个点或条代表各自按照一式三次测定的至少三份独立培养物的平均值和标准偏差。

[0029] 图 4 图示硫酸乙酰肝素 2 对脂肪细胞和成骨细胞分化的作用。A. 将来自在含有或不含 160ng/ml 硫酸乙酰肝素 2(HS2)或肝素(Hep)的培养基中进行培养的 hMSC 在 +4 代以 18,000 个细胞/cm² 接种在 12 孔平板上。将细胞培养至汇合,改变为脂肪形成培养基(DMEM 含有 10% FCS,10 μg/ml 胰岛素,0.5mM 甲基异丁基黄嘌呤,1 μM 地塞米松)或对照培养基并且培养 23 天。使用 Machery Nagel Nucleospin2 试剂盒分离并且纯化 RNA,定量并且将 250 μl 用于使用 superscript 的逆转录。将 80ng cDNA 用作实时 PCR 的模板,其中 PCR 使用对成脂 RNA 标记——脂肪细胞脂肪酸结合蛋白(ALBP)和 CCAAT/增强子结合蛋白 α(C/EBP α)——具有特异性的 Taqman 引物探针。将相对表达水平(REU)校准成 18S 的表达并且乘以 10⁶。B. 将在含有或不含 160ng/ml 硫酸乙酰肝素 2(HS2)或肝素(Hep)的培养基中进行培养的 hMSC 在 +4 代以 3,000 个细胞/cm² 接种在 12 孔平板中。将细胞培养至汇合,改变为成骨培养基(10nM 地塞米松,50 μM 磷酸甘油和 100 μM 抗坏血酸盐)或对照培养基并且培养 27 天。使用 Machery Nagel Nucleospin2 试剂盒分离并且纯化 RNA,定量并且将 250 μl 用于使用 superscript 的逆转录。将 80ng cDNA 用作实时 PCR 的模板,其中 PCR 使用对成骨 RNA 标记——碱性磷酸酶和骨唾液酸蛋白 II(BSP II)——具有特异性的 Taqman 引物探针。将相对表达水平(REU)校准成 18S 的表达并且乘以 106。

[0030] 图 5 图示硫酸乙酰肝素 2 对人充质干细胞表面标记表达的作用。将 hMSC 以 3300 个细胞/cm² 在 60mm 培养皿(NUNC™)中铺板并且在有或没有 160ng/ml HS2、160ng/ml 肝素(阴性对照)、10ng/ml FGF-2(阳性对照)、FGF-2/肝素和 FGF-2/HS2 组合存在下培养 5 天,此后通过基于抗体染色的流式细胞仪测量细胞表面标记 Stro-1(A)、CD49a(B)、CD71(C)和 CD146(D)呈阳性的细胞比例。每个点代表一式三份实验的平均值和标准偏差。

[0031] 图 6 图示硫酸乙酰肝素 2 和 FGF-2 对人充质干细胞的促细胞分裂作用。将 hMSC 以 3300 个细胞/cm² 在 24 孔平板(NUNC)上铺板并且在有或没有 160ng/ml 硫酸乙酰肝素 2(HS2)、160ng/ml 肝素和 10ng/ml FGF-2 以及 FGF-2 与 HS2 或肝素的组合存在下培养 9 天。

[0032] 图 7 图示硫酸乙酰肝素 2 和 FGF-2 对人充质干细胞存活的作用。将人充质干细胞以 3300 个细胞/cm² 在 24 孔平板(NUNC)上铺板并且在有或没有 160ng/ml 硫酸乙酰肝素 2、160ng/ml 肝素和 10ng/ml FGF-2 以及 FGF-2 与 HS2 或肝素的组合存在下培养 9 天。通过

膜联蛋白 V 流式细胞以测试培养物中细胞的生存力和程序性细胞死亡。

[0033] 图 8 图示硫酸乙酰肝素 2 对人充质干细胞多能性的作用。将基因表达特征用于比较在不同条件下（使用或不使用 160ng/ml HS2 或肝素）培养的低和高群体倍增 (PD) 的细胞。使用奇异值分解 (Singular Value Decomposition) (SVD) 构建特征。对来自干细胞 SuperArrays (使用 GEMArray 提取的, SuperArray Bioscience Corp, 进行 log- 转化并且对交叉-芯片变异 (cross-chip variations) 修正) 的基因表达测量值进行 SVD, 从而将数据投射到前 2 个最大变异的奇异载体上。使用的缩写: Hep : 肝素, Hsp : 硫酸乙酰肝素 2 ; Ctrl : 对照 ; 数字表示 PD 数量。

[0034] 定义

[0035] 除非另作陈述, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述类似或等效的任意方法和物质可以用于实施或测试本发明, 仍描述了优选的方法和物质。就本发明的目的而言, 将下列术语定义如下。

[0036] 本文所用的表达方式“增殖 (proliferation)”或“增殖 (proliferating)”以其常规的含义使用并且涉及细胞或组织扩增, 包括细胞生长和细胞分裂。

