

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 1136846 B
CN 101558151 B

[12]

STANDARD PATENT SPECIFICATION
標準專利說明書

[21] Application No. 申請編號
10103472.9

[51] Int.Cl.⁸ C12N

[22] Date of filing 提交日期
08.04.2010

[54] METHODS FOR CELL EXPANSION AND USES OF CELLS AND CONDITIONED MEDIA PRODUCED THEREBY FOR THERAPY 細胞擴增方法和藉此產生的細胞和條件培養基用於治療的用途

[30] Priority 優先權
23.03.2006 US 60/784,769
26.09.2006 US 60/847,088
[43] Date of publication of application 申請發表日期
09.07.2010
[45] Publication of the grant of the patent 批予專利的發表日期
03.06.2016
CN Application No. & Date 中國專利申請編號及日期
CN 200780018851.7 22.03.2007
CN Publication No. & Date 中國專利申請發表編號及日期
CN 101558151 14.10.2009
Date of Grant in Designated Patent Office 指定專利當局批予專利日期
21.10.2015

[73] Proprietor 專利所有人
PLURISTEM LTD.
Matam Building # 20 31905 Haifa
ISRAEL
[72] Inventor 發明人
MERETZKI Shai
ABERMAN Zami
BURGER Ora
[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
NTD Patent & Trade Mark Agency Ltd.
Units 1805-6, 18/F
Greenfield Tower, Concordia Plaza
No. 1 Science Museum Road
Tsimshatsui East, Kowloon HONG KONG



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101558151 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 21

(21) 申请号 200780018851. 7

(22) 申请日 2007. 03. 22

(30) 优先权数据

60/784, 769 2006. 03. 23 US

60/847, 088 2006. 09. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 11. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2007/000380 2007. 03. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2007/108003 EN 2007. 09. 27

(73) 专利权人 普拉里斯坦有限公司

地址 以色列海法

(72) 发明人 S·梅雷茨基 Z·阿伯曼 O·伯格

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020076400 A1, 2002. 06. 20, 全文.

US 20030032179 A1, 2003. 02. 13, 全文.

US 20030235563 A1, 2003. 12. 25, 全文.

鞠晓东. 脂肪间充质干细胞的基本生物学特性及向成骨细胞诱导分化的实验研究.《中华实验外科杂志》. 2004, 第 21 卷 (第 6 期), 654-656.

Zhang Yi. Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow.《Chinese Medical Journal》. 2004, 第 117 卷 (第 6 期), 882-887.

Feng Zhao. Perfusion Bioreactor System for Human Mesenchymal Stem Cell Tissue Engineering: Dynamic Cell Seeding and Construct Development.《BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING》. 2005, 第 91 卷 (第 4 期), 482-491.

审查员 李楠

权利要求书1页 说明书23页 附图10页

(54) 发明名称

细胞扩增方法和藉此产生的细胞和条件培养基用于治疗用途

(57) 摘要

本发明提供细胞扩增方法。所述方法包括在支持细胞扩增的三维培养条件下培养来自胎盘和脂肪组织的粘附细胞。

1. 来自胎盘或脂肪组织的粘附基质细胞群扩增方法,所述方法包括:
 - (i) 在支持细胞扩增的三维培养条件下培养粘附基质细胞群,其中,所述的三维培养条件包括具有纳米级细胞外基质纤维的生长基质,以便模拟组织的基础结构;和
 - (ii) 从三维培养系统中收集所扩增的粘附基质细胞群,其中,所述的粘附基质细胞群表达 CD73、CD90、CD29 和 CD105 但不表达 CD45、CD80、HLA-DR、CD11b、CD14、CD19、CD34 和 CD79。
2. 权利要求 1 的方法,其进一步包含收集培养了经扩增的粘附基质细胞群的培养基,由此制备包含 Flt-3 配体, IL-6 和 SCF 的条件培养基。
3. 权利要求 1 的方法产生的经扩增的粘附基质细胞群。
4. 权利要求 3 的经扩增的粘附基质细胞群,其中,所述的粘附基质细胞群抑制免疫反应。
5. 权利要求 2 的方法制备的条件培养基。
6. 药物组合物,其包含权利要求 3 的经扩增的粘附基质细胞群和可药用载体。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述三维培养系统包含 3D 生物反应器。
8. 权利要求 1 的方法,其中,培养所述粘附基质细胞群达到至少 60%汇合。

细胞扩增方法和藉此产生的细胞和条件培养基用于治疗的目的

[0001] 发明领域和发明背景

[0002] 本发明涉及细胞扩增方法、藉此产生的细胞群及其用途。具体地本发明涉及扩增来自胎盘或脂肪组织（贯穿于整个 PCT 中）的粘附细胞（adherent cell）的方法及其例如用于造血干细胞移植的治疗用途。

[0003] 在日益发展的医学界，为了细胞移入和组织工程目的越来越需要大量成人干细胞。另外，成人干细胞疗法正持续不断地开发用于治疗 and 治愈各种病症，例如造血功能障碍、心脏病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、中风、烧伤、肌肉萎缩症、自身免疫病、糖尿病和关节炎。

[0004] 造血干细胞（HSC）是祖细胞，其产生髓系和淋巴系的所有血细胞类型。移植的 HSC 的移入和启动造血作用取决于 HSC 在受者骨髓中的归巢和增生的能力。

[0005] 普遍公认干细胞在体内与骨髓中离散的龕（niche）有密切的联系，所述龕提供了经由细胞间接触或短距离作用共同介导干细胞分化和自我更新的分子信号。这些龕是“造血诱导性微环境”（HIM）的部分，由骨髓细胞即巨噬细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和内皮细胞组成。骨髓细胞通过提供促进细胞间接触的细胞外基质（ECM）蛋白和基底膜组分来保持 HIM 功能完整性。它们还提供用于控制造血细胞分化和增殖所需的各种可溶性或常驻性细胞因子。

[0006] 需要 HSC 和基质之间的相互作用以保护 HSC 生存力并防止其分化。在 HSC 移植后，移植的 HSC 在其增殖和分化之前必须归巢到骨髓（BM）微环境并驻留在合适龕中。在归巢过程中，移植的 HSC 离开血流，并通过随趋化因子梯度穿过 BM 内皮细胞屏障到达专用龕来转移。然后供者 HSC 必须归巢到造血龕，在那里它们遇到对其分裂更有利的微环境，在那里 HSC 与间充质细胞、ECM 和分泌的生长因子之间可建立连续统一的物理和化学接触。所有这些过程涉及一系列复杂的分子，例如细胞因子、趋化因子、激素、类固醇、细胞外基质蛋白、生长因子、细胞间相互作用蛋白、黏附蛋白和基质蛋白。

[0007] 移入到 BM 专用龕的细胞总数构成 HSC 移植成功的基础。为了完成移入，移植到血液循环的供者 HSC 应该归巢到其产生功能性血细胞生成集落（hematopoiesis foci）的受者骨髓中。这些灶的数目可从输注的 HSC 总数乘以其移入效率的积来推算。

[0008] HSC 移植涉及的主要问题之一是这些细胞在接受者系统中存活率低。充分证明的是，静脉内移植的 HSC 被从循环中清除并在其灌输后数分钟内在 BM 中显现。HSC 移植后 3-5 小时，在受者的外周血中检测不到供者细胞 [Askenasy 等 2002, 移植的造血细胞在体内丛生于受者骨髓中 (Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo). Stem Cells. 20:301-10]。灌输后不久大量的移植细胞被破坏。因此，受者骨髓建群有效性低，移植后 2-3 天在受者 BM 中检测到的所输注细胞仅为 1-5% [Kerre 等 2001, CD34+38+ 和 CD34+38- 两种细胞特异性归巢到 NOD/LtSz scid/scid 小鼠骨髓但显示不同的扩增动力学 (Both CD34+38+ and CD34+38- cells homespecifically to the bone marrow of NOD/LtSz scid/scid mice but

show different kinetics in expansion). *J Immunol.* 167 :3692-8 ;Jetmore 等 2002, 移植到条件化 NOD/SCID 受者中的静止和循环的人 CD34(+) 细胞的归巢效率、细胞周期动力学和存活率 (Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients). *Blood.* 99 :1585-93]。

[0009] 间充质基质细胞 (Mesenchymal Stromal Cell) (MSC) 为异质细胞群, 能够分化为不同类型的成熟间充质细胞。这些细胞受到各种生物活性因子影响而分化为网状内皮细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和骨祖细胞 (osteogenic precursor cell)。

[0010] MSC 支持 HSC 移入的用途已为本领域所知。若干出版物已经证明当与间充质干细胞共同移植时, HSC 的移入效率更高 [Gurevitch 等 1999, 在供体基质微环境中同种异体或异种骨髓移植 (Transplantation of allogeneic or xenogeneic bone marrow within the donor stromal microenvironment). *Transplantation.* 68 :1362-8 ;Fan 等 2001, 通过经门静脉注射骨髓细胞成功实施同种异体骨髓移植 (BMT) : 基质细胞作为促进 BMT 的细胞 (Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein : stromal cells as BMT-facilitating cells). *Stem Cells.* 19 :144-50]。还证明了在人羊移入模型中共同移植人间充质干细胞导致促进人 HSC 嵌合 BM 在动物中的长期移入 [Almeida-Porada 等 2000, 将人基质细胞祖先共同移植到免疫前的胎羊中导致在循环中早期出现人供者细胞并在移植后的稍后时间点提高骨髓中的细胞水平 (Co-transplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in the circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation). *Blood.* 95 :3620-7]。发现同时注射 HSC 和间充质干细胞加速血细胞生成 [Zhang 等 2004, *Stem Cells.* 22 :1256-62]。最近, 这些发现扩展到更近缘的动物模型——猕猴。当共同移植单倍体同一性 (haploidentical) 的 HSC 和间充质干细胞时, 证明是促进了 HSC 移入 [Liu 等 2005, *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 26 :385-8]。最近还报道了使用间充质干细胞来促进 HSC 移入人类对象 [Koc ON, *J Clin Oncol.* 2000 ;18 :307-316 ;Lazarus HM, *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 May ;11(5) :389-98]。

[0011] 显然, MSC 对造血移入的贡献在于 : 产生帮助介导并平衡所移植 HSC 的归巢、自我更新和定向潜能的 HSC 支持性细胞因子 ; 复原受损的 HSC 归巢和增殖所需造血微环境 ; 以及抑制源自供者的 T 细胞 (可引起移植物抗宿主病 (GvHD)), [Charbord P. 和 Moore, K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044 :159-167 (2005) ; 美国专利第 6, 010, 696 号 ; 第 6555374 号]。例如, 在 Maitra 的研究中 [Maitra B 等, *Bone Marrow Transplant.* 33(6) :597-604. (2004)] 发现在 NOD-SCID 小鼠模型中, 人间充质干细胞支持非亲缘供者造血干细胞和受抑制的 T 细胞激活, 表明非亲缘源自人骨髓的 MSC 可改进同种异体移植结果。

[0012] 使用 MSC 的一个主要障碍是难以分离大量的这些正常存在的细胞群, 其从技术上来说是困难的且耗费大, 部分是由于细胞数量有限。MSC 最明显的来源是骨髓, 但涉及获得骨髓吸出物和活检风险的显著不便之处成为这些方法的缺点。人胚胎和胎儿形成独立生命这一普遍持有观点使得人胚胎作为干细胞来源有了疑问, 在已经存在的逻辑困难之上又增加了宗教和伦理方面的问题。

[0013] 近来已在尝试从备选来源中发现可收获的干细胞。这样的备选来源有例如：脂肪组织、毛囊、睾丸、人嗅粘膜、胚胎卵黄囊、胎盘、青少年皮肤和血液（例如脐带血甚至月经血）。然而，从备选来源收获足够量的干细胞用于治疗和研究目的仍受限制且通常是费事的，其涉及例如从供者对象或患者收获细胞或组织、体外培养和 / 或繁殖细胞、解剖 (dissection) 等等。

[0014] 胎盘被认为是干细胞最有可能的来源之一，不涉及任何不便之处或伦理约束。发现源自胎盘的 MSC 具有与源自 BM 的 MSC 相似的特性。它们能粘附塑料，表达 CD105、CD73 和 CD90 膜标记，且缺乏 CD45、CD34、CD14、CD19 和 HLA-DR 表面分子的表达。然而，不象源自 BM 的 MSC，经干扰素- γ 处理的源自胎盘的 MSC (placenta-derived-MSC, PD-MSC) 极低限度地上调 HLA-DR。此外，PD-MSC 细胞在干扰素- γ 存在下显示出提高的免疫抑制特性。(Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL. 在干扰素- γ 存在下源自胎盘多潜能细胞显示出提高的免疫抑制特性 (Placenta-derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma). Stem Cells. 2006 Nov;24(11):2466-77.)。

[0015] 除 MSC 标记之外，PD-MSC 还显示出独特的 ESC 表面标记 SSEA-4、TRA-1-61 和 TRA-1-80，提示这些可能是极为原始的细胞。(Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. 从人足月胎盘分离多潜能细胞 (Isolation of multipotent cells from human term placenta). Stem Cells. 2005;23(1):3-9)。此外，PD-MSC (胎儿来源) 而非源自 BM 的 MSC 对于细胞内人白细胞抗原-G (HLA) 为阳性 (Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL, 在干扰素- γ 存在下源自胎盘多潜能细胞显示出提高的免疫抑制特性 (Placenta-derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma). Stem Cells. 2006 Nov;24(11):2466-77.)。

[0016] 研究表明 PD-MSC 的扩增潜能显著高于源自成人 BM 的 MSC (Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC, 从人足月胎盘分离多潜能细胞 (Isolation of Multipotent cells from Human Term Placenta). Stem Cells. 2005;23(1):3-9; M. J. S. de Groot-Swings, Frans H. J. Claas, Willem E. Fibbe 和 Humphrey H. H. Pieterella S. in 't Anker, Sicco A. Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Godelieve. 从人中胎盘分离胎儿或母体来源的间充质干细胞 (Placenta Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human). Stem cells, 2004;22:1338-1345)。另外，源自胎盘的粘附细胞可分化为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞。发现源自胎盘的 MSC 如源自 BM 的 MSC 一样阻抑脐带血 (UCB) 淋巴细胞增殖，这表明联合移植 HSC 和源自胎盘 (PD)-MSC 可降低受者潜在的移植物抗宿主病 (GvHD) [Li CD 等, Cell Res. Jul;15(7):539-47(2005)]，并且可增强造血支持 [Zhang Yi 等, Chinese Medical Journal 117(6):882-887(2004)]。胎盘作为羊膜上皮细胞来源的应用教导于例如 WO00/73421 中，但得到这些细胞仍很麻烦，并且 MSC 产率极低。