[0037] 本文所用与的干细胞培养相关的术语“维持”是指保持“干细胞性”, 即所述的干细胞在培养中的多能性和生存力。

[0038] 所谓“硫酸乙酰肝素”或“HS”意指最初在高尔基体中作为 D- 葡萄糖醛酸 (GlcA) 和 N- 乙酰基 -D- 葡萄糖胺 (GlcNAc) 的串连重复组成的多糖类合成的链。新生多糖类随后可以在一系列步骤中被修饰: GlcNAc 的 N- 脱乙酰化 /N- 硫酸化; GlcA 的 C5 差向异构化成艾杜糖醛酸 (IdoA); IdoA 和 GlcA 的 C2 上的 O- 硫酸化; N- 磺基葡萄糖胺 (GlcNS) 的 C6 上的 O- 硫酸化, 以及 GlcNS 的 C3 上的临时 O- 硫酸化。HS 的 N- 脱乙酰化 /N- 硫酸化, 2-O-, 6-O- 和 3-O- 硫酸化分别通过 HS N- 脱乙酰酶 /N- 磺基转移酶 (HSNDST), HS 2-O- 磺基转移酶 (HS2ST), HS 6-O- 磺基转移酶 (HS6ST) 和 HS 3-O- 磺基转移酶的特异性作用介导。在每个修饰步骤时, 只有部分的潜在底物被修饰, 产生相当多的序列多样性。这种 HS 的结构复杂性使得难以测定其序列和难以理解 HS 结构与功能之间的关系。

[0039] 所谓“硫酸乙酰肝素 2”或“HS2”意指 Brickman 等 (1998), J. Biol. Chem. 273(8), 4350-4359 描述的并且能够与 FGF-2 相互作用的硫酸乙酰肝素。因此, 这种硫酸乙酰肝素 2 可以获自如 Brickman (文献同上) 所述的 10 天胎龄时的鼠细胞的乙酰肝素蛋白聚糖类。用于本申请实验部分的 HS2 来源于胚胎小鼠, 已经发现它对小鼠、人、大鼠、小鸡、非洲蟾蜍属 (Xenopus) 和果蝇属 (drosophila) 细胞极为有效。与这些结果符合的, 本文关注任何高等生物 (例如昆虫或脊椎动物, 诸如哺乳动物、鸟类、爬行动物或鱼类) 中的通用机理。因此, 本发明包括能够与 FGF-2 相互作用并且能够促进或有利于先体外后体内干细胞增殖和 / 或维持的任意硫酸乙酰肝素 2 和任意各自的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖, 包括仍然分离自特定物种的这类硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和硫酸乙酰肝素 2。分离的硫酸乙酰肝素或硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的分离及其功能性的测定属于本领域普通技术人员知识范围并且, 例如, 可以如 Brickman 等 (1998), J. Biol. Chem. 273(8), 4350-4359 所述进行。

[0040] 本发明实施方案的详细描述

[0041] 本说明书中在先公开的文件清单或对其的讨论不必视为承认该文件为本领域

状态的组成部分或一般性的常规知识。将所有列出的文件引入本文作为参考。

[0042] 将充质干细胞或人骨髓基质干细胞定义为具有生成软骨、骨、肌肉、腱、韧带和脂肪能力的多能祖细胞。这些原始祖细胞在出生后存在并且表现出干细胞特征,即低发生率和广泛更新的潜能。这些特性与其发育可塑性的组合在充质干细胞替换受损组织的潜在应用中已经产生了巨大的意义。实际上,可以培养充质干细胞以使其数量扩大,然后将其植入受损部位或在植入支架中/植入支架上后产生合适的组织构造。

[0043] 因此,就骨与传导或诱导支架的组合而言,骨骼、肌肉、腱和韧带修复的备选手段在于选择、扩大和调节合适的祖细胞,诸如骨祖细胞,所述的传导或诱导支架用于与正确选择的特异性组织生长因子一起支持和引导再生。

[0044] 可以使用选择标记(诸如 STRO-1,来自 CD34⁺ 级分)分离并且检测人骨髓充质干细胞,从而表明了其对骨髓再生的潜能。仅在充质干细胞的细胞表面上发现了这些细胞表面标记并且它们为细胞多能性的指征。

[0045] 在干细胞的先体外后体内培养中,由通常在幼稚干细胞生态位中发现的微环境改变的事实引起的主要缺点导致干细胞在培养中自发分化。干细胞生态位的微环境为来自与胞外基质(ECM)的特异性成分,相邻细胞和激素的相互作用的信号复杂模式。

[0046] 指示生态位中指导细胞命运的生化信号由生长因子及其辅因子组成。现已证实某些种类的糖胺聚糖类(GAG)通过经 FGF 受体 1(FGFR1)的信号传导对乳腺癌细胞具有促细胞分裂作用(Nurcombe 等(2000)J. Biol. Chem. 275(39),30009-30018)。

[0047] 当 FGFR1 也在人充质干细胞(hMSC)上表达时,本发明发现将糖胺聚糖类与生长因子(FCS 的补充形式)一起添加到骨髓衍生的成体人充质干细胞培养物中可以优化这些细胞的生长和分化的培养条件。

[0048] 为了进行实验,使用如上述所定义的特异性硫酸乙酰肝素糖胺聚糖(HS)硫酸乙酰肝素 2(HS2)。然而,可以从任意合适的来源,例如,从非鼠(例如仅称作几个例示性实例的人、大鼠、小鸡、果蝇属、非洲蟾蜍属、斑马鱼、狗)的前体细胞中分离用于本发明的硫酸乙酰肝素 2,使用例如,如 WO 96/23003 或 Brickman 等(文献同上)所述的分离方法。

[0049] 本发明中已经证实将硫酸乙酰肝素 2(HS2)添加到充质干细胞中能够增加人充质干细胞的增殖。通过标准层析和酶促操作步骤从 E9-10 小鼠胚胎神经上皮细胞培养物收集的培养基中纯化 HS2(Nurcombe 等(1993)Science 260,103-106,将该文献完整地引入本文作为参考)。

[0050] 为了测试特异性硫酸乙酰肝素提取物对成体干细胞增殖的作用,在有或没有不同浓度的硫酸乙酰肝素 2 存在下的 DMEM 低葡萄糖+10%胎牛血清(FCS)(维持培养基)中培养人充质干细胞(Poietics, Cambrex)。通过 WST-1 测定法(Roche)分析细胞的代谢活性。结果证实,在一个实施方案中,约 160ng/ml 的 HS2 浓度为最能促细胞分裂的浓度并且更高剂量为抑制性的(图 1)。尽管 160ng/ml 表现为最佳的 HS2 浓度,但是 HS2 在 6.4ng/ml-20 μg/ml 浓度范围内仍然可以有效地使充质干细胞增殖。

[0051] 在短期培养中,160ng/ml 的(最佳)剂量将分汇合的细胞数量增加 65%(图 2A,第 6 天)并且这种增加部分是由于程序性细胞死亡减少所致(图 2C),正如通过流式细胞测定法所测定的。然而,这种增加大部分是由于如图 2B 中所示在给定时间进入细胞周期的细胞数量更高所致。

[0052] 在最佳 HS2 浓度下,人充质干细胞增殖的增加与在 10ng/ml 已知的促分裂原 FGF-2 存在下观察到的作用相当(图 6)。除其促细胞分裂特性外,还已知 FGF-2 可防止程序性细胞死亡。因为硫酸乙酰肝素 2(HS2)表现出与 FGF-2 类似的特性,所以研究了防止程序性细胞死亡是否可以促进所观察到的细胞数量增加。可以证实这种增殖的增加与程序性细胞死亡的降低相关(图 7)。

[0053] 还研究了 FCS 补充在介导 HS2 作用中的重要性。正如图 2D 中所示,HS2 甚至在低至 1% 的 FCS 浓度下具有促细胞分裂作用。然而,HS2 不能在血清饥饿条件中在短时间期限内显著增加细胞数量。

[0054] 在有 HS2 存在下培养的 hMSC 增殖的总体增加指示,在给定的时间内,它们进行更多的群体倍增(PD)。由于 PD 在这些细胞中有限,所以预计如果长期保持在培养物中,那么它们将更早达到复制衰老。令人意外地,证实在与对照组相似时间的培养后细胞增殖减缓,而在培养 45 天后产生了多于 50% 的群体倍增(图 3A)。由于表明了 FGF-2 可增加神经前体细胞中端粒末端转移酶活性(Haik 等(2000)Oncogene 19,2957-2966),所以验证了是否有任何残留活性存在于 hMSC 中。然而,根据上述结果(Shi 等(2002)Nature Biotechnol. 20, 587-591;Simonsen 等(2002)Nature Biotechnol. 20,592-596;Yudoh 等(2001)J. Bone Miner. Res. 16,1453-1464),在这些细胞中未检测到端粒末端转移酶活性,从而表明 HS2 靶向具有更大倍增潜力的细胞群,即该群体中的绝大部分幼稚细胞。

[0055] 异源性 hMSC 群体中的大部分“干细胞样”细胞的标志为其在以低密度接种时形成集落的能力,由此给我们提供了证实 HS2 作用的表型。因此,设置集落形成测定并且结果表明用 HS2 培养的 hMSC 能够形成多于对照组 5 倍的集落(图 3B),并且如果 FCS 浓度降低,则差异更大。

[0056] 骨发生和脂肪形成由一定范围的乙酰肝素结合生长因子(如 FGF 中的成员)和转化生长因子 β 家族诱导和控制。分化测定(图 4)证实单独增加 hMSC 或在有骨诱导性培养基(10nM 地塞米松,50 μ M 磷酸甘油和 100 μ M 抗坏血酸盐)或脂肪形成培养基(含有 10% FCS,10 μ g/ml 胰岛素,0.5mM 甲基异丁基黄嘌呤,1 μ M 地塞米松的 DMEM)存在下添加 HS2 不会对人充质干细胞分化产生显著影响,从而证实尽管 HS2 增加 hMSC 增殖并且可保护其“干细胞性”,但是其分化能力未受损。

[0057] 使用干细胞表面标记,特别是 STRO-1 获得的结果(图 5)表明 HS2 通过增加大部分未分化细胞的增殖来帮助维持“干细胞样”表型。图 5 证明在有 HS2 存在下培养的人充质干细胞增殖,同时维持了其多能性,而那些与 FGF-2 一起培养的人充质干细胞能够增殖,但这些细胞失去了其某些多能性。充质干细胞多能性的维持由高水平的 STRO-1 表达表示,而干细胞增强的增殖由更高水平的 CD71 表达所暗示,所述 CD71 为铁转运蛋白并且对增殖是重要的。同时,细胞运动性增加,表示为细胞粘附分子 CD49a 和 CD 146 表达水平降低。从这些结果中看出,HS2 介导的增殖机制可以包括 FGF- 非依赖性信号传导途径。