[0017] 解决 MSC 量有限问题的另一方法是用不同的培养条件离体扩增这些细胞 [例如美国专利第 6,326,198 号；第 6030836 号；第 6555374 号；第 6,335,195 号；第 6,338,942 号]。然而，这样的方法的缺点仍在于耗时、需要特定选择和分离程序，使得这些方法花费

大、难实施。

[0018] 在若干研究中发现三维 (3D) 细胞培养在产量上更为有效 [Ma T 等, 生物工程进展 (Biotechnology Progress). Biotechnol Prog 15:715-24(1999); Yubing Xie, Tissue Engineering 7(5):585-598(2001)]。模拟 MSC 天然环境的 3D 培养方法的应用基于将这些细胞接种到以下生物反应器中: 含有 Polyactive 泡沫的灌注式生物反应器 [Wendt, D. 等, Biotechnol Bioeng 84:205-214, (2003)]、管状聚 L 乳酸 (PLLA) 多孔支架的径向流灌注式生物反应器 [Kitagawa 等, Biotechnology and Bioengineering 93(5):947-954(2006)]、和用于培养和扩增造血干细胞的推流式生物反应器 (美国专利第 6,911,201 号)。

[0019] 在美国专利第 6,022,743 号中提出粘附基质细胞的三维框架, 在 Hosseinkhani, H 等, [Tissue Engineering 11(9-10):1476-1488(2005)] 中提出海绵胶原作为 3D 基质。然而, 这些研究中无一曾提及在这些条件下生长的 MSC 用于在 HSC 移植后支持体内移入 HSC 的用途。还需要耗时来为特定细胞类型优化各种条件 (例如灌注条件) 或各种分离技术。

[0020] 在美国专利第 7045148 号和美国专利申请第 20020123141 号、第 20030032179 号和第 2005011871 号中提出灌注的产后胎盘作为 3D 反应器用于培养 MSC 的用途。然而, 该方法受限于要待到胎盘分离后 24 小时并涉及灌注, 因此, 细胞的群集生长 (mass growth) 且其在延长的时间周期内维持是不可能的。

[0021] 因此, 普遍公认需要且将极为有利的是具备: 不存在上述限制的新颖的细胞扩增方法和藉此产生的细胞及条件培养基用于治疗用途。

[0022] 发明简述

[0023] 本发明一方面提供细胞扩增方法, 所述方法包括在支持细胞扩增的三维培养条件下培养来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞。

[0024] 本发明另一方面提供产生条件培养基的方法, 所述方法包括: 在允许细胞扩增的三维培养条件下培养来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞; 和收集扩增的粘附细胞的条件培养基, 藉此产生条件培养基。

[0025] 本发明又一方面提供根据上述方法产生的细胞群。

[0026] 本发明再一方面提供分离的细胞群, 其包含胎盘或脂肪组织粘附细胞, 其中所述粘附细胞分泌比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞分泌的更高水平的选自 SCF、IL-6 和 Flt-3 的至少一种因子。

[0027] 本发明另外方面提供分离的细胞群, 其包含胎盘或脂肪组织粘附细胞, 其中所述粘附细胞表达比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞表达的更高水平的选自 H2A 组蛋白家族 (H2AF)、醛脱氢酶 X (ALDH X)、真核细胞翻译延伸因子 2 (EETF2)、网钙结合蛋白 3、EF- 手形钙结合结构域 (RCN2) 和钙调蛋白 1 碱性平滑肌 (CNN1) 的至少一种蛋白质。

[0028] 本发明又一方面提供分离的细胞群, 其包含胎盘或脂肪组织粘附细胞, 其中所述粘附细胞表达比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞表达的更低表达水平的选自核内不均一核糖核蛋白 H1 (Hnrph1)、CD44 抗原同种型 2 前体、3 磷酸腺苷 5 磷酸硫酸合成酶 2 同种型 a (Papss2) 和核糖体蛋白 L7a (rpL7a) 的至少一种蛋白质。

[0029] 本发明再一方面提供分离的细胞群, 其包含胎盘或脂肪组织粘附细胞, 其中所述粘附细胞特征为比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞的免疫抑制活性更高。

[0030] 根据下述本发明优选实施方案的另外特征, 免疫抑制活性包含降低 T 细胞增殖。

- [0031] 本发明另一方面提供药物组合物,其包含作为活性成分的按照上述方法产生的细胞群。
- [0032] 本发明另一方面提供药物组合物,其包含作为活性成分的按照上述方法产生的条件培养基。
- [0033] 本发明又一方面提供药物组合物,其包含作为活性成分的上述分离的细胞群。
- [0034] 本发明再一方面提供治疗有其需要的对象中可受益于基质细胞移植的病症的方法,所述方法包括:给予该对象治疗有效量的选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞,藉此治疗该对象中可受益于干细胞移植的病症。
- [0035] 本发明再一方面提供治疗有其需要的对象中可受益于基质细胞移植的病症的方法,所述方法包括:给予该对象治疗有效量的源自选自胎盘和脂肪组织的组织的粘附细胞的条件培养基,藉此治疗对象中可受益于干细胞移植的病症。
- [0036] 本发明再一方面提供降低有其需要的对象中的免疫应答的方法,所述方法包括给予该对象治疗有效量的权利要求 3、4、5、6 或 7 的分离的细胞群,以此降低该对象的免疫应答。
- [0037] 根据所述优选实施方案的再一特征,用细胞疗法治疗该对象。
- [0038] 根据所述优选实施方案的再一特征,该方法进一步包括给予干细胞。
- [0039] 根据所述优选实施方案的再一特征,该干细胞包含造血干细胞。
- [0040] 根据所述优选实施方案的再一特征,将所述细胞与条件培养基或粘附细胞同时给予。
- [0041] 根据所述优选实施方案的再一特征,在给予条件培养基或粘附细胞后给予所述细胞。
- [0042] 根据所述优选实施方案的再一特征,该粘附细胞从三维培养获得。
- [0043] 根据所述优选实施方案的再一特征,该粘附细胞从二维培养获得。
- [0044] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述病症选自:干细胞缺乏症、心脏病、帕金森氏病、癌症、阿尔茨海默氏病、中风、烧伤、组织缺损 (loss of tissue)、失血、贫血症、自身免疫病、糖尿病、关节炎、多发性硬化症、移植物抗宿主病 (GvHD)、神经退行性疾病、自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)、系统性红斑狼疮 (SLE)、类风湿性关节炎、系统性硬化症、Sjorgen 综合征、多发性硬化症 (MS)、重症肌无力 (MG)、格-巴综合征 (GBS)、桥本甲状腺炎 (HT)、格雷夫斯病、胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 和炎症性肠病。
- [0045] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述三维培养包含 3D 生物反应器。
- [0046] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述生物反应器选自推流式生物反应器、连续搅拌罐生物反应器和固定床生物反应器。
- [0047] 根据所述优选实施方案的再一特征,细胞培养在连续流动培养基中进行。
- [0048] 根据所述优选实施方案的再一特征,三维培养包含粘附材料选自:聚酯、聚烯烃、聚氟氯乙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜、醋酸纤维素、玻璃纤维、陶瓷颗粒、matrigel (基质胶)、细胞外基质组分、胶原、聚 L 乳酸和惰性金属纤维。
- [0049] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述培养至少进行 3 天。
- [0050] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述培养至少进行 3 天。
- [0051] 根据所述优选实施方案的再一特征,直到粘附细胞达到至少 60 % 汇合

(confluence) 才完成所述培养。

[0052] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述病症可受益于对造血干细胞移入的促进。

[0053] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞包含选自 CD73、CD90、CD29 和 CD105 的阳性标记表达系列 (marker expression array)。

[0054] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞包含选自 CD45、CD80、HLA-DR、CD11b、CD14、CD19、CD34 和 CD79 的阴性标记表达系列。

[0055] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞分泌比在 2D 培养中生长的来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞分泌的更高水平的选自 SCF、Flt-3 和 IL-6 的至少一种因子。

[0056] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞表达比在 2D 培养中生长的来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞分泌的更高水平的选自 H2A 组蛋白家族 (H2AF)、醛脱氢酶 X (ALDH X)、真核细胞翻译延伸因子 2 (EEF2)、网钙结合蛋白 3、EF- 手形钙结合结构域 (RCN2) 和钙调理蛋白 1 碱性平滑肌 (CNN1) 的至少一种蛋白质。

[0057] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞表达比在 2D 培养中生长的来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞分泌的更低表达水平的选自核内不均一核糖核蛋白 H1 (Hnrph1)、CD44 抗原同种型 2 前体、3 磷酸腺苷 5 磷酸硫酸合成酶 2 同种型 a (Papss2) 和核糖体蛋白 L7a (rpL7a) 的至少一种蛋白质。

[0058] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述粘附细胞或培养基特征为比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞免疫抑制活性更高。

[0059] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述免疫抑制活性包含降低 T 细胞增殖。

[0060] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述细胞包含具有基质干细胞表型的细胞

[0061] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述基质干细胞表型包含 T 细胞抑制活性。

[0062] 根据所述优选实施方案的再一特征,所述基质干细胞表型包含造血干细胞支持活性。

[0063] 根据所述优选实施方案的再一特征,上述细胞群的用途为制备用于鉴定移植的药物。

[0064] 本发明通过提供新颖的细胞扩增方法和藉此产生的细胞和条件培养基用于治疗用途,成功解决目前已知结构 (configuration) 中的缺点。

[0065] 除非另外定义,否则本文所用的所有科技术语具有与本发明所属领域一般技术人员通常理解相同的含义。在本发明实践或试验中,尽管可使用与本文所述相似或相当的方法和材料,但适宜的方法和材料如下文所述。在有冲突的情况下,包括定义在内的本专利说明书将起主导作用。另外,材料、方法和实施例仅为说明性的,并非意欲限制。

[0066] 附图简述

[0067] 本发明于此仅通过与附图有关的实例来阐述。强调的是,于此与具体附图有关的详细内容通过实施例出示且仅旨在阐述性地讨论本发明的优选实施方案,并且是为了提供什么被认为是本发明原理和构思方面的最有用和最易理解的说明而提出。在这一点上,不试图比基本理解本发明所需的更详细地显示本发明结构性细节,对附图所作的说明使得本领域技术人员明白本发明的几种形式在实践中是怎样具体化的。

[0068] 在附图中:

[0069] 图 1a-g 描述在含有 3-D 载体的生物反应器系统中创造类骨微环境。图 1a-b 是描述天然骨 (图 1a) 与在接种粘附基质细胞 (3D-ASC) 后 7 天 PluriX™3D 载体结构的仿造骨微环境 (图 1b) 的比较电子显微图。图 1c-f 是描述用从骨髓产生的 3D-ASC 接种的 PluriX™3D 基质在接种后 20 天 (图 1c-d, 分别放大 X150 和 250) 和 40 天 (图 1e-f, 分别放大 X350 和 500) 的电子显微图。图 1g 是具有由编号定义的单独部件的 Plurix 3D 推流式生物反应器: 培养基库 (1)、混合气体供给 (2)、过滤器 (3)、注射点 (4)、在其中放置 3D 载体的柱 (5)、流量监控器 (6)、流量阀 (6a)、分离容器 (7)、细胞生长分析仪 (8)、蠕动泵 (9)、取样点 (10)、溶 O₂ 测量电极 (11)、pH 测量电极 (12)、控制系统 (13)、新鲜生长培养基 (14)、用过的生长培养基 (15)。

[0070] 图 2 是描述在生物反应器系统内 3D 生长条件下生长的来源于胎盘的粘附基质细胞不同生产批次 (lot) 图 (3D-ASC; 批次 5-8)。将 ASC (2X10⁶) 以 10000-15000 个细胞 / 载体的密度接种到生物反应器。培养 12 天后, 3D-ASC 的密度达到 150,000-250,000 个细胞 / 载体或含有 150 个载体的生物反应器中 22.5-37.5X10⁶ 个。。

[0071] 图 3a-b 是描述比较在源自胎盘的 3D-ASC 中表达的膜标记 (暗紫色) 与在常规 2D 培养条件下培养的胎盘细胞中的膜标记 (淡紫色) 的表达水平差异的条形图。粘附细胞在培养瓶 (2D) 中生长 4-6 周, 或在生物反应器系统中于聚苯乙烯载体 (3D) 上生长 2-3 周。使细胞从培养瓶或载体经收获后, 孵育并与识别 MSC (图 3a) 或造血细胞 (图 3b) 膜标记特征的一组单克隆抗体 (MAb) 结合。注意到在 2D 培养细胞中的 MSC 膜标记表达 (如对于 CD90、CD105、CD73 和 CD29 膜标记所示) 比在 3D 培养的粘附细胞中表达的 MSC 膜标记明显更高, 尤其是 CD105, 在 3D 培养细胞中显示 56% 表达, 相比较在 2D 培养细胞中为 87% (图 3a)。2D 和 3D 二者培养物中的 ASC 都不表达任何造血膜标记 (图 3b)。

[0072] 图 4a-d 是描述比较在 2D 和 3D 条件或在 2D 和 3D 条件培养基下培养的从胎盘产生的 ASC 的蛋白质水平的条形图。图 4a-c 描述由 ELISA 分析以 pg/ml (标准化为 1X10⁶ 个细胞 / ml) 2D 和 3D 条件培养基中培养的 ASC 的 Flt-3 配体 (图 4a)、IL-6 (图 4b) 和 SCF (图 4c) 的水平。结果代表三个独立实验之一。图 4d 显示不同细胞蛋白的表达水平, 根据用 iTRAQ 试剂标记之间比较的蛋白质样品的质谱法分析。蛋白样品采自在 2D (白条) 和 3D (灰条) 条件下生长的 ASC。该图代表两个重复实验中的一个。注意到 2D 和 3D 培养条件的条件培养基及细胞中某些蛋白的表达水平的差异。

[0073] 图 5a-d 是描述源自胎盘的 3D-ASC 在体外分化为成骨细胞的能力的显微照片。源自人胎盘的 ASC 在导成骨分化的培养基 (含有 10% FCS、100nM 地塞米松、0.05mM 抗坏血酸 2-磷酸盐、10mM B-甘油磷酸盐的 DMEM) 中培养 3 周时间。图 5a-b 显示表达钙化基质的细胞, 根据由 AlizarinRed S 染色所示。图 5c-d 显示不用导成骨分化的培养基处理的对照细胞, 其保持成纤维细胞样表型并证明没有矿化。