[0058] 由于不存在用于评价充质干细胞在与其分化潜能之外的干细胞性的特异性试验,所以将基因表达特征用来比较在不同条件下培养的低和高 PD 细胞。使用上述证实为有效工具的奇异值分解(SVD)构建特征,所述工具可以在基于基因分布的肿瘤亚型之间进行区分。正如图 8 中所示,在有 HS2(Hsp6 和 Hsp8)存在下培养的高 PD hMSC 与对照组的低 PD(Ctrl14 和 Ctrl116)强烈群集。然而,用 HS2(Hsp4)处理的最低 PD hMSC 独立存在,我们由

此可以推断对照组的早期世代（同时由 Cambrex 处理）将与其群集。这些结果符合在群体倍增中 HS2 保护 hMSC 的“干细胞性”这一推定。就用肝素（Hep4, Hep6, Hep8）处理的细胞而言，它们不会与任何其他类群集，从而表明这种处理明显改变了其干细胞性并且这一结果应在分化测定中得以反映。

[0059] 在本发明中，已经首次证实，硫酸乙酰肝素 2 的存在将使 hMSC 的增殖比对照组培养物增加几个数量级，同时还增加了总寿命。增殖的这种增加与干细胞的相对缺失无关，正如通过集落形成单位、干细胞标记表达和多能性测定所测量的。

[0060] 因此，可以证实硫酸乙酰肝素 2 为用于先体外后体内干细胞增殖、“干细胞性”的维持和特异性细胞分化的有价值的工具且由此有助于开启干细胞在疗法和组织修复中的潜在应用。

[0061] 因为已经证实肝素结合生长因子参与人干细胞在体外和体内的分化和增殖，所以特异性糖胺聚糖类在控制干细胞增殖和命运中的应用可以为医学应用（诸如未来基于细胞的疗法）提供有用和可靠的方法。

[0062] 本文例示描述的本发明可以在没有本文所未具体公开的任何成分或多种成分、限制或多种限制的情况下实施。因此，例如，术语“包含”、“包括”、“含有”等应当宽泛解读并且没有限制。另外，本文使用的术语和表达方式作为描述性术语使用并且对此没有限制，并且在这类术语和表达方式的使用中不意图排除所示和所述特征的任何等同特征或其部分，而且认为各种变型能够属于请求保护的本发明的范围。因此，应理解尽管已经通过优选实施方案具体公开了本发明，但是本领域技术人员可以采取本文公开的本发明的变型和变化形式，并且认为这类变型和变化形式均属于本发明的范围。