[0074] 图 6 是描述在移植后用化学疗法 (连续 2 周腹膜内注射 25mg/kg 白消安 (busulfan)) 治疗 3.5 周的 NOD-SCID 小鼠骨髓 (BM) 中检测的人 CD45+ 细胞百分比的图表。将从源自脐带血的单核细胞纯化的 CD34+ 细胞 (100,000) 单独移植 (5 只小鼠, a), 或与在 2D 条件下培养的 0.5X10⁶ 个源自胎盘的粘附细胞共同移植 (2D-ASC; 2 只小鼠, b), 或与在 pluriX™ 生物反应器中 3D 条件下培养的源自胎盘的粘附细胞 (3D-ASC) 共同移植 (5 只小鼠, c)。然后从小鼠大腿骨和胫骨收集 BM。通过流式细胞术检测 BM 中的人细胞。通过让

细胞与抗人 CD45-FITC 孵育来测定表达 CD45 的人细胞的百分比。注意到与单用 HSC 处理小鼠中的人类细胞的百分比 (a) 相比,与 2D-ASC(b) 以及与 3D-ASC(c) 共同移植的小鼠骨髓中的人细胞 (hCD45+) 的百分比更高。在经 3D-ASC 培养细胞处理的小鼠中观察到比经 2D-ASC 培养细胞处理的小鼠更高的移入,表明了经 3D 培养的 ASC 所特有的更高治疗优势。

[0075] 图 7a-b 是仅用 CD34+ 细胞移植的小鼠中的人移植 CD45+ 细胞 (图 7a) 与 CD34+ 细胞加源自脂肪组织的 ASC (图 7b) 比较的 FACS 分析。注意到与单用人 CD34+ 处理的小鼠中的 (7b-12%) 相比,用源自脂肪组织的 ASC 共同移植的小鼠中的人造血群体 (hCD45+) 百分比 (7a-29%) 明显更高。

[0076] 图 8 是描述在人脐带血单核细胞 (CB) 与等辐射量 (3000Rad) 脐带血细胞 (iCB)、源自人外周血单核细胞 (PBMC)、2D 培养的 (2D) 或 3D 培养的 (3D) 胎盘 ASC、或 PBMC 和 2D 及 3D 培养的胎盘 ASC 的联合 (PBMC+2D 和 PBMC+3D) 之间进行混合淋巴细胞反应的条形图。CB 细胞群大小由 ^3H - 胸苷吸收 (以 CPM 测量) 来表示,在培养的最后 18 小时内测量。受刺激的 CB 细胞增殖升高说明较高的免疫应答水平。注意到与粘附细胞孵育的细胞显示出较低的免疫应答水平,特别是在与粘附细胞共同孵育时,对 PBMC 的 CB 免疫应答减少。每一反应作三个重复。

[0077] 优选实施方案说明

[0078] 本发明为新颖的细胞扩增方法和藉此产生的细胞和条件培养基用于干细胞相关治疗、干细胞移入和 HSC 支持的用途。

[0079] 参考附图和随附说明可更好地理解本发明的原理和操作。

[0080] 在详细解释至少一种本发明实施方案之前,应该理解本发明申请不限于在以下说明所阐述的或实施例例证中的细节。本发明能够有其它实施方案或以各种方式实践或实施。还应该理解,本文所用措辞和术语是为了说明目的,不应该认作限制。

[0081] 在日益发展的医学界,为了临床和研究目的越来越需要干细胞,更具体地是基质干细胞 (也称为“间充质干细胞”)。MSC 用于支持 HSC 移植和移入,也用于治疗越来越多种病症,例如心脏病、BM 缺乏症、神经元相关疾病和需要器官或组织移植的病症。

[0082] 使用干细胞的障碍在于分离大量正常存在的干细胞或祖细胞群技术上困难,因为这些细胞在大部分组织中数量有限,在得到干细胞的方法中涉及不便之处和风险,并且用目前的收获方法伴随记忆 B 细胞和造血干细胞损失。从人胚胎获得细胞在已经存在的技术困难之上又增加了宗教和伦理方面的问题。

[0083] 源自骨髓的干细胞的备选来源包括脂肪组织和胎盘。然而,目前尚无有效扩增来自这些组织的干细胞的方法。

[0084] 在将本发明付诸于实践时,本发明人发现来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞可在 3D 培养条件下有效繁殖。本发明人出乎意料之外地发现这样的细胞包含与 MSC 相似的功能特性,因此,这些细胞和由此产生的条件培养基可用作治疗目的,例如移植、组织再生和体内 HSC 支持。

[0085] 如下文和以下实施例部分所述,本发明人能够在 3D 环境中扩增包含基质干细胞特性的源自脂肪组织和胎盘的粘附细胞。发现据此扩增的细胞在低温贮藏后有活力,这由粘附和重形成群体测定 (repopulation assay) 证明 (参见实施例 1)。源自胎盘的粘附细胞的流式细胞术分析发现不同的标记表达型式 (参见图 3a-b)。最重要的是,在 2D 或 3D 环

境中繁殖的源自脂肪组织和胎盘的粘附细胞能够支持 HSC 移入（参见实施例 2），其证实了本发明细胞作为基质干细胞在临床上的用途。

[0086] 因此，本发明一方面提供细胞扩增的方法。

[0087] 所述方法包括在支持细胞扩增的三维（3D）培养条件下培养来自胎盘或脂肪组织的粘附细胞。

[0088] 本文所用术语“扩增的”和“扩增”指基本上不分化地维持细胞及最终细胞生长，即使细胞群增加（例如至少到 2 倍）而不存在伴随所述增加的分化。

[0089] 本文所用术语“维持的”和“维持”指基本上不分化的细胞更新，即基本上稳定细胞群而不存在伴随所述稳定的分化。

[0090] 本文所用短语“粘附细胞”指具有贴壁依赖性的同质或异质细胞群，即细胞为了在体外生长需要粘附表面。

[0091] 本文所用短语“脂肪组织”指包含脂肪细胞（adipocyte）的结缔组织。

[0092] 本文所用术语“胎盘组织”指沿着子宫壁并在怀孕期间包裹胎儿的哺乳动物雌性器官的任何部分，胎盘和胎儿通过脐带连接。出生后胎盘剥离（称为产后胎盘）。

[0093] 本文所用短语“三维培养条件”指将细胞置于与细胞生长相容同时使得细胞可以在多于一层上生长的条件。完全可将细胞在活生物体（或组织）中的原位环境理解为三维构造。细胞被其它细胞围绕。它们被固定在使得可建立各种局部微环境的纳米级细胞外基质纤维的复合网络中。它们的胞外配体不仅介导对基底膜的附着，而且还通向多种血管和淋巴管。氧、激素和营养素被运送到细胞而废物则被运出。本发明三维培养条件设计为模拟例如以下进一步作为例证的环境。

[0094] 因此，本发明这方面的粘附细胞从脂肪组织或胎盘组织提取。

[0095] 可从足月或早产胎盘得到胎盘细胞。优选一旦外出血就收集胎盘。优选在足以除去残留细胞的时间内灌注胎盘。本文所用术语“灌注（perfuse 或 perfusion）”指将液体倾注或使液体通过器官或组织的行为。胎盘组织可来自任何哺乳动物；最优选的胎盘组织是人的胎盘组织。胎盘组织方便的来源是产后胎盘（例如 1-6 小时），然而，胎盘组织或细胞的来源或分离胎盘组织的方法对于本发明而言并不重要。

[0096] 源自胎盘的粘附细胞可来自胎盘的胎儿（即羊膜或胎盘内部部分，参见实施例 1）和母体（即基蜕膜和壁蜕膜）部分。在生理盐水缓冲液〔例如磷酸盐缓冲盐水（PBS）或 Hank 缓冲液〕中洗涤组织样品。通过用消化酶处理组织（参见下面）或 / 和切碎（mince）并用洗涤培养基经过尼龙滤器冲洗组织部分或通过轻轻吹打（Falcon, Becton, Dickinson, San Jose, CA），制备单细胞悬浮液。

[0097] 源自脂肪组织的粘附细胞可通过本领域技术人员已知的多种方法来分离。例如，这样的方法阐述于美国专利第 6, 153, 432 号。脂肪组织可源自网膜 / 内脏、乳腺、性腺或其它脂肪组织部位。优选脂肪组织来源为网膜脂肪组织。在人类中，脂肪组织通常通过吸脂来分离。

[0098] 从脂肪组织分离粘附细胞可通过在如下条件处理组织得到：用消化酶（例如胶原酶、胰蛋白酶和 / 或分散酶；和 / 或有效浓度的透明质酸酶或 DNA 酶）；和乙二胺四乙酸（EDTA）；在 25-50℃ 的温度作用 10 分钟 -3 小时。然后可以让细胞通过 20 微米 -800 微米的尼龙或粗棉布网滤器。然后让细胞直接在培养基中或经过 Ficoll 或 Percoll 或其它颗

粒梯度进行差速离心。细胞在 4-50℃ 温度以 100-3000xg 速度离心 1 分钟 -1 小时（参见美国专利第 7,078,230 号）。

[0099] 除源自胎盘或脂肪组织的粘附细胞外，本发明还展望特征为基质干细胞表型（其将在下文进一步阐述）的来自其它细胞来源的粘附细胞的用途。可从其中提取粘附细胞的组织来源包括但不限于：脐带血、毛囊 [例如美国专利申请第 20060172304 号所述]、睾丸 [例如 Guan K. 等, *Nature*. 2006 Apr 27; 440(7088):1199-203 所述]、人嗅粘膜 [例如 Marshall, CT. 等, *Histol Histopathol*. 2006 Jun; 21(6):633-43 所述]、胚胎卵黄囊 [例如 Geijsen N, *Nature*. 2004 Jan 8; 427(6970):148-54 所述] 和羊膜水 [Pieternella 等 (2004) *Stem Cells*. 22:1338-1345]，已知它们所有的都包括间充质干细胞。来自这些组织来源的粘附细胞可以通过使这些细胞在粘附表面上培养分离，由此从其它细胞原始群中分离出粘附细胞。

[0100] 不管是什么来源（例如胎盘或脂肪组织），优选在无菌条件下提取细胞。一旦得到分离的细胞，就使其粘附到粘附材料（例如构成表面）上，藉此分离粘附细胞。这可在于 3D 培养条件中培养之前（参见实施例 1）或同时进行。

[0101] 本文所用“粘附材料”指具有可让细胞保持在其表面的化学结构（例如含有表面暴露基团）的人工合成、天然存在或其组合的无毒（即生物相容）材料。

[0102] 可用于本发明这方面的粘附材料实例包括但不限于：聚酯、聚烯烃、聚氟氯乙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜、醋酸纤维素、玻璃纤维、陶瓷颗粒、matrigel、细胞外基质组分（例如纤维粘连蛋白、软骨粘连蛋白、层粘连蛋白）、胶原、聚 L 乳酸和惰性金属纤维。

[0103] 用本领域熟知方法可实现进一步纯化或富集基质干细胞的步骤（例如通过用基质干细胞标记表达的 FACS，其在下文进一步阐述）。

[0104] 用于本发明培养的基本培养基的非限制性实例包括极限必须培养基 Eagle、ADC-1、LPM（无牛血清白蛋白）、F10 (HAM)、F12 (HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI1640、BGJ 培养基（进行和不进行 Fitton-Jackson 改良）、基本培养基 Eagle (BME- 加入 Earle 碱盐)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM- 无血清)、Yamane、IMEM-20、Glasgow 改良 Eagle 培养基 (GMEM)、Leibovitz L-15 培养基、McCoy5A 培养基、培养基 M199 (M199E- 含 Earle 碱盐)、培养基 M199 (M199H- 含 Hank 碱盐)、极限必须培养基 Eagle (MEM-E- 含 Earle 碱盐)、极限必须培养基 Eagle (MEM-H- 含 Hank 碱盐) 和极限必须培养基 Eagle (MEM-NAA, 含非必须氨基酸)，在数目众多的其他培养基中包括：培养基 199、CMRL1415、CMRL1969、CMRL1066、NCTC135、MB 75261、MAB 8713、DM 145、Williams' G、Neuman & Tytell、Higuchi、MCDB 301、MCDB 202、MCDB 501、MCDB 401、MCDB 411、MDBC 153。用于本发明的优选培养基为 DMEM。这些和其它有用的培养基购自 GIBCO, Grand Island, N. Y., USA 和 Biological Industries, Bet HaEmek, Israel 等等。大量这些培养基概述于酶学方法 (*Methods in Enzymology*) 第 LVIII 册，“细胞培养 (Cell Culture)”，第 6272 页，William B. Jakoby 和 Ira H. Pastan 编辑，Academic 出版公司出版。

[0105] 培养基可补充例如血清（例如牛或其它物种的胎血清或）和任选或备选以皮克 / ml - 毫克 / ml 水平浓度的生长因子、细胞因子和激素（例如生长激素、促红细胞生成素、促血小板生成素、白介素 3、白介素 6、白介素 7、巨噬细胞集落刺激因子、c-kit 配体 / 干细胞因子、骨保护素配体、胰岛素、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经

生长因子、睫状神经营养因子、血小板源生长因子和骨形成蛋白)。

[0106] 应进一步认识到可将另外组分加入培养基中。这样的组分可为抗生素、抗真菌素、白蛋白、氨基酸和本领域已知用于细胞培养的其它组分。此外,需要时可加入组分以提高分化过程(参见以下进一步阐述)。

[0107] 一旦取得粘附细胞就可将其转移到三维环境(参见以下实施例部分的实施例 1)。但是应该了解,可在分离后立即将所述细胞转移到 3D 构造基质中(如上文所述)。

[0108] 因此,使本发明这方面的粘附材料成形用于 3D 培养,藉此提供基本上增加对基质细胞粘附有用附着表面的生长基质,以便模拟组织(例如胎盘)的基础结构。

[0109] 例如,对于 0.5mm 高的生长基质而言,增加到至少 5-30 倍,其通过投影到生长基质基部来计算。所述增加到约 5-30 倍是对于每一单层而言,若使用许多所述层(无论是堆叠的还是由间隔物隔开或诸如此类),则 5-30 倍都适用于每一层如此结构。当基质以片(sheet)形式使用时,优选非编织纤维片或开孔发泡聚合物片,优选片厚度为约 50-1000 μm 或更厚,其提供供细胞进入、营养素进入和从片除掉废物用的足够的多孔性。根据优选实施方案,所述孔具有 10 μm -100 μm 的有效直径。这样的片可从各种厚度的纤维制备,优选纤维厚度或纤维直径范围为约 0.5 μm -20 μm ,更优选纤维直径范围为 10 μm -15 μm 。

[0110] 本发明结构可由提供空间稳定性和物理强度的多孔支撑片或筛网支撑,或甚至更好与其结合。

[0111] 还可切割、冲孔或切碎这样的基质片,以提供投影面积约 0.2mm-约 10mm 且大约同样厚度(约 50-1000 μm)的颗粒。

[0112] 更多与用于使本发明付诸于实践的生长基质的制作、用途和/或优点阐述于美国专利第 5,168,085 号和特别是第 5,266,476 号中,它们都在此引作参考。

[0113] 粘附表面可具有选自正方形、环形、圆形和十字形的形状。

[0114] 对于大规模生产而言,优选在 3D 生物反应器中实现培养。

[0115] 这样的物反应器实例包括但不限于推流式生物反应器、连续搅拌槽罐生物反应器和固定床生物反应器。

[0116] 如实施例部分的实施例 1 所示,三维(3D)推流式生物反应器(如美国专利第 6911201 号所述)能够支持基质细胞的生长和长期维持。在该生物反应器中,基质细胞被接种到装于玻璃柱中由非编织纤维聚酯基质构成的 porous 载体上,藉此使大量细胞在相对小的体积内繁殖。

[0117] 在推流式生物反应器中所用的基质可为片形式,为非编织纤维片或开孔发泡聚合物片,优选片厚度为约 50-1000 μm 或更厚,其提供供细胞进入、营养素进入和从片除掉废物用的足够的多孔性。

[0118] 可与本发明使用的其它 3D 生物反应器包括但不限于连续搅拌罐生物反应器(其中使培养基连续进料到生物反应器中,将产物连续抽出,以维持反应器内的恒时稳态。带有纤维床篮的搅拌罐生物反应器可购自例如 New Brunswick Scientific 公司 Edison, NJ)、固定床生物反应器、气升式生物反应器(其中空气通常通入中央导管的底部,向上流动同时形成气泡,在柱顶分离废气)、带有 Polyactive 泡沫塑料的细胞接种灌注式生物反应器(如 Wendt, D. 等, Biotechnol Bioeng 84:205-214, (2003) 所述)、管状聚 L 乳酸 (PLLA)

多孔支架径向流灌注式生物反应器 [如 Kitagawa 等, *Biotechnology and Bioengineering* 93(5):947-954(2006) 所述]。符合本发明的其它生物反应器阐述于美国专利第 6,277,151 号、第 197,575 号、第 139,578 号、第 132,463 号、第 902,741 号和第 5,629,186 号。

[0119] 接种时优选细胞接种达到 100,000-1,500,000 个细胞/mm。

[0120] 优选一旦达到至少约 40% 汇合、60% 汇合或 80% 汇合就收获细胞,同时优选避免不受控制的分化和老化。

[0121] 培养进行至少约 2 天、3 天、5 天、10 天、20 天、1 个月或甚至更长。应该了解,在生物反应器中的培养可能延长这一时间。可能实现传代以增加细胞数目。

[0122] 优选本发明粘附细胞包含至少一种“基质干细胞表型”。

[0123] 本文所用“基质干细胞表型”指源自骨髓基质(即间充质)干细胞的典型结构或功能表型。

[0124] 本文所用短语“干细胞”指没有终末分化的细胞。

[0125] 因此,例如,细胞可能具有纺锤形。作为备选或另外,细胞可表达基质干细胞象征的一种或一群(例如表面标记)标记。基质干细胞表面标记(阳性和阴性)实例包括但不限于 CD105+、CD29+、CD44+、CD73+、CD90+、CD34-、CD45-、CD80-、CD19-、CD5-、CD20-、CD11B-、CD14-、CD19-、CD79-、HLA-DR- 和 FMC7-。其它基质干细胞标记包括但不限于酪氨酸羟化酶、巢蛋白和 H-NF。

[0126] 基质干细胞代表性功能表型实例包括但不限于 T 细胞抑制活性(不刺激 T 细胞而相反地对其抑制)、造血干细胞支持活性以及脂肪细胞、肝细胞、成骨细胞和神经细胞定向分化。

[0127] 这些结构或功能特征中的任一项都可用于评定本发明细胞(参见以下实施例部分的实施例 1-2)。

[0128] 根据本发明教导产生的细胞群特征为独特的蛋白质表达谱,其如实施例部分的实施例 1 所示。因此,例如,根据本发明教导产生的胎盘或脂肪组织粘附细胞能够表达和/或分泌高水平的所选择的因子。例如,这样的细胞表达或分泌 SCF、Flt-3、H2AF 或 ALDH X 比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞表达或分泌的高达至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或优选 12 倍。另外或作为备选,本发明细胞群分泌或表达 IL-6、E2F2、RCN2 或 CNN1 比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞表达或分泌的高达至少 2、3 或 5 倍水平。另外或作为备选,本发明细胞群特征为与 2D 培养的细胞比较各种其它蛋白表达水平较低。因此,例如,分泌或表达比在 2D 培养中生长的胎盘或脂肪组织粘附细胞表达或分泌的 Hnrph1、CD44 抗原同种型 2 前体、Papss2 或 rpl7a 的表达水平低至 0.6、0.5、0.25 或 0.125。

[0129] 当进一步将本发明具体化到实践中时,本发明人认识到粘附基质细胞尤其是 3D-ASC 显示免疫抑制活性。如以下实施例部分的实施例 3 所示,在 MLR 测定中发现粘附基质细胞尤其是 3D-ASC 抑制人类脐带血单核细胞的免疫反应。因此,本发明细胞可包含可优先用于临床的生物活性(例如 T 细胞抑制活性、造血干细胞支持活性)。

[0130] 当进一步将本发明具体化到实践中时,本发明人认识到本发明细胞的条件培养基可包含可优先用于临床的生物活性(例如 T 细胞抑制活性、造血干细胞支持活性)。

[0131] 因此,本发明进一步展望条件培养基的收集和其照原样的或在用本领域熟知方法浓缩、富集或分馏的另外步骤后的应用。优选本发明条件培养基来自高生存力的细胞培养

对数中期。

[0132] 如上所述,本发明细胞和条件培养基特征为基质干细胞表型,因此可用于任何研究和可能受益于使用这样的细胞的任何临床应用中。

[0133] 移植的 HSC 移入并启动血细胞生成依赖于复杂的过程,包括随趋化因子梯度穿过内皮细胞屏障归巢到骨髓并驻留在合适龕,同时在龕中的移植细胞、ECM 和间充质细胞之间建立物理接触。所有这些过程涉及一群复杂的分子,例如细胞因子、激素、类固醇、细胞外基质蛋白、生长因子、细胞间作用和黏附蛋白和基质蛋白。

[0134] 已知移植后 2-3 天于受者 BM 中仅检测到 1-5 % 灌输的 HSC[Kerre 等, J Immunol. 167 :3692-8. (2001) ;Jetmore 等, Blood. 99 :1585-93(2002)]。

[0135] MSC 对造血移入的贡献部分在于抑制引起移植抗宿主病的源自供者的 T 细胞产生 [(GvHD, Charbord P., 和 Moore, K., Ann. N. Y. Acad. Sci 1044 :159-167(2005) ;Maitra B 等, Bone Marrow Transplant. 33(6) :597-604. (2004) ;美国专利第 6,010,696 号 ;第 6555374 号],部分在于提供造血干细胞 (HSC) 支持 (即维持并帮助造血干细胞增殖、成熟和 / 或归巢)。

[0136] 如以下实施例部分的实施例 2 所述,意想不到地发现源自胎盘和脂肪组织的粘附细胞即使在化疗后也支持 HSC 移入。

[0137] 考虑到这些结果,可想象到本发明细胞或培养基可用于使用基质干细胞移植的任何临床应用中。

[0138] 因此,本发明另一方面提供在需要治疗的对象中治疗可受益于基质干细胞移植的医学病症 (例如病理、疾病、综合征) 的方法。

[0139] 本文所用术语“治疗”指抑制或阻滞病理进展和 / 或引起病理的减轻、消除或消退。本领域技术人员应该理解,可使用各种方法和测定来评估病理进展,同样地,可使用各种方法和测定来评估病理的减轻、消除或消退。术语“治疗”优选指减缓或缩小与癌病有关的症状。优选治疗治愈例如基本上消除与医学病症有关的症状。

[0140] 本文所用“可受益于基质干细胞移植的医学病症”指可通过给予本发明细胞 / 培养基减缓的任何医学病症。

[0141] 术语或短语“移植”、“细胞置换”或“移入”在本文中可交替使用,指将本发明细胞引入到靶组织中。

[0142] 本文所用术语“对象”指任何对象 (例如哺乳动物),优选人类对象。

[0143] 本发明这方面的方法包括给予所述对象治疗有效量的本发明细胞或培养基 (上述),藉此治疗对象的可受益于基质干细胞移植的医学病症。

[0144] 根据本发明这方面可给予的细胞包括上述可在二维或三维环境中培养的粘附细胞及其间充质和非间充质的部分或终末分化衍生物。

[0145] 衍生来自本发明基质干细胞的特定谱系细胞的方法为本领域熟知。参见例如美国专利第 5,486,359 号、第 5,942,225 号、第 5,736,396 号、第 5,908,784 号和第 5,902,741 号。

[0146] 细胞可为天然的,或遗传改良例如以便衍生的目的谱系 (参见美国专利申请第 20030219423 号)。

[0147] 细胞和培养基可为新鲜或冷冻 (例如冷冻保存) 制备的自体或非自体来源 (即同

种异体或异种)。

[0148] 根据医学病症可给予所述对象另外的化学药物(例如免疫调节剂、化疗等)或细胞。

[0149] 因此,为了改进干细胞移入(例如增加受者 BM 中的有存活力的 HSC 数目和最优化改进正常白血细胞计数),例如可将本发明细胞/培养基在 HSC 移植之前、同时或之后给予。

[0150] 优选 HSC 和基质细胞享有共同的 HLA 抗原。优选 HSC 和基质细胞来自单一个体。或者, HSC 和基质细胞来自不同个体。

[0151] 术语或短语“移植”、“细胞置换”或“移入”在本文中可交替使用,指将本发明细胞引入到靶组织中。所述细胞可源自受者或源自同种异体或异种供者。

[0152] 因为当将非自体细胞给予身体时可能诱导免疫反应,所以已开发了几种方法来降低排斥非自体细胞的可能性。这些方法包括在移植前抑制受者免疫系统或将非自体细胞包被在免疫隔离(immunoisolating)半渗透膜中。

[0153] 胶囊化(encapsulation)技术通常分为涉及小的球状载体的微胶囊和涉及较大的平板中空纤维膜的大胶囊(macroencapsulation)(Uludag, H. 等,哺乳动物细胞胶囊化技术(Technology of mammalian cellencapsulation).Adv Drug Deliv Rev.2000 ;42 : 29-64)。

[0154] 制备微胶囊的方法为本领域所述,包括例如如下公开的方法:LuMZ 等,用藻酸盐和 α -苯氧基亚肉桂基乙酰化聚(丙烯胺)的细胞胶囊化(Cell encapsulation with alginate and α -phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine)). Biotechnol Bioeng. 2000,70 :479-83 ;Chang TM 和 Prakash S,酶、细胞和遗传工程微生物的微胶囊封装方法(Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms).Mol Biotechnol. 2001,17 :249-60 ;和 Lu MZ 等,用光敏聚(丙烯胺 α -氰基亚肉桂基乙酸酯)胶囊封装细胞的新颖的方法(A novel cell encapsulation method usingphotosensitive poly(allylamine α -cyanocinnamylideneacetate)). JMicroencapsul. 2000,17 :245-51。

[0155] 例如,通过将改良的胶原与甲基丙烯酸 2-羟乙酯(HEMA)、甲基丙烯酸(MAA)和甲基丙烯酸甲酯(MMA)三元聚合物壳混合来制备微胶囊,导致胶囊厚 2-5 μm 。这样的微胶囊可进一步用另外的 2-5 μm 三元聚合物壳包被,以提供负电荷的光滑表面并使血浆蛋白吸收最小化(Chia, S.M. 等,用作细胞胶囊化生物材料的多层微胶囊(Multi-layered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials). 200223 :849-56)。

[0156] 其它微胶囊基于藻酸盐、海洋多糖(Sambanis, A, 糖尿病治疗中的胶囊化胰岛(Encapsulated islets in diabetes treatment).Technol. Ther. 2003,5 :665-8)或其衍生物。例如,可通过在氯化钙存在下聚阴离子藻酸钠和纤维素硫酸钠与聚阳离子亚甲基-胍共聚物盐酸盐之间的聚合电解质络合作用来制备微胶囊。

[0157] 应该了解,当使用较小的胶囊时改进了细胞胶囊化。因此,当胶囊大小从 1mm 减小到 400 μm 时,胶囊化细胞的质量控制、机械稳定性、分散特性和体外活性都得到改进(Canaple L. 等,通过大小控制改进细胞胶囊化(Improving cell encapsulation through size control).JBiomater SciPolym 编辑,2002 ;13 :783-96)。此外,发现孔径很好地控制在小至 7nm 的、经处理(tailored)表面化学和精确微构造的纳米孔生物胶囊

成功地细胞免疫隔离出微环境 (Williams D. 小即是美:医疗装置中的微粒和纳米粒技术 (Small is beautiful:microparticle andnanoparticle technology in medical devices).Med Device Technol.1999,10 :6-9 ;Desai, T.A. 胰腺细胞胶囊化的微构造技术 (Microfabricationtechnology for pancreatic cell encapsulation).Expert Opin Biol Ther. 2002,2 :633-46)。

[0158] 免疫抑制剂实例包括但不限于:氨甲蝶呤 (methotrexate)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、环孢霉素 (cyclosporine)、环孢霉素 A(cyclosporin A)、氯喹 (chloroquine)、羟氯喹、柳氮磺吡啶 (sulphasalazopyrine)、金盐、D-青霉胺 (D-penicillamine)、来氟米特 (leflunomide)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、阿那白滞素 (anakinra)、英夫利昔单抗 (infliximab) (REMICADE)、依那西普 (etanercept)、TNF α 阻断剂、靶向炎性细胞因子的生物药物、和非固醇类抗炎药物 (NSAID)。NSAID 实例包括但不限于:乙酰水杨酸、水杨酸胆碱镁、二氟尼柳 (diflunisal)、水杨酸镁、双水杨酸酯、水杨酸钠、双氯芬酸 (diclofenac)、依托度酸、非诺洛芬 (fenoprofen)、氟比洛芬 (flurbiprofen)、吲哚美辛 (indomethacin)、酮洛芬 (ketoprofen)、酮咯酸、甲氯芬那酸酯、萘普生 (naproxen)、萘丁美酮 (nabumetone)、保泰松 (phenylbutazone)、吡罗昔康 (piroxicam)、舒林酸、托美丁 (tolmetin)、对乙酰氨基酚 (acetaminophen)、布洛芬 (ibuprofen)、Cox-2 抑制剂和曲马多 (tramadol)。