[0063] 在本文中已经广泛并简要地描述了本发明。属于上位概念的公开范围的较窄的下位概念和亚上位概念的分组也各自构成本发明的组成部分。

[0064] 其他实施方案属于下列权利要求范围内。

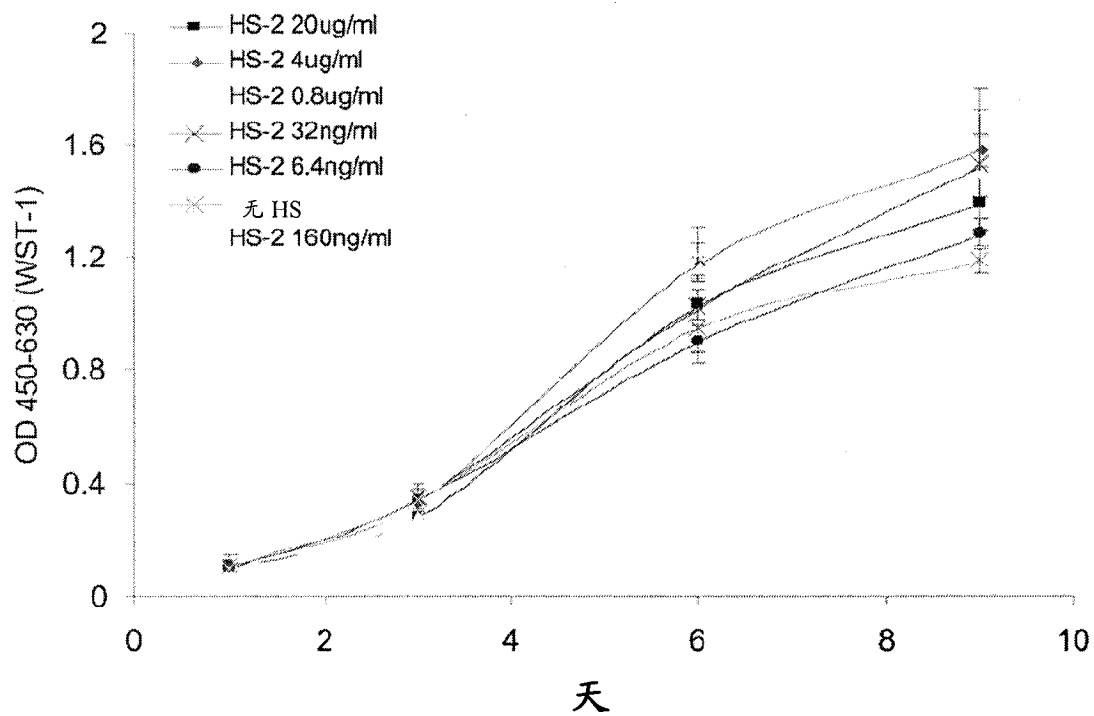