[0159] 在本文所述任一方法中,可以给予细胞或培养基本身,或优选作为进一步包含药理学上可接受载体的药物组合物部分来给予。

[0160] 本文所用“药物组合物”指含其它化学组分(例如药学上合适的载体和赋形剂)的本文所述一种或多种化学缀合物的制剂。药物组合物目的是方便将化合物给予对象。

[0161] 下文所用术语“药学上可接受的载体”指载体或稀释剂,其对对象不引起明显刺激,不消除所给予化合物的生物学活性和特性。载体的非限制性实例为丙二醇、盐水、乳液和有机溶剂与水的混合物。

[0162] 本文所用术语“赋形剂”指加到药物组合物中以进一步方便施用化合物的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0163] 根据本发明优选实施方案,药学载体为水性盐溶液。

[0164] 制备和给予药物的技术可在“雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)”, Mack 出版公司, Easton, PA, 最新版本中找到,其在此引作参考。

[0165] 可以全身方式给予药物组合物(如上文所述)。或者,可局部给予药物组合物,例如直接将药物组合物注射到患者的组织区。

[0166] 可通过本领域熟知的方法来制备本发明药物组合物,例如借助于常规混合、溶解、成粒、制成糖锭剂、研粉、乳化、胶囊化、包埋或冻干的方法。

[0167] 因此,可用一种或多种包含赋形剂和辅助剂的生理学上可接受的载体以常规方式来调配用于本发明的药物组合物,所述载体方便将活性成分加工成可在药学上使用的制剂。合适的制剂取决于所选择的给药途径。

[0168] 对于注射而言,可以以水溶液来调配药物组合物的活性成分,优选以生理上可容的缓冲液例如 Hank 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液。对于透过粘膜给药而言,制剂中

使用适于待渗透的屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常为本领域所知。

[0169] 对于用于本发明方法中的任何制剂而言,可从体外和细胞培养测定中初始估计治疗有效量或剂量。优选在动物模型中调配剂量以达到所需的浓度或滴度。这样的资料可用于更准确地确定人类使用的剂量。

[0170] 可通过体外标准药理学方法在细胞培养或实验动物中测定本文所述活性成分的毒性和疗效。

[0171] 从这些体外和细胞培养测定和动物研究中得到的数据可用于调配供人类使用的一系列剂量。剂量可视所用剂型和所用给药途径而变化。可通过个别医生考虑患者病症选择确切的制剂、给药途径和剂量(参见例如 Fingl 等,1975,载于“治疗学的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics)”,第1章第1页)。例如,可对帕金森患者的显示对治疗积极反应的运动功能进行症状监控。

[0172] 对于注射而言,可以以水溶液调配药物组合物的活性成分,优选以生理上可容的缓冲液例如 Hank 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液。

[0173] 可个别调整剂量和给药间隔,以使活性成分水平足以通过移植的细胞来有效调节神经递质合成。达到理想效果所需的剂量将视个体特征和给药途径而定。检测试验可用于测定血浆浓度。

[0174] 根据待治疗病症的严重程度和反应,可单次或多次给药,且疗程持续若干天到若干周,或达到减轻疾病状态。

[0175] 当然,待给予的组合物的量将视正接受治疗的个体、病痛的严重程度、给药方式、主治医生的判断等等而定。给药剂量和时间应该对仔细连续监测的个体病情变化做出反应。例如,基于监测的指示,将给予被治疗的帕金森患者足以减轻疾病症状的细胞量。

[0176] 本发明细胞经移植后优选在患病区域存活一段时间(例如至少6个月),以便观察到治疗效果。

[0177] 包括调配在药物可容载体中的本发明制剂在内的组合物可以经制备;置于合适容器中;并标上用于指定病症的治疗。

[0178] 若有需要,本发明组合物可以存于包或分配装置(dispenser device)例如 FDA 核准的试剂盒中,其可含有含活性成分的一个或多个单位剂型。所述包可例如包含金属或塑料片,例如起泡包(blister pack)。所述包或分配装置可附有给药说明。包或分配装置还可提供与由管理药物生产、使用或销售的政府机构规定的形式的容器有关的公告,所述公告反映该机构批准的组合物形式或人类给药或兽用给药形式。这样的公告例如可以是由美国食品和药品管理局批准的处方药物标签或批准的产品插入物。

[0179] 实施例

[0180] 现在以下实施例和以非限制方式阐明本发明的上述说明一起构成参考。

[0181] 本文所用术语和本发明所用实验方法通常包括分子、生化、微生物学和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如:“分子克隆:实验手册(Molecular Cloning:A laboratory Manual)”Sambrook 等,(1989);“分子生物学通用方案(Current Protocols in Molecular Biology)”第 I-III 卷,Ausubel, R. M. 编辑(1994);Ausubel 等,“分子生物学通用方案(Current Protocols in Molecular Biology)”,John Wiley 和 Sons, Baltimore, Maryland(1989);Perbal,“分子克隆实用指南(A Practical Guide

to Molecular Cloning)”, John Wiley & Sons, New York(1988); Watson 等, “重组 DNA(Recombinant DNA)”, Scientific American Books, New York; Birren 等(编辑) “基因组分子:实验手册丛书 (Genome Analysis: A Laboratory Manual Series)”, 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(1998); 美国专利第 4,666,828 号、第 4,683,202 号、第 4,801,531 号、第 5,192,659 号和第 5,272,057 号提出的方法; “细胞生物学:实验手册 (Cell Biology: A Laboratory Handbook)”, 第 I-III 卷 Cellis, J.E. 编辑 (1994); “免疫学通用方案 (Current Protocols in Immunology)” 第 I-III 卷 Coligan J.E. 编辑 (1994); Stites 等(编辑), “基础和临床免疫学 (Basic and Clinical Immunology)” (第 8 版), Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994); Mishell 和 Shiigi(编辑), “细胞免疫学选择方法 (Selected Methods in Cellular Immunology)”, W.H. Freeman 和 Co., New York(1980); 广泛阐述于专利和科学文献中的有用的免疫测定, 参见例如美国专利第 3,791,932 号、第 3,839,153 号、第 3,850,752 号、第 3,850,578 号、第 3,853,987 号、第 3,867,517 号、第 3,879,262 号、第 3,901,654 号、第 3,935,074 号、第 3,984,533 号、第 3,996,345 号、第 4,034,074 号、第 4,098,876 号、第 4,879,219 号、第 5,011,771 号和第 5,281,521 号; “寡核苷酸合成 (Oligonucleotide Synthesis)” Gait, M.J. 编辑 (1984); “核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization)” Hames, B.D., 和 Higgins S.J. 编辑 (1985); “转录和翻译 (Transcription and Translation)” Hames, B.D., 和 Higgins S.J. 编辑 (1984); “动物细胞培养 (Animal Cell Culture)” Freshney, R.L 编辑 (1986); “固定化细胞和酶 (Immobilized Cells and Enzymes)” IRL Press, (1986); “分子克隆实行指南 (A Practical Guide to Molecular Cloning)” Perbal, B., (1984) 和 “酶学方法 (Methods in Enzymology)” 第 1-317 卷, Academic Press; “PCR 方案:方法和应用指南 (PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications)”, Academic Press, San Diego, CA(1990); Marshak 等, “蛋白质纯化和鉴定策略 - 实验课手册 (Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual)” CSHL Press(1996); 以上所有如同本文完全提出一样在此引作参考。贯穿本文献提供了其它一般的参考资料。认为其中的方法为本领域熟知, 提供它们是为了方便读者。其中所包含的所有资料在此引作参考。

[0182] 实施例 1

[0183] 从骨髓、胎盘和脂肪组织生产和培养粘附基质细胞 (ASC)

[0184] 在含有 3D 载体的生物反应器系统中培养粘附细胞, 以生产特征为特定细胞标记表达谱的 3D-ASC 细胞。通过细胞计数测定生长效率。通过在分化培养基中培养来测定这些细胞的分化能力。

[0185] 材料和试验方法

[0186] 骨髓基质细胞 - 经过心脏直视手术或 BM 活检从血液学健康的供者吸出胸骨骨髓得到骨髓 (BM) 基质细胞。用 Hank 平衡盐溶液 (HBSS; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) 将骨髓吸出物稀释 3 倍, 进行 Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific 公司, Sunnyvale, CA) 密度梯度离心。此后收集骨髓单核细胞 ($<1.077\text{ gm/cm}^3$), 用 HBSS 洗涤 3 次, 重新悬浮于生长培养基 [补充 10% FCS (GIBCO BRL)、 10^{-4} M 巯基乙醇 (Merck, White House Station, NJ)、青霉素 - 链霉素 - 制霉菌素混合物 ($100\text{ U/ml}:100\text{ ug/ml}:1.25\text{ un/ml}$; Beit Ha' Emek)、

2mM L-谷氨酰胺 (Beit Ha'Emek) 的 DMEM(Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel)]。在组织培养培养瓶 (Corning, Acton, MA) 中于 37℃ (5% CO₂) 分开孵育来自各个供者的细胞且每周更换培养基。每 3-4 天用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA(Beit Ha'Emek) 分裂 (split) 细胞。传 2-40 代后,当达到 60-80% 汇合时,收集细胞用于分析或用于在生物反应器中培养。

[0187] 源自胎盘的基质细胞 - 在无菌条件下切下足月分娩胎盘的里面部分 (Bnei Zion 医学中心, Haifa, Israel), 用 Hank 缓冲液洗涤 3 次, 于 37℃ 与 0.1% 胶原酶 (1mg/ml 组织; Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO) 孵育 3 小时。用吸管轻轻吹打, 然后用补充 10% FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物 (100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml) 和 2mM L-谷氨酰胺的 DMEM 洗涤悬浮的细胞, 接种到 75cm² 培养瓶中并于 37℃ 在 5% CO₂ 增湿条件下于组织培养培养箱中孵育。此后使细胞在塑料表面贴壁 72 小时, 然后每 3-4 天换一次培养基。当达到 60-80% 汇合 (通常 10-12 天) 时, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 从生长培养瓶分离细胞, 并接种到新培养瓶中。此后收集培养的细胞用于分析或用于在生物反应器中培养。

[0188] 源自脂肪组织的基质细胞 - 从吸脂方法的人脂肪组织获得基质细胞 (Rambam Haifa, Israel)。用等体积的 PBS 彻底洗涤脂肪组织, 用胶原酶 (20mg/ml) 于 37℃ 消化 30 分钟。然后用含有 10% FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物 (100 U/ml:100ug/ml:1.25un/ml) 和 L-谷氨酰胺的 DMEM 洗涤细胞, 以 1200rpm 在室温离心 10 分钟, 用裂解液重新悬浮 (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, 以弃掉血细胞), 离心, 用含有 10% FCS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物 (100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml) 和 L-谷氨酰胺的 DMEM 重新悬浮。然后以 3-10x10⁷ 个细胞 / 培养瓶将洗涤过的细胞接种到无菌组织培养基培养瓶。第二天用 PBS 洗涤细胞以除掉残留的 RBC 和死细胞。于 37℃ 在 5% CO₂ 增湿条件下于组织培养培养箱中保持细胞。每 3-4 天更换培养基。在 60-80% 汇合时, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 从生长培养瓶分离细胞, 并接种到新培养瓶中。传 2-40 代后, 当达到 60-80% 汇合时, 收集细胞用于分析或用于在生物反应器中培养。

[0189] PluriX™ 推流式生物反应器 - 用由非编织纤维聚酯基质构成的 1-100ml 包好的 3D porous 载体 (直径 4mm) 装载 PluriX™ 推流式生物反应器 (Pluristem, Haifa, Israel; 如图 1g 所述, 也参见美国专利第 6, 911, 201 号)。这些载体使得可在相对小的体积内繁殖大量细胞数。由 Pluristem 设计并制造玻璃器皿。生物反应器在 37℃ 培养箱中保持, 且流速由阀门 (图 1g 中的 6a) 和蠕动泵 (图 1g 中的 9) 调节并监控。生物反应器含有取样和注射点 (图 1g 中的 4), 使得可连续接种细胞。从库 (图 1g 中的 1) 中供给 pH 6.7-7.4 的培养基。该库由含有不同比例的空气 / CO₂ / O₂ (由生物反应器中的细胞密度而定) 的已过滤气体混合物 (图 1g 中的 2、3) 供给。O₂ 的比例适合生物反应器出口的溶 O₂ 水平, 其由监控器 (图 1g 中的 6) 测定。经由硅胶管或扩散器 (Degania Bet, Emek Hayarden, Israel) 将气体混合物提供给所述库。培养基流经能够收集循环中的非粘附细胞的分离容器 (图 1g 中的 7)。通过蠕动泵 (图 1g 中的 9) 使得培养基循环。生物反应器进一步配备有附加的取样点 (图 1g 中的 10) 和用于连续交换培养基的容器。

[0190] 生产 3D-粘附基质细胞 (3D-ASC) - 用胰蛋白酶处理按上所述培养的非汇合原代人粘附 2D 细胞培养物, 用补充 10% FBS、青霉素-链霉素-制霉菌素混合物 (100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml) 和 2mM L-谷氨酰胺的 DMEM 洗涤并重新悬浮, 经由注射点接种 (10³-10⁵ 个细

胞/ml) 到无菌推流式生物反应器 (参见图 1g) 的 3D 载体。接种前将 PBS-Ca-Mg (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel) 填入生物反应器, 高压灭菌 (120℃, 30 分钟), 用含有 10% 热灭活的胎牛血清和青霉素-链霉素-制霉菌素混合物 (100U/ml:100ug/ml:1.25un/ml) 的 Dulbecco 生长培养基洗涤。流速保持在 0.1-5ml/分钟。接种过程涉及停止循环 2-48 小时, 藉此使得细胞沉积在载体上。生物反应器保持在控制温度 (37℃) 和 pH 条件 (pH = 6.7-7.4) 下; 根据需要使用供给无菌空气和 CO₂ 的培养箱。每周置换 2-3 次生长培养基。用新鲜的 DMEM 培养基每 4 小时-7 天替换循环培养基。在密度为 1x10⁶-1x10⁷ 个细胞/ml (生长后 12-40 天) 时, 从生物反应器除掉总培养基体积, 用 PBS 将生物反应器和载体洗涤 3-5 次。然后用胰蛋白酶-EDTA 从载体分离 3D-ASC 细胞; (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel; 轻轻搅动 3-15 分钟, 1-5 次), 此后重新悬浮于 DMEM 并冷冻保存。