图 1

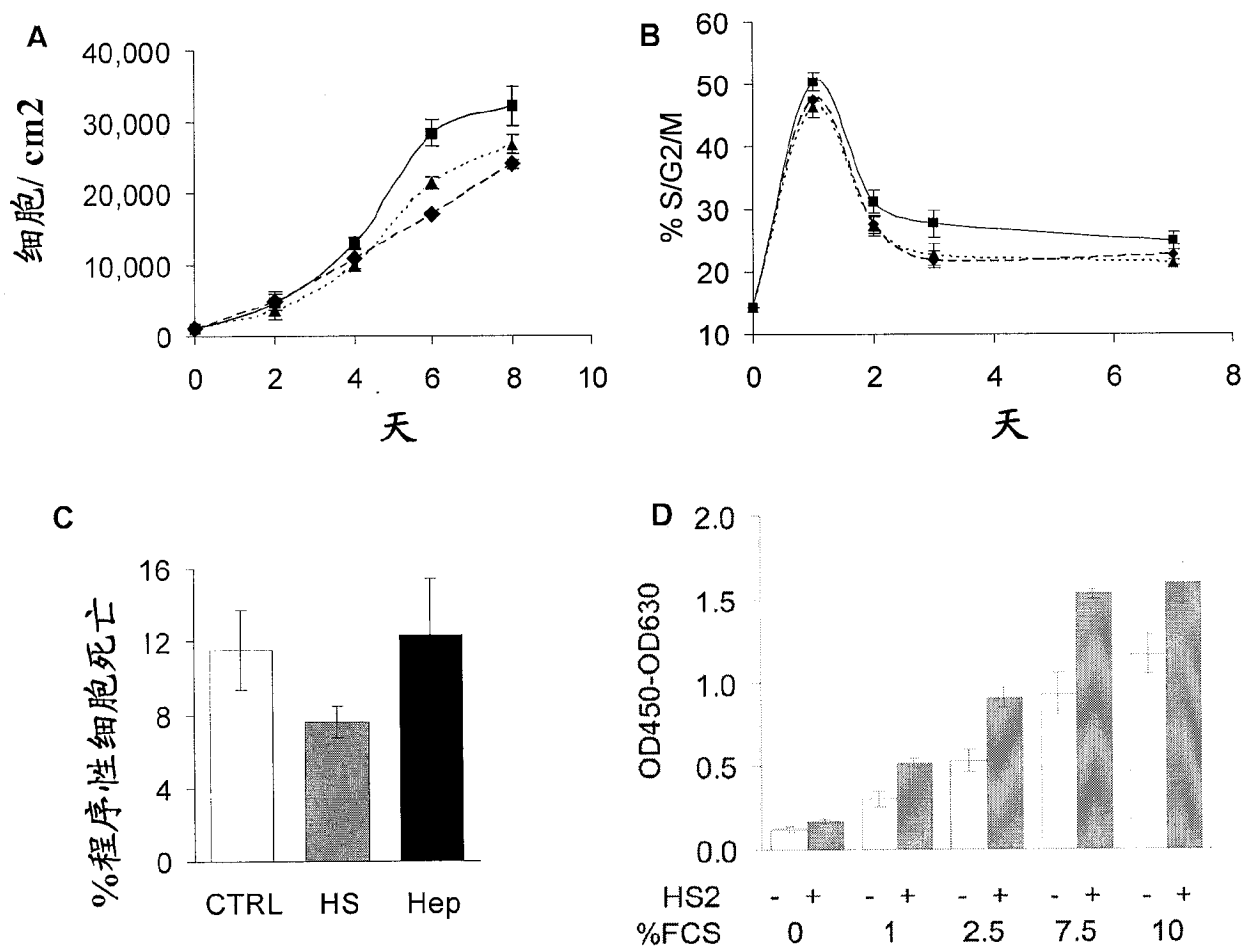


图 2

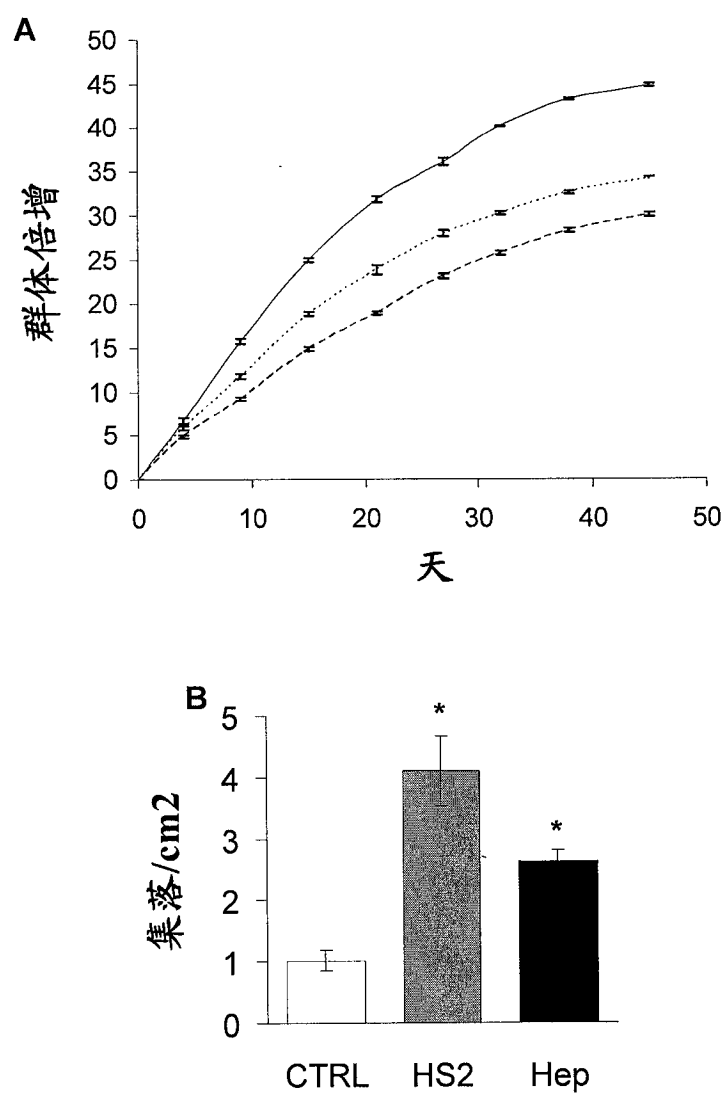


图 3