[0191] 3D-ASC 质量生物学测定-解冻并计数冻存的 3D-ASC 细胞。为评估细胞生存力, 将 2x10⁵ 个细胞接种到 150cm² 组织培养培养瓶中, 在接种后 7 天内评估其粘附能力和重形成群体 (repopulation)。此后用荧光单克隆抗体流式细胞仪 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 分析 3D-ASC 膜标记表型。

[0192] 用流式细胞术测定比较 3D 和 2D 培养的粘附细胞的细胞膜标记谱-将来自 2D 培养物和 3D 流动系统培养物中的 100,000-200,000 个粘附细胞悬浮在 5ml 管中的 0.1ml 培养基中, 与饱和浓度的下述各种单克隆抗体 (MAb) 孵育 (4℃, 30 分钟, 暗环境): FITC-缀合的抗人 CD90 (Chemicon International 公司, Temecula, CA)、PE 缀合的抗人 CD73 (Bactlab Diagnostic, Ceasarea, Israel)、PE 缀合的抗人 CD105 (eBioscience, San Diego, CA)、FITC 缀合的抗人 CD29 (eBioscience, San Diego, CA)、Cy7-PE 缀合的抗人 CD45 (eBioscience)、PE 缀合的抗人 CD19 (IQProducts, Groningen, The Netherlands)、PE 缀合的抗人 CD14Mab (IQProducts)、FITC 缀合的抗人 CD11b (IQProducts) 和 PE 缀合的抗人 CD34 (IQProducts) 或 FITC 缀合的抗人 HLA-DR Mab (IQProducts)。孵育后在含有 1% 热灭活的 FCS 的冰冷 PBS 中洗涤细胞两次, 重新悬浮于 500 μl 10.5% 甲醛中, 用 FC-500 流式细胞仪 (BeckmanCoulter, Fullerton, CA) 分析。

[0193] 用质谱分析比较 3D 和 2D 培养的粘附细胞的蛋白谱-如上所述生产来自胎盘的源自 2D 和 3D 培养程序的 ASC。简言之, 通过在增湿 5% CO₂ 环境 (atmosphere) 下于 37℃ 在 175cm² 培养瓶中培养 0.3-0.75x10⁶ 个细胞 4 天直至达到 60-80% 汇合来生产 2D 培养物。通过在含有 2000 个载体的生物反应器中接种 2-10x10⁶ 个细胞/克并培养 18 天来生产 3D 培养物。收获后洗涤细胞 (x3) 以除去所有血清, 沉淀并冷冻。根据厂商的方案, 从沉淀物分离蛋白质 [使用 Tri 试剂盒 (Sigma, SaintLouis, USA), 用胰蛋白酶消化并用 iTRAQ 试剂标记 (AppliedBiosciences, Foster City, CA)]。简言之, iTRAQ 试剂为非聚合物的同量异位标记试剂。用四种同量异位的同位素编码标记中的一种经由其 N 末端和/或赖氨酸侧链标记每一样品中的肽。混合四个经标记的样品, 用质谱法分析肽。在肽片段上的每种标记释放独特的质量报告离子, 因此, 四种报告离子的比值给出样品中特定肽的相对丰度 (资料见: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/00113379.pdf>)。

[0194] 在 Smoler 蛋白质组中心 (department of Biology, Technion, Haifa, Israel) 用 LC-MS/MS 在 QTOF-Premier (Waters, San Francisco, CA) 上实施源自胎盘的 ASC 的 2D 培养物对 3D 培养物的蛋白质组分析, 且通过 Pep-Miner 软件 [Beer, I. 等, Proteomics, 4,

950-60(2004)] 针对 nr 数据库的人类部分进行鉴别和分析。被分析的蛋白质有：核内不均一核糖核蛋白 H1 (Hnrph1, GeneBank 登录号 NP_005511)、H2A 组蛋白家族 (H2AF, GeneBank 登录号 NP_034566.1)、真核细胞翻译延伸因子 2 (EEEF2, GeneBank 登录号 NP_031933.1)、网钙结合蛋白 3、EF- 手形钙结合结构域 (RCN2, GeneBank 登录号 NP_065701)、CD44 抗原同种型 2 前体 (GeneBank 登录号 NP_001001389)、钙调理蛋白蛋白 1 碱性平滑肌 (CNN1, GeneBank 登录号 NP_001290)、3 磷酸腺苷 5 磷酸硫酸合成酶 2 同种型 a (Papss2, GeneBank 登录号 NP_004661)、核糖体蛋白 L7a (rpL7a, GeneBank 登录号 NP_000963) 和醛脱氢酶 X (ALDH X, GeneBank 登录号 P47738)。每一实验进行 2 次。因为分析的特性,每一蛋白质按照出现在样品中的肽数目来分析(在每一次分析中蛋白质出现 2-20 次)。

[0195] 用 ELISA 比较 3D 和 2D 培养的粘附细胞分泌的蛋白质 - 如上所述生产来自胎盘的源自 2D 和 3D 培养方法的 ASC,且 3D 培养持续 24 天。此后收集条件培养基,在三个独立实验中,用 ELISA (R&D 系统,Minneapolis,MN) 对 Flt-3 配体、IL-6、促血小板生成素 (TPO) 和干细胞因子 (SCF) 进行分析。结果标准化为 1×10^6 个细胞 /ml。

[0196] 成骨细胞分化培养基 - 通过在由补充 10% FCS、100nM 地塞米松、0.05mM 抗坏血酸 2- 磷酸盐、10mM B- 甘油磷酸盐的 DMEM 组成的成骨细胞分化培养基中培养细胞 3 周来评估成骨细胞分化。由 Alizarin Red S 染色显示钙化基质,由碱性磷酸酶测定试剂盒(所有试剂来自 Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO) 检测碱性磷酸酶。

[0197] 结果

[0198] PluriX™ 生物反应器系统创造了生理样微环境

[0199] 为了给粘附细胞提供有效的培养条件,用 PluriX 生物反应器 (Pluristem, Haifa, Israel ;载体在图 1g 中阐明,在接种前显示于图 1b 中) 人工创造生理样环境(图 1a 中所述)。如图 1c-f 所示,骨髓产生的 3D-ASC 细胞在 3D 基质上成功培养并在接种后扩增 20 天(图 1b-c,分别放大 x150 和 250) 和 40 天(图 1c-d,分别放大 x350 和 500)。

[0200] 生长在 PluriX 生物反应器系统中的细胞显著扩增 - 不同生产批次的源自胎盘的 3D-ASC 细胞在 PluriX 生物反应器系统中生长。接种密度为 13,300 个细胞 / 载体(至总量为 2×10^6 个细胞)。接种 14 天后,细胞密度增加到 15 倍,达到大约 200,000 个细胞 / 载体(图 2),或者说在 150 载体的生物反应器中 30×10^6 。在不同的实验中,将细胞以 1.5×10^4 细胞 /ml 密度接种到生物反应器,接种 30 天后,载体含有超过 50 倍的更大的细胞数量,即大约 0.5×10^6 个细胞 / 载体或 0.5×10^7 个细胞 /ml。在各种水平生长柱的载体上的细胞密度一致,说明氧和营养素均一传递到细胞。由此证明 3D 培养系统为高密度间充质细胞培养物的生长和长期维持提供支持条件,所述细胞培养物可以有效生长到足以用于支持移入和成功移植目的的量。

[0201] 3D-ASC 显示独特的膜标记特征 - 为了确定可溶性分子分泌谱及蛋白质产生(通过模拟骨环境的 3D 培养方法来实施)的差异,进行了 FAC 分析。如图 3a 所示,细胞标记的 FACS 分析描述的是,3D-ASC 表现出与在 2D 条件中生长的粘附细胞不同的标记表达型式。与 3D 培养的细胞相比,2D 培养的细胞表达明显更高水平的阳性膜标记 CD90、CD105、CD73 和 CD29 膜标记。例如,3D 培养的细胞显示 56% 的 CD105 表达,对比 2D 培养的细胞为 87%。2D 和 3D 二者胎盘培养物的 ASC 都不表达任何造血膜标记(图 3b)。

[0202] 3D-ASC 显示独特的可溶性因子谱 - 造血龛包括产生丰富细胞因子、趋化因子和生

长因子的支持细胞。为了进一步确定 2D 和 3D 培养的 ASC 之间的差别,通过 ELISA 得到 2D 和 3D ASC 培养物条件培养基中四种主要的造血分泌蛋白谱。图 4a-c 显示生长在 3D 条件的细胞产生含更高水平的 Flt-3 配体 (图 4a)、IL-6(图 4b) 和 SCF(图 4c) 的条件培养基,而在 2D 培养物的条件培养基中检测到较低水平的 IL-6 和接近零水平的 Flt-3 配体和 SCF。在两种培养物中促血小板生成素 (TPO) 产量都很低并不相上下。

[0203] 3D-ASC 在质谱分析中显示独特的蛋白谱 - 为了进一步确定 2D 和 3D 培养的 ASC 之间的差异,用质谱分析这些细胞的蛋白谱。图 4d 表示 2D 和 3D 培养的 ASC 展现出明显不同的蛋白质表达谱。如下表 1 所示,3D 培养的细胞表现出更高的 H2AF 和 ALDH X 表达水平 (分别高出超过 9 和 12 倍) 和更高的 EEEF2、RCN2 和 CNN1 蛋白水平 (分别为大约 3、2.5 和 2 倍)。另外,3D 培养的细胞展现大约一半的蛋白 Hnrph1 和 CD44 抗原同种型 2 前体表达水平和大约三分之一的 Papss2 和 rpL7a 表达水平。

[0204] 表 1

[0205]

蛋白质	蛋白水平(相对于 iTRAQ 报告基团)			
	3D 培养的 ASC		2D 培养的 ASC	
	Av	SD	Av	SD
Hnrph1	1.434493	0.260914	0.684687	0.197928
H2AF	0.203687	0.288058	1.999877	0.965915
EEEF2	0.253409	0.130064	0.799276	0.243066
RCN2	0.54	0.25	1.34	0.26
CD44 抗原同种型 2 前体	1.68	0.19	0.73	0.17
CNN1	0.77	0.15	1.55	0.17
Papss2	1.48352	0.314467	0.45627	0.137353
rpL7a	1.22	0.24	0.43	0.05
ALDH X	0.15847	0.22411	1.986711	0.212851

[0206] 3D-ASC 具有分化为成骨细胞的能力 - 为了进一步表示 3D-ASC 的特征,在成骨细胞分化培养基中将细胞培养 3 周。此后实施钙沉淀。分化的细胞显示产生了钙 (图 5a-b 中的红色所描述),反之对照细胞维持成纤维细胞样表型并表明没有矿化 (图 5c-d)。这些结果表明源自胎盘的 3D-ASC 具有体外分化为成骨细胞的能力。

[0207] 实施例 2

[0208] 源自胎盘的 3D-ASC 改进 HSC 移入的能力评估

[0209] 通过在亚致死辐射或化疗预处理的免疫缺陷 NOD-SCID 小鼠中检测人造血细胞 (hCD45+) 水平,来评估 3D-ASC 支持 HSC 移入。

[0210] 材料和实验方法

[0211] 分离 CD34+ 细胞 – 在分娩期间于无菌条件下取脐带血样品 (BneiZion Medical Center, Haifa, Israel), 用 Lymphoprep (Axis-Shield PoC As, Oslo, Norway) 密度梯度离心分层单核细胞并冷冻保存。洗涤解冻的单核细胞并用抗 CD34 抗体孵育, 用 midi MACS (Miltenyl Biotech, Bergish Gladbach, Germany) 分离。将来自一个以上样品的细胞合并达到所需的量 (50, 000-100, 000 个细胞)。

[0212] 在经辐射小鼠中检测移植的细胞 – 在无菌开放系统笼中饲养 7 周龄雄性和雌性 NOD-SCID 小鼠 (NOD-CB 17-Prkdcscid/J ;Harlan/Weizmann Inst., Rehovot Israel), 给予无菌饮食和高压灭菌的酸性水。亚致死 (350cGy) 辐射小鼠, 此后 (辐射后 48 小时) 通过静脉注射至尾静脉, 移植 50, 000-100, 000 个 hCD34⁺细胞, 加上或不加另外的源自胎盘或脂肪组织的 ASC (0. 5x10⁶-1x10⁶) (每组 3-7 只小鼠)。移植 4-6 周后, 脱臼处死小鼠, 用 FACS 缓冲液 (50ml PBS, 5ml FBS, 0. 5ml 叠氮钠 5%) 从大腿骨和胫骨两处冲洗收集 BM。通过流式细胞术检测小鼠 BM 中的人细胞, 通过使细胞与抗人 CD45-FITC (IQ Products, Groningen, The Netherlands) 孵育, 产生在处理的 NOD-SCID 小鼠中表达人和鼠 CD45 造血细胞标记的细胞百分比。明确的人移入最低阀限指定为 0. 5%。

[0213] 化疗处理的小鼠中移植细胞的检测 – 如上述用于辐射小鼠的一样饲养的 6. 5 周龄雄性 NOD-SCID 小鼠 (NOD. CB17/JhkiHsd-scid ;Harlan, Rehovot Israel) 接受白消安 (25mg/kg- 连续 2 天) 腹膜内注射。第二次注射白消安 2 天后, 单用 CD34+ 细胞或与从胎盘产生的 0. 5x10⁶个 ASC 一起注射小鼠。移植后 3. 5 周, 处死小鼠, 如上文对辐射小鼠所述测定人造血细胞的存在情况。

[0214] 结果

[0215] 3D-ASC 改进辐射小鼠的 HSC 移入 – 在经辐射 NOD-SCID 小鼠中共同移植人 CD34+ 造血细胞和源自胎盘或脂肪组织的 3D-ASC。在共同移植之后 4 周评估移入效率, 并与单用 HSC 移植的小鼠比较。如表 2 和图 6 所示, 与单用 UCB CD34+ 细胞处理的小鼠比较, 3D-ASC 和 UCB CD34+ 细胞共同移植导致移入率高相当多及受者小鼠 BM 中人细胞的水平高相当多。

[0216] 表 2

[0217]

移植的细胞	平均 h-CD45	STDEV
CD34	3. 8	7. 9
CD34+ 来自胎盘的 3D-ASC	5. 1	12. 2
CD34+ 来自脂肪组织的 3D-ASC	8. 7	9. 6

[0218] 3D-ASC 改进化疗小鼠的 HSC 移入 – 将人 CD34+ 造血细胞与源自胎盘的 500, 000-2D-ASC 或 3D-ASC 共同移植到经化疗预处理的 NOD-SCID 小鼠中。

[0219] 在共同移植之后 3. 5 周评估移入效率, 并与单用 HSC 移植的小鼠比较。如表 3 所示, 与单用 UCB CD34+ 细胞相比, ASC 和 UCB CD34+ 细胞共同移植导致受者小鼠 BM 中的移入水平更高。此外, 如表 3 所示, 用在 PluriX 生物反应器系统中生长的源自胎盘的粘附细胞 (3D-ASC) 共同移植的小鼠, 比在常规静态 2D 培养条件 (培养瓶) 中生长的来自同样供者的细胞共同移植的小鼠的平均移入水平更高。

[0220] 表 3

[0221]

移植的细胞	平均 h-CD45	STDEV
-------	-----------	-------

CD34	0.9	1.1
CD34+ 来自胎盘的常规 2D 培养物	3.5	0.2
CD34+ 来自胎盘的 3D-ASC	6.0	7.9

[0222] 图 7a-b 中所示的 FACS 分析结果证明 ASC 与 hHSC (图 7b) 共同移植的优势, 以及在 HSC 移植后 ASC 改进造血系统恢复的能力。

[0223] 这些结果综合起来表明, ASC 可在 HSC 移植 (自体或同种异体) 之后作为支持细胞改进造血恢复。3D-ASC 在 HSC 移植之后提高造血干细胞和 / 或祖细胞移入的能力可来自 3D-ASC 分泌可改进移植细胞的归巢、自我更新和增殖能力的支持 HSC 的细胞因子的能力, 或来自那些细胞重建可移植的 HSC 归巢和增殖所需的受损造血微环境的能力。

[0224] 实施例 3

[0225] 通过 2D 和 3D 培养的 ASC 抑制淋巴细胞应答

[0226] 在 MLR 分析中发现粘附基质细胞尤其是 3D-ASC 抑制人类脐带血单核细胞的免疫反应。

[0227] 材料和实验方法

[0228] 混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定 - 通过 MLR 测定法测定源自 2D 和 3D 培养方法的从胎盘产生的 ASC 的免疫抑制和免疫赦免 (immunoprivilege) 特性, MLR 测定测量位于 HLA 基因座的组织相容性, 根据在答应细胞 (增生) 和刺激细胞 (不能增生) 的混合培养中不相容淋巴细胞的增殖率来实现。使用人脐带血 (CB) 单核细胞 (2×10^5) 作为应答细胞, 其通过与等量 (10^5) 辐射 (3000Rad) 过的源自人外周血单核细胞 (PBMC)、或者与 2D 或 3D 培养的由胎盘产生的粘附细胞或粘附细胞和 PBMC 组合的共同培养来刺激。每一测定重复三次。细胞在 96-孔板中的 RPMI1640 培养基 (含 20% FBS 在增湿的 5% CO_2 环境于 37°C) 中共同培养 4 天。在培养的最后 18 小时用 $1 \mu\text{Ci}$ ^3H - 胸苷脉冲该板。然后经玻璃纤维滤器收集细胞, 用闪烁计数器定量胸苷吸收。

[0229] 结果

[0230] 图 8 显示 CB 细胞的免疫应答, 这根据当用 PBMC 刺激时这些细胞的增殖增加来表现, 在不受任何理论的束缚下这很可能与响应 HLA 的不相容性的 T 细胞增殖有关。然而, 当与本发明粘附细胞孵育时, 这些细胞显示出相当低的免疫应答水平。此外, 当与这些粘附细胞共同孵育时, CB 对 PBMC 的免疫应答基本降低了。因此, 以与 MSC 相似的方式, 发现 ASC 具有潜在的降低供者细胞的 T 细胞增殖 (典型的是 GvHD) 的能力。尽管 2D 和 3D 两种培养物都降低了淋巴细胞免疫应答, 但与上文所述的 3D-ASC 的其它优点一致, 3D ASC 的免疫抑制更强。

[0231] 应该了解, 为清楚起见, 在各别实施方案的上下文中所阐述的本发明某些特征也可在单个实施方案中组合提供。反之, 为简短起见, 在单个实施方案上下文中所阐述的本发明的各种特征, 也可分开或以任何合适的亚组合提供。

[0232] 尽管本发明联合其具体实施方案已得到阐述, 但显然很多备选、修改和变更对于本领域技术人员来说将显而易见。因此, 意欲包括落在附加权利要求的精神和广泛范围内的所有这样的备选、修改和变化。本说明书所提到的所有出版物、专利和专利申请和 GenBank 登记号以其整体在此引作本说明书的参考, 其程度如同明确并单独地指出将每一单独出版物、专利或专利申请或登记号在此引作参考一样。另外, 本申请中的任何参考的附加、引用或认同不应该被理解为承认这样的参考可用作本发明的现有技术。