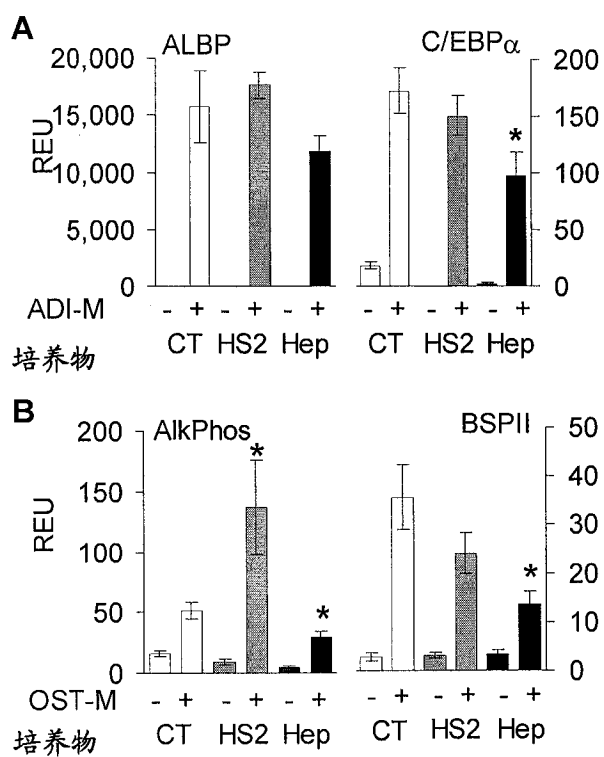


图 4

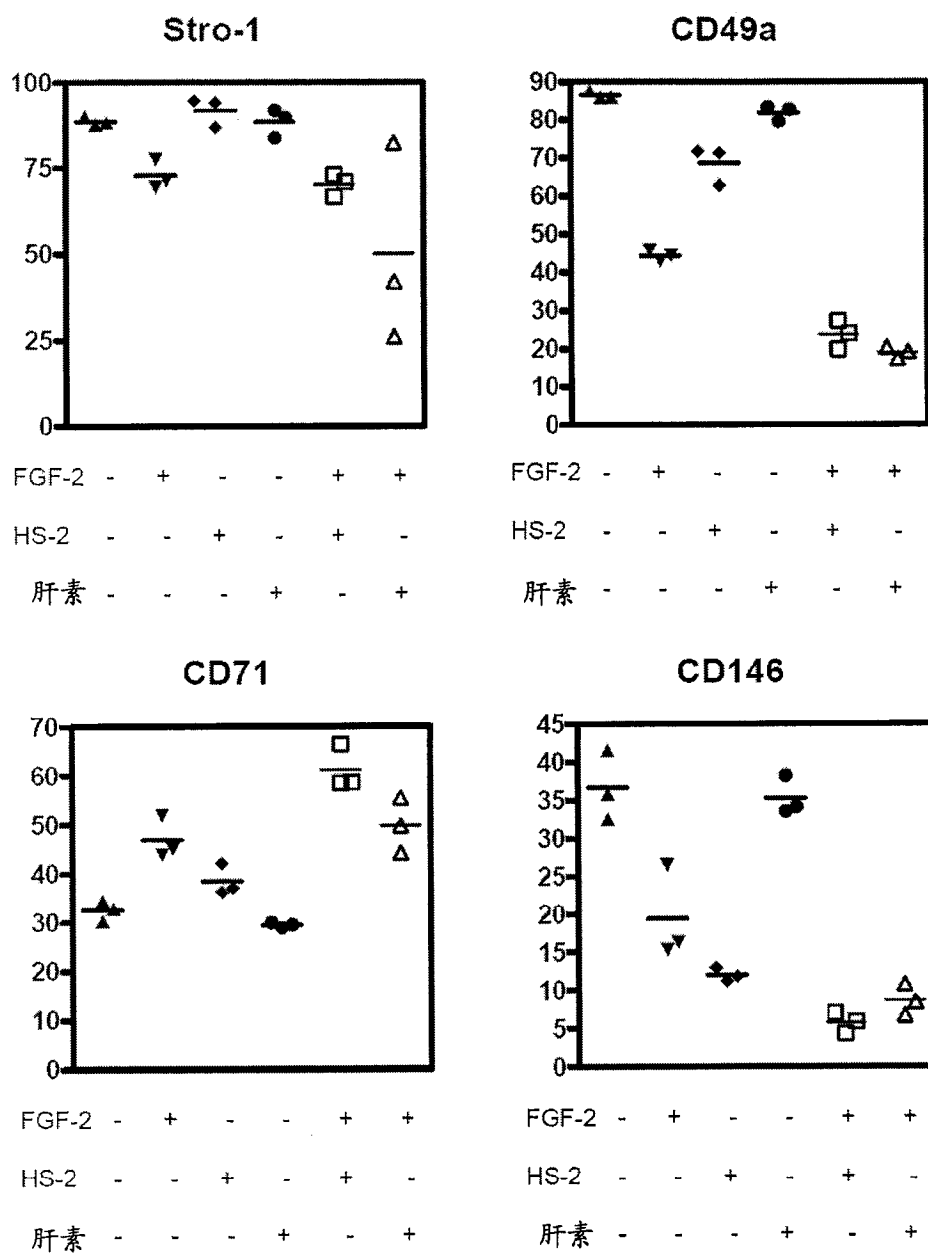


图 5

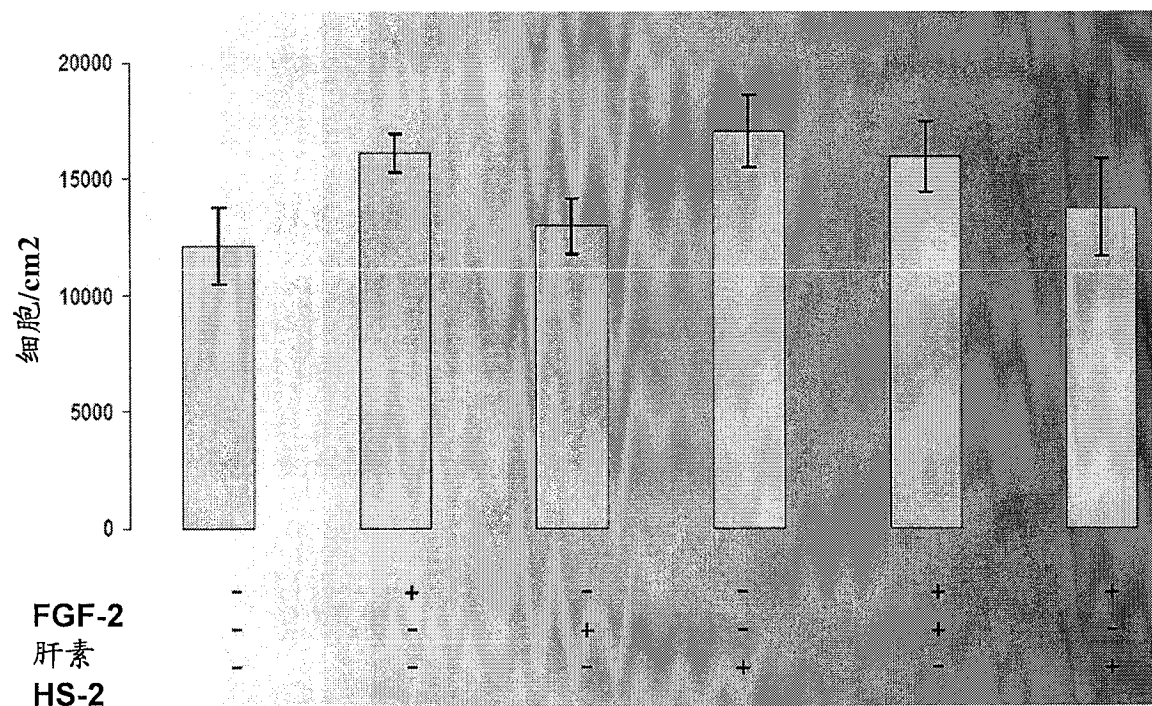


图 6

9 天后培养物中 hMSC 的存活和程序性细胞死亡

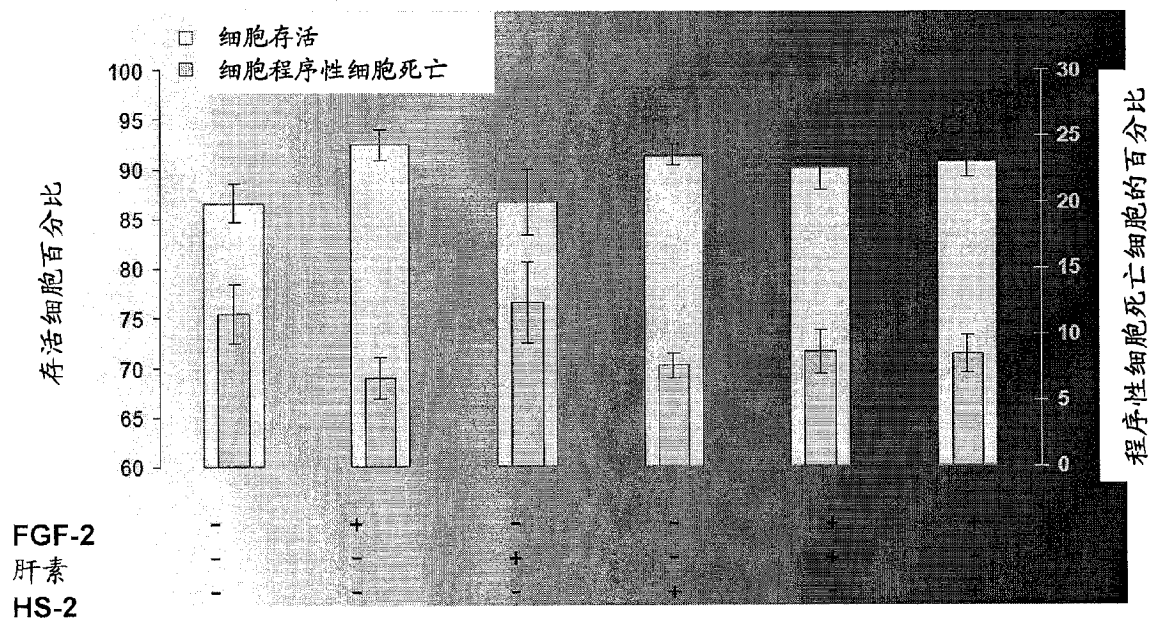


图 7

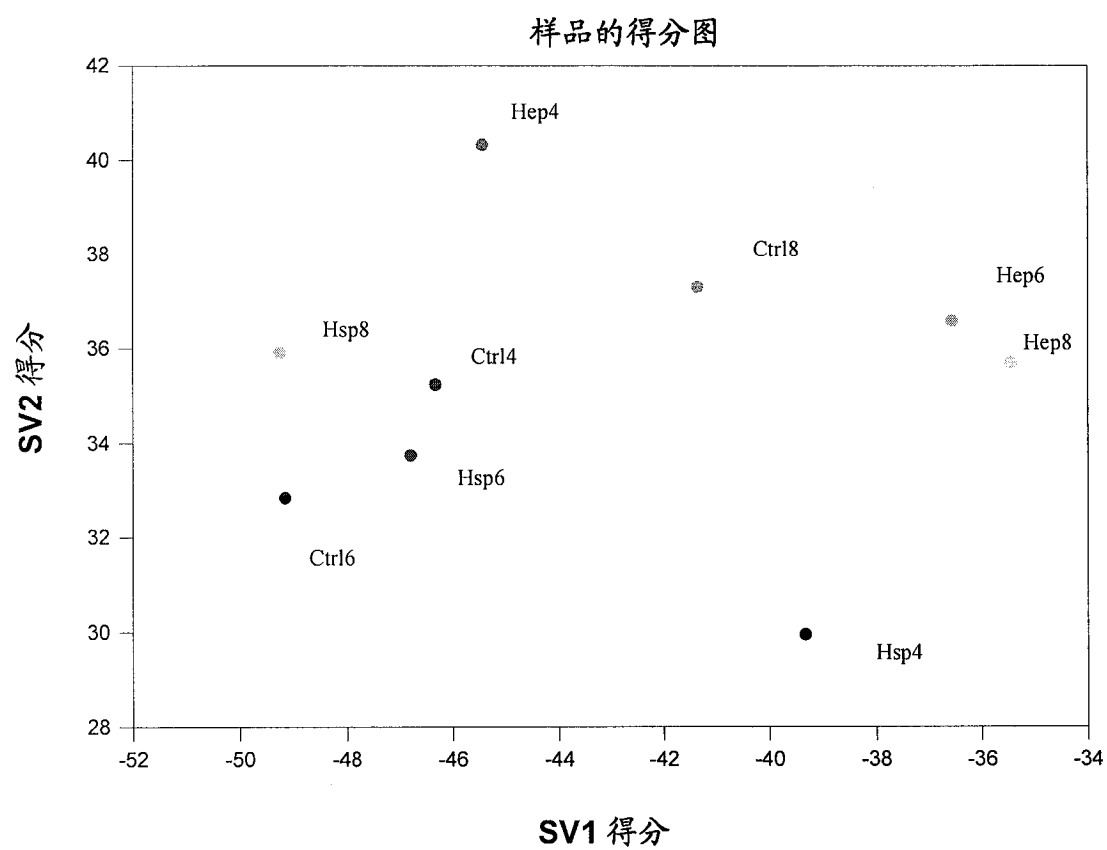


图 8