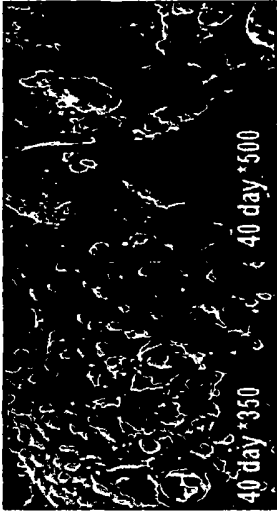


图 1e 图 1f

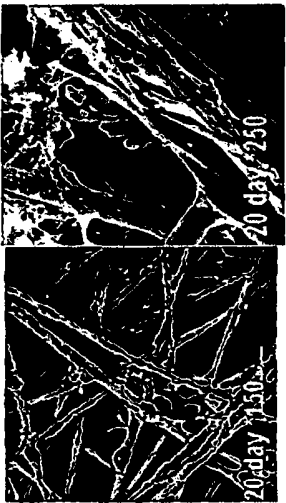


图 1c 图 1d



图 1a 图 1b

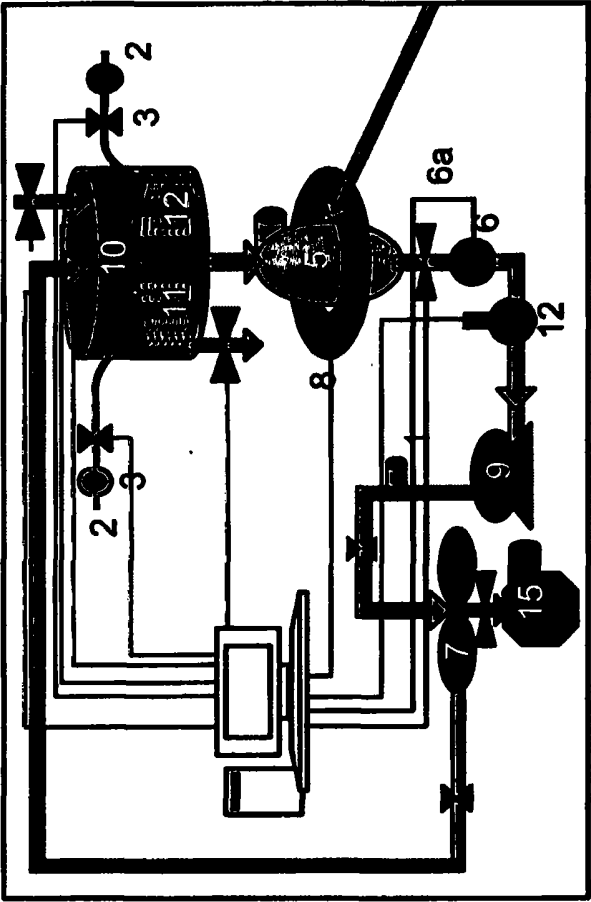


图 1g

图 2

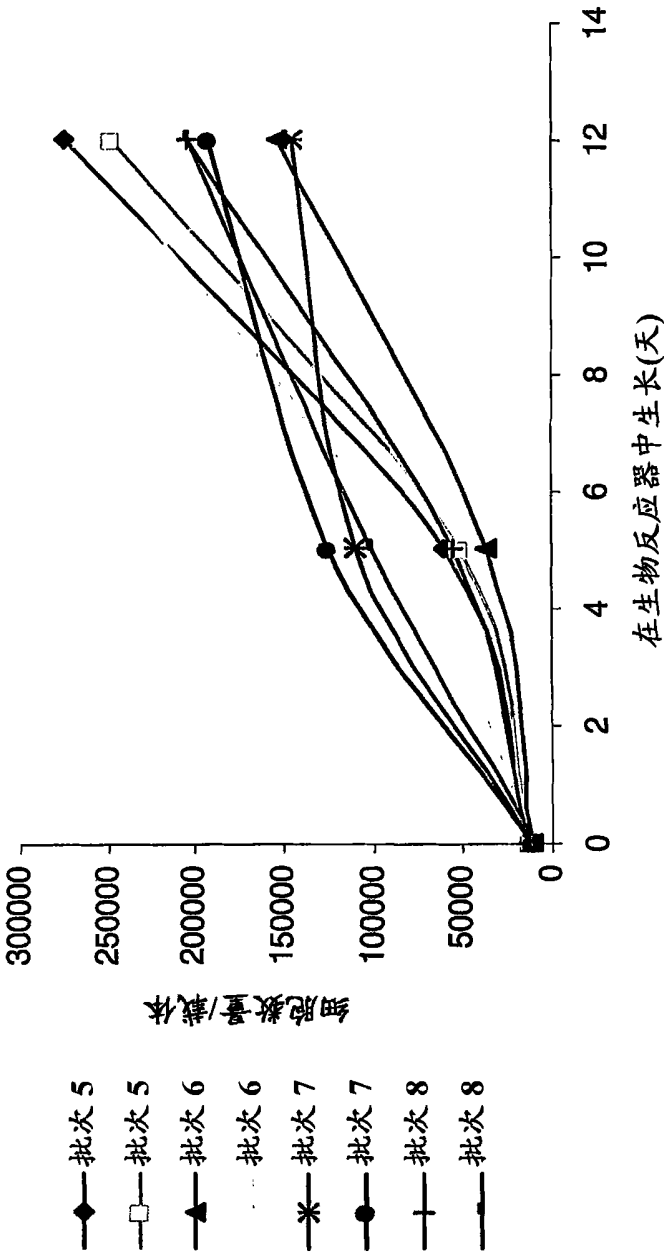


图 3a-b

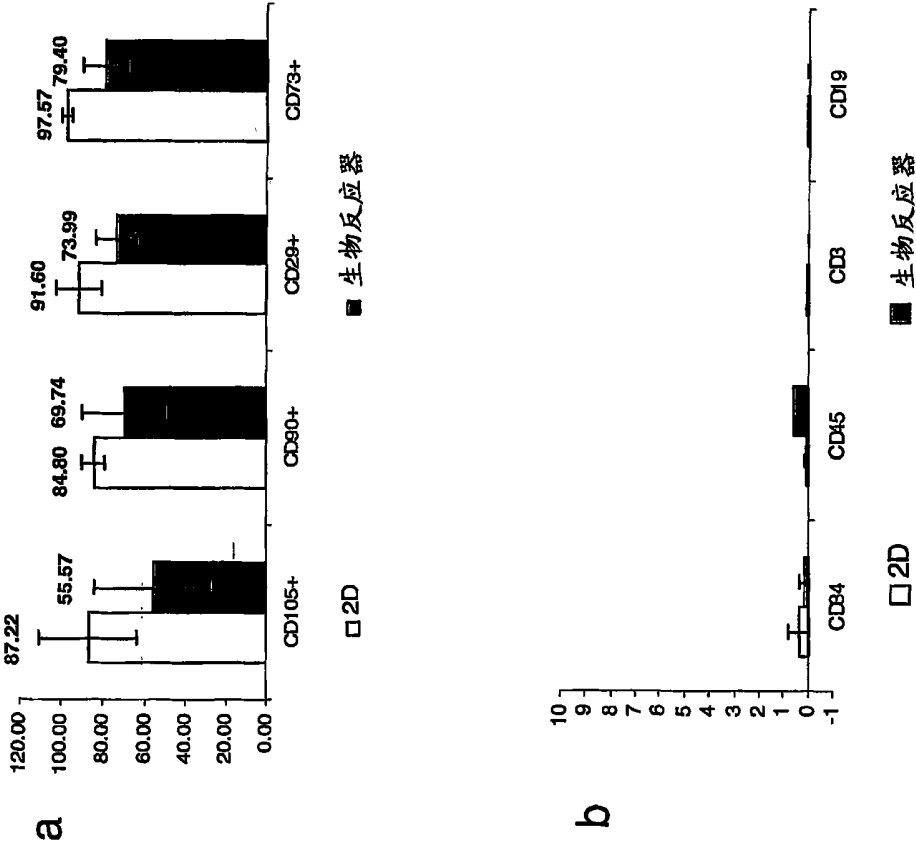


图 4a

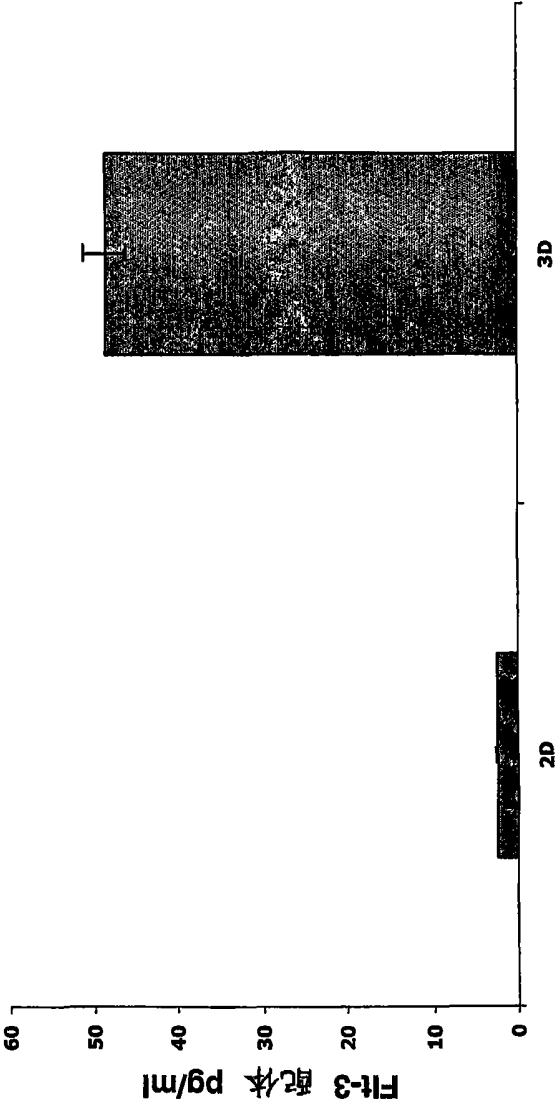


图 4b

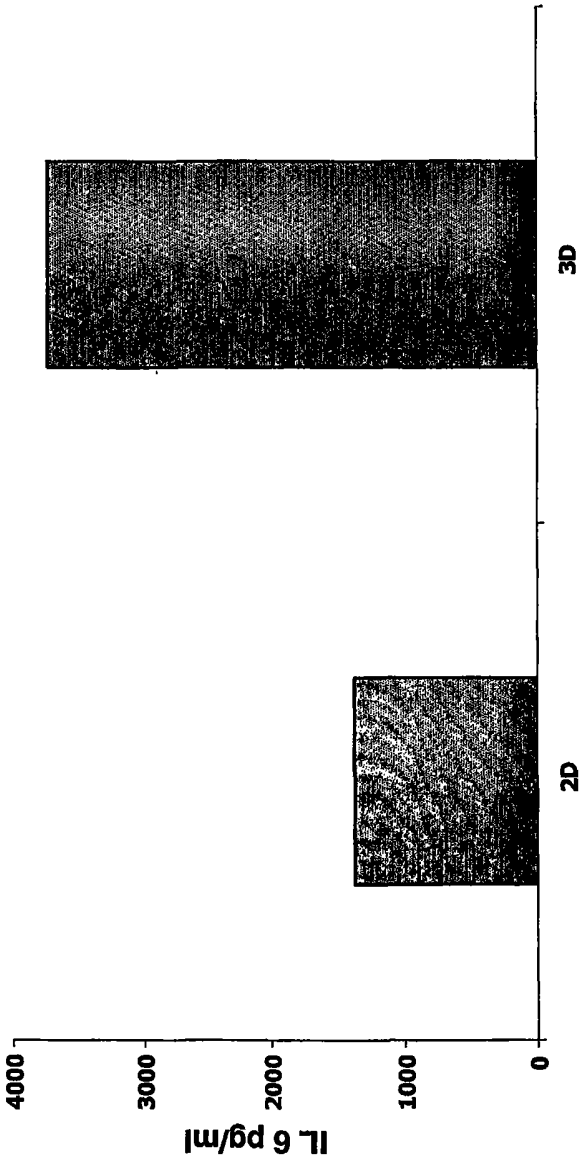


图 4c

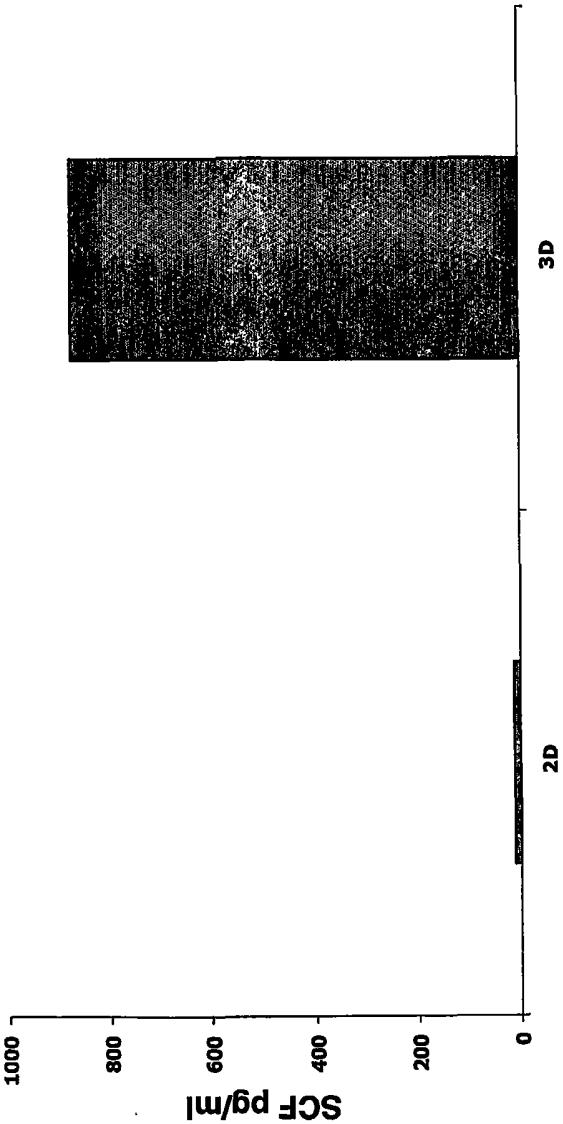


图 4d

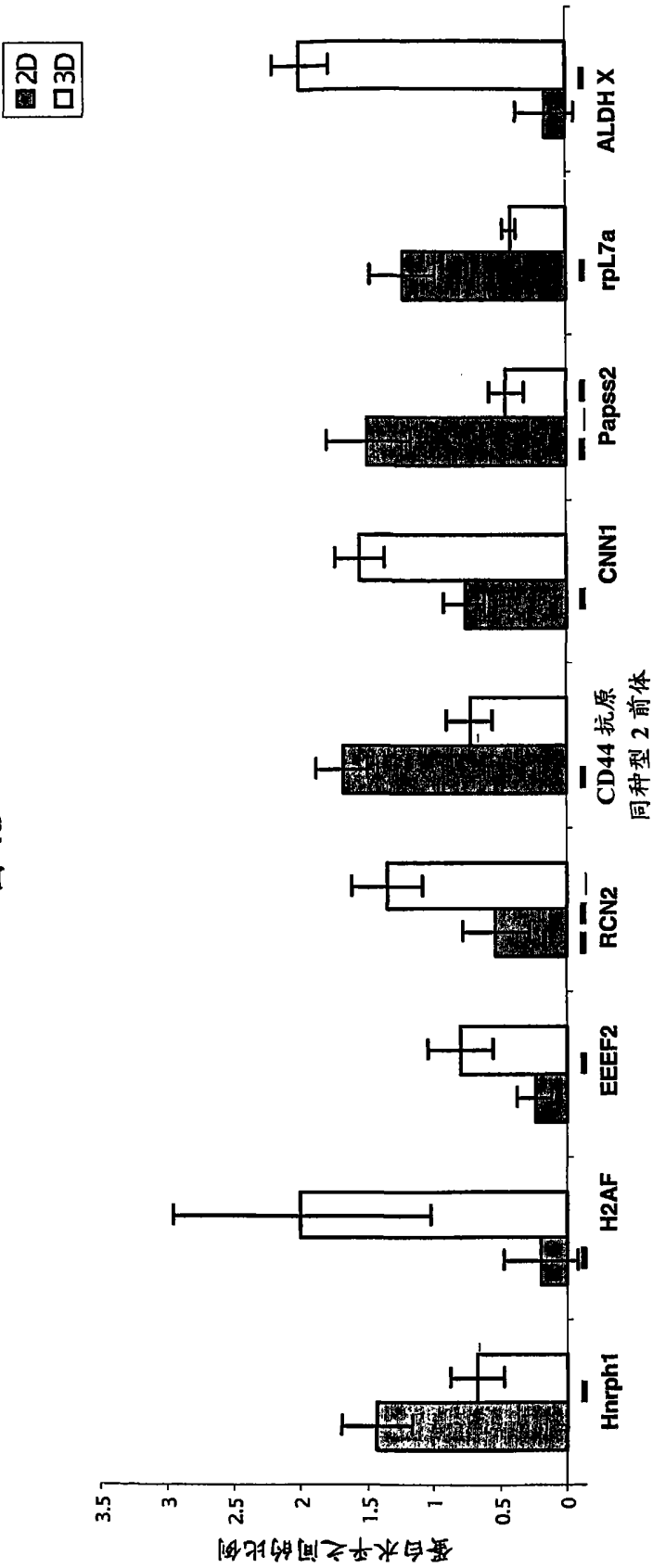


图 5a-d

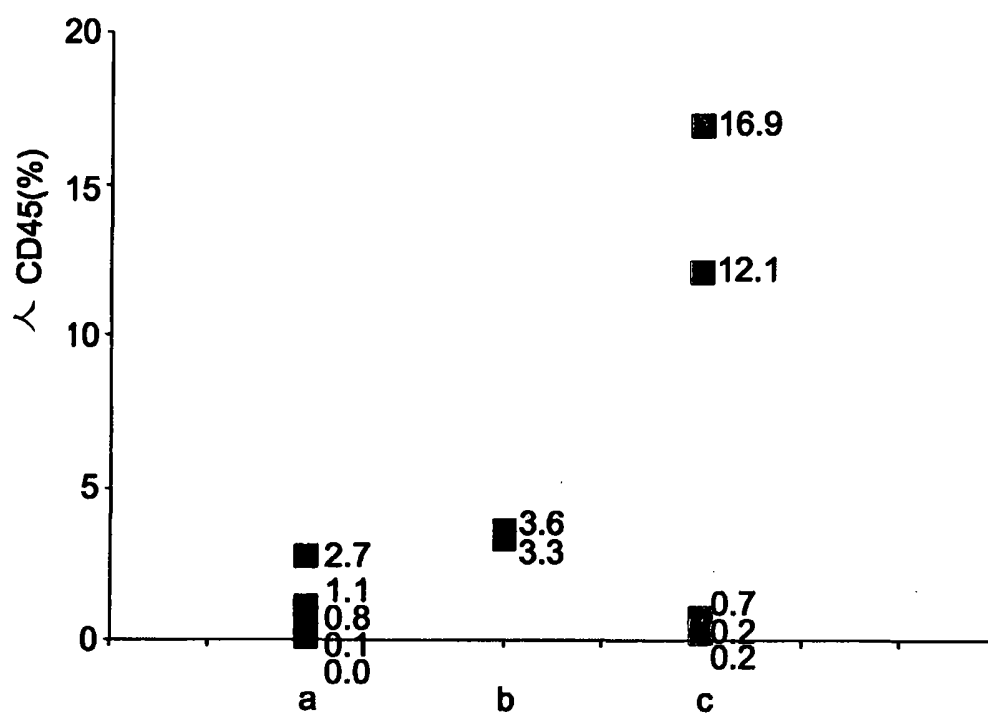
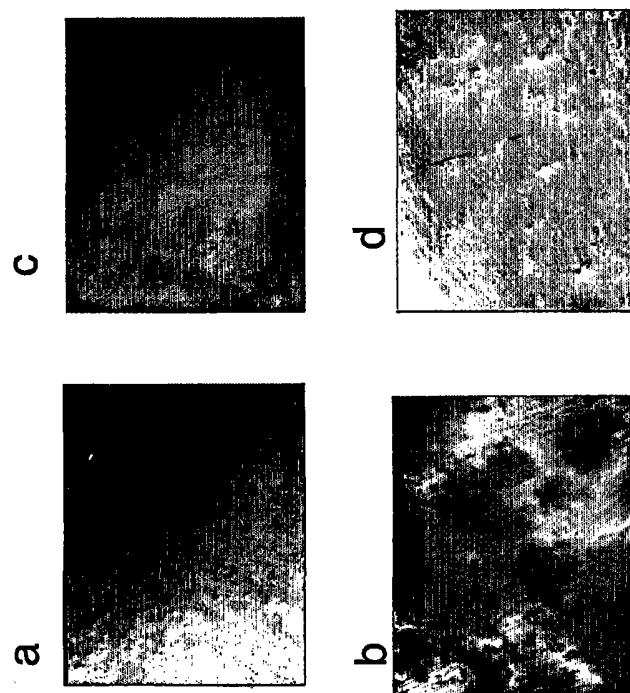
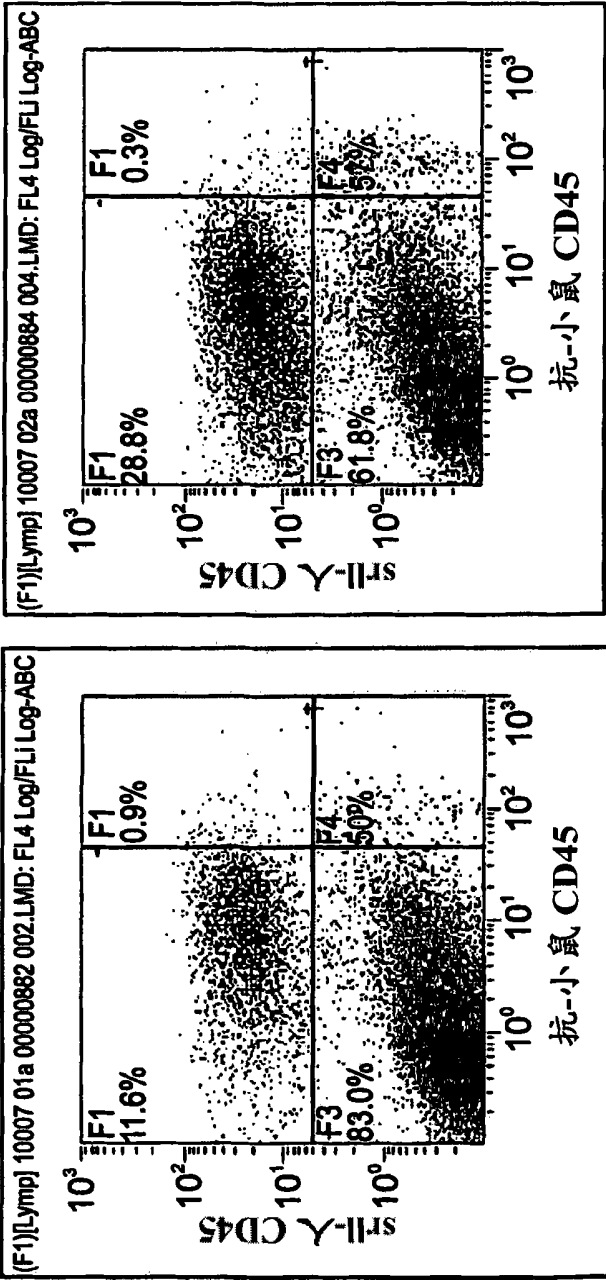


图 6



(F1)[Lymph] 10007 01a 00000882 002.LMD: Legend				
颜色	名称	数量	细胞/μL	
	抗-人 CD45+	4961	错误	
	抗-小鼠 CD45+	2229	错误	
	lymp	41342	错误	
		100.00	83.08	
		11.94	9.92	

图 7a

人 CD45+ (%)
小鼠 CD45+ (%)

(F1)[Lymph] 10007 02a 00000884 004.LMD: Legend				
颜色	名称	数量	细胞/μL	
	抗-人 CD45+	12407	错误	
	抗-小鼠 CD45+	3997	错误	
	lymp	42441	错误	
		100.00	84.88	
		29.23	4.81	

图 7b

图 8

